

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4報）

微生物体およびその細胞壁物質の超音波処理および熱乾処理によって無機化が促進される有機態窒素の化学的組成

丸本卓哉*・甲斐秀昭**・吉田 堯***・原田登五郎**

前報⁹⁾において、微生物体およびその細胞壁部分を乾燥処理すると、明らかにその無機化が促進されることを確認した。さらに、細胞壁物質を土壌に添加し放置すれば、やがて無機化の上限に達し、その時点で乾燥処理すれば、土壌は高い乾燥処理効果を示すようになることを明らかにした。このような結果から、土壌のいわゆる易分解性有機物の主要な給源として、これらの物質が寄与していることを明らかにした。

HAYASHI と HARADA⁵⁾は、耕地土壌の易分解性窒素は土壌の有機態窒素画分のうち、アミノ酸態窒素画分およびアミノ糖態窒素画分にその主要な部分が存在しており、乾土効果によって無機化が促進されるアミノ酸態窒素画分中のアミノ酸組成をみれば、原土のアミノ酸組成とほぼ同じであり、Gly, Ala, Asp, Glu, Lys などがその大部分を占めていることを報告している。また、KAI ら⁶⁾、AHMAD ら⁷⁾は、土壌中での窒素の有機化・無機化過程における化学的形態別窒素の動向を明らかにする目的で、¹⁵N を用いて追跡実験を行なった。その結果、アミノ酸態窒素画分が無機化する窒素の主要な給源であるが、土壌が乾燥、なかでも加熱乾燥された場合は、アミノ糖態窒素画分もまた無機化する窒素として寄与していることを明らかにし、土壌のいわゆる易分解性窒素の給源として微生物体、とりわけ細胞壁の寄与が示唆されるとしている。

さらに、著者らは第1報⁷⁾において、ライグラスの分解過程を通じて土壌中に新たに集積される有機態窒素化合物中のアミノ酸組成は、従来報告されている耕地土壌のアミノ酸組成に類似しており、これらのアミノ酸組成中の主要なアミノ酸は、微生物細胞壁のアミノ酸組成中の

主要なアミノ酸に近似しているように推定されることを報告した。しかしながら、微生物体およびその細胞壁物質を直接用いて、乾燥処理によって無機化が促進される有機態窒素の化学的組成について実験した例はまだない。

そこで、本報では、まず第2報⁸⁾で報告した *Aspergillus niger*-(以下、*A. niger* と表示) 乾燥菌体の無機化過程で無機化される菌体の有機態窒素の化学的組成について実験し(実験1)、次に、*Bacillus subtilis* (以下、*B. subtilis* と表示) の菌体とその細胞壁物質および *Saccharomyces cerevisiae* (以下、*S. cerevisiae* と表示) の細胞壁物質の、超音波処理および熱乾処理によって無機化が促進される有機態窒素の化学的組成について実験した(実験2)。さらに、*B. subtilis* の菌体およびその細胞壁物質については、前処理によって無機化が促進されるアミノ酸態窒素画分中のアミノ酸組成についても検討した(実験3)。前報⁹⁾の結果によれば、培養期間中に無機化された菌体および細胞壁物質の約80%は、培養2週間ですでに無機化され、さらに実験開始時の乾燥処理効果も、培養2週間ではほぼ明らかになり、その後はあまり変わらないことなどから考えて、実験2および実験3における培養期間は2週間とした。

有機態窒素画分の分画は、BREMNER 法²⁾に基づいて行なった。この方法により分画した有機態窒素画分のうち、未同定画分が高い場合、また処理放置後、アンモニア態窒素画分がかなり増加する場合など、現在説明し難い点があって、無機化された窒素の量を各有機態窒素画分の量の減少から鮮やかに説明することは容易でないが、アミノ糖態窒素とアミノ酸態窒素画分の減少を主体として無機化の傾向を考察してみたい。

実験1. *A. niger*-乾燥菌体の無機化過程で無機化される菌体の有機態窒素の化学的組成

実験方法

50 ml 容の三角フラスコに、富山県農試水田土壌(主

* 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、アジアそ菜研究開発センター、台湾)

昭和48年8月10日受理

日本土壌肥科学雑誌 第45巻第8号 p.395~402(1974)

要粘土鉱物ハロイサイト、以下、富山(H)と表示)、長崎県諫早干拓地水田土壌(主要粘土鉱物モンモリロナイト、以下、諫早(M)と表示)および大分県飯田水田土壌(主要粘土鉱物アロフェン、以下、飯田(A)と表示)の3種の水田作土の湿潤土壌を乾土当たり20g秤取りし、おのおのに *A. niger* 乾燥菌体をNで4mg添加した。供試土壌の理化学性および *A. niger*-乾燥菌体の調製法については第2報⁸⁾で報告したとおりである。ついで、これに第2報で示した無機栄養液を添加した。そして、水分含量を最大容水量の60%に調節し、ポリエチレン膜でカバーをしたのち、30°Cの恒温器中にインキュベイトした。対照として菌体を添加しない区を設け、同様にインキュベイトした。インキュベーション期間中の水分蒸散量は、三角フラスコ全容の重量減少分を蒸留水で適宜補正した。そして、実験開始時(0週)と培養5週目における有機態窒素の分別定量を行ない、5週間に無機化した有機態窒素の内容について検討した。この分析に先だて、各土壌試料を100°Cで5時間乾燥したのち、

