

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 7 月 31 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2014～2016

課題番号：26310302

研究課題名(和文) 不耕起栽培畑地土壌の物質循環系メタゲノム解析

研究課題名(英文) Metagenomic microbial community composition and its relation to biogeochemical carbon cycling in no-tilled upland soils

研究代表者

太田 寛行(Ohta, Hiroyuki)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：80168947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の成果は、慣行農法である耕起栽培にはない不耕起栽培土壌の特徴として、団粒構造の発達と土壌炭素隔離機能の向上に加えて、土壌生物性の特徴を明らかにした点である。すなわち、不耕起栽培では、ミミズと糸状菌のバイオマスの顕著な増加、糸状菌と細菌の群集組成の変化の詳細、細菌群集の多様性の増加、団粒内での細菌グループ(特に、Acidobacteria)の微視的棲み分け、が明らかにされた。これらの結果は、大気二酸化炭素の上昇を抑制する農法として、不耕起栽培の特性を微生物学的に示したものである。

研究成果の概要(英文)：The outcome of this research was to reveal the impact of no tillage vs. conventional tillage systems on soil biological properties, aggregate stability, and carbon sequestration function. Particularly, this research showed that comparing with the tillage system, no tillage management increased the soil biomass of earthworms and fungi, altered soil fungal and bacterial community structures, increased soil bacterial diversity, and induced the formation of microhabitats for specific bacterial groups such as members of the phylum Acidobacteria within soil aggregates. These findings will contribute to a better understanding of relationships between soil microbes' microhabitats and carbon cycle in agriculture ecosystem and further represent environmental merits of non-tillage farming, comparing with the conventional tillage cultivation.

研究分野：環境毒性化学

キーワード：不耕起栽培 土壌団粒 微生物群集 炭素隔離 温室効果ガス 気候変動 メタシーケンス

1. 研究開始当初の背景

温暖化が土壤有機炭素の分解に及ぼす影響の議論が始まり、まず、Knorr ら (*Nature* 433, 298-301, 2005) は、3つの炭素プール (fast, intermediate, very slow) に分けて扱い、難分解性 (very slow) の土壤炭素プールが易分解性 (fast) プールよりも温度感受性が高いことを報告した。この土壤有機物の性質の違いによる温度感受性 ('Intrinsic' temperature sensitivity) の違いに加えて、Davidson と Janssens (*Nature* 440, 165-173, 2006) は、土壤有機物分解の環境制約 (Environmental constraints) を指摘した。すなわち、土壤有機物が、吸着、団粒内保持、嫌気、水分ストレス、凍結という環境にある場合、有機物分解の温度感受性が見かけ上、低くなるという指摘である。特に、土壤団粒の役割は大きい。Beare ら (*Soil Sci. Soc. Am. J.* 58, 787-795, 1994) は、通常耕起と不耕起の土壤を比較して、不耕起土壤の団粒は微生物の摂取(分解)から物理的に隔離された有機物を多く含むことを示した。この団粒による有機物隔離が、有機物分解の温度感受性を下げている大きな因子である。こうして、耕起/不耕起という農法の違いは、土壤団粒構造の違いを引き起こし、土壤の物質循環機能にも影響を与えていると言える。

Robertson ら (*Science* 289, 1922-1925, 2000) は、1991~1999年の試験で、農地(耕起区と不耕起区を含む)と未耕地の生態系から発生する温室効果ガス(CO₂、N₂O、CH₄)を測定して、土壤管理と地球温暖化ポテンシャル(global warming potential, GWP: 年間1平方mあたりの土壤から発生する3つの温室効果ガスの量を、温室効果係数を加味してCO₂量(g)に換算した尺度)との関係を調査した。その結果、GWPは、一年生作物の通常耕起栽培畑地で最も高く(114)、20年間未耕地の場合で最も低かった(-211)。また、一年生作物を不耕起栽培にすることで、GWPは14にまで低下することを示した。

