

畑土壤における微生物活性の指標としての 土壌酵素の特徴*

東田 修司^{*2} 山神正弘^{*3}

畑土壤における微生物の代謝活性の強弱を評価するための手法として、FDAの分解活性(“FDA”と略記)、p-ニトロフェノールの誘導体(“S”を付した)を基質とするいくつかの酵素活性(フォスファターゼ、 α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、セルラーゼ)及び4-メチルウンベリフェロンの誘導体(“F”を付した)を用いた酵素活性(α -グルコシダーゼ、セルラーゼ)の特性について比較検討した。十勝中央部の農家圃場を対象として調査したところ、フォスファターゼ(S)を除く他の酵素活性はてん菜乾物収量と正の相関関係を示した。フォスファターゼ(S)は土壤を薫蒸処理、または超音波処理をしても活性の低下が小さく、また、多湿黒ボク土の耕起層よりも下の暗黒色土層で高い活性が見いだされることが特徴であった。これらの結果はフォスファターゼ(S)が他の酵素活性に比べて安定であり、バイオマスに依存しないで存在し得る可能性を示唆しており、微生物の活性を表す指標としては適切ではないと判断した。 α -グルコシダーゼ(S)は、フォスファターゼ(S)と高い相関関係を有したので同様に微生物活性の指標としては適さない。また、土壤間を比較すると、多湿黒ボク土は多湿のために微生物活性が抑制された条件にあると考えられるにも拘らず、フォスファターゼ(S)、 α -グルコシダーゼ(S)と β -グルコシダーゼ(S)は黒ボク土と多湿黒ボク土を同等または多湿黒ボク土を高く評価する傾向であった。逆にセルラーゼ(S, F)と α -グルコシダーゼ(F)は黒ボク土の方をより高く評価した。他の結果を含めて、本試験で供試した酵素活性の中では、土壌微生物の代謝活性を評価する上で、 α -グルコシダーゼ(F)が最も適切な手法であると判断した。

はじめに

土壤診断により土壤の特性を数値化することは適正な土壤管理や作物栽培管理を実施するための具体的な指針を提供する上で有効な手法である。現在、土壤の化学性及び物理性の診断法はほぼ確立しつつあり、農家レベルでの土壤診断に利用されている。しかし、微生物特性の診断については、その具体化に対し漠然とした期待感があるものの全く手付かずの状態にある。

一方、土壤に生息する微生物の中で大多数を占める有機栄養を営む微生物は、有機物を分解してエネルギーを得て活動する。その活動は、作物にとっての養分となる無機成分の生成、腐植や団粒の生成など、畑土壤の作物生産性に密接に関連し、土壤の総合的な環境を表す指標となることが示唆された^{8, 9)}。これらの微生物の働きを

数値化することは、土壤の生産力の1つの側面を評価することにつながると考えた。本報告では、こうした土壤微生物全般の働きを“微生物活性”と呼ぶこととし、その強弱を評価するための測定手法を提示しようとした。

有機栄養を営む微生物が活動する条件は、1つに基質となる有機物が存在することであり、加えて他の環境条件も微生物の活動にとって好適である必要がある。それ故、土壤微生物にとっての基質の存在量とそれを分解する微生物が活動するための環境条件を総合的に表現し得る方法が、微生物活性の評価法として適当である。微生物活性の指標としてたびたび用いられる炭酸ガス放出量は、十勝地方の火山性土壤に当てはめた場合に、もともと物理性が劣悪で微生物活性が抑制され腐植が蓄積した土壤で逆に高い値となることがあるので微生物活性の評価法としては適当ではないと考えた。一方、土壌酵素活性は、有機物施用条件の違いを的確かつ安定的に反映すること、及び作物収量や有機物分解と関連することから⁹⁾、微生物活性の評価法としてより適切な手法であると考えた。また、p-ニトロフェノールの誘導体等の人工基質を用いた酵素活性は、測定自体が簡便であることも他の微生物特性測定法と比較しての利点の1つである。

1996年7月12日受理

* 本報の一部は1994年日本土壌肥料学会北海道支部会で発表した。

^{*2} 北海道立十勝農業試験場(現 北海道立北見農業試験場, 099-14常呂郡訓子府町)

^{*3} 北海道立十勝農業試験場(082 河西郡芽室町)

本報告では、いくつかの土壌酵素活性を対象とし、作物収量との関連性、土層深別の差異、黒ボク土と多湿黒ボク土での大小関係、及び酵素活性相互の関連性から畑土壌における“微生物活性”の指標として、より適切な土壌酵素を選定しようとした。

実験方法

1 畑土壌での酵素活性の実態と作物収量との関連

(1) 調査時期及び対象圃場

芽室町内の各種土壌に立地する農家圃場を対象とし、平成1993～1994年に土壌理化学性、土壌酵素活性、てん菜収量、埋設麦稈（えん麦稈）の分解率等を調査した。土壌酵素活性の測定は9～10月に行った。土壌の採取法と前処理法及び、埋設麦稈の分解率測定法は前報⁹⁾の通りである。収穫調査を実施したてん菜圃場の前作はすべて秋播小麦とした。

(2) 酵素活性の測定法

p-ニトロフェノール誘導体とFDAを用いた土壌酵素活性は前報⁹⁾と同様の方法で測定した。但し、 α -グルコシダーゼ(S)の測定には、150mgのp-nitrophenyl α -D-glucopyranosideを100mlの脱塩水に溶解したものを基質溶液として用いた。

