

(S4-16) 試験所における微生物学的プロセス、バイオマス及び多様性評価のための、好気条件下での土壌の採取、取り扱い及び保管（ISO 18400-206:2018）についての検討

○川畑智尋¹・神谷貴文^{1,2}・古川靖英¹・ISO/TC 190 検討部会¹

¹土壌環境センター・²静岡県環境衛生科学研究所

1. 背景および目的

ISO/TC 190（地盤環境）では、土壌採取等に関するガイダンスとして、ISO 18400 シリーズが発行されている。シリーズの中においては、一般規格として土壌採取計画や輸送、保管方法等についての規格のほか、専用規格として土壌汚染調査や土壌ガス採取に関する指針等が規格化されている¹⁾。

そのほか、試験所における微生物学的プロセス、バイオマス及び多様性評価についてのガイダンスとして、本報告で取り上げる ISO 18400-206:2018（以下、本規格）²⁾も ISO 18400 シリーズに含まれている。本規格は、好気条件下での土壌の採取、取り扱い及び保管に関する手順を記載したものである。

本報告では、本規格の概要を示すとともに、我が国における本規格の適用性を検討する。

2. 土壌試料採取の事前準備

2.1 試料採取地点の選定

土壌試料の採取地点を選定する際は、調査の目的や事前情報、土地の履歴を考慮するとともに、現場状況（土壌の種類や特性、土壌層位、植物被覆の有無など）に応じて選択し、その地点は調査範囲全体を代表するものでなければならない。また、選定した試料採取地点は、コンピューター上で座標値を与える作業を行うことが推奨されている。

試料採取報告書の作成では、現場状況のほか、試料採取場所の形態（平坦地、斜面、急勾配など）、化学的・生物学的負荷や予想外の土壌汚染などの情報を正確に記録し、報告することが求められている。

2.2 土壌試料採取時の記録内容

試料採取時には、必要に応じて以下の情報を記録し、試料採取報告書に記載する。

- ・土壌の分布を記録したものや土地評価など、土壌特性の比較を容易にする情報
- ・敷地に関する情報（土地の位置と利用方法、土壌条件、耕作条件、気候など）
- ・試料採取場所の座標
- ・位置図、現地地図、写真などで、試料採取地点や方法を捕捉
- ・試料採取時期における、試料採取地の状態の詳細（作物の種類など）
- ・調査目的の詳細な説明

そのほか、現場調査員が作成する試料採取報告書には、以下の情報を記載する。

- ・試料の指定と番号（試料容器の標示と同様）
- ・試料採取日
- ・土地に関する情報（場所、土地利用、土壌種類（WRB 分類による）、土性区分、気象条件）
- ・特殊な事例における土壌情報
- ・使用された手順に関する情報（採取地点、採取機器、採取深度、採取個数、複合試料の構成など）
- ・保管と輸送に関する情報
- ・試験所への搬入時間と場所に関する情報
- ・試料の識別
- ・試験所による受取の確認

さらに、法的な目的のために試料が必要な場合には、試料管理記録が重要となる。

Study on collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in the laboratory (ISO 18400-206:2018)

Chihiro Kawahata¹, Takafumi Kamitani^{1,2}, Yasuhide Furukawa¹, and Study group on ISO/TC 190¹ (¹GEPC)

連絡先：〒102-0083 東京都千代田区麹町 4-5 KS ビル 3F （一社）土壌環境センター

TEL 03-5215-5955 FAX 03-5215-5954 E-mail info@gepc.or.jp

2.3 土壌試料採取方法の決定

土壌試料の採取方法を検討する際は、以下の項目を考慮する。

- ・地形や気候条件、植物被覆、土壌の種類及び物理化学的特性などの現場条件
- ・土壌汚染が確認された場合は、汚染源の位置や汚染の広がり

これら現場条件や土壌汚染は、一般的に時間的・空間的なばらつきが大きい。そのため、試験目的に応じて異なる試料採取計画と統計の手法を適用する必要がある。また、調査要員の安全及び、環境負荷の対策を事前に確立し、採取を実施しなければならない。

一方、樹木、岩、アクセス上の問題などの様々な理由により、予定場所で試料採取ができない場合は、調査完了までに長い時間を要する。その際、現場における応急的な判断は、調査範囲全体の代表ではなく、偏りのある試料採取地点の設定に繋がるため、不測の事態を想定した試料採取計画を事前に立てておくべきである。また、現場状況により、当初予定していた試料採取地点を選択せず、近くの代替地点（例えば、元の地点からグリッド間隔の10%以内）を選ぶこともできる。この場合、試料採取地点を再配置する場合は、再配置の理由を報告書に明記する。

