

## 酸性硫酸塩土壌の水分状態が土壌呼吸活性に及ぼす影響

上野 薫\*・足立忠司\*\*・成岡 市\*\*

### Influence of Moisture Content on Soil Respiration in Acid Sulfate Soils

Kaoru UENO\*, Tadashi ADACHI\*\* and Hajime NARIOKA\*\*

\* The Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University,  
3-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan

\*\* Faculty of Environmental Science and Technology, Okayama University,  
3-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan

#### Abstract

The basic mechanism of acidification on acid sulfate soils (ASS) was studied, but the relation between matric potential (soil moisture) and the behaviour of microorganisms in ASS was still unclear. In this paper, the effects of drying on the mechanism of acidification were identified, especially in relation to different microbial populations and soil respiration through soil incubation experiments.

Six soil moisture conditions were set by drying in the incubator at 30°C. Soil pH, soil respiration and total bacterial population, *Thiobacillus ferrooxidans* (*T. ferrooxidans*) that had a big role as a catalyst on the acidification of ASS and other gram-negative bacteria were analysed. It was determined that within the matric potential range of  $-35\sim 220$  kPa (pF 2.55~3.35), soil respiration was active. Specifically at  $-35$  kPa (pF 2.55), the main bacterial population in the soil was *T. ferrooxidans*, while population of gram-positive bacteria decreased, though, total bacterial population had a significant relation to soil respiration. Soil acidification was effected not because of the population of *T. ferrooxidans* but mainly due to the speed in their increase. Carbon dioxide fixation by *T. ferrooxidans* (per cell) and aerobic respiration (per cell) were active in high matric potential range, but the high population of these bacterium were more effective in increasing the amount of carbon dioxide fixed and aerobic respiration.

**Key words** : acid sulfate soils, soil respiration, moisture content, acidity, *Thiobacillus ferrooxidans*

#### 1. はじめに

酸性硫酸塩土壌を材料とする研究の主たるテーマは、土壌の酸性化機構や改良方法に関するものである (Dent and Pons, 1995; Darrell *et al.*, 1982; 米田, 1958 など)。酸性硫酸塩土壌の酸性化過程は土壌の乾燥過程で進行するため、土壌水分状態と諸現象との関係は重要であるが、この関係を論じた研究は少ない。足立ら (1992) は、土壌水分状態 pF 3.0 付近で土壌酸性化が促進されることを示した。筆者らは、この理由について、

この土壌水分状態で急激に鉄酸化細菌の増殖活性が高まるためであることを報告した (上野ら, 2002a) が、この背景は未だ明らかではない。一方、近年様々な分野で温室効果ガスが取り上げられる中、酸性硫酸塩土壌の低湿地開発における排水作業により、CO<sub>2</sub>が大量に大気へ放出されることが報告され (Hicks *et al.*, 2002)、土壌の乾燥過程における CO<sub>2</sub> 発生と微生物との関係が問題となっている。しかし、現地での微生物組成の変化やそれぞれの増殖過程および呼吸活性を把握することは困難である。本論では、乾燥による土壌酸性化機構の追究と共

\* 岡山大学大学院自然科学研究科 〒700-8530 津島中 3-1-1

\*\* 岡山大学環境理工学部 〒700-8530 津島中 3-1-1

キーワード : 酸性硫酸塩土壌, 土壌呼吸, 土壌水分, 酸性化, 鉄酸化細菌

に、現地での上記現象把握の一助として、酸性硫酸塩土壌の乾燥に伴う微生物組成、土壌呼吸活性の変化を土壌の酸性化過程および鉄酸化細菌との関係を含めて室内実験により把握し、検討を行ったので報告する。

## 2. 材料および方法

### 2.1 供試土の採取および基本的理化学性

供試土は、前報(上野ら, 2002b)と同様、島根県中海干拓地安来工区下層還元土壌(採土深185~210cm)とした(表-1)。土壌の前処理は前報と同様に行った。

### 2.2 実験方法

#### 2.2.1 土壌水分条件の設定

土壌水分を初期含水比(1.38 kg/kg)以下から、土壌の力学的変異点である塑性限界(PL)、収縮限界(SL)が含まれる含水比範囲で30°C恒温器での乾燥により6段階(含水比1.38, 1.00, 0.70, 0.50, 0.30, 0.10 kg/kg)に設定した。水分条件設定方法および水分条件設定後の試料の状況は前報(上野ら, 2002b)と同様であった。なお、これらの含水比は、後にマトリックポテンシャルに変換した(2.2.6)。

#### 2.2.2 土壌呼吸量の測定

本論における土壌呼吸とは、Andersonの定義(Anderon, 1982)に基づき、土壌中の生物によるCO<sub>2</sub>の発生という意味で用いた。なお、微生物の活性を把握するため、植生の影響は排除して実験を行った。CO<sub>2</sub>発生量の測定は、アルカリ溶液による中和滴定法(Sugahara and Katoh, 1992)を用いた。水分条件を設定した土壌各100g(湿土重)を200mL容UMサンプル瓶に充填した。充填は、空気の層が生じないように留意し少量ずつで行った。土壌を入れたUMサンプル瓶を、0.5M-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液(100cc容ビーカー)、1.0M-NaOH溶液(50cc容ビーカー)とともに2L容バイアル瓶に密封し、30°C恒温器内に静置、培養した。密封バイアル瓶内で発生したCO<sub>2</sub>濃度を1.0M-NaOH(アルカリ溶液)の中和滴定により測定し、土壌の入っていないバイアル瓶の中和滴定量をブランク値として差し引き、乾土1kgあたりのモル濃度で表示し、これを土壌呼吸量とした。

土壌の培養時間は後述3.1の実験から4日とした。中和滴定後には、密閉による微生物への影響を緩和するため、10分間瓶内の換気を行った。瓶内の換気を行った後は、3日間アルカリ溶液は入れず、アルカリ溶液の連続静置による微生物への影響軽減を考慮した。実験は2反復行い、データは平均値で示した。また、微生物数の計数用および土壌pH・EC測定用の系も同様に土壌呼吸量を測定した。

なお、CO<sub>2</sub>専用の系(非攪拌区)以外では、各測定の試

表-1 供試土の基本的理化学性

(中海干拓地下層還元土壌, 採土深185~210cm)

Table 1 Fundamental physical and chemical properties of sample soils (in subsoils Polder-Nakaumi, Shimane, depth; 185~210 cm)

