

酸性硫酸塩土壌の生成過程における化学性および 硫黄酸化細菌・鉄酸化細菌数の経時的変化

大峽広智¹・小巻義幸²・尾和尙人^{2*}

(平成 16 年 5 月 31 日受付)

要 約

海成の還元型硫黄化合物、主にパイライト (FeS₂) を含むと思われる新潟県佐渡市の農業用水路脇の水田跡地で深層土壌 (深度 1.0~1.5m) を採取し、その土壌を好気的条件下で培養し、化学性および硫黄酸化細菌・鉄酸化細菌数の経時的変化を測定し、酸性硫酸塩土壌の生成過程におけるこれら細菌の作用機構について検討した。

その結果、pH (H₂O)、pH (KCl) は 0~2 週にかけて低下し、その後はほぼ一定の値で推移した。EC は 0~2 週にかけて急激に増加し、それ以降は緩やかな増加を続けた。可酸化性硫黄は 0~4 週にかけて急激に減少したのに対して、水溶性硫酸イオンは同時期に急激に増加し、それ以降は双方ともほぼ一定の値で推移した。Fe²⁺ は 0~2 週にかけて減少し、その後はほぼ一定の値で推移した。Fe³⁺ は 0~4 週にかけて増加し、その後も緩やかに増加した。以上のことから、供試土壌は還元型硫黄化合物の硫酸への酸化によって酸性化したことが確認された。また 2 週目以降 pH (H₂O) が 3.80~3.88 と 4.0 以下で推移したことから、2 週目までで酸性硫酸塩土壌が生成されたことが明らかになった。

硫黄酸化細菌は培養期間を通じて培地 pH に関わらず 10⁷⁻⁸ cells g⁻¹ で推移したのに対して、鉄酸化細菌は 2 週目まで検出されず、4 週目以降 10⁴ cells g⁻¹ で推移した。以上のことから、供試土壌の酸性硫酸塩土壌の生成過程初期には、還元型硫黄化合物の化学的酸化と硫黄酸化細菌による生物的酸化が大きく作用していて、鉄酸化細菌は関与していないことが示唆された。

新大農研報, 57(1):47-51, 2004

キーワード：酸性硫酸塩土壌、硫黄酸化細菌、鉄酸化細菌、還元型硫黄化合物

新潟県佐渡市の国府川右岸地区で、農業用水路改修工事の時に深さ約 3 m 掘削した土壌を上乗せ客土した水田で水稻の生育障害が発生した。わが国では表層土層は不良土壌ではないが、その下層には海岸沿いの低湿地で生成した土壌や還元的条件下の海底で堆積した海生層が化石のように地中に保存されている地帯が海岸に続く平坦地に多く存在する。このような地帯で農業基盤整備や土木工事に伴い下層土が土壌表層に搬出された場合に酸性硫酸塩土壌が生成されたという事例が多数報告されている。この酸性硫酸塩土壌は下層土に含まれている還元型硫黄化合物、主にパイライト (FeS₂) が好気的条件下に晒され、硫酸に酸化され、土壌 pH が低下することによって生成される¹⁻⁴⁾。また酸性硫酸塩土壌には鉄酸化細菌や硫黄酸化細菌の存在が認められ、これらの細菌が酸性硫酸塩土壌の生成を促進していると考えられている⁵⁻⁹⁾。実際、筆者らが前述の酸性化した水田土壌および掘削土壌を採取し、その化学性および硫黄酸化細菌・鉄酸化細菌数を測定した結果、生育障害の原因は客土した掘削土壌に含まれていたパイライトなどの還元型硫黄化合物が硫酸に酸化されたことによる pH の低下であり、酸性硫酸塩土壌の生成には硫黄酸化細菌よりも鉄酸化細菌が大きく関与していることが示唆された¹⁰⁾。

