

土壌環境中における窒素循環活性の新規評価法

津田治敏¹⁾、松野敏英¹⁾、久保田謙三¹⁾、松宮芳樹¹⁾、久保 幹¹⁾

=====

A new method for an evaluation of a nitrogen circulation activity in soil.

Tsuda Harutoshi, Matsuno Toshihide, Kubota Kenzo, Matsumiya Yoshiki and
Kubo Motoki

This study was designed to construct a new method to evaluate a nitrogen circulation in soil environment using three indexes, bacterial number, ammonium oxidization, and nitrite oxidization. First, bacterial number and nitrate nitrogen in soils were analyzed using soils applied with various nitrogen sources, and the result supports that the ammonium oxidizing reaction was a rate-limiting step in nitrogen circulation. Databases of bacterial number, ammonium oxidizing activity, and nitrite oxidizing activity were constructed. A diagnosis of nitrogen circulation in soils was evaluated based on this database. The relationship between the value of agricultural soil by the synthetic evaluation index and plant growth showed positive correlation, and the activity evaluated with this method has possibility of a useful indicator for nitrogen circulation activity in soil environment. A raise of a nitrogen circulation activity in soil environment before manuring was thought to be important for efficient use of organic fertilizer.

Keywords: Nitrogen circulation, Organic agriculture, Soil assessment

E-mail: kubo@sk.ritsumeiji.ac.jp

=====

立命館大学生命科学部生物工学科

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

1. はじめに

土壌の肥沃度解析は、安定した収穫量につながるため、化学分析を中心にいろいろな手法が開発されてきた。硝酸態窒素、可溶性リン、および可溶性カリウムは植物の重要な肥料成分であるため、土壌中におけるこれらの成分解析と植物生長との関係解析が詳細に行われており、再現性のある農業生産が可能となっている(1、2)。

一方、土壌中の物質循環に基づいた有機農法は、土壌微生物による有機物から無機物への変換によって、作物生長に必要な栄養素を供給する。そのため、土壌中の無機態窒素、無機態リン、無機態カリウムの蓄積量の把握が難しく、また、堆肥の品質も季節毎に異なるため、施肥量などは経験的な手法に頼ってきた。従って、土壌の微生物学および化学的分析が安定した農産物の収穫量に必要である。

植物の生長に最も影響を与えるのは窒素であるため、土壌中の窒素循環を詳細に把握することで再現性のある有機栽培に資することができる。土壌中の窒素循環において、植物が利用可能な窒素は、有機質肥料中の有機態窒素が無機化されることによって供給される(3)。土壌中の総細菌数が多いほど、窒素の無機化は進むと考えられるが、土壌中の微生物の多くは難培養性であり、正確な菌数の把握は難しい。これまでに著者らは土壌から抽出した DNA 量から土壌中の総細菌数を定量的に解析する方法を構築している(4)。こうした遺伝学的な手法によって土壌中の総細菌数を解析する事によって、土壌の窒素循環活性を詳細に把握する事ができるだろう。

窒素の無機化とはタンパク質などの有機体窒素が分解されてアンモニアや亜硝酸および硝酸へと変換することであり、これらの反応のうち、アンモニアから亜硝酸への酸化および亜硝酸から硝酸への酸化にはそれぞれアンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌が重要な役割を担っている(5)。アンモニア酸化反応は亜硝酸酸化反応と比べて反応速度が遅く、土壌環境中の窒素循環においてアンモニア酸化は律速段階であることがこれまでに示されている(6)。これらのことから、土壌中の窒素循環活性を高めるにはアンモニア酸化活性を高めることが効果的であると考えられた。

