

沖縄県宮古島の地下水保全に関する資源循環型総合研究

**The Studies on Recycling and Circulation Resource for Protecting the Life
Sustaining of the Quality of Groundwater of Miyako Island, Okinawa**

学位論文

Doctoral Thesis

前里和洋

Kazuhiro Maesato

鹿児島大学大学院連合農学研究科

**The United Graduate School of Agricultural Sciences
Kagoshima University**

March 2016

目 次

第1章 緒 論	1
第2章 難溶性無機リン酸の賦存量に関する研究	5
第1節 農耕地および林地土壌の一般化学性	5
第3章 リン溶解菌による難溶性無機リン酸の再生・循環に関する研究	9
第1節 リン溶解菌の分離	11
第2節 高性能リン溶解菌の選抜	13
第3節 リン溶解菌菌株22の同定	16
第4節 リン溶解菌菌株22の大量培養の検討	20
第5節 リン溶解菌菌株22の有機酸生成に対する炭素源の影響	22
第6節 リン溶解菌菌株22のバガス炭を担体とした定着性試験	25
第7節 バガス炭の形態および物理性試験	27
第4章 リン溶解菌による難溶性無機リン酸の可溶化に関する研究	30
第1節 菌株22接種バガス炭とバガス混合資材施用による難溶性無機リン酸の可溶化がサラダ菜の生育に及ぼす影響(ポット試験)	30
第2節 菌株22接種バガス炭とバガス混合資材施用による難溶性無機リン酸の可溶化がナスの生育に及ぼす影響(ポット試験)	34
第3節 菌株22接種バガス炭とバガス混合資材施用による難溶性無機リン酸の可溶化がナスの生育に及ぼす影響	36
第4節 菌株22接種バガス炭とバガス混合資材施用による難溶性無機リン酸の可溶化がピーマンの生育に及ぼす影響	39
第5章 リン溶解菌による難溶性無機リン酸の可溶化に関する研究Ⅱ	42
第1節 菌株22接種バガス炭とバガス混合資材施用による難溶性無機リン酸の可溶化がサトウキビの生育および品質に及ぼす影響	43
第2節 菌株22接種バガス炭とバガス混合資材施用による難溶性無機リン酸の可溶化が株出しサトウキビの生育および品質に及ぼす影響	48

第6章 キビ酢液を活用した化学的溶解性による 難溶性無機リン酸の有効化	56
第1節 リン酸三カルシウムの溶解に対するキビ酢液処理の影響	57
第2節 サトウキビの生育および品質に及ぼすキビ酢液処理の影響	60
第7章 総合考察	67
謝 辞	71
引用文献	72
要 旨	76
Summary	79

第1章

緒 論

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、後背山地をもたない典型的な低島で、面積 158.6Km²、周囲 114.6Km、平均標高 60m(最高標高は 114.5m)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。この琉球石灰岩は、基底含礫泥質石灰岩、珊瑚石灰岩、砂質石灰岩および泥質石灰岩から成っており、基盤の島尻層群を不整合に覆っている(沖縄県総務部宮古事務所 2014)。宮古島の気候は年平均気温 23.1℃と温暖な亜熱帯性海洋気候で、年間降水量は約 2,200mm、5~6月の梅雨と8~10月頃の台風時の降雨が主な地下水源となっている。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(宮古島地下水保全対策協議会 2002)。

宮古島は、川や湖などの水資源がなく、島では飲料水のみならず、生活用水および産業用水のすべてが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%(宮古島地下水保全対策協議会 2002)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(中西・池間 2001)。また、宮古島の地質は多孔質のサンゴ石灰岩から成り透水性が極めて高い。そのため畑に施用される化学肥料由来の作物に吸収されなかった余分な硝酸態窒素が面的且つ直接的に宮古島の命の源である地下水を汚染している。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由来の硝酸態窒素によって、島民の生活に必要な不可欠な地下水が汚染されている(安元・前里 2013)。地下水に流入する窒素の由来別寄与率は、化学肥料56.5%、家畜排泄物18.6%、自然循環16.5%および生活排水8.4%と推定されている(中西ら 2001)。地下水の硝酸態窒素(NO₃-N)濃度については、水

道水水質基準値の 10 mg L^{-1} ($\text{NO}_3\text{-N}$) に準じて、公共用水域および地下水の水質の要監視項目の指針値として 10 mg L^{-1} ($\text{NO}_3\text{-N}$ および $\text{NO}_2\text{-N}$) が設定されている。現在の宮古島の硝酸態窒素濃度は $7\sim 9 \text{ mg L}^{-1}$ に上昇し、危機的状況にある（宮古島市上下水道部 2013, 山本ら 1995）。

ところで、日本にはリン資源がなく、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となっている。作物栽培上、重要な肥料三要素の内、窒素(N)は大気からの固定が可能であり、カリウム(K)はエネルギー源を必要とするものの、海水からの回収により無限の資源を持つ。これに対して肥料三要素の一つリン(P)はリン鉱石でしか生産できず資源的に限界がある。現在、リン肥料の原料となるリン鉱石の枯渇が世界的に問題とされる中、日本にはリン資源がなく、その全てを海外からの輸入に頼っている。現行の技術で採掘可能なリン鉱石資源量の耐用年数は約 100 年と推定されており、持続的な食料生産の見地から大きな問題になっている（栗原・越野 1986, 黒田ら 2005, 松八重・長坂 2012）。

宮古島は、周囲を海に囲まれた島嶼地域であり、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、島内で有機資源を循環させる目的で有機質肥料を研究開発し、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良質な有機資源の地域循環を促進することは、環境への負荷を軽減できるとともに、地下水への窒素負荷の軽減にも繋がり意義があると思われる（前里ら 2005）。

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 pH がアルカリ性を示し、カルシウムを豊富に含有した特徴を有する暗赤色土の土壌群が多く分布しており、有効土層が浅く保水力の小さい土壌が多い（大屋 1976, 1978）。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。リン酸は土壌粒子に吸着されやすく、且つ難溶性無機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おり、多くの地域で土壤中に難溶性無機リン酸として過剰に蓄積されていることが報告されている(小原・中井 2004)。

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の琉球石灰岩土壤に含有されているカルシウムと反応し、作物に利用されにくい形態の難溶性無機リン酸として、施肥リン酸の大部分が土壤に固定し、地下水への流出は僅かであることが推察される。そのことは、宮古島市の飲料水源である白川田および加治道水源流域に含有されるリン酸(PO_4^{3-})濃度は、 0.001mgL^{-1} を示しており、モニタリングによる地下水水質分析結果報告書が示している(宮古島市上下水道部 2013)。

そこで本研究では、宮古島の命の源である地下水の汚染源である化学肥料の低投入型施肥技術(LISA=Low Input Sustainable Agriculture)による作物栽培を目指し、化学肥料として多量に施用されるリン酸の利用率の向上および作物に利用されにくい形態の難溶性無機リン酸の再利用を試みた。

まず、**第 2 章**では宮古島の暗赤色土に蓄積していることが想定される難溶性無機リン酸の存在を土壤分析により検討した。ところで、土壤リンの動態には土壤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、難溶性無機リン酸の活用のために微生物を利用するには至っていない(Sperber 1958a)。そこで、**第 3 章**では難溶性無機リン酸の再生・循環の方法として、土壤微生物であるリン溶解菌の機能を活用することを目的に、宮古島に分布する暗赤色土を分離原にリン溶解菌の分離・選抜および同定を行った。また、選抜したリン溶解菌の機能性解明とともに土壤中安定性試験に担体として用いたバガス炭の形態および物理性についても検討した。

第 4 章では、土壤微生物であるリン溶解菌の機能活用による難溶性無機リン酸の可溶化について検討した。すなわち、リン溶解菌接種バガス炭とバガス混合資材施用が、暗赤色土に含有される難溶性無機リン酸化合物を可溶化し土壤中に蓄積した難溶性無機リン酸由来の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し作物の生育および品質に対する一連の実験についてポット試験および圃場試験を行った。**第 5 章**では、リン溶解菌接種バガス炭とバガス混合資材施用による難溶性無機リン酸化合物の可溶化が沖縄県の基幹作物であるサトウキビ、または栽培方法が異なる株出しサトウキビの生育および品質に

及ぼす影響について検討した。

第6章では、サトウキビの搾りかすであるバガスの炭化物であるバガス炭製造時に発生するキビ酢液を供試し、宮古島の暗赤色土に蓄積した難溶性無機リン酸の化学的溶解性による可溶化について検討した。総合考察では、微生物機能活用および化学的溶解性による難溶性無機リン酸の可溶化が作物の生育および品質向上に及ぼす影響について検討し、あわせて化学肥料の低投入型施肥技術の確立による地下水保全について考察した。

第2章

難溶性無機リン酸の賦存量に関する研究

作物栽培では作業省力化のため化学肥料の普及によって、畑作物に十分な養分供給がなされると同時に労働生産性も向上した。その反面、過度の化学肥料依存によって有機資源の投入が減少し、土壤微生物活性や土壤肥沃度の低下が懸念される（西尾 2003）。また、宮古島に分布する土壤は、特にリン酸の不足が作物生産の制限要因となっており、そのためリン酸の肥沃化は作物生産を安定的に維持するために重要である（大屋 1976）。

一方、宮古島の土壤は珊瑚虫類、海藻類等が発育堆積し、珊瑚礁が地殻変動隆起によって死滅して珊瑚石灰岩となり宮古島が形成された。その後、その岩石が長い年月の間に風化分解して、宮古島の琉球石灰岩由来のカルシウム成分を多く含有する pH が中性からアルカリ性の化学的性質の特徴をもつ暗赤色土ができた。その結果、宮古島の農耕地に施肥した化学肥料由来のリン酸が暗赤色土に含有されるカルシウムと反応し難溶化することにより、土壤に蓄積していることを想定し土壤分析を試みた。供試土壤は、宮古島の暗赤色土の土壤統として、糸州、摩文仁および多良間より、サトウキビ、採草地、野菜および果樹等、またはサトウキビと組み合わせたカボチャ栽培土壤およびサトウキビと日本そばの輪作栽培土壤を供試、作物無栽培土壤である林地の土壤と比較検討した。

第1節 農耕地および林地土壤の一般化学性

材料および方法

土壤分析に供試した土壤は、農耕地の 0~30cm の作土層および林地の作物無栽培土壤を採取し、採取した土壤は風乾した後、粉砕機を用いて粉砕後、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、風乾細土2g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。有効態リン酸はトルオグ法によって測定した。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、吸光度を求めリン酸濃度を定量した(土壤環境分析法編集委員会1997, 宮丸ら2008)。なお、難溶性無機リン酸とは土壤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(前里ら2005)。

結果および考察

供試土壌の化学的性質は第1表に示すように、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(新田1991)、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832.9mg(P_2O_5 /100g 乾土)および1005.1mg(P_2O_5 /100g 乾土)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1025.4mg(P_2O_5 /100g 乾土)の値を認め、野菜畑では1262.6mg(P_2O_5 /100g 乾土)および1301.9mg(P_2O_5 /100g 乾土)含有され高いリン酸濃度の値を示した。そして、宮古島はサトウキビ栽培と組み合わせたカボチャの露地栽培が盛んで、その輪作栽培畑の全リン酸は1252.6mg(P_2O_5 /100g 乾土)の高い値を認めた。近年、宮古島ではサトウキビと日本そばを組み合わせた作付け体系が試みられており、その輪作栽培畑の全リン酸は625.1(P_2O_5 /100g 乾土)および875.3mg(P_2O_5 /100g 乾土)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981.7mg(P_2O_5 /100g 乾土)含有され野菜などの施設土壌と同様高い値を認めた。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12.5mg(P_2O_5 /100g 乾土)の極めて低い値であった。

宮古島の地質は、平坦な隆起珊瑚礁である琉球石灰岩の台地から成り、この琉球石灰岩は、基底含礫泥質石灰岩、珊瑚石灰岩、砂質石灰岩および泥質石灰岩から成っており、基盤の島尻層群を不整合に覆っている。宮古島の土壌は珊瑚虫類、海藻類等が発育堆積し、珊瑚礁が地殻変動隆起によって死滅して珊瑚石灰岩となり宮古島が形成された。その珊瑚石灰岩が長い年月の間に風化分解して、宮古島の琉球石灰岩由来のカルシウム成分を多く含有する、pHが中性からアルカリ性の化学的性質の特徴をもつ暗赤色土が形成された。その結果、宮古島の農耕地に施肥した化学肥料由来のリン酸が暗赤色土に含有されるカルシウムと反応し、難溶化することにより土壌に蓄積していることを想定し土壌分析を試みた。供試土壌は、宮古島の暗赤色土の土壌統として、糸州、摩文仁、多良間および稲嶺より、栽植土壌はサトウキビ、採草地、施設野菜、施設果樹またはサトウキビと日本そばおよびサトウキビとカボチャの輪作栽培土壌等の栽培土壌を供試分析した。そして、作物無栽培土壌である林地の土壌と比較した。

土壌分析の結果、林地の土壌のリン酸濃度に比べ農耕地の土壌に高濃度のリン酸の存在を認めた。全リン酸に対する難溶性無機リン酸の割合は、93.2～97.3%の高い割合で土壌に蓄積していることを認めた。このように、土壌に高濃度で蓄積したリン酸を認めたことは、元々宮古島に存在する天然由来のリン酸源ではなく、化学肥料として元肥または追肥を目的に、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、土壌に蓄積されることが推察された。

大屋(1976, 1978)は、宮古島に分布する土壌は、特にリン酸の不足が作物生産の制限要因となっており、そのためリン酸の可給態化は作物生産を安定的に維持するために重要であると報告している。現在、化学肥料の価格は10年前に比較し約1.8～2.0倍の伸び率で高騰しており、収益性の低いサトウキビ農家の経営を圧迫している。化学肥料価格高騰の主な要因は、世界的にリン鉱石資源の枯渇に伴うリン酸源の輸入制限に原因がある(松八重・長坂 2012)。本試験の土壌分析において示された、宮古島の暗赤色土に大量に蓄積した難溶性無機リン酸の再利用および施肥リン酸の効率的なサトウキビへの吸収利用が可能であれば、土作りを通したリン酸の土壌循環による化学肥料の低投入型施肥技術の確立に繋がり、農家のコスト削減またはサトウキビ栽培の持続的展開および地

下水に配慮した農業が期待できる(大屋・喜納 1989, 安元・前里 2013).

第1表 宮古島における採取土壌の化学的性質

採取地区	土壌統群	土壌統	栽 植	pH		EC (mS/cm)	リン酸(P ₂ O ₅ mg/100g乾土)			
				H ₂ O	KCl		水抽出リン酸	可給態リン酸	全リン酸	難溶性無機リン酸 ^{#3}
平良	礫質暗赤色土	摩文仁	林地 ^{#1}	6.52	5.86	0.04	0.7	1.3	12.5	11.2
平良	細粒暗赤色土	糸 洲	サトウキビ:日本そば	7.23	6.99	0.28	3.8	16.7	625.1	608.4
平良	細粒暗赤色土	多良間	サトウキビ:日本そば	6.61	6.23	0.23	4.3	18.9	753.8	734.9
平良	細粒暗赤色土	糸 洲	サトウキビ:採草地	6.98	6.89	0.45	7.1	23.1	981.7	958.6
平良	細粗暗赤色土	多良間	果樹 ^{#2}	6.91	6.85	0.41	8.6	62.1	1025.4	963.3
平良	礫質暗赤色土	摩文仁	サトウキビ	6.99	6.24	0.31	3.5	24.2	832.9	799.7
城辺	細粒暗赤色土	多良間	サトウキビ:日本そば	7.73	7.29	0.27	3.3	21.9	875.3	853.4
城辺	礫質暗赤色土	摩文仁	野菜 ^{#2}	6.96	6.71	0.46	8.2	75.3	1262.5	1187.2
城辺	灰色台地土	稲 嶺	サトウキビ	8.53	8.21	0.35	4.8	29.8	888.9	859.1
下地	礫質暗赤色土	摩文仁	野菜 ^{#2}	6.86	6.48	0.56	6.7	88.1	1301.9	1213.8
下地	礫質暗赤色土	摩文仁	サトウキビ:カボチャ	7.09	6.85	0.51	7.1	62.5	1252.6	1190.7
上野	細粒暗赤色土	多良間	サトウキビ:日本そば	7.65	7.01	0.19	3.5	19.3	682.6	663.3
上野	礫質暗赤色土	摩文仁	サトウキビ	6.85	6.52	0.38	4.6	57.2	1005.1	947.9
上野	礫質暗赤色土	摩文仁	サトウキビ:日本そば	6.89	6.73	0.17	3.4	14.6	696.3	681.7

#1: 林地の土壌

#2: 施設畑の土壌

#3: 難溶性リン酸濃度は、全リン酸-可給態リン酸より求めた。

第3章

リン溶解菌による難溶性無機リン酸の再生・循環に関する研究

土壌リンの動態には微生物が関与することが知られているものの、その実態については不明な点が多い (Sperber 1958a, 1958b)。そこで、難溶性無機リン酸の溶解や植物による吸収を促進するリン溶解菌に着目し、土壌微生物の機能活用による難溶性無機リン酸を有効態リン酸として、作物が吸収利用するための基礎的知見を得ることおよび基礎的技術を確立することを目的とした。

リン溶解菌は無機の難溶性無機リン酸を溶解する微生物であり、細菌および糸状菌に属する多様な微生物が知られているが、土壌中での分布や活性化条件については不明な点が多く、農業上の利用技術はいまだ確立されていない (Alexander 1977, Kucey 1983)。リン溶解菌には大別して3つのタイプがある。第一のタイプは硫化水素生成菌である。硫化水素はリン酸根と結合している鉄等と反応して沈殿するために、リン酸根が遊離する。硫化水素によってリン酸第一鉄からは容易にリン酸根が遊離するが、鉄やアルミニウム等の二、三酸化物が共存するとリン酸根の遊離が著しく妨害される。好気条件下でも硫化水素を生成する菌は存在するが、硫化水素生成菌によるリンの溶解は嫌氣的な堪水土壤中重要と考えられる (Sperber 1958a)。

第二は硫黄を硫酸に酸化してエネルギーを獲得する硫黄酸化菌で、硫酸で無機難溶性リンを溶解する。

第三はキレート作用をもつ有機酸を生成する微生物で、有機酸が陽イオンとキレート結合するためにリン酸根を可溶化する。このタイプのリン溶解菌には各種の土壌に広汎に分布する一般的な土壌微生物が多い。細菌では *Arthrobacter* 属、*Bacillus* 属、*Pseudomonas* 属、*Escherichia* 属、放線菌では *Streptomyces* 属、糸状菌では *Penicillium* 属および *Aspergillus* 属などを中心にこれまでに多くのリン溶解菌が同定されている (Subba 1982)。リン溶解細菌には硫黄酸化細菌、硫酸還元菌、有機酸生成菌が知られているが、このうち有機酸生成菌が最も広範にかつ多数生息するので、活用できる可能性が大きい (西尾 1990)。

そこで、第 1 節ではこの有機酸生成型のリン溶解細菌を対象として、菌数・活性の調査方法を確立して、宮古島の農耕地における分布および機能発現条件を解明し、活用条件を明らかにする。

宮古島のカルシウムを多く含有する、アルカリ性土壌の暗赤色土における難溶性リン酸塩の形態は、主としてカルシウム塩、マグネシウム塩および鉄塩と推定されるので、難溶性無機リン酸を有効利用する為には、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対しても、溶解能を示すリン溶解菌の選抜が重要である。

第 2 節では、宮古島の暗赤色土を分離源に合成ヒドロキシアパタイトに溶解能を示すリン溶解菌を分離し、その中から、最も活性の高い菌株を選抜した。

著者は宮古島における土壌蓄積リンの可溶化を図るために、リン溶解菌の利用について検討してきた。その中で暗赤色土を分離源に選抜した菌の中から、有機酸生成能が高く難溶性無機リン酸の可溶化に優れる菌を選抜することに成功した（前里ら 2005）。

そこで第 3 節では、これまで未同定であったリン溶解菌の同定について検討した。特に、分子生物学的手法を用いて DNA の塩基配列を比較する方法として、菌株 22 の *16S rDNA* を *Bacillus thuringiensis* ATCC=10792 との相同性を比較検討し同定した。

土壌より分離選抜した、土壌微生物の機能を解明し実際の畑土壌において、実用化に供する場合、活用する微生物の大量培養が可能でなければ、その目的の達成は不可能である。そこで、第 4 節では暗赤色土を分離源として、選抜したリン溶解菌である菌株 22 の大量培養について液体培地の濃度を調整し検討した。

分離源である暗赤色土より選抜した、リン溶解菌が土壌中で有機酸を生成する為には、大量の可給態の炭素源がリン溶解菌の土壌への接種と同時に供給されることが必要である。そこで、第 5 節では、島内における有機物資源の地域循環を目指し、宮古島において安価で且つ大量に入手可能な炭素源について、供試したリン溶解菌である菌株 22 が資化し有機酸を生成することが可能か検討した。

