

学 位 論 文 要 旨

Azoarcus sp. KH32C 株を利用した水稻栽培におけるメタン排出に関する研究 Methane emission from paddy rice cultivation with *Azoarcus* sp. strain KH32C

環境資源共生科学専攻 環境保全学大講座

迫田 翠

水田は温室効果ガスの一つであるメタンの主要な排出源のため、水田由来メタンの排出量削減が課題となっている。水田から発生するメタンは嫌氣的有機物分解の過程で土壌中のメタン生成古細菌により生成され、そのメタンはメタン酸化細菌により好氣的に消費される。イネと相互作用する *Betaproteobacteria* 綱 *Azoarcus* sp. KH32C 株をイネ種子に接種して栽培することでイネ根域土壌の微生物群集構造が変動するため、水田土壌の物質循環に影響を及ぼすことが示唆された。本研究では、KH32C 株を接種したイネを栽培する水田のメタン排出およびそのイネ根域土壌のメタン生成・消費に関わる微生物群集を調査した。

イネ種子（日本晴）を浸種・催芽後、KH32C 株を接種したイネ種子と無接種のイネ種子を約 3 週間育苗し、窒素施肥（8N）区と窒素無施肥（0N）区の水田圃場にそれぞれ移植して栽培した。湛水期間中の土壌水の溶存メタン濃度、溶存有機炭素（DOC）濃度、二価鉄濃度を測定した結果、各項目ともイネ栽培の経過とともに増加する傾向にあった。湛水期間中の水田由来メタンの排出量は 72 days after transplantation（DAT）以降増加し、KH32C 株をイネ種子に接種して栽培した水田においてメタン排出量が低下した。落水直前の 100 DAT における積算メタン排出量（測定期間中の総メタン排出量の推定値）は、0N 区および 8N 区のそれぞれの無接種栽培区と比較して KH32C 株接種-0N 区で 23.5%、KH32C 株接種-8N 区で 17.2%減少した。

イネの生育は土壌への有機物供給に影響を及ぼすことから、イネのバイオマスおよび収量を調査した結果、両項目とも窒素施肥により増加し、総メタン排出量あたりの収量は KH32C 株接種栽培区において無接種栽培区より増加した。

さらに、KH32C 株接種栽培区では外観品質により分類した玄米の整粒割合も向上し、青未熟粒の割合が減少した。イネ根域土壌の全炭素・全窒素量を分析した結果、KH32C 株接種栽培区において全炭素量（54 DAT）と全窒素量（54 DAT と 89 DAT）が無接種栽培区より増加（ $p < 0.05$ ）したことから、土壌への有機物の蓄積が推察された。

イネ根域土壌のメタン生成・酸化微生物群集の動態を評価するため、イネ根域土壌から RNA を抽出し、メタン生成古細菌が保有するメチル補酵素 M 還元酵素 α サブユニット遺伝子（*mcrA*）およびメタン酸化細菌が保有する膜結合型メタンモノオキシゲナーゼ β サブユニット遺伝子（*pmoA*）の定量的逆転写 PCR アッセイおよび *mcrA* と *pmoA* のアンプリコンシーケンス解析を行った。土壌 cDNA 中の *mcrA* のコピー数はイネの生育段階により変動し、77 DAT で最も多く、次いで 89 DAT で多かった。一方、*pmoA* のコピー数の顕著な変動はなかった。*mcrA/pmoA* のコピー数比は、無接種 -0N 区より KH32C 株接種 -0N 区で大きく、無接種 -8N 区より KH32C 株接種 -8N 区で小さかった。アンプリコンシーケンス解析から、転写発現している *mcrA* および *pmoA* を操作的分類単位（OTU）で分類し、アミノ酸配列に基づく系統解析から優占する 9 OTU を属レベルでそれぞれ同定した（*mcrA*, OTU01m–OTU09m; *pmoA*, OTU001p–OTU007p, OTU010p, OTU011p）。同定した *mcrA* および *pmoA* の OTU の転写発現割合は、イネの生育段階、窒素施肥、KH32C 株接種により変動することが示された。*mcrA* では、嫌氣的メタン酸化 *Ca. Methanoperedens* 属古細菌に近縁と同定された OTU05m と OTU07m は 27 DAT で最も高い相対存在量を示し、一方 *pmoA* では、Type II メタン酸化 *Methylocystis* 属細菌に近縁と同定された OTU001p がサンプリングした全ての生育段階において優占した。

以上の結果に基づく相関分析から、メタンフラックスはイネのバイオマス、土壌水の溶存メタン濃度、DOC 濃度、二価鉄濃度、*mcrA* のコピー数、*mcrA/pmoA* 比と正の相関を示し、イネのバイオマス増加と土壌還元の進行に伴ってメタン排出が増加するメカニズムが推察された。また、*mcrA* の OTU01m (*Methanoregula* 属)、OTU02m (*Methanothrix* 属) および *pmoA* の OTU004p、OTU005p (Type I メタン酸化 *Methylococcaceae* 科) の相対存在量はメタンフラックスと正の相関を示した。これら高い相対存在量の OTU は生育段階および施肥条件により増減したが、KH32C 株接種栽培区ではそれらの OTU は減少傾向であった。よって、KH32C 株接種栽培区における低メタン生成・高メタン酸化の微生物群集構造への変動がメタン排出低減に寄与したと推察される。

本研究の結果から、KH32C 株は水田由来メタンの排出低減に有用であることが示された。KH32C 株–イネ植物間相互作用機序の解明により、土壌物質循環機能を担う微生物生態系の制御技術への応用が期待される。