

課題名	F-073 土壌生物の多様性と生態系機能に関する研究		
課題代表者名	金子信博（国立大学法人横浜国立大学大学院環境情報研究院）		
研究期間	平成19－21年度	合計予算額	99,328千円（うち21年度 32,404千円） ※予算額は、間接経費を含む。
研究体制	<p>（1）森林における植生と土壌生物多様性の相互依存性に関する研究（国立大学法人北海道大学）</p> <p>（2）農法が土壌生物多様性と生態系サービスに与える影響の解析（国立大学法人茨城大学）</p> <p>（3）同位体を用いた土壌食物網による炭素利用の解析（国立大学法人京都大学）</p> <p>（4）土壌細菌の多様性と機能解析（国立大学法人静岡大学）</p> <p>（5）生態系の生物多様性と生態系機能に関する研究（国立大学法人横浜国立大学）</p>		
研究概要	<p>1. はじめに（研究背景等）</p> <p>土壌生態系の理解と適切な管理は、地球環境問題のなかでも重要な課題の一つである。土壌には大気の2, 3倍の炭素が貯留されており、人類を含むほとんどの陸上生物は土壌を利用して生育する陸上植物の一次生産に依存している。</p> <p>国連ミレニアム生態系評価(MA)は、生態系サービスが生物多様性によって担われていることを鮮明に打ち出した。生態系サービスとは生態系の機能、すなわち一次生産や物質循環の維持や向上、水の浄化や供給、炭素隔離などによって人間の福利が生じることを意味する。地球環境の変動や生息地の改変による生物多様性の変化は、生態系がもたらす生態系サービスの劣化を引き起こすことが懸念されている。しかし、生物多様性をどのように保全すると生態系サービスを維持できるのかについては、先行研究はほとんどなく、またMAにも具体的には示されていない。</p> <p>生態系の多様性と機能の関係は、単に生物の種の数が多いだけでは、生態系の機能が低いという単純な関係ではないが、具体的にどのような生物多様性をどのように保全すれば生態系の機能を損なうことなく生態系サービスを利用できるかについてはよくわかっていない。このことから、多様性保全の意義は一般にわかりにくく、その重要性が社会に受け入れられにくくなっている。</p> <p>陸上生態系では、一次生産の9割以上が生食物連鎖に利用されることなく腐食食物連鎖に利用され、栄養塩が植物に再利用できるように分解される。同じ面積や、空間あたりで比較すると、土壌には地上部よりはるかに多くの現存量と多様性を持つ生物群集が成立している。土壌の劣化は、多くの古代文明の衰退の大きな要因であり、現在でも土壌劣化が多くの地域で進行している。地球環境の変動下において、土壌は炭素の大きなプールであり、メタンや亜酸化窒素の挙動にも大きな影響を与えている。したがって、土壌の生物多様性と一次生産や物質循環に関わる生態系機能、そしてその機能からもたらされる生態系サービスとの関係の基本的な解明は、地球環境問題の解決に必須のものである。そこで、生物多様性と生態系機能の関係を明瞭に説明するために、陸上生態系の一次生産を支えるサブシステムである土壌生態系を解析し、土壌保全の重要性を生物多様性の面から再定義することが必要である。</p> <p>2. 研究目的</p> <p>本研究の目的は、土壌の生物多様性と一次生産や物質循環のような生態系機能との関係を定量的に明らかにし、生物の多様性が生態系の機能を通して生態系サービスを支えるわかりやすい具体例を示すことである。</p> <p>そこで、本研究では、植生・土壌微生物・土壌動物の多様性相互の関係と、それらによって維持されている生態系機能との関係の解明をめざした。遺伝子解析を使って微生物を単なる群集リストの作成ではなく構造を持った群集として記載するとともに、機能遺伝子の解析から物質循環速度の大きさと機能個体群の多様性との関係を調べた。さらに、土壌動物との相互作用のうち、微生物の生息環境を大きく変える糞団粒に注目することで、土壌の機能との関係を明示した。森林と農地の土壌生成について土壌有機物に着目し、炭素貯留速度に与える生物多様性の寄与率を明らかにした。</p>		

5つのサブテーマが協力して、森林と畑地土壌の物質転換の主役である微生物の多様性と、微生物の活動の場を形成するミミズによって作り出される糞団粒の機能を遺伝子と同位体解析で明らかにした。土壌動物の糞団粒の構造土壌全体における組成を調べることで、炭素・窒素動態、そして一次生産と土壌生物の多様性との関係を説明できることを示した。

3. 研究の方法

本研究では、北海道大学苫小牧研究林、茨城大学附属阿見農場、八ヶ岳の山梨県有林と筑波大学附属八ヶ岳演習林のカラマツ林、そして滋賀県桐生水文試験地を用い（図1）、サブテーマ間の密接な協力のもとに主に図2のような内容の調査を行った。

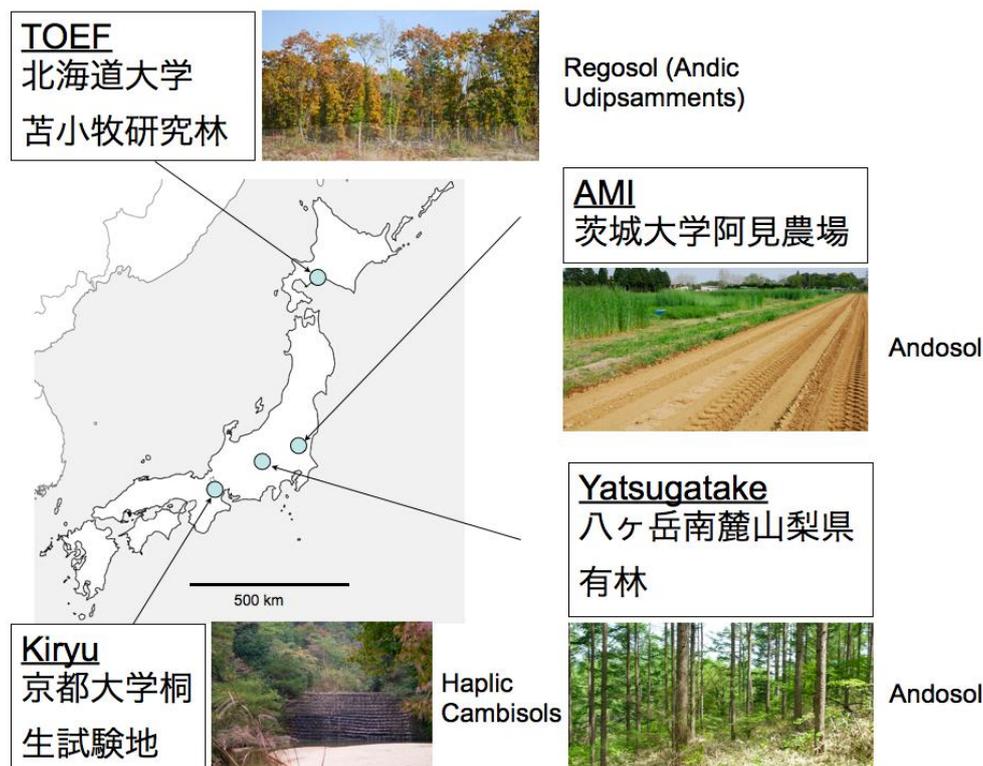


図1 本研究の主要な調査地

(1) 森林における植生と土壌生物多様性の相互依存性に関する研究

苫小牧研究林に3つの操作実験区、1) 伐採跡地の土壌保全実験区、2) ミミズ密度操作区、3) シカ-植生操作区を設けた。1) では、2004年台風で風倒被害にあった2カ所の人工林跡地を地拵えし、枝条を取り除いただけの保全区、土壌をプレーナーで圧密機で土壌団粒を破壊した圧密区、そして表土を50cmの深さまで剥離したはぎ取り区を設け、植生の回復と、土壌の機能、土壌生物の多様性を周りの森林と比較した。2) ではミズナラ林内に金属板でミミズが移動できない処理区を設け、柵内のミミズを除去し、植物の成長および土壌の変化を調べた。3) ではフェンス内にシカを導入し、間伐と施肥の組み合わせを行い、林床植生の変化を調べた。さらに、微生物群集の構造と機能の発現との関係を検証するために、土壌を培養して細菌群集の変化を調べた。

(2) 農法が土壌生物多様性と生態系サービスに与える影響の解析

不耕起でライ麦とマメ科のヘアリーベッチを冬季にカバー作物として栽培している試験圃場に、表層性ミミズを導入して作物（オカボ、ダイズ）の生育と土壌炭素、および微生物の変化を調べた。微生物群集を定量的に評価するために、T-RFLP法の改良を行った。長期に不耕起草生栽培を行っている農家の圃場でミミズ群集と土壌炭素の調査を行った。

(3) 同位体を用いた土壌食物網による炭素利用の解析

土壌有機物および土壌動物の放射性炭素14の天然存在比および炭素・窒素の安定同位体比を用いることにより、土壌炭素の蓄積履歴および土壌動物の有機物利用を解明した。苫小牧研究林、八ヶ岳カラマツ林、および阿見農場でそれぞれの土地管理履歴が土壌炭素、土壌動物群集に与える影響を調べた。放射性同位体炭素の分析から、ミミズやヤスデによる土壌炭素の利用を光合成によって

有機物が生成されてからの時間（炭素年齢）としてとらえた。

（４） 土壌細菌の多様性と機能解析

これまでにクローン解析のデータ集積がある花崗岩の小集水域で、さらにクローン解析を行うとともに、土壌A層、B層、C層（風化花崗岩）の細菌群集を比較した。モデル実験としてA層とB層土壌に栄養塩添加した場合と、キシヤヤスデに摂食させた場合の細菌群集の変化を調べた。さらに、脱窒にかかわる細菌遺伝子の多様性、埋没A層におけるメタン生成細菌の挙動を明らかにした。

（５） 生態系の生物多様性と生態系機能に関する研究

八ヶ岳南麓に生息するキシヤヤスデの生態系機能を団粒形成と土壌炭素隔離の点から解析した。苫小牧研究林の伐採跡地の土壌保全実験区で土壌の機能および土壌動物群集を調べ、ミミズ操作区でミミズ群集の変化と土壌窒素動態を調べた。苫小牧研究林、阿見農場、不耕起草生圃場、キシヤヤスデ土壌の耐水性団粒を解析し、炭素隔離の効果を定量化した。全体の研究成果を総括し、植物、土壌動物、土壌微生物からなる陸上生態系の生物多様性と生態系機能を統合するモデルを構築した。

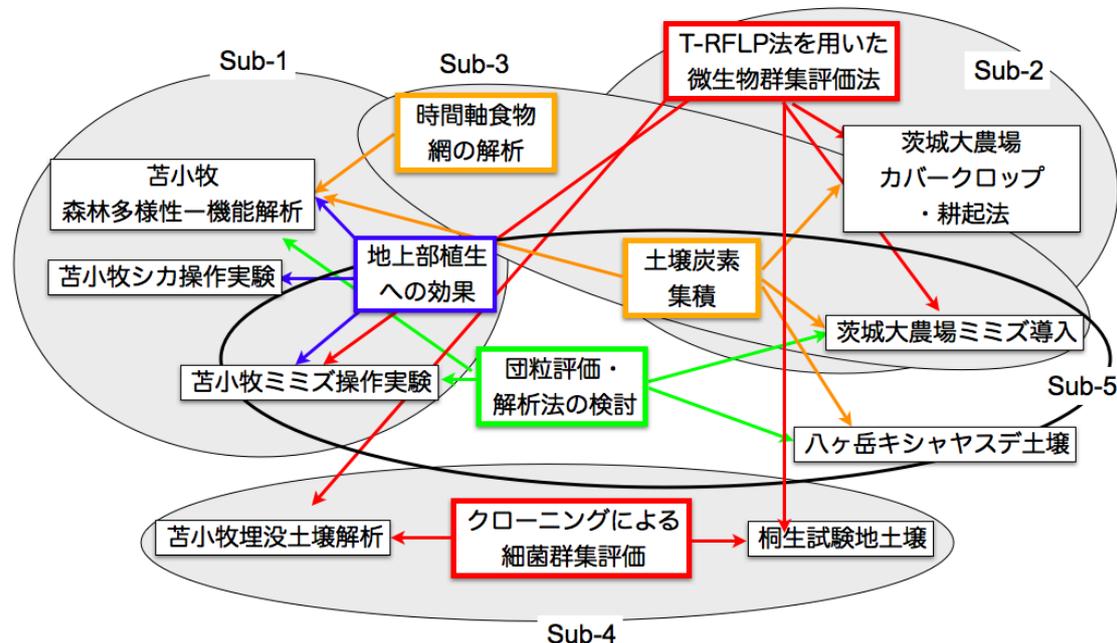


図2 本研究の主な調査地と調査方法、サブテーマ間の関係

4. 結果および考察

（１） 森林における植生と土壌生物多様性の相互依存性に関する研究

冷温帯落葉広葉樹林生態系における 1) 分解者から生産者への影響、2) 消費者から分解者と生産者への影響、3) 生産者から分解者への影響、4) 環境変化が土壌微生物群集構造に与える影響、の4点について大規模な野外操作実験等を用いて明らかにすることを目的とした。

密度操作実験によって、ミミズの密度の違いは主に糞団粒の多寡を通して地上部植生に大きな影響を与えており、林床草本だけでなく林冠木の成長さえ左右していることが明らかとなった（図3）。

大型植食獣（シカ）の密度＋生産性操作実験によって、その場の生産性の違いに応じて被食率が異なった。このことから、地上部植生の種組成は被食率の差を通して、その場所の生産性にも影響を与える可能性が示唆された。また、シカの密度が高くなるに伴い土壌中の窒素量は減少し、シカにより栄養塩循環が促進される可能性が示唆された。

攪乱や遷移に伴って優占する樹種の転換が起こったサイト間の比較から、樹種転換が起こると分解速度が変化して有機物堆積量が変化するとともに、大型土壌動物群集の構造も変化していた。

乾燥から滞水まで環境が大きく異なるにも関わらず、土壌微生物の多くのOperational Taxonomic Unit (OUT) ではその相対個体数がほとんど変化を見せない（図4）。このように非常に安定な群集要素が存在することは、土壌の環境に関わらず偏在するなんらかの機能の存在を示唆している。

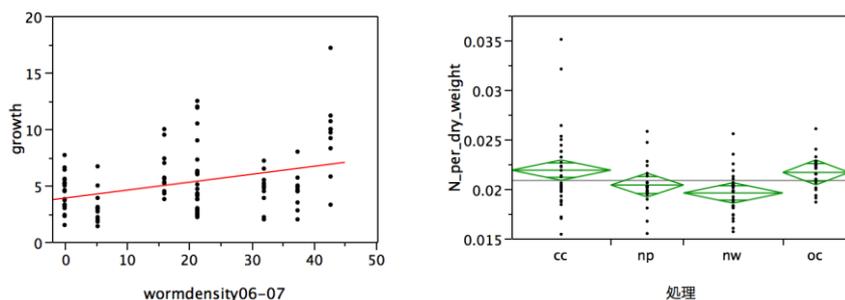


図3 ミズナラ実生の伸長成長とミミズ密度の関係（左）、処理区ごとの葉の窒素含量

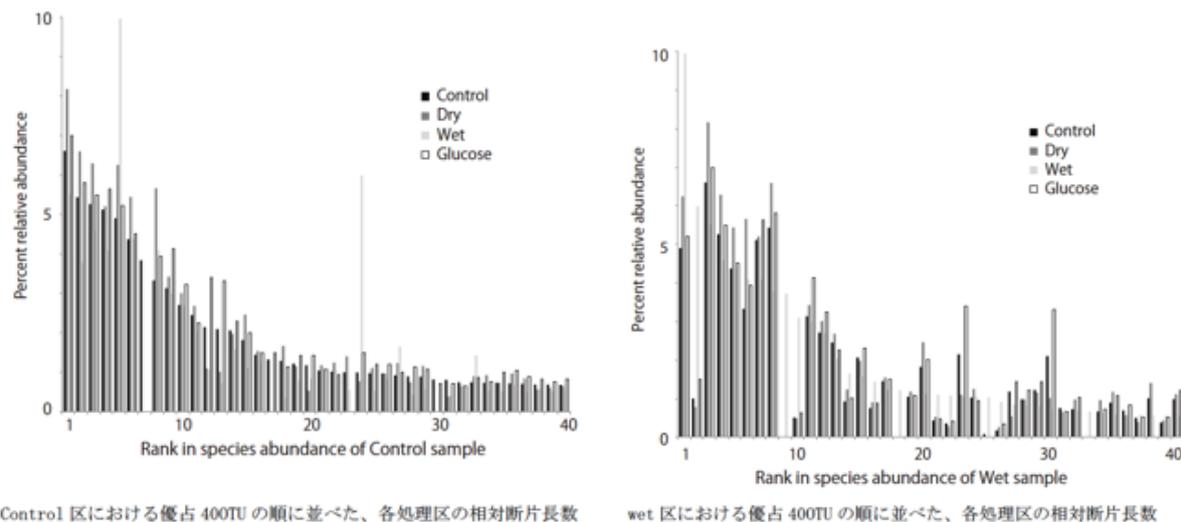


図4 桐生試験地土壌を採取し（Control）、乾燥、滞水、グルコース添加の各処理をして培養し、T-RFLP法でもとめたOTU-ランク関係。Control区における順位（左）、滞水区における順位（右）で並べたもの。

（2）農法が土壌生物多様性と生態系サービスに与える影響の解析

農耕地内における生物資源再生と物質循環プロセスの最適化を目指し、1) 不耕起栽培、2) 冬期カバー作物利用、3) ミミズ導入による畑地土壌生態系改変による生態系サービスへの影響を解析した。また、人為的な土壌管理を極度に減じた自然農法畑地の土壌分析も行った。2007年度は、夏作物として陸稲を栽培したが、2008年度は作物をダイズに変更し、不耕起／冬期カバー作物栽培、ミミズ導入処理（1㎡あたり100匹）の効果を検討した。

その結果、(1) 2007年の陸稲栽培では、無施肥区においてミミズ導入で収量（玄米重）の増加がみられたが、2008年のダイズ栽培では、有意差は認められなかった。(2) 陸稲栽培区では、ミミズ導入で無機態窒素量が増加する傾向にあり、特にヘアリーベッチ・カバー作物との併用で顕著であり、ダイズ栽培畑地でも同様な結果であった。(3) 陸稲栽培畑地での7月の測定結果では、裸地区に対して、カバー作物施用で増加する土壌呼吸活性がミミズ導入で抑えられる結果が観察されたが、ダイズ栽培畑地では、カバー作物施用効果がそれほど顕著ではなく、ミミズ導入による抑制もみられなかった。(4) 土壌の亜酸化窒素（ N_2O ）生成活性は、ミミズを導入していない土壌に比べて、カバー作物施用のミミズ導入土壌で低くなる傾向が観察された。また、比較として用いた自然農法畑地の土壌炭素含量は、慣行農法畑地の場合に比べて、約2倍近い値を示すことがわかった（図5）。

各畑地について、土壌微生物（アーキア、細菌、糸状菌）の群集構造を、リアルタイム定量PCR-末端制限断片長多形（T-RFLP）分析法で解析した（図6）。この方法により、サンプル中に含まれる微生物の種（OTU）ごとの個体数（正確にはDNAのコピー数）を表現することが初めて可能となった。

ミミズ導入や土壌管理によりアーキア群集と細菌群集は比較的安定ではあるが、その構成種の生育には影響を及ぼしていることが示された。また、真核微生物群がもっとも影響を受けやすいことが示された。ミミズ導入とカバー作物施用の効果を比較すると、後者においてより強い影響が

あることが示された。以上の結果より、土壌の物質循環機能の最適化に向けて、不耕起栽培、冬期カバークロップ利用、ミミズ導入の技術は有用であることが示唆された。

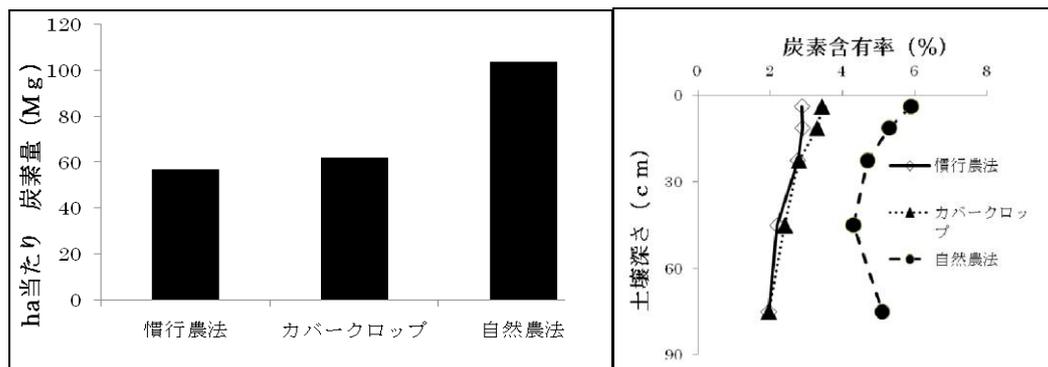


図5 農法の違いと土壌炭素量、垂直分布の変化

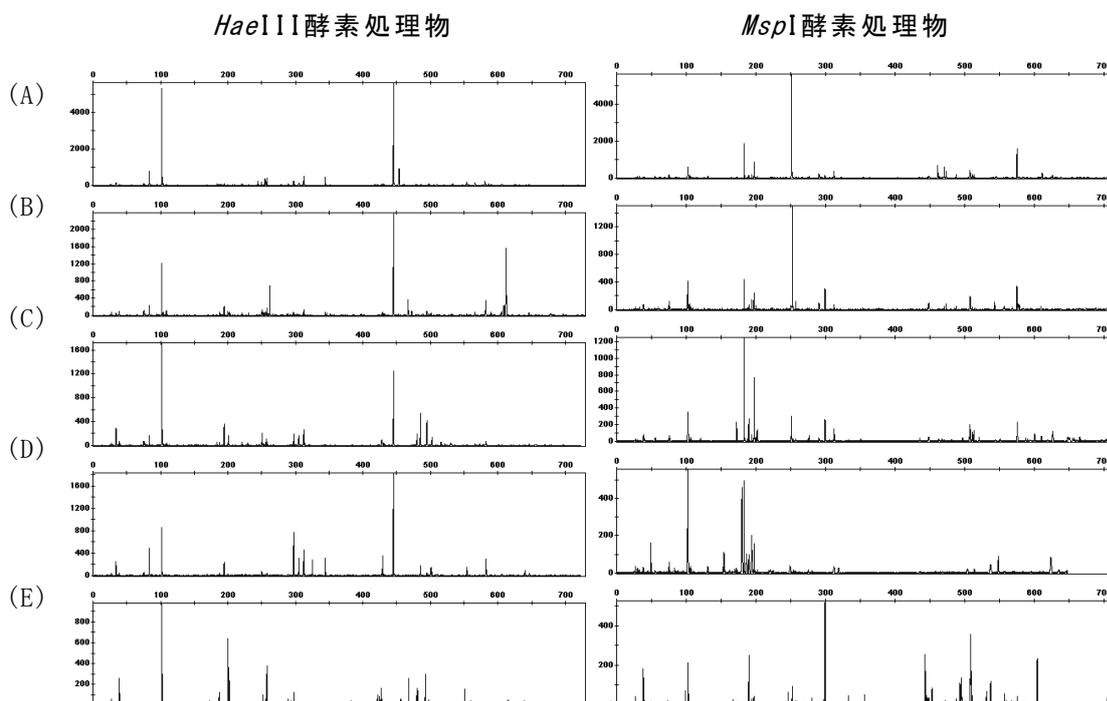


図6. 畑地真核微生物群集のT-RFLPプロファイル (X軸は各OTUを、Y軸はDNA量を表す)。(A)、裸地・ミミズ導入区；(B)、裸地・ミミズなし対照区；(C)、ライ麦カバークロップ・ミミズ導入区；(D)、ライ麦カバークロップ・ミミズなし対照区；(E)、自然農法

(3) 同位体を用いた土壌食物網による炭素利用の解析

まず、苫小牧研究林において、1960年代の核実験由来の放射性炭素が増加する以前に樹種の交替があった森林と樹種交替のない森林を比較し、樹種タイプが落葉堆積層の分解速度および土壌動物群集を変化させ、土壌動物（とくにミミズ）による炭素の混合効果が土壌炭素集積に影響を与えていることを示した。また、土壌炭素の中でミミズが利用した炭素の年代を決定することにより土壌動物の炭素利用が多様であることを示し、森林植生-土壌有機物-土壌動物多様性の関係を示した（図7）。

次に、八ヶ岳においてキシヤヤスデの発生の履歴の異なる森林土壌の比較、阿見農場の農地土壌における土壌団粒の炭素年齢の測定、および茨城県北茨城市小川における食物網の研究を行った。八ヶ岳においては、土壌有機物およびキシヤヤスデの炭素・窒素の安定同位体比に関して大きな変化があることがわかり、放射性炭素分析 ($\Delta^{14}\text{C}$) 結果はキシヤヤスデが異なる炭素年齢の土壌有機物の混合効果に影響を与えていることを示した（図8）。さらに、阿見農場の研究では団粒に比べて細土に含まれる炭素の起源が新しいことがわかり、団粒構造で古い炭素が固定化されることが推察された。最後に、茨城県の小川においては、樹上のクモ類が新しい炭素起源を持つ生食連鎖と古い炭素起源を持つ腐食連鎖系を連結しており、クモ間の捕食行動の違いが、食物網連結機能に相違

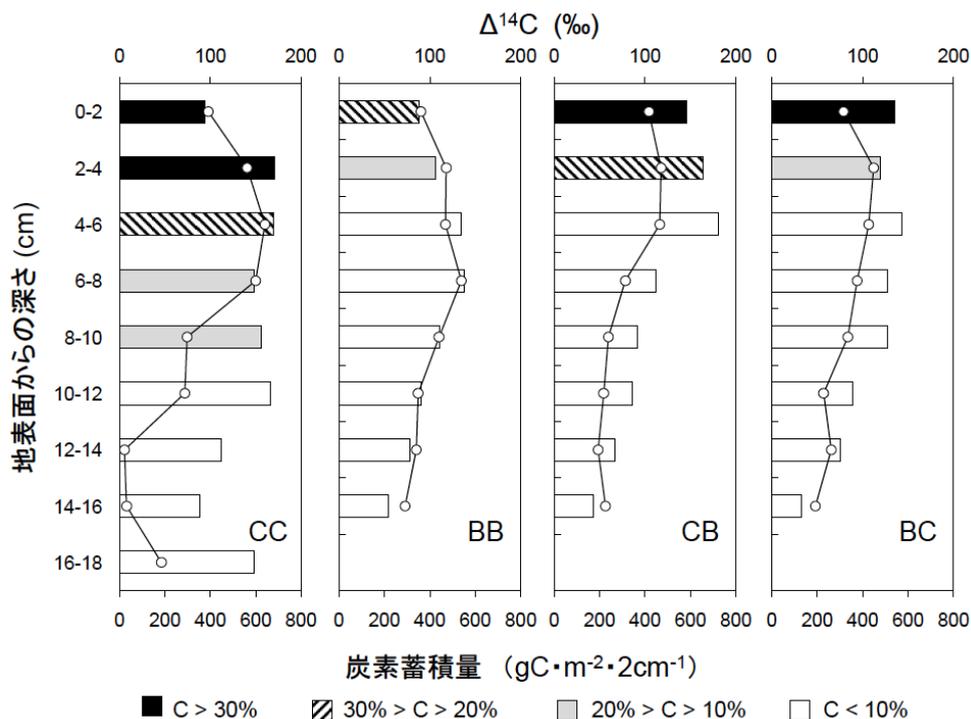


図 7. 苫小牧研究林各サイトにおける地表面から採取されたコアの炭素蓄積量（棒グラフ、下軸）および $\Delta^{14}\text{C}$ 値（折れ線グラフ、上軸）。棒グラフの色は、炭素濃度をあらわす。表層の高い炭素濃度は落葉堆積層を示し、下層の低い炭素濃度は土壌層を示す。

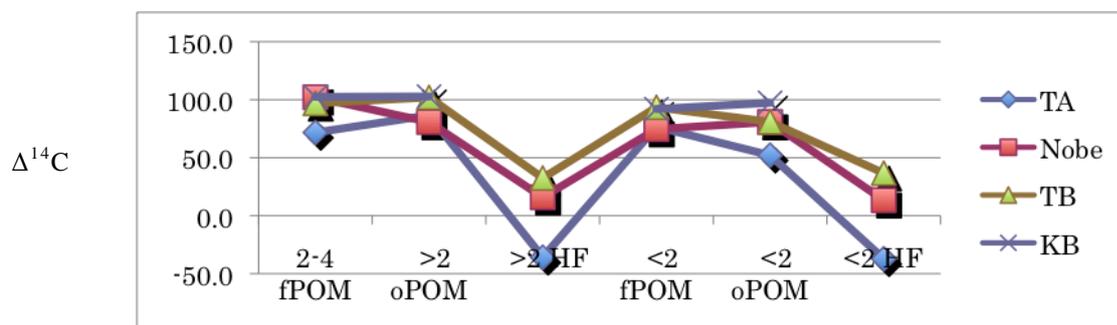


図 8. ハヶ岳天女山試験地A(TA)、天女山試験地B(TB)、観音平試験地(KB)、野辺山試験地(Nobe)における、団粒(aggregate: >2mm)と細土(fine fraction: <2mm)に含まれる有機物の放射性炭素濃度 ($\Delta^{14}\text{C}$)。団粒外部の軽い有機物画分 (Free Particulate Organic Matter: fPOM)、団粒内部の軽い有機物画分 (Occluded-POM: oPOM)、重い有機物画分 (Heavy Fraction: HF) を表す。

をもたらしている事が明らかになった。これらを通して、本研究は生態系の中の「炭素循環の時間軸」を土壤有機物・落葉堆積層・デトライタス食者・捕食者に至るまで明示することの重要性を示した。この結果は、生態系の中に放射性炭素14 ($\Delta^{14}\text{C}$) を用いて時間軸を明示することで、「当年の」環境変動が食物網を通じてどのような波及効果を及ぼすかを理解できることを示した。

(4) 土壤細菌の多様性と機能解析

土壤生態系を支える細菌群集の多様性とそれが発現する機能との関係を明らかにすることを目的とし、まず1) 森林土壌における細菌群集の多様性のクローン解析を行った。桐生試験地乾性土壌 (G31地点) A層の細菌群集の構成は、*Acidobacteria*、 α -*Proteobacteria*が優占し、B層においてもほぼ同様の構成であった。また、多様性の解析からB層では微生物の遺伝的な多様性のプールとしての役割を果たしていることを示した。このような森林土壌に、2) 化学的環境条件(栄養塩添加)、あるいは、3) 土壤動物の存在(キシヤヤスデ)により場に大きな変化を与えた場合、土壤細菌がどのような反応を示すかを明らかにすることを試みた。桐生試験地森林土壌A層、B層を用いて栄養

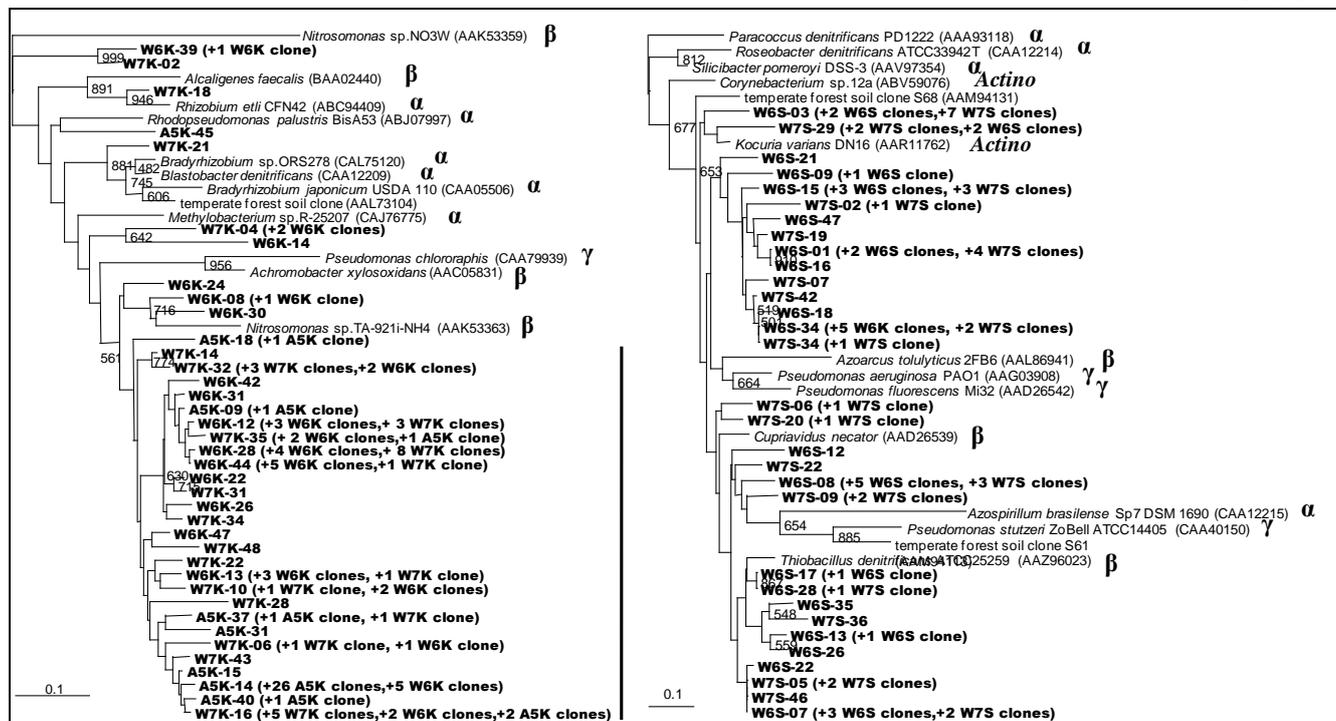


図9. G1-WおよびG31-Aの細菌群集に含まれる *nirK* または *nirS* クローンのアミノ酸配列に基づいた系統発生的位置づけ: (a) *nirK* (左)、(b) *nirS* (右). クローン名のW6は2007年6月11日G1-W、W7は2007年7月13日G1-W、A5は2008年5月17日G31-Aのサンプルから得られたクローンを示す. []内は同一のOTUに含まれるクローンの数とサンプル、()内はDDBJのデータベース登録番号を示す. α: α-proteobacteria, β: β-proteobacteria, γ: γ-proteobacteria, Actino: Actinobacteria.

塩添加およびキシヤサデ飼育実験を行った。T-RFLP解析の結果、どちらの環境の変動に対してもA層においては微生物群集に変化はみられなかったが、B層において微生物群集の主たる構成に変化が現れることが示された。この時のキシヤサデ消化管内容物の細菌群集構成は土壤のものとは異なった。また、4) 土壤そのものの物理的攪乱が微生物群集に及ぼす影響を明らかにするための研究手法の確立をめざした。苫小牧研究林で流入としての降水、および表層土壤を剥離した区、押し固めた区(圧密区)、無処理区の土壤水を採取し、クローン解析を行った。クローン解析、T-RFLP解析の結果、無処理区と圧密区で、細菌群集構成が大きく異なっており、表層土壤が地下環境に影響を与えることが示唆され、またその研究手法を確立することができた。さらに、5) 細菌の多様性と機能発現の関係を明らかにするために、代謝過程が明瞭な脱窒機能を対象とし、¹⁵Nトレーサー実験による脱窒活性の測定と亜硝酸還元遺伝子 (*nirK*, *nirS*) による脱窒細菌群集構成の解析を行った(図9)。桐生試験地湿性土壤(G1地点)の表層土壤の脱窒活性は非常に高く、これは酸素の存在によって抑制された。また、*nirK*, *nirS*を持つ細菌群集は非常に多様であった。乾燥土壤に比べ湿潤な土壤の方が脱窒活性は高く、それぞれの土壤における脱窒活性は、酸素濃度と添加基質により異なった。*nirK*によるクローン解析の結果、活性の高い湿潤な土壤ではクレード内で多様化がみられた。最後に、6) 地下堆積物が地表生態系へ及ぼす影響について理解する手懸かりを得るため、苫小牧埋没A層における細菌群集構成を解析した。この結果、メタン生成やメタン酸化に機能を有すると推察される細菌群が検出され、埋没A層において活発な物質変換の可能性が示唆された。さらに、メタンに着目して苫小牧研究林埋没土壤をもちいメタン生成実験を行った。酢酸、ギ酸、メタノールおよび二酸化炭素/水素を基質として添加し、培養温度25°C、暗所、嫌気条件で140日間培養を行ったが、メタンは検出されなかった。調べられた限りではこの土壤システムにおける鉛直方向の相互作用の可能性は限られたものであると推察された。

(5) 生態系の生物多様性と生態系機能に関する研究

ミミズやヤスデなどの大型土壤動物の活動は、直接、有機物や土壤微生物を摂食するだけでなく、生息環境の土壤に孔隙を開けたり土壤の団粒化を促進したりするなど土壤構造を改変している。このような間接的な影響は、炭素や窒素循環など生態系機能に影響することが予測できるが、これまで土壤生態系では評価されてこなかった。そこで、生態系改変者としての土壤動物が、微生物群集の変化を通して物質循環に与える影響を定量化した。

苫小牧研究林の埋没A層を利用して土壤炭素集積速度を調べたところ、苫小牧では植生の発達に

より約6000年にわたって $3 - 17 \text{ g C m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ の速度で土壤炭素が集積していた。また、土壤表層の団粒量はダニ類やトビムシなどの土壤小型節足動物の個体数と正の相関があり、団粒を人為的に破壊すると、節足動物の個体数が回復せず、土壤呼吸や窒素無機化も処理後2年間にわたって低下し、伐採などの攪乱が土壤構造の変化を通して森林の機能を低下させていた。苫小牧研究林のミズナラ林でミミズの密度を低下させたところ、土壤表層の耐水性団粒が減少し、土壤炭素、窒素および栄養塩濃度が低下した。ミミズの糞はアンモニア態窒素を細土の数十倍の濃度で含み、培養条件では4週間でその約半分が硝酸態窒素に変換された。本州中部八ヶ岳周辺にしばしば大発生をおこすキシヤヤスデを飼育したところ、ヤスデの活動により土壤の炭素・窒素循環速度が促進され、その作用は土壤のみを摂食する幼虫に比べ、土壤と落葉を混食する成虫が特に大きくなった。温室効果ガスへの影響として、団粒形成が CO_2 放出と CH_4 吸収の増加という相反する作用を持つことが分かった。過去にキシヤヤスデが大量に生息していた立地から採取した土壤の培養実験により、団粒構造が壊れることにより土壤の CH_4 吸収能力の劣化や CO_2 放出の増加を招くことが示された。実際の野外生態系にキシヤヤスデを実験的に導入し、土壤の物質循環と地上部植物現存量への効果を調べたところ、キシヤヤスデが成虫となる時期に土壤呼吸量が増加したことから、土壤微生物相の活性化に寄与していることが分かった。不耕起草生栽培ではミミズが増加し、土壤団粒が増加していることが土壤炭素量を増大させるメカニズムとなっていた。農地土壤の変化は小型節足動物の個体数と多様性を向上させた。多くの土壤でミミズの糞を起源とする土壤の団粒化が炭素隔離のメカニズムとして有効であることが示された(図10)。

これらのことから陸上生態系の生態系機能が土壤構造を形成する多様性要素を取り入れることで、微生物-土壤動物-植物の間の階層的な関係を整理できることが明らかとなり(図11)、農地を含めた陸上生態系の多様性の保全が、地球環境変動に関わる生態系機能につながっていることを示すことができた。

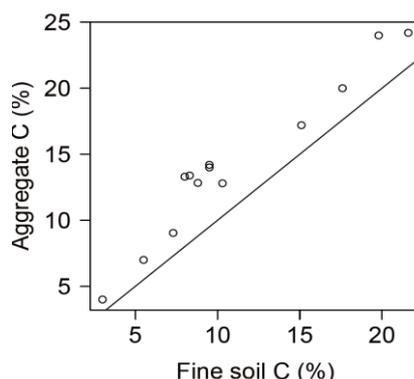


図10. 本研究で調べた各土壤における細土と団粒の炭素含有率の比較。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究では、地球環境問題研究において個別に扱われてきた生物多様性の問題と、地球システムのプロセスの問題を統合し、解析することができた。本成果は小スケールでのメカニズム解明であり、グローバルなスケールへの適用については、今後の課題であるものの、温帯の森林と農地において普遍的な材料を扱っていることを考えると、きわめて応用性の高い成果である。

土壤食動物の糞団粒によって短期的には CO_2 、 N_2O が放出されるが、長期的には CO_2 、 N_2O の放出抑制が可能であった。このことは、土壤の耐水性団粒の評価が、土壤と大気との温室効果ガスの挙動を理解するために必要であることを示している。従来、土壤の分析では土壤を採取して測定前に篩別し、細土に調整する行為が普通に行われてきたが、これは生物を介した物質循環の推定に大きな誤差をもたらしていたことになる。

土壤細菌の群集構造は土壤が異なってもあまり違いがないことは近年、多くの研究例が出つつある。一方、同じ細菌のメンバーを含む土壤が土壤食動物の消化管を通過することで、もとの土壤とは異なった機能を発揮していた。このことは地球システムが、まず微生物が出現することにより生命系として発達し、その後微生物の機能を変化させる存在として微生物以外の生物が出現し、機能していることを示唆している。現在の陸上生態系では、土壤動物と有機物を供給する植物の多様性

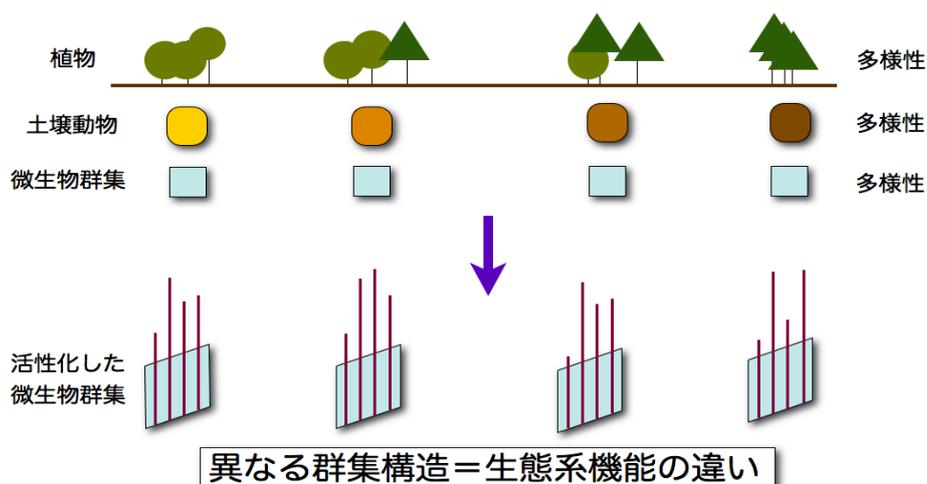


図11. 本研究で明らかになった陸上生物の多様性と機能との関係。土壌動物は植生とともに土壌微生物の群集構造を変化させ、土壌呼吸やメタン酸化、脱窒、炭素隔離、土壌の物理性や土壌生成に影響し、最終的に一次生産を左右している。

