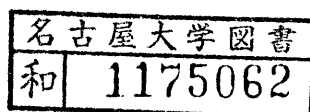


水田土壌におけるメタンの生成とその後の動態に関する  
化学的・微生物学的研究



名古屋大学農学部土壌生物化学研究室  
村瀬 潤

## 目次

第1章	緒言	1
1-1	地球環境問題と水田	1
1-2	水田土壌の還元過程とメタン生成に関する研究	3
1-3	水田からのメタン放出に関する研究	5
1-4	メタン生成菌に関する微生物学的研究	7
1-5	メタン生成環境としての水田	8
第2章	水田土壌で生成したメタンの移行経路の解明	10
2-1	田面水の浸透・稲わらの添加が メタンの下方への移動に及ぼす影響	11
2-2	稲作期間中のメタンの大気および 心土へのメタンフラックス	23
2-3	土壌中に残留したメタンの落水時における挙動	39
2-4	要約	48
第3章	下方移動したメタンの移行とその後の動態	51
3-1	作土から溶脱したメタンの心土での挙動	52
3-2	心土における嫌氣的メタン酸化に關与する 微生物・有機物の由来	61
3-3	作土における嫌氣的メタン酸化	67
3-4	嫌氣的メタン酸化に關与する酸化剤の解明	80
3-5	作付期間中の心土におけるメタン酸化	90
3-6	要約	93

第4章	メタン生成・酸化に関与する微生物群の 水田土壌中の生態	96
4-1	作付期間中の水田作土における メタン生成菌・メタン酸化菌数の季節的变化	97
4-2	田面水の浸透にともなう作土から 硫酸還元菌の流脱と心土における挙動	112
4-3	作土中でのメタン生成菌の移動とメタン生成	121
4-4	土壌の風乾・磨砕がメタン生成に及ぼす影響	127
4-5	メタン生成に及ぼす原生動物の影響	131
4-6	要約	137
第5章	熱帯水田からのメタン発生 タイ国各地の水田からのメタンフラックス	140
第6章	総合考察	154
6-1	水田作土で生成したメタンの動態	154
6-2	嫌氣的メタン酸化と水田土壌の還元過程	157
6-3	メタン生成菌・酸化菌住場所	160
6-4	メタン生成菌の生育環境としての原生動物	161
6-5	メタン生成環境としての水田	163
6-6	熱帯水田からのメタン発生	163
第7章	総括	166
	謝辞	170
	補 微生物数測定培地・計数方法	171
	引用文献	175

## 第1章 緒言

### 1-1 地球環境問題と水田

今世紀に入ってから爆発的な人口増加と急激な産業構造の変化によって、人間活動は飛躍的に拡大し、今や地球環境に最も影響を与える要素となった。1980年代後半から地球環境問題は東西南北を問わない人類共通の国際問題へと発展しており、その解決策を模索すべく世界的な議論が高まっている（大来1990）。

地球温暖化問題は、オゾン層の破壊・酸性雨・熱帯林の破壊・砂漠化と並ぶ地球規模の環境問題として社会的関心を集めている。地球の温暖化は、温暖化ガスと呼ばれる赤外線を吸収する微量成分の大気中濃度が増加することによって地球の平均気温が上昇する現象である。温暖化ガスとして重要な微量成分には水蒸気・二酸化炭素・メタン・亜酸化窒素・オゾン・フロン類が挙げられる。

メタンは「大気の窓」と呼ばれる、二酸化炭素が吸収しない領域の赤外線を効率よく吸収し、1分子当りの温室効果は二酸化炭素の約30倍と考えられている。また、現在のメタン大気濃度は約1.7ppmvで二酸化炭素（約340ppmv）と比較して微量である。従って二酸化炭素による赤外線の吸収が現在ほぼ飽和状態に達しているのに対し、大気中のメタン濃度の増加は直接的に地球温暖化を促進すると予想されている。さらに、大気中のメタン濃度が年率0.8-1.0%という高い割合（二酸化炭素は0.5%/年）で増加していることが明らかとなった。地球温暖化に対するメタンの寄与率は現在15%程度と推定されているものの、上記の事実から将来的に寄与率の増加が危惧されている（陽 1991）。

一方、大気中におけるメタンの平均滞留時間は8-12年と二酸化炭素（100年）や亜酸化窒素（100-200年）に比べ短く、放出量の制御効果が近未来的に顕在化すると期待されるため、メタン発生源の特定とその制御が急務とされている。

大気に放出されるメタンの起源は、生物・非生物起源、あるいは自然的・人為的起源に分類される（表1-1）。IPCC（気候変動に関する政府間パネル）は、



Table 1-1. Sources of atmospheric methane.

Source	CH <sub>4</sub> emission Tg CH <sub>4</sub> y <sup>-1</sup>	
	Mean	Range
Natural wetlands	115	100-200
Rice fields	110	25-170
Intestines of ruminants	80	65-100
Exploration of natural gas	45	25- 50
Biomass burning	40	20- 80
Termites	40	10-100
Landfill sites	40	20- 70
Coal mining operation	35	19- 50
Oceans	10	5- 20
Freshwater lakes	5	1- 25
Methane hydrate	5	0-100
Total	525	410-620

これまでに得られたデータから、水田が、家畜と並ぶ農業生態系からのメタンの主要な発生源であり、人為的発生源の約30%を占めていると報告した

(Houghton et al. 1990)。IPCCの報告に前後して1980年代前半から、実測値に基づいた、より精密な水田からのメタン発生量の評価に関する研究が多数報告されるようになった。

## 1-2 水田土壌の還元過程とメタン生成に関する研究

水田におけるメタン生成に関する研究は決して地球環境問題として突然浮上してきたものではなく、最も特徴的な現象である湛水条件下における還元状態の発達に関連した水田土壌学の根本的な課題である。湛水は、水田土壌の肥沃度の維持・増進、環境汚染の防止に役立っている反面、いわゆる「異常還元」による根腐れを招いて低収の原因となりうる(和田 1984)。稲作技術の改善を目的として、多くの水田土壌学者が水田土壌の還元過程に関与する嫌氣的微生物代謝の実体の解明に心血を注いできた。メタンはの中で微生物代謝の最終生産物として位置づけられ、メタン発酵の機作およびメタン生成に及ぼす各種環境要因の解析が進められた。

水田土壌中のガス成分に関する研究は今世紀始めにまでさかのぼることができる。高井(1960)によれば、インドのHarrison and Aiyer(1913)が初めて水田圃場中のガス組成を分析し、多量のメタンが存在し酸素は微量かあるいは欠除していることを明らかにした。Robinson(1930)も室内実験で同様の結果を得ている。わが国においても戦前、小野寺(1929)はれんげを施用した水田圃場のガス成分を分析し、メタンと窒素が最も多く、水素が少量存在すると報告している。

その後山根(1954, 1955, 1961a, b, c)は、水田圃場におけるメタンを含むガスの生成と温度・易分解性有機物・基質との関係を詳細に検討した。その結果メタンの生成ポテンシャルが8月中旬に高まること、土壌温度が25-40℃の間でメタンが生成されること、畑状態での前培養によりメタン生成量が減少すること、セルロース・デンプン・有機酸(乳酸、酪酸、酢酸)等の有機化合物がメタン

の基質となることなどを明らかにした。

同じ頃、高井らのグループは湛水下水田土壤中における還元過程の解明に関する研究に着手しており、メタン生成が水田土壤の中で硝酸呼吸、マンガン・第二鉄の還元、硫酸還元に引き続いて起こることを明らかにし、水田土壤における逐次還元モデルを提唱した（高井ら 1955, 1957a, b, Takai et al. 1956, 1963a, b）。

また高井・小山（1956）は、愛知県に分布する性質の異なる2カ所の現地水田土壤のガス組成を調査し、湿田が乾田に比べてメタンを含む多量のガスを集積していることを観察した。さらに解析の結果、高井・加村（1961）は、湛水土壤中に生成する $\text{CO}_2$ と $\text{CH}_4$ の比率（ $\text{CO}_2/\text{CH}_4$ ）の大小は、土壤中の電子受容体（酸素、硝酸、酸化マンガン、還元性第二鉄）の電子受容量の合計によって推定される土壤の「酸化容量」と、易分解性有機物の指標である湛水静置に伴い生成する $\text{NH}_4\text{-N}$ 量によって代表される土壤の「還元容量」の比（酸化容量／還元容量）の大小とよく一致することを報告した。そして、これらの比は同時に各水田の収穫量の高低とも非常によく対応することを見出し、水田土壤の肥沃度とメタン生成との関係を明確にした。後に浅見・高井（1970）は非晶質水酸化鉄を添加して湛水培養した土壤は無添加の場合に比べメタンの生成量が著しく減少することを示し、上記の考え方を支持する結果を得た。またBell（1969）は、湛水土壤への硝酸の添加が還元過程の進行を遅らせ、酸化還元電位がメタン生成のレベルまで下がるまでに無添加に比べ長時間を要すると報告している。

Takai（1970）は放射性同位体を用いて水田土壤におけるメタン生成機構の解明を試み、酢酸のメチル基転移反応と水素による二酸化炭素還元反応によってメタンが生成されることを証明した。同時に両反応系の意義についても考察し、メタン生成に対する二酸化炭素還元反応の寄与が20-40%と推定している。

それまでの室内実験は必ずしも現地水田の状態を正確に再現しているわけではなかった。高井ら（1969a）は、水稻の存在および透水が湛水土壤の還元過程に及ぼす影響を検討した。彼らは後に、透水が湛水土壤酸化還元電位を下げる効果と上げる効果という2つの相反する効果を有しており、土壤の性質により

いずれか一方の効果がより強く現れることを明らかにした (Takai et al. 1974)。

木村ら (1977) は、水稻が生育段階に応じてその根圏土壌を非根圏土壌に比して酸化あるいは還元的な状態にすることを報告した。そして、生育後期の様々な生理状態の根から構成される水稻根群のうち、新しい根からは水素が、老化した根からはメタンが生成することを見出した。さらに解析の結果、水素は根内および根面で生成すること、老化した根から生成するメタンは、根から放出される水素を利用して根圏土壌中のメタン生成菌が生成していることを明らかにした (木村ら 1984)。また、根圏においてメタン生成と硫酸還元とが基質をめぐる競合関係にあることを阻害剤を用いた室内実験で明らかにした (Kimura et al. 1991a)。水田土壌でのメタン生成と硫酸還元の水素・酢酸をめぐる競合関係は、その後堀ら (1990a, 1993) によって系統的に研究された。

### 1-3 水田からのメタン放出に関する研究

Rasmussen and Khalil (1981) は、大気中のメタン濃度が年率約 1 % という高い割合で増加していることを報告した。この時期以降、水田におけるメタンの研究は、主に大気への放出量に関心が向けられるようになり今日に至っている。

de Bont et al. (1978) は、水稻体からメタンが放出されることを初めて報告した。メタンは主に水稻体を経由して大気へと放出され、気泡や拡散で直接土壌から放出されるメタン量は全放出量の 10 % にも満たないと考えられている (Cicerone et al. 1981, 1983, Seiler et al. 1984, Holzapfel-Pschorn et al. 1986, Schutz et al. 1989b, 犬伏ら 1989, Sass et al. 1991)。Seiler et al. (1984) は、メタンが水稻根の破生間隙を通じた拡散によって放出されることを報告した。また、Nouchi and Mariko (1991) は、水稻葉鞘部にメタンが放出する気孔を発見し、水稻体を経由したメタンの大気への放出過程モデルを提唱した。

水田からのメタン放出速度には日変化・季節変化がみられる。1 日の内では午後から夕刻に最大速度を示し、夜間や明け方のメタン発生速度は低い (

Seiler et al. 1984, Holzapfel-Pschorn and Selier 1986, Schutz et al. 1989a, 1990b, Yagi and Minami 1990, Miura et al. 1992)。栽培期間中のメタンフラックスの季節変化は、水稻生育初期に少なく、出穂期付近に2ないし3つのピークを示し、生育後期に再び減少する場合が一般的である。

土壌の性質の違いはメタン発生量に重大な影響を与える。Yagi and Minami (1990)の測定によればメタン発生量は泥炭土>グライ土>黒ボク土の順であり、泥炭土と黒ボク土の間には約40倍の差がみられた。犬伏ら(1989)はポット実験でメタン発生量がグライ土>灰色低地土>褐色低地土の順に低下することを報告している。

施肥管理によっても、メタン発生量は顕著に変化する。稲わらなどの新鮮有機物の土壌への添加はメタン発生量を著しく増大させる (Schutz et al. 1989b, Yagi and Minami 1990, Kimura et al. 1991c)。一方、堆肥化した有機物の施用はメタン発生量にほとんど影響しない (Schutz et al. 1989b, Yagi and Minami 1990, Kimura et al. 1991c)。硫酸アンモニウムなど硫酸根を含む化学肥料の添加は、硫酸還元菌の活性を高め、その結果メタン発生量を低下させる (Schutz et al. 1989b, Kimura et al. 1992)。Kimura et al. (1992)は、追肥の窒素肥料 (硫酸アンモニウム) を葉面散布すると硫酸イオンが効率よく根圏に到達しメタン生成を抑制するため、土壌に直接散布するのに比べメタン発生量がさらに低下すると報告している。農薬の施用がメタン発生に及ぼす影響を検討した研究例は現在のところ報告されていない。

水田の水管理は、土壌の酸化還元電位に直接影響を与えメタン発生にも大きな影響を与える。盛夏の中干しや収穫時の落水により土壌の酸化還元電位は急激に上昇し、メタン発生量も激減する (Kimura et al. 1991c)。また、Yagi et al. (1990)は田面水の浸透が土壌Ehを上昇させ、メタン発生量を減少させたと報告した。

水田土壌で生成するメタンの起源として、土壌有機物・植物遺体 (稲わらなど)・施用有機物 (堆厩肥など)・水稻体が考えられる。Kimura et al. (1991b)は土壌有機物のメタン発生に対する寄与を10%程度と推定し、メタン生成に

はその他の有機物、特に水稻体からの有機物の関与が大きいことを示唆した。

一方、Sass et al. (1990) はメタン発生量と水稻体のバイオマスとの間に正の相関を見い出した。

大気へ放出されるメタンは土壌中で生成されるメタンの一部であり、かなりの部分が根圏や酸化層で酸化されると考えられている (Holzapfel-Pschorn et al. 1985, 1986, Sass et al. 1990)。

水田からのメタン放出量の測定は、アメリカ、ヨーロッパ、日本で主に行なわれていたが、最近では中国やインドでの測定例が報告されている (Khalil et al. 1991, Parashar et al. 1991, Zongliang et al. 1993)。水稻栽培期間中の日平均メタンフラックスは、 $0.005\text{--}0.9\text{ g/m}^2/\text{d}$ 、栽培期間を通じたメタン総発生量は、 $0.6\text{--}97\text{ g/m}^2$  の範囲にあり地域や土壌で非常に大きな差があることが分かる (八木 1991)。

#### 1-4 メタン生成菌に関する微生物学的研究

地球上で発生するメタンの多くが微生物由来であることは古くから知られていた。しかしながら、1970年代に入り嫌気性細菌の分離方法が確立するまで、メタン生成細菌そのものについてはほとんど何も知られていなかったと言える。メタン生成菌について多くの知見が得られるようになったのは最近20年程のことであり、本格的に研究が進みだしたのはわずか10年前からである。1974年の *Bergey's manual* の第8版では3属9種 (現在存在しない菌も含む) しか登録されていなかったが、1985年8月の時点では13属36種、今日では既知のメタン生成菌は19属59種に達しており、メタン生成菌の研究の急速な進歩が伺える (古賀・森井 1986、鎌形 1993)。

メタン生成菌は、メタン生成という独自の代謝様式とエネルギー獲得様式に関連する新規な酵素、補酵素を有していることが明らかにされた。また、通常の真性細菌とは進化過程を全く異にしていることが、リボソームの16SrRNAの塩基配列などから明らかとなった。現在メタン生成菌は、高度好塩性菌・好熱好酸性菌とともに真核生物や真正細菌と異なる第3の生物群である古細菌 (

Archaea) を形成しており、微生物学者の注目を集めている。メタン生成菌の分類・生化学・生態については、その研究の歴史の浅さにも関わらず既に多くの著書・総説が著されている (Zeikus 1977, Balch et al. 1979, Mah 1982, Daniels et al. 1984, Dubach and Bachofen 1985, Whitman 1985, Keltjens and van der Drift 1986, 古賀・森井 1986, Jones et al. 1987, Oremland 1988, 上木・永井 1993)。

メタン生成菌は、広範な環境に生育しており、その環境中における生態に関して、反すう動物のルーメンや嫌気消化槽で比較的良好に研究がなされている。一方、水田におけるメタン生成菌の研究はこれまで物質を介した間接的微生物学にとどまる場合が多く、微生物生態学的研究は後述するようにその他のメタン生成環境に比して遅れているのが現状である。しかしながら古坂(1993)が指摘するように、微生物は地球上における諸反応のもっとも基礎になる反応の多くの部分を担っており、水田土壌中のメタン生成に関する根本的な理解のためにはメタン生成に関わる微生物群の生態学的研究が重要であることは言うまでもない。

#### 1-5 メタン生成環境としての水田

水田は、メタン生成環境として、以下の諸点でその他の嫌気環境（湖沼・海洋・ルーメン・シロアリ・嫌気消化層）と大きく異なっていると考えられる。

##### ・非連続的還元環境

中干しにより土壌は一時的に酸化的環境になる。また、落水から翌年の湛水まで土壌は全体として好氣的である。

##### ・水稻の存在

水稻はメタンの放出やメタンとなる基質の提供に関与するばかりでなく、水稻根圏がメタン生成・酸化の場となる。

##### ・水の移動

田面水の浸透により、水田生態系で物質の流入・流出が絶えず起こる。

##### ・構造的性

水田は、作土層と心土層に大別される。また、湖沼や海洋の堆積物とは異なり下層の方が上層に比べ相対的に酸化状態にある。

本論文では、これら水田独自の特徴に注目し、メタンの生成とその後の動態に関する化学的・微生物学的研究を行なった。

第2章では、田面水の浸透に伴うメタンの大気および心土への移動を検討した。また、水稻生育後期に土壌中に集積したメタンの落水時の挙動を追跡した。

第3章では、作土から下方へと移行したメタンの心土における挙動に関する研究を行なった。そして、水田土壌における嫌氣的メタン酸化という新たな概念を提唱し、その機構の解明を試みた。

第4章では、メタン生成に関与する微生物群の土壌中における生態を検討した。

第5章では、これまでほとんど研究例がない、熱帯（タイ国）水田からのメタン発生速度の測定を系統的に行なった。

第6章では、第2章から第5章までの結果とこれまでに報告されている知見とを合わせ、メタン生成環境としての水田について総合的に考察した。



## 第2章 水田土壌で生成したメタンの移行経路の解明

### 序論

水稻多収穫の成否を決める鍵の一つとして、田面から地下への適当量の水の垂直移動（減水深）が必要とされる。適正な減水深は20～30mm/日程度であって、蒸発散量は5～8mm/日、適正浸透量は20mm/日が基準とされる（熊田 1980）。本邦水田の平均浸透量は15mm/日程度である。

浸透にともなって土壌から物質が溶脱する現象は、土壌生成過程あるいは土壌肥沃度の観点から、土壌学における基本的な研究課題の1つである。水田土壌では、還元状態にある土壌から物質が溶脱するという点で、畑や森林土壌とは異なる特有の現象が起こっていると予想される。また、水田作土から溶脱した物質は、心土の生成過程に影響を及ぼすと考えられる。以上のような背景から、水田土壌からの各種成分の溶脱（あるいは流脱）過程に関する研究が多数なされてきた。その内容は、有機成分（加藤 1972a,b, 和田ら 1975, 岡崎ら 1976a,b,c, 1977）、無機成分（和田ら 1979, 土屋ら 1981, 1984, 1986）、微生物（高井ら 1968, 1969b, 香川 1968, 香川・高井 1969, 近藤ら 1982a,b）等多岐にわたっており、それぞれ土壌の種類、酸化還元状態、水稻の影響を受けることが明らかにされている。

一方、メタンの溶脱に関する研究はこれまで報告がない。これは、メタンの溶解度が非常に低いので他の成分に比べ溶脱量が少ないと予想されること、嫌気環境における微生物の最終代謝産物であるメタンは還元土壌で化学的にも生物学的にも不活性であると考えられていたことに理由があると推察される。

本章では、水田土壌で生成したメタンの移行経路を解明することを目的として、田面水の浸透にともなう水田土壌中のメタンの動態を追跡するとともに、各種環境要因とメタンの挙動との関係を明らかにするために一連の研究を行った。

## 2-1 田面水の浸透・稲わらの添加がメタンの下方への移動に及ぼす影響

### <はじめに>

落水時あるいは湛水直後の酸化的環境では、水田土壌中の気相にメタンはほとんど含まれていないが、土壌の還元が進むにつれて土壌気体の半分以上をメタンが占有する (Takai et al. 1956, 山根 1961c, Takai et al. 1963b, 高井ら 1969a, Bell 1969, 伊藤・飯村 1989a,b)。

一方、メタンは、25°C 1atmの条件下で蒸留水1mlに約0.03ml、すなわち16.1  $\mu$ gC溶解する (化学便覧 1984)。また溶媒 (水) の塩濃度の増加によりメタンの溶解度は低下する (Wiesenburg and Guinasso 1979) が、通常の土壌水、特に湛水状態の土壌水の塩類濃度は溶解度にほとんど影響を与えないと考えられる。

従って、還元状態が進行した水田土壌の土壌水は当然メタンを含んでおり、田面水の浸透にともなって溶脱されると予想される。本節では、浸透に伴う水田作土からのメタンの溶脱を確認するとともに、土壌への有機物 (稲わら) 添加、浸透速度がメタンの溶脱に及ぼす影響を検討した。また透水液中のその他の有機・無機成分も比較のため併せて測定した。

### <材料および方法>

#### 1. 土壌

本章から第4章までの研究に供試した土壌は愛知県安城 農業技術センターおよび福島県農業 試験場の稲わら連用水田圃場の作土層・心土層から採取した。両土壌ともこれまで本研究室において水田土壌からのメタン発生に関する研究に供試されてきており (Kimura et al. 1991c, 1992, Miura et al. 1992)、既存の結果との比較を考慮し、上記2種類の土壌を使用した。同時に、これらの土壌はそれぞれ黄色土、灰色低地土に属し、代表的な日本の水田土壌といえる。土壌試料は採取後2mmあるいは4mmの篩を通し、実験に供試するまで湿潤状態で低温 (4°C) 保存した。各土壌の理化学的性質を表2-1-1に示す。

Table 2-1-1. Some chemical properties of soil samples used.

	Plow layer soil		Subsoil	
	Anjo	Fukushima	Anjo	Fukushima
Total-C (%)	1.78	1.66	0.35	1.43
Total-N (%)	0.13	0.11	0.03	0.13
pH(1:2.5)	5.9	6.6	6.5	6.5
Free iron (%)	1.10	2.23	2.92	2.82
Redusible Mn(ppm)	140	107	283	408
NO <sub>3</sub> -N (mg/100g)	2.87	2.49	1.14	2.61
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg/100g)	12.09	7.85	15.74	14.13

## 2. 土壌カラムの作成および透水液の採取

300gの福島作土(<2 mm)に稲わら粉末を0, 0.3, 0.6, および1.0%の濃度でそれぞれ混合し、ガラスカラム(内径7 cm、高さ12 cm)に充填した。ガラスカラムの底部にはあらかじめグラスウールを敷き、その上に石英砂を加えて平らにした。カラム下部の排水口にゴム管を取り付け、スクリューコックで口を閉じた。また、カラム内に気泡が残留するのを防ぐため土壌は蒸留水とともに少量ずつ交互に充填し湛水状態にした。カラム上部は穴をあけたゴム栓で蓋をした。各処理に2つずつのカラムを準備した。光合成細菌の生育を防ぐためカラムの周囲をアルミホイルで覆い、25℃の恒温室に静置した。

3日毎に50mlの注射筒を排水口のゴム管に接続し、大気との接触を避けて直接透水液を採取した。引圧による透水液からの溶存気体の揮散を防止するため、浸透速度は透水液の自由落下速度に準じた。稲わら添加濃度の影響を検討する実験では一度に60ml透水した。また、田面水の浸透速度がメタンの心土への移行に及ぼす影響は0.6%稲わら添加区で検討し、30, 60, 120mlの透水液を各々採取した。カラムの直径から計算すると透水速度30, 60, 120ml / 3日は減水深にしてそれぞれ2.6, 5.2, 10mm/日に相当する。カラム下部の石英砂部分に含まれる水を除外するため、透水開始後最初の5-20mlは捨て、次の25-40mlを注射筒に採取しガスクロ用のセプタムで口を閉じた。採取した透水液を後述する各種成分の分析に供試した。透水により減少した分の蒸留水をカラム上部から補充し、常時湛水状態を維持した。

## 3. 透水液成分の分析

### a. メタン

透水液を採取した注射筒のセプタム部分に注射針を差込み、2-5 mlの透水液を5 mlプラスチックシリンジを用いて採取し、二重ゴム栓をした30ml三角フラスコに注入した。透水液注入後の三角フラスコ内の気相の圧力が大気圧と等しくなるように、注入する透水液の容積分だけあらかじめ三角フラスコ内の気

相を抜いた。

三角フラスコを氷水中でほぼ 0℃になるまで冷却した後に十分に振とうし、気相と液相とのメタンの分配を平衡状態にした。気相の一部を取り水素炎イオン化検出器 (FID) 付きガスクロマトグラフでメタン濃度を測定した。ガスクロの測定条件は以下の通りであった。

機種	島津ガスクロマトグラフ GC-14APF
カラム	Porapak-N 3 m
カラム温度	60℃
インジェクター温度	80℃
検出器温度	80℃

メタンの溶解度 (0℃, 1 atmで0.0556ml/ml)、大気中のメタン濃度 (ここでは一律1.7ppmで計算) 等を考慮し、透水液中のメタン含量を次式より求めた。

メタン含量 (mgC/l)

$$= ((X-1.7) \times (V-V_L+0.0556 \times V_L) + 1.7 \times 0.0556 \times V_L) \times 100 / V_L \times 12 / 22.4 \times 10^{-6}$$

X: 気相のメタン濃度 (ppm)

V: 三角フラスコ容積 (ml)

V<sub>L</sub>: 透水液注入量 (ml)

#### b. 水溶性有機態炭素 (TOC)

透水液の一部を取り、1 NのHClで酸性状態にした後に、窒素ガスで爆気し透水液中の無機態炭素およびメタンを除いた。その一部を採取し溶存炭素計 (島津 TOC-500) によりTOC含量を測定した。

#### c. ヘキソース

透水液中のヘキソース含量は、アンスロン硫酸法 (大槻・半谷 1967) により測定した。すなわち、透水液試料 3 mlを大試験管 (内径 3 cm) に取り、アンスロン硫酸 (アンスロン 1 g/濃硫酸 500ml) 10mlを添加し30秒攪拌した後に氷冷し

た。冷却後、625nmの吸光度を測定し、グルコースを標準液として透水液中のヘキソース含量を計算した。

#### d. 二価鉄およびマンガン

透水液中に含まれる二価鉄は、o-フェナンスロリンを用いた比色法で、マンガンは、原子吸光法を用いて測定した。尚、透水液は二価鉄・マンガンの酸化を避けるため、TOCと同様塩酸酸性状態にした後に分析に供試した。

#### e. 培養終了時の土壌中の二価鉄含量

培養終了時のカラムを解体し、土壌中の二価鉄を酢酸緩衝液（pH2.8）で抽出し、比色法で定量した。

### < 結果および考察 >

#### 1. メタンおよびその他の成分の溶脱に及ぼす稲わらの影響

##### a. メタン

図2-1-1に透水液60ml当りのメタン含量の経時的变化を示す。稲わら無添加区では、27日間の培養期間中に検出されたメタンは極少量（ $<0.002\text{mgCH}_4\text{-C}/60\text{ml}$ ）であった。一方、稲わら添加区では稲わらの添加濃度に関わらず、培養3日目に透水液中にメタンが検出され、以後メタン濃度は増加した。0.6%および1.0%稲わら添加区では、18日目まで透水液中のメタン濃度が急激に増加し、それ以降緩やかな増加傾向を示した。稲わら添加量の違いによる透水液中のメタン濃度の差異は15日目まで明確に認められたが、18日目以降、0.6%稲わら添加区と1.0%稲わら添加区との差は非常に小さくなった。27日目の透水液中のメタン濃度と、 $25^{\circ}\text{C}$ 、メタン分圧1atmのときのメタンの溶解度（ $0.967\text{mg CH}_4\text{-C}/60\text{ml}$ ）から計算すると、27日目における0.6%稲わら添加区と1.0%稲わら添加区の土壌気体中のメタン分圧は0.84-0.91atmと推定された。またこの時期、同区土壌カラムには気泡や裂け目が頻繁に観察されるようになったことから、土壌水中のメタン濃度はほぼ飽和レベルに達していると推察された。一方、稲わら添加

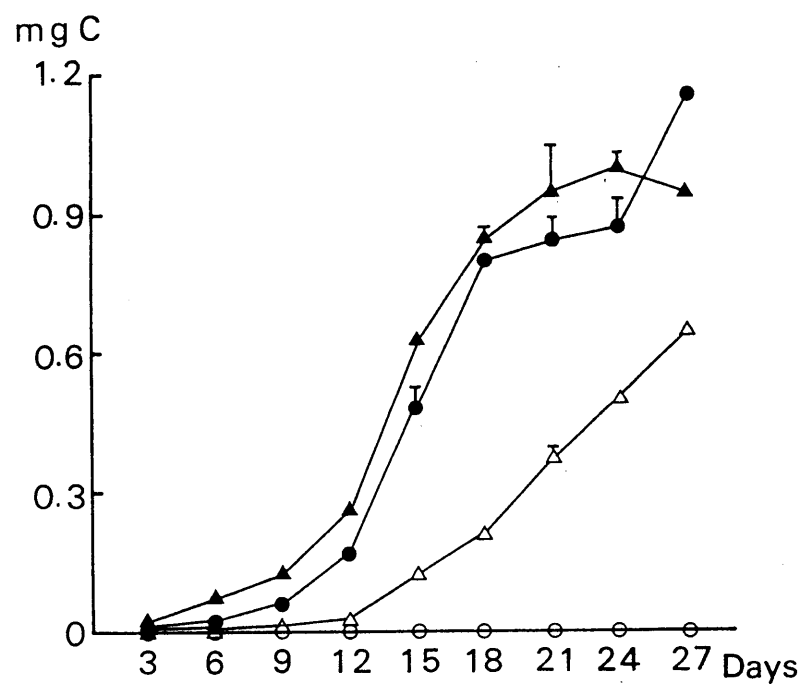


Fig. 2-1-1. The effect of rice straw on methane contents in 60ml of leachate.  
 Application rate: ○, 0%; △, 0.3%; ●, 0.6%; ▲, 1.0%  
 The bars are half ranges.

濃度が0.3%のカラムでは、メタン濃度が培養期間中徐々に増加する傾向を示した。

実験期間中に土壌カラムから溶脱したメタンの合計量は、0.3, 0.6, 1.0% 稲わら添加区でそれぞれ1.9, 4.4, 4.8 mgCであった。伊藤・飯村(1989)は、作付期間中に稲わらを添加した水田土壌で生成されるメタンの量を測定した。その結果、3, 6, 10t/haの稲わら添加圃場(本実験の0.3, 0.6, 1.0%区に相当)で生成したメタンは、添加した稲わらのそれぞれ9, 14, 18%に相当していた。この結果を本実験に適用すると、27日間に0.3, 0.6, 1.0% 稲わら添加区から溶脱されたメタン量は、添加した稲わらから生成すると予想されるメタン量の各々6, 5, 2%に相当すると計算された。27日間の結果と一作期間の結果を比較するのは問題があるが、稲わら添加量が高いほど生成量に比べ溶脱するメタンの割合が低くなる傾向が示唆された。稲わら添加量の増加によりメタン生成量は増加するが、溶脱するメタン量はその溶解度に依存するため、溶脱量は稲わら添加量には比例しないと推察された。

#### b. TOC、ヘキソース、二価鉄、二価マンガン

図2-2-2に、透水液60mlに含まれるTOC、ヘキソース、二価鉄および二価マンガンの経時的变化を示す。稲わら無添加区のTOC濃度は非常に低く終始1.7mgC/60ml以下であった。0.3% 稲わら添加区では、6日目以降ほぼ一定レベルを維持した。一方、1.0% 稲わら添加区では、6日目より急激にTOC濃度が上昇し12日目に最大値を示した後再び減少した。このTOC濃度の増加は酢酸を主体とする有機酸に由来することがKimura et al. (1993)によって明らかにされている。

0.6% 稲わら添加区では両者(0.3, 1.0% 稲わら添加区)の中間の傾向を示した。また、12日目以降のTOC濃度の速やかな減少は、水溶性有機物がさらに微生物代謝を受けたことを示唆するものであり、同時期にメタン濃度の上昇が観察されたことからメタン生成にも利用されたと推察した。21日目以降は稲わら添加量の大小によるTOC含量の顕著な差異は認められなかった。

透水液中のTOC濃度とメタン炭素濃度との比は27日目の時点で0.3, 0.6, 1.0%



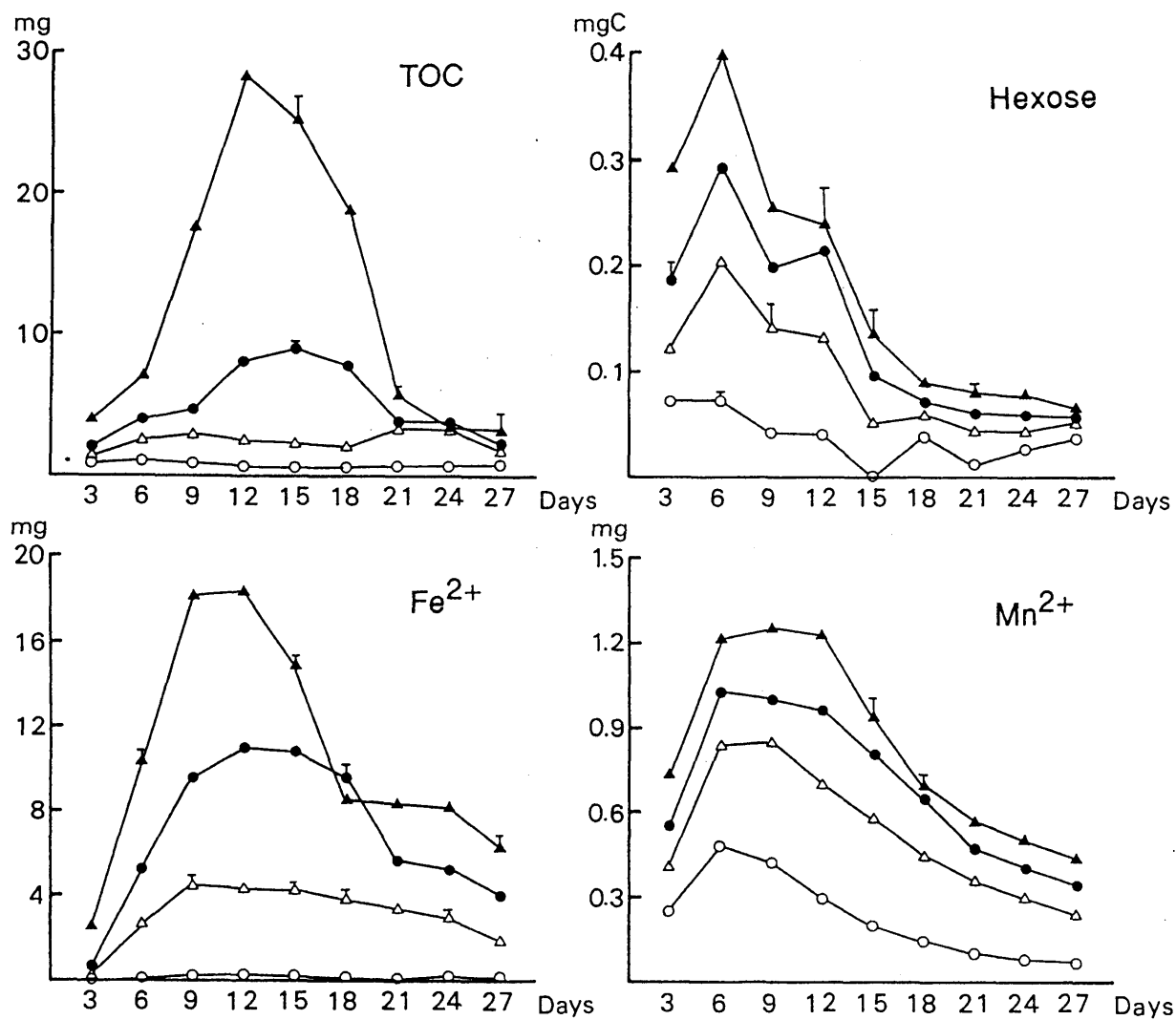


Fig. 2-1-2 The effect of rice straw on contents of TOC, hexose, Fe<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup> in 60ml of leachate. Application rate:○, 0%; △, 0.3%; ●, 0.6%; ▲, 1.0%  
The bars are half ranges.

、稲わら添加区でそれぞれ8:3, 2:1, 6:1であり、溶存有機態炭素に対しメタンがかなりの比率を占めることが見い出された。透水期間中に溶脱した稲わら由来のTOC量を稲わら無添加区との差から計算すると、0.3, 0.6, 1.0%稲わら添加区で、添加した稲わら炭素のそれぞれ4.7, 5.6, 9.3%、同じく透水期間中に溶脱したメタン量の12, 10, 24倍に相当することが明らかになった。

二価鉄・マンガン量も同様に稲わら添加濃度の上昇とともに増加した。稲わら無添加区では二価鉄はほとんど検出されなかったが、マンガンは0.3%稲わら添加区の1/2-1/3程度検出された。マンガン還元系は鉄還元系に比べ高い酸化還元電位で進行する（高井 1980）ことから、稲わら無添加区では湛水にともなう土壌の還元過程がマンガン還元系まで進行していると推察された。稲わら添加区においてマンガン量のピークが二価鉄のピークに比べて3日ほど早く現われたのもマンガン還元系が鉄還元系に先んじた結果であると推察された。また二価鉄・マンガン濃度の減少にともないメタン濃度が上昇した。

## 2. 田面水の浸透速度の違いがメタンその他の成分の溶脱に及ぼす影響

図2-1-3に異なる浸透速度のカラムから溶脱されたメタン量の経時的变化を示す。浸透速度に関わらずメタン含量は6日目より増加し、15-18日目ではほぼ飽和状態に達したものと考えられた。透水液中のメタン濃度自体は3つの処理区の間で顕著な差異は認められなかったため、メタンの下方への移動量は結果的に透水速度に比例的に増加した。

田面水の浸透が土壌の酸化還元過程に及ぼす影響には2つの作用があると考えられる。1つは還元過程で微生物の代謝によって生成したある種の毒性物質が、透水により作土から溶脱されるため、微生物活動が再び活発になりさらに還元を促進する作用であり、もう1つは、浸透による溶存酸素の供給に加えて土壌微生物の基質の溶脱が起こり嫌気性微生物の活性が低下し土壌を酸化する作用である。両作用のいずれが強く影響するかは土壌の持つ性質に依存している（Takai et al. 1974）。すなわち、易分解性有機物が土壌中に豊富に存在する場合、後者よりも前者の作用が有効に働き、土壌の還元化が促進される。稲

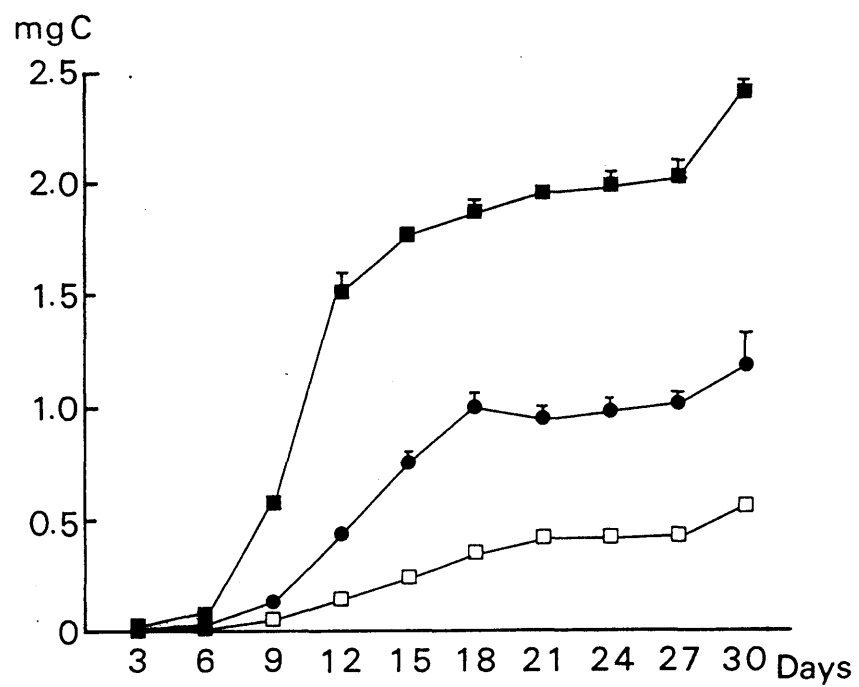


Fig. 2-1-3 The effect of percolation rate on methane leaching.  
Percolation rate: □, 2.6mm/d; ●, 5.2mm/d; ■, 10mm/d

わらを添加した湛水土壌の浸透水は微生物の増殖活性を抑制する物質が含まれていることが報告されており（近藤ら 1982a,b）、本実験条件下では浸透にともなう阻害物質の除去によって土壌の還元化はむしろ促進されたと推察した。

30日間に溶脱したメタンの総量は、浸透速度2.6, 5.2, 10mm/日区で、一作期間中に稲わらから生成すると予想されるメタン（先述）の3, 7, 15%に相当すると計算された。浸透速度の増加、透水期間の延長などによりメタンの溶脱量がさらに増加すると予想された。

TOC、ヘキソース、二価鉄の溶脱量の経時的变化を図2-1-4に示す。TOCはいずれの区も培養前期にピークを示し、21日目以降低い値で安定した。30日間で溶脱されたTOC量は、透水速度2.6, 5.2, 10mm/日区でそれぞれ26, 47, 63mgで、透水速度に比例的ではなく、メタン溶脱の結果とは異なっていた。

浸透速度の増加によってヘキソースの溶脱量も増大したが、TOCの結果と同様浸透速度には比例的ではなかった。二価鉄の場合、培養前期は浸透速度による差が認められたが、15日目以降その差は非常に小さくなった。

溶脱した二価鉄と培養終了時の土壌中の二価鉄の合計量は、2.6, 5.2, 10mm/日区でカラム当りそれぞれ1.91, 1.88, 1.83gであった。浸透速度が上昇するほど二価鉄量は減少しており、浸透による還元過程の抑制あるいは還元鉄の再酸化の可能性が示唆されたが、30日間のメタンの溶脱に影響を与えるほどではなかった。

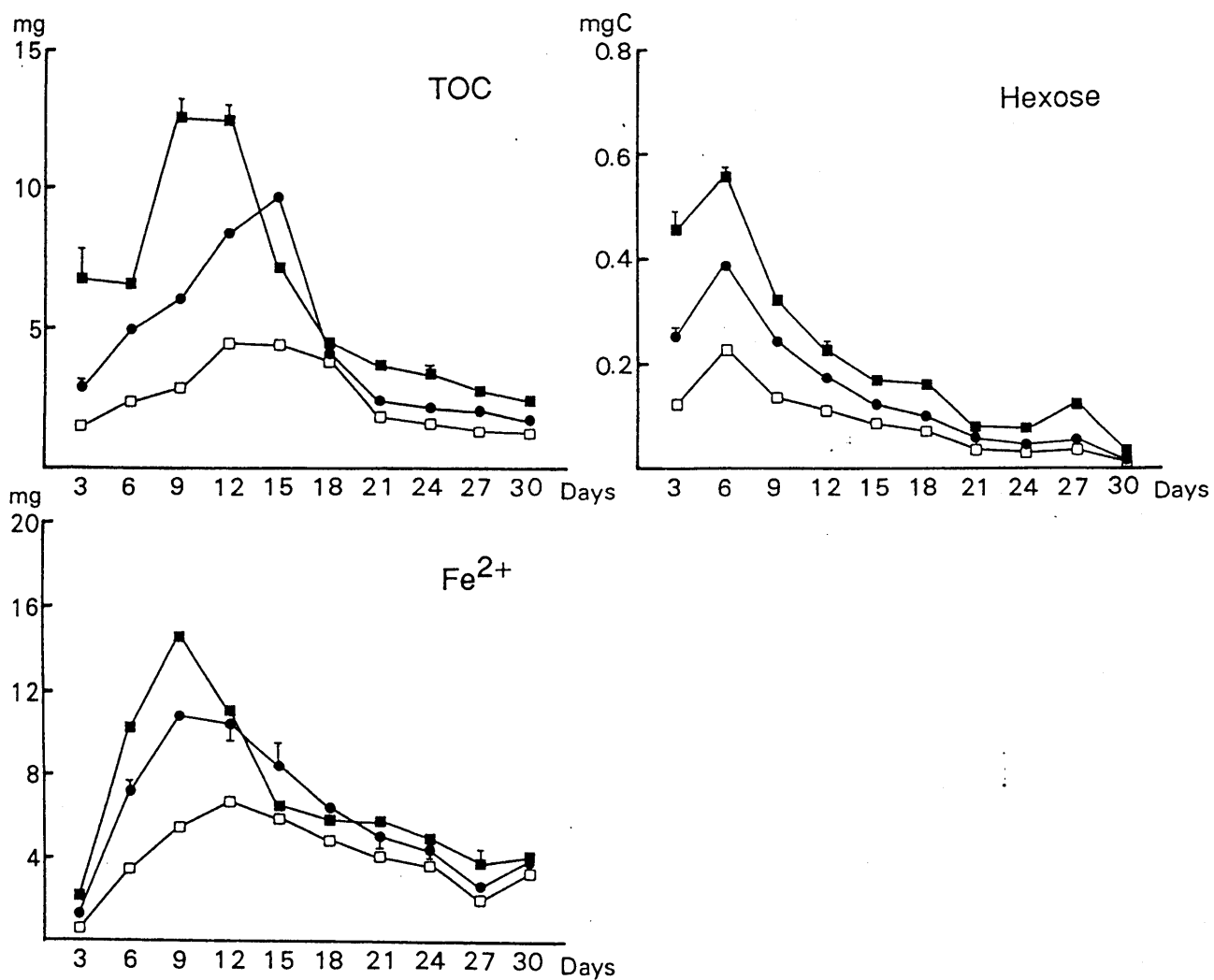


Fig. 2-1-4 The effect of percolation rate on leaching of TOC, hexose, and Fe<sup>2+</sup>.  
Percolation rate: □, 2.6mm/d; ●, 5.2mm/d; ■, 10mm/d

## 2-2 稲作期間中の大気および心土へのメタンフラックス

### <はじめに>

前節の土壌カラムを用いたモデル実験で、水田作土で生成したメタンは田面水の浸透にともない下方へと移動することが明らかになった。その量は、25℃、透水速度10mm/日、30日間の実験条件で、添加した稲わらから生成するメタンの約15%に相当していた。

ところで、水稻体が大気へのメタン放出に与える影響に関する研究が多数報告されてきた。そして、水田土壌から大気へと放出されるメタンのうち約90%が水稻体を経由すること (Cicerone and Shetter 1981)、水稻根圏は水田土壌中で生成したメタンの酸化の場であると同時にメタン生成の場でもあることが明らかにされている (de Bont et al. 1978, Holzapfel-Pschorn et al. 1985, Sass et al. 1990, Kimura et al. 1991a)。前節では無作付条件で実験を行ったが、水稻体の存在が水田作土中で生成したメタンの下方への移行に対し少なからず影響を及ぼすと予想される。

これまでに水田土壌中で生成したメタンの大気および心土への移動を同時に追跡した研究はない。本節では、1991、1993年の2度にわたり、水稻を作付したポットを透水し、透水液中のメタンおよび大気に放出されるメタンを各々定量することにより、田面水の浸透・水稻の作付がメタンの大気および心土への移動に与える影響を定量的に評価することを試みた。

### <材料および方法>

#### 1. 1991年

##### a. ポットの準備・水稻の栽培

1/5000aワグネルポット下部の排出口をガラス管 (φ 6 mm) をつけたゴム栓で密栓した。ポット内側のガラス管は目詰まりを防ぐためにガラスウール、ついで石英砂 (25~35 mesh) で被った。ポット外側部のガラス管の口はゴム管をつけピンチコックで封じた。

3 kgの安城水田土壌湿潤土 (<4 mm) をポットに充填し、湛水状態にして一日静置し、播種後40日目の水稻（黄金晴）幼苗を6月8日に2株ずつポットに移植して、野外で栽培した（写真2-2-1）。

移植後31日目（7月9日）、62日目（8月8日）にそれぞれ追肥として硫酸アンモニウム1.0gを各ポットに施用した。出穂日は、移植後72日目（8月17日）であった。

#### b. 土壌および水管理条件

稲わら添加、浸透速度、作付の有無により7つの処理区を表2-2-1に示すように設けた。基肥としてポット当り硫酸アンモニウム1.5g、過リン酸石灰1.5g、塩化カリウム0.6gを全処理区の土壌に添加した。また、稲わら添加区の土壌には、切断した稲わら(<5 mm)をポット当り18g混合した。

2日に1度ポット下部のガラス管のピンチコックを開き、0.200および600 ml（それぞれ浸透速度 0.5, 15mm/日に相当）ずつ透水した。透水あるいは蒸発による田面水の減少は随時イオン交換水で補充し、実験終了時まで湛水状態を維持した。6日に一度50ml注射筒を用いて透水液を採取し（写真2-2-2）、メタン、水溶性有機物（TOC）および二価鉄濃度を前節に述べた方法で各々測定した。透水量と濃度から各成分の下方への移行速度を計算した。

6日に一度ポットから大気に放出されるメタンをチャンバー法 (Kimura et al. 1991c) で測定した。すなわち、水を張ったポリバケツ中にポットを静かに沈めアクリル製チャンバーで覆い、一定時間（42分間）におけるチャンバー内のメタン濃度の増加を測定し、ポットからのメタン放出速度を算出した。

## 2. 1993年

以下の点を除いて1991年と同じ条件で実験を行ない、メタンの大気および心土への移行量のみを測定した。

#### a. 土壌・処理区

福島土壌作土 (<4 mm) を供試した。処理区は、表2-2-1に示すとおりである。透水区は3日に一度160mlずつ採水を行なった（浸透速度2.7mm/日に相当）。



Photo. 2-2-1. Pots used for the experiment (1991).

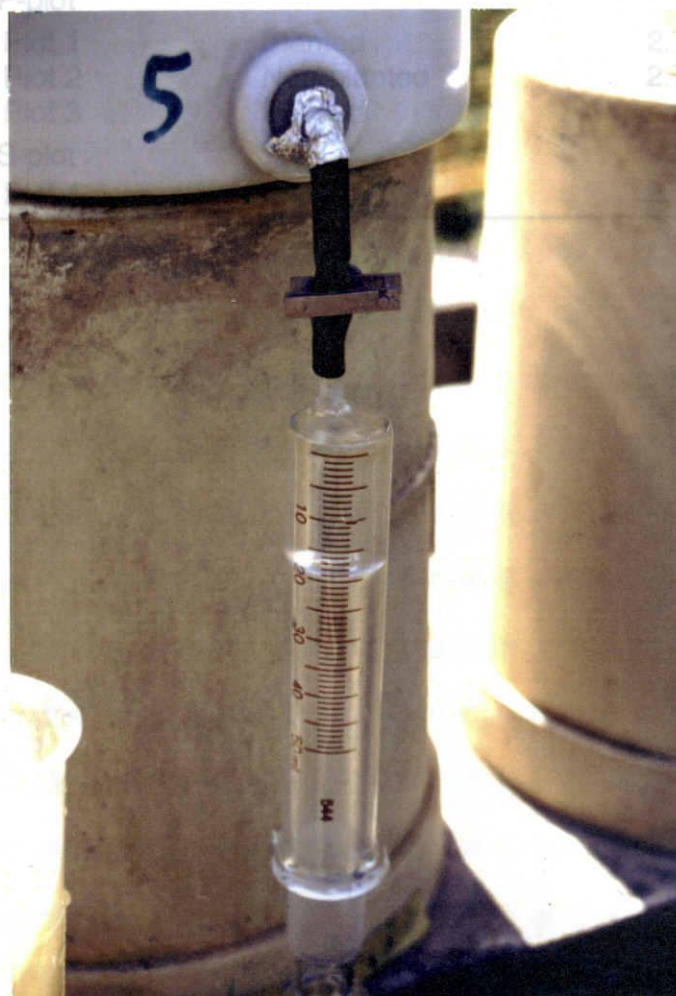


Photo. 2-2-2. Sampling of the leachate.



