

ポット内で分解させたスギ落葉の化学的・微生物的变化

仁王以智夫*・春田 泰次**・川上日出國***

Chemical and Microbial Changes of Leaf Litter of Japanese Cedar (*Cryptomeria japonica*) decomposed in a Pot

Ichio NIHO*, Yasuji HARUTA** and Hidekuni KAWAKAMI***

はじめに

森林における落葉落枝の分解は森林生態系を支える主要な過程であり、これに関する研究は数多い。そして、その大部分は落葉落枝の分解にともなう重量減少速度や、環境条件が速度にあたえる影響などに関するものである¹⁹⁾。分解にともなう落葉成分の変化については、ワクスマンの近似分析法が用いられることが多い^{13, 15)}が、近年の有機物の分析法の進歩にともなって主要な有機成分の変化を直接的に扱ったり、またこれらの変化と無機養分の放出や酵素活性をふくむ各種生物活性との関連についての研究が行われるようになってきている^{6, 14, 28, 29)}。

前報²⁴⁾においては、スギ林の林床より種々の分解段階にある有機物を採取し、その性質、ことに無機窒素代謝に関する活性を比較して、窒素固定活性と窒素の無機化活性が一連の順序で進行すること、分解の過程での窒素の有機化の段階 (F₁ 区分) と無機化の段階 (F₂ および H 区分) は肉眼的に識別しうる区分として存在すること、さらに無機化された窒素は弱湿性土壌では急速に硝酸に変化するが乾性土壌では硝酸に変化しないことなどについて報告した。

野外で種々の分解段階にある有機物を採取し、その性質を比較することは森林土壌を自然状態で把握するのに最も常識的な方法と考えられるが、時間の経過を部位の違いとして捉えるために、分解過程を直接示すものではない。そこで本実験では、林床にスギ落葉を入れたポットを設置し、分解にともなう落葉のいくつかの生物的、化学的性質の変化を経時的に追跡するとともに、主として F₁ 区分に相当すると考えられる段階について、無機窒素代謝に関する前報で得られた結果が落葉の分解にともなう諸性質の変化とどのように関連するかを明らかにすることを試みた。

実験方法

落葉の採取と試料の調製

実験に用いたスギ落葉は 1981 年の秋、東京大学愛知演習林 (愛知県瀬戸市白坂町) 内 62 林班

* 東京大学農学部附属演習林研究部

Administration Office of University Forests, Faculty of Agriculture, University of Tokyo.

現: 静岡大学農学部応用生物化学科

Present address: Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University.

** 東京大学農学部附属演習林愛知演習林

University Forest in Aichi, Faculty of Agriculture, University of Tokyo.

*** 名古屋大学農学部林産学科

Department of Forest Products, Faculty of Agriculture, Nagoya University.

の1964年に植栽されたスギ造林地無施肥区から採取した。採取場所の状況は既報²⁾に示すとおりである。赤褐色の新鮮落葉を選び、風乾状態で保存した。採取した落葉のうち枝の直径約3mm以下の部分を集め、長さ5~10cmに切断して試料とした。試料の分析値を表-1に示す。

林床における落葉の分解と試料の採取

1982年6月14日東京大学愛知演習林内64林班の、試料採取地に近接したスギ見本林(1966年植栽)内にスギの落葉350g(絶乾重で310g)をつめた直径25cm、高さ30cm、容量14.7lの下口付きポットを置き、上部を寒紗で覆って分解させた。雨水が自由に落葉の層内を通過できるようにポットの下口は開放した。

試料の採取は1982年6月から1983年10月までの17か月にわたって行ない、1~2か月毎の、午前10時に行なった。ポット内の温度を測定したのち、試料をよく混合して

その一部を取り出し、長さ5mm以下に細断した。試料は現地での測定に用いる部分を除いて実験室に持ち帰り、測定に供した。一部の測定項目については試料採取期間を1984年9月のおよそ27か月まで延長した。

試料の分析

実験室に持ち帰った試料はただちに含水率とpHを測定したのち、各種微生物数、生理活性および無機態窒素量の測定に供した。さらに電子顕微鏡観察用の試料とした。試料の一部は風乾し、化学成分の分析に用いた。測定項目のうち、二酸化炭素の発生、窒素固定、およびセルラーゼの各活性は現地での値をも測定した。この場合は試料採取後ただちに後述の方法に従って調製した測定系を林床のポットのすぐ横に遮光して設置し、24時間後に回収して実験室に持ち帰り、測定を行った。24時間中の最高と最低温度を知るために測定系の付近に最高最低温度計を置いた。

含水率、pH、アンモニア態および硝酸態窒素は前報²⁴⁾に従って分析した。風乾し、振動ミルで粉碎した試料について全炭素量をチューリンの変法²⁰⁾により、また全窒素量をセミキエルダール法によって測定した。さらに粉碎試料を550℃以下で灰化し、塩酸に溶解、珪酸分離した溶液について、原子吸光法でカリ、カルシウム、マグネシウム、鉄、マンガン、ナトリウムの各元素を定量し、さらにメタバナジン酸法による410nmの比色法によってリンの定量を行った。

落葉の主成分の一つであるクラソンリグニン²²⁾はTappi法³²⁾によって定量した。また、落葉の表面を覆うクチクラ層の成分であるクチンはその全量がクラソンリグニン区分に含まれるので、クラソンリグニンから川上ら¹⁷⁾の方法に従って定量した。クラソンリグニン0.3gを取り、2N水酸化ナトリウムとともに170℃、2時間加水分解した。内容物を取り出し、塩酸で酸性

表-1 供試したスギ落葉の分析値

Table. 1 Some characteristics of the fresh leaf litter of Japanese cedar

Moisture	11.4%
pH (H ₂ O)	5.1
Total carbon	57.0%
Total nitrogen	0.66%
C/N ratio	86
Alcohol-benzene soluble matter	18.3%
Klason lignin	34.7
Cutin acids	10.4
Holocellulose	44.1
α -Cellulose	36.6
β -Cellulose	0.1
Calcium	2,470 mg 100 g ⁻¹
Iron	31.0
Magnesium	100.0
Manganese	4.6
Phosphorus	20.0
Potassium	60.0
Sodium	6.3
Ammonium nitrogen	2.64
Nitrate nitrogen	0.00

化して生成したクチン構成モノマー（クチン酸）をエチルエーテル抽出，溶媒留去後ジアゾメタンメチル化し，ガスクロマトグラフ法によって分析した。ホロセルロースの定量は Wise の方法に従った。 α -セルロースおよび β -セルロースはホロセルロースの 17.5% アルカリに対する溶解度から求めた²¹⁾。

全般的な生物活性の指標としての二酸化炭素の放出量の測定は直接吸収法³¹⁾によった。湿潤試料 5 g を容量 250 ml のねじ蓋つきプラスチック容器にとり，10 ml の N/5 水酸化ナトリウム溶液を入れた小ビーカーを入れて密栓し，林床または 30℃ の定温器内においた。24 時間後，ビーカー内のアルカリに塩化バリウムを加えて塩酸で滴定し，採取後 24 時間の間に試料 1 g が放出する二酸化炭素量を算出した。セルラーゼ活性の測定は PANCHOLY と RICE²⁶⁾ の方法を変更して用いた。湿潤試料 2 g を 100 ml 容ビーカーにとり，トルエン数滴を加えてよく混合し，15 分後に pH5.9 の 0.2 N 酢酸緩衝液 10 ml と 1% カルボキシメチルセルロース (CMC) 溶液 10 ml を加えてプラスチックフィルムで覆い，林床で 24 時間放置した。そして CMC より生成した還元糖を Somogyi の方法で定量し，CMC を加えないで同様の処理をした対照区での値との差から試料採取後 24 時間に試料 1 g が CMC より生成する還元糖量を求めた。そしてそのグルコース換算量をセルラーゼ活性とした。窒素固定活性は島津 GC-3PF ガスクロマトグラフを用いたアセチレン還元法により，また窒素の無機化（アンモニア生成）活性および硝化活性は前報²⁴⁾にしたがって測定した。

