

土壌の易分解性有機物に対する微生物体 およびその細胞壁の寄与について(第3報)

土壌中における微生物体およびその細胞壁物質の無機化に及ぼす
乾燥処理の効果と易分解性有機物に対する細胞壁物質の寄与

丸本 卓哉*・甲斐 秀昭**・吉田 堯***・原田登五郎**

前報^{13,14)}までに得られた結果によると、土壌に有機物を添加すれば、それは分解され、窒素の大部分は一応微生物体を形成することが認められた。また、炭素源を添加すれば、それをエネルギー源として細菌やカビが増殖し、その培地を乾燥前処理すると有機物の無機化促進効果すなわち乾燥処理効果が認められた。そして、その処理効果の大きさは培地の微生物活性と相関が高かった。さらに、土壌に乾燥菌体を添加して、その無機化が上限に達した時点で土壌を乾燥前処理すると、主として添加菌体由来する新しい集積有機物に処理効果のみられる部分が存在することが確かめられた。そして、これらの結果から、土壌の乾燥処理効果の給源として土壌中の微生物体自身の寄与が推察された。

そこで、本報では微生物体自身を乾燥した場合に、その無機化促進すなわち乾燥処理効果が認められるかどうか、また、その乾燥処理効果があるとすれば、菌体構成のどの部分にあるかを確かめる目的で次のような三つの実験を行なった、すなわち、実験1では、あらかじめ乾燥した菌体と生菌体との無機化を比較した。実験2では、*Arthrobacter simplex* (以下、*Ar. simplex* と表示) と *Bacillus subtilis* (以下、*B. subtilis* と表示) を用いて、菌体およびその細胞質物質の熱乾処理効果について調べた。また、*B. subtilis* については、超音波処理によって調製した細胞壁物質の熱乾処理効果を同時に比較検討した。実験3では、*Saccharomyces cerevisiae* (以下、*S. cerevisiae* と表示) を超音波処理して調製した細胞壁物質の乾燥処理効果を調べた。そして、これらの実験結果を基にして、土壌に添加された細胞壁物質の分解が一応ほぼ定常状態になって、その無機化がほぼ上限に達したと考えられる時点で熱乾処理を行ない、熱乾前処理による無機化促進効果を調べ、いわゆる土壌の易分解性有機物に対する細胞壁物質の寄与について総合考察を行なった。

* 九州大学農学部 (現在、山口大学農学部、山口市吉田1677の1)

** 九州大学農学部

*** 九州大学農学部 (現在、アジア野菜研究開発センター、台湾)

昭和48年8月6日受理

日本土壌肥科学雑誌 第45巻 第7号 p.332~340(1974)

実験1. 微生物生菌体とその乾燥 菌体との無機化

実験方法

500 ml 容の試薬ビンに 8g のケイ砂 (米山薬品社製、粒径 0.5~0.25mm) と 2g の長野県農試水田土壌より採取調製した土壌粘土 (主要粘土鉱物モンモリロナイト) を入れ、十分混合した人工土壌 (人工土壌 10g 当たり 0.18mg の無機態窒素を含んでいる) に、以下の微生物の菌体を添加混合した。すなわち、*Aspergillus niger* (以下、*A. niger* と表示、生と乾燥)、*S. cerevisiae* (生と乾燥)、*Penicillium chrysogenum* (乾燥)、*Candida lipolitica* (乾燥) および *Microbacterium ammoniaphilum* (乾燥) で、それらの添加量は第2表に示している。全炭素はチューリン法⁹⁾、全窒素はマイクロケルダール法²⁾にて定量した。生菌体は第1表に示した培養液を用いて振とう培養後、集菌し、蒸留水で4回洗浄して供試した。乾燥菌体は 100°C で1時間、ついで 70°C で一夜通風乾燥したものを粉碎して (<60メッシュ) 供試した。これらの菌体を添加したのち、前報¹⁴⁾で示した無機栄養液とイノキュラム (九大附属農場水田土壌の水懸濁液 (1:5) を人工土壌 10g 当たり 0.5ml) を加え、水分を最大容量の60%に調節した。そして、第1図中の10に示すようなコック付きのゴム栓をし、30°C の恒温器中に2週間

第1表 培養液の組成と培養条件
A. niger, *P. chrysogenum*, *S. cerevisiae*, *C. lipolitica*

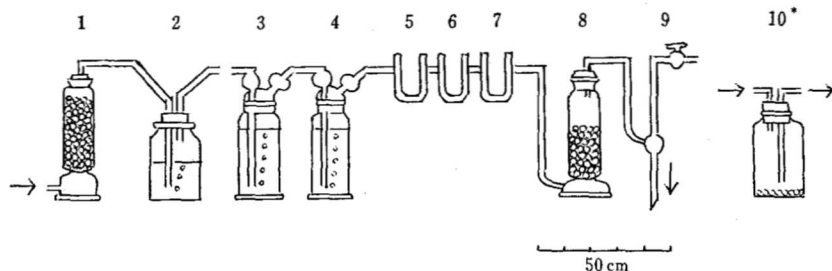
グルコース	20.0 g
酵母エキス	2.0 g
ペプトン	5.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
蒸留水	1 l
pH	5.6~5.8

