

# 水田・低湿地における温室効果ガス（メタン）の 生成・分解のメカニズムに関する研究

Mechanism on methane formation and oxidation in paddy and wetland fields

研究代表者 千葉大学園芸学部生物生産科学科教授 犬伏和之  
Prof., Division of Bioproduction Science, Faculty of Horticulture, Chiba University  
Kazuyuki Inubushi

共同研究者 名古屋大学農学部応用生物科学科教授 木村真人  
Prof., Department of Applied Biological Sciences, School of Agricultural Sciences, Nagoya University  
Makoto Kimura

京大大学生態学研究センター助教授 杉本敦子  
Assoc. Prof., Center for Ecological Research, Kyoto University  
Atsuko Sugimoto

Methane is one of the greenhouse gases, of which atmospheric concentration is increasing rapidly and may induce global warming. Paddy fields and natural wetlands are both important sources of biogenic methane. In this study, mechanisms of methane formation and oxidation were investigated cooperatively by soil microbiological/biochemical methods and biogeochemical methods. The first part of the present study focuses population dynamics of methane producing bacteria, methanogens, by MPN method. Methanogens were estimated in the range of  $10^5 \sim 10^6$ /g soil through the rice cropping season. Methanogenic activity was positively correlated with methanogenic population only in peat soil. Then, aerobic methane oxidation in paddy soil was found both during and after the cropping season, especially at rice root zone. In the second part, anaerobic methane oxidation was confirmed in paddy soils. Microorganisms responsible for it were incubated to be manganese reducers and sulfate reducers. From the determination of ether lipids from methanogens in a waterlogged paddy soil, methanogens were estimated to be  $10^7 \sim 10^8$ /g soil which was higher order than those estimated by MPN method and shifted from  $H_2$ -utilizing forms to acetate-utilizing forms with incubation time. In the third part, GC/GC/C/IRMS system was developed for determining low concentration of stable isotopic C. By using this system, methane emission from temperate sphagnum peat bog was observed and found that the rate of methane emission depends on the type of vegetation. The difference in the rate of methane emission was caused by the quality (decomposability) of the organic matter. Carbon isotopic composition of methane suggested that methane was oxidized in water, however, oxidation of methane in the emission process is insignificant, because the rate of methane production is high enough to transport methane by bubbling and through plants.

メタンは強力な温室効果ガスであり、その急速な大気濃度上昇が地球温暖化の一因になると懸念されている。本共同研究ではその主な発生源である水田と自然湿地に焦点を絞り、生成メカニズムを微生物学的及び地球化学的視点から明らかにするとともに、メタン酸化にも着目してメタン放出制御の基礎的知見を得ることを目的とした。

水田および自然湿地ともにメタンは絶対嫌気性細菌、メタン菌によって生成されるがその生態は十分

解明されていない。一方、生成されたメタンの一部は大気へ放出される前に好気性または嫌気性細菌によって酸化される可能性があるが、その割合や変動要因は明らかではない。本研究では、まず水田および湿地土壌中でのメタン生成機構とくにメタン生成菌の生態と生成支配因子を解明し、ついでメタン酸化の機構とメタン放出量との関係を明らかにするための室内実験および現地調査を行った。本報告書では、各分担課題ごとに、その目的・経過・成果・課

題と発展を記述することにする。

## 1. 水田土壌中のメタン生成菌数および好氣的メタン酸化

1. 1 研究目的 水田土壌中に棲息する絶対嫌氣性細菌のメタン生成菌の生態を明らかにする第1段階として、希釈頻度法による菌数が土壌タイプおよび基質（稲わら）添加によって影響されるかを明らかにすることを目的として、水稻を播種した水田土壌ポット系、およびその室内モデル系でメタン生成菌の計数と基質の検討およびメタン放出量の測定を行った。

一方、好氣的メタン酸化菌の活性を調べるためメタン酸化酵素の代替基質であるプロピレンを用いた測定法を検討し、落水以後も含めて酸化の高い部位を調べた。

1. 2 研究経過 代表的な水田土壌としてグライ土、砂質グライ土、泥炭土を供試し、室内実験におけるメタン生成量はガスクロマトグラフィーで、稲藁または緩効性窒素肥料を施用したポット系からの大気へのメタン放出量はチャンバー法で、メタン生成の基質となる酢酸などの有機酸は高速液体クロマトグラフィーでそれぞれ定量し、メタン生成菌数は酢酸を含む培地で希釈頻度法により評価した。

