

水田土壤に對してウイノグラツキー氏

アゾトバクター試験の應用(豫報)

(土壤肥料學雜誌 第一卷第四號 發表)

農學博士 板 野 新 夫

荒 川 左 千 代

緒 言

土壤の肥沃度ニマンナイト分解量又は微生物に依る窒素固定量との間に極めて密接な關係の存在することは、約二十年前即ち一九〇八年に Löhnis の Pillai⁽¹⁾に依つて實驗されて以來 Brown⁽²⁾ Burgess⁽³⁾ Beijerinck⁽⁴⁾ Christensen⁽⁵⁾ Waksman and Karmali⁽⁶⁾等に依つて確證された所であるが、本邦に於ける之等に關する實驗報告は全く皆無である。

最近土壤細菌學の研究方法として自然的培養法 (Spontaneous Culture) が提唱せらるゝに至つた。其主なるものは Donn⁽⁷⁾が最初に土壤細菌類の數を計算に應用した顕微鏡的直接計算法⁽⁸⁾ Winogradsky⁽⁸⁾の試みた窒素固定菌の珪酸ゲル培養に依る土壤肥沃度の診斷的測定法である。就中後者は先年米國ワシントン市に於いて開催された第一回萬國土壤學會議に報告され⁽⁹⁾且其門下生 Mme. Dr. Jawiga Ziemiecka に依つて殊に實驗的操作が紹介されたものである。其要旨とする所は Winogradsky の「現在に於ける土壤細菌學的研究法は専ら一般細菌學的研究法に従つたものであつ

て之等は土壤細菌の研究に應用することは到底不可能である」云ふ主張に基いたものであつて、窒素固定菌の自然的培養に其窒素固定力を査定して以つて土壤の肥沃度を診断測定せんとするものである。

此の自然的培養⁽¹⁰⁾に云ふのは試験土壤、蒸溜水及び五%の澱粉を能く混和して糊狀培養基を調製し、之を攝氏三〇度に四八時間保温して置くに活性窒素固定菌の聚落が形成するに云ふのであつて、其窒素固定力の測定法⁽¹¹⁾は新に温帯及び熱帯地方より多數の供試土壤を採取して研究を重ねたものである。即ち其乾土一瓦を珪酸ゲル培養基に移植し、自然的培養法と同様なる處分を爲す時は肥沃土壤に於いては一二〇時間に二瓦のマンナイトを消費して二〇瓩以上の窒素を固定するに共、其他の場合は肥沃程度に従つて固定量も準するに云ふのである。茲に於て著者等は斯の如き簡便なる生物學的方法に依つて土壤の肥沃度が診断し得らるゝとするならば、之は極めて重要な事項に屬するを以てこの方法を應用して本邦水田の土壤を診断してその肥沃程度を調査せんを試みたものである。

今この研究を報告するに臨み土壤採取に寄與されし廣島縣立農事試験場水野勉氏に對して深甚なる謝意を表する次第である。

實 驗

一、珪酸ゲル培養基の調製法

珪酸ゲルプレート⁽¹²⁾を Winogradsky 法⁽¹²⁾に依つて調製するには比重一・〇六の珪酸加里液に比重一・一〇の濃塩酸を等量宛混合してゲルを製し、之をシャーレーに注ぎ固化せしめて後流水中に浸して塩素の反應を除去しブローム・クレゾ

ール・バアブルを指示藥として中和し、然る後一旦煮沸したる蒸溜水にて數回洗滌するのであるが、著者等は寧ろ Waksman 改良法⁽¹³⁾に従つたのが至便と思惟するので該方法を用ふることにした。

先づ珪酸加里（メルク製）一〇％液を一規定塩酸液を調製して置いて他に豫め數本の試験管を用意し、此の試験管に五坵宛の珪酸液を注入し置き、之にビュレット法に依つて塩酸を五坵六坵七坵に漸次増量的に注加し能く振盪して放置し、以つて二乃至五分間以内にゲル化し得る分量を檢索する。實驗結果は七乃至一〇坵の一規定塩酸を所要するのが常であつた。次いで蒸溜水を以つてこの兩液が等量にてゲルを形成する様に調節した後約一〇〇乃至二〇〇坵宛の兩液を混合して直徑九糎のシャーレーに對しては凡そ三〇坵、直徑二〇糎のシャーレーの場合は一〇〇乃至二〇〇坵を注入し水平狀態に靜置し、徐ろにゲルを固化せしむるのである。固化したる珪酸ゲルプレートは之を流水中に浸漬して透析し塩化物の反應を除去する事等は前述の Winogradsky 法に同等に處分するのである。この透析に要する時間は約二四乃至四八時間である。

