

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2015～2017

課題番号：15KT0036

研究課題名 (和文) 失われた地力の回復を担う土壌団粒：団粒構造内部の窒素の存在形態と微生物の代謝活性

研究課題名 (英文) Examination of soil aggregate structure, chemistry, and microbiology to enhance soil fertility

研究代表者

和穎 朗太 (Wagai, Rota)

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) 12,800,000 円

研究成果の概要 (和文)：黒ボク土や熱帯強風化土壌を含む調査土壌において、長期堆肥連用や不耕起・残渣投入により有機CおよびNの一部は比較的強固な団粒中に蓄積することが分かった。しかし蓄積Nの特徴は、アルカリ可溶性成分の化学分析から検出はできなかった。

有機Cの染色と放射光源X線マイクロCT分析から、マクロ団粒内部の有機物を0.5μm空間分解能で可視化することに成功した。有機物投入量が減ると、微生物生息空間である空隙に露出する有機物の割合が低下し、鉱物粒子に付着した微小な有機物の割合が増加することが分かった。物質移動、有機物動態、微生物活動を団粒三次元構造 (共通フレームワーク) 内で理解するための新たなアプローチを提示した。

研究成果の概要 (英文)：Long-term soil conservation practices (compost addition, no-tillage) led to the accumulation of organic matter (OM) including organic N in the aggregates of intermediate density range as well as in low-density fraction. Despite characterization of alkali-soluble organic N, the chemical nature of the accreted N remained unclear. Using synchrotron-based X-ray computer tomography with Os staining of OM, we developed a method to visualize OM localization within macroaggregates at spatial resolution of 0.5 micron. Upon the decline in OM input to soil, the proportion of OM exposed to pores within macroaggregates declined and that of OM attached to solids increased. The approached developed here would make it possible to examine material transport, OM dynamics and microbial activity from the common physical framework of 3-D aggregate structure.

研究分野：土壌科学、生物地球化学

キーワード：土壌有機物 有機炭素 有機窒素 団粒構造 微生物群集組成 農地管理 保全型農業 トモグラフィ

### 1. 研究開始当初の背景

自然生態系の破壊や化成肥料を過剰に投入する収奪的農業は、土壤表層の団粒構造を破壊する。これに伴う土壤の物理、化学、生物学的機能の劣化は、土壤浸食、硝酸の水汚染、温室効果ガスの増加、そして地球規模の炭素・窒素循環の攪乱を引き起こしている。この土壤機能を回復させ本来の物質循環を取り戻すための重要な方策として、土壤団粒形成の促進と地力窒素の効率的利用が挙げられる。

植物が利用可能な無機化された窒素(地力窒素)の給源は有機態窒素である。近年の研究から、その大部分はペプチド類(タンパク質起源)であり、土壤団粒あるいは鉱物と結合する有機物として存在することが分かってきた。しかし、「微生物分解されやすいはずのペプチド類が、どのような仕組みで土壤団粒中に長期的に貯留し、継続的な地力窒素の供給を可能にしているのか」という土壤肥沃度と窒素循環を考える上で最も根本的と言える問題が未解明である。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、この大きな問題を解明するための第一歩として、農耕地土壤(表層)を対象に、不耕起栽培・無肥料区と耕起栽培・化成肥料区と比較を行い、土壤団粒構造の形成と団粒内部の窒素形態および微生物生態に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

調査地は日本(複数地点)および熱帯(インドネシア1地点)の20年以上継続されている連用試験圃場とした。日本の調査地は、代表的な農耕地土壤である黒ボク土及び非黒ボク土(褐色低地土、黄色土)の長期連用圃場で、冬小麦・大豆の輪作体系からなり、堆肥区では稲わら堆肥が毎年投入されている。また茨城県つくば農研機構・農業環境変動研究センター(農環研)の圃場では、不耕起(No-Till)に加え落葉堆肥の投入がされてきた。インドネシア調査地では、強く風化を受けた Ultisol の土壤タイプで、トウモロコシ、大豆、休閒のローテーション栽培が行われ、省耕起(ほぼ不耕起)と耕起処理、および化成窒素投入量の処理を組み合わせた4反復プロットが24年間維持されてきた。

