自然栽培と慣行農業圃場の微生物叢の比較調査

笹川創平*,**・武田征士*,***

Comparison of soil microflora between conventional and natural farming fields

Sohei SASAGAWA*,** , Seiji TAKEDA*,***

要　旨：日本の食糧生産は、低い食料自給率、農薬による環境汚染や人体への影響、輸入に依存する化成肥料とその過剰使用といった問題を抱えている。これらの解決手段として、自然栽培（自然農法、自然農）と言われる農法がある。農薬と肥料を使用しない自然栽培では、慣行栽培と比較して、環境への負荷の減少・コスト削減などのメリットがあるが、自然栽培土壌についての科学的根拠は不足している。本研究では、京都府木津川市の自然栽培農家の協力を得て、同地域内の自然栽培土壌と慣行栽培土壌の微生物叢の比較をメタゲノム解析により行なった。メタゲノム解析の結果から、自然栽培と慣行栽培による細菌組成の差異が示唆された。このような自然栽培におけるデータの蓄積から、自然栽培に特長的な環境の特定につながることが期待される。

（2023 年 9 月 29 日受理）

1　はじめに

増え続ける世界人口の食糧を賄うため、近代農業は農薬や肥料を使用し、農作物の安定収量を成し遂げてきた。一方で、これら化学合成品や畜産由来の有機肥料の過剰使用、農地開発による自然環境の減少、水の過剰利用、低い食糧自給率、農業従事者の高齢化による離農と耕作放棄地の増加、温室効果ガスの排出など、現代の農業は様々な問題を抱えている。

国内外問わず、農薬及び肥料の過剰使用と環境や人体への悪影響が懸念されてきた。農薬は農業において重要な役割を担うが、散布による急性及び慢性の人体毒性があり、農薬の環境および人体への悪影響は、依然として深刻な問題である (Tudi et al, 2022)。また、化成肥料は過剰使用による問題の他、原材料の多くを輸入に頼っていることから、世界情勢の不安定化などによる価格高騰が農作物栽培コストの高騰に繋がっている。

これらの観点から、日本の農業問題、世界の持続可能な農業の形態を支える手段の一つとして、農薬や化成肥料を使用しない農法が提唱されてきた。岡田茂吉氏（自然農法）に始まり、福岡正信氏、川口由一氏（自然農）、木村秋則氏（自然栽培）らが提唱した手法は、細かい部分に相違はあるものの、農薬や化成肥料を全く使わずに農作物を育てるというものである（大星 2000、福岡 1983、2013, 川口　2019、木村　2007）。ここでは、この農法をまとめて「自然栽培」、従来通りの農薬・肥料有りの栽培法を「慣行栽培」と呼ぶ。自然栽培は、雑草管理や不安定な収穫などのデメリットがあるものの、農薬や肥料を使った慣行栽培に比べて、初期コストや環境負荷の大幅な軽減、農業従事者の健康、安全な農作物栽培、生物多様性維持などの利点がある。尚、化学合成物質を使わないという点で、自然栽培は有機農業の一種であるが、外からの持ち込みを極力減らすという目的で、牛糞や鶏糞由来の堆肥なども使用しないのが自然栽培の特徴である。

環境・経済コストの観点から優れた農法ではあるものの、自然栽培には収穫の不安定さ、雑草管理等の労力増などのデメリットが考えられる。また、慣行農法に比べて土壌生物多様性へのメリットが示唆されているが、根拠となるデータが乏しく、その効果についてはほとんど分かっていない。そこで、本研究では、京都府木津川市の自然栽培農家の協力を得て、同地域内の自然栽培土壌と慣行栽培土壌をサンプリングし、その中に含まれる微生物叢の比較をメタゲノム解析により行なった。メタゲノム解析とは、試料中の DNA の配列情報を網羅的に取得し、データベースと照合することで、存在する微生物の種類や構成比、機能性遺伝子の割合を把握する解析手法である。得られた結果から、自然栽培圃場に特徴的な