暗赤色土を分離源として選抜したリン溶解菌である菌株 22 を土壌中で安定的

に定着させることは、菌株 22 の機能を発現させるためにも重要と考える。そこで、第 6 節では、菌株 22 を定着させる担体として炭化物であるバガスを炭化したバガス炭および木炭を担体(キャリアー)として菌株 22 の土壤中における定着性(生存率)について検討した。

著者は宮古島における土壌蓄積リンの可溶化を図るために、リン溶解菌の利用について検討してきた。その中で暗赤色土を分離源に選抜した菌の中から、有機酸生成能が高く難溶性無機リン酸の可溶化に優れる菌を選抜することに成功した(前里ら 2005)。しかし、菌単独で暗赤色土に接種するとリン溶解菌に関して期待した結果が得られなかった。木嶋(1994)も同様のことを報告しており、その原因は土壌に接種された微生物の住処や炭素源が十分でないため、すでに生息しているその他一般の土壌微生物との競合によって、供試した菌株の機能が発揮されないからであると推察している。

そこで著者は、リン溶解菌の効果を安定的に発現させるため、接種菌を土壌中で保護し、定着させる資材としてサトウキビ搾りかすであるバガスを炭化させた難分解性のバガス炭と、接種菌を増殖させる資材として易分解性のバガスの利用について検討してきた。その結果、これらの処理をすることで、リン溶解菌による難溶性無機リン酸の可溶化が安定して認められ、春植えサトウキビのリン吸収は高まり、生育と品質も向上した(前里ら 2006)。しかし、リン溶解菌である菌株 22 を土壌中で安定的に定着させる機能を有する担体である、バガスを炭化したバガス炭の形態および物理性については、未解明であった。そこで、第 7 節では菌株 22 の担体として用いたバガス炭の形態および物理性について調査した。

第 1 節 リン溶解菌の分離

材料および方法

リン溶解菌の分離は土壌希釈平板法を用い、分離源は暗赤色土の琉球石灰岩土壌を供試した。200mL の三角フラスコに蒸留水 90mL を入れオートクレーブを

かけた滅菌水中へ風乾採土 10 g を秤量し添加後、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 (Kucey 1983)。これを 28°C 暗条件下にて 10 日間培養し、透明帯 (クリアゾーン) を形成したコロニーについて計数し、乾土 1g 当りに換算した (Sperber 1958a)。

結果および考察

第 2 表に示すように、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 1 g 当たり 3×10^5 CFU (Colony Forming Unit) であり、採草地・サトウキビ畑は 2×10^2 CFU、野菜・サトウキビ畑は 7×10^2 CFU、果樹畑は 5×10^2 CFU および野菜畑は 8×10^2 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虫害駆除の目的で、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 (1985) 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質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となり、化学肥料由来の硝酸態窒素による地下水汚染の軽減を示唆するものであった。

第2表 宮古島における採取土壤中のリン溶解菌数

栽植	菌数(コロニー/g乾土)
林地 ^{#1}	3×10^5
サトウキビ	—
採草地・サトウキビ	2×10^2
野菜・サトウキビ	7×10^2
果樹 ^{#2}	5×10^2
野菜 ^{#2}	8×10^2

#1 林地の作物無栽培土壌

#2 施設畑の土壌

第2節 高性能リン溶解菌の選抜

材料および方法

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 (Nishio 1985) を用いて測定した。寒天透明帯直径測定法では、 PO_4 としての濃度が 7.5mM の $Ca_3(PO_4)_2$ 、 $FePO_4 \cdot H_2O$ および $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$ 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% $MgSO_4$, 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、 PO_4 としての濃度が 7.5mM の $Ca_3(PO_4)_2$ 、 $FePO_4 \cdot H_2O$ および $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$ 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 (Nishio 1985)。

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_4 , 0.02% KCl , 0.1% $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, 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-ブロス) 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 1.0 mL min^{-1} , 反応液 1.4 mL min^{-1} , サンプル量 10 μL , 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 (Sperber 1958a).

結果および考察

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 55 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 (第 3 表). 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. 暗赤色土の琉球石灰岩土壌における土壌中でのリン酸塩の形態は主としてカルシウムおよび鉄塩と推定されるので, 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 (第 4 表).

供試菌株 22 の生成する有機酸を第 5 表に示した. 用いた 2 種類の培地で主に乳酸と酢酸が検出された. Sperber (1958b) 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. 本菌は可給態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.

第3表 分離リン溶解菌の難溶性リン酸塩(Ca, Feおよび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	36
0.1-0.5	12		16
0.5-1.0	8		3
1.0-1.5			
>1.5			
全分離株数	100		

第4表 高性能分離株の難溶性リン酸塩(Ca, FeおよびMg塩)に対する溶解能(14日間培養(28°C))

分離株	リン溶解量(mg P)		
	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

第5表 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($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
		菌株22	無接種培地
酸生成試験用液体培地	コハク酸	ND ^{#1}	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

#1 ND: 検出せず(検出限界: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

第3節 リン溶解菌菌株 22 の同定

材料および方法

既報（前里ら 2005）において、宮古島の暗赤色土を分離源として分離したリン溶解菌 100 株の中から、特にリン溶解能に優れた菌株 22 系統を実験に供試した。同菌株について、形態観察、生理的性状試験および分子生物学的試験を行い（Sneath ら 1986, Hendriksen and Hansen 2002）、菌学的性質を明らかにして同定した（長谷川 1990, Vos ら 2009）。形態的特性および生理的性状試験は Sneath ら（1986）の方法によって調査した。すなわち、形態は普通寒天平面培地を用いて培養温度 30℃で 1 日間培養後、光学顕微鏡（×1000）を用いて観察した。グラム染色性は Hucker の変法（長谷川 1990）により、エタノール（99.5%）20 mL にクリスタルバイオレット 2 g を溶解した液で菌株を染色し、蒸留水 300 mL にヨウ素 1 g およびヨウ化カリウム 2 g を溶解したルゴール液で固定した後、エタノールで脱色し光学顕微鏡（×1000）により、染色性および孢子形成を観察した。運動性は試験管に分注した普通寒天斜面培地で培養温度 30℃、1 日間培養後、菌株を光学顕微鏡による形態観察（×1000）で判定した。酸素に対する反応性は、1%グルコース肉汁寒天斜面培地を用いて、培養温度 30℃で 2 日間培養後判定した。カタラーゼ反応は、スライドガラスに 3%過酸化水素液 1 滴を置き、その液中に普通寒天斜面培地で培養温度 30℃1 日間培養した 1 白金耳の菌体をつけ、気泡の発生を観察した。結晶タンパクは、普通寒天斜面培地で培養温度 30℃、1 日間培養後、スライドガラスに培養した供試菌体を滅菌水に懸濁後、風乾し火炎固定した後、5%マラカイトグリーン水溶液で染色し、80℃の乾燥機内で 1 分間加温染色後、水洗した後、0.5%サフラニン水溶液で 15 秒間染色し、水洗、乾燥後、カバーガラスをかけて余計な水分を除去した後、光学顕微鏡（×1000）を用いて、供試菌体の染色性を観察することで確認した（江崎 1993）。菌株 22 の分子生物学的同定は、依頼分析（財団法人日本食品分析センター）に供し相同性検索を行った。すなわち、DNA を抽出し PCR 法により 16S *rDNA* 領域を増幅し、塩基配列を決定した。得られた塩基配列を国際塩基配列データベース（DDBJ/EMBL/GenBank）に登録されている塩基配列および

Microseq ID Analysis Software Version 2.1 (Applied Biosystems) のデータベースと相同性検索を行った。

また、近縁種との系統樹を近縁結合法(NJ法)により作成し、菌株 22 を同定した(Vos ら 2009, 長谷川ら 1990)。

結果および考察

単離した菌株 22 の性状試験では、本菌株がグラム陽性の桿菌で、結晶タンパク形成を認め通性嫌気性を有することが示された(第 6 表)。また、光学顕微鏡観察から、栄養細胞は約 3 μm , 胞子は約 2 μm の大きさであった(第 1 図)。16S rDNA 領域の配列検索において、*Bacillus thuringiensis* ATCC=10792 との相同性が 99.85% (第 7 表)、菌株 22 は結晶タンパクが認められたことから、*B. thuringiensis* に最も近縁であることを認めた(第 2 図)。以上より、菌株 22 は、475bp の塩基配列が決定し、本菌株を *Bacillus thuringiensis* と同定した。

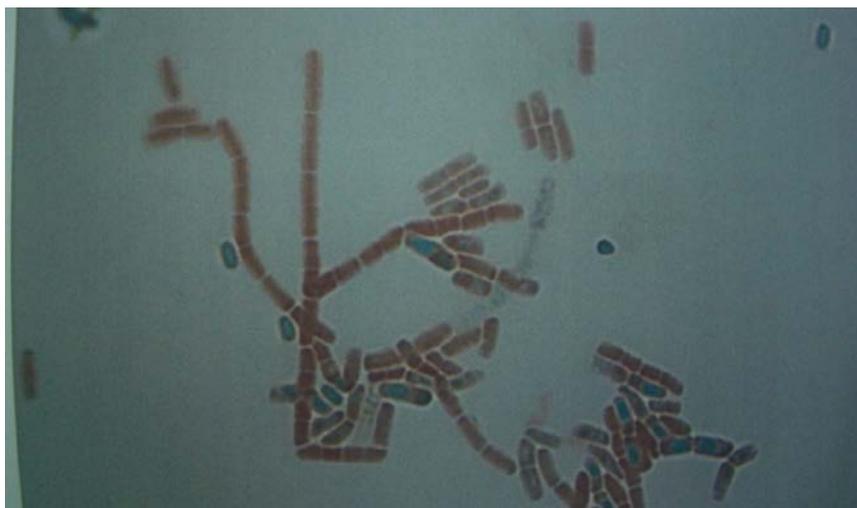
菌株 22 は、耐熱性の胞子を形成する桿菌で、一般の土壌環境に広く分布する土壌微生物である。また、菌株 22 は菌学的性状試験の結果、細胞内結晶タンパク形成能を有していた(Ichimatsu ら 2000)。渡部 (1988) は、土壌微生物の生成する結晶タンパクに病害虫に対する殺虫効果があることから、多くの農業分野で環境に配慮した微生物農薬(バイオコントロール)として実用化の可能性について報告している。今後、菌株 22 に関し土壌微生物の高度利用の観点から土壌に蓄積した難溶性無機リン酸の再利用・リンの循環に加え病害虫に対する殺虫性についても興味もたれる。

本研究では、土壌微生物であるリン溶解菌の分離源として、宮古島の暗赤色土より合成ヒドロキシアパタイトに溶解能を示すリン溶解菌の中から、最も活性の高い菌株 22 を選抜した。宮古島の Ca を多く含有するアルカリ性土壌の暗赤色土における難溶性無機リン酸塩の形態は、主として Ca 塩および Mg 塩と推定される。そこで、暗赤色土に高濃度で蓄積した難溶性無機リン酸を有効利用する為には、リン酸三カルシウムおよびリン酸マグネシウムに対し高いリン溶解能を示し、且つ難分解性のリン酸鉄およびリン酸アルミニウムのいずれのリン酸塩に対しても、菌株 22 は溶解能を示した。Nishio (1985) は、農業におけ

る作物栽培では、作業省力化のため化学肥料の普及によって、畑作物に十分な養分供給がなされると同時に労働生産性も向上したが、その反面、過度の化学肥料依存によって有機資源の投入が減少し、土壌微生物活性や土壌肥沃度の低下が懸念されることを報告している。これは、各種難溶性無機リン酸塩に対しリン溶解能を有する菌株22を含有した有機質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無機リン酸を可溶化し、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の可能性と、その必要性を示唆するものであった。

第6表 供試細菌菌株22の性状

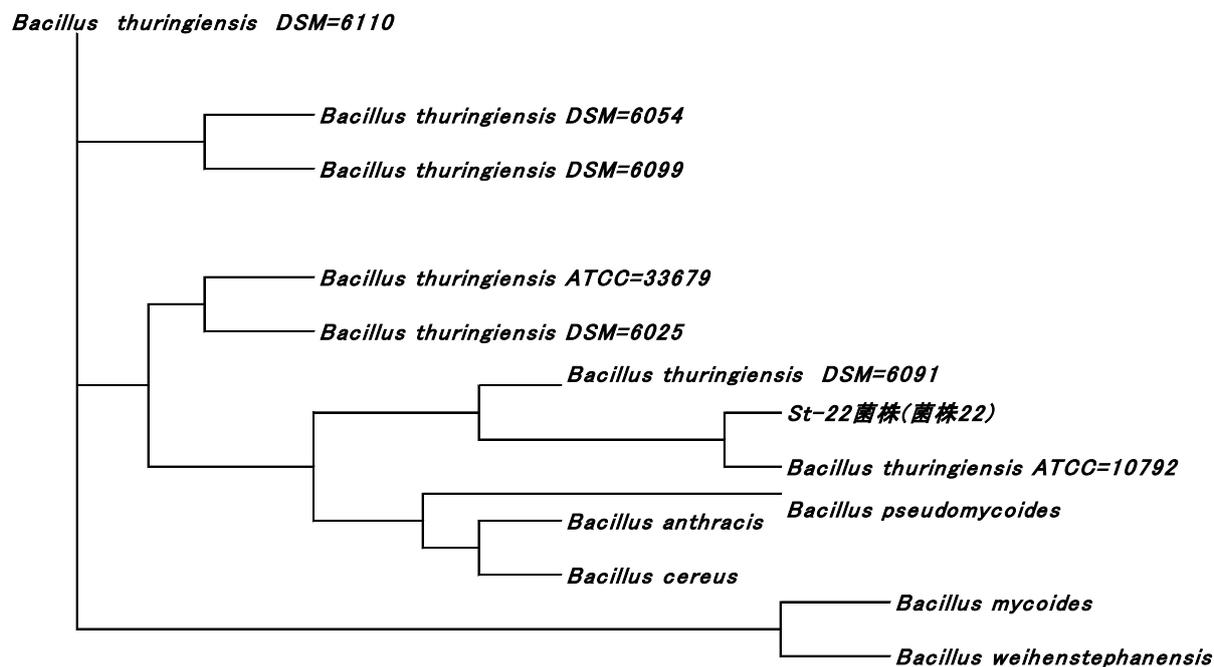
試験項目	試験結果
形態	桿菌
グラム染色性	+
孢子	+
形	楕円型
位置	亜端立
孢子	非膨出
運動性	+
酸素に対する態度	通性好気性
カタラーゼ	+
結晶タンパク	+



第1図 菌株22の栄養細胞(赤色)および孢子(青色)(×1000).

第7表 菌株22の16S rDNA相同性.

菌種	相同性(%)
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC=10792	99.85
<i>Bacillus thuringiensis</i> DSM=6091	99.72
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC=33679	99.44
<i>Bacillus thuringiensis</i> DSM=6025	99.44
<i>Bacillus anthracis</i>	99.42
<i>Bacillus cereus</i>	99.42
<i>Bacillus thuringiensis</i> DSM=6110	99.33
<i>Bacillus thuringiensis</i> DSM=6099	99.18
<i>Bacillus thuringiensis</i> DSM=6054	99.13
<i>Bacillus pseudomycooides</i>	98.74
<i>Bacillus mycooides</i>	98.58
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	98.58
<i>Bacillus herbersteinensis</i>	92.95
<i>Bacillus acidicola</i>	92.38
<i>Bacillus niabensis</i>	92.20
<i>Bacillus idriensis</i>	92.18
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	92.04
<i>Bacillus altitudinis</i>	91.88
<i>Bacillus aerophilus</i>	91.88
<i>Bacillus shackletonii</i>	91.38



第2図 菌株22とその近縁種の系統樹

第4節 リン溶解菌菌株 22 の大量培養の検討

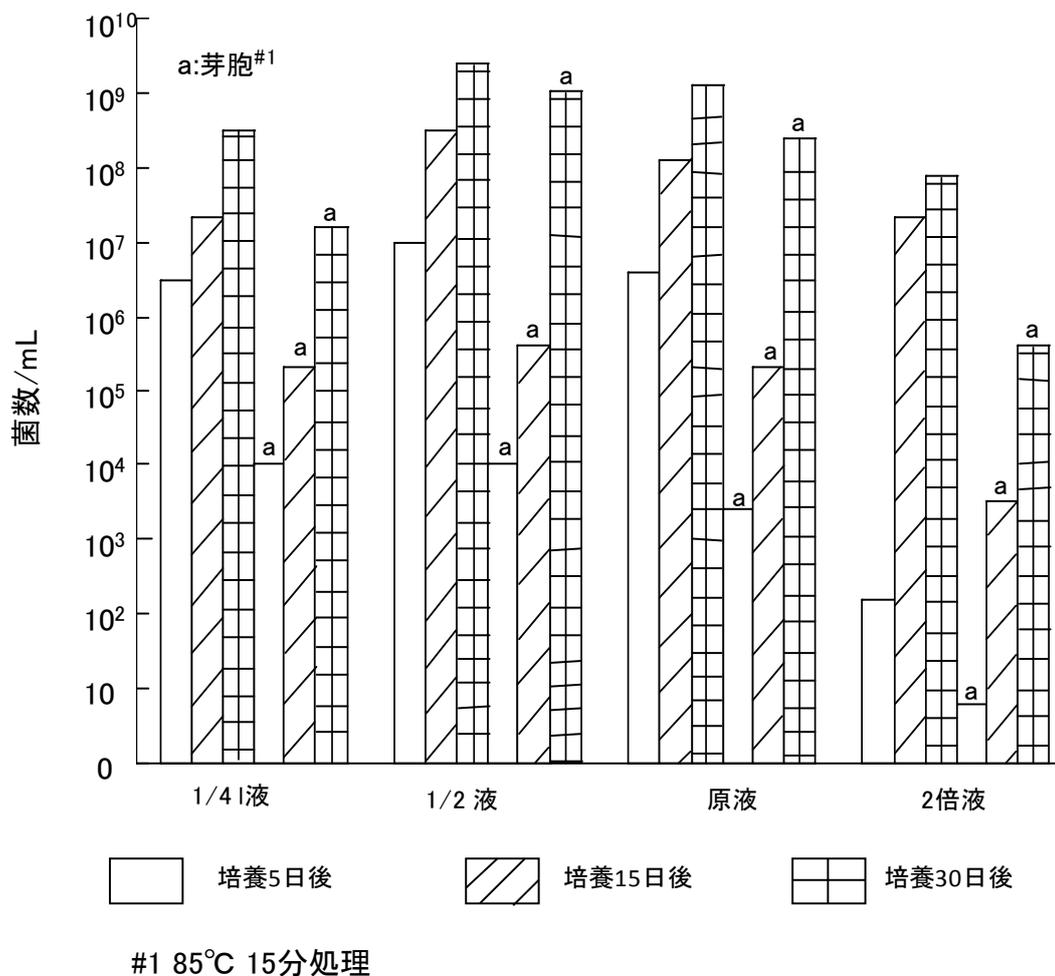
材料および方法

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 2×10^2 CFU (Colony Forming Unit)/mL であった．培養条件は，30℃，150rpm 暗条件下で 30 日間培養し，菌の増殖を求めた．

結果および考察

第3図より、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た。基本培地の1/2希釈培地でやや優れた菌数がえられ、30日後の孢子の形成率は培養液1mL当たり 8×10^8 CFU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。



第3図 菌株22の大量培養

第5節 リン溶解菌菌株 22 の有機酸生成に対する炭素源の影響

材料および方法

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 0.01, 0.05, 0.1 および 0.5g を添加した. 菌株 22 の接種方法は, ヒドロキシアパタイト含有平板を用いて純粋培養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.

結果および考察

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 の経時的变化を第 8 表および第 4 図に示した. 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想定すれば, 易分解性の炭素源が有機酸生成に有利と考えられる. 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, かなり多量の可給態の有機物の存在, そして供給の必要性が示唆された.