土性 <sup>1)</sup>	SiC(粘土40%)
土粒子密度(Mg/m <sup>3</sup> ) <sup>2)</sup>	2.58
初期含水比(kg/kg)	1.32
液性限界LL(kg/kg)	1.59
塑性限界PL(kg/kg)	0.56
収縮限界SL(kg/kg)	0.32
塑性指数Ip	102.44
粘土活性度A <sup>3)</sup>	7.59
pH(H <sub>2</sub> O; 1:5)	6.25
pH(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	2.05
EC(1:5; mS/cm)	4.41
パイライト含有量(wt.%) <sup>4)</sup>	4.99

1): ハイドロメーター法(国際土壌学会)

2): ピクノメーター法

3):  $A = I_p / [2\mu\text{m以下粘土含有率}(\%)]$

4): 酸可溶性イオウの半定量法(村上, 1961)

料採取により、土壌が攪乱され、通気条件の変化や酸化部位の部分的な反転が生じてしまうため、採取後には残土全体を攪拌し、整地を行った(攪拌区)。

#### 2.2.3 土壌呼吸量のとらえかた

土壌呼吸量は土壌からのCO<sub>2</sub>発生量を示すが、CO<sub>2</sub>濃度は、土壌に植物が存在していない場合には、土壌微生物による好氣的呼吸および独立栄養細菌による炭酸固定(CO<sub>2</sub>消費)の二つの現象により決定されていると考えられる。棲息する微生物の種や数の情報は、CO<sub>2</sub>の発生量とCO<sub>2</sub>の消費量を推定する手がかりとなり、微生物の好氣的呼吸活性や炭酸固定活性の理解に役立つ。本論では、土壌から発生したCO<sub>2</sub>量の低下量から鉄酸化細菌の炭酸固定活性を推定する試みを以下の方法で行った。

供試土に棲息する主な生物は、肉眼による観察から、藻類と原生動物以外の土壌微生物(細菌類、放線菌類、真菌類)と推定した。これら微生物の呼吸特性を整理し、表-2に示した。鉄酸化細菌は好気性細菌であるが、好氣的呼吸は行わず、第一鉄を最初の電子供与体として利用し、最終受容体にO<sub>2</sub>を用いてATP・NADHを獲得する化学合成独立栄養細菌である(千田, 1996)。炭素源はCO<sub>2</sub>のみを用い、ATP・NADHを消費してカルビン・ベンソン回路でアミノ酸等を誘導して菌体を構成する(同上)。つまり単体としては生育時にCO<sub>2</sub>の排出はなく、CO<sub>2</sub>には消費(炭酸固定)のみで関与する。

表-2 微生物の呼吸特性による分類（光呼吸を除く）

Table 2 Classification of microorganisms based on types of respiration (except photorespiration)

分類	呼吸方法	生成するガス	代表的な微生物
偏性好気性菌	好氣的呼吸により炭素源を分解	CO <sub>2</sub>	多くの細菌, 糸状菌 (+)
偏性嫌気性菌	発酵により炭素を分解(O <sub>2</sub> 耐性なし)	CO <sub>2</sub> /CH <sub>4</sub>	酪酸菌 (+), 硫酸還元菌 (-)
通性嫌気性菌	O <sub>2</sub> 耐性を持ち, 完全発酵を行う 好氣的呼吸から発酵へ代謝型を転換 できる	CO <sub>2</sub> /CH <sub>4</sub>	乳酸菌 (+), 多くの腸内細菌 (-), 酵母, 大腸菌 (-), 多くの放線菌 (+)
化学合成独立栄養菌	CO, NH <sub>4</sub> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , Fe <sup>2+</sup> , H <sub>2</sub> , 一部の還元型硫黄化合物等の無機化 化合物を呼吸基とする	—	鉄酸化細菌 (-), 硫黄酸化細菌 (-), 硝化細菌 (-), 水素細菌 (-)

(+) ; gram positive, (-) ; gram negative

環境調査のための微生物学 (1996), 微生物学第5版下巻 (1997) を参考に作成

以上を考慮し, 本論では次の3つの基準で微生物の好氣的呼吸活性 (以降, 呼吸活性と表記) および鉄酸化細菌の炭酸固定活性を判定した。

① 土壌中の菌群の組成から鉄酸化細菌の優占程度を把握し, 鉄酸化細菌がその系の優占種である場合, CO<sub>2</sub>濃度の変化は鉄酸化細菌の炭酸固定量を反映する。② CO<sub>2</sub>濃度が高く, 棲息する全菌数が多い場合, 菌の呼吸活性が高いのではなく, 菌数の多さが反映された結果である。③ CO<sub>2</sub>濃度が高く, 棲息する細菌数が少なければ, 菌の呼吸活性は高い。

#### 2.2.4 土壌微生物の計数

計数した微生物は, 土壌の酸性化に大きく影響を与える鉄酸化細菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*) 数を MPN 法で, 全菌数をイースト・グルコース培地 (YG 培地) で, グラム陰性菌数をクリスタルバイオレット (CV) 添加の YG 培地でそれぞれ希釈平板法により計数し, 乾土あたりの細菌数で示した (全て土壌微生物実験法, 1992 に準拠)。ただし, 採取土壌量が少量であるため, 一次土壌希釈液量は, 湿土を 10 wt.% 含む 90 mL とし, MPN 法にはオートクレーブ処理をした 2 mL 容の蓋付きエッペンチューブに 1 mL の培養液, 0.12 mL の土壌希釈液を分注し, 蓋をして培養を行った。この MPN 法は従来法の試験管による培養結果よりも若干小さい値となるが, オーダーは同じであり, 再現性も高く, 実験上問題は無いと判断した。菌の培養温度は, 全て 30°C とした。また, 培養計数した細菌は, その栄養要求性から *T. ferrooxidans* に近い種であることを確認した。

各微生物群の数は, 真値に近づけるために上述の方法で計数した値を用いて, 次の計算により各菌数を定めた。全菌数 (図-4 中: T) は, YG 培地に生育した“全菌数”に鉄酸化細菌用培地である 9K 培地に生育した“鉄酸化細菌数”を加えた。グラム陰性菌数 (同図中: GN)

は, CV を加えた YG 培地に生育した“グラム陰性菌数”に“鉄酸化細菌数”を加えた。これはグラム陰性細菌である鉄酸化細菌の生育に必要な鉄が YG 培地に含まれていないためである。グラム陽性菌の数は, 全菌数 (T) とグラム陰性菌数 (GN) の差により示した。なお, 真菌と認識・計数可能なものは計数したが, 細菌の計数を目的に土壌希釈濃度を設定したため, 希釈率が高いと孢子量が少なくなるなど計数精度には問題が残るため, 本報では真菌についての記載は控えた。

#### 2.2.5 土壌 pH・EC の測定

土壌 pH・EC 測定用の系から, 試料の上層, 中層, 下層から湿土 3g ずつの合計 9g を採取し, 蒸留水を用いて土壌 pH (H<sub>2</sub>O, 1:5) を電極法により測定した。pH 測定後, 5 種 B 定量濾紙を用いて濾過を行い, 得た濾液の電気伝導度 (EC) を EC メータで測定した。