* 京都府立大学　生命環境学部　農学生命科学科
** 現所属：京都大学大学院　生命科学研究科
*** Corresponding author

微生物を抽出することができた。地域差があるのは当然ではあるが、他圃場でもこのような知見が蓄積することで、自然栽培圃場の特性が明らかになっていくことが期待される。

2. 材料と方法

1） 材料

自然栽培及び慣行栽培の土壌サンプルは Red Rice 自然農園 (京都府木津川市加茂町) 及び隣接する慣行栽培農園から、2022 年 6 月 28 日、9 月 28 日、12 月 22 日に採取した。植物体地下部の影響を調べるため、植物体直下と、そこから 30cm 離れた場所から採集した。6 月 28 日は、それぞれズッキーニと万願寺唐辛子を育てている圃場、9 月 28 日は自然栽培ではズッキーニと万願寺唐辛子、慣行圃場では 6 月と全く同じ場所でのサンプリングという都合上、ジャガイモとゴーヤを生育していた場所から採集した。12 月 22 日は、自然栽培では万願寺唐辛子とコウサイタイ、慣行圃場ではダイコンとコウサイタイを栽培していた圃場から採集した。

2) 方法

土壌からの DNA 抽出は、1 サンプル辺り 0.5 g の土壌を材料に、MN Bead Tube Type A (MACHEREY-NAGEL) で粉砕し、NucleoSpin Soil (MACHEREY-NAGEL）のプロトコルに従って抽出した。抽出された DNA を 1 % アガロースゲルでの電気泳動で確認した後、株式会社生物技研 (https://gikenbio.com/) のアンプリコンシーケンス解析の受託サービス（16S rRNA の V3/V4 領域、341f-805r）で、MiSeq システムによるメタゲノムシーケンスを行った。

シーケンシング結果を QIIME2 を用いてメタゲノム解析を行なった (Bolyen et al, 2019)。初めに DADA2 による低品質なシーケンシングリードの除去、修復を行い、クオリティスコアプロットを作成した (Challahan et al, 2016)。処理を行うのはフォワードリード、リバースリード共にプライマーとの相同配列を含みつつ、シーケンシングプロットの中央値がクオリティスコア 30 を下回る部分とした。DADA2 による処理後、scikit-learn を用いて SILVA を参照データベースとした各サンプルの属レベルでの細菌の組成表を作成した (Pedregosa et al, 2011; Quast et al, 2013; Yilmaz et al, 2014; Glöckner et al, 2017)。細菌については、それに先駆けて、Mafft によるアライメント、fasttree による無根系統樹を経て有根系統樹を作成した (Katoh et al, 2002; Price et al, 2009)。自然栽培と慣行栽培、栽培作物、作物の根元からの距離による各サンプルの細菌、α 多様性、β 多様性指標の作成を行なった。この時、α 多様性は Shannon index を用い、統計検定を Kruskal-Wallis 検定で行なった (Shannon, 1948; Kruskal et al, 1952)。β 多様性は Bray-Curtis index を用い、統計検定を PERMANOVA (Permutational multivariate analysis of variance) で行なった (Bray et al, 1957; Anderson, 2017)。

3. 結果

土壌細菌のメタゲノム解析

抽出した土壌 DNA をゲル電気泳動で確認した後（Figure 1A)、シーケンス受託先の生物技研に送付した。生物技研では、ライブラリー作成、DNA アナライザーによる品質確認（Figure 1B)、MiSeq システムによって 2 × 300 bp のシーケンシングが行われた。ペアリード数はいずれのサンプルも 4 万～ 7 万程度であった。
得られたシーケンス結果と分類解析から、Figure 2 にあるようなバープロットが得られた。これは、生物分類（界、門、綱、目、科、属、種）ごとに表示することができるようになっている。分類レベルで表示したところ、種レベルでは分類が細かすぎて全体が把握できなかったため、属レベルでの分類を利用することとした。

属レベルの分類グラフから、自然・慣行栽培圃場で差のある細菌類を抽出した（Figure 2, Table 1)。6 月、9 月、12 月のいずれでも、自然栽培で多いものが 10 程度、慣行栽培で多いものが 3 ～ 5 程度抽出できた。自然栽培の方で抽出数が多かったことから、細菌の多様性は自然栽培圃場の方が高い事が示唆される。また、自然栽培で抽出したもののほとんどが重複していたことから、これらの細菌類については、季節変動が少ないことが示唆される。

自然栽培圃場で共通してみられたもののうち、*Candidatus Solibacter* は 2 年間の休耕地で検出され、キチンやヘミセルロース、ペクチン、デンプン、キシラン等の複雑な基質を利用できることが示されている（Li et al., 2023)。*Candidatus Koribacter* は、有機栽培農地に多く見られ、農作物収量にも効果的であることが示唆されている（Li et al, 2023)。また、JG30-KF-AS9 は化成肥料を減じた圃場で増加しており、有機圃場の指標種のひとつとして示唆されている（Shen et al, 2021)。今回の調査と合わせて、これらの細菌類が化成肥料の少ない、あるいは無い状態で共通して検出されていることから、これらが脱・化成肥料圃場の指標となり得る事が示唆される。

