

令和元年5月23日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K20039

研究課題名（和文）微生物炭素ポンプは土壌生態系においても駆動しているか - 炭素長期隔離のキープロセス

研究課題名（英文）Examination on the microbial carbon pump process in soil ecosystem - a key process of long-term carbon isolation

研究代表者

濱 健夫（HAMA, Takeo）

筑波大学・生命環境系・名誉教授

研究者番号：30156385

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：海洋生態系では、バクテリアが分解しにくい難分解性有機物を生産することにより、炭素を長期隔離することが知られている。この「微生物炭素ポンプ」が陸上の土壌生態系においても働いているか否かについて、土壌バクテリアを対象とした実験的解析を実施した。バクテリアを含む土壌試料を用いた培養実験では、添加した分解しやすい有機物（グルコース）の利用が認められたが、その速度は海洋生態系に比較して、非常にゆっくりとした進行であった。このため、本研究期間中では、難分解性有機物の生成を確定することは困難であった。また、研究の基幹となる土壌バクテリア細胞数の計測法について検討を実施し、従来より簡便な手法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

土壌は、地球表層で最大の有機炭素リザーバーであり、その生成・分解は地球環境変動と大きく関わっている。そのため、土壌有機物の蓄積過程は社会的にも重要な研究課題である。本研究では、土壌バクテリアが難分解性の代謝産物を生成することにより、土壌有機物の蓄積に寄与している可能性を検討した。本研究期間内では、難分解性有機物の生成に関して、十分な証拠を得ることはできなかったが、本研究課題に適したバクテリアの培養実験系、および土壌バクテリア細胞数の簡便な測定法を確立することができた。今後、長期培養を実施することにより、バクテリアによる有機物の蓄積過程がより明確になるものと思われる。

研究成果の概要（英文）：It has been recognized that marine bacteria play a role of long-term carbon fixation by producing refractory organic matter. In the present study, the bacterial culture experiments was carried out to elucidate the possibility whether the microbial carbon pump is working in the land soil ecosystem. Firstly, the protocol of bacterial counting was examined and the method using a fluorescence microscopy was established. Culture experiment of soil microbial population showed the utilization of labile organic material (glucose), but the decompositional rate was much lower compared with the marine microbial environment. This caused the difficulty of the confirmation of the bacterial production of refractory organic matter. The longer experiment will provide the significant information on microbial pump in soil ecosystem.

研究分野：生物地球化学

キーワード：土壌バクテリア 難分解性有機物 微生物炭素ポンプ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

土壌に含まれる有機物は地球全体で 1500 - 2400 PgC と推定されており、大気、陸上、海洋からなる地球表層において、最大の有機炭素リザーバーである。このため、地球環境変動との関係について、大きな関心が寄せられている。この土壌有機物は、陸上植物体の主成分であるセルロースやリグニンなどが、安定な物質に変質したものと考えられてきている。一方、海洋においても、700 PgC もの有機物が海水に溶存している。この有機物は分解されにくい難分解性有機物で占められているが、その成因について、バクテリアの代謝産物が分解されずに残存する可能性が指摘された。その後の研究で、この「微生物炭素ポンプ」は広く認められるようになった。しかしながら、土壌生態系において「微生物炭素ポンプ」が機能しているか否かについては、これまでほとんど研究は行われてきていない。

2. 研究の目的

本件研究では、土壌生態系において「微生物炭素ポンプ」が駆動しているか否かを確認するため、土壌バクテリアを対象とした培養実験を実施する。これにより、バクテリアが分解しやすい有機物を利用して、分解しにくい難分解性有機物を生成する可能性について検討する。また、本研究の基幹となるバクテリアの細胞数の測定法に関して、従来行われてきた平板希釈法に代わる、より簡便な落射型蛍光顕微鏡法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 土壌中における ^{13}C 標識有機物の動態

実験に使用する土壌試料は筑波大学構内のススキ草原から採取した。土壌試料を 1.35 L の円形プラスチック容器に入れた後、安定同位体 ^{13}C で標識されたグルコース水溶液を土壌に噴霧した。 ^{13}C - グルコースの添加量は、土壌中の全有機炭素量の 10% を目安とした。土壌とグルコースを均一化するために容器を振動し、26 の培養器中で 30 日間の培養を実施した。培養開始時 (0 日)、開始後 1、2、4、8、10、20 および 30 日後に、培養器内の 3ヶ所から 500 mg ずつの土壌試料を採取した。採取した試料の一部を乾燥し秤量した後、土壌に含まれる有機炭素濃度および ^{13}C atom% を、元素分析計-質量分析計により測定した。

