

土壌肥沃度指標 (SOFIX) に基づくデータベースから見た日本農地

堀井幸江¹⁾、松野敏英¹⁾、久保田謙三¹⁾、福原優樹¹⁾、松宮芳樹¹⁾、平川潤²⁾、
松田文雄³⁾、北村實彬⁴⁾、久保幹¹⁾

=====

Database of Japanese Agricultural Soil analyzed by SOFIX

Sachie Horii¹⁾, Toshihide Matsuno¹⁾, Kenzo Kubota¹⁾, Yuki Hukuhara¹⁾, Yoshiki Matsumiya¹⁾,
Jun Hirakawa²⁾, Bunyu Matsuda³⁾, Chikayoshi Kitamura⁴⁾ and Motoki Kubo¹⁾

The evaluation method of soil fertility (Soil Fertile Index; SOFIX) had been developed for the measurement of the material circulation activity in agricultural soil. Soil bacterial number, Nitrogen circulation activity, phosphorous circulation activity, and nutritional components (SOFIX) in soil were analyzed for construction of database of the Japanese agricultural soil. The range of bacterial number was between detection limit (7.8×10^6 cells/g) to 1.9×10^9 cells/g, and the average number was 6.4×10^8 cells/g. The average value of nitrogen circulation activity and phosphorus circulation activity was 26 points and 43 points, respectively. The average values of all samples suggest that material circulation activity of Japanese agricultural soil was low level. For the efficient and reproductive organic agricultural system, the total evaluation of agricultural soil should be needed.

Key words; Environmental DNA, Material circulation, SOFIX, Japanese agricultural soil

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

=====

¹⁾ 立命館大学生命科学部生物工学科、²⁾ 新江州株式会社、

³⁾ 立命館大学研究部リサーチオフィス (BKC)、⁴⁾ 近畿アグリハイテック

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

²⁾ Shingoshu CO., LTD,

759-3, Kawamiticho, Nagahama, Shiga 526-0111, Japan

³⁾ Research Office (BKC), Division of Research, Ritsumeikan University,
1-1-1, Nojihigashi, Kusatsu, Shiga 525-8577, Japan

⁴⁾ NPO Kinki Agri-hightech,

15, Shimogamo Morimotocho, Sakyu, Kyoto 606-0805, Japan

1. はじめに

20 世紀以降、多くの先進国では化学肥料の普及によって、農作物の生産量の増大および生産性の向上が可能になった。しかし現在、化学肥料の連用や過剰施肥に起因する様々な問題が顕在化してきている。例えば、土壌生産力の低下 (団粒構造の減少、土壌の硬質化) や、肥料成分の流出に伴う地下水汚染の発生、河川・湖沼あるいは閉鎖性海域での富栄養化などが挙げられる (1, 2, 3)。そのため、一部の先進国では、化学肥料の使用量が減少してきており、西ヨーロッパでは、カリウムの化学肥料の使用量が 1999 年から 2008 年の 9 年間で 23.5%減少している (4)。このように、環境保全への取り組みも進められてきている。また、世界的な化学肥料の需要に伴う地下資源の枯渇問題から、化学肥料価格も高騰しており、必要経費の増大は生産者の経済的負担を招いている。

このような環境意識の高まりと生産コストの高騰に伴い、堆肥等の有機質肥料の積極的利用が考えられている。堆肥等の有機質肥料は有機態および無機態の成分を含有しており、植物が有機態成分を直接吸収することはできない。そのため、有機質肥料を利用するには、土壌中の微生物による有機態成分の無機化が必要である。土壌中では、多種多様な生物や微生物によって物質循環が行われており (図 1)、有機物は生物の作用によって、無機物に分解 (無機化) される。分解された無機物は植物によって吸収され、植物体内に貯蓄される。この循環系においては、無機成分の流出が少なく環境負荷が小さいため、循環型の食料生産においては、有機質肥料の利用が重要である。

しかし、堆肥などの有機質肥料は化学肥料と異なり肥料成分バランスの調整が非常に困難である。そのため、有機質肥料の使用においては、土壌中の肥料成分の過不足を見極めることが重要である (6)。また、生物による無機化が施肥効果に影響を及ぼすことから、土壌生物や土壌細菌の活性に起因する物質循環を考慮しなければならない。言い換えれば、有機質肥料の効率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。

