

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05326

研究課題名（和文）水田土壌の生物的鉄酸化反応—微好気性鉄酸化細菌の潜在的役割の評価

研究課題名（英文）Biological iron oxidation in paddy field soil: the potential role of microaerophilic iron-oxidizing bacteria

研究代表者

渡邊 健史（Watanabe, Takeshi）

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：60547016

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では水田より分離したGallionellaceae科微好気性鉄酸化細菌の鉄酸化活性を測定するとともに、水田土壌落水時のGallionellaceae科微好気性鉄酸化細菌群集の動態を解析し、土壌中の微好気性鉄酸化細菌の鉄酸化ポテンシャルを推定した。土壌培養実験により、Gallionellaceae科鉄酸化細菌群集は土壌に酸素がわずかに入るようになった落水後の初期の鉄酸化反応に関わると推察され、短期間で著しく増殖することが明らかになった。また、そのときの鉄酸化ポテンシャルは乾土1gあたり最大0.03mg Fe(II)で、主に土壌溶液中の2価鉄イオンの酸化に関わることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

湛水と落水が繰り返される水田では、土壌中の鉄の酸化還元状態が大きく変化する。鉄の酸化還元反応は土壌中の炭素や窒素、その他様々な無機元素の動態にも影響を及ぼす重要な反応である。近年、微好気性鉄酸化細菌として知られるGallionellaceae科鉄酸化菌が、水田土壌の鉄酸化反応に関わることが明らかになってきたが、そのポテンシャルは不明であった。本研究では、土壌中での微好気性鉄酸化菌の鉄酸化ポテンシャルをはじめ評価した研究であり、今後、水田土壌中での鉄酸化反応に伴う物質動態の詳細を理解する上で貴重な知見を得た。

研究成果の概要（英文）：This study analyzed the iron-oxidizing activity of microaerophilic iron oxidizer isolated from a paddy field and the dynamics of the microaerophilic iron-oxidizing bacterial (FeOB) community in paddy soils after drainage to evaluate the iron-oxidizing potential of the microaerophilic iron oxidizers in paddy soils. Soil incubation experiments revealed that the microaerophilic FeOB community was involved in the initial iron oxidation after draining, when the soil is marginally oxygenated, and that they proliferated significantly in a short period of time. The iron oxidation potential at that time was up to 0.03 mg Fe(II) per gram of dry soil, and it was indicated that they are mainly involved in the oxidation of ferrous iron ions in the soil solution.

研究分野：土壌微生物学

キーワード：水田 鉄酸化菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

コメは世界人口の半分を養う極めて重要な穀物であり、その75%が灌漑水田で収穫される。地殻中に4番目に多く存在する鉄は主に2価と3価の化学形態で存在し、水田土壌では湛水や落水に伴って還元反応( $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ )や酸化反応( $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ )が進行する。また、湛水状態でも土壌表層や水稻根圏では鉄酸化反応が起こる。鉄の酸化還元反応は、水田土壌のpHやEh、有機物分解などの物質代謝に影響を及ぼす。したがって、水田土壌の鉄の酸化還元機構を正しく理解することは、土壌肥料学の観点から極めて重要である。しかし、これまで水田の鉄酸化反応は非生物的反応が主体と考えられてきたため、鉄酸化反応に関わる微生物に注目した研究は限られており、不明な点が多い。

中性淡水環境中の鉄酸化反応は、非生物的反応に加え生物的反応によっても進行し、生物的反応には微好気性鉄酸化細菌、硝酸還元鉄酸化細菌、光合成鉄酸化細菌が関わる。近年、水田土壌の鉄酸化反応に微好気性鉄酸化細菌が関わるのが明らかになった。しかし、水田土壌中の鉄酸化反応へ微好気性鉄酸化細菌がどの程度関わるのかは明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では水田土壌に生息する *Gallionellaceae* 科微好気性鉄酸化細菌の鉄酸化活性を測定するとともに、水田土壌落水時の *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌群集の動態を解析し、菌株の細胞あたりの鉄酸化活性と土壌中での菌数の変化から、水田土壌が落水され鉄が酸化される際の微好気性鉄酸化細菌の鉄酸化ポテンシャルを推定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 水田より分離した微好気性鉄酸化細菌のゲノム解析と鉄酸化活性

水稻の根より分離した *Ferrigenium* sp. NRt1 株を対象とした。

NRt1 株を大量培養して集菌し、ゲノムDNAを抽出した後、ゲノムシーケンスを解読した。鉄酸化反応に関わると推定される酵素をコードする遺伝子を探索し、その特徴を推定した。