供試菌株 22 は用いた 2 種類の培地で主に乳酸, 酢酸およびコハク酸を生成することが検出された. Sperber (1958a) は, リン溶解菌の生成する有機酸について調査した結果, 主に, 乳酸, グルコール酸およびクエン酸等の生成を認めている. これより, 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

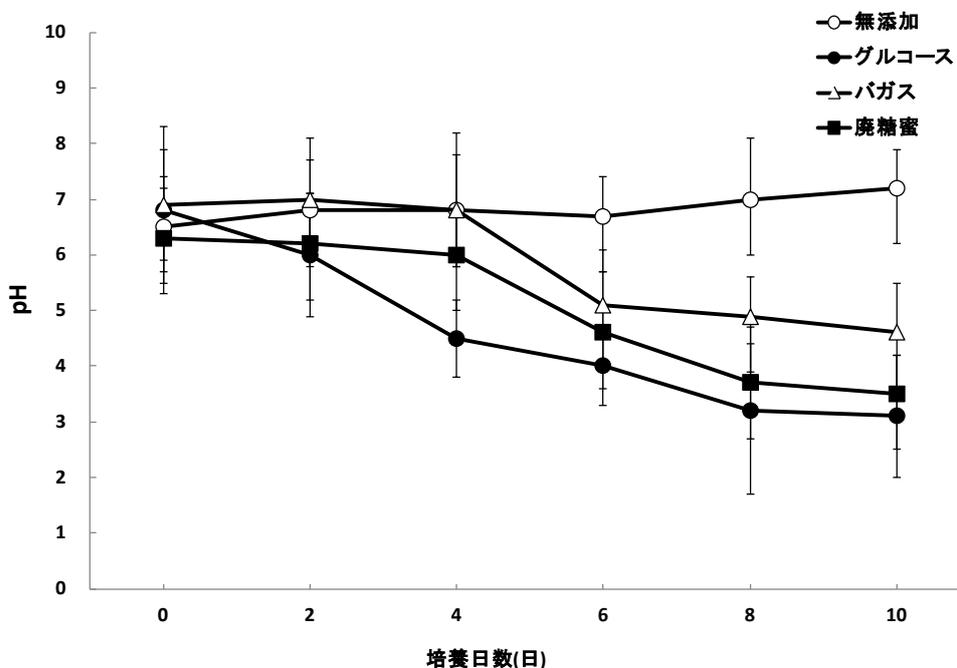
可給態炭素化合物を取り組み乳酸，酢酸およびコハク酸等の有機酸を生成し，生成した有機酸でリン酸三カルシウム，リン酸マグネシウム，リン酸鉄およびリン酸アルミニウムを可溶化した．Nishio (1985) は，土壌中の全炭素量とリン溶解菌数の関係について，両者間には高い相関があることを認めており，土壌中の炭素量がリン溶解菌数を規定する最も大きな要因と推測している．また，土壌は作物残査および堆肥等が多く投入され熟畑化した土壌では，多様な微生物層を形成し量的にも増加する．そのことは，一般の微生物およびリン溶解菌が土壌中で定着し生息するためには，炭素化合物として多量の有機物が土壌に投入され，土壌中に存在していることが重要と考えられた．即ち，分離源である暗赤色土より選抜した菌株 22 が，土壌中で有機酸を生成する為には，大量の可給態の炭素源がリン溶解菌の土壌への接種と同時に供給されることが必要である．

そこで，宮古島において安価で且つ大量に入手可能な炭素源として製糖工場の副産物であるバガスおよび廃糖蜜について，菌株 22 が資化し有機酸を生成することが可能か検討した．異なる炭素源添加によって，いずれの場合も培養液の pH 低下を認めた．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，次に廃糖蜜が続き，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想定すれば，易分解性の炭素源が有機酸生成に有利と考えられる．しかし，バガスや廃糖蜜のように比較的容易に，しかも安価で且つ島嶼内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，かなり多量の可給態有機物の存在，そして供給の必要性が示唆された．

第8表 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±10.07	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



第4図 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

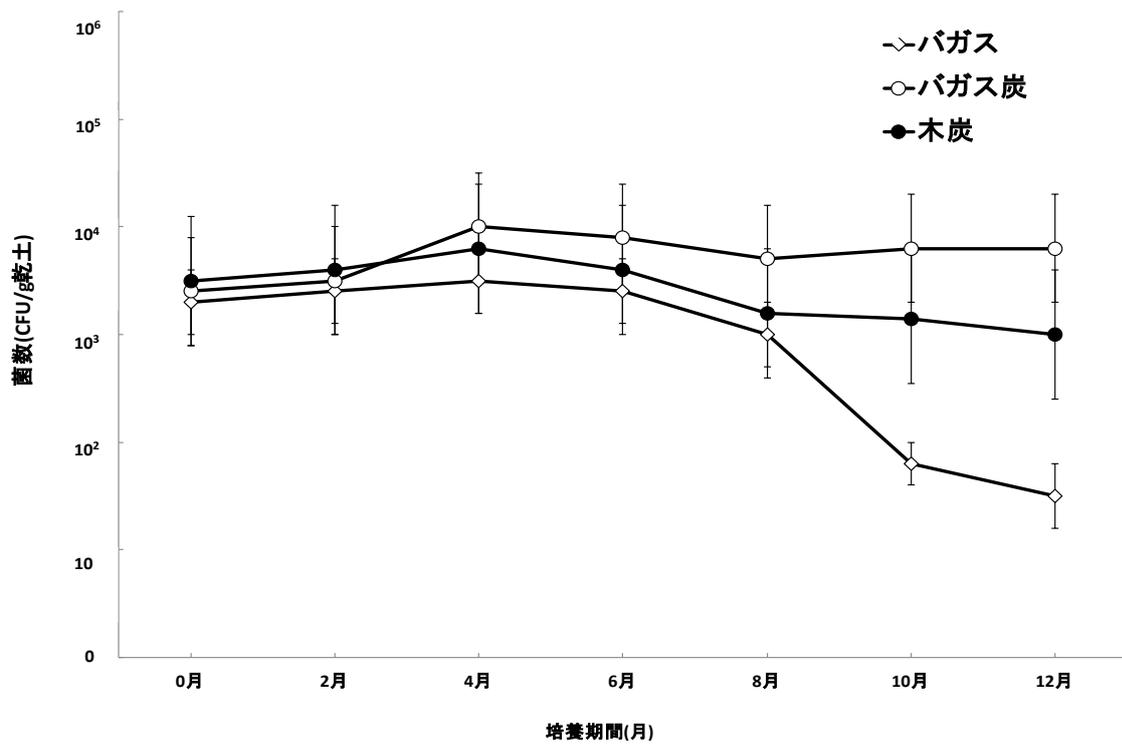
第6節 リン溶解菌菌株 22 のバガス炭を担体とした定着性試験

材料および方法

菌株 22 の土壤中における安定性について測定した。1/2 Nutrient Broth 培養液で 1×10^9 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 (2mm メッシュ) 1g 当たりおよそ 1×10^3 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 を粉碎後、2mm メッシュに調整したバガス炭 1g 当たり 1×10^3 CFU になるように添加定着させた。なお、比較対照炭化物として、木炭 1g 当たり 1×10^3 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 12 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、土壤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。

結果および考察

バガスおよび炭化物に付着した菌株 22 の土壤中における定着性 (生存率) について調べた (第 5 図)。菌株 22 含有バガスを土壤に添加して約 6 ヶ月後から菌株 22 の菌数が若干下がり、8 ヶ月後では著しく下がった。その原因はバガスなどの炭素源が分解され、様々な土壤要因により菌株 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 は土壤処理 12 ヶ月後において、高い定着率を認めた。また、炭化物の比較試験で木炭に菌株 22 を定着し土壤処理した結果、土壤に添加して約 8 ヶ月後から菌数が若干下がる傾向にあった。以上より、バガス炭は土壤中における菌株 22 のキャリアーとしての高い定着性を認めたことは、木炭に比べハニカム形状を有し、多くの細かい空隙を有する物理性に要因があり、その空隙に菌株 22 は担持することにより、様々な生存に不利な環境要因から守られたものと推測した。



第5図 菌株22の炭化物をキャリアーとした定着性試験

第7節 バガス炭の形態および物理性試験

材料および方法

菌株 22 の担体として用いた、バガス炭の空隙に関する形態観察を行った。すなわち、表面構造を走査型電子顕微鏡 SEM (JSM-6510LA, 日本電子) を用いて主に横断面を観察した。観察は、高真空で 500 倍の観察では加速電圧 10 KV, 1000 倍の観察では加速電圧 15 kV 条件で行った (川崎・松田 2008)。

バガス炭の保水性を評価するために pF 試験を行った。2 mm 篩にかけたバガス炭と圃場から採取した土壌を混合し試料とし、山根 (1986) の方法で含水比を求めた。なお、木炭 (みどり産業 (株) 製) を用いて同様の操作を行い、両者を比較した。

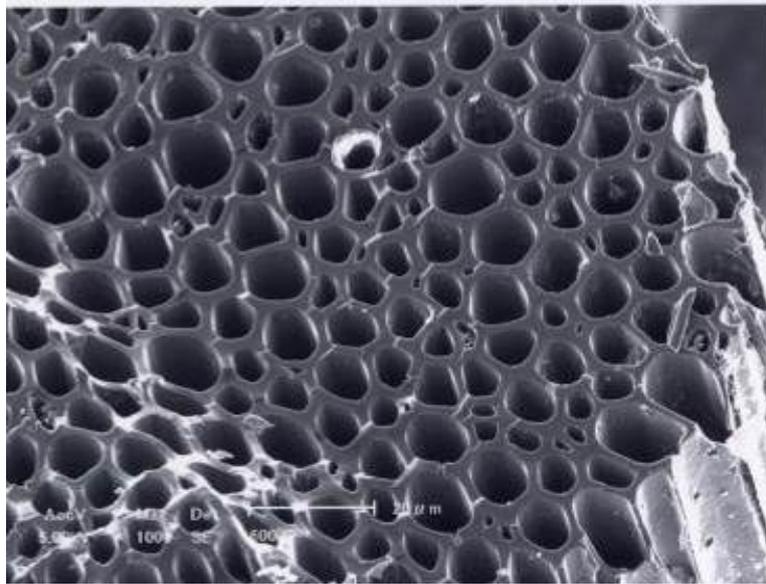
結果および考察

菌株 22 の担体として用いたバガス炭の表面構造を SEM で観察した結果、直径 10~20 μm の空隙が規則正しく配列されたハニカム構造が認められた (第 6 図)。その形状は細菌である菌株 22 の形態より大きく、同菌株を担持するのに適していたことが推察される。また、炭化物の含水比の比較として、バガス炭および木炭の pF-水分曲線を第 7 図に示した。バガス炭は作物の有効水分とされる圃場容水量 pF1.5 では含水比 480%を示し、木炭は含水比 100%を示した。また、バガス炭は作物の生長阻害水分点 pF3 では含水比 270%を示し、木炭は含水比 60%を示した。すなわち、バガス炭は木炭に比べ保水性が大きく、多量の水分を空隙に保持することが示された。このことは、菌株 22 がバガス炭の空隙で担持され、一般の土壌微生物の競合などの土壌環境に適応し生存する可能性を示唆した。

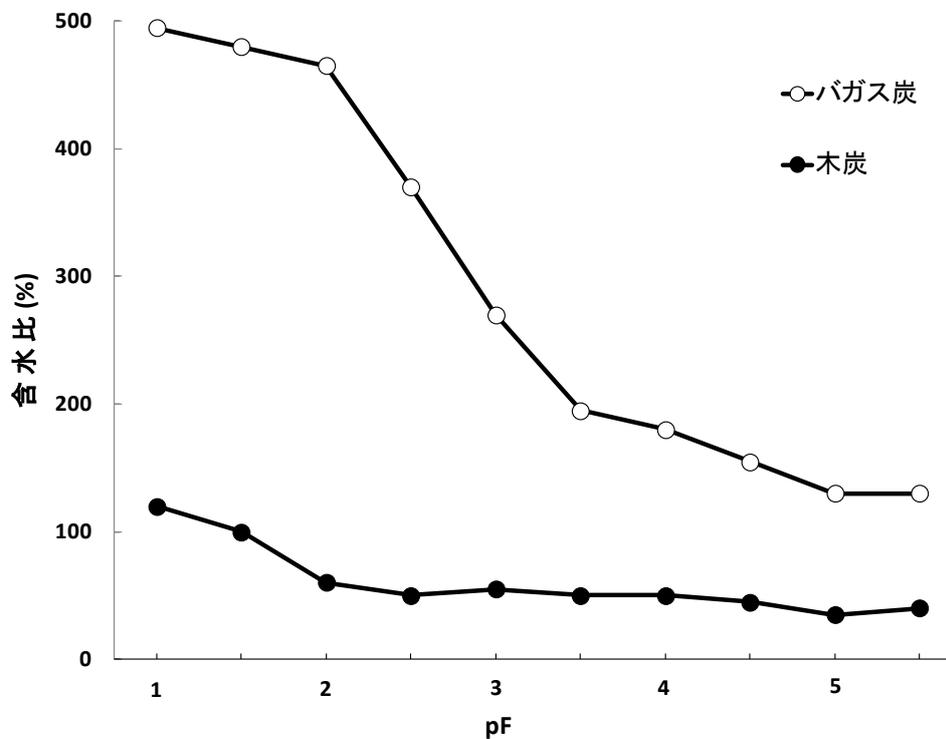
選抜したリン溶解菌菌株 22 を土壌中で安定的に定着させることは、菌株 22 の機能発現のためにも重要と考える。木嶋 (1994) は、分離源より選抜したプレートで活性の認められた菌株も生菌の状態直接土壌中に投入すると、ほとんどの場合効果が発現しないが、その要因として土壌に投入された微生物の住

処やエサがないため、すでに生息している一般の土壌微生物との競合に負けてしまい、供試微生物の機能が発揮されないからであるとしている。そこで、供試微生物を土壌へ定着させるためには、担体（キャリアー）に定着させて、これをエサと共に土壌に投入することが重要であり、その用いる担体は先住する一般の土壌微生物の栄養源とならない低栄養またはほとんど栄養源を含まない素材であることが望ましいと報告している。本研究では、菌株 22 を接種し定着させる担体としてバガス炭および木炭を住処（キャリアー）として菌株 22 の土壌中における定着性（生存率）について検討した。セルロースなどの栄養素を含有するバガスに定着した菌株 22 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死滅したものと考えられた。

一方、炭化物である木炭に定着した菌株 22 は土壌処理後、菌数は若干下がるものの顕著な低下は認められず、同じ炭化物のバガス炭に定着した菌株 22 は、土壌投入 12 ヶ月後においても高い定着率を認めた。そのことは、キャリアーとして用いた炭化物のバガス炭はほとんど栄養源はなく、またハニカム形状を有し、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。電子顕微鏡によるバガス炭の形状観察の結果、10~20 μm の気腔および空隙が規則的に配列されており、その形状は細菌である菌株 22 の形態より大きく、菌株 22 が担持するのに適していたことが推察される (Katznelson・Bose1959)。そして、炭化物である木炭およびバガス炭の pF-水分曲線よりバガス炭は木炭に比べ保水性が大きく、多量の水分を空隙に保持していることを推測し、バガス炭の組織は多くの空隙より形成されている電子顕微鏡の形態観察結果と同様であった。そのことは菌株 22 がバガス炭の空隙で担持し、一般の土壌微生物の競合など、生育に極めて困難な土壌環境に適応し生存したものと推察した。



第6図 走査型電子顕微鏡(SEM)によるバガス炭の形態観察(×1000)



第7図 バガス炭および木炭のpF水分曲線

第4章

リン溶解菌による難溶性無機リン酸の可溶化に関する研究

堆厩肥やわら類などの有機物中にはキレート作用を有する腐植酸、有機酸などが含まれている。これらの物質は前述のような作用により土壌によるリン酸肥料の固定抑制と一旦固定されたリン酸を可溶化する効果を持つことが推測される。この効果は肥沃性の低い土壌ほど観察されやすい傾向がある(山根 1989)。

そこで、宮古島の暗赤色土より分離したリン溶解菌である、菌株 22 の作物に対する効果の確認試験として、炭素源のみの施用および炭素源へ菌株 22 を接種した有機資材の施用を試みた。

第 1 節および第 2 節では、供試菌であるリン溶解菌を炭素源である、バガスに添加しリン酸肥沃度の低い暗赤色土を供試土壌とし、難溶性無機リン酸塩の溶解に対する効果を基礎的な栽培試験としてポット栽培により検討した。しかし、作物の根圏域が制限された栽培条件のポット試験のみでは、畑土壌において効果の信頼性が低いと思われた。

そこで、第 3 節および第 4 節においては、合成ヒドロキシアパタイト培地に透明帯を形成した有機酸生成菌である菌株 22 を、サトウキビの絞りかすのバガスおよび炭化物であるバガス炭に添加定着させた混合有機物を作物連作土壌に施用した。そして、リン酸源無添加または添加土壌を設定し、供試作物であるナスおよびピーマンを定植し、作物の生長、品質およびリン吸収に及ぼす影響または作物収穫後土壌中のリン酸の溶解について、圃場試験を実施した。

第 1 節 菌株 22 接種バガス炭とバガス混合資材施用による難溶性無機リン酸の可溶化がサラダ菜の生育に及ぼす影響(ポット試験)

材料および方法

供試土壌は沖縄県立宮古総合実業高等学校の第一農場内にある野菜連作畑の暗赤色土を用い、その化学的性質は第9表に示した(土壌環境分析法編集委員会1997)。供試土壌を1/5000aワグナールポットに3kg充填した。難溶性リンとして土壌1g当たり200 μ gP(0.6g/ポット:P-200)相当量のリン酸三カルシウム($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)を添加した。なお、土壌蓄積リン活用の指標としてリン酸源無添加区(P-0)を設定した。基肥は、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ の添加と同時に窒素($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)およびカリウム(K_2SO_4)を土壌1g当たりそれぞれ成分として160 μ g(0.48g/ポット)全区共通に施用した。菌株22の大量培養方法および菌株22を添加した有機物の調整方法は、基本培地として1/2 Nutrient Brothを用い、培養条件は30 $^{\circ}\text{C}$ 、150rpm、暗条件下で30日間培養した。培養30日後の菌数は培養液1mL当たり 8×10^8 CFUの孢子形成率があり、得られた芽胞を菌株22として実験に供試した。大量培養した菌株22をバガス炭に接種後、有機資材であるバガスに混合した(菌株22添加量はバガス炭1g当たり 1×10^3 CFU)(前里ら2005)。調整した菌株22含有バガス+バガス炭を土壌100g当たり0.05, 0.1, 0.5および1.0g添加した。肥料成分およびバガス添加後混合し、供試作物であるサラダ菜(品種:サンタクララ)を2008年3月10日に播種し、以降常法によって栽培管理した。なお、播種15日間後に間引きを行い、ポット当たり3個体に調整した。60日間栽培した後、生育調査および葉中リン酸濃度を測定した。試験区の構成は第10表に示した通りで、1区3連制で行った。

結果および考察

収量調査、葉中リン酸濃度およびリン吸収量を第10表に示した。その結果、サラダ菜の生育はリン酸源施用のP-200区でP-0区に比べ高い値を認めた。バガス無添加の対照区に比べ、バガス添加区の乾物重は高くなる傾向であった。そして、菌株22接種区の乾物重はバガス添加量に関わらず全ての区で高い値を認め、最大の収量増はバガス1.0%菌株22接種区で得られ、対照区に対しP-0区で22%、P-200区で26%の増となっている。バガス1.0%菌株22無接種区の乾物重は、対照区に対しP-0区で11%、P-200区で8%の増を認めた。葉中リン酸濃度は乾物重の結果と類似した傾向が認められ、概して生育が優れた処理区

で高い値を認めた。サラダ菜地上部のリン吸収量は収量とリン含量に支配されるので、処理の効果は拡大された形になっている。対照区に対するバガス 1.0% 菌株 22 接種区のリン吸収量の指数は P-0 区で 43%、P-200 区で 64% の増、バガス 1.0% 菌株 22 無接種区のリン吸収量の指数は P-0 区で 19%、P-200 区で 27% を認め、菌株 22 無接種区に比べ接種区のリン吸収量は、ほとんどのバガス添加量区で高くなる傾向であった。

そして、菌株 22 含有バガス+バガス炭の有機資材を調製し作物の生育およびリン吸収にどのような作用を及ぼすのか栽培試験を試みた。本研究の結果、リン酸三カルシウム添加および無添加区において菌株 22 含有バガス+バガス炭処理区のサラダ菜の生育は、菌株 22 無接種区に比べ高くなる傾向を認めた(第 10 表)。また、菌株 22 接種区と無接種区のリン吸収量を比較すると、菌株 22 接種区のリン吸収量指数は 15~30% 程度増加していることを認めた。以上の結果より、菌株 22 含有バガス+バガス炭添加により難溶性リン酸塩が可溶化し、サラダ菜がそのリンを直ちに吸収利用したこと、サラダ菜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、その結果リン吸収量増大に寄与したものと推測した。

宮古島の土壌は大部分を琉球石灰岩由来の暗赤色土が形成しており、作物の生育促進または品質向上の目的で施用されたリン酸が暗赤色土に含まれる Ca などの陽イオンと反応し難溶性リンとなり吸収利用されず、耕地土壌では約 93.2~97.3% の割合でリン酸が土壌に固定されていることを認めた(第 1 表)。そして、有機酸生成能を有する菌株 22 などのリン溶解菌を含有した有機質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価格が高騰傾向にある化学肥料への依存度を下げ、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、そして、そのことは化学肥料由来の硝酸態窒素による地下水汚染の軽減に繋がることを示唆するものであった。

