

令和元年 8月30日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05056

研究課題名(和文) 酸化還元境界層のゆらぎが微生物の動態とガス代謝に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of fluctuation of redox potentials on microbial dynamics and metabolisms of wetland soils

研究代表者

村瀬 潤 (Murase, Jun)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：30285241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：水田土壌に焦点を当てて、酸化還元境界層のゆらぎの実態と微生物群集の応答を解析した。水田土壌表層は過飽和から完全な無酸素状態まで、溶存酸素濃度が極めて大きな変動を示した。水稻根圏でもイネの生育に応じて酸化還元電位が劇的に変動した。水田土壌に生息する原生生物は、好適な酸素濃度あるいは酸化還元電位を持つグループや広範囲の酸素濃度に適応するグループが存在し、酸化還元境界層で捕食者として重要な役割を果たすと考えられた。メタン酸化細菌はメタン酸化に酸素を必須とするものの、嫌気状態に置かれても長期間活性を維持することが可能であった。また、微好気性鉄酸化細菌が表層で活動することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化還元境界層は、多くの重要な微生物代謝が進行するホットスポットであるが、厚さ数ミリの酸化還元境界層の中での劇的な化学的濃度勾配に応じた微生物の群集や活性の空間分布の詳細はほとんど分かっていなかった。本研究では、酸化還元境界層が大きなゆらぎを有していることを実証するとともに、境界層で微生物がサブミリスケールの住み分けを行なっている実態を明らかにした。また物質循環の鍵を担う微生物群集の境界層のゆらぎに対する応答を検証した。本研究の成果から、酸化還元境界層における環境変動が微生物の生態や温室効果ガスであるメタンの動態に及ぼす影響を微生物サイズの視点に立ったスケールで解析することの重要性が示された。

研究成果の概要(英文)：Focusing on paddy soil, we analyzed the fluctuation of the redox boundary layer and the response of the microbial community. In the paddy soil surface layer, the dissolved oxygen concentration showed extremely large fluctuation from supersaturation to complete anoxia. The oxidation-reduction potential also changed dramatically in the paddy rice rhizosphere according to the growth of rice. Protozoa living in paddy soils are considered to play an important role as a predator in the redox boundary layer, as there are groups with suitable oxygen concentration or redox potential and a group adaptable to a wide range of oxygen concentrations. Although methane oxidation bacteria require oxygen for methane oxidation, they were able to maintain their activity for a long time even under anaerobic conditions. Microaerobic iron-oxidizing bacteria act in the surface.

研究分野：環境微生物学

キーワード：水田 酸化還元境界層 微生物 メタン 鉄酸化 原生生物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酸素の拡散と消費によって形成される酸化還元境界層は、海洋の堆積物から土壌の小団粒や生物の糞に至るまで、あらゆる生態系に遍在する。そこには酸素を用いた好気呼吸、酸素以外の様々な電子受容体を利用する嫌気呼吸を行なう多様な微生物が存在し、微小な空間で熱エネルギーの法則によって規定される厳密な生態学的棲み分けを行なっている。また、嫌気的な環境における微生物代謝の生成物が好気環境における別の微生物の基質となる(あるいはその逆)など、酸化還元境界層は微生物反応による物質動態が最も盛んな場所である。水田や湿地生態系は温室効果ガスであるメタンの主要な発生源であるが、同時にメタン酸化の最も活発な生態系でもあり(Reeburgh 2007)、還元層から移行したメタンは表層わずか数 mm の酸化層で 90% 以上酸化される。

