

研究成果報告書

所属機関
北海道大学大学院農学研究院

職名
助教

氏名
内田義崇

研究テーマ

窒素流出を防ぐ草地酪農－冬の微生物活性と窒素循環の謎を解明する－

研究報告

1. 研究の背景と目的

【背景】

北海道は日本の生乳の約半量を生産する酪農大国である。一方で、牛尿・堆肥などが、草地に散布された後、微生物により分解され、水圏の汚染を引き起こすことが問題となっている。

水圏へ流出する窒素の多くは「硝酸 (NO₃)」である。秋に散布された糞尿が、雪解け時期に硝酸として地下水へ多量に溶脱することはよく知られているが、そのメカニズムについては不明な部分が多い。なぜなら、雪の下や凍った土壤中での窒素に関する動態は、その実験の困難さなどから、精緻な実験が進んでいないからである(右図)。

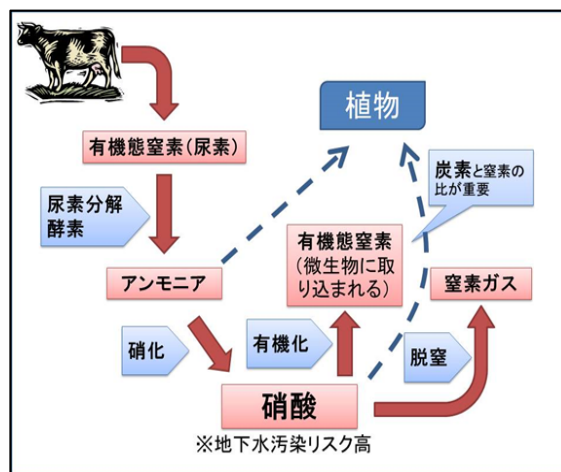
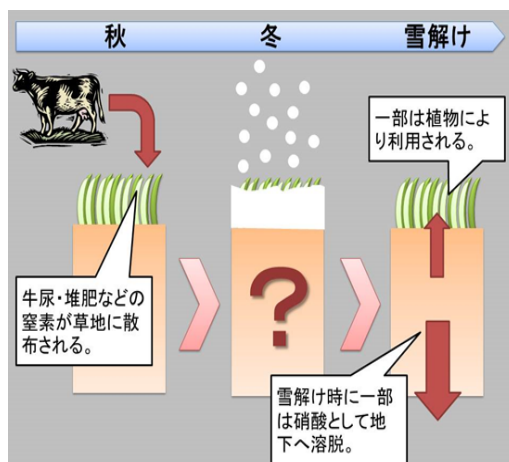
申請者は、窒素を「溶脱しにくい形」で留めておける土づくりを発展させることが出来れば、秋に散布される窒素を雪解け時に溶脱しにくくさせ、生産性を落とさないうま、環境負荷を低減できるのではないかと考えた。そのためには牛尿・堆肥を分解する微生物の働きを調べる必要があると考え、下記研究を計画するに至った。本研究では、下記の三点を目標に実験を行った。

【目的】

1. 秋に散布された牛尿や堆肥窒素の、冬、春までの動態を調査する。
2. ゼロ度を下回る条件での窒素循環に関わる微生物活性を調査する。
3. 秋から春にかけて微生物群衆構造がどのように変化するかを、遺伝子レベルで調査する。

右図に示すように、牛尿や堆肥を散布した後硝酸に至るまでの過程は非常に複雑である。冬期は、低温のため微生物活性が弱まるが、一部の土壌微生物は、低温に適応し活性をある程度保つことが出来る。

本研究では、下記の窒素循環に関わる微生物プロセスが、土壤の凍結有り無しでどう変化するのかを調査する。微生物プロセスとして、本報告書では、尿素分解、硝化、脱窒について考察する。