#### 2.2.6 含水比から土壌水分状態への変換

設定した水分条件 (含水比表示) を状態量として表すために, 完全飽和した各水分条件の試料のマトリックポテンシャルを加圧板法 (0~619 kPa) と蒸気圧法 (-981 kPa~-246×10<sup>3</sup> kPa) により測定し, それぞれの水分特性曲線を得た。これらの曲線から, 設定水分条件の含水比に対応する点を結ぶと, 土壌の乾燥過程における各含水比での水分状態が示される (足立ら, 1992)。加圧板法では 50 cc 円筒をフレームとして利用し, 円筒下部にナイロン製の薄い布を輪ゴムで固定し, その上に土壌厚 10 mm で充填した。土壌充填時に器具は用いなかった。蒸気圧法では, 完全飽和後に遠心法で -981 kPa で脱水した各試料 3g ずつを平型秤量瓶に薄く並べ, 濃度の異なる H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液を入れたデシケータに入れ恒温室 (25°C) に静置し, 質量が平衡に達するのを待って測定した。

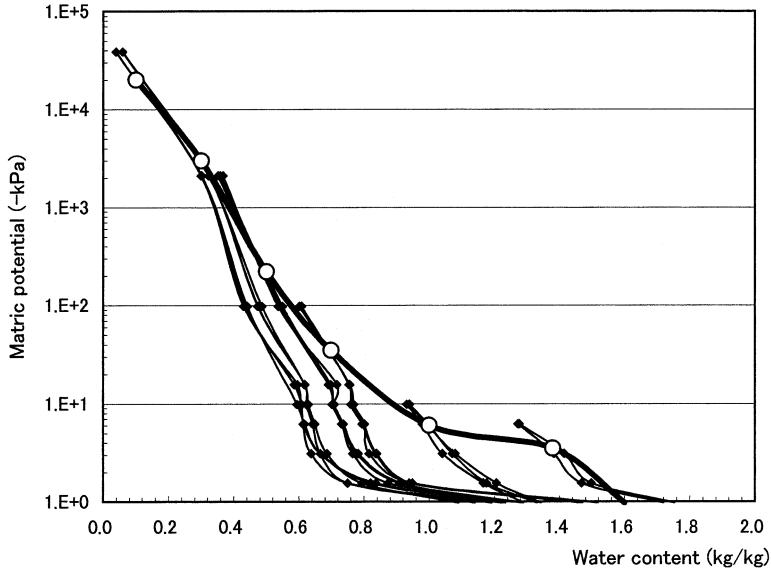


図-1 乾燥過程における土壌水分特性曲線

Fig. 1 Soil moisture curve during the drying process.

- : 供試土の乾燥過程でのマトリックポテンシャルの変化  
changes in matric potential during the drying process
- ◆ : ある含水比まで乾燥調整した供試土のマトリックポテンシャルの変化  
changes in matric potential of sample soils set at different water content by drying

### 3. 結 果

#### 3.1 乾燥過程における土壌水分状態の変化

乾燥により含水比を調整した各区の水分特性曲線を図-1に示した。これらの結果から土壌の乾燥過程における土壌水分状態の変化を求めると、図中の太線のようになった。これより、含水比 1.38, 1.00, 0.70, 0.50, 0.30, 0.10 kg/kg に設定した各区の土壌水分状態は、それぞれ、 $-3.5$ ,  $-6.0$ ,  $-35$ ,  $-220$ ,  $-3 \times 10^3$ ,  $-2 \times 10^4$  kPaであった。これは pF 1.6, 1.8, 2.55, 3.35, 4.49, 5.31 に相当する。以降、各水分区を  $-3.5$  kPa 区等と表記した。

#### 3.2 培養時間の検討

土壌呼吸量測定のための土壌培養時間を決定するため、土壌水分状態を2条件 ( $-35$  kPa,  $-3 \times 10^3$  kPa)、培養時間を2, 4, 6, 10日間に設定し、 $\text{CO}_2$ 濃度を測定した。その結果を図-2に示した。 $\text{CO}_2$ 濃度の傾きは、 $-35$  kPa区では4日間よりも長い培養期間で低下し、 $-3 \times 10^3$  kPa区では10日間の培養ですでに低下していた。この低下は、時間に伴う土壌微生物の呼吸活性の低下を意味しており、土壌呼吸量は呼吸活性が高い状態で測定される必要がある(木村ら, 1984)。本供試土では呼吸活性の高い場合には4日以上は培養は不適であり、呼吸活性の低い場

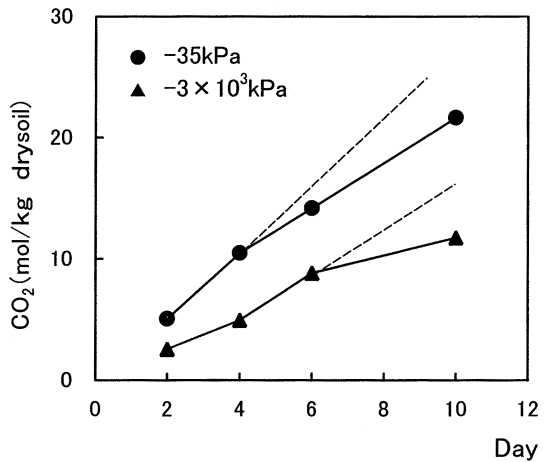
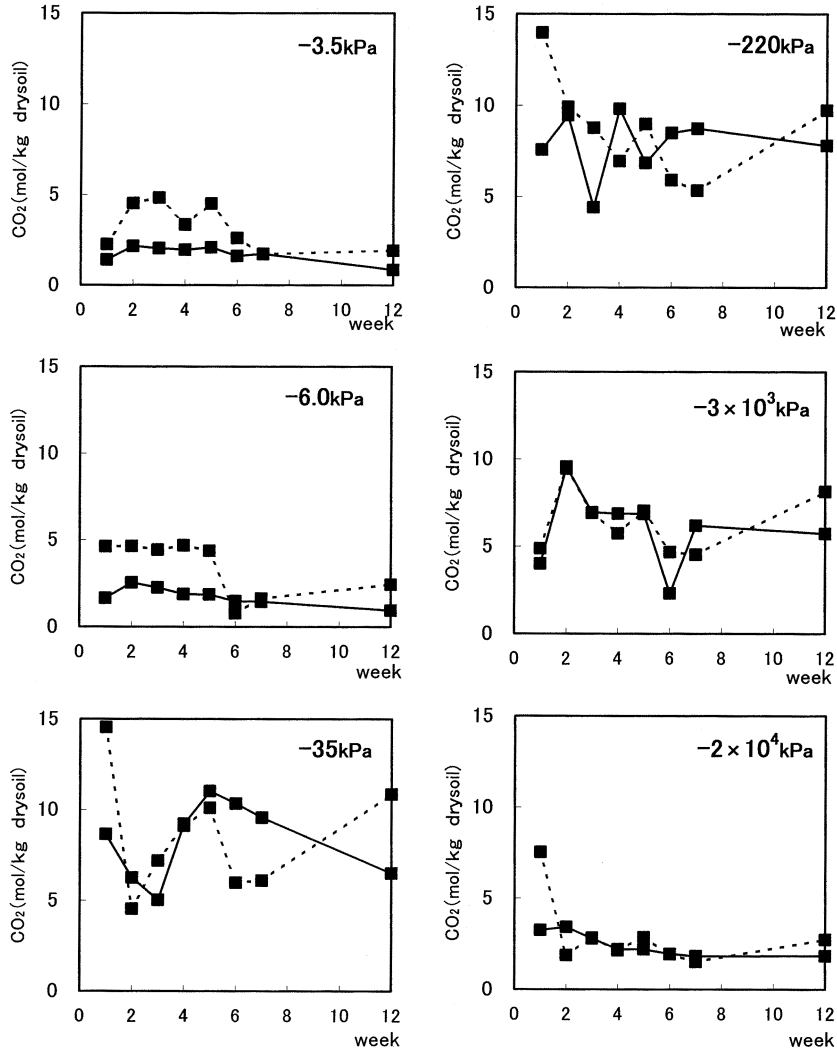