よって、各調査地において耕起栽培・化成肥料区を対照区とし、堆肥区(Comp区)、不耕起栽培区(NT区)あるいは不耕起+堆肥区(NT+Comp区)を比較した。

土壤理化学分析手法は多岐にわたるため、以下の研究成果と同時に説明を加えた。

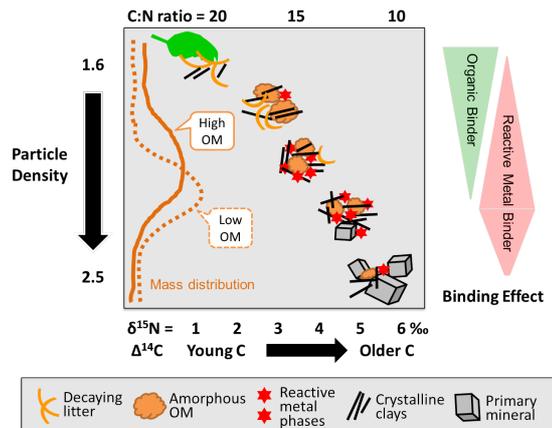
### 4. 研究成果

#### A. 植物残渣と団粒中有機物の分離評価

植物由来の粗大有機物(例:枯死根や収穫残渣)の比重は低く、粘土が付着しても

1.8-1.9 g/cm<sup>3</sup>を越えることはない。一方、鉱物粒子(比重 2.6 g/cm<sup>3</sup>前後)を主体とする土壤団粒の比重は高い。よって、比重分画法を用いて各連用試験圃場の C、N の存在割合を調べた。非黒ボク土(褐色低地土、黄色土)では、低比重画分だけでなく、1.9-2.5 g/cm<sup>3</sup>の団粒画分において対照区に比べ Comp 区で約2倍の C、N の増加が見られた。一方、東京、山梨の黒ボク土では、堆肥連用による C、N の増加は低比重画分に止まった。

この黒ボク土の堆肥連用に対する異なる応答の詳細を調べるため、農環研圃場の NT+Comp 区から裸地管理区まで毎年の有機物投入量が大きく異なる4つの黒ボク土を比重分画および各画分の化学分析を行った。ここから、土壤鉱物学的要因(非晶質および遊離の鉄、アルミニウム濃度が高い)により有機物分解が遅く、分解途中の有機物が接着物質として団粒化を促進するため、有機物投入量の増加に伴いより低比重画分側に耐水性団粒が形成され(下図左側点線から実線)、土壤中の鉱物粒子やマイクロ団粒もこれに引っ張られて低比重団粒の一部となることが分かった(発表論文1)。より具体的には、比較的新しい植物由来の有機物が接着物質となり低比重の耐水性団粒形成が起こり、微生物代謝を経た窒素に富む有機物と非晶質鉱物の複合体が接着物質となり、中比重程度の物理的にも生化学的にも安定な団粒が形成されることを示した。



From: Wagai et al. 2018 (Soil Systems) Fig. 6.

また、同じ農環研黒ボクの対照区および NT+Comp 区の土壤を用い、小型土壤動物(アメーバ)の細菌捕食による C、N 無機化が、農地管理、団粒構造、温度条件にどの程度影響を受けるかを調べた。耐水性マクロ団粒を滅菌した後、アメーバ3種およびアメーバの餌となる細菌1種を加え、24日間の培養実験を行った。予想に反して、長期的な NT+Comp 管理によって形成されたマクロ団粒構造が破壊されても、捕食圧に大きな増加は見られなかった。しかし、高温条件下(25℃)では、アメーバの細菌捕食に起因する炭素の無機化は、団粒の破壊によって有意に促進され、

低温（15℃）条件下ではそれが起こらなかった。つまり、少なくともこのような単純な土壌食物網システムでは、捕食-被食の関係には温度依存性があることが初めて示された（発表論文）。

