

鹿児島県内の有機栽培圃場における土壌微生物性の解析

白尾 吏・餅田利之・相本涼子・遠嶋太志・重 光雄*・藤川和博

要 約

鹿児島県内の野菜有機栽培圃場 (n=53) の土壌化学性と土壌微生物性の実態を調査した結果、pH (H₂O)、可給態リン酸および塩基飽和度の県土壌診断基準の上限を超過した圃場が多かった。次世代シーケンスによる有機栽培圃場の糸状菌および細菌の種数、多様性指標については、慣行栽培圃場 (n=10) との差は認められなかった。なお、pH (H₂O) と細菌の種数および多様性指標との間、塩基飽和度と糸状菌、細菌の種数および細菌の多様性指標との間に負の相関が認められた。

鹿児島県農業開発総合センター内の栽培開始 3～4 年目の有機栽培転換期の圃場においては、土壌肥沃度の指標である可給態窒素や全炭素が高まり、微生物バイオマスの指標である土壌からの抽出 DNA 量および ATP は有機栽培区が慣行栽培区や無作付区に比べて多かった。一方、次世代シーケンスによる糸状菌および細菌の種数については区間差は認められなかったが、主座標分析から有機栽培区、慣行栽培区および無作付区の微生物群集構造にそれぞれ違いが認められ、優占して生息する微生物種が異なることが示唆される。

キーワード：土壌化学性、土壌微生物性、微生物群集構造、微生物バイオマス、有機栽培

緒 言

鹿児島県は、「鹿児島県有機農業推進計画」に基づき有機農業の推進を図っており、県内における 2021 年の有機農業の取組面積は 1,190ha であり増加傾向にある。農産物の生産安定には、土壌環境を構成する土壌化学性、土壌物理性、土壌微生物性の 3 つのバランスを適正に維持することが重要とされている⁴⁾。一般に、有機農業の生産現場では、地力を向上させ有機農産物の生産性を高めるため積極的な有機物の施用が行われていると考えられる。有機物の施用は、土壌の緩衝作用の増大や土壌物理性や土壌化学性の改善、土壌中の生物の多様化などの効果をもたらす³⁾との知見があるものの、これまで土壌微生物性の診断技術の開発は、土壌化学性や土壌物理性と異なりデータ蓄積が進んでいない現状である。従来、土壌微生物の生菌数の測定法として培養を経由する希釈平板法が用いられるが、土壌微生物の多くの種で培養が困難であるため微生物数や多様性を評価する上で大きな制限となっている。微生物バイオマスは土壌微生物性の重要な量的指標であり、クロロホルムくん蒸法、基質誘導呼吸法および ATP 法による測定法⁸⁾の他、土壌からの抽出 DNA 量を測定^{1, 20)}する方法があり、土壌肥沃度指標 SOFIX (<https://sofixagri.com/sofix/>) では土壌中から

細菌の DNA を抽出しその DNA 量を指標として総細菌数を測定する技術¹⁴⁾が用いられている。

近年、土壌微生物性の解析にあたって培養を経由せずに土壌微生物群集の DNA を抽出し解析する手法が開発された^{10, 18)}。土壌微生物群集の DNA の解析法として、クローンライブラリー法¹³⁾、DGGE 法 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)^{7, 17)}、次世代シーケンス¹⁵⁾などがある。その中で次世代シーケンスはコストが高く大量のデータを扱う必要があるが、サンプル中の多数の分類群や存在比率の詳細情報を一度に得られる技術であり¹²⁾、微生物群集構造の解析においても主要な手法となっている。

本研究では有機栽培圃場における土壌微生物性に関する基礎的データを蓄積し有機農産物の生産安定の一助とするため、県内の有機栽培圃場において土壌化学性ととも、次世代シーケンスにより土壌微生物性の実態を調査した。なお、これまで鹿児島県域に及ぶ広範囲の有機栽培圃場を対象とした次世代シーケンスによる土壌微生物性の実態調査の報告はない。また、鹿児島県農業開発総合センター内の栽培開始 3～4 年目の有機栽培転換期の圃場において、微生物バイオマスや微生物群集構造等の推移を解析したので報告する。

(連絡先) 園芸作物部

* 農業開発総合センター農業大学校

試験材料および方法

1 県内の野菜有機栽培圃場の土壌化学性と土壌微生物

性的実態 (試験1)

(1) 供試土壌

2017年から2018年にかけて県内の野菜有機栽培53圃場(鹿児島市1圃場, 霧島市8圃場, 始良市24圃場, 南九州市4圃場, 志布志市6圃場, 湧水町3圃場, 大崎町5圃場, 東串良町2圃場)および野菜慣行栽培10圃場(霧島市4圃場, 始良市2圃場, 南九州市1圃場, 湧水町2圃場, 東串良町1圃場)から栽培跡地の表層(0~15cm)土壌を採取した。採取した土壌は未風乾の状態です。2mmの篩を通したものを4℃で冷蔵保存し、随時DNA抽出を行い次世代シーケンスによる土壌微生物性の測定に供試した。pH(H₂O)の測定には採取後未風乾の状態です。2mmの篩を通したものを、その他の土壌化学性の測定には2mmの篩を通し風乾したものを供試した。

(2) 土壌化学性

供試土壌について、pH(H₂O)、全炭素、全窒素、可給態窒素、可給態リン酸および塩基飽和度を測定した。全炭素、全窒素はNCアナライザー(JM-1000CN, J-SCIENCE)による乾式燃焼法により、他は土壌環境分析法²⁾に準じて測定した。

(3) 土壌微生物性(次世代シーケンス)

土壌からのDNA抽出は未風乾土0.5gを4℃で冷蔵保存したものを、VD-250R Freeze Dryer(TAITEC)により凍結乾燥後、Shake Master Neo(bms)を用いて粉砕し、MPure Bacterial DNA Extraction Kit(MP Bio)により行った。抽出したDNAを鋳型に用い、糸状菌はgITS領域、細菌は16S rRNA V3/V4領域について、次世代シーケンスMiSeqにより300bpペアエンド解析を行い、網羅的に得られた塩基配列データを解析ソフトQIIME2(Quantitative Insight Into Microbial Ecology2)を用いて解析した。得られた塩基配列データのうち、相同性が97%以上のものでOTU(Operational Taxonomic Units)を作成し、微生物種のデータベースと比較することにより近縁種の推定を行った。糸状菌および細菌の種数は確認されたOTUの数から推定し、多様性指標はShannon indexを用いた。

2 有機栽培開始3~4年目の圃場における土壌微生物性の推移(試験2)

(1) 栽培管理

当センター内の多腐植質厚層黒ボク土壌のこれまで作物栽培歴がない圃場において、2017年に有機栽培区、慣行栽培区および無作付区(各2反復)を設置し、以降、有機栽培区と慣行栽培区で秋冬作と春夏作の年2作で栽培を行った(表1)。慣行栽培区は、青果用サツマイモ

の作付前に毎回、D-D剤による土壌消毒(20L/1000m²)を実施した。無作付区は、施肥、農薬散布および作付は一切行わず、雑草が繁茂しないように定期的に耕耘を行った。

