

論文の内容の要旨

論文題目 茶園土壌の亜酸化窒素生成に関する研究

氏名 徳田進一

現代の食料生産において、高い生産性を維持するためには、窒素肥料の利用が必要不可欠である。しかし、窒素肥料の過剰施用は、地域レベルでは地下水の硝酸汚染を引きおこし、地球レベルでは温室効果ガスである亜酸化窒素 (N_2O) の生成を増加させている。 N_2O は農地から発生する温室効果ガスとしては、二酸化炭素やメタンよりも温暖化係数 (GWP) が大きく、オゾン層の破壊にも関与している。そのため、農業形態別の N_2O 発生量の把握と発生機構の解明が急がれている。一方、茶園土壌の室内培養試験や、ライシメーターを使った茶の栽培試験の結果から、茶園からの窒素揮散の可能性が示唆されていた。しかし、これまで茶園からの窒素揮散量、揮散のメカニズムについて検討した報告はほとんどない。茶園は窒素施肥量が多く、これに伴って土壌が酸性化しており、これまで得られている知見から、 N_2O として窒素が揮散している可能性が考えられた。そこで、茶園土壌から N_2O が生成しているかどうかを調査するとともに、 N_2O 生成量と土壌の理化学性や肥培管理との関係を明らかにし、さらには N_2O 発生機構を生成反応とそれに関与する微生物のレベルで検討した。

最初に土壌の N_2O 生成能の評価方法を確立した。茶園土壌 (生土) を三角フラスコに入れ、アンモニア態窒素と硝酸態窒素をそれぞれ 0.4 mgN g^{-1} 乾土になるように添加し、水分含量を最大容水量の 60% に調整した後、フラスコ気相を大気条件のままに密

封した。25°Cで培養し、定期的にフラスコ気相中の N₂O 濃度を ECD-GC で分析した。その結果、無機態窒素を添加した茶園土壌からは、培養開始から 2 週間目まで一定速度で N₂O が生成し続けた。この時、フラスコ気相中の酸素濃度は 19%以上を維持していた。茶園土壌の N₂O 生成能は 3.8 μg N₂O ·N g⁻¹ d⁻¹ と計算され、これまで報告されている森林土壌や草地土壌、一般の畑土壌の値に比べて 3~1000 倍以上高かった。また、供試土壌を、風乾、4°Cで長期保存、あるいは供試前に前培養しても N₂O 生成能は上昇しなかった。以上の結果から、好気条件において、強酸性化した茶園土壌の N₂O 生成能は非常に高く、それは茶園土壌がもともと有している性質であると考えられた。さらに、重窒素標識した無機態窒素を添加した茶園土壌から発生するガスを GC-MS で分析したところ、重窒素標識されていたのは N₂O のみで、標識された窒素ガスは検出されなかった。このことから、茶園土壌からは N₂O が生成していることが確認されるとともに、窒素揮散の形態は N₂O が中心で窒素ガスの揮散はほとんどないと考えられた。

次に、N₂O 生成能と土壌の理化学性や肥培管理との関係を明らかにするために、国内の主要な茶産地を持つ府県の茶業関係研究所で管理されている試験圃場から、畝間表層土壌を採取して解析した。その結果、茶園土壌の N₂O 生成能と土壌 pH には負の指数関数的相関が認められ、土壌 pH が低くなるほど加速度的に N₂O 生成能が高まった。また、相関関係からはずれて著しく高い N₂O 生成能を有していた 3 種類の土壌は、これら土壌を採取した茶園の窒素施肥量が 1,000 kgN ha⁻¹ y⁻¹ を越えていた。そこで、N₂O 生成能と土壌の理化学性、肥培管理との関係をさらに検討するために、異なる肥培管理を長期継続している野菜茶業研究所内の四要素試験圃場から、窒素肥料と石灰資材（苦土石灰）の施用量が異なるために土壌 pH が異なる土壌を採取し、N₂O 生成能を比較した。その結果、石灰資材を施肥しないことによって酸性化した土壌に比べ、窒素多肥によって酸性化した土壌の N₂O 生成能は非常に高かった。以上の結果から、長期にわたる窒素多肥によって土壌 pH が低下することによって、茶園土壌の N₂O 生成能が高まったと考えられた。

茶園土壌が高い N₂O 生成能を持つという知見を確かなものとするために、四要素試験圃場からの N₂O フラックスを 2 年間にわたって測定し、N₂O フラックスと土壌の理化学性や地温、降水量等との相関関係を検討した。その結果、圃場からも N₂O が大気中に多量に放出されており、室内培養試験の結果と同様に、窒素施肥量が多く、土壌 pH が低い圃場ほど放出量は多かった。また、茶園からの N₂O フラックスは大きな時間的変動を示したが、その変動要因を解析したところ、従来報告されている土壌水分や無機態窒素含量ではなく、土壌の N₂O 生成能の影響が最も強かった。以上の結果から、窒素施肥量が多く、土壌 pH が低い茶園からは多量の N₂O が生成することが、圃場に

