

略 歴

2006年 7月 ニュージーランドカンタベリー州
リンカーン大学農業科学部 卒業

2011年 11月 ニュージーランドカンタベリー州
リンカーン大学博士課程 卒業

2012年1月～2013年12月
農業環境技術研究所
(現:農業環境変動研究センター)
特別研究員

2014年1月～2017年3月
北海道大学大学院農学研究院
助教

2017年 4月 同上 准教授
現在に至る

貧栄養土壌への有機物添加が微生物コミュニティと 窒素循環に及ぼす影響

食糧生産の基盤たる土壌が、世界中で危機に瀕している。気候変動、過剰施肥や、有機物供給量の減少による団粒構造の破壊が農地で起きており、風雨浸食への耐久性を失い、表層の土壌が流亡している。この表層土壌は、農地の生産性を規定する重要な基盤である。この表層土壌は、いわば、栄養素のバッファー機能を有しており、供給された栄養素を、一部は植物(作物)に有効な形で供給し、残りは有機物として蓄積するなどして、栄養素循環を適切に保つ働きをしている。この物質循環を主に担っているのが、土壌微生物である。

表層土壌の流亡地域では、その下にある下層土を用いて農業を営まざるを得ない。下層土は、表層土壌と比較し、栄養素や有機物量が少なく、土壌微生物にとって決して適当な環境とは言えない。下層土を農業に適する土壌とするために、様々な有機物資材を添加し、土壌の改善を試みることになる。有機物を用いて、表層土壌を失った下層土で、適切な物質循環を再生するためには、各有機物資材が、どのようなメカニズムのもと、下層土における土壌微生物の機能を復活させるかについて、さらに理解を積み上げる必要がある。

栄養素循環の中でも、窒素循環は重要である。農地において、特に重要な窒素種はアンモニウム態窒素と硝酸態窒素であり、植物は主にこの2種類の窒素を吸収する。有機物の分解や、肥料の施肥によって供給されたアンモニウム態窒素は、硝化菌により酸化され、硝酸態窒素になる。このプロセスを硝化という。また、硝酸はさらに脱窒菌によって窒素ガス(N₂)に還元される。このプロセスを脱窒という。この二つのプロセスが土壌中窒素循環に大きく関わっており、窒素が効率よく作物に利用されるためにも、特に硝化と脱窒に関わる微生物の活性を理解することが求められている。

家畜糞尿は土壌有機物の供給源としての重要な役割がある。この家畜糞尿を土壌に還元する際の

方法として、主として堆肥 (compost) と消化液 (anaerobic digestate) 利用が挙げられる。堆肥と消化液はどちらも、主に家畜糞尿を原料として作られる。堆肥は好気発酵、消化液は嫌気発酵による産物である。消化液は、主に、バイオガスプラントの副産物として得られている。

そのため、本研究では、堆肥と消化液を対象として、これらの施肥が表層土と下層土の窒素循環と土壤微生物活性に及ぼす効果を評価した。また、それぞれの有機資材を混合した処理も調査することで、同時に利用した際の影響力の強さも比較することを目的とした。

堆肥と消化液の効果の比較を比較するため、表層土と下層土にこれらの有機物資材を混ぜて、1 か月間の培養実験を行った。土壌は、北海道大学附属農場の牧草地より、0 ~ 30cm (Topsoil)、および 30 ~ 60cm (Subsoil) の土層から採取した。堆肥と消化液の主原料は牛糞であった。処理は、表層土 (Topsoil) と下層土 (Subsoil) のそれぞれに対して、土壌のみ (Soil 区)、土壌+堆肥 (Compost 区)、土壌+消化液 (Digestate 区)、土壌+堆肥+消化液 (Mix 区) の計 4 処理とした。微生物活性として、硝化活性 (NEA) と脱窒活性 (DEA)、ウレアーゼ活性 (UA) を測定した。また、土壌 DNA を抽出し、バクテリアの群集構造を 16S rRNA 領域の配列をもとに、除歪対応分析 (DCA) を用いて解析した。

土壌への糞尿由来有機物の添加は、土壌中の窒素循環、そして微生物を大きく変化させた。土壌中の硝酸量の変動は、基本的に土壌 pH と関連していた。Digestate 区、Mix 区では、消化液中のアンモニアの硝化が行われ、硝酸が蓄積し、それにともない pH が低下したと考えられる。また、表層土では、Soil 区でも、硝酸量の増加が見られることから、下層土とは違い、土壌に含まれる有機物が無機化され、硝酸の蓄積量が多くなっていると考えられる。

表層土では、NEA は、下層土よりも高い値を示したが、30 日目を除き、処理区間で大きな差は見られなかった。また、下層土の NEA については、各処理間で有意差は検出されなかったが、Compost 区、Mix 区では 0 日に負の値 (硝酸の消費) が見られた。

微生物コミュニティ構造の変化としては、堆肥施与では、Bacteroidetes が増加しており、30 日後でも大きな減少は見られてなかった。一方、下層土において、消化液により、Firmicutes が顕著に増加したが、これは 30 日後には減少した。この変化は、表層土に比べ、下層土で特に顕著である。DCA でも、有機物施肥直後の 3 日目において、表層土よりも下層土の方で、有機物添加による微生物コミュニティ構造の変化が大きく見られた。また、3 日目から 30 日目にかけてのコミュニティ構造の変化も、下層土の方が表層度よりも大きかった。これらの結果から、もともとの土壌中の微生物量や組成は、添加された有機物中の微生物が、土壌に定着するかどうか大きく影響していると考えられる。特に、土壌微生物が貧弱と考えられている下層土においては、有機物施肥 (または、微生物の接種) の影響が大きく表れると考えられる。また、DCA の結果、両者を混合した場合 (Mix 区)、その微生物コミュニティ構造は、堆肥寄りに大きく偏ることが判明した。よって、土壌微生物コミュニティの形成という点では、堆肥の効果が非常に大きいと言える。