複数のインデックスを用いて土壌の窒素循環活性の評価することは、土壌の窒素循環活性をより正確に理解でき、土壌肥沃度の指標の一つになる。本研究では土壌中の総細菌数、アンモニア酸化活性および亜硝酸酸化活性の3つのインデックスを用いて土壌環境中の窒素循環活性を評価する方法を構築することが目的である。そこで、土壌中の硝酸態窒素の変動に及ぼす総細菌数の影響を解析し、窒素循環が活発となる土壌中の総細菌数の指標を設定した。さらに土壌中の総細菌数、アンモニア酸化活性および亜硝酸酸化活性のデータベースを構築し、土壌環境中の窒素循環活性を総合的に診断する方法を構築した。最後に窒素循環活性の診断値と植物生長との関係を解析した。

2. 材料と方法

土壌環境中での窒素の無機化

カゼインを添加した土壌中の硝酸態窒素濃度を啓示的に測定した。すなわち、56カ所の農地土壌試料にカゼインを最終濃度が4g/kg-soilとなるように添加し、25°C、水分含量30%で4日間静置した。1日目と4日目の土壌から無機態窒素を1M KCl水溶液で抽出し、硝酸態窒素をブルシン法で測定した(7)。土壌中の総細菌数は既報に従って測定した(4)。

アンモニア態窒素および亜硝酸態窒素の減少率

10 カ所の土壤を用いて測定した。すなわち、土壤に硫酸アンモニウムあるいは亜硝酸カリウムをそれぞれ最終濃度が 60 $\mu\text{g-N/g-soil}$ となるように添加し、25 $^{\circ}\text{C}$ 、水分含量 30%で 4 日間静置した。1 日目と 4 日目の土壤から無機態窒素を 1M KCl 水溶液で抽出し、アンモニア態窒素濃度および亜硝酸態窒素濃度をそれぞれインドフェノール青法およびナフチルエチレンジアミン法を用いて測定した(8、9)。アンモニア態窒素および亜硝酸態窒素の減少率は下記の式に従って算出した。

$$\text{減少率} = (\text{1 日目の } \text{NH}_4^+\text{-N 濃度あるいは } \text{NO}_2^-\text{-N 濃度} - \text{4 日目の } \text{NH}_4^+\text{-N 濃度あるいは } \text{NO}_2^-\text{-N 濃度}) / (\text{1 日目の } \text{NH}_4^+\text{-N 濃度あるいは } \text{NO}_2^-\text{-N 濃度}) \times 100$$

窒素循環活性の異なる土壤の調製

立命館大学の畑土壤を滅菌するため、121 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間の高圧滅菌を 3 回繰り返した。滅菌土壤に 5.0% (w/w)の牛糞堆肥(アースパワー)を加えたものをグループ A とし、2.5% (w/w)の牛糞堆肥を加えたものをグループ B とした。

調製土壤での *Brassica rapa* (コマツナ) の栽培試験

Brassica rapa の苗はピートモスと赤玉土の混合土壤(1:1)で発芽させたものを用いた。調製した土壤をワグネルポット(1/5000a)に充填し、1 ポットにつき苗を 3 株植栽した。栽培条件は 24 時間光照射、25 $^{\circ}\text{C}$ で 3 週間栽培し、地上部の重量を測定した。

3. 結果

土壤環境中の窒素循環における律速段階の確認

土壤中の窒素循環活性の評価方法を確立するため、まず、土壤にカゼインを基質として添加して静置した後の窒素循環の流れをみた。すなわち、土壤中の総細菌数と土壤中の窒素循環過程における最終産物である硝酸態窒素の増加量の関係を解析した。その結果、総細菌数が 2 億個/g 以下の土壤では、硝酸態窒素の増加あるいは減少ともに認められず、物質変換が起きていないことが示唆された一方、総細菌数が 2 億個/g 以上の土壤では、硝酸態窒素の増加あるいは減少が認められ、物質循環が活発に起きていることが示唆された(図 1)。この