一方、インドネシアの強風化土壌では、湿潤熱帯では有機物分解が急速に進むため、対照区に比べNT区の全土壌C、Nに殆ど差が見られなかった（C: 15.7-20.46 mg/g, N: 1.1-1.8 mg/g）。しかしバルク土壌および高比重画分（>1.6 g/cm<sup>3</sup>）のN濃度においては、NT区で対照区に比べて10-20%程度の有意な蓄積が検出された。よって、植物残渣の投入量が多いNT区では、微生物分解も早まり、ほとんどの投入Cは無機化されるが、一部のNは微生物ループを介してリサイクルされ蓄積されることが示唆される。

既存研究から、多くの土壌タイプに共通して、植物残渣よりも団粒中の有機物の分解が遅いことが知られている。よって、以上の結果をまとめると、不耕起や堆肥連用という環境保全型農地管理により有機窒素の一部は耐水性団粒中に蓄積することが示され、長期的な肥沃度（地力窒素）維持のメカニズムの一端が明らかになった。

## B. 土壌有機態窒素の評価

堆肥連用や不耕起が土壌団粒中の有機態Nの存在形態に与える影響を評価するため、a) シンクロトロン放射光源走査型透過軟X線顕微鏡（STXM）分析、b) アルカリ可溶性Nの分子量およびアミノ酸分析を行った。

a) に関しては、茨城県つくば市高エネルギー加速器研究機構の放射光施設（Photon Factory）で測定を行った。N濃度の高いComp区では微小領域（<2μm画分中の限定視野）中のNを検出することはできたものの、対照区での検出は困難であったため、このアプローチは中断した。

b) に関しては、まず各比重画分から有機態Nを可溶化するための手法検討（NaOH vs. ピロリン酸:PP）を行った。NaOHとNaピロリン酸（PP）での抽出効率に大差はないものの、PPでは有機物を結合しやすい鉄やアルミニウムも同時に可溶化できるため、これを採用した。PPによって可溶化した有機態窒素は分子量分布を調べ、また一部は塩酸加水分解処理を行った後、アミノ酸組成分析を行った。

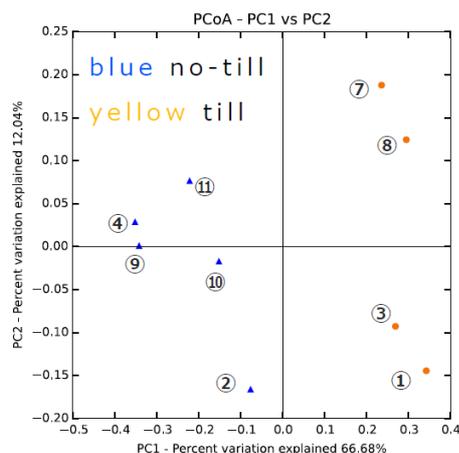
上述の褐色低地土ペアの各比重画分中の全Nのうち10-30%がPP可溶性であった。分子量分布を液体クロマトグラフィー法から調べたところ、対照区とComp区に大きな差は見られなかったが、植物残渣主体の低比重画分側では高分子Nの割合が高く、高比重/団粒化画分では低分子Nの割合が高まるとい

う傾向が見られた。更に、アミノ酸組成分析から、主要成分はGlycine、Asparagine、Glutamine、Alanineであり、過去の農地土壌の熱水抽出から得られた結果と類似したが、対照区とComp区において、農地管理による顕著な組成変化は見られなかった。

## C. 団粒中の土壌微生物群集の評価

当初、団粒サイズごとの微生物活性を培養実験や易分解性基質を取り込む微生物群の特定（SIP-DNA）で調べることを検討したが、技術的に困難であるため、時間および予算的観点から断念した。

