

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12644

研究課題名(和文)窒素欠乏水田で生じるイネ根圏微生物の変化と窒素の自律的供給

研究課題名(英文) Soil microbial community and self-sustaining nitrogen supply in unfertilized paddy soil

研究代表者

杉山 修一 (SUGIYAMA, Shuichi)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：00154500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：日本には、30年以上無肥料でも高い収量をあげている水田が存在する。無肥料水田における窒素固定微生物群集と窒素供給力を調査するため、収量性の異なる長期無肥料水田と慣行水田を対象に土壌の無機窒素供給力と窒素固定細菌群集の解析を行った。その結果、水田間で土壌の窒素固定細菌群集は大きく異なり、無肥料水田で増加した細菌の多くはメタン酸化細菌に属することがわかった。このことから、(1)無肥料水田ではメタンをエネルギー源とする窒素固定細菌が優占し、土壌の自律的窒素供給に貢献していること、(2)無肥料水田では細菌による窒素固定を通じてメタンの排出が抑制されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：High-yield paddies exist even without fertilizer application for a long period of time in Japan. In this study community structure of nitrogen fixing bacteria and capacity of nitrogen supply of soil were compared between four paddies. The soils were incubated under flood condition for eight weeks and capacity of nitrogen supply of the soils and abundance changes in nitrogen fixing bacteria were examined. Results : (1) The amounts of increased inorganic nitrogen during the incubation corresponded with the yield level of unfertilized paddies. (2) The clear differentiation of nitrogen fixing bacterial communities were found between the four paddies. (3) Most bacteria that increased their abundance during the incubation belonged to methane oxidizing bacteria. This result suggests that the bacteria responsible for nitrogen fixation in paddy soil utilize methane oxidation as its energy source and thus contribute to reduction of methane emission from paddies.

研究分野：環境農学

キーワード：水田 窒素固定 土壌 細菌群集 窒素

1. 研究開始当初の背景

(1) 窒素は、作物収量を制限する最も大きな要因の一つである。自然生態系と違い農業生態系では、収穫を通じてお米や野菜等の収穫物に含まれる窒素が毎年系外に持ち出されるために、長期間の無肥料栽培を行うと農地の窒素が枯渇し、最終的には作物栽培が不可能になると考えられる。しかし、この常識に反し、日本には長期間(30年以上)無肥料栽培を行いながらも慣行栽培に匹敵する収量をあげている水田農家が存在する。肥料を与えなくても農地での持続的作物生産が可能になるメカニズムが解明されれば、化学肥料と農薬の投入を前提としてきた慣行栽培とは異なる革新的な栽培技術への道を開く可能性がある。

(2) 肥料以外に農地に窒素を供給する方法として生物的窒素固定がある。生物的窒素固定は、反応に関与するニトロゲナーゼが酸素存在下と周辺のアンモニア濃度が高い条件で反応が抑制される。無肥料水田では、湛水による酸素のない嫌気条件が発生し、無肥料による土壌のアンモニア濃度が低いという生物的窒素固定に最適の条件が生成する。そこで、申請者は、長期無肥料水田では窒素固定微生物の活性化を通じて、水田内に自律的に窒素を供給できるシステムが生成するという仮説を考え、検証を行ってきた。その結果、慣行栽培と長期無肥料栽培水田土壌の窒素固定能力をアセチレン還元法で比較したところ、長期無肥料水田で窒素固定能が高いことを示すことができた。

(3) しかし、実際にどのような微生物群集が活性化し、窒素固定に係わっているかはこれまで明らかにされてこなかった。生物的窒素固定は空中の窒素ガスからアンモニアを生成する生化学反応であるが、1モルのアンモニアの生成に18モルのATPを必要とするエネルギーを大量に消費する反応である。したがって、窒素固定に関与する細菌群集を明ら

かにするには、窒素固定反応に供給されるエネルギーがどこから供給されるかという視点が不可欠である。そこで、窒素固定に関する細菌群以外にそれに連関して変動する細菌群を明らかにすることで、長期無肥料水田で活性化する窒素固定にどのようなグループの微生物が関与しているかを解明することを目的に、本研究を計画した。

2. 研究の目的

(1) 生物的窒素固定に係わる *nif* 遺伝子は進化の過程で水平伝搬により様々な細菌に拡散している。生物窒素固定に必要なエネルギー源として、マメ科植物に共生する根粒菌のように宿主植物からエネルギーの供給を受けるもの、光合成細菌のように自らの光合成で得たエネルギーを用いるもの、土壌中の有機炭素の分解エネルギーを利用するものなど、窒素固定反応に必要なエネルギーの供給源は多様である。

(2) 窒素固定に供給されるエネルギーは主に有機炭素の化学エネルギーを基にしているので、水田における窒素固定反応は、水田内での炭素と窒素の循環と密接に結びつく。窒素と炭素循環には多様な微生物群集が関与しており、特定の微生物の動態を追跡するよりも、微生物全体の変動を網羅的に解析する手法が有効である。

