

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780324

研究課題名(和文) 微生物による作物依存型一酸化二窒素発生スポット形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of the N<sub>2</sub>O emission from crop residues.

研究代表者

多胡 香奈子 (Tago, Kanako)

独立行政法人農業環境技術研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：20432198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：温室効果ガスである一酸化二窒素(N<sub>2</sub>O)は葉菜類の作物体やその残さからも発生するが、詳細は不明である。そこで作物体に存在する脱窒菌群集からのN<sub>2</sub>O発生メカニズムを解明することを目的とした。まず新たにガスサンプリング器具を考案し、それを用いてキャベツ畑で残さ(葉)から生じるN<sub>2</sub>Oを測定し、葉の表面ではスポット的にN<sub>2</sub>Oが発生していることを明らかにした。そこで葉表面のうちN<sub>2</sub>Oが盛んに発生している部位を特定し、そこから実際に脱窒菌を多数分離することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Denitrification is a microbial respiratory process converting nitrate to dinitrogen gas. This process contributes to the emission of N<sub>2</sub>O, an important greenhouse gas. Denitrifiers responsible for production of N<sub>2</sub>O in crop residue are largely unknown. The objectives of this research were to find a 'hot spot' of N<sub>2</sub>O emissions on crop (cabbage) residues and to isolate the active denitrifiers from the 'hot spot'. A new apparatus was designed to sample the N<sub>2</sub>O gas from the surface of the cabbage residue at small scales without destruction of the residue. The N<sub>2</sub>O emission from the surface of cabbage residue in the field was evaluated using the sampling apparatus. As a result, large amounts of emissions were observed from rotten parts of the residue. Thereafter, denitrifiers were recovered from the rotten parts of residue where the highest N<sub>2</sub>O emission was observed. Sixty denitrifiers were isolated and assigned to five genera.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：環境農学

キーワード：環境汚染

## 1. 研究開始当初の背景

食料の安定生産のため、農耕地には多量の窒素肥料が投入されている。その結果、農耕地の微生物群集による窒素代謝作用が影響を受け、温室効果ガス一酸化二窒素( $N_2O$ )の発生量が増加し続けている。一般的に土壌はその発生源だといわれているが、それだけでは農耕地からの総  $N_2O$  発生量を十分に説明できない。しかし土壌以外の  $N_2O$  発生源に関する情報は乏しく、それらの場所での  $N_2O$  の発生メカニズムは全く不明である。

$N_2O$  は施肥や降雨時だけでなく葉菜類の作物体やその残さからも発生することもあるが、あまり知られていない。例えばキャベツ畑では収穫前後に多量の  $N_2O$  が発生するが、我々はこの  $N_2O$  がキャベツ自体から発生していることを突き止めた。しかし植物常在菌の生態は不明で、残さからの  $N_2O$  発生がどのような窒素代謝に起因しているのかわかっていない。

$N_2O$  発生に関わる窒素代謝の1つである脱窒は一般的には嫌気～微好気環境で起こり、 $N_2O$  は主に微好気環境で発生するといわれている。ただ一部の細菌で好氣的に脱窒を行うものが見つまっている。キャベツには脱窒に必要な電子受容体である硝酸が蓄積し、電子供与体として必要なクエン酸やコハク酸も含まれる。このことから、ここでの  $N_2O$  発生には脱窒が強く関与していると思われる。従って作物体という酸素に十分触れる場所での  $N_2O$  発生は、農作物の  $N_2O$  発生源としての重要性に加え、これまで予期していなかった好気環境での  $N_2O$  発生源であり、その仕組みを解明する必要がある。

## 2. 研究の目的

以上から、脱窒からの  $N_2O$  発生に必須である有機酸と無機態窒素の供給量と、脱窒菌群集を取り巻く酸素濃度、およびその時群集で機能している脱窒代謝系を明らかにし、それらに対比させることで脱窒由来の  $N_2O$  発生メカニズムを明らかにできると考えた。以上のことから本研究では、作物体(キャベツ)に存在する脱窒菌群集からの  $N_2O$  発生メカニズムを解明することとした。そのために具体的に以下4つの目的を立てた。

作物体での  $N_2O$  発生スポットを特定する。

スポットで機能する脱窒菌を分離し、作物体成分や酸素による菌株の代謝活性の違いを示す。

スポットで機能する  $N_2O$  発生代謝系を、メタゲノム解析から提示する。

スポットでの脱窒菌群集を再現し、 $N_2O$  が発生するときの作物体成分と酸素濃度の条件を明らかにする。

研究期間内には、 と を達成した。

## 3. 研究の方法

(1) 葉の部位別ガスサンプリング装置(ピンポイントガス採取装置、図1)の考案

1枚の葉表面で場所による発生量の違いを調べるため、直径5cmの葉表面から発生する  $N_2O$  を採取する器具を考案した(図1)。これを用いることで試料を非破壊的にその表面からガスを採取することが可能となった。