以上のような事前準備は、試料採取計画を技術的かつ経済的に設計する目的と、現場の現況や隣接地における、過去の活動で土壌に影響を与えた可能性のあるものについての知識を得る目的で行われる。

3. 現場での採取

試験所での分析において使用する土壌試料は、試験の目的以外で別途必要とされない限り、以下の期間を避けて極力ふり分けが容易な土壌含水率である時期に採取を実施する。

- ・1ヵ月など長期間の干ばつ
- ・凍結期間
- ・洪水期間中またはその直後

ただし、現場の状況把握のために室内試験を用いる場合は、現場条件を室内試験に当てはめて行うことが必要である。

試料採取方法は、試験目的に応じて適切な試料採取技術を選択し適用する。例えば、好気性の農耕地土壌が必要な場合は、以下の項目に留意する。

- ・試料採取は、実際の耕作深さまで実施する。
- ・試料採取後は、表層の植物被覆、視認できる根と土壌動物相、大型または木本植物の腐植や腐食層を除去する。

採取の際にこれらの除去を行わなかった場合は、根やその他の供給源からもたらされた有機成分が、土壌微生物群の活動や組成に予測不可能な変化を引き起こし、間接的に植物や無脊椎動物の試験条件にも影響を及ぼす可能性があるため注意する。

そのほか、以下の点にも留意する。

- ・明瞭な層位がある場合は層位ごとに採取を行い、代表的な試料は、層位の上端から下端まで採取する。
- ・試料採取容器には、試料採取場所と関連した明確な印をつけ、見分けがつくようにしておく。
- ・試料採取容器は、土壌水分を吸収するものや、土壌中に溶媒や可塑剤などを放出する可能性のあるものを使用しない。

4. 保管

4.1 試料の輸送時

土壌試料は、土壌含水率の変化を最小限に抑えるような方法で輸送し、ゆるく縛ったポリエチレン袋に入れて通気性の良い暗所に保管し、好気性を確保するべきである。

DNA または RNA 分析をするための土壌試料は、現場でドライアイスを用いて速やかに凍結する。試験所への輸送中には、RNA 分析のための土壌試料の温度を維持するために、ドライアイスを使用する。

DNA 分析のための土壌試料は、ドライアイスが必要な状況でない限り、冷却ボックスに入れて輸送することが可能である。

土壌試料の保管では、以下の項目に留意するべきである。

- ・土壌を可能な限り低温に保ち、過度な乾燥や過湿状態、凍結など厳しい環境条件を避ける。
- ・長時間の光により土の表面に藻類が繁殖するため、光の照射と物理的な圧縮をできるだけ避ける。

4.2 試験所での土壌処理時

土壌試料の採取後は、可能な限り速やかに処理を行う必要がある。土壌の処理時は、粒子間の気体交換を容易にし、土壌試料の自然な好気性を維持するため、ふるい分けが推奨されている。

ふるい分け等では、試験に応じて以下のような点に留意する。

4.2.1 微生物試験が予定されている場合

- ・事前に植物や大型の土壌動物、石などを除去し、土壌試料を 2 mm のふるいにかける。
- ・腐植層や泥炭のような一部の有機物が多い土壌試料は、2 mm のふるいを容易に通過しないため、湿っている状態で 5 mm のふるいにかけた後、2 mm のふるいにかける。

4.2.2 土壌無脊椎動物の試験に使用する場合

- ・事前に土壌試料に生息する試験対象外の生物を死滅させる。

4.2.3 植物を用いた試験に使用する場合

- ・4 mm のふるいにかける。

以上のようなふるい分けの際、土壌試料が湿りすぎていることで、ふるいを通過しない場合には、常温かつ極力緩やかな空気が流れている条件で、土壌試料を広げて均一に乾燥させる。この時、土壌試料は指で砕き、頻繁に反転し表面の過度な乾燥を避け、ふるい分けを容易にする程度とすることが重要である。

一般的に、生物学的試験では土壌試料の乾燥は推奨されず、空気乾燥と再湿潤は、表層土壌の微生物群にとって生理的負荷となる。植物や無脊椎動物は乾燥に敏感であるため、そのような試験では、土壌試料を再湿潤させることを念頭に置くべきである。乾燥と湿潤作用は、微生物の C と N の動態に大きな変化を引き起こし、この負荷から動態変化が 1 ヶ月以上続く可能性があることが示されている。また、乾燥後の再湿潤は、呼吸の活性とバクテリア個体群の増殖を引き起こす。そのため、その後さらに保管が必要な場合は保管条件（(4.3) 参照）を考慮する必要がある。

