

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510012

研究課題名(和文) 森林土壌微生物群集におけるリン制限の包括的理解

研究課題名(英文) Studies on phosphorus limitation in microbial communities of forest soils

## 研究代表者

國頭 恭 (Kunito, Takashi)

信州大学・学術研究院理学系・准教授

研究者番号：90304659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：リン利用性が低い土壌では、土壌微生物は多くのリンを獲得するために、炭素獲得酵素よりもリン獲得酵素に相対的に多くの資源を配分していることが判明した。供試土壌では、土壌中リン利用性が低い場合には、ホスファターゼ生産能を有する一部の微生物種が優占し、それらが盛んにホスファターゼを生産している可能性が示された。また本研究により、炭素獲得酵素として  $\alpha$ -D-グルコシダーゼ、リン獲得酵素として酸性あるいはアルカリホスファターゼを代表させ、その比を算出することで、土壌中リンの生物利用性を化学的抽出法に依らず推定できることが示された。

研究成果の概要(英文)：It was found that microorganisms preferentially expended resources in the form of phosphatase production rather than  $\alpha$ -D-glucosidase production to acquire phosphorus in soils with low phosphorus availability. Specific microbial species might predominate for production of phosphatase in low phosphorus available soils. The ratio of acid or alkaline phosphatase to  $\alpha$ -D-glucosidase activities would be useful for evaluating phosphorus availability in soils.

研究分野：生物地球化学

キーワード：リン ホスファターゼ 資源配分モデル 土壌

## 1. 研究開始当初の背景

土壌微生物は概してエネルギー制限(炭素制限)の状態にあるが、エネルギー以外に温帯の陸域では窒素、熱帯の陸域ではリンが共制限因子となっている場合がある。申請者は平成 22-23 年度の科研費:若手(B)「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」において、日本の一部の森林土壌では微生物がリン制限であることを見出した(Kunito et al., 2012)。しかしながら、可給態リン濃度は極めて低いにも拘らず、微生物がリン制限になっていない土壌も存在した。その原因を究明するために実施した予備的研究において、ホスファターゼ活性とグルコシダーゼ活性の比を求めたところ、リン制限になっていない土壌でも、可給態リン濃度が低い場合にはこの比が上昇していた。つまり土壌微生物は未だリン制限の状態には陥っていないが、欠乏しがちなリンを獲得するため、炭素獲得系酵素よりもリン獲得系酵素の生産に資源を多く配分したものと推察される。このように、土壌微生物のリン制限の有無の調査では限られた情報しか得られないが、より鋭敏に可給態リン濃度に応答するホスファターゼ活性を対象とした資源配分モデルによって、土壌微生物のリン要求性に関して詳細な情報が得られる可能性がある。しかし本仮説は、予備的研究で対象とした少数の試料の結果に基づいており、その妥当性は不明である。また可給態リン濃度へのホスファターゼ活性の応答が、土壌微生物の生理状態の変化によるのか、微生物群集構造の差異によるのか、あるいは両者によるとすればいずれの寄与が大きいのか、といった情報は皆無である。

## 2. 研究の目的

本研究では、可給態リン濃度の低い森林土壌を主な対象とするが、森林土壌ではリン濃度以外の特性も大きく変動するため、実験結果の解釈が極めて複雑である。そこで、長期にわたってリンを施肥していない畑地と施肥している畑地から土壌試料を採取し、可給態リンの多寡によるホスファターゼ活性や微生物群集構造の差異を調査するモデル系として使用する。これら畑土壌を実験に供し、可給態リン濃度が、リン獲得系酵素と炭素獲得系酵素生産への資源配分や土壌微生物群集のリン制限の有無に対して与える影響を調査する。また、可給態リン濃度に応じたホスファターゼ活性の変化が、微生物の生理状態の違いによるのか、ホスファターゼを生産する微生物相の差異によるのかを、ホスファターゼ遺伝子の多様性に着目して検討する。微生物のリン要求性は、可給態リン濃度だけでなく、炭素、窒素といった他の栄養素との相対的関係にも依拠している。そこで、土壌中の炭素、窒素濃度も測定し、リン制限や酵素生産への資源配分の結果の解釈に用いる。同様の実験を森林土壌でも実施し、得られた

結果を、畑地土壌の結果を基に解析する。これらの結果を総合し、今後、窒素沈着により「人為的リン制限」が生じる可能性がある森林土壌の特徴を精査する。

## 3. 研究の方法

森林土壌ではリン濃度以外の特性も大きく変動し、可給態リンに対する微生物群集の応答の評価が難しいため、リンを施肥した畑地と施肥していない畑地から採取した土壌をモデル系として実験に供する。

### (1) リン濃度と存在形態

土壌中に含まれるリン濃度を測定すると同時に、Hedley の逐次抽出法を使用し、水溶性リンや Fe-Al 結合態リンなどに分画する。この分析法により、土壌中リンの存在形態と生物利用性を評価する。

