

C-2 酸性物質の生態系に与える影響に関する研究

(2) 環境酸性化の指標生物に関する研究

② 環境酸性化の土壤微生物に与える影響に関する研究

研究代表者 農業環境技術研究所 横山 和成

農林水産省 農業環境技術研究所
環境生物部 土壤微生物生態研究室 横山 和成

平成5～7年度合計予算額 9,637千円
(平成7年度予算額 3,222千円)

[要旨] 環境酸性化が土壤微生物生態系に及ぼす影響をモデル環境と自然環境について評価した。モデル環境での酸性化では、モデル土壌 (pH6.1) に人工酸性雨 (0.25mMの塩酸、硝酸、硫酸の混合液、pH3.5) を処理し、処理直後 (24時間後) と長期間の静置後 (1年間)、土壤細菌集団に現れる影響について調査した。人工酸性雨を処理した土壌の細菌群の多様性は、処理直後、対照土壌 (殺菌蒸留水処理) の56%と激減し、長期間の静置により次第に回復し、1年後には対照土壌の85%まで回復した。これに対して、分離される細菌の利用炭素源数では、処理直後に対照土壌の30%と激減したものが1年後においても44%までしか回復しなかった。このことから、人工酸性雨のモデル土壌細菌集団への影響には多様性の減少と利用炭素源数の少ない菌種が優先する集団へのシフトとの両面が考えられ、シフトした細菌集団は長期にわたり維持されると考えられた。自然環境での酸性化の土壤微生物への影響に関しては、青森県恐山に存在する酸性化土壌の細菌集団と糸状菌集団の菌数と多様性を調査した。その結果、生菌数で見た場合、酸性化の進行とともに細菌が減少し、糸状菌が増加した。これに対して、多様性では細菌、糸状菌ともに減少し、酸性化が土壤微生物生態系を広範囲に単純化する恐れがあることが示唆された。

[キーワード] 酸性化土壌、土壤微生物、多様性評価、単純化、炭素源利用能

1. 序

地球環境の変動、特に気温の上昇、降雨量の変動等は土壤生態系を保持する微生物の機能を攪乱する恐れがある。更に、酸性雨降下、酸性化学物質の投入等による土壤環境の酸性化の植物生態系への影響は、既に顕在化しつつある⁷⁾⁹⁾。土壤中で行われる微生物生態系変化は、物質循環における分解者として極めて重要な役割を担うにもかかわらず、地上部の変化に比べ著しく確認が困難である。

一般に、土壤微生物群集は環境が変化するときその変化に敏感に反応すると考えられている¹⁾。しかしながらその変化を捉える手法としては、土壤の懸濁液中に土壤粒子から遊離してくる微生物を培地上でコロニーを形成させ、そのコロニー数を計数する事により、土壤中の生菌数を推定する希釈平板法、土壤中の呼吸量等の生物活性、抽出される有機物量等から推定されるバイオマス量などが定法として用いられているが、微弱な変化を捉えることが不得意であった³⁾⁶⁾。近年、土壤微生物群集に起こる変化を迅速に感度良く検出することの重要性から、土壤中のDNA分子着目した手法¹⁰⁾、土壤の酵素的活性に着目した手法⁴⁾等様々な手法が開発されている。

2. 研究目的

本研究では、環境酸性化の土壤微生物集団に与える影響の迅速で高感度な評価法について検討・開発するとともに、その影響の評価、予測を試みる。

3. 研究方法

(1) 供試土壌

①モデル土壌：農環研エコトロン土壌 (気温：外気追従、CO₂濃度：350ppm、pH6.1) 土

壤を用いた。

②自然土壌：青森県恐山に分布する自然酸性化土壌（スギ美林：pH5.4，円通寺硫気口周辺スギ林：pH3.6，硫気口直上ブナ林：pH3.4，鬼石ササ原：pH3.2，硫気口周辺：pH3.1）を用いた。