4-メチルウンベリフェロンの誘導体を用いた土壌酵素活性の測定は以下のようにして行った。よく混和した生土壌2gをポリ試験管(ϕ 18mm $\times$ 180mm)に秤量し、基質溶液を2ml加えた。これをよく混合して、30℃温浴中で1時間培養し、直ちに18mlのエタノールを添加し、10秒間以上手で激しく振とうしてろ過した。ろ液100 μ lを分析用の試験管にとり、脱塩水6mlと0.2Nトリス溶液1mlを加えて、攪拌後励起波長360nm、蛍光波長50nmで測定した。標準として100 μ lの 10^{-5} mol 4-methylumbelliferoneをろ液と同様に分析用試験管にとり、同様に発色した。 α -グルコシダーゼ、セルラーゼ測定のための基質溶液として、それぞれ、25mgの4-Methylumbelliferil- α -D-glucoside、または4-Methylumbelliferil- β -D-cellobiopyranosideを100mlの脱塩水に溶解したものをを用いた。

なお、土壌酵素活性測定用の基質の試薬はすべてシグマ社製を用いた。また、p-ニトロフェノールと4-メチルウンベリフェロンの誘導体を用いた土壌酵素活性を、それぞれ(S)と(F)を付けて区別した。

易分解性有機物の測定は、Higashidaらの報告⁷⁾に従った。

2 土壌酵素活性の相互関係

以下に記した5つの実験系における酵素活性とバイオマス及び易分解性有機物（易分解性C）間の相関係数を求めた。

①芽室町内の各種土壌、てん菜作付圃場53筆の測定結果、平成1991年9月実施⁹⁾。②芽室町内火山性土、てん菜作付圃場29筆の測定結果、平成1994年9月実施¹¹⁾。③芽室町内の多湿黒ボク土、てん菜作付圃場26筆の調査結果、平成1993年9月実施、表1に対応。④芽室町内の火山性土、てん菜作付圃場10筆の調査結果、平成1994年8月実施。⑤芽室町内の各種土壌、各種畑作物作付圃場40筆、平成1993年9月測定結果¹¹⁾。

3 物理ストレス及び部分殺菌処理が土壌の酵素活性に及ぼす影響（培養実験）

(1) 供試土壌 十勝農試試験圃場（淡色黒ボク土）の作土を2mmのふるいにかけ、4℃で保存したものを供試した。

(2) 処理法 超音波処理：2gの土壌をガラス試験管（180mm $\times$ ϕ 18mm）に秤量し、2mlの脱塩水を加えた。これを氷冷しながら超音波処理装置（Tomy UD-201）で所定の時間処理した。処理後、2mlの基質溶液を加え土壌と同様に酵素活性を測定した。なお、基質溶液は、通常の2倍濃度のものを用いた。

薫蒸処理：土壌30gを管ビンに秤量し、デシケーター内で薫蒸法によるバイオマス測定時と同様にクロロフォルムで脱気薫蒸した⁵⁾。そのまま密栓して25℃で24時間静置後、クロロフォルムを除去しないで酵素活性の測定に供試した。

実験結果

1 埋設麦稈分解率および作物収量と酵素活性との関連性

土壌中に施用された有機物を分解することは、土壌微生物の働きの主なもの1つである。それ故、微生物活性の評価法として用いようとする土壌酵素の測定値と、実際の土壌中での有機物の分解速度とは矛盾しないことが望ましい。また、前報⁹⁾で論じたように、微生物活性が高い土壌では、微生物の持つ諸機能が高いレベルで発現するので作物生育にもプラスの影響を及ぼすと考えられる。それ故、微生物活性評価法によって得られる測定値と作物収量も矛盾しないことが必要である。ここでは、圃場条件での有機物分解及び作物収量との関係を指標として、各種酵素活性を比較した。その際、てん菜の菜根重よりも乾物重あるいは窒素などの要素吸収量の方がより土壌の生産力を反映すると考えて、これらも検討に加えた。

1993年に芽室町の多湿黒ボク土に立地する農家圃場26ヶ所を調査した結果をもとに、麦稈の分解率及びてん菜収量と土壌酵素活性の相関を表1に示した。その結果、麦稈の分解率はいずれの土壌酵素とも有意な相関関係を有しなかった。

一方、てん菜乾重など収量関連項目は、FDA、セル

表1 多湿黒ボク土での酵素活性と埋設麦稈分解率及びてん菜収量等との関係

酵 素 活 性	て ん 菜 収 量	て ん 菜 乾 重 収 量	窒 素 吸 収 量	リ ン 酸 吸 収 量	麦 分 解 率
フォスファターゼ (S)	0.207	0.233	0.149	0.367	0.121
α -グルコシダーゼ (S)	0.441*	0.477*	0.331	0.549**	0.282
β -グルコシダーゼ (S)	0.377	0.428*	0.366	0.520**	0.095
セルラーゼ (S)	0.410*	0.415*	0.325	0.489*	0.179
FDA (F)	0.571**	0.603**	0.468*	0.687**	0.100
α -グルコシダーゼ (F)	0.256	0.359	0.433*	0.431*	-0.009
セルラーゼ (F)	0.450*	0.494*	0.459*	0.505**	0.152
易分解性有機物	0.057	0.096	0.109	0.141	-0.261

注) 1993年調査 (n=26)