また Hedley の逐次抽出法は、土壌中のリン全体の形態を評価するには適しているが、リンの生物利用性の評価は化学的にされたものであり、実際の生物利用性を反映していない可能性がある。そこで実際に生物が生産する各種ホスファターゼを利用し、これら酵素を土壌抽出液に添加・培養し、放出されるリン酸を定量することで、リンの生物利用性を調査する。各種ホスファターゼの基質特異性を利用し、易分解性リン酸モノエステル、フィチン酸様リン、DNA 様リンの 3 タイプの生物利用性リン濃度を測定する。

### (2) ホスファターゼ遺伝子の多様性評価

土壌微生物群集のホスファターゼ遺伝子の多様性評価は、土壌から抽出した DNA を鋳型としたホスファターゼ遺伝子部位の PCR 増幅と、その後の DGGE 解析により実施する。

## 4. 研究成果

### (1) 畑土壌のリン濃度と形態

リンを施肥していない処理を含め、様々な施肥管理をしている長期連用圃場 14 区から、畑土壌(黒ボク土)を計 42 点採取した。可給態リン酸量は Truog 法、Bray 第二法(準法)、Hedley 法により測定した。リンを施用していない区では、可給態リン酸量は極めて低い値を示した。抽出されたリン酸量は Bray 第二法(準法) > Truog 法 > Hedley 法の H<sub>2</sub>O-Pi + NaHCO<sub>3</sub>-Pi の順であった。Truog-P、Bray 2-P、H<sub>2</sub>O-Pi + NaHCO<sub>3</sub>-Pi は互いに有意な正の相関を示し、またリン施肥量とも強い正の相関を示した。Hedley 法によりリン形態を分析したところ、いずれの区でも NaOH-Pi + Po が卓越していた。またこの画分のリン含量は、リン施肥量と有意な正の相関を示した。このため今回用いた黒ボク土では、施肥リンの多くが活性 Al・Fe に吸着していることが示唆され、既存の知見と一致した。また NaHCO<sub>3</sub> 抽出液に各種ホスファターゼを添加しリン

の利用性を調査したところ、ほぼ全てが分解され、生物利用性が高いことが判明した。

微生物群集におけるリン要求性を評価するため、 $\beta$ -D-グルコシダーゼ活性に対するホスファターゼ活性の比を測定した。この比はリンを施用していない区で高く、Truog-P、Bray 2-P、 $H_2O$ -Pi +  $NaHCO_3$ -Pi のいずれとも有意な負の相関を示した。とくに  $\beta$ -D-グルコシダーゼ活性に対する酸性ホスファターゼ活性の比は、 $H_2O$ -Pi 濃度と強い負の相関を示した(図)。このため、リンが少ない土壤では、微生物がリンを獲得するため、ホスファターゼの合成に優先的に資源を配分している可能性が示された。しかしながら、リン添加により微生物活性が有意に増加した区は1つのみであり、それ以外の区では微生物群集はリン制限の状態ではなかった。

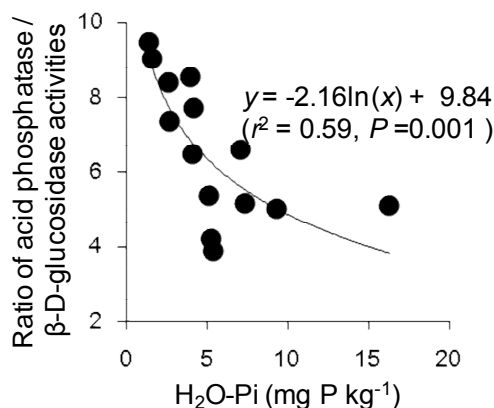


図.  $\beta$ -D-グルコシダーゼ活性に対する酸性ホスファターゼ活性の比は、 $H_2O$ -Pi濃度

### (2) 畑土壤のホスファターゼ遺伝子

アルカリホスファターゼ産生細菌(PhoD 生産菌)では、リン施肥を行っていないまたは非常に少ない区において、他の区と異なる群集構造を示した。またこれらの区では、 $\beta$ -D-グルコシダーゼ活性に対するアルカリホスファターゼ活性の比が高く、微生物はアルカリホスファターゼ生産に優先的に資源を配分している可能性が示唆された。PhoD 生産菌の多様性は、堆肥由来のリン施与量およびアルカリホスファターゼ活性と有意な負の相関を示した。このため、栄養素利用性により、それを獲得するための酵素を有している微生物群集の組成や多様性が変化するとともに、微生物群集の酵素生産への資源配分や酵素活性といった生理的側面も変化することが示された。

### (3) 森林土壤中のリン利用性評価

用いた森林土壤の水溶性リンを測定したところ、その濃度は概ね低く、また有機態が優占し約半分から75%を占めた。酸性ホスファターゼ活性は土壤 pH と有意な負の相関を示した。また酸性ホスファターゼ活性と  $\beta$ -D-グルコシダーゼ活性の比も土壤 pH と有意な

負の相関を示した。酸性ホスファターゼ活性と  $\beta$ -D-グルコシダーゼ活性の比は、水溶性無機態リンとも有意な負の相関を示した。前年度までに畑土壤で行なった研究から得られた結果より、この関係は、pH の低い森林土壤ではリン利用性が低く、微生物が炭素獲得のための  $\beta$ -D-グルコシダーゼ生産よりも、リン獲得のための酸性ホスファターゼ生産に、相対的により多くの資源を配分したことによると推察された。

