

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 13 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00652

研究課題名(和文) 里山林を対象とした一時的水域における落葉の分解過程

研究課題名(英文) Leaf decomposition at temporary water area in Satoyama forest

研究代表者

河内 香織 (Kochi, Kaori)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：50423984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：河川最上流部では、森林から落下した落葉は林床や細流に多量に供給され、降雨によって陸域と水域が頻繁に入れ替わる。本研究はこの一時的水域を対象として分解実験を行った。その結果落葉の分解速度および分解に関わる無脊椎動物群集は、落葉の分解が進行する場所や順番によって異なることを明らかにした。また、里山林内の陸上の落葉・半陸上(水流に近く湿った土壌)の落葉・陸上の土壌・水中の落葉・水中の落枝の5基質に見られる菌叢を次世代シーケンサーを用いて特定し各菌叢の特色について検討した。多様なバクテリア群集が解読され群集構造は基質によって異なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

森林は世界の陸上面積の約3割を占める最も一般的なバイオームで、その一次生産のうちの9割が腐食連鎖に移行する。日本国内には広く温帯林が分布しており、森林上部から落下する落葉や落枝(リター)量は多い。森林を流れる河川最上流部の細流は、降雨の影響を受け同じ場所が陸域や水域に変化する一時的水域である。このような場所での落葉に分解に関する知見は乏しい状況下で、開発や人工構造物の設置が行われていることが多い。本研究は森林内の一時的水域における落葉の分解速度と分解に関わる生物、およびバクテリア叢を明らかにし、河川最上流部の有機物分解のシステムの解明の一端を担った。

研究成果の概要(英文)：Leaves, flowers and other plant litter are important food and habitat resources for stream organisms where riparian forests cover stream water column. In river head, temporary water area, namely terrestrial and aquatic environment appears alternately is observed. This study investigated leaf litter decomposition and associated macro-invertebrates in the temporary water area. Bacterial community associated with the leaves on soil, in stream and other different conditions were estimated using a next generation sequencer. Under four different conditions, decomposition rate was fastest in the stream throughout the experimental period. Bacterial community (order) were similar between leaves on soil and wet soil.

研究分野：河川生態学

キーワード：水生昆虫 細流 落葉分解速度 源流部 有機物分解

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

温帯林では、森林から落下する有機物のうち、7割から8割を落葉が占める。これらの枯死した有機物を起点とする腐食連鎖によって光合成に匹敵する量の炭素が無機化されており(大園2003)、物質循環を考えるうえで落葉の分解に着目することは重要である。森林域では落下した落葉は土壌または溪流に供給され、連続的な3段階のプロセスを経る。

このうち溶脱については、一般的に着水後24時間から48時間以内に、葉の可溶性有機物が溶出するため(Suberkropp, 1998, 大園, 2003), この期間に全体の数パーセントから、多いもので30%程度の葉重量を失う(例えば Taylor and BÄrocher, 1996). 溶脱量は樹種や水分状態によって異なることがわかっているほか(例えば Kaushik and Hynes, 1971; 河内&知花 2016)、溪畔から供給された落葉の物理化学的な特徴(窒素、タンニン、リン濃度、強度など)は、微生物によるコンディショニングやシュレッターの摂食速度に影響を与えるため(Arsuffi and Suberkropp, 1984), 落葉分解そのものも影響を受ける(Lecerf et al., 2007b). 落葉分解については土壌や水域それぞれで研究が行われており、関連する書籍も出版されている(大園 2003, Graca et al., 2005)。

一方、陸域と水域の入れ替わる、いわゆる一時的水域での有機物の挙動に関する研究は少ない。一時的水域は、里山の小溪流および接続湿地、氾濫原、砂州、ワンドやたまり等降雨や増水による水位変動が生じる場所が考えられる。これらの場所では地球温暖化によって今後水域陸域の入れ替わりがより激しくなると考えられるにも関わらず有機物分解過程の解明はほとんど行われていない。

平成24年に作成された生物多様性国家戦略2012-2020の第3章生物多様性の保全及び持続可能な利用の目標では、対象地に里地里山が含まれている。環境省の平成20年度重要里地里山選定等委託業務報告書資料3では、里地里山は国土の39.4%を占めることが報告されている。里山林の小溪流は目立たないが上述したような興味深い場所であり、天候による小溪流内のみず道の変化量も大きく変化が頻発するため、研究場所として着目するのに相応しい場所であると考えられる。

