


 解説

地球環境における土壌微生物の役割

古賀邦正

(受取日：2007年2月6日，受理日：2007年2月17日)

The Roles of Soil Microbes in the Global Environment

Kunimasa Koga

(Received February 6, 2007; Accepted February 17, 2007)

Attention has been paid to CO₂ balance of atmosphere along with global warming. The soil stores carbon in organic matters twice as much as carbon in atmosphere, and, on the other hand, the soil releases CO₂ into atmosphere by soil respiration. Therefore, the soil has two characteristics as C storing warehouse and a supplier of CO₂. Though soil respiration is chiefly due to the activity of soil microbes, the behavior of them has been hardly evaluated from the aspect of the CO₂ generation. The microbe calorimeter is a suitable device for catching the behavior of the microbes in the soil nondestructively. In the present manuscript, the calorimetric studies about influences of soil microbes on the environmental condition were explained. A change in the metabolic heat (thermogram) of the soil microbes with decomposition of organic matters was similar to a change in the CO₂ generation under the same condition, and profiles of the thermograms and of the CO₂ generation curves varied according to the different kinds of organic matter and the soil. A microbe composition was known to change dynamically with decomposing the organic matters using the microbe calorimetry and the DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) technique. Soil microbes could not decompose a specific amino acid easily, and on the other hand, could decompose rapidly catechins and bio-degradable plastics beyond our expectation. The calorimetric method can offer the kinetically evaluating technique about the influence of herbicides, pesticides and heavy metals on the decomposing activity of soil microbes. The microbe calorimetry is useful for the investigation about the generation mechanism of CO₂ in the soil.

1. 地球環境と土壌の微生物

「生命の自然発生説」の否定を実証し、微生物の役割を明らかにし、多くの成果を残したルイ・パスツールは1864年のソルボンヌ大学の市民講座で次のように述べている。¹⁾「さて、皆さん、われわれが取り上げなければならない大事な課題がここに一つあります。発酵の原因をなし、また腐敗の原因をなす微生物の中のあるものが、天地万物の総体

調和に演ずる役割に関する問題です。この役割たるや、計り知れぬほど巨大であり、驚異的であり、まさにわれわれを感動せしめるものであります。」パスツールが指摘したとおり、その後、生物の主要構成成分である炭素、酸素、窒素、硫黄などの循環の系への微生物の関与が明らかになり、安定した状態に保たれている地球環境はこの動的な循環の系の総体調和のうえに成り立っていることが理解されるようになった。

例えば、大気約80%を占める窒素に関しては、マメ科の根に共生する根粒菌や土壌中のアゾバクテリア、水圏のラン藻類などが分子状窒素を固定してアンモニアに変換する。このアンモニアをさらに硝化細菌と呼ばれる一群の微生物が、亜硝酸・硝酸と変換する。生成したアンモニアや硝酸は植物の根から吸収され、アミノ酸やタンパク質に変換され、さらに、われわれを含む動物に摂取される。その後、代謝利用されたのちの代謝産物や糞便は土壌微生物に分解され、アンモニアや硝酸に変換されて再度植物に吸収される。また、一部は嫌気性の脱窒菌によって分子状窒素まで還元され、大気に戻る。このようにダイナミックな物質循環には、土壌中や海水中の微生物群の関与が大きい。²⁾

物質循環への土壌の関与は、生態系への理解というだけでなく、大気組成、とくに二酸化炭素などの地球温暖化ガス濃度との関わりから注目されるようになった。土壌中には、無機物炭素(C)として 750×10^9 トン、微生物に分解されにくい腐植質を中心とした有機物Cとして 1550×10^9 トンがプールされていると推定される。³⁾ この土壌中の有機物Cの貯蔵量は大気中の二酸化炭素Cの2倍、植生有機物Cの3倍であることを考えるとエコシステムにおける炭素貯蔵庫としての土壌の役割の重要性が理解される。⁴⁾ 土壌中の有機物Cプールは一定の状態では維持されているのではなく、土壌への有機物の流入と変換、CO₂などの大気への放出のバランスのうえに成立っており、土壌はCO₂発生源としてもエコシステムに関与していることになる。また、大気中のCO₂濃度(約0.4%)も、地上での生命活動や工業生産によるCO₂の生成と放出、吸収のバランスで決定されており、窒素循環と同様、二酸化炭素の循環にも微生物の関与は大きい。CO₂の固定には、緑藻類やラン藻類、光合成細菌あるいは独立栄養型の微生物が関与しており、植物による固定量の50%に達する。また、固定生成された有機物を分解して、CO₂に変換するにも従属栄養型の土壌微生物の関与が大きい。しかし、炭素の貯蔵庫としての役割を果たす腐植質を中心とした有機物Cの土壌中での生成にも、また、易分解性有機物のCO₂への変換にも土壌微生物の関与は大変大きいにもかかわらず、地上での生命活動によるCO₂の生成と放出について、植物や動物を中心とした土壌生態系でのフラックスが検討され始めているものの、土壌微生物の関与について定量的な把握は殆ど行われていない。

土壌の中は、通常、微生物が容易に資化できる栄養素は少なく、いわば飢餓状態に置かれている。そのような環境の中、土壌の微生物叢は外部からの様々な物質の不定期の流入に敏速に対応して物質循環の系を回している。そのため、多様な微生物が長期に渡って安定して存在することができる場が不可欠であり、それを可能にしているのが、