これまでに本研究室では、土壌の物質循環に寄与する生物活性に着目した総合的な土壌肥沃度指標 (Soil Fertile Index; SOFIX) を開発した (7)。SOFIX とは、土壌中の生物の活性に着目し、総細菌数や窒素循環活性およびリン循環活性等によって、土壌の生物的、化学的、物理的な総合評価を試みる指標である。本研究では、これまでに蓄積した分析結果をデータベース化し、その解析結果から日本の農地土壌の現状について報告する。

2. 材料および方法

総細菌数の測定

供試土壌中の総細菌数は、土壌中の環境 DNA (environmental DNA; eDNA) の抽出および解析法に従って測定した (8, 9)。滅菌したチューブに供試土壌 1g、DNA 抽出緩衝液 8 mL、20%ドデシル硫酸ナトリウム溶液 1 mL を加え、攪拌機で攪拌 (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 μ L を新たなチューブに分取した。クロロホルム・イソアミルアルコール (24:1 (v/v))

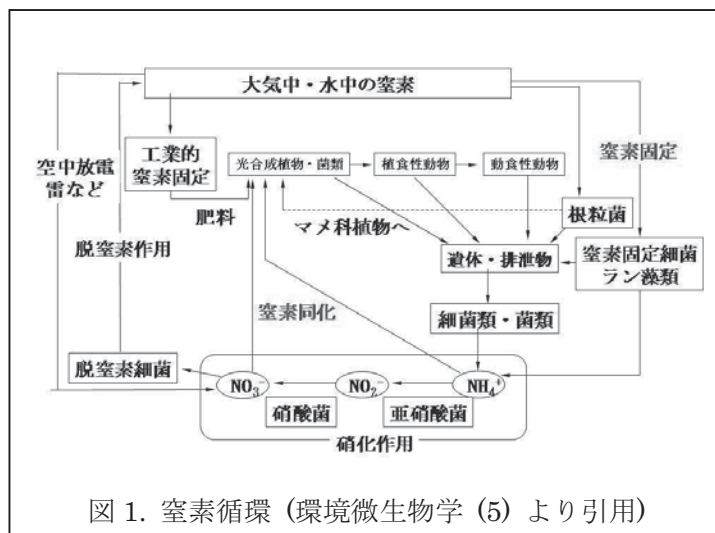


図 1. 窒素循環 (環境微生物学 (5) より引用)

700 μ L を添加し、緩やかに混和後、遠心分離 (14,000 rpm、室温、10 分間) した。水層 500 μ L を新たなチューブに分取して、2-プロパノールを添加し、緩やかに混和後遠心分離 (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 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 eDNA を得た。1.0 %アガロースゲルを作製し、得られた eDNA 溶液および検量線作製のマーカーとして既知量の DNA を含む Smart Ladder (NIPPON GENE) をゲルに供した。電気泳動を行ったアガロースゲルは、エチジウムブロマイドで染色後 UV 照射し、DNA バンドを確認した。KODAK 1D Image Analysis software (KODAK) を用いて、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った。アガロースゲル上の DNA 量の測定結果から、試料 1.0 ml あたりの eDNA 量を算出し、得られた eDNA 量と eDNA-総細菌数検量線 (土壌総細菌数 (cells/g-sample) = $1.7 \times 10^8 \times \text{eDNA 量} (\mu\text{g/g-sample})$ ($r^2 = 0.96$)) を用いて、土壌総細菌数を算出した。

窒素循環活性測定法

供試土壌の含水率を調整するために、土壌の最大保水容量を求めた。その後、水田土壌および畑土壌はそれぞれ最大保水容量の100%および60%の含水率に調整し、窒素循環活性の測定に用いた。土壌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°Cで4日間静置した。1日目と4日目の土壌4 gから無機態窒素を1M KCl水溶液40 mL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 (10、11)。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。

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

アンモニア態窒素および亜硝酸態窒素の減少率を、それぞれアンモニア酸化活性および亜硝酸酸化活性と定義して評価した。総細菌数の評価値は、総細菌数の平均値 8.0×10^8 cells/gを100%として供試土壌の総細菌数の評価値を相対的に算出した。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活性の評価値とした (0-100点) (12)。