4.3 保管条件と保管期間

土壌試料の採取後は、可能な限り速やかに使用することが望ましいため、輸送による遅延は最小限に抑えるべきである。しかし、やむを得ず保管する場合の様々な試験目的に対する適切な保管条件を表 4-1 に示す。

4.3.1 基本的な保管条件

土壌試料を (4±2) °C で保管する場合は、通気性の良い暗所で行う。保管の際は、一般的にゆるく縛ったビニール袋、またはそれに同等のものが適している。保管時は、以下の点に注意する。

- ・土壌試料は重ねての保管をしない。
- ・保管容器の底に嫌気状態が発生するような量の土壌の保管をしない。
- ・安定した好気性条件を確保するため、保管前に土壌の処理（(4.2) 参照）を行う。
- ・輸送時同様、保管中には土壌試料を過度な乾燥や、過湿状態にしない。
- ・試料を 3 ヶ月以上保管することは一般的に推奨されないが、-20°C、-80°C、-180°C での冷凍保存が適応できる場合がある。

4.3.2 試験方法に応じた保管条件

- ・微生物群の構造分析には、4°C での保存は適さない。
- ・リン脂質脂肪酸 (PLFA) 分析のための試料をすぐに処理しない場合は、-20°C で冷凍保存する。
- ・DNA 分析のための試料をすぐに処理しない場合は、-20°C で冷凍保存する。
- ・RNA 分析の場合、試料は -80°C で冷凍保存する。

これら DNA、RNA、PLFA/リン脂質エーテル脂質 (PLEL) 分析を行う試料の冷凍は、液体窒素による急速冷凍が推奨されている。

また、土壌試料が植物や無脊椎動物の試験に使用され、揮発性または分解性の汚染物質を含まない場合、土壌試料を事前に乾燥させておくことで、室温での無期限保管が可能である。ただし、土壌試料によっては窒素の無機化や土壌 pH に大きな変化が起こる可能性がある。

表 4-1 生物学的評価項目ごとにおける評価を直ちに実施できない場合の保管条件と保管期間

試験目的	国際規格	湿潤条件下		
		4°C±2°C（またはその他の温度）	-20°C ^a	-80°Cまたは液体窒素(-180°C ^a)
無脊椎動物への影響	ISO 11267 ³⁾ ISO 11268-1 ⁴⁾ ISO 11268-2 ⁵⁾ ISO 15952 ⁶⁾ ISO 16387 ⁷⁾ ISO 17512-1 ⁸⁾ ISO 17512-2 ⁹⁾ ISO 20963 ¹⁰⁾	3 ヶ月	-	-
高等植物への影響	ISO 11269-1 ¹¹⁾ ISO 11269-2 ¹²⁾ ISO 17126 ¹³⁾ ISO 18763 ¹⁴⁾ ISO 22030 ¹⁵⁾ ISO 29200 ¹⁶⁾	3 ヶ月	-	-
リン脂質脂肪酸(PLFA) リン脂質エーテル脂質(PLEL)	ISO/TS 29843-1 ¹⁷⁾ ISO/TS 29843-2 ¹⁸⁾	7 日	2 年	10 年
DNA	ISO 11063 ¹⁹⁾	-	2 年	10 年
RNA	ISO 14238 ²⁰⁾	-	-	10 年
バイオマス ・基質誘導呼吸法 ・燻蒸抽出法	ISO 14240-1 ²¹⁾ ISO 14240-2 ²²⁾	7 日	1 年	-
アンモニウム酸化の可能性	ISO 15685 ²³⁾	7 日	1 年	-
窒素の無機化	ISO 14238 ²⁴⁾	7 日	1 年	-
微生物による土壌呼吸	ISO 16072 ²⁵⁾	7 日	1 年	-
土壌呼吸曲線	ISO 17155 ²⁶⁾	7 日	-	-
デヒドロゲナーゼ活性	ISO 23753-1 ²⁷⁾ ISO 23753-2 ²⁸⁾ ISO 18187 ²⁹⁾	7 日 7 日 14 日	1 年	-
酵素活性パターン	ISO/TS 22939 ³⁰⁾ ISO 20130 ³¹⁾	- 15°C/4 日	-	4 ヶ月以上
脱窒酵素活性	ISO/TS 20131-1 ³²⁾ ISO/TS 20131-2 ³³⁾	7 日	1 年	-
^a 採取土壌は、保管前に追加調査のために補助試料に分割する。 あるいは、採取後すぐに湿った状態の土壌(2 mm 未満)から PLFA を抽出する。 抽出物は-20°Cで数ヶ月間保存した後、さらに分離工程を行い GC-MS で分析する。 -20°Cまたは-80°Cで保存する前に、液体窒素で急速冷凍することを推奨する。 ※「-」は保管できないことを示す。				

