

## 土壤微生物のエネルギーチャージ測定と環境浄化能の解明

Energy charge and purification ability of soil microorganisms

代表研究者 三重大学生物資源学部助教授

犬伏和之

Assoc. Prof., Fac. of Bioresources, Mie Univ.  
Kazuyuki INUBUSHI

The roles of soil microorganisms are extremely important, especially in the dynamics of bioelements and energy flow, playing as a "motor", maintenance of soil fertility and even the existence of all lives on the earth. The soil microorganisms are also critical in the purification of our environments.

In this study, I proved first the technique of measuring soil microbial biomass as pool size of soil microorganisms and their energy charge (AEC) as activity index. Then these methods were applied to various samples, particularly aerobic and anaerobic paddy soils. Bioelements such as carbon and nitrogen in the soil microbial biomass were estimated.

When organic matter like rice straw or glucose was added to paddy soil, large amount of methane was formed, which will induce "global warming". In this connection, significance of soil microbial biomass was evaluated quantitatively as decomposer of organic matter and methane. Effect of toxic substances such as heavy metal and organic compounds on methane formation was determined. Relationship between these effects and energy charge was also discussed.

### 研究目的

土壤微生物は多種多様な有機物を分解して水と無機物へ変換する能力を有しており、また地球上の物質循環やエネルギーフローの極めて重要なプロセスを担っている。特に土壤微生物は人間活動の結果、排出されるさまざまな廃棄物や有害物質を分解し、環境を浄化する能力を持つことが注目されている。しかしその能力は無限でも万能でもなく、適切な知識なしに廃棄物を土壤に投入すると土壤微生物はこの浄化能力を失う。さらには分解産物が、かえって地球規模での環境破壊を引き起こす可能性も指摘されている。例えば都市域で大量に発生する下水汚泥には相当量の重金属が含まれており、これをそのまま土壤へ投入すると生態系が大きく攪乱され、回復には長い時間が必要となる。また水田においてワラ類などの有機物の施用方法を誤ると、稲の収量が激減するばかりでなく、強い温室効果を持つメタンや一酸化二窒素が多量に大気中へ放出されて来る。

本研究は、この土壤微生物の環境浄化能を損うことなく最大限に利用するために、土壤微生物自身の活性指標であるエネルギーチャージ (AEC) を測定する新しい方法を確立し、土壤への投入有機物の質や量との関係を追究し、環境破壊を起こさぬような廃棄物処理方策を確立するための基礎的知見を得ることを目指す。特に欧米での知見が極めて限られている水田土壤中での微生物を主な研究対象とし、土壤中の各種有機物の分解過程と微生物のエネルギーチャージとの関係を解明することを目的とする。

### 研究経過

#### 1. 土壤微生物バイオマスおよびエネルギーチャージ測定法の確立と基礎的検討

11種の代表的な水田土壤を対象として、その中に存在する微生物バイオマス (生体量) とエネルギーチャージ (微生物の活性指標の一つ) を正確かつ簡便に測定する手法を確立した。バイオマスは微生物中に存在する高エネルギー生体成分の

ATP (アデノシン 5' 三リン酸) を抽出し定量して求めた。またエネルギーチャージは ATP の他に ADP (アデノシン二リン酸) と AMP (アデノシン一リン酸) も抽出・定量し計算により求めた。

(1) 供試土壌試料: 農林水産省農研センター旧鴻巣試験地, 滋賀県農試本場および湖西分場ならびに三重県内の 3 カ所の農家水田より採取した合計 11 種類の土壌を供試した。

(2) 土壌微生物バイオマスの定量方法: 土壌にトリクロロ酢酸・リン酸混液を加え, 超音波細胞破砕機で処理し土壌微生物菌体中の ATP, ADP, AMP を抽出した。抽出液にルシフェラーゼ溶液と緩衝液を加え, 単一光子モニターつき液体シンチレーションカウンターで生物発光量を測定し, バイオマス中の ATP 量を算出した。

(3) エネルギーチャージ (AEC) 測定法: 上記抽出液にピルベートキナーゼとホスフォエノールピルベートを加え反応させた後, (2) と同様にして ATP を定量し, この二つの酵素により ADP から ATP に変換された量を求めた。また抽出液にこれら二つの酵素とミオキナーゼを加え同様に反応後 ATP を定量し, 三つの酵素により AMP から ATP に変換された量を求めた。以上の結果を次式に代入しエネルギーチャージを計算した。

$$AEC = \frac{[ATP] + 0.5 \times [ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

