

世界農業遺産！傾斜地農耕システムの秘密 ～コエグロ利用の可能性を探る！！～

3509 内田 颯 3516 木南 咲来 3521 瀬野 佳乃子

1. 動機・背景

世界農業遺産である「にし阿波の傾斜地に持続可能な循環農業」に使用されている **コエグロ** を研究することで、平地でもそれを応用して循環農業として活かすことを目標に、研究を始めた。

コエグロとは…

- カヤを束にし、テント型に積み上げたもの
- 農地に投入されるまでカヤを腐らせないための保存方法
- コエグロは**西阿波特有の農法**



[図1 傾斜地のコエグロ]

2.仮説

西阿波の傾斜地において持続可能な循環農業が成立しているのは、
「**肥料として用いるカヤをコエグロにして保存している過程で農業に有用な菌が発生しているからである**」という仮説を立てた。

この研究における農業に有用とは次の3つの働きを持つことと定義する。

〈定義〉

1. **菌が有機物を分解**し、植物の成長に適した土壌を作る
2. 菌が**植物の土壌からの栄養吸収**を促進する
3. 菌自体が**植物の成長を促進するホルモン**等を分泌する

3. 実験1-1 〈菌の同定〉

<目的>

傾斜地農業を行う畑の土と
カヤからの菌を同定

<仮説>

傾斜地農業を行う畑には、
農業に有用な菌がいる



3. 実験1-1 〈菌の同定〉

〈方法〉

- ① 菌の培養
- ② PCR法
- ③ 電気泳動
- ④ 塩基配列解析 (シーケンス解析)
- ⑤ 菌の同定

3.実験1-1 〈サンプル採取〉

- ・サンプル採取場所 **傾斜地（家賀地区にある本校専用の実験畑）**
校内に作ったコエグロ（傾斜地の土）
校内に作ったコエグロ（グラウンドの土）



〔図2 傾斜地の藍畑に設置した実験畑〕



〔図3 脇町高校で制作したコエグロ〕

3.実験I-1 <サンプル採取>

傾斜地 [図2]	平地（脇町高校） [図3]
①傾斜地農法を行う畑の土とカヤ	①‘傾斜地の土を敷いたコエグロのカヤ
②カヤが混ぜ込まれていない傾斜地の土	②‘傾斜地の土
③畑に投入していないコエグロのカヤ	③‘グラウンドの土を敷いたコエグロのカヤ
④刈り取り直後カヤ	④‘グラウンドの土（真砂土）

[表1 採取したサンプル]

3. 実験I-1 <菌の培養>

傾斜地 [図2]

①傾斜地農法を行う畑の土とカヤ

②カヤが混ぜ込まれていない
傾斜地の土

③畑に投入していない

サンプル①から同定

④刈り取り直後カヤ

菌① - 1

平地 (膝)

①'傾

②'

③'ク

④'グラ

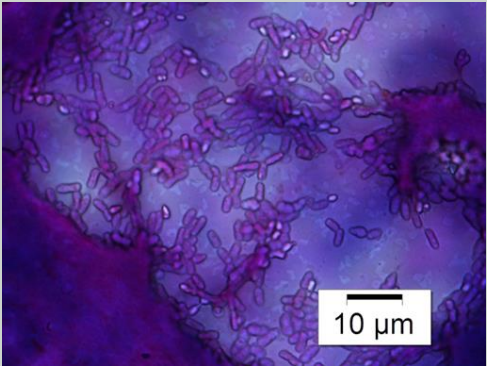
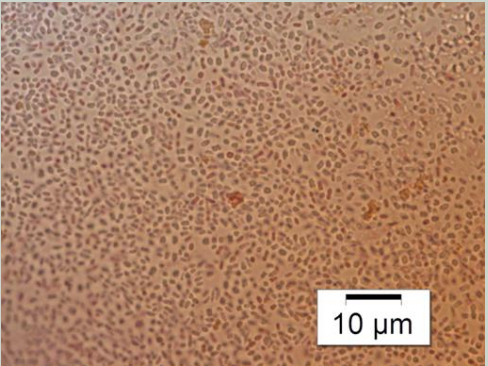
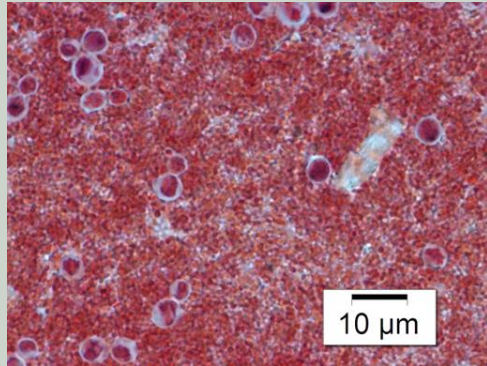
菌① - 2



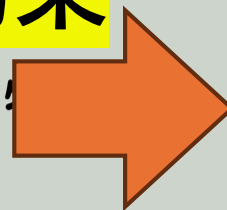
菌① - 3

4. 実験1-1 [結果]

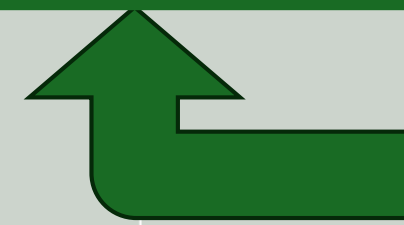
[表2 サンプル①からの3種類の菌の同定結果]
(光学顕微鏡：1000倍)

学名	(サンプル①-1) Bacillus zanthoxyli	(サンプル①-2) Pseudomonas Jessenii	(サンプル①-3) Pseudomonas vancouverensis
画像			
一致率	99.25%	99.8%	100%
	<ul style="list-style-type: none"> 2017年に中国の唐辛子の葉から分離 病気の発症を抑制し、野菜植物に塩分ストレスに対する耐性を与える 植物の成長に悪影響を与える線虫(ネマトーダ)に対し殺線虫効果を示す 	<ul style="list-style-type: none"> 作物真菌病に対して真菌活性を行う 植物ホルモンを生産し、根の成長を促進する 	<ul style="list-style-type: none"> 作物真菌病に対して真菌活性を行う 植物ホルモンを生産し、根の成長を促進する

殺線虫効果



植物の
成長促進効果



5. 実験I-1[考察]

サンプル①-1 ⇒ 植物への**殺菌効果**を示す。

サンプル①-2, ①-3 ⇒ 植物の**成長促進効果**を示す。



それぞれの植物への効果を
植物実験によって検証する必要がある。

6.実験 1-2 〈コロニーの形状比較〉

<目的>

実験 1-1 で同定した3種類の菌(図4-1)が
カヤ由来か**土由来**かを調べる

<仮説>

実験 1-1 で同定した菌は**カヤ由来**である

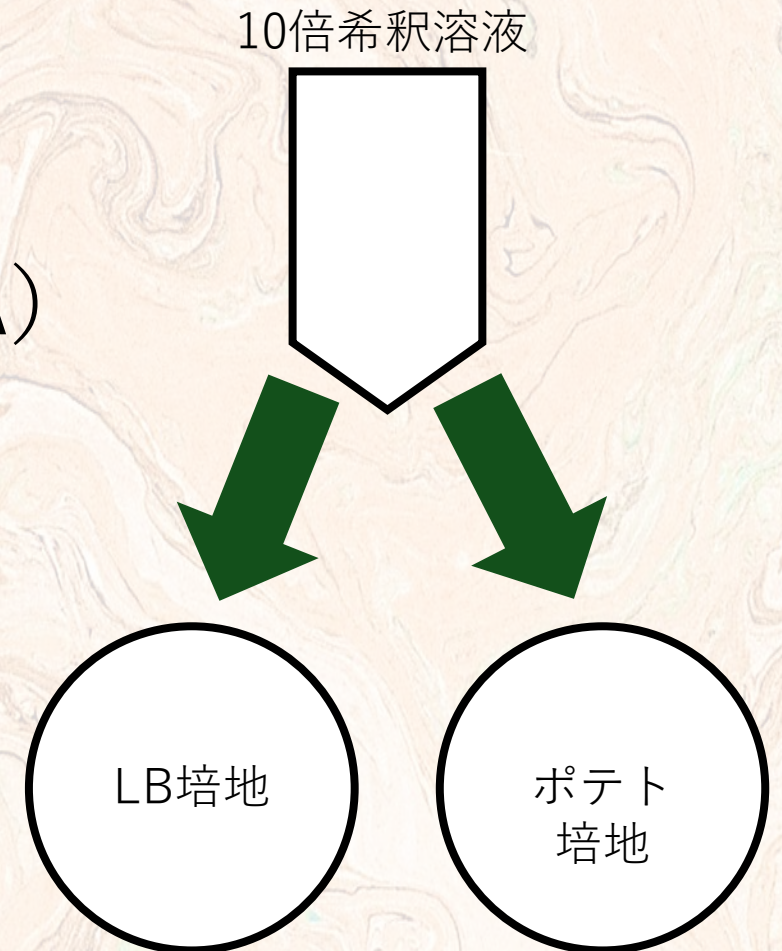
6.実験 1-2 〈コロニーの形状比較〉

〈方法〉

- 1.表1の**サンプル②～④**と**サンプル④'**を培地に塗布
- 2.コロニーの形状比較を行う(実験 1-2-A)
- 3.手順1で得た菌をグラム染色し、観察する(実験 1-2-B)

試料

- ・ **ポテト培地**、**LB培地** (寒天1.5%)
- ・ 原液
(蒸留水をサンプルに加え、攪拌機で混ぜたもの)
(10倍希釈のものを各100 μ l塗布)


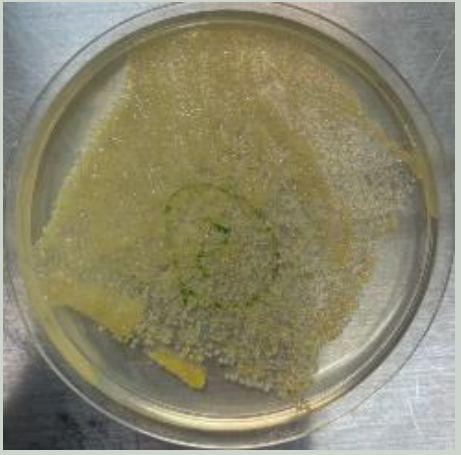




[図5 実験操作]