5. 取り扱い上の留意事項（前培養）

処理後の土壌試料を特定の微生物試験に使用する前に、発芽植物と種子の除去および採取を行い、保管条件から培養条件に移行した後の微生物代謝の均衡を再確立するために、前培養を行うべきである。前培養の条件は試験の目的によるが、可能な限り試験条件に近づけるべきである。その期間は、試験の目的、土壌組成、保管条件および前培養条件によって異なるが、一般的には、2 日～28 日の期間が適当である。

試料が凍結している場合、解凍に特別な注意を払わなければならない。微生物活性（土壌呼吸など）の分析では、4°Cで1週間もしくは20°Cで3日間の解凍が推奨され、20°Cで1日の解凍も適している。DNA、RNA、PLFA/PLEL分析では、分解過程を避けるために、解凍期間を可能な限り短くすることが重要となる。

土壌試料によっては、凍結により保水力が変化することがある。そのため、保水力が変化する試料については、解凍後に保水力を測定する必要がある。

6. 我が国における本規格の適用性について

本規格は、実験室での微生物学的プロセスやバイオマス、多様性評価が目的であり、土壌が微生物や無脊椎動物、植物に及ぼす影響を評価するための、採取や取り扱い、保管に適用できる。我が国では、土壌環境の保全を担う法律として土壌汚染対策法が挙げられるが、法の目的は人の健康被害防止のため、土壌生物への影響は対象とされていない。そのため、本規格と土壌汚染対策法では、土壌の処理や保管に違いがみられる。

例えば、土壌試料の処理について、本規格では微生物試験や植物試験など、対象生物によってふり分け方法が異なる。また、微生物試験では微生物の動態変化を防ぐため、土壌試料の乾燥は推奨されていない。保管方法においても、DNA または RNA 分析のための土壌試料は、すぐに試験しない場合、急速冷凍することが示されている。以上のように、本規格は生物試験の観点から対象生物や分析対象により、未解明かつ複雑なことを加味し、土壌試料の取り扱いを選択する必要がある点が土壌汚染対策法と大きく異なる。

我が国において、実験室で行われる物理化学性試験は、地盤工学分野、農業分野、環境分野の大きく3つで体系化されている。地盤工学分野の試験では、地盤工学会基準（JGS）で規定される、土懸濁液の pH 試験方法³⁴⁾、農業分野の試験では、作物の栄養診断方法³⁵⁾、環境分野の試験では、土壌汚染対策法で規定される方法などが挙げられる。これら全てで目的に応じた土壌採取手法が確立されている。

また近年、土壌微生物の種類やその働きである「土壌の生物性」が注目されており、土壌中の微生物の多様性や微生物活性を計測し、土壌の生物性の評価する技術が開発されている³⁶⁾。

近年における周辺分野の動向として、2030年までにネイチャーポジティブ実現を目指す国際目標と、その実現に向けた30by30目標（環境省）が2022年に定められている。このように、生物多様性保全のための取り組みが急速に進んでいることから、今後はさらに土壌の生物性に対する研究も活発になると予想されるため、本規格の土壌の取り扱いや保管方法がより広範な分野において適用できる可能性がある。

参考文献

- 1). 中島誠・ISO/TC190 部会(2018)：地盤環境に係るサンプリングのための新たな ISO 規格 -ISO18400 シリーズの概要- 第 24 回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会講演集, S5-05
- 2). ISO (2018) : ISO 18400-206:2018 Soil quality - Sampling - Part 206: Collection , handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes , biomass and diversity in the laboratory, 10p
- 3). ISO(2023) : ISO 11267:2023 Soil quality - Inhibition of reproduction of *Collembola (Folsomia candida)* by soil contaminants, 38p
- 4). ISO(2012) : ISO 11268-1:2012 Soil quality - Effects of pollutants on earthworms - Part 1: Determination of acute toxicity to *Eisenia fetida/Eisenia Andrei*, 18p
- 5). ISO(2023) : ISO 11268-2:2023 Soil quality - Effects of pollutants on earthworms - Part 2: Determination of effects on reproduction of *Eisenia fetida/Eisenia andrei* and other earthworm species, 36p
- 6). ISO(2018) : ISO 15952:2018 Soil quality - Effects of pollutants on juvenile land snails (*Helicidae*) - Determination of the effects on growth by soil contamination, 34p
- 7). ISO(2023) : ISO 16387:2023 Soil quality - Effects of contaminants on Enchytraeidae (*Enchytraeus sp.*) - Determination of effects on reproduction, 23p
- 8). ISO(2008) : ISO 17512-1:2008 Soil quality - Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour - Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*), 25p
- 9). ISO(2011) : ISO 17512-2:2011 Soil quality - Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour - Part 2: Test with collembolans (*Folsomia candida*), 13p
- 10). ISO(2005) : ISO 20963:2005 Soil quality - Effects of pollutants on insect larvae (*Oxythyrea funesta*)- Determination of acute toxicity, 12p
- 11). ISO(2012) : ISO 11269-1:2012 Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora - Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth, 16p