これまで、このような酸性硫酸塩土壌の生成過程における硫黄酸化細菌や鉄酸化細菌の役割や動態に関する研究は、パイライトを含む液体培地に *Acidithiobacillus ferrooxidans* などの硫黄酸化細菌や鉄酸化細菌を接種し、培養する中で硫酸イオンなどの生成物を測定するもの¹¹⁻¹³⁾ や、パイライトなどの還元型硫黄化合物を含むと思われる土壌を滅菌して、硫黄酸化細菌や鉄酸化細菌を接種して培養し、土壌が酸性化していく中での化学性や菌数の変化を測定したもの^{6, 9)} が多く、還元型硫黄化合物を含む土壌をそのまま好気的条件下で培養し、土壌が酸性化してい

く過程の中での化学性や硫黄酸化細菌・鉄酸化細菌数の経時的変化を測定した報告は少ない。

そこで本研究では、海成の還元型硫黄化合物を含んでいる潜酸性硫酸塩土壌を水田跡地土壌の深層から採取し、好気的条件下で培養して、化学性および硫黄酸化細菌・鉄酸化細菌数の経時的変化を測定し、酸性硫酸塩土壌の生成過程におけるこれら細菌の作用機構について検討したので報告する。

材料および方法

1) 供試土壌

2003年4月に、新潟県佐渡市の農業用水路脇の水田跡地から深さ1.0~1.5mの深層土壌を採取した。採取した土壌は、ふるいを通せる程度まで風乾し、4.0mmのふるいにかけて、研究に供試した。

2) 培養方法

供試土壌10gを広口ガラス瓶(108mL容、直径45mm、高さ81.5mm)に詰め、WHC60%になるように蒸留水を添加した。ガラス瓶の蓋は小さな穴を空け、そこに水分の蒸発を少なくするためにポリプロピレンフィルムを貼った。培養は30℃で6週間行い、2週間ごとに化学性と各菌数を測定した。なお、培養期間中土壌水分はWHC60%を維持した。

3) 土壌化学性

① pH (H₂O) および pH (KCl) はガラス電極法、EC は 1 : 5 水浸出法で測定した。

② 可酸化性硫黄 : 300mL ビーカーに生土を 1.0g 測り取り 30% 過酸化水素水 (pH = 6.0) 10mL を加え、室温で 30 分放置後、湯浴上で 1 時間加熱した。冷却後 No.6 のろ紙でろ過して 100mL 容メスフラスコで定容にした。この溶液を 0.2 μ m のメンブレ

¹新潟大学大学院自然科学研究科

²新潟大学農学部

*代表著者 : owanet@agr.niigata-u.ac.jp

ンフィルターでろ過した後、イオンクロマトグラフ(HIC-6 A、島津製作所製)で硫酸態硫黄を測定し、後述の水溶性硫酸イオンとの差を可酸化性硫黄とした^{14,15)}。

③水溶性硫酸イオン:EC測定時と同条件で振盪した土壤溶液を0.2μmのメンブレンフィルターでろ過した後、イオンクロマトグラフ(HIC-6 A、島津製作所製)法で測定した⁸⁾。

④Fe²⁺:生土1.0gに1.0N酢酸ナトリウム溶液70mlを添加し、室温で60分間振とうした後、ろ紙(No.6)で100mLメスフラスコにろ過し、内容物を0.2N酢酸ナトリウム溶液で2回以上洗浄し、0.2N酢酸ナトリウム溶液で定容にした。この溶液のFe²⁺を原子吸光光度計(Z-8200、日立製作所製)で測定した¹⁶⁾。

⑤Fe³⁺:200mL三角フラスコに生土2.0gを取り、3.0gのヒドロサルファイトナトリウムと100mLの0.02M EDTA液を加え、沸騰している湯せん上に置き、時々攪拌しながら70°Cで15分間保つ。処理後上澄液をろ紙(No.6)で250mLメスフラスコにろ別し、残渣を1.0%塩化ナトリウム液で3回洗浄し、定容にした。この溶液のFe²⁺を原子吸光光度計(Z-8200、日立製作所製)で測定し、④のFe²⁺との差をFe³⁺とした¹⁶⁾。