(2) 土壌バクテリアの計測法の検討

土壌中のバクテリア細胞数を簡便に計測するため、落射型蛍光顕微鏡法の検討を行った。筑波大学山岳科学センターおよび筑波大学アイソトープ環境動態研究センター圃場から採取した土壌試料を、超純水に懸濁した後、ボルテックスで 3 分間、あるいは超音波処理 (100kHz) で 1 分間処理することにより、土壌粒子からバクテリアを遊離させた。得られた懸濁液は、有効保持粒子径 $0.7\ \mu\text{m}$ のガラス繊維濾紙 (ワットマン社、GF/F) を用いて濾過し、バクテリアを濾液中に集めた。濾液を孔径 $0.2\ \mu\text{m}$ のメンブレンフィルター (ワットマン社、サイクロポアメンブレン) により濾過し、濾紙上のバクテリア細胞について、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) を用いて染色した後、落射型蛍光顕微鏡により細胞数を計測した。これを全細胞数とした。また、バクテリア細胞が有する有機炭素および ^{13}C atom% を測定するためには、バクテリアを捕集するフィルターとして、ガラス繊維濾紙を用いる必要がある。このため、市販されているガラス繊維濾紙として最小の孔径 ($0.3\ \mu\text{m}$) を有する濾紙 (アドバンテック社、GF-75) を、サイクロポアメンブレンの代わりに使用して、バクテリアを含む濾液を濾過した。この濾液を、再度サイクロポアメンブレンにより濾過してバクテリア数を計数することにより、GF-75 によるバクテリア回収率を求めた。

4. 研究成果

(1) 培養実験における ^{13}C 標識有機物の動態

土壌に ^{13}C 標識グルコースを添加して培養した実験中の、有機炭素濃度の変化を図 1 に示す。実験開始当時、有機炭素濃度は $60\ \text{mgC/g-DW}$ (土壌の乾重量 1 g あたりの炭素重量として示す) であったが、培養開始後 10 日目以降、やや低下する傾向が認められた。しかしながら、1 日目および 4 日目に低めの値が得られているため、培養実験の 30 日間で、土壌中の有機炭素が有意に減少したとは結論できない。この結果は、土壌中に含まれる有機物の多くが、微生物の分解作用に対して安定な性質を有することを示している。

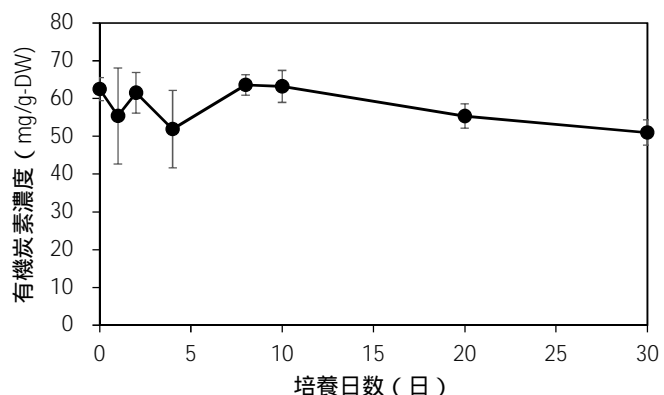


図 1 培養期間中の土壌有機炭素濃度

有機物の ^{13}C atom%は、培養開始時において 11 - 12 atom%であったが、2日目以降に減少が認められ、10日目には 6.7 atom%まで低下した(図2)。この結果は、 ^{13}C で標識されたグルコースが、他の土壌有機物と比較して、速い速度で分解されていることを示している。一方、10日目以降は、顕著な減少は認められず、30日目で 5.7%であった。 ^{13}C atom%がこの期間で大きい変化を示さない原因としては、 ^{13}C 標識有機物と他の土壌有機物の分解速度に大きな差が無かったことを示唆する。

同一日における試料間の差は、1日目でやや大きかったものの、他の培養日数における試料においては、試料間の差はほとんど認められなかった。このことから、添加した ^{13}C グルコースは、土壌中に均一に混合していたものと判断できる。

