

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21310003

研究課題名（和文） 畑地土壌管理が窒素循環と亜酸化窒素の動態に及ぼす影響の解析

研究課題名（英文） Analysis of nitrogen cycle and nitrous oxide production in upland soils under different managements

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

研究成果の概要（和文）：

本研究の主要な成果は、不耕起栽培畑地における土壌の亜酸化窒素（ $N_2O$ ）生成ポテンシャルの季節変動と土壌の  $N_2O$  生成における糸状菌の寄与率を推定した点である。季節変動では、夏作物（ダイズ）の収穫直前にポテンシャルが最大になること、冬期のカバークロープ栽培により、春期に  $N_2O$  生成ポテンシャルが高まることを明らかにした。また、高水分含量の条件下では、糸状菌の  $N_2O$  生成活性は細菌の活性とほぼ同等であった。

研究成果の概要（英文）：

One of the major results of this study is to present the data on the seasonal variation of nitrous oxide ( $N_2O$ )-producing potential in no-tilled upland soils and the contribution of fungi to soil  $N_2O$  production. Our results showed that the soil  $N_2O$ -producing potential was the highest just before the harvest of summer crop (soy bean), winter-cover cropping enhanced the potential after the cut down of cover crop in spring, and the fungal  $N_2O$ -producing activity was comparable to the bacterial activity when the soils were kept at high water content.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：温室効果ガス、亜酸化窒素、脱窒菌、不耕起栽培、カバークロープ

## 1. 研究開始当初の背景

大気中の亜酸化窒素（ $N_2O$ ）濃度の増加が判明したのは1980年代に入ってからであり、それ以降  $N_2O$  をめぐる地球化学的研究が盛んに行われるようになった(Weiss 1981)。1992年の報告では、地球レベルでの  $N_2O$  発生量は5.2～16.1 Tg N/年であり、その中で人為起源の発生量は1.03～5.8 Tg N/年、農耕

地土壌からの発生量は0.03～3.0 Tg N/年であった(Watson et al. 1992)。また、年間増加量は3～4.5 Tg N/年と推定されている。施肥窒素に由来する  $N_2O$  発生量は0.01～2.0%の範囲と見積もられているが(Conrad et al. 1983; Slemr et al. 1984)、世界の窒素肥料生産量が1974年から1988年にかけて倍増した勢いを考えると(FAO 1990)、施肥由来の土壌からの

N<sub>2</sub>O 発生量は増大していると推察される。

一方で、農地土壌での炭素隔離と N<sub>2</sub>O 発生のトレードオフが問題となっている。現在、多くの研究者は、不耕起栽培が土壌の炭素隔離に有効であると理解している(例えば、Al-Kaisi and Yin 2005)。しかし、不耕起栽培土壌では N<sub>2</sub>O 発生が高まるという報告も多数ある(例えば、MacKenzie et al. 1997)。この問題を含めて、我々は、持続的な農法や土壌管理法のあり方について考察した論文を公表した(Komatsuzaki and Ohta 2007)。

土壌からの N<sub>2</sub>O の発生は土壌微生物の働きであり、アンモニア酸化細菌の副産物または脱窒細菌の中間代謝産物として発生すると考えられてきた。しかし、生化学の分野では、脱窒菌以外の細菌や糸状菌が N<sub>2</sub>O を生成することが早くから知られていた。祥雲らは、土壌糸状菌が、硝酸イオンや亜硝酸イオンから N<sub>2</sub>O に還元する活性(脱窒活性)を持つことを明らかにした(Shoun and Tanimoto 1991)。実際の土壌における糸状菌による N<sub>2</sub>O 発生は、草地から採取した土壌試料を細菌阻害剤と糸状菌阻害剤で処理して培養し、発生する N<sub>2</sub>O 量の比較から示された(Laughlin and Stevens 2002)。我々は、冬季にカバークロップ処理を行った不耕起の陸稲栽培土壌では、土壌糸状菌密度が上昇し、それと同時に土壌からの N<sub>2</sub>O 発生活性が高まることを報告した(Zhaorigetu et al. 2008)。この結果は、農法が糸状菌密度と土壌からの N<sub>2</sub>O 生成に大きく影響を与えることを示唆するものである。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、我々のこれまでの取組をさらに発展させるものであり、以下の項目に焦点をあてた：

