

農地土壌診断 —有機農法のための農地物質循環の評価—

松野敏英<sup>1)</sup>、津田治敏<sup>1)</sup>、久保田謙三<sup>1)</sup>、松宮芳樹<sup>1)</sup>、久保幹<sup>1)</sup>

=====  
Diagnosis of agricultural soil

– Assessment of Material Cycle for Organic agriculture –

Toshihide Matsuno<sup>1)</sup>, Harutoshi Tsuda<sup>1)</sup>, Kenzo Kubota<sup>1)</sup>, Yoshiki Matsumiya<sup>1)</sup> and  
Motoki Kubo<sup>1)</sup>

A simple and rapid method for extracting environmental DNA (eDNA) from soils was constructed by slow-stirring with chemical treatment. eDNA was efficiently extracted with minimal damage from various kinds of soil. The amount of eDNA and soil bacterial biomass showed a linear proportional relation, indicating that bacterial biomass could be evaluated by quantifying levels of eDNA. An average bacterial biomass of 220 agricultural soils was  $3.0 \times 10^9$  cells/g-sample by the slow-stirring method. For analysis of the circulation of inorganic nitrogen in agricultural soils, ammonia nitrogen and/or nitrite nitrogen were added into the soils, and then the reduction amounts of each nitrogen compound were measured after three days incubation. A bacterial biomass based on eDNA and the reduction ratio of both ammonia nitrogen and nitrite nitrogen were used for assessment of the agricultural soils. Consequently, a novel quantification method based on nitrogen circulation using the radar chart was constructed.

Key words; Environmental DNA, Nitrogen circulation, Organic agriculture, Material cycle, Soil assessment

E-mail: kubo@sk.ritsumei.ac.jp (M. Kubo)

=====  
<sup>1)</sup>立命館大学生命科学部生物工学科

<sup>1)</sup>Department of Biotechnology, Faculty of Life Sciences, Ritsumeikan University,  
1-1-1, Nojihigashi, Kusatsu, Shiga 525-8577, Japan

## 1. はじめに

日本や多くの先進国では、化学肥料の普及によって農作物の生育に必要な栄養分を容易に施用することが可能となり食料増産に成功した。世界の人口は今後も増加することが予想されており、食料生産性を向上させるために化学肥料の適切な施用は今後も重要であろう。

一方、現在では化学肥料の連用や過剰使用に起因する様々な問題点が顕在化してきている。例えば、土壌生産力の低下（化学肥料の連用によって土壌団粒の減少、土壌の硬質化）、環境汚染（化学肥料の過剰使用によって土壌や地下水の汚染）などが挙げられる（1）。さらに、近年の世界的な化学肥料需要の増大に伴って化学肥料価格も高騰しており、農業生産コストの大幅な上昇は農業への経済的負担を招いている。

農業における農作物の生育や収穫量は農地の土壌環境に大きく依存している（2）。このため、農地の土壌環境を農作物栽培に適した状態にコントロールすることが重要である。このような状況下で、農地の土壌環境を簡便かつ高精度に把握・評価する技術が求められている。農地土壌診断は、土壌の物理化学的性質やその土壌中の栄養分の質および量を科学的に解析する技術であり、農作物栽培に適した施肥設計のための情報を提供する技術として注目されている。このような診断技術は、これまでの経験的な施肥を改め、診断に基づいた適正な施肥を可能にした。この結果、減肥による肥料コストの低減、適正施肥による環境汚染の防止が期待されている。

また、近年の“食の安全・安心”に対する消費者意識の高まりに伴い、有機農法に対する関心が増大している。有機農法で施用する堆肥などの有機肥料は化学肥料と異なり肥料成分バランスの調整が不可能である。このため、有機農法では有機肥料中の肥料成分の過不足を見極めることが重要である（3）。しかし、堆肥などの有機肥料の作製は、多くの場合、経験的に行われており、その中に含まれる肥料成分

