

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292184

研究課題名(和文) 安定同位体自然存在比と微生物解析を用いた農耕地からのN₂O発生メカニズムの解明研究課題名(英文) Investigation on N₂O production processes from agricultural soil by analysis of isotopomer and microbes

研究代表者

秋山 博子 (Akiyama, Hiroko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター・ユニット長

研究者番号：00354001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：N₂Oは強力な温室効果ガスであるとともにオゾン層破壊物質でもある。農業はN₂Oの最大の人為的排出源であり、その主要な発生源である農耕地におけるN₂Oの発生メカニズムの解明および発生削減技術の開発は急務である。

N₂Oの発生経路は主に微生物による硝化および脱窒と考えられている。本課題は、応募者らがこれまでに開発した手法を進展させ、圃場でのN₂Oフラックス連続測定、レーザー分光N₂O同位体計によるN₂O安定同位体自然存在比の連続測定および土壌微生物解析を組み合わせたN₂O発生メカニズムの全体像の解明を行うことにより、将来的な発生抑制技術の開発につなげることを目的として実験を行った。

研究成果の概要(英文)：N₂O is a powerful greenhouse gas and an ozone depleting substance. Agriculture is the largest source of N₂O anthropogenic emission. It is important to elucidate the N₂O production processes in agricultural soil, and to develop mitigation options. N₂O is thought to be mainly produced via microbial nitrification and denitrification, although the actual production process is not clear in site fields. The aim of study is to investigate N₂O production processes in situ field. We developed continuous N₂O flux monitoring system, continuous measurement technique of N₂O isotopomer ratio by laser spectroscopy, and soil microbial analysis method to investigate N₂O production processes.

研究分野：環境農学

キーワード：温室効果ガス 一酸化二窒素 硝化 脱窒

1. 研究開始当初の背景

一酸化二窒素 (N_2O) は強力な温室効果ガスであるとともにオゾン層破壊物質でもある。農業は N_2O の最大の人為的排出源であり、その主要な発生源である農耕地における N_2O の発生メカニズムの解明および発生削減技術の開発は急務である。

N_2O の発生経路は主に微生物による硝化および脱窒と考えられているが、実際の圃場における発生経路の割合は不明である。このことは新たな発生削減技術の開発を阻む大きな要因である。

我々は、温室効果ガス自動採取装置を開発し (Akiyama et al., 2000, 2009) 農耕地における N_2O フラックスのモニタリングを行った結果、実際の農耕地土壌の N_2O の発生は施肥や降雨に伴う時間的変化が大きく、肥料や土壌の種類、気象条件等により異なることを明らかにした (Akiyama and Tsuruta, 2002, 2003a, 2003b, Akiyama et al., 2000, 2013; Hayakawa et al., 2009) これらの結果から複数の微生物の発生経路の関与が示唆され、モニタリングと同時に発生経路の解析が必要であると考えた。発生経路は N_2O の安定同位体自然存在比 (^{15}N bulk, ^{18}O , Site Preference (SP)) の質量分析計を用いた測定により推定できる (Toyoda et al., 2011) 。しかし本方法は分析に時間を要するため、連続測定はできない。

そこで我々はこれまでに、レーザー分光 N_2O 同位体計を用いた N_2O 安定同位体自然存在比の連続測定技術を開発した (Yamamoto et al. 2016) 。さらに微生物解析も組み合わせ、 N_2O 生成微生物の DNA・RNA 存在量測定手法およびメタゲノム解析手法を検討した (Uchida et al., 2013; Shimomura et al., 2012; Hoshino et al. 2011, Morimoto et al., 2011) 。これらの研究により、施肥後の N_2O 発生経路を明らかにする (Akiyama et al., 2013, Uchida et al., 2012) 等の成果を挙げてきたが、発生メカニズムの全体像の解明には至っていなかった。

