

令和元年6月26日現在

機関番号：82111

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0028

研究課題名（和文）地球表面最大の炭素プールの反応性：土壌と海底堆積物の共通メカニズムの検証（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Reactivity of organic carbon on earth surface: an examination of common mechanisms between soils and sediments(Fostering Joint International Research)

研究代表者

和穎 朗太（Rota, Wagai）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター・上級研究員

研究者番号：80456748

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,000,000円

渡航期間： 11ヶ月

研究成果の概要（和文）：土壌および表層堆積物に有機物（OM）が安定化するメカニズムとして、主要構成要素である鉱物粒子との相互作用が重要だが、空間スケールに応じてその様式が異なるため、評価が難しい。本研究では、この相互作用の起点と考えられる土壌細菌と鉱物粒子の結合・集合体化に着目し、培養実験からその形成条件について今後に関わる知見を得た。また、相互作用の終点（結果）であるマクロ団粒の三次元構造評価手法の開発を進め、高精度のOM特定、団粒構造全体の自動演算を実現し、間隙とあわせて鉱物と有機物の空間的位置関係を定量的に評価することが可能になった。更に、マクロとミクロスケール現象の機能的関係性について考察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

作物の持続的な生産には土壌有機物の維持・増進が基盤となる。また、土壌有機物の増加は、大気中の炭素を隔離するため、地球温暖化の緩和策として世界的に期待されている。鉱物粒子と有機物の集合体は階層構造を持つが、その低次構造から高次構造の形成および高次構造の崩壊を予測し制御できるようになれば、劣化した農地や生態系の保全、肥沃度管理、温室効果ガス放出の削減といった社会ニーズに対応できるようになる。

既存の土壌炭素モデルでは、土壌構造と水・炭素動態は関連づけられていない。本研究成果は、これを可能にする重要なステップであり、次世代の物質循環モデル開発に必須の知見と考える。

研究成果の概要（英文）：Interaction with mineral is a major mechanism of organic matter (OM) stabilization in soils and sediments. However, the mode of interaction depends strongly on the spatial scale, which creates a big challenge in our understanding of OM-mineral interaction. At a smallest scale, we conducted incubation experiments using model bacteria and model mineral particles to gain basic information on their interaction. At a large scale, we focused on water-stable aggregate which is the outcome of OM-mineral interactions at smaller scales and developed an approach to examine 3-D inter-relationship between pore, mineral, and OM through aggregate fixation/staining of C, X-ray microCT measurement, and a series of image analyses. We also attempted to make a functional linkage between micro- and macro-scale interaction of OM and mineral.

研究分野：土壌科学

キーワード：炭素貯留 地球温暖化 鉱物・有機物相互作用 団粒 土壌有機物

1. 研究開始当初の背景

土壌には、大気 CO₂ と植物バイオマス炭素 (C) を足した値を超える 1,600Pg 以上の炭素が、そして海底堆積物には 3,000 Pg の炭素が、有機物 (organic matter, OM) として存在する。土壌および河川・海洋堆積物中 OM は、その大部分は鉱物粒子と集合体化 (団粒化) した形態で存在し、環境変化に反応しやすいという共通性を持つ巨大な炭素プールである。この炭素プールの分解および分解抑制のメカニズムが不明であることが、炭素循環および温暖化予測に深刻な不確実性をもたらしている。

先に採択された基盤 B 研究課題 (15H02810) の目的は、世界の主要土壌および表層堆積物を対象に、物理分画手法の最適化、放射光を使った先端的固体分析、同位体や鉱物組成分析などを通じて、鉱物による OM 分解抑制メカニズムを明らかにし、炭素の平均滞留時間を説明する因子解析を行い、メカニスティックモデル構築のための基盤情報を集約することであった。

有機物・鉱物の相互作用による団粒化・集合化については、団粒階層構造モデル (Tisdall & Oades, 1982, AJSS) が提案されているが、ミクロ団粒より小さいスケールでの現象について定量的情報に乏しく、OM 分解抑制プロセスのモデル化は困難なのが現状である。我々は、団粒階層モデルがサブミクロスケールにまで拡張できることを示し (Asano & Wagai, 2014) 伝説ある土壌科学の国際誌 *Geoderma* の 2014 年論文賞を得るなど、高い評価を得た。