図-2 培養時間による土壌呼吸量 ( $\text{CO}_2$ 濃度)の変化

Fig. 2 Changes in soil respiration ( $\text{CO}_2$  content) in different culture periods.

合には4~6日の培養で活性状態の測定が可能と判断できる。以上より、本研究における土壌呼吸量の測定は、土壌水分状態の違いおよび測定期間の長さから様々な呼

図-3 土壌呼吸量 (CO<sub>2</sub> 濃度) の変化Fig. 3 Changes in soil respiration (CO<sub>2</sub> content).

—: 非攪拌 (without stir), .....: 攪拌 (with stir)

吸活性状態が予測できることを考慮し、土壌培養時間は4日間とした。

### 3.3 各土壌水分状態の土壌培養結果

#### 3.3.1 土壌呼吸量 (CO<sub>2</sub> 濃度)

各水分状態における土壌呼吸量 (CO<sub>2</sub> 濃度) の経時の変化を図-3に示した。非攪拌区のCO<sub>2</sub>濃度は、 $-35 > -220 > -3 \times 10^3 > -2 \times 10^4 > -6.0 > -3.5$  kPa 区の順に値が高く、変化量は $-35 > -220 > -3 \times 10^3 > -6.0, -3.5$  kPa 区の順で大きかった。また、攪拌区は、非攪拌区に比べて高い濃度を示す傾向がみられ、とくに $-3.5$  kPaと $-6.0$  kPa 区の湿潤側では、その影響が大きかった。土壌

基質内のガスの移動は、気相率が高いほど拡散移動性が高まり、浸潤により拡散移動性は低くなる (Penman, 1940)。 $-3.5$  kPa 区や $-6.0$  kPa 区の土壌はペースト状であり、土壌中のガスの移動は、土壌構造をもつ乾燥側よりも小さいことは明らかであり、攪拌区と非攪拌区の差は、通気性の低さが好氣的呼吸を抑制していたことを示した結果と考えられた。 $-35$  kPa 区は、非攪拌区の中で最高濃度を示し、値の変動も最大であった。値は初期から3週目まで大きく低下し、5週目まで増加し、再び12週目までに大きく低下した。 $-220$  kPa 区では多少の変動はあったが、 $5 \sim 10$  mol/kg の比較的高い値を維持

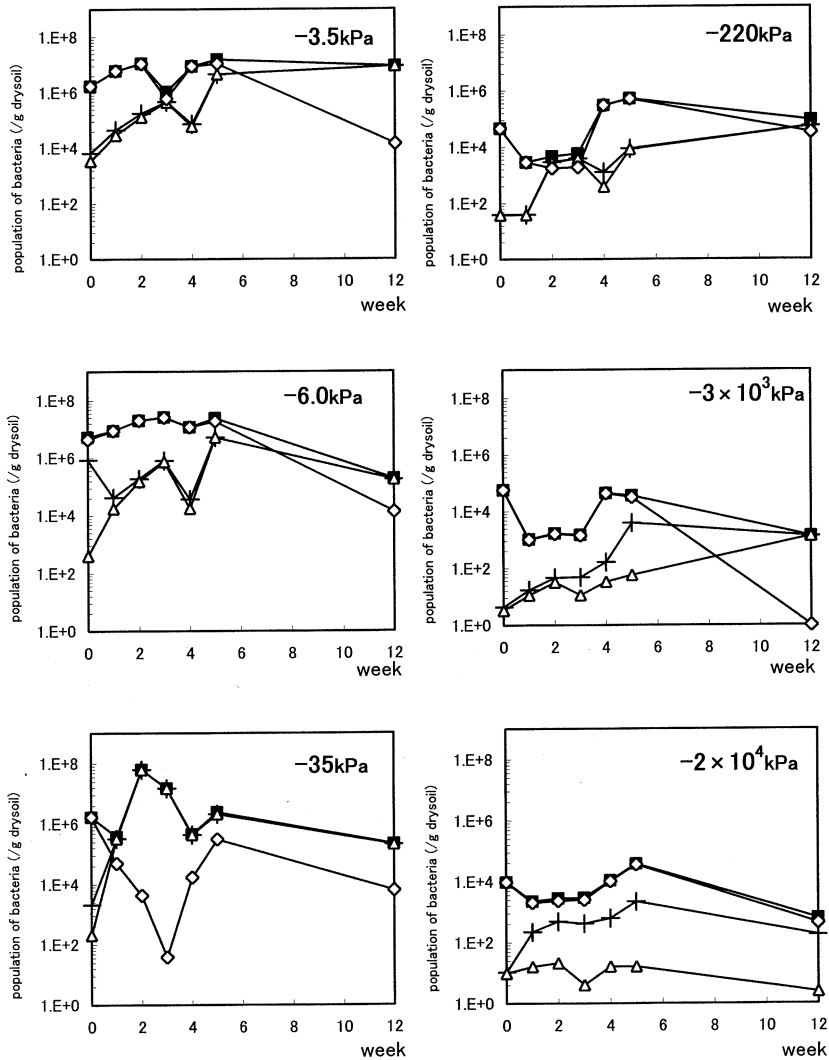


図-4 細菌数の変化

Fig. 4 Changes in population of bacteria.