Table 2-2-1 Outline of the experimental plots.

1991		
Chemical fertilizer plot (without rice straw;CF-plot)		
Plot 1	Planted	5mm/d
Plot 2	Non-planted	5mm/d
Rice straw-applied plot (RS-plot)		
Plot 3	Planted	0mm/d
Plot 4	Planted	5mm/d
Plot 5	Planted	15mm/d
Plot 6	Non-planted	5mm/d
-----		
1993		
CF-plot		
Plot 1	Planted	2.7mm/d
Plot 2	Non-planted	2.7mm/d
Plot 3	Planted	0mm/d
RS-plot		
Plot 4	Planted	2.7mm/d

## b. 水稻・施肥管理

水稻は播種後44日目の葵の風幼苗を6月8日にポットに移植し、追肥は移植後47日目(7/24)、65日目(8/11)の2回、硫安をそれぞれ1gずつ田面水に散布した。出穂日は9月3日頃であった。

### <結果および考察>

#### 1. 1991年

##### a. 化学肥料区 (CF-plot)

大気および心土へのメタンフラックスの季節的变化を6日毎の平均気温とともに図2-2-1に示す。作付条件の化学肥料区 (plot 1) では、大気へのメタン放出速度は7月中旬まで低い値を示した。(図2-2-1a)。その後、8月1日、8月19日にそれぞれピークを示し、以後収穫期まで漸減した。化学肥料区における2つのピークはYagi and Minami(1990)によっても報告されている。無作付条件の化学肥料区 (plot 2) から大気へのメタンフラックスは、実験期間中非常に低い値 ( $<0.2\text{mgC/日}$ ) を維持した。

心土へのメタンフラックスは無作付区 (plot 2) において6月14日に初めて観察され、8月7日に最大レベルに達した(図2-2-1a)。この時点における平衡土壌気相中のメタン分圧は透水液中のメタン濃度から計算して約 $0.9\text{atm}$ と推定された。作付区 (plot 1) においても無作付区と同じ日に透水液中にメタンが検出されたが、その濃度は無作付区に比べて低かった。一方大気へのメタンフラックスは無作付区に比べ作付区において顕著に高かった。本結果から、水田土壌で生成したメタンは優先的に水稻体経由で大気へと放出し、心土へのメタンフラックスはこの時期水稻の影響により低く抑えられているものと推察された。8月中旬以降、大気へのメタンフラックスは漸減する傾向を示したが、それとは対照的に透水液中のメタン濃度は上昇した。本結果より、栽培後期に大気へのメタンフラックスが減少した原因は、土壌のメタン生成活性の低下ではなく、水稻根の老朽化にともなう破生間隙への土壌水の侵入等によるメタン移行経路の閉塞にあると推察された。

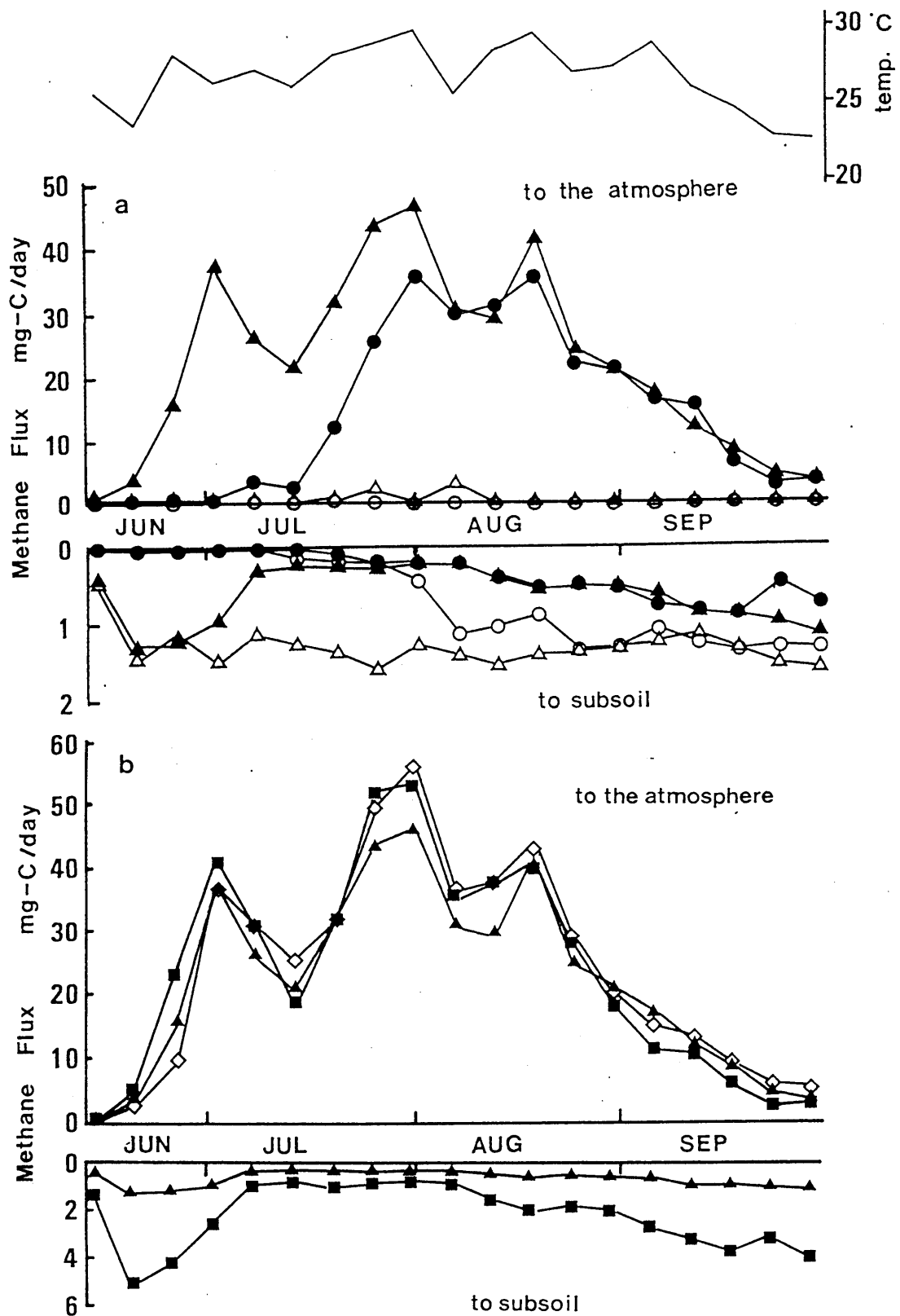


Fig. 2-2-1 Six days mean of daily temperature and seasonal variation of methane fluxes to the atmosphere and to the subsoil (1991).

a) Effects of rice plant and rice straw application on methane fluxes;

b) Effect of percolation on methane fluxes (RS plots).

●, plot1; ○, plot2; ◇, plot3; ▲, plot4; ■, plot5; △, plot6

透水液中のTOC含量は、栽培初期から中期にかけて作付区と無作付区との間で差異がほとんど認められなかったが、栽培後期に無作付区が作付区を若干上回った（図2-2-2）。水稻は根の侵出物や脱落細胞の形で根圏に有機物を供給することが知られている（Andal et al. 1956, MacRae and Castro 1967, 木村ら1977）ので、実験当初は作付によって透水中のTOCが増加するものと予想していた。本結果はこの予想と異なるものであり、根圏に供給されたと考えられる有機物は速やかに分解を受け、一部はメタンとなり作付区における急激なメタンフラックス（特に大気）の増加に関与したものと考えられた。

図2-2-3に透水中の二価鉄含量を図2-2-1, -2に準じて1日当りの移行量で示す。作付区の二価鉄含量は7月中旬以降、特に8月初旬から無作付区に比べ高くなった。Kimura et al. (1982)はこの時期作付区において土壌の還元が進行することを報告しており、本実験の結果はそれを支持するものと考えられた。また、水稻根はその根圏に酸化鉄を集積することから、作付区における8月以降の二価鉄の溶脱量の増加には、特に根圏での有機物分解と直接・間接的に共役した鉄還元が関与しているものと推察された。

#### b. 稲わら添加区 (RS-plot)

稲わらを添加した作付区 (plot 4) からの大気へのメタンフラックスは湛水1週間後から観察され、化学肥料区 (plot 1) と同時期に2つのピークを示したほか、稲わら由来のメタンと思われるピークが7月初旬に検出された（図2-2-1a）。Yagi and Minami (1990) も同様な3つのピークを観察している（図2-2-1a）。なお、8月7日以降、稲わら添加区と化学肥料区の間でメタンフラックスに顕著な差は認められなかった。

透水速度の違い（0, 5, 15mm/日、それぞれplot 3, 4, 5）によって大気へのメタンフラックスに有意な差は認められなかった（図2-2-1b）。一方、Yagi et al. (1990) は、水田から大気へのメタンフラックスは、5mm/日の田面水の浸透により非透水区の約50%に減少し、20mm/日では極微量であることを報告した。その原因として、彼らは、田面水の浸透により土壌に溶存酸素が供給

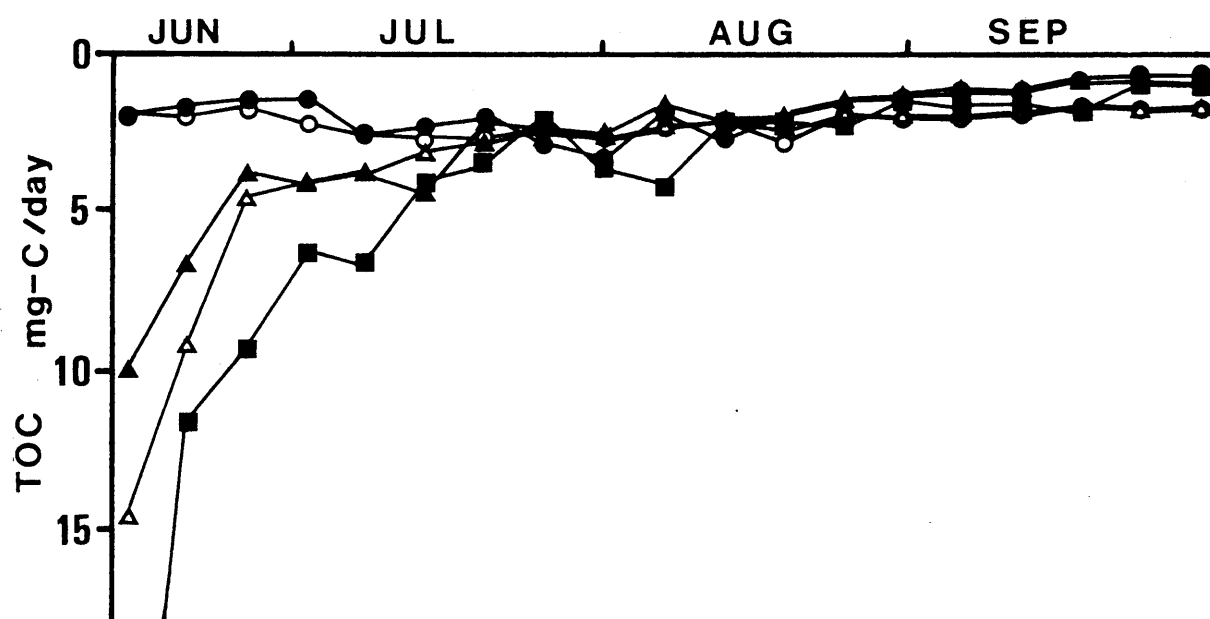


Fig. 2-2-2 Seasonal variation of the amount of TOC leached from the pots.  
 ●, plot1; ○, plot2; ▲, plot4; ■, plot5; △, plot6

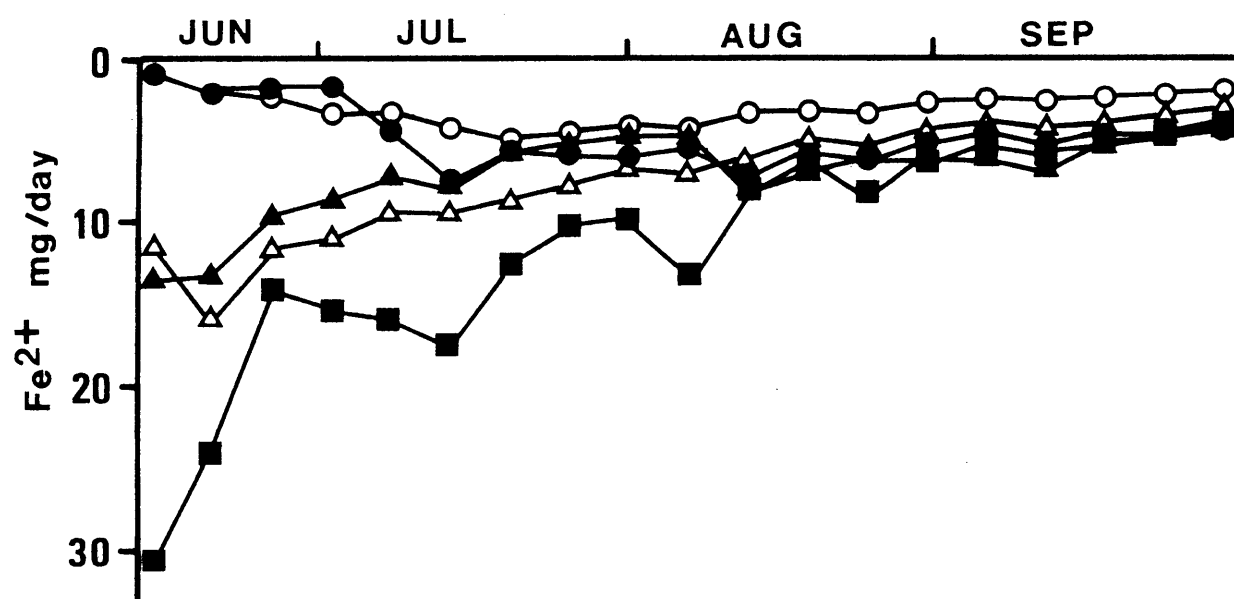


Fig. 2-2-3 Seasonal variation of the amount of  $\text{Fe}^{2+}$  leached from the pots.  
 ●, plot1; ○, plot2; ▲, plot4; ■, plot5; △, plot6

され、その結果土壌Ehが上昇したためメタン生成活性が低下したためと考察している。

稲わら添加区では、透水処理を行なわなかったplot 3以外の全ての処理区において、湛水後最初の透水から透水液中にメタンが検出され、12日後には最大レベルに達した（図2-2-1b）。無作付区（plot 6）ではその後収穫期までそのレベルを維持した。一方、作付区では水稻の生長とともに大気へのメタンフラックスが増加しそれに呼応して心土への移行量が減少した。本結果から、水稻体は比較的生育初期段階においてメタン放出経路を確立していることが明らかになった。

作付区から心土へのメタン移行量はその後化学肥料区と同様、無作付区に比べ低い値を示した。また、心土へのメタンフラックスに及ぼす稲わら施用の影響は、作付区では7月26日以降、無作付区では8月7日以降認められ<sup>た</sup>かった。

透水液中のメタン濃度は、7月初旬の2回を除き透水速度が高いほど増加し、その結果、plot 5（15mm/日）の心土へのメタンフラックスはplot 3（5mm/日）に比べて3倍以上の値を示した（図2-2-1b）。従って本実験では、透水により土壌中のメタン生成量はむしろ増加したと推察された。透水速度の違いによる大気へのメタンフラックスの差異が認められなかったのは、水稻体が大気へのメタン放出量を制御しているため土壌中に一定量以上メタンが存在する場合には水稻体の放出活性以上のメタンは大気へ放出されないことに起因すると考えられた。稲わら添加区における透水液中のTOC濃度は1回目の測定で最大値を示し、その後急激に減少した（図2-2-2）。化学肥料区ではこの様な減少が認められず、このピークは添加した稲わらの水溶性画分および水溶性代謝産物に由来すると考えられた。TOCの溶脱に及ぼす稲わらの影響はメタンフラックスほど長く続かず7月20日以降認められ<sup>た</sup>かった。透水液中のTOC濃度に及ぼす浸透速度の影響はメタンの場合とは異なり、浸透速度の増加によりTOC濃度は低下した。その結果、TOCの心土へのフラックスは栽培期間のごく初期を除いて浸透速度の違いによる差が認められなかった。

無作付区の透水液中の二価鉄含量は6月20日に最大値を示し、その後収穫期

まで漸減した。作付区では、無作付区に比べやや低い濃度で推移し、8月初旬まで減少した。8月中旬に一旦増加に転じ、その後無作付区よりも高い濃度で漸減した（図2-2-3）。本結果は、水稻の存在が土壌環境を一定の酸化還元電位に保つ効果を有するという土屋ら（1984）の報告を支持しているものと考えられた。栽培後期は水稻作付条件下で稲わらの有無、透水の多少によって二価鉄の溶脱量に顕著な差異は認められなかったが、無作付条件では稲わら添加区の方が終始化学肥料区の二価鉄含量を上回っていた。

#### c. 栽培期間中の各成分の総移行量

栽培期間中に大気へ放出されたメタン、心土へ移行したメタンおよびTOCの総量を表2-2-2に示した。稲わら添加区で浸透速度の変化に伴うメタンの大気への総放出量には差異が認められなかった。一方、下方への移行量はplot 4（浸透速度5 mm/日）が71.0mgCであったのに対し、plot 5（浸透速度15mm/日）では251.2mgCと浸透速度の比率以上の差が認められた。この結果から浸透速度の増加により土壌中のメタン生成が促進したと推察した。

メタンの大気および心土への移行量を出穂期（7月下旬）を境に2分し、栽培前期・後期のメタン移行量を比較した（表2-2-2）。Kimura et al.（1982）は、水稻体の生理は幼穂形成期を境にして大きく変化し、根圏環境を酸化状態から還元状態へと変化させると報告している。作付した化学肥料区の透水液中の二価鉄含量が急激に増加したこと（図2-2-3）から、本実験においても幼穂形成期を境にして水稻体の生理に変化があったと推察された。稲わらを添加した作付区では、ほぼ同量のメタンが前期・後期に大気へ放出された。一方化学肥料区では、大気へのメタン放出は主に栽培後期に観察され、総放出量の83%が後期に放出されたことが明らかになった。栽培後期における大気へのメタン放出量には稲わら添加の有無は顕著な影響を与えなかった。メタンの心土への移行は栽培後期が主であり、化学肥料区では総移行量の94-95%、稲わら添加区でも58-60%が後期に集中していた。また、栽培後期には大気への放出と同様化学肥料区と稲わら添加区との差はほとんど認められなかった。栽培期間中のメタンの



Table 2-2-2 Total amounts of methane fluxes and TOC leached to the subsoil.

Plots	To the atmosphere			To the subsoil					
	Methane (mg-C/pot)			Methane (mg-C/pot)			TOC (mg-C/pot)		
	Early stage*	Late stage*	Total	Early stage	Late stage	Total	Early stage	Late stage	Total
CF-plots(5mm/day)									
planted	266.8	1327.5	1594.3	2.4	36.1	38.5	99.3	107.9	207.2
non-planted	1.6	5.4	7.0	3.7	73.1	76.8	108.1	133.2	241.3
RS-plots									
0mm/day									
planted	1123.7	1637.8	2761.5	0	0	0	0	0	0
non-planted	40.4	8.8	49.2	0	0	0	0	0	0
5mm/day									
planted	1080.1	1441.1	2521.2	29.7	41.3	71.0	227.5	96.6	324.1
non-planted	20.6	25.9	46.5	59.1	89.3	148.4	271.0	131.1	402.1
15mm/day									
planted	1210.6	1457.2	2667.8	99.6	151.6	251.2	449.8	136.6	586.4

\*; Early stage: June 8- July 31 (54 days), Late stage: Aug. 1- Sep. 30 (61 days)

総移行量に占める心土への移行量は作付条件下で2.4-8.6%、無作付条件下では76-92%であった。水稻根付近で生成したメタンは主に水稻体経由で大気へと放出されるが、水稻体の影響が及ばない部位で植物遺体などの分解に伴い生成したメタンは、大気へほとんど放出されず田面水の浸透にともない心土へと移行することが示唆された。以上の結果から、水田土壌で生成したメタンのその後の動態として心土への移行は重要な意味を持つと結論された。

透水によって心土へと移行したTOC量は化学肥料区・稲わら添加区によらず作付条件の方が無作付条件に比べ低い値を示した。稲わらの添加はメタンの場合と同様に主に栽培前期のTOC量に影響を与えていた。浸透速度の増加によってTOCの心土への移行は促進されたが、メタンの場合に比べ促進の程度は低かった。その結果、栽培後期にはTOCに対するメタンの割合が上昇し、plot5（透水速度15mm/日）で9月下旬に透水液中のメタンの量がTOC量を上回った。本結果より、メタンが栽培後期の水田下層土における微生物の基質として重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

## 2. 1993年

作付期間中のメタンの大気および心土へのフラックスを図2-2-4に示す。化学肥料区（plot1, 2および3）では8月までメタンのフラックスは両方向とも非常に低く、8月中旬に大気への放出速度が急激に増加した後漸減した。心土へのメタン移行量は8月中旬から収穫期まで増加した。無作付区ではメタンのフラックスは両方向ともに非常に低く、化学肥料区で生成したメタンが主に水稻体に由来すると推察された。

稲わらの添加によって、水稻生育初期の透水液中のメタン濃度が上昇したが、大気への放出量の増加によって心土へのフラックスは7月下旬から減少し、大気への放出速度が減少する8月下旬以降再び増加した。水稻体が、水田におけるメタンフラックスを制御している点は1991年と同様であった。

一方、田面水の浸透がメタンフラックスに及ぼす影響は1991年の結果とは著しく異なっていた。すなわち、透水によって大気へのメタンフラックスは著し

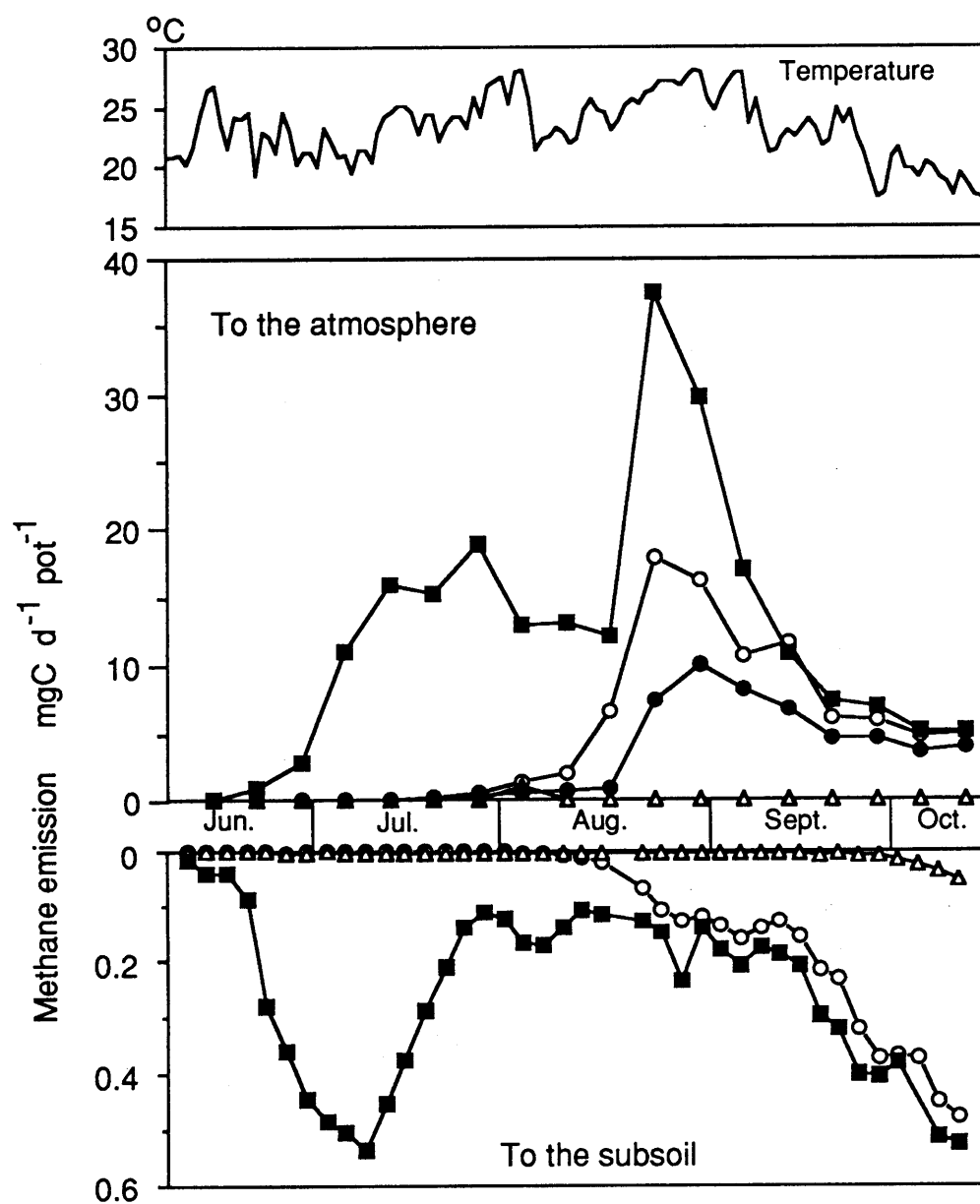


Fig. 2-2-4 Effects of percolation and rice straw application on methane flux distribution (1993). ○, plot1; △, plot2; ●, plot3; ■, plot4

Table 2-2-3 Total amount of methane fluxes (mgC)

	To the atmosphere	To the subsoil
CF-plot		
Plot 1	620.3 (97.6*)	15.0 ( 2.4)
Plot 2	10.1 (89.4)	1.2 (10.6)
Plot 3	362.4 (100)	0 ( 0)
RS-plot		
Plot 4	1,561.7 (97.9)	33.6 ( 2.1)

\*: Relative value of methane flux to the total

く増加した。

作付期間中のメタンの総移行量を表2-2-3に示した。Kimura et al. (1991c)は同じ福島水田作土を用いてポット実験を行い、ポット当り1,040mgCのメタンが作付期間中に放出されたと報告している。一方本実験における同一条件下のポット（化学肥料添加無透水区）からのメタン放出量は362.4mgC/potで、Kimura et al. (1991c)の報告値の35%程度であった。この様な低いメタン発生量の一因として、1993年の記録的な冷夏が関与していると推察された。心土への移行量は全体の2-10%を占めていた。1991年の透水速度5mm/日の化学肥料区の結果と比較すると、透水速度は2.7mm/日ではほぼ半分であったので、当然のことながら絶対量としては1991年の方が高かったが、大気への放出に対する割合に顕著な差異は認められなかった。

透水によって大気へのメタン放出量は1.7倍増加した。福島土壌は安城土壌と比較して有機物含量には差が無いが、易還元性の鉄含量が高く、安城土壌と比べて還元が進みにくい土壌であると考えられるので、実験当初田面水の浸透は、メタン放出を抑制すると予想していた。本実験の結果は予想と反していたが、その原因については明らかではなかった。いずれにせよ、田面水の浸透が大気へのメタンフラックスに与える影響は、促進・抑制・影響無しと様々でその機構を解明するためにはさらに詳細な研究が必要であると考えられた。

## 2-3 土壤中に残存したメタンの落水時における挙動

### <はじめに>

前節のポット実験において、水稻栽培後期における大気へのメタンフラックスの減少とそれに対応した心土へのメタン移行量の増加が観察され、大気へのメタン放出速度の低下はメタン生成量の減少によるものではなく、水稻体のメタン放出活性の低下に起因することが明らかとなった。この結果から、栽培後期に生成したメタンが大気へ放出されることなく作土中に残留していると推察された。

ところで水田からのメタン発生に及ぼす水管理の影響に関しては、前節で述べた田面水の浸透の他に、中干しと呼ばれる水稻生育中期の落水がこれまでに検討されている。中干しは、土壤の酸化還元電位を上昇させ、大気へのメタン放出を著しく抑制することが知られている (Kimura et al. 1991c)。しかしながら、それまでに生成したメタンの落水後の動態についての知見は未だ得られておらず、特に生育後期における落水は、土壤中に蓄積したメタンの挙動に少なからぬ影響を与えていると予想される。

そこで本節では、栽培後期のポットを用いて、土壤中に残存したメタンの落水にともなう挙動を追跡した。

### <材料および方法>

#### 1. ポット

前節の実験 (1991年) で使用した、作付区 (化学肥料区・稲わら添加区) および無作付区 (稲わら添加区) のポット各2つを実験に供試した。

#### 2. 落水に伴うメタンフラックスの測定

各ポットの田面水の高さを約1cmになるように調整し、前節と同様注射筒を用いて透水液を採取した。自由水の重力落下が終了するまで採水を続け、透水液中のメタン濃度を測定した。同時に大気中に放出されるメタンを図2-3-1の様な仕組みを用いてチャンバー法で測定した。落水後、チャンバー内部のメタン濃

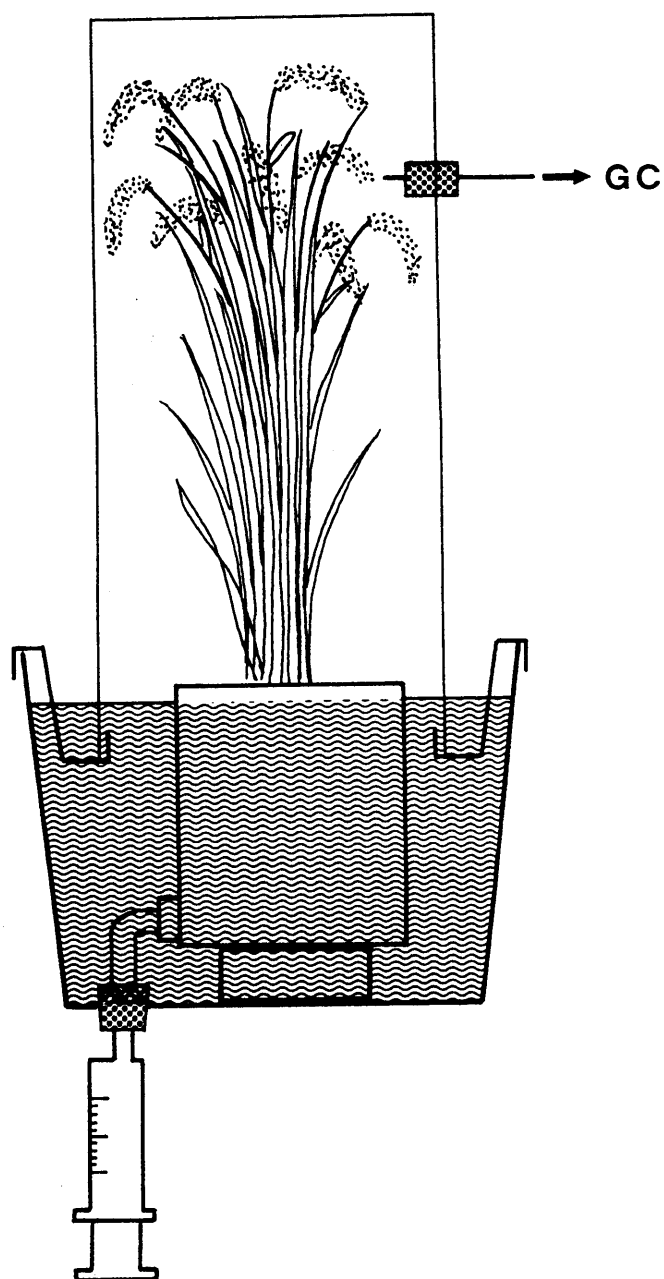


Fig. 2-3-1. Layout of the experiment.

度が急激に上昇したため、随時別途用意したチャンバーと速やかに交換した。

約24時間（無作付区）、あるいは48時間（作付区）の間にポットから放出されるメタン量を測定した後、先切れの注射筒（容積約25ml）を用いて、ポットから土壌（容積約20ml）を採取し、土壌水分含量、二価鉄含量を測定した。

また、落水実験に供試しなかったポット（作付区各1つずつ）を落水前のポットとみなし、同様に土壌中の水分含量、二価鉄含量を測定し、落水後のポットと比較した。

### < 結果および考察 >

#### 1. 落水時のメタンフラックス

##### a. 作付区（稲わら添加区・化学肥料区）

稲わら添加区・化学肥料区とも作付条件のポットから落水後メタンがほぼ一定速度で放出された（図2-3-2a）。メタンは主に水稻根内に発達した通導組織をパイプとして土壌から大気へと放出される。前節の実験で観察された栽培後期のメタン放出量の減少は、土壌水の浸入によるパイプの閉塞に起因すると考えられる。本結果から、落水にともなうポット水位の低下により、通導組織内の水が除かれ再びメタン放出量が増加したものと推察した。

稲わら添加区のメタン放出速度は化学肥料区に比べて高く、48時間で稲わら区から大気中へ放出されたメタンの量は化学肥料区の2倍以上であった。

いずれのポットにおいても落水時の透水液中のメタン濃度は栽培後期の透水液のそれにほぼ等しく、飽和レベルに達していると考えられた。しかしながら、透水量が少量（300-400ml）であったため、落水時のメタンの心土への移行量は大気への放出と比較して低かった。

##### b. 無作付区

無作付区ポットからのメタンの放出はポット間で大きく異なっていた（図2-3-2b）。落水にともないポットと土壌の間に隙間が生じたポット（写真2-3-1a）からは落水終了時（透水液が得られなくなった時点）より急激にメタンが放出され、全放出量の90%以上が落水後約7時間で放出された。そして24時間後には



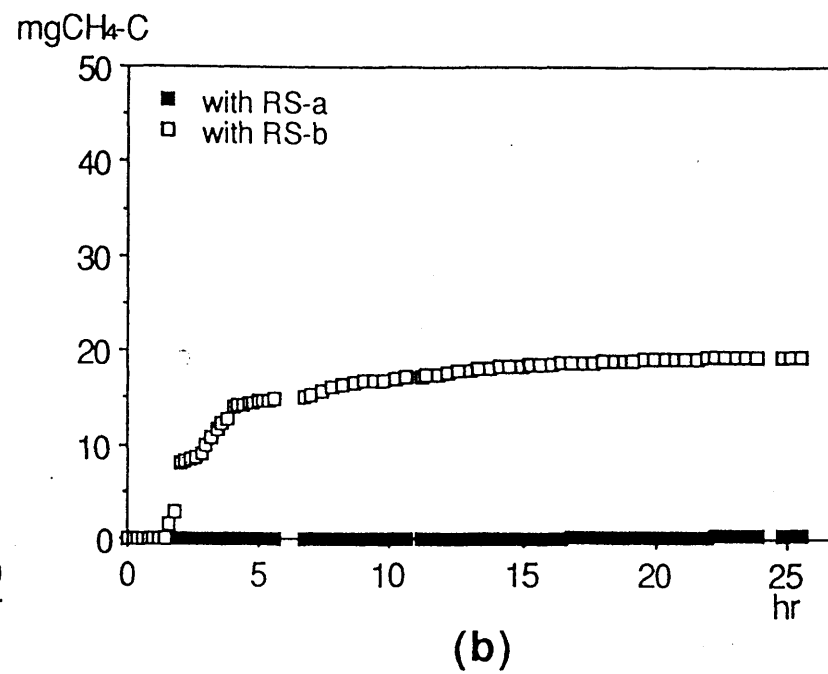
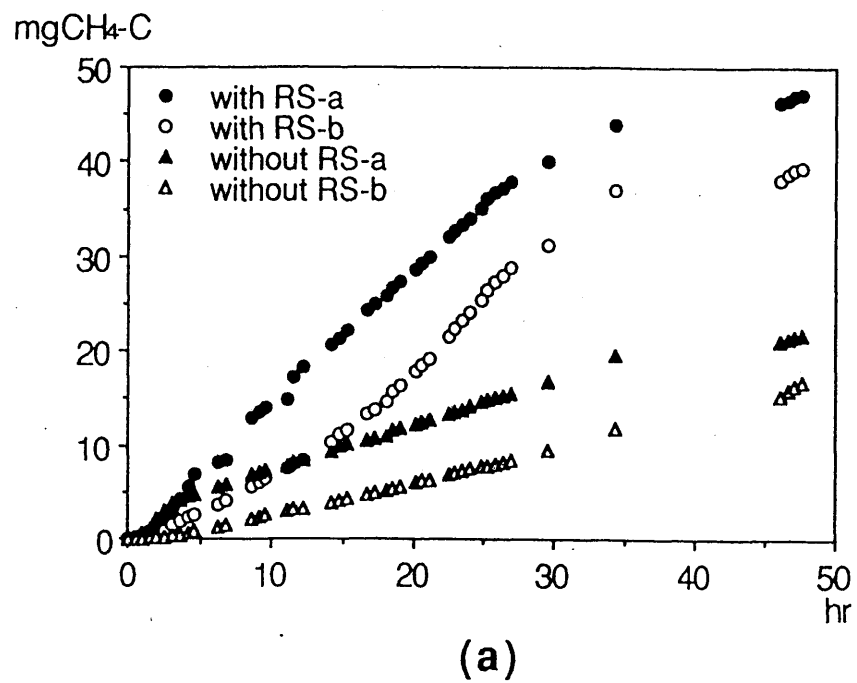
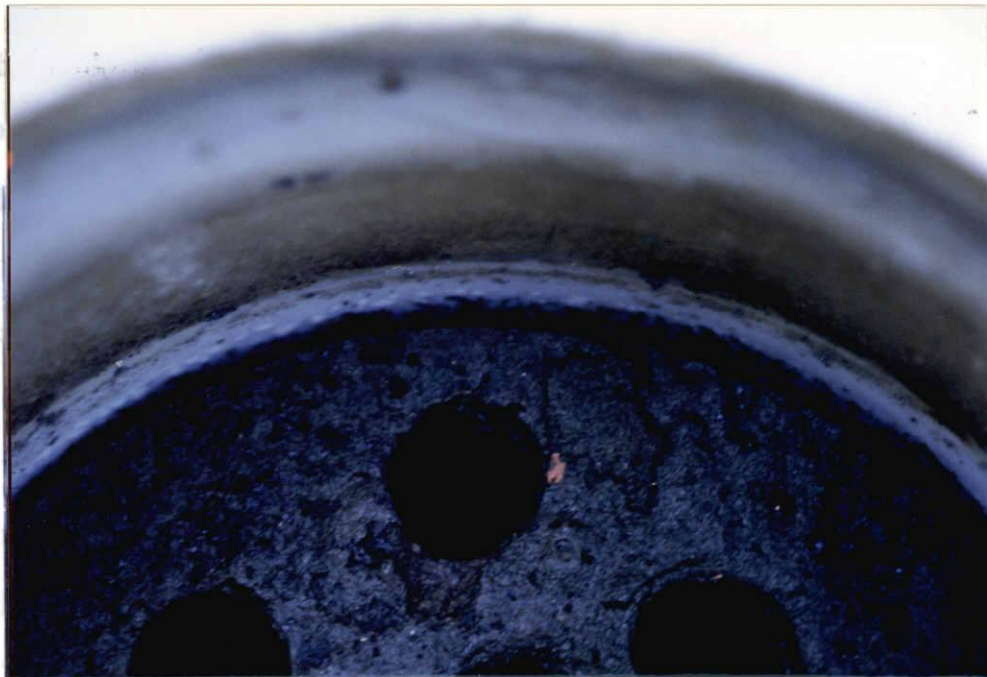
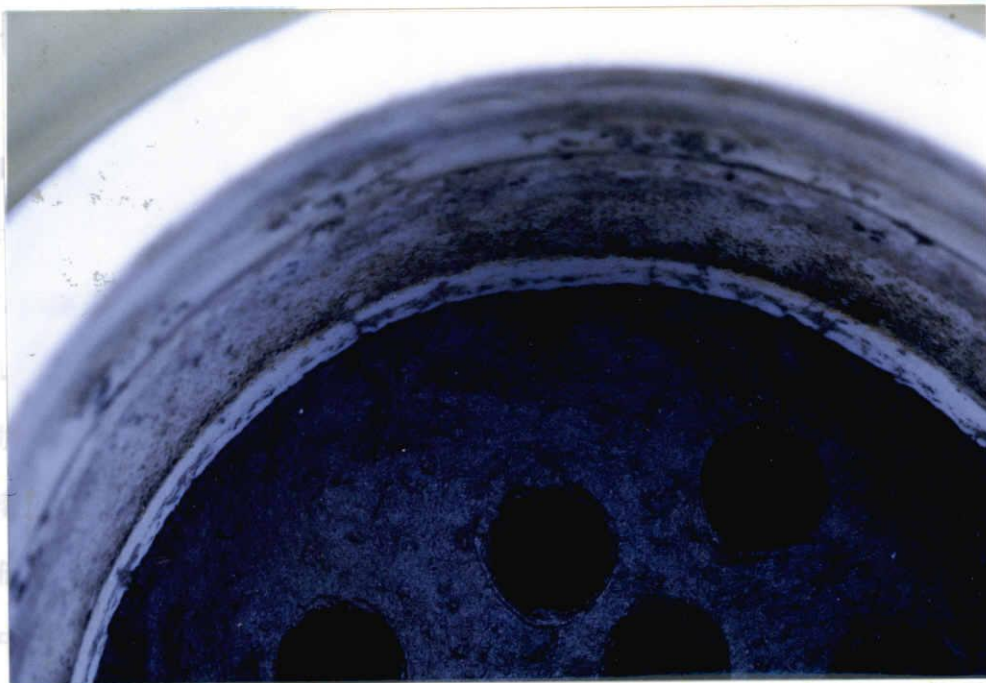


Fig. 2-3-2 Methane flux from drained pots. (a) planted pots; (b) non-planted pots



a



b

Photo 2-3-1. The non-planted pots after drainage.

a, The pot with large amount of methane emission.

b, The pot with small amount of methane emission.

ほとんど放出されなくなった。

一方、その様な隙間が観察されなかったポット（写真2-3-1b）からは落水後のメタン放出量は非常に低かった。正確な定量はできなかったものの、落水後24時間経過したポット中に相当量のメタン（ $>49.5\text{mg-C/pot}$ ）が検出され、活発なメタン放出が観察されたポットに比べて多量メタンが土壌中に残存していることが明らかになった。

無作付区では、メタンの放出は大気との直接的な接触によってのみ起こりうると考えられる。そのため隙間の観察されたポットではメタンの大気への移動が速やかに起こったが、一方隙間のないポットではメタンの放出は非常にわずかであると考えられた。

作付区と同様に、落水時の透水液中のメタン濃度はほぼ飽和に達しており、メタンの心土への移行量は透水量に比例的であったためポット間で大きな差はみられなかった。

## 2. 生育期間中のメタンフラックスとの比較

作付期間中と落水時における各ポットからの大気へのメタンフラックスを表2-3-1に示す。落水前のメタンフラックスは非常に低かったが、落水後は生育期間中の最大レベルと同等（化学肥料区）かあるいはそれをはるかに越える速度（稲わら添加区）でメタンが大気へと放出された。特に、無作付区においてその傾向は顕著で、放出速度が低いポットで栽培期間中の3-30倍、高いポットでは300-3000倍の速度でメタンが放出された。

作付期間中と落水時におけるメタンの大気および下方への移動量を表2-3-2に示した。約120日間の生育期間にポットから大気へ放出されたメタンの総量に対し、作付区では48時間でその4%（化学肥料区）から10%（稲わら添加区）が放出されていることが明らかになった。無作付条件で活発なメタン放出が観察されたポットからは生育期間中の放出量の2.8倍ものメタンが24時間で大気へ放出されていた。本実験では、ポットをアクリルチャンバーで常時覆った状態で測定を行っていたため、湛水土壤からの水分の消失は落水によるものだけである

Table 2-3-1 Methane flux to the atmosphere at the drainage stage (mg-C/day).

	During the rice growth priod				At the drainage		
	Max. — Min. (Mean)				A	B	
<hr/>							
Planted							
RS-plot	46.3	—	0.58	(22.1)	a	3.67	119.2
					b	4.57	88.7
CF-plot	35.9	—	0.05	(14.0)	a	4.43	38.5
					b	3.32	34.9
Non-planted							
(RS-plot)	0.39	—	0.04	(0.41)	a	0.04	1.2
					b	0.03	128.5

a, b: different pots of the same plot

A, before drainage; B, after drainage

Table 2-3-2 The amount of methane emitted to the atmosphere and leached to the subsoil at drainage stage (mg-C/pot)

	Rice growth period (120d)		At the drainage(48/24h)	
	Atmosphere	Subsoil	Atmosphere	Subsoil
Planted				
RS-plot	2521.2(100*)	71.0(2.8)	a	238.4(9.5)
			b	177.4(7.0)
CF-plot	1594.3(100)	38.5(2.4)	a	76.9(4.8)
			b	69.7(4.4)
Non-planted (RS-plot)	46.5(100)	148.4(319)	a	1.2(2.5)
			b	128.5(276)

\*, Relative value to the amount of methane emitted to the atmosphere during the rice growth period. a, b: Different pots of the same plot

と考えられる。実際には、土壌表面からの水分の蒸発散をともなうので、実際のメタン発生量は実験結果より高くなる可能性がある。以上のことから、落水時の大気へのメタン放出活性は生育期間中のそれに匹敵しており、特に大気へのメタン放出経路を持たない無作付条件では、土壌が大気と接触する落水時が重要な大気へのメタン放出の機会であることが明らかになった。

### 3. 落水時の水分含量・二価鉄含量の推移

落水後、作付区土壌の水分含量・二価鉄含量を測定し、落水を行わなかったポットを落水前と考え、両者を比較した（表2-3-3）。化肥区では落水の有無に関わらず二価鉄含量および水分含量に顕著な差は認められなかった。いっぽう稲わら区の非落水ポットでは化学肥料区に比べ水分含量が高かったが、落水により同程度まで低下した。また、二価鉄含量も落水により減少した。稲わら等の有機物の添加は、易分解性有機物の供給のほかに土壌の膨軟化、通気性、保水性の向上など物理的性質の改善効果を持つことが知られている。水分含量の低下・二価鉄含量の減少は、落水にともなう土壌の収縮と液相部への大気の侵入を示唆するものと考えられた。稲わら 添加区でメタンの放出が活発であったのはそのような土壌の物理的性質の変化によるものと推察した。

Table 2-3-3 The effect of drainage on the water content and the amount of ferrous iron in soil.