しかし、OM 動態と団粒階層モデルの関係解明には至っていない。そのためには、微生物活動 (特に OM 分解) とミクロ団粒形成・崩壊の関係を調べ、マクロ団粒とミクロ・サブミクロ団粒の時空間的関係性の解明が必要である。そこで、これらの分野で先駆的な研究で世界をリードしてきたフランス国立農学研究所 (INRA) の Chenu 教授グループと共同研究を計画した。

2. 研究の目的

本国際共同研究では、以下の 3 点を目的とした。

マクロスケール (mm to μm サイズ) で起こる有機物・鉱物の団粒化・集合体化の評価法の確立

ミクロ・サブミクロスケール (μm to nm) で起こる有機物・鉱物相互作用の実験的評価

マクロとミクロスケールで起こる OM-鉱物相互作用の関係性の解明

以上 3 点に加え、有機物・鉱物・微生物の相互作用の解明は困難も予想される挑戦的かつ基礎基盤的な研究課題であるため、長期的に国際共同研究を進めることを念頭にいた研究者ネットワーク作りを行うことも目的とした。

3. 研究の方法

マクロスケール：団粒構造内部の鉱物、有機物、間隙の可視化と定量分析手法の確立

放射光源 X 線を利用したマイクロ CT 分析は、大型放射光施設 SPring-8 BL20XU のマイクロ CT を利用した。これは、基盤研究 (15H02810) と共通の課題として進めた。団粒構造内の有機物を可視化するために、四酸化オスミウム水溶液とチオカルボヒドラジド水溶液を用いた導電染色を行った (詳しくは、Arai et al., 2019, 下記論文業績 1)。数 μm ピクセルの超高分解能マイクロ CT 画像データの解析は、独カッセル大学 Peth 教授グループの協力を得て、Toolip プログラムを用いて、鉱物、OM、間隙分布の 3 次元構築・解析を行った。

ミクロスケール：細菌と粘土鉱物の相互作用によるミクロ団粒形成

当初は INRA 長期実験圃場のアーカイブ土壌を用いてミクロ団粒動態を調べることを目的としていたが、Chenu 教授と議論し、より基礎的なミクロ団粒形成実験に変更した。その理由は、日本の黒ボク土壌に比べて仏国シルト質農地土壌の団粒の物理的安定性が顕著に低く、ミクロ団粒の形成・崩壊を野外土壌で検出することが困難であるとの判断による。よって、より普遍的なミクロ団粒形成・崩壊プロセスの解明のため、土壌だけでなく、湖沼や海底堆積物中で起こる現象を疑似的に再現するため、モデル細菌とモデル鉱物 (2 種類の粘土鉱物) を用いた培養実験を行った。

実験には、土壌モデル細菌としてよく利用され国際的に入手可能である *Pseudomonas putida* を、土壌モデル鉱物としては 2 種類の典型的な土壌粘土鉱物 (カオリナイト、モンモリロナイト、日本粘土学会参考試料) を利用した。炭素質には同位体標識グルコース (100 per mil ¹³C-glucose) 培養液にその他の必須元素を含む無機塩 (M9) を用いた。複数条件でのパイロット実験を行った後、最終的には 4g 粘土 + 200mL of 400ppm glucose 溶液を 500mL 容器に準備し、*P.putida* を接種後、暗所で 12 日間の静置培養 (毎日 1 回 3 分間の攪拌) を行った。

マクロとミクロ・サブミクロスケールでおこる有機物・鉱物相互作用の関係性の解明

ミクロな低次構造およびミクロ団粒などから構成される高次構造（マクロ団粒）の形成と崩壊は、有機物の動態と密接にかかわると考えられているが、未だ不明な点が多い。マクロ団粒とミクロ・サブミクロ団粒の形成・崩壊と OM 動態を繋ぐ包括的な理論の構築に向けて、これまでの我々の個別な研究結果を統一的な枠組みの中で関連付け、再解釈することを試みた。そのために、これまで土壤団粒研究や細菌と鉱物粒子の相互作用の基礎的な研究を 30 年以上進めてきた Chenu 教授と土壤微生物の生態・機能の研究を独自の視点から進める Nunan 博士と議論を行い、また、フランス、ドイツ、イギリスの関連研究者との意見交換を積極的に行った。