酸化還元境界の構造は安定ではなく、酸素の供給と消費のバランスに応じて変化する。このことは、同一の微視的空間が好気環境から嫌気環境(あるいはその逆)に変化したり、嫌気環境の中でも酸化還元電位が変動したりすることを意味している。したがって、ある特定の酸化還元条件で最適の活性・生育を示す微生物も、実際の環境中では常にこの酸化還元境界層の「ゆらぎ」に対する適応を迫られていると予想される。酸化還元境界層の周期的あるいは突発的な環境変化に対する微生物群集の応答を明らかにすることは湿地生態系の物質循環の実態解明と地球規模の環境変動の影響予測に必須であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、物質動態のホットスポットである酸化還元境界層に焦点をあて、水田を対象にそのゆらぎの実態を明らかにするとともに、土壌微生物群集の応答をサブミリメートルスケールの空間解像度で解明する。また、FACE(Free Air CO₂ Enrichment)試験圃場を利用して、温暖化や大気 CO₂ 濃度の上昇などの環境変動が酸化還元境界層の構造と物質動態、微生物群集に与える影響を予測する。また、メタン発生の鍵をにぎるメタン生成古細菌、メタン酸化細菌、土壌の酸化還元環境の支配要因である鉄の存在状態に影響を与える微好気性鉄酸化細菌、捕食を通じて原核生物の群集構造や機能に影響をあたえる原生生物(繊毛虫、鞭毛虫、アメーバ)を対象に、酸化還元環境の変化に対する各微生物群の適応戦略と微生物間相互作用の応答を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)水田土壌の酸化還元環境の変動解析

水田作土(<2mm)を 1/10,000a ポットの中に入れて基肥を施肥した。水飽和状態で土壌をよく攪拌した後湛水状態として野外に設置した。微小酸素電極を用いて 100-200 μm の解像度で土壌表層深度 8mm までの溶存酸素濃度を昼夜にわたって測定した。また、同様のポットに根域を制限するためのメッシュバッグを入れてその中に水稻を移植し、メッシュバッグ内(根圏)と外(非根圏)の土壌酸化還元電位を測定した。

(2)水田土壌の酸化還元環境の変動に対する微生物群集の応答

(1)の測定で用いたポットから土壌を採取し、抽出した核酸(DNA, RNA)を用いた PCR-DGGE 法による微生物群集の解析を行った。

(3)土壌のメタン酸化活性に及ぼす酸素条件の影響

絶対好気性であるメタン酸化細菌の土壌中での酸化活性におよぼす酸素濃度の変動の影響を室内培養実験で検証した。水田土壌をそのままあるいはメタンを加えて好气的に培養しメタン酸化を活性化させた後に一定期間培養した後のメタン酸化活性を測定し、好気条件と比較した。また、貧酸素条件(1%)、大気条件(21%)、過酸素条件(100%)における土壌のメタン酸化活性を測定した。

(4)水稻根圏におけるメタン酸化微生物食物連鎖の解析

つくばみらい市 FACE 実験圃場から採取した水稻(コシヒカリ、タカナリ)根試料および作土試料について、¹³C 標識メタンを利用した安定同位体プロービング法により、メタン由来の炭素を取り込んだ微生物群集の解析を行った。

(5)捕食性原生生物群集に対する酸素分圧の影響

水田土壌の懸濁液を餌細菌となる大腸菌とともに寒天培地に塗布し、異なる酸素濃度条件で培養を行ない、生育した捕食性原生生物を最確値法で係数するとともに、寒天培地上に生育した真核微生物群集を PCR-DGGE 法により解析した。また、分離に成功したアメーバについて、異なる酸素条件での増殖と活動(移動)度を比較した。

(6)水田土壌表層における酸素が微好気性鉄酸化細菌群集の分布に及ぼす影響

水田より落水期に採取した土壌を用いた。アクリル製円筒に粉末状の稲わらを 0.2%(w/w)混合した土壌を詰め、25℃、暗所で湛水静置培養した。培養 1 ヶ月後に表層より深さ 3mm までの溶存酸素濃度を 100 μm 間隔で測定するとともに、深さ 10mm までの土壌を 2mm ずつ 5 層に分け

て採取した。各層の活性二価鉄量を測定するとともに土壌より DNA を抽出し、Gallionellaceae 科好気性鉄酸化細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象とした qPCR、DGGE 解析を行った。また、細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象とした qPCR 解析も併せて行った。