(3) 本研究では、最近普及してきた次世代シーケンズ技術を用いたメタゲノム解析により、無肥料水田で活性化する窒素固定に係わる細菌群集を網羅的に解析した。解析には、窒素固定酵素、ニトロゲナーゼをコードする *nifH* 遺伝子を用いた。また、同時に窒素固定反応とともに変動する細菌群集を網羅的に解析するために、リボソーム RNA 遺伝子(16S)の解析も合わせて行った。

3. 研究の方法

(1) 東北地方で、長期無肥料栽培を行っている農家の中で、高収量水田(480kg/10a)、中

程度の収量を達成している水田(300kg/10a)、低収量の水田(200kg/10a)の3水田を選び、2017年4月に土壌をサンプリングした。また、慣行栽培水田の土壌も加えた。サンプリングした土はガラス室で5月末まで風乾後、6月6日に、10cm x 5.5cm、深さ15cmのプラスチックポットに土を入れ、湛水条件で8週間培養した。実験には無処理区を含め、炭素・窒素循環に影響を与えるワラ処理、光処理、肥料処理の3処理を加えた。光処理では微生物による光合成を可能にするために実験期間中に太陽光がポットに届くようにしたが、他の処理では光合成の影響を除去するために暗黒条件下で培養した。各処理はいずれも3反復で行った。

(2) 培養前の土壌と各処理の培養後の土壌の窒素量を硝酸態窒素とアンモニア態窒素に分けて比色法により求めた。培養前後の窒素量の差から、培養期間の微生物活動による窒素供給力とした。なお、窒素供給力は微生物による窒素固定以外に、微生物の分解による土壌有機物に含まれる無機窒素の放出も含まれる。

(3) 窒素固定遺伝子は多くの細菌グループに含まれており、そのすべての細菌が窒素固定に係わっているわけではない。そこで、実際に窒素固定に関与している細菌群を特定するために、実験開始前と終了後の各微生物の変化量を求め、実際に活動している微生物群を変化量から推定した。各土壌から、市販のDNA抽出キット(ISOIL)を用いてDNA抽出後、窒素固定微生物については *nifH* 遺伝子領域を増幅するプライマー(PolF/PolR)を用い、一般の細菌群集についてリボソームRNA 遺伝子を増幅するプライマー(515F/806R)を用いてPCR反応を行い、対象の遺伝子領域を増幅した。増幅したPCR産物は、精製後に次世代シーケンス解析により含まれるDNAの塩基配列を網羅的に解析し、塩基配列からデータベースを基に各微

生物の分類群の特定を行った。なお、次世代シーケンスによる配列の読み取りと解析は外注(生物技研,厚木)により行った。

4. 研究成果

(1) 水田土壌の8週間の培養により、土壌に含まれる無機窒素量は、どの処理区でも増加した。窒素の増加程度は、高収量、中収量、低収量の順に大きくなり、無肥料水田の収量性を反映した。このことから、無肥料水田に見られる大きな収量差は、微生物による土壌からの窒素供給力が大きく係わっていることが示唆された。しかし、光処理、ワラ処理という処理間には、収量性の異なる水田土壌間程には大きな差異は見られなかった。

(2) *nifH* 遺伝子で得られた1249の異なる塩基配列(OTU)のうち培養前後0.5%以上変動したOTUが113個見いだされた。この配列を基に多変量解析(非計量多次元解析)を行ったところ、水田土壌間には大きな差が見られ、特に無肥料水田と慣行栽培水田では顕著な差が見られた。このことから、窒素固定に係わる細菌群は水田間で異なり、特に肥料を与えないことで窒素固定に係わる細菌群は大きく変動することが分かった。

(3) 培養後に増加した12のOTUのうち、10のOTUはAlpha proteobacteria 綱のメタン酸化細菌グループ(MOB, Methane Oxidizing Bacteria)に属していた。また、無肥料の高収量水田は低収量水田に比べて、このグループの細菌の増加量が大きかった。水田は、強力な温室効果ガスであるメタンの発生源の一つである。水田におけるメタン発生はメタン生成古細菌の活動を通じて起こるが、生成されたメタンは土壌表面の酸素のある場所でメタン生成菌により酸化(分解)されてCO₂となり、この時にエネルギーが生成する。このことは、無肥料水田における窒素固定細菌は主にメタンをエネルギー源として窒素固定を行っているグループで有り、高収量水田土壌では、特にメタン酸化が活発であること

を示している。

(4) すべての細菌群集を増幅するリボソーム RNA 遺伝子を対象とした OTU についても培養前後の増加量を多変量解析（主成分分析）で解析した。その結果，無肥料水田と慣行水田間で窒素固定以外の細菌群集でも大きな差が見られ，肥料が水田土壌の細菌群集の構成を大きく変える要因であることが分かった。窒素固定細菌群と一般細菌群との関連を調べたところ，両者には密接な関係が見られ，多くの細菌が窒素固定反応とともに共変動していることが分かった。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

斎藤嶺次郎・杉山修一：長期無肥料水田における窒素固定微生物群集と窒素供給力. 土壤微生物学会 2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 修一 (SUGIYAMA Shuichi)
弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：00154500

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
()