

平成22年 4月 9日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19710008  
 研究課題名（和文） 窒素降下物が森林土壌有機物の分解に与える影響  
 研究課題名（英文） Influences of nitrogen deposition on decomposition of soil organic matter in forest  
 研究代表者  
 國頭 恭（KUNITO TAKASHI）  
 信州大学・理学部・准教授  
 研究者番号：90304659

研究成果の概要（和文）：巨大な炭素貯留庫である森林土壌に窒素が流入した場合、その有機物量が増加するのか減少するのかを、有機物分解酵素に着目して研究した。森林植生下の黒ぼく土を対象に調査した結果、窒素流入により、土壌有機物分解に重要な働きをするフェノールオキシダーゼ活性は低下することが示唆された。この低下は、リン酸固定力の強い黒ぼく土への窒素流入により、競合力の弱いフェノールオキシダーゼ生産菌のリン制限が顕在化したことによるものと推察された。

研究成果の概要（英文）：The effects of nitrogen depositions on organic matter contents in forest soils, the large reservoir of carbon, was examined, focusing on enzymes involved in decomposition of soil organic matter. It is suggested that the nitrogen input lowers the polyphenol oxidase activity, which facilitates the degradation of soil organic matter, in a forested Andisol. This decline may be due to the increased phosphorus limitation for polyphenol oxidase-producing microorganisms with an inferior competitive ability in Andisols having high capacity for phosphorus sorption.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	510,000	3,710,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：森林土壌、土壌酵素、植物リター、窒素、リン

## 1. 研究開始当初の背景

陸域生態系には有機炭素が約2200 Pg存在し、その貯留量は大気中炭素量の約3倍、海

洋表層水中炭素量の約2倍に相当する。そのため、陸域生態系は、地球規模での炭素循環において重要な貯留域となっている。その中

でも森林生態系は、陸上の有機炭素の約 50% を貯留し、大気中 CO<sub>2</sub> 濃度に大きな影響を与えうる。とくに森林生態系の炭素貯留量の約 70% は土壌に存在し、森林土壌中の炭素循環を理解することは、今後の気候変動を予測する上でも重要である。

土壌中の炭素循環は、窒素循環と密接な関係を持っていることが知られており、化石燃料の消費等に起因する、森林生態系への大気降下物由来の窒素流入により、土壌中炭素循環が大きく影響を受ける可能性がある。とくに中国の NO<sub>x</sub> 等の大気汚染物質の放出量は 2030 年まで増加すると予測されており、今後も日本に窒素酸化物が越境輸送され、森林生態系へ多量の窒素が流入することが危惧される。このように、窒素流入による森林生態系の物質循環の攪乱が懸念されており、現在、世界各地で研究が展開されている。しかし、窒素流入が森林土壌中の炭素貯留量に与える影響としては、正反対の二つの考え方がある。一つ目は、多くの陸域生態系では窒素制限により有機物分解が抑制されているため、窒素流入により有機物分解が促進されるというものである。さらに、大気中 CO<sub>2</sub> 濃度が上昇することで植物の光合成が活発化し、土壌中で微生物が利用できる炭素量は増加するが、それに伴い相対的に窒素量が欠乏し、有機物分解が進まなくなる可能性があり、この点でも窒素流入は有機物分解の促進に重要な働きを示す可能性がある。二つ目は、窒素流入による土壌有機物構造の難分解化、微生物のリグニン分解酵素生産の抑制、あるいは他の必須元素とのバランスの攪乱により、微生物による有機物分解の効率が低下するというものである。

このように森林生態系への窒素流入は、森林生態系の炭素循環、ひいては地球規模での炭素循環に影響を与える可能性があるにも関わらず、その影響は未だ十分に理解されていない。これは各地域での土壌の特徴や植生といった様々な条件により、その影響が異なることによると思われる。そこでさらに多くの地域で研究を実施する必要があると同時に、各地域に共通した一般法則を確立する必要がある。