### 2. 研究の目的

上記の背景とこれまでの研究成果をもとに、本研究では里山を流れる小溪流を対象として、常緑広葉樹および落葉広葉樹の落葉の分解について研究期間内に以下2点について明らかにすることを目的とした。いずれも、上記の背景とこれまでの研究からさらに解明が必要と思われる項目である。

#### (1) 同所において陸域と水域が入れ替わった場合の落葉の分解過程の解明。

里山林に生育する多様な樹種を用いて、里山小溪流にて分解実験を行い落葉の分解速度を算出するとともに、分解に関与する大型無脊椎動物を明らかにした。

#### (2) 分解途中の落葉の細菌群集の解明。

細菌群集については、次世代シーケンサーを用いた分析から明らかにした。分解実験開始一定時間ごとに落葉をくり抜き、ゲノム抽出、精製を行った後、大学所有の次世代シーケンサーにて、解析を行った。

### 3. 研究の方法

(1) 実験にはリターバッグ法を用いた。サンプルの設置は1つの樹種につき川のみ、陸のみ、川から陸の入れ替え、陸から川の入れ替えの4条件、それぞれ5反復を設定した。

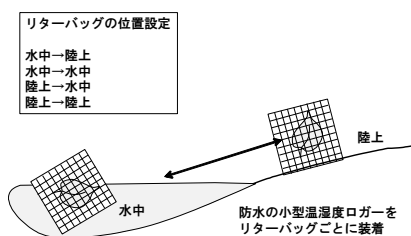


図1 リターバッグ設置のイメージ

樹種は里山に一般的に見られる常緑樹からシラカシ、ツバキ、クスノキの3種類を選定した。落葉を2019年6月に採取し、室内で一週間風乾した。その後落葉を1cm目合いの20cm四方のプラスチックバッグに防塵・防水はかりを用いて約3gずつ計量して詰め、1樹種につき20個を作成した。作成したバッグは同年の7月9日に近畿大学奈良キャンパス(34°40'24.6"N, 135°43'42.5"E)の森林内を流れる細流約30mの範囲内に設置した(写真1)。1樹種につき10個を流速0~30cm/sの水流に浸るよう設置し、鉄製のロープ止めで固定した。残りの10個はその周囲の水に浸からない陸地に設置し同様にロープ止めで固定した。また、ペンダントロガー(HOBO UA-002-64)を陸地と水中それぞれに設置し水温と照度を測定した。設置場所はなるべくアクセスしやすい箇所を選定し、2週間に一度ほどチェックして泥が溜まって目詰まりしている、もしくは河床に埋もれているようであれば掘り出して河川水で軽くすすぎ、再び設置した。1ヶ月後に設置したサンプルから水域と陸域それぞれ1樹種5サンプルずつ無作為に選び、水域と陸域とを入れ替えて(図1)さらに1ヶ月間設置し、回収した。



写真1 細流に設置したリターバッグ

回収したサンプルは冷凍庫で1~2日保管し、その後水を張ったバットにあげピンセットを使い目視で大型無脊椎動物を集め、70パーセントエタノールで固定し、その後ズーム式実体顕微鏡(ケニス LZ-LED-T)で同定、計測を行った。同定には日本産水生昆虫-科・属・種への検索(川合禎次, 谷田 一三 共編 東海大学出版部)およびその第二版を参考にした。ソーティングの際バッグに封入していた落葉は表面に付着した泥や汚れをバット内で指を使って軽くこすり落とし、その後乾燥機を用いて(三洋電機 MOV-112F) 50度で48時間させ、封筒に入れてサンプルごとに保管した後に重量を測定(ザルトリウス AZ214)した。取得したデータは統計分析フリーソフト

「R」を用いて分析し、落葉の残存率はKruskal-Wallis検定、出現生物はクラスター解析によって有意差を調べた。

葉の分解における重量減少過程は、一般に以下の指数関数モデルによって近似される。

$$M_t = M_0 \times e^{-kt}$$

ここで、 $t$  は時間(日)、 $M_0$  は初期乾燥重量(g)、 $M_t$  は  $t$  日経過後の乾燥重量(g)、 $k$  は分解速度(g/g/日)である(PETERSEN&CUMMINS 1974)。本実験では河内(2002)にならぬ実験期間中のサンプルの分解速度を求めた。また、分解速度の違いが温度によるものかを検討するため、 $t$  に時間(日)ではなく積算温度(日・度)を用いた場合の速度の算出も行った。