得られた土壌有機炭素濃度と ^{13}C atom%を用いて、土壌に含まれる ^{13}C 標識有機炭素の濃度を算出した(図3)。開始時に $7 \text{ mg}^{13}\text{C}/\text{g DW}$ であった ^{13}C 有機炭素濃度は、10日目において $4.2 \text{ mg}^{13}\text{C}/\text{g DW}$ と、開始時の 60%に低下した。10日以降も低下は継続したが、低下速度は 10日以前よりも低かった。30日目において認められた $2.9 \text{ mg}^{13}\text{C}/\text{g DW}$ は、開始時の 41%に相当しており、添加した ^{13}C -グルコースの約 60%が 30日間で分解されたものと推定される。

海水試料を用いて実施した同様の実験では、添加したグルコースは数日中に分解されることが確認されている(Shimotoriら、2009、Araiら、2018)。これに比較すると、今回の結果は、土壌中では、グルコースのような易分解性有機物の分解が急速に進行しないことを示している。この原因としては、有機物を利用する微生物量の急速な増加が生じないこと、グルコースと土壌粒子等の相互関係により分解性が低下すること、あるいは ^{13}C -グルコースが他の安定な有機物に変換されたこと、などが予想される。が生じた場合は、微生物炭素ポンプが効率よく駆動している可能性がある。しかし、バクテリアによる安定な有機物への変換が、添加した基質の数%程度である(Shimotoriら、2009、Araiら、2018)ことを考慮すると、30日目に残存する ^{13}C 有機物の多くが、バクテリアにより変換された有機物である可能性は低いものと考えられる。このため、本培養実験においては、あるいはが生じた可能性が考えられる。

この培養実験で得られた結果を考慮して、バクテリア現存量の正確な把握に加えて、土壌粒子を含まない実験系を用いることが、今後の研究に有効と考えられる。

(2) 土壌バクテリアの計測法の検討

土壌懸濁液をボルテックス処理(3分間)あるいは超音波処理(1分間)を実施した後に、GF/F フィルターで大型粒子を除き、濾液に含まれるバクテリア数を測定した(図4)。試料の濾液に含まれるバクテリア細胞数は、超音波処理試料で高く、ボルテックス処理試料では、超音波処理試料の 66%に相当するのみであった。このことから、土壌試料中のバクテリア数計測に際しては、超音波処理を用いることとした。

有機炭素濃度および ^{13}C atom%の計測が可能でガラス繊維濾紙である GF-75(保持粒子径 $0.3 \mu\text{m}$)を用いてバクテリアの回収率を検討した。濾過の際に吸引濾過して得られた濾液中には、原液に含まれるバクテリアの約 50%が含まれていた(図5)。これ