を考慮していないのが現状である。また、有機農法では土壌中に未分解の有機物が蓄積する。このような有機物の一部は植物生長促進作用を有することが近年知られつつある（4, 5）。しかし、土壌中の有機物の大部分は植物によって直接的に利用されることはなく、土壌生物や土壌細菌の働きによって分解（無機化）されることで、やがて農作物に利用される。このため、特に有機農法では施肥効果に影響を及ぼすことから、土壌生物や土壌細菌に基づく物質循環を考慮することが重要である。換言すれば、有機農法の安定的な施用には土壌環境および堆肥環境を正確に把握する必要がある。しかし、従来の診断技術では化学分析による肥料成分の解析のみであった。このため、今後は土壌の物質循環に寄与する生物活性に着目した生物的解析が重要である。本研究では、農地土壌診断の指標として土壌細菌（生物活性）に着目し、土壌中の総細菌数およびそれらの細菌に起因する窒素循環活性に基づいた農地土壌診断を開発した。

## 2. 材料および方法

### 環境 DNA (environmental DNA、eDNA) 解析

自然環境中の細菌由来 DNA（environmental DNA、以下 eDNA）の抽出および解析を行った（6, 7）。滅菌したチューブに供試土壌 1.0 g、DNA抽出緩衝液（100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM 2Na・EDTA、100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.5 M NaCl、1% (w/v) Hexadecyltrimethylammonium Bromide) を 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、攪拌機（簡易型微生物 DNA 抽出前処理装置 1004、井元製作所）で攪拌（1,500 rpm、室温、20 分間）した。攪拌した溶液 1.5 ml を遠心分離（8,000 rpm、室温、10 分間）に供し、水層 700  $\mu$ l を新たなチューブに分取し、クロロホルム・イソアミルアルコール（24:1 (v/v)）700  $\mu$ l を添加し、緩やかに転倒

混和後、遠心分離（14,000 rpm、室温、10 分間）した。水層 500  $\mu\text{l}$  を新たなチューブに分取し、2-プロパノール 300  $\mu\text{l}$  を添加し、緩やかに転倒混和後、遠心分離（14,000 rpm、室温、20 分間）した。水層を除去後、70 % (v/v) エタノール 1.0 ml を添加し、遠心分離（14,000 rpm、室温、5 分間）した。水層を除去後、アスピレーターで減圧乾燥し、環境DNA (eDNA) を得た。このeDNAをTE 緩衝液に溶解し、アガロースゲル電気泳動に供した。マーカーとして smart ladder (NIPPON GENE、富山) を使用した。アガロースゲル上のDNA量はKODAK 1D Image Analysis software (KODAK、東京) を用いて解析した。eDNA量は以下の式 (A) から算出した。

$$\text{eDNA 量} = \text{ゲル中の DNA 量}(\text{ng}) \times \frac{\text{TE 緩衝液量}(\mu\text{l})}{\text{eDNA 溶液量}(\mu\text{l})} \times \frac{\text{全溶液量}(\mu\text{l})}{\text{分取した水層量}(\mu\text{l})} \times 10^{-3} \quad \dots \text{(A)}$$

さらに、eDNA-総細菌数の検量線 ( $R^2 = 0.94$ ) から算出した以下の式 (B) に従って総細菌数を算出した (図 1)。

$$\text{総細菌数 (cells/g-sample)} = \text{eDNA量} (\mu\text{g/g-sample}) \times 1.70 \times 10^8 \quad \dots \text{(B)}$$

### 窒素循環活性測定法

供試土壌の含水量を調整するために、水田土壌および畑土壌はそれぞれ最大保水量の 100% および 60% の含水率に調整した。これらの土壌にアンモニア態窒素として硫酸アンモニウム水溶液あるいは亜硝酸態窒素として亜硝酸カリウム水溶液を終濃度が 60  $\mu\text{g-N/g-soil}$  になるように添加し、25°C で 4 日間静置した。添加したアンモニア態窒素および亜硝酸態窒素の減少率からアンモニア酸化活性および亜硝酸酸化活性を見積もった。土壌に含まれる無機態窒素含有量を測定するために、土壌 2.0 g と 1.0 M

KCl 溶液 20 ml を混和（100 rpm、室温、60 分間）した後、遠心分離（10,000 rpm、室温、5 分間）した。この上清に含まれるアンモニア態窒素、亜硝酸態窒素および硝酸態窒素の定量はそれぞれインドフェノール青法、ナフチルエチレンジアミン法およびブルシン・スルファニル酸法に従って行った (8, 9)。