3) 硫黄酸化細菌数・鉄酸化細菌数

①硫黄酸化細菌計数用培地:組成[NH₄Cl 0.1g, KH₂PO₄ 0.05g, MgSO₄・7 H₂O 0.02g, Na₂S₂O₃・5 H₂O 0.4g, 酵母エキス 1.0g, 蒸留水1.0L]、硫酸および水酸化ナトリウム溶液で培地pHを3.5と6.5に調節した。その後30ml試験管に10mlずつ分注し、シリコン栓で栓をした後、120°C、20分間のオートクレーブ滅菌をした¹⁷⁾。

②鉄酸化細菌計数用培地:組成[NH₄Cl 0.1g, KH₂PO₄ 0.05g, MgSO₄・7 H₂O 0.02g, FeSO₄・7 H₂O 10.0g]、硫酸で培地pHを2.5に調節した。その後、pHを調節した培地をクリーンベンチ内で0.2μmのメンブレンフィルターでフィルター滅菌をして、あらかじめシリコン栓をして180°Cで1時間乾熱滅菌をしておいた30ml試験管に10mLずつ分注した¹⁸⁾。

③細菌計数方法:供試土壤生土30gに270mlの滅菌水(120°C、20分間オートクレーブ滅菌)を加え、室温で30分振盪する[この土壤懸濁液が1次(10倍)希釈液になる]。この土壤懸濁液を滅菌水で8次(10⁸倍)まで段階希釈し、3~8次の希釈液を滅菌した各培地に0.5mLずつ5連で接種し、30°Cで1ヶ月間静置培養した。培養後、硫黄酸化細菌計数用培地は、ヨウ素滴定法¹⁹⁾でチオ硫酸イオン濃度を測定し、培地中に含まれていたチオ硫酸イオンの半分以上を消費したものを陽性、消費しなかったものを陰性とし²⁰⁾、MPN法²¹⁾で硫黄酸化細菌数を算出した。鉄酸化細菌計数用培地は培養後試験管内に3価鉄が付着あるいは沈殿したものを陽性、しなかったものを陰性とし¹⁸⁾、同様にMPN法で鉄酸化細菌数を算出した。

結果および考察

1) 化学性

pH(H₂O)、pH(KCl)の経時的変化を図1に示した。pH(H₂O)は培養開始時は4.55を示したが、2週目には3.88まで低下し、その後は3.80~3.81とほぼ一定の値で推移した。またpH(KCl)も同様に培養開始時の3.76から2週目には3.29まで低下し、その後は3.23で推移した。

ECの経時的変化を図2に示した。ECは培養開始時には0.46 dS m⁻¹の値を示したが、2週目には0.86 dS m⁻¹まで増加した。その後4週目には0.98 dS m⁻¹までゆるやかに増加し、6週目まではほぼ一定の値で推移した。