土壤の物質循環機能を担う実体は微生物であるが、耕起/不耕起という農法の違いが微生物の群集構造にどのような影響を及ぼすかということはまだ十分には研究されていない。特に、土壤の物理性と微視的な微生物分布の関わりに及ぼす農法の影響の解明は重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、不耕起栽培畑地土壤の理化学性とガス代謝活性の特徴、微生物群集と物質循環に関わる微生物群集の特徴を明らかにすることである。さらに、土壤団粒内の微生物群集を微視的にメタゲノミクスで解析し、本農法がもつ土壤有機炭素保持能との関係を探る。

3. 研究の方法

本研究は、茨城大学農学部附属フィールド

サイエンス教育研究センター内の「不耕起栽培畑地試験圃場 A、B」で行った。この試験圃場の土壤の土性は黒ボク土(土性、LiC)である。試験圃場は、耕起方法2条件(不耕起、ロータリ耕)、施肥方法2条件(無施肥、施肥)とした。試験圃場 A は2003年から不耕起栽培を行っており、本研究期間中はダイズを栽培した。試験圃場 B は2009年から不耕起・草生栽培を行っており、本研究期間中は緑ナスを栽培した。土壤は、化学性(全炭素、有機炭素、全窒素、pH等)、物理性(三相分布、保水性等)、生物性を常法にしたがって分析した。土壤ガス分析は、4深度(2.5、7.5、20、50 cm)にガス採取管を挿入して、土壤ガスを回収し、ガスクロマトグラフィーで測定した。土壤微生物バイオマスは基質誘導呼吸法で測定し、糸状菌バイオマスは土壤中のエルゴステロール(糸状菌のバイオマーカー)を抽出して液体クロマトグラフィーで測定した。土壤細菌の群集組成のプロファイルは、16S rRNA 遺伝子を対象としたPCR-T-RFLP(制限断片長多型)法で分析した。また、真核微生物に対してはITS(Internal transcribed spacer)領域のPCR-T-RFLP法を用いた。さらに、土壤細菌の群集構造を16S rRNA 遺伝子を標的としたメタシーケンス(バーコード・パイロシーケンス)法で解析した。土壤団粒は、水中篩別法によって、耐水性土壤団粒として分画した。試験圃場 A の土壤は、>2 mm、0.25-2 mm、0.1-0.25 mm、<0.1 mmの画分に分けた。一方、試験圃場 B の土壤は、>2 mm、1-2 mm、0.5-0.1 mm、0.25-0.5 mm、0.1-0.25 mm、<0.1 mmの画分に分けた。各画分はPCR-T-RFLP法とメタシーケンス法によって、細菌群集構造を解析した。群集構造の類似性解析にはNMDS(non metric multidimensional scaling)を用いた。

4. 研究成果

(1) 不耕起草生栽培の農業的意義

Robertson らの研究結果にあるように、不耕起栽培によって土壤のGWPは大きく低下する。しかし、作物収量の面では、不耕起栽培は必ずしも推奨されてこなかった。

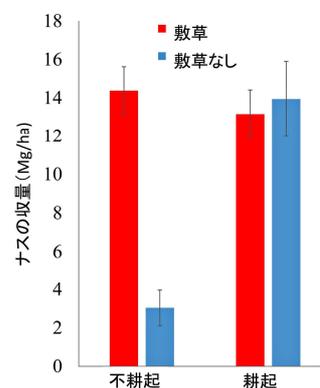


図1 不耕起/耕起栽培における緑ナスの収量と敷草の効果(2014年、試験圃場B)

本研究では(試験圃場 B)、草生(敷草)栽培を併用することで、収量が大きく改善することが示された(図 1)。その収量増加は、土壤養分の利用性、特に硝酸態窒素の供給が高まることと関係している結果が得られた(図 2)。

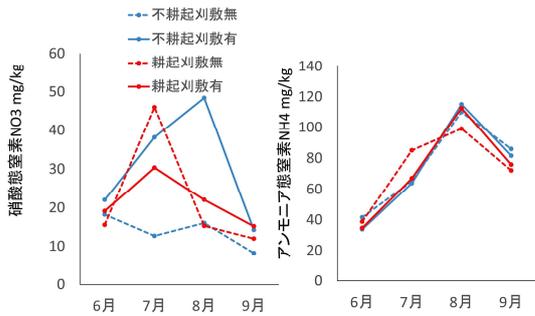


図 2 緑ナスの不耕起/耕起栽培土壌における硝酸態窒素とアンモニア態窒素の動態(試験圃場 B)