## 2. 研究の目的

実際の森林生態系の現場では、多様な要因により、窒素流入が有機物分解に与える影響が不明瞭になる可能性がある。そこで本研究では、様々な処理条件が調節可能な室内実験により、どのような要因により、窒素流入による有機物分解への影響が変化するのか調査した。なお多様な成分を含む土壌有機物の分解を評価するには、有機物分解に関わる土壌酵素活性の測定が有用であることが報告

されているので、酵素活性を有機物分解の指標として用いた。本研究ではとくに、

- ・窒素流入が、植物リター分解に重要な役割を果たすフェノールオキシダーゼ活性および  $\beta$ -グルコシダーゼ活性に与える影響
- ・葉リターの分解性（難分解性と易分解性）と、窒素添加に対する土壌微生物群集の応答との関連
- ・窒素添加により、他の必須元素（炭素、リン）が微生物分解の制限要因になる可能性の点に着目して研究した。

## 3. 研究の方法

本研究では、室内実験により、窒素流入が植物リター分解に与える影響について調査した。土壌や植生の影響を調べるために、カラマツとササが優占している地点から、カラマツとササの葉リターと土壌（非アロフェン黒ぼく土）、広葉樹植生の地点から、コナラとクリの葉リターと土壌（褐色森林土）を採取し、実験に供した。

多様な成分を含む植物リターの分解を評価するには、その分解に関わる土壌酵素活性の測定が有用であることが報告されているため、本研究でも酵素活性を植物リター分解の指標として用いた。土壌の水分量を最大容水量の 60% に調整し、その後、各種植物リターと数段階の濃度の窒素を添加後 22°C で培養し、経時的に酵素活性を測定した。主な対象酵素は、リグニン分解に関わるフェノールオキシダーゼ活性と、セルロース分解に関わる  $\beta$ -グルコシダーゼ活性である。

(1) 窒素流入が、植物リター分解に重要な役割を果たすフェノールオキシダーゼ活性および  $\beta$ -グルコシダーゼ活性に与える影響

黒ぼく土にカラマツ落葉を添加・培養し、窒素添加後のフェノールオキシダーゼ活性および  $\beta$ -グルコシダーゼ活性の経時変化を追跡した。窒素無添加区と窒素添加区の結果の比較から、窒素添加がフェノールオキシダーゼ活性および  $\beta$ -グルコシダーゼ活性に与える影響を調べ、土壌有機物分解への窒素添加の影響について考察した。

また両酵素を生産している微生物群を抗生物質を用いて推定した。生土を一部残し、残りを乾熱処理により滅菌すると同時に、細胞外酵素を失活させた。その後、菌類の生育を阻害するためにシクロヘキシミドを添加した処理区と、細菌の生育を阻害するためにクロラムフェニコールを添加した処理区の 2 つを用意し、少量の生土を添加し培養した。培養後、酵素活性を測定することで、フェノールオキシダーゼと  $\beta$ -グルコシダーゼを生産していた微生物が菌類か細菌であったか

を推定した。

フェノールオキシダーゼ活性の窒素添加による低下は、他の必須元素（とくに炭素、リン）が制限要因になった結果である可能性も考えられた。そこで、窒素以外に炭素あるいはリン源を添加後に培養し、活性の低下が窒素の直接的な影響か、窒素添加により引き起こされた炭素やリンの欠乏といった間接的な影響かを考察した。

(2) 葉リターの分解性（難分解性と易分解性）と窒素・リン添加が土壤細菌群集の生理的プロファイルに与える影響

3種類の植物リター（易分解性のササ葉、難分解性のカラマツ落葉、中程度の分解性の広葉樹落葉）のいずれかを褐色森林土に混合後に培養し、Biolog社のEcoPlateを用いて細菌群集の生理的プロファイルへの影響を調査した。また窒素・リンを添加し、その影響も調べた。EcoPlateの基質を、アミン、アミノ酸、炭水化物、カルボン酸、ポリマー、フェノール化合物の6グループに大別し、それらへの影響も比較した。

4. 研究成果

(1) 窒素流入が、植物リター分解に重要な役割を果たすフェノールオキシダーゼ活性およびβ-グルコシダーゼ活性に与える影響

黒ぼく土にカラマツ落葉を混合した試料において、窒素添加がフェノールオキシダーゼ活性およびβ-グルコシダーゼ活性に与える影響を図1に示した。β-グルコシダーゼ活性は、窒素添加量に依存して増加し、培養7日目で最大に達した。一方、フェノールオキシ