4. 研究成果

団粒構造内部の鉱物、有機物、間隙の可視化と定量分析手法の確立

放射光源 X 線を利用したマイクロ CT 法によって、土壤 3 次元構造中の固相と間隙を定量的に評価することが可能になりつつあるが、固相中の鉱物と有機物を見分けることは困難であった。近年、Chenu 教授らはオスミウムが選択的に不飽和脂肪酸と結合する性質を利用し、X 線透過率の違いから土壤 OM を可視化する手法を開発した (Peth et al., 2014, SBB)。我々は、この手法をより高空間分解能での解析に応用するために、前処理法と有機物染色法の改良を基盤 B 研究 (15H02810) と共通の課題として進めた。

具体的には、四酸化オスミウム水溶液とチオカルボヒドラジド水溶液を用いた電子染色による前処理法と X 線 CT 法を組み合わせることで、より低濃度あるいは微小サイズの OM 検出に成功した。団粒切断面に対しては SEM/EDX を用い、団粒 3 次元構造に対しては X 線 CT を利用し、それぞれの分析で数マイクロメートルサイズのオスミウム染色部位を確認し、手法開発論文として発表し (Arai et al., 2019, 下記論文業績 2)、国際学会でも高い関心が寄せられた。

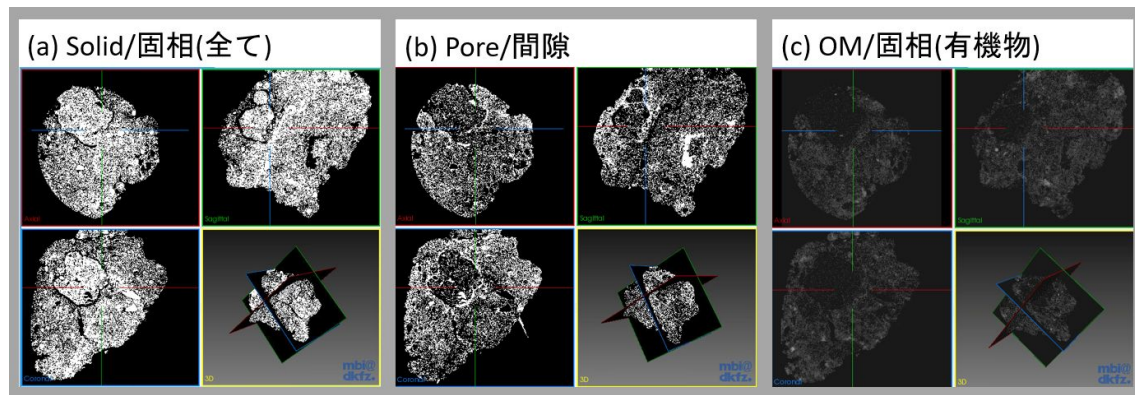


図1. Toolipによる500 μ m径団粒の構成要素の可視化の例。ToolIPを用いて画像演算し、(a)白:固相、(b)白:間隙、(c)白:オスミウム染色部位(=有機物)。

改良した手法により、高空間分解能 (0.5 μ m) で X 線 CT 画像データを得ることに成功したが、膨大な情報を精密に処理し、2次元・3次元再構成画像から鉱物、OM、間隙分布を定量的に評価するには、X 線 CT の撮影条件だけでなく画像演算の条件検討という障壁があった (1 団粒の CT データは基本的な画像処理だけで計 60GB を越える情報量)。そこで、新たに独カッセル大 Peth 教授グループの協力を得て、画像データ処理に特化した解析ソフト ToolIP を用いて解析プログラムを作成し、以下の解析を行った。