(2)不耕起栽培土壌の物理性と生物性

不耕起栽培が土壌に及ぼす大きな影響の一つは団粒構造の発達である。これは、両試験圃場で示された(試験圃場 B での結果を図 3 に示す)。試験圃場 A の不耕起区では、粒径>2 mm の団粒画分が栽培期間を通じて安定して約 30%を越えた割合で存在したが、耕起区では、10~30%の範囲で変動した。試験圃場 B の不耕起草生栽培の試験区では、粒径>2 mm の団粒画分が 40%にまで増加した。

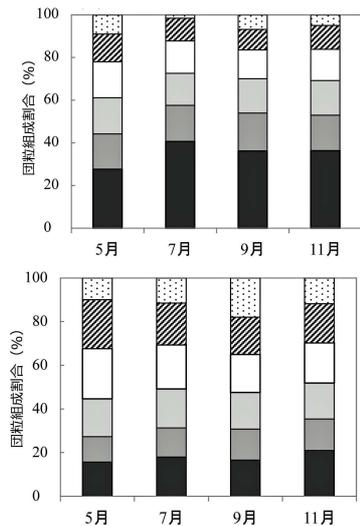


図 3 不耕起草生栽培土壌(上図、無施肥区)と耕起栽培土壌(下図、無施肥区)の耐水性団粒プロファイルの季節変動。

■画分1 (> 2.0 mm) ■画分2 (1.0-2.0 mm) □画分3 (0.5-1.0 mm)
□画分4 (0.25-0.5 mm) ■画分5 (0.1-0.25 mm) □画分6 (< 0.1 mm)

土壤団粒構造の発達は、土壤炭素量と正に相関した(図 4)。また、各団粒が占める割合と団粒の炭素含量とを掛け合わせた土壤炭素保持の寄与率を計算すると、不耕起区で、最も寄与率が高いのは、安定して粒径>2 mm

の画分であり、耕起区では、変動がみられたが、主に粒径<2 mm の画分であった。

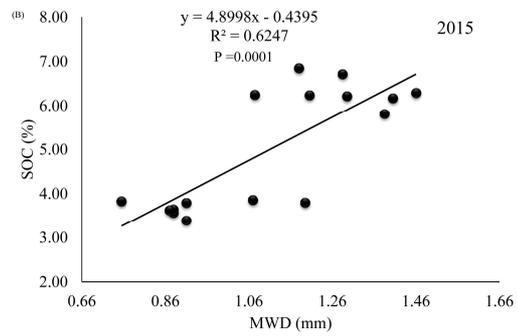


図 4 土壌の平均団粒径(MWD)と土壤炭素含量(SOC)との関係(試験圃場 B、2015年)

不耕起栽培による団粒構造の発達のメカニズムとして、耕起という機械的な団粒の破壊が指摘されてきた。また、団粒形成には、ミミズ等の土壤動物の役割や、糸状菌の機能も指摘されている。不耕起栽培によるミミズのバイオマス増加は、本研究でも確認された(図 5)。また、糸状菌バイオマス(エルゴステロール量)の増加も明確に観察された(図 6)。一方、土壤線虫の個体数密度は、

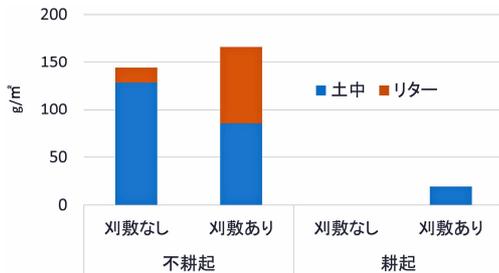


図 5 不耕起/耕起栽培土壌でのミミズのバイオマス(試験圃場 B)

