

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580095

研究課題名(和文) 微生物を介した土壌の炭素代謝に対する無機物質の影響

研究課題名(英文) Effects of soil inorganics on carbon dynamics through soil microorganisms

研究代表者

西山 雅也 (NISHIYAMA, Masaya)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(環境)・教授

研究者番号：50263801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：土壌微生物に対する鉄の影響を調べる目的で、溶存態二価鉄の酸化析出過程に細菌株を共存させ、鉄と細菌の凝集体を形成させた上で、培養液中での微生物活性を測定した。その結果、培養初期の二酸化炭素発生量が低下した。また、土壌に鉄溶解処理を施すことにより、培地上でコロニーを形成する細菌数が増加した。このことから、一部の細菌は、土壌中では鉄の影響を受け、増殖できない状態にあることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：To study effects of iron on soil microbial activities, aggregates of bacterial cells and iron hydroxides were prepared through oxidation of soluble Fe (II) with bacterial cells, and incubated in culture medium, followed by measurement of CO<sub>2</sub> evolved. As a result, less CO<sub>2</sub> was observed from the culture of aggregated bacteria than that of non-aggregated ones although the difference was not significant. The soil sample after Fe extraction showed a higher number of bacterial colony than the non-extracted soil sample, suggesting that some bacteria are not able to grow to form bacterial colony in soil due to iron.

研究分野：土壌圏科学

キーワード：土壌 微生物 二酸化炭素 腐植 炭素循環 鉄 生きているが培養できない微生物 生物地球化学

## 1. 研究開始当初の背景

土壌圏は、さまざまな物質を変換し、大気圏や水圏とこれらを交換することにより、地球環境恒常性維持の一翼を担う。温暖化ガスである二酸化炭素について言うならば、土壌微生物の有機物分解活動によって土壌圏から大気圏へ放出される二酸化炭素量は、植物経由で大気圏から土壌圏へ移動する炭素と均衡することにより、地球環境の恒常性維持に貢献している。しかし、気候変動によりこの均衡が崩れるならば、土壌圏の有機炭素総量がきわめて大きい故に、土壌からの二酸化炭素放出量が増大する懸念が持たれている。その一方で、土壌有機物分解活性をわずかでも抑制できるならば、大気二酸化炭素量の増加が緩和されるとともに、作物やバイオエネルギー植物の生育にも適した有機炭素含量の高い優良土壌の拡大を通じて、食料事情・エネルギー事情の改善に貢献できることも期待される。

土壌微生物の有機物分解活性に影響を与える因子としてこれまで研究されてきた主なものは、気候関連因子である温度、土壌水分量、土壌関連因子として土性、無機態窒素量などである。このうち、土性に関しては、砂質の土壌において有機物が速やかに分解され、粘土含量の高い土壌では分解・無機化が遅いことが知られている。一方、各種土壌の有機物量とその<sup>14</sup>C年代を調べた研究では、粘土、とりわけ、非晶質粘土を多く含む土壌において、多量の、かつ古い炭素が含まれることが示されている。これらの既往の知見は、粘土粒子の存在条件下では微生物による土壌有機物分解活性が低下し、その結果、有機炭素が土壌に残存・蓄積する過程を示すものである。一方、有機物含量の高い粘土・シルト画分に蓄積する糖は微生物由来であることも示唆されており、また、両画分は、まさに微生物あるいは微生物マイクロコロニーと同程度のサイズである。

これらのことから、粘土による有機物蓄積促進機構として、微生物の有機物分解活動を粘土が抑制する機構に加えて、粘土の影響を受けた微生物の死後、微生物バイオマス成分が分解・溶存態化することなく土壌に残留する可能性を申請者は考えている。一連の過程の素過程に関する土壌微生物学的・土壌生化学的見地からの説明は未だなされていない状況である。

## 2. 研究の目的

前項・背景を踏まえ、本課題申請時における当初の研究目的を次のように設定した：菌体～マイクロコロニー程度の微小領域における微生物・無機物相互作用を想定した実験系を設定する。これを利用することにより、土壌中において粘土・非晶質微小無機物が微生物細胞に及ぼす影響を検討する。得られた結果を基に、微生物を介した土壌系での炭素代謝に関する知見を得る。

## 3. 研究の方法

(1) 溶存態 Fe(II) の酸化析出にともなう "菌体・Fe(III) 凝集体" の生成

希釈平板培養法 (R2A 寒天培地または YG 培地) により土壌から細菌株を得た後、16S リボソーム遺伝子の塩基配列を明らかにすることにより、分離菌株の系統学的位置を推定した

菌体懸濁液 (pH 6 緩衝液に懸濁) に、塩化アルミニウム水溶液または硫酸第一鉄アンモニウム水溶液を滴下し、生成したアルミニウムおよび鉄の析出物と菌体を顕微鏡で観察した。

シリンジ中で土壌を湛水状態として培養し、還元状態を発達させた。このときの土壌から土壌水を抽出し、溶存態二価鉄の存在を確認した。この土壌抽出水を菌体懸濁液と混合し、さらに攪拌することによって、酸化鉄の析出を生じさせ、菌体とともに顕微鏡で観察した。

(2) 凝集体の微生物活性

二酸化炭素発生量

(1) で調製した菌凝集体について、二酸化炭素発生量 (呼吸量) を次の方法で求めた。すなわち、菌体を YG 液体培地に懸濁させ、密閉容器中で培養し、発生した二酸化炭素を赤外線ガス分析計にて定量した。または、培養に用いる密閉容器中にアルカリ溶液を併置することにより二酸化炭素をこれに捕集し、培養後に酸で滴定することにより定量した。