また、NRt1 株を接種した培養液中の2価鉄減少量を経時的に追跡し、コントロールとして用意した非接種培養液中(非生物的な鉄酸化)の濃度との差から、NRt1 株が酸化した鉄量を推定した。同時に、培養液中の細胞数を顕微鏡で計数し、単位時間あたりの1細胞の鉄酸化活性を求めた。培養は、低酸素濃度条件下、19、30、37°Cで行った。

#### (2) 水田落水時の *Gallionellaceae* 科微好気性鉄酸化細菌の鉄酸化ポテンシャルの推定

水田土壌の室内培養実験を行い、落水に伴う *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌群集の動態を解析した。愛知県農業総合試験場(安城)の水田より採取した土壌を、10 mL ガラスシリンジに詰め、30°C、暗所で2週間あるいは4週間湛水培養して鉄を還元させた。その後、培養温度を12°C、30°C、37°Cに変更して下方より排水し、落水状態とすることで鉄を酸化させた。土壌中の酢酸(pH 3.0)抽出2価鉄量(活性2価鉄量)の変化を経時的に測定するとともに、*Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌の存在量を16S rRNA 遺伝子を対象とした定量PCR法により推定した。落水後の存在量の変化と先に求めたNRt1 株の細胞あたりの鉄酸化活性より、水田土壌中の *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌群集の鉄酸化ポテンシャルを推定した。

#### (3) 水田土壌中の2価鉄の存在形態と *Gallionellaceae* 科微好気性鉄酸化細菌の動態の関係の解析

湛水した水田土壌を落水して2価鉄が酸化される際に、土壌中での2価鉄の存在形態によって酸化のされやすさが異なると予想し、土壌中の2価鉄を存在形態別に分けて定量して *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌群集の動態との関係を解析した。

愛知県農業総合試験場内の水田より採取した土壌(安城)、研究室の水田(元長野農試土壌)より採取した土壌(長野)、ブルキナファソの鉄過剰障害発生水田より採取した土壌(ブルキナファソ)をそれぞれ50 mL パイアルピンに詰め、粉末状の稲わらと蒸留水を加えてN<sub>2</sub>雰囲気下、30°Cで培養した。その後、蓋を開けて好気条件に変え、ピンを横向きにしてなるべく空気に触れるように土壌を広げた。経時的に土壌を採取し、水抽出画分(水溶性画分)、1M KCl 抽出画分(交換性画分)、酢酸(pH 3.0)抽出画分(活性2価鉄画分)の2価鉄を定量した。また、その際の *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌の存在量の変化を16S rRNA 遺伝子を対象とした定量PCR法により推定し、*Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌がどの画分の2価鉄の酸化に主に関わるのか推定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 水稻の根より分離した *Ferrigenium* sp. NRt1 株のゲノムの特徴

NRt1 株は2.8 Mbp の染色体を有し、そのG+C含量は58.6 mol%であった。近縁種のゲノムとの類似性を示す指標である Average Nucleotide Identity (ANI) と digital DNA-DNA hybridization (dDDH) の値を計算すると、最も近縁な *Ferrigenium kumadai* An22<sup>T</sup> 株と95%以下、70%以下の値を示した。したがって、NRt1 株は *Gallionellaceae* 科 *Ferrigenium* 属の新種の微好気性鉄酸化細菌

であることが示唆された。

NRt1 株の鉄酸化酵素をコードする遺伝子を探索した結果、溶液中の  $\text{Fe}^{2+}$  イオンの酸化に関わる *Cyc2* をコードする *cyc2* が見つかった。一方、 $\text{Fe}^{2+}$  イオンに加え粘土鉱物中の  $\text{Fe(II)}$  を酸化することが可能な MTO をコードする *mto* は見つからなかった。*cyc2* はゲノムが解読されたすべての *Gallionellaceae* 科微好気性鉄酸化細菌において見つかり、*mto* は一部の *Gallionellaceae* 科微好気性鉄酸化細菌からしか見つかっていない。NRt1 株は、水田土壌溶液中の  $\text{Fe}^{2+}$  イオンを酸化して生息することが推察された。

