

## 湛水状態土壌の微小部位における物質変化の解析第2報

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者	和田, 秀徳
巻/号	47巻4号
掲載ページ	p. 109-113
発行年月	1976年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 湛水状態土壤の微小部位における物質変化の解析 (第2報)

硫酸還元ならびに TB および NTB の還元\*

和田 秀 徳\*\*

前報では、湛水状態にある土壤の個々の微小部位で進行している物質変化を追跡するために、新たに考案された実験方法を記し、それを用いて見出された2,3の結果について論じた。本報告では、前報に引き続き、湛水状態土壤の微小部位での硫酸還元反応の解析および脱水素酵素反応の再検討を実施した結果を述べたい。

### 実験方法

1) 供試土壤 前報<sup>1)</sup>と同じく、長野県農業試験場水田および富山県入善町水田の各作土層より採取、調製した風乾細土を実験に供した。

2) 保温静置および観察方法 前報<sup>1)</sup>に準じて、炭酸カルシウム 50 mg と風乾細土 5 g との混合物に、硫酸アンモニウム 2.5 mg、あるいは後述の TTC 類縁化合物 10 mg を加え、それぞれを蒸留水 10 ml を用いてペトリ皿中に湛水状態で封入した。これを 30°C の恒温器内に保温静置して、土壤の微小部位で生じる物質変化を顕微鏡下で経時的に観察した。

TTC は還元される酸化還元電位が著しく低く、還元生成物である Formazan の結晶粒子が大きく、かつ脂溶性であるために、組織化学の試薬として好ましくないとされ、TTC に代るいくつかの類縁化合物が合成されている<sup>2)</sup>。湛水下保温静置した土壤に TTC を用いた場合には、Formazan の結晶粒子が粗い事実は、Formazan が生成沈着した土壤の微小部位および微生物自身を低倍率の顕微鏡で観察することを可能にし<sup>1)</sup>、また、TTC の還元される電位が著しく低い事実は、湛水土壤中で生成された還元力を持った物質の非生物的反応で TTC が還元される機会を少なくしていると考えられる。しかし土壤の微小部位における物質変化の解析に TTC を適用する実験に対しても、脱水素酵素活性の高い部位を高倍率の顕微鏡を用いてより正確に同定したり、還元状態の発達が悪い土壤中で感度良く脱水素酵素活性の高い部位を検出したりする場合には、TTC のみを使用していたのでは不満足な結果しか得られないことが予想される。そこで生化学分野で開発された TTC 類縁化合物の中か

ら TB(3,3'-(3,3'-dimethyl-4,4'-biphenylene) bis[2,5 bis(*p*-nitrophenyl)-2H-tetrazolium chloride]) および NTB(3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-biphenylene) bis[2-(*p*-nitrophenyl) 5-phenyl-2H-tetrazolium chloride]) を選んだ。しかし TB は冷水に極めて溶けにくかったので、あらかじめ温水に溶かし、その溶液が冷却した後に土壤に加えた。また TB, NTB とともに 10 mg 以上を 10 ml の蒸留水に溶解させることが不可能だったので、これらの物質を 10 mg 以上添加する必要のある長野土壤を、TB あるいは NTB を添加する実験から除外した。

### 実験結果および考察

#### 1) 硫酸根の還元

硫酸イオンが湛水土壤中で硫酸還元菌の作用により硫化水素に還元されること、およびこの硫化水素が主として第1鉄と結合して溶解度の低い黒色の硫化鉄となって沈殿することは広く知られている事実である。古坂<sup>3)</sup>は、還元状態が発達した土壤中には水溶性の第1鉄および2価マンガンの多量に溶存しているので、硫化物が沈殿する部位は硫酸還元が行なわれている部位に一致すると主張した。またこの推定に基づいて、古坂<sup>3)</sup>は放射性硫黄で標識した硫酸ナトリウムを土壤に加え、湛水下保温静置後、土壤のオートラジオグラフィを撮影して、0.166 mm 程度の大きさの小斑点が土壤中に無数に分布していることを見出し、これが硫酸還元菌の存在位置を示唆していると考察した。

