

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月1日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710007

研究課題名（和文）森林土壌中の有機物分解がリン制限を受けている可能性の検討

研究課題名（英文）Examination of the possible phosphorus limitation in decomposition of soil organic matter in Japanese forest soils

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）：日本の森林土壌の有機物分解がリン制限を受けている可能性を調べるため、有機物分解を担う微生物のリン制限について検討した。森林土壌中のホスホモノエステラーゼ活性とホスホジエステラーゼ活性は、可給態 P / 微生物バイオマス炭素の比と有意な負の相関を示した。また低 pH 土壌では、リン添加によりデヒドロゲナーゼ活性は有意に増加した。これらの結果は、とくに酸性の森林土壌において微生物がリン制限であることを示しており、有機物分解もリン制限により抑制されていることを暗示している。

研究成果の概要（英文）：To examine the possibility of phosphorus limitation in decomposition of soil organic matter in Japanese forest soils, we determined whether the soil microorganisms are limited by phosphorus. Both phosphomonoesterase and phosphodiesterase activities showed significant negative correlations with available P / microbial biomass C ratio in the soils. Also, phosphorus addition significantly increased dehydrogenase activity in low-pH soils. These results indicate the phosphorus limitation in soil microorganisms, and, therefore, imply that decomposition of soil organic matter may be limited by phosphorus in Japanese forest soils.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：リン、ホスファターゼ、森林土壌、リン制限、土壌微生物、可給態リン

## 1. 研究開始当初の背景

陸域生態系の有機炭素貯留量は、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%は土壌に存在するため、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。また日本に広く分布する黒ぼく土は、世界的に見ても炭素含有レベルの高い土壌であり、その土壌有機物の分解速度を規定する

要因を解明することは重要である。

申請者はこれまで土壤中の炭素循環と窒素循環の関連に注目し、森林生態系への窒素流入が土壤中炭素循環に与える影響について研究してきた。そのなかで、森林植生下の黒ぼく土では、植物リター分解過程での窒素流入により、増殖速度の速い微生物が優占してリンを利用するため、植物リターや腐植の分解を律速するポリフェノールオキシダーゼを生産する微生物ではリン制限が顕在化することを発見した。申請者は、リン酸固定力が大きい森林植生下の黒ぼく土では、競争能力の低いポリフェノールオキシダーゼ生産菌は、窒素流入に関わらずリン制限であるとの仮説をたてているが、未だ検証されていない。また現在まで申請者は、森林生態系での植物リターの分解過程について研究してきたが、植物リターよりも炭素貯留量が多い腐植の分解における「リン制限仮説」の妥当性も不明である。近年、生態系はリービッヒの最少養分律に従わず、複数の必須元素が同時に制限因子になっている可能性も指摘されているが、土壤中の腐植分解についての研究例は皆無である。

## 2. 研究の目的

本研究では、「温帯・寒帯の森林生態系では、一次生産や土壤有機物分解は窒素制限を受けており、熱帯林ではリン制限である」という法則が、日本に広く分布する森林植生下の黒ぼく土では適用できず、有機物分解がリン制限を受けている可能性を検討する。野外試料の分析だけでなく、様々な処理条件が調節可能な室内培養実験によっても、黒ぼく土中の微生物がリン制限を受けている可能性を検討したい。とくに競争能力の低いポリフェノールオキシダーゼ生産菌のリン制限の可能性に注目したい。加えて、リン以外に窒素やカリウムなどの必須元素が同時に制限要因となっている可能性についても調査する。なお、土壤有機物分解のリン制限の可能性については、化学的なアプローチと生物学的なアプローチの両方から研究する。

## 3. 研究の方法

### (1)森林土壤中のリン形態とホスファターゼ活性

長野県下各地の森林から A 層土壤試料を計 20 点採取し、実験に供した（ポドゾル性土のみ O 層より採取）。土壤中リンの形態は、Hedley の逐次抽出法を改変した方法により分析した。またホスホモノエステラーゼ、ホスホジエステラーゼ活性を測定した。微生物バイオマスはクロロホルムくん蒸抽出法で

測定した。

### (2)リン添加に対するホスホモノエステラーゼ活性・デヒドロゲナーゼ活性の応答

黒ぼく土 5 点、褐色森林土 3 点を実験に供した。土壤に炭素、窒素、リンのいずれかを添加し、1 週間培養後にホスホモノエステラーゼ活性とデヒドロゲナーゼ活性を測定した。

### (3)ポリフェノールオキシダーゼ生産微生物はリン制限か？

黒ぼく土 2 点と褐色森林土 1 点を実験に供した。土壤にリンを添加後培養し、ポリフェノールオキシダーゼ活性と、Biolog プレートによる細菌群集と菌類群集活性を調査した。