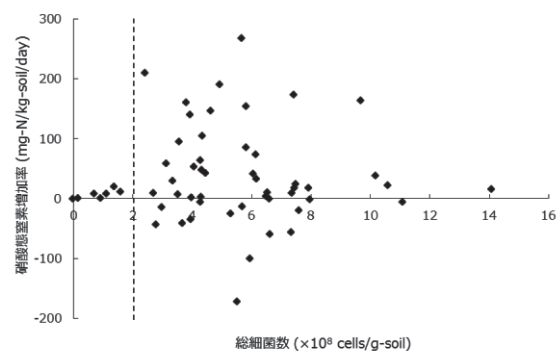


図 1. 総細菌数と硝酸態窒素増加率の関係

ことから、少なくとも土壤中の総細菌数が 2 億個/g なければ、窒素循環が進まない事が示唆された。そのため、窒素循環を評価する上で土壤中の総細菌数は重要な因子になると考えた。窒素循環の動きを解析するため、固有の細菌が関与するアンモニア酸化活性および亜硝酸酸化活性を評価するため、10 土壤サンプルに硫酸アンモニウムあるいは亜硝酸カリウムを添加して静置した後のアンモニア態窒素の減少率あるいは亜硝酸態窒素の減少率を測定した。その結果、亜硝酸態窒素の減少率(99.9%)はアンモニア態窒素の減少率(37.4%)よりも高かったことから、窒素循環においてアンモニアから亜硝酸への酸化が律速段階

であることが示唆された(表 1)。アンモニアが窒素循環において蓄積傾向にあることは、これまでに多く報告されており、今回得られた結果はこうした報告に合致するものである(6、10、11)。これらのことから、土壌の窒素循環においてアンモニアの酸化が律速段階であることが示唆され、アンモニア酸化活性および亜硝酸酸化活性は土壌診断において重要な指標となることがわかった。以上のことから、窒素循環の要素として総細菌数、アンモニア酸化活性および亜硝酸酸化活性を評価すれば土壌の窒素循環活性を評価できることが示唆された。客観的な評価基準を設定するため、種々の土壌における上記の測定値をデータベース化した。

表 1 農地土壌におけるアンモニア態窒素減少率および亜硝酸態窒素減少率。

土壌番号	アンモニア態窒素減少率 (%)	亜硝酸態窒素減少率 (%)
1	8.7	100
2	71.5	99.7
3	60.9	99.8
4	57.2	100
5	19.7	100
6	7.1	100
7	55.9	100
8	64.3	99.8
9	25.3	100
10	3.1	100
平均	37.4	99.9

種々の農地土壌における総細菌数、アンモニア態窒素酸化活性および亜硝酸態窒素酸化活性のデータベース構築

43 個の農地土壌における総細菌数、アンモニア態窒素酸化活性および亜硝酸酸化活性を測定した(図 2)。総細菌数とアンモニア酸化活性、総細菌数と亜硝酸酸化活性およびアンモニア酸化活性と亜硝酸酸化活性との間で、それぞれ相関関係は見られなかった。窒素循環において総細菌数は 2.0×10^8 cells/g-soil 以上であることが必要条件であるが、アンモニア酸化活性あるいは亜硝酸酸化活性においては十分条件ではないことがわかった。これらの結果から、3 つの指標(総細菌数、アンモニア酸化活性および亜硝酸酸化活性)はそれぞれ独立した指標であることが明らかとなった。43 個の農地土壌における総細菌数の範囲は 1.5×10^8 から 2.0×10^9 cells /g-soil であり、平均は 8.7×10^8 cells /g-soil であった(図 2-A)。43 個の農地土壌におけるアンモニア酸化活性および亜硝酸酸化活性の範囲はそれぞれ 0 から 83%(平均: 38.9%)および 0 から 100 % (平均: 78.8%)であった(図 2-B および 2-C)。高い総細菌数を

