

## &lt;論文&gt;

## 宮古島の暗赤色土における土壌蓄積リンの再生・循環利用に関する基礎的研究

The Studies on Recycling and Circulation Utilizing Phosphorus Accumulated in the Dark-Red Soil of Miyako Island

前里和洋\*<sup>1</sup>, 川満芳信<sup>2</sup>, 清水芳久<sup>3</sup>, 松井三郎<sup>4</sup><sup>1</sup> 沖縄県立宮古農林高等学校環境工学科, <sup>2</sup> 琉球大学農学部生物生産科<sup>3</sup> 京都大学大学院工学研究科付属流域圏総合環境質研究センター, <sup>4</sup> 京都大学地球環境学大学院地球環境学堂Kazuhiro MAESATO\*<sup>1</sup>, Yoshinobu KAWAMITSU<sup>2</sup>, Yoshihisa SHIMIZU<sup>3</sup>, Saburo MATSUI<sup>4</sup><sup>1</sup>Okinawa Prefectural Miyako Agriculture and Forestry High School,<sup>2</sup>Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus,<sup>3</sup>Reserch Center for Environmental Quality Management, Kyoto University,<sup>4</sup>Graduate School of Global Environmental Studies Department of Technology and Ecology, Kyoto University

## Abstract

With the goal of recycling accumulated phosphorus in the dark-red soil which is made of weathered Ryukyu limestone and distributed over most of Miyako Island, Okinawa Prefecture, we conducted the study on phosphorus dissolving ability by analyzing the soil and separating and isolating phosphorus dissolving bacteria from the soil.

We asumed that the soil contains phosphorus which can be used for crops but high density of non-soluble phosphorus are accumulated in the soil.

We isolated 100 strains of phosphorus dissolving bacteria from 6 kinds of soil and tested their dissolving ability in the medium which contained non-soluble phosphate.

We selected a strain which had high phosphorus dissolving ability with the tricalcium phosphate, the phosphoric acid magnesium phosphoric acid iron and considered the best.

The bacterial strain22 which demonstrated its phosphorus dissolving ability in all phosphates was considered to produce organic acids such as lactic acid, acetic acid and succinic acid utilizing added carbon resources, and with these organic acids, the strain22 was able to solubilize phosphates.

The strain22 when it was cultured in the medium added with bagasse and molasses decreased the pH of the medium.

The strain22 was expected to grow in the pores of bagasse charcoal using bagasse and molasses as organic carbon sources and generating organic acids, while proliferating being protected within the porous bagasse charcoal.

It was considered vital to add available organic materials to the soil in order for the phosphorus dissolving bacterium strain22 to produce organic acids.

The growth of crops and absorption of phosphorus were enhanced in the tricalcium added and the strain22 with bagasse / bagasse charcoal applied field.

The result of the study implies that phosphorus dissolving bacterium such as the strain22 can facilitate solubilizing accumulated phosphorus in the soil when it was applied with organic carbon sources such as bagasse and molasses, consequently, increasing in absorption of phosphorus by crops.

**Key Words** : dark-red soil, ryukyu limestone, phosphate, recycle, groundwater, Miyako island

## 1. はじめに

沖縄県宮古島は琉球列島の南西部(北緯 24° 45' , 東経 125° 20' )に位置し、面積 158.6 km<sup>2</sup>, 周囲 114.6 km,

\*〒906-0013 沖縄県平良市下里 280 番地

TEL : 0980-72-2249 FAX : 0980-72-1296

E-mail : maesatok@open.ed.jp

平均標高 60mの平坦な隆起珊瑚礁である琉球石灰岩の台地から成り、宮古群島最大の島である<sup>1)</sup>。宮古島では雨水の48%が蒸発し、42%が地下に流出し10%が地表を流れる水の循環構造になっている<sup>2)</sup>。

宮古島は、川や湖などの水資源がなく、島では飲料水のすべてを降雨からの地下水に依存している。そのことは、地下水汚染が島民の生活および生命に直ちに影響を及ぼすことが容易に推測できる。宮古島は平坦な為農地

開発が促進され、その結果土地利用状況は約 57%<sup>3)</sup>が農耕地として活用され、特に水道水源流域における耕地率は 65%と高い<sup>4)</sup>。また宮古島の地質は多孔質の珊瑚石灰岩から成り透水性が極めて高い。宮古島においても、近代農業の象徴である化学肥料は沖縄県が日本復帰後の 1980 年代以降、急速に普及し作業の省力化および作物の生産性の向上に多大な貢献をした。しかしその代償として化学肥料が主な要因となり、島民の生活に必要な不可欠な地下水の汚染となっている<sup>5)6)</sup>。

ところで、日本にはリン資源がほとんどなく、その全てを輸入に頼っているのが現状である。しかし、世界的にリン鉱石資源の有限性が持続的な食料生産の見地から大きな問題になっている<sup>7)</sup>。宮古島のような周囲を海に囲まれた島嶼域では、島外から移入される大量の化学肥料のみに頼った施肥方法から、島内で有機物資源を循環させる目的で有機肥料を研究開発し、島の農耕地に活用した有機農業への転換は急務である。また、小さな宮古島においてバイオマスである有機資源の地域循環を促進することは環境、特に地下水への負荷の軽減にも繋がり意義があると思われる。