ところで本実験で採用した方法によって湛水下保温静置した土壤を顕微鏡で観察した結果は以下のようであった。すなわち入善、長野両土壤のいずれにおいても、Formazan 生成の時期<sup>1)</sup>よりもかなりおくれ、土壤中に黒色の斑紋が現われてくるのが認められた。硫酸アンモニウムを添加しないで湛水下保温静置した土壤には、後にふれるような特殊な部位を除き、このような黒色の斑紋を見出しにくかったので、この黒色の斑紋は硫化鉄が多量に沈殿している部位に相当していると判断された。またこの黒色の斑紋はかなり特異的な土壤部位に位置していることを見出された。たとえば、黒色の斑紋はまず主として植物遺体上に現われた。しかも植物遺体の種類により黒色の斑紋の現われ方に相違が見られた。最も早

\* 本報告の要旨は昭和 47 年度日本土壤肥料学会関東支部大会および昭和 48 年度日本土壤肥料学会大会にて発表した。

\*\* 東京大学農学部 (東京都文京区弥生 1-1-1)

昭和 49 年 11 月 8 日受理

日本土壤肥料学雑誌 第 47 巻 第 4 号 p. 109~113 (1976)



写真 1 植物遺体上の黒変部位  
(長野土壤, 硫酸添加区, 保温静置 19 日後) ×40

く黒色の斑紋が現われ、比較的短期間のうちに斑紋の形成が終了し、その後斑紋の形状がほぼ一定していた植物遺体は、管状であって斑紋以外の部位は淡色を呈しており、皮層の多くを消失した植物根であると推定された。この植物遺体上での黒色の斑紋の出現部位は、管の長軸方向に沿った幾本かの断続した筋、および二次根が脱落した跡の孔の周囲をめぐる丸い環をなしていた(写真1)。この種の植物遺体で硫化鉄が比較的速やかに生成され、かつその生成部位がこのような特殊な形状を示している原因については、この実験のみでは必ずしも明らかではないが、黒色の斑紋が形成されていない時期にこの種の植物遺体の形態を調べると、上述した硫化鉄の生成部位が赤褐～黄褐色を呈していた。したがって、この部位には活性の高い第2鉄が含まれており、土壤溶液に溶存している硫化水素がこの第2鉄と反応して硫化鉄を生成したと推定することができる。本実験で採用した土壤の観察方法に準じて、土壤に硫化アンモニウムを添加し、土壤中で硫化鉄が生成しやすい部位を調べた実験によって、以上のような推定を支持する結果が得られた。すなわち裏返しにしたペトリ皿の蓋に、風乾細土 5g、粉末炭酸カルシウム 50mg を取り、硫化アンモニウム溶液 (1:50) 10ml を加え、これを直ちに真空デシケーター中で減圧下に放置し、過剰の硫化アンモニウムと土壤に含まれていた空気とを除去した後に、ペトリ皿の底を土壤の上に載せ、土壤を顕微鏡下で観察した。その結果、上述したような特異の形状の黒色の斑紋が植物遺体上に形成されていることが確かめられた(写真2)。

植物遺体の中には、土壤を湛水下長期間(1ヵ月以上)保温静置した後も、黒色の斑紋が全く現われてこないものがあった。この種の植物遺体には2種類あり、その1つは淡色で管状ないしは糸状の形態であり、他は褐色を呈し、厚みのある長方形の形態を示していた。前者の管状の植物遺体は、黒色の斑紋が現われやすい上述した

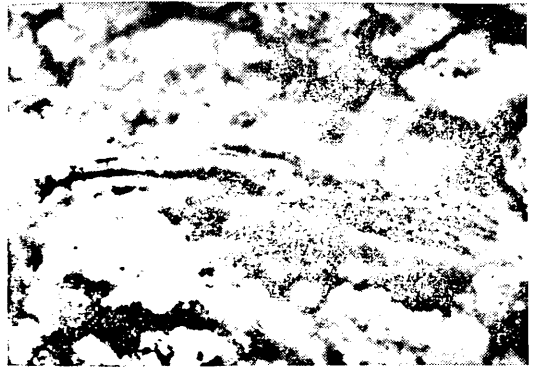


写真 2 植物遺体上の黒変部位  
(入替土壤, 硫化アンモン添加区) ×40

植物遺体に類似していた。しかし黒色の斑紋が現われにくいこの種の植物遺体には、保温静置初期に赤褐～黄褐色の部位の存在が認められなかった。したがって植物根の腐朽が進み、分解されにくい外皮のみが残されるに至ると、その上を覆っていた鉄も失われ、それに伴って硫化鉄の沈澱も起こりにくくなると考えられる。また淡色で糸状の植物遺体は、腐朽した植物根から脱落した中心柱であると判断された。中心柱は植物根諸組織の中でも分解しにくく、かつ鉄によって汚染される機会が少ないことが認められている<sup>9)</sup>ので、この中心柱についても淡色管状の植物遺体について上述したことがほぼ同様にあてはまると思われる。なお褐色を呈し、厚みのある長方形の植物遺体の起源、およびこれに硫化鉄が沈着しにくい原因については現在のところ不明である。