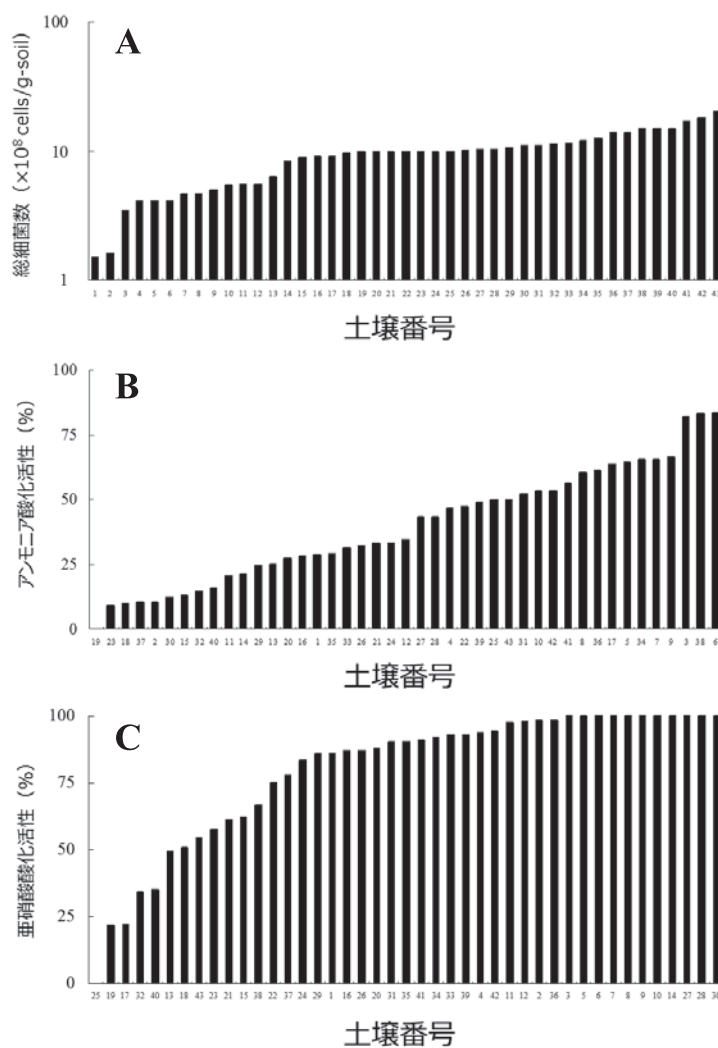


図 2. 農地土壌(43カ所)における総細菌数、アンモニア酸化活性および亜硝酸酸化活性 A: 総細菌数; B: アンモニア酸化活性; C: 亜硝酸酸化活性

保持する土壤における亜硝酸酸化活性は比較的高かった(土壤番号 35、36、37、38、39、41、42、43)。一方、高い総細菌数を保持するにもかかわらず、土壤番号 37 および 40 ではアンモニア酸化活性は低かった。このことから、総細菌数が多い土壤においてもアンモニア酸化細菌数が少ないことが示唆された。これらのデータベースを基に総合的な土壤診断法を構築した。

新規窒素循環評価法

土壤中の窒素循環においてアンモニアが蓄積傾向にあることがわかったため、窒素循環を評価するにはアンモニアから硝酸までの変換が特に窒素循環評価において重要であると考えた。そこで、指標として総細菌数評価値、アンモニア酸化活性および亜硝酸酸化活性を測定し、窒素循環活性を総合的に評価する方法の構築を試みた。総細菌数評価値は 43 サンプルの農地土壤から得られた総細菌数の平均値、 8.7×10^8 cells/g を 100%として供試土壤の総細菌数の評価値を算出した。アンモニア酸化活性および亜硝酸酸化活性については活性値で評価した。これら三つの評価値によるレーダーチャートの面積値を窒素循環評価値とした(0-100 点)。