- (1) 畑地の土壌管理条件(耕起と不耕起、カバークロップ冬季栽培の有無など)が土壌窒素の収支バランスと N<sub>2</sub>O 発生へ及ぼす影響の総合的な分析
- (2) 上記の土壌管理条件での N<sub>2</sub>O 生成微生物(脱窒細菌、硝化細菌、脱窒糸状菌)の動態解析
- (3) 脱窒糸状菌の分離と分類、そして様々な分類系統の糸状菌における N<sub>2</sub>O 発生活性の解析
- (4) 熱帯地域のモデルとして、インドネシアの畑地土壌を選び、土壌窒素の収支バランス分析

以上の研究項目を通して、N<sub>2</sub>O 発生と N<sub>2</sub>O 生成微生物を指標とした窒素循環の様態解明と既存の土壌管理法の評価を行い、新たな土壌管理法の開発に向けた基礎情報の提供を目指した。

## 3. 研究の方法

- (1) 調査地と試験地：国内では、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ダイズ栽培畑地(茨城試験地)と九州沖縄農業研究センター都城研究拠点の圃場内トウモロコシ栽培畑地(都城試験地)を試験地とした。また、海外の調査地ではインドネシア国ナンジュック地域での農業地域を対象とした。

- (2) 理化学分析と微生物バイオマス分析：土壌の全炭素と全窒素の含量を CN コーダーを用いて測定した。細菌数は直接検鏡法、糸状菌バイオマスはエルゴステロール含量を測定して間接的に評価した。土壌からのエルゴステロールの抽出と HPLC による定量は Montgomery ら(2000)の方法に従った。水試料の硝酸塩濃度はイオンクロマトグラフィで測定した。

- (3) 土壌及び分離株の N<sub>2</sub>O 発生活性：土壌からの N<sub>2</sub>O フラックスの測定では、密閉チェンバー法によって経時的にガスを採取し、ECD-ガスクロマトグラフで N<sub>2</sub>O を測定した。また、採取土壌の N<sub>2</sub>O 生成ポテンシャルを測定するために、基質呼吸阻害法を応用した方法を開発した。具体的には、土壌試料(100 g 生重)を 500 mL 容のガラス製容器内に入れて密栓し、容器と N<sub>2</sub>O 分析計をチューブで接続して土壌から発生する N<sub>2</sub>O ガスを連続測定した。土壌水分条件は最大容水量の 100% に調整した。呼吸基質としてグルコース(10 mg/g soil)、抗細菌剤としてクロラムフェニコール(2 mg/g soil)、抗真菌剤としてシクロヘキシミド(10 mg/g soil)をそれぞれ土壌に添加した後、30°C で 10 時間連続的に CO<sub>2</sub> 生成(呼吸)量と N<sub>2</sub>O 生成量を測定した。

- (4) 土壌微生物の分析：定量 PCR(qPCR)/T-RFLP 法によって、細菌と糸状菌の多様性を評価した。方法は Nishizawa et al. (2008)が記載する方法に従った。対象遺伝子は、細菌 16S rRNA 遺伝子、糸状菌 18S-28S ITS 領域 DNA とした。

## 4. 研究成果

- (1) 畑地の土壌管理条件が土壌窒素の収支バランスと N<sub>2</sub>O 発生へ及ぼす影響の総合的な分析

茨城試験地の不耕起栽培試験区では、夏作物(ダイズ)収穫期に、土壌からの N<sub>2</sub>O 発生が高まること、裸地区土壌に比べてライムギ・カバークロップ区土壌で活性が高い傾向にある結果が得られた(図1)。また、不耕起・草生栽培を対象として農耕地土壌から排出される温室効果ガスの排出と吸収に関する圃場試験を実施した結果、N<sub>2</sub>O の排出量は耕うん直後では耕起>不耕起・草生区を示し、不耕起・草生区では、草生による窒素吸収により排出が抑制された可能性が認められた。また、炭素貯留量は不耕

