

# 第1章 緒 言

## 第1節 草地における土壤微生物の役割と本研究の目的

土壤微生物は草地生態系のなかで極めて大きな役割を果たしている。その一つは、有機物の分解者としての役割である。草地には、牧草の未利用部分や牧草枯死茎葉、家畜の糞尿など、他の耕地に比べて大量の有機物が還元される。その量を測定することは容易ではないが、Whiteheadの総説<sup>186)</sup>では、ニュージーランドで冬期間に枯死茎葉320kg/10aが還元された例、採草地の刈株が620kg/10aにもなった例や、オーストラリアで390kg/10aのリターが還元された例が紹介された。また、三木ら<sup>106)</sup>は、牧草収量の増加にともなって枯死茎葉還元量も増加し、年間700kg/10aの収量をあげた草地での枯死茎葉還元量は約250kg/10aにも達することを報告した。

枯死茎葉に加えて、根部からの有機物供給も無視できない。カナダのマタドール草地では光合成量の約40%が根部に分配されると報告された<sup>184)</sup>。Bakerら<sup>6)</sup>は、低く見積っても年間340kg/10aの枯死根が土壤に供給されるとした。三木ら<sup>106)</sup>とBakerら<sup>6)</sup>の結果をもとに、枯死茎葉のN、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>含有率をそれぞれ1.7%、0.7%、枯死根のそれを、それぞれ0.9%、0.4%として計算すると、地上部・地下部合計で年間にそれぞれ7.0、3.2kg/10aのNとP<sub>2</sub>O<sub>5</sub>が土壤に還元されることになる。これらが土壤微生物によって円滑に分解され、無機成分となって牧草に供給されることは、もともと施肥量が充分とはいえない<sup>73)</sup>草地における牧草生産にとって重要な意味を持つ。本研究では有機物分解の観点からみた土壤の微生物的性質を便宜上「微生物特性」として論議をすすめる。

土壤微生物の中で牧草に対する養分供給においてより直接的な働きをしているのは、マメ科牧草と共生する根粒菌である。気象条件の良好なニュージーランドでは、牧草生産に必要な窒素の全てを根粒固定窒素、いわゆる「clover nitrogen」に頼っており<sup>91)</sup>、その重要性は論を持たない。

一方、牧草は栄養成長期に収穫され、これを年間数回にわたって繰り返すために、無機養分の収奪量が多い。天北地方の気象条件で、安定的に生産可能と考えられる乾物750kg/10a・年を得るためには、窒素を例にとると、10a当たり約20kgが必要となる。しかし、草地での施肥は充分とはいえず、それ故、有機物が分解して生ずる無機成分とマメ科牧草による窒素固定の重要性は大きい。

しかし、有機物の分解は雑多な土壤微生物群によって行われるため、これまでのところ本格的な研究対象となることが少なく、特に北海道の草地を対象とした研究は、沢田ら<sup>149)</sup>や吉田ら<sup>193)</sup>の研究があるのみである。また、マメ科牧草による窒素固定に関しても、窒素施肥法や、草種の組合せによる植生維持の観点からは多くの研究がなされているが<sup>58, 112, 180)</sup>、マメ科牧草・根粒菌による共生窒素固定系による窒素固定量や、固定された窒素の土壤および草地生産性への影響を直接解析した例は少ない。

従って、本研究は、草地の物質循環と窒素固定を通じて草地の生産力に大きな影響を与える土壤微生物の働きの特徴や、それらを規制する要因を明らかにして、土壤微生物を活用した草地の管理法を明らかにすることを目的として実施した。

## 謝 辞

本研究をとりまとめるにあたり、北海道大学農学部教授 但野利秋博士には終始懇切なるご指導をいただき、さらに本稿のご校閲を賜った。北海道大学農学部教授 佐久間敏雄博士、および同教授 富田房男博士には本稿のご校閲をいただき、有益なご助言をいただいた。ここに深甚なる謝意を表する。

本研究は、元天北農試土壤肥料科長 高尾欽弥氏のご指導とご援助により開始したものであり、後任の西宗昭博士には研究の遂行に当り貴重なご助言と絶大なるご援助をいただいた。また、元天北農試場長 後藤計二氏、同 南松雄博士にはご指

導とご援助をいただいた。元十勝農試土壤肥料科科長 相馬暁博士、同 沢口正利博士、前同科長 下野勝昭博士、十勝農試土壤肥料科科長 山神正弘氏には取りまとめに際し終始変わらぬご激励とご配慮をいただいた。

さらに、元天北農試土壤肥料科研究職員 三木直倫氏、同 宝示戸雅之氏には本研究の遂行に際しご助言とご助力をいただいた。

以上各位に心から感謝の意を表する。

## 第2節 微生物の生育環境としての天北重粘土 草地

宗谷支庁全域および留萌・上川・網走支庁の北部は総称して天北地方と呼ばれる。本地域の農業は1970年代から、草地型酪農としての発展を指向しており、1989年現在、農家1戸当りの草地面積61ha、牛の飼養数61頭（宗谷支庁平均、公共草地を含む）と、わが国では、根釧地方と並ぶ大規模化を達成している。また、当地域の土壤は、北海道の3大特殊土壤の1つに数えられる重粘土が

表1-1 天北地方の気温、降水量の特徴

月	月平均気温（℃）				月平均降水量（mm）			
	天北地方 （浜頓別）	根釧地方 （中標津）	道央 （札幌）	草地試験場 （西那須野）	天北地方 （浜頓別）	根釧地方 （中標津）	道央 （札幌）	草地試験場 （西那須野）
1	-8.1	-8.3	-6.4	0.4	80	58	114	41
2	-9.0	-9.2	-6.2	1.8	59	42	92	46
3	-4.2	-4.0	-1.8	4.8	68	77	78	77
4	2.3	3.3	5.0	10.6	62	109	65	117
5	8.8	9.0	11.3	15.3	92	140	59	150
6	12.5	12.3	15.4	19.0	66	126	76	222
7	17.2	16.8	19.7	22.9	88	97	80	225
8	18.6	18.6	20.5	24.1	138	117	131	254
9	14.9	15.0	16.0	20.2	126	132	142	241
10	8.7	9.0	10.0	14.5	140	123	115	140
11	1.0	2.1	3.2	8.8	137	97	104	72
12	-4.4	-3.9	-3.2	3.8	93	50	101	44
平均	4.9	5.1	7.0	12.2	1149	1168	1158	1629

表1-2 天北地方の気象の特徴

項目	天北地方 （浜頓別）	根釧地方 （中標津）	道央 （札幌）	草地試験場 （西那須野）
根雪初め（月・日）	11.17	12.22	12.10	—
最大積雪深（cm）	93	66	102	—
根雪終り（月・日）	4.19	4.13	3.30	—
積雪期間（日）	143	114	110	—
無霜期間（日）	129	121	160	—

主体となっている。我国における大規模草地のほとんどが火山性土壌を基盤とするのに対し、これは天北地方の大きな特徴である<sup>126)</sup>。

道立天北農業試験場における気象の特徴を、札幌市、農水省草地試験場のある栃木県西那須野、および同じ草地型酪農地帯に位置する根釧農業試験場（中標津町）と比較して表1-1、1-2に示した。当地域は、北海道の北部に位置するため、年平均気温5℃と、極めて冷涼であり、無霜期間も短い。そのため、特に宗谷支庁北部では、飼料用トウモロコシ作が不安定であり、粗飼料を草地に頼らざるを得ない。しかも、8月の月平均気温は20℃に満たず、月平均気温が牧草にとっての有効気温である5℃以上の月は5～10月までの6ヶ月間にすぎない。一方、降雪が早いので、土壌の凍結は起こらない。このことは、土壌凍結が起こる根釧地方と対照的であり、天北地方の栽培可能草種を変化に富んだものになっている。また、5月から10月までの降水量は450mmであり、牧草にとって充分とはいえない<sup>65, 108)</sup>。当然、自然草地は存在せず、草地は前植生を除去した後に、寒地型の優良牧草を播種して造成される。

この地域でよく利用される採草型イネ科牧草は、オーチャードグラスであり、根釧地方が「チモシーランド」と呼ばれているのに対して、「オーチャードランド」と呼ばれている。これは、当地域の根雪が早く、土壌凍結がほとんどないので、冬損が少なく、オーチャードグラスが極めて安定なためである。凍上による断根もないのでアルファルファを栽培し得る可能性もある。特に、排水良好な土壌に生育したアルファルファは地中深く根を伸ばし、吸水をおこなうので乾燥年でも高い乾物収量が得られる。しかし、天北地方の重粘土は一般に保水力が小さいので浅根性のラジノクローバは、不安定である。

また、草地型酪農といっても、寒冷積雪地帯であるため放牧期間は5月下旬から11月上旬までの200日程度に限られ、さらに、地形が入り組んで放牧地面積に制約があるため、大量の貯蔵飼料を生産する必要がある。そのため、単位面積当りの牧草収量を向上させることが要求され、その実現

