

平成28年度 地域志向教育研究プロジェクト推進事業 事業報告書

	3		
①プロジェクト名称：	「ねばーるプロジェクト」バイオ産業への納豆菌の応用 ー環境負荷低減型農業を目指してー		
②プロジェクトメンバー：			
学部学科・所属部署	氏名	役割	
バイオ・化学部 応用バイオ学科	袴田 佳宏	研究代表	
バイオ・化学部 応用バイオ学科	松本 恵子	研究分担	
バイオ・化学部 応用化学科	藤永 薫	研究分担	
基礎実技教育課程	堂本 光子	研究分担	
連携推進課	林 学	事務担当	
連携推進課	川本 拓見	事務担当	
③プロジェクトへの参加者数（補助期間終了時）			
学部1～3年次生	研究室所属学生（大学院生含む）	外部参加者数	
25名	1名	2名	
④関連した主要授業科目名			
授業科目名	対象学年	必修・選択	対象学科
微生物学	2	選択	応用バイオ学科
主な特徴：食品・環境・医療・エネルギー分野に欠かせない微生物について、その形態や生理機能、応用について学ぶ。本プロジェクトでは納豆菌の分離・培養を行うことから、本科目の内容と密接に関わりをもち、得られた知識を活用することができる。			
授業科目名	対象学年	必修・選択	対象学科
基礎生物	2	選択	全学科
主な特徴：生物学の基本事項を中心に、生物の能力を応用したバイオテクノロジーやバイオミメティクス、環境問題について学ぶ。本プロジェクトでは、化学肥料による汚染を納豆菌で改善することを目的としており、生物全般の知識が必要となる。本科目で得られた知識を活用することができる。			
授業科目名	対象学年	必修・選択	対象学科
環境化学	2	選択	応用化学科
主な特徴：陸水環境に影響する化学種が、酸塩基平衡、酸化還元平衡、溶解平衡によって水圏環境にどのような挙動をするかを学ぶ。プロジェクトでは、モデル植物を育てる土壌の解析や納豆菌散布による土壌への影響を科学的に分析することから、			

本科目で得られた知識の活用が必須となる。

⑤事業概要 (800 字以上 1000 字以内)

本事業は日本特有の食品微生物である納豆菌を加賀野菜等の地域の作物栽培に応用することで、栽培に伴う環境負荷の低減や野菜の品質向上を目指すものである。

野菜等の植物を栽培する場合、大量の化学肥料や農薬を使用している。農薬の使用は「農薬取締法」で規制されているが、肥料に関しての法規制はない。そのため、農家は農作物の増収のために必要以上の化学肥料を使用している。その結果、農地の土壌には硝酸態窒素が過剰に蓄積し、地力の低下、キャベツなどの葉物植物への蓄積、河川への流入を招いている。硝酸態窒素化合物は人の体内で、発がん物質のニトロソ化合物への変換も指摘されている。地力の低下による植物の抵抗性の低下、病原菌の感染、作物収量の減少、作物の機能低下や他の動植物への影響が将来問題となってくると予想される。

これらの問題を解決する手段として、本事業では日本特有の食品微生物である納豆菌利用に着目した。納豆菌は生きていくために周囲の窒素化合物などの栄養素を取り込んでいる。この納豆菌の機能を利用して、土壌中の窒素化合物を含めた余分な栄養素を吸収、分解させ、残留窒素化合物の量を減らすことができる。また、納豆菌が生産する酵素フィターゼにより、フィチン酸を分解することで植物の成長を促進させたとする報告もされている。更に、アスパラ、キャベツ、ニンジン、ゴボウ、イチゴなどの病原菌の繁殖を抑えることも報告されている。いわゆる、微生物農薬としても期待でき、肥料の他、農薬の使用量も低減できる可能性がある。しかし、これらの現象は科学的に説明されていない。そこで、具体的には、食品廃棄物であるオカラを用いて培養した納豆菌肥料（ぼかし）として土壌に施肥、もしくは孢子懸濁液として作物に直接噴霧する。効果の検証としては、土壌 pH、窒素量の測定、作物の成育状態の観察、機能性物質の含有量の測定、遺伝子発現解析、農業用水の化学分析を行い効果を検証する。

