

し尿汚泥土壌改良資材から見出す植物寄生性線虫害抑制に關与する複合微生物群の探索

長岡技大・院 学生会員 ○蔵下 はづき、正会員 幡本 将史、正会員 山口 隆司
 都城高専 非会員 穂田 南海、非会員 野口 太郎
 農研機構 正会員 島 武男、非会員 村田 岳、非会員 田淵 宏朗
 群馬高専 正会員 青井 透
 産総研 非会員 成廣 隆、正会員 黒田 恭平

1. 背景

し尿処理施設より発生するし尿処理残渣は年間 90 万 t 程度であり、そのうち約 72%は焼却処分、緑農地還元等の再資源化は 15%程度である¹⁾。し尿汚泥の再資源化を促すため、我々はし尿処理汚泥等の未利用資源を用いた *Bacillales* 目細菌および自活性線虫優占化土壌改良資材（以下、土壌改良資材）を開発した。土壌改良資材をヤマトイモやコンニャク等の植物寄生性線虫害発生圃場に適用したところ 10 a 当り 3 t の施用で防除可能なことを確認した²⁾。一方で、資材中の複合微生物群が植物寄生性線虫害防除に関わる要因は未だ不明である。本研究では土壌改良資材の植物寄生性線虫害防除に関わる要因を明らかにすることを目的とし、土壌改良資材を用いた 2 年間のカンショ栽培試験を実施し、土壌改良資材施用により土壌中で優占する微生物・自活性線虫と植物寄生性線虫との相関解析を行った。

2. 実験方法

本研究では4試験区(1:対象区, 2:土壌改良資材 1 t/10 a 区, 3:土壌改良資材 3 t/10 a 区, 4:殺線虫剤(ネマトリンエース) 20 kg/10 a 施用区)を対象に2年間の栽培試験を行った(表 1)。各試験区の土壌試料は、一年目:土壌改良資材施用前(0日目), 植え付け日(34日目), 中間(109日目), 収穫日(187日目)から, 二年目:土壌改良資材施用前(0日目), 植え付け日(30日目), 中間(121日目), 収穫日(176日目)からそれぞれ採取した。中間および収穫日にはカンショ 4-5

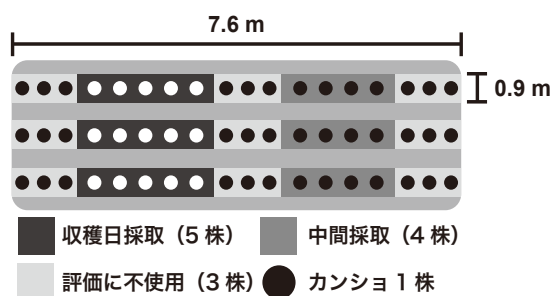


図1 カンショ栽培試験の一試験区の概要

株を採取し、塊根重量、カンショの被害度を調査した (図 1)。カンショの被害度は 0-4 の 5 段階 (0: 根茎全体に根こぶを全く認めない, 1: 根こぶをわずかに認める, 3: 根こぶの数が多い, 4: 根こぶが特に多く, かつ大きい) で根こぶ程度として評価した。採取した土壌試料は DNA 抽出を行い, MiSeq (Illumina) による 16S および 18S rRNA 遺伝子解析に供試した。得られたシークエンスデータは QIIME2 を用いて解析を行い, 相同性 97%以上を同一の OTU と設定し, その系統解析には SILVA 138 を用いた。また, 各試験区のネコブセンチュウ密度 (*Meloidogyne incognita*) および自活性線虫密度は土壌 20 g からベルマン法を用いて回収し, 植物寄生性線虫および自活性線虫の頭数を計測することで計算した。また, 18S rRNA 遺伝子に基づき線形動物門のみのリードを抽出し, 各試験区より計測した線

