

1. 背景及び目的

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。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)¹⁾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。

2. 土壌試料採取の事前準備

(1) 試料採取地点の選定

試料採取地点の選定は、調査範囲全体を代表するものを選択する。また、現場では**試料採取場所の形態や化学的・生物学的負荷、土壌汚染の情報**のほか、**必要に応じて表1に示す項目**を正確に記録し、報告することが求められている。

(2) 土壌試料採取方法の決定

試料採取方法を検討する際は、以下2項目を考慮する。
①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
②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が
これらは、時間的・空間的なばらつきが大きいため、試験目的に応じた採取計画と統計的手法を適用する必要がある。
なお、予定場所での採取が困難な場合、現場での応急的な判断は、偏りのある試料採取地点の設定に繋がるため、代替の採取計画を事前に立ておくべきである。

3. 土壌試料の取り扱い

(1) 土壌試料の取り扱い工程と留意事項

室内試験に使用する土壌試料の採取、輸送、処理、保管時の留意事項を表2に示す。現場状況を把握する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ることが必要である。

表2 現場における土壌試料採取時の留意事項

工程	対象	留意事項
 土壌採取	全ての土壌	以下(1)~(3)の期間の採取は避ける (1)1ヶ月など長期間の干ばつ (2)凍結期間 (3)洪水期間中またはその直後 【試料採取容器】 (1)試料採取場所と関連した明確な印をつける (2)土壌水分を吸収する容器の使用を避ける (3)土壌中に溶媒や可溶性などを放出する可能性のある容器の使用を避ける ※明確な層位がある場合は、層位ごとに採取し、代表的な試料は層位の先端から下端までを採取
	好気性農用地土壌	実際の耕作深さまで実施
	RNA分析用試料	ドライアイスを用いて速やかに凍結
 不要物除去	好気性農用地土壌	・表層の植物被覆 ・植物の根と土壌動物相 ・大型または本本植物の腐植・腐食層 ※除去は、有機成分によって試験条件に影響が生じることを防止するために実施
	RNA分析用試料	ドライアイスを用いて速やかに凍結
 土壌試料輸送	全ての土壌	含水率を極力維持する方法で輸送
	DNA分析用試料	冷却ボックスに入れて輸送可能 ※ドライアイスが必要でない限り
	RNA分析用試料	ドライアイスを使用し輸送
 土壌処理	微生物試験用試料	植物や大型土壌動物、石を除去し、2 mmのふるいにかける
	土壌無脊椎動物試験用試料	・有機物が多い試料は、5 mm→2 mmの順でふるいにかける ・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
	植物試験用試料	4 mmのふるいにかける
 保管	全ての土壌	・ゆるく縛ったポリエチレン袋に入れ、通気性の良い暗所に保管 ・土壌を低温に保ち、厳しい環境条件を避ける ・光の照射と試料の重みでの保管などの物理的な圧縮を可能な限り避ける ・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

(2) 試験所での土壌処理

土壌処理では**好気性維持**のため、ふるい分けが推奨される。試料が湿っており、ふるいを通過しない場合は、均一に広げ乾燥させる。この時、試料表面の過度な乾燥を避けることが重要である。
表層土壌の微生物群にとって、乾燥と再湿潤は、生理的負荷となる。しかし、植物や無脊椎動物は乾燥に敏感なことから、試料を再湿潤させることを念頭に置くべきである。

生物学的試験では生理的負荷による動態変化が生じる可能性があるため、土壌処理までに保管が必要な場合は、表3に示す保管条件を考慮する必要がある。

(3) 様々な保管条件

1) 基本的な保管条件

試料を3か月以上保管することは一般的に推奨されないが-20℃、-80℃、-180℃での冷凍保存が適応できる場合がある。

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℃での保存は適さない。
PLFA(リン脂質脂肪酸)分析のための試料をすぐに処理しない場合は、-20℃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℃で冷凍保存する。
RNA分析の場合、試料は-80℃で冷凍保存する。

これらDNA、RNA、PLFA/PLEL(リン脂質エーテル脂質)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、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。

(4) 取り扱い上の注意事項

1) 前培養

処理後の土壌試料は、**微生物試験に使用する前に、前培養を行う**べきである。前培養の期間は、試験の目的などによって異なるが、一般的には、2日~28日の期間が適当である。

2) 凍結試料の取り扱い

試料が凍結している場合は、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℃で1週間もしくは20℃で3日間の解凍が推奨され、20℃で1日の解凍も適している。DNA、RNA、リン脂質脂肪酸(PLFA)/リン脂質エーテル脂質(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。

4. 我が国における本規格の適用性について

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である。一方、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、**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。そのため、土壌汚染対策法と本規格では、土壌の処理や保管方法に相違がみられる。

近年における国内外の動向として、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。また、国内では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。

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、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。

表3 土壌処理を直ちに実施できない場合の保管条件と保管期間¹⁾

試験目的	ISO規格	温度条件下		
		4℃±2℃ (またはその他の温度)	-20℃*	-80℃または液体窒素(-180℃*)
無脊椎動物への影響	ISO 11267 ISO 11268-1 ISO 11268-2 ISO 15952 ISO 16387 ISO 17512-1 ISO 17512-2 ISO 20963	3か月	-	-
高等植物への影響	ISO 11269-1 ISO 11269-2 ISO 17126 ISO 18763 ISO 22030 ISO 29200	3か月	-	-
リン脂質脂肪酸(PLFA) リン脂質エーテル脂質(PLEL)	ISO/TS 29843-1 ISO/TS 29843-2	7日	2年	10年
DNA	ISO 11063	-	2年	10年
RNA	ISO 14238	-	-	10年
バイオマス ・基質呼吸法 ・燃焼抽出法	ISO 14240-1 ISO 14240-2	7日	1年	-
アンモニウム酸化的可能性	ISO 15685	7日	1年	-
窒素の無機化	ISO 14238	7日	1年	-
微生物による土壌呼吸	ISO 16072	7日	1年	-
土壌呼吸曲線	ISO 17155	7日	-	-
デヒドロゲナーゼ活性	ISO 23753-1 ISO 23753-2 ISO 18187	7日 7日 14日	1年	-
酵素活性/パターン	ISO/TS 22939 ISO 20130	- 15℃/4日	-	4か月以上
脱窒酵素活性	ISO/TS 20131-1 ISO/TS 20131-2	7日	1年	-

*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℃で数か月間保存した後、さらに分離工程を行いGC-MSで分析する。
-20℃または-80℃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。