納豆菌は日本人が 1000 年以上にわたり食してきた微生物で、その安全性は確認されている。兼六園や金沢市内の公園等から分離した納豆菌を使用することで、いわゆる、地産の納豆菌を使用する。環境問題は 21 世紀には避けて通れない問題である。その問題の 1 つとして農業に焦点を当て、課題に対する解決策を提示し、その有効性を科学的に検証して環境負荷低減型農業を金沢から日本全国に発信するものである。(992 字)

⑥地域志向教育研究プロジェクトの活動実績

※平成 28 年度 地域志向教育研究プロジェクト 事業計画書を踏まえてご記入ください。

※写真や定量的なデータを用いて具体的に表現してください。

1. 金時草農家の見学

5 月 10 日のキックオフミーティングから活動を本格的に始動した。5 月から 8 月の前学期終了までの期間に平均週 2 日活動した。本目的達成のため A、B および C 班の 3 班を編成した。A 班は散布・施肥用の納豆菌孢子調製班、B 班は土壌分析班、C 班は生体反応分析班とし、学生の希望により班編成を行った。実際の納豆菌を植物の栽培に利用するにあたり、そのイメージを膨らませるため金時草



図1. 金時草栽培ハウスの見学

農家の見学を実施した。当農家は長年にわたり納豆菌を畑に施肥している。この見学で納豆菌の加工形態や施肥の仕方などを思考することができた（図 1）。

## 2. 自然界からの納豆菌の分離とその遺伝子解析

本プロジェクトで使用する納豆菌を広く自然界から分離するため、土壌や草木などのサンプルを収集し、授業科目で学んだ知識を活用した。分離した株を使って納豆作製や形態観察を行い、その結果を踏まえて各班から 1 株ずつ候補株を選定した。選抜された 3 株について素性を調べるべく、16S rDNA の塩基配列決定を行い分離菌の帰属を行った。その結果、1 株は納豆菌ではないと判断されが、他 2 株は実際に納豆を作ることと合わせて遺伝子解析結果から納豆菌と判断された（図 2）。そこで、この 2 株を用いて硝酸塩の資化能と生育度を調べて、最終的に硝酸塩を良く資化する 1 株（A 班株）を選抜した。

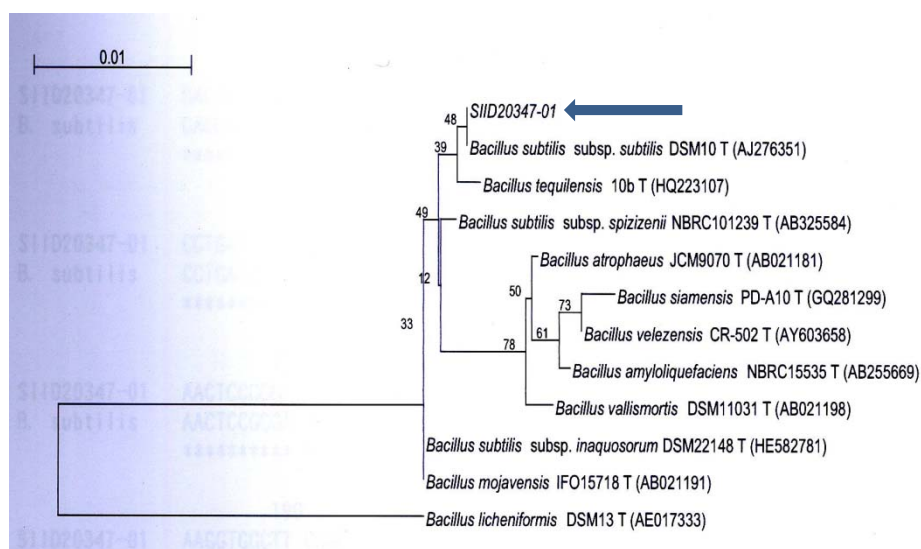
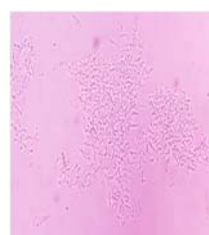


図 2 分離菌の遺伝子解析による分子系統樹

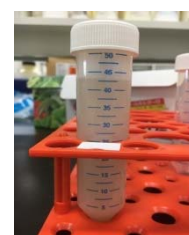
選抜された A 株の形態観察を顕微鏡により行った後、土壌およびモデル植物に施肥する納豆菌の孢子懸濁液を調製した。納豆菌を培養するにあたり、炭素源であるグルコース濃度を変えて培養し、培養液中の孢子数を細菌計算盤を使って測定した。またグルコース計を用いて、培地中に残っているグルコースの濃度を測定した。最終的に高濃度に濃縮した納豆菌の孢子懸濁液を得ることができ、目的を達成することができた（表 1）。