微生物数の測定においては，湿潤試料 5 g を 50 ml の生理食塩水-リン酸緩衝液 (0.05N, pH 7.0) 中で 3 分間ホモジェナイズした浮遊液を用いた。従属栄養細菌数はアルブミン寒天による希釈平板法によった。また，糸状菌数は JONES-MORRISON 法⁸⁾によった。顕微鏡の視野に巾 50 μ m の格子を置き，各正方形内の一連の菌糸を一個とした。セルロース分解菌数は CMC を基質とする希釈平板法³³⁾を変更して用いた。すなわち，分解菌数が多いときには食塩の添加によって生じる加水分解ゾーンがお互いに重なり合って計数が困難であったので，希釈段階を変えた 10 枚ずつの平板を作成し，それぞれの平板上の加水分解ゾーンの存在から MPN 法によって菌数を算出した。窒素固定菌の計数には RENNIE の半流動寒天培地²⁷⁾を次のように改変して用いた。sucrose 2.0 g, mannitol 2.0 g, Na-lactate (60%) 0.5 ml, K_2HPO_4 0.8 g, KH_2PO_4 0.2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.06g, NaCl 0.1 g, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.025 g, $Na_2FeEDTA$ 0.028 g, yeast extract (Difco) 0.1 g, biotin 5 μ g, p-aminobenzoic acid 10 μ g, agar 3.0 g, distilled water 1,000 ml. これを培地として用い，アセチレン還元活性を指標とする 10 倍希釈 10 連の MPN 法によって，前報²⁴⁾にしたがって計数した。

走査型電子顕微鏡による観察

採取した試料を 3% グルタルアルデヒドで固定したのち，酢酸イソアミルと置換，臨界点乾燥し，金蒸着して日本電子 JEOL JSM T-300 および日立 S-450 走査型電子顕微鏡でその表面を観察した。

実験結果

温度および試料の含水率と pH の変化

供試したスギ落葉のいくつかの分析値を表-1 に，また試料採取時に測定した試料温度，試料採取後 24 時間中の最高，最低気温，および試料の含水率と pH の変化を図-1 と図-2 に示す。実験

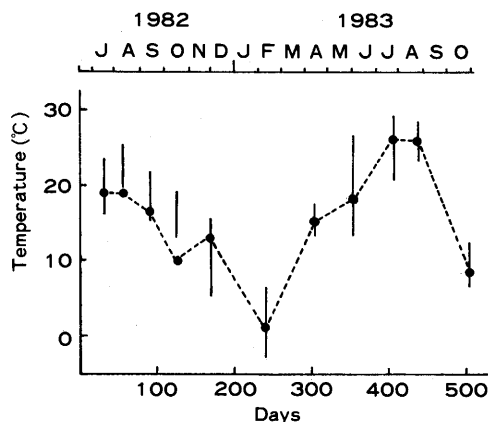


図-1 実験期間中の試料の温度変化。たて線は試料採取後 24 時間の最高温度と最低温度の幅をあらわす。

Fig. 1. Temperature of the litter during the experimental period. Bars in the figure indicate maximum and minimum atmospheric temperature within 24 hr after sampling.

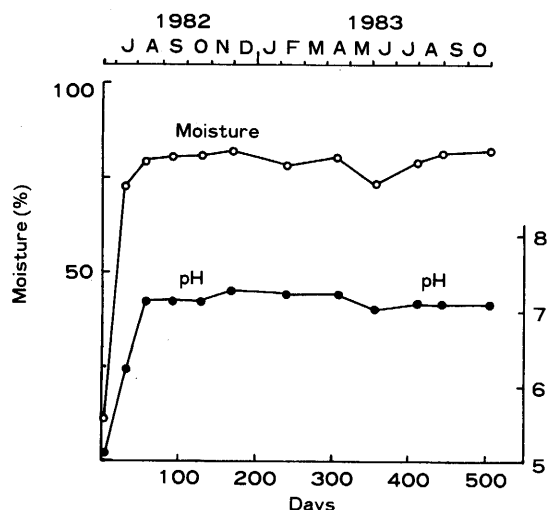


図-2 試料の含水率と pH の変化

Fig. 2. Changes in the moisture and pH of the sample.

開始直後に雨季に入り、15 日間で 15 mm、50 日までさらに 220 mm の林内雨があったため、試料の含水率は急速に高まり、以後全期間を通じて 80%前後に保たれた。pH もこの時期に 7.0～7.2 に上昇し、以後およそこの値付近で推移した。

二酸化炭素放出量と微生物数の変動

全生物活性の指標としての二酸化炭素放出量と糸状菌および細菌（好気性従属栄養細菌）数の変動を図-3 に示す。実験開始後二酸化炭素放出量は急速に高まり、30 日で最大値に達した。その後、現地での放出量が冬期に低下したほかはほぼ一定のレベルで終始した。微生物数に関しては、微生物間での相の遷移が観察された。すなわち、初期の二酸化炭素放出量のピークに対応して糸状菌数が増加して 56 日目で最大に達し、その後糸状菌の減少につれて細菌数が増大して 169 日目（11 月 30 日）に最大値に達した。翌年には秋季に細菌数の増大が認められたものの、糸状菌に関しては前年度のような菌数の増加はみられなかった。

分解にともなう落葉成分の含量と C/N 比の変化

分解にともなう炭素、窒素およびその他の無機成分の含有率の変化を表-2 に示す。炭素の含有率は分解の進行にともなってやや減少する傾向にあったが、窒素の含有率は増加した。その結果、分解の程度を表すと思われる C/N 比は 504 日の分解の間に 86 から 44 まで、約 1/2 に減少した（図-4）。C/N 比の減少は最初の約 2 か月はゆるやかであったが、それに続く 8 月上旬から 9 月上旬にかけての 1 か月に急に約 10 減少した。その後翌年の 2 月まで（約 240 日目）ほぼ 70 付近で推移した。分解の 2 年目にはこのような段階はみられず、以後ほとんど直線的に減少した。その他の成分の含有率についてはリンとマンガンが明らかな増加を示したのに対し、カリとマグネシウムは減少の傾向を示した。その他の元素についてははっきりした傾向は認められなかった。

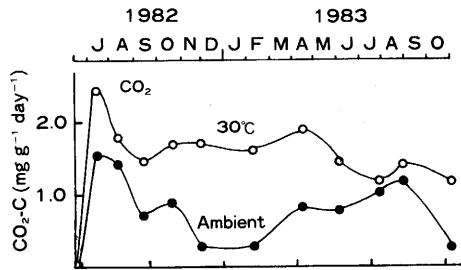


図-3 試料よりの二酸化炭素放出量と試料中の細菌, 糸状菌数の変化

Fig. 3. Evolution of carbon dioxide and the number of fungi and bacteria.

