分析方法 (SOFIX土壌分析)

1. **生物性に関する項目**

**・環境DNA (eDNA) 解析法を用いた総細菌数の測定**

(1) 滅菌 (15分間、121℃) した50 ml容遠心管に土壌試料1.0 gおよびDNA抽出緩衝液 (pH 8.0) 8.0 ml、20% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム溶液1.0 mlを加えた。

(2) 攪拌機に遠心管をセットし、eDNA抽出攪拌器で攪拌 (1,500 rpm、20分間、室温) した。

(3) 攪拌後の溶液1.5 mlを遠心分離 (8,000 rpm、10分間、20℃) した。

(4) 水層700 lにクロロホルム・イソアミルアルコール (24:1,v/v) 700 lを加えて緩やかに攪拌し、遠心分離 (14,000 rpm、10分間、20℃) した。

(5) 水層500 lに2-プロパノール300 lを加えて緩やかに攪拌し、遠心分離 (14,000 rpm、20分間、20℃) した。

(6) 水層を除去し、70% (v/v) エタノールを1.0 ml加え、遠心分離 (14,000 rpm、5分間、20℃) した。

(7) 水層を除去し、アスピレーターで減圧乾燥 (30分間) した。

(8) 10:1 TE 緩衝液 (pH 8.0) 50 lに溶解し、eDNA溶液とした。

(9) eDNA溶液5 lにloading dye 4 µlを加えて混合し、アガロースゲル電気泳動に供した。また、マーカーとしてsmart ladderを用いた。

(10) エチジウムブロマイドを標識としたDNAバンドの蛍光強度測定を行い、アガロースゲル上のゲルDNA量を測定した。

(11) 得られたゲルDNA量を以下の計算式に当てはめ、試料1.0 gあたりのeDNA量を算出した。



(12) 上記の式から得られたeDNA量とeDNA-総細菌数の検量線から、試料1.0 gあたりの総細菌数を算出した。

総細菌数 (億個/g) ＝eDNA量 (g/ml) ×1.70×108 [R2＝0.938]

**・窒素循環活性の評価方法**

水田土壌あるいは畑土壌において、それぞれ最大保水容量の100%あるいは60%となるように含水率を調整後、NH4＋-N (硫酸アンモニウム) あるいはNO2－-N (亜硝酸ナトリウム) を60 µg-N/g-soilとなるように投与した。含水率一定で静置 (3日間、室温) し、投与した基質の減少率からアンモニア酸化活性 (NH4＋-N→NO2－-Nへの変換) および亜硝酸酸化活性 (NO2－-N→NO3－-Nへの変換) を解析した。また、総細菌数、アンモニア酸化活性、亜硝酸酸化活性の値を用いて、窒素循環活性評価値を算出した。

(1) 含水率調整後の土壌試料4.0 gを50 ml容遠心管に量り取り、85 mM硫酸アンモニウム水溶液、あるいは、168 mM亜硝酸ナトリウム水溶液を100 µl添加した。

(2) 含水率一定で静置 (3日間、室温) し、0日目 (基質添加直後) にアンモニア態窒素、亜硝酸態窒素および硝酸態窒素を測定し、3日目にアンモニア態窒素と亜硝酸態窒素を測定した。

亜硝酸態窒素の測定※は以下を参照。アンモニア態窒素および硝酸態窒素の測定方法は、「2. 化学性に関する項目」の「硝酸態窒素の測定 (ブルシン・スルファニル酸法)」と「アンモニア態窒素の測定 (インドフェノール青法)」を参照。

※亜硝酸態窒素の測定 (ナフチルエチレンジアミン法)

(1) 土壌試料4.0 g、1.0 M KCl溶液40 mlを遠心管に加え、振とう (100 rpm、60分間、室温) 後、遠心分離 (10,000 rpm、5分間、室温) した。

 (2) 上澄液の希釈液1.0 mlにスルファニルアミド溶液 (ジアゾ化剤) 100 lを加え攪拌し、静置 (3分間、室温) した。

 (3) ナフチルエチレンジアミン溶液 (カップリング剤) 100 lを加え攪拌し、静置 (20分間、室温) した。

 (4) 吸光度 (A540) を測定し、亜硝酸態窒素濃度を定量した。

**・リン循環活性の評価方法**

(1) 土壌試料0.5 gを250 ml容ポリ瓶に量り取り、フィチン酸75 µlを添加した。

(2) 静置 (3日間、室温) し、0日目 (基質添加直後) と3日目に可給態リン酸を測定し、その増加量に基づいてリン循環活性評価値を算出した。可給態リン酸の測定方法は、「2. 化学性に関する項目」の「可給態リン酸の測定」を参照。