7.実験 1-2-A [結果]

○該当コロニーあり ×該当コロニーなし

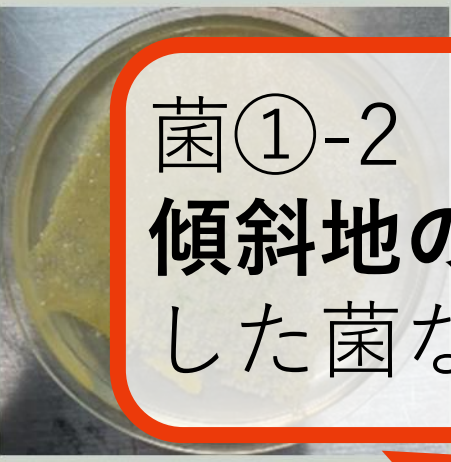
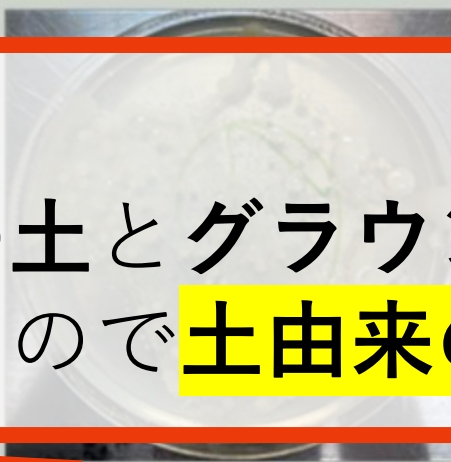
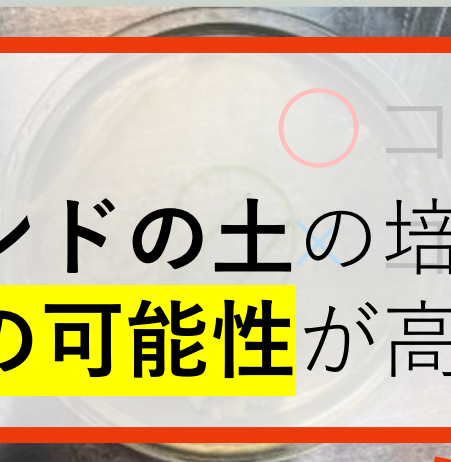
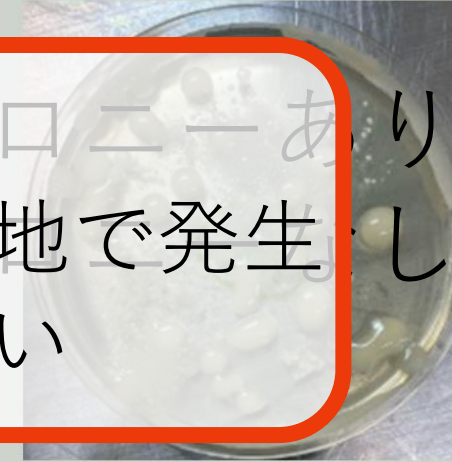
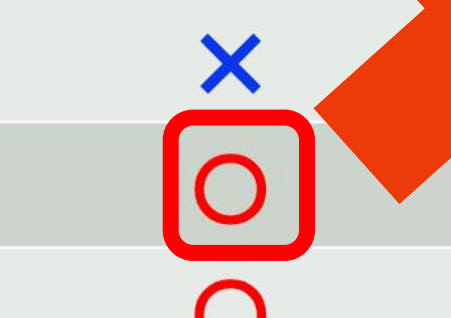


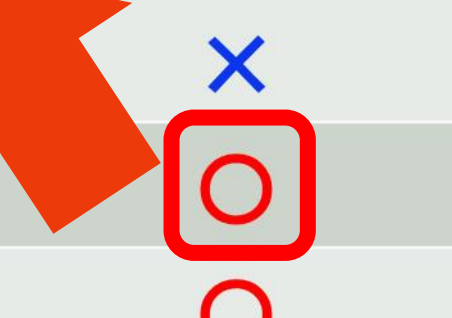
[表3 実験 1-2の結果の表]

サンプル名	②カヤが混ぜ込まれていない傾斜地の土	③畑に投入していないコエグロのカヤ	④刈り取り直後のカヤ	④'グラウンドの土
☒				
① - 1	×	×	×	×
① - 2	○	×	×	○
① - 3	○	○	○	○

傾斜地

平地 (コエグロ+グラウンドの土)

8.実験 1-2-A [考察]

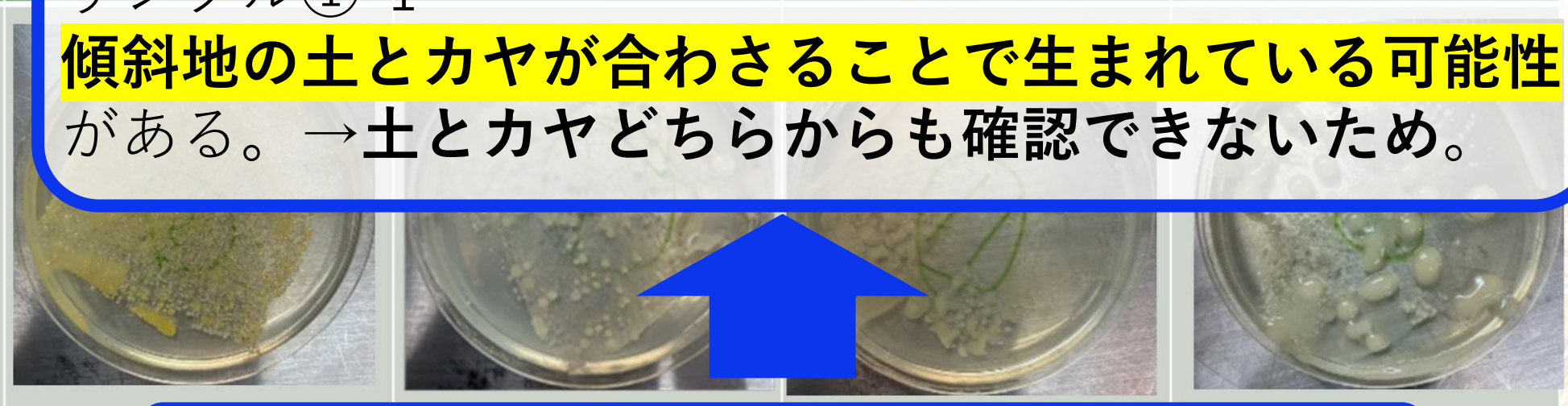
サンプル名	②カヤが混ぜ込まれていない傾斜地の土	③畑に投入していないコエグロのカヤ	④刈り取り直後のカヤ	④'グラウンドの土
				
				
① - 1	×	×	×	×
① - 2	○	×	×	○
① - 3	○	○	○	○

菌①-2
 傾斜地の土とグラウンドの土の培地で発生した菌なので**土由来の可能性**が高い



○コロニーあり

8.実験 1-2-A [考察]

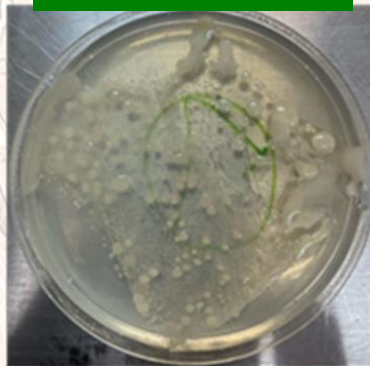
サンプル名	②カヤが混ぜ込まれていない傾斜地の土	③畑に投入していな土	④刈り取り直後のカヤ	⑤「グラウンドの上
<p>図</p> 	<p>サンプル①-1と①-3はこの実験では断定できない サンプル①-1 傾斜地の土とカヤが合わさることで生まれている可能性がある。→土とカヤどちらからも確認できないため。</p>			
① - 1	×	×	×	×
① - 2	○	×	×	○
① - 3	○	○	○	○

7.実験 1-2-B [結果]