	Drainage (-)		Drainage (+)
Water content (%)			
CF-plot	32.4(100*)	a	32.3( 99.7)
		b	33.7(104.0)
RS-plot	40.7(100)	a	35.0( 86.0)
		b	34.0( 83.5)
.....			
Ferrous iron(g/pot)			
CF-plot	5.55 (100)	a	5.87 (106)
		b	6.11 (110)
RS-plot	6.08 (100)	a	3.26 ( 54)
		b	4.68 ( 77)

\*:Relative value to Drainage(-)

## 2-4 要約

水田は、適当量の田面水の下方への浸透が必要とされる。田面水の浸透が各種土壌成分の溶（流）脱に及ぼす影響が過去詳細に研究されてきたが、メタンに関する知見はこれまで得られていない。本章では田面水の浸透にともなう水田土壌中のメタンの動態とそれに及ぼす各種環境要因の影響を解明することを目的として一連の実験を行なった。

第1節では、稲わら添加量および田面水の浸透速度が水田作土から溶脱するメタン、水溶性有機態炭素（TOC）、ヘキソース、二価鉄、および二価マンガンの量に及ぼす影響を土壌カラム実験により検討した。水田土壌作土をガラスカラムに充填し湛水状態で静置した。定期的に透水液を採取し、透水液中の各成分を定量した。

透水液中のメタン濃度は、稲わら添加量（0.3-1.0%）が多いほど高かった。稲わら0.6%および1.0%添加区では透水液中のメタン濃度が培養開始後18日目頃まで経時的に増加し、その後は高い値を維持した。また、透水液中のメタン濃度から18日目以降土壌カラム内に多量に生成された気泡中のメタン分圧は0.84-0.91atmと計算された。

透水速度の変化（2.6、5.2および10mm/日）は透水液中のメタン濃度に影響を及ぼさず、結果的にメタンの溶脱量は透水速度の増加にともない比例的に増大した。実験期間（30日間）中のメタン溶脱量は、一作期間中に稲わらから生成するメタンの3、7および15%に相当すると推定された。

TOC、ヘキソース、二価鉄、二価マンガンの溶脱量もまた、稲わら添加量あるいは透水速度を増大させることにより増加した。これらの物質の透水液中の濃度は6-15日目にそれぞれ最大値を示し、その後メタン濃度の増加と対応して減少した。

第2節では田面水の浸透が作土で生成したメタンの大気および心土への移行におよぼす影響を1991年と1993年の二度にわたりポット実験で検討した。ポットに水稻を栽培し、ポットから大気へ放出されるメタンの放出速度をチャンバ

一法で測定するとともに、ポット下部の排水口から透水液を定期的に採取し、そのメタン含量を測定した。透水量とメタン濃度から田面水の浸透にともなうメタンの心土への移行量を算出した。また、作土から心土へ溶脱されるメタンの量をその他の水溶性有機物の量と比較した。

田面水の浸透が大気へのフラックスに及ぼす影響は1991、1993年で異なっていた。すなわち、1991年の実験では浸透速度の大小は大気へのメタンフラックスに影響を与えなかったが、1993年の実験では田面水の浸透により明らかにメタンの放出量が増大した。

心土へのメタン移行量は水稻体の影響を受け、水稻体からのメタン放出が活発な生育中期には減少し、水稻体の生育が未発達な生育初期や大気への放出量が減少した生育後期に増加した。また、浸透速度の上昇により、メタンの心土への移行量は比例的に増加した。

心土へのTOCの溶脱はメタンとは異なった水稻体・浸透速度の影響を受けており、生育後期に減少した。その結果栽培後期のポット（減水深15mm/日）では、メタン炭素の溶脱量がTOC炭素の溶脱量を上回った。

一作期間中に心土へ移行するメタン量は、大気および心土への移行量を合計した総移行量に対し、作付条件で2.4-8.6%、無作付条件では76-92%を占めることが明らかになった。

水田作土でのメタン生成は、土壌の酸化還元電位を下げる水管理（中干し・落水）によって著しく抑制されることが知られているが、それまでに生成したメタンの落水にともなうその後の消長についての知見は少ない。第3節では、収穫期のポットを用いて、土壌中に残存するメタンの落水時の挙動を追跡した。

落水時の透水液を注射筒を用いて採取し、メタン含量をGCで定量した。その結果、透水液中のメタン濃度は飽和に達しているものと推察された。採取した透水液量は、それほど多くなかった(2-300ml)ので、メタンフラックス全体に対する寄与は小さかった。

落水時にポットから放出されるメタンをチャンバー法で経時的に測定した。その結果、落水にともなうメタンが活発に放出されることが明らかになった。



特に土壤に稲わらを添加(0.6%)したポットではその傾向が顕著で、約48時間の間に大気へ放出されたメタンは、177-238mg-C/pot、栽培期間中の総放出量の7-9%に相当していた。一方化学肥料区では、落水にともなう放出量は稲わら添加区より少なかった(70-77mg-C/pot)が、栽培期間中の4-5%に相当しており、落水時のメタン放出が作付期間中に匹敵するかそれを上回る程度に活発であることが明らかになった。

無作付区からのメタン放出は、同一の処理区でもポット間で大きく異なっていた。すなわち、落水にともない急激に放出される場合、落水後もほとんどメタンが放出されない場合がそれぞれ観察された。

落水後の土壤の二価鉄含量を比色法で定量し、非落水ポットと比較した。その結果、活発なメタン放出が観察された稲わら添加区では、落水にともなう二価鉄量の減少が観察され、土壤の酸化が進んでいることが推察された。

### 第3章 作土で生成したメタンの移行とその後の動態

#### 序論

透水性の良好な水田では心土に柱状ないしは角塊状の構造が発達している。構造体の表面はキュータンと呼ばれ、有機物含量あるいは微生物数が高いという点で構造体内部とは異なった性質を有している（高井ら 1970, 和田ら 1971 a, b）。和田らは、作土から下降してきた浸透水に含まれる有機物が直接的あるいは微生物活動を介して間接的に心土の構造体表面の土壌物質に影響を及ぼした結果キュータン物質が生成すると報告している。このように、作土からの浸透水は心土の形成過程あるいは心土における微生物活動に少なからず影響を与えていると考えられる。

第2章において田面水の浸透にともない水田作土からメタンが溶脱されることが示された。メタンの溶脱は土壌還元の進行にともなって増加し、その量は同じく作土から溶脱されるヘキソース、有機酸などを含む水溶性有機物（TOC）に匹敵するか、あるいは時としてそれを上回ることが明らかになった。

溶脱したメタンもまた心土へ到達すると予想される。本章では溶脱したメタンのその後の動態をカラムを用いたモデル実験で検討した。その結果、作土から溶脱したメタンが、心土あるいは作土においても嫌気条件で酸化されることが明らかになったので、嫌氣的メタン酸化の機構を解明すべくさらに実験を行った。

### 3-1 作土から溶脱したメタンの心土での挙動

<はじめに>

本節ではまず、溶脱したメタンが心土でどのような作用を受けるかを検討した。

<材料および方法>

300gの福島水田作土(<2mm)と稲わら粉末(0.6%)と混合した後、ガラスカラム(内径:7cm、高さ:12cm)に充填し湛水状態にした。ガラスカラムの底部は第2章第1節で述べた通りガラスウールを敷き石英砂で底面を水平にした。

50gの福島水田心土(<2mm)を小ガラスカラム(内径:3cm、高さ:10cm)に充填し湛水状態にして、ガラス管を差し込んだゴム栓で蓋をした。作土のカラムと心土のカラムを図3-1-1の要領で接続し、次の4処理区を設けた。

作土区: 作土カラムのみ

心土区: 心土カラムのみ

作土+心土区: 作土カラムの下に心土カラムを1つ接続した区

作土+2心土区: 作土カラムの下に心土カラムを2つ接続した区

接続には黒ゴム管を使用し、その際、カラムに気泡が入らぬよう充分注意した。カラムは、前章と同様、アルミホイルで被い25°Cで培養した。3日毎にカラム下部から大気に触れないよう50ml注射筒を使って透水液を60ml採取し、メタン、TOC、二価鉄の測定に供試した。各成分の測定は先述の方法に準じた。また、透水を行わない心土カラムを準備して、カラム上部・下部を密封し30日間培養した。培養後の各心土カラムを解体し、前章の方法に準じて土壌中の二価鉄を抽出・定量した。

<結果および考察>

#### 1. メタン

図3-1-2に透水液中のメタン濃度の経時変化を示す。一回の透水量(60ml)は、心土カラムが保持する水量にほぼ等しいので、作土から心土へ移行した透水液

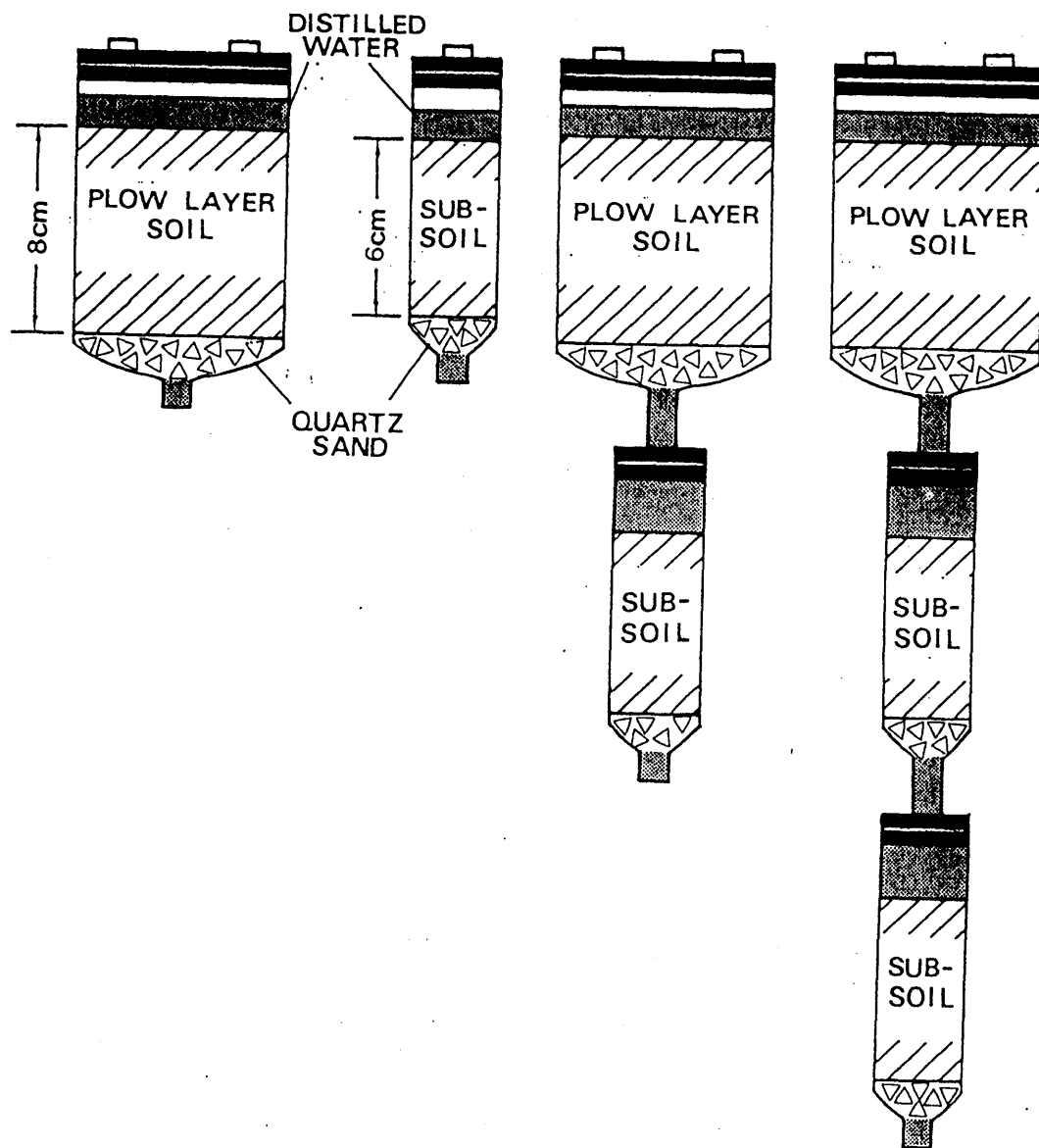


Fig. 3-1-1 Layout of experimental design.

は心土で3日間滞留した後に心土カラムから透水液として採取される。従って、作土+心土区からの透水液はその3日前の作土区からの透水液に対応している。同様に、作土+2心土区からの透水液は、作土から溶脱して6日後に採取されることになる。この処理区間の時間的なずれを考慮して、作土からの透水液とその3日後および6日後の作土+心土区、作土+2心土区からの透水液を比較する必要がある。このことは、メタン以外の成分についても同様である。

作土区では培養3日目の透水液中に初めてメタンが検出された。その後急激に増加し、18日目にほぼ飽和レベルに達した。一方作土+心土区では、12日目までメタン濃度は非常に低く、その後少しずつ増加した。心土カラムをもう1つ接続した作土+2心土区ではメタン濃度はさらに減少していたが作土+心土区との差は非常に小さく、先述の時間的なずれを考慮した場合、27日目に両処理区間の差が認められなくなった。心土区からの透水液には培養期間中メタンはほとんど検出されなかった。

本結果から、作土から溶脱したメタンは心土を通過することにより減少することが明らかとなった。その原因としては、心土によるメタンの吸着・保持、あるいは心土でのメタンの消費（酸化）が考えられる。心土によるメタンの吸着・保持が減少の主要な原因であるならば、心土カラムを2つ連結した作土+2心土区ではさらにメタン濃度は減少しているはずで、作土+心土区の結果から考えるとメタンはほとんど無くなっていることになる。しかしながら、心土の2連結によるメタン濃度の減少は非常にわずかであった。従って、作土から溶脱したメタンが心土で吸着・保持されている可能性は低く、消費されたと推察した。

## 2. TOC

透水液中のTOC濃度の時間的変化を図3-1-3に示す。作土区のTOC濃度は、前章第1節の結果と同様、15日目まで増加した後に急減し21日目以降漸減する傾向を示した。心土区からのTOCの溶脱量は、培養前半に緩やかなピークが観察されたものの実験期間中非常に少量であった（ $<17\mu\text{gC/ml}$ ）。

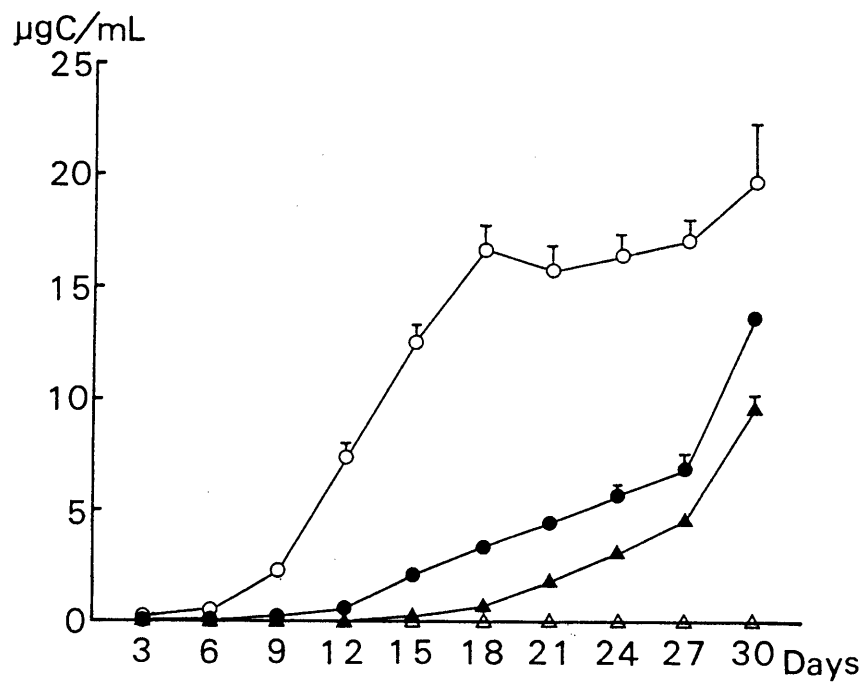


Fig. 3-1-2 Time course of methane content in leachate.  
 ○, plow layer soil ; △, subsoil ;  
 ●, subsoil connected to plow layer soil ;  
 ▲, two subsoil columns connected to plow layer soil.  
 The bars are half ranges.

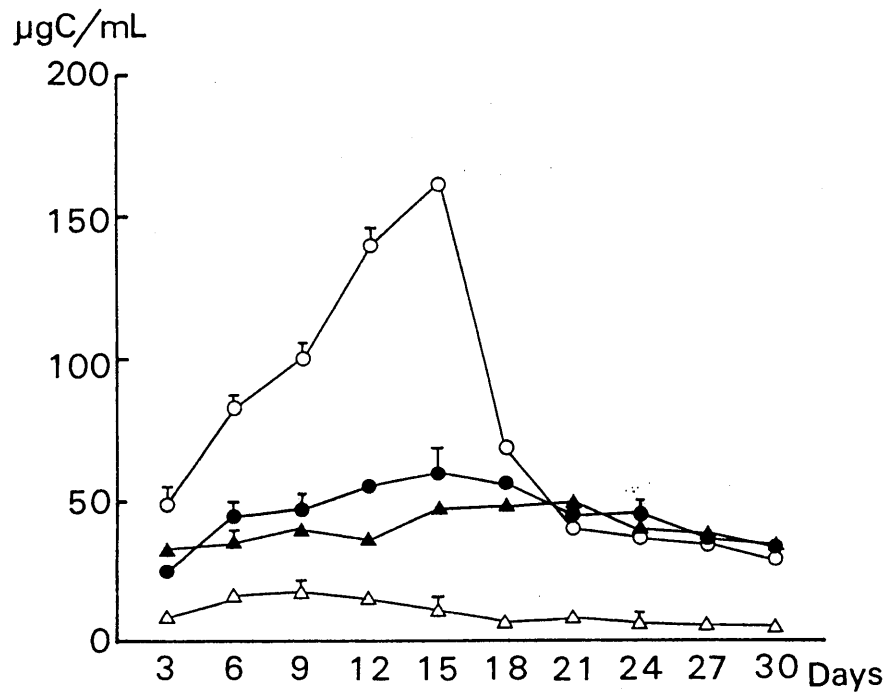


Fig. 3-1-3 Time course of TOC content in leachate.

○, plow layer soil ; △, subsoil ;

●, subsoil connected to plow layer soil ;

▲, two subsoil columns connected to plow layer soil.

The bars are half ranges.

作土 + 心土区、作土 + 2 心土区では、作土区で観察された急激なTOC濃度の上昇は認められず、 $23-61 \mu\text{gC/ml}$ の間ではほぼ一定であった。21日目には作土区と心土連結区との差が認められなくなった。接続した心土カラムの数によってTOC濃度に変化はほとんど認められなかった。以上の結果より、作土から溶脱したTOCの一部は心土、特に1つめの心土カラムで保持あるいは消費され、1つめの心土を通過したTOCは2つめの心土によって保持・消費されることなくさらに溶脱したと推察された。作土から溶出したTOCの成分は心土での保持・利用のされ易さから大きく2つに分類されることが考えられる。培養後期、作土区と心土連結区で透水液中のTOC濃度に差が認められなかったのは、この時期作土から溶脱するTOC成分は心土で保持利用が困難な有機物が卓越していたことによると推察した。

作土から溶脱する水溶性有機物に関しては、その後江崎(1992)が詳細に研究を行い、作土からの透水液中に含まれる水溶性有機物には、微生物に利用され易い物質(有機酸等)とフェノール性物質を吸着するPVP樹脂に保持されるフルボ酸に近い物質との2種類があることを見いだした。さらに、作土からのTOCの増減は有機酸の増減と深い関係にあり、培養前期にみられるTOCのピークはかなりの部分有機酸が占めその多くが心土で保持利用されること、培養後期の透水液は有機酸をほとんど含有しないことを明らかにしており、上記の推察はほぼ裏付ける結果を得ている。

### 3. 二価鉄

二価鉄は3日目から作土区の透水液で検出され、9日目まで急増した後に減少した(図3-1-4)。作土 + 心土区では透水液中の二価鉄含量は培養後期に少量検出されたものの作土区に比べ非常に少量であった。作土 + 2 心土区では30日間ほとんど二価鉄は検出されず、作土から溶脱した二価鉄の大部分が心土で吸着保持されたと考えられた。

溶脱した二価鉄の合計量と土壌中に存在していた二価鉄量、および心土における二価鉄生成量を計算し、表3-1-1に示した。尚、作土の影響がなかったとき



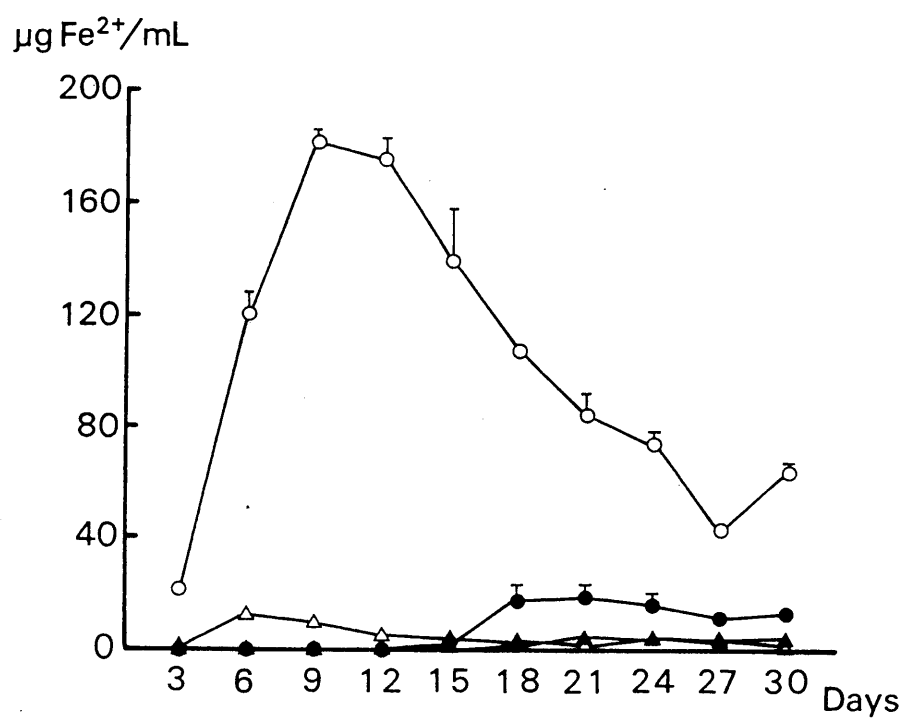


Fig. 3-1-4 Time course of  $\text{Fe}^{2+}$  content in leachate.  
 ○, plow layer soil ; △, subsoil ;  
 ●, subsoil connected to plow layer soil ;  
 ▲, two subsoil columns connected to plow layer soil.  
 The bars are half ranges.

Table 3-1-1 Total amount of  $\text{Fe}^{2+}$  in leachate and incubated subsoils.

	In leachate	In subsoil	(mmol)
Treatment 1	1.08	n.d.	
Treatment 2	0.04	0.15	0.27 <sup>a</sup>
Treatment 3	0.09	4.08	
Treatment 4	0.02	6.23	(4.09, 2.14) <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Subsoil column without incubation.

<sup>b</sup>  $\text{Fe}^{2+}$  contents in the 1st and 2nd subsoil columns, respectively

の心土での二価鉄の生成量は、密閉系で30日間培養した心土の結果から推定した。この結果から、心土では二価鉄の生成が起こっていることが明らかとなった。この事実は、作土から溶脱した有機物を基質とする微生物活動があったこと、心土が鉄還元系の進行する程度に還元的すなわち分子状の酸素が存在しなかったことを意味している。以上のことから、心土で起こったメタンの消費が嫌氣的に進行したと推察された。水田における嫌氣的なメタン酸化は、これまで報告例が無いが、海洋学・湖沼学の分野では数多くの直接的・間接的証拠が報告されている (Reeburgh and Heggie 1977, Kosiur and Warford 1979, Panganiban et al. 1979, Zehnder and Brock 1980, Reeburgh 1980, Devol and Ahmed 1981, Iverson and Blackburn 1981, Devol 1983, Oremland and Des Marais 1983, Alperin and Reeburgh 1984, Devol et al. 1984, Alperin and Reeburgh 1985, Iverson et al. 1987, Alperin et al. 1988)。

心土で消費されたメタン量は、接続した心土カラム数に関係なく0.08-0.25 mmol、作土から溶脱してきたメタンの22-67%と計算された。数字に幅があるのは、心土カラム中には土壌と接触していない浸透水が存在し、その浸透水の中のメタンが土壌水中のメタンと同様な挙動をとったか否かによって、計算値が変化するためである。心土を2つ連結してもメタンの消費量に差が無いこと、培養後期にメタンの消費量が減少したことから、心土におけるメタンの消費に一定の限界があると推察された。

同様にTOCの心土での消費（吸着を含む）量は、作土+心土区で0.62-1.86 mmol、作土+2心土区で0.7-2.11mmol、作土からの溶脱量のそれぞれ18-54%、21-62%に相当すると計算された。

### 3-2 心土における嫌氣的メタン酸化に関与する微生物および有機物の由来

#### <はじめに>

前節において作土から溶脱したメタンが心土で嫌氣的に消費されることが示された。

嫌氣的メタン酸化は、メタンを唯一の炭素源として進行する好気条件下でのメタン酸化とは異なり、酢酸・乳酸等メタン以外の有機物を要求することが報告されている (Davis and Yarbrough 1966, Panganiban et al. 1979)。しかしながら、心土は微生物が利用可能な有機物量に乏しく、微生物活性は低いと考えられる。一方、作土からの透水液中にはメタンとともに各種の微生物、有機酸等の水溶性有機物が含まれている (香川1968, 高井ら1968, 1969b, 香川・高井 1969, Esaki et al. 1993, Kimura et al. 1993)。また、作土から流脱した水溶性有機物の一部は心土で消費されることが前節において明らかとなった。従って、作土から流(溶)脱してくる微生物あるいは有機物が心土における嫌氣的なメタン酸化に何等かの影響を与えていることが予想される。本節では心土におけるメタン酸化に関与する微生物・有機物の起源を特定するために以下のようなカラム実験を行った。

#### <材料および方法>

福島水田作土 (<2 mm) 300gを基肥、0.6%稲わら粉末と混合してガラスカラム (φ 7 cm) に充填し湛水状態とした。ガラスカラムの下部に後述する処理を施した福島水田心土50gを蒸留水とともに充填した小ガラスカラム (φ 3 cm) を接続した。カラムは22-25°C暗条件で培養し、3日毎に60mlずつ透水液を採取した。採取した透水液のうち、最初の10mlは除外し、次の40mlをメタン、TOCおよび二価鉄含量の測定に供試した。45日間培養した後、心土カラムを解体し、土壌中の二価鉄を抽出定量した。

## ・心土の処理

心土中の微生物がメタン酸化に及ぼす影響を検討するためにオートクレーブ殺菌（120℃、30分）した心土を作土カラムに接続した区（殺菌区）、有機物の影響を検討するためにマッフルで550℃、12時間加熱し有機物を除去した心土を接続した区（有機物除去区）を用意し、無処理の心土を接続した区（対照区）と比較した。

## <結果と考察>

### 1. メタン濃度

各処理を施した心土を通過した透水液中のメタン濃度を図3-2-1に示す。比較のため、前節の作土区の結果を併せて示した。対照区のメタン濃度は前節と同様、作土からの透水液に含まれるメタン濃度に比べて明らかに低く、心土におけるメタン酸化が確認された。殺菌区・有機物除去区ともにそのメタン濃度は対照区のメタン濃度と大差が認められなかった。嫌氣的なメタン酸化には、メタンの他に酪酸・酢酸等の有機物が必要であると考えられる（Davis and Yarbrough 1966, Panganiban et al. 1979）ことから、心土におけるメタンの酸化には、元来心土に存在する微生物ではなく、メタンと共に作土から流脱してきた微生物が関与しており、同じく作土由来の有機物が基質として利用されたと推察された。本結果から、嫌氣的メタン酸化が心土のみならず作土においても進行している可能性が示唆された。

### 2. TOC濃度

各透水液中のTOC濃度をメタンと同様、前節の作土区の結果と共に図3-2-2に示した。対照区からの透水液中のTOC濃度は、前節の結果およびEsaki et al. (1993)の知見と同様、作土からの透水液に比べて低く、作土からの水溶性有機物が心土で吸着・利用されていることが確認された。殺菌区では、特に実験初期のTOC濃度が増加しており、心土中のバイオマスあるいは有機物がオートクレーブ処理により可溶化し溶脱したと考えられた。有機物除去区と対照区の間で顕

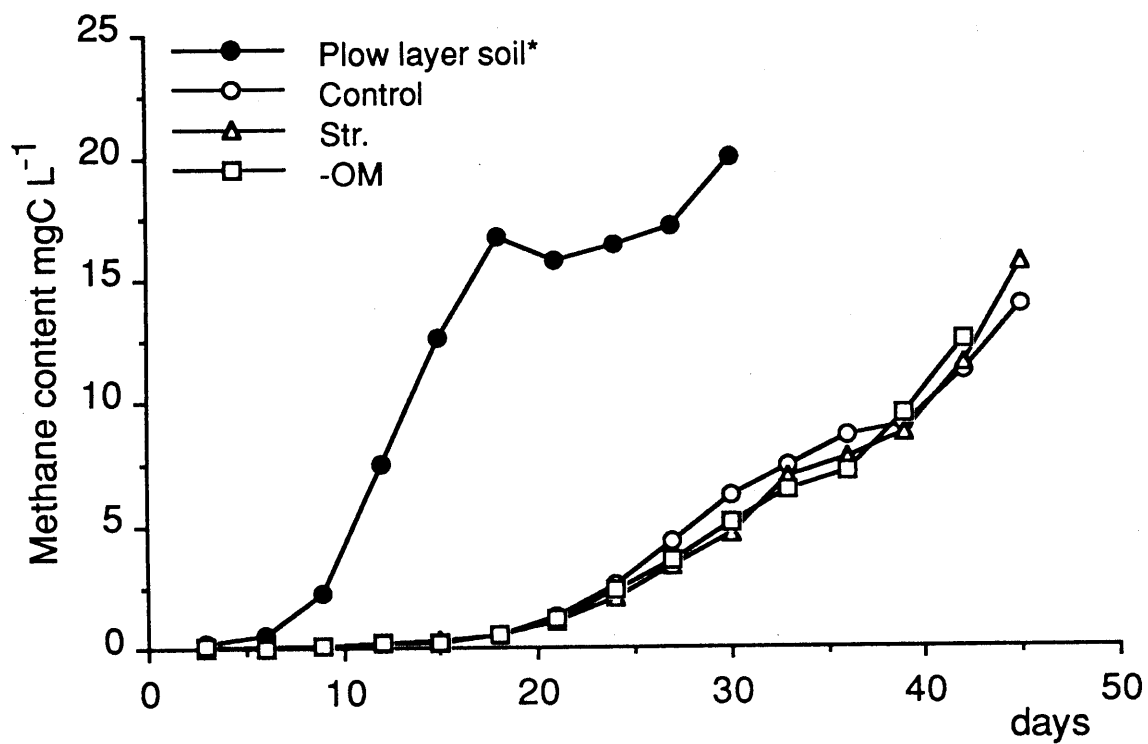


Fig.3-2-1 The effect of subsoil on methane content in the leachate.  
\*: data from Fig. 3-1-2

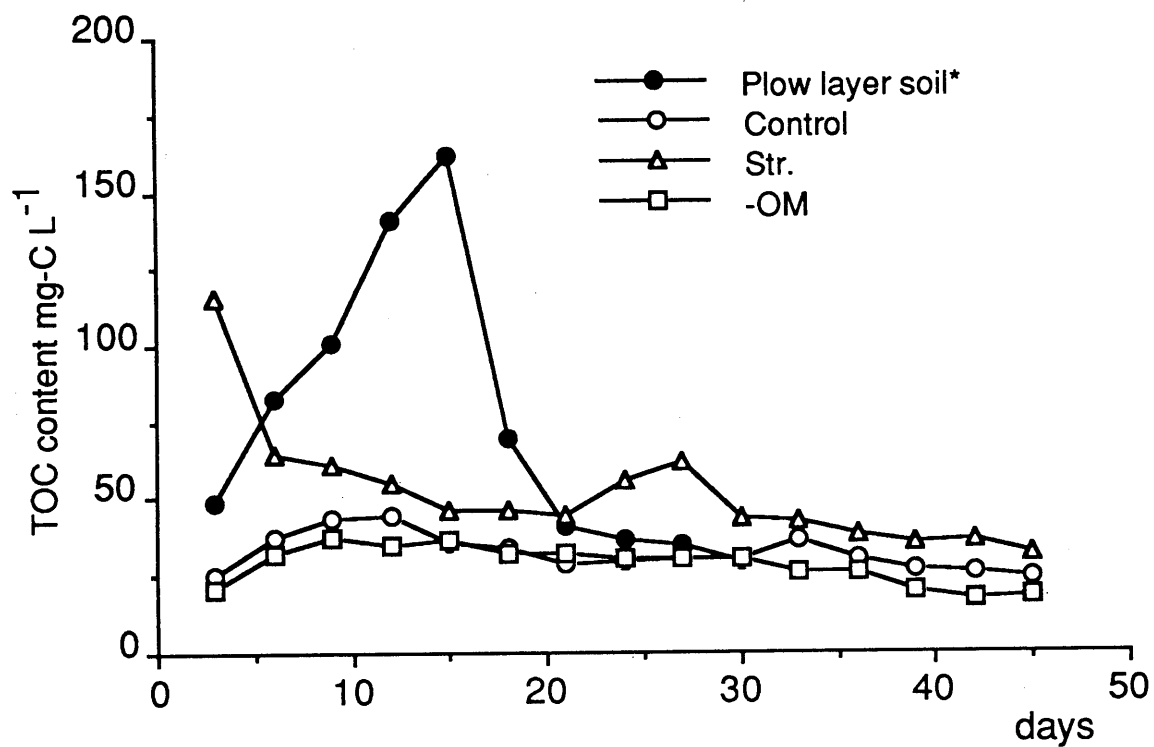


Fig.3-2-2 The effect of subsoil on TOC content in the leachate.  
\*: data from Fig. 3-1-3

著な差異は認められなかった。

### 3. 二価鉄含量

対照区、有機物除去区では透水液中の二価鉄含量は非常に低かった（図3-2-3）。殺菌処理により二価鉄の溶脱量が増加した。オートクレーブ処理により利用可能になったバイオマスあるいは土壌有機物が作土から流脱した微生物によって代謝され、心土の還元が進行したためと推察した。

培養期間中に溶脱した二価鉄量と、終了時の土壌中の二価鉄含量を表3-2-1に示した。両者の合計を処理区間で比較すると、有機物除去区<対照区<殺菌区の順であった。この順序は微生物が利用可能な心土中の有機物量を反映していると考えられ、心土での二価鉄の生成への心土の微生物・有機物の関与が示唆された。

以上の結果から、心土中の微生物・有機物は直接的あるいは間接的な微生物活動を反映する鉄還元には寄与しているものの、心土における嫌氣的メタン酸化には、作土から流脱した微生物が関与しているものと推察された。



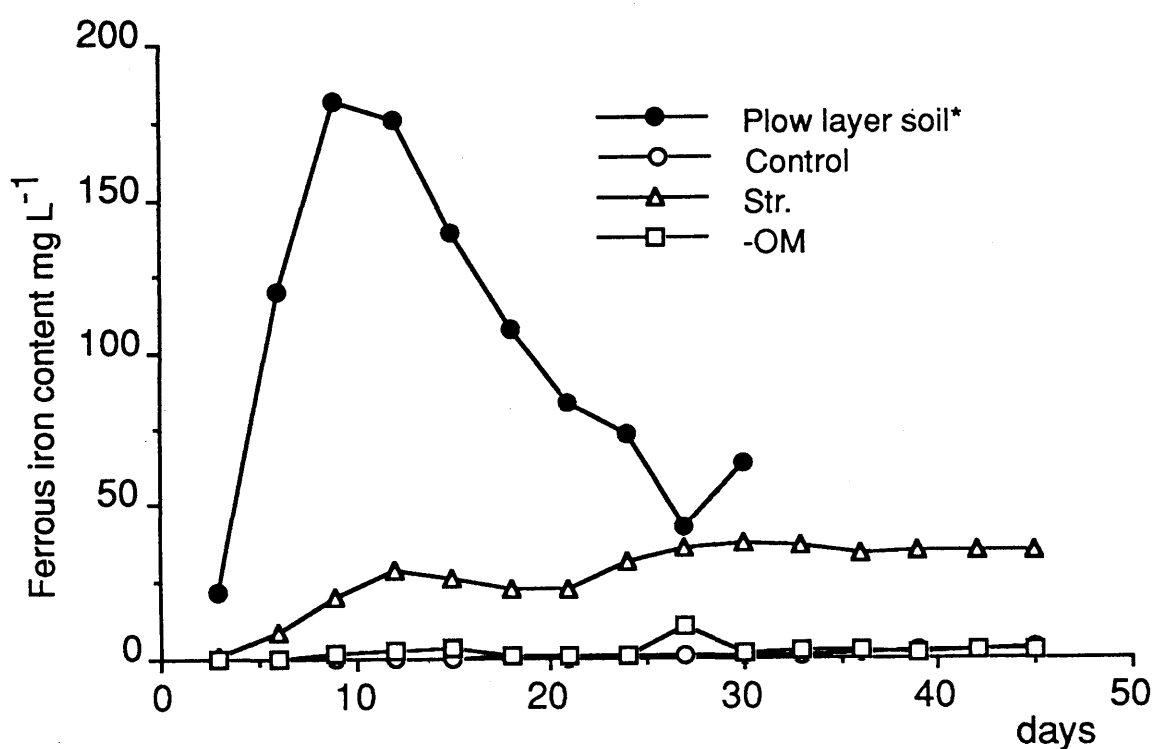


Fig.3-2-3 The effect of subsoil on Fe(II) content in the leachate.

\*: data from Fig. 3-1-4

Table 3-2-1 Total amount of Fe<sup>2+</sup> in leachate and in subsoil at the end of incubation(mg)

Treatment	Leachate	Subsoil
Control	0.8	126
Str.	24.5	273
-OM	2.1	65

### 3-3 作土における嫌氣的メタン酸化

#### <はじめに>

土壤環境は微生物にとって極めて不均一な場であると考えられる。すなわち、植物遺体周辺、根圏は基質に富んだ微生物活動の盛んな場であるのに対し、例えば土壤鉱物表面は基質に乏しいと言える。また、水田土壤の窒素代謝に関して、硝化作用は土壤表面の酸化層で、脱窒はその直下の還元層で起こることを高井・上原(1973)が報告している。このように土壤中での微生物活動は微視的な場でそれぞれ異なっていると考えられる。

メタンの生成および酸化も水田土壤の異なる部位で起こっていると予想される。メタンの酸化は根圏や土壤と田面水の境界付近で起こっていることが示唆されている(de Bont et al. 1978, Holzapfel-Pschorn et al. 1985, 1986, Sass et al. 1990)。また、Seiler et al. (1984)は田面水における酸化はわずかであることを報告している。以上のメタン酸化はすべて好氣的なメタン酸化を想定している。

本章第1、2節において、心土における嫌氣的なメタン酸化が指摘され、それには作土から流脱してきた微生物が関与していることが示唆された。この結果から嫌氣的にメタンを酸化する微生物は作土層においても働きうると予想された。

本節では前節と同様なカラム実験で土壤の不均一性を考慮した作土における嫌氣的メタン酸化の可能性を検討した。

#### <材料および方法>

福島水田作土および安城水田作土(ともに<2mm)を実験に供試した。基肥を添加した土壤に、稲わら粉末を0、0.3、0.6%となるように混合した。異なる稲わら添加濃度の土壤150gずつを表3-3-1の組合せに従いガラスカラム(内径:7cm、高さ:12cm)に充填し、2層からなる土壤カラムを作成した。先述の通り、カラムの底部はガラスウール・石英砂で平らにし、土壤は蒸留水を用いて充填し、

Table 3-3-1 The amount of rice straw applied into the soil layers.

Plot	The upper layer	The lower layer
Plot 1	0.3	0.3
Plot 2	0.6	0
Plot 3	0	0.6
Plot 4	—*	0.6
Plot 5	—	0 (w/w%)

\* Plots 4 and 5 consist of one soil layer.

その際土壌中に気泡が残らないよう注意した。2層の土壌を識別できるよう2層の土壌間には石英砂約20gを挿入した。また、表3-3-1に示した通り、稲わら粉末0および0.6%を添加した土壌1層のみの土壌カラムも比較のためそれぞれ用意した。

土壌カラムは湛水状態とし、暗条件25°Cで培養した。3日毎に50ml注射筒で80ml（土壌150gが保持する水の量に相当）を採水し、透水液中のメタン、TOC、無機態炭素(IC)、二価鉄含量を測定した。メタン、TOC、二価鉄は前述の方法に準じて測定し、ICは50mlの注射筒の先に付けたセプタムから直接透水液をとり、溶存炭素計（島津TOC-500）で測定した。

## < 結果 >

### 1. メタン

透水液中のメタン濃度の経時的变化を図3-3-1に示す。稲わら無添加の土壌カラム（plot5）の透水液中のメタン濃度は培養期間を通して非常に低かった。plot4（0.6%稲わら添加）では、6日目より透水液中のメタンが増加し、安城（図3-3-1a）で21日目に、福島（図3-3-1b）で27日目にほぼ一定値に達した。この時の土壌気体のメタン分圧は安城、福島でそれぞれ0.91、0.84atmと計算された。plot3（上層稲わら0%、下層0.6%）ではメタン濃度は若干低いもののplot4と似たような傾向を示した。plot2（上層稲わら0.6%、下層0%）からの透水液中のメタン濃度は特に培養前半、plot3あるいはplot4比べ低かった。plot1（全層稲わら0.3%）はplot2と同様な傾向を示した。

安城土壌の各処理区からのメタンの溶脱量は福島土壌に比べて高かった。

### 2. TOC

透水液中のTOC濃度を図3-3-2に示す。安城土壌（図3-3-2a）では稲わら無添加区（plot5）で培養中期まで低く、後半徐々に増加した。一方plot3,4では12日目に鋭いピークを示した後に急激に減少した。plot2のTOC濃度のピークも12日目にみられたが、plot3,4に比べ低かった。21日目以降各処理区ともTOC

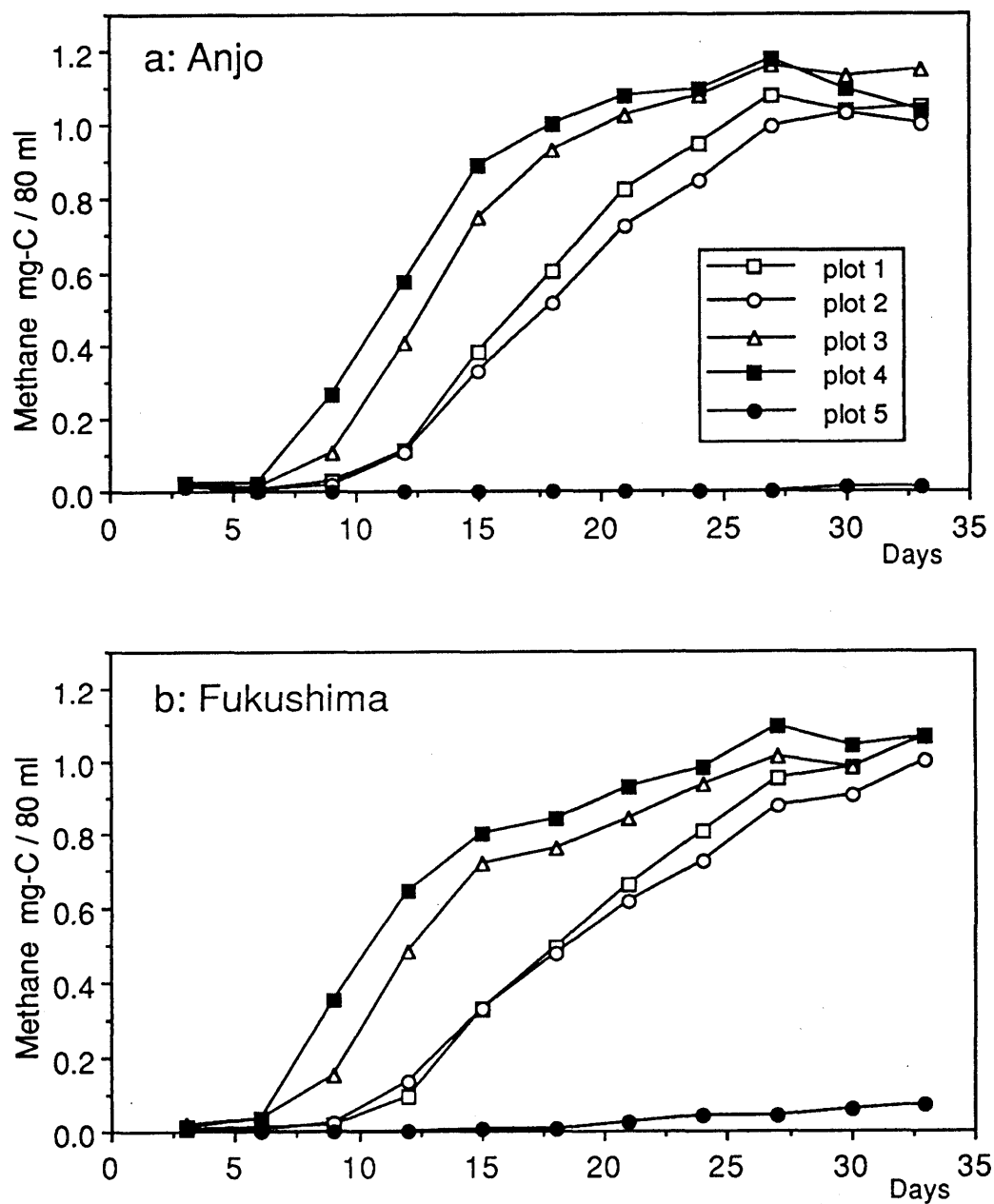


Fig. 3-3-1 Time course of methane content in leachate.

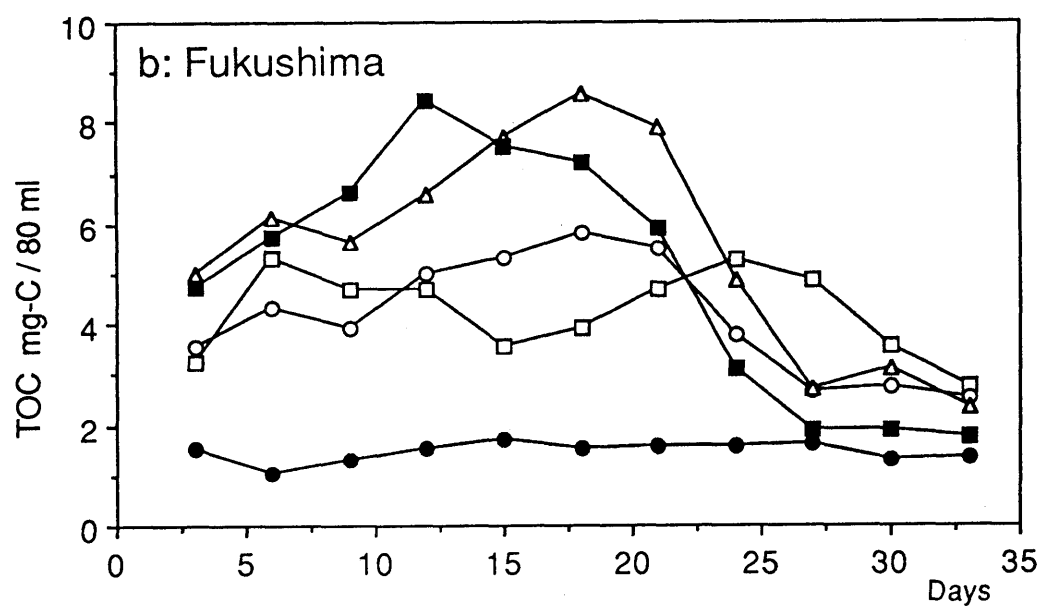
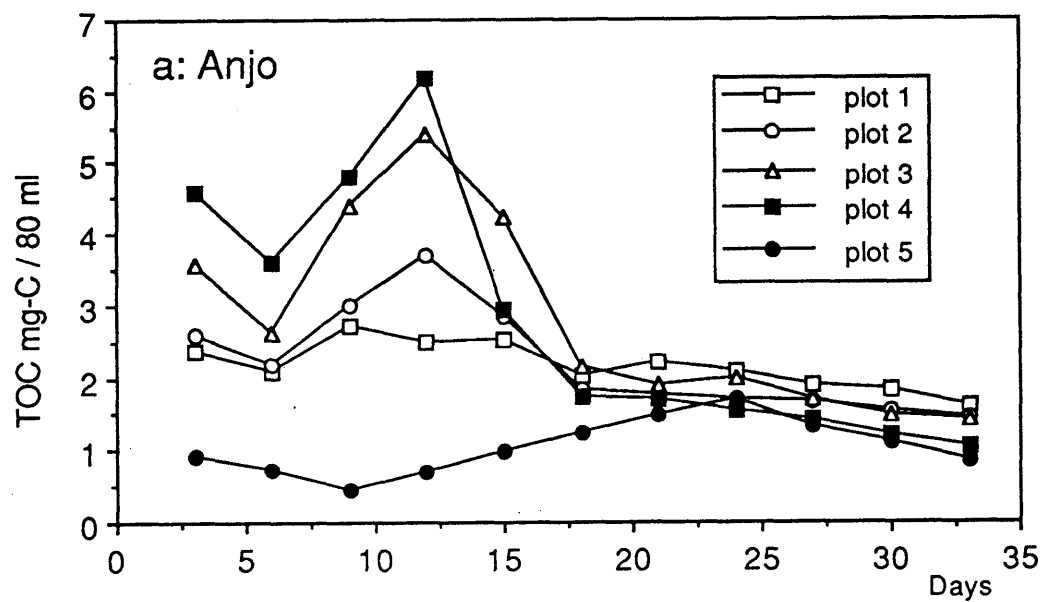


Fig. 3-3-2 Time course of TOC content in the leachate.

濃度は安定した値を示したが、2層のカラム（plot 1, 2, 3）の方が1層カラム（plot 4, 5）に比べ高い傾向を示した。福島土壤（図3-3-2b）の場合、plot 5では培養期間中TOC濃度は低い値で安定していた。plot 4のTOCのピークは12日目に、plot 3は18日目に観察された。plot 2からの透水液中のTOC含量は培養初期と後期に小さなピークが認められた。培養後半plot 1, 2, 3のTOC濃度はplot 4, 5に比べ高かった。

福島土壤の各処理区のTOC濃度は対応する安城土壤の各処理区のTOC濃度に比べて高い値を示した。

### 3. IC

透水液中のIC濃度の経時的变化を図3-3-3に示す。ICも稲わらを添加しないと非常に低い値を維持した。plot 4では安城土壤で9日目、福島土壤で6日目にピークに達した後に漸減した。plot 3ではplot 4と類似した傾向を示したが、その量はplot 4よりも高かった。plot 2では15日目（安城土壤）と12日目（福島土壤）にピークに達し、他の区と同様に以後漸減した。福島土壤からの透水液は概して安城土壤に比べIC濃度が高かった。また、両土壤とも2層カラムの方が1層カラムに比べ12日目以降IC濃度は高かった。

### 4. 透水液中の二価鉄

透水液中の二価鉄量の経時变化を図3-3-4に示す。plot 5では二価鉄濃度は培養期間中非常に低かった。plot 4では12日目（安城土壤）および9日目（福島土壤）に最大値に達し、以後漸減した。plot 3はplot 4と似たような傾向を示したが、plot 4に比べて絶対量は高かった。plot 2は培養期間中二価鉄濃度が少しずつ増加を続けたが、特に培養前半plot 4に比べて非常に低かった。本結果は、plot 2の稲わらを含む上層から溶脱してきたであろうはずの二価鉄が下層で保持されていることを示唆していると考えられた。福島土壤からの透水液は安城土壤に比べて二価鉄含量が高く、ピークにも早い時期に達することが観察された。

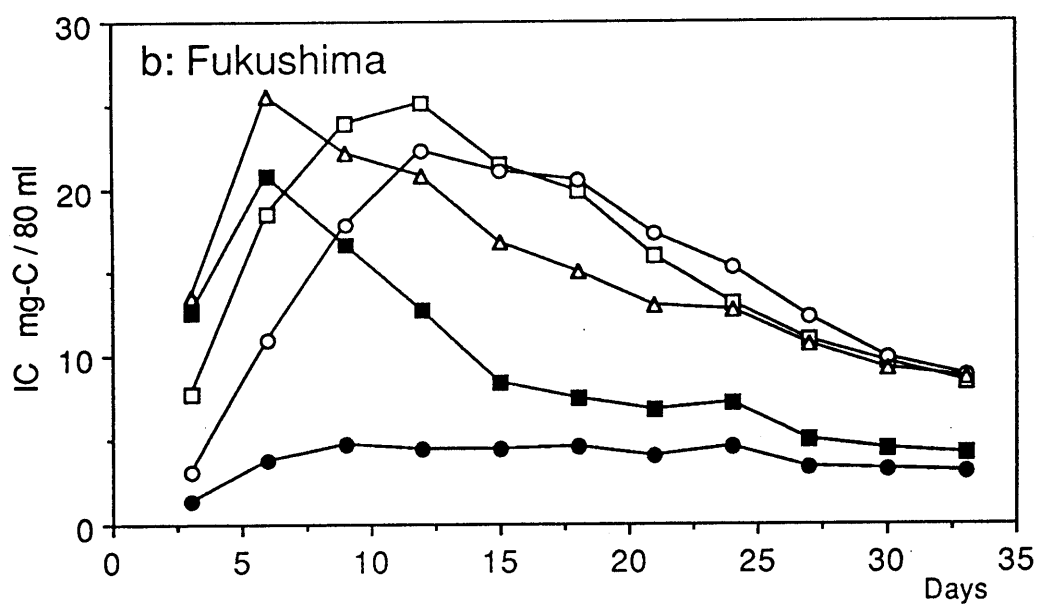
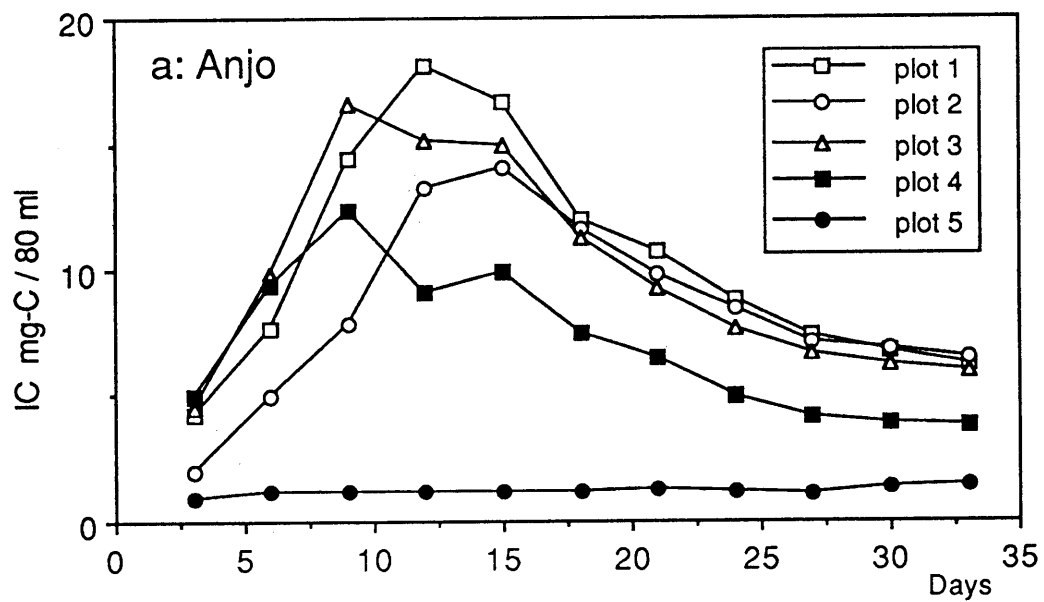


Fig. 3-3-3 Time course of IC content in the leachate.