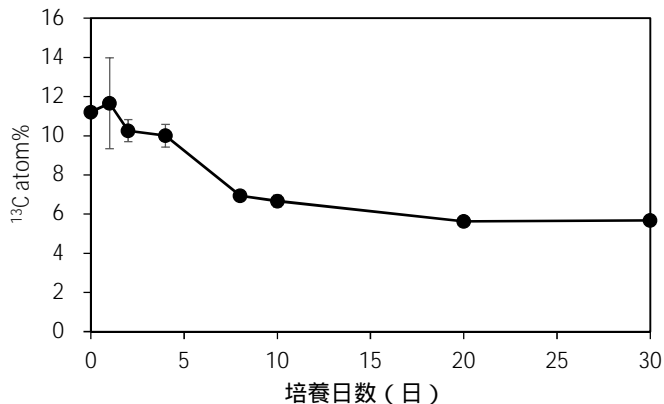


図2 培養期間中の土壌有機炭素の ^{13}C atom%

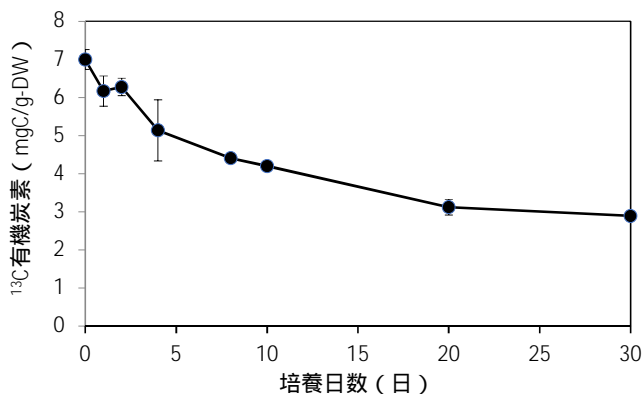


図3 培養期間中の土壌に含まれる ^{13}C 有機炭素濃度

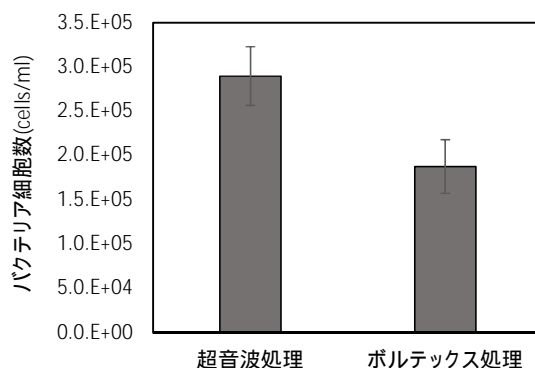


図4 バクテリア細胞分画時における超音波およびボルテックス処理による違い

は、GF-75 を用いた吸引濾過操作においては、半数近くの細菌が濾紙を通過してしまうことを示唆している。

低い細菌回収率を向上するため、吸引濾過ではなく自然濾過を用いる方法を検討した。その結果、濾液中に含まれる細胞数は、細菌懸濁液中の細胞数の 16% に低下した。自然濾過を用いた際の回収率 (84%) は、本研究の実施において十分な高さを有していると考えられる。

これらの検討の結果、土壌中の細菌の計測には、土壌試料を超純水で懸濁した後、超音波処理を実施すること、および細菌の回収には GF-75 フィルター上に自然濾過法を用いることが最適であることを確認した。

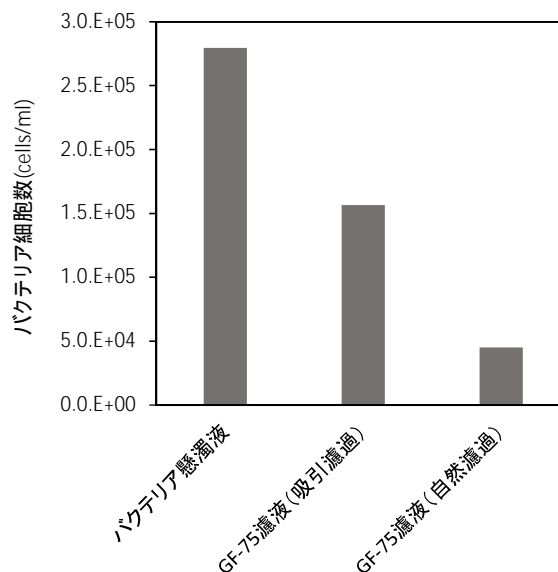


図 5 吸引濾過および自然濾過を用いた際の GF-75 濾液に含まれる細胞数

< 引用文献 >

Shimotori, K., Y. Omori, T. Hama (2009) Bacterial production of marine humic-like fluorescent dissolved organic matter and its biogeochemical importance. *Aquatic Microbial Ecology*, 58, 55-66.

Arai, K., S. Wada, K. Shimotori, Y. Omori, and T. Hama (2018) Production and degradation of fluorescent dissolved organic matter derived from bacteria. *Journal of Oceanography*, 74, 39-52.

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 2 件)

廣田 充、林 素利、正木大祐、冷温帯二次林におけるリタ-フォールの年変動と季節変化、日本生態学会第 66 回全国大会、2019 年

岡本遼太郎、大塚俊之、廣田 充、冷温帯二次林における土壌炭素、窒素プール量の 10 年間の変化、日本生態学会第 65 回全国大会、2018 年

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：廣田 充

ローマ字氏名：(HIROTA mitsuru)

所属研究機関名：筑波大学

部局名：生命環境系

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：50387958

研究分担者氏名：大森裕子

ローマ字氏名：(OMORI yuko)

所属研究機関名：筑波大学

部局名：生命環境系

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：80613497

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：細田雄飛

ローマ字氏名 : (HOSODA yuhi)

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。