表 1 培養結果

生菌数:  $5.7 \times 10^6$  個  
 孢子濃度:  $8.8 \times 10^6$  個/mL  
 孢子形成率: 60.7%  
 残糖濃度: 0.22 %



顕微鏡写真



調製孢子液

### 3. 土壌分析方法の確立

土壌あるいは植物に納豆菌胞子懸濁液を施肥や散布をした場合、納豆菌がどのような影響を土壌に与えるかを調べるためには、土壌の化学分析が必要不可欠となってくる。そこで、土壌中のリン、カリ、硝酸塩などの分析方法を検討した。土壌分析法は RQ フレックス装置およびパックテストの 2 種類を検討した結果、データのばらつきや再現性などからパックテストによる分析方法に決定した。いくつかの模擬土壌を作製し、パックテストによって土壌中の硝酸塩の経時的変化を測定した (図 3)。この結果、パックテスト法を土壌分析に使用することと決定した。

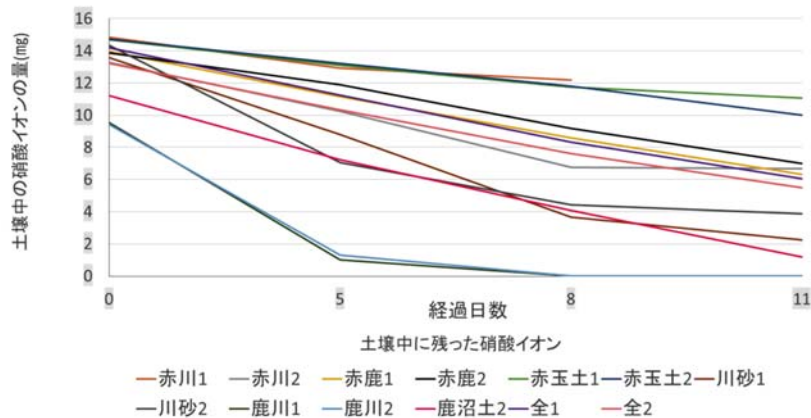


図 3 各調製土壌中の硝酸塩の経時的変化

### 4. モデル植物の選定と栽培実験

栽培上の簡易性、観察のし易さ、評価系の構築などを基準に選考した結果、モデル植物としてブロッコリースプラウトを決定した。栽培土壌としてゴールドデンピートバンを使用し、種を播種後、25°Cの一定温度下で暗環境下、明環境下で栽培した。栽培は納豆菌胞子懸濁液散布の有無で行った。栽培後、胚軸長と新鮮重を測定した結果、新鮮重には有意な差が見られなかったが、胚軸長は納豆菌無添加の方が長くなった (図 4)。新鮮重に差がなく、胚軸の長さが長くなったことから、納豆菌の影響が考えられるが、植物の外観や葉肉厚、葉緑体濃度など機能面での差の検討が必要と考えられた。

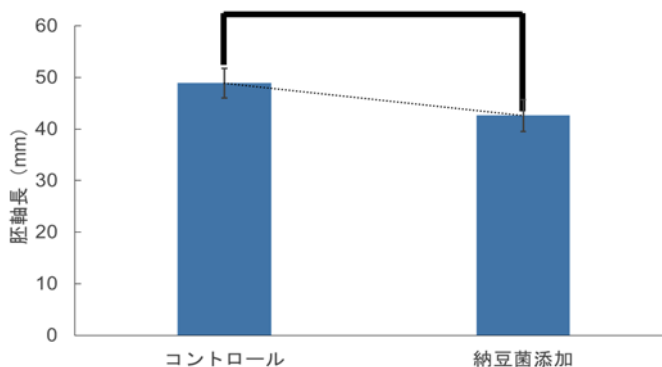


図 4. 胚軸長に及ぼす納豆菌の影響 (n10)

p < 0.05 (有意差あり)、エラーバーは標準偏差

## ⑦地域志向教育研究プロジェクトの具体的な成果

※活動実績に関連させてなるべく量的にご記入ください。

※学生の成長の視点からご記入ください。

地域産業のひとつとして、本プロジェクトでは農業に着目した。具体的には、農業における環境負荷の低減について、微生物資材（納豆菌）に着目して知見を深めた。本学近隣の農家に実地見学に赴き、農地への微生物施用の実際を学んだ。微生物の生態を学術的に学ぶとともに、研究成果の産業応用を視野に学ぶことにより、実践的に技術開発の初歩を体験した。