リン循環活性測定法

供試土壌は、窒素循環活性と同様に含水率を調整した。土壌にフィチン酸を終濃度 9.0 mg-P₂O₅/g-soil となるように添加し、25°Cで4日間静置した。1日目と4日目の土壌 1 g から無機態リン酸を蒸留水 20 mL で抽出し、水溶性リン酸濃度をモリブデンブルー法を用いて測定した (13)。リン循環活性は下記の式に従って算出した。

$$\text{リン循環活性 (点)} = (\text{4日目の水溶性リン酸濃度} - \text{1日目の水溶性リン酸濃度}) / 2.7 \times 100$$

全分解

供試土壌は、硫酸、過酸化水素水分解法で分解を行った (14)。その後、全分解溶液のアンモニア態窒素濃度およびリン酸濃度をそれぞれインドフェノール青法およびモリブデンブルー法を用いて測定した (10, 13)。また、全分解溶液のカリウム濃度は原子吸光光度計 (A-2300 形偏光ゼーマン原子吸光光度計, HITACHI) で測定した。

全炭素

供試土壌の全炭素は、固体試料燃焼装置 (SSM-5000A, Shimazu) を接続した全有機体炭素計 (TOC-V CPH, Shimazu) で測定した。検量線はグルコースを用いて作成した。

硝酸態窒素、水溶性リン酸および水溶性カリウム

硝酸態窒素濃度は、土壌 4 g に 1M KCl 水溶液 40 mL を加えて硝酸態窒素を抽出し、ブルシンスルファニル酸法で測定した (15)。水溶性リン酸濃度および水溶性カリウム濃度は、土壌 1 g に蒸留水 20 mL を加えて抽出し、それぞれモリブデンブルー法および原子吸光光度計で測定した (13)。

pH

土壌 10 g に蒸留水 25 mL を加え、1 時間振とうして静置した後、pH メーター計 (pH METER F-52, HORIBA) で測定した (14)。

水田およびハウス栽培土壌を含む農地土壌を分析の対象とした。様々な土壌を分析するため、栽培作物や肥培管理、サンプリングの時期などは考慮せず多数の土壌を分析した。統計処理は、Excel ソフトを用いた。相関係数の評価は、石村 (16) に基づき、 $0 \leq |r| \leq 0.2$ (ほとんど相関がない)、 $0.2 \leq |r| \leq 0.4$ (やや相関がある)、 $0.4 \leq |r| \leq 0.7$ (かなり相関がある)、 $0.7 \leq |r| \leq 1$ (強い相関がある) と判断した。

3. 結果

SOFIX 分析に基づく総細菌数データベース

農地土壌 206 サンプルの総細菌数は、eDNA 法の検出限界である 7.8×10^6 cells/g-soil 以下から 1.9×10^9 cells/g-soil の範囲であり、その平均は、 6.4×10^8 cells/g-soil であった (図 2)。松野ら (17) は、農地、農地以外の土壌および石油汚染土壌の総細菌数を測定し、その範囲は検出限界以下から 1.8×10^{10} cells/g-soil の範囲で、総細菌数が土壌環境によって大きく異なることを報告している。今回は、農地のみを調査対象としたが、実際に耕作している農地であっても、その管理方法によって、土壌中の細菌数が大きく異なることが示された。また、窒素の循環においては、 2.0×10^8 cells/g-soil 以上の総細菌数が必要であるとされており (12)、総細菌数が 2.0×10^8 cells/g-soil 以下であった土壌は 30 サンプルであり、206 サンプルの約 15% を占めた。

