

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450227

研究課題名(和文)近赤外スペクトルを用いた枯死木分解者判定手法の開発

研究課題名(英文) Estimation of main fungal decay of softwoods in Japan by near infrared spectroscopy

研究代表者

酒井 佳美 (Sakai, Yoshimi)

国立研究開発法人 森林総合研究所・九州支所・チーム長

研究者番号：40353700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：近赤外スペクトルによって枯死木の分解者を判定できるか検討した。白色腐朽菌(カワラタケ)と褐色腐朽菌(オオウズラタケ)を接種しそれぞれ分解させたスギ試験体の近赤外スペクトルは主成分分析によって2種を判別可能であった。判別を可能にした主成分は分解材の重量減少の進行に伴うリグニン濃度変化を反映していると考えられた。これに全国各地で採取した分解材のスペクトルを加えて主成分分析すると、白色腐朽菌側、あるいは褐色腐朽菌側に分かれるサンプルの存在を確認でき、近赤外スペクトルを使用した分解者の判定が可能であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Near infrared (NIR) spectra collected from Japanese cedar wood samples, which were decayed by white rot (*Trametes versicolor*) and brown rot (*Tyromyces palustris*), were subjected to principal component analysis. Most of the PC1 score of brown rot was negative and that of white rot was positive. The separating was contributed by spectra that were in the lignin-assigned wavenumber region. This result showed the NIR spectrum could distinguish between the white rot and the brown rot. Using this method, scores of dead wood samples of Japanese cedar, which collected from planted forests around country, distributed along PC1 axis. While higher score of PC1 would relate to white rot, lower score would relate to brown rot. Those results show that NIR spectra are effective for the fungal decay classification.

研究分野：森林生態学

キーワード：枯死木 分解 木材腐朽菌 シロアリ 近赤外分光法 リグニン

## 1. 研究開始当初の背景

森林での枯死木(倒木、立枯木、根株)は多様な生物の生息場として、あるいは物質循環での養分プールとして重要な役割を果たしている。枯死木を分解できるのは全重量の9割を占める木材主成分(リグニン、セルロース、ヘミセルロース)を利用可能な木材腐朽菌類(白色腐朽菌、褐色腐朽菌、軟腐朽菌)と無脊椎動物類(シロアリや食材性甲虫類)である。自然条件下では分解者が多種多様に存在し、分解の進行とともに優占種も変化することが知られている。どの分解者が主に関与するかによって分解速度や分解残渣の化学的特性は異なる。つまり、枯死木による物質循環の解明には分解者の寄与も解明する必要がある。

枯死木の分解に大きな影響を及ぼす分解者は、木材腐朽菌類とシロアリである。木材腐朽菌類の生育や生物活性に最適な気温や湿度は種によって異なる。また、菌類の活着のしやすさは広葉樹と針葉樹とで異なることから、森林によって優占する木材腐朽菌類が異なる可能性があるが、地域ごとの木材腐朽菌の分布の特徴はほとんど知られていない。シロアリに関してはヤマトシロアリやイエシロアリの日本での分布域は知られている。しかし、森林での枯死木分解へのシロアリの影響についての情報は非常に乏しく、観察例として言及されるに留まる。日本は気候や地勢が多様であり、その立地環境に適した分解者が優占し分布すると予想され、地域ごとに特徴的な分解パターンの存在があると予想される。

近赤外分光法(NIR)では特定波数における光の吸収量の変化に着目し、これらを統計的手法で処理することにより、試料内の成分を定量・定性分析できる。木材分野では、波数 $5974\text{cm}^{-1}$ や $5795\text{cm}^{-1}$ での吸収量変化がリグニンの濃度変化に対応することが報告されている(Schwanninger et al., 2011)。NIRのこのような特長を活かし、Facklerら(2007)は、純粋培養した既知の木材腐朽菌種によって一定期間木材を腐朽させた後に、リグニンとセルロースの分解に伴う濃度変化とそれに対応するNIRスペクトルの波数を菌種別に明らかにすることで、木材腐朽菌の分解の特徴をパターン化している。地域間で異なる分解者群集が存在するとすれば、分解者の分解パターンをNIRスペクトルの統計的手法による解析をもとにモデル化することができる。つまり、各地域の森林で採取した枯死木のNIRスペクトルから、主たる分解者の推定が可能になると着想した。

## 2. 研究の目的

本課題では、化学成分の変化をそれぞれの成分を特徴付ける吸収ピークの変化として解析できるNIRを利用して、枯死木の分解者判定手法を開発することを目的とする。地域ごとに主たる分解者群集によって3つの分解

