

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 10 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2009 ～ 2012
 課題番号： 21580400
 研究課題名 (和文) 熱測定による、培養できない微生物にも適用可能な、土壌生態系機能解析法の新展開
 研究課題名 (英文) Development of a novel calorimetric method for analyzing microbial properties of soil including VBNC microbes.

研究代表者
 田中 晶善 (TANAKA AKIYOSHI)
 三重大学・大学院生物資源学研究科・教授
 研究者番号： 10155111

研究成果の概要 (和文)：土壌試料をそのまま用い、これに各種炭素源を加えた際の発熱過程を測定することによって、土壌の生態系機能の一つとしての微生物性を解析する手法を開発した。土壌試料の採取や保存条件が土壌の微生物性に与える影響を検討し、標準的な採取法を策定すると共に、得られた結果を解析する標準的モデルを決めた。この手法を用いて、土壌微生物活性のストレス物質の効果や、土壌の機能的多様性を評価する手法を開発した。

研究成果の概要 (英文)：A novel calorimetric method for analyzing functional properties of soil microbes including VBNC microbes was developed. Exothermic processes of carbon-source assimilation by soil microbes were directly observed using soil samples as they were, and calorimetric parameters which characterize the exothermic procedures were evaluated for each combination of soil sample and carbon source. It was shown that functional properties of soil microbes, such as resistibility of microbes against chemicals and functional diversity of soil microbes, can be quantitatively evaluated on the basis of the analysis of the parameters.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物物理化学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：環境分析、熱測定、土壌微生物、バイオログ法

1. 研究開始当初の背景

土壌微生物による炭素化合物代謝能は、土壌の重要な生態系機能の一つである。

土壌微生物の炭素化合物代謝能解析法として代表的なものに「バイオログ法」がある。これはマイクロプレート上のくぼみに、各種の炭素源を系統的・網羅的に置き、土壌希釈

液を加えるというものであり、土壌微生物による資化が起こると紫色に発色する。

その発色パターンから、土壌微生物種の同定や、土壌の炭素化合物代謝機能、およびこれを指標とした土壌微生物の多様性解析ができる。

この手法は頻用されるが、本質的に培養法

であるため、土壤微生物（大半が培養困難微生物 VBNC と考えられる）の生態とその代謝能力をそのまま反映してはいないと考えられる。

研究代表者らは、バイオログ法の特長を活かしつつ、その欠点を克服し、すべての微生物活性を評価対象とする手法の開発をめざして、科学研究費（萌芽研究）「熱測定による、培養できない微生物にも適用可能な、土壤生態系機能解析法の開発」（平成 19～20 年度）を受け、この手法が、土壤生態系、特に土壤の微生物性の解析に有効であることを示した。

2. 研究の目的

炭素源が代謝される速さは、炭素源の種類と土壤に含まれる微生物の種類に依存するので、これを指標として、土壤の炭素化合物代謝能を定量的に特徴づけ、評価することができる（図 1）。

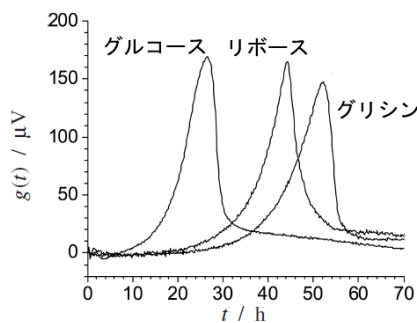


図 1 発熱過程曲線（サーモグラム）の例

畑土壤 10g に炭素源を与えた際の資化に伴う発熱過程。縦軸は発熱シグナル、横軸は時間を表す。

この原理や機能に基づいて、土壤微生物の多様性や土壤生態系機能を解析する手法を、装置と解析法の標準化を含めて確立し、その手法の有用性を立証することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 多サンプル同時測定が可能な装置の作成

バイオログ法では 96 穴プレートを用いていることを参考にして、一つの土壤試料について数十種の炭素源の資化過程を同時測定できる等温熱量計（特にその測定部）を制作した。

(2) 発熱過程の測定

三重大学附属農場、附属演習林等から、畑、水田、果樹園、森林等、種々の土壤試料を採取した。それぞれの土壤に、糖やアミノ酸を始めとした種々の炭素源を加え、土壤微生物

による資化に伴う発熱過程を測定した。その結果に基づいて、発熱過程を特徴付ける各種パラメータを評価した。

本研究においては原則として、採取土壤試料を風乾後、水分量を最大容水量の 50% に調整し、10 日間前培養を行った後、各種炭素源（炭素原子として 0.6mmol 相当）を加え、25℃、好氣的条件で発熱過程を測定するという方法を採用した。得られたサーモグラムの解析に最も適切なモデルを検討し、発熱パラメータ（総発熱量、最大発熱速度に達する時間、発熱が半分終了する時間、最大発熱速度、最大発熱速度定数）を求めた。