の組み合わせによって種プールとしての土壌微生物の活動を変え、生態系機能が発揮されていることが明らかとなった。

本研究で土壌の生物多様性と機能とを結びつけることが可能となったので、多様性の効果が機能の変化にどの程度寄与しているかを、窒素無機化と炭素隔離に関して試算したところ、ミミズやキシヤスデの窒素無機化への寄与は $2.7\text{--}4.0\text{ g m}^{-2}\text{ yr}^{-1}$ と大気からの窒素負荷量($0.5\text{--}2\text{ g m}^{-2}\text{ yr}^{-1}$)に匹敵し、農地における大量の堆肥投入やカバークロープ導入に匹敵する炭素隔離機能($145\text{--}210\text{ g m}^{-2}\text{ yr}^{-1}$)を持つと推定できた。今後、さらに他の機能についても定量的に明らかにする必要がある。

(2) 環境政策への貢献

生物多様性は人為影響を排除し、保全のための十分な面積を確保するか、あるいは伝統的な自然資源利用と生態系の安定的な関係がない限り、一定の水準で保全することはできないだろう。また、生物多様性は一律に保全、あるいは操作可能なものではない。私たちが現在直面している生態系の劣化は、直接的な利用、生息地の破壊、侵入種、地球環境変動といった要因が様々な程度で影響している。それでは、土壌の生物多様性はどの程度保全することが必要なのだろうか？

本研究から予測されることは、土壌の団粒構造が維持される限り、土壌は団粒構造が失われた土壌に比べて、より多様で高い機能を発揮するだろうし、団粒が崩壊するような土壌の扱いは、土壌微生物の回復力を低下させるだろうという点である。

陸域生態系を保全することで生態系の基盤サービスを維持するには、土壌構造が破壊されない程度までに攪乱を抑える必要があるだろう。このことが正しいとしたら、これまで意識されてこなかったが、土壌保全が陸域の生態系保全の十分条件であると考えられることができる。苫小牧研究林で着手した表土の操作実験は今後も継続するが、他の研究成果と併せてこのことに対する解答となる。十分な多様性を持ち、団粒を形成する土壌動物まで含む熟成した土壌こそが、植生遷移のすみやかな進行を保障する。したがって、陸域の生態系保全は、その内容として土壌団粒の維持を目標とするガイドラインを設定することができるだろう。

普段目にすることがないが、実は身近な生物である土壌微生物と、一般に土壌の状態の改善に「役に立つ」と信じられているミミズのような土壌動物の多様性は、植生や農林業とうまく結びつけて考えられてこなかった。本研究で明らかにしたように、土壌動物は植生の多様性や土地利用と密接な関係を持ち、その生態学的な活動が今や一般の人々にも身近に論じられている温暖化効果ガスの挙動にも深く関わっていることを示すことで、説得力を持って生物多様性の重要性を説明することができる。

6. 研究者略歴

課題代表者：金子信博

1959年生まれ、京都大学大学院農学研究科修士課程修了、農学博士、現在、横浜国立大学大学院環境情報研究院教授

主要参画研究者

(1) : 日浦勉

1963年生まれ、北海道大学大学院農学研究科博士後期課程修了、博士(農学)、現在、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター教授

(2) : 太田寛行

1954年生まれ、東北大学大学院農学研究科博士課程修了、農学博士、現在、茨城大学農学部教授

(3) : 陀安一郎

1969年生まれ、京都大学大学院理学研究科博士課程修了、博士(理学)、現在、京大学生態学研究センター准教授

(4) : 加藤憲二

1951年生まれ、名古屋大学理学研究科博士課程満了、理学博士、現在、静岡大学理学部教授、創造科学技術大学院教授(兼任)

(5) : 金子信博 (同上)

7. 成果発表状況 (本研究課題に係る論文発表状況。)

(1) 査読付き論文

- 1) Nishizawa, T., Komatsuzaki, M., Kaneko, N., Ohta, H. (2008) Archaeal diversity of upland rice field soils assessed by the terminal restriction fragment length polymorphism method combined with real time quantitative-PCR and a alone library analysis. *Microbes Environ.* 23: 237-243.
- 2) Katsuyama, C., Kondo, N., Suwa, Y., Yamagishi, T., Ito, M. Ohte, N., Kimura, H., Nagaosa, K., Kato, K. (2008) Denitrification activity and relevant bacteria revealed by nitrite reductase gene fragments in soil of temperate mixed forest. *Microbes and Environments* 23: 337-345.
- 3) Miyamoto, T., Hiura, T. (2008) Decomposition and nitrogen release of fir (*Abies sachalinensis*) and oak (*Quercus crispula*) under different forest canopies in Hokkaido, Japan. *Ecological Research* 23: 673-680.
- 4) Katsuyama, C., Nakaoka, S., Takeuchi, Y. Tago, K., Hayatsu, H., Kato, K. (2009) Complementary cooperation between two syntrophic bacteria in pesticide degradation. *J. Theor. Biol.* 256:644-654.
- 5) 甘楽法、金子信博 (2009) 土壌団粒を用いたトビムシの機能研究を目的とした飼育実験系の確立. *Edaphologia* 85: 7-11.
- 6) 西澤智康、小松崎将一、金子信博、太田寛行 (2010) 末端制限断片 (T-RFs) プロファイル情報に基づく土壌微生物群集構造解析. *土と微生物*. 64: 30-43.
- 7) Toyota, A., Tayasu, I., Fujimaki, R., Kaneko, N., Uchida, M., Shibata, Y., Hiura, T. (2010) Effects of vegetation switch and subsequent change in soil invertebrate composition on soil carbon accumulation patterns, revealed by radiocarbon concentrations. *Radiocarbon*, in press
- 8) Tayasu, I., Hyodo, F. (2010) Use of carbon-14 natural abundances in soil ecology: implications for food-web research. In: Ohkouchi, N., Tayasu, I., Koba, K. (eds), *Earth, Life, and Isotopes*, Kyoto University Press, in press
- 9) Tayasu, I., Folgarait, P.J., Hyodo, F., Lavelle, P. (2010) Carbon sources and feeding habits of selected soil animals from an abandoned rice field chronosequence determined by carbon and nitrogen isotope ratios and natural carbon-14. In: Ohkouchi, N., Tayasu, I., and Koba, K. (eds), *Earth, Life, and Isotopes*, Kyoto University Press, in press
- 10) Nishizawa T, Zhaorigetu, Komatsuzaki M, Sato Y, Kaneko N, Ohta H. (2010) Molecular characterization of fungal communities in non-tilled, cover-cropped upland rice field soils. *Microbes Environ.*, in press

F-073 土壌生物の多様性と生態系機能に関する研究

(1) 森林における植生と土壌生物多様性の相互依存性に関する研究

国立大学法人北海道大学北方生物圏フィールド科学センター 日浦 勉
揚妻直樹

<研究協力者> 千葉大学理学部 村上正志
財団法人自然環境研究センター 豊田 鮎

平成19～21年度合計予算額 18,315千円
(うち、平成21年度予算額 4,874千円)

※予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 冷温帯落葉広葉樹林生態系における1) 分解者から生産者への影響、2) 消費者から分解者と生産者への影響、3) 生産者から分解者への影響、4) 環境変化が土壌微生物群集構造に与える影響、の4点について大規模な野外操作実験等を用いて明らかにすることを目的とした。密度操作実験によって、ミミズの密度の違いは主に糞団粒の多寡を通して地上部植生に大きな影響を与えており、林床草本だけでなく林冠木の成長さえ左右していることが明らかとなった。大型草食獣(シカ)の密度+生産性操作実験によって、その場の生産性の違いに応じて被食率が異なった。このことから、地上部植生の種組成は被食率の差を通して、その場所の生産性にも影響を与える可能性が示唆された。また、シカの密度が高くなるに伴い土壌中の窒素量は減少し、シカにより栄養塩循環が促進される可能性が示唆された。攪乱や遷移に伴って優占する樹種の転換が起こったサイト間の比較から、樹種転換が起こると分解速度が変化して有機物堆積量が変わるとともに、大型土壌動物群集の構造も変化していた。乾燥から滞水まで環境が大きく異なるにも関わらず、土壌微生物の多くのOTUではその相対個体数がほとんど変化を見せていない。このように非常に安定な群集要素が存在することは、土壌の環境にかかわらず偏在するなんらかの機能の存在を示唆している。

[キーワード] ミミズ、大型植食獣、地上部植生、遷移、土壌微生物

1. はじめに

生態系の物質循環は生産者、分解者、消費者の3者で構成される生物群が駆動しており、どれが欠けてもうまく機能しない。従って分解者が多くを占める土壌生物の多様性が生態系で果たす役割を考えるには、生産者としての植物と消費者としての植食者との相互作用に着目する必要がある。本サブグループではこの相互作用のうち1) 分解者から生産者への影響、2) 消費者から分解者と生産者への影響、3) 生産者から分解者への影響、4) 環境変化が土壌微生物群集構造

に与える影響、の4点について、森林生態系での大規模な野外操作実験と野外観察、およびマイクロコズム実験によって明らかにすることを目的とした。

2. 研究目的

(1) ミミズ密度の違いが地上部植生に与える影響

土壌中の生物多様性は、地上部の生態系にも影響を及ぼす。植物群集構造を考える際、地上部の現象だけでなく、地下部で起こる現象も重要である。大型の土壌動物であるミミズは土壌部の栄養塩の状態や物理構造を改変することで、植物群集に影響を与えると予想される。ミミズが地上植生に与える影響を評価するために、1) 野外でのミミズの密度や糞の分布に対する植物種の個体群の反応、2) 植物各種の成長にミミズの糞が与える影響、3) 植物の初期加入に対するミミズの影響を検討するための野外実験を行う。

(2) シカ密度の違いがミミズ密度と地上部植生に与える影響

シカによる森林生態系へのインパクトを直接効果(植物の種多様性の改変)と間接効果(栄養塩循環の改変)に着目して解明することを目的とした。具体的設問として以下の2つを設けて調査を行った。①多様性への影響:シカの植食圧は、生産性が低い条件下では植物多様性を下げ高い条件下では植物多様性を上げるか?②栄養塩循環の促進:シカの生息は栄養塩循環を促進するか?

(3) 地上部植生が大型土壌動物組成や地下部微生物群集およびその機能に与える影響

地上部植生は、リターの質や土壌中の化学成分の選択利用、あるいは呼吸等によりそれを変成させることによって、大型土壌動物組成や地下に生息する微生物群集に影響を与えると共に、そこでの物質循環過程にも影響することが予想される。過去の攪乱や遷移によって針葉樹優占林と落葉広葉樹林が林分スケールで変化した、履歴の明確なサイトで大型土壌動物組成を比較した。

(4) 土壌微生物群集構造への環境変化の影響

これまでに野外における微生物群集の生息地間の変化が確認され、潜在的に共通の種プールが存在していること、環境の改変によって異なる微生物種(OTU)が活性化され、その場の機能が変化することが示唆されている。この結果は、微生物群集の群集集合において、「眠り姫仮説」が働いていることを示すものである。この仮説は微生物群集多様性と環境改変、あるいは、大型土壌生物等その他の生物の機能を結びつける概念である。しかし野外における生息地間の群集構造の比較のみでは、「眠り姫」仮説を直接検証することが出来なかった。その原因として、微生物群集解析の手法的な限界から、ある生息地に分布する微生物種を完全に把握することは不可能であることや、環境の改変が植栽種の変化やミミズの導入といったものであるため土壌中のどのような機能が変わり、それが微生物群集とどのように関係するのかを直接検証することができない、ことが挙げられる。本課題ではこれらの仮説を直接検証するために、土壌を用いたマイクロコズム実験を実施した。

3. 研究方法

(1) ミミズ密度の違いが地上部植生に与える影響

苫小牧研究林のミズナラが優占する二次林に、2003年に一辺が10mの三角形の実験区にミズナラ林冠木が3個体以上含まれるよう計12箇所づくり、ミミズ排除区、捕食者排除区、囲い対照区、開放対照区をそれぞれ3反復設置した。ミミズ排除区においてハンドソーティングで可能な限りミ

ミズを除去した。ユキザサとオオアマドコロのバイオマスと光合成速度、ミズナラ実生の伸長成長と葉の炭素・窒素量、ミズナラ林冠木の直径成長と葉の炭素・窒素量を測定した。

ミミズ糞団粒が、植物群集に与える影響を野外観察により検討した。苫小牧研究林内の5カ所を選定し、それぞれの場所で20地点の方形区(20x20cm)を設定して、全ての植物の茎数(個体数の代用として)を数えた。そのあとで、方形区内の3地点から直径5cmの鉄製のコアで土壌を採取し、篩い法でミミズの糞団粒を選別し、秤量した。

(2) シカ密度の違いがミミズ密度と地上部植生に与える影響

北大苫小牧研究林内の約25haにおいてシカ密度と林床植物の生産性を操作する二因子実験を組み、大規模野外操作実験を行った。シカの密度操作は、2004年に囲い柵を用いて高密度区(約20/km²)・低密度区(調査地の自然密度5-10/km²)・排除区(0/km²)の3段階設定した。森林の生産性の処理は、2005年春に施肥(窒素添加)と伐採(光条件が好転)を行った。3つのシカ密度操作毎に4つの処理区(施肥、伐採、施肥伐採+無処理)を反復して設置した。シカの生態系への直接的な影響をみるために、高木よりも処理への応答が早い林床植物を対象に、シカによる被食率、植物の多様性、植物高、開花率の調査を林床植物の生育期である7-8月に行った。さらに、シカの生態系への間接的な影響をみるために土壌サンプルを採取し、土壌中の全窒素量を測定した。また、シカの活動は植生だけでなく土壌環境にも波及し、そこに生息する土壌動物にも影響が及ぶ可能性がある。そこで、先のシカ密度を操作した実験区でミミズ類に関する調査を行った。さらに樹木から供給される落葉落枝量を調査した。

(3) 地上部植生が大型土壌動物組成や地下部微生物群集およびその機能に与える影響

北海道大学苫小牧研究林において1960年頃に針葉樹から広葉樹(CB)または広葉樹から針葉樹(BC)に樹種交替したサイトと交替していないサイト(広BB、針CC)のうち、土壌や地形、標高など樹種交代履歴以外の環境条件がほぼ同じ場所を4カ所選んで比較した。広葉樹林はミズナラが優占し、針葉樹林はエゾマツとトドマツが優占している。土壌は1サイト3地点、深さ0-5cm、5-10cmで採取し土壌理化学性(pH、EC、TC、TN、可給態リン酸、交換性陽イオン、窒素無機化量)を分析した。2007年10月に各調査サイトで25cm×25cmの落葉堆積層を採取し、60℃で72時間、乾燥後に重量を秤量した。同様の区画の落葉層および土壌深さ10cmまでに生息する大型土壌動物をハンドソーティングによって採取し、ナガミミズ目は、種レベルで、そのほかの土壌動物は目レベルで同定し、重さを測定した。

(4) 土壌微生物群集構造への環境変化の影響

実験には、既に土壌微生物のフロラについてクローニングにより情報が得られている、桐生試験地の土壌を用いた。桐生試験地A層の土壌を採取し、細根や大型土壌生物を取り除いた後、ガラスバイアルに土壌を各10g入れ、以下の4つの処理を準備した。1) 乾燥: 水分補充なし、2) 滞水: 土壌表面まで滞水、3) 糖添加: グルコース3.5mgを500μlで水溶し添加。添加後は水分を調節し、コントロールと同じ水分条件で培養、4) コントロール: 初期の条件と同様の水分条件を維持。これらを25℃の暗所で、17日間培養し、微生物群集の変化と、硝酸、アンモニア、ガス態窒素の動態を同時に測定する。微生物群集の変化は、茨城大の協力によりT-RFLPを用いた。

4. 結果・考察

(1) ミミズ密度の違いが地上部植生に与える影響

自然状態での糞団粒と植生の対応関係について典型的な反応を示した植物3種について、ミミズの糞団粒量 (mg乾燥重量) と茎数との関係を図1-1に示す。ハエドクソウは糞団粒密度に対して負の反応を、フッキソウは正の反応をそれぞれ示し、チョウセンゴミシは糞団粒に対する反応が見られなかった。このような関係は、植物からミミズへの作用、ミミズ糞団粒に対する植物の作用の両方から予測される。

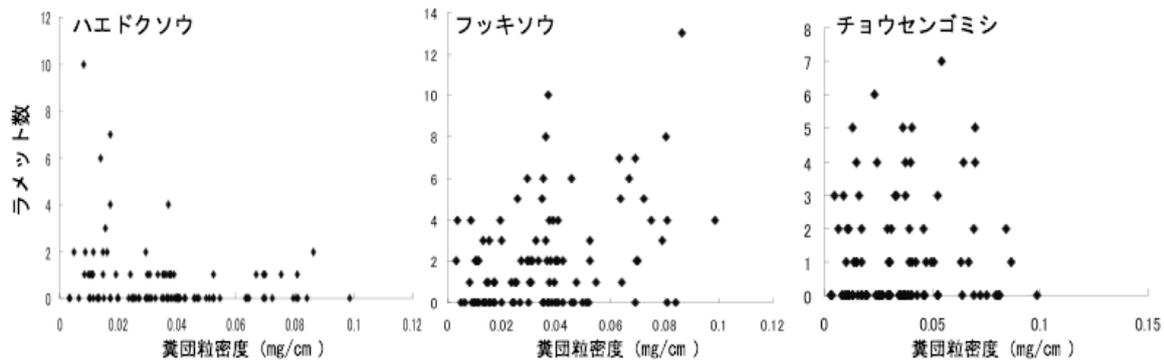


図1 ミミズ糞団粒密度と各種植物ラメット数の関係

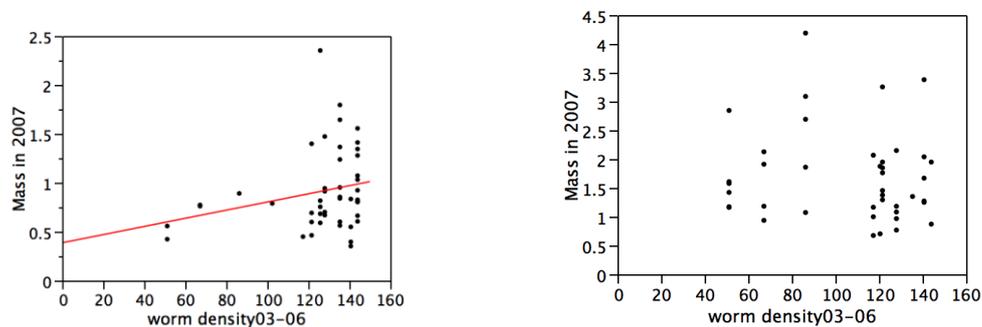


図2 ユキザサ (左) とオオアマドコロ (右) のバイオマス (g) とミミズ密度の関係

ミミズ密度操作実験においては、ユキザサのバイオマスと光合成速度はミミズの密度が高いほど高くなったが、オオアマドコロではそのような傾向は見られなかった (図1-2)。ミズナラ実生ではミミズの密度が高いほど伸長成長が大きく、葉の窒素含量が高い傾向があった (図1-3)。ミズナラ林冠木では葉の窒素含量は有意な差がなかったが、直径成長はミミズ排除区で小さい傾向があった (図1-4)。これらの効果の違いは、植物の生活史の違いによってもたらされ、相対的に栄養塩制限を受けやすい植物がミミズ密度の影響を受けていたものと考えられる。従って様々な生活史を持つ植物が共存する森林生態系では、ミミズの果たす役割もより複雑なものとなるだろう。

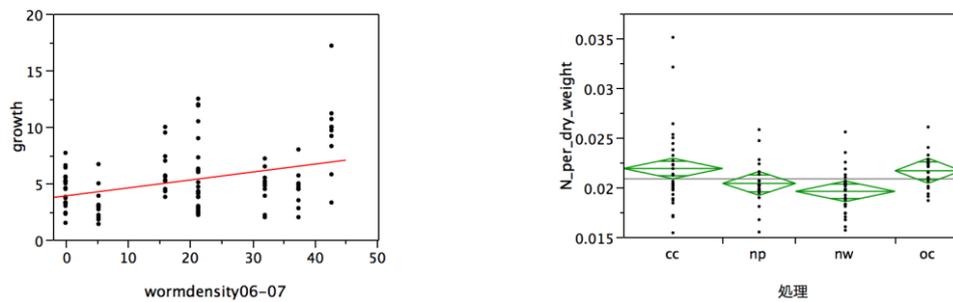


図3 ミズナラ実生の伸長成長とミミズ密度の関係（左）、処理区ごとの葉の窒素含量

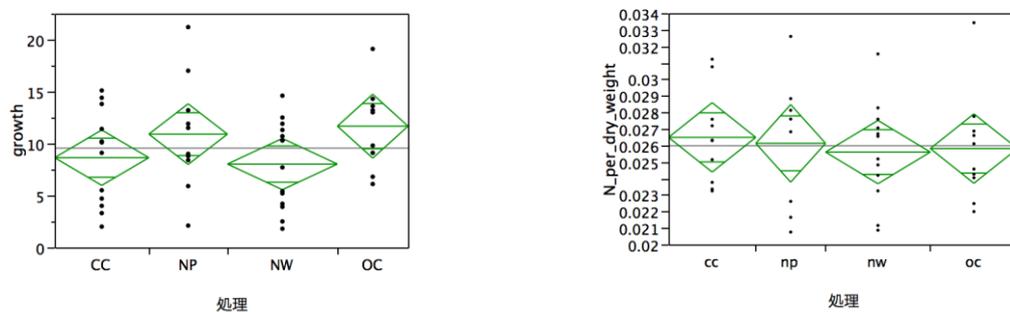


図4 ミズナラ林冠木の処理区ごとの直径成長（mm）（左）、と葉の窒素含量

（2）シカ密度の違いがミミズ密度と地上部植生に与える影響

大型草食獣であるシカの植物多様性への直接効果を検討する際に有効な仮説として、「生産性が低い貧栄養条件下では植食圧は植物多様性を減少させ、逆に富栄養条件下では多様性を増加させる」（GR仮説）¹⁾がある。自然環境には、火山灰地のような貧栄養条件や有機物が堆積した富栄養条件がモザイク状に存在する。このような栄養条件の違いによって、シカによる植物の種多様性への影響は異なると予想される。

林床植物の被食率はシカ密度が高い程増加した。生産性の勾配に対して被食率は、無処理区と施肥区で変わらなかったが、伐採区と伐採+施肥区で有意に増加し（図1-5）、それに伴い嗜好種であるチゴユリの地面からの高さが低下した（図1-6）。これは、伐採区と伐採+施肥区において光資源の増加に伴って林床植物の生産性が増加していたため、シカが選択的に採食を行い、被食率が增大したことによると考えられた。一方、林床植物の種数・シャノン指数、シン普森指数に対してシカ密度間では有意な差はみられず、生産性処理との交互作用も検出されなかった。つまり、GR仮説は本研究のシカ導入後3年間の調査では支持されなかった。この理由は、調査対象の林床植物のほとんどが多年生であったため、3年間のシカの採食圧では個体の消滅にはすぐにはつながらず、種数を変化させるに至らなかったためと考えられた。しかし、種によって被食率に大きな差がありシカ密度の増加に伴い植物の開花率は下がっていることから（図1-7）、長期的に見た場合、特定の種の死亡率の増加と繁殖率の低下をもたらして、種組成が変化すると予想された。また、生産性処理によっても被食率が異なったことから、種組成は被食率の違いを通して

その場所の生産性にも影響を受ける可能性が示唆された。シカの密度が高くなるに伴い土壌中の窒素量は減少し(図 1- 8)、シカにより栄養塩循環が促進される可能性が示唆された。これには二つ理由が考えられる。まず、シカが植物を採食し分解し易い糞を排出することにより、植物そのものがリターとなるよりも無機化が早まった可能性がある。次に、シカによる被食により植物高が低くなっていることから、植物に遮られていた光が土壌表面に届き、地温が上昇し分解が進んだ可能性もある。本研究ではシカ導入後僅か3年間で土壌栄養塩に差異がみられたので、今後このようなシカによる栄養塩循環の改変が中長期的に生態系に対してどのように作用するのかを調べる必要があると思われる。

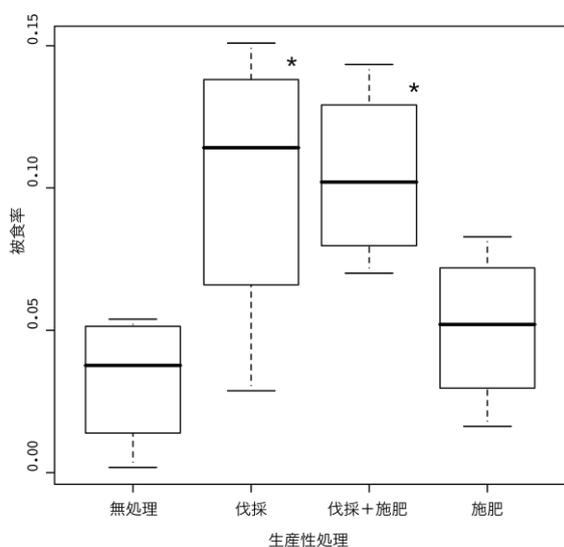


図 5 生産性処理毎の被食率

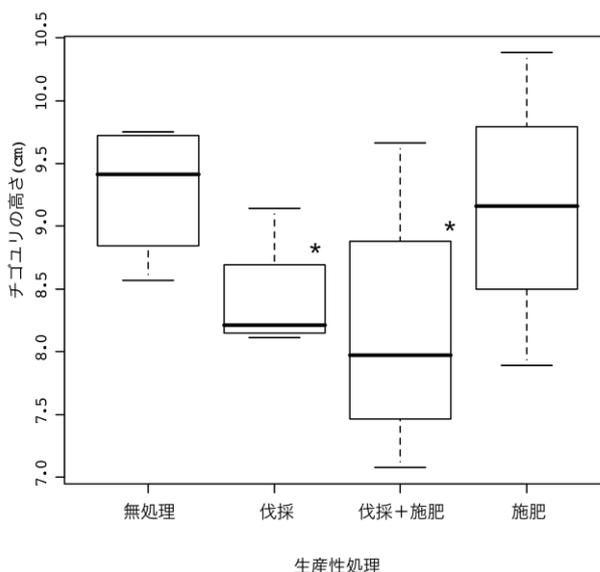


図 6 生産性処理毎のチゴユリの高さ

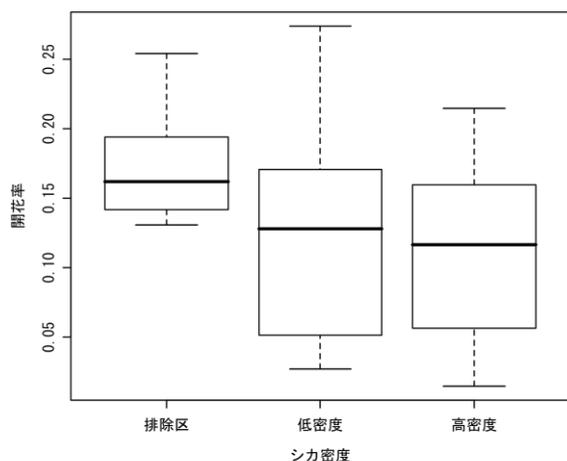


図 7 シカ密度毎の林床植物の開花率
(開花個体が少なくとも1個体あった種のみ)

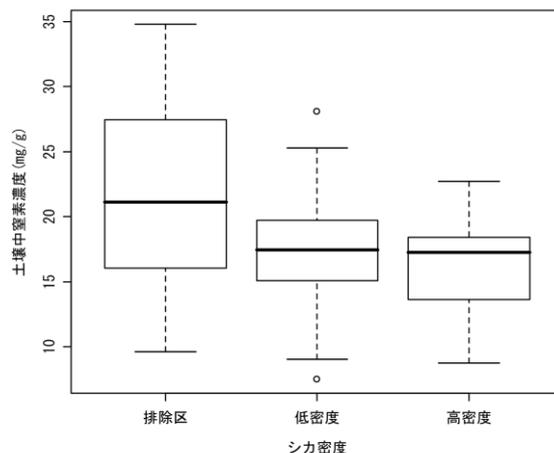


図 8 シカ密度毎の土壌中全窒素濃度

図1-9は各操作区におけるミミズの生物量を示している。図1-8のようにエゾシカの密度が多いほど土壌N量は低下したが、ミミズ類生物量はエゾシカの密度処理間で有意差がみられなかった。ミミズ類生物量は択伐によってのみ低下した。

ミミズ類調査の前年の落葉供給量は択伐区で他の処理区よりも有意に少なかった(図1-10)。したがって、表層性ミミズ類の餌資源である落葉供給量の挙動がミミズ類の繁殖能力を変化させ、択伐区において翌年のミミズ類生物量が低下したと考えられる。本結果は、シカ導入からの経過年数が少ないためミミズ類にシカの影響がみられなかったが、土壌N量でみられたようにエゾシカの活動は土壌環境を改変した。そのため、今後、ミミズ類に時間遅れの影響を与える可能性がある。

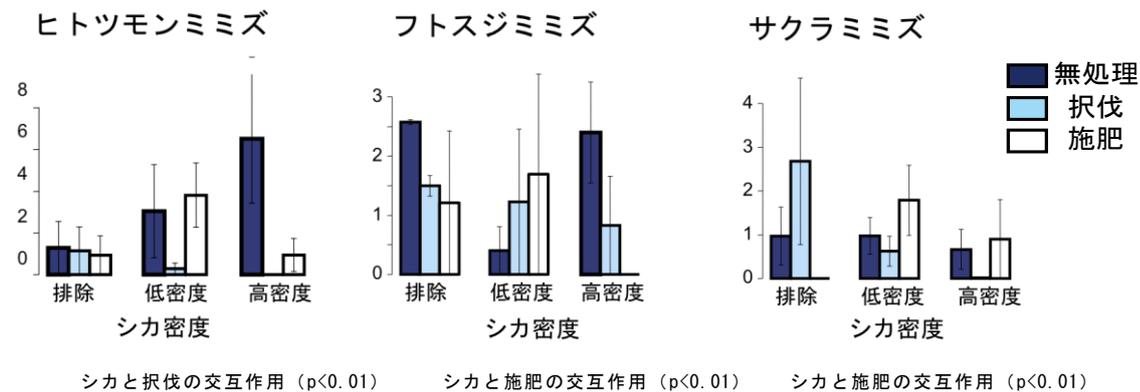
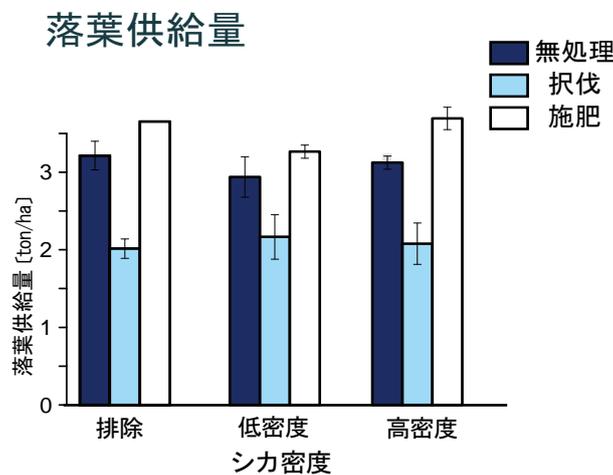


図9 各操作区におけるミミズ類の生物量



シカ密度操作区と施肥区では有意差がみられず、
 択伐によってのみ、有意に減少。

図10 前年の落葉供給量

(3) 地上部植生が大型土壌動物の組成や地下部微生物群集およびその機能に与える影響

植生履歴の異なる4サイトのうちBB、CBはリター堆積量が少なく、CC、BCでは多かった(図1-11)。土壌表層においてTC、TNはほぼ同じ値を示し、BB、CBの土壌ではその他の分析項目に

においてCC、BCよりも高い値になった。閉鎖した森林ではそれほどリターフォール量は変わらないので、落葉堆積量の違いは分解速度の違いを示している。大型土壌動物の生物量は、BB、CBで大きくなった（図1-12）。また、その生物量のほとんどをナガミミズ目のミミズが占め、ナガミミズ目のうち、フトミミズ科はBB、CBで生息密度が高くなった。CBではフトミミズ科のみ、BCではツリミミズ科が多い傾向にあった。また、BCでは窒素の無機化量が少なく、ミミズの少なさが影響した可能性が示唆された。土壌化学性全体において、BB、CBは上層と下層の差が少なかった。これはミミズにより土壌が攪拌されたことが要因であると考えられた。樹種交替は有機物の堆積様式や土壌理化学性、そしてミミズの個体数や群集構造に影響を及ぼすことが示唆された。

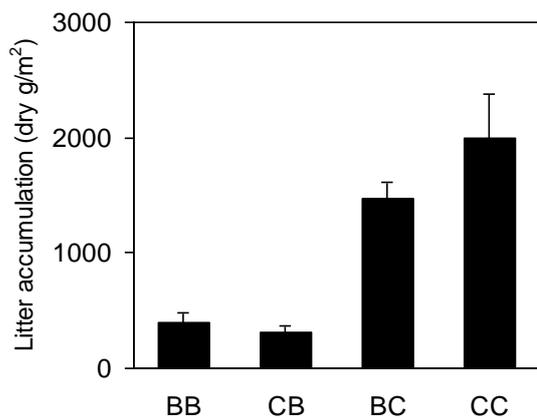


図1-1 地上部構成樹種の転換履歴が異なる林分のリター堆積量（Bは広葉樹、Cは針葉樹）

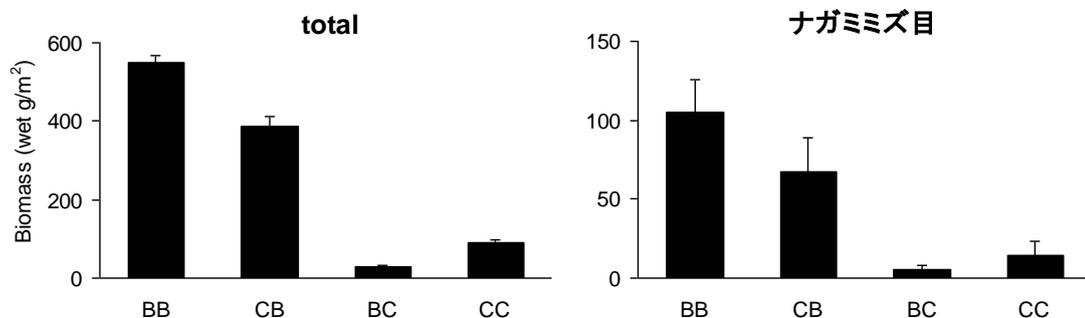
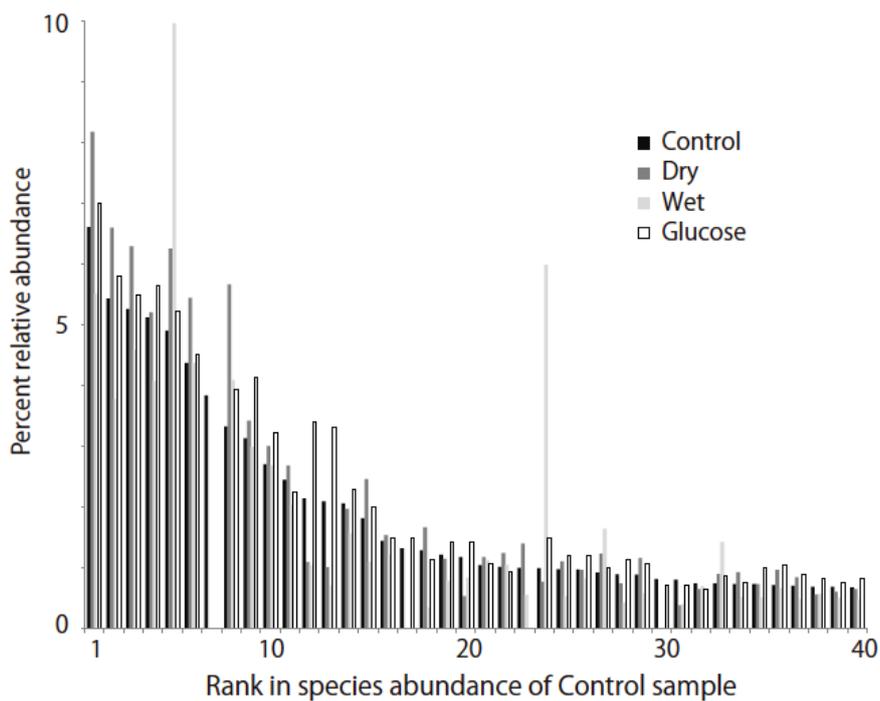


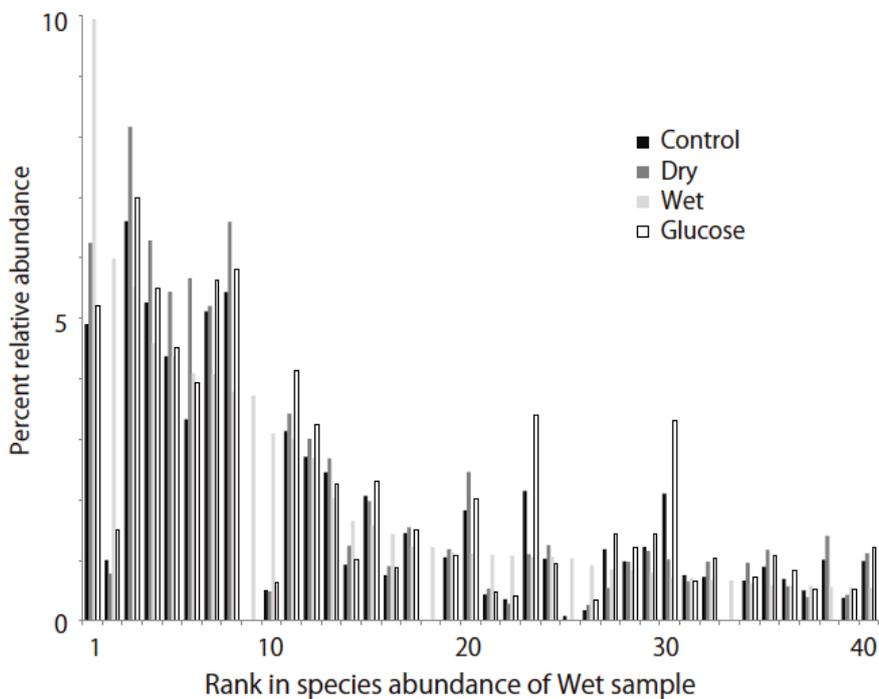
図1-2 地上部構成樹種の転換履歴が異なる林分の大型土壌動物量（Bは広葉樹、Cは針葉樹）

（4）土壌微生物群集構造への環境変化の影響

各処理区における、微生物のリボソーム16S領域の制限酵素処理による断片長ごと（OTUと仮定）の相対頻度を図1-13上図に示す。図は、Controlにおいて優占していた40 OTUについて、それぞれのサンプル中での相対断片長数を示しており、それぞれのサンプルでの微生物種の高い共通性を示している。同様の図を滞水処理区において優占していた40 OTUについて、その優占度順に図1-13下図に示す。図に見られるように、水分添加（滞水）処理の効果が顕著に見られる。この図では、他の処理区では検出されていないOTUもいくつか確認され、「眠り姫」の存在が示される。



Control 区における優占 40OTU の順に並べた、各処理区の相対断片長数



wet 区における優占 40OTU の順に並べた、各処理区の相対断片長数

図 1 3 桐生試験地土壌を採取し (Control)、乾燥、滞水、グルコース添加の各処理をして培養し、T-RFLP法でもとめたOTU-ランク関係。

各土壌での窒素循環機能の測定結果、および、処理によって変化が見られたOTUの特定（T-RFLP結果と既存のDBと配列検索、あるいは新たなクローニング）を行う必要があるが、本結果は、17日間という短い期間のうちに、微生物群集が大きく変化しうることが示された。

一方で、図1-13に顕著に示されるように、乾燥から滞水まで環境が大きく異なるにも関わらず、多くのOTUではその相対個体数がほとんど変化を見せていない。このように非常に安定な群集要素が存在することは、土壌の環境に関わらず偏在するなんらかの機能の存在を示唆している。このような機能がなんなのかを理解することは、土壌生態系の機能を考える中で重要な示唆を含むものと考えられる。

本結果を、これまで本研究グループで集められた環境変化に対する微生物群集の反応に関する結果の解釈に結びつける必要がある。今回の実験は、ガラスバイアル中の10gの土壌という、小スケールの空間の中で起こった反応である。一方で、野外の土壌中では、例えば、脱窒と硝化が同所的に同時に生じているように見えるなど、微少な空間異質性の中で、異なる機能が発現していると考えられる。つまり、ミミズによる団粒の生成、広葉樹と針葉樹での落葉の物理的構造の差異など、小スケールでの空間異質性の生成と、そのスケールでの微生物の機能を特定し、全体の反応を考える必要があるだろう。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

森林生態系の物質循環を駆動する生物群の機能を評価するために、これらの生物群の相互作用の各パスについて、大規模な野外操作実験を中心に明らかにする試みはこれまでほとんど行われてこなかった。大型分解者の密度を直接操作することにより明らかとなった生産者の応答の多様性、大型消費者の密度操作による生産者の多様性への影響の直接効果と、栄養塩循環の改変を通じた中長期の時間スケールでの間接効果、森林植生の除去操作による分解者への影響、など本研究の成果は国内外に大きなインパクトを与えると考えられる。

(2) 地球環境政策への貢献

森林生態系の土壌と地上部の炭素ストックは莫大な量に上るが、その変化量に大きな影響を与える生物の効果の一端を明らかにした。このことは温室効果ガスの挙動を評価する上で生物の多様性を考慮することが欠かせないことを示している。

一方、高密度になったシカなどの大型植食獣による生態系の改変は、日本も含め世界各地で大きな問題となっている²⁾³⁾⁴⁾。本研究で実験的に明らかにされる場の生産性の違いを含めた大型植食獣の直接効果と間接効果は、このような問題に的確に対処するための基礎を与えるだろう。

6. 引用文献

- 1) Proulx, M., Mazumder, A. (1998) Reversal of grazing impact on plant species richness in nutrient-poor vs. nutrient-rich ecosystems. *Ecology* 79: 2581-2592.
- 2) Fuller, R.J., Gill, R.M.A. (2001) Ecological impacts of increasing number of deer in British woodland. *Forestry* 74: 193-199.
- 3) Husheer SW, Coomes DA & Robertson AW (2003) Long-term influences of introduced deer on the composition and structure of New Zealand *Nothofagus* forests. *Forest Ecology and Management* 181:

99-117.