第9表 サラダ菜のポット試験における供試土壌の化学的性質

採取地区	土壌統群	土壌統	栽培	pH		EC (mS/cm)	全炭素 (wt%)	全窒素 (wt%)	リン酸(mgP ₂ O ₅ /100g乾土)				TC/TN
				H ₂ O	KCl				水抽出リン酸 ^{#1}	可給態リン酸 ^{#2}	全リン酸 ^{#3}	難溶性リン酸 ^{#4}	
平良	礫質暗赤色土	摩文仁	野菜	7.52	7.18	0.36	1.23	0.11	4.3	23.4	1008.9	985.5	11.43

#1 : 水抽出リン酸は、風乾採土に水を加え振り混ぜた後、ろ液にバナドモリブデン酸液を加え発色後の吸光度により求めた。

#2 : 可給態リン酸は、トルオーグ法によって測定した。

#3 : 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、吸光度を求めリン酸濃度を定量することにより求めた。

#4 : 難溶性リン酸は、全リン酸濃度から可給態リン酸濃度を差し引いて求めた。

第10表 リン酸三カルシウム添加土壌における菌株22含有バガス処理がサラダ菜の生育およびリン吸収に及ぼす影響

リン酸濃度 (μ gP/g乾土)	バガス添加量 ^{#1} (g/100g乾土)	供試菌 ^{#2} (菌株22)	乾物重 (g/本)	リン酸濃度 (mgP/乾物)	リン吸収量 (mgP/本)
P-0	0.0	—	0.54	5.95	3.21
	0.05	—	0.53	5.85	3.10
	0.05	+	0.58	5.88	3.41
	0.1	—	0.59	6.50	3.84
	0.1	+	0.61*	6.85	4.18
	0.5	—	0.58	6.25	3.63
	0.5	+	0.59	6.73	3.97
	1.0	—	0.60*	6.35	3.81
	1.0	+	0.66*	6.95	4.59
	P-200	0.0	—	0.78	8.49
0.05		—	0.82	8.80	7.22
0.05		+	0.84	9.10	7.64
0.1		—	0.87	8.55	7.44
0.1		+	0.89	9.71	8.64
0.5		—	0.86	9.72	8.36
0.5		+	0.90*	10.35	9.32
1.0		—	0.84	9.98	8.38
1.0		+	0.98**	10.94	10.72

#1 バガス+バガス炭

#2 —:無接種 +:接種

*,**はそれぞれ5%および1%レベルで有意、その他は有意性未検定。

各リン酸処理区におけるバガス+バガス炭無添加区と添加区間の生育との関係。

第 2 節 菌株 22 接種バガス炭とバガス混合資材施用による難溶性無機リン酸の可溶化がナスの生育に及ぼす影響(ポット試験)

材料および方法

第 11 表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。難溶性無機リン酸として土壌 1 g 当たり 1000 μgP (P-1000 区)または 5000 μgP (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 1 g 当たりそれぞれ成分として 500 μg 全区共通に施用した。

1/2 Nutrient 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 1 g 当たり 1×10^6 CFU で調整した菌株 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 100g 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°C 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。試験区は 1 試験区 1 個体 10 反復数とし、試験区の構成は第 12 表に示したように設定した。

結果および考察

収穫時のナスの乾物重およびリン吸収の調査結果を、第 12 表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。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。その要因としては、バガス施用に伴う土壌の理化学性および微生物性の改善など多くの要因が想定された。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域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。

第11表 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 (%)	(mgP ₂ O ₅ /100g乾土)			TC/TN
			H ₂ O	KCl				水抽出リン酸	可給態リン酸	全リン酸	
平良	糸洲-1	林地 ^{#1}	7.08	6.81	0.05	1.03	0.11	0.7	1.8	15.7	9.36

#1 林地の作物無栽培土壌

第12表 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 ^{#1} (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 ^{#2}	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1×10⁶コロニー)

#2 バガス+バガス炭

第3節 菌株 22 接種バガス炭とバガス混合資材施用による難溶性無機リン酸の可溶化がナスの生育に及ぼす影響

材料および方法

供試土壌は、沖縄県立宮古総合実業高等学校の第一農場にある、野菜連作畑の暗赤色土を用いた。その化学的性質は第 13 表に示した（土壌環境分析法編集委員会 1997）。リン酸源として 10 a 当たりリン酸成分として $15 \text{ P}_2\text{O}_5 \text{ kg}$ (P-15 区) およびその 1/10 濃度のリン酸成分として $1.5 \text{ P}_2\text{O}_5 \text{ kg}$ (P-1.5 区) 相当量のリン酸カルシウム (CaHPO_4) を添加し、土壌に蓄積した難溶性リン活用の比較のためリン酸無施用区 (P-0 区) を設定した。基肥はリン酸カルシウムの添加と同時に、窒素として硫酸アンモニウム ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) およびカリウムとして硫酸カリウム (K_2SO_4) を 10a 当たりそれぞれ成分として窒素 15 N kg およびカリウムを 15 K_2O kg 全区共通に施用した。合成ヒドロキシアパタイトを含有した寒天平板を用いて、透明帯を形成した有機酸生成菌である菌株 22 をリン溶解菌として供試した。1/2 Nutrient broth の基本培地で大量培養した菌株 22 を、第 14 表に示した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 $1 \times 10^6 \text{ CFU}$ で調整した。そして、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 10a 当たり 4 t 施用し、同時に糖分 4% の糖蜜を土壌 10a 当たり 1 t 添加し耕起した後、ナス（品種：黒陽）の 3～5 葉期の苗を畝幅 100 cm，株間 100 cm の一条植えで定植した。90 日間 (2004 年 4 月 26 日～7 月 25 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。試験区は 1 試験区 5 個体 5 反復数に設定した。

結果および考察

収穫時のナスの乾物重およびリン吸収の調査結果を第 15 表に取り纏め示した。その結果、ナスの乾物重は、リン酸施用量が増加するに伴い高くなる傾向にあり、リン酸多量施用区の P-15 区で最も高く、P-0 区の 2 倍強であった（第 15

表)。バガス無施用区に比べバガス処理区の乾物重の値は高い傾向を示した。ナス最大の収量増はバガス添加量が 10a 当たり 4 トンの接種区で得られ、P-15 区で対照区に対して 11%の増となっており、同無接種区はその値は 1%を示した。P-1.5 区におけるナスの収量増は、接種区で対照区に対して 21%の増となっており、同無接種区はその値は 3%を示した。また、P-0 区におけるナスの収量増は、接種区で対照区に対して 34%の増となっており、同無接種区はその値は 13%を示した。このようにバガス施用および菌株 22 接種の効果は、リン酸源の無処理区またはリン酸濃度 1/10 処理区で高くなる傾向を認めた。

ナスのリン含量は、生育と類似した傾向が認められ、リン吸収量に関しても同様であった（第 15 表）。リン酸濃度 P-0 区の菌株 22 含有バガス処理区の乾物重およびリン酸含量は、土壌蓄積リン活用の目安として設定した P-15 区のバガス無処理区（慣行区）に比べ低い値であった。

また、ナスの収穫後土壌の各種形態のリン酸濃度として、水溶性リン酸、可給態リン酸および全リン酸の分析結果を第 8 図に示した。その結果、すべての処理区において土壌中の全リン酸濃度に大きな差は認められなかったものの、可給態リン酸および水溶性リン酸濃度は、バガス処理区の菌株 22 接種区で高くなる傾向を認めた。

第 13 表 ナスの圃場試験における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 (wt%)	全窒素 (wt%)	リン酸(P ₂ O ₅ mg/100g乾土)				TC/TN
			H ₂ O	KCl				水抽出リン酸 ^{#1}	全リン酸 ^{#2}	可給態リン酸 ^{#3}	難溶性リン酸 ^{#4}	
平良	糸洲-1	野菜	7.17	6.76	0.47	1.47	0.13	8.9	1208.9	29.9	1179.0	11.3

#1 水抽出リン酸は、風乾採土に水を加え振り混ぜた後、ろ液にバナドモリブデン酸液を加え発色後吸光度により求めた。

#2 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、吸光度を求めリン酸濃度を定量することにより求めた。

#3 可給態リン酸はトルオーグ法によって測定した。

#4 難溶性リン酸は、全リン酸濃度から可給態リン酸濃度を差し引いて求めた。

第14表 供試有機物の化学性

有機物	pH (H ₂ O)	炭素 (wt%)	窒素 (wt%)	リン酸 (wt%)	カリウム (wt%)	カルシウム (wt%)	マグネシウム (wt%)
バガス	6.8	45.0	0.1	0.03	1.04	0.02	0.01
バガス炭	9.8	73.0	0.6	0.12	0.12	0.64	0.06
糖蜜	4.9	55.0	4.5	0.61	0.61	1.20	0.98

第15表 リン酸添加土壌における供試菌株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

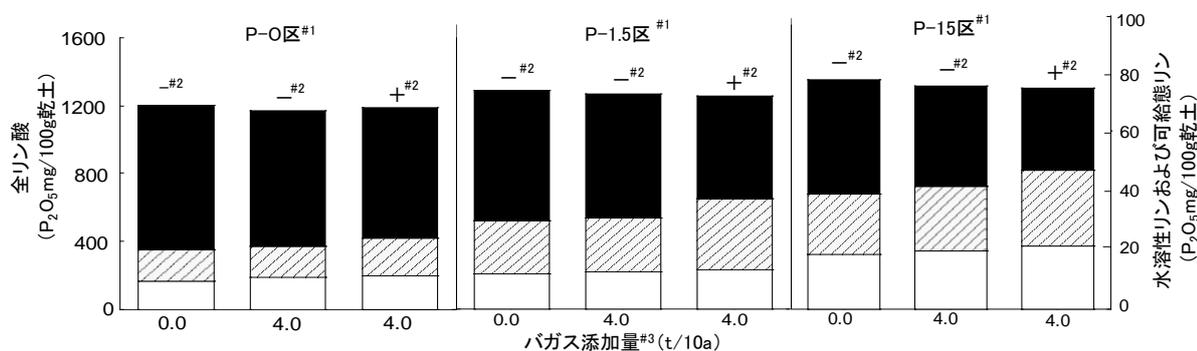
リン酸濃度区 (P ₂ O ₅ kg/10a)	バガス添加量 ^{#1} (t/10a)	供試菌 ^{#2} (菌株22)	乾物重 (g/本)	リン酸濃度 (Pmg/乾物)	リン吸収量 (Pmg/本)
P-0	0.0	-	80.6	3.09	249.1
	4.0	-	91.1**	3.32	302.5
	4.0	+	108.7**	3.99	433.7
P-1.5	0.0	-	112.4	3.82	429.4
	4.0	-	115.4	4.07	469.7
	4.0	+	136.0**	4.22	573.9
P-15	0.0	-	166.3	4.28	711.8
	4.0	-	168.3	4.39	738.8
	4.0	+	184.6**	4.73	873.2

#1 バガス+バガス炭

#2 -:無接種, +:接種

** は、1%レベルで有意、その他は有意性未検定

各リン酸処理区におけるバガス+バガス炭無添加区と添加区間の生育との関係



第8図 ナスの栽培土壌における水溶性リン、可給態リンおよび全リン酸生成に対する菌株22含有バガス処理の影響 (ナス収穫後の土壌)

#1 P-0区(リン酸無処理)、P-1.5区(リン酸1.5kg/10a)、P-15区(リン酸15kg/10a)

#2 -:無接種 +:接種

#3 バガス+バガス炭

■ 全リン酸

▨ 可給態リン酸

□ 水溶性リン酸

第4節 菌株 22 接種バガス炭とバガス混合資材施用による難溶性無機リン酸の可溶化がピーマンの生育に及ぼす影響

材料および方法

供試土壌は、沖縄県立宮古総合実業高等学校の第一農場内の、野菜連作畑の暗赤色土を用いた。その化学的性質は第 16 表に示した（土壌環境分析法編集委員会 1997）。リン酸源の添加方法および処理区の設定または元肥である窒素およびカリウムの施用方法は、第 3 章、第 1 節の実験方法に示す通りに設定した。また、有機酸生成菌である菌株 22 の大量培養方法および菌株 22 を添加した供試有機物の調整方法は、合成ヒドロキシアパタイトを含有した寒天平板を用いて、透明帯を形成した有機酸生成菌である菌株 22 をリン溶解菌として供試した。1/2 Nutrient broth の基本培地で大量培養した菌株 22 を、第 14 表に示した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 1×10^6 CFU で調整した。そして、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 10a 当たり 4 トン施用し、同時に糖分 4% の糖蜜を土壌 10a 当たり 1 トン添加し耕起した後、ピーマン（品種：ニューエース）の 5~7 葉期の苗を畝幅 100 cm、株間 50 cm の二条植えで定植した。60 日間（2004 年 4 月 26 日~6 月 25 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。試験区は 1 試験区 5 個体 5 反復数に設定した。

結果および考察

収穫時のピーマンの乾物重およびリン吸収の調査結果を第 17 表に取り纏め示した。その結果、ピーマンの乾物重はナスと同様、リン酸施用量が増加するに伴い高くなる傾向にあり、リン酸多量施用区の P-15 区で最も高かった（第 17 表）。バガス無施用区に比べ菌株 22 含有バガス処理区の乾物重は高い値を示した。ピーマン最大の収量増はバガス添加量が 10a 当たり 4 トンの接種区で得られ、P-15 区で対照区に対して 18% の増となっており、同無接種区はその値は 8%

を示した。P-1.5 区におけるナスの収量増は、接種区で対照区に対して 38%の増となっており、同無接種区はその値は 12%を示した。また、P-0 区におけるナスの収量増は、接種区で対照区に対して 34%の増となっており、同無接種区はその値は 11%を示した。バガス施用および菌株 22 接種の効果は、リン酸源の 1/10 処理区または無処理区で高くなる傾向を認めた。

ピーマンのリン含量も、生育と類似した傾向が認められ、リン吸収量に関しても同様であった（第 17 表）。リン酸濃度 P-0 区の菌株 22 含有バガス処理区の乾物重およびリン酸含量は、土壌蓄積リン活用の目安として設定した P-15 区のバガス無処理区に比べ低い値であった。

ところで、第 17 表に示した P-1.5 区の菌株 22 含有バガス処理区のピーマンの乾物重およびリン含量は、P-15 区のバガス無処理区に比べ有意な差は認められなかった。その要因として、リン酸濃度 1/10 の P-1.5 区における菌株 22 含有バガス処理区において、施肥リン由来の水溶性リン酸の供給がピーマンの初期生育を促したことにより、P-15 区のバガス無処理区と同様な生長量を示したものと考えた。しかし、P-0 区の菌株 22 含有バガス処理区でピーマンの生育が抑制された原因として、リン酸の供給源である難溶性リンの可溶化に一定の時間を要することが推測され、その改善には菌株 22 含有バガス添加と同時に低濃度の水溶性リンの施肥が必要であることが示唆された。

また、ピーマンの収穫後土壌の各種形態のリン酸濃度として、水溶性リン酸、可給態リン酸および全リン酸の分析結果を第 9 図に示した。その結果、すべての処理区において土壌中の全リン酸濃度に大差は認められなかったものの、特に P-1.5 区においては、可給態リン酸および水溶性リン酸濃度がバガス処理区の菌株 22 接種区で高くなる傾向を認めた。

第16表 ピーマンの圃場試験における供試土壌の化学的性質

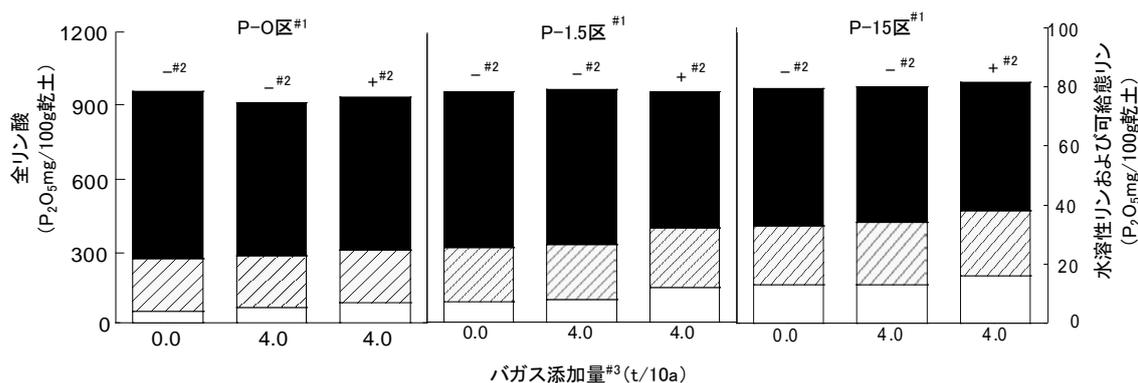
採取地区	土壌統	栽植	pH		EC (mS/cm)	全炭素 (wt%)	全窒素 (wt%)	リン酸(P ₂ O ₅ mg/100g乾土)				TC/TN
			H ₂ O	KCl				水抽出リン酸 ^{#1}	全リン酸 ^{#2}	可給態リン酸 ^{#3}	難溶性リン酸 ^{#4}	
平良	糸洲一	野菜	7.07	6.66	0.36	1.37	0.13	5.9	1008.9	24.8	984.1	10.5

#1 水抽出リン酸は、風乾採土に水を加え振り混ぜた後、ろ液にバナドモリブデン酸液を加え発色後吸光度により求めた。
 #2 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、吸光度を求めリン酸濃度を定量することにより求めた。
 #3 可給態リン酸はトルオーグ法によって測定した。
 #4 難溶性リン酸は、全リン酸濃度から可給態リン酸濃度を差し引いて求めた。

第17表 リン酸添加土壌における供試菌株22含有バガス処理がピーマンの生育およびリン吸収に及ぼす影響

リン酸濃度区 (P ₂ O ₅ kg/10a)	バガス添加量 ^{#1} (t/10a)	供試菌株 ^{#2} (菌株22)	乾物重 (g/本)	リン酸濃度 (Pmg/乾物)	リン吸収量 (Pmg/本)
P-0	0.0	-	25.4	2.03	51.6
	4.0	-	28.3	2.08	58.9
	4.0	+	34.2**	2.79	95.4
P-1.5	0.0	-	37.6	2.13	80.1
	4.0	-	42.0**	2.45	102.9
	4.0	+	52.2**	3.04	158.7
P-15	0.0	-	54.8	2.86	156.7
	4.0	-	59.0	3.25	191.8
	4.0	+	64.8**	3.26	211.2

#1 バガス+バガス炭
 #2 -: 無接種, +: 接種
 ** は、1%レベルで有意、その他は有意性未検定
 各リン酸処理区におけるバガス+バガス炭無添加区と添加区間の生育との関係



第9図 ピーマンの栽培土壌における水溶性リン、可給態リンおよび全リン酸生成に対する菌株22含有バガス処理の影響(ピーマン収穫後の土壌)

#1 P-0区(リン酸無処理)、P-1.5区(リン酸1.5kg/10a)、P-15区(リン酸15kg/10a)
 #2 -: 無接種 +: 接種
 #3 バガス+バガス炭

■ 全リン酸 ▨ 可給態リン酸 □ 水溶性リン酸

第5章

リン溶解菌による難溶性無機リン酸の可溶化に関する研究Ⅱ

サトウキビは基幹作物として沖縄県の農業に重要な役割を果たしてきた。しかし、1975年から84年までの12年間に、粗生産額で約100から367億円、生産量にして140から170万トンも増加したもののその後は漸減傾向を示し、現在は約80～90万トンの生産量を維持している。そのような沖縄県のサトウキビ農業が厳しい状況の中、宮古島では約30万トン以上の生産量を維持しておりサトウキビ栽培が盛んな島嶼地域である。台風の常襲地帯である宮古島では、台風の被害を受けやすい葉菜類に比べ、サトウキビは台風の被害を受けても回復力が早くある程度の収穫量は確保でき厳しい農家の生活を支えてきたことから、現在でもサトウキビは宮古島の作付け面積の8割以上を占め、盛んに栽培されている。一方、宮古島の貴重な飲料水源である地下水の硝酸態窒素汚染の大部分は化学肥料由来の窒素が占めており、サトウキビ栽培で使用される大量の化学肥料の施肥方法について検討することは、島民の生活を支える農業の持続的な発展および島民の生命を支える地下水保全の見地から意義があると考えられる。

そのような状況の中、平成6年度よりサトウキビの取引制度は従来の原料茎重による重量取引制度から甘蔗糖度による品質取引制度へと移行し、近年ではサトウキビの収量や甘蔗糖度に及ぼす畑土壌の養分含量に関して生産関係者の関心が高まっている。宮古島の土壌は大部分を琉球石灰岩由来の暗赤色土が形成しており、サトウキビの生育促進または糖度向上の目的で施用されたリン酸が暗赤色土に含まれる陽イオンと反応し難溶性リンとなり吸収利用されず、その多くが土壌に固定されていることを認めた。