次にこれに要する培養基の成分は左の如きものを調製した。

酸性 磷酸 瓦 0.25	硫酸 瓦 0.15	鹽化 ナトリウム 瓦 0.15	硫酸 瓦 0.15	鐵 瓦 0.15	硫酸 瓦 0.15	鐵 瓦 0.15	蒸 瓦 100	水
-----------------------	-----------------	--------------------------	-----------------	----------------	-----------------	----------------	---------------	---

備考 左の鹽分は珪酸に代つた。

而して大型（二〇糎）のプレートにはこの培養液五坵に炭酸石灰〇・五瓦及マンナイト二瓦を添加し、小型（九糎）のプレートに對してウイノグラツキー氏アゾトバクター試験の應用（豫報）

プレートには培養液一瓩の他に炭酸石灰〇・五瓦及びマンナイト〇・五瓦を添加した。そして此のプレートを攝氏六五度の定温装置内に蓋を取つて放置し、餘剰の水分を蒸發せしめて殆ど乾固するに至つた時取出し之を實驗用に供したのである。

二、供試土壤及び其處分

實驗に供したる土壤は次の一〇種であつて採取地及び摘要は第一表の通りである。

第一表 供試土壤採取地及び摘要

實驗 番 號	採 取 地 名	採 取 時 期	玄米生産 量(反當)	施 肥 量 (反當)
1	岡山縣倉敷市大原農務研究所 試驗田	昭和2年11月	2.6 ^石	堆肥30.0貫大豆粕10貫棉實 粕10貫過磷酸石灰7貫下肥 100貫草木灰12貫石灰25貫
2	同 上	同 上	2.0	無肥料區
3	廣島縣鹽田郡生口村福田	昭和2年12月	1.8	堆肥150貫糠粕15貫過磷酸 石灰10貫
4	同上瀬戸田町澤	同 上	2.0	堆肥100貫糠粕20貫
5	同 上	同 上	1.8	堆肥80貫糠粕20貫
6	同上沼隈郡上吉區	同 上	關	配合肥料10俵
7	岡山縣吉備郡神在村上原	昭和3年2月	1.3	不 明
8	同 上	同 上	3.2	同 上
9	同 上 富 原	同 上	1.6	同 上
10	同 上 上 原	同 上	3.2	同 上

供試土壤は氣乾物をなし豫め殺菌したる金屬篩にて篩別し〇・五粒以下のものをさしたるを用いた。

三、土壤の診斷的査定方法

土壤沃度の診斷的査定方法は之を五種に區別して行ふものであるが、其三種は豫備試驗、他の二種が本試驗とも見做し得らるゝものである。

第一試驗 直徑九糎の珪酸ゲル培養基に供試土壤を五〇乃至一〇〇粒點置し、之を三〇度に於て四八時間保温すれば肥沃土壤にあつては *Azotobacter* の聚落が二五乃至五〇形成さるゝが、普通土壤に於ては四乃至五日後にも尙少數の聚落を形成し瘠薄土壤は全く聚落を形成しない。

第二試驗 供試土壤五〇瓦にマンナイト〇・五瓦を加へ蒸溜水にて糊形をなし、三〇度に四八時間保温して置き然る後顯微鏡的に *Azotobacter* の數量を計算する。そして其の増殖量に依り肥沃度を測定する。

第三試驗 供試土壤五に對して澱粉一〇〇の割合に混合し蒸溜水を以つて糊形をなし、表面を平滑として之を三〇度に四八時間保温する時は肥沃土壤にては多數の *Azotobacter* 聚落を形成する。

第四試驗 供試土壤一瓦を直徑二〇糎の珪酸ゲル培養基に撒布し、之を三〇度に四八時間保温する時は肥沃土壤では二五〇〇乃至三〇〇〇の *Azotobacter* 聚落が形成し普通土壤は寡數、瘠薄土壤では形成しないのである。

第五試驗 本試驗は第四試驗に供したる培養を其の儘繼續し、一二〇時間目にケルダール法を以て其全窒素を測定し、マンナイト二瓦に對する固定量を算定する。即ちマンナイト二瓦を消費して二〇厘の窒素固定量ある時は之を標準とするもので、之はマンナイト一〇〇部に對して固定窒素一、又は有機炭素四〇に對して窒素一となるのである。併し普通