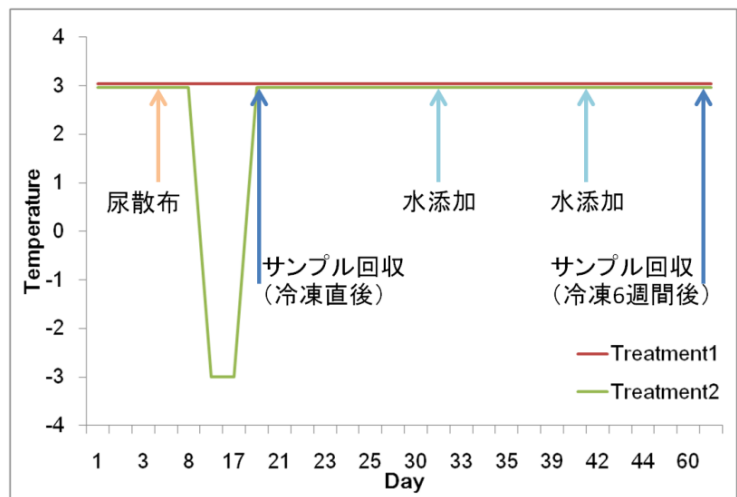
2. 研究成果及び考察

2.1 秋に散布された牛尿の動態調査

本研究では、複数の農家を訪問し、放牧地土壤をサンプリングした。土壤凍結がより起こりやすいと考えられる北海道東部の土壤を用いて、以降の実験を行った。土壤は、直径5センチ、長さ15センチのコアを実際のフィールドに打ち込み、土壤構造を壊すことなく採取した。土壤凍結は、コアを0° C

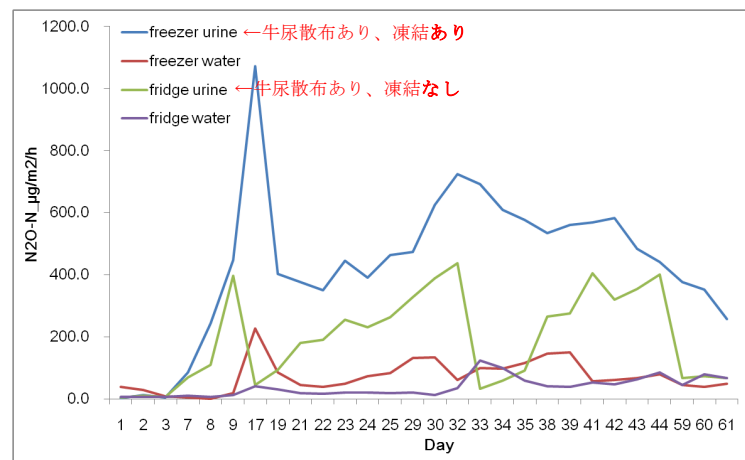
〜5°Cに保つことによって促した。比較対象として、土壌温度を2°C程度に保ったコアも用意した。さらに、土壌表面に牛尿（北海道大学内の酪農場にてサンプル）を散布し、後述する窒素循環に関わる特徴を経時的に考察した。右図に、温度処理を図式化した。「Treatment2」では、土壌が一週間ほど凍結処理されている。その期間以外は、実験期間を通して土壌は低温で培養（3°C）された。

また、コントロール区として、牛尿を散布せずに、水だけを散布し、同様の温度処理を施すコアも設けた。



2.1.1 亜酸化窒素排出量

土壌に蓄積する硝酸量、また微生物によって利用できる炭素量の指標として、亜酸化窒素(N₂O)排出量を測定した(右図)。結果、牛尿を散布した後に、一時的に凍らせた土(青線、freezer urine)は、凍らせていない土(緑線、fridge urine)よりも多くの亜酸化窒素を排出することがわかった。亜酸化窒素排出は微生物の活性と関係があるが、本来微生物は、温度が高い方が、活性が高くなる。この結果はそれとは逆であり、非常に驚くべきものであり、引き続き考察が必要であると判断した。



2.2 窒素循環に関わる微生物活性の変化

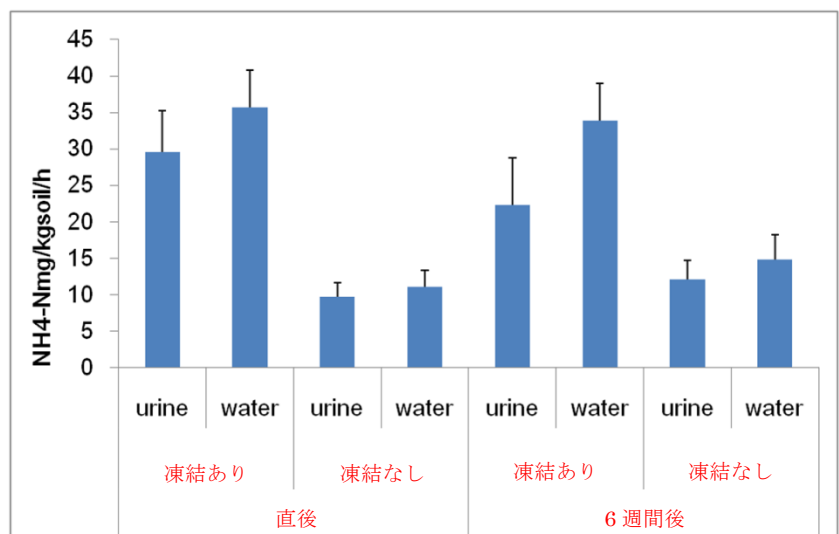
微生物活性のコントロール要因として、1) 温度や水分など、細胞そのものの活性をコントロールする要因と、2) 基質(炭素や窒素などの微生物にとっての「エサ」)の量、の二つが挙げられる。そのため、ここでは、2.1で検証した条件で、「基質の量」を微生物にとって最適にし、細胞そのものの活性(1)を調査した。

