

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04382

研究課題名（和文）無肥料水田で起こる炭素・窒素循環の微生物プロセスの解明とメタン放出抑制

研究課題名（英文）Microbial processes regulating carbon/nitrogen cycling and methane release in unfertilized paddies

研究代表者

杉山 修一（sugiyama, shuichi）

弘前大学・農学生命科学部・客員研究員

研究者番号：00154500

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：水田からのメタン発生の実態とそれに関与する要因を明らかにするために、メタン発生の実態と土壌微生物による影響を調べた。その結果、メタンは田植え後2週目頃から発生し、出穂期に最大となり、その後減少する。出穂期のメタン発生量は地域間に大きな差が見られ、宮城県の水田は秋田、新潟、岡山県の水田より10倍以上大きな発生量を示した。この差はメタン生成・分解に関わる微生物の作用より、むしろ水田の水管理、特に出穂期前の間断灌漑による土壌乾燥の影響が大きかった。水田の窒素固定は、嫌気呼吸に関与する鉄還元や硫酸還元に関与する細菌も貢献したが、メタン分解に関与する細菌の貢献が最も大きかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水田から放出されるメタンは、我が国の農林水産セクターの温室効果ガス排出量の37.2%を占め、水田からのメタン放出を抑制する技術の開発は大きな社会的意義を持つ。水田からのメタン発生は、酸素のない嫌気条件下で特定の微生物の働きにより起こる。本研究では、出穂期前の間断灌漑がメタン放出抑制に最も効果があること、メタンをエネルギー源として窒素固定を行う（窒素肥料をつくる）微生物を水田で活性化することで水田のメタン発生を大幅に抑制できる可能性を示した。本研究の結果は、我が国の温暖化対策に大きな意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：In order to clarify the actual state of methane emission from rice fields and the factors involved, we measured the methane flux of many paddies across Japan and investigated the influence of soil microorganisms. As a result, methane emission peaks at the heading stage, and then decreases. There were large differences between regions in the amount of methane emitted during the heading stage, with rice fields in Miyagi prefecture emitting more than 10 times as much methane as those in Akita, Niigata, and Okayama prefectures. This difference was largely due to water management in the rice fields, especially soil drying due to intermittent irrigation before heading, rather than the effects of microorganisms involved in methane production and decomposition. Although bacteria involved in iron reduction and sulfate reduction involved in anaerobic respiration also contributed to nitrogen fixation in rice fields, the contribution of bacteria involved in methane decomposition was the largest.

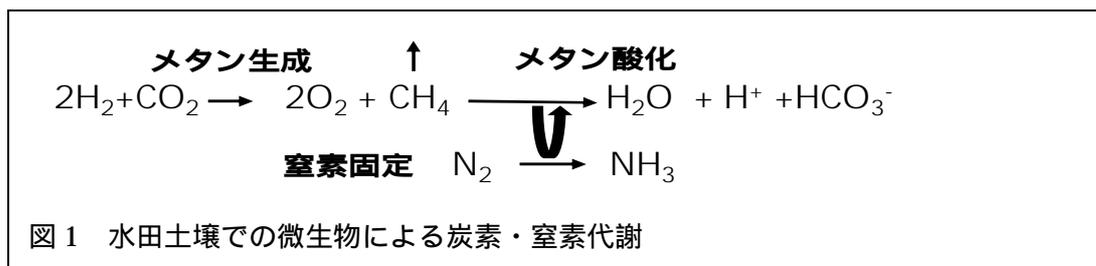
研究分野：応用生態学

キーワード：温室効果ガス排出抑制 水田 メタン生成菌 窒素固定菌 生物地球化学

## 1. 研究開始当初の背景

メタン(CH<sub>4</sub>)は二酸化炭素に次ぐ強力な温室効果ガスである。メタンは我が国の農林水産セクターから放出される温室効果ガス全体の63%を占め、その半分(37.2%)は水田由来とされている(農研機構資料)。メタンはCO<sub>2</sub>の25倍の温室効果をもつため、排出量に比べ温室効果に与える影響は高く、水田からのメタンの排出削減は、日本での温暖化防止に対する実質的な貢献となる。メタンは嫌気条件下でメタン生成菌(古細菌)によりつくられるが、生成されたメタンはメタン分解(酸化)細菌により消費されるため、生成と分解の収支から大気へのメタンの実質的な放出量が決まる。