脱窒活性 (DEA) については、表層土では、0 日目から 7 日目にかけて、処理区間の変化はなかったが、14 日以降、Compost 区で非常な大きな DEA 値 ($950\text{ng N kg}^{-1} \text{h}^{-1}$) を示した。下層土では、Soil 区と Digestate 区はほとんど変わらず、 $40\text{ng N kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ 以下で横ばいの傾向を示した。下層土の Compost 区では、0 日に $850\text{ng N kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ と非常に大きな活性を示したが、3 日目には $200\text{ng N kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ まで低下した。しかし、その後も $100\text{ng N kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ 付近の活性値で安定して示し

続けた。Mix区では、当初、0～3日目の脱窒活性は約 $100\text{ng N kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ であったが、7日目にはSoil区とDigestate区と同レベルになった。これらの結果から、表層土では、脱窒活性については、培養0～7日目までは、有機物の施肥に関わらず、土壤中の脱窒菌が系全体の脱窒活性を支配していたと言える。しかし、14日目以降を境に、脱窒活性において、土壌由来の微生物と堆肥由来の微生物の優占度が逆転した可能性がある。一方、下層土においては、堆肥施肥により、脱窒活性は大きく増加することが明らかとなった。さらに、Mix区では、脱窒活性は、Compost区に比べて低い値を示しことから、消化液の施肥は、堆肥による脱窒の活性化を抑制していた可能性がある。ウレアーゼ活性(UA)は、有機物の施肥によって増加したことから、基質の供給が大きな制御要因であると考えられる。

下層土は、表層土と比較して、有機物の施肥による影響を受けやすいことが明らかとなった。また、堆肥の施肥は、pHを高く保ち、土壌微生物コミュニティを安定させる一方、土壌の脱窒活性を大きく活性化させることが明らかとなった。一方、消化液については、単独での脱窒活性への寄与は見られなかったが、脱窒活性については、堆肥施肥による脱窒の活性化を抑制する効果が見られた。これらの結果は、下層土を、微生物が健全に働く土壌とするためには、施肥する有機物の性質や組み合わせが重要であることを示唆している。

1. 諸言

増え続ける人口を養うためには、食糧供給の増強が必須である。しかしながら、食糧生産の基盤たる土壌は、世界中で危機に瀕している。最も重要な問題のひとつが、表層土壌の流出である。表層土壌とは、土壌鉱物(粘土)が有機物とよく混じり、団粒構造が発達した層の土壌をいい、基本的には、土壌表面より、15cmほどに存在するだけである。中には、ほんの数cmしかない地域もある。この表層土壌は、いわば、栄養素のバッファー機能を有しており、供給された栄養素を、一部は植物(作物)に有効な形で供給する一方、残りは有機物(主に微生物のからだ)として蓄積し、栄養素循環を適切に保っている。この物質循環を主に担っているのが、土壌微生物である。表層土壌は、農地においては作土と呼ばれ、農地の生産性を規定する重要な基盤である。近年、この重要な表層土壌が農地からの流出しているのである。過剰な化学肥料の施肥や、有機物供給量の減少による団粒構造の破壊が農地で起きており、風雨浸食への耐久性を失い、土壌が流亡している(Lal 2015)。

表層土壌の流亡地域では、その下にある下層土を用いて農業を営まざるを得ない。下層土は、表層土壌と比較し、栄養素や有機物量が少ない。そのため土壌微生物の機能が十分に働かず、表層土壌で成り立っていたような理想的な栄養素循環を期待することができない。ゆえに、下層土を農業に適する土壌とするために、様々な有機物資材を添加し、土壌の改善を試みることになる。この際に、どのような有機物資材を使えばよいのかという点については、多くの議論がある(Odlare et al. 2014、Wang et al. 2016、Galvez et al. 2012)。有機物を用いて、表層土壌を失った下層土で、適切な物質循環を再生するためには、各有機物資材が、どのようなメカニズムのもと、下層土における土壌微生物の機能を復活させるかについて、さらに理解を積み上げる必要がある。

栄養素循環の中でも、特に重要なものが窒素循環である。近年、ハーバーボッシュ法による窒素化学肥料の生産と、その過剰施肥を筆頭に、農業を含めた人為由来の窒素負荷が深刻化している(Ravishankara et al. 2009)。そのため、農地においても、破綻した窒素循環の是正が急務である。

農地において、特に重要な窒素種はアンモニウム態窒素と硝酸態窒素であり、植物は主にこの2種類の窒素を吸収する。有機物の分解や、肥料の施肥によって供給されたアンモニウム態窒素は、硝化菌により酸化され、硝酸態窒素になる。このプロセスを硝化という。また、硝酸はさらに脱窒菌によって窒素ガス (N₂) に還元される。このプロセスを脱窒という。ゆえに、窒素が効率よく作物に利用されるために、特に硝化と脱窒に関わる微生物の活性を理解することが求められている。

