

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25281059

研究課題名(和文) 農地からのCH<sub>4</sub>とN<sub>2</sub>O放出に関わる微生物プロセスの解明と削減技術の確立研究課題名(英文) Microbial processes in emission of CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O from crop fields and reduction method

研究代表者

杉山 修一 (Sugiyama, Shuichi)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：00154500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：農地から放出される強力な温室効果ガスのメタンと亜酸化窒素は、地球温暖化防止のために削減することが求められている。メタンは主に水田から、亜酸化窒素は畑地から土壌微生物の反応を通じて放出される。本研究では、水田を畑地条件に交互に変換することで、メタン生成菌と亜酸化窒素放出に係わる微生物活動を抑える可能性を検討した。その結果、(1)水田を畑地にすることでこのメタン生成菌の活動が大きく抑制されメタン放出は抑制されること、(2)水田2年目に入ると菌の活動は再び活性化しメタン放出量も元に戻ることがわかり、水田-畑作の定期的な転換がメタン抑制に効果があるという結論に達した。

研究成果の概要(英文)：Crop field is one of the major sources for the emission of the two greenhouse gases CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O. CH<sub>4</sub> is produced by methanogenic archaea in anaerobic paddy soil, while N<sub>2</sub>O is emitted through microbial metabolic processes of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. In this study the effects of the land change between paddy and arable field on soil microbial processes involved into CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emission were examined. The land change restricted the activity of methanogenic archaea and resulting release of CH<sub>4</sub> from paddy. However, the activity recovered in the second year of paddy cropping. The land change also restricted the activity of microbes involved into NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> metabolism. These results indicate that land change between paddy and arable field is effective to reduce the emission of greenhouse gases from farm lands.

研究分野：環境農学

キーワード：メタン 温暖化防止 水田 微生物

## 1. 研究開始当初の背景

(1)CO<sub>2</sub> に次ぐ強力な温室効果ガスのメタン(CH<sub>4</sub>)と亜酸化窒素(N<sub>2</sub>O)はそれぞれ CO<sub>2</sub> の 25 倍, 298 倍の温室効果をもつため, 排出量に比べ全温室効果に占める割合は 20%, 8%と高く, これらガスの排出削減は温暖化防止に対する実質的な貢献となる。CH<sub>4</sub> も N<sub>2</sub>O も農地が大きな放出源となっている。CH<sub>4</sub> は嫌気条件下にある水田でメタン菌(古細菌)により生成され, N<sub>2</sub>O は化学肥料由来のアンモニア(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)の酸化と硝酸(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)の脱窒に関わる多くの微生物の複雑な反応過程で生成される。

(2)近年, DNA を利用した分子生態学的手法の急速な発展は, これまで難しかった土壌微生物群集の解析を可能にした。水田でのメタン生成遺伝子(*mcrA*)のコピー数や特定のメタン生成菌種の割合から水田の CH<sub>4</sub> フラックスを推定できることが明らかになってきた(図1)。また, 土壌中でアンモニア酸化や硝酸の脱窒に関わる窒素代謝関連遺伝子も解明されており, 水田や畑地における CH<sub>4</sub> や N<sub>2</sub>O の放出に係わる微生物の動態を DNA から解析することで, 農地からの温室効果ガス放出の実態が理解できるようになってきた。

(3)現在, 日本では米の供給過剰のため 1/3 の水田が減反により畑に転作されているが, 多くの農家は畑と水田を固定して栽培している。したがって, 全国的に水田転作畑の固定栽培を転換栽培に変えることで, 農地からの CH<sub>4</sub> と N<sub>2</sub>O の大幅な削減が可能になることが予想される。

## 2. 研究の目的

(1) 水田後作に畑作として大豆等を栽培することで, 土壌が還元条件から酸化条件に大きく変化する。メタン生成反応や N<sub>2</sub>O を生成す

る脱窒反応は酸素の欠乏した嫌気条件下で起きるため, 土壌の酸化-還元条件の変動は CH<sub>4</sub> と N<sub>2</sub>O 生成にかかわる微生物群集の組成に大きな影響を与えることが予想される。しかし, 水田-大豆転換栽培での CH<sub>4</sub> や N<sub>2</sub>O の放出がどのように変化するかについて知見は少ない。そこで, CH<sub>4</sub> や N<sub>2</sub>O 生成・分解に関与するプロセスを関連遺伝子の動態を解析することで, 水田-大豆転換栽培における CH<sub>4</sub> と N<sub>2</sub>O の放出変化予測と, 農地からの温室効果ガス削減についての方策を検討する。