宮古島は亜熱帯地域に属し年間降水量も多いため、このような土壌では養分の流亡が激しく、耕地土壌では無機成分組成の不均衡をきたしている可能性がある。宮古島には珊瑚由来の琉球石灰岩を母岩とする暗赤色土の pH がアルカリ性を示すカルシウムを豊富に含有した土壌群が多く分布しており<sup>8)9)</sup>、有効土層が浅く保水力の小さい土壌が多い<sup>10)</sup>。化学肥料が普及した近年、多量のリン肥料が施用されているものの施用したリン酸の大部分が固定化によって、不可給態になってしまうのは無駄が大きいきりばかりでなく土壌中のリン酸の蓄積量を増大させる原因となっている<sup>11)</sup>。リン酸は土壌粒子に吸着されやすく、且つ難溶性リン酸塩として沈殿しやすい成分であり一般に土壌溶液中での溶解度はきわめて低い。その為多くの土壌においてリン酸が作物生産の制限因子となっていることが推定される。

宮古島の農耕地において、化学肥料として施用されるリン酸が暗赤色土に含有されている陽イオンと反応し、作物に利用されにくい形態の難溶性リンとして土壌に固定していることが推察される。ところで、土壌リンの動態には土壌微生物が関与することが知られているもののその実体については不明な点が多く、土壌蓄積リンの利用のために微生物を利用するには至っていない<sup>12)</sup>。

そこで本研究では、土壌微生物の機能を活用し、暗赤色土に含有される土壌蓄積リンを効率的に作物へ吸収させ、リンの利用率向上を目指すとともに、地下水の主な

汚染源である化学肥料の抵投入型施肥による作物栽培の可能性について検討した。

## 2. 方法

### 2.1 農耕地および林地土壌の化学性

土壌分析に供試した土壌は、農耕地の 0~30cm の作土層および林地の作物無栽培土壌を採取し、採取した土壌は風乾した後、粉碎機を用いて粉碎後、ふるい(2mm)にかけて風乾採土として分析に供した。pH は土と水が 1:2.5 の割合のサスペンションを作りガラス電極法によって測定した。EC は土と水が 1:5 の割合のサスペンションを作り EC メーターによって測定した。水抽出リン酸は、風乾採土 2.0 g を 200mL 容の三角フラスコに水 80mL を加え 1 時間振り混ぜた後、ろ液を得バナドモリブデン酸液を加え発色後吸光度を求めた<sup>13)</sup>。有効態リン酸はトリオグ法によって測定した<sup>13)</sup>。全リン酸は過塩素酸で分解抽出した液をバナドモリブデン酸により発色後、吸光度を求めリン濃度を定量した<sup>13)</sup>。なお、難溶性リンとは土壌中のリン酸が陽イオンと結合し沈殿したリン酸化合物を指し、求め方は全リン酸濃度より可給態リン酸濃度を差し引いた値を難溶性リン酸濃度とした。

### 2.2 リン溶解菌の分離

リン溶解菌の分離は土壌希釈平板法を用い、分離源は暗赤色土を供試した。200mL の三角フラスコに蒸留水 90mL を入れオートクレーブした滅菌水中へ風乾採土 10 g を添加し、往復振とう機で 10 分間振とうした。上澄み液 1mL をメスピペットを用いて合成ヒドロキシアパタイトを含有した滅菌シャーレ中へ接種した<sup>14)</sup>。これを 28°C 暗条件下にて 10 日間培養し、透明帯を形成したコロニーについて計数し、乾土 1 g 当りに換算した<sup>15)</sup>。なお、リン溶解菌とは陽イオンと結合して難溶化しているリン酸根を可溶化する微生物を指し、大別して硫化水素生成菌、硫黄酸化菌、有機酸生成菌の 3 タイプが認められている<sup>12)~15)</sup>。

### 2.3 高性能リン溶解菌の選抜

土壌より分離したリン溶解菌 100 株のリン溶解能を寒天透明帯直径測定法および寒天透明域深度測定法<sup>16)</sup>を用いて測定した。寒天透明帯直径測定法では、 $\text{PO}_4$  としての濃度が 7.5mM の  $\text{Ca}_3(\text{PO}_3)_2$ 、 $\text{FePO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  およ

び  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  を分散させたグルコース・イーストエキス培地(1.0%グルコース、0.05%酵母エキス、0.05%MgSO<sub>4</sub>、0.01%KCl および 0.01%NaCl)20mL を直径 90mm の滅菌シャーレに分注し、1 白金耳の分離株を寒天表面に接種した。寒天透明域深度測定法では、 $\text{PO}_4$  としての濃度が 7.5mM の  $\text{Ca}_3(\text{PO}_3)_2$ 、 $\text{FePO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  および  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  を分散させたグルコース・イーストエキス培地 10mL を直径 16.5mm の試験管に分注し、1 白金耳の分離株を寒天表面に接種した。28°C 暗条件下にて 14 日間培養し、シャーレではコロニーの周囲に形成された透明帯、また試験管ではコロニーの下に形成された深度を測定し、溶解したリン酸の量を計算した<sup>16)</sup>。

土壌より分離したリン溶解菌 100 株より高性能リン溶解菌として Strain22 の菌株を菌株 22 として選抜し供試菌とした。この菌株 22 を滅菌した酸生成試験用液体培地(0.02%MgSO<sub>4</sub>、0.02%KCl、0.1%(NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、0.02%酵母エキスおよび 0.5%グルコース、pH7.0)および VP 試験用(J-プロス)培地(0.5%トリプトン、1.5%酵母エキスおよび 0.5%グルコース、pH6.8)に接種し、30°C で 14 日間培養した。得られた菌株 22 の培養液をメンブランフィルターでろ過除菌した後、25mL 容量のフラスコにろ液 2.5mL を分取し、5%過塩素酸 2.5mL を加え、蒸留水で定容とした。この液を再度メンブランフィルターでろ過し、ろ液中の有機酸を高速液体クロマトグラフィー(島津 LC-10AD、カラム Shodex Ionpak C-811、移動相 3mM 過塩素酸、カラムオープン温度 60°C、移動相 1.0mL/min、反応液 1.4 mL/min、サンプル量 10  $\mu\text{L}$ 、検出器 紫外可視分光光度計 島津 SPD-6AV)で測定した。同定には、有機酸標準品として 6 種類のコハク酸、乳酸、酢酸、ギ酸、プロピオン酸および酪酸を用いた<sup>15)</sup>。