滋賀県草津市周辺の 47 箇所の農地土壤の窒素循環評価値を測定した結果、評価値は 3.9 から 79 までの範囲で平均値は 46 点であった(図 3)。

得られた結果から土壤を次の 5 つのタイプに分類した(図 4)。総細菌数、亜硝酸酸化活性およびアンモニア酸化活性のすべてが高い土壤(土壤番号 3、5-10、31、34、36、38、および 41-43)(図 4-A)、高総細菌数、高亜硝酸酸化活性および低アンモニア酸化活性を示した土壤(土壤番号 4、11、12、14-16、18、20-24、26-30、33、35、37、および 39)(図 4-B)、高総細菌数、低亜硝酸酸化活性および低アンモニア酸化活性を示した土壤(土壤番号 13、19、32、および 40)(図 4-D)、および低総細菌数、高亜硝酸

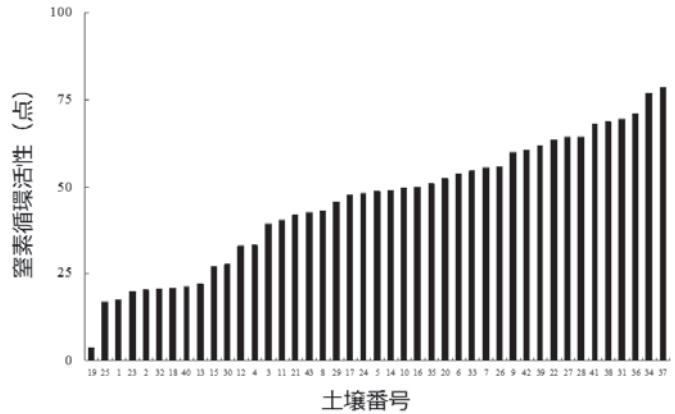


図 3. 農地土壤(43カ所)における窒素循環活性

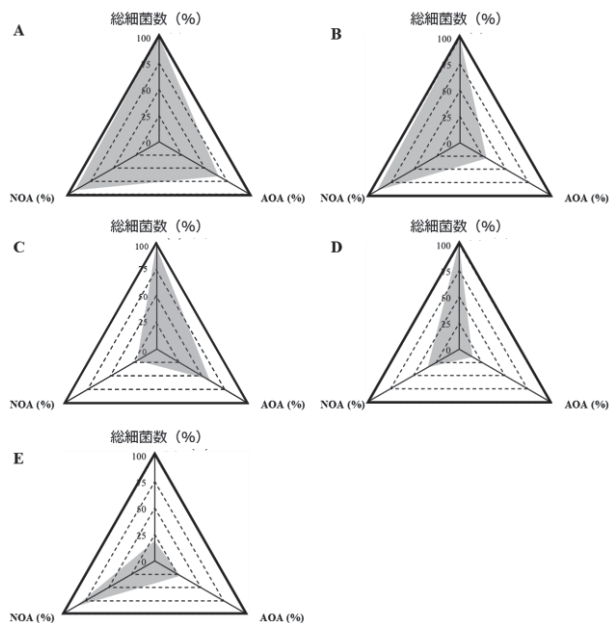


図 4. 土壤環境における 5 タイプの窒素循環活性
A、B、C、D、および E の窒素循環活性評価値はそれぞれ 76.9、50.8、47.5、20.5、および 17.4

AOA: アンモニア酸化活性; NOA: 亜硝酸酸化活性

- A タイプ: 高総細菌数、高 NOA、および高 AOA (土壤番号 34)
- B タイプ: 高総細菌数、高 NOA、および低 AOA (土壤番号 35)
- C タイプ: 高総細菌数、低 NOA、および高 AOA (土壤番号 17).
- D タイプ: 高総細菌数、低 NOA、および低 AOA (土壤番号 32).
- E タイプ: 低総細菌数、高 NOA、および低 AOA (土壤番号 1).