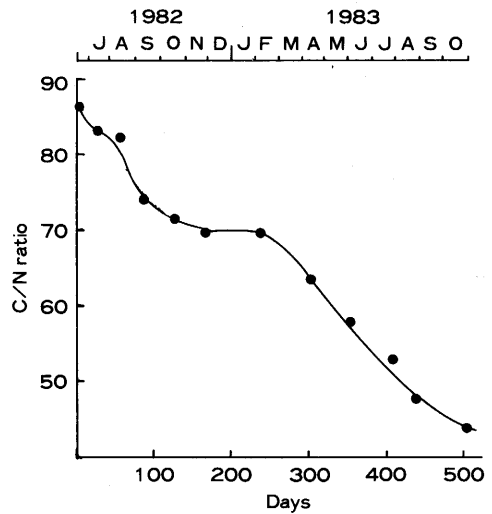


図-4 分解の進行にともなう C/N 比の減少

Fig. 4. Decrease in C/N ratio during decomposition.

表-2 スギ落葉の分解にともなう無機成分量の変化

Table 2. Changes in the amount of carbon and plant nutrients of Japanese cedar leaf litter during decomposition

Date of sampling	Days	C	N	P	K	Ca	Mg	Na	Mn	Fe
		(g 100 g ⁻¹)	(mg 100 g ⁻¹)							
'82 Jun. 14	0	57.0	660	20	60	2,470	100	6.3	4.6	30.6
Jul. 14	30	56.7	680	20	50	2,690	110	6.4	4.5	45.9
Aug. 9	56	56.7	690	20	30	2,590	90	4.6	4.7	53.9
Sep. 13	91	55.9	760	22	40	2,660	100	7.9	5.0	67.1
Oct. 18	126	54.3	760	21	30	2,600	90	5.2	5.0	45.4
Nov. 30	169	54.7	790	21	30	2,580	80	6.7	5.2	37.9
'83 Feb. 8	239	55.6	800	22	30	2,730	90	6.7	5.2	50.8
Apr. 15	305	48.8	770	27	30	2,540	80	8.0	5.7	55.6
Jun. 3	354	50.0	870	31	30	2,650	90	5.6	6.0	57.2
Jul. 28	409	50.8	960	27	20	2,080	80	3.8	6.7	55.7
Aug. 29	441	50.7	1,070	33	40	2,290	80	7.2	7.1	89.6
Oct. 31	504	49.5	1,130	35	30	2,700	90	7.7	7.6	95.2

Numbers are expressed as dry matter basis.

表-3 スギ落葉の分解にともなう有機成分含量の変化

Table 3. Changes in the amount of some organic components during decomposition

Date of sampling	Days	Alcohol- benzene soluble (% of dry matter)	Klason lignin	Cutin acids	Holo- cellulose	α - Cellulose	β - Cellulose
			(% of defatted dry matter)				
'82 Jun. 14	0	18.3	42.5	12.7	54.0	36.6	0.1
Jul. 14	30	16.1	42.5	12.7	53.3	35.4	trace
Aug. 9	56	13.9	47.0	14.2	53.3	35.2	0.1
Sep. 13	91	13.0	49.4	11.9	48.4	32.6	trace
Oct. 18	126	12.0	50.0	8.6	49.8	32.8	trace
Nov. 30	169	12.6	50.4	10.2	48.4	31.4	0.5
'83 Feb. 8	239	11.8	50.0	9.0	50.8	32.2	2.0
Apr. 15	305	11.5	50.1	7.3	48.5	30.4	2.5
Jun. 3	354	11.7	51.5	7.5	44.9	27.7	2.8
Jul. 28	409	9.2	50.6	3.4	48.2	28.4	5.1
Aug. 29	441	9.7	51.9	3.2	42.4	24.4	2.4
Oct. 31	504	9.2	52.9	4.5	43.3	24.1	3.3

落葉を構成する主な有機成分のうち、アルコール-ベンゼン可溶区分は実験の全期間を通じて顕著な減少を示し、クチン酸、ホロセルロース、および α -セルロースも減少の傾向にあったが、クラソンリグニンはやるやかに増加した(表-3)。表-3から求めた落葉のアルコール-ベンゼン可溶区分:クラソンリグニン区分:ホロセルロース:その他の成分の比は最初が18:35:44:3であったのが504日間の分解によって9:48:39:4となり、リグニンとセルロースの比が逆転する。

分解の進行にともなう落葉の重量変化の推定

落葉の重量は分解によって減少し、また、最初落葉に含まれていた成分も減少するが、この間降雨や生物による取り込みなどによって付加される成分もあると考えられる。表-2および表-3に示した成分含量の値は各分解段階にある試料を分析して得られた値である。従って、これらの値はリターそのものの性質を表すものであっても、各成分の増減については相対的なものに過ぎない。

分解にともなう各成分の変化の絶対値を知るためには重量の減少を求める必要がある。しかし、物理的な細片化による消失などがあるために、一般には野外において分解による重量減少を求めることは困難である¹¹⁾。本実験では落葉をポットにつめて野外に放置し、その中からしばしば試料を採取するという形をとったために、分解の進行にともなう重量減少を直接求めることはできなかった。そこで、分解期間を通じて外部との出入りが比較的少なく、落葉中に安定して存在していたマンガンに着目し、それを基準にして間接的に重量の減少を求めることにした。504日の間に雨水からポットに流入したマンガンの量は100gあたり0.20mg、落葉を入れたポットから流出した量は0.06mgで、最初の量のそれぞれ4.3%と1.3%であった(投稿準備中)。

図-5には、表-2のマンガン含有率の変化から計算した推定の重量変化を示す。重量は最初の30日を過ぎる頃から1982年冬季の休止期を除いて減少を続け、504日目では当初のおよそ60%になった。こうして求めた重量の減少とC/N比の減少の間には高い相関($r=0.9906$)があった。

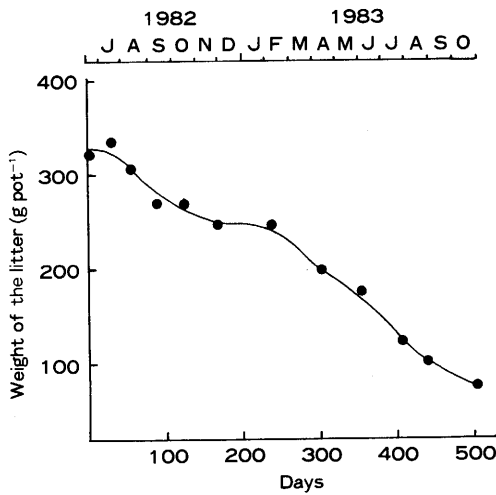


図-5 リター中のマンガ量より求めた推定重量の変化

Fig. 5. Change in the estimated weight of the litter calculated from the amount of manganese in the litter.

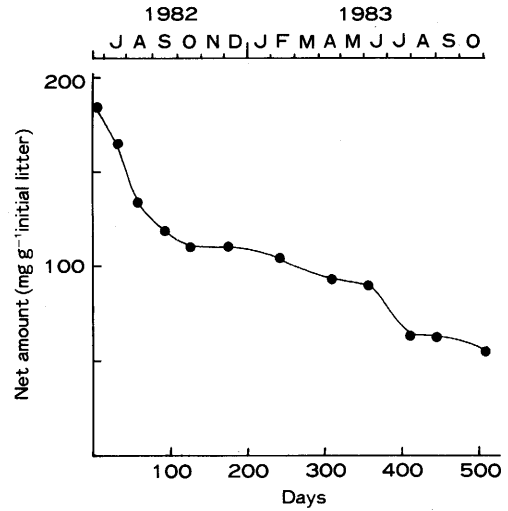


図-7 アルコール・ベンゼン混液可溶物質の正味の減少

Fig. 7. Net decrease in the amount of the materials soluble in the mixture of ethanol and benzene.