表1 試験区の作付年度、作型、品目および資材施用量

作付年度・ 作型・品目	資材施用量(kg/1000m ²)			
	有機栽培区		慣行栽培区	
2017 秋冬作 (1作目) キャベツ	牛ふん堆肥	2,000	牛ふん堆肥	1,000
	鶏ふん堆肥	500	BB48	125
	なたね油かす	200	苦土石灰	100
2018 春夏作 (2作目) 青果用サツマイモ	牛ふん堆肥	2,000	牛ふん堆肥	1,000
	鶏ふん堆肥	500	からいも配合	63
	苦土石灰	100	苦土石灰	100
2018 秋冬作 (3作目) パレイショ	牛ふん堆肥	2,000	牛ふん堆肥	1,000
	鶏ふん堆肥	500	パレイショ配合	107
	なたね油かす	200	苦土石灰	100
2019 春夏作 (4作目) 青果用サツマイモ	牛ふん堆肥	2,000	牛ふん堆肥	1,000
	鶏ふん堆肥	500	からいも配合	63
	苦土石灰	100	苦土石灰	100
2019 秋冬作 (5作目) パレイショ	牛ふん堆肥	2,000	牛ふん堆肥	1,000
	鶏ふん堆肥	500	パレイショ配合	107
	なたね油かす	200	苦土石灰	100
2020 春夏作 (6作目) 青果用サツマイモ	牛ふん堆肥	2,000	牛ふん堆肥	1,000
	鶏ふん堆肥	500	からいも配合	63
	苦土石灰	100	苦土石灰	100
2020 秋冬作 (7作目) パレイショ	牛ふん堆肥	2,000	牛ふん堆肥	1,000
	鶏ふん堆肥	500	パレイショ配合	107
	なたね油かす	200	苦土石灰	100
2021 春夏作 (8作目) 青果用サツマイモ	牛ふん堆肥	2,000	牛ふん堆肥	1,000
	鶏ふん堆肥	500	からいも配合	63
	苦土石灰	100	苦土石灰	100

(2) 供試土壌

試験開始前および各品目の収穫後の表層(0~15cm)土壌を採取後、未風乾の状態です。2mmの篩を通し、速やかに土壌微生物性のATPの測定に供試した。その後4℃で冷蔵保存し、随時DNA抽出を行い次世代シーケンスによる土壌微生物性の測定に供試した。pH(H₂O)の測定には採取後未風乾の状態です。2mmの篩を通したものを、その他の土壌化学性の測定には2mmの篩を通し風乾したものを供試した。なお、土壌化学性は試験開始前と1作目から8作目までの跡地土壌を、土壌微生物性は栽培開始3~4年目の5~8作の跡地土壌を測定した。

(3) 土壌化学性

1(試験1)と同様に測定した。

(4) 土壌微生物性

ア アデノシン5'-三リン酸(ATP)の測定

浦島らの方法¹⁹⁾に準じて、未風乾土2gを市販のミキサーに入れ、蒸留水200mLを加え1分間処理した。懸濁液をルシパックPen-AQUA(キッコーマンバイオケミファ社)に0.1mL添加し、ルミノメーター(ルミテス

ター PD-30) で発光量 (RLU 値) を測定した。

イ 土壤からの DNA 抽出

4℃で冷蔵保存した未風乾土 0.4g を FastDNA SPIN Kit for Soil (Q-BioGene 社) を用いてマルチビーズショッカー MB1200 (安井機器) により粉碎後, プロトコールに従って行った。なお, Sodium Phosphate Buffer を加える際に, 20% (w/v) スキムミルク溶液を 120 μ L を添加した。土壤試料から抽出した DNA 量の測定は Synergy H1 (Bio Tek) と QuantiFluor dsDNA System (Promega) を用いて行った。

ウ 次世代シーケンス

1 (試験 1) と同様に測定した。

エ 微生物群集構造解析

作成した OTU の塩基配列データに基づく系統分析とリード数を考慮し, サンプル間の群集構造の違いを距離 UniFrac distance として算出し主座標分析 (PCoA: Principal Coordinate Analysis) を行った。有機栽培区で慣行栽培区より生息割合が有意に高い糸状菌および細菌の属・種の抽出は, 5 作目から 8 作目までの有機栽培区および慣行栽培区における糸状菌および細菌の各生息割合をアークサイン変換後, JMP12 (SAS Institute Japan) の応答のスクリーニングを用いた一元配置分散分析により, 慣行栽培区と比較して有機栽培区で有意に高いものかつ, 属・種が推定されているものを抜粋した。

結 果

1 県内の野菜有機栽培圃場の土壤化学性と土壤微生物性の実態 (試験 1)

(1) 有機栽培圃場と慣行栽培圃場における土壤化学性および土壤微生物性

県内の野菜有機栽培圃場 (n=53) の土壤化学性につ

いては, 有機栽培圃場の多くで pH (H₂O), 可給態リン酸および塩基飽和度が土壤診断基準の上限を超過し, 可給態窒素 5 mg/100g 乾土を上回っていた (図 1, 4, 6, 7)。また, 有機栽培圃場の塩基飽和度は野菜慣行栽培圃場 (n=10) に比べて高かったが, 他の項目は両圃場間に差が認められなかった (図 1)。

土壤微生物性の糸状菌および細菌の種数, 多様性指標については, 有機栽培圃場と慣行栽培圃場間に差は認められなかった (図 2, 3)。

(2) 野菜有機栽培圃場における土壤化学性と土壤微生物性の関係

県内の野菜有機栽培圃場 (n=53) における土壤化学性と糸状菌および細菌の種数, 多様性指標との関係については, pH (H₂O) が高くなるに従い細菌の種数は少なくなり多様性指標も低くなる負の相関が, 可給態リン酸と糸状菌種の多様性指標にも負の相関が認められた (表 2, 図 5, 6)。さらに塩基飽和度と糸状菌, 細菌の種数および細菌の多様性指標との間にも負の相関が認められた (表 2, 図 7, 8)。なお, pH (H₂O) と糸状菌の種数および多様性指標との間には相関は認められなかった (表 2, 図 4)。

鹿児島県土壤管理指針⁴⁾における根菜類野菜の土壤診断基準は pH (H₂O) 5.5 ~ 6.5 であるが, 調査した有機栽培圃場 53 圃場のうち 31 圃場が pH (H₂O) の上限 6.5 を超過した。基準を超過した圃場では基準内の圃場と比較し細菌の種数が少なくなる傾向がみられた (図 5)。同様に, 根菜類野菜の塩基飽和度の土壤診断基準は 50 ~ 75% であるが, 53 圃場のうち 43 圃場が上限 75% を超過した。基準を超過した圃場では基準内の圃場と比較し糸状菌および細菌の種数が少なくなる傾向がみられた (図 7, 8)。