この活性は「ポテンシャル」もしくは「能」と呼ばれるが、本研究では、尿素分解酵素活性ポテンシャルと、脱窒能を考察した。

2.2.1 尿素分解酵素活性ポテンシャル

土壌中で尿素は加水分解し、アンモニアとなる。この反応はウリアーゼという酵素によって行われるが、ここではその酵素のポテンシャルを調べる。実験手法として、多量の尿素存在下で、アンモニア量の増加を経時的に調査する方法を用いた。土壌は、冷凍直後のサンプルと、冷凍が終わって6週間後のサンプルを用いた(右上図青矢印)。

結果として、土壌が凍結することによって、土壌中の尿素分解酵素活性ポテンシャルが大きく増加することが分かった(上図)。また、その増加は凍結後一



か月半経っても継続しており、尿素有分解してアンモニアにする能力は凍結により大きく変化することがはっきりした。この理由については、さらなる検証が必要だが、凍結により土壌の物理性（密度など）が変化することや、土壌有機物の動態が変化することが可能性として考えられる。

2.2.2 脱窒能

土壌中において、硝酸が還元される作用を脱窒というが、この反応についても、そのポテンシャルを考察した。方法

として、アセチレン法と呼ばれる、土壌を嫌気条件でアセチレンと共に培養し、発生した亜酸化窒素 (N_2O) 量を測定する手法を用いた。結果として、尿素に見られた凍結による大きな変化は無かった（上図）。

この結果は非常に興味深い、なぜなら、「ポテンシャル」ではなく、実際に牛尿を土壌コアに散布した実験 (2.1.1) においては、亜酸化窒素排出量は凍結によって大きく増加したからである。そのため、冬季において土壌凍結が起きた場合、窒素循環に関わる一部の反応はその「ポテンシャル」が増減するために変化するが、一方で、ポテンシャルは変化していないが、その他の要因（基質量など）が変化し、微生物活性が変化することもあることがわかった。

窒素循環に関わる反応は硝化、無機化、有機化などほかにも多数あるため、それぞれの反応についても今後考察する必要がある。

2.3 遺伝子レベルでの調査

本研究でサンプルした土壌の一部は、Ion Torrent 16S Metagenomics Kitを利用し、解析を試みている。現在まで、土壌DNAの抽出と、バクテリア由来の16S rRNAをPCR増幅するコンディションを確立した。今後の実験において、微生物の多様性に変化が及んでいるのかを精緻に検証する予定である。

3. 将来展望

本研究によって、土壌凍結の有無しが窒素循環に関わる微生物に与える影響に関する基礎データが得られた。しかし、土壌タイプが変化すれば、これら影響も変化する可能性があるため、異なる土壌での実験をさらに行う必要がある。また、当初はそれほど重要視していなかったが、凍結有り無しで、土壌物理性（密度、透水性など）が大きく異なることは大きな驚きであったため、今後は、低温状態での土壌物理性と微生物活性の関連性に着目したい。

また、現場への応用に関してであるが、現状は冬季に糞尿を土壌表面に放置することは多くの場合禁止されている。一方で、たい肥舎のサイズが足りず、大量のたい肥をどのように処理すればいいのに関わる技術が求められている。そのため、冬季でも糞尿への微生物反応があるのであれば、一部を土壌表面で分解させる等の技術を発展させることが出来るかもしれない。現場レベルでの実験へ発展させたい。

4. 研究発表

- 濱本亨、内田義崇、「Nitrogen cycle related microbial activities in frozen pasture soil」、ILTER (国際長期生態系研究) and JaLTER (日本長期生態系研究) 合同ワークショップ、2016年6月19日、北海道大学学術交流会館 (発表決定済)
- Soil Science and Plant Nutrition誌に論文投稿予定

