

平成 28 年 10 月 18 日現在

機関番号：82107

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660052

研究課題名(和文) 窒素施肥土壌のメタン酸化におけるアンモニア酸化細菌および古細菌の役割の解明

研究課題名(英文) The contribution of ammonia monooxygenase for methane oxidation in agricultural soil

研究代表者

秋山 博子 (Akiyama, Hiroko)

国立研究開発法人 農業環境技術研究所・その他部局等・主任研究員

研究者番号：00354001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：好気土壌は温室効果ガスであるメタン(CH<sub>4</sub>)の吸収源である。アンモニアモノオキシゲナーゼ(AMO)はCH<sub>4</sub>酸化も行うが、土壌中のCH<sub>4</sub>酸化は主にメタンモノオキシゲナーゼ(MMO)によるとされてきた。一方、窒素施肥土壌のCH<sub>4</sub>酸化は主にAMOによる可能性がある(Akiyama et al., 2014)。このため、施肥土壌のCH<sub>4</sub>酸化へのAMOの役割の解明を目的とした。堆肥および化学肥料の連用土壌において、CH<sub>4</sub>吸収量と硝化能・AMO存在量の関係を調べた結果、相関はみられなかった。また4種類の土壌においても相関はみられなかった。これにより、CH<sub>4</sub>吸収へのAMOの貢献は大きくないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Aerobic soil is a sink of atmospheric CH<sub>4</sub>. Ammonia monooxygenase (AMO) can oxidize CH<sub>4</sub>, but CH<sub>4</sub> is mostly oxidized by methane monooxygenase (MMO), and CH<sub>4</sub> oxidation by AMO is generally negligible in the soil. Akiyama et al. (2014) reported that the AMOs of AOB and AOA may have more important roles than those previously considered during CH<sub>4</sub> oxidation in agricultural soils treated with N fertilizers. Thus we investigated the importance of AMO on CH<sub>4</sub> oxidation in agricultural soils. Results showed that there were no relationship between CH<sub>4</sub> uptake rate and AOB and AOA AMO gene copy numbers nor ammonia oxidation potential in soils from long-term chemical and organic fertilizer application fields and also in 4 different kinds of soils. Therefore we concluded AMO contribution for CH<sub>4</sub> oxidation was minor in the investigated soils.

研究分野：農業環境

キーワード：温室効果ガス メタン酸化 土壌 アンモニアモノオキシゲナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

森林土壌など好氣的な土壌は温室効果ガスであるメタン(CH<sub>4</sub>)の吸収源であり、土壌による CH<sub>4</sub> 酸化は地球全体の CH<sub>4</sub> 吸収源の約 5% を占めると推定されている (Denman et al., 2007)。アンモニアモノオキシゲナーゼ (AMO) とメタンモノオキシゲナーゼ (MMO) は非常によく似た構造を持ち、MMO がアンモニア酸化能も有するとともに MMO が CH<sub>4</sub> 酸化能も有することが知られている (Conrad and Donald 2007, Reay et al., 2005)。しかし、土壌中で実際に CH<sub>4</sub> 酸化を主に担っているのはメタンモノオキシゲナーゼ (MMO) であり、AMO による CH<sub>4</sub> 酸化は無視できるレベルであると考えられてきた (Jiang and Bakken 1999; Klemmedtsson et al. 1999; Reay et al. 2005)。一方、メタン酸化は窒素施肥により阻害されることが知られている (Aronson and Helliker, 2010)。

我々はこれまでの研究において、化学肥料を施用した黒ボク土、黄色土、灰色低地土の枠圃場において、N<sub>2</sub>O 発生量とアンモニア酸化菌 (AOB) およびアンモニア酸化古細菌 (AOA) の AMO 存在量には相関がみられない一方で、CH<sub>4</sub> 吸収量と AOB および AOA の AMO をコードする遺伝子 (*amoA*) 存在量に相関がみられることが明らかにした。しかし MMO をコードする遺伝子 (*pmoA*) 存在量は検出限界以下であった。これらの結果から、窒素施肥土壌における CH<sub>4</sub> 酸化は、これまでに考えられていたメタン酸化菌ではなく、主にアンモニア酸化菌が担っている可能性があると考えられた (Akiyama et al., 2014)。しかしこれまでに同様の現象の報告例はなく、本現象が窒素施肥土壌で一般的な現象であるかどうかはさらに検証する必要がある。

