

ノ ー ト

畑土壌における有機態窒素分解酵素の
活性に及ぼす稲わら添加の促進効果

進藤晴夫*・丸本卓哉*

藤本浩司**・東 俊雄*

キーワード プロテアーゼ, β -アセチルグルコサミニダーゼ, アデノシンデアミナーゼ, 稲わら, 畑土壌

1. はじめに

プロテアーゼ, β -アセチルグルコサミニダーゼ, アデノシンデアミナーゼは, それぞれタンパク質, アミノ糖, 核酸の分解に関する酵素である¹⁻³⁾. 最近, これらの酵素について土壌生化学的立場から活発に研究が進められるようになり, 水田および畑圃場における土壌中の酵素活性の経時変化^{4,5)}ならびにそれらの活性に及ぼす堆肥連用効果⁶⁻⁸⁾, 酵素活性と微生物フローラおよび窒素無機化量との関係^{9,10)}などについて貴重な知見が得られてきた.

ところで, 土壌中における酵素活性は, 自然環境だけでなく人為によっても影響を受けるものと相対される. このきわめて複雑な系における酵素活性の変動に及ぼす因子を十分に解析し, 有機態窒素の無機化におけるそれらの酵素の役割を的確に把握するためには, 個々の因子を任意の条件下に設定できる室内インキュベーション実験が有効な手段と考えられる.

そこで本研究では, 耕地土壌へ広く施用されている稲わらが, 畑土壌中にみいだされるプロテアーゼ, β -アセチルグルコサミニダーゼおよびアデノシンデアミナーゼ活性に及ぼす影響を及ぼしているかについて基礎的知見を得る目的で, 室内インキュベーション実験を行った. また, 酵素活性と無機態窒素量の変動パターンを比較し, 本実験条件下での有機態窒素の無機化過程に対する上記の酵素の寄与の仕方について論じた.

Haruo SHINDO, Takuya MARUMOTO, Koji FUJIMOTO and Toshio HIGASHI: The Promoting Effect of Rice Straw Added on the Activities of Organic Nitrogen-Decomposing Enzymes in Upland Soils

* 山口大学農学部 (753 山口市吉田 1677-1)

** 同上 (現在, 長崎県佐世保農業改良普及所 857 佐世保市木場田町 3-12)

1992年2月3日 受理

日本土壌肥科学雑誌 第63巻 第6号 p.709~711 (1992)

2. 実験試料および方法

1) 供試土壌

山口大学農学部附属農場の畑作土層(黄色土)より採取した湿潤細土であり, その二三の性質は次のとおりである. pH(H₂O): 6.4, CEC: 10.7 cmol kg⁻¹, 有機態炭素: 13.0 g kg⁻¹, 全窒素: 1.5 g kg⁻¹, 土性: L (砂, 63.5%; シルト, 22.9%; 粘土, 13.6%).

2) 供試稲わら

収穫後の稲わら風乾物をウィレー型粉砕機で粉碎し, さらにメノウ乳鉢で磨砕した後, 60メッシュのふるいを通して試料とした. 供試した稲わら風乾物は, 有機態炭素を 379 g kg⁻¹, 全窒素を 5.38 g kg⁻¹ 含有しており, その炭素率は, 70.4であった.

3) インキュベーションの方法

200 mL容の三角フラスコに乾土 30 g 相当量の湿潤細土を秤取し, 土壌のみの系と土壌へ炭素 120 mg 相当量の稲わら粉末を加えた系を設けた. 水分含量を最大容水量の 60% に調整し, フラスコの口部をアルミホイルで覆って 30°C の定温器内に入れ, 最長 6 週間インキュベーションした.

4) 酵素活性の測定

所定のインキュベーション期間終了後に試料中の酵素活性を測定した. プロテアーゼ活性は, 基質として α -フェニルアラニルロイシンを用い, 反応後, 遊離したアミノ酸をニンヒドリンで比色定量する LADD and BUTLER の方法¹¹⁾に準じて測定した. また, β -アセチルグルコサミニダーゼ活性は, 基質として *l*-カニトロフェニル- β -D-グルコサミニドを用い, 反応後, 遊離した *l*-カニトロフェニルを定量する金沢と高井の方法¹²⁾に準じた. さらに, アデノシンデアミナーゼ活性は, 基質としてアデノシンを用い, 反応後, 遊離したアンモニアをネスラー試薬で比色定量する SATO らの方法³⁾に準じて測定した. これらの酵素の測定法の詳細については前報³⁾に記載済みである. 酵素活性の分析は, 各試料につき 4 連で行い, その平均をとって活性値とし, 30°C の U (μ mol/min/kg 乾土) で表示した.