#### (2) *Ferrigenium* sp. NRt1 株の鉄酸化活性の評価

19、30、37 の各温度において NRt1 株を約  $10^7$  cells  $\text{mL}^{-1}$  となるように液体培地に接種して 8~15 時間培養し、培養期間中の 2 価鉄の減少量から 1 細胞あたりの鉄酸化活性を求めた。培養中、いずれの温度でも細胞数に大きな変化はなかったが、培地中の  $\text{Fe}^{2+}$  濃度は、非接種培地（非生物的鉄酸化反応）と比べて減少していた。その濃度差より 1 細胞あたりの鉄酸化活性を求めると、いずれの温度でも約  $10^{-15}$  mol cell $^{-1}$  h $^{-1}$  であったが、NRt1 株の至適生育温度と対応して 30°C で最も高かった。

#### (3) 水田落水時の *Gallionellaceae* 科微好気性鉄酸化細菌の鉄酸化ポテンシャルの推定

培養実験はそれぞれの温度で 2 回行った。そのうち 1 回目は 2 週間湛水後に温度を変えて 1 週間静置し、その後落水した。2 回目は 4 週間湛水した後、温度を変えて 1 日後に落水した。ただし、落水前に土壌を攪拌し、湛水期間中に生じた土壌中の気泡を追い出した。

1 回目、2 回目の培養実験ともに湛水培養により土壌中の活性 2 価鉄量は増加した。気泡を除去せずそのまま落水した 1 回目の培養の 30、37 では、時間が経過するとともに活性 2 価鉄量は減少していった。一方 12 ではほとんど減少しなかった。また、温度間や同一温度の反復間でのバラツキが大きかった。したがって、湛水培養中に発生した気泡の存在によって、水の落ちやすさが異なり 2 価鉄の酸化程度に違いが見られた可能性が考えられた。一方、落水前に気泡を追い出した 2 回目培養での活性 2 価鉄量は、いずれの温度でも落水後は 2 週間経過してもほとんど減少しないが、わずかに減少したのみであった。

土壌中の *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌群集の 16S rRNA 遺伝子コピー数は、1 回目と 2 回目の培養実験どちらでも、湛水期間はほとんど変化せず、落水後 5~17 日間に 10~90 倍増加した。このうち 2 回目の培養実験では、低い温度ほど増加率が大きかったが、増加速度は 30°C が最も大きかった。2 回目の培養実験の結果を用いて落水後の *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌群集の増殖に伴う鉄酸化量を、NRt1 株の鉄酸化活性から推定すると土壌 1g あたり最大 0.03 mg と見積もられた。

#### (4) 水田土壌中の 2 価鉄の存在形態と *Gallionellaceae* 科微好気性鉄酸化細菌の動態の関係の解析

ガラスシリンジを用いた土壌培養実験により、*Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌は落水後短期間で顕著に増殖することが示された。一方、土壌中の活性 2 価鉄量は、その間ほとんど減少せず、*Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌は、土壌中の 2 価鉄のうち一部の存在形態の 2 価鉄の酸化に関わっている可能性が考えられた。そこで、土壌中の 2 価鉄を水溶性、交換性、活性 2 価鉄画分に分けて測定し、*Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌がどの画分の 2 価鉄の酸化に関わっているのかを明らかにすることを試みた。

ガラスバイアルビンを用いた土壌培養実験の結果、いずれの土壌においても湛水培養により 2 価鉄が還元され 2 価鉄量は増加することが確認された (3.46~11.74 mg  $\text{g}^{-1}$  soil)。その時の水溶性、交換性および活性 2 価鉄の画分の割合は土壌により異なり、それぞれ 2.0~7.1、9.7~50、43~88% の範囲であった。その後、ビンの蓋を開けて好気的条件下に変更すると、土壌によらずどの画分の 2 価鉄も減少し、*Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌 16S rRNA 遺伝子コピー数は増加する傾向が見られた。特に長野土壌では、好気培養後 1 日目で 16S rRNA 遺伝子コピー数が約 6 倍増加した。

(2) で述べた NRt1 株の鉄酸化活性の値を用いて、その間に *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌が酸化した鉄量を計算すると 0.014 mg  $\text{g}^{-1}$  乾土となった。この値は水溶性、交換性、活性 2 価鉄の総量の 0.9% に過ぎなかったが、(1) のゲノム解析からも明らかのように既知の *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌は全て  $\text{Fe}^{2+}$  イオンを酸化する鉄酸化酵素を持っており、仮に *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌は土壌の水溶性 2 価鉄の酸化に関わると仮定するとその寄与率は 7.8% と推定された。