#### 2.4 リン溶解菌の大量培養の検討

リン溶解菌(菌株 22)の大量培養に供試した基本培地は、Nutrient Broth(NB: 0.1%Lab-Lemco Powder, 0.2%酵母エキス、0.5%ペプトン、0.5%塩化ナトリウム)を用い、培養液の濃度を 1/4, 1/2, 原液および 2 倍液に調整した。菌株 22 の接種方法は、合成ヒドロキシアパタイト含有平板を用いて単離し透明帯を形成したコロニーより 1 白金耳をとり滅菌水 10mL に懸濁し、その懸濁液 1mL を振とう培養器中の 250mL 中へ接種した。培養液中の最初の菌数は約  $2 \times 10^2$  CFU(Colony Forming Unit)/mL であった。培養条件は、30°C、150rpm、暗条件下で 30 日間培養し、菌の増殖を求めた。

#### 2.5 リン溶解菌の有機酸生成に対する炭素源の影響

1/2Nutrient Broth(0.03%NaCl, 0.01%酵母エキスおよび 0.03%ペプトン, pH7.0)培地に、グルコース、バガスおよび糖蜜(糖分 35%)を炭素源として添加し菌株 22 を培養した。炭素源の処理濃度は、培養液 100mL 当たり乾物として 0.01g, 0.05g, 0.1g および 0.5g を添加した。菌株 22 の接種方法は、合成ヒドロキシアパタイト含有平板を用いて単離し透明帯を形成したコロニーより 1 白金耳をとり滅菌水 10mL に懸濁し、その懸濁液 1mL を培養液 250mL 中へ接種した。培養条件は 30°C、150rpm、暗条件下で 10 日間培養し、培養液中の pH を経時的に測定し、pH 低下を有機酸生成の指標とした。

#### 2.6 リン溶解菌のバガス炭をキャリアーとした定着性試験

リン溶解菌(菌株 22)の土壌中における安定性について測定した。1/2Nutrient Broth の培養液で  $1 \times 10^9$  CFU/mL に大量培養した菌株 22 を 105°C で 6 時間乾熱滅菌したバガス 1g 当たりおよそ  $1 \times 10^3$  CFU になるように添加定着させた。そして、炭化物であるバガス炭が菌株 22 のキャリアーとしての機能があるか否かを検討するため、大量培養した菌株 22 をバガス炭 1g 当たり  $1 \times 10^3$  CFU になるように添加定着させた。このように調整した資材を 105°C で 6 時間乾熱滅菌した暗赤色土に 3%添加し、30°C 暗条件下にて 6 ヶ月間インキュベーションした。菌数の測定は、合成ヒドロキシアパタイトを含有した培地を用い、土壌希釈平板法により透明帯を形成したコロニーについて計数し、乾土 1g 当たりに換算した。

#### 2.7 リン溶解菌含有バガス+バガス炭添加による難溶性リンの溶解と作物の生育

Table1 に示した暗赤色土の風乾採土を供試土壌として用い、8 号ポットに 3 kg 充填した。難溶性リンとして土壌 1g 当たり 1000  $\mu\text{gP}$ (P-1000 区)または 5000  $\mu\text{gP}$ (P-5000 区)相当量のリン酸三カルシウムを添加した。基肥についてはリン酸三カルシウムの添加と同時に窒素(硫安)およびカリウム(硫酸カリ)を土壌に 1g 当たりそれぞれ成分として 500  $\mu\text{g}$  全区共通に施用した。

1/2Nutrient broth の基本培地で大量培養した菌株 22 をバガスおよびバガス炭(バガス 9 割: バガス炭 1 割の混合割合)の混合有機物に添加定着させた。菌株 22 添加量は、供試有機物 1g 当たり  $1 \times 10^6$  CFU で調整した

Table 1 供試土壌の化学的性質

採取地区	土壌統	栽植	pH		EC (mS/cm)	全炭素 (%)	全窒素 (%)	リン酸(P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> mg/100g 乾土)			TC/TN
			H <sub>2</sub> O	KCl				水抽出リン酸	可給態リン酸	全リン酸	
平良市	糸洲-1	林地 <sup>#1</sup>	7.08	6.81	0.05	10.03	1.01	0.7	1.8	15.7	9.9

