

武蔵学園の土壌環境と 土壌微生物多様性の調査結果

Investigation of the Soil Environment and Soil Microbial Diversity at Musashi Gakuen

李 天舒 LI, Tianshu

【緒言】

持続可能な開発目標（SDGs）である「陸の豊かさを守ろう」および「気候変動に具体的な対策を」について、環境生命科学の観点から理解し、合理的アプローチを考える力と行動力を育むため、本研究では文系大学において実施可能な環境調査および分析手法を開発した。

土壌環境とは、土粒子を構成する有機物と無機物、空気、水、さらに腐食連鎖を支える微生物を統合するものを指す。土壌環境の保全は植物をはじめとする陸上生物の繁栄に大きく寄与しており、土砂崩れ、干ばつ、洪水などの自然災害を防ぐ上でも重要な役割を果たしている。一方で、気候の変化や人間活動、特に森林伐採と都市開発によって土壌の物理学的・化学的性質が変化するとともに、土壌生物相の組成もダイナミックに変化していく。地球の表層環境を構成する土壌圏、大気圏、水圏および生物圏は、物質循環を通じて統合したものであるから、環境問題は局地的な範囲にとどまらずほかの地域に影響を及ぼすことも少なくない。だからこそ、生物多様性の維持は生態系のバランスを保つための鍵であり、食料生産や気候調整など、人類の存続に関わる環境問題の対策にもなる¹。

土壌微生物は有機物の分解、炭素貯蔵量と栄養分の調節に関与し、植物による栄養分の摂取を促進することで植物の多様性と生産性の向上に貢献する²³。土壌圏には約1兆5000億トンの炭素が貯蔵されると推定され、これは大気中の炭素の約2倍、陸上植物の約3倍に相当し、海洋表層水に溶存する炭素量を上回る規模

である⁴。特に森林生態系は陸上生態系の炭素貯蔵量の5割以上を占め、単位面積の炭素貯蔵量はほかの生態系より圧倒的に高い。森林生態系の維持は炭素収支の時空間変動に大きな影響を与えているため、森林減少または森林劣化は二酸化炭素固定量の減少につながり、国連の報告によると温室効果ガス排出量の約10%に寄与している⁵。森林資源の保全と生態系の維持は、地球温暖化の対策として極めて重要であることが認識されている。

生態系の発達には、分解者である微生物の働きが不可欠であり、微生物多様性が高まるほど無機・有機養分の循環効率がよくなる⁶。土壌微生物の種類や数、また微生物コミュニティの多様性は、土壌の生物学的性質として定義され、土壌の物理学的および化学的性質と互いに影響を与える。本研究では、土壌の物理学的性質である含水率と土粒度分布、および化学的性質である pH、塩分濃度、また窒素 (N)、りん (P)、カリウム (K) の含有量を簡易に測定できる方法を試み、土壌の生物学的性質を定量する実験方法を確立した。現段階では武蔵学園内の数カ所の土壌を測定対象とし、各地点の植生の特徴と土壌の物理学的・化学的・生物学的性質との関連性を調べた。

【実験材料と方法】

1、土壌サンプルの採取

武蔵学園内の7箇所で地表から深さ5 cm までの表層土を採取した(図1)。各地点の生物学的および環境学的特徴は次に述べる。地点 A は人通りが多く、白樫(常緑高木)が植えられている; 地点 B は東と西南の方向に建物があるため直射日光が届かない草地である; 地点 C は流速が遅いすぎ川下流の一ノ橋付近で、多様な低木が植えられている; 地点 D はビワ(常緑高木)が植えられている; 地点 E は流速が速いすぎ川上流にある中ノ島で、ヒイラギ(常緑高木)が植えられている; 地点 F は多様な低木が植えられている道路沿いである; 地点 G は直射日光がほとんど届かない大講堂の北側で、ケヤキが植えられている。