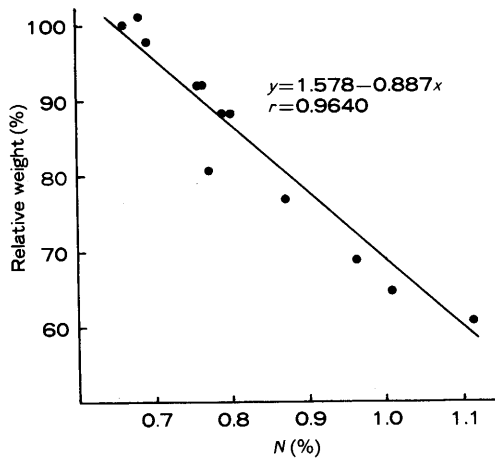


図-6 分解にともなうリターの重量減少と窒素含量との関係

Fig. 6. Linear relationship between the residual weight and the concentration of nitrogen in the decomposing litter.

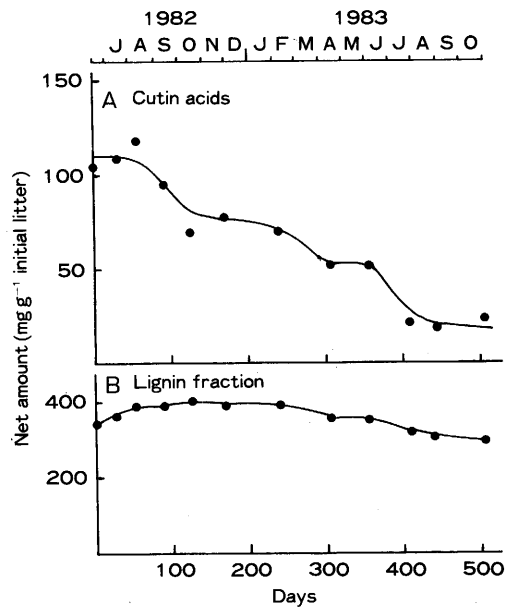


図-8 クチン酸とリグニン区分の量の変化

Fig. 8. Changes in the net amount of cutin monomers and lignin fraction during decomposition.

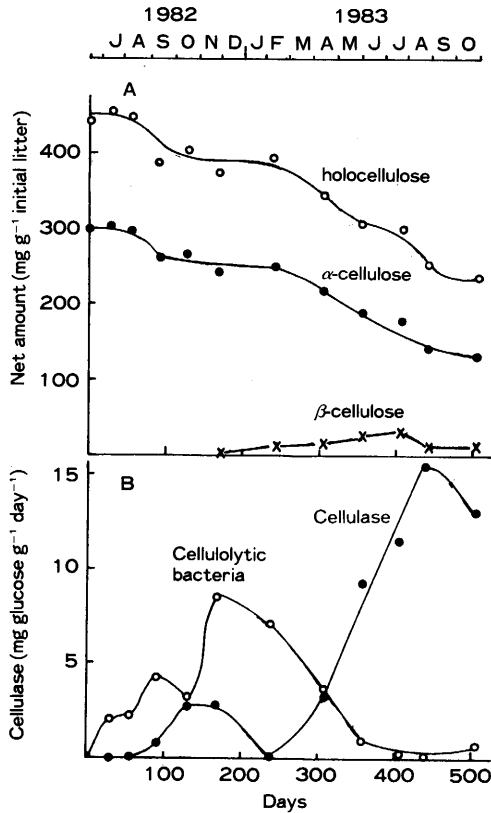


図-9 ホロセルロース、 α -セルロース、および β -セルロース量の変化とリターのセルラーゼ活性およびセルロース分解細菌の変動

Fig. 9. Net changes of holo, α -, and β -cellulose, and changes in cellulolytic activity and bacteria of the litter.

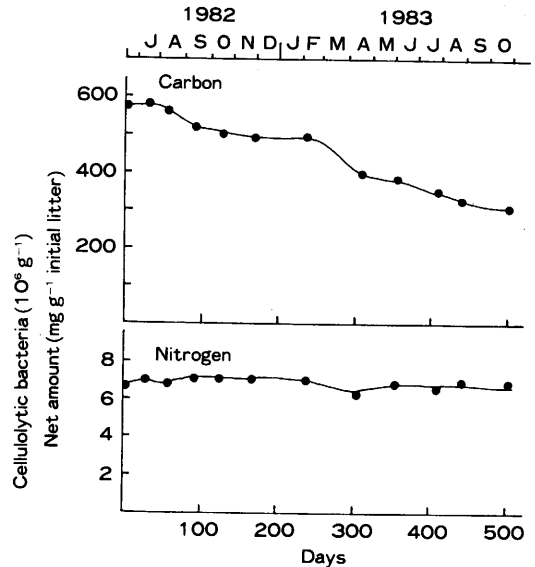


図-10 試料中の炭素および窒素量の正味の変化

Fig. 10. Net changes of the amount of carbon and nitrogen in the litter.

ABER と MELILLO¹⁾ によれば、落葉の分解において、1) 物理的な作用による重量減少を最低に見積もり、2) 窒素量が微生物の増殖を制限する程度に低く、3) 開放系である（外部より窒素の供給がある）場合には重量とその時の窒素含有率との間には直線関係がある。マンガンの変化から計算した推定の重量と表-2 に示した窒素含量との間には図-6 に示すように高い相関のある直線関係がある。このことは上記の方法による重量変化の推定が妥当であることを示す。

落葉主成分の正味の変化

表-3 のデータから、落葉中の主な有機成分の変化を最初の含量に対する比で表し、いくつかの活性やそれに関与する微生物数の変化と比較した。

アルコール-ベンゼン可溶区分は図-7 に示すように実験開始直後から急速に減少し、126 日目には最初の約 60% になった。それ以後ゆるやかな減少時期が翌年の 6 月までおよそ 240 日間続き、それ以降さらに減少して、504 日目までに最初の約 70% が分解された。分解初期の急速な減

少は図-3 に示す糸状菌数のピークと対応し、またそれに続くゆるやかな減少は細菌数のピークと対応している。これは、落葉分解においては糸状菌によるアルコール-ベンゼン可溶区分の分解が初期段階であることを示唆する。

脂溶性成分とともに落葉表面のクチクラ層を構成するクチン酸の変化を図-8A に示す。クチン酸は56日目頃から急速に減少し、82年度冬季の126日目では最初のおよそ67%になり、さらに翌年秋の504日目までには24%になった。クラーソンリグニン区分にはクチンの他に高分子窒素化合物を含む種々の物質が含まれるので、この区分からクチン酸をさし引いた重量を単純にリグニンの量とすることはできないが、最初の年はむしろ増加し、分解2年目になってゆるやかな減少を示すようになる(図-8B)。

ホロセルロースについては、クチン酸と同様最初の約2か月は減少しなかったが、それ以降、56日目から90日目、および240日目以降の2つの減少時期が認められた(図-9A)。90日目から240日目にかけての平坦な時期は1982年から83年にかけての冬季に当たり、この時期の生物活性が微弱なことを示している。この傾向は α -セルロースについても同様であった。同時に測定したセルラーゼ活性およびセルロース分解菌の変動を図-9B に示す。活性はセルロースの最初の急激な減少に対応して高まり、169日目(11月)まで続いた。温度が最高6.5℃、最低-2.7℃