起・草生>耕起を示したが、メタン吸収量については両者に差異は認められなかった。

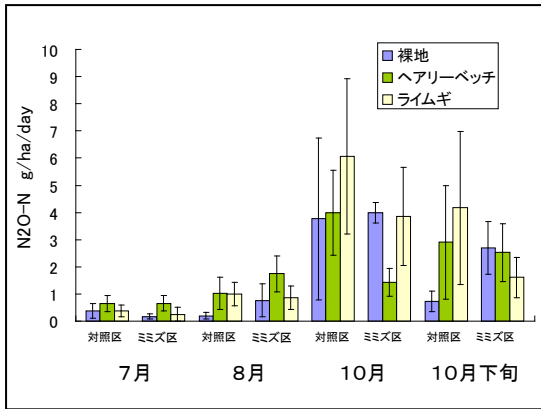


図1. 不耕起栽培試験区現場での土壌からの亜酸化窒素の生成活性（2008年のデータをもとに解析した）。

冬作物（カバー作物）として、ライムギ、ヘアリーベッチ、対照（裸地）の3区を設け、3区とも夏作物としてダイズを栽培した。

(2) 土壌管理条件での N<sub>2</sub>O 生成微生物（脱窒細菌、硝化細菌、脱窒糸状菌）の動態解析

①実験室モデル系で、土壌からの N<sub>2</sub>O 発生ポテンシャルを連続測定するシステムを開発し、N<sub>2</sub>O 発生における細菌と糸状菌の寄与率測定の方法を確立した。このシステムを用いて、茨城試験地土壌について、N<sub>2</sub>O 発生の土壌温度依存性、冬期カバー作物栽培の影響、季節変動性を分析した。その結果、不耕起土壌では、測定した温度範囲内では、細菌と糸状菌由来活性の両方で2相的で正の直線的な温度依存性があり、20~40℃域の温度依存性は10~20℃域の約4倍であることを見出した。また、クロラムフェニコール処理土壌の N<sub>2</sub>O 生成活性と土壌エルゴステロール含量は正の相関を示した ( $R^2=0.73675$ ) (図2)。この結果は、N<sub>2</sub>O の生成は糸状菌量に依存することを示唆した。冬期カバー作物栽培の影響は、夏作物（ダイズ）栽培前の土壌で、細菌由来と糸状菌由来の N<sub>2</sub>O 発生を2~3倍上昇させること、栽培期間中と収穫後の土壌ではその影響が小さいこと(1.3倍以下)を観察した。また、細菌と糸状菌由来の N<sub>2</sub>O 生成活性は、収穫後の供試土壌では同レベル (56~60μg N<sub>2</sub>O-N/kg 土壌/時間) であることを明らかにした (図3)。

都城試験地の液状きゅう肥施用畑地では、600トン/ha/年の施用区で、茨城試験地土壌の2~3倍の N<sub>2</sub>O 発生ポテンシャルが測定された。糸状菌の N<sub>2</sub>O 生成ポテンシャルは、細菌のポテンシャルとほぼ同等であった。

②qPCR/T-RFLP 法とクローンライブラリー法によって、冬期カバー作物栽培で特異的に応答する糸状菌グループとして *Cryptococcus* 属を特定した。しかし、検討した培養条件では有意な N<sub>2</sub>O 生成活性は認められなかった。