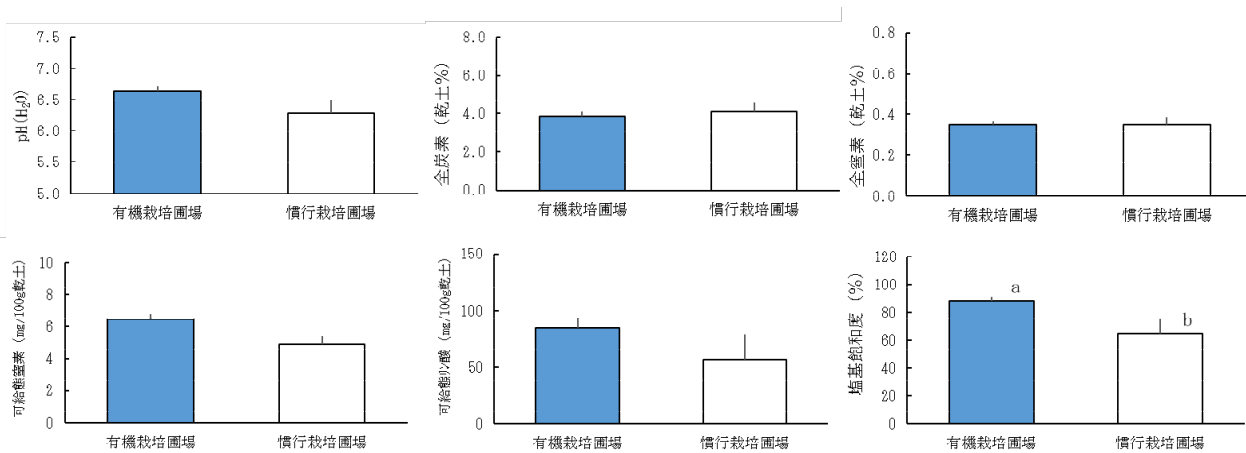


図 1 有機栽培圃場と慣行栽培圃場の土壤化学性の比較

注 1) 値は圃場の平均値であり, エラーバーは標準誤差を示す

注 2) t 検定により異符号間には 5% 水準で有意差あり

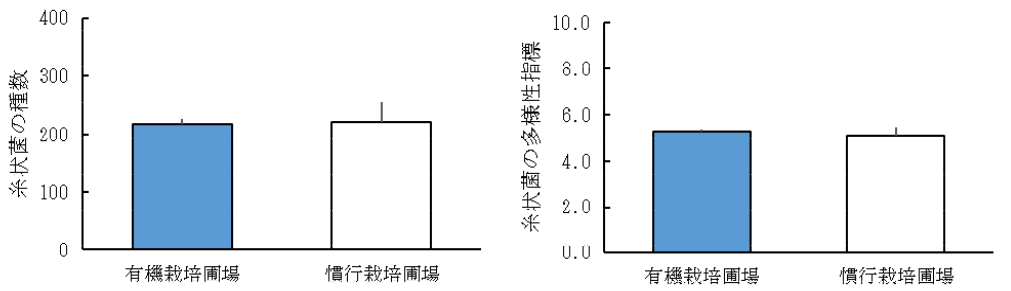


図2 有機栽培圃場と慣行栽培圃場の糸状菌の種数および多様性指標

注) 値は圃場の平均値であり，エラーバーは標準誤差を示す

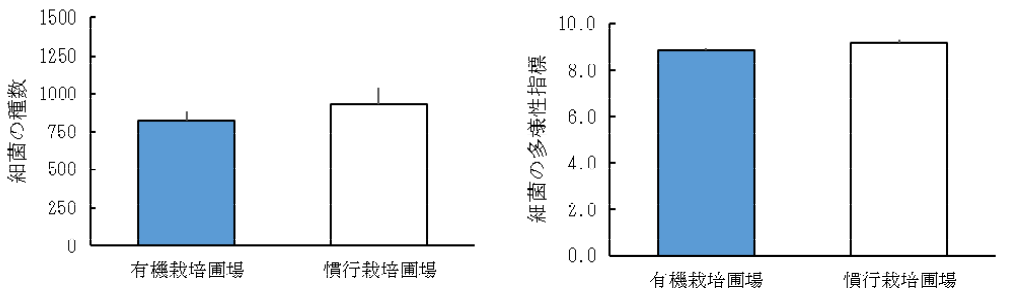


図3 有機栽培圃場と慣行栽培圃場の細菌の種数および多様性指標

注) 値は圃場の平均値であり，エラーバーは標準誤差を示す

表2 有機栽培圃場における土壌微生物性と土壌化学性との相関

土壌微生物性	土壌化学性	pH (H ₂ O)	全炭素	全窒素	可給態窒素	可給態リン酸	塩基飽和度
糸状菌の種数		-0.25	-0.25	-0.14	0.11	-0.22	-0.58 **
糸状菌種の多様性指標		0.22	-0.04	0.02	0.12	-0.30 *	-0.25
細菌の種数		-0.35 *	-0.03	-0.12	-0.12	-0.17	-0.30 *
細菌種の多様性指標		-0.29 *	-0.06	-0.14	0.02	-0.15	-0.35 **