2. 研究の目的

本課題では、我々がこれまでに開発した手法を進展させ、異分野の研究を融合し、圃場での N_2O フラックス連続測定、レーザー分光 N_2O 同位体計による N_2O 安定同位体自然存在比の連続測定および土壌微生物解析を組み合わせた N_2O 発生メカニズムの全体像の解明を行うことにより、将来的な発生抑制技術の開発につなげることを目的として研

究を行った。

3. 研究の方法

(1) レーザー分光 N_2O 同位体計を用いた N_2O 安定同位体比の連続測定システムの開発

レーザー分光 N_2O 同位体計を用いた N_2O 安定同位体比の連続測定システムを開発した。

(2) 異なる土壌における有機肥料と化学肥料からの N_2O 発生量の比較

日本の代表的な農耕地土壌である黒ボク土と灰色低地土のライシメーター圃場においてニンジン栽培し、 N_2O フラックスの自動連続モニタリングを行った。また N_2O 安定同位体比および土壌中無機態窒素の測定を行った。

処理区 (各区 3 連) は下記の通りである。

2014 年度 :

化学肥料 (尿素) 区

有機肥料 (鶏糞ペレット) 区

2015 年度 :

化学肥料 (尿素) 区

有機肥料 (豚糞ペレット) 区

2016 年度 :

化学肥料 (尿素) 区

有機肥料 (豚糞ペレット) 区

2017 年度

化学肥料 (尿素) 区

混合堆肥複合肥料 (エコレット) 区

(3) N_2O 発生に関与する糸状菌の解析

上記圃場において、施肥前、施肥後および残渣後の土壌および残渣より糸状菌を分離した。これまでに圃場から分離した糸状菌のうち、非常に高い N_2O 発生ポテンシャルを示す約 3 割の菌について培養実験を行い、糸状菌脱窒の安定同位体比の測定を行った。

(4) N_2O 安定同位体比の解析

(1) で開発したシステムを利用して N_2O 安定同位体比の解析を行った。

4. 研究成果

(1) N_2O 安定同位体比の連続測定システムの開発

レーザー分光 N_2O 同位体計を用いた N_2O 安定同位体比の連続測定システムを開発し

た。本システムの概要は下記の通りである。

レーザー分光計1台にチャンパー12台を接続し、各チャンパーラインを電磁弁により切り替える。

チャンパーの大きさは 45cm×45cm×高さ45cm の自動開閉式である。

チャンパー閉鎖時間は1時間である。これは、 N_2O ガスフラックス測定時にはチャンパー閉鎖は短時間が望ましいためフラックス連続測定システムでは閉鎖時間 30 分としているが、同位体比測定のためにはチャンパー内濃度をより高濃度とする必要があるためである。

レーザー分光同位体計の測定時間はチャンパー閉鎖 1 時間後より約 30 分であり、チャンパー蓋を開く直前 1 分間のデータの平均値を同位体比の解析に用いる。1 サイクル(チャンパー12 台)に 12 時間であり、一日各チャンパー2 回の測定である。

(2) 異なる土壌における有機肥料と化学肥料からの N_2O 発生量の比較

黒ぼく土および灰色低地土ともに、鶏糞ペレット区からの N_2O 発生量は化学肥料区よりも多かった。また N_2O の発生量は基肥後が最も多かったが、収穫後の残渣からも N_2O の発生がみられた(図1)。

黒ぼく土において豚糞ペレット区からの N_2O 発生量は尿素区よりも多かった。しかし、灰色低地土においては有機肥料区と尿素区の N_2O 発生量に差は見られなかった(図2)。

黒ボク土において、混合堆肥複合肥料区からの N_2O 発生量は尿素区と同程度であった。

上記の結果より、堆肥ペレットからの N_2O 発生量は一般に化学肥料よりも多いことが明らかになった。一方、混合堆肥複合肥料からの N_2O 発生は化学肥料と同程度であり、堆肥単独でペレット肥料化するよりも N_2O 発生量を削減できる可能性が示された。