そこで、第1節では、本研究では土壌微生物を活用し暗赤色土に含有されている難溶性リン化合物を可溶化し、且つ化学肥料として施用したリン酸の難溶化を防ぐことにより、有効態リン酸濃度を高めることが可能か、サトウキビの生育および甘蔗糖度などの品質の面から検討した。

著者は、リン溶解菌の効果を安定的に発現させるため、接種菌を土壌中で保

護し、定着させる資材としてサトウキビ搾りかすであるバガスを炭化させた難分解性のバガス炭と、接種菌を増殖させる資材として易分解性のバガスの利用について検討してきた。その結果、これらの処理をすることで、リン溶解菌による難溶性無機リン酸の可溶化が安定して認められ、春植えサトウキビのリン吸収は高まり、生育と品質も向上した（前里ら 2006）。

国内のサトウキビ産業が低迷する中、平成 25 年度の宮古島のサトウキビ生産量は約 32 万トンを維持しており（沖縄県宮古農林振興センター2015）、近年では株出し栽培が推奨されている。

そこで第 2 節では、バガスとリン溶解菌を接種したバガス炭の施用を、株出しサトウキビの栽培に応用するには、これらが根域土壌中におけるリンの形態にどのような影響を及ぼし、春植えサトウキビで見られた処理効果が同様に確認されるかについて検証した。本研究は、沖縄県の基幹作物であるサトウキビの主要な栽培体系である春植え株出しサトウキビの連作栽培畑（株出）において、土壌微生物であるリン溶解菌の機能を活用し、暗赤色土に含有されている難溶性無機リン酸化合物を可溶化させ、併せて、化学肥料として施用したリン酸の難溶化を防ぐことで有効態リン酸濃度を高め、その結果、サトウキビの生育および甘蔗糖度などの品質向上を目的に実施した。

第 1 節 菌株 22 接種バガス炭とバガス混合資材施用による難溶性無機リン酸の可溶化がサトウキビの生育に及ぼす影響

材料および方法

供試土壌は沖縄県立宮古総合実業高等学校の第二農場内にあるサトウキビ連作畑の暗赤色土を用いた。その化学的性質は第 18 表に示した（土壌環境分析法編集委員会 1985）。リン酸源として 10a 当たりサトウキビ春植えの沖縄県施肥基準（沖縄県農林水産部 1993）のリン酸成分を $6.0 \text{ P}_2\text{O}_5\text{kg}$ (P-6.0 区) および春植え施肥基準の 1/10 濃度のリン酸源として、10a 当たり $0.6 \text{ P}_2\text{O}_5\text{kg}$ (P-0.6 区) 相当量のリン酸カルシウム (CaHPO_4) を添加した。基肥は、リン酸カルシウムの添

加と同時に、窒素として硫酸アンモニウム($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)およびカリウムとして硫酸カリウム(K_2SO_4)を10a当たりサトウキビ春植えの沖縄県施肥基準(沖縄県農林水産部1993)の、それぞれの成分を窒素20.0Nkgおよびカリウム6.0 K_2O kgを全区共通に施用した。なお、有機酸生成菌である菌株22の大量培養方法および菌株22を添加した供試有機物の調整方法は、合成ヒドロキシアパタイトを含有した寒天平板を用いて、透明帯を形成した有機酸生成菌である菌株22をリン溶解菌として供試した。1/2 Nutrient brothの基本培地で大量培養した菌株22を、第14表に示した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 1×10^6 CFUで調整した。そして、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10a当たり1トン(4%糖蜜250kg/10a)および4トン(4%糖蜜1t/10a)土壌に処理し耕起した後、供試材料にはサトウキビ(*Saccharum* spp. cv. NiF8 農林8号)の一節苗を畝幅135cm、株間40cmの密度で定植した。1年間(2003年2月25日~2004年2月24日)栽培をした後、生育、品質および土壌のリン酸の溶解について調査した。また、バガスおよびバガス炭の混合有機物の無処理区(対照区)および菌株22無接種バガスおよびバガス炭処理区(糖蜜も希釈後同量散布)も設定した。そして、搾汁液中の甘蔗糖度およびリン濃度について定量し、甘蔗糖度とリン濃度の関係からサトウキビの品質について検討を加えた。土壌中のバイオマスリンは土壌懸濁液トルエン処理法で測定した(木村・西尾1992)。試験区は1試験区20個体4反復数に設定した。

結果および考察

サトウキビの生育および収量調査結果を第19表に示した。その結果、茎長および節数においては有意な差はなかった。しかし、茎重、茎数、株重および収量はリン酸多量施用のP-6.0区における対照区およびバガス施用区間に有意差は認められなかったものの、P-0.6区においては対照区に比べバガス施用区で高くなる傾向にあった。生育調査の結果、バガス添加量の違いによるサトウキビの生育に対しては、大きな影響が認められなかった。そのことは、島嶼の宮古島において大量且つ安定的に入手可能なバイオマス資源である良質なバガスな

どの有機資源も有限であり、今後適切なバガス添加量を詳細に検討することが必要である。

第 10 図および第 11 図に品質調査結果を示した。甘蔗糖度は、P-0.6 区の対照区で 13.3%を示し、P-6.0 区の対照区で 14.1%であった。一方、各リン酸濃度区におけるバガス処理区の甘蔗糖度は、対照区に比べ高く、P-0.6 区で菌株 22 含有バガス 4 t 区は 15.1%で、P-6.0 区では菌株 22 含有バガス 4t 区は 15.6%と高かった（第 10 図-A）。産糖量(茎重×甘蔗糖度)は、P-0.6 区および、P-6.0 区ともバガス処理および処理濃度が増加するに伴い高くなる傾向にあったが、P-0.6 区の菌株 22 含有バガス 1t および 4t 区の値は、P-6.0 区の対照区とほぼ同様の値となった（第 10 図-B）。

搾汁液中のリン成分と甘蔗糖度とは、正の相関関係にあり、甘蔗糖度は吸収されたリン成分によって高まることが示唆された（第 11 図）。収穫時の栽培土壌におけるリン酸の溶解は可給態リン酸については P-0.6 区および P-6.0 区間で大きな差は認められないが、バガス処理区でバイオマスリンが高くなる傾向を示し、その濃度は P-0.6 区および P-6.0 区の対照区に比べ有意な差となった（第 20 表）。

第 18 表 サトウキビ圃場試験における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 (wt%)	全窒素 (wt%)	リン酸(P ₂ O ₅ mg/100g乾土)				TC/TN
			H ₂ O	KCl				水抽出リン酸 ^{#1}	全リン酸 ^{#2}	可給態リン酸 ^{#3}	難溶性リン酸 ^{#4}	
平良	摩文仁	サトウキビ	7.82	7.09	0.29	1.36	0.11	4.3	899.7	15.1	884.6	12.4

#1 水抽出リン酸は、風乾探土に水を加え振り混ぜた後、ろ液にバナドモリブデン酸液を加え発色後吸光度により求めた。

#2 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、吸光度を求めリン酸濃度を定量することにより求めた。

#3 可給態リン酸はトルオーグ法によって測定した。

#4 難溶性リン酸は、全リン酸濃度から可給態リン酸濃度を差し引いて求めた。

第19表 リン酸添加土壌における供試菌株22含有バガス処理がサトウキビの生育および収量に及ぼす影響

リン酸濃度区 (P ₂ O ₅ Kg/10a)	バガス添加量 ^{#1} (t/10a)	供試菌 ^{#2} (菌株22)	茎長 (cm/本)	茎重 (g/本)	節数 (節/本)	茎数 (本/株)	株重 (kg/株)	収量 (t/10a)
P-0.6	0.0	-	222.9	671.5	21.0	5.5	4.05	3.64
	1.0	-	224.7	728.8**	22.3	6.5	4.81	4.33
	1.0	+	231.5	932.0**	25.3	9.7**	7.95**	7.05**
	4.0	-	229.8	767.0**	22.0	8.0**	5.67	5.10**
	4.0	+	248.5	977.8**	24.5	11.0**	8.49**	7.09**
P-6.0	0.0	-	242.3	946.8	23.5	11.0	7.97	7.17
	1.0	-	238.5	941.3	21.5	10.5	7.88	7.59
	1.0	+	265.0	1008.0**	26.0	12.7	8.79	7.91
	4.0	-	249.8	957.8	24.3	10.7	8.43	7.64
	4.0	+	259.0	1069.5**	24.3	11.0	8.73	7.86

#1 バガス+バガス炭

#2 -:無接種 +:接種

** は、1%レベルで有意、その他は有意性未検定

各リン酸処理区におけるバガス+バガス炭無添加区と添加区間の生育および収量との関係

第20表 サトウキビの栽培土壌におけるリン酸の溶解に対する供試菌株22含有バガス処理の影響

リン酸濃度区 (P ₂ O ₅ kg/10a)	バガス添加量 ^{#1} (t/10a)	供試菌 ^{#2} (菌株22)	リン酸の溶解(P ₂ O ₅ mg/100g乾土)		
			バイオマスリン	可給態リン	溶解量 ^{#3}
P-0.6	0.0	-	3.38	12.81	16.19
	1.0	-	10.73*	23.11	33.84
	1.0	+	14.23**	26.20*	40.43**
	4.0	-	10.85*	24.67*	35.52
	4.0	+	15.23**	26.86*	42.09*
P-6.0	0.0	-	4.69	19.11	23.80
	1.0	-	13.76**	28.13	41.89**
	1.0	+	22.33**	31.60	53.93**
	4.0	-	20.34**	28.48	48.82**
	4.0	+	22.15**	32.43	54.58**

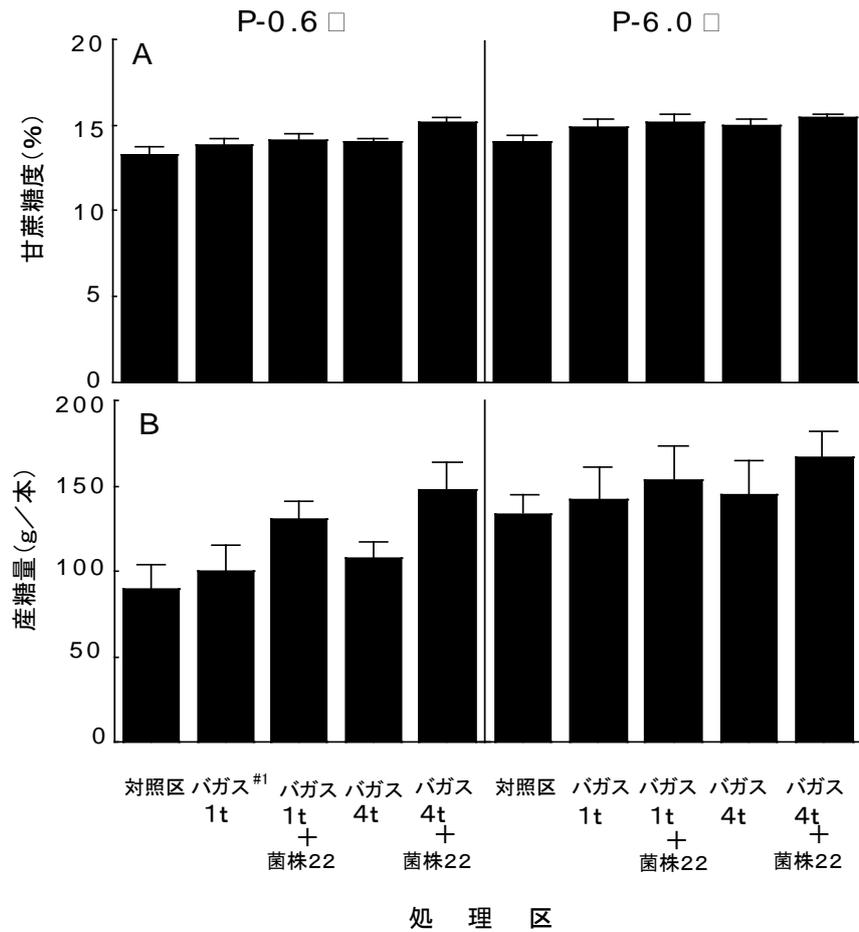
#1 バガス+バガス炭

#2 -:無接種, +:接種

#3 収穫土壌(バイオマスリン+可給態リン)の増加

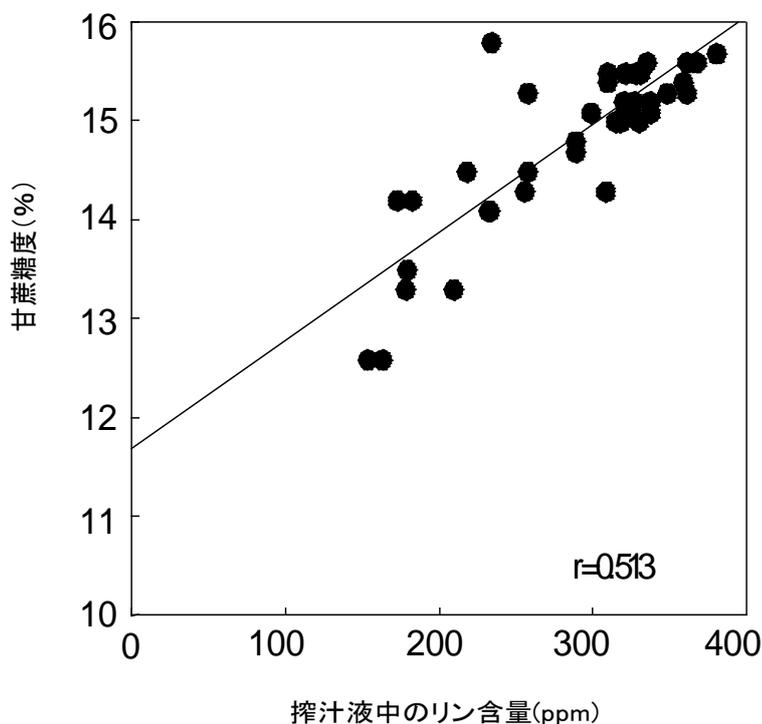
*、**はそれぞれ5%および1%レベルで有意、その他は有意でない

各リン酸処理区におけるバガス+バガス炭無添加区と添加区間のリン酸溶解との関係



第10図 供試菌株22含有バガス処理がサトウキビの甘蔗糖度(A)および産糖量(B)に及ぼす影響

#1 (バガス=バガス+バガス炭)



第11図 サトウキビの甘蔗糖度と搾汁液中のリン含量の関係

第2節 菌株 22 接種バガス炭とバガス混合資材の施用による難溶性無機リン酸の可溶化が株出しサトウキビの生育に及ぼす影響

材料および方法

株出しサトウキビに対するリン溶解菌の接種試験を沖縄県立宮古総合実業高等学校の第二農場内にある面積 1ha の圃場（北緯 24° 45′ ， 東経 125° 20′ ， 標高 28 m， 暗赤色土）において 2004 年から 2005 年にかけて行った。供試品種には農林 8 号 (*Saccharum spp. cv. NiF8*) を使用し，前年において畝間 135 cm，株間 40 cm で春植えしたサトウキビの株を供試して株出し栽培を行った。土壌は暗赤色土で，その化学的性質は第 21 表に示した。供試土壌は採取した土壌を

風乾した後、粉砕機を用いて粉砕後、ふるい（2 mm）にかけた後、各種土壌分析に供試した。水抽出リン酸は、採取した土壌に水を加え振とう後、ろ液にバナドモリブデン酵液を加え発色後、吸光度により求めた。可給態リン酸は、トルオーグ法によって測定した。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、吸光度を求めて定量した。難溶性無機リン酸は、全リン酸濃度から可給態リン酸濃度を差し引いて求めた（土壌環境分析法編集委員会 1997）。

2004年2月28日に、施肥については沖縄県施肥基準に基づき、硫酸アンモニウムおよび硫酸カリウムをそれぞれ10 aあたり22 kgおよび7 kgを基肥として与えた。リンについては土壌蓄積リンの利用を評価する区としてリン肥料を施肥しない区（P0区）と沖縄県施肥基準であるリン（ CaHPO_4 ）を10 aあたり7 kg施肥する区（P7区）の2処理区を設けた。

接種菌株22の培養には、1/2NB培地（前里ら2005）を用い、培養条件は30℃として、暗条件下で30日間回転振とう培養（150 rpm）を行った。培養した菌株は菌密度 8×10^8 個/mLとして実験に供試した。

バガスとバガス炭を99:1の重量比で混合した資材を10 aあたり0.5 t施用する区と1 t施用する区を設けた。リン溶解菌の接種区では、あらかじめ菌液を接種したバガス炭（バガス炭1 gあたり 1×10^7 個）をバガスと混合し、接種資材とした。2004年2月28日の施肥と同時に、これらの資材を株元の表層3~5 cmの土壌に施用した。各処理区の面積は10 aとし、1反復あたり250 m²（7畝×25 m）で4反復の乱塊法とし、調査対象は中央3畝より中庸な生育を示す5個体を供試した。栽培期間中の灌水、除草および培土（平培土および高培土）などの栽培管理は、製糖用サトウキビ栽培に準じて慣行通りに行った。

施用後12カ月にあたる2005年2月27日に、各処理区について、茎長、茎重、節数、茎径および株あたりの茎数を測定し、あわせて単位面積あたりの収量を試算した。なお、収量は調査面積（3 m×135 cm）の全茎の茎生体重を測定し10 aに換算し算出した。茎長は地際から最上部の肥厚帯までの長さとした。茎径は葉鞘を取り除いた後、茎中央の節間の短径部分を測定した。品質調査は、沖縄製糖株式会社農務部品質検査室の近赤外線分析装置（260型、BRAN-LUEBBE社製）を用いて、製糖用サトウキビ品質検査法に準じて、1反復につき5個体

分の搾汁液を孔径 0.45 μm のフィルターで濾過し、得られた搾汁液の糖度を測定し、甘蔗糖度を算出した。なお、糖度の測定は 1 試験区当たり 4 反復で行った。産糖量は、茎生体重と甘蔗糖度を掛け合わせることで算出した。

搾汁液の各種元素の分析は、試験管に分取した 50 mL の搾汁液をドライアイス中で凍結後、速やかに琉球大学農学部作物学研究室に移送し、 -40°C の冷凍庫で保存した後に適宜供試して行った。搾汁液の元素の定量は、3,000 rpm で 15 分間遠心後、その上澄み液を 1 mL とり 25 倍に超純水で希釈後、リン (P)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、マグネシウム (Mg) およびケイ素 (Si) の含有率を ICP プラズマ発光分析装置 (ICP-2000S, 島津製作所) を用い、シーケンシャルモードで定性後、ポリクロモードで定量した。近赤外線分析装置によって得られた甘蔗糖度の値と、ICP による搾汁液のリン含有率の値との相関関係を解析した。

2 月 28 日に、各処理区における土壌からのリン供給能を評価するために収穫時の株元近くの土壌を採取し、可給態リン酸含有率 (トルオーグ法) およびバイオマスリン含有率 (トルエン処理法) を調査した (木村・西尾 1992)。土壌サンプルは、1 反復あたり試験区内 5 箇所、表層から 15 cm の作土層を採取し混和した後分析に供試した。なお、土壌分析は各試験区 4 反復で行った。採取した土壌は風乾した後、粉砕機を用いて粉砕後、ふるい (2 mm) にかけて分析に供した。なお、栽培試験および土壌分析より得られた結果に対する統計分析は、エクセル統計 2008 (株式会社 情報サービス社) を用いて、一元配置分散分析および Tukey 法による多重比較検定を行った。

結果および考察

処理後 12 ヶ月にあたる 2005 年 2 月 18 日における、株出しサトウキビの生育量と収量を第 22 表に示した。リン酸を 7kg/10a 施用した P7 区では、茎長、節数、茎径、茎数、株重に処理区間で差はみられなかったが、茎重についてはバガス資材を施用した区において有意に高く、リン溶解菌菌株 22 を接種した区では収量が有意に高かった。なお、バガスの施用量による差異はみられなかった。

一方、リン酸無施用の P0 区では茎長および茎径には施用区間で差はみられなかったものの、茎重および節数はバガス資材の施用区において有意に高く、茎数、株重および収量は菌株 22 の接種区において有意に高かった。なお、いずれのリン施肥条件下においても甘庶糖度には差異はみられなかった（第 22 表）。産糖量は、P7 区では施用区間で差はみられなかったが、P0 区においてはバガス資材の施用区で無施用区よりも高い傾向がみられ、菌株 22 を接種した資材の施用区で有意に高かった。またバガス資材の施用区では、リンを 7 kg 施用した P7 区と同程度の産糖量が認められた（第 11 図）。

