

# 第1章 緒論

## 第1節 研究の背景

化学肥料を活用した農業生産はその生産性向上に大きく寄与している。作物や土壌条件に合わせた施肥設計によって効率的に化学肥料を使用することは作物生産と環境負荷低減との両立にとって重要となるが、生産現場では収量性の確保を重視するあまり、作物による養分吸収量を大きく上回る化学肥料が施用されている場合が多々ある。近年、世界的な食料増産に伴って化学肥料消費量も増加しているため、農業生産を継続的・安定的に行っていく上で化学肥料資源の維持・管理が大きな課題となっている。

一方で、地域内での有機物を活用した循環型農業が広がりを見せており、特に養分供給源を有機物だけに限定した有機農業は、全世界での取組面積が1995年からの20年間で約5倍に拡大し、特に欧州諸国でその傾向が顕著である。我が国でも有機農業の取組面積は徐々に増加しているものの、国内の全耕地面積の約0.5%に過ぎない（農林水産省、2020）。この状況は、有機農業の拡大には克服すべき多くの課題があることを示しており、有機農産物の生産（以下、有機栽培）を推し進めるためには、有機栽培に対応した病害虫や雑草の抑制技術だけでなく、生産者からの要望の多い土づくり技術（北海道農政部、2010）への対応が重要である。

有機物の施用は土壌の緩衝作用の増加や理化学的の改善、生物性の多様化などの効果をもたらす（橋本、1981）が、その分解は概して緩慢であるため、確実な肥効を求めて資材の多投入や過度の連用などに陥りやすい。実際、北海道内の有機栽培露地野菜畑を対象とした実態調査によれば、熱水抽出性窒素、有効態リン酸、交換性カリ・苦土含有量は土壌診断基準値を上回り、交換性塩基のアンバランスも認められている（北海道立中央農業試験場、2007）。また、愛知県（瀧・加藤、1998）や京都府（堀ら、2002）でも同様の事例が確認されていることを鑑みれば、この状況は我が国全体の課題と考えることができよう。さらに、過剰な有機物施用は有機態窒素の継続的な無機化に伴って硝酸性窒素の溶脱（前田、2007）などの環境負荷を招くだけでなく、葉菜類の硝酸濃度の上昇や還元糖含量の低下（山崎・六本木、1998）などの品質低下も危惧される。このような背景から、有機物施用を主体とした栽培様式に適合した施肥対応技術の確立が求められている。

有機質資源の施用により作物生育の確保と環境負荷の低減を両立させるためには、多量要素である窒素、リンが土壌中で適度に放出（無機化）される必要があるが、この

作用は主に土壌微生物が担っている（堀、1994）。近年、土壌微生物の解析にあたって培養過程を経ずにDNAを抽出する手法が開発され、土壌微生物群集のDNAを直接解析できるようになった（Ogram *et al.*, 1987; Trsvik, 1980）。DNAを用いた微生物の群集構造解析法として、クローンライブラリー法（Pace *et al.*, 1986）、DGGE法（Denaturing Gradient Gel Electrophoresis：変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法、Torsvik *et al.*, 1998；Muyzer, 1999）、T-RFLP（Liu *et al.*, 1997）、マイクロアレイ（Guschin *et al.*, 1997）、次世代シーケンス（Shokralla *et al.*, 2012）などがある。その中で、DGGE法はPCR（polymerase chain reaction：ポリメラーゼ連鎖反応）によって増幅されたDNAを電気泳動することで微生物群集をバンドパターンとして視覚化する解析手法である。DGGE法におけるバンドの数、位置、相対強度は、それぞれの微生物の数、種類、存在比率を表し、多数のサンプルを低コストで迅速かつ容易に解析できるため群集間の比較検討に有効である（Nakatsu *et al.*, 2000；Tourlomos *et al.*, 2010）。また、次世代シーケンスも群集構造解析において主要な手法となっており、環境サンプル中の多数の分類群や存在比率の詳細情報を一度に得られる強力な技術であるが、コストが高くデータ解析が難しいなどハードルが高い側面もある（大森、2017）。その点、DGGE法はそのハードルが比較的低いことから、都道府県の試験研究機関が土壌微生物の群集構造を調査するために導入する例もあり（吉田、2014；對馬、2015）、生産現場に近い試験研究への適用に向いている。

## 第2節 既往の研究成果

### 1. 有機物施用による土壌微生物活性とその生成細菌群集構造との関係

圃場の施用された有機態窒素は、主に代謝回転が速いバイオマス窒素を経由してタンパク分解、アンモニア化などを経て最終的に無機態窒素として作物に吸収される（渡辺・早野、1996）。プロテアーゼはこの窒素代謝の第一段階であるタンパク分解に作用し、窒素循環を制御する律速酵素で（Ladd and Butler, 1972）、その供給源は従属栄養性の土壌細菌である（Asmar *et al.*, 1992；Nannipieri *et al.*, 1983）。Bach and Munch（2000）は、広範な土壌に存在するタンパク分解細菌は *Pseudomonas fluorescens* biotypes, *Bacillus cereus*, *B. mycoides*, *Flavobacterium-Cytophaga species* で、これらは金属が触媒作用に関係している金属プロテアーゼを放出することを培養法によって示した。ただ、培養可能な微生物は0.3から20%程度

(Torsvik *et al.*, 1990) であるため、培養法では土壤環境中の一部しか評価できない。

近年、分子生物学の発展により培養を経ることなく土壤微生物の解析が可能となり、その一つに先述した DGGE 法がある。DGGE 法では 16S rRNA 遺伝子を対象とした解析が数多くなされ、農耕地の細菌群集構造解析に用いられている (Girvan *et al.*, 2004 ; Sun *et al.*, 2004)。これは 16S rRNA 遺伝子がすべての原核生物に存在し、遺伝的な系統関係を解析する上で有用であるため、細菌全般を対象とした解析には好都合である。一方、特異的な微生物の解析に関しては、特定の機能を有する微生物群に特徴的な遺伝子を用いることで対応可能であり、アンモニア酸化酵素遺伝子 (Oved *et al.*, 2001)、キチナーゼ遺伝子 (Williamson *et al.*, 2000)、安息香酸分解酵素遺伝子 (Morimoto *et al.*, 2005)、 $\beta$ -グルコシダーゼ遺伝子 (Li *et al.*, 2013) を対象とした解析がなされている。土壤中の主要な金属プロテアーゼであるアルカリ金属プロテアーゼ遺伝子 (*apr*) や中性金属プロテアーゼ遺伝子 (*npr*) を対象とした DGGE 解析が可能となれば、土壤中のプロテアーゼ遺伝子資源や窒素循環について重要な情報が得られる可能性がある。

また、リンは窒素と並んで作物生育に重要な元素の一つで、土壤中での存在形態や挙動は農業生産性と密接に関わっている。土壤中に存在するリンの約半分は有機態であるが、微生物は有機態リンを直接細胞内に取り込むことができないため、細胞外に多様なホスファターゼを分泌し、生成した無機態リンを取り込んでいる (早野, 1997)。核酸やリン脂質などのリン酸ジエステルはホスホジエステラーゼによってリン酸モノエステルに変換され、これがさらにホスホモノエステラーゼにより加水分解され、無機態リンが生成することで作物に取り込まれる (Nannipieri *et al.*, 2011)。リン酸ジエステルは土壤中で分解され易い (Stewart and Tiessen, 1987 ; Tate, 1984) ため、ホスホモノエステラーゼによるリン酸モノエステルの分解が律速段階となり、有機態リンの無機化速度はホスホモノエステラーゼ活性と正の相関を示す場合がある (Bünemann, 2015)。このホスホモノエステラーゼの代表格が酸性ホスファターゼとアルカリホスファターゼ (ALP) である (Nannipieri *et al.*, 2011)。酸性ホスファターゼの主要供給源は植物根である (Speir and Cowling, 1991 ; Dinkelaker and Marschner, 1992) 一方、ALP の主要供給源は主に細菌である (Nakas *et al.*, 1987 ; Tarafdar and Claassen, 1988)。有機物の施用により ALP 活性が上昇した事例は数多く確認され (Mandal *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2006 ; Lee *et al.*, 2004)、有機物の施用は ALP 生成細菌に大きな影響を与えている可能性がある。

## 2. 有機栽培畑の土壤診断に基づく窒素施肥対応

作物を栽培する上で、養分供給や収量性はもちろんのこと環境負荷、品質と良好なバランス関係を維持することは、生産性の安定的かつ継続的な営農管理をする上で重要である。収量だけを目標とすれば養分供給量をやや過剰域で管理すれば良いが、養分の過剰供給は農作物の品質を低下させる。また、作物により吸収しきれない余剰養分は資源の無駄となることに加え、地下水の硝酸汚染などの環境負荷を招く恐れがある (図 1-2-1 ; 北海道農政部, 2020)。

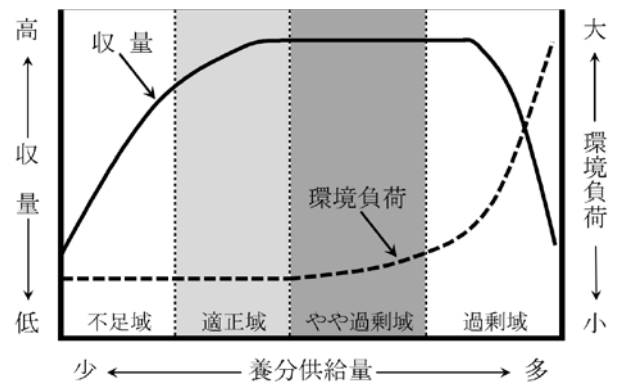


図 1-2-1 作物への養分供給と収量、環境負荷の関係 (北海道農政部, 2020)

作物の養分吸収が良好に進行するためには、肥料成分が作物の養分要求時期に、過不足なく根群域に存在する必要がある。このため、化学肥料あるいは有機物による施肥だけでなく土壤そのものから供給される養分の把握が必要で、その適正管理には土壤診断に基づく施肥対応が有効である。すなわち、土壤分析によって土壤由来の養分供給量を推定し、不足する量を肥料などで補うことで、合理的で無駄のない施肥が可能となる。この考え方を窒素施肥に適用すると目標収量を得るための作物の窒素吸収量、窒素無施用条件での窒素吸収量、施肥窒素利用率の3項目を明らかにすれば窒素施肥量を設定できる (斉藤ら, 2007)。慣行栽培では水稻をはじめ畑作物、園芸作物、牧草・飼料作物についての施肥対応が北海道施肥ガイドにまとめられている (北海道農政部, 2020)。一方、有機栽培では露地野菜畑向けの窒素肥沃度指標として熱水抽出性窒素が適し (中辻ら, 2008)、その簡易測定法が開発されている (坂口ら, 2010) が、窒素肥沃度の目安 (土壤窒素診断基準値) や土壤診断に基づく窒素施肥対応は未設定である。

### 3. 有機栽培畑における地力の醸成と施肥対応の総合化

有機栽培に取り組んで間もない圃場では窒素肥沃度が十分醸成されていないために収量性が不安定となることが多い。窒素肥沃度を高める手段としては堆肥の施用があるが、近隣に畜産施設がないため堆肥の入手が困難な事例だけでなく、堆肥を散布する労力が確保出来ない場合も見受けられる。緑肥は地力の向上はもちろん、病害虫や雑草の抑制、有用微生物の増加などの効果を有する(北海道農政部, 2004)。よって、化学肥料や化学合成農薬に依存しない有機栽培にとって緑肥を導入する意義は大きいと考えられる。有機 JAS では有機栽培に取り組むにあたって播種または植付けの時点から遡り 2 年以上、化学肥料や化学合成農薬を使用しない転換期間を設ける必要があるが、この転換期間に緑肥を活用して窒素肥沃度を高める方策は土壌生物性を維持、向上させる観点からも有益である(唐澤, 2020)。

また、本道の有機栽培畑ではリン酸を含めた各種養分が蓄積している(桑原, 2012; 三木ら, 2017)。リン酸の蓄積は、微量元素欠乏による生理障害(渡辺, 2002)のみならずアブラナ科根こぶ病などの土壌病害を助長する(村上ら, 2004)ため、化学合成農薬での対応ができない有機栽培では大きな問題となる。また、有機質資材の価格は上昇傾向にあるため、経営面からもリン酸施肥の適正化が求められている。

加えて、生産場面では主に窒素、リン酸、カリの 3 要素を対象とした施肥設計をするが、有機質資材は 1 成分のみを含む単肥ではなく、2 成分以上含む複合肥料に相当するため、窒素、リン酸、カリの施肥量を目標とする量にそれぞれ揃えるのは困難である。その対応として、表計算ソフトを活用するなどして 3 要素の施肥量計算とそれに基づく有機質肥料の施用量設定ができるツールの開発も望まれている。

## 第 3 節 研究の目的

本研究は、有機栽培をはじめとする有機物施用を主体とした栽培様式において、窒素とリン酸代謝に関わる土壌微生物群集を解析するとともに作物生産と環境保全を両立する総合的な施肥対応技術を確立することを目的とした。

第 2 章では窒素に関してプロテアーゼ、リンに関してアルカリホスファターゼを対象酵素として、有機物施用による酵素活性の変動とその生成細菌群集との関係を解析する(Sakurai *et al.*, 2007; Sakurai *et al.*, 2008)。

第 3 章では有機栽培畑の土壌診断に基づく窒素施肥対応を確立するために、生産現場での活用が期待される鶏ふん堆肥の窒素肥効を評価し、有機物施用を主体とした栽培様式に適した資材を選定する(櫻井ら, 2013a)。また、

有機栽培畑に適した土壌窒素診断基準値を設定するとともに、本道の主要な作物であるカボチャ、スイートコーン、レタス、タマネギ、バレイショについて、窒素施肥対応を検討する(櫻井ら, 2013b; 櫻井ら, 2016; 櫻井ら, 2018b)。

第 4 章では有機栽培で施用されることの多い堆肥について、窒素収支の観点からその施用上限量について検討する。また、有機栽培畑へ転換する際の生産安定化に資する緑肥導入モデルについて提案する(櫻井ら, 2021)。さらに、有機栽培畑における適正なリン酸施肥量をリン酸肥沃度別に設定するとともに、これまでの検討結果を活用しながら、有機栽培畑に適した窒素、リン酸、カリの施肥量目標値を算出し、有機質肥料の施用量を簡易に設定できる総合施肥設計ツールを開発する(櫻井・谷藤, 2020)。

## 第 2 章 有機物施用による土壤微生物活性とその生成細菌群集構造との関係

### 第 1 節 プロテアーゼ生成細菌群集の解析手法と栽培様式による変動

#### 1. はじめに

有機物を圃場へ施用すると、有機物中の有機態窒素はバイオマス窒素を経由してタンパク分解、アンモニア化成等の分解過程を経て最終的に無機態窒素となって植物に吸収される。プロテアーゼは、この窒素代謝の第一段階であるタンパク分解に作用し、窒素循環を制御する律速酵素である (Ladd and Butler, 1972)。

本節では、有機物を施用した土壤においてプロテアーゼ活性を調査するとともに、土壤中の主要なプロテアーゼであるアルカリ金属プロテアーゼ遺伝子 (*apr*) および中性金属プロテアーゼ遺伝子 (*npr*) をターゲットとした PCR-DGGE 法によりプロテアーゼ生成細菌群集の解析手法を確立して、プロテアーゼ生成細菌の系統関係を調査し、施肥条件や土壤採取部位による群集構造の変化を解析した。

#### 2. 試験方法

##### 1) 調査圃場と栽培方法

調査圃場は北海道立中央農業試験場の黒ボク土で、2003 年より化学肥料 (CF) 区と有機物 (OM) 区を設け、レタス (*Lactuca sativa* L. 品種「みずさわ」) を毎年栽培した。CF 区には硫酸、苦土重焼リン、硫酸カリを、OM 区には牛ふん麦稈堆肥 25 Mg ha<sup>-1</sup>、米ぬか 2 Mg ha<sup>-1</sup>、魚かす 1070 kg ha<sup>-1</sup> をそれぞれ施用することで、両区とも施肥量は 140-120-120 (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O kg ha<sup>-1</sup>) とし、1 区 36 m<sup>2</sup> の 2 反復とした。

本試験は栽培 3 年目に当たる 2005 年に実施し、施肥は 5 月 24 日、定植は 6 月 3 日、収穫は 7 月 19 日にそれぞれ行った。土壤の採取は施肥直前、施肥後 29 日目 (6 月 22 日)、41 日目 (7 月 4 日)、56 日目 (7 月 19 日、収穫日) の 4 回行った。施肥直前は非根圏土壤 (B) のみを、施肥後は非根圏土壤と根圏土壤 (R) を採取した。非根圏土壤は畝間から深さ 15 cm で採取した。根圏土壤

