

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02324

研究課題名(和文) 有機態炭素欠乏土壌における硝化菌による無機態炭素固定能～その制御要因の解明

研究課題名(英文) Inorganic carbon fixation ability by nitrifying bacteria in carbon-depleted soil - elucidation of its control factors

研究代表者

内田 義崇 (Uchida, Yoshitaka)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：70705251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、農地土壌の生産性や肥沃度は有機態炭素量に依存するが、過剰な施肥や耕起によって有機態炭素が欠乏した土壌「有機態炭素欠乏土壌」が生成されることが世界的な問題となっていることを背景としている。劣化した土壌を省力的に回復させる技術が緊急に必要とされている中で、無機態炭素(二酸化炭素(CO₂))を有機態炭素として固定する独立栄養微生物である硝化細菌・古細菌(硝化菌)に着目した研究を行った。有機態炭素欠乏土壌で微生物量は減少するが硝化菌が逆に増加・多様化している現象を踏まえ、その傾向から予測メタゲノム法を用いて無機態炭素固定遺伝子の量的変化を調べる試験を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は世界規模課題である劣化土壌の広まりを食い止め、その回復を促す技術の確立に寄与するための基礎情報を蓄積できる。またそのカギとなる微生物として硝化菌に着目しているが、硝化菌はこれまで窒素循環との関連性のみが広く注目され研究されてきた。この研究では、硝化菌のCO₂資化という能力に着目している部分においても意義がある。

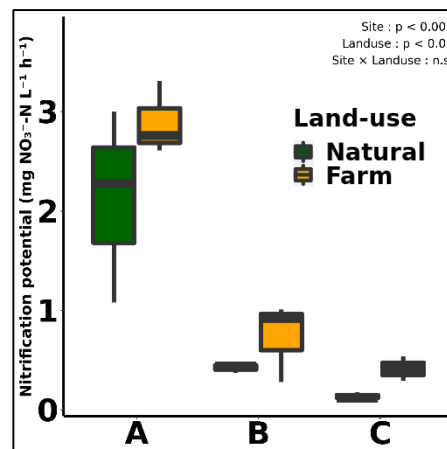
研究成果の概要(英文)：This study was conducted in relation to the worldwide problem of carbon-depleted soils, which are produced by excessive fertilization and tillage, although the productivity and fertility of agricultural soils depend on the amount of organic-form carbon. With the urgent need for labor-saving technology to restore degraded soils, we conducted research focusing on nitrifying bacteria and archaea, which are autotrophic microorganisms that fix inorganic carbon (carbon dioxide (CO₂)) as organic-form carbon. Based on the phenomenon that the amount of microorganisms decreases in carbon-depleted soils, but nitrifying bacteria conversely increase and diversify, we conducted a study to examine quantitative changes in inorganic carbon-fixing genes using predictive metagenomic methods based on this trend.

研究分野：窒素循環、炭素循環

キーワード：炭素循環

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、土壌中有機態炭素の欠乏により、微生物全体の量は減少するが、硝化菌が多様化する場合があることを明らかにし、その理由について研究を進めてきた。この理由として、土壌有機態炭素が欠乏すると、有機態炭素に依存せず無機態炭素を利用する独立栄養細菌(黒い微生物(硝化菌等))が活性化し、微生物コミュニティが有機態炭素欠乏に適応するからではないかと考えた。特に、アンモニウム態窒素(NH_4^+)の施用が起こる農地土壌では、 NH_4^+ をエネルギー源とする硝化菌の無機態炭素固定が活性化され、そのことが、有機態炭素の欠乏を食い止めている可能性がある。例えば右図は申請者がサブサハラアフリカ土壌の硝化ポテンシャルを A、B、C 三サイトで調査した結果だが、農地化によって土壌が劣化する傾向が見られていたが(微生物量の損失や土壌炭素の欠乏)、硝化ポテンシャルは逆に向上する傾向が見られた。この理由として申請者らは、硝化菌に関する研究は、ほとんどが窒素循環、つまりアンモニア酸化や亜硝酸酸化に着目したものであり、硝化菌による無機態炭素固定能を、土壌炭素欠乏と関連させて行った研究はほとんど存在していないからではないかと考えた。近年、硝化菌の無機態炭素固定能は土壌や水圏で重要なプロセスとして認識されつつあり、その活性を評価するための遺伝子マーカーなども開発され利用できるようになりつつある(例:Alfreider et al. FEMS Microb Ecol, Hu et al. 2016 Soil Biol Biochem)。土壌表層の有機炭素の四分の一程度がこの無機態炭素固定に由来しているという報告(Nowak et al. 2015 Biogeosci)もあり、この反応は無視できない。土壌の有機態炭素欠乏が極めて深刻な世界規模課題となっていることを背景に、無機態炭素を有機化できるこれら微生物の力に着目し理解を深めることは極めて重要である。