## 3. 結果および考察

### eDNA と総細菌数の関係解析

これまで、eDNAの抽出には、コストパフォーマンスや処理時間、特殊な機器の必要性、物理的なDNAのせん断、土壌中の腐食酸のような不純物の混入による酵素反応阻害など改良すべき課題が存在した。そこで、土壌中に存在する総細菌数を短時間で簡便かつ高精度に把握できるeDNA解析方法を構築した。さらに、本解析方法に基づくeDNA量と総細菌数の関係解析を行ったところ、抽出したeDNA量とDAPI染色によって求めた総細菌数は高い相関性を示した (eDNA量と総細菌数の検量線は  $Y=(1.70 \times 10^8)X$  であり、相関係数  $R^2$  値は 0.96 を示した (図 1))。本検量線における検出限界は  $7.8 \times 10^6$  cells/g-sample であった。これらの結果から、本解析方法によって土壌に含まれる総細菌数を短時間で簡便に解析することが可能になった (10)。

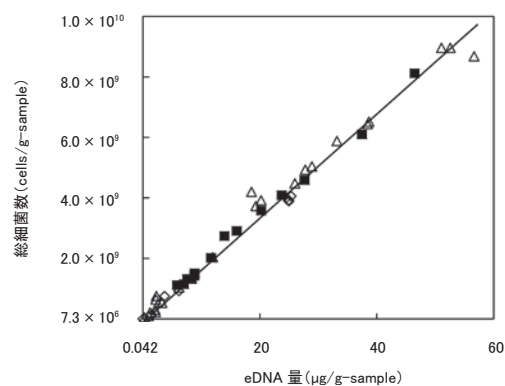


図1 土壌57サンプルのDAPI染色による総細菌数とeDNAの相関性。(■) 農地土壌、(△) 農地以外の土壌、(◇) 石油汚染土壌を示す。

### eDNA 解析方法による土壤中の総細菌数

eDNA解析方法によって様々な土壤中における総細菌数を解析するために、農地（86 サンプル）、農地以外の土壤（60 サンプル）、石油汚染土壤（63 サンプル）の合計 209 サンプルを用いて解析を行った。その結果、農地の総細菌数は  $1.2 \times 10^9 \sim 1.8 \times 10^{10}$  cells/g-sample の範囲であり、その平均は  $6.0 \times 10^9$  cells/g-sample であった。農地以外の土壤の総細菌数は  $3.0 \times 10^8 \sim 9.6 \times 10^9$  cells/g-sample の範囲であり、その平均は  $1.9 \times 10^9$  cells/g-sample であった。さらに、石油汚染土壤の総細菌数は  $1.0 \times 10^9$  cells/g-sample 以下であり、検出限界以下の土壤が多数存在した（図 2）。これらの結果から、土壤中の総細菌数は土壤環境によって大きく異なることが明らかになった。このため、土壤中の総細菌数が農地やその他の土壤環境を判断するための指標の 1 つとして使用可能であることが示唆された。

### 農地土壤の総細菌数の解析

農地土壤を評価・診断するための指標の 1 つとして農地土壤の総細菌数を使用するためには、先述した農地土壤（60 サンプル）よりも多数の土壤を解析し、総細菌数の閾値を把握することが重要であることが考えられた。このため、実際の農地土壤（220 サンプル）における総細菌数の解析を行った。その結果、これらの農地土壤の総細菌数の平均は  $3.0 \times 10^9$  cells/g-sample であった（図 3）。この値は先述の農地土壤（60 サンプル）よりも低い値を示した。この理由として、栽培環境や肥培管理が幅広く異なった多数の農地土壤を供試土壤として使用したためであることが考えられる。結果的に、実際の農地土壤診断では農地土壤の現状を反映すべきであることから、農地土壤診断のための総細菌数の平均は  $3.0 \times 10^9$  cells/g-sample を使用した。また、総細菌数が  $2.0 \times 10^8$  cells/g-sample 以下の土壤では窒素循環活性の顕著な低下を示した。