(3) 標準的測定・解析条件の設定

サーモグラムの解析（熱測定パラメータの評価）に最も適した成長曲線モデルの検討を行うと共に、土壤の採取条件（季節、深さ）や保存条件が熱測定パラメータに与える影響を検討し、本法の標準的な測定と解析条件の設定を行った。

(4) 土壤微生物性評価への応用

上記のような方法を用いて種々の系で測定・解析を試み、土壤微生物性評価法としての本法の可能性を検討した。

4. 研究成果

(1) 熱測定部の制作

熱電素子、ヒートシンク、循環恒温槽などを用いて、シャーレやバイアルなど多様な試料容器の形状に対応でき、5～10 グラム程度の土壤を対象として、同時に多試料を測定可能な熱測定システムを構築した（図 2）。



図 2 システムの測定部（部分）

(2) サーモグラム解析モデルの検討

熱測定によって得られる発熱過程曲線（サーモグラム）を成長曲線に基づいて解析する場合に、どの成長曲線を用いるのが最も適切かを検討した。ロジスティック、ヒル、ゴンペルツ、およびリチャーズの各モデルについて、約 800 種のサーモグラムを解析し、赤池情報量規準によって適否を判断した。その結果、熱測定パラメータの正確な評価にはリチャーズモデルを用いるのが最適であること、またロジスティックモデルは簡便な解析に

適していることを明らかにした。

(3) 標準的測定条件の設定

土壌試料を採取してその生物性を調べようとする場合、同一地点であっても、季節や採取深さが異なる場合、それらがどのような影響を与えるのか（与えないのか）についての知見は多くない。

さらに、採取した土壌試料を保存する場合、乾燥させ、低温において密封容器中で保存することが多いが、保存中にどのような変化が起こっているのかについての知見も乏しい。

そこで、これらの問題が熱測定の結果やその解析にどのような影響を与えるのかを検討した。

①採取の季節と表層からの深さの影響

土壌試料は、三重大学附属農場の畑で、冬から翌年の冬まで定期的に5回採取し、表層から30cmまでの土壌を3層に分け、試料とした。

全試料について発熱過程や発熱パラメータを比較したところ、全体としてほぼ同じであるが、一部例外的に異なる特徴を示す試料もあった。

②試料の保存温度と期間の影響

乾燥状態で、室温、冷蔵（4℃）、および冷凍（-30℃）で、2、5、8、および10か月保存した畑土壌試料に、糖やアミノ酸など18

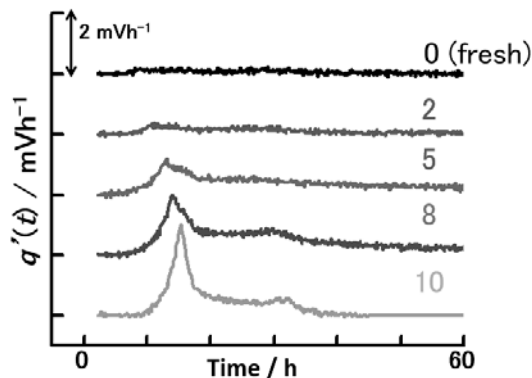


図3 室温で長期間保存した畑土壌試料のキシロース資化サーモグラム
右段の数值は保存期間(月)。保存が長期になるに伴い、キシロース資化能を獲得する。

種の炭素源を加えて熱測定し、サーモグラムの解析を行った。その結果、冷蔵、冷凍保存では10か月でも、また室温保存では2か月まではほとんど変化が見られないが、室温で5か月以上保存したものでは、炭素源によっては新たな発熱ピークが見られたりするなどの変化が見られた(図3)。発熱パラメータに基づいてクラスター分析を行うと、室温で5か月以上保存した試料は、別の場所から採取された土壌試料と同じクラスターに属