デヒドロゲナーゼ活性

(1) で調製した菌凝集体、ならびに、同じ工程を経ても凝集体生成が観察できなかった菌株について、デヒドロゲナーゼ活性を測定した。

(3) アルミニウム水酸化物の共存が、植物遺体の無機化に及ぼす影響

久保田らの方法に準じて、各種アルミニウムによる処理を植物遺体に施した。植物遺体を水洗した後、土壌に混和し、畑状態土壌条件下で培養を行った。このとき、発生する二酸化炭素発生量を測定した。

(4) 鉄溶解処理が細菌生菌数計数値に及ぼす影響

鉄溶解液として、クエン酸、EDTA、マロン酸、グリコール酸、3-ヒドロキシ-2,2'-イミノジコハク酸 4 ナトリウム (HIDS) の水溶液 (濃度 10 mM, 50 mM, 100 mM, pH 6.5) を調製し、最大 120 分間、土壌からの溶出予備実験を行った。結果に基づき、各溶液 (濃度 50 mM) を土壌に添加し、5~60 分間の鉄溶解処理を行った後、希釈平板培養法 (R2A 培地) により細菌生菌数を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 菌体・無機物凝集体の形成

3.(1) による調製の場合、析出物と菌体の接触は顕微鏡観察により認められたが、洗浄によって容易に両者が別れたことから、付着・凝集体の形成には至っていないと判断した。これに対して、(1) による調製の場合、懸濁液中に観察される菌体の数が低下した。このことから、一部の菌体は、析出した鉄凝集体に取り込まれ、その結果、観察された菌体数が低下したと考えられた。

(2) 3.(1) により調製した菌体・鉄析出物からの二酸化炭素発生量は、培養 1.5~2 日目において対照(菌体を、別途、酸化析出させた鉄と混合することにより、両者が共存するものの凝集体は生成していない試料)と比して低い値を示した。但し、これは有意な差とは認められなかった。この結果から、培養初期には、一部の菌体が、析出した鉄との凝集体形成による影響を受け、呼吸活性が低下したこと、しかし、培養中盤以降には、あらたに増殖して生じた非凝集体状態の菌体が培養系の多数を占める結果、対照との二酸化炭素発生量の差が消失した可能性が考えられる。

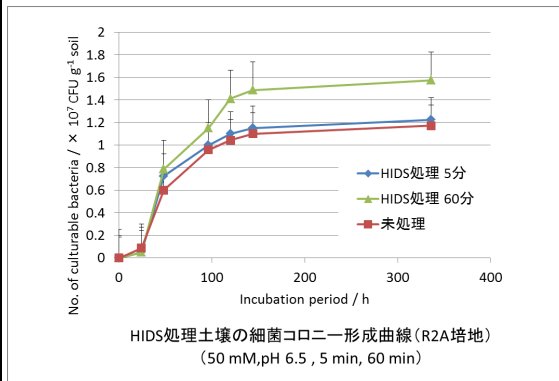
凝集体の形成が認められなかった菌株のデヒドロゲナーゼ活性を測定したところ、一部の菌株で溶存第一鉄の酸化過程を経験することにより活性が低下した。第二鉄として酸化析出させた後に菌体と接触させた場合にも活性が低下する菌株が見られた。

以上の結果は、土壤中でしばしば生じる溶存態第一鉄の酸化析出によって、微生物の種類によっては活性が低下することを示しており、今後の詳細な解析の必要性を示す点で重要と思われる。

(3) アルミニウム処理を施した植物遺体では、二酸化炭素発生量の低下が認められる場合があった。また、処理の過程で植物遺体を乾燥させることにより、二酸化炭素の発生がさらに抑制される事例が見られた。以上の結果は、易分解性成分を含む生物遺体有機物にある種の形態あるいはある強度でアルミニウムが付着した場合、土壤中での有機物滞留時間が増す可能性を示すものと思われた。

(4) 鉄溶解処理を行った土壤の細菌生菌数は、脱イオン水で同様の振盪処理を施した土壤と比べて、EDTA 処理により最大 10%程度、HIDS 処理により最大 30%程度、細菌コロニー計数値が増大した(図)。このことから、EDTA 処理ならびに HIDS 処理では、土壤中の細菌表面に付着していた鉄が溶解除去された結果、培地上で増殖可能な細菌の数が増えた可能性が考えられた。すなわち、土壤中の細菌は、その表面を鉄で覆われるあるいは鉄が付着した状態で存在することにより、増殖能を

有しているが増殖できない状態にある可能性が考えられた。



既往の研究では、非晶質鉄や非晶質アルミニウムと土壤有機物の間の量的な相関関係、ならびに、非晶質無機物量と 14C に基づき推定される土壤有機態炭素の年代の間の相関が報告されているが、本研究の結果からは、付着鉄の影響によって増殖できない土壤微生物が、土壤中に蓄積する有機物となる可能性も考えられる。また、土壤中における、生きてはいるが培養できない微生物 (viable but non-culturable; VBNC) の一部は、このような理由による可能性も考えられる。

#### <引用文献>

土壤環境分析法編集委員会編 (1997) 土壤環境分析法、博友社。

久保田ら (1986) ヒドロキシャルミニウム処理による堆肥の分解抑制。日本土壤肥料学雑誌 57: 155-160。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

(なし)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 雅也 (NISHIYAMA, Masaya)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科 (環境)・教授

研究者番号: 50263801

(2)研究分担者  
(なし)

(3)連携研究者  
(なし)