下層土に投入するの有機物資材として、家畜糞尿が多く用いられている。この家畜糞尿を土壤に還元する際の利用法として、主として堆肥利用と消化液利用が挙げられる。堆肥と消化液はどちらも、主に家畜糞尿を原料として作られる。堆肥は好気発酵、消化液は嫌気発酵による産物である。消化液は、主に、バイオガスプラントの副産物として得られている。

そのため、本研究では、下層土における土壤微生物の活性や組成を表層土のものに近づけることを目標とした。具体的には、投入有機物として、堆肥と消化液を対象として、これらの施肥が下層土の窒素循環と土壤微生物活性に及ぼす効果を評価した。

2. 材料と方法

2-1. 培養処理

堆肥と消化液の効果の比較を比較するため、下層土とこれらの有機物資材を混ぜて、1か月間の培養実験を行った。土壤は、北海道大学附属農場の牧草地より、0～30cm (Top 土壤)、および30～60cm (Sub 土壤) の土層から採取した。このとき、Top 土壤層は、主として A、B 層、下層土は C 層である。土壤 CN 比は両土壤で大きな変化はないが、下層土の炭素または窒素量は表層土の2分の1であった。堆肥は、北海道大学附属農場より、デントコーンサイレージ、スキ残渣、および牛糞を発酵させたものを利用した。また、消化液は北海道大学附属農場のバイオガスプラントより得た。消化液の原料も、同様の牛糞である。それぞれの有機物資材の化学性を表1に示した。

表1. 消化液、堆肥、表層土、下層土の化学分析結果。誤差は標準偏差 (n=3)。

	含水率 (%)	pH (KCl)	全炭素 (g C kg ⁻¹)	全窒素 (g N kg ⁻¹)	CN 比	NH ⁴⁺ -N (mg N kg ⁻¹)	NO ₃ ⁻ -N (mg N kg ⁻¹)
消化液	96.1±0.27	8.38±0.03	31.6±11.0	2.55±0.23	12.2±3.44	1799±195	0.84±0.33
堆肥	69.3±0.23	8.35±0.01	30.0±9.56	2.72±0.28	10.9±2.82	428.4±6.61	222±3.87
表層土	5.69±0.30	4.74±0.03	3.85±0.40	0.41±0.04	9.45±1.40	11.0±1.87	19.9±2.41
下層土	4.88±0.12	4.56±0.00	1.70±0.06	0.24±0.09	8.04±3.87	8.69±2.11	8.01±0.35

各値は、消化液と堆肥は、湿重量あたり、表層土と下層土は絶乾重量当たりで示した。

処理は、表層土と下層土のそれぞれに対して、土壤のみ (土壤区)、土壤+堆肥 (堆肥区)、土壤+消化液 (消化液区)、土壤+堆肥+消化液 (混合区) の計4処理とした。各有機物資材の施肥量は、100kg N ha⁻¹とした。この値は、北海道におけるペレニアルライグラス (*Lolium perenne*) 主体草地の基肥として推奨されている量である。なお、施肥窒素量は無機態窒素含有量をもとに計算している。混合区については、堆肥と消化液で、それぞれの資材の無機態窒素量が1:1となるように混合した。

風乾土にして40gの土壌と、有機質資材を混ぜ、100mLのポリエチレン瓶に入れ、土壌コアとした。含水率は、重量比33%に調整した。培養中、酸素を通しつつ、水分の蒸発を抑えるため、それぞれの瓶はパラフィルムで封をした。

2-2. 土壌酵素活性

有機質資材の混合日から0, 3, 7, 14, 28日目に3つずつ取り出し、破壊的に、硝化活性、脱窒活性、ウレアーゼ活性を測定した。

硝化活性 (NEA) は、過去に採用されている方法を参照した (Mogi et al. 2017)。土壌を5g、50mLのポリエチレン瓶に入れ、0.2mg N g⁻¹となるように硫酸アンモニウムを添加した。その後、25℃で24時間培養した。それぞれの瓶はパラフィルムで封をし、水分の蒸発を防いだ。24時間の培養前後での硝酸態窒素の差をとり、それを培養時間 (24時間) で除することで、硝化活性を推定した。

脱窒活性 (DEA) は、アセチレンブロック法を用いて、培養中に発生した亜酸化窒素 (N₂O) 量を培養時間で除すことで推定した。アセチレンブロック法の詳細としては、Jin et al. (2010) が採用した方法を改良して用いた。まず、5mLのDEA培養液 (0.72g KNO₃ および 0.5g glucose L⁻¹) を、100mLバイアルに入れた2.5gの土壌サンプルに添加し、セプタムとアルミニウム製のふたで密閉した。ヘッドスペースをN₂ガスで置換後、その体積比で約10%分をアセチレンで置き換え、25℃で2時間培養した。培養後、30~40mLのヘッドスペースのガスを採取した。採取したガス中のN₂Oは、ガスクロマトグラフィー (GC-2014, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) で測定した。

ウレアーゼ活性 (UA) は、3gの土壌サンプルに7.5mLの10%尿素液を添加し、24時間振とう後、増加したアンモニウム態窒素の差をとり、それを培養時間 (24時間) で除することで推定した。

硝酸態窒素、アンモニウム態窒素の測定には、フローインジェクションアナライザー (AQLA-700, Aqualab Co., Ltd., Japan) を用いた。