定期的に学習会や毎月の月例報告会を開催し、栽培実験の基礎ならびに植物の生体計測、データ解析について学んだ。学習会においては、アクティブラーニングを導入し、学生同士で教えあい、成果報告をすることで自立的な学びを促した。

2月17日に行った活動の締めくくりとしての2016ねば一報告会時に、学生アンケート（19名）をとった。その結果と感想を下記に記載した。

### 質問1. 本プロジェクトを通して自己成長できたと思いますか。

9割の学生が自己成長を実感していた。2名はあまりできなかったと回答しているが、この2名は2016年11月からの参加であったため、活動期間が少なかったのが要因と考えられる（図5）。

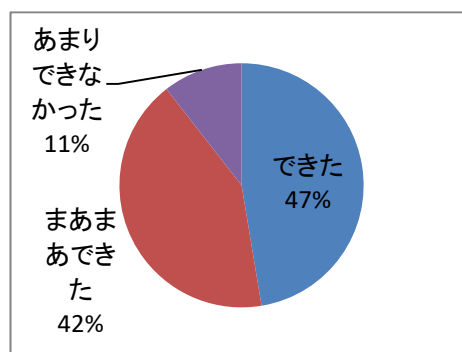


図5

### 質問2. 地域貢献とは何かを意識できるようになったと思いますか。

現地見学を取り入れたが、初年度は基礎的な予備実験が多かったため、活動と地域貢献との結びつきが実感できなかったと考えられる（図6）。このことは、学生アンケートからも伺える。本プロジェクトを地域貢献に結びつけることが来年度の課題となった。

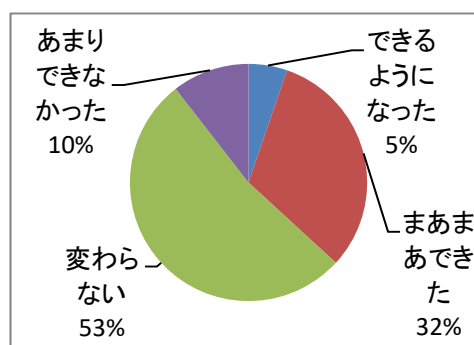


図6

質問 3. 専門あるいは専門外の知識や技能を修得できたと思いますか。

95% (18 人) が専門あるいは専門外の知識や技能を修得できたと実感している (図 7)。本プロジェクトは応用バイオ学科と応用化学科の学生で構成されている。異分野の学生同士の交流や意見交換を交え、それぞれの専門分野にふれることができた成果は大きいと考えられる。

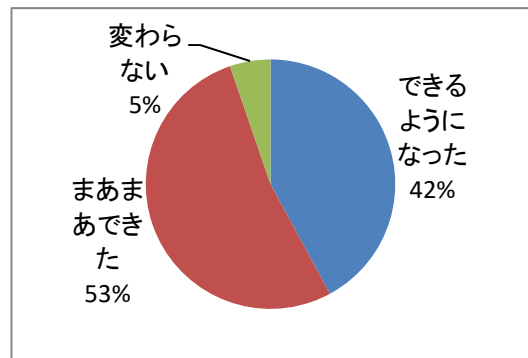


図 7

質問 4. 自ら考え、行動することの意味を感じることができましたか (図 8)。

本学の理念である「自ら考え、行動する技術者」の意味を実感できている学生が 9 割を占めている。

本プロジェクトは学生の主体性を考え、教員はできるだけ指導をしていない。後述する感想にもあるように、自ら考えることの難しさやそれを行動することの大切さを理解して貰えたと考えられる。