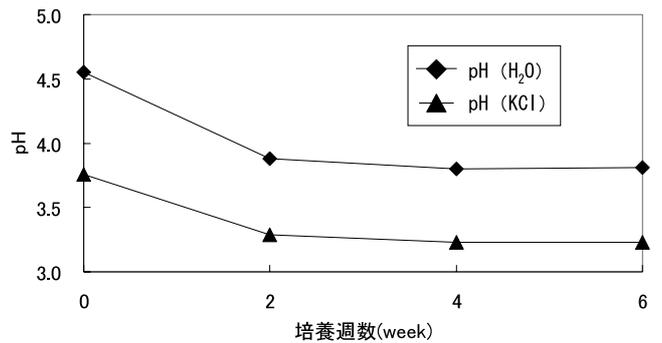


図1 pH (H₂O)、pH (KCl) の経時的変化

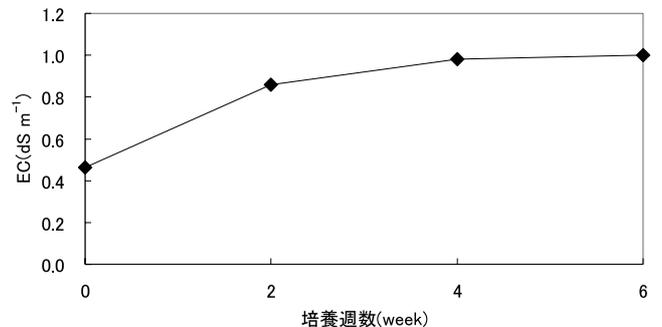


図2 ECの経時的変化

可酸化性硫黄と水溶性硫酸イオンの経時的変化の結果を図3に示した。可酸化性硫黄は、培養開始時の2.38 g S kg⁻¹から4週目までで1.15 g S kg⁻¹と約半分に減少した。また4週目以降はほぼ一定の値で推移した。これに対して水溶性硫酸イオンは培養開始時の0.671 g S kg⁻¹から4週目までで1.42 g S kg⁻¹とほぼ倍増した。その後は可酸化性硫黄と同様に、培養終了までほぼ一定の値で推移した。

Fe²⁺、Fe³⁺の経時的変化を図4に示した。Fe²⁺は培養開始時には1.07 g kg⁻¹だったが、2週目には0.866 g kg⁻¹まで減少し、その後は培養終了まで0.818~0.898 g kg⁻¹とほぼ一定の値で推移した。Fe³⁺は培養開始時の4.10 g kg⁻¹から4週目までで6.01 g kg⁻¹まで増加し、その後4週目から6週目にかけても緩やかに増加し、6週目には6.40 g kg⁻¹の値を示した。

以上の結果から、供試土壤は培養開始時から2週目にかけて

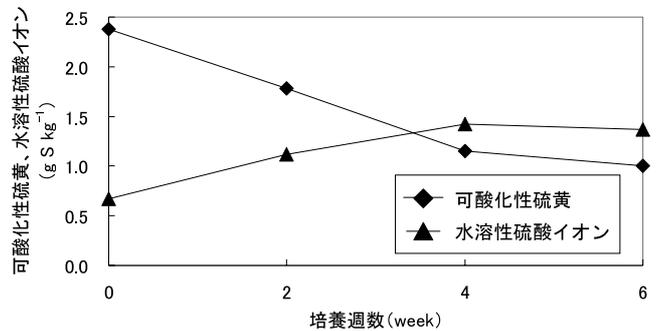
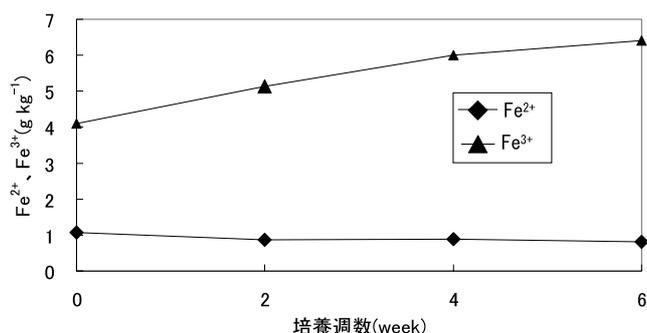


図3 可酸化性硫黄、水溶性硫酸イオンの経時的変化

図4 Fe²⁺、Fe³⁺の経時的変化

還元型硫黄化合物の酸化で生成された硫酸イオンによる土壌pHの低下が起こったことが示された。一般的に酸性硫酸塩土壌の判定基準は『硫化物または硫酸を含み、pH (H₂O) が3.0未満、もしくはpH (H₂O) が4.0未満』^{22,23)}となっている。硫化物または硫酸含量について明確な基準は無いが、福岡・佐賀両県では酸性硫酸塩土壌の調査結果から、『易酸化性硫黄 SO₄-S (本研究の可酸化性硫黄と水溶性硫酸イオンの合計値に相当) 2.0g S kg⁻¹以上』²⁾ が設定されている。本試験では2週目以降のpH (H₂O) が3.80~3.88と4.0以下で推移し、可酸化性硫黄と水溶性硫酸イオンの合計値も2.37~3.05 g S kg⁻¹と2.0 g S kg⁻¹以上で推移したことから、供試土壌は2週目以降酸性硫酸塩土壌に生成されたことが確認された。

2) 硫黄酸化細菌、鉄酸化細菌数

硫黄酸化細菌、鉄酸化細菌の経時的変化の測定結果を図5に示した。硫黄酸化細菌は培地のpHに関わらず、培養期間を通して10^{7~8} cells g⁻¹で推移した。これに対して鉄酸化細菌数は2週目まで検出されず、4週目以降10⁴ cells g⁻¹で推移した。