(2) 研究開始前年の秋に近畿大学農学部奈良キャンパス里山林内において採取した陸上の落葉・半陸上の落葉・陸上の土壌・水中の落葉・水中の落枝を解析に用いた。計5基質からゲノムを抽出し菌叢解析を行った。菌叢解析を行った各基質の反復数は、陸上の落葉・半陸上の落葉・陸上の土壌が各10サンプル、水中の落葉・水中の落枝が9サンプルであった。回収した落葉等は蒸留水に浸して表面に付着した泥を除去した。浸しても除去できないものについてはピンセットで葉柄をはさみ蒸留水に浸しつつ市販の歯ブラシで3回表面を軽く撫で蒸留水で5回すすいだ。キムタオルで軽く水分をとり、木製まな板を下敷きを用いてコルクローラーでくりぬいたものを1サンプルとした。ゲノムの抽出には抽出キット(ISOIL for beads beating)を用いた。16srRNA領域をPCRで増幅させ精製し、ナノドロップで濃度・純度を確認した後ライブラリーを作成し次世代シーケンサーMiseq(illumina 株式会社)を用いて菌叢の塩基配列を解読し、出現した菌叢を特定した。Miseqから出力されたデータには、各サンプルの16srRNAから解読することができた界門綱目科属種の各階級ごとに、出現した上位7つの名前とそれらの占める割合がパーセンテージで示される。これをもとに生物群集の類似度を多次元尺度構成法(MDS)のユークリッド距離モデルを用いて比較した。

#### 4. 研究成果

(1) リターバッグは平均して4~5個ほど回収できたが、川は全体的に回収できた数が少なく、特にシラカシは1バッグしか回収できなかった。調査期間中に調査地に台風が接近したこともあり、急な増水が起こり流された、もしくは堆積物に埋もれてしまったと推測された。落葉の残存率は樹種間で有意差は認められなかったが、条件別では川、川陸、陸川、陸の順に低かった。実験期間中の積算温度は陸、陸川、川陸、川の順で高かった(図2)。

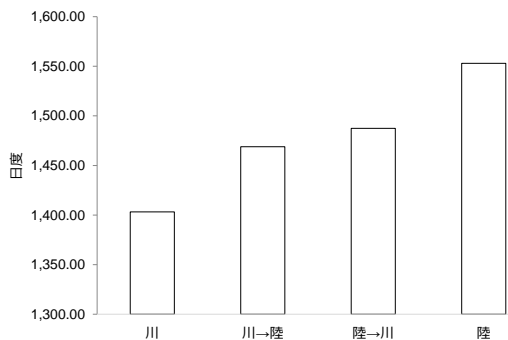


図2 実験期間中の積算温度

分解速度  $k$  (g/g/日) の算出結果は PETERSEN & CUMMINS (1974) にしたがって、算出に経過時間(日)を用いたものは陸のクスノキとツバキ、陸川のクスノキを除いて全て「速い」となった。積算温度を用いたものは全て「遅い」となった。本研究では落葉の分解速度と温度の対応は認められなかった。

出現生物は、川、川陸、陸川においてユスリカ目が約半数を占めた。川と陸川ではミズムシ科、ヒメガガンボ亜科がそれに次いで見られた。川陸では水生生物がほぼ見られなくなり、トゲダニ亜目等陸上の生物が主に出現した。陸ではそれに加えハガヤスデ科等の陸上生物のみが出現した。樹種間、条件間で出現生物の有意差は認められなかったが、出現生物の

物群集の個体数を用いたクラスター解析の結果、川と陸川が最も近く、次いで川陸で、陸で出現した生物の種数が最も異なるという結果になった(図3)。

初期に川に設置されていたサンプルの分解量が特に多く、落葉が分解初期に水中にあることは後の分解過程に影響を及ぼすと考えられた。水中に設置された際の溶脱によって分解が進行したと考えられる。似たような条件の川陸と陸川においては前者の方がより分解が進んでいた。このことから落葉が分解の初期段階に水中に存在し、溶脱および微生物によるコンディショニングが行われる事はその後陸域水域どちらにおいても分解速度に大きな影響を及ぼすものと思われる。川と陸川ではヒメガガンボ亜科とミズムシ科が、陸ではハガヤスデ科が主に分解に関わったとみられる。川陸では陸で分解に関わったとみられる種が出現しなかったため、分解は主に水域で進んだのだろう。水域での分解の影響で陸域でトビムシ目等の出現が増加し、さらに分解が進行、加えてトゲダニ亜目等捕食者の増加につながった可能性がある。