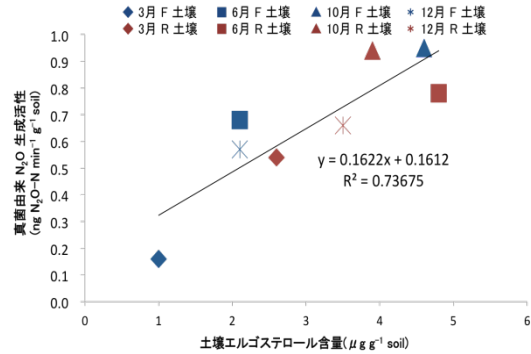


図2. クロラムフェニコール存在下での N<sub>2</sub>O 生成活性と土壌エルゴステロール含量の関係

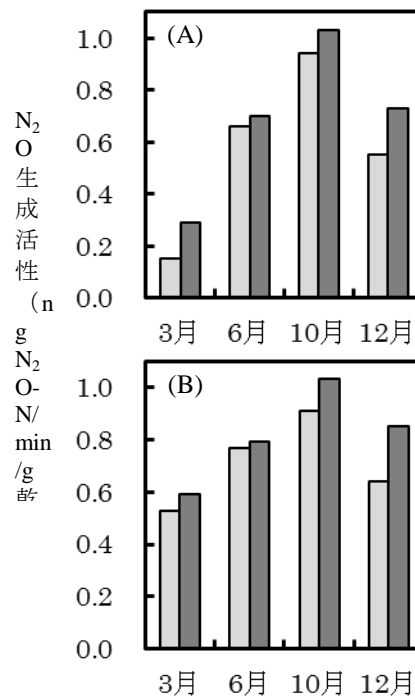


図3. 2010年の土壌試料採取時期別での真菌及び細菌由来の N<sub>2</sub>O 生成活性 (A)冬期裸地区; (B)冬期カバー作物区 (■、糸状菌由来活性; ■、細菌由来活性)

③畑地土壌における硝化細菌と硝化アーキアの動態と主要なグループの特定をアンモニア酸化酵素の遺伝子を標的とした方法で解析した。環流土壌モデルを用いて、農薬（ノニルフェノールスルホン酸銅剤）が硝化アーキアと硝化細菌の動態に及ぼす影響

を検討し、硝化細菌に比べて硝化アーキアが高い耐性を持ち、農薬負荷土壌での活性の担い手になる可能性を明らかにした。

(3) 脱窒糸状菌の分離と分類、そして様々な分類系統の糸状菌における N<sub>2</sub>O 生成活性の解析

茨城試験地の不耕起・冬期カバークロープ栽培区土壌から 171 株、不耕起・冬期裸地区土壌から 47 株の酵母及び糸状菌を分離し、約 60%の菌株が硝酸塩から N<sub>2</sub>O を生成する結果を得た。特に、*Fusarium*、*Gibberella*、*Hypocrea* 及び *Nectria* と同定された菌株で高い活性が検出された(表 1)。また、糸状菌分離株である *Mortierella elongata* 菌糸内部に内生する細菌(図 4)の性状解析に向けて、内生細菌の DNA を抽出・精製する方法を確立した。また、糸状菌から内生細菌を除去する方法も開発した。得られた内生細菌 DNA はゲノム解析を行う予定である。

(4) 熱帯地域モデルでの畑地土壌における窒素収支のバランス分析

インドネシア国ナンジュック地域での農業地域での水収支解析を行い、河川、地下水の連続水質調査を実施した。結果として、熱帯土壌においても畑作の多い乾期において地下水の硝酸態窒素濃度は河川水より低い濃度であることが分かった。また、雨期には圃場は水田として利用されており、地下水濃度が低い乾期に畑作が導入されると濃度が上昇することが示された。

表 1. 畑地からの糸状菌分離株の亜酸化窒素生成活性

菌株	属	N <sub>2</sub> O 生成活性*
PDA3	<i>Hypocrea</i>	++
PDA4	<i>Penicillium</i>	+++
PDA7	<i>Gibberella</i>	+++
PDA9	<i>Penicillium</i>	+
PDA12	<i>Nectria</i>	++++
PDA14	<i>Fusarium</i>	++++
PDA17	<i>Fusarium</i>	+
PDA19	<i>Gibberella</i>	++++
PDA23	<i>Ascomycota</i>	++
PDA30	<i>Penicillium</i>	+
PDA32	<i>Purpureocillium</i>	++
PDA34	<i>Hypocrea</i>	++++
PDA35	<i>Penicillium</i>	+
SBR5	<i>Penicillium</i>	++
SBR15	<i>Nectria</i>	+++
SBR17	<i>Fusarium</i>	+
SBR21	<i>Cladosporium</i>	++
SBR27	<i>Malassezia</i>	+
SBR42	<i>Hypocrea</i>	+
SBR48	<i>Paecilomyces</i>	+

表 1 の脚注: \*30°C、15 日間の培養(13 ml の硝酸塩-グリセロール培地)で生成した N<sub>2</sub>O 量 (ng N<sub>2</sub>O-N) で判定した: +, 0.1~1; ++, 1~10; +++, 10~100; +, 100~1000.