のため相当量の施肥が必要となる。

こうした条件の中で草地は耕起されることなく、数年から数十年にわたって施肥・利用が繰り返される。この際、肥料は当然草地表面に施用される。また、畑地のように毎年耕起されることはないので、施肥・収穫・飼料調整等の機械走行によって土壌の堅密化が加速される。このため、物理的にも、化学的にも草地表層の作土は激的な変化を受け、0-15cmの比較的浅い土層内でも、理化学性の点で明確な層位分化を起こす<sup>104)</sup>。

まず、0-2cm土層では、雨水中の重炭酸イオンや肥料中の随伴アニオンにより、主にカルシウムが流亡し、酸性化が進行する<sup>66)</sup>。カルシウムの流亡量は、年間20~40kg/10aにもなり、pHは4.5を下回るようになる。逆に、土壌中で動きにくいリン酸やカリは施肥と枯死茎葉の地表面への還元のために、年間の施肥量に匹敵する量が草地表面に蓄積されていく<sup>34)</sup>。地上部枯死茎葉の還元のみならず、草地の経年化によって牧草根も浅い層に集中してくるので<sup>12, 122)</sup>、草地表面には、有機物が集積してくる<sup>186)</sup>。ただし、天北地域では草地表面の有機物層が、容易に剥離するような「root mat」が形成されることはない。これは、積雪が早く（表1-2）凍上が起きないことによると考えられる。作土の下層では、無機・有機成分ともに吸収あるいは分解されるのみで、作土表層と比べてこれらの供給が極めて限られるので、長期にわたる圃場実験では、僅かではあるがカリ、リン酸、有機物等の含量に低下傾向がみられる<sup>74)</sup>。

天北地方の土壌はもともと堅密な重粘土が主体となっている。これに、機械走行・家畜の蹄圧が加わって、この傾向は一層増幅される。土壌が堅密であること自体が牧草生育の制限要因となる場合もある。加えて、保水量は小さく、根釧の火山性土壌と比べても有効水分量は半分にすぎない<sup>61)</sup>。このため夏期の降水量不足は牧草収量の低下をもたらす。また、前述の様に土壌の堅密化に対応して、根群の過半は作土上部に集中するので、水ストレスを受けやすくなり、これも低収化の原因となる。草地生態系の一次生産者であり、微生物に基質を供給する源となる牧草は、以上に記した

ような草地の経年化に伴う土壌理化学性の悪化によって低収化する。

これらの草地土壌の理化学性、植生変化の方向・程度は、当然、造成後の経過年数と施肥・利用等草地管理法によって左右される。そして、牧草収量が経済的に成り立たない水準まで低下した段階で更新が行われ、更新された草地は再び経年化の道を歩むことになる。このように、草地は決して一定したものではなく、更新から経年草地、低収草地へとアクティブに変化するものであり、これも、北海道に立地する人工草地の特徴といえる。

以上に記した土壌、気象、植生、施肥管理等の要因が総合して、天北地方の草地土壌における微生物特性を形造ると考えられる。

### 第3節 草地土壌微生物に関する既往の研究

#### 1. 草地土壌の微生物数と活性に関する研究

##### (1) 草地土壌の微生物特性

###### 1) 土層間の違い

土壌はその生成過程や母材の堆積様式によって、層位分化を起こしており、これが土壌分類の基礎となっている。層位分化は土壌の微生物特性にも影響をおよぼし、逆に微生物作用も、腐植の生成等を通じて層位分化に影響を及ぼす。微生物特性をいくつかの土層に分けて測定することは、土壌の微生物的な特徴付けを行う上で重要な手段と言える。このため、国内外を問わず微生物の数や活性が土層別に測定されている。その結果、程度の差はあれ下層ほど微生物数や活性が低下することが報告されている。

北海道における研究の事例をあげると、吉田らは、沖積土、重粘土、火山性土、泥炭土の耕地と未耕地を比較し、耕地化によって表層土の菌数が著しく増加したのに対して、下層土では変化が小さかったこと<sup>191)</sup>、湿地統の土壌では下層土における微生物数の低下が大きかったこと<sup>195)</sup>を報告した。関谷<sup>155)</sup>は十勝地方の主要畑土壌の微生物数を層位別に測定し、地下水位の高い土壌では下層土の低下程度が大きいかを明らかにした。

微生物特性の層位分化は、土層間のみでなく、

比較的浅い作土内でも認められる。この場合も、一部の例外を除いて、下層に向かうほど微生物数や活性は低下することが報告されている。

Vandecaveyeら<sup>177)</sup>は、草地と林地の土壌を0-1.3, 1.3-10, 10-25cmの土層に分けて微生物数を測定し、草地では細菌の、林地では糸状菌の土層間差が大きかったことを報告した。Waksman<sup>181)</sup>は下層での微生物数の低下が、園地よりも林地・草地で大きいことを認めた。我国でも沢田ら<sup>150)</sup>は火山性土壌に立脚した林地、耕地、草地の比較を行い同様の結果を得るとともに、草地土壌の物理性、特に耕起されないことによる通気性の悪化が微生物数の低下をもたらすと推定した。

微生物数と活性の層位間差については数多くの報告がある。その主要な例を表1-3に示した。これらは土層の分け方、測定項目・測定法の点で異なっており、直接の比較はできないが、下層での微生物数の低下程度は土壌によって多様であることが理解できる。天北地方の草地では、化学性の面で、作土表層の十数cmの範囲でも明確な層位分化が起こった<sup>66)</sup>。加えて、物理性の面でも、火山性土に立地した草地とは著しく異なる<sup>129)</sup>。この様な土壌環境条件が微生物特性にどのように反映しているかは、天北地方における草地土壌の微生物特性を把握する上で重要な点である。さらに、下層土壌の低い微生物活性が、その土層での有機物分解速度にどのような影響を及ぼすかを明らかにしようとする試みはほとんど行われておらず、今後の問題点として残されている。

###### 2) 季節変化の特徴

土壌の微生物特性は、物理性や化学性に比べて施肥を行わない条件でも、通常大きな季節変化を示すことが知られている。季節変化の把握は土壌微生物研究上次の2つの点で重要な意味を持っている。1つは季節変化そのものが、土壌微生物に対する自然的・人為的働きかけを反映しており、研究対象となる土壌の特徴が明確に表される点である。すなわち、季節変化の特徴は、層位分化と同様に、その土壌の特徴を示す指標の1つと言える。他の1つは、微生物特性の土壌間差を比較す

表1-3 稀釈平板法による細菌数の土層間差に関する既往の主要な研究報告

報告者 (年次) 国名	層位 (cm)	細菌数 ( $10^6/g \cdot \text{土}$ )			備考
		畑地	草地	林地	
Waksman <sup>181)</sup> (1916) アメリカ	0-2.5	7.2	9.2	2.1	季節変化の
	-10	7.7	5.7	1.2	平均値
	-20	4.0	2.9	0.4	
	-30	1.3	1.3	0.3	
Blueら <sup>9)</sup> (1955) アメリカ	0-15	8.1	—	—	無施肥区での
	-23	5.8	—	—	季節変化の
	-30	5.2	—	—	平均値
Vandecaveyeら <sup>177)</sup> (1938) アメリカ	0-1.3	—	5.7	2.7	季節変化の
	-10	—	2.7	2.8	最大値・最小値
	-25	—	1.9	1.1	の平均値
Rossら <sup>138)</sup> (1968) ニュージーランド	1-2	—	16.5	—	4地域の平均値
	2-5	—	15.3	—	
	12-15	—	12.0	—	
	27-30	—	6.6	—	
沢田ら <sup>149)</sup> (1962) 日本・札幌	0-5	—	13.4	—	3草地の平均値
	-15	—	5.9	—	
沢田ら <sup>150)</sup> (1975) 日本・西那須野	0-5	61	104	47	供試土壤の
	-10	38	16	12	平均値
Campbellら <sup>18)</sup> (1982) カナダ	0-2.5	67	—	—	季節変化の
	-15	28	—	—	最大値・最小値
	-30	4	—	—	の平均値

るための条件を決める際の基礎データとなることである。

季節変化の大きい時期に異なる土壌間の微生物特性を比較したのでは、その大小関係を正確に捉えることはできない。土壌間の比較を行う場合に、どの時期に各種微生物の測定を行うのが適当であるかを知るためには、その季節変化の特徴をあらかじめ知る必要がある。

季節変化を起す要因の中で、最も良く知られているのは、気温や降雨量を反映した土壌の温度、乾湿などの気象要因である。一般に、低温条件は微生物活性を抑制し、凍結・融解の繰返しは一部

の微生物に損傷を与える。また、乾燥条件は微生物活動を制限する。土壌系においても、Mack<sup>98)</sup>、Soulidesら<sup>162)</sup>は、土壌の凍結・融解、乾燥は微生物数を低下させることを報告した。この際、乾燥の効果は凍結・融解よりも大きく、有機物を多く含んだ土壌の方が微生物数の低下程度が大きかった。Liら<sup>96)</sup>は中国の高原草地で窒素代謝に係わる細菌数と温度・降水量の間に正の相関関係をみいだした。

