

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658200

研究課題名(和文) 土壌中の現位置酵素活性に関する基礎的検討

研究課題名(英文) A basic study for measurements of in situ soil enzymatic activities

研究代表者

土居 良一(DOI, Ryoichi)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：20587125

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)：土壌中に存在する酵素の活性を、土壌構造の破壊を伴わず、また、pHなどの土壌環境の改変を最小限度化して、評価するための土壌現位置酵素活性測定方法の開発を試みた。竹串を土壌中に挿入し、その強度低下を評価する方法を栃木県の畑地土壌を利用して試験した。室温、暗所にて水飽和、水没、飽和から乾燥を2回繰り返し、の3処理を2週間行った。の処理で竹串の強度がもっとも低下し、当方法の適用可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：A method for in situ soil enzyme activity measurement with neither the destruction of soil structure nor the alternation of soil environmental components such as pH was examined. Changes in bending strength of bamboo barbecue skewer were determined by inserting the bamboo skewer into a field soil collected in Tochigi prefecture. The soil-skewer system underwent one of the following three treatments, namely, water saturation, water-submerging, and two saturation-to-dry cycles within two weeks. The saturation-to-dry treatment resulted in the most significant reduction of bending strength, hence the applicability of the current method to activity measurements of in situ soil enzymes was indicated.

研究分野：土壌生物

キーワード：リグノセルロース分解活性 土壌微生物 原位置土壌酵素 土壌水分 開発適正技術

### 1. 研究開始当初の背景

土壌酵素の活性は、土壌の健康状態を示す。しかし、既存酵素活性測定法は多くが、試料たる土壌を緩衝液と混合するなどして、活性が最大化されるよう、最適化された環境で測定されている。最適化された土壌環境は、実際の土壌環境から乖離していることが多い。土壌サンプリングに際して、本来、現位置に存在した土壌の構造も破壊される。それゆえ、既存の最適化された環境下で測定される土壌酵素活性は、土壌の潜在的な生化学的活性にとどまると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究で、現位置土壌酵素活性と呼ぶものは、上記のように最適化された環境において測定される酵素活性とは異なり、実際の土壌環境における酵素活性であり、本研究の目的は、土壌酵素の現位置活性を測定する手段を試験・開発するものであった。

### 3. 研究の方法

pH の改変や塩類の付加を回避した、テトラゾリウムと糖の水溶液を目的とする土壌に流し込み、一定時間後に、その土壌を採取し、酵素による糖の酸化に伴い、還元されたテトラゾリウムの量を定量する方法を採択した。また、テトラゾリウムと糖の水溶液を含む寒天を目的土壌に接触させ、一定時間後に回収、還元されたテトラゾリウムの量を測定する方法も試みた。

### 4. 研究成果

当初予定した上記方法は、次に述べる問題に直面し、利用できなかった。まず、テトラゾリウムとブドウ糖の水溶液については、植物へのテトラゾリウムの毒性が示された。バジルなどの葉物野菜幼植物では、葉脈がまず着色し、その後、枯死した(図1)。さらには、ポット試験で、土壌を回収し、還元されたテトラゾリウム塩をメタノール抽出で回収することも困難であり、活性の検出が難しかった。pH など、実際に植物が生育している土壌の環境が、これまで多く採用されてきた土壌を当該酵素の活性が最大化する緩衝液などの条件下で培養し、生成物濃度を測定する方法の環境とは乖離していることによると思われる。

また、テトラゾリウムとブドウ糖を含む寒天の回収は困難であった。寒天は土壌に接触した後、休息に収縮した。収縮した寒天から還元されたテトラゾリウムを回収し、定量を試みたものの、ごく微量の回収にとどまり、生成物としての還元型テトラゾリウムの正確な測定に疑問が持たれた。これらのことから、当初計画

していたテトラゾリウムと糖の溶液を利用する方法の開発は中断し、代替法の検討を開始した。

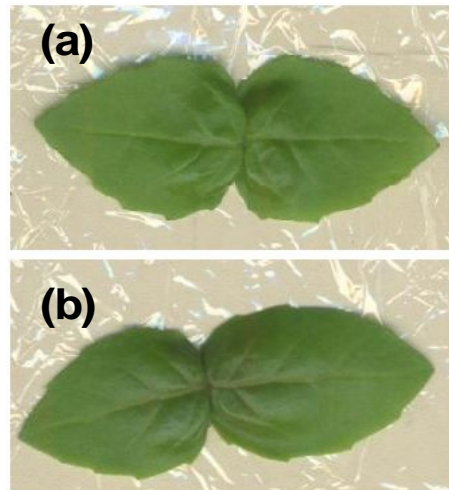


図 1. テトラゾリウムによるバジル幼植物葉の変色。(a)対照、(b)バジル幼植物にテトラゾリウムとブドウ糖の水溶液を与えたもの

代替法として選択した、竹串による現位置リグノセルロース分解酵素活性測定方法は、調理用として市販されている竹串を土壌に対して、構造の破壊を最小限度化しつつ挿入し、土壌と接触させ、土壌と竹串の接触面でのリグノセルロース分解酵素活性を評価するものである。