酸化活性および高アンモニア酸化活性を示した土壌(土壌番号 1 および 2)が見られた(図 4-E)。三つの評価値がすべて低い土壌は見られなかった。

新規評価法と植物生長との関係

本評価法と植物生長との相関関係を解析した。微生物数を制御する事で窒素循環活性の異なる8タイプの土壌を作製した(表 2)。これらの土壌の物性は同じであるが、窒素循環活性は 6.6 から 63 点であった(表 2)。土壌に 5.0% (w/w)の牛糞堆肥を加えたものをグループ A とし、2.5% (w/w)の牛糞堆肥を加えたものをグループ B とした。グループ A の中で滅菌処理した土壌 1 および 2 と、グループ B の中で滅菌処理した土壌 5 および 6 とでは、牛糞堆肥の添加量が多いグループ A の方が高い窒素循環活性を示した。同様に、グループ A の中で処理していない土壌 3 および 4 と、グループ B の中で処理していない土壌 7 および 8 とでは、牛糞堆肥の添加量が多いグループ A の方が高い窒素循環活性を示した。

3 週間栽培した後の *Brassica rapa* の生重量は窒素循環活性と正の相関を示した(図 5)。土壌 3 および 4(無処理、グループ A)は土壌 1 および 2(滅菌処理、グループ A)よりも生重量が重かった。同様に、土壌 7 および 8(無処理、グループ B)は土壌 5 および 6(滅菌処理、グループ B)よりも生重量が重かった。この結果から、窒素循環活性の高い土壌では植物生長に必要な窒素分が供給された為、*B. rapa* の生長が促進されたと考えられた。

4. 考察

土壌の肥沃度解析は、安定した収穫量につながるため、化学分析を中心にいろいろな手法が開発されてきた。硝酸態窒素、可溶性リン、および可溶性カリウムは植物の重要な肥料成分であるため、土壌中におけるこれらの成分解析と植物生長との関係解析が詳細に行われている(12)。化学農法における無機態窒素、無機態リン、無機態カリウムの投与量は、これらのデータに基づき定量的に決められるため、再現性のある農産物の収穫量が確保されることになった。

一方、土壌中の物質循環に基づいた有機農法は、土壌微生物による有機物から無機物への変換を伴うため、土壌中の無機態窒素、無機態リン、無機態カリウムの蓄積量の把握が難しく、経験的な手法に頼

表 2. 作製土壌における窒素循環活性と 3 週間栽培後の *Brassica rapa* の生重量。

土壌	グループ	処理	堆肥添加量 (%)	窒素循環活性	生重量 (g)
1	A	無処理	5.0	63.0	10.22
2	A	無処理	5.0	62.2	9.32
3	A	高压滅菌	5.0	48.7	4.93
4	A	高压滅菌	5.0	32.7	5.43

5	B	無処理	2.5	50.9	5.17
6	B	無処理	2.5	46.0	4.93
7	B	高压滅菌	2.5	7.9	1.99
8	B	高压滅菌	2.5	6.6	3.14

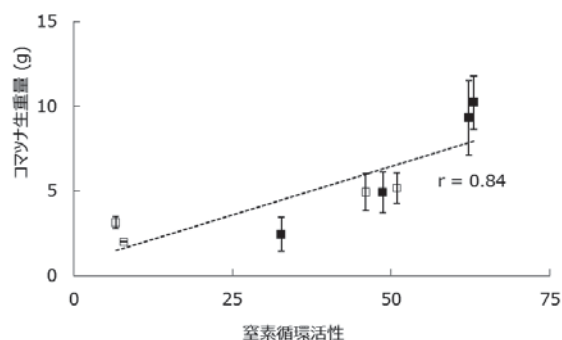


図 5. 窒素循環活性と *Brassica rapa* の生重量との相関関係
エラーバー: 標準偏差; 黒四角: 堆肥添加 5%; 白四角: 堆肥添加 2.5%