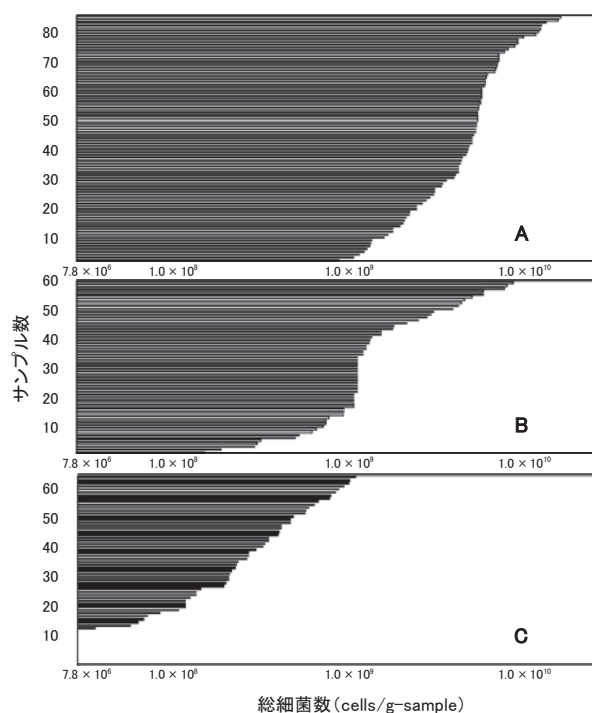


図 2 各種土壤での eDNA 量からの総細菌数の分布（合計 209 サンプル）. (A) 農地土壤（86 サンプル）、(B) 農地以外の土壤（60 サンプル）、(C) 石油汚染土壤（63 サンプル）を示す。

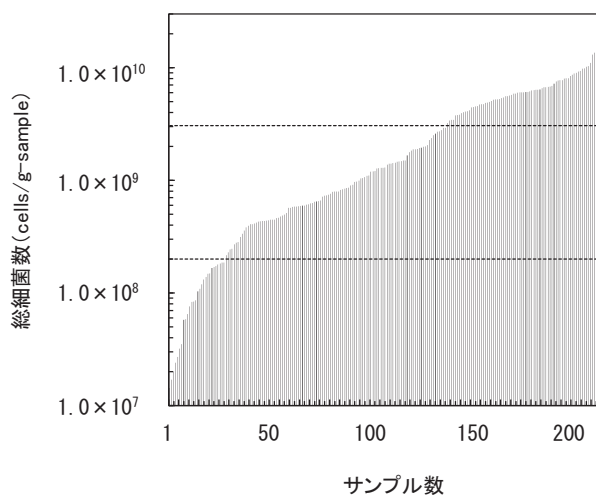


図 3 農地土壤の総細菌数. 220 サンプルの農地土壤の総細菌数を解析した。

### 農地土壌の窒素循環

農地土壌の窒素循環過程では、アンモニア態窒素が亜硝酸態窒素に変換され、さらに亜硝酸態窒素から硝酸態窒素に変換されている。そこで、農地土壌における無機態窒素の蓄積量を明らかにするために、複数の土壌中のアンモニア態窒素、亜硝酸態窒素および硝酸態窒素の含有量を測定した。その結果、使用した大部分の試料土壌において他の窒素化合物と比較して硝酸態窒素含有量が最も高い値（7.0～46.0  $\mu\text{g-N/g-sample}$ ）を示した。さらに、使用したすべての土壌において亜硝酸態窒素含有量が最も低い値（0.03～0.41  $\mu\text{g-N/g-sample}$ ）を示した。さらに、これらの農地土壌における無機態窒素の変換活性を明らかにするために、供試土壌にアンモニア態窒素（硫酸アンモニウム）、亜硝酸態窒素（亜硝酸ナトリウム）および硝酸態窒素（硝酸ナトリウム）をそれぞれ添加し、4日間静置した後の各無機態窒素の減少率を測定した。その結果、アンモニア態窒素の減少率は13～96%の範囲であり、平均は43%であった。亜硝酸態窒素の減少率は18～100%の範囲であり、平均は86%であった。また、硝酸態窒素含有量は変化しなかった。本結果から、農地土壌の窒素循環過程ではアンモニア態窒素から亜硝酸態窒素への変換が律速段階であることが示唆された（11, 12）。本結果は既知の報告と一致するものであった（13, 14）。