4) Takatsuki, A., Gorai, T. (1994) Effects of deer on the regeneration of a *Fagus crenata* forest on Kinkazan Island, northern Japan. *Ecological Research* 9: 115-120.

7. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はなし

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文 (査読あり)>

1) Toyota, A., Tayasu, I., Fujimaki, R., Kaneko, N., Uchida, M., Shibata, Y., Hiura, T. (2010) Combined effects of vegetation switch and subsequent change in soil invertebrate compositions on the soil carbon accumulation patterns, revealed by radiocarbon concentrations. *Radiocarbon* in press

<査読付論文に準ずる成果発表>

なし

<その他誌上発表 (査読なし)>

1) 中村誠宏・日浦勉 (2008) 地下部の温暖化が林冠部の植食性昆虫群集に与える影響. 長期生態系モニタリングの現状と課題—温暖化影響と生態系応答— CGER News

(2) 口頭発表 (学会)

1) 日浦勉・鍋島絵里・豊田鮎・川口達也・金子信博 (2008) ミミズは森林植物の成長を改変するか? 第55回日本生態学会、福岡

2) 中村誠宏・日浦勉 (2008) ミズナラ樹木地下部の温暖化が林冠部の昆虫群集に与える影響. 第55回日本生態学会、福岡

3) 川口達也・大久保慎二・日浦勉・金子信博 (2008) 苫小牧研究林におけるミミズ密度操作と窒素無機化の関係. 第55回日本生態学会、福岡

4) 豊田鮎・荒木奈津子・日浦勉 (2008) ミズナラ林の発達段階に伴うミミズ類の分布と落葉分解の変化. 第55回日本生態学会、福岡

5) 廣永拓男・日野貴文・揚妻直樹・日浦勉 (2008) 環境の変化によるエゾシカの餌選択への影響. 第55回日本生態学会、福岡

6) 豊田鮎・陀安一郎・藤巻玲路・金子信博・内田昌男・柴田康行・日浦勉 (2009) ミミズによる森林土壌の炭素蓄積パターンの変化-¹⁴C天然存在比を用いた解析 第56回日本生態学会、盛岡

7) 川口達也・日浦勉・岩島範子, 増永二之・大久保慎二・金子信博 (2009) ミミズが土壌の団粒量と窒素動態に与える影響 -苫小牧研究林におけるフトミミズ除去による効果-. 第56回日本生態学会、盛岡

8) 廿楽法・金子信博・日浦勉・村上正志・豊田鮎 (2009) 土壌表層の団粒を潰すとどうなるか? - 小型節足動物の多様性と物質循環-. 第56回日本生態学会、盛岡

- 9) 日野貴文・揚妻直樹・日浦勉 (2009) 異なる光・栄養塩環境下におけるシカの林床植物への影響- 大規模密度操作実験による検証-. 第56回日本生態学会、盛岡
- 10) 甘楽法・金子信博・日浦勉・村上正志・豊田鮎 (2009) 土壌を踏み固めることによる小型節足動物相と物質循環への影響. 第32回日本土壌動物学会、沖縄
- 11) 藤巻玲路・豊田鮎・陀安一郎・金子信博・日浦勉 (2009) 針葉樹・広葉樹の転換がおきた森林土壌における炭素蓄積とリグニン由来フェノールの特性. 日本土壌肥料学会2009年大会、京都
- 12) Toyota, A., Tayasu, I., Fujimaki, R., Kaneko, N., Uchida, N., Shibata, Y., Hiura, T. (2009) Comparison of soil carbon accumulation in conifer and broad leaf forests using radiocarbon measurements. Radiocarbon conference, Hawaii

(3) 出願特許

なし

(4) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)

なし

(5) マスコミ等への公表・報道等

なし

(6) その他

なし

F-073 土壌生物の多様性と生態系機能に関する研究

(2) 農法が土壌生物多様性と生態系サービスに与える影響の解析

国立大学法人茨城大学

農学部

太田寛行

農学部附属フィールドサイエンス研究教育センター

小松崎将一

平成19～21年度合計予算額 23,737千円

(うち、平成21年度予算額 8,375千円)

※予算額には、間接経費を含む。

[要旨] 農耕地内における生物資源再生と物質循環プロセスの最適化を目指し、1) 不耕起栽培、2) 冬期カバークロープ利用、3) ミミズ導入による畑地土壌生態系改変による生態系サービスへの影響を解析した。また、人為的な土壌管理を極度に減じた自然農法畑地の土壌分析も行った。2007年度は、夏作物として陸稲を栽培したが、2008年度はダイズに変えて、不耕起/冬期カバークロープ栽培、ミミズ導入処理(1㎡あたり100匹)の効果を検討した。その結果、(1) 2007年の陸稲栽培では、無施肥区においてミミズ導入で収量の増加がみられたが、2008年のダイズ栽培では、有意差は認められなかった。(2) 陸稲栽培区では、ミミズ導入で無機態窒素量が増加する傾向にあり、特にヘアリーベッチ・カバークロープとの併用で顕著であり、ダイズ栽培畑地でも同様な結果であった。(3) 陸稲栽培畑地での7月の測定結果では、裸地区に対して、カバークロープ施用で増加する土壌呼吸活性がミミズ導入で抑えられる結果が観察されたが、ダイズ栽培畑地では、カバークロープ施用効果がそれほど顕著ではなく、ミミズ導入による抑制もみられなかった。(4) 土壌の亜酸化窒素(N_2O)生成活性は、ミミズを導入していない土壌に比べて、カバークロープ施用のミミズ導入土壌で低くなる傾向が観察された。また、比較として用いた自然農法畑地の土壌炭素含量は、慣行農法畑地の場合に比べて、約2倍近い値を示すことがわかった。各畑地について、土壌微生物(アーキア、細菌、糸状菌)の群集構造を、リアルタイム定量PCR-末端制限断片長多形(T-RFLP)分析法で解析した。ミミズ導入や土壌管理によりアーキア群集と細菌群集は比較的稳定ではあるが、その構成種の生育には影響を及ぼしていることが示された。また、糸状菌がもっと影響を受けやすかった。ミミズ導入とカバークロープ施用の効果を比較すると、後者においてより強い影響があることが示された。以上の結果より、土壌の物質循環機能の最適化に向けて、不耕起栽培、冬期カバークロープ利用、ミミズ導入の技術は有用であることが示唆された。

[キーワード] カバークロープ、不耕起栽培、ミミズ、土壌炭素、微生物群集構造

1. はじめに

人口増加に対応した食料増産の責務に加えて、気候変動への適応、環境負荷の軽減など、農業生産システムに関わる課題は深刻化と多様化が著しい。そのような状況で、基本的な解決のアプローチは、農業生産基盤である土壌の機能保全ないし向上と言える。その機能は、一般的な「生態系サービス」という概念と一致するものであり、そのサービス機能と「生物多様性」との関連

性追求が今日の自然科学では中心的命題と考えられる。ここで、現在の農業生産システムを概括すると、土壌-植物系のサービス機能における一次生産性が、外部資源（化石燃料、化学肥料など）を利用しながら増加してきたが、外部資源への高度依存は不可避な状況に達してしまった状況にある。今後は、地域内での資源再生にシフトした新しい農業生産システムの探求が必要と言える。しかしながら、現実の農業生産現場では、①輪作体系が崩壊し単作化が進行したため耕地内の一次純生産量（ソース）が低下していること、②化学肥料や農薬依存型の生産システムであったために土壌の物質循環機能（プロセス）が低下し、有機物投入に対してその利用効率が低いことが指摘される¹⁾。筆者らは、①の点への対処としては、全体的な土壌保全の観点から、冬期カバークロープ栽培によって、冬期の土壌浸食防止や雑草防除効果、そしてマメ科作物を用いた場合の後作物への窒素源とする技術を開発してきた^{2) 3), 4), 5), 6)}。また、②の点に関しては、土壌生物機能を支える土壌有機物を保持する方法として、「不耕起」や「最小耕起」の効果が研究してきた^{6), 7)}。

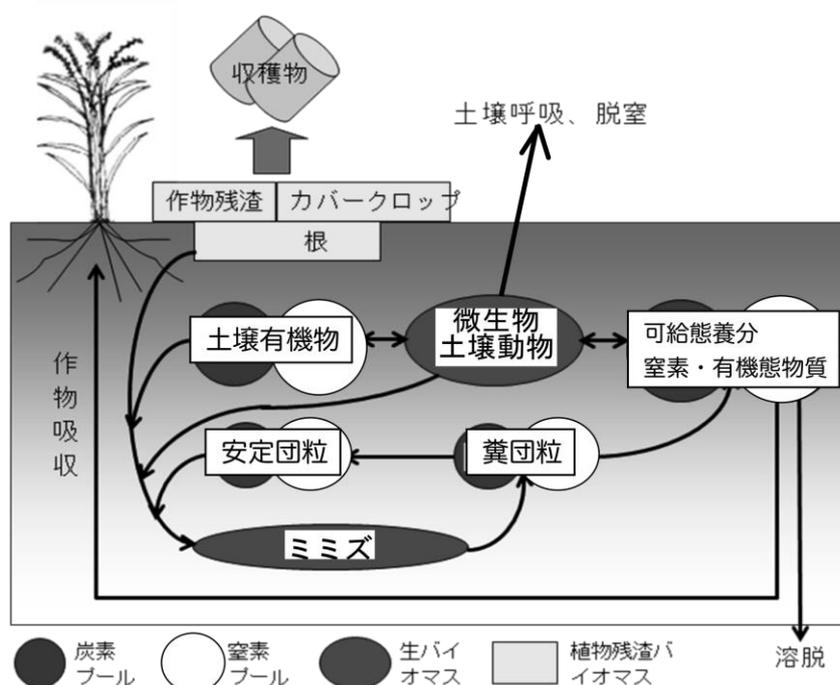


図1. 土壌における有機物動態の模式図（小松崎・太田 原図）

ここで、地域内での資源再生として、土壌有機物の保持について考察する。図1は土壌中での有機物の動態を模式的に示したものである。土壌有機物は炭素と窒素のプールとして機能するものであり、その可給態が栄養物として作物に吸収される。しかし、溶脱や微生物の作用（呼吸、脱窒）によって土壌系外に放出してしまう部分も大きい。土壌有機物保持を向上させるメカニズムの一つは「団粒による土壌の構造化」であり、団粒内での有機物保持が微生物の分解作用をマイナスに制御することが知られている⁸⁾。したがって、団粒形成の大きな担い手である「ミミズ」の個体群密度を高めることは、土壌有機物の存在形式の変化を介して、土壌中の炭素や窒素の循環にも大きな影響を与えることが推察される。

先に、筆者らは不耕起栽培にカバークロープを導入することで土壌動物のバイオマスが耕起圃

場に比べて11倍増加することを認め、とくに土壤動物の中でミミズが耕地内における窒素循環に極めて重要な役割を担っていることを報告した^{1),2)}。本研究ではカバークロップ利用による農耕地への有機物供給と不耕起カバークロップ被覆環境下においてミミズを導入しその定着を促すことで、耕地内における生物資源ソースの創出と循環プロセスを最適化し土壤圏を有効に活用する生物多様性に貢献する新しい農業システムの形成を目指すものである。

2. 研究目的

農法が土壤生物多様性と生態系サービスに与える影響の解析を行うために、前年度の結果の再現性検討とより詳細な分析を以下の2項目について行った。

(1) 不耕起栽培と冬期カバークロップ栽培が一次生産と物質循環機能に及ぼす影響を調べてきたこれまでの結果を踏まえて、さらに、ミミズ導入処理が土壤機能に与える影響を解析する。また、人為的な土壤管理や栽培管理を極度に減じた自然農法畑地の土壤についても分析し、これまでの試験区のデータと比較検討する。

(2) 土壤機能の実質的な担い手である土壤微生物について、不耕起栽培、冬期カバークロップ栽培、ミミズ導入がその多様性に与える影響を、これまでの本研究のなかで開発してきた定量PCRを併用したT-RFLP（末端制限断片長多型）解析法を用いて解析する。

3. 研究方法

茨城大学農学部附属フィールドサイエンス教育研究センター（FSC）の畑地圃場に以下の試験区を設置した（図2A）。また、自然農法を営むA氏（茨城県稲敷郡阿見町）からも畑地（図2B）の土壤試料を得た。2種のカバークロップ（ライムギ、ヘアリーベッチ）を冬期に栽培し、夏作物として2007年までは陸稲（品種:ユメノハタモチ）、2008年はダイズ（品種:エンレイ）を栽培した。また、カバークロップを栽培しない裸地区を設けた。裸地区で発生した主な雑草はナズナ（*Capsella bursa-pastoris*(L.) Medic）、オオイヌノフグリ（*Veronica persica* Poir.）、ホトケノザ（*Lamium amplexicaule* L.）とハルジオン（*Erigeron philadelphicus* L.）であった。耕耘方法はプラウ耕、ロータリー耕および不耕起とした。耕耘は夏作物栽培時およびカバークロップ栽培時の年2回実施した。試験は分割区画デザイン法により4反復で実施した。陸稲栽培の窒素施肥量は100 kg N/haとし、 P_2O_5 および K_2O は栽培開始前の土壤調査により所定量を施した。ダイズ栽培においては無肥料で実施した。

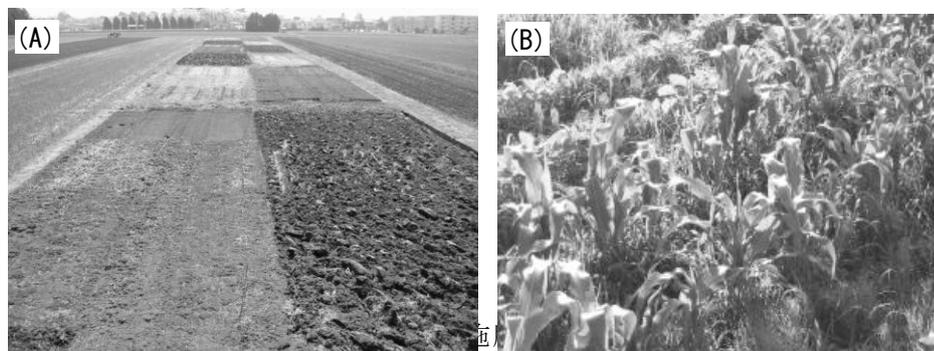


図2. 茨城大学農学部附属フィールドサイエンス教育研究センター（FSC）の畑地圃場(A)と自然農法畑地（トウモロコシ栽培）(B)の写真

4連の各区内（3×6 m）にミミズ導入区画（0.60×0.90 m）を設けた（図3）。2007年5月と2008年4月にFSC内の果樹園および自然農法畑で採取した数種類の表層性ミミズおよび地中性ミミズを試

4. 結果・考察

(1) ミミズ導入による農耕地の一次生産および物質循環に及ぼす影響

昨年度に、①導入1ヶ月後のミミズの生存率はヘアリーベッチ区が最も高く、次いでライムギ区であり、裸地区でのミミズの生存率は低く、ミミズの生存率にはカバークロープ残渣の量が関係していること、②ダイズ栽培期間中の土壤呼吸量はミミズ導入区が対象区に比べてやや低下したこと、③土壤の硝酸態窒素含有量は、カバークロープ区で増加し、ミミズ導入によりさらに増加すること、を報告した。ここでは、前年度の結果と比較しながら、(1)作物収量、(2)土壤無機態窒素の動態、(3)土壤呼吸活性、(4)亜酸化窒素(N_2O)発生活性への影響を述べる。

(1-1) カバークロップとミミズ導入の作物収量への影響

2007年の陸稲栽培では、無施肥区においてミミズ導入によって収量(玄米重)の増加がみられた(図5)。しかし、2008年のダイズ栽培では、有意差は認められなかった(図6)。より明確な効果の評価を行うためには、継続した栽培実験が必要であると考えられる。

図5. カバークロップとミミズ導入が陸稲(2007年栽培)収量に及ぼす影響

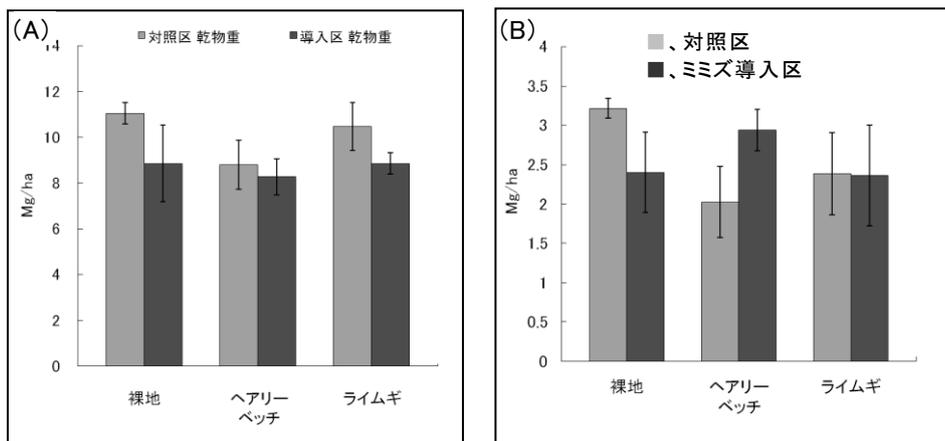
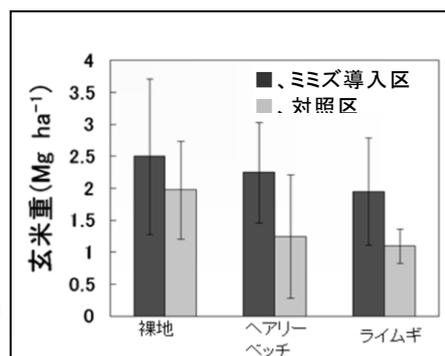


図6. カバークロップとミミズ導入によるダイズ乾物重(A)と全粒重(B)への影響

(1-2) 土壤無機態窒素の動態への影響

2007年の陸稲栽培区で、6月と8月の測定結果(それぞれ、ミミズ導入後1か月と3か月に対応)では、ミミズ導入で無機態窒素量が増加する傾向にあり、特にヘアリーベッチ・カバークロップとの併用で、効果は顕著であった(図7)。6月と8月の比較では、8月に無機態窒素量が減少するが、カバークロップとミミズの併用効果は引き続き観察された。

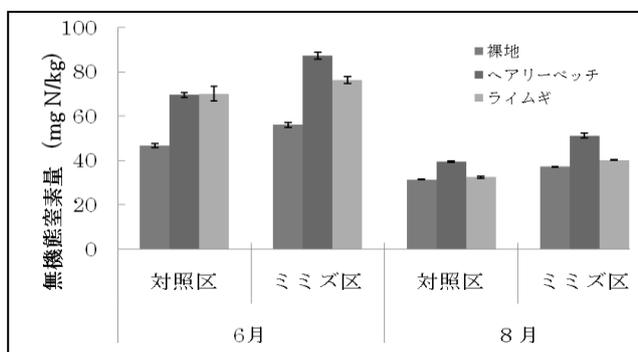


図7. カバークロップとミミズ導入が陸稲栽培畑地(2007年)での無機態窒素量に及ぼす影響

2008年のダイズ栽培畑地でも、6月に、ミミズ導入起因すると考えられる無機態窒素量の増加がみられ、ヘアリーベッチ・カバークロープとの併用で、さらに促進した(図8)。ここで、アンモニア態と硝酸態に分けてみると、6月に見られた無機態窒素量の増加は、主に硝酸態窒素に由来するものであった(図9)。ヘアリーベッチ・カバークロープとミミズの併用効果は、硝化の促進と関連することが推察される。この点については、土壤の硝化活性等の測定を行って確認することが必要であると考えている。

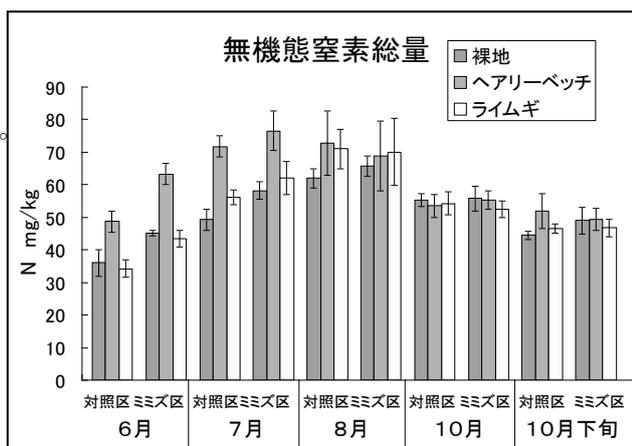


図8. カバークロープとミミズ導入がダイズ栽培畑地(2008年)での無機態窒素量に及ぼす影響

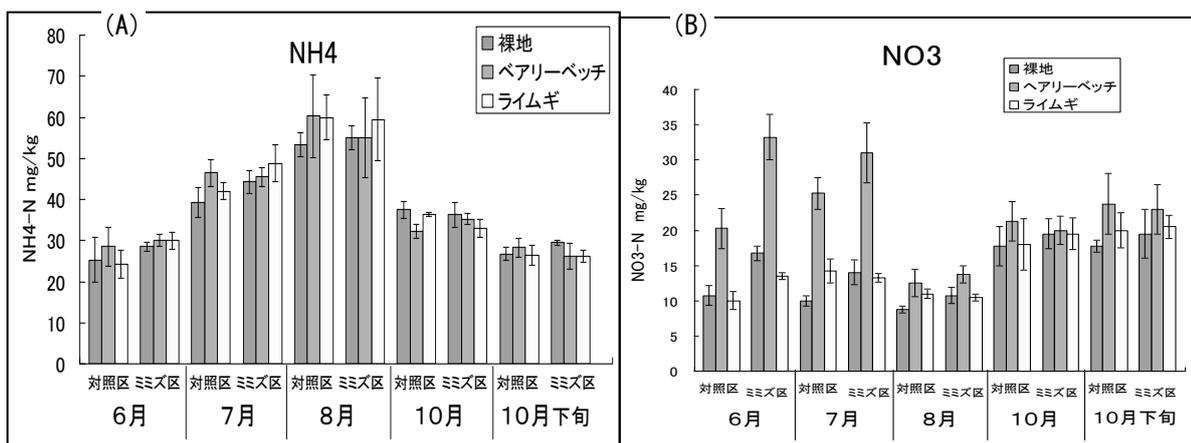


図9. カバークロープとミミズ導入がダイズ栽培畑地(2008年)でのアンモニア態(A)と硝酸態(B)の窒素量に及ぼす影響

(1-3) 土壤呼吸活性

2007年の陸稲栽培畑地での7月の土壤呼吸活性測定結果では、裸地区に対して、カバークロープ施用で増加する傾向がミミズ導入で抑えられる結果が観察された。8月には、その効果は小さくなり、10月になると、その効果は認められなかった(図10)。一方、2008年のダイズ栽培畑地では、カバークロープ施用による土壤呼吸活性促進が、それほど顕著ではなく、ミミズ導入による抑制もみられなかった(図11)。なお、裸地区のミミズを導入していない土壤(ベ

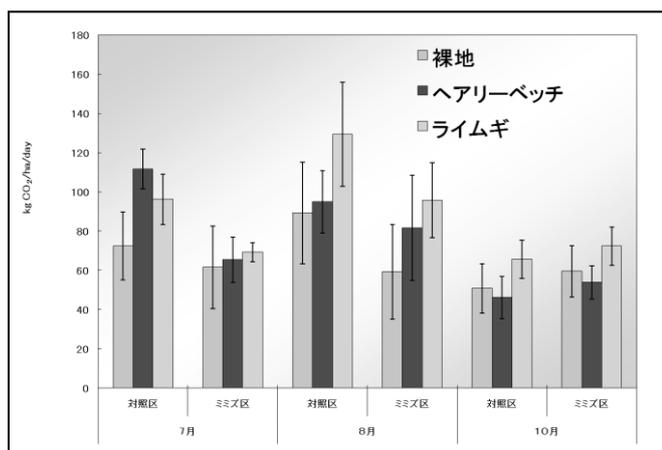


図10. カバークロープとミミズ導入が陸稲栽培畑地(2007年)の土壤呼吸活性に及ぼす影響

ースラインに相当)について陸稲栽培畑地とダイズ栽培畑地での活性を比べると、ダイズ畑で高い傾向にあり、また、7~8月の活性が10月初旬~10月下旬よりも高かった。土壌生物の呼吸活性には、栽培作物の種類によっても影響を受けるものと推察される。

(1-4) 土壌の亜酸化窒素生成活性

土壌のN₂O生成活性は、2008年のダイズ栽培畑地で測定した。土壌呼吸活性の季節プロファイルと異なり、10月初旬~10月下旬の測定値が7~8月の測定値を明確に上回る結果となった(図12)。また、カバー作物施用区のみミズ導入土壌の活性は、ミズを導入していない土壌に比べて、低い傾向にあることが観察された。

N₂Oは、硝化反応の副産物であり、また脱窒反応の中間産物でもある¹⁰⁾。N₂Oがどちらの反応に由来するかは、土壌の水分条件などの因子に依存する¹¹⁾。先に述べた土壌のアンモニア態および硝酸態の窒素量(図9)の季節変動の結果を考えると、6~8月に、硝化活性が高くなり、10月に活性は落ちることが推察される。したがって、おそらく10月に見られたN₂O生成活性の増大は、脱窒活性に由来することが推察される。

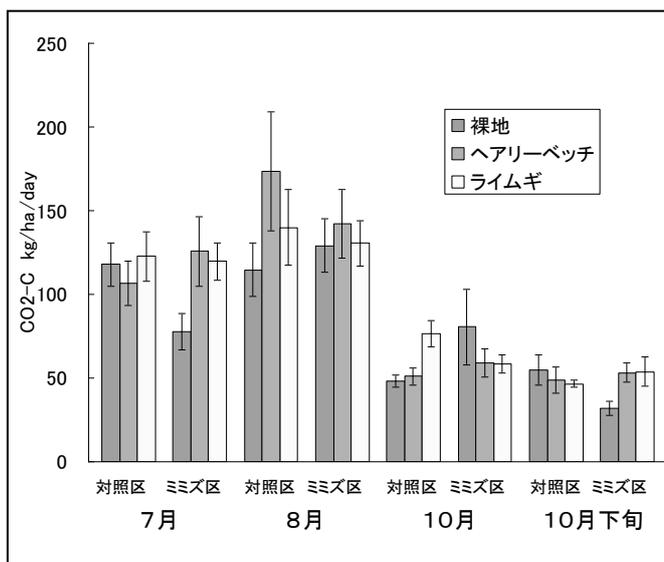


図11. カバークロップとミミズ導入がダイズ栽培畑地(2008年)の土壌呼吸活性に及ぼす影響

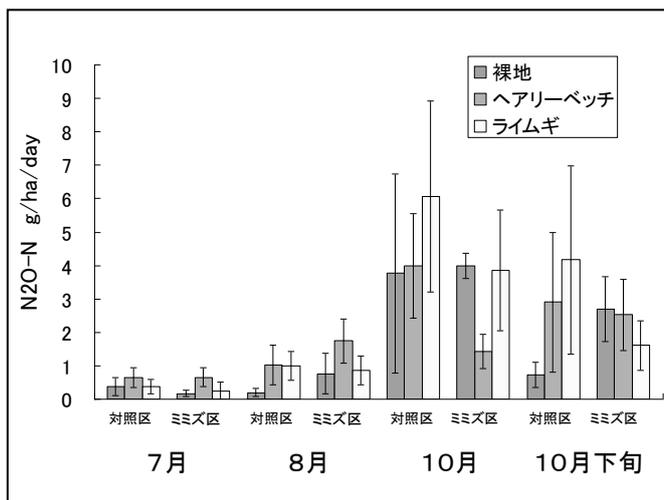


図12. カバークロップとミミズ導入がダイズ栽培畑地(2008年)の亜酸化窒素生成活性に及ぼす影響

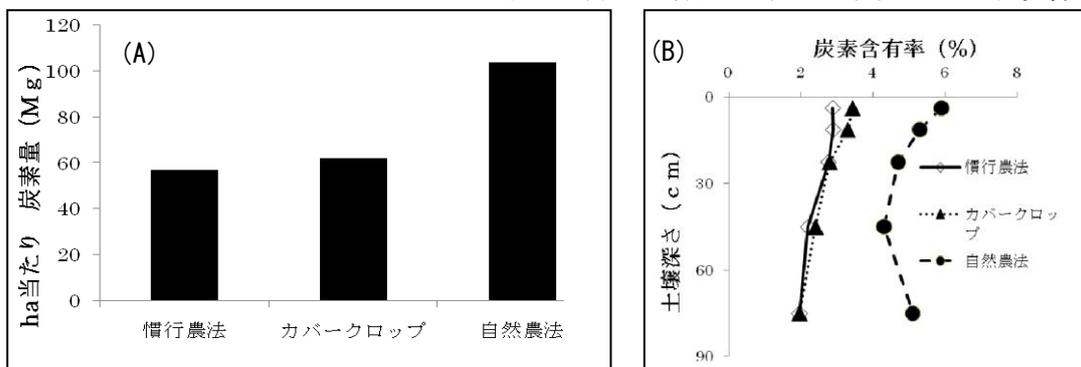


図13. 自然農法畑地、カバークロップ施用畑地、慣行農法畑地間での土壌炭素含量(A)と炭素含量の深度プロファイル(B)の比較

(1-5) 自然農法畑地の土壌炭素含量

化学肥料投入や除草処理などを行っていない畑地は、通常の畑地とは異なる様相を呈し(図2B)、土壌の性質も異なることが推察された。そこで、土壌炭素量を測定して、慣行農法の畑地やカバー作物施用の畑地と比較した。図13に示すように、自然農法畑地の土壌炭素含量は、慣行農法畑地に比べて約2倍近い値を示した。その高い炭素含量は、深さ75 cmまでみられた。

(2) 環境保全型農法畑地の土壌微生物群集解析

2008年6月採取の土壌(ミミズ導入から2か月後)について、分析を行った。ここでは、自然農法畑地についても調査した。

(2-1) アーキア群集と細菌群集

アーキア群集構造のT-RFLPプロファイルを見ると、ミミズ導入よりもライ・カバー作物の施用による影響の方が大きかった(図14、(A)と(B)に対する(C)と(D)の変化は、(A)と(B)間や(C)と(D)間の違いに比べると大きい)。同様なことは、細菌群集のT-RFLPプロファイルについても観察された(図15)。なお、自然農法畑地のアーキア群集T-RFLPプロファイルは、FSCの土壌のプロファイルと明確に異なり、細菌群集T-RFLPプロファイルについてもその傾向がみられた。

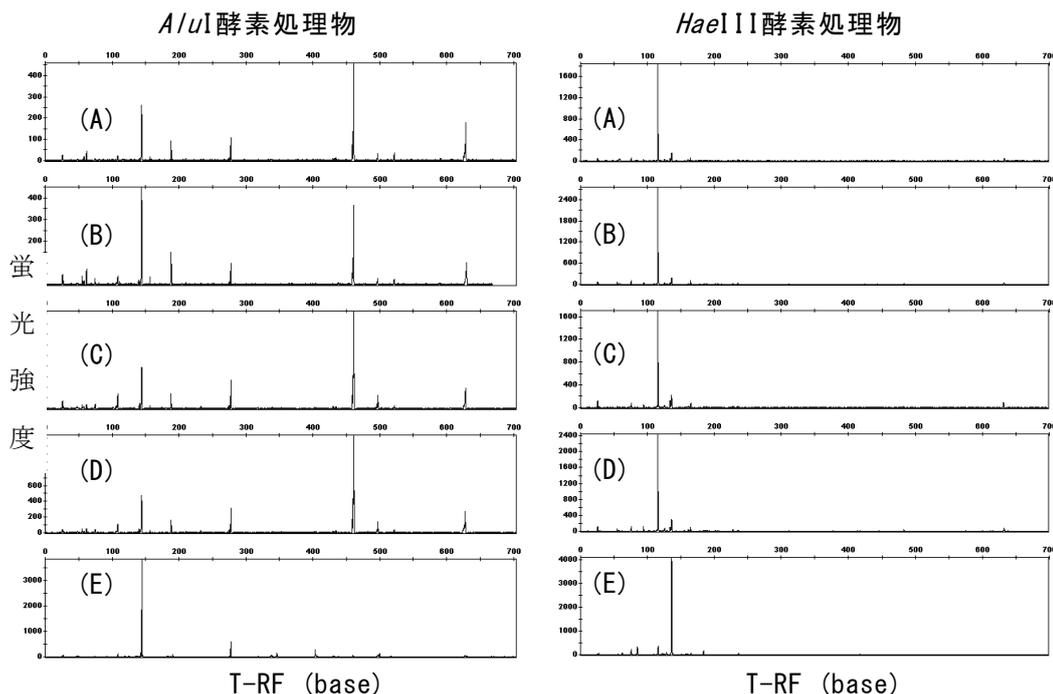


図14. 畑地アーキア群集のT-RFLPプロファイル

(A)、裸地・ミミズ導入区；(B)、裸地・ミミズなし対照区；(C)、ライカバー作物・ミミズ導入区；(D)、ライカバー作物・ミミズなし対照区；(E)、自然農法畑地

(2-2) T-RFsに基づく真核微生物群集多様性評価

これまでに、ロータリー耕起・裸地区および不耕起・裸地区の土壌試料のエルゴステロール(糸状菌のバイオマス指標)を定量した結果では、カバー作物処理区土壌よりも低い結果が得ら

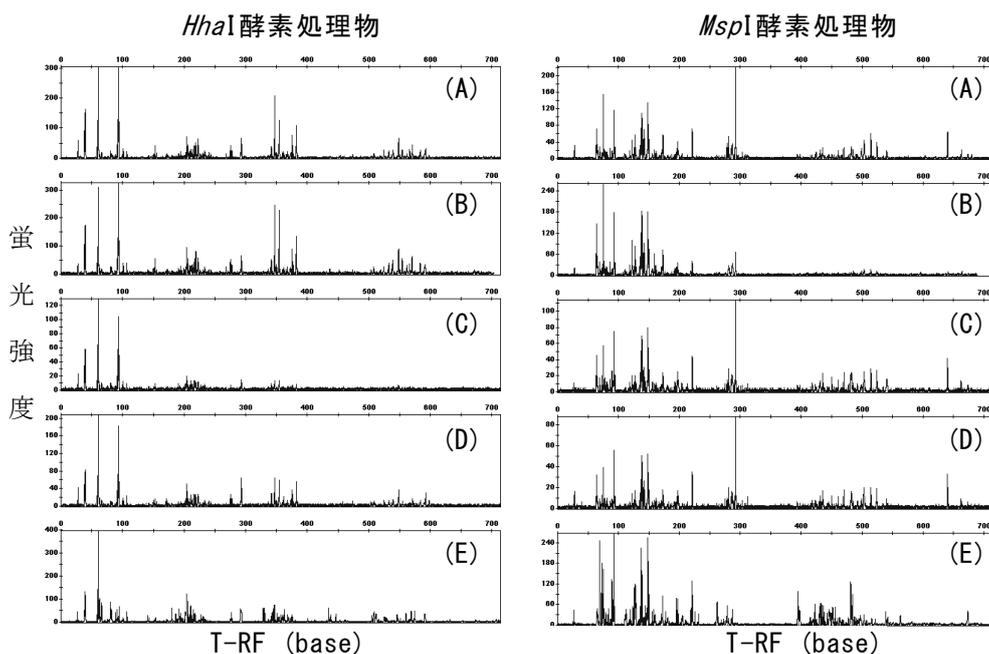


図15. 畑地細菌群集のT-RFLPプロファイル

(A)、裸地・ミミズ導入区；(B)、裸地・ミミズなし対照区；(C)、ライカバークロップ・ミミズ導入区；(D)、ライカバークロップ・ミミズなし対照区；(E)、自然農法畑地

れている¹¹⁾。また、昨年度までに真核微生物群集構造は、ライ麦・カバークロップ区でのみ群集構造の変化が観察され、群集の多様性が低下することを報告した。さらに、耕耘方法よりもカバークロップ施用によって真核微生物群集は影響を受けやすい傾向を示した。

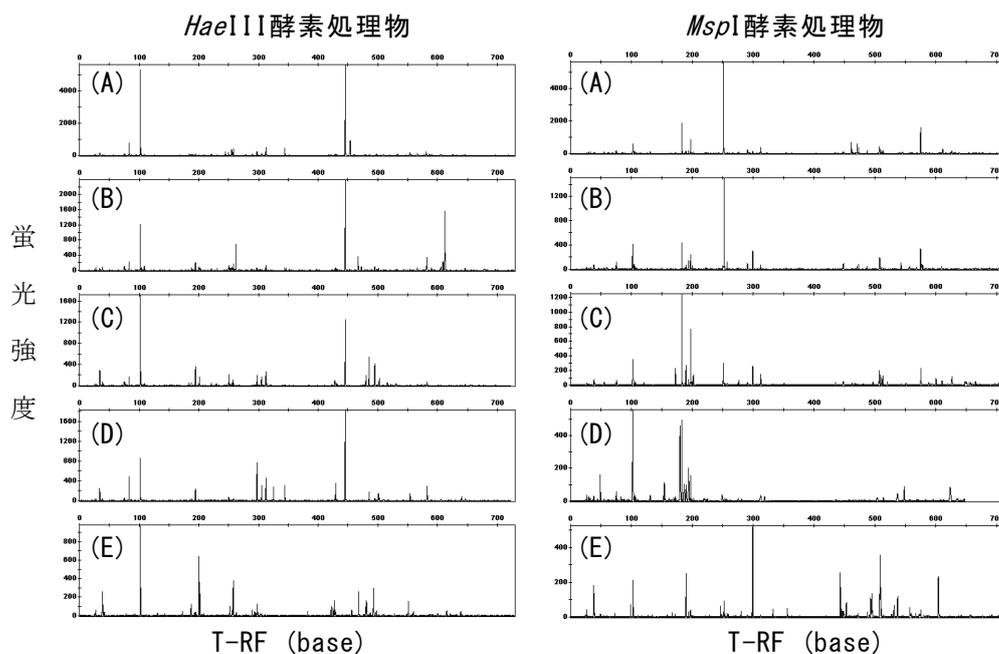


図16. 畑地真核微生物群集のT-RFLPプロファイル

(A)、裸地・ミミズ導入区；(B)、裸地・ミミズなし対照区；(C)、ライカバークロップ・ミミズ導入区；(D)、ライカバークロップ・ミミズなし対照区；(E)、自然農法畑地

畑地土壌から真核微生物（糸状菌および酵母）の18S-26S/28S internal transcribed spacer (ITS) sequence領域—Large Subunit (LSU) rRNA遺伝子 (ITS—LSU rRNA) 領域を一定のサイクル数（30回）でPCR増幅を行い、畑地土壌真核微生物群集構造をT-RFLP解析した（図16）。2007年（10月）、2008年（6月）および2008年（10月）の真核微生物群集プロファイルで検出されたT-RFsプロファイルデータに基づく相対的存在量の頻度分布から、群集の多様性評価を行った（図17）。土壌真核微生物群の多様性は、ミミズ導入による影響よりも植生が大きな要因となることが示唆された。さらに、2008年（6月）から2008年（11月）の多様性が持続傾向にあるが示された。自然農法畑地の多様性度は、FSC畑地2008年6月と同程度の値を示した。

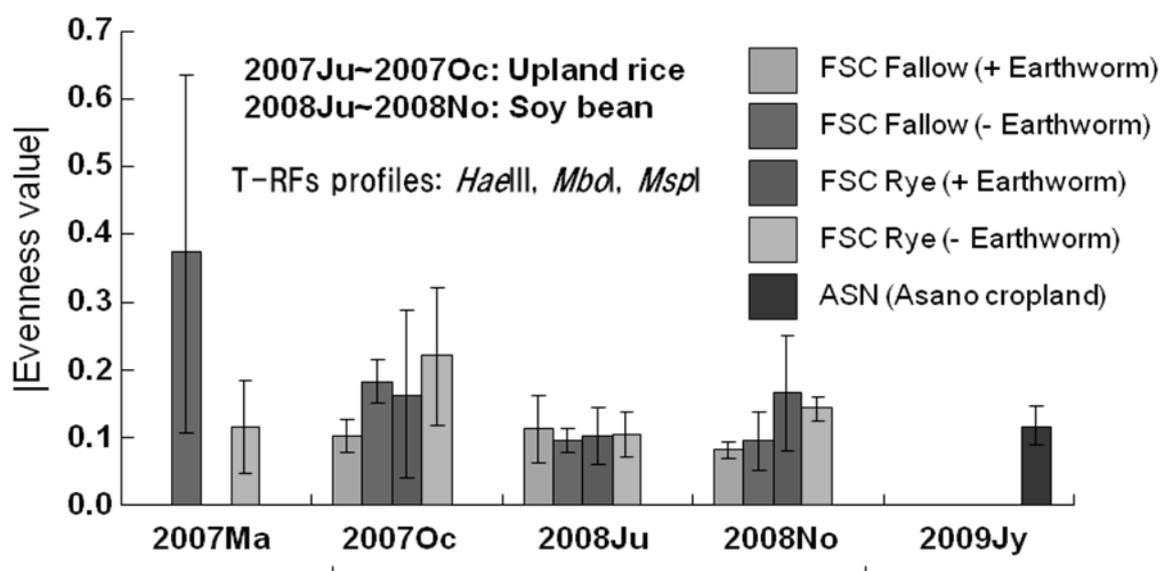


図17. 試験畑地での真核微生物群集の多様性解析
FSC、茨城大学圃場畑地試験区；ASN、自然農法畑地。|Evenness value|は低いほど多様であることを示す。

(2-3) 真核微生物群集

真核微生物群集構造のT-RFsプロファイルから裸地区とライ麦・カバークロップ区のみミズ導入区と非導入区で群集の構成に差が認められた（図16）。ミミズ導入により畑地土壌に生息する真核微生物の構成に差異が生じていたが、主要なT-RFsはどの処理区土壌でも共通して検出された。裸地区は、ライ麦・カバークロップ区に比べ、OTU（OTU：シーケンス相同性を一定の値に設定した場合の分類単位、ここではT-RFs群とみなした）レベルでの真核微生物多様性の増加傾向が示された。また、非ミミズ導入区—ライ麦・カバークロップ区土壌のT-RFsプロファイルでは特定のT-RFsへ収束する傾向が認められ、カバークロップ植物が群集構造の多様性に強く影響することが示唆された。また、自然農法畑地とFSC畑地のT-RFsプロファイルに基づく土壌真核微生物群集の比較から、共通のT-RFsが多く見られた。しかし、OTU（T-RFs群）数は自然農法畑地の方が多く、検出した主要なT-RFs群が異なることから、土壌真核微生物群集構造が異なることが示唆された。

(2-4) 畑地土壌微生物群集プロファイルからの生態学的解釈

畑地土壌微生物群集構造解析から、ミミズ導入や土壌管理に対してアーキア群集と細菌群集は比較的安定ではあったが、真核(真菌)微生物群集はもっとも影響を受けやすいことが示された。今後は、土壌微生物多様性と土壌機能の関係で、本解析法を展開していく予定である。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

環境微生物群集の解析手法として、PCR法を基盤とした分子生物学的な手法が開発されてきた。これまでは、アーキア、細菌、真核微生物という分類群単位で別々に分析することが中心であり、微生物全体像を捉えようとするアプローチは十分ではなかった。本研究では、定量PCR法でのPCRバイアス最小化の考えをT-RFLPプロファイリング法に応用し、試料間の定量的な相互比較を可能にする手法を開発した。さらに、アーキア、細菌、真核微生物を含めた全体的な土壌微生物群集の解析に向けて、T-RFLPプロファイリング法の標準化を図った。このような研究手法の標準化は今後の土壌微生物研究のさらなる展開を導くものとして期待される。

次に、この標準化した土壌微生物解析手法によって、耕起方法、冬期カバークロップ栽培、ミミズ導入という土壌管理技術や農法が土壌微生物群集に与える影響を明確に、定量的に捉えることが可能になった。そして、土壌の生物活性の測定データを含めた総合的な解析によって、そのような農法が土壌の生態系サービスの機能充進を導くことが示唆された。

(2) 地球環境政策への貢献

元素循環におけるリザーバーとフラックスの変化が地球環境の変化につながると言える。例えば、炭素循環において、大気リザーバーの炭素レベル上昇が気候変動と関係するという指摘はすでに周知のものである。地球温暖化問題が深刻化するなかで、土壌は炭素と窒素の大きなリザーバーであり、農業はそのリザーバー管理の重要な方法として意味を持つことがようやく理解されつつある。本研究が掲げた「農法が土壌生物多様性と生態系サービスに与える影響の解析」という研究課題は、地球環境管理における農法の重要性の理解を深めるものと位置づけられる。

6. 引用文献

- 1) Komatsuzaki, M., Ohta, H. (2007) Soil management practices for sustainable agro-ecosystems. *Sustain. Sci.* 2: 103-120.
- 2) Komatsuzaki, M. (2008) Ecological significance of cover crop and no tillage practices for ensuring sustainable of agriculture and eco-system service, in *Ecosystem Ecology Research Development*, F. Columbus, Editor, Nova Science Publishers: New York. p. 177-207.
- 3) 小松崎将一 (2004) 畑作でのカバークロップ利用. *農作業研究* 39: 157-163.
- 4) 小松崎将一、鈴木光太郎 (2008) ハクサイ栽培でのカバークロップ利用による土壌風食の抑制. *農作業研究* 43: 187-197.
- 5) 辜松、小松崎将一、森泉昭治、牟英輝 (2004) カバークロップの利用と土壌窒素動態. *農作業研究* 39: 9-16.
- 6) 辜松、小松崎将一、太田寛行、本林隆、森泉昭治、山口昌良 (2004) オカボ栽培でのカバークロップ利用と耕うんシステムが耕地の土壌炭素と生物相に及ぼす影響. *農作業研究* 39: 83-92.