好氣的メタン酸化については、水田土壌試料を封入した瓶内の気相をメタン、プロピレンの混合比を変えて培養し、生成された酸化プロピレンをガスクロマトグラフィーで定量した。

1. 3 研究成果 メタン放出量は水稻栽培や稲藁添加によって増大し、各土壌のメタン生成活性とも対応していた。また生成活性に及ぼす稲藁添加の影響は水稻栽培前半に、また水稻作付けの効果は栽培後半に現れた。一方、メタン生成菌数は各土壌とも栽培期間を通して $10^5$ ・ $10^6$ /gの範囲で推移し、泥炭土ではメタン生成活性や放出量との間に正の相関関係が認められたが（図1）、その他の土壌では明確な関係は認められなかった。また土壌中の有機酸は多くの場合、酢酸が検出されその他の有機酸も微量検出されたが、緩効性窒素施肥区ではまったく検出されなかった。以上の結果から土壌中でのメタン生成菌の生息部位や利用基質が土壌タイプや施肥によって変化するかと推察された。

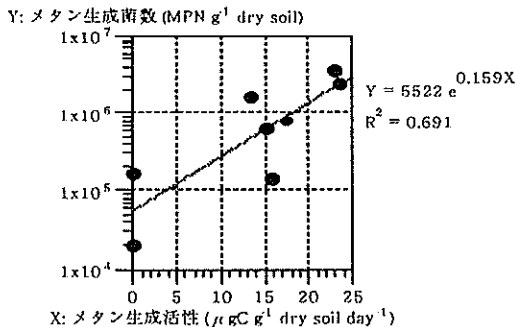


図1 水田土壌中のメタン生成菌数と活性の関係

一方、好氣的メタン酸化については、酸化プロピレン生成が高まる最適ガス混合比と培養時間を決めその活性を測定した結果、泥炭土壌以外で酸化能が検出され、とくに水稻や水田雑草の根圏で高い活性

が見出された。落水後の水田土壌でも、大気中のメタン濃度によっては、それを低下させるだけの好氣的メタン酸化が起こりうることを明らかにした。

1. 4 今後の課題と発展 今回、好氣的メタン酸化が十分検出できなかった泥炭土壌で、実際にどれくらいメタン酸化が起こりうるのか、後述の嫌氣的メタン酸化は起こりうるのかが今後の課題である。熱帯には潜在的には可耕地でありながら強酸性など問題をもった泥炭土壌地域が広がっており、今後の持続的食糧生産を考慮すれば湿地の保全と「賢明な利用」の両立をどう計るかが重要である。

## 2. 水田土壌中の嫌氣的メタン酸化およびメタン生成菌バイオマス

2. 1 研究目的 還元が発達した水田土壌中で生成したメタンは、水稻根圏や作土表層の酸化的部位で好氣酸化されることが知られていたが、近年木村らはメタンの一部が作土還元層や心土中で嫌氣的にも酸化される現象を見いだした。そこで、海洋での知見を参考に各種の酸化剤を添加した還元土壌中に<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>を注入し、<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>の生成から嫌氣的メタン酸化に関与する微生物の動態解析を試みた。

ところで、メタン生成菌は、その生体膜中に古細菌特有のグリセロールエーテル型脂質（以下エーテル脂質とする）を含んでいる。メタン生成菌には酢酸利用型と水素利用型があるが、両者のエーテル脂質組成は異なっており、前者はhydroxyarchaeol (Hy-Ar)およびarchaeol (ArOH)を有し、後者はArOHおよびcaldarchaeol (CAOH)を有している。したがって、3種のエーテル脂質の定量により、環境中におけるメタン生成菌バイオマスとそれに占める酢酸利用型菌と水素利用型菌の割合を見積もることが可能である。しかし、現在までに土壌からエーテル脂質の抽出・分離に成功した例はない。そこで、本研究では、水田土壌中のエーテル脂質定量法について検討した。