（2）糸状菌集団の多様性評価法の検討のためのモデル糸状菌

形態的特徴に基づく糸状菌集団の多様性評価法の検討のためモデル菌として，希釈平板法により土壌から通常分離される糸状菌について定法で分類同定された7属25菌株（表1）を供試した。

これら25菌株から無作為に選ばれた10菌株で構成される20グループをモデル糸状菌集団とした。

表1. 供試菌

<i>Aspergirus niger</i>
<i>Fusarium graminearum</i>
<i>F. oxysporum</i>
<i>F. solani</i>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>
<i>C. macrocarpum</i>
<i>C. herbarum</i>
<i>Trichoderma viride</i>
<i>T. koningii</i>
<i>T. pseudokoningii</i>
<i>T. crassum</i>
<i>Mucor microsporum</i>
<i>M. racemosus</i>
<i>M. hiemalis</i>
<i>M. sp.</i>
<i>Mortierella chlamidospora</i>
<i>M. hyalina</i>
<i>M. isabellina</i>
<i>M. alpina</i>
<i>Penicillium italicum</i>
<i>P. digitatum</i>
<i>P. chrisogenum</i>

（3）土壌の人工酸性化処理

モデル土壌10gを容量25mlポリプロピレン製注射筒に充填し，人工酸性雨（それぞれ0.25mMに無菌的に調整した塩酸，硝酸，硫酸混合溶液，pH3.5），それぞれ0.25Mの塩酸，硝酸，硫酸溶液（それぞれpH1），対照として殺菌蒸留水（pH6.5）を10ml処理した。処理液は，処理後速やかにピストンにより押し出した。処理土壌は25℃で静置した。

（4）土壌細菌集団の解析

①15mMのリン酸緩衝液（pH7.0）を用いて調製した土壌懸濁液をスパイラルプレーター（スパイラルシステム）を用いてPTYGA培地に塗布し，プレート毎に出現コロニーから10コロニーを分離した。同様の処理を1土壌当たり6反復し，合計60コロニーを分離した。分離菌株は，同一の培地と緩衝液を用いて2回再分離し，純化を行った。純化過程でコロニー形成能を消失したものを除外し，最終的に50菌株を供試菌株として無作為に選抜した。

②供試50菌株をそれぞれ0.85%殺菌食塩水に懸濁（生菌数1ml当たり約 10^8 cfu）し，懸濁液をBiolog社製細菌簡易同定用パネルに分注し，25℃暗黒条件で24時間インキュベート後，各ウェルの発色の有無により炭素源利用能を判定した。

③②で求めた供試50菌株の炭素源利用パターンをパラメータとし，SASを用いてUPGMA法によりクラスター分析し，得られたクラスター間距離に基づく多様性指数¹²⁾

を求めた。

④①と同様に調製した土壌懸濁液を定法の希釈平板法により、25℃ 4日間培養後PTYGA培地上に形成されるコロニー数を計測し、土壌細菌の生菌数とした。

(5) 土壌糸状菌集団の解析

①15mMのリン酸緩衝液 (pH7.0) を用いて調製した土壌懸濁液をローズベンガル寒天培地に塗布し、プレート毎に出現コロニーから10コロニーを無作為に分離した。同様の処理を1土壌当たり6反復し、合計60コロニーを分離した。分離菌株は、PDA培地を用いて1回再分離し、純化を行った。純化過程でコロニー形成能を消失したものを除外し、最終的に50菌株を供試菌株として無作為に選抜した。

②供試50菌株をそれぞれPDA平板上で25℃暗黒条件で7日間インキュベート後、培養形態を肉眼によって、菌体形状を顕微鏡観察によって判定した。対象となる糸状菌の形態的特徴として、PDA平板上でのコロニー形態、菌相、菌糸、胞子の形態的特徴を24の項目(表2)に分解し、対照となる菌株がそれぞれの項目の特徴を満たしている場合を1、満たさない場合を0として2進数の数値に変換した。