- 7) 牟英輝、小松崎将一、森泉昭治、辜松、荒木肇、平田聡之 (2007) オカボ栽培でのカバークロップの利用と耕うん方法が土壌物理性に及ぼす影響. 農作業研究 42: 11-20.
- 8) Davidson, E.A., Janssens, I.A. (2006) Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature* 440: 165-73.
- 9) Nishizawa, T., Komatsuzaki, M., Kaneko, N., Ohta, H. (2008) Archaeal diversity of upland rice field soils assessed by the terminal restriction fragment length polymorphism method combined with real time quantitative-PCR and a alone library analysis. *Microbes Environ.* 23: 237-243.
- 10) Zhaorigetu, Komatsuzaki, M., Sato, Y., Ohta, H. (2008) Relationships between fungal biomass and nitrous oxide emission in upland rice soils under no tillage and cover cropping systems. *Microbes Environ.* 23: 201-208.
- 11) Fenchel, T., King, G.M., Blackburn, T.H. (1998) *Bacterial Biogeochemistry: The Ecophysiology of Mineral Cycling*. Academic Press, London.

7. 国際共同研究等の状況

なし

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文 (査読あり) >

- 1) Nishizawa, T., Komatsuzaki, M., Kaneko, N., Ohta, H. (2008) Archaeal diversity of upland rice field soils assessed by the terminal restriction fragment length polymorphism method combined with real time quantitative-PCR and a alone library analysis. *Microbes Environ.* 23:237-243.
- 2) 西澤智康、小松崎将一、金子信博、太田寛行 (2010) 末端制限断片 (T-RFs) プロファイル情報に基づく土壌微生物群集構造解析. *土と微生物* 64: 33-40.
- 3) Nishizawa T, Zhaorigetu, Komatsuzaki M, Sato Y, Kaneko N, Ohta H. (2010) Molecular characterization of fungal communities in non-tilled, cover-cropped upland rice field soils. *Microbes Environ.* (in press)

(2) 口頭発表 (学会)

- 1) Komatsuzaki, M., Kusumoto, R., Okiba, C., Asaki, N., Ueno, H., Araki, M., Araki, H., Matsumura, S. (2007) "N Release from a Nitrogen 15 Labeled Cover Crop in Relation to Soil Fauna Activities between No-till and Conventional Tilled Upland Rice Production" The ASA-CSSA-SSSA International Annual Meetings.
- 2) 小松崎将一、楠本理香、大木葉ちはる、浅木直美、上野秀人、荒城雅昭、荒木肇 (2007) 「カバークロップ残渣窒素の土壌生態系での動態と後作物へのフロー」第30回日本土壌動物学会
- 3) Zhaorigetu, Komatsuzaki, M., Nishizawa, T., Sato, Y., Ohta, H. (2007) "Contribution of Fungi Activity for N₂O Emission in No-Tillage with Cover Crop Field" The ASA-CSSA-SSSA International Annual Meetings.
- 4) Mu, Y., Komatsuzaki, M. (2007) "Effects of Cover Crop and Tillage System on Carbon and Nitrogen Dynamics in Field Rice Production" The ASA-CSSA-SSSA International Annual Meetings.

- 5) 小松崎将一、太田寛行、牟英輝、昭日格図、荒木肇、平田聡之、三浦重点 (2008)「カバークロープ利用による炭素貯留機能と亜酸化窒素によるオフセット」日本農作業学会
 - 6) 小松崎将一、西澤智康、惟村奈未、太田寛行、金子信博、甘楽法、伊藤雅道 (2008)「不耕起栽培におけるカバークロープ利用とミミズ導入の効果」第31回日本土壌動物学会
 - 7) 石井真英、昭日格図、西澤智康、小松崎将一、金子信博、太田寛行 (2008)「T-RFLPデータベースによる畑地土壌細菌群集構造の解析」；ミニシンポジウム「分子生態学的解析手法を研究室のルーチンに!(その1)」日本土壌肥料学会2008年度愛知大会
 - 8) 西澤智康、石井真英、小松崎将一、金子信博、太田寛行 (2009)「末端制限断片(T-RFs)データによる畑地土壌微生物多様性解析：複数の解析手法を用いた評価方法の検討」；ミニシンポジウム「分子生態学的解析手法を研究室のルーチンに!(その2)」日本土壌肥料学会2009年度京都大会
 - 9) 西澤智康、小松崎将一、金子信博、太田寛行 (2008)「定量的T-RFLP解析法による畑地土壌微生物の多様性評価」日本土壌微生物学会2008年度大会
 - 10) 西澤智康、石井真英、梅津昌史、昭日格図、小松崎将一、金子信博、太田寛行(2009)「T-RFLPプロファイルによる畑地土壌微生物群集構造の解析」日本土壌微生物学会2009年度大会
 - 11) 太田寛行、西澤智康、佐藤嘉則、藤村玲子(2009)「細菌についての生態学的種を考える：この数年の展開をめぐって」第25回日本微生物生態学会
 - 12) 西澤智康 (2009)「畑地生態系における生物多様性と一次生産性」第57回日本生態学会東京大会
- (3) 出願特許
なし
 - (4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）
なし
 - (5) マスコミ等への公表・報道等
なし
 - (6) その他
なし

F-073 土壤生物の多様性と生態系機能に関する研究
 (3) 同位体を用いた土壤食物網による炭素利用の解析

国立大学法人京都大学

生態学研究センター

<研究協力者>

(独) 国立環境研究所

岡山大学 新技術研究センター

京都大学大学院理学研究科

陀安一郎

内田昌男

兵藤不二夫

原口 岳

平成19～21年度合計予算額 10,681千円

(うち、平成21年度予算額 3,474千円)

※予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 本研究は、土壤有機物および土壤動物の放射性炭素¹⁴の天然存在比および炭素・窒素の安定同位体比を用いることにより、土壤炭素の蓄積履歴および土壤動物の有機物利用を解明することを目的とした。まず、北海道大学苫小牧研究林において、1960年代の核実験由来の放射性炭素が増加する以前に樹種の交替があった森林と樹種交替のない森林を比較し、樹種タイプが落葉堆積層の分解速度および土壤動物群集を変化させ、土壤動物（とくにミミズ）による炭素の混合効果が土壤炭素集積に影響を与えていることを示した。また、土壤炭素の中でミミズが利用した炭素の年代を決定することにより土壤動物の炭素利用が多様であることを示し、森林植生-土壤有機物-土壤動物多様性の関係を示した。次に、八ヶ岳においてキシヤヤスデの発生の履歴の異なる森林土壌の比較、茨城大学農学部附属農場の農地土壌における土壤団粒の炭素年齢の測定、および茨城県北茨城市小川における食物網の研究を行った。八ヶ岳においては、土壤有機物およびキシヤヤスデの炭素・窒素の安定同位体比に関して大きな変化があることがわかり、放射性炭素分析 ($\Delta^{14}\text{C}$) 結果はキシヤヤスデが異なる炭素年齢の土壤有機物の混合効果に影響を与えていることを示した。さらに、茨城大学農場の研究では団粒に比べて細土に含まれる炭素の起源が新しいことがわかり、団粒構造で古い炭素が固定化されることが推察された。最後に、茨城県の小川においては、樹上のクモ類が新しい炭素起源を持つ生食連鎖と古い炭素起源を持つ腐食連鎖系を連結しており、クモ間の捕食行動の違いが、食物網連結機能に相違をもたらしている事が明らかになった。これらを通して、本研究は生態系の中の「炭素循環の時間軸」を土壤有機物・落葉堆積層・デトライタス食者・捕食者に至るまで明示することの重要性を示した。この推進費研究の結果は、生態系の中に放射性炭素¹⁴ ($\Delta^{14}\text{C}$) を用いて時間軸を明示することで、「当年の」環境変動が食物網を通じてどのような波及効果を及ぼすかを理解することができることを示した。

[キーワード] 放射性炭素¹⁴、安定同位体、土壤動物、分解系、炭素蓄積

1. はじめに

地球規模の環境変動として、大気中の二酸化炭素濃度の上昇と地球温暖化が明確なものとなってきた。さらに、近年の人間活動の影響を受け、生物多様性の減少も問題となっている。そこで、

生物多様性が生態系機能に与える影響を評価することは喫緊の課題となってきた。本研究で扱う土壌生態系は、植物が生産したリター（枯死体）が炭素の大きなリザーバーである土壌に混合し、分解していく過程のシステムである。また、森林樹木のリター生産と土壌動物相の関係は相互作用系であるため、これを一体として解析する必要がある。しかしながら、土壌生態系の物質動態は数百年から数千年にもわたるため、現存量を測定するだけではそのダイナミクスが理解できない。

近年、炭素・窒素の安定同位体比($\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$)を用いた解析は、生態系の構造および物質循環の解明に有効であることがわかってきた。一方、炭素には放射性炭素(^{14}C)も存在し、約5,730年の半減期を持つため、炭素化合物の年代決定に用いられてきた。これに加え、大気核実験を起源とする放射性炭素(^{14}C)が1960年代に大量に生成され、大気中の二酸化炭素(CO_2)の ^{14}C 濃度が変化してきているため、半減期を用いる研究では扱われてこなかったごく近過去の時間軸も扱えることがわかってきた(図1)。有機炭素の ^{14}C 情報を用いることにより、それがいつの二酸化炭素を用いた光合成によって固定されたかを示すことができる。土壌動物は枯死直後の有機物を餌として利用し分解するが、分解されなかった炭素は腐植として土壌中に大量に滞留される。ミミズやシロアリには明確な土壌食者が存在するが、土壌有機物・腐植の分解過程が土壌生態系食物網構造および土壌有機物動態に与える影響は分かっていない。近年我々は放射性炭素同位体比($\Delta^{14}\text{C}$)の天然存在比を用いて、土壌動物の食物年齢という概念を提出した^{1),2),3)}。

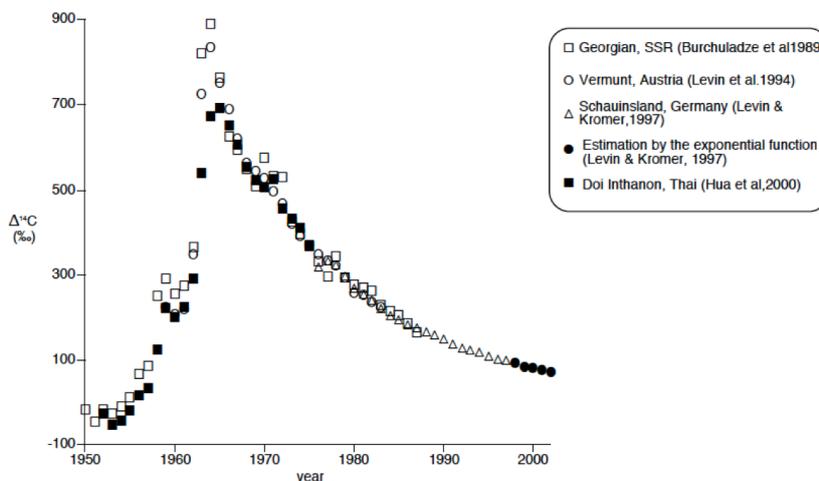


図1. 大気 CO_2 における放射性炭素天然存在比($\Delta^{14}\text{C}$)の増減²⁾。各プロットは、それぞれの調査地点における $\Delta^{14}\text{C}$ 値の値を示す

陸上生態系における有機態炭素の起源は全て光合成生産物であるが、光合成生産物が系を支える物質循環に取り込まれる経路は大きく2つに分けられる。一つは、生きた植物が直接食われる生食連鎖であり、もう一つは、枯死後の植物が食われる腐食連鎖である。生食連鎖では生産後すぐの有機態炭素が消費者へと供給される。一方、枯死植物体にはより難分解性の有機態炭素が多く含まれており、菌類を中心とする分解者と一部の動物の相互作用を介して、長い時間をかけて腐食連鎖に入る。すなわち、2つの連鎖の違いは光合成生産時を起点とする有機物の年代と密接に関係している。

そこで、本研究では土壌有機物および土壌動物に「時間軸」を入れ、炭素循環と生物多様性の関係について研究を行う。

2. 研究目的

本研究では、炭素・窒素安定同位体および放射性炭素同位体分析により、土壌生態系および土壌動物群集に「時間軸」を与え、土壌生態系の時間軸構造を明らかにすることを目的とする。調査地は、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター苫小牧研究林（以降、苫小牧研究林と略す）、長野県八ヶ岳山麓の森林（以降、八ヶ岳調査地）、茨城県北茨城市にある小川群落保護林付近の二次林（以降、小川）、茨城大学農学部附属フィールドサイエンス教育研究センター農場（以降、茨城大学農場）である。苫小牧研究林では、森林の履歴の違いにより土壌有機物の蓄積パターンがどう変わるか、また土壌動物群集の利用する炭素年齢はどれくらいであるかを調べる。八ヶ岳調査地では、キシヤヤスデによる土壌改変影響に着目し、キシヤヤスデの発生履歴の有無によって土壌有機物の団粒構造の炭素年齢を測定する。茨城大農場では、畑地といったまったく異なる生態系で同様の土壌有機物の団粒構造の炭素年齢を測定する。小川においては、クモによる腐食連鎖と生食連鎖の連結機能を、 $\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$ によるエサ資源利用率の定量化と、 $\Delta^{14}\text{C}$ による食物連鎖経路の推定によって明らかにする。

3. 研究方法

(1) 安定同位体比および放射性同位体比の分析法については平成19年度に確立した。

1) 安定同位体分析に関しては、京大大学生態学研究センターに設置されている元素分析計 (Fisons EA 1108) をインターフェイス (Finnigan MAT Conflo II) を通じて接続した安定同位体比質量分析計 (Finnigan MAT delta S) を用いて分析した。物質Xの安定同位体比の表現方法は、 $\delta X = (R_{\text{測定資料}} / R_{\text{標準物質}} - 1) \times 1000$ (‰) である。ここで $R = {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$ もしくは ${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$ 、標準物質は窒素では大気 (Air)、炭素では矢石 (PDB) を用いる。分析精度は窒素同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$) で 0.15‰ (SD)、炭素同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$) で 0.10‰ (SD) 以下であった。

2) 放射性炭素同位体分析に関しては、まず京大大学生態学研究センターにおいて前処理をおこなった。前処理過程は、試料を酸化銅 (1g)・還元銅 (0.5g)・銀片とともに真空中に封緘し 850℃ で 2 時間反応させガス化した後、真空ラインで寒剤 (液体窒素およびドライアイス・エタノール) を用いて CO_2 のみを分離した。さらにこの CO_2 を、450℃ であらかじめ水素還元をした鉄触媒とともに 650℃ で 6 時間還元しグラファイト (単体の炭素) 化した。このグラファイトと鉄の混合物を、ハンドプレス機をもちいてアルミ製のブランクカソードにプレスし、測定用ターゲットを作成した。そのあと、国立環境研究所に設置されている、環境試料の ^{14}C 分析も多く行っている加速器質量分析計⁴⁾ によって分析した。分析結果は、試料中の $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比を標準物質であるシュウ酸によって 1950 年よりの減衰を補正し、さらに試料の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ をもとに $\delta^{13}\text{C} = -25\text{‰}$ に規格化した値 ($\Delta^{14}\text{C}$) で表現した。測定精度は通常 4‰ 以内であったが、いくつかの試料は最大 6‰ の誤差をもっていた。

(2) 19年度よりサブテーマ 1 と協力して調査した苫小牧研究林は、少なくとも過去 4 回の樽前山の噴火によって堆積した火山灰の上に立地しており、最後の噴火は約 270 年前 (西暦 1739 年) とされている。従って、最表層に形成された土壌層は最長でも 270 年の炭素蓄積を受けたものである。

苦小牧研究林は冷温帯に属し、数樹種の広葉樹、針葉樹植生によって特徴づけられるが、ここでは洞爺丸台風による攪乱の後、1960年頃に針葉樹から広葉樹（CBサイト）または広葉樹から針葉樹（BCサイト）に樹種交替したサイト、および樹種交替していないサイト（針葉CCサイト、広葉BBサイト）の計4サイトで調査を行った（サイトの詳細はサブテーマ1に記載）。現在、広葉樹の森林では針葉樹の森林よりも大型土壌動物の生物量、とくに落葉食ミミズの生息数が多く、土壌炭素蓄積にこれらの土壌動物の活動が影響を与えていることが推定される。

土壌試料は各サイトで直径105mmのコアを270年前の噴火による火山灰層の深さまで3本採取し、この土壌を現場で地表面から2cm刻みでスライスした（ここでは、270年の集積を受けた炭素動態をリター層と土壌層を含む総体として扱うため、このコアはリター（A0）層も含む地表面から採取した）。火山灰の上に成立している層が、BBサイト、CBサイトおよびBCサイトでは約16cm、CCサイトでは約18cmの深さを持っていた。多数の ^{14}C 分析を行うことが不可能なため、その後各サイトにおいて3本のコアをプールし、深度別に分析した。リター（A0）層としては、別途25cm×25cmの区画を各サイトに対して5つ設定し採取した。明確なミミズ糞についても別途採取した。また、リター（A0）層を取り除いたあと、この区画の直下深さ15cmまでの土壌を採取し、大型土壌動物をハンドソーティングによって採取し、ミミズ類および等脚類は種レベル、ヤスデ綱およびコウチュウ目成虫は科レベル、そのほかは目レベルで同定し、それぞれ生物量を測定した。土壌動物に関しては、この区画のみの調査では、同位体分析に必要な個体数が採取できなかったため、各サイトにおいて調査地付近の土壌中に生息するものも別途採取し、炭素・窒素安定同位体比および放射性炭素同位体比の分析に供した。

土壌の前処理方法は、2mmメッシュのふるいを通し、それよりも大きいものの中からレキを除いたものを土壌団粒、それよりも小さいものを細土とした。安定同位体比については、一部これらを独立して測り比較を行った。 ^{14}C 分析用サンプルについては、土壌団粒と細土を元の比率で再混合して用いた。 ^{14}C 分析には無機炭酸の混入が大きなエラーを引き起こす可能性があるため、0.5mol/lの塩酸水溶液中で一昼夜静置する手法により脱炭酸を行った。安定同位体比分析にはこの処理を行ったもので行っていないものを分析に供し比較した。団粒比較は、塩酸処理を行わなかったものに対して行った。

（3）20年度より長野県八ヶ岳山麓を調査地とし、サブテーマ5と協力して研究を行った。現地で見られるキシヤヤスデは年に一度脱皮をして成長し、8齢で成虫となり、体長は約35mmまで成長する。成虫は時に地表面を徘徊し、八ヶ岳山麓ではおよそ8年周期で成虫の徘徊が確認されていることから、この地域個体群は全て同齢の集団からなっていると考えられる。6齢幼虫までは土壌を摂食し、7齢幼虫と8齢成虫は落葉や腐植などの有機物を土壌と混ぜて摂食すると考えられている⁵⁾。このことから、成虫のキシヤヤスデは、鉱質土への炭素隔離効果をもつことが示唆されている⁶⁾。また、7齢から成虫になる際に形成される脱皮室や成虫の糞には土壌の団粒構造を発達させる作用があると考えられている。これらの先行研究から、八ヶ岳山麓では、キシヤヤスデの生活史に関連して8年に一度、土壌の有機物動態に大きなインパクトが与えられていることが予想できる。また、団粒構造発達という土壌構造の改変作用をとまなうため、その影響は長期に及ぶことが考えられる。本研究では、周期的に群遊をするキシヤヤスデをもちいて、大型土壌動物による土壌炭素動態への影響が長期間続くことを明らかにすることを目的とする。

調査は、成虫の群遊が始まった2008年10月1~3日に行った。ヤスデ生息履歴の異なる4サイトで(天女山試験地A(TA)、天女山試験地B(TB)、観音平試験地(KB)、野辺山試験地(Nobe))において、土壌の団粒割合を比較した。天女山試験地A(TA)は前回の群遊が「高密度」かつ今回の群遊が「中密度」、天女山試験地B(TB)は前回の群遊が「高密度」かつ今回の群遊が「観察されず」、観音平試験地(KB)は前回の群遊が「低密度」かつ今回の群遊が「中密度」、野辺山試験地(Nobe)は前回の群遊が「観察されず」かつ今回の群遊が「観察されず」となっている。それぞれの試験地から表層土壌を採取し、乾燥後、篩を用いて2mm以上の大型団粒と直径2mm以下の細土とに分けた。大型団粒と細土それぞれについて、ポリタングステン酸ナトリウム重液(1.6g/cm³)を用いた遠心分離法により団粒と細土に含まれる植物枯死遺体のような団粒外部の軽い有機物画分(Free Particulate Organic Matter: fPOM)、超音波法により土壌団粒を破碎して得られる団粒内部の軽い有機物画分(Occluded-POM: oPOM)、重い有機物画分(Heavy Fraction: HF)に分け、それぞれの炭素濃度・C/N比、炭素・窒素の安定同位体比、放射性炭素($\Delta^{14}\text{C}$)を比較した。

(4) 21年度よりサブテーマ2と協力して茨城大学農学部附属フィールドサイエンス教育研究センター農場において研究を行った。調査した畑は、不耕起・カバークロープ試験圃場のライ麦区(以降、ライ麦区)である。

不耕起・カバークロープ試験圃場のライ麦区において4地点(F1、F2、F3、F4)から土壌の採集を行った。各地点において目視にて、ミミズの糞団粒が確認できた場所「ミミズ区」と確認できない場所「ミミズなし区」から土壌の採集を行った。

採土円筒として、内径5 cm、高さ1 cmの塩ビ管を4つ重ね、ビニールテープで固定し、内径5 cm、高さ4 cmとしたものを用いた。2009年7月に、ライ麦区において採集した土壌を実験室に持ち帰り、塩ビ管上部2 cmの土壌のみを分析用とし、1 mm以上(団粒)と1 mm以下(細土)の粒径に篩別して採集した。この際、粗大な有機物は取り除いた。これらの土壌を、60 °Cの乾燥機にて24 時間乾燥させ、その後、メノウ乳鉢を用いて土壌団粒の粉碎を行った。その後、放射性同位体と安定同位体測定用の土壌の処理として、塩酸処理を行った。

ミミズについては2009年7月にライ麦区において、ミミズの糞団粒が確認できた場所付近でハンドソーティングによって採取した(F2では採取できなかった)。

採取したミミズを実験室に持ち帰り、ミミズ一頭ずつを純水で洗浄後、湿らせたろ紙を敷いたシャーレに移し、20 °Cの恒温器で12 時間排糞させた。恒温器から取り出し、ミミズを純水で洗浄後、冷凍庫に24時間入れた。その後、真空乾燥機で24 時間乾燥させた。乾燥させた個体の胃内容物を取りのぞき、メノウ乳鉢を用いて粉末状にした。放射性同位体と安定同位体測定用として、複数個体をプールせずに、一頭ずつ処理を行った。

植物については、放射性同位体と安定同位体測定用として、粉末状になったライ麦を茨城大学の小松崎准教授より分譲を受けた(刈り取り日は2009年5月18日)。

(5) 20年度より茨城県北茨城市に位置する小川を調査地とし、森林生態系が発達する過程での土壌と植物体への炭素蓄積が、動物による有機物利用の在り方を変化させるのかを検討した。食物網にとりこまれる有機物の動態を明らかにする上では、森林生態系の遷移現象に着目する必要があることから、本研究では茨城県北茨城市に点在する伐採後経過年数の異なる森林を比較する

という時系列解析的な手法を用いた。具体的には、調査地において、森林伐採後1, 7, 11, 24, 105年を経過した二次林にプロットを設置し、樹上に生息するクモと、そのエサの採集を行った。樹上のクモ及び樹上に生息するエサを採集する方法としてはビーティング（棒状の器具で枝などをたたき、落下した生物を採取する方法）を、飛翔性昆虫を採集する方法としてはスィーピング（ネットを振り、飛んでいる生物を直接採取する方法）を用いた。各サンプルの炭素・窒素安定同位体分析および $\Delta^{14}\text{C}$ 値から、クモが利用するエサの比率の定量化および食物連鎖系を特定する。 $\Delta^{14}\text{C}$ (‰) に関しては、当年生の有機物資源が、どの調査地点でも等しい値を有するのかが確認する目的で、優占樹種の生葉の分析も行った。森林伐採後1, 7, 11, 105年たった二次林樹木の葉の $\Delta^{14}\text{C}$ 値は、だいたい採取された絶対年代と同じであったが、24年たった森林では少し低い $\Delta^{14}\text{C}$ 値をもった。この原因としては、 $\Delta^{14}\text{C}$ - CO_2 の値をずらす何らかの要因(source effect)があったと考えられる。そこで、等しい基準で地点ごとに各生物の炭素起源の古さを表す指標として調査地点ごとに補正したdiet age (炭素年齢、単位：年) を用いた。diet ageとは、「生物の利用する有機物が、何年前に光合成生産されたものであるか」と定義される値である。今回、各調査地で採集された生葉の値を当年生産された有機物の $\Delta^{14}\text{C}$ 値であると仮定した上で、 $\Delta^{14}\text{C}$ - CO_2 の減衰式からdiet ageを算出した。

4. 結果・考察

(1) 苫小牧研究林の研究

1) 塩酸処理の効果

まず、塩酸処理の影響を見るため、炭素・窒素の安定同位体比の比較を行った。その結果、プロファイル間で差が見られなかった (Paired t-test)。放射性同位体に関しては、これらのプロファイルに対しては比較しなかったが、ミミズの糞試料を用いて比較したところ、塩酸処理なしのサンプルが $\Delta^{14}\text{C} = 109.0 \pm 3.3\%$ に対し、塩酸処理後のサンプルで $105.3 \pm 3.2\%$ となった。この差は、大気 CO_2 の ^{14}C 濃度減衰 (図1) と土壌 ^{14}C プロファイル (下記2) 参照) を用いた研究レベルでは無視できる差である。これらの結果は、本研究サイトにおいて安定同位体比および放射性同位体比の分析上、塩酸処理の効果はごくわずかであることを示す。しかしながら、深度プロファイルに関する今回の分析では、 ^{14}C 分析の標準手法である塩酸処理を行った分析値を用いて解析した。

2) 各森林の特徴

各森林での胸高断面積合計等のデータを表1に示す。現在広葉樹であるサイト(BB, CB)は現在針葉樹であるサイト(CC, BC)よりも落葉堆積層の炭素量は有意に少なかった (Tukey-Kramer-test, $P < 0.05$). が、土壌層の炭素蓄積量にはサイト間で有意差がなかった。

表 1. 調査プロットの胸高断面積合計, 落葉供給量, および落葉堆積層の炭素量 (N = 5), 土壌層の炭素量 (N = 3).

調査プロット	胸高断面積合計 (cm ² /m ²)	落葉供給量 (kg/m ² /yr)	落葉堆積層の炭素量 (kg/m ²)		土壌層の炭素量 (kg/m ²)	
CC	35.36	0.24	1.9 ± 0.77	b	4.3 ± 1.34	a
BB	22.99	0.25	0.4 ± 0.15	a	3.2 ± 0.14	a
CB	13.69	0.17	0.3 ± 0.09	a	3.4 ± 0.28	a
BC	37.59	0.29	1.5 ± 0.28	b	3.0 ± 0.29	a

落葉堆積層の炭素量, および土壌層の炭素量の値に付記したアルファベット異符号間には5%水準で有意差があることを示す (Tukey-Kramer 検定).

各プロットにおける大型土壌動物相を表2に示す。現在広葉樹であるサイト(BB, 14.1 g dry /m², CB, 12.8 g dry /m²) は、現在針葉樹であるサイト(CC, 3.6 g dry /m², BC, 2.1 g dry /m²; Tukey-Kramer test, P<0.05)よりも現存量が多かった。また、大型土壌動物現存量の大部分をミミズが占め、CCでは7割、それ以外のサイトでは8割以上であった。現在、針葉樹であるサイトBCでは、土壌食ミミズが優占していた。

表 2. 各調査プロットにおける大型土壌動物 (体幅 >2mm) の生物量および個体数密度。それぞれの分類群の値は、各調査プロットにおける5地点の平均を示す。

分類群				生物量 (mg dry wt/m ²)				個体数密度 (ind./m ²)			
綱	目	科または種	機能群	CC	BB	CB	BC	CC	BB	CB	BC
クモ綱	ダニ目			0.1				6.4			
クモ綱	クモ目		捕食者	60.6	164.0	38.5	13.6	108.8	76.8	16.0	9.6
クモ綱	ザトウムシ目			0.7				3.2			
クモ綱	カニムシ目				0.2				3.2		
ムカデ綱	ジムカデ目		捕食者	30.1	34.3		5.9	54.4	32.0		9.6
ムカデ綱	イシムカデ目			53.7	26.6	13.7	49.9	80.0	19.2	6.4	22.4
ヤスデ綱	オビヤスデ目	ヤケヤスデ科	落葉食者	41.2	25.2			9.6	9.6		
内顎綱	トビムシ目			10.1	2.5	0.9	0.9	57.6	12.8	3.2	3.2
内顎綱	コムシ目			1.0				19.2			
内顎綱	カマアシムシ目			0.4				6.4			

マキ										
ガイ			127.8	397.7			6.4	19.2		
網										
昆虫	コウチュウ目	捕食者	508.9	116.3	733.3	39.2	60.8	28.8	48.0	6.4
網	双翅目		3.6		9.4	2.9	28.8		6.4	3.2
昆虫	膜翅目		11.1	28.1	7.3		19.2	3.2	3.2	
網	鱗翅目			456.7	1426.6			6.4	6.4	
昆虫	ワラジムシ目	落葉食者	80.0	137.7	124.8	44.5	38.4	73.6	35.2	25.6
網	イトミミズ目		1.9	11.0			19.2	19.2		
ミミズ	ナガミミズ目	フトスジミミズ		1682.9				3.2		
網	ナガミミズ目	ユノシマミミズ	1460.5	3486.6	3665.3		6.4	16.0	9.6	
ミミズ	ナガミミズ目	ヒトツモンミズ		5721.4	6588.6			9.6	12.8	
網	ナガミミズ目	サクラミミズ	1236.8	1818.3	214.5	1916.1	9.6	19.2	3.2	25.6
ミミズ	ナガミミズ目									
網										
総計			3628	14109	12823	2073	534	352	150	106

3) 炭素蓄積量、および放射性同位体存在比 ($\Delta^{14}\text{C}$) の土壌深度プロファイル

4 サイトにおける、炭素蓄積量、および放射性同位体存在量 ($\Delta^{14}\text{C}$) の土壌深度プロファイルを図2に示す。

炭素蓄積量について深度プロファイルをとると、BBサイト・CBサイト・BCサイトの間では大きな差がなかったが、それらに比べCCサイトでは全層にわたって高く、炭素蓄積量が多かった(図2)。続いて $\Delta^{14}\text{C}$ 値に関して考察する。CCサイトでは、深度プロファイルに沿って下層からたどると、最下層(16-18cm層)の次の連続する14-16cm層および12-14cm層では1950年以前のシグナル($\Delta^{14}\text{C}<0$)に近い値を持っており、少なくともこの2層の土壌では、核実験由来の放射性炭素の影響のない1950年以前の炭素蓄積が見られている。それより上層は一旦上昇した後4-6cmを最大値として減少しており、図1に示した $\Delta^{14}\text{C}$ 値の上昇-下降カーブを反映した増減を示した。これは、CCサイトにおける多量の炭素蓄積が順に下層から上層にむけて起ったことを示す。一方、BBサイト・CBサイト・BCサイトではCCサイトに比べて $\Delta^{14}\text{C}$ 値が上下層で平均化されており、上下が混合されていることを示す。これは、CCサイトに比べて多い土壌動物、とくにミミズの活動の影響を示唆する。一方、CBサイトとBCサイトでは、現在の植生が広葉樹と針葉樹と大きく異なる割には $\Delta^{14}\text{C}$ 値のプロファイルに関して大きな差がみられなかった。この理由を完全に解釈することは難しいが、BCサイトにおいて植生交替時の台風攪乱が広葉樹を完全に除去することはなかったため、ミミズの活動がしばらく残った可能性があること、また、CBサイトにおいて広葉樹の侵入にある程度時間がかかったため、ミミズの活動が土壌プロファイルに影響をあたえるまでに時間がかかったということかも知れない。なお、CCサイトでは最下層の16-18cm層で $\Delta^{14}\text{C}$ 値が再び上昇しているが、同時に炭素含量も増加していることから、新しい根の分解産物などが入った可能性を示して

いる。

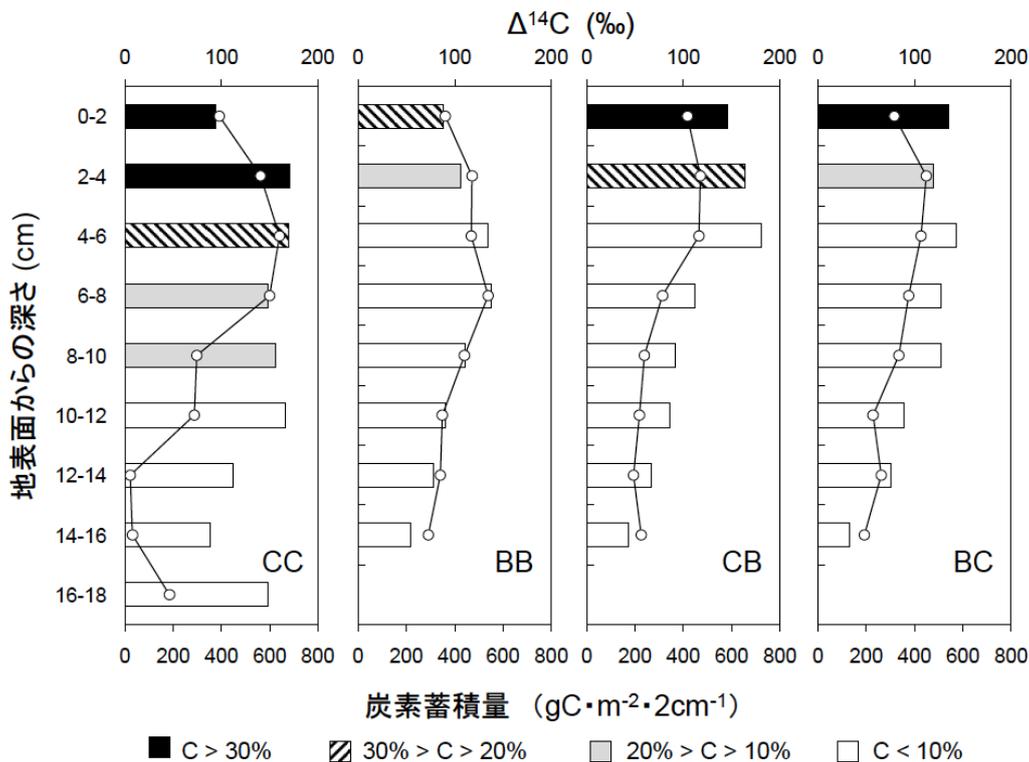


図2. 苫小牧研究林各サイトにおける地表面から採取されたコアの炭素蓄積量（棒グラフ、下軸）および $\Delta^{14}\text{C}$ 値（折れ線グラフ、上軸）。棒グラフの色は、炭素濃度をあらわす。表層の高い炭素濃度は落葉堆積層を示し、下層の低い炭素濃度は土壌層を示す。

4) ミミズの安定同位体比($\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$)および放射性同位体存在比 ($\Delta^{14}\text{C}$)

今回同位体分析用に採取されたミミズは、フトスジミミズ(*Amyntas vittatus*)、ユノシマミミズ(*Amyntas yunoshimaensis*)、ヒトツモンミミズ(*Metaphire hilgendorfi*)およびサクラミミズ(*Eisenia japonica*)である。このうち前者3種は、その生活型と消化管内容物から表層性(epigeic)ミミズと呼ばれているのに対し、サクラミミズは地中性(endogeic)ミミズとされている⁷⁾。一般に表層性ミミズはリター食者、地中性ミミズは土壌食者と言われている。炭素・窒素の安定同位体比は分解が進んだ有機物を食べるものがどちらも上昇することが示されているが³⁾、本研究サイトにおいても表層性ミミズより地中性ミミズの方が分解の進んだ有機物を摂取（同化）していることを示した（図3）。

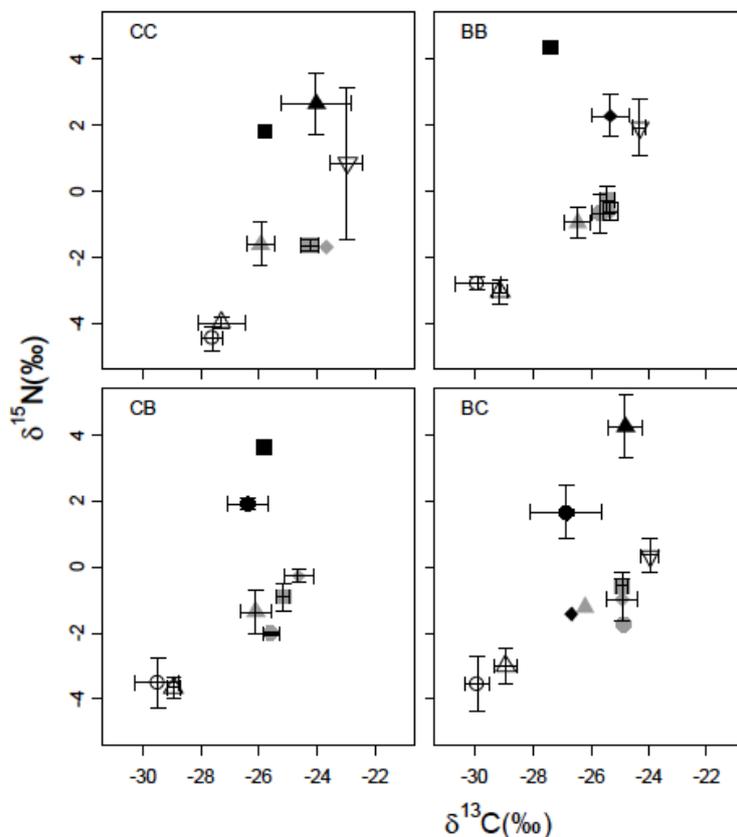


図3. 苫小牧研究林各サイトにおける炭素・窒素安定同位体比。○：リタートラップで採取された落葉、△：落葉堆積(A0)層、表層性ミミズ(●：フトスジミミズ(*Amyntas vittatus*)、■：ユノシマミミズ(*Amyntas yunoshimaensis*)、▲：ヒトツモンミミズ(*Metaphire hilgendorfi*)、◆：ニホンヒメフナムシ、地中性ミミズ(▽：サクラミミズ(*Eisenia japonica*))、捕食者(●：クモ目、■：オサムシ科、▲：ジムカデ目、◆：イシムカデ科)

放射性炭素同位体に関して、本研究ではCBサイトで採取されたフトスジミミズ、ユノシマミミズ、ヒトツモンミミズ、サクラミミズ、さらに当年の落葉、および落葉堆積層(A0層)の $\Delta^{14}\text{C}$ を分析した。この値に、図1でみられる $\Delta^{14}\text{C}$ 値の減衰を重ね合わせるため、Hua and Barbetti⁸⁾の観測値を元にした回帰式³⁾

$$\text{Year} = 2074 - 16.71 \ln(\Delta^{14}\text{C})$$

を適用し、炭素年齢(carbon age: 土壌動物についてはdiet ageと同じ意味)を計算した。それをを用いて、Hyodo et al.³⁾で示した炭素年齢(carbon ageまたはdiet age)と $\delta^{15}\text{N}$ 値を両軸にプロットした(図4)。その結果、炭素年齢と $\delta^{15}\text{N}$ 値はCCサイトおよびBCサイトにおいては、Hyodo et al.³⁾で示された正の相関関係が見られた。これは、世界的に見ても温帯の土壌動物においては最初の報告である。その解釈は、分解が進んだ(humification gradient)有機物は炭素年齢が高くさらに微生物分解により窒素同位体比が上昇していると解釈される。現在の植生が広葉樹であるCBサイトおよびBBサイトではその関係は統計的に有意な相関はみられなかったが、データ数の制約もあり今後のさらなるデータの集積が必要であると考えられる。