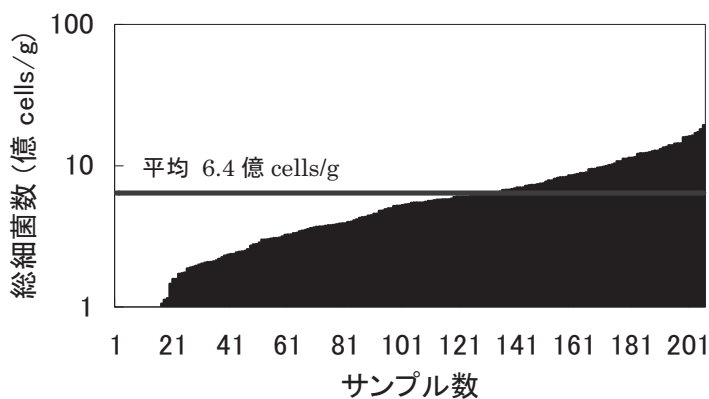


図 2. 農地土壌の総細菌数

SOFIX 分析に基づく窒素循環活性データベース

農地土壌 152 サンプルの窒素循環活性は、0 点から 100 点の範囲であり、その平均は 26 点であった。既報 (12) の 47 土壌サンプルの平均 46 点よりも低い値であった (図 3)。その理由は、栽培管理が異なる多くの土壌を分析したためと思われるが、サンプリング時期についても考慮する必要があるのかもしれない。アンモニア酸化活性は、0 点から 99.5 点の範囲であり、その平均は 30.2 点であった。亜硝酸酸化活性は、0 点から 100 点の範囲であり、その平均は 56.7 点であった。多くの土壌で、アンモニア酸化活性が亜硝酸酸化活性よりも低かった。

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れらの報告に合致するものである (12、18、19)。従って土壤の窒素循環では、アンモニアの酸化が律速段階であることが、本研究でも示唆された。

さらに津田ら (12) の分類に基づき、分析土壤を5つのタイプに分類した (図4)。最もサンプル数が多かったのは、Bタイプ (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) の土壤で、全体の約39%であった。

Aタイプ (高総細菌数、高亜硝酸酸化活性および高アンモニア酸化活性) の土壤は全体の約26%であった。このことから、窒素循環活性の評価となる三角形の形態は、土壤環境によって異なり、アンモニア酸化活性が低い土壤が多くを占めることが示された。

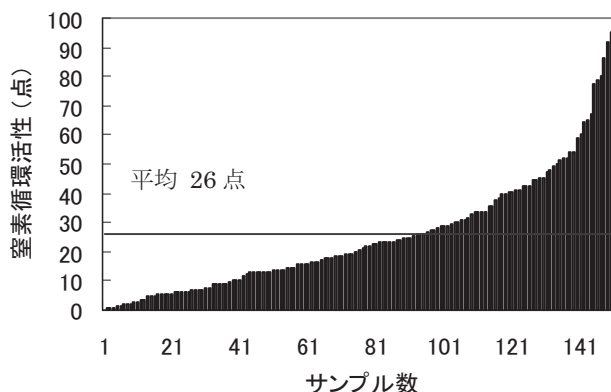
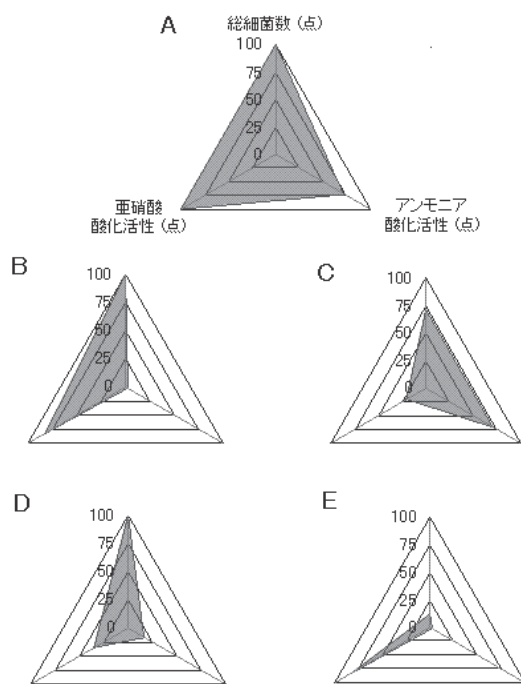


図 3. 農地土壤の窒素循環活性



- A: 高総細菌数、高 NOA、および高 AOA
- B: 高総細菌数、高 NOA、および低 AOA
- C: 高総細菌数、低 NOA、および高 AOA
- D: 高総細菌数、低 NOA、および低 AOA
- E: 低総細菌数、高 NOA、および低 AOA

(AOA: アンモニア酸化活性)
(NOA: 亜硝酸酸化活性)

