

信州大学審査学位論文

土壤酵素を用いた土壤の養分利用性評価

2015 年 3 月

信州大学総合工学系研究科

山岳地域環境科学専攻

12ST410A 諸 人誌

目次

緒言	5
----------	---

第Ⅰ章 長期連用圃場の黒ボク土における化学的抽出法と 酵素活性法によるリン利用性評価の比較

I -1. 背景	17
I -2. 試料と方法	20
I -2-1. 土壌試料と施肥管理	20
I -2-2. 化学分析	21
I -2-3. 酵素活性	22
I -2-4. 土壌微生物に対する P 添加の影響の評価	23
I -2-5. 統計処理	24
I -3. 結果	24
I -3-1. 土壌中の P 形態と P 利用性	24
I -3-2. 酵素活性	26
I -3-3. 土壌中のデヒドロゲナーゼ活性に対する P 添加の影響	27
I -4. 考察	28
I -5. 結論	32
表	33
図	36

第Ⅱ章 微生物と植物の土壌中 K 制限に対する感受性の差異について

Ⅱ-1. 背景	39
Ⅱ-2. 試料と方法	40
Ⅱ-2-1. 土壌試料と施肥管理	40

II-2-2. 土壌分析	40
II-2-3. 土壌中の微生物活性における K 添加の影響の評価	41
II-3. 結果と考察	41
II-4. 結論	43
表	44
図	46

第Ⅲ章 施肥管理の異なる黒ボク土における酵素遺伝子を標的とした 微生物群集構造解析と酵素活性、養分量との関係性

Ⅲ-1. 背景	47
Ⅲ-2. 試料と方法	48
Ⅲ-2-1. 土壌試料と施肥管理	48
Ⅲ-2-2. 化学分析	49
Ⅲ-2-3. 酵素活性	49
Ⅲ-2-4. 土壌からの DNA 抽出と PCR-DGGE	50
Ⅲ-2-5. 統計処理	52
Ⅲ-3. 結果	52
Ⅲ-3-1. 土壌特性	52
Ⅲ-3-2. 酵素活性	52
Ⅲ-3-3. 微生物群集構造	54
Ⅲ-3-4. 各微生物群集における Shannon の多様度指数(H')	54
Ⅲ-4. 考察	55
Ⅲ-5. 結論	59
表	60
図	63

第Ⅳ章 酵素添加法による植物根圏における有機態リンの利用性評価

Ⅳ-1. 背景	69
Ⅳ-2. 試料と方法	70
Ⅳ-2-1. 供試土壌と施肥管理	70
Ⅳ-2-2. ライゾボックス	70
Ⅳ-2-3. 化学分析と植物体の分析	71
Ⅳ-2-4. 酵素添加における Po の形態別評価	71
Ⅳ-2-5. 酵素活性	72
Ⅳ-2-6. Biolog 分析	73
Ⅳ-3. 結果と考察	73
Ⅳ-4. 結論	76
表	77
図	78
総合考察	86
図	92
引用文献	93

緒言

土壌中の栄養素の中でも、リン(P)は生物にとって極めて重要である。PはDNAの構成成分として存在し(Thies, 2007)、植物の三大栄養素の一つとしても知られ (Tate, 2000)、窒素(N)やカリウム(K)と同様に一次生産の主軸を担っている。しかし、PはNと異なり根粒菌などの細菌によって大気中から固定される(仁王ら、1994; Bottomley and Myrold, 2007)ことも、工業的にも固定できない。また、Kは植物遺体中にも比較的多く含まれるが(Tate, 2000)、Pはそれに比べると含量が少ない。このような背景から、人類はリン鉱石からリン酸肥料を生産し、農地に施肥することでその繁栄を支えてきた(Cordell et al., 2009)。しかし、Pは一般的に土壌生成の過程で流失したり、生物に利用可能な割合が減少し、吸蔵態などの難利用性の割合が増加していくことが示唆されている(Walker and Syers, 1976; Izquierdo et al., 2012; 図 i -1)。さらに近年、採掘可能で良質なリン資源の枯渇が懸念されてきており (Vaccari et al., 2009; Cordell et al., 2009; Gilbert, 2009)、現実には肥料価格の高騰などの事態も起こっている(Cordell et al., 2009; Gilbert, 2009)。また、リン資源は世界に偏在しており、モロッコ、中国、南アフリカ、米国に集中している(Vaccari et al., 2009; 図 i -2)。これらの事柄は、我が国においても、大きな影響が懸念される事態である。日本の農地の約半分は火山灰由来の黒ボク土であるため(高田ら、2009)、多くのPが土壌中の活性アルミニウム(Al)や活性鉄(Fe)に吸着され、難溶性のPとなってしまう(Hashimoto et al., 2012; Kunito et al., 2012a)。そのため、施肥したPの作物への利用効率は 20%以下であると推定されている(南條、2010)。このような事情から、日本では過剰なP施肥を行っており、その程度はOECD加盟国の中でも最大のものである(OECD, 2008; 表 i -1)。もしも、実際にリン酸肥料の高騰などが起きれば、資源を 100%輸入に頼る日本において、その影響は甚大であると予想される。一方で、Pは湖沼などの汚染物質としても認識されており、農地からの表層水の流出によって湖沼の富栄養化を引き起こすことが懸念されている(Lougheed, 2011; Tiessen et al., 2011)。また、過剰な施肥による土壌深部での可溶性P濃度の増加も懸念されている(Simard et al., 1995)。日本でも、地域によっては過剰な施肥による土壌中へのリン酸の蓄積が進み(岡崎, 2011)、ハウスなどの栽培施設では、リン酸過剰が作物体に被害をもたらすことも報告され、その低減法の開発が課題となっている(岡本ら、2009; 岡本, 2012)。また、リン酸肥料中にはCdが含まれ(Arao et al., 2010)、なかには 100mg kg^{-1} を超えるような肥料も存在し(Jiao et al., 2012)、リン資源枯渇に伴うリン

酸肥料の品質悪化によって肥料中のCd濃度の更なる増加が懸念されている。Jiao et al. (2012) やLougheed (2011)では、長期にわたる過剰施肥によって農地へのCd蓄積やそれに伴う植物体への移行を引き起す可能性について触れている。このような問題は、日本にとって将来の懸案事項の 1 つであるといえる。以上のように、Pは一方では不足している状況にあり、他方では過剰害が懸念されるといった矛盾した問題を抱えている。

これらの問題に対処していくためのアプローチとしては、主に P の再利用と効率的な利用の 2 つが考えられる。P の再利用は、産業廃棄物や生活排水などのリン酸を多く含むソースからの回収などが考えられる。実際に、家畜ふんの堆肥化、液肥化といったプロセスを経た再利用は古くから存在しており、また近年では上記のようなリン酸資源の確保の必要性から、従来見過ごされてきた P 資源からの再利用も活発化している(鈴木, 2010; Elser and Bennett, 2011; 齋藤, 2011)。このように、すでに多くの研究者が P の再利用の可能性について検討している一方で、土壌中にすでに蓄積している P の有効利用技術の開発は遅れている(南條, 2010)。そこで本章では、土壌中の P の有効利用法の模索について深く考察していくことにする。先に述べたように、日本では、作物の生育を保証するために多量の P 施肥が行われており、その大部分が土壌中に蓄積してしまっている。このような観点から、P 資源の有効利用に向けて、適正な施肥を行うことが喫緊の課題であると考えられる。そのためには、まず土壌中の生物学的な P 利用性を正確に評価することが必要となる。

これまでに、土壌中の作物に対するリン利用性を迅速に評価するために様々な化学的抽出法が考案されてきた(Beegle, 2005; Hedley, 2008)。P の抽出には、酸による溶出、陰イオンによる交換、陽イオン錯体形成、陽イオンの加水分解といった 4 つのメカニズムが関わっており(Kamprath and Watson 1980; Fixen and Grove 1990)、抽出法には代表的なもので Olsen 法, Bray 法, Truog 法などが存在する(Olsen et al. 1954; Kuo, 1996; Truog, 1930)。これらの方法は P の抽出メカニズムが異なり、それぞれ土壌中で利用性の高い、(少なくとも部分的には)異なる形態の P を抽出していると考えられる。このような抽出法の特徴から、抽出法によっては、P 利用性を正確に評価できていない場合が報告されていたり(Kumar et al., 1992; Sharpley et al., 1994)、同じ土壌においても、これらの化学的抽出法間で相関が得られないといった報告もある(Chang and Juo, 1963)。また、日本では一般的な評価法として Truog 法が用いられているが、日本の畑地の約半分を占める黒ボク土 (高田ら, 2009)において作物体の P 吸収量と相関が得られない場合も報告されている(杉戸, 2011)。つまり、P の真の生物利

用性を評価する絶対的な方法は、現在までのところ存在しないということになる。

このような背景から、Pの利用性を生物的に評価しようという試みも行われている。その一つが微生物バイオマスPを用いた評価である。微生物バイオマス中のPは $5\text{--}75\mu\text{gP g}^{-1}$ であることが報告されており、耕作地では有機態Pの 2-5%、草地や林地では 20%程度であると報告されている(Plante, 2007)。このように、割合ではそこまで大きなP画分ではないものの、その代謝回転速度はCやNよりも早いことが知られ、微生物によるPの供給は植物栄養的にも重要であることが示唆されている(武田, 2010)。杉戸(2011)では、微生物バイオマスPによるP利用性評価の可能性について述べられている。しかし、微生物バイオマスPはその測定法に問題点も指摘されている。すなわち、黒ボク土などのリン酸吸着能の高い土壌では、クロロホルム燻蒸で溶出した微生物バイオマス由来の無機態P (Pi)が強く土壌に再吸着され(杉戸ら, 2006)、土壌種間での比較が複雑であること、通常、菌体の溶出割合として使用する定数(Kp値)に 0.40 を使うのが一般的(Brookes et al., 1982)であるが、それは土壌中に細菌と菌類を一定の割合で播種し、その回収効率から推定した値であるため、土壌団粒内に存在している微生物などの菌体溶出について、実際の値を反映しているかどうか分からないこと、などが挙げられる。

他にも、P 添加によって実際に土壌中の微生物がどれだけ活性を増加させるのかを測定し、微生物の P 要求度を推定することで、土壌中の P 利用性の指標にするといった方法も考えられる。Kunito et al. (2012b)では、森林土壌において、全微生物活性を示すと考えられるデヒドロゲナーゼ活性 (Skujins, 1967; Tate, 2000)が P 添加へどのように応答するのかを調査し、一部の土壌では P 制限となっていると推察した。Ino and Monsi (1964)は、草地の腐植質黒ボク土において P および K 添加時の土壌呼吸を測定しており、P 添加で呼吸量が著しく増加したことから、P による有機物分解制限の可能性を示唆している。このように、微生物の P 添加への応答を評価することで、土壌中の生物学的な P 利用性を間接的に評価することができると考えられる。しかし、これらの P 添加による微生物の応答は、土壌中の他の栄養素とのバランスで決定すると考えられるため、生物学的な P 利用性が低い土壌であったとしても、P 添加に対する応答が起こらない場合もある(Kunito et al., 2012b)。このような特徴を踏まえると、微生物活性による土壌中の生物学的な P 利用性の評価では、各々の土壌において、P 以外の栄養素の状態についても詳細に把握しなければならないため、P の生物利用性の評価には容易には使用できないだろう。

他方、微生物や植物は P を獲得するために土壤中に細胞外酵素としてホスファターゼを放出している(金沢, 1994)。約半世紀も前から現在まで、様々な研究によって有機態 P 分解に関わる酵素であるホスファターゼの活性と土壤中の可給態 P 濃度との関係や、その他の養分条件変化への応答などが調査されている(e.g. Halsted, 1964; Kunito et al., 2012a,b; Marklein and Houlton, 2012; Colvan et al., 2001)。多くの報告で、P 利用性とホスファターゼ活性には逆相関が出ることが知られており、P 利用性の評価に使用できる可能性も示唆されている(Sinsabaugh, 1994)。しかし、問題点も存在する。例えば、Colvan et al. (2001)は、草地土壌において、土壌中の酸性ホスファターゼ活性が化学肥料区では可給態 P と負の相関を示す一方で、有機物を施与している区では正の相関を示すと報告している。また、Marklein and Houlton (2012) は自然生態系に焦点を当てて、土壌中のホスファターゼ活性への N 施与、P 施与、NP 施与の影響をメタ解析で評価している。その結果、P、NP 施与によってホスファターゼ活性が減少し、N 施与によって増加する可能性を示唆している。Kunito et al. (2012b) では、8 つの森林土壌に C、N、P を添加し、それに対する酸性ホスファターゼ活性の応答を評価しているが、P 添加によってその活性が上昇するものもあれば、変わらないものも存在した。このように、一見、生物的评价に用いることができそうなホスファターゼ活性であるが、その実際は、土壌中の P 状態やその変化と一貫性がみられない場合もある。

汎用性の検証が不十分など、まだ研究途上ではあるが、土壌酵素を用いた P 利用性の評価に対するアプローチとして、Sinsabaugh らの提案した資源配分モデルによる評価(Sinsabaugh and Moorhead, 1994; Sinsabaugh and Follstad Shah, 2012)も注目に値する。このモデルでは、微生物は各栄養素(C、N、P)獲得に関わる酵素への資源配分を調節することで自身の生産量を最大にしているという仮定に基づいている(図 i -3)。実際に Sinsabaugh and Moorhead (1994)は、畑地、川辺、流域に設置した有機物の分解量が、そこでの各栄養素獲得系酵素の活性比によって示される資源配分率によって表現できる可能性を示唆している。つまり微生物群集は、栄養利用性の状況によって、最も必要としている資源を獲得する酵素の生産に優先的に資源を配分している可能性が示されたのである。言い換えれば、微生物にとっての養分利用性を反映した値が得られると考えられる。しかし、このモデルを土壌中の栄養素利用性の評価に使用した例は皆無であり、その展開が待たれている。

ここまでは、P の利用性を生物的に評価する必要性、現在までに提案されている方法の問題点とそれを踏まえた新しいアプローチについて概説してきた。ここからは、植物や微生物

物などの生物を介した P の変動について紹介し、その有効利用の可能性について検討していく。土壌中には無機態 P (Pi)や有機態 P (Po)が存在し、それぞれが Ca や Fe、Al を露出した鉱物の末端に吸着したり、吸蔵態となって存在している(Tiessen and Moir 2008)。その存在形態によって P の生物利用性が異なるため(Hedley et al., 1982; Tiessen and Moir, 2008)、先の可給態 P 抽出法では、比較的利用性が高いと考えられる画分に注目して、その量を推定している。しかし、植物や微生物はそれらの化学的抽出法で可給態 P と評価されていない形態の P も利用する可能性が示されている。例えば、植物を栽培した土壌での P 形態分析の結果から、根圏において Al や Fe に吸着していると考えられる Pi の減少などが報告され、植物体による難利用性 P 吸収の可能性が示唆されている(Berland et al., 1999; Chen et al., 2002; George et al., 2002)。そのメカニズムとしては、ルーピン、キマメなどを用いた実験から、根圏でクエン酸、ピシジン酸といった有機酸の分泌による Al、Fe などとの錯体形成や配位子交換反応が示唆されている(Otani et al., 1996; 平舘, 1999)。また、植物根圏では Al や Fe に結合した Po 濃度の減少や (Li et al., 2008, Condron et al., 2008)、根圏でのホスファターゼ活性の増加とそれに伴う Po 減少も報告されている (Helal and Sauerbeck, 1984; Tarafdar and Jungk, 1987; George et al., 2006)。また、低 P 利用性時における根からのホスファターゼ分泌の増加も示唆されている(Tadano et al., 1993)。シロバナルーピンなどの植物では、P 欠乏時にクラスター根を形成し、ホスファターゼ分泌を高めて P の可給化を行っていることが知られている(和崎, 2012)。このように、難利用性 P の植物による可給化には様々な研究例がある。その特性は植物によって異なる事が知られており(阿江ら, 1993; Otani et al., 1996)、これらの植物を通した難溶性 P の回収、利用法の開発のためには、より実践的な現地試験が必要だろう。

微生物においても、リン溶解菌による P の可給化や(西尾ら, 1986; Osorio and Habte, 2013)、菌根菌を通した P 供給による植物の成長促進(斎藤, 1998; 唐澤, 2009)などが知られている。また、アルカリホスファターゼは主に細菌が、酸性ホスファターゼは細菌と菌類が分泌することが知られており(金沢, 1994; Nannipieri et al., 2011)、土壌中の Po の可給化に重要な役割を担っていると考えられる。特に、土壌中の Po は全 P に対して平均で 30-50%を占めるともいわれ(Plante et al., 2007)、土壌中の P 循環に大きな役割を担っていると考えられる。Zubillaga and Giuffré (1998)は、黒ボク土では特に Po が作物への P 供給において重要な役割を担っていることを報告している。有機態 P は大部分がモノエステルであることが示唆さ

れており、主にフィチン酸が関連したものが優占している(Turner et al., 2002; Plante et al., 2007; 図 i-4)。このモノエステル P は土壤中のホスファターゼによって加水分解され、生物に利用されるオルトリン酸になる(金沢, 1994; Nannipieri et al., 2011)。つまり、土壤微生物のホスファターゼ分泌による Po の分解は、土壤中のリン循環にとって大きな役割を担っていると考えられる。このため P 有効利用化法の一つとして、肥培管理等をとおした土壤微生物による Po の可給化を促進することが挙げられる。その実現には、土壤中の微生物群集、肥培管理などによる土壤条件(養分など)の変化、そしてホスファターゼ活性などの土壤機能の変化の相互作用を理解する必要がある。しかしながら、先に述べたようにホスファターゼ活性の変化は養分利用性との関係性が示唆されているものの、一貫性のある結果は得られていない。また、微生物の群集構造も土壤中の養分や酵素活性などの機能との関連性が示唆されてきたが、不明な点が多いままである。この問題には、近年までの土壤中の P 形態変動に関わる微生物を対象とした研究手法の開発の遅れが起因している。いままでの微生物群集構造解析には 16S、18S rDNA を標的とした細菌、糸状菌の解析が主流を占めていた。この手法では、特定の機能を持っていない微生物まで群集構造の評価対象となってしまうため、機能と群集構造を比較する際に関係性が不明確で、踏み込んだ議論ができない状態であった。そこで、機能遺伝子に注目した微生物群集構造解析が行われるようになってきたが、ホスファターゼ産生遺伝子を標的とした群集構造解析は行われてこなかった。しかし近年、Sakurai et al. (2008) によってアルカリホスファターゼ産生遺伝子を標的としたポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR 法)のプライマーが設計されたことをきっかけに、アルカリホスファターゼ産生細菌群集を対象とした変性剤ゲル電気泳動法(DGGE 法)による群集構造解析が行われるようになってきた。このプライマーは陸上生態系において、現在までに発見されているアルカリホスファターゼ遺伝子の内、細菌が持つもの (*phoD*、*phoA*、*phoX*)の中で最も頻出する *phoD* を対象としている(Tan et al., 2013)。その後、このプライマーを用いた研究としてアルカリホスファターゼ細菌群集構造を評価した数例の報告がある(Wang et al., 2012; Chhabra et al., 2013; Tan et al., 2013; Jorquera et al., 2014)。しかし、これらの研究では、肥培管理の種類が少ない点や、施肥管理が異なる根圏の試料のみで実験を行っているなどデータの解釈が難しい点、アルカリホスファターゼ活性を調査していない点などが課題として残されている。今後は様々な肥培管理下での土壤を用い、酵素活性、養分利用性、微生物群集構造などを同時に評価し、それらの関係をさらに明確化する研究が必

要となるだろう。

以上、世界と日本における P の現状とその問題点、対策法の例、今後進展が期待されるアプローチなどについて紹介した。先にも述べたように P を取り巻く状況はかなり逼迫しており、人類の持続可能な発展のために解決しなければならない喫緊の課題である。本章で紹介した方法は、まだ研究途上であるため、実用化するには、それらの研究の早急な進展が求められる。

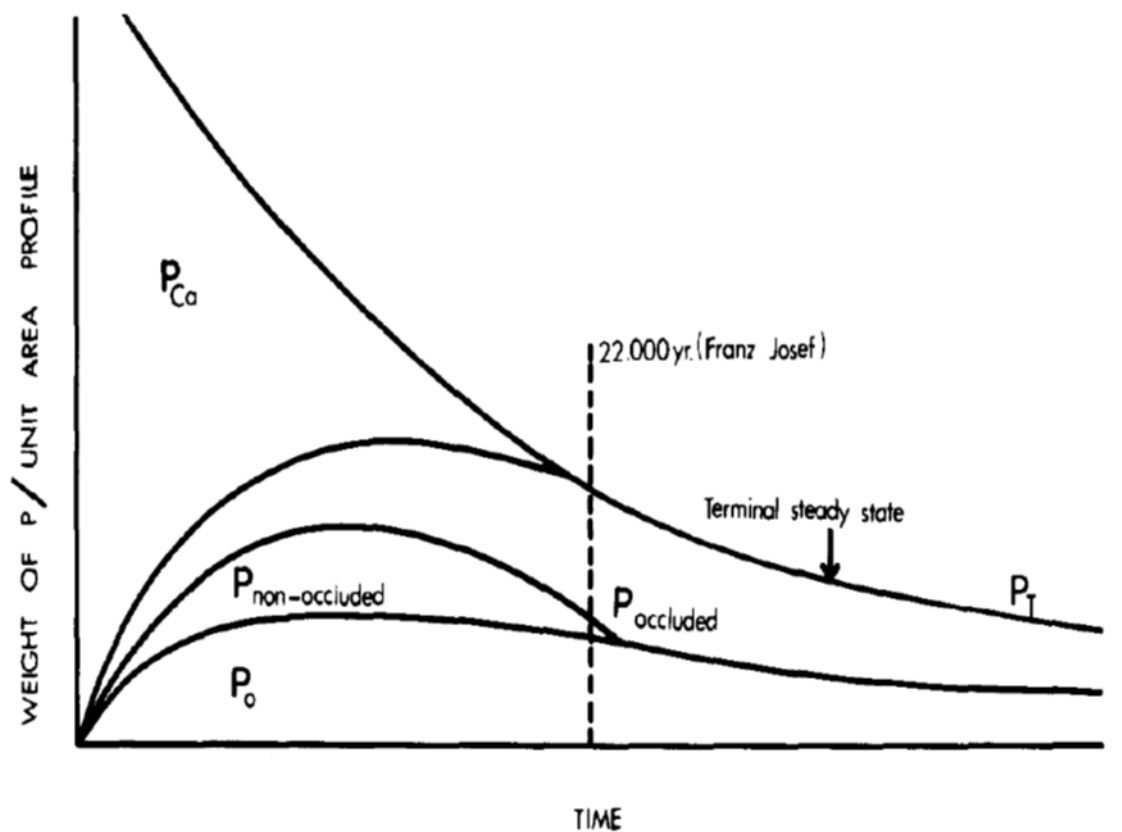


図 i -1. 土壤生成における P の流出過程

Walker and Syers (1976)より引用。P_{Ca}はアパタイト態のPや結晶中のP、P_{non-occluded} は比較的に使用されやすい形態のP、P_{occluded}は吸蔵態のP、P_oは有機態のP、P_Tは全Pを示す。

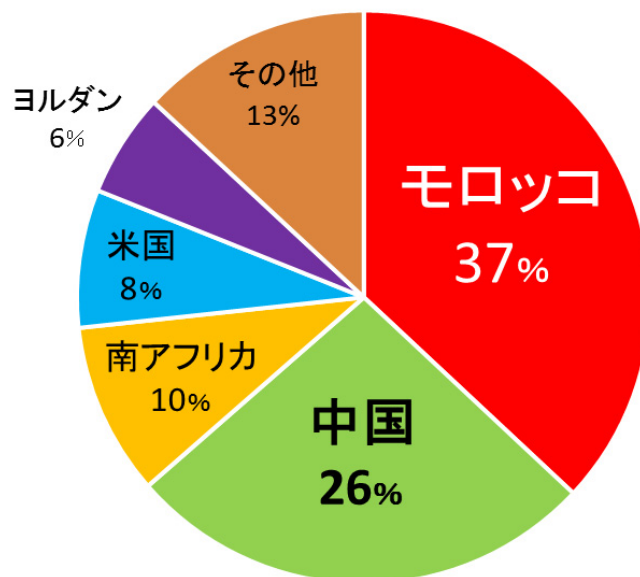


図 i -2. 世界の推定リン資源埋蔵量
Vaccari (2009)のデータを基に作成。

表 i -1. OECD 加盟国の P バランス

	Balance expressed as tonnes of phosphorus (P)				Balance expressed as kg phosphorus per hectare of total agricultural land		
	Average		Change		Average		Change
	1990-92	2002-04	1990-92 to 2002-04		1990-92	2002-04	1990-92 to 2002-04
	000' tonnes P		000' tonnes P	%	Kg P/ha		%
New Zealand ²	76	174	98	128	6	14	136
Canada ³	37	82	45	123	1	1	137
Australia	309	403	94	30	1	1	35
Spain	194	229	36	18	6	8	23
United States	1 300	1 415	115	9	3	3	13
Portugal	59	59	0	0	15	15	5
Norway	15	14	-1	-9	15	13	-13
Korea	103	92	-12	-11	47	48	2
OECD⁴	4 743	3 829	-914	-19	16	10	-37
Iceland	4	3	-1	-21	2	1	-21
United Kingdom	274	215	-59	-22	15	13	-13
Japan	339	243	-95	-28	65	51	-21
Italy	242	162	-80	-33	14	11	-22
Denmark	47	30	-17	-36	17	11	-33
Ireland	44	28	-16	-37	10	6	-35
Turkey	354	214	-140	-39	9	5	-40
EU15	1 844	1 043	-800	-43	18	10	-48
Belgium	55	31	-24	-43	41	23	-45
Greece	69	35	-34	-50	8	4	-49
Poland	89	45	-45	-50	5	3	-43
Netherlands	75	37	-38	-51	38	19	-49
Mexico	176	85	-91	-52	2	1	-53
Switzerland	19	8	-11	-56	12	5	-55
Austria	26	10	-16	-62	7	3	-61
Finland	51	18	-33	-65	20	8	-60
Sweden	18	6	-12	-67	5	2	-65
France	404	114	-290	-72	13	4	-71
Germany	281	68	-212	-76	16	4	-75
Luxembourg	6	1	-5	-76	48	11	-77
Czech Republic	43	7	-36	-84	10	2	-84
Slovak Republic	36	2	-35	-96	15	1	-96
Hungary ⁵	-9	-1	n.a.	n.a.	-4	-1	n.a.

OECD (2008)より引用。P バランスは P 施肥量と P 回収量(収穫等による)を引いた差。赤枠は日本の P バランスを示す。日本は OECD 加盟国の中で単位面積当たりの P バランスが最も過剰である。

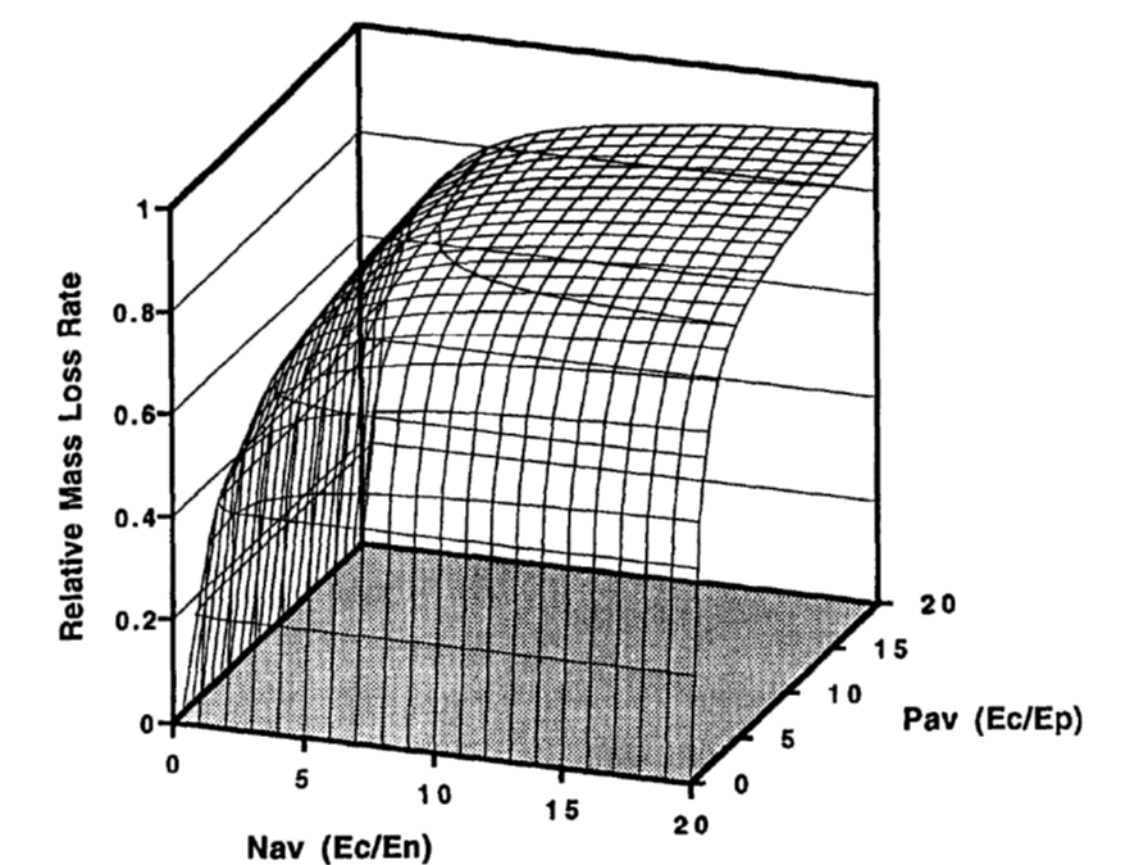
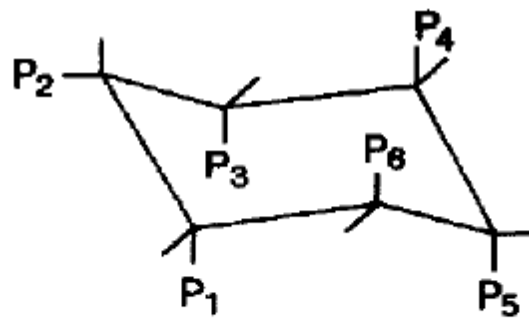
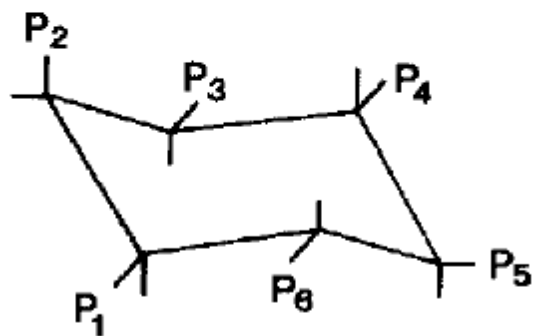


図 i -3. 資源配分モデルの理論.