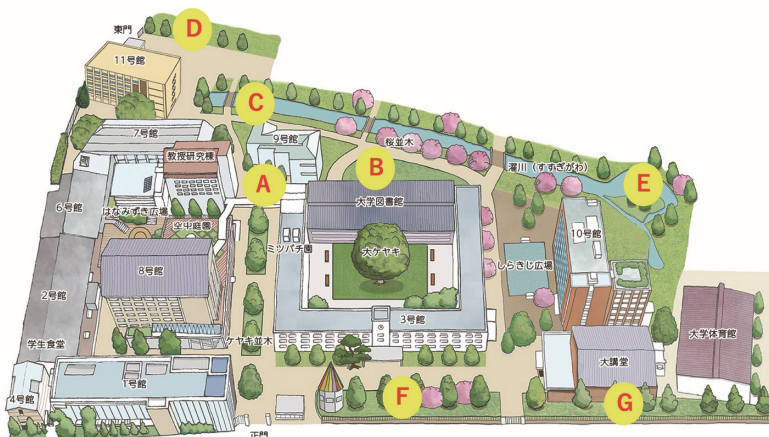


図 1. 武蔵学園土壌のサンプリング地点

2. 土の物理学的および化学的性質の測定

土壤懸濁液の pH、硝酸態窒素 (N)、および水溶性リン酸 (P)、水溶性カリウム (K) の含量測定には、農大式簡易土壌診断キットみどりくん N およびみどりくん PK 試験紙を使用した。操作手順はメーカーの指示を参考にして、学生実験の操作性も図るため一部に改良を加えた。具体的に、4 mL の土を 50 mL コニカルチューブ (Falcon®) に入れ、40 mL まで精製水を加えた後、1 分間激しく振とうする。その懸濁液に、みどりくん N 試験紙チップを 3 秒間、またはみどりくん PK 試験紙チップを 10 秒間浸して取り出し、余分な水分をペーパータオルで吸い取る。1 分間後に透明なプラスチックの表面を通して、呈色をカラーチャートと比較し測定値を得る。硝酸態窒素 (N) パックテスト (WAK-NO3、共立理化学研究所) での測定は取扱説明書に従って行なった。

pH メーターと電気伝導率計 (LAQUAtwin EC-33B、堀場) を用いた測定では、土壤懸濁液を 1 時間以上静置して土の粒を沈殿させ、上澄みを数滴測定セルに滴下し、数値が安定したら測定値として読み取る。電気伝導率 (導電率) は、物質中に電気の流れやすさを表す値である。水中に不純物 (イオン分子) が多いほど、電流が流れやすくなり、値が高くなる。土壤には様々な栄養塩が含まれるため、

土の抽出液の導電率は土壤肥沃度指標の一つとして用いられる。

含水率の測定では、2 mg の土を坩堝に入れ、総重量 (x) を量る。低温乾燥機 (SSN-114S、いすず社) を用いて 105℃ で 3 時間加熱した後、シリカゲルを入れたガラス製デシケータに放置する。室温まで冷えたら、乾燥土と坩堝の総重量 (y) を量って、蒸発した水分量の百分率 (w%) を計算する (式 1)。

$$\text{含水率 (\%)} = \frac{x-y}{2} \times 100 \quad (\text{式 1})$$

土の粒度試験では、ステンレス製試験ふるい (野中理化工器製作所) を用いて、目開き 500 μm , 212 μm , 106 μm , 63 μm , 38 μm の順に土サンプルを濾過する。各ふるいを通過しなかった土の重量を秤量し、土サンプルの総重量に対する百分率で土粒子の粒径分布を表す。

3、腐植質フミン酸の含有量の比較

土からフミン酸を抽出する方法は、以前に発表した論文を参考にした⁷⁾。目視による色変化の判断は精度が低いため、本研究では硫酸銅 (II) の光吸収特性を利用して、フミン酸の反応性を定量する方法を試みた。具体的に、まずは硫酸銅 (II) 水溶液の標準液 (0.2 M, 0.1 M, 0.05 M, 0.025 M, 0.0125 M) を調製し、波長 750 nm における吸光度を測って検量線を作成する。次は土から抽出したフミン酸沈殿物に、0.2 M 硫酸銅 (II) 水溶液 5 mL を入れて、振とうさせる。その後、卓上型遠心分離機で 5 分間遠心処理し、未反応フミン酸を沈殿させる。そして上澄み中の未反応硫酸銅 (II) の吸光度を測定し、検量線の回帰式で濃度 (c) を計算する。フミン酸との反応性は (0.2 - c) M で推定する。硫酸銅 (II) 水溶液は、波長 800 nm 付近に吸収ピークがあるのに対し、銅錯体溶液は波長 350 ~ 400 nm と波長 600 ~ 700 nm に二つの吸収ピークがあることが報告された⁸⁾。そのため、主波長 750 nm と副波長 405 nm の吸光度差から、未反応の硫酸銅 (II) 水溶液の濃度 (c) を求めた。