搾汁液中の成分は、P0 区と P7 区においてやや異なる傾向を示したが、P および Si はバガス資材および菌株 22 の接種区において高い傾向が認められた。他の養分についてみると、P0 区では K および Mg は、菌株 22 を接種した資材の施用区で無施用区よりも高い傾向を示した。Ca は、全ての施用区間で差異はみられなかった（第 23 表）。搾汁液中のリン酸含量と甘庶糖度との関係を解析した結果、両者には有為な正の相関関係（ $r = 0.63$, $P < 0.05$ ）が認められた（第 12 図）。

収穫時における土壌のバイオマスリンおよび可給態リン酸は、いずれもバガス資材の施用区では無施用区と比較して高い値を示す傾向にあった。特に、菌株 22 を接種した資材の施用区では、バガス資材の施用量に関わらず、バイオマスリンおよび可給態リン酸は、無施用区よりも有意に高い値を示した（第 24 表）。

著者らは、微生物機能の利用による難溶性無機リン酸の可溶化が作物の生育に及ぼす影響について、リン溶解菌菌株 22 をバガス炭の担体に接種しバガスと混合した資材を調整し検討した。ナスおよびピーマンを供試作物にした栽培試験ではリン吸収量にともなう生育促進効果を認め、春植えサトウキビを供試作物とした栽培試験では生育が促進され品質が向上した（前里ら 2006）。本研究では、菌株 22 接種バガス炭とバガスの混合資材による難溶性無機リン酸の可溶化が、株出しサトウキビの生育および養分吸収に与える影響について検討した。

本研究の結果、P7 区では、菌株 22 を接種した資材施用区で株出しサトウキビの収量が有意に高まり、P0 区では、茎数、株重および収量が菌株 22 の接種によって有意な差を認めた（第 22 表）。産糖量は、P0 区においてはバガス資材を施用することによって無施用区よりも高くなる傾向がみられ、さらに資材に菌株

22 を接種することで有意に高まった（第 11 図）。このことは、バガス炭を担体とした菌株 22 によって難溶性無機リン酸が可溶化され、株出しサトウキビがそのリン酸を吸収利用したと推測した。株出しサトウキビの生育促進は、この過程を通じたリン供給増に起因すると推定された。搾汁液中の成分分析の結果、リン成分と甘蔗糖度とは正の相関関係にあり、菌株 22 接種バガス炭とバガスを混合した資材の施用によって難溶性無機リン酸が溶解し、そのリン酸を株出しサトウキビが吸収利用したリン成分によって、甘蔗糖度が高まることが示唆された（第 12 図）。その要因として玉城ら（1998）は、リン成分のサトウキビへの吸収促進はショ糖合成酵素 Sucrose Phosphate Synthase (SPS) 活性を高め、糖代謝系の中間産物量を減少させ、更に転流を促進して日中高い光合成速度を維持し、CO₂ 収支量を高め物質生産を向上させ糖度向上に寄与するとしている。また、搾汁液中の成分分析の結果、菌株 22 接種バガス炭とバガスの混合資材施用区は無施用区に比べ P は高い値を認めた。このことは、バガス炭を担体とした菌株 22 による難溶性無機リン酸の可溶化が株出しサトウキビによる P 吸収を高め、甘蔗糖度の向上に作用したことを示唆した（第 23 表）。

第 24 表で示した結果からは、菌株 22 接種バガス炭をバガスと混合した資材を土壤に施用することにより、菌株 22 などのリン溶解菌が生育し有機酸を生成することで難溶性無機リン酸が溶解され可溶性リン酸となり、一般の有機栄養微生物に取り込まれ土壤バイオマスリンを形成することが明らかとなった。その後の過程として想定されることは、その微生物の死滅に伴い土壤バイオマスリンが土壤中へ放出され、可給態リン酸となり作物に吸収利用される難溶性無機リン酸化合物の溶解と株出しサトウキビへの移行である。しかし、本試験は収穫時の土壤について調査したものであり、土壤微生物を介した難溶性無機リン酸の可溶化による株出しサトウキビへのリンの移行過程については、さらに経時的な土壤調査が必要である。

第21表 サトウキビ圃場試験における供試土壌の化学的性質

採取地区	土壌統群	栽培	pH		EC (mS/cm)	全炭素 (wt%)	全窒素 (wt%)	リン酸(mgP ₂ O ₅ /100g乾土)				TC/TN
			H ₂ O	KCl				水抽出リン酸 ^{#1}	可給態リン酸 ^{#2}	全リン酸 ^{#3}	難溶性リン酸 ^{#4}	
平良	礫質暗赤色土	サトウキビ	7.85	7.29	0.47	1.34	0.11	4.1	19.2	806.1	786.9	12.18

#1 水抽出リン酸は、風乾採土に水を加え振り混ぜた後ろ液にバナドモリブデン酸液を加え発色後吸光度により求めた。
 #2 可給態リン酸は、トルオーグ法によって測定した。
 #3 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酸濃度を定量することにより求めた。
 #4 難溶性リン酸は、全リン酸濃度から可給態リン酸濃度を差し引いて求めた。

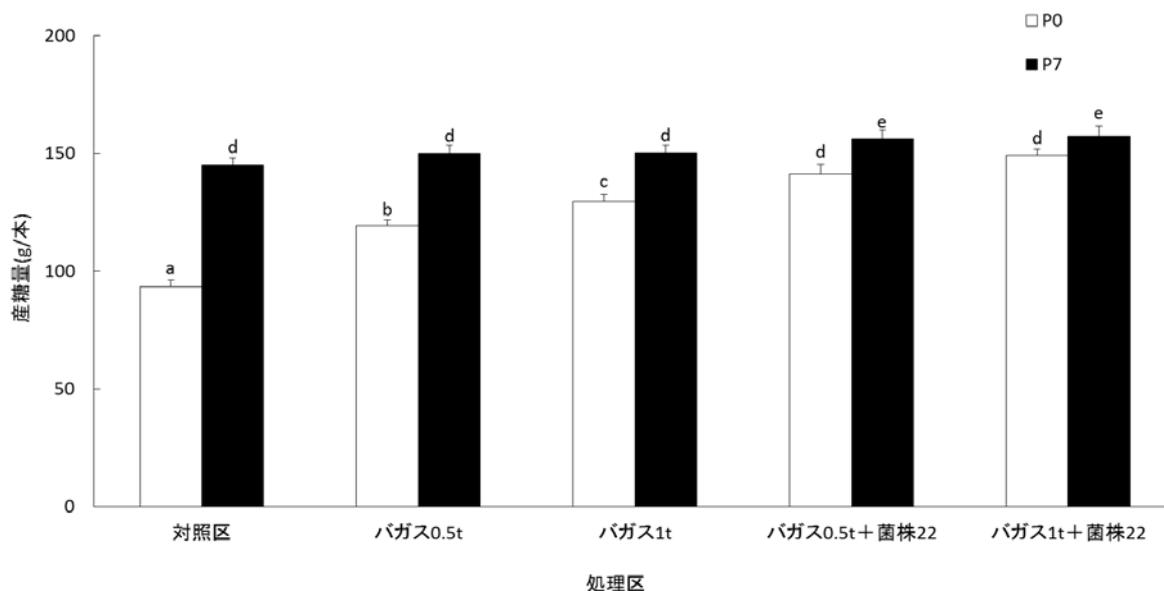
第22表 供試菌株22含有バガス処理が株出しサトウキビの生育収量および甘蔗糖度に及ぼす影響

リン酸濃度区 (kg P ₂ O ₅ /10a)	バガス添加量 ^{#1} (t/10a)	供試菌 ^{#2} (菌株22)	茎長 (cm/本)	茎重 (g/本)	節数 (節/本)	茎径 (cm/本)	茎数 (本/株)	株重 (kg/株)	収量 (t/10a)	甘蔗糖度 (%)
P-0.0	0.0	—	200.8a	661.3a	18.8a	2.1a	5.3a	4.7a	4.5a	14.14a
	0.5	—	207.5a	824.3b	24.0b	2.2a	6.0ab	5.3ab	5.7ab	14.51a
	0.5	+	223.5a	928.3b	31.6b	2.4a	6.7c	6.6c	6.2c	15.20a
	1.0	—	204.2a	857.3b	31.7b	2.2a	6.3b	5.7b	5.4ab	15.12a
	1.0	+	218.2a	976.1b	31.8b	2.5a	7.0c	6.7c	6.8c	15.23a
P-7.0	0.0	—	233.0a	978.2b	27.8b	2.4a	7.0c	6.8cd	6.9c	14.87a
	0.5	—	222.9a	1004.0c	32.6b	2.3a	7.0c	6.9cd	6.8c	14.96a
	0.5	+	234.6a	1020.6c	32.0b	2.6a	7.6c	7.3d	7.2d	15.29a
	1.0	—	223.6a	997.0c	31.1b	2.5a	6.6c	6.9cd	6.6c	15.08a
	1.0	+	241.2a	1022.2c	30.6b	2.5a	6.7c	7.3d	7.3d	15.38a

#1 バガス+バガス炭

#2 —: 無接種 +: 接種

各調査項目において、全ての処理区間で比較した場合に、同一アルファベット間には有意差が無いことを示す(P<0.05).



第11図 菌株22含有バガス処理が株出しサトウキビの産糖量に及ぼす影響

#1 バガス+バガス炭

#2 産糖量において、全ての処理区間で比較した場合に、同一アルファベット間には有意差が無いことを示す(P<0.05).
 縦棒は標準誤差を示す(n=4).

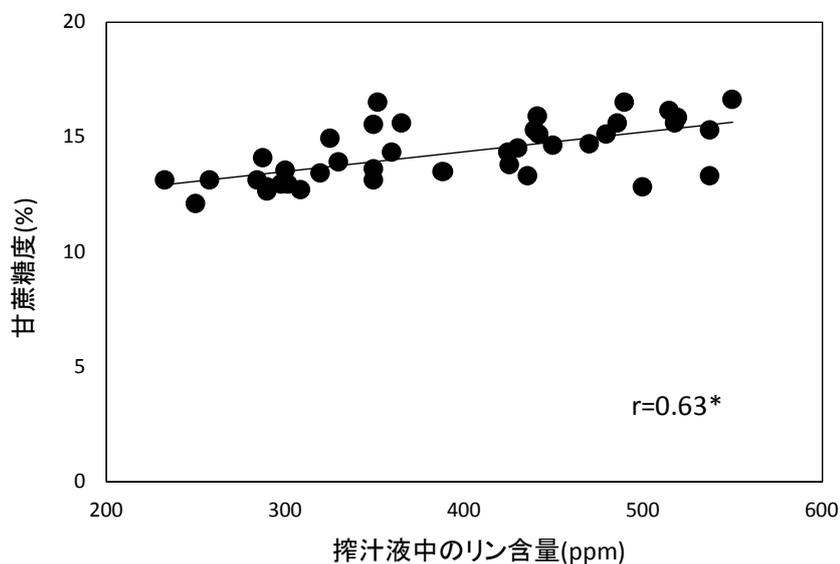
第23表 株出しサトウキビ搾汁液中の成分含量に及ぼす菌株22含有バガスの影響.

リン酸濃度区 (kgP ₂ O ₅ /10a)	バガス添加量 ^{#1} (t/10a)	供試菌 ^{#2} (菌株22)	成分含量(ppm)				
			P	K	Ca	Mg	Si
P-0.0	0.0	—	279.1a	2422.6b	283.3a	189.0ab	19.3a
	0.5	—	309.5ab	2400.3b	272.6a	202.4ab	22.5ab
	0.5	+	329.5bc	2536.6b	318.2a	214.6abc	24.1b
	1.0	—	397.8bc	2142.5ab	307.1a	217.4abc	25.9bc
	1.0	+	429.3c	2542.5b	305.9a	219.2abc	29.5c
P-7.0	0.0	—	354.1bc	2039.2ab	399.9a	223.9bc	18.8a
	0.5	—	397.5bc	2460.7b	382.2a	229.5bc	21.9ab
	0.5	+	470.1d	1963.5a	314.9a	201.4ab	25.1bc
	1.0	—	444.6cd	2430.5b	285.5a	185.9a	25.3bc
	1.0	+	473.4d	2037.9ab	398.1a	245.2c	28.7c

#1 バガス+バガス炭.

#2 —:無接種+接種.

各成分含量において、全ての処理区間で比較した場合に、同一アルファベット間には有意差が無いことを示す(P<0.001).



第12図 甘蔗糖度と搾汁液中のリン含量の関係.

*は5%水準(t検定)であることを示す.

第24表 株出しサトウキビ栽培土壌のバイオマスリンおよび可給態リンに及ぼす菌株22含有バガス処理の影響.

リン酸濃度区 (P ₂ O ₅ kg/10a)	バガス添加量 ^{#1} (t/10a)	供試菌 ^{#2} (菌株22)	バイオマスリン (P ₂ O ₅ mg/100g乾土)	可給態リン (P ₂ O ₅ mg/100g乾土)
P-0.0	0.0	-	3.56a	13.52a
	0.5	-	9.88ab	22.56ab
	0.5	+	15.31c	25.69c
	1.0	-	10.95ab	23.28bc
	1.0	+	16.11cd	26.10c
P-7.0	0.0	-	5.13ab	20.25ab
	0.5	-	12.81bc	27.79c
	0.5	+	21.68d	32.86d
	1.0	-	20.56d	29.51cd
	1.0	+	21.38d	33.61d

#1 バガス+バガス炭.

#2 -:無接種,+:接種.

バイオマスリンおよび可給態リンのそれぞれにおいて,全ての処理区間で比較した場合に,同一アルファベット間には有意差がないことを示す(P<0.05).

第6章

キビ酢液を活用した化学的溶解性による 難溶性無機リン酸の有効化

リン鉱石は、主として肥料生産のための原料として世界中で取引されており、2009年時点で世界全体の資源量は約160億トンであり、およそ1億5800万トンのリン鉱石が産出されている。今後も同じペースでリン鉱石の採掘が進むと経済埋蔵量および基礎埋蔵量の耐用年数は約100年と推定されている（松八重・長坂2012）。日本は現在、中国、南アフリカ、モロッコおよびヨルダンからリン鉱石を輸入している。しかし、高品位のリン鉱石の枯渇と産出国による輸出制限などを背景に、日本のリン鉱石の輸入量は、1993年の140万トンから2008年には77万トンにまで減少しており、リン鉱石1トン当たりの価格も2倍以上に高騰し、リン酸肥料価格も急騰している（農林水産省2015）。今後、世界人口の増加やバイオ燃料の普及などにより、リン酸肥料の需要増加が予測され、我が国にとってリン資源を安定的に確保することは困難であり、自国の食糧自給を確保する上で、他国へのリン資源の依存度を下げる必要がある。一方で、農地に施用されたリン酸肥料の作物による利用効率は低く（西尾・木村1986, 西尾2003）、多くの土壌においてリン酸が作物生産の制限因子となり（西尾1990）、土壌中へのリン酸の過剰蓄積が進んでいる（小原・中井2004）。筆者らは、宮古島の農耕地において、化学肥料由来の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無機リン酸として全リン酸に対し約92.1~96.2%の高い割合で土壌に固定化されていることを明らかにした（前里ら2005）。このため、リン酸肥料の利用率向上を目指した技術開発が求められている。

橋本ら（1969）は、腐植酸およびニトロフミン酸が鉄、アルミニウム、カルシウムおよびマグネシウム塩に対し、リン酸固定を抑制することを報告しているが、普及には至っていない。有機酸が作物の生育に及ぼす影響については、Moslemら（1994, 1995, 続ら1989）が木酢液と木炭の混合物を施肥することに

よりサトウキビの収量構成要素および蔗糖収量の両者を向上させる効果があると報告している。杜ら（1997）は、木酢液と木炭の混合物の施肥はメロン果実の SPS 活性を高めスクロース合成を促進し、スクロース含量が増加することを報告している。しかし、作物へのリン吸収を目的に、バガス炭製造時に生成するキビ酢液を土壌施用した研究はない。既報（前里ら 2006）において、微生物機能の利用による難溶性無機リン酸の可溶化が、春植えサトウキビの生育に及ぼす影響を検討した。本研究は調整したキビ酢液を供試し、難溶性無機リン酸の化学的溶解性について検討するものである。

そこで第 1 節および第 2 節では、施肥リン酸および難溶性無機リン酸の利用率の向上を目的に、大量且つ容易に調整可能なキビ酢液をサトウキビの株元の土壌に施用し、サトウキビの生育および養分吸収に及ぼす影響について検討した。

第 1 節 リン酸三カルシウムの溶解に対するキビ酢液処理の影響

材料および方法

リン酸三カルシウムを供試し、バガスの炭化物製造時に生成するキビ酢液（第 25 表）を処理した際、遊離するリン酸の生成量について調べた。キビ酢液は、サトウキビの搾りかすであるバガスを 600℃の還元域で炭化する際、発生する燻煙を管に引き込み管全体を水で冷却することで液化させ、キビ酢液として回収し実験に供試した。

対照区として、リン酸三カルシウム ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) 1 g を 300 mL の三角フラスコに計量後、蒸留水 99 mL を添加し往復振とう機で 10 分間振とう後、30℃暗条件下で 30 日間インキュベーションした。処理区はリン酸三カルシウム 1 g を同様に 300 mL の三角フラスコに計量した中に、キビ酢液の希釈液（200, 100, 50, 10 倍）および原液 99 mL を添加し対照区と同じ条件下で 30 日間処理した。原液の希釈は蒸留水で行った。処理 30 日後の溶液を No.2 の濾紙（アドバンテック東洋）で濾過し、可溶化したリン酸濃度を ICP プラズマ発光分析装置 (ICP-2000S, 島津) で定量した（日本土壌肥料学会 1994）。リンの溶解量は、得

られたる液中のリン含有量から添加に用いた原液分のリン含有量を差し引いて示した。なお、実験は非滅菌条件下で行い1試験区3反復とした。統計解析は、エクセル統計 2008（社会情報サービス社）を用いて、Tukey 法による多重比較検定を行った。

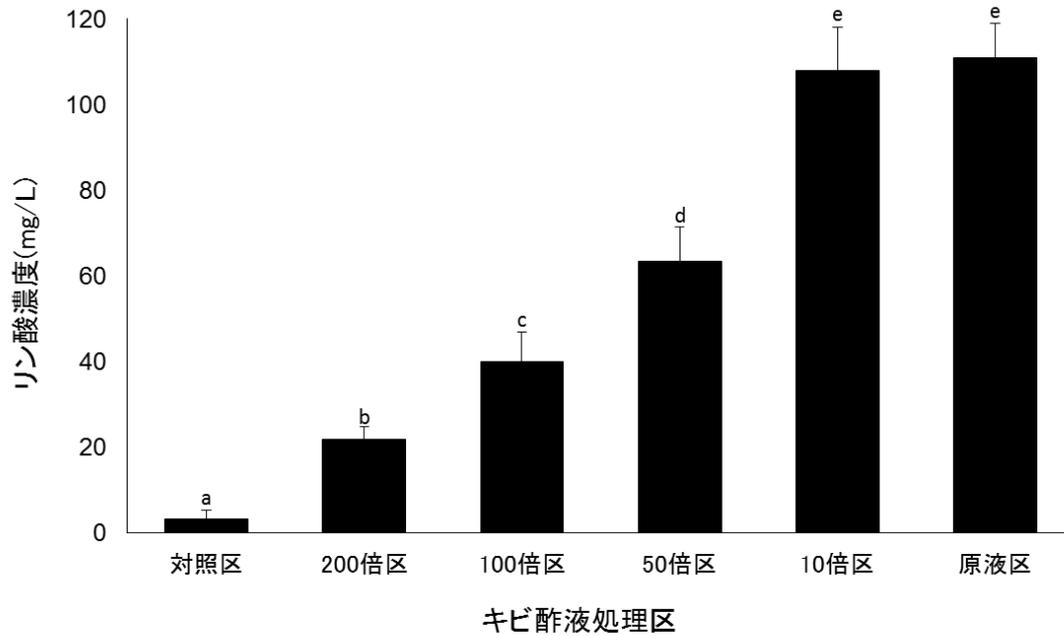
結果および考察

キビ酢液を施用した際のリン酸三カルシウムの溶解量を第 13 図に示した。リン酸三カルシウムに蒸留水のみを添加した対照区に比べて、キビ酢液原液ならびに原液を各割合で希釈して添加した区において、リン酸濃度は有意に高くなった。また、原液の希釈程度が低い区ほどリン酸濃度は有意に高く、100 倍希釈区では約 40 mg/L であったが、10 倍希釈区では約 100 mg/L と対照区に比べて約 30 倍の高い値を示した。なお、本実験では、リン酸三カルシウムとして加えた全リン酸のうち、200 倍希釈区では 1.9%が、また 10 倍希釈区では 5.4%がそれぞれ溶解されたことが示された。

第25表 キビ酢液の化学的性質.

pH (H ₂ O)	EC (mS/cm)	有機酸濃度 ^{#1} (W / V %)	無機成分(mg/L)			
			Al	P	S	K
3.2	220	5.0	81.5	13.5	90.0	116.6

#1 酢酸およびプロピオン酸.