表 1 各試験区の栽培条件および収穫日における収量、根こぶ程度およびネコブセンチュウ密度

試験区	投入資材	資材施用量 (kg/10 a)	2019 (収穫日)			2020 (収穫日)		
			カンショ収量平均* (kg/畝)	根こぶ程度** (-)	ネコブセンチュウ密度† (頭/20 g-soil)	カンショ収量平均* (kg/畝)	根こぶ程度** (-)	ネコブセンチュウ密度† (頭/20 g-soil)
1	無	—	8.4 ^a	2.0 ^a	236.0 ^a	4.2 ^a	2.6 ^a	299.2 ^a
2	土壌改良資材	1000	7.4 ^a	2.1 ^a	419.0 ^a	5.3 ^a	2.4 ^a	251.8 ^a
3		3000	5.6 ^a	2.0 ^a	213.8 ^a	3.7 ^a	2.1 ^a	154.8 ^a
4	殺線虫剤	20	6.3 ^a	1.5 ^a	64.7 ^a	3.8 ^a	1.4 ^b	114.6 ^a

*：2019年度は3畝から15株(5株/畝)、2020年度は3畝から12株(4株/畝)を評価に使用

**：2019年度は15株の平均値、2020年度は12株の平均値

ab: Tukey HSD検定. 異なるアルファベットは試験区間の有意性を示す ($p < 0.05$).

†: 各試験区の3つの畝より計測された土壌20g当りの線虫頭数の平均値

キーワード し尿汚泥, 土壌改良資材, *Meloidogyne incognita*, Spearman の順位相関係数, 自活性線虫

連絡先 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 国立大学法人 長岡技術科学大学 TEL:0258-47-1611 (内線 6646)

虫密度から各系統の線虫密度を算出した。16S および 18S rRNA 遺伝子解析結果を基にして、ネコブセンチュウ密度との Spearman の順位相関分析を行った。

3. 実験結果および考察

カンショ栽培圃場を対象に土壌改良資材施用栽培試験を行った結果、各試験区におけるカンショ収量は2019年で5.6–8.4 kg/畝、2020年で3.7–5.3 kg/畝の範囲であり、収量に統計学的有意差はみられなかった(表1)。また、各試験区の根こぶ程度は2019年で1.5–2.1、2020年で1.4–2.6の範囲を示し、2020年の試験区1、2、3と試験区4で有意に異なる結果となった。ネコブセンチュウと根こぶ程度の相関性を評価するため、各試験区のネコブセンチュウ密度と根こぶ程度の単回帰分析を行った結果、二年間の栽培試験においてR²が0.52を示す一方で、二年目のみの単回帰分析ではR²が0.90となった(図2)。また栽培一年目の試験区2において、収穫日の根こぶ程度が2.1であるのに対してネコブセンチュウ密度が419頭/20 g-soilとなり、この値を除外したところR²は0.84を示した。この結果より試験区2の値は外れ値である可能性が示され、根こぶ程度とネコブセンチュウ密度は直線性を有すると考えられた。16S および 18S rRNA 遺伝子に基づいて栽培期間全体の土壌中に優占する系統とネコブセンチュウ密度とのSpearmanの相関係数を評価した結果、Acidobacteria等13門に属する細菌の系統とラセンセンチュウは有意な相関関係(p<0.05)が確認された。ネコブセンチュウ密度と比較的強い負の相関を示す系統はActinobacteriota門に属するArthrobacter属等、比較的強い正の相関を示す系統はAcidobacteriota門に属するAcidobacteriales目の未培養細菌等であることが確認された(表2)。また、ネコブセンチュウと比較的強い負の相関(r=-0.73)を示したArthrobacter属は、植物寄生性線虫の系統であるMeloidogyne属に対して毒性を示す酪酸メチルを生産することで生育を抑制可能なことが報告されている³⁾。一方で、M. incognitaが優占して検出された1年目収穫日、2年目中間・収穫日における優占する系統とネコブセンチュウ密度とのSpearmanの相関係数を評価した結果、ChitinobacteraceaeやGemmatimonadaceae等の系統がネコブセンチュウ密度と負の相関関係を、複数の細菌と正の相関関係を示した(表3)。これら

の系統は栽培期間全体でもネコブセンチュウ密度と有意な相関があった(但し、A_67は正負が逆転していた)。また、線形動物門に着目すると、Dorylaimida目に属する系統がネコブ密度とネコブセンチュウ密度と負の相関を示し、その他のDorylaimida目と正の相関関係を示した。この結果より、土壌中では単一の微生物が有する制線虫効果だけでなく、ネコブセンチュウに負の相関を示す微生物の複合的な機能が線虫害抑制に寄与する可能性が考えられた。

参考文献

1) 環境省：一般廃棄物の排出及び処理状況等(平成30年度)について、2) 林恵里香ら、第45回環境工学研究フォーラム講演集、pp.106-108、2008.、3) Castillo et al., Microb Ecol., Vol. 74., pp888–900., 2017.

