

学 位 論 文 要 旨

氏 名	松下 美歩
題 目	リン脂質脂肪酸分析法を用いた森林土壌および木材中の微生物群集構造の推定 (Application of phospholipid fatty acid analysis for microbial community structure in soil and wood on the forest floor)

本論文は、土壌試料から直接抽出したバイオマーカーをもとに微生物群集構造を推定する方法の一つであるリン脂質脂肪酸 (PLFA) 分析法を用いて、九州南東部の森林生態系、特に過去の土地利用履歴や微地形が土壌微生物群集構造へ及ぼす影響について検討し、さらにこの分析法を森林内での木材の腐朽過程における微生物群集構造遷移の解析に応用しようとしたものである。

過去に草地または薪炭林として利用されていたスギ人工林および天然性林を用いて、これら過去の土地利用歴が現在の森林土壌中の微生物群集構造に及ぼす影響を、異なる深さから採取した土壌を用いて比較検討した。PLFA データを解析した結果、FH 層では現在の植生による影響が見られたが、A 層上部 (0-5 cm) において過去の土地利用歴の影響が検出された。しかし、それよりも下層の A 層下部 (5-10 cm) においては、現在の植生による影響がより強くみられた。このように採取した土壌の中間層に当たる A 層上部に過去の土地利用歴の影響が強く見られたのは、土壌の理化学的性質の違いよりもむしろこの土壌層に集中する下層植生の根の影響によるものではないかと推定された。しかし、草地は傾斜が比較的なだらかな場所が利用されるなど土地利用様式と地形には一定の傾向があるため、斜面位置の影響についても検討する必要がある。そこで同程度の広さのスギ人工林を用いて検討したが斜面の位置や角度、土壌の凹凸などの微地形は土壌微生物群集構造にあまり大きな影響を及ぼさないことが明らかとなった。

スギ人工林または天然性林でのスギ及びコナラ供試材の腐朽にともなう微生物群集構造の変化について比較検討した。クラスター分析の結果、土壌中の微生物群集構造にはスギ人工林と天然性林で違いが明らかに認められるが、そこに埋土した供試材中の微生物群集構造には森林の植生の影響はあまり見られず、むしろスギかコナラという供試材の樹種の影響が明瞭に見られることが明らかとなった。さらに、木材の腐朽には、菌類に属する担子菌の寄与が大きいと一般にいわれてきたが、スギ材においては菌類バイオマスと木材腐朽率との間には相関関係が認められず、スギ材の腐朽には細菌類や放線菌類の関与が比較的大きいものと推定された。

以上の結果より、微生物群集構造の解析に使用したリン脂質脂肪酸分析 (PLFA) 法は、過去の土地利用履歴や植生の違い、腐朽材の樹種の違いによる影響を明確に検出しており、森林生態系における微生物群集構造への影響を推定する方法として、きわめて有効な手段の一つであることが分かった。

《英 文》

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Miho Matsushita
題 目	Application of phospholipid fatty acid analysis for microbial community structure in soil and wood on the forest floor (リン脂質脂肪酸分析法を用いた森林土壌および木材中の微生物群集構造の推定)

Effects of the previous land-use types or micro-topographic factors on soil microbial community structures in forests in southeastern area of Kyushu were investigated by using phospholipids fatty acid (PLFA) analysis. The use of this PLFA analysis was also attempted to detect the changes in microbial community during decomposition of wood samples on forest floors.

Phospholipid fatty acid profiles were used to evaluate microbial community composition in different soil layers of sugi plantations and semi-natural secondary forests which had previously been utilized as meadows or coppices. Statistical analysis of the PLFA data demonstrated difference in microbial community structure between current vegetation in the FH layer. Differences between the previous land-use types were detected through variation in the soil microbial community structure in the upper part of the A layer (0-5 cm). However, in the deeper part of the A layer (5-10 cm), the influence of the current vegetation could be detected, again. In the 0-5 cm part of the A layer, the organic matter was correlated with the microbial community structure, but the difference in chemical characteristics between the sites was small. These result suggested that the rhizosphere of the understorey could play some role in microbial communities of the upper soil layer in a forest. The micro-topographic factors such as position and asperity of the slope could be another factor on the structural change of soil microbial community, because the flat part of mountain slop has been usually used for meadow. So, microbial community structures and chemical properties of surface soils on the slope in sugi plantation were measured. The results suggested that the micro-topographic factors, position and asperity of the slope in a small scale could have a little effect on the structure of soil microbial community.