注) **は1%水準で有意差あり，*は5%水準で有意差あり

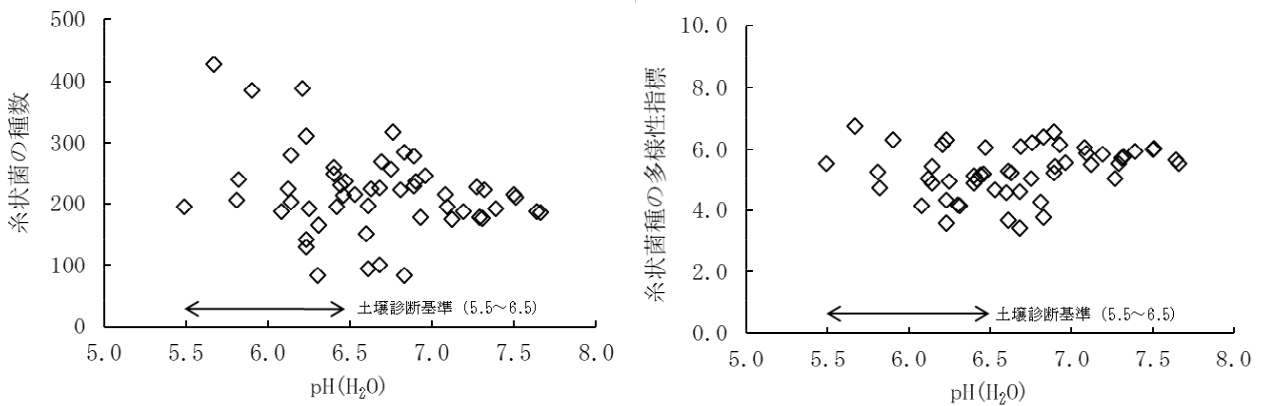


図4 有機栽培圃場における pH (H₂O) と糸状菌の種数および多様性指標との関係

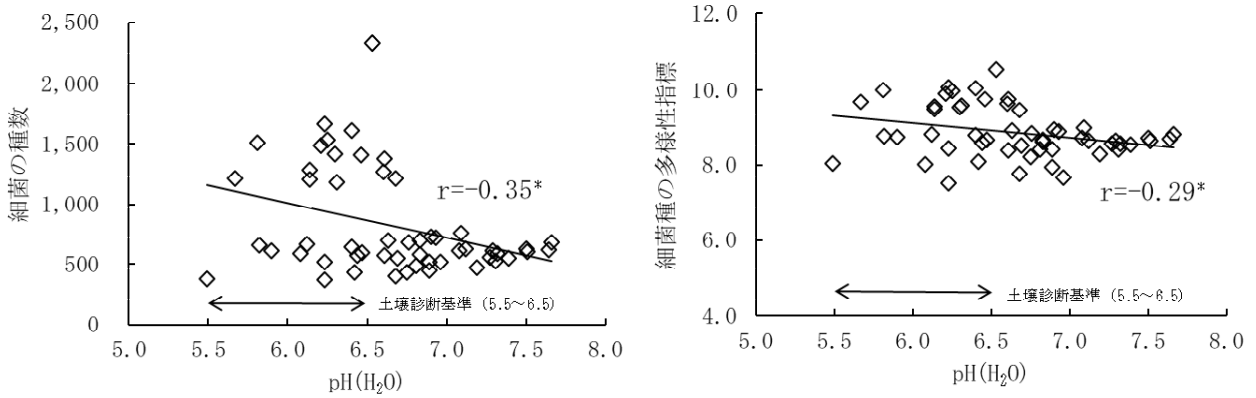


図5 有機栽培圃場における pH (H₂O) と細菌の種数および多様性指標との関係

注) *は5%水準で有意差あり

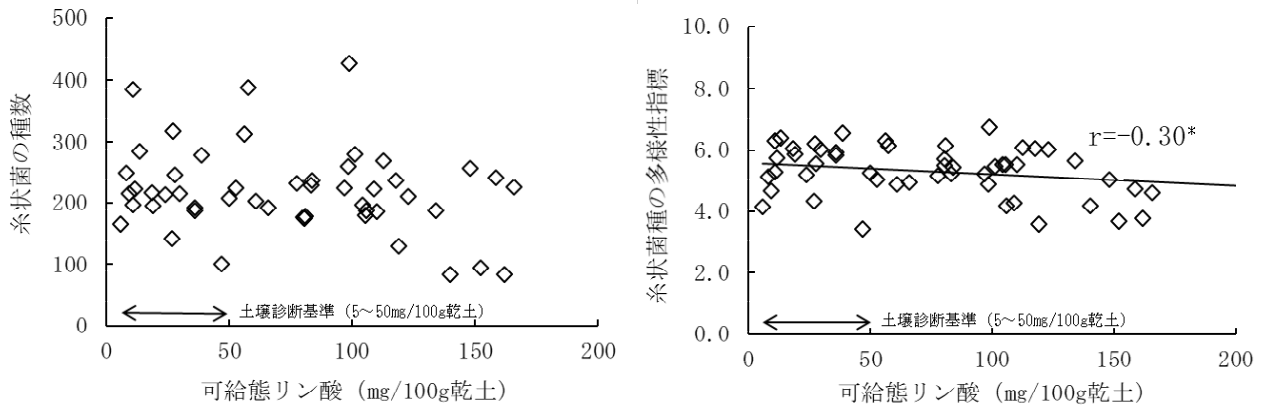


図6 有機栽培圃場における可給態リン酸と糸状菌の種数および多様性指標との関係

注) *は5%水準で有意差あり

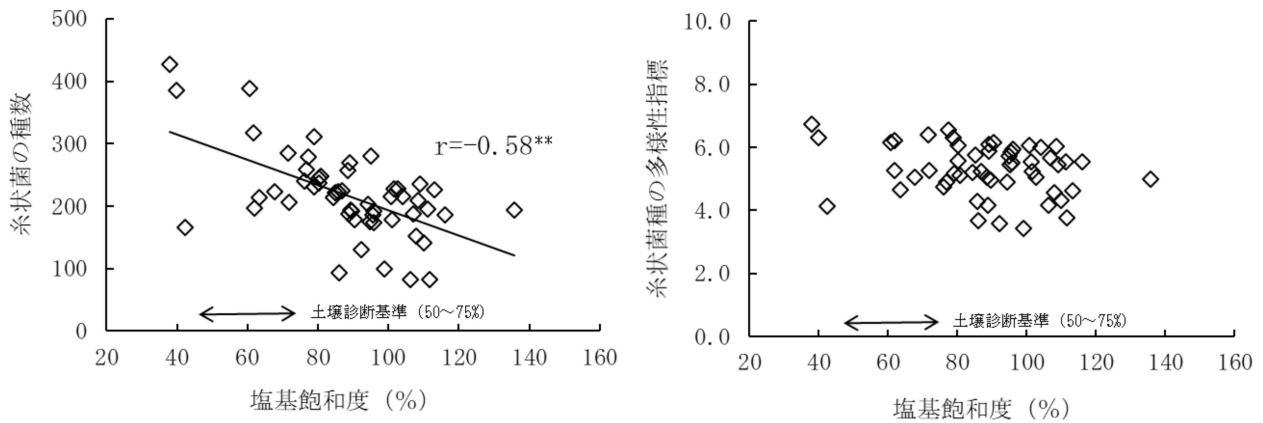


図7 有機栽培圃場における塩基飽和度と糸状菌の種数および多様性指標との関係

注) **は1%水準で有意差あり

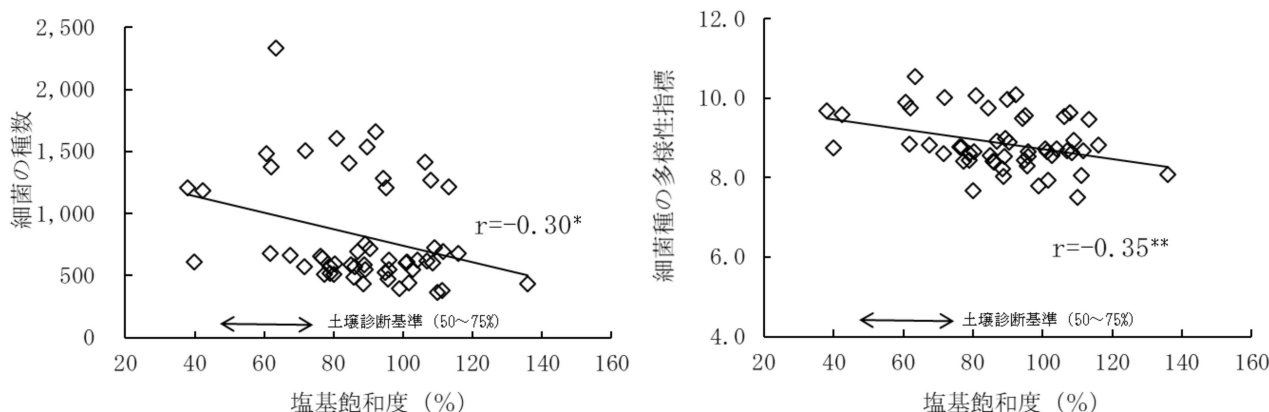


図8 有機栽培圃場における塩基飽和度と細菌の種数および多様性指標との関係
注) **は1%水準で有意差あり, *は5%水準で有意差あり

2 有機栽培開始3～4年目の圃場における土壌微生物性の推移(試験2)