することが示された(図4)。

以上の結果より、生物性評価のための熱測定用土壌試料の採取に当たっては、採取の時

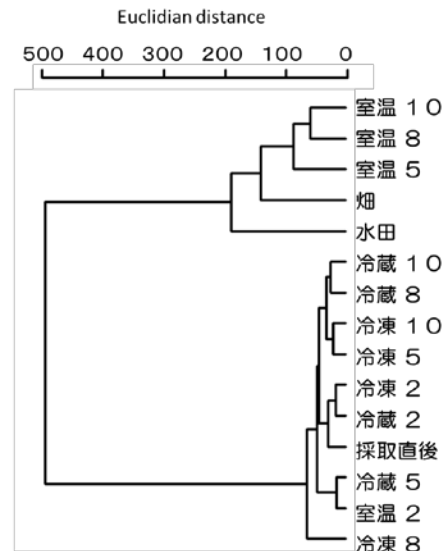


図4 保存期間と保存温度を異にする土壌試料のクラスター分析の結果

サンプル名の数値は保存期間(月)。「畑」、「水田」は参照のための別の地点の試料。5種の発熱パラメータを用い、Ward法で分析した。

期と深さは揃えるのが望ましいこと、また採取試料を4℃以下の低温で保存すれば、10か月までは新鮮な土壌試料と同等と見なうことが示された。

(4) 土壌微生物性評価への応用

①土壌微生物の活性抑制物質の効果の解析

各種土壌に対する農薬(除草剤2,4-PA)の影響について、グルコースを炭素源として与えた場合の資化サーモグラムに基づいて解

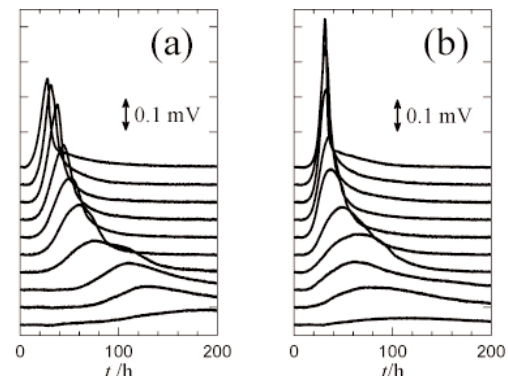


図5 水田(a)および畑(b)土壌に除草剤2,4-PAを加えた際のグルコース資化サーモグラム

土壌中2,4-PA濃度は上から下へそれぞれ0~4mg/g、および0~2.2mg/g。

析を行った。発熱パラメータに与える農薬の効果調べることにより、最小生育阻止濃度や、農薬の効果の共同性の指数などを評価した。その結果に基づいて、土壤微生物活性に与える農薬の効果を定量的・定性的に議論できることを示した。

他方、長年にわたって塩素系農薬 (γ -HCH および TPN) を投与し続けてきたそれぞれの土壤と、投与していない参照用土壤、計3種について検討したところ、PCR-DGGE 法によっては微生物 (細菌相) 群落構造の差が確認できないが、熱測定法によって炭素源資化活性を指標とすると有意な差がみられることが示された。

② 土壤の利用形態との相関

大学農場や演習林、農家の畑や河川敷などから採取した、利用形態を異にする各種土壤試料に数十種類の炭素源をそれぞれ単独で与えた場合の発熱過程を測定した。発熱パラメータの値に基づいて土壤のクラスター分析を行ったところ、畑土壤は畑土壤で、森林土壤は森林土壤でクラスターを形成するなど、土地利用形態をよく反映した結果が得られた (図6)。すなわち土地の利用形態が土壤の生物性に影響を与えること、またその影響を熱測定によって解析可能であることが示され、本法が土壤の微生物性を評価するための有効で新規な手法である可能性が示唆された。

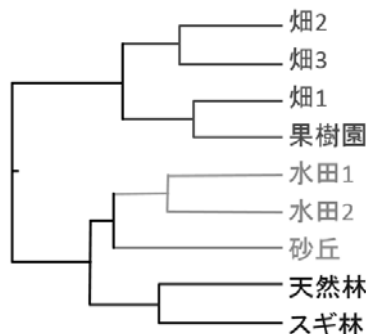


図6 発熱パラメータに基づく各種土壤のクラスター分析の例
土地利用形態を反映したクラスターを形成した。

③ 土壤微生物群集の機能的多様性評価方法の開発

試料として、畑、果樹園、水田など、計13種類の土壤を用い、糖やアミノ酸など41種類の炭素源をそれぞれ単独に加え、サーモグラムを得た。

すべてのサーモグラムについて、発熱速度が最も大きくなる時間の平均値を求め、その時間における発熱量を評価し、これを用いて、

シャノン指数およびシンプソン指数により各土壤の機能的多様性を評価した (シャノン指数の結果を図7-aに示す)。

他方、各土壤からゲノム DNA を抽出し、PCR-DGGE 法によるゲルのバンド数とバンド強度から、一般細菌叢の種の多様性を、シャノン指数とシンプソン指数により評価した (シャノン指数の結果を図7-bに示す)。