Campbellら<sup>18)</sup>は3年間にわたって畑土壌の細菌数を調査し、低温条件で細菌数が低下する可能性を示し、一旦乾燥した後に水分が与えられるこ

とによって菌数増加が起こることを報告した。また別の報告<sup>17)</sup>で、夏期には細菌数が土壤水分に左右されることを明らかにした。土壤水分が細菌数の季節変化の支配要因になることはLundgrenら<sup>97)</sup>も認めている。ニュージーランドの草地でも、酸素消費・還元糖生成の季節変化が土壤水分と密接な関係を有することが報告された<sup>136)</sup>。同様にアメリカの草地でも、土壤水分が高いほど炭酸ガス放出量が増大し、その影響は温度が高いほど大きくなることが認められた<sup>187)</sup>。以上のように、乾燥土壌では、土壤水分が微生物数と活性の季節変化をもたらす主要因となる。

これらの他に、微生物数と活性に季節変化をもたらす要因として、基質供給量の変化があげられる。凍結・融解、乾燥は一時的に微生物が利用可能な基質量を増加させることが知られており、高温条件も比較的難分解性有機物をより分解され易い形態に変化させる作用があると推定されている<sup>81)</sup>。

このほか、植生からの基質供給は、微生物数と活性に顕著な増減をもたらす。畑地では作物残渣が土壤に付与されることによって微生物数の増加が観察された<sup>18)</sup>。Katznelson<sup>88)</sup>は、mangel栽培土壌で年2回のセルロース分解菌の増加を観察し、1回目の増加は根の分泌物に、2回目の増加は地上部残渣の還元由来であると推定した。Kauri<sup>89)</sup>はブナ林土壌で春には下草、秋には落葉による基質供給に対応した細菌数の増加が起こったことを報告した。

さらに、土壌に対する人為的な働きかけも広い意味では季節変化の要因となる。鏡谷ら<sup>1)</sup>は、耕起によって微生物数が増大し、その後低下していくことを報告した。また、堆肥等の微生物の基質となる有機物の施用は、微生物数と活性の増加をもたらす、その消耗によって微生物数は施用以前の水準まで低下した<sup>102, 116, 192)</sup>。

前述の諸要因が複合して、それぞれの土壌に特有な微生物数と活性の季節変化のパターンを形造ることになる。一般に、微生物の数と活性は、春と秋に高まり夏と冬に低下する様な季節変化を示すと言われているが、既往の文献ではこれに合致

しない場合も多くみられる。特に畑地での報告では、春と秋の両方に明確なピークを示す例はほとんど報告されていない。他方、草地や林地では春と秋にピークを示す例がWaksman<sup>181)</sup>、Vandecaveyeら<sup>177)</sup>、Kauri<sup>89)</sup>、岡野ら<sup>124)</sup>によって報告された。しかし、これに対し草地や林地の場合でも、規則的な季節変化が認められなかった例がRossら<sup>136, 142)</sup>、Lundgrenら<sup>97)</sup>によって報告された。

季節変化の変動幅は、下位の土層ほど小さくなることが報告されている<sup>17, 18)</sup>。これは、温度・水分等の土壌微生物特性に季節変化を起こす要因の変動が下層ほど小さいためである。

以上のように、土壌微生物特性の季節変化は気象・土壌・植生等の影響を複雑に受け、極めて多様なものである。天北地方における草地土壌の微生物特性がどのような季節変化を辿るかは興味ある問題であるが、草地土壌における微生物特性の季節変化を支配する要因については、十分に解明されているとは言えないので、これについても検討を加える必要がある。

## (2) 微生物特性の規制要因

～土壌微生物特性に影響を与える環境要因～  
前項で論じた土壌微生物特性の季節変化に影響を与える要因は、当然いづれも、微生物特性の土壌間差違をかたちづくる要因にもなる。

特に、有機物量は、土壌の微生物数と活性を支配する大きな要因である。人為的な有機物施用はほとんどの場合微生物数・活性・バイオマスを増加させる。関谷<sup>155)</sup>は、十勝地方の火山性土壌において、表層有機物(腐植)蓄積量の多い土壌で微生物数が多いことを報告した。Zantuaら<sup>200)</sup>、Sparling<sup>163)</sup>は、それぞれウレアーゼ活性、ATP含量と土壌有機物含量との間に正の相関関係を認めた。

草地の例では、ニュージーランドの草地で全炭素含量が微生物バイオマス、窒素無機化量や、フォスファターゼ活性と正の相関を示すことが報告されている<sup>148)</sup>。また、同じニュージーランドで、Rossらは、酸素消費量、シュクロース・グルコースの分解活性<sup>136, 137, 138)</sup>およびバイオマス炭素量<sup>140)</sup>

が有機炭素量と関連性のあることを明らかにした。ただし、土壤の微生物特性は他の要因の影響を複雑に受けるために、この関係は、常に一定したものではない<sup>178)</sup>。また、草地の植生の違いは微生物活性に影響をもたらすことが報告されており、これも植生から供給される有機物の量・質の違いに由来すると考えられる<sup>137)</sup>。

土壤の物理性も水分供給や、酸素供給を通じて、微生物特性に影響を及ぼす。吉田ら<sup>196)</sup>は土壤水分が微生物相を規制するとともに、それらの作用に対して直接影響を与えると考察した。水分供給と酸素供給は表裏一体の関係にある。東海地方における重粘土畑地において、硝化作用は土壤空気量が10%以下で抑制されること<sup>70)</sup>、稲藁の分解は土壤空気量12%以下で抑制されること<sup>103)</sup>が報告された。草地においても、水分含有率の上昇に従って、好気性細菌、亜硝酸酸化菌数が低下することが認められた<sup>147)</sup>。以上は、微生物に対する酸素供給が制限要因になった例である。これに対し、逆に水分の供給が制限要因となる場合も多い。先の東海地方の重粘土畑地では、硝化作用、稲藁の分解が、それぞれ土壤水分20%以下<sup>70)</sup>、23%以下<sup>103)</sup>で抑制された。田中<sup>173)</sup>は、毛管水と吸湿水の範囲では土壤水分が高いほど細菌数が多いこと、灌水によって細菌数とグラム陰性菌数が増加することを報告した。また、乾燥の影響はグラム陰性菌においてより大きく現れた<sup>43)</sup>。

耕起によって土壤の物理性は大きく変化するが、その微生物への影響は土壤の種類や気象条件によって異なった形で現れるようである。ソ連のチェルノーゼム土壤では、簡易耕に比べて、普通耕で細菌、放線菌、糸状菌および硝酸化成菌数が増加し、その程度は多雨年に大きかったことが報告された<sup>201)</sup>。Suzukiら<sup>168)</sup>もプラウ耕と浅耕の比較で同様の傾向を認めている。これらは耕起によって通気性が改善された例である。これに対して、アメリカ（オレゴン）では、通常の耕起をほどこした土壤に比べて不耕起土壤の方が高い土壤酵素活性（アルカリフォスファターゼ、アシドフォスファターゼ、インベルターゼ、アミダーゼ、ウレアーゼ）を示した<sup>31)</sup>。この要因として耕起によって土

壤が過乾に陥った可能性がある。

土壤の化学性も、微生物特性に影響を与える要因の1つに数えられる。吉田ら<sup>194)</sup>は、火山性土で微生物数の低い原因が活性アルミニウムによる有機物やリン酸の不可給化にあるとした。関谷ら<sup>156)</sup>は、pH5.3の火山性土壤に炭酸カルシウムを施用してpH矯正を行うことにより、微生物数が増加することを報告した。また、ポット条件ではあるが、Campino<sup>19)</sup>はカリの施用が微生物活性を高め、窒素の無機化量を増大させたことを報告した。一方、殺菌剤や過剰の重金属は土壤の酵素活性（アミダーゼ）を低下させた<sup>36)</sup>。

草地においても、沢田ら<sup>151)</sup>は、低pH、低リン酸草地で微生物数が減少したことを報告した。しかし、Sarathchandraら<sup>148)</sup>がニュージーランドで土壤pH4.9~6.8の草地20ヶ所について各種微生物特性を調査した結果、土壤pHはどの微生物特性とも相関を有しなかった。同じく、Ross<sup>137)</sup>がpH5.0~6.7までの草地を調査した結果では、pHはアミラーゼ、インベルターゼ活性と見かけ上マイナス相関を示した。実際には低pH条件が微生物特性を向上させることは考えられず、これらの実験系では、pH以外の条件がより強く微生物活性の高低を支配したと考えられる。

この様に、土壤の微生物数と活性はいわばその土壤の置かれている立地・環境条件を総合的に反映するものであり、多種多様の要因の影響を受ける。そのため、ある対象地域の微生物特性規制要因の解明を直接目的とした研究は少なく、さらに微生物数と活性の改善およびその制御法に関する試みはほとんどなされていない。

### (3) 測定法の問題

現在までのところ土壤の微生物特性は極めて多種多様の方法で測定されてきた。土壤微生物特性の捉え方としては大きく分けて、微生物数、微生物活性、および微生物バイオマスの3つに大別される。ここでは、それらの測定法の特徴を既往の文献から紹介する。