## 4. 研究成果

### (1)森林土壤中のリン形態とホスファターゼ活性

土壤中リンの形態を Hedley の逐次抽出法により評価したところ、いずれの土壤型でも NaOH-P が卓越していた（図 1）。またポドゾル性土で H<sub>2</sub>O-Pi が著しく高い値を示した。この試料は標高 2050 m の地点から採取したため、冷涼な環境下でリンが生物にあまり利用されずに残存していたことが予想される。

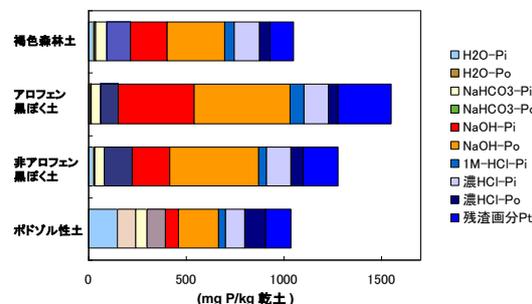


図1. 各土壤型のリン形態分布。

通常リンの利用性は pH 6~7 で最大であると言われている。しかし本研究では、最も利用性が高い H<sub>2</sub>O-P は pH が低いほど高値を示した（図 2）。また pH と NaOH-Pi 濃度に

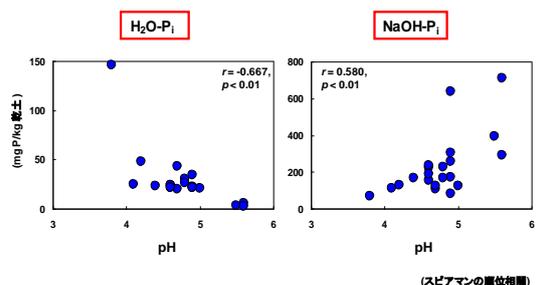


図2. pHとH<sub>2</sub>O-Pi、NaOH-Piの関係。

正の相関が見られ (図 2)、pH が低い土壤ほど吸着し利用できないリン量が少ないという結果になった。この矛盾は、本研究で用いた土壤試料では、リンを吸着しやすい非晶質 Al や Fe 酸化物 (活性 Al・Fe) が、pH が低い土壤ほど少ないことに起因する。

NaOH・Pi は 0.5Feo + Alo 量と正の相関を示し (図 3)、NaOH が非晶質 Al や Fe 酸化物に吸着した Pi を抽出することを追認した。

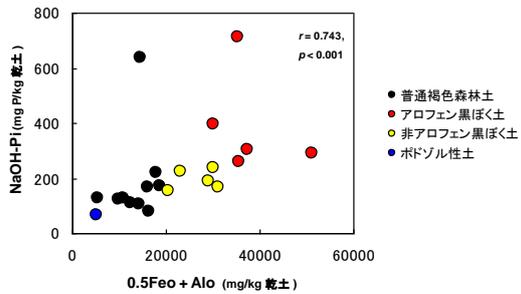


図3. 活性Fe・Al量とNaOH-Pi濃度との関係。

土壤型による微生物特性の差異は認められなかった。ホスホモノエステラーゼ活性とホスホジエステラーゼ活性は共に pH と有意な負の相関を示したが、いずれの画分の P 濃度とも相関は認められなかった。しかしながら、両活性とも可給態 P / 微生物バイオマス炭素の比と有意な負の相関を示した (図 4)。ホスファターゼ生産はリン欠乏により誘導されることが知られているため、この結果は、とくに酸性の森林土壤において微生物がリン制限である可能性を示している。このため、これら土壤は窒素流入により微生物のリン制限が顕在化しやすいと予想される。得られた成果は、日本の森林土壤における微生物群集のリン制限を明らかにした初めてのものであり、国際誌に発表した [Kunito et al. (2012) *Soil Sci.* 177, 39-46]。