■: 全菌 (total bacteria)      ◇: グラム陽性菌 (gram-positive bacteria)  
 +: グラム陰性菌 (gram-negative bacteria)    △: 鉄酸化細菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*)

していた。-3×10<sup>3</sup> kPa区は、-220 kPa区に類似した傾向で、やや低い値であった。-2×10<sup>4</sup> kPa区は、最も緩慢な挙動で若干減少傾向にあり、攪拌の影響はほとんどなかった。

3.3.2 各水分状態における微生物組成

各区の細菌数の変化を図-4に示した。-3.5 kPa区では、全菌数は全期間を通じて1×10<sup>6</sup>~2×10<sup>7</sup>/g乾土の高い値を維持し、グラム陰性菌数は、4週目に若干低下したが12週目までに9×10<sup>6</sup>/g乾土に増加していた。この区の優占群は5週目まではグラム陽性菌、12週目ではグ

ラム陰性菌であった。グラム陰性菌の優占種は鉄酸化細菌であった。

-6.0 kPa区は、-3.5 kPa区に類似した微生物組成で、優占群はグラム陽性菌であり、グラム陰性菌の優占種は鉄酸化細菌であった。全菌数は、5週目までは5×10<sup>6</sup>~2×10<sup>7</sup>/g乾土の高い値を維持していたが、12週目には2×10<sup>5</sup>/g乾土まで減少した。グラム陰性菌数は、1週目と4週目に若干低下したが、5週目までは4×10<sup>4</sup>~5×10<sup>6</sup>/g乾土を維持し、12週目には2×10<sup>5</sup>/g乾土に減少した。

-35 kPa 区では、全菌数は、 $2 \times 10^5 \sim 6 \times 10^7$ /g 乾土の高い値を示した。優占群は、グラム陰性菌であり、優占種は鉄酸化細菌であった。鉄酸化細菌の増殖率は全区中で最も高かった。グラム陽性菌は、鉄酸化細菌数に反比例する傾向にあった。グラム陰性菌数は、2 週目までに  $2 \times 10^3 \sim 6 \times 10^7$ /g 乾土まで急激に増加してピークをとり、後に  $2 \times 10^3 \sim 2 \times 10^6$ /g 乾土で安定した。

-220 kPa 区では、全菌数は、 $3 \times 10^3 \sim 5 \times 10^5$ /g 乾土の中程度の数を維持していた。優占群は、グラム陽性菌であるが、グラム陰性菌も多かった。グラム陰性菌では鉄酸化細菌が優占し、全期間中に  $40 \sim 6 \times 10^4$ /g 乾土まで増加した。グラム陽性菌は、-35 kPa 区と同様に鉄酸化細菌数に反比例する傾向にあった。

$-3 \times 10^3$  kPa 区では、全菌数は、 $1 \times 10^3 \sim 6 \times 10^4$ /g 乾土のやや低い値を維持していた。優占菌群は、グラム陽性菌であり、-35 kPa 区や-220 kPa 区と同様に鉄酸化細菌数に反比例する傾向にあった。グラム陰性菌は、全期間中に  $4 \sim 4 \times 10^3$ /g 乾土まで増加し、鉄酸化細菌が優占していたが、3 週目からは他の細菌が増加していた。

$-2 \times 10^4$  kPa 区では、全菌数は、 $2 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ /g 乾土の少ない値を維持し、12 週目には  $6 \times 10^2$ /g 乾土に減少した。優占菌群はグラム陽性菌であり、5 週目までは  $2 \times 10^3 \sim 4 \times 10^4$ /g 乾土を維持していたが、12 週目には  $4 \times 10^2$ /g 乾土まで激減した。グラム陰性菌は鉄酸化細菌以外の菌が優占しており、鉄酸化細菌の増殖はほとんどみられなかった。

### 3.3.3 希釈平板に発現したコロニーについて

YG 培地には好気性および通性嫌気性とみられる細菌のコロニーや、放線菌とみられるコロニー、真菌の菌糸が生育し、CV を添加した YG 培地にも細菌、放線菌、真菌が認められたが、真菌は YG 培地よりも少なく、CV に濃く染色される細菌と薄く染色される細菌が存在した。また同様に水分状態によってそれらの構成は異なっていた。

### 3.4 土壌 pH

pH の経時変化を図-5 に示した。pH の低下は、 $-35 > -2 \times 10^4 \sim -220 > -6.0$ 、-35 kPa 区の順に速かった。-35 kPa 区の低下は著しく、3 週目には各区中最低値である pH 2.0 をとり、停滞傾向に入った。4 週目以降では、徐々に pH が上昇した。-220  $\sim$   $-2 \times 10^4$  kPa 区は、3 週目までに pH 3.0 の値をとるまで低下し、停滞傾向に入った。-35 kPa 区および-6.0 kPa 区は、5 週目には pH 4.0 付近で停滞傾向に入った。本実験では、土壌水分調整のための乾燥時間は、水分量の多い区からそれぞれ 0, 3, 11, 18, 22, 27 時間と比較的短時間であった。調整後の各区の pH は-3.5、-6.0、 $-2 \times 10^4$  kPa 区が pH

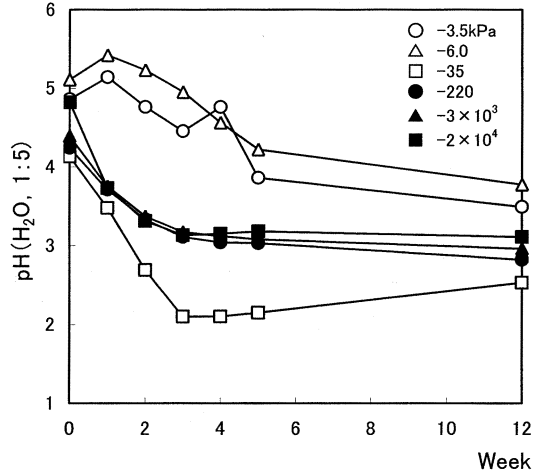


図-5 土壌 pH の変化

Fig. 5 Changes in pH of soil solution.

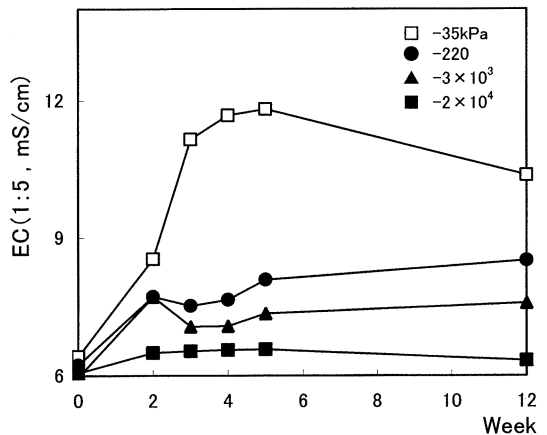


図-6 土壌 EC の変化

Fig. 6 Changes in EC of soil solution.

