

(37) 担子菌 *Coprinopsis* sp. のアンモニア利用特性の評価と窒素負荷軽減のための微生物資材への応用の可能性

立石 貴浩^{1*}・滝沢 崇幸¹・颯田 尚哉¹・前田 武己¹・登尾 浩助^{1,2}

¹岩手大学農学部 (〒020-8550 岩手県盛岡市上田3-18-8)

²現明治大学農学部 (〒214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田1-1-1)

* E-mail: ttateisi@iwate-u.ac.jp

本研究では、家畜ふん尿の利用や処理の際に生じる環境への窒素負荷を軽減する様な微生物資材を開発することを目的として、アンモニア菌の窒素利用特性を評価し、その特性の資材化への応用の可能性を検討した。供試菌として、牛ふん尿放置現場で採取し純粋分離した担子菌 *Coprinopsis* sp. の2株を使用した。液体培地による本菌の培養では、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度の増加に伴い栄養菌糸の成長は抑制される傾向にあったが、添加された $\text{NH}_4^+\text{-N}$ は優先的に消費されていた。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ を過剰に添加した園芸用土に本菌を接種した培養試験では、本菌の菌糸長の増加に伴い、土壌中の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 量が減少していた。このことは、本菌による $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の吸収と不動化の能力が、微生物資材の効能として利用可能であることを示唆している。

Key Words : cattle slurry, nitrogen immobilization, ammonia fungi, *Coprinopsis*

1. はじめに

家畜ふん尿の処理法のひとつとして、農地への肥料成分としての還元があげられる。家畜ふん尿を圃場へ施用した国内での試験によると、施用された土壌中での家畜ふん尿に含まれる有機態窒素化合物の無機化は速やかに進行し、その後の硝化や脱窒の過程で、土壌より窒素成分が損なわれているということである^{1,2}。硝化過程で生成した硝酸は、地下水へと流出し、地下水汚染を引き起こす可能性がある。さらに、土壌中の脱窒過程では、不完全な還元によって一酸化二窒素が発生することも考えられる。この気体は温室効果ガスの1つであるため、地球温暖化への影響も懸念される。

このような家畜ふん尿の処理に起因する環境問題の解決に向けて、微生物の有用機能の利用とその資材化が検討されている³。しかし、今まで報告されている微生物資材の中で、家畜ふん尿中の過剰な窒素の流出による環境負荷の防止に焦点を当てたものはほとんど無い。

ところで、高等菌類の中でアンモニア菌と呼ばれるものがある。アンモニア菌は「アンモニア水又は他の窒素化合物で、それ自体または分解によって塩基として作

用するもの、あるいはアルカリを、非耕地土壌に突然与えた時、その部分に特異的又は無処理部より豊富に遷移的発生をする真菌群」と定義されている⁴。これらアンモニア菌は、アンモニア態窒素が存在することで、本菌の胞子の発芽や栄養菌糸の成長が促進されることが報告されている^{5,6}。このことは、アンモニア菌は、アンモニア態窒素を窒素源として特異的に利用していることを示している。

一般に、菌類により吸収された無機態窒素は、菌糸細胞内に取込まれ、有機態窒素化合物に変換された上で、体の構成成分として蓄積される。このような吸収された無機態窒素の有機態窒素への変換と細胞内での窒素の蓄積までの一連のプロセスを、窒素の不動化と呼ぶ⁷。担子菌であるアミスギタケ(*Polyporus arcularius* (Batsch) Fr.)では、子実体原基(キノコを形成するための芽のような組織)が形成される時期において、吸収されたアンモニア態窒素は、有機態窒素化合物(タンパク質、遊離アミノ酸、核酸、キチンなど)に変換され、菌糸細胞内に蓄積された⁸。一方、土壌中より分離した菌類14種を無機態窒素を含む培地で培養した実験によると、培養細胞には乾燥重量あたり窒素元素の重量に換算して44~48%に

相当する量を保持していたということである⁹⁾。このように菌類は、吸収した無機態窒素を有機態窒素として細胞内に保持しているため、土壤中に生息する菌類の生きている細胞や組織（菌類バイオマス）は、窒素などの養分の貯蔵庫としての機能を持っている¹⁰⁾。

アンモニア態窒素が過剰に存在する環境で生育することができるアンモニア菌も、このような機能を持っていると考えられ、その生態的特徴からアンモニア態窒素の不動態化能は優れているものと予想される。そこで本研究では、この特性が環境中での家畜ふん尿に由来する窒素負荷を軽減する手法に利用できるものと考え、その手法の開発に向けた第1段階として、アンモニア菌の窒素利用特性を評価し、窒素不動態化資材への応用の可能性を検討する。