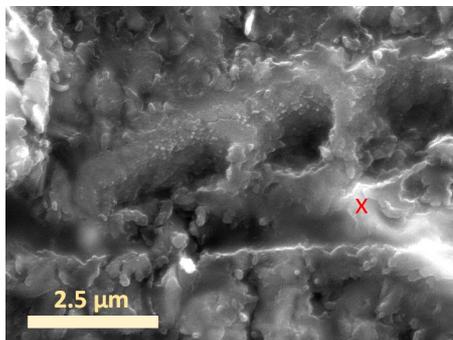
代替案として、土壌細菌群集の組成および多様性をターゲットとし、農地管理と土壌団粒サイズの影響を評価した。農環研の黒ボク土を対象に、先ずDNA抽出・PCRの検討を行った（ISOIL DNA extraction kit 使用）。次に、耐水性マクロ団粒（>250μm）とミクロ団粒（53-250μm）を用いて、NGSによる16S rRNA遺伝子解析を行った。対照区とNT+Comp区では、土壌炭素および微生物バイオマス量が約2倍違うものの多様性に違いは見られなかった。更に、UniFracによる類似性解析から、対照区とNT+Comp区の団粒の土壌細菌群集の組成は団粒サイズに関わらず一貫して異なること、またNT+Comp区に比べ有機物に乏しい対照区では団粒サイズ間で群集組成のバラツキが増大する傾向が得られた。しかし反復の少なさ、および同一団粒を用いたゲノム分析と団粒物理構造・化学分析の評価が困難であることから、今後の研究に繋げる予定である。



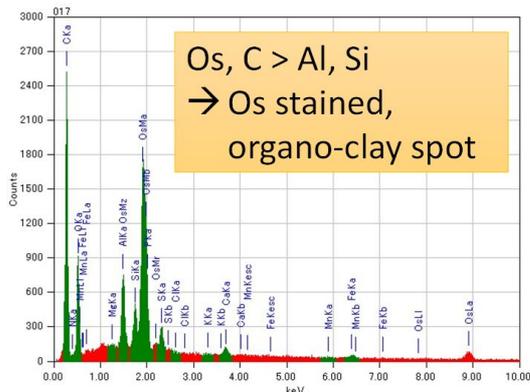
また、農環研黒ボク対照区とNT+Comp区のマクロ団粒を用いて、団粒内部に生息する微生物を定量するための手法検討を行った。幾つかの手法を考えたが、最終的に、分離した耐水性団粒を個別に超音波分散し団粒内部間隙に生息する微生物を露出させた後、SYBR Green 染色し、蛍光顕微鏡によるセルカウントを行うアプローチが有効であることが分かってきた。

## D. 団粒構造と内在する有機物の可視化

つくば農環研の黒ボク土およびインドネシア土壌の対照区と NT 区を対象に、耐水性マクロ団粒の三次元構造と内在する有機物の評価を行った。Pethら(2014)は、TEM 分析で用いられてきたオスミウム (Os) による C (不飽和脂肪酸) の選択的染色を初めて土壌団粒に応用したが、気相で染色が行われ、植物残渣のような高 C, N 濃度かつ粗大な有機物のみが可視化された可能性が高かった。そこで我々は、海洋堆積物用に改良された Uramotoら(2014)の手法と Ohtaら(2012)の触媒染色法を用い、団粒中の有機物染色を行った。樹脂包埋後、一部の団粒を切断し、切断面の電子顕微鏡観察 (SEM/EDX、下図) を行い、団粒内部の植物残渣のみならず数ミクロンサイズの不定形有機物 (微生物残渣あるいは代謝物) が染色された事を確認した。

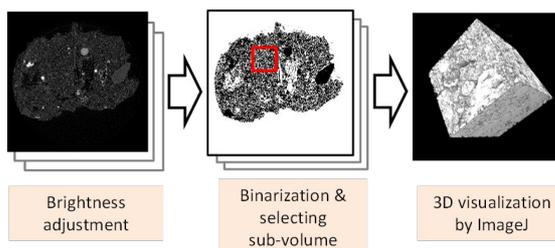


農環研黒ボク対照区マクロ団粒、切断面の SEM



団粒切断面 SEM 右部 (X) の EDX 点分析結果

次に、団粒三次元構造内の Os 染色部位 (有機 C, N の存在部位) を可視化するため、放射光源 X 線を利用したコンピュータ断層撮影 (μCT) による分析を行った (Spring-8、BL20XU)。X 線 μCT 測定後のデータは再構成、輝度調整後、画像にアーチファクトがない部分を選択し、三次元化した (下図)。