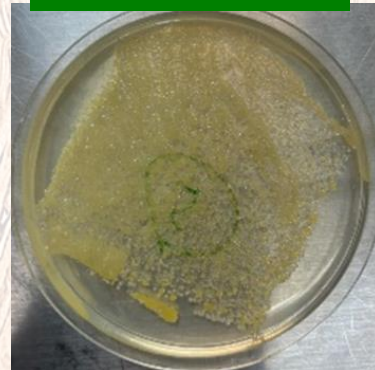
<グラム染色の結果>

光学顕微鏡 倍率：1000倍

サンプル②



サンプル③



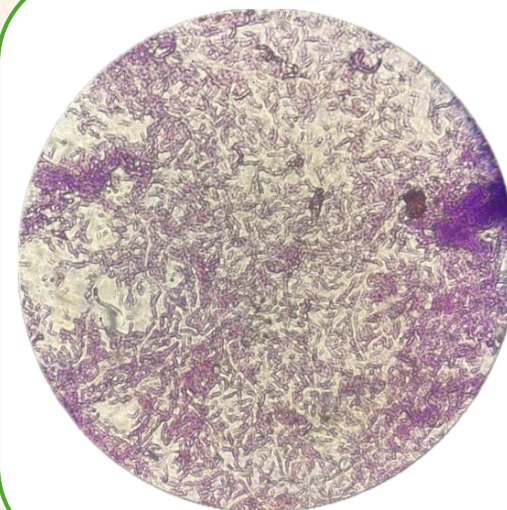
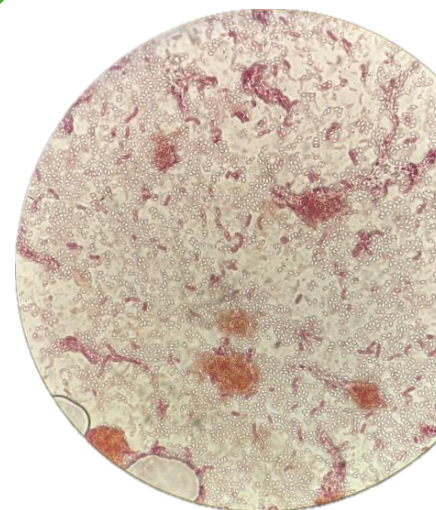
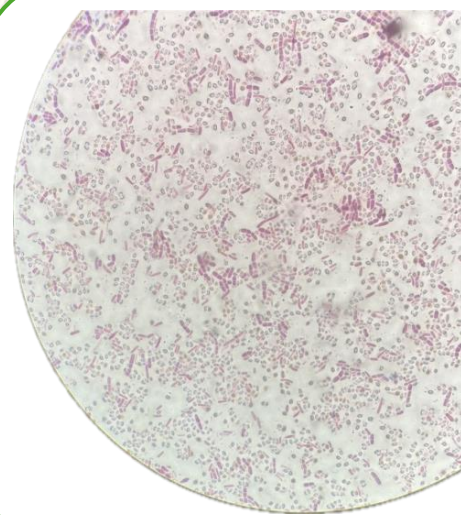
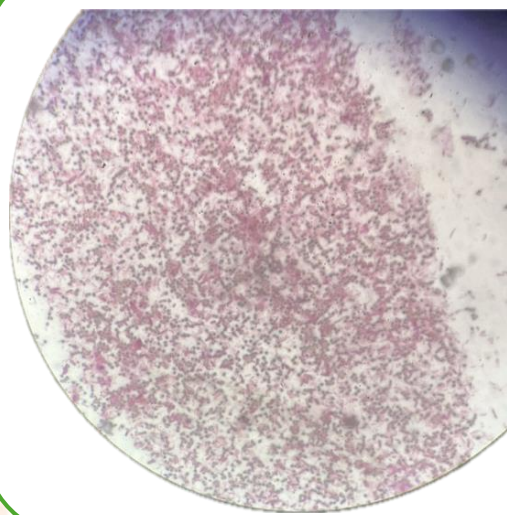
サンプル④



サンプル④'



図7-



[図7-1 サンプル②LB培地]

[図7-2 サンプル③LB培地]

[図7-3 サンプル④LB培地]

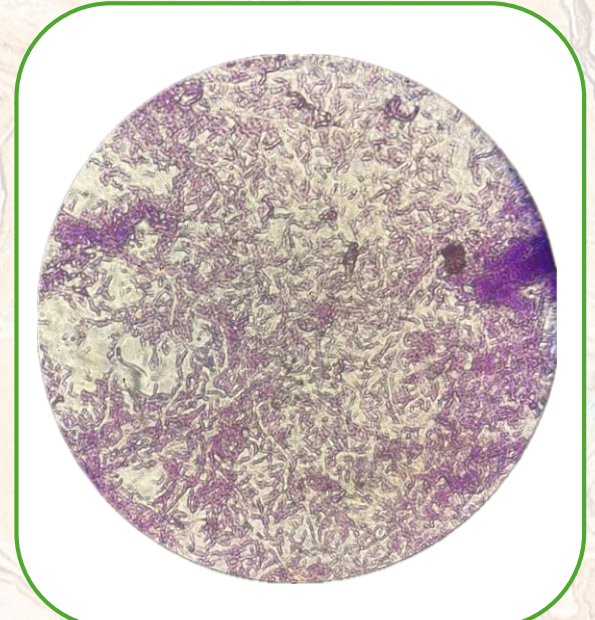
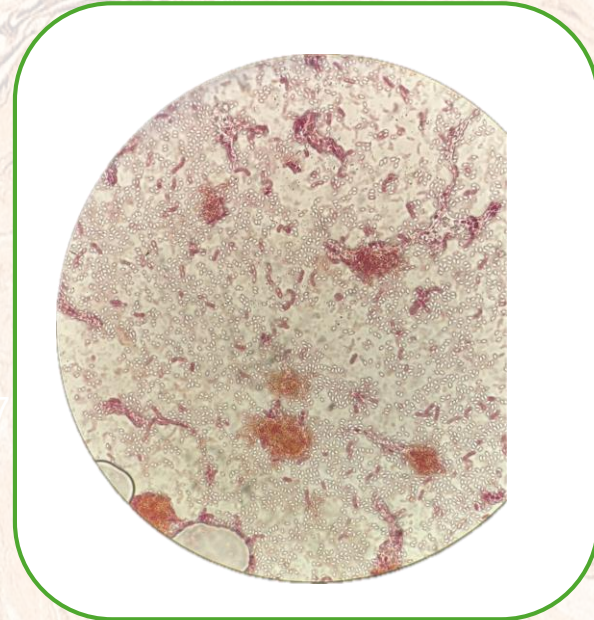
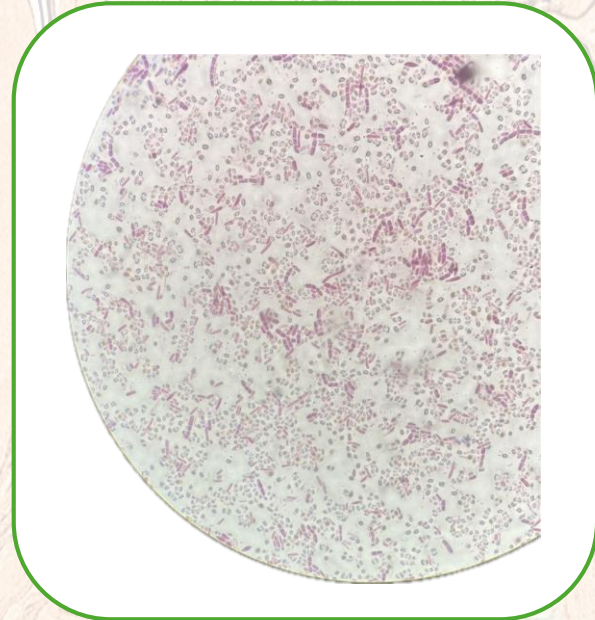
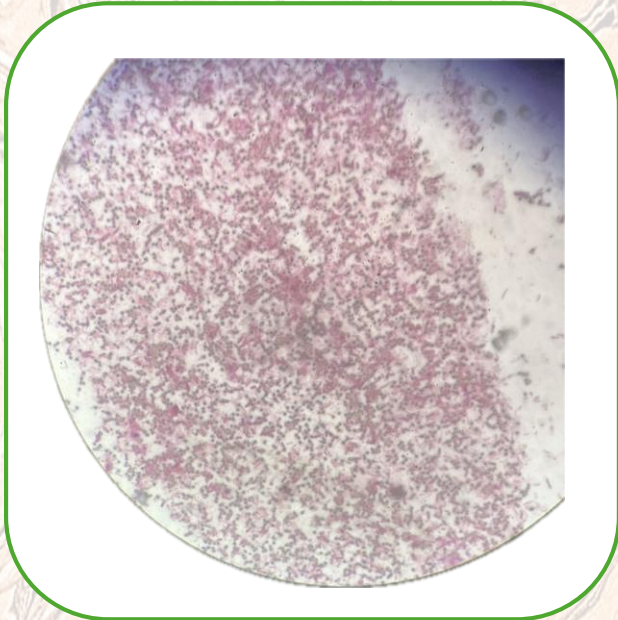
[図7-4 サンプル④'LB培地]

7.実験 1-2-B [結果]

<同定した菌との比較>

<グラム染色>

<光学顕微鏡 倍率：1000倍>



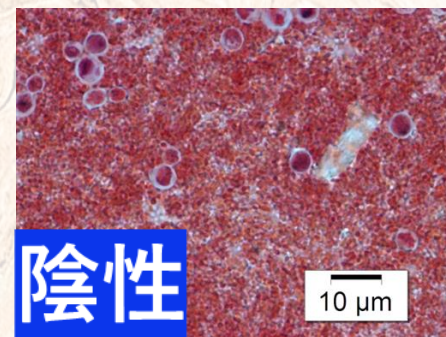
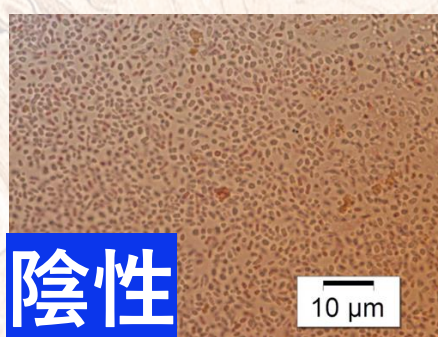
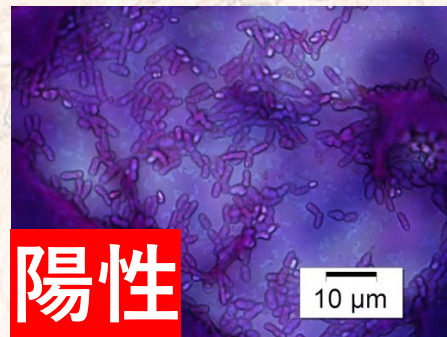
[図7-1 サンプル②LB培地]

[図7-2 サンプル③LB培地]

[図7-3 サンプル④LB培地]

[図7-4 サンプル④LB培地]

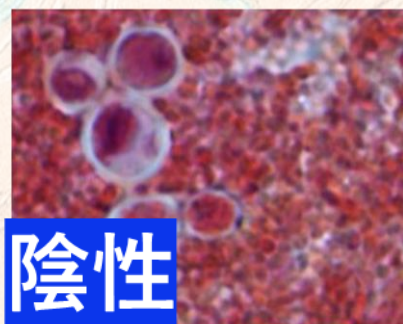
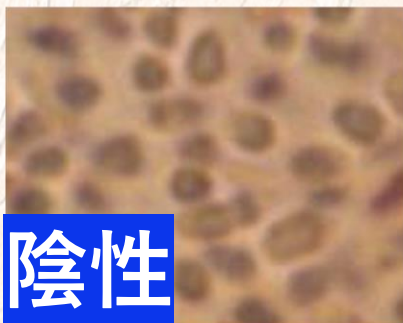
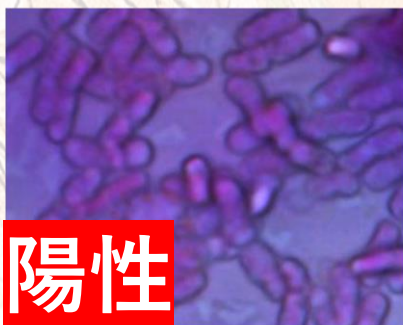
同定した菌