2 材料および方法

(1) 供試菌の採取・分離

採取地は岩手県岩手郡滝沢村(E141°05', N39°44')に位置する横田牧場園場の牛ふん尿放置現場であった。これより発生した *Coprinopsis* 様子実体（いわゆるキノコ）を採取し、純粋分離により2株を得た。分離菌2株の和合・不和合性検定を、ポテトデキストロース寒天培地（以下PDA培地）を用いた対峙培養により実施したところ¹¹⁾、2菌は、異なる系統であることが分かった。本研究では、*Coprinopsis* 様子実体の形態的特徴を有する2株を、それぞれ、*Coprinopsis* sp. SIU1、および *Coprinopsis* sp. SIU2 とした。

(2) 各種有機物の分解能の評価

供試菌による有機物の分解能を定性的に評価するために、タンパク質分解菌用培地、セルロース分解菌用培地、尿素分解菌用培地の寒天平板を準備した。培地組成は、海洋性の好気性細菌の計数に使用される組成¹²⁾を参考とした。これらの組成は塩化ナトリウムを多く含んでおり、これが菌類の成長を抑制する可能性があるため、各培地組成より塩化ナトリウムを除いたものを使用した。この寒天平板に、供試菌を接種し、1週間暗所、25℃で培養した。培養終了時の寒天平板の状態の変化を調べ、分解能の有無の判定を行った。

一方、稲わらの分解能は、稲わらに直接供試菌を接種し、稲わら上で栄養菌糸が成長するかどうかで判断した。稲わらを細かく裁断したものに水道水を添加し、オートクレーブ滅菌した。これに栄養菌糸を接種し、2週間暗所、25℃で培養した。稲わら上での栄養菌糸の成長が認められた場合、稲わらの分解能はあると判断した。

(3) 栄養菌糸の培養

培地成分が供試菌の栄養菌糸の成長に及ぼす影響を調べる実験では、基礎培地としてポテトデキストロース液体培地（以下PD基礎培地）を用いて培養した。供試菌の栄養菌糸をPDA培地で前培養し、形成されたコロニーの周縁部より5 mm角の菌糸ブロックを切り出し、これをPD基礎培地へ接種した。培養は基本的に、2週間暗所、25℃で実施した。

培養終了後、吸引ろ過により、栄養菌糸と液体培地を分離して、両者を回収した。吸引ろ過時のフィルターとして0.2 μmメンブランフィルター(ADVANTEC Toyo Roshi Kaisha, Ltd.)を用いた。栄養菌糸は0.3%塩化ナトリウム水溶液、蒸留水の順で洗浄し、吸引ろ過により余分な水分を除去した。回収した栄養菌糸は秤量瓶に入れ、80℃、24時間で乾燥させ、乾燥重量を測定した。

培地中のアンモニア態窒素量は、インドフェノール法¹³⁾により、栄養菌糸および培地中の全窒素含量は、 $H_2SO_4-H_2O_2$ 分解-水蒸気蒸留法¹⁴⁾により測定した。

(4) *Coprinopsis* sp.のアンモニア態窒素の利用特性の評価

PD基礎培地にアンモニア態窒素の最終濃度がそれぞれ0, 0.25, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mg N/mlとなるように塩化アンモニウム(NH_4Cl)を加え、pHを5.8に調整したものを、20 mlずつ100 ml容三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌(120℃、20分)した。これにPDA培地で前培養した栄養菌糸を接種した。これを2週間暗所、25℃で培養した。

培養終了後、吸引ろ過により栄養菌糸と液体培地に分離し、両者を回収した。回収した液体培地は、容量を測定し、アンモニア態窒素量の測定に使用した。回収した栄養菌糸は、前述の方法で乾燥重量を測定した。

一方、培地中のアンモニア態窒素の *Coprinopsis* sp.による不動態化の経時的変化の評価では、基礎培地に最終濃度が0.25 mg N/mlになるように NH_4Cl を添加し、前述と同じ方法で培養した。なお、接種した菌糸ブロックが液体培地に沈んだ場合、液体培地中での栄養菌糸の成長は非常に遅いが、その一部が液体培地の液面上に現れると、液体培地に浮かんだ状態で菌糸が成長する。これを気中菌糸と呼ぶが、この気中菌糸を形成した時点を0日目とし、この5日後、10日後および15日後に栄養菌糸と液体培地を回収し、前述と同様の分析を行った。

(5) アンモニア態窒素を含む土壌への *Coprinopsis* sp.の接種と土壌中のアンモニア態窒素の消長

ふん尿スラリーが園場の土壌に施用され、*Coprinopsis* sp.より構成された微生物資材が投入されたことを想定したモデル実験として、100 ml容ビーカーに市販赤玉土を充填した系を設定した。なお、本節に関する実験で、特