まで下がった83年2月(図-1参照)には活性はほとんどなくなったが4月になって再び高まり、以後前年度を大きく上回る活性が検出された。これは上記240日目以降のセルロース分解と対応していた。分解菌については、最初の時期に相当するピークが認められ、これは、図-3 に示した細菌のピークと時期的に一致していた。しかし、翌年のセルロースの減少や活性の高まりに相当する分解菌の増大は見られなかった。本実験で用いた方法では細菌以外の分解菌は計数できないので、翌年のセルロース分解には真菌類など、細菌以外の微生物が関与する可能性がある。

炭素および窒素量の正味の変化

同様に、表-2の結果から分解にともなう炭素量と窒素量の変化を求めた(図-10)。分解のごく初期と冬期を除き、分解の進行とともに炭素量は減少したが、窒素量は全期間ほとんど変化しなかった。したがって図-4 に示したC/N比の減少は分解による炭素量の減少によるものである。

窒素固定活性

分解しつつあるスギ落葉の一段階に窒素固定活性が存在することはすでに報告した²²⁾が、窒素固定活性が分解の経過とどのように関連するかを検討するために、採取試料の窒素固定(アセチレン

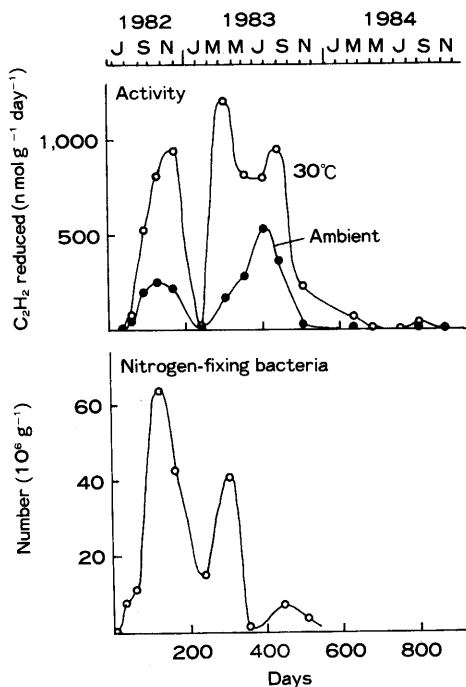


図-11 試料のアセチレン還元活性と窒素固定細菌数の変動

Fig. 11. Variation of acetylene-reducing activities and the number of nitrogen-fixing bacteria during decomposition.

還元) 活性と窒素固定菌数を測定した (図-11)。活性については測定の期間をさらに 1 年間延長し, 84 年の 9 月 11 日までの 801 日間おこなった。活性は 30 日から 56 日にかけて増大し, 126 日目の 10 月 18 日には最大値 $259 \text{ nmol g}^{-1} \text{ day}^{-1}$ を示した。冬季には現地, 実験室内ともに活性は消失したが, 翌年はさらに活性は高く, 7 月後半に最大値 $537 \text{ nmol g}^{-1} \text{ day}^{-1}$ を示した。活性はその後急速に減少し, 3 年目にはほとんど消失した。このことは, 前報で明らかにしたように窒素固定活性が F_1 区分と名付けた分解初期の特定の区分にのみ存在するという観察と一致しており, 本実験の試料が, 3 年目以降に F_2 区分に相当する分解段階に入ること示している。窒素固定菌数も活性のピークとはほぼ一致していた。

現地で測定した窒素固定活性の数値と先に述べたリター中のマンガン量に基づく重量の減少値を用いて, 落葉が分解されるまでに固定される窒素量を算出した。図-11 に示した結果のうちの現地における窒素固定活性の時間変化をポット全体の活性に換算するために活性に採取時の推定重量を乗じ, さらにアセチレンから窒素への換算比 $3:1^{10)}$ を用いて, 試料採取後 24 時間中にポット内の試料全体が固定する窒素量を算出した (図-12)。図に示した面積の 2 年間の合計が一定量 (この場合は 310 g) の落葉が分解を受ける間に固定される窒素量になる。結果は表-4 に示すとおりで, 1 g のスギ落葉が 2 年間にわたって分解される間に約 0.7 mg の窒素が生物的に固定されることになる。

窒素の無機化活性と硝化活性

窒素固定活性が存在する 2 年目までは, 前報にのべた F_1 区分に相当すると考えられる。本実

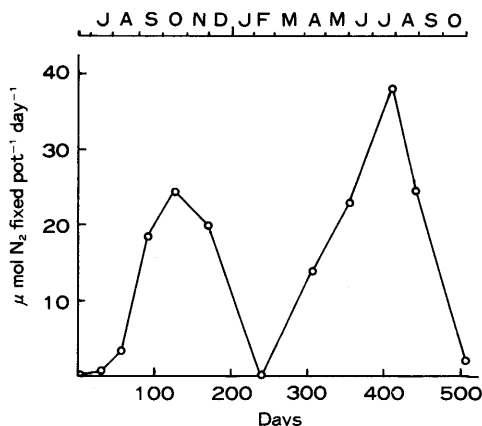


図-12 ポットあたりに換算した窒素固定活性

Fig. 12. Changes in the nitrogen-fixing activity of the litter. The activities were expressed as the amount of nitrogen fixed by the whole litter in the pot during successive 24 hr after sampling.

表-4 スギ落葉が分解される間に固定される窒素量

Table 4. Amount of nitrogen fixed during the decomposition of Japanese cedar leaf litter

Unit	Nitrogen fixed (mg)		
	1982	1983	Total
Per pot	79.2	137.1	216.4
Per g initial litter	0.255	0.442	0.697

表-5 分解段階による硝化活性の違い

Table 5. Comparison of nitrifying activities of Japanese cedar leaf litter with different decomposition periods

Decomposition period		Nitrogen (mg 100 g^{-1} dry matter)	
		Initial	After 60 days' incubation
400 days	$\text{NH}_4\text{-N}$	5.66	3.30
	$\text{NO}_3\text{-N}$	0.71	0.71
770 days	$\text{NH}_4\text{-N}$	5.51	3.23
	$\text{NO}_3\text{-N}$	2.71	5.15

