

## 下水処理水を地下灌漑した水田における温室効果ガス排出に関わる土壤微生物の解析

山形大学大学院農学研究科	正会員○宮澤 優彰
岩手大学大学院連合農学研究科	非会員 Phung Duc Luc
山形大学農学部	正会員 西山 正晃
山形大学農学部	非会員 Pham Viet Dung
山形大学農学部	正会員 渡部 徹

## 1. はじめに

我々の研究グループでは、下水処理水を用いた水稻栽培を実施し、これまでに、窒素、リン酸、カリの肥料を全く与えない条件で、タンパク質が豊富で飼料として価値の高い、飼料用米の栽培に成功している<sup>1)</sup>。また、下水処理水の地下灌漑が、地表灌漑と比較して、飼料用米の収量を増加させることが確認できた。さらに、2018年度に行った我々の先行研究では、下水処理水の地下灌漑が、一般的な水田と比較して、水田からの温室効果ガス（メタン、亜酸化窒素）の排出量を抑制することを確認している<sup>2)</sup>。

本研究では、この先行研究で下水処理水を地下灌漑した水田から採取した土壤サンプルを用いて、16SrRNA 遺伝子にもとづく定量 PCR (qPCR) および微生物群集構造解析を行い、水田での温室効果ガスの生成に関わる微生物群集が、下水処理水の灌漑によってどのように変化するかを明らかにすることを目的とした。

## 2. 方法

## 2. 1 実験の概要

山形大学農学部キャンパス（鶴岡市）の敷地内において、2019年5月から10月にかけて、水田模型（縦30cm、横60cm、高さ36cm）を用いた飼料用米「べこあおば」の栽培試験を行った。

試験区では、標準活性汚泥法が採用された鶴岡市浄化センターの下水処理水を用いた地下灌漑を行った。苗移植後から30日目までは8.3L/m<sup>2</sup>、31日目から108日目までは25L/m<sup>2</sup>、109日目から収穫期までは8.3L/m<sup>2</sup>の下水処理水を毎日灌漑した。

対照区では、化学肥料（基肥：160kg N-K<sub>2</sub>O/ha、追肥：100kg N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O/ha）を施用し、毎日湛水深が5cmになるように水道水を地表灌漑した。試供土壌は、山形大学農学部附属高坂農場の水田圃場から採取した。試験区、対照区とも苗移植後から43～52日の間に中干しを行った。

## 2. 2 サンプリング

土壌は、土壌コアサンプラー（直径1.5cm、長さ15cm）を用いて、苗移植前、中干し前、中干し後、穂ばらみ期、出穂期、収穫期（苗移植からそれぞれ0、43、52、64、107、126日後）の計6度、水田土壌の上層（酸化層：0～1cm）と下層（還元層：12～15cm）のそれぞれから採取した。

ガスの採取は、水稻生育期間を通して週に1度、中干し期間中は2日に1度、午前10時から11時にかけて行った。

## 2. 3 分析方法

水田から発生するメタンと亜酸化窒素は、各系列の水田模型をアクリル製チャンバーで覆い、その中の空気を経時的に回収し、ガスクロマトグラフ（Shimadzu GC-2014）を用いて排出量を測定した。

採取した土壌のDNAは、Dneasy PowerSoil kit (MP Biomedicals)のマニュアルに従って抽出した。その後、16SrRNA 遺伝子にもとづくqPCRおよび群集構造解析を行った。

qPCRは、ハイブリダイゼーション法であるTaqMan Probe法を採用し、CFX96 Touch Real-Time Detection System (Bio-Rad)で行った。プライマーとプローブは、細菌にはNadkarniら(2002)<sup>3)</sup>、古細菌にはYuら(2005)<sup>4)</sup>によって設計されたものを使用した。反応液の組成は、細菌、古細菌ともSso Advanced Universal Probes Supermix (Bio-Rad) 12.5μL、ヌクレアーゼフリー水 10.75μL、Fプライマー0.25μL、Rプライマー0.25μL、テンプレートDNA 1μLとした。反応条件は、細菌では、50°C2分、95°C10分の後、95°C15秒、60°C1分を30サイクル<sup>3)</sup>とした。古細菌では、95°C10分の後、95°C20秒、60°C1分を40サイクル<sup>4)</sup>とした。

微生物群集構造解析のためのアンプリコンの作成および次世代シーケンサーMiseq (illumina)を用いたシーケンス解析は、株式会社FASMACに委託した。そこで得られた配列情報は、キメラ配列を除去した後に、群集構造解析ソフトウェアQiime ver 1.9を使用して、97%以上の相同性でOTUにクラスタリングした。その後、既存のデータベース (Green genes) と照合し、土壌中の細菌・古細菌群集の構成を明らかにした。

キーワード：下水処理水、飼料用米、温室効果ガス、16SrRNA 遺伝子、群集構造解析

住所：山形県鶴岡市若葉町 1-23, Email: to-ru@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

### 3. 結果及び考察

#### 3. 1 水田からの温室効果ガスの排出

図1に、各系列の水田からのメタンと亜酸化窒素の排出量を示す。水稻生育期間を通して、水田からのメタンと亜酸化窒素の排出パターンは、試験区と対照区で類似していた。メタンは、穂ばらみ期（64日目）以降に大幅な変動がみられ、出穂期（86日目）にピークに達した。亜酸化窒素は、苗移植後から約1ヵ月後（0-28日目）までに大幅な変動がみられ、試験区では苗移植後0日目、対照区では7日目にピークに達した。対照区と比較して試験区では、水稻生育期間を通して、メタン排出量は79.5%、亜酸化窒素排出量は58.3%削減された。