に指定がない場合、以下では赤玉土を単に土壌と略す。

事前に滅菌した土壌 50 g を 100 ml 容ビーカーに充填し、これに NH_4Cl 水溶液を加えたもの、これにさらに稲わら粉碎物を加えたもの、2 種類の土壌を用意した。以下、それぞれ赤玉土区、赤玉土+稲わら区、と略す。赤玉土+稲わら区では、稲わら粉碎物は、50 g (乾燥重量) の土壌に対して 1 g の割合で添加した。 NH_4Cl 溶液は、土壌中での窒素の最終濃度が 0.25 mg N/g 乾土になるように添加し、最終的な土壌の水分量は、最大容水量の 50% となるよう調整した。オートクレーブ滅菌後、これらに *Coprinopsis* sp. SIU1 および SIU2 の栄養菌糸を接種した。接種する栄養菌糸は 1 ビーカーあたり新鮮重 0.5 g の割合で添加した。これを暗所、25 °C で 2 週間培養した。コントロールとして栄養菌糸を接種していないものも同様に調製し、同じ条件で培養した。

土壌のアンモニア態窒素含量はブレンナー法¹⁹⁾により測定した。土壌中で成長した栄養菌糸の菌糸長の測定は、直接検鏡法¹⁹⁾により測定した。この方法は、成長した栄養菌糸を含む土壌を蒸留水に懸濁、この一部を溶解寒天と混合し寒天薄層を作成、寒天薄層の中に含まれる断片化した菌糸を蛍光色素で染色、落射型蛍光顕微鏡下で計数、所定の算出法で菌糸長を求める、という手順で行われる。

3. 結果および考察

(1) 各種有機物の分解能の評価

本実験では、供試菌 *Coprinopsis* sp. SIU1 および SIU2 の 2 株による尿素、タンパク質、およびセルロースの分解能を定性評価した。

尿素およびタンパク質は、家畜ふん尿中に含まれる有機態窒素成分を、またセルロースは、牧草地での土壌表層に蓄積する草本リターや堆肥製造の際に混合する作物残渣の炭素源の成分を想定している。これらの結果を表-1 に示した。

有機態窒素化合物である尿素、タンパク質ともに、*Coprinopsis* sp. SIU1 および SIU2 両菌は分解することがで

きた。一方、炭素源として利用されるセルロースは、SIU1 により分解されたが、SIU2 では、セルロースは部分的な分解にとどまった。

さらに、セルロースを多く含む天然素材である稲わらに対する分解能を評価した。培養期間中に、稲わらのチップの表面を菌糸が旺盛に覆っていたが、稲わらチップが完全に腐朽する状態ではなかった。このことは、稲わらに含まれる比較的分解しやすい炭素化合物（例えばセルロースなど）を炭素源として利用し、生育していることを示している。

これらの結果より、供試菌 *Coprinopsis* sp. SIU1 および SIU2 は、家畜ふん尿中において主要な有機態窒素成分である尿素やタンパク質を分解し、窒素源として利用することができ、さらに草本リターなどの植物残渣も炭素源として利用できる事を示している。

(2) アンモニア態窒素の利用特性の評価

a) 乳牛ふん尿スラリー中の窒素化合物の成分

Coprinopsis sp. の窒素不動化能力を評価するにあたり、圃場で実際に撒かれているスラリーの全窒素含量および無機態窒素量を測定しておく必要がある。そこで、横田牧場内のふん尿槽より採取したスラリーの全窒素含量および無機態窒素量を測定した。

スラリー 1 ml 中に含まれている全窒素含量は、5.16 mg N/ml、そのうちアンモニア態窒素量は、5.13 mg N/ml であり、ふん尿スラリー中のほぼ 100% がアンモニア態窒素であることが示された。このことは、ふん尿層の貯蔵期間中にスラリー中の有機態窒素の無機化が始まり、散布時には、有機態窒素のほとんどがアンモニア態窒素へと変換されていることを示している。硝酸態窒素はほとんど含まれていないことから、スラリー中に含まれるアンモニア態窒素の硝化は圃場に散布された後に始まるものと思われる²⁾。

b) 培地中の異なるアンモニア態窒素量が供試菌の栄養菌糸の成長に及ぼす影響

PD 基礎培地に異なる量のアンモニア態窒素を添加し、培地中のアンモニア態窒素量が供試菌の栄養菌糸の成長に及ぼす影響を評価した。本実験において添加するアンモニア態窒素の量は、スラリー中のアンモニア態窒素濃度が 5 mg N/ml であることを参考にして、培地中のアンモニア態窒素の最終濃度が 0~10 mg N/ml の範囲になるようにした。菌類を培養するための培地の窒素濃度は、一般に 0.3~1 mg N/ml であると言われている¹⁹⁾。これに比べると、スラリー中のアンモニア態窒素濃度はおよそ 5~17 倍、本実験で使用する培地中のアンモニア態窒素濃度は、その 10~33 倍と非常に高い値となっている。