土壤にては多少延朗しても尙少量瘠薄土壤では痕跡の固定に過ぎぬ云ふ。

右に述べたる所に從つて得たる實驗結果は次の通である。

四、第一試験の結果

瘠め調製したる珪酸ゲル培養基に殺菌白金耳にて供試土壤を移植し右に述べたる所に從つて試験した結果第二表に示す如き成績を得た。

第二表 第一試験成績

實驗 番號	培養時間	移植土粒	聚落 數	培養時間	聚落 數	總 計
1	48	100	30	1:0	60	90
2	"	"	22	"	50	72
3	"	"	1	"	1	1
4	"	"	89	"	9	93
5	"	"	100	"	1	100
6	"	"	1	"	1	1
7	"	"	1	"	1	1
8	"	"	1	"	1	1
9	"	"	1	"	1	1
10	"	"	1	"	1	1

備考 成績は二乃至三個の平均結果を示す。

之等の結果に依れば實驗番號一、二、四、五の土壤は *Azotobacter* の聚落を形成するが他の六種は一二〇時間培養後もその形成が無かつた。併してその形成結果四及び五は肥沃土壤なることを示し一及び二は中庸土壤に相當する如き結果をなつた。この状態は第一圖に示す通りである。

五、第二試験の結果

第二試験を試みたけれ共之に於ては豫期の成績を得ることは出来なかつた。併し培養基上に *Azotobacter* の露狀聚落の形成又は遊離鐵に似たる色狀を呈して本菌の増殖する状態は肉眼的に觀察し得られ共この試験法に依つて土壤の特性を區別することは稍困難の如く思惟するものである。

六、第三試験の結果

本試験の結果も第二試験と同様豫期の成績を得ることが出来なかつた。この試験では聚落の形成は全く發見することが出来なかつたのである。

七、第四試験の結果

本試験は珪酸ゲル培養基上に形成する *Azotobacter* の聚落は極めて容易に且つ判然と形成され得るけれ共、只保温装置内に於て培養中培養基が過剰の水分に覆はれ（殆ど乾固したる培養基も培養の爲め保温するに水分が多量に珪酸ゲルより滲出するため）之が爲めに聚落は全く接着密集して其數量の計算が全く不可能になつて仕舞つた。

然共其の發育状態を示せば第三表の如くなつた。

第三表 第四實驗の成績

實驗 番号	培養時間	繁殖發育	培養時間	繁殖發育	實驗 番号	培養時間	繁殖發育	培養時間	繁殖發育
1	48	+	120	+	6	"	+	"	+
2	"	+	"	+	7	"	-	"	+
3	"	+	"	+	8	"	-	"	+
4	"	+	"	+	9	"	-	"	+
5	"	+	"	+	10	"	-	"	+

備考 一形成無し、+形成不明、+形成す、+形成多し、+形成甚多し、+形成甚だ多し。

これ等の結果をみれば繁殖数の計算は不可能であつたが結果は第二試験の場合と殆ど一致した。今この状態を圖示すれば第二圖の通である。

八、第五試験の結果

本試験は所定の如く第四試験に供したる培養をそのまゝ一二〇時間繼續して後之をケルダール法に依つて全窒素を測定し之より標準の全窒素を減じて窒素固定量を算出した。その結果は第四表に示す如くである。

第四表 第五試験の成績

實驗 番号	固定窒素量	豫想肥度	實驗 番号	固定窒素量	豫想肥度
1	20.70 _{mg}	肥沃壤	6	4.65 _{mg}	普通壤

2	17.93	糞土	糞土	7	2.01	糞土	糞土
3	3.19	普通肥	普通肥	8	2.02	普通肥	普通肥
4	18.04	糞土	糞土	9	3.50	糞土	糞土
5	19.95	糞土	糞土	10	1.92	糞土	糞土

この結果に依つて見れば第一試験及び第四試験の結果を殆ど一致してゐるが Winogradsky の稱する肥沃土壌即ち「
 ○庭の窒素固定力を有する土壌は只二種であつてこの標準より稍少量の固定力を有するもの二種他は殆ど固定力が薄弱
 であつた。

九、供試土壌の溶液培養及び土壌の酸素イオン濃度

次に以上行ひたる如き珪酸ゲル培養法に比較せんとしてこれと同等なる成分を有する溶液培養基を調製し、三〇〇℃
 のフラスコ内に於て第五試験の如き操作に従つて固定窒素量を測定した。

又 Azotobacter の生存は著しく土壌の酸素イオン濃度に支配されるを以つてこれを Quinhydrone 電極法に依つて
 測定した。浸出液は土壌と水との比率を一對一として得たるものに就いて行つたものである。

之等の實驗成績は第五表に示す通りである。

第五表 土壌の溶液培養及び P_H 値

實驗 番號	發 育 時 間	狀 態	固 定 量	P _H 値	實驗 番號	發 育 時 間	狀 態	固 定 量	P _H 値
1	48	+	8.30	6.23	6	48	+	1.04	5.43