ネマトーダあるいはミミズと思われる生物の遺体が土壤中に混入している場合には、その消化管の部位が比較的速やかに黒変することが認められた。

これまでに述べてきたように、黒色の斑紋の初期の出現は、ほとんど生物遺体に局限されていたが、場合によっては、生物遺体の周囲にも黒色の斑紋がハロー(halo)状に広がっていることが見出された。このハローの広がっている範囲は生物遺体の種類によって異なっており、生物遺体に含まれている易分解性有機物量が多いほど広がる傾向があった。たとえば腐朽の程度がかなり高いと思われる植物遺体では、それに近接している土壤粒子がほとんど黒変しておらず、腐朽の程度がより低いと思われる植物遺体では、それに接触している土壤粒子の一部が黒変しており、腐朽の程度がさらに低いと思われる植物遺体では、植物遺体を覆っている土壤粒子の薄い層(0.1~0.2mm)全体が黒変していた。これに対して重物の遺体の周囲には、しばしば0.3~0.4mm程度の前に広がったハロー状の部分黒変していた。これらの事実は、活発な微生物分解を受けている生物遺体からは、

その周囲へ向かって硫化水素が拡散していることを示していると思われる。

上述した推定を支持する結果が、合成した水酸化第2鉄の粉末 30 mg をあらかじめ土壌 5 g に加え、これを上述の方法で湛水状態に保温静置して、硫酸還元反応を調べた実験によって得られた。すなわち水酸化第2鉄を添加していない入善土壌を保温静置した場合には、黒色のハローはもとより、自分自身もほとんど黒変しなかった生物遺体（ある種の植物の種子）が、水酸化第2鉄を添加して保温静置した土壌中では自分自身が多少黒変するとともに、その周囲に幅広い黒色のハローを形成した（写真3, 4）。この事実は、土壌基質に活性な鉄が欠乏している入善土壌では、湛水下、易分解性有機物に富む生物遺体から硫化水素が生成放出されても、硫化鉄が沈殿しにくかったこと、およびこの入善土壌に水酸化第2鉄を加えると、生物遺体で生成され、その周囲に拡散してきた硫化水素が硫化鉄を多量に沈殿し始めることを意味していると言えるであろう。またこの実験結果は、湛水状態の土壌中で硫化鉄が沈殿しやすい部位が、硫酸還元

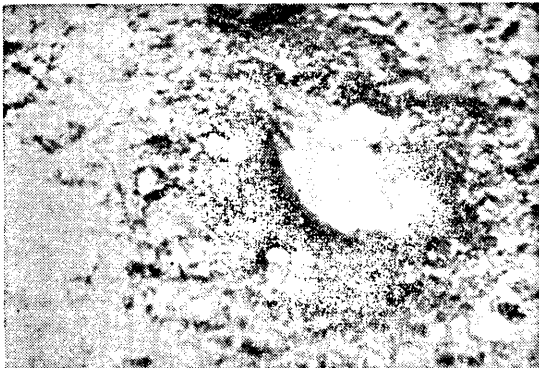


写真3 植物遺体（種子）およびその周囲のハロー状の黒変（入善土壌、水酸化第2鉄および硫酸添加区、保温静置8日後）×16

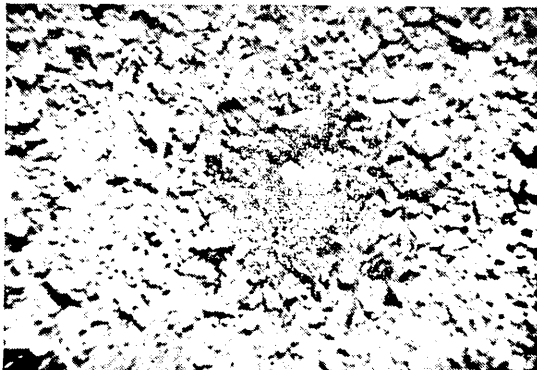


写真4 植物遺体およびその周囲のハロー状の黒変（入善土壌、水酸化第2鉄および硫酸添加区、保温静置20日後）×10

菌のコロニーが存在している部位よりも、活性な鉄が存在している部位によく対応しているとする前述した推論をも支持していると考えられる。事実、生物遺体に直接接している土壌部位、あるいはハロー状に黒変した土壌部位を詳細に調べると、その中で特に強く黒変している物体は角張っており、微生物のコロニーというよりも、鉱物粒子を思わせる形状をしばしば示していた。また入善土壌を湛水状態に保温静置している間に、土壌中に混入していた黒雲母が次第に黒変してくる事実も認められた。