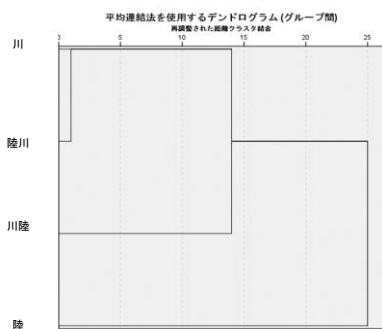


図 3 設置場所ごとに出現した生物種の個体数を用いたクラスタ解析結果

Alphaproteobacteria 網、半陸上の落葉・水中の落葉群集では Betaproteobacteria 網であった。なお Betaproteobacteria 網はアンモニアを酸化することで亜硝酸を生じる、様々な植物の窒素固定に重要な役割を演じる網である。陸上の落葉と土壌からは Rhizobiales 目が出現割合が最も高かった。半陸上の落葉、水中の落葉と落枝からは Burkholderiales 目が多く出現した(表 1)。

表 1 基質ごとに出現したバクテリア上位 3 目の出現割合 (%)

陸上の落葉	出現割合 (%)
Rhizobiales	13.0
Burkholderiales	13.0
Sphingomonadales	9.6
半陸上の落葉	
Burkholderiales	13.6
Stigonematales	6.7
Sphingobacteriales	5.3
陸上の土壌	
Rhizobiales	9.0
Rhodospirillales	6.3
Sphingobacteriales	5.3
水中の落葉	
Burkholderiales	32.7
Xanthomonadales	9.4
Flavobacteriales	8.5
水中の落枝	
Burkholderiales	19.7
Sphingomonadales	10.5
Rhodobacteriales	10.4

(2) 陸上の落葉から 2 界 8 門 10 綱 14 目 23 科 29 属 34 種、半陸上の落葉から 2 界 11 門 10 綱 17 目 27 科 30 属 31 種、陸上の土壌から 3 界 7 門 9 綱 13 目 19 科 28 属 21 種、水中の落葉から 1 界 11 門 9 綱 15 目 17 科 20 属 28 種、水中の落枝から 3 界 11 門 12 綱 14 目 21 科 25 属 36 種の微生物が判別された。門以下については場所ごとの生物群集の類似度を多次元尺度構成法 (MDS) のユークリッド距離モデルを用いて解析を行った。MDS の結果、門については各群集の類似は見られなかった。綱については 5 つある群集のうち水中の落葉群集のみが類似していなかった。目から属については陸上の落葉の群集・半陸上の落葉の群集・陸上の土壌の群集について類似がみられたが水中の落葉の群集と水中の落枝の群集について類似は見られなかった。各群集の全分類における優占種は、門では全 5 群集について Proteobacteria 門が優占門であった。綱においては、陸上の落葉・陸上の土壌・水中の落枝群集の優占綱が

Sphingomonadaceae 科、半陸上の落葉・水中の落葉・水中の落枝群集は Comamonadaceae 科、陸上の土壌群集は Rhodospirillaceae 科が多く見られた。目から属については陸上の落葉の出現群集・半陸上の落葉の群集・陸上の土壌の群集について類似がみられたが水中の落葉の群集と水中の落枝群集については離れて位置しており類似は認められなかった。落葉を用いた微生物群集の解析を行う上での課題は、基質上の微生物群集の量にばらつきが大きいこと、濃度調整が難しいことであった。落葉が河川もしくは土壌のどの場所に位置しているかによりバクテリア群集の不均一性が大きいと考えられる。このことがライブラリ調整を難しくしている原因と考えられる。

(3)

研究遂行期間中には、上記以外に以下の知見を得た。

今回の調査では知見の乏しい

*Homoplectra gracilis* 幼虫(写真 2)が確認された。本種は河川最上流部に出現する造巢性のトビケラである。



写真 2 *Homoplectra gracilis* 幼虫

-は 1mm を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 河内香織、小林誠、東田昌悟 ニューサイエンス社、 2019年12月臨時増刊号	4. 巻 54
2. 論文標題 里山林を対象とした一時的水域における落葉の分解過程	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 26-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小林 誠  (Kobayashi Makoto)		