の採取にあたっては振とう法を適用し、根系をできるだけ攪乱せずに採取し、それを空中で緩やかに振とうしながら土壤をふるい落とし、根の周りに付着した土壤を根圏土壤とみなした (森塚, 2006)。根圏土壤も概ね深さ 15 cm であった。土壤分析用のサンプルは 2 mm のふるいをかけた後直ちに 4 °C で冷蔵保存した。また、遺伝子解析用の土壤サンプルは施肥後 56 日目に採取し、DNA の抽出作業を行うまでの間 -80 °C で保存した。なお、施肥直前の主要土壤化学性は表 2-1-1 の通りである。作物体のサンプリングは施肥後 29, 41, 56 日目の 3 回行い 70 °C で 2 日間乾燥後、乾物重を測定した。また、乾燥サンプルは分析前に微粉砕した。

##### 2) プロテアーゼ活性

プロテアーゼ活性は Ladd and Butler (1972) に従って測定した。すなわち、湿潤土壤 0.5 g を試験管に秤量し、0.1M Tris・ホウ酸緩衝液 (pH 8.1) を 1.8 ml, 2 mM ベンジルオキシカルボニル-フェニルアラニル-ロイシンを 2 ml それぞれ加えた。40 °C で 1 時間保った後、5 M 塩酸を 0.2 ml 加えて酵素反応を停止させた。遠心分離して得られた上澄み液を用いてニンヒドリン試薬により反応させ、570 nm にて測定した。

##### 3) 土壤無機態窒素

土壤中の無機態窒素は土壤 10 g に 100 g L<sup>-1</sup> KCl を 50 ml 加えて 30 分振とうし、No. 6 (Advantec) を用いてろ過することで抽出した。ろ液中のアンモニア態窒素と硝酸態窒素はオートアナライザー (SYNCA) (BLTEC, Tokyo, Japan) で測定し、その合計を無機態窒素とした。

##### 4) 土壤 DNA の抽出

DNA の抽出は ISOIL for Beads Beating (NIPPON GENE CO., LTD. Japan) を用いて行い、Wizard DNA Clean-Up System (Promega, WI, USA) によって精製した。精製した DNA は、PCR および DGGE に供するまで -20 °C で保存した。

表 2-1-1 供試圃場の主要土壤化学性 (2005 年)

試験区	pH (H <sub>2</sub> O)	全炭素 (g kg <sup>-1</sup> )	全窒素 (g kg <sup>-1</sup> )	熱水抽出性窒素 (mg kg <sup>-1</sup> )	有効態リン酸 <sup>1)</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	交換性塩基 (mg kg <sup>-1</sup> )		
						K <sub>2</sub> O	MgO	CaO
CF	6.4	21.4	1.91	67	199	233	483	2366
OM	6.5	20.6	1.95	74	203	226	517	2445

<sup>1)</sup> トルオーグ法。

## 5) PCR および DGGE

PCR は Thermal Cycler Dice (TAKARA BIO, Shiga, Japan) を使って HotStarTaq DNA polymerase (QIAGEN, USA) により行った。プライマーは Bach *et al.*, (2001) が設計した *apr* や *npr* 用のプライマーに PCR 産物の分離を向上させるために、forward primer に GC clamp (5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCC-3') を付加した (Myers *et al.*, 1985)。PCR 反応は DNA テンプレート 20 ng, 5  $\mu$ M of each primer, 10 $\times$ PCR buffer を 2  $\mu$ l, dNTP を各 0.2 mM, MgSO<sub>4</sub> 濃度を 1.5 mM とし, HotStarTaq DNA polymerase を 0.5 U 加え, 最終的に 20  $\mu$ l とした。*apr* 遺伝子のサーマルサイクルは 95  $^{\circ}$ C を 15 分した後, 94  $^{\circ}$ C で 30 秒, 60  $^{\circ}$ C で 30 秒, 72  $^{\circ}$ C で 30 秒を 40 サイクル行い, 最後に 72 $^{\circ}$ C で 5 分間とした。

*npr* 遺伝子のサーマルサイクルは, 95  $^{\circ}$ C を 15 分した後, 94  $^{\circ}$ C で 60 秒, 55  $^{\circ}$ C で 60 秒, 72  $^{\circ}$ C で 60 秒を 40 サイクル行い, 最後に 72  $^{\circ}$ C で 5 分間とした。

DGGE 分析には D-Code universal mutation system (BIO-RAD laboratories, California, USA) を使用した。*apr* は 40~65%, *npr* は 25~50% の変性剤濃度に調整した 10% アクリルアミドゲルにて 60  $^{\circ}$ C で 80 V, 16 時間泳動した。泳動後, SYBR Green I nucleic acid gel stain (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) で染色し, LumiVisonPRO 400EX (TAITEC, Saitama, Japan) で可視化するとともに, 特徴的なバンドをシーケンス用に切り出した。

## 6) DGGE バンドのシーケンス

アクリルアミドゲルから切り出した DNA 断片を 1.5 ml マイクロチューブ中で滅菌水により 2 度洗浄した後, 断片の一部を DNA テンプレートとして PCR により増幅した。PCR は GC クランプを付加していないプライマーを使用したことを除いて 5) の PCR 条件と同一で

ある。PCR 産物は MinElute PCR purification kit

(QIAGEN, Hilden, Germany) により精製し, pGEM-T Vector System I (Promega Corporation, WI, USA) を用いてクローニングした。シーケンス反応は GenomeLab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter, CA, USA) を使用し, T7 プライマーにより行った。反応産物は, CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, CA, USA) により解析し, 塩基配列を決定した。

## 7) 系統解析

決定した塩基配列は DDBJ の BLAST (塩基配列をアミノ酸配列に翻訳しながら, アミノ酸配列データベースと比較) により相同性解析を行った。塩基配列および DDBJ から得た塩基配列は, ClustalW (DDBJ version, available at the following URL ;

<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/clustalw-j.html>) を使用してアライメントを行った。ClustalW と NJplot (Perriere and Gouy, 1996) から neighbor-joining (NJ) trees (Saitou and Nei, 1987) を作成した。

## 8) 統計解析

プロテアーゼ活性および無機態窒素濃度は Tukey-Kramer 法により検定した。タンパク分解性細菌の群集構造を特徴付けるため, DGGE バンドの値を標準化した後, 主成分分析を行った。また, プロテアーゼ活性を目的変数, 主成分分析の第一主成分と第二主成分を説明変数とした重回帰分析を実施した。共に, 統計ソフト JMP for Macintosh (SAS Institute, NC, USA) を用いた。

## 3. 結果

## 1) プロテアーゼ活性と土壌無機態窒素

施肥処理と土壌採取部位別によるプロテアーゼ活性の推移を図 2-1-1 に示す。

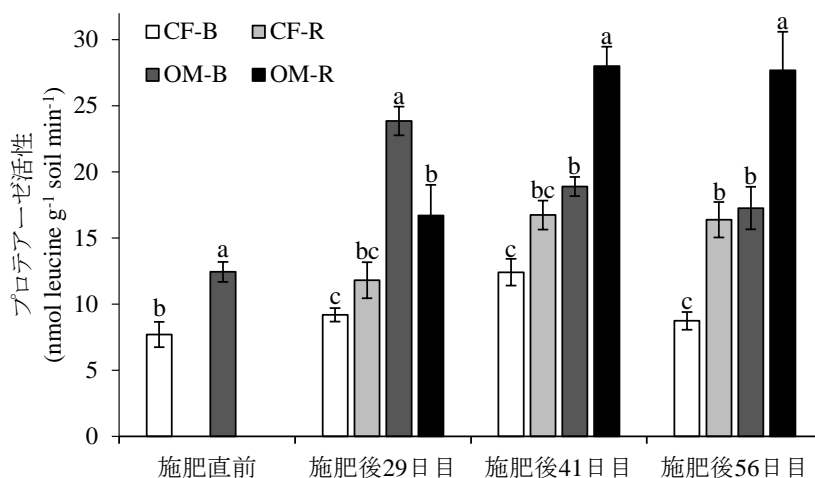


図 2-1-1 施肥処理および土壌採取部位によるプロテアーゼ活性の推移

1) CF : 化学肥料, OM : 有機物, B : 非根圏土壌, R : 根圏土壌.

2) エラーバーは標準誤差.

3) 同一の英文字を付した数値間には, Tukey-Kramer 法による有意差がない ( $p < 0.05$ ).

プロテアーゼ活性は時間の経過とともに増加する傾向で、有機物の施用により有意に上昇した。根圏土壌のプロテアーゼ活性は施肥後29日目を除き非根圏土壌よりも高く、特に、施肥後56日目ではその傾向が顕著であった。

施肥処理と土壌採取部位による土壌無機態窒素の推移を図2-1-2に示す。非根圏土壌における施肥直前の無機態窒素はCF区で6.1、OM区で7.3 mg kg<sup>-1</sup>であったが、施肥後では54~146 mg kg<sup>-1</sup>と大きく増加した。一方、根圏土壌では27~38 mg kg<sup>-1</sup>の範囲で非根圏土壌よりも低い傾向であった。

## 2) PCR-DGGE 解析

*apr* のPCR-DGGE プロファイルは、施肥処理を問わず非根圏土壌よりも根圏土壌でバンド数が多い傾向であった(図2-1-3)。 *apr* のDGGE プロファイルから9バンド(*apr-1*~*apr-9*)の塩基配列を決定し、DGGEバンドとDNA data bank から得た関連するアミノ酸配列をもとに

NJ系統樹を作成した(図2-1-4)。

9バンド中8バンドは *Pseudomonas fluorescens* 由来のアルカリ金属プロテアーゼとの相同性が高く、残りの一つは *Erwinia carotovora* 由来のアルカリ金属プロテアーゼと相同関係にあった。根圏土壌で目立った *apr-6*, *apr-7*, *apr-8* は、 *Pseudomonas fluorescens* no. 33 に近縁であり、それぞれ98%の高い相同性であった。また、CF区の根圏土壌での存在が目立った *apr-2* は *Pseudomonas fluorescens* CY091 と相同性が100%であった。 *apr-3*, *apr-9* は *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 に近縁であり、それぞれ95%、98%と高い相同性を示した。 *apr-4*, *apr-5* は *Pseudomonas fluorescens* M114 に近縁であり、それぞれ87%、78%の相同性であった。 *apr-1* は、 *Erwinia carotovora* subsp. SCRI 1043 / ATCC BAA-672 に近縁であるものの、相同性は61%であった。

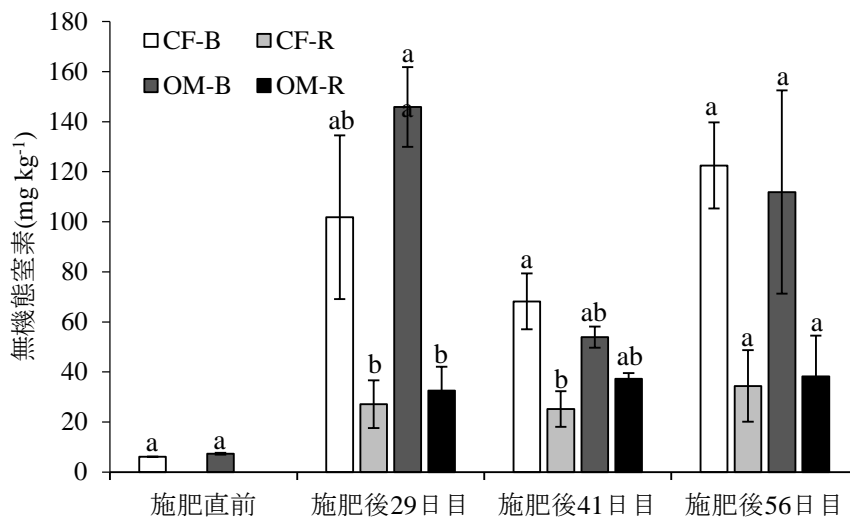


図2-1-2 施肥処理および土壌採取部位による土壌無機態窒素の推移

1) CF: 化学肥料, OM: 有機物, B: 非根圏土壌, R: 根圏土壌.

2) エラーバーは標準誤差.

3) 同一の英文字を付した数値間には, Tukey-Kramer 法による有意差がない ( $p < 0.05$ ).

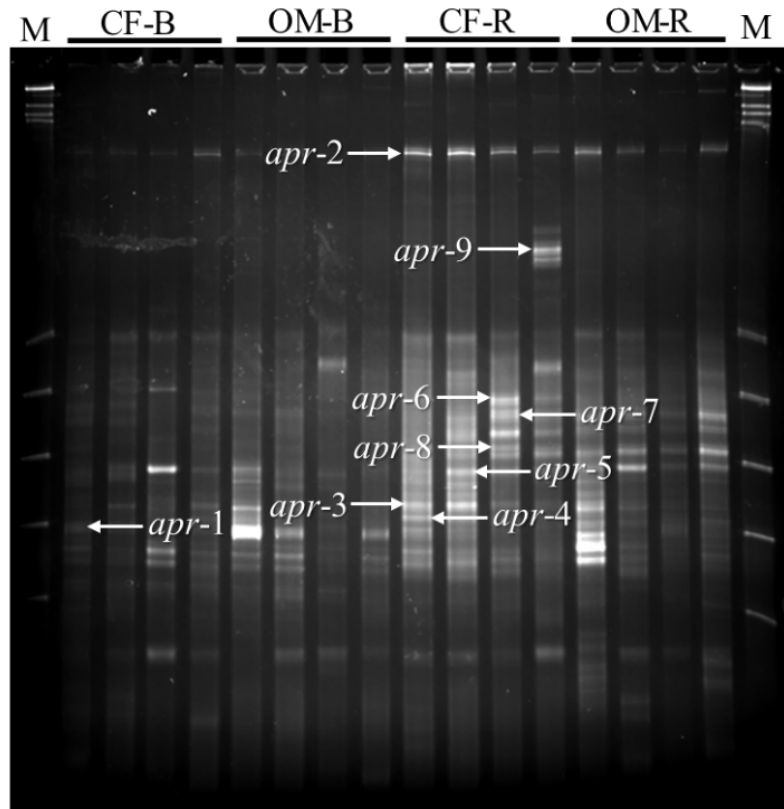


図2-1-3 アルカリ金属プロテアーゼ遺伝子 (*apr*) のPCR-DGGE プロファイル

- 1) CF : 化学肥料, OM : 有機物, B : 非根圏土壌, R : 根圏土壌.
- 2) M : DGGE Marker II (Nippon Gene, Tokyo, Japan).