2-3. バクテリアコミュニティの解析

土壌中のDNAは、Powersol DNA extraction kit (MoBio labs, Carlsbad, CA) を用いて抽出した。抽出したDNAはIon 16S Metagenomics kit (Ion Torrent Life Technologies, USA) を用いて、16S rRNA 遺伝子 (V2-4-8, V3-6, 7-9) 領域をPCR法で増幅後、Ion PGM Sequencer (Ion Torrent Life Technologies, USA) でシークエンスを行った (Toda and Uchida, 2017)。遺伝子配列の解析には、Torrent Suite Software V5.4 (16S Metagenomics workflow V5.4) を用いた。

2-4. 統計解析

土壌化学性分析および酵素活性については、処理と時間を説明変数として、2元配置の分散分析を行った。また、1日しか測定しなかった分析項目については、処理のみを説明変数として、1元配置の分散分析を行った。さらに、各分析値どうしの相関関係については、単回帰分析を行った。バクテリアのコミュニティ構造は、除歪対応分析 (DCA) を用いて、類似度を評価した。以上の統計解析には、R ver. 3.2.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を用いた。

3. 結果

3-1. 微生物コミュニティ

全体を通して、Proteobacteriaの割合が多かった。消化液施与により、Firmicutesが顕著に増加した(D 3、図1)が、これは30日後には減少していた(D 30、図1)。一方、堆肥施与では、Bacteroidetesが増加しており、こちらは30日後でも大きな減少は見られてなかった(M 3、M 30、図1)。この変化は、表層土(Top、図1)に比べ、下層土(Sub、図1)で特に顕著である。

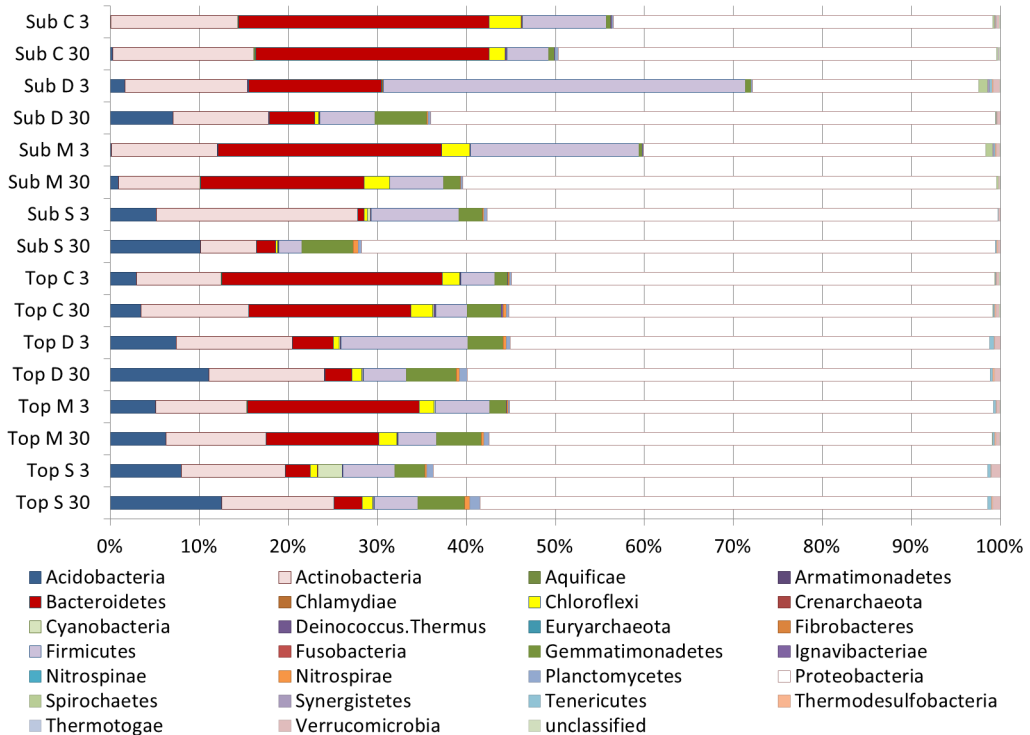


図1. 土壌中バクテリア(門レベル)の存在比を示した。

Sub:下層土、Top:表層土、C:堆肥区、D:消化液区、M:混合区、S:土壌区を示す。
数字(3、30)はサンプリング日を示す。

除歪対応分析(DCA)では、有機物施肥直後の3日目において、表層土(図2a)よりも下層土(図2b)で、有機物添加による微生物コミュニティ構造の変化が大きく見られた。また、3日目から30日目にかけてのコミュニティ構造の変化も、下層土の方が表層度よりも大きかった。全体として、30日後では、有機物施肥後の3日目に比べて、各処理区間でのコミュニティ構造の違いが小さくなっていった。

表層土では、3日目の時点では、土壌区と比較して、堆肥区、消化液区ともにそれぞれ異なるコミュニティ構造を示していた。また、混合区は堆肥区に近いコミュニティ構造を示していた。一方、30日後になると、消化液区のコミュニティ構造は、土壌区のものに近づいていた。混合区も、やや土壌区のコミュニティ構造に近づいた。

下層土については、3日目の時点で、堆肥区、消化液区ともに、土壌区とは大きく異なるバクテリアコミュニティ構造を示すことが明らかとなった。混合区は、ばらつきが多少大きいがおおむね堆肥区に

近い構造をとることがわかった。30日後では、堆肥区、混合区では、3日後の組成と比べて大きな変化は見られなかったが、Digestat 区の組成は、土壤区のものに近づいていた。また、土壤区の組成自体も変化が見られた。