乳鉢中で十分粉碎し、その一定量を分析に供した。

実験結果および考察

実験開始時および培養5週目の土壌の有機態窒素および添加菌体に由来すると考えられる有機態窒素の化学的組成を第1表に示した。なお、新鮮有機物を土壌に添加すれば、いわゆる priming effect があると考えられるが、本実験ではその値は極めて小さいと考え、第1表には(菌体添加区)-(菌体無添加区)を添加菌体に由来する部分として示した。本表によれば、富山(H)および諫早(M)では、菌体添加区、無添加区ともに酸可溶性窒素のうち、未同定画分が5週目に減少していたが、ほかの画分はあまり変わらなかった。一方、飯田(A)では、酸不溶性窒素が減少し、酸可溶性窒素中のアミノ糖態窒素および未同定画分が増加し、アミノ酸態窒素画分が減少していた。

次に、菌体添加区から菌体無添加区を引いた値(第1表中の(B-A)欄参照)、すなわち添加菌体にはほぼ由来していると考えられる有機態窒素の分解に伴う化学的組

第1表 実験開始時および培養5週間後の土壌有機態窒素および添加 *A. niger*-菌体に由来する有機態窒素の化学的組成 (N mg/100 g 土壌)

有機態窒素の 化学的組成*	(A) 菌体無添加区		(B) 菌体添加区		(B-A) 添加菌体に由来する部分		
	培養期間(週)		培養期間(週)		培養期間(週)		
	0	5	0	5	0	5	0-5
富山(H)							
有機態窒素	176.3(100.0)**	173.7(100.0)	196.3(100.0)	184.7(100.0)	20.0(100.0)	11.0(100.0)	9.0(100.0)
酸不溶性窒素	26.1(14.8)	26.6(15.4)	26.9(13.7)	26.8(14.5)	0.8(4.1)	0.2(1.9)	0.6(6.7)
酸可溶性窒素	150.2(85.2)	147.1(84.6)	169.4(86.3)	157.9(85.5)	19.2(95.9)	10.8(98.1)	8.4(93.3)
アンモニア態	37.6(21.3)	41.6(23.8)	40.2(20.5)	46.3(25.1)	2.6(12.9)	4.7(42.3)	-2.1(-)
アミノ糖態	14.7(8.3)	14.6(8.5)	16.1(8.2)	14.7(8.0)	1.4(7.2)	0.1(1.0)	1.3(14.4)
アミノ酸態	69.4(39.4)	73.6(42.4)	78.0(39.8)	78.8(42.7)	8.6(42.8)	5.2(47.1)	3.4(37.8)
未同定	28.5(16.2)	17.3(9.9)	35.1(17.9)	18.1(9.8)	6.6(33.0)	0.8(7.7)	5.8(64.4)
諫早(M)							
有機態窒素	159.1(100.0)	154.0(100.0)	179.1(100.0)	167.3(100.0)	20.0(100.0)	13.3(100.0)	6.7(100.0)
酸不溶性窒素	46.3(29.1)	52.0(33.7)	47.1(26.3)	53.2(31.8)	0.8(4.0)	1.2(9.0)	-0.4(-)
酸可溶性窒素	112.8(70.9)	102.0(66.3)	132.0(73.7)	114.1(68.2)	19.2(96.0)	12.1(91.0)	7.1(106.0)
アンモニア態	31.1(19.5)	31.7(20.6)	33.6(18.8)	35.5(21.2)	2.5(12.4)	3.8(28.4)	-1.3(-)
アミノ糖態	8.1(5.1)	8.4(5.5)	9.5(5.3)	9.0(5.4)	1.4(7.0)	0.6(4.2)	0.8(11.9)
アミノ酸態	53.9(33.9)	55.0(35.7)	62.1(34.7)	60.2(36.0)	8.2(40.8)	5.2(39.0)	3.0(44.8)
未同定	19.7(12.4)	6.9(4.5)	26.8(15.0)	9.4(5.6)	7.1(35.8)	2.5(19.4)	4.6(68.6)
飯田(A)							
有機態窒素	609.6(100.0)	603.6(100.0)	629.6(100.0)	616.5(100.0)	20.0(100.0)	12.9(100.0)	7.1(100.0)
酸不溶性窒素	186.8(30.6)	162.8(27.0)	187.6(29.8)	162.8(26.4)	0.8(4.0)	0(0)	0.8(11.3)
酸可溶性窒素	422.8(69.4)	440.8(73.0)	442.0(70.2)	453.7(73.6)	19.2(96.0)	12.9(100.0)	6.3(88.7)
アンモニア態	110.7(18.2)	116.4(19.3)	113.3(18.0)	116.5(18.9)	2.6(12.6)	0.1(0.9)	2.5(35.2)
アミノ糖態	54.6(9.0)	61.4(10.2)	56.0(8.9)	61.6(10.0)	1.4(7.0)	0.2(1.8)	1.2(16.9)
アミノ酸態	231.0(37.9)	212.6(35.2)	239.3(38.0)	217.0(35.2)	8.3(41.7)	4.4(33.6)	3.9(54.9)
未同定	26.5(4.3)	50.4(8.3)	33.4(5.3)	58.6(9.5)	6.9(34.7)	8.2(63.7)	-1.3(-)

