

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12815

研究課題名(和文) 土壌微生物群集の機能的安定性と種多様性の関係

研究課題名(英文) Relationship between functional stability of soil microbial communities and species diversity

研究代表者

墨 泰孝 (SUMI, Hirotaka)

中部大学・応用生物学部・助教

研究者番号：80757922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：炭素・窒素・リン循環に関わる酵素を対象として、それぞれの酵素生産の攪乱に対する安定性と、土壌微生物群集の種多様性の関係性について調査した。その結果、酵素活性の種類によって、土壌攪乱に対する安定性に土壌微生物群集の種多様性が与える影響は異なることが示唆された。炭素循環に関わる-Dグルコシダーゼ活性は、調査した中で唯一、全ての土壌試料で酵素活性値の安定性と土壌微生物の種多様性の間に正の相関が認められた。土壌中の有機物分解に関わる実験結果からも同様の傾向が認められたことから、炭素循環に関わる微生物機能の攪乱に対する安定性は、種多様性に依存する可能性があると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回得られた成果は、陸上生態系での有機物分解にとって重要な役割を果たす土壌微生物群集の種多様性と、それらが担う機能の攪乱に対する安定性との関係について、有用な知見を提供するものである。炭素循環は、生物生産や気候変動をはじめとして、地球環境全体に大きな影響を及ぼすため、攪乱に対する土壌微生物群集の応答と、それを左右する因子に関する知見は、生態系の脆弱性評価や劣化土壌の修復、将来の気候変動予測等、様々な活用法が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The relationship between the stability of each enzyme production against disturbance and the species diversity of soil microbial community was investigated for the enzymes involved in carbon, nitrogen and phosphorus cycles. As a result, it was suggested that the effect of species diversity of soil microbial communities on the stability against soil disturbance depends on the type of enzyme activity. The -D glucosidase activity involved in carbon cycle was the only positive correlation between the stability of enzyme activity and the species diversity of soil microorganisms in all soil samples. The same tendency was observed from the results of experiments related to the decomposition of organic matter in soil, suggesting that the stability of microbial functions related to carbon cycle to disturbance may depend on species diversity.

研究分野：土壌学

キーワード：土壌微生物 炭素循環 窒素循環 リン循環 土壌劣化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 土壤微生物群集の役割と土壤劣化

土壤微生物群集は、汚染物質の無害化や元素循環における分解者としての役割など、生態系機能の中で大きな役割を果たしているが、しばしば人為的活動による影響を受け、それが土壤劣化につながっていることが古くから指摘されてきた(Bridges and Oldeman, 1999)。近年、温暖化をはじめとした大規模な気候変動や、それに伴う自然災害が多発するようになり、土壤微生物群集が担う生態系機能への影響はより深刻になることが懸念される。

(2) 土壤攪乱に対する土壤微生物群集の応答

一般的に、生物の研究では、種多様性は生態系機能の安定性に重要であることが示されているが、微生物群集においては、種多様性が生態系機能に与える影響について、必ずしも意見が一致していない。複数の先行研究において、各種攪乱に対する微生物群集の安定性が評価されているが、これまでに明確な結論は得られていない(Allison and Martiny, 2008; Shade et al., 2012)。

2. 研究の目的

本研究では、陸上生態系において有機物分解に大きな影響を与える、炭素・窒素・リンの循環に係わる機能を対象として、これらの機能の攪乱に対する安定性と、土壤微生物群集の種多様性との関係を解明することを目的とする。具体的には、土壤微生物群集の種多様性が異なる土壤試料を用意し、これらに対して攪乱処理を行った後、培養する過程で炭素・窒素・リン循環に係る主要な酵素活性を測定する。これにより、土壤微生物群集の種多様性によって、攪乱に対する酵素活性の安定性がどのように変化するか検討を行う。これに加えて、リアルタイム定量的 PCR 法により、土壤中の酵素遺伝子 DNA と RNA の両者を定量することで、酵素活性の変動が酵素生産微生物数の差異によるのか、それとも酵素発現量に依存するのかについても解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) 種多様性の異なる土壤試料の調製と攪乱処理