(3) N_2O 発生に関する糸状菌の解析

収穫後の残渣から N_2O 発生に関する脱室カビを分離し N_2O 発生ポテンシャルを測定した結果、脱室カビが収穫後の N_2O の発生に関与していると考えられた。また土壌および作物残渣より糸状菌を分離し、 N_2O 発生ポテンシャルを測定した結果、分離した糸状菌のうち約 3 割の菌が、非常に高い N_2O 発生ポテンシャルを示した。

(4) N_2O 安定同位体比の解析

N_2O 安定同位体比解析により、すべての年

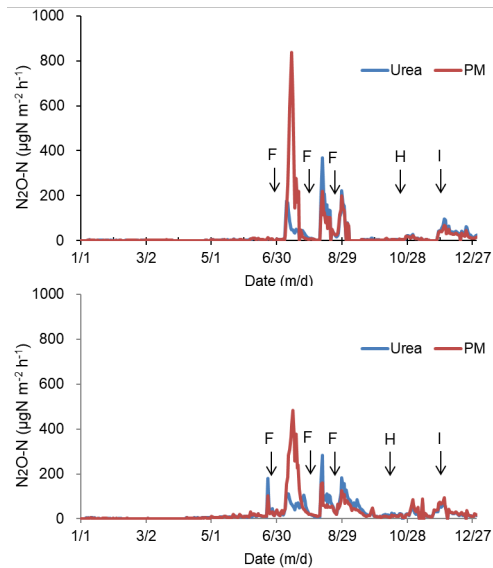


図1 黒ぼく土(上)および灰色低地土(下)における、尿素(Urea)区および鶏糞堆肥ペレット(PM)区からの N_2O フラックスの変化
F: 施肥、H: 収穫、I: 収穫残渣のすきこみ

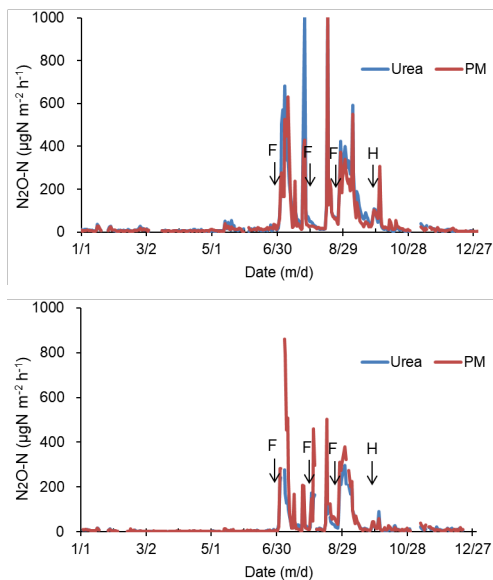


図2 黒ぼく土(上)および灰色低地土(下)における、尿素(Urea)区および豚糞堆肥ペレット(PM)区からの N_2O フラックスの変化
F: 施肥、H: 収穫

において、黒ぼく土、灰色低地土ともに、いずれの処理区においても施肥後の N_2O 発生は細菌脱室が重要な発生経路と考えられた。

(5) まとめ

有機肥料は重要な N_2O 発生源であることが明らかになった。微生物解析および同位体解析の結果から、本試験圃場においては、施肥後は細菌脱室が、また収穫後の残渣におい