一方、ミミズの生態学として考えてみると、フトスジミミズ、ユノシマミミズ、ヒトツモンミミズは表層性ミミズとして分解初期のリターを食べると考えられているのに対し、サクラミミズ

は土壌性ミミズとして分解後期の腐植や土壌を食べると考えられている。図4を見てみると、表層性ミミズに対して土壌性のミミズは一般的に炭素年齢と $\delta^{15}\text{N}$ 値が高いという傾向は明らかに見られる。しかし、CBサイトにおいては、フトスジミミズとユノシマミミズは光合成から数年の新しい炭素を利用しているのに対し、ヒトツモンミミズはかなり古い炭素年齢の餌を食べていることがわかった。Uchida et al.⁷⁾によれば、ヒトツモンミミズの消化管内容物のうち硬質土壌の割合は、フトスジミミズやユノシマミミズに比べて高いことが示されており、今回の結果と合致する。

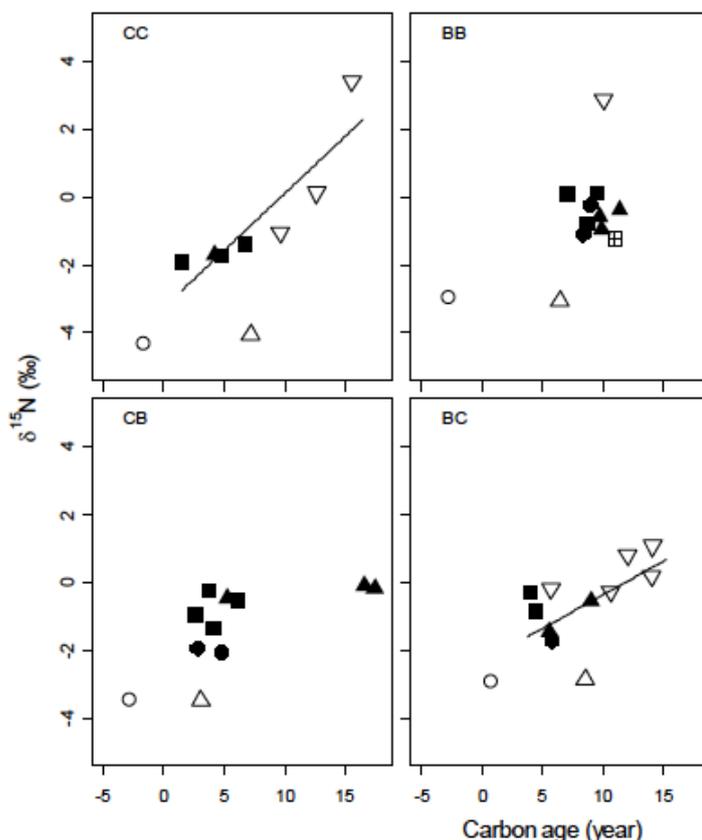


図4. 苫小牧研究林各サイトにおける、放射性炭素濃度 ($\Delta^{14}\text{C}$) から計算した炭素年齢 (carbon ageまたは diet age) と窒素安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$) の関係。○: リタートラップで採取された落葉、△: 落葉堆積 (A0) 層、表層性ミミズ (●: フトスジミミズ (*Amyntas vittatus*), ■: ユノシマミミズ (*Amyntas yunoshimaensis*), ▲: ヒトツモンミミズ (*Metaphire hilgendorfi*))、地中性ミミズ (▽: サクラミミズ (*Eisenia japonica*))、およびミミズの糞団粒 (田)

土壌動物の炭素年齢とリターの炭素年齢を比較してみると、表層性ミミズの炭素年齢はA0層の炭素年齢にほぼ対応し、新鮮な落葉というよりも熟成されたA0層のリターを利用していることを示した。一方、CCサイトやBCサイトのサクラミミズやCBサイトのヒトツモンミミズはもっと古い炭素源を利用しており、土壌有機物と混合されている炭素源を利用していることを示していた。まだ研究例がほとんどないために、多様な土壌動物が利用する炭素年齢の違いに関して結論を出すのは難しいが、土壌動物の利用する炭素年齢に応じて、長期的な土壌炭素動態に及ぼす影響が異なることが推察され、今後、土壌動物多様性、さらに要となる生物の機能を考慮した上で、土壌炭素動態を解明することが重要であることを示す。

(2) 八ヶ岳の研究

八ヶ岳における炭素・窒素安定同位体比の結果を図5に示す。

リターフォールの炭素・窒素安定同位体比はいずれも低い値を示し、分解され土壌有機物となるに従って炭素・窒素同位体比は上昇した。大型団粒 (A=aggregate:2-4mm)および細土(F=fine fraction: <2mm)における団粒外部の軽い有機物画分 (Free Particulate Organic Matter: fPOM) については土壌画分の中で低い値を示した。団粒内部の軽い有機物画分 (Occluded-POM: oPOM) においては、天女山試験地A(TA)において細土中の軽い有機物画分 (fPOM)、天女山試験地B(TB)において大型団粒中の軽い有機物画分 (oPOM) において高い同位体比がみられた。一般に、土壌有機物は分解の程度に応じて炭素・窒素安定同位体比の濃縮が見られるが、団粒構造の中に同位体比の高い成分が保持される理由に関しては不明である。

一方、大型団粒および細土における重い有機物画分 (Heavy Fraction: HF) は、炭素・窒素とも高い同位体比を示した。この値は、キシヤヤスデの同位体比とほぼ同じであった。ヤスデの安定同位体比は、土壌食ミミズで見られる高い炭素・窒素安定同位体比⁷⁾を示した。

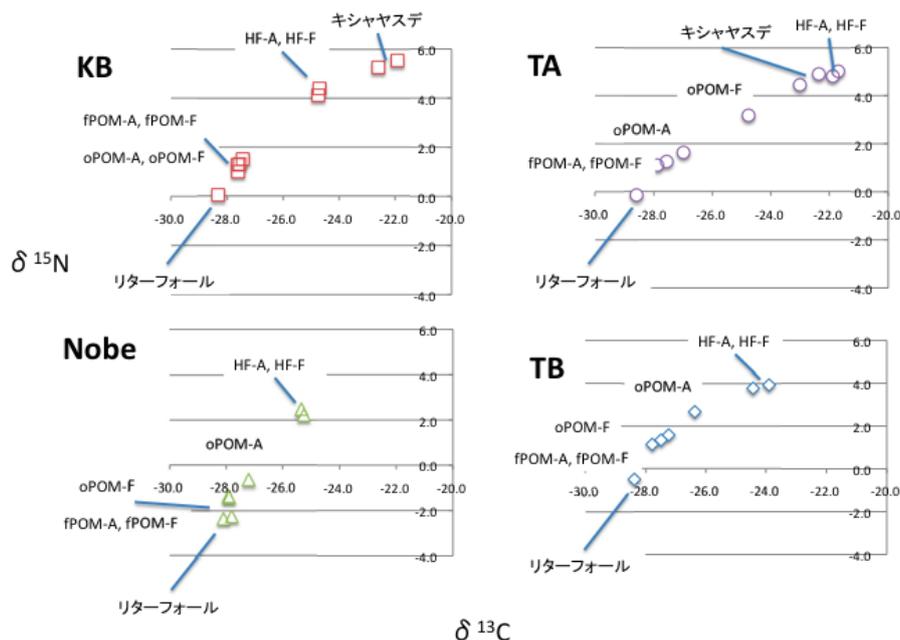


図5. 天女山試験地A(TA)、天女山試験地B(TB)、観音平試験地(KB)、野辺山試験地(Nobe)における、キシヤヤスデ、および、団粒(aggregate)と細土(fine fraction)に含まれる有機物の炭素・窒素安定同位体比。団粒外部の軽い有機物画分 (Free Particulate Organic Matter: fPOM)、団粒内部の軽い有機物画分 (Occluded-POM: oPOM)、重い有機物画分 (Heavy Fraction: HF) ダッシュ以下の記号はそれぞれ A(=aggregate:2-4mm)、F(=fine fraction: <2mm)を表す。

これらの土壌画分について放射性炭素($\Delta^{14}\text{C}$)分析を行った結果を図6に示す。現在の $\Delta^{14}\text{C}$ 値は40%程度(図1)であるので、重い有機物画分 (Heavy Fraction: HF) のみがpre-bomb(核実験前

の炭素)の値を示し、それ以外はpost-bomb(核実験以後の炭素)の値を示した。これは、図5の結果とあわせて考えると、重い有機物画分は鉱物に吸着した古い有機物画分であることを示す。一方、団粒と細土の差は予想に反して大きくなかった。ヤスデの生息履歴と今回の土壌画分の関係をみると、このなかで一番ヤスデの効果が大きいと思われる天女山試験地A(TA)で、より重い画分と軽い画分の差が大きくなっていた。この理由を簡単に説明することはできないが、土壌食の幼虫が古い炭素からなる重い画分を表層に持ち込んできたことを示すのかも知れない。いずれにせよ、土壌動物の団粒構造の形成は炭素年齢のことなる炭素の混合具合に影響をあたえることから、土壌動物の活動が土壌炭素動態にいくらかの寄与を与えることが示唆された。

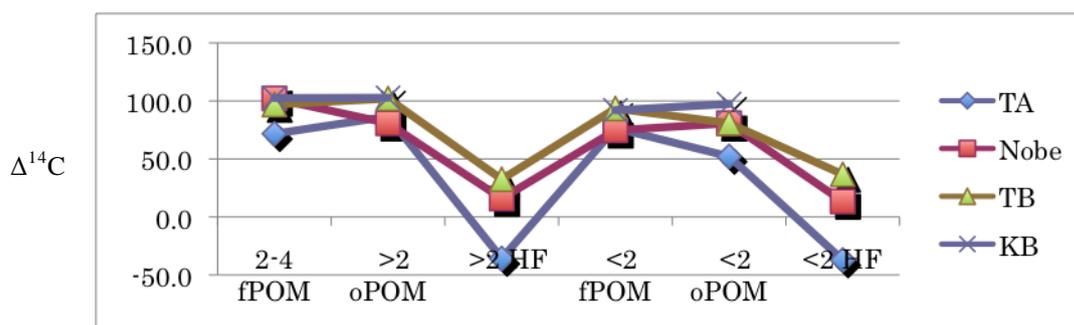


図6. 八ヶ岳天女山試験地A(TA)、天女山試験地B(TB)、観音平試験地(KB)、野辺山試験地(Nobe)における、団粒(aggregate: >2mm)と細土(fine fraction: <2mm)に含まれる有機物の放射性炭素濃度(Δ¹⁴C)。団粒外部の軽い有機物画分(Free Particulate Organic Matter: fPOM)、団粒内部の軽い有機物画分(Occluded-POM: oPOM)、重い有機物画分(Heavy Fraction: HF)を表す

なお、キシヤスデの炭素年齢(diet age)は、苫小牧の研究と同様の手法を用いて計算すると11.9-13.5年となった。これは苫小牧研究林であれば土壌食ミミズであるサクラミミズやCBサイトで見られたフトスジミミズの炭素年齢と同じくらいであり、キシヤスデの同化した炭素はある程度分解の進んだ軽い土壌有機物であることを示唆する。

(3) 茨城大農場の研究

不耕起栽培農地、カバークロープとしてライ麦を植えた畑(ライ麦区)でのデータを図7に示す。F1、F2、F3、F4の4地点に関して、ミミズの糞団粒が確認できた場所「ミミズ区」と確認できない場所「ミミズなし区」に関して、団粒と細土の比較を行ったところ、ミミズの有無にかかわらずF3地点以外でのΔ¹⁴C値は 団粒<細土 となっていた。この結果は「土壌有機物の炭素の年齢は、団粒に比べて細土のほうが新しい」ことを示している。これは、団粒構造で古い炭素が固定化されることを示すのかも知れない。

一方Δ¹⁴Cの値自体を八ヶ岳の研究と比較すると、八ヶ岳土壌に比べ団粒・細土ともΔ¹⁴C値は低く、pre-bomb(核実験前の炭素)の値の影響を強く受けている。これがどういう理由かはわからないが、不耕起栽培を行い始めたのが7年前(2003年)であることを考えると、新鮮な有機物の土壌炭素への寄与はまだ小さく、不耕起栽培以前の耕起の影響により天然森林に比べて古い炭素が露出していることを示しているのかも知れない。

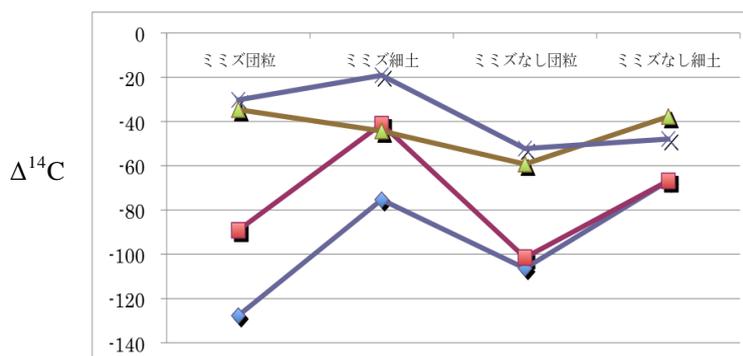


図7. 茨城大学農学部農場の不耕起・カバークロープ試験圃場ライ麦区における土壌炭素の $\Delta^{14}\text{C}$ 値。◆F1、■F2、▲F3、×F4の4地点に関して、それぞれミミズの糞団粒が確認できた場所「ミミズ区」もしくは確認できない場所「ミミズなし区」をペアで選び、1 mm以上（団粒）と1 mm以下（細土）に分けて分析した。

また、カバークロープとして植えられていたライ麦の $\Delta^{14}\text{C}$ 値は30‰であったのに対し、採取されたミミズの $\Delta^{14}\text{C}$ 値は25-30‰（4個体の $\Delta^{14}\text{C}$ 値の範囲）となりほぼ当年の値になった。畑地土壌で上記の通り古い炭素も表面に出てきている不耕起栽培地であるが、この結果はミミズの利用した炭素源は現在の光合成産物であることを明確に示している。

（4）小川群落保護林の研究

森林生態系において数多く存在する広食性捕食者であるクモ目に着目し、それらを頂点とする食物網が、森林伐採からの攪乱回復過程においてどのように変化するかについて調査を行った。特に、エサ源として樹上のエサ群集と、腐食などに起源すると考えられる飛翔性の昆虫に着目して研究を行った。

伐採後年数の異なるサイトで複数種のクモ類を採集・安定同位体分析した結果を図8に示す。ただし、クモの同位体比に関しては、先行研究⁹⁾により得られている一栄養段階あたりの同位体分別効果を除いた値を示してある。クモについてのこの値が、エサの同位体比を結ぶ多角形の内側にあることから、エサ源としてこれらの生物を検討する事は妥当であると考えられる。また、図中のクモの同位体比がエサ同位体比の被食割合に応じた混合比率によって得られるという原理のもとに、クモの利用エサ資源比率を推定した。また、エサの安定同位体比には、樹上の昆虫（トビムシ・ヨコバイ・鱗翅目幼虫）に比べて飛翔性の昆虫（双翅目）が $\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$ 共に高いという結果を得た。他のエサ昆虫に比べて $\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$ 値が高くなる要因として、1. 腐植形成過程での同位体濃縮と、2. 栄養段階の上昇に伴う濃縮の2つが考えられるが、安定同位体の結果のみから要因を分離する事は出来ない。

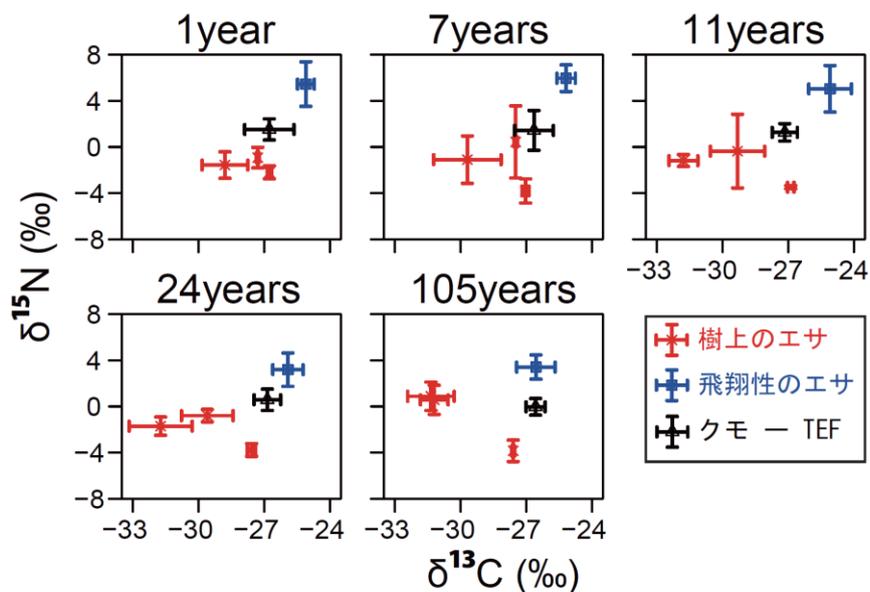


図8. エサ昆虫及び、栄養段階に伴う同位体濃縮の効果を除いたクモの安定同位体比. エサについてはサンプル処理の段階で目ごとにプールした. クモについては種ごとの分析を行った上で、分析結果の平均と分散値をプロットした.

一方、 $\Delta^{14}\text{C}$ の値は、方法で示したようにdiet ageに変換して示した(図9)。これによると、主に樹上に生息している昆虫は低いdiet age (新しい炭素起源)を示し、飛翔昆虫では高いdiet age (古い炭素起源)を示した。この事は、樹上昆虫がほぼ当年生の有機物を利用する生食連鎖上に位置づけられる一方、飛翔昆虫中で優占する双翅目が炭素の滞留する食物連鎖経路である腐食連鎖系に位置づけられることを意味する。双翅目が高いdiet ageを示した事から、 $\delta^{13}\text{C} \cdot \delta^{15}\text{N}$ 値が他のエサ昆虫に比べて高い主な要因は腐植形成過程での同位体濃縮であると考えられる。また、クモ類は各調査地で幅広いdiet ageを示すが、その値はエサのdiet ageの範囲内である。つまり、diet ageの結果からも、エサ源としてこれらの生物を検討する事が妥当であると考えられる。さらに、伐採後1年の森林においても10年以上のdiet ageを示す生物が存在した事は、環境変動以前の履歴である残存の土壌腐植が、攪乱直後の生態系において重要な構成要素となっている事を示すと考えられる。

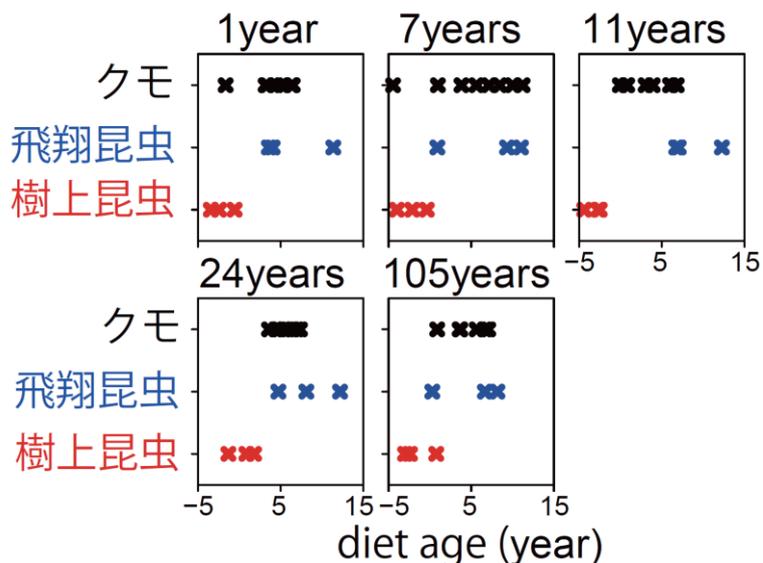


図9. クモおよび生息場所ごとに採集されたエサ昆虫の $\Delta^{14}\text{C}$ 分析から算出したdiet age. 飛翔昆虫はサイズ画分の異なる双翅目(0-5 mm, 5-10 mm, 10- mm), 樹上昆虫はトビムシ・半翅目・鱗翅目幼虫より成る.

次に、安定同位体による利用エサ比率の推定結果と $\Delta^{14}\text{C}$ の結果の一致を検討するため、全クモサンプルについて、安定同位体比から算出した飛翔昆虫の寄与率とdiet ageの関係を検討した (図10)。両者は正の相関を示し、クモ類のdiet ageを上昇させる要因が飛翔昆虫による古い有機物の供給であることが支持された。

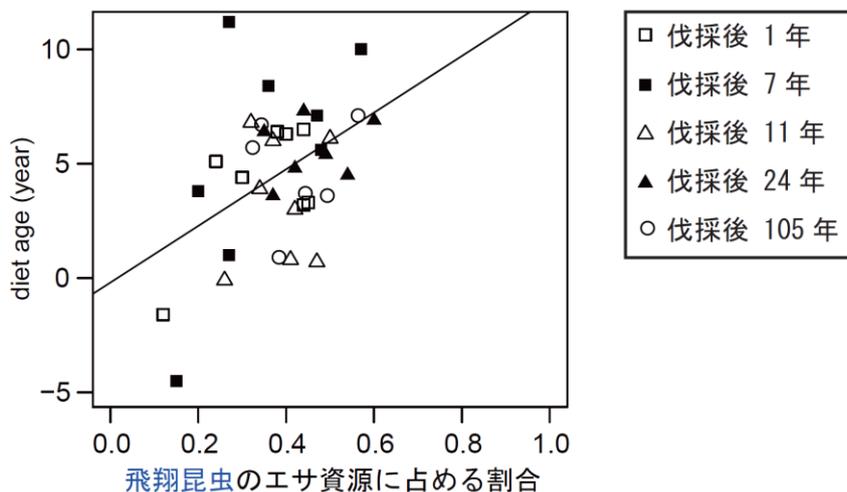


図10. 全調査地で採集されたクモの、安定同位体比から求めた飛翔昆虫のエサ寄与率と, diet ageの関係. 採集された調査地ごとに異なる図形で示した.

最後に、クモ毎にdiet ageが大きく異なる要因を検討するため、各クモのdiet ageを説明変数として、クモの分類群に起因する捕食行動の違いおよび調査地の違いを従属変数とした交互作用項込

みのtwo-way ANOVAによる解析を行った。結果、調査地ごとのエサ資源の違いは有意ではなく ($p = 0.47, F = 3.76, d.f. = 4, 19$)、分類群の違いの効果のみが有意であった ($p = 0.02, F = 2.38, d.f. = 3, 19$)。更に、多重比較検定の結果、分類群中で円網によってエサを捕えるグループであるコガネグモ上科で特にdiet ageが高い傾向が見られた。これは、造網性のクモ類が飛翔昆虫を捕食する事で生食連鎖と腐食連鎖を連結しているという先行研究の主張とも一致する。以上より、第一にクモ類による生食連鎖系と腐食連鎖系の連結作用が明らかになった。また、そのような連結構造が周辺環境の変化に伴う潜在的なエサの量的変化というよりも、クモの分類群毎に捕食特性が異なることによって左右される事が明らかになった。そこで、今後森林遷移に伴うクモ群集の遷移を併せて解明することで、クモ群集を頂点とする食物網構造全体が森林遷移に伴ってどう変化するのかを示す事が出来ると考えられる。生態系上の機能の種毎の相違を立脚点として、群集レベルの食物網構造を構築し、更には長期的な食物網動態にまで展開しうる点において、時間軸による炭素動態を扱う本研究は、複雑な陸域食物網の解明に資するものである。

(5) まとめ

これら(1)から(4)に述べた研究を元に、この研究の重要性についてまとめておく。本研究は、生態系の中の「炭素循環の時間軸」を土壌有機物・落葉堆積層・デトライタス食者・捕食者に至るまで明示することの重要性を示した(図11)。生態系の中に時間軸を明示することで、「当年の」環境変動が食物網を通じてどのような波及効果を及ぼすかを理解することができる。この推進費研究の結果をまとめて放射性炭素14 ($\Delta^{14}\text{C}$)を用いた研究の重要性を示し、さらに既存の研究のレビューを行うとともに今後の研究の見通しを示した論文をTayasu and Hyodo(2010)として発表した。

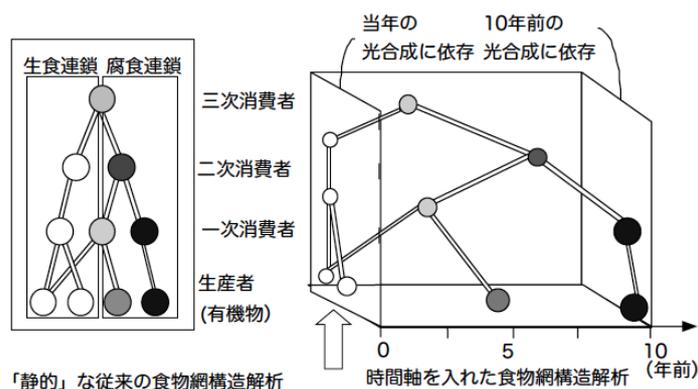


図11 生態系の時間軸構造を解明する意義: 環境変動(図中の矢印)が生態系の食物網構造に与える影響は、静的な従来の食物網構造解析(左図)では解けないが、時間軸を入れた食物網構造解析(右図)を用いると定量的に予測可能となる。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究は、土壌炭素の $\Delta^{14}\text{C}$ 値プロファイルを基に土壌炭素の蓄積状況と年代を把握するとともに

に、陸上生物の炭素利用（炭素同化）および炭素混合効果（ecosystem function）を研究したものである。残念ながら、前処理に非常に大きな労力がかかること、また加速器質量分析計(AMS)による環境試料分析がまだまだ一般的になっていないため、統計的処理を行える程の多量の試料分析が不可能である。それにもかかわらず、本研究は $\Delta^{14}\text{C}$ 手法が、大気リザーバー(CO_2)と、生態系リザーバーのうちの大きな部分を占める土壌炭素動態、さらに生態系食物網構造の中身に関する研究に適用できる画期的な手法であることを明らかにした。今後は、 $\Delta^{14}\text{C}$ 手法がもっと一般的になり、世界各地での生態系炭素循環解析に用いられるようになることを期待している。

(2) 地球環境政策への貢献

本研究は、土壌生態系の生物多様性が土壌炭素動態に与える影響を明らかにすることを目標とした。これらの成果は、2010年の生物多様性国際年にむけて積極的に発信していく。その一つとして、2010年11月、COP10直後に京都でInternational Symposium on Isotope Ecology 2010 in Kyoto: Relationship between biodiversity and ecosystem function（同位体生態学国際シンポジウム2010京都：生物多様性と生態系機能の関係）を主催することが決定している。その中に、「Carbon-14 in Ecology（生態学における炭素14の利用）」というセッションを設け、本研究の成果についても議論する予定である。

6. 引用文献

- 1) Tayasu, I., Nakamura, T., Oda, K., Hyodo, F., Takematsu, Y., Abe, T. (2002) Termite ecology in a dry evergreen forest in Thailand in terms of stable- ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) and radio- (^{14}C , ^{137}Cs and ^{210}Pb) isotopes. *Ecological Research* 17: 195-206.
- 2) Hyodo, F., Tayasu, I., Wada, E. (2006) Estimation of the longevity of C in terrestrial detrital food webs using radiocarbon (^{14}C): how old are diets in termites? *Functional Ecology* 20: 385-393.
- 3) Hyodo, F., Tayasu, I., Konaté, S., Tondoh, J.E., Lavelle, P., Wada, E. (2008) Gradual enrichment of ^{15}N with humification of diets in a belowground food web: relation between ^{15}N and diet age determined using ^{14}C . *Functional Ecology* 22: 516-522
- 4) Tanaka, A., Yoneda, M., Uchida, M., Uehiro, T., Shibata, Y., Morita, M. (2000) Recent advances in ^{14}C measurement at NIES-TERRA. *Nuclear Inst. and Methods in Physics Research B*, 172: 107-111
- 5) Hashimoto, M., Kaneko, N., Ito, M.T., Toyota, A. (2004) Exploitation of litter and soil by the train millipede *Parafontaria laminata* (Diplopoda: Xystodesmidae) in larch plantation forests in Japan. *Pedobiologia* 48: 71-81.
- 6) Toyota, A., Kaneko, N., Ito, M.T. (2006) Soil ecosystem engineering by the train millipede *Parafontaria laminata* in a Japanese larch forest. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 1840-1850.
- 7) Uchida, T., Kaneko, N., Ito, M.T., Futagami, K., Sasaki, K., Sugimoto, A. (2004) Analysis of the feeding ecology of earthworms (Megascolecidae) in Japanese forests using gut content fractionation and $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ stable isotope natural abundances. *Applied Soil Ecology* 27: 153-163.
- 8) Hua, Q., Barbetti, M. (2004) Review of tropospheric bomb ^{14}C data for carbon cycle modeling and age calibration purposes. *Radiocarbon* 46: 1273-1298

- 9) Wise, D.H., Moldenhauer, D.M., Halaj, J (2006) Using Stable Isotopes To Reveal Shifts In Prey Consumption By Generalist Predators. *Ecological Applications* 16: 865-876

7. 国際共同研究等の状況

なし

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) Toyota, A., Tayasu, I., Fujimaki, R., Kaneko, N., Uchida, M., Shibata, Y., Hiura, T. (2010) Effects of vegetation switch and subsequent change in soil invertebrate composition on soil carbon accumulation patterns, revealed by radiocarbon concentrations. *Radiocarbon*, in press
- 2) Tayasu, I., Hyodo, F. (2010) Use of carbon-14 natural abundances in soil ecology: implications for food-web research. In: Ohkouchi, N., Tayasu, I., and Koba, K. (eds), *Earth, Life, and Isotopes*, Kyoto University Press, in press
- 3) Tayasu, I., Folgarait, P.J., Hyodo, F., Lavelle, P. (2010) Carbon sources and feeding habits of selected soil animals from an abandoned rice field chronosequence determined by carbon and nitrogen isotope ratios and natural carbon-14. In: Ohkouchi, N., Tayasu, I., and Koba, K. (eds), *Earth, Life, and Isotopes*, Kyoto University Press, in press

<その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 陀安一郎 2008. 群集生態学の研究に用いる同位体解析 In: (大串隆之・近藤倫生・仲岡雅裕 編) シリーズ群集生態学4 「生態系と群集をむすぶ」 京都大学出版会 pp.55-65
- 2) 陀安一郎・兵藤不二夫・石川尚人 2008. 大気圏核実験由来放射性炭素14を用いた生態学、生物の科学「遺伝」11月号:90-94
- 3) 陀安一郎 2010. 「元素の同位体比から生物環境を見る」生き物たちのつづれ織り 第3巻:77-81

(2) 口頭発表(学会)

- 1) 金子信博、藤巻玲路、川口達也、日浦勉、村上正志、陀安一郎、太田寛行、西沢智康、増永二之、岩島範子、豊田鮎 (2008) 「北海道大学苫小牧研究林における土壌炭素集積速度」第119回日本森林学会大会
- 2) 岩島範子、豊田 鮎、藤巻玲路、陀安一郎、日浦 勉、金子信博、増永二之 (2008) 「樹種交替が土壌動物および土壌理化学性へ及ぼす影響」日本土壌動物学会第31回大会
- 3) 原口 岳、陀安一郎、武田博清 (2008) 「落葉樹林の林床に生息するクモ目の季節的消長」日本土壌動物学会第31回大会
- 4) 原口岳、陀安一郎 (2009) 「森林の遷移が食物網に与える影響：捕食者であるクモ類の群集比較から」日本生態学会第56回大会
- 5) 豊田鮎、陀安一郎、藤巻玲路、金子信博、内田昌男、柴田康行、日浦勉 (2009) 「ミミズに

よる森林土壌の炭素蓄積パターンの変化- ^{14}C 天然存在比を用いた解析」日本生態学会第56回大会

- 6) 藤巻玲路、陀安一郎、浅沼弘人、岡井尚之、佐藤由依、金子信博 (2009) 「落葉・土壌混食者の生息履歴と森林土壌の有機物蓄積様式-土壌改変効果からの考察-」日本生態学会第56回大会
- 7) Toyota, A., Tayasu, I., Fujimaki, R., Kaneko, N., Uchida, M., Shibata, Y., Hiura, T. (2009) “Comparison of soil carbon accumulation in conifer and broad leaf forests using radiocarbon measurements” International Radiocarbon Conference, Hawaii
- 8) 陀安一郎 (2009) 「放射性炭素14を用いた食物網研究」第32回日本土壌動物学会大会
- 9) 原口岳、陀安一郎 (2009) 「 $\Delta^{14}\text{C}$ 指標を用いた食物網起源の解明：攪乱回復過程における生物のエサ資源の変化」第32回日本土壌動物学会大会
- 10) 藤巻玲路、豊田鮎、陀安一郎、金子信博、日浦勉 (2009) 「針葉樹・広葉樹の転換がおきた森林土壌における炭素蓄積とリグニン由来フェノールの特性」日本土壌肥料学会2009年大会
- 11) Ichiro Tayasu (2010) “Use of carbon-14 natural abundances in soil ecology: carbon assimilation and carbon sequestration.” 日本生態学会第57回大会
- 12) 原口岳、内田昌男、柴田康行、陀安一郎 (2010) 「異地性腐食連鎖と自生性生食連鎖が形成する樹上食物網： $\Delta^{14}\text{C}$ によるクモの機能群間の利用エサ資源比較」日本生態学会第57回大会

(3) 出願特許

なし

(4) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)

なし

(5) マスコミ等への公表・報道等

なし

(6) その他

なし

F-073 土壌生物の多様性と生態系機能に関する研究

(4) 土壌細菌の多様性と機能解析

国立大学法人静岡大学

理学部

加藤憲二

平成19～21年度合計予算額 16,158千円

(うち、平成21年度予算額 5,929千円)

※予算額には、間接経費を含む。

[要旨] 土壌生態系を支える細菌群集の多様性とそれが発現する機能との関係を明らかにすることを目的とし、森林土壌における細菌群集の多様性の解析を行った。桐生試験地乾性土壌 (G31地点) A層の細菌群集の構成は、*Acidobacteria*、 α -*Proteobacteria*が優占し、B層においてもほぼ同様の構成であった。B層は微生物の遺伝的な多様性のプールとしての役割を果たしていた。化学的環境条件 (栄養塩添加) あるいは、土壌動物の存在 (キシヤヤスデ) により場の大きな変化を与えた場合の土壌細菌の反応を明らかにするために、桐生試験地森林土壌A層、B層を用いて栄養塩添加およびキシヤヤスデ飼育実験を行った。T-RFLP解析の結果、A層においては微生物群集に変化はみられなかったが、B層において微生物群集の主たる構成に変化が現れた。この時のキシヤヤスデ消化管内容物の細菌群集構成は土壌のものとは異なった。土壌そのものの物理的攪乱が微生物群集に及ぼす影響を明らかにするため、苫小牧研究林の土壌攪乱実験区の降水と土壌水を採取し、クローン解析を行った。無処理区とプレス区で、細菌群集構成が大きく異なっており、表層土壌が地下環境に影響を与えることが示唆された。細菌の多様性と機能発現の関係を明らかにするために、代謝過程が明瞭な脱窒機能を対象とし、 ^{15}N トレーサーによる脱窒活性の測定と亜硝酸還元遺伝子 (*nirK*、*nirS*) による脱窒細菌群集構成の解析を行った。桐生試験地湿性土壌 (G1地点) の表層土壌の脱窒活性は非常に高く、酸素の存在によって抑制された。また、*nirK*、*nirS*を持つ細菌群集は非常に多様であった。土壌における脱窒活性は、酸素濃度と添加基質により異なった。*nirK*によるクローン解析の結果、湿潤な土壌ではクレード内で多様化がみられた。最後に、苫小牧埋没A層における細菌群集構成を解析したところ、メタン生成・酸化に機能を有すると推察される細菌群が検出され、メタン生成実験を行ったが、メタンは検出されなかった。この土壌システムにおける鉛直方向の相互作用の可能性は限られたものであると推察された。

[キーワード] 土壌細菌群集、キシヤヤスデ、埋没A層、脱窒活性、機能遺伝子

1. はじめに

土壌中の細菌密度は非常に高く、細菌群集は多様な分類群から成っている。しかし、農耕地土壌と異なり森林土壌における微生物の生態に関する知見は極めて乏しい。森林土壌生態系における細菌群集の多様性と機能を明らかにすることは、森林生態系における物質循環過程と微生物多様性との関係の解明へとつながる。本研究では、①森林土壌における細菌群集の多様性を解析し、②栄養塩の流入や③土壌動物および、④土壌の物理的攪乱が土壌細菌群集に与える影響を解析し、

⑤脱窒機能の発現と脱窒機能遺伝子をもつ細菌群集の多様性を解析、さらに、⑥地下圏微生物活動が表層土壌に与える影響を解析することにより土壌微生物群集の構成とバイオマス、そして担いうる機能のポテンシャルを遺伝子解析によって把握することを目的とする。

2. 研究目的

(1) 森林土壌における細菌群集の多様性の解析 (①)

森林土壌はA層、B層、C層、さらに基盤岩と、狭い空間の中で土壌の質が大きく変化する。このことは物理化学環境が狭い範囲で大きく変わることを示唆し、森林地下圏は不均一な環境であるといえる。本研究では、滋賀県大津市の桐生水文試験地においてそのような不均一な環境における微生物群集構造の解析を行い、土壌微生物群集の多様性を評価することを目的とした。

(2) 土壌改変（栄養添加 (②)、土壌動物 (③) および物理的攪乱 (④)）が細菌群集に及ぼす影響

桐生試験地の森林土壌を用いてモデル実験を行い、栄養塩濃度の変化や土壌動物相の変化といった選択圧がかけられた場合のA層、B層の微生物群集構造の変化を解析し、環境条件の変動に対する群集の応答について考察を行うことを目的とした。また、土壌そのものの物理的攪乱が微生物に与える影響を明らかにする目的で、苫小牧研究林にて土壌攪乱実験を行った。

(3) 森林土壌における微生物多様性と脱窒機能の解析 (⑤)

桐生試験地の集水域斜面下部と上部に位置する表層土壌を対象に、代謝系が明確な脱窒機能と脱窒機能遺伝子 (*nirK*、*nirS*) による細菌群集構成の解析によって、細菌の多様性と機能発現の関係を明らかにすることを目的とした。

(4) 地下圏が土壌に及ぼす影響 (⑥)

1) 埋没A層における微生物物群集の解析

地中に埋没した富有機物層 (埋没A層) におけるメタンの発生が表層の土壌生態系に影響を与えるかどうかを明らかにすることを目的として、苫小牧研究林内の地下2~3mに埋没するA層に生息する微生物群集構成を解析した。

2) 埋没A層におけるメタン生成実験

地中に埋没した富有機物層が表層土壌生態系に影響を与えるかどうかを明らかにすることを目的として、苫小牧研究林において、埋没A層における微生物活動としてメタン生成実験を行った。

3. 研究方法

(1) 森林土壌における細菌群集の多様性の解析

1) サンプリング

土壌採取サイトは滋賀県大津市上田上桐生町に位置する桐生試験地(34° 58' N、136° 00' E)である(図1)。桐生試験地は琵琶湖集水域草津川水系で標高は250 m、年間の平均気温は14°C、平均降水量1,645mm/年である。面積約6 haのヒノキとマツの混交林であるが、90年代初頭の松枯れ以降はヒノキが優占種となっている。2006年8月12日試験地の最奥松沢流域の観測井戸G-31近くのヒノキ横1.5mの地点から、A層 (以降、G31-A) および B層 (以降、G31-B) の土壌を採取した。ま

た、花崗岩が露出している地点から風化岩石を採取した。さらに樹冠と同じ高さ(20 m)に滅菌した風化岩石を入れたポットを3か月間設置することで降下細菌の採取を試みた。環境データは土壌温度、pH、電気伝導度(Electron Conductivity、EC)、含水比、全炭素(Total Carbon、TC)、全窒素(Total Nitrogen、TN)を測定した。なお、流域内の下流に位置するG1地点では流域内を通った地下水が集まり、表層土壌はG31地点と比較して湿った環境となっている。

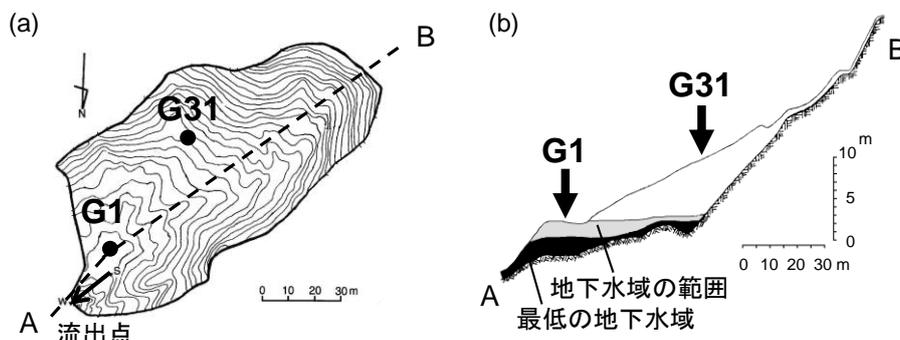


図 1. 桐生試験地の地形図 (a) と断面図 (b) . サンプル地点 : G1、 G31.