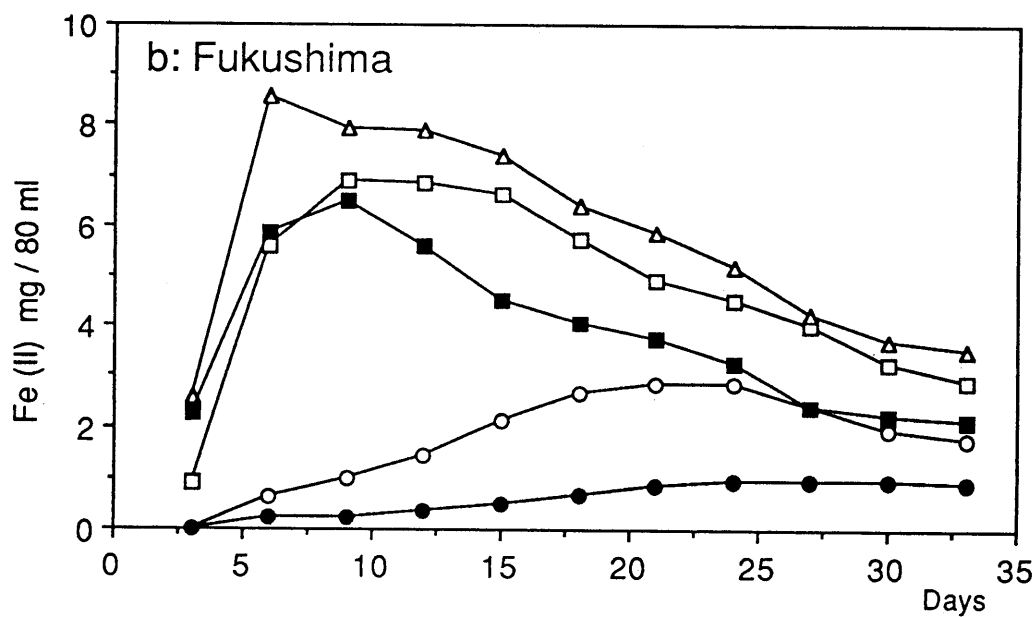
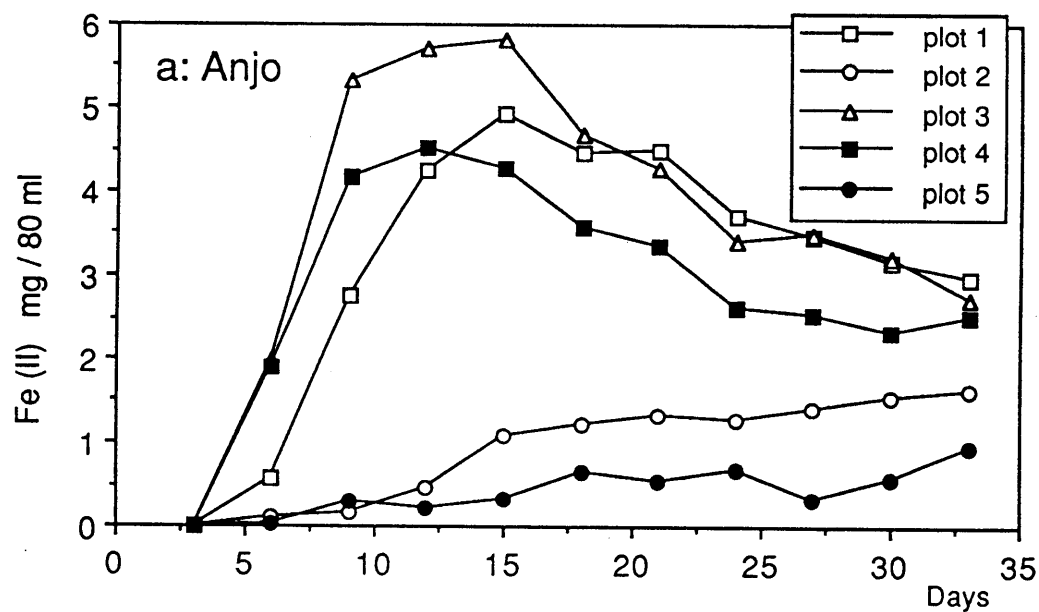


Fig. 3-3-4 Time course of Fe(II) content in the leachate.

## 5. 培養終了時の土壌中の二価鉄含量

培養終了時の土壌カラムの各層位の二価鉄含量の測定の結果を表3-3-2に示す。稲わらを添加した層位、すなわちplot1、plot2の上層、plot3の下層、そしてplot4の二価鉄含量は稲わらを添加していない層位よりも高かった。plot2の下層はそのほかの稲わらを添加していない層位(plot3の上層、plot5)に比べ高い二価鉄含量を示した。各処理区の各層位で福島土壌の方が安城土壌に比べ二価鉄含量は高かった。

### < 考察 >

これまでの結果と同様、稲わらの添加によって透水液中のメタン、TOC、二価鉄の量は増加し、ICもまた稲わら添加の影響を強く受けていることが明らかになった。

plot2のメタン溶脱量は、plot4に比べて特に培養前半低いことから、plot2の上層(稲わら添加土壌)で生成したメタンが下層で消費されたと判断された。また後述するように、心土の場合と同様に下層で二価鉄の生成が認められたことからplot2の下層も無酸素状態であることが明らかとなった。以上のことから稲わらを含む作土層で生成したメタンが透水によって、稲わらを含まない、分子状の酸素は存在しないが比較的酸化的な下層へと移動し、そこで酸化されることが明らかとなった。

本結果から、水田土壌作土で生成したメタンの挙動について次のように考えることができる。作土中の有機物に富む、還元状態の進んだ部位で生成したメタンは拡散あるいは浸透により垂直あるいは水平方向に移動し、近傍の相対的に酸化的な部位で嫌氣的に酸化される。稲わらを0.3%の濃度で均一に土壌カラム全体に混合したplot1は、plot2と似たような傾向を示したが、これはメタン生成活性が低かったことを示すとともに、酸化と生成が同時に起こっている可能性を示唆するものと考えられた。

培養後期にはplot2とplot4との差がほとんど無くなり、心土におけるメタ

Table 3-3-2 Ferrous iron content in soil layers at the end of incubation

		The upper layer	The lower layer
Anjo	Plot 1	601	607
	Plot 2	575	436
	Plot 3	266	645
	Plot 4	—	601
	Plot 5	—	209
<hr/>			
Fukushima	Plot 1	1680	1776
	Plot 2	1713	1540
	Plot 3	1244	1793
	Plot 4	—	1753
	Plot 5	—	1219(mg/ column)

ン酸化と同様に作土においても嫌氣的メタン酸化に一定の限界が存在すると推察された。

TOCもplot2の下層（稲わら無添加）を通過することにより減少しており、作土においてもTOCが生成した部位とは別の部位で保持・利用されることが明らかとなった。plot1のTOC含量はplot3あるいはplot4に比べて低かったが、ICはplot3,4に匹敵するか、あるいはそれよりも高い値を示した。この結果から、plot1では活発に稲わら中の有機物の無機化が起こっていると推察された。

透水液中の二価鉄のピークがICのピークとほぼ同じ日に観察されており、稲わらの分解が鉄の還元と共役していると考えられた。plot3の二価鉄の溶脱量は他の処理区と比較して高かったのは、上層で透水液中の溶存酸素が消費されてしまったため、下層での稲わらの分解にはもっぱら土壌中の鉄の還元を中心とした嫌気分解が進行したためと考えられた。

福島土壌カラムからの透水液のTOC、IC、二価鉄含量は安城土壌カラムのそれに比べて高く、そのピークも安城土壌に比べ早期に観察された。この結果は、福島土壌で微生物活性が高いことを示しており、その原因は嫌気状態の水田土壌における主たる電子受容体である易還元性鉄の量的差異（安城土壌1.10、福島土壌2.23 g/100g soil）によると考えられた。安城土壌の方がメタン溶脱量が多かったのも本土壌の酸化容量が小さいためにメタン生成に寄与する有機物の割合が福島土壌に比べ高かったことによると推察された。

培養期間中に溶脱したメタン、TOC、ICおよび二価鉄の合計量を表3-3-3に示した。plot4と5から稲わら添加に由来するメタン、TOC、ICの増加量を計算すると安城土壌で添加した稲わらの2.1,4.9,16.0%、福島土壌では1.9,9.8,16.2%に相当していた。

plot2の下層における各成分の生成あるいは消費量をplot2,4,5からの溶脱量の差から推定した（表3-3-4）。二価鉄生成量の推定には培養終了時の土壌中の二価鉄量も考慮した。下層で消費されたメタンは安城で1.68mgC(0.14mmol)、福島では1.89mgC(0.16mmol)で、上層から溶脱したメタン（plot4から推定）のそれぞれ23.28%に相当していた。

Table 3-3-3 Total amount of CH<sub>4</sub>, TOC, IC, and Fe<sup>2+</sup> leached from the soil column. (mmol)

		CH <sub>4</sub>	TOC	IC	Fe <sup>2+</sup>
Anjo	Plot 1	0.51	1.99	9.42	0.62
	Plot 2	0.47	2.02	7.70	0.18
	Plot 3	0.65	2.57	9.01	0.73
	Plot 4	0.69	2.56	6.38	0.57
	Plot 5	0.00	0.96	1.10	0.08
<hr/>					
Fukushima	Plot 1	0.45	3.87	14.55	0.93
	Plot 2	0.43	3.76	13.28	0.35
	Plot 3	0.59	5.04	14.01	1.13
	Plot 4	0.65	4.56	8.84	0.76
	Plot 5	0.02	1.33	3.48	0.12

Table 3-3-4 The amount of CH<sub>4</sub>, TOC, IC, and Fe<sup>2+</sup> produced(+) or consumed(−) in the lower layer of Plot 2. (mmol)

	Anjo	Fukushima
CH <sub>4</sub>	−0.14	−0.16
TOC	−1.41~−1.54	−1.99~−2.16
IC	+0.46~+0.54	+1.18~+1.33
Fe <sup>2+</sup>	+3.60	+5.21

plot 2 の下層で TOC が減少し、一方 IC が増加していたことから、透水液中の有機物が下層で利用されていることが明らかとなった。嫌氣的メタン酸化にはメタンの他に炭素源が必要であると考えられているので、利用された TOC の一部がメタン酸化に関与していると推察された。下層で増加した IC の量から考えて、少なくとも保持された TOC の 21-28% が安城土壌の下層で、47-59% が福島土壌の下層でそれぞれ消費されたと計算された。二価鉄生成量も福島土壌で高く、福島土壌の高い微生物活性が示された。一方、メタンの酸化量も、福島土壌の方が安城土壌より 15% 程度高かったが、TOC の消費量に比べ顕著な差異ではなかった。

### 3-4 嫌氣的メタン酸化に関与する酸化剤の解明

#### <はじめに>

前節までに、水田土壌作土で生成したメタンは、作土の相対的に酸化的な部位や心土において嫌氣的に酸化されることを明らかにした。先述したように、嫌氣的メタン酸化に関しては湖沼・海洋の水および堆積物環境で既に多くの研究がなされている。そのうちいくつかはそのメカニズムの解明を試み、僅かな例外を除いていずれも硫酸還元との共役でメタンが酸化されると推察している (Davis and Yarbrough 1966, Reeburgh and Heggie 1977, Kosiur and Warford 1979, Panganiban et al. 1979, Zehnder and Brock 1980, Reeburgh 1980, Iverson and Blackburn 1981, Devol 1983, Oremland and Des Marais 1983, Alperin and Reeburgh 1984, 1985, Iverson and Jorgensen 1985, Iverson et al. 1987)。

水田土壌では、硝酸イオン、二酸化マンガ、酸化鉄、硫酸イオンが嫌気呼吸における主な電子受容体であると考えられる。本節では、土壌カラム実験により嫌氣的メタン酸化に関与する電子供与体の解明を試みた。その結果、水田においても硫酸イオンの関与が示唆されたので、心土におけるメタンの酸化と硫酸イオン還元の量的関係についても検討した。

#### <材料および方法>

##### 1. 透水液によるメタン酸化

第2章第1節の方法に従い土壌カラムを作成した。すなわち、福島水田作土 (<2 mm) 300gに稲わら粉末 (0.6%) を混合し、ガラスカラムに充填後湛水状態として、暗所25°Cで培養した。3日毎に100mlの注射筒で透水液を60ml採取した。最初と最後の10mlを捨て、中間の40mlを実験に供試した。

透水液40mlの入った100ml注射筒の口からセプタムを通して窒素ガス40mlを注入し、10分間振とうの後窒素ガスだけを排除した。この操作を4回繰り返し透水液中のメタンを除去した。この透水液4mlを二重ゴム栓をつけた小型注射筒

(容積10ml) に大気に触れないように注入した。ついで、その小型注射筒に各種酸化剤の入った蒸留水1ml、基質溶液10 $\mu$ l、最後にメタン飽和蒸留水100 $\mu$ lを注入した。酸化剤には硝酸ナトリウム、二酸化マンガ、水酸化第二鉄および硫酸ナトリウムを各々1.52, 20.8, 8.60, 4.44mg/mlの濃度で使用した。なお、非晶質の水酸化第二鉄は0.2M 硝酸第二鉄溶液500mlとアンモニア溶液の混合により調整した(岡崎ら1976a)。得られた水酸化第二鉄の鉄含量は29.7%であった。基質溶液は、グルコース62.6mg/ml、酢酸ナトリウム85.4mg/mlの混合溶液を用いた。酸化剤と基質溶液は15分間窒素ガスで爆気した後に小型注射筒に注入した。メタン飽和蒸留水は蒸留水を100mlの注射筒に入れ、同体積のメタンと共に10分間振とう・気体の除去を4回繰り返して調整した。小型注射筒は30°C暗所で3日間培養した。酸化剤の代わりに蒸留水のみを添加した注射筒を対照とした。

培養後、注射筒内の試料の一部(10-40 $\mu$ l)を二重ゴム栓からHPLC用シリンジを用いて採取し、溶存炭素計(島津TOC-500)で無機態炭素濃度(IC)を測定した。

その後、小型注射筒に窒素ガス5mlを注入し、氷水中で約0°Cまで冷却した。注射筒内のメタンの気液分配を平衡状態にするため十分に振とうし、気相のメタン濃度をガスクロで測定した。注射筒内のメタン量は測定した気相中のメタン濃度と0°Cにおけるメタンの溶解度から求めた。

## 2. 作土および心土における嫌氣的メタン酸化に及ぼす各種酸化剤の影響

福島水田作土および心土(<2mm)25gに酸化剤(水酸化第二鉄、二酸化マンガ、硫黄粉末、硫酸カルシウム、硫酸第二鉄)を土壌に対し1%となるように混合した後、ガラスカラム(内径:3cm、高さ:10cm)に充填した。ついで稲わら0.6%と基肥を混合した作土25gを酸化剤を混合した作土あるいは心土の上に充填した。土壌の充填は先述の方法に準じて行い、湛水状態にした。少量の石英砂を2つの土壌の間に挿入した。稲わらを混合した作土のみを充填したカラムを対照として準備した。土壌カラムを25°C暗所で培養し、5日毎に25ml



透水液を採取してそのメタン含量を測定した。

### 3. 透水にともなう硫酸イオンの溶脱と心土での挙動

第3章第1節に従い、基肥および稲わら粉末0.6%を含む作土を充填した作土カラム区、およびその作土カラムに心土カラムを接続した作土+心土カラム区を準備し、25℃暗所で培養した。3日毎に60mlずつ透水し、透水液中のメタンおよび硫酸イオン濃度を測定した。メタンは前述の方法で測定した。透水液の一部を塩酸酸性にした後に陽イオン交換樹脂 (Dowex HCR-W2) を添加して2時間振とうし二価鉄等の陽イオンを除去した。この試料を濾過定容後、イオンクロマトグラフ (島津イオンクロマトグラフ HIC-6A) で硫酸イオン濃度を測定した。測定条件は次の通りであった。

カラム: 島津 Shim-pack IC-A3

カラム温度: 40℃

検出器: 電気伝導度検出器 島津 CDD-6A

検出器温度: 40℃

移動相: 8.0mM p-hydroxybenzoic acid

3.2mM bis(2-hydroxyl)iminotris(hydroxymethyl)methane

流速: 1.0ml/min

### <結果および考察>

#### 1. 透水液中でのメタン酸化

培養前に測定した10mlの注射筒内のICおよびメタン含量と、培養後の結果から3日間に生成あるいは分解したICおよびメタン量を計算した (図3-4-1)。実験には土壌カラムから3、9、15、21日目に採取した透水液試料を供試した。

酸化剤の添加により、ICの生成量は増加しており、各酸化剤の添加による微生物活動の促進が示唆された。特に、3日目の透水液の試料では硝酸イオンが、それ以降の試料においては硫酸イオンの添加がICの増加を著しく促進していた。この結果は各時期における透水液中の脱窒菌、硫酸還元菌の潜在的活性の高さ

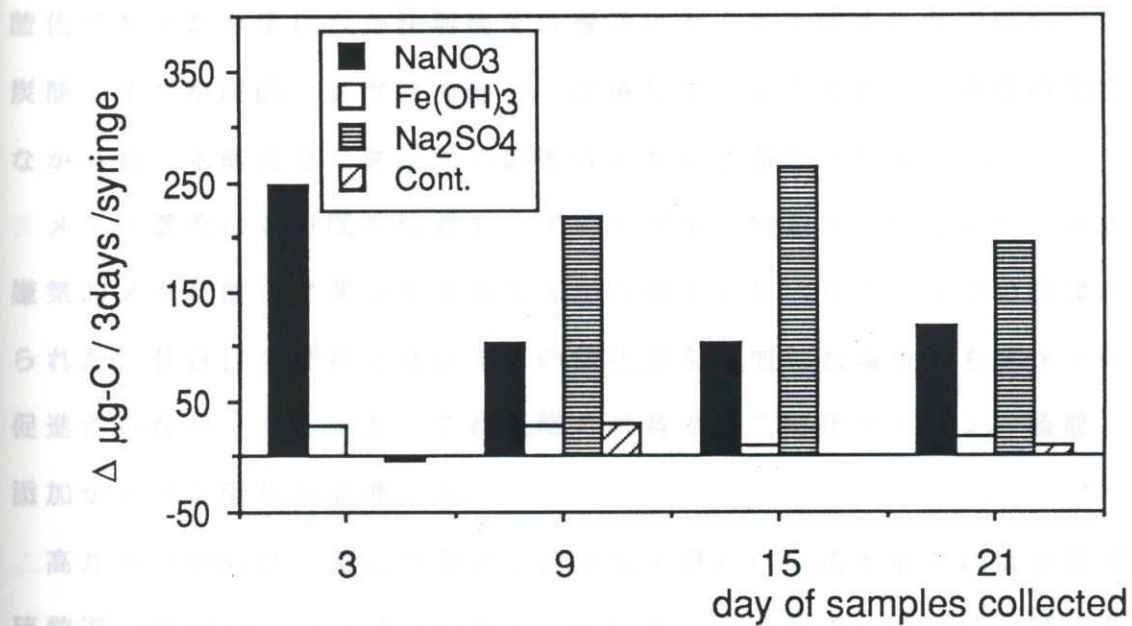


Fig. 3-4-1 Effect of oxidants on inorganic carbon content of the leachate in the syringe.

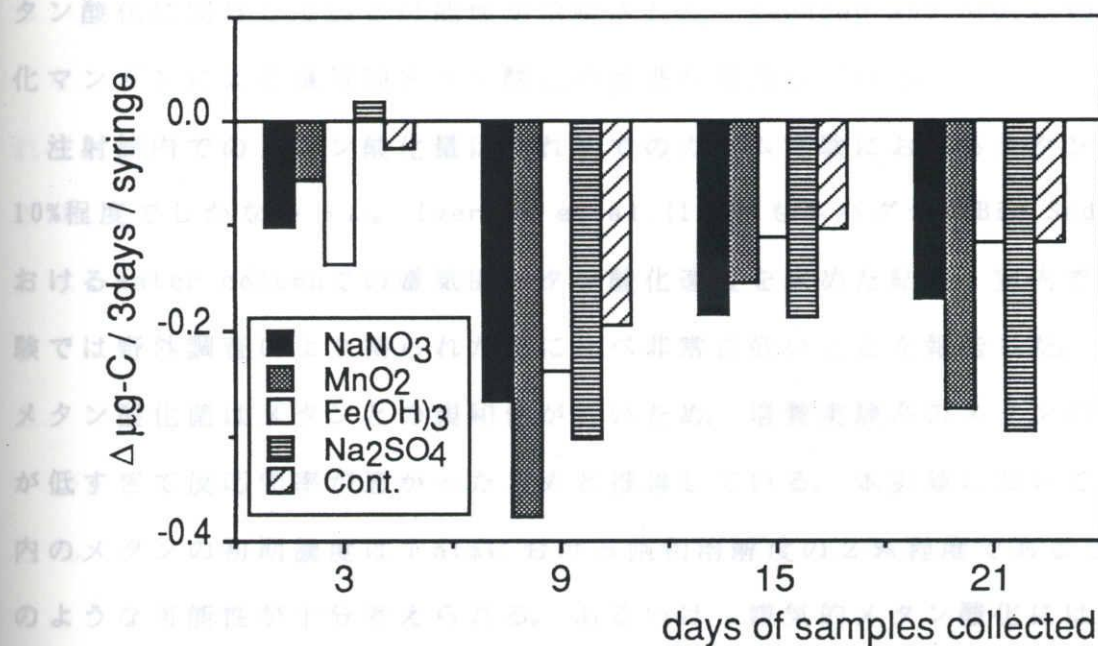


Fig. 3-4-2 Effect of oxidants on methane content of leachate in the syringe.

を示していると考えられた。土壌の還元過程と同調している点が興味深い。二酸化マンガンを添加した注射筒では還元によって生成された二価のマンガンと炭酸イオンが炭酸マンガンを形成、沈積してしまうため、IC濃度の測定はできなかった。水酸化第二鉄添加の影響はそれほど顕著でなかった。

メタン濃度は3日間の培養でいずれも減少しており、作土からの透水液中に嫌氣的メタン酸化に関与する微生物が存在するというこれまでの推論が裏付けられた。3日目の試料ではいずれの酸化剤を添加した場合にもメタンの減少は促進されなかった。一方、それ以降の試料では二酸化マンガン、硫酸イオンの添加がメタン酸化を促進した。

高井ら(1968)は、還元が発達した湛水土壌からの透水液中には対数増殖期の硫酸還元菌が $10^3-4$  M.P.N./ml含まれていることを報告している。後の章で述べるように、本研究においても還元が発達した土壌から $10^5$  M.P.N./mlレベルの活性の高い硫酸還元菌が計数されており、このように高い菌数の硫酸還元菌がメタン酸化に関与している可能性が示唆された。Zehnder and Brock(1980)は二酸化マンガンによる嫌氣的メタン酸化の促進を報告している。

注射筒内でのメタン酸化量はこれまでのカラム実験におけるメタン酸化量の10%程度でしかなかった。Iverson et al.(1987)もネバダ州のBig Soda Lakeにおけるwater columnでの嫌氣的メタン酸化速度を求めた結果、室内での培養実験では野外調査により得られた値に比べ非常に低いことを報告した。彼らは、メタン酸化菌はメタンとの親和性が低いため、培養実験系のメタンの初期濃度が低すぎて反応効率が悪かったためと推論している。本実験においても注射筒内のメタンの初期濃度は1 atmにおける飽和溶解度の2%程度であることからそのような可能性が十分考えられる。あるいは、嫌氣的メタン酸化には、その他の要素(窒素源、微量元素、あるいは土壌界面など)が必要である可能性も考えられた。

## 2. 作土および心土における嫌氣的メタン酸化に及ぼす酸化剤の影響

酸化剤を含む作土あるいは心土を通過した透水液中のメタン濃度の経時的変

化を図3-4-3、3-4-4に示す。

稲わらを添加した作土から溶脱したメタンは作土・心土を通過することにより減少しており、前節までの実験結果を支持した。硫黄を含む酸化剤（硫酸カルシウム、硫黄粉末、硫酸第二鉄）の添加によりメタン濃度はさらに減少した。また、硫黄化合物を添加したカラムでは下層に硫化鉄の生成を示唆する黒色斑点が多数観察された。以上のことから、下層の作土・心土における嫌氣的メタン酸化には硫酸還元菌が関与していることが示唆された。硫黄化合物が下層土壌から上層土壌へ拡散し、メタン生成を阻害した可能性も考えられるが、溶解度の低い硫黄粉末や硫酸カルシウムの添加によっても同様の現象が観察されたことから、硫黄化合物の拡散によるメタン生成阻害の可能性は低いと考えられた。二酸化マンガンの添加は顕著な影響を示さなかった。

これまで水田土壌中の硫酸還元菌とメタン酸化菌とは基質（水素・酢酸）をめぐって養分競合関係にあることが報告されてきた（Kimura et al. 1992、堀ら 1990a、1993）。本研究の結果は両者の新たな関係を示唆した。

なお、図3-4-4の結果が図3-4-3に比べ全体的にメタン濃度が低かったが、これは前者の実験を行なった際、培養室の温度が一時的に20℃付近に低下していたためと推察された。Kimura et al. (1993)は培養温度が25℃から18℃に下がると水田土壌のメタンの生成速度が著しく低下すると報告している。

### 3. 作土からの硫酸イオンの溶脱および心土での挙動

30日間に土壌カラムから溶脱したメタンと硫酸イオンの合計量を表3-4-1に示した。作土区から溶脱した硫酸イオンはモル換算でメタンに比べ非常に多量であった。培養直後の作土カラムには、土壌（新鮮土300g）が含有する硫酸イオンと基肥（硫酸アンモニウム）に由来する硫酸イオンが合計 $1.332\mu\text{mol}$ 存在していたが、本結果より作土中の硫酸イオンのほとんどが浸透により心土へ溶脱されることが明らかとなった。

メタン、硫酸イオンともに心土を通過することにより溶脱量が減少した。また、心土の特に表層部位で硫化鉄に由来すると思われる黒色帯が観察され、作

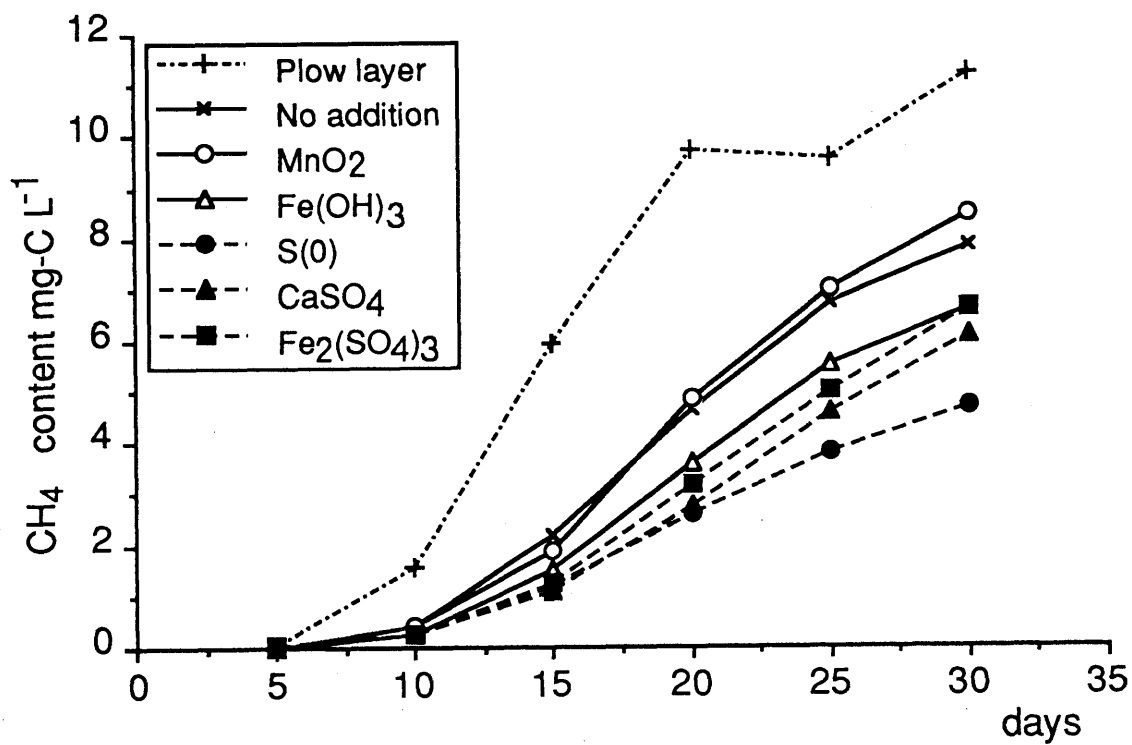


Fig.3-4-3 Effects of oxidants on methane content in leachate from the plow layer soil.

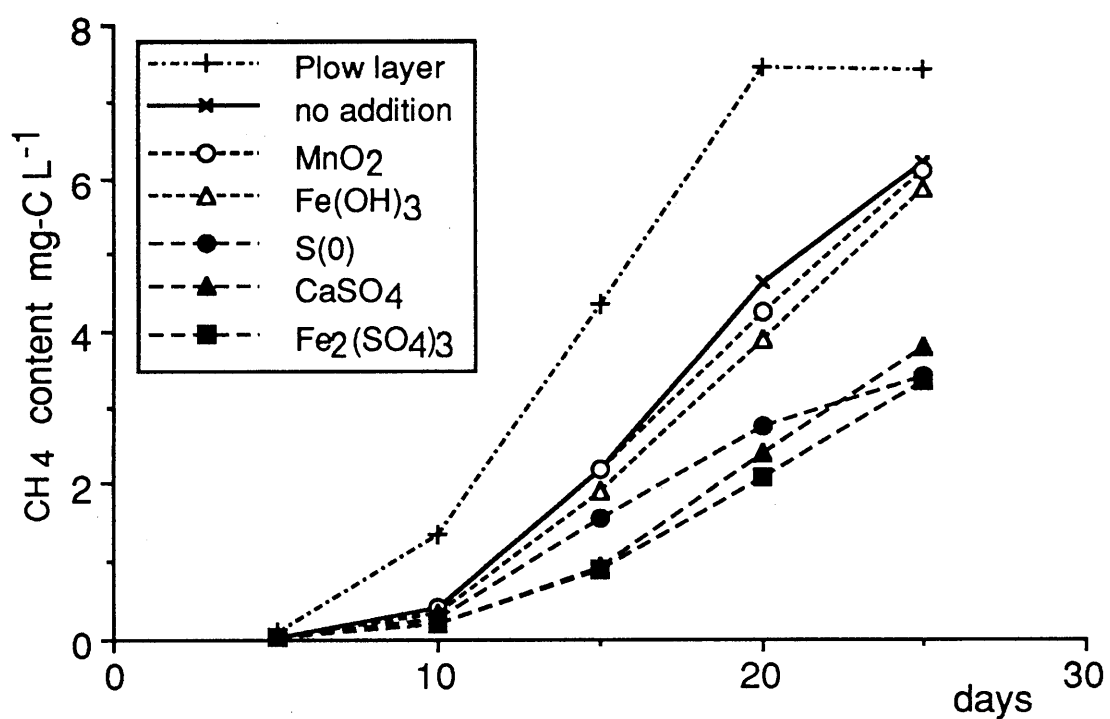


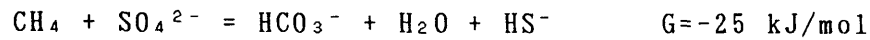
Fig.3-4-4 Effects of oxidants on methane content in leachate from the subsoil.

Table 3-4-1 The total amount of  $\text{CH}_4$  and  $\text{SO}_4^{2-}$  leached from the soil column. ( $\mu\text{mol}$ )

	$\text{CH}_4$	$\text{SO}_4^{2-}$
Plow layer soil (a)	138	1,270
Subsoil (b)	102	1,030
(a) — (b)	36	240

土から溶脱した硫酸イオンが心土で吸着され、一部還元されたと判断した。

硫酸還元とカップリングした嫌氣的メタン酸化は次の反応式で表される。



この反応は吸エルゴン反応で熱力学的に進行可能である (Martens and Berner 1977)。この反応式に従えば、1モルのメタンは1モルの硫酸イオンの還元によって酸化される。作土区と作土+心土区の差から、心土を通過することによる硫酸イオンの減少量は $240 \mu\text{mol}$ と計算され、メタン ( $36 \mu\text{mol}$ ) に比べはるかに多量であった。心土に保持された硫酸イオンがすべて還元されたか否かは明確でないが、実験結果から心土で減少したメタンをすべて酸化分解し得る十分量の硫酸イオンが作土から溶脱し心土に保持されたことが示された。先の実験で心土において進行する嫌氣的メタン酸化に関与する微生物・有機物が作土由来であることを述べたが、本実験の結果は酸化剤についても作土から溶脱・供給されている可能性を示唆した。

硫酸イオンは主として培養前半に溶脱し、培養後半はごく微量しか検出されなかった。従って、培養後期における嫌気条件下でのメタン酸化活性の低下が炭素源と共に酸化剤 (硫酸イオン) の供給量の低下に一因すると推察された。



### 3-5 作付期間中の心土におけるメタン酸化

#### <はじめに>

これまでの土壌カラムを用いた実験で、作土から溶脱したメタンが心土で硫酸還元菌の関与により嫌氣的に酸化されることが示された。但し、この実験は約1ヶ月間、稲わらの添加によりメタン生成を促進した条件下で行われた。そして嫌氣的メタン酸化が顕著であったのは主に培養中期で、後期のメタン酸化は非常に僅かであった。

ところで、第2章第1節で大気および心土へのメタンフラックスを検討した。その結果、水稻に由来すると考えられるメタンは移植後約2カ月経過した後に初めて透水液中に検出され、心土へ溶脱したメタンの90%以上が作付後期に集中することが明らかとなった。

以上の結果は、メタンの酸化時期とメタンの生成時期が異なっていることを示唆するものであり、実際の水田でどの程度嫌氣的なメタン酸化が進行しているか疑問である。そこで本節では作付期間中の心土におけるメタン酸化をポット・カラムを用いたモデル実験系で検討した。

#### <材料および方法>

福島水田作土 (<4 mm) 3 kgを基肥と混合し1/5000a ワグネルポットに充填し湛水状態とした。ポット底部から透水液の採取方法は第1章第2節に準じた。

ガラスカラム (内径: 7cm 高さ: 12cm) に福島水田心土 (<2mm) を約400g充填し湛水状態にした。カラム下部は前述と同様にガラスウール・石英砂で平らにし、ゴム管で透水口を閉じた。カラム上部もガラス管をつけたゴム栓で蓋をした。そして、ポットの透水液採取口とガラスカラム上部にに取り付けたガラス管をゴム管で接続し、野外に静置した。心土カラムは光合成活動を抑えるために周りをアルミホイルで被った。ポットに播種後44日の水稻幼苗 (葵の風) を2株ずつ移植した。3日毎に作土ポットの排水口あるいは作土ポットに接続した心土カラムの下部から透水液を160ml (心土カラム内の液相の容積に相当)

ずつ採取し、そのメタン含量を測定した。施肥管理等は第2章第2節1993年の実験に準じた。

#### <結果および考察>

透水液中のメタン含量から1日当りのメタンの下方への移行量を算出し、図3-5-1に示した。作土ポットで透水液中にメタンが検出されたのは作付条件下では8月中旬からで、それ以後10月の収穫期まで増加傾向を示した。一方、作付の無い作土ポットからは9月下旬に初めてメタンが検出され収穫期まで増加したがその量は僅かであった。このことから、作土で生成したメタンは主に水稻体に起因し、水稻根からの浸出物・脱落細胞に由来すると考えられた。

心土のカラムを通過することにより、作付無作付に関わらず透水液中のメタン濃度は減少したことから、作付期間中に下方へ移行した主に水稻体由来と考えられるメタンも心土において酸化されることが明らかになった。

作土ポットあるいは心土カラムから下方へ移行したメタンの総量および両者の差から心土カラム内でのメタンの酸化量を求めた(表3-5-1)。一作期間中の心土におけるメタンの消費は、無作付区で0.5、作付区で7.7mgCと計算され、作土から移行してきたメタンの72-74%に相当していた。

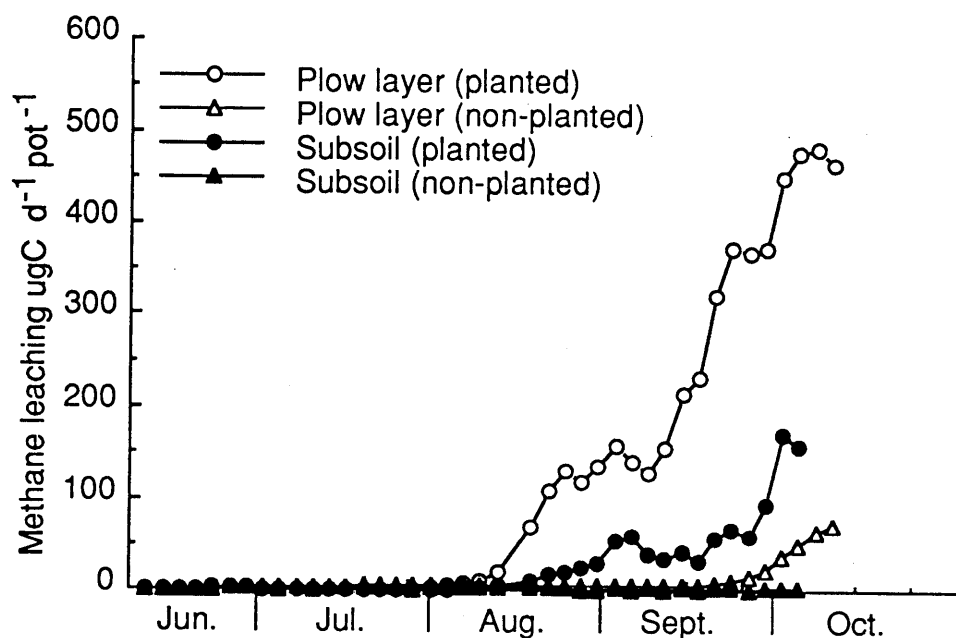


Fig. 3-5-1 The effect of the subsoil on methane leaching (Pot experiment).

Table 3-5-1. Total amount of methane leached ifrom the plow layer soil and subsoil<sup>a</sup>.  
(mg C/ pot)

	Plow layer soil (A)	Subsoil (B)	(A)-(B)
Planted pot	10.74	3.00	7.74 (72.1 <sup>b</sup> )
Non-planted pot	0.65	0.17	0.48 (73.8)

a; June 8- October 6, b; ((A)-(B))/(A) (%)

第2章において、田面水の浸透にともなって水田作土からメタンが溶脱することが明かとなった。本章では溶脱したメタンおよびその他の透水液成分の心土における挙動を検討した。

第1節では、水田作土より透水によって溶脱されたメタンおよび全水溶性有機炭素(TOC)の心土における挙動をカラム実験によって検討した。稲わらを添加した作土カラムの下に心土を充填したカラムを接続し、湛水状態で培養した。定期的に透水液を採取し、透水液中の各種成分の濃度を測定した。

作土カラムからの透水液中のメタンおよびTOC含量は心土カラムを通過することにより明らかに減少したが、1カ月の培養期間の後半にはメタン、TOCともに減少率が低下した。また、心土カラムを2つ接続しても心土カラム1つの場合と比較して著しい変化は認められなかった。

一方、作土より溶脱された二価鉄はほぼ完全に心土に保持されたが、培養中に心土に集積した二価鉄量は作土由来の二価鉄量を大きく上回っており、心土中で鉄還元が進行が示唆された。この結果から、心土は分子状の酸素が存在しない環境であることが示唆され、心土で減少したメタンは嫌氣的に酸化されたものと推察された。

第2節では、心土における嫌氣的メタン酸化の機構解明を目的として、土壌カラムを用いた室内実験を行い、メタン酸化に関与する微生物・炭素源の起源を検討した。作土を稲わら粉末とともにガラスカラムに充填、湛水状態とし、作土カラム下部に心土を充填したカラムを接続した。心土カラム下部より定期的に透水液を採取し、メタン・水溶性有機炭素(TOC)・二価鉄含量をそれぞれ測定した。心土をオートクレーブ殺菌したカラム、550°Cで12時間加熱し有機物を除去したカラムを設け、心土の微生物・有機物がメタン酸化に及ぼす影響を検討した。

その結果、作土からの透水液が心土を通過する際にメタン濃度は減少し、心土でのメタン酸化が確認された。心土の殺菌・有機物の除去はメタン酸化に何

ら影響を及ぼさなかったことから、作土からの透水液中の微生物・有機物が心土での嫌氣的メタン酸化に主に関与しているものと推察された。心土中の微生物および有機物はメタン酸化には影響を与えなかったが、二価鉄の生成には関与していた。

第3節では作土におけるメタン酸化の可能性を土壌カラムを用いたモデル実験で検討した。稲わらを混合した作土と混合しない作土を2層をなすように充填し湛水状態とした。透水液を定期的に採取し、透水液中のメタン濃度を測定した。上層の稲わらを混合した土壌で生成したメタンは下層の稲わら無添加土壌を通過する際に減少した。二価鉄の分析結果から、下層には分子状の酸素が存在しないことが明らかとなり、作土の比較的に酸化的な部位（下層）でメタンの嫌氣的酸化が起こったものと考えられた。稲わらの分解にともなって生成した水溶性有機炭素（TOC）も稲わらを添加しない作土層を通過することにより減少した。この稲わら無添加層では無機態炭素（IC）、二価鉄の増加が観察されたことから、メタンとTOCが消費されていることが推察された。30日間の実験においてメタンの酸化には土壌間（福島土壌・安城土壌）で顕著な差は認められなかったが、TOCの消費、ICの増加には差が認められ、福島土壌の方が安城土壌に比べ微生物活性が高いことが示された。

第4節では、土壌カラムを用いて嫌氣的メタン酸化に関与する酸化剤の検討を行った。

土壌カラムから透水液を採取し、メタンとともに各種酸化剤（硝酸イオン、二酸化マンガ、水酸化第二鉄、硫酸イオン）を添加して注射筒内で培養した。硝酸イオンと硫酸イオンの添加によりそれぞれ培養初期・中後期に採取した透水液中の無機態炭素が増加し、各時期における透水液の潜在的な脱窒・硫酸還元活性の高さが示唆された。注射筒内のメタンは3日間の培養で減少したが、特に二酸化マンガ、硫酸イオンの添加によりメタンの酸化が促進された。

土壌カラムにおける作土および心土での嫌氣的メタン酸化は硫黄化合物（硫酸カルシウム、硫酸第二鉄、硫黄粉末）の添加によって促進された。このことから、水田土壌における嫌氣的メタン酸化には硫酸還元菌が関与しているもの

と推察された。

作土カラムから硫酸イオンが溶脱し、心土で保持利用されていることが明らかになった。その量は、心土におけるメタン酸化量をはるかに上回っており、心土での嫌氣的メタン酸化に関与する微生物・基質（メタン・水溶性有機物）に加え、酸化剤も作土から供給される可能性が示唆された。

第5節では、一作期間中の心土におけるメタン酸化量を、ポットとガラスカラムを用いたモデル実験で検討した。作土を充填したポットの排水口に心土を充填したガラスカラムを取り付け、定期的にポットおよびガラスカラムの排水口から透水液を採取しメタン濃度を測定した。

水稻を作付したポットでは8月中旬に透水液からメタンが検出され、以後収穫期まで増加した。一方、無作付条件では9月下旬に初めてメタンが検出され、収穫期まで僅かに増加した。ポットに心土カラムを接続すると、透水液中のメタン濃度は減少した。本結果から、生育中期以後に作土から溶脱する水稻体に由来するメタンも、心土で酸化されることが明らかとなった。その量は作土から溶脱したメタン量の70%以上に相当した。

### 序論

水田のメタン生成および放出に関しては比較的詳細に研究されているが、水田土壌中におけるメタン生成菌に関する研究は対照的に非常に限られている。水田土壌からのメタン生成菌の分離・同定例は数例にとどまり (Rajagopal et al. 1988, Asakawa et al. 1993)、水田土壌中のメタン生成菌数の季節的変動に関する若干の報告がある (Schutz et al. 1989a, Mayer and Conrad 1990, 浅川 1991) もの、未解明の問題が多数残されている。さらに、土壌中でのメタン生成菌の生態に関する知見は未だ皆無と言ってよい。その原因としては、メタン生成菌に関する微生物学的研究の歴史がまだ浅いこと、偏性嫌気性であるメタン生成菌を扱う水田土壌学者が他の嫌気環境 (湖沼・海洋、反すう動物ルーメン) に比べ圧倒的に少数であることが挙げられる。

また、水田土壌におけるメタン酸化菌の生態についても、現在までにごく限られた知見しか得られていない (de Bont et al. 1978)。

本章では、本研究で前章までに得られた結果と他の研究者による水田におけるメタン生成・酸化に関する既報の知見に基づいて、水田土壌中のメタン生成および酸化に関する微生物学的研究を行なった。

#### 4-1 作付期間中の水田作土におけるメタン生成菌・メタン酸化菌数の季節的变化

##### <はじめに>

Schutz et al. (1989) は、水田からのメタン発生量と土壌中のメタン生成菌数の季節的変動に関する研究を行った。彼らは、両者の間に明確な関係はなく、酢酸資化性メタン生成菌が $10^4$ 、水素資化性メタン生成菌が $10^6$  M.P.N./g soil レベルで作付期間中一定していると報告した。Mayer and Conrad (1990) は風乾土壌を嫌氣的に培養してメタン生成量とメタン生成菌数との関係を検討し、Schutzらと同様な結果を得ている。また、浅川 (1991) は落水時の水田土壌にも作付期間中と変わらない程度のメタン生成菌が存在すると報告している。

上記の研究で供試された土壌は、いずれも水田土壌中の不均一性に特別な配慮をせずに採取された。しかしながら、メタン生成は強還元状態でのみ進行するため、メタン生成菌が活性を示すのは土壌中の限られた部位（新鮮有機物周辺・還元的根圏環境）であると考えられる。

また、水田から発生するメタンは全体のほんの一部で、土壌中で生成したメタンの半分から9割以上は酸化層や根圏で好氣的に酸化され则认为られている (Holzapfel-Pschorn et al. 1985, 1986, Sass et al. 1990)。de Bont et al. (1978) は、土壌中のメタン酸化菌数を測定し、酸化層や根圏の菌密度が高いことを報告しているが、メタン酸化菌数の季節的変動に関する系統的な研究は現在までなされていない。

本節では、水田土壌の各部位（酸化層 vs 還元層、根圏 vs 非根圏）におけるメタン生成菌およびメタン酸化菌数の季節的变化を追跡した。また、透水液中に存在するメタン生成菌数も併せて測定した。

メタン生成菌は限られた基質しか利用できないため、常に水素や酢酸等の基質を提供する微生物の存在を必要としている。本節ではメタン生成菌への基質の供給者と考えられるセルロース分解菌や他の一般微生物の挙動も併せて検討した。



## <材料および方法>

### 1. 水稻の栽培

第3章第5節に準じ、福島水田作土を用いて1/5000aワグネルポットに水稻（葵の風）を栽培した。作付しないポットも設けた。栽培期間は6月8日から10月14日までであった。栽培期間中3日に1度160mlずつポット下部から透水液を採取した。

### 2. 土壌・透水液の採取

1カ月毎にポットを解体し、根圏、非根圏（酸化層・還元層）の土壌を採取し、微生物数を測定した。無作付のポットを非根圏と見なし、上層約5mmの褐色層を酸化層、それより下の青灰色を還元層とした。また、作付したポットから根ごと土壌を引き出し、切断した根をピンセットで摘出して希釈液に投じ、根から脱離してくる土壌を根圏土壌とした。

硫酸還元菌以外の嫌気性微生物数測定用の土壌試料は、土壌が大気に接触しないようにドライアイスを入れて内部の気相を炭酸ガスで充満した大きめの容器の中で採取した。また、土壌の希釈は0.03%のcysteine·HClを含む0.75%生理食塩水を用いて行い、同希釈液に添加した100ppmのレサズリンナトリウムの脱色（-0.042V以下）により希釈液が完全な無酸素状態であることを確認した。

好気性微生物と硫酸還元菌数測定の際の土壌希釈は通常の生理食塩水を用いて行った。

透水液はこれまでの方法に準じ、ガラス製の注射筒を使って大気に触れないように採取した。

### 3. 微生物数の測定

以下に述べる好気性菌・嫌気性菌数の測定を行なった。計数培地・検出方法の詳細は本論文末に掲載した。

### (1) 好気性微生物数

- ・一般微生物: 1/10 Nutrient Borth (NB) を含む寒天培地を用いた希釈平板法
- ・低栄養性微生物: 1/100NBを含む寒天培地を用いた希釈平板法
- ・セルロース分解菌: カルボキシメチルセルロース (CMC) を含む寒天培地を用いた希釈平板法
- ・メタン酸化菌: メタンを唯一の炭素源とする無機塩培地を用いた最確値法

### (2) 嫌気性微生物数

- ・一般微生物: 1/10NB寒天培地を用いたロールチューブ法
- ・低栄養性微生物: 1/100NB寒天培地を用いたロールチューブ法
- ・セルロース分解菌: CMC寒天培地を用いた最確値法
- ・硫酸還元菌: 流動パラフィンを用いた重層培養による最確値法
- ・メタン生成菌
- 酢酸資化性菌: トリメチルアミンを唯一の炭素源とする無機塩培地を用いた最確値法
- $H_2 \cdot CO_2$  資化性菌:  $CO_2$  を唯一の炭素源とする無機塩培地を用いた最確値法

透水液中の微生物数の測定は一般好気性菌、メタン生成菌について行った。

### < 結果および考察 >

#### 1. 土壌中の各種微生物数の変化

##### a. 好気性菌

- ・一般微生物数・低栄養性微生物数

好気性菌数の季節的变化を図4-1-1に示す。好気性菌数は季節的な変化が非常に小さく、培地の栄養濃度に関わらず  $10^8$  c.f.u./g soil レベルであった。酸化層は還元層よりも若干高い菌数を維持した。根圏土壌中の好気性菌数はおよそ酸化層と還元層の好気性菌数の範囲内で推移し、9月10日に若干減少する傾向が認められた。なお一般微生物数・低栄養微生物数に占める放線菌の割合は数%であった。

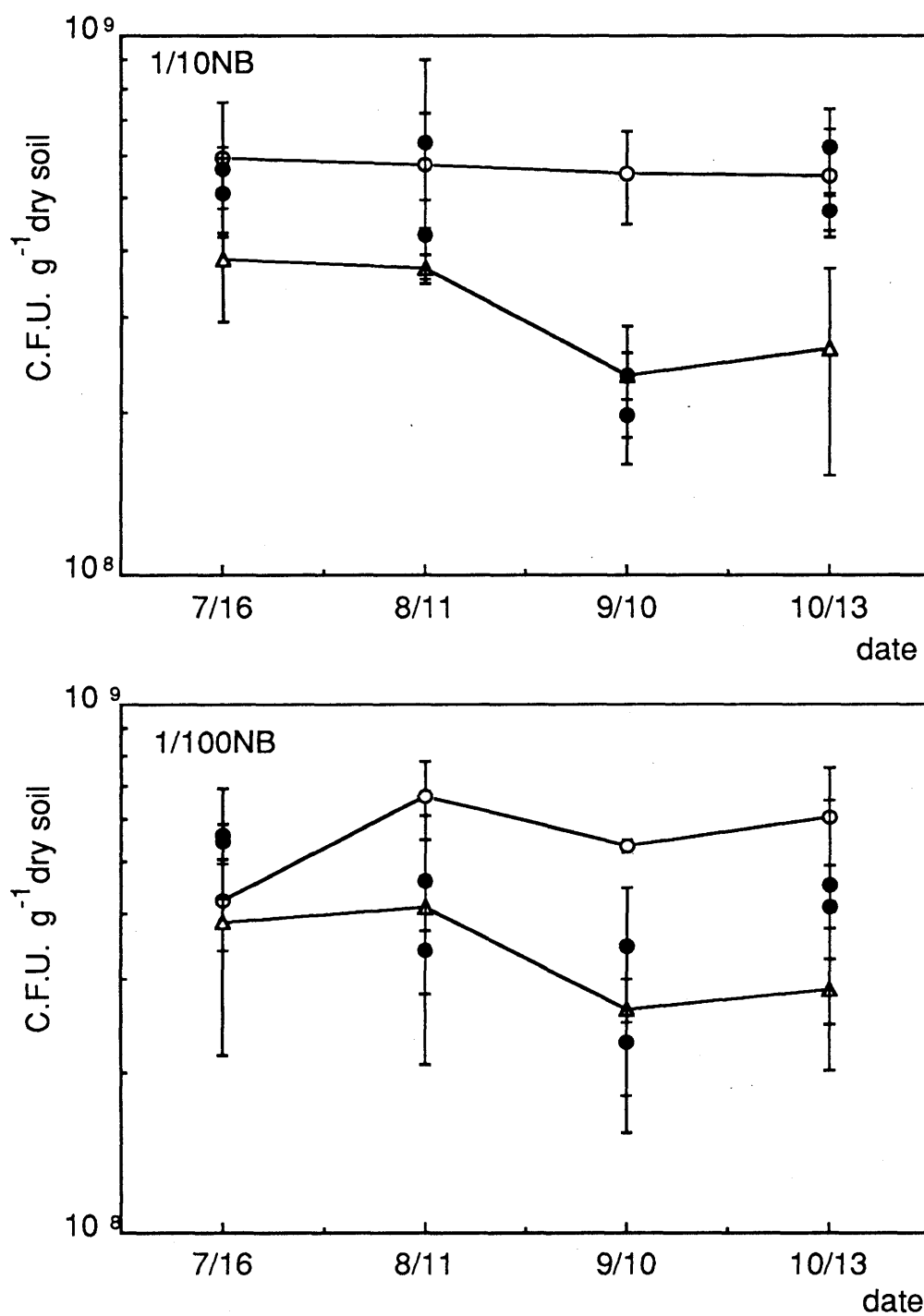


Fig. 4-1-1 Seasonal change in the number of aerobes in paddy soil.