ては細菌脱窒および糸状菌脱窒が重要な N₂O 発生経路であったと考えられた。

<引用文献>

- Akiyama H, H Tsuruta, T Watanabe, 2000, N₂O and NO emissions from soils after the application of different chemical fertilizers, *Chemosphere - Global Change Science*, 2, 313-320
- Akiyama H, H Tsuruta, 2002, Effect of chemical fertilizer form on N₂O, NO and NO₂ fluxes from Andisol field, *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 63, 219-230
- Akiyama H, H Tsuruta, 2003a, Effect of organic matter application on N₂O, NO, and NO₂ fluxes from an Andisol field, *Global Biogeochemical Cycles*, 17, 11-1
- Akiyama H, Tsuruta H, 2003b, Nitrous oxide, nitric oxide, and nitrogen dioxide fluxes from soils after manure and urea application, *Journal of Environmental Quality*, 32, 423-431
- Akiyama H, Hayakawa A, Sudo S, Yonemura S, Tanonaka T, Yagi K (2009) Automated sampling system for long-term monitoring of nitrous oxide and methane fluxes from soils, *Soil Science and Plant Nutrition*, 55, 435-440,
- Akiyama H, Morimoto S, Hayatsu M, Hayakawa A, Sudo S, Yagi K (2013) Nitrification, ammonia-oxidizing communities, and N₂O and CH₄ fluxes in an imperfectly drained agricultural field fertilized with coated urea with and without dicyandiamide, *Biology and Fertility of Soils*, 49, 213-223,
- Hayakawa A, Akiyama H, Sudo S, Yagi K (2009) N₂O and NO emissions from an Andisol field as influenced by pelleted poultry manure, *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 521-529,
- Hoshino YT, Morimoto S, Hayatsu M, Nagaoka K, Suzuki C, Karasawa T, Takenaka M, Akiyama H (2011) Effect of soil type and fertilizer management on archaeal community in upland field soils, *Microbes and Environments*, 26, 307-316,
- Morimoto S, Hayatsu M, Hoshino YT, 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 and Environments*, 26, 248-253,

- Shimomura Y, Morimoto S, Hoshino YT, Uchida Y, Akiyama H, Hayatsu M (2012) Comparison among amoA primers suited for quantification and diversity analyses of ammonia-oxidizing bacteria in soil, *Microbes and Environments*, 27, 94-98,
- Toyoda S, Yano M, Nishimura S, Akiyama H, et al. (2011) Characterization and production and consumption processes of N₂O emitted from temperate agricultural soils determined via isotopomer ratio analysis, *Global Biogeochemical Cycles*, 25 (GB2008), doi:10.1029/2009GB003769
- Uchida Y, von Rein I, Akiyama H, Yagi K (2012) Contribution of nitrification and denitrification to nitrous oxide emissions in Andisol and from Fluvisol after coated urea application, *Soil Science and Plant Nutrition*, 59, 46-55,

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- Yamamoto A, H Akiyama, Y Nakajima, Y T Hoshino, 2017, Estimate of bacterial and fungal N₂O production processes after crop residue input and fertilizer application to an agricultural field by 15N isotopomer analysis, *Soil Biology and Biochemistry*, 108, 9-16 査読有
- Cai Y, H Akiyama, 2017, Effects of inhibitors and biochar on nitrous oxide emissions, nitrate leaching, and plant nitrogen uptake from urine patches of grazing animals on grasslands: a meta-analysis, *Soil Science and Plant Nutrition* 63, 405-414, DOI: 10.1080/00380768.2017.1367627 査読有
- Wang Y, Y Uchida, Y Shimomura, H Akiyama, M Hayatsu, 2017, Responses of denitrifying bacterial communities to short-term waterlogging of soils, *Scientific Reports* 803, DOI: 10.1038/s41598-017-00953-8 査読有
- Hayatsu M, K Tago, I Uchiyama, A Toyoda, Y Wang, Y Shimomura, T Okubo, F Kurisu, Y Hirono, K Nonaka, H Akiyama, T Ito, H Kakami, 2017, An acid tolerant ammonia-oxidizing γ -proteobacterium from soil, *ISME Journal*, DOI: 10.1038/ismej.2016.191 査読有
- Akiyama H, Y T Hoshino, M Itakura, Y Shimomura, Y Wang, A Yamamoto, K Tago, Y

Nakajima, K Minamisawa, M Hayatsu, 2016, Mitigation of soil N₂O emission by inoculation with a mixed culture of indigenous *Bradyrhizobium diazoefficiens*, Scientific Reports, DOI: 10.1038/sreo32869 査読有