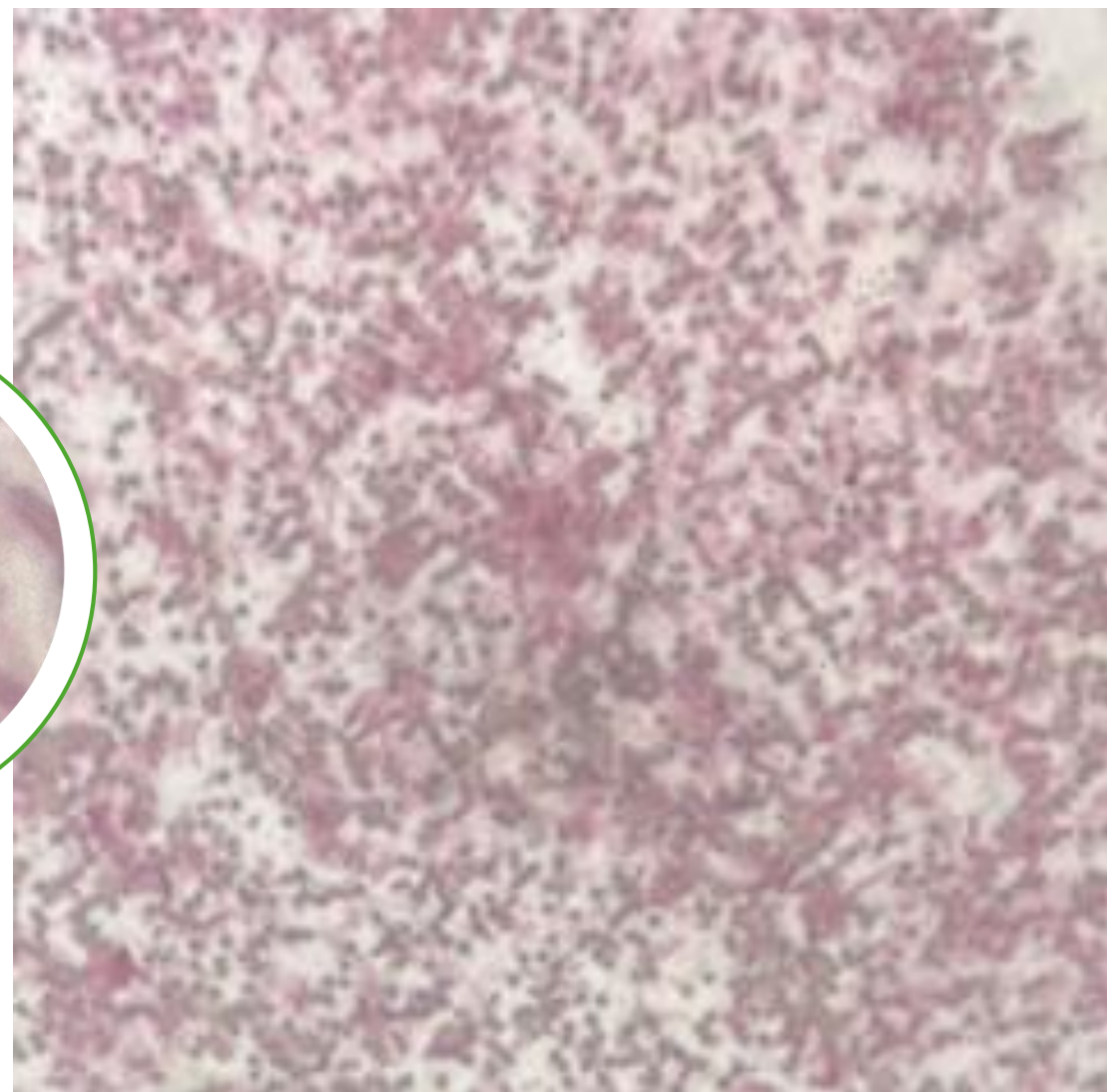
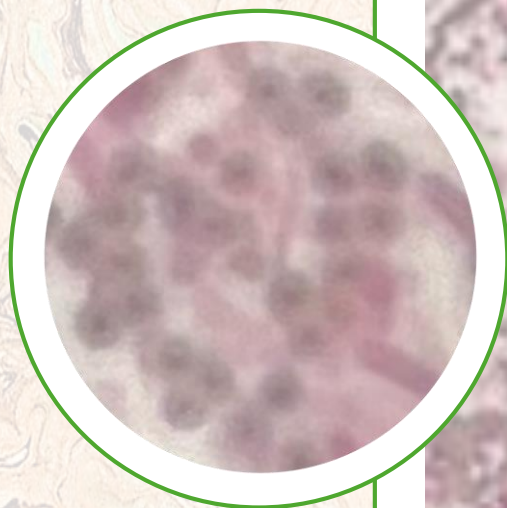
7.実験 1-2-B [結果]

<同定した菌との比較>

同定した菌



菌① - 2

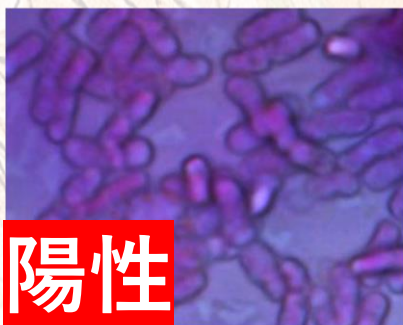


[図7-1 サンプル②LB培地]

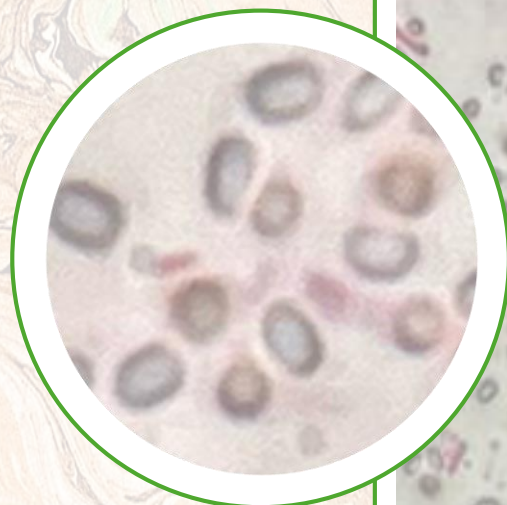
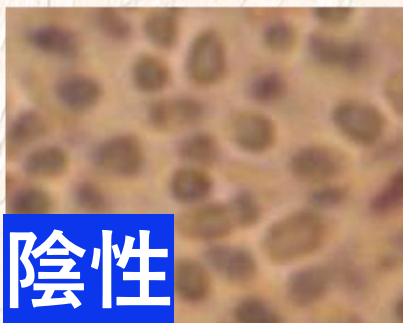
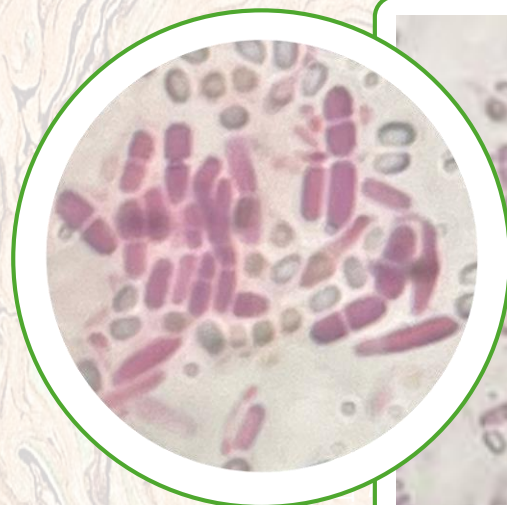
7.実験 1-2-B [結果]

<同定した菌との比較>

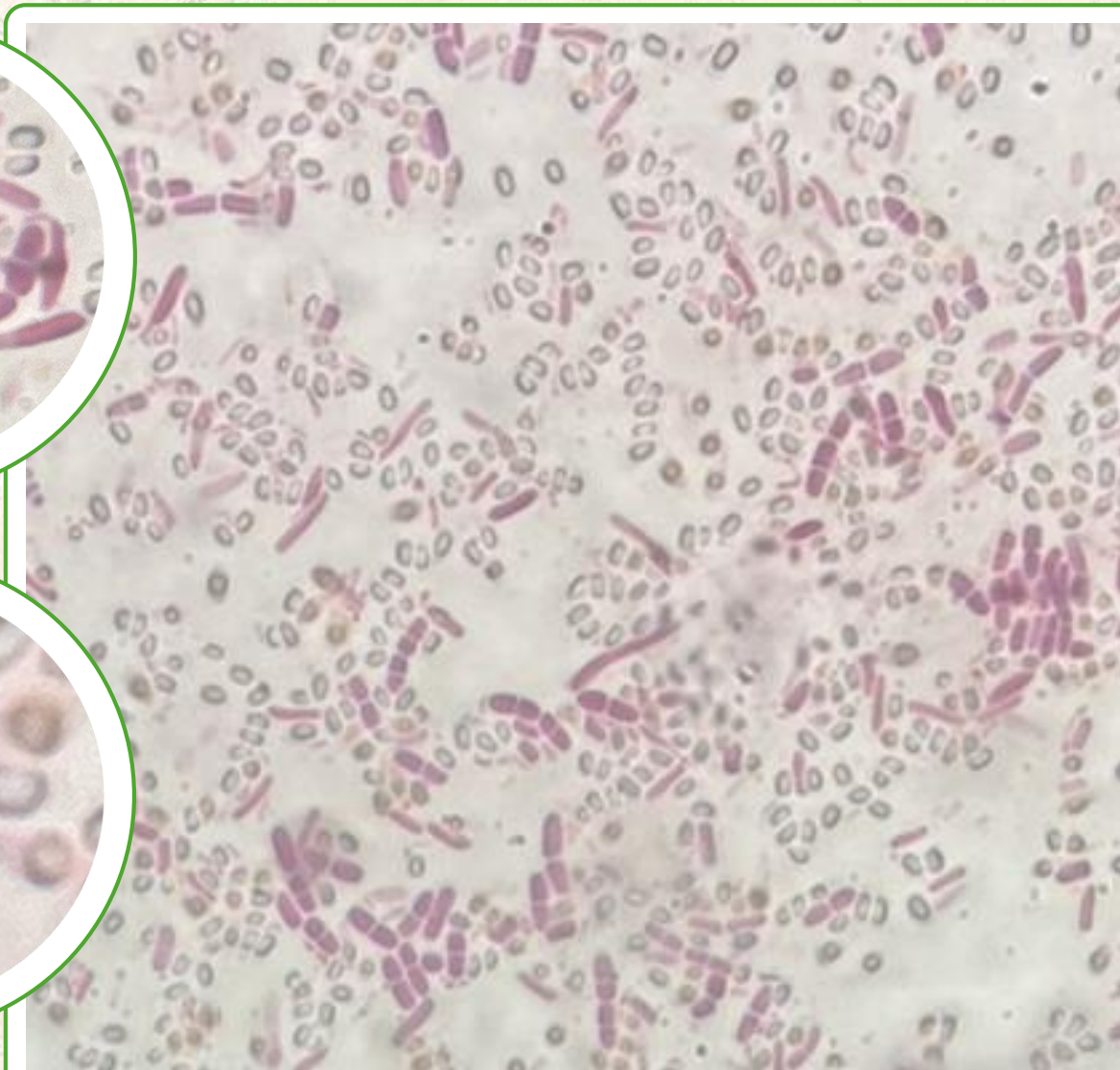
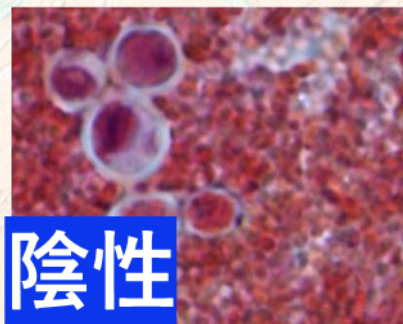
同定した菌