Sinsabaugh and Moorhead (1994)より引用。Ec は C 獲得系酵素活性、En は N 獲得系酵素活性、Ep は P 獲得系酵素活性を表す。Nav は N 利用性、Pav は P の利用性を示す。



STRUCTURE I



STRUCTURE II

図 i -4. フィチン酸の形態

Martin and Evans (1986) より引用。pH 5-12 では上の Structure I の構造 (axial form)を、pH < 5 または pH > 12 では Structure II (equatorial form)の形態を取る。評価されている Po の中で優占するのがフィチン酸である。

第 I 章

長期連用圃場の黒ボク土における化学的抽出法と酵素活性法による リン利用性評価の比較

I-1. 背景

黒ボク土は日本の畑地の約半分を占める。黒ボク土は様々な土壌種の中でも全リン(P)含量は高い値を示すが(Yang and Post, 2011)、土壌中の活性アルミニウム(Al)、活性鉄(Fe)が多く、高い P 吸着能を示すため(Hashimoto et al., 2012; Kunito et al., 2012a)、P 利用性は小さい(Shoji et al., 1993; Dahlgren et al., 2004)。ゆえに、日本の耕地における黒ボク土では、作物生産性の増加を目的として過剰な P 施肥が行われており、その大半が化学肥料由来のものである(Mishima et al., 2003)。露地野菜やハウス栽培の野菜では、それぞれ施肥された P の 9%、12%程度しか植物体の地上部には吸収されておらず(西尾, 2003)、そのことが日本における土壌への P の蓄積を助長している(OECD, 2008)。

世界のP資源は有限であることから、近年、高品質のP鉱石の枯渇が懸念されている(Cordell et al., 2009; Gilbert, 2009; Vaccari, 2009)。一方では、作物の要求量を超えた過剰なP施肥によって湖沼の富栄養化を引き起こすことも懸念されている(Carpenter, 2005)。そのため、土壌中のP利用性を正確に把握し、適切な施肥管理を行っていくことが、Pを効率的に使用し、持続可能な農業を進めていくためにも重要な課題となっている。実際に、土壌中の作物に対するP利用性を迅速に評価するために様々な化学的抽出法が考案されてきた(Beegle, 2005; Hedley, 2008)。土壌からPを抽出して測定する評価法には、主に 4 つのメカニズムが存在する。それは酸による溶出、陰イオンによる交換、陽イオン錯体形成、陽イオンの加水分解である(Kamprath and Watson, 1980; Fixen and Grove, 1990)。このようにそれぞれの抽出法が少なくとも部分的には異なる形態のPを抽出している。日本で特に良く使用されているのが

Truog法とBray法である(Shoji et al., 1993)。Truog法はCaに結合したP (Otani and Ae, 1999)や、Ca及びAlに結合したP (Susuki et al., 1963)を抽出しているとされている。Bray法は、Alとフッ素(F)の複合体を作ることによってAlの活動度を低下させ、Alに結合したPを抽出する方法である(Kuo, 1996)。また、Olsen法(Olsen et al., 1954)やColwell法 (Colwell, 1963)といったアルカリ性の抽出液を用いた評価法は、石灰質土壌、酸性土壌の両方で適用できることが知られている(Kamprath and Watson, 1980; Beegle, 2005)。Olsen法による NaHCO_3 抽出では、pH8.5 という比較的高い水酸化物イオン濃度に起因して、配位子交換によってAlやFeに結合したPがある程度抽出されるほか、 CO_3^{2-} がCaと結合することによって CaCO_3 を生じ、Caの活動度が低下することによってCaに結合していたPが抽出される(Kuo, 1996; Beegle, 2005)。Hedleyらによって提案された逐次抽出法は、Pを利用性が異なる形態別に評価するために良く使用されてきたが、黒ボク土への適用例は少ない(Cross and Schlesinger, 1995)。これらの化学的抽出法はPの潜在的な利用性を異なる手法で推定しており、それ故に矛盾した結果も生じている(e.g., Sharpley et al., 1994; Kato et al., 1995; Otani and Ae, 1996; Vimpany et al., 1997)。例えば、リン鉱石が直接施肥されている圃場において、Olsen法はP利用性を過小評価するが、Bray第1法、Bray第2法、Truog法は過大評価する可能性があるとの報告がある(Kumar et al., 1992; Sharpley et al., 1994)。Susuki et al. (1963)では、Truog法とBray第1法では、アメリカ合衆国のミシガン州における土壌においては相関が得られなかったことを報告している。Chang and Juo (1963)によれば、Olsen法によって評価されるP(Olsen-P)やBray第2法によって評価されるPは、Feに結合したPやFeやCaに結合したPが優占する土壌では高い相関を見せるが、Caに結合したPが優占する土壌では相関が得られなかった。また、Olsen-PとTruog法によって評価されるP (Truog-P)は、Feに結合したPが優占する土壌においては高い相関を示す一方で、FeとCaに結合するPやCaに結合するPが優占する土壌では相関が得られなかった。Bray第2法によるPとTruog-Pは、Feと結合するP、もしくはCaと結合するPが多い場合には相関が高いがFe及びCaと結合するPが多い土壌では相関が無かった。また、P評価法によって作物に

対する最適値は異なり、かつ、土壌特性の違いから同じ抽出法を用いても土壌間で最適値が異なってしまうといった問題もある(e.g., Holford, 1980; Bolland et al., 1994)。さらに、化学的抽出法は、酸による溶出などの化学的なプロセスに基づいた評価であり、生物的または生化学的な評価ではないため、土壌中の真の生物利用性を正確には反映してない可能性がある。このように現行の化学的抽出法のみでは、真の生物利用性を評価するには限界がある。

Sinsabaugh らは環境中の栄養素利用性に関して、細胞外酵素の資源配分モデルを提唱した(Sinsabaugh and Moorhead, 1994; Sinsabaugh and Follstad Shah, 2012)。このモデルでは、例えば、C 獲得酵素に対する P 獲得酵素活性の比が、C に対する相対的な P 利用性の指標となる。Hill et al. (2012)は、河川において、C 制限の地点では C 獲得酵素であるグリコシダーゼが、N 制限の地点では N 獲得酵素であるペプチダーゼが、P 制限の地点では P 獲得酵素であるホスファターゼが優占していることを明らかにした。このモデルは微生物が分泌する酵素を基にした理論であるため、より生物的な P 利用性を評価できる可能性があり、上記のような現行の化学的抽出法での問題点を補うことができるかもしれない。しかし、この資源配分モデルによる栄養素利用性評価の有効性については、まだ仮説の域を出ていない。また、このモデルで実際の環境中で栄養素利用性を評価している例はほとんどなく、特に農地では皆無である。

本研究では、70 年間同一の施肥管理を行っている圃場から黒ボク土を採取し、資源配分モデルが P 利用性の評価に使用可能かどうか検討した。なお、本研究では資源配分モデルの検証が目的であるため、化学的抽出法間に矛盾があるとその正当な評価ができない。そこで、どの化学的抽出法間にも正の相関が得られやすいと考えられる長期連用圃場の土壌を実験に用いた。実際に、それらの化学的抽出法間で P 利用性がある程度評価できることを確認した後に、資源配分モデルと化学的抽出法の結果を比較して資源配分モデルの妥当性の評価を行った。また、生物的な指標の一つとして、土壌への P 添加に対する微生物の

反応を見ることで、微生物群集の P 要求度も評価し、資源配分モデルと比較した。

I -2. 試料と方法

I -2-1. 土壌試料と施肥管理

2009 年 6 月に長野県塩尻市の野菜花き試験場 (36°6'N, 137°56'E) で 1938 年より長期間同一の施肥管理を行う 14 圃場から、土壌試料を 1 圃場につき 3 点、計 42 試料を Ap 層から採取した。1 つの圃場の大きさは 29.7m² で、コンクリート枠で仕切られている。年平均気温は 10.8℃、年間平均降水量は 1276mm である。この土壌は黒ボク土で、USDA 分類では Typic Hapludand、WRB 分類では Silandic Andosol に分類され、砂 21%、シルト 36%、粘土 43% を含む軽埴土である。残念ながら、反復区は設けられていないが、このような長期連用圃場は黒ボク土では非常に珍しく、ここで得られたデータの価値は非常に高いと考えられる。

この圃場では 1938 年から 1966 年までトウモロコシを栽培し、1967 年から採取前年の 2008 年まで毎年各種の野菜を栽培していた。試料採取は施肥と作物定植前に行った。土壌試料は、大きな植物遺体がある場合はそれを取り除いて、2mm の篩を通した後、良く均質化した。その後、試料の一部は風乾し、再度 2mm の篩に通してから室温で保存した。残りは酵素活性測定用に湿潤土のまま 4℃ で保存した。酵素活性などの生化学的分析はその後 1 年以内に分析を終了させた。この点においては 1 年後にも酵素活性の再測定を行い、活性の全体的な様相に変化がないことを確認している。

化学肥料、堆肥の施肥は年に 1 回ずつ行っており、試料採取前の施肥は 2008 年 7 月に堆肥を、8 月に化学肥料を施肥している。試料番号と処理区別の施肥の種類及び 2008 年の施肥量を表 I -1 に示した。化学肥料を施肥している区では、N は (NH₄)₂SO₄、P は Ca(H₂PO₄)₂・H₂O、K を KCl で施与している。堆肥処理区では稲わら堆肥を施与しており、稲わら堆肥は、乾物換算で 0.36% の N、0.048% の P、0.55% の K を含んでいる。これらの施肥管理は 1967 か

ら 2008 年の間、その年に育てる作物種によって施肥量をわずかに変えている(与えた比率は同じである)。堆肥施与区では 10a 当たり 2t (1m^2 に換算すると 2 kg)、堆肥 4t 施与区では 10a 当たり 4t (1m^2 に換算すると 4 kg) の堆肥を施与している。NPK(多肥)では稲わら堆肥 2kg 分に匹敵する NPK 分を増じて上記と同様の化学肥料のみで与えている。NPK(減肥)では 2kg 分を減じて、NPK(極多肥)では 4kg 分を増じて施肥している。このような背景から、我々は 2008 年の P 施肥量がこれまでの累積 P 施肥量を反映していると考えた。また、2009 年に収穫されたキャベツ(*Brassica oleracea* L. var. *capitata*)の収量と P 含量のデータも表 I -1 に記載した。

I -2-2. 化学分析

pH は土壌試料：水=1：2.5 の割合の懸濁液で、ガラス電極法を用いて測定した。全 C 及び全 N 含量は、元素分析装置を用いて分析した(Thermo Finnigan Flash EA1112; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)。

土壌中の可給態 P 濃度を調査するために、Truog 法と Bray 第二法(準法)を用いた。Truog-P は Truog (1930)に従って $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を用いて pH 3.0 に調整した 0.001 M H_2SO_4 で土壌：溶液 = 1:200 の割合で抽出した。Bray 第 2 法(準法)による P(Bray-2P)の抽出は、希釈したフッ酸(0.03M NH_4F , 0.1M HCl)を用いて土壌：抽出液= 1：20 の割合で抽出を行った(南條, 1997)。原法の Bray 法における土壌：抽出液=1：7 の方法では黒ボク土では十分に可給態 P を抽出しきれないため、今回は土壌：抽出液=1：20 を採用した。抽出液中の無機態 P (Pi) 濃度はモリブデン青法によって定量した(Murphy and Riley, 1962)。Bray 第 2 法(準法)においては、フッ化物イオンがリン酸の発色を阻害することが知られているため、阻害しないフルオロホウ酸塩を形成させるために、ホウ酸を添加している(南條, 1997)。

土壌中の P 形態は、Hedley の逐次抽出法を改変した方法を用いて測定した(Sui et al., 1999; Tiessen and Moir, 2008)。簡潔に書くと、土壌を蒸留水、0.5M NaHCO_3 、0.1M NaOH 、1M HCl 、濃塩酸で順に抽出している。最後に、残った残渣を濃硫酸と過酸化水素により分解し、残

渣画分のPとした。Pの定量は上記の方法と同様にして行った。H₂O、NaHCO₃、NaOH、conc. HCl 抽出画分では、過硫酸塩による分解を行ってからP濃度を測定することで、全Pを測定した(Tiessen and Moir, 2008)。有機態P (Po) は全PからPiを減じることで算出した。全分析は3連で行い、P濃度は乾土換算で表示した。H₂O画分のPi と Po は最も利用されやすく、不安定なP形態であるとされ(Sui et al., 1999)、次にNaHCO₃ 抽出が利用されやすい形態である(Tiessen and Moir, 2008)。NaOH抽出ではFeやAlに吸着しているPiや、腐植やAl、Feの水酸化物に結合したPoを抽出しているとされる。1M HClで抽出されるPiは、炭酸塩の無い土壤ではアパタイトに含まれるPを抽出していると考えられる(Schlesinger et al., 1998)。Conc.HCl抽出画分のPは、他の画分と比べて、より安定なPを抽出している。残渣画分のPは三二酸化物に吸蔵されたPiや、一次鉱物中のP、より難分解性のPo等を評価していると考えられている(Crews, 1996)。これらの全画分のP濃度の総計を土壤中の全P濃度とみなした。本研究においてはH₂O画分とNaHCO₃画分のPi濃度の合計をHedley抽出における可給態P濃度とした。この可給態Pの定義はOlsen-P (Olsen et al., 1954)やColwell法によって評価されるP (Colwell-P) (Colwell 1963)と類似しているが、抽出時間や抽出液比が大きく異なっている(本研究の抽出時間は20時間であるが、Olsen-Pの場合は0.5時間、Colwell-Pの場合は16時間の抽出を行っている。また、抽出液比は本研究では土壌：抽出液=1：60であるのに対し、Olsen-Pでは1：20、Colwell-Pでは1：100である)。 -

I -2-3. 酵素活性

P獲得系酵素として、酸性ホスファターゼ活性(pH 6.5)とアルカリホスファターゼ活性(pH 11)の2つの酵素活性を測定した。これらの酵素活性は様々なリン酸モノエステルを加水分解する酵素として知られており、土壌中の有機態Pの分解や植物栄養に対して重要な役割を担っていると考えられている(Tabatabai, 1994)。p-ニトロフェノールリン酸塩を基質として用い、酸性ホスファターゼ活性、アルカリホスファターゼ活性をそれぞれpH 6.5、pH 11

の緩衝液(Modified universal buffer ; MUB)を用いて活性の測定を行った(Tabatabai, 1994)。C 獲得系酵素としては、セルロースからグルコースへの分解を律速し、自然界に広く分布している(Tabatabai, 1994; Alef and Nannipieri, 1995) β -D-グルコシダーゼ活性を測定した。基質は *p*-ニトロフェニル β -D-グルコピラノシドを用いて、pH 6.0 の MUB 中で測定した(Tabatabai, 1994)。N 獲得系酵素としては、L-アスパラギナーゼを測定した。L-アスパラギナーゼは土壌中の N 獲得に重要な役割を果たしていると考えられる(Tabatabai, 1994)。L-アスパラギナーゼ活性は、pH 7.0 の 0.1M P 酸緩衝液中で L-アスパラギンを経験基質として測定した(Kanazawa and Kiyota, 1995)。これらの測定は 3 連で行い、データは全て乾土換算で表示した。

I -2-4. 土壌微生物に対する P 添加の影響評価

デヒドロゲナーゼ活性は全土壌微生物の活性を反映する値である(Skujins, 1967; Tate, 2000)。本研究では、土壌微生物のP要求度を、P無添加時におけるデヒドロゲナーゼ活性に対するP添加後のデヒドロゲナーゼ活性の比を求めることで評価した。まず、冷蔵庫で保管していた土壌試料を 1 試料につき 6 つのシャーレにとり、22°Cで圃場での水分量を保ちつつ一週間前培養した。一週間後、3 つのシャーレにはCとPを添加し、もう 3 つにはCのみ添加した。Cはグルコース溶液として乾土あたり 12mgC g⁻¹、PはNa₂HPO₄溶液を乾土あたり 0.24mgP g⁻¹となるように加えた。このCとPの添加量は微生物バイオマス中の化学量論比を参考に決定した(Kunito et al., 2012b)。その後 22°Cでさらに 3 日間培養した後、von Mersi and Schinner (1991)の方法に従い、iodonitrotetrazolium chlorideを経験基質として、デヒドロゲナーゼ活性を測定した。

測定後、P 無添加時におけるデヒドロゲナーゼ活性に対する P 添加後のデヒドロゲナーゼ活性の比を求めた。なお本研究では、P 添加のみではデヒドロゲナーゼ活性の上昇は確認できなかったため、微生物は C 制限にあると判断し、すべての試料に C 添加を施したうえで P 添加の影響を判断した。

I-2-5. 統計処理

偽反復の問題を除くため、1 圃場ごとの 3 つのデータを平均し、施肥管理間の比較はあえて行わなかった。P 施肥量と土壌中の P 形態の関係を評価するために、回帰分析を用いた。また、変数間の関係を評価するためにスピアマンの順位相関係数を用いた。P 形態間の濃度や C 添加時におけるデヒドロゲナーゼ活性と C + P 添加時におけるデヒドロゲナーゼ活性を比較するために、スチューデントの対応のある t 検定を用いた。Hedley 法によって評価した各 P 形態濃度は、土壌試料ごとに全 P 濃度で割り、各 P 形態の割合を算出し、その値を用いて主成分分析を行った。さらに、その主成分得点 1 と P 施肥量の関係を回帰分析で評価した。これらの解析には、SSRISTAT 2010 (Social Survey Research Information, Tokyo, Japan) を用いた。

I-3. 結果

I-3-1. 土壌中の P 形態と P 利用性

可給態P濃度はBray第2法(準法)による抽出で最も高い濃度を示し、次いでTruog法が高く、Hedley法による $\text{H}_2\text{O-Pi}$ と $\text{NaHCO}_3\text{-Pi}$ 濃度の和が最低値を示した(表 I -2)。Truog-Pは処理区 1、2、9 で最も低い値を示した($1.30\text{-}5.00 \text{ mg P kg}^{-1}$)。この値は、日本の黒ボク土で作物栽培に推奨されるリン酸濃度である $43.6\text{-}436 \text{ mg P kg}^{-1}$ よりもかなり低いものであった。一方、最大値を示したのは処理区 8、11、12、14 であった($115\text{-}138 \text{ mg P kg}^{-1}$)。この値は 1994 年から 1997 年にわたって日本の農地土壌を調査した小原・中井 (2004)の報告する、日本の農地における Truog-P濃度の平均値($n = 3,192; 262 \text{ mg P kg}^{-1}$)よりも低い値であった。また、Truog-P濃度は $\text{H}_2\text{O-Pi} + \text{NaHCO}_3\text{-Pi}$ 濃度($r = 0.877, P < 0.001$)、Bray-2P濃度($r = 0.904, P < 0.001$)とそれぞれ有意な正の相関を示した。Bray-2P濃度は $\text{H}_2\text{O-Pi} + \text{NaHCO}_3\text{-Pi}$ 濃度と相関があった($r = 0.845, P$

<0.001)。しかし、Hedley法の第一段階で抽出した $\text{H}_2\text{O-Pi}$ 濃度は、 Truog-P 濃度($r = 0.648$, $P < 0.05$)と $\text{H}_2\text{O-Pi} + \text{NaHCO}_3\text{-Pi}$ 濃度($r = 0.613$, $P < 0.05$)とそれぞれ正の相関を示したが、上記の Truog-P 濃度と他の可給態P濃度との関係や、 Bray-2P と他の可給態P濃度との関係よりも弱く、さらに、 Bray-2P 濃度とは有意な相関を示さなかった($P > 0.05$)。

これら 3 つの評価法によって推定された可給態P濃度は、化学肥料と堆肥によるP施与量の増加に伴って上昇していた(Truog-P : $r^2 = 0.94$, $P < 0.001$; Bray-2P : $r^2 = 0.92$, $P < 0.001$; $\text{H}_2\text{O-Pi} + \text{NaHCO}_3\text{-Pi}$: $r^2 = 0.97$, $P < 0.001$)。また、長期の化学肥料と堆肥によるP施与は、全P濃度に対する可給態P濃度の割合と有意な正の相関を示した(Truog-P : $r^2 = 0.93$, $P < 0.001$; Bray-P : $r^2 = 0.95$, $P < 0.001$; $\text{H}_2\text{O-Pi} + \text{NaHCO}_3\text{-Pi}$: $r^2 = 0.93$, $P < 0.001$)が、全P濃度に対するHedley法によって抽出された $\text{H}_2\text{O-Pi}$ 濃度とは有意な関係は得られなかった($P > 0.05$)。

全ての処理区で、Hedley法によって評価を行った全P濃度に対する同法による各P形態濃度の割合を計算した後に主成分分析を行った(図 I -1)。土壌中のP形態は、肥培管理によって強く影響を受けていると考えられた。また、主成分 1 (PC1)は化学肥料と堆肥による合計のP施与量に影響を受けていた(図 I -1b)。化学肥料と堆肥によってP施肥を行いP含量が高い処理区では、PC1 が負の値を示しており、化学肥料由来のP施与が無い区では、PC1 が正の値となっていた(図 I -1a)。PC1 は多くの難利用性P画分と正の相関があり(主成分負荷量; 残渣-P、0.941; 濃塩酸-Po、0.893; 濃塩酸-Pi、0.886)、一方、可給態Pである $\text{NaHCO}_3\text{-Pi}$ や最も卓越した画分であった NaOH-Pi とは負の相関があった($\text{NaHCO}_3\text{-Pi}$; -0.947、 NaOH-Pi ; -0.953)。主成分 2 (PC2)は、堆肥の施与に関連しており、堆肥を施与している処理区ではPC2 が正の値を示していた(図 I -1a)。また、PC2 は $\text{H}_2\text{O-Pi}$ と正の相関を示した(主成分負荷量; 0.926)。

作物収量はNとPの両方、またはNかPの一方を施肥していない場合で低くなっていた(表 I -1)。このように、作物収量はPだけでなく、Nによっても大きな影響を受けてしまうため、我々は植物へのP利用性の指標として植物体中のP濃度を用いることとした。なお、植物体

中のP濃度は各可給態P濃度と有意な正の相関を示した(Truog-P: $r^2 = 0.92$, $P < 0.001$; Bray-2P: $r^2 = 0.84$, $P < 0.001$; $H_2O\text{-}Pi + NaHCO_3\text{-}Pi$: $r^2 = 0.90$, $P < 0.001$)が、 $H_2O\text{-}Pi$ とは明瞭な関係は得られなかった($P > 0.05$)。

I -3-2. 酵素活性

酸性ホスファターゼ活性(表 I -3)は、全C含量($r^2 = 0.37$, $P < 0.05$)及び全N含量($r^2 = 0.45$, $P < 0.01$) の増加に伴い有意に増加した。また酸性ホスファターゼ活性は、pHや $H_2O\text{-}Po$ 濃度とそれぞれ有意な負の相関を示した(pH: $r^2 = 0.60$, $P = 0.001$; $H_2O\text{-}Po$: $r^2 = 0.36$, $P < 0.05$)。しかしながら、酸性ホスファターゼ活性は、比較的利用性が高いと考えられる $NaHCO_3\text{-}Po$ とは明瞭な傾向を示さなかった($P > 0.05$)。アルカリホスファターゼ活性は全Cや全N含量、土壌pH、測定した3つの抽出法によって評価された可給態P濃度と明瞭な関係を示さなかった($P > 0.05$)。また、酸性ホスファターゼ活性とアルカリホスファターゼ活性の間にも明瞭な関係は得られなかった($P > 0.05$)。 $\beta\text{-D-グルコシダーゼ}$ 活性 (表 1-3)は、堆肥施与量 ($r^2 = 0.69$, $P < 0.001$)と土壌中の全C含量($r^2 = 0.71$, $P < 0.001$)の増加に伴って上昇していた。 $\beta\text{-D-グルコシダーゼ}$ 活性は、酸性ホスファターゼ活性とも有意な正の相関を示した($r = 0.692$, $P < 0.01$)。また、L-アスパラギナーゼ活性は、pH、全C含量、全N含量とは有意な相関を示さなかった($P > 0.05$)。

土壌微生物群集に対する土壌中の栄養素利用性は、細胞外酵素の資源配分モデルで評価できる可能性がある。そこで、C獲得系酵素($\beta\text{-D-グルコシダーゼ}$ 活性)に対するP獲得系酵素(酸性及びアルカリホスファターゼ活性)の比率と、C獲得系酵素($\beta\text{-D-グルコシダーゼ}$ 活性)に対するN獲得系酵素(L-アスパラギナーゼ活性)の比率を算出した(表 I -3)。 $\beta\text{-D-グルコシダーゼ}$ 活性に対する酸性及びアルカリホスファターゼ活性の比は、両者ともに処理区 1 で最も高い値を示した。 $\beta\text{-D-グルコシダーゼ}$ 活性に対するアルカリホスファターゼ活性の比は、Truog-P濃度の減少に伴って大きくなり($r^2 = 0.47$, $P < 0.01$; 図 1-2b)、他の抽出法によって評価された可給態P濃度とも有意な負の相関を示した(Bray-2P: $r^2 = 0.40$, $P < 0.05$; $H_2O\text{-}Pi +$

NaHCO₃-Pi: $r^2 = 0.30$, $P < 0.05$)が、Hedley法によるH₂O-Pi濃度とは明瞭な関係は得られなかった($P > 0.05$)。

作物体のP濃度は、土壌と試料採取の時期が異なるにもかかわらず、β-D-グルコシダーゼ活性に対するアルカリホスファターゼ活性の比と有意な負の相関を示した[(作物 P 含量) = $1.53 \times (\text{アルカリホスファターゼ活性の比})^{-1.24}$, $r^2 = 0.43$, $P = 0.011$]。β-D-グルコシダーゼ活性に対する酸性ホスファターゼ活性の比は、Hedley法でのH₂O-Pi濃度と有意な負の相関を示した($r^2 = 0.59$, $P = 0.001$; 図 I -2a)が、他の抽出法で評価した可給態P濃度とは有意な関係性は得られなかった($P > 0.05$)

作物体中のP含量は、β-D-グルコシダーゼ活性に対する酸性ホスファターゼ活性の比の減少に伴って増加する傾向にあったが、有意な関係性は得られなかった[(作物P含量) = $0.88 \times 0.80^{(\text{酸性ホスファターゼ活性の比})}$, $r^2 = 0.24$, $P = 0.073$]。また、β-D-グルコシダーゼ活性に対する酸性ホスファターゼ活性の比とβ-D-グルコシダーゼ活性に対するアルカリホスファターゼ活性の比の間には、明瞭な関係は得られなかった($P > 0.05$)。β-D-グルコシダーゼ活性に対するL-アスパラギナーゼ活性の比(表 I -3)は、N含量と有意な負の相関を示した($P < 0.01$; 図 I -2c)。また、L-アスパラギナーゼ活性に対する酸性及びアルカリホスファターゼ活性の比は、どちらも全N含量に対する可給態P濃度の比と明瞭な関係を示さなかった。

I -3-3. 土壌中のデヒドロゲナーゼ活性に対する P 添加の影響

土壌微生物群集のP要求状態を、C添加後のデヒドロゲナーゼ活性とC + P添加後のデヒドロゲナーゼ活性の比(デヒドロゲナーゼ活性比)を算出することで評価した。C添加後のデヒドロゲナーゼ活性に対してC + P添加後のデヒドロゲナーゼ活性が有意に高かったのは処理区 10 のみであった($P < 0.05$; 表 I -3)。つまり、処理区 10 ではC制限の次にP制限となっている可能性が示唆された。デヒドロゲナーゼ活性比は、Hedley抽出によるH₂O-Pi + NaHCO₃-Pi濃度と有意な負の相関を示した($r^2 = 0.36$, $P < 0.05$; 図 I -3a)が、Bray-2P濃度、Truog-P濃度、

Hedley法による H_2O -Pi濃度とは明瞭な関係を示さなかった($P>0.05$)。また、デヒドロゲナーゼ活性比は、Hedley法によって評価した H_2O -Pi+ NaHCO_3 -Pi濃度/全N含量とも有意な負の相関を示した(図 I -3b)。一方で、デヒドロゲナーゼ活性比と作物体P濃度との間には明瞭な関係は得られなかった($P>0.05$)。

I -4. 考察

化学的抽出法による P 利用性の評価

図 I -1aにみられるように、施肥管理は本研究で用いた黒ボク土におけるP形態およびP利用性に影響を及ぼした。Rubaek and Sibbesen (1995) と Motavalli and Miles (2002)では、生物に利用されやすいP画分と安定なP画分の量と割合が、長期の施肥管理によって大きな影響を受けることが示されている(Rubaek and Sibbesen (1995)ではデンマークのAskovにて 100 年間の施肥を受けている土壌を対象; Motavalli and Miles (2002)ではアメリカのコロンビアで 111 年間の施肥を受けている土壌を対象)。本研究では、比較的利用されやすく不安定なP画分(H_2O 抽出または NaHCO_3 抽出のP画分)は、他の安定的なP画分よりも施肥管理により大きく変動していた。 H_2O -Pi濃度は最も濃度の低い処理区と高い処理区の比が 11.7、 H_2O -Poは 29.7、 NaHCO_3 -Piは 18.1 であった(表 I -2)。一方で、最も小さな変動は残渣Pでみられ、最高値と最低値の比は 1.5 にとどまっていた。また、一般的には、conc. HCl-P画分のP濃度は安定的であると考えられるが、本研究では興味深いことに、conc. HCl-Po濃度は処理区間で 20 倍以上と大きな変動を示した。この画分は、ある程度は利用可能な有機態のPを含むと考えられている(Magid et al., 1996; Tiessen and Moir, 2008)。また、Hedley法によって評価されたP画分の処理間での変動の程度は、Truog-P濃度やBray-2P濃度の処理間での変動に比べて小さいものであった (Truog-P濃度の最高値/最低値は 106 倍、Bray-2Pは 52.6 倍)(表 I -2)。このことに関して、Negassa and Leinweber (2009)は、Hedley法は、施肥管理によるP画分の変化には

あまり鋭敏ではないと述べている。各抽出法で評価した可給態P濃度は、互いに強い正の相関を示した。また、Truog-P濃度や $\text{H}_2\text{O-Pi} + \text{NaHCO}_3\text{-Pi}$ 濃度は、 $\text{H}_2\text{O-Pi}$ 濃度とも弱いながらも有意な正の相関を持っていた。このような、化学的抽出法間での強い関係性は一般的に得られるものではなく、同じ土壌において同一の施肥管理を長期間行ってきた土壌を実験に用いたことにより得られたものであろう。この結果より、この黒ボク土におけるP利用性は、今回用いた化学的抽出法のいずれでも評価できていると判断し、資源配分モデルによるP利用性評価の有効性を検証した。

資源配分モデルによるP利用性評価の検証

β -D-グルコシダーゼ活性に対する酸性ホスファターゼ活性の比は $\text{H}_2\text{O-Pi}$ 濃度と、 β -D-グルコシダーゼ活性に対するアルカリホスファターゼ活性の比は各抽出法によって得られた可給態P濃度と、それぞれ有意な負の相関を示した(図 I -2)。これは土壌中でP利用性が低い場合には、微生物はC獲得系酵素よりもP獲得系酵素であるホスファターゼ生産に優先的に資源を配分していることを示しており、資源配分モデルを用いた微生物群集のP利用性の評価が可能であると推察される。またこれらの結果は、可給態P濃度の低下がホスファターゼ生産を高めるといった他の研究と一致する(Olander and Vitousek, 2000; Marklein and Houlton, 2012; Kunito et al., 2012a, 2012b)。ここで強調しておきたいのは、資源配分モデルは微生物の栄養状態を反映しているもので、植物の栄養素要求状態とは異なる可能性があるということである。しかし、試料採取時期が異なるにも関わらず、 β -D-グルコシダーゼ活性に対するアルカリホスファターゼ活性の比は、作物体P濃度と有意な負の相関を示した。このことは、資源配分モデルによって、土壌微生物と植物のP利用性の両方を評価できる可能性を暗示している。また、今回得られた明瞭な関係(図 I -2)は、同じ土壌を処理区ごとに異なる施肥管理で長期間維持した試料を選定して実験に用いたことにより初めて得られた結果であると考えられる。もし、異なった土壌を用いた場合には、今回の様な資源配分モデルと化学的

