

第5節 土壤微生物による資源利用特性の解析

生態系における無機元素利用（獲得）を考えると、それらの一次供給源および獲得様式に基づいて、以下のように類型化してみるとわかりやすい。

- I. 植物による光合成を経て、大気・水より同化される炭素、水素、酸素.
- II. 微生物あるいは非微生物過程によって、大気中より固定される窒素.
- III. 岩石・土壌より供給されるリン、カリウム、カルシウム、マグネシウム、その他の金属元素.

大気・岩石が一次的供給源であるのに対し、ある程度成熟した生態系においては、上記 II では土壌有機物プールが、III では土壌コロイド表面に吸着された易交換性のプールが、事実上の供給源となっていることが多い。本節では特に微生物による土壌有機物無機化に着目し、関連する土壌の性質と合わせて、そのプロセスを解析する。この土壌有機物の分解は、生態系における窒素動態の主要な過程であるのと同時に、地球温暖化に関わる炭素循環において重要な過程でもある。

本実験では、森林、耕地、草地など異なる生態系より採取した土壌試料を用いる。以下の項目について調べた上で、土壌有機物の無機化を規定する要因（土壌の一般理化学性）について考察する。

1. 静置実験による土壌の有機炭素無機化過程の解析
2. 静置実験による土壌の有機窒素無機化過程の解析
3. 土壌 pH の測定
4. 土壌の有機炭素含量の定量

5.1 静置実験による土壌の有機炭素無機化過程の解析

【測定原理】 密閉容器中に湿土とアルカリ溶液を入れ、2週間の静置期間中に発生する二酸化炭素をアルカリ溶液中に捕捉した後、酸-アルカリ滴定により重炭酸イオン量を定量する。

【試薬】

- 1) 1M NaOH：特級 NaOH（粒状）を利用する。大気中の二酸化炭素を吸収するので、使用する直前に作成する。
- 2) 1M HCl：濃塩酸（約 12M）を希釈する。HCl のガスが発生するので、ドラフト内で作業する。
- 3) 0.01M HCl：2) で作成した 1M HCl を希釈する。
- 4) 0.2M HCl：滴定用。市販の容量分析用 1M HCl より調製する。
- 5) 0.1%フェノールフタレイン溶液：指示薬。フェノールフタレイン 0.1g を 60%エタノール 100 mL に溶解させる。変色域は pH 8.2-10.0 で、アルカリ側で濃いピンク、酸性側で無色である。準備済み
- 6) 0.1%ブロムクレゾールグリーン：指示薬。ブロムクレゾールグリーン 0.1g を 20%エタノール 100mL に溶解させる。変色域は pH 3.8-5.4 で、アルカリ側で青、酸性側で黄色である。準備済み

【器具】 ポリ製 500mL 容角型培養容器、バイアル（中）2個、ピンセット、インキュベーター、三角フラスコ、ビュレット

【手順】 本実験は、3週にわたって継続的に行う。

- 1) 湿潤土壌 15.0g をバイアル（中）にとる。水分条件は土壌の最大容水量の 50~60%を目安とする。今回は、2ml の水を添加する。
- 2) もう一つのバイアル（中）に約 1M NaOH を 10mL 入れる。

- 3) これら2つのバイアルをポリ製培養容器へ入れる（ピンセットを用いる）。
- 4) 乾燥を防ぐため、約0.01M HCl 10mLを培養容器の底へ加える。培養容器の中フタ、外フタをしっかりと閉め、大気由来の二酸化炭素の混入を最小限に抑える。
- 5) 30°Cに調節したインキュベーターへ入れて放置する。
- 6) 土壌を入れないブランク試料を各班4本、同様に準備して静置する。——本実験では、操作中の大気由来炭酸ガスの吸収が避けられない。このバックグラウンド値を測定しておく必要がある。
- 7) 捕捉CO₂の定量（第2・3週）。炭酸ガスを捕捉したアルカリ溶液を2段階に分けて滴定・定量する。1段階目で余剰のOH⁻を中和するとともに、捕捉した炭酸ガスに由来するCO₃²⁻を部分中和する。2段階目でHCO₃⁻を中和するが、下記の反応式から明らかなように、アルカリ溶液が捕捉した炭酸ガスのモル数は、ここで滴定に要した酸のモル数に等しい。