<sup>#1</sup> 林地の作物無栽培土壌

Table 2 宮古島における採取土壌の化学的性質

採取地区	土壌統	栽植	pH		EC (mS/cm)	リン酸(P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> mg/100g 乾土)			
			H <sub>2</sub> O	KCl		水抽出リン酸	全リン酸	可給態リン酸	難溶性リン酸 <sup>#3</sup>
平良市	糸洲-1	林地 <sup>#1</sup>	6.53	5.79	0.03	0.8	13.5	1.50	12.0
平良市	糸洲-1	サトウキビ	8.04	8.01	0.27	4.1	422.6	15.9	406.7
平良市	糸洲-1	採草地・サトウキビ	8.33	7.89	0.49	3.0	628.0	13.7	604.3
平良市	糸洲-1	野菜・サトウキビ	8.06	7.35	0.12	4.5	564.8	29.4	535.4
平良市	摩文仁	果樹 <sup>#2</sup>	5.75	5.57	0.20	6.8	900.8	57.0	843.8
平良市	摩文仁	野菜 <sup>#2</sup>	8.33	7.96	0.24	7.2	666.7	52.5	614.2
平良市	摩文仁	野菜 <sup>#2</sup>	7.84	7.18	0.16	8.3	1236.9	72.5	1164.4
城辺町	摩文仁	サトウキビ	7.58	7.21	0.18	6.9	1251.5	58.9	1192.6
上野村	多良間-2	野菜 <sup>#2</sup>	5.96	5.71	0.14	7.7	1276.3	68.3	1208.0

<sup>#1</sup> 林地の作物無栽培土壌

<sup>#2</sup> 施設畑の土壌

<sup>#3</sup> 全リン酸－可給態リン酸

菌株 22 含有バガスおよびバガス炭の混合有機物を先の土壌に風乾採土 100 g 当たり 0.1g(4% 糖蜜 0.025g/100g)および 1.0g(4%糖蜜 0.25g/100g)添加した。肥料およびバガス添加後、灌水し 2 週間ガラスハウス室に放置した。この調製した土壌をよく混合した後、供試作物であるナス(品種:黒陽)の 3～5 葉期の苗を定植し、28℃のガラスハウス内にて栽培管理した。30 日間(2003 年 5 月 12 日～6 月 11 日)栽培をした後、植物全体を供試し乾物重量の測定および成分分析を行った<sup>17)</sup>。試験区は 1 試験区 1 個体 10 反復数とし、試験区の構成は Table8 に示したように設定した。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 土壌の性質とリン溶解菌数

供試土壌の性質は Table2 に示すように、pH は酸性からアルカリ性まで幅広い値を示した。また、耕地土壌では作物に利用可能な可給態リン酸は含有されているものの<sup>18)</sup>、作物に利用されにくい不溶性のリン酸が顕著に高い濃度で土壌に蓄積されていることが測定された。また、土壌採取区分ではサトウキビ栽培畑の全リン酸は 422.6mg (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100g)及び 1251.5mg(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100g)の値を示した。果樹または野菜畑の施設土壌の全リン酸は、果樹畑で 900.8mg(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100g)の値を認め、野菜畑では 666.7mg(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100g)及び 1276.3 mg(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100g)含有され高いリン酸濃度の値を示した。また、採草地とサトウキビの輪作栽培畑の全リン酸は 628.0

mg(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100g)含有され野菜などの施設土壌と同様高い値を認めた。その結果、全リン酸に対する難溶性リンの割合は 92.1%～96.2%を示した。林地の作物無栽培土壌に含有されるリン酸濃度は、他の作物栽培土壌に比べ 13.5mg(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100g)の低い値であった。このように林地の土壌に比べ農耕地の土壌に高濃度のリン酸が認められたことは、元々宮古島に存在する天然のリン酸源ではなく、化学肥料として農耕地に施用されたリン酸の大部分が暗赤色土に含有される陽イオンと反応し、土壌に蓄積されていることが推察された。Table3 に示すように合成ヒドロキシアパタイトを含有した寒天平板にコロニーの形成を認めた。採取土壌のリン溶解菌数は林地の土壌で最も多く乾土 1g 当たり 3×10<sup>5</sup> CFU であり、採草地・サトウキビ畑は 2×10<sup>2</sup>CFU、野菜・サトウキビ畑は 7×10<sup>2</sup>CFU、果樹畑は 5×10<sup>2</sup>CFU および野菜畑は 8×10<sup>2</sup>CFU であった。しかしサトウキビの連作畑では透明帯を形成したコロニーを認めなかった。その詳細な原因は不明であるが、採取したサトウキビ連作土壌では、サトウキビの収穫直後に雑草防除または病害虫駆除の目的で、サトウキビの有機物残査を燃焼させており著しく有機物投入量の少ない土壌であった。Nishio<sup>16)</sup>は、土壌中の全炭素量とリン溶解菌数の関係について調査した結果、その両者間には高い相関があることを認めており、土壌中の炭素量がリン溶解菌数を規定する最も大きな要因と推定している。また、土壌は作物残査および堆肥等が多く投入され熟畑化した土壌では、多様な微生物層を形成し量的にも増加する。そのことは、一般の微生物およびリン溶解菌が土壌中で定着し生息するためには、炭

**Table 3** 宮古島における採取土壤中のリン溶解菌数

栽植	菌数(CFU/g 乾土)
林地 <sup>#1</sup>	3×10 <sup>5</sup>
サトウキビ	-
採草地・サトウキビ	2×10 <sup>2</sup>
野菜・サトウキビ	7×10 <sup>2</sup>
果樹 <sup>#2</sup>	5×10 <sup>2</sup>
野菜 <sup>#2</sup>	8×10 <sup>2</sup>

<sup>#1</sup> 林地の作物無栽培土壌

<sup>#2</sup> 施設畑の土壌

**Table 4** 分離リン溶解菌の難溶性リン酸塩(Ca, Fe 及び Mg 塩) に対する溶解能(14日間培養(28°C))

リン溶解量 (mg)	菌株数		
	Ca	Fe	Mg
0	32	98	43
<0.1	48	2	38
0.1-0.5	12		16
0.5-1.0	8		3
1.0-1.5			
>1.5			
全分離株数	100		