(2)これまでのリボソーム RNA 遺伝子の制限

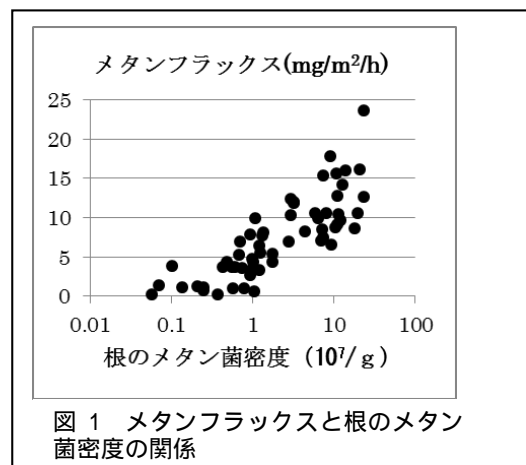


図1 メタンフラックスと根のメタン菌密度の関係

酵素断片長(T-RF)研究から, 水田に棲息するメタン生成菌は 9 種ほど知られているが(表1), そのうち根に棲息するメタン生成菌, *Methanocella paludicola* (392bp)が水田からのメタン放出量に密接に関係することが知られている。メタン生成菌の群集組成を DNA 配列から解析することで, この種の水田土壌における動態を明らかにし, 水田からのメタン放出削減の知見を得る。

## 3. 研究の方法

(1)東北農業研究センター(盛岡)内に設けられた 19 年目の連作田区と 6 年間の大豆栽培後に転換された 1 年目, 2 年目の水田において調

査を行った。メタン放出とメタン生成菌の関係を調査した。土壌とイネの根のサンプリングは田植え後、約2週間間隔(7, 19, 34, 49, 60, 75, 92日目)で合計7回行った。生育期中の中干しは行わなかった。イネ株間の中間点から土壌と根を採取し、DNAの抽出を行った。DNA抽出後、特定のプライマーを使いPCR増幅した後、メタン菌群集構造をT-RFLP法により、メタン菌及びメタン酸化菌数の動態をリアルタイムPCRにより調べた。これまでの研究から制限酵素断片長 base pair(bp)とメタン菌種の関係は表1の通りである。また、土壌中に存在する各機能遺伝子

表1 DNA断片長(bp)と該当種

base pair	identification
75	Rice cluster 5
83	<i>Methanomicrobiaceae</i>
92	<i>Methanobacteriaceae</i>
185	<i>Methanosarcinaceae</i>
283	<i>Methanosaetaceae</i>
392	<i>Methanocella paludicola</i> Rice cluster 1
738	Rice cluster 4
780	Unknown
792	Rice cluster 4 or Group1.1b

のコピー数を定量した。用いた機能遺伝子はメタン生成遺伝子として *mcrA*、硝酸還元遺伝子として *narC*、鉄還元遺伝子として *Geobacter* 属の 16sRNA 遺伝子、硫酸還元遺伝子として *dsrAB*、メタン酸化遺伝子として *pmoA* と *mmo* を用いた。

(2)土壌の窒素代謝に係わる微生物プロセスの研究は、青森県北津軽郡中泊町で水田-大豆転換栽培を営む農家の圃場で行った。この圃場では昭和57年より2年ごとに水田-大豆畑と交互に転換栽培が行われており、化学肥料は一切投与されていない。また、化学肥料なしでの水田連続栽培と、化学肥料を用いるコ

ムギ連続栽培等も行なわれている。調査した試験区は水田から転換後の大豆1年目区、大豆2年目区、畑から転換後の水田1年目区、水田2年目区、比較として水田連作区、コムギ連作区の計6地点である。6月6日、7月1日、7月29日、9月21日の計4回、各地点3反復で土壌のサンプリングを行った。土壌はサンプリング用のコアを用いて表層から5cm分採取し、サンプルの一部(生重で5g程度)はDNA抽出用として-25℃で、残りは化学分析用として4℃で保存した。