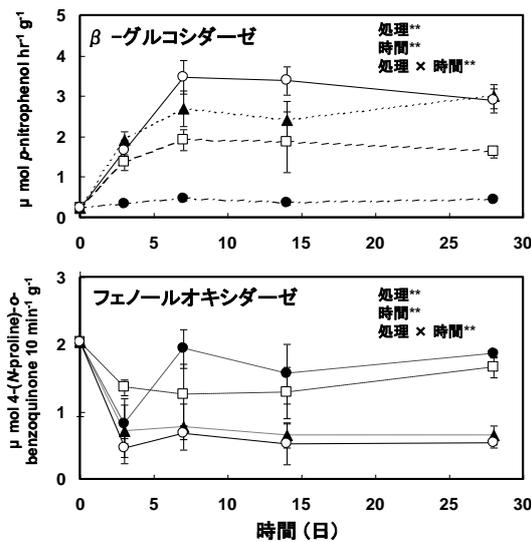


図1. 植物リターと窒素添加が酵素活性に与える影響。●, 土壌; □, 土壌+落葉; ▲, 土壌+落葉+低N; ○, 土壌+落葉+高N

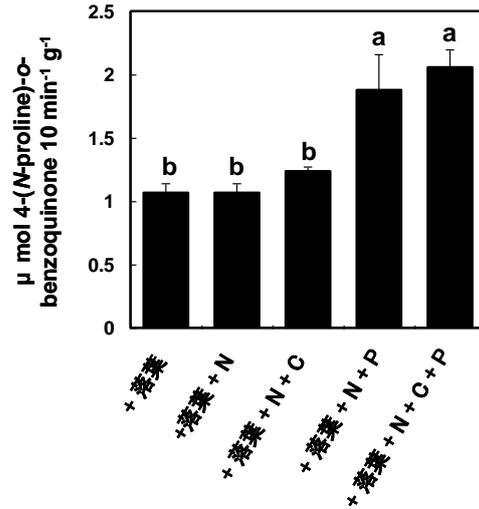


図2. 窒素・リン・炭素添加が植物リター混合土壌のフェノールオキシダーゼ活性に与える影響. 同じ文字がついていない値間には有意差がある(one-way ANOVA, Tukey's HSD test,  $p < 0.001$ ).

シダーゼ活性はカラマツ落葉添加により低下し、窒素添加によりさらに低値を示した。この際、土壌 pH の顕著な変化は見られなかったため、窒素添加の影響は pH によらないと判断した。

窒素添加により、β-グルコシダーゼ活性が

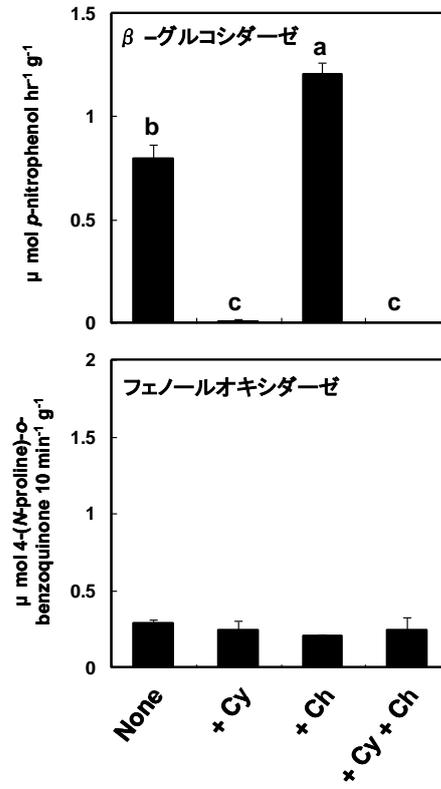


図3. 菌類阻害剤シクロヘキシミド(Cy)と細菌阻害剤クロラムフェニコール(Ch)が酵素活性に与える影響. β-グルコシダーゼでは、同じ文字がついていない値間には有意差がある(one-way ANOVA, Tukey's HSD test,  $p < 0.001$ ). フェノールオキシダーゼでは処理間に有意差なし。