*, **: それぞれ 5, 1% の水準で有意であることを示す

表2 層別別の土壌酵素活性

土 壌	土層深 (cm)	土 色	全炭素 (%)	酵素活性		易分解性 有機物量 (mg・100 g ⁻¹)	バイオマス (mg・100 g ⁻¹)
				フォスファ ターゼ(S)	セルラ ーゼ(S)		
多湿黒ボク土 (厚層多腐植質 多湿黒ボク土)	0-5	10YR2/1	9.0	19.4	2.0	83.6	13.9
	5-10	10YR2/1	8.8	20.2	2.6	68.8	11.0
	10-15	10YR2/1	8.9	20.8	2.6	53.0	12.1
	15-20	10YR2/1	9.2	19.7	2.2	28.8	7.2
	20-25	10YR2/1	8.9	18.2	2.0	25.5	5.1
	55-65	10YR1.7/1	13.5	52.1	2.4	6.9	trace
黒ボク土 (淡色黒ボク土)	0-10	10YR3/2	7.4	8.1	1.5	11.2	4.1
	10-15	10YR3/2	7.1	7.6	1.5	10.9	3.4
	15-20	10YR3/2	6.8	7.5	1.4	10.3	2.2
	20-25	10YR3/2	6.6	7.9	1.4	11.3	1.3
	25-30	10YR6/4	6.7	7.5	T	7.0	trace
	30-35	10YR6/6	3.3	4.4	T	4.0	trace

注) 1992年測定、酵素活性は、(nmol・g⁻¹・min⁻¹) で表示した

ラーゼ(F)と比較的高い正の相関を有した。フォスファターゼ(S)を除く、 α -グルコシダーゼ(F, S)など他の活性は、いくつかの収量関連項目と有意な正の相関を示した。フォスファターゼ(S)は、表1の結果ではリン酸吸収量との相関が得られなかったが、1991年度の調査結果では、てん菜のリン酸吸収量と正の相関を示した⁹⁾。これは、1991年の調査では低地土も含めたので、土壌のトルオーグリン酸含量の幅が大きかったことに関連すると考えられる。

2 土層間の差異

土壌では土層深が深くなるほど酸素や基質の供給が制約されるので微生物数^{17, 21)}、活性¹⁹⁾ともに低下するのが一般的である。表2に示した厚層多腐植質多湿黒ボク土と淡色黒ボク土の例でも、バイオマスは下位土層ほど低下した。しかし、厚層多腐植質多湿黒ボク土において、耕起層の下部に出現する暗黒色部分に、作土の2倍以上に達するフォスファターゼ(S)が存在することが見い

だされた。この土層のバイオマス含量は極めて低いにも拘らず、セルラーゼ(S)も作土と同程度であった。他方、淡色黒ボク土の例では、作土と考えられる0~25 cm土層までは、酵素活性、バイオマスともほぼ一定であり、土色が褐(10YR 6/4)に変わった層から、バイオマス、セルラーゼ(S)が著しく低下した。しかし、フォスファターゼ(S)は土色が明黄褐である30~35 cm土層でも作土の1/2以上の活性を保った。

次に他の土壌酵素についても作土と耕起層より下層にみられた暗黒色土層での活性の比較を行った(表3)。フォスファターゼ(S)は表2の結果と同様に、供試した酵素活性の中では作土/下層土比が最も小さかった。FDA(F)と α -グルコシダーゼ(F)は、比較的高い比を有し、これらはバイオマスに依存しないで存在する度合いが小さいと考えられた。 α -グルコシダーゼ(S)、 β -グルコシダーゼ(S)、セルラーゼ(S)は両者の中間であった。

表3 多湿黒ボク土(厚層多腐植質多湿黒ボク土)での上下土層間の酵素活性

供試土壌	酵素活性 (nmol・g ⁻¹ ・min ⁻¹)				酵素活性 (pmol・g ⁻¹ ・min ⁻¹)	
	フォスファターゼ (S)	α -グルコシダーゼ (S)	β -グルコシダーゼ (S)	セルラーゼ (S)	FDA (F)	α -グルコシダーゼ (F)
0 - 20 cm 土層	15.8	2.0	16.4	3.5	246	456
下層の暗黒色土層	39.9	2.0	20.7	2.9	120	240
作土 / 下層土	0.4	1.0	0.8	1.2	2.1	1.9

注) 1995年測定

表4 土壌酵素活性およびその関連項目の土壌間差異

土 壌	酵素活性の平均値 (変動係数、CV)					
	フォスファターゼ (S)	α -グルコシダーゼ (S)	β -グルコシダーゼ (S)	セルラーゼ (S)	FDA (F)	α -グルコシダーゼ (F)
黒ボク土 (n=13)	10.2 (15)	1.08 ab (20)	14.2 a (18)	3.1 a (20)	379 a (20)	664 a (22)
多湿黒ボク土 (n=11)	13.2 (38)	1.20 a (41)	14.4 a (30)	3.1 a (35)	302 b (26)	638 a (38)
低地土 (n=11)	11.0 (22)	0.82 b (29)	9.4 b (26)	1.8 b (29)	417 a (29)	476 b (36)

土 壌	土壌の理化学性の平均値 (CV)			
	易分解性有機物量*	熱水抽出性窒素 (mg・100 g ⁻¹)	全炭素 (%)	トルオーグ P ₂ O ₅ (mg・100 g ⁻¹)
黒ボク土 (n=13)	22.4 a (25)	5.3 b (48)	4.1 b (57)	4 c (84)
多湿黒ボク土 (n=11)	29.4 a (36)	13.2 a (62)	8.3 a (34)	15 b (94)
低地土 (n=11)	17.8 b (30)	6.5 b (27)	2.6 b (44)	47 a (31)