- 12). ISO(2012) : ISO 11269-2:2012 Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora - Part 2: Effects of contaminated soil on the emergence and early growth of higher plants, 19p
- 13). ISO(2024) : ISO 17126:2024 Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora - Screening test for emergence of lettuce seedlings (*Lactuca sativa* L.), p7
- 14). ISO(2016) : ISO 18763:2016 Soil quality - Determination of the toxic effects of pollutants on germination and early growth of higher plants, p22
- 15). ISO(2005) : ISO 22030:2005 Soil quality - Biological methods - Chronic toxicity in higher plants, 18p
- 16). ISO(2013) : ISO 29200:2013 Soil quality - Assessment of genotoxic effects on higher plants - *Vicia faba* micronucleus test, 18p
- 17). ISO(2010) : ISO/TS 29843-1:2010 Soil quality - Determination of soil microbial diversity - Part 1: Method by phospholipid fatty acid analysis (PLFA) and phospholipid ether lipids (PLEL) analysis, 9p
- 18). ISO(2021) : ISO/TS 29843-2:2021 Soil quality - Determination of soil microbial diversity - Part 2: Method by phospholipid fatty acid analysis (PLFA) using the simple PLFA extraction method, 7p
- 19). ISO(2020) : ISO 11063:2020 Soil quality - Direct extraction of soil DNA, 10p
- 20). ISO(2012) : ISO 14238:2012 Soil quality - Biological methods - Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these processes, 12p
- 21). ISO(1997) : ISO 14240-1:1997 Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1: Substrate-induced respiration method, 4p
- 22). ISO(1997) : ISO 14240-2:1997 Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigation- extraction method, 12p
- 23). ISO(2012) : ISO 15685:2012 Soil quality - Determination of potential nitrification and inhibition of nitrification -Rapid test by ammonium oxidation, 11p
- 24). ISO(2012) : ISO 14238:2012 Soil quality - Biological methods - Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these processes, 12p
- 25). ISO(2002) : ISO 16072:2002 Soil quality - Laboratory methods for determination of microbial soil respiration, 19p
- 26). ISO(2012) : ISO 17155:2012 Soil quality - Determination of abundance and activity of soil microflora using respiration curves, 13p
- 27). ISO(2019) : ISO 23753-1:2019 Soil quality - Determination of dehydrogenase activity in soils - Part 1: Method using triphenyltetrazolium chloride (TTC), 9p
- 28). ISO(2019) : ISO 23753-2:2019 Soil quality - Determination of dehydrogenase activity in soils - Part 2: Method using iodotetrazolium chloride (INT), 8p
- 29). ISO(2024) : ISO 18187:2024 Soil quality - Contact test for solid samples using the dehydrogenase activity of *Arthrobacter globiformis*, 27p
- 30). ISO(2019) : ISO/TS 22939:2019 Soil quality - Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using fluorogenic substrates in micro-well plates, 13p
- 31). ISO(2018) : ISO 20130:2018 Soil quality - Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using colorimetric substrates in micro-well plates, 29p
- 32). ISO(2018) : ISO/TS 20131-1:2018 Soil quality - Simple laboratory assessments for characterizing the denitrification in soil - Part 1: Soil denitrifying enzymes activities, 12p
- 33). ISO(2018) : ISO/TS 20131-2:2018 Soil quality - Simple laboratory assessments for characterizing the denitrification in soil - Part 2: Assessment of the capacity of soils to reduce N₂O, 13p
- 34). 公益社団法人地盤工学会(2020) : 地盤材料試験の方法と解説 第一回改訂版 二分冊の一 JGS 0211:2020 土懸濁液の pH 試験方法, p322-351
- 35). 茨城県農業総合センター(2015) : 改訂版 土壌・作物栄養診断マニュアル, ver.3, p3-31
- 36). 三菱 UFJ リサーチ&コンサルティング(2019) : 令和元年度 ICT や AI 化に対応した新たな土づくり体制実態調査, p45-72