30°C にて2~3日振とう培養

Ar. simplex, *B. subtilis*, *M. ammoniaphilum*

肉エキス	10.0 g
ペプトン	10.0 g
食塩	2.0 g
蒸留水	1 l
pH	6.8~7.0

30°C にて一夜振とう培養



第1図 CO₂定量装置

1.8 ソーダライム 2. 蒸留水 3,4 濃硫酸 5. CaCl₂
6,7 アスカライト 9. サッカー 10. サンプル

* 定量時には, 10 を 2 と 3 の間に設置する。

インキュベイトした。インキュベーション当初の反応は pH 6.5 であった。インキュベーション期間中に無機化した炭素および窒素の定量は次のようにして行なった。すなわち, CO₂ として無機化した炭素は第1図に示す CO₂ 定量装置を用いて定量した。図中の2と3の間に10の試料ビンを設置し, 9のサッカーで徐々に吸引する。1および2を通過して脱 CO₂ された水蒸気飽和の空気が試料ビン内に流入すると同時に, 試料ビン中の CO₂ を含んだ空気は押し出され, 3, 4および5を通過うちに完全に脱水される。そして CO₂ は6および7のU字管中のアスカライトに吸収される。吸引時間15分で試料ビン内の CO₂ は完全に押し出される。吸引前後の6および7のU字管の重量を秤量し, 吸引後の重量増より, 吸収された CO₂ の量を求め, これよりC量を計算で求めた。

試料中の無機態窒素 (NH₄-N+NO₃-N) は, CO₂-Cを

第2表 微生物体の無機化
(CあるいはNmg/100g人工土壌*)

供試菌	添加量 (有機態) C N	C/N 比	2週間の無機 化量		2週間の無機 化率 (%)	
			C	N	C	N
A ⁽¹⁾	(a)	230 19.2	11.9	53 3.3	23.0 17.2	
	(b)	178 17.5	10.2	71 4.8	39.9 27.4	
S ⁽²⁾	(a)	277 45.6	6.1	39 5.2	14.1 11.4	
	(b)	404 62.0	6.5	236 28.9	59.0 46.6	
P ⁽³⁾	(b)	420 55.0	7.6	256 22.5	61.0 40.9	
C ⁽⁴⁾	(b)	420 89.2	4.7	272 46.0	64.8 51.6	
M ⁽⁵⁾	(b)	211 51.0	4.2	115 26.0	54.5 51.0	

* 長野県農試水田土壌より採取した土壌粘土 20% 入り砂培地 (主要粘土鉱物: モンモリロナイト)

- (1) *Aspergillus niger*
- (2) *Saccharomyces cerevisiae*
- (3) *Penicillium chrysogenum*
- (4) *Candida lipolitica*
- (5) *Microbacterium ammoniaphilum*
- (a) 生菌体物質
- (b) 乾燥粉末菌体物質

定量したのち, 培地に10倍量のN塩化カリウム溶液を加えて振とう抽出し, CONWAYの微量拡散法⁵⁾にて定量した。

実験結果および考察

第2表に供試微生物体の無機化を示した。これによると, *A. niger*の生菌体はN:17.2%, C:23.0%の無機化率を示し, 乾燥菌体はN:27.4%, C:39.9%を示した。*S. cerevisiae*の場合は, 生菌体がN:11.4%, C:14.1%, 乾燥菌体がN:46.6%, C:59.0%の無機化率を示した。また, 他の3種の乾燥菌体の場合は, N:40.9~51.6%, C:54.5~64.8%の無機化率を示した。この結果によれば, *A. niger*と*S. cerevisiae*で数値に多少の差は認められるが, いずれも生菌体より乾燥菌体の無機化率が明らかに高いことが示される。また, 他の3種の乾燥菌体の場合も, その無機化率の高いことが示された。これは, 微生物生菌体が一旦乾燥処理を受けると, その無機化が著しく促進されることを示唆している。このような乾燥処理効果には, 生菌体の死に伴う分解性の変化も含まれているが, 後述するように, 微生物の細胞壁物質には乾燥による著しい無機化促進が認められることからみて, 乾燥処理効果の主体は, 乾燥そのものの影響により分解が促進されることにあるものと思われる。ただし, 菌体の無機化率は微生物の種類によっていくぶん異なることが推察される。これは, 微生物の種類によってその細胞壁の構造や組成が異なることによるものであろう。

JENSEN⁶⁾やMARTIN¹²⁾らは, 数種のカビの乾燥菌体を用いて, 土壌中におけるそれらの分解について実験し, 暗色の菌糸より明色の菌糸の方が分解がよく, この差についてMARTIN¹²⁾は, カビのもつリグニン様物質により暗色の菌糸が分解に対し抵抗性を示すのであろうと述べている。また, HURSTとWAGNER⁴⁾は, 超音波処理後, 凍結乾燥して調製した数種のヒアリン質およびメラニン質のカビの細胞壁物質の土壌中における分解実験

を行ない、メラニン質の細胞壁物質の分解率はヒアリン質のものより低かったと報告している。また、Kuo と ALEXANDER¹¹⁾ は、カビの細胞壁の分解に対する抵抗性は、そのメラニン含量と直接関係していると述べている。その後、BALLESTA と ALEXANDER³⁾ は、着色していないカビの細胞壁でも fucose を含むものは分解に対して抵抗性を示すと報告している。

このように、微生物の種類によってその無機化率に差のあることは確かであるが、実験1の結果より考えれば、いずれの微生物も生菌体の無機化率は、乾燥菌体の無機化率より低いことが予想される。そこで、このことをさらに確認するため、バクテリアの *Ar. simplex* と *B. subtilis* を用いて実験を行なった。