(1) 土壌化学性の推移

慣行栽培区の有機物施用量は毎作牛ふん堆肥 1,000 kg/1000m² であるのに対して、有機栽培区は毎作、牛ふん堆肥 2,000 kg/1000m² と鶏ふん堆肥 500 kg/1000m²、さらに秋冬作は油かす 200 kg/1000m² を施用した(表1)。これにより有機栽培区の土壌化学性はすべての調査項目で慣行栽培区に比べて高く推移し、5作目以降、有機栽培における露地野菜の土づくり指標の可給態窒素 5 mg/100g 乾土、可給態リン酸 30 mg/100g 乾土⁴⁾ を上回った(表3)。

(2) 土壌からの抽出DNA量およびATPの比較

土壌からの抽出DNA量は、5作から8作のすべての作型および品目において、有機栽培区、慣行栽培区、無作付区の順に多くなった(図9)。また、土壌からの抽出DNA量とATPには正の相関が認められ、ATPも有機栽培区、慣行栽培区、無作付区の順に多くなった(図10)。さらに、土壌からの抽出DNA量と、土壌の肥沃度の指標である可給態窒素や全炭素とも正の相関が認められた(図11, 12)。

(3) 土壌微生物性

ア 糸状菌の種数および多様性指標の推移

糸状菌の種数は、有機栽培区および慣行栽培区とも作付回数が増えるに従い、漸増する傾向が認められたが、無作付区でも漸増し、栽培管理の違いによる糸状菌の種数の増減への影響は判然としなかった(図13)。糸状菌種の多様性指標については、6～7作目の有機栽培区と無作付区は、慣行栽培区より高く推移したが、8作目は有機栽培区と慣行栽培区との差は認められず、糸状菌の種数と同様、栽培管理の違いによる影響は判然としな

かった(図13)。

イ 細菌の種数および多様性指標の推移

有機栽培区における細菌の種数については、5作目、6作目および8作目で慣行栽培区と無作付区より多くなったが、7作目では慣行栽培区より少なくなり、栽培管理の違いの影響は判然としなかった(図14)。細菌種の多様性指標については、有機栽培区、慣行栽培区、無作付区の順に大きい傾向であったが、いずれの栽培法でも糸状菌種の多様性指標と比較して高い値で推移し、作付年度・作型・品目による変動も小さかった(図14)。

(4) 微生物群集構造

有機栽培区、慣行栽培区、無作付区における糸状菌の群集構造については、寄与率47.1%のPCoA1と寄与率24.0%のPCoA2により各々グループが形成され、細菌の群集構造についても、寄与率59.3%のPCoA1と寄与率12.9%のPCoA2により各々グループが形成された。このように、土壌微生物の群集構造は栽培管理の違いによって異なる結果となった(図15)。

(5) 有機栽培圃場で有意に生息割合が高い糸状菌属・種および細菌属・種

有機栽培区と慣行栽培区間において、生息割合に有意な差があった糸状菌については、40のOTUが観察された(データ未掲載)。このうち、有機栽培区で慣行栽培区より有意に生息割合が高く、OTUの塩基配列データにより属・種まで推定されたものは、腐生性アンモニア菌の*Ascobolus*属や腐生菌であり同属に土壤中のリン酸量に反応する種の報告¹⁰⁾がある*Cunninghamella*属など、子囊菌門(Ascomycota)の4属・種とケカビ亜門(Mucoromycota)の1属であった(表4)。

また、有機栽培区と慣行栽培区間において、生息割合に有意な差があった細菌については、242のOTUが観

察された（データ未掲載）. このうち、有機栽培区で慣行栽培区より有意に生息割合が高く、OTU の塩基配列データにより属・種まで推定されたものは、β-アミラ

ーゼを産生する *Bacillus flexus*¹⁶⁾ や多様な植物に広く共生し生育促進効果を示す根粒菌が属する *Rhizobium* 属など 22 属・種であった（表 5）.

表 3 試験区の試験開始前および跡地土壌の土壌化学性の推移

	pH (H ₂ O)			可給態窒素 (mg/100g 乾土)			T-C (乾土%)			T-N (乾土%)			可給態リン酸 (mg/100g 乾土)			塩基飽和度 (%)		
	有機	慣行	無作付	有機	慣行	無作付	有機	慣行	無作付	有機	慣行	無作付	有機	慣行	無作付	有機	慣行	無作付
試験開始前	6.0	6.0	未測定	2.4	2.1	未測定	6.04	6.19	未測定	0.36	0.37	未測定	11	9	未測定	40	36	未測定
2017秋冬作 (1作目)	6.1	5.5	未測定	3.5	1.8	未測定	6.44	6.45	未測定	0.42	0.39	未測定	18	12	未測定	45	28	未測定
2018春夏作 (2作目)	6.1	5.6	未測定	5.9	3.5	未測定	6.25	5.97	未測定	0.42	0.38	未測定	20	11	未測定	51	37	未測定
2018秋冬作 (3作目)	6.4	5.8	5.8	3.1	1.4	0.9	6.04	6.03	5.81	0.36	0.33	0.32	25	15	10	53	39	31
2019春夏作 (4作目)	6.4	5.8	5.9	4.7	2.4	2.4	6.19	6.15	5.52	0.44	0.41	0.36	23	12	8	57	39	30
2019秋冬作 (5作目)	6.4	5.7	5.6	5.6	2.9	1.1	6.39	6.15	5.78	0.42	0.38	0.35	32	16	10	68	46	32
2020春夏作 (6作目)	6.5	5.9	6.0	5.5	2.9	1.2	6.31	6.03	5.20	0.49	0.43	0.38	32	14	8	64	46	27
2020秋冬作 (7作目)	6.5	5.7	5.6	6.4	2.9	1.5	6.42	6.05	5.79	0.43	0.37	0.34	37	16	9	74	49	31
2021春夏作 (8作目)	6.6	6.0	5.9	6.0	3.4	1.2	6.44	6.08	5.59	0.47	0.40	0.36	42	16	9	76	50	29