抽出法の明瞭な結果はおろか、化学的抽出法間での明瞭な関係性すら得られなかったかもしれない。

また、もう一点特筆すべき結果として、 β -D-グルコシダーゼ活性に対する酸性ホスファターゼ活性の比と β -D-グルコシダーゼ活性に対するアルカリホスファターゼ活性の比で、有意な負の相関が得られたP形態が異なる事が挙げられる(酸性ホスファターゼ活性の場合は H_2O -Pi濃度と、アルカリホスファターゼ活性の場合はTruog-P、Bray-2P、 H_2O -Pi+ $NaHCO_3$ -Pi濃度と負の相関を示した；図 I -2)。 H_2O -Pi濃度は土壤中Pの強度因子であり、短期の植物成長と良い関連性を示し、一方でBray法、Truog法、Olsen法によって評価されるPは容量因子であり、長期的な植物の成長を良く表現できることが、酸性土壌で報告されている (Ballard and Pritchett, 1975)。Fixen and Grove (1990)においても、Bray法、Truog法、Olsen法によって評価されるPは、強度因子というよりは容量因子であるとされている。そのため、今回実験にもちいた黒ボク土では、 β -D-グルコシダーゼ活性に対する酸性ホスファターゼ活性の比は土壤中のP強度因子に関連し、 β -D-グルコシダーゼ活性に対するアルカリホスファターゼ活性の比は容量因子に関連しているのかもしれない。土壌酵素は、腐植物質や粘土に吸着し、長期間保存されることが示唆されているため(Killham and Staddon, 2002)、アルカリホスファターゼ活性は長期間にわたる微生物のPへの応答を積分し、容量因子と相関を示したのかもしれない。あるいは、この違いは酸性ホスファターゼとアルカリホスファターゼの起源が異なる事に起因している可能性がある。アルカリホスファターゼは主に細菌が分泌し、酸性ホスファターゼは主に植物や菌類、細菌が分泌することが知られている(Nannipieri, 2011)。このことが、本研究において、酸性ホスファターゼ活性とアルカリホスファターゼ活性の間に相関が無い($P>0.05$)ことと関連しているのかもしれない。

日本の黒ボク土において、微生物のP制限が数例報告されている。Ino and Monsi (1964)やYoshida and Sakai (1963)では、土壌呼吸と糸状菌数が草地、畑地の黒ボク土においてP制限となっていることを示唆した。Nの無機化について調べた齋藤 (1990)の論文や、微生物活性を

森林の黒ボク土で調査したKunito et al. (2012b)でもP制限が報告されている。しかし、我々が今回用いた土壌では全て、Cによって微生物活性が制限されていた。そのため、C添加した試料に対するCとPを同時に添加した試料のデヒドロゲナーゼ活性比を測定することで、微生物のP添加への反応を評価した。その結果から、本研究では、処理区 10 においてのみ、C制限を緩和した後に微生物群集がPによって制限されている可能性が示唆された。また、デヒドロゲナーゼ活性比は、 $\text{H}_2\text{O}-\text{Pi} + \text{NaHCO}_3-\text{Pi}$ と有意な負の相関を示した(図 I -3a)。このことから、デヒドロゲナーゼ活性比は、ある程度は微生物群集のP利用性を評価していると推察された。しかし、その関係性は弱く(図 I -3a)、また、デヒドロゲナーゼ活性比は、 $\beta\text{-D-グルコシダーゼ}$ 活性に対するアルカリホスファターゼ活性の比($P > 0.05$)や、作物体P濃度($P > 0.05$)とは明瞭な関係を示さなかった。これは、用いた多くの試料でC制限の次にN制限が効いているため、P添加への応答がみられなかったためであると考えられる(未発表データ)。実際に処理区 1 や 2 ではP濃度が低いにもかかわらずN制限が効いていると考えられる(表 I -2)。これは、N利用性の指標となる $\beta\text{-D-グルコシダーゼ}$ 活性に対するL-アスパラギナーゼ活性の比(表 I -3、図 I -2c)が、処理区 1 及び 2 で最も高い値を示したためである。さらに、デヒドロゲナーゼ活性比は、 $\text{H}_2\text{O}-\text{Pi} + \text{NaHCO}_3-\text{Pi}$ 濃度/全N濃度の比とも有意な負の相関を示した。このことは、デヒドロゲナーゼ活性比がPとNのバランスによって影響を受ける可能性を示唆している。本実験では、P添加によってデヒドロゲナーゼ活性が低下してしまう区も存在した(図 I -3)。これは浸透圧によるストレスが原因であるかもしれない。さらに、施肥管理が異なりP施肥量が異なる土壌間で、Piを吸着するサイトの量に差が生じ、同じP量を添加していても実際のP利用性は異なっていた可能性がある。これは、NaOH-PがPを施肥している処理区としていない区で大きく異なる事(表 I -2)からも示唆される。また、栄養制限が、ある栄養素から他の栄養素へと移行する際には、閾值的な応答が起こるため(第II章)、デヒドロゲナーゼ活性比は微生物群集のP要求状態を評価する上では感度の良い指標としては使えないだろう。一方で、資源配分モデルは栄養素の要求状態に基づき徐々に変化するた

め、土壤微生物群集のP要求状態の評価に使用できると考えられる。このことは、C制限が緩和されてもP制限となっていなかった多くの土壌においてすら、微生物はホスファターゼ生産に優先的に資源を配分していた(表 I -3)ことから支持される。

I -5. 結論

β -D-グルコシダーゼ活性に対する酸性及びアルカリホスファターゼ活性の比は、各抽出法によって評価された H_2O -Pi濃度、可給態P濃度と有意な負の相関を示した。また、 β -D-グルコシダーゼ活性に対するL-アスパラギナーゼ活性の比は、全N含量と有意な負の相関を示した。この結果は、資源配分モデルが土壌中のPやNの利用性を判断する手法となり得ることを暗示している。また、資源配分モデルは微生物群集のP利用性だけでなく、植物に対するP利用性も表現できると推察された。一方で、デヒドロゲナーゼ活性比を用いた評価では、他の栄養素に制限されている微生物群集ではP利用性を正確に評価できない可能性が示され、鋭敏なP利用性の指標としては使用できないと考えられた。異なる土壌型においてP利用性を直接比較することは、同じ抽出法を用いていても困難な場合がある。日本では、同じ黒ボク土であるアロフェン質と非アロフェン質では、Truog-PやBray-Pの値は直接比較できないことが指摘されている(伊藤ら、2011)。このような問題において、資源配分モデルによるP利用性の評価は、化学的抽出法と組み合わせて使用することで、様々な土壌型、肥培管理において、より正確なP利用性の情報を提供すると考えられる。今後、他の土壌型においてもP利用性評価に資源配分モデルが有効であるのか検証する必要がある。

表 I-1. 施肥管理と作物収量、作物体の P 含量

処理区 番号	処理	堆肥施与量 (kg m ⁻² yr ⁻¹)	N 施与量 (g m ⁻² yr ⁻¹)	P 施与量 (g m ⁻² yr ⁻¹)	K 施与量 (g m ⁻² yr ⁻¹)	作物体収量 (kg m ⁻² yr ⁻¹)	作物体 P 含量 (g P kg ⁻¹)
1	施肥なし	0	0.0	0.0	0.0	0.76	0.4
2	NK	0	15.0	0.0	16.6	1.01	0.4
3	PK	0	0.0	10.9	16.6	1.06	2.6
4	NP	0	15.0	10.9	0.0	2.74	3.1
5	NPK	0	15.0	10.9	16.6	8.73	3.1
6	NPK (減肥)	0	7.8	10.0	5.6	4.49	3.1
7	NPK (多肥)	0	22.2	11.9	27.6	5.35	3.5
8	NPK (極多肥)	0	29.4	12.8	38.5	4.81	3.1
9	堆肥 2t	2	7.2	1.0	11.0	0.83	0.9
10	NK + 堆肥 2t	2	22.2	1.0	27.6	1.58	0.9
11	PK + 堆肥 2t	2	7.2	11.9	27.6	1.27	3.9
12	NP + 堆肥 2t	2	22.2	11.9	11.0	5.02	3.1
13	NPK + 堆肥 2t	2	22.2	11.9	27.6	5.12	3.5
14	NPK + 堆肥 4t	4	29.4	12.8	38.5	5.22	3.9

処理区 2-8 は化学肥料として施肥した養分、9-14 は化学肥料と堆肥として施肥した養分の合計の値を表示した。

堆肥施与量は 1m²換算で表示しており、10a 当たりで 2t あるいは 4t 施肥している計算になる。

作物体の収量と P 含量は 2009 年 10 月に収穫したキャベツのものを表示した。また、P 含量は乾燥重量当たりで表示した。

表 I-2. 供試土壌の土壌特性(平均±S.D.)

処理区 番号	P 形態															
	pH(H ₂ O)	C	N	Trueg-P	Bray-2P	H ₂ O-Pi	H ₂ O-Po	NaHCO ₃ -Pi	NaHCO ₃ -Po	NaOH-H-Pi	NaOH-Po	1M HCl-Pi	Conc. HCl-Pi	Conc. HCl-Po	Residual-P	Total P
(mg P kg ⁻¹)																
(g kg ⁻¹)																
1	7.4±0.1	34.3±1.5	2.3±0.1	1.30±1.14	9.37±0.54	1.39±1.38	6.83±2.68	18.0±3.3	35.1±1.7	303±10	260±40	43.2±5.2	185±29	43.3±21.4	160±7	1060±10
2	6.2±0.1	36.4±5.7	2.5±0.4	5.00±1.37	20.1±6.1	1.65±1.79	3.85±1.55	23.4±10.9	27.0±7.1	384±44	318±87	43.7±6.6	213±24	18.9±19.5	121±14	1150±140
3	7.1±0.0	31.2±3.5	2.1±0.2	92.2±12.3	251±25	5.14±0.92	6.15±1.70	281±17	85.6±74.0	1600±140	587±130	166±24	326±5	20.7±13.6	149±10	3230±290
4	6.4±0.3	33.8±0.7	2.4±0.0	87.5±3.2	312±18	4.11±1.56	3.91±2.41	256±14	37.7±36.6	1840±170	632±153	150±10	374±54	2.03±3.52	129±9	3390±160
5	6.4±0.0	34.4±1.3	2.5±0.1	89.5±19.8	284±23	2.73±0.89	3.92±1.47	233±29	74.3±68.2	1720±220	736±138	145±13	279±16	21.1±19.7	164±14	3370±480
6	6.5±0.2	39.4±2.8	2.9±0.2	102±5	284±34	7.12±1.28	1.96±1.84	229±10	39.7±6.8	1630±70	826±102	153±21	283±2	55.1±19.3	174±11	3400±120
7	6.0±0.4	34.8±0.9	2.6±0.0	92.9±17.8	339±85	2.63±1.30	3.71±0.29	249±43	26.9±4.5	1850±180	858±55	136±21	279±16	n.d.	165±2	3560±270
8	5.5±0.1	36.9±0.5	2.6±0.1	123±15	493±35	4.01±2.19	1.81±3.07	317±25	126±27	2190±80	883±149	222±51	264±26	5.43±9.41	168±27	4170±230
9	7.1±0.1	38.2±1.4	2.7±0.1	4.53±0.38	16.2±3.6	5.26±3.23	0.23±0.35	31.1±7.4	23.5±13.2	414±30	258±41	46.6±8.3	177±5	13.1±9.59	163±8	1130±10
10	6.1±0.1	43.7±1.7	3.2±0.1	10.9±2.8	40.9±5.1	4.19±0.66	1.06±1.52	17.6±2.2	36.1±2.0	455±33	259±24	41.3±1.1	150±4	21.4±1.3	150±6	1140±60
11	7.0±0.0	38.8±1.8	2.8±0.1	138±16	340±4	16.3±1.97	1.94±1.88	318±14	82.0±46.3	1700±70	878±167	215±24	278±21	7.56±6.76	165±3	3650±200
12	6.2±0.0	43.7±0.4	3.1±0.0	115±15	415±25	9.34±0.42	n.d.	285±21	36.2±13.5	1800±80	989±26	194±27	231±11	6.34±9.33	184±6	3730±120
13	6.3±0.1	43.4±0.8	3.2±0.1	93.0±3.0	320±8	5.38±1.58	5.02±1.90	256±4	81.7±38.9	1540±80	829±224	151±6	351±55	8.6±15.0	146±9	3340±230
14	6.1±0.1	49.3±1.0	3.7±0.1	120±13	389±48	7.39±4.39	0.41±0.45	278±17	119±12	1800±30	962±17	198±8	135±13	23.5±17.7	179±13	3790±60

全 P 濃度は Hedley 法によって求めた各形態の P 濃度の総計で示した。

n.d.はその形態の Pi 濃度がその形態の全 P 濃度よりも大きかったため、算出できなかったことを示している。

表 I -3 土壌酵素活性と C 添加に対する C + P 添加のデヒドロゲナーゼ活性の比(デヒドロゲナーゼ活性比)

		各活性の比											
処理区	酸性ホスファターゼ活性 ($\mu\text{mol } p\text{-nitrophenol hr}^{-1} \text{ g}^{-1}$)	アルカリホスファターゼ活性 ($\mu\text{mol } p\text{-nitrophenol hr}^{-1} \text{ g}^{-1}$)	β -D- グルコシダーゼ活性 ($\mu\text{mol } p\text{-nitrophenol hr}^{-1} \text{ g}^{-1}$)	L-アスパラギナーゼ活性 ($\mu\text{mol NH}_4^+ \cdot \text{N hr}^{-1} \text{ g}^{-1}$)	デヒドロゲナーゼ活性 (+C)	デヒドロゲナーゼ活性 (+C+P)							
番号					($\mu\text{g INTF hr}^{-1} \text{ g}^{-1}$)	($\mu\text{g INTF hr}^{-1} \text{ g}^{-1}$)	酸性ホスファターゼ / β -D-グルコシダーゼ	アルカリホスファターゼ / β -D-グルコシダーゼ	L-アスパラギナーゼ / β -D-グルコシダーゼ	デヒドロゲナーゼ活性比			
1	0.80±0.02	1.54±0.36	0.08±0.01	1.41±0.06	179±37	184±26	9.47±1.13	17.8±2.5	16.5±1.7	1.03±0.06			
2	1.02±0.21	0.81±0.16	0.12±0.04	1.39±0.05	151±23	158±39	9.04±3.50	6.85±1.39	12.3±4.3	1.04±0.12			
3	0.88±0.09	0.83±0.29	0.17±0.04	1.26±0.33	233±37	234±41	5.38±1.09	5.03±1.74	7.50±0.94	1.00±0.04			
4	1.30±0.18	1.00±0.43	0.20±0.03	2.06±0.11	228±17	229±18	6.49±0.95	4.87±1.43	10.4±2.3	1.01±0.05			
5	1.93±0.37	1.19±0.62	0.26±0.01	2.04±0.08	336±17	262±27	7.36±1.26	4.52±2.36	7.78±0.22	0.78±0.11			
6	1.56±0.27	1.70±0.14	0.24±0.04	2.35±0.08	372±18	330±44	6.63±1.29	7.19±0.63	10.0±1.4	0.89±0.15			
7	2.17±0.31	1.02±0.14	0.26±0.05	1.96±0.03	282±24	270±29	8.40±1.00	4.07±1.28	7.73±1.76	0.96±0.04			
8	2.53±0.62	1.59±0.22	0.29±0.02	1.53±0.05	235±22	209±15	8.55±1.56	5.45±0.97	5.24±0.36	0.90±0.13			
9	1.15±0.07	1.47±0.06	0.28±0.04	2.05±0.07	330±42	330±90	4.21±0.73	5.35±0.70	7.46±0.87	0.99±0.15			
10	2.22±0.16	1.21±0.47	0.29±0.01	1.89±0.02	294±49	356±29	7.73±0.37	4.21±1.65	6.58±0.15	1.22±0.09			
11	1.51±0.11	1.59±0.11	0.30±0.01	1.94±0.08	394±36	400±47	5.13±0.60	5.39±0.29	6.57±0.11	1.02±0.09			
12	1.94±0.42	1.57±0.15	0.39±0.08	1.80±0.24	431±70	417±42	5.03±0.35	4.16±0.79	4.71±0.32	0.97±0.06			
13	1.55±0.24	1.17±0.11	0.40±0.03	1.65±0.03	431±40	397±62	3.90±0.36	2.98±0.49	4.17±0.27	0.92±0.07			
14	2.83±0.36	1.59±0.32	0.55±0.01	1.99±0.15	594±55	596±87	5.17±0.69	2.90±0.63	3.64±0.28	1.00±0.08			

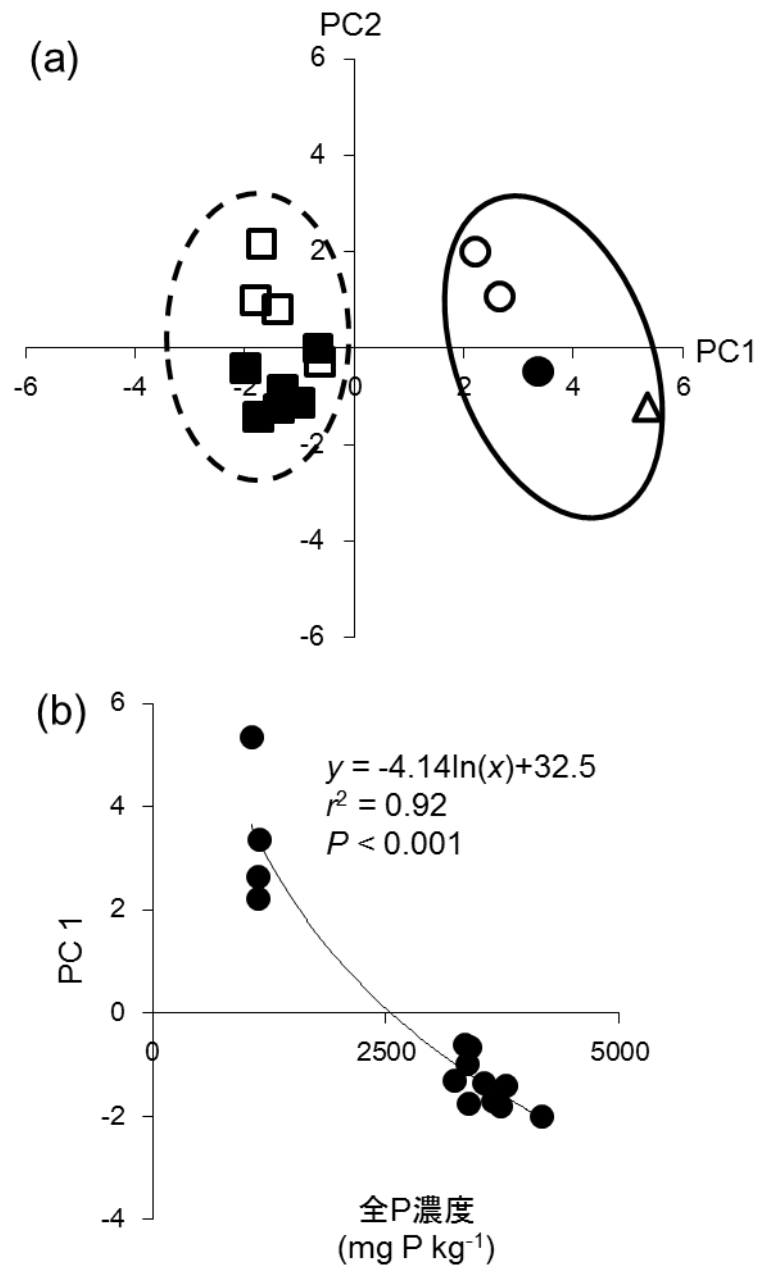


図 I -1. Hedley 法によって評価した全 P 濃度に対する各形態 P 濃度の割合の主成分分析 (a)、とその主成分得点 1 と全 P 濃度の関係 (b)

PC1 は主成分得点 1 を PC2 は主成分得点 2 を示す。それぞれ、 Δ =施肥なし; \bullet = 化学肥料を施与しているが P を施肥していない区; \circ =堆肥のみ施与している区と堆肥と化学肥料を施与しているが化学肥料では P を施肥していない区; \blacksquare =化学肥料で P を施与している区, \square =堆肥と化学肥料を施与しており、かつ P を化学肥料として施与している区を示している。実線の楕円は化学肥料由来の P を施与していない処理区を囲んでおり、点線の楕円は化学肥料由来の P を施与している処理区を囲んでいる。PC1 の寄与率は 55.7%、PC2 の寄与率は 14.6%であった。

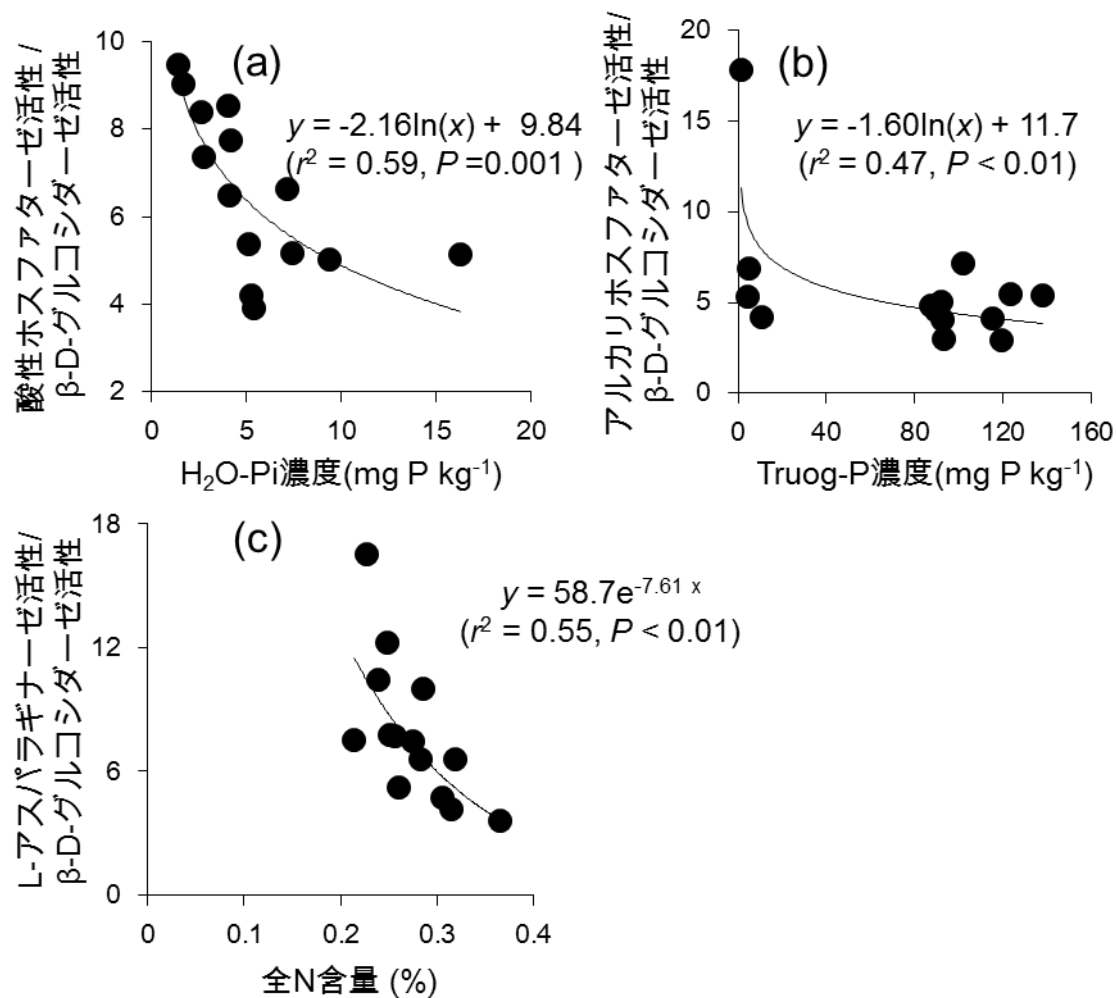


図 I -2. 土壌中の H_2O -Pi濃度と β -D-グルコシダーゼ活性に対する酸性ホスファターゼ活性の比の関係 (a)、Truog-P濃度と β -D-グルコシダーゼ活性に対するアルカリホスファターゼ活性の比の関係 (b)、全N含量と β -D-グルコシダーゼ活性に対するL-アスパラギナーゼ活性の比の関係 (c)

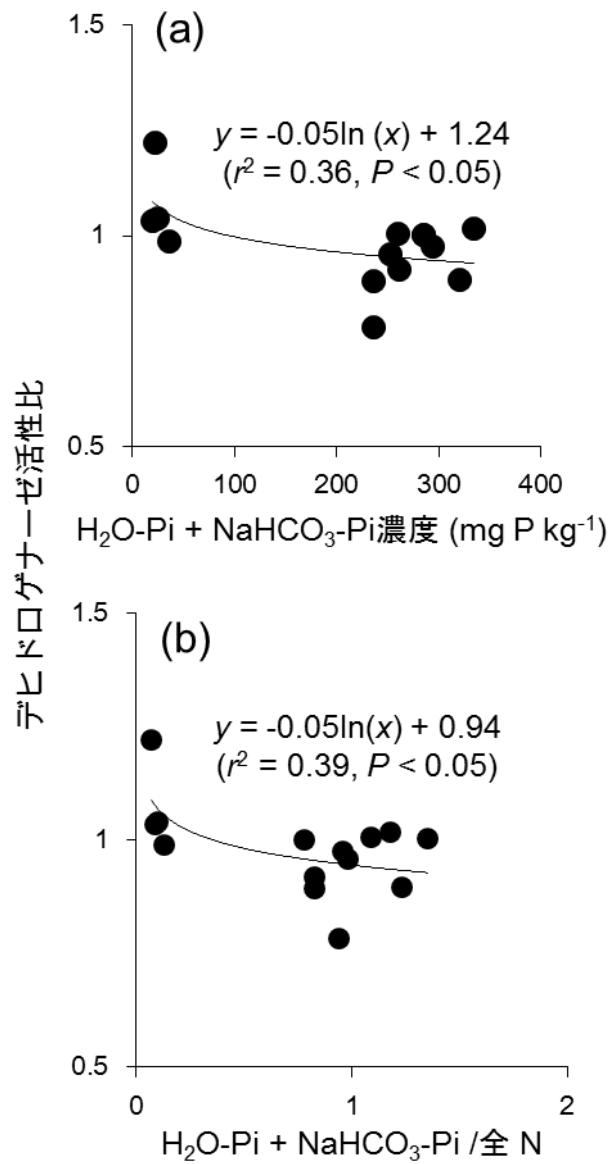


図 I -3. C添加時のデヒドロゲナーゼ活性に対するC + P添加時のデヒドロゲナーゼ活性の比 (デヒドロゲナーゼ活性比)とH₂O-Pi+NaHCO₃-Pi濃度の関係 (a)、デヒドロゲナーゼ活性比と全N含量に対するH₂O-Pi+NaHCO₃-Pi濃度の比の関係 (b)

第Ⅱ章

微生物と植物の土壌中K制限に対する感受性の差異について

Ⅱ-1. 背景

窒素(N)、リン(P)、カリウム(K)は植物の成長にとって最も重要な栄養素である(Brady and Weil, 2002; Havlin et al., 2014)。Kは植物体の浸透圧調整や、師部における物質輸送、酵素の活性化、タンパク質合成、光合成など生化学的及び物理的なプロセスに関わっている(Marschner, 2002)。また、干ばつや塩害、昆虫による病害などの環境ストレスへの適応にも役割を担っている(Brady and Weil, 2002; Römheld & Kirkby, 2010)。植物は多量のKを土壌から吸収(おおよそN吸収量と同等)する。農地の場合、作物は収穫され少量の植物残渣しか土壌に戻されないため、作物のK欠乏を防ぐためには施肥によるKの供給が必要である(Brady and Weil, 2002)。土壌中のKの形態は、Kイオン、交換態K、鉱物の間隙に固定された形で存在する非交換態のK、鉱物中のKの4つに大きく分類できる(Brady and Weil, 2002; Havlin et al., 2014)。この中でもKイオンと交換態Kとして存在するKが最も利用性が高いと考えられている。また微生物バイオマスKも、土壌中のKの挙動に貢献している可能性がある(Anderson & Domsch, 1980; Perrott et al., 1990; Lolenz et al., 2010)。Roberts (1968) と Díaz-Raviña et al. (1995)は、微生物バイオマスKは土壌中の交換可能なKの重要な源であることを指摘している。このように、土壌微生物群集におけるKの状態は、土壌中のKの挙動や作物の生産性に大きく関与していると考えられる

このような背景にも関わらず、筆者が知る限りでは土壌微生物のK制限の報告は2報にとどまっている。Ino and Monsi (1964) は、日本の草地土壌において、有機物の分解をKが制限している可能性を見出した。Kaspari et al. (2008)は、熱帯の森林において、セルロースの微生物分解がKによって制限されている可能性を報告した。

本研究では、農地の黒ボク土(長期にわたってK施肥をせずに耕作をしている土壤で、植物がK欠乏症を示している土壤も含む)を対象として、K添加による微生物活性への影響を評価することで、微生物群集におけるKの状態を調査した。また、作業仮説として、植物がK制限を示している土壤では、K添加が微生物活性を上昇させると予想した。

II-2. 試料と方法

II-2-1. 土壤試料と施肥管理

第 I 章の土壤の一部(表 II-1)を本実験にも供した。NP 区では 70 年以上にわたって K 施肥を全く受けておらず、NP+堆肥区では、NP 区に比べると比較的少ない量の K が施肥されている。2008 年に行った施肥管理の詳細を表 II-1 に示した。

化学肥料を施肥している区では、Nは $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、Pは $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、KをKClで施与している。堆肥区とNP+堆肥区では 1m^2 あたり 2kgの堆肥を施与している。土壤採取の後、キャベツ(*Brassica oleracea* L. var. *capitata*)を栽培し、2009 年 10 月に収穫した。キャベツ体中のK濃度は、硫酸と過酸化水素による分解の後、原子吸光分光光度計(ContrAA 300; Analytik Jena, Jena, Germany)で分析した。

II-2-2. 土壤分析

土壤pHと全炭素及び窒素含量は、第 I 章と同一である。交換態Kは、pH 7.0 の 1M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 溶液により、土壤：抽出液 = 1 : 20 の割合で抽出した。抽出液中のK濃度は、原子吸光分光光度計(ContrAA 300; Analytik Jena, Jena, Germany)を用いて測定した。データは全て乾土換算で記載した。偽反復の問題を避けるため、処理区間の差は検定しなかった。

II-2-3. 土壌中の微生物活性に対する K 添加の影響評価

微生物へのK添加の影響を評価するために、K添加後と無添加時のデヒドロゲナーゼ活性を比較した。デヒドロゲナーゼ活性は、全微生物の活性を表す指標とされている(Tate, 2000)。3連で採取した土壌それぞれを2つに分け、22℃で前培養を一週間行った後、一方にはC+Nを添加、もう一方にはC+N+Kを添加した。C、N、Kの添加量は微生物バイオマスの化学量論比に基づき、Cをグルコースとして(12.0 mg C g^{-1} 乾土)、Nを NH_4Cl として(1.20 mg N g^{-1} 乾土)、KをKClとして(0.82 mg K g^{-1} 乾土)添加している。添加後にさらに3日間22℃で培養を行った後、von Mersi and Schinner (1991)の方法に基づきiodonitrotetrazolium chlorideを基質としてデヒドロゲナーゼ活性を測定した。K添加に対するデヒドロゲナーゼ活性への影響を評価するために、C+N添加のデヒドロゲナーゼ活性で、対応するC+N+K添加のデヒドロゲナーゼ活性の値を除いて、その反応比を評価した(Kunito et al., 2012b)。なお本実験で用いた土壌では、微生物はC、Nの順に制限されていた。そこでCとNを添加した上で、K添加に対する微生物の応答を調査した。

II-3. 結果と考察

土壌中の K 濃度と作物体の K 欠乏

土壌中の全C含量と全N含量はNP+堆肥区で最大値を示した(表 II-2)。交換態Kの濃度は $0.32\text{--}0.51 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ であり、1994-1997年にわたって調査された日本の農地の平均値の $1.21 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ を大きく下回っていた(小原・中井, 2003)。交換態Kの濃度は、堆肥区でK施肥量がNPK区よりも少なく、NP+堆肥区と同等であるにもかかわらず、最大値を示した(表 II-2)。交換態K濃度とK施肥量との間には有意な相関は得られなかった。この矛盾は、堆肥区での植物によるKの吸収量が、NPK区やNP+堆肥区と比較して少ないことによると考えられる(表 II-1)。また、土壌採取時期が当該年度の施肥の前であること、前年に施肥した分は、作