生物多様性解析

細菌のそれぞれについて、群内の多様性を検証する α 多様性、群間の多様性を評価する β 多様性解析を行った。サンプル数が 8 であり正規分布する可能性が期待で

きないことから、先行研究及びQIIME2で推奨される検定方法であるノンパラメトリックなKruskal-Wallis検定及びPERMANOVA検定を行った。Shannon indexによるα多様性解析について、6月のサンプルでは、作物からの距離の比較において、5%水準以下の有意差が確認されたが、他の実験区では有意差が見られなかった（Table 2）。Bray-curtis indexによるβ多様性解析について、PERMANOVAによる999回の繰り返し計算の結果、6月と12月の自然・慣行の間で、5%水準以下の有意差が確認された(Table 3)。また、9月のサンプルについても、5%水準の有意差は無かったものの、自然・慣行の間でのp値は低かった。

4.　考察

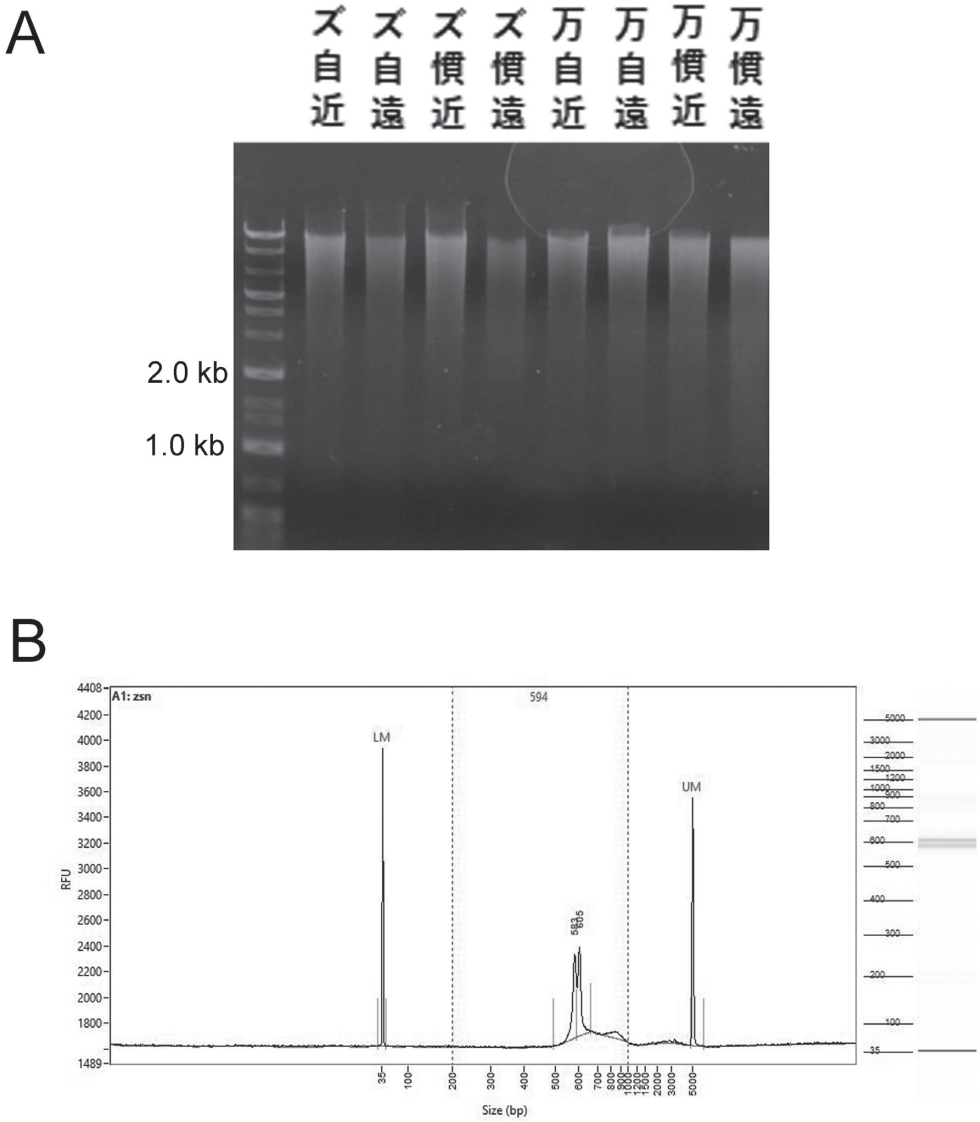

Figure 1.　土壌から抽出したDNAの確認。(A) ゲル電気泳動による確認。ズ：ズッキーニ、万：万願寺唐辛子、自：自然栽培圃場、慣：慣行栽培圃場、近：植物体の根元の土壌、遠：植物体から30cm程度離れた所での土壌。(B) DNAアナライザーによるライブラリー品質確認の一例。