これまでの研究で、有機態炭素欠乏土壌で硝化菌が多様化していることがわかった。しかし、その理由として考えられる「有機態炭素欠乏によって独立栄養細菌が活性化し、無機態炭素取り込み能力が高まっているのか」という問いに対する答えは得られていない。有機態炭素欠乏土壌を用いて、微生物の無機態炭素固定能を対象とした研究を分子レベルで行い、硝化菌が有機炭素欠乏にどのように適応しているのかを理解する必要がある。また、硝化菌による無機態炭素固定能がどのような条件で増減するのか、そして、エネルギー源であるアンモニウム態窒素の影響や固定された炭素の他微生物グループへの影響はどの程度なのか、という問いにも答え、有機態炭素欠乏からの回復メカニズムへの理解を深める必要がある。

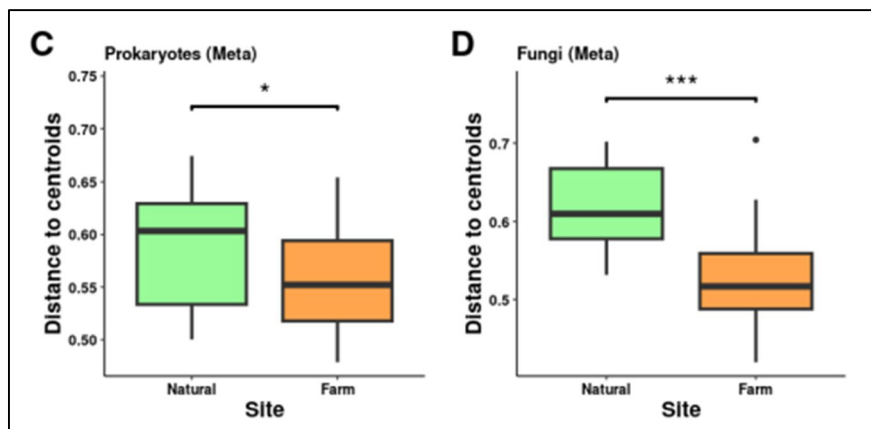
2. 研究の目的

本研究の目的は、世界中の土壌微生物コミュニティデータをメタ解析し、有機態炭素欠乏状態の土壌で、硝化菌の多様性が普遍的に高まっているのかを解析し、硝化菌の量や多様性の変化に、アンモニウム態窒素の施用(例:化学肥料の散布)がどのように関連しているのかを調べ、硝化菌により固定された無機態炭素は、有機態炭素欠乏土壌における窒素循環や炭素循環をどのように駆動しているのか、を明らかにすることである。

3. 研究の方法

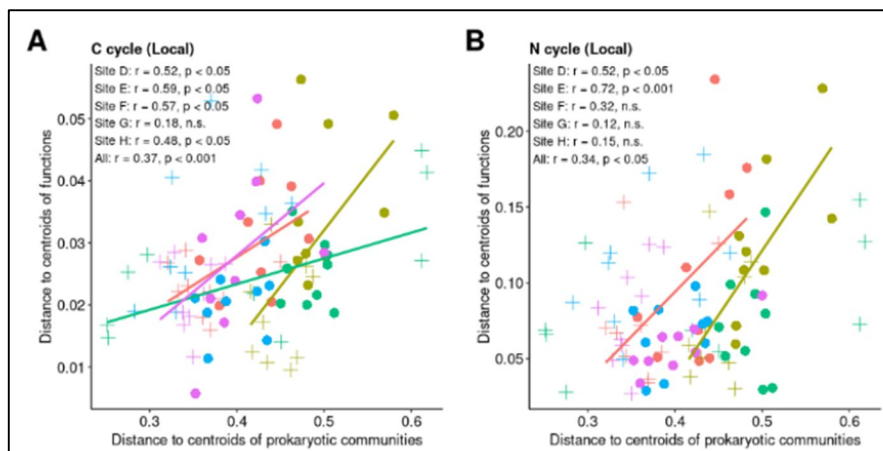
まず、有機態炭素欠乏土壌で微生物量は減少するが硝化菌が逆に増加・多様化している現象を踏まえ、その傾向から予測メタゲノム法を用いて無機態炭素固定遺伝子など炭素循環に関わる機能遺伝子の量的変化を調べる試験を行った。例えば、硝化菌が持つ無機態炭素固定遺伝子は *ccbL* として知られており、その相対的な量をバクテリアの種から推定することができる。有機態炭素欠乏土壌として、農地化によって劣化したサブサハラアフリカ土壌を用いた。さらに、硝化菌の活性と多様性、アンモニウム施肥回数との関連性を調べる試験も行った。さらに、予測メタゲノム法を用いて無機態炭素固定遺伝子の量的変化を調べる試験においては、ザンビア、ケニア、マラウイの農地土壌や自然生態土壌(炭素量が平均 1%程度の炭素欠乏土壌)を対象にした。硝化菌の活性と多様性、アンモニウム施肥回数との関連性を調べるために、土壌をガンマ線を用いて滅菌し、そこに多様性を段階希釈を用いて変化させた土壌抽出液中微生物を接種する実験を行った。さらに、農地開発などで起こる生態系全体の変化が硝化菌群の硝化ポテンシャルの変化にどのように寄与しているのかを調べた。そこで、炭素や窒素が欠乏した土壌で実際に「硝化反応」を行っている硝化菌群を解析するために硝化時に菌体に取り込む炭素を安定同位体標識する Stable Isotope Probing (SIP) を行い標識された DNA から判別された硝化菌群と微生物全体の多様性の関係を調査した。研究サイトとしては、北米の元氷河地域の森林で外来ミミズの侵