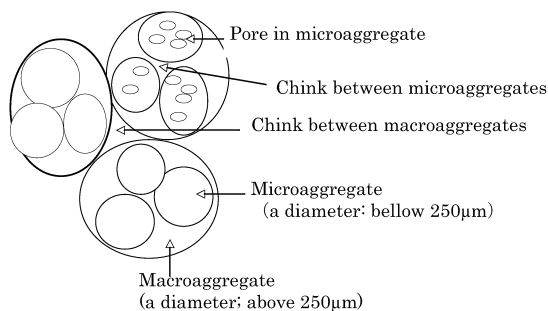


Fig.1 Soil aggregates: microaggregates and macroaggregates.⁵⁾

団粒構造と呼ばれる土壌の構造特性である (Fig.1)。⁵⁾

もっとも小さい土の粒子(一次粒子)は、粘土粒子が凝集してできたもので、数µm程度の大きさであり、一次粒子を中心に腐食質、鉄・マンガン酸化物によって直径10~60µm程度の安定した土粒子の凝集体であるマイクロ団粒ができる。マイクロ団粒は細菌の分泌する多糖類、糸状菌の菌糸、ミミズの摂食作用などによって直径250µm以上のマクロ団粒を形成する。団粒構造には大小の孔隙が発達しているが、直径数µm以下の毛管孔隙はマイクロ団粒内、それより大きい非毛管孔隙はマイクロ団粒間であると考えられている。⁵⁾ この団粒構造が微生物の住み場としての豊富な固体表面を提供することとなり、微生物は団粒表面層や孔隙中の固体表面に吸着して乾燥、酸性化、捕食者などの攻撃から身を守っている。また、大小様々な孔径の孔隙が発達していることから、その孔隙内部は水分や空気や熱の流入と放散が異なり、その結果、湿度、酸素濃度、二酸化炭素濃度、pH、温度が異なる多様な環境の“住みか”(マイクロニッチと呼ばれている)を微生物に提供する結果となる。⁵⁾ さらに、細孔ごとに養分や無機塩類が確保されることから、養分などをめぐる競争は同じ環境に存在する微生物の間で起こるので、結果として微生物種の多様性が安定して維持される。また、外界の急激な変化に比較して細孔の中は緩やかな変化となる点も微生物にとって存在し続けるうえでの有利な点である。このように土壌には多様な微生物叢が共存できる環境があり、そのことが種々の変化に対応して微生物が活躍でき、結果としてダイナミックな物質の変換や循環に寄与することになる。

以上のべてきたように、土壌微生物叢が本来のダイナミックかつ多様な働きをするには、土壌環境に存在することが不可欠であるが、土壌中での動きをそのまま捉えることのできる手法は多くない。さらに、その定量性となると、大変難しいと言わざるを得ないのが現状である。

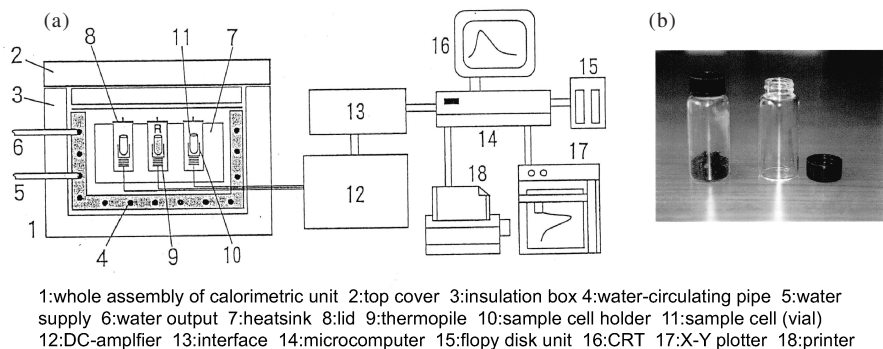


Fig.2 Schematic illustration of the apparatus used for the detection of metabolic heat of soil microbes (a) and calorimetric vessel containing soil sample (b).

2. 微生物熱量計による土壌微生物叢の活性測定

微生物が増殖する際には一定の代謝熱を発生する。「熱」は、微生物が存在する環境が固体であろうと液体であろうと伝導することから、代謝熱の経時変化を測定することによって、土壌中の微生物叢の増殖曲線が把握可能であると考えられる。

熱量計の詳細については、すでに熱測定誌においても詳しい紹介があるので多くを述べないが、方式からみると、(i) 微生物の培養装置を外におき、ポンプで熱量計に培養液を導きながら測るフロー法と (ii) 熱量計セルを培養容器そのものとして用いるバッチ法に分けられるが、土壌などの固体環境での細菌のコロニー増殖を測定するにはバッチ法に限られる。われわれが用いているのは、伝導型原理で作動する20点式熱量計である。大きさが350×700×120 mmのアルミニウム製のヒートシンク中に一つの比較ユニットと19個の試料ユニットが設置された計20個の熱測定ユニットで構成されている。熱の検出は半導体熱電対素子(サーモジュール)によっており、比較ユニットからの出力との差を示差的に取り出して、マルチプレキサー機能を有するインターフェースを通してマイクロコンピューターで、種々の解析を行うことができるようになっている (Fig.2(a))。試料ユニットには3~5 gの土壌試料を入れた30 mlもしくは50 ml容バイアル瓶 (Fig.2(b)) を置き、土壌試料に有機物を添加した際の微生物分解による代謝熱生成に伴う容器の温度の経時変化を検出する。

高橋らが本装置の測定精度の確認を行った結果を Fig.3 に示す。7) Fig.3は6個の5 g土壌試料それぞれに5 mgのグルコースと硫酸を含む溶液を添加した際の発熱量の経時変化(サーモグラム; $g(t)$ カーブ)である。見やすいように、縦軸のプロットをずらして示しているが、きわめて再現性よいことが知られる。

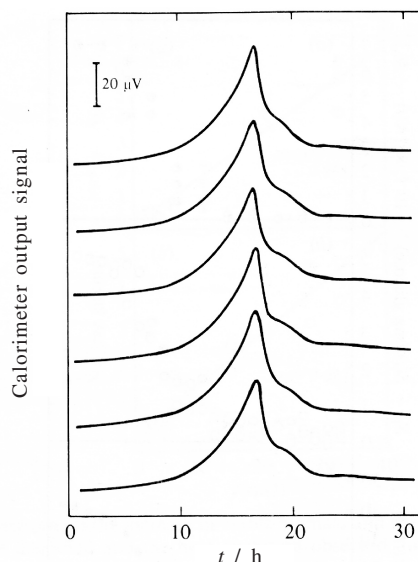


Fig.3 Reproducibility experiment for degradation thermograms of D-glucose in soil sample (brown arid andosol) at 30 °C.⁷⁾ The thermograms are shifted vertically by about 25 μ V on the voltage-recorder scale to distinguish the thermograms easily.