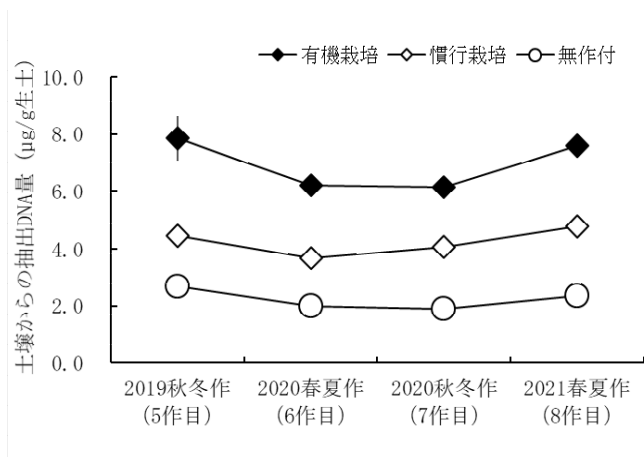


図 9 土壌からの抽出 DNA 量の推移
注) エラーバーは標準誤差を示す

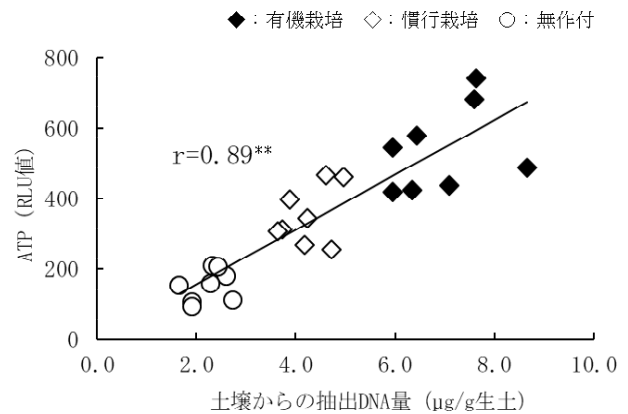


図 10 土壌からの抽出 DNA 量と ATP の関係
注) **は 1%水準で有意差あり

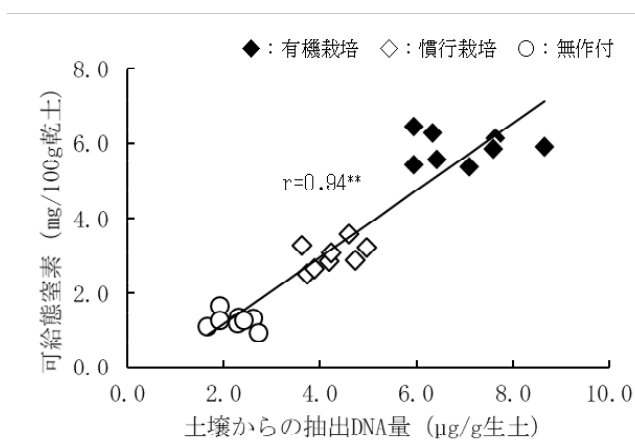


図 11 土壌からの抽出 DNA 量と可給態窒素の関係
注) **は 1%水準で有意差あり

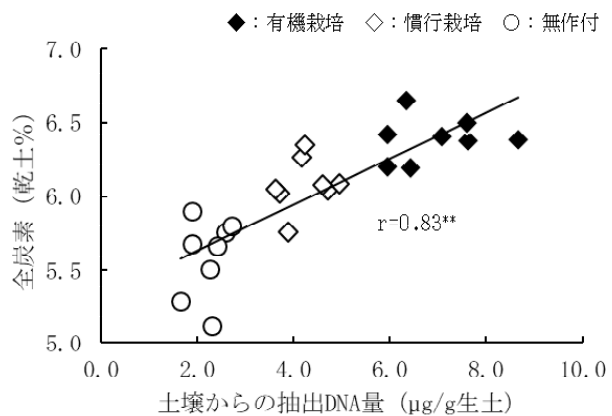


図 12 土壌からの抽出 DNA 量と全炭素の関係
注) **は 1%水準で有意差あり

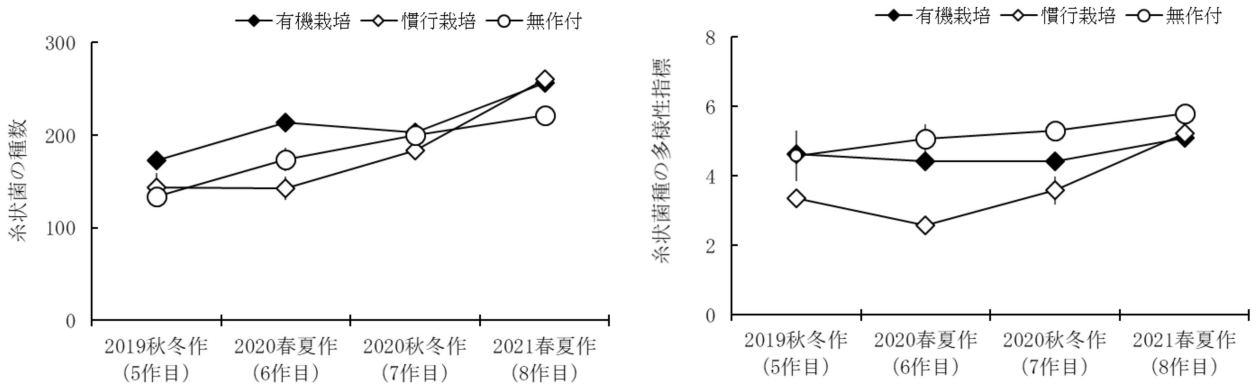


図13 糸状菌の種数および多様性指標の推移

注) エラーバーは標準誤差を示す

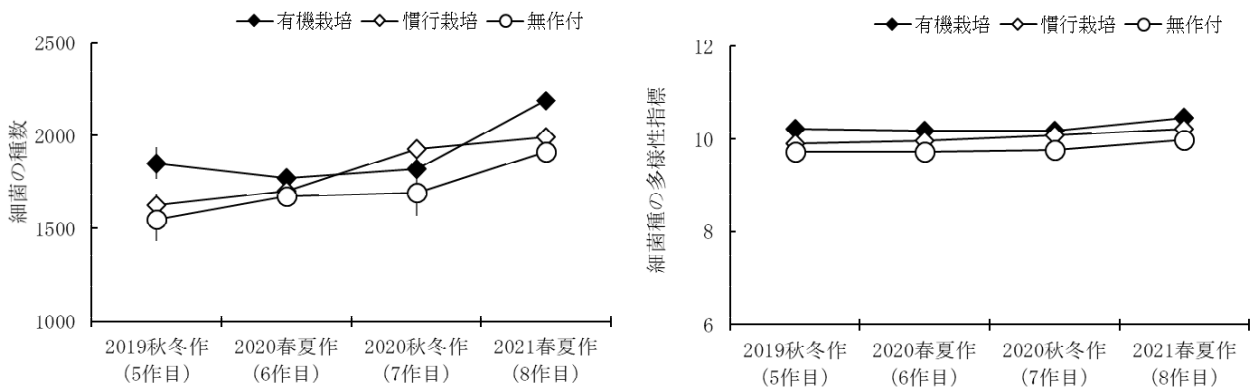


図14 細菌の種数と多様性指標の推移

注) エラーバーは標準誤差を示す

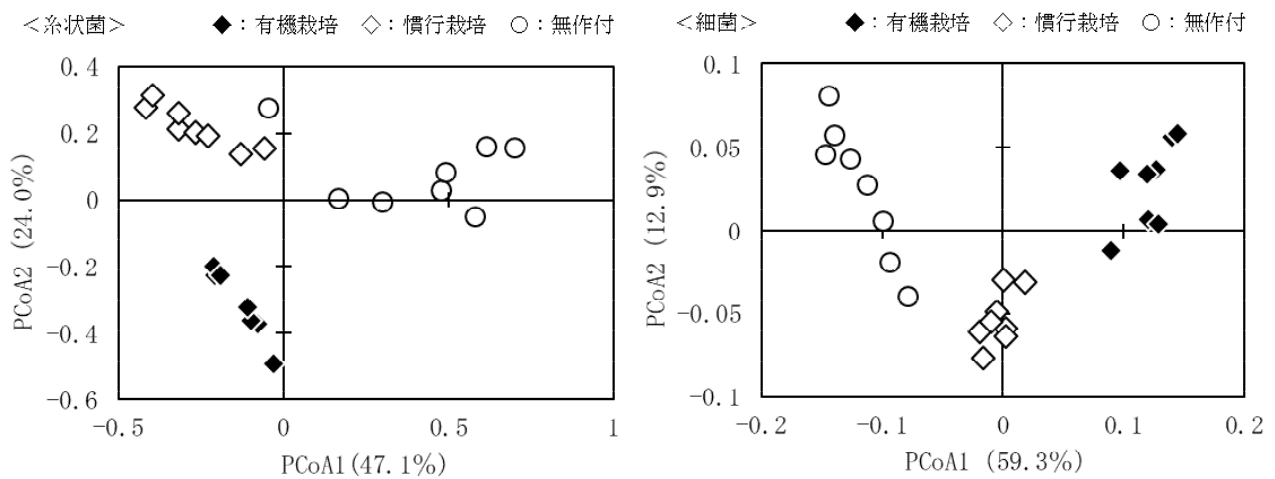


図15 主座標分析による微生物群集構造

表 4 有機栽培区で慣行栽培区より有意に生息割合が高い糸状菌属・種

門 (phylum)	綱 (class)	目 (order)	科 (family)	属 (genus)	種 (species)	生息割合 (%)			p値
						有機	慣行	無作付	
Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Sordariaceae	<i>Neurospora</i>	<i>intermedia</i>	1.763	N.D.	0.017	<0.001
	Pezizomycetes	Pezizales	Pyrenomataceae	<i>Cheilymenia</i>	<i>theleboloides</i>	3.688	N.D.	N.D.	<0.001
			Ascobolaceae	<i>Ascobolus</i>		3.436	0.182	0.050	<0.001
	Sordariomycetes	Sordariales	Lasiosphaeriaceae	<i>Cladorrhinum</i>	<i>flexuosum</i>	1.363	0.121	0.228	<0.001
Mucoromycota	Mucoromycetes	Mucorales	Cunninghamellaceae	<i>Cunninghamella</i>		1.697	0.005	0.095	<0.001

注) 生息割合は3～4年目(5作～8作)の平均

表 5 有機栽培区で慣行栽培区より有意に生息割合が高い細菌属・種

門 (phylum)	綱 (class)	目 (order)	科 (family)	属 (genus)	種 (species)	生息割合 (%)			p値			
						有機	慣行	無作付				
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Intrasporangiaceae	<i>Oryzihumus</i>	<i>leptocrescens</i>	0.208	0.109	0.079	<0.001			
				<i>Terracoccus</i>		0.210	0.118	0.078	<0.001			
			Micromonosporaceae	<i>Catellatospora</i>		0.039	0.004	0.001	0.039			
			Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>		0.224	0.140	0.137	0.003			
			Nocardioideaceae	<i>Nocardioides</i>		0.034	N.D.	N.D.	0.034			
			Streptosporangiaceae	<i>Nonomuraea</i>		0.028	N.D.	0.003	0.005			
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>		0.029	0.001	N.D.	0.037			
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>flexus</i>	0.279	0.143	0.249	<0.001			
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	<i>Gemmatimonas</i>		0.017	0.002	N.D.	0.029			
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	<i>Nitrospira</i>		1.092	0.544	0.766	<0.001			
Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae	<i>A17</i>		0.216	0.106	0.037	0.001			
				<i>Balnearmonas</i>		0.312	0.011	0.027	<0.001			
			Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	<i>Hyphomicrobium</i>		0.172	0.022	N.D.	<0.001	
						<i>Hyphomicrobium</i>		0.325	0.266	0.104	0.014	
						<i>Pedomicrobium</i>		0.402	0.190	0.151	<0.001	
			Proteobacteria			Rhodospirillaceae	<i>Rhodoplanes</i>		4.046	3.017	2.204	<0.001
							<i>Rhizobium</i>		0.100	0.010	N.D.	<0.001
							<i>Achromobacter</i>		0.014	N.D.	0.001	0.050
			Betaproteobacteria	Burkholderiales		Oxalobacteraceae	<i>Cupriavidus</i>		0.133	0.013	0.048	<0.001
						Sinobacteraceae	<i>Steroidobacter</i>		0.148	0.077	0.112	0.009
Gammaproteobacteria	Xanthomonadales		Xanthomonadaceae	<i>Thermomonas</i>		0.042	0.002	N.D.	<0.001			
				<i>Ellin506</i>		0.017	0.003	0.001	0.039			

注) 生息割合は3～4年目(5作～8作)の平均

考 察

1 有機栽培圃場における土壌化学性

県内の野菜圃場の実態調査においては、有機栽培圃場の塩基飽和度は慣行栽培圃場に比べて有意に高く、有機栽培圃場の多くが pH (H₂O)、可給態リン酸および塩基飽和度の土壌診断基準の上限を超過し、可給態窒素 5mg/100mg 乾土を上回っていた。このことは、2007 年から 2008 年に県内始良地域および大隅地域の有機栽培圃場の土壌化学性を調査した結果、pH (H₂O)、可給態リン酸および塩基飽和度が高かったとの報告⁹と一致した。また、当センターの圃場試験では、有機物の施用量

が多い有機栽培区は栽培開始3年目の5作目以降、有機栽培における露地野菜の土づくり指標である可給態窒素 5 mg/100g、可給態リン酸 30 mg/100g を上回り、測定したすべての土壌化学性の項目で慣行栽培区を上回った。これらのことから県内の有機栽培圃場では有機物が過剰に施用されている可能性があり、栽培年数が長く過剰な有機物施用を継続している圃場では pH (H₂O)、可給態リン酸および塩基飽和度の土壌診断基準の上限を超過していることが推察される。

2 有機栽培圃場における微生物バイオマス

微生物バイオマスは土壌微生物性の重要な量的指標であり、ATP の他、土壌中から細菌の DNA を抽出しその DNA 量を指標として総細菌数を測定する技術が用いられている。当センターの圃場試験においては、土壌から

⁹ 農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センター 2015. 有機農業研究の新たな展開研究会資料。

の抽出 DNA 量は、有機物の施用量が多い有機栽培区、慣行栽培区、無作付区の順に多くなり、ATP、可給態窒素および全炭素と正の相関が認められた。これは微生物バイオマスの形成には土壌への炭素源の供給が大きく関与しているとの知見⁶⁾を支持する結果であった。有機物を継続して施用する有機栽培圃場は、土壌肥沃度の指標である可給態窒素や全炭素の土壌化学性ととともに土壌微生物性の量的指標である微生物バイオマスも高まることが明らかとなった。

3 有機栽培圃場における糸状菌および細菌の種数、多様性指標

県内の野菜有機栽培圃場における糸状菌および細菌の種数、多様性指標は慣行栽培圃場と同等であった。また、当センターの有機栽培開始3～4年目の圃場試験においても、糸状菌の種数、多様性指標および細菌の種数は有機栽培区、慣行栽培区および無作付区間の違いは判然としなかった。なお、細菌の多様性指標は有機栽培区、慣行栽培区、無作付区の順に大きくなる傾向が認められたが、糸状菌種の多様性指標と比較して全区とも高い値で推移し区間の差は小さかった。これらの結果から有機物の施用が多い有機栽培圃場は慣行栽培圃場と比較して微生物バイオマスは増加するものの、糸状菌および細菌の種数、多様性指標の増加への影響は小さいことが示唆される。有機物を土壌に加えると特定の微生物群が増加するために微生物バイオマス量は増加するが微生物の種類数は減少することが多いとの報告⁹⁾がある。今回の実態調査と圃場試験の結果についても微生物バイオマスの増加は糸状菌や細菌種の種類数の増加と一致しなかった。