注) 平均値に付した "a", "b" の違いは, t検定で5%レベルの有意差があったことを示す。

(S) : nmol・g⁻¹・min⁻¹, (F) : pmol・g⁻¹・min⁻¹* : Cmg・100 g⁻¹・20日⁻¹

1994年9月測定, 各種畑作物作付

3 黒ボク土と多湿黒ボク土での大小関係

十勝地方の主要畑土壌である火山性土は, 同一母材の場合でも土壌水分の影響を受けて腐植含量が大きく異なる。多湿黒ボク土では, 多湿条件のために微生物活性が抑制されたことにより有機物が蓄積したと考えられる。しかし, 耕地化のための排水改良や土壌改良資材の施用がなされて土壌の理化学性が改良された場合, 微生物基質となる有機物の含量が多いために, 黒ボク土よりもむしろ微生物活性, すなわち土壌酵素活性が高まる可能性がある。本項では, 土壌の特性をより適切に表す酵素活性を選定しようとして, 十勝地方における畑土壌の主要部分をなす火山性土を多湿黒ボク土と黒ボク土に分け, 低地土も含めて, 現地農家圃場の実態を調査した(表4)。

低地土では, FDAが火山性土より高く, 他の活性はむしろ低かった。多湿黒ボク土と黒ボク土を比較すると, 酵素活性測定値の大小関係は酵素の種類によって異なった。フォスファターゼ (S), α -グルコシダーゼ (S) は, 多湿黒ボク土で高く, β -グルコシダーゼ (S) とセルラーゼ (S) は同等であり, FDA, α -グルコシダーゼ (F) は黒ボク土で高い傾向であった。

一方, 酵素活性の変動係数 (CV) は, どの酵素でも黒ボク土に比べ多湿黒ボク土の方が大きかった(表4)。これは, 多湿黒ボク土において排水改良や土壌改良効果のばらつきがより大きく酵素活性に反映されることを意味しよう。前述のように, 多湿黒ボク土は過去の多湿条件のために酸化的分解が抑制され, 腐植が蓄積する。そのため, 多湿黒ボク土の方が黒ボク土に比べて微生物にとっての基質含量が高いので(表4), 排水改良や土壌改良が充分なされた場合, 酵素活性が高まり易く, 一方, 排水改良が充分でないときに低いまま留まると理解される。

表5は, 表4に示した調査例の中で黒ボク土, 及び多湿黒ボク土それぞれで α -グルコシダーゼ (F) が最も高かった地点と低かった地点及び2番目に高かった地点と低かった地点の酵素活性等を表示したものである。最大値を比較すると, すべての酵素活性で多湿黒ボク土の方が黒ボク土よりも高かった。このことは, 前述のように充分改良がなされれば多湿黒ボク土のほうが基質含量が高いことを反映して黒ボク土よりも高い酵素活性を有する可能性が強いことを示唆する。他方, 酵素活性の最も

表5 酵素活性の高い土壌の例

土 壌	高低の 区 分	酵素活性						易分解性 有機物量*
		フォス ファター ゼ (S)	α -グルコ シダーゼ (S)	β -グルコ シダーゼ (S)	セルラ ーゼ (S)	FDA (F)	α -グルコ シダーゼ (F)	
黒ボク土	高	11.0	1.10	14.8	3.1	500	819	24.2
	高	11.3	1.27	17.3	3.4	497	807	28.1
	低	10.5	1.02	11.4	2.5	445	505	15.7
	低	7.0	0.90	10.5	2.2	298	459	17.1
多湿黒ボク土	高	22.6	2.53	25.4	5.8	220	1213	57.4
	高	19.0	1.78	14.6	3.5	433	780	36.8
	低	10.3	1.06	12.0	2.5	217	480	20.5
	低	6.6	0.66	8.6	1.8	246	418	1

注) (S) : $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, (F) : $\text{pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ * : $\text{Cmg} \cdot 100 \text{g}^{-1} \cdot 20 \text{日}^{-1}$

1993年9月測定, 各種畑作物作付

表6 各種微生物特性測定項目間の相互関係 (相関係数で表示)

項 目	フォスファ ターゼ (S)	α -グルコ シダーゼ (S)	β -グルコ シダーゼ (S)	セルラー ーゼ (S)	α -グルコ シダーゼ (F)	セルラー ーゼ (F)	FDA (F)	バイオマス
α -グルコシダーゼ (S)	*****	☆	—	—	—	—	—	—
β -グルコシダーゼ (S)	***-+	***-	☆	--	—	—	—	—
セルラーゼ (SP)	***--	***-	*****	☆	—	—	—	—
α -グルコシダーゼ (F)	—	+--+	*--*	**+*	☆	—	—	—
セルラーゼ (F)	*	-	+	*	*	*	☆	—
FDA (F)	--+-	-*-	--+-	-+-	-+-	—	☆	—
バイオマス	+*---	+--+	+*--*	*+---	---*	+	*	+—
易分解性C	***-*	*--*	***-*	***-*	-*-*	*	*	+—
(実験区分)	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5

注) 実験区分の数字はそれぞれ独立した5回の実験に対応する

*, +, —: それぞれ相関係数が1%で有意, 5%で有意, 5%で有意なしを示す

また, 記号がない場合は当該する実験でその項目を測定しなかったことを示す

低い地点間を比較した場合には, 逆に多湿黒ボク土の方が低い酵素活性を示す傾向であった。また, 多湿黒ボク土, 黒ボク土とも同一の土壌型では酵素活性の高い土壌で易分解性の有機物含量も高いことが特徴であった。このことは, 物理的な性質が概ね同一の土壌では, 基質量が土壌酵素活性の大小を左右することを示す。

多湿黒ボク土で最も α -グルコシダーゼ(F)が高かった地点は他のほとんどの酵素活性も表5で例示した地点の中で最も高かった。しかし, FDAのみは, むしろ他の地点よりも低かった。FDA (F) が他の酵素活性と異なった傾向を示すことは, FDAの特性として留意すべき点である。

