

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05372

研究課題名(和文) 水田土壌における微好気性鉄酸化細菌の鉄酸化特性および群集動態の解析

研究課題名(英文) Characteristics and community dynamics of microaerophilic iron-oxidizing bacteria in paddy field soil

研究代表者

渡邊 健史 (Watanabe, Takeshi)

名古屋大学・生命農学研究科・講師

研究者番号：60547016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では水田のGallionellaceae科の微好気性鉄酸化細菌を対象に、鉄酸化細菌の生育とともに形成した鉄酸化物の特徴と、土壌中での微好気性鉄酸化細菌群集の動態を解析した。分離菌株を対象とした解析により、微好気性鉄酸化細菌はフェリハイドライトを主体とした鉄酸化物を形成すること、また、菌株によっては樹枝状の構造物を形成させることを示した。また、土壌中での群集動態の解析により、微好気性鉄酸化細菌群集は、土壌中での鉄の酸化還元状態の変化と対応して変化することを明らかにし、Gallionellaceae科鉄酸化細菌が、水田土壌の鉄酸化過程に関わっていることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鉄の酸化還元反応は、水田土壌の物質代謝において重要な役割を担う。このうち、鉄の酸化反応については、これまで非生物的反応(いわゆる空気酸化)が主体と考えられ、鉄酸化細菌による生物的反応については知見が限られていた。本研究では、Gallionellaceae科の微好気性鉄酸化細菌に注目し、土壌中での鉄酸化過程に微好気性鉄酸化細菌が関与していることを初めて示した。また、非生物的反応による鉄酸化物とは異なる特徴的な形態の鉄酸化物が一部形成されることを示した。これらの成果は、水田土壌の物質代謝のさらなる理解につながると期待され、環境や食の安全に配慮した持続可能な水稲栽培管理の確立に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The characteristics of Fe oxides formed during the growth of Gallionella-related Fe-oxidizing bacteria and dynamics of Gallionella-related Fe-oxidizing bacterial community in paddy field soils were studied to understand the role and significance of them in the Fe oxidizing process in paddy field soil. The microscopic observations and XAFS analysis showed that Gallionella-related Fe-oxidizing bacteria produced ferrihydrite-predominated iron oxides during the growth, some of which produce dendrite structures of Fe oxides. The community analysis showed that the dynamics of Gallionella-related Fe-oxidizing bacterial community changed depending on the redox cycle of Fe in paddy soils. These results suggested that Gallionella-related Fe-oxidizing bacteria are involved in the Fe-oxidizing process in paddy field soil, and their behavior may influence the dynamics of not only Fe but also other elements in the soil.

研究分野：土壌微生物学

キーワード：水田 鉄 鉄酸化細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鉄は地殻中に4番目に多く存在する元素であり、主に2価と3価の化学形態で存在する。その酸化還元反応は地球化学的物質循環の駆動力となり、様々な有機・無機物質の動態に影響を及ぼす。2価鉄は非生物的反応または生物的反応により3価鉄に酸化される。一般的に、中性、酸素飽和条件下では、非生物的反応による2価鉄の半減期が短いため、中性淡水環境では非生物的铁酸化が優先的に起こると認識されてきたが、中性淡水環境においても様々な鉄酸化細菌がはたらいっていることが徐々に明らかにされ、生物的铁酸化反応の重要性が認識されつつある。

コメは世界人口の半分を養う極めて重要な穀物であり、その75%が灌漑水田で収穫される。通常、水稲栽培期間は湛水され、収穫前には落水されるため、土壌中の鉄の酸化還元状態は大きく変動する。その変化は、炭素、窒素、リンのほか様々な物質の動態と密接に関わる。したがって、水田土壌の鉄の酸化還元機構を詳細に理解することは、環境と食の安全に配慮した持続可能な水稲栽培技術を確立する上でも不可欠である。しかし、これまでに人為的に土地が管理される水田の生物的铁酸化反応はあまり注目されてこなかった。したがって、水田の鉄の酸化還元サイクルにおける生物的铁酸化反応の位置付けはなされていなかった。

2. 研究の目的

研究代表者らは先行研究により、水田に *Gallionellaceae* 科の微好気性鉄酸化細菌が生息することを明らかにした。本研究では、微好気性鉄酸化細菌の生育とともに形成した鉄酸化物の特徴の解析、水田圃場および室内モデル実験での微好気性鉄酸化細菌の群集動態の解析を行い、水田土壌での鉄酸化反応における *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌の役割をさらに明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 微好気性鉄酸化細菌の生育により形成した鉄酸化物の特徴の解析