この結果、機能的多様性と種の多様性には相関はなく、熱測定法では種の多様性とは異なる土壤微生物性の多様性の一側面を評価していることが示された。

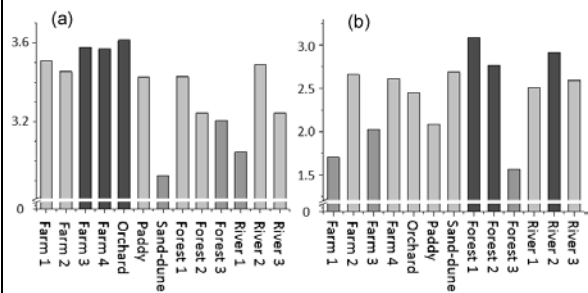


図7 各種土壤の多様性評価の結果
(a)熱測定法に基づく機能的多様性、および
(b)PCR-DGGE 法に基づく種の多様性の評価結果。縦軸はシャノン指数の値。Farm 1~4などは、異なる地点で採取した畑土壤等を示す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

①坂宮章世, 田中晶善, 微生物熱測定データ解析モデルの妥当性の検討, 熱測定, 査読あり 37(2), 58-63 (2010)

②Akiyo K. Sakamiya, Natsuki Origuchi, and Akiyoshi Tanaka "Calorimetric Analysis of Effects of a Soil-Stress Compound on Soil-Microbial Activity" *Netsusokutei (Calorimetry and Thermal Analysis)*, 査読あり, 37(5), 186-190 (2010)

[学会発表] (計10件)

①石川卓, 小野泰弘, 妹尾啓史, 田中晶善, 熱測定法と PCR-DGGE 法を用いた土壤微生物群集の多様性評価, 日本農芸化学会, 2013年3月27日, 東北大学 (仙台)

②石川卓, 林寛人, 妹尾啓史, 田中晶善, 熱測定法を用いた土壤微生物の資化活性に基づく土壤試料の保存条件検討, 日本農芸化学会, 2013年3月27日, 東北大学 (仙台)

③T. Ishikawa, Y. Ono, K. Senoo, and A.

Tanaka, "Development of evaluation methods for soil microbial diversity by carbon source utilization activity using multiplex calorimetry", 15th International congress on Thermal Analysis and Calorimetry, 2012年8月24日, 近畿大学(東大阪)

④小野泰弘、石川卓、妹尾啓史、田中晶善、熱測定法による土壌微生物の多様性評価、日本土壌微生物学会、2012年6月23日、神戸大学(神戸)

⑤畑田優、坂宮章世、高橋克忠、田中晶善、微生物活性測定を目的とした多試料等温型熱量計の試作とその応用、日本熱測定学会、2010年9月28日、三重大学(津)

⑥坂宮章世、蒔田和弥、桑原麻衣、近藤沙紀、田中晶善、熱測定法による、土壌微生物活性への塩化ナトリウムの影響の解析、日本熱測定学会、2010年9月28日、三重大学(津)

⑦坂宮章世、折口菜都希、田中晶善、多サンプル同時熱測定法による、各種土壌の微生物活性への除草剤の影響の解析、日本土壌微生物学会、2010年5月21日、東京大学(東京)

⑧坂宮章世、妹尾啓史、田中晶善、多サンプル同時熱測定法による土壌の生物性評価の試みー各種炭素化合物代謝過程の解析に基づいてー、日本土壌微生物学会、2010年5月21日、東京大学(東京)

⑨坂宮章世、田中晶善、微生物熱測定データ解析モデルの検討、日本熱測定学会、2009年9月28日、首都大学東京(八王子)

⑩坂宮章世、折口菜都希、田中晶善、熱測定法による、土壌微生物活性への土壌ストレス物質の影響の解析、日本熱測定学会、2009年9月28日、首都大学東京(八王子)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 晶善 (TANAKA AKIYOSI)

三重大学・大学院生物資源学研究科・教授
研究者番号： 10155111

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

妹尾 啓史 (SENŌ KEISHI)

東京大学・農学生命科学研究科・教授
研究者番号： 40206652