## 2. 研究の目的

窒素施肥土壌の CH<sub>4</sub> 酸化におけるアンモニア酸化細菌の役割を明らかにすることを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

CH<sub>4</sub> 吸収能と *amoA* 存在量の関係の解明

*amoA* 存在量が大きく異なると予想される農耕地土壌および森林土壌から土壌コアを採取する。インキュベーション実験により

CH<sub>4</sub> 酸化能と AOB, AOA の AMO をコードする遺伝子 (*amoA*) 存在量との関係を解明する。同時に MMO をコードする遺伝子 (*pmoA*) 存在量も測定し、*amoA* 存在量と *pmoA* 存在量の比較も行う。同時に硝化能の測定も行う。

黒ボク土壌の堆肥長期連用圃場、化学肥料長期連用圃場、同圃場隣接の森林土壌を用いた土壌コアのインキュベーション実験

本圃場 (淡色黒ボク土、農研機構内圃場) は施肥歴が大きく異なるために *amoA* 存在量が大きく異なることが最近明らかになっている (Shimomura et al., 投稿準備中)。本圃場は土壌の物理性はほぼ同じで *amoA* 存在量が異なることから、物理性の影響を除外したうえで *amoA* 存在量と CH<sub>4</sub> 酸化との関係を調査するのに適していると考えられる。

このため、本圃場の土壌コアインキュベーション実験を行い、CH<sub>4</sub> 酸化能と *amoA* および *pmoA* 存在量の間関係を調べた。

灰色低地土、黄色土、淡色黒ボク土の堆肥長期連用圃場、化学肥料長期連用枠圃場および同圃場隣接の森林土壌の土壌コアのインキュベーション実験

本枠圃場 (農研機構内圃場) の *amoA* 存在量は土壌の種類により大きく異なることが明らかになっている (Morimoto et al., 2011)。さらに同一土壌内で施肥歴が異なる圃場があるため、の実験で用いる土壌よりも *amoA* 存在量の変化の幅が大きくなると予想される。の実験で用いた淡色黒ボク土のみでなく、様々な土壌タイプの土壌においてと同様の結果を得ることができれば、より幅広い農耕地土壌において、*amoA* 存在量と CH<sub>4</sub> 酸化との関係を明らかにすることができる。

このため、本圃場の土壌の土壌コアインキュベーション実験を行い、CH<sub>4</sub> 酸化能と *amoA* および *pmoA* 存在量の間関係を調べる。

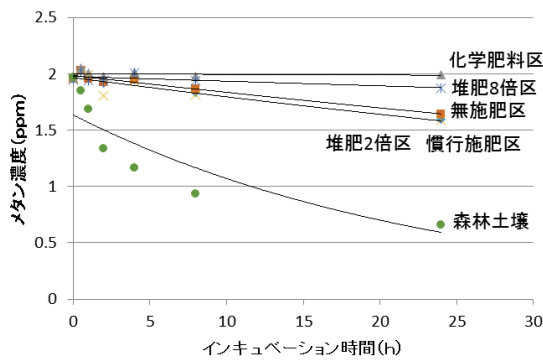
・ CH<sub>4</sub> 濃度測定：オートサンプラー付き FID 付きガスクロマトグラフ (島津 GC2014) を用いた。

・ 硝化能、AOB, AOA の *amoA* 存在量測定：Morimoto et al. (2011) の方法を用いて測定した。

・ *pmoA* 存在量測定：Kolb et al. (2003)の方法を用いて測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 淡色黒ボク土壌の堆肥長期連用圃場、化学肥料長期連用圃場、同圃場隣接の森林土壌を用いた土壌コアのインキュベーション実験を行った。その結果、CH<sub>4</sub> 吸収量は森林土壌が最も多く、ついで堆肥2倍区、慣行肥料(堆肥+化学肥料)区、無施肥区、堆肥8



倍区、化学肥料区となっていた(図1)。

図1 長期連用圃場土壌を用いたインキュベーション実験におけるメタン濃度の変化

一方、どの区においても AOA のほうが AOB よりも存在量が多かったが、慣行区においては差が小さかった。AOB の存在量は無施肥区および化学肥料区において小さかった。また MMO の存在量はいずれも検出限界以下であった。