表2. 形態項目

菌そう生育が速い (> 4.5 mm/7日)
菌菌そうが高く生育する (> 9 mm)
菌そうにしわがよる
菌糸体が輪紋を形成する
菌糸体が綿毛状である
菌糸体が花卉状である
菌糸体が粉状である
菌糸体が赤色を呈する
菌糸体が青色を呈する
菌糸体が黄色を呈する
菌糸体が黒色を呈する
着色が菌糸体中央に局在する
培地が赤色を呈する
培地が青色を呈する
培地が黄色を呈する
培地が黒色を呈する
着色が菌糸体中止部直下のみに局在する
菌糸に隔壁が生じる
胞子に隔壁が生じる
胞子が着色する
胞子が球形である
胞子が長球形である
胞子が長細い
胞子の形が上の3種以外である

③②で求めた供試50菌株の形態的特徴のパターンをパラメータとし、SASを用いてUPGMA法によりクラスター分析し、得られたクラスター間距離に基づく多様性指数¹²⁾を求めた。

④①と同様に調製した土壌懸濁液を定法の希釈平板法により、25℃ 4日間培養後PTYGA培地上に形成されるコロニー数を計測し、土壌糸状菌の生菌数とした。

4. 結果および考察

(1) 人工酸性雨のモデル土壌の微生物に与える影響

①短期的影響

土壌への人工酸性雨処理が土壌中の細菌相に及ぼす影響を調べた結果、処理後pHが4.9

に降下した土壤中で生菌数は、対照区に対して若干減少したものの大きな変化は見られなかった。分離される細菌50菌株の多様性は、対照区の約56%に減少した。酸性雨の微生物への影響の原因物質と考えられる3種の強酸の土壤細菌への直接的な影響を調べた結果、塩酸、硫酸の両者は、細菌数を著しく減少させたが放線菌数は増加した。硝酸は、細菌、放線菌ともに明かに減少させた。処理土壤から分離される細菌の多様性では、3種の強酸とも著しく減少させた。多様性の減少は塩酸区で最も著しく、硝酸区で最も緩やかであった(表3)。

表3. 酸性化処理の土壤細菌相への影響

	処理				
	対照	人工酸性雨	塩酸	硝酸	硫酸
細菌数(cfu/g)	4.3 X 10 ⁸	1.8 X 10 ⁸	6.0 X 10 ⁴	1.4 X 10 ⁴	3.0 X 10 ⁴
放線菌数(cfu/g)	2.6 X 10 ⁶	3.9 X 10 ⁶	4.3 X 10 ⁷	1.7 X 10 ⁵	5.1 X 10 ⁷
分離細菌集団の多様性指数	1353.5	755.8	39.1	665.4	213.0

②長期的影響

人工酸性雨処理直後、対照区の約56%まで減少した細菌集団の多様性は12カ月静置後、約85%まで回復した(表4)。これに対して、人工酸性雨処理直後、対照区の約30%に激減した利用炭素源種数は、長期静置後も対照区の44%に留まり、対照区に比べて明らかに少数であった(表5)。

表4. 人工酸性雨の長時間処理がモデル土壤の細菌集団多様性に及ぼす影響

測定時期	処 理	
	人工酸性雨	蒸留水(対照区)
1994年	755.8	1353.5
1995年	1153.0	1358.4

表5. 人工酸性雨の長期間処理がモデル土壤の細菌集団の炭素源利用能*)に及ぼす影響

測定時期	処 理	
	人工酸性雨	蒸留水(対照区)
1994年	4.2	14.0
1995年	6.6	15.2

*) 分離細菌の平均利用炭素源種数で表示

(2) 形態的特徴に基づく糸状菌集団の多様性評価法の検討

無作為に選ばれた10菌株で構成されるグループの属数ならびに種数とそれぞれの多様性指数の相関を調べた結果、多くの属数、種数を含むグループほど多様性が高い傾向を示した(図1, 2)。