4 土壌酵素活性相互の関連性

表6に複数年に実施した5回の実験での各種酵素活性

及びバイオマス, 易分解性有機物量(易分解性C)相互の相関関係の有意性をまとめて示した。実験区分の3, 5, はそれぞれ表1, 5に対応し, 他は別個の実験である¹¹⁾。これらの項目は互いに有意な正の相関関係を有することが多かった。

易分解性有機物量は, ほとんどの酵素活性と有意な正の相関関係を有したが, バイオマスと酵素活性間の相関性はそれよりも低かった。

フォスファターゼ(S)と α -グルコシダーゼ(S)は常に有意な相関を示したので相互に強い関連性があると判断できる。同様に β -グルコシダーゼ(S), セルラーゼ(S)(F), α -グルコシダーゼ(F)も常に相互に有意な正の相関を示したので, これらは1つのグループを形成するとみなせる。これに対し, FDAはいずれの

表7 超音波処理と薫蒸処理が土壤酵素活性に及ぼす影響

土壤酵素活性	超音波処理 (秒)			クロロフォルム 薫蒸処理
	30	60	120	
フォスファターゼ(S)	140	126	76	93
α -グルコシダーゼ(F)	71	25	5	30

注) 無処理土の活性に対する%で表示した

酵素活性とも関連性が小さく比較的独立した性格を有すると判断された。FDAが、他の土壤酵素と違った挙動をとることは、表5に示した傾向からも同うことができる。

5 部分殺菌処理が土壤酵素活性に及ぼす影響

土壤酵素は、腐植や粘土鉱物と結合して安定化することが知られている³⁾。実際に活動する微生物に依存する度合の少ない土壤酵素は、土壤の微生物活性を評価する手段として適当でない。そこで、超音波処理とクロロフォルムによる薫蒸処理による部分殺菌が、土壤酵素活性に及ぼす影響を調べた。実験には、相互の相関関係から異なった性格を示した(表6)フォスファターゼ(S)と α -グルコシダーゼ(F)を供試した。

超音波処理の時間が短い場合にはフォスファターゼはむしろ増加傾向あり、処理時間を120秒まで延長しても70%以上の活性を保持した(表7)。それに対し、 α -グルコシダーゼは、処理時間が長いほど活性が低下し、120秒間の処理で残った活性は処理前の5%であった。薫蒸処理も同様に、フォスファターゼ(S)の活性をほとんど低下させなかったが、 α -グルコシダーゼ(F)は大幅に低下した。これらの結果から、フォスファターゼ(S)は土壤中で生きた微生物に依存しないで存在し得ること、それに対して、 α -グルコシダーゼ(F)は微生物の死滅によって急激に活性が低下することが示された。

考 察

土壤微生物はそれ自体が土壤の生成プロセスに必須な役割を果たしており、その代謝活性が土壤肥沃度と深く結び付いていることは古くから認識されている。そのため、多くの研究において土壤肥沃度との関連で微生物活性が測定された¹⁹⁾。

過去には炭酸ガス放出量や酸素消費量あるいはデヒドロゲナーゼ(TTCの還元力)が、土壤微生物の活性を総合的に表す測定法として盛んに用いられた^{12, 20)}。ここでは、圃場条件での微生物活性を評価する方法として、これらは2つの欠点を有すると考えた。1つはこれらの方法では基質を加えないので、土壤に存在する基質の量に過大に影響されることである。この点は、半乾燥地帯の土壤のように肥沃度が有機物量に規制されるような条件や、同一土壤で処理を変えたような場合であれば問題はない。しかし、先にも論じたように十勝地方の火山性

土壤は、過去に過湿条件で微生物活性が抑制されたものほど高い腐植含量を有するので、これらの方法で得られた値が高いことは必ずしも圃場条件での微生物活性が高いことを意味しない。もう1つは、これらの方法が測定に長時間の培養を必要とすることである。試料の採取は必然的に土壤の物理的攪乱を起し、実際よりも好気的な条件をもたらすので、培養によってもとの土壤とは異なった微生物相が形成される恐れがある¹⁵⁾。デヒドロゲナーゼの培養時間は24時間程度を要し、これは、Burns⁴⁾が許容できる培養時間の限度とした4時間を大きく超える。

それ故、土壤の微生物活性を評価するためには基質を添加し、且つ短時間で測定が可能な方法を用いるべきである。Pauli¹²⁾は、土壤微生物の活性を評価する上での土壤酵素活性の欠点として、その活性を有する微生物群のみしか評価されないことをあげたが、その点は比較的広範な微生物が有する基本的な酵素活性を選ぶことで回避することができよう。Alefら¹⁾はアルギニンの分解活性が土壤の窒素無機化量とバイオマスを表す指標として有用であるとした。また、実際は酵素活性は相互に関連することが多い⁶⁾ので1つの酵素活性で微生物活性全体を代表させることも可能であろう。一方、土壤酵素活性はバイオマスと有意ではあるが必ずしも高くはない相関を示したとする報告もある^{14, 18)}。バイオマスとの相関が必ずしも高くないのは、バイオマスが代謝活動を営む微生物の炭素のみでなく休止状態にあるものも含めて計測するためであろう。