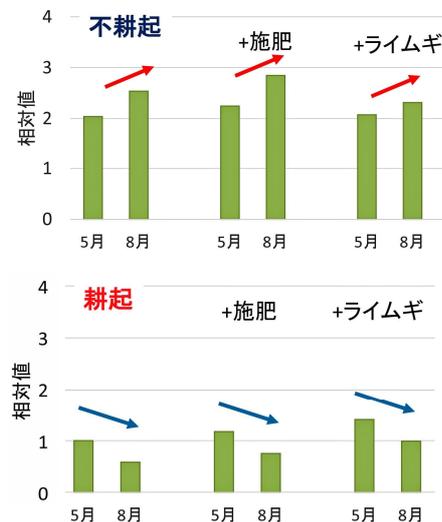


図 6 不耕起/耕起栽培土壌での糸状菌バイオマス(試験圃場 A)、耕起区の 5 月の測定値に対する相対値で示した。

敷草処理を行うことで増加し、特に、耕起区で顕著であった(4,287 22,323/100 g 土壌)。不耕起区での敷草処理での増加は、1,930 5,372/100 g 土壌であった。線虫の種類は細菌食性が主体であったことを考えると、不耕起区で線虫個体数密度が低いことは、団粒構造の発達によって線虫が入り込めない細菌のマイクロハビタットが形成されていると推察される。

(3)不耕起栽培土壌からの二酸化炭素とメタンの発生

試験圃場 B では、2016 年 6 月から 3 ヶ月間、CO₂ の地表面フラックスを測定した。不耕起区と耕起区の両方で、6 月下旬に 0.7-0.8 mg C/m²/h の CO₂ 放出が計測され、8 月~9 月上旬には、放出速度が減少し、9 月下旬に増加する傾向が観察された(図 7)。この間、耕起区では CO₂ 放出しか計測されなかったが、不耕起区では 8~9 月に CO₂ 吸収が起こった。一方、メタンは、この計測期間中、不耕起区土壌では常に吸収されていた。耕起区では 9 月上旬に一時的に放出が起こったが、その時点以外は吸収のフラックスであった。

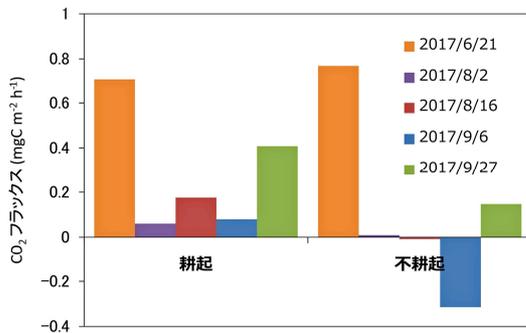


図 7 不耕起 / 耕起栽培土壌での CO₂ 地表面フラックス

(4)不耕起栽培によって微生物群集構造は変化するか？

バイオマスという量的な観点に加えて、群集組成という質的な面での違いを調べるために、各団粒画分から DNA を抽出し、真核微生物と細菌を対象とした PCR-T-RFLP 法とメタシーケンス法で、群集構造を比較解析した。その結果、栽培期間中に変動することを考慮しても、真核微生物も細菌も、不耕起栽培土壌の群集構造は、耕起栽培土壌とは明確に異なっていた(図 8, 9)。

次に、団粒の粒径の違いと群集構造の変動との関係を見ると、真核微生物の場合は、粒径 > 2 mm の団粒画分で変動が大きいことが観察された。一方、細菌群集は、試験圃場 A の場合には、粒径 0.1-0.25 mm の画分で変動が大きい傾向がみられたが、試験圃場 B では、顕著ではなかった。