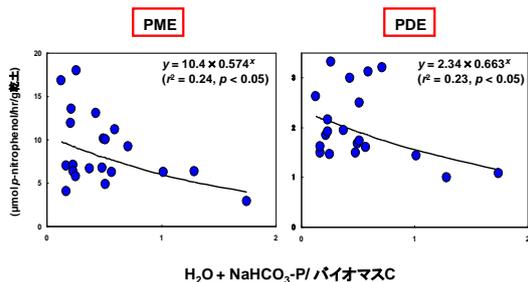


図4. 微生物バイオマスに対する可給態リン濃度の比とホスファターゼ活性との関係。

(2) リン添加に対するホスホモノエステラーゼ活性・デヒドロゲナーゼ活性の応答  
供試土壤中のホスホモノエステラーゼ活性は pH 6.5 で測定しているのものにも拘わらず、

pH が低い土壤で高値を示した (図 5)。この原因を究明するため、まず各土壤のホスホ

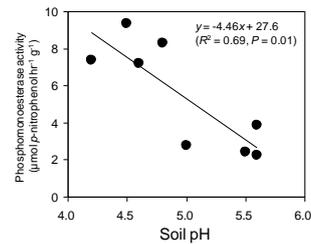


図5. 土壤pHとホスホモノエステラーゼ活性との関係

ノエステラーゼ活性の至適 pH を調査した。その結果、土壤 pH が 4.5 以下の試料でのみ、pH 5 付近で最大値を示し、かつその値は他の土壤より高値であった (図 6)。

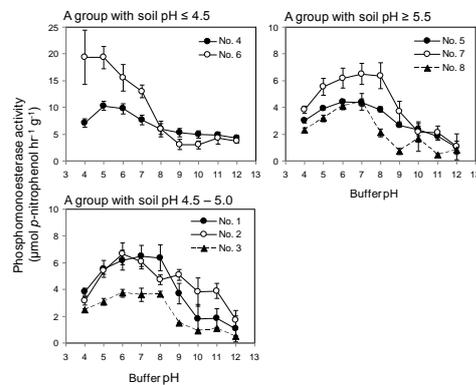


図6. 土壤pHとホスホモノエステラーゼ活性の至適pHとの関係。

次に土壤微生物群集の制限因子を明らかにするため、炭素、窒素、リンを添加し、ホスホモノエステラーゼ活性を測定した (図

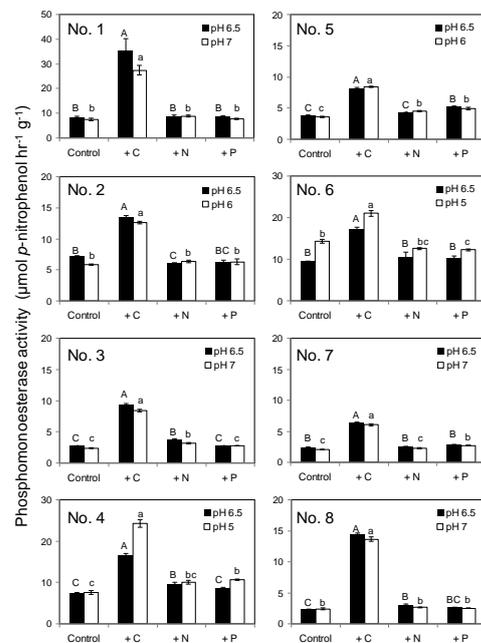


図7. 炭素、窒素、リン添加がホスホモノエステラーゼ活性に与える影響。

7)。炭素添加により、全ての土壌において活性が増加した。これは炭素添加により微生物バイオマスが増加したことによると推察される。試料 3、4、5、8 では窒素添加により活性が増加した。これはもともとの窒素制限の状態が窒素添加により解消し、ついでリン制限になったため、リン獲得のために微生物群集がホスホモノエステラーゼを多量に生産したためかもしれない。試料 6 ではリン添加により活性が低下した。この土壌では、リン制限がリン添加により解消し、ホスホモノエステラーゼ生産が中止されたことにより活性が低下したことが予想される。しかしながらこの実験では、試料 6 以外にもリン制限の試料が存在することは否定できない。一部のホスホモノエステラーゼは細胞外においても長期間残存し、また単位微生物量当たりのホスホモノエステラーゼ生産がリン添加により減少したとしても、リン制限が解消されたことで微生物バイオマス量が増加し、微生物群集全体のホスホモノエステラーゼ生産量は増加する可能性があるためである。そこで細胞内にしか存在せず、微生物活性の指標となるデヒドロゲナーゼ活性も測定した(図 8)。その結果、試料 1、4、6 ではリン添加により活性が有意に増加し、リン制限であることが示唆された。また試料 1 と 6 では、微生物群集は炭素、窒素、リンの 3 元素による共制限である可能性が示された。