菌① - 1



菌① - 2

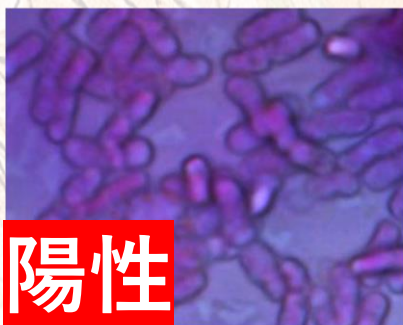


[図7-1 サンプル③LB培地]

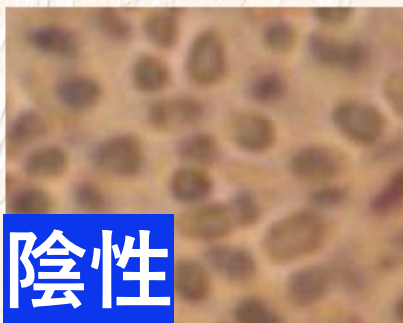
7.実験 I - 2 - B [結果]

<同定した菌との比較>

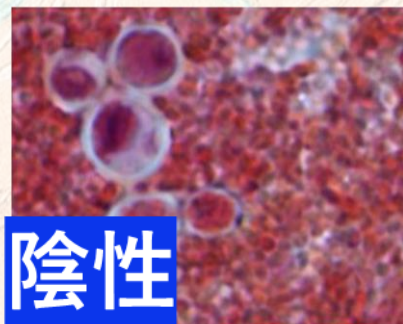
同定した菌



陽性



陰性

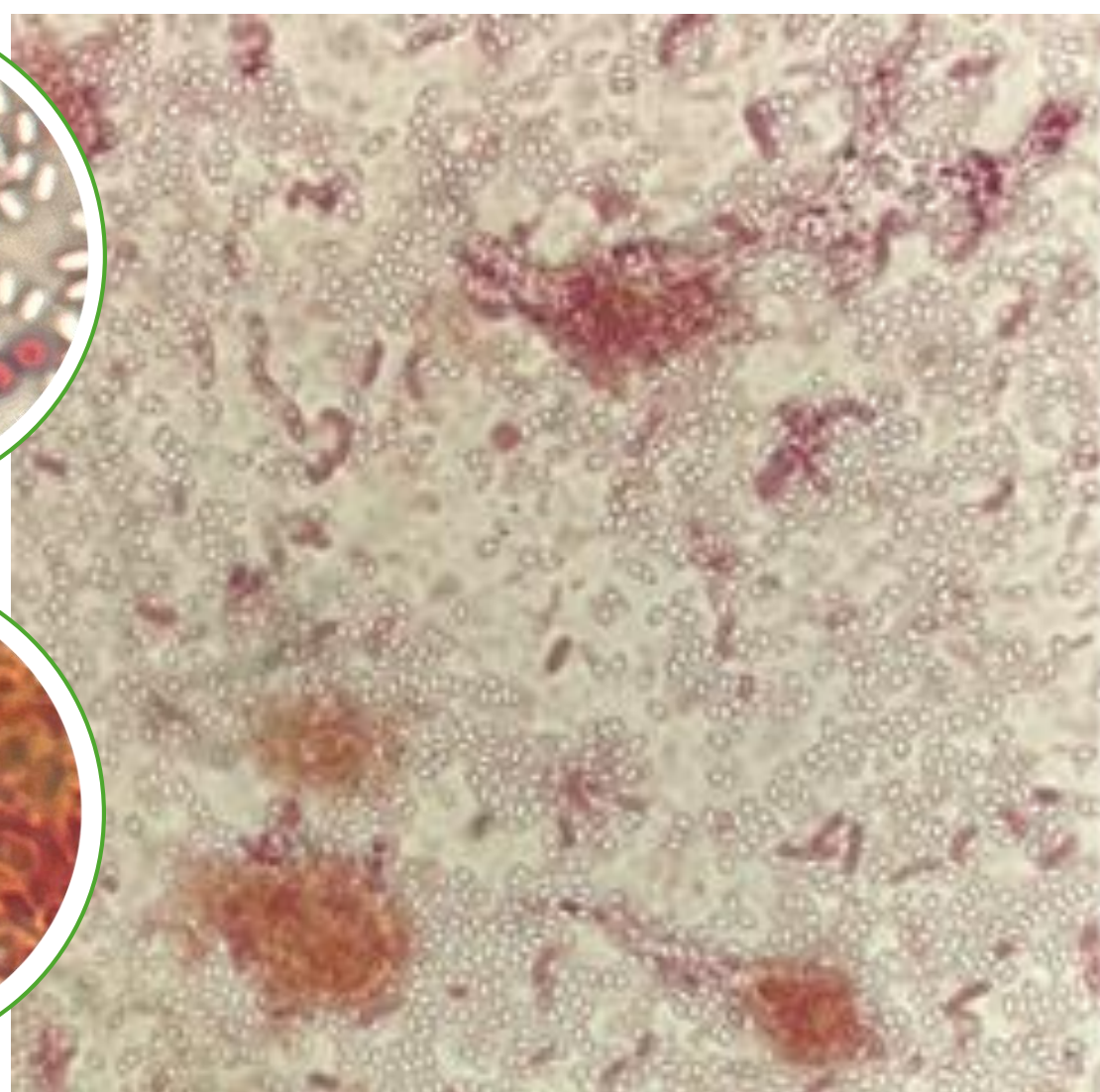
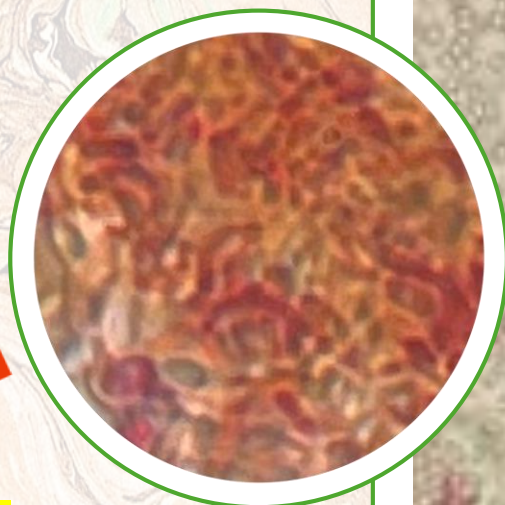


陰性

菌① - 1



菌① - 3

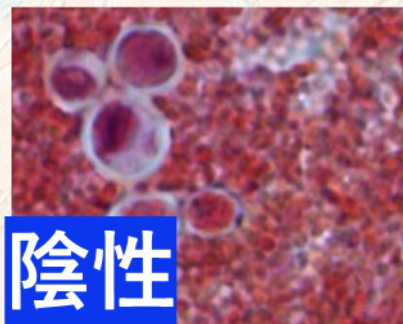
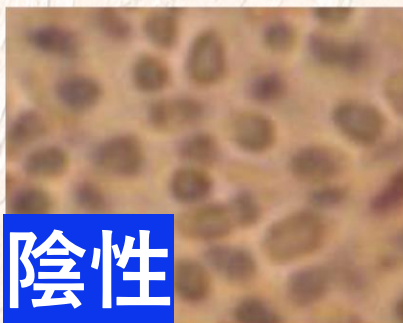
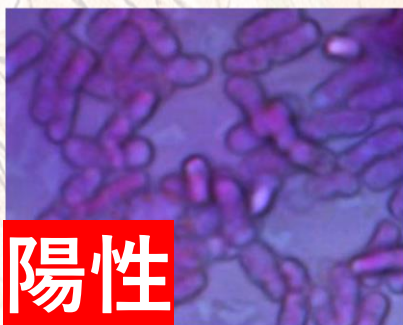


[図7-1 サンプル③LB培地]