これまでに述べてきたことからするならば、易分解性有機物に富む生物遺体は硫酸還元反応の重要な拠点の1つをなしており、そこで生成した硫化水素が、生物遺体自身およびその周囲に分布している活性な鉄と反応して硫化鉄を形成すると結論することができる。

若尾ら<sup>3,6)</sup>も硫酸還元菌の分布が水田土壌の特定の微小部位に局在しやすいことを見出し、この原因を土壌中の硫酸還元菌の基質の不均一な分布に求め、室内実験で土壌の局所に炭水化物を加え、湛水保温静置することによって、炭水化物添加部位を中心として土壌の黒変が著しいことを認めている。また酸性硫酸塩土壌の研究の一環として、土壌中のパイライトの分布と量をマイクロベドロジーの手法を用いて調べた Pons<sup>7)</sup> は、パイライトの大部分が植物遺体上に存在していることを確かめている。したがって硫化物の生成および硫化鉄の沈殿が生物遺体およびその周辺で特に顕著であることは、水田土壌に普遍的に現われる現象であるだけでなく、より広く hydromorphic soils 一般に共通して見られる現象であると思われる。しかしこの現象の詳細な機構の解明については、今後の研究にまつところが多い。たとえば動物遺体の多くは、硫酸アンモニウムを添加した土壌中ではもとより、硫酸アンモニウムを添加していない土壌中でも、自分自身が著しく黒変するとともに、その周囲に幅広い黒色のハローを形成した。また易分解性有機物に富んでいる稲藁を土壌に加えて湛水下保温静置した場合には、まず稲藁に近接している土壌粒子あるいは土壌に元来含まれていた、鉄で汚染されている植物遺体が黒変し、その後かなりの日数がたってから稲藁自身の黒変が開始された（写真5）。この際、稲藁の周辺の土壌粒子が黒変する時期に、しばしば稲藁が赤変（*Rhodotolura* の増殖に起因していると推測される）することが認められた。これらの事実の解析は、現在までのところ、不十分な段階に留まっている。

湛水保温静置が1カ月近くなると、泥状の土壌基質（matrix）の部分も全体として明瞭に黒変してきたが、その中でも黒変の程度が高い部位と低い部位とがあるこ



写真 5 稲葉に近接している植物遺体の黒変  
(長野土壤, 稲葉および硫安添加区, 保温静置 16 日後) ×40

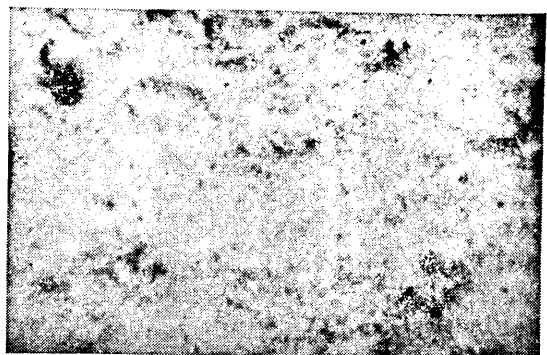


写真 6 基質中の黒変部位  
(長野土壤, 硫安添加区, 保温静置 28 日後) ×40

とが認められた(写真6)。黒変の程度が高い部位は多少とも盛り上っており, その下に細かい粒団ないしは小型の植物遺体が埋没していると思われた。ところで細かい粒団には腐朽が進んだ小型の植物遺体が含まれていると想定されている<sup>9)</sup>。したがってこの実験結果は, 湛水保温静置が長期にわたると, 腐朽が進んだ小型の植物遺体も硫化鉄沈澱反応の拠点としての役割を果たすようになり, ついにはその周囲の土壤粒子までも黒変するに至ることを意味していると考えられる。