○, Oxidic layer; △, Anoxic layer; ●, Rhizosphere  
The bars show standard deviation.

・セルロース分解菌（図4-1-2）

好気性セルロース分解菌数は酸化層と還元層および根圏で差異が認められず、 $10^7$  c.f.u./g soilで作付期間中ほぼ一定の値を維持した。染谷・古坂（1983）は、水田土壌中のセルロース分解菌数と低栄養性微生物数の季節的变化に類似の傾向があることを見出し、両者の間に何らかの栄養的な関連性があると推察している。一方、本結果からは両者の間にそのような傾向は認められなかった。

・メタン酸化菌（図4-1-3）

還元層では水稻生育1カ月後すでに酸化層に比べてメタン酸化菌数が低く、絶対好気性菌であるメタン酸化菌は基本的に湛水土壌では活性が低いと推察された。菌数の季節的变化は顕著でなく、酸化層で $10^5$ 、還元層で $10^{3-4}$  m.p.n./g soil程度を維持していた。根圏土壌では8月11日を除いて酸化層と還元層の間菌数を示した。特に水稻生育初期に根圏土壌の2連のばらつきが顕著であった。酸化層・還元層は1連で実験を行なっているため断定できないが、根圏は還元層に比べてややメタン酸化菌の生育に好適な場であること、また水稻根の種類・生理状態によって根圏の酸化還元電位が異なるためメタン酸化菌にとって好適な部位とそうでない部位が存在することが推察された。水稻栽培後期に活発なメタン放出があったことが第2章1節で示されているが、根圏土壌におけるメタン酸化菌数の増加は認められず、この時期に生成したメタンが活発に分解されているか否かについて、微生物数からの判断は不可能であった。

培養液中に増殖したメタン酸化菌を検鏡観察すると、2種の桿菌と1種の球菌が確認された（写真4-1-1）。球菌は、その形態から炭素の同化様式にリブローースリン酸経路を有する *Methanococcus* 属のメタン酸化菌であると推定された（武田 1984）が、桿菌については形態からその種類の判定は不可能であった。

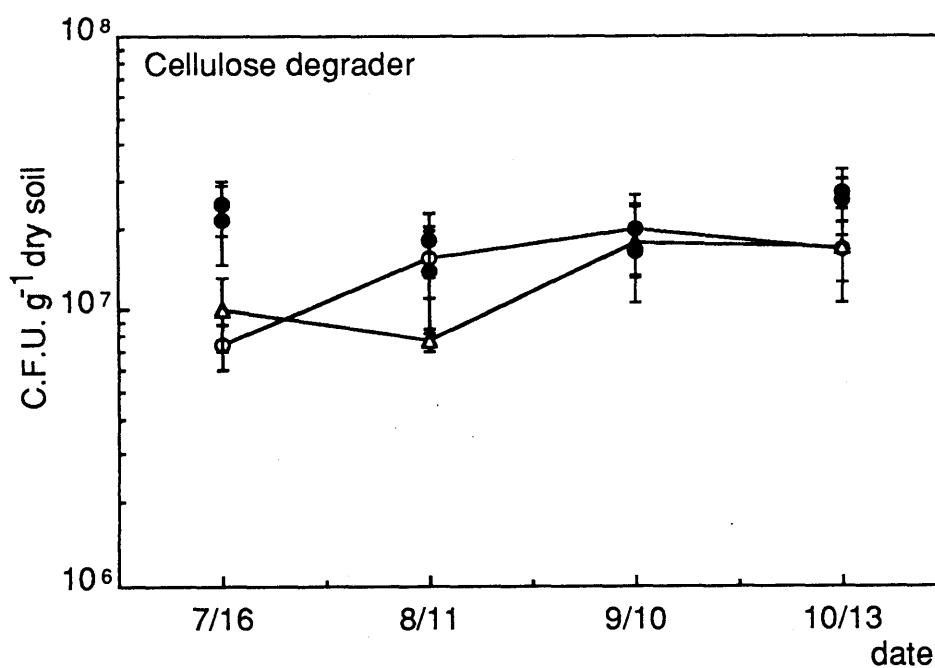


Fig. 4-1-2 Seasonal change in the number of aerobic cellulose degrader in paddy soil.  
 ○, Oxidic layer; △, Anoxic layer; ●, Rhizosphere  
 The bars show standard deviation.

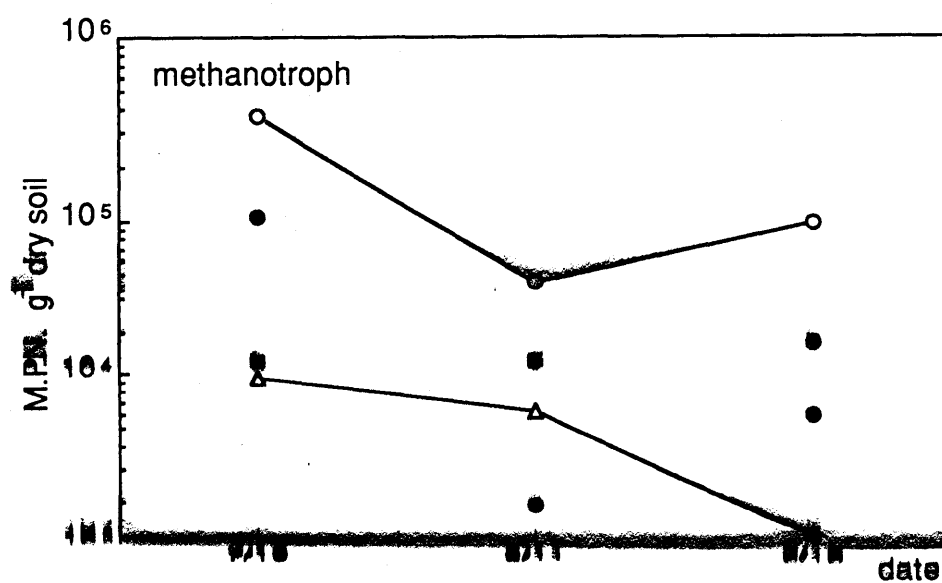


Fig. 4-1-3 Seasonal change in the number of methanotrophic bacteria in paddy soil.  
 ○, Oxidic layer; △, Anoxic layer; ●, Rhizosphere

## b. 嫌気性菌

### ・一般微生物数（図4-1-1）

酸化層と還元層の両層に於ける微生物の増殖は、非根圏土壌中の微生物増殖とほぼ同等であった。培養後期に還元層土壌中の微生物数は、酸化層土壌中の微生物数よりも、電極の設置深度によって顕著な差は認められなかった。一方、各還元層土壌中の微生物数は、非根圏土壌中の微生物数に比べて10倍から1000倍に増加した。

### ・セルロース分解速度（図4-1-2）

酸化層で

した。還元

の有意な差

加傾向を示

1/100以上低

宮下ら（

ら構成され

細菌が侵入

からの活発

メタン生成

るとの予想

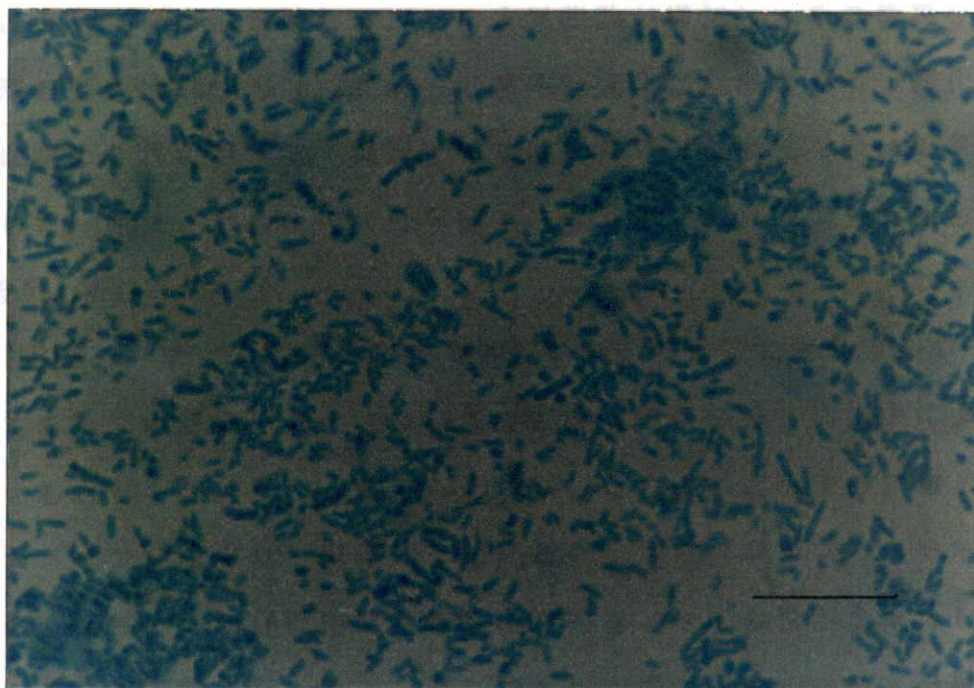


Photo. 4-1-1. Methanotrophic bacteria in media (x1,000)  
scale bar 10 $\mu$ m

るメタン生成速度との相関は、還元層では認められなかった。

### ・硫酸還元速度（図4-1-3）

酸化層・還元層で硫酸還元速度の有意な差は認められず、非根圏土壌中に減少した。一方、還元層土壌ではその減少の速度を維持するとともに、かなりの増加する傾向を示し、根圏が非根圏と比較して硫酸還元速度の増加に好適な環境であることが推察された。宮下ら（1982）は同様な結果を観察し、硫酸還元速度の基質が非根圏土壌では枯渇してきたのに対し、水稻根圏ではなおも豊富に存在してい

## b. 嫌気性菌

### ・一般微生物数・低栄養微生物数（図4-1-4）

酸化層と還元層で差異が認められず、作付期間中徐々に菌数が減少した。生育後期に根圏土壌で非根圏土壌に比べやや高い菌数を示した。培地の栄養濃度による菌数の差は顕著でなかった。各嫌気性菌数は対応する好気性菌数に比べて10倍から100倍低い値を示した。

### ・セルロース分解菌（図4-1-5）

酸化層では9月10日に嫌気性セルロース分解菌数が増加し、その後再び減少した。還元層の菌数は $10^4$  m.p.n./g soilで季節的变化は観察されず、酸化層との有意な差は認められなかった。根圏土壌では10月13日の1点を除いて若干増加傾向を示した。嫌気性セルロース分解菌数は好気性セルロース分解菌数の1/100以上低かった。

宮下ら（1980a, b）は、水稻根の表皮や外皮の細胞壁は主に薄いセルロースから構成されており、水稻根の老化に伴い表層の細胞壁が崩壊し細胞中に多数の細菌が侵入することを報告した。宮下らの観察した表層の細胞壁の崩壊と水田からの活発なメタン放出がほぼ同時期に起こることから、セルロース分解菌がメタン生成の直接的あるいは間接的な基質の提供者としての役割を果たしているとの予想の基に本実験を行った。しかしながら、嫌気性セルロース分解菌数とヘテロトロフ微生物数（一般微生物・低栄養性微生物数）、あるいは後述するメタン生成菌数との明確な関連性は観察されなかった。

### ・硫酸還元菌（図4-1-6）

酸化層・還元層で硫酸還元菌数の有意な差は認められず、水稻生育後期に減少した。一方、根圏土壌ではそのままの菌数を維持するか、わずかに増加する傾向を示し、根圏が非根圏と比較して硫酸還元菌の生育に好適な環境であることが推察された。宮下ら（1982）は同様な結果を観察し、硫酸還元菌の基質が非根圏土壌では枯渇してきたのに対し、水稻根圏ではなおも豊富に存在してい

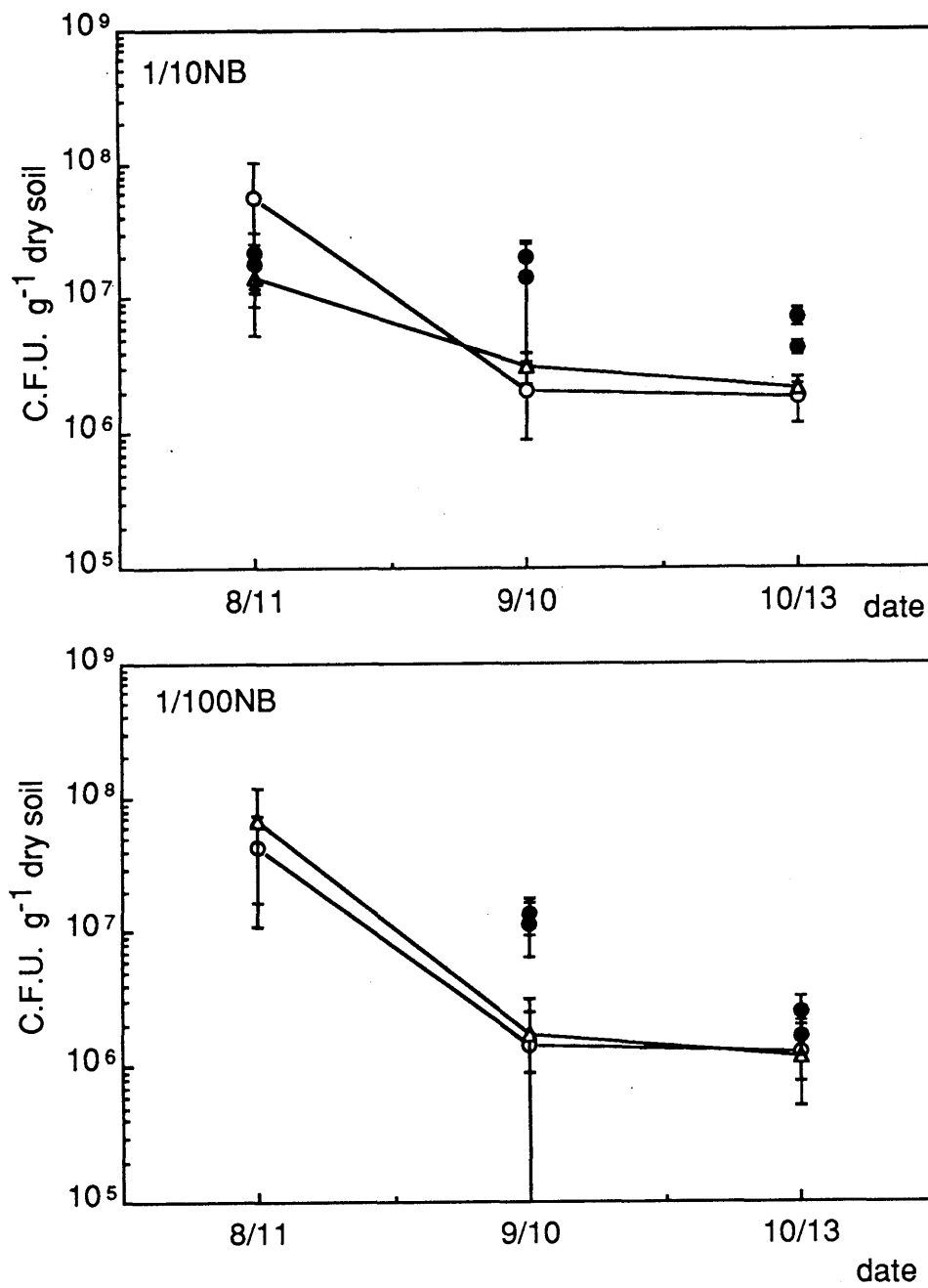


Fig. 4-1-4 Seasonal change in the number of anaerobes in paddy soil.  
 ○, Oxic layer; △, Anoxic layer; ●, Rhizosphere  
 The bars show standard deviation.



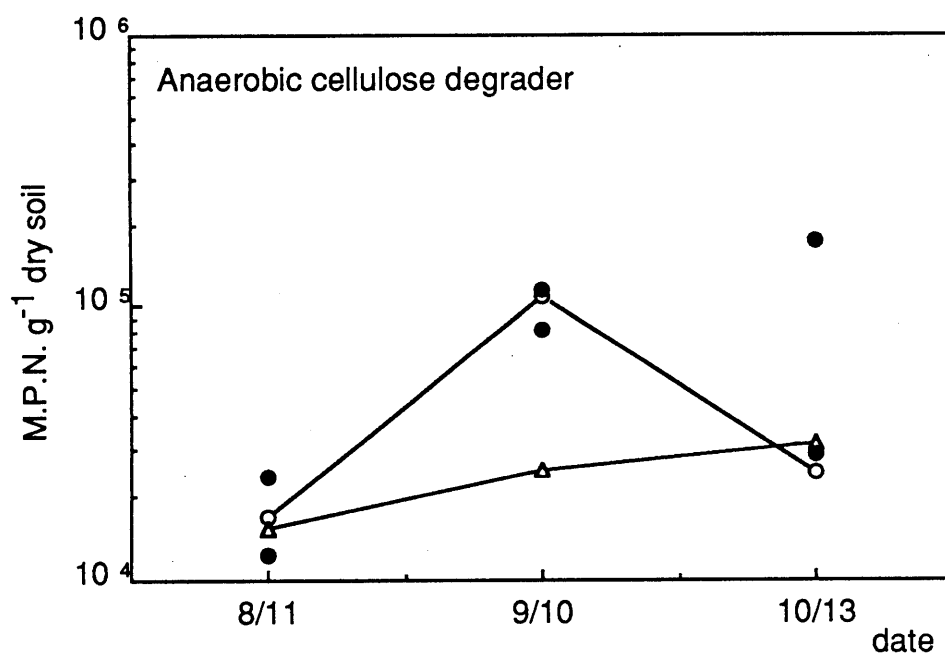


Fig. 4-1-5 Seasonal change in the number of anaerobic cellulose degrader in paddy soil.  
○, Oxidic layer; △, Anoxic layer; ●, Rhizosphere

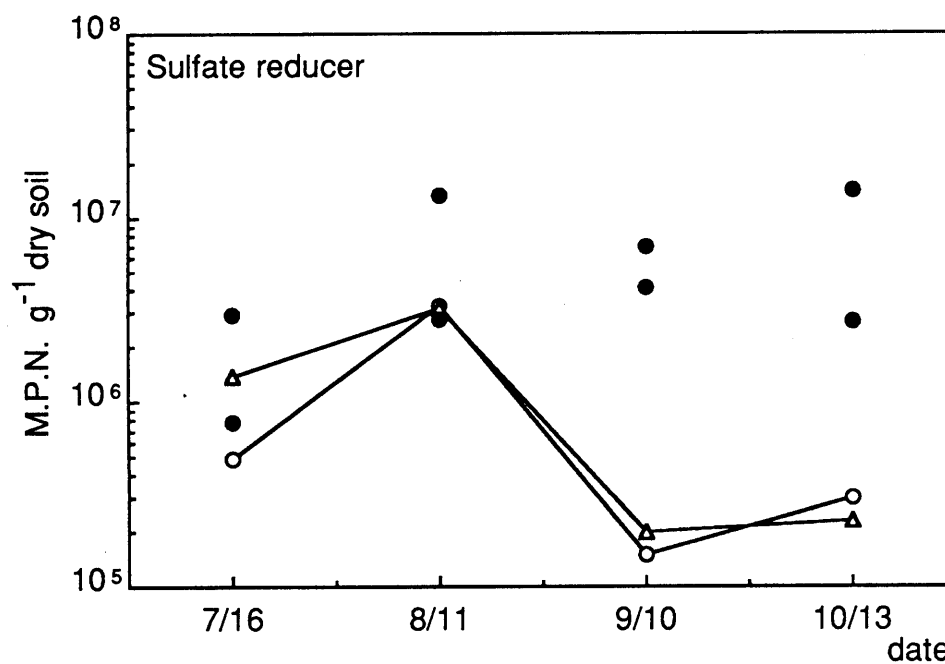


Fig. 4-1-6 Seasonal change in the number of sulfate reducer in paddy soil.  
○, Oxidic layer; △, Anoxic layer; ●, Rhizosphere

ることに原因があると考察している。

・メタン生成菌（図4-1-7）

水素資化性菌は計数されてこなかった。培養方法に問題があると思われたが詳細は明らかでなかった。以下にメチル基資化性菌の結果を記す。

8月には各土壌部位で顕著な差はなく $10^5$  m.p.n./g soilレベルのメチル基資化性メタン生成菌が検出された。大気へのメタン放出が活発になった9月（第2章第2節の1993年の実験参照）以降、酸化層と還元層で若干減少したのに対し根圏土壌ではそのままの菌数を維持するかあるいは $10^6$ レベルまで増加した。また、根圏土壌における2連のばらつきが水稻生育後半に大きくなった。以上の結果から、メタン生成菌は根圏の一部で活発に生育しているものの根圏土壌全体に占める割合は低いため、根圏土壌全体で考えると菌数の季節的变化は顕著ではないと推察された。

この仮説を確かめるため、稲わらを添加した土壌懸濁液と寒天とを混合した培地に水稻幼苗を生育し、一定期間の後に水稻根を摘出しを蛍光顕微鏡（V励起）で観察した。その結果、同じ一本の根においてもメタン生成菌特有の蛍光が観察される部分と観察されない部分が存在することが明らかになった（写真4-1-2）。

培養液を顕微鏡観察したところ、Methanosarcina属菌特有のザルチナ（小荷物）状のコロニーが認められ、複数の菌体が集合体を形成していることが明らかになった（写真4-1-3）。このコロニーは超音波処理によっても完全に分散することはなかった。本結果は、メタン生成菌が増殖しても1コロニー当りの菌数は増加するがコロニー数は変化しない可能性を示唆している。メタン生成菌の計数に用いた最確値法は、土壌希釈液中で個々の細菌が完全に分散していることを前提とする方法である（石栗 1992）ため、この種の細菌は菌数を過少評価している可能性が考慮された。

セルロース分解菌以外の好気性菌は、酸化層に比べて還元層で菌数が低く、根

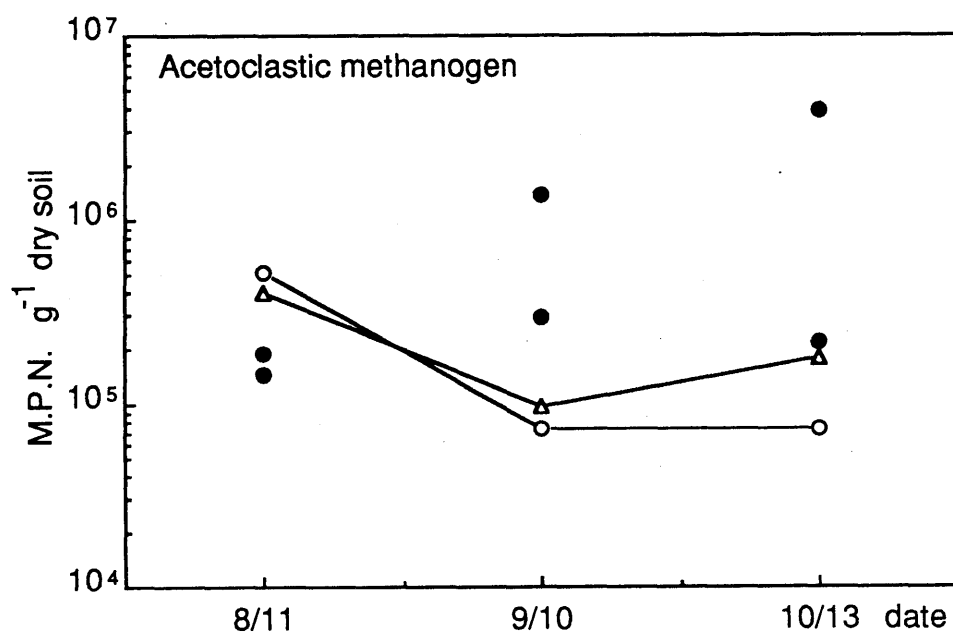


Fig. 4-1-7 Seasonal change in the number of acetoclastic methanogen in paddy soil.

○, Oxic layer; △, Anoxic layer; ●, Rhizosphere

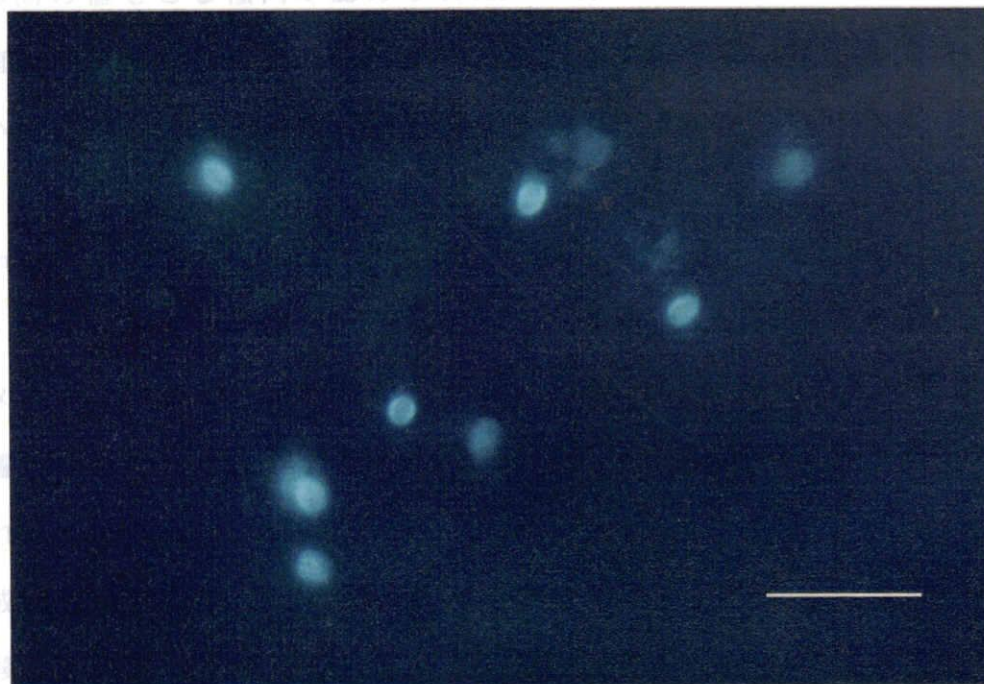


Photo. 4-1-2. Methanogen on a root surface (x1,000)  
scale bar 10 $\mu$ m

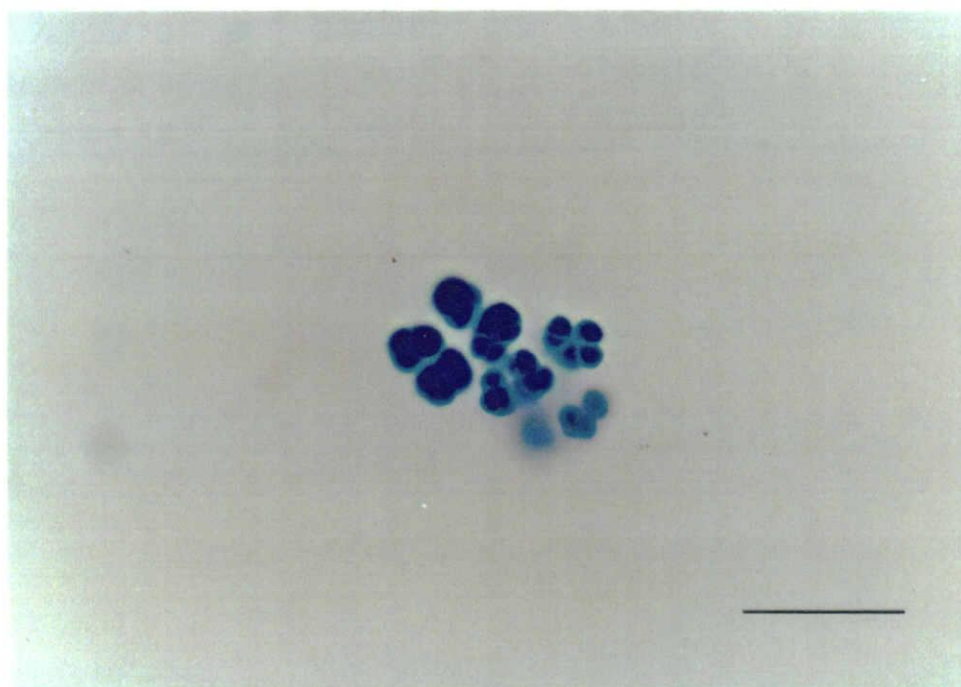


Photo. 4-1-3. Methanosarcina-like acetoclastic methanogen in media  
(x1,000). scale bar 10 $\mu$ m

圈では両者の間の値をとる傾向が認められた。一方、嫌気性菌は酸化層と還元層で顕著な菌数の差がなく根圏で菌数が高い傾向が認められ、好気性菌の酸素要求性が高いのに対し、嫌気性菌の酸素感受性が低いことが示唆された。

## 2. 透水液中の微生物数

水稻作付・無作付条件のポットから採取した透水液中の一般好気性菌・メチル基資化性メタン生成菌数の測定結果を表4-1-1に示す。好気性菌数に及ぼす水稻作付の影響は明確でなく、作付期間中 $10^5$  c.f.u./mlで菌数の顕著な季節的变化は認められなかった。

メタン生成菌は、 $10^{0-1}$  M.P.N./mlと非常に低い菌数ではあるものの透水により、下方へ移動することが明らかになった。無作付条件に比べ作付条件の透水液で菌数が高くメタン発生が活発な9月において $10^2$ レベルまで増加したことから、水稻根の影響によるメタン生成菌数の増加が推察された。

Table 4-1-1 The number of microorganisms in the leachate from the pot.

	Planted pot	Non-planted pot
Aerobic microbes ( $\times 10^5$ c.f.u./ml)		
July 23	$9.76 \pm 1.16$	$7.02 \pm 0.75$
August 10	$9.22 \pm 1.16$	$2.46 \pm 0.33$
September 9	$5.67 \pm 1.88$	$5.80 \pm 0.54$
October 12	$4.34 \pm 0.78$	$2.60 \pm 0.23$
Acetoclastic methanogen (M.P.N./ ml)		
July 23	—	—
August 10	$2.30 \times 10^1$	$4.50 \times 10^0$
September 9	$1.75 \times 10^2$	$7.80 \times 10^0$
October 12	$1.30 \times 10^1$	$4.00 \times 10^0$

#### 4-2 田面水の浸透にともなう作土からの硫酸還元菌の流脱と心土における挙動

##### <はじめに>

第3章のカラム実験により、作土から溶脱したメタンの一部が心土で酸化されること、このメタン酸化に作土から流脱した硫酸還元菌が関与していることが示された。高井ら(1968)は還元が進行した湛水土壌から $10^3$ - $10^4$  m.p.n./mlの硫酸還元菌が浸透にともない流脱されると報告している。本研究においても、第3章第4節で透水液中の潜在的な硫酸還元活性が示されている。

本節では、作土から硫酸還元菌が流脱することを確認するとともに、心土における硫酸還元菌の挙動を検討するために、同様なガラスカラムを用いて透水液中および培養終了時の土壌に存在する硫酸還元菌数の測定を行なった。

硫酸還元菌の測定と並行して、比較のために一般微生物(好気性菌・嫌気性菌)の菌数測定を行なった。好気性菌の作土からの流脱現象については、高井ら(1968, 1969b)の報告があるが、嫌気性菌に関する研究例はこれまでない。また、計数培地の栄養濃度を変えて低栄養性微生物の挙動についても検討した。

##### <材料および方法>

##### 1. 土壌カラムの作成および透水液の採取

第3章に準じ、福島水田土壌を用いて稲わら添加(作土稲わら区)および無添加条件(作土無添加区)の作土カラム、および稲わら添加作土カラムを接続した心土カラム(心土接続区)を作成した。3日毎に60mlずつ透水液を採取し、3, 9, 15, 21, 27日目の透水液中の微生物数を測定した。カラムは1処理区当たり2つ用意し、両面針を用いて一方の透水液をもう一方の透水液の入った注射筒へ移し、両者をよく混合した後に菌数測定に供試した。

実験終了時の作土、心土の微生物数も測定した。心土はその色調から判断して灰暗色の上部(0-15mm)とその下(下部、15-60mm)とに分けて各菌数を測定した。嫌気性菌を測定するための土壌試料は、前節と同様、ドライアイスの入

った大きめの容器の中で採取した。

## 2. 微生物数の計数

透水液中および土壌中の以下の微生物数について測定を行なった。方法は前節に準じた。

### ・好気性菌

一般微生物

色素耐性菌

低栄養性細菌

低栄養性色素耐性菌

### ・嫌気性菌

一般微生物

色素耐性菌

低栄養性細菌

低栄養性色素耐性菌

硫酸還元菌

色素耐性菌数は0.005%クリスタルバイオレットを含む1/10あるいは1/100NB寒天培地を用い希釈平板法（好気性菌）、あるいはロールチューブ法（嫌気性菌）で測定した。

## <結果および考察>

### 1. 透水液中の微生物数

#### a. 好気性菌 (図4-2-1)

透水液中に $10^{6-7}$  c.f.u./mlの好気性菌が存在し、稲わらの添加による影響は顕著ではなかった。また培地の栄養濃度による菌数の差異は認められなかった。作土区（稲わら添加・無添加）では透水期間中菌数が漸減する傾向を示したが、心土接続区ではほぼ一定の値を保つ（1/100NB）か後半やや増加（1/10NB）しており、心土での微生物数の増加が示唆された。

色素耐性菌は $10^{5-6}$  c.f.u./mlのレベルで推移し、作土無添加区では培養後期に一定レベルを維持していたのに対し、稲わら添加区（作土区・心土接続区）では減少した。その結果、透水液中の色素耐性菌の割合は作土無添加区で37-54%、稲わら添加区（作土区・心土接続区）で5-14%であった。近藤ら（1982a, b



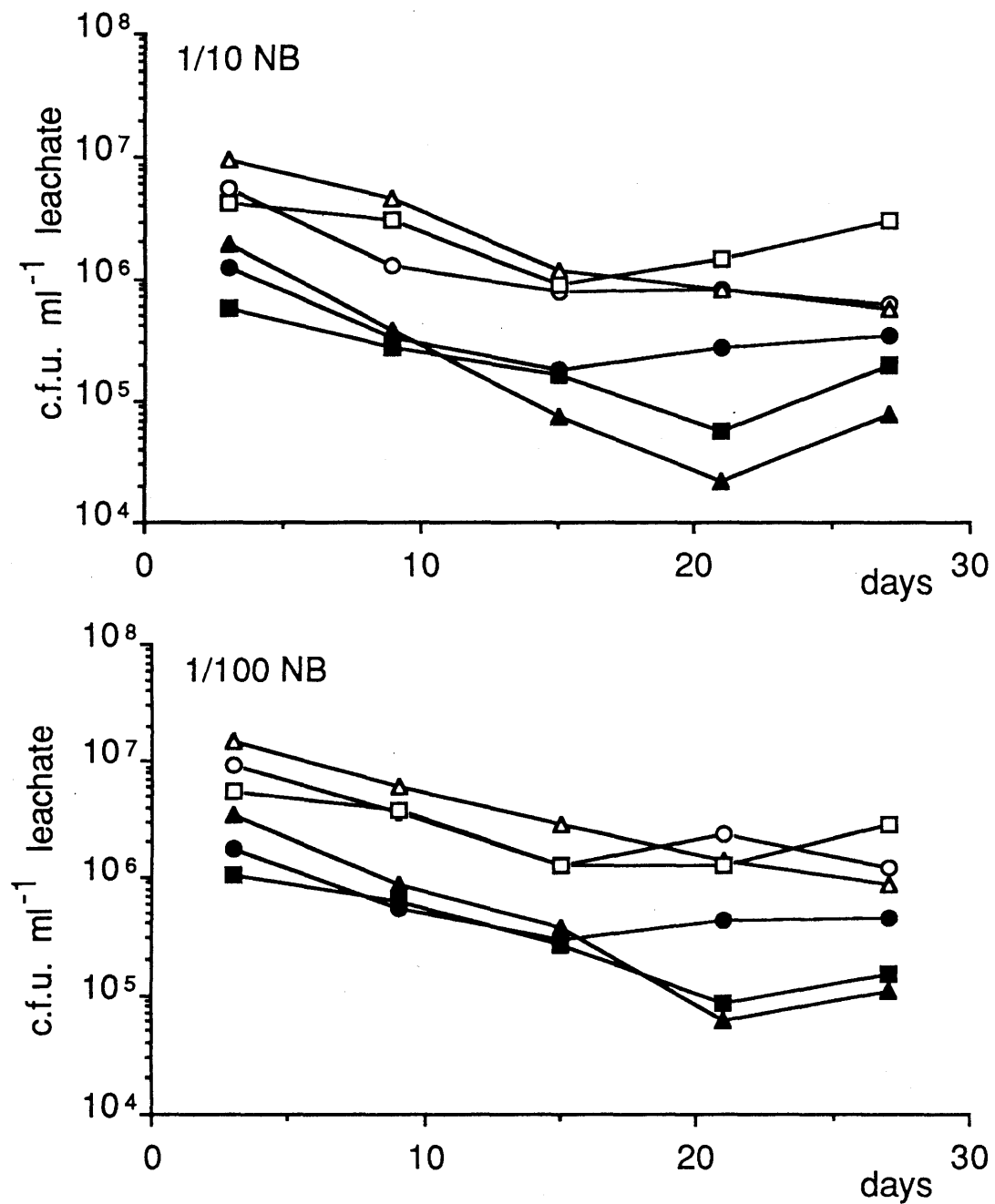


Fig.4-2-1 Time course of the number of aerobes in the leachate.

- , Plow layer soil without rice straw.
- △▲, Plow layer soil with rice straw.
- , Subsoil connected to plow layer soil with rice straw.
- Open symbols, Total microbes.
- Closed symbols, C.V. tolerant bacteria.

)は稲わら添加などにより還元が進んだ作土からの浸透水は特にグラム陰性菌の生育を抑制することを報告しており、今回の結果はそれを支持するものと考えられた。

#### b. 嫌気性菌 (図4-2-2)

作土無添加区からの透水液中には、培養初期 $10^4$  c.f.u./mlレベルの嫌気性菌が検出された。一方、作土稲わら区では $10^6$  c.f.u./mlレベルの嫌気性菌が計数され、好気性菌とは異なり、稲わら添加にともなう嫌気性菌の活性化が示唆された。1/10NB培地で計数される嫌気性菌は、いずれの処理区においても培養期間中菌数に著しい変動がなかったのに対し、1/100NBで生育する低栄養性嫌気性菌数は、作土無添加区で透水中期から後期にかけ10倍以上増加した。この結果から、還元状態がそれほど進行していない作土無添加区においても、湛水により低栄養性嫌気性菌が活発化したと推察された。心土接続区では、培養初期に作土稲わら区に比べ菌数は低かったが、2回目の測定以降同レベルで推移した。

色素耐性菌は両培地 (1/10NB、1/100NB) において低栄養性嫌気性菌と同様の傾向を示した。すなわち、透水初期に作土無添加区・心土接続区では作土稲わら区に比べ菌数が低く、2回目の測定以降 (心土接続区) あるいは培養後期 (作土無添加区) に差異が認められなくなった。稲わら添加による色素耐性菌数の減少は認められず、近藤ら (1982b) の報告した還元物質によるグラム陰性菌の生育抑制効果は好気性菌に特有な現象であると推察された。

#### c. 硫酸還元菌 (図4-2-3)

作土無添加区では $10^{2-3}$  m.p.n./mlで、透水後期にやや減少する傾向を示した。一方、作土稲わら区では、9日目に増加し以後 $10^5$  m.p.n./mlレベルの硫酸還元菌が下方へと流脱していることが明らかになった。心土接続区では、透水初期から中期にかけて $10^4$  m.p.n./mlであったが、後期に作土稲わら区と同程度まで増加した。

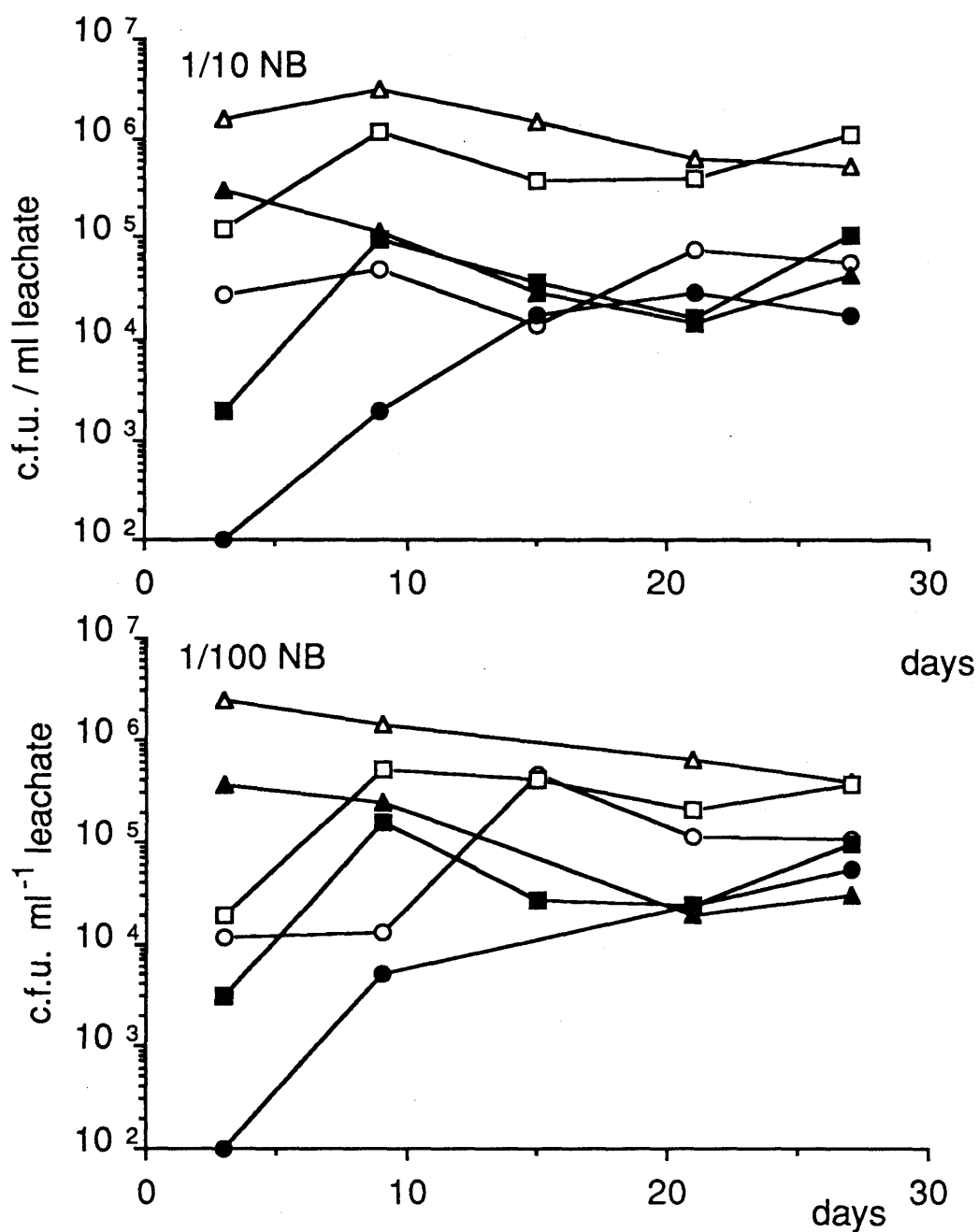


Fig.4-2-2 Time course of the number of anaerobes in the leachate.

- , Plow layer soil without rice straw.
- △▲, Plow layer soil with rice straw.
- , Subsoil connected to plow layer soil with rice straw.
- Open symbols, Total microbes.
- Closed symbols, C.V. tolerant bacteria.

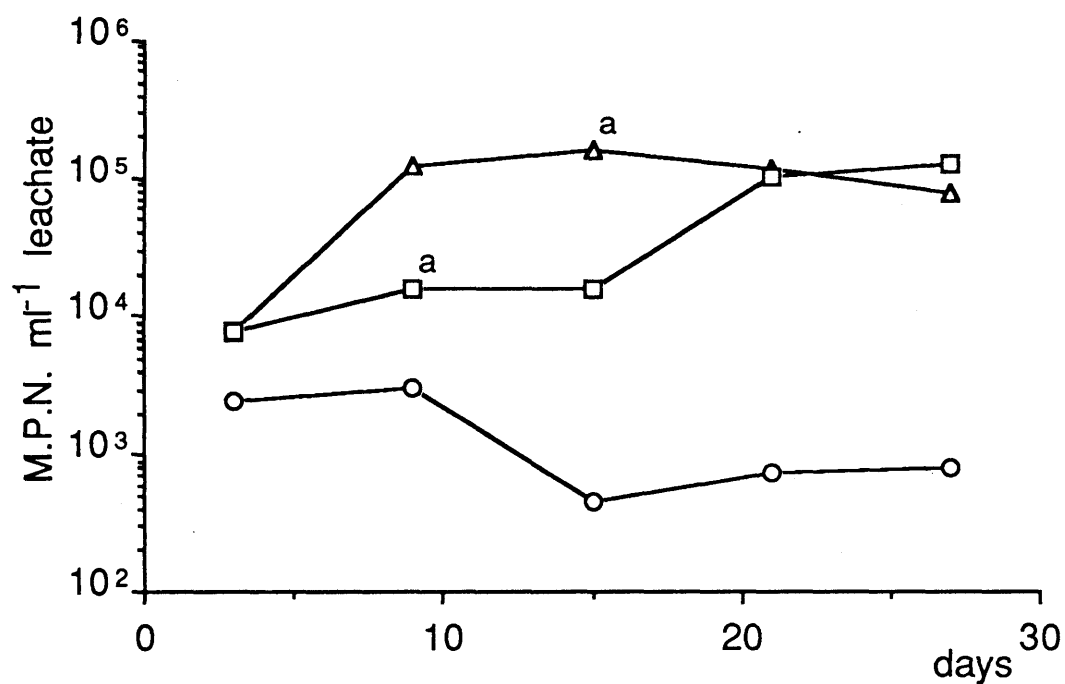


Fig.4-2-3 Time course of number of sulfate reducers in the leachate.

○, Plow layer soil without rice straw.

△, Plow layer soil with rice straw.

□, Subsoil connected to plow layer soil with rice straw.

<sup>a</sup>All test tubes were positive.

## 2. 培養終了時の土壌中の微生物数 (表4-2-1)

稲わら添加にともなう作土中の全好気性菌数の変化はほとんど認められなかった。培養前の土壌と比較すると、好気性菌全体としては1/10NB、1/100NBともにやや増加した。一方、色素耐性菌は減少し、全菌数に対する割合は培養前に比べて1/3から1/6程度に減少した。このような現象は心土においても観察された。近藤ら(1982a,b)も同様な結果を得ており、作土からの浸透水に含まれる還元物質(フェノール性物質と推定)が心土のグラム陰性菌を抑制すると報告している。

稲わらを添加した作土中の嫌気性菌は稲わら無添加作土に比べて2-3倍高い値を示し、嫌気性の色素耐性菌数ではその傾向が顕著であった。心土の暗灰色を呈した上部には特に低栄養性の色素耐性菌の集積が認められた。武田・古坂(1970a,b)によれば、水田土壌から分離された偏性嫌気性菌のほとんどはグラム陽性の孢子形成菌 Clostridium 属であるので、稲わら添加によって増殖した嫌気性色素耐性菌は、強い還元状態を好む通性嫌気性菌であると推察された。彼らはまた、湛水後の水田土壌からグラム陰性の通性嫌気性菌 Aeromonas hydrophila が多く分離されると報告している。

硫酸還元菌についても稲わら添加によりその菌数が増加していることが明らかになった。また、培養前に比べると稲わら添加作土では10倍以上増加していた。心土中の硫酸還元菌数も増加し特に上部で増加が顕著であった。この結果は、作土から流脱した硫酸還元菌が心土で活性を示し、嫌氣的メタン酸化に参与するという前章の実験結果を支持するものと考えられた。高井ら(1970)も心土表層の灰色部分で硫酸還元菌数の増大を観察しており、水田土壌心土の柱状構造におけるキュータンの生成に関連していると考察している。

## 3) 微生物の流脱率

培養終了時の土壌カラム中の微生物数に対する、流脱した微生物数の割合(流脱率)を推定した(表4-2-2)。好気性菌では作土に残存する全菌数の1%程度、色素耐性菌は50-85%が流脱していることが明らかになった。これは、培養期間

Table 4-2-1 Microbial numbers in soil at the end of incubation.

			Plow layer soil		Subsoil	
			RS(—)	RS(+)	Upper <sup>a</sup>	Lower
Aerobes	1/10 NB	Total( $\times 10^8$ ) <sup>b</sup>	3.18	5.17	2.34	1.92
		C.V. tol.( $\times 10^5$ )	13.4	9.85	2.88	1.26
	1/100 NB	Total( $\times 10^8$ )	5.47	6.18	3.24	2.81
		C.V. tol.( $\times 10^5$ )	32.7	29.1	7.30	4.94
Anaerobes	1/10 NB	Total( $\times 10^7$ )	10.6	18.9	4.56	3.42
		C.V. tol.( $\times 10^5$ )	1.35	4.53	<0.99	0.58
	1/100 NB	Total( $\times 10^7$ )	5.46	14.8	3.93	5.65
		C.V. tol.( $\times 10^5$ )	1.48	9.83	6.49	0.58
Sulfate reducer ( $\times 10^5$ ) <sup>c</sup>			8.10	26.6	17.4	2.72

<sup>a</sup>Upper, 0-15mm; Lower, 15-60mm.<sup>b</sup>c.f.u. g<sup>-1</sup> dry soil.    <sup>c</sup>M.P.N. g<sup>-1</sup> dry soil.

Table 4-2-2 Relative value of the number of microbes leached through the soil column to that in the soil at the end of incubation.