現在、基質を添加して微生物活性を測定する方法は大まかに2つに分けることができる。1つは、最終産物である炭酸ガスを測定する方法であり、もう1つは基質を添加して短時間に生成する生産物量または消費される基質量を測定するものである。前者の代表としてSubstrate induced respiration²⁾があげらる。これは、土壤バイオマスの測定法として認められた方法の1つであるが、基質を土壤に均一に混合するために土壤水分をある程度調節する必要がある。そのため、現場の土壤の微生物活性を直接測定することは難しいと考えた。後者は、酵素反応によって特異的な分光または蛍光特性を有する反応産物を生成する人工基質が多く開発されたため、以前よりも測定が格段に簡便になった。蛍光法は試料を抽出した液自体のバックグラウンド値が測定に支障ないほど小さい利点を有する。4-メチル・ウンベリフェロン、クマリンなどの蛍光性を有する人工基質は、食品等の生菌数を簡便に検定する方法に実用化された。FDA(フルオレスセイン・ジアセタイト)は、土壤微生物活性の指標として、たびたび用いられている^{13, 16)}。

本報告では、これらのことと前報⁹⁾の結果を踏まえて、

人工基質を用いた数種の土壌酵素活性を以下の観点から比較検討し、土壌微生物活性を総合的に評価し得る方法を選定しようとした。

(1) 作物生産性との関連

フォスファターゼ (S) 以外の活性は作物収量、あるいは窒素吸収量などの収量関連項目と正の相関を示した。前報⁹⁾でも論じたように、土壌酵素活性と作物収量の間に有意な相関が生じた要因としては以下のことが考えられる。1つは、酵素活性が高いことは、有機物分解などの微生物の働きが活発であることを意味し、そのことが作物に対する養分供給の円滑化や作物が生育する土壌条件の向上につながって作物生育にプラス要因として働くことである。また、微生物活性が高いことは、土壌に微生物の基質となる有機物が豊富であり、かつ、通気性や無機成分が微生物の活動にとって良好であることを示す。そのような条件は作物生育にとっても良い条件であるはずである。もちろん、人為的な栽培管理等は、作物収量を左右する大きな要因であるが、本調査は施肥法などが比較的平準化された狭い地域内で行い、土壌型も限定したので、それらの影響を受けたにも拘らず、酵素活性と作物収量に有意な相関が得られたものと推察される。

表1に示した例では、土壌酵素の種類によって相関係数の大小が認められ、また、有意性を示す項目数に違いがあった。しかしながら、相関係数の僅かな差で土壌酵素活性と作物生産性との関連の大小を論ずることは出来ないと考えた。ただし、フォスファターゼ (S) のみは作物収量と全く相関関係がなかった。フォスファターゼ (S) は生きた微生物に依存しない存在し得ると考えられること (表2) は、作物生産性と相関を有しなかった要因の1つであると推察される。以上から、本実験で供試したフォスファターゼ (S) を除く他の土壌酵素はいずれも作物収量と関連があると判断した。

(2) 土層間の差異

厚層多腐植質多湿黒ボク土の耕起層よりも下の土層に見いだされたバイオマスに依存しない酵素活性が何に由来するかは未検討である。可能性としては、作物根あるいは微生物に由来する酵素活性が、有機物の分解が抑制される条件下で集積したことがあげられる。バイオマスに依存しない酵素活性の存在に関連する要因として、以下の2つを指摘することができる。まず、土壌条件によって微生物に依存しない酵素活性が存在する程度に差があると考えられる。酵素自体も蛋白であり微生物作用によって分解されるので、微生物に依存しない活性は、微生物の分解活性が抑制された条件で存在し易いと考えられる。黒ボク土と多湿黒ボク土の比較から (表2) 腐植の集積するような条件で酵素活性も安定化され易いことが示唆される。2つ目に、酵素活性の種類によって土壌中での

安定性に差のある可能性が指摘できる。表3の例では、耕起層よりも下の腐植の集積した土層で高い活性を示したフォスファターゼ (S) はセルラーゼ (S) よりも土壌中で安定であることが示唆された。超音波処理や蒸気処理の実験からもフォスファターゼ (S) は α -グルコシダーゼ (S) に比べて安定であり (表7)、フォスファターゼ (S) は生きた微生物に依存しない場合でも存在し得ることが示された。

土壌中で安定化されやすいと考えられる土壌酵素は、微生物の代謝活性を評価しようとするための手段として適当ではない。

(3) 黒ボク土と多湿黒ボク土の比較

各酵素活性の黒ボク土と多湿黒ボク土の平均値の大小関係は、酵素の種類によって異なった (表4)。このことは、土壌酵素の種類によって、黒ボク土と多湿黒ボク土の評価が異なることを意味する。ここでは、微生物活性の評価法としては両土壌のどちらを高く評価すべきかを論議する。

数年間にわたって調査した結果、圃場に埋設した麦稈の分解率は、多湿黒ボク土に比べて黒ボク土の方が高かった⁹⁾。また、採土缶を用いたモデル実験でも、気相率を同じにした条件で、黒ボク土の方が多湿黒ボク土に比べて高い麦稈分解率を示した⁹⁾。麦稈分解率から判断すれば、黒ボク土の微生物活性の方が相対的に高いといえる。また、現行の窒素評価において多湿黒ボク土が除外されたのは、熱水で抽出される有機態の窒素が多いにも拘らず、圃場条件では窒素の無機化率が、黒ボク土よりも低いためと考えられた¹⁰⁾。

農家圃場の実態では、土壌酵素活性が最も高い土壌は多湿黒ボク土であった (表5)。このことは多湿黒ボク土はもともと有機物含量が多いので理化学性の改良が充分なされれば黒ボク土よりも高い酵素活性を持ち得ることを示す。しかし、平均的には、多湿黒ボク土の方が黒ボク土に比べて、必ずしも酵素活性が高いとはいえない。そのことは、現状では多湿黒ボク土の理化学性改善は黒ボク土のレベルにまでは達していないことを示唆する。