パターン(木材腐朽菌類優占型、シロアリ優占型、木材腐朽菌・シロアリ混合型)を仮定した木材分解試験、および、室内で純粋培養した分解者(白色腐朽菌、褐色腐朽菌)による木材分解試験を実施し、NIRスペクトルをもちいて分解パターンを確認する。さらに全国各地で採取した自然条件下で分解した枯死木のNIRを用いた枯死木の分解者判定手法によって判定可能かを確認する。

## 3. 研究の方法

### (1) NIR スペクトル採取用試料の収集

野外分解試験(以下、野外分解試験): 気候と主たる分解者群集の異なる3地域(亜寒帯・木材腐朽菌類優占型:北海道・羊ヶ丘、温帯・木材腐朽菌類シロアリ混合型:茨城・桂、筑波山、暖帯・シロアリ優占型:鹿児島・吹上浜)に計4プロットを設定し材分解試験をおこなった。羊ヶ丘は森林総合研究所北海道支所実験林のトドマツ人工林(北海道札幌市)、桂は茨城森林管理署管内に設置した桂試験地のスギ林(茨城県東茨城郡)、筑波山は茨城森林管理署管内に設置した筑波共同試験地のスギ林(茨城県石岡市)、そして、吹上浜は鹿児島森林管理署管内のクロマツ林である(鹿児島県日置市)。予備調査時に羊ヶ丘ではヤマトシロアリの生息は確認していない。桂と筑波山ではヤマトシロアリの生息を確認した。吹上浜にはイエシロアリとヤマトシロアリ両種が生息しており、プロットはイエシロアリの巣から10m以内に設定した。一辺が約5mのプロットを2013年5月に各調査地に設定し、直径約25cmのスギとヒノキの円板を各樹種48枚設置した。各樹種とも半年ごとに3枚の円板を回収し、分解開始後6か月、12か月、18か月、24か月となる分解材とした。

腐朽菌接種分解試験(以下、接種試験): 試験材は野外分解試験で使用した円板を採取した残りの丸太から採材したスギ辺材試験体(20×20×10mm)を使用した。PDA培地の試験体への吸着による成分分析への影響を抑えるため、腐朽操作においては、100mL容プラスチック製培養瓶に基材としてパーミキュライトとコーンコブ各々10gを入れ、イオン交換水25mLを添加した。これをオートクレーブで121、30分滅菌後、PDA培地上に展開したオオウズラタケ(FFPRI 0507)もしくはカワラタケ(FFPRI 1030)菌叢をコルクポスターで打ち抜き、培養瓶内の基材上に菌片を接種した。基材表面に菌叢が蔓延した時点で(接種後、約3週間)EOG滅菌したスギ辺材試験体を設置し、所定期間、暴露した。暴露後、60-48時間乾燥させた。質量減少率はスギ辺材試験体の暴露前後における60-48時間乾燥時の質量をもとに求めた。

自然条件下で分解した枯死木(以下、枯死木): スギとヒノキの直径5cm以上の枯死木材を人工林で収集した。幅広い気候下で分

解した試料を含むようにするため、スギは 6 県（秋田、茨城、富山、千葉、山口、大分）、ヒノキも 6 府県（埼玉、新潟、京都、三重、広島、長崎）で収集した。試料として枯死木から 3~10cm 厚の円板を採取した。

#### (2) NIR スペクトル採取用試料の前処理

野外分解試験で回収した円板は乾燥後 4 等分した 1 枚を樹皮、心材、辺材に分けた。辺材部分を化学分析と NIR スペクトル取得に供した。枯死木の円板は樹皮と材とに分けた。材部分を化学分析と NIR スペクトル取得に供した。

分析に使用した材はハサミや鉋で小さくした後、粉碎機をもちいて微粉碎試料にした。NIR スペクトル取得用の微粉碎試料はガラス製サンプル管に移し替え、70℃で乾燥した後、分析直前までデシケーター内で保管した。木材成分測定用の試料はポリエチレン製袋に保管した。

接種試験の試験体は固形のまま NIR スペクトルを取得することにし、試験体は乾燥後、分析直前までデシケーター内で保管した。

#### (3) NIR スペクトルの取得と解析

NIR スペクトルは FT-IR(Nicolet FT-IR 6700、Thermo Fisher Scientific Inc.) に Smart UpDRIFT を装着した近赤外分光分析計により反射スペクトルを測定した。測定条件は、波数を 10000~4000  $\text{cm}^{-1}$ 、分解能 8.0  $\text{cm}^{-1}$ 、スキャン回数を 100 回とした。微粉碎試料のスペクトルは 3 回測定したものを平均して使用した。接種試験の試験体はランダムに表面の 3 か所で測定したものを使用した。