			Plow layer soil	
			RS(—)	RS(+)
Aerobes	1/10NB	Total	1.39 %	1.60 %
		C.V. tol.	85.6	122.6
	1/100NB	Total	1.58	2.07
		C.V. tol.	51.5	82.4
Anaerobes	1/10NB	Total	0.11	1.93
		C.V. tol.	23.9	55.1
	1/100NB	Total	0.62	1.92
		C.V. tol.	14.0	39.4
Sulfate reducer			0.46	9.08

中に作土中の色素耐性菌が減少したことと、色素耐性菌が特に流脱され易いことによると考えられた。稲わらの添加により流脱率は増加し、特に色素耐性菌では土壤中に存在する菌数とほぼ同数が溶脱されたと算出された。

嫌気性菌では、全菌数に比べて色素耐性菌の流脱が顕著であった点、稲わら添加により流脱率が増加する点は好気性菌と同様であったが、嫌気性菌は好気性菌に比べて流脱率が低いことが明らかになった。ただし、稲わらを添加することによる流脱率の増加は嫌気性菌の方が顕著であり、土壌還元の進行にともない嫌気性菌が増殖し、容易に流脱する菌数の割合が増加したと考えられた。

硫酸還元菌は作土無添加区からの流脱率は嫌気性菌と同程度であったが、稲わらを添加することにより10倍以上増加した。高井ら(1970)は硫酸還元菌の流脱率は好気性菌に比べ低いと報告している。本実験の結果も稲わら無添加条件では硫酸還元菌の流脱率が低かったが、稲わらを添加し、還元状態が発達した土壌環境では硫酸還元菌の流脱率が一般好気性菌や嫌気性菌の流脱率と比較してむしろ高く、菌数の増加にともない流脱が容易な硫酸還元菌が増加したものと推察された。

#### 4-3 浸透にともなうメタン生成菌の移動とメタン生成

##### <はじめに>

メタン生成菌は、非メタン生成菌群の発酵代謝産物（酢酸・水素・メタノール等）を基質として利用する。一方非メタン生成菌は、メタン生成菌による代謝産物の消費がない限り生育は不可能であるため、両者は緊密な共生系を形成している（Mah 1982）。本章第1節において、ポットからの透水液中にメタン生成菌（メチル基資化性菌）が検出され、メタン生成菌は土壤中を移動可能であることが示唆された。しかしながら、メタン生成菌が、共生系を維持した状態で移動するか、あるいは移動先で共生系を形成しない限り、新たな環境でメタン生成活性を示さないと推察される。

Conrad and Babbel (1989) と Conrad et al. (1989) は、水田土壌において水素・二酸化炭素から生成するメタンの95%以上が水素を介した共生系により生成されること、またこの共生系は湛水後非常に短時間（5日間以内）で形成されると報告している。

本節では、浸透によって移動したメタン生成菌が、移動先の有機物（稲わら）を利用してメタン生成活性を示すか否かを土壌カラムを用いて検討した。

##### <材料および方法>

福島水田作土 (<2mm) を供試し、第3章第3節の実験に準じて稲わら添加濃度の異なる2層（あるいは1層）の土壌カラムを作成した。稲わらの添加濃度は、0、0.6%の2段階とし、稲わら無添加条件の土壌1層から成るカラム（無添加1層区）、稲わらを添加土壌の1層カラム（稲わら1層区）、下層に稲わら添加土壌、上層に無添加土壌を充填した2層カラム（下層稲わら区）、および上下層の組合せが逆のカラム（上層稲わら区）を準備した。また、2層カラムの下層の土壌を充填前に121℃30分オートクレーブ殺菌した区も設けた。カラムは湛水状態とし、25℃暗所で培養した。

3日毎に80mlずつ透水し、透水液中のメタン、TOC、IC、二価鉄量を測定した。



33日間の培養終了時に土壌中の二価鉄を抽出・定量した。

#### <結果および考察>

##### 1. 透水液中の各種成分の含量

###### a. メタン (図4-3-1)

無添加1層区の透水液からメタンはほとんど検出されなかった。稲わら1層区では9日目よりメタン濃度が増加し、27日目に最高値に到達した後わずかに減少した。下層稲わら区では稲わら1層区よりもメタン濃度は高い値で推移した。これらの結果は第3章第3節で得られた知見と同様であった。また、本実験においても上層稲わら区の透水液中のメタン含量は稲わら1層区あるいは下層稲わら区に比べ低く、作土における嫌氣的メタン酸化が確認された。また、下層を殺菌しても、心土におけるメタン酸化と同様、酸化量にほとんど変化がなかった。

下層に殺菌した稲わら添加土壌を充填したカラムからの透水液中にはメタンが9日目までほとんど検出されなかったが、12日目以降徐々に増加する傾向を示した。殺菌した稲わら無添加土壌を下層に充填したカラムでは非殺菌区に比べメタン濃度の増加が僅かであったことから、下層殺菌稲わら区におけるメタン生成に稲わらが関与していると考えられた。なお、オートクレーブの影響からか、下層殺菌稲わら区は培養期間中に目詰まりをおこし、24日目以降注射筒で引きながら透水液を採取した。そのためメタン含量の正確な測定は24日目以降不可能であった。

###### b. TOC (図4-3-2)

下層の土壌を殺菌することにより透水液中のTOC含量は著しく増加した。稲わらを添加した下層の方が、無添加に比べ殺菌によるTOC含量の増加は顕著であったことから、殺菌処理により微生物菌体や土壌有機物ばかりでなく稲わらも可溶性物質が増加したと推察した。

1層カラム、あるいは殺菌処理をしなかった2層土壌カラムからのTOCの溶脱

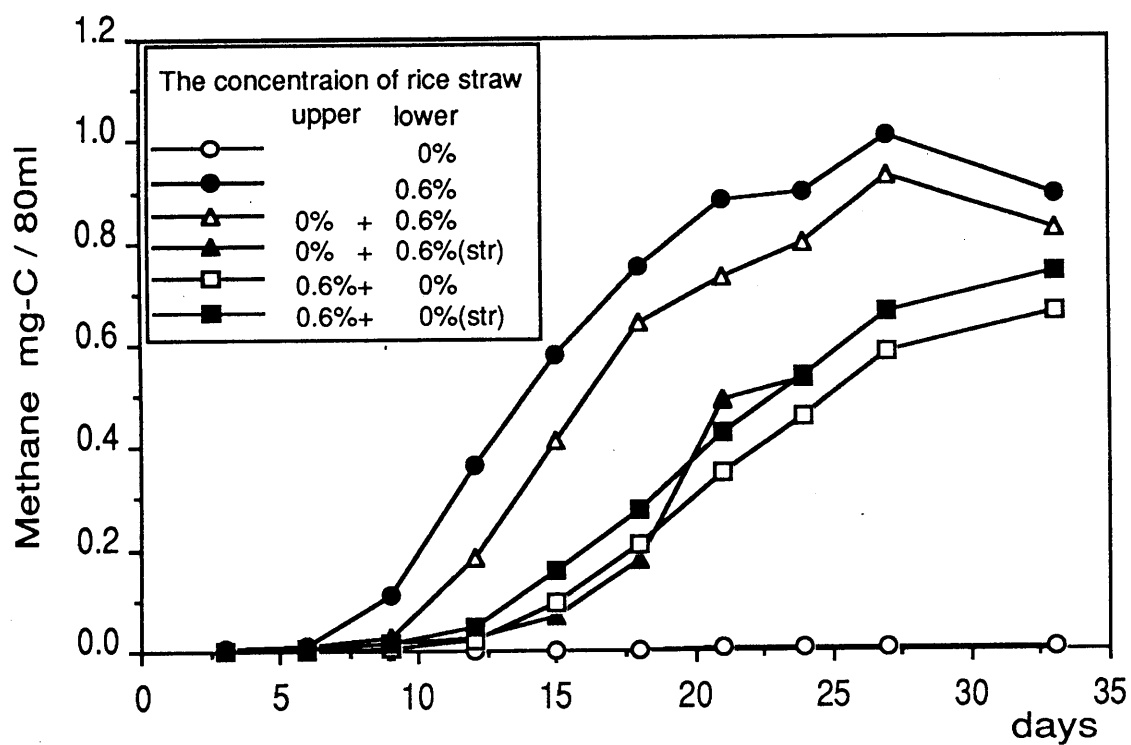


Fig.4-3-1 Methane content in the leachate.  
 Circle symbols, One soil layer with or without rice straw.  
 Str, Lower soil was sterilized by autoclaving.

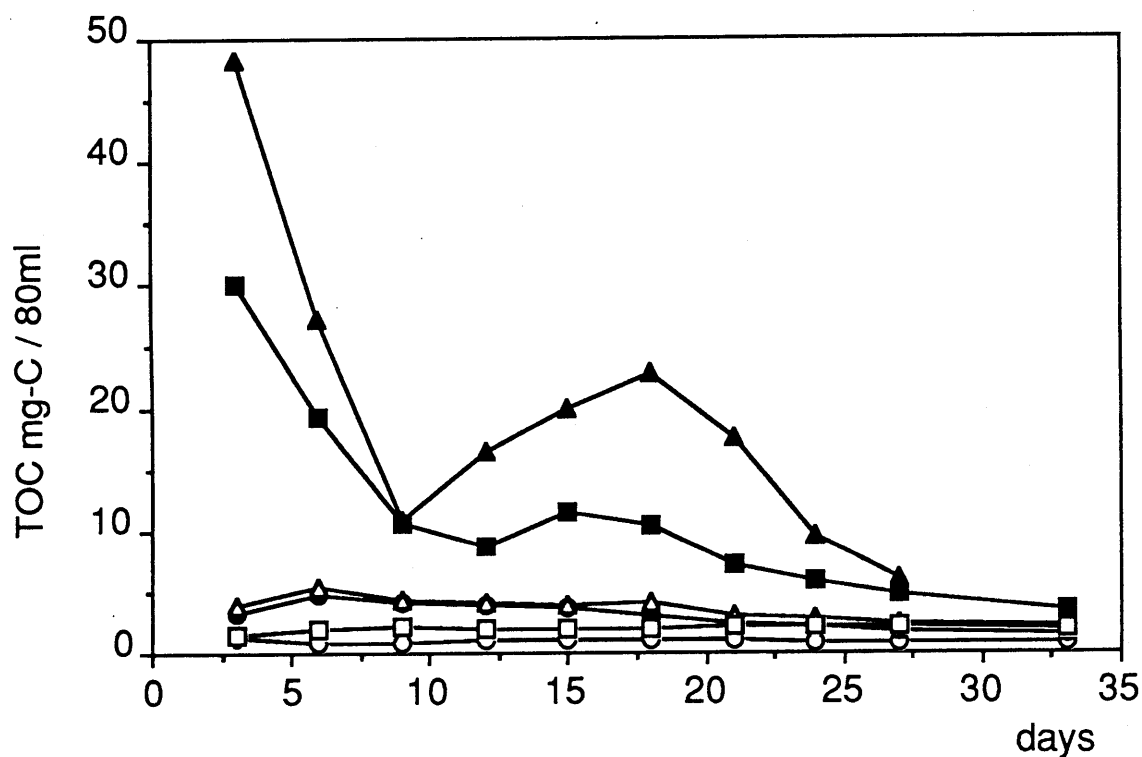


Fig.4-3-2 TOC content in the leachate.  
 For the symbols, see Fig. 4-3-1

は第3章第3節の結果と同様の傾向を示した。

c. IC (図4-3-3)

下層土壌を殺菌することにより、下層無添加区の透水液中のIC含量は培養前期から中期にかけて著しく増加した。また、下層殺菌稲わら添加区においても非殺菌区とほぼ同量のICが透水液中に検出され、殺菌した下層土においておもに上層から流脱してきた微生物に由来する微生物活動があったことを示唆した。

非殺菌条件の土壌カラムから採取した透水液中のIC含量は、第3章第3節の結果と同様の傾向を示した。

d. 二価鉄 (図4-3-4)

殺菌処理による透水液中の二価鉄含量の増加が顕著に観察され、殺菌した下層の土壌中で微生物活動が活発であるとするICの結果を支持した。透水液中のICおよび二価鉄含量が、下層殺菌稲わら区に比べ下層殺菌無添加区で高くなる傾向が認められたが、IC・二価鉄の生成に関与すると考えられるTOCの下方への溶脱が下層殺菌稲わら区で顕著であったことに原因があると推察した。

非殺菌区に関しては、TOC、ICと同様に前章の結果とほぼ同様であった。

## 2. 培養終了時の土壌中の二価鉄含量

培養終了時における土壌中の二価鉄含量を培養期間中にカラムから溶脱した二価鉄量とともに表4-3-2に示す。下層殺菌無添加区で殺菌による下層土の二価鉄生成量が顕著であった。また、下層殺菌稲わら区においても非殺菌区と同程度の二価鉄が生成していることが明らかになった。一方、下層殺菌稲わら区の上層の二価鉄含量は非殺菌に比してやや高かったが、稲わらを添加した土壌 (>900mg) と比較すると、土壌中に還元され得る酸化鉄が残存していると推察された。すなわち、下層殺菌稲わら区の上層の酸化還元電位は酸化鉄の還元反応が起こる程度であると判断できるので、この処理区から溶脱したメタンは下層で主に生成したものと考えられる。

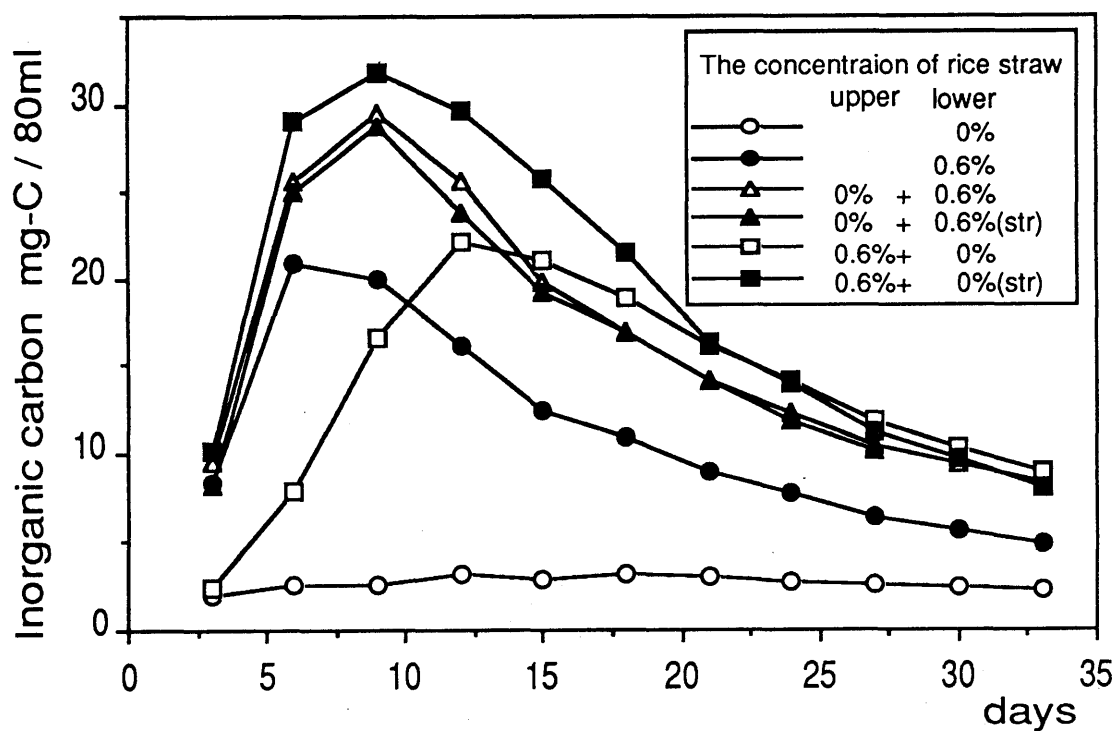


Fig.4-3-3 IC content in the leachate

Circle symbols, One soil layer with or without rice straw.  
Str., Lower soil was sterilized by autoclaving.

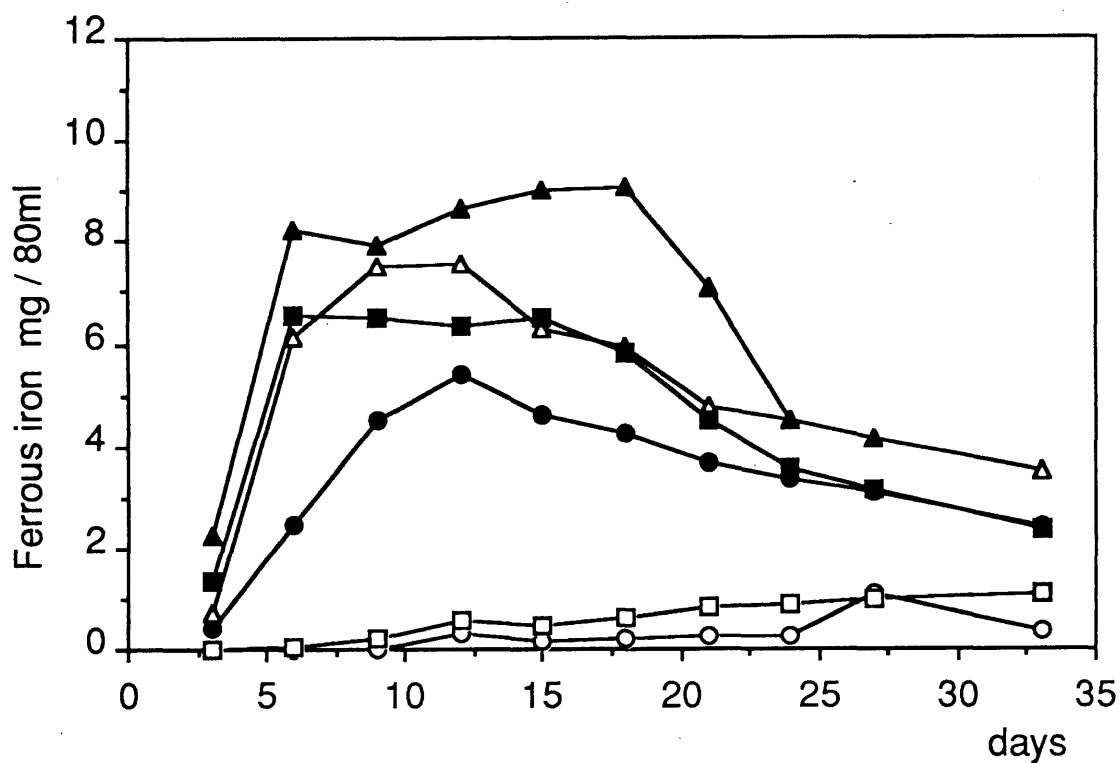


Fig.4-3-4 Fe(II) content in the leachate

For the symbols, see Fig. 4-3-3

Table 4-3-1 Ferrous iron content in the leachate and the soil column at the end of incubation.

Treatment	Upper layer	Lower layer	Leachate
0%	—	360.5	2.7
0.6%	—	995.1	34.1
0+0.6%	411.0	947.3	51.1
0+0.6% (str)	532.0	942.6	60.9
0.6+0%	974.3	572.9	5.8
0.6+0% (str)	970.5	955.9	46.6 (mg)

以上の結果から、メタン生成菌は浸透により下方へと移動し、下層でのメタン生成に関与したと推察した。本結果を敷衍するならば、稲わら等の有機物が湛水状態で嫌氣的に分解される場合、有機物の近傍のみならず、比較的離れた部位に存在するメタン生成菌もメタン生成に関与する可能性があると言えるであろう。なお、流脱したメタン生成菌は共生関係を維持しているのかあるいは流脱後新たに共生系を確立するのかは明らかではなかった。

#### 4-4 土壌の風乾・磨砕がメタン生成に及ぼす影響

##### <はじめに>

メタン生成菌は絶対嫌気性菌の中でも特に酸素に対する感受性が高く孢子形成能を持たないことから、分子状酸素の存在下でその活性は速やかに阻害されることが知られている。しかしながら、本章第1節の結果からメタン生成菌は酸化層においても $10^4-5$  m.p.n./g soil程度存在することが明らかになった。また、浅川(1991)、上木ら(1993)は落水期においても水田土壌中のメタン生成菌数に著しい減少は観察されなかったと報告している。さらに、Mayer and Conrad(1990)は森林土壌や耕地土壌等通常好気状態であると考えられる環境においてもメタン生成菌が普遍的に存在することを明らかにした。

土壌環境の酸化還元状態は、酸素の供給と消費のバランスで決定され、後者が優ればその環境は嫌気状態になる。畑土壌でも嫌気性菌が相当数検出されるのは、団粒内部の微小孔隙に嫌気環境が発達しているからであり、メタン生成菌はそのような部位に存在していると考えられている。土壌団粒内部への酸素の拡散速度は、微生物の呼吸を無視すれば団粒の半径によって規定され、半径が大きければ酸素の拡散速度は当然低くなる。

本節では、水田土壌を団粒サイズで分画し、どの程度の大きさまでメタン生成活性を示しうるのかを検討した。

##### <材料および方法>

福島水田土壌作土(<2 mm)を風乾後ふるいにかけ、<2 mm、<1 mm、<0.25 mmのサイズに分画した。各画分の土壌5 gを蒸留水4 ml、基質として3%グルコース溶液1 mlとともに加圧培養試験管に入れ、ブチル栓、ねじ口栓をした後に試験管内部の気相を窒素で置換した。試験管は30℃暗所で培養し、気相のメタン濃度を測定した。

また、風乾後の土壌(<1 mm)をさらにミルで粉碎して粉末状態とし、大きめのシャーレに薄く広げ大気にさらし、室温で保存した。粉碎後0、20、56日目の

試料について先と同条件で培養し気相のメタン濃度を測定した。

#### <結果および考察>

各サイズの作土土壌からの生成したメタンの気相中の濃度変化を図4-4-1に示す。培養後3日目の測定から試験管中にメタンが検出され、培養期間（15日）中ほぼ指数関数的にメタン濃度が増加した。土壌団粒のサイズによってメタン濃度に大きな差は認められず、むしろ土壌サイズが小さくなるほどメタン濃度は高くなる傾向が認められた。このことから、メタン生成菌は比較的小さな土壌構造単位にも存在していることが明らかになった。

構造を持たない粉末状態の土壌から生成したメタンの気相濃度を風乾土壌（ $< 2\text{ mm}$ ）と比較し、図4-4-2に示した。土壌を粉末状にすると風乾土壌よりメタン濃度は上昇した。これは土壌が粉末状になることにより、これまで物理的に隔離されていた易分解性土壌有機物（植物遺体等）が微生物にとって利用可能となり、土壌の還元・メタン生成がさらに進行したためと思われる。

培養系のメタン生成菌は、種類によって程度は異なるが、酸素の存在下で速やか（数分～30時間）に生育阻害を受けることが知られている（Zhilina 1972, Kiener and Leisinger 1983）。しかしながら、粉末土壌の大気への暴露によってメタン生成の抑制・遅延などの影響は観察されなかった。このことから、メタン生成菌は土壌構造中の深部に存在し、酸素に対する防衛機構を備えていることが想像された。



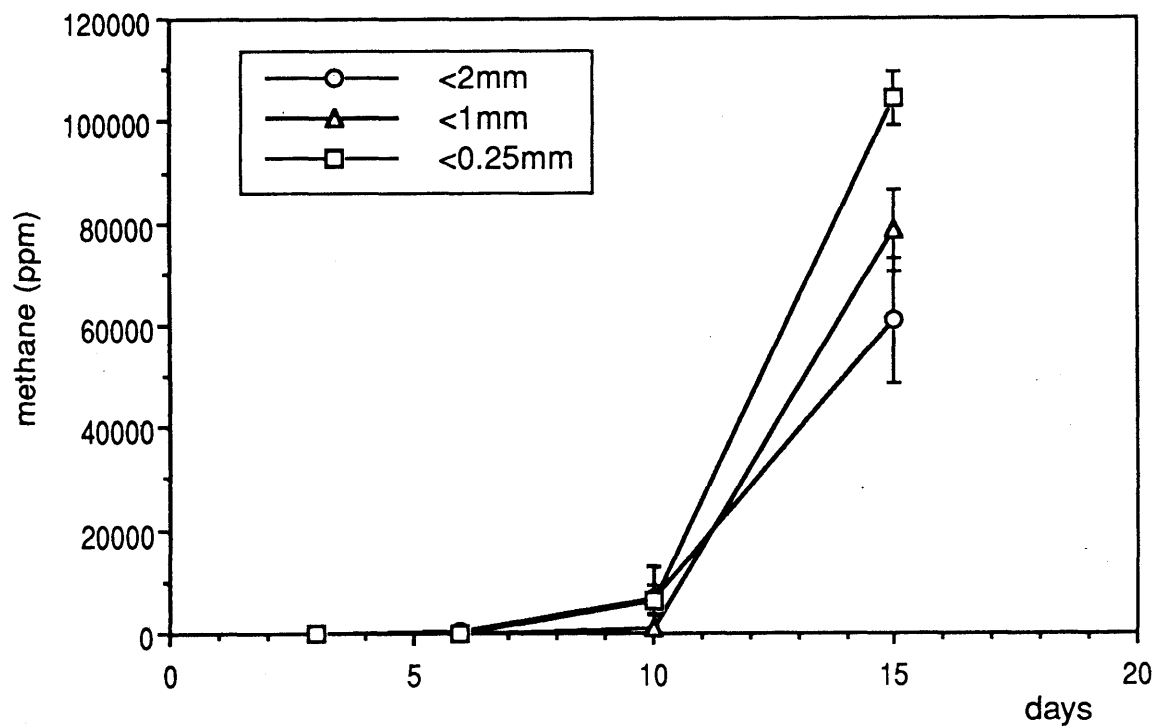


Fig.4-4-1 Methane production in soil particles with different sizes.

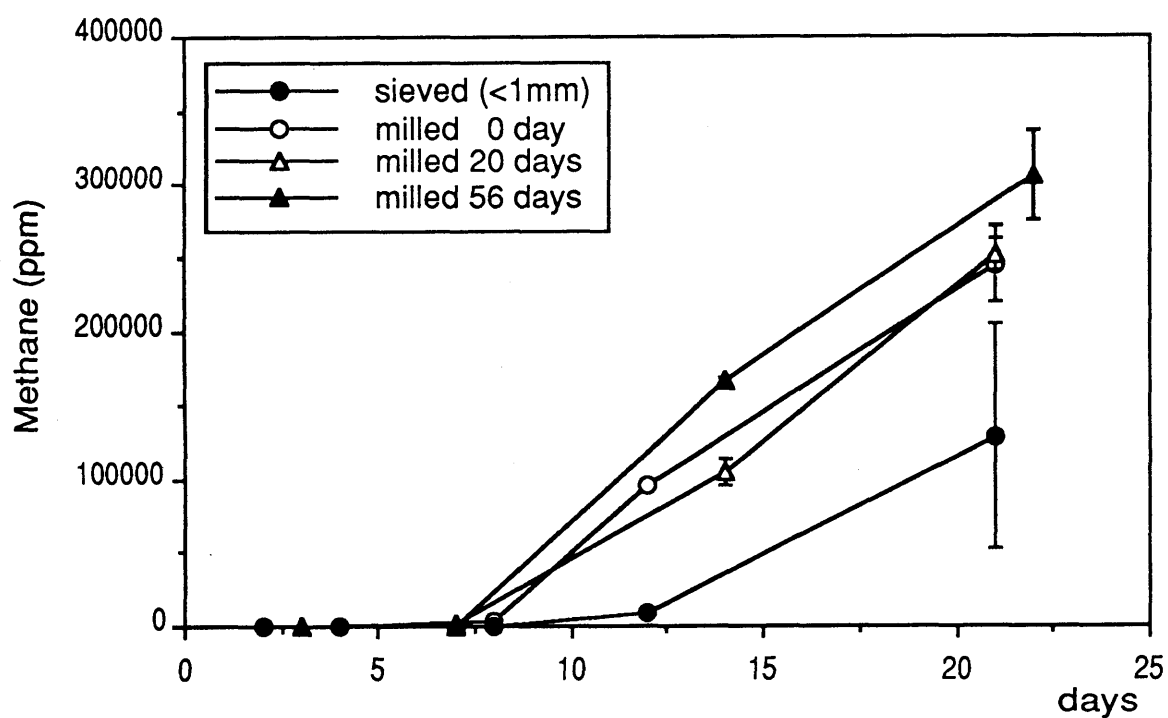


Fig.4-4-2 Methane production in sieved and milled paddy soils.

#### 4-5 メタン生成に及ぼす原生動物の影響

<はじめに>

前節でメタン生成菌は大気中の酸素に対し、なんらかの防衛機能を持っている可能性が示唆された。Methanosarcina 属菌は、その名前の由来の通りザルチナ（小荷物）状の細胞凝集体を形成し、内部のメタン生成菌は酸素の影響が及びにくくなるために、1つのコロニーとしてはある程度の酸素に対する抵抗性を有することが知られている（Kiener and Leisinger 1983）。しかしながらその様な場合でも、凝集体外部のメタン生成菌は確実に酸素による阻害を受け、コロニーの活性は低下することが確認されている。一方、前節の実験では、好気状態での放置によってもメタン生成活性の低下やメタン生成開始の遅延といった影響は全く観察されなかった。

メタン生成菌のもう一つの酸素耐性機構として原生動物との内部共生が考えられる。反すう動物のルーメン、シロアリの腸内あるいは湖沼・海洋の底泥といった嫌気環境に原生動物が生息していることが知られているが、この嫌気性原生動物の多くは内部あるいは表面でメタン生成菌と共生関係を保っている（Vogels et al. 1980, 1984, Stumm et al. 1982, Stumm and Zwart 1986, Van Bruggen et al. 1984, 1986, 1988, Lee et al. 1985, 1987, Wagener and Pfeninig 1987, Goosen et al. 1988, Stumm and Vogels 1989, Wagener et al. 1990, Gijzen et al. 1991）。嫌気性原生動物はメタン生成菌に比べ酸素に対する感受性が低く、周りの環境が比較的酸化的（酸素濃度3%）でも体内を還元状態に保つことができるために共生メタン生成菌は体内で生育可能と考えられている（Hillman et al. 1988, Finlay and Fenchel 1991）。また、原生動物は乾燥などの生育条件の悪化に伴って耐久体（シスト）を形成するが、シストの内部にもメタン生成菌の存在することが報告されている（Finlay and Fenchel 1991）。さらに、原生動物と共生関係にあるメタン生成菌は、その嫌気環境中のメタン生成菌のかなりの割合を占める可能性が示唆されている（Krumholz 1983, Van Bruggen et al. 1983, 1985）。

本節では、抗生物質を添加し真核生物の活性を抑えた水田土壌でのメタン生成活性を測定し、メタン生成に及ぼす原生動物の影響を検討した。

#### <材料および方法>

福島および安城水田作土（新鮮土、<2mm）5gを稲わら0.6%、蒸留水5mlとともに加圧培養試験管にいれ、気相を窒素置換した後に30℃暗所で培養した。定期的に気相のメタンおよび炭酸ガス濃度をガスクロマトグラフ（島津 GC-14B）で測定した。測定条件は以下の通りであった。

検出器	: 熱伝導度検出器（炭酸ガス） 水素炎イオン化検出器（メタン）
カラム	: Porapak-N 3m
カラム温度	: 60℃
インジェクター温度	: 80℃
検出器温度	: 80℃
キャリアーガス	: He

培養6日目にメタン生成に及ぼす真核生物の影響を検討するため抗真核生物性抗生物質シクロヘキシミドを1,500ppm、あるいはメタン生成菌の活性を抑えるためにプロモエタンスルホン酸ナトリウム(BES)を5mMとなるように試験管内に注入した。また、シクロヘキシミドを添加した試験管に水素ガス0.5mlあるいは酢酸ナトリウム5.4μmolを添加した区も設けた。

#### <結果および考察>

試験管内のメタンおよび炭酸ガス濃度の経時変化を図4-5-1（福島）および4-5-2（安城）に示す。BESの添加により両土壌ともメタン生成がほぼ完全に抑制された。炭酸ガス濃度もBESの添加により減少したが、メタン生成阻害によって嫌氣的物質代謝が円滑に進行しなくなったことによると判断された。堀ら(199

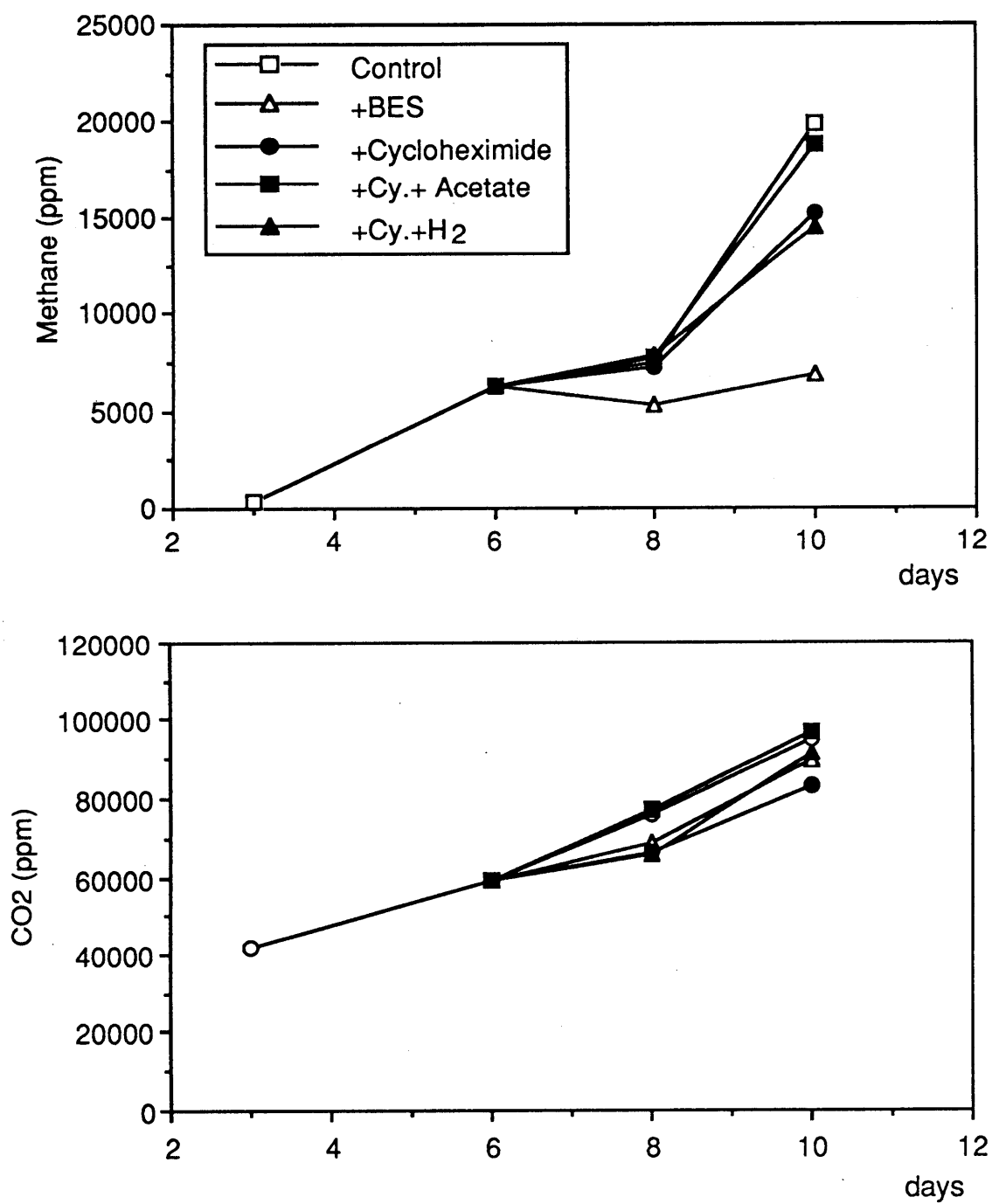


Fig. 4-5-1 Effect of specific inhibitors on CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> production in Fukushima paddy soil.

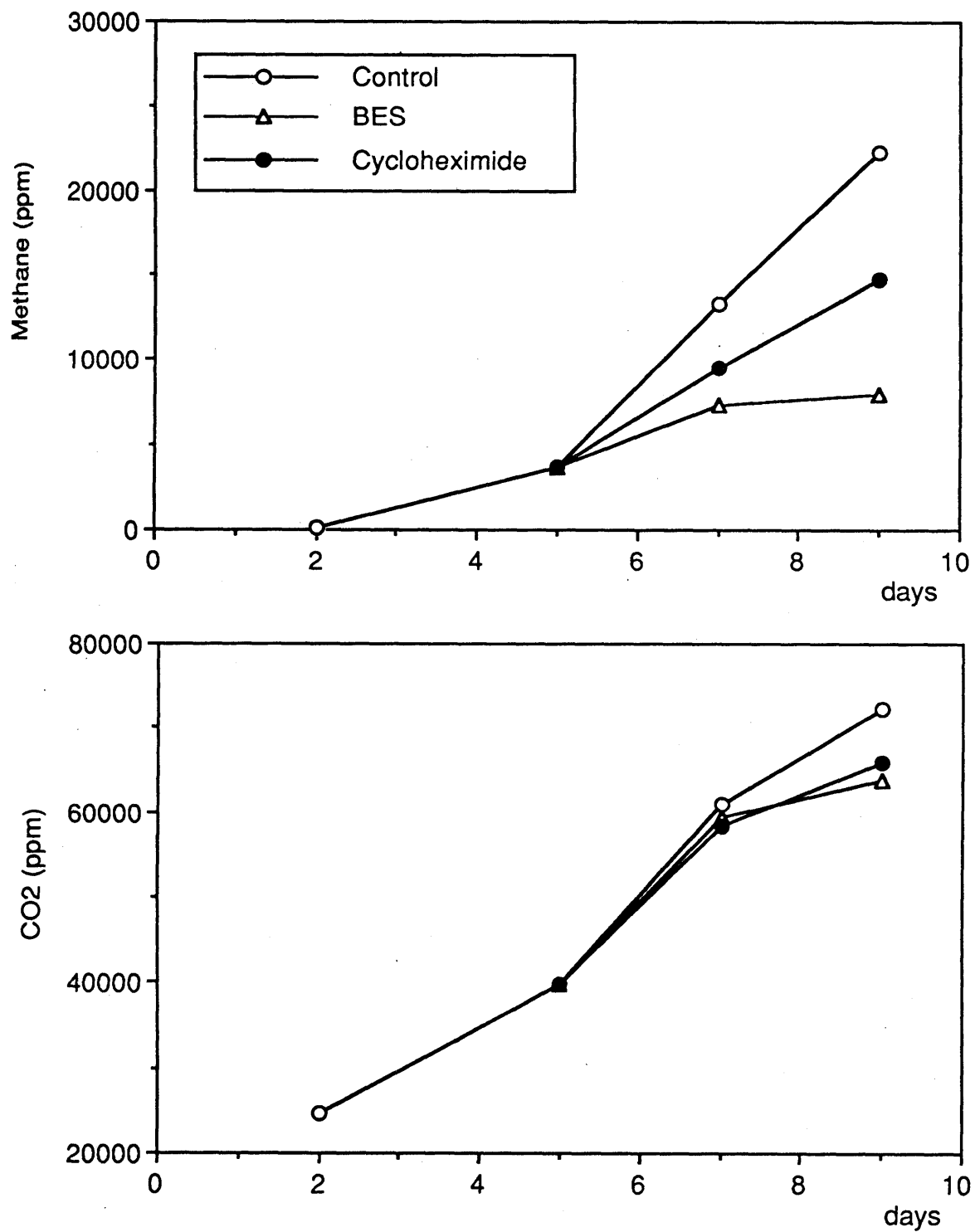


Fig. 4-5-2 Effect of specific inhibitors on CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> production in Anjo paddy soil.

0b)は5mMのBESは鉄還元、マンガン還元には阻害作用が無いが、炭酸ガス生成には抑制作用を示すと報告している。

福島土壌ではシクロヘキシミド添加後4日目に対照区と比べて明らかにメタン濃度が低下していた。炭酸ガス濃度もメタンほどではないが若干減少していた。安城土壌でもシクロヘキシミドの影響は明らかであった。

シクロヘキシミドとともにメタン生成菌の基質である酢酸を添加した区ではメタン濃度が上昇した(図4-5-1)。このことから、シクロヘキシミドによるメタン生成の阻害はメタン生成菌への直接的効果ではなく、真核生物の阻害に伴うメタン生成のための基質の供給の低下によるものと考えられた。嫌気条件下の水田土壌では糸状菌の活性は低いと考えられるので、シクロヘキシミドによって抑制された真核生物は原生動物であると推察された。

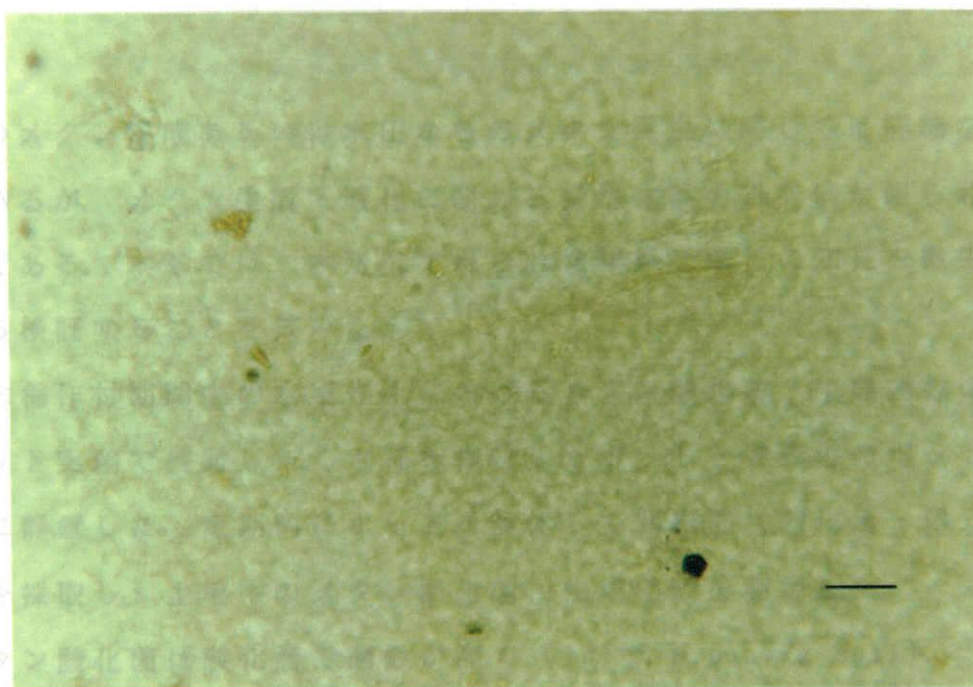
なお水素添加の影響は認められなかったが、水素の添加量(0.5ml)がメタン生成菌に利用されるには十分量なかったためと推察した。

阻害剤添加時から実験終了時の間における各処理区のメタン濃度の増加量から計算すると、シクロヘキシミドの添加によるメタン生成の阻害は30-40%程度と推定された。還元の進行した作土からの透水液中にメタン生成菌を体内に持つ原生動物が観察されており(写真4-5)、これらのことから、嫌気性原生動物と共生関係にあるメタン生成菌は水田土壌のメタン生成において重要な役割を担っているものと推察された。また、炭酸ガスの生成も20-30%抑制されており、原生動物は嫌気環境における有機物の無機化作用にも少なからず寄与していると考えられた。

[illegible]

一般の嫌気性  
れなかったが、  
数を維持する

scale bar 10  $\mu$ m



scale bar 10  $\mu$ m

水田土壌でのメタン生成あるいは水田からのメタン発生に関しては詳細な研究がなされているが、メタン生成・酸化に関わる微生物群の研究例が限られているのが現状である。本章では、本研究で得られた結果と既報の知見を微生物学的な観点から検証することを試みた。

第1節では水稻作付期間中の水田作土におけるメタン酸化菌・生成菌数の季節的变化をポット実験で検討した。水稻を作付したポットと無作付のポットを準備し、野外に静置した。定期的にポットを解体して非根圏（酸化層・還元層）、根圏の土壌を採取し、土壌中のメタン酸化菌・生成菌数を測定した。

好気性のメタン酸化菌は酸化層で菌数が高く（ $10^{5-6}$  m.p.n./g soil）、還元層で低かった（ $10^3$  m.p.n./g soil）。根圏土壌ではその中間程度のメタン生成菌数が検出された。菌数の季節的变化は顕著ではなかった。

一般好気性菌数もメタン酸化菌と同様酸化層で菌数が高く、還元層で低い傾向が認められた。

メタン生成菌（メチル基資化成菌）は、酸化層と還元層で菌数の有意な差異が認められず  $10^{4-5}$  m.p.n./g soil レベルで検出され、水稻生育後期にやや菌数が減少する傾向が認められた。一方、根圏土壌中のメタン生成菌数は、水稻栽培前・中期まで非根圏土壌と同程度であったが、水稻体からのメタン放出が活発になった栽培後期にそのレベルを維持するか  $10^6$  m.p.n./g soil まで増加した。

一般の嫌気性菌や硫酸還元菌も栽培初期は各土壌部位で菌数の差異が認められなかったが、栽培後期に非根圏土壌で菌数が減少するのに対し根圏土壌で菌数を維持するかやや増加する傾向が認められた。

メタン生成菌と共生関係にあると予想されたセルロース分解菌とメタン生成菌との間に明確な菌数の相関関係は認められなかった。

透水液中のメタン生成菌数を測定した結果、無作付ポットでは  $10^0$  m.p.n./ml、作付ポットでは  $10^{1-2}$  m.p.n./ml レベルのメタン生成菌が検出され、メタン放出活性の高い9月に菌数が高まる傾向が認められた。



第3章第4節で、心土における嫌氣的メタン酸化に作土から溶脱した硫酸還元菌が関与していることが示唆された。この結果を微生物学的な立場から裏付けるために、本章第2節では、田面水の浸透にともなう硫酸還元菌の作土からの流脱と心土における挙動を土壌カラムを用いたモデル実験で検討した。

稲わらを添加しない作土カラムからの透水液中から $10^{2-3}$  m.p.n./ml レベルの硫酸還元菌が検出されたが、稲わらを添加することにより急激に増加し、9日目以降 $10^5$  m.p.n./mlレベルの硫酸還元菌が作土から流脱することが明らかとなった。稲わら添加作土カラムに心土カラムを連結することにより、培養初期の透水液中の硫酸還元菌数が減少し作土に硫酸還元菌が保持されていると推察された。培養後期稲わら添加作土と同レベルの硫酸還元菌が流脱された。

作土からの透水液には培地の栄養濃度（1/10, 1/100NB）に関わらず $10^{6-7}$  c.f.u./mlの好気性菌が含まれており、稲わら添加の影響は顕著でなかった。稲わらを添加した作土に接続した心土からの透水液中に含まれるの好気性菌数（1/10NB）は後半やや増加した。一方、色素耐性菌は、 $10^{5-6}$  c.f.u./mlのレベルで推移し、稲わら添加により菌数減少する傾向が認められた。

透水液中の嫌気性菌数は、作土に稲わらを添加することにより培養初期から無添加区（ $10^4$  c.f.u./ml）に比べ高い値（ $10^6$  c.f.u./ml）を示した。心土からの透水液に含まれる嫌気性菌数も培養時間の経過と共に増加した。稲わら無添加作土の透水液中の低栄養性嫌気性菌は培養後期に稲わら添加区と同レベルまで増加した。色素耐性菌は培地濃度に関わらず低栄養性嫌気性菌と同様の傾向を示し、好気性菌に観察された稲わら添加による生育阻害効果は認められなかった。

30日間の培養終了後、土壌中の微生物数を測定した結果、硫酸還元菌と嫌気性の色素耐性菌が心土の特に上層部に多数存在していることが明らかになった。

作土からの各種微生物の流脱のしやすさを検討したところ、好気性菌＞嫌気性菌、色素耐性菌＞一般細菌、稲わら添加＞無添加といった傾向が認められた。硫酸還元菌の流脱率は稲わら無添加土壌では一般嫌気性菌と同程度で非常に低かったが、稲わらを添加することにより飛躍的に増加した。

第1節で透水液中にメタン生成菌が検出された。第3節では、田面水の浸透にともなって移動したメタン生成菌が、移動先でメタン生成活性を示すか否かをカラム実験で検討した。稲わらを添加した水田作土を殺菌した後にガラスカラムの下層に充填し、その上に稲わら無添加の非殺菌土壌を充填して湛水状態で培養した。定期的に透水液を採取し、メタン、水溶性有機物（TOC）、無機態炭素（IC）および二価鉄濃度を測定した。

透水液中のメタン濃度は、培養前期稲わら添加土壌を殺菌しない場合と比較して低かったが、培養15日目から急激に増加した。また、透水液中のIC、二価鉄含量および培養終了時の下層の二価鉄量も、非殺菌土壌と比較して同程度かそれより高く、殺菌稲わら添加土壌でメタン生成を含む微生物活性があったと推察された。

第4節では、メタン生成菌の土壌中における住み場所を明らかにするために、風乾土壌を篩にかけ団粒サイズごとに分画し各々のメタン生成活性を比較した。その結果、 $<2\text{mm}$ 、 $<1\text{mm}$ 、 $<0.25\text{mm}$ の土壌サイズでは小さくなるほどメタン生成活性が高く、メタン生成菌は比較的小さな土壌構造単位にも存在することが明らかになった。風乾土壌をミルで粉砕し粉末状態にした土壌のメタン生成活性を測定したところ、粉砕前に比べメタン生成活性は高まり、8週間の大気への暴露によってもメタン生成活性に全く影響はみられなかった。このことから、土壌中に生育するメタン生成菌は大気中の酸素に対し、何等かの防御機構を備えているものと推察された。

メタン生成菌の酸素抵抗性の機構の一つとして原生動物との内部共生が知られている。第5節では、メタン生成菌の生態解明の一環として、メタン生成に及ぼす原生動物の関与を検討した。土壌を稲わらとともに嫌気培養し、培養途中でシクロヘキシミドを添加するとメタン生成活性が低下した。シクロヘキシミド添加土壌にメタン生成の基質である酢酸を添加するとシクロヘキシミドを添加しない区と同程度のメタン生成活性が認められたことから、シクロヘキシミドの添加によるメタン生成活性の低下は真核生物（原生動物）の生育阻害によるメタン生成のための基質の供給の減少によるものと推察された。

## 第5章 熱帯水田からのメタン発生

### タイ国各地の水田からのメタンフラックス

#### <はじめに>

Koyama (1963) はインキュベーション実験の結果をもとに初めて世界の水田から発生するメタンを推定した。近年地球温暖化問題に対する関心が高まるにつれ、世界の水田から発生するメタンの総発生量に関し、実測値に基づいた様々な推定値が報告されている (Holzapfel-Pschorn and Seiler 1986, Cicerone and Oremland 1988, Aselman and Crutzen 1989, Schutz et al. 1989b, Bouwman 1990, Neue et al. 1990, Matthew et al. 1991, Anastasi et al. 1992)。その多くは、合衆国・スペイン・イタリア等欧米 (温帯地域) での測定結果に世界の水田収穫面積を乗じることにより推定されたものであり、その値にさらに温度などの変動要因の補正を加えたものもある。

一方、全世界の水田面積の90%はアジア地域に集中している (Schutz et al. 1990b) にもかかわらず、この地域での測定結果が非常に不足している。将来的に水田からのメタン発生量をより精度よく推定するためにはアジア地域での測定は不可欠である。特に熱帯アジア地域は、気候学的に温帯地域とは大きく異なっているばかりでなく、土壌学的にも熱帯独特の特性を持つ。一般的に温帯地方には少ない低腐植質グライ土、酸性硫酸塩土壌が熱帯に広く分布しており (Kawaguchi and Kyuma 1977)、これらの土壌に固有の性質が水田からのメタン発生にも影響を与えていると予想される。

本章では東南アジア有数の米産出国であるタイ国に分布する水田土壌のうち典型的な3種の土壌型に属する3カ所の水田圃場を選び、作付期間中のメタン発生速度を測定した。

#### <材料および方法>

##### 1. 実験圃場および水稻の栽培

タイ国内の各県に設置されている稲作試験場から3カ所の水田圃場を選抜し

た（図5-1-1）。それぞれ、タイ中央平原のラチャブuri (Ratchaburi) 県、パトゥムタニ (Pathumthani) 県、そして東北部スリン (Surin) 県に位置する稲作試験場である。中央平原はチャオプラヤー川を水源にした灌漑水田地帯で、ラチャブuriの土壌は母材を淡水性の堆積物に由来し、パトゥムタニ土壌は汽水堆積物を母材とした酸性硫酸塩土壌である。一方、スリンは天水田を主体とする肥沃度の低い東北タイの典型的な砂質土壌である。これらの土壌はタイ国の典型的な水田土壌型であり、タイ国内に広く分布する (Suwanwong et al. 1983)。各土壌の理化学的性質を表5-1-1に示す (Motomura et al. 1979)。

各県の水田圃場に、無肥料区 (NF-plot)、化学肥料区 (CF-plot)、有機物施用区 (OM-plot) の3つの処理区を準備した。化学肥料、有機質肥料の種類および量は表5-1-2に示すように各試験場で異なっていた。処理区当りの水田面積は約300m<sup>2</sup>であった。

インディカ種の水稲を1992年8月から11月にかけて栽培した。あらかじめ湛水した圃場に播種後28日目の幼苗を移植した。圃場は作付期間を通して湛水状態を維持した。各圃場における水稲の栽培品種、栽培日程（湛水日、移植日、追肥日、収穫日等）を表5-1-3に示す。

## 2. メタン発生量の測定

各圃場からのメタン発生量はほぼ全栽培期間中にわたり1週間毎に測定した。4株の水稲をアクリル製のチャンバー（ラチャブuri、パトゥムタニでは40x40x120cm、スリンでは50x50x150cm）で覆った。実験前に圃場にチャンバーを乗せるための杭を打ち、測定時のチャンバー設置の際に予想される土壌攪乱を防止した。2Lのテドラーバッグをチャンバー側部につけチャンバー内の空気と大気圧との平衡を保った。ガラス管を通したゴム栓をチャンバー上部に取り付け、ガラス管にはガスクロのインジェクター部分のセプタムをはめ込んだ。両面針をセプタムに通し、すばやく反対側の針先をあらかじめダブルキャップをして手動型真空ポンプで脱気した10ml血清管に差し込んでチャンバー内の空気を血清管に採取した。気体の採取は20-30分間隔で3回行なった。

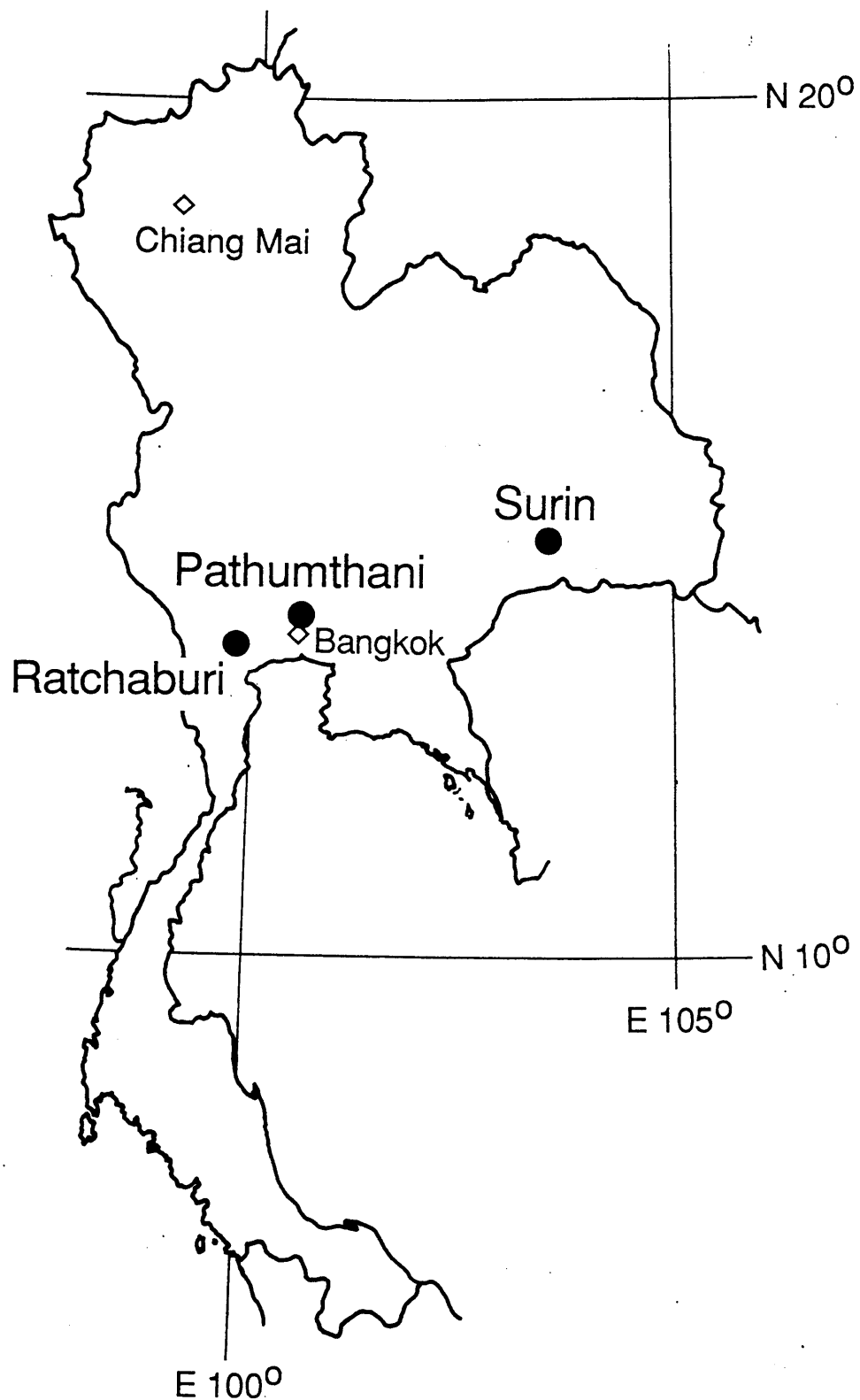


Fig. 5-1-1 Location of experimental sites.