観察される $g(t)$ カーブは試料のヒートシンクに対する温度差であり、その熱伝導に関してはNewtonの熱伝導則が成り立つとみなされるので、熱量計ユニットの熱伝導定数(Newtonの冷却定数)を K とすると、熱伝導損失を補正した時の熱量計出力 $f(t)$ は次のように与えられる。

$$f(t) = g(t) + K \int g(t) dt \quad (1)$$

この $f(t)$ は系を仮想的な断熱状態に置いた時に観察されるで

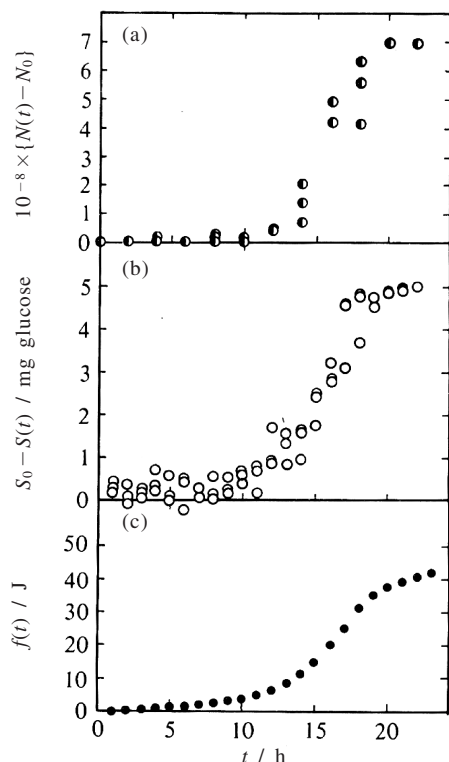


Fig.4 Changes in (a) the number of viable microbial cells, (b) the amount of glucose degraded and (c) the heat evolution during incubation of 5 g soil sample (brown arid andosol) with 5 mg glucose at 30°C.⁷⁾

あろう試料とヒートシンクとの間の温度差である。したがって、試料の熱容量に大きな変化がない限り、この $f(t)$ は試料系が生成する熱量の経時変化に対応することになる。^{8,9)}

Fig.4に、グルコースを添加後の (a) 土壤中の細菌数の経時変化、(b) 土壤中のグルコース減少量の経時変化、(c) 熱量計によって測定した $g(t)$ カーブを(1)式に従って得た $f(t)$ カーブのそれぞれを示している。⁷⁾ $f(t)$ カーブは細菌数およびグルコース消費量の経時変化とよく一致しており、土壤微生物叢がグルコースをエネルギー源として増殖する際の発熱量の経時変化を示していることが理解される。また、増殖曲線を示す $f(t)$ カーブを片対数プロットした直線の傾きから、各土壤における微生物叢のみかけの増殖速度定数 (μ' 値) を求めることができる。

ひとくちに土壤微生物叢といっても、極地から赤道に向かって気候の変化とともにその分布は変化している。また、同じ地点でも、地表から地下に向かうにつれ、その分布は大きく変わる。微生物密度は、植物遺体やその副産物が多

い表層 10 cm でもっとも高く、一般的に、深さが 10 cm 以上になると急激に低下する。また、地表付近では有機物を利用する従属栄養微生物が圧倒的に多く、地下深い所では無機物のみを利用して増殖できる独立栄養微生物が多い。¹⁰⁾ 従って、通常、土壤試料は土壤表面を覆っている枯葉などを除いて、土壤表層の 3~10 cm までの試料を採土器にて採取し、直ちに密封可能なサンプル袋に入れて冷蔵保存する。必要に応じて、目の粗い篩にかけて細かい枝葉を除去する。土壤試料の取扱の詳細は参考資料¹¹⁾を参照されたい。こうして冷蔵保存した土壤試料を微生物熱量計で評価する場合、少なくとも 3 ヶ月は微生物活性が安定であることを確認している。¹²⁾

また、生物遺体の分解をめぐる、発酵型と固有型の微生物の存在を服部らは指摘している。¹³⁾ 前者は生物遺体など、新鮮有機物があると、分解活動を行いながら急速に増殖し、分解終了後急速に減少するグループであり、後者は遺体の比較的分解しにくい部分をゆっくり分解するが活発な増殖を見せず、従って細菌数をあまり大きく変動させないグループである。とくに、本実験に用いている易分解性の有機物の資化・分解活性の評価は、土壤表層付近の発酵型の微生物叢の活性を中心に評価していることになるが、生物遺体を、まず、発酵型の微生物叢が分解し、ついでその分解産物を固有型微生物叢が分解する共同作業を進めていることを考えれば発酵型の活性の高さで土壤の有機物分解能がある程度評価できると考えられる。

3. 土壤の種類の違いと微生物活性および二酸化炭素の発生

土壤はその成り立ちから、大きく洪積土壤、沖積土壤、水田土壤および火山土壤に分類される。それぞれの土壤試料に易分解性有機物を添加した際の CO_2 の発生パターンと微生物熱量計によって捉えた土壤微生物叢の挙動パターンから各種土壤微生物叢の有機物分解に対する特性を評価した。¹⁴⁾ 密閉系で土壤試料 5 g に易分解性有機物として酵母エキス 30 mg を添加し、37°C に保持した際の雰囲気中 CO_2 濃度の経時変化を求めた (**Fig.5**)。易分解性有機物が添加されたときに発生する CO_2 量の経時変化の様相は土壤の種類によって大きく異なり、沖積土壤では有機物の添加の早い段階で急激な CO_2 の発生が起こること、火山灰土壤では添加の後期に急激に発生が高まるのに対して、水田土壤と洪積土壤では CO_2 の急激な発生が起こらないことが観測された。

添加した易分解性有機物から発生する CO_2 の違いはそれぞれの土壤に棲息する土壤微生物叢の基質に対する分解特性によると考えられたため、易分解性有機物を添加した際

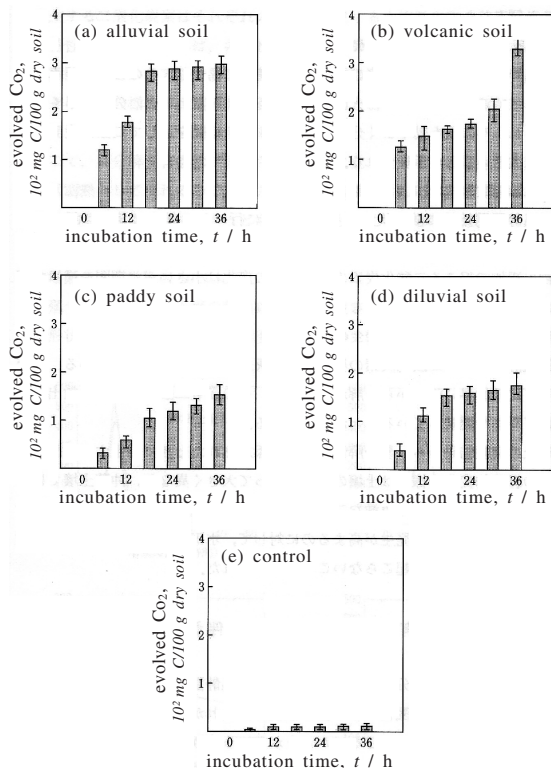


Fig.5 Changes in quantity of evolved CO₂ from various soil with addition of 30 mg yeast extract to 5 g soil sample at 37 °C; (a) alluvial soil, (b) volcanic soil, (c) paddy soil, (d) diluvial soil.¹⁴⁾