4. 研究成果

(1) 水田土壌の酸化還元環境の変動解析

湛水水田土壌表層の溶存酸素濃度は昼夜で大きく変動し、同じ深度でも、夜間に無酸素状態になる層位が日中は最大で $1,600 \mu\text{mol L}^{-1}$ にまで達するケースが観察された (図 1)。また、溶存酸素濃度のピークは土壌表層よりも 2-3mm 下層に認められ、土壌によっては深度 5mm でピークを示す時間帯もあった。日中の土壌酸素濃度は光合成有効放射 (PAR) が $1,000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ を下回る夕刻を過ぎると急速に低下し、日中溶存酸素濃度のピークが観察された層位が夜間には無酸素状態となった。夜明け時には PAR が $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 程度に上昇した時点で急激な酸素濃度の上昇が認められ、その層位は日中のピークよりも深かった。このことから、水田土壌中では光量や栄養塩濃度に対する異なる応答性を持った複数のグループによる光合成が行われていると推察された。溶存酸素濃度の昼夜変動の程度は土壌によって異なり、土壌の有機物量あるいは地力窒素の違いがその要因になっているのではないかと推察した。湛水土壌の表層における溶存酸素濃度の日内変化は田面水と比較してはるかに大きく、日中は光合成、夜間は呼吸による表層土壌における酸化還元状態の大きな変化が存在することが示された。

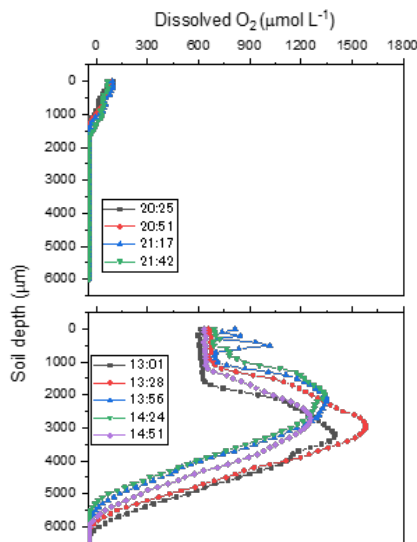


図 1 湛水水田表層土壌の溶存酸素濃度

水田土壌の酸化還元電位を測定した結果、非根圏土壌では湛水後電位は徐々に低下する傾向を示したが、根圏土壌は水稻移植後一端上昇した後に急激に低下した。すなわち移植後約一ヶ月間は根から供給される酸素によって根圏土壌の酸化還元電位は高く保たれるが、その後は根由来の有機物の分解によって急激に酸素の消費が進み、さらに嫌気微生物代謝が進行するものと推察された。

(2) 水田土壌の酸化還元環境の変動に対する微生物群集の応答

土壌 RNA に基づく細菌群集、メタン生成古細菌および真核微生物群集は、昼夜で差は認められなかった。このことから、24 時間周期の酸素環境の急激な変化に対して群集レベルで微生物が急激に変わることはないものと考えられた。今後酸化還元境界層に生息する微生物活性をについてさらに詳細に解析する必要があると考えられた。一方、水稻根圏では酸化還元電位が急激に低下した 9 日間で、真核微生物群集の遷移が確認された。

(3) 土壌のメタン酸化活性に及ぼす酸素条件の影響

好気条件で活発にメタン酸化が起きている水田土壌をメタンのない状態で好氣的あるいは嫌氣的に一定期間保存した後に再び好気条件でメタン酸化活性を測定したところ、嫌気条件では高いメタン酸化活性を維持していたのに対し、好気条件では保存期間に応じて活性が低下した。また嫌気状態でメタンを添加して一定期間保存すると保存期間中にメタン酸化は観察されなかったものの、好気条件に転じたときのメタン酸化の開始が早くなった。一方で、気相の酸素濃度が 100% のときのメタン酸化活性は 21% (大気レベル) のときと比べて明らかにメタン酸化活性が低下していた。以上のことから、酸素レベルの変化がメタン酸化の活性に影響を与えること、嫌気条件は絶対好気性のメタン酸化細菌の活性の維持に寄与することが示された。

(4) 水稻根圏におけるメタン酸化微生物食物連鎖の解析

細菌群集については、Type I, II のメタン酸化細菌が最も優占していたが、その他にも細菌捕食性の Myxococcales や代謝産物を同化したと推察される非メタン酸化細菌 (Burkholderiales, Gemmatales) の関与が明らかとなった。根圏試料の細菌叢は非根圏に比べて相対的に単純であることが示唆された。また、

