

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660047

研究課題名(和文) 土壌生態系の解剖学的解析ツールとしての人工土壌の開発

研究課題名(英文) Development of artificial soil as an anatomical tool for understanding soil ecosystems

研究代表者

村瀬 潤 (Murase, Jun)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：30285241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：土壌は、鉱物・イオンなどの無機物、植物遺体・腐植などの有機物、微生物を含む生物から構成される複雑系である。本研究では、「土壌とは何か?」という問いに答えるためのツールとして人工土壌の開発を行った。水田土壌の各土壌構成要素を抽出し、それを再構成することで作成した人工土壌の嫌氣的有機物分解活性を測定し、各種構成要素の影響を解析した。その結果、腐植物質が人工土壌の活性を大きく左右することが明らかとなった。最終的にもとの土壌に匹敵する人工土壌の開発に成功し、今後様々な土壌機能の解析に利用できる人工土壌の「レシビ」を確立できた。

研究成果の概要(英文)：Soil is the complex system consisting of inorganic substance (minerals, ions), organic substance (plant residue, humus), and biota including microorganisms. In this study, we developed an artificial soil as a tool to answer the fundamental questions "what is soil?". Our artificial soil was synthesized by combining different biotic and abiotic elements composing rice field soil. The artificial soils with different combination of soil components were analyzed for the activity of anaerobic decomposition of organic matter. The study revealed that humic substances have a great impact on the activity of the artificial soil. Finally we succeeded in creating the artificial soil that shows a comparable activity to the original soil. The artificial soil and its recipe developed in this study would be useful to study the role of each component in soil functions.

研究分野：土壌微生物学

キーワード：人工土壌 水田 メタン生成 微生物 腐植物質

### 1. 研究開始当初の背景

土壌は非常に多くの物質、生物から構成される複雑系であり、この事は、土壌を構成するある特定の一要素が土壌中の生化学反応や微生物の代謝過程に与える影響を直接的に明らかにするのを困難にしている。

土壌構成要素の性質や動態を知るために、土壌から要素を分離して解析するという手法が用いられてきた。しかしながら、はたして土壌から分離した要素が土壌中の機能や形態を正しく反映しているのかは疑問であった。土壌構成要素の働きを、より土壌に近い条件で調べるために、単純な構成要素から作成した「人工土壌」が考案されてきた。ところが、既存の人工土壌では、市販の砂や粘土に有機物を添加した人工土壌であるなど (Guenet et al., 2011; Ding et al., 2013)、実際に存在する環境中の土壌を表現しようとするものではなかった。また、作成した人工土壌と自然土壌との違いは論じられてはならず、得られた知見が実際の土壌中での挙動とどの程度異なるのかは明確でなかった。土壌と、土壌を単純化したものである人工土壌の差異は得られた知見の解釈を行う上で重要である。そこで、自然土壌と人工土壌の差を明確にできる実験系が必要であると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、自然土壌から土壌構成要素を分離し、元々の組成に基づいて再統合するという要素還元主義的アプローチにより「人工土壌」を開発することとした。こうして作成した人工土壌が、元の土壌が持つ機能を再現できるか、どの程度の違いをもつのかを調査した。人工土壌の機能は、その機能の多くを担っていると考えられる土壌微生物の有機物分解活性および群集構造を基に評価した。この評価に基づき人工土壌の機能を元の土壌へと近づけるプロセスを通じ、土壌における各種構成要素の果たす役割を解明することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1)人工土壌の調製方法の検討

愛知県農業総合試験場安城農業技術センターの水田土壌(黄色土)から土壌構成要素として土壌鉱物、植物遺体、腐植物質、微生物を分離した。定量値を参考にして分離した各要素を混合し、組成の異なる5種類の人工土壌[1. 全要素混合土壌、2. 全要素混合土壌にモンモリロナイトを5% (w/w) 添加した粘土添加土壌、3. 腐植を添加しない腐植無添加土壌、4. 草地黒ボク土由来の腐植物質に置き換えた腐植置換土壌、5. 他の水田土壌(東北農業研究センター大仙拠点)由来の微生物を接種した微生物置換土壌]を作成した。調製した人工土壌と元の土壌に炭素源として稲わら粉末を0.6% (w/w) 添加し、水飽和条件として密閉容器内で45日間嫌気培