水田より分離した *Gallionellaceae* 科微好気性鉄酸化細菌 *Ferrigenium kumadai* An22 株および、新たに水稲根より分離した NRt1 株と NRt3 株を供試した。試験管の底に FeS を沈めた MWMM 無機塩培地で各菌株を生育させ、菌の生育とともに形成される鉄酸化物の特徴を、EDX 装置 (SwiftED3000, Oxford) を備えた低真空 SEM (Miniscope TM3000, 日立) で観察した。

An22 株については、あいちシンクロトロン光において X 線吸収微細構造解析法 (XAFS) により鉄酸化物の構造的な特徴を分析した。試験管より回収、凍結乾燥した鉄酸化物と、参考試料としてフェリハイドライト、マグネタイト、パイライトを対象とした。これらをあいちシンクロトロン光センターのビームライン BL5S1 において Fe-K 吸収端の XAFS スペクトルを透過法により測定した。測定データのバックグラウンド処理、規格化は Athena ソフトウェアを用いた。

(2) 水田圃場の土壌中の鉄の酸化還元サイクルと微好気性鉄酸化細菌群集の動態の関係の解析

圃場レベルでの土壌中の鉄の酸化還元サイクルと微好気性鉄酸化細菌群集の動態の関係を明らかにするために、国内外の水田圃場より経時的に採取した土壌を対象に、*Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌 16S rRNA 遺伝子を対象とした変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法、定量 PCR 法を用いた群集構造解析を行った。

対象試料として、①愛知県農業総合試験場内(安城)の二毛作圃場(稲-小麦)および東北農業研究センター研究センター大仙研究拠点内(大曲)の長期連用圃場(化学肥料区および稲わら堆肥区)より経時的に採取した土壌より抽出した DNA、②フィリピン国際イネ研究所で試験された Alternate Wetting and Drying (AWD) 節水水稲栽培圃場より3作付け期間にわたって経時的に採取した土壌より抽出した DNA、③大曲において、2000年以降水稲作とダイズ作が2-3年ごとに繰り返されている区(輪換区)と水稲作を継続している区(対照区)より、2008年以降、経時的に採取した土壌(深さ5-10cm)から抽出された DNA を供試した。

また、土壌より 1M 酢酸緩衝液 (pH 3.0) で抽出される活性 2 価鉄量を定量し、鉄の酸化還元状態の変化と *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌の動態の関係を明らかにした。

(3) 室内モデル実験による水田土壌中の鉄の酸化還元状態の変化と微好気性鉄酸化細菌群集の動態の関係解明

水田土壌を室内で湛水/落水培養し、土壌中の鉄還元過程および還元された鉄の再酸化過程を、土壌中の活性二価鉄量を測定して追跡するとともに、*Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌 16S rRNA 遺伝子を対象とした定量 PCR 法による解析を行い、その対応関係を明らかにした。

大曲田畑輪換圃場より採取、風乾した土壌(連年水田、輪換田(畑)、輪換田(水田))に粉末状にした稲わら (0.2% w/w) を加え、ガラスシリンジを用いて4週間湛水培養し、その後、シリンジの先端を開放して落水した。経時的に土壌を採取し、活性 2 価鉄量を測定するとともに、DNA を抽出し、定量 PCR により *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌 16S rRNA 遺伝子コピー数を定量した。

4. 研究成果

(1) 水田から分離した微好気性鉄酸化細菌による鉄酸化の特徴の解明

供試した An22 株、NRt1 株、NRt3 株全てにおいて、菌の生育とともに不定形の粒子状の沈殿物が主に観察された。一方、NRt1 株と NRt3 株の培養液では樹枝状物質もところどころで観察された(図 1)。SEM-EDX による観察、分析を行い、樹枝状物質は複数の細い糸状物質から形成されていること、粒子状沈殿物、樹枝状物質を問わず、鉄、酸素、リンが主に集積していることを示した。ただし、細胞の多くは粒子状沈殿物中に観察されたため、樹枝状物質の生成と鉄酸化反応の関係についてはさらなる分析が必要であった。