の増殖サーモグラムを測定した。増殖サーモグラムは土壤の種類によって大きく異なっており、有機物の分解・資化の進行がもっとも早いのが沖積土壌であり、次いで火山土壌、これらの土壌よりも遅れて洪積土壌、分解・資化が長く継続するのが水田土壌であった (Fig.6)。

増殖サーモグラムのピークの立ち上がり時間はCO₂発生時間とほぼ対応している。また、増殖サーモグラムから、(1)式に従って土壤微生物叢の増殖曲線 ($f(t)$ カーブ) を求めることができる。この曲線は、貧栄養の状態に置かれていた微生物叢が易分解性の物質を添加されることによって資化・増殖し、新たな菌相に移行した過程を示す。火山土壌は後半、急激なCO₂発生が見られるものの、沖積土壌では資化・増殖が早く進行するのに対して、水田・沖積土壌では緩やかに進行しており、 $f(t)$ カーブとCO₂発生経過は同様の傾向を示すことが確認されている。各土壌試料の $f(t)$ カーブから得られた土壤微生物叢の見かけの増殖速度定数 (μ' 値) は、沖積土壌で0.935、火山土壌で0.623、水田土壌で0.432、洪積土壌で0.340であり、CO₂発生しやすさの指

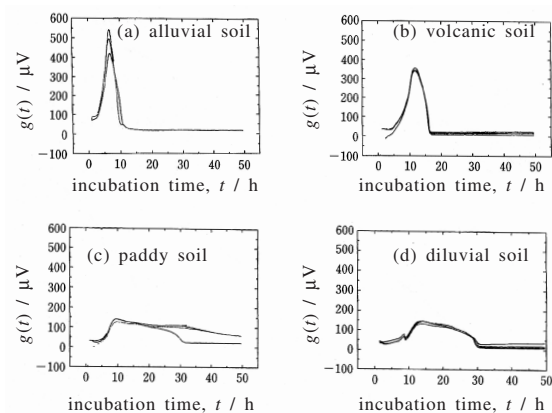


Fig.6 Growth thermograms of microbes in various soil samples with addition of 30mg yeast extract to 5g soil sample at 37 °C; (a) alluvial soil, (b) volcanic soil, (c) paddy soil, (d) diluvial soil.¹⁴⁾

標となると考えられる。以上のことから、土壤の種類によって土壌に添加された有機物から発生するCO₂の様相は異なり、それは、主として有機物に対するその土壌の微生物活性に基づくものであることが示唆される。

土壤はその成り立ちの違いからの分類とは別に、われわれの生活活動を反映した分類もなされる。その視点で、半径約5 km以内のタイプの異なる5点の土壌試料 (野菜畑土壌、海岸砂地、山地土壌、運動場土壌、茶畑土壌) の微生物叢の有機物分解活性を評価した結果、海岸砂地、野菜畑土壌、運動場土壌、山地土壌、茶畑土壌の順で活性の-highいことが明らかになった。¹⁵⁾ また、茶畑土壌は茶樹が密生しており、集中して施肥されることによって極端にpH値の低いことが知られているが、pH値を高めることによって微生物活性が向上することを微生物熱量計によって定量的に実証することができた。¹⁶⁾

4. 有機物の分解に伴う土壤微生物叢の菌相変化

土壤微生物叢の菌相を把握するには、土壌試料からUltra Clean Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Lab.) を使用してDNAを抽出し、細菌個々の種類の違いを反映する塩基配列領域 (16SrRNAの特定領域をコードするDNA領域) をPCR法にて増幅する。得られたPCR産物の構成をDGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) 法により解析することによって、土壤微生物叢の菌相を評価することができる。¹⁷⁾

茶畑土壌試料5 gに易分解性有機物 (酵母エキス) 30 mgを添加して、30 °C・25 h静置培養した際のサーモグラムと培養前後のDGGEによるDNAパターンの変化をFig.7に示した。¹⁸⁾

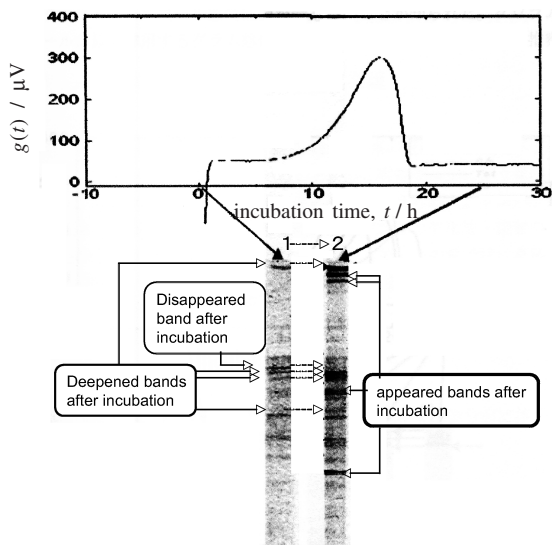


Fig.7 Growth thermogram of microbes in tea field soil with addition of 30 mg yeast extract to 5 g soil sample, and DGGE profiles of soil microbes in tea field soil: lane 1; before incubation, lane 2; after incubation of soil sample added yeast extract for 25 h at 30 °C.