養した。気相に放出されるCO<sub>2</sub>およびCH<sub>4</sub>の濃度を経時的に測定した。

#### (2)土壌構成要素が人工土壌の有機物分解活性に及ぼす影響評価

上記で検討した人工土壌の作出法に準じ、粘土、腐植物質、微生物といった土壌構成要素を換えながら人工土壌を調製し、培養を行った。これにより、各種土壌構成要素が微生物の有機物分解活性に及ぼす影響を調査した。

#### (3)腐植物質が人工土壌の微生物群集に及ぼす影響

高い有機物分解活性を示した人工土壌の培養終了時の微生物群集をPCR-DGGE法およびアンプリコンシーケンスにより解析した。人工土壌で形成される微生物群集が腐植物質に受ける影響を調査した。

### 4. 研究成果

#### (1)人工土壌の調製方法の検討

全要素を混合した人工土壌では、元の土壌の約20%のCO<sub>2</sub>生成が認められた(図1)。一

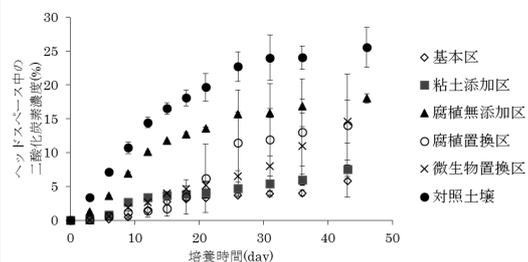


図1 土壌構成要素が人工土壌の二酸化炭素生成におよぼす影響

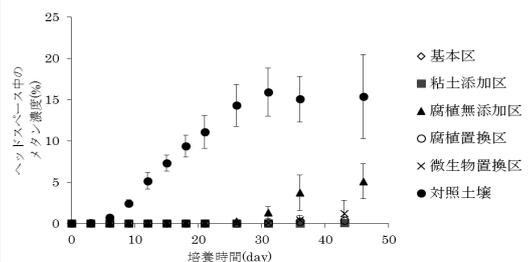


図2 土壌構成要素が人工土壌のメタン生成におよぼす影響

方、CH<sub>4</sub>はほとんど生成しなかった(図2)。粘土の添加によってCO<sub>2</sub>生成量は約2倍に増大し、少量のCH<sub>4</sub>生成が観察された。腐植無添加土壌では、CO<sub>2</sub>生成量は約3倍に増大した。CH<sub>4</sub>生成量も著しく増大し、元の土壌に比べて生成開始が20日程度遅れたものの、最終的に約50%に相当するCH<sub>4</sub>生成が観察された。

培養を終了した人工土壌を風乾静置後再度培養することで人工土壌の有機物分解活性は上昇し、腐植物質を添加した人工土壌においてもメタン生成が認められた。培養34日間で、全要素混合土壌では元の土壌と同等の二酸化炭素生成、約60%のメタン生成が認められ、一度培養し培養終了後に風乾するこ