#### 1) 希釈平板法、希釈頻度法

希釈平板法の特徴は、特定培地でコロニーを形

成する菌は計数されるが、当然のことながらコロニーを形成できない菌は計測されないところにある。これは、この方法の長所であり短所にもなっている。このため希釈平板法で土壤中に生存する全ての微生物を計測することは困難である。しかし、使用する培地の種類を変えることによって、種類の異なる菌や、特殊な分解能を有する微生物を分別して計測することは可能である。近年、服部は希釈平板上に形成されるコロニーを経時的に計数することから始めて、コロニー形成モデルを創出した<sup>44)</sup>。この研究は土壤微生物研究手法としての希釈平板法に新たな光を当てるものである。

希釈平板法、希釈頻度法（最確法）は古くに開発されたため、1960年代以前の土壤微生物研究は主にこれらの方法でおこなわれた。草地土壤を対象とした研究では、希釈平板法で一般的に測定されている細菌、糸状菌、グラム陰性細菌以外に、Azotobacter・好気性セルロース分解菌・嫌気性窒素固定菌<sup>177)</sup>、非共生窒素固定菌<sup>135)</sup>、孢子形成細菌・蛍光性シュードモナス<sup>147)</sup>、リン溶解菌<sup>117)</sup>などが測定された。

希釈頻度法は希釈平板で識別が不可能であり、かつ特定の生理活性を有する菌を計数する場合に多く用いられる。草地では、硝酸化成菌<sup>166)</sup>、アルファルファ根粒菌<sup>111)</sup>、アンモニア化成菌・脱窒菌<sup>96)</sup>の測定例が報告された。

## 2) 土壤微生物の酵素活性

酵素活性は、炭酸ガス放出量やTTC（トリクロルテトラゾリウムクロライド）還元活性の様に基質を加えない方法と、基質を加えてその減少量や反応生成物の増加量を測定する方法に大別される。近年、人工基質の利用や分析法の進歩によって簡便に土壤の酵素活性が測定できるようになり、研究例が急増した<sup>87)</sup>。草地では表1-4に挙げるような測定例が報告された。

酵素活性測定上の問題点は、土壤採取後に活性測定のため一定期間の培養が必要なことである。その間、基質の添加、土壤の攪乱によって、採取前の微生物相が変化する可能性がある。Burnsら<sup>16)</sup>は許容される培養期間を4時間程度であるとした。炭酸ガス放出量、硝酸化成活性の測定のため

数日を超える培養を行っている場合があるが、このようなデータの解釈には注意が必要である。

## 3) 微生物バイオマス

微生物バイオマスは従来顕微鏡による検鏡法で測定された。検鏡法では、まず、一定量の土壤懸濁液を寒天などでスライドガラス上に固定し、染色して、検鏡する。視野中に認められる細菌、糸状菌を大きさ別に積算することによって、その体積を求め、それに比重をかけて重量に換算する手順となる<sup>76)</sup>。検鏡法による草地の微生物バイオマスの測定はBabiukら<sup>5)</sup>、岡野ら<sup>124)</sup>によって報告されており、それぞれ、土層深0~30cm、0~20cmの微生物バイオマス量を155~232、48~98g/m<sup>2</sup>と推定した。この量は牧草現存量の約10%にあたる。

しかし、検鏡法による微生物バイオマスの測定は、高度な技術を要するばかりでなく、時間的にも大きな労力を必要とする。そこで、他の方法を用いてより簡便に土壤のバイオマスを測定することが試みられている。

Jenkinsonら<sup>75)</sup>の提案したクロロフォルム薫蒸法は、土壤微生物をクロロフォルムで殺菌し、それに再び微生物を添加して培養後生じた炭酸ガス量から、殺菌されたバイオマス量を推定しようとするものである。この方法は、手軽であり、再現性にも優れているが、反面、有機物施用直後の土壤やpHの低い土壤での測定には誤差が大きい。それ故、枯死茎葉や牧草根などが集積した草地での利用には疑問が残る。近年、クロロフォルムで殺菌された菌体由来の有機態炭素をK<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液を用いて直接抽出・定量すること<sup>164)</sup>、並びにKCl溶液による抽出液中のニンヒドリン反応性化合物<sup>2)</sup>からバイオマス量を推定することも試みられている。

さらに、Jenkinsonら<sup>77,78)</sup>は、生体中のエネルギー伝達を担っている物質であるATPを土壤微生物から抽出・定量し、それを基にバイオマス量を推定する方法を提案した。近年、発光分析によるATP測定が容易に行えるようになり、この方法も比較的手軽に利用できるようになった。しかし、高温（37℃）で活発に有機物分解が行われて



表1-4 草地土壤の微生物活性測定例

報告者 (年度) 国名	測定項目 (基質)	測定値	測定値
Pauli <sup>129)</sup> カナダ(1965)	デヒドロゲナーゼ	15-60 $\mu$ l	H <sub>2</sub> /20g•soil
Ross <sup>138)</sup> ニュージーランド(1968)	シュウクロース分解活性	0.45-4.3	pmol/g•sec
	デンプン分解活性	0.04-0.26	pmol/g•sec
	酸素消費量	6.7-47	pmol/g•sec
Ladd <sup>92)</sup> オーストラリア(1971)	プロテアーゼ(Z-phe-leu)	0.59-3.5	nmol/g•sec
	プロテアーゼ(カゼイン)	0.09-0.29	nmol/g•sec
Pancholy <sup>127, 128)</sup> アメリカ(1973)	アミラーゼ	6.4-51.4	pmol/g•sec
	セルラーゼ	12.8-270	pmol/g•sec
	インベルターゼ	6.4-508	pmol/g•sec
	デヒドロゲナーゼ	116-12346	pmol/g•sec
	ウレアーゼ	0.07-2.0	pmol/g•sec
de Jong <sup>83)</sup> カナダ(1974)	炭酸ガス放出量	138-786	mg/m <sup>2</sup> •hr 5月1日~9月1日の平均値
Redmann <sup>133)</sup> カナダ(1978)	炭酸ガス放出量	200mg/m <sup>2</sup> •hr	年間の最大値
Steele <sup>166)</sup> ニュージーランド(1980)	硝酸化成力	0.4-15.58	pmol/g•sec
Speir <sup>165)</sup> ニュージーランド(1982)	インベルターゼ	46-150	nmol/g•sec
	アミラーゼ	10-38	nmol/g•sec
	セルラーゼ	281-448	pmol/g•sec
	ヘミセルラーゼ	3.0-12.0	nmol/g•sec
	ウレアーゼ	21-126	nmol/g•sec
	フォスファターゼ	33-170	nmol/g•sec
	スルファターゼ	16-58	nmol/g•sec
Sarathchandra <sup>148)</sup> ニュージーランド (1984)	硝酸化成力	3.0-463	pmol/g•sec
	炭酸ガス放出量	32-175	pmol/g•sec
	フォスファターゼ	1500-9100	pmol/g•sec
	アシルスルファターゼ	40-1580	pmol/g•sec
	プロテアーゼ	14-125	pmol/g•sec
	ウレアーゼ	340-3820	pmol/g•sec

表1-5 草地における土壤微生物バイオマスの測定例

報告者 (年度) 国名	測定方法	測定結果 (乾物表示) (土層深)
Clarkら <sup>25)</sup> (1970)	検鏡法	D.M.155-232 g/m <sup>2</sup>
Jenkinsonら <sup>75)</sup> (1976)	クロロフォルム薫蒸法	D.M.404 g/m <sup>2</sup> (23cm)
Jenkinsonら <sup>77,78)</sup> (1979)	クロロフォルム薫蒸法	C 0.9-1.1mg/g (15cm)
Rossら <sup>139)</sup> (1980)	クロロフォルム薫蒸法	C 0.5-2.8mg/g (8cm)
Rossら <sup>141)</sup> (1981)	クロロフォルム薫蒸法	C 0.1-1.1mg/g (5cm)
東田ら <sup>52)</sup> (1981)	クロロフォルム薫蒸法	C 0.2-0.4mg/g (10cm)
Grahamら <sup>40)</sup> (1985)	クロロフォルム薫蒸法	C 0.3-0.5mg/g (30cm)
Sparlingら <sup>164)</sup> (1988)	SIR	C 0.2-2.0mg/g (5or7.5cm)
Sarathchandraら <sup>148)</sup> (1984)	クロロフォルム薫蒸法	C 1.3-2.5mg/g (7.5cm)

SIR:基質添加による炭酸ガス放出量の増加から推定

いる土壤が極めて低いATP含量を示すなど、説明しにくい現象も観察されており<sup>81)</sup>、すべての局面でATP法によるバイオマスの測定が可能ではなさそうである。