5) 無機態窒素の定量

所定のインキュベーション期間終了後に, 試料中に含まれている無機態窒素を塩化カリウム溶液で抽出しブレムナー法¹³⁾で測定した.

3. 実験結果および考察

第1表に土壌のみ, および稲わら添加土壌のインキュベーション期間中における各酵素活性の経時変化を示した.

まずプロテアーゼ活性についてみると, 供試土壌は最

第1表 土壌のみおよび稲わら添加土壌における酵素活性の経時変化

(U)*

酵 素	実験系	インキュベーション期間 (週)				
		0	1	2	3	6
プロテアーゼ	土壌のみ	8.32 (100)**	6.98 (100)	7.33 (100)	7.40 (100)	8.01 (100)
	稲わら添加土壌	8.32 (100)	12.4 (178)	14.5 (198)	13.5 (182)	12.5 (156)
β-アセチルグルコサミニダーゼ	土壌のみ	5.66 (100)	5.50 (100)	6.65 (100)	6.77 (100)	5.90 (100)
	稲わら添加土壌	5.66 (100)	8.58 (156)	9.00 (135)	9.50 (140)	11.0 (186)
アデノシンデアミナーゼ	土壌のみ	4.32 (100)	4.16 (100)	4.15 (100)	3.15 (100)	2.76 (100)
	稲わら添加土壌	4.32 (100)	7.21 (173)	6.78 (163)	4.10 (130)	3.41 (124)

* Uは, $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg}$ 乾土を示す.

** () の値は, 土壌のみの活性を100とした場合の相対活性を示す.

初 8.3 U の活性を有していた. 土壌のみをインキュベーションした場合, 活性は1週目まで減少したが, それ以降は徐々に増加した. これに対して稲わら添加土壌の場合, 活性は2週目まで激増して14.5 U に達したが, それ以降は徐々に減少した. 稲わら添加土壌系の活性は, 土壌のみの系の1.6~2.0 倍の高い値で推移した.

供試土壌のβ-アセチルグルコサミニダーゼ活性は, 5.7 U であった. 土壌のみをインキュベーションした場合, 活性は3週目まで若干増加したが, それ以降は減少した. 一方, 稲わら添加土壌の場合, 活性は1週目まで急増し, それ以降も増加を続けて6週目では11.0 U に達した. 稲わら添加土壌系の活性は, 土壌のみの系の1.4~1.9 倍の値で推移した.

アデノシンデアミナーゼ活性についてみると, 供試土壌の活性は4.3 U であるが, 土壌のみをインキュベーションすると, 活性は日数の経過とともに減少した. 一方, 稲わら添加土壌では, 活性は1週目に7.2 U まで増加した後, 3週目まで顕著に減少し, それ以降は緩慢に減少した. 稲わら添加土壌系の活性は, 土壌のみの系の1.2~1.7 倍の値を示した.

以上述べてきたように, 本研究において, 畑土壌への稲わらの添加は, プロテアーゼ, β-アセチルグルコサミニダーゼおよびアデノシンデアミナーゼ活性をいずれも促進したが, その活性促進効果は, 酵素の種類だけでなくインキュベーション期間によってもかなり異なっていた. 得られた結果を明確に解釈することは困難であるが, 稲わらを栄養源とし, それぞれの酵素を産出する微生物の増殖速度の相違, 土壌および稲わら中にもともと含有されていたそれぞれの基質量の相違などが複雑に絡みあったことに原因があるものと推定している.

第2表に土壌のみ, および稲わら添加土壌における無機態窒素量の経時変化を示した. 土壌のみの系において, 無機態窒素量は最初乾土1 kg 当たり28 mg であるが, インキュベーション日数の経過とともに増加して6

第2表 土壌のみおよび稲わら添加土壌における無機態窒素量の経時変化 (mg/kg 乾土)

実験系	インキュベーション期間 (週)				
	0	1	2	3	6
土壌のみ	27.6	33.5	41.7	50.2	70.9
稲わら添加土壌	27.6	5.1	8.4	7.9	7.0

週目では71 mg となった. これに対して, 稲わら添加土壌系では, 無機態窒素量は1週目まで急減して5 mg となったが, それ以降大きい変動を示さなかった. ここで得られた無機態窒素量の変動パターンは, 広瀬¹⁴⁾の研究結果とほぼ一致した. 土壌のみの系における無機態窒素量から稲わら添加土壌系の無機態窒素量を差し引いた値を有機態窒素量とすれば, 稲わら添加土壌系において新たに生成した有機態窒素量は, インキュベーション日数の経過とともに増加したことになる.