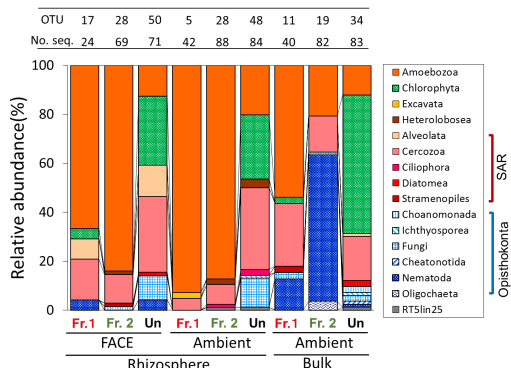


図 2 クローン解析により解析したメタン由来の炭素を利用する真核微生物の構成に及ぼす根圏効果と FACE 効果。Fr.1, Fr.2: $^{13}\text{C}\text{-CH}_4$ を利用した群集、Un: $^{13}\text{C}\text{-CH}_4$ を利用しなかった群集

原生生物、線虫などの真核生物がメタンの炭素を同化していることが明らかとなり、水稻根圏においてもメタンを基点とする微生物食物連鎖が機能していることが示された(図2)。水稻根試料でメタン酸化食物連鎖に関わる真核微生物群集の構成は非根圏土壌とは大きく異なっており、水稻根特有の微生物食物連鎖の存在が示された。水稻根のメタン酸化微生物食物連鎖の構造は、大気CO₂の上昇の影響を受けて変化した。

(5)捕食性原生生物群集に対する酸素分圧の影響

捕食性原生生物は培養時の酸素濃度に応じて異なる群集が生育することが明らかとなった(図3)。また、大気酸素濃度の1%(パスツール点)以下の貧酸素条件下で生育する捕食性原生生物の数は大気酸素濃度条件と違いがなかった。分離したアメーバ(*Vermamoeba vermiformis*)の移動度や増殖に対する酸素濃度の影響はほとんどなく、大気酸素濃度の1-100%にわたって活発に移動、増殖することが明らかとなった(図4)。

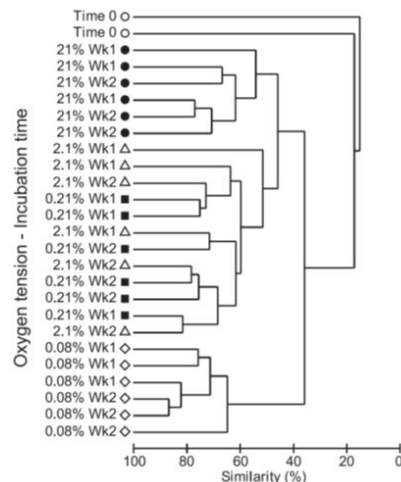


図3 培養時の酸素濃度が捕食性原生生物群集に対する影響

(6)水田土壌の微好気性鉄酸化細菌の生態

湛水状態とした水田土壌の室内培養実験で、培養中に土壌表層部に鉄酸化層が形成されたことが目視で確認された。土壌中の酸素は深さ2.5mm付近で消失し、活性二鉄量は0-2mm層で最も低い値を示した。乾土1gあたりの好気性鉄酸化細菌16S rRNA遺伝子コピー数は、4-6mm層下では10⁶コピーであったのに対し、0-2mm層では約10⁸コピーと最も高い値を示した。全細菌16S rRNA遺伝子コピー数に占める割合も同様に最表層で最も高い値を示した。DGGEバンドパターンは、培養前後および土壌深で異なり、0-2、2-4mm層には特徴的なバンドが観察された。以上の果は、湛水に伴い水田土壌表層部で Gallionellaceae科の微好気性鉄酸化細菌が増殖したことを示しており、土壌表層の鉄酸化反応に菌が関与していることが示唆された。

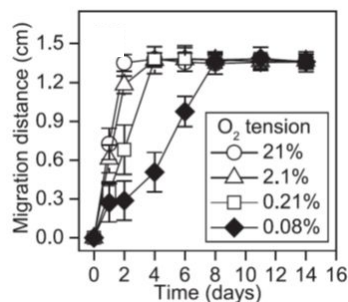


図4 培養時の酸素濃度が捕食性原生生物の移動に及ぼす影響

<引用文献>

Reeburgh WS. 2007. Oceanic methane biogeochemistry. *Chemical Reviews* 107:486-513.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件 いずれも査読有)

Khalifa, A., Nakasuji, Y., Saka, N., Honjo, H., Asakawa, S., and Watanabe, T.: *Ferrigenium kumadai* gen. nov., sp. nov., a microaerophilic iron-oxidizing bacterium isolated from a paddy field soil, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 68, 2587-2592, doi:10.1099/ijsem.0.002882, 2018.