以上の論議から、黒ボク土に比べて多湿黒ボク土を低く評価する傾向であった α -グルコシダーゼ (F) と F D A の方がフォスファターゼ (S)、 α -グルコシダーゼ (S) 及び β -グルコシダーゼ (S) よりも、微生物活性の実態を適切に表しており、土壌微生物の代謝活性を表現する測定法として適当であると考えた。フォスファターゼ (S) と α -グルコシダーゼ (S) が多湿黒ボク土で高かった要因として、土層深の項でも論議したように、これらの酵素が腐植の集積する条件で安定化され易いことも関与する可能性がある。これも、黒ボク土に比べて多湿黒ボク土を低く評価した方が良いと考えた

理由の1つである。

(4) 酵素活性相互の関係

微生物はエネルギーを得たり、自らの細胞を合成するために、本報告で供試したような代謝上重要な酵素活性を多くを持つことが想定される。それ故、基本的には各種酵素活性間には相互に正の相関関係が存在した。しかし、その相関性には強弱が認められた。これは、土壤に生息する微生物群の酵素活性が常に一定のバランスにはないことばかりでなく、酵素の存在部位や細胞外に存在する酵素活性の影響等により左右されるためと推察される。

特に α -グルコシダーゼは使用した基質の種類によって異なった傾向を示した。この理由は明確ではないが、基質の細胞内への浸透性や、基質と酵素の親和性の差異がこの結果に関与したと考えられる。これに対し、セルラーゼは2つの方法でほぼ同一な傾向の値が得られた。

土壤微生物活性の評価法として用いる酵素活性は、より広範な土壤酵素活性を代表するものであることが望ましい。酵素活性相互の相関性から(表6)ここで供試した酵素活性は、フォスファターゼ(S)と α -グルコシダーゼ(S)のグループ、 β -グルコシダーゼ(S)、セルラーゼ(S, F)、 α -グルコシダーゼ(F)のグループ、及びFDA(F)の3つに分けることができる。この内、FDAは表5でも他の酵素活性と異なる傾向であり、広い酵素活性を代表しないので微生物活性の評価法として適切ではない。

(5) 微生物活性の評価法として適切な土壤酵素活性とその応用場面

これまで論議した結果から、フォスファターゼ(S)は微生物活性の評価手法として適切ではない。 α -グルコシダーゼ(S)はフォスファターゼ(S)と相関が高く、 β -グルコシダーゼ(S)は多湿黒ボク土と黒ボク土を同等に評価するので、ともに除外した。残されたセルラーゼ(S, F)と α -グルコシダーゼ(F)間を比較すると、土層深との反応から(表3)、 α -グルコシダーゼ(F)の方が微生物活性を評価するためにより適切であると考えた。

α -グルコシダーゼ(F)を用いた微生物活性の評価法は、土壤肥料分野の試験研究において、種々の応用が可能である。

その一つの例として土壤窒素診断への応用が考えられる。現行の熱水抽出性窒素による土壤窒素診断で多湿黒ボク土が除外されたのは、多湿黒ボク土で微生物活性が抑制され、その抑制の程度が条件によって異なるからであろう¹⁰⁾。すなわち、有機物からの土壤窒素供給量の診断は、易分解性の有機態窒素量とそれを分解する活性の両者が評価されることによって可能になる。有機物を分解する微生物の活性は土壤の種類や管理来歴によって

大きく異なるのでそれを知る必要がある。加えて、微生物活性の数値化によって、微生物による活発な無機化が行われる土層深を推定することも可能である。このように、微生物活性の高低を勘案することによって土壤窒素診断の高精度化を図ることが出来る可能性がある。

また、数十ヶ所の農家圃場で各種の酵素活性を調査したところ、いくつかの酵素活性とてん菜の収量に正の相関関係が見いだされた。酵素活性は有機物が施用され、pH、リン酸、通気性や水分条件など土壤の理化学性が良好な土壤で高く、そのような土壤では当然てん菜の生育も良いことが、この相関関係をもたらしたと考えられる。それ故、微生物が活発に活動できるような環境は、作物根にとっても良い環境であるといえる。従って、土壤の微生物活性の評価法を作物根圏の総合的な環境指標として用いることも可能であると考ええる。

さらに、この方法を用いた知見が蓄積された段階で、実際の農地の微生物活性を評価する手法として使うことが出来る。また、土壤条件が比較的等しければ、微生物の代謝活性は供給される基質量に左右されるはずであるから、微生物活性を評価することは個々の圃場の有機物管理来歴を知る手がかりとなる。

本手法を用い、従来ブラックボックスであった微生物の代謝活性と、土壤で起こる各種の現象を結びつけることによって、双方をより深く理解することができるとともに、手法が統一されることによって、異なる試験のデータを統一した基準で相互に比較検討することができよう。謝辞 本稿を取りまとめるに当たり、ご校閲を頂いた十勝農業試験場成田秀雄場長、環境化学部長沢口正利博士及び農産化学部長木村清氏に深く感謝します。

引用文献

- 1) Alef, K.; Beck, Th.; Zelles, L.; Kleiner, D. "A comparison of methods to estimate microbial biomass and N-mineralization in agricultural and grassland soils". *Soil Biol. Biochem.* 20, 561-565 (1988).
- 2) Anderson, J.P.E.; Domsch, K.H. "A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils". *Soil Biol. Biochem.* 10, 215-221 (1977).
- 3) Boyd, S.A.; Mortland, M.M. "Enzyme interactions with clays and clay-organic matter complexes". *Soil Biochemistry*, Vol. 6. Bollag, J.M. and Stotzky, G. ed. Marcel Dekker, 1990, p. 1-28.
- 4) Burns, R.G. "Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology".