4、土壤微生物の培養

無菌操作は除菌フィルターを備えたクリーンブース内で行われた。各サンプルの土 4 mL をファルコンチューブに入れ、40 mL まで精製水を加える。1 分間激しく振とうし、1 時間静置する。その後、上澄み液から 10 μ L を取り出し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 990 μ L と混合して 100 倍に希釈した菌液を調製する。100 μ L の菌液を寒天培地に滴下し、アルコールランプで火炎滅菌したコンラージ棒で均一に塗布する。通気が良い暗所に室温で 24 時間培養した後、菌の集落 (コロニー) の数を数え、コロニーの大きさ、形状、色、隆起などの形態を観察する。

5、微生物コミュニティ多様性・活性の評価

GEN III マイクロプレート (グラム陰性 + 陽性菌用、BIOLOG) の各ウェルに 100 倍に希釈した菌液 100 μ L を入れ、通気が良い暗所に室温で 24 時間培養した。GEN III マイクロプレートには、71 の炭素源と 23 の化学物質がウェルごとにコーティングされ、これらの化合物は微生物によって消費されると発光する反応が起こる。微生物の種類が増えれば増えるほど、より多くの炭素源化合物が利用可能になり、発光するウェル数も増える。微生物の数や代謝能力が大きいほど、炭素源化合物の消費量が多くなり、発光強度も強くなる。したがって、マイクロプレートリーダーで各ウェルの吸光度 (Abs_{492 nm}) を測定することにより、土壤微生物コミュニティの多様性と活性を評価することが可能である。

【実験結果と考察】

1、土の物理学的および化学的性質の測定

表 1. 各地点における土壌の物理学的・化学的性質

サンプル	A	B	C	D	E	F	G
pH (試験紙)	6.0	6.0	6.5	7.0	6.0	6.0	6.5
pH (pHメーター)*	6.4±0.1	6.2±0.4	6.4±0.1	7.2±0.3	7.2±0.3	7.1±0.2	6.9±0.2
N (mg/L, 試験紙)	30	0	0	15	0	0	0
N (mg/L, バックテスト)	5	1	2	2	1	<1	<1
P (mg/L, 試験紙)	7~17	7~17	7~17	17~33	7~17	7	7
K (mg/L, 試験紙)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
導電率 (μS/cm)*	17.7±0.6	12.3±0.6	19.0±1.7	53.7±5.1	13.3±1.2	12.7±1.5	17.7±1.5
含水率 (w%)	35.9%	42.4%	18.8%	31.7%	24.0%	20.7%	29.0%

*Data are shown as mean±S.D. (n=3)

表 1 では武蔵学園各地点の土壌中の硝酸態窒素 (N)、水溶性リン酸 (P)、水溶性カリウム (K) の含有量および pH の測定結果を示す。まずは土の化学的性質を説明する。A, B, C の 3 地点は pH 6.0~6.5 の弱酸性土壌であり、D 地点は pH 7.0~7.2 の中性土壌であることを、pH 試験紙と pH メーター両方で確認できた。E, F, G 地点のサンプルを測定したところ、pH 試験紙では弱酸性、pH メーターでは中性を示した。pH 試験紙 (みどりくん N) と pH メーターでの測定値に差異が生じる原因は、土の懸濁液に微粒子が多量に存在することで比色判定の正確さに影響した可能性が高いことを考察している。また、硝酸態窒素含有量の測定においても試験紙とバックテストの結果には大きな差があり、それは測定原理の違いによるものと考えられるが、不純物の混在で試験紙の発色不良や目視判断の誤差を生じることを否定できない。どちらの方法がより信頼性が高いかを判断できないが、どちらかの方法でも土壌 A には最も高いレベルの硝酸態窒素含有量が検出された。

水溶性リン酸含量の測定では、土壤 D 中の含有量が最も高い (17~33 mg/L)、次に A, B, C, E (7~17 mg/L)、最も低いのが F と G (7 mg/L) であることがわかった。水溶性カリウム含量の測定では全てのサンプルが検出限界 (3 mg/L) 以下であった。導電率の測定では、土壤 D は他のサンプルに比べて著しく高い値 (約 $53.7 \mu\text{S}/\text{cm}$) を得たことに対し、ほかのサンプルは $12.3\sim 19.0 \mu\text{S}/\text{cm}$ の平均値を示した。これは、硝酸やリン酸などのマイナスに帯電したイオンと、カリウムやナトリウムなどのプラスに帯電したイオンが存在することで測定されたため、土壤 D の塩分濃度が最も高いことを意味している。