物によって吸収されてしまった後であることも関係していると考えられる。作物のK含量はNP区とNP+堆肥区で低値を示し、NP区ではその値が 0.5%と、キャベツのK欠乏症の閾値(1.2%; 岐阜県農林水産局, 2005)と一般植物の閾値(1.4%; 間藤, 2001)を下回った。加えて、このNP区ではキャベツや他の作物において厳しいK欠乏が生じていた(未発表データ)。この区では作物体がK欠乏であったにもかかわらず、NPK区やNP+堆肥区などの他の区に比べて交換態K含量が低いわけではなかった(表 II-2)。これは、表 II-2 に示した交換態K濃度が、施肥以前に採取したサンプルを分析して得たものであり、実際に作物が生育している時期のK利用性を反映しているわけではないことと関係しているのかもしれない。

K 添加に対する土壌微生物の応答

NP+堆肥区において、C+N添加に比したC+N+K添加時のデヒドロゲナーゼ活性の比が最大値を示した(Student's paired t-test, $P = 0.06$; 図 II-1、表 II-2)。この区は最も低い交換態K濃度を示し、微生物に対するKの利用性は他の区に比べて低かったものと考えられる。しかし、我々の予想に反し、最も低いK濃度を示したNP+堆肥区においてすら、KはCとNに次いだ第3制限因子であった。さらに、植物がK欠乏の症状を示したNP区においては、微生物はCとNを加えてもK制限を示さなかった。今回実験に供した土壌は、作物を育てた後で、かつ施肥を行う前に採取したものであるため、すでにKが作物に吸収されており、実際にキャベツを育てた時期よりもK制限を呈しやすい土壌であったと考えられる。そのような極めて低い土壌中Kの利用性に関わらず、微生物はKよりもCやNを要求した。上述したように、微生物のK制限を示した報告は筆者の知る限り 2 例のみである。Stotzky and Norman (1961a, b)によると、C源としてグルコースを添加した場合の土壌呼吸は、まずNに制限され、次にP、そしてSに制限されており、Kでは制限されていなかった。また、Powers and Salute (2011)では、Pや亜鉛(Zn)の添加はマイクロコズム内のリターからのCO₂放出を増加させたが、Kにはそのような効果はなかった。また、低地の熱帯雨林での一次生産はP、N、Kに制限されている

が、微生物バイオマスはPのみに制限されており、植物と微生物を制限している栄養素が異なることが報告されており(Turner & Wright, 2014)、我々の結果と一致した。本研究で土壌微生物がK制限でなかったのは、植物に比べ微生物はKをあまり要求しないためかもしれない。植物体中のK/N比は、キャベツで 0.5(岐阜県農林水産局、2005)、トウモロコシで 0.6、ダイズで 0.6、コムギで 0.9、トマトで 1.2、アルファルファで 0.8 である(Brady and Weil, 2002)。一方、細菌でのその比は 0.18 (n=10)と比較的小さい(Anderson and Domsch, 1980)。また、菌類においては平均 0.86 (n=14)と植物のそれに匹敵してはいるが、その変動係数は 60%と大きく(Anderson and Domsch, 1980)、少なくともある種の菌類ではKの要求性が植物よりかなり小さいと推察される。このため本研究に供した土壌では、Kの要求性が低い微生物が優占していた可能性がある。あるいは、微生物はKを土壌成分から溶解して得ている可能性もある。実際に多くの細菌と菌類が、土壌に固定されたKや難溶性のKを溶かし、可給態の形に変換することが知られている(Meena et al., 2014)。

II-4. 結論

本研究の結果より、土壌中の微生物はK利用性の極めて低い土壌においても、KよりもC、Nといった栄養素に制限されている可能性が示唆された。また、植物がK制限されるような、長期間K施肥を行っていないような土壌でも、微生物を制限する因子はCやNであり、制限因子が植物と微生物との間で異なる可能性も示された。

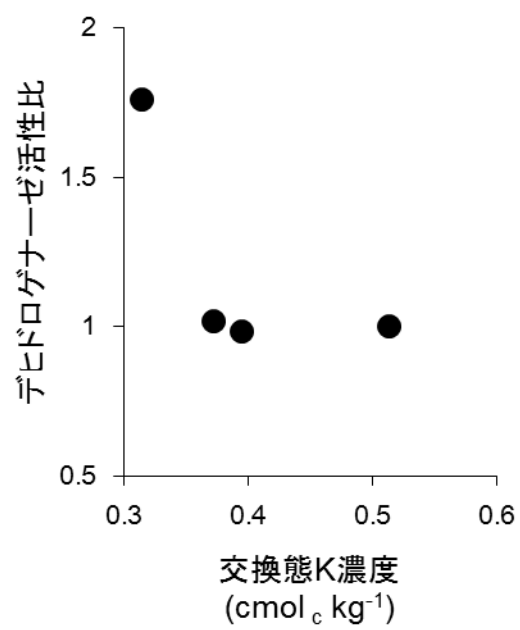
表Ⅱ-1 本研究で用いた土壌の施肥量および収穫された作物の K 含量、K 吸収量

処理区名	作物体 K 吸収量			
	K (g m ⁻² yr ⁻¹)	N (g m ⁻² yr ⁻¹)	P (g m ⁻² yr ⁻¹)	作物体 K 含量 (%)
NP	0	15	10.9	0.5
NPK	16.6	15	10.9	2.4
堆肥	11	7.2	1	2.2
NP + 堆肥	11	22.2	11.9	1.7

NP、NPK 区での施肥量は化学肥料由来の施肥量を示し、NP+堆肥区では化学肥料と堆肥の両方からの養分施与量の合計を表示している。

表 II -2. 供試土壌の化学特性とデヒドロゲナーゼ活性及びデヒドロゲナーゼ活性比 (平均値±SD)

処理区名	交換態 K					デヒドロゲナーゼ活性 (C + N)		デヒドロゲナーゼ活性比	
	pH (H ₂ O)	C (%)	N (%)	(cmol _c kg ⁻¹)	(μg INTF g ⁻¹ hr ⁻¹)	(μg INTF g ⁻¹ hr ⁻¹)	(μg INTF g ⁻¹ hr ⁻¹)		
NP	6.4±0.3	3.37±0.07	0.24±0.00	0.39±0.05	579±68	582±247		0.98±0.29	
NPK	6.4±0.0	3.44±0.13	0.25±0.01	0.37±0.07	618±134	613±67		1.02±0.22	
堆肥	7.1±0.1	3.82±0.14	0.27±0.01	0.51±0.04	417±46	419±78		1.00±0.09	
NP + 堆肥	6.2±0.0	4.37±0.04	0.31±0.00	0.32±0.05	491±113	850±185		1.76±0.35	



図Ⅱ-1. 交換態 K 濃度とデヒドロゲナーゼ活性比の関係

第Ⅲ章

施肥管理の異なる黒ボク土における酵素遺伝子を標的とした

微生物群集構造解析と酵素活性、養分量との関係性

Ⅲ-1. 背景

リン(P)、窒素(N)、炭素(C)は生物の必須元素である。Pの特性及びその資源の世界的状況、日本におけるP資源の有効利用対策の必要性は緒言に述べた通りである。他方、Nは他の必須元素と比べ、過剰に存在した場合の生態系への悪影響が大きいことが知られている(Brady and Weil, 2002)。陸上生態系へのNの流入経路は、主にマメ科植物に共生する細菌などによるN固定と工業的なハーバー・ボッシュ法によるものである。微生物によるN固定量は、かつては脱窒量と釣り合いが取れていたが、人類の農耕によって 1860 年頃の 15Tgから 33Tgに増えているとされている(Galloway et al., 2003)。注目すべきはハーバー・ボッシュ法による陸上へのN流入であり、1960 年代からその量が爆発的に増加し、毎年 100Tgを超えるNが大気から固定されている(Galloway et al., 2003)。また、ハーバー・ボッシュ法で固定されたNの内 85%が肥料として使用されており、地下水のN汚染の主な起源は農地であるといわれている(Galloway et al., 2003)。さらに、その水を幼児や家畜動物が飲用することで、メトヘモグロビン血症などの危険な障害が引き起こされることが懸念されている(Brady and Weil, 2002)。Cは植物や土壌藻類による光合成で土壌に流入し、大半が微生物や土壌動物によって分解され、わずかに土壌に蓄積する(Horwath, 2007)。このようなプロセスによって、土壌は大気の3倍ものCを含有しており、Cの貯蔵庫としての役割を果たしている(Brady and Weil, 2002)。近年、大気中の二酸化炭素(CO₂)濃度は、400ppmを観測するまでに至り(Monastersky, 2013)、人為起源の温暖化による気温上昇を 2℃以下に抑える目標とした 2℃ターゲット(Randalls, 2010)の達成すら危ぶまれている。このような背景から、C貯蔵庫としての土壌中のCの貯蔵・安定化は、CO₂濃度の上昇抑制のためにも重要であると考えられる。農業生態

系においては毎年土壌中のCの2.5%が減少しているとされるため(Brady and Weil, 2002)、その抑制についても考えなければならない。そのためには、まず、生態系内におけるCバランスと循環に影響するプロセスや要因を把握する必要がある(Brady and Weil, 2002)。このような背景から、農地において、土壌中の様々な元素の適切かつ有効的な利用が求められている。

土壌微生物は細胞外酵素を放出することで有機物を分解するため(金沢、1994)、土壌中の栄養素の循環には微生物が大きな役割を果たしている(Dilly, 2010)。先に述べた、農地での適切な養分管理の必要性からも、微生物を介した有機物からの養分供給の制御技術の開発が期待されている(Sakurai et al., 2008)。その実現のためには、微生物群集の機能に作用し有機物分解に寄与する要因と、その機序の理解を深めなければならない。しかしながら、現在まで、土壌中の微生物群集構造と機能面である酵素活性、養分利用性の三者の関係性については、一貫した結果は得られていない。また、その三者の関係性を同時に評価した例も少ない。

本研究では、土壌中の元素循環、有機物分解にとって重要であると考えられるホスファターゼ、プロテアーゼ、グルコシダーゼの3系統の酵素活性とその酵素をコードする機能遺伝子に着目し、異なる肥培管理を受けた土壌において酵素活性と酵素産生微生物群集の構造を調査することでその関係性を評価した。さらに、土壌中の養分量も測定し、3者の関係性を総合的に評価した。

III-2. 試料と方法

III-2-1. 土壌試料と施肥管理

第I章と同じ圃場より2012年に再度土壌を採取した。試料採取は施肥と作物定植後の10月に行った。土壌試料は、大きな植物遺体がある場合はそれを取り除いて、2mmの篩を通

した後良く均質化した。その後、試料の一部は風乾後再度 2mm の篩に通してから室温で保存し、残りは酵素活性測定用と DNA 抽出用に-20℃で保存した。

化学肥料、堆肥の施肥は年に 1 回ずつ行っており、試料採取前の施肥は 2012 年 7 月に堆肥を、8 月に化学肥料を施肥している。試料番号と処理区別の施肥の種類及び 2011 年の施肥量を表Ⅲ-1 に示した。化学肥料を施肥している区では、Nは $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、Pは $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、KをKClで施与している。堆肥処理区では稲わら堆肥を施与しており、稲わら堆肥は、乾物換算で 0.36%のN、0.048%のP、0.55%のKを含んでいる。これらの施肥管理は 1967 から 2011 年の間同じで、その年に育てる作物種によって施肥量をわずかに変えているだけである(与える比率は同じである)。堆肥施与区では 10a 当たり 2t (1m^2 に換算すると 2 kg)、堆肥 4t 施与区では 10a 当たり 4t (1m^2 に換算すると 4 kg)の堆肥を施与している。NPK(多肥)では稲わら堆肥 2kg 分に匹敵する NPK 分を増じて、上記と同様の化学肥料のみで与えている。NPK(減肥)では 2kg 分を減じて、NPK(極多肥)では 4kg 分を増じて施肥している。このような背景から、我々は 2011 年の P 施肥量がこれまでの累積 P 施肥量を反映していると考えた。

Ⅲ-2-2. 化学分析

全C及び全N含量は、元素分析装置を用いて分析した(Thermo Finnigan Flash EA1112; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)。Truog-PはTruog (1930)に従って、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ により pH 3.0 に調整した 0.001 M H_2SO_4 をもちいて土壌：溶液 = 1：200 の割合で抽出した。抽出液中のPi濃度はモリブデン青法によって定量した(Murphy and Riley, 1962)。

Ⅲ-2-3. 酵素活性

本研究では P 獲得酵素として酸性ホスファターゼとアルカリホスファターゼ、N 獲得酵素としてプロテアーゼ、C 獲得酵素として β -D-グルコシダーゼの 4 種の加水分解酵素の活性を測定した。酸性及びアルカリホスファターゼと β -D-グルコシダーゼ活性の測定法は第

I 章と同じである。プロテアーゼは、ポリペプチドを加水分解する位置によってエキソペプチダーゼ、エンドペプチダーゼに分かれ、その中でも至適 pH と異化活性によって分類される(Vranova et al., 2013)。本研究では Kandeler (1995)に従い、カゼインを基質として 0.05 M のトリス緩衝液中で測定を行った。また、データは平均値を乾土当たりの活性で示した。

III-2-4. 土壌からの DNA 抽出と PCR-DGGE 解析

土壌からの DNA の抽出は Fast DNA SPIN kit for soil(Qbiogene, Carlsbad, California, USA)を用いて、Qbiogene 社の推奨する手順通りに行った。また、黒ボク土は DNA 抽出が他土壌より困難であることが知られているため、DNA 抽出時にオートクレーブ処理をした 20%スキムミルク溶液を 80 μ L 添加した(森本ら、2008)。抽出した DNA は分析時まで-20 $^{\circ}$ Cの冷凍庫で保存した。

DNA ポリメラーゼに KOD-Plus- (東洋紡績、大阪、日本)を用い、一般細菌群集には 16S rDNA、糸状菌群集には 18S rDNA、アルカリホスファターゼ産生細菌群集には *phoD*、中性金属プロテアーゼ産生細菌には *npr*、 β -グルコシダーゼ産生微生物群集には Family 1 β -glucosidase genes を標的として、土壌から抽出した DNA を用い PCR 増幅した。

16S rDNA、18S rDNAは、森本ら(2008)の方法に従い、それぞれV6-V8 可変領域、V1-V3 可変領域を増幅した。*phoD*遺伝子の増幅は、Sakurai et al. (2008)で作成されたプライマーを用いて、鋳型DNAが 1 μ L、10 \times PCR buffer for KOD-Plus-が 5 μ L、2mMのdNTPが 5 μ L、25mM MgSO₄を 1.6 μ L、20mg ml⁻¹のBovine Serum Albumin溶液 (BSA溶液)を 1 μ L、1UのKOD-Plus-を混合し、最終的に滅菌超純水を用いて 50 μ Lに調整した反応液組成で行った。増幅条件は初回のDNAの解離を 94 $^{\circ}$ Cで 2 分行い、その後、解離を 94 $^{\circ}$ C15 秒、アニーリングを 68 $^{\circ}$ C、45 秒で 35 サイクル行った(2 ステップPCR)。*npr*遺伝子の増幅にはBach et al. (2001)が設計したプライマーを用い、鋳型DNAが 1 μ L、10 \times PCR buffer for KOD-Plus-が 5 μ L、2mMのdNTPが 5 μ L、25mM MgSO₄を 2.4 μ L、20mg ml⁻¹ BSA溶液を 1 μ L、1UのKOD-Plus-を混合し、最終的に滅菌超純水を用い

て 50 μ l に調整した反応液組成を用いた。増幅条件は初回の DNA の解離を 94 $^{\circ}$ C で 2 分行い、その後、解離を 94 $^{\circ}$ C で 15 秒、アニーリングを 50 $^{\circ}$ C で 30 秒、伸長反応を 68 $^{\circ}$ C で 30 秒を 40 サイクル行った。 β -グルコシダーゼ産生微生物群集が持つ Family 1 β -glucosidase genes を標的とした PCR には Li et al. (2013) の設計したプライマーを用い、反応液組成は鋳型 DNA が 1 μ l、10 \times PCR buffer for KOD-Plus-が 5 μ l、2mM の dNTP が 5 μ l、25mM MgSO₄ を 2 μ l、20mg ml⁻¹ BSA 溶液を 1 μ l、1U の KOD-Plus-を混合し、最終的に滅菌超純水を用いて 50 μ l に調整した。増幅条件は初回の DNA の解離を 94 $^{\circ}$ C で 2 分行い、その後、解離を 94 $^{\circ}$ C で 15 秒、アニーリングを 50 $^{\circ}$ C で 30 秒、伸長反応を 68 $^{\circ}$ C で 1 分を 30 サイクル行った。得られた PCR 産物は全て QIAGEN 社の QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands) を用いて精製した後、分析まで -20 $^{\circ}$ C で保管した。

変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (Denaturing gradient gel electrophoresis : DGGE 法) は Dcode システム (BioRad Laboratories, Hercules, California, USA) を用いて行った。16S rDNA、18SrDNA を標的とした DGGE 分析は、森本ら (2008) の方法に従って行った。アルカリホスファターゼ産生細菌群集 (PhoD 産生細菌群集) の DGGE 分析については、Wang et al. (2013) の泳動条件 (40% アクリルアミド/ビス溶液 37.5 : 1 溶液をもとに 10% ゲル濃度で 45-75% の変性剤濃度勾配、60 $^{\circ}$ C、80V で 16 時間泳動) を用いた。中性金属プロテアーゼ産生細菌群集 (Npr 産生細菌群集) の分析は、泳動条件を 40% アクリルアミド/ビス溶液 37.5 : 1 溶液をもとに 10% ゲル濃度で、25-50% の変性剤濃度勾配で 60 $^{\circ}$ C、80V、16 時間の泳動を行った。 β -グルコシダーゼ産生微生物群集 (Family 1 β -glucosidase genes) の分析では 40% アクリルアミド/ビス溶液 37.5 : 1 溶液をもとに 8% ゲル濃度、30-60% の変性剤濃度勾配で 60 $^{\circ}$ C、80V で 11 時間の泳動を行った。本研究で行った DGGE 分析では、全て電気泳動後にゲルを SYBR Green I で染色し、撮影を行ってバンドイメージを得た。得られたバンドイメージは、位置と強度 (0-5 段階で評価) を視確認で判定し、数値化した。

III-2-5. 統計処理

変数間の関係の強さを評価するために回帰分析とスピアマンの順位相関係数を用いた。変数間の関係性の解析は SSRISTAT 2010 (Social Survey Research Information, Tokyo, Japan)を用いて行った。また、土壌中の微生物群集構造に対する肥培管理の影響を評価するため、バンドイメージの数値をクラスター解析によって評価した。クラスター解析及び Shannon の多様度指数(H')の解析には R を用いた(R Core Team, 2013)。クラスター解析には R のパッケージである R コマンダー(Fox, 2005)、多様度指数の解析には Vegan (Oksanen et al., 2013)を用いた。

III-3. 結果

III-3-1. 土壌特性

土壌特性を表III-1 に示した。全C含量及び全N含量は、堆肥施与量と有意な正の相関を示した(C: $r=0.813$, $P<0.001$; N: $r=0.781$, $P<0.001$)。Truog-P濃度は処理区 11、13 で最高値を示し、1、2、9、10 で最低値を示した。この最高値ですら、1994 年から 1997 年にわたって日本の農地土壌を調査した小原・中井(2004)の報告する、日本の農地におけるTruog-P濃度の平均値($n = 3,192$; 262mg P kg^{-1})よりもかなり低い値であった。また、Truog-P濃度はP施与量と有意な正の相関を示した($r = 0.887$, $P < 0.001$)。

III-3-2. 酵素活性

本研究で調査した 4 種の酵素活性を表III-2 に記載した。酸性ホスファターゼ活性とアルカリホスファターゼ活性は全C含量と有意な正の相関を示した(酸性ホスファターゼ: $r^2 = 0.66$, $P < 0.001$; アルカリホスファターゼ: $r^2 = 0.32$, $P < 0.05$)。また、両者は堆肥由来のP施与量とも有意な正の相関を示した(酸性ホスファターゼ: $r = 0.748$, $P < 0.01$; アルカリホスファターゼ: $r = 0.716$, $P < 0.01$)。一方で、酸性ホスファターゼ活性とアルカリホスファターゼ

活性の間には明瞭な関係はみられなかった($P > 0.05$)。酸性及びアルカリホスファターゼ活性は両者とも、Truog-P濃度とは明瞭な関係を示さなかった($P > 0.05$)。

プロテアーゼ活性は、全C、N含量と堆肥量の増加に伴って有意に上昇していた(全C含量: $r^2 = 0.52, P < 0.01$; 全N含量: $r^2 = 0.64, P < 0.001$; 堆肥: $r = 0.878, P < 0.001$)。また、 β -D-グルコシダーゼ活性や、酸性及びアルカリホスファターゼ活性ともそれぞれ強い正の相関を示した(β -D-グルコシダーゼ活性: $r^2 = 0.81, P < 0.001$; 酸性ホスファターゼ活性: $r^2 = 0.44, P < 0.01$; アルカリホスファターゼ活性: $r^2 = 0.55, P < 0.001$)。

β -D-グルコシダーゼ活性は、全C含量及び堆肥施与量と有意な正の相関を示した(全C含量: $r^2 = 0.52, P < 0.01$; 堆肥施与量: $r = 0.716, P < 0.001$)。さらに、酸性及びアルカリホスファターゼ活性ともそれぞれ有意な正の相関を示した(酸性ホスファターゼ活性: $r^2 = 0.50, P < 0.01$; アルカリホスファターゼ活性: $r^2 = 0.33, P < 0.05$)。

第I章で示したように、土壤中の栄養素間の相対的な利用性は、それらの養分を獲得するための細胞外酵素活性の比で評価できる可能性がある。そこで本研究においても、 β -D-グルコシダーゼ活性に対する酸性及びアルカリホスファターゼ活性の比と、 β -D-グルコシダーゼ活性に対するプロテアーゼ活性の比を算出し、対応する養分濃度との関係性を評価した(表III-2)。 β -D-グルコシダーゼ活性に対するアルカリホスファターゼ活性の比は、Truog-P濃度と有意な負の相関を示した(図III-1)。一方で β -D-グルコシダーゼ活性に対する酸性ホスファターゼ活性の比は、Truog-Pの上昇とともに減少する傾向がみられたが、有意ではなかった($r^2 = 0.24, P = 0.07$)。 β -D-グルコシダーゼ活性に対するプロテアーゼ活性の比は、全N含量、堆肥施与量と有意な正の相関を示した(全N含量: $r^2 = 0.35, P < 0.05$; 堆肥: $r = 0.843, P < 0.01$)。また、この比は、*phoD*のDGGE解析におけるバンドパターンの多様度指数と有意な負の相関を示した($r^2 = 0.66, P < 0.001$)。

III-3-3. 微生物群集構造

16S rDNA と 18S rDNA を標的とした PCR-DGGE 法によって得られたバンドイメージから、クラスター解析によって微生物群集構造を評価した(図Ⅲ-2)。細菌群集では、全体的な養分の施肥量の多い処理区でクラスターを形成するような傾向が見られたものの、明瞭な関係ではなかった(図Ⅲ-2a)。菌類群集では、処理区 1(施肥なし)で異なるクラスターに分かれた(図Ⅲ-2b)。また完全ではないが、P 施肥量が同程度の処理区が、同じクラスター内に集まっていた。*phoD*、*npr*、Family 1 β -glucosidase genes を保有する微生物群集のクラスター解析の結果を図Ⅲ-3 に示した。*phoD* 遺伝子を持つ細菌の群集構造は、P 施肥が無い処理区と極端に少ない処理区で他の処理区と異なるクラスターに区分された(図Ⅲ-3a)。また、*npr* 遺伝子を持つ細菌群集の構造は N 施肥の有無やその程度では特徴づけられなかったが、P 施肥がない、または極端に少ない処理区で他の処理区と異なるクラスターに分かれた(図Ⅲ-3b)。 β -グルコシダーゼ産生微生物群集は、化学肥料由来の N 施肥を行っている処理区と行っていない処理区でクラスターが分かれ、さらに化学肥料による N 施与を行っている処理区内では、堆肥施与の有無で異なるクラスターに区分されていた(図Ⅲ-3c)。

Ⅲ-3-4. 各微生物群集における Shannon の多様度指数(H')

16S rDNA、18S rDNA、*phoD*、*npr*、Family 1 β -glucosidase genes の DGGE 解析のバンドパターンから算出した Shannon の多様度指数を表Ⅲ-3 に示した。16S rDNA の多様度指数は、土壌特性や酵素活性とは明瞭な関係を示さなかった($P > 0.05$) が、極端に P 施肥が少ない区を除いた場合には多様度指数と Truog-P 濃度との間に有意な負の相関がみられた($r^2 = 0.44$, $P < 0.05$; 図Ⅲ-4a)。18S rDNA の多様度指数は Truog-P 濃度と有意な負の相関を示した($r^2 = 0.31$, $P < 0.05$; 図Ⅲ-4b)。

phoD の多様度指数は、堆肥由来の P 施与量とアルカリホスファターゼ活性の上昇に伴って有意に減少した(図Ⅲ-5)。*npr* の多様度指数は、プロテアーゼ活性や、プロテアーゼが獲得すると考えられる C や N の濃度とは相関を示さなかった($P > 0.05$)。しかし、極端に P 施

肥が少ない処理区を除くと、P 施与量と有意な負の相関を示した ($n = 10$; 図III-4c)。Family 1 β -glucosidase genes の多様度指数は、C 含量、堆肥施与量、 β -D-グルコシダーゼ活性とそれぞれ有意な負の相関を示した(図III-6 a, b; 堆肥施与量: $r = -0.750$; $P < 0.001$)。また、Family 1 β -glucosidase genes の多様度指数は、*phoD* の多様度指数の増加に伴って増大する傾向にあったが、有意な相関は得られなかった($P = 0.06$)。

III-4. 考察

16S rDNA と 18S rDNA による微生物群集構造

図III - 2aに示したように、16S rDNAによる細菌群集構造は、肥培管理や養分利用性等による明瞭な影響を受けていなかった。Wallis et al. (2010)では、Oxisolにおいて 16S rDNAを対象とした細菌群集構造を評価しているが、その正準対応分析(CCA)による結果では細菌群集構造はP濃度やpHによって影響を受けることを示唆した。本研究では、全処理区では関係がみられなかったものの、P施肥が極端に少ない区を除けば、Truog-P濃度の増加とともに多様性が有意に低下した($r^2 = 0.44$, $P < 0.05$; 図III-4a)。

他方 18S rDNAを対象としたPCR-DGGEプロファイルのクラスター解析では、同様のP施肥量を持つもの同士で同じクラスターに集まる傾向があった(図III-2b)。また、18S rDNAの多様度指数はTruog-P濃度とともに減少した($r^2 = 0.31$ $P < 0.05$; 図III-4b)。Bao et al. (2013) では、日本の 9 地域における黒ボク土 ($n = 138$) において、本研究と同じプライマーを用いて 18S rRNA遺伝子を標的としたPCR-DGGE解析を行っている。その結果、本研究と同様に Truog-P濃度と 18Sの多様度指数の間に負の相関が見られた。試料数が 14 点と少なく Truog-P濃度の範囲もBao et al. (2013)に比べると狭い本研究においても同様の結果が得られたことから、黒ボク土におけるP利用性と菌類群集の関係性は注目に値する。

PhoD 生産菌の微生物群集構造

PhoD 生産菌の微生物群集構造は P 施肥が無い、または非常に少ない区(処理区 1、2、9)で異なるクラスターに区分された(図Ⅲ-3a)。また、それらの処理区では β -D-グルコシダーゼ活性に対するアルカリホスファターゼ活性の比が比較的大きく(表Ⅲ-2)、ホスファターゼの生産に優先的に資源を配分していると考えられた。Tan et al.(2013)では、約 42 年間の連用圃場の Gleysol で、P 施肥の程度(低投入区、中投入区、高投入区)によって PhoD 生産菌の群集構造が異なり、ホスファターゼ活性は低投入区>中投入区>高投入区の順になることを報告した。Sakurai et al. (2008)では、日本の黒ボク土の堆肥施与と化学肥料施与土壤の根圏と非根圏で、PhoD 生産菌の群集構造とアルカリホスファターゼ活性を評価し、両者の関係性の存在と、肥培管理によって PhoD 生産菌の群集構造が異なることを示唆した。一方で本研究では、群集構造とアルカリホスファターゼ活性の間には明瞭な関係はみられなかった。この結果の不一致は、Sakurai et al. (2008)、Tan et al. (2013)の研究に比べて本研究の肥培管理の処理区数が多い[Sakurai et al. (2008)では 2 処理、Tan et al. (2013)では 3 処理]ため、関係性が複雑になっているからかもしれない。他方、本研究では、PhoD 生産菌の多様性指数が堆肥由来のリン施肥量とアルカリホスファターゼ活性の両方にそれぞれ有意な負の相関を示した(図Ⅲ-5)。Tan et al. (2013)でも、同様に多様性の低下とともに活性の上昇がみられていた。このことは、PhoD 生産菌においては堆肥施与が多様性低下を誘導し、比較的少ない微生物種が高い酵素活性に寄与している可能性を示唆している。筆者が知る限りアルカリホスファターゼ遺伝子の多様性とアルカリホスファターゼ活性との関係を調査しているのは Tan et al. (2013)と本研究のみである。本研究のように様々な施肥管理を用いた土壤で得られた、PhoD 生産菌の H' とアルカリホスファターゼ活性の間関係性が、異なる土壤で行った Tan et al. (2013)の結果と一致するということは非常に興味深い。しかし Tan et al. (2013)では、アルカリホスファターゼ活性が土壤中の P_i 濃度の減少に伴って増加する傾向を示したと報告し、 P_i による活性の阻害を考察している。一方、本研究ではそのような傾向は見られず($P > 0.05$)[化学肥料区のみでもそのような傾向は見られなかった($P > 0.05$)]、代わりに、アルカ

リホスファターゼ活性が堆肥由来の P 施与量と正の相関を示した($r = 0.716$, $P < 0.001$)。これは、有機物施与によってホスファターゼの分泌が誘導された、もしくは堆肥とともにアルカリホスファターゼ産生細菌とホスファターゼが投入されたためであるのかもしれない(Nannipieri et al., 2011)。アルカリホスファターゼ活性の変動要因に関する叙述は、他の文献間でも異なるが、有機物施与にともなう酵素活性の変化は複雑であるため、その原因究明は非常に難しい(Nannipieri et al., 2011)。このような背景において、本研究と Tan et al. (2013)におけるアルカリホスファターゼ産生細菌群集の多様性低下に伴う活性の増加という共通点は、注目に値する。

Npr 産生菌の微生物群集構造

Sakurai et al. (2007)では、本研究と同じプライマーを用いて、化学肥料区と堆肥区の根圏と非根圏で*Npr*産生細菌群集の評価を行っている。その結果、施肥管理によって*Npr*産生細菌の群集構造とプロテアーゼ活性が異なる事を示した。しかし本研究では、堆肥施与区と化学肥料区で群集構造に大きな違いは認められなかった(図Ⅲ-3b)。本研究では、クラスター解析による群集構造の評価で、P施肥が極端に少ない区と他の処理区で異なるクラスターに区分された。この結果の差異は、Sakurai et al. (2007)ではTruog-P濃度が施肥前でも $87\text{--}88\text{mg P kg}^{-1}$ という土壌を用いていたのに対し、本研究では、 $5.55\text{--}98.2\text{mg P kg}^{-1}$ と濃度が低い土壌を対象に研究を行ったことに起因する可能性がある。実際に、P濃度が極端に低い処理区である 1、2、9、10 を除いてクラスター解析を行うと、化学肥料区と堆肥施与区でクラスターが 2 分される結果となった。さらに、その 2 分されたクラスター間ではプロテアーゼ活性が有意に異なっており($P < 0.05$)、Sakurai et al. (2007)の結果と同様の傾向を示した。これらの結果は、P濃度の程度が*Npr*産生細菌群集の構造に大きく影響する可能性を示唆している。また前述したように、*Npr*産生細菌の多様度指数は、極端にP施肥が少ない処理区を除くと、Truog-P濃度と有意な負の相関を示した(図Ⅲ-4c)。また、このTruog-P増加に