This PLFA analysis was also used to estimate the changes in microbial community structure during decompositions of sugi and konara wood samples buried in soil of sugi plantation or semi-natural secondary forests. As the result of cluster analysis, the microbial community structure estimated by PLFA composition was classified in two groups by the wood species of sample, not by the forest vegetation. In konara wood sample, the index of fungal biomass was held constant at a higher level. In sugi wood sample, no correlation was found between the amount of fungal biomass and the degree of wood decay. These results suggested that bacterial and actinomyces groups except for fungal group would play a significant roll in the decay of sugi wood sample.

These results suggested that PLFA analysis could be a useful method for detecting influence of land-use history and estimating the changes in microbial community structure during decompositions of organic matter.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	松下 美歩
審査委員	主査 宮崎大学 教授 目黒貞利
	副査 宮崎大学 准教授 伊藤 哲
	副査 鹿児島大学 教授 米田 健
	副査 佐賀大学 教授 柳田晃良
	副査 琉球大学 教授 金城一彦
審査協力者	
題目	リン脂質脂肪酸分析法を用いた森林土壌および木材中の 微生物群集構造の推定 (Application of phospholipid fatty acid analysis for microbial community structure in soil and wood on the forest floor)
<p>本論文は、土壌試料から直接抽出したバイオマーカーをもとに微生物群集構造を推定する方法の一つであるリン脂質脂肪酸 (PLFA) 分析法を用いて、九州南東部の森林生態系が土壌微生物群集構造へ及ぼす影響を、過去の土地利用履歴や微地形について検討し、さらにこの分析法を森林内での木材の腐朽過程における微生物群集構造遷移の解析に応用し、以下の結果を得た。</p> <p>まず、過去に草地または薪炭林として利用されていたスギ人工林および天然性林を用いて、これら過去の土地利用歴が現在の森林土壌中の微生物群集構造に及ぼす影響を、異なる深さから採取した土壌を用いて比較検討した。PLFAデータを解析した結果、FH層では現在の植生による影響が見られたが、A層上部 (0-5 cm) において過去の土地利用歴の影響が検出された。しかし、それよりも下層のA層下部 (5-10 cm) においては、現在の植生による影響がより強くみられた。このように採取した土壌の中間層に当たるA層上部に過去の土地利用歴の影響が強く見られたのは、土壌の理化学的性質の違いよりも</p>	

むしろこの土壌層に集中する下層植生の根の影響によるものではないかと推定された。しかし、草地は傾斜が比較的なだらかな場所が利用されるなど土地利用様式と地形には一定の傾向があるため、斜面位置の影響についても検討する必要がある。そこで同程度の広さのスギ人工林を用いて検討したが斜面の位置や角度、土壌の凹凸などの微地形は土壌微生物群集構造にあまり大きな影響を及ぼさないことが明らかとなった。

スギ人工林または天然性林でのスギ及びコナラ供試材の腐朽にともなう微生物群集構造の変化について比較検討した。クラスター分析の結果、土壌中の微生物群集構造にはスギ人工林と天然性林で違いが明らかに認められるが、そこに埋土した供試材中の微生物群集構造には森林の植生の影響はあまり見られず、むしろスギかコナラという供試材の樹種の影響が明瞭に見られることが明らかとなった。さらに、木材の腐朽には、菌類に属する担子菌の寄与が大きいと一般にいわれてきたが、スギ材においては菌類バイオマスと木材腐朽率との間には相関関係が認められず、スギ材の腐朽には細菌類や放線菌類の関与が比較的大きいものと推定された。