- A) 取得画像の全領域からのリングアーチファクトなどのノイズの低減
- B) ノイズの除去と OM の特定
- C) 取得画像からの団粒全領域の抜き出し

以上の解析から、Arai et al.(2019)よりも確実な OM 位置の特定、団粒構造全体の自動演算が可能となり、間隙とあわせて鉱物と OM の空間的位置関係を定量的に評価する手法を確立することに成功した。図 1 は、TOC = 10% の有機物に富むアロフェン質黒ボク表層の耐水性団粒の例であるが、同様に TOC=5% の黒ボク、有機物含量の低い強風化熱帯土壤の団粒にも、この手法が適用できることを確認した。一方、X 線 CT 測定の最適条件検討など、更に手法を最適化するための課題も認識することができた。

これによって、世界最高レベルの空間分解能をもって間隙に面した OM と鉱物マトリックスに囲まれた OM を見分ける、土壤水分ポテンシャル対応してどのサイズの間隙に水が残存しやすいか等の評価が初めて可能となった。

バクテリア・粘土複合体の形成実験

まず、パイロット培養実験から、本培養条件において初期 50 時間で 10^{+7} 程度まで *P.putida* が急速に増殖し、その後は菌数は一定となることを確認した。

本実験では、glucose 培養液に *P.putida* のみ添加したコントロール、glucose 培養液に鉱物粒子のみを加えたコントロール、それに *P.putida* を加えた処理区を準備し、3 連で 12 日間 (25 度) 培養を行った。培養後のサンプルの一部を希釈し SEM 観察したところ、カオリナイト実験系では、バクテリア増殖に伴い直径 5-10 μm の団粒の形成が一部観察された (図 2 左下、右下)。しかし、無菌コントロールにおいても非生物学的に団粒化した小型団粒が観察された (図 2 右上)。バクテリア団粒は丸みを帯び、やや大型という傾向はあるものの、SEM などイメージ分析から定量的に評価することは困難であった。そこでレーザー回折による粒径分布の比較を行ったが、ここでも一貫した変化は検出されなかった。モントモリロナイト実験系においても同様の結果であったが、剥離・分散しやすい膨潤性粘土であるため、SEM による定性的評価においても、バクテリア増殖による団粒化を検出することはできなかった。

以上の結果から、培養条件の再検討が必要であることが分かったが、本実験から得られた一連の研究アプローチ (単一の微生物の培養、微生物・鉱物混合培養、培養後の評価) は、今後幅広い研究に応用することができる技術である。将来的には、これらの集合体を対象に、同位体顕微鏡を用いた標識炭素と鉱物のナノスケール相互作用の評価および X 線 CT 技術を用いた 3 次元構造評価を行うことも視野に入れている。

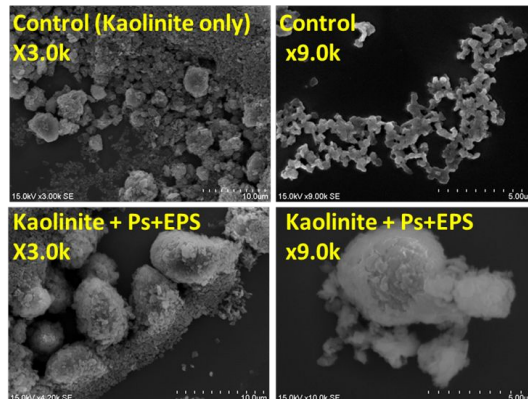


図2. 走査型電子顕微鏡による培養実験後の粘土・バクテリア集合体の観察。

倍率: x3000, x9000, x3000, x9000 (左上から時計回り)

マクロ団粒とミクロ・サブミクロ団粒の関係解明

マクロ団粒とミクロ・サブミクロ団粒の形成・崩壊と OM 動態を繋ぐ包括的な理論の構築に向けて、有機物・鉱物の相互作用から形成される団粒構造の階層性に着目したフレームワークから、これまでの我々の研究を整理した (図 3)。

a) 最も高次構造を持つものとして 250 μm 以上の耐水性団粒を研究対象とした。この階層レベルでは間隙が重要となることが、上述の X 線 CT を利用した研究から分かってきた。この高次構造の研究はこれまでも数多く、物質循環の視点だけでなく、団粒形成による土壌侵食低減など土壌物理学的な視点からの研究も多い。