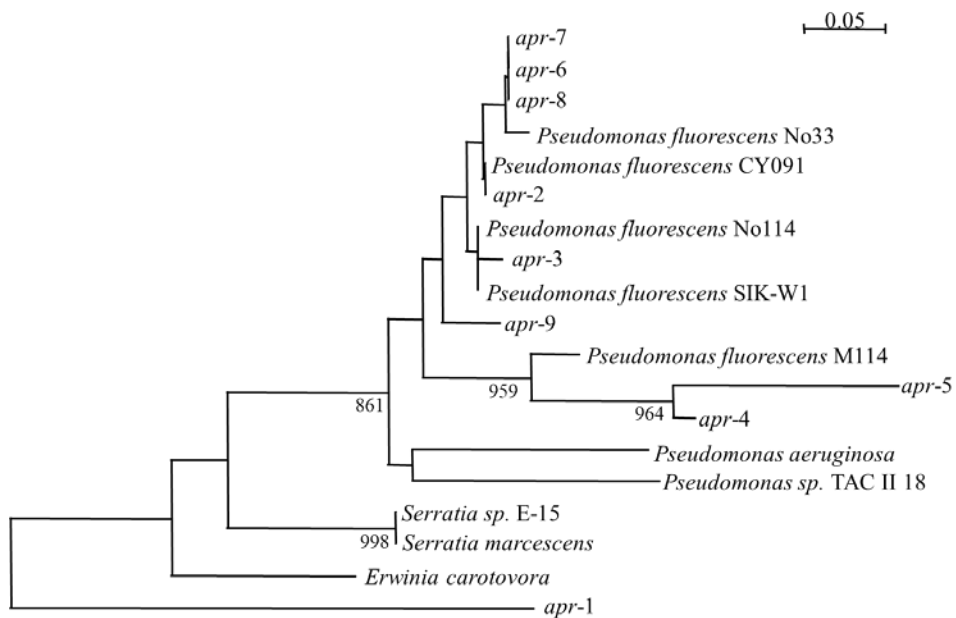


図2-1-4 アルカリ金属プロテアーゼ遺伝子 (*apr*) のアミノ酸配列をもとにしたNJ系統樹

*npr* の PCR-DGGE プロファイルを図 2-1-5 に示す。 *apr* に比べてバンド数が少ない傾向で、CF 区は土壌採取部位を問わずバンドがかすかに見える程度に対し、OM 区でははっきりしたバンドが数本確認された。 DGGE プロファイルから 6 バンド (*npr-1*~*npr-6*) の塩基配列を決定し、アミノ酸配列をもとに NJ 系統樹を作成したのが図 2-1-6 である。 6 バンドはすべて *Bacillus spp.* 由来の中性金属プロテアーゼとの相同性が高く、5 バンドは *Bacillus Megaterium* に近縁であった。 *npr-1*, *npr-4*, *npr-5* は、 *Bacillus Megaterium* DSM319 に近縁であり、それぞれ 100%, 98%, 87% と高い相同性を示した。 CF 区に比べ OM 区での存在が顕著であった *npr-2*, *npr-6* は、 *Bacillus Megaterium* A 9542 に近縁で 85% の相同性であり、 *npr-3* は *Bacillus Vietnamensis* に近縁で 89% の相同性であった。 以上、6 バンドはすべて中性金属プロテアーゼに関連するものであったことから、本 PCR-DGGE は土壌中の *npr* を特異的に検出できたと判断された。

DGGE プロファイルに基づき、プロテアーゼ生成に関わる細菌群集構造について主成分分析を行った (図 2-1-7)。 主成分プロットにおいて *apr* は全分散の 42.7%, *npr* は全分散の 56.2% を説明していた。 施肥処理によ

て根圏土壌のアルカリ金属プロテアーゼ生成細菌群集が大きく影響を受けた一方、非根圏土壌ではアルカリ金属プロテアーゼ生成細菌の群集構造に差はなかった。 また、施肥処理に関わらず、根圏土壌と非根圏土壌間でアルカリ金属プロテアーゼ生成細菌の群集構造が異なった。

*npr* では右側に OM 区、左側に CF 区が位置し、施肥処理によってその生成細菌群集が影響を受けた。 また、上部に根圏土壌、下部に非根圏土壌が位置しているが、土壌採取部位間について統計的な有意差はなかった。

プロテアーゼ活性とその生成細菌群集との関連性を検討するため、プロテアーゼ活性を目的変数、主成分分析によって得た第一主成分と第二主成分を説明変数として重回帰分析を行った。 その結果、*apr*, *npr* ともに重回帰モデルが有意であり (*apr* モデル:  $R^2=0.52$ ,  $p<0.003$ , *npr* モデル:  $R^2=0.39$ ,  $p<0.015$ ), *apr* は第一主成分 ( $p<0.022$ ) より第二主成分 ( $p<0.005$ ) の影響度が大きく、*npr* は第二主成分 ( $p<0.059$ ) より第一主成分 ( $p<0.017$ ) の影響度が大きかった。

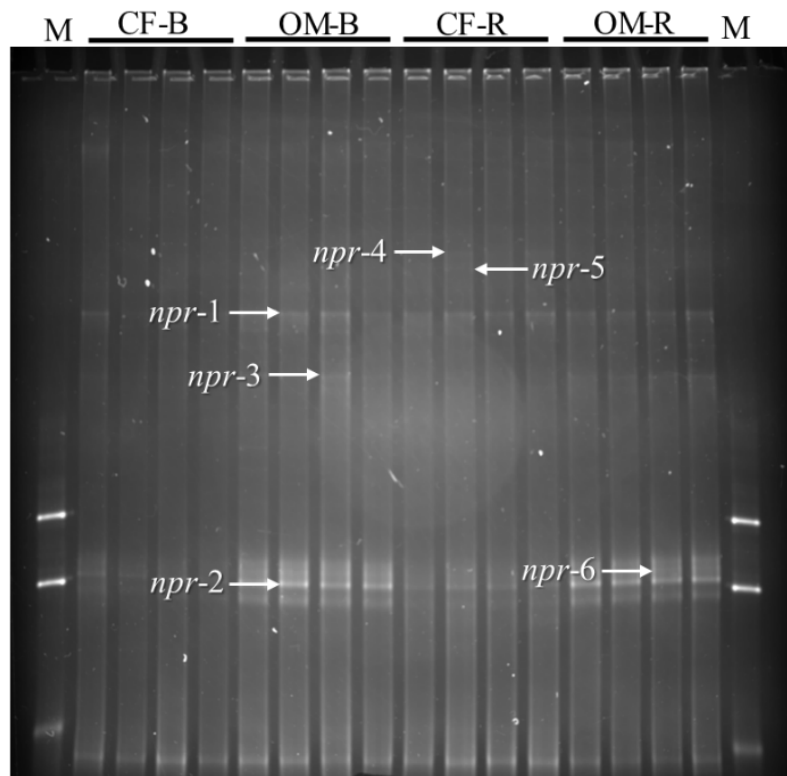


図 2-1-5 中性金属プロテアーゼ遺伝子 (*npr*) の PCR-DGGE プロファイル

- 1) CF : 化学肥料, OM : 有機物, B : 非根圏土壌, R : 根圏土壌.
- 2) M : DGGE Marker II (Nippon Gene, Tokyo, Japan).



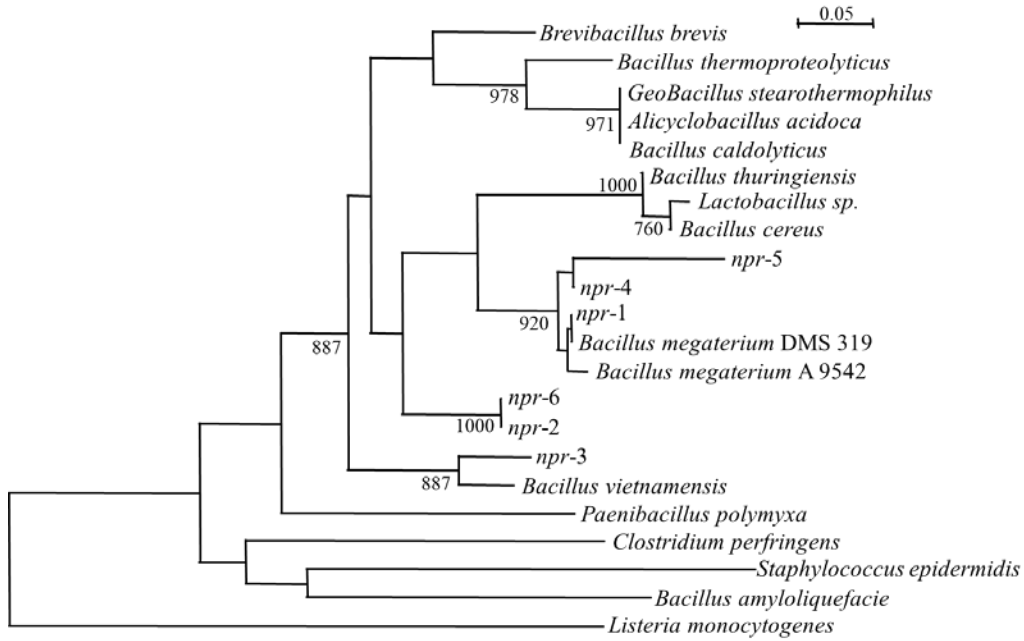


図 2-1-6 中性金属プロテアーゼ遺伝子 (npr) のアミノ酸配列を基にした NJ 系統樹

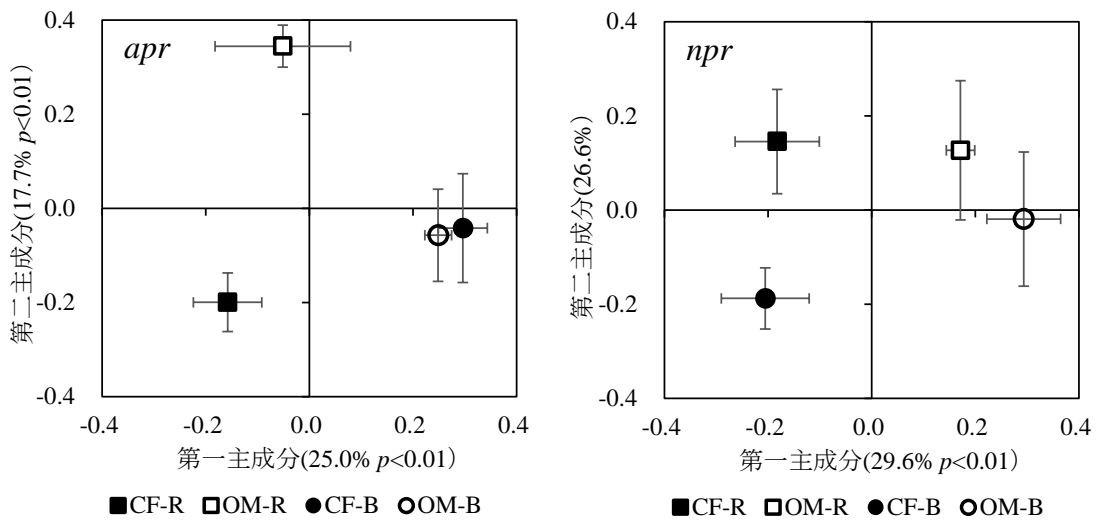


図 2-1-7 DGGE プロファイルに基づくプロテアーゼ生成細菌群集構造の主成分分析

1) CF：化学肥料，OM：有機物，B：非根圏土壌，R：根圏土壌。

2) エラーバーは標準誤差。

#### 4. 考察

##### 1) 有機物の施用がプロテアーゼ活性に与える影響

プロテアーゼ活性は非根圏土壌，根圏土壌を問わず化学肥料区よりも有機物区で上昇した（図 2-1-1）が，土壌中の無機態窒素は化学肥料区と有機物区で大きな差は見られなかった（図 2-1-2）。この結果は，施用された有機物によってプロテアーゼ生成細菌の活動が高まったこと，そのプロテアーゼの作用により有機態窒素が速やかに無機化したことを示唆する。また，根圏土壌のプロテ

アーゼ活性は非根圏土壌より高かった（図 2-1-1）。根圏では糖，有機酸，多糖類などの有機物が根から分泌され，微生物が生育するためのエネルギー源として利用されている（Whipps, 1990）。根圏土壌におけるプロテアーゼ活性の上昇は，根から分泌された有機物によるタンパク分解菌の活性向上，すなわち「根圏効果」と考えられた。一方，根圏土壌の無機態窒素濃度は非根圏土壌よりも低い傾向で（図 2-1-2），窒素の無機化よりも根からの無機態窒素の吸収が速いことが推察された。以上から，

微生物から根への窒素供給と根から微生物への養分供給による相互関係が構築されていることが示唆された。

## 2) DGGE プロファイルの系統解析

プロテアーゼ生成細菌の系統解析の結果、*apr* の主要バンドの多くは *Pseudomonas fluorescens* 由来のアルカリ金属プロテアーゼ遺伝子との相同性が高かった(図2-1-4)。*Bach and Munch (2000)* は培養法によって多様な土壌から得られたプロテアーゼ生成細菌は主に *Pseudomonas fluorescens* であったと報告している。*Pseudomonas fluorescens* は土壌中の常在菌で、細胞外プロテアーゼを生産するとの特徴 (*Stanier, et al.1966*) を加味すれば、アルカリ金属プロテアーゼの生成に *Pseudomonas fluorescens* が主要な働きをしていると推察された。

*npr* の主要バンドは、すべて *Bacillus* 由来の中性金属プロテアーゼ遺伝子との相同性が高かった (図 2-1-6)。*Watanabe and Hayano (1994)* は、日本の畑土壌のプロテアーゼ供給源は *Bacillus spp.* で、中性金属プロテアーゼの生成に大きく関与していると述べており、本調査と傾向が一致した。よって、本調査法は土壌中の中性金属プロテアーゼの生成に関与する細菌の検出方法として適切であったと判断された。また、本試験で切り取ったバンドの大部分は *Bacillus megaterium* に近縁であった (図 2-1-6)。*Watanabe and Hayano (1993)* によれば、水田土壌から単離されたタンパク分解細菌の多くは *Bacillus spp.* であり、その中の *Bacillus megaterium* は有機物施用土壌のみから得られていた。本試験でも化学肥料区より有機物区で *Bacillus megaterium* の中性金属プロテアーゼ遺伝子に近縁なバンドが多く得られたことから、*Bacillus megaterium* は有機物の添加によって増殖しやすい菌種である可能性がある。

## 3) プロテアーゼ生成細菌の群集構造

DGGE プロファイルをもとに、主成分分析によりプロテアーゼ生成細菌の群集構造を解析した結果、施肥処理や土壌採取部位によってプロテアーゼ生成細菌の群集構造が変化した (図 2-1-7)。

アルカリ金属プロテアーゼ生成細菌は、非根圏土壌では施肥処理によって群集構造が変化しなかったが、根圏土壌では群集構造が大きく変化した。また、施肥処理に関わらず、根圏土壌と非根圏土壌との間でアルカリ金属プロテアーゼ生成細菌群集が変化した。これらの結果は、アルカリ金属プロテアーゼ生成細菌が有機物の施用自体の影響よりは根圏での作用、すなわち根からは炭素源が分泌される一方、無機態窒素などの窒素源が根から吸収され、非根圏土壌とは異なる炭素、窒素栄養状態がアルカリ金属プロテアーゼ生成細菌の挙動に大きく影響したことを示唆している。

中性金属プロテアーゼ生成細菌では第一主成分の右側に有機物区、左側に化学肥料区が位置したことから、第一

主成分は主に施肥処理の違いを反映したと考えられた。施肥処理によって非根圏土壌、根圏土壌ともに中性金属プロテアーゼの生成細菌の群集構造が変化しており、根圏土壌のみで生成細菌群集が変化した *apr* とは異なる挙動を示した。このことは土壌部位を問わず中性金属プロテアーゼ生成細菌が有機物施用の影響を受けやすいことを示すものである。一方、第二主成分では統計的な有意差は認められないものの上部に根圏土壌、下部に非根圏土壌が位置したことから、主に土壌採取部位の違いを反映したものと考えられた。

プロテアーゼ活性と主成分分析による第一主成分、第二主成分の重回帰分析では、*apr* は第二主成分、*npr* は第一主成分との関係性が認められた。このことは、プロテアーゼ生成細菌は種毎のプロテアーゼ特異性が異なることを示唆するものである。

## 5. 要約

有機物と化学肥料の施用が非根圏土壌と根圏土壌のプロテアーゼ活性とプロテアーゼ生成細菌の群集構造に与える影響について、レタスを供試作物として解析した。

- 1) 有機物区のプロテアーゼ活性は化学肥料区に比べて常に高かった。また、根圏土壌のプロテアーゼ活性は非根圏土壌よりも高かった。
- 2) アルカリ金属プロテアーゼ遺伝子と中性金属プロテアーゼ遺伝子を対象とした DGGE 法により細菌群集構造を解析した結果、アルカリ金属プロテアーゼ生成細菌は主に *Pseudomonas fluorescens*、中性金属プロテアーゼ生成細菌は *Bacillus megaterium* に近縁であった。これらの結果は、既往の培養法による結果と一致し、本研究の DGGE 法がアルカリ金属プロテアーゼ遺伝子と中性金属プロテアーゼ遺伝子に対して高い特異性を持っていることを意味する。
- 3) DGGE プロファイルに基づく主成分分析の結果、有機物区と化学肥料区の間で、アルカリ金属プロテアーゼや中性金属プロテアーゼ生成細菌の群集構造が異なった。また、プロテアーゼ活性を目的変数、主成分分析の第一主成分と第二主成分を説明変数とした重回帰モデルはアルカリ金属プロテアーゼ、中性金属プロテアーゼともに有意であった。
- 4) 以上から、各々のプロテアーゼ生成細菌は量や特異性の異なるプロテアーゼを放出し、アルカリ金属プロテアーゼと中性金属プロテアーゼの生成細菌群集構造がプロテアーゼ活性の変動に対して大きな影響を及ぼしていることが示唆された。