易分解性有機物添加前の茶畑土壌では、DNA メインバンドが8本観察され、微生物叢はこのDNA パターンを示す菌相が主要菌相であることが示唆された。有機物分解・資化後のサーモグラム終了時点では、1本のバンドが薄くなり、新たに出現したバンドが4本、発色が濃くなったバンドが4本（右の矢印で示している）観察され、この8本の菌相が有機物を分解・資化するのに深く関与していると考えられる。新たに出現したバンドを示した菌は、もともと劣勢状態で土壌中に存在していた菌が易分解性有機物添加を機に優勢菌として勢力を拡大し、薄くなったバンドの菌は劣勢勢力に移行するものと考えられ、多様な菌群の保管庫としての土壌の奥深さを感じさせられる。微生物熱量計とPCR/DGGEの組み合わせは、複合微生物系における微生物叢の総合的な動きの把握とそれを構成する個々の菌相の変化を定量的に把握でき、興味深い手法である。¹⁹⁾

5. 低分子量有機物の土壌呼吸による分解特性の把握

土壌中の有機物に関する研究対象の殆どはフミン（腐食質）などの難分解性高分子有機物である。その理由は、土壌中に存在する有機物は殆どが難分解性有機物で、易分解性低分子量有機物（アミノ酸・単糖類・有機酸など）は通常、土壌中に存在していないためである。しかし、そのことは、土壌微生物叢による低分子量有機物の分解はきわめて早く、

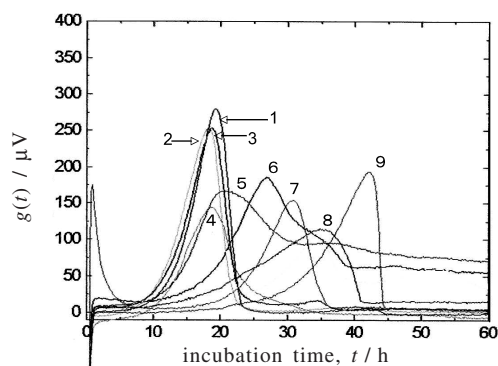


Fig.8 Growth thermograms of microbes in tea field soil with addition of various amino acids (30 mg) to 5 g soil sample. 1; His, 2; Arg, 3; Gln, 4; Asn, 5; Glu, 6; Ala, 7; Cys, 8; Asp, 9; Thr.

土壌中の低分子量有機物プールのターンオーバー数は高く維持され、大気へのCO₂放出に対する寄与は大変大きいのではないかと指摘がされるようになってきた。²⁰⁾ しかし、肥沃な耕地での土壌微生物叢による低分子量有機化合物の分解速度、その際の大気への放熱量、微生物菌体成分に取り込まれる量と温暖化ガスとして放出される量の割合、低分子量有機化合物の種類とその供給源などについて定量的に評価された例はきわめて少ない。

グルコースに関しては、土壌試料に添加すると添加量に比例して発熱量と土壌呼吸量が増加するという一連の研究が報告されており、²¹⁻²⁴⁾ グルコースの添加に伴ってすぐに発熱が観察されることから、通常、土壌微生物叢は不活発な飢餓状態にあることが確認された。また、土壌呼吸はグルコース添加により、相乗的に活性化され、添加グルコース以外の基質も分解されることが示唆された。この際、発生するCO₂あたりの発熱量は22.1～23.0 J cm⁻³で、この値は好気下での酵母の発熱量（18.08～27.72 J cm⁻³）²⁵⁾とよく一致している。このことから、添加グルコースの分解に関与する土壌微生物叢は主に好氣的代謝を行っていると推察されている。²⁶⁾ 高橋らは種々の温度下で、種々の糖質を土壌に添加した際のサーモグラムを測定している²⁷⁾が、37℃でグルコースを添加した場合、20時間までに発熱が終了しており、きわめて早く土壌呼吸によるグルコース分解が進行していることが知られた。

われわれは茶畑土壌に20種類のアミノ酸をそれぞれ添加した際のサーモグラムを測定した。²⁸⁾ 一般的に親水性アミノ酸は疎水性アミノ酸よりサーモグラムの立ち上がり早い傾向にあり、親水性アミノ酸の方が土壌中を移動しやすく、微生物にも取り込まれやすいと推察される。アミノ酸の一部についての測定結果を**Fig.8**に示したが、サーモグラ

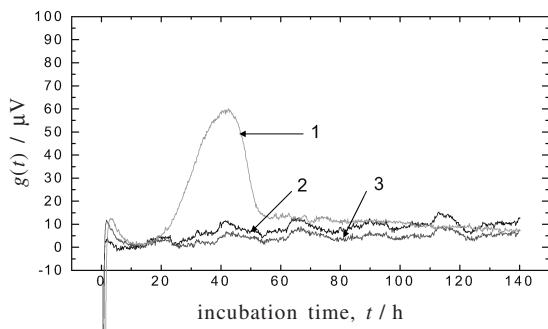


Fig.9 Growth thermograms of microbes in soil with addition of catechins. 1; addition of 30 mg catechins to 5 g tea field soil sample, 2; addition of 30 mg catechins to 5 g mountain soil sample, 3; no addition of catechins, but 5 g tea field soil.

ムの立ち上がりと $f(t)$ カーブから得られる μ 値の大きさに従って20種類のアミノ酸の順序づけを行った。

分解・資化されやすいアミノ酸はアルギニン・アスパラギン・グルタミン・ヒスチジンであり、いずれも側鎖に窒素を含むアミノ基やイミノ基があり、微生物叢に効率よく利用されるものと考えられる。これらのアミノ酸を添加した際の土壌中のアンモニア含量は増加しており、植物は根から無機化された窒素成分を吸収することを考えると、これらのアミノ酸は微生物の窒素代謝とともに植物の窒素代謝も高めるものと推察される。一方、メチオン添加では殆どサーモグラムが観察されず、きわめて分解・資化されにくいことが知られた。サーモグラムの発熱終了時期は添加したアミノ酸を土壌微生物叢が分解資化し終えた時点を示していると考え、殆どのアミノ酸が60時間までに資化されていることが知られる。しかし、その際の放散二酸化炭素量の多いアミノ酸はグルタミン、プロリン、トリプトファン、チロシンなどであり、個々のアミノ酸の分解されやすさや炭素数には比例しておらず、二酸化炭素までの分解に向かう量とアミノ酸再構成に向かう量の比はアミノ酸の種類ごとに決まっているようで、今後さらに検討する必要がある。

同じ低分子有機物であっても、ポリフェノール類に対して微生物叢は異なった動きをする。²⁹⁾ **Fig.9**は茶畑土壌試料とそこに隣接する山地土壌試料各5gに茶葉由来のカテキン類30mgを添加して30℃で培養した場合のサーモグラムである。普段から切り落とされた茶葉を腐葉土化している茶畑土壌にはカテキン類を資化する活性があるが、隣接していても山地土壌には、その活性が認められない。