Table 5-1-1 Physicochemical properties of soils.

	Ratchaburi	Pathumthani	Surin
pH(H <sub>2</sub> O)	7.1	4.0	4.7
pH(KCl)	5.6	3.4	3.3
Total-C (%)	1.02	2.35	0.10
Total -N (%)	0.07	0.18	0.02
CEC (cmol(+)kg <sup>-1</sup> )	23.9	28.0	2.2
Free Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (%)	1.08	1.83	0.11
Easily reducible MnO <sub>2</sub> (ppm)	387	91	29
Soil texture	SiC	HC	LFS

Motomura et al. (1979)

Table 5-1-2 Chemical fertilizer and organic material applied into the field.

	Ratchaburi	Pathumthani	Surin
Chemical fertilizer			
Basal <sup>a</sup>	30:38:0	18:8:20	30:30:15
Top dressing <sup>a</sup>	20: 0: 0	17: 0: 0	14: 0: 0
Organic material <sup>b</sup>	<i>Sesbania rostrata</i> <sup>c</sup>	Rice straw	Rice straw compost
	30,000 kg ha <sup>-1</sup>	2,000 kg ha <sup>-1</sup>	3,100 kg ha <sup>-1</sup>

<sup>a</sup>N:P:K (kg ha<sup>-1</sup>). <sup>b</sup>In Ratchaburi and Pathumthani, the chemical fertilizers were applied to the plots with application of organic material at the same rates as those to the plots with chemical fertilizer application.

<sup>c</sup>Grown in the same field and incorporated into soil before submergence.

Table 5-1-3 Rice varieties and cultivation calendar.

	Ratchaburi	Pathumthani	Surin
Rice variety	SPR90	SPR90	KDML105
Spacing of hills	20x20 cm	25x25 cm	25x25 cm
Flooding	Aug. 3	July 22	Aug. 3
Plowing	Aug. 4	July 24	Aug. 4
OM application	Aug. 13	July 29	Aug. 13
Transplanting	Aug. 14	Aug. 5	Aug. 5
Top dressing	Sept. 23	Sept. 15	Sept. 24
Heading	Oct. 20	Oct. 20	Oct. 20
Harvest	Nov. 26	Nov. 18	Nov. 24

Table 5-1-4 Yield of unhulled rice in each plot (kg ha<sup>-1</sup>).

	Ratchaburi	Pathumthani	Surin
NF-plot	2,700	2,300	1,900
CF-plot	4,500	3,500	2,800
OM-plot	3,900	3,100	2,700

採取した気体試料はバンコクにあるカセサート大学まで持ち帰り、FID付ガスクロマトグラフ（島津 GC-14APF）にてメタン濃度を測定した。測定条件は国内での実験に準じた。既知濃度のメタンを含むチューブで検討し、輸送中の血放管からの気体漏れがないことを確認した。時間の経過にともなうメタン濃度の増加とチャンバーの体積からメタン発生速度を計算した。

## < 結果 >

### 1. 各圃場における収量

3つの圃場の収量を表5-1-4に示す。収量は試験場別ではラチャブリ>パトゥムタニ>スリンの順に高く、施肥の種類では化学肥料>有機質肥料>無肥料の順であった。

### 2. 各水田圃場からのメタン発生

#### a. ラチャブリ

図5-1-2aにラチャブリ水田圃場からのメタン発生速度を示す。無肥料区でも1回目の測定からメタン発生が観察されたが、その量は作付期間中を通じて非常に低かった（ $<4\text{mgC}/\text{m}^2/\text{h}$ ）。化学肥料区からは、無肥料区の1.5-2.5倍のメタンフラックスが観察された。両区ともメタンフラックスのピークは認められなかった。この結果は、栽培後期に明確なピークを示す多くの温帯水田のメタンのフラックスパターン（Cicerone and Shetter 1981, Cicerone et al. 1989, Seiler et al. 1984, Holzapfel-Pschorn et al. 1986, Schutz et al. 1989, Khalil et al. 1990, Sass et al. 1990, Yagi and Minami 1990）とは大きく異なっていた。有機物施用区では、メタン発生速度が非常に高く、生育期間前期は $38\text{--}52\text{mgC}/\text{m}^2/\text{h}$ 、後期は約 $22\text{mgC}/\text{m}^2/\text{h}$  で一定していた。

#### b. パトゥムタニ

図5-1-2bにパトゥムタニ水田圃場のメタン発生量の季節変化を示す。無肥料区および化学肥料区のメタンフラックスは、9月2日の無肥料区（ $5\text{mgC}/\text{m}^2/\text{h}$ ）



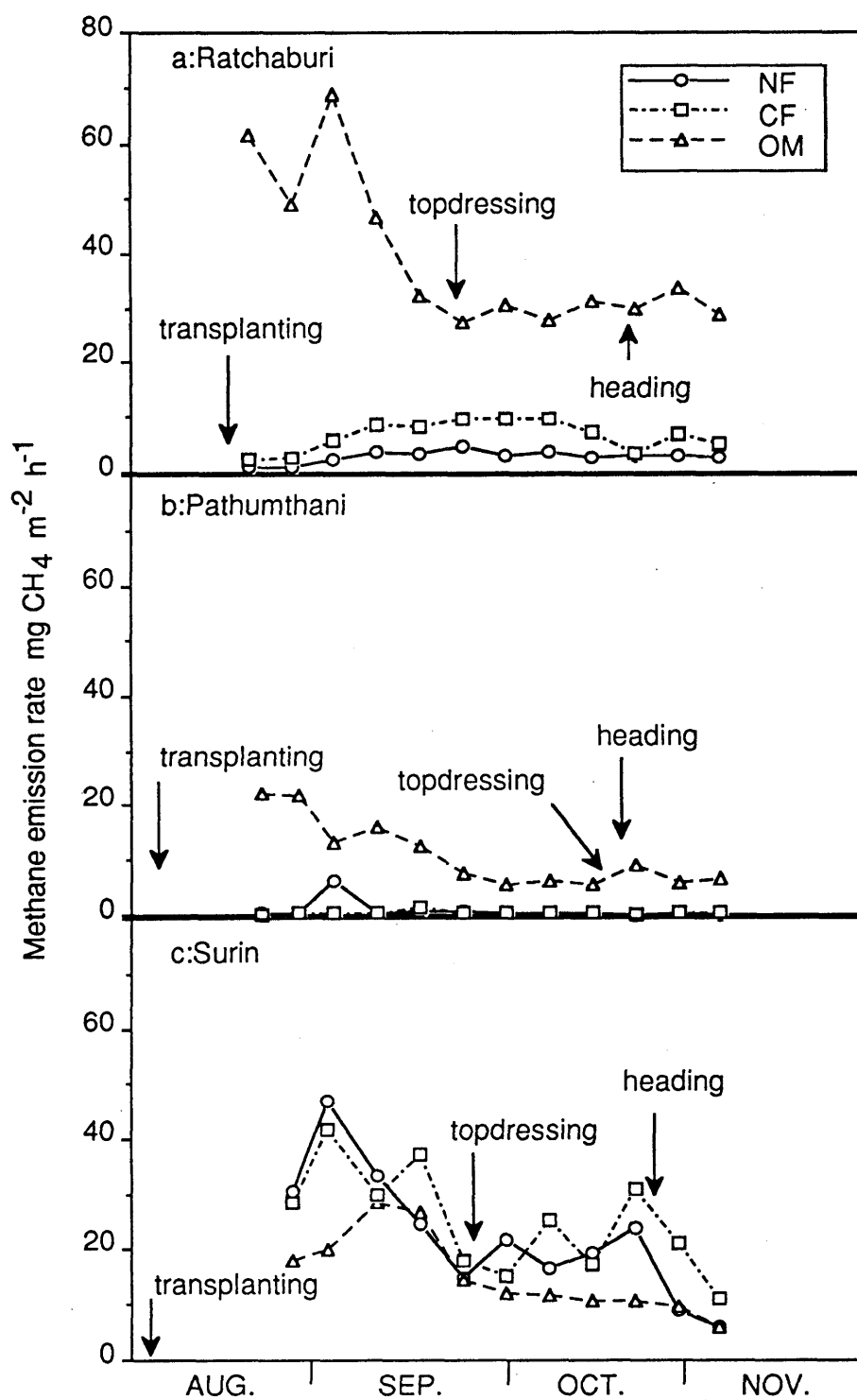


Fig. 5-1-2 The methane emission rate from paddy fields in Thailand.

NF, no fertilizer;  
 CF, chemical fertilizer;  
 OM, organic material fertilizer

以外作付期間中非常に低い値を維持 ( $<0.5\text{mgC}/\text{m}^2/\text{h}$ ) した。有機物施用区では最初の測定 (8月21日) に最大発生速度を記録し、その後分げつ期まで徐々に減少し、9月下旬以降  $4-6\text{mgC}/\text{m}^2/\text{h}$  で一定していた。

### c. スリン

図5-1-2cにスリン水田圃場の結果を示す。有機物施用区のメタン発生速度の方が化学肥料区・無肥料区に比べ低かった。メタン発生速度のピークは他の2カ所の水田と同様生育期間前期に見られ、それ以降は小さな増減を繰り返しながら、全体的には減少傾向を示した。

## 3. 作付期間中の各圃場からのメタン発生

図5-1-3に各圃場における作付期間中の平均メタン発生速度を示す。無肥料区、化学肥料区ではスリン>ラチャブリ>パトゥムタニの順に高かった。化学肥料の施用によって、ラチャブリ、スリンで無肥料区に比べて1.1-2.3倍メタン発生速度が増加したが、国内の結果 (Kimura et al. 1991c) に比べるとその影響は小さかった。また、パトゥムタニでは化学肥料施用にともなうメタン発生速度の増加は認められなかった。

ラチャブリでは、緑肥 (*Sesbania rostrata*) の施用により無肥料区の13倍と飛躍的にメタン発生速度が増加した。有機質肥料の導入によるメタン発生速度の増加はパトゥムタニにおいても観察された。一方、スリンでは稲わら堆肥の添加によりメタン発生速度がむしろ減少した。

作付期間中のメタン発生量を表5-1-5に示す。メタン発生量を計算するにあたっては、測定を行なわなかった水稻移植後から最初の測定日まで (ラチャブリでは0日、パトゥムタニ・スリンでは約2週間) と最後の測定から収穫まで (3圃場とも1週間) は考慮にいれなかった。ラチャブリでは  $4-59\text{mgC}/\text{m}^2$ 、パトゥムタニでは  $0.6-17\text{mgC}/\text{m}^2$ 、スリンでは  $21-35\text{mgC}/\text{m}^2$  とそれぞれ計算された。

## < 考察 >

### 1. 各水田からのメタン発生速度

過去10年以上にわたり水田からのメタン発生に関して多くの研究がなされ、温帯に分布する水田からのメタン発生速度が報告されている (Cicerone and Shetter 1981, Seiler et al. 1984, Holzapfel-Pschorn et al. 1986, Khalil et al. 1990, Sass et al. 1990, Yagi and Minami 1990)。そこで、タイ国3カ所の水田からの平均メタン発生速度を既報の温帯各地のメタン発生速度と比較した。それらの値をまとめた結果が図5-1-3であり、温帯各地からの平均メタン発生速度の最大値から最小値までの範囲で示す。無肥料区、化学肥料区では、酸性硫酸塩土壌であるパトゥムタニからのメタン発生速度は非常に低く、一方スリンは、温帯水田からの報告よりもはるかに高い値であった。

パトゥムタニの土壌は酸性硫酸塩土壌で、低pHと硫酸還元菌競合のためにメタン生成活性が低かったと推察された。スリン土壌は風化が進み、土壌中の遊離鉄含量が非常に低いため、土壌の還元化が容易に起こり、酸化還元電位がメタン生成の段階まで速やかに低下するためにメタン発生量が高くなったと推察された。有機物施用の影響は各圃場で異なっていたが、施用した有機物の種類と施用方法によってメタン発生に及ぼす影響は異なると考えらる。ラチャブリでは作付前まで試験圃場で栽培した *Sesbania rostrata* を湛水直前にそのまま土壌に鋤き込んだため、土壌中の易分解性有機物の量が著しく増加し、多量のメタンが生成したと考えられた。スリンでは、稲わら堆肥を湛水後、土壌の表面に散布しておりメタンの生成への関与は低いと想像されたが、化学肥料区に比べてメタン発生量が低い原因は不明であった。

### 2. 栽培期間中のメタン発生の分配

栽培期間を栽培前期と後期に2分し、両時期のメタン発生量を総発生量を100とした百分率で表した (図5-1-4)。第1章2節のポット実験とKimura et al. (1991c)の結果を比較のために同図に示した。国内での結果は化学肥料区、堆肥施用区 (OM1) でメタンの発生時期が後期に集中しており、有機物施用区で

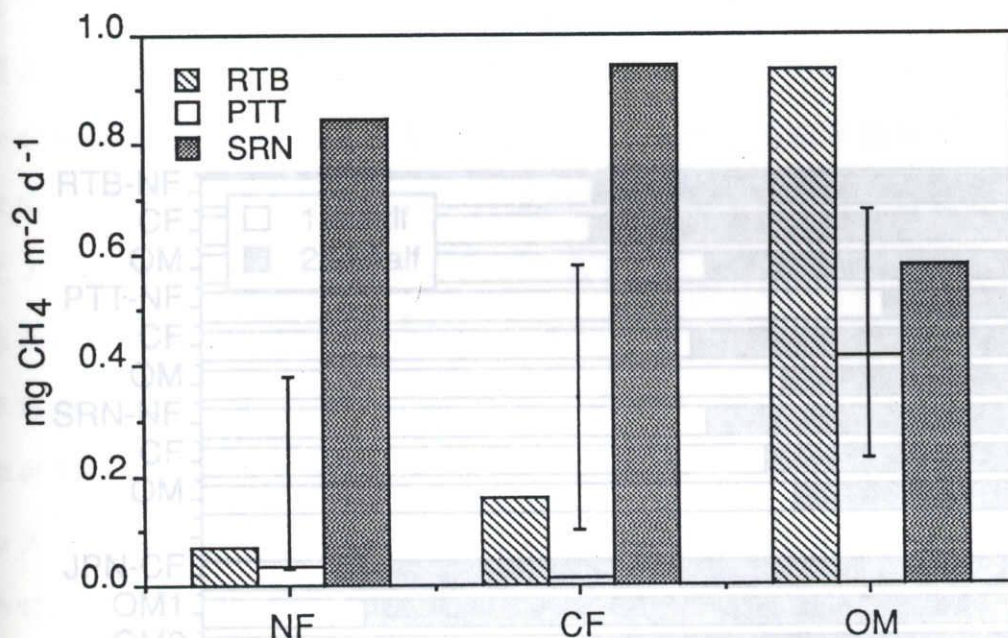


Fig. 5-1-3 Seasonal average rate of methane emission from Thai paddy fields.

RTB, Rachaburi;  
PTT, Pathumuthani;  
SRN, Surin

NF, no fertilizer;  
CF, chemical fertilizer;  
OM, organic material fertilizer

The bars are the range of methane emission rates in temperate regions.

は前期と後期ほぼ同量であった。一方、タイ国の水田ではラチャブリの無肥料区で前期と後期とはほぼ同量であった他は、メタンは主に前期に発生するという温帯水田とは異なる傾向を呈した。

この結果は、温帯水田と熱帯水田を比較した際に、タイ国で用いられた有機物の分解が温帯水田からのメタン発生よりも速く、また、熱帯地域より高湿な環境がメタン発生を促進している。また、ラチャブリンの無肥料区水田でも前期から高いメタン発生速度が観察された。この原因は明らかでない。

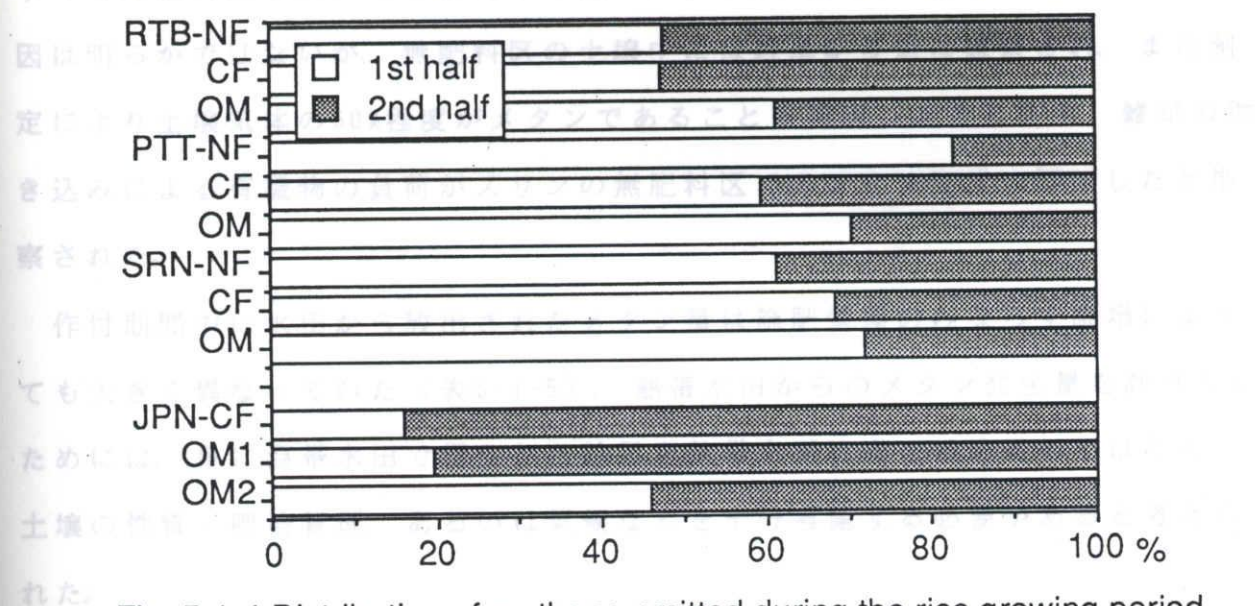


Fig. 5-1-4 Distribution of methane emitted during the rice growing period.

RTB, Ratchaburi  
PTT, Pathumthani  
SRN, Surin  
JPN, Japan  
NF, No fertilizer plot  
CF, Chemical fertilizer plot  
OM, Organic material plot  
OM1, Manure plot  
OM2, Rice straw plot

#### <要約>

タイ国の典型的水田の異なる肥料区の水田圃場から発生するメタンを一作期間中、1週間毎に測定・記録した。酸性硫酸塩土壌の水田からのメタン放出速度は高かった。無肥料区・化学肥料区では、温帯各地の水田からのメタン発生速度と異ならなかった。一方、東北シイの成層積質ブライ土壌の水田では高湿に比べてはるかに高いメタン放出速度を観測した。洪水性沖積土壌の水田は温帯で観察されたメタン発生速度の平均以下であった。

有機質肥料区からのメタン発生は、施用された有機質肥料の質・量によって傾向は異なっていたが、温帯で観測された範囲内の値がそれを上回っていた。

タイ国の水田からのメタン発生のパターンは温帯とは異なっており、温帯で

は前期と後期ほぼ同量であった。一方、タイ国の水田ではラチャブリの無肥料区で前期と後期とほぼ同量であった他は、メタンは主に前期に発生するという温帯水田とは対照的な結果を得た。

この結果は、温帯地域とは異なり、熱帯地域のタイ国では土壌中あるいは施用された有機物の分解が湛水初期から活発に進行するため、メタン生成が温帯地域よりも早く起こることに原因があると推察した。土壌有機物含量が低いスリンの無肥料区水田からも初期から高いメタン発生速度が観察された。この原因は明らかではないが、無肥料区の土壌中には雑草が多量に観察され、また測定により土壌気体の50%程度がメタンであることが判明したことから、雑草の鋤き込みによる有機物の負荷がスリンの無肥料区でのメタン生成に関与したと推察された。

作付期間中に水田から放出されたメタン量は施肥管理のみならず圃場によっても大きく異なっていた（表5-1-5）。熱帯水田からのメタン発生量を評価するためには、単に温帯水田で得られた結果を熱帯水田に当てはめるのではなく、土壌の性質・肥培管理、あるいは気候などを十分考慮する必要があると考えられた。

#### <要約>

タイ国の典型的な3カ所の異なる施肥管理（無肥料、化学肥料、有機質肥料）の水田圃場から発生するメタンを一作期間中、1週間毎にチャンバー法で測定した。酸性硫酸塩土壌の水田からのメタン放出速度は非常に低く、無肥料区・化学肥料区では、温帯各地の水田からのメタン発生速度と比較しても著しく低かった。一方、東北タイの低腐植質グライ土壌の水田では温帯に比べてはるかに高いメタン放出速度を観測した。淡水性沖積土壌の水田は温帯で観測されたメタン発生速度の平均以下であった。

有機質肥料区からのメタン発生は、施用された有機質肥料の質・量によって傾向は異なっていたが、温帯で観測された範囲内の値かそれを上回っていた。

タイ国の水田からのメタン発生のパターンは温帯とは異なっており、温帯で

Table 5-1-5 Total amount of methane emitted from the field (g C m<sup>-2</sup>)

	Ratchaburi <sup>a</sup>	Pathumthani <sup>b</sup>	Surin <sup>c</sup>
No fertilizer plot	4.4	1.3	31.2
Chemical fertilizer plot	10.1	0.6	34.9
Organic material plot	58.9	16.7	21.4

<sup>a</sup>Aug. 19-Nov. 4. <sup>b</sup>Aug. 21-Nov. 4. <sup>c</sup>Aug. 17-Nov. 4.

は水稻生育後期にメタンの放出が活発化するのに対し、タイ国の水田では生育前期から活発なメタン放出が観察された。

作付期間中のメタン発生量は淡水性沖積土壌、酸性硫酸塩土壌、低腐植質性グライ土土壌の水田でそれぞれ、4-59、0.6-17、21-35gC/m<sup>2</sup>であった。



## 第6章 総合考察

本論文では、水田土壌の嫌気環境としての独自の特徴に注目し、メタン生成とその後の動態に関する化学的・微生物学的研究を行なった。すなわち、第2章では、田面水の浸透と水稻の存在が水田土壌で生成したメタンの大気および心土への移行に及ぼす影響を検討した。また、土壌中に保持されたメタンの落水時の動態を検討した。第3章では、水田土壌の構造的に着目し、作土層から溶脱したメタンが心土において無酸素条件で酸化分解されることを明らかにした。ついで作土においてもメタンが嫌氣的に酸化されることを明らかにした。この嫌氣的メタン酸化の機構の解明を試み、硫酸還元がメタン酸化に関与しているという結果を得た。第4章では、水稻の存在、浸透がメタン生成菌・酸化菌の生態に及ぼす影響を検討した。また、メタン生成菌と共生関係にあると考えられる微生物に関する研究を行ない、原生動物の重要性が指摘された。また第5章では、これまでほとんど研究例がなかった東南アジア（タイ国）の熱帯水田からのメタン発生速度を測定した。

本章では、本研究で得られた結果と既存の知見とを合わせ、メタン発生源あるいはメタン生成環境としての水田を総合的に考察する。

### 6-1 水田作土で生成したメタンの動態

水田土壌作土層で生成するメタン量を100と仮定して、水田生態系におけるメタンの動態を図6-1-1に示す。

土壌中で生成したメタンの内、5-40%程度が主に水稻体を経由し大気へと放出されると報告されている（de Bont et al. 1978, Holzapfel-Pschorn et al. 1985, 1986, Sass et al. 1990）。これまで、放出されないメタンは水稻根圏あるいは酸化層で好氣的に酸化分解されと考えられてきた。しかしながら本研究の結果より、作土中で生成したメタンは好氣的酸化分解の他に次の3つの運命を辿ることが明らかとなった。

1. 心土へと移行し、そこで嫌気分解を受ける。

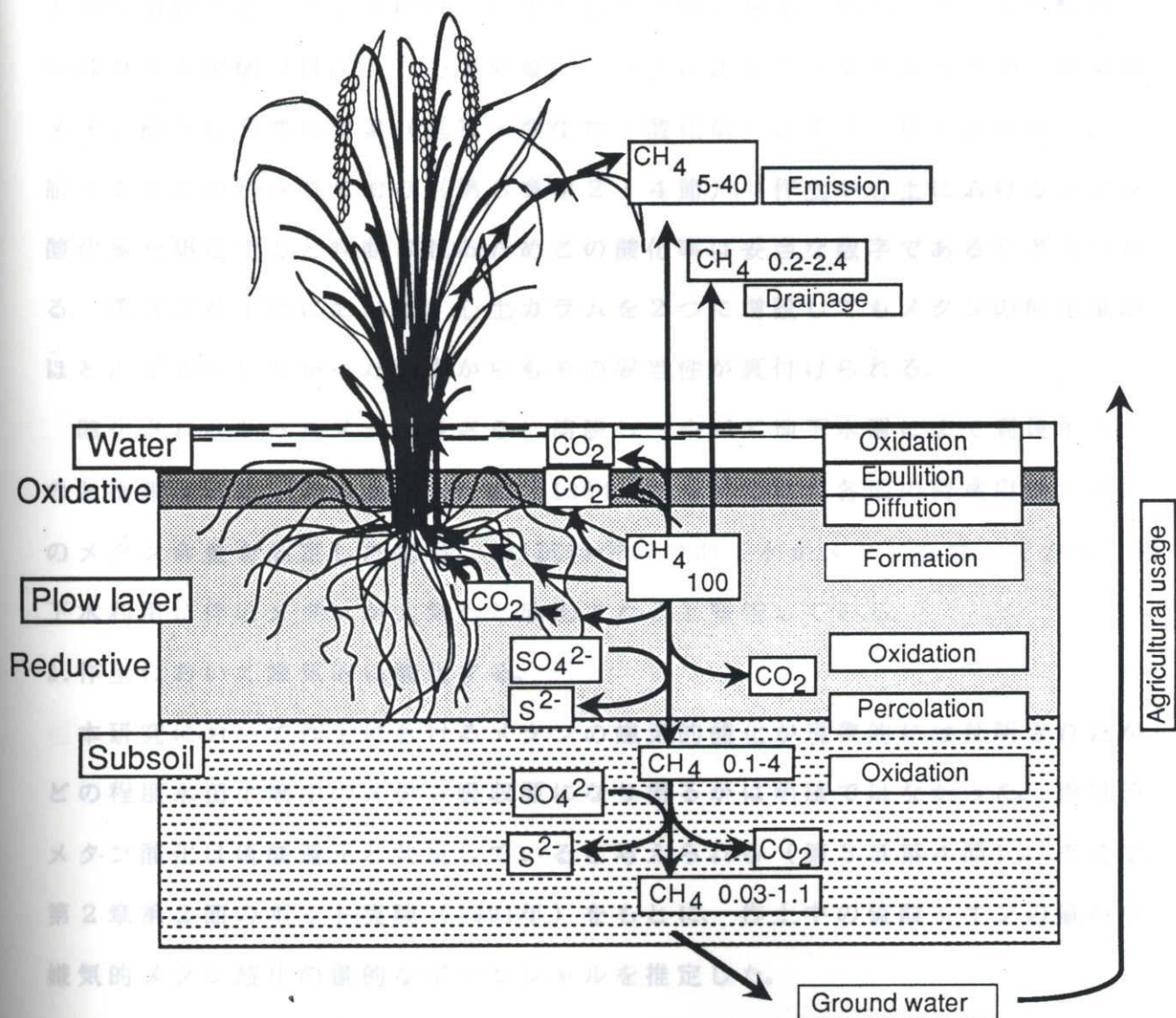


Fig. 6-1-1 Fate of methane produced in paddy soil.

田面水の浸透により下方へと溶脱したメタン量は、減水深によっても異なるが、大気へ放出されたメタンの約2-10%、生成量の0.1-4%に相当した（第2章第2節）。また、心土におけるメタンの嫌氣的酸化量は、一作期間中に作土から溶脱するメタンの約70%に相当した（第3章第5節）。ポット実験あるいはカラム実験で供試した心土の量は、作土に比して少量であったが、嫌氣的メタン酸化に必要な要素（基質・微生物・酸化剤）はすべて作土から溶（流）脱することが示されており（第3章第2・4節）、作土が心土におけるメタン酸化量を規定すると判断されるためこの酸化率は妥当な数字であると考えられる。第3章第1節において、心土カラムを2つに増設してもメタンの酸化量がほとんど変化しなかった事実からもその妥当性が裏付けられる。

酸化されなかったメタンはさらに溶脱し、やがて地下水層にまで到達するものと推測される。Watanabe et al. (1994a)は、愛知県内各地の農業用地下水中のメタン含量を測定した結果、131試料中69の地下水がメタンを含んでおり、地下水利用に伴いメタンが大気へと放出されると報告している。

## 2. 作土において嫌氣的に酸化する。

本研究において作土におけるメタンの嫌氣的酸化が現象的には証明されたが、どの程度水田土壌中のメタン吸収源になり得るかは明確ではなかった。嫌氣的メタン酸化は硫酸還元と共役していると考えられる（第3章第4節）。そこで、第2章第2節のポット実験（1991年）をもとに、作土中の硫酸イオンの量から嫌氣的メタン酸化の量的なポテンシャルを推定した。

安城土壌の硫酸イオン含量は、ポット（土壌3kg）当たり290mg=3.0mmolである。そして本実験では、窒素肥料として硫酸アンモニウムを基肥で1.5g/ポット、追肥で1.0x2g/ポット添加した。この窒素肥料に含まれる硫酸イオンの合計量は16.4mmol  $((1.5+1 \times 2)/132 \times 1000)$ であった。これらの硫酸イオンがすべて同当量のメタンの酸化に利用されたと仮定すると、ポット当たりの嫌氣的メタン酸化量は232.8mgC  $((3.0+16.4) \times 12)$ と計算された。この値は水稻生育期間中に化学肥料区のポットから放出したメタンの約9%に相当した。

一方、本研究で土壌中に負荷された硫酸イオンの大半が浸透にともない溶脱

することが示された（第3章第4節）。また、土壤中で起こる硫酸還元がすべてメタン酸化と共役しているとは考え難い。従って、実際の嫌氣的メタン酸化量は当然この推定値を下回ると考えられ、メタンの吸収源としての意義は好氣的メタン酸化と比較して大きくはないと推測された。

本実験では元来土壤中に存在する硫酸イオンの量は施用された肥料に含まれるその5分の1以下であった。また、塩化アンモニウム、尿素など硫酸イオンを含まない窒素肥料も広く水田に施用されており、嫌氣的メタン酸化の程度は土壤中の硫酸イオン含量や肥培管理の違いにより大きく異なっていると予想された。

3. 土壤にそのまま残留し落水時に大気へと放出される。

水稻生育後期の土壤には放出されないメタンが集積しており、落水にともなう大気へと放出されることが明らかとなった（第2章第3節）。落水時に放出されたメタンは土壤中で生成したメタンの0.2–2.4%と推定された（図6-1-1）。

本研究において、落水の際土壤の酸化に伴いメタンが好氣的に分解されるか否かは明確ではなかった。Watanabe et al. (1994b) は、翌年同様な実験を行い、水稻生育期間中に土壤に集積したメタンは落水時にその大半が大気へ放出されることを明らかにした。

## 6-2 嫌氣的メタン酸化と水田土壤の還元過程

硫酸還元との共役による嫌氣的メタン酸化は、メタン吸収源としての量的な意義はそれほど大きくなかったが、水田土壤の還元過程に新たな概念を提起したという点で非常に重要な知見であると考えられる。

水田土壤の還元過程の進行に関しては、現在次のような認識がある（川口 1978、高井 1980）。

- ・湛水後、土壤の酸化還元電位は低下する。
- ・還元過程に関与する微生物代謝は、湛水後、最もエネルギー効率のよい酸素呼吸、硝酸呼吸からマンガン還元、鉄還元、硫酸還元、そしてメタン発酵とエ

エネルギー効率の低いものへと逐次的に進行する。

・現実の土壌は解放系であり、構造的を持つので、物質および生物の分布が不均一であり、土壌中の物質変化は空間的に不均一に進行する。

このことは、土壌全体として一つの酸化還元系が終わらないうちに他の酸化還元系が進行し、いくつかの反応が空間的に異なる場で同時に進行することを示唆している。しかしながら、同時に進行している異なった酸化還元系が相互に影響を及ぼすという考え方は、これまでわずかな例外（吉田・加村 1975、吉田 1975）を除いて存在しなかった。本研究の結果は、還元的な部位で生成した還元物質（メタン）が相対的により酸化的な環境（硫酸還元系）で再び酸化される可能性を示唆していると考えられる。

そこで、いくつかの還元物質（ $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{S}$ 、 $\text{S}^{2-}$ ）とその物質が生成する酸化還元電位よりも高い電位で起こる反応系（硝酸還元、マンガン還元、鉄還元）との相互作用を検討した（村瀬・木村 1994）。その結果、マンガンの還元と共役した $\text{Fe}^{2+}$ の酸化、マンガン・鉄の還元と共役した $\text{S}^{2-}$ の酸化、そして硝酸還元と共役した $\text{S}$ の酸化が、化学的・微生物学的にそれぞれ進行することが明らかとなった。以上の実験事実から、水田土壌における還元過程について再考した（図6-2-1）。

湛水土壌中の物質代謝は酸化還元電位の低下にともないエネルギー効率の高い反応から低い反応へと逐次的に進行する。そして、土壌の不均一性から、易分解性有機物に富み土壌の還元が早く進行する場（Site A）と、逆に易分解性有機物に乏しく比較的遅く還元が進行する場（Site B）が同時に存在すると考えられる。その場合、Site Aで生成した還元物質が、Site Bにおけるより酸化還元電位（ $E_h$ ）の高い反応と共役して再酸化されると推察される。このような相互反応は、Site Aでは $E_h$ の低下を抑制し、一方Site Bでは $E_h$ の低下を促進する働きがあると考えられ、これにより両者の酸化還元電位は近づくと推察される。

これらの反応が現実の土壌でどの程度意義を持つかは現在明らかではない。吉田・加村（1975）、吉田（1975）は、土壌中で生成した二価鉄は直ちにマン

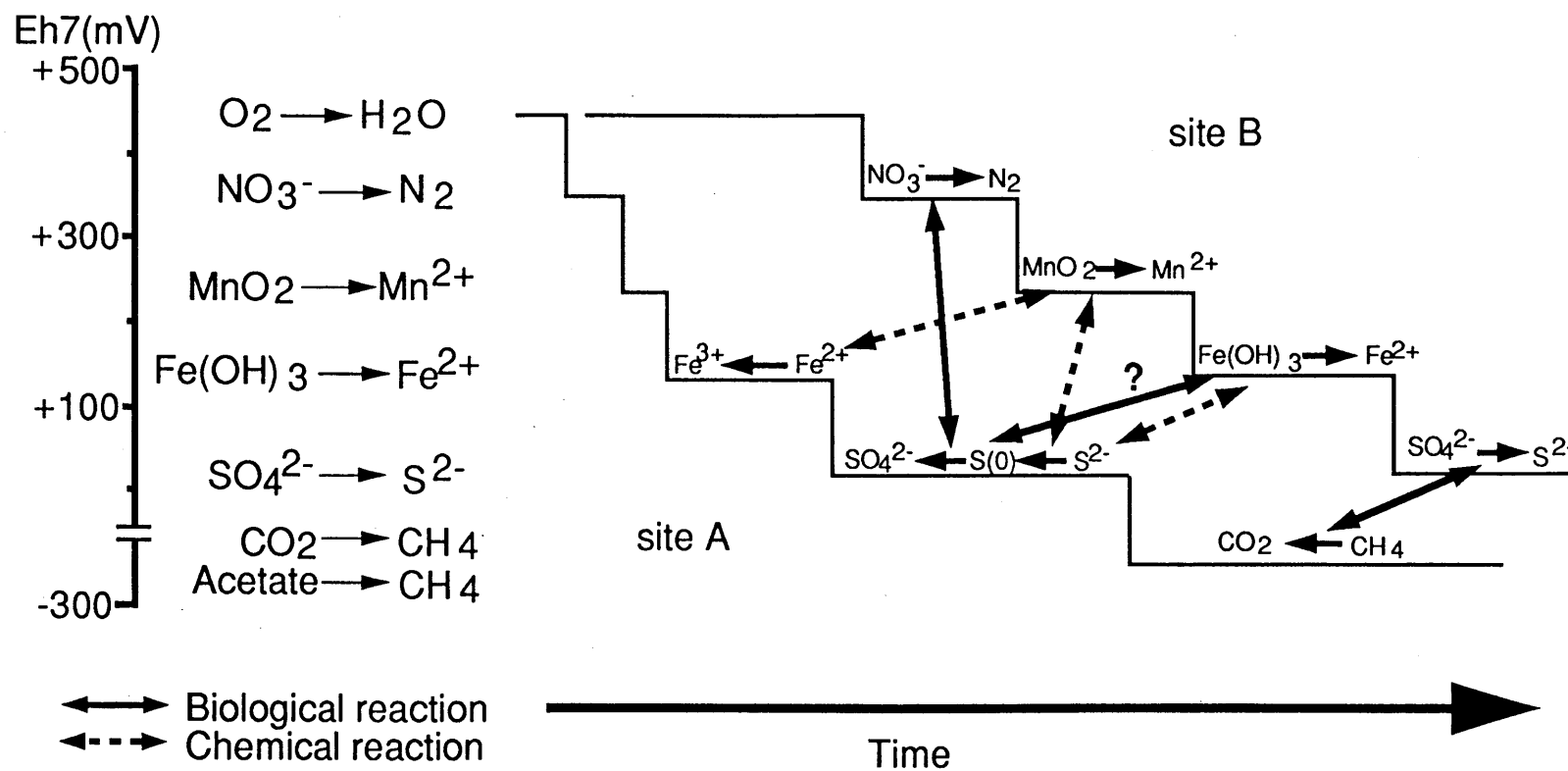


Fig. 6-2-1 Reduction process in paddy soil.

ガン還元を利用されるため、二価鉄の生成はマンガンの還元が終了するまで見かけ上起こらないと報告している。また、嫌氣的メタン酸化は、土壌の硫酸イオン含量を考慮すると重要ではないと先述したが、生成した $S^{2-}$ が鉄あるいはマンガンの還元とともに再酸化されれば、見かけ上硫酸化物量は増加し、嫌氣的メタン酸化量はさらに増加する可能性が考えられる。

### 6-3 メタン生成菌・酸化菌の住場所

水稻根圏が、水田土壌でのメタン生成および酸化に重大な影響を及ぼしていることが、水田からのメタン発生に関する研究から指摘されてきた (Kimura et al. 1991a, Holzapel-Pschorn et al. 1985, 1986, Sass et al. 1990, 1991)。しかしながら、メタン生成菌あるいは酸化菌の生態に関して根圏環境を考慮にいたした研究はこれまで非常に少数であった (de Bont et al. 1978)。本研究では、メタン生成環境としての水田の重要な特徴の一つである水稻の存在が、メタン生成菌および酸化菌の挙動に及ぼす影響を検討した (第4章第1節)。その結果、メタン生成菌・酸化菌いずれにとっても水稻根圏が非根圏 (還元層) に比して好適な環境であることが明らかになった。本結果は、水稻根圏がメタン生成あるいは酸化の場であることを示唆する、水田からのメタン発生に関する既報の研究や本研究の結果と一致する。

絶対好気性菌であるメタン酸化菌と偏性嫌気性菌であるメタン生成菌が同じ水稻根圏を生育の場としていることの矛盾は、両菌の根圏における住み分けにより説明され则认为られる。メタン生成菌は、メタン生成が進行する酸化還元電位 (Eh) まで低下した根圏部位に生育するものと推測される。一方、メタン酸化菌は先述したように酸素要求性が高いため、酸化的な根圏環境を住み場所とし、近傍のEhが低い根圏から拡散してきたメタンを利用しているものと考えられる。根圏土壌中の両菌数の測定値に関して2連間の相違が認められたこと、メタン生成菌が同一根でも部位によって存在密度が大きく異なっていたことが本仮説を支持する結果であると推察される。本研究では根圏土壌採取の際に水稻根の種類に特別な配慮をしなかったが、この仮説を立証するためには、

個々の水稻根の生理状態を考慮した詳細な根圏土壌の採取が必要であろう。

#### 6-4 メタン生成菌の生育環境としての原生動物

水田土壌におけるメタン生成活性は、原生動物（真核生物）の生育を阻害することで30-40%低下することが明らかとなり、メタン生成に対する原生動物の重要性が指摘された（第4章第5節）。そこで本節では、メタン生成菌が原生動物体内に生育する意義に関する若干の考察を試みる。

メタン生成菌は、原生動物体内に存在することで次の3つの恩恵を受けていると推察される。

第1に、原生動物が基質の供給者としての役割を果たしていることが考えられる。メタン生成菌は原生動物の代謝産物である水素等を基質として利用する。一方、原生動物もメタン生成菌による消費によって代謝産物の濃度が低く抑えられているために代謝産物による生育阻害を受けないという点で利益を得ており、両者は栄養共生の関係にあるといえる（Stumm and Vogels 1989）。原生動物の生育を阻害するとメタン生成活性は低下するが、メタン生成の基質（酢酸）を添加するとメタン生成活性が上昇に転じたことから原生動物がメタン生成の基質を供給していたと推察される。

第2に、分子状酸素からの回避が考えられる。先述したように原生動物中のメタン生成菌は環境中に単独で存在するよりも酸素に対する感受性が低い（Hillman et al. 1988, Finlay and Fenchel 1991）。本研究においても、土壌の風乾処理や粉碎後の大気への長期暴露によってその後の嫌気培養に伴うメタン生成活性は全く影響されないことが明らかとなった（第4章第4節）。従って、水田土壌の原生動物中に生育すると考えられるメタン生成菌も大気中の酸素に対し耐性を有していると推察された。

第3に、メタン生成菌が土壌中を移動する手段の一つであると考えられる。第4章第3節で、稲わら添加土壌を殺菌しても、稲わら無添加の非殺菌土壌から流脱したメタン生成菌を含む微生物群が稲わらを分解しメタンを生成することが明らかとなり、メタン生成菌は土壌中を移動可能であることが示された。



原生動物と共生関係にないメタン生成菌は、第4章第4節の結果から大気中の酸素に影響されない土壌構造内の深部に存在すると推測される。水田土壌に存在すると考えられるメタン生成菌はすべて運動性を持たない (Konig and Stetter 1989) ことから構造内深部に存在するメタン生成菌は容易に構造内から流脱されないと推察される。一方、原生動物は土壌水中を自由に移動することが可能である。また、水稻の刈株は原生動物が多数観察される環境であり (重中 1988)、水稻根圏にも原生動物が多数存在することが観察されている (村瀬 1989)。従って、原生動物体内のメタン生成菌は土壌環境中の分子状酸素の影響を受けることなくメタン生成の基質となる新鮮有機物 (稲わら・水稻根圏) に接近することが可能であり、他の生態を営むメタン生成菌と比較して非常に有利であると考えられる。

還元が進行した土壌から採取した透水液中にメタン生成菌を体内に有する原生動物が観察された (第4章第5節)。写真からの推定は正確を欠いているものの、原生動物1個体当たり少なくとも $10^2$ レベル以上のメタン生成菌が存在していると判断された。また、van Bruggen et al. (1983, 1985) は、腐生性の堆積物中から採取された原生動物体内には1個体当たり $10^{3-4}$ レベルのメタン生成菌が存在していると報告している。ところで、第4章第1節で測定された透水液中のメタン生成菌 (メチル基資化成菌) は、1 ml 当たり $10^{0-1}$ レベルであった。この透水液に観察されたような原生動物が、1 ml 当たり1個体存在したと仮定すると、最確値法ではメタン生成菌は1個体としか計測できないが、実際には、その数百から数千、数万倍のメタン生成菌が存在することになる。従って、原生動物体内のメタン生成菌は、最確値法による数的な評価は不可能であると考えられる。

本研究では、原生動物中に共生するメタン生成菌が、土壌環境全体のメタン生成菌に対しどの程度数的意義を持つかは明らかにはされなかった。しかしながら基質の供給者、酸素からの保護者、さらに安全かつ大規模な移動手段として、原生動物はメタン生成菌にとって重要な役割を果たしていると考えられた。

## 6-5 メタン生成環境としての水田

水田は、先述した通り、田面水の浸透・水稻の存在・構造的・非連続的還元といった点で他のメタン生成環境と異なる特徴を有していると考えられる。これら水田の特性がメタン生成に及ぼす影響を表6-4-1に要約した。

田面水の浸透は、土壌中でのメタン生成およびメタン放出を促進あるいは抑制する作用を有する。また、土壌中で生成したメタンを心土へと溶脱する。さらに、メタン生成菌・嫌氣的メタン酸化菌（硫酸還元菌）の移動に關与する。

水稻体は、水田土壌から大氣への主たるメタン放出経路であり、水稻体の生理が大氣へのメタン放出を制御すると同時に、結果として心土へのメタンの溶脱にも影響を与えている。また、水稻根圏がメタン生成および好氣的メタン酸化の場となる。さらに、根圏は非根圏と比較して硫酸還元菌数が高いことが明らかとなり、本研究では検討しなかったが、水稻根圏で嫌氣的メタン酸化が進行する可能性も考えられる。

心土は、作土から溶脱した諸物質が化学的・生物的变化を受ける場であり、メタンも一部嫌氣的に酸化される。

落水によって土壌は酸化的環境となりメタン生成活性は低下するが、それまでに集積したメタンが大氣へと放出される。一方、メタン生成菌は土壌の酸化によっても殆ど阻害を受けないと考えられた。

以上のように、水田はメタン発生源として他のメタン生成環境に比して極めてダイナミックな環境と言えるであろう。

## 6-6 熱帯水田からのメタン発生

タイ国の水田におけるメタンフラックスのパターンが温帯と異なっており、水稻生育前期にメタン発生速度が高くなることが観察された（第5章）。インドネシアの水田でも同様な結果が報告されており（Nugroho et al. 1994）、水稻生育前期の活発なメタン放出は熱帯水田共通の現象であると言えよう。この現象は先述のように高温による湛水初期からの活発な土壌還元化の進行により説明できると考えられる。ところで、水稻生育後期に温帯水田で報告されてい

Table 6-5-1. Effect of characteristic features of paddy field on chemical and microbiological processes related to dynamics of methane.