**Table 5** 高性能分離株の難溶性リン酸塩(Ca, Fe 及び Mg 塩) に対する溶解能(14日間培養(28°C))

分離株	リン溶解量 (mgP)		
	Ca	Fe	Mg
菌株 8	0.7	0.1	0.3
菌株 9	0.8	0.0	0.6
菌株 26	0.8	0.0	0.4
菌株 61	0.9	0.0	0.4
菌株 22	0.9	0.1	0.5

**Table 6** 菌株 22 の培養液中の有機酸(30°C, 14日間)

使用倍数	有機酸	培養液中の有機酸 (µg/mL)	
		菌株 22	無接種培地
酸生成試験用液体培地	コハク酸	ND <sup>#1</sup>	ND
	乳酸	400	ND
	酢酸	300	ND
	ギ酸	ND	ND
	プロピオン酸	ND	ND
	酪酸	ND	ND
J-ブロス(VP試験用)	コハク酸	100	ND
	乳酸	600	ND
	酢酸	200	ND
	ギ酸	ND	ND
	プロピオン酸	ND	ND
	酪酸	ND	ND

<sup>#1</sup> ND: 検出せず(検出限界: 100µg/mL)

素化合物として多量の有機物が土壌に投入されることが重要と考えられた。これは、有機酸生成能を有するリン溶解菌を含有した有機肥料を土壌に施肥することにより、宮古島の暗赤色土に高濃度で蓄積している難溶性のリン

酸を可溶化し、作物に吸収利用できれば化学肥料の低投入型施肥技術による作物栽培が可能であることを示唆するものであった。

### 3.2 高性能リン溶解菌の選抜および大量培養

供試株 100 株のうちからリン溶解能を示した株は、リン酸三カルシウムに対して 68 株、リン酸マグネシウムに対して 57 株であったが、リン酸鉄に対しては極めて少ない 2 株にすぎなかった(Table 4)。これらのリン溶解菌の中から、リン溶解能が高く有望と思われる 1 株を選抜した。暗赤色土に含有される、土壌蓄積リンを有効利用するためには、リン酸三カルシウム、リン酸鉄およびリン酸マグネシウムのいずれのリン酸塩にも溶解能を示した菌株 22 が最も有望と考えられた(Table 5)。

供試菌株 22 の生成する有機酸を Table 6 に示した。用いた 2 種類の培地で主に乳酸と酢酸が検出された。Sperber<sup>15)</sup>は、リン溶解菌の生成する有機酸について調査した結果、乳酸、グルコール酸およびクエン酸等の生成を認めた。そのことより、菌株 22 は有機酸生成型のリン溶解菌と推定された。本菌は炭素化合物を取り組み、乳酸、酢酸およびコハク酸等の有機酸を生成し、生成した有機酸でリン酸三カルシウム、リン酸マグネシウムおよびリン酸鉄を可溶化すると考えられた。Fig.1 より、培養液濃度の如何にかかわらず、同じ菌の増殖パターンを示している。基本培地の 1/2 希釈培地でやや優れた菌数が得られ、30 日後の胞子の形成率は 8×10<sup>8</sup>CFU/mL であった。

この結果より、1/2 希釈の NB 培地で pH を中性域に保って振とう培養すれば、菌株 22 は効率よく増殖できると結論された。また、菌株 22 は 85°C, 15 分の熱処理をした結果、芽胞を形成することから耐熱性を有することが推測された。

### 3.3 リン溶解菌の有機酸生成に対する炭素源の影響

異なる炭素源を添加した培養液で菌株 22 を培養した場合の pH の経時的变化を Table 7 に示した。炭素源添加によって、いずれの場合も培養液の pH 低下が認められ、しかもその低下は添加濃度の増加とともに促進される傾向が得られた。炭素源間の比較では、易分解性のグルコース添加区で最も pH 低下度合いが大きく、次に糖蜜が続き、バガスではやや劣る pH 低下を示した。培養液の pH 低下が有機酸生成量に関連していると思定すれば、易分解性の炭素源が有機酸生成に有利と考えられる。