栄養菌糸の成長が最も大きかったのは、SIU1 および SIU2 ともにアンモニア態窒素を添加していない区であ

表-1 *Coprinopsis* sp. SIU1 および SIU2 の各種有機物に対する分解特性

各種有機物	分解能力*		想定する起源
	SIU1	SIU2	
尿素	+	+	家畜尿
カゼイン	+	+	家畜ふんタンパク質
セルロース	+	±	植物の炭素成分
稲わら	+	+	植物の炭素成分

*+, 分解した; ±, 部分的に分解した。

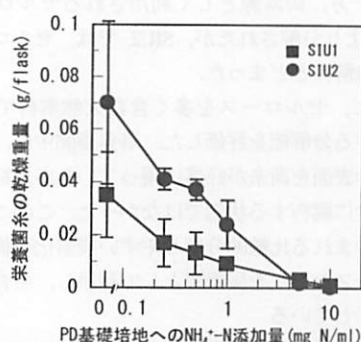


図-1 PD 基礎培地へのアンモニア態窒素の添加量が *Coprinopsis* sp. SIU1 および SIU2 の栄養菌糸の成長に及ぼす影響。縦のバーは標準偏差を示す。

った (図-1)。PD 基礎培地にアンモニア態窒素を添加した時の最終濃度が 0.25, 0.5, 1.0 mg N/ml と増加するにつれて、栄養菌糸の乾燥重量は小さくなった。PD 基礎培地に添加したアンモニア態窒素量がふん尿スラリーとほぼ同じ 5 mg N/ml を越えると、栄養菌糸はほとんど成長せず、その乾燥重量は微量であった。分散分析の結果、PD 基礎培地にアンモニア態窒素を添加した時の最終濃度が 0–0.5 mg N/ml の範囲では、栄養菌糸の乾燥重量に有意な差は見られず、アンモニア態窒素添加量が 1 mg N/ml を越えると、栄養菌糸の成長は抑制されるという傾向にあった。

同様の実験は、Licyayo and Suzuki¹⁷⁾が、合成培地 (化学構造が既知の成分より構成された培地) を用いて行っている。これによると、*Coprinopsis* 属 3 菌株の栄養菌糸は、アンモニア態窒素濃度が 8.4 mg N/ml の液体培地でも成長した。本研究では PD 基礎培地にアンモニア態窒素を添加した培地で検討しているため、単純に比較はできないが、PD 基礎培地に含まれる有機態窒素量 (約 0.1 mg N/ml) を考慮しても、8.4 mg N/ml という濃度は非常に高い値である。本研究での *Coprinopsis* sp. の窒素濃度に対する反応性と、Licyayo and Suzuki の結果との違いの原因は、現在のところ不明である。

ただし、培地中のアンモニア態窒素の濃度が極端に大きい場合は、両研究とも共通して栄養菌糸の成長は大きく抑制されていることから、アンモニア態窒素の過剰吸収が栄養菌糸の成長に何らかの阻害的な作用を引き起こしたことに間違いない。植物の場合、アンモニア態窒素の過剰吸収は、細胞質における電子伝達系の阻害、細胞膜の膜脂質の飽和による膜機能の低下などを引き起こし、その結果として植物の成長は抑制されることが知られている¹⁸⁾。細胞膜構造を有する菌類の場合も、植物と同様のメカニズムで成長の抑制が起きているものと思われる。

次に、栄養菌糸が成長した PD 基礎培地の区、PD 基礎培地にアンモニア態窒素を添加し最終濃度が 0.25,

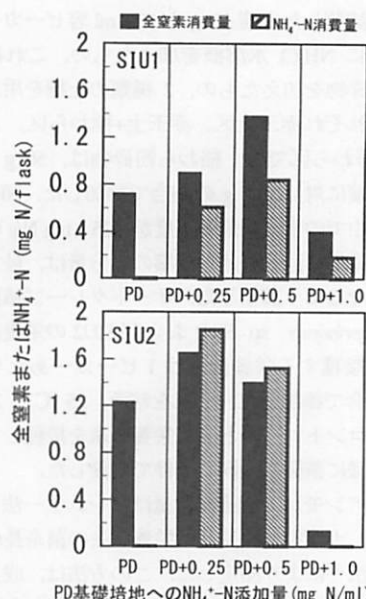


図-2 PD 基礎培地に異なる濃度のアンモニア態窒素を添加し *Coprinopsis* sp. SIU1 および SIU2 の栄養菌糸を培養した時の培地中の窒素消費量。

