

速報

紫外可視分光光度計による土壤中微生物バイオマス窒素の測定法の検証^{*1}石塚成宏^{*2}

石塚成宏：紫外可視分光光度計による土壤中微生物バイオマス窒素の測定法の検証 九州森林研究 67：72－73，2014 土壤中の微生物バイオマス窒素を測定するためには、クロロホルム燻蒸法で抽出された硫酸カリウム溶液中の全窒素を測定する必要がある。本研究では、ペルオキシ二硫酸カリウムを使用して全窒素を硝酸態窒素に変換した後、硝酸態窒素を紫外可視分光光度計で測定する方法を試みた。その結果、ほぼ従来法と同一の結果を得ることができた。今後は、今回用いた土壌以外でも検証することが必要である。

キーワード：微生物バイオマス窒素、燻蒸抽出法、紫外吸光度法、オートアナライザー

I. はじめに

土壤中の微生物バイオマス窒素を測定する方法として、クロロホルム燻蒸法で抽出された0.5M硫酸カリウム溶液中の全窒素を測定する方法が主流である。従来、ケルダール分解による蒸留法によるか、あるいは全窒素分析計による測定が主として行われていたが、ケルダール分解は非常に煩雑な手続きが必要であるし、全窒素分析計は高価でかつ設置している研究機関が少ないなどの問題があり、手軽に測定できない分析項目であった。

近年、オートクレーブを使用しペルオキシ二硫酸カリウムのアルカリ溶液によって全窒素を硝酸態窒素に変換し、硝酸態窒素を紫外可視分光光度計（以下、分光光度計）で測定する方法が提案された（小森ら，2009）。この方法では従来法の測定値と比例関係にあるもののやや低い値を示すため、一定の係数を掛ける必要がある。この理由として、畑土壌では試料液中の塩素イオンなどの無機態成分が高濃度で存在し、これが有機態窒素から硝酸態窒素への酸化を妨害している可能性を指摘している。一方でこの論文では、ペルオキシ二硫酸カリウム溶液による分解前に10倍希釈して測定した場合、ほぼ1:1の直線関係を示したことを報告している。この論文では、1)畑土壌等に特有の高濃度塩素イオン等による分解時の妨害イオンの問題と2)分光光度計の測定時における高濃度硫酸カリウムの妨害の問題を区分できておらず、実は1)には問題がなく、分解液を10倍程度に希釈すれば2)の問題が無くなり、ほぼ1:1の関係になっていた可能性がある。そこで本研究では熊本県菊池市で採取した森林土壌を用いて、ペルオキシ二硫酸カリウムによる分解液を10倍希釈することにより、換算係数を用いることなく分光光度計による測定が可能かどうかについて検証した。

II. 使用した土壌

熊本県菊池市木護国有林内のスギ・ヒノキ林に設置した斜面上部6ヶ所および斜面下部6ヶ所の計12ヶ所のプロットから、2012

年12月に採取した土壌を使用した。それぞれのプロットの0-10cm、10-30cm、30-60cm深さからサンプルを採取した。サンプルは実験室に持ち帰り、根や礫を除いて2mmのメッシュ篩を通し、実験開始まで4℃の冷蔵庫で保存した。母材は凝灰岩、土壌は褐色森林土または褐色森林土偏乾亜型であった。表-1に使用した土壌の一般の性質を示す。

III. 分析方法

それぞれのサンプルについて2個の100mLの三角フラスコに生土10gずつを量り取り、1個をクロロホルム燻蒸用、もう1個を対照用とした。コック付真空デシケーターにあらかじめアルコールを除去し無水硫酸ナトリウムで脱水したクロロホルムと湿らせた濾紙を入れ、クロロホルム燻蒸用のフラスコを入れて蓋をした後、有機溶媒吸引用の真空ポンプによって減圧した。クロロホルムが沸騰したのを確認してからコックを閉じ、25℃の培養器の中で24時間放置した。対照用フラスコはパラフィルムで蓋をして同じ培養器の中で同時間放置した。培養終了後にクロロホルム燻蒸用フラスコから数回脱クロロホルム処理を行い、試料からクロロホルムを除去した。このフラスコに対照用フラスコにそれぞれ0.5M硫酸カリウム溶液40mLを添加して30分間振盪し、定量濾紙（東洋濾紙，No.6）で濾過して抽出液を得た。

この抽出液中の全窒素量を定量するために、ペルオキシ二硫酸カリウムによる分解を行った。50mL容のガラス製遠沈管に抽出液5mLを入れ、これにペルオキシ二硫酸カリウムの水酸化ナトリウム溶液（坂本・林，1999）5mLを加え、オートクレーブで

表-1. 使用した土壌の一般化学性の範囲

深さ (cm)	全窒素 (mg N g ⁻¹)	全炭素 (mg C g ⁻¹)	NH ₄ -N (mg kg ⁻¹)	NO ₃ -N (mg kg ⁻¹)
0-10	5.4 ~ 9.0	92.6 ~ 162.1	4.6 ~ 9.5	0.0 ~ 17.6
10-30	2.6 ~ 5.6	48.6 ~ 76.3	4.1 ~ 7.0	0.0 ~ 34.5
30-60	0.9 ~ 4.2	14.5 ~ 55.7	3.8 ~ 5.9	0.0 ~ 24.5

NH₄-NおよびNO₃-NはKCl抽出の値

^{*1} Ishizuka, S.: Verification of method for microbial biomass nitrogen analysis in soils using spectrophotometer.