* BREMNER 法(6N HCl 105°C 12時間加水分解)にて定量した²⁾。

** ()内の数値は有機態窒素を100とした割合(%)。

成の変化についてみると、いずれの土壤においても5週間に分解した有機態窒素のうち、その大部分は酸溶性窒素画分であり、そのなかではアミノ酸態窒素画分が37.8%から54.9%を占め、アミノ糖態窒素画分は11.9%から16.9%の範囲であった。未同定画分の動向は土壤間で異なり、富山(H)および諫早(M)では5週間に分解した有機態窒素のうち、それぞれ64.4%および68.6%と非常に高い無機化の割合を示したが、飯田(A)では0週よりむしろ増加し、この画分からの寄与は見掛上認められなかった。上述した土壤間における差異については第2報⁵⁾でもふれたが、結晶性粘土鉱物を含む土壤(すなわち、富山(H)と諫早(M))と非結晶性粘土鉱物を含む土壤(すなわち、飯田(A))とで異なり、土壤に含まれる粘土鉱物の種類が影響していると推察されるが、この点については今後の研究を要する。

CHUとKNOWLES³⁾は、 $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ と ^{15}N でラベルした*Pseudomonas*の菌体を用いて、これら窒素の土壤中における無機化と有機化に関する実験を行なっている。それによると、両者の場合ともに、インキュベーション100日間の置換態窒素とアミノ酸態窒素の動向には明らかな反比例関係がみられると報告している。本実験においても、添加菌体の分解に伴う土壤中の無機態窒素とアミノ酸態窒素の動向は、上記の知見とほぼ同じ傾向を示している。これらのことから考えれば、土壤中の窒素代謝のなかで比較的短期間に代謝回転している有機態窒素画分はアミノ酸態窒素画分であり、しかもそれは、菌体由来する有機態窒素画分の動きとも同じ傾向を有している。そして、それに一部アミノ糖態窒素画分が加わっていると推察される。なお、未同定画分については、定量法上の問題も含めてさらに検討する必要がある。また、本実験において、菌体由来のアミノ糖態窒素画分の分解が良いのは、菌体を乾燥して供試したことが大きく影響していると考えられる(実験2参照)。

実験2. *B. subtilis*の生菌体とその細胞壁物質および*S. cerevisiae*の細胞壁物質の超音波処理および熱乾処理によって無機化が促進される有機態窒素の化学的組成

実験方法

まず、*B. subtilis*を用いた実験について述べる。この菌体および細胞壁物質の調製法については前報⁹⁾で報告したとおりである。実験条件は、200 ml容の三角フラスコにケイ砂(米山薬品工業社製、粒径0.5~0.25 mm)

10 gを秤取し、これに上記の*B. subtilis*-菌体をNで16.13 mg添加した(これを対照区とする)。別に、超音波処理(海上電機社製、19.5 Kc/s)を20分間施した菌体を添加した区(これを超音波処理区とする)と生菌体添加直後、80°Cで2時間熱乾処理した区(これを熱乾処理区とする)を設けた。そして、第2報⁵⁾で示した無機栄養液およびイノキュラム(九大付属農場水田土壤懸濁液(1:5)を0.5 ml)を添加し、水分を最大容水量の60%に調節した後、ポリエチレン膜でカバーをし、30°Cの恒温器中に2週間インキュベートした。

別に、超音波処理を施したのち、分離調製した*B. subtilis*の細胞壁物質を10 gの砂培地当たりNで6.53 mg添加した区を設けた。さらにまた、細胞壁物質を添加直後に80°Cで2時間熱乾処理を行なった区も設けた。そして、上記と同じ実験条件で2週間インキュベートした。この場合は、実験開始時を対照区、培養2週間後のものを超音波処理区とし、熱乾処理を加えて2週間培養したものを超音波プラス熱乾処理区とした。

次に、*S. cerevisiae*の場合の実験方法を簡略に述べる。200 ml容の三角フラスコに10 gの人工土壤(長野県農試水田土壤より採取した粘土を20%になるように砂に加えたもの。主要粘土鉱物はモンモリロナイトである)を秤取し、これに前報⁹⁾と同様に調製した*S. cerevisiae*の細胞壁物質をNで17.56 mg添加した区と細胞壁物質添加直後、80°Cで2時間熱乾処理した区とを設けた。そして、上記と同様の実験条件で2週間インキュベートした。そして、この場合も、実験開始時を対照区、培養2週間後のものを超音波処理区とし、熱乾処理を加えて2週間培養したものを超音波プラス熱乾処理区とした。