土壤としての性質が大きく異なる、黒ボク土と灰色低地土を 1 試料ずつ実験に用いる。各土壤試料を滅菌した後、滅菌前に採取した土壤試料を用いて調製した 3 つの異なる希釈段階 (10^1 , 10^4 , 10^7) の土壤懸濁液を接種し、6 週間培養する。培養後、細菌および糸状菌の群集構造を各々 16S rDNA と 18S rDNA を標的とした PCR-DGGE 解析により評価し、土壤試料間で種多様性が異なっていることを確認する。また、細菌と糸状菌を希釈平板法により計数し、微生物量が土壤試料間で同等であることを併せて確認する。このような手法により、種多様性が高い土壤微生物群集を有する土壤試料 (10^1 希釈液添加)、中程度の多様性を有する土壤試料 (10^4 希釈液添加)、種多様性が低い土壤試料 (10^7 希釈液添加) をそれぞれ調製し、実験に用いる。

上述した方法で調製した、3 段階の種多様性を有する土壤試料を対象に、一過性の攪乱処理であるクロロホルム燻蒸処理と、中長期的に影響が残る農薬添加処理、銅添加処理を行う。これに対照区を加えた 4 処理区の土壤試料について、最長 6 ヶ月間培養を実施し、経時的に土壤試料を採取し、次項に示す分析を実施する。

(2) 微生物特性および銅形態の測定

酵素活性

炭素循環に係わる β -D-グルコシダーゼ、窒素循環に係わるプロテアーゼ、リン循環に係わるホスファターゼについて、経時的に採取した土壤試料中の活性を測定する。

細菌および糸状菌の群集構造解析

経時的に採取した土壤試料中の細菌および糸状菌群集構造を、各々 16S rDNA と 18S rDNA を標的とし PCR-DGGE 解析により評価する。

微生物群集の機能的多様性の評価

採取した土壤試料中の微生物群集の炭素基質利用性を、Classen et al.(2003)が示した方法に従い、Biolog プレートを用いて評価する。

希釈平板法を用いた微生物数測定

経時的に採取した土壤試料中の細菌と糸状菌数を、希釈平板法により測定する。

銅形態分析

土壤に添加後、エイジング効果により毒性の低下が予想される銅について、土壤中における銅の存在形態を把握するため、銅添加処理を行った土壤試料を対象として、生物利用性画分の銅濃度を測定する。

各酵素遺伝子を対象とした PCR-DGGE 解析、酵素遺伝子 DNA、RNA の定量

今回分析対象とした 3 種類の酵素生産に関わる遺伝子を対象に、PCR-DGGE 解析、およびリアルタイム定量的 PCR 法による酵素遺伝子 DNA、RNA の定量を試みる。

4. 研究成果

(1) 微生物群集の種多様性と、その機能の攪乱に対する安定性の関係

-D グルコシダーゼ活性

-D グルコシダーゼ活性は、調査した酵素活性の中で唯一、土壌の種類や攪乱処理の違いによらず、微生物群集の種の多様性と酵素活性値の間に正の相関が認められた。また、攪乱処理に対する安定性も最も高かった。

具体的には、黒ボク土における -D グルコシダーゼ活性は、種多様性や攪乱処理の違いに関わらず、培養期間を通して対照区と同程度の水準で推移し、攪乱による負の影響はほぼ認められなかった。灰色低地土では、農薬添加処理や銅添加処理によって、種多様性が低い土壌試料において培養開始後に酵素活性値が低下傾向を示したが、培養開始後 3 ヶ月程度で攪乱処理前の水準にまで回復した。ただし、銅添加処理を行った土壌試料については、両土壌共に培養開始後 3 ヶ月が経過するまでの間に微生物に対する毒性が低下したことも影響していると思われる。後述する Biolog プレートによる機能的解析においても、銅添加処理区では培養開始後 3 ヶ月を経過する頃から微生物群集の機能的多様性が回復傾向を示しており、攪乱処理による影響の低下が、酵素活性値の回復につながったことが推察される。

ホスファターゼ活性、プロテアーゼ活性

ホスファターゼ活性やプロテアーゼ活性は、-D グルコシダーゼ活性とは異なり、種多様性と酵素活性値の間に共通した傾向が認められなかった。また、攪乱処理による酵素活性値の変動も -D グルコシダーゼ活性と比較して大きかった。