実験 2. *Ar. simplex*-生菌体と *B. subtilis*-生菌体およびその細胞壁物質の無機化に及ぼす乾燥処理の効果

実験方法

500 ml 容の滅菌振とう培養ビンに、第1表に示した滅菌培養液 100 ml を入れ、これにそれぞれ *Ar. simplex* および *B. subtilis* を接種したのち、30°C の恒温器中にて一夜振とう培養した。培養後、集菌し、蒸留水で4回洗浄して得た生菌体の一定量を、実験1で用いた 500 ml 容の試薬ビンに入れた 10 g の砂あるいは人工土壌（佐賀県有明水田土壌より採取調製した土壌粘土を 20% になるように砂に加えたもの。10g の人工土壌当たり 0.28 mg の無機態窒素を含んでいる）培地に添加したのち、実験1と同様の実験条件でインキュベートし、これを対照区とした。また、一部は生菌体を添加後、80°C で2時間熱乾処理を行なったのち、無機栄養液およびイノキラムを加え、以下同様にインキュベートし、これを熱乾処理区とした。インキュベーションは4週間行なった。なお、実験当初の反応は pH 6.5 であった。

菌体の添加量は 10 g の培地当たり、*Ar. simplex* の場合は C : 5.0 mg, N : 1.65 mg とその2倍量を加えた区を、また、*B. subtilis* の場合は C : 7.1 mg, N : 2.36 mg とその2倍量を加えた区を設けた。

なお、本実験における実験開始時の熱乾処理中の、粘土による NH₄-N の固定は認められなかった。

実験結果および考察

第3表に、*Ar. simplex*-および *B. subtilis*-生菌体の熱乾処理効果を示した。まず、*Ar. simplex* についてみると、熱乾処理による無機化促進効果がみられ、その割合は炭素で 2.0~4.0%、窒素で 1.8~3.9% の範囲であった。*B. subtilis* の場合も熱乾処理効果がみられ、その割合は炭素で 2.8%、窒素で 2.8~3.8% を示した。*Ar.*

第3表 *Ar. simplex*-および *B. subtilis*-生菌体の熱乾処理効果

炭素の場合 (C mg/100 g 砂あるいは人工土壌)							
	培地	添加炭素量 (有機)	処理区	2週間目		4週間目	
				無機化量	処理効果	無機化量	処理効果
<i>Ar. simplex</i>	砂	50	対照	28	2	39	1
			熱乾	30	(4.0)*	40	(2.0)
	砂	100	対照	52	4	64	4
			熱乾	56	(4.0)	68	(4.0)
	人工土壌	100	対照	52	3	60	4
			熱乾	55	(3.0)	64	(4.0)
<i>B. subtilis</i>	人工土壌	71	対照	41	2	51	2
			熱乾	43	(2.8)	53	(2.8)
	人工土壌	142	対照	72	4	85	4
			熱乾	76	(2.8)	89	(2.8)
窒素の場合 (N mg/100 g 砂あるいは人工土壌)							
	培地	添加窒素量 (有機)	処理区	2週間目		4週間目	
				無機化量	処理効果	無機化量	処理効果
<i>Ar. simplex</i>	砂	16.5	対照	9.8	0.4	14.2	0.4
			熱乾	10.2	(2.4)*	14.6	(2.4)
	砂	33.0	対照	18.0	1.3	18.4	1.0
			熱乾	19.3	(3.9)	19.4	(3.0)
	人工土壌	33.0	対照	15.9	0.6	17.2	1.0
			熱乾	16.5	(1.8)	18.2	(3.0)
<i>B. subtilis</i>	人工土壌	23.6	対照	11.7	0.9	12.5	0.7
			熱乾	12.6	(3.8)	13.2	(3.0)
	人工土壌	47.2	対照	22.6	1.7	25.3	1.3
			熱乾	24.3	(3.6)	26.6	(2.8)

* () 内の数値は、処理効果率すなわち

$\frac{\text{処理効果 (C あるいは N)}}{\text{添加量 (C あるいは N)}} \times 100 (\%)$ を表わす。

simplex と *B. subtilis* で数値に多少の差は認められるが、処理効果の割合はほぼ等しく、炭素および窒素ともほぼ 2~4% の範囲であった。

2週間目と4週間目の結果について比較してみると、いずれの菌体も経時的にその無機化量は増加したが、処理効果は大差なかった。なお、第2表で示した *A. niger* および *S. cerevisiae* の生菌体の無機化率に比べて、*Ar. simplex* および *B. subtilis* の無機化率が高いのは、バクテリアの細胞壁の構造や組成が糸状菌や酵母のものに比べて異なることによるものと思われる。

以上の結果から、微生物体には乾燥前処理によって無機化が促進される部分のあることが示唆された。そこで次に、菌体構成成分中の細胞質部分と細胞壁部分のいずれに乾燥処理効果があるかを調べる目的で、以下の実験を行なった。まず、*Ar. simplex* と *B. subtilis* の細胞質物

質の無機化とそれらの熱乾処理効果について実験した。なお、参考のためゼラチンについても同様の実験を行なった。細胞質物質は、生菌体を超音波処理(海上電機社製、超音波菌体破壊装置 TA-4201 型, 19.5kc/s, 20分)して破壊したのち、遠沈(10,000 rpm, 10分)して細胞壁部分を除いた上清液を用いた。ゼラチンはメルク社

製のゼラチン粉末(C: 43.21%, N: 14.14%)を供試した。培地は前記の人工土壌培地を用い、細胞質物質の場合は添加量を2段階、ゼラチンの場合は3段階設けた。インキュベーションおよび定量法は実験1の場合と同様に行なった。

第4表 *Ar. simplex*-および *B. subtilis*-細胞質物質の熱乾処理効果
炭素の場合 (C mg/100 g 人工土壌)

	添加炭素量	処理区	2週間目		4週間目	
			無機化量	処理効果	無機化量	処理効果
<i>Ar. simplex</i>	(1) 53	対照熱乾	31 30	-1	40 40	0
	(2) 106	対照熱乾	57 51	-6	65 59	-6
<i>B. subtilis</i>	(1) 69	対照熱乾	43 41	-2	52 50	-2
	(2) 138	対照熱乾	75 64	-11	88 77	-11