（1段階目） $\text{OH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}$

$\text{CO}_3^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HCO}_3^-$ ($pK_a = 10.35$)

（2段階目） $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$ ($pK_a = 6.35$)
- 8) 以下、上記1段階目の反応である。アルカリ溶液は空気中の炭酸ガスを吸収し誤差の原因となるため、操作は迅速に行う。培養容器中のアルカリ溶液を100mL容三角フラスコに取る（ブランク用試料も同様に）。バイアルの壁に残留したアルカリ溶液を脱塩水で完全に洗い移す。pH指示薬として0.1%フェノールフタレイン溶液を数滴加えた後（ピンクになる）、1M HClを8mL程度加える。なおこのとき加える1M HCl量は、吸収した炭酸ガス量によって異なるであろう。加えすぎて指示薬のピンク色が消えないよう慎重に行う。
- 9) 指示薬（フェノールフタレイン）のピンク色が消えるまで、ビュレットを用いて0.2M HClを加える。
- 10) これより2段階目の反応である。新たに指示薬として0.1%ブロムクレゾールグリーン溶液を数滴加え（青色になる）、0.2M HClで滴定する。滴定終点は、指示薬による色が青から黄色に変わる点である。
- 11) 第2週終了後、バイアルに新しい約1M NaOHを10mL加え、インキュベーター内に静置し、培養を継続する。

5.2 静置実験による土壌の有機窒素無機化過程の解析

【測定原理】 土壌中の窒素の大部分は有機態窒素である。本法では、2週間の静置期間中に無機化される窒素を中性塩溶液中に抽出し、比色法を用いて定量する。

【試薬】

- 1) 1M KCl 溶液。
- 2) 2M KCl 溶液。
- 3) 粒状 Cd：硝酸塩分析用。カラム設定済み。
- 4) カラム緩衝液：NH₄Cl 10g を水に溶かして 1L にする。
- 5) 硝酸態窒素標準液：105°Cで24時間絶乾したKNO₃ 0.3609gを1M KCl溶液に溶かして500mlとし（100mg NO₃-N/Lの硝酸態窒素溶液）、これをもとに0, 2, 4, 6, 8, 10mg NO₃-N/L標準溶液を50mlメスフラスコに調製する。
- 6) スルファニルアミド液：スルファニルアミド0.5gを2.4M HCl 100mLに溶解する。
- 7) N-（1-ナフチル）-エチレンジアミン液：N-（1-ナフチル）-エチレンジアミン二塩酸塩0.3gを0.12M HCl 100mLに溶解する。
- 8) アンモニア標準液：絶乾したNH₄Cl 0.1911gを1M KCl溶液に溶かして500mlとし（100mg

- NH₄-N/L), これをもとに0, 1, 2, 3, 4, 5mg NH₄-N/L 標準溶液を 50 ml メスフラスコに調製する.
- 9) インドフェノール反応 A 液: 2-ヒドロキシフェニル Na 四水和物 30g とニトロプルシドナトリウム 100mg を水で溶かして, 1L に定容する. なお, 作成量はサンプル数に応じて調節すること.
 - 10) インドフェノール反応 B 液: NaOH 5g, アンチホルミン (次亜塩素酸ナトリウム溶液) 8.4mL, クエン酸 3Na 二水和物 40g を水に溶かして, 1L に定容する. 作成量はサンプル数に応じて調節すること.
 - 11) 試薬 5)・6)に使用する HCl は, 適宜濃 HCl (12M) を希釈して調製する.

【器具】 バイヤル (大) 8 個, インキュベーター, ホールピペット, メスフラスコ

【手順】 本実験は, 3週にわたって継続的に行う. 分析日をそろえるために, 第1・2週にそれぞれ静置培養を開始し, 第3週に培養していない試料と併せて無機態窒素の抽出・定量を行う.