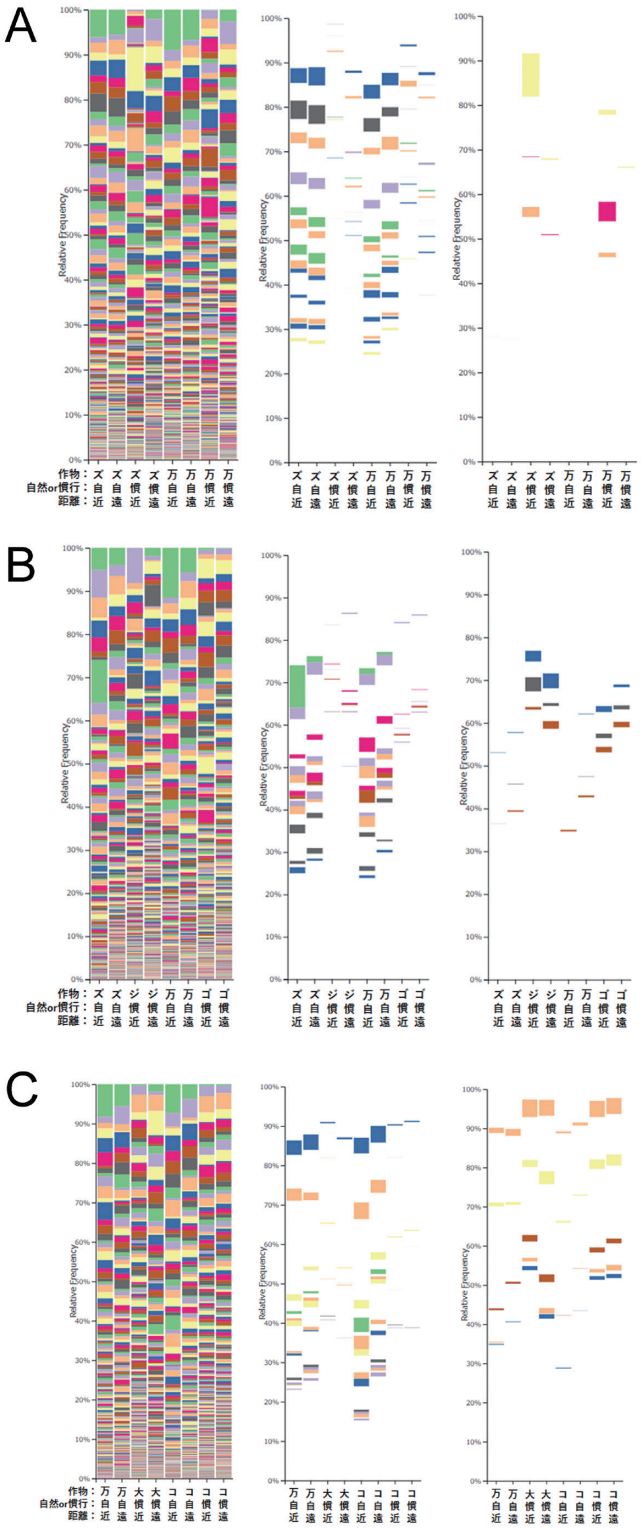

Figure 2. 土壌 DNA シーケンスから得られた、属レベルでの細菌分類。(A)2022 年 6 月 28 日、(B)2022 年 9 月 28 日、(C)2022 年 12 月 22 日。左：全細菌の表示、中央：自然栽培圃場で多いものを抽出、右：慣行栽培圃場で多いものを抽出。ズ：ズッキーニ、万：万願寺唐辛子、ジ：ジャガイモ、ゴ：ゴーヤ、大：ダイコン、コ：コウサイタイ、自：自然栽培圃場、慣：慣行栽培圃場、近：植物体の根元の土壌、遠：植物体から 30cm 程度離れた所での土壌。