窒素の場合 (N mg/100 g 人工土壌)

	添加窒素量	処理区	2週間目		4週間目	
			無機化量	処理効果	無機化量	処理効果
<i>Ar. simplex</i>	(1) 21.1	対照熱乾	11.2 10.8	-0.4	15.4 15.3	-0.1
	(2) 42.2	対照熱乾	23.8 23.2	-0.6	26.2 26.1	-0.1
<i>B. subtilis</i>	(1) 28.2	対照熱乾	14.8 13.0	-1.8	16.0 15.8	-0.2
	(2) 56.4	対照熱乾	31.0 29.1	-1.9	34.1 34.6	0.5

第5表 *Ar. simplex* および *B. subtilis* の生菌体とその細胞質物質の対照区における無機化率* (%)
炭素の場合

	菌体		細胞質物質	
	2週目	4週目	2週目	4週目
<i>Ar. simplex</i>	—	—	58.5	75.5
	52.0	60.0	53.8	61.3
<i>B. subtilis</i>	57.7	71.8	62.3	75.4
	50.7	59.9	54.3	63.8

窒素の場合

	菌体		細胞質物質	
	2週目	4週目	2週目	4週目
<i>Ar. simplex</i>	—	—	53.0	73.0
	48.2	52.1	56.4	62.1
<i>B. subtilis</i>	49.6	53.0	52.5	56.7
	47.9	53.6	55.0	60.5

* 人工土壌における無機化率

第4表に、*Ar. simplex*-および *B. subtilis*-細胞質物質の熱乾処理効果を示した。本表によると、熱乾処理効果は認められず、むしろマイナスの傾向を示した。そして、その無機化率は第5表に示したように、*Ar. simplex* と *B. subtilis* で多少差はあるが、明らかに細胞質物質の無機化率の方が菌体のそれよりも高かった。なお、培養2週目と4週目の培地の pH はいずれも 6.2~6.5 の範囲であった。

第6表にゼラチンの熱乾処理効果を示した。これから明らかのように、ゼラチンそのものも熱乾処理効果は認められず、むしろ無機化は抑制された。これらの結果から、土壌中において、菌体が分解する場合、その細胞質物質に比べて細胞壁物質の無機化は遅く、そのため細胞壁物質の一部は土壌中に残留するが、土壌が乾燥処理を受ければ、その無機化が促進されて、いわゆる易分解性有機物の給源の一部になることが予想される。また、もし土壌中に細胞質物質やタンパク質そのものが存在していたとしても、それは乾燥前処理によって無機化が促進されることはないことを示唆している。

そこで次に、*B. subtilis* を用いてその細胞壁の無機化と乾燥処理効果を検討した。供試細胞壁の調製¹⁰⁾は次の

第6表 ゼラチンの熱乾処理効果
炭素の場合 (C mg/100 g 人工土壌)

添加炭素量	処理区	2週間目		4週間目	
		無機化量	処理効果	無機化量	処理効果
(1) 60	対照熱乾	38	-4	47	-7
		34		40	
(2) 120	対照熱乾	65	-11	81	-12
		54		69	
(3) 240	対照熱乾	115	-7	138	-7
		108		131	

窒素の場合 (N mg/100 g 人工土壌)

添加窒素量	処理区	2週間目		4週間目	
		無機化量	処理効果	無機化量	処理効果
(1) 20.0	対照熱乾	12.5	-2.1	15.4	-2.2
		10.4		13.2	
(2) 40.0	対照熱乾	26.6	-4.9	27.2	-3.3
		21.7		25.9	
(3) 80.0	対照熱乾	48.0	-4.9	50.0	-5.0
		43.1		45.0	

第7表 供試過酸化水素処理土壌*の理化学性

土 壤	土性 ¹⁾	粘土含量 ¹⁾ (%)	主要粘土鉱物 ⁵⁾	炭 素 含有量 ⁹⁾ (%)	窒 素 含有量 ²⁾ (%)	置換態窒素量 ³⁾ (mg/100g 土壌)	塩基置換容量 ¹⁾ (me/100g 土壌)	
佐賀県後川内洪積台地	B層	LiC	40.2	カオリナイト	0.23	0.04	8.2	11.8
長崎県諫早市干拓地	A層	LiC	44.2	モンモリロナイト	0.40	0.06	12.0	31.9
熊本県長陽火山灰土	B層	L	14.5	アロフエン	0.47	0.01	6.2	11.5

* 30%の過酸化水素液で処理し、大部分の有機物を除去したのち、十分水洗した。この操作を4回くり返し、風乾後、粉碎して供試した。なお、各欄の肩番号に測定法に関する文献を示した。