サーモグラムの発熱ピークの出現時間から、カテキン類は約15～55時間の間で資化されていることが分かる。この

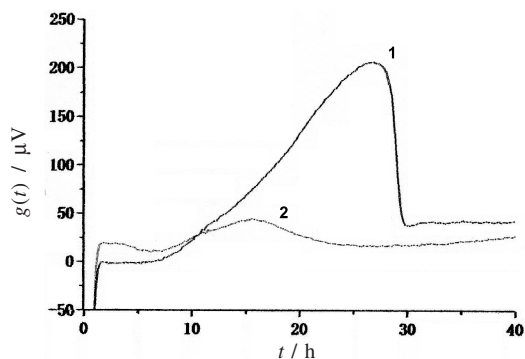


Fig.10 Growth thermograms of microbes in tea field soil with addition of biodegradable plastics to soil sample (1), and without addition (2).

サーモグラムに対応して CO_2 の発生も認められることから、茶畑土壌には微生物叢による効率的なカテキン分解機構が備わっているものと考えられる。カテキン類は縮合型タンニン類であり、分解されない場合には縮合されて高分子化して一層分解されにくくなると考えられる。大気に CO_2 として放散されるか、土壌中に滞留して炭素の貯蔵庫としての役割を果たすか、ということを検討しながらカテキン類などの挙動を想像すると興味は尽きない。このように、土壌中には、「土壌代謝」とでも名づけたいような整然とした分解機構が用意されていると考えられるが、その評価には微生物熱量計は大いに力を発揮すると期待される。

6. 生分解性プラスチックの土壌中での分解評価

以上述べたように、土壌は物質循環の系を回す大きな役割を担っているが、一方、産業目的で土壌中の微生物叢の分解力を利用する試みもある。例えば、生分解性プラスチック（生分解プラ）由来の農業資材は、本来の使用目的を果たした後は、そのまま土壌中で分解されるように設計されている場合が多い。われわれは、この生分解プラが、実際にどの程度の効率で分解されるのか、また、分解菌としてどのような菌が関与しているのかという点について実験室で微生物熱量計を用いた評価と実際のフィールドでの評価の比較を試みた。^{30,31)}

評価に用いた生分解プラは3種のポリエステル（硬質性脂肪族、軟質性脂肪族、軟質性脂肪族）それぞれに混合比を変えて可塑化剤を混合し、グリセロールとともにエクストルーダーによって調製した。種々の土壌を集積培養した後、生分解プラ粉末を唯一の炭素源とした選択培地を用いて、生分解プラ分解菌を分離した。分離菌を土壌に接種して、粉末試料添加した際のサーモグラムを無添加の場合と比較して**Fig.10**に示す。

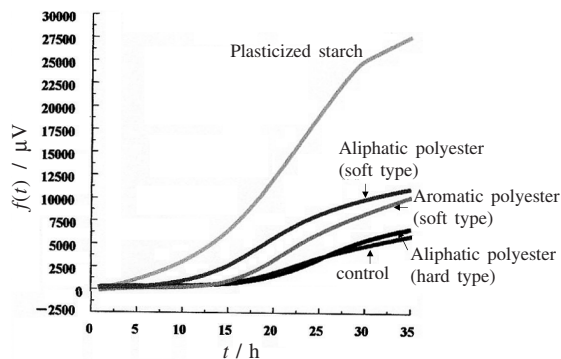


Fig.11 Growth curves ($f(t)$ curves) of soil microbes with addition of various biodegradable plastics to soil sample.

生分解プラ添加に伴う土壌中での分離菌の資化分解に伴う発熱ピークが観察される。数種の分解菌を分離し、熱量計による評価を行い、発熱ピークが最も早く出現し、しかもピーク面積も大きく観察された分解菌 (DH9910) を選抜した。各種生分解プラ粉末試料0.1 g を含有した土壌試料5 g に分解菌を接種して、各種試料の資化・分解に伴う分解菌の増殖サーモグラムを測定した。Fig.11 はサーモグラムから得られた $f(t)$ カーブを示している。 $f(t)$ カーブは分解菌の増殖過程を示すと同時に、土壌中に存在する生分解プラの資化・分解過程も示していると考えられる。この結果から、分解菌は土壌中で可塑化デンブン、軟質性脂肪酸ポリエステル、軟質性芳香族ポリエステル順で資化し、硬質性脂肪酸ポリエステルは資化されにくいことが知られた。

実際のフィールド試験で、土壌中での分解菌による各種生分解プラの分解評価を行った。評価した試験片は、硬質性脂肪酸ポリエステル、軟質性脂肪酸ポリエステル、軟質性芳香族ポリエステルそれぞれと可塑化デンブンを25%と50%の割合で混合し、ダンベル状に成型したものをを用いた。この試験片を、分解菌を植菌した滅菌川砂で覆って土壌中に埋設し、埋設から1年後の評価試験片それぞれの様子と重量減少率を Fig.12 に示した。

分解菌を接種した試験片は、接種しないコントロールの試験片に比べて、いずれも重量減少が大きかった。また、可塑化デンブン含有量の高い試験片の方が重量減少が大きかった。ポリエステルの種類の違いでは、軟質性芳香族、軟質性脂肪酸、硬質性脂肪酸順で重量減少が大きい結果となった。この結果から、分解菌が生分解プラの分解を促進すること、軟質性芳香族・脂肪酸の生分解プラについてはよく資化・分解するが、硬質性の素材に対しては分解しにくいことがフィールド実験で明らかになった。この結果は実験室での微生物熱量計を用いた結果とよく一致してお

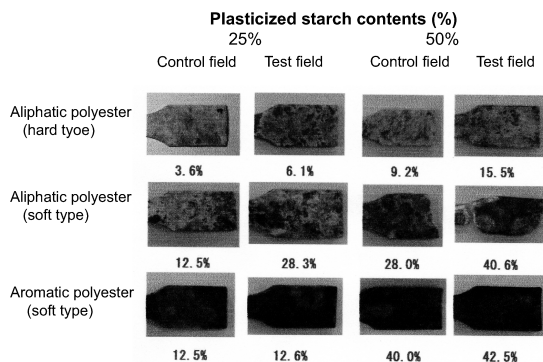


Fig.12 Degradation results of various biodegradable plastics after keeping the plastics in the soil of the experimental field (Numazu, Shizuoka) for 12 months.