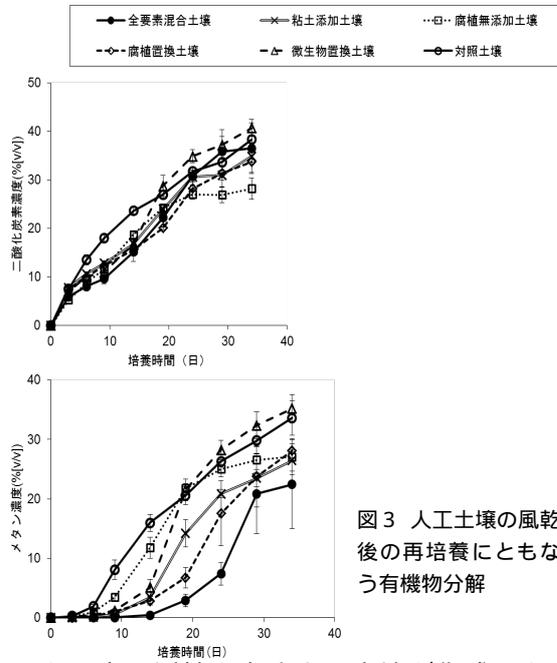


図3 人工土壌の風乾後の再培養にともなう有機物分解

とで高い活性を有す人工土壌が作成できることが示された(図3)。

腐植物質が人工土壌の有機物分解活性を抑制することが明らかになったため、腐植物質の調製方法と添加方法を検討した。抽出フルボ酸の酸除去をより入念に行うとともに、微生物接種源以外の要素を混合後一定の時間(～15日間)静置して人工土壌の安定化を図った。その結果、腐植物質の添加はむしろCO<sub>2</sub>およびCH<sub>4</sub>生成を向上させること、腐植物質と鉱物を混合後、微生物源を添加するまでに静置時間を設けることで活性はさらに増大することが示された。そして、最終的に元の土壌に匹敵するCO<sub>2</sub>およびCH<sub>4</sub>生成を記録

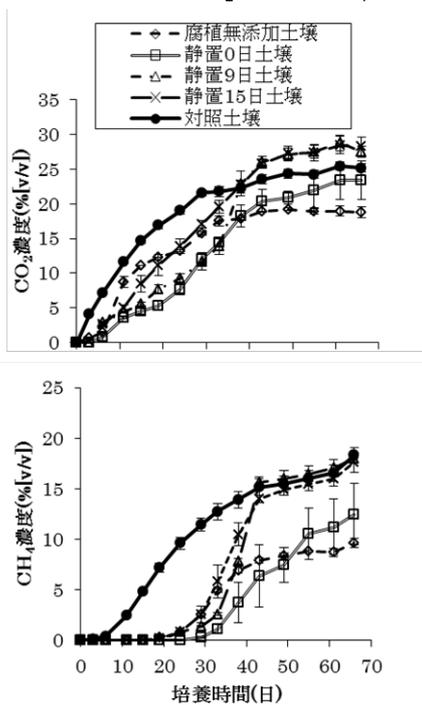


図4 培養前の静置時間が人工土壌の有機物分解活性におよぼす影響

する微生物活性を示す人工土壌の作成に成

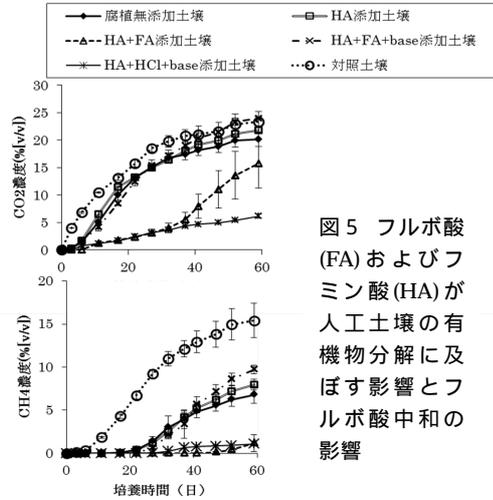


図5 フルボ酸(FA)およびフミン酸(HA)が人工土壌の有機物分解に及ぼす影響とフルボ酸中和の影響

功した(図4)。

人工土壌の有機物分解活性を左右した腐植物質の影響について、フミン酸、フルボ酸に分けて個別に解析した。腐植無添加の場合に比べフミン酸の添加による二酸化炭素、メタンの生成量に変化はなく同等の有機物分解量となったため、人工土壌の有機物分解活性に影響を与えないと考えられた。一方、フルボ酸の添加は有機物分解活性の著しい低下を招いた。調製フルボ酸のpHが低いことがその原因と考えられ、調製時のpHが人工土壌作出の鍵になっていると考えられた。pH矯正を行なうとむしろ活性が向上することから、フルボ酸は水田土壌中の微生物代謝を促進する可能性があると考えられた(図5)。