Percolation	Leaching of methane to the subsoil
	Controlling methane production and emission (suppressive and promotive)
	Leaching of methane producing bacteria and anaerobic methane oxidizer (sulfate reducer)
Rice plant	Controlling methane fluxes to the atmosphere and the subsoil
	Methane production and oxidation in rhizosphere
	Anaerobic methane oxidation in rhizosphere ?
Subsoil	Anaerobic methane oxidation in subsoil
Drainage (Drought)	Suppression of methane production
	Emission of methane retained in paddy soil
	No effect on survival of methane producing bacteria

る水稻根圏で生成されたメタンの放出に由来すると考えられるメタン発生速度のピークが熱帯水田では観察されなかった。一般に熱帯アジアの水稻在来品種は、湛水状態の水田で起こる還元障害に対し抵抗性を示す傾向が認められている（杉本 1975）。すなわち、在来品種の根圏環境は比較的酸化状態に維持されていることが推察され、品種による根圏制御機能の差異が水稻根圏におけるメタン生成に影響を及ぼしている可能性が考えられた。以上のことから、熱帯水田は、湛水初期の土壌還元の進行・根圏環境の酸化状態の維持という点で温帯水田とは異なる様式の還元過程が進行しているものと想像された。

本研究でメタン発生量を測定した水田圃場は、いずれも各県の稲作試験場内に設置されており、実験期間中灌漑によって湛水状態が維持されていた。一方、タイ国水田の灌漑率は全国平均で30%程度である。地方別でみると、中央平原の灌漑率は80%と高いが、東北部では水田の90%以上が天水田であり、特に浅水の天水田が主要であると考えられる（浜村 1987、長谷川 1992）。東北部は気候が不安定（海田ら 1985）で、水稻栽培期間中常時湛水状態が維持されるとは考え難い。スリンの水田で非常に高いメタン発生量が記録されたが、水田の実態を考慮すると東北部からのメタン発生量は本研究の結果を下回ると推測される。現在、地球規模のメタン発生量の推定値は、単位面積当りのメタン発生量に水田収穫面積を乗じることにより求められているが、より精密な推定には、土壌型や肥培管理とともに、水稻栽培品種や土地利用形態といった水田農業の細部にも十分な配慮が必要であろう。

## 第 7 章 総括

地球温暖化は、オゾン層の破壊・酸性雨・熱帯林の消失・砂漠化等と並ぶ地球規模の環境問題として現在社会的関心が高まっている。温暖化ガスの 1 種であるメタンは、現在の大気濃度は低いものの、将来的に温暖化に対する寄与率の増大が危惧されている。そのためメタン発生源の特定とその制御が急務となっており、重要な発生源の一つと予想される水田からのメタン放出速度の実測値や様々な環境要因の影響に関する研究が数多く報告されている。

水田は、非連続的還元・水稻体の存在・浸透水の移動・構造的等の諸点で他のいずれのメタン生成環境（湖沼・海洋・ルーメン・シロアリ・嫌気消化槽）とも大きく異なるが、水田の特徴を考慮したメタン生成に関する系統的な研究は未だなされていない。本論文では、これら水田独自の特性に着目し、水田土壌におけるメタン生成とその後の動態に関する化学的・微生物学的研究を行った。本研究は大別すると、

- (1) 水田作土で生成したメタンの移行経路の解明（第 2 章）
- (2) 下方移動したメタンのその後の動態（第 3 章）
- (3) メタン生成・酸化に関与する微生物群の生態（第 4 章）
- (4) 熱帯水田からのメタン発生（第 5 章）

よりなっており、その概要は以下の通りである。

### 1. 水田作土で生成したメタンの移行経路の解明（第 2 章）

水稻多収穫のためには、水田は適当量の田面水の下方浸透が必要とされる。水田作土で生成したメタンは、水稻体を経由して大気へと放出されるだけでなく、田面水の浸透にともない心土へ溶脱されることが明らかになった。一作期間中の大気へのメタン放出量に対するメタン溶脱量の比率は浸透速度の上昇に伴って増大し、水稻栽培条件で 2 - 10%、無作付条件では 300 - 1,000% と計算された。本結果より、メタンの移行経路として心土への溶脱の重要性が指摘された。また、田面水の浸透は、土壌中のメタン生成および大気へのメタン

放出を促進する効果を有することが明らかとなった。しかしながら、浸透が大気へのメタン放出に影響を及ぼさない場合も観察され、浸透の効果は環境要因により変動すると推察した。

水稻栽培後期の土壌には多量のメタンが集積しており、収穫期の落水とともに一作期間中に放出されるメタンの4-9%に相当するメタンが大気へ放出された。落水は土壌を酸化しメタン生成を抑制することがこれまで知られていたが、本研究より土壌中に集積したメタンの大部分が落水時に大気へ放出されることが明らかになった。

## 2. 下方移動したメタンのその後の動態

浸透にともなって作土から溶脱したメタンのその後の動態をカラムを用いたモデル実験系で検討した。溶脱したメタンの一部は、心土において酸化分解されることが見い出された。心土に分子状の酸素が存在しないことから、嫌氣的にメタンが酸化されたと判断した。この嫌氣的メタン酸化の機構について検討した結果、作土からメタンと共に心土へ流脱した硫酸還元菌が、同じく作土由来の有機物と硫酸イオンを利用してメタンを酸化していることが明らかになった。また、嫌氣的メタン酸化は心土だけでなく作土でも進行することが示唆された。

さらに、一作期間中に心土で酸化されるメタン量は、作土から溶脱したメタンの70%に相当することがポット実験により明らかになった。

## 3. メタン生成・酸化に関与する微生物群の生態（第4章）

前章までに得られた結果や既報の知見に基づき、メタン生成・酸化に関与する各種微生物の水田土壌中の生態を検討した。

水田土壌中のメタン生成菌および酸化菌数の季節的变化を土壌の微細部位に着目して追跡した。メタン生成菌は非根圏土壌で $10^4-5$  m.p.n./g soilレベルで検出され、酸化層と還元層で菌数の差異は認められなかった。土壌を好気条件で長期間放置しても後の嫌気培養時のメタン生成活性に何等影響を与えなかつ

たことから、偏性嫌気性菌である本菌が、環境中で分子状酸素に対する何等かの防御機能を備えていることが示唆された。この点についてさらに詳細に検討した結果、メタン生成菌の一部は原生動物体内に共生することにより酸素耐性を獲得することが示唆された。原生動物体内の共生メタン生成菌のメタン生成活性は、土壌全体のメタン生成活性の30-40%程度を占めると推定された。

根圏土壌中のメタン生成菌数は、水稻生育前期に非根圏と同程度であったが、水田からの活発なメタン放出が観察された生育後期に増加する( $10^6$  m.p.n./g soil)傾向が認められた。メタン生成菌と、共生関係にあると考えられるセルロース分解菌やヘテロトロフ微生物との数的相関関係は見い出されなかった。

透水液からもメタン生成菌が検出され、本菌が土壌環境中を移動可能であることが明らかになった。カラム実験により、流脱したメタン生成菌が移動先の新たな環境でメタン生成活性を示すことが明らかとなった。

絶対好気性であるメタン酸化菌は、酸化層( $10^{5-6}$  m.p.n./g soil)に比べ還元層( $10^3$  m.p.n./g soil)で菌数が低く、酸素要求性の高いことが示唆された。根圏では非根圏に比べ菌数が高く、メタン酸化菌にとっても根圏が好適な環境であることが明らかになった。根圏にメタン生成菌と酸化菌が同時に存在するこの一見矛盾する現象は、各水稻根間の生理的状态(酸化能)の違いによる両菌の住分けにより説明可能であると推察された。

嫌氣的メタン酸化に関与する硫酸還元菌の土壌中での生態を検討した。浸透にともない流脱する硫酸還元菌数は非常に低かった( $10^{2-3}$  m.p.n./ml)が、稲わら添加による土壌還元の進行にともない透水液中の硫酸還元菌数が著しく増加( $10^5$  m.p.n./ml)した。さらに、流脱した硫酸還元菌が心土で保持され、増殖していることが明らかになり、硫酸還元菌の心土における活性が裏付けられた。

#### 4. 熱帯水田からのメタン発生(第5章)

これまでほとんど研究例がなかった熱帯水田からのメタン発生を、タイ国の典型的な土壌型に属する水田圃場において測定した。

メタン放出速度は土壌型によって大きく異なり、酸性硫酸塩土壌<淡水性沖積土壌<低腐植質グライ土の順に高かった。作付期間中の平均メタン発生速度は、低腐植質グライ土水田で温帯水田のそれと比較して著しく高かった。一方、酸性硫酸塩土壌水田の平均メタン放出速度は温帯の値を下回っていた。有機質肥料の添加によりメタン発生量は増大したが、その種類によっては、逆にメタン放出量が減少する場合も観察された。

タイ国水田からのメタン発生のパターンは温帯とは異なっており、温帯で水稻生育後期にメタン放出が活発化するのに対し、タイ国の水田では水稻生育前期から活発なメタン放出が観察された。

## 5. 総合考察（第6章）

本研究で得られた結果と既存の知見から、メタン発生源あるいはメタン生成環境としての水田を総合的に考察した。

第2章および第3章で得られた結果から、水田生態系におけるメタンの動態（生成・放出・移動・酸化（好氣的・嫌氣的））を総括した。

湛水土壤中での還元物質の再酸化という観点から嫌氣的メタン酸化について考察し、水田土壌の不均一性を考慮した還元過程の進行について言及した。

メタン生成菌・酸化菌の生息場所としての根圏の重要性を指摘した。

メタン生成菌の生育環境としての原生動物の役割について、基質の提供者・酸素からの擁護者・メタン生成菌の移動手段の観点からその意義を考察した。

水田のメタン生成環境としての特性（非連続還元・水稻体の存在・浸透水の移動・構造的）が、メタンの生成およびその後の動態に及ぼす影響を総括し、水田が他のメタン発生源に比して極めてダイナミックな環境であることを指摘した。

タイ国およびインドネシアの水田におけるメタン放出量の測定結果から、熱帯水田の特徴を考察した。



## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、公私にわたり終始懇切なる指導を賜った名古屋大学農学部土壌生物化学研究室教授、木村真人博士に深謝の意を表します。また、同室前教授鍬塚昭三博士（現名古屋大学名誉教授）、同室助教授片山新太博士、同助手渡辺 彰博士には有益な御助言と適切な御指導を賜りました。ここに謹んで謝意を表します。同助手豊田剛己博士をはじめとする当研究室の皆様に数々の御迷惑をお詫びするとともに暖かい御協力に厚く御礼申し上げます。

本研究は、文部省創成的基礎研究「アジア地域熱帯生態系の変動過程と温室効果ガスの動態（班長 高井康雄東京農業大学教授）」の一環として、日本学術振興会特別研究員制度からの援助を受けた。御便宜を賜った高井康雄教授に謹しんで謝意を表するとともに、同会に感謝申し上げます。

土壌試料を提供して頂いたばかりでなく有益な御助言を頂いた三浦吉則氏をはじめとする福島県農業総合試験場、ならびに愛知県農業技術センターの方々に厚く御礼申し上げます。

タイ国水田におけるメタン発生量の測定を行うにあたり、懇切なる指導を賜った名古屋大学工学部原口広和教授に謝意を表します。また、カセサート大学準教授Pimpan Jermsawatdipong博士、タイ国農業省Yaovapa Hasathon女史、パトゥムタニ稲作試験場Nipansri Khomthong博士、スリン稲作試験場Kunnika Naklang博士、および測定に多大なご協力を得た各稲作試験場の方々に心よりお礼申し上げます。

有益なご助言を頂いた京都大学生態学研究センター和田英太郎教授、同助手杉本敦子博士、九州産業医科大学古賀洋介教授ならびに同学化学教室の皆様に深謝致します。

本研究を遂行する機会を与え、深遠なる理解と協力を頂いた両親に感謝します。最後に、研究生活を支援し激励してくれた妻と息子に感謝します。

## 補 微生物数の計数培地・計数方法

### 1. 好気性菌

#### a. 一般微生物 (希釈平板法)

Nutrient Broth	1.8 g
寒天	15 g
蒸留水	1 L

30°Cで10日間培養後に平板上のコロニーを計数した。

#### b. 低栄養性微生物 (希釈平板法)

Nutrient Broth	0.18 g
寒天	15 g
蒸留水	1 L

30°Cで10日間培養後にコロニーを計数した。

#### c. セルロース分解菌 (希釈平板法)

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.3 g	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g	pH 6.8
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g	
KCl	0.5 g	
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01 g	
寒天	10.0 g	
カルボキシメチルセルロース		
ナトリウム(CMC-Na)	10.0 g	
蒸留水	1 L	

30°Cで1週間培養後コンゴレッド染色法 (Teather and Wood 1982) で菌数を測定した。

##### ・コンゴレッド染色法

平板状に0.1%コンゴレッド水溶液を10ml程度流し入れ、平板全面を満たす。

15分間静置後、液を捨てる。

1M-NaClを10ml程度流し入れる。

15分間静置後、液を捨てクリアゾーンを形成したコロニーを計数する

#### d. メタン酸化菌 (最確値法)

KNO <sub>3</sub>	1.0 g	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0.3 g	pH 7.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.15 g	
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02 g	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.001 g	
蒸留水	1 L	

培地 5 ml を添加した試験管に土壌希釈液を接種後、気相をCH<sub>4</sub>:Air=20:80で置換し、30°Cで振とう培養した。1カ月後菌体の増殖に伴う白濁が観察された試験管を陽性として最確値法(10倍希釈5連)により菌数を計算した。

## 2. 嫌気性菌

### a. 一般微生物 (ロールチューブ法)

Nutrient Broth	1.8 g	
寒天	15 g	pH 7.0
CysteineHCl	0.3 g	
レサズリン	0.001g	
蒸留水	1 L	

30°Cで10日間培養し、コロニー数を計数した。

### b. 低栄養性微生物 (ロールチューブ法)

Nutrient Broth	0.18 g	
寒天	15 g	pH 7.0
CysteineHCl	0.3 g	
レサズリン	0.001g	
蒸留水	1 L	

30°Cで10日間培養し、コロニー数を計数した。

### c. セルロース分解菌 (最確値法)

好気性セルロース分解菌計数培地にCysteineHCl (0.3g/L) とレサズリン (0.001g/L) を添加した培地を使用し、寒天濃度は15g/Lとした。ロールチューブを作成し、30°Cで10日間培養した。コンゴレッド染色法でクリアーゾーンが観察された試験管を陽性として最確値法 (10倍希釈5連) で菌数を計算した。

### d. 硫酸還元菌 (最確値法)

培地 1	NH <sub>4</sub> Cl	0.1g	
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0g	
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1g	pH 7.1-7.4
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2g	
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2g	
	乳酸ナトリウム(70%)	3.5g	
	酵母エキス	1.0g	
	蒸留水	980ml	
培地 2	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.0g	
	蒸留水	1 L	
培地 3	アスコルビン酸ナトリウム	0.1g	
	チオグリコール酸ナトリウム	0.1g	
	蒸留水	10ml	

培地 1、2 はオートクレーブ殺菌、培地 3 は濾過滅菌後、培地 1 490mlに培地 2、3 を各 5 ml添加し、土壌希釈液を入れた試験管に 7 mlずつ分注した。さらに滅菌した流動パラフィン 5 mlを注いで、30°Cで培養した。2週間後、黒色 (FeS) を生じた試験管を陽性として最確値法 (10倍希釈5連) により菌数を測定した。

e. メチル基資化性メタン生成菌 (最確値法)

培地 1	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5g
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.72g
	NH <sub>4</sub> Cl	1.8g
	ニトリロ三酢酸	0.082g
	微量無機塩溶液	20ml
	ビタミン	20ml
	レサズリン(1g/L)	2ml
	酵母エキス	0.04g
	蒸留水	1558ml
培地 2	トリメチルアミン	20g/100ml
還元剤 1	Na <sub>2</sub> S·9H <sub>2</sub> O	2.0g/100ml
還元剤 2	Cysteine·HCl	2.0g/100ml

ビタミン:

ビオチン	2.0mg
葉酸	2.0mg
塩酸ビリドキシン	10.0mg
塩酸チアミン	5.0mg
リボフラビン	5.0mg
ニコチン酸	5.0mg
DL-パントトン酸カルシウム	5.0mg
ビタミンB <sub>12</sub>	0.1mg
p-アミノ安息香酸	5.0mg
リボ酸	5.0mg
蒸留水	1 L

微量無機塩溶液:

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3.0g
MnSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.5g
NaCl	1.0g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1g
CoCl <sub>2</sub>	0.1g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1g
ZnSO <sub>4</sub>	0.1g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.01g
AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0.01g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01g
蒸留水	1 L

培地 1 240ml に蒸留水 42ml を添加し、110°C で 5 分間オートクレーブ後直ちに微量の酸素を除いた窒素ガスで爆気し、培地中の酸素を除いた。その後酸素が混入しないように密栓をして121°C で15分間オートクレーブ殺菌した。蒸留水を煮沸・窒素ガス爆気を繰り返して得た無酸素水に培地 2 および還元剤を溶解し、酸素の混入がないように密栓をしてオートクレーブ殺菌した。

培地 1 に還元剤 1、2 を 7.5ml、培地 2 を 3 ml 添加して、窒素気流下で 5 ml ずつ加圧培養試験管に分注した。培地中のレサズリンの退色を確認した後に土壌希釈液を接種し、試験管内の気相を CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>=20:80 で置換して 30°C で静置培養した。

1 カ月後、試験管内の気相をガスクロで分析し、土壌希釈液を接種しない試験管の気相と比較してメタン濃度が高い試験管を陽性として最確値法 (10 倍希釈 5 連) で菌数を計算した。

f. 炭酸ガス資化性メタン生成菌

培地 1      メチル基資化性メタン生成菌に同じ

培地 2      NaHCO<sub>3</sub>              10g/150ml

還元剤 1    メチル基資化性メタン生成菌に同じ

還元剤 2    メチル基資化性メタン生成菌に同じ

培地 1 160ml に蒸留水 15ml を添加し、上述の方法に従い培地を爆気・殺菌した。また培地 2 は無酸素水に溶解した。培地 1 に上述の還元剤 1、2 を各 5ml、濾過滅菌した培地 2 を 15ml 添加して、3 ml ずつ加圧培養試験管に分注した。試験管内の気相を CO<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>=20:80 で置換して 1 カ月間振とう培養した。菌数測定はメチル基資化性菌の方法に準じた。

## 引用文献

- Alperin, M.J. and Reeburgh, W.S. 1984: Geochemical observations or supporting anaerobic methane oxidation. pp.282-289. In Microbial growth on C-1 compounds eds. Crawford, R.L. and Hanson, R.S., American Society for Microbiology, Washington D.C., U.S.A.
- Alperin, M.J. and Reeburgh, W.S. 1985: Inhibition experiments on anaerobic methane oxidation. Appl. Environ. Microbiol., **50**, 940-945
- Alperin, M.J., Reeburgh, W.S., and Whiticar, M.J. 1988: Carbon and hydrogen isotope fractionation resulting from anaerobic methane oxidation. Global Biochem. Cycles, **2**, 279-288
- Anastasi, C., Dowding, M., and Simpson, V.J. 1992: Future CH<sub>4</sub> emission from rice production. J. Geophys. Res., **97**, 7521-7525
- Andal, R., Bhuvaneswari, K., and Subba-Rao, N.S. 1956: Root exudates of paddy. Nature, **178**, 1063
- 浅川 晋 1991: 第1回 澄石セミナー講演要旨集 18-22
- Asakawa, S., Morii, H., Akagawa-Matsushita, M., Koga, Y., and Hayano, K. 1993: Characterization of Methanobrevibacter arborihilus SA isolated from a paddy field soil and DNA-DNA hybridization among M. arboriphilus strains. Int. J. Sys. Bacteriol., **43**, 683-686
- 浅見輝男・高井康雄 1970: 水田土壤中における遊離鉄の行動に関する研究(第4報)、土肥誌、**41**、48-55
- Aselman, I. and Crutzen, P.J. 1989: Global distribution of natural fresh water wetlands and rice paddies, their net primary productivity, seasonality and possible methane emission. J. Atmos. Chem., **8**, 307-358
- Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R., and Wolfe, R.S. 1979: Methanogens; Reevaluation of a unique biological group.

- Bell, R.G. 1969: Studies on the decomposition of organic matter in flooded soil. Soil Biol. Biochem., 1, 105-116
- Bouwman, A.F. 1990: Soils and the greenhouse effect, John Wiley and Sons, Chichester, U.K.
- Cicerone, R.J. and Shetter, V.J. 1981: Source of atmospheric methane: measurements in rice paddies and a discussion. J. Geophys. Res., 86, 7203-7209
- Cicerone, R.J., Shetter, J.D., and Delwiche, C.C. 1983: Seasonal variation of methane flux from a California rice paddy. J. Geophys. Res., 88, 11022-11024
- Cicerone, R. and Oremland, R.S. 1988: Biogeochemical aspects of atmospheric methane. Global Biogeochem. Cycles, 2, 299-327
- Conrad, R. and Babbel, M. 1989: Effect of dilution on methanogenesis, hydrogen turnover and interspecies hydrogen transfer in anoxic paddy soil. FEMS Microbiol. Ecol., 62, 21-28
- Conrad, R., Mayer, H., and Wust, M. 1989: Temporal change of gas metabolism by hydrogen-syntrophic methanogenic bacterial associations in anoxic paddy soil. FEMS Microbiol. Ecol., 62, 265-274
- Daniels, L., Sparling, R., and Dennis Sprott, G. 1984: The bioenergetics of methanogenesis. Biochimica et Biophysica Acta, 768, 113-163
- Davis, J., B. and Yarbrough, H.F. 1966: Anaerobic oxidation of hydrocarbons by *Desulfovibrio desulfuricans*. Chem. Geol., 1, 137-144
- de Bont, J.A.M., Lee, K.K., and Bouldin, D.F. 1978: Bacterial oxidation of methane in a rice paddy. Ecoll. Bull. (Stockholm), 26, 91-96
- Devol, A.H. 1983: Methane oxidation rates in the anaerobic sediments of Saanich Inlet. Limnol. Oceanogr., 28, 738-742
- Devol, A.H. and Ahmed, S.I. 1981: Are high rates of sulphate reduction

- associated with anaerobic oxidation of methane? Nature, **291**, 407-408
- Devol, A.H., Anderson, J.J., Kuivila, K., and Murray, J.W. 1984: A model for coupled sulfate reduction and methane oxidation in the sediments of Saanich Inlet. Geochimica et Cosmochimica Acta, **48**, 993-1004
- Dubach, A.Ch. and Bachofen, R. 1985: Methanogens: a short taxonomic overview. Experientia, **41**, 441-446
- Ehrlert, D.H. and Schmidt, U. 1978: Sources and sinks of atmospheric methane. Pure Appl. Geophys., **116**, 452-464
- 江崎幾朗 1993: 水田土壤中における水溶性有機物の動態及び組成に関する研究  
1993年度名古屋大学農学研究科修士論文
- Easki, I., Watanabe, A., and Kimura, M. 1993: Water-soluble organic materials in paddy soil ecosystem. I. Fractionation of water-soluble organic materials in leachate from submerged paddy soils using PVP and ion exchange resins. Soil Sci. Plant Nutr., **39**, 529-538
- Finlay, B.J. and Fenchel, T. 1991: An anaerobic protozoa, with symbiotic methanogens, living in municipal landfill material. FEMS Microbiol. Ecol., **85**, 169-180
- 古坂澄石 1993: 地球環境と微生物、日本微生物学会報、**8**、127-131
- Gijzen, H.J., Broers, C.A.M., Barughare, M., and Stumm, C.K. 1991: Methanogenic bacteria as endosymbionts of the ciliate Nyctotherus ovalis in the cockroach hindgut. Appl. Environ. Microbiol., **57**, 1630-1634
- Goosen, N.K., Horemans, M.C., Hillebrand, S.J.W., Stumm, C.K., and Vogels, G.D. 1988: Cultivation of the sapropelic ciliate Plagiopyla nasuta Stein and isolation of the endosymbiont Methanobacterium formicicum. Arch. Microbiol., **150**, 165-170
- 浜村邦夫 1987: タイの稲作、農業および園芸、**62**、90-94



- Harrison, W.H. and Aiyer, P.A.S. 1913: The gases of swamp soils. (I) Mem. Dept. Agr. Ind., 3, 65-104
- 長谷川善彦 1992: タイ農業が警告する - 21世紀の食料問題 -, 農文協
- Hillman, K., Lloyd, D., and Williams, A.G. 1988: Interaction between the methanogen Methanosarcina barkeri and rumen holotrich ciliate protozoa Lett. Appl. Microbiol., 7, 49-53
- Holzapel-Pschorn, A., Conrad, R., and Seiler, W. 1985: Production, oxidation, and emission of methane in rice paddies. FEMS Microbiol Ecol. 31, 343-351
- Holzapel-Pschorn, A., Conrad, R., and Seiler, W. 1986: Effect of vegetation on the emission of the methane from submerged rice paddy soil. Plant Soil, 92, 223-233
- Holzapel-Pschorn, A. and Seiler, W. 1986: Methane emission during a cultivation period from an Italian rice paddy. J. Geophys. Res., 91(D), 11803-11814
- 堀 謙三・犬伏和之・松本 聡・和田秀徳 1990a: 水田土壌におけるメタン生成と硫酸還元のプロ酸をめぐる競合、土肥誌、61、572-578
- 堀 謙三・犬伏和之・松本 聡・和田秀徳 1990b: 湛水土壌系におけるメタン生成と硫酸還元の阻害剤の適正濃度、土肥誌、61、647-648
- 堀 謙三・犬伏和之・松本 聡・和田秀徳 1993: 水田土壌におけるメタン生成と硫酸還元の水素をめぐる競合、土肥誌、64、363-367
- Houghton, J.T., Jenkins, G.J., and Ephraums, J.J. (eds.) 1990: Climate change. The IPCC scientific assessment, p.1-40, Cambridge Univ. Press New York
- 犬伏和之・堀 謙三・松本 聡・梅林正直・和田秀徳 1989: 水稻体を経由したメタンの大気への放出、土肥誌、60、318-324
- 石栗 秀 1992: 2.5 MPN法、新編土壌微生物実験法 p.45-54、土壌微生物研究会編、養賢堂

- 伊藤滋吉・飯村康二 1989a:北陸地方の細粒質グライ土水田に発生するガスの組成について、土肥誌、**60**、116-121
- 伊藤滋吉・飯村康二 1989b:北陸地方の細粒質グライ土水田における有機物の分解とガス発生量について 土肥誌、**60**、290-297
- Iverson,N. and Blackburn,T.H. 1981: Seasonal rates of methane oxidation in anoxic marine sediments. Appl. Environ. Microbiol., **41**, 1295-1300
- Iverson,N., and Jorgensen,B.B. 1985: Anaerobic methane oxidation rates at the sulfate-methane transition in marine sediments from Kattegat and Skagerrak (Denmark). Limnol. Oceanogr., **30**, 944-955
- Iverson,N., Oremland,R.S., and Klug,M.J. 1987: Big Soda Lake (Nevada). 3. Pelagic methanogenesis and anaerobic methane oxidation. Limnol. Oceanogr., **32**, 804-814
- Jones,W.J., Nagle,D.P., and Whitman,W.B. 1987: Methanogens and the diversity of archaebacteria. Microbiol. Rev., **51**, 135-177
- 化学便覧 1984: 化学便覧基礎編 改訂3版、pp.II-158 8.7.1 気体の溶解度、日本化学会編、丸善
- 香川尚徳 1968:水田状態土壌内の細菌分布 土と微生物、**10**、1-8
- 香川尚徳・高井康雄 1969: 水田状態土壌内を流下する浸透水中の好気性細菌相、土肥誌、**40**、332-336
- 海田能宏・星川和俊・河野泰之 1985: 東北タイ・ドンデーン村;稲作の不安定性、東南アジア研究、**23**、252-266
- 鎌形洋一 1993: 第5章 メタン生成菌の分類と生態、上木勝司・永井史郎編著、嫌気微生物学、p.95-117、養賢堂
- 加藤忠司 1972a:湛水土壌の水溶性有機物について(第1報)、土肥誌、**43**、357-363
- 加藤忠司 1972b:湛水土壌の水溶性有機物について(第2報) 水溶性有機物の理化学性、土肥誌、**43**、403-408

- Kawaguchi, K. and Kyuma, K. 1977: Paddy soils in tropical Asia., p.156-200, Univ. Press of Hawaii, Honolulu
- 川口桂三郎 1978: 水田土壌学、講談社
- Keltjens, J.T. and van der Drift, C. 1986: Electron transfer reactions in methanogens. FEMS Microbiol. Rev., **39**, 259-303
- Khalil, M.A.K., Rasmussen, R.A., Wang, M.X., and Ren, L. 1990: Emissions of trace gases from Chinese rice fields and biogas generators: CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O, CO, CO<sub>2</sub>, Chlorocarbons and hydrocarbon. Chemosphere, **20**, 207-226
- Khalil, M.A.K., Rasmussen, R.A., Wang, M.X., and Ren, L. 1991: Methane emission from rice fields in China. Environ. Sci. Tech., **25**, 979-981
- Kiener, A. and Leisinger, T. 1983: Oxygen sensitivity of methanogenic bacteria. System. Appl. Microbiol., **4**, 305-312
- 木村真人・和田秀徳・高井康雄 1977: 水稻根圏に関する研究 根圏土壌の理化学的性質 (その1)、土肥誌、**48**、85-90
- 木村真人・和田秀徳・高井康雄 1984: 水稻根圏における代謝活性、土肥誌、**55**、338-343
- Kimura, M., Wada, H., and Takai, Y. 1982: Effects of direct sowing cultivation on the rhizosphere of lowland rice. Soil Sci. Plant Nutr., **28**, 173-182
- Kimura, M., Murakami, H., and Hidenori, W. 1991a: CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, and CH<sub>4</sub> production in rice rhizosphere. Soil Sci. Plant Nutr., **37**, 55-60
- Kimura, M., Ando, H., and Haraguchi, H. 1991b: Estimation of potential CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> production in Japanese paddy fields. Environ. Sci., **4**, 15-25
- Kimura, M., Miura, Y., Watanobe, A., Katoh, T., and Haraguchi, H. 1991c: Methane emission from paddy field (Part 1). Effect of fertilization, growth stage and midsummer drainage: Pot experiment., Environ. Sci., **4**, 265-271
- Kimura, M., Asai, K., Watanabe, A., Murase, J., and Kuwatsuka, S. 1992:

- Suppression of methane fluxes from flooded paddy soil with rice plants by foliar spray of nitrogen fertilizers. Soil Sci. Plant Nutr. **38**, 735-740
- Kimura, M., Minoda, T., and Murase, J. 1993: Water-soluble organic materials in paddy soil ecosystem. II. Effects of temperature on contents of total organic materials, organic acids, and methane in leachate from submerged paddy soil amended with rice straw. Soil Sci. Plant Nutr., **39**, 713-724
- 古賀洋介・森井宏幸 1986: メタン生成菌の分類と生化学、醗酵工学、**64**、115-137
- 近藤 熙・近藤吉和・高井康雄 1982a: 水田土壌の作土の浸透水が心土の微生物相に及ぼす影響、土肥誌、**53**、415-419
- 近藤 熙・近藤吉和・高井康雄 1982b: 水田土壌作土浸透水の心土微生物抑制効果について、土肥誌、**53**、420-424
- Konig, H and Stetter, K.O. 1989: Section 25 Archaeobacteria, In Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 3, ed. Taley, J.S.T., p. 2171-2253 Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A.
- Kosiur, D.R. and Warford, A.L. 1979: Methane production and oxidation in Santa Barbara Basin sediments. Estuarine and Coastal Marine Science, **8**, 379-385
- Koyama, T. 1963: Gaseous metabolism in lake sediments and paddy soils and the production of atmospheric methane and hydrogen. J. Geophys. Res., **68**, 3971-3973
- Krumholz, L.R., Forsberg, C.W., and Veira, D.M. 1983: Association of methanogenic bacteria with rumen protozoa. Can. J. Microbiol., **29**, 676-680
- 熊田恭一 1980: 基礎農学 - 1 土壌環境、p. 69、学会出版センター
- Lee, J.J., Soldo, A.T., Reisser, W., Lee, M.J., Jeon, K.W., and Gortz, H.-D.

- 1985: The extent of algal and bacterial endosymbioses in protozoa. J. Protozool., 32, 391-403
- Lee, M.J., Schreurs, P.J., Messer, A.C., and Zinder, S.H. 1987: Association of methanogenic bacteria with flagellated protozoa from a termite hindgut. Current Microbiol., 15, 337-341
- MacRae, I.C. and Castro, T.F. 1967: Root exudates of the rice plant in relation to akagare, a physiological disorder of rice. Plant Soil, 26, 317-323
- Mah, R.A. 1982: Methanogenesis and methanogenic partnerships. Phil. Trans. R. Soc. Lond., B297, 599-616
- Martens, C.S. and Berner, R.A. 1977: Interstitial water chemistry of Long Island Sound sediments. I. Dissolved gases. Limnol. Oceanogr., 22, 10-25
- Matthews, E., Fung, I., and Lerner, J. 1991: Methane emission from rice cultivation: geographic and seasonal distribution of cultivated areas and emission. Global Biogeochem. Cycles, 5, 3-24
- Mayer, H.P. and Conrad, R. 1990: Factors influencing the population of methanogenic bacteria and the initiation of methane production upon flooding of paddy soil. FEMS Microbiol. Ecol., 73, 103-112
- 陽 捷行 1991: 土壤生態系のガス代謝と地球環境I -総論-, 土肥誌, 62, 445-450
- Miura, Y., Watanabe, A., Kimura, M., and Kuwatsuka, S. 1992: Methane emission from paddy field (Part 2). Main route of methane transfer through rice plant, and temperature and light effects on diurnal variation of methane emission. Environ. Sci., 5, 187-193
- 宮下清貴・和田秀徳・高井康雄 1980a: 水稻根の腐朽分解過程について(第3報) 走査電子顕微鏡による水稻根表面の分解状況の観察, 土肥誌, 51, 307-312

- 宮下清貴・和田秀徳・高井康雄 1980b: 水稻根の腐朽分解過程について (第4報) 組織化学的方法による水稻根分解過程の追跡、土肥誌、51、313-317
- 宮下清貴・和田秀徳・高井康雄 1982: 水稻根の腐朽分解過程について (第5報) 水稻根に存在する微生物の数とバイオマスの測定、土肥誌、53、39-44
- Motomura, S., Seirayosakol, A., Piyapongse, P. and Cholitkul, W. 1979: Field observation and laboratory analyses of paddy soils in Thailand. 熱研資料 45, p.54-55, 72-73, 178-179, 熱帯農業研究センター
- 村瀬 潤 1989: 水稻根圏における酸化還元状態、1989年度名古屋大学農学部卒業論文
- 村瀬 潤・木村真人 1994: 水田土壌の不均一場における逐次還元過程、土壌肥料学会講演要旨集、40、p.117
- Neue, H.C., Becker-Heidmann, O., and Scharpenseel, H.W. 1990: Organic matter dynamics, soil properties, and cultural practices in rice lands and their relationship to methane production; in Soil and the greenhouse effect, ed. Bouwman, A.F., p.457-466, John Wiley and Sons, Chichester, U.K.
- Nouchi, I. and Mariko, S. 1991: Mechanism of methane transport by rice plants. In Biogeochemistry of global change. ed. Oremland, R.S., p.336-352, Chapman & Hall, New York
- Nugroho, G.S., Lumbanraja, J., Suprpto, H., Sunyoto, Ardjasa, W.S., Haraguchi, H., and Kimura, M. 1994: Methane emission from an Indonesian paddy field subjected to several fertilizer treatments. Soil Sci. Plant Nutr., 40, 275-281
- 岡崎正規・和田秀徳・高井康雄 1976a: 水田土壌作土層からの浸透水が第二鉄を溶解する能力を規制している因子の解析 土壌水溶性成分の役割 (第2報)、土肥誌、47、142-147
- 岡崎正規・和田秀徳・高井康雄 1976b: 水田土壌作土層からの浸透水による水酸化第二鉄の溶解過程解析へのトレーサーの利用 土壌水溶性成分の役割 (第

- 3 報)、土肥誌、47、148-151
- 岡崎正規・和田秀徳・高井康雄 1976c:水田土壌の土壌溶液による鉄およびマンガンの溶解過程解析へのトレーサーの利用 土壌水溶性成分の役割 土壌水溶性成分の役割 (第4報)、土肥誌、47、289-295
- 岡崎正規・和田秀徳・高井康雄 1977:水田土壌作土層からの浸透水によるリン酸第二鉄の溶解過程 土壌水溶性成分の役割 土壌水溶性成分の役割 (第5報) 土肥誌、48、297-301
- 大来佐武郎 1990:講座 [地球環境]、第1巻 地球規模の環境問題 (1)、中央法規出版
- 小野寺伊勢之助 1929: 紫雲英の土壌中における分解及びその稲作に及ぼす影響、盛岡高等農林学校学術報告、13、1-276
- Oremland, R.S. and Des Marais, D.J. 1983: Distribution, abundance and carbon isotopic composition of gaseous hydrocarbons in Big Soda Lake, Nevada: An alkaline, meromictic lake. Geochimica et Cosmochimica Acta 47, 2107-2114
- Oremland, R.S. 1988: Biogeochemistry of methanogenic bacteria. In A.J. B. Zehnder (ed.), Biology of anaerobic microorganisms, p.641-705, John Wiley & Sons, New York
- 大槻 晃・半谷高久 1967: アンスロンによる汚水中の糖類の吸光光度定量法、水質汚濁研究、4、54-58、資源研
- Panganiban, A.T., Patt, T.E., Hart, W. and Hanson, R.S. 1979: Oxidation of methane in the absence of oxygen in lake water samples. Appl. Environ. Microbiol., 37, 303-309
- Parashar, D.C., Rai, J., Gupta, P.K., and Singh, N. 1991: Parameters affecting methane emission from paddy fields. Ind. J. Radio Space Phys. 20, 12-17
- Rajagopal, B.S., Belay, N., and Daniels, L. 1988: Isolation and characterization of methanogenic bacteria from rice paddies. FEMS Microbiol.

Ecol., 53, 153-158

Rasmussen, R.A., and Khalil, M.A.K. 1981: Increase in the concentration of the atmospheric methane. Atmos. Environ., 15, 883-886

Reeburgh, W.S. 1980: Anaerobic methane oxidation: Rate depth distribution in Skan Bay sediments. Earth and Planetary Science Letters, 47, 345-352

Reeburgh, W.S. and Heggie, D.T. 1977: Microbial methane consumption reactions and their effect on methane distributions in freshwater and marine environments. Limnol. Oceanogr., 22, 1-9

Robinson, W.O. 1930: Some chemical phases of submerged soil condition. Soil Sci., 30, 197-217

Sass, R.L., Fisher, F.M., and Harcombe, P.A. 1990: Methane production and emission in a Texas rice field. Global Biogeochem. Cycles, 4, 47-68

Sass, R.L., Fisher, F.M., and Harcombe, P.A. 1991: Mitigation of methane emissions from rice fields: Possible adverse effects of incorporated rice straw. Global. Biogeochem. Cycles, 5, 275-287

Schutz, H., Seiler, W., and Conrad, R. 1989a: Processes involved in formation and emission of methane in rice paddies. Biogeochemistry, 7, 33-53

Schutz, H., Holzapfel-Pschorn, A., Conrad, R., Rennenberg, H., and Seiler, W. 1989b: A three years continuous record on the influence of daytime, season and fertilizer treatment on methane emission rates from an Italian rice paddy field. J. Geophys. Res., 94, 16405-16416

Schutz, H., Seiler, W., and Conrad, R. 1990a: Influence of soil temperature on methane emission from rice paddy fields. Biogeochemistry, 11, 77-95

Schutz, H., Seiler, W., and Rennenberg, H. 1990b: Soil and land use related sources and sinks of methane (CH<sub>4</sub>) in the context of the global



- methane budget., In Soil and the greenhouse effect, ed. Bouwman, A.F., p.269-285, John Wiley and Sons, Chichester, U.K.
- Seiler, W., Holzapfel-Pschorn, A., Conrad, R., and Scharffe, D. 1984: Methane emission from rice paddies. J. Atmospheric Chemistry, 1, 241-268
- 重中義信 1988: 原生動物の観察と実験法、共立出版
- 染谷 孝・古坂澄石 1983: 4水田土壌の好氣的セルロース分解菌の動態、微生物生態研究会編、微生物の生態 11変動と制御をめぐって、p.55-73、学会出版センター
- Stumm, C.K., Gijzen, H.J., and Vogels G.D. 1982: Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. Br. J. Nutr., 47, 95-99
- Stumm, C.K. and Zwart, K.B. 1986: Symbiosis of protozoa with hydrogen-utilizing methanogens. Microbiological Sciences, 3, 100-105
- Stumm, C.K., and Vogels, G.D. 1989: 10. Autotrophic bacteria in protozoa. In Autotrophic bacteria, eds. Schlegel, H.G. and Bwien, B., Springer Verlag, Berlin, p.177-191
- 杉本勝男 1975: 4. 稲の栽培法、農林省熱帯農業研究センター・国際協力事業団共編、熱帯アジアの稲作、p.123-183、農林統計協会
- Suwangwong, S., Wada, H., Kanareugsas, C., Songmuang, P., and Kai, H. 1983: Environmental condition. In Paddy Nitrogen Economy—Comparative study on Nitrogen Economy of Paddy Soil between Tropical and Temperate Regions—, Ed. S.Vacharotayan and Y.Takai, p.7-32, Nodai Research Institute, Tokyo University of Agriculture, Tokyo
- 高井康雄・小山忠四郎・加村崇雄 1955: 水田土壌の微生物代謝に関する研究 (第1報)、農化誌、29、967-972
- 高井康雄・小山忠四郎 1956: 水田土壌の微生物代謝に関する研究 (第2報) 現地水田土壌のガス及び有機酸について、土肥誌、26、25-28
- Takai, Y., Koyama, T., and Kamura, T. 1956: Microbial metabolism in re-

duction process of paddy soils (Part 1). Soil Sci. Plant Nutr., 2, 63

-66

高井康雄・小山忠四郎・加村崇雄 1957a: 水田土壤の微生物代謝に関する研究  
(第3報) 各種水田土壤における還元状態の発達について(その1)、

農化誌、31、211-215

高井康雄・小山忠四郎・加村崇雄 1957b: 水田土壤の微生物代謝に関する研究  
(第4報) 各種水田土壤における還元状態の発達について(その2)、

農化誌、31、215-220

高井康雄・加村崇雄 1961: 科学、31、618-624

Takai, Y., Koyama, T., and Kamura, T. 1963a: Microbial metabolism in re-  
duction process of paddy soils (Part 2). Effect of iron and organic  
matter on the reduction process(1). Soil Sci. Plant Nutr., 9(5),  
10-14

Takai, Y., Koyama, T., and Kamura, T. 1963b: Microbial metabolism in re-  
duction process of paddy soils (Part 3). Effect of iron and organic  
matter on the reduction process (2). Soil Sci. Plant Nutr., 9(6), 1-5

高井康雄 1960: 水田土壤中のメタン発酵について、土と微生物、1、30-41

高井康雄・香川尚徳・弘法健三 1968: 水田状態土壤における透水による細菌  
の流脱(第1報)、土肥誌、39、219-223

高井康雄・小山忠四郎・加村崇雄 1969a: 水稻根および透水がポット内湛水土  
壤の還元過程におよぼす影響 水田土壤の微生物代謝に関する研究(第5報)、  
土肥誌、40、15-19

高井康雄・香川尚徳・弘法健三 1969b: 水田状態土壤における透水による細菌  
の流脱(第2報) 好気性グラム陰性細菌群の動態、土肥誌、40、359-363

Takai, Y. 1970: The mechanism of methane fermentation in flooded paddy  
soil. Soil Sci. Plant Nutr., 16, 238-244

高井康雄・島津 武・好田 肇・香川尚徳・近藤 熙・和田秀徳 1970: 水田土  
壤心土の柱状構造における細菌フロアの不均一分布(第1報)、土肥誌、41、

- Takai, Y., Wada, H., and Kobo, K. 1974: Microbial mechanism of effects of water percolation on Eh, iron, and nitrogen transformation in the submerged paddy soils. Soil Sci. Plant Nutr., **20**, 33-45
- 高井康雄 1980: 水田土壌の動態に関する微生物学的研究 I、肥料科学、**3**、17-55
- 武田 潔・古坂澄石 1970a: 水田土壌から嫌氣的に分離した細菌について (第 1 報) 湛水前後に嫌氣的に分離した細菌種の変化、農化誌、**44**、343-348
- 武田 潔・古坂澄石 1970b: 水田土壌から嫌氣的に分離した細菌について (第 2 報) 通性嫌気性菌と偏性嫌気性菌の類別化、農化誌、**44**、349-355
- 武田 潔 1984: メタン酸化細菌の特徴と生態、東北大農研報、**36**、59-66
- Teather, R.M. and Wood, P.J. 1982: Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl. Environ. Microbiol., **43**, 777-780
- 土屋一成・和田秀徳・高井康雄 1981: 水稻栽培が主要無機成分の溶脱に及ぼす影響と温度因子、土肥誌、**52**、27-30
- 土屋一成・和田秀徳・高井康雄 1984: 水稻栽培が主要無機成分の溶脱に及ぼす影響と環境因子、土肥誌、**55**、213-219
- 土屋一成・和田秀徳・高井康雄 1986: 湛水土壌中における主要無機成分の水溶化機構、土肥誌、**57**、593-597
- 上木勝司・永井史郎 1993: 嫌気微生物学、養賢堂
- 上木厚子・小野和宏・加来伸夫・上木勝司 1993: 水田土壌中におけるメタン生成菌の分布と生存、第 9 回日本微生物生態学会講演要旨集、p.95
- Van Bruggen, J.J.A., Stumm, C.K., and Vogels, G.D. 1983: Symbiosis of methanogenic bacteria and sapropelic protozoa. Arch. Microbiol., **136**, 89-95
- Van Bruggen, J.J.A., Zwart, K.B., Van Assema, R.M., Stumm, C.K., and Vogels, G.D. 1984: Methanobacterium formicicum, an endosymbiont of the

- anaerobic ciliate Metopus striatus McMurrich. Arch. Microbiol., 139, 1-7
- Van Bruggen, J. J. A., Stumm, C. K., Zwart, K. B., and Vogels, G. D. 1985: Endosymbiotic methanogenic bacteria of the sapropelic amoeba Mastigella. FEMS Microbiol. Ecol., 31, 187-192
- Van Bruggen, J. J. A., Zwart, K. B., Hermans, J. G. F., Van Hove, E. M., Stumm, C. K., and Vogels, G. D. 1986: Isolation and characterization of Methanoplanus endosymbiosus sp. nov., an endosymbiont of the marine sapropelic ciliate Metopus contortus Quennerstedt. Arch. Microbiol., 144, 367-374
- Van Bruggen, J. J. A., Van Rens, G. L. M., Geertman, E. J. M., Zwart, K. B., Stumm, C. K., and Vogels, G. D. 1988: Isolation of a methanogenic endosymbiont of the sapropelic amoeba Pelomyxa palustris Greeff., J. Protozool., 35, 20-23
- Vogels, G. D., Hoppe, W. F., and Stumm, C. K. 1980: Association of methanogenic bacteria with rumen ciliates., Appl. Environ. Microbiol., 40, 608-612
- Vogels, G. D., Van Der Drift, C., Stumm, C. K., Keltjens, J. T. M., and Zwart, K. B. 1984: Methanogenesis: surprising molecules, microorganisms and ecosystems. Antonie van Leeuwenhoek, 50, 557-567
- 和田秀徳・好田 肇・高井康雄 1971a: 埴質水田土壌のキュータン (第1報) 土肥誌, 42, 12-17
- 和田秀徳・好田 肇・松本 聡 1971b: 埴質水田土壌のキュータン (第2報) 土肥誌, 42, 65-68
- 和田秀徳・岡崎正規・高井康雄 1975: 水田作土層からの浸透水による水酸化第二鉄の溶解過程 土壌水溶性成分の役割 (第1報), 土肥誌, 46, 201-209
- 和田秀徳・土屋一成・高井康雄 1979: 水田土壌からの物質の溶脱に関する研究 (第1報) 水田土壌からの主要無機成分の溶脱過程, 土肥誌, 50, 511-516

和田秀徳 1984: IX.水田土壌、 新土壌学 p.159-183 朝倉書店 (共著)

Wagener,S. and Pfennig,N. 1987: Monoxenic culture of the anaerobic ciliate Trimyema compressum Lackey., 149, 4-11

Wagener,S., Bardele,C.F. and Pfennig,N. 1990: Functional integration of Methanobacterium formicicum into the anaerobic ciliate Trimyema compressum. Arch. Microbiol., 153, 496-501

Watanabe,A., Kimura,M., Kasuya,M., Kotake,M., and Katoh,T. 1994a: Methane in groundwater used for Japanese agriculture: Its relationship to other physico-chemical properties and possible tropospheric source strength. Geophys. Res. Letters., 21, 41-44

Watanabe,A., Murase,J., Kato,K., and Kimura,M. 1994b: Methane production and its fate in paddy fields.V. Fate of methane remained in paddy soil at harvesting stage. Soil Sci. Plant Nutr., 40 (in publication)

Whitman,W.B. 1985: Methanogenic bacteria In The bacteria, Vol VIII, eds. Woese,C.R. and Wolfe,R.S., p.3-84, Academic Press, New York

Wiesenburg,D.A. and Guinasso, Jr.N.L. 1979: Equilibrium solubilities of methane, carbon monoxide, and hydrogen in water and sea water. J. Chem. Eng. Data, 24, 356-360

Yagi,K. and Minami,K. 1990: Effect of organic matter application on methane emission from some Japanese paddy fields. Soil Sci. Plant Nutr., 36, 599-610

Yagi,K., Minami,K., and Ogawa,Y. 1990: Effects of water percolation on methane emission from paddy fields. Res. Rep. Div. Environ. Planning, 6, 105-112

八木一行 1991: 土壌生態系のガス代謝と地球環境 2. -水田からのメタン発生-, 土肥誌, 62, 556-562

山根一郎 1954: 水田圃場よりのガス組成、東北大学農学研究所彙報、6、187

- 山根一郎 1955: 水田土壤のアンモニア並びにガス生成に及ぼす畑状態処理の影響、東北大学農学研究所彙報、7、239-254
- 山根一郎 1961a: 水田土壤における有機酸の分解とガスの生成、東北大学農学研究所彙報、12、147-159
- 山根一郎 1961b: 水田土壤中における葡萄糖の分解とガスの組成、東北大学農学研究所彙報、12、217-229
- 山根一郎 1961c: ガス分析法並びに水田土壤におけるガス成分の消長に関する研究、東北大学農学研究所彙報、12、261-367
- 吉田光二・加村崇雄 1975: マンガン還元過程における2価鉄の役割に関するモデル実験 水田土壤中のマンガン還元機構(第7報)、土肥誌、46、382-388
- 吉田光二 1975: 湛水土壤中のマンガン還元過程における2価鉄の役割 水田土壤中のマンガン還元機構(第8報)、土肥誌、46、458-464
- Zehnder, A. J. B. and Brock, T. D. 1980: Anaerobic methane oxidation: Occurrence and ecology. Appl. Environ. Microbiol., 39, 194-204
- Zeikus, J. G. 1977: The biology of methanogenic bacteria. Bacteriol. Rev., 41, 514-541
- Zhilina, T. N. 1972: Death of Methanosarcia in the air. Mikrobiologiya, 41, 1105-1106
- Zongliang, C., Debo, L., Kesheng, S., and Bujun, W. 1993: Features of CH<sub>4</sub> emission from rice paddy fields in Beijing and Nanjing. Chemosphere, 26, 239-245

## 報文目録

1. Murase, J., Kimura, M. and Kuwatsuka, S.:

Methane production and its fate in paddy fields. III.

Effects of percolation in paddy fields on methane flux distribution to the atmosphere and the subsoil.

Soil Sci. Plant Nutr., 39, 63-70 (1993)

2. Murase, J. and Kimura, M.:

Methane production and its fate in paddy fields. IV.

Sources of microorganisms and substrates responsible for anaerobic methane oxidation in subsoil. Soil Sci. Plant Nutr., 40, 57-61 (1994)

3. Jermsawatdipong, P., Murase, J., Prabuddham, P., Hasathon, T., Khomthong N., Naklang, K., Watanabe, A., Hiroki, H., and Kimura, M.:

Methane emission from Thai paddy fields with different fertilizer applied plots. Soil Sci. Plant Nutr., 40, 63-71 (1994)

4. Murase, J. and Kimura, M.:

Methane production and its fate in paddy fields. VI.

Anaerobic oxidation of methane in plow layer soil.

Soil Sci. Plant Nutr., (accepted)

5. Murase, J. and Kimura, M.: Methane production and its fate in paddy fields. VIII. Electron acceptors responsible for anaerobic methane oxidation. Soil Sci. Plant Nutr., (submitted)  
oxidation.