研究者は、最近、水田での窒素固定がメタンをエネルギー源としていること、このメタンをエネルギー源とするメタン分解菌の割合が増えるほど、水田からのメタン放出が抑制されるという予備的データを得た。このことは、図1に示すように、土壌でのさまざまな細菌が関与するメタン生成と生物的窒素固定という一連の炭素-窒素代謝反応が水田土壌で有機的に連結し、水田の炭素・窒素循環を通じて水田からのメタン放出を制御している可能性を示唆する。本研究は、「無肥料水田ではメタン生成、メタン分解、窒素固定に関わる一連の微生物反応を通じてメタン放出抑制がどのように起きているか?」という問いを中核に置き、水田における土壌微生物の炭素・窒素循環に関わるメカニズムを学術的に解明することを目指した。



## 2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の三つである。

- (1) 無肥料と通常の化学肥料を利用している慣行栽培水田におけるメタンフラックスについて田植えから収穫までの間の経時的測定を行い、年間の放出量を比較する、
- (2) 土壌、気候条件の異なる複数の無肥料水田と慣行栽培水田でのメタンフラックスの比較を行い、無施肥による水田からのメタン放出量の削減効果を定量的に把握し、そして、各水田の土壌やイネの窒素濃度から窒素固定量を推定し、メタンフラックスとの関係を調べる。
- (3) 無肥料水田と慣行栽培水田における土壌とイネの根からDNAを抽出し、次世代シーケンシングによるメタン生成、メタン消費、窒素固定に関わる微生物群集の動態を解明し、メタン放出削減のプロセスを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 農家水田におけるメタンフラックスの実態

秋田市で大規模に無肥料栽培を行っている A 法人の水田においてメタン放出の季節変動の調査を行った。調査は、Licor 社製 LI7810 を用い、田植え直後の 6 月初旬から出穂後の 8 月中旬までの期間を通して 1 週間間隔で行った。この測定器はアメリカ製で、2020 年から日本で販売されるようになった新しいメタン測定器で、分析精度が高く (0.25ppb)、またプログラムにより一定間隔でのメタン濃度測定が可能のため、フラックスが現場で瞬時に得られる。測定は、内部空気のサーキュレーションを行える密閉アクリルチャンバー (25 cm x 25 cm x 1 m) を水田内に設置し、20 分間を通じて 1 秒間隔でメタン濃度を測定し、その期間のフラックスを計算した。

青森県 (弘前市, 青森市), 秋田県 (秋田市), 岩手県 (遠野市), 宮城県 (登米市, 涌谷町), 新潟県 (新潟市), 岡山県 (倉敷市) の 4 県にまたがる地域で、無肥料栽培水田と隣接する慣行栽培水田のメタンフラックスを測定した。測定時期は 7 月下旬から 8 月上旬の各地域のイネの出穂期に合わせて行う。測定方法は、季節変化の測定と同じである。

#### (2) メタン生成, メタン酸化, 窒素固定に関わる微生物群集の解析

各調査時に表層 10cm の水田土壌とイネの根をサンプリングし、土壌中のメタン生成菌とメタン分解菌についてリボソーム RNA16S の V4 領域のプライマー (515F/806R) により次世代シーケンサー (Miseq, Illumina 社, USA) による塩基配列の網羅的解析を行った。窒素固定遺伝子は、窒素固定遺伝子 (nif) 増幅用プライマー (PoIF/PoIR) を用いた。得られた大量のシーケンスデータは、既存のデータベースから菌種を同定した。窒素固定遺伝子解析は、外部の機関に依頼した。

### 4. 研究成果

#### (1) 現地水田 (秋田市 A 法人) におけるメタン放出の季節変化

秋田市の無肥料栽培を行っている A 法人の水田において、施肥と無施肥条件で栽培されている 2 水田において、田植え後 (6 月 14 日) から出穂後 (8 月 6 日) までの 1 週間隔でのメタン放出量を示した。両水田で、メタン放出は田植え後 1 月後からはじまり、出穂期にピークを迎え、その後低下するパターンを示した。このパターンはこれまで報告されている結果と同じである。

秋田市 A 法人の無施肥水田の 16 筆でイネの出穂始め期にあたる 7 月 22 日 ~ 23 日にかけてメタン放出量と土壌のメタン生成菌と分解菌の群集解析を行った。メタン放出量には、1.01 から 64.83 (単位は  $\text{mg C m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) までの大きな差異が認められ、同じ地域の近接する水田ではあっても、メタン放出量は 50 倍以上の差異が見られた。土壌微生物のメタゲノム解析では、メタン生成菌として 4 グループ (Methanobacteriales, Methanocellales, Methanomicrobiales, Methanosarcinales) が、メタン分解菌として 3 グループ (Methylococcales, Methylobacteriaceae, Methylocystaceae)

が検出された。

メタン放出量とメタン生成菌とメタン分解菌の構成割合の相関を調べたところ、メタン生成菌の Methanomicrobiales との間に  $r=0.645$  の有意な相関がみられた。一方、メタン分解菌との間に明確な相関関係は見られず、水田からのメタン放出にはメタン生成菌の方が深く関わっていると考えられる。