これらの他に、Andersonら<sup>3)</sup>は、グルコース添加時の炭酸ガス放出量からバイオマスを推定した。この方法は、短時間で測定が可能であるのに加えて、ストレプトマイシンやシクロヘキシミド等の選択性のある呼吸阻害抗生物質を利用することによって細菌と糸状菌バイオマスを分別測定できる長所を有している。ただし、有機物が施用されていて炭酸ガス放出量の多い土壤には適用し難い。

さらに、微少熱量計によるバイオマスの測定もSparlingら<sup>163)</sup>によって試みられた。これらの方法で草地バイオマスを測定した研究例を表1-5に示した。

ここまでで紹介した微生物数、微生物活性およびバイオマスの測定は、それぞれ特色を有しており、研究目的に応じて使い分けられている。本研究の目的の1つは、草地生態系の物質循環に係わる有機物の分解・無機化を担っている微生物活性の定量的把握とその活性化についての方策を検討することにある。この目的のためには、微生物特性を正確に評価することが不可欠である。希釈平板法も、有機物を添加した寒天培地上にコロニーを形成し得る微生物を測定することから、土壤微

生物中の活性の高い画分を示す指標として利用できる<sup>5)</sup>。

一方、検鏡法で測定される細菌数は希釈平板の10~数100倍におよぶことが報告されている<sup>124)</sup>。しかし、これらの土壤に存在する細菌の全てが活発に代謝活動を行なっているのではなく、多くは休止状態にあると考えられる<sup>44)</sup>。これに関して、Rossら<sup>142)</sup>はクロロフォルム薫蒸法によって測定したバイオマスとインベルターゼ、アミラーゼ、セルラーゼ、およびフォスファターゼ活性の間に正の相関が認められないことを報告した。また、Sparlingの報告<sup>163)</sup>では、アミラーゼ活性と呼吸法バイオマスとの間に有意な正の相関関係があったものの、薫蒸法バイオマスとの間には相関が認められなかった。これらから、全ての微生物を測定することを目的としたバイオマス測定は、活発に活動していない菌も含めて測定していることが示唆される。そこで、本研究では、希釈平板法と、酵素活性による微生物活性の測定を主な研究手段とした。この中で、微生物活性は表1-4に示すように、数多くの方法が草地土壤系に応用されており、これらの方法間に相関関係が存在することも認められた<sup>37,86,142,148)</sup>。研究対象である土壤系での微生物特性を数値化するために最も適当な測定法はどれかを整理する必要がある。

## 2. マメ科牧草の窒素固定に関する研究

### (1) マメ科牧草混播草地の生産力

草地の維持管理は牧草生産そのものを目的として行われるのではなく、酪農・畜産への飼料供給の手段であるため、他の農耕地に比べて一層の低コスト化が要求される。低コスト化の有力な手段の1つがマメ科牧草・根粒菌による共生窒素固定系の利用である。これを有効に活用することによって少なくとも窒素肥料を大幅に削減することができる。そのため、世界各地で、その地域の気象・土壌条件に適合したマメ科牧草の導入が行われている。

Wagner<sup>179)</sup>は、無窒素栽培したラジノクローバ混播草地の蛋白収量が、窒素18kg/10aを施用したイネ科単播草地に匹敵することを報告した。Wedinら<sup>185)</sup>、Cowling<sup>26)</sup>もラジノクローバ混播草地で同程度の窒素生産を得たことを報告した。表1-6にCowlingのまとめたクローバの効果について示した。ここで紹介されている草地は、いずれも20kg/10aの窒素施用と同程度の窒素固定を行った。

適正管理されたアルファルファ混播草地では、更に大きな窒素固定が得られる。Carterら<sup>20)</sup>は、アルファルファ混播草地と同等の窒素収量を得るためには、イネ科牧草混播草地に年間27kg/10aの窒素を施用しなければならないことを報告している。また、気象条件の良好なニュージーランドの草地では、白クローバでも年間最大65kg/10aの窒素固定が可能なが紹介された<sup>69)</sup>。この生物固

定窒素を背景として、ニュージーランドでは、世界で最も低コストの酪農生産が可能となっている。

一方、天北地方はラジノクローバにとって良好な気象・土壌条件にないため、先に紹介した報告に比べ、ラジノクローバの生産性は低い。ラジノクローバ混生率が40%程度の草地では、窒素10kg/10aのイネ科牧草単播草地と同程度の収量をあげることが出来るが、年6kg/10a程度の窒素施用でもラジノクローバ混生率を一定に保つことが難しく、年によっては10%以下まで落ち込むことが報告された<sup>55)</sup>。それに対し、排水の良い土壌に造成されたアルファルファ混播草地の生産性は極めて高い。中村ら<sup>112)</sup>の報告によると、適正に管理されたアルファルファ混播草地の乾物収量は年間約1000kg/10aであった。これは、年間20kg/10aの窒素を施用したイネ科牧草単播草地を凌いでおり、天北地方の冷涼な気象条件を考えるとかなり大きな値といえる。ここで紹介した研究の他にも、マメ科牧草混播草地の収量性について検討を行った例は数多くあるが、マメ科牧草混播草地の生産性の中での窒素固定の役割について解析した例は少ない。

### (2) 主要マメ科牧草の窒素固定の特性

マメ科牧草の研究は、まず草地としての生産力や植生の維持に主眼をおいて行われたが、1970年代後半からは研究方法としてアセチレン還元活性や<sup>15</sup>Nが比較的手軽に使えるようになり、窒素固定自体の研究が進められるようになった。

表1-6 マメ科牧草混播草地と同等の収量を得るためのイネ科牧草単播草地への必要窒素施用量 (Cowling<sup>27)</sup>)

報告者	混播イネ科草	必要窒素施用量(kg/10a)	
		乾物収量対応	窒素収量(N-yield)対応
Holmes, W.	12種類のイネ科草	121	212
Wilman, D.	ライグラス	184	260
Cowling, D.W.	オーチャードグラス	162	238
Wagner, R.E.	オーチャードグラス	160	200

### 1) マメ科牧草とマメ科畑作物との比較

一年でその生育が完結し、子実生産が目的であるマメ科畑作物と、栄養体が収獲物であり、永年性が前提であり越冬を行わなければならないマメ科牧草では、窒素固定の特性にいくつかの相違点が認められる。Murphy<sup>111)</sup>はエンドウと数種のマメ科牧草を比較し、マメ科牧草では炭酸ガス濃度を高めて光合成量を増加させると、根重の増加が著しく、その結果、根粒数が増えてアセチレン還元活性が高まることを報告した。また、Henson<sup>50)</sup>はアルファルファではダイズに比べて、固定窒素が根に集積される割合が高いことを見いだした。これらの結果は、マメ科牧草では、子実生産を目的とするマメ科畑作物と異なり、栄養生長と生殖生長の競合が激しくないことから、炭水化物や窒素化合物が根粒に供給されやすいことを示唆している。

### 2) 窒素固定の日変化と季節変化

窒素固定の日変化についてはアセチレン還元法で調査した例が報告された。Marriott<sup>100)</sup>、Halliday<sup>41)</sup>は白クローバのアセチレン還元活性が光合成産物の供給を反映して、日没前に最高となり、日の出前に最低となることを報告した。これは、西宗ら<sup>118)</sup>がダイズで調査した結果と同一パターンである。それに対し、吉田ら<sup>197)</sup>の報告では、白クローバのアセチレン還元活性に特徴的な日変化が見いだせなかった。ただし、暗処理を数日間続けることによって、アセチレン還元活性の大幅な低下が観察されている。また、Haystead<sup>47)</sup>は、ポット条件でアセチレン還元活性の典型的な日変化を得たが、放牧地では日変化の幅がきわめて小さかったことを報告した。これらの報告による違いは、それぞれの実験系における白クローバの炭水化物蓄積量の違いに由来すると考えられる。

Marriott<sup>99)</sup>は白クローバのアセチレン還元活性の季節変化について報告した。白クローバのアセチレン還元活性は地温とほぼ対応しており、起生期以降に高まり、夏に最大となって、秋には低下していった。白クローバ乾物当りのアセチレン還元活性もほぼ同じ推移をたどった。後に紹介するアルファルファと異なり白クローバのアセチレン

還元活性は、生育ステージの影響を受けないようである<sup>20)</sup>。また、秋期におけるアセチレン還元活性の低下と関連してMurphy<sup>111)</sup>は、短日条件下で白クローバのアセチレン還元活性当りのH<sub>2</sub>発生が増加することから、窒素固定のエネルギー効率が低下すると推定した。

アルファルファのアセチレン還元活性は起生期地上部の再生にともなって上昇し、着らい期・開花初期に最高となり、開花期以降は低下した<sup>188)</sup>。

草地では、必然的に1年間に数回の刈り取りがおこなわれ、このことがアセチレン還元活性の季節変化に対して大きな影響を及ぼす。刈り取りは、光合成を中断し、蓄積した炭水化物も牧草の再生に使われるので、アセチレン還元活性は低下した。吉田ら<sup>197)</sup>によると、白クローバのアセチレン還元活性は刈り取りによって急激に低下し、2日目に最低となった。低下程度は刈り取り強度に対応した。また、Chu<sup>20)</sup>によると、葉の切除は、根粒の数・重とも低下させ、その回復には10日間を要した。アルファルファのアセチレン還元活性も刈り取りによって低下した<sup>188)</sup>。Vance<sup>176)</sup>によると、刈り取りによって根粒は脱落しなかったが、根粒生重は僅かに低下することが観察された。