以上のように本論文は、近年、森林の土壌微生物群集構造解析に欧米で盛んに用いられていながら、わが国ではほとんど報告例のないリン脂質脂肪酸分析法によって、過去の土地利用履歴や微地形が森林土壌微生物群集構造へ及ぼす影響を明確に検出できることを示し、本分析法の有用性を明らかにした。さらにこの分析法は森林内での木材腐朽過程の微生物群集構造解析にも応用可能なことを示し、このことは今後の木材腐朽現象の解明に大きく貢献するものと高く評価できる。よって、本論文は博士(農学)の学位論文として十分に価値あるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	松下 美歩
審査委員	主査 宮崎大学 教授 目黒貞利
	副査 宮崎大学 准教授 伊藤 哲
	副査 鹿児島大学 教授 米田 健
	副査 佐賀大学 教授 柳田晃良
	副査 琉球大学 教授 金城一彦
審査協力者	
実施年月日	平成20年 6月28日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査及び副査は、平成20年6月28日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	松下 美歩
<p>[質問 1] 分析量が非常に多く、信頼性が高い。今後の変化のモニタリングに道を開く研究と評価できる。過去の土地利用履歴との関連で、0-5cm の層に過去の土地利用の影響が最も強く残っていることについて、下層植生の違いをその理由としているが、過去の土地利用が現在の下層植生に具体的にどのような違いを生じさせているのか、</p>	
<p>[回答 1] 以前、伊藤らが、過去の土地利用履歴が異なるスギ人工林と天然性林における下層植物種の多様性について検討しており、過去が草地あるいは薪炭林かによって森林の下層植生の種組成が大きく異なることを明らかにしている。本研究はその試験地を用いて土壤微生物群集構造に及ぼす影響を検討した結果なので、下層植生の根の影響と推定した。</p>	
<p>[質問 2] そのことは承知しているが、その原因が下層植生の根の影響と言うのであれば、下層植生がなぜ過去の履歴を引きずっているかを説明する必要がある。</p>	
<p>[回答 2] 過去の利用履歴によって生活形組成、特に草本植物の出現傾向が異なる。これは、草地利用による木本植物の繁殖体の欠如、および草本植物の埋土種子寿命が比較的長いことによると思われる。</p>	
<p>[質問 3] リン脂質脂肪酸と微生物グループの組成および量的な関係にもう少し説明が必要ではないか。とくに、複数の微生物グループに重複するような脂肪酸をどのように扱うかという点が不明である。</p>	
<p>[回答 3] これまで一般的に捉えられていた種のレベルの組成ではなく、機能が類似したグループの組成として群集構造を捉えている。生態学的な機能タイプの評価に近い考え方である。特定のリン脂質脂肪酸と特定の微生物が一对一で対応しているわけではない。あるリン脂質脂肪酸で微生物の機能グループの量的な指標を得ようとしている。</p>	
<p>[質問 4] 特定の脂肪酸ではなく、それらの組合せを考慮した分析をすると、種の特定を含むもう少し詳細な構造分析が可能となり、さらに発展性があるのではないかと。たとえば抗体などをもちいればさらに精密になると思うが。</p>	
<p>[回答 4] その考え方で、種の同定までを行うことを目的にするのであれば、DNA を用いる方法が優れているだろう。しかし、複雑な種構成の土壤微生物を種レベルで扱うのは現実的ではない。また、DNA の場合は PCR 増幅による誤差のため生体量を定量するには向かない。</p>	

今回の目的、すなわちマクロな視点でみた微生物群集の機能評価を行うという目的には、現時点ではリン脂質脂肪酸分析が最も適しているのではないかとと思われるし、そのように評価されている。

[質問5] 今回の一連の結果を通して考えると、微生物群集の構造が与えられた基質に直接的に反応していると見てよいか？

[回答5] 原則的に微生物は、適した環境や基質がない場合でも、孢子としての残存能力は高く、新たに適した基質が与えられれば速やかな増殖が可能であると考えられる。ただし、その周りはずもとの土壌微生物群集構造が維持されていると思われるので、基質が分解され易かったり、基質の絶対量が少ない場合は全体の変化としてみれば非常に小さく、基質の影響は一時的なものかもしれない。

[質問6] 元々の土壌の微生物群集組成が基質上の群集に影響するのではなく、与えられた特定の基質に適した特定のグループが増加し、それによって群集構造が変化するのか？

[回答6] 今回の結果では、基本的には与えられた基質の影響が大きいと考えられる。

[質問7] そうであれば、微生物群集構造は基質によって決まってしまうことになるが、そうなのか？

[回答7] 今回のスギ林内での木粉の分解試験で見られたように、スギ木粉はコナラ林内よりもスギ林内で良く分解されることから、現植生下での土壌微生物群集組成に影響を受ける部分があるのも事実である。

[質問8] スギ林内の土壌に埋設したスギ材が良く分解されるのは、菌類よりも放線菌の方がその基質に適しているということか？

[回答8] 放線菌の影響が大きいということで、腐朽の主体は菌類によるものと思われる。