このアプローチは、黒ボク土では機能したものの、インドネシア強風化土壌については、X 線吸収率の大きく異なる粒子の存在により、画像の一部が乱れ、現状のイメージ解析ツールでは分析することができなかった。

この一連の画像処理を Os 原子 L 吸収端前後の 2 つの X 線エネルギーで行った (下図 a, b)。この両者の X 線 CT 画像の差分から、有機炭素の存在部位 (Os 吸収端より高い X 線エネルギーで X 線吸収率が増加する部分) を示すことができた (下図 c, d)。

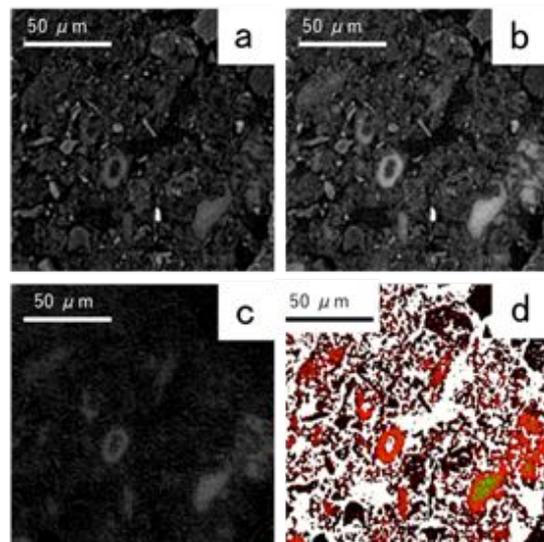


図. NT 区マクロ団粒の Pre- (a)、Post-edge images (b)、差分画像 (c)、Os 差分画像の輝度により色分けした図 (d)。赤から緑へのグラデーションは輝度 (低から高)、つまり Os 濃度に対応。

本研究のイメージ分析は 0.5 ミクロンの空間分解能であり、これは過去の土壌団粒研究に比べて空間分解能が約 6-20 倍高く、重要な技術革新と言える。団粒構造中の有機態 N を含む有機物の存在形態および挙動を、土壌細菌 (1 ミクロン) に匹敵するスケールで理解する足がかりを得た。

X 線 μCT 装置で測定したデータの解析は、膨大な量とソフトウェアの限界から難航したため、三次元構造全体の解析は一端中断し、団粒を一定以上のランダムな距離で輪切りにした断面 (二次元) 画像に絞り、有機物と空隙および土壌固相の位置関係を GIS ソフトを利用して進めた。

農環研黒ボクの対照区、NT + Comp 区それぞれから得られたマクロ団粒 3 粒 (各団粒から 7 断面) を比較したところ、識別された有機物の塊 (上図 d) の境界長のうち、空隙に接する割合は NT+Comp 区で高く、固相に接する割合は対照区で有意に高いという結果を得た。この結果から、微生物は空隙に生息することから、空隙に接する有機物から分解活動が起こるため、NT+Comp 区に比べて有機物投

入が少なく微生物による分解が早く進む対照区では、間隙に接する有機物の割合が減少することが示唆された。

これまで環境保全型農業により団粒形成が促進できることは示されていたが、団粒内部における有機物と微生物の定量的関係を調べることは非常に困難であり、団粒の形成・崩壊が土壌の物理化学、生物学的な諸機能に及ぼす影響を調べる際の大きな障壁となっていた。本研究で開発したアプローチはこの壁を突破する有効な手段として期待できる。

#### <引用文献>

Ohta, K., Sadayama, S., Togo, A., Higashi, R., Tanoue, R., Nakamura, K. 2012. Beam deceleration for block-face scanning electron microscopy of embedded biological tissue, *Micron* 43, 612-620.