前報<sup>1)</sup>において, TTC還元反応の観察結果に基づき, 生物遺体およびその近傍は, 物質変化および微生物活性の高い微小土壤部位を形成しているので, これらを一括して生物遺体圏と呼ぶことが適当であると指摘しておいた。以上に述べてきた硫化鉄の沈澱過程に関する本実験の結果も, この生物遺体圏という概念が妥当であることを示していると思われる。TTC還元の際には, 赤色のFormazanの生成, 沈着が生物遺体に主として局限しており, 生物遺体の周囲に幅広い赤色のハローを見出しにくかったのに対し, 硫化鉄の沈澱の際には, 易分解性有機物に富む生物遺体の周囲に幅広い黒色のハローがしば

しば見出された。TTC還元と硫化鉄生成との間にこのような差異が存在する事実は, 同一の生物遺体についても生物遺体圏の範囲が固定したものではなくて, 注目している反応の種類およびそれに関する微生物活動の程度に応じて, 広がったり, せばまったりするものであることを意味していると思われる。またTTC還元が顕著に現われる生物遺体と, 硫化鉄沈澱の重要な拠点となる生物遺体とは多少とも種類を異にしていることがうかがわれたが, このことは生物遺体圏が成立するか否かも物質変化の種類によってある程度左右されていることを示唆している。

なお硫化鉄で黒変した生物遺体の近くを紡錘形の原生動物が餌を求めて泳いでおり, かつその体内も黒変していることがしばしば観察された。この事実は, 硫化鉄が沈澱するような極めて嫌気的な条件においても, 生物遺体圏の形成に対して原生動物もなんらかの役割を果たしていることを示していると思われる。

## 2) TB および NTB の還元

TBおよびNTBはともに, TTCと同様に, 保温静置数日後には生物遺体において優先的に還元されFormazanを生成し, 生物遺体を青ないし紫色に着色することが認められた。生物遺体の種類に応じてFormazan沈着量が異なる<sup>1)</sup>点についても, TBおよびNTBとTTCとは互いによく類似していた。しかしTBあるいはNTBを用いた場合には, TTCを用いた場合に見られなかった2,3の事実が注目された。その1つは, 保温静置後一定期間, Formazanの生成が進まなかった事実である。このFormazan生成反応におけるlag phaseの期間は, TBではほぼ6日間, NTBで2日間であった。またlag phase終了後の数日間には, Formazanの沈着は生物遺体よりも, いくつかの比較的粗い粒団において明瞭に認められた。すなわち植物遺体の多くがまだ不十分にしか着色していない時期に, ある種の粒団はそれ自身が明瞭に着色するとともに, その周囲に着色した幅広いハローを形成した(写真7)。さらにTBあるいはNTBを用いた場合には, 湛水保温静置期間が長期におよぶと, 土壤全体がほぼ一様に強く着色するようになった。これに対してTTCを用いた場合には, 長期間保温静置後にも, 生物遺体その他の土壤部位に比べて明らかに強く着色しており, その後も引き続いて保温静置を行なうと, ついにはFormazanの赤色が次第に退色してくることが見出された。

TBあるいはNTBとTTCとの間に上述したような差異が認められた主要な原因は, 前2者がTTCに比べて微生物に対する毒性がより強く<sup>9)</sup>, かつ既に指摘して