Cai Y, H Akiyama, 2016, Nitrogen loss factors of nitrogen trace gas emissions and leaching from excreta patches in grassland ecosystems: A summary of available data, Science of the Total Environment, 572 査読有

Akiyama H, Y Uchida, K Tago, Y T Hoshino, Y Shimomura, Y Wang, M Hayatsu, 2015, Effect of dicyandiamide and polymer coated urea applications on N₂O, NO and CH₄ fluxes from Andosol and Fluvisol fields, Soil Science and Plant Nutrition, 61, 541-551, DOI:10.1080/00380768.2015.1028103 査読有

【学会発表】(計 22件)

秋山博子、土着根粒菌の接種による一酸化二窒素の発生削減、第34回土・水研究会、2017年2月27日、つくば農林ホール

星野裕子、秋山博子、中島泰弘、山本昭範、作物残渣からのN₂O発生への糸状菌の寄与の検討 - 脱窒糸状菌の動態と抗菌剤処理の影響、環境微生物学会、2017年

加藤孝太郎、奈良吉主、浜口一宏、横田克長、秋山博子、江口定夫、陽捷行、堆肥あるいは化成肥料で肥培管理されたキャベツおよび大根連作圃場からの温室効果ガス排出、日本有機農業学会、2016年12月10日、山梨大学

星野裕子、秋山博子、板倉学、下村有美、王勇、山本昭範、多胡香奈子、中島泰弘、南澤究、早津雅仁、ダイズ圃場からの収穫期前後におけるN₂O発生源の特定と土着ダイズ根粒菌混合菌株利用によるN₂O発生削減、日本微生物生態学会、2016年10月23日~25日、横須賀市文化会館

秋山博子、星野裕子、板倉学、下村有美、王勇、山本昭範、多胡香奈子、中島泰弘、南澤究、早津雅仁、土着ダイズ根粒菌混合菌株の接種によるダイズ圃場からのN₂O発生削減、日本土壌肥料学会、2016年9月20日、佐賀大学

Hiroko Akiyama, Emissions and mitigation techniques of N₂O from agricultural soils, BNI International Symposium BNI (Biological Nitrification Inhibition- Potential impacts on nitrogen-cycling in global agricultural systems, 2016年9月14日、つくば国際会議場

星野裕子、上西博英、秋山博子、中島泰弘、山本昭範、ジャガイモ栽培圃場における土壌及び放置残渣の糸状菌相メタゲノム解析、日本土壌微生物学会、2016年6月11日~12日、岐阜大学

山本昭範、秋山博子、中島泰弘、星野(高田)裕子、N₂O発生と発生機構の短期的時間変化：発生源としての作物残渣の重要性、日本生態学会、2016年03月20日~24日、仙台市国際センター

加藤孝太郎、奈良吉主、横田克長、秋山博子、江口定夫、陽捷行、堆肥および化成肥料を施用したキャベツ連作圃場からの温室効果ガス排出および硝酸イオン溶脱 - 堆肥の連用は化成肥料の連用より地球環境の保全効果が高い - 、日本有機農業学会、2015年12月12日、龍谷大学

金原一真、板倉学、鶴丸博人、星野(高田)裕子、王勇、秋山博子、早津雅仁、南澤究、Metagenome-mapping method discriminates native and inoculant populations of soybean bradyrhizobia in agricultural soil、日本微生物生態学会 2015年10月17日~20日、土浦亀城プラザ

星野(高田)裕子、板倉学、秋山博子、中島泰弘、山本昭範、下村有美、王勇、早津雅仁、南澤究、圃場における土着ダイズ根粒菌のnirK遺伝子発現とN₂O発生、日本微生物生態学会 2015年10月17日~20日、土浦亀城プラザ

秋山博子、山本昭範、内田義崇、星野(高田)裕子、多胡香奈子、下村有美、王勇、早津雅仁、N₂O発生源としての作物残渣の重要性、日本土壌肥料学会、2015年9月9日~11日、京都大学