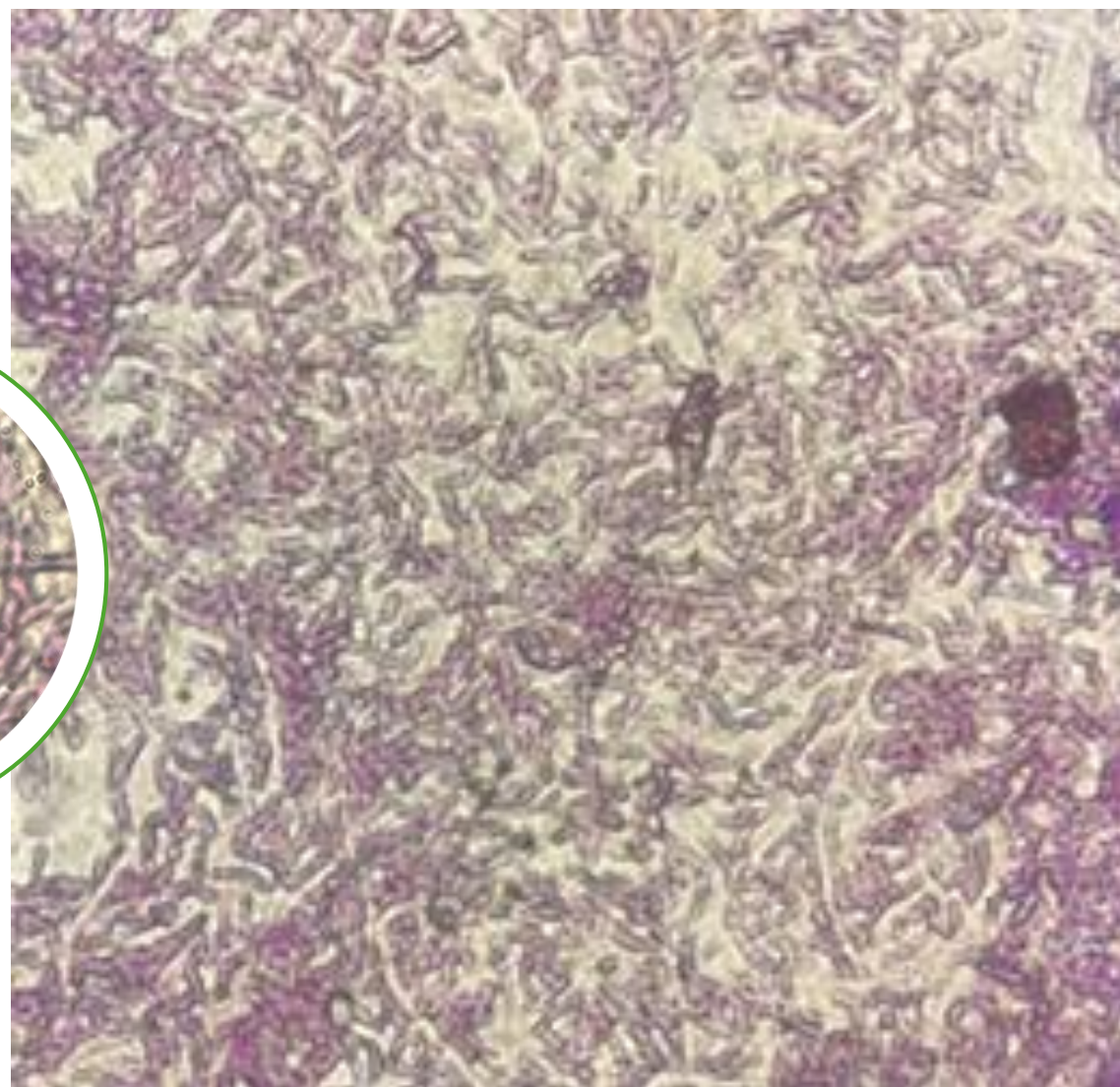
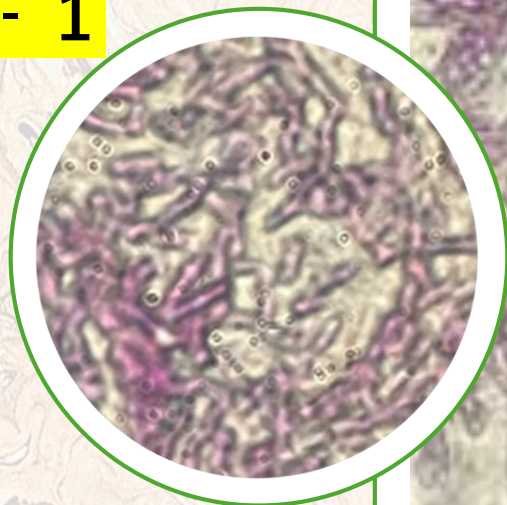
7.実験 1-2-B [結果]

<同定した菌との比較>

同定した菌



菌① - 1


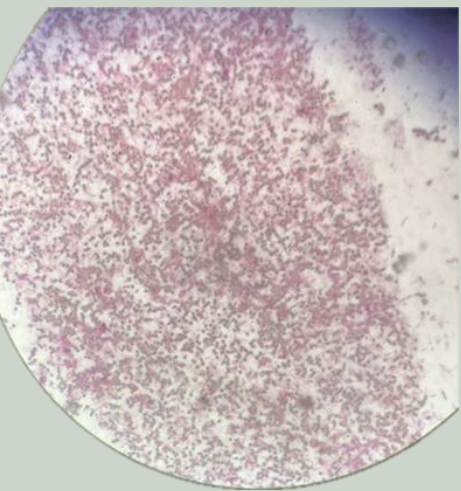
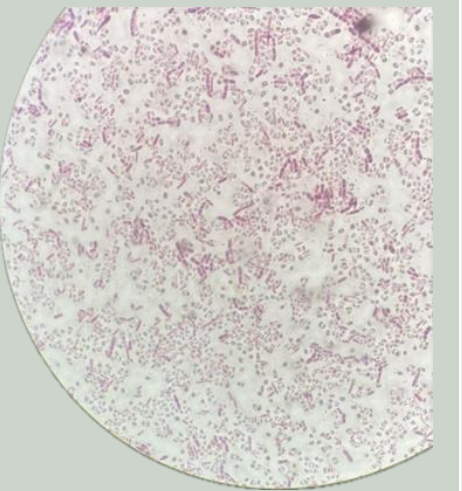
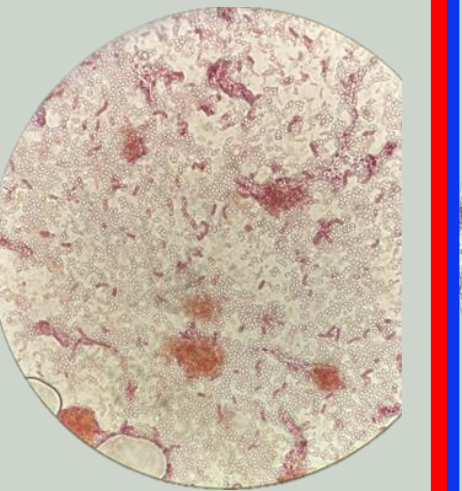
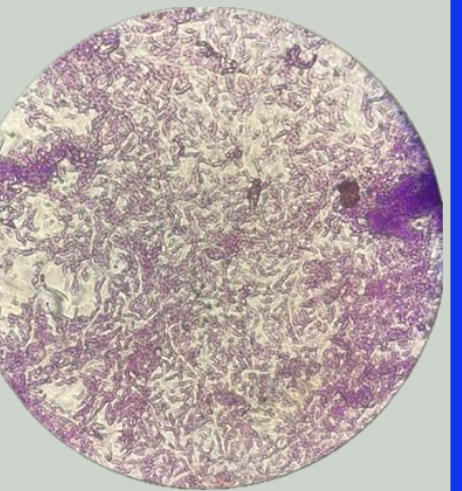


[図7-1 サンプル②LB培地]

7.実験 1-2-B [結果]

○該当菌あり ×該当菌なし △判断中

[表3 実験 1-2の結果の表]

サンプル名	②カヤが混ぜ込まれていない傾斜地の土	③畑に投入していないコエグロのカヤ	④刈り取り直後のカヤ	④'グラウンドの土
				
① - 1	×	○	○	○
① - 2	○	○	△	×
① - 3	×	×	○	×

傾斜地

平地 (コエグロ+グラウンドの土)

7.実験 1-2-B [結果]

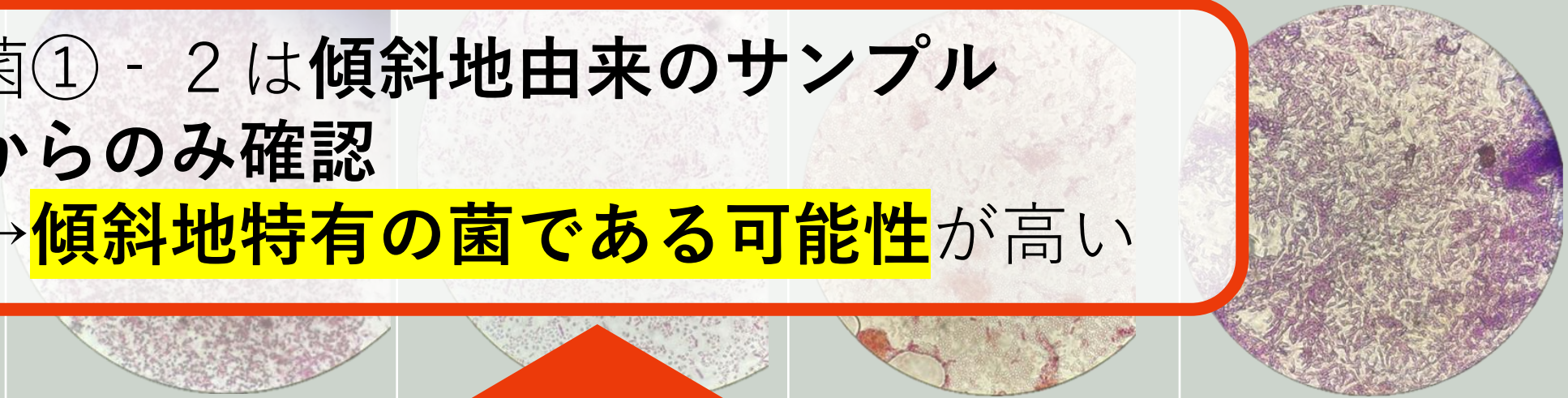
○該当菌あり ×該当菌なし △判断中

[表3 実験 1-2の結果の表]

サンプル名	②カヤが混ぜ込まれていない傾斜地の土	③畑に投入していないコエグロのカヤ	④刈り取り直後のカヤ	④'グラウンドの土
-------	--------------------	-------------------	------------	-----------