図 4. 土壤環境中における 5 タイプの窒素循環活性

SOFIX分析に基づくリン循環活性データベース

農地土壤152サンプルのリン循環活性は、0点から100点の範囲であり、その平均は43点であった (図5)。4日間の水溶性リン酸の増加量は、0 mg-P₂O₅/g-soilから5.83 mg-P₂O₅/g-soilの範囲であった。リン循環活性100点の基準値とした2.7 mg-P₂O₅/g-soil以上のサンプルの割合は、全サンプル中の約13%であった。

152サンプル中からランダムに選んだ60サンプルのリン循環活性および総細菌数を図6に示す。リン循環活性と総細菌数の相関は弱く (r=0.24)、リン循環活性には、フィチン酸を分解する特定の細菌の関与が示唆された。また、水田の土壤は、その他の土壤と比較してリン循環活性が高い傾向がみられた。サンプル数が少ないため、今後詳細な検討が必要である。これまでに研究室では、既にフィチン酸分解菌の単離・同定を行

っており、フィチン酸分解菌の定量方法を確立している。総細菌数だけでなく、土壤中のリン循環に関与する微生物数を正確に定量することで、土壤中のリン循環活性を改善し、リン循環活性の高い状態を維持する方法を提案できると思われる。

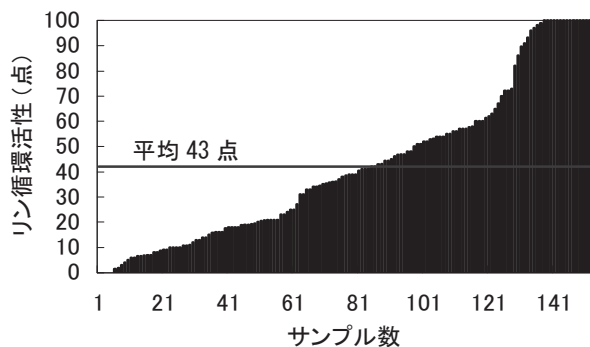


図 5. 農地土壤のリン循環活性

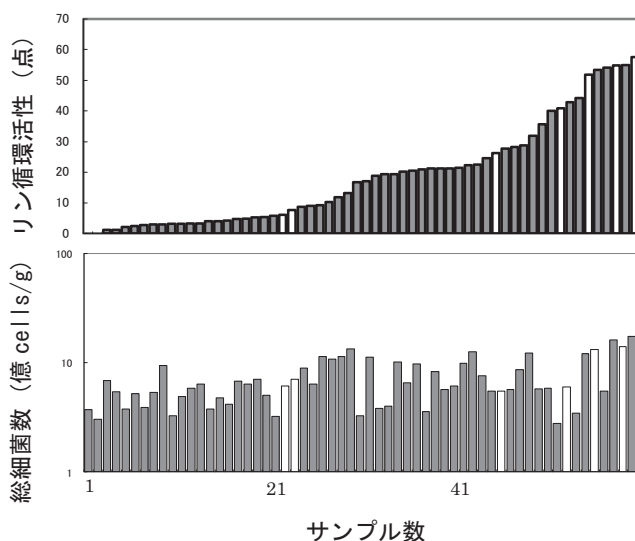


図 6. リン循環活性と総細菌数の関係
□水田、■畑作地

SOFIX分析に基づく全炭素データベース

農地土壤183サンプルの全炭素量は、5,600 mg/kgから85,600 mg/kgの範囲であり、幅広い分布を示した (図7)。平均は24,000 mg/kgであった。土壤中の全炭素量と総細菌数の相関係数は $r=0.33$ で弱い相関が認められた (データ略)。総細菌数が、平均総細菌数の 6.4×10^8 cells/g-soil 以上の土壤は全て、全炭素量が10,000 mg/kg 以上であった。しかし、全炭素量が10,000 mg/kg 以上であっても、総細菌数が 6.4×10^8 cells/g-soil より低い土壤も認められた。従って、全炭素量が10,000 mg/kg 以上であることは、総細菌数の維持にとって必要条件であると言える。土壤中に一定量以上の細菌数を維持するには、10,000 mg/kg 以上の全炭素量が必要である。また、全炭素量は全窒素量と高い相関 ($r=0.85$) を示した (図8)。このことは、土壤においても“レッドフィールド比”類似の関係式が成り立つという報告 (20) と一致している。土壤に人為的もしくは自然に供給された有機物は、そのC/N比を大きく崩すことなく微生物によって分解され、土壤中で物質が循環している可能性があることが示唆された。