## 第2節 アルカリホスファターゼ生成細菌群集の解析手法と栽培様式による変動

### 1. はじめに

土壌中の有機態リンは、大部分の土壌では全リンの30～50%を占める。植物は有機態リンを直接吸収できないため、植物が吸収可能な無機態に変換される必要がある。ホスファターゼはリン酸モノエステルを加水分解しリン酸を遊離する酵素で (Richardson, 2001), 至適 pH によって酸性ホスファターゼとアルカリホスファターゼ (ALP) に分類される。酸性ホスファターゼの主要供給源は植物根である (Speir and Cowling, 1991; Dinkelaker and Marschner, 1992) 一方, ALP の主要供給源は主に細菌である (Nakas *et al.*, 1987; Tarafdar and Claassen, 1988)。ALP 活性は有機物の施用により上昇したとの報告 (Mandal *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2004) があることから, ALP 生成細菌の挙動に対して有機物の施用が何らかの影響を及ぼすことが想定される。

本節では, 有機物施用による ALP 活性の変動を非根圏土壌と根圏土壌に分けて調査するとともに, ALP 遺伝子に基づく新たにプライマーを作成し PCR-DGGE 法による解析手法を確立する。また, 本手法により ALP 生成細菌の同定と群集構造の解析をすることを目的とした。

### 2. 試験方法

#### 1) 調査圃場と栽培方法

調査圃場および栽培方法は前節と同様で, 本試験は栽培4年目に当たる2006年に実施し, 施肥は5月26日, 定植は6月6日, 収穫は7月18日にそれぞれ行った。土壌の採取は施肥直前, 施肥後11日目(6月6日, 定植日), 32日目(6月27日), 53日目(7月18日, 収穫日)の計4回実施し, 施肥直前は非根圏土壌(B)のみを, 施肥後は空中震とう法により, 非根圏土壌と根圏土壌(R)に分離した。なお, 土壌の採取方法は前節に準じた。土壌分析用サンプルは, 2mmのふるいをかけた

後4℃で冷蔵保存した。また, 遺伝子解析用サンプルは, DNAの抽出作業を行うまでの間-80℃で保存した。施肥前の土壌化学性は表2-2-1の通りである。

#### 2) アルカリホスファターゼ活性

アルカリホスファターゼ活性は Tabatabai and Bremner (1969) に従って測定した。すなわち, pH 11 に調整した TRIS buffer に土壌を入れ, p-ニトロフェニルリン酸溶液中でインキュベートし, p-ニトロフェノールとして定量した。

#### 3) バイオマスリンと有効態リン

バイオマスリンの測定は Brookes *et al.* (1982) が開発したクロロホルムくん蒸抽出法を用いた。乾土5g相当の生土をデシケーター内で24時間燻蒸し, 0.5M炭酸水素ナトリウム溶液で抽出した。抽出液を硫酸により中和した後, モリブデン酸アンモニウム-アスコルビン酸法 (Murphy and Riley, 1962) で比色定量した。クロロホルムくん蒸しない土壌についても同様の操作を行いブランクとした。また, リンの回収率を調べるため, 上記の抽出液にリン酸二水素カリウム溶液を非燻蒸土壌に乾土1g当り25μgPとなるよう添加し, 同様の操作を行った。有効態リンの測定は, Truog (1930) によった。

#### 4) 作物体分析

レタスについては70℃で乾燥後粉碎し, 硫酸一過酸化水素分解法 (水野・南, 1980) で灰化後, 窒素をインドフェノール法 (Dorich and Nelson, 1983), リン酸をバナドモリブデン酸法 (北海道立総合研究機構農業研究本部, 2012) でそれぞれ定量した。

#### 5) 土壌DNAの抽出

DNAの抽出は, ISOIL for Beads Beating (NIPPON GENE, Tokyo, Japan) を用いて行い, Wizard DNA Clean-Up System (Promega, WI, USA) によって精製した。精製したDNAは, PCR-DGGEに供するまで-20℃で保存した。

表2-2-1 供試圃場の主要土壌化学性 (2006年)

試験区	pH (H <sub>2</sub> O)	全炭素 (g kg <sup>-1</sup> )	全窒素 (g kg <sup>-1</sup> )	全リン (g kg <sup>-1</sup> )	熱水抽出性窒素 (mg kg <sup>-1</sup> )	有効態リン酸 <sup>1)</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	交換性塩基(mg kg <sup>-1</sup> )		
							K <sub>2</sub> O	MgO	CaO
CF	6.4	21.4	1.9	1.0	67	199	233	483	2366
OM	6.5	20.6	1.9	1.1	74	203	226	517	2445

<sup>1)</sup>トルオーグ法。

## 6) ALP 遺伝子用プライマーの設計

土壌 DNA から ALP 遺伝子の一部分を増幅するためのプライマーを設計した。作成方法は、alkaline phosphatase (putative を含む) を BLAST 検索し、以下の 8 種類の ALP のアミノ酸配列の Clustal W によるアライメントに基づいて、プライマーを設計した。 *Bacillus subtilis* 168 (database accession number P42251) , *Nostoc* sp. PCC 7120 (NP489016, NP484251) , *Caulobacter crescentus* CB15 (NP420376) , *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (NP252599) , *Sinorhizobium meliloti* 1021 (NP387197) , *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (NP105065) , *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (NP601465) .

プライマー配列は *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (NP105065) の配列を最優先させた。作成したプライマーは、ALPS-F730 5'-CAGTGGGACGACCACGAGGT-3' (F730-749) , ALPS-R1101 5'-GAGGCCGATCGGCATGTCG-3' (R1083-1101) である。かつこの数字は、 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (NP105065) の配列の位置である。なお、ALPS-R1101 については、DGGE での分離度を向上させるために 5' 側に GC クランプ (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G) を付加した (Myers *et al.*, 1985) .

## 7) PCR および DGGE

PCR は Thermal Cycler Dice (TAKARA BIO, Shiga, Japan) を使って、TAKARA Ex-Taq (TAKARA BIO, Shiga, Japan) により行った。10×PCR buffer, dNTP mixture は、Ex-Taq に付属のものを使用した。

PCR 反応液は DNA テンプレート 10 ng, 20 μM のプライマー溶液を各 2 μl, 10×PCR buffer (Mg 濃度は 20 mM) を 2 μl, dNTP mixture (各 2.5 mM) を 1.6 μl, Ex-Taq を 0.1 μl 加え、最終的に滅菌水で 20 μl とした。サーマルサイクルは、94 °C で 3 分した後、94 °C で 1 分、57 °C で 1 分、72 °C で 2 分を 35 サイクル行い、最後に 72 °C を 7 分間行った。

DGGE 分析には D-Code universal mutation system (BIORAD laboratories, USA) を使用し、変性剤濃度を 40~60% に設定した 10% アクリルアミドゲルを用いて 60 °C で 90 V, 16 時間泳動した。泳動後、SYBR Green I nucleic acid gel stain (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) で染色して、LumiVisonPRO 400EX (TAITEC, Saitama, Japan) で可視化するとともに、特徴

的なバンドをシーケンス用に切り出した。

## 8) DGGE バンドのシーケンス

アクリルアミドゲルから切り出した DNA 断片を、1.5 ml マイクロチューブを用いて 1 ml の滅菌水で二度洗浄し、その一部を DNA テンプレートとして使用した。PCR は GC クランプを付加していないプライマーを使用したことを除いて、DGGE で行った条件と同一である。PCR 産物は、MinElute PCR purification kit (QIAGEN, Germany) により精製し、pGEM-T Vector System I (Promega Corporation, WI, USA) を用いてクローニングした。シーケンス反応は、GenomeLab DTCS - Quick Start Kit (Beckman Coulter, CA, USA) を使用し、T7 プライマーにより行った。反応産物は、CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, CA, USA) により解析し、塩基配列を決定した。

## 9) 系統解析

決定した塩基配列および DDBJ から得た塩基配列は、ClustalW (DDBJ version, <http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) を使用してアライメントを行った。ClustalW と NJplot (Perriere and Gouy, 1996 ; <http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html>) から neighbor-joining (NJ) trees (Saitou and Nei, 1987) を作成した。

## 10) 統計解析

ALP 活性、バイオマスリンおよび有効態リンは Tukey-Kramer 法により統計評価した。また、ALP 生成細菌の群集構造を特徴付けるため、DGGE バンドの相対的位置および輝度値を標準化した後、主成分分析を行った。共に、統計ソフト JMP for Macintosh (SAS Institute, NC, USA) を用いた。

## 3. 結果

## 1) ALP 活性と土壌化学性、作物体分析

施肥処理と土壌採取部位別での ALP 活性の推移を図 2-2-1 に示す。非根圏土壌における ALP 活性は、施肥直前では CF 区 23.1, OM 区 26.5 nmol p-nitrophenol g<sup>-1</sup> soil min<sup>-1</sup> であった。施肥後、CF 区の ALP 活性は 17.7~18.9 nmol p-nitrophenol g<sup>-1</sup> soil min<sup>-1</sup> と施肥直前より低く推移したのに対し、OM 区では 27.9~30.6 nmol p-nitrophenol g<sup>-1</sup> soil min<sup>-1</sup> と施肥直前より高く推移した。一方、根圏土壌の ALP 活性は非根圏土壌よりも高い傾向でとりわけ OM 区の ALP 活性は概ね 40 nmol p-nitrophenol g<sup>-1</sup> soil min<sup>-1</sup> と高かった。

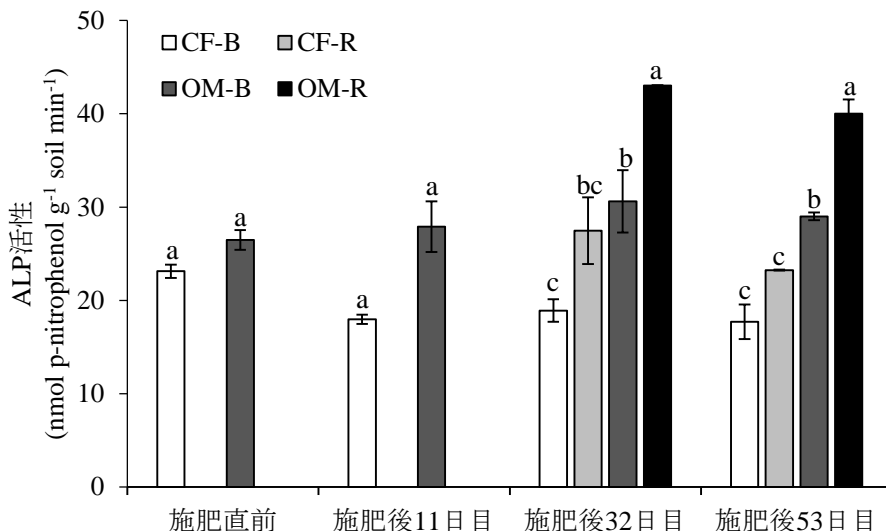


図 2-2-1 施肥処理および土壌採取部位による ALP 活性の推移

- 1) エラーバーは標準誤差.
- 2) 同一の英文字を付した数値間には, Tukey-Kramer 法による有意差がない ( $p < 0.05$ ).

施肥処理と土壌採取部位別でのバイオマスリンの推移を図 2-2-2 に, 有効態リンの推移を図 2-2-3 に示す. バイオマスリンは施肥後から増加し施肥後 32 日目にピークを迎え, その後低下した. 施肥処理別では CF 区よりも OM 区で多い傾向であったが有意差は認められなかった. また, 土壌採取部位別でも差は無認められなかった. 有効態リンは非根圏土壌についてみると CF 区は  $76.0 \sim 95.4 \text{ mg P kg}^{-1}$  と大きな変動が無かったのに対し, OM 区では施肥直前の  $91.4 \text{ mg P kg}^{-1}$  から時間の経過とともに増大し, 施肥後 53 日目には  $139.1 \text{ mg P kg}^{-1}$  となり CF 区を上回った. また, 統計的な有意差はないものの根圏土壌の有効態リンは施肥処理に関わらず非根圏土壌

よりも多い傾向であった.

上記分析結果について相関関係を解析したところ, ALP 活性は有効態リン ( $r=0.821, p < 0.001$ ) およびバイオマスリン ( $r=0.418, p=0.042$ ) と正の相関関係が認められた. また, バイオマスリンは有効態リン ( $r=0.505, p=0.012$ ) と正の相関関係が認められた.

レタスの乾物重とリン, 窒素含有率の推移を表 2-2-2 に示す. OM 区の乾物重は施肥後 32, 53 日目ともに CF 区の 1.4 倍程度であった. OM 区のリン含有率は施肥後 32, 53 日目ともに CF 区よりも有意に高かった. 一方, 窒素含有率は試験区間で有意差は認められなかった.

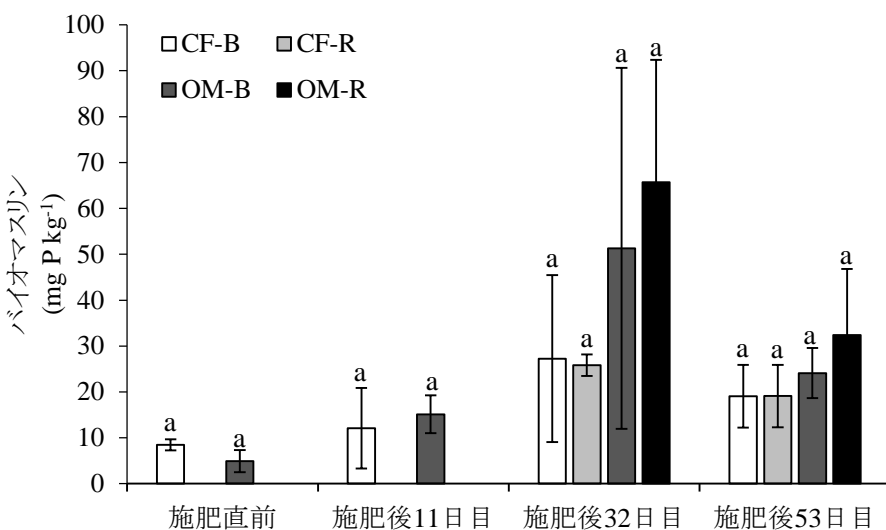


図 2-2-2 施肥処理および土壌採取部位によるバイオマスリンの推移

- 1) エラーバーは標準誤差.
- 2) 同一の英文字を付した数値間には, Tukey-Kramer 法による有意差がない ( $p < 0.05$ ).

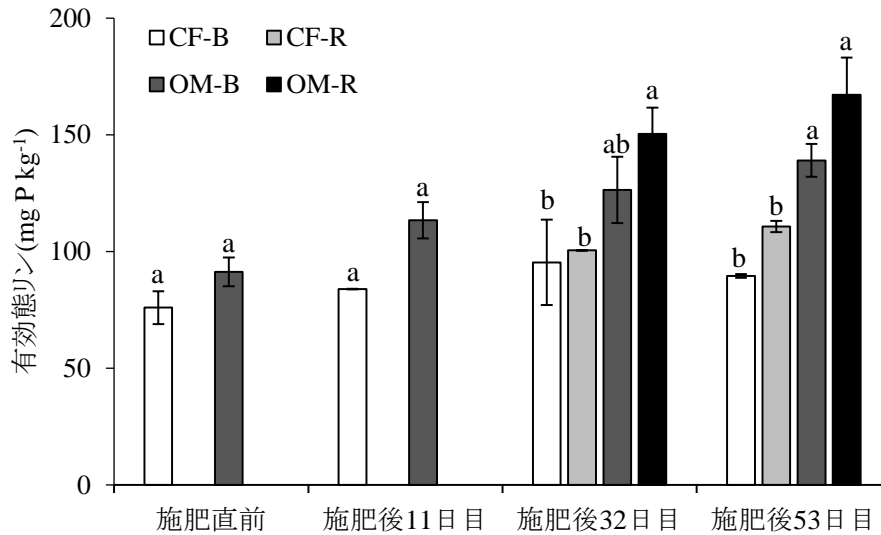


図 2-2-3 施肥処理および土壌採取部位による有効態リンの推移

- 1) エラーバーは標準誤差.
- 2) 同一の英文字を付した数値間には, Tukey-Kramer 法による有意差がない ( $p < 0.05$ ).