変わらないなどと答えた学生は、質問 1 の 2 名と同じ学生で活動期間が短かったのが要因と考えられる。

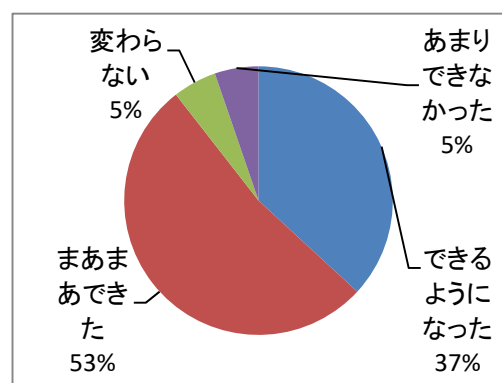


図 8

以下、学生アンケートに記載された感想をそのまま転記する。

- ・ゼミや研究室で学ばないテーマについて、学ぶことができ、有意義であった。
- ・問題があった時に自分たちでアイデアを出すのが面白かったです。
- ・発表会で人前でのプレゼンの仕方についても勉強になりました。
- ・調査活動を通して、最適な調査方法を選択する力が見についた。
- ・プレゼン資料の作成を通して、考えを分かりやすくまとめる力が見についた。
- ・栽培実験の計画や、マニュアル制作を学ぶことができたと共に発表などの技術を培うことができた。
- ・普通の授業では受動的に動くことがほとんどであるため、自分で考えて行動することが大変だった。
- ・難しいこともたくさんあったが、考えたり、解決するために実験するのはとても楽しかった。勉強になった。
- ・納豆菌の分離・培養する操作が初めての経験だったので、わからないことばかりだったが、回を重ねて操作を理解したり、自分達で様々なことを調査することを通して、自分の成長につながったと思う。

- ・グループにリーダーが必要だと思いました。
- ・難しいことも多いけれど多くのことを学べ成長する機会が増えて良かったです。これから積極的に活動しようと思います。また、2年生になるので、考え方も増やしていきたいです。
- ・本年度は班毎の活動が多く、実験手順の確立などを行ったため地域貢献についてはあまり感じることができなかった。来年度は、後輩にしっかりと成果を引き継げるように努めようと考えている。
- ・大変だった。自分で考えることが増えた。
- ・微生物工学にふれられて良かった。
- ・納豆菌の特性や利用価値を考えることができた。
- ・培養などの知識を身に付けながら、活動ができたのでよい経験となった。
- ・納豆菌の分離、植物の栽培など様々な経験をすることができたので良かった。
- ・専門の知識について、深い理解をえることができた。
- ・生物や植物のことについても調べ学習したが難しかった。
- ・機器の使い方などを学ぶことができた。
- ・土壌分析など、バイオの実験ではやらない実験を学ぶことができた。
- ・先輩方の知識や行動力がすごく来年からの活動は自分たちが主体となっていく必要があるので気を引きしめていく必要があると思いました。

本学生アンケートから読み取れるのは、殆どの学生が自ら考え行動することの難しさを体験しそれが、「気づき」になっていることである。言葉で理解していても実体験がないと本当に理解していることにはならないことを学んでもらえたと考えている。

#### ⑧次年度以降の活動予定

平成 29 年度 A 班は、分離した菌株を使って、更なる高濃度の胞子化条件を検討しながら、B 班の土壌分析や C 班の植物生体機能解析班、遺伝子解析班に納豆菌を供給する。具体的には、4～6 月で炭素源、窒素源濃度、最適培養温度や酸素供給量を検討して納豆菌を培養後、各班に提供していく。

B 班は、選定した土壌中の硝酸塩、亜硝酸塩、リン、窒素量を納豆菌の施肥の有無による違いについて分析する。この分析により納豆菌が土壌に及ぼす影響を化学的に検証していく。

C 班は 2 グループに分かれ、モデル植物における生理機能解析や代謝物質の解析を行い、納豆菌の有用性を植物の観点から検証していく。一方で、現在進行中の納豆菌による土壌の変化により植物（農作物）への影響が観察された場合、植物体内での遺伝子発現量を解析することで作用機序が解明できる。従って、遺伝子解析を行う対象とする植物は、生育・RNA 抽出・マイクロアレイ解析が確立されていることが望ましいので、ゲノム解析が終了しており、これまでにいろいろな情報が蓄積されているモデル植物についてプロジェクト参加学生が検討した結果、次年度の遺伝子解析植物としてシロイヌナズナ（図 9）を対象として選抜した。

平成 28 年度は A、B、C 班として活動してきたが、平成 29 年度は班の枠を超え、それぞれの研究結果をもとに知識や技術の融合を行い、本プロジェクトの目的である、納豆菌による環境負荷低減型農業へ貢献を遂行していく。



図 9 シロイナズナ