Table 1. 自然栽培と慣行栽培で差が見られた細菌類

	門（Phylum）	綱（Class）	目（Order）	科（Family）	属（Genus）
2022/6/28					
自然 -rich	Acidobacteria	Solibacteres	Solibacterales	Solibacteraceae	Candidatus Solibacter
(12)	Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Koribacteraceae	Candidatus Koribacter
	Proteobacteria	Betaproteobacteria	SC-I-84	-	-
	Verrucomicrobia	[Pedosphaerae]	[Pedosphaerales]	Ellin515	-
	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	-
	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Ellin329	-	-
	Chloroflexi	Ktedonobacteria	JG30-KF-AS9	-	-
	Chloroflexi	Ktedonobacteria	Thermogemmatisporales	Thermogemmatisporaceae	-
	Acidobacteria	iii1-8	32-20	-	-
	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	-	-
	Proteobacteria	Betaproteobacteria	A21b	EB1003	-
	Armatimonadetes	[Fimbriimonadia]	[Fimbriimonadales]	[Fimbriimonadaceae]	Fimbriimonas
慣行 -rich	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Lysobacter
(3)	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	[Weeksellaceae]	Chryseobacterium
	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Rhodanobacter
2022/9/28					
自然 -rich	Chloroflexi	Ktedonobacteria	JG30-KF-AS9	-	-
(12)	Acidobacteria	Solibacteres	Solibacterales	Solibacteraceae	Candidatus Solibacter
	Verrucomicrobia	[Spartobacteria]	[Chthoniobacterales]	[Chthoniobacteraceae]	DA101
	Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Koribacteraceae	Candidatus Koribacter
	Chloroflexi	Ktedonobacteria;	Thermogemmatisporales	Thermogemmatisporaceae	-
	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Ellin329	-	-
	Acidobacteria	iii1-8	32-20	-	-
	Verrucomicrobia	[Pedosphaerae]	[Pedosphaerales]	Ellin515	-
	AD3	ABS-6	-	-	-
	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	-	-
	Proteobacteria	Betaproteobacteria	A21b	EB1003	-
	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	-	-
慣行 rich	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas
(3)	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	-
	Acidobacteria	[Chloracidobacteria]	RB41	-	-
2022/12/22					
自然 -rich	Acidobacteria	Solibacteres	Solibacterales	Solibacteraceae	Candidatus Solibacter
(11)	Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Koribacteraceae	Candidatus Koribacter
	Verrucomicrobia	[Pedosphaerae]	[Pedosphaerales]	Ellin515	-
	Chloroflexi	Ktedonobacteria	JG30-KF-AS9	-	-
	AD3	ABS-6	-	-	-
	Chloroflexi	Ktedonobacteria	Thermogemmatisporales	Thermogemmatisporaceae	-
	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	-	-
	Proteobacteria	Betaproteobacteria	A21b	EB1003	-
	Armatimonadetes	[Fimbriimonadia]	[Fimbriimonadales	[Fimbriimonadaceae]	Fimbriimonas
	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	-	-
	Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	-
慣行 rich	Acidobacteria	Acidobacteria-6	iii1-15	-	-
(5)	Proteobacteria	Betaproteobacteria	MND1	-	-
	Acidobacteria	[Chloracidobacteria]	RB41	-	-
	Planctomycetes	OM190	agg27	-	-
	Chloroflexi	S085	-	-	-

Table 2. α 多様性の Kruskal-Wallis 検定

	p-value
2022/6/28	
慣行 / 自然	0.7728
遠 / 近	0.0433*
2022/9/28	
慣行 / 自然	0.7728
遠 / 近	0.3865
2022/12/22	
慣行 / 自然	1
遠 / 近	0.0832

n=4, * p<0.05

Table 3. β 多様性（Bray-Curtis index）の PERMANOVA による検定

	p-value
2022/6/28	
慣行 / 自然	0.030*
遠 / 近	0.649
2022/9/28	
慣行 / 自然	0.065
遠 / 近	0.75
2022/12/22	
慣行 / 自然	0.033*
遠 / 近	0.904

n=8, *p<0.05

本研究では、自然栽培と慣行栽培の差を、土壌微生物叢の解析によって見出すことを試みた。自然栽培圃場で多い細菌類を 10 程度抽出でき、そのいくつかは、有機圃場や休耕地で見られることが他の研究でも報告されていた。また、6 月と 12 月のサンプル間で、自然栽培と慣行栽培の間で有意差が見られた。以上の結果から、これらの細菌類が自然栽培圃場の指標種となりうる可能性がある。一方で、圃場によるばらつきがあることも容易に想像されることから、このような微生物叢分類の知見を蓄積することが重要である。最近ではメタゲノム解析のコストが下がってきており（本研究では 8 サンプルで 10 万円程度）、今後ますます環境 DNA のメタゲノム解析による圃場の性質把握が進むと考えられる。