表 2-2-2 レタスの乾物重とリン, 窒素含有率の推移

試験区	乾物重 (kg 株 <sup>-1</sup> )		リン含有率 (mg g <sup>-1</sup> )		窒素含有率 (mg g <sup>-1</sup> )	
	施肥後32日目	施肥後53日目	施肥後32日目	施肥後53日目	施肥後32日目	施肥後53日目
CF	5.2 ± 0.9	30.7 ± 4.8	2.9 ± 0.4	4.0 ± 0.2	31.2 ± 0.1	29.9 ± 0.8
OM	7.2 ± 0.6	45.5 ± 4.2	4.0 ± 0.2	4.7 ± 0.2	32.5 ± 0.0	29.4 ± 0.1
t検定	**	*	**	*		

1) 平均値 ± SE (n = 2).  
 2) \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

2) PCR-DGGE 解析

ALP 遺伝子に基づく PCR-DGGE プロファイルを図 2-2-4 に示す. サンプルング時期, 施肥処理, 土壌採取部位を問わず多くのバンドが得られ, それらの系統関係を調査するため, DGGE プロファイルから 19 個の DNA 断片 (ALP-1~ALP-19) を切り出し, 塩基配列を決定した. 相同性の高かった DNA 断片と DNA data bank から得た関連するアミノ酸配列をもとに NJ 系統樹を作成した (図 2-2-5). ALP-1, ALP-6, ALP-9, ALP-13 は *Mesorhizobium loti* MAFF303099 に近縁であり, それぞれ 91%, 91%, 90%, 94% と高い相同性を示した. ALP-11, ALP-15, ALP-17 は *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 に近縁であり, それぞれ 89%, 89%, 84% の相同性を示した. ALP-3, ALP-7, ALP-8, ALP-18 は *Anabaena variabilis* ATCC 29413 に近縁であった. ALP-2, ALP-5, ALP-16 は *Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941 に近縁であった. ALP-12, ALP-19 は *Verminephrobacter eiseniae* EF01-2 に近縁であった. ALP-10 は *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A に近縁であった. ALP-4 は *Ralstonia metallidurans* CH34 に近縁であった. ALP-14 は *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 DNA に近縁であっ

た.

DGGE プロファイルを基に, 施肥処理や土壌採取部位の違いが ALP 遺伝子を持つ細菌の群集構造に影響を及ぼすかを検討するため, サンプルング日毎に主成分分析により解析した (図 2-2-6). 施肥直前, 施肥後 11 日目, 施肥後 32 日目, 施肥後 53 日目において, 第一主成分と第二主成分で全体の分散のそれぞれ 97.5%, 89.0%, 58.6%, 61.0% を説明していた. 施肥処理間の群集構造の違いは施肥直前および施肥後 32 日目の第一主成分で認められた. また, 土壌採取部位による群集構造の違いは根圏土壌を採取した施肥後 32, 53 日目の両日で第一主成分によって認められた. 次に, ALP 活性とその細菌群集との関連性を検討するため, ALP 活性を目的変数, 主成分分析の第一主成分と第二主成分を説明変数として重回帰分析を行ったところ, 施肥後 32 日目では重回帰モデルが有意であり ( $R^2=0.81$ ,  $p=0.007$ ), 第二主成分 ( $p=0.175$ ) に比べ第一主成分 ( $p=0.003$ ) の影響が大きかった. 一方, 施肥後 53 日目では重回帰モデルの有意性が認められなかった ( $R^2=0.09$ ,  $p=0.338$ ).

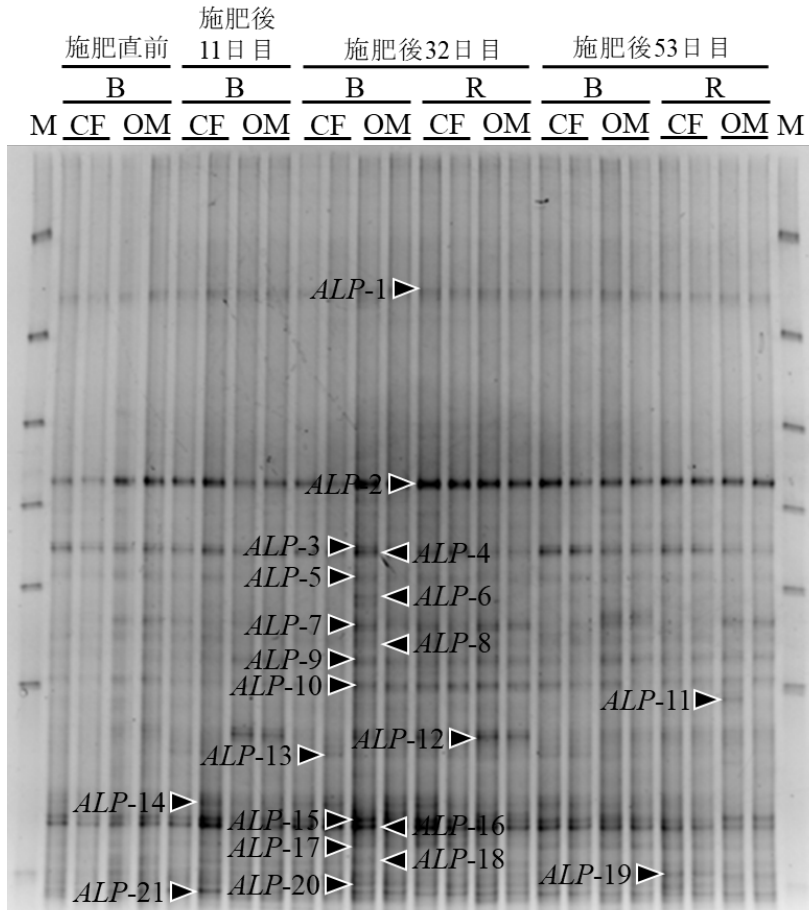


図 2-2-4 ALP 遺伝子の PCR-DGGE プロファイル

- 1) CF：化学肥料，OM：有機物，B：非根圏土壌，R：根圏土壌。
- 2) M：DGGE Marker II (Nippon Gene, Tokyo, Japan).

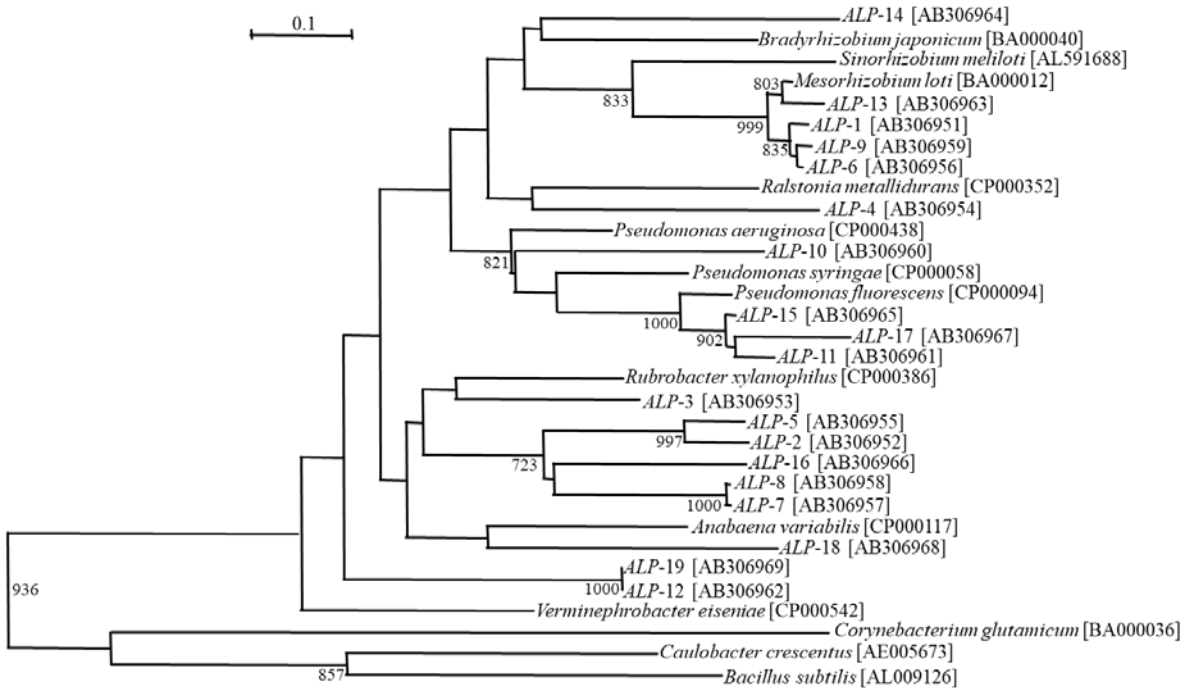


図 2-2-5 ALP 遺伝子のアミノ酸配列を基にした NJ 系統樹

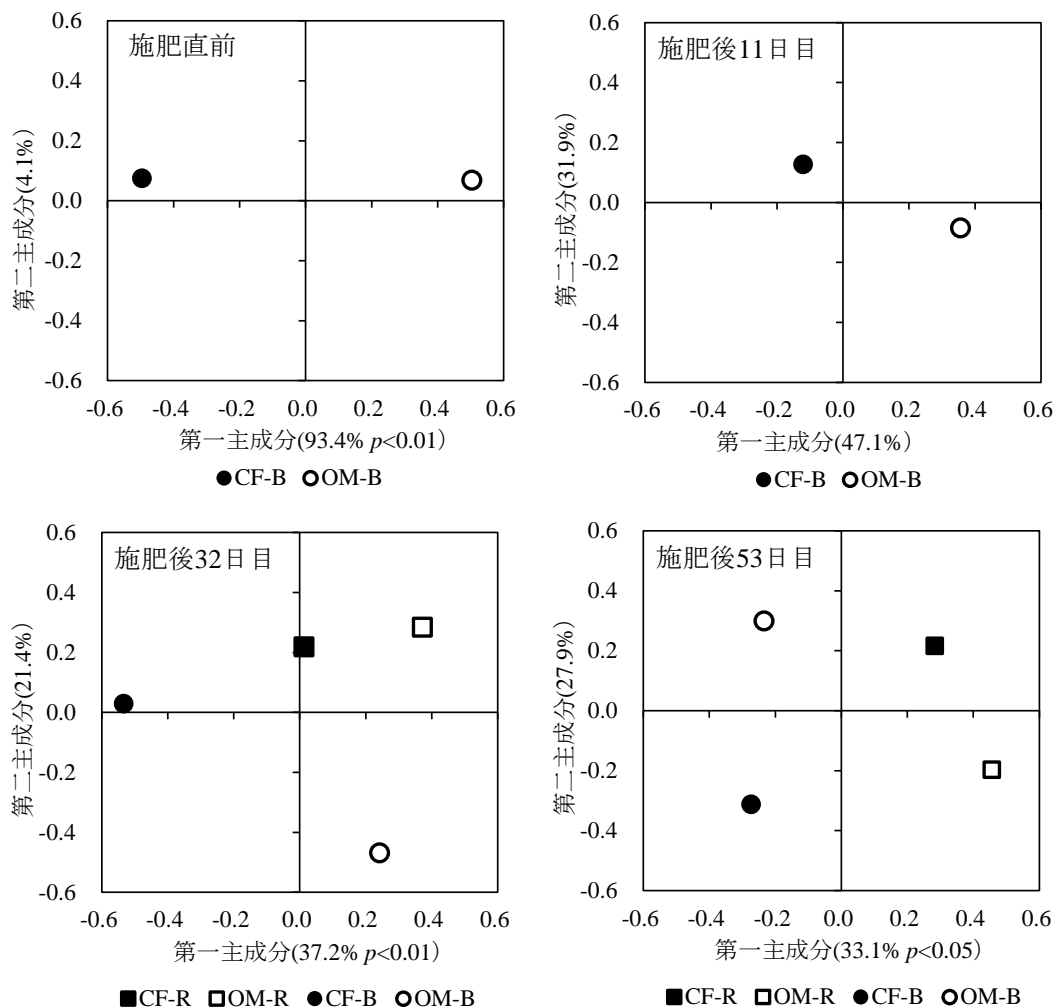


図 2-2-6 DGGE プロファイルに基づくアルカリホスファターゼ生成細菌群集構造の主成分分析

#### 4. 考察

##### 1) 有機物の施用が根圏の ALP 活性に与える影響

ALP 活性は CF 区に比べ OM 区で高く (図 2-2-1), 有機物の施用は化学肥料に比べて ALP 活性を有意に上昇させた既往の報告 (Mandal *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2006 ; Lee *et al.*, 2004) と同様の結果であった。また, 土壌部位別の ALP 活性については根圏土壌で高く (図 2-2-1), Tarafdar and Jungk (1987) や Kandeler *et al.*

(2002) の結果と一致していた。根圏では糖, 有機酸, 多糖類などの有機物が根から分泌され, 微生物が生育するためのエネルギー源として利用されている (Whipps, 1990)。根圏土壌における ALP 活性の上昇は, 根から分泌された有機物による ALP 生成細菌の活性向上, すなわち「根圏効果」と考えられた。

本試験で ALP 活性は有効態リンやバイオマスリンと正の相関関係が認められ, ALP により有機態リンが有効態リンもしくはバイオマスリンに転換されていることが

うかがえた。また, OM 区の植物体リン含有率は CF 区に比べて高かったが (表 2-2-2), これは有機物施用に伴う ALP 活性の上昇で根圏でのリン可給化が促進されて, 有効態リンが増加したことによるものと推察された。これまでに根圏土壌における有機態リンの減少程度とホスファターゼ活性との間に正の相関関係が認められている (Tarafdar and Jungk, 1987 ; Asmar *et al.*, 1995)。また, Tarafdar and Jungk (1987) は根のごく近傍の無機態リン濃度の上昇は有機態リンの無機化速度が根からのリン吸収速度を上回った可能性を指摘しているが, 本試験における根圏土壌の有効態リンの増加 (図 2-2-3) も Tarafdar and Jungk (1987) の結果に合致するかもしれない。土壌のバイオマスリンは植物が利用できる主要なシンク・ソースであると同時に, 土壌有機態リンの生化学的な転換プロセスにおいて重要な役割を果たしている

(Stewart and Tiessen, 1987)。また, 高い代謝回転率の微生物バイオマスが緩効的で持続的な有効態リン源として



働くことを Oberson *et al.* (2001), Seeling and Zasoski (1993) は述べている。本試験で統計的な有意差は認められなかったが、土壌バイオマスリンは CF 区に比べ OM 区で多い傾向であり (図 2-2-2), Ghoshal and Singh (1995) の報告と一致した。また、バイオマスリンと有効態リンとの間に正の相関関係が認められたことを鑑みると、有機物の施用は ALP 活性の上昇だけでなく、土壌バイオマスリンの増加をもたらす、有効態リンの増大に貢献していると推定された。

## 2) DGGE プロファイルの系統解析

土壌微生物の多くはホスファターゼの分泌によって有効態リンを無機化することが可能である (Tarafdar and Claassen, 1988)。本試験でもサンプリング時期、施肥処理、土壌採取部位を問わず、多くのバンドが得られたこと (図 2-2-4)、また、そのバンドが系統樹上で広範囲に分布していたこと (図 2-2-5) から、ALP 遺伝子を持つ細菌が多種存在していたことが推察された。近縁種とされた *Mesorhizobium loti* と *Bradyrhizobium japonicum* が属する  $\alpha$ -プロテオバクテリアには多くの窒素固定細菌が存在する。これらの窒素固定細菌はリン欠乏状態に対しては ALP 活性を高めることで対応している (Al-niemi *et al.*, 1997; Smart *et al.*, 1984) ことが知られている。また、*Pseudomonas fluorescens* は ALP を生成すること (Friedberg and Avigad, 1967), *Pseudomonas syringae* は細胞外 ALP を放出することが報告されている (Cheng *et al.*, 1970) ことを鑑みれば、本研究で設計したプライマーが ALP 生成細菌を特異的に検出し、ALP 遺伝子を持つ細菌のモニタリングに活用できると判断される。

## 3) ALP 生成細菌の群集構造

有機物施用による細菌群集の変化を DGGE により解析した報告は幾つかある (Marschner *et al.* 2003; Sun *et al.* 2004) が、特定の機能を持った細菌群集についての報告は少ない。本試験では、主成分分析により ALP 生成細菌の群集構造を解析した結果、土壌採取部位によって ALP 生成細菌の群集構造が変化した (図 2-2-6)。施肥処理間の群集構造の違いは施肥直前および施肥後 32 日目で認められ、特に施肥後 32 日目は ALP 活性が施肥処理間で有意差があった時期であることから、これらの変動に対して群集構造が関与していた可能性がある。