伴う多様性の低下は、極端にP施肥が少ない区を除いた場合には、16S rDNAで評価される細菌群集においても確認された。このことは、Npr産生細菌群集が、自身が持つ*npr*遺伝子に直接関わりの無い栄養素によって、影響を受けている可能性を示唆している。活性自身は、全C、N含量といったプロテアーゼによるタンパク質の分解によって得られる栄養素と正の相関を示すにもかかわらず、多様性指数は、活性や、プロテアーゼが獲得すると考えられるCやNの濃度とは相関を示さなかった($P > 0.05$)。このことは、本研究の土壌では、可給態P濃度が細菌群集全体の多様性を変化させると共に、Npr産生細菌群集にも強く影響を与えたことを暗示している。

β-グルコシダーゼ産生微生物の群集構造

β-グルコシダーゼ産生微生物の群集構造は、化学肥料によるN施肥を行っていない処理区と他の処理区とで異なるクラスターに区分された(図III-3c)。同じ土壌を用いた第I章の実験では、本研究で他と異なるクラスターに分かれた処理区1、3、9、11ではpHが他の区より高くなっていた。推察の域を出ないが、本研究ではN肥料として $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を施肥しているため、化学肥料由来のN施与区でpHが低下し、*β*-グルコシダーゼ産生微生物群集構造に影響を与えたのかもしれない。また、*β*-グルコシダーゼ産生微生物群集の多様性は、土壌中の全C含量と*β*-D-グルコシダーゼ活性の両者と負の相関を示した(図III-6)。この結果は、土壌中のC含量が多いと*β*-グルコシダーゼ産生微生物群集の多様度が低下し、比較的少ない微生物種により高い*β*-D-グルコシダーゼ活性が支えられてることを示唆している。*β*-グルコシダーゼ産生微生物群集に関する報告は、本研究と同じプライマーを使用しているLi et al. (2013)と、異なるプライマーを用いているMoreno et al. (2012)とがある。Li et al. (2013)では、堆肥化過程の*β*-グルコシダーゼ産生微生物群集を評価しているため、土壌でFamily 1 *β*-glucosidase genes を生産する微生物群集を評価した研究は、筆者が知る限りでは本研究が初めてである。Li et al. (2013)では、堆肥化過程で、*β*-D-グルコシダーゼ活性の増加とともに

に出現する DGGE バンドが存在し、その中には好熱性で嫌気条件下で堆肥分解に関わる *Clostridium thermocellum* の近縁種が存在していた。本研究では、これらの β -D-グルコシダーゼ活性、 β -グルコシダーゼ産生微生物群集の関係に加え、C 含量も含めた三者の関係性が示唆された。この結果は、このプライマーが土壌中においても β -グルコシダーゼ産生微生物群集を評価できる可能性を示している。

III-5. 結論

PhoD 生産菌の微生物群集構造は、P 施肥が無い、または非常に少ない区で他の区と異なった。さらに、PhoD 生産細菌の多様性は、堆肥由来の P 施与量の増加に伴って減少し、同時にアルカリホスファターゼ活性とも負の相関を示した。このことから、PhoD 生産菌においては、堆肥施与によって多様性が低下し、比較的少ない微生物種が高いホスファターゼ活性に寄与している可能性が示唆された。また、 β -グルコシダーゼ産生微生物群集も同様の傾向を示した。他方、Npr 産生細菌の群集構造は、極端にリン施肥が少ない処理区を除くと、Truog-P 濃度と有意な負の相関を示した。またこの傾向は、極端にリン施肥が少ない区を除いた場合の 16S rDNA においても確認された。このことは、Npr 産生細菌群集が、自身が持つ機能遺伝子に直接関わりの無い栄養素によって影響を受けている可能性を示している。このように、土壌中の微生物群集と機能、養分利用性との関係性は、異なる機能を持つ微生物群集によってその様相が異なることが示唆された。

表Ⅲ-1. 供試土壌の施肥管理と土壌特性

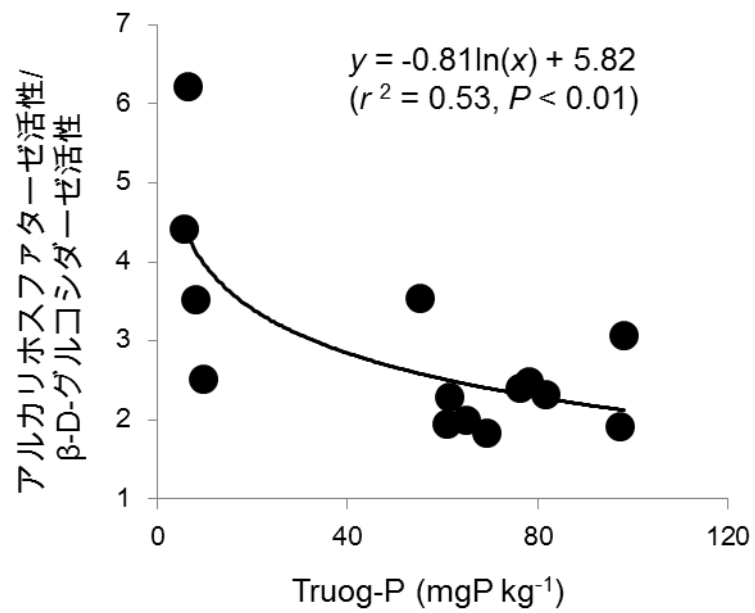
処理番号	処理	施肥量				土壌の理化学性		
		堆肥 (kg m ⁻² yr ⁻¹)	N (g m ⁻² yr ⁻¹)	P (g m ⁻² yr ⁻¹)	K (g m ⁻² yr ⁻¹)	C 含量 (g kg ⁻¹)	N 含量 (g kg ⁻¹)	Truog-P 濃度 (mg P kg ⁻¹)
1	施肥なし	0	0.0	0.0	0.0	33.0	2.37	6.54
2	NK	0	10.0	0.0	8.3	30.6	2.28	5.55
3	PK	0	0.0	4.4	8.3	32.0	2.41	55.2
4	NP	0	10.0	4.4	0.0	32.6	2.49	61.5
5	NPK	0	10.0	4.4	8.3	30.8	2.44	61.1
6	NPK(減肥)	0	2.8	3.4	5.6	35.2	2.72	65.0
7	NPK(多肥)	0	17.2	5.4	19.3	33.8	2.70	69.5
8	NPK(極多肥)	0	24.4	6.4	30.3	34.6	2.71	76.5
9	堆肥	2	7.2	1.0	11.0	34.1	2.68	8.01
10	NK + 堆肥 2t	2	17.2	1.0	19.3	42.1	2.98	9.58
11	PK + 堆肥 2t	2	7.2	5.4	19.3	37.4	2.86	98.2
12	NP + 堆肥 2t	2	17.2	5.4	11.0	41.3	3.16	78.3
13	NPK + 堆肥 2t	2	17.2	5.4	19.3	38.6	3.02	97.5
14	NPK + 堆肥 2t	4	24.4	6.4	30.3	46.2	3.66	81.7

表Ⅲ-2. 供試土壌の微生物特性

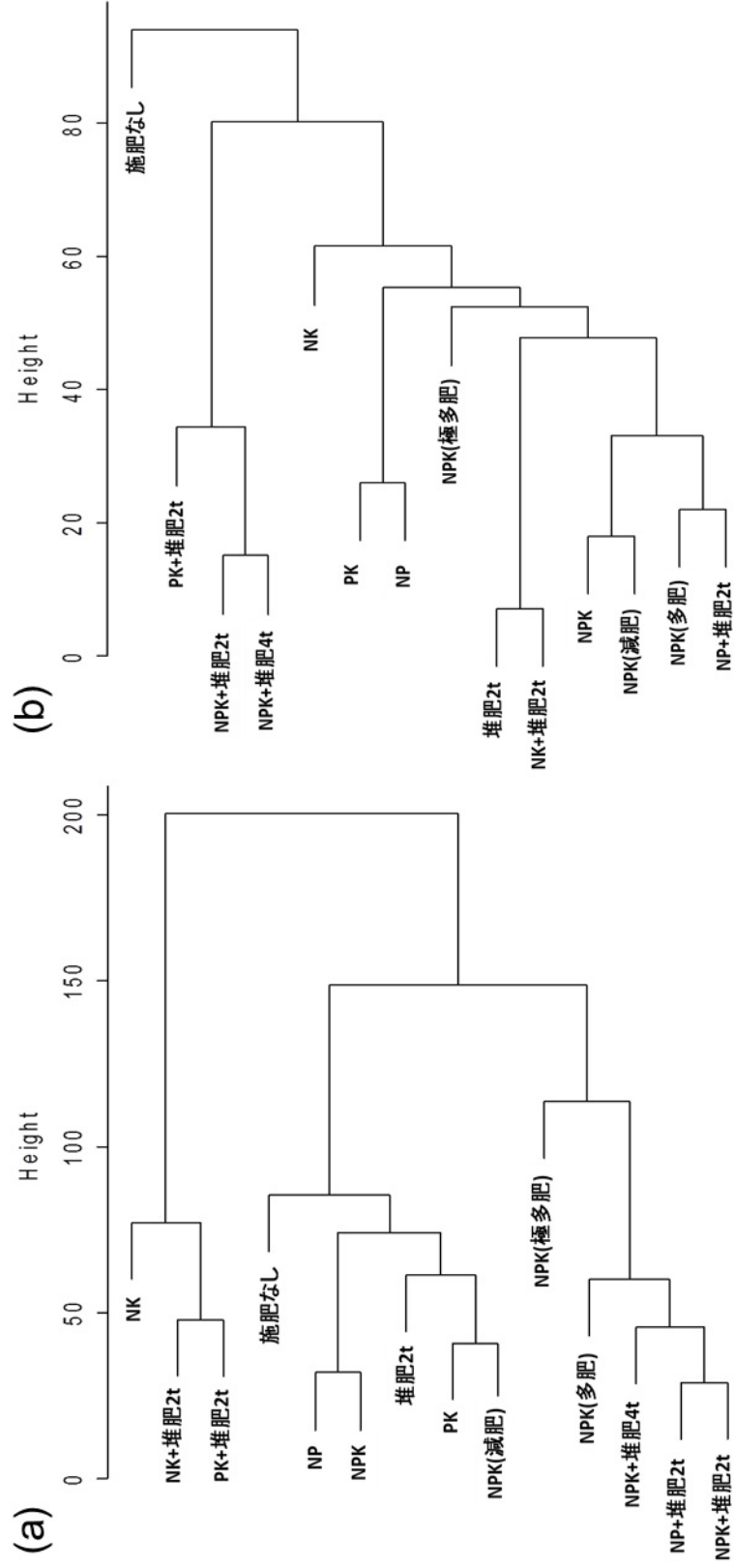
処理番号	アルカリホスファターゼ活性 ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{hr}^{-1}$)	酸性ホスファターゼ活性 ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{hr}^{-1}$)	β -D - グルコシダーゼ活性 ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{hr}^{-1}$)	プロテアーゼ活性 ($\mu\text{g tyr g}^{-1} 2\text{hr}^{-1}$)	アルカリホスファターゼ/ β -D-グルコシダーゼ	酸性ホスファターゼ/ β -D-グルコシダーゼ	プロテアーゼ/ β -D-グルコシダーゼ
1	1.16	0.93	0.19	18.3	6.22	4.97	98.3
2	0.60	1.51	0.14	6.40	4.41	11.1	46.9
3	0.80	1.04	0.23	37.2	3.53	4.57	164
4	0.63	1.78	0.27	46.9	2.29	6.51	172
5	0.63	2.03	0.32	41.0	1.94	6.25	126
6	0.67	1.09	0.33	55.7	1.99	3.27	167
7	0.73	1.08	0.40	57.7	1.84	2.72	145
8	0.64	1.78	0.26	12.0	2.41	6.71	45.4
9	1.21	1.64	0.34	98.4	3.52	4.78	287
10	0.72	2.55	0.29	60.2	2.51	8.93	211
11	1.19	1.88	0.39	117	3.07	4.83	300
12	1.04	2.73	0.42	82.9	2.48	6.5	197
13	1.05	2.76	0.55	125	1.91	5.01	227
14	1.39	3.33	0.60	144	2.33	5.57	241

表Ⅲ-3. 各微生物群集の Shannon の多様度指数(H')

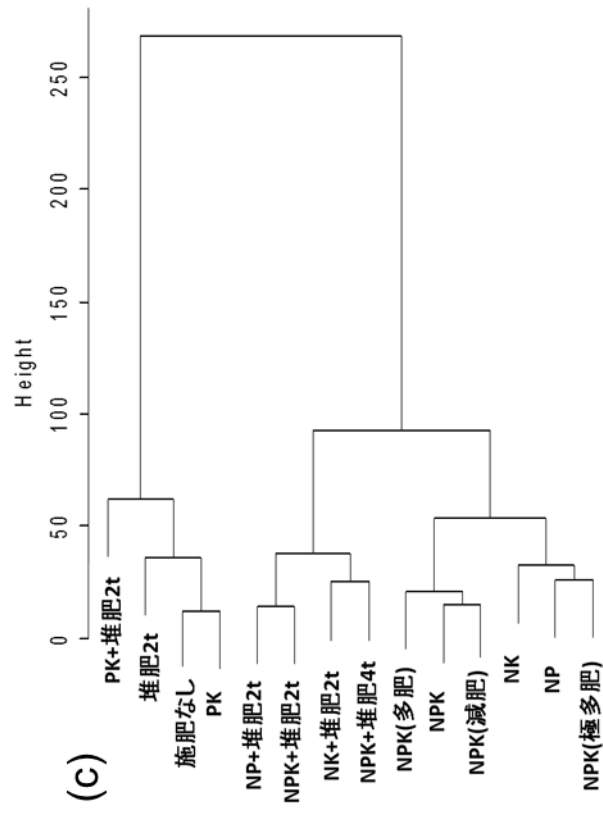
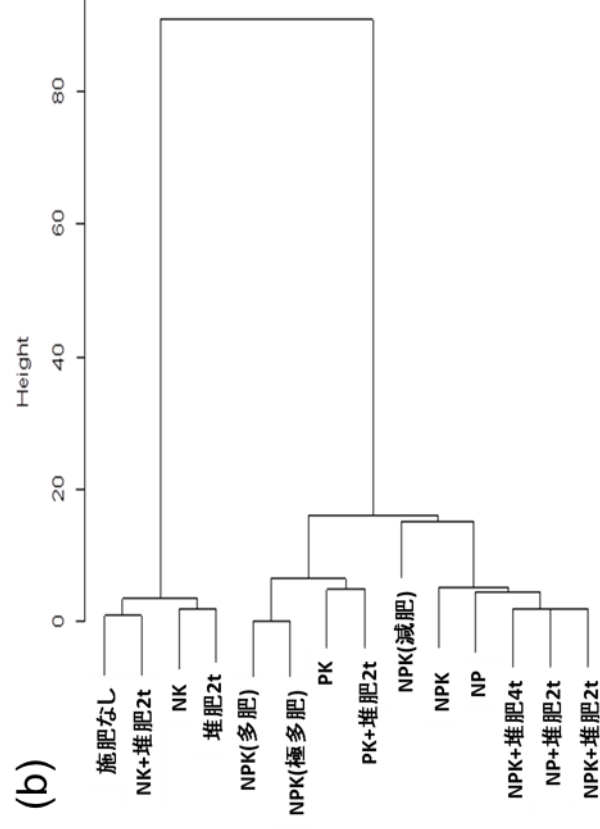
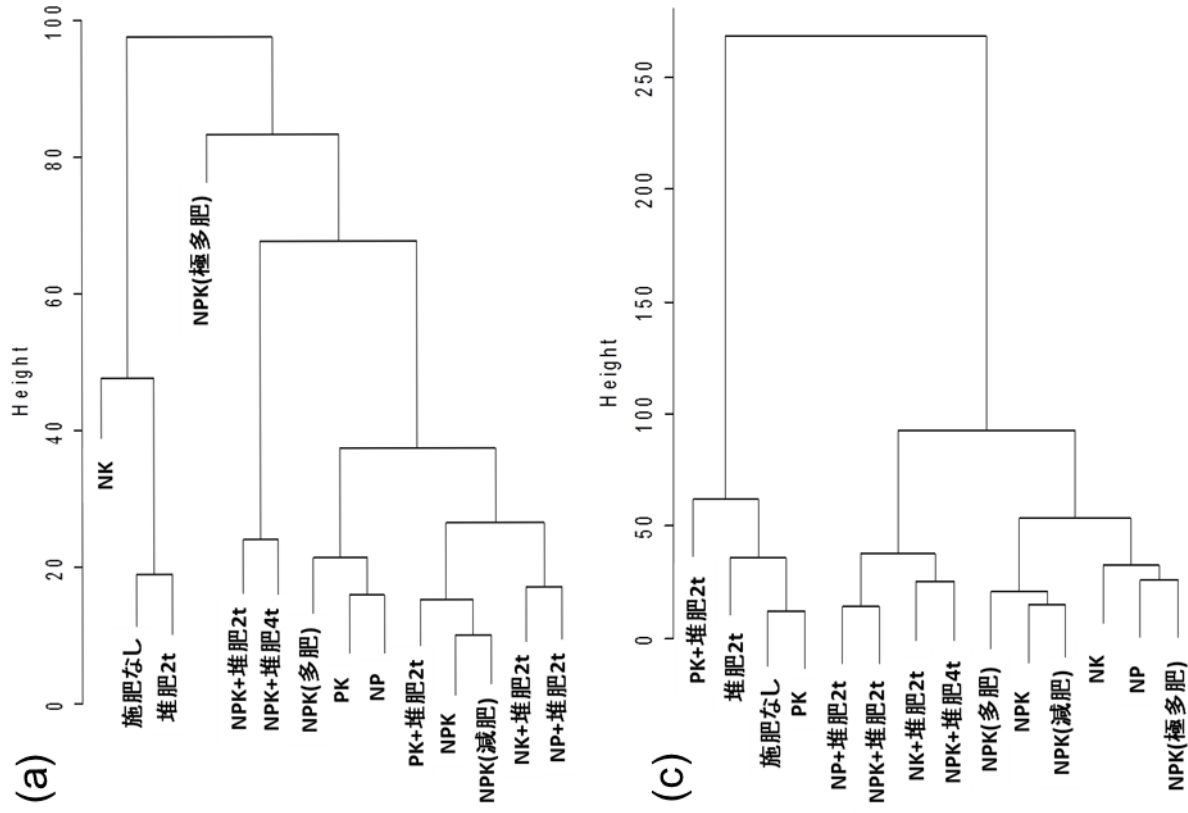
処理番号	H' (16S rDNA)	H' (18S rDNA)	H' (<i>phoD</i>)	H' (<i>npr</i>)	H' (Family 1 β -glucosidase genes)
1	3.63	2.94	3.01	1.61	3.46
2	3.39	2.92	2.97	1.04	3.38
3	3.74	2.72	2.77	2.69	3.64
4	3.58	2.75	3.08	2.39	3.50
5	3.64	3.09	2.73	2.53	3.51
6	3.62	3.07	2.45	2.32	3.64
7	3.67	2.75	2.86	2.28	3.60
8	3.62	3.00	3.14	2.23	2.97
9	3.75	2.97	2.22	1.04	3.34
10	3.59	3.03	2.67	1.08	3.07
11	3.38	2.41	1.95	2.14	2.99
12	3.69	2.96	2.32	2.15	3.18
13	3.60	2.63	2.56	2.21	2.96
14	3.57	2.6	1.75	2.08	2.82



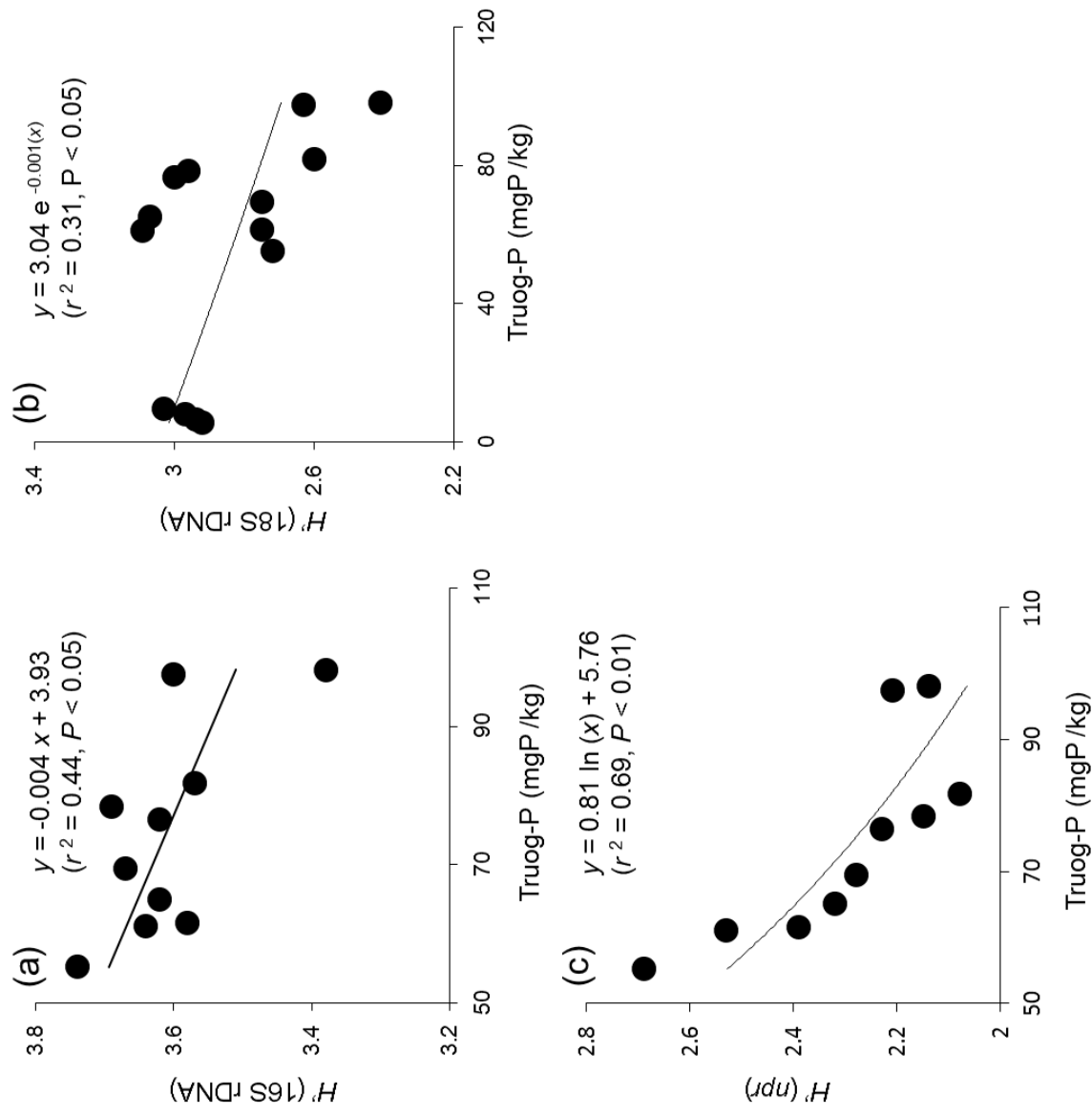
図Ⅲ-1. Truog-P 濃度とアルカリホスファターゼ/β-D-グルコシダーゼ活性の関係



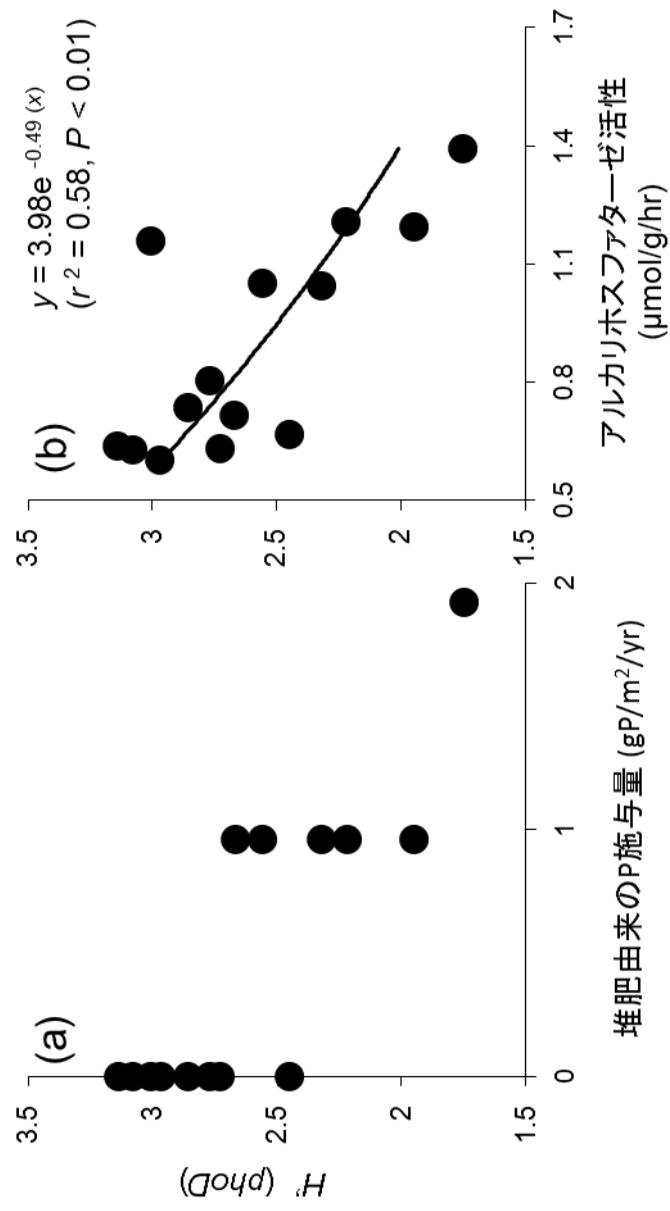
図III-2. 16S rDNA と 18S rDNA の DGGE プロファイルのクラスター解析結果. 16S rDNA(a), 18S rDNA(b)



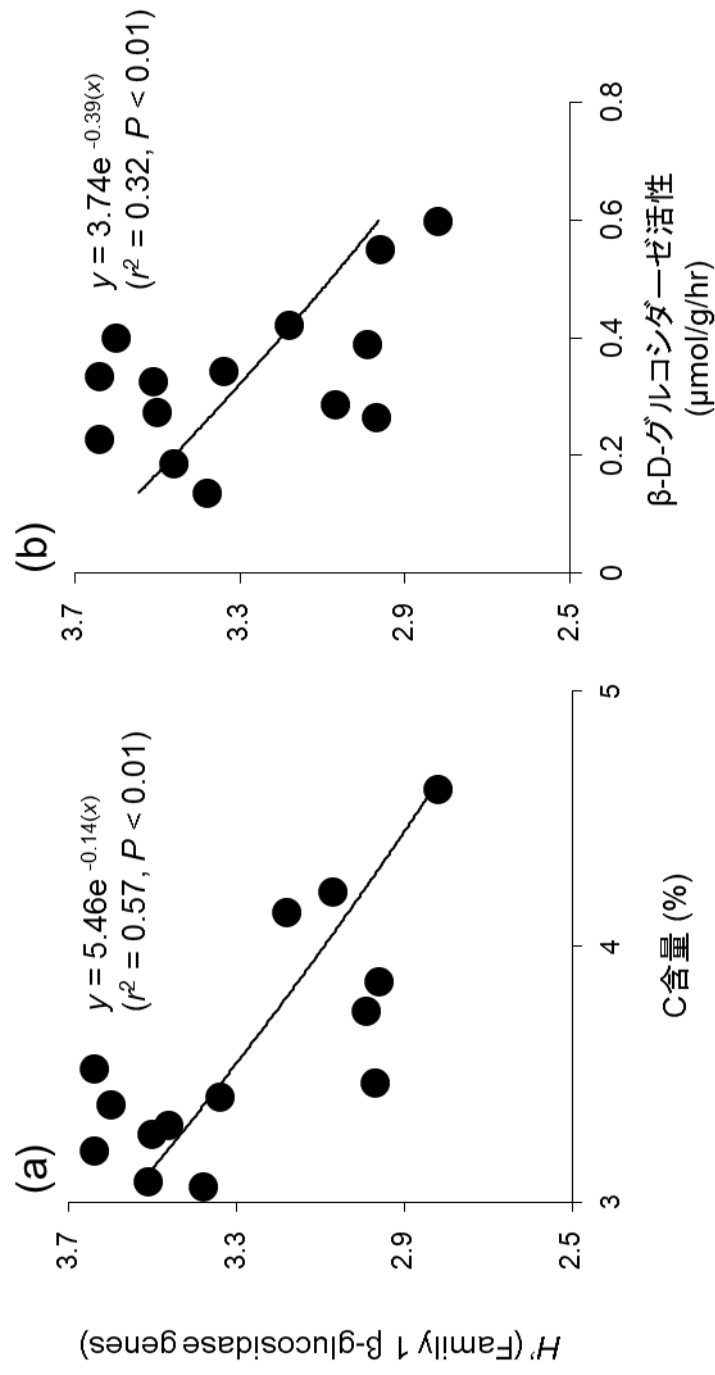
図III-3. 機能遺伝子の DGGE プロファイルのクラスター解析結果. PhoD 生産細菌(a)、Npr 生産細菌(b)、 β -グルコシダーゼ生産微生物(c)



図Ⅲ-4. Truog-P 濃度と 16S rDNA の多様度(a)、18S の多様度(b)、npr の多様度(c)の関係
 Truog-P と 16S rDNA の多様度の関係は極端に P 施肥が少ない処理区を除いたもの (n = 10)。



図III-5. *phoD* の Shannon の多様度指数(H')と堆肥由来の P 施与量(a)、アルカリホスファターゼ活性(b)との関係



図III-6. β -D-グルコシダーゼ産生微生物群集の Family 1 β -glucosidase genes の多様度指数(H')と C 含量(a)、 β -D-グルコシダーゼ活性(b)との関係

IV章

酵素添加法による植物根圏における有機態リンの利用性評価

IV-1. 背景

緒言でも述べたように、持続可能な農業を行うために土壤中に蓄積した P の有効利用が喫緊の課題となっている。第 I 章では、肥培管理の異なる土壌を用いて P 形態分析および P の生物学的利用性評価の検討を行ったが、作物への P 利用性を考える上では、その根圏での P 利用性評価が極めて重要になる。

有機態 P は黒ボク土中の P 画分で大きな割合を占めており (Borie and Zunino, 1983)、植物体への P 供給に大きな役割を担っている (Zubillaga and Giuffré, 1999)。土壌中の有機態 P (Po) の種類はモノエステル、ジエステルなどがあるが、定量可能な Po の中ではモノエステルであるフィチン酸が優占している (Turner et al., 2002)。植物は土壌中で酸性ホスファターゼを分泌し (Nannipieri et al., 2011)、これら Po の分解を行い、P 形態変動に影響を与えている可能性が示唆されている (Chen et al., 2002; Li et al., 1997; Seedling, 1996)。また、根からの分泌物の影響で増加した微生物によって、根圏では非根圏土壌に比べて微生物由来のホスファターゼ活性が高められている可能性もある (Nannipieri et al., 2011)。実際に、根圏において Po が減少し、それに伴い無機態リン (Pi) が増加することが確認されている (George et al., 2002; George et al., 2006)。

先行研究による P 形態の定量は化学的な手法を用いたものが多く、本当の生物利用性を反映しているのかという疑問も残されている。He et al. (2004) は、土壌や豚糞に 3 種類のホスファターゼを加えて Po 分解させることで、土壌中の Po の種類別の定量ができる可能性を示唆している。この方法を用いれば、土壌中 Po の生物学的な利用性をより正確に評価することが可能かもしれない。

このような背景を踏まえて、本研究では黒ボク土における作物根圏の土壌中 Po プールの

重要性を生化学的な観点で評価するため、施肥管理が異なる黒ボク土壌 2 試料を用い、大麦を栽培し、根圏での P 形態変動と P 利用性を評価した。

IV-2. 試料と方法

IV-2-1. 供試土壌と施肥管理

第 I 章と同じ圃場の NPK(多肥)区と NPK + 堆肥 2t 区より、2010 年 10 月に再度土壌を採取した。試料採取は作物の栽培中に行い、作物体の影響が及んでいないと考えられる処理区の端で採取した。土壌試料は、大きな植物遺体がある場合はそれを取り除いて、2mm の篩を通した後、風乾した。風乾後、再度 0.5mm の篩に通し、実験に供した。