具体的には、黒ぼく土において、農薬添加処理を除いた処理区のホスファターゼ活性は、微生物群集の種多様性との間に正の相関が認められたが、農薬添加処理区では、そのような傾向はみられなかった。一方、黒ぼく土におけるプロテアーゼ活性は、対照区やクロロホルム燻蒸処理区において、培養期間中を通じて中程度の種多様性を有する土壌試料で最も高い値を示した。その一方で、長期的な攪乱処理を行った処理区では、種多様性と正の相関を示すような結果が認められた。灰色低地土においても、これらの酵素活性値と土壌微生物群集の種多様性との関係性は明確でなく、攪乱処理の種類によって異なる傾向を示した。

(2) 攪乱に伴う土壌微生物群集の機能的多様性と種多様性の変動

微生物群集の機能的多様性

Biolog プレートをを用いて、土壌微生物群集の機能的多様性を解析した結果、種多様性が低い土壌試料ほど、炭素基質の資化性に関わる微生物機能が攪乱されやすいことが示された。また、攪乱処理によってもその影響が異なり、農薬添加処理や銅添加処理など、比較的長期間影響が持続する攪乱処理では、特に種の多様性が低い土壌試料において、土壌微生物群集の機能的多様性に対する影響が長期化する傾向がみられた。

細菌および糸状菌の群集構造解析

16S rDNA と 18S rDNA を標的とした PCR-DGGE 解析を行った結果、細菌群集、糸状菌群集ともに、土壌試料調製時の種多様性の違いが攪乱処理や培養期間によって入れ替わることはなかった。また、攪乱処理や多様性指数の低下に伴う DGGE 解析のバンドパターンの変化と酵素生産との関係については、研究期間内に検討が行えなかった。

以上の研究成果から、今回分析した酵素活性の攪乱に対する安定性と土壌微生物群集の種多様性の関係は、対象とする酵素活性によって異なることが示唆された。今回分析対象とした酵素活性の中で、-D グルコシダーゼ活性は、種多様性が高い土壌において攪乱に対する安定性が高まることが示唆された。また、土壌微生物群集の機能的多様性を分析した結果からも、炭素基質利用性の変動と微生物群集の種多様性との間に同様の傾向が認められたことから、炭素循環に関わる微生物機能の攪乱に対する安定性は、種多様性に依存している可能性があると考えられる。今回得られた成果は、微生物群集の種多様性と、それらが担う機能の攪乱に対する安定性との関係について、有用な知見を提供するものであり、攪乱に対する生態系の脆弱性評価や、それを基にした生態系管理の実施に役立つことが期待される。

その一方で、研究開始当初の大きな目的であった、土壌中の酵素生産遺伝子を標的とした PCR-DGGE 法や、リアルタイム定量的 PCR 法による土壌中の酵素遺伝子 DNA と RNA の定量は、研究計画の遅れにより、期間内に実験を完了することができなかった。各酵素生産に関わる微生物の種数と均衡度を評価することは、種多様性に依存しない酵素活性値の変動を解明する上で重要であり、今後の主要な検討課題である。

< 引用文献 >

Allison and Martiny (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 11512-11519.

Bridges and Oldeman (1999) *Arid Soil Res. Rehabil.* 13, 319-325.

Classen et al. (2003) *FEMSMicrobiol. Ecol.* 44, 319-328.

Shade et al. (2012) *Front. Microbiol.* 3, 417.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤拓磨, 墨泰孝, 榊原大晃, 永井健太郎
2. 発表標題 不溶化法による重金属汚染土壌の修復後の施肥管理が微生物群集機能に及ぼす影響
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永井 健太郎, 墨 泰孝, 國頭 恭
2. 発表標題 改良資材添加に伴う水稻根圏土壌の重金属形態と微生物群集の炭素基質利用パターンの変化
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 墨 泰孝、國頭 恭、石川祐一、朴 虎東、佐藤 強、長岡一成、相川良雄
2. 発表標題 アルカリ資材添加に伴う大麦根圏土壌の重金属形態と微生物群集の炭素基質利用パターンの変化
3. 学会等名 愛知県農学系 4 機関による研究交流会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永井健太郎, 墨 泰孝
2. 発表標題 水田土壌の水管理の違いが土壌中カドミウム形態および微生物群集活性に及ぼす影響
3. 学会等名 第28回環境化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井健太郎, 墨 泰孝
2. 発表標題 改良資材添加に伴う水稻根圏土壌の重金属形態と微生物群集の変化
3. 学会等名 日本土壌肥科学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----