Peth, S., Chenu, C., Leblond, N., Mordhorst, A., Garnier, P., Nunan, N., Pot, V., Ogurreck, M., Beckmann, F. 2014. Localization of soil organic matter in soil aggregates using synchrotron-based X-ray microtomography. *Soil Biology & Biochemistry* 78, 189-194.

Uramoto, G. -I., Morono, Y., Uematsu, K., Inagaki, F., 2014. An improved sample preparation method for imaging microstructures of fine-grained marine sediment using microfocussed X-ray computed tomography and scanning electron microscopy. *Limnology & Oceanography: Methods* 12, 469-483.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

R.Wagai, M.Kajiura, M.Uchida, M.Asano. "Distinctive Roles of Two Aggregate Binding Agents in Allophanic Andisols: Young Carbon and Poorly-Crystalline Metal Phases with Old Carbon" *Soil Systems*. 2018, 2(2), 29  
<https://doi.org/10.3390/soilsystems2020029>

G.Zhan, R.Wagai, S.Yonemura. "The effects of amoebal bacterivory on carbon and nitrogen dynamics depend on temperature and soil structure interaction" *Soil Biology Biochemistry* 94:133-137. 2016

和穎朗太「陸域最大の炭素・窒素プールを制御する土壌微生物と土壌団粒構造」土

と微生物 70:3-9. 2016.

〔学会発表〕(計 7 件)

M.Arai, G. Uramoto, M.Asano, Y.Morono, K.Uesugi, A.Takeuchi, N.Iwasaki, R.Wagai. "Quantifying aggregate structure of contrasting carbon levels in Andisol by synchrotron-based X-ray microtomography" *European Geosciences Union 2018 Annual Assembly 2018*

R.Wagai, M.Asano, M.Kajiura. "Binding agents for aggregation in some Andisols: organic vs. inorganic binders" *Workshop on Formation, Properties and Function of Soil Microaggregates*. Munich, Germany 【招待講演】 2017

R.Wagai, M.Kajiura, M.Asano. "How organic matter interacts with mineral to form aggregates: a density-based approach using soils from a long-term field experiment" *6th International Symposium on Soil Organic Matter*, Rothamsted Research, Harpenden, UK. 2017

荒井見和、浅野真希、浦本豪一郎、諸野祐樹、和穎朗太。「X線 CT 技術を用いた土壌団粒中の有機物と間隙構造の可視化」土壌肥料学会 2017 年大会

池谷 康祐・森泉 美穂子・松永 俊朗・和穎 朗太。「長期堆肥連用により蓄積する土壌窒素の存在形態を探る」土壌肥料学会 2016 年大会

R.Wagai. "Studies on soil organic matter dynamics and organic-mineral aggregation towards land sustainability" *Max-Schonleutner Award, Technische Universität München* 【招待講演】 2016

R.Wagai, M.Asano, M.Kajiura. "Soil aggregate structure and its implications for microbial ecology: location and quality of substrates for heterotrophs" *Japan-Taiwan-Korea Symposium on Microbial Ecology (JSME)* 【招待講演】 2015

〔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

### (1) 研究代表者

和穎 朗太 (WAGAI, Rota)

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

### (2) 研究分担者

長尾 (浅野) 眞希 (ASANO, Maki)

筑波大学・生命環境科学研究科・助教

研究者番号：80453538

濱村 奈津子 (HAMAMURA, Natsuko)

九州大学・理学研究院・准教授

研究者番号：50554466

森泉 美穂子 (MRIIZUMI, Nahoko)

龍谷大学・農学部・准教授

研究者番号：10220039

### (3) 連携研究者

諸野 祐樹 (MORONO, Yuki)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・高知コア研究所・グループリーダー代理

研究者番号：30421845

### (4) 研究協力者

浦本 豪一郎 (URAMOTO, Go-Ichiro)

研究者番号：70612901