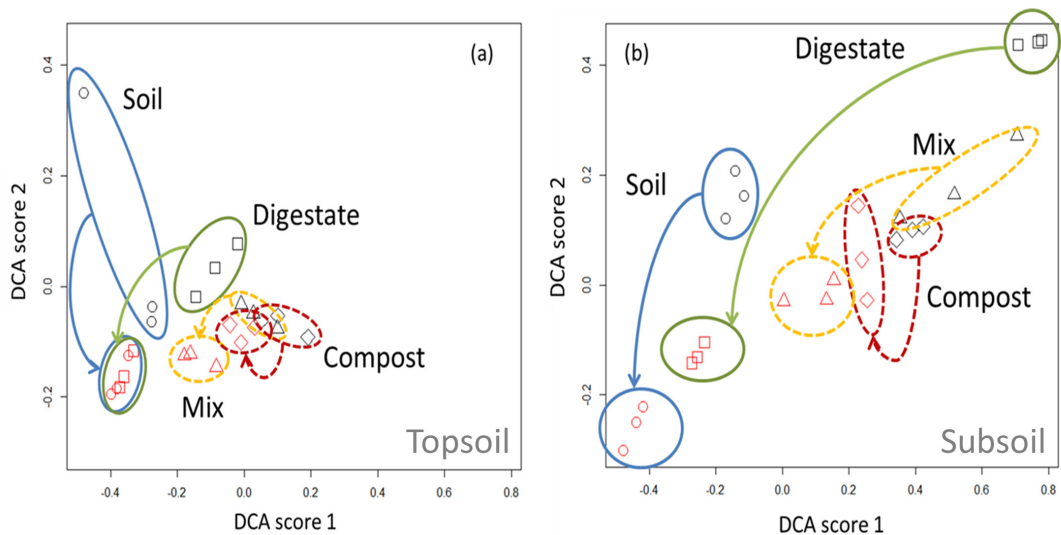


図2. 除歪対応分析 (DCA) の結果。

(a) 表層土、(b) 下層土。○: 土壤区、◇: 堆肥区、□: 消化液区、△: 混合区。
円から円への矢印方向に、Day 3、Day 30の反復をそれぞれ示した。

3-2. 硝化活性

表層土では、NEAは、下層土よりも高い値を示し、30日目を除いて処理区間で大きな差は見られなかった(図3a)。下層土のNEAについては、各処理間で有意差は検出されなかった(図3b)。経時的変化について見てみると、土壤区ではほとんど変化が見られなかった。また、堆肥区と混合区は同様の変化を示した。すなわち、0日目では活性は負の値(硝酸の利用)が見られたが、3日目以降から、土壤区よりも高い値を示して、増加傾向で推移した。0日目での負の値(硝酸の利用)は、硝酸蓄積速度においても見られるものである。消化液区については、土壤区と比較して大きな変化はなかったが、14日目には特異的に高い値を示した。無機化速度については、表層土では、すべての処理区で、0~3日目に正の値を示した後、3~7日目に負の値(無機化)を示し、その後はほとんど変化がなかった。一方、下層土も似た傾向を示したものの、無機化については明確なピークは見られなかった。

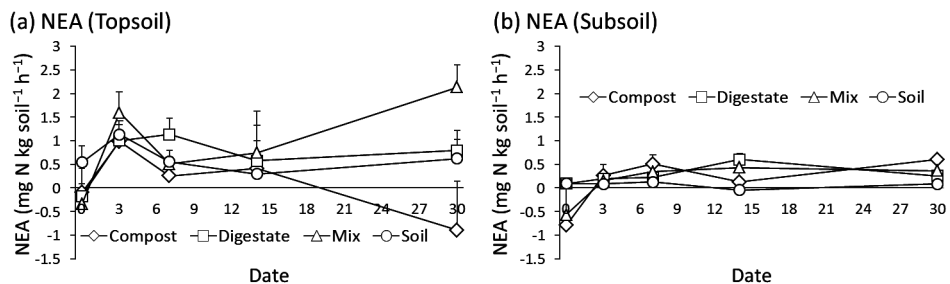


図3. 硝化活性 (NEA) の経時的変化。

(a) 表層土、(b) 下層土。○: 土壤区、◇: 堆肥区、□: 消化液区、△: 混合区。

3-3. 脱窒活性

脱窒活性 (DEA) については、表層土では、0日目から7日目にかけて、どの処理区においても、同様の値を示したが、14日以降、堆肥区で非常な大きな DEA 値を示した (図 4a)。下層土では、土壌区と消化液区はほとんど変わらず、横ばいの傾向を示した (図 4b)。また、活性値自体も小さく、全期間を通して、 $40\text{ng N kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ 以下であった。下層土の堆肥区では、0日目に $850\text{ng N kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ の非常に大きな活性を示したが、3日目には $200\text{ng N kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ まで低下した。しかし、その後も $100\text{ng N kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ 付近の活性値で安定して示し続けた。混合区では、当初、0～3日目の脱窒活性は約 $100\text{ng N kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ であったが、7日目には土壌区と消化液区と同レベルになった。下層土では、脱窒活性の大きさは、実際の N_2O 発生量と有意な正の相関 ($p < 0.01$) が見られた一方、表層土では、有意な関係は見られなかった。