NIR スペクトル解析には波数域 6100-5750  $\text{cm}^{-1}$  を使用した。スペクトルの前処理には SNV 補正と Savitzky-Golay 法の後に二次微分処理をおこなった。これらのスペクトルをもちいて主成分分析 (PCA) を The Unscrambler X ver.10.3(Camo Software) によって実行した。

#### (4) 木材成分分析

微粉碎試料はクラークソン法（硫酸法）に

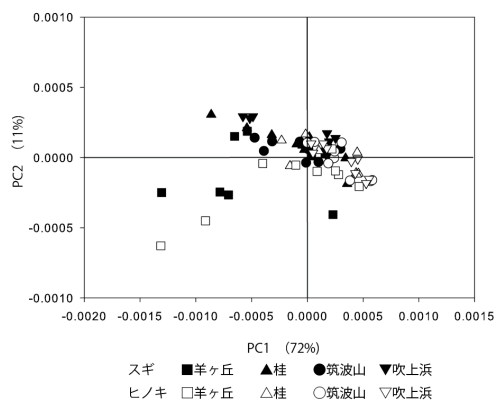


図1 野外分解試験による分解材のスコアプロット

よりリグニンの定量を行った(日本木材学会・化学編編集委員会, 1985)。微粉碎試料はソックスレー抽出器を用いてエタノール 1:ベンゼン 2 の混合液により脱脂したのちに、クラークソン法に供した。脱脂試料は 72% 硫酸で加水分解した後、濾過し、残渣と濾液に分けた。酸可溶性のリグニンは、濾液の吸光度 (205-210 nm) を測定して算出した。リグニンは、残渣としての酸不溶性のリグニンと酸可溶性のリグニンを合わせたものとした。リグニン濃度は、リグニン量を脱脂試料重量あたりの濃度として計算した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 主たる分解者群集が異なる試験地間での分解材の比較

野外分解試験によって得られたスギとヒノキの 4 か所の試験地(羊ヶ丘、桂、筑波山、吹上浜)での分解材の NIR スペクトルを全てもちいて PCA 分析をおこなった。主成分 1 (PC1) の寄与率は 72%、主成分 2(PC2) では 11% となった。X 軸に PC1、Y 軸に PC2 のスコアをプロットしたスコアプロットでは、4 か所の試験地の多くのデータが帯状に 1 つの塊となっていた(図 1)。このことはサンプルの類似性を量的に示すスペクトル強度にあまり差が無かったことを示しており、使用した波数域 6100-5750  $\text{cm}^{-1}$  において分解材から得られる光学的性質に地域間差はなかったと考えられた。一方、PC1 と PC2 のスコア値が負となる領域に離れて点するサンプルがあり、これらは全て羊ヶ丘であった(図 1)。このことから、羊ヶ丘では同じ調査地内でも光学的性質の異なる分解材が存在したと考えられる。光学的性質は供試した分解材の木材成分に起因するものであることから、羊ヶ丘では異なる分解者グループも存在していたと予想される。本課題の仮説は、地域分解パターンがあるとしていたが、本結果ではそれは示されなかった。それよりも、同じ調査地内での個体間差のほうが大きかった。

##### (2) 褐色腐朽菌と白色腐朽菌による分解材の比較

オオウズラタケ(褐色腐朽菌)とカワラタケ(白色腐朽菌)による分解材と分解していない初期材の NIR スペクトルをもちいて PCA 分析を行った。PC1 の寄与率は非常に高く 94% であった。スコアプロットでは PC1 に沿って高いスコアの方にカワラタケ、低いスコアにオオウズラタケとそれぞれに分かれ、分解材から得られる光学的性質に差があることが示された(図 2)。そこで、オオウズラタケとカワラタケの二次微分スペクトルを比較すると波数 5980  $\text{cm}^{-1}$  付近でオオウズラタケによる分解材のピークはカワラタケより高くなっていった(図 3)。各サンプルの質量減少率データと比較すると、カワラタケは質量減少が進んだ分解材ほどピークが低く、オオウズラタケは高いことがわかった。この波数の

ピークはリグニン由来であると報告されており (Schwanninger et al., 2011)、質量減少にともなうリグニン濃度変化を示していると予想された。菌ごとに PCA 分析を実施しスペクトル形状の光学的情報を示すローディングプロットを比較すると、どちらの菌も PC1 のローディングプロットの波数 5980 $\text{cm}^{-1}$  付近に最も高いピークが示されており (図 3)、2 つの菌の PC1 スコアの差はリグニン濃度を反映していると考えられた。このことは褐色腐朽菌類では分解の進行に伴いリグニン濃度が上昇し、白色腐朽菌ではリグニン濃度が低下することを示しているといえるため、これらの菌類によって分解された材の木材成分特性を NIR スペクトルから判別することは可能であると考えられた。