化学肥料、堆肥の施肥は年に 1 回ずつ行っており、試料採取前の施肥は 2010 年 7 月に堆肥を、8 月に化学肥料を施肥している。処理区別の施肥の種類及び 2010 年の施肥量を表 IV-1 に示した。化学肥料は、N は $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、P は $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、K を KCl で施与している。NPK + 堆肥 2t 区では稲わら堆肥を施与しており、稲わら堆肥は、乾物換算で 0.36% の N、0.048% の P、0.55% の K を含んでいる。これらの施肥管理は 1967 から 2010 年の間同一であり、その年に育てる作物種によって施肥量をわずかに変えている(与える比率は同じである)。このような背景から、我々は 2010 年の P 施肥量がこれまでの累積 P 施肥量を反映していると考えた。

IV-2-2. ライゾボックス

風乾後に 0.5mm の篩に通した土壌を供して、Yossef et al. (1988) の方法を改変してライゾボックスを作成した。植物体を植える幅 1mm の中央区画から、同幅の区画を左右に 7 つずつ設置した。1 区画には 22.5g の風乾土を詰めた。各区画は 25 μm の穴の開いたナイロンメッシュで区切られており、植物根は中央区画から他の区画に侵入できない。土壌投入後、P 以外

の栄養素を投入するために、蒸留水に 0.27g の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Nを 0.057g含む)と 0.089gのKCl (Kを 0.047g含む)を溶かした溶液を上部からスポイトで土壌の最大容水量の 60%になるように加えた (実験に供した両処理区ともに乾土 1 kgあたり 0.18gのNと 0.15gのKを加えている)。あらかじめシャーレ上で発芽させておいた大麦 (*Hordeum vulgare* L. cv. Minorimugi)を中央区画に等間隔になるよう 7 個体定植した。雑草及び藻類の繁茂と極度の乾燥を避けるため、植物体には光が当たるようにした穴の開いたアルミホイルでライゾボックスを覆った。インキュベーター内に入れ、12 時間明期/12 時間暗期で 17.5°C、3.5-5.0 kluxを保ち、最大容水量の 60%の水分量を維持して 5 週間培養した。培養終了後、区画ごとに土壌を採取し、4°Cで保存した。植物体の培養終了後は、酵素活性、pH、酵素添加を伴うP形態の分析を培養後 2 週間以内に行った。また、植物体はライゾボックス解体時に収穫し、地上部と根部に分け、根は蒸留水で洗浄した。植物体は 70°Cで一晩乾燥させ、7 個体合計の乾重を根と地上部で別々に測定した後、分析まで保存した。

IV-2-3. 化学分析と植物体の分析

各区画ともに土壌試料の pH は、第 I 章と同様に測定した。植物体の P 濃度は、ミキサーで粉碎した試料を耐圧性テフロン分解容器に入れ、硝酸を加えて 100°Cで 1 時間加熱、分解した後にバナドモリブデン酸法で測定した。

IV-2-4. 酵素添加による Po の形態別評価

各区画の土壌試料から、He et al. (2004)の方法に従って 0.5M NaHCO_3 (pH8.5)と 0.1M NaOH を用いPの抽出を行った。抽出液をHe et al. (2004)と同様に処理し、さらに 8.8M 酢酸を用いてpH を 5.0 に調整した。用いたホスファターゼは 3 種類でacid phosphatase TypeIV-S from potato(SIGMA-ALDRICH, P1146 : PP)、acid phosphatase(EC 3.1.2.1) Type I from wheat germ(SIGMA-ALDRICH, P3627 : GP) 、 nuclease P1 (EC 3.1.3.26) from *Penicillium*

citrinum(SIGMA-ALDRICH, N8630 : NP)である。これらの酵素をpH 5.0 の酢酸ナトリウム緩衝液に溶かし、それぞれPP液、GP液、NP液を作成した。これら基質特異性が異なる3種の酵素液を組み合わせて抽出液に添加し、酵素分解可能なPo濃度を測定した (He et al., 2004)。同時にNaHCO₃抽出液、NaOH抽出液それぞれの全リン(Pt) 濃度とPi濃度も測定した。Ptは、試料を過硫酸分解してからP濃度を測定することで求めた。抽出液中の無機態P (Pi) 濃度はモリブデン青法によって定量した(Murphy and Riley, 1962)。Po濃度はPt濃度からPi濃度を減じて算出した。また、各形態別のPo濃度の計算式を以下に記した。求めた各形態のP濃度は全て乾土換算で表示した。

易分解性モノエステル P 濃度 = PP - Pi 濃度

易分解性モノエステル P + フィチン酸様 P 濃度 = (PP + GP) - Pi 濃度

易分解性モノエステル P + フィチン酸様 P 濃度 + DNA 様 P 濃度 = (PP + GP + NP) - Pi 濃度

非加水分解性 P 濃度 = Pt 濃度 - (PP + GP + NP)

*PP = PP 酵素液で Po を分解した試料の Pi 濃度

**PP + GP = PP 酵素液と GP 酵素液を同時に添加し、Po を分解した試料の Pi 濃度

***PP + GP + NP = PP 酵素液と GP 酵素液と NP 酵素液を同時に添加し、Po を分解した試料の Pi 濃度

IV-2-5. 酵素活性

P 獲得系酵素として、ホスホモノエステラーゼ活性(pH 6.5)とホスホジエステラーゼ活性を測定した。ホスホモノエステラーゼ活性の測定法は第 I 章の酸性ホスファターゼ活性のものと同一である。ホスホジエステラーゼは、DNA などのジエステル P を加水分解する酵素として知られている(Nannipieri, 2011)。ホスホジエステラーゼ活性は sodium bis *p*-(4-nitrophenyl) phosphate を基質として、トリス緩衝液 (pH 8.0)中で測定した。求めた活性

は全て乾土換算で表示した。

IV-2-6. Biolog 分析

微生物群集の生理学的プロファイル(community-level physiological profile = CLPP)を、細菌ではBIOLOG Eco plateTM (Ecoプレート)と菌類ではSFN2 plateTM (SFN2 プレート)を用いて評価した。Ecoプレートでは、培養可能な細菌による様々なC基質の利用度を評価する。全 96 のウェルに 31 種の異なる炭素基質と水が 3 連で入っており、C基質の利用度を、テトラゾリウムが細菌の呼吸によってホルマザンに還元され発色する反応を利用して測定している。SFN2 は培養可能な糸状菌類のC基質利用性を評価するためのプレートである。こちらは全 96 のウェルの中に 95 個の基質と水が入っており、実験後の濁度を測定することでC基質の利用性を評価している。CLPP解析の手順は以下のように行った。まず、土壌試料に土：リン酸緩衝液＝1：10 となるように緩衝液を加え 30 分間振とうした。この溶液を 1000 倍希釈した後(この段階で菌類群集の解析用試料には、テトラサイクリンとストレプトマイシンを添加した)、その希釈液を各プレートの各ウェルに 150μlずつ接種した。細菌群集は 3 日間、菌類群集は 7 日間の 28℃で培養を行い、実験終了後プレートリーダーで各ウェルの吸光度を測定した。すべてのウェルから水の入ったウェルの吸光度(コントロール)を引き、さらに実験開始時の発色を引いて補正した。なおEco plateによる測定では、細菌増殖による濁度の影響も補正した。各区画の土壌試料ごとに、全基質利用度の合計値をウェルの数で除した値を平均発色強度(average well color development ; AWCD)として表した。

IV-3. 結果と考察

作物体の収量と P 吸収量

作物体の収量は、地上部及び根部ともに NPK + 堆肥 2t 区の方が NPK(多肥)区より大きか

った(表IV-1)。また、P吸収量も同様の傾向を示した。NPK + 堆肥 2t 区では、地上部の重量が NPK (多肥)区の 1.9 倍、根の重量が 1.5 倍であった。さらに処理区間での作物体の P 吸収量比は、地上部で 1.7 倍、根部で 1.5 倍と根の成長量の比率と類似していた。

土壌の pH と酵素活性、Biolog 分析

NPK(多肥)区及び NPK+堆肥 2t 区の区画ごとの pH、ホスホモノエステラーゼ活性、ホスホジエステラーゼ活性及び Biolog プレートによる細菌群集と菌類群集の AWCD を図IV-1、2 に示した。NPK(多肥)区においては、中央区画で pH が他の区に比べて低値を示したが、最低値は根からの距離が 5-6mm の区画で確認され、明瞭な傾向は見られなかった[図IV-1(a)]。一方で、NPK + 堆肥 2t 区では中央区画で最も低い pH を示し、根からの距離が 0-1mm の区画でも他の区に比べて低値を示した[図IV-2(a)]。ホスホモノエステラーゼ活性は、NPK(多肥)区では中央区画で最高値を示し[図IV-1(b)]、NPK + 堆肥 2t 区では根からの距離が 0-1mm の区画で最高値を示した[図IV-2(b)]。両土壌とも根からの距離が 0-1mm 区画と中央区画で他の区画と比べて高値を示したが、その上昇の程度は NPK 区の方で大きかった。ホスホジエステラーゼ活性もホスホモノエステラーゼ活性と似通った傾向を示した[図IV-1(c)、2(c)]。NPK(多肥)区の細菌、菌類群集の AWCD は、中央区画で他の区画に比べて卓越していた[図IV-1(d)、(e)]。一方で NPK + 堆肥 2t 区における細菌群集の AWCD は、中央区画で最高値を示したが、他の区画との差は大きくなかった[図IV-2(d)]。また、菌類群集では最大値は根からの距離が 0-1mm の区画でみられ、明瞭な傾向は得られなかった[図IV-2(e)]。

土壌の形態別 P 濃度

各処理区における各区画の形態別P濃度を図IV-3、4、5、6 に示した。酵素添加により推定した易分解性モノエステルP+フィチン酸様P濃度は、酵素分解可能なPoの大部分を占めた[図IV-3、4、5、6 の(b)]。また、両処理区のNaHCO₃抽出画分のPP添加、PP+GP添加によ

る結果から、フィチン酸様Pが生物的に利用され得る形態として多く存在することが確認できる。またその量は易分解性モノエステルPの量にも匹敵していた[図IV-3(b)、5(b)]。

NPK(多肥)区では、 NaHCO_3 抽出画分と NaOH 抽出画分の易分解性モノエステルP+フィチン酸様P濃度、易分解性モノエステルP+フィチン酸様P+DNA様P濃度が中央区画で顕著に減少していたが、その他の区画では明瞭な傾向は確認されなかった[図IV-3、4]。このNPK(多肥)区での酵素分解可能なPの根近傍での減少は、ホスファターゼ活性の増加[図IV-1(b)、(c)]と調和的であった。Helal and Sauerbeck (1984)は、放射性同位体の ^{32}P を用いた実験でフィチン酸様Pが根近傍で利用されている可能性を示唆しているが、フィチン酸Pの減少は見られなかったため、これを微生物によるフィチン酸の再生成によるとした。本研究においてこのような根近傍での易分解性モノエステルP+フィチン酸様Pの減少が確認されたのは、酵素添加によって、より生物に利用されうる形態を評価したからかもしれない。また、根近傍で易分解性モノエステルP+フィチン酸様Pの減少が確認されたことは、根圏土壤において化学的方法でしか示されていなかった Po の減少とそれに伴い放出された Pi の植物による吸収の可能性が、より生物的に評価できたという点で重要である。

他方、NPK + 堆肥 2t区では NaHCO_3 抽出の Pi と Pt 濃度が中央区画に近づくにつれ著しく低下した(図IV-5(e)、(g))。これは、大麦によるこの形態のPの利用を示唆している。また、大麦のP吸収量はNPK区よりもNPK + 堆肥 2t区で大きかった(表IV-1)。しかし、これだけ明瞭なPの利用があるにもかかわらず、酵素分解可能な Po は明瞭な傾向を示さなかった(図IV-5)。この要因としては、堆肥施与によって微視的なレベルで土壤中の Po の分布に不均一さが生じていることが関連しているのかもしれない。また、NPK + 堆肥 2t区の微生物群集のAWCDは、NPK(多肥)区に比べて全区画で一様な値を取る傾向にあった(図IV-2(d)、(e))。特に細菌群集のAWCDでは、酵素活性などに比較しその傾向が顕著であった。根圏効果は、元々微生物量が高い土壌では低い土壌に比べて不明瞭になることが知られている(木村, 1988)。本研究においても、NPK + 堆肥 2t区では微生物量が元から大きかったことで根圏効果が明瞭に

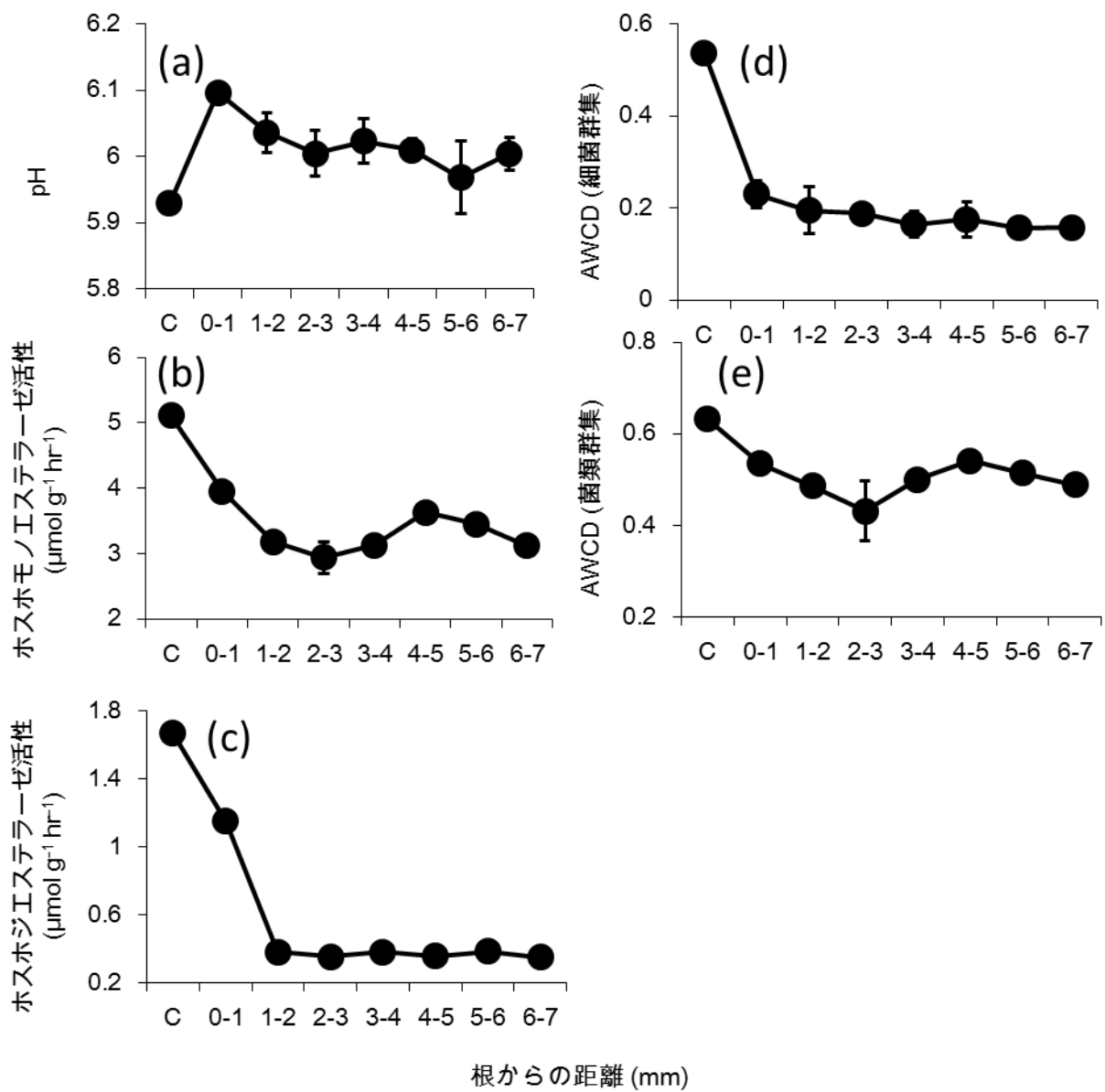
表れず、NPK(多肥)区に比較して、ホスファターゼ活性などの値も大きく上昇しなかったのかもしれない。さらにNPK(多肥)区土壌では細菌群集の基質利用パターンが中央区画とL1区画で他の区画と異なり(図IV-7)、また、Eco plateに含まれる炭素基質の中でPを含むものの基質利用度がその2区画で他区画より著しく高かった(図IV-8)。一方でNPK + 堆肥 2t区ではNPK(多肥)区に比べ、細菌群集の基質利用パターンも中央区画と他区画で明瞭に分かれておらず、P含有炭素基質の利用性も明瞭な差は見られなかった。このように根圏と非根圏での差異が明確でなかったことが、NPK + 堆肥区において植物根が形態別P濃度に与える影響が不明瞭であったことの一因であると推察された。

IV-4. 結論

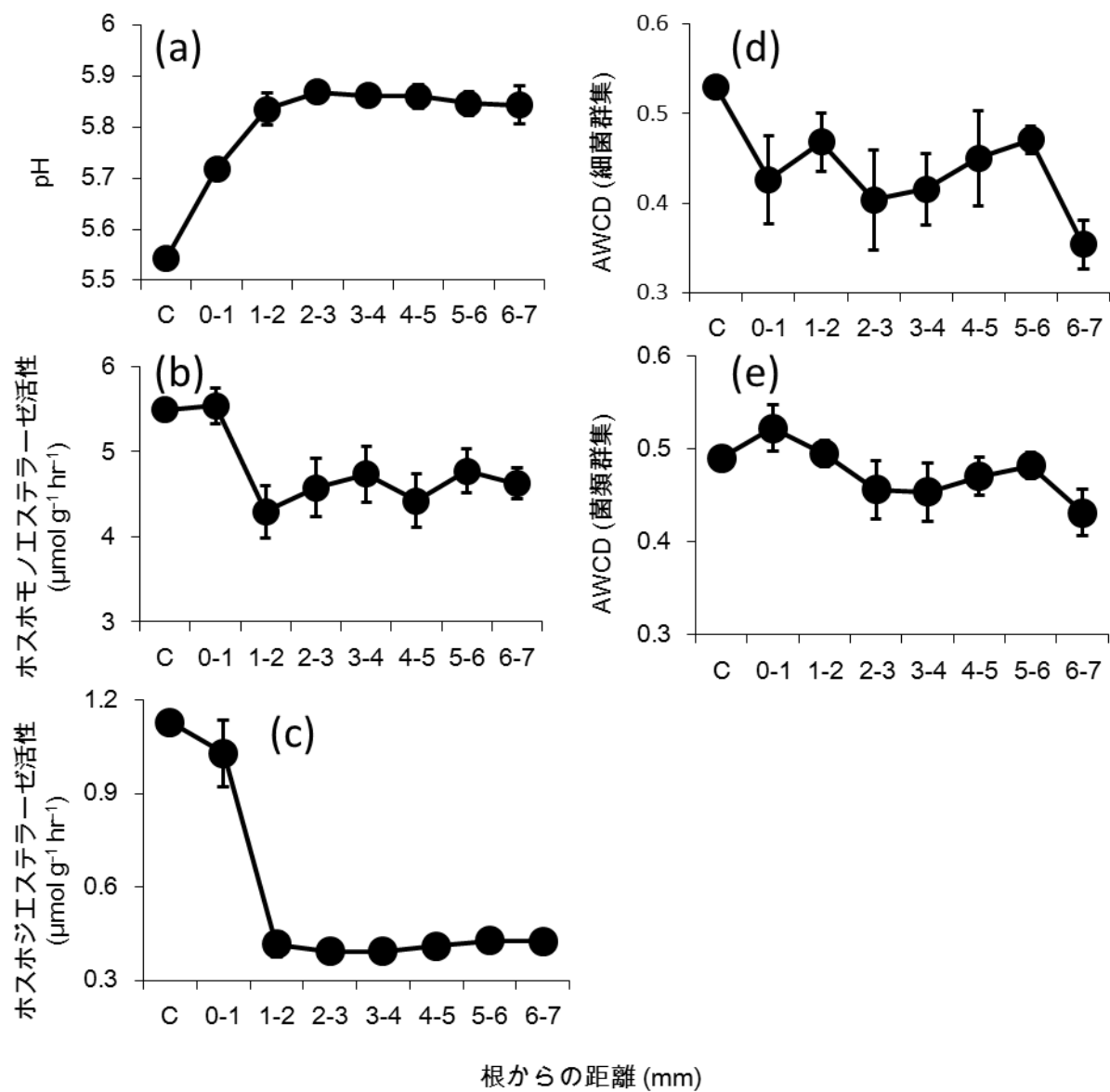
黒ボク土における酵素添加試験によって、NPK(多肥)区では根圏効果が明確であり、 NaHCO_3 抽出される加水分解性の易分解性モノエステルP+フィチン酸様P濃度が根圏で減少していることが確認された。このことから、現在まで化学的抽出法のみで利用性が高いと判断されていたPoの重要性を生化学的に確認できた。また、黒ボク土において、潜在的に利用される可能性のあるフィチン酸様Pが、処理区や区画によっては易分解性モノエステルPに匹敵、またはそれを上回る量存在していることが推察された。このため、少なくともフィチン酸の一部が、植物に対するP利用性に大きな役割を示していることが予想される。

表IV-1. 供試土壌の施肥量と作物体収量、P 吸収量、P 濃度

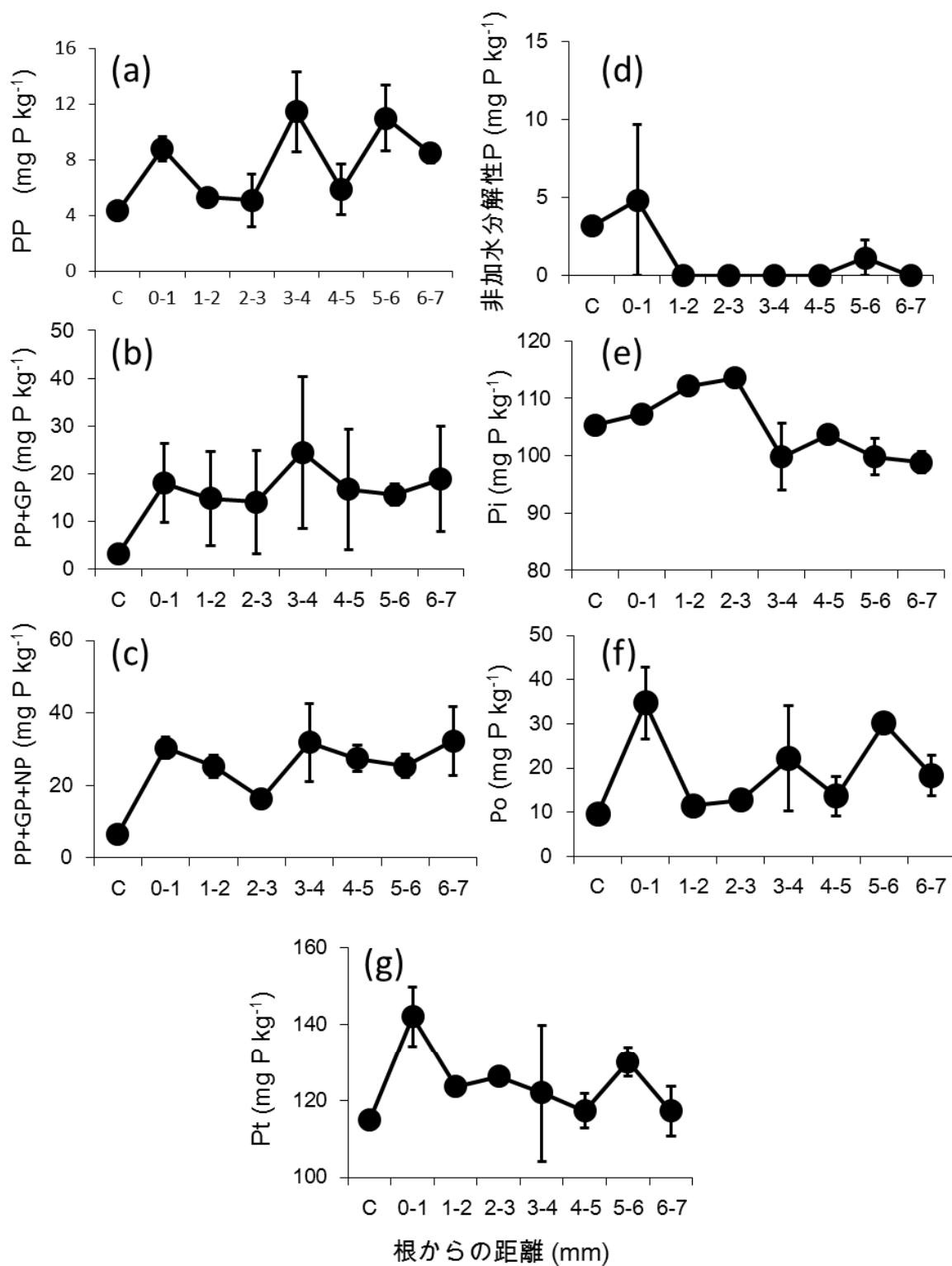
処理	施肥量				作物体収量		作物体の P 吸収量		作物体の P 濃度	
	堆肥	N	P	K	地上部	根	地上部	根	地上部	根
	(kg m ⁻² yr ⁻¹)	(g m ⁻² yr ⁻¹)	(g m ⁻² yr ⁻¹)	(g m ⁻² yr ⁻¹)	(g)	(g)	(μgP g ⁻¹)	(μgP g ⁻¹)	(μgP g ⁻¹)	(μgP g ⁻¹)
NPK(多肥)	0	27.2	9.7	27.6	0.6	1.12	78.2	187	130	167
NPK + 堆肥 2 t	2	27.2	9.7	27.6	1.14	1.69	129	279	113	165



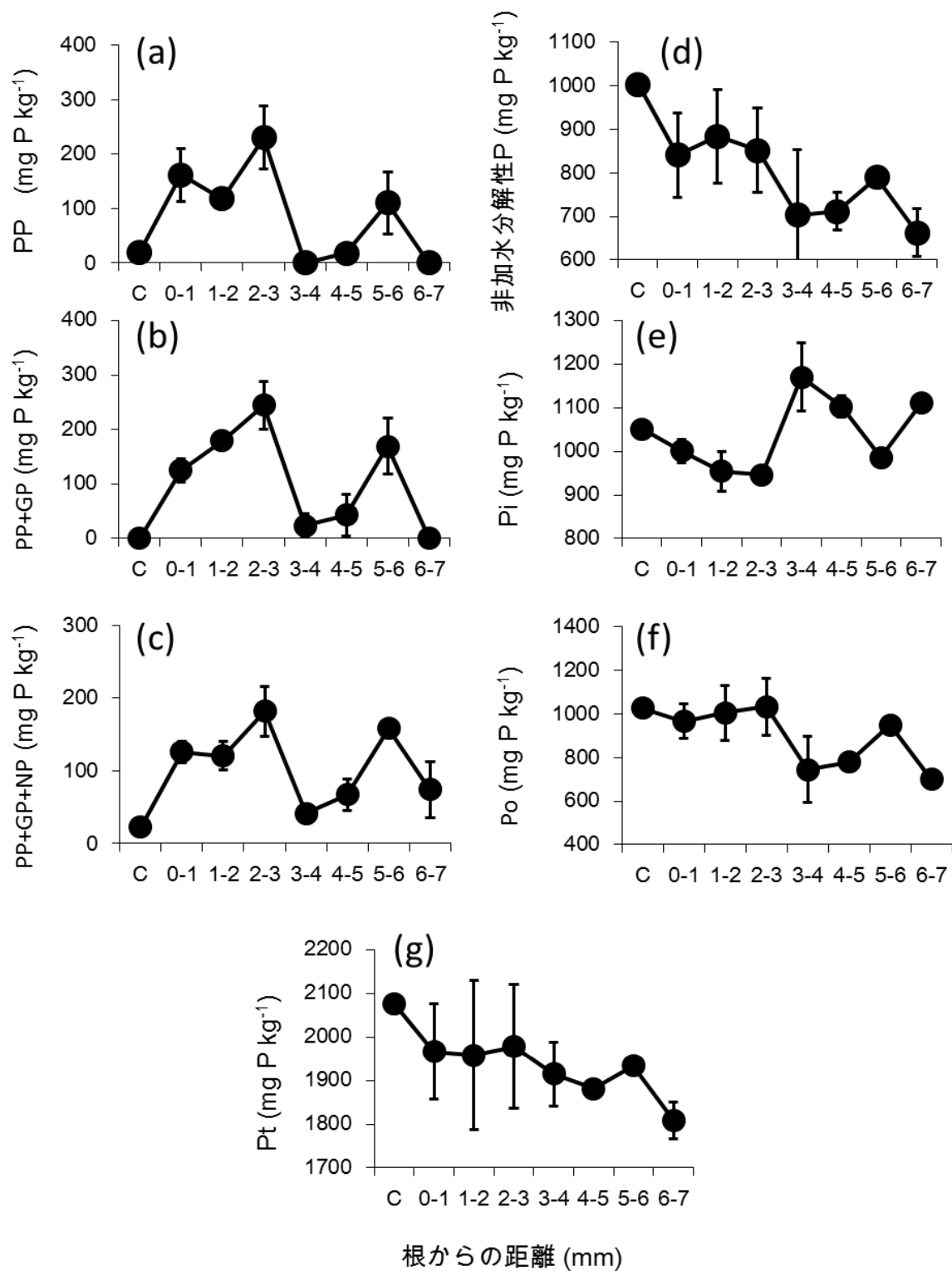
図IV-1. NPK (多肥) 区の pH と酵素活性、AWCD. pH (a)、ホスホモノエステラーゼ活性 (b)、ホスホジエステラーゼ活性 (c)、AWCD(細菌群集) (d)、AWCD(菌類群集) (e). C は中央区画を示す. 菌類群集の AWCD の 6-7mm のみ試料欠損のため 1 連で分析. 他のプロットは全て左右 2 連の平均値を示し、エラーバーは 2 連の各値からの平均の差を示す.