0.5, および 1.0 mg N/ml である区に限定して、培養期間における培地中のアンモニア態窒素量、および全窒素含量の変化を調べた。なお、それぞれの処理区を、PD 区、PD+0.25 区、PD+0.5 区、PD+1.0 区とする。培養開始時の培地中のアンモニア態窒素量および全窒素含量より、培養終了時のそれらを差し引くことで、それぞれの窒素成分の培養期間における減少量を求めた。本研究では、培養期間における培地中の各窒素成分の減少量は、栄養菌糸により吸収された各窒素量と同じであると仮定し、この減少量を消費量と呼ぶことにする。PD 区では、培養前後でアンモニア態窒素の現存量はいずれも微量であり、全窒素の成分だけが消費されていた (図-2)。このことは、PD 区に含まれる窒素成分の形態は、ほとんどがジャガイモ由来の有機態窒素と考えられた。一方、この PD+0.25 区および PD+0.5 区では、消費された窒素の 60–100% がアンモニア態窒素であった。ただし、SIU2 の PD+0.25 区では、アンモニア態窒素の消費量が全窒素の消費量を越えていたが、これは「材料および方法」で示した様に、それぞれの窒素成分の測定法が異なることで誤差が生じたためと考えられ、この区的全窒素消費量はアンモニア態窒素消費量とほぼ一致するものと思われる。さらに、液体培地中にアンモニア態窒素量をより多く含んだ PD+1.0 区になると、全窒素消費量、アンモニア態窒素消費量ともに大きく減少した。

以上の結果より、アンモニア菌である *Coprinopsis* sp. は窒素源として有機態窒素とアンモニア態窒素がともに存

表-2 PD 基礎培地に異なる濃度のアンモニア態窒素を添加し *Coprinopsis* sp. SIU1 および SIU2 の栄養菌糸を培養した時の培地中の窒素収支.

処理区*	菌株	培地中の全窒素含量の初期値 (mg N/flask)	栄養菌糸の乾燥重量 1g あたりの全窒素消費量 (mg N/g)	培養期間における培地中の全窒素含量の消費率 (%)
PD	SIU1	2.1	20	34
	SIU2	2.1	18	58
PD+0.25	SIU1	7.1	54	13
	SIU2	7.1	40	23
PD+0.5	SIU1	11.8	104	12
	SIU2	11.8	38	12
PD+1.0	SIU1	21.3	46	2
	SIU2	21.3	5	1

*PD 基礎培地への $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 添加量(mg N/ml)を示す.

在する条件では、アンモニア態窒素を優先的に消費していることが明らかとなった。

ここで、この実験での培養期間における培地中の窒素収支について考えてみる。培養期間中に成長した栄養菌糸の乾燥重量 1 g あたりの培地中の全窒素消費量を、図-1 および図-2 に記載のデータをもとに求めた (表-2)。この値は、SIU1 では PD+0.5 区で 104 mg N/g, SIU2 では PD+0.25 区で 40 mg N/g と高い値を示した。このことは、これらの栄養菌糸によるアンモニア態窒素の吸収効率は、培地中のアンモニア態窒素量が 0.25~0.5 mg N/ml の範囲で高くなることを示唆している。一方、培養期間中における培地中の全窒素含量の消費率は、基礎培地へ添加されたアンモニア態窒素量の増加に伴い減少した。しかし、アンモニア態窒素の消費量が大きい PD+0.25 区および PD+0.5 区では、培地中の全窒素量の 12~23%に相当する量を消費、すなわち栄養菌糸が吸収していたことになる。

c) 培養期間中における栄養菌糸の成長とアンモニア態

窒素の消費

供試菌 *Coprinopsis* sp. SIU1 および SIU2 の培養期間中における栄養菌糸の成長と培地中のアンモニア態窒素の消費との関係を調べた(図-3)。この実験では、培地中のアンモニア態窒素の最終濃度が 0.25 mg N/ml となるよう調製した。その結果、SIU1 では培養日数が 10 日、SIU2 では 5 日を境に、アンモニア態窒素の消費が少なくなり、その一方で、栄養菌糸の成長がほぼ頭打ちとなった。培養終了時に両菌株とも培地中の約 50%のアンモニア態窒素を消費していた。栄養菌糸の増加とアンモニア態窒素の減少という経時的なパターンは、供試菌が培養期間中に培地中のアンモニア態窒素を窒素源として不動化していることを示している。

本実験では、培養期間中における液体培地の pH も測定した。培養初期では 5.8 であったが、培養終了時には、SIU1 で 4.3, SIU2 で 4.1 まで低下していた (図-3)。液体培地の pH が 4 前後になると、栄養菌糸の成長も頭打ちとなっていた。この pH の低下の理由として、液体培地中のアンモニア態窒素が栄養菌糸に吸収され、塩基性を示すアンモニウムイオンの濃度が相対的に減少したこと、さらに栄養菌糸の成長に伴い代謝産物である有機酸などが産出されたこと、などが考えられる。