ってきた。従って、農産物の収穫量が安定せず、化学農法に比べ収量が低い報告が多い。

本研究では、土壤の窒素循環に着目し、まず土壤中の細菌数と硝化活性の関係解析を行った。土壤中の細菌数が約 2 億個/g を下回る土壤では殆ど硝化が進まなかった。一方、2 億個/g 以上では活発に硝化が進んだが、硝酸増加・減少と細菌数との関連性は認められなかった。本研究により、土壤中の安定な窒素循環のためには、一定数以上の細菌数と硝化活性に関与する細菌叢が不可欠であることが明らかとなった。

土壤中の窒素循環は、アンモニア→亜硝酸の反応が律速であるという報告が多くなされている(6)。本研究においても、アンモニア→亜硝酸の反応は、亜硝酸→硝酸の反応よりも進みにくいことが示され、硝化活性強化にはアンモニア酸化活性に関与する細菌叢が重要であることが示唆された。アンモニア蓄積傾向にある土壤の硝化活性を上げるためには、アンモニア酸化細菌の投与が有効であるかもしれない。

土壤の窒素循環活性を定量的に評価するため、3 つの指標、「細菌数」、「アンモニア酸化活性」および「亜硝酸酸化活性」を総合的に評価した。約 30% の土壤 (14/43) はバランスがとれていたが、約 50% の土壤でアンモニア酸化活性が低い事がわかった。土壤環境中の安定した窒素循環の為には、総合的な判断とバランスのとれた細菌叢が要求されることが示唆された。バランスのとれた細菌叢を実現するためには、細菌数の向上・維持が不可欠であり、土壤中の「有機 C:有機 N:有機 P」と各項目の量の制御が重要な処方になるかもしれない。

本土壌肥沃度評価値と植物生長には、正の相関関係が認められ、有機農法展開における本手法に基づく土壤改善・改良が有効であることが期待できる。今後、フィールド実験による有効性を詳細に検討することが不可欠であり、現在実験が進行している。また、リン循環やカリウム循環の評価手法の確立と、窒素循環との関係解析も興味深いと考えている。

5. 参考文献

1. Liebig J.: Chemistry in its application to agriculture and physiology. Taylor and Walton, London (1841)
2. Taiz L & Zeiger E, eds (2002) Plant Physiology. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
3. Drury D. F., Zhang T. Q. and Kay B. D.: The non-limiting and least limiting water ranges for soil nitrogen mineralization. *Soil Sci. Soci. Ame. J.*, **67**, 1388-1404 (2003)
4. Aoshima H., Kimura A., Shibutani A., Okada C., Matsumiya Y. and Kubo M.: Evaluation of soil bacterial biomass using environmental DNA. *Appl. Microbiol.*, **71**, 875-880 (2006)
5. Hayatsu M., Tago K. and Saito M.: Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **54**, 33-45 (2008)
6. Hojberg O., Binnerup S. J. and Sorensen J.: Potential rates of ammonium oxidation, nitrite oxidation, nitrate reduction and denitrification in the young barley rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*, **28**, 47-54 (1996)
7. Jenkins D. and Medsker L. L.: Brucine method for determination of nitrate in ocean, estuarine, and fresh waters. *Anal. Chem.*, **36**, 610-612 (1964)

8. Weatherburn M. W.: Phenol-hypo-chlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.*, **39**, 971-974 (1967)
9. Amer A. and Al-Hatim A.: Spectro-metric determination of nitrite in aqueous solution by the diazotization-coupling method with p-Amino-benzophenone-N-(1-Naphthyl)-Ethylenediamine. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **38**, 617-622 (1990)
10. Belser L. E. and Mays E. L.: Specific inhibition of nitrite oxidation by chlorate and its use in assessing nitrification in soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 505-510 (1980)
11. Both G. J., Gerards S. and Laanbroek H. J.: Temporal and spatial variation in the nitrite oxidizing bacterial community of grassland soil. *FEMS Microbiol. Lett.*, **101**, 99-112 (1992)
12. Watson C. A., Atkinson D., Gosling P., Jackson L. R. and Rayns F. W.: Managing soil fertility in organic farming systems. *Soil Use Manag.*, **18**, 239-247 (2002)