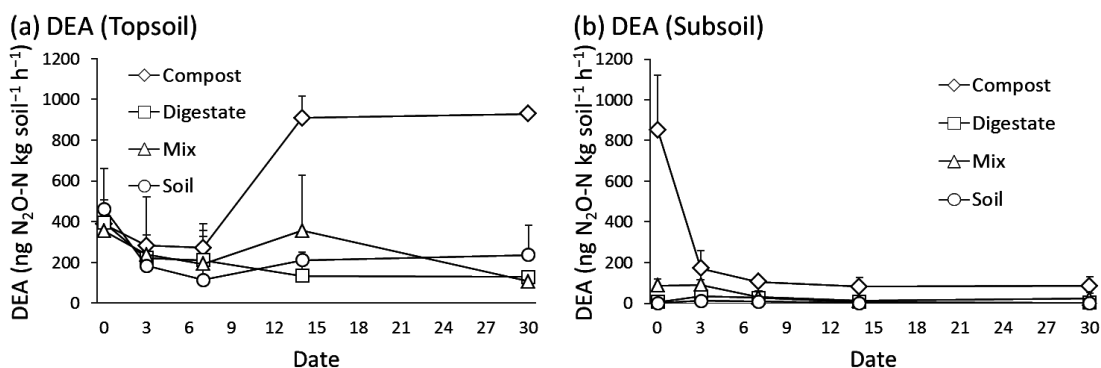


図 4. 脱窒活性 (DEA) の継時的変化。

(a) 表層土、(b) 下層土。○: 土壌区、◇: 堆肥区、□: 消化液区、△: 混合区。

3-4. ウレアーゼ活性

ウレアーゼ活性 (UA) は、堆肥の施肥により活性化する傾向を示した。活性は、平均すると表層土で下層土より大きく、堆肥、または消化液の施肥による増加割合も大きかった (図 5)。

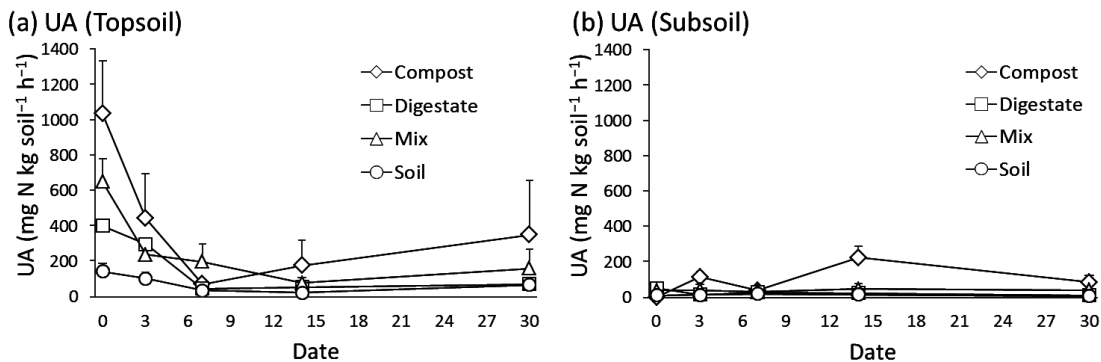


図 5. ウレアーゼ活性 (UA) の継時的変化。

(a) 表層土、(b) 下層土。○: 土壌区、◇: 堆肥区、□: 消化液区、△: 混合区。

4. 考 察

4-1. 微生物コミュニティ

DCAによるコミュニティ解析の結果から、堆肥または消化液の施与は、その直後(3日目)に土壤微生物の組成に大きな影響をもたらすことが判明した(図1、2)。詳しく組成の変化を見ると、特に下層土については、消化液の施肥により、混合区も含めて、Firmicutes門の優占度を大きく増加させた(図1)。Firmicutesは、糞中の主要微生物(Wong et al. 2016)であり、消化液由来であると考えられる。しかしながら、表層土では、このような大きな変化は見られなかった。これは、下層土では、もともとの土壤微生物が貧弱なため、施与された有機物中の微生物が生存できるが、表層土では、もともと多くの土壤微生物が存在しているため、消化液中の微生物は、すぐに淘汰された(優占できなかった)可能性がある。また、堆肥の施肥に関しては、下層土の方が表層土よりもコミュニティ構造の変化が大きかった。この理由として、もともとの土壤中の微生物量や組成は、添加された有機物中の微生物が、土壤に定着するかどうかにより大きく影響していることが考えられる。特に、土壤微生物が貧弱と考えられている下層土においては、有機物施肥(または、微生物の接種)の影響が大きく表れると考えられる。

また、DCAの結果、両者を混合した場合(混合区)、その微生物コミュニティ構造は、堆肥寄りに大きく偏ることが判明した(図2)。よって、土壤微生物コミュニティの形成という点では、堆肥の効果が非常に大きいと言える。また、長期的(30日後)にみると、堆肥区、混合区では、3日後の組成と比べて大きな変化は見られていないが、Digestat区の組成は、土壤区のものに近づいていた。ゆえに、消化液が微生物組成に与える長期的効果は、堆肥に比べて小さいと考えられる。また、土壤区の組成自体も変化が見られたことから、土壤中の微生物自体は、培養中に変化しやすい一方、堆肥の施与は、堆肥—土壤混合物中の微生物組成の安定化にも寄与していると考えられる。