増加し、フェノールオキシダーゼ活性が低下した理由として、過剰な窒素存在下で炭素制限になり、微生物群集がセルロースから炭素を獲得するために、セルロース分解のためにβ-グルコシダーゼ生産に資源を投入し、フェノールオキシダーゼ生産が抑制された可能性が考えられた。一方、窒素添加により微生物群集構造が変化し、それに共役して酵素活性が変動した可能性もある。リン酸固定力の強い黒ぼく土では、リターと窒素添加によりリン制限が一層顕著となることが予想される。仮に、フェノールオキシダーゼ生産菌が競合に弱いなら、その数は減少し、当酵素活性も低下するであろう。これらの可能性を検討するため、土壤に窒素以外に炭素あるいはリンを添加し、フェノールオキシダーゼ活性に与える影響を調査した(図2)。炭素添加は活性に有意な影響を及ぼさなかったため、フェノールオキシダーゼ活性の低下は、炭素源を得るために、優先してβ-グルコシダーゼ生産に資源を投入したのではないと推察された。他方、リン添加によりフェノールオキシダーゼ活性は有意に増加した。このことは、フェノールオキシダーゼ生産菌が競合に弱く、リン制限が顕在化したことを暗示している。

フェノールオキシダーゼとβ-グルコシダーゼを細菌、菌類のいずれが主に生産しているかを解明するため、抗生物質を用いた選択的阻害法により調査した。β-グルコシダーゼは、菌類阻害剤であるシクロヘキシミド添加で大幅に活性が低下したが、細菌阻害剤クロラムフェニコールでは影響が認められなかった(図3)ため、主に菌類が生産していることが判明した。一方フェノールオキシダーゼでは、両抗生物質とも顕著な阻害を示さず、本酵素の生産微生物の特徴は不明であった。

本結果より、森林植生下の黒ぼく土では、窒素流入によりリン制限が顕在化し、競合に弱いフェノールオキシダーゼ生産菌がより苛烈なリン制限にさらされることで、土壤有機物分解の主たる酵素であるフェノールオキシダーゼ生産が低下し、土壤有機物量が増加する可能性が示唆された。

## (2) 葉リターの分解性(難分解性と易分解性)と窒素・リン添加が土壤細菌群集の生理的プロファイルに与える影響

植物リターおよび窒素・リンの添加により、褐色森林土の細菌群集の基質利用性(AWCD)は大幅に増加した。植物リターの中では、易分解性のササ葉によりAWCDは最も増加した(図4)。

窒素・リンを添加しない場合、植物リター添加で最もAWCDが増加した基質グループは炭水化物で、次いでアミンであった。また炭

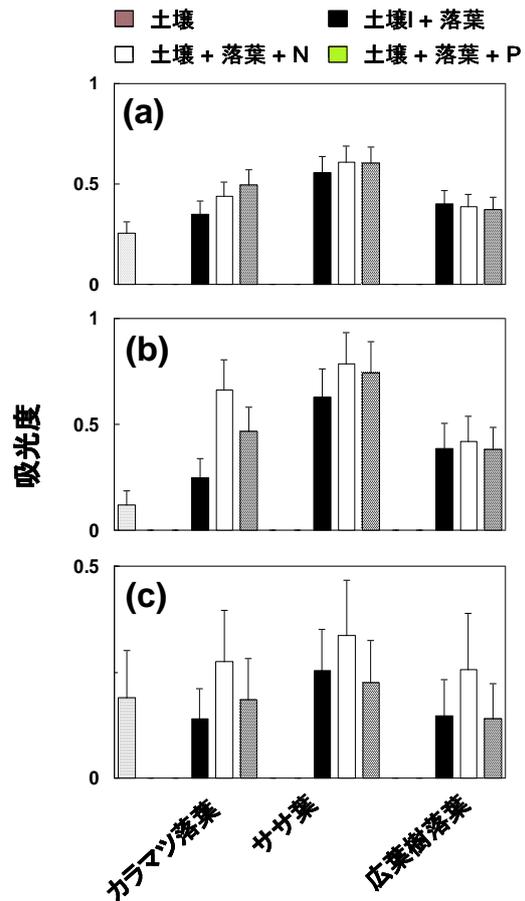


図4. EcoPlateの平均吸光度。(a) 全基質 (n = 31)、(b) 炭水化物 (n = 10)、(c) ポリマー (n = 4)