有機態窒素の分画は実験1と同様の方法で行なったが、本実験では、三角フラスコ全容をそのまま分析に供した。

実験結果および考察

第2表に、*B. subtilis*-生菌体の超音波処理および熱乾処理によって無機化が促進される有機態窒素の化学的組成を示した。本表によると、*B. subtilis*の生菌体の有機態窒素中(実験開始時の対照区参照)には、約5.3%のアミノ糖態窒素および51.3%のアミノ酸態窒素が存在していた。この生菌体の砂培地における培養2週間後の定量値(2週間後の対照区参照)によると、アミノ糖態窒素画分はほとんど同じであるが、アミノ酸態窒素および未同定画分は著しく減少した。このことは、アミノ糖態窒素画分は分解が遅いことを示し、アミノ酸態窒素画分は分解がきわめて速く、その約78%が無機化されたことを示している。これからみると、生菌体中のアミノ酸態窒素画分は速やかに分解されるものが大部分であり、

第2表 *B. subtilis*-生菌体の前処理によって無機化が促進される有機態窒素の化学的組成

(N mg/100 g 砂)

処 理 区	添 加 有 機 態 窒 素	培養 2 週間後		培養 2 週間後の有機態窒素画分 (6 N. HCl, 12 時間 105°C)				
		無 機 態 窒 素	有 機 態 窒 素	塩酸不溶性 窒 素	塩 酸 可 溶 性 窒 素			
					アノモニア態	アミノ糖態	アミノ酸態	未 同 定
(1) 実験開始時* 対 照 区	161.3 [100.0] (100.0)			3.3 〔 2.0〕	19.0 〔 11.8〕	8.6 〔 5.3〕 (100.0)	82.7 〔 51.3〕 (100.0)	47.7 〔 29.5〕 (100.0)
(2) 2 週間後** 対 照 区	161.3	64.9	96.4 <100.0>	3.9 < 4.0>	44.9 < 46.6>	8.5 < 8.8>	18.3 < 19.0>	20.8 < 21.6>
(3) 超音波処理区	161.3	70.1	91.2	3.8	30.0	4.5	14.0	38.9
(4) 熱乾処理区	161.3	69.8	91.5	3.5	30.4	2.4	12.3	42.9
対照区の無機化量 (1)-(2)			64.9 (40.2)	-0.6	-25.9	0.1 (1.2)	64.4 (77.9)	26.9 (56.4)
超音波処理区の無機 化量 (1)-(3)			70.1 (43.5)	-0.5	-11.0	4.1 (47.7)	68.7 (83.1)	8.8 (18.4)
熱乾処理区の無機化 量 (1)-(4)			69.8 (43.3)	-0.2	-11.4	6.2 (72.1)	70.4 (85.1)	4.8 (10.1)

* *B. subtilis*-生菌体の有機態窒素の組成。 ** (1) を培養して 2 週間後。

〔 〕 内の数値は、(1) の添加有機態窒素を 100 とした場合の各窒素画分の割合 (%)。

< > 内の数値は、(2) の培養 2 週間後の有機態窒素を 100 とした場合の各窒素画分の割合 (%)。

() 内の数値は、(1) の各窒素画分を 100 とした場合の各処理区の無機化割合 (%)。

一部分の遅いものがあるようにみられる。前報⁹⁾の成績によれば、細胞質物質の窒素化合物はきわめて分解が速く、細胞壁物質の窒素化合物は分解が遅い。このようなことから考えれば、アミノ酸態窒素画分中、分解の速やかなもの多くは細胞質物質であり、分解の緩やかなもの多くは細胞壁物質であると解釈される。かくして生菌体を砂培地に添加すれば、その菌体の細胞質物質は速やかに分解され無機化されるが、残留した細胞壁物質の分解は比較的ゆるやかに進行し、細胞壁物質成分中のアミノ糖およびペプチド化合物は緩徐に無機化するものと想像される。なお、2 週間後に残留していた有機態窒素の分画値からみれば、残留細胞壁物質中には約 9% のアミノ糖態窒素および約 20% のアミノ酸態窒素があったことになる。

次に、*B. subtilis*-生菌体を砂培地に添加直後熱乾処理し、2 週間分解させたものの分析値 (第 2 表の熱乾処理区参照) は以下のとおりである。すなわち、アノモニア態窒素画分は増加し、アミノ糖態窒素画分およびアミノ酸態窒素画分は著しく減少した。これは生菌体を乾燥することによって、アミノ糖化合物が微生物によって速やかに分解されるようになり、アミノ糖態窒素画分の約 70% が無機化されたと考えられる。アミノ酸態窒素画分もまた生菌体を乾燥することによって速やかに無機化されるようになり、生菌体の場合に比較して、その分解率は約 7% だけ増加して、アミノ酸態窒素画分の約 85