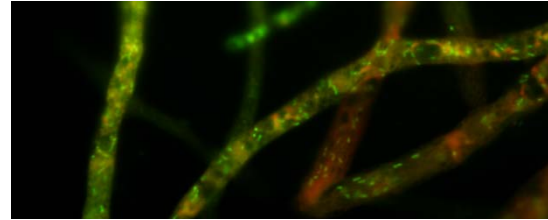


図 4. 土壌分離糸状菌株 (*Mortierella elongata*) の菌糸内部に内生している新規細菌種 (*Burkholderiaceae* 科)。菌糸内の緑色に染まっている粒子状の構造体が *Burkholderiaceae* 科の細菌であると同定された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- (1) 小松崎将一・山下幸祐・竹崎善政・嶺田拓也・金子信博・中島紀一・太田寛行、「自然草生利用・不耕起による有機栽培体系に関する研究—茨城県での栽培事例分析—」、*有機農業研究* 4: 印刷中, 2012. (査読あり)
- (2) Liyantono, T. Kato, H. Kuroda, K. Yoshida, “GIS analysis of conjunctive water resource use in Nganjuk district, east Java, Indonesia”, *Paddy and Water Environment* 10: in press, 2012. (査読あり)
- (3) Liyantono, T. Kato, H. Kuroda, K. Yoshida, “The influence of El Nino southern oscillation on agricultural production sustainability in a tropical monsoon region: case study in Nganjuk district, east Java, Indonesia”, *Journal of Developments in Sustainable Agriculture* 7:65-74, 2012. (査読あり)
- (4) 佐藤嘉則・成澤才彦・西澤智康・小松崎将一・太田寛行、「糸状菌細胞に内生する細菌の存在とその検出法」、*土と微生物*, 65:49-54, 2011. (査読あり)
- (5) 西澤智康・小松崎将一・金子信博・太田寛行、「末端制限断片 (T-RFs) プロファイル情報に基づく土壌微生物群集構造解析」、*土と微生物*, 64:33-40, 2010. (査読あり)
- (6) Sato, Y., K. Narisawa, K. Tsuruta, M. Umezu, T. Nishizawa, K. Tanaka, K. Yamaguchi, M. Komatsuzaki, H. Ohta, “Detection of betaproteobacteria inside the mycelium of the fungus *Mortierella elongata* soil isolates”, *Microbes Environ.* 25:321-324, 2010. (査読あり)
- (7) Nishizawa, T., Zhaorigetu, M. Komatsuzaki,

Y. Sato, N. Kaneko, H. Ohta, “Molecular characterization of fungal communities in non-tilled, cover-cropped upland rice field soils”, *Microbes Environ.* **25**:204-210, 2010.  
(査読あり)

[学会発表] (計 14 件)

- (1) 佐藤嘉則・鶴田和人・梅津昌史・成澤才彦・小松崎将一・太田寛行, 「糸状菌細胞内内生細菌の存在と亜酸化窒素生成活性の関係」, 日本土壌微生物学会 2009 年度大会、2009 年 6 月 12 日、九州大学
- (2) Sato, Y., K. Narisawa, K. Tsuruta, M. Umezu, T. Nishizawa, M. Komatsuzaki, H. Ohta, “Identification of intracellular bacteria related to the genus *Burkholderia* in the mycelia of the nitrous oxide-producing fungus *Mortierella elongate*”, XIX International Symposium on Environmental Biogeochemistry, 2009 年 9 月 14 日, ハンブルグ大学, ドイツ
- (3) 西澤智康・河村明寛・佐藤嘉則・小松崎将一・金子信博・太田寛行, 「環境保全型農法を継続した畑地土壌における真核微生物の群集構造解析」, 日本微生物生態学会第 25 回大会、2009 年 11 月 21 日、広島大学
- (4) 赤池 恵・佐藤嘉則・西澤智康, 昭日格 図・太田寛行, 「畑地土壌における *Cryptococcus* 属真核微生物の分布と亜酸化窒素生成活性」, 日本土壌微生物学会 2010 年度大会, 2010 年 5 月 22 日, 東京大学.
- (5) 河村明寛・西澤智康・小松崎将一・金子信博・太田寛行, 「不耕起栽培畑地土壌における微生物群集の分子生態学的解析」, 日本土壌微生物学会 2010 年度大会, 2010 年 5 月 22 日, 東京大学.
- (6) Sato, Y., T. Nishizawa, M. Umezu, K. Tsuruta, K. Narisawa, M. Komatsuzaki, H. Ohta, “Predomance of nitrous oxide-producing fungus, *Mortierella elongate*, in no-tilled, low-Nitrogen input upland soils”, 13th International Symposium on Microbial Ecology, 2010 年 8 月 23 日, シアトル, アメリカ.
- (7) 赤池 恵・佐藤嘉則・西澤智康・小松崎将一・太田寛行, 「不耕起畑地土壌から分離した糸状菌の亜酸化窒素生成活性」, 日本微生物生態学会第 26 回大会, 2010 年 11 月 25 日, 筑波大学.
- (8) 太田寛行・山田桂衣・河村明寛・安田智昭・佐藤嘉則・西澤智康, 「環流土壌系を用いた硝化菌の動態解析: 硝化アーキアの働きを考える」, 日本土壌肥料学会 2011 年度つくば大会, 2011 年 8 月 9 日, つくば国際会議場.
- (9) 奈良岡雅大・佐藤嘉則・赤池 恵・太田寛行, 「基質誘導呼吸阻害法を用いた土壌モデル系での細菌と糸状菌の亜酸化窒素生成活性の解析」, 日本微生物生態学会第 27