Chenu 教授、Nunan 博士との 1 年を通じた議論、およびミクロスケールの土壌プロセス解明を目指した研究を進めている欧州の土壌物理学達との議論から、土壌構造のなかでも「微生物ハビタットは、酸素や水や基質の供給が間隙に集中している」ことの重要性を認識するようになった。また、ガスや水移動を重要視する土壌物理学者の中には、団粒構造の重要性は認めず、現場土壌 (あるいは非破壊的に採取した土壌コア) の間隙の 3 次元ネットワークのみに注目する研究者もあり、貴重な議論ができた。その過程で、間隙ネットワークの変化の予測ができないことが大きな問題となっていることも分かった。そこに、OM 動態が駆動する団粒の形成・崩壊が関与している可能性が高いため、土壌物理学との具体的な接点や課題を発見できた。

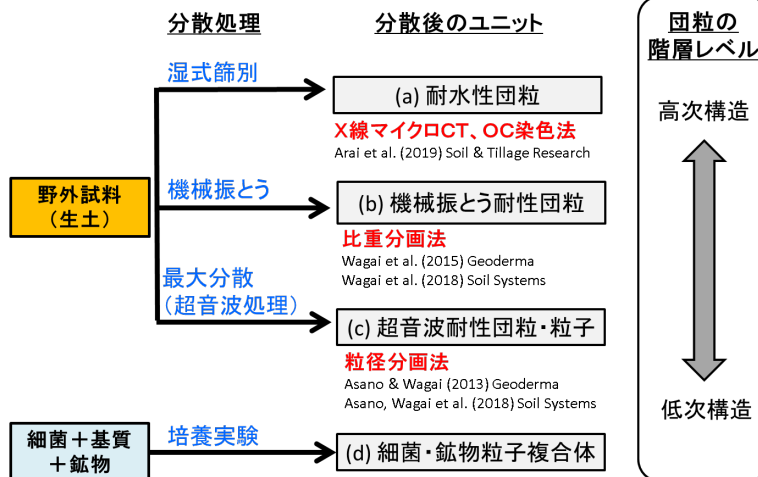


図3. 本研究で用いた土壌の分散前処理、物理分画法によって得られる物質の名称と団粒構造の階層レベルの関係

b) 1 つ下の構造として機械振とうで破壊されない程度に強固な団粒を対象にする階層レベルがある。ここでは、OM と鉱物 (特に活性 Fe, Al) の結合が重要であることが、基盤 B 研究

(15H02810)による比重分画法を用いた研究から分かった。つまり、低比重の植物リターから供給される微生物変性作用を受けた OM と高比重である鉱物の化学風化によって供給される活性金属 (Fe, Al) が結合することで中比重画分に、これらの成分が共局在することが、幅広い世界の酸性～中性土壌の共通パターンとして認められた(論文準備中)。また、OM 供給と分解のバランスによって、共局在パターンが予測的に変化することも分かってきた(Wagai et al., 2018, Soil Systems)。一方で、共局在する中比重の機械振とう耐性団粒の中で、実際にどのような仕組みで OM 安定化が起っているか、この階層からはわかり得ない。

c) そこで団粒を最大分散した後で得られる粒子を調べたところ、OM の多くは 2 μm 以下のサイズのマイクロ・サブマイクロ団粒として存在していることが分かった(基盤 B:15H02810 の成果)。この実際の土壌から実験的に分離可能な最も低次構造に内在する OM・鉱物の相互作用をナノスケールで調べたところ(STXM 分析) C と Al, Fe に空間的相関が見られた。つまり、超音波耐性微粒子の中においても、OM と Al, Fe は共局在しており、そのような部位が接着物質として機能することにより、強固な団粒構造が発達することが示唆された(Asano, Wagai et al. 2019, Soil Systems 下記論文業績 2)。

d) 上記 の培養実験は、実験的・人工的に c) に類似する複合体を形成することを目指したが、今後、実験材料や培養条件の検討が必要であることが分かった。

以上の考察から、包括的な理論の構築には至らなかったものの、ミクロスケールにおける有機物と鉱物の相互作用メカニズムからマクロ団粒スケールにおける間隙、有機物、鉱物、および微生物の関係までを統合的に捉えるための重要な足がかり(1つの視座)を得ることが、本研究を進めることによって可能になったと考える。また、本研究によって、多くの欧米の土壌学者、生物地球化学の研究者と議論し、ネットワークを築くことができた。その交流を通じて、自分自身の研究に手応えを感じることもできたため、今後、更に研究を進めていきたい。

<引用文献>

Peth, S., et al. (2014). "Localization of soil organic matter in soil aggregates using synchrotron-based X-ray microtomography." *Soil Biology and Biochemistry* 78(0): 189-194.