## 2. 2 研究経過

嫌氣的メタン酸化：稲わらを混合した福島県農業試験場水田作土を灌水・充填したカラムの下に、各種酸化剤（MnO<sub>2</sub>、Fe(OH)<sub>3</sub>、S、CaSO<sub>4</sub>）を添加した水田作土または同心土を灌水・充填したカラムを連結し、透水実験を実施した。3日毎に下層カラムの下部より浸透水を採取しCO<sub>2</sub>濃度、 $\delta^{13}\text{CH}_4$ を測定するとともに、培養18日目に下層カラム内の土壌を取り出し、無酸素状態として<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>を添加後再度培養し、10、20、30日目に $\delta^{13}\text{CO}_2$ を測定した。

メタン生成菌バイオマス：酢酸利用型メタン生成菌 *Methanosarcina mazei* TMA (DSM9195)と水素利用型メタン生成菌 *Methanobrevibacter arboriphilicus* SA (DSM7056)を培養し、まず、培養液を用いて、各エーテル脂質の分析条件を検討した。次いで、水田土壌（福島県農業試験場）に *M. mazei* TMAを添加して回収率を求めるとともに、福島水田土壌を灌水培養し、Hy-ArとArOHの分析を行った。

## 2. 3 研究成果

嫌氣的メタン酸化：土壌浸透水中のメタン濃度は下層カラムの通過に伴い減少した。特に、下層カラムに硫黄化合物を添加した場合にメタン濃度の減少が顕著であった。この消失が嫌氣的メタン酸化に起因すると判断し、下層カラム下部から採取した浸透水

中の  $\delta^{13}\text{CH}_4$  を測定したが、有為な  $\delta^{13}\text{CH}_4$  値の上昇は認められなかった。そこで、培養後の下層カラム土壌に  $^{13}\text{CH}_4$  を添加しメタン酸化量を測定した結果、メタンの酸化生成物  $^{13}\text{CO}_2$  が検出されたが、オートクレーブ殺菌した土壌では  $^{13}\text{CO}_2$  が検出されなかったことより、本過程が生物的過程であると判断された(図2)。

なお、 $^{13}\text{CH}_4$  添加実験でも  $\text{MnO}_2$  や硫酸塩を添加した処理区で  $^{13}\text{CO}_2$  生成量の増加が観察され、メタン酸化活性は  $8 \times 10^3 \mu\text{L}/\text{日}/\text{g}$  土壌以上と評価された。本酸化活性は先の実験で消失したメタン量のわずかに1.2%に相当し、 $\delta^{13}\text{CH}_4$  値の上昇が検出されなかった理由が明らかとなった。

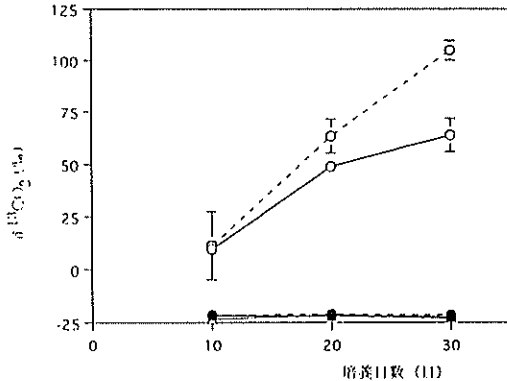


図2 酸化剤無添加区における  $\delta^{13}\text{CO}_2$  値の変化

● 作土  $^{13}\text{CH}_4$  無添加    △ 心土殺菌区  
 ○ 心土  $^{13}\text{CH}_4$  無添加    ● 作土  $^{13}\text{CH}_4$  添加区  
 ▲ 作土殺菌区    ○ 心土  $^{13}\text{CH}_4$  添加区

メタン生成菌バイオマス：エーテル脂質は、酸性Bligh&yer液により抽出し、マイルドアルカリメタノリシス、HF分解およびマイルド酸性メタノリシスを行った後、9-アントロイルニトリルで蛍光標識し、Sep-Pak C18カートリッジを用いてクリーンアップして、逆相カラムを用いたHPLCにより分析した。その際、Bligh&yer液の組成、抽出回数、抽出後の洗浄液、9-アントロイルニトリルの添加量、クリーンアップの際の洗浄液の組成について検討を行った結果、最終的に土壌に *M.mazei* TMA を添加した際の回収率はほぼ100%となった。湛水土壌中の  $\text{Hy-Ar}$  と  $\text{ArOH}$  の分析結果から、メタン生成菌は  $10^7 \sim 10^8$  cells/g 存在し、湛水開始後、水素利用型菌群から酢酸利用型菌群への遷移が起こることが明らかとなった(図3)。