### 土壌中の総細菌数と窒素循環活性に基づく農地土壌診断

農地土壌診断を行うためのパラメーターとして農地土壌中の総細菌数およびそれらの細菌に起因する窒素循環活性を使用することにした。具体的には「アンモニア態窒素の減少率」、「亜硝酸態窒素の減少率」さらに「総細菌数の相対値」の3つのパラメーターである。「総細菌数の相対値」は、先述した農地土壌中の総細菌数の平均値（ $3.0 \times 10^9$  cells/g-sample）を100%として算出した。さらに、これらのパラメーターから成るレーダーチャートを作成し、この最

大の面積を100点（評価値）とすることで、各供試土壌の評価値（点）を算出した。一例として、本土壌診断によって有機栽培土壌と無機栽培土壌を比較したところ、有機栽培土壌では無機栽培土壌よりも多数の土壌細菌の生育が見られた。さらに、これらの土壌細菌に起因した窒素循環活性も有機栽培土壌の方が高い値を示した。結果的に、本農地土壌診断における有機栽培土壌の評価値は62.7点であり、無機栽培土壌の評価値は7.1点であった（図4）。これらの結果から、本農地土壌診断の利用によって土壌中の生物活性（物質循環）に基づいた土壌の定量的な評価・診断が可能であることが示唆された。

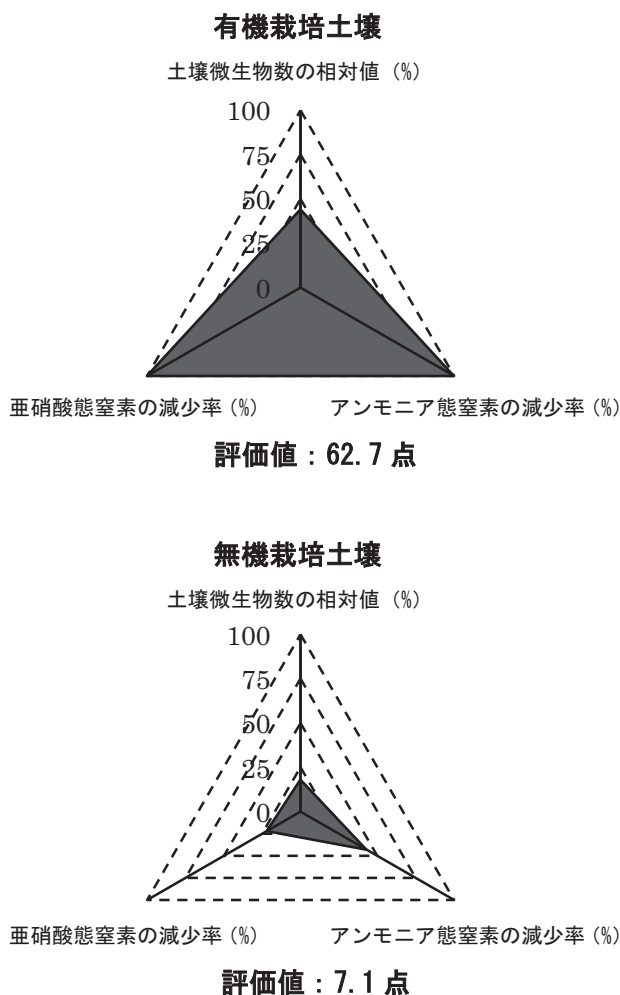


図4 窒素循環に基づく土壌評価. 有機栽培土壌の評価値は62.7点であり、無機栽培土壌の評価値は7.1点を示した。

## 窒素循環に基づく農地の土壌評価

先述した農地土壌診断に基づいて滋賀県、京都府および宮城県の農地土壌(37 サンプル)を解析した。その結果、解析した農地土壌の評価値は 2.6 点～37.1 点の範囲であり、その平均は 22.2 点であった(図 5)。これらの農地土壌の中には、類似した総細菌数(総細菌数の相対値)を示した土壌が複数確認されたが、最終的な評価値は必ずしも類似していなかった。これは、「アンモニア態窒素の減少率」や「亜硝酸態窒素の減少率」が土壌毎に異なったためである。これらの結果は、農地土壌における窒素循環のような土壌の状態を評価するためには、総細菌数および窒素化合物の挙動(アンモニア態窒素および亜硝酸態窒素の挙動)の両方を解析することが重要であることを示している。