- Soil Biol. Biochem. **14**, 423–427 (1982).
- 5) 土壤微生物研究会. “土壤バイオマス測定法”. 養賢堂. 1992, p. 173–190.
- 6) Garcia, C.; Hernandez, T.; Costa, F. “Microbial activity in soils under Mediterranean environment conditions”. Soil Biol. Biochem. **26**, 1185–1191 (1994).
- 7) Higashida, S.; Takao, K. “Seasonal fluctuation patterns of microbial numbers in the surface soil of a grassland”. Soil Sci. Plant Nutr. **31**, 113–121 (1985).
- 8) 東田修司. “土壤微生物診断の可能性”. 北海道土肥研究通信, 第37回シンポジウム, 北海道土肥懇話会, p. 1–12.
- 9) 東田修司, 田村元, 山神正弘. “畑土壤の微生物活性とその規制要因”. 北海道立農試集報. **70**, 17–26 (1996).
- 10) 北海道立中央農試・十勝農試・北見農試, ホクレン. “熱水抽出性窒素によるてん菜及び馬鈴しょ畑の土壌診断”. 北海道農業試験会議資料, 1990. 24 p.
- 11) 北海道立十勝農試. “畑土壤における微生物代謝活性の測定法”. 北海道農業試験会議資料, 1995. 26 p.
- 12) Pauli, F.W. “The biological assessment of soil fertility”, Plant and Soil, **22**, 337–351 (1965).
- 13) Rastin, N.; Rosenplanter, K.; Huttermann, A. “Seasonal variation of enzyme activity and their dependence on certain soil factors in a beech forest soil”. Soil Biol. Biochem. **20**, 637–642 (1988).
- 14) Ross, D.J.; Speir, T.W.; Cowling, J.C.; Whale, K.N. “Temporal fluctuations in biochemical properties of soil under pasture. I. Nitrogen mineralization and enzyme activities”. Aust. J. Soil Res., **22**, 319–330 (1984).
- 15) 沢田泰男, 新田恒雄. “耕・草・林地土壌の微生物相の対比”. 草地試研報. **6**, 32–39 (1975).
- 16) Schnurer, J.; Rosswall, T. “Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter”. Appl. Environ. Microb. **43**, 1256–1261 (1982).
- 17) 関谷長昭. “北海道十勝地方に分布する土壌型の微生物相について”. ペドロジスト. **18**, 72–86 (1974).
- 18) Sparling, G.P. “Microcalorimetry and other methods to assess biomass and activity in soil”. Soil Biol. Biochem. **13**, 93–98 (1981).
- 19) 鈴木達彦, 石沢修一. “畑土壤の微生物およびその活性と肥沃度”. 農業技術研究所報告. **B 15**, 91–186 (1965).
- 20) Vandecasteele, S.V.; Katznelson, H. “Microbiological activities in soil. Microflora of different zonal soil types developed under similar climatic conditions”. Soil Science. **46**, 57–74 (1938).
- 21) 吉田富男, 坂井弘. “北海道における各種土壌の微生物学的研究 第1報 各種土壌の微生物相とその作用”. 北海道農業試験場彙報. **76**, 36–44 (1962).

Characters of Some Soil Enzymes as a Measure of Soil Microbial Activities.

Shuji HIGASHIDA* and Masahiro YAMAGAMI**

Summary

Some soil enzymatic activities were compared in order to select a proper method for evaluating microbial activity in upland fields. Soil enzymes tested were Fluorescein diacetate hydrolysis(FDA), phosphatase (measured using p-nitrophenol derivative, abbreviated as "S"), α -glucosidase(S), β -glucosidase(S), cellulase(S), α -glucosidase (measured using 4-methylumbelliferon derivative, abbreviated as "F"), and cellulase(F).

The survey of farmers fields in the central area of the Tokachi district indicated that enzymatic activities had significant correlations with dry matter yields of sugar beets except for phosphatase(S). Then, high phosphatase activity was detected in the soil sampled from a lower soil profile which have low biomass and high organic matter content. Phosphatase was rather stable with sonication and chloroform fumigation. These data show that phosphatase is stabler in soils than with other enzymes. So phosphatase doesn't always reflect active microbes in situ. Thus, phosphatase is not suitable as a method for evaluating whole microbial activities in soil.

As α -glucosidase(S) always had high correlations with phosphatase(S), this enzyme is also not appropriate for our purpose. In point of soil profile, α -glucosidase(S), β -glucosidase(S) and cellulase(S) sometimes rate subsoil higher than surface soil.

Correlation analysis showed enzyme tested correlated each other except for FDA. FDA is therefore not proper, as it could not represent wide variety of microbial measures. In the Tokachi district, microbial activities in wet andosols were commonly restricted by bad drainage. However, phosphatase(S), α -glucosidase(S) and β -glucosidase(S) prone to rate wet andosols higher than common andosols, while cellulase(F,S) and α -glucosidase(F) were higher in common andosols than wet andosols.

Of all soil enzymes tested in this experiment, measuring α -glucosidase(F) is the most appropriate method of evaluating heterotrophic microbial activities in soils of upland fields.

* Hokkaido Prefectural Kitami Agricultural Experiment Station, Kunneppu, Hokkaido, 099-13, Japan

** Hokkaido Prefectural Tokachi Agricultural Experiment Station, Memuro, Hokkaido, 082, Japan