次に土の物理学的性質である含水率と粒径分布 (図 2) を説明する。草地 B 地点は最も高い含水率 (42.4%) を示し、これは柔らかい黒土の特性と関係していることを理解する。しかし、ふるい分析においては、他のサンプルに比べて、B サンプルには大きい土粒子 ($>500 \mu\text{m}$) の重量百分率が最も高く (83.3%)、 $106 \mu\text{m}$ 以下の微粒子が最も低い (0.5%) 結果を得た。今回の粒度試験は未乾燥土を用いたため、水分やイオンの影響で土粒子が凝集し、ふるいを通過しにくくなったことを考察している。この観点は、含水率が最も低い C サンプルには $500 \mu\text{m}$ を

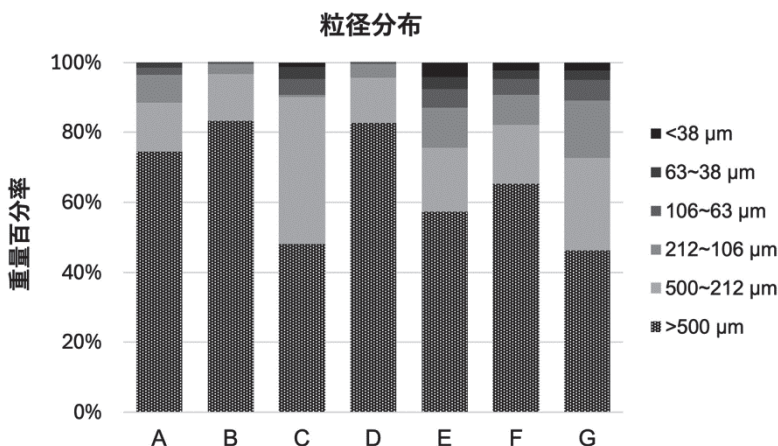


図 2. ふるい分析を用いた粒度試験の結果

超える土粒子の割合が著しく低いという結果によっても裏付けられている。水分や塩分の影響をなくすために、土サンプルを精製水で洗浄し、オーブンで乾燥させる前処理が必要であることを考える。今回の試験では、土 C, E, F, G の含水率が 30% 未満であることから、平均粒子径が比較的小さいこと、また土 A, B, D の含水率が 30% 以上であることから、平均粒子径が比較的大きいことを考察している。

2、腐植質フミン酸の含有量の比較

各地点の土から抽出したフミン酸と 0.2 M 硫酸銅 (II) 水溶液との反応を図 3 左に示す。フミン酸溶液に銅イオンを添加すると錯体が形成され、pH が低下する。そして遠心分離にかけると、フミン酸に付着した銅イオンはフミン酸とともに沈殿する。上澄みに残留した硫酸銅 (II) 水溶液の吸光度 (Abs750 nm) をマイクロプレートリーダーで測定し、硫酸銅 (II) 標準液の検量線に照らして濃度 (c) を計算した (図 3 右、上澄み)。フミン酸と反応した銅イオンの濃度は引き算 ($0.2 - c$) で推定した (図 3 右、沈殿)。上澄みに溶解したフミン酸—銅錯体の影響を抑えるために、波長 405 nm における吸光度をバックグラウンドにした。ただし、硫酸銅錯体の生成量は土サンプルごとに異なり、反応性が高いほど波長 405 nm における吸光度が高くなり、測定値 c が実際の値より低くなる傾向がある。

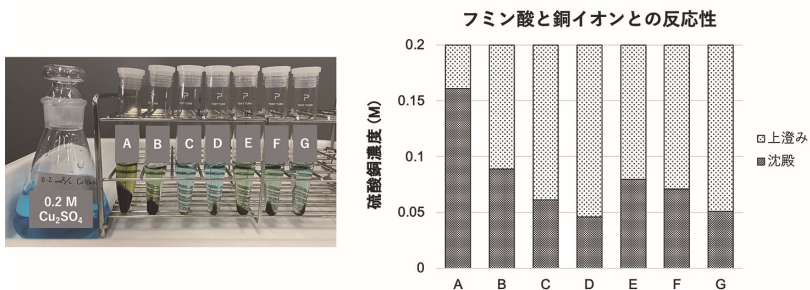


図 3. (左) 各土サンプルから抽出したフミン酸と 0.2 M 硫酸銅 (II) 水溶液と反応させ、遠心分離した後の様子；(右) 上澄み中の未反応硫酸銅 (II) 濃度を吸光度から計算し、フミン酸と反応して沈殿した硫酸銅 (II) の濃度を推定した。