CH<sub>4</sub> 吸収量とアンモニア酸化能・AMO および MMO 存在量の関係を調べた結果、相関はみられなかった。

(2) 灰色低地土、黄色土、淡色黒ボク土の堆肥長期連用圃場、化学肥料長期連用圃場および同圃場隣接の森林土壌の土壌コアのインキュベーション実験を行った。CH<sub>4</sub> 吸収量は森林土壌が最も多く、ついで黒ボク土、黄色土、灰色低地土の順となっていた。一方、どの区においても AOA のほうが AOB よりも存在量が多かった。AOB の存在量は黒ボク土において多く、灰色低地土および黄色土において少なかった。また MMO の存在量はい

れも検出限界以下であった。

CH<sub>4</sub> 吸収量とアンモニア酸化能・AMO および MMO 存在量の関係を調べた結果、有意な相関はみられなかった。

(まとめ)

これらの結果より、今回調査した土壌において、CH<sub>4</sub> 吸収への AMO の貢献は大きくないと考えられた。実際の圃場においては、主に施肥の影響および温度変化による AMO の存在量の変動に加え、CH<sub>4</sub> 吸収はこれよりも短い時間スケールでのフラックス変動および季節変動があるため、さらに長期的な試験が必要と考えられた。

(引用文献)

- Akiyama H, Morimoto S, Tago K, Hoshino YT, Nagaoka K, Yamasaki M, Karasawa T, Takenaka M, Hayatsu M (2014) Relationships between ammonia oxidizers and N<sub>2</sub>O and CH<sub>4</sub> fluxes in agricultural fields with different soil types, *Soil Science and Plant Nutrition*, 60(4), 520-529
- Akiyama H, Morimoto S, Hayatsu M, et al., (2013), *Biology and Fertility of Soils*, 49(2), 213-223
- Aronson and Helliker, 2010, *Ecology*, 91:3242-3251
- Conrad and Donald, 2007, *Advance in Agronomy*, 96:1-63
- Denmen et al., 2007 *Climate Change 2007*, Cambridge University Press, pp 500-587
- Itakura M, Uchida Y, Akiyama H, Hayatsu M (13番目), 他10名 (2013) *Nature Climate Change*, 3, 208-212, (Itakura M, Uchida Y, Akiyama H; equally contributed)
- Jiang and Bakken 1999, *Applied Environmental Microbiology*, 65:2679-2684
- Klemetsson et al. 1999, *Soil Biology and Biochemistry*, 31:839-847
- Morimoto S, Hayatsu M, ..., Akiyama H (8番目) (2011) *Microbes and Environments*, 26, 248-253,
- Reay et al., 2005, *Soil Biology and Biochemistry*, 37:719-730
- Shimomura Y, Akiyama H, Hayatsu M (5,6番目) (2012) *Microbes and Environments*, 27(1), 94-98,

Morimoto S, Hayatsu M, Hoshino TY, Nagaoka K, Yamazaki M, Karasawa T, Takenaka M, Akiyama H (2011) Quantitative analyses of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in fields with different soil types. *Microbes Environ* 26:248–253.

Kolb S, Knief C, Stubner S, Conrad R (2003) Quantitative Detection of Methanotrophs in Soil by Novel pmoA-Targeted Real-Time PCR Assays. *Appl Environ Microbiol* 69:2423–2429

## 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)

1. 秋山博子 (2015) 土壌と地球温暖化—微生物は敵か味方か!? 国際土壌年—命を育む土壌を支える微生物, 日本微生物生態学会、C-3-C-3

〔図書〕(計 1 件)

1. 秋山博子 (2015) 温室効果ガスと土 - 温暖化に関する概説 -, 土のひみつ —食料・環境・生命—, 朝倉書店, 110-113

〔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

秋山博子 (AKIYAMA, Hiroko)

国立研究開発法人 農業環境技術研究所  
物質循環研究領域 主任研究員

研究者番号 : 00354001

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

早津雅仁 (HAYATSU, Masahito)

国立研究開発法人 農業環境技術研究所  
生物生態機能研究領域 上席研究員

研究者番号 : 70283348