(3) アンモニア態窒素を含む土壌での *Coprinopsis* sp. の栄養菌糸の成長とアンモニア態窒素の消長

ふん尿スラリーが圃場で施用され、そこに供試菌で構成された微生物資材が投入された場合を想定したモデル実験を行った。今回の実験で、赤玉土には、0.25 mg N/g 乾土に相当するアンモニア態窒素を添加したが、この量は、ふん尿スラリーが散布された直後の圃場における土壌中のアンモニア態窒素濃度を参考にした³⁾。さらに、赤玉土へアンモニア態窒素を添加しただけでは、炭素源の不足による栄養菌糸の成長抑制が起こる事が予測されたため、炭素源として稲わら粉碎物を赤玉土に加えた区を設けた。

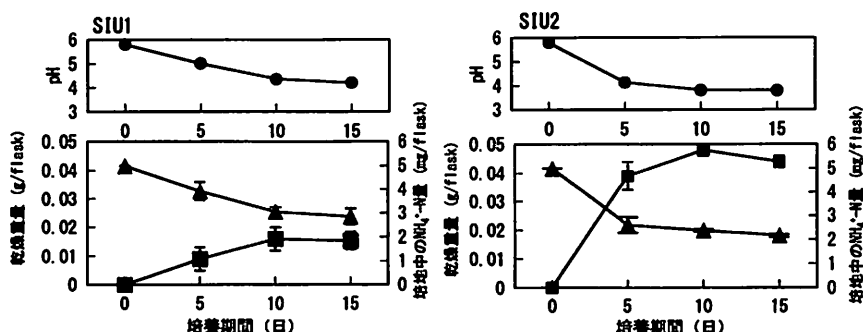


図-3 培養期間中の *Coprinopsis* sp. の栄養菌糸の成長と培地中のアンモニア態窒素量の経時的変化。
●, pH; ▲, 培地中のアンモニア態窒素量; ■, 栄養菌糸の乾燥重量 縦のバーは標準偏差を示す。

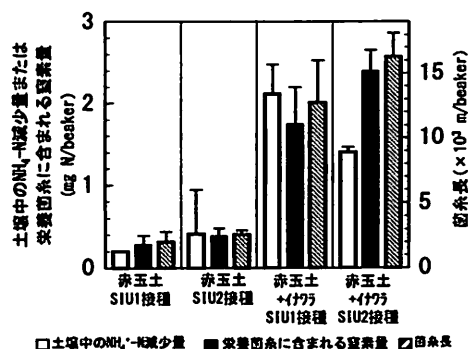


図-4 アンモニア態窒素を添加した土壤中での *Coprinopsis* sp.の栄養菌糸の成長とアンモニア態窒素の消費。 縦のバーは標準偏差を示す。

培養終了時において、炭素源を含む赤玉土+稲わら区では、土壤中に菌糸が蔓延しており、*Coprinopsis* sp. SIU2を接種したものでは、子実体の形成も認められた。これらの土壤では、ピーカーあたり1.4~2.1 mg Nのアンモニア態窒素が培養開始時のそれより減少していた(図-4)。これに対して、炭素源を含まない赤玉土区では、土壤中のアンモニア態窒素ほとんど減少していなかった。さらに、各土壤中で増殖した栄養菌糸の長さを測定したが、赤玉土区では小さく、赤玉土+稲わら区では大きくなる傾向にあった。

この菌糸長をもとにピーカー中の栄養菌糸の乾燥重量を算出し、さらに*Coprinopsis* sp.栄養菌糸の窒素含量を用いて、栄養菌糸に保持されている窒素量を算出した。なお、*Coprinopsis* sp. SIU1およびSIU2の栄養菌糸の窒素含量は、PD基礎培地で生育した栄養菌糸を用いた分析値3.19%を使用した。また、子実体が発生したピーカーについては、その子実体に含まれる窒素含量を加算した。その結果、赤玉土区では、栄養菌糸に保持された窒素は非常に少なかったが、赤玉土+稲わら区では、ピーカーあたり1.7~2.4 mg Nが栄養菌糸に保持されていた。ここで、ピーカー内の土壤中のアンモニア態窒素の減少量と栄養菌糸に保持された窒素量との相関を分析したところ、両者の間には、危険率0.1%のレベルで有意な正の相関が認められた($r=0.899$) (図-5)。このことは、ピーカー内の土壤に接種した*Coprinopsis* sp.は、土壤中のアンモニア態窒素を吸収・不働化し、栄養菌糸の中に窒素を保持したことを示している。

そこで、*Coprinopsis* sp.の栄養菌糸の成長に伴う土壤中のアンモニア態窒素の不働化の効率について考えてみる。図-4で示した結果を基に、培養期間中に減少した土壤中のアンモニア態窒素量が、すべて接種した*Coprinopsis* sp.の栄養菌糸に吸収・不働化され、保持されたものと仮定して、添加されたアンモニア態窒素の不働化率を算出した。その結果、炭素源を含まない赤玉土区では、0~4%