ようにして行なった。すなわち、*B. subtilis*の菌体懸濁液を超音波処理したのち、3,000~4,000rpmで10分間遠沈した。沈殿部は未破砕物を含み、これは再び超音波処理をくり返した。上清部には細胞壁、細胞顆粒および原形質が含まれている。これを再び10,000rpmで10分間遠沈し、沈殿部を十分水洗し、細胞壁部分を分離した。この水懸濁液を細胞壁物質として供試した。その一部を砂培地に添加(10gの砂当たりN:2.23mg(A)と6.53mg(B)の2段階)し、窒素の無機化に対する熱乾処理効果(80°C, 2時間乾燥)をみた。また、一部は第7表に示した3種の過酸化水素処理土壌、すなわち、長崎県諫早市干拓地のA層土壌(主要粘土鉱物モンモリロナイト、以下、M-諫早と表示)、佐賀県後川内洪積台地のB層土壌(主要粘土鉱物カオリナイト、以下、K-後川内と表示)および熊本県長陽火山灰のB層土壌(主要粘土鉱物アロフエン、以下、A-長陽と表示)に添加(10gの土壌当たりC:22.9mg, N:7.53mg)し、風乾処理効果(室温にて1週間乾燥)をみた。インキュベーションおよび定量法は実験1の場合と同様に行なった。なお、土壌培地を用いた実験において、風乾区の炭素無機化量(第10表参照)は、風乾処理中に無機化したCO₂-C(第9表参照)を風乾区の実測値にプラスして補正した。また、風乾処理中の窒素の固定についても調べたが、窒素の固定は認められなかった。さらに、培養前後の全窒素の定量値によれば、培養期間中の脱窒も認められなかった。なお、培養後の砂培地のpHは、(A)では6.5、(B)では6.8であった。土壌培地の場合は6.5であった。

第8表に、砂培地における*B. subtilis*-細胞壁物質の熱乾処理による窒素の処理効果を示した。本表によると、

第8表 *B. subtilis*-細胞壁物質の処理効果
(Nmg/100g 砂)

添 加 窒 素 量 (有機態) (1)	2 週間の無機化量 対 照 熱乾処理 (2) (3)	処理効果 (3)-(2)	処理効果率 (%) (3)-(2) (1) × 100	
22.3	7.2 (32.3)*	8.5 (38.1)	1.3	5.8
65.3	24.6 (37.7)	28.7 (44.0)	4.1	6.3

* ()内の数値は無機化率を表わす。

明らかに熱乾処理による窒素の無機化促進効果が認められた。そして、対照区および熱乾処理区の無機化率は、第5表に示した細胞質物質を含む菌体の場合より低いが、その熱乾処理効果率は細胞壁物質の方が高かった。また、第3表と第8表の結果によると、細胞質物質を含む菌体の方がその細胞壁部分よりも処理効果の低いことがわかる。これは、さきに述べたように、細胞質物質に熱乾処理効果のないことから当然考えられることである。

次に、土壌培地における*B. subtilis*-細胞壁物質の風乾処理効果を第10表に示した。本表によると、いずれの土壌培地においても風乾処理効果が認められた。処理効果率は炭素の場合、K-後川内で6.1%、M-諫早で9.2%、窒素の場合は、K-後川内、M-諫早、A-長陽でそれぞれ4.5%、6.1%および6.2%であった。そして、この場合も細胞質物質を含む菌体の処理効果率(第3表参照)より高いことがうかがえる。このことは、土壌に微生物細胞壁が集積している場合に土壌が乾燥処理を受ければ、細胞壁の無機化が促進されることを示唆している。

第9表 風乾処理中*に無機化された
B. subtilis-細胞壁物質の炭素
(Cmg/100g 土壌)

培 地	添 加 炭 素 量** (1)	風乾処理後の 残存炭素量** (2)	風乾処理中の 無機化炭素量 (1)-(2)
K-後川内	229	208	21
M-諫 早	229	211	18

* 室温にて1週間風乾

** チューリン法⁹⁾にて定量

第10表 *B. subtilis*-細胞壁物質の風乾処理効果
(CおよびNmg/100g 土壌)

培 地	添加炭素 および窒 素量 (1)	2週間の無機化量		処理効果 (3)-(2)	処理効果率 (%) (3)-(2) (1) × 100
		対 照	風乾処理		
炭素の場合					
K-後川内	229	148	162	14	6.1
M-諫 早	229	107	128	21	9.2
窒素の場合					
K-後川内	75.3	35.1	38.5	3.4	4.5
M-諫 早	75.3	26.0	30.6	4.6	6.1
A-長 陽	75.3	25.8	30.5	4.7	6.2

第11表 *B. subtilis*-生菌体の超音波処理効果

(Nmg/100g 砂)							
添加 窒素量 (有機態) (1)	対照区 無機化 窒素量 (2)	超音波処 理区無機 化窒素量* (3)	処理効果 (3)-(2)	処理効果率 (%) (3)-(2) (1) × 100	熱乾処理 区無機化 窒素量* (4)	処理効果 (4)-(2)	処理効果率 (%) (4)-(2) (1) × 100
29.4	10.7	11.6	0.9	3.1	11.5	0.8	2.7

* 2週間培養後の無機態窒素量

土壌培地間における細胞壁物質の窒素の無機化率は、K-後川内>A-長陽≒M-諫早の順を示したが、処理効果率はA-長陽≒M-諫早>K-後川内の順を示した。これらの差異は、土壌中の粘土含量や粘土の質および遊離の鉄などに原因しているものと考えられるが、今後さらに検討を要する問題である。

次に、本実験で用いた超音波処理は一種の機械的破砕処理を伴うことになる。そこで、超音波処理(19.5 kc/s, 20分)による機械的処理が無機化促進を伴うかどうかを確かめるため、*B. subtilis*-生菌体を用いて補足的に超音波処理効果について実験を行なった。培地は砂を用いた。インキュベーションおよび定量法は実験1と同様に行なった。比較として熱乾処理区(80°C, 2時間乾燥)を設けた。その結果を第11表に示した。本表によると、超音波処理によっても明らかに生菌体の無機化が促進され、本実験条件におけるその処理効果は熱乾処理効果にほぼ等しいことが確かめられた。このことから考えれば、さきに述べた実験は、細胞壁物質の調製段階で超音波処理を施しているため、対照区の無機化が一部促進されていることが考えられる。そして対照区は超音波処理区に、また、熱乾処理区は超音波処理プラス熱乾処理区に相当することが推察される。しかし、現在、細胞壁物質の化学的組成を変えることなく、短時間に細胞壁を調製する方法はみあたらない。細胞壁の調製法については今後の研究にまわりたい。ただ、本実験における超音波処理のような一種の機械的破砕処理によってもその無機化が促進されることは明らかである。