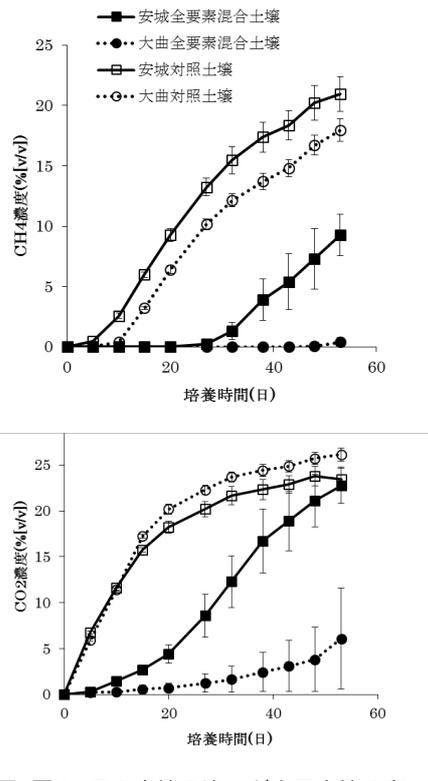


図6 元の土壌の違いが人工土壌の有機物分解活性に及ぼす影響

(2) 土壤構成要素が人工土壤の有機物分解活性に及ぼす影響評価

本研究で確立した方法を用いて、東北農業研究センター大仙拠点(大曲)の水田土壤(灰色低地土)を元に人工土壤を作成し、有機物分解活性を測定したところ、元の土壤に比べ

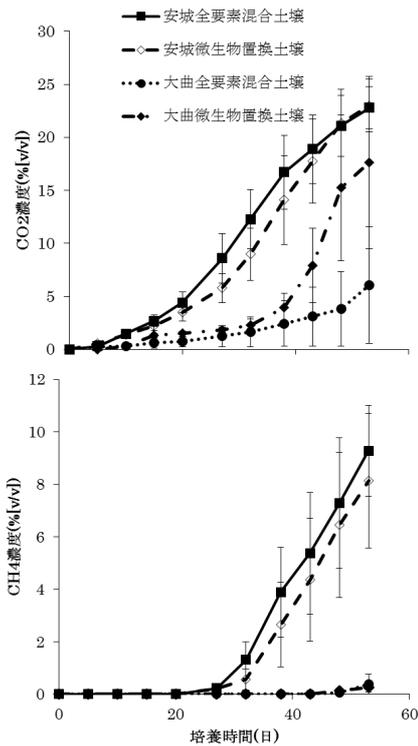


図7 人工土壤の有機物分解活性に及ぼす微生物接種源の影響

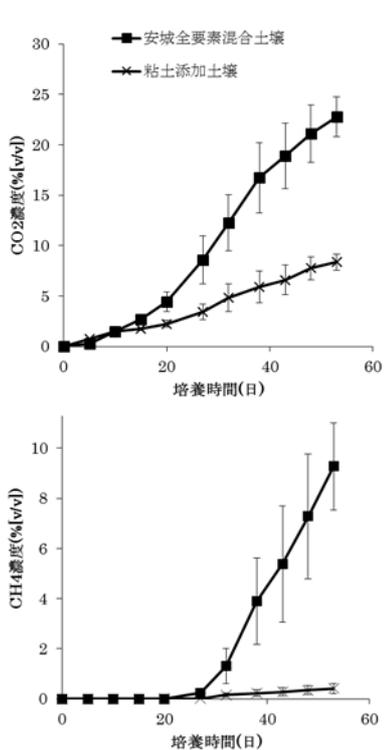


図8 人工土壤の有機物活性に及ぼす粘土鉱物(モンモリロナイト)添加の影響

て、二酸化炭素生成量は20%程度となり、メタン生成はほとんど認められず、ともに著しく小さくなった(図6)。安城と大曲の水田土壤から作成した人工土壤について、微生物接種源だけを相互に入れ替えた場合、接種源の由来に関わらず、大曲の人工土壤では有機物分解活性が低く抑えられた(図7)。土壤分析の結果、土壤鉱物中のアルミニウムの濃度が大曲土壤で高く、腐植物質の添加にともなうpH低下によって溶出するアルミニウムが微生物活性に影響を与えている可能性が示唆された。

粘土(モンモリロナイト)添加は人工土壤の微生物活性に負の影響を示した(図8)。先にpHの低いフルボ酸を加えた人工土壤では抑えられた微生物活性を回復させる効果が認められているが、腐植物質の酸性度が低い条件下では鉱物や腐植物質との相互作用により生じた何らかの負の影響が反映されたものと考えられた。

(3) 腐植物質が人工土壤の微生物群集に及ぼす影響