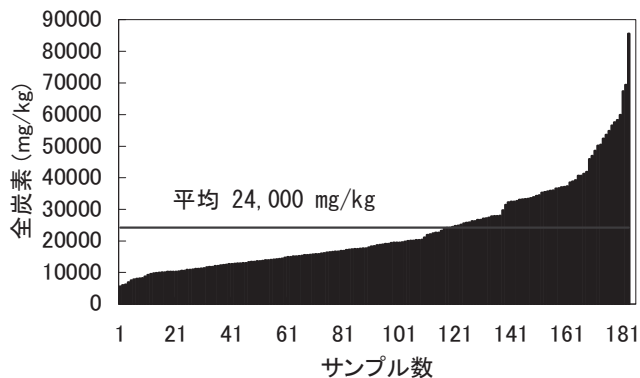


図 7. 農地土壤の全炭素量

SOFIX分析に基づく全窒素、全リン酸および全カリウムデータベース

農地土壤191サンプルの全窒素量は、390 mg/kgから10,600 mg/kgの範囲であり、平均は2,500 mg/kgであった (図9)。全リン酸量は、170 mg/kgから27,600 mg/kgの範囲であり、平均は4,600 mg/kgであった (図10)。全カリウム量は、90 mg/kgから20,500 mg/kgの範囲であり、平均は6,100 mg/kgであった (図11)。土壤中の全窒素量、全リン酸量および全カリウム量と総細菌数の関係を調べたところ、 $r=0.19$ 、 -0.11 および -0.01 で相関は認められなかった。全窒素量と総細菌数の相関は、全炭素量と総細菌数の相関と比較するとより低かった。

