

微生物培養液の散布による農作物の生育と土壤環境への影響

大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科バイオ研究部 3年 塩野 隼人

はじめに

園芸高校バイオ研究部では過去に山本がプランターを用いて菌の培養液を土壤に散布し、納豆菌の散布が作物の成長を促進する効果を確認した。しかし、農業をする上ではプランターではなく畑を使用し作物を作ることが主流であるが、畑での検証は行われておらず実際に圃場で効果があるのかははっきりとしていない。
日本の農業では、農作物を生産するために肥料や農薬を多く使用している。しかし、それには多くの経費がかかり生産性を下げている。そこで、枯草菌やT菌の培養液を畑に散布し、農作物の生育と畑の土壤環境を調べること
肥料や農薬に代わる新しい栽培技術の可能性を探る目的で実験を行った。

材料

T菌 2018年6月、雑菌混入した試験管の植物体が無菌状態のものに比べ、大きく成長する現象が発見され、バイオ研究部で保存されている(図1)
枯草菌 市販の納豆から分離させた(図2)
作物 ピーマン(トーホク育成、やわらかピーマン「緑輝」)
ダイコン(トーホク交配、春夏総とりダイコン「春夏らんまん」)
シロナ(トーホクのたね、晩生大阪しろ菜)

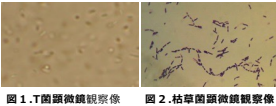


図1.T菌顕微鏡観察像

図2.枯草菌顕微鏡観察像

方法

【実験1】パイオン培地とコンソメ培地のT菌培養比較

- 1) 培地の調整。
 - ・コンソメ培地区は純水250mLに市販のコンソメ 4g 加え溶解し、pH7.2 に調整
 - ・パイオン培地区は純水250mLに肉エキス2.5g ペプトン2.5g、NaCl3.75gを加え溶解し、pH7.2 に調整
- 2) 100mL容の三角フラスコに50mLずつ分注したものを各区分5本ずつ作り、オートクレーブで121℃、15分滅菌した。
- 3) 調整した培地に白金耳でT菌を接種し、30.0℃、150rpmで24時間振とう培養した。
- 4) バクテリアカウンター用い、培養液1mL中の菌体数を計測した。

【実験2】土壌DNAの抽出法の模索とDNA抽出

- 1) 菌の付着
0.5mL容マイクロチューブの底にニードルで穴をあけた。あけた穴をフィルムでおさえ、ホウ砂0.25gを入れた。S A培地で培養した枯草菌の培養液(1,1/10,1/100,0希釈)を150μL入れた。フィルムを外し、1.5mL容チューブにはめた。遠心分離500rpm10秒で菌液を落とし、乾燥させた。
- 2) DNA抽出
乾燥させた砂を1.5mL容チューブに入れ、溶解buffer500μL加え、5秒VORTEX。95℃で10分、その後5秒VORTEXし、遠心分離12000rpm5分。上澄みを取りながらVol チェックし、3M塩酸Naをvol1%加えtapした。99.5%エチルアルコールvol2.5倍加え、15分静置し、12000rpm10分遠心分離した。
アルコールを捨て、70%エタノールアルコール500μL加えた。12000rpm5分遠心分離の後、アルコールを捨てて乾燥させる。
- 3) DNA濃度測定
乾燥させたチューブにTEbuffer20μL入れ、10分振とうし、紫外可視分光光度計で計測し、DNA量を求めた。

【実験3】培養液による作物の生育と土壤環境項目の測定

実験区分

培養液区分：無処理／培養液のみ／T菌(低濃度、中濃度、高濃度)
枯草菌(低濃度、中濃度、高濃度)
作物品種区分：ピーマン、ダイコン、シロナ
測定項目：収穫物の長さ、土壌pH、土壌EC、土壌の可給態窒素量

1.作物の生育

- 1) 培養液の準備
純水400mL、市販のコンソメ4gを溶解し、pH7.2に調整し、コンソメ培地を作成した。そのコンソメ培地にT菌を接種し、24時間振とう培養した。高濃度区は、微生物培養液500mL。中濃度区は、微生物培養液250mLと純水250mLの混合液。低濃度区は、微生物培養液50mと純水450mLの混合液を作成した。
- 2) 園芸高校バイオサイエンス科1区画縦1.2m横1mに1区画につき微生物培養液500mLを区画全体に偏りの無いように実験開始時に1回の散布した。
- 3) 週4日水をやり、8週間後に収穫し、収穫物を計測した。

2.土の準備

開始時から8週間目までの2週間毎の土を1区画につき5か所からそれぞれシャーレ1枚分を採取し、風乾させた。

3.土壌のpH、EC測定

- 1) 乾燥させた土20gと蒸留水50mLを振とうビンに入れ、30分振とうした。
- 2) 振とう終了後、pHメーター、ECメーターで測定した。

4.土壌の可給態窒素計測

- 1) リン酸バッファの作成
1. リン酸一カリウム[KH₂PO₄]9.078gを蒸留水に溶かし1Lに調整し、a液とした。
2. リン酸二ナトリウム[Na₂HPO₄]11.876gを蒸留水に溶かし1Lに調整し、b液とした。
3. a液624mLとb液976mLを混合し、リン酸バッファ1.6Lとした。
- 2) 乾燥させた土20gとリン酸バッファ100mLを振とうビンに入れた。
- 3) 2)のビンを60分振とうした。
- 4) 作成した振とう液を濾紙でろ過し、リン酸抽出液とした。
- 5) 420nmで吸光度を測定をした。
- 6) 吸光度を次式を用いて可給態窒素(mg/100mg)を算出した。
可給態窒素(mg/100 mg)=(17.41×吸光度+1.09)×1.152-0.938