入により炭素量が変化した2地点(軽度侵入(Minimally)・重度侵入(Highly))で採取したものをを用いた。森林から農地への転換、つまり化学肥料の散布や植生の変化が、土壤微生物多様性にどのような影響を及ぼすのかを、特に硝化機能を持つ微生物に着目しながら調べた。調査対象地としては、サブサハラアフリカのザンビア、ケニア、マラウイの土壤炭素量が低い土壤を用いた。



4. 研究成果

硝化菌が持つ無機態炭素固定遺伝子などの炭素循環に関する土壤微生物機能遺伝子を推定した結果、有機態炭素欠乏土壤とそうではない土壤で明らかな違いが見られた。また、アンモニア繰り返し施肥によって起きる硝化菌活性の程度が土壤微生物多様性と正の相関がある可能性を示唆するデータを得た。また、予測メタゲノム法を用いて無機態炭素固定遺伝子の量的変化を調べる試験においては、土壤中の全炭素量と全バクテリア中の無機態炭素固定遺伝子量に負の相関が見られた。このことは、本研究で仮定した炭素欠乏状態の土壤で無機態炭素固定が重要な役割を担っているという推定を支持する。また、アンモニア繰り返し施肥によって起きる硝化菌活性の程度は土壤微生物多様性と正の相関があるが、硝化を担う2つのグループ(AOB、AOA)によってその傾向は大きく異なることが明らかになった。具体的には、AOBはあまり希釈していない多様な土壤微生物溶液を接種した土壤において、繰り返し施肥に反応し活性化する傾向があったが、AOAに関しては希釈倍率に関係なく繰り返し施肥への反応が乏しい傾向を示した。このことは、特にAOBは群衆構造が複雑であることによって周辺環境に適応する能力を有している可能性があることを示している。また、ミミズによって土壤が劣化している場所の硝化ポテンシャルは減少していた。これは土壤中のアンモニア酸化古細菌DNA量の傾向と同様であり、アンモニア酸化古細菌の減少が硝化ポテンシャルの減少につながっている可能性がある。これまでサブサハラアフリカでも類似の研究を行ってきたが、サブサハラアフリカ土壤では、森林に比べて炭素・窒素が減少した農地土壤のほうが硝化ポテンシャルは高く、北米の外来ミミズ侵入による栄養減少とは傾向が異なった。そのため、土壤の劣化と硝化ポテンシャルや硝化菌コミュニティの変化の傾向には地域性があることがわかった。さらに、土壤の原核生物群集と真菌群集の不均一性(Heterogeneity)は、農地では自然地よりも低く、農業管理によって微生物群集構造が均質化されていることが示唆された。上図では、微生物群衆の不均一性を微生物群衆構造の類似度がどのようにばらつくかという指標(Distance to centroids)を用いて調べた結果、農地化によってその値が減少していることを示している。また、このような微生物群集の分類学的不均一性は、窒素循環に関係したサイクルに関連する機能や菌類の生活様式の不均一性と相関していた(右下図)。結論として、自然生態系の農地化は、小規模な希少微生物群のローカルニッチを減少させる可能性があることがわかった。さらに、硝化菌の群集構造に関しては、Clusters 3a.2と3bと呼ばれるグループが農地化によって増加していることがわかってきた。これらがアンモニア肥料など硝化に関わる基質に素早く反応し、土壤の硝化機能を変化させている可能性があり、窒素の土壤からの流亡などとも関連している可能性が示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ohigashi, T., Uchida, Y.
2. 発表標題 Can soil microbes increase their diversity despite soil degradation?
3. 学会等名 The International Symposium on A Green Recovery from COVID-19
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石毛 奈央, 木村 有歌理, 内田 義崇
2. 発表標題 段階希釈して滅菌土壌に接種した微生物の群集構造と炭素・窒素循環
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ohigashi, T., Uchida, Y.
2. 発表標題 Can soil microbes increase their diversity despite nutrient loss? -study on effects of cultivation in sub-Saharan Africa-
3. 学会等名 Ecological Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akari KIMURA, Nao ISHIGE and Yoshitaka UCHIDA
2. 発表標題 Changes in the abundance and community of ammonia oxidizing bacteria/archaea in soils with the repeated ammonium fertilization
3. 学会等名 the 69th Annual Meeting of the Ecological Society of Japan
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分担 者	龍見 史恵 (Tatsumi Chikae) (30883417)	北海道大学・農学研究院・特別研究員 (PD) (10101)	

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