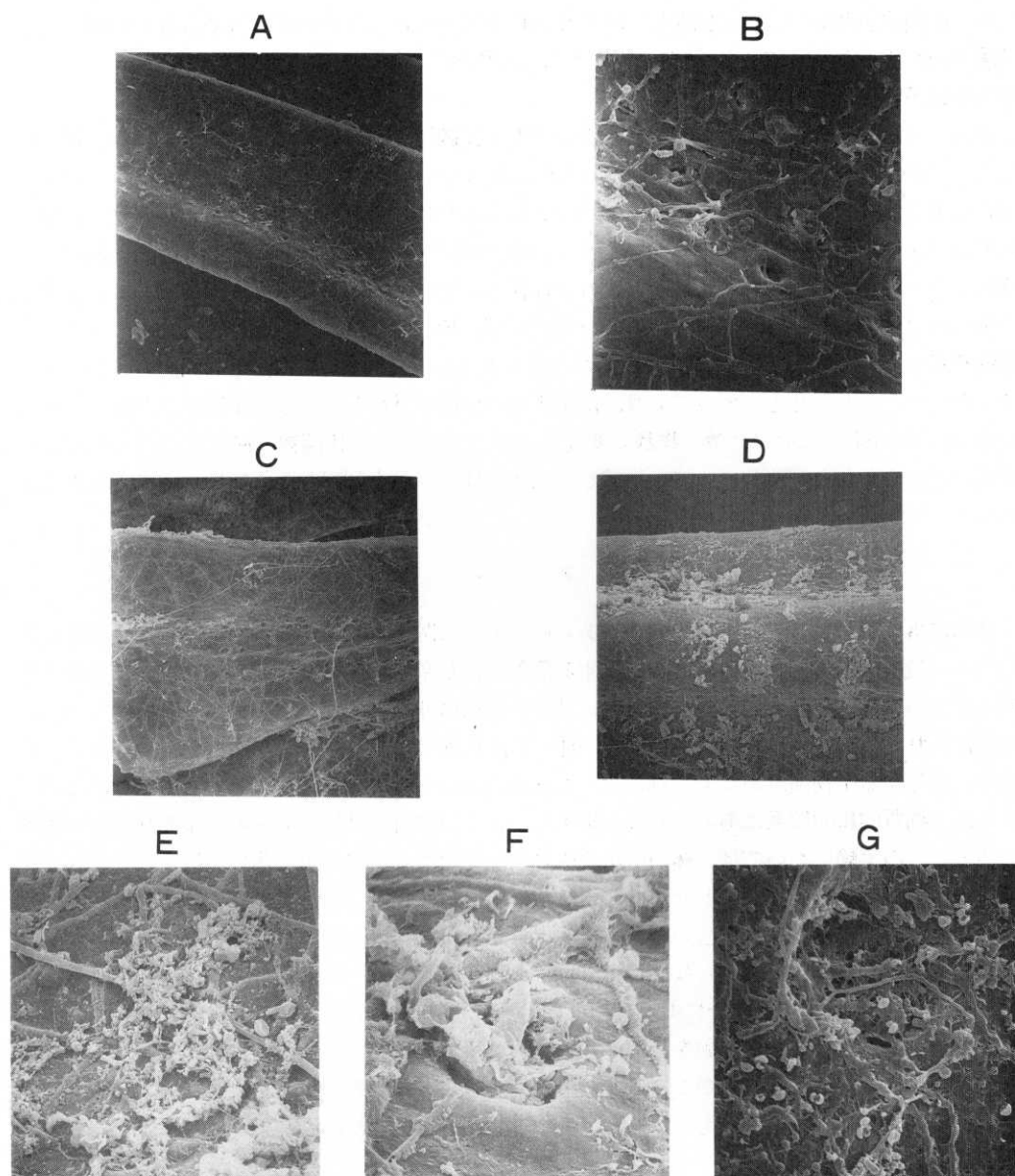


図-13 分解しつつあるスギ落葉の走査型電子顕微鏡写真

A. 0日目(×54) B. 0日目(×230) C. 60日目(×54) D. 120日目(×54) E. 120日目(×350) F. 120日目(×1200) G. 440日目(×1200)

Fig. 13. Scanning electron microscopic photographs of decomposing Japanese cedar leaf litter.

験の最初の2年間はF₁区分に当たることを確かめるために、落葉分解の400日目と770日目の2回の採取試料を30℃で60日間保温培養し、生成したアンモニア態窒素と硝酸態窒素を定量した(表-5)。窒素固定が活発に進行する400日目の試料では硝酸の生成はまったくみられなかつ

たが、窒素固定活性のほとんど消失した 770 日目の試料では未だそれ程顕著ではないが明らかな硝酸生成がみられ、すでに F_2 区分に相当する分解段階に入っていることが確認された。

走査型電子顕微鏡による表面の観察

種々の分解段階にある落葉の表面を、走査型電子顕微鏡で観察した(図-13)。供試した試料にはすでに糸状菌の菌糸が存在し、すでに気孔から侵入している菌糸もあった(A, B)。60 日目には試料の表面はいっそう密な菌糸のネットで覆われるようになった(C)。120 日目になると、糸状菌菌糸のほかに細菌の塊が各所にみられるようになり(D)、これを拡大してみると細菌は糸状菌の菌糸にそってあたかも鞘のようにかたまって存在し、先に増殖した菌糸を栄養源としているようであった(E)。気孔も微生物のすみかのようにみえた(F)。440 日になると糸状菌菌糸の多くは細胞壁を残すのみで、各所に点在する細菌がめだった(G)。この時期には落葉表面にこまかい穴が多く空いて、また気孔もくずれており、落葉組織の分解が進行しているのが観察された。これらの観察結果は図-3 に示した微生物数の変動と一致しており、糸状菌数の減少につれて起こる細菌数の増加のかかなりの部分はすでに生成した糸状菌体の成分を利用したものであることが推定された。

考 察

林床に落葉を置いてその重量や成分、あるいは分解に関与する動物や微生物の変化を追跡する場合に、最も問題とされるのは、対象とする落葉を含む系が必ずしも自然状態を十分には表さないことである。林床での落葉分解の研究には多くの場合リターバッグ法が用いられる。しかし網の袋に入れた落葉は含水率などの物理的条件が自然状態とは異なり、また網目の大きさによって分解に関与する生物種が異なる、細片化した落葉が網目から失われる、などの問題点がある³⁰⁾。さらに、物質的に開放系にあるために、雨水などよりの物質の供給や溶脱の定量的な解析が困難である。この実験においては、林内雨から落葉層へ供給される養分量と落葉分解にともなって流出する養分量の経時変化をあわせて検討するために、林床に置いたポット内で落葉を分解させるという方法をとった。この方法の最大の問題点は、落葉が土壌と接触していないために、大型や中型の土壌動物が分解に関与しないことである。しかし、既報²³⁾のようにスギは比較的まとまったマスとして落葉し、 F_1 区分にあたる初期の分解段階は細片化しないで主に地表から離れた部位で進行する。したがって実験を分解の初期に限れば、比較的大きな土壌動物の影響は除外しうると考えられる。一部を除いてこの実験を約 500 日程度に限ったのもそのためである。しかし、川上ら¹⁶⁾はリターバッグ法と比べて分解が遅いことを指摘しており、結果の解釈には一定の限度がある。

この実験で明らかになった点の一つは、冬期の分解が休止する期間をはさんで、分解は少なくとも 3 つの段階を経て進行することである。第 1 期は実験開始からの 2 か月で、この時期を特徴づけるのは含水率の増加、pH の上昇、有機溶媒可溶物質の顕著な減少、およびそれともなう二酸化炭素放出量の急激な増大と糸状菌の増殖である。一般に植物体の地上部の表面はクチン骨格とそれを埋める有機溶媒可溶の物質からなるクチクラ層で覆われており、植物体を保護している。初期の有機溶媒可溶物質の減少は以後の落葉分解のために必要な過程であり、その結果試料の含水率が増加して微生物による分解の場を形成すると考えられる。そしてこの過程にはおそらく糸状菌が関与していると推察される。第 2 期はそれに続く、冬に入るまでのおよそ 3 か月間と

その後の約1年間である。この時期の特徴は糸状菌数の減少とそれに続いて起こる細菌数の増大で、同時に重量、C/N比、クチン酸の顕著な減少、窒素固定活性の出現、セルロースの減少とセルラーゼ活性の出現などが観察された。また組織にも細かい穴があいて、この時期に主要な成分の本格的な分解が進行することを示している。後半になって活発な二酸化炭素放出および高い窒素固定活性とセルラーゼ活性がみられたが、糸状菌、全細菌、セルロース分解菌、窒素固定菌とも数は前半に比べて低かった(図-3, 9, 11 参照)。このことは後半に入ってからマイクロフロラが変化したことを示しているが、その内容については不明である。しかし、トビムシやセンチュウのような小動物がポット中に多く観察されており、この時期の物質変化とそれに関与する生物との関連を調べるためには、本実験では定量をおこなわなかった小動物の作用を含めた検討が必要である。第3期は本実験では一部の項目を除いて検討しなかったが、分解3年目以降で、この段階に入ると窒素が有機化から無機化へと転換する。