% が無機化されるようになったと解釈される。前報⁹⁾において、生菌体を細胞質部分と細胞壁部分とに分けて乾燥処理を行なうと、乾燥処理効果は細胞壁部分にあることを示したが、本実験結果はそれを裏づけている。すなわち、細胞壁物質中のアミノ糖およびペプチド化合物は、細胞質物質中のペプチド化合物に比較して緩徐に無機化されるが、乾燥処理を受ければ速やかに無機化が促進されるようになると考えられる。

さらに、*B. subtilis*-生菌体にあらかじめ超音波処理を施して、2 週間分解させたものの分析値 (第 2 表の超音波処理区参照) は次のとおりである。すなわち、アノモニア態窒素画分は増加し、アミノ糖態窒素画分およびアミノ酸態窒素画分は著しく減少した。このような傾向は生菌体をあらかじめ乾燥した場合と全く同様である。なお、生菌体を超音波処理した場合は、乾燥処理した場合に比較して、アミノ糖態窒素およびアミノ酸態窒素画分の減少程度がやや軽微であって、アミノ糖態窒素画分は約 50% が無機化され、アミノ酸態窒素画分は約 83% が無機化された。このことは、超音波処理と乾燥処理とは類似の処理効果を示し、ともに細胞壁物質中のアミノ糖およびペプチド化合物の微生物による分解を促進すると考えられる。しかし、細胞壁物質中のペプチド化合物の無機化促進については、両処理効果はほとんど同程度であるが、アミノ糖化合物の無機化促進については熱乾処理効果の方が超音波処理効果より一層高いものと

第3表 *B. subtilis*-細胞壁物質の前処理によって無機化が促進される有機態窒素の化学的組成 (N mg/100 g 砂)

処 理 区	添 加 有 機 態 窒 素	培養 2 週間後		培養 2 週間後の有機態窒素画分 (6 N. HCl, 12 時間 105°C)				
		無 機 態 窒 素	有 機 態 窒 素	塩酸不溶性 窒 素	塩 酸 可 溶 性 窒 素			
					アノモニア態	アミノ糖態	アミノ酸態	未 同 定
(1) 実験開始時* 対 照 区	65.3 〔100.0〕 (100.0)			2.6 〔 4.0〕 (100.0)	11.2 〔 17.2〕 (100.0)	8.5 〔 13.0〕 (100.0)	30.0 〔 45.9〕 (100.0)	13.0 〔 19.9〕 (100.0)
(2) 超音波処理区**	65.3	24.6	40.7	2.7	19.2	2.8	9.2	7.5
(3) 超音波プラス 熱乾処理区	65.3	28.7	36.6	2.4	10.4	1.5	9.4	12.9
超音波処理区の無機 化量 (1)-(2)			24.6 (37.7)	-0.1	-8.0	5.7 (67.1)	20.8 (69.3)	5.5 (42.3)
超音波プラス熱乾処 理区の無機化量 (1)-(3)			28.7 (44.0)	0.2 (7.7)	0.8 (7.1)	7.0 (82.4)	20.6 (68.7)	0.1 (0.8)

* 超音波処理によって調製した *B. subtilis*-細胞壁物質の有機態窒素の組成。 ** (1) を培養して 2 週間後。
〔 〕 内の数値は、(1) の添加有機態窒素を 100 とした場合の各窒素画分の割合 (%)。
() 内の数値は、(1) の各窒素画分を 100 とした場合の各処理区の無機化割合 (%)。

第4表 *S. cerevisiae*-細胞壁物質の前処理によって無機化が促進される有機態窒素の化学的組成 (N mg/100 g 人工土壤)

処 理 区	添 加 有 機 態 窒 素	培養 2 週間後		培養 2 週間後の有機態窒素画分 (6 N. HCl, 12 時間 105°C)				
		無 機 態 窒 素	有 機 態 窒 素	塩酸不溶性 窒 素	塩 酸 可 溶 性 窒 素			
					アノモニア態	アミノ糖態	アミノ酸態	未 同 定
(1) 実験開始時* 対 照 区	175.6 〔100.0〕 (100.0)			5.4 〔 3.1〕 (100.0)	16.2 〔 9.2〕	13.3 〔 7.6〕 (100.0)	70.0 〔 39.9〕 (100.0)	70.7 〔 40.2〕 (100.0)
(2) 超音波処理区**	175.6	74.4	101.2	9.2	23.4	12.8	41.5	14.3
(3) 超音波プラス 熱乾処理区	175.6	98.8	76.8	5.2	19.3	4.4	40.3	7.6
超音波処理区の無機 化量 (1)-(2)			74.4 (42.4)	-3.8	-7.2	0.5 (3.8)	28.5 (40.7)	56.4 (79.8)
超音波プラス熱乾処 理区の無機化量 (1)-(3)			98.8 (56.3)	0.2 (3.7)	-3.1	8.9 (66.9)	29.7 (42.4)	63.1 (89.3)