#### 3. 2 メタン生成に関わる微生物の構成（属レベル）

メタン生成菌は、嫌気的条件下で有機物を還元し、メタンを生成する偏性嫌気性の古細菌である。本研究では7属のメタン生成菌が検出された（図2）。実験水田では、穂ばらみ期以降にメタン排出量が大きく増加したが、メタンが生成される土壌下層において、メタン生成菌の存在量も同様の傾向を示した。*Methanolinea* 属以外のメタン生成菌の存在量は、メタン排出量と強い相関があり、これらのメタン生成菌がメタン生成に関与していることがうかがわれる。

穂ばらみ期以降の水田土壌では、一般にメタン生成に必要な有機物として光合成産物、根からの滲出物、植物残渣が増加する。試験区では、下水処理水灌漑により水稻の葉緑素（SPAD値）が高いレベルに保たれるため、穂ばらみ期以降の稲の老化が遅れ、根の滲出および腐敗の速度を減少させる。土壌中の有機物量が対照区よりも不足することが、メタンの生成が減少する原因と考えられる。

#### 3. 3 亜酸化窒素生成に関わる微生物の構成（科レベル）

水田土壌での亜酸化窒素の生成過程は2通りあり、その結果、硝化では副産物、脱窒では中間生成物として、それぞれ硝化菌と脱窒菌によって生成される。亜酸化窒素は苗移植後から約1ヵ月後（0-28日目）までに排出量が高い値を示していたが、その排出量は、硝化菌の構成や存在量と関連がなかった。脱窒菌は非常に多様であるが、本研究では先行研究<sup>5)</sup>において、水田での亜酸化窒素の発生に積極的に関与していた *Neisseria* 目、*Rhodocyclus* 目、*Burkholderia* 目の3目に着目した。その結果、亜酸化窒素が生成される土壌下層において *Burkholderia* 目 *Oxalobacter* 科に分類される細菌の割合が唯一、亜酸化窒素排出量と同様の变化を示しており、この *Oxalobacter* 科の細菌の関与がうかがわれる。試験区と比較して、対照区で亜酸化窒素排出量が増加した理由は、化学肥料を基肥として与えたことで、苗移植直後の水田土壌中の硝酸・亜硝酸の蓄積量が増え、脱窒反応が促進された結果であろう。

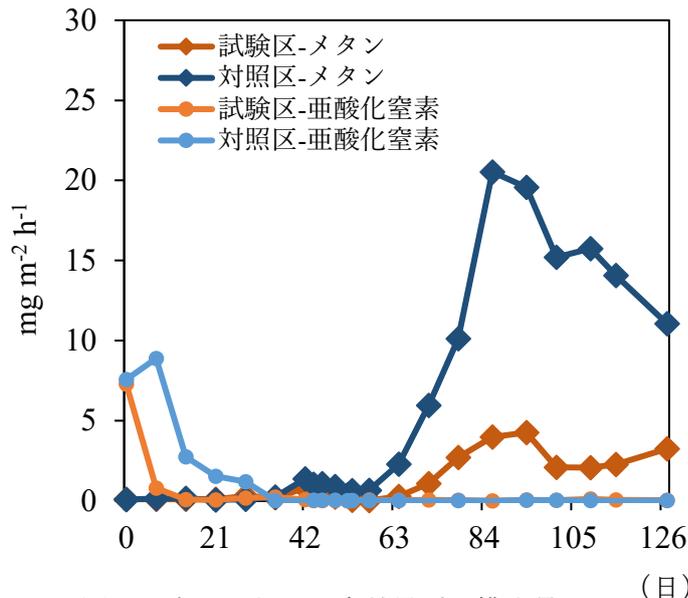


図1. 水田からの温室効果ガス排出量

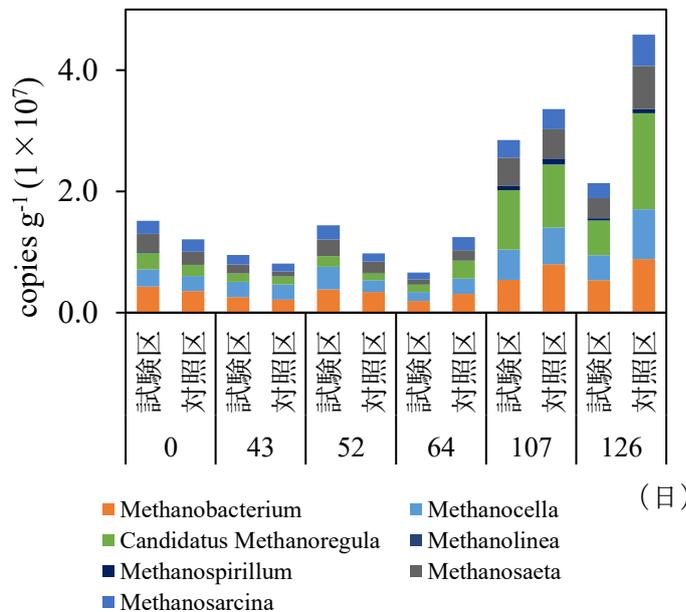


図2. 土壌下層におけるメタン生成菌の存在量

#### 参考文献

- 1) 渡部ら, 土木学会論文集 G (環境), 72(7), III\_505-III\_514, 2016
- 2) Phung et al., Scientific Reports, 10, 5485, 2020
- 3) Nadkarni et al., Microbiology, 148, 257-266, 2002
- 4) Yu et al., Biotechnology and Bioengineering, 89(6), 670-679, 2009
- 5) Yoshida et al., Microbes and Environments, 27, 456-461, 2012