2) 遺伝子解析

簡単な細菌群集解析法としてT-RFLPを導入し、その検出精度について、コストと時間をかけてクローニング・シーケンス解析を行った。サンプル土壌から直接DNAを抽出し、ドメイン・バクテリアに特異的な27F、1492R¹⁾のプライマーセットを使用しPCR増幅を行った。系統関係と群集構造の比較を行うため、PCR産物のクローニング・シーケンス解析を行った。シーケンス反応にはドメイン・バクテリアに特異的な341F²⁾プライマーを用いてシーケンスを行った。塩基配列の配列間距離をDDBJ [DNA data bank of Japan, (URL: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)]のClustal W³⁾により計算し、塩基配列が97%以上の相同性があるものについて一つのOperational Taxonomic Unit(OTU, 操作的分類単位)としてまとめた⁴⁾。得られた各OTUについてBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)⁵⁾を用いて相同性検索を行った。OTUの豊富さのノンパラメトリックな推定値Chao1⁶⁾とShannon-Weinerの多様性指数⁷⁾はDOTUR⁸⁾を用いて算出した。また、Simpsonの多様性指数⁹⁾はDOTURで算出したのち、その逆数をとった。

(2) 土壌変化が細菌群集に及ぼす影響

1) 栄養塩添加効果についてのモデル実験における細菌群集の解析

a. 栄養添加モデル実験

栄養塩添加実験に用いるための土壌のサンプリングは2008年1月24日に行った。桐生試験地G31地点において土壌コア(内径5 cm、高さ35 cm)をA層(以降、G31-A)およびB層(以降、G31-B)より採取した。栄養添加実験の概要を図2にまとめた。採取した土壌コア2本を、コアサンプラーに入った状態のまま暗所14°Cで12週間(2008年1月25日~4月18日)培養した。培養期間中2週間おきに栄養塩{(NH₄)₂SO₄ 20μg/g dry soil、K₂HPO₄ 5.3μg/g dry soil}を添加した。培養6週目と12週目にA層とB層(表層から-20cm)の土壌を採取した。



図2. 栄養塩添加実験概要.

b. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)解析

培養前と6週目、12週目のドメイン・バクテリア群集構造の変化を解析するためT-RFLP解析を行った。モデル実験において採取した土壌0.5gからDNAを抽出し、ドメイン・バクテリアの16S rRNA遺伝子をターゲットにしたPCR増幅を行った。増幅には27F-907R (907R; Beckman Dye4でラベル)のプライマーセットを使用した。PCR反応条件は、初期熱変性 94°C 2分、続いて熱変性 94°C 30秒、アニーリング 52°C 30秒、伸長作用 72°C 1分の反応を22サイクル、最終伸長作用を72°C 10分で行った。MspIとHaeIII、HhaIの3種類を使用し制限酵素処理を行い、キャピラリーシーケンサーを用いてフラグメント解析を行った。

2) 土壌動物効果についてのモデル実験における細菌群集の解析

土壌動物効果についてのモデル実験の供試土壌は桐生試験地G31地点においてA層とB層を2008年5月17日に採取した。また、8齢キシヤヤスデは2008年5月7日に長野県松本市崖の湯付近のカラマツ林において採取した。

キシヤヤスデ導入実験の概要を図3にまとめた。採取したキシヤヤスデをG31土壌に移し、20°C全暗で48時間前培養を行った。その後、新しいG31土壌にキシヤヤスデを入

れ20°C全暗で10日間飼育を行った。サンプル土壌は瓶1本につきG31-Aは150 g、G31-Bは200 g使用し、キシヤヤスデ5個体を入れたものを各2連、キシヤヤスデを加えないコントロールは各1連用意した。10日間の飼育終了後、土壌は20 g採取した。キシヤヤスデの消化管内容物はピンセットで消化管を引き抜き採取した。土壌およびキシヤヤスデ消化管内容物0.5gからDNAを抽出し前述のT-RFLP解析を行った。また、飼育終了後のキシヤヤスデ消化管内容物から抽出したDNAを対象に

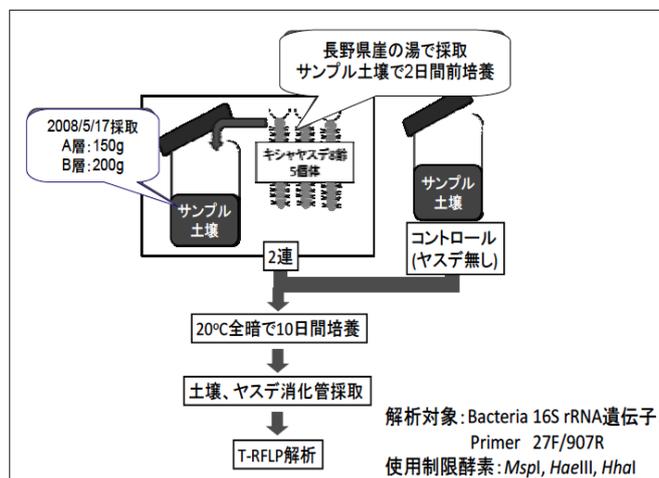


図3. キシヤヤスデ導入実験概要.

クローニング-シーケンス解析を行った。PCRに用いたプライマーはドメイン・バクテリアの16S rRNA遺伝子をターゲットとした21F-907Rのプライマーセットを用い、得られた塩基配列についてBLAST解析のほか、16S rRNA遺伝子による細菌の分類を、Ribosomal Database Project IIの"Classifier" (<http://rdp.cme.msu.edu/>) を用いておこなった。

3) 表層土壌攪乱が微生物群集に及ぼす影響

a. サンプリング地点

土壌攪乱実験は北海道大学苫小牧研究林315試験地で行った。苫小牧研究林はミズナラ、カエデなどの広葉樹林で構成されており、林床に笹類が少ないのが特徴である。水はけが非常によく表土は5~10cmときわめて薄い。この地域の自然攪乱は火山噴火と台風があり、本実験は1981年台風5号による倒木のため開けた箇所で行った。

b. 降水中の細菌群集の解析

まず、土壌への流入を把握するため、試験区に2007年10月から2008年10月まで約2週間間隔で林内、林外に設置した集水器から降水試料を採取した。全細菌数をSYBR Green I 染色¹⁰⁾により計数した。また、それぞれの試料からDNAを抽出し、気温下降期(10月~1月)、低温安定期(雪、1月~3月)、気温上昇期(4月~7月)、高温安定期(7月~10月)の季節毎4期にまとめ、ドメイン・バクテリアの16S rRNA遺伝子についてクローニング・シーケンス解析および末端制限断片長多型(T-RFLP)解析を行った。

c. 土壌水中の細菌群集の解析

つぎに、苫小牧研究林315試験地の表層土壌の状態が異なる5つの区画、森林コントロール土壌(2008年7月3日、7月6日採取)、何も処理しない無処理区(2009年10月12日~15日)表層生態系を剥離した地表剥ぎ取り区(2008年7月14日~16日、2009年9月23日~25日)、土壌を押し固めることにより土壌動物の活動を抑えたTOEF土壌プレス区1、2(2008年8月1日~3日、2009年9月23日~25日)それぞれ深度約3m埋没したA層直上から土壌水を採取した。採取にはドイツ製土壌水採水器(孔径20 μ mフィルター)を用い、270年前の噴火で埋没した旧A層(約3m深)直上の土壌水を得た。ただし、土壌水中には細菌数が 10^4 cells/mLのオーダーで非常に少なく、かつ一度に多くの採水量が確保できないため、採取から2~3日間冷蔵で保管後DNAを抽出した。また、土壌水回収直後およびDNA抽出時の細菌数を計数した。抽出したDNAをドメイン・バクテリアの16S rRNA遺伝子についてクローニング・シーケンス解析および末端制限断片長多型(T-RFLP)解析を行った。

(3) 森林土壌における微生物多様性と脱窒機能の解析

1) 森林土壌(G1-W、G31-A)の採取と現場環境の把握

前述した研究サイト(桐生試験地)のG1地点とG31地点の表層土壌(土壌の上面の大きな植物残渣は除く)を土壌表層から2cm採取した。湿潤なG1地点から採取した土壌をG1-Wとする(G31-Aについては前述)。土壌の環境特性は、各態窒素含量、pH、EC(電気伝導度)、水分含量により記述した。

2) 安定同位体(¹⁵N)を用いたトレーサー実験による脱窒活性の測定

採集した土壌の乾土3g分をバイアルに入れ、滅菌水5mLを添加した。バイアル内を嫌気状態に

したのち、 ^{15}N で標識された硝酸塩または亜硝酸塩水溶液を1 mMとなるよう添加した。また、溶存酸素が1 mg O_2/L となるよう酸素を注入した微好気環境において試験を行った。経時的にバイアル内に生成される窒素ガス ($^{30}\text{N}_2$ 、 $^{46}\text{N}_2\text{O}$) をガスクロマトグラフィー質量分析計によって測定した。

3) 二種類の亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirK*、*nirS*) を用いた脱窒細菌群集構成の解析

土壌抽出DNAを鋳型として*nirK*および*nirS*遺伝子断片をPCR増幅させ、クローニング後シーケンス解析を行った。*nirK*および*nirS*のPCR増幅には、それぞれ*nirK1F-nirK5R*、*nirS1F-nirS6R*のPCRプライマーペアを用いた¹¹⁾。OTU (Operational Taxonomic Unit) はDOTURソフトを用いて塩基配列の5%差異により区切り、データベース上の塩基配列との相同性を検索し、系統樹を作成した。

(4) 地下圏が土壌に及ぼす影響

1) 埋没A層における細菌群集の解析

苫小牧研究林315試験地の表土より約3m深にある270年前の噴火で埋没した旧A層の土壌からDNAを抽出し、ドメイン・バクテリアおよびドメイン・アーキアについて16S rRNA遺伝子をターゲットにPCR増幅を行い、上述の方法でT-RFLP解析とクローニング後シーケンス解析を行った。

2) 埋没A層におけるメタン生成活性

苫小牧研究林315試験地において、2008年5月3日、埋没A層 (A3層) およびさらにその下層のA層 (A4層)、および溪流近くにてむき出しになったA4層から土壌を汚染がないよう注意深く採取した。採取した土壌5 gを窒素置換したグローバック内でバイアル瓶に入れた後、密栓しバイアル瓶内を真空にした。土壌水に溶かした基質 (20 mM酢酸、ギ酸、メタノール) 5 mLを添加し窒素を充填および、土壌水5mLを添加しヘッドスペースを二酸化炭素/水素に置換した。バイアル瓶内を2.5気圧まで加圧し、培養温度25°C、暗所、嫌気条件で140日間培養を行った。経時的にバイアル瓶の気相100 μL を採取し、ガスクロマトグラフィー (GC-2014, SHIMADZU, Japan) でガス分析した。

4. 結果・考察

(1) 森林土壌における細菌群集の多様性の解析

1) 桐生試験地における環境データ

2006年8月12日G31-A土壌における環境データは、土壌温度は22.5°C、pH 3.84、EC2.67 S/m、含水率22.1%であった。pHは一般的な森林土壌と同様の弱酸性であった。また、TC 97 g/kg.dry.soil、TN 4.46 g/kg.dry.soil であり、C/Nは21.8と高く、有機物の分解が進んでいないことが示唆された。これはA₀層直下の土壌のため腐植酸の影響を大きく受けたことによると考えられる。

2) 森林土壌における遺伝子解析

a. 森林土壌における多様性指数とOTUの検出率

クローニング-シーケンスでは、G31Aの184クローン、G31Bの189クローン、風化岩石の199クローン、降下細菌の96クローンを解析した。表1には相同性97%と99%の際の検出OTU数、Chao1、Shannon-WeinerとSimpsonの多様性指数を示した。なお、降下細菌は解析クローン数と検出OTU数

が少ないため、Chao1とShannon-Weiner、Simpsonの多様性指数は算出していない。G31Aにおける相同性97%でまとめた場合の多様性はShannon indexで4.28、Simpson indexで62.といずれも先行研究と比較して高い値を示した。検出されたOTUの数は90で、Chao 1で示された現場群集に含まれるOTUの推定数175の51.2%であった。しかしながら、20,000クローン以上解析してもまだ検出OTU数が増加するという報告¹²⁾もあり、土壌微生物の解析において全OTUを検出するのは不可能に近い。また、検出率が51.2%ならば、現場環境において優占している種は検出できていると考えられる。

また、相同性97%以下ではG31B>風化岩石>G31A順にOTU検出数が推移した。しかし、OTU検出数のサンプル間での傾向は、相同性99%ではG31B>G31A>風化岩石となった。同様にShannon-WeinerとSimpson両多様性指数でも相同性97%から99%でG31B>風化岩石>G31Aの順からG31B>G31A>風化岩石への変化が見られた。相同性の判定基準を97%から99%と厳しくすると、G31B、風化岩石に比べG31Aでは複数のクローンからなるOTUの減少割合が大きかった。これはG31Aにおいて検出されたクローンには、1~2%以内の16S rRNA遺伝子配列の差を持つものが多く存在していることを示す。一方、風化岩石では3%以上の遺伝子配列の差を持つクローンが多く存在していることがわかる。このことがG31Aと風化岩石の相同性97%から99%の間における多様性指数の大小の逆転の原因になっていると考えられる。すなわち、相同性1%の違いによってくくりが変化するOTUが相同性99%におけるG31Aの多様性の高さとして現われたといえる。

表1. OTUをくくる16S rRNA遺伝子配列の相同性とOTUの多様性と豊富さ(richness)の推定値.

サンプリング地点	相同性 判定基準 (%)	クローン数	検出OTU数	推定OTU数	Coverage	多様性指数	
				Chao 1	(%)**	H'	1/D
G31A	97	184	90	176 (137, 252)*	51.2	4.28	62
G31B		189	101	172 (141, 231)	58.7	4.47	105
風化岩石		199	95	158 (131, 212)	60.1	4.40	89
降下細菌		96	5	-	-	-	-
G31A	99	184	123	243 (191, 337)	50.6	4.64	137
G31B		189	130	238 (191, 318)	54.6	4.76	255
風化岩石		199	117	250 (189, 363)	46.8	4.53	102
降下細菌		96	10	-	-	-	-

* 95%信頼区間を示す.

**検出OTU数/Chao1 × 100

なお、本研究において特に注目した16S rRNA遺伝子配列の相同性97%と99%について補足しておく。Stackebrandt and Goebel⁴⁾においては、16S rRNA遺伝子配列の相同性が97%以下ならほぼ確実にゲノムDNA配列の相同性は70%以下であるという微生物種の遺伝子解析上の操作定義がなされており、97%ルールとして広く使用されてきた。しかし、16S rRNA遺伝子配列のデータベースの充実により、新しい知見では、操作定義は相同性が98.7~99%以下ならほぼ確実にゲノムDNA配列の

相同性は70%以下とより相同性レベルを厳しくすべきという提案がなされている¹³⁾。

b. 森林土壌G31A層における細菌群集構成

群集構造解析の結果を図4に示す。*Acidobacteria*が最も優占し、次に α -*Proteobacteria*が優占した。最も優占した*Acidobacteria*は単離菌株が3つしか得られておらず、そのため知見が少ないのが現状である。しかしながら、*Acidobacteria*は多くの環境の土壌で検出され、優占している¹⁴⁾ことが報告されている。また、 α -*Proteobacteria*には根圏細菌として知られる*Bradyrhizobium*に近縁なクローンがみられ、このことから共生窒素固定細菌がG31地点のA層に存在する可能性が示唆される。その他、土壌からよく分離される*Verrucomicrobia*やアンモニア酸化細菌に近縁なクローンも見られた。

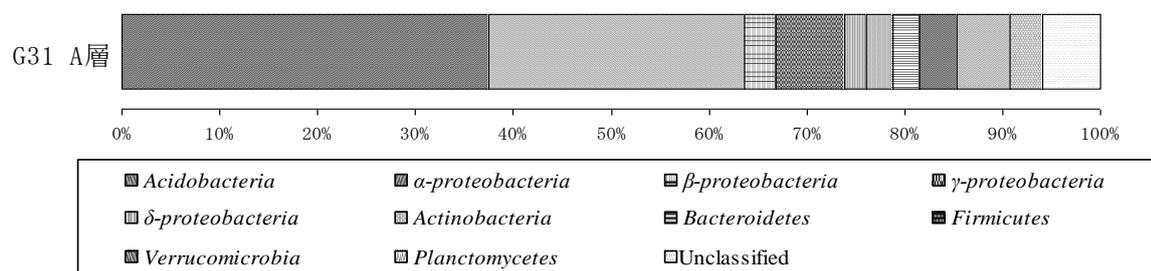


図4. G31地点A層の細菌群集構成. クローン解析より検出された細菌の門、および綱を示す。

c. 門レベルおよび綱レベルでの細菌群集構成

門レベルおよび綱レベルでの細菌群集構成を表2に示した。G31AとG31B、風化岩石において*Acidobacteria*門と*Proteobacteria*門が最も優占しており、この2つの門で各サンプルにおいて得られたクローン全体の64~76%を占めていた。得られたクローン全体に対する*Acidobacteria*門の割合は、G31Aでは38%、G31Bでは39%、風化岩石では31%であった。また*Proteobacteria*門の割合は、G31Aでは39%、G31Bでは35%、風化岩石では33%とそれぞれの占有割合は似た傾向にあった。*Proteobacteria*門の中では α -*Proteobacteria*が最も優占しており、これもG31AとG31B、風化岩石で共通した傾向であった。加えて、これら以外の検出頻度の低い分類群においても3サンプル間で検出される門はほぼ共通しており、風化岩石において*Cyanobacteria*門と*Nitrospira*門が検出された点のみが異なった。また、風化岩石とG31Bは検出されたクローンの約20%が門レベルの分類群を決定できず、G31Aの分類群を決定できなかったクローンの割合6%を大きく上回った。このことは、風化岩石とG31Bに門レベルの大きな分類群でも類縁する細菌の記録がない未知の細菌が多く存在する可能性を示唆しており、これらの環境に対する知見の少なさが表れている。目レベルで分類群が決定できなかったクローンはG31Aで30、G31Bで55となり、風化岩石では77クローンと全解析クローン数の39%を占めた。目レベルで分類が決定されたクローンのうち、 β -*Proteobacteria*に属したクローンは3地点間で分類された目が異なり、分類レベルを高くすると3地点間の違いが明らかになった。一方、降下細菌は他の3サンプルとは異なった群集構成を示し、96クローン中90クローン(94%)が β -*Proteobacteria*に属した。またこの90クローンは目レベルでも単一の分類群(*Burkholderiales*)に属した。森林内の空気中を飛散する細菌は限られた群集構成であったといえよう。

表 2. 目レベルでの系統分類と各分類群に分類されたクローン数.

門(亜門)	目	G31A	G31B	風化岩石	降下細菌
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteriales</i>	69	74	62	/
<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	2	2	3	4
	<i>Caulobacterales</i>	1	2	1	×
	<i>Rhizobiales</i>	31	15	9	×
	<i>Rhodospirillales</i>	12	15	14	×
<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	1	×	6	×
	<i>Burkholderiales</i>	4	6	×	90
	<i>Nitrosomonadales</i>	×	3	×	×
<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Legionellales</i>	1	×	×	/
	<i>Xanthomonadakes</i>	5	×	×	/
<i>δ-Proteobacteria</i>	<i>Myxococcales</i>	1	3	8	/
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteriales</i>	2	2	×	/
	<i>Rubrobacteriales</i>	1	2	7	/
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Shingobactetiales</i>	5	1	3	2
<i>Fimiiutes</i>	<i>Bacillales</i>	4	3	×	/
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	10	5	2	/
<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetales</i>	6	2	10	/
<i>Cyanobacteria</i>	-	/	/	2	/
<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospirales</i>	/	/	1	/

(2) 土壌改変が細菌群集に及ぼす影響

1) 栄養塩添加効果モデル実験

栄養塩添加によるT-RFLP解析結果を図5に示した。G31-Aについては15から18のピークが検出され、蛍光強度、ピークパターンともに培養前、培養6週目、12週目において変化は見られなかった。一方G31-BについてT-RFLP解析を行った結果、栄養塩添加により培養期間中で蛍光強度、ピークパターンともに大きく変化し、培養12週目のピークパターンは培養前のG31-A層のものと類似していた。これは、G31-BではG31-Aにおいて優占していた分類群が活性の低い状態で存在している可能性を示唆し、それらの分類群は栄養塩添加という環境変化により、T-RFLP法で検出可能なレベルまで群集内で優占することができたと推定された。7つのピークがG31-Bライブラリーのクローンと一致し、培養前に最も大きな存在度を示したピークは*Verrucomicrobia*門に分類される bacterium Ellin516に近縁なクローンと一致していた。培養6週目は大きな3つのピークが存在しその一つが培養前と同じbacterium Ellin516に近縁なクローン(相同性92%)であった。第3番目のピークは180bp付近の*M. trichosporium*に近縁なクローン(相同性97%)であった。さらに培養12週目の最も大きなピークは、*M. trichosporium*に近縁なクローンと一致するピークに変化した。

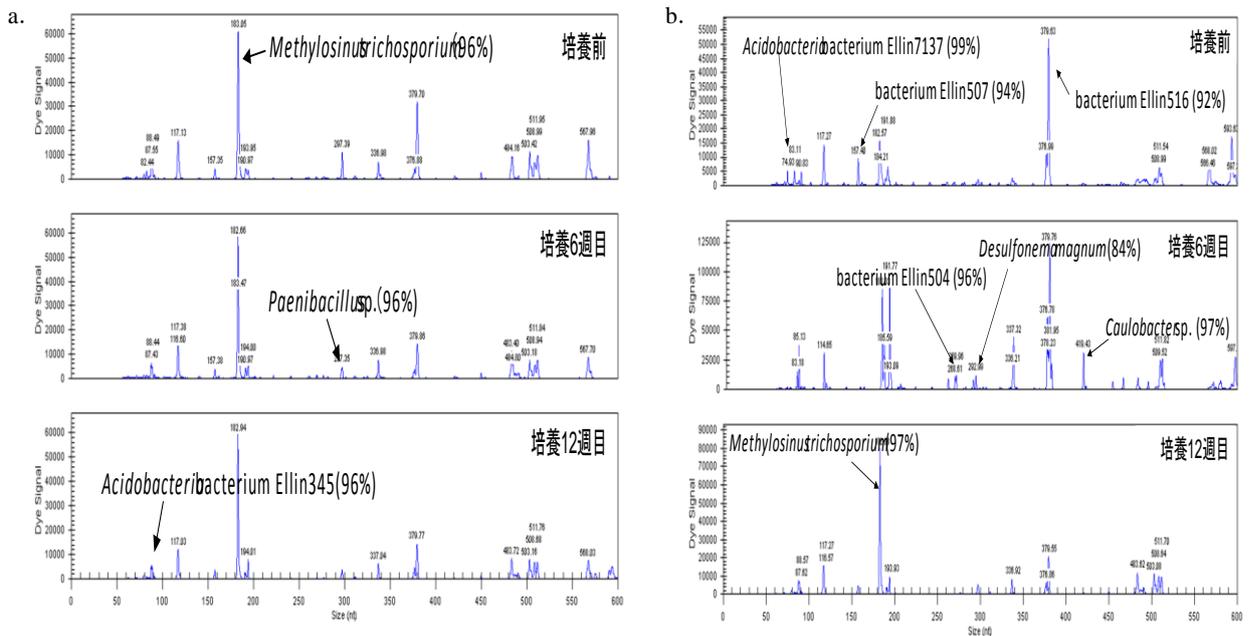


図5. G31-A (a.) およびG31-B (b.) における栄養塩添加によるdomain Bacteria群集構造の変化—T-RFLP解析結果 (*Hae*III切断) .

2) 土壤動物効果モデル実験

a. キシャヤスデ導入による土壤細菌群集の変化

桐生土壤においてキシャヤスデを飼育した際の土壤細菌群集のT-RFLP解析結果を、図6に示した。G31-Aにおけるキシャヤスデ飼育前後において、T-RFLPのピークパターンの大きな変化を示さなかった。このことと栄養添加実験の結果を併せると、G31-Aの微生物群集は環境の変動に対して安定な状態を保つことを示唆している。また、キシャヤスデの消化管内容物のピークパターンは飼育前・後どちらも異なっていたが、ピークのほとんどが飼育前の土壤に存在した。また、土壤におけるピーク数が多く検出された*Msp* I切断のピークとG31-Aライブラリーのクローンと一致したピークは4つで、飼育前後の土壤の3番目に高いピークとメタンやメタノールを炭素源として利用する好気性の従属栄養化学合成細菌である*Methylosinus trichosporium*¹⁵⁾と同一性が96%であるクローンと同一であると推定されたが、このピークはキシャヤスデの消化管内容物では検出されなかった。一方、消化管内容物で2番目に高いピークとBacterium K-5b2に94%同一性を持つクローンが一致した。

G31-Bにおいては、キシャヤスデの飼育前後で土壤において出現したピーク的位置に変化は見られなかったが、ピーク間での相対的な存在度が変化した。310bpと370bpのピークはキシャヤスデの消化管内容物において相対的に高い存在度を示しているピークと一致していた。キシャヤスデの消化管内容物の、ピークのほとんどが飼育前の土壤に存在した。これは、キシャヤスデによりG31-Bの土壤細菌の存在割合が変化することを示している。G31-Bにおいて*Msp* I切断のピークとG31-Bライブラリーのクローンと一致したピークは5つであった。土壤において最も高いピークはbacterium Ellin507と同一性94%のクローンであった。また、消化管内容物において高いピークを示した2つのピークはAcidobacteria bacterium Ellin7137(同一性94%)とbacterium Ellin5121(同一性

92%)に近縁のクローンと推定された。

また、G31-A、G31-Bにおけるキシヤヤスデ消化管内容物のT-RFLPパターンを比較すると、ピークの高さはそれぞれの試料で異なるが、ピークの位置はほとんど一致していた。

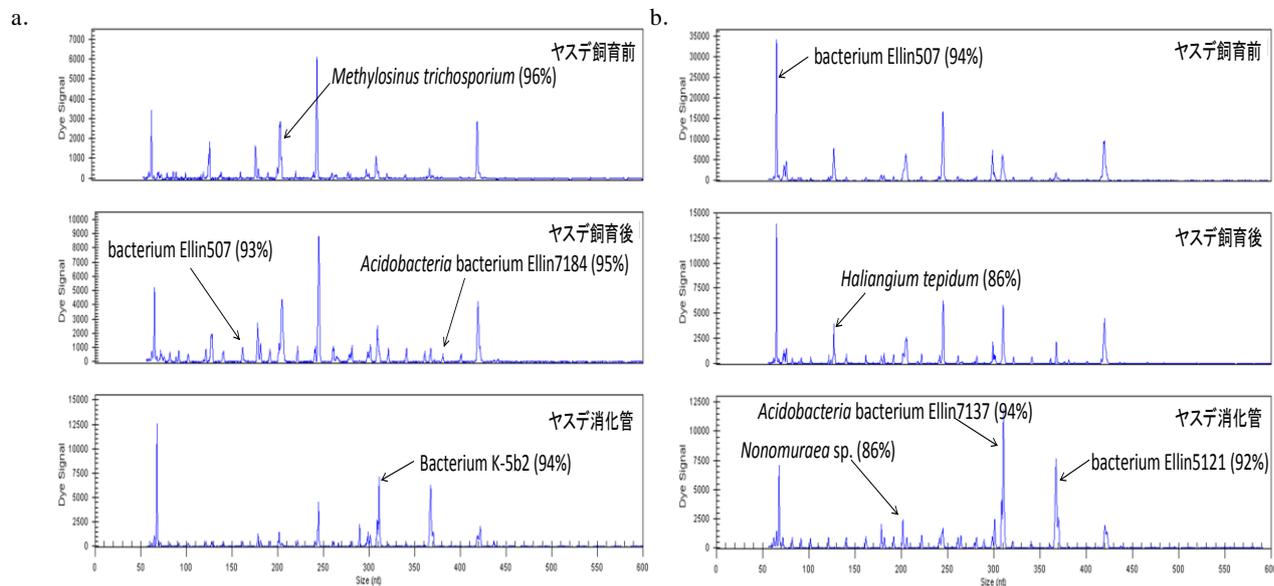


図6. G31-A (a.) およびG31-B (b.) におけるキシヤヤスデ飼育によるドメイン・バクテリア群集構造の変化—T-RFLP解析結果 (*MspI*切断)。

b. キシヤヤスデ消化管内容物中の細菌群集の解析

キシヤヤスデ消化管内容物からDNAを抽出し、クローニング-シーケンスを行い、塩基配列が決定できた63クローンについて、クローン解析を行った。Classifierによる細菌群集構成を図7に示した。前述のG31-Aに比べて、*Firmicutes*門に分類されたクローンの割合が44.4%と多く、そのほとんどは*Clostridea*に分類された。次に*Acidobacteria*が14.3%であった。A層土壌で多く検出された α -*proteobacteria*は3.2%と非常に少なく、土壌とは異なり嫌気性菌が目立つ特異な群集構成であることが明らかにされた。また、BLAST解析の結果、最も近縁なクローンが腸内消化過程に寄与する腸内菌*Clostridium methylpentosum*¹⁶⁾ (*Firmicutes*、相同性91%)、硝酸還元能を持つ嫌気性粘細菌である*Anaeromyxobacter dehalogenans*¹⁷⁾ (δ -*proteobacteria*、相同性89%)、鉄還元菌能を持つ*Geothrix fermentans*¹⁸⁾ (*Acidobacteria*、相同性91%)、また、腸内細菌である*Enterobacter* sp. 638 (99%)であるクローンが検出された。これらのクローンがキシヤヤスデ消化管内においてどのような役割をはたしているかについては、さらなる研究が必要である。

細菌群集が異なることが明らかとなった。気温の上昇により樹冠において降雨に取り込まれる細菌として γ -*proteobacteria*が増大するのではないかと推察される興味深い知見が得られた。また、高温安定期では、森林内外ともに α -*proteobacteria*が出現しており、季節により降水として持ち込まれる細菌群集に変化があることが示唆された。

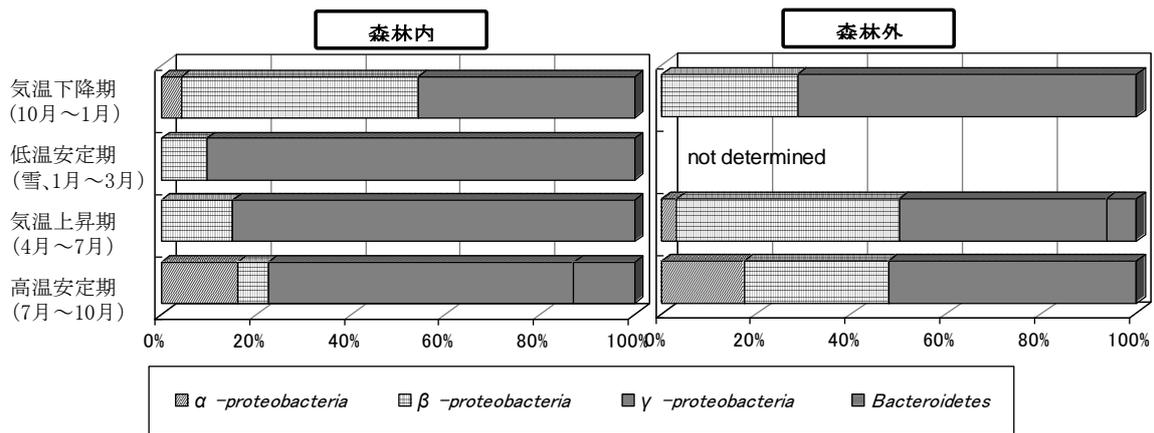


図 9. 苫小牧研究林 降水中の細菌群集構成.

b. 土壌水中の細菌群集構成

苫小牧研究林の表層土壌を剥離した区、プレス区、無処理区の土壌水を採取した。土壌水中の細菌数は、 $6.87 \times 10^4 \sim 3.23 \times 10^5$ cells/mLであった（表 3）。DNAを抽出しクローニング・シーケンス解析を行ったが、剥ぎ取り区およびプレス1区でPCR増幅ができなかった。これは、DNA抽出時の細菌数が 1.37×10^5 cells/mLおよび 5.00×10^5 cells/mLであり、十分なDNA量が回収できなかったためであると考えられた。PCR増幅のできた無処理区とプレス区についてクローン解析した結果を図10に示した。無処理区では β -*proteobacteria*が優占したが、プレス区では α -*proteobacteria*が優占し、細菌群集構成が大きく異なっていた。これは、表層土壌が地下環境に影響を与えることを示唆する。

表 3. 苫小牧研究林 土壌水中の細菌数.

地表土壌	試料採取日	固定および処理日	TDC(cells/mL)	DNA解析用
2008年				
コントロール土壌	7月3日	7月3日	$7.05 \times 10^4 \pm 1.04 \times 10^4$	
		7月5日	$1.08 \times 10^6 \pm 1.24 \times 10^5$	750mL濾過
コントロール土壌	7月6日	7月6日	$2.94 \times 10^5 \pm 4.77 \times 10^4$	
		7月9日	$1.25 \times 10^6 \pm 2.77 \times 10^5$	750mL濾過
地表剥ぎ取り区	7月14-16日	7月16日	$6.87 \times 10^4 \pm 1.88 \times 10^4$	
		7月18日	$1.37 \times 10^5 \pm 4.26 \times 10^4$	600mL濾過
TOEF土壌 press1	8月1-3日	8月3日	$2.72 \times 10^5 \pm 7.45 \times 10^4$	
		8月6日	$5.00 \times 10^5 \pm 1.09 \times 10^5$	約500mL濾過
TOEF土壌 press2	8月1-3日	8月3日	$3.23 \times 10^5 \pm 7.24 \times 10^4$	
		8月6日	$1.40 \times 10^6 \pm 3.95 \times 10^5$	約500mL濾過

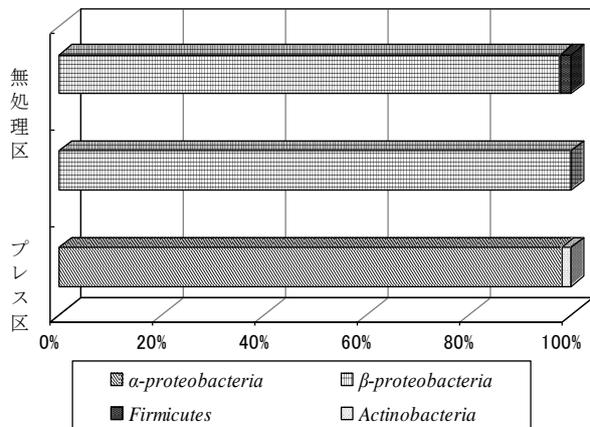


図 10. 苫小牧研究林 土壌水中の細菌群集構成.

c.降水および土壌水中の細菌群集T-RFLP解析結果

降水および土壌水中の細菌群集のT-RFLP解析結果を図11に示した。参考に苫小牧研究林2008年5月に採取した土壌および、地中に埋没した有機物層（埋没A層）のT-RFLP解析結果を載せた。土壌では70から100以上のピークが検出されたが、降水、土壌水試料のピークは少なく、土壌に比べ群集構成は単純であることが示唆された。降水試料にみられたピークが土壌においても検出され、流入した細菌群集が土壌に存在することが確認された。さらに埋没A層においても同様に検出されたピークがあり、水の流れとともに移動している個体群が存在することを示した。また、2008年プレス区ではクローン解析と同様、森林区と全く異なるピークパターンを示し、土壌の物理的攪乱が土壌水中の細菌群集構成に影響を及ぼしていることが示唆された。さらに、攪乱から1年後植生がやや回復していた2009年のプレス区では、2008年プレス区とピークパターンは異なり、保全区と類似してきていた。その他、森林内にのみピークのみられるものなど、各個体群の挙動が異なることが確認でき、この手法は、表層土壌の物理的攪乱が細菌群集に与える影響について探る手法となり得ると考えられた。

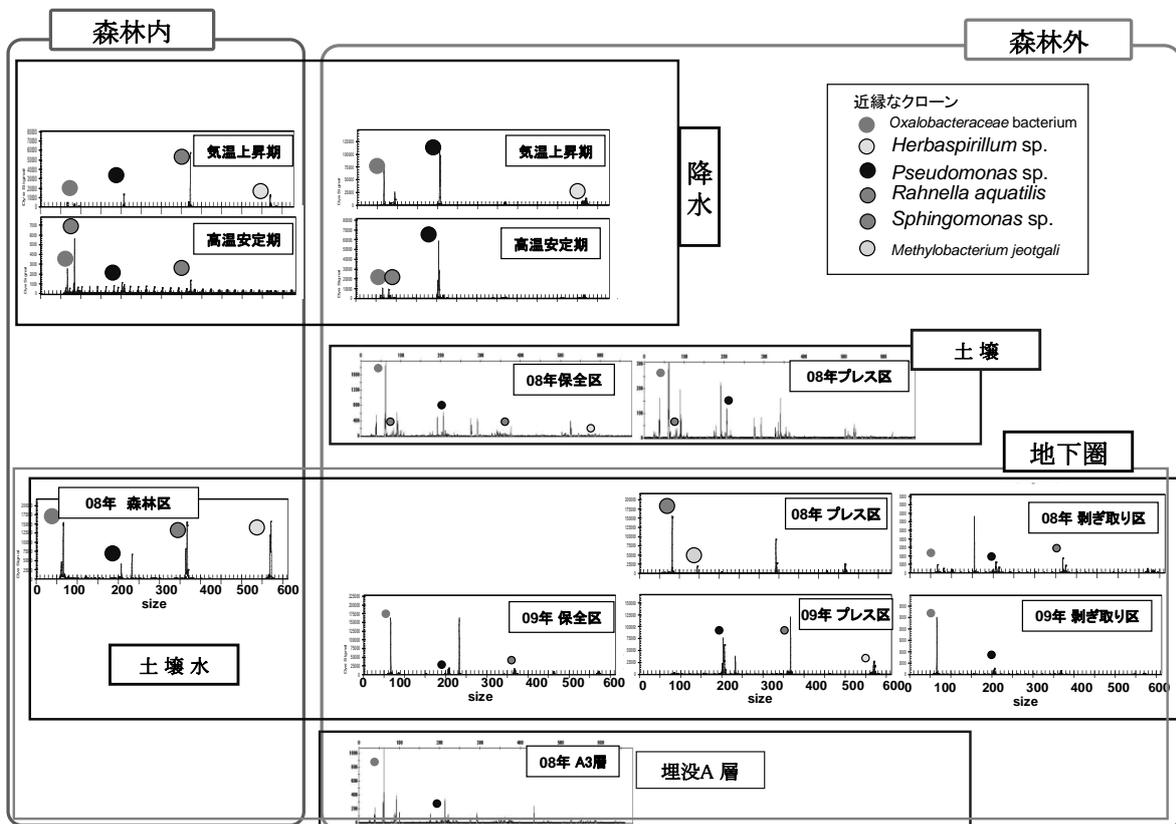


図11. 苫小牧研究林 降水、土壌および土壌水中のBacteria群集のT-RFLP解析結果（*Hha*I）。

(3) 森林土壌における微生物多様性と脱窒機能（桐生試験地）

1) 環境データ

2006年5月16日から2008年5月17日までの環境データをまとめた結果、土壌の含水率は斜面下部のG1-W (62.17-70.31%)の方が上部のG31-A (23.61-57.89%)よりも高かった ($p < 0.05$) (表4)。また、pHはG31-A (5.74 ± 0.30)の方がG1-W (4.05 ± 0.21)よりも低かった ($p < 0.05$)。無機態窒素、

アンモニア態窒素に変動がみられたが亜硝酸態・硝酸態窒素は低濃度または検出限界以下であった。

地下水面の高いG1地点では、表層土壌の水分含量が高かった。無機態窒素に関しては、アンモニア態窒素に変動がみられたが亜硝酸態・硝酸態窒素は低濃度または検出限界以下であった。梅雨後（2007/7/13）には現場において水分がほぼ飽和状態であり硝酸態窒素が検出されなかったことから、土壌がより還元的な環境になり脱窒の促進もしくは硝化の抑制が起こっていたと考えられる。

表 4. G1-Wet土壌の環境データ.

	温度 (°C)	pH	EC (mS/m)	含水率 (%)	NH ₄ ⁺ -N (μg/g 乾土)	NO ₂ ⁻ -N (μg/g 乾土)	NO ₃ ⁻ -N (μg/g 乾土)
2007/6/11	16.2	5.41	2.26	64.75	8.48	N.D.	1.81
2007/7/13	21.3	6.19	7.79	70.31	57.9	N.D.	N.D.
2008/1/24	0.7	5.62	5.40	69.88	Not yet	Not yet	Not yet
2008/2/11	0.0	5.87	5.10	68.99	Not yet	Not yet	Not yet

2) 安定同位体 (¹⁵N) を用いたトレーサー実験による脱窒活性の測定

トレーサー実験を用いることでG1-Wet土壌の脱窒活性を非常に高い感度で測定することができ、酸素条件と添加基質の種類によって脱窒活性に違いが生じることが示された（図12）。硝酸塩を添加後すぐに³⁰N₂および⁴⁶N₂Oが観察されたことから、硝酸からN₂までの一連の脱窒過程が素早く進行していることがわかった。溶存酸素1 mg O₂/Lの環境では硝酸からN₂まではすぐに還元されるものの嫌気条件より活性が抑制された。

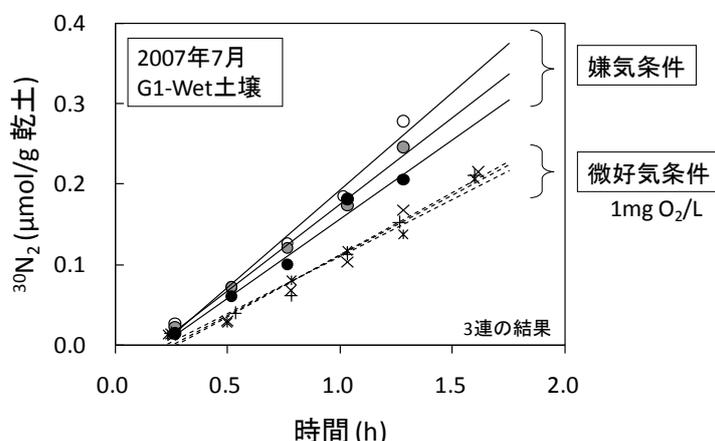


図 12. G1-Wet土壌における脱窒活性.