4-2. 硝化活性

表層土、下層土において、堆肥区と混合区(表層土では、消化液区も含む)が0日目に、NEAで負の活性を示したことは、基質(アンモニウム態窒素)の添加にもかかわらず、硝酸の利用が卓越していたことを意味する(図3)。この原因としては、硝化による硝酸蓄積量よりも、硝酸の利用(たとえば脱窒や無機化)が大きいことが予想される。3日目以降は、脱窒活性の低下とともに、硝化活性が土壤区よりも高くなり、硝化が活発に行われるようになったことがわかる。また、下層土では、堆肥の添加区のみを負の値が見られた一方、表層土では、有機物の添加区すべてで負の値が見られた。これは、下層土では、硝酸の消費を担う微生物が堆肥由来である一方、表層土では、土壤中の微生物が有機物の添加で活性したものと考えられる。堆肥については、長期的(90日)には、硝化活性を促進するが、たとえば7日間のような短期間では硝化活性に対して有意な影響はもたらさないという報告がある(Odlarea and Pell 2008)。

消化液自体が微生物の活性に与える直接的な影響は、本研究では示されなかった。過去の文献でも、消化液が硝化活性に及ぼす影響としては、はっきりした傾向は示されていない(Risberg et al. 2016)。しかし、混合区は堆肥区とほぼ一致した硝化活性のパターンを示していたことから、硝化活性については、堆肥の影響が支配的であり、消化液の施肥は、微生物的には、硝化活性には貢献しないと考えられる。

4-3. 脱窒活性

表層土では、脱窒活性については、培養0-7日目までは、全処理区でほとんど同じ傾向を示した(図4)。これは、有機物の施与に関わらず、土壤中の脱窒菌が系全体の脱窒活性を支配していたと言える。しかしながら、14日目以降、堆肥区の脱窒活性が顕著に大きくなり、堆肥区の高い脱窒活性は、30日目にも継続していた。培養14日目を境に、脱窒活性において、土壌由来の微生物と堆肥由来の微生物の優占度が逆転した可能性がある。堆肥については、長期的(90日)には、硝化活性を促進するが、たとえば7日間のような短期間では硝化活性に対して有意な影響はもたらさないという報告がある(Odlarea and Pell 2008)。

一方、下層土には、堆肥施肥により、脱窒活性は大きく増加した。堆肥による脱窒活性の上昇は、過去にも報告がある(Calderón et al. 2004, Odlarea and Pell 2008)。また、消化液の施肥は、硝化活性と同様に、脱窒活性にはほとんど影響を与えないことがわかった。さらに、混合区では、脱窒活性は、堆肥区に比べて非常に低い値を示した。この結果から、ADの施肥は、堆肥による脱窒の活性化を抑制している可能性がある。混合区では、硝酸の蓄積量は堆肥区と大きくは変わらないことから、消化液の影響は、脱窒菌または脱窒プロセスに直接影響を及ぼしている可能性が高い。消化液が脱窒活性について抑制効果を示しているという研究は、過去にも報告されている(Abubaker et al. 2015)。これらの結果から、土壤中の微生物活性を制御する場合に、異なる有機物を同時に施与することが重要な方法となる可能性を示した。

4-4. ウレアーゼ活性

堆肥施肥は、ウレアーゼ活性を増加させた(図5)。一般的に、堆肥などの有機物施与はウレアーゼ活性を増加させる傾向にある(Albiach et al. 2000, Bol et al. 2003)。ウレアーゼ活性は有機体炭素量と相関するという報告もなされているため(Zhen et al. 2014)、本実験においては、有機物中の炭素が基質として使われることで、ウレアーゼが変動したと考えられる。すなわち、有機物中の微生物よりも、基質量と土壌中にもともと存在する微生物がウレアーゼの制御には重要となると言える。

5. まとめ

下層土は、表層土と比較して、有機物の施肥による影響を受けやすいことが明らかとなった。また、堆肥の施肥は、pHを高く保ち、土壌微生物コミュニティを安定させる一方、土壌の脱窒活性を大きく活性化させることが明らかとなった。すなわち、堆肥の施肥については、脱窒の形で土壌中の窒素損失を促進する可能性が示唆された。これは、堆肥の施肥は、下層土の環境を整え、土壌微生物が機能する「健康な土」を作るために有用である一方、その過程では、窒素の損失を覚悟しなければならないことを意味している。一方、消化液については、単独での脱窒活性への寄与は見られなかったが、脱窒活性については、堆肥施与による脱窒の活性化を抑制する効果が見られた。これらの結果は、下層土を、微生物が健全に働く土壌とするためには、施与する有機物の性質や組み合わせが重要であることを強く示唆している。これらの効果は、堆肥や消化液単独のものではなく、土壌を含めたそれぞれの微生物との相互作用によってもたらされるため、今後は、堆肥と土壌微生物が相互作用する詳細なメカニズムを解明していく必要があるだろう。

本研究は、下層土 = 低肥沃度土壌、表層土 = 肥沃土壌としてシミュレーションし、世界規模で問題となっている肥沃な土壌の損失を解決するための基礎情報を得ることを目的として行った。そのために微生物コミュニティ構造やその活性に着目した。しかし、現在の土壌学は微生物コミュニティ構造を解析することが出来始めた段階であり、その構造の意味や、目指すべき理想の構造はまだよくわかっていない。さらに、この目指すべき理想の土壌コミュニティ構造は、土性、土の母材、気候、植生などによって異なることが容易に予想できる。そのため、どのような土でも肥沃化できるユニバーサルな土壌微生物を探す研究は現段階では意味をなさない可能性が高い。