本研究における3種類の酵素のうち, 直接アンモニア態窒素の生成に関与しているのは, アデノシンをイノシンとアンモニアへ加水分解するアデノシンデアミナーゼだけであるが, 他の2種類の酵素, すなわちプロテアーゼとβ-アセチルグルコサミニダーゼもそれぞれタンパク態, アミノ糖態窒素の分解に関与する. そこで酵素活性と無機態窒素量の変動パターンを比較し, 本実験条件下での有機態窒素の無機化過程に対する上記の酵素の寄与の仕方について検討することとした. 土壌のみの場合, 1週目以降の無機態窒素量の増加とプロテアーゼ活性の増加とは一般に対応していた. このような関係は他の酵素に対してみられなかったため, 土壌のみの系において1週目以降に新たに無機化された窒素は, 主としてタンパク態窒素に由来したものと推定した.

稲わら添加土壌の場合, インキュベーション期間を通して無機態窒素の有機化が生じているものと考えられる. この窒素の有機化は, 一般に稲わらなどの高い炭素率を示す植物遺体が土壌に供給されたときに観察される

もので、微生物が植物遺体の炭素源を利用して増殖する際に、土壌および植物遺体中の有機態窒素から分解・生成した無機態窒素や、もともと土壌中にあった無機態窒素を微生物体に取り込むことに起因している。稲わら添加土壌の場合、プロテアーゼ、 β -アセチルグルコサミニダーゼおよびアデノシンデアミナーゼ活性は、インキュベーション1週目あるいは2週目まで顕著に増加した。したがって、インキュベーション初期に微生物は増殖に必要な無機態窒素を確保するため、これらの酵素を新たに産出し、産出された酵素は土壌または稲わら中にもともと含有されていたタンパク態、アミノ糖態、核酸態窒素の分解にそれぞれ関与しているものと推察される。インキュベーション中期から後期にかけて、プロテアーゼおよびアデノシンデアミナーゼ活性はともに減少したが、これはインキュベーション初期に比べてこれらの酵素の基質量が少なくなったからであろう。一方、 β -アセチルグルコサミニダーゼ活性は中期から後期にかけても増加し続けた。この結果は、 β -アセチルグルコサミニダーゼを産出する微生物が、日数の経過とともに増殖したと考えれば一応説明されるが、この点については今後検討する必要がある。

文 献

- 1) 金沢晋二郎・早野恒一・都留信也：土壌酵素, 1. 土壌の炭素・窒素・磷循環, 化学と生物, 19, 235~242 (1981)
- 2) 早野恒一・都留信也・金沢晋二郎：土壌酵素, 2. 存在状態とその起源, 同上, 19, 330~334 (1981)
- 3) SATO, F., OMURA, H. and HAYANO, K.: Adenosine deaminase activity in soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 32, 107~112 (1986)
- 4) 金沢晋二郎：水田の土壌酵素, ペドロジスト, 24, 69~93 (1980)
- 5) 米林甲陽・森下年起・服部共生：水田土壌中における窒素無機化量の年間変動とその要因, 土肥誌, 58, 729~737 (1987)
- 6) 大村裕顕・佐々木功・栃木博美・室井栄一・赤木 博・小熊純一・佐藤文政：ハウス栽培土壌の β -アセチルグルコサミニダーゼ活性について, 同上, 59, 68~74 (1988)
- 7) 大村裕顕・室井栄一・佐々木功・栃木博美：施設栽培土壌の有機態窒素の無機化に関与する土壌酵素活性について, 同上, 59, 288~295 (1988)
- 8) 進藤晴夫：畑土壌のプロテアーゼ, β -アセチルグルコサミニダーゼおよびアデノシンデアミナーゼ活性に及ぼす堆肥連用の効果ならびに酵素活性と窒素の無機化との関係, 同上, 63, 190~195 (1992)
- 9) 大村裕顕・佐藤文政・佐々木功・栃木博美・室井栄一：火山灰土壌の L-アスパラギナーゼ活性について, 同上, 58, 536~541 (1987)
- 10) 佐藤文政・大村裕顕：プロテアーゼ, β -アセチルグルコサミニダーゼ, アデノシンデアミナーゼ活性と土壌微生物フロラについて, 同上, 60, 34~40 (1989)
- 11) LADD, J. N. and BUTLER, J. H. A.: Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biol. Biochem.*, 4, 19~30 (1972)
- 12) 金沢晋二郎・高井康雄：土壌中における β -アセチルグルコサミニダーゼ活性の測定法, 土肥誌, 47, 329~332 (1976)
- 13) 土壌養分測定法委員会編：土壌養分分析法, p.197, 養賢堂, 東京 (1980)
- 14) 広瀬春朗：稲わらおよび稲わら堆肥の分解とアンモニア態窒素の有機化過程, 土肥誌, 44, 211~216 (1973)