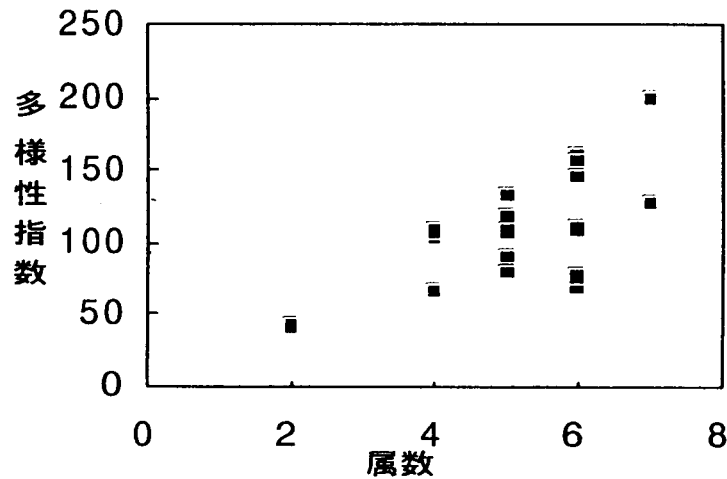


図1. 供試菌株の属数と多様性指数

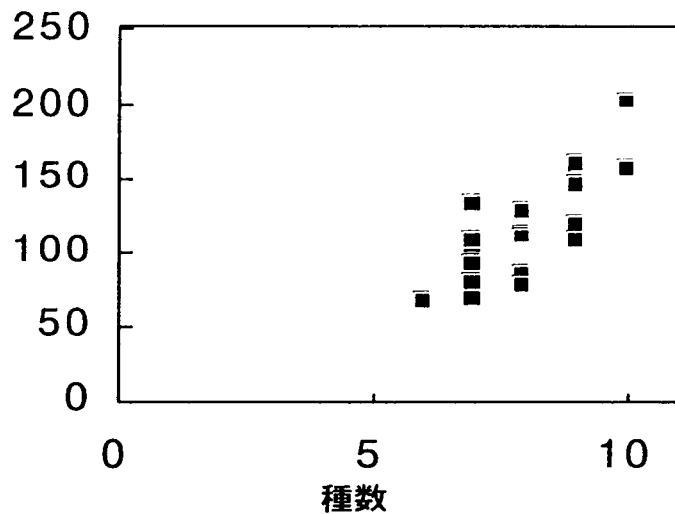


図2. 供試菌株の種数と多様性指数

このことから、無作為に分離された十分多数の菌株を調査するれば、数値化された形態的特徴の多様さを調べることによって、対照となる菌群の分類学的多様さを推定できると考えられた。

(3) 自然土壌における酸性化の細菌および糸状菌集団の多様性評価

酸性条件の異なる自然土壌の細菌群多様性について調査した結果、細菌群、糸状菌群とも多様性はpHの最も高いスギ美林で最も高く、pHの最も低い硫気口周辺で最も低い値を示した。