実験 3. *S. cerevisiae*-細胞壁物質の無機化に及ぼす乾燥処理の効果

実験方法

S. cerevisiae-細胞壁物質の調製は、実験1で用いたものと同じものを用い、実験2と同様に超音波処理(19.5 kc/s, 25分)を施して行なった。そして、第7表に示した3種の過酸化水素処理土壌を供試し、これらの土壌培地における *S. cerevisiae*-細胞壁物質の無機化とその乾燥処

理効果について実験した。乾燥処理は風乾(室温にて1週間乾燥)と熱乾(80°C, 2時間乾燥)を用いた。供試細胞壁物質の添加量は、土壌10g当たりC:74.7mg, N:11.31mgである。なお、細胞壁部分を分離した後の細胞質物質についても、

K-後川内土壌を用いて同様にその熱乾処理効果のみた。細胞質物質の添加量は、土壌10g当たりC:4.9mg, N:0.92mgである。インキュベーションおよび定量の方法は実験1および実験2と同様に行なった。インキュベーション開始時のpHは6.5であった。

なお、風乾処理中にCO₂-Cとして無機化した炭素量を定量し(第12表参照)、風乾区の無機化量にプラスして補正した。また、細胞壁物質を添加していない過酸化水素処理土壌のみを同じ実験条件でインキュベートし、2週間で無機化した炭素および窒素量を定量し(第13表参照)、補正した。これによると、いずれの土壌培地からも多少無機化したが、熱乾処理効果はみられなかった。また、熱乾処理中のNH₄-Nの固定についても検討したが、窒素の固定は認められなかった。さらに、培養前後の脱窒についても検討したが、脱窒も認められなかった。

実験結果および考察

第14表に、3種の過酸化水素処理土壌培地における *S. cerevisiae*-細胞壁物質の乾燥処理効果を示した。本表によると、細胞壁物質の乾燥処理効果はいずれの土壌培地でも認められた。しかし、細胞質物質の場合(K-後

第12表 風乾処理中*に無機化された *S. cerevisiae*-細胞壁物質の炭素 (Cmg/100g 土壌)

培地	添加 炭素量 (1)	風乾処理後の 残存炭素量 (2)	風乾処理中の 無機化炭素量 (1)-(2)
K-後川内	747	699	48
M-諫早	747	698	49
A-長陽	747	699	48

* 室温にて1週間風乾

第13表 過酸化水素処理土壌から培養2週間に無機化した炭素*および窒素**

土 壌	炭素含量 (%)	2週間の無機化量		窒素含量 (%)	無機態 窒素量	2週後の無機態窒素量	
		対 照	熱乾処理			対 照	熱乾処理
		(Cmg/100g 土壌)				(Nmg/100g 土壌)	
K-後川内	0.23	22	22	0.04	8.2	8.4	8.4
M-諫早	0.40	36	36	0.06	12.0	12.5	12.5
A-長陽	0.47	28	28	0.01	6.2	6.4	6.3

* 第1図の装置を用いて定量

** CONWAYの微量拡散法⁵⁾にて定量

第14表 *S. cerevisiae*-細胞壁物質の乾燥処理効果
(CおよびN mg/100g 土壌)

培地	添加炭素 および窒素量 (1)	2週間の無機化量		処理効果 (3)-(2)	処理効果率 (%) $\frac{(3)-(2)}{(1)} \times 100$	
		対照 (2)	乾燥処理 (3)			
炭素の場合						
K-後川内	747	116	風乾	231	115	15.4
			熱乾	270	154	20.6
M-諫早	747	148	風乾	262	114	15.2
			熱乾	313	165	22.1
A-長陽	747	184	風乾	326	142	19.0
			熱乾	330	146	19.5
K-後川内*	49	42	熱乾	40	-2	--
窒素の場合						
K-後川内	113.1	37.2	風乾	42.5	5.3	4.7
			熱乾	45.0	7.8	7.0
M-諫早	113.1	23.6	風乾	29.7	6.1	5.9
			熱乾	37.5	13.9	12.5
A-長陽	113.1	28.8	風乾	32.7	3.9	3.5
			熱乾	35.5	6.7	5.9
K-後川内*	9.2	8.0	熱乾	7.9	-0.1	--

* *S. cerevisiae* の細胞質物質

川内土壌)は、実験2の *Ar. simplex* および *B. subtilis* の場合と同様に処理効果は認められなかった。また、その無機化率は細胞壁物質に比較して高く、実験2でも述べたように、土壌中で菌体が分解される場合、その細胞質物質の無機化は速やかに行なわれるが、比較的分解の遅い細胞壁部分は土壌中に一部残留することが推察される。細胞壁物質の乾燥処理効果のうちでは、熱乾処理効果の方が風乾処理効果より大きかった。これは、乾燥処理強度の違いによるものと考えられる。次に土壌培地間で比較してみると、細胞壁物質の乾燥処理効果率はおよそ M-諫早 > K-後川内 > A-長陽の順を示した。