また、土壌採取部位による ALP 生成細菌の群集構造の違いは根圏土壌を採取した施肥後 32, 53 日目の両日で認められた (図 2-2-6)。根圏では、根から分泌物による影響のため微生物群集が変化することが報告されている (Grayston *et al.* 1998; Marilley and Aragno, 1999; Soederberg *et al.*, 2002; Dunfield *et al.*, 2003; Tesfaye *et al.*, 2003) が、ALP 遺伝子を持つ細菌についても根から分泌物による影

響のため微生物群集が変化し、根圏効果を受けていることが示唆された。Kandeler *et al.* (2002) は、根表面から離れる程 ALP 活性が減少する一因として細菌群集構造の変化を指摘している。施肥後 32, 53 日目の両時期は、土壌採取部位による ALP 活性の差が認められている (図 2-2-1) ことから、ALP 活性の変動に対して ALP 生成細菌の群集構造の関与が推察された。

これまで微生物群集が特定の機能変化と関係があるという示唆は幾つかあり (Avrahami *et al.*, 2003), 特に, Marschner *et al.* (2003, 2005) は圃場試験から細菌群集構造と ALP 活性の間に有意な相関関係が認められたと報告している。しかし、微生物群集と機能の関係はしばしば弱いことがある。なぜなら、多くの機能は特定の基質利用特性を持った広範囲の微生物によって構成されるからである (Zak *et al.*, 1994)。ALP 活性に及ぼす ALP 生成細菌の群集構造の影響を重回帰分析により解析した結果、播種後 32 日目では重回帰モデルが有意であり、第一主成分の影響度が大きかった。このことは ALP 生成細菌種によって異なる量の ALP を放出すること、種毎の ALP の特異性が異なることを示唆するもので、ALP 生成細菌群集が ALP 活性に対して大きな役割を果たしている可能性がある。施肥後 32 日目は ALP 活性 (図 2-2-1) やバイオマスリン (図 2-2-2) が最大となっていることから微生物活動が最も盛んな時期であると推定される。施肥後 32 日目頃はレタスの球肥大が盛んで、生長速度が急激に増大する時期にあたることから、光合成産物が根から盛んに分泌され根圏土壌における微生物が活発化することで、ALP 活性やバイオマスリンが上昇したとも考えられよう。この時期の ALP 活性とその細菌群集構造との関係が認められたことは、各 ALP 生成細菌種による ALP 量や活性の変動がこの時期で大きい可能性がある。

本節では有機物の施用が ALP 活性や ALP 生成細菌群集に対して大きな影響を及ぼしていることを示した。また、群集構造と ALP 活性の間に相関関係が認められた。群集構造と ALP 活性の相互関係を明らかにするためには更なる調査が必要であるが、群集構造の特徴は ALP 活性の変動解析の一助となるであろう。

## 5. 要約

有機物 (OM) と化学肥料 (CF) の施用が非根圏土壌と根圏土壌のアルカリホスファターゼ (ALP) 活性と ALP 生成細菌の群集構造に与える影響について、レタスを供試作物として解析した。

- 1) OM 区の ALP 活性は CF 区に比べ常に高く、根圏土壌の ALP 活性は非根圏土壌よりも高かった。ALP 活性と有効態リン、バイオマスリンとの間に正の相関関係が認められた。また、OM 区におけるレタスのリン含有率は CF 区に比べ高かった。これらの結果から、有機物施用による ALP 活性の上昇は有機態リンから有効態リン、バイオマスリンへの変換を促し、作物が利用可能なリンが増加したことが示唆された。
- 2) DGGE 法によりアルカリホスファターゼ生成細菌群集構造を解析した結果、サンプリング時期、施肥処理、土壌採取部位を問わず、多くの DNA 断片が得られたことから、多種多様なアルカリホスファターゼ生成細菌が存在することが示唆された。得られた DNA 断片は、主に *Mesorhizobium loti* や *Pseudomonas fluorescens* に近縁であった。
- 3) DGGE プロファイルに基づく主成分分析の結果、ALP 生成細菌の群集構造は施肥処理や土壌採取部位によって有意に変化した。また、ALP 活性を目的変数、主成分分析の第一主成分と第二主成分を説明変数とした重回帰モデルは有意であった。
- 4) 以上から、各々の ALP 生成細菌は量や特異性の異なる ALP を放出し、ALP 生成細菌群集が ALP 活性の変動に大きな役割を果たしていることが示唆された。

## 第3章 有機栽培畑の土壌診断に基づく窒素施肥対応

### 第1節 有機物施用を主体とした栽培様式に適した有機質資材の選定

#### 1. はじめに

鶏ふん堆肥は、家畜ふん堆肥の中でも速効性の窒素に富み（村上ら，2009），安価で価格が安定している（農林水産省，2010）ことから，有機物施用を主体とした栽培様式にとってその利用メリットは大きい。しかし，鶏ふん堆肥は窒素含有量やその形態が多岐にわたり，その肥効は製品間で大きく変動する（橘田ら，2002）ため，その選択には十分留意する必要がある。

本節では，窒素含有量の異なる鶏ふん堆肥について，北海道の気象条件を考慮した適応性を，培養試験に基づく窒素無機化特性と本道の主要産品であるバレイショ（*Solanum tuberosum* L.）を用いた栽培試験により検証した。

#### 2. 試験方法

##### 1) 供試試料

供試試料は鶏ふん堆肥となたね油かすで，鶏ふん堆肥は乾物当たりの窒素含有量が  $25 \text{ g kg}^{-1}$  程度（以下，鶏ふん堆肥 A）， $35 \text{ g kg}^{-1}$  程度（以下，鶏ふん堆肥 B）， $50 \text{ g kg}^{-1}$  以上（以下，鶏ふん堆肥 C）の3つの市販品を用いた。各堆肥は後述の栽培試験に用いるため，栽培年次毎に同じ製品を購入した。なお，鶏ふん堆肥 A と鶏ふん堆肥 C は副資材なしの採卵鶏ふんを，鶏ふん堆肥 B は副資材としてオガクズを用いたプロイラーふんを原料とし，それぞれ堆肥化されたものである。

各試料は  $40^\circ\text{C}$  で通風乾燥後，粉碎して  $1 \text{ mm}$  のふるいを全通させたものを成分分析および後述の培養試験に供した。水分および炭素，窒素，リン酸，カリ，石灰，苦土含有量は堆肥等有機物分析法（日本土壌協会，2000）に従い，鶏ふん堆肥の窒素形態は日高ら（2004）の方法に従い分析した（表 3-1-1）。

##### 2) 鶏ふん堆肥の窒素無機化特性

鶏ふん堆肥の窒素無機化特性を，培養試験により評価した。ポリプロピレン製の  $100 \text{ mL}$  容ビンに  $2 \text{ mm}$  のふるいを通した生土（普通褐色低地土； $\text{pH } 6.0$ ， $\text{T-C } 11.1 \text{ g kg}^{-1}$ ， $\text{T-N } 0.9 \text{ g kg}^{-1}$ ）を乾土換算で  $20 \text{ g}$  秤量し，2009 年度購入の鶏ふん堆肥およびなたね油かすを各々全窒素として  $10 \text{ mg}$  相当混合した。最大容水量の  $50\%$  に調整した後，小孔のあるポリエチレンフィルムで覆い， $10$ ， $30^\circ\text{C}$  の2水準で培養した（EYELA，LTE-1010）。なお，培養温度  $10^\circ\text{C}$  は，北海道でのバレイショの生育初期におけ

る地温の近似値として設定し，培養期間中ビンの重量を測定し，定期的に失われた土壌水分を適宜補った。鶏ふん堆肥中の主要な窒素形態の一つである尿酸についても，試薬（WAKO， $\text{T-N } 333 \text{ g kg}^{-1}$ ）を用いて同様の培養を行った。培養時には空試験（試料無添加）を併行させ，全て2反復で行った。

培養 7，14，28，56 日後に  $100 \text{ g L}^{-1}$  塩化カリウムで無機態窒素を抽出し，オートアナライザー

（BRAN+LUEBBE，AACS-II）でアンモニア態窒素と硝酸態窒素を測定し，これらの合計量を無機態窒素とした。試料添加土壌と無添加土壌の無機態窒素量の差を添加窒素量で除して各試料の無機態窒素率とした。

3) 鶏ふん堆肥の施用がバレイショの収量性に及ぼす影響

2009～2010 年の2カ年，北海道長沼町の北海道立総合研究機構中央農業試験場内圃場（普通褐色低地土；表 3-1-2）において，バレイショ「キタアカリ（早生）」、「さやか（中生）」の2品種による栽培試験を実施した。

試験区は，表 3-1-1 に示す有機質資材を用いた特別栽培の4区と慣行区の計5試験区とした（表 3-1-3）。特別栽培における化学肥料由来の窒素施肥量は，「特別栽培農産物に係る表示ガイドライン（農林水産省，2007）」に基づき，北海道における慣行レベルの化学肥料窒素施肥量  $110 \text{ kg ha}^{-1}$ （北海道，2003）の半量（ $55 \text{ kg ha}^{-1}$ ）とし，硫酸アンモニウム（以下，硫安）で施用した。有機質資材由来の窒素施肥量は，化学肥料由来の窒素施肥量と合わせた総窒素施肥量が，「北のクリーン農産物表示制度生産集団登録基準（北海道クリーン農業推進協議会，2010）」で定められた総窒素施肥量上限値（ $100 \text{ kg ha}^{-1}$ ）に収まるよう， $45 \text{ kg ha}^{-1}$  とした。なお，有機質資材の施用量は窒素含有量を基に算出し，肥効率は勘案しなかった。これは，肥効率を考慮せずに総窒素施肥量の5割を有機質資材で代替しても，魚かすを主体とした窒素無機化の速い有機質資材の場合には，全量化学肥料栽培に対する収量比で9割以上確保可能なことが北海道の露地野菜を対象に示されており（中本，2012），このように利用可能な鶏ふん堆肥を検索するためである。慣行区は慣行レベルの化学肥料窒素施肥量（ $110 \text{ kg ha}^{-1}$ ）を硫安で施用した。

リン酸，カリの施肥量は全試験区共通で，北海道施肥ガイド 2020（北海道農政部，2020）における施肥標準量の  $140 \text{ kg-P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$ ， $110 \text{ kg-K}_2\text{O ha}^{-1}$  とし，有機質資材由来のリン酸，カリ含有量で不足する量をそれぞれ過リン酸石灰，硫酸カリウムで補った（表 3-1-3）。なお，リン酸，カ

リについても肥効率は考慮しなかった。施肥は基肥のみとし、全面全層施用を基本としたが、2010年のみ窒素55 kg ha<sup>-1</sup>相当の硫酸を条施用した。

施肥・定植は、2009年5月7日および2010年5月6日に行い、栽植様式は畝間75 cm、株間35 cmとした。1区面積は12.0~13.1 m<sup>2</sup>で、3反復の乱塊法とした。収量調査は、2009年は8月19日(キタアカリ)と8月27日(さやか)に、2010年は8月23日(キタアカリ)と8月31日(さやか)に実施し、変形・丸イモ・緑化・2次生イモを除いたM規格以上(70g以上)の塊茎の合計を規格内収量とした。でんぷん価は、比重測定法(永田, 1956)により測定した。

養分吸収量を算出するため、塊茎と茎葉をそれぞれ

70℃で乾燥後粉碎し、硫酸一過酸化水素分解法(水野・南, 1980)で灰化後、窒素をインドフェノール法(植物栄養実験法編集委員会, 1990)、リン酸をバナドモリブデン酸法、カリを原子吸光分光法(北海道立総合研究機構農業研究本部, 2012)でそれぞれ定量した。これらにそれぞれの乾物重を乗じ、部位別の合計を養分吸収量とした。

#### 4) 統計解析

データの統計解析には、統計ソフトJMP 5.1.2 (SAS Institute Japan)を用い、分散分析とTukey-Kramer法により検定した。

表 3-1-1 鶏ふん堆肥、なたね油かすの成分組成<sup>1)</sup>

年次	資材名	水分 (g kg <sup>-1</sup> )	T-C (g kg <sup>-1</sup> )	窒素形態 <sup>2)</sup> (g kg <sup>-1</sup> )						C/N比	T-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	T-K <sub>2</sub> O	T-CaO	T-MgO
				全窒素	尿酸態	アンモニア態	硝酸態	非尿酸有機態	(g kg <sup>-1</sup> )					
2009	鶏ふん堆肥A	254	207	28.0	0.6 (2.2) <sup>3)</sup>	4.4	0.5	22.5	7.4	74	53	224	21.4	
	鶏ふん堆肥B	121	368	37.4	4.1 (10.9)	5.7	0.5	27.2	9.8	43	45	55	12.8	
	鶏ふん堆肥C	216	277	56.9	23.7 (41.6)	9.1	0.6	23.6	4.9	46	34	170	12.9	
	なたね油かす	80	378	63.4	—	14.6	2.0	—	6.0	32	18	12	10.2	
2010	鶏ふん堆肥A	239	175	25.8	2.0 (7.9)	5.6	1.1	17.0	6.8	68	54	208	19.8	
	鶏ふん堆肥B	216	348	34.7	4.3 (12.3)	7.7	0.8	22.0	10.0	49	47	60	13.8	
	鶏ふん堆肥C	224	225	53.8	21.1 (39.2)	13.7	1.0	17.9	4.2	47	35	156	13.8	
	なたね油かす	78	397	58.8	—	14.0	1.4	—	6.8	43	25	21	13.4	

<sup>1)</sup>水分以外の成分は乾物あたり。<sup>2)</sup>日高ら(2004)の方法に準じた。<sup>3)</sup>全窒素に占める尿酸態の割合を百分比で示した。

表 3-1-2 供試圃場の土壌化学性(深さ0~15cm・施肥前)

年次	pH	全炭素 (g kg <sup>-1</sup> )	全窒素 (g kg <sup>-1</sup> )	C/N比	熱水抽出性窒素 (mg kg <sup>-1</sup> )	有効態リン酸 <sup>1)</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	交換性カリ (mg kg <sup>-1</sup> )
2009	5.6	6.4	0.8	7.9	33.0	289	338
2010	5.6	8.9	0.9	9.7	45.0	234	332

<sup>1)</sup>トルオーグ法。

表 3-1-3 栽培試験における施肥量とその内訳

年次	試験区 <sup>1)</sup>	有機質資材 (kg ha <sup>-1</sup> )			化学肥料 <sup>2)</sup> (kg ha <sup>-1</sup> )			合計 (kg ha <sup>-1</sup> )		
		N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O
2009	慣行区	0	0	0	110	140	110	110	140	110
	特 鶏ふん堆肥A区	45	118	86	55	22	24	100	140	110
	別 鶏ふん堆肥B区	45	51	54	55	89	56	100	140	110
	栽 鶏ふん堆肥C区	45	37	27	55	103	83	100	140	110
	培 なたね油かす区	45	23	13	55	117	97	100	140	110
2010	慣行区	0	0	0	110	140	110	110	140	110
	特 鶏ふん堆肥A区	45	118	94	55	22	16	100	140	110
	別 鶏ふん堆肥B区	45	63	61	55	77	49	100	140	110
	栽 鶏ふん堆肥C区	45	39	30	55	101	80	100	140	110
	培 なたね油かす区	45	33	19	55	107	91	100	140	110

<sup>1)</sup>特別栽培の処理区における有機質資材は、表3-1-1の資材を用いた。

<sup>2)</sup>N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>Oは、それぞれ硫酸アンモニウム、過リン酸石灰、硫酸カリウムで施用した。

### 3. 結果

#### 1) 鶏ふん堆肥の窒素無機化特性

図3-1-1に鶏ふん堆肥, なたね油かす, 尿酸の無機態窒素率を示した. 培養28日後における鶏ふん堆肥の無機態窒素率は, 培養温度10℃で鶏ふん堆肥Aが8.4%, 鶏ふん堆肥Bで12.8%, 鶏ふん堆肥Cで51.1%, 培養温度30℃では鶏ふん堆肥Aが20.2%, 鶏ふん堆肥Bで34.3%, 鶏ふん堆肥Cで52.5%と, 培養温度が高まることで鶏ふん堆肥A, 鶏ふん堆肥Bでは上昇した. また, 鶏ふん堆肥の無機態窒素率の推移も試料間で大きく異なった. す

なわち, 鶏ふん堆肥Cは培養温度に関わらず培養初期から無機化が進行した. 一方, 鶏ふん堆肥A, 鶏ふん堆肥Bでは一旦有機化が起こった後, 緩やかに無機化が進行し, その傾向は培養温度10℃で顕著であった. なたね油かすは培養温度10℃で培養7日後頃に一時的な有機化が生じたが, それ以降は鶏ふん堆肥Cと同様の推移であった. 尿酸の無機態窒素率は他より高く, 培養温度10℃では培養28日後に約90%に達し, 培養温度30℃では多少の増減はあるものの培養7日後以降80~90%で推移した.