5.0 付近、-35  $\sim$   $-3 \times 10^3$  kPa 区が pH 4.0 付近であり、-35 kPa 区は水分調整期間での酸性化が速かった。

### 3.5 土壌 EC

-35 kPa 区および-6.0 kPa 区は、濾液量の不足から測定は行わなかった。-35 kPa 区は、著しく上昇し 4 週目には停滞傾向を示し、-220 kPa 区および $-3 \times 10^3$  kPa 区は 2 週目までに上昇した後、停滞傾向に入った(図-6)。 $-2 \times 10^4$  kPa 区では EC 値はほとんど上昇しなかった。これまでの本土壌による実験から、土壌 pH と土壌 EC は比例関係にあり、-35 kPa および-6.0 kPa 区の EC 値は、これらの区の pH 値から $-2 \times 10^4$  kPa 程度と推定された。

## 4. 考 察

### 4.1 CO<sub>2</sub>濃度結果の吟味

−35 kPa 以上の乾燥側では CO<sub>2</sub> 濃度の値の大きさおよび変動性の大きさから、微生物の呼吸が反映されていたと判断した。湿潤側の −3.5 kPa 区と −6.0 kPa 区では、CO<sub>2</sub> 発生量、変動性がともに小さく、土壤水への CO<sub>2</sub> 溶解の影響も考えられたが、特異的な土壤 pH の低下が認められず、土壤 EC が最低でも 6 mS/cm と高い値であると推定され、イオン強度が高いために電離度は低いことから、CO<sub>2</sub> の土壤水への溶解の影響は小さいと考えた。したがって、本実験による CO<sub>2</sub> の値はいずれも土壤呼吸活性を現していると判断した。

### 4.2 土壤水分状態と好氣的呼吸活性、CO<sub>2</sub> 固定活性

CO<sub>2</sub> 濃度が高く、値の変動が生じていた −35 kPa ~  $2 \times 10^4$  kPa 区の全細菌データと CO<sub>2</sub> 濃度を比較したところ、−35 kPa ~  $2 \times 10^4$  kPa 区の全菌数および −35 kPa ~ −220 kPa 区の鉄酸化細菌数と CO<sub>2</sub> 濃度の関係に若干の相関がみられた (図-7, 図-8)。CO<sub>2</sub> 濃度は、全菌数とは正の相関、鉄酸化細菌とは負の相関があり、土壤からの CO<sub>2</sub> 発生 (好氣的呼吸) には全菌が、CO<sub>2</sub> の消費 (炭酸固定) には鉄酸化細菌が関係していることが示された。ここで、本実験での全菌数は【グラム陽性菌 + グラム陰性菌 + 鉄酸化細菌】であり、−35 kPa 以外はグラム陽性菌が優占群であり、グラム陰性菌数が多い −220 kPa 区までの湿潤側ではグラム陰性菌の優占種は鉄酸化細菌であった。これより、好氣的呼吸は主にグラム陽性菌が行い、炭酸固定は主に鉄酸化細菌の働きによるものと考えた。炭酸固定は、供試土中に多く棲息すると考えられる硫黄酸化細菌も行すが、今回は全て鉄酸化細菌によるものとして扱った。

−3.5 kPa および −6.0 kPa 区では、グラム陽性菌は多く棲息していたが増殖率は低く、鉄酸化細菌は −35 kPa 区に次ぐ増殖率を示していた。また、他の区に比べて土壤が嫌氣的状態にあったことから、グラム陽性菌の好氣的呼吸活性は低く、鉄酸化細菌による炭酸固定が進行し、CO<sub>2</sub> 濃度は一様に低くなっていたと考えた。

−35 kPa 区は、鉄酸化細菌の優占率が高く、最も鉄酸化細菌の炭酸固定活性を強く反映していると考えられた。2週目の CO<sub>2</sub> 量の低下は、鉄酸化細菌数がこの時に最大であることから、個体数の多さに由来した現象と判断した。また、鉄酸化細菌の増殖につれてグラム陽性菌は減少しており、好氣的呼吸による CO<sub>2</sub> 発生量は減少していたと考えられた。つまり、CO<sub>2</sub> の発生が減少する一方で消費が増大し、CO<sub>2</sub> 濃度は 2週目に急激に低下して最低値をとったと考えられた。5週目では CO<sub>2</sub> 濃度は増

大してピークとなり、その後は減少した。この間、鉄酸化細菌は減少した後に安定期に入っており、CO<sub>2</sub> 固定量は減少して低い値で安定したと推察した。グラム陽性菌は 3~5 週目に急激に増加し 12 週目にはやや減少していた。この時期には鉄酸化細菌による炭酸固定量は少なく、グラム陽性菌の好氣的呼吸量が CO<sub>2</sub> 濃度変化に強く現れていたと考えられた。このように、−35 kPa 区での CO<sub>2</sub> の挙動は、細菌の増減における炭酸固定量や CO<sub>2</sub> 発生量の変化でよく説明できた。

−220 kPa 区の微生物組成は、菌数は少ないが −3.5 kPa 区や −6.0 kPa 区に類似していた。CO<sub>2</sub> 濃度はやや減少傾向にあったが比較的高い値を維持していた。この区の優占菌群はグラム陽性菌であった。これらの菌が 5 週目まで増加していたために呼吸量が多く、高い CO<sub>2</sub> 濃度を維持していたが、全期における鉄酸化細菌の緩やかな増加の影響で若干の減少傾向を示したと考えられた。

−3 × 10<sup>3</sup> kPa 区では、全菌数は少なく鉄酸化細菌の増殖率も低いが、微生物組成の傾向は −220 kPa 区に類似していた。CO<sub>2</sub> 濃度は、−220 kPa 区よりやや低い値で安定していた。これは、グラム陽性菌の増殖率が低く呼吸量が少なかったためと考えられた。2週目以降での CO<sub>2</sub> 濃度の緩やかな低下は、全菌数が 4 週目に最大値をとり、2週目以降で鉄酸化細菌以外のグラム陰性菌が優占し増殖していることから、鉄酸化細菌の緩やかな増加と鉄酸化細菌以外のグラム陰性独立栄養細菌 (硫黄酸化細菌の可能性もある) による炭酸固定量の増加によるものと考えた。