これらのことより、*S. cerevisiae* の場合も、*Ar. simplex* や *B. subtilis* の場合と同様にその細胞質物質の無機化は速やかであり、その乾燥処理効果は認められない。細胞壁物質は比較的無機化が遅いが、乾燥処理によってその無機化が著しく促進される。そして、細胞壁物質の無機化率や乾燥処理効果率は、培地の粘土鉱物やその含量が異なれば異なる値を示し、その無機化過程が、粘土鉱物の種類や含量および遊離の鉄やアルミナなどの無機コロイドによって影響を受けることが推察される。さらに実験2でも述べたように、細胞壁部分の調製段階で超音波処理を施しているため、細胞壁部分に超音波処理が加わり、その無機化率がある程度高くなっていることが推察される。

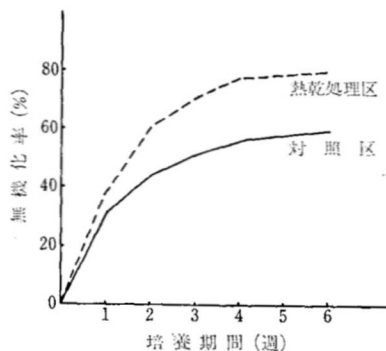
総合考察

前報までに得られた実験結果^{13,14)} や前記の三つの実験結果より、次のようなことが推論できる。すなわち、土壌に植物残渣などの有機物を施用すれば、それは微生物によって分解され、その分解に伴って微生物は増殖し、施用窒素の大部分は一応微生物によって組み換えられる。そして微生物はやがて死滅し、また分解される。その分解過程を通して再び新しい微生物が増殖し、またその微生物は死滅する。このようなサイクルが自然の土壌中では際限なく起っている。このようなサイクルにおいて、微生物が死滅すると新しい微生物によって分解されるが、前記の実験結果からみれば、微生物の細胞構成部分によってその分解速度が異なる。まず、細胞質物質が速やかに分解される。細胞壁物質の分解は、細胞質物質に比べれば緩徐である。したがって、細胞壁物質の一部は土壌中にかなり長く残留する可能性がある。また、前記の実験結果によれば、細胞壁物質は細胞質物質と異なり、乾燥前処理によって著しく無機化が促進され、乾燥処理効果がある。これらの実験結果をあわせ考えれば、いわゆる土壌の易分解性有機物の給源の一部として、微生物の細胞壁物質が寄与していることが推論される。

このような推論を確かめる目的で、細胞壁物質を用い、次のような補足実験を行なった。すなわち、土壌に細胞壁物質を添加し、その分解がほぼ定常状態になり、無機化が上限に達した時点において乾燥処理を行ない、果たして土壌のいわゆる易分解性有機物の一部として細胞壁物質が寄与するかどうかについて実験を行なった。

本実験においては、実験方法はすべて前記実験3に準じて行なった。供試土壌は実験3で使用した M-諫早土壌である。土壌に添加した細胞壁物質は *S. cerevisiae* から分離調製したもので、その添加量は土壌 10g 当たり C: 51.9mg, N: 7.80mg である。なお、本実験においては、生の細胞壁物質添加区(対照区、あるいは無処理区)と同時に熱乾した細胞壁添加区(熱乾処理区)とを設けた。

第2図は、対照区および熱乾処理区の無機化率の推移を示したものである。本図によれば、まず、0週(実験

第2図 *S. cerevisiae*-細胞壁物質の無機化率の推移

開始時)における熱乾処理の効果は、実験2および実験3と同様に認められた。次に両区とも、初期には急激に分解するが、4週目から6週目にかけて無機化はほぼ上限に達している。そして、添加した細胞壁物質は培養6週間に対照区59.7%、熱乾処理区で79.3%の無機化率を示した。これからみれば、それぞれ添加細胞壁の40.3%と20.7%の有機物が残留したことになる。この残留有機物としては、添加細胞壁の残留物のほか、分解に関与した微生物、その微生物の代謝産物などが考えられるが、無機化率の差から考えれば、対照区の方には添加細胞壁の残留物が多く、熱乾処理区の方は分解に関与した微生物やその微生物の代謝産物の割合が多いであろうと推察される。そこで、6週目に、この培地中に残留している有機物について再び熱乾処理効果の実験を行なった。その結果は第15表に示したとおりで、次のようなことが指摘できる。すなわち熱乾処理区の土壤を、培養6週目に再び熱乾処理を行なえば、その処理効果は大きくはないが明らかに認められる。このことは、添加細胞壁物質の無機化過程で新たに処理効果を示すような有機物の集積があったことを示すものであり、このような有機物としては、実験2の結果からみれば、添加有機物の分解に関与して増殖した微生物やその残渣が主なものであると考えられる。

次に、対照区の土壤を培養6週目に熱乾処理を行なえ

第15表 培養6週目に残留している添加細胞壁に由来する有機物の再熱乾処理効果 (CおよびNmg/100g土壤)

0週の治療	6週目の集積全炭素量(1)	6週目の再処理	再処理後2週間の無機化炭素量(2)	再処理後の処理効果(3)	処理効果率(%) $(3)-(2) \times 100$ (1)	再処理後2週間の無機化炭素量(2)	
						(a)	(b)
対照(無処理)	209	対照	(2) 9	10	4.8	(a) 42.9	3.8
	209	熱乾	(3) 19			(b) 46.7	
熱乾(80°C, 2時間)	124	対照	(2) 10	2	1.6	(a) 50.6	0.8
	124	熱乾	(3) 12			(b) 51.4	

(実験開始時の添加細胞壁物質 C: 519 mg, N: 78.0 mg/100 g 土壤)