ただし, [ATP], [ADP], [AMP] はそれぞれの土壌中の含量を示す。AEC の値は 0~1 の間になり, 1 に近いほどバイオマスが活発に代謝回転しているといえる。

## 2. 土壌の環境浄化能の測定・評価

水田土壌にワラ類などの有機物を施用すると, 強い温室効果を持つメタンがどの程度発生するかを定量し, またこのメタン生成に関わる土壌微生物について調べることを試みた。一方, 水田土壌にはメタンを資化 (酸化) することによって地球環境を浄化する能力を持つ微生物がいることを確認し, その活性と菌数を測定した。その概要は以下のとおりである。

(1) 土壌からのメタン発生量の定量: 土壌に稲

表 水田土壌中の ATP

土 壌	試験区	ATP*	回収率 (%)	ATP/TC**
鴻 巣	無肥料	5.39	28.7	260
	無 機	7.14	31.5	262
	有 機	11.89	36.5	351
安 土	化 肥	5.92	21.7	331
	堆 肥	5.54	23.4	258
	牛ふん	11.09	21.5	312
湖 西	化 肥	10.50	25.8	714
	堆 肥	12.72	26.3	677
一 志		4.38	32.5	167
阿 山		—	—	—
高 野		6.43	38.0	269
平 均		8.10	28.6	360

単位 \* nmol/g 乾土, \*\* nmol/mg TC,  
TC=土壌全炭素量。

ワラや麦ワラなどの植物遺体, 人工汚水の単純なモデル物質としてグルコースやアラニンなどを添加し, 三角フラスコにゴム栓をした密閉系で湛水培養し, 発生するメタン量を TCD 付ガスクロマトグラフにより測定した。

(2) 土壌中でのメタン酸化 (資化) 活性の測定: (1) と同様なフラスコの気相をメタン・空気混合ガスに置換し, 培養中に減少するメタン量からメタン酸化活性を計算した。

(3) 土壌中のメタン生成菌およびメタン酸化菌数の測定: 土壌を緩衝液で希釈し, メタン生成の基質となる酢酸の入った培地に植えつぎ, 一定期間培養後にメタン生成の有無を判定し, MPN 表によりメタン生成菌数に換算した。また同様に気相をメタン・空気に置換してから培養し, メタン消費の有無よりメタン酸化菌数を求めた。

## 3. バイオマスやエネルギーチャージ, 土壌浄化能に影響を及ぼす諸因子の解析

土壌中の微生物バイオマスやエネルギーチャージが, 土壌を水田 (湛水) 化したり重金属を添加するとどう変化するか調べた。比較のため畑土壌も供試した。また水田土壌からのメタン発生が重金属や有機化合物等によってどう影響を受けるか実験した。

(1) 土壌を湛水して水田状態にし, あるいは好

氣的に保ち畑状態としてから、一定期間培養し土壤微生物バイオマスとエネルギーチャージを上記と同様の方法で定量した。

(2) 土壤に重金属であるカドミウムを添加して2.と同様にメタン発生量を測定し、無添加の場合と比較した。またメタン生成に影響すると予想されるモリブデン酸やBES(プロモエタンスルホン酸)のナトリウム溶液を添加し、同様な実験を行った。

## 研究成果

### 1. 土壤微生物バイオマスおよびエネルギーチャージ測定法の確立と基礎的検討

#### (1) ATP測定による土壤微生物バイオマス定量法の検討

11種の代表的な水田土壌中のATP測定結果は表のようになり、4~13(平均8.1) nmol g<sup>-1</sup> 乾土の範囲に分布した。これまでに報告されている畑・草地・森林土壌での値(0.5~13 nmol g<sup>-1</sup> 乾土)とほぼ類似した結果になった。これは、水田と畑などでは土壌環境は前者が概ね嫌氣的なのに対し後者が好氣的であるという違いが存在するが、そこに生息する土壤微生物バイオマス量には大きな違いはないと考察される。また水田土壌に有機質肥料(堆肥や牛ふんなど)を施用すると、バイオマスが増加することが読みとれる。またバイオマスは化学肥料でも無肥料よりは増加しているので、肥料として加えられた有機物だけでなく、化学肥料により生育が促進された水稻体由来の有機物によっても、バイオマスが増大すると考えられる。土壌全炭素量(TC)当たりのATP量は170~710(平均360) nmol mg<sup>-1</sup> TCとなったが一志土壌の低い値と湖西土壌の高い値を除くとほぼ260~350の比較的狭い範囲内に収まり、畑土壌などで得られた知見とよく符合する。なお、ATPの土壌からの回収率は21~38(平均29)%で、畑土壌など(60~70%)に比べ低かった。また供試土壌中で最も粘土の多い阿山土壌では、ATPが定量的に回収されず測定できなかった。これは、水田土壌で活性化された鉄化合物や粘土の影響によるものと推察される。