−2 × 10<sup>4</sup> kPa 区の微生物組成は、全菌数は −3 × 10<sup>3</sup> kPa 区よりもやや少なく、より安定していた。鉄酸化細菌数は最も少なく増殖もほとんどなく、鉄酸化細菌以外のグラム陰性菌はどの系よりも多かった。CO<sub>2</sub> 濃度は最も低く、攪拌区の初期値が高い以外は変化量もごく僅かであった。この系における微生物の好氣的呼吸活性は −3 × 10<sup>3</sup> kPa 区よりも低く、この水分状態では、どの細菌も増殖が困難であり生命を維持する限界の環境であることが示唆された。

以上のように、CO<sub>2</sub> 濃度の変化は、鉄酸化細菌の炭酸固定量とグラム陽性菌による呼吸量によってほぼ説明できた。また、他の細菌の呼吸活性や増殖活性は、鉄酸化細菌の増殖量 (あるいは pH) に大きく影響を受けていることが判った。

ある土壤水分で土壤からの CO<sub>2</sub> 発生量が最大になる現象は、他の土壤においても観察されている。Mielnich (2000) は、森林土壌において CO<sub>2</sub> は温度の上昇に伴って大気へ放出され、ある土壤水分 (0.2~0.3 m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup>) で放出の最大値が現れると報告し、瀬戸 (1980) は、林内土



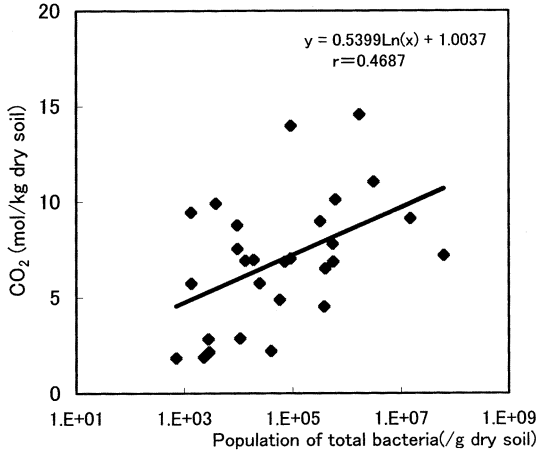


図-7 CO<sub>2</sub>濃度と全菌数の関係（-35 kPa～-2×10<sup>4</sup> kPa）

Fig. 7 Relation between CO<sub>2</sub> content and population of total bacteria (-35 kPa～-2×10<sup>4</sup> kPa).

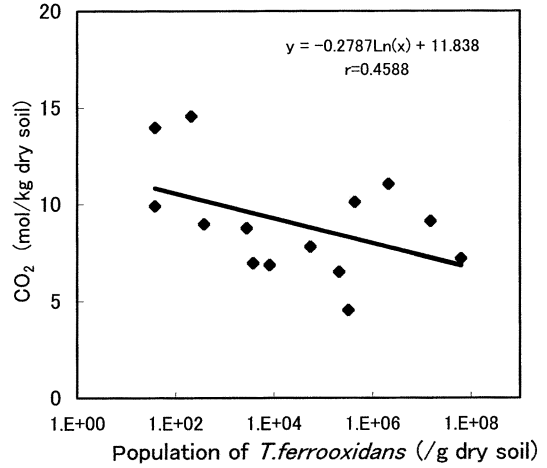


図-8 CO<sub>2</sub>濃度と鉄酸化細菌数の関係（-35 kPa～-220 kPa）

Fig. 8 Relation between CO<sub>2</sub> content and population of *Thiobacillus ferrooxidans* (-35 kPa～-220 kPa).

表-3 細菌の呼吸活性度

Table 3 Degree of respiration per bacteria

week	-3.5 kPa	-6.0 kPa	-35 kPa	-220 kPa	-3×10 <sup>3</sup> kPa	-2×10 <sup>4</sup> kPa
0	0.13	0.09	0.86	30	8	79
1	0.08	0.05	1.21	345	898	84
2	0.04	0.02	0.01	188	412	102
3	0.31	0.02	0.06	120	386	74
4	0.05	0.04	2.24	3	16	27
5	0.00	0.01	0.46	1	19	6
12	0.01	0.50	3.04	9	426	296

(CO<sub>2</sub> content)/(Population of total bacteria)×10<sup>5</sup>

壤では含水比 0.6～1.2 kg/kg で、水田の上層土壌では 0.8～1.5 kg/kg で CO<sub>2</sub> 放出速度が高まることを示している。また、Sakamoto (1994) は、圃場土壌を供試した結果から、微生物バイオマスの種類構成が呼吸活性と微生物バイオマス量との関係に大きな影響を及ぼす要因のひとつであると述べている。これらは、関与している微生物は異なるが、酸性硫酸塩土壌における上記の結果を裏付けていると思われる。

#### 4.3 土壌水分状態と細菌の好氣的呼吸活性、炭酸固定活性

CO<sub>2</sub> 発生量をこれと相関が認められた全菌数で除し、簡易のため 10<sup>5</sup> 倍した値を菌の好氣的呼吸活性度として示すと、-3×10<sup>3</sup>>-220>-2×10<sup>4</sup>>-35>-6.0、-3.5

kPa 区の順になった（表-3）。乾燥側で菌の好氣的呼吸活性度が高い理由は、炭酸固定を行う鉄酸化細菌が少なく（図-4）、CO<sub>2</sub> の消費が少ないことに加え、乾燥側では好氣的従属栄養性の細菌群の棲息割合が大きく、CO<sub>2</sub> の生成量が多いためと推察した。-2×10<sup>4</sup> kPa 区では菌の好氣的呼吸活性度は低くないが、菌数が少ないために CO<sub>2</sub> 発生量が低かったと考えられた。

CO<sub>2</sub> 濃度が前回測定値よりも低下していたものについて、これを鉄酸化細菌数で除し、簡易のため 10<sup>4</sup> 倍し鉄酸化細菌の炭酸固定活性度として比較すると、表-4 のようになった。これより、鉄酸化細菌の炭酸固定活性度は、乾燥に伴い高まることが示された。一方、乾燥側では鉄酸化細菌の増殖活性は低く、鉄酸化細菌が増殖に用いた

表-4 鉄酸化細菌の炭酸固定活性度

Table 4 Degree of CO<sub>2</sub> fixation per *Thiobacillus ferrooxidans*

week	-3.5 kPa	-6.0 kPa	-35 kPa	-220 kPa	-3×10 <sup>3</sup> kPa	-2×10 <sup>4</sup> kPa
0	—	—	—	—	—	—
1	—	—	0.3	1060	—	3562
2	—	0.01	—	4	794	—
3	0.03	—	—	5	1048	1677
4	—	0.2	—	—	—	—
5	0.01	0.005	—	3	30	414
12	0.001	0.05	0.2	—	8	1485