高い有機物分解活性を示した人工土壤の培養終了時の真正細菌群集PCR-DGGE解析により得られたバンドパターンから、人工土壤は対照土壤よりもバンドが少なく、より単純な真正細菌の群集構造が形成されていることが示された(図9)。また、腐植物質の有無に特徴的なバンドが認められたことから、

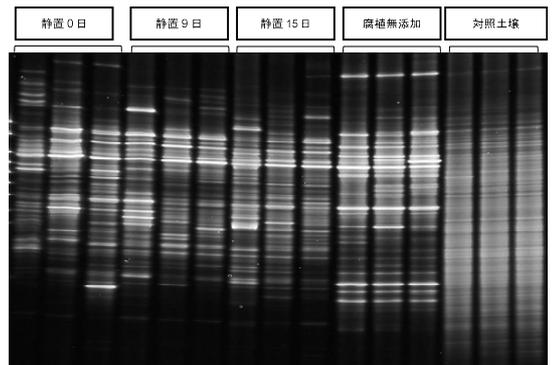


図9 人工土壤中に確立された真正細菌群集のPCR-DGGE解析

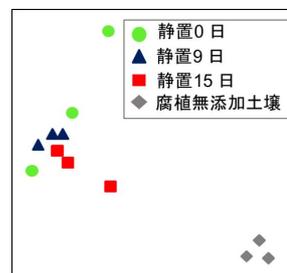


図10 DGGE解析に基づく真正細菌群集のMDS解析

腐植物質の添加に強い影響を受ける微生物がいることが明らかになった。DGGEパターンをMDS解析すると、微生物群集構成は腐植物質の有無で大きく分けられ、微生物群集構成としても腐植物質の有無に強く影響される

ことが示された(図 10)。これは、腐植物質の添加により人工土壌の pH が変化し、それに適応した微生物が優占したためと考えられた。また、還元条件下で腐植物質を電子の授受に用いる微生物が存在する(Lovley et al., 1996)ことや、炭素源として消費された量は少ないと考えられたものの、嫌気条件下で腐植物質を炭素源とできる微生物が存在するため(Lovley et al., 1999)、そういった微生物に有利な環境となったことも群集構造を変化させたと考えられた。

16SrRNA 遺伝子を対象としたアンプリコンシーケンス解析の結果、人工土壌の微生物群集構成は元の土壌に比べ著しく単純であること、腐植物質の有無や静置時間によって原核微生物群集が変化することが確認された(図 11)。各種メタン生成古細菌の原核生