### 3) 各種環境要因の影響

根粒は、マメ科牧草が光合成で得た炭水化物をエネルギー源として窒素固定を行うので、光合成の阻害要因は窒素固定に対しても阻害的に作用する。その中でも、過湿条件<sup>90)</sup>および低pH<sup>79)</sup>は、牧草の生育以上に、窒素固定そのものを阻害する。

マメ科の畑作物で検討された研究結果と同様に窒素施肥も、マメ科牧草の窒素固定に対して影響を与える。白クローバのアセチレン還元活性は水耕培地に10ppmの硝酸態窒素が存在することによって著しく低下した<sup>80)</sup>。しかし、実際の圃場条件では少量の化合態窒素の供給が窒素固定に対して促進的に作用することも報告されている。Young<sup>198)</sup>によると、4kgN/10aの窒素施用は根粒数を増加させ、22kgN/10aでは抑制した。その際根粒数の減少は根量の減少と並行して起こった。Marriott<sup>99)</sup>も、少量の硝酸態窒素が春の低温時の白クローバ生育と根粒着生を増加させることを報告した。

一方、イネ科牧草との混播草地では、窒素施肥がイネ科牧草の生育を促進するため光競合が激化して、窒素固定にマイナスに作用する側面もある。

イネ科牧草との混播を前提とする場合、イネ科牧草とマメ科牧草の間に光に対する競合が生ずる。Chuら<sup>24)</sup>、Joら<sup>80)</sup>は遮光処理によって白クローバの根粒重が低下することを報告した。ただし、根粒数やアセチレン還元活性には有意差がなかった。吉田ら<sup>197)</sup>は遮光処理の影響が無刈り取りの白クローバよりも刈り取って再生過程の白クローバより大きく表れることを明らかにした。

このように、イネ科牧草は光に対する競合を通じて、マメ科牧草の窒素固定に対して抑制的に働く反面、土壤中の化合態窒素を吸収することによって窒素固定を促進する面もあることが指摘された<sup>10, 80)</sup>。Craigら<sup>28)</sup>はアルファルファの単位根粒重当りのアセチレン還元活性がオーチャードグラスとの混播によって上昇するとしており、Brophyら<sup>13)</sup>はアルファルファの全窒素吸収量に占める固定窒素の割合がリードキャナリーグラスとの混播によって高まることを報告した。

温度条件も根粒着生やアセチレン還元活性に影響を及ぼす要因である。季節変化の項で述べたように、極端な低温条件ではアセチレン還元活性が抑制されるのは当然である。しかし、Marriottら<sup>100)</sup>は、白クローバを昼/夜温度8/5℃で生育させた場合に20/15℃で生育させた場合よりも、植物個体当りの根粒の数と重量が増加することを認めた。Hallidayら<sup>41)</sup>は、ラジノクローバのアセチレン還元活性が25℃で最高となり、30℃以上では急激に低下することを報告した。Barta<sup>8)</sup>はアルファルファで同様に16℃に比べて30℃でアセチレン還元活性が低下することを報告し、高温下で窒素固定が低下する理由として、根に対する炭水化物の分配率が低下することをあげた。

以上のように、<sup>15</sup>Nやアセチレン還元活性測定法の利用によってマメ科牧草による窒素固定の特性が明らかになりつつある。しかし、北海道、特に天北地方の土壌・気象条件でのマメ科牧草による窒素固定の特性については、現在のところ全く手をつけられていないのが現状である。

### (3) 固定窒素のイネ科牧草への移譲

マメ科牧草によって固定された窒素の一部はイネ科牧草にも移行することは古くから認識されており、これはマメ科牧草導入の意義の1つに数えられる。

#### 1) 窒素移譲量の測定法

マメ科牧草からイネ科牧草に対する窒素移譲量の測定のために古くから用いられている最も単純な方法は、差し引き法(difference method)である<sup>159)</sup>。差し引き法では混播条件のイネ科牧草が吸収した窒素量から単播条件のイネ科牧草が吸収した窒素量を差し引いて窒素移譲量が求められる。この方法は長期間利用されることが前提となる草地における窒素移譲量の測定に適する。

他に、近年<sup>15</sup>Nを用いた方法が考案された。1つは、<sup>15</sup>Nガスを直接マメ科牧草に固定させて、その<sup>15</sup>Nのイネ科牧草への移行から窒素移譲量を求めるものである。この方法は、短期間に固定された窒素の動態を追跡する場合には極めて有効ではあるが、長期間の測定や圃場での測定には不向きである。第二の方法は、化合態の<sup>15</sup>Nを葉から吸収させ、そのイネ科牧草への移行量から窒素移譲量を推定しようとする方法(foliar absorption method)である<sup>94)</sup>。これも大規模な圃場実験には適さない。

<sup>15</sup>Nを用いる方法のなかで最もよく利用されているのは<sup>15</sup>N-希釈法(<sup>15</sup>N-dilution method)<sup>174)</sup>である。<sup>15</sup>Nで標識した少量の化合態窒素をイネ科牧草単播草地と混播草地に施用し、混播草地のイネ科牧草に吸収された<sup>15</sup>Nが、マメ科牧草からの移譲窒素によって希釈された程度から窒素移譲量を求める。しかし、Vallisら<sup>175)</sup>は、イネ科牧草とマメ科牧草の窒素吸収速度が著しく異なることから、<sup>15</sup>N-希釈法は誤差が大きいとした。

一方、Taら<sup>170)</sup>は、上記の4つの方法をポット条件で比較し、差し引き法は<sup>15</sup>Nを用いた3つの方法と比べて、高い移譲量を示すことを認め、<sup>15</sup>N-希釈法は一定期間内に固定された窒素のイネ科牧草への移譲を測定する上ではより正確な方法であると示した。

表1-7 圃場条件での窒素移譲量に関する研究例

報告者 (年度・国)	窒素移譲 の推定法	組合せ 草種	窒素施用量 (kg/10a)	窒素移譲量 (kg/10a)	その他の事項
Walker <sup>182)</sup> (1954)イギリス	D	grass-WC		0-10	
Herriottら <sup>51)</sup> (1960) イギリス	D	R-WC OG-WC	0 0 8	3-10 4-9 3-10 3-7	WC播種量が多く、経年化が進み、WC減少量の多い場合ほど窒素移譲量が多い。
Cowling <sup>26)</sup> (1961)イギリス	D	Og-WC	0-24	平均7	窒素施肥0-11kg/10aまでは牧草の窒素集積量に差がない。
奥村純一ら <sup>126)</sup> (1967)日本	D	Rt-WC (13種)	0	1-2	造成翌年の結果。
能勢公ら <sup>119)</sup> (1969)日本	D	TY-WC	0 4	2-3 0	Wc播種量を増しても窒素移譲に影響しない。
平島利昭ら <sup>54)</sup> (1971)日本	D	Rt-WC	0	2-4	窒素移譲を高めるにはWC率40-60%が適当。
Chestnut <sup>23)</sup> (1972)イギリス	D	R-WC TY Mf	0 7 13 20	17-22 12-17 10-12 7-10	他のイネ科草に比べて、TYでの窒素移譲量が少ない。単位WC当りの窒素移譲量は経年的に増加した。
Simpson <sup>159)</sup> (1976)ニュージーランド	D	OG-WC Sub,AL		5-15	窒素移譲量は、Sub>WC>AL
Broadbent <sup>12)</sup> (1982)アメリカ	<sup>15</sup> N-dil	R-WC	3	-	Rの吸収した窒素のうち60-80%がWCの固定窒素に由来している。ただし、窒素移譲は処理開始後3ヶ月目までは、認められない。
Goodman <sup>39)</sup> (1986)イギリス	<sup>15</sup> N-dil	R-WC		0-26	乾燥年よりも湿潤年の方が窒素固定量が多い。
Ta, T.C.ら <sup>171)</sup> (1987)カナダ	<sup>15</sup> N-dil	TY-AL	0	20	刈り取り回数が少なく、AL密度が高いほど窒素移譲量が多い。
Bollerら <sup>10)</sup> (1987)スイス	<sup>15</sup> N-dil	R-WC Ir-WC	0 15 0 15	5 4 1-4 0-2	マメ科率40-90%での結果。窒素移譲量は経時的に増加する。
Laidlaw <sup>93)</sup> (1988)イギリス	D	R-WC	0 3 6 9	6-24 6-23 5-21 2-18	窒素移譲量は初年目に少なく、2年目に最大となり、5年目にかけて漸減傾向であった。
Burity <sup>15)</sup> (1989)カナダ	<sup>15</sup> N-dil	TY-AL Brom-AL	0	3-27	窒素固定・窒素移譲量は1年目から3年目にかけて増加する。

<sup>15</sup>N-dil, <sup>15</sup>N希釈法;D, 差引法;