以上の結果から、代表的な水田土壌を用いて

ATPによる微生物バイオマスの定量法が確立され、畑土壌などの既往の知見と比較し類似点が明らかになった。

#### (2) 土壤微生物のエネルギーチャージ(AEC)測定法の検討

11種の水田土壌のうち、最も試験年数の長い鴻巣土壌を畑状態で好氣的に前培養した場合、AECは0.75となった。この値は、畑土壌の値(0.7~0.9)とほとんど変わらなかった。したがって、水田土壌でも水分を調整して畑状態に保っている間は、そこに生息する土壤微生物の活性度が畑土壌一般と変わりないと考えられる。

### 2. 土壤の環境浄化能の測定・評価

#### (1) 水田土壌からのメタン発生量の定量

まず無添加での水田土壌からのメタン発生量は土壌タイプごとに大きく異なり、土壤微生物バイオマスとの間には直接的な関係は見いだせなかった。次に稲ワラや麦ワラなどの植物遺体を土壌に添加するとメタン発生量は著しく増加した。しかし12週間に及ぶ湛水培養でも添加した有機物のうち分解してメタンになった割合は1割前後で、残りは未分解または分解途中であったり二酸化炭素となったり、あるいは土壤微生物菌体になったと考えられる。またグルコースやアラニンも添加してもメタン発生量は増加し、特にグルコースの場合、添加有機物の約4割近くがメタンに変わったと計算された。

#### (2) 水田土壌のメタン酸化活性の測定

水田土壌を好氣的に培養すると、メタンが消費され二酸化炭素の増加する傾向が認められた。特に水田の表層や水稻根の周囲から採取した土壌が高いメタン酸化活性を示した。気相を窒素だけにした場合や土壌を殺菌した場合、この現象は認められなくなった。

#### (3) 水田土壌中のメタン生成菌およびメタン酸化菌の計数

メタン生成菌については培地を嫌氣的に維持するのがむずかしく、一定の計数値を得るには至らなかった。一方、メタン酸化菌は10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup>/g 乾土程度、存在することが見いだされた。

### 3. バイオマスやエネルギーチャージ、土壌浄化能に影響を及ぼす諸因子の解析

#### (1) 湛水または好気培養が土壌微生物バイオマスとエネルギーチャージに及ぼす影響

土壌を好氣的に培養した場合、ATP 含量はほとんど変化しなかった。これに対し、湛水培養では ATP が減少した。これを、水田土壌を湛水して比較したところ、畑土壌中での ATP 減少の方が急激であった。これは、土壌微生物バイオマスは好氣的条件ではほぼ増殖と死滅が釣り合い一定のレベルを維持しているのに対し、湛水状態では土壌環境が嫌氣的になるのでそれに適応できない好気性細菌が死滅していくことを意味すると考えられる。また水田土壌では、もともと湛水状態に強い（通性）嫌気性細菌の割合が大きいので ATP の減少が畑土壌ほど急激ではなかったと推察される。

一方、AEC は湛水培養によって水田土壌で 0.54 まで、また畑土壌では 0.34 まで低下した。したがって湛水培養により土壌微生物の活動度が低下したことが示された。同様な結果は、土壌を風乾した場合にも得られている。しかし、重金属 (Cd, Cu, Ni) の添加では AEC が低下しないので、これら重金属の土壌微生物への影響はバイオマス全体に及ぶのではなく、特定の一群が影響を受けると考えられる。