においても確認された。

茶園土壌は土壌 pH が低いほど N₂O 生成能が高かったが、これはこれまでに報告のない事例であった。そこで、この理由を明らかにするために、茶園土壌からの N₂O 生成機構を検討した。茶園土壌のような酸性条件では化学的脱窒による非生物反応によって N₂O が生成する可能性が示されている。そこで、オートクレーブによって滅菌した土壌に亜硝酸態窒素を添加したところ、土壌からの N₂O 生成量はわずかであった。このことから、土壌全体の N₂O 生成量への化学的脱窒による N₂O 生成の寄与は小さく、主に生物反応によって N₂O が生成すると考えられた。茶園土壌からの N₂O 生成量は硝化抑制剤（ニトラピリン）の添加によって 23.7%減少したが、この減少分は主に硝化由来の N₂O 生成量に相当すると考えられた。一方、硝化抑制剤を添加しても抑制できない N₂O は脱窒由来と考えられた。硝化だけを選択的に抑制する濃度のアセチレンガスを培養フラスコ気相に添加しても依然として N₂O が発生することからも、茶園土壌では脱窒から N₂O が生成すると考えられた。以上の結果から、強酸性化した茶園土壌を好気条件で培養した場合、N₂O は硝酸化成と脱窒の両方から生成するが、脱窒が主反応であると考えられた。

次に、茶園土壌における好氣的脱窒による N₂O 生成に関与する微生物を検討した。細菌と糸状菌の生育を選択的に阻害する抗生物質として、それぞれクロラムフェニコールとシクロヘキシミドを茶園土壌に添加したところ、無添加土壌に比べ、N₂O 生成量はクロラムフェニコールによって 44%、シクロヘキシミドにより 91%が阻害された。このことから、茶園土壌からの脱窒による N₂O 生成には細菌だけでなく糸状菌も関与しており、糸状菌が関与する割合が大きいと考えられた。そこで、N₂O 生成能の高い茶園土壌から希釈平板法等によって 82 株の糸状菌を分離し、純粋培養における N₂O 生成能を評価した。その結果、74 株が N₂O 生成能を有していたが、培養期間中の N₂O 生成量、生育に伴う酸素消費量、菌体増殖量は菌株によって異なっていた。分離株のうち、最も N₂O 生成量が多かった菌株について、純粋培養時の培養フラスコ気相の N₂O 濃度と酸素濃度の変化を詳細に測定した。その結果、この糸状菌はフラスコ気相中の酸素濃度が培養開始 36 時間後に大気レベルから低下し始めると同時に N₂O を生成し始め、酸素消費速度が最大の時に N₂O 濃度の増加速度も最大になった。また、利用可能な酸素が消費されつくし、酸素濃度が一定の値を示し始める 120 時間目以降には、N₂O 濃度の増加速度も低下した。次に、N₂O 生成活性測定培地の pH と硝酸態窒素濃度が N₂O 生成速度に及ぼす影響を検討した。培地 pH が 8.0 から 4.0 に低下するにつれて N₂O 生成速度は徐々に高まり、pH 3.0 では著しく増大した。培地の硝酸態窒素濃度が 500 mgN L⁻¹ まではほぼ一定の速度であったが、この濃度を超えると N₂O 生成速度は増加し、

2,000 mgN L⁻¹ でも N₂O 生成は阻害されなかった。この糸状菌の純粋培養による試験で得られた、培地の pH と硝酸態窒素濃度に対する応答に関する知見は、茶園土壌の N₂O 生成の特徴に類似するものであった。

脱窒活性の茶園内での垂直分布を明らかにするために、茶園の畝間表層から不透水層までの下層土壌をボーリングにより採取して、理化学性と生物性を分析した。全細菌数と脱窒菌数は表層から下層にかけて減少したが、深さ 15 m を超えると再び増加し、下層土壌にも表層と同程度かそれ以上の細菌、脱窒菌が存在した。また、表層から深さ 1.2 m に存在した有機物層では、その上下の土壌に比べ細菌数、脱窒菌数とも多かった。脱窒活性は表層から下層にかけて急激に低下したが、グルコースの添加により下層土壌の脱窒活性は高まることから、下層土壌でも脱窒が起こりうると考えられた。有機物層と地下水面における硝酸態窒素濃度の窒素安定同位体自然存在比の変化からも、これらの部位で脱窒が起こっている可能性が示された。

強酸性茶園土壌の生物性の特徴を、土壌微生物バイオマス量と FDA (二酢酸フルオレセイン) 分解活性から検討した。茶園土壌の微生物バイオマス量は中性土壌に匹敵し、また微生物活性の指標となる FDA 分解活性は、土壌 pH が低いほど高くなる傾向が認められた。

以上の結果から、茶園土壌からの N₂O 生成について、次のように結論づけた。

- ① 好気条件において、今まで報告されている中性土壌に比べて、多量の N₂O を生成する。
- ② N₂O 生成能は土壌 pH が低いほど高く、特に窒素施肥量が一定レベルを超えると著しく増大する。
- ③ N₂O 生成過程は、好気条件にあるにもかかわらず脱窒が主要な生成反応である。
- ④ 好気条件における脱窒による N₂O 生成には糸状菌の関与が大きく、実際に茶園土壌から分離した糸状菌の多くが N₂O 生成能を有していた。