2.4 今後の課題と発展 以上の結果より、嫌氣的メタン酸化の現象が明らかとなった。別途、嫌氣的メタン酸化菌の集積培養を行ったが顕著な増殖が認められず、分離・同定に失敗した。今後、嫌氣的メタン酸化菌の分離・同定を再度試み、分離菌を用いた嫌氣的メタン酸化の生化学的機構を解明することを計画している。また、エーテル脂質を指標とした水田・低湿地中の酢酸利用型、水素利用型メタン生成菌バイオマス定量は、これまで疑問がもたれてきたメタン生成菌数の季節変動や施肥に伴う変化を明らかにできると考えられる。しかしながら、実際に利用できるまでには、CAOHの抽出分析条件の検討および死菌体中のエーテル脂質の土壌中での安定性の検討が必要である。

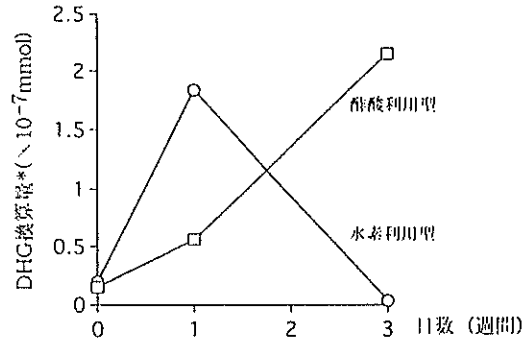


図3 土壌中のメタン生成菌バイオマスの経時変化  
 \*エーテル脂質量を内部標準DHGの量に換算した値

### 3. 低濃度メタン炭素安定同位体比の測定法の開発および泥炭湿地におけるメタン生成と放出

#### 3.1 GC/GC/C/IRMSの開発(図4)

放出されるメタンの安定同位体比はメタンの生成機構と放出過程での酸化により変化する。従って、生成するメタンの同位体比と放出されるメタンの同位体比を比較することにより生成と放出過程を推定することができる。しかしながら、従来のGC/C/IRMSでは、低濃度のメタンを測定することは不可能であった。そこで、バックドカラムのガスクロとキャピラリーカラムのガスクロを連結することにより、低濃度のメタンの炭素同位体比を測定するGC/GC/C/IRMSシステム(Sugimoto, 1996)を開発した。現在、高感度の質量分析計を使って、大気レベル(2ppm)の濃度のサンプル70mlで測定可能である。

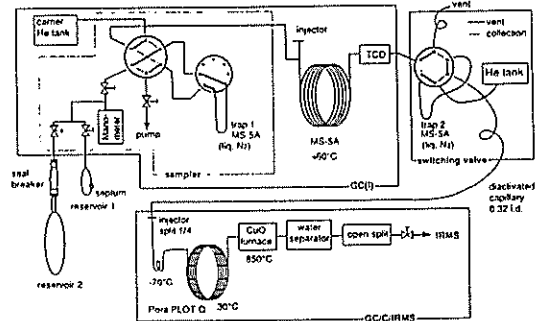


図4 GC/GC/C/IRMSシステムの概要

#### 3.2 温帯泥炭湿地におけるメタン生成と放出

京都市の北部に位置する深泥池において、メタン生成と放出機構を明らかにする目的でチャンパー法によるフラックス観測と放出されるメタンの炭素同位体比の測定を行った。深泥池には泥炭を形成する典型的な植生であるミズゴケ遺体からなる浮島が存在する。ミズゴケからのメタンフラックスは他の植生より小さく、これはミズゴケの植物細胞壁が極めて分解しにくい有機物でできているためである。従って、ミズゴケが優占する湿地はメタンのフラックスが比較的小さい。しかしながら、ミズゴケは極めて貧栄養の水中でのみ生存できる植物で、わずかな

水質の変化によって枯死し他の植物にとって変わられてしまう。その場合、メタンのフラックスは加速度的に増加する事が明らかになった (Sugimoto and Fujita, in press)。このことは将来のメタン放出量を考える場合、高緯度に広がるミズゴケ湿原の水質や水循環が変化すると、気温の上昇によるメタン放出量の増加に加え、植生が変化する事により加速度的にメタン放出量が増大する可能性があることを意味する。