これまでの研究で、*Acidithiobacillus ferrooxidans*を除く多くの硫黄酸化細菌は、パイライト中の硫黄を直接酸化することはできず、パイライトの酸化は化学的酸化および鉄酸化細菌による生物的酸化によって生成されたS⁰やS₂O₃²⁻などの硫黄化合物を硫黄酸化細菌が硫酸に酸化したり、鉄酸化細菌によって生成されたFe³⁺が触媒として化学的に硫酸に酸化したりすると言われている^{11~13)}。また高井ら⁸⁾は、干拓後酸性化した土壌の硫黄酸化細菌数と鉄酸化細菌数を土壌層ごとに測定した結果、鉄酸化細菌数のピークが硫黄酸化細菌数のピークより上層にあったことを示し、上層の方が土壌の酸性化の開始時期が早いと仮定した時、酸性硫酸塩土壌の生成過程において硫黄酸化細菌から鉄

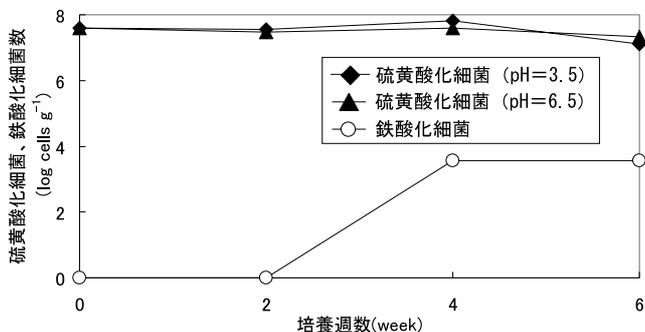


図5 硫黄酸化細菌、鉄酸化細菌数の経時的変化

酸化細菌への菌叢の遷移が起こることを示唆した。また、Arkesteyn⁶⁾は、パイライトを含む滅菌土壌に*Acidithiobacillus ferrooxidans*、*Acidithiobacillus thiooxidans*、*Thiobacillus thioparus*を接種し培養を行った結果、まず*Acidithiobacillus thiooxidans*と*Thiobacillus thioparus*が増殖し、pHが3.5より低くなると*Acidithiobacillus thiooxidans*と*Thiobacillus thioparus*は減少し、*Acidithiobacillus ferrooxidans*が増殖したという結果を示している。

本試験では、硫黄酸化細菌は培養期間と通じて10^{7~8} cells g⁻¹と高いレベルで検出されたのに対して、鉄酸化細菌は供試土壌の酸性化が起こった培養開始から2週目までの間は検出されなかった。このように本試験では、前述の報告とは異なり、土壌pHが低下しても硫黄酸化細菌の減少は認められなかったが、このことは硫黄酸化細菌がpH3.5の培地で高レベルで検出されていることと対応している。また、硫黄酸化細菌がpH6.5の培地でも高レベルで検出されていることから、供試土壌中の主要な硫黄酸化細菌は、培地pHが3.5~6.5と広範囲のpHで繁殖できることが推定される。以上のことから、供試土壌中の主要な硫黄酸化細菌は従来言われているような*Acidithiobacillus thiooxidans*や*Thiobacillus thioparus*などではなく、生育pHが2.0~6.0の*Acidiphilium cryptum*²⁴⁾のような生育pHが広く、中性域でも酸性域でも生育可能な硫黄酸化細菌であると考えられた。

つぎに、培養初期には鉄酸化細菌が検出されないため、鉄酸化細菌によるパイライトの酸化によるS⁰やS₂O₃²⁻などの硫黄化合物の生成は考えられず、また硫黄酸化細菌はパイライト中の硫黄を直接酸化することはできないといわれている^{11~13)}ことから、供試土壌中ではパイライトの化学的酸化によってS⁰やS₂O₃²⁻など硫黄酸化細菌が酸化できる硫黄化合物が生成されていることや供試土壌中の還元型硫黄化合物の形態がパイライト以外のものであることが考えられる。この点については、供試土壌中の硫黄化合物について、さらに詳細に分析する必要がある。