* 超音波処理によって調製した *S. cerevisiae*-細胞壁物質の有機態窒素の組成。 ** (1) を培養して 2 週間後。
〔 〕 内の数値は、(1) の培養 2 週間後の有機態窒素を 100 とした場合の各窒素画分の割合 (%)。
() 内の数値は、(1) の各窒素画分を 100 とした場合の各処理区の無機化割合 (%)。

考えられる。

次に、超音波処理によって調製した *B. subtilis*-細胞壁物質の超音波プラス熱乾処理により無機化が促進される有機態窒素の化学的組成を示したのが第3表である。本表によると、分離した細胞壁物質（実験開始時の対照区参照）には 13% のアミノ糖態窒素があり、約 46% のアミノ酸態窒素が存在していた。これを砂培地中に 2 週間放置すれば（超音波処理区参照）、約 67% のアミノ糖態窒素が分解されると同時に約 69% のアミノ酸態窒素が分解された。さらに、熱乾処理を施したものは（超音波プラス熱乾処理区参照）、82.4% のアミノ糖態窒素が分解され、同時に約 69% のアミノ酸態窒素が分解

された。すなわち、熱乾処理は超音波処理に比較してアミノ糖態窒素画分の分解を約 15% 増加させたが、アミノ酸態窒素画分の分解増はなかったことを示している。このことは、前述の場合と同様に、超音波処理効果と熱乾処理効果はアミノ酸態窒素画分についてはほぼ同程度であるが、アミノ糖態窒素画分については熱乾処理効果の方が大きいことを示している。本実験はあらかじめ超音波処理を施して細胞質物質を除いて分離した細胞壁物質を用いた実験であるが、さきに行なった生菌体の場合の結果（第2表参照）とほぼ同様の傾向を示している。

さらに、超音波処理によって調製した *S. cerevisiae*-細胞壁物質の超音波プラス熱乾処理によって無機化が促

進される有機態窒素の化学的組成を示したのが第4表である。この場合は土壤粘土 20% を砂に加えた人工土壤を用いているので、人工土壤培地の有機態窒素画分は定量して差引いた。本表によれば、超音波処理によって分離した細胞壁物質を2週間放置すれば、かなり無機化が促進され(超音波処理区参照)、さらにこれを熱乾処理すれば、いっそう無機化が促進される(超音波プラス熱乾処理区参照)ことが分る。そして、超音波処理と熱乾処理とは *S. cerevisiae*-細胞壁物質の無機化に対しても *B. subtilis*-細胞壁物質の場合と同様、類似の処理効果を示し、ペプチド化合物の無機化促進に対しては両処理はほぼ同程度の効果をもつが、アミノ糖化合物の分解に対しては熱乾処理の方が超音波処理よりいっそう強力な効果を示した。

なお、両処理の細胞壁物質中のアミノ糖化合物の無機化促進について、*S. cerevisiae* と *B. subtilis* とでは無機化率に大きな差がみられたが、これは両微生物の細胞壁物質中のアミノ糖化合物の構造上の相違によるものと考えられる。

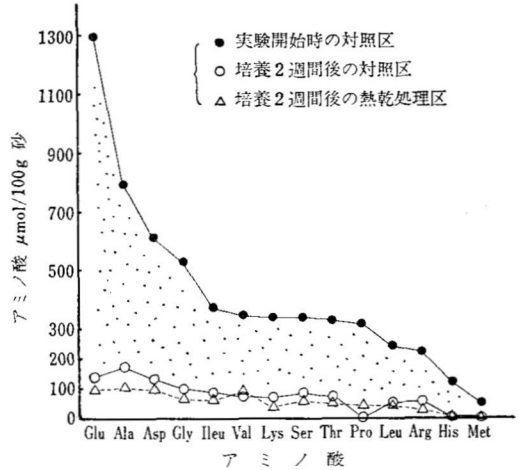
実験 3. *B. subtilis*-菌体およびその細胞壁物質の熱乾処理によって無機化が促進されるアミノ酸態窒素画分中のアミノ酸組成

実験方法

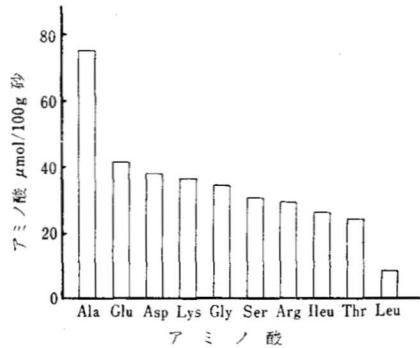
実験2における *B. subtilis*-菌体およびその細胞壁物質の熱乾処理によって無機化が促進されるアミノ酸態窒素画分中のアミノ酸組成について分析を試みた。個々のアミノ酸の分析は次のようにして行なった。すなわち、培養2週間後の試料に6Nの塩酸20mlを添加し、砂皿上で還流冷却器をつけて105°Cで12時間加水分解した。加水分解液は40°Cで減圧濃縮したのち、イオン交換樹脂(アンバライト IR-120)を用いてアミノ酸画分を分離溶出した。この溶出液(2N NH₄OH 溶液)を再び40°Cで減圧濃縮したのち、その一定量を全自動アミノ酸分析器(日本電子社製、J.L.C-5 AH 型)にて分析した。また、アミノ酸の標準物質についても同様に分析し、得られたチャートより個々のアミノ酸量をHW法⁴⁾によって求めた。