しかしながら、各サンプル中のフミン酸の反応性を比較する目的でこの方法を検討する価値はあるだろうと考える。

硫酸銅(II)との反応性でフミン酸の含量を比較したところ、地点Aでは最も含量が高いことがわかった。ほかの地点と比べて、落ち葉や小枝などの堆積物が多量であることは原因の一つとして考えられる。

3、土壤微生物多様性・活性の評価

各地点の土壤抽出液を100倍に希釈し、室温で24時間培養した結果は図4に示す。A, Gには点状、円形のコロニーしか形成しなかったのに対して、ほかのシャーレには3種類以上のコロニーが観察された。具体的に例を挙げると、点状、円形のコロニーに加えて、B, C, D, Eには仮根状、不規則状のコロニー、B, C, E, Fには糸状菌コロニーの形成をも確認できた。これは、B~F地点の微生物種がより多様であることを意味する。

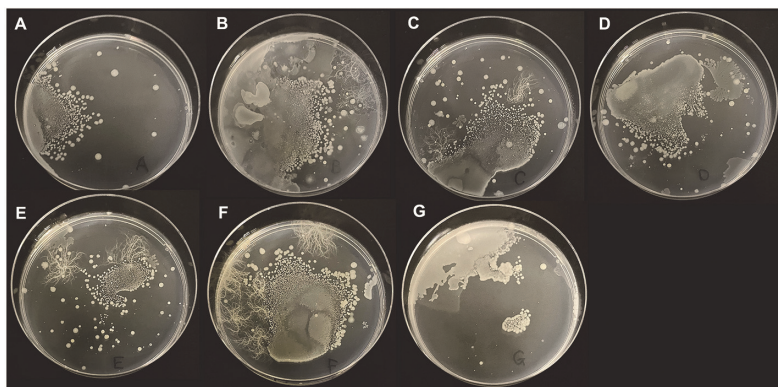


図4. 各地点のサンプルから抽出した水溶液中の微生物の培養結果

図5と表2では GENIII マイクロプレートに培養した土壤微生物コミュニティの炭素源資化能を表す。土サンプルの抽出液を100倍に希釈し、96ウェルプレートに添加して、24時間インキュベーションした後のプレートの発色の一例

を図5左に示す。図5右では、各サンプルを入れたプレートの各ウェルの発色値を発色強さの順に示す。各ウェルに異なる炭素源化合物が含まれ、その炭素源が微生物に消費されるほど発色が強くなる反応を起こす。すなわち、微生物種が多様であるほど、利用する炭素源の種類が多くなり、発色するウェル数（陽性ウェル数）も多くなる。微生物コミュニティの活性が高いほど、炭素源の消費量が高くなり、発色量も高くなる。そして表2では、波長492 nmで測定した96ウェルの総発色量を土壌微生物コミュニティの活性の指標とし、吸光度を0.5を超えたウェル数を土壌微生物の多様性の指標として評価する。

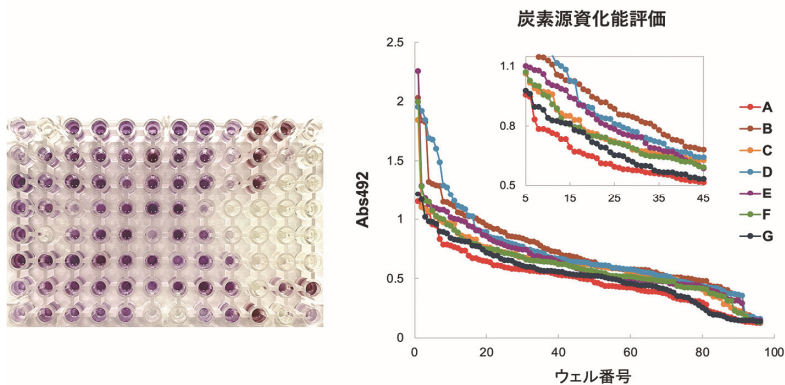


図5. (左) 微生物コミュニティによる各炭素源の利用結果の一例；
(右) 波長492 nmで測定した各炭素源の同化量

表2. 各地点における土壌微生物の活性と多様性評価

サンプリング地点	A	B	C	D	E	F	G
総発色量 (Abs ₄₉₂)	47.382	69.444	59.292	68.918	61.227	58.045	50.670
陽性ウェル数 (Abs>0.5)	46	76	71	71	57	63	54