## (2) 日本各地の水田からのメタン放出量の空間変異

秋田県、宮城県、新潟県、岡山県の4県にまたがる施肥と無施肥水田のメタン放出量を出穂期に調査した。調査した66筆の水田間で、メタン放出量は最小の0.06から最大の486.1 (単位は  $\text{mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) までの大きな幅があり、平均で56.7、中央値で27.1であった。

メタン放出量には調査した県の間で大きな差異があり、秋田県、新潟県、岡山県では平均が  $10 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  以下の値であったのに対して、宮城県ではその10倍に近い  $92.5 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  であった。最小値と最大値を見てもともに宮城県は3県に比べて著しく高かった。

メタン生成菌と分解菌の構成割合との相関では、メタン生成菌の Methanomicrobiales とは  $r=0.323$ 、Methanocellales との間には  $r=0.288$  の正の相関が見られたが、メタン放出量の差異を説明するほど高くはなかった。また、メタン分解菌の構成割合との間に明確な差異はなかった。

調査した水田は出穂期の灌漑状態に県の間で大きな違いが見られた。秋田県、新潟県、岡山県では、多くの水田が7月始めの中落ち灌漑停止後にも継続して間断灌漑をしている水田が多く、土壌には水がないか、水が少し残る湿った状態の水田が多かった。一方、宮城県の水田ではほとんど間断灌漑が見られず、水田は水に浸っている状態だった。そこで、中落ち後の間断灌漑の有無とメタン放出量を比較したところ大きな差が見られた(表1)。間断灌漑行った水田のメタン放出量は、 $7.1 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ 、一方、行わない水田では  $88.9 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  と10倍近い差が見られた。最小値、最大値を比較しても顕著な差が見られる。これらのことから、イネの出穂期におけるメタン放出は水田の水分状態により大きく左右されることが明らかとなった。

間断灌漑	n	平均	最小	最大
無し	40	88.9	10.3	486.2
有り	26	7.1	0.1	26.4
単位は $\text{mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$				

## (3) 無肥料水田での窒素固定細菌の動態

窒素固定細菌の同定で用いた *nifH* 遺伝子は、多岐にわたる細菌の分類群に存在し、

存在する遺伝子の多くが機能を失っていることが報告されている。したがって、メタゲノム法で調べた DNA 情報が必ずしも水田で機能している窒素固定遺伝子を反映しない。

そこで、土壌乾燥により有機物の分解が進み窒素固定反応が促進するという予備的結果を得たので、イネ移植前に湿潤条件と乾燥条件においた同じ由来の土壌を用いて、処理間での nifH 遺伝子の変化から、機能している窒素固定細菌を識別した。

イネ移植前の土壌水分が 50% (湿潤区) と 3% (乾燥区) の異なる処理を行った土壌でポット栽培をしたイネの生育量は 3 倍、葉の窒素濃度は 2 倍乾燥土壌処理で湿潤土壌より増加した。同じ土壌が試験に使われているので、この差異は土壌の窒素固定反応の差により生じたものである。そこで、土壌と根のサンプルから nifH 遺伝子を用いたメタゲノム法で窒素固定遺伝子の網羅的解析を行い、上位 100 の代表配列を得た。これらの配列を系統解析したところ、多くは嫌気呼吸の最終段階で機能する鉄還元菌と硫酸還元菌、メタンをエネルギー源とするメタン分解菌であった(表 2)。

	全体	有意に増加			
		土	根		
メタン分解菌	36	11	8		
メタン分解菌	29	7	4		
鉄還元菌	13	1	2		
硫酸還元菌	17	1	5		
その他	2	1	0		

メタン分解菌は プロテオバクテリアに属するものと プロテオバクテリアに属するものがあり、メタン分解の仕組みが異なるのでそれぞれ分けて表示した。検出された nifH 遺伝子で、 $\gamma$ -メタン分解菌は 36、 $\alpha$ -メタン分解菌は 29 と全体の 7 割近くを占めた。その後硫酸還元菌の 17、鉄還元菌の 13 と続き、シアノバクテリアなどの光合成からエネルギー源を得る細菌グループはほとんど見られなかった。土壌乾燥処理で増加した配列に絞ると、細菌グループ間の差はより広まり、メタン分解菌の割合が顕著に高くなり、特に土壌で顕著な差が見られた。このことから、水田土壌で窒素固定に関わるグループは主にメタン分解菌になっていることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 杉山修一	4. 発行年 2022年
2. 出版社 農山漁村文化協会	5. 総ページ数 179
3. 書名 ここまでわかった自然栽培	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------