実験結果および考察

B. subtilis-生菌体を用いた場合のアミノ酸組成を示したのが第1図である。前述のように、2週間後細胞壁物質はほとんど分解されていると考えられるので、2週間後の対照区のアミノ酸組成は主として残留する細胞壁物質のペプチド化合物に由来して得られたものと考えら



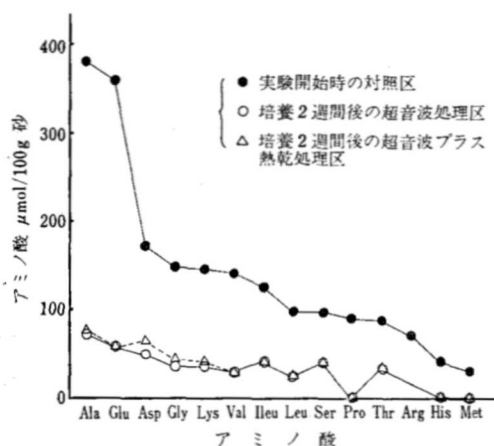
第1図 *B. subtilis*-生菌体の分解に伴うアミノ酸組成の変化



第2図 *B. subtilis*-生菌体を用いた場合の熱乾処理効果に由来し無機化した部分のアミノ酸組成

れる。このアミノ酸組成を含量の多いものから示すと、Ala, Glu, Asp, Gly>Ileu, Ser, Val, Thr, Lys>Arg, Leuの順となる。これらのアミノ酸は後記する細胞壁物質の主要なアミノ酸組成とほぼ類似していることから、生菌体を放置して2週間たてば、細胞質物質は分解されて細胞壁物質が残留することはほぼ確かなようである。なお、本図中の点描部分のアミノ酸は主に細胞質物質の無機化による減少を表わすものと考えられる。

次に、熱乾処理を施せば、前述のように細胞壁物質のペプチド化合物の一部が微生物によって著しく分解されるようになるが、このような処理で無機化が促進されるアミノ酸の種類と無機化量は第2図のようになる。本図によれば、無機化が促進される主要なアミノ酸の種類は細胞壁物質のペプチド化合物のアミノ酸組成とほぼ同じであって、それらの無機化量はアミノ酸組成中のアミノ酸含量にはほぼ比例している。すなわち、本図からみれば、細胞壁物質のペプチド化合物の一部が熱乾処理によって分解されやすくなり、無機化したものであると



第3図 *B. subtilis*-細胞壁物質の分解に伴うアミノ酸組成の変化

推定される。

さらに、第3図は、超音波処理によって分離した *B. subtilis*-細胞壁物質を用いた場合のアミノ酸組成を示したものである。本図から、細胞壁物質中にあるペプチド化合物のアミノ酸組成の主要なものを含量の多い順に示せば次のようになる。すなわち、Ala, Glu > Asp, Gly, Lys, Val > Ileu, Leu, Ser である。このアミノ酸組成のうち Ala, Glu が圧倒的に多いのは、*B. subtilis* がグラム陽性の菌であって、細胞壁物質としてムコペプチドが含まれているためであると思われる。

次に、超音波処理によって分離した細胞壁物質およびこの細胞壁物質をあらかじめ熱乾処理したものを2週間放置すれば、前述のように、細胞壁物質中にあるペプチド化合物は速やかに分解されるが、その際無機化されるアミノ酸の種類と無機化量は、第3図中の実験開始時の対照区と2週間後の超音波処理区および超音波プラス熱乾処理区のアミノ酸量の差に示される。これによると、無機化が促進されるアミノ酸の種類は細胞壁物質中のペプチド化合物のアミノ酸と同じであって、それらの無機化量は細胞壁物質中のそれぞれのアミノ酸含量にはほぼ比例して分解していることが分る。すなわち、ペプチド化合物の一部が超音波処理あるいは熱乾処理によって分解されやすくなり、無機化されるものであると推定される。

総合考察

以上の実験1、実験2および実験3の結果をまとめて考察すれば次のようになる。すなわち、微生物体自身の無機化過程においては、その細胞壁物質の窒素化合物の無機化はきわめて速やかに行なわれ、細胞壁物質の窒素