以上の研究結果を総合すると、リン利用性が低い土壤では、土壤微生物は多くのリンを獲得するために、炭素獲得酵素よりもリン獲得酵素に相対的に多くの資源を配分していることが判明した。また土壤中のリン利用性により、ホスファターゼ生産菌の組成も変化することが示唆された。とくに本研究で用いた土壤では、土壤中リン利用性が低い場合には、ホスファターゼ生産能を有する一部の微生物種が優占し、それらが盛んにホスファターゼを生産している可能性が示された。この結果の一般性については、今後の研究が待たれる。また本研究により、炭素獲得酵素として  $\beta$ -D-グルコシダーゼ、リン獲得酵素として酸性あるいはアルカリホスファターゼを代表させ、その比を算出することで、土壤中リンの生物利用性を化学的抽出法に依らず推定できることが示された。本推定法は、土壤特性の変動が激しい森林土壤において、微生物群集のリン制限・リン要求性を理解する上で有用であろう。

### <引用文献>

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, 39-46.

### 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3件)

Moro, H., Kunito, T., and Sato, T. Assessment of phosphorus bioavailability in cultivated Andisols from a long-term fertilization field experiment using chemical extractions and soil enzyme activities. *Arch. Agron. Soil Sci.*, 61, 1107-1123, 2015. 査読有  
DOI: 10.1080/03650340.2014.984697

Moro, H., Kunito, T., Saito, T., Yaguchi, N., and Sato, T. Soil microorganisms are less susceptible than crop plants to potassium deficiency. *Arch. Agron. Soil Sci.*, 60, 1807-1813, 2014. 査読有

DOI: 10.1080/03650340.2014.918960

Kunito, T., Tobitani, T., Moro, H., and Toda, H. Phosphorus limitation in microorganisms leads to high phosphomonoesterase activity in acid forest soils. *Pedobiologia*, 55, 263-270, 2012. 査読有

DOI: 10.1016/j.pedobi.2012.05.002

〔学会発表〕(計 10 件)

諸 人誌、國頭 恭、齋藤龍司、矢口直輝、大塚重人、長岡一成。施肥管理の異なる畑土壌の酵素活性と酵素産生遺伝子を標的とした PCR-DGGE による微生物群集構造解析。環境微生物系学会合同大会、2014 年 10 月 21-24 日、アクトシティー浜松コングレスセンター。

諸 人誌、國頭 恭、齋藤龍司、矢口直輝、大塚重人、長岡一成。施肥管理の異なる畑土壌におけるホスファターゼ活性とアルカリホスファターゼ生産細菌の群集構造解析。日本土壌肥料学会 2014 年度東京大会、2014 年 9 月 9-11 日、東京農工大学。

藤田一輝、國頭 恭、松下純子、中村 芳、諸 人誌、吉田清志。畑土壌中の可給態窒素評価法の比較。日本土壌肥料学会 2014 年度東京大会、2014 年 9 月 9-11 日、東京農工大学。

Moro, H., Kunito, T., and Sato, T. Evaluation of phosphorus bioavailability using soil enzyme activities: comparison with chemical extraction methods and crop P content. 20th World Congress of Soil Science, June 8-13, 2014, Jeju, Korea.

Moro, H., Kunito, T., Komukai, Y., and Toda, H. Phosphorus or nitrogen limitation in microorganisms in some Japanese forest soils. 20th World Congress of Soil Science, June 8-13, 2014, Jeju, Korea.

Moro, H., Kunito, T., and Sato, S. Assessment of phosphorus bioavailability in cultivated Andisols from the long-term field experiment using chemical extractions and soil enzyme activities. The 11th International Conference of the East and Southeast Asia Federation of Soil Science Societies (ESAFS), October 21-24, 2013, Bogor, Indonesia.

諸 人誌、國頭 恭、佐藤 強。黒ボク土におけるリン利用性評価法の検討—化学的抽出法と酵素活性法によるアプローチ。日本土壌肥料学会 2013 年度名古屋大会、2013 年 9 月 13 日、名古屋大学。

諸 人誌、國頭 恭、佐藤 強。酵素活性法を用いた畑土壌のリン利用性の評価。日本土壌微生物学会 2013 年度大会、2013 年 6 月 20 日、東京農工大学。

諸 人誌、國頭 恭、朴 虎東、佐藤 強。施肥管理の違いが土壌微生物群集の生理的状态へ与える影響。日本土壌肥料学会 2012 年度鳥取大会、2012 年 9 月 4 日、鳥取大学。

諸 人誌、國頭 恭、朴 虎東、佐藤 強。大麦根圏中のリン形態と微生物群集の基質利用パターンの変動。日本土壌微生物学会 2012 年度大会、2012 年 6 月 23 日、神戸大学。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

國頭 恭 (KUNITO, Takashi)

信州大学・学術研究院理学系・准教授

研究者番号：90304659

### (3) 連携研究者

長岡 一成 (NAGAOKA, Kazunari)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター土壌肥料研究領域・主任研究員

研究者番号：80355544