そのため、本研究のような、同じ場所の土壌を用いて、表層と下層を比べる研究は貴重である。下層土の微生物を表層により早く近づける、という目的で、様々な有機資材を様々な混合率で加える実験は、現代の土壌微生物コミュニティ解析法の発展と共により大きく発展する分野であると考えられる。肥沃な土壌の生成には何千、何万年という年月が必要であるとされる。しかしその肥沃な土壌は間違っただけで人間活動により一瞬で失われうる。土壌微生物を視野にいれたより大規模な土壌生成研究を行う必要がある。

6. 謝 辞

本研究は、公益財団法人アサヒグループ学術振興財団からの助成を受けました。また、土壌や堆肥、消化液は北海道大学附属農場より提供を受けました。

7. 引用文献

- Abubaker, J., K. Risberg, E. Jönsson, A. S. Dahlin, H. Cederlund, M. Pell. "Short-Term Effects of Biogas Digestates and Pig Slurry Application on Soil Microbial Activity". *Applied and Environmental Soil Science* (2015). <https://doi.org/10.1155/2015/658542>.
- Albiach, R., R. Canet, F. Pomares, F. Ingelmo. "Microbial biomass content and enzymatic activities after the application of organic amendments to a horticultural soil". *Bioresource Technology* 75 (2000): 43–48. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00030-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00030-4).
- Bol, R., E. Kandeler, W. Amelung, B. Glaser, M. C. Marx, N. Preedy, K. Lorenz. "Short-term effects of dairy slurry amendment on carbon sequestration and enzyme activities in a temperate grassland". *Soil Biology and Biochemistry* 35 (2003): 1411–21. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00235-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00235-9).
- Calderón, F. J., G. W. McCarty, J. A. S Van Kessel, J. B. Reeves. "Carbon and Nitrogen Dynamics During Incubation of Manured Soil". *Soil Science Society of America Journal* 68 (2004): 1592–99. <https://doi.org/10.2136/sssaj2004.1592>.
- Galvez, A., T. Sinicco, M. L. Cayuela, M. D. Mingorance, F. Fornasier, C. Mondini. "Short term effects of bioenergy by-products on soil C and N dynamics, nutrient availability and biochemical properties". *Agriculture, Ecosystems & Environment* 160 (2012): 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.06.015>.

- Jin, T., M.o Shimizu, S. Marutani, A. R. Desyatkin, N.i Iizuka, H. Hata, R.e Hatano. "Effect of Chemical Fertilizer and Manure Application on N₂O Emission from Reed Canary Grassland in Hokkaido, Japan". *Soil Science & Plant Nutrition* 56 (2010): 53–65. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2010.00447.x>.
- Lal, Rattan. "Restoring Soil Quality to Mitigate Soil Degradation". *Sustainability* 7 (2015): 5875–95. <https://doi.org/10.3390/su7055875>.
- Mogi, H., M. Anzai, Y. Uchida. "Heterogeneity of Nitrification Potentials within a Paddock of a Sheep Farming System". *Grassland Science* 63 (2017): 132–38. <https://doi.org/10.1111/grs.12153>.
- Odlare, M., M. Pell, J. V. Arthurson, J. Abubaker, E. Nehrenheim. "Combined mineral N and organic waste fertilization – effects on crop growth and soil properties". *The Journal of Agricultural Science* 152 (2014): 134–45. <https://doi.org/10.1017/S0021859612001050>.
- Odlare, Monica, M.I Pell. "Effect of wood fly ash and compost on nitrification and denitrification in agricultural soil". *Applied Energy* 86 (2009): 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2008.04.004>.
- Ravishankara, A. R., J. S. Daniel, R. W. Portmann. "Nitrous Oxide (N₂O): The Dominant Ozone-Depleting Substance Emitted in the 21st Century". *Science* 326 (2009): 123–25. <https://doi.org/10.1126/science.1176985>.
- Risberg, Kajsa, H. Cederlund, M.I Pell, V. Arthurson, A. Schnürer. "Comparative characterization of digestate versus pig slurry and cow manure – Chemical composition and effects on soil microbial activity". *Waste Management* 61 (2017): 529–38. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.12.016>.
- Toda, M., Y. Uchida. "Long-Term Use of Green Manure Legume and Chemical Fertiliser Affect Soil Bacterial Community Structures but Not the Rate of Soil Nitrate Decrease When Excess Carbon and Nitrogen Are Applied". *Soil Research* 55 (2017): 524–33. <https://doi.org/10.1071/SR17109>.
- Wang, L., F. Yang, E. Yaoyao, J. Yuan, W. Raza, Q. Huang, Q. Shen. "Long-Term Application of Bioorganic Fertilizers Improved Soil Biochemical Properties and Microbial Communities of an Apple Orchard Soil". *Frontiers in Microbiology* 7 (2016). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01893>.
- Wong, K., T. I. Shaw, A.a Oladeinde, T. C. Glenn, B. Oakley, M. Molina. "Rapid Microbiome Changes in Freshly Deposited Cow Feces under Field Conditions". *Frontiers in Microbiology* 7 (2016). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00500>.
- Zhen, Z., H. Liu, N. Wang, L. Guo, J. Meng, N. Ding, G. Wu, G. Jiang. "Effects of Manure Compost Application on Soil Microbial Community Diversity and Soil Microenvironments in a Temperate Cropland in China". *PLOS ONE* 9 (2014): e108555. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108555>.