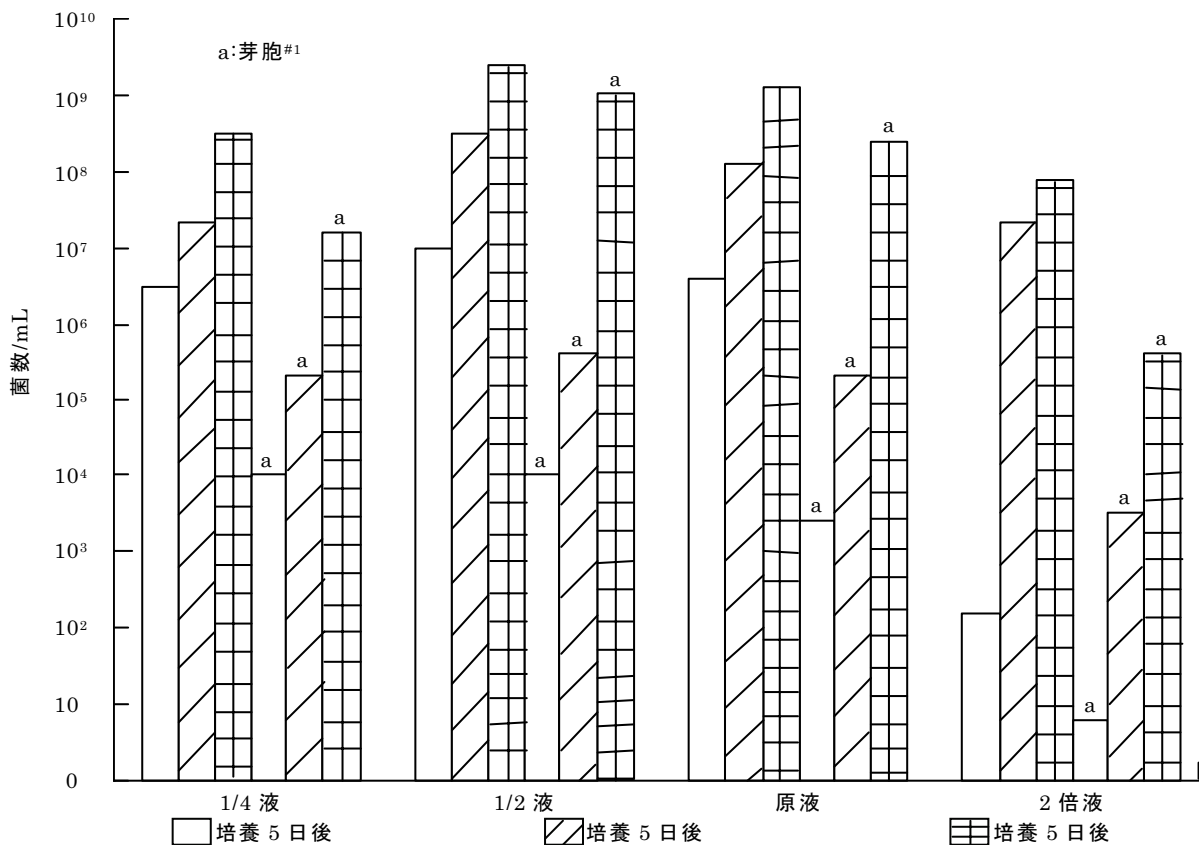


Fig. 1 菌株 22 の大量培養

しかし、バガスや糖蜜のように比較的容易に、しかも安価で入手できる炭素資材でも菌株 22 は炭素基質として利用し、有機酸を生成する能力を持っていることは興味深い。リン溶解菌である菌株 22 による有機酸生成には、多量の炭素源の供給の必要性が示唆された。

### 3.4 リン溶解菌の土壌中におけるバガス炭への定着性

菌株 22 含有バガスに含まれている菌株 22 の土壌中における定着性(生存率)について実験した結果、菌株 22

含有バガスを土壌に添加して約 4 ヶ月後から菌株 22 の数が若干下がり、6 ヶ月後では著しく下がった(Fig.2)。その原因はバガスなどの炭素源が分解され、様々な土壌要因により菌株 22 が死滅したものと考えられた。

一方、炭化物であるバガス炭に定着した菌株 22 は土壌処理 6 ヶ月後において、菌株 22 の高い定着率を認めた(Fig.2)。土壌中にそれを認めたことは、キャリアーとして用いたバガス炭はポーラス状の形状を有し、多くの細かい空隙を有する物理性に要因があると推測した。

Table 7 リン溶解菌(菌株 22)を接種した培養液の pH 変化に及ぼす各種炭素源の影響

各種炭素源	添加量 (g/100g)	pH(平均値±SE)					
		培養日数(日)					
		0	2	4	6	8	10
無添加	0	6.5±0.07	6.8±0.13	6.8±0.14	6.7±0.07	6.7±0.11	6.7±0.07
	0.01	6.5±0.13	6.5±0.07	6.3±0.07	5.0±0.07	4.8±0.11	4.7±0.09
	0.05	6.5±0.09	6.5±0.15	5.0±0.11	4.0±0.18	3.7±0.11	3.6±0.10
	0.1	6.8±0.07	6.0±0.10	4.8±0.09	4.0±0.14	3.6±0.14	3.5±0.14
	0.5	6.8±0.11	6.0±0.11	4.5±0.07	5.0±0.07	3.2±0.15	3.2±0.11
バガス	0.01	7.0±0.07	7.0±0.07	7.0±0.14	6.3±0.11	6.1±0.09	6.0±0.07
	0.05	7.0±0.11	6.9±0.07	7.0±0.07	6.0±0.08	5.7±0.07	5.6±0.08
	0.1	6.9±0.09	6.9±0.09	6.8±0.07	5.6±0.24	5.2±0.10	5.0±0.10
	0.5	6.9±0.14	7.0±0.07	6.8±0.10	5.1±0.10	4.9±0.07	4.6±0.09
	0.01	7.0±0.07	7.0±0.07	6.9±0.07	6.0±0.07	5.9±0.10	5.5±0.07
糖蜜	0.05	7.0±0.11	6.9±0.07	7.0±0.07	6.0±0.08	5.7±0.07	5.6±0.08
	0.1	6.5±0.07	6.7±0.11	6.5±0.11	4.6±0.07	4.3±0.07	3.9±0.09
	0.5	6.3±0.11	6.2±0.09	6.0±0.07	4.6±0.11	3.7±0.07	3.5±0.07