以上の結果より、*Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌群集は、土壌に酸素がわずかに入るようになった落水後の初期の鉄酸化反応に関わると推察され、短期間で著しく増殖することが明らかになった。その応答や鉄酸化ポテンシャルは温度によって異なることも明らかとなった。

また、ゲノム解析では、すべての *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌は  $\text{Fe}^{2+}$  イオンの酸化に関わる *cyc2* 遺伝子を持っている一方、粘土鉱物中の  $\text{Fe(II)}$  の酸化も可能な *mto* 遺伝子は一部の菌株でのみ見つかった。したがって、*Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌は主に土壌溶液中の  $\text{Fe}^{2+}$  イオンの酸化に関わることが推定された。2 価鉄を存在形態別に分けて解析した実験から、土壌中の水溶性 2 価鉄量の割合は高くないが、最も早く酸化されると考えられる。この結果も、*Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌が落水後の初期の鉄酸化反応に関わることを支持し、特にフリーの  $\text{Fe}^{2+}$  の酸化に関わることが示唆された。

ただし水田土壤中では *mto* 遺伝子を持つ *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌がどのくらい存在するのかは不明である。今後、その割合を明らかにすること、また土壤中でどちらのタイプの鉄酸化酵素がはたらくのか調べることによって、*Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌による土壤中の2価鉄の酸化メカニズムをより詳細に明らかにできると期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe Takeshi, Kato Kento, Kawaguchi Kohei, Oga Toshiya, Ban Yoshinori, Otoidobiga Cecile Harmonie, Sawadogo Adama, Wonni Issa, Ouedraogo Leonard S., Zongo Jean Didier, Dianou Dayeri, Asakawa Susumu	4. 巻 69
2. 論文標題 Investigation of iron-reducing and iron-oxidizing bacterial communities in the rice rhizosphere of iron-toxic paddy field: a case study in Burkina Faso, West Africa	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 283 ~ 293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00380768.2023.2259426	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Takeshi, Khalifa Ashraf, Asakawa Susumu	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Ferrigenium kumadai An22, a Microaerophilic Iron-Oxidizing Bacterium Isolated from a Paddy Field Soil	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00346-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00346-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 渡邊健史, 浅野恵大, 山口真輝, 森 小百合, 浅川 晋
2. 発表標題 水田土壌のGallionellaceae科鉄酸化細菌群集の鉄酸化ポテンシャル
3. 学会等名 日本土壌微生物学会2023年度千葉大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊健史, 小島久恵, 松葉悠真, 伊藤舞香, Joseph Sawadogo Benewinde, Mohammad Saiful Alam, 劉冬艶, 海野裕晃, 村瀬潤, 土屋一成, 浪川茉莉, 高本慧, 戸上和樹, 高橋智紀, 西田瑞彦, 浅川晋
2. 発表標題 田畑輪換が水田土壌の微生物群集に及ぼす影響：11年間にわたる動態解析（2）
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2023年度愛媛大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊健史
2. 発表標題 水田土壌の鉄酸化反応への微好気性鉄酸化細菌の関与
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2023年度愛媛大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川裕紀, 大菅康平, 秦史佳, 伊藤舞香, 浅川晋, 渡邊健史
2. 発表標題 水稲根より分離したGallionellaceae科鉄酸化細菌の特性の解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会第36回浜松大会・アジア微生物生態シンポジウム第13回浜松大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Watanabe, T., Naruse, T., Nakagawa, K., Ban, Y., Yoshida, T., Kato, T., Namikawa, M., Takahashi, T., Nishida, M., Katayanagi, N., Agbisit, R., Llorca, L., Hosen, Y., Murase, J., Asakawa, S.
2. 発表標題 Dynamics of Gallionella-related iron-oxidizing bacterial community in paddy field soil
3. 学会等名 22th World Congress of Soil Science (WCSS) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口真輝・森小百合・浅川晋・渡邊健史
2. 発表標題 水田土壌落水時の微好気性鉄酸化細菌群集の鉄酸化ポテンシャルの推定
3. 学会等名 2022年度日本土壌肥料学会中部支部・中部土壌肥料研究会例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊健史・加藤健斗・川口晃平・尾賀俊哉・伴佳典・Otoïdobiga Cecile Harmonie・Sawadogo Adama・Wonni Issa・Ouedraogo Leonard・Zongo Jean Didier・Dianou Dayeri・浅川晋
2. 発表標題 ブルキナファソ鉄過剰障害発生水田の細菌群集構造の特徴
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2022年度東京大会
4. 発表年 2022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

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