

## 土壌微生物の活性化をめざした炭化物添加による植物成長効果

千葉工業大学 学生会員 ○ 齊藤 香織  
 千葉工業大学 非会員 松枝 大佑  
 千葉工業大学 正会員 矢沢 勇樹

### 1. 目的

土壌中の炭素、窒素などの物質循環に対して土壌微生物の作用は極めて重要な役割をもち、その場合に外系からの酸素に左右されやすい。一般的に、荒漠化しやすい土壌構造は極端に粗密な状態であるのに対して、土壌団粒構造やそれを模造したバイオマス炭化物の構造は土壌微生物の生息環境を最適に調節させると考えられている。一方、窒素分子はその分子構造ゆえに安定であり、地球上の生物は窒素を必須元素であるにもかかわらず、その大部分は直接的に利用することが不可能である。Haber-Bosch によるアンモニア合成は我々人類の食糧増産に貢献したが、地球温暖化、水質汚染、化石資源枯渇化を余儀なくした。

本研究では、荒漠地の土壌肥沃化を期待し、*Klebsiella* 菌株の窒素活性向上を好気環境下に創製するために炭化物を添加し、生物的窒素固定活性の促進を目指した。

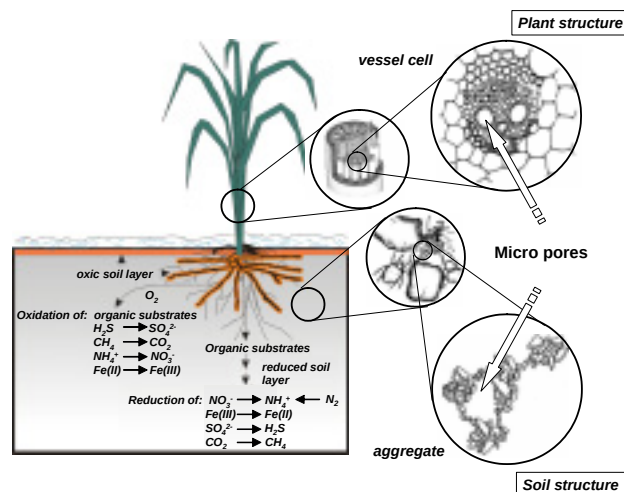


図1 土壌環境による物質変換と団粒と植物組織の構造比較

### 2. 実験方法

#### 2.1 気相中酸素濃度および炭化物添加によるニトロゲナーゼ活性評価

30mL 容バイアル瓶に 75  $\mu\text{m}$  以下に篩い分けした竹炭（中国桂林新竹大自然生物材料社製，炭素含有率 92%，比表面積 242  $\text{m}^2/\text{g}$ ）を 100 mg 添加した条件と無添加条件を設け，それぞれに N-free 液体培地 3 mL を入れてからオートクレーブ（120  $^{\circ}\text{C}$ ，20 min）により滅菌した。滅菌後に窒素固定菌（*Klebsiella pneumoniae* H12，*K.p.H12*）100  $\mu\text{L}$ （ $1.36 \times 10^8$  cells/mL 相当）を接種し，ブチルゴム栓により密閉した。

次に，バイアル瓶気相中の酸素初期濃度を体積分率で 4, 8, 19, 24% と設定し，バランスガスとして不活性ガス（アルゴン）を用いて全圧調整した。ニトロゲナーゼ活性評価として汎用試験法であるアセチレン還元法を採用し，バイアル瓶中のアセチレン濃度を 10% に固定した。各条件設定後，30  $^{\circ}\text{C}$  の恒温槽内で静置培養し，所定時間毎にガス成分（ $\text{O}_2$ ， $\text{C}_2\text{H}_4$ ）をガスクロマトグラフィー（TCD，FID）により計測した。 $\text{C}_2\text{H}_4$  生成量よりニトロゲナーゼ活性を評価した。

#### 2.2 ガラスビーズ粒径および炭化物添加によるニトロゲナーゼ活性評価

酸素初期濃度を 19% に固定し，30mL 容バイアル瓶に粒径 0.5, 1.0, 2.0 mm のガラスビーズを N-free 液体培地 3 mL 体積相当になるようにそれぞれ添加し，さらに N-free 液体培地 3 mL（空隙総体積に対し約 2.1 ~

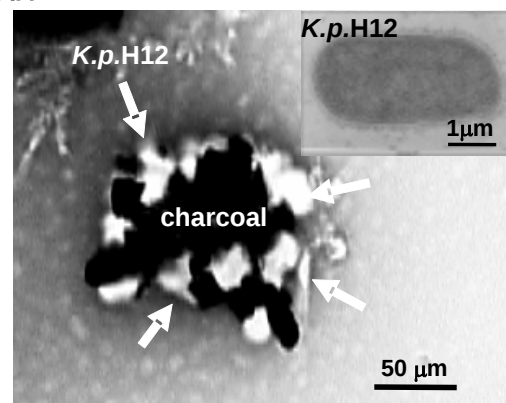


図2 炭化物に集積している窒素固定細菌 *K.p.H12*

3.9 倍相当の過飽和状態) 入れてから滅菌した。同様に, 炭化物 100 mg を添加・無添加の条件を設け, それ以降の培養・分析条件は 2.1 と全て同じである。(添加した菌液中の菌数は  $3.63 \times 10^8$  cells/mL に相当。)