平均値±SE

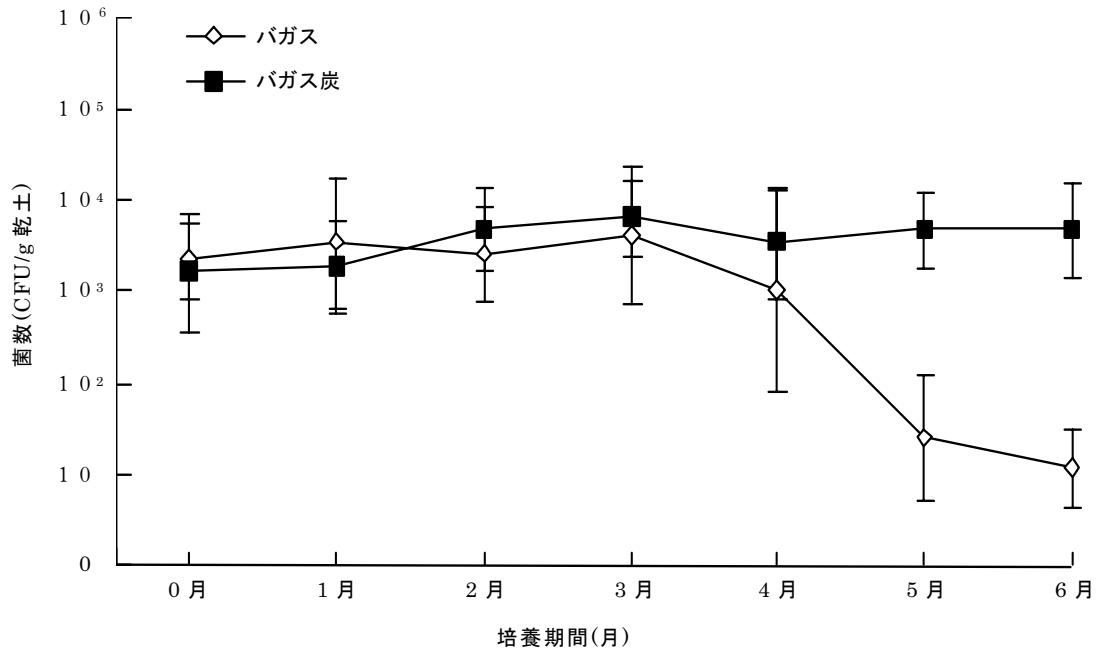


Fig. 2 バガスおよびバガス炭に付着した菌株 22 の土壤中における

### 3.5 栽培試験

収穫時のナスの乾物重およびリン吸収の調査結果を Table 8 にとりまとめ示した。その結果、バガス無施用の対照区に比べ、施用区の収量が勝っている傾向が認められた。また、菌株 22 接種区の収量は無接種区に比べ、乾物重は高くなる傾向が得られた。ナス最大の収量増はバガス 1.0%接種区で得られ、P-5000 区で対照区に対して 17%の増となっており、同無接種区はその値は 15%を示した。P-1000 区におけるバガス 1.0%接種区では、対照区に対して 18%の増となっており、同無接種区はその値は 8%を示した。ナスの生育はリン多量施用の P-5000 区が少量施用の P-1000 区に比べ優れ、有機物源であるバガス施用量は 1.0%が 0.1%に比べ勝っている傾向が認められた。ナスの生育が促進された要因と

して使用した土壌がリン肥沃土の低い暗赤色土で、しかも難溶性リン塩酸を施用したためと考えられた。すなわち、リンの供給がナスの生育を支配していたと推察した。ナスのリン含量は、生育と類似した傾向が認められ概して生育が優れた処理区で高い傾向が認められた。

以上述べた結果から、菌株 22 含有バガスによって難溶性リン酸塩が可溶化し、ナスがそのリン酸を吸収利用したことが推測された。ナスの生育促進は、この過程を通じたリン供給増に起因すると推定された。しかし、本試験はポット栽培による制限された土壌中において作物の生長に及ぼす影響をリン酸を制限因子として検討したものであり、リン溶解菌の機能をいかにしたら作物根圏で発現させるかなど、畑土壌において今後検討しなければならない課題もある。

本報は、土壌蓄積リンの利用率向上を目指し一連の基礎的な実験を試みたものであり、その方法は土壌より分

Table 8 リン酸三カルシウム添加土壌における供試菌菌株 22 含有バガス処理がナスの生育およびリン吸収に及ぼす影響

有機物源	有機物添加量 (g/100g 乾土)	供試菌 <sup>#1</sup> (菌株 22)	乾物重(g/本)		リン酸濃度(mgP/乾物)		リン吸収量(mgP/本)	
			P-1000 区	P-5000 区	P-1000 区	P-5000 区	P-1000 区	P-5000 区
無添加	0.0	-	3.7	3.9	3.41	3.75	12.7	14.8
	0.1	-	3.9	4.1	3.55	3.89	13.7	15.8
	0.1	+	4.2	4.4*	3.75	4.16	16.0	18.2
バガス <sup>#2</sup>	1.0	-	4.0	4.5*	3.81	4.00	15.2	17.9
	1.0	+	4.4*	4.6**	3.99	4.18	17.7	19.2

\*, \*\* はそれぞれ 5%および 1%レベルで有意, 他は有意でないか無検定

#1 - : 無接種, + : 接種(菌数: 供試有機物 1g 当たり 1×10<sup>6</sup>CFU)

#2 バガス+バガス炭



離したリン溶解菌のリン溶解能を指標として試験検討した。本研究の基本的な考えは、人工的に培養した微生物を外部より接種するのではなく、Table3 に示したように土着菌株としてのリン溶解菌の存在を認めている。そして、バガスおよび糖蜜等の有機物を有効に活用することにより、施肥リンの難溶化の防止および土壤蓄積リンの再利用に土着菌であるリン溶解菌の機能をいかに発現させるかにある。そのことは、良質なバイオマスであるバガスおよび糖蜜などの有機資源を宮古島の農耕地に施肥することにより、地力を高め化学肥料の抵投入型施肥技術による作物栽培の可能性について示唆した。