窒素固定活性(図-11)および硝化活性(図-4)の結果より、この実験の全期間の約500日は、前報²⁴⁾に述べたスグリターのF₁区分に相当することがわかる。それ以降、窒素固定活性は消失するとともに窒素は硝酸態として流出することがポットよりの流出水を分析することによって確かめられた(未発表)ことから、3年目以降になって落葉は分解のF₂区分に移行されると結論される。F₁からF₂へ移行する時のC/N比はおおよそ45で、これは岐阜大学位山演習林スギ林や瀬尻国有林での結果²⁴⁾とほぼ一致している。F₂区分に入ったと推定される3年目の試料を分析した結果では、C/N比は504日目から880日目の間44から40の間にあった(未発表)。したがって、F₁区分の間のC/N比の減少は窒素量は変化しないで炭素のみが失われるためであり、F₂区分のC/N比が少なくとも最初の1年間ほとんど変化しないのは、分解がこの段階に入ると炭素の消失とともに窒素の流出あるいは脱窒による消失が始まるためと説明される。

落葉の分解の初期に窒素の絶対量が増加することは多くの研究者が報告しており^{7, 9, 11)}、増加量は20から60%におよんでいる。その理由として降雨や昆虫のふんよりの供給、生物学的窒素固定などが推定されている。BERGとSÖDERSTRÖM⁵⁾は*Pinus sylvestris*の落葉を分解させたときその窒素量と糸状菌バイオマス量との間に相関があることを示し、分解初期には供給された窒素が微生物菌体に保持されることを示した。図-10に示したようにこの実験では窒素量の増加は7%以下で、しかも窒素量は間接的に推定した重量を基に求めているため、この増加が有意であるかどうかは明らかでない。もし窒素の正味のとり込みがあったとしても、スギの場合、その量は僅かであろう。

森林において分解しつつある植物遺体が窒素固定活性を持つことはしばしば報告されている^{4, 12, 18, 25)}。その量は年間1m²あたり19から257mgで、耕地と比べてそれほど多くはないが、森林生態系にとっては重要な過程と考えられている。本実験の500日にわたる分解期間の間にスギの落葉では1gあたりおよそ0.7mgの窒素が微生物によって固定される(表-4)。これは最初の落葉中の窒素の0.1%程度である。この値と実験に用いた地域周辺の平均のリターフォール量から計算された森林が固定する窒素量は年間1m²あたり280mgで、ほぼ他の研究者の値の範囲に入っている。スギ落葉の分解においてF₁区分に存在する窒素固定活性がどのような意味を持つかは不明であるが、BAINESとMILLANK³⁾が推定しているように、窒素固定微生物はおそらく分解性生物に窒素を供給することによって増殖の場をあたえ、それによって落葉分解に好都合な場をつくりだしているのであろう。

落葉よりの養分の流出と分解過程との関連については別に報告の予定である。

謝辞 本実験を進めるにあたり、電子顕微鏡観察に便宜をはかっていただいた愛知県農業総合試験場環境保全部大気研究室田辺仁志室長（当時）に感謝します。この研究の一部は文部省科学研究費補助金 No. 575650134 によっておこなった。

要 約

スギ落葉の分解過程を、特に初期の微生物、生物活性、および成分の変化を中心に検討した。東京大学愛知演習林内のスギ林の林床に落葉をつめたポットを置き、雨水がポット内を自由に通過できるようにして分解させた。

実験開始後、二酸化炭素放出量は急速に高まり、これとともに糸状菌数が増加して 56 日目（8 月 9 日）に最大値を示した。糸状菌が減少するにつれて一般細菌数が増加し、169 日目（11 月 30 日）に最大値に達し、以後減少した。翌年には糸状菌と細菌の顕著な増大はなかった。

分解期間を通じてリター中に安定して存在していたマンガン量を基準とし、分解にともなう重量の変化を間接的に求めた。重量は 56 日目から急速に減少し、冬季の休止期を除いて減少を続けた。重量と C/N 比の間には高い相関があった。このようにして求めた重量変化と採取した試料の成分分析結果から、落葉を構成する各成分の分解にともなう量的変化を求めた。アルコール・ベンゼン混液可溶区分は実験開始直後から減少し、これは糸状菌の増殖時期と一致していた。クチン酸およびセルロースは 56 日以降になって減少した。カルボキシメチルセルロースを基質とするセルラーゼ活性はセルロースの減少、一般細菌数およびセルロース分解菌数の増加の時期と対応していた。

窒素固定活性は 30 日目から 56 日目にかけて増大し、冬季を除いて翌年秋の 504 日目（10 月 31 日）まで持続したが、それ以降はほとんど存在しなかった。初年度の窒素固定活性の高まりの時期は一般細菌数および窒素固定細菌数の増加の時期と一致していた。また、窒素の無機化活性および硝化活性は窒素固定活性の存在する期間には検出されず、それ以降（3 年目）になって出現した。

成分量や活性の変化とこれに関する微生物数の変化とは 2 年目にはほとんど対応せず、これは分解に関与する生物相の交代を示唆するものと考えられた。

走査型電子顕微鏡による観察結果は、分解初期の糸状菌から細菌への変化の少なくとも一部は細菌による糸状菌菌体の成分を利用したものであることを示していた。また、2 年目には組織に多くのこまかい穴がみられ、C/N 比やセルロースの顕著な減少と合わせて、落葉組織の本格的な分解が進行することを示していた。

これらの結果から、スギ落葉の分解過程は少なくとも以下の 3 段階に分けられることが示された。第 1 期：最初の約 2 か月。含水率の増加と有機溶媒可溶物質の顕著な減少、糸状菌の増殖。第 2 期：それ以降翌年の末まで。C/N 比、クチン酸、セルロースの減少など落葉組織の分解、窒素固定活性の出現、および細菌への微生物相の交代。この時期においては後半になって優勢な生物相はさらに変化する可能性がある。第 3 期：分解 3 年目以降。窒素の有機化から無機化への転換の期間。