- 1) 各班で, 湿潤土壌 10.0g (森林土壌 1 点, 水田土壌 2 点) をバイヤル (大) にとる. 好氣的インキュベーション (森林土壌 1 点, 水田土壌 1 点) では, 水分条件は土壌の最大容水量の 50~60% を目安とし, 今回は 1.2ml とする. 残る水田土壌 1 点については, 脱塩水 21.2ml を加え, 水田状態を想定した嫌氣的インキュベーションを行う. 土壌が乾燥しないように, パラフィルムでふたをする (第1・2週).
- 2) 30°C に調節したインキュベーターへ入れて放置する.
- 3) 無機化窒素の抽出・定量 (第3週). 好氣的インキュベーション終了後の土壌試料 4 点に 1M KCl 溶液 40mL を加える. 嫌氣的インキュベーション終了後の土壌試料 2 点に 2M KCl 溶液 20ml を加える. また, 保存中の湿潤土壌 10g (森林 1 点, 水田 1 点) には, 1M KCl 溶液 41.2ml を加える. いずれも 30 分間振とう後, 乾燥ろ紙上で濾過し試料液を得る. 以下硝酸態窒素のついては 4)・5)の, アンモニア態窒素については 6)の定量操作を行う.
- 4) Cd カラムを用いた硝酸イオンの還元. カラム緩衝液を約 10mL 流下させ, カラム内を洗浄する. この操作を計 2 回行い, カラム内の 5mL の線に液面を合わせる. そして, 試料液 (あるいは標準溶液) 10mL を静かにカラムに注ぐ. 約 1 分間放置後, バルブを開け流下させる. 流下速度は 5-10ml/分とする. 最初に流下してくる約 10mL は捨てる. その後流下してくる約 5mL を 10ml 試験管に採取し, 亜硝酸態窒素の定量に供する. カラム緩衝液約 10mL を 2 回流下させ, カラム内を洗浄してから, 次のサンプルの処理に移る.

注意! カラム内の Cd が直接空気に触れないように, 常に溶液で満たしておくこと. 操作中に Cd が空気に触れると, Cd カラムの還元能が劣化し実験をすべてやり直さなくてはならない.

- 5) 亜硝酸態窒素の定量: スルファニルアミド-ナフチルエチレンジアミン法 (亜硝酸が酸性溶液中でジアゾ化試薬と反応してジアゾニウム塩を生成し, この塩がさらにカップリング試薬と反応して形成する赤紫色のアゾ化合物を比色定量する) による. 試料液あるいは標準液 0.4mL を 15mL 試験管にとる. ただし, 好氣的インキュベーションを行った水田土壌の試料液については, 試料液 0.2ml + 1M KCl 0.2ml とする. 次に, 脱塩水 10mL, スルファニルアミド液 0.4mL を加えて混合する. 約 5 分間放置後, N- (1-ナフチル) -エチレンジアミン液を 0.4mL 加えて混合する. 約 20 分間放置後, 520nm で比色定量する.
- 6) アンモニア態窒素の定量: インドフェノール法 (NH₄ は次亜塩素酸ナトリウムと反応してクロロアミンを生じ, さらにヒドロキシフェノールと反応して青色のインドフェノールブルーを生成する) による. 25mL 試験管に濾過済の試料液あるいは標準液をホールピペットで 5mL とる. ただし, 森林土壌と嫌氣的インキュベーションを行った水田土壌の試料液については, 試料液 0.5ml + 1M KCl 4.5ml とする. 反応 A 液を 5mL ホールピペットで加え, パラフィルムで覆った後激しく振とうする. 続いて反応 B 液を 10mL ホールピペットで加え, 再びよく振とうする. 60

分後に 625nm で比色定量する.

5.3 土壌 pH の測定

【器 具】 pH メーター, ビーカー (50mL 容), メスピペット, ガラス棒

【手 順】 $\text{pH} = -\log(\text{H}^+)$ と定義され, 酸性の程度を目安となる.

- 1) 風乾土壌 5g を秤取し, ビーカー (50mL 容) に入れる. 各土壌 2 連.
- 2) 脱塩水をメスピペットで 25mL 加え, 時々ガラス棒で攪拌しつつ 30 分間放置する.
- 3) pH メーターで pH を測定する (測定直前に試料懸濁液を攪拌, ガラス電極を浸してから 1 分後に数値を読む).

5.4 土壌の有機炭素含量の定量

【測定原理】 有機物が還元性物質であることを利用して, 間接的に土壌有機物含量を求める. 重クロム酸カリウムを酸化剤として土壌中の有機炭素を完全酸化した後 (下式参照), このとき消費 (還元) されなかった残余の重クロム酸含量を, 二価鉄化合物であるモール塩溶液を用いて定量する.