#### 4. 研究成果

(1)水田連作区土壌では、メタン放出関係する392bpの割合は転換1年目、2年目区と比べて高かった。この差は田植え後60日以降(出穂期)さらに拡大した。図2から1年目水田土壌では、*Methanosarcinaceae* (185bp)の割合が8割近くを占め、水田転換2年目水田ではこの種の割合が低下し、連作水田にメタン菌群集の組成が類似してきた。このことから、畑作転換は土壌のメタン菌群集組成を大きく変えるが、水田2作目で急速に水田本来の構造に戻ることが分かった。

(2)図2から根のメタン菌ではメタン放出に

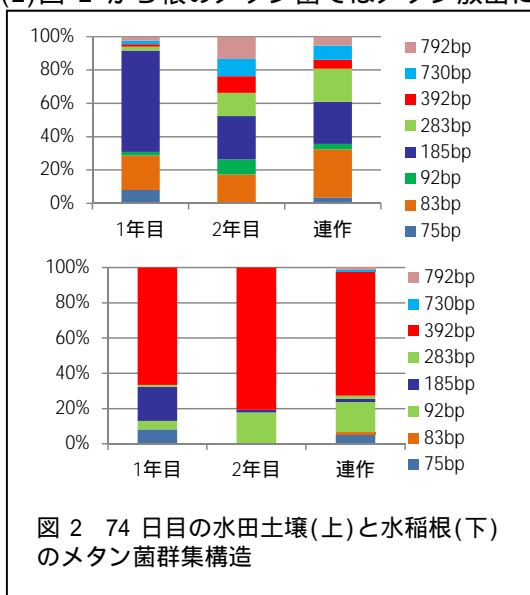


図2 74日目の水田土壌(上)と水稲根(下)のメタン菌群集構造

関係する 392bp の割合が土壌より高くなった。転換 2 年目及び連作水田の根における 392bp の割合は田植え後 34 日目ですでに 2 割を占め、92 日目には 8 割を占めるに至った。転換 1 年目の水田では、392bp の割合は 4 割程度にとどまり、畑作転換の効果が現れた。

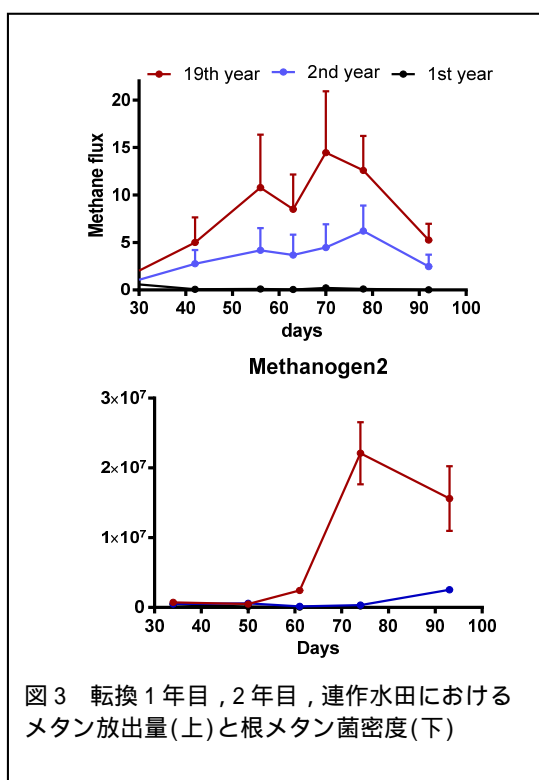


図3 転換1年目,2年目,連作水田におけるメタン放出量(上)と根メタン菌密度(下)

(3)図3からリアルタイムPCRから推定された水田土壌のメタン菌数は稲の生長期間を通じて連作区が転換後1年目,2年目水田より多かったが,34日目以降は差が縮小した。メタン放出は,19年目の水田区では転換1年目水田より圧倒的に多かったが,土壌のメタン菌数の差はメタン放出量の差を反映するほど大きくはなかった。一方,根のメタン菌数は,連作区は移植75日目まで増え続けた一方,転換1年目と2年目では生育時期を通して低水準( $1.69 \times 10^5$ から $5.9 \times 10^5$ 遺伝子コピー数)で推移した。根のメタン菌数の変化は75日目までのメタン放出の変化とよく対応していた。水田転換後1年目,2年目でメタン放出の抑