キーワード: スギ, 落葉分解, 落葉成分, 窒素固定, 微生物相

引用文献

- 1) ABER, J. D. and MELILLO, J. M. (1980): Litter decomposition: measuring relative contributions of organic matter and nitrogen to forest soils. *Can. J. Bot.*, **58**: 416-421.
- 2) 朝日正美・春田泰次(1970): 花崗岩質土壤のスギ造林法(Ⅲ). *日林誌*, **52**: 322-330
- 3) BAINES, E. F. and MILLANK, J. W. (1978): The influence of moisture content on the occurrence of nitrogen fixing bacteria in timber in ground contact. *Ecol. Bull. (Stockholm)*, **26**: 193-198.
- 4) BAKER, T. G. and ATTILLI, P. M. (1984): Acetylene reduction in soil and litter from pine and eucalypt forests in southeastern Australia. *Soil Biol. Biochem.*, **16**: 241-245.
- 5) BERG, B. and SÖDERSTRÖM, B. (1979): Fungal biomass and nitrogen in decomposing Scot pine needle litter. *Soil Biol. Biochem.*, **11**: 339-341.
- 6) ———, HANNUS, K., POPOFF, T. and THEANDER, O. (1982): Changes in organic chemical components of needle litter during decomposition. Long-term decomposition in Scot pine forest. I. *Can. J. Bot.*, **60**: 1310-1319.
- 7) BOCK, K. S. (1963): Changes in the amount of nitrogen in decomposing leaf litter of sessile oak (*Quercus petraea*). *J. Ecol.*, **51**: 555-566.
- 8) 土壤微生物研究会編(1975): 土壤微生物実験法, pp. 467, 養賢堂, 東京.
- 9) GOSZ, J. R., LIKENS, G. E. and BORMANN, F. H. (1973): Nutrient release from decomposing leaf and branch litter in the Hubbard Brook Forest, New Hampshire. *Ecol. Monograph*, **43**: 173-191.
- 10) HARDY, R. W. F., BURNS, R. C. and HOLSTEN, R. D. (1973): Application of the acetylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.*, **5**: 47-81.
- 11) HOWARD, P. J. A. and HOWARD, D. M. (1974): Microbial decomposition of tree and shrub leaf litter. *Oikos*, **25**: 341-352.
- 12) JURGENSEN, M. F., LARSEN, M. J., SPANO, S. D., HARVEY, A. E. and GALE, M. R. (1984): Nitrogen fixation associated with increased wood decay in Douglas-fir residue. *For. Sci.*, **30**: 1038-1044.
- 13) 金沢晋二郎・高井康雄・竹島征二・和田秀徳(1976): 亜高山帯針葉樹林下の土壤有機物の性状と分解過程(第2報) 本地帯の土壤有機物の近似組成成分とその存在量について. *日土肥誌*, **47**: 303-313.
- 14) 金沢晋二郎・高井康雄(1977): 亜高山帯針葉樹林下の土壤有機物の性状と分解過程(第5報) 本地域の土壤中のβ-グルコシダーゼおよびプロテアーゼ活性について. *日土肥誌*, **48**: 534-539
- 15) 河田 弘(1961): 落葉の有機物組成と分解にともなう変化について. *林試研報*, **128**: 115-144.
- 16) 川上日出國・草島すなお・沓名重明(1987): スギ落葉有機組成成分にクチンの生分解について. *名大演報*, **9**: 44-50.
- 17) 川上日出國・草島すなお・仁王以智夫・春田泰次(1987): ポット内で腐朽させたスギ針葉クチン成分の分解過程. 35 回日林中文論. 123-126.
- 18) LARSEN, M. J., JURGENSEN, M. F. and HARVEY, A. E. (1982): N₂-fixation in brown-rotted soil wood in an intermountain cedar-hemlock ecosystem. *For. Sci.*, **28**: 292-296.
- 19) MACLEAN, D. A. and WEIN, R. W. (1978): Weight loss and nutrient changes in decomposing litter and forest floor material in New Brunswick forest stands. *Can. J. Bot.*, **56**: 2730-2749.
- 20) 丸本卓哉・進藤晴夫・東 俊雄(1978): チューリン法による有機態炭素定量における簡易冷却器(水冷管)の効用について. *日土肥誌*, **49**: 250-252.
- 21) 日本木材学会・化学編編集委員会編(1985): 木材科学実験書Ⅱ化学編. 中外産業調査会. pp. 359.
- 22) NIOH, I. (1980): Nitrogen fixation associated with the leaf litter of Japanese cedar of various decomposition stages. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **26**: 117-126.
- 23) NIOH, I. and HARUTA, Y. (1986): Estimation of the amount of asymbiotically fixed nitrogen in the leaf litter of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*). *Jpn. J. For. Soc.*, **68**: 314-319.
- 24) 仁王以智夫・沓名重明(1989): 種々の分解段階にあるスギ落葉の無機窒素代謝. *東大演報*, **81**: 7-19.
- 25) O'CONNELL, A. M. and GROVE, T. S. (1987): Seasonal variation in C₂H₂ reduction (N₂-fixation) in the litter layer of eucalypt forests of south-western Australia. *Soil Biol. Biochem.*, **19**: 135-142.
- 26) PANCHOLY, S. K. and RICE, E. L. (1973): Soil enzymes in relation to old field succession: amylase, cellulase, invertase, dehydrogenase, and urease. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **37**: 47-50.
- 27) RENNIE, R. J. (1981): A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing)

- bacteria from soils. Can. J. Microbiol., **27**: 8-14.
- 28) SPALDING, B. P. (1977): Enzymatic activities related to the decomposition of coniferous leaf litter. Soil Sci. Soc. Amer. J., **41**: 622-627.
- 29) STAAF, H. and BERG, B. (1982): Accumulation and release of plant nutrients in decomposing Scot pine needle litter. Long-term decomposition in a Scot pine forest. II. Can. J. Bot., **60**: 1561-1568.
- 30) SUFFLING, R. and Smith, D. W. (1974): Litter decomposition studies using mesh bags: spillage inaccuracies and the effects of repeated artificial drying. Can. J. Bot., **52**: 2157-2163.
- 31) 田辺市郎・渡辺 巖 (1964): 微生物に関する分析法その 2. 土壤微生物作用の測定法. 日土肥誌, **37**: 46-54.
- 32) TAPPI スタンダード (1986): 1, T2220S-74, 中外産業調査会, 東京.
- 33) THEATHER, R. M. and WOOD, P. J. (1982): Use of Congo-red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl. Environ. Microbiol., **43**: 777-780.

(1988 年 10 月 24 日受理)

Summary

Decomposition process of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) leaf litter was examined during the initial 504 days with special reference to the changes in biological activities and microflora relating them, and the amount of certain main components of the litter.

Immediately after the beginning of the experiment rapid increase of carbon dioxide release and concomitant growth of fungi were observed. After 56 days (Aug. 9) fungi reduced and the number of bacteria began to increase. Bacteria reached maximum at 169 days (Nov. 30). Growth of bacteria was accompanied with nitrogen-fixing and cellulolytic activities. Nitrogen-fixing activities appeared in 30 to 56 days of the decomposition, and continued, except during the winter, until October of the next year. The activity disappeared in the third and following years. Activities for mineralization of nitrogen and subsequent nitrification appeared only at the third year.

Weight decrease of the decomposing litter was estimated indirectly by measuring the amount of manganese in the litter, for the amount of manganese flowed into and out of the litter was negligible through out the experimental period. High correlation was present between the weight and C/N ratio of the litter. The weight of the litter began to reduce after 56 days, and except in the winter it decreased continuously during the experiment.

By multiplying relative weight of the litter by the amount of each component, quantitative changes in some main components during the decomposition were obtained. Alcohol-benzene-soluble matters decreased soon after the beginning, corresponding to the period of fungal growth. Cutin acids and holo- and α -cellulose decreased after 56 days. Growth of cellulolytic bacteria in the first year coincided with the rise of cellulase activity and the decrease of cellulose, while in the second year the activity did not correlate with the number of the bacteria.

Scanning electron microscopic observation indicated that, at the time of fungal decrease in the initial stage, fungal mycelia were covered with bacterial cells, suggesting that at least a part of the growth of bacteria depended on the fungal components.

From the results obtained in this experiment, at least three stages of the decomposition were recognized. First stage was characterized by the increase of moisture content, decrease of organic solvent-soluble matter, and growth of fungi. At the second stage fungi were replaced by bacteria. C/N ratio decreased and some main components of the litter, cutin acids and cellulose, decreased and nitrogen-fixing activity appeared. This stage continued until the next year, although microflora dominant in the litter might change.

The third stage was the third year and thereafter, which was characterized by mineralization of nitrogen and nitrification. At this stage loss of nitrogen from the litter was suggested to proceed.

Key words: Japanese cedar, Litter decomposition, Components of the litter, Nitrogen fixation, Microflora