山本昭範、秋山博子、中島泰弘、星野(高田)裕子、作物残渣由来N₂Oの発生経路の時間変化、日本土壌肥料学会、2015年9月9日~11日、京都大学

秋山博子、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、日本土壌微生物学会(招待講演) 2015年5月23日、つくば国際会議場

星野(高田)裕子、秋山博子、中島泰弘、山本昭範、N₂O発生スポットであるジャガイモ地上部残渣の糸状菌群集構造、日本土壌微生物学会 2015年05月22日~23日、つくば国際会議場

山本昭範、内田義崇、秋山博子、中島泰弘、N₂O生成プロセスの時間変化パターンの解明に向けた試み レーザー分光計による

N₂O 安定同位体比の連続測定 第 62 回生態学会大会、2015 年 3 月 18 日～22 日、鹿児島大学

星野（高田）裕子、秋山博子、中島泰弘、山本昭範、N₂O 発生スポットであるジャガイモ地上部残渣からの糸状菌の分離、環境微生物学会合同大会、2014 年 10 月 24 日～26 日、アクトシティ浜松コンgresセンター

秋山博子、内田義崇、多胡香奈子、星野（高田）裕子、王勇、早津雅仁、黒ぼく土および灰色低地土圃場におけるジシアンジアミド入り肥料および被覆肥料の施用後の N₂O、NO および CH₄ フラックス変化、日本土壤肥料学会、2014 年 9 月 9 日、東京農工大学

星野（高田）裕子、板倉学、秋山博子、中島泰弘、山本昭範、下村有美、王勇、早津雅仁、南澤究、接種した N₂O 還元保有根粒菌の圃場における機能発現、日本土壤肥料学会、2014 年 9 月 9 日～11 日、東京農工大学

奈良吉主、加藤孝太郎、横田克長、河原崎秀志、田淵浩康、秋山博子、陽捷行、有機農法による畑土壌から発生する温室効果ガスの制御に関する研究（1）- 施用資材の異なるキャベツ連作圃場からの亜酸化窒素フラックスの比較、日本土壤肥料学会、2014 年 9 月 9 日～11 日、東京農工大学

加藤孝太郎、奈良吉主、横田克長、河原崎秀志、田淵浩康、秋山博子、陽捷行、有機農法による畑土壌から発生する温室効果ガスの制御に関する研究（2）- 施用資材の異なるキャベツ連作圃場からのメタンフラックスの比較、日本土壤肥料学会、2014 年 9 月 9 日～11 日、東京農工大学

山本昭範、内田義崇、秋山博子、中島泰弘、レーザー分光計を用いた圃場における N₂O 安定同位体比の連続測定、日本土壤肥料学会、2014 年 9 月 9 日～11 日、東京農工大学

〔図書〕(計 2 件)

秋山博子、朝倉書店、土のひみつ 食料・環境・生命 2015、pp110 - 113

秋山博子、(社)農山漁村文化協会、農業技術体系「窒素施肥土壌からの N₂O 発生とその削減」、2014、4 ページ

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

秋山博子 (AKIYAMA, Hiroko)
農研機構・農業環境変動研究センター・
気候変動対応研究領域・温室効果ガス削減ユニット・ユニット長
研究者番号：00354001

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

中島 泰弘 (NAKAJIMA, Yasuhiro)
農研機構・農業環境変動研究センター・
物質循環研究領域・水質影響評価ユニット・上級研究員
研究者番号：10354086

早津雅仁 (HAYATSU, Masahito)
農研機構・農業環境変動研究センター・
物質循環研究領域・物質変換解析ユニット・主席研究員
研究者番号：70283348

多胡香奈子 (TAGO, Kanako)
農研機構・農業環境変動研究センター・
物質循環研究領域・物質変換解析ユニット・主任研究員
研究者番号：20432198

星野（高田）裕子 (HOSHINO (TAKADA), Yuko)
農研機構・農業環境変動研究センター
(現)農研機構本部・上級研究員
研究者番号：40354104

(4)研究協力者

なし