キビ酢液処理区

第13図 リン酸三カルシウム[Ca₃(PO₄)₂]の溶解に対するキビ酢液処理の影響.
 リン酸濃度において、全ての処理区間で比較した場合に、同一アルファベット間には5%水準で有意差が無いことを示す(Tukey法).
 図中の縦棒は標準誤差を示す(n=3).

第2節 サトウキビの生育および品質に及ぼすキビ酢液処理の影響

材料および方法

沖縄県宮古島市下地のサトウキビ連作圃場（北緯 24° 45′，東経 125° 20′，標高 13 m，暗赤色土：化学的性質は第 26 表に記載）において，栽培前の土壌を 2001 年 3 月 1 日に試験圃場全体の 5 箇所から採取し，pH，EC，全窒素含有率，全炭素含有率，水抽出リン酸含有率，可給態リン酸含有率，全リン酸含有率，難溶性無機リン酸含有率，交換性 Ca 含有率を測定した．2001 年 3 月～2002 年 2 月にかけて，サトウキビ品種農林 8 号（*Saccharum* spp. cv. NiF8）を春植え栽培した．施肥については，成分でリン酸 6 kg/10 a，窒素 20 kg/10 a，カリウム 6 kg/10 a を基肥として 2001 年 3 月 6 日に施用した．リン酸はリン酸カルシウム（ CaHPO_4 ），窒素は硫酸アンモニウム（ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ），カリウムは硫酸カリウム（ K_2SO_4 ）で施用した．施用後に耕起し，2001 年 3 月 16 日に農林 8 号の一節苗を畝幅 135 cm，株間 40 cm の栽植密度で定植した．蔗糖が形成される登熟期（川満・上原 2000）に当たる 2001 年 11 月 20 日に，各濃度に調整したキビ酢液を施用した．すなわち，試験区として，キビ酢液の原液，10，50，100，200 倍希釈液の施用区および蒸留水を施用する対照区の計 6 処理区を設けた．原液の希釈は蒸留水で行った．なお，施用量は各液について m^2 あたり 1000 mL（1 株あたり 500 mL）を株元の土壌に施用した．各試験区の面積は 1 区当たり 20.25 m^2 （5 畝×3 m）で，中央 3 畝を調査対象とした．各試験は 3 反復行い，1 反復あたり中庸な生育を示す 3 個体を供試した．植付け方法や肥培管理方法，栽培期間中の灌水，除草および培土（平培土および高培土）などの栽培管理は，製糖用サトウキビ栽培に準じて行った．処理後 100 日に当たる 2002 年 3 月 2 日に，茎長，茎生体重，茎径および株あたりの茎数を測定し，あわせて単位面積あたりの収量を試算した．茎長は地際から最上部の肥厚帯までの長さとした．茎径は葉鞘を取り除いた後，茎中央の節間の短径部分を測定した．品質調査は，沖縄製糖株式会社農務部品質検査室の近赤外線分析装置（260 型，BRAN-LUEBBE 社製）を用いて，製糖用サトウキビ品質検査法に準じて，1 反復につき 3 個体の搾汁液を孔径 $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過し，得られた搾汁液の糖度を測定

し、甘蔗糖度を算出した。なお、糖度の測定は1試験区当たり3反復で行った。3月2日に採取した個体は50 mLの搾汁液を試験管に分取し栓をして、凍結後ドライアイスで詰めたまま琉球大学農学部作物学研究室に移送し、直ちに-40°Cの冷凍庫で保存し、各種元素測定に供試した。搾汁液の元素の定量は、3,000 rpmで15分間遠心後、その上澄み液を1 mLとり25倍に超純水で希釈後、リン、カリウム、カルシウム、マグネシウムおよびケイ素をICPプラズマ発光分析装置を用い、シーケンシャルモードで定性後ポリクロモードで定量した。3月3日に各処理区の株元近くの土壌を採取し、pHの測定および可給態リン酸をトルオーグ法で測定した。土壌サンプルは、1試験区は1反復あたり3箇所、表層から15 cmの作土層を採取し混和した後分析に供試した。なお、土壌分析は各試験区3反復で行った。採取した土壌は風乾した後、粉砕機を用いて粉砕後、ふるい(2mm)にかけて風乾採土として分析に供した。なお、栽培試験および土壌分析より得られた結果に対する統計分析は、エクセル統計2008(情報サービス社)を用いて、一元配置分散分析およびTukey法による多重比較検定を行った。

結果および考察

春植えサトウキビにおける各処理後100日目の生育、収量および甘蔗糖度を第27表に示した。茎長、茎径、茎数については、各キビ酢液希釈区と対照区との間に有意な差異は認められず、いずれも慣行と同程度の生育量を示した。一方、茎重については、対照区および200倍希釈区に比べて、100、50、10倍希釈区および原液区で有意に高かった。また、単位面積あたりの収量を試算したところ、対照区に比べて各施用区はやや高い値を示し、原液区と100倍希釈区では有意に高かった。搾汁液の甘蔗糖度については、各キビ酢液処理区および原液区と対照区との間に有意な差異は認められなかったものの、対照区の15.8%に比べて、キビ酢液100倍希釈区では17.2%と最も高い値を示した。茎重に搾汁液の糖度を乗じて試算した産糖量については、甘蔗糖度の傾向と類似しており、100倍希釈区においては他のキビ酢液希釈区および対照区に比べて有意に高く、また、200、50、10倍希釈区および原液区においては対照区と有意な差異は

なかったもののやや高い値を示した（第 14 図）。

搾汁液のリン，カリウム，カルシウム，マグネシウムおよびケイ素の含有率を第 28 表に示した。リンについては，各キビ酢液処理区が対照区に比べて高く，100，50，10 倍希釈区および原液区では有意に高かった。カリウムについては，対照区に比べて各キビ酢液処理区ではやや低い値を示し，特に 50，10 倍希釈区および原液区では有意に低かった。カルシウムおよびマグネシウムについては，対照区および各キビ酢液処理区との間の差異に明確な傾向は認められなかった。ケイ素については，リンと同様の傾向を示し，対照区に比べて 100，50，10 倍希釈区および原液区で有意に高かった。

上述した搾汁液の各成分と搾汁液の糖度との相関を第 15 図に示した。搾汁液のリン酸含量と甘蔗糖度との関係を解析した結果，両者には有意な正の相関関係（ $r=0.488$ ， $P<0.05$ ）が認められた（第 15 図）。また，搾汁液のカリウム含量と甘蔗糖度との関係を解析した結果，両者には有意な負の相関関係（ $r=-0.434$ ， $P<0.05$ ）が認められた。搾汁液のカルシウム含量およびマグネシウム含量と甘蔗糖度との関係を解析した結果，それぞれ両者には有意な相関関係は認められなかった。搾汁液のケイ素と甘蔗糖度との関係を解析した結果，両者には有意な正の相関関係（ $r=0.424$ ， $P<0.05$ ）が認められた。

収穫時の土壌の pH と可給態リン酸含有率を第 29 表に示した。pH については対照区に比べて各キビ酢液処理区において，やや低い値を示す傾向が認められたものの有意な差異ではなかった。可給態リン酸含有率については，対照区に比べて各キビ酢液処理区において高い傾向が認められ，100，50，10 倍希釈区および原液区では有意に高い値を示した。また，処理区間でも差異がみられ，200 倍希釈区に比べ原液区では有意に高かった。

第26表 サトウキビ圃場試験における供試土壌の化学的性質.

採取地区	土壌統群	栽種	pH		EC (mS/cm)	全炭素 (wt%)	全窒素 (wt%)	リン酸(mgP ₂ O ₅ /100g乾土)				交換性Ca ⁴⁵ (CaOmg/100g乾土)	TC/TN
			H ₂ O	KCl				水抽出リン酸 ^{#1}	可給態リン酸 ^{#2}	全リン酸 ^{#3}	難溶性リン酸 ^{#4}		
下地	長浜	サトウキビ	6.73	6.31	0.52	1.39	0.12	5.3	26.9	806.8	773.9	875	11.58

#1 水抽出リン酸は、風乾採土に水を加え振り混ぜた後ろ液にバナドモリブデン酸液を加え発色後吸光度により求めた。

#2 可給態リン酸は、トルオーグ法によって測定した。

#3 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、吸光度を求めリン酸濃度を定量することにより求めた。

#4 難溶性リン酸は、全リン酸濃度から可給態リン酸濃度を差し引いて求めた。

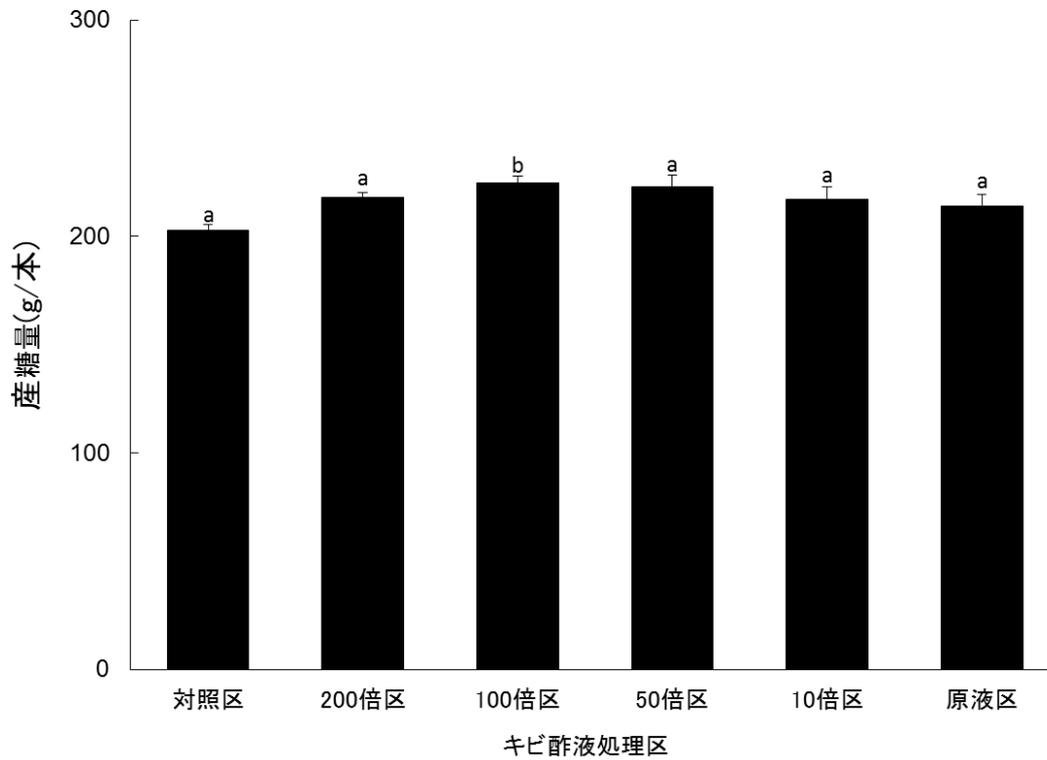
#5 交換性カルシウムは、シヨールンベルガー法、原子吸光度法で測定した。

第27表 キビ酢液処理がサトウキビの生育および収量に及ぼす影響.

処理区	茎長 (cm/本)	茎重 (g/本)	茎径 (cm/本)	茎数 (本/株)	収量 (t/10a)	甘蔗糖度 (%)
対照区	227.1a	1291.3a	2.6a	6.0a	6.0a	15.8a
200倍区	229.4a	1297.5a	2.7a	6.3a	6.1a	16.8a
100倍区	230.3a	1305.9b	2.8a	6.2a	6.4b	17.2a
50倍区	233.9a	1309.7b	2.7a	6.1a	6.3a	16.9a
10倍区	232.5a	1306.4b	2.8a	6.2a	6.2a	16.6a
原液区	235.4a	1315.8b	2.8a	6.1a	6.4b	16.3a

数値は3反復の平均.

各調査項目において、全ての処理区間において比較した場合に、同一アルファベット間には有意差が無いことを示す(P<0.05).



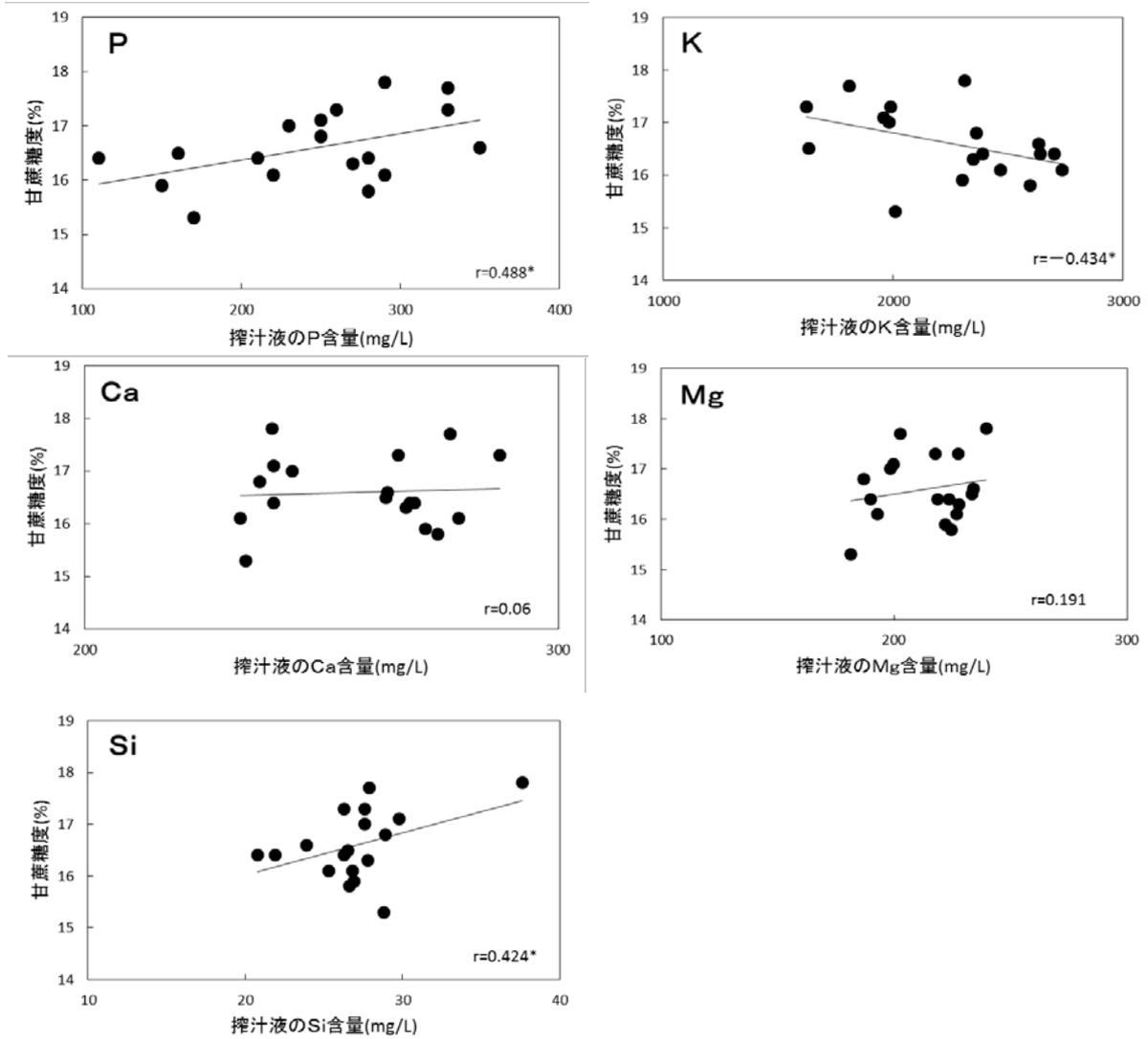
第14図 キビ酢液処理がサトウキビの産糖量に及ぼす影響。
産糖量において、全ての処理区間で比較した場合に
同一アルファベット間には有意差が無いことを示す(P<0.05)。
図中の縦棒は標準誤差を示す(n=3)。

第28表 キビ酢液処理が搾汁液中の各種成分含量に及ぼす影響。

処理区	P	K	Ca	Mg	Si
	成分含量(mg/L)				
対照区	241.9a	2732.8 c	269.7 ab	223.4 bc	18.8 a
200倍区	265.6ab	2640.2 c	234.0 a	181.5 a	21.9 ab
100倍区	301.4 b	2347.8 bc	243.7 ab	198.2 ab	27.6 c
50倍区	298.6 b	1982.4 ab	266.2 ab	217.7 bc	26.3 bc
10倍区	298.1 b	1683.2 a	278.9 b	226.7 c	25.3 bc
原液区	289.3 b	1623.7 a	277.1 ab	232.5 c	24.5 b

数値は3反復の平均。

各成分含量において、全ての処理区間で比較した場合に同一アルファベットには有意差が無いことを示す(P<0.05)。



第 15 図 搾汁液の各成分と搾汁液の糖度との関係。

*は 5%水準 (t 検定) で有意, 無印は有意でないことを示す。

P=リン酸, K=カリウム, Ca=カルシウム, Mg=マグネシウム, Si=ケイ素。

第29表 キビ酢液処理がサトウキビ栽培土壤中のpHおよび可給態リン酸濃度に及ぼす影響.

処理区	pH		可給態リン酸 ^{#1} (mgP ₂ O ₅ /100g乾土)
	H ₂ O	KCl	
対照	6.66a	6.39a	25.4 a
200倍	6.55a	6.28a	28.6ab
100倍	6.58a	6.31a	30.3bc
50倍	6.48a	6.23a	30.8bc
10倍	6.46a	6.21a	31.1bc
原液	6.43a	6.18a	32.6 c

#1 可給態リン酸は、トルオーグ法によって測定した。

数値は3反復の平均。

pHおよび可給態リン酸において、全ての処理区間で比較した場合に、同一アルファベット間には有意差が無いことを示す(P<0.05)。

第7章

総合考察

島嶼である宮古島の農業は地下水に支えられている。宮古島は有効土層が浅く保水力が低いにもかかわらず年間降水量が多いことから(大城・浜側 1980), 土壌養分の溶脱が起こりやすく地下水の汚染につながっている(安元・前里 2013)。このことから, 近年宮古島では島外から移入される化学肥料のみに依存したこれまでの施肥方法を改め, 化学肥料を減らし, さらに島内で肥料成分となりうる資源を可能な限り循環させる動きが活発となってきている。この, 化学肥料の低投入型施肥技術を確立し, 宮古島の農業に定着させることは地下水を保全する上で重要である。

作物栄養の重要な要素の一つであるリン(P)は, 土壌中の陽イオンに吸着されやすく, 難溶化しやすいことから, しばしば作物生産の制限要因になる(西尾 1990)。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でカルシウム(Ca)を豊富に含有した土壌群が広く分布しているが, 著者らの調査によって, 作物に利用されにくい難溶性無機リン酸は全リン酸に対し9割以上を占めることが明らかとなった(前里ら 2005)。

現在, リン肥料の原料となるリン鉱石の枯渇が世界的に問題とされる中(今井 1981), 日本にはリン資源がなく, その全てを海外からの輸入に頼っているのが現状である。現行の技術で採掘可能なリン鉱石資源量の耐用年数は約100年と推定されており, 持続的な食料生産の見地から大きな問題になっている(栗原・越野 1986, 松八重・長坂 2012)。そこで, 土壌中に難溶性無機リン酸として過剰に蓄積されているリン(小原・中井 2004)をうまく可溶化し, 作物に供給することができれば, 持続的な作物生産技術の構築の一助となると考えた。

沖縄県宮古島に広く分布する琉球石灰岩由来の暗赤色土に含有される, 難溶性無機リン酸の作物への再利用および化学肥料として施用したリン酸の難溶化を防ぐことで有効態リン酸濃度を高め, リン酸の利用率向上を目的に下記の研究を実施した。

まず、第2章では宮古島の琉球石灰岩を母岩とする暗赤色土に蓄積していることが想定される難溶性無機リン酸の存在を土壤分析により検討した。ところで、土壤リンの動態には土壤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、土壤蓄積リン活用のために微生物を利用するには至っていない。そこで、難溶性無機リン酸の再生・循環の方法として、土壤微生物であるリン溶解菌の機能を活用し、暗赤色土に含有される難溶性無機リン酸化合物を可溶化し土壤中に存在する難溶性無機リン酸を効率的に作物へ吸収させ、リンの利用率向上を目指し一連の実験を行った。