### 3. 結果および考察

#### 3.1 初期酸素濃度に対するニトロゲナーゼ活性と呼吸活性への炭化物添加効果

初期酸素濃度に対する *K.p.H12* 菌株のニトロゲナーゼ活性 ( $C_2H_2$  還元による  $C_2H_4$  生成速度) と呼吸活性 ( $O_2$  消費速度) を図 3 に示す。炭化物無添加の対照条件において, 初期酸素濃度 4% のみ高いニトロゲナーゼ活性を示し, それ以上では不活性であった。一方, 呼吸活性は初期酸素濃度が増加するに従い高まった。このことから, 窒素固定菌は周辺環境の酸素濃度を感知し, 高酸素濃度での呼吸代謝 (エネルギー獲得) から低酸素濃度での窒素固定代謝 (エネルギー消費) に移行することがわかる。一方, 炭化物添加条件では初期の酸素濃度が高いにも関わらずニトロゲナーゼ活性の発現が確認された。*K.p.H12* 菌株は通性嫌気性窒素固定細菌である。土壤中に窒素源が存在する場合, 好気環境においても生息可能であるが, 無窒素条件下では嫌気環境が整わなければ大気中窒素分子を固定できず, 存続できない。既往研究において (Yazawa et al. (2006), *J. Arid Land Study*, 15, 463-467), 菌凝集体の径をアルギン酸カルシウム塩で任意に調整し, その代謝の影響を評価したのが図 4 である。結果より, 凝集粒子表面から中心への距離が増加するにしたがい窒素固定活性が高まり, 逆に呼吸活性は低くなること示唆された。つまり, 図 2 の写真と合わせ考察すると, 炭化物細孔内に *K.p.H12* 菌株が集積することにより, 表面では外系からの酸素濃度をストレスと認識して呼吸代謝による酸素が消費され, 炭化物細孔中心部において嫌気環境が形成し, それにより窒素固定代謝に機能変換されたと推測される。

#### 3.2 模擬土壌への炭化物添加によるニトロゲナーゼ活性効果

模擬土壌として粒子径の異なるガラスビーズを用い, そこに炭化物を添加した場合の気相酸素濃度の変化とニトロゲナーゼ活性との関係を図 5 に示す。結果より, ガラスビーズを入れることでニトロゲナーゼ活性・呼吸活性ともに向上し, ビーズ径 1.0, 2.0 mm については 3.1 の初期酸素濃度 4% 相当以上にニトロゲナーゼ活性が高まった。模擬土壌に炭化物 2.5% 添加した場合は, むしろ活性が低下することがわかった。本実験では培養液が間隙に対し過飽和状態であったが, 土壌粒子間に生じる間隙に窒素固定菌が支持・集積することで, 土壌深さ方向に呼吸層と窒素固定層が生じることが証明された。

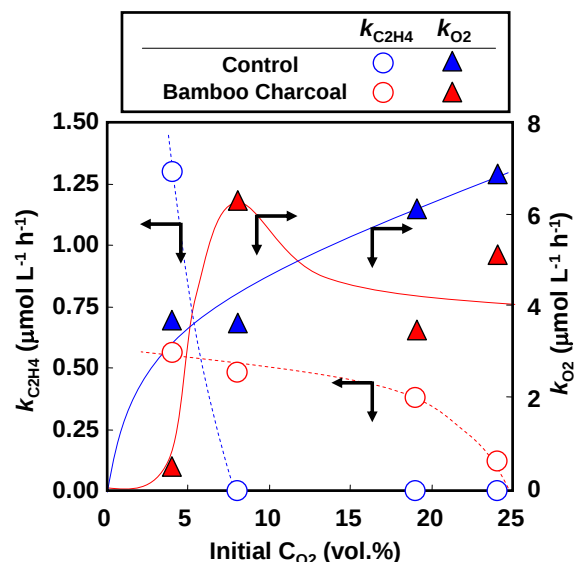


図 3 初期酸素濃度に対する *K.p.H12* のニトロゲナーゼ活性と呼吸活性への影響

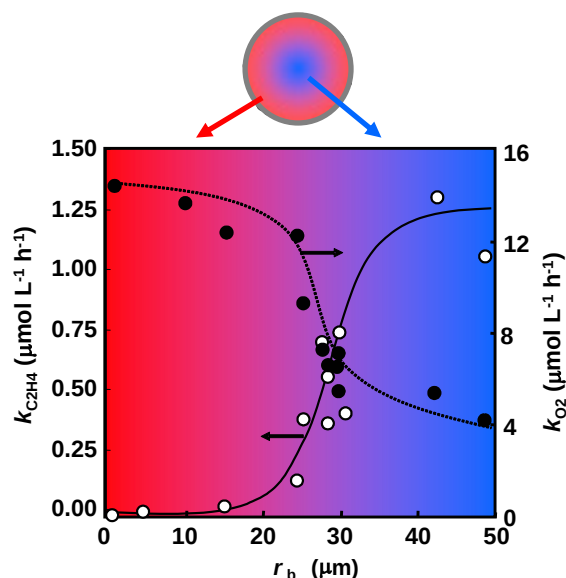


図 4 *K.p.H12* 菌凝集粒子の表面距離とニトロゲナーゼ活性/呼吸活性との関係

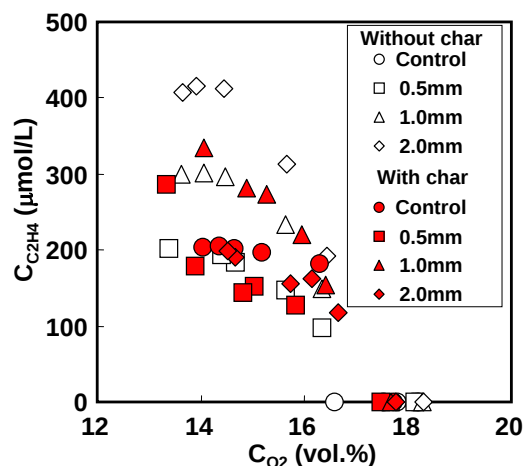


図 5 ガラスビーズ径の異なる模擬土壌への炭化物添加効果