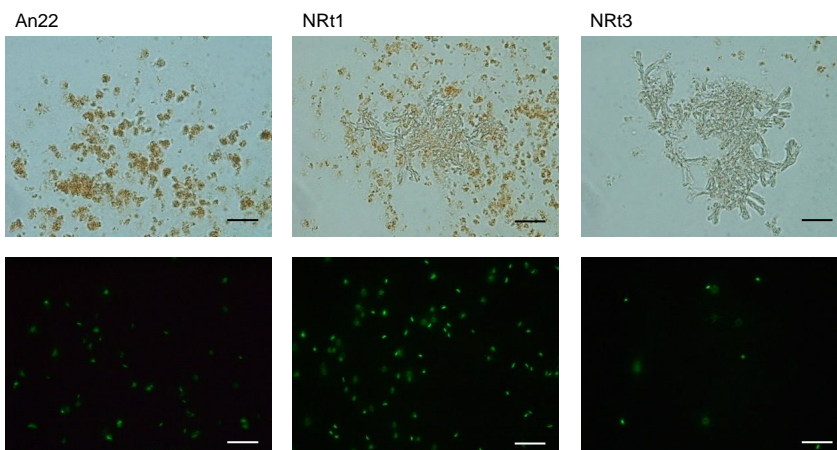


図 1 . *Ferrigenium kumadai* An22 株および NRt1 株、NRt3 株の生育とともに形成された鉄酸化物と細胞の観察. 上写真, 明視野観察. 下写真, 蛍光顕微鏡観察. バーは 10 μ m を示す。

An22 株の生育とともに形成された鉄酸化物の X 線吸収微細構造 XAFS 分析による分析を試みた。An22 株が生成した鉄酸化物は、フェリハイドライトのスペクトルに全体的に類似していた。したがって、An22 株の生育とともにフェリハイドライトが形成されることが推定された。しかし、非生物的に形成された鉄酸化物との間には顕著な違いが見られなかったため、今後、培養方法、鉄酸化物の回収時期、方法も含めて検討を行い、さらなる比較を行う必要があると考えられた。

(2) 水田圃場の土壌中の鉄の酸化還元サイクルと微好気性鉄酸化細菌群集の動態の関係解明

Gallionellaceae 科の鉄酸化細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象としたプライマーセットを設計し、PCR-DGGE および定量 PCR 解析を行った。国内 2 ヶ所(安城と大曲)の水田作土を対象に DGGE 解析を行った結果、安城と大曲の水田圃場間でバンドパターンが大きく異なることが示された。54 バンドの塩基配列をシーケンス解析した結果、54 バンド中 50 バンドは *Gallionellaceae* 科の鉄酸化細菌クラスターに属し、そのうちのいくつかは *Ferrigenium kumadai*、*Ferriphaselus amnicola*、*Sideroxydans lithotrophicus*、*Sideroxydans paludicola* といった既知の微好気性鉄酸化細菌とクラスターを形成した。定量 PCR により解析した安城と大曲の水田土壌中の 16S rRNA 遺伝子コピー数は、それぞれ乾土 1g あたり $10^5 \sim 10^7$ 、 $10^6 \sim 10^8$ コピーであり、水稻栽培期間には土壌中の活性 2 価鉄量と負の相関関係にあった(図 2)。以上の結果より、水田土壌中には相当数の多様な微好気性鉄酸化細菌が生息しており、特に水稻栽培期間において土壌中の鉄酸化過程へ潜在的に関与していることが示唆された。

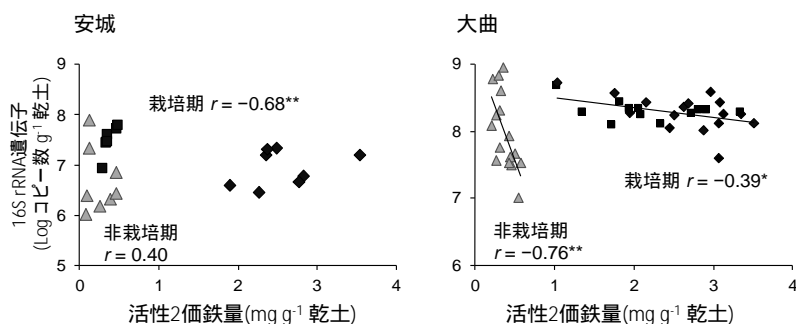


図 2 .安城および大曲水田土壌の活性 2 価鉄量と *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌 16S rRNA 遺伝子コピー数の相関。