^{*2} 森林総合研究所九州支所 Kyushu Res. Ctr., For. & Forest Prod. Res. Inst., Kumamoto 860-0862, Japan.

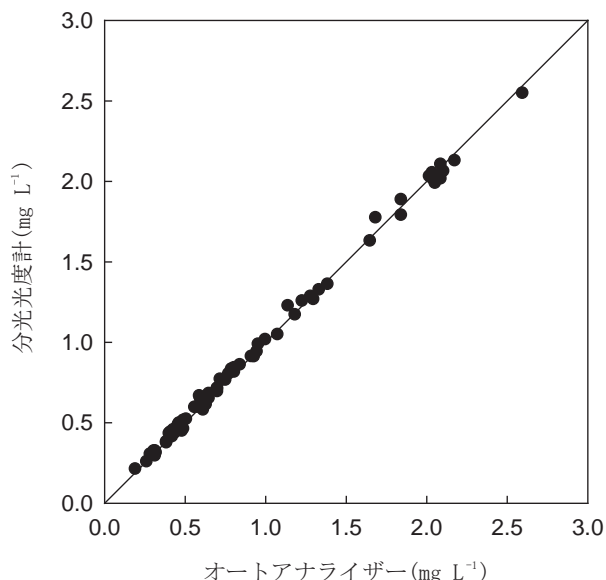


図-1. オートアナライザーと分光光度計による分解液 10 倍希釈液中の硝酸態窒素濃度測定結果の比較
図中の直線は 1:1 の場合の直線

120℃ 30 分の加熱処理を行った。これにより、溶液中の全窒素は硝酸態窒素に変換される。この分解液 1mL に 9mL の純水を添加して希釈し、2つの方法によって硝酸態窒素の定量を行い比較検討した。一つはオートアナライザー（九州沖縄農業研究センター所有の AACS 2, ビーエルテック社）を用いた方法、もう一つは紫外可視分光光度計（島津製作所, UV-2500）を使用する方法である。オートアナライザーでは銅・カドミウムカラムによって硝酸態窒素を亜硝酸態窒素に還元し、ナフチルエチレンジアミン吸光度法によって定量する方法が採用されている。分光光度計を用いる方法では、硝酸態窒素が紫外線（220nm）を吸収することを利用して定量する方法である。

IV. 結果と考察

分光光度計で測定した硝酸態窒素濃度とオートアナライザーで測定した濃度はほぼ 1:1 の直線関係を示した（図-1）。

分解時の妨害イオンの問題については既に様々な土壌に対して分解率が検証されていて、可溶性窒素量が 200mg N kg^{-1} 以下であればそれほど大きな問題を生じないことがわかっている（坂本・林, 1999）。小森ら（2009）の実験において、分解前に 10 倍希釈して測定した場合ほぼ 1:1 の関係が得られたという結果は、硫酸カリウム濃度が 10 分の 1 になり、分光光度計の測定時における高濃度硫酸カリウムによる妨害がなくなったため 1:1 の関係が得られたと考えればつじつまがあう。つまり、小森らの実験においても、分解時の溶液の塩類による妨害はなく、分解液を 10 倍程度に希釈すれば分光光度計測定時の妨害が無くなり、ほぼ 1:1 の関係になっていた可能性がある。いずれにせよ、本研究で用いた森林土壌では、ペルオキシ二硫酸カリウム溶液による分解液を 10 倍程度に希釈することによって分光光度計で硝酸態窒素が定量可能であった。窒素の分解率の問題は依然注意が必要ではあるものの、分解前に 10 倍希釈を行えばそのリスクもかなり低減すると考えられる。比較的多くのラボで設置されているオートクレーブと紫外可視分光光度計のみで微生物バイオマス窒素の定量が可能になる意義は大きい。今後は今回使用した土壌以外でも検証を重ねて、本方法での適用可能な土壌の範囲を広げていく作業が必要である。

謝辞

本研究は森林総合研究所交付金プロジェクト「九州地域の人工林での帯状伐採等が多面的機能に及ぼす科学的評価と林業の評価を考慮した取り扱い手法の提示」の成果である。試験地の土壌採取には、熊本営林局の協力を得た。非常勤職員の本由美子さんには試料調整等でお世話になった。以上の方々に、厚く感謝の意を表します。

引用文献

- 小森冨香・堀兼明・宮丸直子・須賀有子・福永亜矢子・池田順一（2009）土肥誌 80: 37-40.
坂本一憲・林敦敏（1999）土と微生物 53: 57-62.
（2013 年 11 月 3 日受付；2014 年 1 月 21 日受理）