Wagai, R., et al. (2018). "Distinctive Roles of Two Aggregate Binding Agents in Allophanic Andisols: Young Carbon and Poorly-Crystalline Metal Phases with Old Carbon." *Soil Systems* 2(2): 29.

5 . 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文](計2件)

1. Arai M, Uramoto G-I, Asano M, Uematsu K, Uesugi K, Takeuchi A, Morono* Y, Wagai R (2019) An improved method to identify osmium-stained organic matter within soil aggregate structure by electron microscopy and synchrotron X-ray micro-computed tomography. **Soil and Tillage Research** 191: 275-281.
<https://doi.org/10.1016/j.still.2019.04.010> 査読有り
2. Asano, M., Wagai, R., Yamaguchi, N., Takeichi, Y., Maeda, M., Suga, H., Takahashi, Y. (2018) In search of a binding agent: nano-scale evidence of preferential carbon associations with poorly-crystalline mineral phases in physically-stable-clay-sized aggregates. **Soil Systems** 2(2), 32; <https://doi.org/10.3390/soilsystems2020032> 査読有り

[学会発表](計5件)

1. 荒井見和、浦本豪一郎、浅野真希、諸野祐樹、上杉健太郎、竹内晃久、岩崎巨典、和穎朗太。団粒の三次元構造内部の間隙および有機物の空間分布の特徴：放射光源を利用したX線CT法とOs染色法の応用。日本土壌肥料学会2018年神奈川大会 2018年8月29-31日
2. Arai M, Uramoto G-I, Asano M, Uematsu K, Uesugi K, Takeuchi A, Morono Y, Wagai R. Facing pore or solid matrix? Location of organic matter in macroaggregates from two volcanic soils of contrasting C levels, examined by synchrotron-based X-ray CT. Workshop on "Elucidating microbial processes in soils and sediments: Microscale measurements and modeling" (国際学会) 2018年6月26-29日

3. Arai M, Uramoto G-I, Asano M, Uematsu K, Uesugi K, Takeuchi A, Morono Y, Wagai R. Quantifying aggregate structure of contrasting carbon levels in Andisol by synchrotron-based X-ray microtomography. European Geosciences Union General Assembly 2018 (国際学会), Vienna, Austria. 2018年4月9-13日
4. Rota Wagai, Masako Kajiura, Maki Asano, Yudzuru Inoue. Isotopic enrichment of C-13 and N-15 with older radiocarbon age for the organo-mineral aggregates from low- to higher density soil particles: evidence of mineral protection? European Geosciences Union General Assembly 2018 (国際学会), Vienna, Austria. 2018年4月9-13日
5. Rota Wagai, Maki Asano, Masako Kajiura. Binding agents for aggregation in some Andisols: organic vs. inorganic binders. Workshop on Formation, Properties and Function of Soil Microaggregates, Munich, Germany(国際学会)2017年10月10-12日 <招待講演>

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

6. 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：クレア シェヌ

ローマ字氏名： Claire Chenu

所属研究機関名：フランス国立農学研究所 (INRA-Grignon/AgroParisTech)

部局名：農業生態系部門：UMR Ecosys (Ecology and Ecotoxicology of AgroEcosystems)

職名：教授 (Professor, Chair of Soil Science)

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：シュテファン ペス (教授、土壌科学科、カッセル大学、独)

ローマ字氏名： Stephan Peth
professor, Dept of Soil Science, University of Kassel, Germany

研究協力者氏名：ニーシャ ヌナン (上席研究員、国立生態学・環境科学研究所、仏)

ローマ字氏名： Naoise Nunan
Senior Scientist (Lab head), Institute of Ecology & Environmental
Sciences IEES-Paris,

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。