フィリピン国際イネ研究所で試験された AWD 節水水稲栽培圃場の土壌より抽出した DNA を対象に、*Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌の群集構造を定量 PCR、DGGE およびクローンライブラリー法により解析した。AWD 節水管理により、土壌中の活性 2 価鉄量は常時湛水区と比べて減少傾向にあり、特に乾季栽培のイネ生育後半で有意に減少した。一方、*Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌の 16S rRNA 遺伝子コピー数は、乾土 1g あたり $10^5 \sim 10^7$ コピーの間を変動し、AWD 区の特に関節生育後半で高くなる傾向を示した。その結果、活性 2 価鉄量と 16S rRNA 遺伝子コピー数の間に、有意な負の相関が見られた(図 3)。PCR-DGGE 解析の結果、バンドパターンは AWD 区と常時湛水区と異なっていたが、クローンライブラリー解析の結果では、群集構成に大きな違いは見られなかった。既報の鉄酸化細菌の鉄酸化活性と土壌中の *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌 16S rRNA 遺伝子コピー数の変化から、土壌中の *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌の鉄酸化ポテンシャルを計算した結果、1 日あたり $2.4 \times 10^{-3} \sim 1.7 \times 10^{-1}$ mg Fe(II) / g 乾土と推定され、土壌中の鉄酸化反応への寄与は 4.6% と推定された。以上より、AWD 節水水田では、土壌がより酸化状態に変化する際に *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌による鉄酸化反応が活発になると推察された。

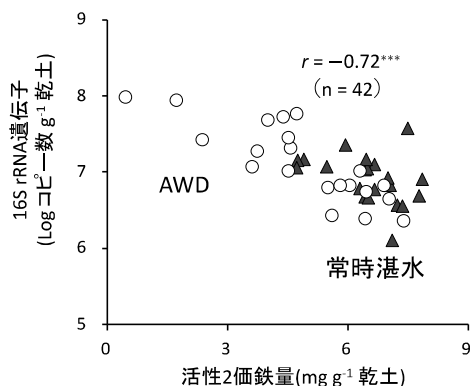


図 3 . AWD 節水管理水田圃場の土壌中の活性 2 価鉄量と *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌 16S rRNA 遺伝子コピー数の相関。

田畑輪換圃場では、毎年イネが栽培されるわけではなく、土壌の酸化還元サイクルは、毎年イネを栽培する連年水田と大きく異なる。ここでは、田畑輪換圃場を対象に *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象とした定量 PCR および PCR-DGGE 解析を行った。その結果、*Gallionellaceae* 科微好気性鉄酸化細菌の 16S rRNA 遺伝子コピー数は、 $10^6 \sim 10^8$ (*Gallionellaceae* 科) コピー/g 乾土の範囲で大きく変化した。特に、畑転換 1 年目の栽培中(夏)以降に対照区に比べて有意に低くなり、復田後は 1 年目、特に水稲作後の落水時に同程度の値まで回復した。畑転換により土壌中で鉄還元反応が活発に起こらなくなると鉄酸化細菌の基質である 2 価鉄が生成されなくなること、鉄酸化細菌数が減少することが示唆された。一方、復田後は、湛水により鉄還元反応が再び活性化して 2 価鉄が生成されるため、*Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌は生成された 2 価鉄を落水時に酸化することで増殖することが示唆された。また、PCR-DGGE 解析により、輪換区と対照区の DGGE パターンは異なる傾向にあることが示された。以上より、土壌中の鉄の酸化還元の周期が、*Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌群集の動態に影響を及ぼすこと、長期間の田畑輪換により異なる群集構造が形成されたことが明らかになった。

(3) 室内モデル実験による水田土壌中の鉄の酸化還元状態の変化と微好気性鉄酸化細菌群集の動態の関係解明

Gallionellaceae 科鉄酸化細菌群集の動態をより詳細に解析するため、室内で土壌の培養実験を行った。風乾した土壌(連年水田、輪換田(畑)、輪換田(水田))を、ガラスシリンジを用いて 4 週間湛水培養し、その後、シリンジの先端を開放して落水した。その結果、活性 2 価鉄量はいずれの土壌でも湛水中に増加し、落水すると約 2 週間ではほぼ 0 まで減少した。ただし、湛水中の 2 価鉄量の増加程度は、輪換田より連年水田で高く、輪換田では、水田の方が畑よりも低かった。次に、*Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌 16S rRNA 遺伝子を対象とした定量 PCR 解析を行った。その結果、連年水田では落水後に 16S rRNA 遺伝子コピー数が顕著に増加した。一方、輪換田では水田、畑を問わず、落水前後で顕著な変化は見られなかった。