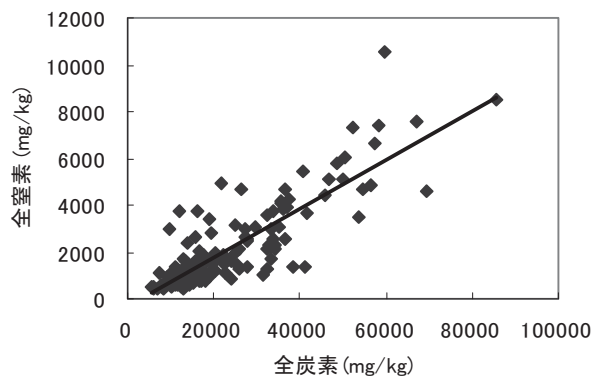


図 8. 農地土壌の全炭素量と全窒素量の関係

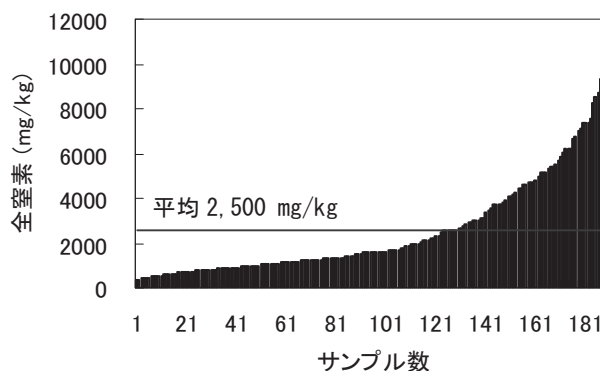


図 9. 農地土壌の全窒素量

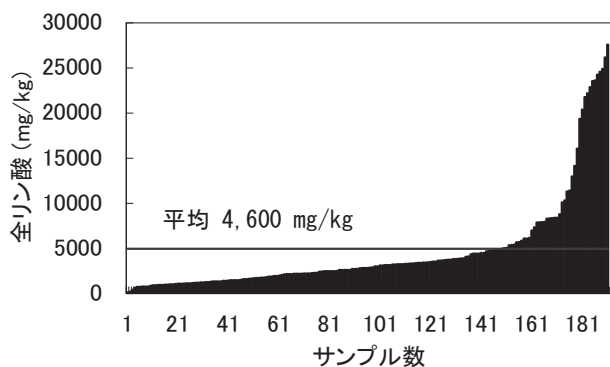


図 10. 農地土壌の全リン酸量

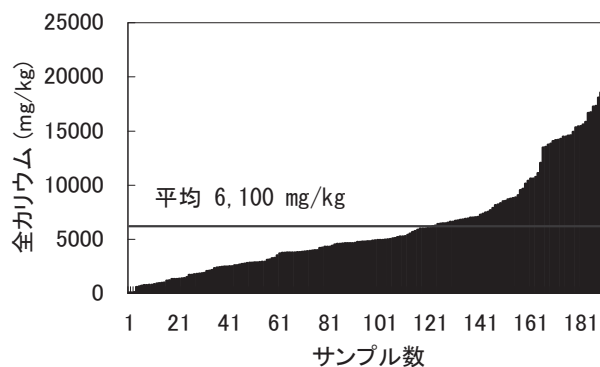


図 11. 農地土壌の全カリウム量

SOFIX分析に基づくC/N比データベース

農地土壌183サンプルのC/N比は、2から32の範囲であり、平均は12であった。土壌のC/N比と総細菌数には相関が認められなかった ($r=-0.1$)。

4. 考察

各測定項目の平均値を表1に示す。どの項目も幅広い分布を示したことから、サンプルによって土壌環境が大きく異なることが示された。

C/N比が10から14のSOFIX推奨値であれば、総細菌数が 6.4×10^8 cells/g-soil 以上であった31サンプルのうち約71%は、全炭素量が10,000 mg/kgから20,000 mg/kg であった (図12)。一方、C/N比が9以下もしくは15以上の場合、総細菌数が 6.4×10^8 cells/g-soil 以上であった59サンプル中、全炭素量が10,000 mg/kgから20,000 mg/kg である土壌の割合は約44%であった。従って、土壌のC/N比が適切な値であれば、比較的少ない

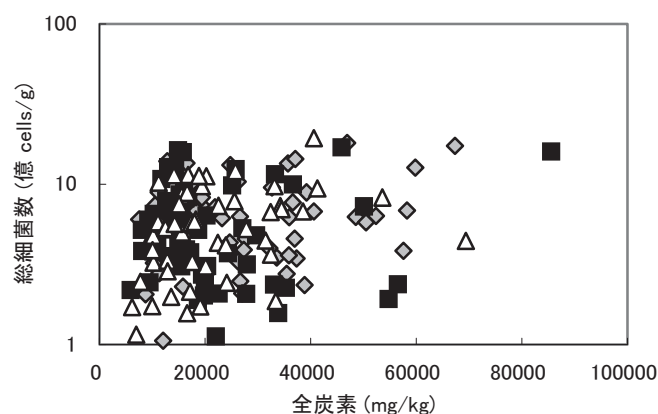


図 12. C/N 比、全炭素量、総細菌数の関係

◆ C/N < 10、■ $10 \leq C/N \leq 14$
△ C/N > 14

炭素量で土壌中の総細菌数を維持することができるものと思われる。また、C/N比が10から14のSOFIX推奨値であれば、総細菌数が 3.0×10^8 cells/g-soil 以上の場合、全炭素量と総細菌数に相関が認められた ($r=0.35$)。しかし、C/N比が9以下もしくは15以上の土壌では、全炭素量と総細菌数に相関が認められなかった ($r=0.13$ 、 $r=-0.08$)。従って、炭素と窒素のバランスがとれた土壌であれば、土壌に供試した炭素量に応じて総細菌数の増加が起こることが推察される。言い換えると、土壌への炭素施用効果を上げるためには、まず土壌のC/N比を整えることも重要である。

平均値から評価すると、日本農地は窒素成分が低い土壌が多く、物質循環の評価点も低かった。これらの土壌を改善するには、まずSOFIXのような総合的な土壌診断を行い、堆肥などの有機質肥料をデータに基づき適切に施用して、全炭素量を向上させ総細菌数を増加させることが必要であると思われる。