(Decrease of CO<sub>2</sub>)/(Population of *T. ferrooxidans*)×10<sup>4</sup>

— ; increase of CO<sub>2</sub>

炭酸固定量は減少していたと考えられる。-35 kPa以上の乾燥に伴い鉄酸化細菌以外のグラム陰性菌が増加していたことを考慮すると、グラム陰性・化学合成独立栄養性の細菌が増殖し、全体の炭酸固定量が増加していた可能性もある。鉄酸化細菌の炭酸固定活性度に関しては、今後のさらなる検討が必要である。

以上の結果より、湿地の排水によるCO<sub>2</sub>発生(Hicks *et al.*, 2002)について、植物体の影響を除いた土壤微生物の影響のみを考慮した場合、土壤水分状態-35~-220 kPa (pF 2.55~3.35)で維持される時間が長いと、微生物の好氣的呼吸により急激に大気中のCO<sub>2</sub>濃度が上昇する危険性があること、鉄酸化細菌のような炭酸固定を行う細菌の増殖によりCO<sub>2</sub>濃度上昇を抑制する可能性があることが示唆された。

#### 4.4 土壤水分状態と土壤 pH, EC

pHの低下は、前報(上野ら, 2002b)と同様の傾向が得られ、-35 kPa区だけが最低値 pH 2.0まで低下した。これは、水分調整時に最も酸が生成されたこと、この水分状態で鉄酸化細菌の優占率が常に高かったこと、鉄酸化細菌の増殖率が高かったこと、の三点が大きく影響していたと考えられた。酸性硫酸塩土壌では、-35 kPa区の土壤水分状態が鉄酸化細菌の増殖に最適であるため、主な酸性原因物質であるパイライトの酸化剤であるFe<sup>3+</sup>が大量に生成され、これにより鉄酸化細菌や硫黄酸化細菌が土壌中で次々と増殖し、結果として土壤 pHが急激に低下して耐酸性のない生物群(本報ではグラム陽性菌群)が衰退したと推察した。

ECはpHの低下に伴い上昇していたが、とくに-35 kPa区はpHの低下が著しく、濾液の酸化鉄イオンの着色が見られた。-35 kPaでは、鉄酸化細菌に由来するFe<sup>3+</sup>の大量の存在により土壌の酸性化が急速に進行したと考えられた。

## 5. おわりに

酸性硫酸塩土壌の乾燥過程における土壤水分状態の変化が土壤呼吸活性に与える影響を把握するため、6段階に水分調整を行った土壌を用いて、土壤培養による土壤呼吸量、微生物組成、土壤 pH・ECの変化を室内実験により追跡したところ、以下の事実が明らかとなった。

1. -35~-220 kPa (pF 2.55~3.35)の土壤水分領域で土壤呼吸量(CO<sub>2</sub>発生量)が多い。
2. 土壌からのCO<sub>2</sub>発生量は、全菌数(グラム陽性菌)に比例し、鉄酸化細菌数に反比例する。
3. 鉄酸化細菌の増殖に最適な環境は、土壤水分状態-35 kPa (pF 2.55)であり、-2×10<sup>4</sup> kPa (pF 5.31)では鉄酸化細菌は増殖しない。
4. 酸の生成量は、鉄酸化細菌の初期棲息数ではなく増殖率、細菌の活性そのものに影響を受ける。
5. 酸の生成が激しい土壤水分状態(-35 kPa; pF 2.55)では鉄酸化細菌が強力な優占種であり、鉄酸化細菌とグラム陽性菌群の増殖は、反比例の関係にある。

## 謝 辞

本論をまとめるにあたり、実験協力を頂いた岡山大学環境理工学部土壌圏管理学専攻学生の皆様、試料採取にあたりお世話になりました島根県農林水産部農地整備課の浜崎修司氏に重ねて厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- Anderson, J.P.E. (1982): Methods of Soil Analysis, Part 2, 2nd ed., pp. 831-871, American Society of Agronomy, Inc., Madison.
- 足立忠司・松本康夫・原 徹夫 (1992): 土壤水分から見た干拓地土壌の酸性硫酸塩土壌化過程. 農土論

- 集, **162** : 89-96.
- 千田 信 (1996) : 微生物資源工学. コロナ社, 東京.
- Darrell Kirk Nordstrom, *et al.* (1982) : Acid Sulfate Weathering, SSSA Special Publication Number 10, pp. 37-56, Soil Science Society of America, Wisconsin.
- Dent, D.L. and Pons, L.J. (1995) : A world perspective on acid sulphate soils. *Geoderma*, **67** : 263-276.
- Hicks, W., Bowman, G. and Fitzpatrick, R. (2002) : The geochemistry of Australian tropical acid sulfate soils and their environmental hazard. 17th. WCSS, World Congress of Soil Science 2002 Paper No. 238.
- 木村真人・和田秀徳・高井康夫 (1984) : 水稻根圏における代謝活性. *土肥誌*, **55** (4) : 338-343.
- 村上英行 (1961) : 過酸化水素による干拓地土壌中の可酸化性イオウの半定量法. *土肥誌*, **32** (6) : 276-279.
- 中山大樹 (1996) : 環境調査のための微生物学. pp. 164-178, 講談社サイエンティフィック, 東京.
- Penman, H.L. (1940) : Gas and vapor movement in soil I. the diffusion of vapors through porous solids, *J. Agric. Sci.*, **30** : 437-462.
- Sakamoto, K. and Oba, Y. (1994) : Effect of fungal to bacterial biomass ratio on the relationship between CO<sub>2</sub> evolution and total soil microbial biomass. *Biol. Fertil. Soils*, **17** : 39-44.
- Sugahara, K. and Katoh, K. (1992) : Comparative Studies on the Decomposition of Rice Straw and Straw Compost by Plant Pathogens and Microbial Saprophytes in Soil I. Similarity in Respiration between the Pathogenes and Saprophytes, *Soil Science and Plant Nutrition*, **38** : 113-122.
- 高橋 甫・斎藤日向・手塚泰彦・水島昭二・山口英世 共訳 (1997) : 微生物学第5版 (下). 培風館, 東京.
- 上野 薫・足立忠司・成岡 市 (2002a) : 児島湖底堆積土の酸性化過程における温度・水分条件の影響. *土壌の物理性*, **91** : 15-23.
- 上野 薫・足立忠司・成岡 市 (2002b) : 酸性硫酸塩土壌の乾燥過程が微生物活性および鉄の形態に与える影響. *土壌の物理性*, **91** : 49-57.
- 米田茂男 (1958) : 干拓地土壌, 肥料に関する総説 (I), *土肥誌*, **28** (10) : 34-38.

受稿年月日 : 2002年11月28日

受理年月日 : 2003年5月29日