**・全炭素の測定**

1. 土壌試料をサンプルボードに適量 (0.5 g ～ 1.0 g) 入れ、全有機体炭素計を用いて試料中の全炭素を測定した。

**・ 全窒素の測定 (ケルダール分解法)**

 (1) ケルダールチューブに土壌試料0.5 gを量り取り、硫酸銅五水和物0.5 g、濃硫酸5 ml、過酸化水素水5 mlを加えた。

 (2) ケルダール装置で加熱 (60分間、420℃) 後、放冷した。

(3) ろ紙を乗せたロートを100 mlメスフラスコにセットし、ここに試料溶液を流し入れてろ過し，ケルダールチューブの洗液を合わせて水で100 mlに定容した。

(4) 試料溶液中のアンモニア態窒素をインドフェノール青法で測定し、全窒素を定量した。

**・全リンの測定 (ケルダール全分解法)**

(1) 「全窒素の測定」の項 (1) ～ (3) まで同様に処理した。

(2) 試料溶液の希釈液1.0 mlにモリブデン酸アンモニウム-アスコルビン酸混合溶液100 μlを添加し、撹拌した。

(3) 静置 (30分間、30℃) 後、吸光度 (A710) を測定し、リン酸を定量した。

**・全カリウムの測定 (ケルダール全分解法)**

(1) 「全窒素の測定」の項 (1) ～ (3) まで同様に処理した。

(2) 試料溶液をイオン交換水で適宜希釈し、原子吸光光度計で測定した。

**・C/N比、C/P比**

1. 全炭素、全窒素、全リンの分析結果を用いて、C/N比、C/P比をそれぞれ算出した。
2. **化学性に関する項目**

**・****硝酸態窒素の測定 (ブルシン・スルファニル酸法)**

(1) 土壌試料4.0 g、1.0 M KCl溶液40 mlを遠心管に加え、振とう (100 rpm、60分間、室温) 後、遠心分離 (10,000 rpm、5分間、室温) した。

(2) 上澄液の希釈液200 µlにブルシン・4-アミノベンゼンスルホン酸溶液100 µlを加え混和した。

(3) 硫酸 (水：濃硫酸＝3：20) 1.0 mlを加え攪拌し、静置 (10分間、冷暗所) した。

(4) 蒸留水1.0 mlを加え攪拌し、静置 (30分間、冷暗所) 後、吸光度 (A410) を測定し、硝酸態窒素を定量した。

**・アンモニア態窒素の測定 (インドフェノール青法)**

(1) 土壌試料4.0 g、1.0 M KCl溶液40 mlを遠心管に加え、振とう (100 rpm、60分間、室温) 後、遠心分離 (10,000 rpm、5分間、室温) した。

(2) 上澄液の希釈液1.0 mlにフェノールニトロプルシッド溶液400 µlを加え静かに混和した。

(3) 次亜塩素酸ナトリウム溶液600 lを加え撹拌し、静置 (45分間、室温) した。

(4) 吸光度 (A635) を測定し、アンモニア態窒素を定量した。

**・可給態リン酸の測定**

1. 土壌試料0.5 gに1 mM硫酸溶液 (pH3.0) 100 mlを加え、振とう (100 rpm、30分間) 後、遠心分離 (10,000 rpm、5分間、室温) した。
2. 上澄液の希釈液1.0 mlにモリブデン酸アンモニウム-アスコルビン酸混合溶液100 μlを添加し撹拌後、静置 (30分間、30℃) した。
3. 吸光度 (A710) を測定し、可給態リン酸を定量した。

**・交換性カリウムの測定**

1. 土壌試料2.0 gに1 M酢酸アンモニウム溶液 (pH7.0) 40 mlを加え、振とう (100 rpm、60分間、室温) した。

(2) 遠心分離 (10,000 rpm、5分間、室温) し、上澄液をイオン交換水で適宜希釈し、原子吸光光度計で測定した。

**・ pH, ECの測定**

(1) 50 ml遠心管に試料10 gを量り取り、25 ml (2.5倍量) の蒸留水を入れた。

(2) 振とう (100 rpm, 60分間、室温) 後、浮遊物が沈殿するまで待ち、専用の機器でEC、pHをそれぞれ測定した。

1. **物理性に関する項目**

**・ 含水率の測定**

(1) 200 mlコニカルビーカーの重量を測定した。

(2) 土壌試料20 gを (1) のビーカーに正確に測り取った。

(3) 乾燥器で静置 (60℃、24時間) 後、乾燥した試料の重量をビーカーごと測定した。

(4) ((1) の重量) ＋ ((2) の重量20 g) － ((3) の重量) で土壌の含水率を計算した。

**・ 最大保水容量の測定**

 (1) ロートにろ紙を乗せ、蒸留水2 mlを注いでろ紙を十分湿らせた。

(2) 200 mlコニカルビーカーに (1) のロートをセットし、その上に「含水率の測定」で乾燥させた試料10 gを加えた。

(3) 蒸留水30 gを試料に加え、水がろ紙から落ち切るのを待って (120分間)、ろ液の重量を測定した。

(4) (水の重量30 g) － ((3) の重量) で試料10 g当りの最大保水容量を計算した。

以上