表1. 日本農地のSOFIX分析

測定項目	SOFIX 推奨値	平均分析値	評価
植物生長に関する成分の実測値			
硝酸態窒素 (mg/kg)	50 ~ 200	17	↓
水溶性リン酸 (mg/kg)	50 ~ 200	88	○
水溶性カリウム (mg/kg)	50 ~ 200	220	↑
物質循環に関する成分の実測値			
C/N 比	10 ~ 14	12	○
全炭素 (mg/kg)	10,000 ~ 60,000	24,000	○
全窒素 (mg/kg)	6,000 ~ 12,000	2,500	↓
全リン酸 (mg/kg)	2,000 ~ 4,000	4,600	↑
全カリウム (mg/kg)	2,000 ~ 4,000	6,100	↑
窒素循環活性評価値	60 点以上/100 点	26	↓
総細菌数 ($\times 10^8$ cells/g)	8 以上	6.4	↓
リン循環活性	60 点以上/100 点	43	↓
pH	5.5 ~ 6.5	6	○

引用文献

1. Widmer F., Rasche F., Hartmann M. and Fliessbach A. 2006. Community structures and substrate utilization of bacteria in soils from organic and conventional farming systems of the DOK long-term field experiment. *Appl. Soil Ecol.* 33:294-307.
2. Rigby D. and Cáceres D. 2001. Organic farming and the sustainability of agricultural systems. *Agric. Syst.* 68:21-40.
3. Kuroda A., Takiguchi N., Kato J. and Ohtake H. 2005. Development of technologies to save phosphorus resources

- in response to phosphate crisis. *Jour. Environ. Biotech.* 4:87-94. (In Japanese)
4. Fertilizer supply statistics of International Fertilizer Industry Association (<http://www.fertilizer.org/>)
 5. 久保幹・森崎久雄・久保田謙三・今中忠行. 2011. 環境微生物学 地球環境を守る微生物の役割と応用 化学同人.
 6. Watson C.A., Atkinson D., Gosling P., Jackson L.R. and Rayns F.W. 2002. Managing soil fertility in organic farming systems. *Soil Use Manag.* 18: 239-247.
 7. 特願 2011-504900 新規土壌診断方法
 8. Aoshima H., Kimura A., Shibutani A., Okada C., Matsumiya Y. and Kubo M. 2006. Evaluation of soil bacterial biomass using environmental DNA. *Appl. Microbiol.* 71: 875-880.
 9. 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
 10. Weatherburn M.W. 1967. Phenol-hypo- chlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39: 971-974.
 11. Al-Hatim A.A. 1990. Spectrometric determination of nitrite in aqueous solution by the diazotization-coupling method with p-Ami-nobenzophenone-N-(1-Naphthyl) -Ethylenediamine. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 38: 617-622.
 12. 津田治敏・松野敏英・久保田謙三・松宮芳樹・久保 幹. 2010. 土壌環境中における窒素循環活性の新規評価法. 立命館大学理工学研究所紀要 69: 39-46.
 13. Murphy J. and Riley J.P. 1962. A modified single solution for the determination of phosphorus from soil. *Journal of Soil Science* 6: 254-267.
 14. 財団法人 日本土壌協会. 2001. 土壌機能モニタリングのための土壌、水質及び植物体分析法 大雄社.
 15. Jenkins D. and Medsker L.L. 1964. Brucine method for determination of nitrate in ocean, estuarine, and fresh waters. *Anal. Chem.* 36: 610-612.
 16. 石村貞夫. 1993. すぐわかる統計解析 東京図書.
 17. 松野敏英・津田治敏・久保田謙三・松宮芳樹・久保幹. 2009. 農地土壌診断—有機農法のための農地物質循環の評価—. 立命館大学理工学研究所紀要 68: 85-90.
 18. Hojberg O., Binnerup S.J. and Sorensen J. 1996. Potential rates of ammonium oxidation, nitrite oxidation, nitrate reduction and denitrification in the young barley rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 28: 47-54.
 19. Belser L.E. and Mays E.L. 1980. Specific inhibition of nitrite oxidation by chlorate and its use in assessing nitrification in soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 505-510.
 20. Cleveland C.C. and Liptzin D. 2007. C:N:P stoichiometry in soil: is there a "Redfield ratio" for the microbial biomass? *Biogeochemistry* 85: 235-252.