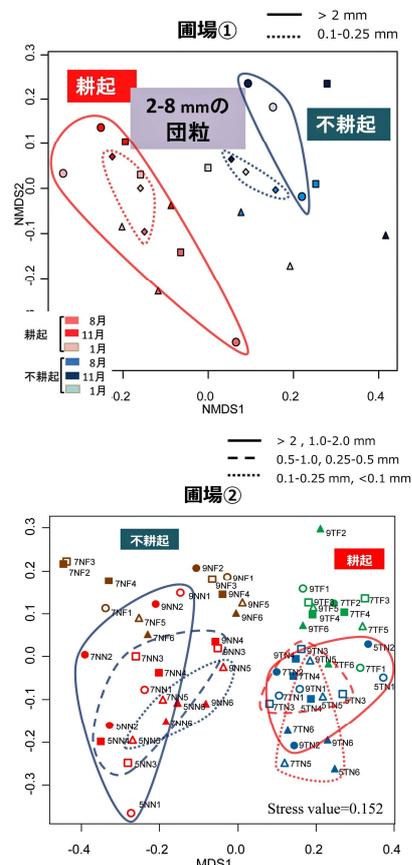


図 8 不耕起 / 耕起栽培土壌での真核微生物群集の NMDS 解析。圃場 と はそれぞ、試験圃場 A と B を示す。

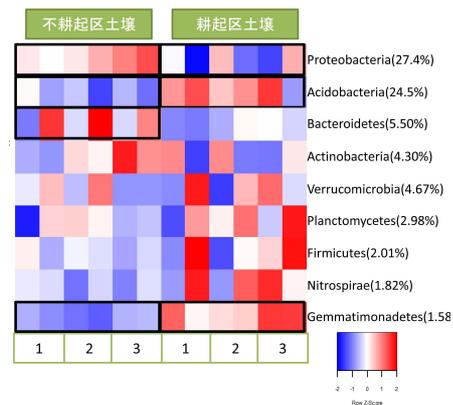


図 9 不耕起 / 耕起栽培土壌 (試験圃場 A) での特徴的な細菌グループ (門レベル) (メタシーケンスのヒートマップ解析)。団粒のサイズ: 1 > 2 mm; 2 0.25-2 mm; 3, 0.1-0.25 mm。各数字の左側は 8 月の試料、右側は 11 月の試料を示す。存在割合は青 赤で高くなること示す。

細菌群集組成の違いをメタシーケンス法で解析すると、不耕起区土壌で *Proteobacteria* と *Bacteroidetes* が多く、耕起区では *Acidobacteria* と *Gemmatimonadetes* が多く検出された(図 9)。この結果は、試験圃場 B でも同様であった。また、耕起区土壌で

の 8 月と 11 月の試料を比較すると、細菌グループの存在割合が変化する傾向にあり、不耕起区の安定した細菌グループの存在割合とは対照的であった。

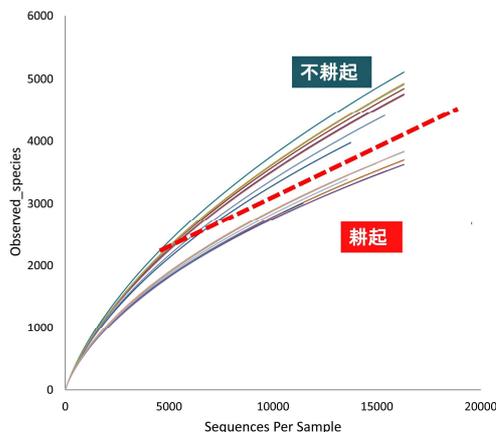


図 10 不耕起 / 耕起栽培土壌の細菌組成の多様性 (レアファクションカーブ) (試験圃場 B)

16S rRNA 遺伝子のシークエンスの相同性が 97% 以上のものを同じ分類単位 (operational taxonomic unit; OTU) として扱い、シークエンス数と OUT 数の関係をプロットすると、図 10 のようなカーブが得られる。このプロットでは、カーブの傾きが大きいかほど細菌の多様性が高いことを示す。ここで、不耕起区と耕起区の土壌を比較すると、すべての団粒画分で不耕起区の方が、カーブの傾きが大きく、細菌群集が多様であることが示された。