AL, アルファルファ;WC, 白クローバ;Sub, サブクローバ;

TY, チモシー;Brom, ブロムグラス;Mf, メドフェスク;Ir, イタリアンライグラス;

OG, オーチャードグラス;R, ライグラス

## 2) 草地における窒素移譲量とその特徴

前項で紹介した方法を用いて圃場条件でマメ科牧草からイネ科牧草に対する窒素移譲量を測定した研究例を表1-7に示した。窒素移譲量には0~26kg/10aと大きな変動が存在した。

窒素移譲の経路としては、大きく分けて、①根から直接窒素化合物が分泌される、②根および根粒の脱落・分解によって生じた窒素が供給される、③マメ科牧草の枯死茎葉から窒素が供給される、の3つの経路をあげることができる。

窒素移譲が主にどの経路によって行われるかは、刈り取り法などの実験条件の他に、マメ科牧草の種類によっても異なる。Simpson<sup>158)</sup>は、ポット条件でアルファルファ混播では最初の刈り取り時から窒素移譲が観察されたが、白クローバでは4回目の刈り取り以降に窒素移譲が起こることから、アルファルファでは①の経路が、白クローバでは②③の経路が、主な窒素移譲の経路であると推定した。白クローバで刈り取りによって窒素移譲が増加することは、Dilzら<sup>32)</sup>も認めた。また、Haysteadら<sup>48)</sup>は白クローバ刈り取り時に根圏での細菌数が増加し、ついで細菌に含まれる窒素がイネ科牧草に移行することを報告した。

Taら<sup>169)</sup>は、アルファルファ根が培地中に直接固定した窒素由来のNH<sub>3</sub>や幾種類かのアミノ酸を分泌し、その量は1個体当たり1nmol/dayにもなることを見いだした。ついで<sup>172)</sup>、チモシー・アルファルファ混播系で、長日・強光・低温条件で窒素移譲が多くなること、無菌栽培することによつ

て、窒素移譲が半減することから、窒素移譲は微生物を経由する部分と、NH<sub>3</sub>の様に微生物を経由する必要のない部分からなることを報告した。

白クローバ混播に限らず他のマメ科牧草を混播した多くの研究において、処理後比較的短期間の測定では窒素移譲が認められないこと<sup>94, 95, 174)</sup>や、草地の経年化によって窒素移譲量が増加することが報告された(表1-7参照)。これは、主にマメ科牧草の枯死茎葉が土壤に蓄積し、そこから供給される窒素の量が増大することによると考えられる。マメ科牧草由来の有機物に含まれる窒素がイネ科牧草に吸収されるためには、その前段に微生物による分解過程が必要であるが、それに係わる土壤微生物の研究は前述のHaysteadら<sup>48)</sup>の報告を除いてほとんどない。

他に、窒素移譲量の多寡に影響を及ぼす要因として、マメ科牧草とイネ科牧草の混生比が指摘されている<sup>10, 54)</sup>。Brophyら<sup>13)</sup>は、1 m四方にマメ科牧草とイネ科牧草を系統的に配置し、近接するマメ科牧草の数が、イネ科牧草への窒素移譲量に影響を及ぼすとした。イネ・マメ科率と窒素移譲の関係は、当該地域の土壤・気象条件における草種間の競合関係やマメ科牧草の窒素固定特性によって大きく左右されると考えられる。窒素移譲とマメ科牧草混生割合の関係を明らかにすることは、マメ科牧草による固定窒素を草地における牧草生産に有効利用する上で重要であり、この分野で残された重要な問題点の1つである。

## 第2章 土壤微生物特性の測定法および土壤・作物体分析法

ここでは、本論文で用いた微生物測定法と土壤・作物体分析法を一括して示した。他の章・節の分析も特に断わらない限りこれに準じて行った。

### 1. 土壤採取法

(1) 草地；特に断わらない限り天北農試内の各種土壤に造成されたオーチャードグラスを主草種とする採草地を供試した。天北地方に分布する放牧地は生産性が低く、放牧期間が短いため大量の貯蔵飼料を生産する必要がある。したがって、この地域の草地酪農は採草地重点型とならざるをえず、実際に採草専用草地の占める割合が大きい。さらに、放牧地では、糞尿の還元や摂食の不均一性などの問題があり、それらに起因する植生の変化等によって微生物活性の測定精度は著しく低下する恐れがある。本研究ではこの理由により採草地のみを研究対象とした。草地の経年数の表示に当たっては、新規造成または耕起を伴う更新を行った年度を1年目とし、翌年から順次経年数を進めた。

天北農試におけるこれまでの草地研究では、重粘土草地の作土を草地造成時に十分に耕起、混合される0-15cm土層とし、この土層について重点的に理化学性の検討を行ってきた。本研究でもそれを踏襲し、作土を0-15cm土層とした。

0-15cm土層の土壤試料は筒状の採土器具(直径37mm)を用いて牧草の株間から採取した。この際、腐食の全く進んでいない牧草茎葉は除去した。採土は1区当り5-8ヶ所で行い、得られた棒状の土壤試料を所定の位置で切断し、当該土層を混合して土壤微生物特性の測定に供試した。0-15cm土層の土壤は通常0-2、2-5、および5-15cm土層に3分割した。本論文では0-2cm土層、5-15cm土層をそれぞれ、「作土表層」、「作土下層」と呼ぶ。

15cm以下の土層は、通常の土壤断面調査と同様に試抗を掘って、汚染を極力避けるように採土し

た。

(2) 畑地；天北農試内の一般畑作圃場および飼料作圃場から土壤を採取し、土壤微生物特性の測定に供試した。採土は清浄な移植ごてを用いて、1区当り畝間から数ヶ所採取し、草地と対応させるため、0-2、2-5、5-15cm土層に3分割し、それぞれの土層を混合して供試した。

土壤の採取・混合・計量に際して牧草根、作物根は極力除去した。微生物特性の測定は、土壤採取後12時間以内に行った。測定は原則として2-3連で行った。

### 2. 微生物数の測定

草地土壤における有機物の分解は、土壤に生息する特定できない多種類の微生物によって行われる。そこで、ここでは有機物の分解を行う微生物を特に有機物分解菌と呼ばずに、単に微生物と呼ぶこととする。本研究では、有機物の分解を触媒するこれらの微生物数の計測や活性の把握を行おうとした。実験で主に用いた希釈平板法は、土壤に生息する微生物の一部のみしか計数できないとされている。しかし、希釈平板法で測定可能な微生物は土壤中でも比較的活性が高いとの報告もあり<sup>5)</sup>、本研究の目的に合致すると考えた。

#### (1) 希釈平板法による微生物数の測定

20gの土壤を100mlのポリビンに秤量し、これに10gの石英砂(100メッシュ内外)と80mlの殺菌水を加え、往復振とう機(360回/分)で45分間振とうした。懸濁液を適当な倍率まで希釈し、希釈液1-2mlをガラスシャーレに取って、寒天培地を10ml加え、30℃で7日間培養後発生したコロニー数を測定した。細菌数、グラム陰性細菌数および糸状菌数の測定に用いた培地は、それぞれ、卵アルブミン培地、クリスタルバイオレット添加の卵アルブミン培地、およびローズベンガル培地であ



る<sup>33)</sup>。卵アルブミン培地に発生したコロニーは放線菌と放線菌以外の細菌に分けて計測し、両者の合計を全細菌数とした。なお、希釈平板法で求めた糸状菌数は土壤中の糸状菌胞子数を反映している。

### (2) Forモデルによる細菌活性の測定

希釈平板法でコロニーを形成する細菌の活性を推定するために、服部<sup>44)</sup>のForモデルによって、コロニー形成率「 $\lambda$ 」を求めた。培地としては前項と同じ卵アルブミン培地を用い、30℃で培養して数日毎に発生したコロニーを計数した。その値を式1に当てはめ、最小二乗法によって各パラメーターを求めた。 $\lambda$ は培養が古くなった細菌や飢餓状態にある細菌では低いことが見いだされており、これが低いと細菌の活性が低いと推定することができる。

$$N = N_{\max} \cdot \{1 - e^{-\lambda(t-t_0)}\} \dots \dots \dots \text{式1}$$

t; 培養後の日数

N; t日目にシャーレ上に形成されたコロニー数

$N_{\max}$ ; tが無限大になった場合のコロニー数

$t_0$ ; 培養を始めてから最初に目に見えるコロニーが出現するまでの日数

$\lambda$ ; 単位時間内のコロニー出現率

### (3) 糸状菌菌糸長の測定

Jonesら<sup>82)</sup>の方法に準じた<sup>33)</sup>。希釈平板法の場合と同様にして調整した土壤懸濁液10mlを、加熱して溶解し50℃程度まで温度を下げた寒天溶液50mlに加えた。それをよく攪拌し、トーマの血球計数板を用いて寒天フィルムを作成した。寒天フィルムはスライドガラス上で乾燥・固定し、アニリンブルー・フェノール・酢酸混合液に1時間浸漬して染色後、エタノールで洗浄した。得られた試料を顕微鏡で検鏡し交点法<sup>115)</sup>で糸状菌菌糸の長さを求めた。以下文章中では糸状菌菌糸長を「菌糸長」と略記する。

