

## 水耕栽培における根粒菌を人工イクラに入れた時の効果

### Effect of adding root nodule bacteria to artificial salmon roe in hydroponics

#### Abstract

Experiments were carried out by confining the lysate of white clover root nodules and isolated rhizobia in an artificial salmon roe. It was found that the isolated rhizobia were more active in nitrogen fixation than when the root nodules were crushed. From the results, it was found that nitrogen fixation was carried out even when root nodule bacteria were confined in the artificial salmon roe. In addition, pure rhizobia were more active in nitrogen fixation than those containing impurities.

#### 1 はじめに

外来種の代表的な植物としてシロツメ草が第一に挙げられる。日本で増えている外来種を利用することは、SDGs の 15 番「陸の豊かさを守ろう」を達成できるのではないかと考えた。シロツメ草について詳しく調べていたところ、シロツメ草の根には、根粒がついていることを知った。根粒の中には根粒菌と呼ばれる窒素固定を行う働きを持つ菌が含まれている。窒素固定とは、空気中から窒素を作る作用のことで、大気中に存在する窒素分子を植物が利用しやすいアンモニアや硝酸塩に変化させることを言う。根粒菌を利用した肥料を作る際、その根粒菌を閉じ込めておく必要があるため、人工イクラで根粒菌を閉じ込めた状態でも窒素固定が行われるのか気になった。また根粒を砕いた液と、根粒菌を単離した液を人工イクラに入れて比較をし、どちらの場合がより窒素固定が行われるのかを見たいと思う。

#### 2 研究方法

シロツメ草の根から根粒菌を抽出し、以下の二つの方法から人工イクラを作った。



- ① 根粒を取り出し、乳鉢を用いてすりつぶし、根粒の粉碎液を作成する。1%のアルギン酸ナトリウム水溶液を 2g、20%の塩化カルシウム水溶液を 40g と、水 400ml を用意す

る。塩化カルシウム 40g と水を 200ml、アルギン酸ナトリウム 2g と水 200ml を混ぜ合わせる。粘性が強くて溶けにくいので、マグネットスターラーで溶かす。単離して出てきた表面の白い粘性のある液をクリーンベンチでからめとる。白い液をアルギン酸ナトリウムに混ぜ合わせたものと、根粒菌を砕いた液をアルギン酸ナトリウムに混ぜ合わせる。そして、塩化カルシウムに駒込ピペットを用いて滴下することによって閉じ込めた人工イクラが完成する。これらを茶こしでこして、水で洗い、室温 26℃で保管する。

② 選択培地 (KBM-BTB 培地) を用いて単離を行う。

(単離方法)

1 シロツメクサについている土をとり、根粒を取り出す。容器にいれて 0.8% の生理食塩水を入れる。(浸透圧の関係上で蒸留水でも問題はない。)

2 10ml がとれるループで培地に塗る。

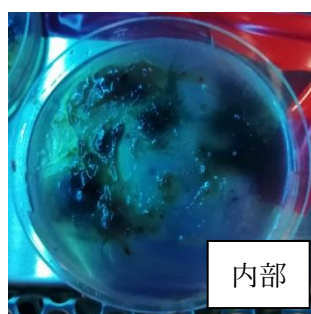
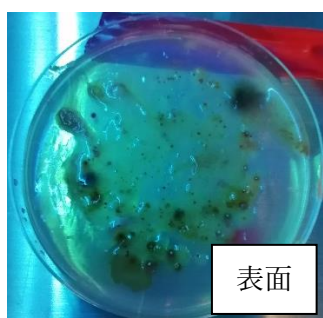
3 食塩水に殺菌剤(0.1ml の次亜塩素酸ナトリウム)を入れる。ただし、ここで周りに付着している菌がすべて死ぬとは限らない。また、根粒の内部は根粒菌だけではなく、他の菌もあるため、割合が上がる。そして、殺菌剤を取り除く。

4 食塩水を再度入れ、混ぜる。また、何度も洗わないと殺菌剤がなくならないため、この工程を 5 回ほど繰り返す。

5 再度生理食塩水を入れて、マイクロピペットの先で 4 の根粒をつぶして液を出す。

6 根粒の内部と表面に分けて、培地に塗る。

そして、二週間培養した後に培地の上澄み液を①と同様にアルギン酸ナトリウム水溶液に混ぜて人工イクラを作成する。この時、根粒菌の生育可能な温度である 26.5℃ に保つように設定する。二日間水の中に入れたのち、水の中の全窒素量を、全窒素測定\*を用いて計測する。