回大会, 2011 年 10 月 8 日, 京都大学.

- (10) 河村明寛・山田桂衣・西澤智康・佐藤嘉則・太田寛行, 「有機系銅剤ノニルフェノールスルホン酸銅 (NPS-Cu) 負荷による土壌細菌/アーキアおよびアンモニア酸化菌の群集構造解析」, 日本微生物生態学会第 27 回大会, 2011 年 10 月 8 日, 京都大学.
- (11) R. Khastini, Y. Sato, H. Ohta, K. Narisawa, “Change in the community of associated bacteria with *Veronaeopsis simplex* in the response of high temperature stress”, 日本微生物生態学会第 27 回大会, 2011 年 10 月 8 日, 京都大学.
- (12) 高島勇介・佐藤嘉則・東條元昭・成澤才彦, 「*Pythium aphanidermatum* 及び *P. nunn* に内生する細菌様構造物の検出」, 日本微生物生態学会第 27 回大会, 2011 年 10 月 8 日, 京都大学.
- (13) 河村明寛・西澤智康・小松崎将一・金子信博・太田寛行, 「不耕起栽培畑地土壌における微生物多様性の解析～特定サイトでの 7 年間の調査～」, 日本土壌微生物学会 2011 年度大会, 2011 年 11 月 26 日, 大崎市鳴子公民館.
- (14) 赤池 恵・鶴田和人・佐藤嘉則・西村 歩・小松崎将一・太田寛行, 「不耕起畑地土壌より分離した糸状菌株の亜酸化窒素生成活性」, 日本土壌微生物学会 2011 年度大会, 2011 年 11 月 26 日, 大崎市鳴子公民館.

[図書] (計 1 件)

- (1) M. Komatsuzaki, H. Ohta, “2-1 Sustainable agriculture practices”: In “Designing Our future: Local Perspectives on Bioproduction, Ecosystems and Humanity”, United Nations University Press, Tokyo, pp. 38-49, 2011.

## 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

成澤 才彦 (NARISAWA KAZUHIKO)  
茨城大学・農学部・准教授  
研究者番号: 90431650

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

加藤 亮 (KATO TASUKU)  
東京農工大学・農学研究院・准教授  
研究者番号: 10302332

(3)連携研究者

橋本 知義 (HASHIMOTO TOMOYOSHI)  
中央農業総合研究センター・上席研究員  
研究者番号：90343946

(4)研究協力者

**Liyantono**  
東京農工大学大学院・連合農学研究科博士  
課程

安田 智昭 (YASUDA TOMOAKI)  
茨城大学大学院・農学研究科修士課程

赤池 恵 (AKAIKE MEGUMI)  
茨城大学大学院・農学研究科修士課程

河村 明寛 (KAWAMURA AKIHIRO)  
茨城大学大学院・農学研究科修士課程

奈良岡 雅大 (NARAOKA MASAHIRO)  
茨城大学大学院・農学研究科修士課程