また、G1-W、G31-A両方の土壌において測定を行い、総合的に考察した。2007/6/11から2008/5/11までのサンプリングにおいて、無酸素条件下で硝酸塩を添加した場合のN₂およびN₂O生成速度は、G1-Wでは254–505 nmol (³⁰N₂+⁴⁶N₂O)g⁻¹ dry soil h⁻¹、G31-Aでは2.73–3.60 nmol (³⁰N₂+⁴⁶N₂O) g⁻¹ dry soil h⁻¹ となり、脱窒活性はG1-WがG31-Aに比べ2桁高いことが示された。G1-Wでは硝酸塩を添加後すぐに³⁰N₂および⁴⁶N₂Oが観察されたことから、硝酸からN₂までの一連の脱窒過程が素早く進行していることがわかった（図13）。G1-Wにおいて溶存酸素1 mg O₂/Lの環境では硝酸からN₂まで

すぐに還元されるものの無酸素条件より活性が抑制された。また、亜硝酸塩を添加した場合G1-Wでは脱窒活性が弱まったが、G31-Aでは脱窒活性が高まり N_2O の蓄積がみられた。よって、G1-W、G31-Aでは脱窒微生物群集も異なることが予想された。

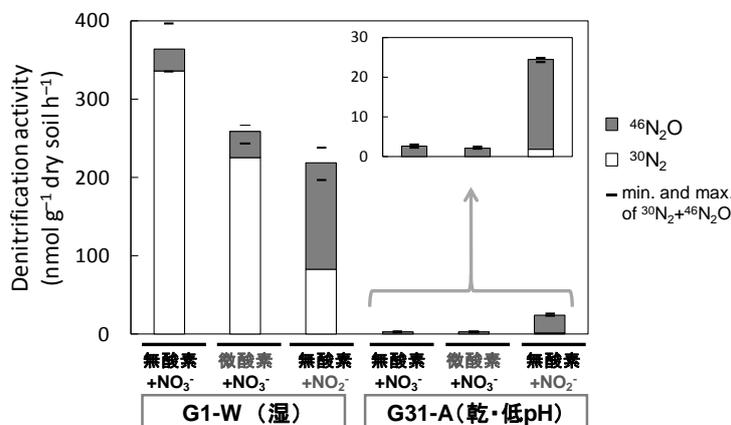


図 13. G1-W、G31-A 土壌における脱窒活性。

3) 亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirK*、*nirS*) を用いた脱窒細菌群集構成の解析

G1-W および G31-A の試料について機能遺伝子 *nirK*、*nirS* を標的として遺伝子解析を行い、脱窒細菌群集の構成について考察した。*nirK*、*nirS* ともに得られたクローンは、データベース上の既知配列との相同性が90%未満であった。よって既知の*nir*とは異なるこのサイト特有の配列であることが示された。*nirK*において、解析したG1-Wクローンの85%、G31-Aの98%を含む大きなクレードがみられ(図13a)、G31-Aの*nirK*の68% (27クローン) がこのクレード内の同一のOTUに含まれた。よって、G31-AのクローンはG1-Wよりも多様性が低く、クレード内の多様化はG1-Wにおいてみられた。大きなクレード内には既知のクローンが含まれないため、サイト特有の脱窒遺伝子が、この環境で多様化したと考えられる。G1-WとG31-Aとの*nirK*の違いは、水分やpHの受けてきた環境の違いによると考えられる。一方、*nirS*においてG1-Wのクローンは*nirS*系統樹上に広く分布した(図13b)。

また、G31-Aでは*nirS*が検出されなかった。これは低pHにより多様性やアバンダンスが低かったためと考えられる。*nirS*は科や属レベルで16S rRNA遺伝子の分布と一致するという報告がある¹⁹⁾ため、観察された*nirS*を持つクローンが系統分類的にも多様であることが示唆された。系統の違いによる生理特性の多様さがあるとすれば、個体群としての応答に差異が期待されるであろう。その場合にはじめて、細菌における多様性がただちに生態系機能(サービス)の多様化を支えていることが有意となろう。

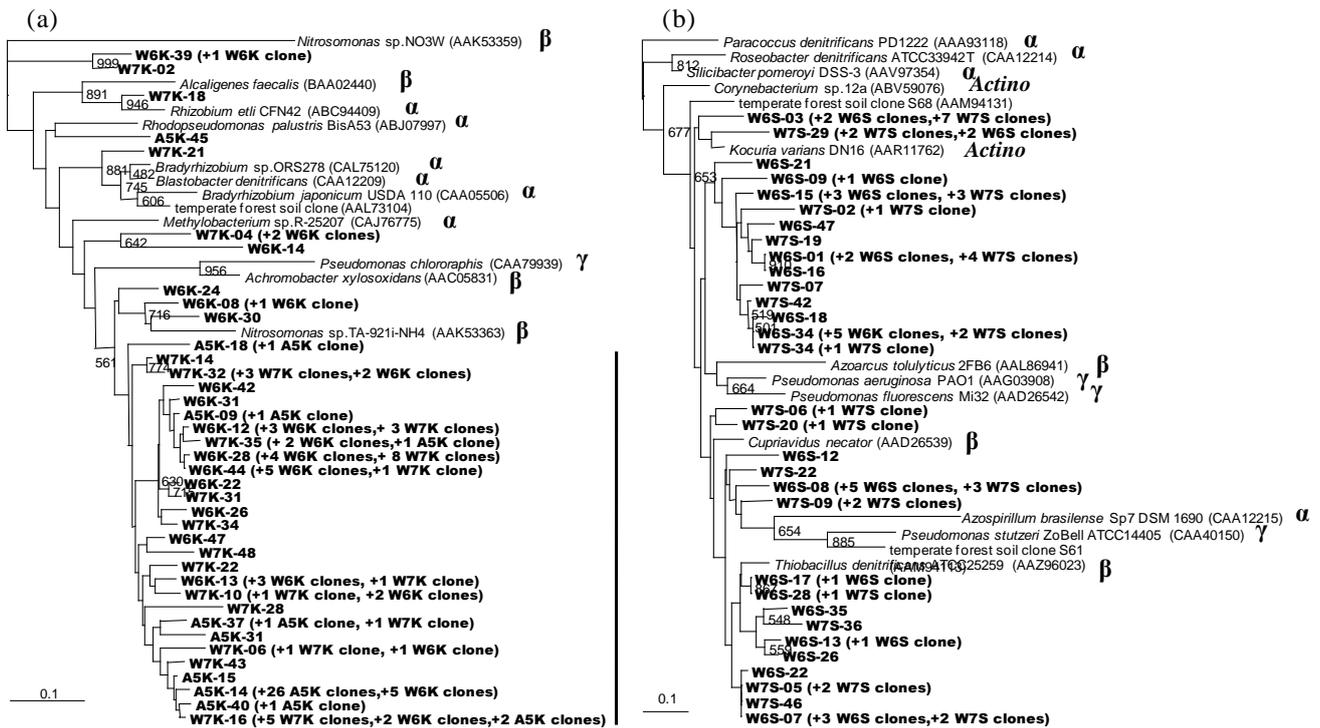


図 13. G1-WおよびG31-Aの細菌群集に含まれる *nirK* または *nirS* クローンのアミノ酸配列に基づいた系統発生的位置づけ：(a) *nirK*、(b) *nirS*。クローン名の W6 は 2007 年 6 月 11 日 G1-W、W7 は 2007 年 7 月 13 日 G1-W、A5 は 2008 年 5 月 17 日 G31-A のサンプルから得られたクローンを示す。[] 内は同一の OTU に含まれるクローンの数とサンプル、() 内は DDBJ のデータベース登録番号を示す。
 α : α -proteobacteria、 β : β -proteobacteria、 γ : γ -proteobacteria、Actino: Actinobacteria。

(4) 地下圏が土壤に及ぼす影響

1) 埋没 A 層における細菌群集の解析 (苫小牧研究林)

a. ドメイン・バクテリア

苫小牧研究林 315 試験地の表土より約 3m 深にある 270 年前の噴火で埋没した旧 A 層 (埋没 A 層) の土壤試料中のドメイン・バクテリアのシーケンス解析は 850~920 塩基、71 クローン行い、44 OTUs が得られたが、1 クローンで構成される OTU の割合が 64% と高かった。群集構成の割合を図 14 に示した。Acidobacteria (29.6%) および Firmicutes (18.3%) の占める割合が高かった。また、T-RFLP による細菌群集の構成を図 15 に示した。各 OTU の塩基配列と T-RFLP のピークパターンと照合した結果、16 OTUs がピークと一致した。BLAST 解析の結果、これらのクローンは、土壤より検出されている *Acidobacteria bacterium*、メタン酸化細菌である *Methylocystis heyerii*、鉄 (III) 還元菌である *Geobacter pelophilus* や *Desulfuromonas palmitatis*、*Bacillus* sp. など最も近縁なクローンを持つものであった。9.9% の割合であった硝化細菌群を含む *Nitrospira* sp. は、T-RFLP 解析のピークには合致しなかった。

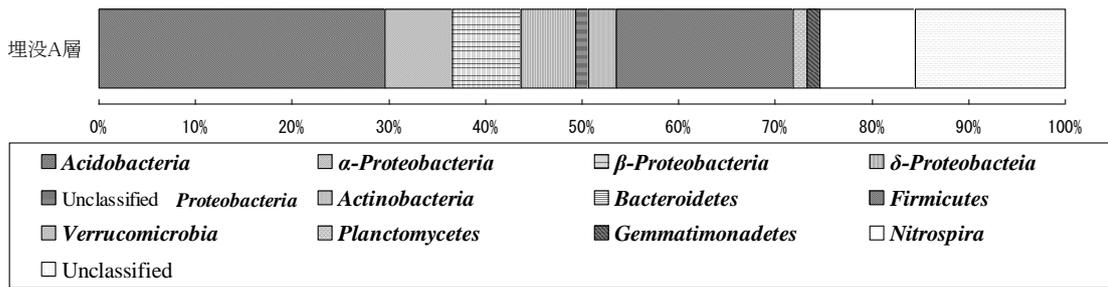


図 14. 埋没A層におけるドメイン・バクテリアの群集構成. クローン解析より検出された細菌の門、および綱を示す.

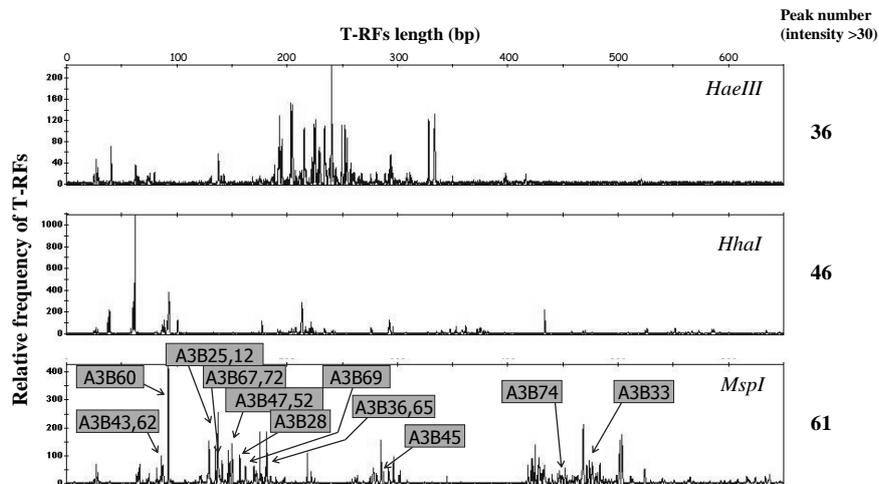


図 15. 埋没A層におけるドメイン・バクテリアT-RFLP解析結果.

b. ドメイン・アーキア

埋没A層土壌試料中のドメイン・アーキアに対して101クローンをシーケンス解析した結果、10 OTUs得られた。Blast解析結果を図16に示した。最も近い相同性を示したクローンで分類して

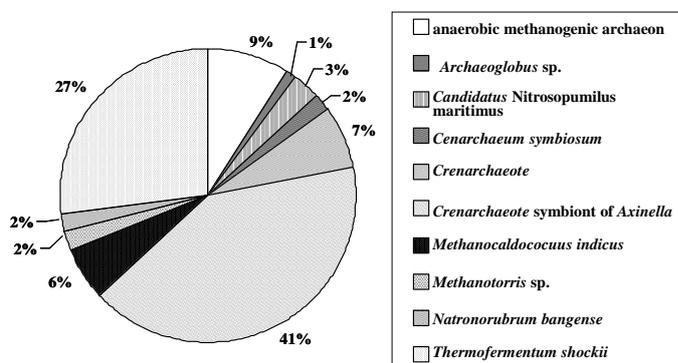


図 16. 埋没A層におけるドメイン・アーキアBLAST解析結果.

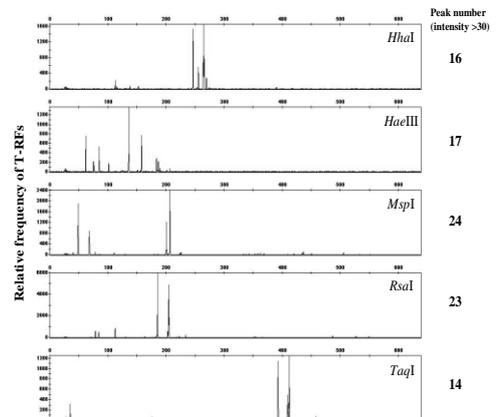


図 17. 埋没A層におけるドメイン・アーキアT-RFLP解析結果.

ある。海綿に共生するアーキア(41%)および*Thermofermentum shochkii* (27%)に近縁なクローンが優占していた。メタン生成菌である anaerobic methanogenic archaeon ET1-8株(9%)、*Methanocaldococcus indicus* (6%)および*Methanotorris* sp. (2%) に近縁なクローンが検出された。T-RFLP解析の細菌群集の構成を図17に示した。anaerobic methanogenic archaeon ET1-8株と近縁なクローンがT-RFLP解析のピークと一致し、メタン生成に関与する細菌が存在することが示された。ドメイン・バクテリアの解析結果と併せて、埋没A層内でメタン生成、酸化が行われている可能性が示唆された。

2) 埋没A層におけるメタン生成活性

埋没A層の細菌群集を解析した結果、メタン生成古細菌が検出された。そこで、メタン生成実験を行った。基質を加えて、140日間嫌気培養を行ったが、実験期間中どの試料からもメタンは検出できなかった。調べられた限りではこの土壌システムにおける鉛直方向の相互作用の可能性は限られたものであると推察された。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

土壌生態系を支える微生物作用の内、多様性が著しいと考えられる原核生物を対象に、物質循環において果たす機能と機能個体群が優占するメカニズムを、土壌動物との関係を考慮しつつ微生物多様性の視点から明らかにしようとする体系的な研究は類例が殆ど見当たらない。本研究は土壌中できわめて普通に生じている生物間相互作用である、微生物が土壌動物の消化管を通過するという現象の微生物群集構成に与える重要性を初めて明らかにした点に意義がある。

森林土壌を鉛直方向に詳細にみた場合、栄養塩濃度の変化や土壌動物の存在に対しては、土壌A層に比べB層の応答が顕著であることが分かった。これは、A層ではOTU内におけるクローンの多様性がみられたことと表裏の関係にあり、微生物のリザーバーとしてのB層の役割の大きさを示唆するものと考えられた。

微生物が発揮する機能と多様性については、高い脱窒活性を示す森林集水域末端の湿潤土壌で細菌の系統分類群における大きな多様性が認められた。このことが経年的な環境の変化に対し、高い脱窒活性を示し続ける微生物群集の基盤であると考えられた。

(2) 地球環境政策への貢献

地上部の生態系を維持する土壌生態系において、物質変換機能の発現とそれを支える微生物群集の多様性との関係を明らかにすることは、陸上生態系の恒常性維持ならびに失われた生態系の回復に対し根本的な知見を与える。

環境の変動に対し、最も素早く反応する原核生物の系統分類的多様性が生態系機能の高活性へ寄与する可能性を我が国の国土の66%を占めるといわれる森林の土壌を対象に明らかにした。この多様性を引き出す要因の一つに共存する土壌動物の効果が示された。温帯域における森林土壌の生態系サービスが生物多様性とその変動によって支えられていることを明らかにしつつある。これらの知見を一層深めることで、持続的な生態系の維持に向けての対応技術施策へ科学的根拠を与えうるであろう。

6. 引用文献

- 1) Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In G. Stackebrandt, E. and Goofellow M. eds. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, 115-175.
- 2) Muyzer, G., de Waal, E.C. Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 695-700.
- 3) Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.*, 22: 4673-4680.
- 4) Stackebrandt, E., Goebel, B. M. (1994) Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16s rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: 846-849.
- 5) Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, A., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.*, 25: 3389-3402.
- 6) Chao, A. (1984) Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Stat.*, 11: 265-270.
- 7) Shannon, C.E., Wiener, W. (1963) The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana.
- 8) Schloss, P.D., Handelsman, J. (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 1501-1506.
- 9) Simpson, E.H. (1949) Measurement of diversity. *Nature*, 163: 688.
- 10) Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., Vaulot, D. (1997) Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 186-193.
- 11) Braker, G., Fesefeldt, A., Witzel, K.-P. (1998) Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 3769-3775.
- 12) Roesch, L.F.W., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A.K.M., Kent, A.D., Daroub, S.H., Camargo, F.A.O., Farmerie, W.G., Triplett, E.W. (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal*, 1: 283-290.
- 13) Stackebrandt, E., Ebers, J. (2006) Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, Nov 06: 152-155.
- 14) Janssen, P. H. (2006) Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 1719-1728.
- 15) Bowman, J. P., (2001) Genus *Methylosinus*. In: Sneath, P. H. A., Holt, J.G., editors. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Volume 1. 417-420, Baltimore, Williams and Wilkins.

- 16) Himelbloom, B.H., Canale-Parola, E. (1989) *Clostridium methylpentosum* sp. nov.: a ring-shaped intestinal bacterium that ferments only methylpentoses and pentoses. Arch Microbiol., 151: 287-93.
- 17) Robert, A.S., James, R.C., James, M.T. (2002) Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halorespiring facultative anaerobic myxobacterium. Appl. Environ. Microbiol., 68: 893-900.
- 18) Coates, J.D., Ellis, D.J., Gaw, C.V., Lovley, D.R. (1999) *Geothrix ferrnentans* gen. nov., sp. nov., a novel Fe(II)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. Int. J. Syst. Bacteriol., 49: 1615-1622.
- 19) Heylen, K., Gevers, D., Vanparrys, B., Wittebolle, L., Geets, J., Boon, N. De Vos, P., (2006) The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. Environ. Microbiol., 8: 2012-2021.

7. 国際共同研究等の状況

- 1) 2007年6月19日～8月21日 JSPSサマー・プログラム外国人研究者としてCraig W Herbold (University of California, Los Angeles, PhD) を受け入れ、研究テーマ「土壌における細菌機能の遺伝子解析」に従って、脱窒関連遺伝子のプライマーの検討などを進めた。
- 2) 2009年10月20日 硝化菌を中心としたゲノム解析のアメリカのリーダーであるOregon State Universityの Daniel J. Arp 教授をお招きし、硝化作用に関する講演を静岡大学にて開催した。講演題目：Nitrification: Genomics and Interactions of Ammonia - Oxidizing Bacteria with Ammonia and Alternative Substrates

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表 <論文(査読あり)>

- 1) Katsuyama, C., Kondo, N., Suwa, Y., Yamagishi, T., Ito, M. Ohte, N., Kimura, H., Nagaosa, K., Kato, K. (2008) Denitrification activity and relevant bacteria revealed by nitrite reductase gene fragments in soil of temperate mixed forest. Microbes and Environments 23: 337-345. (論文賞受賞)
- 2) Katsuyama, C. Nakaoka, S., Takeuchi, Y. Tago, K., Hayatsu, H., Kato, K. (2009) Complementary cooperation between two syntrophic bacteria in pesticide degradation. J. Theor. Biol. 256: 644-654.

(2) 口頭発表(学会)

- 1) 近藤菜穂、勝山千恵、永翁一代、大手信人、木村浩之、加藤憲二(2007) Preliminary study of the contribution of microbes to the weathering of granite. 第23回日本微生物生態学会大会.
- 2) 近藤菜穂、勝山千恵、永翁一代、西澤智康、金子信博、加藤憲二(2008)森林土壌における微生物群集への土壌食動物の影響. 第24回日本微生物生態学会大会.
- 3) 近藤菜穂、勝山千恵、永翁一代、伊藤雅之、大手信人、加藤憲二(2008)土壌微生物群集の環境変動への応答と多様性. 第24回日本微生物生態学会大会.
- 4) Kondo, N., Katsuyama, C., Nagaosa, K., Ohte, N., Itoh, M., Kato, K. (2008) Diversity and community structure change in forest soil microbes. 7th International Symposium for Subsurface Microbiology (ISSM 2008). Shizuoka, Japan.

- 5) Katsuyama, C., Kondo, N., Ohte, N., Yamagishi, T., Suwa, Y., Kato, K. (2008) Denitrification activity and relevant players revealed by nitrite reductase gene fragments in wet soil and groundwater in a forest. 7th International Symposium for Subsurface Microbiology (ISSM 2008). Shizuoka, Japan.
(ポスター賞受賞)
- 6) Katsuyama, C., Kato, K. (2009) Denitrification activity and relevant players revealed by nitrite reductase gene fragments in forest system. International Symposia on Environmental Biogeochemistry 'Environmental Changes and Sustainability of Biogeochemical Cycling' Hamburg, Germany.
- 7) 勝山千恵、近藤菜穂、諏訪裕一、山岸昂夫、伊藤雅之、大手信人、木村浩之、永翁一代、加藤憲二 (2009) 森林地下水における脱窒活性と脱窒機能遺伝子 *nirK*, *nirS* による脱窒細菌群集構成. 第25回日本微生物生態学会大会.
- 8) 永翁一代、勝山千恵、近藤菜穂、村上正志、西澤智康、太田寛行、金子信博、加藤憲二 (2009) 地表部の攪乱が地下圏微生物にどのような影響をおよぼすのか. 第25回日本微生物生態学会大会.

(3) 出願特許
なし

(4) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)
7th International Symposium for Subsurface Microbiology (ISSM 2008). Shizuoka, Japan. 2008.
11.16-21 23カ国、240余名が参加。

(5) マスコミ等への公表・報道等
2010年4月17日放送のNHKサイエンス・ゼロに土壤微生物に関する情報提供。

(6) その他

- 1) 7th International Symposium for Subsurface Microbiology (ISSM 2008)においてポスター賞受賞 (2008年11月)
Chie Katsuyama, Naho Kondo, Nobuhito Ohte, Takao Yamagishi, Yuichi Suwa and Kenji Kato (2008) Denitrification activity and relevant players revealed by nitrite reductase gene fragments in wet soil and groundwater in a forest.
- 2) 日本微生物生態学会2009年度論文賞を受賞 (2009年11月)
Chie Katsuyama, Naho Kondo, Yuichi Suwa, Takao Yamagishi, Masayuki Ito, Nobuhito Ohte, Hiroyuki Kimura, Kazuyo Nagaosa, Kenji Kato (2008) Denitrification activity and relevant bacteria revealed by nitrite reductase gene fragments in soil of temperate mixed forest. *Microbes and Environments* 23:337-345.

F-073 土壌生物の多様性と機能に関する研究

(5) 生態系の生物多様性と生態系機能に関する研究

国立大学法人横浜国立大学

大学院環境情報研究院 金子信博

<研究協力機関> 駿河台大学経済学部 伊藤雅道

国立大学法人東京農工大学大学院共生科学技術研究院 楊宗興、木庭啓介

国立大学法人島根大学生物資源科学部 増永二之

国立大学法人筑波大学生命環境科学研究科 清野達之

平成19～21年度合計予算額 30,437千円

(うち、平成21年度予算額 9,752千円)

※予算額には、間接経費を含む。

[要旨] ミミズやヤスデなどの大型土壌動物の活動は、直接、有機物や土壌微生物を摂食するだけでなく、生息環境の土壌構造を改変している。このような間接的な影響は、炭素や窒素循環など生態系機能に影響することが予測できるが、これまで土壌生態系では評価されてこなかった。そこで、生態系改変者としての土壌動物が、微生物群集の変化を通して物質循環に与える影響を定量化した。苫小牧研究林の埋没A層を利用して土壌炭素集積速度を調べたところ、苫小牧では植生の発達により約6000年にわたって $3 - 17 \text{ g C m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ の速度で土壌炭素が集積していた。また、土壌表層の団粒量は土壌小型節足動物の個体数と正の相関があり、団粒を人為的に破壊すると、節足動物の個体数が回復せず、土壌呼吸や窒素無機化も処理後2年間にわたって低下し、伐採などの攪乱が土壌構造の変化を通して森林の機能を低下させていた。苫小牧研究林のミズナラ林でミミズの密度を低下させたところ、土壌表層の耐水性団粒が減少し、土壌炭素、窒素および栄養塩濃度が低下した。本州中部八ヶ岳周辺にしばしば大発生をおこすキシヤスデを飼育したところ、ヤスデの活動により土壌の炭素・窒素循環速度が促進され、その作用は土壌のみを摂食する幼虫に比べ、土壌と落葉を混食する成虫で特に大きくなった。温室効果ガスへの影響として、団粒形成が CO_2 放出と CH_4 吸収の増加という相反する作用を持つことが分かった。団粒構造が壊れることにより土壌の CH_4 吸収能力の劣化や CO_2 放出の増加を招くことが示された。不耕起草生栽培ではミミズが増加し、土壌団粒が増加していることが土壌炭素量を増大させるメカニズムとなっていた。農地土壌の変化は小型節足動物の個体数と多様性を向上させた。陸上生態系の生態系機能が土壌構造を形成する多様性要素を取り入れることで、微生物-土壌動物-植物の間の階層的な関係を整理でき、農地を含めた陸域生態系の多様性の保全が、地球環境変動に関わる生態系機能につながっていることを示すことができた。

[キーワード] 生態系機能、土壌、土壌動物、二酸化炭素、メタン

1. はじめに

ダーウィンによるミミズの研究以来、欧米では大型ミミズの活動が土壌の耕耘の役割を果たし、炭素集積や養分循環、生態系の生産性を改善することはよく知られてきた。しかし、植生や土壌

微生物、土壤動物の多様性とその機能について統合的に調べた例はない。一方、我が国では大型土壤動物の活動が生態系に及ぼす影響についての研究は少なく、ミミズをはじめとする大型土壤動物類の種のリストアップも十分ではない。火山灰土壤が広く分布する日本では地質の古い欧米とは土壤環境や土壤動物の種構成が異なるので、大型土壤動物類の活動が土壤の炭素や養分の動きに及ぼす影響について考える際、欧米での研究事例をそのまま当てはめることはできない。日本の大型土壤動物の種特性を明らかにし、実際の土壤環境における生態系機能を明らかにすることが、我が国の陸域における地球環境研究を進める上で重要である。

2. 研究目的

本研究では、土壤の主要な生態系改変者であり、糞団粒を形成するミミズ類と、ミミズ同様、土壤を食べ、生態系への影響が大きいと予測される節足動物ババヤスデ科の大型ヤスデであるキシヤスデを研究対象とし、土壤食が微生物群集に与える影響を明らかにし、また土壤のCO₂、N₂O、CH₄の温室効果ガスの動態および窒素の無機化がどの程度変化するかを明らかにすることを目的とした。また、動物の糞を起源とする土壤団粒の時間経過による構造や機能の変化を野外と実験室で観測し、生態系改変効果を評価した。

3. 研究方法

(1) 森林土壤炭素の集積速度

苫小牧研究林において樽前山の過去数度の噴火により埋没している土壤の炭素量を調べ、炭素集積速度を推定した。調査地は北海道大学苫小牧研究林319林班の土壤保全試験地周辺で、平坦な場所における重機を用いて地表面を掘削し、現世の地表面（A1層）、約270年前（A2層）、約310年前（A3層）、約2200年前（A4層）の噴火で埋没した旧地表面の土壤を採取し、容積重、全炭素・窒素濃度を調べ、噴火間隔から炭素の集積速度を求めた。

(2) 表層団粒構造の生態系機能と群集多様性への効果

苫小牧研究林の土壤保全試験地（319林班および401林班）を用いて、保全区と圧密区（団粒構造を押しつぶした処理）の土壤(0-4cm)を採土円筒で採取し、Tullgren装置を用いて土壤小型節足動物を抽出するとともに、窒素の無機化ポテンシャルを測定した。小型節足動物は分類群ごとに個体数を数え、ササラダニ類は種のレベルまで同定して群集構造を調べた。直径2 mm以上の土壤団粒の量と土壤小型節足動物の個体数の関係を求めた。さらに、隣接する森林、保全区、圧密区の土壤呼吸速度を比較した。

(3) 森林におけるミミズ土壤構造改変機能の解明

2003年からミミズの密度をハンドソーティングにより操作している北海道大学苫小牧研究林のミズナラ天然林で、表層土壤（0-5cm）を採取し、土壤の化学性（pH、全炭素・窒素、窒素無機化速度、交換性陽イオン、リン（Bray-2））を測定し、併せて2mm以上の団粒量を測定した。表層土（0-5cm）、下層土（10cm）とヒトツモンミミズ、ユノシママミミズの消化管内容物（新鮮な糞）を採取し、本課題で改良したT-RFLP法でアーキア、バクテリア、糸状菌の群集構造を調べた。ヒトツモンミミズはこの森林におけるミミズの優占種であり、安定同位体と消化管の解析から落葉と土壤を混食し、落葉を消化していることがわかっている¹⁾。

(4) ヒトツモンミミズの土壤窒素動態への影響評価

北海道南部から本州にかけて生息しているヒトツモンミミズを飼育し、窒素の排泄と、糞団粒中の無機態窒素の動態を調べた。苫小牧研究林の土壤を篩別し、ヒトツモンミミズに摂食させ、体重あたりの土壤摂食量を求めた。同時に大量のミミズを飼育し、糞団粒を得た。これを実験室(20℃)で培養し、糞団粒中の無機態窒素・溶存態炭素、および土壤呼吸速度を調べた。

(5) キシャヤスデによる土壤構造改変、炭素隔離機能の解明

キシャヤスデによる土壤構造の改変効果を評価するため、2000年までキシャヤスデが高密度で生息していた八ヶ岳山麓のカラマツ人工林(天女山)と、キシャヤスデが生息していない野辺山の筑波大学八ヶ岳演習林(野辺山)のカラマツ人工林において、土壤の団粒組成を比較した。土壤を採取し、湿式篩別法により、6段階のサイズの団粒(それぞれ直径が0.25mm以下、0.25-0.5mm、0.5-1.0mm、1.0-2.0mm、2.0-4.75mm、4.75mm以上)に区分した。乾燥重量を測定し、各サイズの団粒の重量割合をもとめた。

キシャヤスデによって作られた大型土壤団粒による炭素蓄積様式を明らかにするために、天女山試験地と野辺山試験地それぞれの土壤に含まれる粒状有機物の炭素濃度を比較した。それぞれの試験地から表層土壤を採取し、乾燥後、篩を用いて2mm以上の大型団粒と直径2mm以下の細土とに分けた。大型団粒と細土それぞれについて、重液を用い遠心分離法により比重1.6g/cm³より軽い有機物を取り除いた後、超音波破砕器により団粒を破壊し、再び重液と遠心分離法により得られた比重1.6g/cm³より軽い有機物を、土壤に含まれる粒状有機物画分(POM)とした。これを乾燥した後、燃焼法により画分ごとの炭素・窒素濃度を測定した。

(6) キシャヤスデの活動による土壤の窒素動態および温室効果ガスの放出への影響

キシャヤスデの活動による土壤の無機態窒素動態、および温室効果ガスであるCO₂とN₂Oの土壤からの放出量への影響を明らかにする目的で、2007年にキシャヤスデの個体数をコントロールした土壤培養実験を行った。土壤は、天女山試験地周辺から採取し、2mmの篩を通した細土(乾燥重量で36g相当の生土)を200ml容の密閉容器に入れ、6齢幼虫のキシャヤスデ個体数を容器あたり0、2、4、8個体に調整して18℃のインキュベーターにて28日間培養した。このとき、一週間に2回換気し、水分を補充して、圃場容水量の60%を維持するようにした。培養前および培養後に土壤に含まれるアンモニア態窒素および硝酸態窒素を定量し、培養期間中の無機態窒素の生成量を求めた。また、培養終了後の土壤について、CO₂、N₂Oの放出速度を測定した。その後、土壤を2mmの篩に掛け、2mm以上の団粒量を測定し、キシャヤスデの活動により形成された土壤団粒の量を求めた。さらに、天女山試験地で得られた大型土壤団粒(直径2mm以上)について、団粒構造を保った状態の土壤試料と、団粒構造を破砕した土壤試料についても同様に培養実験を行い、無機態窒素の動態とCO₂、N₂Oの放出速度を測定し、上記の細土と比較した。

2008年には、八ヶ岳山麓で採取した土壤およびカラマツ落葉でキシャヤスデの7齢幼虫及び成虫(8齢)の飼育実験を行った。2007年と同様に土壤を調節した後、カラマツ落葉2gを加えた土壤と加えない土壤を設定した。キシャヤスデの導入個体密度は先行研究²⁾を参考に、各密閉容器につき7齢幼虫は2個体、8齢成虫は1個体、および対照区を設定した。15℃のインキュベーターで4週間飼育し、アルカリ法にて24時間のCO₂放出速度を測定し、飼育開始から3週間後、容器内の空気を十分に換気したのち密閉し、ヘッドスペースのCH₄ガス濃度の変化を10時間観測した。キシャヤスデの生体および腸管を密閉容器に入れ、CH₄ガス濃度の変化を観察・定量することにより、CH₄ガス

の変化に対し、土壤微生物による寄与とヤスデに由来する寄与との分離を試みた。キシヤヤスデによる呼吸量は既往の先行研究における換算式³⁾から推定した。また、飼育前と飼育後の土壤に含まれるアンモニア態窒素および硝酸態窒素を定量し、飼育期間中の無機態窒素生成速度を求めた。

(7) 野外生態系におけるキシヤヤスデ導入試験

実際の野外生態系において大型土壤動物の導入による物質循環への影響を明らかにするため、キシヤヤスデの生息が過去16年以上確認されていない野辺山試験地のカラマツ人工林において、野外エンクロージャーを設置し、キシヤヤスデの導入試験を行った。2006年6月に塩ビ板を用いて50cm×50cmの方形エンクロージャーを4個設置し、それぞれ5齢幼虫のキシヤヤスデ125個体を導入した。

各エンクロージャーおよびそれぞれに対応する対照区において、15cmの深さの土壤にポーラスカップを設置し、土壤水の採取を行い、陽イオン (Na^+ 、 NH_4^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+}) および陰イオン (Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-}) 濃度の分析を行った。土壤水の採取は2007年7月・10月・11月、2008年6月から10月までの各月に一度、24時間以上吸引法にて採取した。また、円筒形の塩ビ製チャンバーを設置し、土壤水と同じ採取日に、アルカリ法にて24時間の CO_2 放出速度の測定を行った。2008年10月にエンクロージャーおよび対照区から土壤を採取し、炭素・窒素濃度、窒素無機化速度および団粒（直径2mm以上のサイズ）の量を測定した。また、下層植生を刈り取り、植物体現存量および炭素・窒素濃度を測定した。

(8) 不耕起栽培に於けるミミズ導入、草生栽培が土壤団粒と土壤小型節足動物群集に与える影響

サブテーマ2によって明らかにされた土壤炭素量増加のメカニズムの一つとしてミミズによる耐水性団粒の形成が土壤炭素量に与える影響を、阿見農場の試験圃場、および不耕起草生を実践している農家の圃場を調べた。それぞれの調査地で0-5cmの表層土壤を100mL円筒で採取し、孔隙率、含水率を調べ、小型節足動物をTullgren装置を用いて抽出した。小型節足動物は分類ごとに個体数を数え、ササラダニ類は種のレベルまで同定して群集構造を調べた。また、別のサンプルを用いて湿式篩別を行い、2mm以上の団粒とそれ以下の細土を求め、土壤炭素量を調べた。

4. 結果・考察

(1) 森林土壤炭素の集積速度

掘削の結果、約4mまでの地下に過去の土壤が3層確認できた。樽前山の大規模な噴火は、B.C.6133年、B.C.193年、1667年、そして1739年とされているので、現在の地表面は約270年、その下に72年、1860年、そして5940年の間地表面であった土壤が埋没していることがわかった。この間それぞれ一次遷移が進行して噴火跡の裸地状態から森林が成立し、植物由来の有機物が土壤に集積したとみなし、時間に対する土壤厚、炭素量、窒素量の変化を求めた（図1）。さらに、土壤炭素集積量を土壤生成に要した時間で割り、炭素集積速度を求めた。その結果、苫小牧研究林では、年間1m²あたりの炭素集積速度は、A1で17.4g、A2で7.9g、A3で4.8g、そして、A4で3.0gであった。これらの値は日本の黒色土における既知の土壤炭素集積速度の推定結果と同様であり（図1右下）、炭素集積速度は土壤形成の初期に速く、時間がたつにつれて遅くなる傾向があった。炭素の年間集積量は、苫小牧研究林の現在の森林地上部の平均バイオマス増加量82g C m⁻²の3.7-21.2%であった。

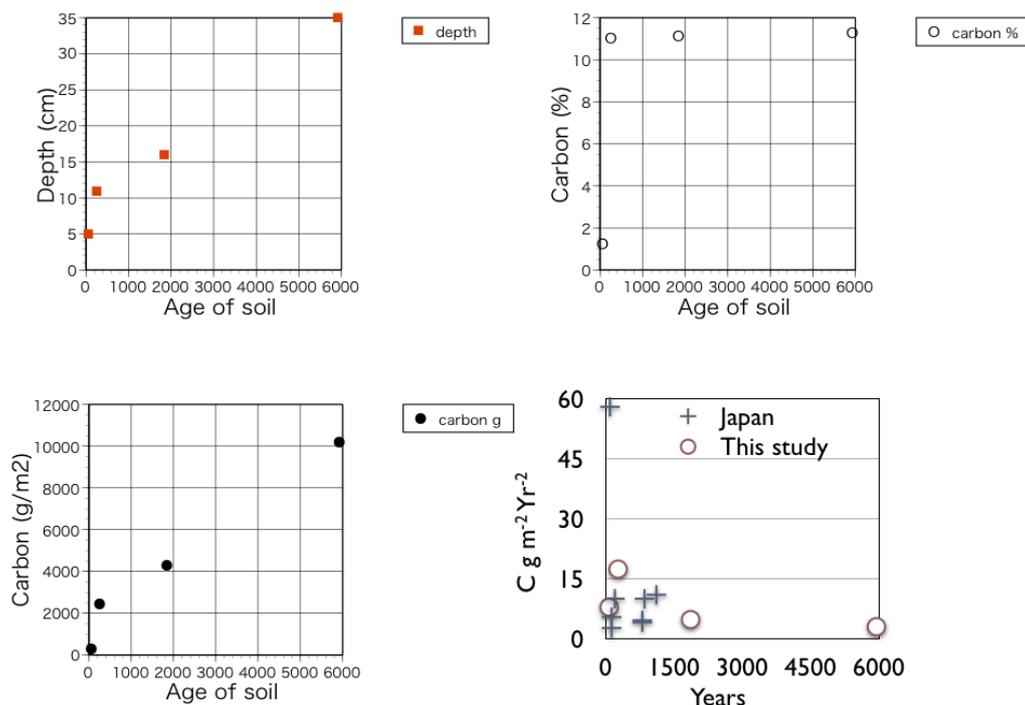


図 1. 苫小牧研究林における土壌厚、炭素濃度、および炭素集積速度の変化

(2) 表層団粒構造の生態系機能と群集多様性への効果

地表面の圧密処理は土壌の最大含水量、全炭素、全窒素量を低下させた（図 2）。また、窒素無機化と土壌呼吸速度も低下していた。さらに、小型節足動物の密度は大幅に減少しており、ササラダニの個体数は土壌容積重と有意な負の相関を示した。この森林における非攪乱の土壌表層は耐水性団粒が多く含まれており、圧密処理により団粒の崩壊が生じていた。土壌の容積重の増加は、森林では歩行者や林業機械による踏圧によって、農地では農業機械の踏圧によって起こることがよく知られている。したがって、本研究の結果から、土壌団粒の破壊は土壌中の空隙を減少させ、そこに生息する小動物個体数の減少だけでなく、土壌の化学性の変化を通して機能の低下に繋がることが明確に示された。

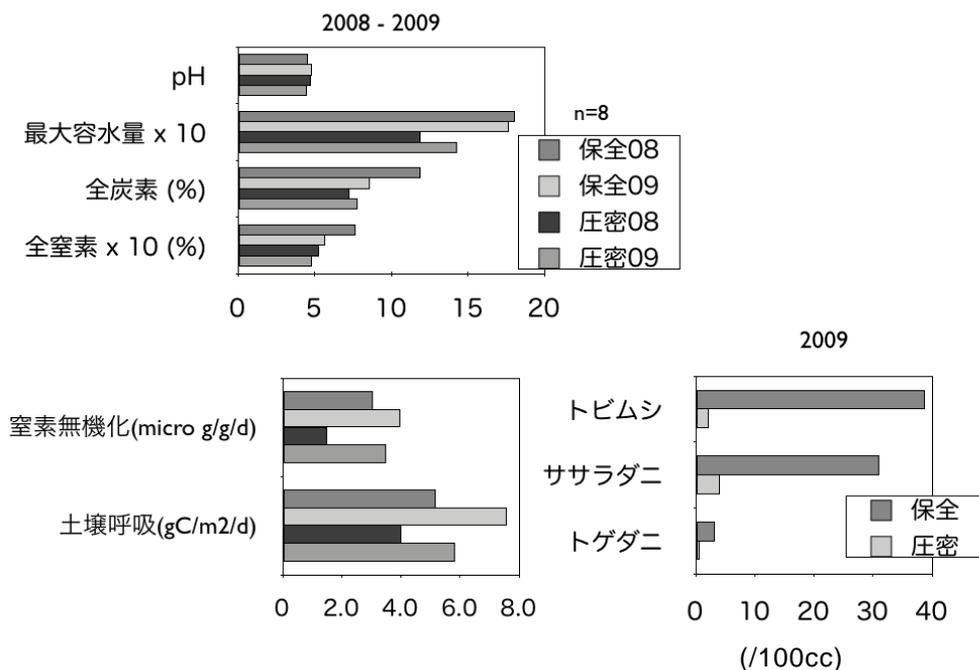


図2. 苫小牧研究林地表攪乱処理区における土壌および土壌小型節足動物の変化

(3) 森林におけるミミズ土壌構造改変機能の解明

ミミズ除去区 (NW) では、エンクロージャーの外のコントロール区(OC)に比べ、土壌 pH、全炭素・窒素、交換性Ca、Mg、およびリン酸が有意に減少していた (表1)。また、2mm以上の団粒はほとんどがミミズの糞を起源とする団粒であり、ミミズを除去することにより半減していた。エンクロージャー内のミミズ密度をゼロにすることは難しく、ミミズ糞団粒は数年にわたって構造を維持するため、まったくミミズの影響のない土壌を作ることは出来なかった。しかし、コントロール区の団粒はまわりの土壌より多くの有機物を含んでおり、ミミズの摂食活動により土壌有機物が短期間で増加していた。