鉄酸化細菌については、培養2週目から4週目にかけて増殖し、4週目以降10⁴ cells g⁻¹で推移したが、その間化学性の大きな変化は認められなかった。しかし、培養終了時にも、可酸化性硫黄はほぼ1.0 g S kg⁻¹残存していることから、土壌中には様々な粒径の還元型硫黄化合物の結晶が存在しており、微粒な結晶中の還元型硫黄が比較的速やかに酸化され、粒径が大きくなるにつれて酸化速度が遅くなることから、鉄酸化細菌が検出された以降も土壌の酸性化が進行しない一つの原因として考えられた。

以上のように、本報では深層土壌における還元型硫黄化合物の酸化過程における硫黄酸化細菌について、新たな知見を得ることができた。今後はPCR-DGGE法などを用いて酸性硫酸塩土壌の生成過程における硫黄酸化細菌叢の遷移を調べたり、硫黄酸化細菌を単離・同定するなどしてどのような硫黄酸化細菌が土壌の酸性化に関与しているかを明らかにしていく必要がある。また、土壌中の硫黄化合物についても、さらに様々な観点から解析を進める必要があると考えられた。

参考文献

- 1) 村上英行：中海、宍道湖地域における酸性硫酸塩土壌の分布とその特性 酸性硫酸塩土壌の特性と改良法(第1報), 土肥誌, 38, 112~116 (1967)
- 2) 下川博通：筑後川下流域クリーク地帯における水田の圃場

- 整備と酸性硫酸塩土壌, 同上, 57, 188~190 (1986)
- 3) 石渡輝夫・沖田良隆・斎藤万之助: 北海道における各種酸性硫酸塩土壌の区分、分布および性状, 同上, 63, 86~90 (1992)
 - 4) 在原克之・渡辺春朗: 河川底質客入造成田における水稲の生育阻害の実態, 同上, 68, 103~111 (1997)
 - 5) Bloomfield C and Coulter JK: Genesis and management of acid sulfate soils., *Adv. Agron.*, 25, 265~326 (1973)
 - 6) Arkesteyn GJM: Pyrite oxidation in acid sulphate soils. The role of microorganisms. *Plant. Soil.*, 54, 119~134 (1980)
 - 7) 田中明編: 酸性土壌とその農業利用—特に熱帯における現状と将来—, P. 104~108, 博友社, 東京 (1984)
 - 8) 高井康雄・小川直人・竹内えりか・犬伏和之・加藤茂・松本聡・和田秀徳: 中海干拓地での溶脱・酸化過程と鉄・硫黄酸化細菌数の経年変化, 土肥誌, 60, 151~156 (1989)
 - 9) 小川直人・犬伏和之・松本聡・和田秀則・高井康雄: 干拓地土壌の酸性化とそれに関与する鉄・イオウ酸化細菌の動態, 同上, 61, 151~156 (1990)
 - 10) 大峽広智・尾和尚人: 農業用水路改修工事の掘削土壌を客土した水田土壌と掘削土壌の化学特性および硫黄酸化細菌フロア, 新大農研報, 56, 41~49 (2003)
 - 11) Friedrich CG: Physiology and genetics of Sulfur-oxidizing Bacteria. *Adv. Microb. Physiol.*, 39, 235~289 (1998)
 - 12) Schippers A, Rohwerder T and Sand W: Intermediary sulfur compounds in pyrite oxidation: implications for bioleaching and biodepyritization of coal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52, 104~110 (1999)
 - 13) Wakao N, Mishina M, Sakurai Y and Shiota H: Bacterial pyrite oxidation I. The effect of pure and mixed cultures of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* on release of iron., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 28, 331-343 (1982)
 - 14) 村上英行: 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, 同上, 32, 276~279 (1961)
 - 15) 米田茂男: 干拓地土壌に関する研究(第16報) 海底土および干拓地土中の酸価性硫黄の含量と土壌反応の変化の迅速測定法について, 岡山大学農学部学術報告, 17, 39~46 (1961)
 - 16) 土壌養分測定法委員会編: 肥沃度測定のための土壌養分分析法, P. 297~332, 養賢堂, 東京 (1991)
 - 17) 大峽広智・地濃美雪・中沢みどり・金野隆光・尾和尚人: 硫黄酸化細菌の硫黄酸化能力測定用培地の選定, 土肥誌, 74, 69~71 (2003)
 - 18) 加村崇雄・大源正明: 希釈頻度法による鉄細菌の計数, 土肥誌, 57, 248~251 (1986)
 - 19) 高木誠司: 定量分析の実験と計算 第2巻 容量分析法, P. 419~464, 共立出版, 東京 (1976)
 - 20) 加村崇雄: 火成性パイライト酸化による酸性硫酸塩土壌の生成と鉄・硫黄細菌, 土肥誌, 57, 252~256 (1986)
 - 21) 土壌微生物研究会編: 新編 土壌微生物実験法, P. 45~52, 養賢堂, 東京 (1992)
 - 22) 土壌環境分析法編集委員会編: 土壌環境分析法, P. 297~301, 博友社, 東京 (1997)
 - 23) 日本ペドロロジー学会第四次土壌分類・命名委員会: 日本の統一的土壌分類体系—第二次案(2002)—, P. 13~25, 薄友社, 東京 (2003)
 - 24) Staley JT, Bryant MP Pfennig N and Holt JG: *Bergey's manual of systematic bacteriology.*, P. 1867, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore (1984)