図1. ピンポイントガス採取装置

(2) 作物残さからの  $N_2O$  発生測定

モデル実験系の構築と  $N_2O$  発生のモニタリング

実験室でキャベツの栽培条件を再現するモデル実験系を構築した。プラスチック容器に土壌を充填し、そこへキャベツの外葉を敷き詰めて水分を一定に保ちながら一定温度下で培養した。プラスチック容器中の  $N_2O$  発生量と、葉表面から出る  $N_2O$  を、(1)で作製したピンポイントガス採取装置を用いて経時的に測定した。

キャベツ栽培圃場(図2)における作物残さからの  $N_2O$  発生測定

収穫後に圃場に残されたキャベツ葉表面での部位別  $N_2O$  発生量を、ピンポイントガス採取装置を用いて調べた。



図2 キャベツ栽培圃場

(3) 植物体からの微生物の回収

植物体から微生物画分を回収するために、密度勾配遠心分離法が有効であることが報告されている(Ikeda *et al.* 2009)。そこで

この方法を応用し、腐敗葉から微生物画分を回収する方法を確立した。方法は、まずキャベツをバッファー存在下で低温に保ったままミキサーで破碎した。次に得られた懸濁液を低速で遠心分離した。上清を回収し、高速で遠心分離を行った。沈殿を回収して希釈平板法で微生物を分離した。

#### (4) 脱窒菌の分離

(3) のモデル系を再び構築し、 $N_2O$  を経時的に測定した。 $N_2O$  発生がピークに達したところで葉からの  $N_2O$  発生量を部位別に測定した。 $N_2O$  発生量が最も高かった部位から、(2) で確立した手法を用いて微生物画分を回収した。微生物画分を順次希釈し、脱窒菌の分離に頻りに用いられる培地など複数の培地に加えて液体培養した。2 日後に脱窒活性を測定した。脱窒活性の測定にはアセチレンブロック法を用いた。脱窒活性が認められた培養液を寒天培地に塗抹して培養し、生育したコロニーの脱窒活性を測定した。これをそれぞれの培地で3度繰り返して脱窒菌を絞り込み、最終的に約 60 株の脱窒菌を分離した。

分離株を 16S rRNA 遺伝子に基づき分類した。

#### (5) $N_2O$ 分析

$N_2O$  の分析にはガスクロマトグラフを用いた。分析条件は一般に用いられている条件とした

### 4. 研究成果

本研究期間内で、作物体での  $N_2O$  発生スポットを特定し、そこで機能する脱窒菌を分離することに成功した。具体的に以下に述べる。

研究を開始するにあたり、キャベツ残さで  $N_2O$  が発生するホットスポットを特定することが最重要である。そこでまずモデル実験を行った。その結果、培養5日後に葉の一部が腐敗し始め、同時に  $N_2O$  が発生し始めた。そこでピンポイントガス採取装置を用いて葉のどこから  $N_2O$  が発生しているのか調べたところ、同じ葉でも健全部分より腐敗部分で高い  $N_2O$  発生が認められた。以上から、葉の腐敗部分が  $N_2O$  発生スポットであることが示唆された。

上記の結果に基づき、圃場でキャベツを栽培し収穫後の残さの  $N_2O$  発生部位を特定することにした。残さ(腐敗葉)から  $N_2O$  が発生することを従来法で確かめ、ピンポイントガス採取装置を使ってさらに詳しく調べた。その結果、1枚の葉の表面でも場所により  $N_2O$  の発生量は異なることが分かった。またその量は葉の変色具合や部位(先端・根元など)とは無関係であった。

次に腐敗葉から実際に脱窒菌を分離することにした。モデル実験を行い、 $N_2O$  発生がピークを迎えた時点で葉の部位別に  $N_2O$  を測定し、最も盛んに発生している部位を突き止めた。その部位から微生物画分を得た。この画分を使って培養と脱窒活性の測定を繰り返し、脱窒菌を分離した。分離株は全部で約 60 株得られ、それらは5属に分かれた。また脱窒活性は菌株によって異なった。

これまでに蓄積された農耕地での  $N_2O$  発生に関する知見は、施肥や降雨など土壌環境の影響に焦点が絞られている。本研究で得られた成果はこれまで見過ごされてきた「作物体における脱窒と  $N_2O$  発生」についての知見となる。また植物病原菌以外にはほとんど不明である作物体の常在菌が  $N_2O$  発生に関与していることを強く示唆する結果を得た。

今後は分離した脱窒菌の代謝系を明らかにする。また脱窒からの  $N_2O$  発生に重要な酸素濃度の影響や電子供与体・電子受容体の種類や量あるいは微生物同士の相互作用を明らかにして、作物残さでの脱窒と  $N_2O$  発生が起こる仕組みを明らかにする。

### 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 1件)

Tomoyasu Nishizawa, Yusuke Uei, Kanako Tago, Kazuo Isobe, Shigeto Otsuka, Keishi Senoo. Taxonomic composition of denitrifying bacterial isolates is different among three rice paddy field soils in Japan. *Soil Science and Plant Nutrition*, 査読有り, 59, 2013, 305-310, DOI

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[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  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

多胡 香奈子 (TAGO Kanako)

(独) 農業環境技術研究所・生物生態機能研  
究領域・任期付研究員

研究者番号：20432198

##### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：