化合物の無機化は緩徐に行なわれるように推定される。たとえば、*B. subtilis*-生菌体の無機化2週間後に行なわれた有機態窒素画分の結果によれば、無機化される有機態窒素画分は大部分がアミノ酸態窒素画分であり、アミノ糖態窒素画分はほとんど分解されていない。このことは、上述の推定の正しいことを物語るものであり、比較的分解が緩徐な細胞壁物質が土壌中に残留するようになると思われる。また、生菌体を熱乾処理すると、前報⁹⁾に示したとおり分解の緩徐な細胞壁物質の無機化が促進されるようになるが、その際無機化が促進される有機態窒素画分はアミノ糖態窒素とアミノ酸態窒素画分であって、とくにアミノ糖化合物の無機化促進が著しいようである。そして、処理によって無機化が促進されるアミノ酸態窒素画分中のアミノ酸の種類は、細胞壁物質のペプチド化合物中のアミノ酸組成とはほぼ同じであり、その無機化量は細胞壁物質中の各アミノ酸含量にはほぼ比例している。すなわち、細胞壁物質のペプチド化合物の一部が熱乾処理によって分解されやすくなって無機化されるものと考えられる。無機化が促進されたアミノ酸の種類をその量の多い順に示すと、およそ、Ala, Glu > Asp, Gly, Lys, Val > Ileu, Leu, Ser, Thr, Arg のようになる。

また、生菌体に超音波処理を施した場合の処理効果は、熱乾処理効果にはほぼ類似の処理効果を示すことは前記のとおりである。とくにペプチド化合物の分解促進に対して両処理はほとんど同じ効果を示し、アミノ糖化合物の分解促進に対しては、熱乾処理の方が超音波処理より強力なことがうかがわれる。

要約

微生物体およびその細胞壁物質の超音波および熱乾処理によって無機化が促進される有機態窒素の化学的組成について分析し、次のような結果を得た。

1) 土壌培地において5週間に無機化された *A. niger*-乾燥菌体に由来する有機態窒素の組成は、アミノ酸態窒素画分、アミノ糖態窒素画分および未同定画分が大部分であった。

2) 砂培地に *B. subtilis*-生菌体を添加して2週間放置すれば、その菌体は速やかに分解され、分解された有機態窒素の組成はアミノ酸態窒素画分が大部分であり、アミノ糖態窒素画分はほとんど分解されなかった。しかし、生菌体に超音波処理あるいは熱乾処理を施すと、その無機化がさらに促進され、無機化が促進された有機態窒素の組成はアミノ糖態窒素画分とアミノ酸態窒素画分が大部分であり、とくにアミノ糖態窒素画分の無機化率が著

しく高かった。そして、熱乾処理の方が超音波処理に比べアミノ糖態窒素画分に対する処理効果が高かった。

3) 超音波処理を施して分離調製した *B. subtilis*-細胞壁物質および *S. cerevisiae*-細胞壁物質についても、超音波および熱乾処理によって無機化が促進される有機態窒素の組成は、アミノ糖態窒素画分およびアミノ酸態窒素画分が大部分であった。そして、2)と同様に、アミノ糖態窒素画分に対する処理効果は熱乾処理効果の方が超音波処理効果より高かった。

4) *B. subtilis*-生菌体およびその細胞壁物質のうち、超音波処理および熱乾処理によって無機化が促進されるアミノ酸態窒素画分中のアミノ酸の種類は、細胞壁物質のペプチド化合物中のアミノ酸組成と同じであり、その無機化量は細胞壁物質中の各アミノ酸含量にほぼ比例していた。すなわち、細胞壁のペプチド化合物の一部が熱乾処理によって分解されやすくなり無機化されるものと考えられる。無機化が促進されたアミノ酸の種類をその量の多い順に示すと、およそ、Ala, Glu>Asp,

Gly, Lys, Val>Ileu, Leu, Ser, Thr, Arg であった。

文 献

- 1) AHMAD, Z., YAHIRO, Y., KAI, H. and HARADA, T.: *Soil Sci. Plant Nutr.*, (Tokyo), 19, 287 (1973)
- 2) BREMNER, J.M.: *Methods of Soil Analysis, Agronomy* No. 9, Part 2, p. 1238, American Society of Agronomy, Inc., Madison (1965)
- 3) CHU, J.P.-H. and KNOWLES, R.: *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 30, 210 (1966)
- 4) 波多野博行: アミノ酸自動分析法, p. 53, 化学同人 (1964)
- 5) HAYASHI, R. and HARADA, T.: *Soil Sci. Plant Nutr.*, (Tokyo) 15, 226 (1969)
- 6) KAI, H., AHMAD, Z. and HARADA, T.: *Soil Sci. Plant Nutr.*, (Tokyo), 19, 275 (1973)
- 7) 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)
- 8) 丸本卓哉・甲斐秀昭・吉田 堯・原田登五郎: 土肥誌, 45, 239 (1974)
- 9) 丸本卓哉・甲斐秀昭・吉田 堯・原田登五郎: 土肥誌, 45, 332 (1974)