### (3) 枯死木の分解者判定手法の開発

NIR スペクトルをもちいた分解者判定が可能であるか検討した。スギの全ての NIR スペクトルをもちいて PCA 分析をおこなった。PC1 の寄与率は 73%、PC3 では 5% となった。スコアプロットを見ると、オオウズラタケとカ

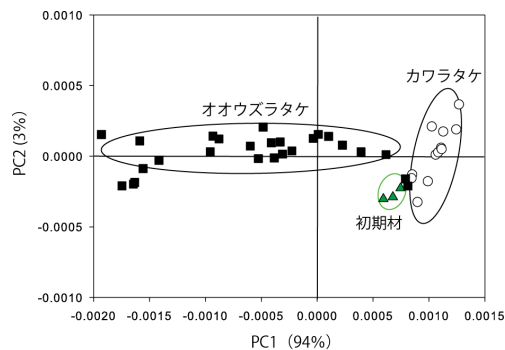


図 2 オオウズラタケとカワラタケによる分解材のスコアプロット

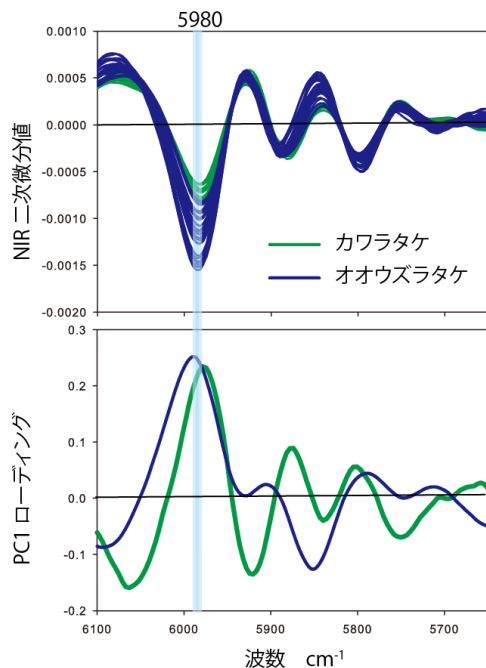


図 3 オオウズラタケとカワラタケによる分解材の二次微分スペクトルと PC1 のローディングプロット

ワラタケは (2) の結果と同様に、X 軸の PC1 に沿って分かれた (図 4)。また、野外分解試験材と枯死木は、PC1 に沿ってスコア 0 付近を中心に左右に広がる集団となった。Y 軸方向には接種試験による分解材が PC3 スコアの高い位置に横に並び、その下に野外分解試験材、そして枯死木と分かれた (図 4)。野外分解試験材と枯死木のサンプルは、PC1 スコアが低いほどリグニン濃度が高くなる傾向があり、回帰直線は野外分解試験材では決定係数がやや低いものの  $y = -2276x + 32.6$  ( $r^2 = 0.25$ )、枯死木が  $y = -7732x + 35.9$  ( $r^2 = 0.75$ ) となった (図 5)。つまり、PC1 のスコアが低くリグニン濃度の高いサンプルは主に褐色腐朽菌による分解を受け、反対に PC1 スコアが高くリグニン濃度の低いサンプルは主に白色腐朽菌による分解を受けていたことが、スコアプロット (図 4) から推察された。なお、PC3 が分解材のどのような特徴に由来するのかは不明である。しかし、野外分解試験と接種試験の材は同じ林分で伐採した丸太材を使用し、枯死木は全国各地で採集したものであったことから、初期の材の特徴が反映しているかもしれない。

### (4) 今後の課題

本研究で供試した褐色腐朽菌類、あるいは白色腐朽菌類に主に分解された分解材は NIR スペクトルによる分解者判定の可能性を示した。他の褐色腐朽菌や白色腐朽菌による接種分解試験材等をもちいた検証試験が必要である。また、当初の試験設定では、地域ごとに主たる分解者群集によって 3 つの分解パターンを想定していたが、NIR スペクトルから地域間差は検出できなかった。この原因の