制の主要な原因は,畑作転換によりメタン放出能力を持つ菌種(392bp)の割合が低下し,かつ全メタン菌密度の増加が水稻根で抑えられていることによると考えられる。

(4) 水田-畑作転換試験区の土壌微生物群集は水田-大豆転換区、水田連続区、コムギ慣行区の大きく3つに分かれ、Monte-Carlo検定によりこれらは有意に分かれる結果となった( $P < 0.01$ )。また各群集と土壌化学性、硝化・脱窒微生物との影響を見てみると、水田-大豆転換区は $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ の、水田連続区は脱窒微生物の、コムギ慣行区は硝化微生物と土壌pHの影響が特に強いことが示された。さらに硝化・脱窒微生物に注目してみると、硝化微生物の影響はコムギ慣行区 > 水田-大豆転換区 > 水田連続区の順に大きいのに対し、脱窒微生物の影響は水田連続区 > 水田-大豆転換区 > コムギ慣行区の順とその傾向は逆になり、どちらも転換区ではその影響が中間になることがわかった。また、リアルタイムPCRで測定した硝化微生物(*amoA*)の量は、7月1日以降はコムギ慣行区 > 水田-大豆転換区 > 水田連続区というような顕著な傾向を示した( $P < 0.001$ )。一方脱窒微生物(*narG*, *nirS*, *cnorB*, *nosZ*)の量は、サンプリングの初めの段階では地点間での有意差は見られなかったが、最終的に9月21日にはいずれの遺伝子でも水田連続区 > 水田-大豆転換区・コムギ慣行区というような傾向を示した( $P < 0.001$ )。これらのことから、水田から畑作の転換により窒素代謝に係わる微生物群が脱窒から硝化作用に移行することが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文

[雑誌論文](計4件)

Fraser L.H., J. Pither, Sugiyama S.他

63 名 55 番目. Worldwide evidence of a unimodal relationship between productivity and plant species richness. *Science*. 349: 302-305, 2015. (査読あり)

Okubo A., Matusaka M. and Sugiyama S. (2016) Impacts of root symbiotic associations on interspecific variation in sugar exudation rates and rhizosphere microbial communities: a comparison among four plant families. *Plant and Soil* 399: 345-35. (査読あり)

細谷啓太・杉山修一 (2016) 北日本の無施肥栽培における水稻収量の地域間変異とその寄与要因. *日本作物学会記事* 85: 266-273. (査読あり)

Hosoya K. and Sugiyama S. (2017) Weed communities and their negative impact on rice yield in no-input paddy fields in the northern part of Japan. *Biological Agriculture & Horticulture*. (Online) DOI: 10.1080/01448765.2017.1299641 (査読あり)

[学会発表] (計5件)

安達陽一, 杉山修一: 地力とは何か? - 地力の生態学的解析-. *日本生態学会第63回大会*. (仙台市), 2016年3月20日.

細谷啓太, 杉山修一: 無肥料無農薬水田における雑草群集構造の決定要因. *日本生態学会第63回大会* (仙台市), 2016年3月20日

細谷啓太, 劉 広成, 杉山修一: 収量性が異なる長期無施肥水田の窒素循環. 日

本作物学会第240回大会. 長野, 2015年3月30日.

細谷啓太, 杉山修一: 東日本16無肥料水田における収量差の解析. *日本作物学会第239回講演会*. 藤沢, 2015年3月28日. 杉山修一, 劉広成: 日本の水田におけるメタン生成菌の群集構造の空間パターン. *環境微生物系学会合同大会2014*(浜松市) 2014年10月23日.

[図書] (計1件)

Zabed H. and S.Sugiyama: Seasonal variation of soil microbial communities in semi-natural and improved grassland in northern Japan. In "Grassland biodiversity and conservation in a changing world" (eds. Mariotte P and Kardol P) p51-68. Nova Science Publishers Inc. 2014. (査読あり)

[産業財産権]

なし

6. 研究組織

研究代表者

杉山修一 (SUGIYAMA Shuichi)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号: 00154500