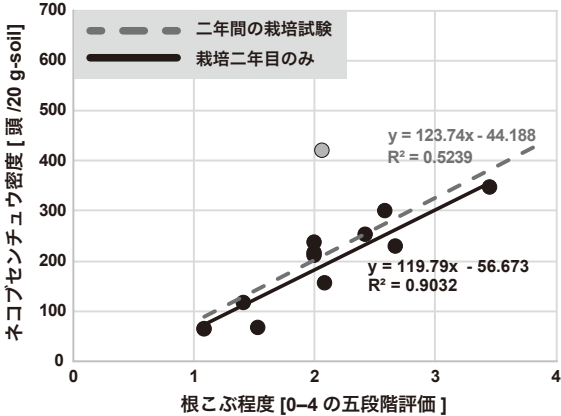


図2 ネコブセンチュウ密度と根こぶ程度の単回帰分析。灰色のプロットは1年目収穫日(187日目)の試験区3を示す。

表2 栽培期間全体においてネコブセンチュウ密度と正負の相関を示す上位2系統(p<0.05)

OTU	最近縁な系統(16S rRNA遺伝子)	相関係数	存在割合(%)
A_38	Arthrobacter sp. 11/16c	-0.73	0–1.4
A_9	uncultured Anaerolineaceae	-0.63	0.11–3.1
A_3	Mizugakiibacter sediminis	0.70	0.1–11
A_95	Acidobacteriales	0.73	0–0.94

表3 1年目収穫日、2年目中間・収穫日においてネコブセンチュウ密度と正負の相関を示す系統とその系統に相関関係を有する系統(p<0.05)

OTU	ネコブセンチュウ密度・根こぶ程度と相関を示す系統	OTU	有意(p<0.05)に相関のある系統	相関係数
A_17 Chthoniobacteraceae		A_13 Nitrososphaeraceae	根こぶ程度	0.87
		A_14 Pyrinomonadaceae	根こぶ程度	0.83
		A_67 Oxalobacteraceae	根こぶ程度	-0.77
		A_65 Nitrososphaeraceae	根こぶ程度	-0.85
		A_100 Chloroflexi	根こぶ程度	0.85
		A_26 Myxococcota	根こぶ程度	0.82
		A_27 Ellin6067	根こぶ程度	0.81
A_25 Gemmatimonadaceae		A_74 Bryobacter	根こぶ程度	0.80
		A_24 Acidobacteriales	根こぶ程度	0.78
		A_91 Rhizobiaceae	根こぶ程度	-0.87
		A_95 Acidobacteriales	根こぶ程度	-0.79
		A_69 Acidobacteriales	根こぶ程度	0.88
		A_27 Ellin6067	根こぶ程度	-0.85
		A_34 Xanthobacteraceae	根こぶ程度	-0.81
A_67 Oxalobacteraceae		A_98 Latescibacterota	根こぶ程度	0.80
		A_85 Anaeromyxobacter	根こぶ程度	0.77
		A_33 Anaerolineae	根こぶ程度	0.78
		A_52 Chloroflexi	根こぶ程度	0.76
A_33 Anaerolineae		ネコブセンチュウ密度	根こぶ程度	-0.86
		ネコブセンチュウ密度	根こぶ程度	-0.81
B_36 Dorylaimida		B_2 Dorylaimida	根こぶ程度	0.97
		ネコブセンチュウ密度	根こぶ程度	-0.85
B_51 Helicotylenchus dihystra		ネコブセンチュウ密度	根こぶ程度	-0.89
		B_35 Rhabditida	根こぶ程度	-0.89
		B_41 Rhabdolaimus aquaticus	根こぶ程度	-0.79
		ネコブセンチュウ密度	根こぶ程度	0.80