ば、顕著な熱乾処理効果が認められた。そして、その処理効果率は熱乾処理区の再熱乾処理効果よりはるかに高かったが、実験当初の処理効果率は低かった。第2図に示した無機化率曲線から考えて、本実験に添加した細胞壁物質は超音波処理による機械的処理効果が加わっているため、微生物によって比較的分解されやすくなっており、かなりの部分は初期に分解されるが、一部は土壤中に残留する。この部分は、その後経時的に緩徐な分解を受けるが、これが熱乾処理によって無機化が促進される有機物の主体になっていると考えられる。なお、熱乾処理効果の一部は、添加有機物の分解に関与して増殖した微生物やその残渣によると考えられるが、それらによる効果は、前記の熱乾処理区の再熱乾処理効果からみてあまり大きくはないと考えられる。

以上の結果を基に次のことが推論される。すなわち、土壤中で微生物体が分解される場合、その細胞質部分は、そのままではきわめて速やかに分解される。それに比べると細胞壁部分の分解は緩徐であるが、一部は比較的容易に分解されて新たな菌体を構成したり、 NH_4^+ として土壤中に放出される。また、一部は分解が遅く土壤中に残留するが、その際おそらく一種の複合体を形成し、かなり長期にわたって、微生物の分解に対し抵抗性を有し、土壤中に保持されるものと想像される。そして、この保持された細胞壁部分も経時的に緩徐な部分的分解を受けるが、もし土壤が乾燥や機械的破壊処理を受ければ、その無機化が著しく促進されるようになるものと考えられる。

土壤に集積している有機物のうち、微生物体やその遺体の占める量はかなりの割合に相当することが報告されている^{7,15,16}が、本実験の結果とも考えあわせると、微生物体、とりわけその細胞壁部分が、土壤のいわゆる易分解性有機物の主要な給源として寄与していることは間違いないと思われる。

要約

前報までの実験結果から、土壤の乾燥効果の給源とし

て、土壤中の微生物体自身の寄与が推論された。そこで本報では、まず微生物体自身を乾燥した場合の無機化促進の有無、菌体の構成部分と乾燥効果との関係などについて実験を行なった。それらの実験結果を基にして、菌体の細胞壁物質を土壤に添加し、土壤の乾燥効果と菌体および細胞壁物質との関係を論じた。結果の概要は次のとおりである。

1) 土壤に添加した乾燥菌体の無機化率は生菌体のそれよりも高かった。

2) 土壤に添加した *Ar. simplex* と *B. subtilis* の生菌体を熱乾処理すると、その無機化が明らかに促進された。

3) 土壤における微生物の細胞質物質の無機化率は、細胞壁物質のそれよりも高く、その熱乾処理効果は認められなかった。

4) 土壤における *B. subtilis*-細胞壁物質の無機化率は菌体全体としてのそれより低かったが、乾燥処理効果は菌体より高かった。

5) *B. subtilis* の生菌体を超音波処理 (19.5 kc/s, 20分) すると、熱乾処理 (80°C, 2時間乾燥) にほぼ等しい処理効果のあることが認められた。

6) 細胞壁物質の無機化率および熱乾処理効果率は、土壤培地間で異なる値を示した。

7) 土壤に添加した微生物細胞壁物質の無機化に及ぼす乾燥処理効果のうちでは、熱乾処理効果の方が風乾処理効果より大きかった。

8) 微生物の細胞壁物質は細胞質物質に比べれば、分解は緩徐である。そして、その一部はおそらく土壤中の無機あるいは有機のコロイドと複合体を形成し、分解に対して抵抗性を有するようになり、土壤中にかなり長期にわたって保持されるが、土壤が乾燥や機械的破砕などの処理を受ければ、その無機化が促進されることが示された。

9) 以上の結果から、土壤中の微生物体、とりわけその細胞壁部分が、土壤のいわゆる易分解性有機物の主要な給源として寄与していることが明らかにされた。

文 献

- 1) 青峰重範・原田登五郎：土壤肥科学実験ノート，p. 9，養賢堂 (1967)
- 2) 青峰重範・般引真吾：土壤実験法，p. 74，養賢堂 (1953)
- 3) BALLESTA, J-P.G. and ALEXANDER, M.: *Bacteriol. Proc.*, 68, G 119 (1968)
- 4) HURST, H.M. and WAGNER, G.H.: *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 33, 707 (1969)
- 5) JACKSON, M.L.: *Soil Chemical Analysis. Advanced Course*, p. 171 (1958)
- 6) JENSEN, H.L.: *J. Agr. Sci.*, 22, 1 (1932)
- 7) JENSEN, H.L.: *Sci. Hort.*, 16, 15 (1962-1963)
- 8) 甲斐秀昭・原田登五郎：九大農学芸誌，26, 61 (1972)
- 9) KONONOVA, M.M.: 土壤有機物，菅野一郎ほか訳，p. 179，新科学文献刊行会 (1966)
- 10) 小谷尚三・加藤慶二郎：蛋白質，核酸，酵素，14, 606 (1969)
- 11) KUO, M-J. and ALEXANDER, M.: *J. Bacteriol.*, 94, 624 (1967)
- 12) MARTIN, J.P., ERVIN, J.O. and SHEPHERD, R.A.: *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 23, 217 (1959)
- 13) 丸本卓哉・古川謙介・吉田 堯・甲斐秀昭・山田芳雄・原田登五郎：土肥誌，45, 23 (1974)
- 14) 丸本卓哉・甲斐秀昭・吉田 堯・原田登五郎：土肥誌，45, 239 (1974)
- 15) MISHUTIN, D.I., NIKITIN, D.I. and NOSTROV, I.S.: *Trans. Intern. Congr. Soil Sci.*, 9th, Adelaide, 3, 629 (1968)
- 16) WEBLEY, D.M. and JONES, D.: *Soil Biochemistry*, Vol. 2, p. 446, Marcel Dekker, Inc., New York (1971)