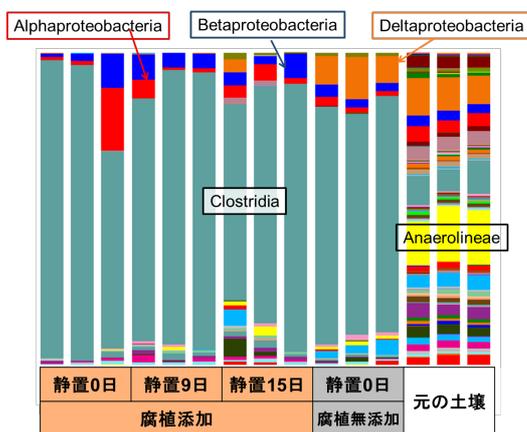


図 11 16S rRNA 遺伝子を対象としたアンプリコンシーケンスにより解析した人工土壌の原核生物群集組成

物に占める割合を比較すると、元の土壌では優占している *Methanosaeta* が人工土壌中では観察されないこと、腐植物質の存在により *Methanocella* の優占度が低下することが示された。-プロテオバクテリアには腐植物質の影響を強く受ける微生物が存在し、*Geobacter* は腐植物質無添加土壌では優占するが、腐植物質の添加によりほとんど見られなくなった。一方で、*Myxococcales* に属する微生物は、腐植物質を添加後静置した土壌でのみ検出された。

以上の結果から、人工土壌は単純化した微生物群集により十分な有機物分解を示すことが明らかとなり、環境中での微生物の生態を解明するためのツールとなりうると期待された。また、腐植物質は人工土壌中の微生物群集の構造と機能を左右する重要な因子であることが明らかとなった。

#### 参考文献

Ding, G.C., Pronk, G.J., Babin, D., Heuer, H., Heister, K., Kogel-Knabner, I., Smalla, K., 2013. Mineral composition and charcoal determine the bacterial community structure in artificial soils. *FEMS*

*Microbiol Ecol*, **86**, 15-25.

Guenet, B., Leloup, J., Hartmann, C., Barot, S., Abbadie, L., 2011. A new protocol for an artificial soil to analyse soil microbiological processes. *Appl Soil Ecol* **48**, 243-246.

Lovley, D. R., Coates, J. D., Blunt-Harris, E. L., Phillips, E. J. P., and Woodward, J. C., 1996. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature*, **382**, 445-448.

Lovley, D. R., Fraga, J. L., Coates, J. D., and Blunt-Harris, E. L., 1999. Humics as an electron donor for anaerobic respiration. *Environ Microbiol.* **1**, 89-98.

#### 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 4 件)

1. 前田悠・渡邊彰・浅川晋・村瀬潤 (2014) 水田土壌微生物の生態解析を目指した人工土壌の試験的開発. 日本土壌肥料学会東京大会 東京農工大学(東京都府中市) 2014.9.10.

2. 前田悠・村瀬潤 (2015) 水田土壌微生物の生態解析を目指した人工土壌の開発-腐植物質と微生物接種源の調製法の検討-. 日本土壌肥料学会京都大会 京都大学(京都府京都市) 2015.9.9.

3. 前田悠・村瀬潤 (2015) 水田土壌微生物の生態解析を目指した人工土壌の開発. 第 31 回日本腐植物質学会. 名古屋大学(愛知県名古屋市) 2015.11.20.

4. 前田悠・村瀬潤 (2016) 水田土壌微生物の生態解析を目指した人工土壌の開発 -腐植物質が微生物群集およびその活性に及ぼす影響-. 日本土壌肥料学会中部支部第 95 回例会. 三重大学(三重県津市) 2016.3.3.

〔図書〕(計 1 件)

1. 村瀬潤 土壌酸化還元境界の微生物ダイナミズム、「土のひみつ -食料・環境・生命-」 白戸康人、豊田剛己、平館俊太郎、船川晋也、矢内純太(日本土壌肥料学会)編、朝倉書店 70-171

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

村瀬潤 (MURASE, Jun)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：30285241

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
前田 悠 (MAEDA, Yu)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・博士課程前期課程