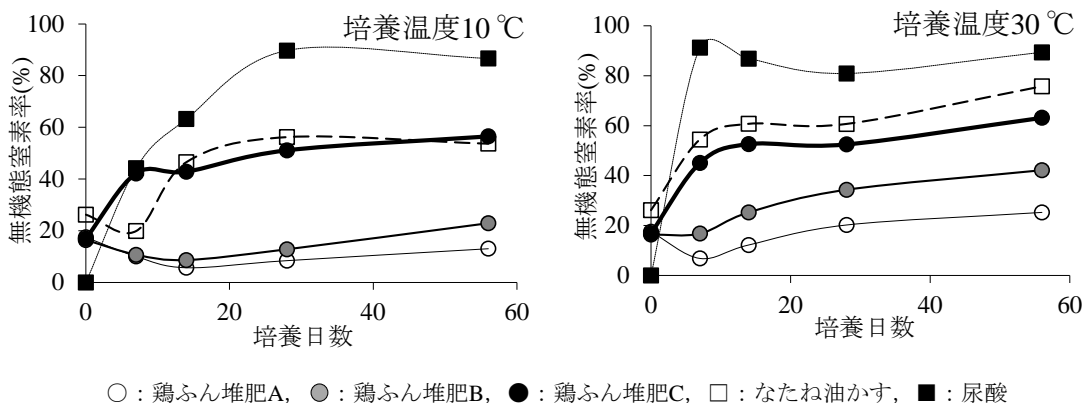


図3-1-1 鶏ふん堆肥, なたね油かす, 尿酸の無機態窒素率

#### 2) 鶏ふん堆肥の施用が特別栽培バレイシヨの収量性に及ぼす影響

表3-1-4に収穫期の規格内収量, でんぷん価を示した. 試験区と年次による分散分析の結果, 試験区間差は「キタアカリ」のでんぷん価を除く調査項目で認められた. また, 全ての調査項目で年次による有意差が認められたが, 試験区と年次の交互作用はいずれの調査項目においても認められなかった. 慣行区に対する鶏ふん堆肥A区, 鶏ふん堆肥B区, 鶏ふん堆肥C区, なたね油かす区のそれぞれの収量指数は, 「キタアカリ」で74, 86, 90, 90, 「さやか」で82, 88, 93, 90と, 両品種の規格内収量は施用資材の影響を受け, 「キタアカリ」では鶏ふん堆肥A区が, 「さやか」では鶏ふん堆肥A区, 鶏ふん堆肥B区, なたね油かす区が慣行区より有意に減収した. 一方, 鶏ふん堆肥C区と慣行区の規格内収量間に有意差は認められなかった. 表3-1-5に収穫期の養分含有率, 養分吸収量を示した. 窒素, リン酸, カリ吸収量は, 鶏ふん堆肥の窒素含有量が高い試験区ほど多くなる傾向で, 鶏ふん堆肥C区は慣行区と同等である一方, 鶏ふん堆肥A区は「キタアカリ」のリン酸吸収量を除き, 慣行区よりも少なかった. なお, 塊茎および茎葉の養分含有率において試験区間差が認められたのは「キタアカリ」の塊茎の窒素含有率のみであることから, 養分

吸収量全般に対する塊茎および茎葉の養分含有率の影響は小さかった.

表 3-1-4 収穫期の規格内収量, でんぷん価<sup>1)</sup>

品種	試験区	規格内収量 (Mg ha <sup>-1</sup> )				でんぷん価 (%)
		2009年	2010年	2カ年平均		
キタアカリ	慣行区	25.4	31.0	28.2 a <sup>2)</sup>	(100) <sup>3)</sup>	13.6 a
	特 鶏ふん堆肥A区	19.9	21.8	20.9 b	(74)	14.0 a
	別 鶏ふん堆肥B区	21.6	27.0	24.3 ab	(86)	13.8 a
	栽 鶏ふん堆肥C区	22.7	27.9	25.3 ab	(90)	13.7 a
	培 なたね油かす区	22.3	28.4	25.3 ab	(90)	13.9 a
	分散分析					
	処理区				** <sup>4)</sup>	ns
	年次				***	**
	処理区×年次				ns	ns
	慣行区	32.3	38.6	35.5 a	(100)	12.8 b
さやか	特 鶏ふん堆肥A区	26.6	31.7	29.2 c	(82)	13.5 a
	別 鶏ふん堆肥B区	30.0	32.5	31.2 bc	(88)	13.4 ab
	栽 鶏ふん堆肥C区	30.5	35.3	32.9 ab	(93)	13.2 ab
	培 なたね油かす区	30.1	33.8	32.0 bc	(90)	13.0 ab
	分散分析					
	処理区				***	*
	年次				***	***
	処理区×年次				ns	ns

<sup>1)</sup> でんぷん価は, 2カ年 (2009, 2010年) の平均値のみを示した。

<sup>2)</sup> 同一の英文字を付した数値間には, Tukey-Kramer法による有意差がない ( $p < 0.05$ )。

<sup>3)</sup> 慣行区に対する収量指数を百分比で示した。

<sup>4)</sup> \*\*\*, \*\*, \*はそれぞれ0.1%, 1%, 5%水準で有意差あり。nsは有意でないことを示す。

表 3-1-5 収穫期の養分含有率, 養分吸収量<sup>1)</sup>

品種	試験区	塊茎の養分含有率 (g kg <sup>-1</sup> )			茎葉の養分含有率 (g kg <sup>-1</sup> )			養分吸収量 (kg ha <sup>-1</sup> )			
		N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	
キタアカリ	慣行区	8.7 ab <sup>2)</sup>	7.1 a	28.3 a	8.6 a	3.2 a	28.9 a	88.2 a	67.9 ab	290 a	
	特 鶏ふん堆肥A区	7.5 b	7.2 a	29.4 a	9.1 a	3.5 a	21.8 a	64.5 b	58.3 b	244 b	
	別 鶏ふん堆肥B区	7.9 ab	7.2 a	28.8 a	8.7 a	3.4 a	31.6 a	74.8 ab	65.0 ab	272 ab	
	栽 鶏ふん堆肥C区	9.1 a	7.6 a	29.9 a	8.8 a	3.4 a	30.0 a	86.3 a	69.5 a	287 ab	
	培 なたね油かす区	8.1 ab	7.4 a	29.0 a	9.0 a	3.4 a	27.5 a	74.8 ab	65.5 ab	264 ab	
	分散分析										
	処理区	* <sup>3)</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	***	*	*	
	年次	**	ns	ns	ns	ns	**	***	***	*	
	処理区×年次	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
	慣行区	9.3 a	7.8 a	31.2 a	9.2 a	3.2 a	23.3 a	90.2 a	72.0 a	296 a	
さやか	特 鶏ふん堆肥A区	8.1 a	7.6 a	31.3 a	9.7 a	3.8 a	30.1 a	68.3 c	61.2 b	259 b	
	別 鶏ふん堆肥B区	8.7 a	7.7 a	30.7 a	10.0 a	3.7 a	23.7 a	76.0 bc	64.5 ab	261 bc	
	栽 鶏ふん堆肥C区	8.9 a	7.9 a	31.8 a	9.6 a	3.7 a	25.8 a	82.7 ab	70.0 a	289 ab	
	培 なたね油かす区	9.5 a	8.3 a	32.7 a	10.0 a	3.7 a	24.3 a	80.2 ab	67.1 ab	270 abc	
	分散分析										
	処理区	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	**	**	
	年次	***	**	***	***	*	*	***	***	***	
	処理区×年次	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	

<sup>1)</sup> 2カ年 (2009, 2010年) の平均値で示した。

<sup>2)</sup> 同一の英文字を付した数値間には, Tukey-Kramer法による有意差がない ( $p < 0.05$ )。

<sup>3)</sup> \*\*\*, \*\*, \*はそれぞれ0.1%, 1%, 5%水準で有意差あり。nsは有意でないことを示す。

#### 4. 考察

鶏ふんと尿の排せつ肛が一つであるため、鶏ふん堆肥の窒素含有量は概して高い(村上ら, 2009)が、発酵処理の日数や温度によって窒素含有量やその形態は大きく変動する(橘田ら, 2002)。作物生産の安定化を図る上で、堆肥毎の窒素肥効を把握することは重要で、乾物当たりの窒素含有量(日置ら, 2001; 棚橋・矢野, 2004)あるいは尿酸態窒素含有量(日高ら, 2004; 橘田ら, 2002; 村上ら, 2007)からその肥効を推定する手法が開発され、いずれも含有量の上昇に伴い、無機化速度は早まると報告されている。これらの成果の多くは培養温度30℃での解析に基づくが、北海道におけるバレイショの生育初期の平均地温に近似する培養温度10℃でも、窒素含有量が最も多い鶏ふん堆肥Cが最も速やかに無機化した(図3-1-1)。培養温度10℃と30℃における無機態窒素率を比較すると、鶏ふん堆肥Cは類似した無機化パターンを示すのに対し、鶏ふん堆肥Aおよび鶏ふん堆肥Bでは10℃で明らかに低く推移した。橘田ら(2002)も培養温度10℃と30℃の2水準で同様の結果を示しており、無機態窒素率の試料間差は主に初期の有機態窒素の窒素無機化速度に由来するものと推察される。実際に鶏ふん堆肥Cは、窒素無機化速度が早い尿酸態窒素(図3-1-1)の含有量が最も多い(表3-1-1)ことから、地温に左右されず安定した肥効を示す資材として有望と考えられた。

これを裏付けるように、収穫期の規格内収量や窒素吸収量は、鶏ふん堆肥の窒素含有量が高くなるほど多い傾向(表3-1-4, 3-1-5)で、鶏ふん堆肥の窒素無機化特性が、バレイショの収量性や窒素吸収に強く影響していることを示している。なお、鶏ふん堆肥間での収量順序は、品種を問わず一定の傾向であることから、鶏ふん堆肥の選択において品種の早晩性を考慮する必要はないと考えられた(表3-1-4)。

鶏ふん堆肥C区すなわち窒素含有量が50 g kg<sup>-1</sup>以上含まれる鶏ふん堆肥の施用が収量性の確保に有効である要因を、鶏ふん堆肥由来の無機態窒素量の観点から考察した。本試験におけるバレイショ生育中の積算地温は約1900℃であり、30℃での培養試験における63日後に相当する。近傍の54日後の無機態窒素率63.2%と鶏ふん堆肥の窒素施肥量45 kg ha<sup>-1</sup>を乗算した約28 kg ha<sup>-1</sup>が、鶏ふん堆肥C区における鶏ふん堆肥由来の推定無機態窒素量となる。これに、硫酸による窒素施肥量55 kg ha<sup>-1</sup>を加えた83 kg ha<sup>-1</sup>が、鶏ふん堆肥C区において推定される無機態窒素の総供給量となる。この量は、慣行区の無機態窒素供給量110 kg ha<sup>-1</sup>と比べて27 kg ha<sup>-1</sup>余り少ないが、慣行栽培の施肥標準窒素量80 kg ha<sup>-1</sup>(北海道農政部, 2020)に近似し、バレイショの窒素供給量として概ね充足しているものと考えられた。

また、本試験における鶏ふん堆肥のリン酸、カリの肥効

率は、それぞれ70~100%、65~90%との報告例(倉島, 1983; 牛尾ら, 2004; 西尾, 2007)を参考に、両成分ともに100%と仮定して不足する量を化学肥料で補充した(表3-1-3)。鶏ふん堆肥の窒素含有量が多いほどその施肥量が少なくなるため、鶏ふん堆肥に由来するリン酸、カリ施肥量は少量となり、化学肥料の割合が増える。特に、鶏ふん堆肥C区における鶏ふん堆肥由来のリン酸、カリ施肥量は3割未満(表3-1-3)と少なく、収穫期における鶏ふん堆肥C区のリン酸、カリ吸収量は慣行区と同等であった(表3-1-4)。よって、窒素含有量50 g kg<sup>-1</sup>以上の鶏ふん堆肥を用いる場合、鶏ふん堆肥のリン酸とカリの肥効率を実用上100%と見積もっても支障ないと判断した。

以上のことから、バレイショの特別栽培において、鶏ふん堆肥の窒素肥効率を加味せず窒素含有量を基に施用する場合には、窒素含有量50 g kg<sup>-1</sup>以上の鶏ふん堆肥を用いることが収量性の確保に有効と判断された。なお、袋詰め等で市販されている鶏ふん堆肥の成分表示は通常現物当たりである。鶏ふん堆肥の水分を20%(棚橋・矢野, 2004)と仮定した場合、現物当たりの窒素含有量に換算した40 g kg<sup>-1</sup>以上が鶏ふん堆肥選択の判断基準となる。

#### 5. 要約

窒素含有量の異なる鶏ふん堆肥の施用が特別栽培バレイショの収量性に及ぼす影響を、培養試験に基づく窒素無機化特性の調査を含め解析した。供試した鶏ふん堆肥は、現物当たり窒素含有量が20 g kg<sup>-1</sup>前後(低N鶏ふん)、30 g kg<sup>-1</sup>前後(中N鶏ふん)、40 g kg<sup>-1</sup>以上(高N鶏ふん)の3種類で、総窒素施肥量100 kg ha<sup>-1</sup>の内、北海道の慣行レベルの半量に相当する55 kg ha<sup>-1</sup>を硫酸で、残りの45 kg ha<sup>-1</sup>を鶏ふん堆肥で施用した。

- 1) 窒素無機化は、高N鶏ふん堆肥が最も速く、中N鶏ふん堆肥、低N鶏ふん堆肥の順であり、含有する尿酸の量を反映した。窒素無機化に及ぼす培養温度(10℃, 30℃)の影響は、高N鶏ふんでは少なかったのに対し、低Nおよび中N鶏ふんは10℃で無機態窒素率が低く推移した。よって、高N鶏ふんは地温に左右されず安定した窒素肥効を示す資材と考えられた。
- 2) これを裏付けるように、収穫期におけるバレイショの規格内収量や窒素吸収量は、窒素含有量の高い鶏ふん堆肥ほど多くなる傾向で、鶏ふん堆肥の窒素無機化特性が、バレイショ生育に強く影響を及ぼしていた。なお、鶏ふん堆肥間でのでんぷん値に有意差は認められなかった。
- 3) 以上から、バレイショの特別栽培において、高N鶏ふん堆肥の施用の有効性が確認された。

## 第2節 土壌窒素診断基準値とカボチャ、スイートコーン、レタスの窒素施肥対応

### 1. はじめに

土壌養分の適正管理には土壌診断に基づく施肥対応が有効である。すなわち、土壌分析によって土壌由来の養分供給量を推定し、不足する量を有機質資材で補うことで、合理的で無駄のない施肥が可能となる。この考え方を窒素施肥に適用すると、目標収量を得るための作物の窒素吸収量（以下、目標窒素吸収量）、窒素無施用条件での窒素吸収量、施肥窒素利用率の3項目を明らかにすれば、窒素施肥量を設定できる（斉藤ら、2007）。

本節では、北海道の有機栽培で広く作付されているカボチャ (*Cucurbita maxima* Duch.)、スイートコーン (*Zea mays* L.)、レタス (*Lactuca sativa* L.) を対象に、有機JASに準拠した広範な窒素肥沃度を有する圃場で有機質肥料を用いた窒素用量試験を行い、前述した目標窒素吸収量、窒素無施用条件での窒素吸収量、施肥窒素利用率などを検討することにより、有機栽培露地野菜畑の土壌診断に基づく窒素施肥対応の構築を目的とした。

### 2. 試験方法

#### 1) 供試圃場および栽培体系

供試圃場は、北海道長沼町の北海道立総合研究機構中央農業試験場内の2圃場（圃場A、B）で、窒素施肥対応の作成に必要となる広範なデータを得るために、圃場A（褐色森林土）では2004年から2009年まで、堆肥を毎年10月に10、30、55、75 Mg ha<sup>-1</sup> y<sup>-1</sup>（それぞれA-1、A-2、A-3、A-4）施用することにより4水準の窒素肥沃度を、圃場B（褐色低地土）では1998年から2009年まで、堆肥を毎年10月に0、25 Mg ha<sup>-1</sup> y<sup>-1</sup>（それぞれB-1、B-2）施用し2水準の窒素肥沃度をそれぞれ設けた（図3-2-1）。