2	"	+	5.91	6.09	7	"	+	1.31	5.51
3	"	+	1.33	5.33	8	"	+	1.33	5.19
4	"	+	12.60	6.61	9	"	+	3.44	5.43
5	"	+	8.78	6.84	10	"	+	1.33	4.75

備考 + 固多、+ 固多し、+ 固多甚多し。

此結果に就て見るに全く珪酸ゲル培養法の成績と一致することを知るが、併しその固定窒素量に至つて著しく劣ることが知れる。但し珪酸ゲル培養法の優れた培養法たる所以であらうと思はれる。

又その P_H 價をみると窒素固定量の多量なる土壤は殆ど P_H 六・〇以上であつて、それ以下の土壤は固定量が甚だ少量である。この點は極めて重要なことであつてこれは後述する如く *Azotobacter* の生存が水素イオン濃度によつて支配され、従つてその窒素固定量が減少するものと思ふのである。

考 察

本研究は一九二六年 *Winoogradsky* に依つて案出された窒素固定菌法を以つて土壤の肥沃度を診断的に測定する方法に従つて本邦水田土壤の肥沃度を診断せんとして試みたものであつて、以上得たる實驗結果を總括すれば第六表の如くである。

第六表 實驗結果の總括

實驗 番號	土壌採取地	豫備試験	固 定 窒 素 量		土壌 P _H 價	玄米生産量 石
			珪酸ゲル培養法	溶液培養法		
1	岡山縣倉敷市	井	20.70 ^{mg}	8.30 ^{mg}	6.23	2.6
2	同 上	井	17.93	5.91	6.09	2.0
3	廣島縣豊田郡	—	3.19	1.38	5.83	1.8
4	同 上	井	18.04	12.60	6.61	2.0
5	同 上	井	19.95	8.78	6.84	1.8
6	廣島縣沼隈郡	—	4.05	1.04	5.43	蘭
7	岡山縣吉備郡	—	2.01	1.34	5.54	1.3
8	同 上	—	2.02	1.33	5.19	3.2
9	同 上	—	3.50	3.44	5.48	1.6
10	同 上	—	1.98	1.35	4.76	3.2

備考 豫備試験の記號は前掲の場合と同じである。

この結果から見て Winogradsky の提唱する標準肥沃土壌は只一種であつて、これより稍劣れる擬肥沃土壌とも云ふべきものが二種、他の六種は殆ど普通又は擬瘠薄土壌に相當するものであつた。

然るにこの診斷結果と實際の玄米生産量をその土壌に就いて見るに大體は平行するが、併し多少相違する結果を示してゐて、單に土壌の玄米生産量を基調として考へた場合この診斷的判定結果とは必ずしも一致しない云ふことになる。併し之等は唯十種にすぎぬ實驗結果よりの考察であつて、もつと多數の土壌に對して實驗を重ねる必要のあること。

水田土壌に對してウイノグラツキー氏アソトバクター試験の應用(續報)

は勿論のことである。然共ここに注意すべきことは本法が主として *Azotobacter* 法に基礎を置く以上本菌の特異性に就いて考察する必要があると思ふ。

本菌は殊に土壤の反應及び季節の變化に於ける數量の増減等があるから土壤採集地の反應燐酸塩の存在及び時期等は最も重要な條件であらねばならぬ。

著者等⁽¹⁴⁾は昭和二年六月中旬より十一月中旬に至る水稻栽培期間に於いて同一圃場の窒素固定力の變化を測定したのに季節に依つて六・〇乃至一九・八厘の變化があることを知つた。即ち七月中旬及び十一月中旬が最も固定力が旺盛であつた。又露西亞の *Razoumov*⁽¹⁵⁾ は一九二五年モスコウに於て季節に於ける *Azotobacter* 數の變化を測定して夏期の初頭には土壤一瓦當一四〇〇〇存在するが、九月乃至十一月は反つて減少し六〇〇〇乃至八〇〇〇となり十二月に至れば再び夏期に等しき數量に歸復するを報告してゐるが、この結果を傾向に於て著者等の研究は極めてよく一致するのである。

又本菌の生存が反應(殊に酸性)に依つて支配されることは歐米に於ても可成り多數報告があるが今山縣博士と著者⁽¹⁶⁾の一人が共同研究した結果に依る *Azotobacter Chirococcum* 及び *Azot. Beijerinckii* の限界 P_n が五・八 *Azot. Vinelandii* の限界 P_n が五・九である。併し *Bac. Amylobacter (Ol. Pastorianum)* の限界 P_n は Dornier⁽¹⁷⁾ に従へば P_n 五・七以下と云ふ。斯の如く本菌は酸性に對して極めて抵抗が無いから酸性に相當強い抵抗力のある水稻に比較して水田の肥沃度と本菌の數量又は作用が平行的に一致しないのではないかと思ふものである。