Asiloglu, R., and Murase, J.: Microhabitat segregation of heterotrophic protists in the rice (*Oryza sativa* L.) rhizosphere, *Rhizosphere*, 4, 82-88, https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.08.001, 2017.

Murase, J.: Quest of soil protists in a new era, *Microbes Environ.*, 32, 99-102, 10.1264/jsme2.ME3202rh, 2017.

Asiloglu, R., and Murase, J.: Active community structure of microeukaryotes in a rice (*Oryza sativa* L.) rhizosphere revealed by RNA-based PCR-DGGE, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 62, 440-446, 10.1080/00380768.2016.1238281, 2016.

Takenouchi, Y., Iwasaki, K., and Murase, J.: Response of the protistan community of a rice field soil to different oxygen tensions, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 92, fiw104, 10.1093/femsec/fiw104, 2016.

[学会発表](計12件)

Mohammad Saiful Alam, Joseph Benewindé Sawadogo, 浅川 晋: 水田生態系から分離されたメタン酸化細菌の亜酸化窒素生成能、日本土壤微生物学会 2019年度札幌大会、2019

村瀬 潤, 後藤佳介, 杉浦大輔: 湛水水田土壌表層における溶存酸素鉛直プロファイルの昼夜変動, 日本土壌肥料学会中部支部会第 8 回大会, 2018

楠 悠季, 難波竜士, 和田隆太郎, 吉田稜, 江見晃一, 小川 拓哉, 邊見 久, 浅川 晋: メタン生成古細菌 *Methanosarcina mazei* のメタノコンドロイチン分解酵素の解析, 日本 Archaea 研究会第 31 回講演会, 2018

Murase, J.: Ecology of protists in a rice rhizosphere, International Workshop of Mollisols Ecology, Harbin, 2018,

Murase, J.: Microbial food chain driven by methane in a rice field soil, The 8th East Asian Federation of Ecological Societies, Nagoya, 2018

村瀬 潤: 水稲根圏における原生生物の生態と機能, 第 362 回生存圏シンポジウム大気 - 森林 - 土壌循環ワークショップ, 2017

Hibino, Y., Tokida, T., Okubo, T., Arai, M., Hayashi, K., Sakai, H., Hasegawa, T., and Murase, J.: Methane-driven microbial food web in the rice rhizosphere, ESAFS, 2017

日比野優子, 常田岳志, 大久保卓, 荒井美和, 林健太郎, 酒井英光, 長谷川利拓, 村瀬 潤: 水稲根圏におけるメタン酸化食物連鎖の安定同位体プロービング法による解析, 日本土壌肥料学会 2017 年度仙台大会, 2017

中川晃希・村瀬潤・浅川晋・渡邊健史: 水田土壌表層部の微好気性鉄酸化細菌群集構造の解析, 日本土壌肥料学会 2017 年度仙台大会, 2017

村瀬 潤, 日比野優子, 常田岳志, 大久保卓, 荒井美和, 林健太郎, 酒井英光, 長谷川利拓: 水田土壌のメタン酸化微生物食物連鎖の構造と機能, 日本地球惑星科学連合 2017 年大会, 2017

Takenouchi, Y., Iwasaki, K., and Murase, J.: Response of the protistan community of a rice field soil to different oxygen tensions, 16th International Symposium of Microbial Ecology, 2016

Murase, J.: Diversity and ecology of microeukaryotes in rice field soil, The 8th Asian Symposium on Microbial Ecology, 2016

〔図書〕(計 1 件)

村瀬 潤: 実践土壌学 1 土壌微生物学 水田土壌の特徴と生産性とのかわり p. 110-128 豊田剛己 (編), 2018

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~soil/Soil_Biology_and_Chemistry/toppupeji.html

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 浅川 晋

ローマ字氏名: Susumu ASAKAWA

所属研究機関名: 名古屋大学

部局名: 生命農学研究科

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 50335014

研究分担者氏名:

ローマ字氏名：渡邊健史

ローマ字氏名：Takeshi WATANABE

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：生命農学研究科

職名：講師

研究者番号（8桁）：60547016

(2)研究協力者

研究協力者氏名：林健太郎

ローマ字氏名：Kentaro HAYASHI

研究協力者氏名：常田岳志

ローマ字氏名：Takeshi TOKIDA

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。