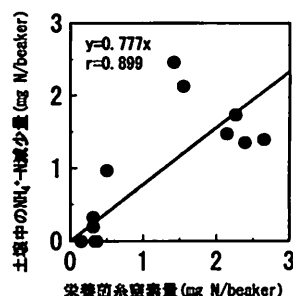


図-5 *Coprinopsis* sp.の栄養菌糸に不働化された窒素量と土壤中のアンモニア態窒素の減少量との関係。 縦のバーは標準偏差を示す。

表-3 *Coprinopsis* sp.の栄養菌糸の成長に伴う土壤中の添加アンモニア態窒素の不働化率。

処理区	接種菌	添加した $\text{NH}_4\text{-N}$ の不働化率(%)
赤玉土区	SIU1	0
	SIU2	4
赤玉土+稲わら区	SIU1	19
	SIU2	12

であった。一方、炭素源を含む赤玉土+稲わら区では、12~19%であった(表-3)。

炭素源を含む区でのアンモニア態窒素の不働化率10~20%という値は、微生物資材の効能として、あまり芳しくない結果であった。今回の実験では、炭素飢餓に伴う供試菌の成長抑制を避けるため、炭素源として稲わら粉碎物を添加した。一般に、植物体の炭素含量は約50%であることから、ピーカー内の土壤に添加された炭素量は、500 mg Cと推定される。一方、添加されたアンモニア態窒素量は、ピーカーあたり125 mg Nである。この窒素量をすべて*Coprinopsis* sp.栄養菌糸が吸収・不働化すると仮定して、栄養菌糸の増殖に必要な炭素量を単純に計算した。栄養菌糸のC/N比を8とすると⁹⁾、100 mg Cとなる。この値は、ピーカー内の土壤に添加された炭素量500 mg Cで十分賄えるものである。しかし、実際には、500 mg Cに相当する炭素化合物の中から炭素源として利用できる易分解性の炭素成分はその一部であること、吸収された炭素源の10-50%が細胞の構成成分にとりこまれ、残りはエネルギー代謝に利用されること¹⁰⁾、などにより、栄養菌糸が利用することのできる炭素源の量が十分に供給されておらず、栄養菌糸の成長が抑制されたものと思われる。

4. まとめ

本研究では、牛ふん尿放置現場で採取し純粋分離し

た *Coprinopsis* sp. 2 株を供試菌として、アンモニア態窒素量が栄養菌糸の成長に及ぼす影響を評価した。PD 基礎培地に異なる量のアンモニア態窒素を添加した培養実験では、アンモニア態窒素量の増加に伴い、栄養菌糸の成長は抑制される傾向にあるものの、0.25~0.5 mg N/ml の範囲では、アンモニア態窒素を優先して利用・不動化し、その栄養菌糸単位重量あたりの全窒素消費量は、高いことが明らかとなった。

一方、ふん尿スラリーが圃場に施用され、*Coprinopsis* sp. より構成される微生物資材が投入された場合を想定したモデル実験を行ったが、*Coprinopsis* sp. の栄養菌糸による土壌中のアンモニア態窒素の不動化率は、20%に満たないものであった。これは、*Coprinopsis* sp. の栄養菌糸が生育するための利用可能な炭素源が不足したことが、主な原因と考えられる。そのため、*Coprinopsis* sp. の栄養菌糸の成長に適した土壌中の C/N バランス、たとえば、土壌中のアンモニア態窒素の現存量と栄養菌糸が利用可能な炭素源の添加量との関係などについて検討を加えることで、不動化率の向上が期待できる。

今回の研究では、ふん尿放置現場で採取した *Coprinopsis* sp. 2 株のみを用いた実験であったが、今後は、アンモニア菌に属する他の菌株について、今回と同様の検討を行い、効果が期待できる菌株の選別や、微生物資材としての効能の至適条件を検討する必要がある。

謝辞： 本研究の一部は、科学研究費補助金（課題番号：16658091, 20380130），および第15回地球環境財団研究奨励金によって行われた。

参考文献

- 1) 杉本安寛, 永松勝彦, 上野昌彦, 武藤勲, 豊満幸雄: 牧草地における尿窒素の動態に関する研究, 2. パヒアグラス (*Paspalum notatum* Flugge) 草地における ^{15}N を指標とした牛尿窒素の動態, 日草誌, Vol. 40, pp. 325-322, 1994.
- 2) Mizota, C., Yamaguchi, Y. and Noborio, K.: Microbial transformation of nitrogen in cattle slurry as applied to an Andisol grassland, *J. Jpn. Soil Phys.*, No. 104, pp. 13-26, 2006.
- 3) 羽賀清典: 家畜排泄物処理, 汚染対策における微生物利用と資材化, 微生物の資材化: 研究の最前線, 鈴井孝仁ほか編, pp. 328-341, ソフトサイエンス社, 2001.