#### 4. 要約

沖縄県宮古島に多く分布する琉球石灰岩由来の暗赤色土に含有される土壤蓄積リンの作物への再利用による循環を目的に、土壤分析およびリン溶解菌の分離を試み、その分離株のリン溶解能について検討を加えた。耕地土壤では作物に利用可能なリン酸は含有されているものの、作物に利用されにくい不溶性のリン酸が高い濃度で土壤に蓄積されていることが推測された。6種類の土壤から100株のリン溶解菌を分離し、それら分離菌のリン溶解能を難溶性リン酸塩を含む培地で検討し、リン酸三カルシウム、リン酸マグネシウムおよびリン酸鉄に対してリン溶解能が高く有望と思われる1株を選抜した。いずれのリン酸塩に対しても溶解能を示した菌株22は、添加炭素源を利用して乳酸、酢酸およびコハク酸等を生成し、これら有機酸の作用でリン酸塩を可溶化すると考えられた。菌株22は、バガスおよび糖蜜の有機資材を添加した培養液で培養した結果、培地のpHを低下させた。菌株22は、キャリアーとして用いたバガス炭に効率よく定着することにより、バガス炭の空隙の中で生息が可能となり、バガスや糖蜜などをエサとして増殖しながら有機酸を生成し、生存に不利な土壤要因から保護されたものと推測した。土壤中においてリン溶解菌である菌株22に有機酸を生成させるためには、有機物が土壤に投入されることが重要と考えられた。リン酸三カルシウムおよび土壤に菌株22含有バガス+バガス炭を施用した土壤で作物の生育は促進されリンの吸収も高まった。したがってバガスおよび糖蜜などの易分解性の有機資材とともに、菌株22のようなリン溶解菌をバガス炭に定着し土壤に施用すると施用難溶性リン酸または土壤蓄積リンの可溶化を促進し、作物によるリンの利用率が高まること

#### [謝辞]

本研究の遂行に際しては琉球大学農学部 上野正実博士および小宮康明博士、東京農業大学宮古亜熱帯農場中西康博博士、前筑波大学農林工学系 西尾道徳博士、農業環境技術研究所 木村龍介博士および斎藤雅典博士には懇篤なるご指導を賜り、宮古広域圏事務組合 豊見山真澄氏には地下水に関する資料を提供して頂いた。そして本研究は沖縄県立宮古農林高等学校環境班の生徒達と共に取り組んだ。ここに厚く感謝の意を表する次第である。

#### [参考文献]

- 1) 沖縄県宮古支庁総務観光振興課: 宮古概観, 沖縄県宮古支庁, 1-2 (2003)
- 2) 宮古島地下水水質保全対策協議会: サンゴの島の地下水保全, 宮古広域圏事務合, 40-104(2002)
- 3) 宮古島地下水水質保全対策協議会: 宮古島地下水水質保全調査報告書, 宮古広域圏事務組合, 12(2004)
- 4) 中西康博, 池間昌克: 沖縄県宮古島の水道水源窒素の由来と森林による窒素除去能の推定, 日本土壤肥科学雑誌, 第72巻, 372-378(2001)
- 5) 中西康博, 高平兼司, 下地邦輝: 地下水窒素汚染における起源別窒素負荷率の重回帰法による測定, 日本土壤肥科学雑誌, 第72巻, 365-371(2001)
- 6) 山本洋司, 朴光来, 中西康博, 加藤茂, 熊澤喜久雄: 宮古島の地下水中の硝酸態窒素濃度と $\delta^{15}N$ 値, 日本土壤肥科学雑誌, 第66巻, 18-25(1995)
- 7) 栗原淳, 越野正義: 肥料製造学, 養賢堂, 95-143(1986)
- 8) 大屋一弘: 宮古島北東部土壤の理化学性, 沖縄農業, 14(1), 29-31(1976)
- 9) 大屋一弘: 宮古島南西部土壤の理化学性, 沖縄農業, 14(2), 33-38(1978)
- 10) 大城喜信, 浜川兼: よみがえれ土-沖縄の土壌とその改良, 新報出版, 98-105(1980)
- 11) Katznelson, H., Bose, B.: Metabolic Activity and Phosphate-Dissolving Capability of Bacterial Isolates from Wheat Roots, Rhizosphere, and Non-Rhizosphere Soil, *Can. J. Microbiol.*, Vol.5, 79-85(1959)
- 12) Sperber, J.I.: Solution of Apatite by Soil Microorganisms Producing Organic Acids, *Aust. J. Agric. Res.*, Vol. 9, No. 6, 784-787(1958)
- 13) 土壤環境分析法編集委員会: 土壤環境分析法, 博友社, 11-272(1997)
- 14) Kucey, R. M. N.: Phosphate-Solubilizing Bacteria and Fungi in Various Cultivated and Virgin Alberta Soils, *Can. J. Soil Sci.*, 63, 671-678(1983)
- 15) Sperber, J.I.: The Incidence of Apatite-Solubilizing Organisms in the Rhizosphere and Soil, *Aust. J. Agric. Res.*, Vol. 9, No. 6, 778-781 (1958)
- 16) Nishio, M.: Some Ecological Features of Phosphate-Solubilizing Microorganisms in Grassland Soils, *Proceedings of the 15th International Grassland Congr.*, 483-485(1985)
- 17) 作物分析法委員会: 栄養診断のための栽培植物分析測定法, 養賢堂, 69-72(1975)
- 18) 新田孝子, 森山高広, 池田正治: 沖縄県における主要土壌群草地のミネラル分布, 沖畜試験報, 29, 119-129(1991)

(受付 2005. 3. 4)

(受理 2005. 6. 23)