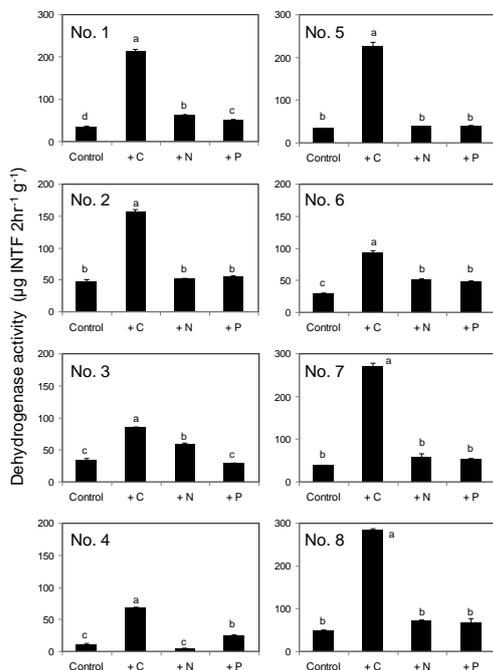


図8. 炭素、窒素、リン添加がデヒドロゲナーゼ活性に与える影響。

上述したように、リン制限ではデヒドロゲナーゼ活性は増加し、リン獲得に必要なホスホモノエステラーゼはその生産が不要とな

るため活性が低下もしくは増加しないことが予想される。そこで、リン添加区のデヒドロゲナーゼ活性/ 対照区のデヒドロゲナーゼ活性の比(RR-dehydrogenase)と、リン添加区のホスホモノエステラーゼ活性/ 対照区のホスホモノエステラーゼ活性の比(RR-phosphomonoesterase)を求め、さらにこの 2 つの値の比(RR-dehydrogenase/ RR-phosphomonoesterase)を算出した。この比は、リン制限土壌では高くなるはずである。調査したところ、この比は至適 pH でのホスホモノエステラーゼ活性と有意な正の相関を示した(図 9)。このため、酸性森林土壌においてホスホモノエステラーゼ活性が高いのは、土壌微生物がリン制限の状態にあり、リン獲得のためにこの酵素を多量に生産していることに起因すると思われる。

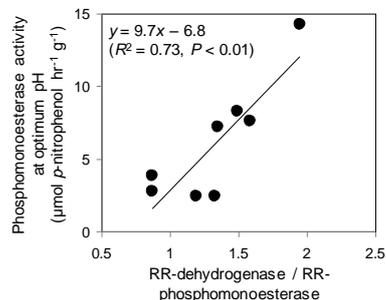


図9. ホスホモノエステラーゼ活性とRR-dehydrogenase 活性 / RR-phosphomonoesterase 活性比の関係。

### (3) ポリフェノールオキシダーゼ生産微生物はリン制限か?

森林土壌中においてポリフェノールオキシダーゼ生産微生物がリン制限となり腐植分解が抑制されている可能性を検討した。用いた黒ぼく土 2 点と褐色森林土 1 点のうち黒ぼく土 1 点において、リン添加によりポリフェノールオキシダーゼ活性が有意に増加した。またこの土壌では Biolog プレートを用いた実験において、リン添加により細菌群集と菌類群集のいずれの活性も有意に増加し、また基質利用パターンも変化した。このため、微生物群集全体がリン制限の状態であり、腐植分解に大きく寄与するポリフェノールオキシダーゼ生産菌もリン制限の状態であることが推察された。また褐色森林土では、微生物群集がカリウム制限である可能性も示唆された。

### 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 1 件)

- ① Kunito, T., Tsunekawa, M., Yoshida, S., Park, H.-D., Toda, H., Nagaoka, K., and Saeki, K. (2012) Soil properties affecting phosphorus forms and phosphatase activities in Japanese forest soils: Soil microorganisms may be limited by phosphorus. *Soil Sci.*, 177(1), 39-46. (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

- ① 國頭 恭、飛谷 徹、酸性森林土壌でホスファターゼ活性が高いのはなぜか?、日本土壌肥料学会つくば大会、2011年8月9日、エポカルつくば
- ② 諸 人誌、國頭 恭、朴 虎東、佐藤 強、根圏中のリン形態変動について、日本土壌肥料学会つくば大会、2011年8月9日、エポカルつくば
- ③ 諸 人誌、國頭 恭、佐藤 強、畑地土壌におけるリン利用性の評価：逐次抽出法と酵素活性法の比較、日本土壌肥料学会関東支部大会、2010年12月5日、女子栄養大学
- ④ 日比野翔太、國頭 恭、佐藤 強、吉田清志、朴 虎東、長岡一成、土壌微生物群集の代謝多様性と土壌特性との関連、日本土壌肥料学会、2010年9月7日、北海道大学
- ⑤ 諸 人誌、國頭 恭、佐藤 強、施肥管理の違いが畑土壌中のリンの形態と酵素活性に与える影響、日本土壌肥料学会、2010年9月7日、北海道大学

## 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