細菌では、昨年の結果と同様に、地上植生の発達により、菌数、多様性ともに増加し、

菌数では、pHの高いスギ美林土壌と同程度となるが、多様性についてはスギ林、ブナ林とも対照の2分の1程度に留まり、明らかに低pHによる単純化が見られた(図3)。

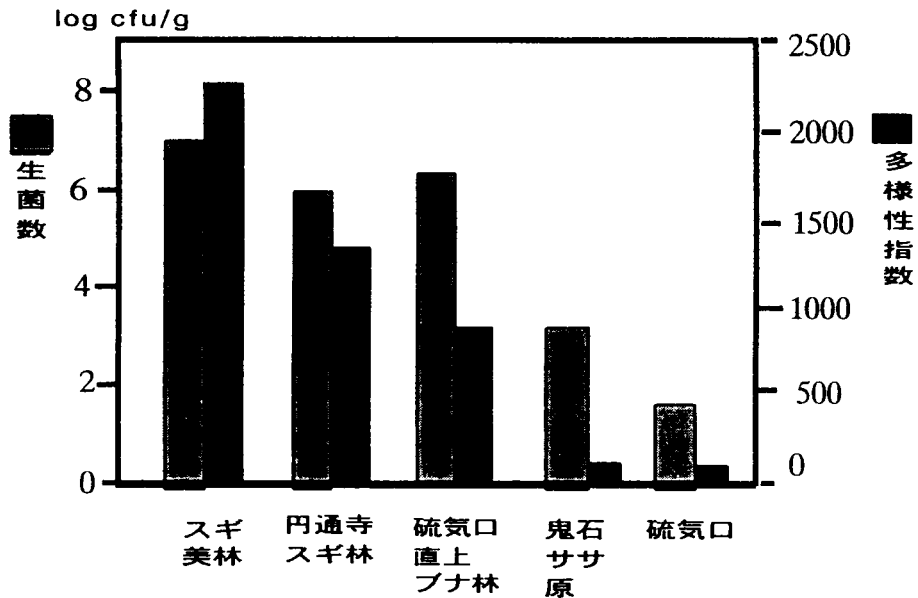


図3. 酸性化した土壌における土壌細菌集団の多様性

糸状菌では、硫気口周辺の砂質土を除き酸性化による菌数が増加する傾向が見られ、鬼石ササ原土壌でスギ美林土壌よりも約10倍となった。これに対して多様性では、細菌と同様に酸性化による著しい減少が確認された(図4)。

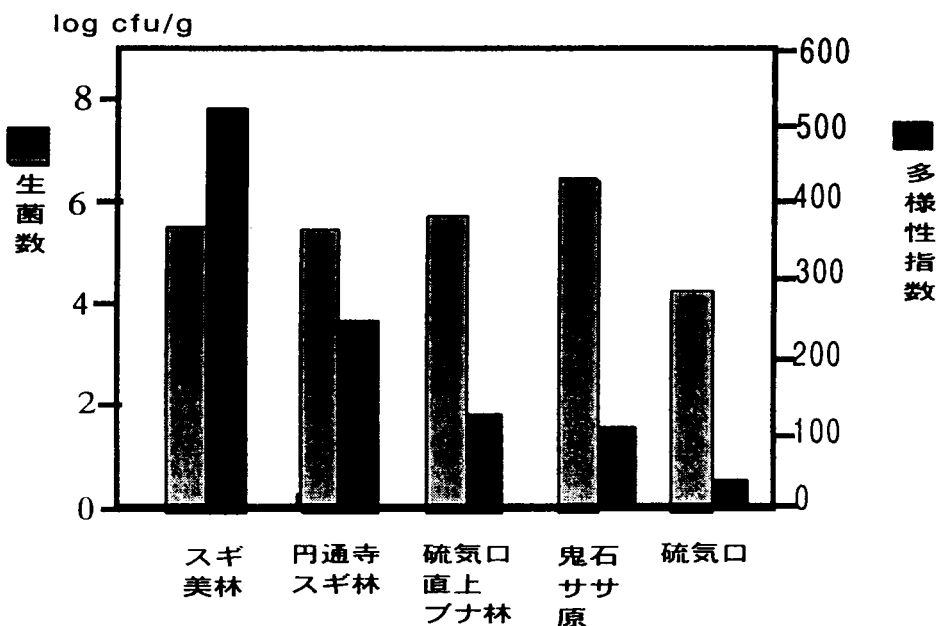


図4. 酸性化した土壌における土壌糸状菌集団の多様性

5. まとめ

本研究ではモデル系，自然環境の両方に関して，環境酸性化が土壤微生物の生態系に及ぼす影響について検討を行った。その中で，可能な限り迅速，簡便で感度良く土壤微生物の群集変化を捉える手法として，表現型のパターンの多様さに着目した多様性指標を開発し¹¹⁾¹²⁾，細菌と糸状菌の両方を対象にして酸性化の影響の解明を試みた。細菌の表現型としては炭素源の利用能を用い，検出のためのシステムとして，方法論自体についての信頼性，再現性の検討が進んでいるBiolog社製の検査パネルを使用した⁵⁾⁸⁾。糸状菌の集団変化を捉えるための表現型パターンとしては，分類同定の基本となる形態的特徴を数値に分解する手法を開発した。