- 4) 相良直彦: アンモニア菌類の増殖, 微生物の生態(3)-増殖をめぐって, 微生物生態研究会編, pp. 153-178, 東京大学出版会, 1976.
- 5) Morimoto, N., Suda, S. and Sagara, N.: Effects of ammonia on fruit-body induction of *Coprinus cinereus* in darkness, *Plant Cell Physiol.*, Vol. 22, pp. 247-254, 1981.
- 6) Suzuki A., Motoyoshi N. and Sagara, N.: Effects of ammonia, ammonium salts, urea, and potassium salts on basidiospore germination in *Coprinus cinereus* and *Coprinus phycidiosporus*. *Trans. mycol. Soc. Japan.*, Vol. 23, pp. 217-224, 1982.
- 7) Sylvia, D.M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.G. and Zuberer, D.A.: Principles and applications of soil microbiology, pp. 259-294, Prentice Hall, 1999.
- 8) 北本豊, 松本晃幸, 細井登, 寺下隆夫, 河野又四, 市川吉夫: アミスギタケの窒素代謝: 子実体形成における栄養菌糸と子実体の窒素化合物の代謝変動, 日菌報, Vol. 21, pp. 237-244, 1980.
- 9) Anderson, J.P.E. and Domsch, K.H.: Quantities of plant nutrients in the microbial biomass of selected soils, *Soil Science*, Vol. 130, pp. 211-216, 1980.
- 10) Koller, A. and Struwe, S.: Microfungi in ecosystems: fungal occurrence and activity in litter and soil, *Oikos*, Vol. 39, pp. 389-422, 1982.
- 11) 善知寺厚, 渡辺直明: きのご実験マニュアル, pp. 85-86, 講談社サイエンティフィク, 1987.
- 12) 林孝市郎: 好気性従属栄養細菌, 海洋微生物研究法, 門田元・多賀信夫編, pp. 69-80, 学術出版センター, 1985.
- 13) 日高伸: 窒素, 土壌標準分析法, 土壌環境分析法編集委員会編, pp. 231-255, 博友社, 1997.
- 14) 木村和彦: 無機成分の分析法, 新農学実験マニュアル, 羽柴輝良・金浜耕基編, pp. 170-173, ソフトサイエンス社, 2002.
- 15) Tateishi, T.: Estimation of fungal to bacterial biomass ratio in a burned pine forest soil by substrate-induced respiration inhibition method and microscopic method. *Soil Microorganisms*, Vol. 54, pp. 1-11, 2000.
- 16) 北本豊, 鈴木彰: 純粋培養, 菌類研究法, 青島清雄ほか編, pp. 39-55, 共立出版, 1983.
- 17) Licayo D.C. and Suzuki, A.: Growth responses of ammonia fungi to different concentrations of ammonium nitrogen, 日本きのこ学会誌, Vol. 14, pp. 145-156, 2006.
- 18) 伊豆田猛: 酸性降下物と植物, 植物と環境ストレス, 伊豆田猛編著, pp. 65-75, コロナ社, 2006.

(2010.5.21 受付)

Properties of nitrogen utilization by ammonia fungi and its application to microbial inocula to improve the nitrogen-excess conditions

Takahiro TATEISHI¹, Takayuki TAKIZAWA¹, Naoya SATTA¹, Takeki MAEDA¹ and Kosuke NOBORIO^{1,2}

¹Faculty of Agriculture, Iwate University

²Faculty of Agriculture, Meiji University

In this study responses of ammonia fungi to different concentrations of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ in liquid media were examined and the properties of nitrogen utilization by ammonia fungi were applied to microbial inocula to improve nitrogen-excess conditions where animal wastes were applied to the soil in a dairy farming system. Ammonia fungi in the microbial inocula could be expected to immobilize excess $\text{NH}_4^+\text{-N}$ to microbial cells. Test fungi were two strains of ammonia fungi, *Coprinopsis* sp. which were isolated from the field where cattle wastes were disposed. Although growth of vegetative mycelia of *Coprinopsis* sp. was restricted with the increase of concentrations of $\text{NH}_4^+\text{-N}$, they absorbed $\text{NH}_4^+\text{-N}$ almost exclusively in liquid media. The cultured mycelia of *Coprinopsis* sp. were inoculated to soils amended with $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and then incubated. Hyphal lengths of inoculated *Coprinopsis* sp. were significantly correlated with the amounts of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ decreased in the soils after the incubation. These results indicated that the mycelia of *Coprinopsis* sp. immobilized excess $\text{NH}_4^+\text{-N}$ in the soils to their cells and might be available to microbial inocula to improve nitrogen-excess condition.