・上の写真は選択培地に根粒菌の粉碎液を塗り、二週間培養した後の様子である。

\*全窒素測定の方法

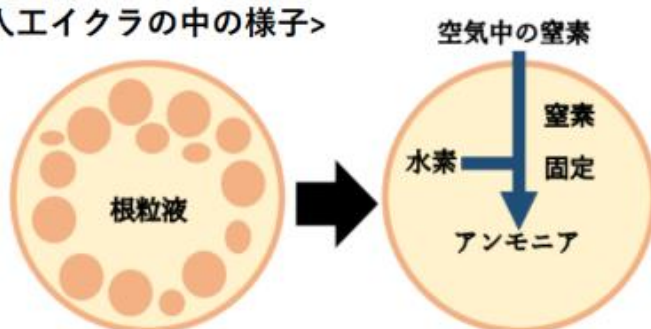
蒸留水(ここでは人工イクラを浸していた水)100ml あたり水酸化ナトリウムを 4g、ペルオキシニ硫酸カリウム 3g を混ぜる。試料 50ml あたり、水酸化ナトリウム・ペルオキシニ硫酸カリウム水溶液を 10ml 混ぜる。その後オートクレーブで加熱分解し、冷却した後上澄

み液 25ml あたり 5ml の塩酸を混ぜる。分光光度計で各液に波長 220nm の吸光度を測定する。計量線から求めた分取試料中の全窒素量 a(ブランク値で補正)から、次の式で全窒素濃度を求める「 $\bar{N}(\text{mgN/L})=a \times 60/25 \times 1000/50$ 」

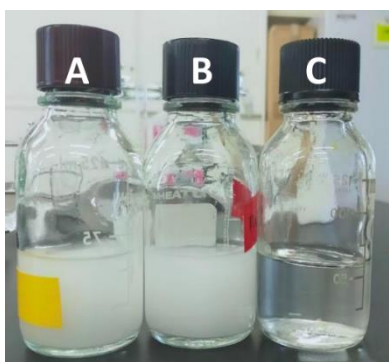
### 3 仮説

根粒菌は単独でも窒素固定を行うことができると証明されている。そのため、人工イクラの中に根粒菌を閉じ込めた時も、窒素を取り込むことができるのなら、窒素固定を行うことができると考えられる。また、単離した根粒菌を閉じ込めた人工イクラの方が、より多くの根粒菌を含むため、窒素固定が盛んにおこなわれると考えられる。

#### <予想する人工イクラの中の様子>



### 4 実験結果



全窒素測定を行う前にそれぞれの人イクラが入っていた水に水酸化ナトリウム、ペルオキシソニ硫酸カリウムを加えた結果、左の写真のように濁った。

- A→根粒の破碎液が入った人工イクラを入れた水
- B→単離した根粒菌が入った人工イクラを入れた水
- C→コントロール

これらをそれぞれ分光光度計にかけて、全窒素測定を行った。

以下の表のとおり、単離した根粒菌が入った人工イクラを入れた水のほうが、根粒の破碎液の入った人工イクラを入れた水に比べて、水中に全窒素が多く含まれていることが分かった。

| mgN/L  | 一回目 | 二回目 | 三回目 |
|--------|-----|-----|-----|
| Aの上澄み液 | 3.8 | 3.8 | 3.9 |
| Bの上澄み液 | 5.1 | 4.7 | 4.4 |

### 5 考察

まず、二通りのどの場合においても全窒素量が増えていることから、根粒菌は人工イクラに包まれていたとしても、窒素固定を行うことができると考えられる。また、単離した根粒菌が入った人工イクラを入れた水のほうが、根粒の破碎液の入った人工イクラを入れた水に比べて、盛んに窒素固定を行っているといえる。これは、単離された根粒菌の方が含まれる不純物が少ないため、より多くの根粒菌を人工イクラに包むことができたからだと考えられる。

## 6 今後の課題

今回の研究においての問題点として、試行回数が少なかったことが挙げられる。そのため、より試行回数を増やし、実験結果を正確性の高いものにする必要がある。また、何も閉じ込めていない人工イクラを使ったものを含め、対象実験を行わなければならない。また、先行研究では、土壌栽培において単離した根粒菌が窒素固定を行うことが分かっている。そのため、人工イクラに閉じ込めた根粒菌の窒素固定の働きを、水耕栽培の場合と土壌栽培の場合で調べる余地がある。

## 7 謝辞

本研究を進めるにあたって単離作業において多くのご助言をいただいた大阪教育大学の鶴沢武俊先生に感謝の意を表します。ありがとうございました。

## 8 参考文献

- ・ 根粒菌は単独で窒素固定を行うのか(仲尾華暖・2020)最終閲覧 12/16  
<https://www.hitohaku.jp/publication/book/kyousei15-p121.pdf>
- ・ 全窒素の分析 最終閲覧日 12/15  
<https://www.pref.kanagawa.jp/documents/2952/rivou06.odf>
- ・ 根粒とは 最終閲覧 11/15  
<http://www2.tokai.or.jp/seed/seed/mijika10.htm>
- ・ 根粒単離実験 最終閲覧 11/15  
<https://ameblo.jp/shokuho/entry-11592548187.html>