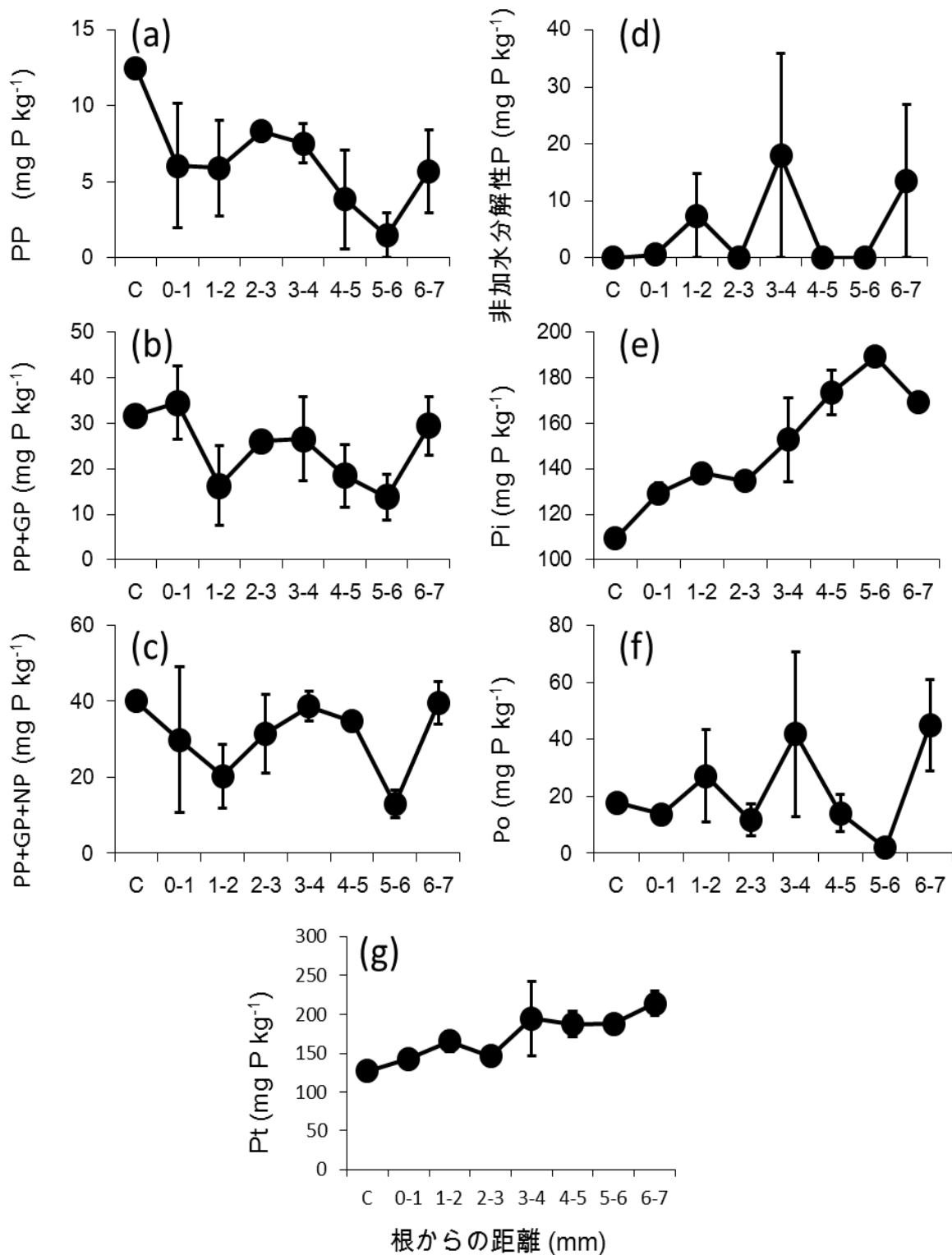
図IV-2. NPK + 堆肥 2t 区の pH と酵素活性、AWCD. pH (a)、ホスホモノエステラーゼ活性 (b)、ホスホジエステラーゼ活性 (c)、AWCD(細菌群集) (d)、AWCD(菌類群集) (e). C は中央区画を示す. プロットは全て左右 2 連の平均値を示し、エラーバーは 2 連の各値からの平均の差を示す.



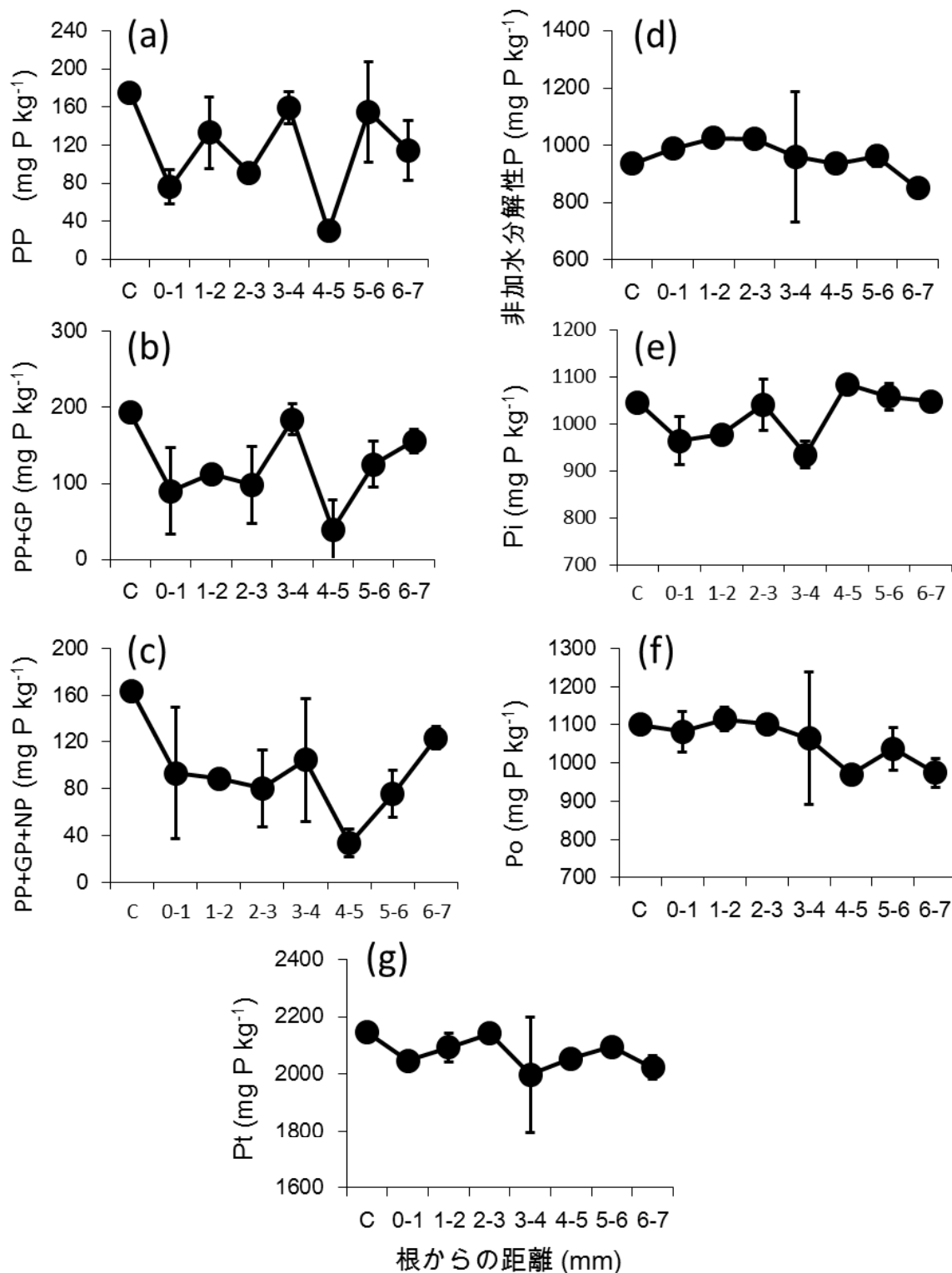
図IV-3. NPK (多肥)区におけるNaHCO₃抽出における各形態のP濃度. PP (a)、PP + GP (b)、PP+GP+NP(c)、非加水分解性P(d)、Pi濃度(e)、Po濃度(f)、Pt濃度(g). Cは中央区画を示す. PPは酵素PPで分解可能であったPo濃度、PP+GPは酵素PPとGPの組み合わせで分解可能であったPo濃度、PP+GP+NPは酵素PPとGP、NPの組み合わせで分解可能であったPo濃度、非加水分解性Pは酵素PPとGP、NPでは分解できなかったPo濃度である. 各プロットは全てライゾボックスの左右2区画の平均値を示し、エラーバーは両値からの平均の差を示す.



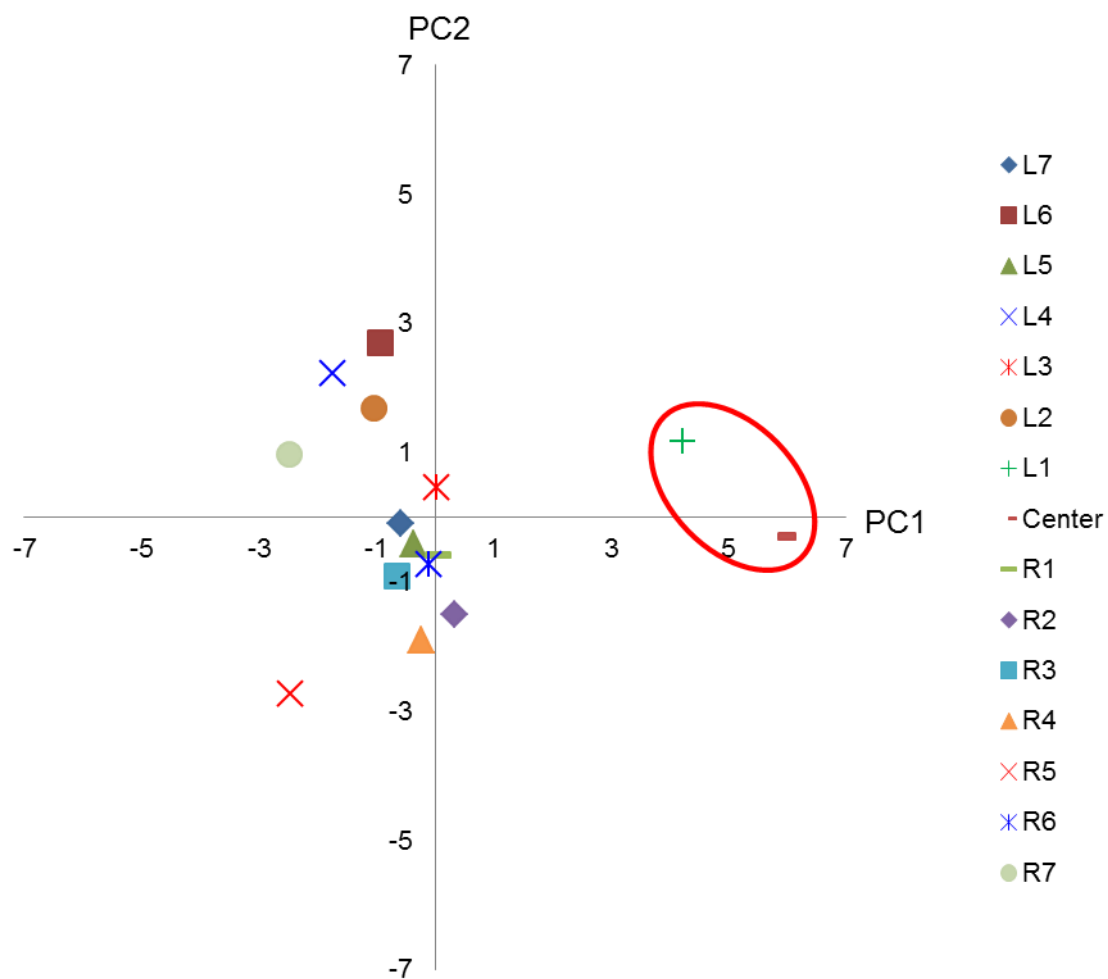
図IV-4. NPK (多肥)区における NaOH 抽出における各形態の P 濃度. PP (a)、PP + GP (b)、PP+GP+NP(c)、非加水分解性 P(d)、Pi 濃度(e)、Po 濃度(f)、Pt 濃度(g). C は中央区画を示す. PP は酵素 PP で分解可能であった Po 濃度、PP+GP は酵素 PP と GP の組み合わせで分解可能であった Po 濃度、PP+GP+NP は酵素 PP と GP、NP の組み合わせで分解可能であった Po 濃度、非加水分解性 P は酵素 PP と GP、NP では分解できなかった Po 濃度である. 各プロットは全てライゾボックスの左右 2 区画の平均値を示し、エラーバーは両値からの平均の差を示す.



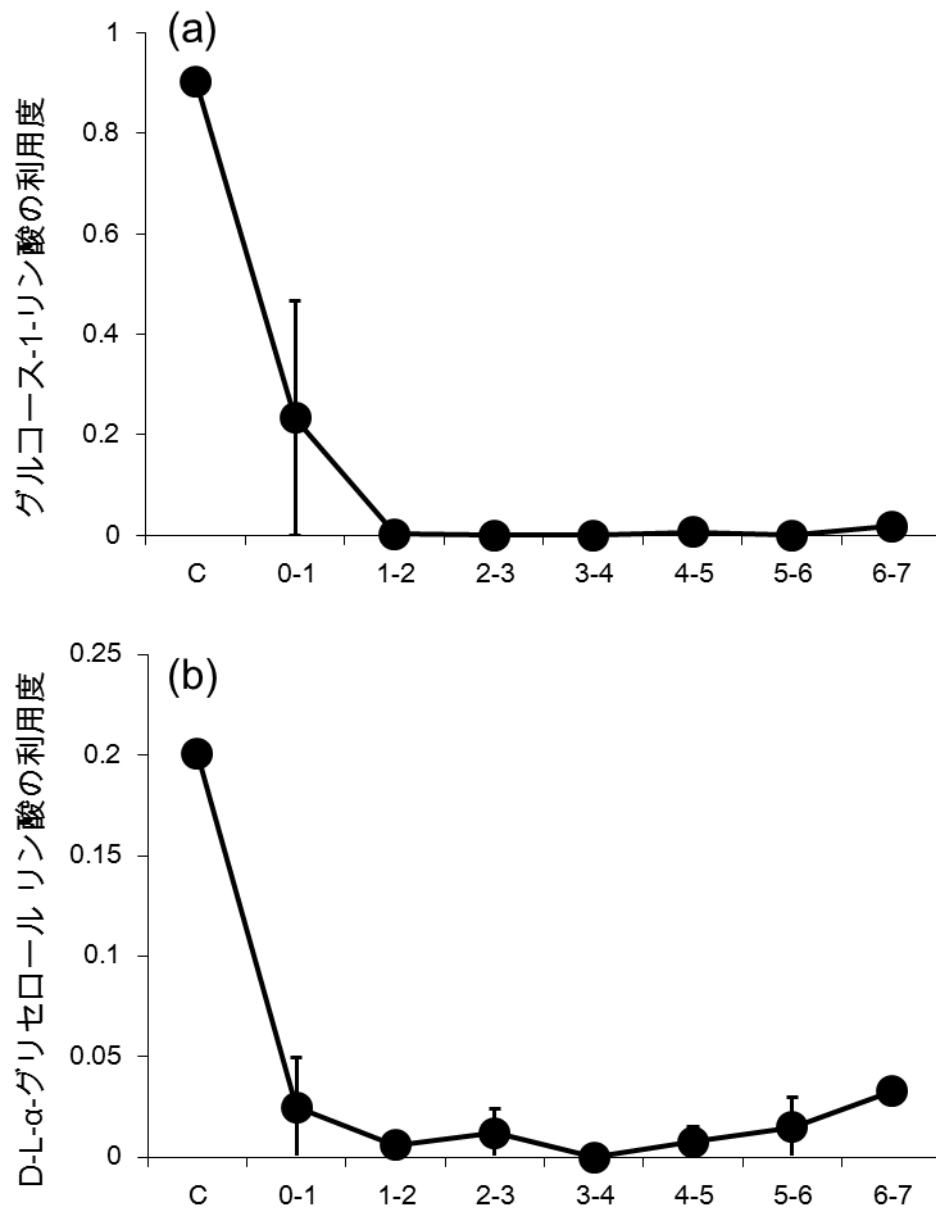
図IV-5. NPK+堆肥 2t区におけるNaHCO₃抽出における各形態のP濃度. PP (a)、PP + GP (b)、PP+GP+NP(c)、非加水分解性P(d)、Pi濃度(e)、Po濃度(f)、Pt濃度(g). Cは中央区画を示す. PPは酵素PPで分解可能であったPo濃度、PP+GPは酵素PPとGPの組み合わせで分解可能であったPo濃度、PP+GP+NPは酵素PPとGP、NPの組み合わせで分解可能であったPo濃度、非加水分解性Pは酵素PPとGP、NPでは分解できなかったPo濃度である. 各プロットは全てライゾボックスの左右2区画の平均値を示し、エラーバーは両値からの平均の差を示す.



図IV-6. NPK+堆肥 2t 区における NaOH 抽出における各形態の P 濃度. PP (a)、PP + GP (b)、PP+GP+NP(c)、非加水分解性 P(d)、Pi 濃度(e)、Po 濃度(f)、Pt 濃度(g). C は中央区画を示す. PP は酵素 PP で分解可能であった Po 濃度、PP+GP は酵素 PP と GP の組み合わせで分解可能であった Po 濃度、PP+GP+NP は酵素 PP と GP、NP の組み合わせで分解可能であった Po 濃度、非加水分解性 P は酵素 PP と GP、NP では分解できなかった Po 濃度である. 各プロットは全てライゾボックスの左右 2 区画の平均値を示し、エラーバーは両値からの平均の差を示す.



図IV-7. 主成分分析による NPK(多肥)区における細菌群集の基質利用パターンの評価。L、R は左右の区画、Center は中央区画を示す。赤い楕円は L1 区画と中央区画を囲み、PC1 は主成分得点 1 を、PC2 は主成分得点 2 を示す。PC1 の寄与率は 36.0%、PC2 の寄与率は 16.9%であった。



図IV-8. NPK(多肥)区土壤における Ecoplate 中の P 含有炭素基質利用度. グルコース-1-リン酸の利用度(a)、D-L- α -グリセロールリン酸の利用度(b). 縦軸の値は発色強度(吸光度)を示す. 各プロットは全てライゾボックスの左右2区画の平均値を示し、エラーバーは両値からの平均の差を示す.

総合考察

現在、人類が食糧生産のために使用している P 資源を取り巻く状況はかなり逼迫した状況にあり、持続可能な発展のために解決しなければならない喫緊の課題である。緒言でも示したように、現在、我々が直面している P の問題に対する主なアプローチは P 資源の再利用と効率的な利用の 2 つの技術開発であると考えられる。本論文では、特に後者の達成を将来的な目標に定め、生物的な P 利用性の把握に関する研究、微生物と植物の栄養要求性の違いに関する研究、土壌微生物群集と肥培管理、酵素活性などの機能面の三者における関係性の研究、植物における Po 利用性の形態別評価を行い、土壌中の P 有効利用に向けた基礎的知見の提供を試みた。

第 I 章では、先に述べた生物的な P 利用性の把握の必要性に応えるべく、Sinsabaugh らの提案した資源配分モデル(Sinsabaugh and Moorhead, 1994; Sinsabaugh and Follstad Shah, 2012)に注目して、生物的な P 利用性の評価の可能性を検討した。その結果、14 種類の肥培管理を行う土壌での、細胞外酵素活性の比 (β -D-グルコシダーゼ活性に対する酸性及びアルカリホスファターゼ活性の比)を用いた P 利用性の評価は、化学的抽出法の評価 [Truog 法、Bray 第二法(準法)、Hedley 法]と相関を示し、土壌中の P 利用性の指標となる可能性が示唆された。また、作物体の P 濃度とも有意な負の相関を示したことから、微生物の分泌する酵素を対象とした P 利用性の評価法でありながらも、植物体の P 利用性の指標にもなり得ることが予想された。一方、微生物の P 添加に対するデヒドロゲナーゼ活性の応答からも P 利用性を評価しようと試みたが、P 濃度が極端に少ない一部の区を除いては応答せず、資源配分モデルとも明瞭な関係を示さなかった。微生物は他の栄養素によって制限されると、たとえ栄養利用性が低くても、応答を示さないといった例がある(Kunito et al., 2012; 第 II 章)。デヒドロゲナーゼ活性比による評価では、このことが有用性を低下させていると考えられる。すでに紹介したように、P の生物利用性を評価する化学的方法は数多く提案されている

が、一貫した結果が得られない場合があり、また手法上の問題点も存在するため、その適応範囲が限られていた。本研究で妥当性が示された資源配分モデルは P の生物利用性を評価していく新しい指標となる可能性がある。今後は資源配分モデルによる P 利用性の評価が他の土壌型でも用いることができるのかといった汎用性についての検証、作物の栽培後や栽培前といった P 利用性の急激な変化への対応などを反映するのかといった検証なども必要となるだろう。また、序章で述べたような、抽出法間での P 利用性評価の違いや、異なる土壌間で同じ抽出法を用いても、植物体の収量と抽出法による値との間に有意な相関が得られないといった矛盾において、資源配分モデルが正確に働くのかも検討していかなければならない。

第Ⅱ章では、Ⅰ章で行った P 制限の研究から発想を得て、これまでに研究例が極めて少ない微生物の K 要求性について報告した。本研究で用いた試料は、長期連用圃場において毎年のように植物体に K 欠乏症が生じる土壌であり、研究当初は微生物に K 制限が起きていることを予想していた。しかし、実際には、植物体に K 欠乏を引き起こすような土壌であっても、微生物は K 制限ではないことが示唆された。また、C+N 添加に対する C+N+K 添加時のデヒドロゲナーゼ活性比は、交換態 K 濃度が低い区で最も高くなっていたものの、その反応は閾值的なものであった。このことは、第Ⅰ章での P 添加試験の結果と一致する。デヒドロゲナーゼ活性比の反応は、他の栄養素の要求性にも影響されること、微生物が栄養素を得た後の反応であることを考えると、この評価は利用性のような外的要因というよりはむしろ、より内的要因である栄養素に対する要求度の評価の意味合いが強いのだろう。一方で、資源配分モデルによる結果は、化学的抽出法や植物体 P 濃度とも有意な相関が得られており、比較的土壌中の養分利用性を評価する意味合いが強いと考えられる。このように、生物的な P 状態を評価する方法にも、それぞれ特徴があることを示唆できたのも本研究の成果の一つである。

Ⅲ章では、土壌有機物の有効利用技術の発展を視野にいれ、土壌微生物群集と酵素活性

などの機能面、養分利用性の三者の関係性を調査する基礎的研究を行った。このような三者間の関係を同時に研究した例は少なく、多様な肥培管理下において複数の機能遺伝子に対して評価した例は、筆者の知る限りでは初めてのものである。得られた結果から、アルカリホスファターゼ産生細菌(PhoD 生産菌)では、クラスター解析による群集構造の評価において P 施肥を行っていない、または非常に少ない区においては、他区と異なる群集構造を示していた。また、その P 施肥が非常に少ない区では β -D-グルコシダーゼ活性に対するアルカリホスファターゼ活性の比が他の処理区に比べて大きく、アルカリホスファターゼ生産に優占的に資源を配分している可能性も示唆された。この発見は、肥培管理による養分などの土壌特性の変化が、特定の機能遺伝子を保有する微生物群集の構造を変化させ、同時に微生物群集の酵素生産への資源配分も変えている可能性を示唆している。しかしながら、この仮説は推測の域を出ないため、その証明のためには室内実験などによる追試が必要不可欠である。本研究と同様に Sakurai et al. (2008)の作成したプライマーを用いて PhoD 生産細菌群集を調査した研究には、Wang et al. (2012)、Chhabra et al. (2013)、Tan et al. (2013)、Jorquera et al. (2014)があるが、これらの研究では、根圏土壌のみで肥培管理を変えて試験していたり(Jorquera et al., 2014)、アルカリホスファターゼ活性の測定を行っていない(Wang et al., 2012; Chhabra et al., 2013)、処理区数が少ない(Sakurai et al., 2008; Tan et al., 2013)などの問題が残されていた。本研究では、上記の研究に比べて多数の肥培管理土壌を用いて、群集構造、酵素活性、養分利用性を同時に調査することで、その三者の関係性を見出した点において、今後の微生物を介した土壌中養分動態の制御技術の発展に、重要な知見を提供できたと考えられる。本研究では DNA を標的としたものとどまったが、今後は土壌から抽出した RNA を用いた群集構造解析との比較などが期待される。

IV章では、栄養素利用性を考える上で農業的に最も重要といえる作物根圏において、黒ボク土では P 供給に対して大きな役割を担っている、Po の利用性を形態別に評価した。その結果、加水分解可能なフィチン酸様 P が易分解性モノエステル P に匹敵するほど存在す

ることを生化学的に評価できた。さらにフィチン酸様 P が根圏で減少し、植物に使用されている可能性も示された。また、酵素分解を受けにくいとされる Fe や Al に吸着しているフィチン酸様 P の減少も確認された。酵素添加試験を用いた実験で、フィチン酸様 P の減少を評価できたことは、今まで化学的抽出法でのみ調査されていた根圏での P 利用性増加を裏付けた点で重要である。

これらの研究で得られた知見を発展させれば、持続可能な農業を行う上で様々な貢献ができると考えられる。I 章と II 章の研究では、P 利用性を従来より生物的な方法で評価できる可能性を示した。この方法の汎用性を評価した後、化学的抽出法において同じ土壌型ですら異なる抽出を用いた評価で、一貫した結果が得られていない土壌に本法を適用すれば、P 利用性を今までより正確に評価できる可能性がある。また、生物的な評価である利点を生かし、土壌間での P 利用性の直接比較も可能となるかもしれない。現時点では、妥当性が示された段階であるため、植物体の成長、植物体中の P 濃度、他の土壌型における土壌中 P 濃度との比較は不十分であるが、その実験を行うことで、適切な土壌中 P 利用性に対応する資源配分モデルの適正值を定めることも可能だろう。この基準を用い、P 施肥量を決定すれば、無駄の少ない P 施肥を実現できる可能性がある。大竹(2011)は、日本の農地には年間 395.2 kt の P が施肥されており、そのうち 32.9kt が河川へ流出することを示している。上記のような施肥による P 施肥の無駄を減らせれば、P の流出を抑制し、富栄養化の問題の改善にもつながるであろう。他方、P の循環、再利用という面では堆肥および厩肥の施用が有効な方法である。この問題に関しては、III 章、IV 章での研究結果が貢献できると考えられる。III 章では、土壌中のアルカリホスファターゼ活性と堆肥由来の P 施与量が正の相関を示し、この二者と PhoD 産生細菌群集の多様性が関係している可能性が示唆された。この結果から、堆肥由来の P 施与が多様性を低下させ、アルカリホスファターゼ活性の上昇が起こったことが想像できる。この仮説の証明には、有機態 P の添加による同現象の再現実験と活性との比較試験などが必要であるが、今後どのような条件で肥培管理を行えばホスファターゼ

活性を高めることができ、効率的に堆肥などの有機肥料を利用することができるのかといった技術開発につながる可能性がある。これが実用化すれば、今までは、やみくもに生産、施用されてきた堆肥、厩肥の制御が可能となり、有効な有機質肥料の生産・利用体制が実現できるかもしれない。日本は、リン酸肥料の大部分を化学肥料に頼っており (Mishima, 2003)、その水準は OECD 加盟国 33 ヶ国の内で最も高い (OECD, 2008)。微生物を介した Po 有効利用法を開発することができれば、先に書いたリン資源枯渇に伴う肥料価格高騰などの危機を緩和することができる可能性がある。この効果は日本にとどまらず、世界中のリン資源を持たない国はもちろん、地球規模での持続可能な農業の発展にも貢献し得る。また、Ⅲ章での結果を発展させた技術を用いれば、土壌中に蓄積した Po も有効利用できるかもしれない。これはⅠ章の結果でみるように、Fe や Al に結合する P が多く存在し、Po が植物に対する P 供給源として重要である黒ボク土 (Zubillaga and Giuffr , 1999) にとって P 利用性を大きく増進させる可能性があり、畑地の半分が黒ボク土である日本では、重要な技術となるかもしれない。さらにⅣ章の結果から、本研究に用いた黒ボク土では、酵素分解可能なフィチン酸態 P が、潜在的には、易分解性モノエステル P にも匹敵する程、存在している可能性が示唆された。このことは、Ⅲ章による技術が土壌中で大きな効果を発揮することを暗示している。またⅣ章で示された、難利用性であると考えられていた Al や Fe に吸着していると考えられるフィチン酸様 P の作物根圏での減少は、植物体による難利用性 P の回収の期待を大きく膨らませる。今後の技術開発としては、根圏試料で化学的抽出法や酵素添加法を併用し、様々な作物種で試験することで Pi、Po の回収に優れた作物種を選定し、肥培管理に組み入れることなどが考えられる。また、その作物残渣を堆肥にすることを考えれば、先に述べたⅢ章の結果が生きてくる。さらに、厩肥にはフィチン酸が多く存在することが知られている (Turner et al., 2011)。このフィチン酸の利用のために、飼料中に分解酵素であるフィターゼの添加を行う場合もある。しかし、このフィターゼの添加は、フィチン酸をオルトリン酸に変化させるため、それを施肥した場合には表面流去水に

よる P の流出を増加させる可能性がある(Turner et al., 2011)。このような問題に、第IV章での結果を活かして、フィチン酸を活発に利用できる作物種の選定ができれば、土壌中に蓄積したフィチン酸態 P の利用促進と、厩肥による P 施与の効率化が図れる可能性がある。しかも、植物根圏でのフィチン酸の分解は、必要時に作土層で起こるため余分な P 流出も削減できる。本研究での結果は基礎的知見ではあるが、このような、技術と組み合わせた展開も考えられ、今後の P 利用性向上の一助となるものである。2050 年までに人口が 20-30 億人増加し、世界の食糧需要は倍増するといわれる(Foley, 2011)一方で、持続可能な農業として注目される有機農業は、その収量が慣行の 75%程度にとどまることが示されている(Seufert et al., 2012)。このような背景からも、有機質肥料や土壌中の Po の利用性を増加させる技術は非常に重要なものとなることが予想される。

土壌は様々な要因が複雑に絡みあう環境であり、1 つの視点からでは解決できない問題が多い。本研究では土壌酵素を用いて生物的な P 利用性を評価する方法を化学的、生化学的方法と組み合わせて提示した。また分子生物学的手法を用いることで、堆肥を鍵とする、微生物由来のホスファターゼによる Po 利用性向上技術の開発も暗示できた。さらに酵素添加法を用いて、作物根圏における Po 利用性の評価が可能なこと、また、生物的に利用できると考えられる P 化合物の幅が広いことを示した。これらのアプローチを組み合わせることで、P 施肥量の削減、土壌中に蓄積した Po の有効利用、有機質肥料の P 利用性の改善を達成し、総合的な P 節約、有効利用策を展開していけると考えられる。リン資源の需要が加速していくと考えられる現状で、持続的な農業を行っていくためにも、基礎研究の推進と技術開発、そして早急な農地への適用が望まれる。

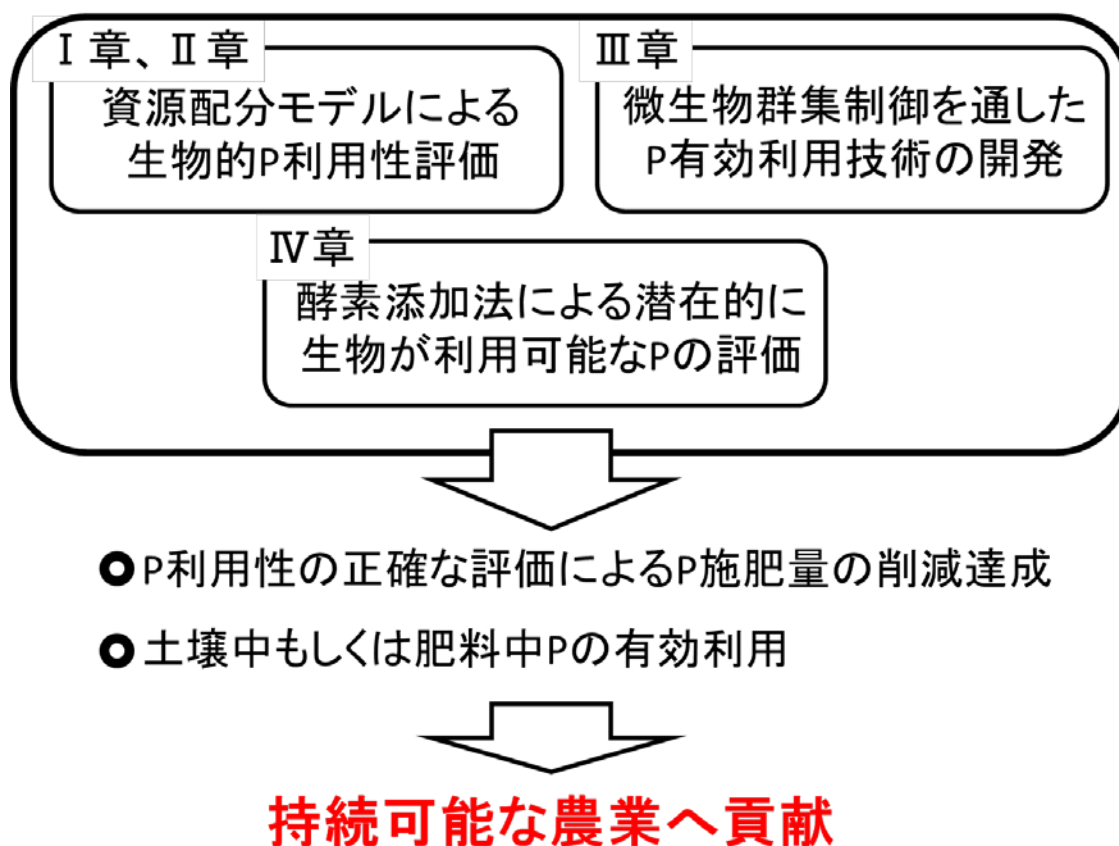


図 ii -1. 本研究の成果を通した持続可能な農業への貢献イメージ.