栃木県内で、園芸作物などの農業生産に利用されている畑の土壌を利用して、深さ 15 cm 直径 4 cm の土壌カラムを作成した。土壌には、乾燥した稲わらを 5 mm 角かそれ以下に細断したものを、重量比で 0、0.2、または 1%加えた。カラムの中央付近上部から竹串をカラム底に向かってゆっくりと静かに挿入した。水の与え方により、3 処理を準備した。それらは、飽和、水没、飽和乾燥である。の飽和处理では、土壌カラムの水分が飽和となるよう、毎日水を加えた。の水没処理では、カラム最上部からさらに 1 cm の深さに水位を保ち、湛水状態の水田に近い環境とした。の飽和-乾燥処理では、と同じく試験開始当初は飽和させたカラムを 1 週間放置し、再度飽和させ、また 1 週間放置して乾燥させた。稲わらの量で 3 処理区、水分条件で 3 処理区となり、これらにより生じた全 9 処理区の各々で 2 カラムを準備した。また、各カラムに竹串 4 本を挿入した。培養は暗所、26 °C で 2 週間行い、竹串を回収した。その後、竹串を手早く水道水で洗い、恒量となるまで凍結乾燥した。この試料を曲

げ強度試験に供した。

表1. 土壌に挿入した竹串強度低下に対する稲わらと水分の影響

処理	稲わら 水分 (%, w/w)	曲げ強度変化	
		対照に対して	強度低下
0	飽和	86.8	13.2
	水没	84.2	15.8
	飽和-乾燥	68.1	31.9
0.2	飽和	84.2	15.8
	水没	90.6	9.4
	飽和-乾燥	63.2	36.8
1.0	飽和	78.0	22.0
	水没	91.7	8.3
	飽和-乾燥	69.6	30.4

結果、表1を得た。これによると、飽和-乾燥のサイクル2回を経た土壌カラムに挿入されていた竹串の強度低下が最も大きく、いずれの稲わら処理区でも強度低下が30%を上回った。他方で、飽和と水没の区では、比較的強度が保たれていた。より還元的な環境でリグノセルロース分解が阻害されたことで、竹串の強度が保存されやすい結果を示している。

表2. 竹串強度変化に対する変動要因の有意性

変動要因	p 値
稲わら	0.962
水分	<0.001
稲わら x 水分	0.009

表1で示された竹串の強度変化に関与した変動要因としては、稲わらは有意性がなく、他方、土壌水分量が竹串の強度を決定する重要な要因であることが示された。水田などでの作物生産において、水分飽和や湛水といった利用形態においては、土壌内のリグノセルロースは、緩慢に分解されるにとどまることが示唆された。

このリグノセルロース分解酵素活性測定方法をコメの商業生産を行っているタイ国中部の水田で利用し、湛水状態や休耕となっており、より酸化条件でのリグノセルロース分解の評価を試みた。ところが、竹串設置後1週間ほどして、確認したところ、竹串の多くが、とくに湛水中の水田で多く紛失していた。付近には、コウノトリなど、水田でタニシなどの小動物を捕食する鳥類が多く活動していた。また、

タガニもいくらか見受けられた。これらの動物が竹串を引き抜いてしまい、回収を妨げたものと考えられた。竹串の回収を確実にするため、鳥類などから防護するカゴなどを設置するべきだったかもしれない。このような、動物の活動が活発な環境での確実な竹串回収については、今後の課題となった。



図2. タイの水田に多く見られたタガニ

#### 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)

Ryoichi DOI (2014) "Precise micromolar-level glucose determination using a glucose test strip for quick and approximate millimolar-level estimation"

*Anal. Methods*, **6**, 9509-9513.

(DOI: 10.1039/C4AY02219J)

査読あり

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

土居 良一 (DOI, Ryoichi)  
東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：20587125

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：