自然栽培は環境負荷が小さい一方で、収量の不安定さ、雑草管理等の手間などのデメリットも多くある。安定収益が難しいことから、慣行農家から自然農家へ転換する事例は極めて少ない。また、肥料高騰などで苦しみながらも、従来の慣行システムから脱却できない農家が多いことも否めない。そこで筆者らは、京田辺市普賢寺地域で住民参加型の「自然栽培研究会」を実施している。これは、地域の遊休農地を借りて、週末農業などに興味のある住民に呼びかけて、無農薬・無肥料で農作物栽培を体験してもらう試みである。現在、月に 1 度の活動で、約 30 名ほどが参加している。このように、収益目的ではなく、市民の農業体験・参加を目的にすることで、遊休農地の有効利用、市民の健康増進、自然栽培の推進に繋がると考えている。このような取り組みは、自然栽培を活かす有効な手段のひとつであろう。

このような圃場で、本研究のような生物多様性評価を進めることで、自然栽培の科学的な知見が蓄積し、今後拡がっていく際の根拠となり得る。人間の為だけでなく、他の生物や環境を考えた自然栽培が拡充していくことを期待したい。

謝辞

本研究で土壌サンプルを提供いただいた Red Rice 自然農園の赤穂達郎氏、DNA 抽出の実験補助をいただいた森本陽子氏（京都府立大学）に感謝いたします。本研究は、AGBIOTECH 株式会社との共同研究により実施されました。

引用文献

大星光史(2000)　岡田茂吉　その豊かな世界　ー地上の天国と自然農法ー

川口由一(2019)　完全版　自然農

木村秋則(2007)　自然栽培ひとすじに　無農薬・無肥料の技と心

福岡正信(1983)　自然農法　わら一本の革命

福岡正信(2013)　自然農法　緑の哲学　農業革命論　一反百姓のすすめ

Anderson MJ (2017) Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA). In Wiley StatsRef: Statistics Reference Online eds. (N. Balakrishnan, T. Colton, B. Everitt, W. Piegorsch, F. Ruggeri and J.L. Teugels)

Bolyen E et al. (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nat Biotechnol 37, 852–857.

Bray JR, Curtis JT (1957) An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. Ecol. Monogr, 27, 325–349.

Callahan B, McMurdie P, Rosen M et al. (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nat Methods 13, 581–583.

Glöckner FO, Yilmaz P, Quast C, Gerken J, Beccati A, Ciuprina A, Bruns G, Yarza P, Peplies J, Westram R, Ludwig W (2017) 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and 15 tools. J Biotehnol 261, 169-176.

Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic Acids Res 30, 3059–3066.

Kruskal WH, Wallis WA (1952) Use of ranks in onecriterion variance analysis. J Am Stat Assoc 47, 583-621.

Li Y, Jones FG, Zhang B, Cui J, Zhang W (2023) The effect of short-term fallowing on the microbial communities in forest soil cultivated with ginseng: Preliminary research. PeerJ 11, e14758.

Li ZR, Luo SQ, Peng YJ, Jin CZ, Liu DC (2023) Effect of long-term application of bioorganic fertilizer on the soil property and bacteria in rice paddy. AMB Express 13, 60.

Pedregosa F, Varoquaux G, Gramfort A et al. (2011) Scikit-learn: Machine Learning in Python, JMLR 12, 2825-2830.

Price MN, Paramvir SD, Adam PA (2009) FastTree: Computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix, molecular biology and evolution. 26, 1641–1650.

Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res 41, D590-6.

Shannon CE (1948) Shannon CE. A mathematical theory of communication. Bell System Technical Journal. 27, :379–423.

Shen MC, Zhang YZ, Bo GD, 1 Yang B, Wang P, Ding ZY, Wang ZB, Yang JM, Zhang P, Yuan XL (2021) Microbial Responses to the Reduction of Chemical Fertilizers in the Rhizosphere Soil of Flue-Cured Tobacco. Front Bioeng Biotechnol 9, 812316.

Tudi, M, Li H, Li H et al. (2022) Exposure routes and health risks associated with pesticide application. Toxics 10, 335.

Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Pruesse E, Quast C, Schweer T, Peplies J, Ludwig W, Glöckner FO (2014) The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. Nucleic Acids Res 42, D643-648.