一方、県内の野菜の有機栽培圃場の実態調査において、pH (H₂O) 5.5～7.5ではpH (H₂O)と細菌の種数との間に、塩基飽和度40～140%では塩基飽和度と糸状菌および細菌の種数、細菌の多様性指標との間に負の相関が認められた。これらのことから高pH (H₂O)や塩基成分の過剰は土壌微生物の生息環境に悪影響を及ぼし種数の減少や多様性指標の低下を引き起こしている可能性が示唆される。このため、有機栽培圃場の土壌管理においても、定期的な土壌診断を行い、診断結果に基づいた有機物の種類や施用量を決定することが、土壌化学性だけでなく土壌微生物性のバランスを適正に維持する上で重要であると考えられる。

4 有機栽培圃場における微生物群集構造

当センターの栽培開始3～4年目の圃場の主座標分析による糸状菌および細菌の群集構造解析においては、有

機栽培区、慣行栽培区、無作付区ごとにグループが形成され各区の微生物群集構造は異なり、優占して生息する微生物種は異なることが示唆される。その要因については、有機物の施用量の違いの他、有機栽培区のみ施用した鶏ふん堆肥やなたね油かすの有機物資材の影響、慣行栽培区のD-D剤による土壌消毒の影響、pH (H₂O)や塩基飽和度等の土壌化学性の違いの影響等が考えられる。

有機栽培区で慣行栽培区より有意に生息割合が高かった *Bacillus flexus* は、米ぬかやなたね油粕を土壌に混和した培養試験においても増加する細菌種であったこと(データ未掲載)から、有機物の施用量が多い有機栽培圃場では生息割合が高くなる細菌種の一つである可能性が推察される。また、*Rhizobium* 属は、有機栽培を行った作物に共生する細菌群の一つであり堆肥の施用により生息割合が高まるとの報告⁹⁾があり、有機栽培圃場の土壌でも生息割合が高かった可能性が推察される。しかしながら、慣行栽培区と比較して有機栽培区で有意に生息割合が高かった糸状菌および細菌について、今回の次世代シーケンスにより種まで推定できたのは糸状菌3種と細菌2種と少数であった。今後、有機栽培において土壌微生物性の視点を組み入れた土づくり技術の開発にあたっては、各種有機物資材の施用が微生物群集構造に及ぼす影響、作物の生育期間を通じた微生物群集構造の推移、土壌タイプや土壌化学性と微生物群集構造との関係についてもデータを蓄積し、有機栽培圃場で生息割合が高くなる微生物種の機能解析を進める必要がある。

引用文献

- 1) Blagodatskaya EV, Blagodatskii SA and Anderson T-H, 2003. Quantitative isolation of microbial DNA from different types of soils of natural and agricultural ecosystems. *Microbiology*, 72: 744-749.
- 2) 土壌環境分析法編集委員会編 1997. 土壌環境分析法. 博友社, 東京
- 3) 橋本秀教 1981. 有機物施用の理論と応用, p. 13-128. 農文協, 東京.
- 4) 鹿児島県農政部 2020. 鹿児島県土壌管理指針
- 5) Katayama, A, Hu, y., Nozawa, M., Takahashi, S. and Fujie, K. 2002. Changes in microbial community structure in soils incorporated with the mixture of glucose and peptone with reference to respiratory quinone profile, *Soil Sci, Plant Nutr.*, 48: 841-846.
- 6) 丸本卓哉 1996. 土壌バイオマス形成と窒素フロー, 土肥誌, 67: 446-452

- 7) Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 317-322.
- 8) 日本土壌微生物学会編 2013. 土壌微生物実験法第3版: 87-94.
- 9) 農林水産省農林水産技術会議事務局研究統括官室 2013. 委託プロジェクト研究 (気候変動プロ). 有機栽培圃場における植物共生微生物の特性
- 10) Ogram, A., Sayler, G. S., and Barkay, T. 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods*, 7: 57-66.
- 11) 大島秀彦・田中漾子・三幣正巳 1964. 糸状菌による磷酸質肥料の肥効迅速測定法に関する研究, 農業技術研究所報告 B 第14号: 1-40.
- 12) 大森裕子 2017. PCR-DGGE 解析法の最適化と農地土壌の微生物群集解析に関する研究. 筑波大学大学院学位論文, 1-116
- 13) Pace, N. R., Stahl D. A., Lane D. J., and Olsen G. J. 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.*, 9: 1-55.
- 14) Pitchayapa Pholkaw, Quoc Thinh Tran, Takamitsu Kai, Taiki Kawagoe, Kenzo Kubota¹, Kiwako S. Araki, Motoki Kubo 2020. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 9: 159-176
- 15) Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., and Hajibabaei, M. 2012. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol. Ecol.*, 21: 1794-1805.
- 16) 杉田亜希子・岡田正通・谷明代・箕田正史・山口庄太郎 2011. *Bacillus flexus* 由来の耐熱性β-アミラーゼについて, 応用糖質科学 第1巻 第2号: 194-200.
- 17) Torsvik, V., Daae, F. L., Sandaa, R. A., and Øvrea^o s. L. 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.*, 64: 53-62.
- 18) Trsvik, V. L. 1980. Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biol. Biochem.*, 12: 15-21.
- 19) 浦島泰文・唐澤敏彦・中塚博子・林正紀・徳田進一 2017. ATP 測定キットを用いた簡易迅速な土壌微生物バイオマス評価法, 土肥誌, 88: 336-338
- 20) Widmer F, Rasche F, Hartman M and Fliessbach A, 2006. Community structures and substrate utilization of bacteria in soils from organic and conventional farming systems of the DOK long-term field experiment. *APPL, Soil Ecol*, 33: 294-307.

Investigation of Soil Microbial Properties in Organic Farming Fields in Kagoshima Prefecture

Tsukasa Shirao, Toshiyuki Mochida, Ryoko Aimoto, Futoshi Tojima, Mitsuo Shige and Kazuhiro Fujikawa

Summary

As a result of investigating the soil chemistry and soil microbial properties in organic vegetable fields (n=53) and conventional fields (n=10) in Kagoshima Prefecture, pH(H₂O), available phosphorus and base saturation in organic vegetable fields tended to exceed the upper limit for soil diagnostic criteria. The differences in the count of species and the diversity index of fungi and bacteria were unclear between organic vegetable fields and conventional fields. Furthermore, a negative correlation was observed in organic vegetable fields between pH(H₂O) and both the count of species and diversity index of bacteria, moreover, base saturation and the count of species of fungi and bacteria, diversity index of bacteria.

Next, we analyzed the soil microbial properties in the organic transition plots 3 to 4 years after the start of cultivation. The microbial biomass such as the amount of extracted DNA and ATP from the organic transition plots were higher than those of the conventional and non-cultivated plots. The count of species of fungi and bacteria analyzed by the next-generation sequencing, however, did not differ depending on the cultivation method. On the other hand, principal coordinate analysis revealed that the microbial community structure was different among organic transition, conventional and non-cultivated plots.

Keywords : microbial biomass, microbial community structure, organic farming, soil chemistry, soil microbial properties