尙 Waksman and Karmaliak⁽⁶⁾ の研究に依れば酸性土壤及び擬瘠薄土壤のマンナイト分解力と磷酸塩とは極めて重要

なる關係を有し、磷酸塩の存在に依つて著しく分解力が増進することを知つたが併し肥沃土壤にあつては左程効果が認められなかつたこと云ふ。故に本方法を直ちに本邦水田土壤に應用せんとするには相當研究の餘地があると思つてゐる。

(Gibbs の Batchelor)¹⁸⁾ は最近土壤細菌の作用に及ぼす木材廢棄物の効果を試験するに當つて本方法を應用せんと試みたけれ共 Azotobacter 聚落數の測定に對して豫期の成績を擧げ得なかつたこと報告し、且つ第一回萬國土壤學會議に於て本法に關しては充分成績を得なかつたこと報告(非公式)した人々のあつたことを附言して置く。

又殊に本法の取扱ひ上至難なる點は(一)珪酸ゲル・プレート破損し易きこと、(二)保温中培養基内に水滴が過剰となり易きこと、(三)聚落の計算が充分行ひ難き事等であつて、これ等の點も亦改良の餘地があると思ふ。

結 論

本研究は Winogradsky の提唱する Azotobacter Test に依つて水田土壤の肥沃度を診斷的に檢定せんと試みたるものであつてその結果を概述すれば次の如くである。

一、本研究に用ひたる土壤は岡山縣土壤六種、廣島縣土壤四種合計一〇種であつて、夫々肥沃度の異なるものである。試験の結果この土壤で Azotobacter Test の標準肥沃土壤を見做すべきものは二種、擬肥沃土壤二種であつて、他は普通又は擬瘠薄土壤に相當するものであつた。

二、水田土壤の肥沃度 Azotobacter Test に依つて肥沃土壤と檢定したる土壤とは必ずしも一致せずして多少相違するところを知つた。

三、Azotobacter Test を行ふに當つては寧ろ供試土壌の反應、磷酸鹽の存否及び土壌採取時期等の諸條件及び栽培作物等に関する因子によつて支配せらるることが多い様に見える。

四、珪酸ゲル培養法は溶液培養法より遙かに莖素固定菌の作用が旺盛であつた。

五、供試土壌の莖素固定力はその水素イオン濃度と密接なる關係のあることを知つた。

六、珪酸ゲル培養基の調製及び處理上不便な點が多いので改良の餘地があると思ふ。

本研究は更に多くの供試土壌に就いて試験を重ねる筈である。

参 考 文 献

- (1) Löhms, F. and Pilai, N. K., 1908, Centrbl. Bakt., V. 20, P. 781-799. (2) Brown, P. E., 1916, Jou. Agri. Res., V. 5, 855-869. (3) Burgess, P. S., 1918, Soil Sci., V. 6, 449-462. (4) Beijerinck, M.W., 1921, Akad. Wetenschap. Amsterdam, V. 30, 431-438. (5) Christensen, H. R., 1923, Soil Sci., V. 15, 29-30. (6) Waksman, S. A. and Karunakar, P. D., 1924, Soil Sci., 17, 373-393. (7) Conn, J. H., 1918, N. Y. (Geneva) Agr. Exp. Sta. Tech. Bull., No. 64. (8) Winogradsky, S., 1926, Comp. Rend. Acad. Sci. (Paris), V. 182, 18 1061-1063. (9) Winogradsky, S., 1928, Soil Sci., V. 25, 37-43. (10) ———, 1926, Comp. Rend. Acad. Sci. (Paris), V. 182, 17, 996-1001, (11) ———, 1926, Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris), V. 182, 15, 907-910. (12) ———, 1924, Comp. Rend. Acad. Sci. (Paris), V. 180, 771-719. (13) Waksman, S. A. and Carey, C., 1926, Jou. Bact., V. 12, 87. (14) 板野, 荒川 昭和三年 土壤肥科學雜誌 第二卷 第二號 (15) Razoomov, A. S., 1925, Tran. Inst. Fertilizers, No. 28, (U. S. S. R. Moscow). (16) 山縣, 板野 1923, Jou. Bact., V. 8, 521-531. (17) Dörner, W., 1924, Landw. Jahrb. Schweiz, 1-28. (18) Gibbs, Wm. M. and Batchelor, H. W., 1927, Soil Sci., V. 21, 351-363.