#### (2) カドミウムやモリブデン酸、BES の添加によるメタン発生量の変化

重金属（カドミウム）を添加してメタン発生量を測定したところ、無添加に比べメタン発生の開始時間が 1~2 週間遅れたが、その後のメタン発生は速やかに回復し 4 週目以降には差がなくなった。また稲わらの添加を組み合わせた場合にも重金属添加によるメタン発生の遅れは同程度で、メタン発生量は稲ワラの添加により重金属の有無に関わらず増大した。またモリブデン酸を添加した場合にも、メタン発生量はほとんど変わらずむしろ増加する場合もあった。これらの結果は、メタン生成菌は重金属に対し感受性を持つものの、湛水土壌中でメタン生成よりやや先行して起こる硫酸還元反応によって生じた硫化物が重金

属を不溶化させるので、メタン生成は最終的にはあまり影響を受けなかったものと考察される。またモリブデン酸は硫酸還元を特異的に阻害するがメタン生成にはほとんど影響なく、カドミウムの場合に似た結果が得られたと考えられる。

これに対し BES はメタン生成をほとんど停止させたので、メタン生成反応の強い阻害剤であることが明らかになった。なお BES は、水田土壌に類似した嫌氣的試料である海や湖沼の底質ないし下水汚泥でも同じ作用を示すことが知られている。

#### 今後の課題と発展

土壌微生物バイオマスを ATP により定量する方法は、水田土壌についてほぼ確立されたと言える。ただ粘土含量が高い水田土壌での対策、ATP の回収率、また湛水期間中の変化などについて課題が残されている。次に AEC 測定法には、二つの問題点を指摘できる。一つは、ATP だけではなく ADP, AMP も低い回収率を示した。また本法では回収率や酵素の反応効率も調べるために、AEC の値を一つ求めるのに最低 42 試料の ATP 測定が必要となる。今後 HPLC などを用いた AEC 測定の簡便化を図ることが望ましい。しかしこれらの問題が解決されれば土壌微生物の役割を量と活性の両面から評価できるようになり、適正な土壌管理による浄化能の維持・強化も可能になると考えられる。

土壌の浄化能として水田土壌から発生する温室効果ガスのメタンに注目したが、有機物添加により増加するメタンを減らす方法としてメタン酸化菌の利用が可能であることを示すことができた。また有機質肥料および都市廃棄物に含まれる有機化合物や重金属が、メタン生成を促進する場合と抑制する場合があることを見いだしたが、これらの物質がメタン酸化菌や土壌微生物バイオマス全体の量や活性にどんな影響を及ぼすかを解明するには至っていない。引き続きこの問題を研究していくことが急務であると言える。

#### 発表論文

- 1) Inubushi, K., Brookes, P. C., and Jenkinson, D. S.: Soil microbial C, N and ninhydrin-N in

- aerobic and anaerobic soil measured by the fumigation-extraction method, *Soil Biology & Biochemistry*, **23**, 737~741 (1991).
- 2) 犬伏和之・柴原藤善・辻 藤吾・梅林正直: 水田土壤の微生物バイオマス窒素定量法の検討, とくにクロロホルムくん蒸抽出法について, 日本土壤肥料学雑誌 (投稿中).
  - 3) 犬伏和之: “土壤バイオマス測定法, 新土壤微生物実験法第 11 章”, 土壤微生物研究会編 分担執筆, 養賢堂 (印刷中).
  - 4) Brookes, P. C., Inubushi, K., Wu, J. and Patra, D. D.: 土壤微生物バイオマスの性質, 日本土壤肥料学雑誌, **62**, 79~83 (1991).
  - 5) 犬伏和之: 地球温暖化と土壤生態系との関係, 三重大環研紀要, **15**, 83~89 (1991).
  - 6) 犬伏和之・村松康彦・梅林正直: 水田土壤におけるメタンの発生機構 (第 6 報) メタン生成・酸化量の経時変化, 日本土壤肥料学会講演要旨集 (名古屋), **37**, 52 (1991).
  - 7) Inubushi, K., Muramatsu, Y. and Umebayashi, M.: Mechanism and control of methane emission from paddy soil, Abstracts of Papers, 17th Pacific Sci. Congr., p. 60 (1991).
  - 8) Inubushi, K., Umebayashi, M. and Wada, H.: Methane emission from paddy fields, Proc. 14th International Congr. Soil Sci., pp. II-249~254 (1990).
  - 9) 堀 謙三・犬伏和之・松本 聡・和田秀徳: 水田土壤におけるメタン生成と硫酸還元の前酸をめぐる競合, 日本土壤肥料学雑誌, **61**, 572~578 (1990).