(5) 土壌団粒構造の発達には細菌の棲み分けをもたらすか？

試験圃場 B の土壌の解析では、粒径 >2 mm と 0.1-0.25 mm の団粒画分で細菌の棲み分けが推察された。不耕起区の粒径 >2 mm の団粒画分では、*Acidobacteria* Gp4, Gp6, Gp22 のグループが特徴的に検出され、0.1-0.25 mm の団粒画分では、*Acidobacteria* Gp7, Gp17 のグループと *Spartobacteria*、*Comamonadaceae*、*Sphingomonadaceae* が検出された (図 11)。このような棲み分けは、耕起区土壌では認められなかった。このように、不耕起区の土壌では、*Acidobacteria* のグループがマクロ団粒 (>2 mm) とミクロ団粒 (<0.25 mm) に棲み分けしていることが推察される。

Smit らは (Appl. Environ. Microbiol. 67, 2284-2291, 2001) *Proteobacteria/Acidobacteria* の存在比 (P/A 比) が土壌の栄養条件と関係することを議論している。例えば、低栄養の土壌の、P/A 比は 0.16、低投入土壌では 0.34 に上昇し、高投入土壌では 0.87 にまで上がることを指摘した。このような議論からすれば、*Acidobacteria* は低栄養条件を好む細菌 (低栄養細菌) であると考えられる。

現在、*Acidobacteria* は 26 の subdivision に

分けられている (Kielak et al., Front. Microbiol., 7, 744, 2016)。分離に成功し、分類学的に記載されているのは、Gp1 (5 株)、Gp3 (1 株)、Gp4 (2 株)、Gp8 (1 株)、Gp23 (1 株) だけである。したがって、*Acidobacteria* 全体の生理生化学的性状はまだ十分に明らかにされていない。このような *Acidobacteria* の多様性を考えると、一概に低栄養細菌と見なすことには問題があるかもしれない。この点は、今後の研究で、各画分から *Acidobacteria* を分離して、性状解析することが必要であろう。

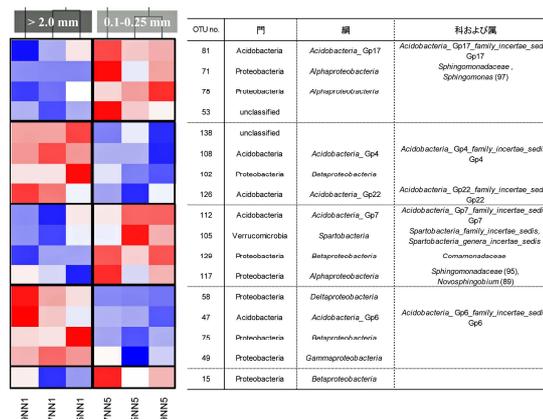


図 11 不耕起栽培土壌 (試験圃場 B) の団粒画分で特徴的に検出された細菌グループ

(結論)

慣行農法である耕起栽培と比べて、不耕起栽培土壌の特徴は、団粒構造の発達と、土壌炭素含量の増加である。このことと連動して起こる土壌生物性の変化は以下の 4 点に要約される。

1. ミミズと糸状菌のバイオマスの顕著な増加
2. 糸状菌と細菌の群集組成の変化
3. 細菌群集の多様性の増加
4. 団粒という観点での細菌グループの微視的棲み分け、特に、*Acidobacteria* のグループ

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)

[学会発表] (計 12 件)

小松崎将一、Hashimi R、岩崎明、根本亮輔、嶺田拓也、西脇淳子、西澤智康、金田哲、金子信博、太田寛行、『不耕起、敷草栽培での有機栽培ナスの生産性と土壌の変化』、第 17 回日本有機農業学会大会、2016.12.10 ~ 11、山梨大学 (山梨県・甲府市)

古和真理奈、西脇淳子、小松崎将一、太田寛行、『耕起、不耕起圃場における土壌物理性と温室効果ガス発生』、2016 年度土壌物理学会大会、2016.10.29、京都大学吉田キャンパス (京都府・京都市)

中根麻芽美、栗田麻衣、西澤智康、小松崎将一、橋本知義、太田寛行、『不耕起栽培畑地土壌における耐水性団粒の微生物群集メ

タゲノム解析』、日本微生物生態学会第 31 回横須賀大会、2016.10.23～25、横須賀市文化会館（神奈川県・横須賀市）

雫田麻衣、中根麻芽美、橋本知義、小松崎将一、西脇淳子、太田寛行、西澤智康、『自然農法圃場に形成される土壌団粒の組成割合および微生物群集構造解析』、日本土壌肥料学会 2016 年度佐賀大会、2016.9.20、佐賀大学（佐賀県・佐賀市）