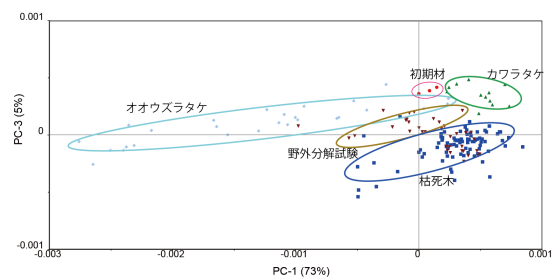


図 4 全てのスギの分解材のスペクトルデータを使った PCA 分析のスコアプロット

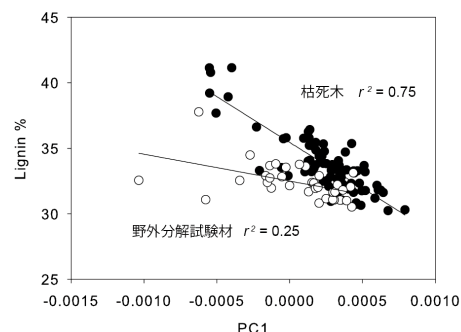


図 5 PC1 のスコアとリグニン濃度との関係

1 つとして、野外分解試験において主たる分解者がシロアリであった分解材の頻度が少なかった(酒井ら、2015)ことがあげられる。野外での枯死木分解へのシロアリの影響は分解初期には限定的である可能性がある。また、分解者判定にシロアリを加えるには室内試験によるシロアリの分解残渣等をもちいるなど手法を工夫し、木材腐朽菌類との違いをさらに検討する必要がある。

#### 引用文献

Fackler, K., Schwanninger, M., Gradinger, C., Srebotnik, E., Hinterstoisser, B. & Messner, K. (2007). Fungal decay of spruce and beech wood assessed by Near-infrared spectroscopy in combination with uni- and multivariate data analysis. *Holzforschung* 61, 680-687.

日本木材学会・化学編編集委員会(1985) 木材科学実験書 化学編, 中外産業調査会東京.

酒井佳美、大村和香子、鶴川 信、石塚成宏、相澤州平(2015)スギとヒノキの材の初期分解過程への分解者群集と周辺環境の影響、九州森林研究、68: 161-163.

Schwanninger, M., Rodrigues, J. C. & Fackler, K. (2011) A review of band assignments in near infrared spectra of wood and wood components. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 19, 287-308.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

酒井佳美、大村和香子、鶴川 信、石塚成宏、相澤州平、北海道、茨城、鹿児島でのスギとヒノキの材分解試験による初期分解過程の比較、九州森林研究、査読有、69号、2016、pp. 75-80.

Jomura Mayuko, Akashi Yuhei, Itoh Hiromu, Yuki Risa, Sakai Yoshimi, Maruyama Yutaka, Biotic and abiotic factors controlling respiration rates of above - and belowground woody debris of *Fagus crenata* and *Quercus crispula* in Japan, *PLOS ONE*, 査読有、10, 2015, e0145113, DOI: 10.1371/journal.pone.0145113

酒井佳美、大村和香子、鶴川 信、石塚成宏、相澤州平、スギとヒノキの材の初期分解過程への分解者群集と周辺環境の影響、九州森林研究、査読有、68号、2015、pp. 161-163.

[学会発表](計9件)

酒井佳美、石塚成宏、大村和香子、分解者群集の異なる地域でのスギとヒノキの材分解試験による分解材の化学的性質の比較、第66回日本木材学会大会、2016年3月27日~2016年3月29日、名古屋大学(愛知県・名古屋市)

酒井佳美、石塚成宏、大村和香子、異なる地域で分解を受けた針葉樹材の近赤外スペクトル解析 - 化学特性による地域間差の検討 -、第30回記念近赤外フォーラム、2014年11月26日~2014年11月28日、筑波大学(茨城県・つくば市)

酒井佳美、石塚成宏、伐採後放置された針葉樹材の分解による化学性の地域間差、第64回日本木材学会大会、2014年3月13日、ひめぎんホール(愛媛県・松山市)

大村和香子、片岡 厚、木口 実、伊藤優子、酒井佳美、築瀬佳之、シロアリ蟻道の性状と光遮断性、第29回(公社)日本木材保存協会年次大会、2013年5月28日、メルパルク東京(東京)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

酒井 佳美 (SAKAI Yoshimi)

国立研究開発法人森林総合研究所・九州支所・チーム長

研究者番号: 40353700

##### (2) 研究分担者

大村 和香子 (OHMURA Wakako)

国立研究開発法人森林総合研究所・木材改質研究領域・領域長

研究者番号: 00343806

鶴川 信 (UGAWA Shin)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号: 30582738

##### (3) 連携研究者

石塚 成宏 (ISHIZUKA Shigehiro)

国立研究開発法人森林総合研究所・立地環境研究領域・室長

研究者番号: 30353577