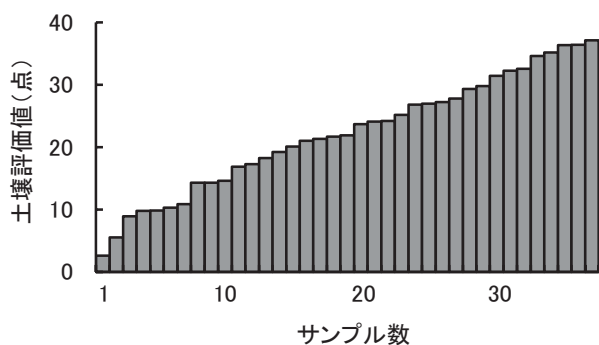


図 5 窒素循環に基づく農地の土壌評価. 37 サンプルの農地土壌を解析した. 土壌評価の平均は 22.2 点であった.

## 4. おわりに

今後は、農地土壌を評価する因子として、土壌の物理化学的性質や栄養分組成のみならず生物活性に基づいた物質循環が重要になることが予想される。土壌中の有機物は土壌生物や土壌細菌の分解作用によって無機化されることで農作物に利用される。このため、特に、有機農法では農作物の生育にとって土壌中の物質循環が重要である。さらに、有機農法では、堆肥の肥料成分が明確であると共に、容易に分解(無機化)される堆肥を施用するべきである。

このため、有機農法で施用するための肥料成分が整った理想的な堆肥の開発も重要である。土壌診断に基づいた適正施肥や土壌改良は、健全な農作物を育み、人の健康維持、環境汚染防止に繋がることが期待される。本稿で紹介した土壌細菌に基づいた農地土壌診断が農地土壌の包括的評価の一助となることを期待したい。

## 文 献

- (1) Rigby D and Cáceres D (2001) Organic farming and the sustainability of agricultural systems. *Agricultural Systems* 68 (1): 21-40
- (2) Stirzaker R. J, Passioura J. B and Wilms Y (1996) Soil structure and plant growth: Impact of bulk density and biopores. *Plant and Soil* 185 (1): 151-162
- (3) 棚橋寿彦、矢野秀治 (2004) 鶏ふん堆肥の窒素含有量に基づく肥効推定法、*日本土壌肥科学雑誌*、第 73 巻第 2 号、p. 257-260
- (4) Sanpa S, Sumiyoshi S, Kujira T, Matsumiya Y and Kubo M (2006) Isolation and Characterization of a Bluegill-Degrading Microorganism, and Analysis of the Root Hair-Promoting Effect of the Degraded Products. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70 (2): 340-347
- (5) Rentsch D, Schmidt S and Tegeder M (2007) Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS Letter* 581(12): 2281-2289
- (6) 特願 2003-135012 環境診断方法及びこれを利用した環境診断システム
- (7) H. Aoshima H, Kimura A, Shibutani A, Okada C, Matsumiya Y, Kubo M (2006) Evaluation of soil bacterial biomass using environmental DNA extracted by slow-stirring method. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 875-880
- (8) 土壌機能モニタリング調査のための土壌、水質及び植物体分析法、財団法人 日本土壌協会
- (9) 堆肥等有機物分析法、財団法人 日本土壌協会
- (10) 津田治敏、松野敏英、佐藤貴宣、諸江泰宏、久保田謙三、松宮芳樹、久保 幹、農地土壌のアンモニア酸化細菌と窒素循環 (1) -アンモニア酸化細菌数とアンモニア酸化活性との関係解析-、*生物工学会誌*、9 月、2009 年
- (11) 松野敏英、津田治敏、佐藤貴宣、諸江泰宏、久保田謙三、松宮芳樹、久保 幹、農地土壌のアンモニア酸化細菌と窒素循環 (2) -アンモニア酸化細菌の土壌投与による窒素循環活性の促進-、*生物工学会誌*、9 月、2009 年
- (12) 佐藤貴宣 (2009) 土壌における窒素循環に関する研究～アンモニア酸化細菌と硝化能の関係解析～、修士論文、立命館大学大学院 理工学研究科 創造理工学専攻
- (13) Adair K. L and Schwartz E (2008) Evidence that ammonia-oxidizing archaea are more abundant than ammonia-oxidizing bacteria in semiarid soils of northern Arizona, USA. *Microbial Ecology* 56 (3): 420-426
- (14) Kowalchuk G. A and Stephen J. R (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology* 55: 485-529