Shizukuda M, Nakane M, Nishizawa T, Komatsuzaki M, Narisawa K, Hashimoto T, Ohta H, “Molecular analysis of microbial community in water stable aggregation of upland field soils managed by no-tillage practices for seven years”, XVII International Colloquium on Soil Zoology (ICSZ), 2016.8.24, Nara Kasugano International Forum I-ra-ka (奈良県・奈良市)

Nakane M, Shizukuda M, Nishizawa T, Komatsuzaki M, Hashimoto T, Ohta H, “Microbial community structure analysis of water-stable soil aggregates in no-till cropping systems”, XVII International Colloquium on Soil Zoology (ICSZ), 2016.8.24, Nara Kasugano International Forum I-ra-ka (奈良県・奈良市)

中根麻芽美、雫田麻衣、西澤智康、小松崎将一、橋本知義、太田寛行、『不耕起栽培畑地土壌における耐水性団粒内の微生物群集構造解析』、日本土壌微生物学会 2016 年度大会、2016.6.12、岐阜大学（岐阜県・岐阜市）

雫田麻衣、中根麻芽美、西澤智康、小松崎将一、成澤才彦、橋本知義、太田寛行、『不耕起、草生畑地土壌中に形成される土壌団粒の真核微生物群集構造解析』、日本微生物生態学会第 30 回大会、2015.10.18、亀城プラザ（茨城県・土浦市）

太田寛行、西澤智康、『土壌生成プロセスにおける微生物の役割』（招待講演）日本土壌微生物学会 2015 年度大会、2015.5.22、つくば国際会議場（茨城県・つくば市）

Hashimi R, Muramatsu D, Komatsuzaki M, “Comparison of soil quality and yield response between no-tillage with weed mulch and conventional tillage system in organic eggplant production”, 日本農作業学会平成 27 年度春季大会、2015.3.18～20、千葉大学（千葉県・柏市）

太田寛行、『土壌は気候変動を増大させるか？：土壌から大地の微生物学へ』、環境微生物系学会合同大会 2014、2014.10.24、アクトシティ浜松（静岡県・浜松市）

石川美友紀、奈良岡雅大、藤村玲子、高見英人、新美洋、西澤智康、太田寛行、『液状きゅう肥長期連用畑地土壌の窒素循環と微生物生態系』、環境微生物系学会合同大会 2014、2014.10.22、アクトシティ浜松（静岡県・浜松市）

6. 研究組織

(1)研究代表者

太田 寛行 (OHTA HIROYUKI)
茨城大学・農学部・教授
研究者番号：80168947

(2)研究分担者

小松崎 将一 (KOMATSUZAKI MASAKAZU)
茨城大学・農学部・教授
研究者番号：10205510

西澤 智康 (NISHIZAWA TOMOYASU)
茨城大学・農学部・准教授
研究者番号：40722111

西脇 淳子 (NISHIWAKI JUNKO)
茨城大学・農学部・助教
研究者番号：00549892

(3)連携研究者

服部 正平 (HATTORI MASAHIRA)
東京大学・新領域創成科学研究科・教授
研究者番号：70175537

金子 信博 (KANEKO NOBUHIRO)
横浜国立大学・環境情報研究科・教授
研究者番号：30183271

新美 洋 (NIIMI HIROSHI)
(独)農業・食品産業技術総合研究機構・九州
沖縄農業研究センター・主任研究員
研究者番号：70414828

(4)研究協力者

橋本 知義 (HASHIMOTO TOMOYOSHI)
(独)農業・食品産業技術総合研究機構・室
長

Rahmatullah Hashimi
茨城大学大学院農学研究科・修士課程学生

雫田 麻衣 (SHIZUKUDA MAI)
茨城大学大学院農学研究科・修士課程学生

中根 麻芽美 (NAKANE MASAMI)
茨城大学大学院農学研究科・修士課程学生