図

菌① - 2は傾斜地由来のサンプルからのみ確認
 →傾斜地特有の菌である可能性が高い

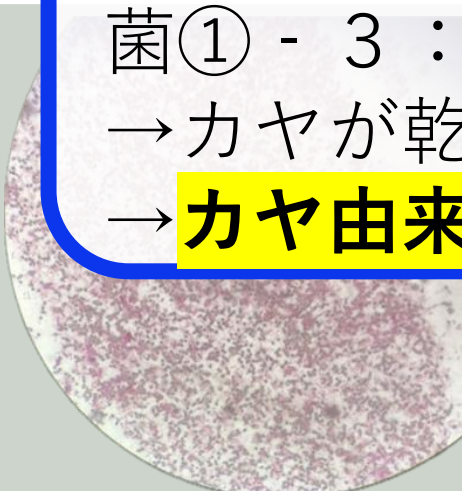
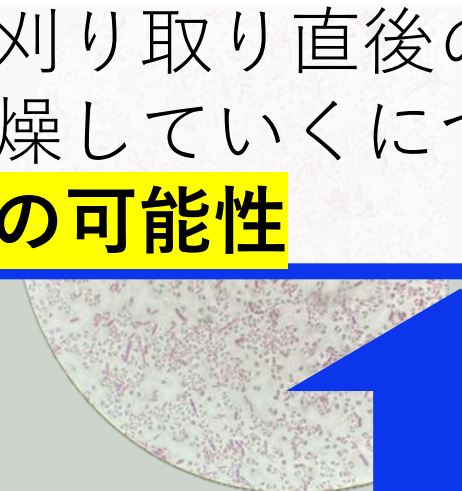
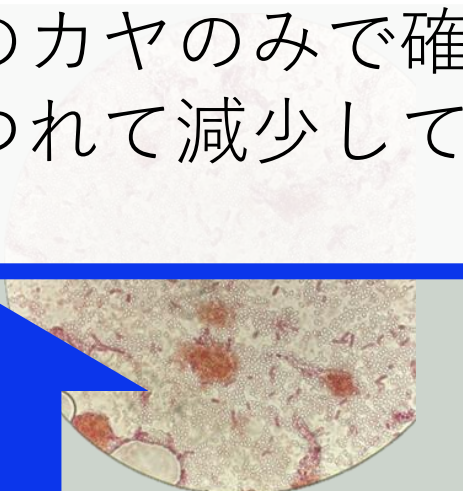
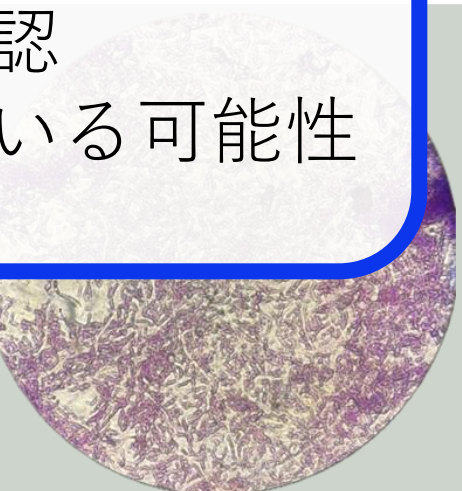


① - 1	×		○	○
① - 2	○		△	×
① - 3	×	×	○	×


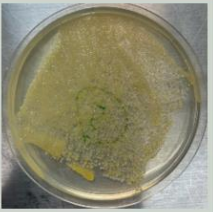


7.実験 1-2-B [結果]

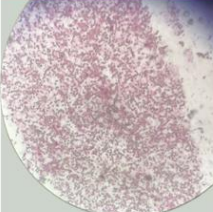
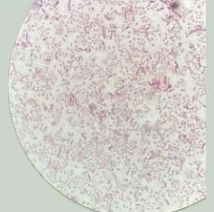
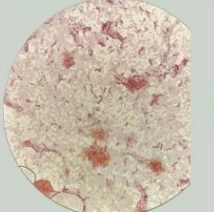
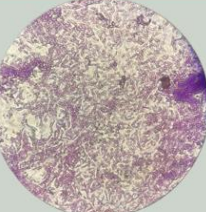
○該当菌あり ×該当菌なし △判断中

[表3 実験 1-2の結果の表]

サンプル名	②カヤが混ざり込まれた傾斜地の土	③畑に投入している土	④刈り取り直後の土	④グランドの土
<p>☒</p> <div data-bbox="598 278 2433 756" style="border: 2px solid blue; padding: 10px;"> <p>菌① - 1 菌① - 3 : 断定できない 菌① - 1 : 明確な相関性が見られない 菌① - 3 : 刈り取り直後のカヤのみで確認 →カヤが乾燥していくにつれて減少している可能性 →カヤ由来の可能性</p> </div>				
① - 1	×	○	○	○
① - 2	○	○	△	×
① - 3	×	×	○	×

7.実験 1-2 [考察]

サンプル名	②カヤが混ぜ込まれていない傾斜地の土	③畑に投入していないコエグロのカヤ	④刈り取り直後のカヤ	④'グラウンドの土
図				
① - 1	×	×	×	×
① - 2	○	×	×	○
① - 3	○	○	○	○

サンプル名	②カヤが混ぜ込まれていない傾斜地の土	③畑に投入していないコエグロのカヤ	④刈り取り直後のカヤ	④'グラウンドの土
図				
① - 1	×	○	○	○
① - 2	○	○	△	×
① - 3	×	×	○	×

実験 1-2-Aと実験 1-2-Bで全く違う結果に

- ・ LB培地とポテト培地が混合しているため、培地の種類によって結果が変わった
- ・ サンプル内の同定した菌とは別の菌が同定した菌と酷似していて、同じように見えた

9.実験Ⅱ-1 〈コンゴレッドの実験〉

〈目的〉 **カヤの細胞壁を分解する菌** がいるか
確認する

〈仮説〉 実験Ⅰ-1で同定した3種類の菌の中に
セルロースを分解する菌 がいる

9.実験II-1

〈コンゴレッドの実験〉

〈方法〉

①セルロース培地作成

(硝酸ナトリウム0.3% 塩化カリウム0.2% リン酸二水素カリウム0.1% 硫酸マグネシウム七水和物0.05%)
(硫酸鉄七水和物0.002% セルロース1%)

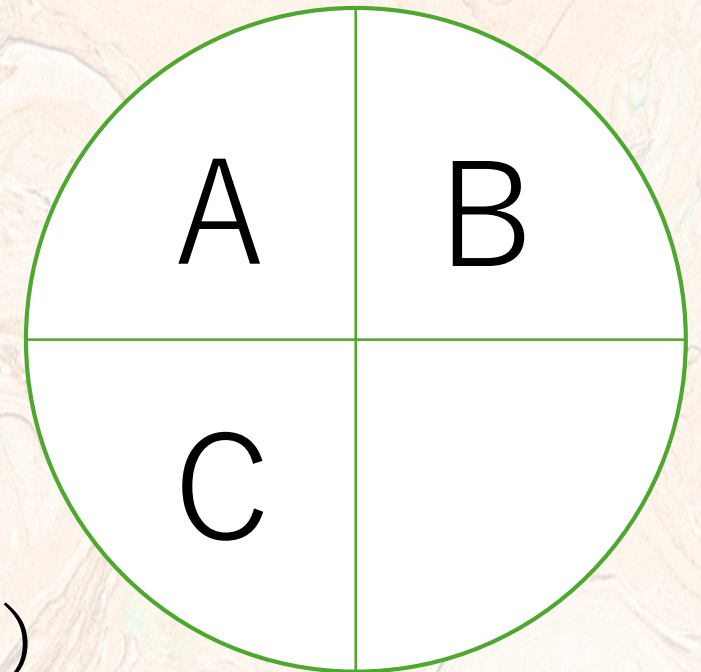
②分注(寒天1%、0.9%)

③同定した3種類の菌を液体培地で 1週間培養

④作成した培地に菌の培養液を滴下

⑤数時間おきコンゴレッドで染色

(A,B,Cにそれぞれ100mlずつ液体培地滴下)

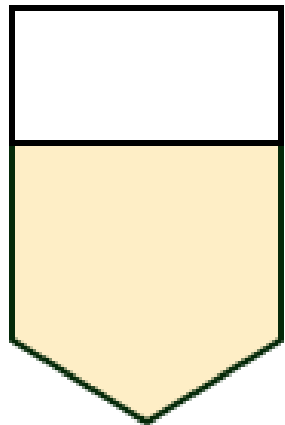


9.実験II-1

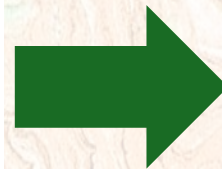
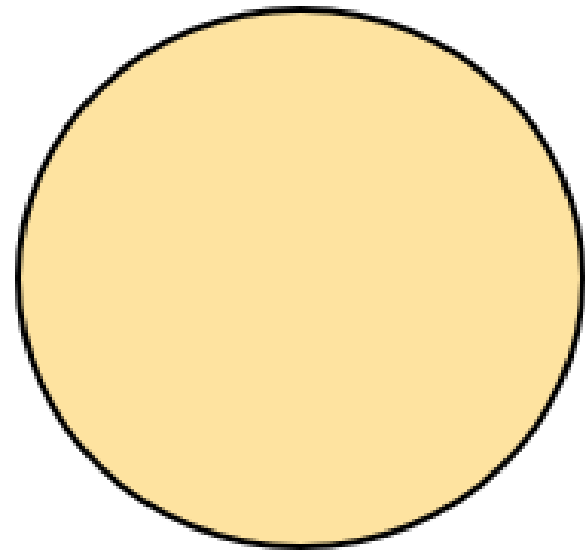
〈コンゴレッドの実験〉