重クロム酸イオンによる有機炭素の酸化反応: $2\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-} + 3\text{C} + 16\text{H}^+ = 4\text{Cr}^{3+} + 3\text{CO}_2 + 8\text{H}_2\text{O}$

重クロム酸イオンと二価鉄の酸化還元反応: $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-} + 6\text{Fe}^{2+} + 14\text{H}^+ = 2\text{Cr}^{3+} + 6\text{Fe}^{3+} + 7\text{H}_2\text{O}$

【試 薬】 (以下で、試薬の濃度単位 N とは規定濃度のこと。価数×モル数に相当する)

- 1) 0.4N 重クロム酸・硫酸混液: 重クロム酸カリウム 2.5g を 500mL 容三角フラスコにとり, 脱塩水 62.5mL を加え溶解させる. これとは別に濃硫酸 62.5mL をメスシリンダーに取る. 水と氷を入れたプラスチックバットに重クロム酸カリウム溶液の入った三角フラスコを据え, 濃硫酸を極めて少量ずつ加える (ガラス棒を伝わせながら三角フラスコを振り揺らす). 特に終わり頃は慎重に行う (液温が上がると黒色の針状結晶ができ 0.4N にはならない). 後放冷.
- 2) 指示薬: Na_2CO_3 0.2g と N-フェニルアントラニル酸 0.2g を秤取し磁製皿に入れ, 数滴の脱塩水を加えガラス棒でよく練った後, メスシリンダーに取った 100mL の脱塩水を用いて試薬を磁製皿からビーカーに洗い込む. 準備済み
- 3) 0.2N 硫酸第一鉄アンモニウム (モール塩) 溶液: 脱塩水 400mL を 500mL 容ビーカーに取り, モール塩 40g を加えガラス棒で攪拌・溶解した後, 濃硫酸 10mL を加える. 最後にメスフラスコに移し, 脱塩水で 500mL 定容とする.
- 4) 0.1N 過マンガン酸カリウム溶液: 市販品を適宜希釈する.

【器 具】 乳鉢・乳棒, スパチュラ, 薬包紙, 三角フラスコ, ホールピペット, 安全ピペッター, ホットプレート, 漏斗, プラスチックバット, メスシリンダー, 三角フラスコ (1L 容), 氷, ガラス棒, ビュレット, ビュレット台, 廃液ボトル, 磁製皿

【手 順】

- 1) 風乾土壌を薬匙一杯取り乳棒・乳鉢で粉碎する.
- 2) 粉碎した土壌 0.1g を化学天びんで秤量, 三角フラスコ (100mL 容, 乾いていること、底が平らなものがよい) へ移す. 3 連で秤取する. ブランク試験用として沸騰石のみを入れた三角フラスコも 3 連で用意する.

- 3) 三角フラスコへ重クロム酸・硫酸混液 10mL を安全ピペッター付きホールピペットで注加する。
- 4) フラスコに漏斗を差し込み（還流させるため）、200°Cに予め加熱したホットプレート上で加熱する。フラスコの底から一様に泡が発生し始めてから正確に5分間煮沸を続ける。
- 5) ホットプレートからおろし放冷，更に水冷する（酸化終了時の液の色は黄橙色～褐色で，緑色がかっていれば試料重を減らしてやり直し）。
- 6) 漏斗の内壁およびフラスコの口に付着したクロム酸・硫酸混液を少量の脱塩水で洗い込む。滴定操作直前に指示薬（N-フェニルアントラニル酸溶液）を5滴添加し振り混ぜる。
- 7) 0.2N 硫酸第一鉄アンモニウム（モール塩）溶液で滴定する（ μmL ：滴定終点は透明あるいは赤紫色から明緑色に変わる点）。ブランク試験用の試料も同様に滴定する（ μmL ）。
- 8) 0.2N モール塩溶液の力価の標定：ビュレットに標準 0.1N 過マンガン酸カリウム溶液を用意する。モール塩溶液を正確に 5mL 取りビーカー（50mL 容）に移す。これを標準 0.1N 過マンガン酸カリウム溶液で滴定する（終点は，液を振っても過マンガン酸カリウムの紫色が消失しない点）。下式によって力価 F を計算する。

$$0.1\text{N} \times X \text{mL}_{\text{KMnO}_4} = 0.2\text{N} \times 5\text{mL}_{\text{モール塩}} \times F_{\text{モール塩}}$$
- 9) 0.2N モール塩 1 mL の消費が炭素 0.6 mg に相当する。