## 3. 微生物バイオマスの測定

Jenkinsonら<sup>75)</sup>のクロロフォルム薫蒸法を用いて測定した。50gの土壤をポリビンに秤量し、クロロフォルムをいれたビーカーを置いた真空デシケーター内に入れた。デシケーター内の空気をアスピレーターで1時間吸引除去し、そのまま室温に放置した。24時間後、残ったクロロフォルムを取り出してから、アスピレーターで1時間吸引し、空気を再注入した。吸引、再注入の操作を7回繰り返して、クロロフォルムを除去してから、酸性褐色森林土畑地作土の1000倍希釈懸濁液1mlを加えた。次に、土壤を800mlの密栓容器に入れて30℃で培養し、10、20日目の炭酸ガス放出量を測定した。同時に、クロロフォルム処理していない土壤の炭酸ガス放出量も平行して測定し、次の計算式から微生物バイオマス量を求めた。

$$(\text{土壤微生物バイオマス量}) = \{(\text{薫蒸処理土壤の0~10日間の炭酸ガス放出量}) - (\text{無処理土壤の炭酸ガス放出量})\} / 0.45.$$

炭酸ガス放出量の測定は次項に示した。

## 4. 微生物活性の測定

酵素活性測定に際しては、従来緩衝液を用いる場合が多い。しかし、緩衝液を使うことは、反応が行われている場としての土壤pHを無視することになり、その土壤の化学性を加味しての微生物活性を正しく反映しないと考えた。供試土壤のpHを重視する立場から、本研究では、緩衝液を用いなかった。本研究で微生物数を測定するために用いたフラクトースなどの基質は草地生態系で一定の役割を有するものである。たとえば、炭酸ガス放出量、TTC還元活性は土壤中での有機物分解反応の指標である。フラクトースやグルコースは微生物にとっての基本的な代謝経路に組み込まれているばかりでなく、牧草の貯蔵成分である多糖類の構成成分である。硝酸化成分活性、尿素分解活性は、窒素の形態変化に係わっている。カゼイン分解活性はプロテアーゼ活性を表す。デンプンお

よびセルロースは牧草の構成成分であり、これらの分解活性は牧草体の分解過程に必須である。

なお、炭酸ガス放出量は乾土100gが20日間に放出した炭素量で表した。硝酸化成活性は1週間で硝酸となった窒素のmgで示した。他の活性は乾土100gあたり1日間の培養で分解した基質量、または生成した産物量(mg)で表した。

(1) 炭酸ガス放出量；坂井ら<sup>144)</sup>の方法に準じた。土壌20gを500mlのポリビンに秤量し、その中に0.2N NaOH5~15mlを入れた試験管を置いた。これを密栓して30℃で、20日間培養した。但し10日目に試験管を交換した。試験管中のNaOH溶液を100mlの三角フラスコに移し、3mlの3N BaCl<sub>2</sub>を加え、フェノールフタレインを指示薬として0.2N HClで滴定し、NaOH溶液に吸収された炭酸ガス量をもとめた。

本実験で求めた炭酸ガス放出量は、実際の土壤条件に比べ、培養温度が高く、培養期間もかなり長いので、得られた測定値は、微生物活性の尺度とみるよりは、微生物によって分解可能な基質量の指標と考えた方が妥当である。それ故、これを以後「易分解性基質量」と呼ぶこととする。

(2) TTC還元活性；Casida<sup>21)</sup>の方法に準じた。湿土10gを100ml容のポリビンに秤量し、0.5% TTC(トリフェニルテトラゾリウムクロライド)溶液5mlを加え密栓して、30℃で24時間培養した。培養後、生成したヒドラゾンを経過したメタノールで抽出し、485nmで比色定量した。

(3) 硝酸化成活性および添加窒素有機化率；湿土10gを100ml容のポリビンに秤取し、0.94%硫酸アンモニウム溶液1mlを加え30℃で7日間培養した。培養後、80mlの1N KCl溶液で生成した無機態窒素を抽出した。硝酸とアンモニアはコンウェイのユニットを用いた微量拡散法で分別定量した。平行して培養前の無機態窒素も定量し、培養後の硝酸態窒素量から培養前のそれを差し引いたものを硝酸化成活性とした。また、添加窒素量と培養前に土壤に存在した無機態窒素量との含量から培

養後の無機態窒素量を差し引き、添加窒素量で除したものを、添加窒素有機化率(%表示)とした。

(4) フラクトース分解活性；湿土10gを100ml容のポリビンに入れ、1%フラクトース溶液1mlを加えた。30℃で4時間培養後、80mlの1N KClを加え残存するフラクトースを経過抽出した。フラクトースの定量は堀越らのアンスロン法<sup>38)</sup>で行った。

(5) グルコース分解活性；基質としてグルコースを用いた以外はフラクトース分解活性と同様の方法で測定した。

(6) 尿素分解活性；Porter<sup>132)</sup>の方法に準じた。10gの湿土を100ml容のポリビンに取り、3%尿素溶液1mlを添加して30℃で16時間培養した。培養後80mlの1N KClを加えて充分振とう後ろ過した。ろ液2mlに1mlの80%トリクロル酢酸溶液と、2mlの発色液を加えよく混合した。室温で30分放置後、400nmの吸光度を測定した。標準液としては1N KCl溶液に溶かした300ppmの尿素溶液(尿素として)を用いた。発色試薬はp-ジメチルアミノベンズアルデハイド2.0gを95%のエタノール100mlに溶かし、それに濃塩酸10mlを加えたものである。

(7) カゼイン分解活性；Nannipieriら<sup>114)</sup>の方法に準じた。大型試験管(外径32mm高さ200mm)に湿土10gを秤量し、それに5%カゼイン5mlを添加してよく混和し52℃で1時間培養した。培養の際、反応液の蒸発を避けるためガラス球を試験管の上に置いた。5mlの20%トリクロル酢酸溶液を加えて反応を停止させた後、ろ過した。ろ液1mlに3.7% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液7mlと0.06% CuSO<sub>4</sub>溶液1mlを加え、攪拌して30分間室温で放置した。それに、蒸留水で1/4に希釈したフェノール=チオカルト試薬(和光純薬製)1mlを加え、30分間室温で静置後、3000回転で10分間遠心分離し、上清の吸光度(578nm)を測定し、生成したアミノ酸量を定量した。標準液には100ppmのチロシン溶液を

用いた。

(8) グルタミン酸分解活性；湿土10gに4%のグルタミン酸溶液1mlを添加し、30℃で培養した。3時間後、1N KCl80mlを加え数分間振とうしてろ過した。ろ液に含まれる残存グルタミン酸をニヒドリン発色<sup>167)</sup>によって定量した。

(9) デンプン分解活性；100ml容のポリビンに湿土10gを秤量し、2%デンプン溶液5mlとトルエン0.5mlを加え、30℃で16時間培養した。培養後、1N KCl80mlを加え充分振とう後、残存しているデンプンをろ過抽出した。デンプンの定量は以下のようにして行った。ろ液1mlに蒸留水5mlと発色液5ml（45mlの蒸留水に5mlのヨウ素試薬を加えた溶液）を加え混和後、室温で30分間静置してから620nmで比色定量した。ヨウ素試薬はヨウ素1.2gとヨウ化カリ2.5gを100mlの蒸留水に溶解して調整した。

(10) セルロース分解活性；Pancholyら<sup>127)</sup>の方法に準じた。湿土10gに1%のカルボキシメチルセルロース懸濁液を10ml加えた。30℃で2時間培養後、1N KCl 150mlを加えて、数分間振とう後、ろ過した。ろ液中に生じた還元末端をソモジネルソン法で定量した。標準液にはグルコースを用い、セルロース分解活性は、生じたグルコース量として表示した。

(11) 土壤窒素無機化量；湿土20gを100mlのポリビンに秤量し、20日間30℃で培養した。これに、10% KCl 100mlを加え1時間振とう後ろ過し、ろ液中の硝酸態窒素、アンモニア態窒素の含量をデバルダ合金を用いた水蒸気蒸留法によって測定した。これから、培養開始前の土壤に存在する無機態窒素を差し引いたものを土壤窒素無機化量とした。

## 5. 土壤分析法

### (1) 物理性

高さ5cmの100ml採土管に土壤を採取し、常法により容積重、三相分布を測定した。

### (2) 化学性

全窒素は土壤をケルダール分解し、蒸留法によって求めた。全炭素はチューリン法によって測定した。pHはガラス電極法によって測定した。置換性塩基は土壤1に対し1N酢酸アンモニウムを20加え、振とう法によって抽出したものについて、炎光法・原子吸光法によって測定した。有効態りん酸はBray II法によって測定した。

## 6. 作物体分析法

作物体は、硫酸・過酸化水素で分解した<sup>110)</sup>。分解液の全窒素含有率は水蒸気蒸留法によって求めた。