100 μ lずつ滴下

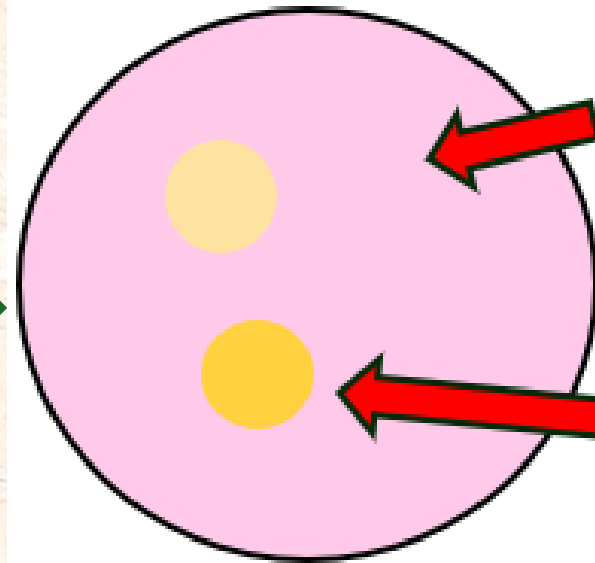
培養液



セルロース培地



コンゴレッドで染色



セルロース分解
無し


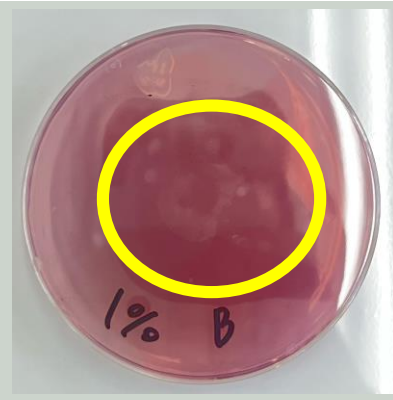

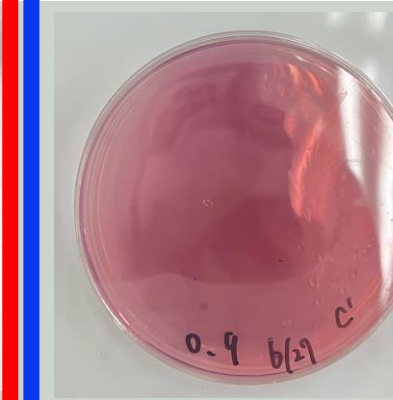

セルロース分解
有り

セルロースの分解が行われた所のみ
染まらない



10.実験Ⅱ-1 [結果]

校内コエグロ

同定した菌


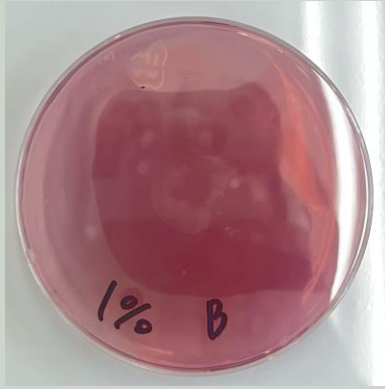
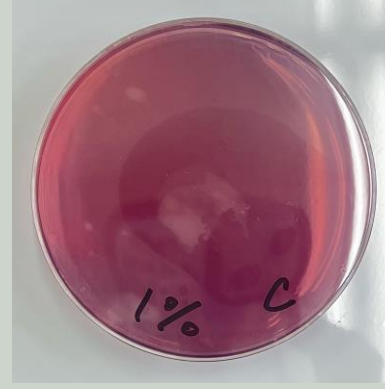
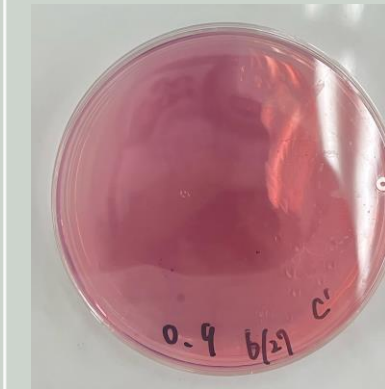

	A (菌① - 1)	B (菌① - 2)	C (菌① - 3)	C' (グラウンドの土)	D' (傾斜地の土)
図					
セルロースの分解活性の有無	あり	あり (弱)	あり	なし	あり

11.実験Ⅱ-1 [考察]

	A (菌① - 1)	B (菌① - 2)	C (菌① - 3)	C' (グラウンドの土の学校でのコエグロ)	D' (傾斜地の土)
図					
セルロースの分解活性の有無	あり	あり	あり	なし	あり

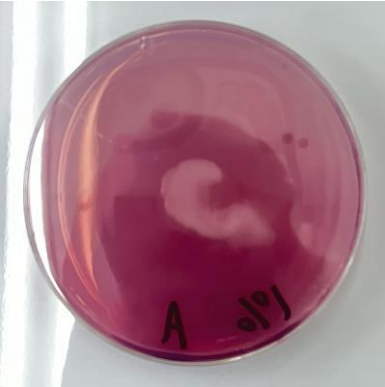
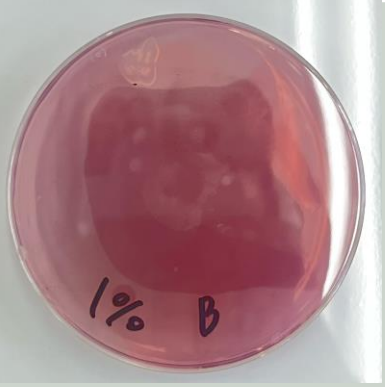
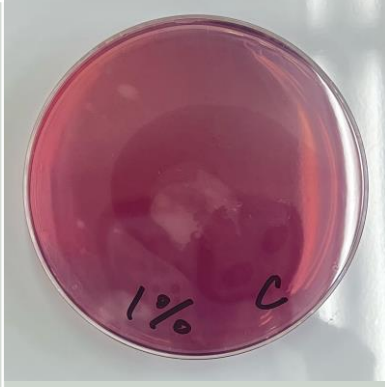
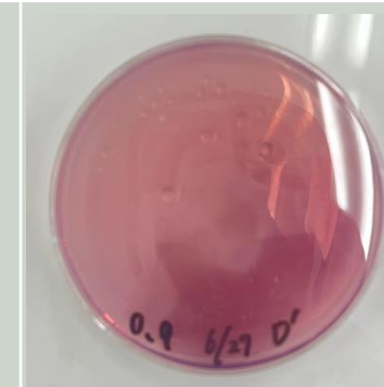
傾斜地の土から同定された菌
→セルロースの分解活性がみられる
→カヤを分解する機能がある

11.実験Ⅱ-1 [考察]

	A (菌① - 1)	B (菌① - 2)	C (菌① - 3)	C' (グラウンドの土の学校でのコエグロ)	D' (傾斜地の土)
図					
セルロースの分解活性の有無	あり	あり	あり	なし	あり

D'の結果より
→傾斜地の土にはセルロースの分解活性が見られる。

11. 実験II-1 [考察]

	A (菌① - 1)	B (菌① - 2)	C (菌① - 3)	C' (グラウンドの土の学校でのコエグロ)	D' (傾斜地の土)
図					
セルロースの分解活性の有無	あり	あり	あり	ない	あり

C'の結果より
→グラウンドの土の上でコエグロを制作しても、
農業に有用な菌が発生するとは言えない。

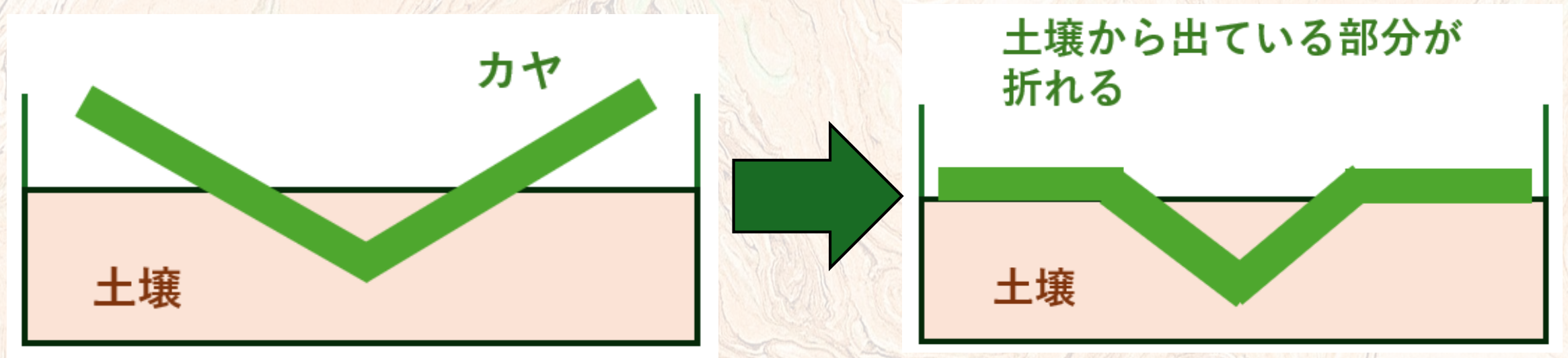
12. 進行中の実験 〈カヤの細胞壁分解の確認〉

〈目的〉

土壌中の菌がカヤの細胞壁を分解する能力を持つかを調べる

〈仮説〉 傾斜地農法を行う畑の土にはカヤの細胞壁を分解する能力を持つ菌がいる

→カヤが分解され、カヤの土と面している部分が腐敗する



13.展望

- ・ 実験 1-2を再度行い、結果を確認する
- ・ 土壌中の菌の働きを特定するために、次の2つの仮説を検証する

1. 菌が**土壌からの栄養吸収を促進する**

のではないか

2. 菌自体が**植物の成長を促進する**

ホルモン等を分泌するのではないか

14.謝辞・参考文献

<謝辞> 本研究にご協力してくださった方々に班員一同深く感謝申し上げます。

徳島大学教養教育院 教授 渡辺稔先生

徳島大学 大学院社会産業理工学研究部 准教授 平田章先生

家賀ガイド 石田修様

<参考文献>

- ・ Mining Biosynthetic Gene Clusters of *Pseudomonas vancouverensis* Utilizing Whole Genome Sequencing
<https://www.mdpi.com/2076-2607/12/3/548>
- ・ Characterisation of a psychrotolerant plant growth promoting *Pseudomonas* sp. strain PGERs17 (MTCC 9000) isolated from North Western Indian Himalayas
<https://link.springer.com/article/10.1007/BF03175558>
- ・ 生物科学班勉強会結果報告～セルラーゼ生産系状菌の分離～
https://www.hiroshima-u.ac.jp/system/files/84953/report2016_1-5.pdf