5.5 各実験日の作業

第1週目の作業

- 5.1 培養開始
- 5.2 培養開始（2週間培養用）
- 5.3 測定
- 5.4 重クロム酸・硫酸混液の調製

第2週目の作業

- 5.1 滴定，培養継続
- 5.2 培養開始（1週間培養用）
- 5.4 測定

第3週目の作業

- 5.1 滴定
- 5.2 培養終了，土壤試料の抽出，アンモニウム・硝酸の比色

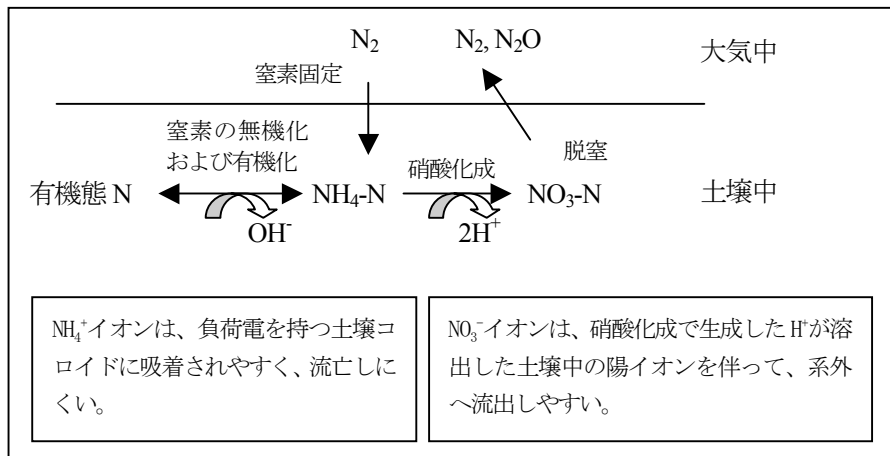
5.6 考察のポイント

I. 静置実験による土壤の有機炭素無機化過程の解析

一週目と二週目における無機化炭素量は，どちらが大きかったか？ その違いの程度は，森林土壤と畑土壤で比べたらどうか？ 一週目が顕著に大きかった場合，その理由として考えられるのは？——例えば微生物によってごく利用されやすい有機物の蓄積？

II. 静置実験による土壤の有機窒素無機化過程の解析

好氣的な土壤における窒素のフローの概要は以下の通りである。



本実験は閉鎖系で行われたので NO_3^- イオンの流亡は起こらず、もし有機態 N の無機化が卓越していれば NH_4^+ イオンまたは NO_3^- イオンの集積が観察される。脱窒は測定困難であるが、嫌気的条件下では NO_3^- イオンの NH_4^+ イオンへの還元と並んで、起こりうる過程である。また本実験の条件では、窒素固定を無視することとする。

窒素無機化の実験では、有機態 C の無機化と異なり、窒素無機化により生成した NH_4-N の再有機化が起こりうることに注意が必要。これらの点に留意した上で、検出された無機態 N の形態 (NH_4-N , NO_3-N , $NH_4-N + NO_3-N$ の合計) とそれらの量の時間に伴う推移について考察せよ。

III. 土壌 pH の測定

IV. 土壌の有機炭素含量の定量

これらの項目は、I, II の実験結果を説明する際、積極的に用いること。

V. 総合討論

以下の点に注意しながら土壌微生物による資源利用特性について、森林土壌、畑土壌、水田土壌 (嫌氣的インキュベーション) を比較検討せよ。

- 1) 全有機炭素量に対する無機化炭素量の割合は、森林土壌と水田土壌のどちらで高かったか？ またその理由をどう考えるか？
- 2) おそらく炭素無機化は、インキュベーション開始直後 (一週目) から活発であったと思われる。それに対して、見かけの窒素無機化量はどうか？ もし窒素無機化が一週目で低いように見えたならば、その原因は？
- 3) 無機化された有機物の CN 比を比べてみよ。この違いをもたらしたのは、前述の窒素動態に関する図の中のどのプロセスが異なったからであろうか？
- 4) 一般に、土壌酸性は硝酸化成を抑制する傾向にあること、豊富な無機態 N が有機炭素の無機化を促進することなどが知られている。今回の実験は森林、畑、水田土壌各一点のみであり一般化は難しいが、可能な範囲で、土壌微生物による資源利用特性について、森林土壌、畑土壌、水田土壌を比較検討せよ。