7つの地点を比較したところ、草地Bの微生物多様性と活性は最も高い、次はD、EとC、Fの順に微生物コミュニティの多様性と活性が低くなり、GとAは最も低いであることがわかった。この結果は培養法を用いた観察結果とほとんど

一致している。また、土壤微生物コミュニティの多様性と活性の間に相関関係があることを推定できた（図6）。

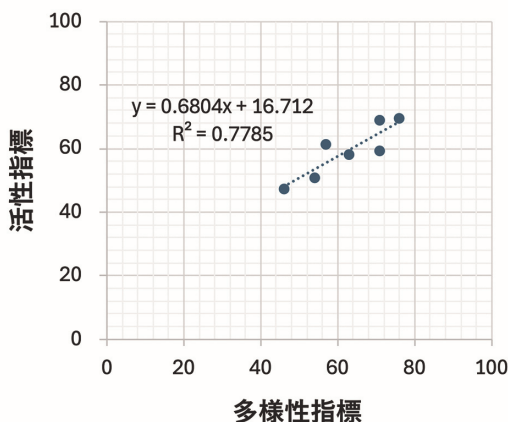


図6. 微生物コミュニティ多様性と活性の相関関係

【結論と今後の展望】

草地 B 地点の土壤では水分含有量が高い特徴、常緑高木周辺の D 地点では塩分濃度と窒素、リン含有量が高い特徴を持つことで、土壤微生物コミュニティの働きはほかの地点と比較して活発になっていることが明らかになった。今後は季節や天候などの環境要因を調査項目に入れ、微生物コミュニティの時空間変化をモニタリングすることを計画する。サンプル数を増やせば、相関分析の精度（ R^2 ）を高めることができ、さらに多変量解析を用いれば、土壤の生物学的性質を左右する物理学的・化学的主因子を分析し、それらの寄与度を数式で表すことも可能である。

武蔵学園は緑あふれ的环境であるが、都市生態系の一部であり、土壤の物理学的・化学的性質は森林や草地生態系と異なって、微生物コミュニティの多様性・活性も異なることを想定している。今後の課題として、生態系の微視的な違いを理解するために、都市生態系と森林生態系の特徴を見出す実習項目を設計する。

【謝辞】

本研究は、2024 年度「武蔵大学学長裁量経費＜教育分野＞」の助成を受けて実施された。フミン酸の抽出実験は、教務課職員（実験助手）東泉 恵美氏、石川 元美氏および 2024 年度サイエンスラボ講座（生物学）A の受講生のご協力をいただいて行われた。この場を借りて厚く御礼申し上げる。

【参考文献】

1. Bender SF, Wagg C, van der Heijden MGA. An Underground Revolution: Biodiversity and Soil Ecological Engineering for Agricultural Sustainability. *Trends Ecol Evol*. **2016**; 31(6): 440-452.
2. van der Heijden MG, Bardgett RD, van Straalen NM. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett*. **2008**; 11(3): 296-310.
3. Delgado-Baquerizo M, Reich PB, Trivedi C, Eldridge DJ, Abades S, Alfaro FD, Bastida F, Berhe AA, Cutler NA, Gallardo A, Garcia-Velázquez L, Hart SC, Hayes PE, He JZ, Hseu ZY, Hu HW, Kirchmair M, Neuhauser S, Pérez CA, Reed SC, Santos F, Sullivan BW, Trivedi P, Wang JT, Weber-Grullon L, Williams MA, Singh BK. Multiple elements of soil biodiversity drive ecosystem functions across biomes. *Nat Ecol Evol*. **2020**; 4(2): 210-220.
4. IPCC, Climate Change 2001: The Scientific Basis, **2001**.
5. UNFCCC, UN Climate Change Annual Report, **2018**.
6. 武田博清, 森林生態系において植物—土壌系の相互作用が作り出す生物多様性, 日本生態学会 **1994**; 44(2): 211-222.
7. 李天舒, 細胞生物学的研究手法を用いた自然環境の調査方法の探索, 武蔵大学リベラルアーツ&サイエンス学会雑誌 **2024**; 1: 49-64.
8. 上林景太, 杉本将之, 和田仁, 川崎三津雄, 加藤立久, 新規銅錯体溶液を用いた銅微粒子分散液の作成, 粉体および粉末冶金 **2017**; 64(12): 667-672.