り、微生物熱量計の手法が有用菌の探索や実際の系での評価に有力であることを実証することができた。

7. 微生物代謝熱計測法による 重金属や農薬の土壌汚染への影響評価

以上述べてきたように、土壌微生物叢は多様な動きをしていることが理解できるが、その土壌微生物叢の活動を指標にして、重金属や農薬などがどれほど環境に負荷をかけるかを定量的に評価しようとする試みがなされている。^{32,33)} Fig.13 は種々の濃度 (0~200 ppm) の除草剤 (oxadiazon) を含む水浸漬の水田土壌試料に酵母エキスを添加し、30℃に維持した際の増殖サーモグラムと $f(t)$ カーブを示した。除草剤添加によって微生物の代謝活性の低下が明確に把握される。

代謝活性の低下をサーモグラムの遅れの相対比 (一定の菌数に達するのに要する時間 (t_a) の無添加の場合と除草剤添加の場合の比; $t_a(0)/t_a(i)$) で評価した結果を Fig.14 に示した。³²⁾

濃度依存的に立ち上がりが遅れていることが知られる。相対比50%の時の除草剤の濃度を K_i 値として、評価試料の土壌環境への影響が評価できると高橋らは提言している。見かけの増殖速度定数 (μ') の相対比で評価することも可能であり、微生物熱量計の手法は速度論的な解析に耐えるに十分な定量性のあることが理解できる。

8. おわりに

以上、微生物叢の土壌呼吸による有機物分解の多様な動きを、われわれの研究を中心に紹介した。土壌微生物叢はいつも飢餓状態にあり、易分解性有機物の流入にきわめて敏感に反応し、すぐに二酸化炭素が発生する、という興味

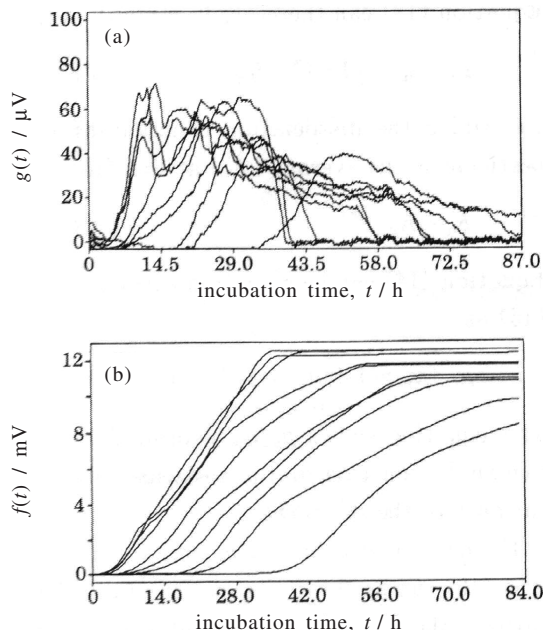


Fig.13 Calorimetric observation of the growth of soil microbes at 30 °C in flooded paddy soil with yeast extract substrate containing various amounts of the herbicide oxadiazon. (a) growth thermograms (b) actual heat evolution curves ($f(t)$ curves). In the diagram, the curves correspond (from left to right) to cultures in the presence of 0, 2, 5, 10, 20, 30, 50, 75, 100 and 200 ppm oxadiazon in water.³²⁾

ある事実が確認できた。今後、もっと視野を拡げて、地球全体で土壌呼吸を介して二酸化炭素がどの程度放出されているのか、さらに、土壌の種類や環境の違いによって、その放出がどの程度、活性化されるか、あるいは抑制されるか、という点などについて明らかにする必要がある。また、有機物の種類の違いによって微生物叢の動きが異なることから、微生物叢菌相のダイナミックな動きと土壌の団粒構造との関わりについてもさらに検討する必要があるだろう。カテキン類や生分解性プラスチックなどの比較的分解しにくい水不溶性の物質に対しても、土壌微生物叢の反応は想像以上に早い。土壌微生物叢は、それを資化できる微生物群をすばやく選抜し、それを優勢化することができるメカニズムを持っているようだが、一体、その仕組みはどのようになっているのだろうか？微生物熱測定は、興味がつきない色々の現象をわれわれに提示してくれる。また、「天行は健なり」という言葉があるが、それを支えている土壌微生物叢の活動を抑制する活性を指標に、種々の環境影響因子を評価することも、大事であることが理解される。

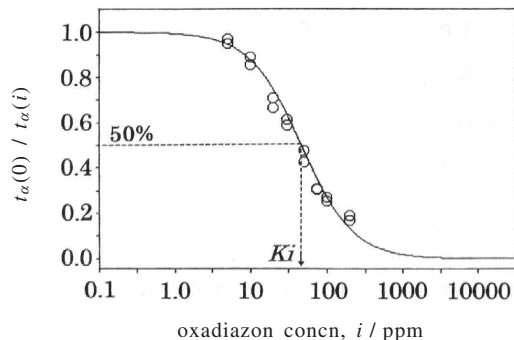


Fig.14 Representative potency curve of the herbicide oxadiazon calculated on the basis of specific growth retardation $t_{\alpha}(0)/t_{\alpha}(i)$.³²⁾

有機物を添加した時に、すばやく反応する微生物群は主に土壌表層のマクロ団粒間にいる発酵型の微生物が中心であり、これらの多くは好氣的な従属栄養型であり増殖代謝も活発だが、それに伴う発熱も大きい。しかし、嫌気性菌や独立栄養型の微生物群もまた物質循環では大切な役割を担っているが、これらは土壌表層からは離れていたり、ミクロ団粒の細孔の奥にいて、ゆっくりと増殖をする固有型の微生物であり、増殖代謝に伴う発熱も小さいと推察される。微生物熱量計で、これらの挙動を定量的に捉えることができれば、土壌微生物叢に対する知見が大きく広がると考えられるが、そのためには、さらに装置や培養法の工夫が必要であろう。