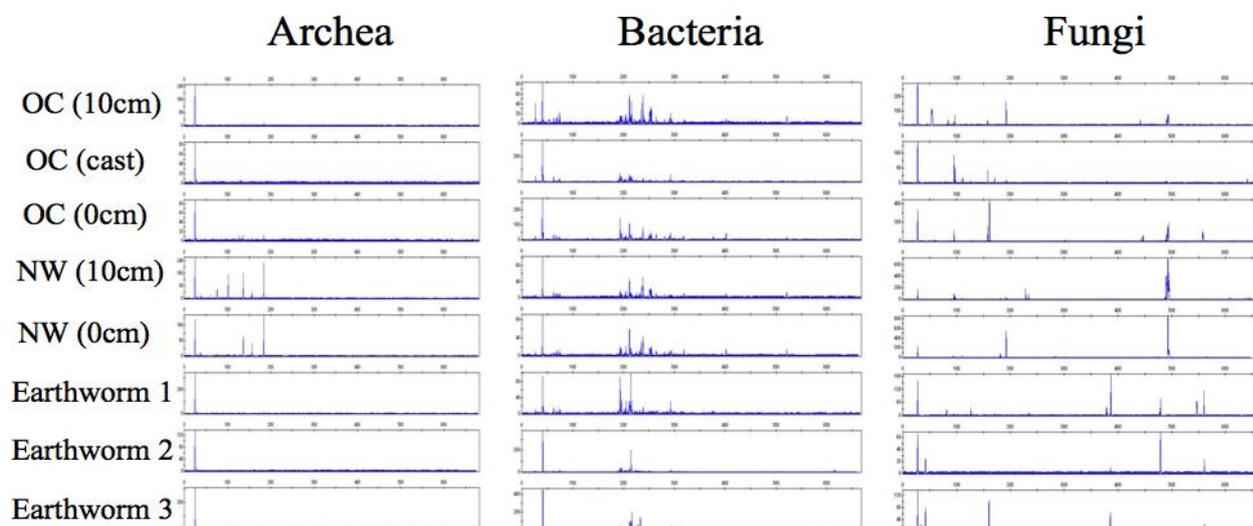
表1. 苫小牧研究林ミミズ操作区土壌の化学性

	pH	Na	K	Ca	Mg	P ₂ O ₅	C	N	C/N	Aggregate
	(H ₂ O)	cmol/kg				mg/kg	%	%		g/100ml
コントロール (OC)	4.95	0.20	0.24	9.09	1.25	39.5	12.8	0.84	15.0	9.6
ミミズ除去区 (NW)	4.74	0.20	0.23	4.09	0.65	20.0	9.0	0.66	13.5	4.3

ミミズ成体より採取した糞と、野外土壌の微生物群集を茨城大学のチームによって改良された T-RFLP法を用いて解析した (図3)。アーキアは表層と深層の土壌で違いが少なく、コントロー

ル区の団粒も同じパターンを示したが、処理区間では大きな差が認められた。ミミズ消化管ではピーク数が極端に減少した。細菌は土壌層位、団粒で似て違いがなかったが、消化管では土壌では見られない位置に大きなピークが見られた。糸状菌は、土壌層位、団粒、消化管ともそれぞれ大きく異なっていた。

この森林に生息するミミズは表層性で落葉と土壌を混食する¹⁾。ミミズの摂食活動により落葉が土壌に混入し、落葉起源の陽イオンが土壌pHの上昇をもたらしていた。このことは微生物の生息環境を大きく変える可能性がある。ミミズ消化管には固有の細菌は少なく、土壌と細菌相が共通することが報告されており、本研究でも確認できた。しかし、細菌だけでなくアーキア、糸状菌も同じ試料を用いて同時に解析した例はなく、T-RFLP法により土壌微生物群集の動態を土壌動物の摂食による土壌環境の変化に対応して調べることができた。



Archaeal and bacterial 16S rRNA genes and fungal 18S-28S ITSs digested by *Hae*III

図3. 苫小牧研究林ミミズ操作実験土壌の微生物群集(T-RFLPプロファイル)。OC: 対照区、NW: ミミズ除去区、Earthworm1, 2はヒトツモンミミズ、3はユノシマミミズの消化管内容物

(4) ヒトツモンミミズの土壌窒素動態への影響評価

ヒトツモンミミズは北海道から九州まで広く分布し、森林の表層に生息する日本を代表するミミズである。材料の関係から、苫小牧研究林の土壌を用いて横浜国立大学構内で採取したヒトツモンミミズを用いて飼育を行った。大量飼育により得られた糞土を瓶培養したところ、排泄直後の糞は細土の約70倍の高濃度のアンモニウム態窒素を含み、約4週間でその半分が硝酸態窒素に変換されることがわかった(図4)。この時、餌となった細土より土壌pHは一時的に高くなり、硝化が進むにつれて酸性化し、もとの土壌よりやや低いpHとなった4週目以降、硝酸態窒素濃度

の上昇が停止した。瓶培養条件では雨水による溶脱が生じないため、硝酸態窒素濃度が高いまま維持された可能性がある。また、糞土を2mmの篩を通して通過させた処理は窒素とpHの変化に影響はなかった。団粒の破壊処理としては、もっと細かく粉碎する必要があったかもしれない。

培養にともなって無機態窒素の総量の変化は少なく、糞土中で無機化が進む訳ではなかった。したがって、排泄直後の糞土中の高い窒素濃度は、ミミズの消化管内の分解もしくはミミズの排泄物としての窒素を起源とするもので、土壌の中では糞土が無機態窒素濃度の高いスポットとなることがわかった。

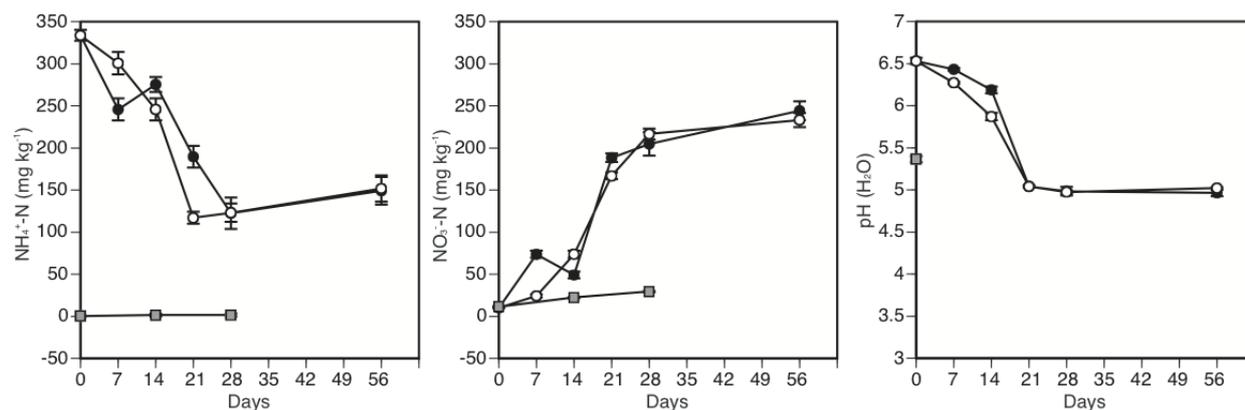


図4. ヒトツモンミミズの糞団粒におけるアンモニア態、硝酸態窒素濃度、およびpHの8週間にわたる変化。白丸は非破壊の団粒、黒丸は団粒を2mmの篩を通して破壊した処理。四角は餌とした土壌。

(5) キシャヤスデによる土壌構造改変、炭素隔離機能の解明

ヤスデが生息していた天女山の土壌は野辺山の土壌よりも仮比重が小さく、0.25mm以下、0.25-0.5mmの画分の土壌が少なく、逆に2.0-4.75mmの画分が多かった(表2)。キシャヤスデは他のヤスデ類と異なり、土壌を摂食する。したがって、排泄された糞は耐水団粒を形成し、土壌構造を構成する。天女山では、2000年に高密度の成虫個体群が観察されている。キシャヤスデは8年の生活史を持ち、幼虫のバイオマスは小さく、発育段階が進むにつれ面積当たりのバイオマスが大きくなる。また、1カ所には同齢の個体しか生息しないので、天女山では2000年と2008年に成虫が出現した。これらのことから考えると、土壌を改変するヤスデの影響はバイオマスの大き

表2. 天女山(ヤスデ生息地)と野辺山(非生息地)の土壌団粒の比較

Site	Bulk density (mg cm^{-3})	Size fraction (%)					
		<0.25 mm*	0.25-0.5 mm*	0.5-1.0 mm	1.0-2.0 mm	2.0-4.75 mm*	>4.75 mm
Tennyō	298.9 (38.5)	5.9 (2.4)	5.8 (0.7)	18.6 (15.0)	18.1 (12.1)	29.9 (6.3)	21.7 (6.2)
Nobeyama	352.8 (86.1)	14.0 (3.7)	13.0 (2.9)	14.7 (5.4)	27.9 (13.6)	7.0 (4.4)	23.4 (10.8)

Values in parenthesis are standard deviations and asterisks indicate significant differences between the two sites (Mann-Whitney U test, $P < 0.05$).

い7齢や成虫個体群が生息する時期に大きく、それ以外の時期には小さいだろう。したがって、摂食活動によって改変された土壤構造はヤスデの死後もしばらく残るといえる。

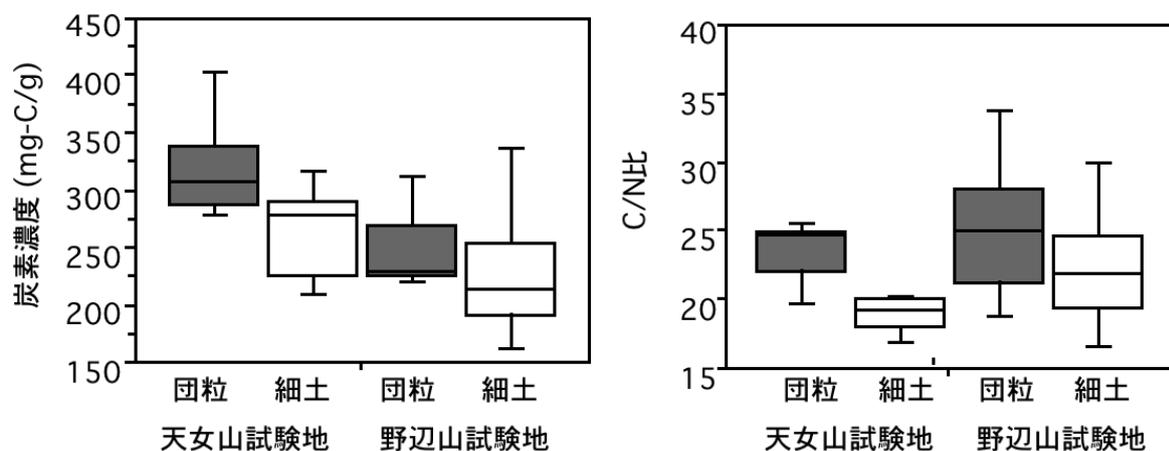


図5. 大型土壤団粒 (>2mm) と細土 (<2mm) に含まれる有機物の炭素濃度とC/N比

キシヤスデが高密度で生息していた天女山試験地では、細土に含まれるPOMに比べ大型土壤団粒に含まれるPOMの炭素濃度やC/N比が高かった(図5)。これは、大型土壤団粒に含まれる有機物は微生物の分解作用をあまり受けていない状態で保たれていることを示している。大型土壤団粒内では有機物の分解速度が遅くなるので、土壤の炭素隔離の効果が期待できる。

(6) キシヤスデの活動による土壤の窒素動態および温室効果ガスの放出への影響

土壤培養実験における団粒の無機態窒素濃度の経時変化は、細土とほぼ同様の無機態窒素濃度の変化パターンを示し、3日目に濃度が低下した後、増加した(図6)。一方、ヒトツモンミズの場合と異なり、団粒を破碎すると比較的高い無機態窒素濃度で推移し、窒素無機化が促進されていることが分かった。このことは、団粒と細土では見かけ上同等の窒素無機化能を持つが、団粒内には無機化されやすい窒素が微生物に利用されない状態で多く含まれていることを示唆している。また、培養の初期には細土・団粒に比べ団粒破碎物では比較的高いアンモニア態窒素が多かったが、8週間後の培養実験終了時にはほぼ全てが硝酸態窒素となった。したがって、ミミズの糞同様、土壤食を行うキシヤスデの糞は窒素無機化のホットスポットとなっていた。

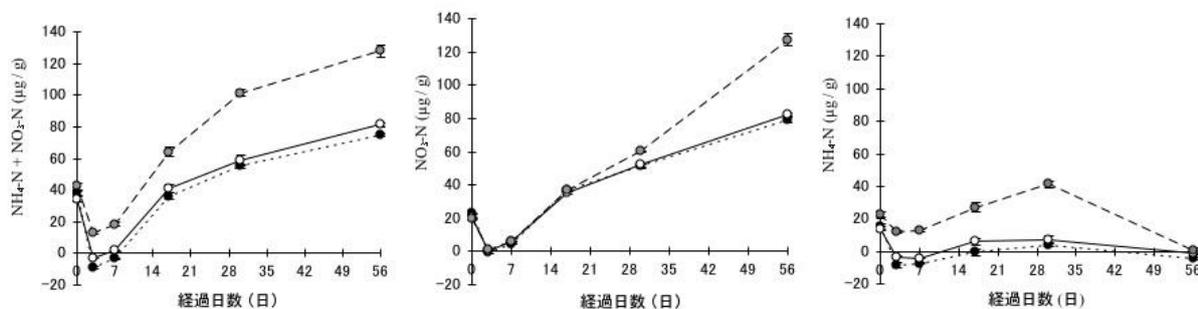


図6. 細土(●)、団粒(○)、団粒破碎物(●)の培養実験における無機態窒素濃度(A)、硝酸態窒素濃度(B)、アンモニア態窒素濃度(C)の経時変化。

CH₄濃度の変化を測定したところ、土壌のみと土壌の落葉を添加したいずれの処理においてもメタン吸収・分解能が認められた（図7）。CH₄吸収の速度は、8齢成虫の飼育土壌で特に大きかった。キシヤヤスデの生体および腸管にはCH₄吸収作用は認められず、メタン吸収への影響についてもキシヤヤスデ導入による土壌微生物活性への作用の結果であることが分かった。7齢幼虫は2個体、8齢成虫は1個体の導入であるため、個体あたりの影響は成虫時で特に大きくなることを示している。また、キシヤヤスデ成虫による温室効果ガスへの影響には、土壌のCO₂放出の増加とCH₄吸収の促進という相反する作用を持っていることが明らかになった。ミミズの糞団粒がメタン酸化能力が高いことが知られているが、キシヤヤスデの糞団粒もメタン酸化能を持つことが明らかになったのは世界で初めての成果である。

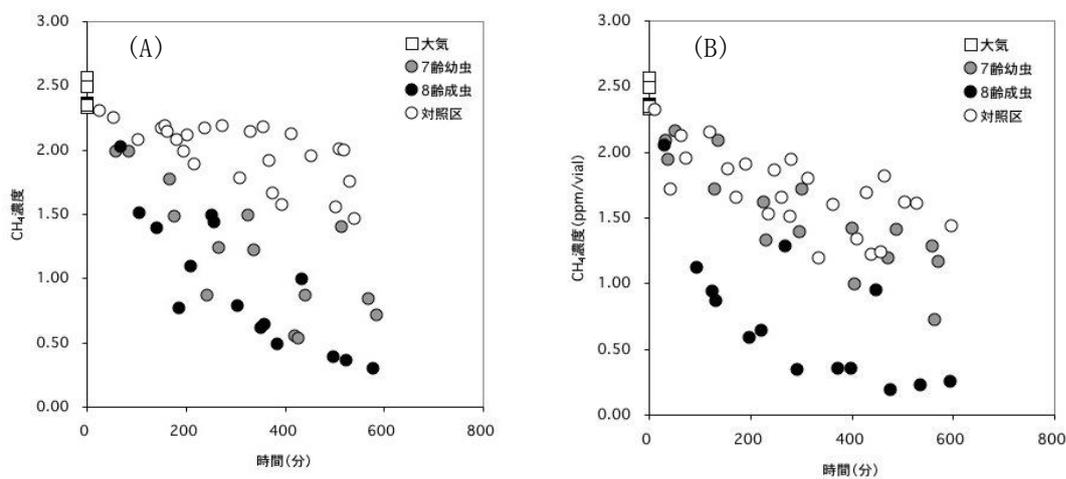


図7. キシヤヤスデ飼育3週間の土壌のCH₄吸収。大気CH₄濃度(□)からの密閉容器中CH₄濃度の経時的な変化を示す。(A)土壌のみの飼育、(B)カラマツ落葉添加土壌での飼育。

団粒を破壊する影響を調べると、土壌からのCO₂放出速度は、細土に比べ団粒破砕物で大きくなった。このことは、団粒破砕物で微生物が利用できる有機物が多いことを示しており、団粒に蓄えられていた有機物が、団粒構造が壊れることにより微生物の攻撃を受けて利用されたためにCO₂放出が増加したと考えられた。培養4週時におけるCH₄濃度変化から、いずれの土壌においてもCH₄分解能が認められた（図8）。CH₄分解の速度は、団粒と細土で同等の速度を示し、団粒破砕物ではやや遅くなった。これらの結果は、団粒構造が壊れることにより土壌のCH₄吸収能力の劣化やCO₂放出の増加を招くことを示唆している。

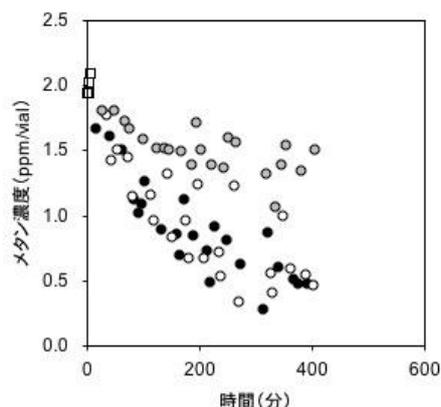


図8. 4週間培養後における細土(●)、団粒(○)、団粒破砕物(●)の CH_4 吸収。大気 CH_4 濃度(□)からの密閉容器中 CH_4 濃度の経時的な変化を示す。

(7) 野外生態系におけるキシヤヤスデ導入試験

野外生態系へのキシヤヤスデ導入による土壌 CO_2 放出への影響は、2008年の夏期以降は対照区にくらべて促進されることが確認された(図9)。2008年の7月から8月にかけては、キシヤヤスデが7齢幼虫から8齢の成虫に脱皮を行う時期であり、土壌中に自らの糞で脱皮室を作る。2008年の夏期に見られる土壌 CO_2 放出の促進は、このようなヤスデの行動に由来する土壌構造の改変効果により、土壌微生物の活性が高まったことに由来すると考えられる。また、8齢成虫の個体重量は7齢の3倍ほどになるため、土壌へのインパクトも大きくなることが期待される。2007年度には土壌 CO_2 放出への影響が認められなかったことから、土壌 CO_2 放出への影響はキシヤヤスデの成虫時に特に顕著になることが分かった。

土壌水のイオン類については、キシヤヤスデ導入による明瞭な影響は認められなかった。また、土壌の団粒化・窒素無機化速度および炭素・窒素濃度、植物体の現存量および炭素・窒素濃度にはキシヤヤスデ導入による影響は確認できなかった。これらの結果から、生態系レベルでの野外実験では、キシヤヤスデの導入による栄養塩循環機構の改変や植物生産性の増加は現在の分析項目の解像度では顕著ではなかったと結論づけられた。

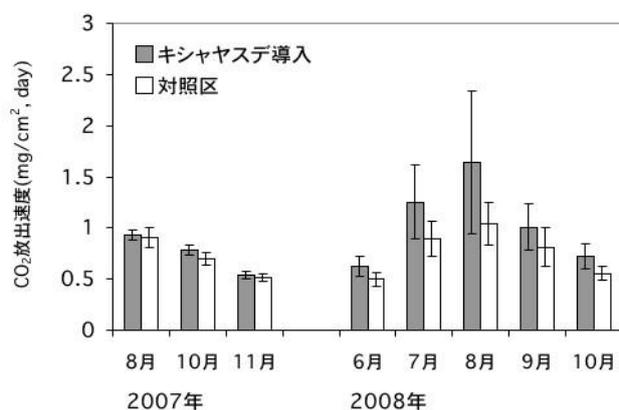


図9. 野外土壌へのキシヤヤスデ導入による土壌 CO_2 放出への影響

(8) 不耕起栽培におけるミミズ導入、草生栽培が土壤団粒と土壤小型節足動物群集に与える影響

3年間にわたる茨城大学阿見農場におけるミミズ導入試験は、ミミズの定着状況がよくなかったが、2009年には土壤団粒量は導入区でわずかに増加し、団粒の平均加重直径は導入区で0.96 g mm、非導入区で0.88 g mmであった。

土壤小型節足動物は、苫小牧研究林での結果と同様、土壤の孔隙率とササラダニやトビムシの個体数に正の有意な相関が見られ、土壤の物理性が密度を規定していることがわかった。阿見農場の不耕起+ライ麦カバークロップ処理と、そこへミミズを3年間導入した処理、さらに自然農（浅野圃場）の土壤におけるササラダニ群集を比較すると、不耕起を8-10年継続した浅野圃場では阿見に比べて小型節足動物の密度が高く、ササラダニの多様性が高くなっていた（図10）。保全型農法のなかでも不耕起草生の方法が農地内の生物多様性を高めるという結果は世界で初めての成果である。

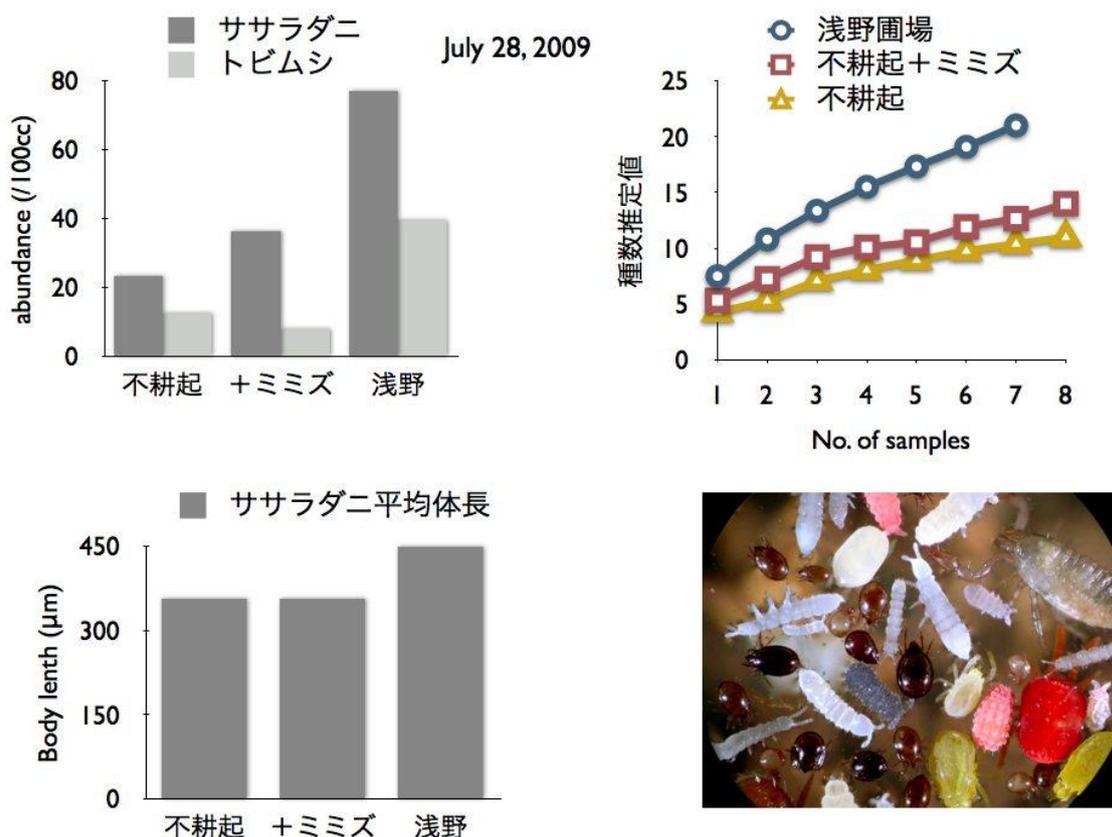


図10 農法の違いが小型節足動物群集に与える影響。ササラダニとトビムシの密度（左上）、ササラダニの種-面積曲線（右上）、ササラダニ成虫の平均体長（左下）。

ササラダニの種- ランク曲線をこれら3カ所の土壌で比較すると、浅野圃場では種数が増加するだけでなくより大型の種が定着していることがわかる（図11）。保全型農法では細菌から糸状菌がより優占する土壌に変化することがわかっている。浅野補助の大型の種は糸状菌食であり、土壌構造の変化の他に、餌資源の変化がこのような群集の変化をもたらしている可能性がある。

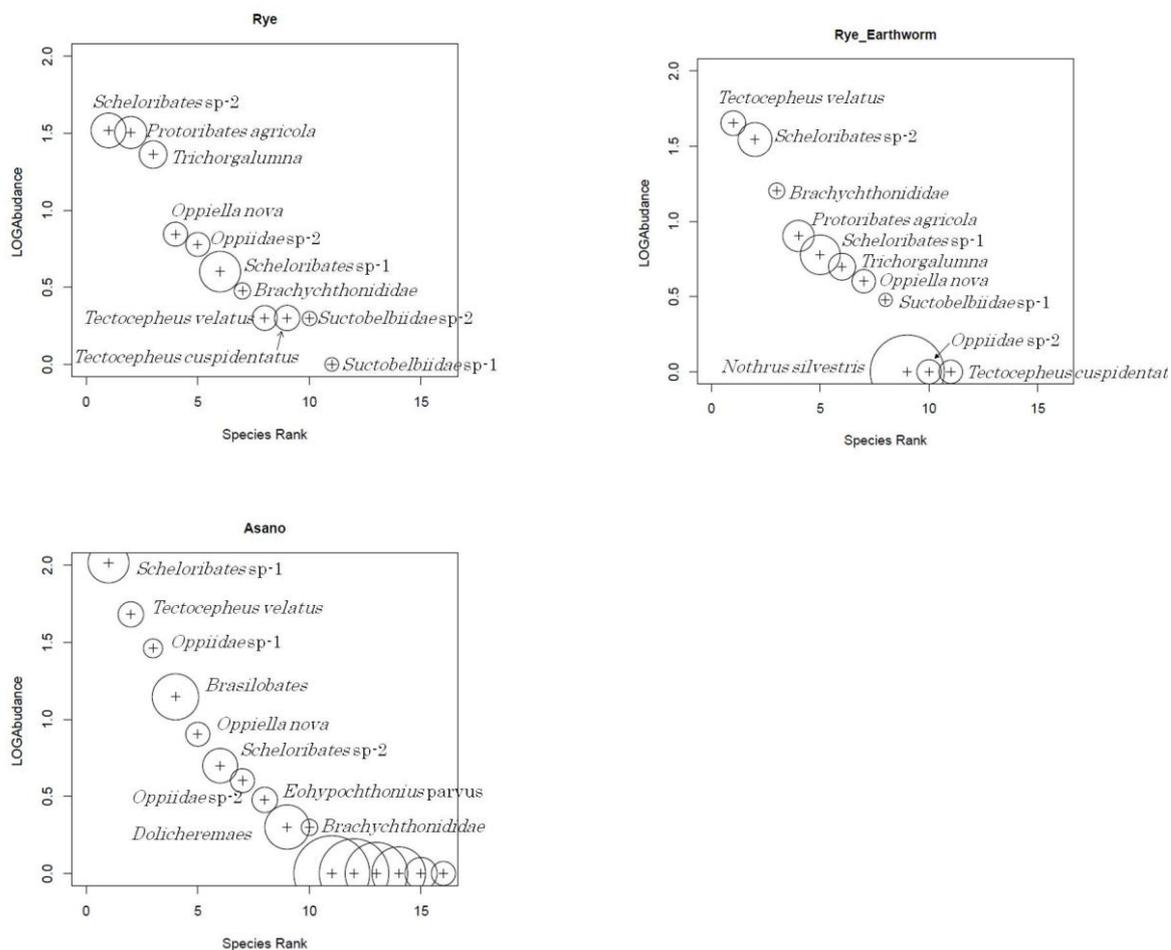


図11 農法の違いとササラダニ群集の種-ランク曲線。不耕起+ライ麦、不耕起+ライ麦+ミミズ導入、不耕起草生。円の大きさは成虫の相対体長を示す。

TOEF、阿見農場、不耕起草生圃場、八ヶ岳カラマツ林で得られた表層0-5cmの土壌の細土と団粒の炭素含有率を比較すると、団粒はまわりの細土よりも常に2%前後、炭素濃度が高くなっていた（図12）。これまでの結果から明らかなように、これらの団粒はミミズやキシヤスデの活動により土壌と有機物が混合され、微生物による分解を抑制することにより炭素濃度が高く保たれている。したがって、土壌動物の密度が高く維持されることで、炭素隔離が進行し、同時に窒素無機化や CH_4 、 N_2O のフラックスも改変されている。

フトミミズ類とキシヤスデの飼育データを用いて一年間にこれらの動物が改変する生態系機能を推定した（表3）。これらの動物の機能は、バイオマスがこれまでの観測値で最大である場合には、大気からの窒素降下物に匹敵する窒素無機化に関与し、カバークロープを導入したり、

大量に堆肥を投入したりする農地に匹敵する炭素隔離速度を示した。

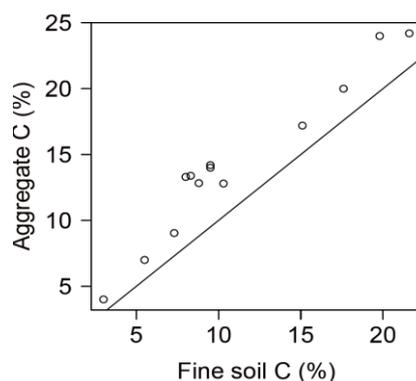


図12 本研究で調べた各土壌における細土と団粒の炭素含有率の比較。

表3 生態系プロセスと土壌食土壌動物の生態系機能との比較

要因	現存量 (wet g m ⁻²)	年間活動日数 (日)	窒素無機化 (g m ⁻² yr ⁻¹)	炭素隔離 (g m ⁻² yr ⁻¹)
フトミミズ*	100	150	4.0	210
キシヤヤスデ*	120	120	2.7	145
日本の窒素降下物量	-	-	0.5-2	-
TOEF森林土壌炭素隔離*	-	-	-	3-17
阿見カバークropp農法*	-	-	-	136
堆肥による畑地炭素隔離 (農水省)	-	-	-	37-170

要因のうち*が本研究のデータから計算したもの

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究では、土壌を食べ、土壌有機物を利用しているミミズとキシヤヤスデについて物質循環、微生物との関係まで含めて調べた。ミミズとキシヤヤスデが、糞団粒形成による土壌改変機能を有することを明らかにした。土壌はこれらの動物の影響を受け、有機物の分解速度や窒素無機化速度が変わるだけでなく、温室効果ガスであるCH₄やN₂Oの動態にも影響があった。野外と室内の糞団粒の操作実験が示唆しているように、土壌の団粒構造を指標とすることで、土壌の生物多様性と機能をうまく結びつけることができた。土壌と落葉を摂食する大型の土壌動物は、多くの土壌に広く普通に生息しており、これらの動物の活動は、いままで評価されてこなかっただけで、土壌に普遍的な現象であるといえる。

(2) 地球環境政策への貢献

本研究成果は、地球環境に大きな影響を与えるパラメータとして土壌生物の活動を正しく把握

する必要があることを示唆している。土壌生物の保全の目的が、健全な土壌構造の維持であることを示すことができれば、土地利用のあり方に関して、簡便で強力な指標とすることができる。

2009年3月の日本生態学会企画シンポジウム「地球温暖化と向き合う生態学」で講演し、本研究の成果を交えて温暖化研究における土壌の生物多様性研究の重要性を指摘した。

2010年3月の日本生態学会企画シンポジウム”Diversity on diversity; aboveground and belowground communities as drivers of ecosystem functioning”を主催し、本課題の推進担当者とともに成果を公表した。

2010年4月26日発行の雑誌「ニュートン」の「生物多様性特集」を監修し、生物多様性と物質循環とのリンクの重要性を解説した。

6. 引用文献

- 1) Hashimoto, M., Kaneko, N., Ito, M.T., Toyota, A., 2004. Exploitation of litter and soil by the train millipede *Parafontaria laminata* (Diplopoda: Xystodesmidae) in larch plantation forests in Japan. *Pedobiologia* 48, 71-81.
- 2) Toyota, A., Kaneko, N., Ito, M.T., 2006. Soil ecosystem engineering by the train millipede *Parafontaria laminata* in a Japanese larch forest. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 1840-1850.
- 3) Kitazawa, Y., 1977. Ecosystem analysis of the sub alpine coniferous forest of the Shigayama IBP area, Central Japan. In: Japanese Committee for Biological Program (15), pp.135-166, University of Tokyo Press.

7. 国際共同研究等の状況

生物地球化学研究会2008年研究集会に招へいたチェコ科学アカデミー・チャールズ大学准教授Jan Frouz博士と、土壌動物による荒廃土壌の回復過程における土壌食動物（特にミミズ）の機能に関する共同研究を行っている。

2009年12月には金子がインドネシア・ジョグジャカルタで開催された地下の生物多様性会議 (Belowground Biodiversity, BGBD)で招待講演を行った。これは地球環境ファシリティ (GEF) と UNEPの支援により、インドネシア、インド、ケニア、ウガンダ、コートジボアール、メキシコ、ブラジルによって行われている共同研究プロジェクトであり、2009年度で終了したため、次のプロジェクトの検討を行っている。

2010年3月には日本生態学会企画シンポジウムの講演者としてインドネシアのBGBD担当者であるF.X. Susilo教授を招へいた。Susilo教授とは、2010年6月からスマトラ島南部のサトウキビプランテーションにおける不耕起栽培による土壌炭素プール増加実験を行う予定である。

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) Nishizawa, T., Komatsuzaki, M., Kaneko, N., Ohta, H. (2008) Archaeal diversity of upland rice field soils assessed by the terminal restriction fragment polymorphism method combined with real time quantitative-PCR and clone library analysis. *Microbes and Environments* 23: 237-243.

- 2) 甘楽法、金子信博 (2009) 土壌団粒を用いたトビムシの機能研究を目的とした飼育実験系の確立. *Edaphologia* 85: 7-11.
- 3) 西澤智康、小松崎将一、金子信博、太田寛行 (2010) 末端制限断片(T-RFs)プロファイル情報に基づく土壌微生物群集構造解析. *土と微生物* 64: 33-40.

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 金子信博（訳）（2009）「生物多様な星の作り方：生態学からみた地球システム」東海大学出版会、David Wilkinson著、Oxford University Press
- 2) 金子信博 (2008) 足下の生物多様性- 森林の土壌生態系- . *クリンネス* 272:2-7.
- 3) 金子信博 (2008) 生物多様性の交差点- 表層土壌が育む生物群集とその知られざる働き- . *ペドロジスト* 52:47-50.
- 4) 金子信博 (2009) ミミズの働きは森林の土を変えるくらい大きいか？. 北の森づくりQ&A-北方林業創立60周年記念誌、社団法人北方林業会、札幌. 110-111.
- 5) 金子信博 (2010) バイオ燃料と生物多様性. *現代化学* 466: 64-67.
- 6) 金子信博 (2010)土壌のbioturbation- 土壌生物の多様性と土壌構造の関係- . *タクサ* 28: 28-31.

(2) 口頭発表（学会）

- 1) 金子信博（2007）「土の生物多様性-生態系のかなめ石-」日本土壌動物学会第30回大会記念市民セミナー、横浜市
- 2) 金子信博（2007）「気候変動と土壌-生態システムとしての土壌生物群集の反応-」日本微生物生態学会2007年度大会、愛媛大学、松山
- 3) 金子信博、藤巻玲路、丹羽慈、川口達也、岡井尚之、佐藤由依、甘楽法（2008）「土壌動物の窒素無機化への影響の再検討」第55回日本生態学会、福岡
- 4) 金子信博、藤巻玲路、川口達也、日浦勉、村上正志、豊田鮎、陀安一郎、太田寛行、西沢智康、増永二之、岩島 範子（2008）「北海道大学苫小牧研究林における土壌炭素集積速度」第119回日本森林学会、東京農工大学、東京
- 5) 藤巻玲路、岡井尚之、佐藤由依、金子信博（2008）「八ヶ岳カラマツ林における土壌の団粒化と窒素無機化特性」第119回日本森林学会、東京農工大学、東京
- 6) 浅沼弘人、藤巻玲路、岡井尚之、佐藤由依、金子信博（2008）「キシヤヤスデの密度と分布が土壌炭素貯蓄に与える影響 ～GISを用いた広域での分析～」第31回日本土壌動物学会、琉球大学、沖縄
- 7) 岡井尚之、藤巻玲路、佐藤由依、金子信博（2008）「キシヤヤスデ幼虫の摂食活動による土壌団粒の形成が窒素無機化促進に与える影響」第31回日本土壌動物学会、琉球大学、沖縄
- 8) 佐藤由依、藤巻玲路、岡井尚之、楊宗興、木庭啓介、金子信博（2008）「土壌食のキシヤヤスデ幼虫は土壌からの温室効果ガス放出を促進させるか？」第31回日本土壌動物学会、琉球大学、沖縄
- 9) 岩島範子、豊田鮎、藤巻玲路、陀安一郎、日浦勉、金子信博、増永二之（2008）「樹種交替が土壌動物および土壌理化学性へ及ぼす影響」第31回日本土壌動物学会、琉球大学、沖縄
- 10) 甘楽法、金子信博（2008）「団粒土壌におけるトビムシ(*Folsomia candida*) が窒素無機化に与

える影響について」第31回日本土壌動物学会、琉球大学、沖縄

11) 川口達也, 金子信博, 日浦勉: (2008) 「ミミズの糞が窒素循環に与える影響 -糞団粒は無機化を促進しているのか?-」第31回日本土壌動物学会、琉球大学、沖縄

12) 藤巻玲路, 浅沼弘人, 岡井尚之, 佐藤由依, 金子信博 (2008) 「キシヤヤスデによる土壌生態系改変」生物地球化学研究会2008年研究集会、山梨県北杜市

13) 浅沼弘人, 藤巻玲路, 岡井尚之, 佐藤由依, 金子信博 (2008) 「キシヤヤスデの生息分布と土壌炭素貯留の関係」生物地球化学研究会2008年研究集会、山梨県北杜市

14) 岡井尚之, 藤巻玲路, 佐藤玲路, 金子信博 (2008) 「八ヶ岳山麓においてキシヤヤスデ (*Parafontaria laminata*)による土壌構造改変が窒素動態に与える影響」生物地球化学研究会2008年研究集会、山梨県北杜市

15) 佐藤由依, 岡井尚之, 藤巻玲路, 金子信博 (2008) 「落葉・土壌混食者の団粒形成による CO₂・N₂O・CH₄放出」生物地球化学研究会2008年研究集会、山梨県北杜市

16) Sato, Y., Nagaosa, K., Kondo, N., Fujimaki, R., Koba, K., Kato, K., Hanai, Y., Yoh, M., Okai, N., Kaneko, N. (2008) "Impact of litter-soil mix feeding by the train millipede on soil microbial activity and gas flux", The 7th International Symposium of Subsoil Microbiology, Shizuoka.

17) 浅沼弘人, 藤巻玲路, 岡井尚之, 佐藤由依, 金子信博 (2009) 「八ヶ岳山麓におけるキシヤヤスデの分布と生息適地の推定」第56回日本生態学会、盛岡

18) 川口達也, 日浦勉, 岩島範子, 増永二之, 大久保慎二, 金子信博(2009) 「ミミズが土壌の団粒量と窒素動態に与える影響-苫小牧研究林におけるフトミミズ除去による効果-」第56回日本生態学会、盛岡

19) 甘楽法, 金子信博, 日浦勉, 村上正志, 豊田鮎(2009) 「土壌表層の団粒を潰すとどうなるか? -小型節足動物の多様性と物質循環-」第56回日本生態学会、盛岡

20) 金子信博(2009) 「『地球温暖化問題』における土壌生態系研究の役割」第56回日本生態学会、盛岡

21) 金子信博, 甘楽法, 和田徳之, 村上正志, 豊田鮎, 日浦勉: (2009) 「表土はぎ取り実験による土壌の生物多様性と機能の評価」第120回日本森林学会、京都大学、京都

22) Kaneko, N., Hiura, T., Ohta, H., Komatsuzaki, M., Nishizawa, T., Murakami, M., Kato, K., Nagaosa, K., Tayasu, I., Masunaga, T., Iwashima, N., Fujimaki, R., Kawaguchi, T., Asanuma, H., Okai, N., Sato, Y., Tsudura, H.(2009) "Measuring ecosystem functioning of soil mega-aggregates produced by soil/litter mix-feeding animals". EGU General Assembly 2009, 20-24 April, Wien, Austria.

23) 金子信博.(2009) 「土壌のbioturbation -土壌生物の多様性と土壌構造の関係-」日本動物分類学会シンポジウム、静岡.

24) Fujimaki, R., Okai, N., Sato, Y., Asanuma, H., Kaneko, N. (2009) "Periodical millipede impacts on soil structure and C and N dynamics in central Japan." The 10th International Congress of Ecology, 2009, 16-21 August, Brisbane, Australia

25) Kaneko, N. (2009) "Linking BGBD and ecosystem services" National Exit Seminar, Conservation & Sustainable Management of Belowground Biodiversity, Kaliurang Yogyakarta, Indonesia, 21-22 December, 2009 UNIVERSITAS LAMPUNG.

26) 岩島範子, 金子信博, 若月利之, 益永二之 (2010) 「キシヤヤスデとミドリババヤスデの食性

- の違いと糞の化学性への影響」第57回日本生態学会、東京大学、駒場
- 27) 仁科一哉、Utomo M、藤江幸一、金子信博 (2010)「熱帯土壌における長期不耕起栽培による炭素隔離能力の評価 -Rothamsted Carbon modelを用いて-」第57回日本生態学会、東京大学、駒場
- 28) 三浦季子、金子信博、小松崎将一 (2010)「低投入・不耕起農地におけるミミズがリン循環に果たす役割」第57回日本生態学会、東京大学、駒場
- 29) 廿楽法、荒井見和、三浦季子、金子信博、小松崎将一(2010)「ミミズ導入が農地の小型節足動物相と窒素循環に与える効果。」第57回日本生態学会、東京大学、駒場
- 30) Fujimaki, R. (2010) “Soil macrofauna modulates ecosystem function of soil microbes: A case study of the train millipede”. 第57回日本生態学会、東京大学、駒場
- 31) 京島達也、川口達也、藤巻玲路、仁科一哉、金子信博 (2010)「窒素無機化のホットスポットとしてのヒトツモンミミズとキシヤヤスデの糞の比較」第57回日本生態学会、東京大学、駒場
- 32) 川口達也、藤井芳一、金子信博(2010)「自然土壌/人工土壌の混合比とミミズによる窒素無機化速度との関係」第57回日本生態学会、東京大学、駒場

(3) 出願特許

なし

(4) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)

- 1) 生物地球化学研究会2008年研究集会 (2008年10月4-5日、山梨県北杜市、参加者50名)
- 2) 日本生態学会企画シンポジウム (2010年3月16日、東京大学駒場キャンパス、参加者約400名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

NHKサイエンスZERO「つながる生物の謎 土のなかの小宇宙」(2010年4月17日放送)にて、キシヤヤスデによる土壌の摂食が土壌微生物を目覚めさせる「眠り姫仮説」が紹介された。

(6) その他

なし