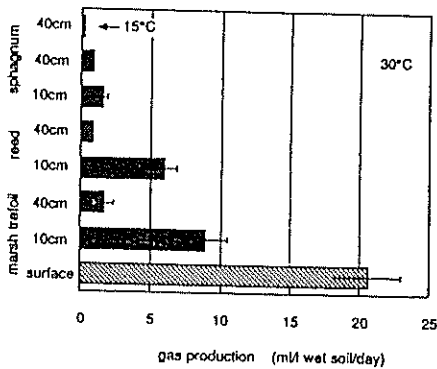


図5 泥炭の培養実験で生成したガス量。ミズゴケ帯、ヨシ帯、ミツガシワ帯のそれぞれで表面、10cm深、40cm深の泥炭を比較した。

また、メタン放出過程での酸化の影響を調べるため、放出されるメタンと気泡中のメタンの同位体比を比較した。その結果、放出されるメタンの同位体比の方が気泡中のメタンと同じか、低いという結果が得られた。このことは、深泥池のような温帯に位置する湿地ではメタン放出量が大きく、放出量に対してメタン酸化が大きくないことを示している (Sugimoto, in preparation)。しかしながら、湿地水中の溶存メタンの炭素同位体比は気泡中メタンや放出されるメタンより高く、水中ではメタンが酸化されている可能性が高い。つまり、メタン放出機構を考えたとき、水カラム経由で輸送されるメタンは酸化を受けるが、メタンフラックス大部分はヨシなどの植物体を経由したもの、あるいは気泡の大気への噴出により輸送されるため酸化による影響が小さいものと考えられる。

### 3. 3 今後の課題

湿地植物にはミズゴケのように極めて分解しにくい細胞壁を持つものや分解の速い水草など様々な植生が存在する。これらの相互関係によりメタンの生成と放出機構が違い、フラックスも変動しているものと考えられる。湿地植生のダイナミクスとメタンフラックスの関係を明らかにすることが将来のメタン生成と放出機構を予測するのに必要であろう。

### 発表論文および参照論文リスト

(印刷中、準備中を含む)

Amnat Chidthaisong, Kazuyuki Inubushi and Iwao Watanabe, 1996: Methanogenic characteristics of flooded rice soils responded to glucose amendment. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 42(3), 645-649.

Amnat Chidthaisong, Kazuyuki Inubushi, Yasuhiko Muramatsu and Iwao Watanabe, 1996: Production potential and emission of methane in flooded rice soil microcosms after continuous application of straw. *Microbes and Environments*, 11(3), 73-78.

Kazuyuki Inubushi, Kenzo Hori, Satoshi Matsumoto and Hidenori Wada 1997: Anaerobic decomposition of organic carbon in paddy soil in relation to methane emission to the atmosphere, 8th International Conference on Anaerobic Digestion (Sendai, May 25-29, Proceedings), Vol. 2, 620-627.

犬伏和之・西野将司 1997: 水田土壌および水稲におけるメタン酸化能の評価, 日本土壌肥料学会講演要旨集, 43, 207.

Syouji Nishino, Kazuyuki Inubushi and Nozomi Hatanaka 1996: Methane formation and oxidation to control emission from paddy soil, International Symposium on Maximizing Sustainable Rice Yields through Improved Soil and Environmental Management (Khon Kaen, Thailand, Nov. 11-17, Proceedings), Vol. 2, p. 813-825.

Jun Murase and Makoto Kimura 1996: Methane production and its fate in paddy fields. IX. Methane flux distribution and decomposition of methane in the subsoil during the growth period of rice plants. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 42(1), 187-190.

Jun Murase and Makoto Kimura 1997: Anaerobic re-oxidation of  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $S^0$  and  $S^{2-}$  in submerged paddy soils. *Biol. Fertil. Soils*, (in press)

Atsuko Sugimoto and Eitaro Wada 1995: Hydrogen isotopic composition of bacterial methane:  $CO_2/H_2$  reduction and acetate fermentation, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 59(7), 1329-1337.

Atsuko Sugimoto 1996: GC/GC/C/IRMS system for carbon isotope measurement of low level methane concentration, *Geochim J.*, 30, 195-200.

Atsuko Sugimoto and Noboru Fujita 1997: Characteristics of methane emission from different vegetations on a wetland, *Tellus* (in press)

Atsuko Sugimoto: Carbon and hydrogen isotopic composition of methane observed in a temperate wetland. (in preparation)

Atsuko Sugimoto: Comparison of carbon isotopic composition of methane among bubble, dissolved and emitted methane. (in preparation)