最後に、この研究の分野を始めるにあたって、端緒を開いてくださった大阪府立大学名誉教授・高橋克忠先生に深く感謝します。

文 献

- 1) ルイ・パストゥール, 自然発生説の検討 (山口清三郎訳), 岩波書店 (東京), p.201 (1970).
- 2) 大森俊男, 環境微生物学, (株) 昭晃堂, p.14 (2000).
- 3) 松本 聡, 土壌の自然環境とその意義, 「地球環境調査計測事典」(竹内均監修), フジテクノシステム (東京), p.908 (2002).
- 4) 松本 聡, 土壌圏と地球温暖化 (木村真人・波多野隆介編), 名古屋大学出版会, p.3 (2005).
- 5) 服部 勉, 宮下清貴, 土の微生物学, (株) 養賢堂, p.30 (1996).
- 6) 高橋克忠, 熱測定 **18**, 9 (1991).
- 7) T. Kimura and K. Takahashi, *J. Gen. Microbio.* **131**, 3083 (1985).
- 8) S. Ono, K. Hiromi, and K. Takahashi, *J. Biochem.*

- 57, 799 (1965).
- 9) 高橋克忠, 生化学実験講座 (日本生化学会編), 東京化学同人, **12**, p.19 (1976).
- 10) 服部 勉, 大地の微生物, (株) 岩波書店, 76 (1072).
- 11) 日本土壤肥料学会監修, 土壤環境分析法 (土壤環境分析法編集委員会編), 博友社 (東京), 11 (1997).
- 12) 金 英樹, 萩原大輔, 古賀邦正, 高橋克忠, 日本農芸化学会2001年度大会要旨集, 98 (2001).
- 13) 服部 勉, 宮下清貴, 土の微生物学, (株) 養賢堂, p.44 (1996).
- 14) 松本 聡, 古賀邦正, 土壤圏と地球温暖化 (木村真人・波多野隆介編), 名古屋大学出版会, p.191 (2005).
- 15) 古賀邦正, 平岡伸一, 金 英樹, 萩原大輔, 末廣康孝, 坂本泰子, 高橋克忠, 熱測定 **28**, 54 (2001).
- 16) K. Koga, Y. Suehiro, S. Matsuoka, and K. Takahashi, *J. Biosci. Bioeng.* **95**, 429 (2003).
- 17) V. Torsvik, F. L. Daae, R.-A. Sandaa, and L. Ovreas, *J. Biotech.* **64**, 53 (1998).
- 18) 今村理依, 末廣康孝, 古賀邦正, 日本土壤肥料学会2004年度福岡大会講演要旨集, 37 (2004).
- 19) Y. Suehiro, K. Koga, and K. Kamino, *Soci. Ad. Sci.* **14**, 110 (2002).
- 20) P. A. W. van Hees, D. L. Jones, R. Finaly, D. L. Godobold, and U. S. Lundstrom, *Soil Biol. Biochem.* **37**, 1 (2005).
- 21) J. P. E. Anderson and K. H. Domsch, *Soil Biol. Biochem.* **10**, 215 (1978).
- 22) K. Ljungholm, B. Noren, and I. Wadso, *Oikos* **33**, 24 (1979).
- 23) K. Ljungholm, B. Noren, R. Skold, I. Wadso, *Oikos* **33**, 15 (1979).
- 24) G. P. Sparing, *Soil Biol. Biochem.* **13**, 93 (1981).
- 25) I. Lamprecht, *Biological Microcalorimetry* (ed. A.E. Beezer), London: Academic Press, p.43.
- 26) G. P. Sparing, *J. Soil Sci.* **34**, 341 (1983).
- 27) H. Yamano and K. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.* **47**, 1493 (1983).
- 28) 今村理依, 今村 脩, 沼畑 旭, 古賀邦正, 日本農芸化学会2006年度大会要旨集, 196 (2006).
- 29) 清水宏幸, 茂木 学, 猪野晋平, 古賀邦正, 野中邦彦, 日本農芸化学会2006年度大会要旨集, 243 (2006).
- 30) 萩原大輔, 永井義悠, 古賀邦正, 大澤哲哉, 日本生物工学会平成14年度大会要旨集, 155 (2002).
- 31) 猪野晋平, 萩原大輔, 立原誠之, 古賀邦正, 大澤哲哉, 大田俊也, 日本農芸化学会2005年度大会要旨集, 51 (2005).
- 32) H. Horiguchi, H. Isozaki, and K. Takahashi, *Ann. Report Interdiscipl. Res. Inst. Environ. Sci.* **16**, 41 (1997).
- 33) 高橋克忠, 環境科学総合研究年報 **14**, 27 (1996).

要 旨

地球温暖化に伴い, 大気中のCO₂のマテリアルバランスに注目が集まっている。土壌は大気の2倍の有機物Cを貯蔵する, 一方, 土壌呼吸によってCO₂を大気中に放散している。従って, 土壌はC貯蔵庫としての役割とCO₂放出という二面性を持っている。土壌呼吸は, 主に, 土壌微生物叢によっているが, CO₂発生の視点から土壌微生物の挙動を定量的に評価しようとする研究は少ない。微生物熱量計は土壌中の微生物叢の動きを非破壊的に捉えるのに, 適した装置である。微生物熱量計による有機物分解資化に伴う土壌微生物叢の増殖代謝熱とCO₂発生の経時変化がよく一致し, 有機物や土壌の種類の違いと土壌微生物挙動やCO₂発生の経時変化が大きく変わることが明らかになった。有機物分解に伴って菌相がダイナミックに変化することも熱測定とDGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) の手法で分ってきた。土壌微生物叢は特定のアミノ酸に対して分解資化が悪い, 一方, 縮合型タンニンや生分解性プラスチックなど比較的難分解性の物質に対して想像以上に早く分解資化を行うことが可能という興味ある現象も示している。また, このダイナミックな微生物挙動への影響を指標にして, 農薬・重金属などの環境への影響を速度論的に解析できる情報も熱測定の手法は提供できる。微生物熱量計を用いて, これらの現象を解明することによって, 土壌微生物を中心とする土壌中でのCO₂の発生機構の解明が可能となるだろう。

古賀邦正 Kunimasa Koga
東海大学開発工学部生物工学科, School of high technology for human welfare, Tokai University, TEL. 055-968-1211 ex.4530, FAX. 055-968-1156, e-mail: koga@wing.ncc.u-tokai.ac.jp
研究テーマ: 複合微生物の挙動把握と食品・環境分野への応用
趣味: ラグビー観戦, サイクリング