引用文献

- 阿江 教治、有原 丈二、岡田 健介. 1993. III キマメのリン酸吸収機構とピシディン酸誘導体の役割. 日本土壌肥料学会編: 植物の根圏環境制御機能, 博友社, 東京, pp. 85-124.
- Alef K, Nannipieri P. 1995. β -glucosidase activity. In: Alef, K., Nannipieri P., editors. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. London: Academic Press; pp. 350-352.
- Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. 1980. Quantities of plant nutrients in the microbial biomass of selected soils. *Soil Sci.* 130, 211-216.
- Antibus.R.K., Bower,D., Dighton,J. 1997. Root surface phosphatase activities and uptake of ^{32}P -labelled inositol phosphate in field-collected gray birch and red maple roots. *Mycorrhiza* 7, 39-46.
- Arao, T., Ishikawa, S., Murakami M., Abe, K., Maejima, Y., Makino, T. 2010. Heavy metal contamination of agricultural soil and countermeasures in Japan. *Paddy Water Environ.* 8, 247-257.
- Bach, H.-J., Hartmann, M., scholoter, M., Munch, J.C. 2001. PCR primers and functional probes for amplification and detection of bacterial genes for extracellular peptidases in single strains and in soil. *J. Microbiol. Methods* 44, 173-182.
- Ballard, R, Pritchett, W.L. 1975. Evaluation of soil testing methods for predicting growth and response of *Pinus elliotii* to phosphorus fertilization. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 39, 132-136.
- Bao, Z., Matsushita, Y., Morimoto, S., Hoshino, T.Y., Suzuki, C., Nagaoka, K., Takenaka, M., Murakami, H., Kuroyanagi, Y., Urashima, Y., Sekiguchi, H., Kushida, A., Toyota, K., Saito, M., Tsushima, S. 2013. Decrease in fungal biodiversity along an available phosphorus gradient in arable Andosol soils in Japan. *Can. J. Microbiol.* 59, 368-373.

- Beegle, D. 2005. Assessing soil phosphorus for crop production by soil testing. *In*: Sims, J.T., Sharpley, A.N., editors. Phosphorus: Agriculture and the Environment. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America; pp. 123-143.
- Bertland, I., Hinsinger, P., Jalillard B., Arvieu, J.C. 1999. Dynamics of phosphorus in the rhizosphere of maize and rape grown on synthetic, phosphated calcite and goethite. *Plant Soil* 211, 11-119.
- Bolland, M.D.A., Kumar, V., Gilkes, R.J. 1994. A comparison of five soil phosphorus tests for five crop species for soil previously fertilized with superphosphate and rock phosphate. *Fert. Res.* 37, 125-132.
- Borie, F., Zunino, H. 1983. Organic matter-phosphorus association as a sink in P-fixation processes in allophanic soils of Chile. *Soil Biol. Biochem.* 15, 599-603.
- Bottomley, P.J., Myrold D.D. 2007. Biological N inputs. *In*: Paul, E.A. (ed). *Soil microbiology, ecology and biochemistry* 3rd ed. Elsevier, MA. pp. 85-118.
- Brady, N.C., Weil, R.R. 2002. *The Nature and Properties of Soils*, 13th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Brookes, P.C., Powlson, D.S., Jenkinson, D.S. 1982. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biol. Biochem.* 14, 319-329.
- Carpenter, S.R. 2005. Eutrophication of aquatic ecosystems: Bistability and soil phosphorus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 10002-10005.
- Chang, S.C., Juo, S.R. 1963. Available phosphorus in relation to forms of phosphates in soils. *Soil Sci.* 95, 91-96.
- Chen, C.R., Condron, L.M., Davis, M.R., Sherlock, R.R. 2002. Phosphorus dynamics in the rhizosphere of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and radiata pine (*Pinus radiata* D. Don.). *Soil Biol. Biochem.* 34, 487-499.

- Chhabra, S., Brazil, D., Morrissey, J., Burke, J., O’Gara, F., Dowling, D.N. 2013. Fertilization management affects the alkaline phosphatase bacterial community in barley rhizosphere soil. *Biol. Fertil. Soils* 49, 31-39.
- Cleveland, C.C., Townsend, A.R., Schmidt, S.K. 2002. Phosphorus limitation of microbial process in moist tropical forests: evidence from short-term laboratory incubations and field studies. *Ecosystems* 5, 680-691.
- Colvan, S.J., Syers, A.G., O’Donell, A.G. 2001. Effect of long-term fertilizer use on acid and alkaline phosphomonoesterase and phosphodiesterase activities in managed grassland. *Biol. Fertil. Soils* 34, 258-263.
- Colwell, J.D. 1963. The estimation of the phosphorus fertilizer requirements of wheat in southern New South Wales by soil analysis. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 3, 190-197.
- Condon, L.M., Davis, M.R., Newman, R.H., Cornforth, I.S. 1996. Influence of conifers on the forms of phosphorus in selected New Zealand grassland soils. *Biol. Fertil. Soils* 21, 37-42.
- Cordell, D., Drangert, J-O., White, S. 2009. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environ. Change* 19, 292-305.
- Cross, A.F., Schlesinger, W.H. 1995. A literature review and evaluation of the Hedley fractionation: applications to the biogeochemical cycle of soil phosphorus in natural ecosystems. *Geoderma* 64, 197-214.
- Dahlgren, R.A., Saigusa, M., Ugolini, F.C. 2004. The nature, properties and management of volcanic soils. *Adv. Agron.* 82, 113-182.
- Díaz-Raviña, M., Acea, M.J., and Carballas, T. 1995. Seasonal changes in microbial biomass and nutrient flush in forest soils. *Biol. Fertil. Soils* 19, 220-226.
- Dilly, O. 2010. Microbial Energetics in soils. *In: Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions.* Buscot, F. and Varma, A. (eds.) Springer, Berlin, pp. 123-138.

- Elser, J., Bennet, E. 2011. A broken biogeochemical. *Nature*. 478, 29-31.
- Fixen, PE., Grove, JH. 1990. Testing soils for phosphorus. *In*: Westerman RL, editor. *Soil Testing and Plant Analysis*, 3rd edn. Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America; pp. 141-180.
- Fox, J. 2005. The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R. *J. Stat. Softw.* 14, 1-42.
- Foley, J.A. 2011. Can we feed the world and sustain the planet? *Sci. Am.* 305, 60-65.
- Galloway, J.N., Aber, J.D., Erisman, J.W., Seitzinger, S.P., Howarth, R.W., Cowling, E.B., Cosby, B.J. 2003. The Nitrogen cascade. *Bioscience* 53, 341-356.
- George, T.S., Gregory, P.J., Robinson, J.S., Buresh, R.J. 2002. Changes in phosphorus concentrations and pH in the rhizosphere of some agroforestry and crop species. *Plant Soil* 246, 65-73.
- George, T.S., Turner, B.L., Gregory, P.J., Cade-Menun, B.J., Richardson, A.E. 2006. Depletion of organic phosphorus from Oxisols in relation to phosphatase activities in the rhizosphere. *Eur. J. Soil Sci.* 57, 47-57.
- 岐阜県農林水産局. 2005. 岐阜県主要園芸作物体系.
- Gilbert, N. 2009. The disappearing nutrient. *Nature* 461, 716-718.
- Guo, F., Yost, R.S., Hue, N.V., Evensen, C.I., Silva, J.A., 2000. Changes in phosphorus fraction in soils under intensive plant growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, 1681-1689.
- 間藤 徹. 2001. カリウムとナトリウム. 植物栄養学. 間藤 徹、馬 建鋒、藤原 徹. 植物栄養学. 文英堂, 東京. pp. 115-123. .
- Halstead, R. L. 1964. Phosphatase activity of soils as influenced by lime and other treatment. *Can. J. Soil Sci.* 44, 137-143.
- Hashimoto, Y., Kang, J., Matsuyama, N., Saigusa, M. 2012. Path analysis of phosphorus retention capacity in allophanic and non-allophanic Andisols. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 76, 441-448.

- Havlin, J.L., Tisdale, S.L., Nelson, W.L., and Beaton, J.D. 2014. Soil Fertility and Fertilizers: An Introduction to Nutrient Management, 8th ed. Pearson, Boston.
- Hedley, M.J., Stewart, J.W.B., Chauhan, B.S. 1982. Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. Soil Sci. Soc. Am. J. 46, 970-976.
- Hedley, M.J. 2008. Techniques for assessing nutrient bioavailability in soils: current and future issues. *In*: Naidu R, editor. Chemical Bioavailability in Terrestrial Environments (Developments in Soil Science Vol. 32). Amsterdam: Elsevier; pp. 283-327.
- Helal, H.M., Sauerbeck, D.R. 1984. Influence of plant roots on C and P metabolism in soil. Plant Soil 76, 175-182.
- He, Z. Griffin, T.S. Honeycutt, C.W. 2004. Enzymatic Hydrolysis of Organic phosphorus in swine manure and soil. J. Environ. Qual. 33, 367-372.
- Hill, B.H., Elonen, C.M., Seifert, L.R., May, A.A., Tarquinio, E. 2012. Microbial enzyme stoichiometry and nutrient limitation in US streams and rivers. Ecol. Indic. 18, 540-551.
- 平舘 俊太郎. 1999. 根から分泌される有機酸と土壌の相互作用 土壌による吸着反応と有機酸による溶解反応. 化学と生物 37, 454-459.
- Holford, I.C.R. 1980. Effects of phosphate buffer capacity on critical levels and relationships between soil tests and labile phosphate in wheat-growing soils. Aust. J. Soil Res. 18, 405-414.
- Horwath, W. 2007. Carbon cycling and formation of soil organic matter. *In*: Paul, E.A. (ed). Soil microbiology, ecology and biochemistry 3rd ed. Elsevier, MA. pp. 303-339.
- Ino, Y. and Monsi, M. 1964. On the decomposition rate of soil organic matter in humic allophane soils of Mt. Kirigamine. Bot. Mag. 77, 168-175.
- 伊藤 豊彰、木川 直人、三枝 正彦. 2011. 黒ボク土におけるリン酸吸着と土壌リン酸の

- 可給性 アロフェン質黒ボク土と非アロフェン質黒ボク土の違いに注目して. ペドロ
ジスト. 55, 84-88.
- Izquierdo, J.E., Houlton, B.Z., van Huysen, T.L. 2012. Evidence for progressive phosphorus limitation over long-term ecosystem development: Examination of a biogeochemical paradigm. *Plant Soil* 367, 135-147.
- Jiao, W., Chen, W., Chang, A.C., Page, A.L., 2012. Environmental risks of elements associated with long-term phosphate fertilizers applications: A review. *Environ. Pollut.* 168, 44-53.
- Jorquera, M.A., Martinez, O.A., Marileo, L.G., Acuna, J.J. Saggar, S., Mora, M.L. 2014. Effect of nitrogen and phosphorus fertilization on the composition of rhizobacterial communities of two Chilean Andisol pastures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 99-107.
- Kamprath, E.J., Watson, M.E. 1980. Conventional soil and tissue tests for assessing the phosphorus status of soils. *In: Khasawneh, F.E., Sample, E.C., Kamprath, E.J., editors. The Role of Phosphorus in Agriculture. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America; pp. 433-469.*
- 金沢 晋二郎. 1994. 土壌酵素. 仁王 以智夫、木村 真人. 土壌生化学. 朝倉書店, 東京. pp. 52-72.
- Kanazawa, S., Kiyota, H. 1995. Estimation of L-glutaminase and L-asparaginase activities in soils by the indophenol method. *Soil Sci. Plant Nutr.* 41, 305-311.
- Kandeler, E. 1995. Protease activity. *In: Schinner, F., Öhliger, R., Kandeler, E., Margesin, R., editors. Method in Soil Biology. Springer, Berlin. pp. 165-168.*
- 唐澤 敏彦. 2009. 土壌微生物の機能を活用した土壌蓄積リンの有効利用技術. 農林水産技術研究ジャーナル 32, 31-35.
- Kaspari, M., Garcia, M.N., Harms, K.E., Santana, M., Wright, S.J., Yavitt, J.B. 2008. Multiple nutrients limit litterfall and decomposition in a tropical forest. *Ecol. Lett.* 11, 35-43.

- Kato, N., Zapata, F., Fardeau, J.C. 1995. The ability of chemical extraction methods to estimate plant-available soil P and a better understanding of P availability of fertilized Andosols by using isotopic methods. *Soil Sci. Plant Nutr.* 41, 781-789.
- Killham, K., Staddon, WJ. 2002. Bioindicators and sensors of soil health and the application of geostatistics. *In: Burns, R.G., Dick, R.P., editors. Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications.* New York: Marcel Dekker; pp. 391-405.
- 木村 真人. 1988. 根圏微生物を生かす. 農山漁村文化協会、東京. pp25-28.
- Kumar, V., Gilkes, R.J., Bolland, M.D.A. 1992. A comparison of seven soil P tests for plant species with different external P requirements grown on soils containing rock phosphate and superphosphate residues. *Fert. Res.* 33:35-45.
- Kunito, T., Nagaoka, K. 2009. Effects of plant litter type and additions of nitrogen and phosphorus on bacterial community-level physiological profiles in a brown forest soil. *Microbes Environ.* 24, 68-71.
- Kunito, T., Akagi, Y., Park, H.-D., Toda, H. 2009. Influences of nitrogen and phosphorus addition on polyphenol oxidase activity in a forested Andisol. *Eur. J. For. Res.* 128, 361-366.
- Kunito, T., Tsunekawa, M., Yoshida, S., Park, H.-D., Toda, H., Nagaoka, K., Saeki, K. 2012a. Soil properties affecting phosphorus forms and phosphatases activities in Japanese forest soils: Soil microorganisms may be limited by phosphorus. *Soil Sci.* 177, 39-46.
- Kunito, T., Tobitani, T., Moro, H., Toda, H. 2012b. Phosphorus limitation in microorganisms leads to high phosphomonoesterase activity in acid forest soils. *Pedobiologia* 55, 263-270.
- Kuo, S. 1996. Phosphorus. *In: Sparks, DL., Page, AL., Helmke, PA., Loeppert, RH., Soltanpour, PN., Tabatabai, MA., Johnston, CT., Sumner, ME., editors. Methods of Soil Analysis, Part 3, Chemical Methods.* Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America, American Society of Agronomy; pp. 869-919.

- Li, H., Shen, J., Zhang, F., Clairotte, M., Drevon, J.J., Cadre, E.L., Hinshinger, P. 2008. Dynamics of phosphorus fractions in the rhizosphere of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) grown in monocropping and intercropping systems. *Plant Soil* 312, 139-150.
- Li, M., Shinano, T., Tadano, T., 1997. Distribution of exudates of lupin roots in the rhizosphere under phosphorus deficient conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.* 43, 237-245.
- Li, H., Xu, X., Chen, H., Zhang, Y., Xu, J., Wang, J., Lu, X. 2013. Molecular analyses of the functional microbial community in composting by PCR-DGGE targeting the genes of β -glucosidase. *Bioresour. Technol.* 134, 51-58.
- Liu, Q., Loganathan, M.J., Hedley, M.J., Skinner, M.F. 2006. Root processes influencing phosphorus availability in volcanic soils under young *Pinus radiata* plantations. *Can. J. For. Res.* 36, 1913-1920.
- Lolenz, N., Verdel, K., Ramsier, C., Dick, R.P. 2010. A rapid assay to estimate soil microbial biomass potassium in agricultural soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 74, 512-516.
- Lougheed, T. 2011. Phosphorus paradox. *Environ. Health Perspect.* 119, 208-212.
- Marklein, A.R., Houlton, B.Z. 2012. Nitrogen inputs accelerate phosphorus cycling rates across a wide variety of terrestrial ecosystems. *New Phytol.* 193, 696-704.
- Marschner, H. 2002. *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd ed. Academic Press, London.
- Meena, V.S., Maurya, B.R., Verma, J.P. 2014. Does a rhizospheric microorganism enhance K⁺ availability in agricultural soils? *Microbiol. Res.* 169, 337-347.
- Mishima, S., Itahashi, S., Kimura, R., Inoue, T. 2003. Trends of phosphate fertilizer demand and phosphate balance in farmland soils in Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.* 49, 39-45.
- Monastersky, R. 2013. Global carbon dioxide levels near worrisome milestone. *Nature.* 497, 13-14.
- Moreno, B., Cañizares, R., Nuñez, R., Benitez, E. 2013. Genetic diversity of bacterial

- β -glucosidase-encoding genes as a function of soil management. *Biol. Fertil. Soils* 49, 735-745.
- 森本 昌、星野(高田) 裕子、2008. PCR-DGGE 法による土壌微生物群集解析法 (1) 一般細菌・糸状菌相の解析. *土と微生物* 62, 63-68.
- Motavalli, P.P., Miles, R.J. 2002. Soil phosphorus fractions after 111 years of animal manure and fertilizer applications. *Biol. Fertil. Soils* 36, 35-42.
- Murphy, J., Riley, J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta.* 27, 31-36.
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., Renella, G. 2011. Role of phosphatase enzymes in soil. *In*: Bünemann, EK., Oberson, A., Frossard, E., editors. *Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling (Soil Biology 26)*. Berlin: Springer-Verlag; pp. 215-243.
- 南條 正巳. 1997. 可給態リン酸. 土壌環境分析法編集委員会編. 土壌環境分析法. 博友社、東京. pp. 267-273.
- 南條 正巳. 2010. 黒ボク土壌に多量に蓄積したリン酸は利用可能か. *ペドロジスト* 54, 45-51.
- Negassa, W., Leinweber, P. 2009. How does the Hedley sequential phosphorus fractionation reflect impacts of land use and management on soil phosphorus: a review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 172, 305-325.
- 西尾 道德. 2003. 農業生産環境調査にもとづく我が国のリン酸施用実態の解析. *土肥誌* 74, 435-433.
- 西尾 道德、木村 龍介. 1986. リン溶解菌とその農業利用の可能性. *土と微生物* 28, 31-40.
- 小原 洋、中井 信. 2003. 農耕地土壌の交換性塩基類の全国的変動 農耕地土壌の特性

- 変動 (1). 土肥誌 74, 615-622.
- OECD. 2008. Environmental Performance of Agriculture in OECD Countries since 1990. Paris, France: OECD.
- 岡本 保、山田 裕. 2009. 施設スイートピーに発生したリン酸過剰による葉身白化症状. 土肥誌 80, 630-633.
- 岡本 保. 2012. リン酸過剰症が発生したスイートピーハウス土壌の可給態リン酸還元法. 土肥誌 83, 431-433.
- 岡崎 智哉. 2011. 十勝の農耕地におけるリン酸の利用と蓄積の実態. ペドロジスト 55, 89-92.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H. 2013. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-10.
- Olander, L.P., Vitousek, P.M. 2000. Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. Biogeochemistry 49, 175-190.
- Olsen, S.R., Cole, C.V., Watanabe, F.S., Dean, L.A. 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate (USDA Circular No. 939). Washington, DC: USDA.
- 大竹 久夫. 日本の「リン資源」が危ない!. 化学 66, 19-23.
- Osorio, N.W., Habte, M. 2013. Phosphate desorption from the surface of soil mineral particles by a phosphate-solubilizing fungus. Biol. Fertil. Soils 49, 481-486.
- Otani, T., Ae, N. 1996. Phosphorus (P) uptake mechanisms of crops grown in soils with low P status. I. Screening of crops for efficient P uptake. Soil Sci. Plant Nutr. 42, 155-163.
- Otani, T., Ae, N., Tanaka, H. 1996. Phosphorus (P) uptake mechanisms of crops grown in soils with low P status. II. Significance of organic acids in root exudates of pigeonpea. Soil Sci. Plant

- Nutr. 42, 553-560.
- Otani, T, Ae, N. 1999. Extraction of organic phosphorus in Andosols by various methods. *Soil Sci. Plant Nutr.* 45, 151-161.
- Perrott, K.W., Sarathchandra, S.U., Waller, J.E. 1990. Seasonal storage and release of phosphorus and potassium by organic matter and the microbial biomass in a high-producing pastoral soil. *Aust. J. Soil Res.* 28, 593-608.
- Plante, A.F. 2007. Soil biogeochemical cycling of inorganic nutrients and metals. *In*: Paul, E.A. (ed). *Soil microbiology, ecology and biochemistry* 3rd ed. Elsevier, MA. pp. 389-432.
- Powers, J.S. Salute, S. 2011. Macro- and micronutrient effects on decomposition of leaf litter from two tropical tree species: inferences from a short-term laboratory incubation. *Plant Soil* 346, 245-257.
- Randalls, S. 2010. History of the 2C° climate target. *WIREs Clim. Change* 598-605.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Roberts, F.J. 1968. The annual pattern of potassium release from organic matter in sandy soils of south-west Australia. *Aust. J. Soil Res.* 6, 193-202.
- Römheld, V. Kirkby, E.A. 2010. Research on potassium in agriculture: needs and prospects. *Plant Soil* 335, 155-180.
- Rubæk, G.H., Sibbesen, E. 1995. Soil phosphorus dynamics in a long-term field experiment at Askov. *Biol. Fertil. Soils* 20, 86-92.
- 齋藤 雅典. 1998. 土壌と植物をつなぐ VA 菌根菌. *化学と生物* 36, 682-687.
- 齋藤 雅典. 1990. 東北地方における畑土壌の窒素無機化特性値 各種可給態窒素指標との関係について. *土肥誌* 61, 265-272.
- 齋藤 雅典. 2011. リン資源の枯渇と農業生産への有効利用. *遺伝* 65, 32-38.

- Sakurai, M., Suzuki, K., Onodera, M., Shinano, T., Osaki, M. 2007. Analysis of bacterial communities in soil by PCR-DGGE targeting protease genes. *Soil Biol. Biochem.* 39, 2777-2784.
- Sakurai, M., Wasaki, J., Tomizawa, Y., Shinano, T., Osaki, M. 2008. Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase genes in soil supplied with organic matter. *Soil Sci. Plant Nutr.* 54, 62-71.
- Seedling, B., Jungk, A. 1996. Utilization of organic phosphorus in calcium chloride extracts of soil by barley plant and hydrolysis by acid and alkaline phosphatases. *Plant Soil* 198, 179-184.
- Seufert, V., Ramankutty, N., Foley, J.A. 2012. Comparing the yields of organic and conventional agriculture. *Nature* 485, 229-232.
- Sharpley, A.N., Sims, J.T., Pierzynski, G.M. 1994. Innovative soil phosphorus availability indices: Assessing inorganic phosphorus. *In*: Havlin, J.L., Jacobsen, J.S., editors. *Soil Testing: Prospects for Improving Nutrient Recommendations*. Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America; pp. 115-142.
- Shoji, S., Nanzyo, M., Dahlgren, R.A. 1993. *Volcanic Ash Soils*. Amsterdam: Elsevier.
- Simard, R.R., Cluis, D., Gangbazo, G., Beauchemin, S., 1995. Phosphorus status of forest and agricultural soils from a watershed of high animal density. *J. Environ. Qual.* 24, 1010-1017.
- Sinsabaugh, R.L., Follstad Shah, J.J. 2012. Ecoenzymatic stoichiometry and ecological theory. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 43, 313-343.
- Sinsabaugh, R.L., Moorhead, D.L. 1994. Resource allocation to extracellular enzyme production: a model for nitrogen and phosphorus control of litter decomposition. *Soil Biol. Biochem.* 26, 1305-1311.
- Skujins, J.J. 1967. Enzymes in soil. *In*: McLaren AD, Peterson GH, editors. *Soil Biochemistry*. New York: Marcel Dekker; pp. 371-414.

- Stotzky, G., Norman, A.G. 1961a. Factors limiting microbial activities in soil. I. The level of substrate, nitrogen, and phosphorus. *Arch. Mikrobiol.* 40, 341-369.
- Stotzky, G., Norman, A.G. 1961b. Factors limiting microbial activities in soil. II. The effect of sulfur. *Arch. Mikrobiol.* 40, 370-382.
- 杉戸 智子. 2011. 黒ボク土壌でのリン酸肥沃度の再評価 - 土壌微生物バイオマスリンは指標となるのか? -. *土と微生物* 65, 34-40.
- 杉戸 智子、吉田 光二. 2006. 黒ボク土畑の土壌微生物バイオマスリン測定のためのクロロホルム燻蒸法の改良. *土と微生物* 60, 11-15.
- Sui, Y., Thompson, M.L., Shang, C. 1999. Fractionation of phosphorus in a Mollisol amended with biosolids. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63, 1174-1180.
- Susuki, A., Lawton, K., Doll, E.C. 1963. Phosphorus uptake and soil tests as related to forms of phosphorus in some Michigan soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 27, 401-403.
- 鈴木 一好. 2010. 家畜ふん尿の新処理・利用技術と課題 ; 4. 豚舎汚水中の MAP 結晶化法による除去回収及び利用技術. *土肥誌* 81, 609-613.
- Tabatabai, M.A. 1994. Soil enzymes. *In*: Weaver, R.W, Angle, S., Bottomley, P., Bezdicek, D., Smith, S., Tabatabai, M.A., Wollum, A., editors. *Methods of Soil Analysis, Part 2, Microbiological and Biochemical Properties*. Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America; pp. 775-833.
- Tadano, T., Ozawa, K., Sakai, H., Osaki, M., Matsui, H. 1993. Secretion of acid phosphatase by the roots of crop plants under phosphorus-deficient conditions and some properties of enzyme secreted by lupin roots. *Plant Soil* 155/156, 95-98.
- 高田 裕介、中井 信、小原 洋. 2009. 1992 年の農耕地分布に基づくデジタル農耕地土壌図の作成. *土肥誌* 80, 50-505.
- 武田 容枝. 2010. 土壌リンの存在形態と生物循環. *土と微生物* 64, 25-32.

- Tan, H., Barret, M., Mooij, M.J., Rice, O., Morrissey, J.P., Dobson, A., Griffiths, B., O’Gara, F. 2013. Long-term phosphorus fertilisation increased the diversity of the total bacterial community and the *phoD* phosphorus mineraliser group in pasture soils. *Biol. Fertil. Soils* 49, 661-672.
- Tarafdar, J.C., Jungk, A. 1987. Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. *Biol. Fertil. Soils* 3, 199-204.
- Tate, R.L., III. 2000. *Soil Microbiology*, 2nd ed. John Wiley & Sons, New York.
- Thies, J.E. 2007. Molecular methods for studying soil ecology. *In*: Paul, E.A. (ed). *Soil microbiology, ecology and biochemistry* 3rd ed. Elsevier, MA. pp. 85-118.
- Tiessen, H., Moir, J.O. 2008. Characterization of available P by sequential extraction. *In*: Carter, M.R., editor. *Soil Sampling and Methods of Analysis*, Second Edition. Boca Raton, FL: CRC Press; pp. 293-306.
- Tiessen, H., Ballester, M.V., Salcedo, I. 2011. Phosphorus and global change. *In*: Bünenmann E.K., Oberson, A., Frossard, E., editors. *Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling (Soil Biology 26)*. Berlin: Springer-Verlag; pp. 459-471.
- Truog, E. 1930. The determination of the readily available phosphorus of soils. *J. Am. Soc. Agron.* 22, 874-882.
- Turner, B.L., Papházy, M.J., Haygarth, P.M., McKelvie, I.D. 2002. Inositol phosphate in the environment. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 357, 449-469.
- Turner, B.L., Wright, S.J. 2014. The response of microbial biomass and hydrolytic enzymes to a decade of nitrogen, phosphorus, and potassium addition in a lowland tropical rain forest. *Biogeochemistry* doi: 10.1007/s10533-013-9848-y
- Vaccari, D.A. 2009. Phosphorus: A looming crisis. *Sci. Am.* 300, 54-59.
- Varanova, V., Rejsek, K., Formanek, P. 2013. Proteolytic activity in soil: A review. *Appl. Soil Ecol.* 70, 23-32.

- Vimpany, I.A., Nicholls, P.J., Milham, P.J., Bradley, J. 1997. Reactive Fe controls the relative amount of PO₄ extracted from acidic soils by NaHCO₃ and by acidic fluoride. I. Soils without recent P additions. *Aust. J. Soil Res.* 35, 355-364.
- von Mersi, W., Schinner, F. 1991. An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with idonitrotetrazolium chloride. *Biol. Fertil. Soils* 11, 216-220.
- Walker, T.W., Syers, J.K. 1976. The fate of phosphorus during pedogenesis. *Geoderma* 15, 1-19.
- Wallis, P.D., Haynes, R.J., Hunter, C.H., Morris, C.D. 2010. Effect of land use and management on soil bacterial biodiversity as measured by PCR-DGGE. *Appl. Soil Ecol.* 46, 147-150.
- Wang, Y., Zhang, F., Marschner, P. 2012. Soil pH is the main factor influencing growth and rhizosphere properties of wheat following different pre-crops. *Plant Soil.* 360, 271-286.
- 和崎 淳. 2012. リン酸資源の枯渇に対応したリン栄養研究. 2. 有機態リンの利用. *土肥誌.* 83, 177-182.
- Yang, X., Post, W.M. 2011. Phosphorus transformations as a function of pedogenesis: A synthesis of soil phosphorus data using Hedley fractionation method. *Biogeosciences* 8, 2907-2916.
- Yousef, R.A., Chino, M. 1988. Development of a new rhizobox system to study the nutrient status in the rhizosphere. *Soil Sci. Plant Nutr.* 34, 461-465.
- 吉田 富夫、坂井 弘. 1963. 北海道における各種土壌の微生物学的研究 -4-. *北海道農業試験場彙報* 82, 23-27.
- Zubillaga, M., Giuffré, L. 1999. Soil phosphorus mobilization in different taxonomic orders. *J. Plant Nurt. Soil Sci.* 162, 201-205.

謝辞

信州大学理学部物質循環学科の國頭 恭先生には、研究活動の遂行にあたり、多大なご助言、ご指導をいただきました。また、論文投稿、研究の際の心構えをお教えいただき、苦しいときには本当に温かい励ましも頂きました。最大の敬意とともに、心より感謝申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科の大塚 重人先生、信州大学理学部物質循環学科の朴 虎東先生、戸田 任重先生、宮原 裕一先生には本論文執筆にあたりご助言、ご指導を賜りました。厚く御礼申し上げます。

また、中央農業総合研究センターの長岡 一成博士、長野県農業試験場の佐藤 強氏、長野県野菜花き試験場の矢口 直輝氏、齋藤 龍司氏、出澤 文武氏にはサンプル提供、分析においてご助言、ご指導を頂きました。御礼申し上げます。

また、同研究室の井表 靖貴氏、日比野 翔太氏、墨 泰孝氏、田中 詩織氏、舘野 泰明氏、中山 到氏、松下 純子氏、市川 靖崇氏、梅山(旧性 古沢) 美日夏氏、小向 由季子氏、中村 芳氏、宮原 大夢氏、伊藤 大智氏、川面 貴司氏、堀 由紀子氏、小川 恵理子氏、竹川 周兵氏、藤田 一輝氏、丸山 るな氏、北原 晴輝氏、栗田 博朗氏、瀬田 亮氏、小野寺 千尋氏、桐原 峻氏、久保田 悠美氏、久守 正樹氏には在学中はもちろん、卒業してからも励ましの言葉を頂きました。ここに御礼申し上げます。また、他の物質循環学科の先輩、後輩方にも多くの支えを頂きました。有難う御座いました。

最後になりましたが、私をここまで育て、博士課程までの学費の支援もしていただいた両親、祖父母に御礼申し上げます。特に父を亡くしてからここまで一人で育て上げ、挫けそうになった時に絶えず励まして頂いた母に感謝の意を表したいと思います。本当に有難う御座いました。