Change of Chemical Property and the Number of Sulfur-Oxidizing Bacteria and Iron-Oxidizing Bacteria in the Process of Acid Sulfate Soil Genesis

Hiroto OHBA¹, Yoshiyuki KOMAKI² and Naoto OWA^{2*}

(Received May 31, 2004)

Summary

We sampled the subsoil at 1.0-1.5m depth in the bank area of agriculture waterway where marine reduced sulfur compounds such as pyrite was considered to be contained in buried horizon on Sado Island in Niigata. To evaluate the function of sulfur-oxidizing bacteria and iron-oxidizing bacteria in the process of acid sulfate soil genesis, the changes in the chemical properties and the numbers of sulfur- and iron-oxidizing bacteria of the sampled soil at aerobic condition were studied.

The pH (H₂O) and pH (KCl) of the sampled soil lowered from 0 to 2 weeks after experiment started and changed at almost same value after 2 weeks. The value of electric conductivity (EC) increased rapidly from 0 to 2 weeks and increased slowly after 2 weeks. The concentration of oxidizable sulfur decreased from 0 to 4 weeks and changed at the same level after 4 weeks. On the other hand, the concentration of water-soluble sulfate ion increased from 0 to 4 weeks and changed at the same level after 4 weeks. The concentration of ferrous ion (Fe²⁺) decreased from 0 to 2 weeks and changed at the same level after 2 weeks. The concentration of ferric ion (Fe³⁺) increased from 0 to 4 weeks and increased slowly after 4 weeks. These results suggested that the soil sample was acidified as a result of the oxidation of reduced sulfur compounds in its soil. Furthermore, the soil sample was generated to acid sulfate soil within 2 weeks, because its pH (H₂O) was less than 4.0 after 2 weeks. The number of sulfur-oxidizing bacteria changed at 10⁷⁻⁸ cells g⁻¹ regardless of the pH of medium during the whole incubation period. On the other hand, no iron-oxidizing bacteria were detected from 0 to 2 weeks and its number was changed at 10¹ cells g⁻¹ after 4 weeks. Above results shows that oxidization of reduced sulfur compounds by chemically oxidization and sulfur-oxidizing bacteria took an important part of the initial process of acid sulfate soil genesis and iron-oxidizing bacteria took no part of it.

Bull.Facul.Agric. Niigata Univ., 57(1):47-51,2004

Key words : acid sulfate soil, iron-oxidizing bacteria, reduced sulfur compounds, sulfur-oxidizing bacteria

¹Graduate School of Science and Technology, Niigata University

²Faculty of Agriculture, Niigata University

* Corresponding author: owanet@agr.niigata-u.ac.jp