参考文献

茨城県農業総合センター、平成27年3月 土壌・作物栄養診断マニュアルI 土壌分析法、p.38
山本辰真、納豆が作物に及ぼす影響
平成30年度大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科卒業論文
杉本萌唯、新しい植物生育促進細菌の発見と植物への影響
令和2年度大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科卒業論文

結果

【実験1】

パイオン培地とコンソメ培地のT菌培養比較
パイオン培地の菌体数がコンソメ培地の菌体数に比べて約20倍の差があった(表1)

表1：コンソメ培地とパイオン培地の培養比較

| 培地の種類 | 菌体数 |
|--------|----------------------|
| コンソメ培地 | 3.53×10 ⁷ |
| パイオン培地 | 7.18×10 ⁸ |

【実験2】

土壌DNAの抽出法の模索とDNA抽出

枯草菌を付着させた砂からのDNA抽出では1倍希釈(原液)では50.2μg/mLだが10倍希釈、100倍希釈、希釈なし(培地のみ)ではほとんど差が無かった(表2)

表2：枯草菌培養液の希釈倍率とそのDNA量

| 培養液の希釈倍率 | DNA量(μg/mL) |
|----------|-------------|
| 1倍(原液) | 50.2 |
| 10倍 | 7.1 |
| 100倍 | 4.9 |
| 培地のみ | 7.0 |

【実験3】

培養液による作物の生育と土壤環境項目の測定

ピーマンは、培養液の濃度が薄いほうが生育が良く、濃度が濃くなると生育が悪くなっていた(図4)
ダイコンは、微生物培養液を散布した区分は無処理区よりも生育がよくなっており、特に枯草菌高濃度区の生育が著しく良かった(図5) シロナは、微生物培養液を散布した区分で生育がよく、特にT菌の区分での生育がよくなっていた(図6)



図3：実験3で収穫したシロナ、ダイコンとピーマンの写真



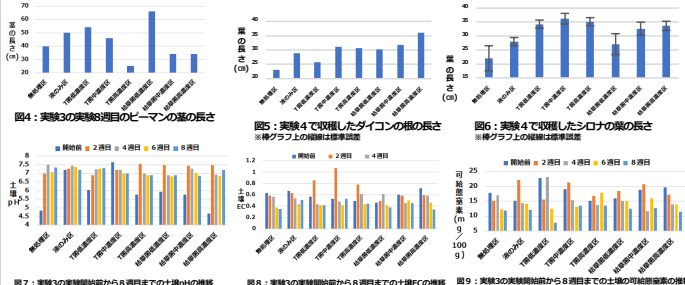
液のみ

T菌中濃度

枯草菌低濃度

枯草菌高濃度

図4：実験3で収穫したピーマン



微生物の種類と培養液の濃度によって作物の生育に差が出ており、作物によって生育に適切な微生物の種類や培養液の濃度が異なっていた。また、実験区分間の土壤環境項目の差を明らかにすることができた。また、微生物培養液を散布した区分にはその他の区分より明らかな防草効果が見られた。実験区分間の土壤環境項目の値は、最終的に土壌pHは、pH7.0前後(図7)、土壌ECは0.4前後(図8) 可給態窒素は10mg/100g前後(図9)となっていて、大きな差はなかった。

考察

【実験1】パイオン培地とコンソメ培地のT菌の培養比較では、コンソメ培地はパイオン培地に比べ、約20倍の菌体数の差があったが、コンソメ培地の試薬の量がパイオン培地よりも少なかったことが原因だと考え、試薬の量を増やせばパイオン培地の菌体数に近づくと考えた。

【実験2】培養液原液を砂に付着させると、培地のみや濃度を薄くした時よりもDNA量が増えており、濃度による差が出ることからDNA量が土壌の差を表す要素となると考える。

【実験3】培養液の作物への影響は、実験区分による生育の差が認められ、微生物培養液を散布することにより生育に差が出ていた。微生物培養液を散布することによって、各区分で生育に差が出ており、無処理区や培養液のみ区より良い生育への影響が見られた。微生物培養液にはpH、EC、可給態窒素の数値を変化させる効果はなく、単純に作物の生育の向上だけでなく、その他への影響がなく使用できる技術であると考えた。微生物の種類とその濃度による差を出すことのできる栽培実験を確立することができた。なお、一つの培養液が生育に適しているのではなく、作物の種類によって最適な培養液があった。また、生育が良くなった要因の一つとして、微生物培養液の防草効果により作物が栄養等を吸収する量が増えたからと考える。これらのことより、微生物培養液は肥料や農薬とは違う新しい栽培技術として使用することのできる可能性が高いといえる。

今後の展望

広い範囲の作物を対象にし、その作物の品種全体に効果があるのか使用した品種のみに効果があるのかを確かめたい。また、微生物の種類を増やし、効果のある微生物の範囲について明らかにしたい。