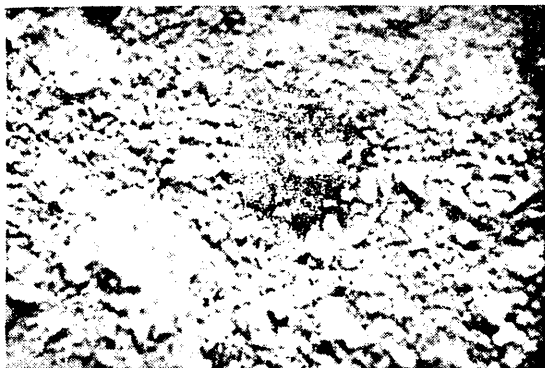


写真7 粒団およびその周囲のハロー状の青変  
(入善土壤, NTB 添加区, 保温静置 14 日後) ×16

おいたように、より還元されやすいことにあると思われる。すなわち TB あるいは NTB を用いた場合には、保温静置直後の土壤中では、これらの試薬の強い毒性のために微生物活動が著しく抑制されており、保温静置数日後に、これらの試薬が土壤粒子に強く吸着されて毒性が弱められたり、あるいはこれらの試薬の耐性菌が増殖してきたりして、初めて Formazan の生成が順調に進行するようになると推定される。また TTC は還元されにくいために、主として微生物の脱水素酵素作用によって還元されるのに対し、TB、NTB はともに微生物の脱水素酵素作用によってはもとより、湛水土壤中生成された水溶性の還元性物質によっても還元されることが予想される。たとえば、TB あるいは NTB を添加して湛水下保温静置した土壤がやがて全面的に着色するようになるのは、この時期になると土壤溶液中に還元性の物質が集積してくることを示唆している。さらに比較的粗い粒団には、微生物にとって特に利用しやすい有機物が含まれており、保温静置初期の湛水土壤中では、この有機物が活発な微生物分解を受け、その際に多量に生成された水溶性の還元性物質が粒団全体に広がり、ついには粒団の外部にまで拡散してゆき、粒団および粒団の周囲に非生物的反応で生成された Formazan が沈着するに至ると推定される。

以上に述べてきたことからするならば、TB、NTB はともに微生物に対する毒性が強いこと、還元性物質によって非生物的にも Formazan を生成しやすいこと、土壤中では青系統の Formazan を識別しにくいことなどのために、これらの試薬を用いて脱水素酵素活性の高い土壤の微小部位を同定しようとする所期の意図は達成されなかったといえよう。しかしその反面、TB あるいは NTB を土壤に添加したことによって初めて、粗い粒団においても微生物活性が高いこと、微生物活性の周囲には還元性の水溶性物質が拡散していることなどを示唆す

る事実が見出されたとともに、微生物の生育を阻害する物質が土壤に加えられた際に、土壤微生物が示す行動の一端を観察することができたと思われる。

## 要 約

前報に引き続き、湛水状態の土壤をペトリ皿中に封入し、土壤の微小部位で起こる変化を経時的に顕微鏡で観察した。この際、土壤にあらかじめ硫酸アンモニウムを加えて硫化鉄が沈殿する部位を解析し、また TB あるいは NTB を土壤に加えて、これらの物質の Formazan が沈着する部位を追跡した。得られた結果を要約すれば以下のようである。

- 1) 易分解性有機物に富む生物遺体は、硫酸還元反応の重要な拠点であり、そこで生成された硫化水素が土壤中を拡散し、生物遺体自身およびその周囲に存在する活性な鉄と反応して硫化鉄を沈殿させることが見出された。
- 2) TB および NTB は微生物に対して毒性があるために、これらの物質を添加して土壤を保温静置すると、一定期間の lag phase を経た後に、生物遺体および比較的粗い粒団で Formazan の生成が優先的に始まった。またこの粒団の周囲に幅広いハローが形成されたが、この事実は微生物活動の活発な部位からは水溶性の還元性物質が拡散してきており、この物質によっても TB および NTB が非生物的に還元されることを示していると推定された。

謝 辞 本研究を行なうにあたり、有益な御助言を賜った東京大学高井康雄教授、実験に御協力いただいた東京大学土壤学研究室の各位に深く感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 和田秀徳：湛水状態土壤の微小部位における物質変化の解析（第1報）。気泡の発生、消失、TTCの還元。土肥誌，45，435～440（1974）
- 2) LISON, L., 今泉正訳：増訂組織化学および細胞化学，理論と方法，p. 242～246，白水社（1962）
- 3) 古坂澄石：水田土壤における硫酸還元菌群の化学的活性について。東北大農研報，19，101～184（1968）
- 4) 和田秀徳：実体顕微鏡による水田土壤の観察（その1）。土肥誌，42，421～428（1971）
- 5) WAKAO, N. and FURUSAKA, C.: Distribution of Sulfate-reducing Bacteria in Paddy Field Soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* (Tokyo), 19, 47～52 (1973)
- 6) 若尾紀夫：水田土壤中における硫酸還元菌の存在様式について。東北大農研報，24，177～222（1973）
- 7) PONS, L. J.: A Quantitative Microscopical Method of Pyrite Determination in Soils, in *Soil Micromorphology*, ed. JONGERIUS, A., p. 401～409, Elsevier (1964)
- 8) 和田秀徳：土壤有機物の物理的分画法，近代農業における土壤肥料の研究，第3集，p. 26～35，養賢堂（1972）
- 9) TENDERDY, R. P., NAGY, J. G. and MARTIN, B.: Quantitative Measurement of Bacterial Growth by the Reduction of Tetrazolium Salts. *Appl. Microbiol.*, 15, 954～955 (1967)