以上の結果より、連年水田では、落水時に *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌が増殖し、落水時の鉄酸化過程に関与していたことが示唆された。一方、輪換田では、そのような傾向は見られなかった。圃場を対象とした解析では、連年水田、輪換田どちらも 16S rRNA 遺伝子コピー数の増減が見られたことから、湛水中に生成した気泡などが落水後の透水性に影響を与え、結果として鉄酸化過程にも影響した可能性が考えられた。したがって、本実験での輪換田の土壌では、非生物学的な鉄酸化反応が優先して起こり、微好気性鉄酸化細菌による鉄酸化の寄与は小さかったと考えられた。今後、落水時の条件を揃えた上で、微好気性鉄酸化細菌と水田土壌の鉄酸化の関係についてさらに解析を進める必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Watanabe Takeshi, Katayanagi Nobuko, Agbisit Ruth, Llorca Lizzida, Hosen Yasukazu, Asakawa Susumu | 4. 巻 152 |
| 2. 論文標題 Influence of alternate wetting and drying water-saving irrigation practice on the dynamics of Gallionella-related iron-oxidizing bacterial community in paddy field soil | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Soil Biology and Biochemistry | 6. 最初と最後の頁 108064 ~ 108064 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.soilbio.2020.108064 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Nakagawa Koki, Murase Jun, Asakawa Susumu, Watanabe Takeshi | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 Involvement of microaerophilic iron-oxidizing bacteria in the iron-oxidizing process at the surface layer of flooded paddy field soil | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Soils and Sediments | 6. 最初と最後の頁 4034 ~ 4041 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11368-020-02717-w | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Naruse Tatsushi, Ban Yoshinori, Yoshida Tomofumi, Kato Takahiro, Namikawa Mari, Takahashi Tomoki, Nishida Mizuhiko, Asakawa Susumu, Watanabe Takeshi | 4. 巻 65 |
| 2. 論文標題 Community structure of microaerophilic iron-oxidizing bacteria in Japanese paddy field soils | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition | 6. 最初と最後の頁 460 ~ 470 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00380768.2019.1671139 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 松葉悠真・伊藤舞香・劉冬艶・海野裕晃・石川裕己・西田瑞彦・土屋一成・浪川茉莉・高本慧・戸上和樹・高橋智紀・浅川晋・渡邊健史 |
| 2. 発表標題 田畑輪換圃場の土壌中の微好気性鉄酸化細菌群集の動態 |
| 3. 学会等名 日本土壌肥科学会2020年度岡山大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 渡邊健史・伊藤舞香・浅川 晋 |
| 2. 発表標題 水稻根に生息する微好気性鉄酸化細菌の分離 |
| 3. 学会等名 日本土壤微生物学会2019年度大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 渡邊健史・片柳薫子・Ruth Agbisit・Lizzida Llorca・宝川靖和・浅川 晋 |
| 2. 発表標題 AWD 節水水田土壌中の微好気性鉄酸化細菌群集の動態 |
| 3. 学会等名 日本土壤肥料学会2019年度静岡大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Nakagawa, K., Murase, J., Asakawa, S. Watanabe, T. |
| 2. 発表標題 Involvement of microaerophilic iron-oxidizing bacteria in the iron-oxidizing process at the surface oxidized layer of flooded paddy field soil |
| 3. 学会等名 14th International Conference of the East and Southeast Asia Federation of Soil Science Societies (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 加藤健斗・尾賀俊哉・伴 佳典・Otoidobiga Cecile・Sawadogo Adama・Wonni Issa・Ouedraogo Leonard・Zongo Jean Didier・Dianou Dayeri・浅川 晋・渡邊健史 |
| 2. 発表標題 水稻根圏の鉄の酸化還元反応に関わる微生物群集に関する研究 (1) 微好気性鉄酸化細菌群集の解析 |
| 3. 学会等名 日本土壤肥料学会中部支部第99回例会・中部土壤肥料研究会第109回例会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kato, K., Naruse, T., Ban, Y., Yoshida, T., Funao, T., Kato, T., Namikawa, M., Takahashi, T., Nishida, M., Asakawa, S., Watanabe, T. and |
| 2. 発表標題 Microaerophilic iron-oxidizing bacterial community in the bulk soil rhizosphere of paddy field |
| 3. 学会等名 21th World Congress of Soil Science (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 連携研究者 | 浅川 晋 (Asakawa Susumu) (50335014) | 名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授 (13901) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 | | |
|---------|--|--|--|
| フィリピン | International Rice Research Institute | | |