第3章では、土壤微生物であるリン溶解菌の分離源として用いた暗赤色土より分離選抜した有機酸生成能を有するリン溶解菌 100 株の中から、を炭素源として、バガスおよびバガス炭の混合有機物に添加した有機資材を調製し栽培試験を試み、作物の生育および品質に対する影響を検討した。

第4章、第5章および第6章では、バガス炭を担体としたリン溶解菌による難溶性無機リン酸の可溶化が作物の生育および養分吸収に与える影響について検討した。

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難溶性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。合成ヒドロキシアパタイトを含有した寒天平板にクリアゾーンを形成した 100 株のリン溶解菌を分離した。分離菌のリン溶解能に関して難溶性リン酸塩を含む培地で検討した。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た菌株 22 を選抜した。

菌株 22 は 1/2 希釈の NB (Nutrient Broth) 基本培地で pH を中性域に保って振とう培養すれば効率よく増殖できることが明らかになった。 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{FePO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ および $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ いずれのリン酸塩に対しても溶解能を示した供試菌 22 は、添加炭素源を利用して乳酸、酢酸およびコハク酸などを生成し、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。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、可給態の炭素源が土壤に投入されることが重要と考えられた。

菌株 22 は菌学的性状試験の結果、細胞内結晶タンパク形成能を有し *Bacillus*

thuringiensis と同定した。菌株 22 は、耐熱性の胞子を形成する桿菌で、土壌環境に広く分布する土壌微生物である。また、渡部（1988）は、土壌微生物の生成する結晶タンパクに病害虫に対する殺虫効果があることから、多くの農業分野で環境に配慮した微生物農薬として実用化の可能性について報告している。今後、菌株 22 に関し土壌微生物の高度利用の観点から土壌に蓄積した難溶性無機リン酸の再利用・リンの循環に加え病害虫に対する殺虫性についても興味もたれる。

また、菌株 22 の担体として供試したバガス炭は木炭に比べ保水性が大きく、多量の水分を空隙に保持することが示された。このことは、菌株 22 がバガス炭の空隙で担持され、一般の土壌微生物の競合などの土壌環境に適応し生存する可能性を示唆した。

リン酸三カルシウムおよび土壌に菌株 22 含有バガス+バガス炭を施用した土壌で作物の生育は促進された。したがってバガスなどの有機資材と共に菌株 22 のようなリン溶解菌を土壌に施用すると施用したリン酸または難溶性無機リン酸の可溶化を促進し、作物によるリン酸の利用率が高まることが示唆された。

また、菌株 22 含有バガス+バガス炭を処理することによりサトウキビの生育を促進し、甘蔗糖度などの品質向上も認められた。また、搾汁液中のリン成分と甘蔗糖度とは正の相関関係にあり、甘蔗糖度は吸収されたリン酸成分によって高まることが示唆された。土壌分析の結果、土壌バイオマスリンが高くなる傾向にあり、リン溶解菌である菌株 22 によって溶解されたリン酸は一旦、有機栄養微生物に取り込まれ土壌バイオマスの死後、無機化し可給態リンとして作物に利用される可能性が示唆された。菌株 22 含有バガス+バガス炭を処理することにより株出しサトウキビの生育は促進し、甘蔗糖度などの品質向上も認められた。搾汁液中のリン成分と甘蔗糖度との関係および土壌バイオマスリンが高くなる傾向などの結果は、春植えサトウキビの結果と類似した。

化学的作用による機能性を活用した研究の一環として、酢酸およびプロピオン酸を含有するキビ酢液を土壌に施用した結果、施肥リン酸の難溶化の抑制および難溶性無機リン酸を可溶化し、サトウキビのリン吸収量が増加し収量および品質が高まった。

本研究は、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、第2表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壌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低投入型施肥技術による作物栽培を確率し、土づくりを通した宮古島の命の源である地下水保全の可能性について示唆した。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり終始懇篤なる御指導を賜りました，琉球大学農学部教授 川満芳信博士には，心から厚く感謝申し上げます。

また，本論文の取りまとめに際し惜しめない御助言を頂きました，琉球大学農学部教授 上野正実博士，小宮康明博士および平良英三博士，鹿児島大学農学部教授 坂上潤一博士，佐賀大学農学部教授 鈴木章弘博士および野瀬昭博博士，京都大学大学院工学研究科教授 清水芳久博士には，心からお礼申し上げます。

本研究の遂行に際しては，琉球大学農学部作物学研究室の方々，沖縄県農業研究センター宮古島支所 砂川善信氏および沖縄県立宮古総合実業高等学校 武島健二氏には多大なご協力を頂き，お礼申し上げます。

そして本研究は，沖縄県立宮古総合実業高等学校 環境班の生徒達とともに取り組んだ。ここに感謝の意を表する。

最後に，沖縄県立宮古総合実業高等学校に在職し，社会人入学制度を活用，鹿児島大学大学院連合農学研究科 博士課程に在籍し長年の夢であった学位を取得できたことは，職場の理解があってこそ成し遂げることができたものであり、校長 具志堅三男先生はじめ職員の方々には，心より感謝申し上げます。

引用文献

- Alexander, M. 1977. Introduction to soil microbiology. 2nd ed. John Wiley & Sons: 338-339.
- 土壌環境分析法編集委員会 1997. 土壌環境分析法. 博友社. 11-272.
- 長谷川武治 1990. 微生物の分類と同定(下). 学会出版センター, 東京. 99-160.
- 橋本雄司・鶴沢綱夫・高山秀穂 1969. 腐植酸およびニトロフミン酸塩の形態とリン酸固定抑制作用との関係. 土肥誌 40: 457-463.
- Hendriksen, N. B. and Hansen, B. M. 2002. Long-term survival and germination of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in a field trial. Canadian Journal of Microbiology 48: 256-261.
- 平館俊太郎 1999. 根から分泌される有機酸と土壌の相互作用－土壌による吸着反応と有機酸による溶解反応－. 化学と生物 37(7): 454-459.
- 杜冠華・小川正則・安藤定美・続栄治・村山盛一 1997. 木酢液と木炭の混合物がメロン果実のスクロース含量に及ぼす影響. 日作紀 66(3): 369-373.
- Ichimatsu, T., Mizuki, E., Nishimura, K., Akao, T., Saitoh, H., Higuchi, K. and Ohba, M. 2000. Occurrence of *Bacillus thuringiensis* in fresh waters of Japan. Current Microbiology. 40: 217-220.
- 今井秀夫 1981. 火山灰土壌のリン酸吸着について－リン酸吸着に及ぼす平衡 pH の影響. 土肥誌 52(1): 11-19.
- Katznelson, H., Bose, B. 1959. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non-rhizosphere soil. Can. J. Microbiol. 5: 79-85.
- 川満芳信・上原康之 2000. 剪葉処理がサトウキビの光合成速度, 蒸散速度, 糖蓄積に与える影響. 沖縄甘蔗糖年報 31:77-89.
- 川崎道夫・松田智明 2008. 走査型電子顕微鏡の特徴と試料作製法. 前田英三・三宅博・井上吉雄編, 作物の形態研究法－ミクロからマクロまで－. 日本作物学会, 東京. 29-32.
- 木嶋利男 1994. 拮抗微生物による病害防除. 農村漁村文化協会, 東京. 86-90.

- 木村龍介・西尾道徳 1992. 土壌バイオマス P の測定法. 土と微生物 39:49-52.
- Kucey, R. M. N. 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin alberta soils. Can. J. Soil Sci., 63:671-678.
- 栗原淳・越野正義 1986. 肥料製造学. 養賢堂, 95-143
- 黒田彰夫・滝口昇・加藤純一・大竹久夫 2005. リン酸源枯渇の危機予測とそれに対応したリン有効利用技術開発. 環境バイオテクノロジー学会誌 4: 87-94.
- 前里和洋・川満芳信・清水芳久・松井三郎 2005. 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. 環境システム計測制御学会誌 10: 73-80.
- 前里和洋・川満芳信・清水芳久・松井三郎 2006. 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Ⅱ. 環境システム計測制御学会誌 11: 35-40.
- 松八重一代・長坂徹也 2012. 国際貿易に伴う世界および日本のリンフロー. 生物工学誌 90: 470-472.
- 宮古島地下水水質保全対策協議会 2002. サングの島の地下水保全. 宮古広域圏事務合, 40-104.
- 宮古島市上下水道部 2013. 宮古島地下水水質保全調査報告書. 宮古広域圏事務組合, 27-36.
- 宮丸直子・儀間靖・輿那嶺介功・亀谷茂 2008. 沖縄における緑肥の生育特性および分解特性. 沖縄農業 42: 21-27.
- Moslem Uddin, S. M., Murayama, S., Ishimine, Y. and Tsuzuki, Y. 1994. Studies on sugarcane cultivation I. Effects of the mixture of charcoal with pyroligneous acid on cane and sugar yield of spring and ratoon crops of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Jpn. J. Trop. Agr. 38: 281-285.
- Moslem Uddin, S. M., Murayama, S., Ishimine, Y., Tsuzuki, Y. and Harada, J. 1995. Studies on sugarcane cultivation II. Effects of the mixture of charcoal with pyroligneous acid on dry matter production and root growth of summer planted sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Jpn. J. Crop Sci. 64: 747-753.
- 中西康博・池間昌克 2001. 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. 日本土壌肥料学雑誌. 72:372-378.
- 中西康博・高平兼司・下地邦輝 2001. 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. 日本土壌肥料学雑誌, 72:365-371
- 中西康博 2001. 沖縄県宮古島におけるサトウキビの施肥実態と地下水窒素濃度との関係. 土肥誌 72: 499-504.
- 日本土壌肥料学会 1994. 土壌構成成分解析法(Ⅲ). 博友社, 東京. 5-20.
- Nishio, M. 1985. Some ecological features of phosphate-solubilizing microorganisms in grassland soils. Proceedings of the 15th International Grassland Congress. 483-485
- 西尾道徳・木村龍介 1986. リン溶解菌とその農業利用の可能性. 土と微生物 28: 31-40.
- 西尾道徳 1990. 土壌微生物の基礎知識. 農村漁村文化協会, 東京. 192-193.
- 西尾道徳 2003. 農業生産環境調査にもとづく我が国のリン酸形態の解析. 土肥誌 74: 35-443.
- 新田孝子, 森山高広, 池田正治 1991. 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.
- 農林水産省 2015. 肥料をめぐる事情. [http://www.maff.go.jp/J/seisan/kankyo/sehi/pdf/hiryo_meguji.pdf#_h1m1\(2015/8/30/閲覧\)](http://www.maff.go.jp/J/seisan/kankyo/sehi/pdf/hiryo_meguji.pdf#_h1m1(2015/8/30/閲覧)).
- 小原洋・中井信 2004. 農耕地土壌の可給態リン酸の全国的変動－農耕地土壌の特性変動－. 土肥誌 75: 59-67.
- 沖縄県宮古農林振興センター2015. 宮古の農林水産業. 22-23.
- 沖縄県農林水産部 1993. 「サトウキビ栽培指針」。6-7.
- 沖縄県総務部宮古事務所 2014. 宮古概観. 沖縄県総務部宮古事務所, 1-2.
- 大城喜信・浜川兼 1980. よみがえれ土－沖縄の土壌とその改良. 新報出版, 98-105.
- 大屋一弘 1976. 宮古島北東部土壌の理化学性. 沖縄農業, 14(1):29-31
- 大屋一弘 1978. 宮古島南西部土壌の理化学性. 沖縄農業, 14(2), 33-38
- 大屋一弘・喜名景秀 1989. サトウキビ増収法に関する土壌肥料学的研究. 第3報 暗赤色土のpHと可溶性ケイ酸. 琉大農学報 36: 25-32.
- 坂崎利一 1993. 医学細菌同定の手引き. 近代出版, 東京. 280-310.

- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. 1986. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams & Wilkins, USA.12: 1105-1138.
- 玉城雄一・川満芳信 1998. 窒素処理がサトウキビ茎の糖蓄積に及ぼす影響. 沖縄農業 33 : 9-14.
- Sperber, J. I. 1958a. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Aust. J. Agric. Res.*, 9(6):778-781.
- Sperber, J. I. 1958b. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Aust. J. Agric. Res.*, 9(6):784-787.
- Subba-Rao, N.S 1982. Phosphate solubilization by soil microorganisms. In "Advances in Agricultural Microbiology," Butterworth, London: 295-303.
- 田中明・渡辺紀元・石塚喜明 1969. 難溶性リン酸塩の溶解度積よりみた湛水土壌の土壌溶液リン酸濃度の解析. 土肥誌 40(10): 406-414.
- 続栄治・脇山恭行・江藤博六・半田弘 1989. 木酢液ならびに木酢液と木炭の混合物がイネの生育および収量に及ぼす影響. 日作紀 58(4): 592-597.
- Vos, P. D., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H. and Whitman, W. B. 2009. *Berge's manual of systematic Bacteriology. Second Edition Vol. 3* Springer, New York. 21-128.
- 渡部仁 1988. 微生物で害虫を防ぐ.微生物的防除法とは. 裳華房, 東京. pp. 108-146.
- 山本洋司・朴光来・中西康博・加藤茂・熊澤喜久雄 1995. 宮古島の地下水中の硝酸態窒素濃度と $\delta^{15}\text{N}$ 値. 日本土壌肥料学雑誌, 66:18-25.
- 山根一郎 1986. 土壌学の基礎と応用. 農山漁村文化協会, 東京. 87-90.
- 安元純・前里和洋 2013. 沖縄の地下水保全. 水環境学会誌 36 : 261-265.

要 旨

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難溶性無機リン酸の賦存量に関する検討および難溶性無機リン酸の作物への再利用による循環を目途に、土壌分析およびリン溶解菌を分離・選抜し、各種難溶性リン酸塩 ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{FePO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ および $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) に溶解能を示した菌株 22 を同定した。そして、分離株である菌株 22 の各種炭素源に対するリン溶解能の検討および菌株 22 の担体として用いたバガス炭の形態および物理性について炭化物である木炭と比較検討した。また、菌株 22 による難溶性無機リン酸の可溶化が株出しサトウキビの生長および品質に及ぼす影響について栽培試験を行った。

さらに、バガス炭製造時に副産物として生成するキビ酢液を供試し、土壌施用することによる施肥リン酸および暗赤色土に蓄積した難溶性無機リン酸の可溶化が春植えサトウキビの生長および品質に及ぼす影響について検討した。

宮古島に広く分布する暗赤色土の耕地土壌では、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、作物に利用されにくい不溶性のリン酸が高い濃度で土壌に蓄積されており、土壌全リン酸の 9 割以上を占める難溶性無機リン酸の存在を認めた。化学肥料を施用した耕地土壌の比較土壌として、化学肥料無施用の林地の土壌に含有されている可給態リン酸および全リン酸濃度について土壌分析した結果、その値は極めて低濃度であることを認めた。そのことは、宮古島の暗赤色土に高濃度で含有、蓄積されている難溶性無機リン酸は、元々宮古島の土壌に含有されていたものではなく、沖縄の本土復帰後近代農業の象徴として、急速に普及した化学肥料由来のリン酸源であることが示唆された。

宮古島の暗赤色土を分離原に 100 株のリン溶解菌を分離し、それら分離株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菌株 22 を選抜した。形態観察、生理的性状試験および *16S rDNA* 領域の塩基配列検索結果から、菌株 22 は *Bacillus thuringiensis* と同定した。菌株 22 は菌学的性状試験の結果、細胞内結晶タンパク形成能を有することを認めた。

いずれのリン酸塩に対しても溶解能を示した菌株 22 は、添加炭素源を資化して乳酸、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、易分解性のバガスおよび糖蜜など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、担体（キャリアー）として用いたバガス炭に効率よく定着した。菌株 22 の担体として供試したバガス炭の表面構造を電子顕微鏡（SEM）で形態観察した結果、バガス炭には、直径 10~20 μm の空隙が規則正しく配列されたハニカム構造が認められた。その形状は、細菌である菌株 22（2~4 μm ）より大きく、同菌株を担持するのに適していた。pF-水分曲線の結果から、バガス炭は木炭に比べ保水性が大きく、多量の水分を空隙に保持することが示された。菌株 22 はバガス炭に担持され生息が可能となり、他の微生物の競合などの土壤環境に適応し生存する可能性が示唆された。また、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、可給態炭素源が土壤中へ投入されること、または土壤中における可給態炭素源の存在が重要と考えられた。

菌株 22 接種バガス炭とバガスの混合資材を施用した土壤において、株出しサトウキビの生育は菌株 22 無接種区に対して促進され、リンの吸収量も高まった。したがって、易分解性のバガスとともに、リン溶解菌をバガス炭に定着させ土壤に施用することによって、難溶性無機リン酸の可溶化は促進され、サトウキビのリン酸の利用効率が高まったと考えられる。リン成分と甘蔗糖度とは正の相関関係にあり吸収利用されたリン成分によって甘蔗糖度は上昇したと考えられる。そして、土壤分析の結果、土壤バイオマスリンおよび可給態リン酸は菌株 22 接種資材の施用により高い値を認めた。

また、バガスの炭化物製造時に生成するキビ酢液を供試し、難溶性無機リン酸の化学的溶解性について検討した。水に対する溶解度の低いリン酸三カルシウムに対し、キビ酢液を処理した結果、リン酸が高い値で検出され、その影響が明らかになった。なお、リン酸三カルシウムとして加えた全リン酸のうち、200 倍希釈区で 10.9%、10 倍希釈区で 54.0%がそれぞれ高い割合で溶解された。さらにサトウキビの登熟期にキビ酢液を株元の土壤に施用することで、リン酸の利用率が改善され甘蔗糖度など品質が向上することが明らかになった。

以上の結果より、リン溶解菌など微生物機能を活用し、また、キビ酢液施用

によって化学的溶解性による土壤中難溶性無機リン酸を可溶化させ、サトウキビのリン酸の吸収率を高め、成長促進および甘蔗糖度など品質向上が計れることを明らかにした。以上の成果は、化学肥料の低投入型施肥技術の確立の一助となり、化学肥料の負荷量が抑制でき、地下水保全に繋がる可能性が期待できる。

Summary

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 bacterium from the soil.

We assumed that the soil contains phosphorus which can be used for growing crops however, a high density of non-soluble phosphorus has accumulated in the soil. We isolated 100 groups of phosphorus dissolving bacterium from 6 kinds of soil and tested their dissolving ability in the medium which contained non-soluble phosphate. We then selected the group which had high phosphorus dissolving ability with the tricalcium phosphate. The phosphoric acid magnesium and phosphoric acid iron are considered the best.

The nucleotide sequence results of *16S rDNA* area, the Strain 22 was identified as *Bacillus thuringiensis*. The bacterial strain22 which demonstrated its phosphorus dissolving ability in all phosphates was thought to produce organic acids such as lactic acid, acetic acid and succinic acid. With these organic acids, the strain22 was able to solubilize phosphates utilizing added carbon resources with these organic acids, the strain22 was able to solubilize phosphates. When the strain22 was cultivated in the medium and added with bagasse and molasses. The pH of the medium was decreased reduced. The bagasse charcoal, honeycomb voids that were observed are regularly arranged with diameters of 10~20 μm . The results of pF-moisture curve indicate that, bagasse charcoal has relatively large water retention compared with charcoal. Bagasse charcoal was shown to retain large amounts of water in the air gaps of it's surface. Strain 22 enables life supported by bagasse charcoal, suggesting the possibility of microorganisms adapting to survive in the soil environment. Competition from other microorganisms supports this theory.

The strain22 was considered to survive in the pores of bagasse charcoal using bagasse and molasses as organic carbon sources and generating organic acids, while

proliferating under the protection of the porous bagasse charcoal. It was considered vital to add available organic material to the soil composition for the phosphorus dissolving bacterium strain22 to produce organic acids.

The growth of crops and absorption were promoted with 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 Strain-22 can facilitate solubilizing of accumulated phosphorus in the soil when it is used in conjunction with organic carbon sources such as bagasse and molasses. Consequently this resulted in an increase in absorption of phosphorus on the growth and nutrient uptake of sugarcane in ratooning cultivation.

Effect of bagasse vinegar on the dissolution of tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). The bagasse vinegar was applied to the tricalcium phosphate, solubility of phosphoric Acid and was detected at higher values as compared with water. The present results, suggest that the bagasse vinegar treatment at the soil surface to the ripening stage of sugarcane improves the cane quality through the utilization of phosphoric acid in the soil. The result of the study implies that phosphorus dissolving bacterium such as the strain22 can facilitate solubilizing accumulated phosphorus in the soil when it is applied with organic carbon sources such as bagasse and molasses. Consequently, this results in an increase in the absorption of phosphorus by crops.

The present study suggests that, solubilization of phosphorus accumulated in the soil through microbial function advantage and bagasse vinegar as well as chemical solubility such as phosphorus dissolving bacteria. This in turn, increases the utilization of phosphorus in sugarcane, and contributes to overall growth and quality improvement.