その結果，モデル土壤に対して人工酸性雨を処理した場合，自然条件で酸性化した土壤の場合の両方で，土壤細菌の著しい単純化が観察された。また，自然土壤では，糸状菌群についても単純化が観察され，環境の酸性化が土壤微生物の広い範囲に単純化を引き起こしていることが示唆された。

一般に土壤中には植物体上等の地上微生物の約1000倍以上の多様性を有した微生物群集が存在し，動的なバランス状態を保ちつつ，多様な物質循環を支えていると考えられている¹⁾²⁾¹⁰⁾。本研究の結果から，長期の酸性化は，これら多様な土壤微生物集団においても広範囲に単純化させ，土壤中での物質循環の系の単純化を招く危険性があると予測される。

6. 本研究により得られた成果

(1) モデル土壤に人工酸性雨を処理すると，処理直後，土壤細菌の生菌数に変化の無い条件においても，多様性に著しい現象が起こることが明らかになった。

(2) 人工酸性雨の影響は一年間の長期の静置後も残存し，その影響は土壤細菌の炭素源利用能の現象に顕著であった。

(3) 土壤糸状菌の多様性評価のための簡便な手法を開発した。

(4) 自然条件かで酸性化した土壤の細菌，糸状菌相の多様性を評価した結果，土壤細菌および糸状菌は何れも酸性化の進行に比例して単純化することが明らかになった。

(5) 以上から土壤環境の酸性化は土壤微生物相を単純化する危険性があると予測された。

7. 国際共同研究などの状況

ノルウェー国立ベルゲン大学のVigdis Torsvik教授のグループとの共同研究により，本研究に用いられた細菌集団の多様性評価手法が細菌のDNAの配列に着目した多様性評価手法と矛盾しないことが明らかとなった。

8. 研究発表状況

横山和成 (1996) 土壤微生物群集の多様性評価. 土と微生物47: 1-8.

9. 引用文献

- 1) Atlas, R. M. (1984) Diversity of microbial communities. in *Advances in microbial ecology*, ed. Marshall, K. C. Plenum Press, New York 7: 1-47.
- 2) Bull, A. A., Goodfellow, M. and Slater, J. H. (1992) Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Ann. Rev. Microbiol.* 46: 219-252.
- 3) Fisher, R. A., Thonton, H. G. and Mackenzie, W. A. (1922) The accuracy of the plating method of estimating the density of bacterial populations. *Ann. App. Biol.* 9: 325-359.
- 4) Garland, J. L. and Mills, A. L. (1994) A community-level physiological approach for

studying microbial communities. in *Beyond the Biomass*, British Society of Soil Science. p.77-83.

- 5) Haack, S. K., Garchow, H., Klug, M. J. and Forney, L. J. (1995) Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1458-1468.
- 6) Hashimoto, T. and Hattori, T. (1989) Grouping of soil bacteria by analysis of colony formation on agar plates. *Biology and Fertility of Soils* 7: 198-201.
- 7) 金野 隆光(1986)酸性雨—農業生態系への影響 化学と生物 24 : 591-599
- 8) Klingler, J. M., Stowe, R. P., Obenhuber, D. C., Groves, T. O. Mishra, S. K. and Pierson, D. L. (1992) Evaluation of the Biolog automated microbial identification system. *Applied and Environmental Microbiology* 58:2089-2090.
- 9) 野内 勇(1991)酸性雨と植物被害 農業気象47 : 165-175
- 10) Torsvik, V., Goksoyr, J. and Daar, F. L. (1990) High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 56:782-787.
- 11) Yokoyama, K., Hiraku, M.. and Inomoto, A. (1994) Evaluation of richness of soil bacterial communities in suppressive soil by analyzing diversity of carbon sources utilization pattern. *Proceeding of 2nd Hangzho International Symposium on Plant Pathology* p.122.
- 12) 横山和成 (1996) 土壤微生物群集の多様性評価. 土と微生物47 : 1-8.