水化物は植物リターの種類、ポリマーは植物リターの種類と添加栄養分の種類の両者によって、その利用性が有意に変動した。

炭水化物の利用性が最も増加したのは、本基質グループが、リター分解の初期段階において重要な化合物であることを反映しているだろう。興味深いことに、窒素添加により幾つかのアミンやアミノ酸の利用性が低下した。

生理的プロファイルの主成分分析の結果を図5に示した。植物リターの種類が、生理

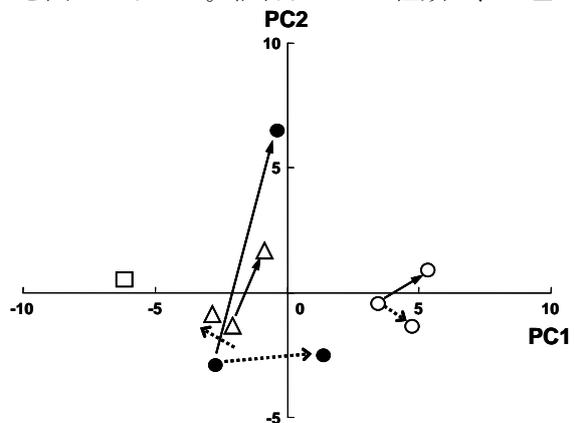


図5. EcoPlateデータの主成分分析。●、土壤+カラマツ落葉; △、土壤+広葉樹落葉; ○、土壤+ササ葉; □、コントロール土壤。実線は窒素添加、点線はリン添加を示す。

的プロファイルに最も大きな影響を与えていることが分かる。リターを添加することで、生理的プロファイルは主成分1の値が大きくなり、また植物リターの種類によって、主成分1の軸に沿って大別された。

窒素添加によって主成分2の値は、いずれの植物リターでも増加した(図5)。また主成分2は、アミノ酸と強い負の相関を示した。カラマツと広葉樹の落葉は、その低い窒素含量から、窒素添加により微生物が大きな影響を受けたことが示唆された。またカラマツ落葉はリン添加によっても大きく影響された。カラマツ落葉のN/P比16(重量ベース)は、落葉分解の際のリン制限の閾値である9より極めて高く、リン添加に微生物活性が高まり分解も進行することが推察された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Kunito, T., Akagi, Y., Park, H.-D., and Toda, H. (2009) Influences of nitrogen and phosphorus addition on polyphenol oxidase activity in a forested Andisol. *European Journal of Forest Research*, 128(4), 361-366. (査読有)
- ② Kunito, T. and Nagaoka, K. (2009) Effects of plant litter type and additions of nitrogen and phosphorus on bacterial community-level physiological profiles in a brown forest soil. *Microbes Environ.*, 24(1), 68-71. (査読有)

[学会発表] (計4件)

- ① 日比野翔太、國頭 恭、吉田清志、土壤微生物群集の生理的プロファイルと環境要因との関連、日本土壤肥料学会、2009年9月15日、京都大学
- ② 日比野翔太、國頭 恭、吉田清志、異なる施肥管理下の畑土壌における微生物群集の生理的プロファイル、日本土壤肥料学会関東支部大会、2009年6月28日、信州大学
- ③ 國頭 恭、恒川真紀子、吉田清志、朴 虎東、戸田任重、長岡一成、佐伯和利、森林土壌中のリンの存在形態とホスファターゼ活性、日本土壤肥料学会、2008年9月11日、名古屋市立大学
- ④ 國頭 恭、宮岸靖典、朴 虎東、戸田任重、カラマツおよびササ葉リター分解過程における土壤酵素活性の経時変化、日本土壤肥料学会、2007年8月22日、東京農業大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

國頭 恭 (KUNITO TAKASHI)

信州大学・理学部・准教授

研究者番号：90304659