施用した堆肥は牛ふん麦稈堆肥で、含水率0.58 kg kg<sup>-1</sup>、C/N比11.5、T-N 6.6 g kg<sup>-1</sup>、T-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 8.0 g kg<sup>-1</sup>、T-K<sub>2</sub>O 15.3 g kg<sup>-1</sup>であった（現物当たり、各年の平均値）。供試圃場における主要土壌化学性は表3-2-1の通りである。

2008～2010年の3ヵ年、両圃場の窒素肥沃度毎にカボチャ（品種「こふき」）、スイートコーン（品種「味来390」）、レタス（品種「エムラップ231」）、エダマメ (*Glycine max* Merr., 品種「サッポロミドリ」）の4作物を栽培し、カボチャ→スイートコーン→レタス→エダマメの順による輪作体系で管理した（図3-2-1）。供試作物は、本道の有機栽培での作付実績に加え、養分吸収特性の相違を考慮して選定した。すなわち、カボチャは栄養生長体である茎葉を伸長させながら、生殖生長体である果実の肥大・充実を図る「連続吸収型」に、スイートコーンは止葉の出現により栄養生長は停滞し、生殖生長に転換する「山型吸収型」に、レタスは外葉の生長の後、球葉が形成されて、生育相が転

換する「連続吸収に近い山型吸収型」にそれぞれ分類される（相馬、1988）。なお、窒素吸収量の多くを根粒由来の窒素供給に依存するエダマメは、慣行栽培の施肥標準窒素量が20 kg ha<sup>-1</sup>（北海道農政部、2020）と少量で、後述する窒素用量試験において窒素施肥量による生育量の差異を検出することが困難であったことから、本解析からは除外した。

スイートコーンは5月中旬に播種し、8月中旬に収穫した。カボチャはガラス温室内で育苗した苗を6月上旬に圃場へ定植し、8月下旬に収穫した。レタスはカボチャと同様に、ガラス温室内で育苗した苗を6月上旬に圃場へ定植し、7月中下旬に収穫した。各作物とも、1N区の収穫適期を基本に全試験区一斉に収穫した。栽植密度は、カボチャ5556株 ha<sup>-1</sup>（条間300 cm、株間60 cm）、スイートコーン38095株 ha<sup>-1</sup>（条間75 cm、株間35 cm）、レタス5556株 ha<sup>-1</sup>（条間60 cm、株間30 cm）で、カボチャとスイートコーンではグリーンマルチを、レタスでは白黒ダブルマルチをそれぞれ使用した。

栽培管理は有機JAS（農林水産省、2017）に準拠し、病害虫の発生により作物の正常な生育が妨げられる恐れがある場合に、有機JASに適合する農薬を必要最小限使用した。除草は耕うん機による整地および手取りにより実施し、作物と雑草による養分競合が起きないように管理した。収穫残さは全て圃場から搬出した。

#### 2) 窒素用量試験

両圃場の4または2水準の窒素肥沃度毎に速効性の有機質肥料を用いた窒素用量試験を実施した。窒素施肥量は無窒素(0N)、慣行栽培での施肥標準窒素量(1N)、施肥標準窒素量の2倍(2N)の3水準とし、スイートコーンにはなたね油かす、カボチャとレタスには魚かすを用い、これらで施肥窒素の全量を施与した（表3-2-2）。なたね油かすおよび魚かすの成分組成は表3-2-3の通りである。

窒素が作物生育の制限因子になるよう、リン酸およびカリ施肥量は土壌分析値に基づき北海道施肥ガイド2020（北海道農政部、2020）の施肥対応を準用して設定し、なたね油かすまたは魚かすで不足する量を、それぞれグアノ、天然硫酸カリで施与した（表3-2-2）。これらの肥料は全量基肥施用とした。なお、堆肥の施用圃場では、堆肥由来のリン酸およびカリ供給を考慮し、前年秋の施用堆肥1 Mg 当たりリン酸1 kg、カリ4 kgを表3-2-2の各施肥量から減じた（北海道農政部、2020）。

1区面積は10.8～24.0 m<sup>2</sup>で、圃場Aは3反復、圃場Bは2反復で試験区を設置した（図3-2-1）。なお、栽培期間中に湿害などの窒素用量以外の要因によって生育が妨げられた試験区については、以後の解析から除外した。



年	供試作物			A-1									A-2	A-3	A-4
	2008年	2009年	2010年	反復1			反復2			反復3					
供試作物	カボチャ	スイートコーン	レタス	0N <sup>2)</sup>	1N	2N	2N	0N	1N	1N	2N	0N	同左	同左	同左
	エダマメ	カボチャ	スイートコーン	0N	1N	2N	2N	0N	1N	1N	2N	0N			
	レタス	エダマメ	カボチャ	0N	1N	2N	2N	0N	1N	1N	2N	0N			
	スイートコーン	レタス	エダマメ	0N	1N	2N	2N	0N	1N	1N	2N	0N			

図 3-2-1 圃場 A における輪作体系と窒素肥沃度，窒素施肥量の配置<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 圃場 B は，窒素肥沃度が 2 水準(B-1, B-2)，反復数が 2 の他は圃場 A と同様の配置。

<sup>2)</sup> 0N：無窒素，1N：慣行栽培の施肥標準窒素量，2N：施肥標準窒素量の 2 倍。

表 3-2-1 供試圃場の主要土壌化学性（2010 年・施肥前）

圃場	窒素肥沃度 区分	堆肥施用量 (Mg ha <sup>-1</sup> y <sup>-1</sup> )	pH (H <sub>2</sub> O)	熱水抽出性窒素 (mg kg <sup>-1</sup> )	有効態リン酸 <sup>3)</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	交換性塩基(mg kg <sup>-1</sup> )		
						K <sub>2</sub> O	MgO	CaO
A <sup>1)</sup>	A-1	10	5.0	67	393	555	474	2484
	A-2	30	5.2	91	465	1207	635	2629
	A-3	55	5.4	105	554	1544	849	2807
	A-4	75	5.5	124	624	1815	799	2677
B <sup>2)</sup>	B-1	0	5.7	31	415	372	1237	1727
	B-2	25	6.0	70	653	908	1241	1952

<sup>1)</sup> 褐色森林土で，2004年から2009年まで，堆肥を毎年10月に施用。

<sup>2)</sup> 褐色低地土で，1998年から2009年まで，堆肥を毎年10月に施用。

<sup>3)</sup> トルオーグ法。

表 3-2-2 窒素用量試験の概要

作物名	窒素施肥量 <sup>1)</sup>		リン酸施肥量 <sup>2)</sup> (kg-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ha <sup>-1</sup> )			カリ施肥量 <sup>3)</sup> (kg-K <sub>2</sub> O ha <sup>-1</sup> )	
	水準 (kg ha <sup>-1</sup> )		有効態リン酸 <sup>4)</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )			交換性カリ (mg kg <sup>-1</sup> )	
			300~450 <sup>5)</sup>	450~600	600~	300~600	600~
カボチャ	0N	0	70	30	0	50	0
	1N	80	70	30	0	50	0
	2N	160	70	30	0	50	0
スイートコーン	0N	0	100	50	0	70	0
	1N	120	100	50	0	70	0
	2N	240	100	50	0	70	0
レタス	0N	0	80	40	0	70	0
	1N	120	80	40	0	70	0
	2N	240	80	40	0	70	0

<sup>1)</sup> カボチャ，レタスには魚かすを，スイートコーンにはなたね油かすを施用した。

<sup>2)</sup> グァノにより施用。<sup>3)</sup> 天然硫酸カリにより施用。<sup>4)</sup> トルオーグ法。<sup>5)</sup> 以上～未満。

表 3-2-3 なたね油かす，魚かすの成分組成<sup>1)</sup>

資材名	T-N	T-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	T-K <sub>2</sub> O	C/N比
	(g kg <sup>-1</sup> )			
なたね油かす	58	29	17	6.4
魚かす	74	64	11	5.0

<sup>1)</sup> 現物あたりで各年の平均値。

## 3) 調査分析方法

## (1) 熱水抽出性窒素

2008～2010年の3カ年、施肥・耕起の約1週間前に表層から深さ15 cmまでの土壌を採取し、風乾・砕土後に2 mmの篩いを通したものを分析試料とした。本試料10 gに脱塩水100 mLを加え、オートクレーブにより105℃で1時間加熱し放冷後、No.5Cのろ紙でろ過して抽出液を得た。抽出液中の有機態窒素を分解し、その分解液中のアンモニア態窒素をインドフェノール法(Dorich and Nelson, 1983)で定量し、これを熱水抽出性窒素とした(北海道立総合研究機構農業研究本部, 2012)。

## (2) 収量および作物体窒素吸収量

各作物の収量は、出荷基準を満たした規格内収量(生重)とし、カボチャは1果重が900 g以上の良果、スイートコーンは皮付き1穂重が300 g以上の雌穂、レタスは1球重が450 g以上の結球部を対象とした(花・野菜技術センター, 2020)。

作物体の窒素含有率は、収穫部位とそれ以外の部位に分け、70℃で48時間以上乾燥して粉碎した試料を硫酸-過酸化水素分解法(水野・南, 1980)で灰化後、インドフェノール法により定量した(Dorich and Nelson, 1983)。これに部位別乾物重を乗じ、

その合計を各作物の窒素吸収量とした。レタスについては硝酸態窒素を多く含むため、ガンニング変法で窒素含有率を求めた(北海道立総合研究機構農業研究本部, 2012)。なお、施肥窒素利用率は1N区または2N区の作物体窒素吸収量と0N区のそれとの差を窒素施肥量で除して求めた。

相関解析にあたっては、JMP5.1.2(SAS Institute Japan)を用いた。

## 3. 結果

2008～2010年の3カ年における窒素吸収量と収量の関係を図3-2-2に示す。各作物とも窒素吸収量と収量の間には0.1%水準の有意な関係が認められた。各作物の0N区, 1N区, 2N区における平均収量は、カボチャが各々17, 20, 21 Mg ha<sup>-1</sup>、スイートコーンが8, 13, 14 Mg ha<sup>-1</sup>、レタスが15, 24, 26 Mg ha<sup>-1</sup>であった。全般に、窒素施肥量および窒素吸収量の増加に伴って増収したが、カボチャでは窒素吸収量150 kg ha<sup>-1</sup>あたりで収量は頭打ちとなった。また、慣行栽培の施肥標準窒素量を施与した1N区の多くで、慣行栽培の基準収量(カボチャ 20 Mg ha<sup>-1</sup>、スイートコーン 12～15 Mg ha<sup>-1</sup>、レタス 20 Mg ha<sup>-1</sup>; 北海道農政部, 2020)以上の収量が得られた。

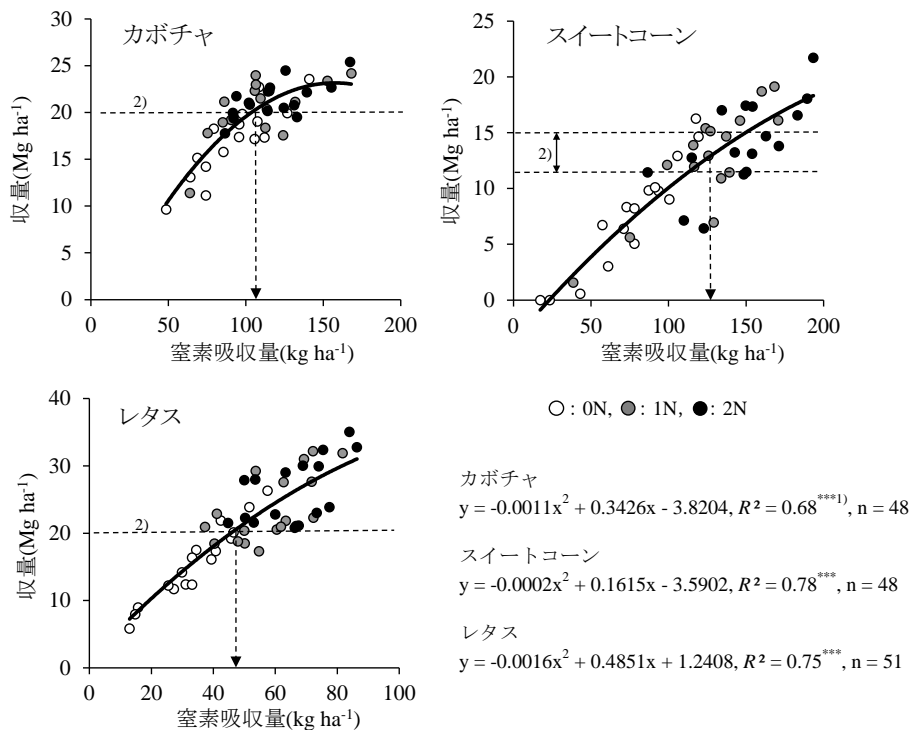


図3-2-2 窒素吸収量と収量の関係(2008～2010年)

- 1) \*\*\*: 0.1%水準で有意.  
 2) 慣行栽培における基準収量.

図 3-2-3 に土壤の熱水抽出性窒素と各作物の窒素吸収量の関係を 0N および 1N 区について示す。0N 区における両者の関係はカボチャ、スイートコーンでは 1%水準、レタスでは 0.1%水準でいずれも正の相関が認められた。一方、1N 区での相関は統計的に有意でない場合もあったが、いずれの作物も熱水抽出性窒素の上昇に伴い窒素吸収量は増加した。各作物の 0N 区、1N 区における窒素吸収量の平均値は、カボチャが各々 93, 109 kg ha<sup>-1</sup>、スイートコーンが 76, 125 kg ha<sup>-1</sup>、レタスが 36, 59 kg ha<sup>-1</sup>であった。

図 3-2-4 に土壤の熱水抽出性窒素と各作物の施肥窒素利用率の関係を示す。窒素施肥量の多少を問わず、施肥窒素利用率は熱水抽出性窒素の上昇とともに低下した。また、2N 区の回帰直線は 1N 区よりも常に下方に位置し、同等の熱水抽出性窒素レベルでは、窒素施肥量が多い方が施肥窒素利用率は小さかった。各作物の 1N 区、2N 区における施肥窒素利用率の平均値は、カボチャが各々 21, 16%、スイートコーンが 41, 30%、レタスが 19, 12%であった。

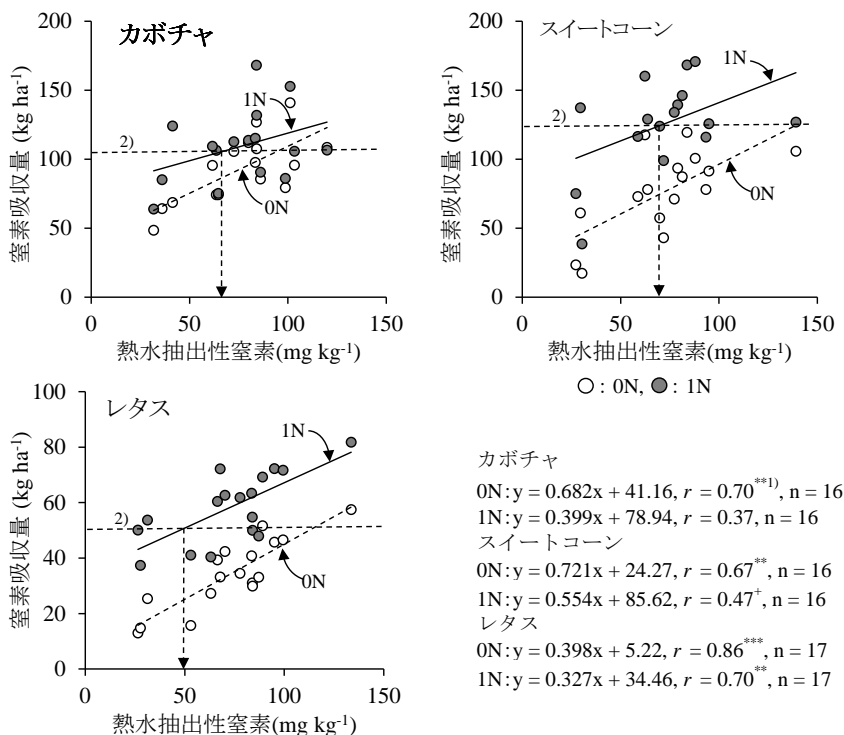


図 3-2-3 土壤の熱水抽出性窒素と各作物の窒素吸収量の関係 (2008~2010 年)

- 1) \*\*\*, \*\*, \*, + : 0.1%, 1%, 5%, 10%水準で有意。
- 2) 目標窒素吸収量。

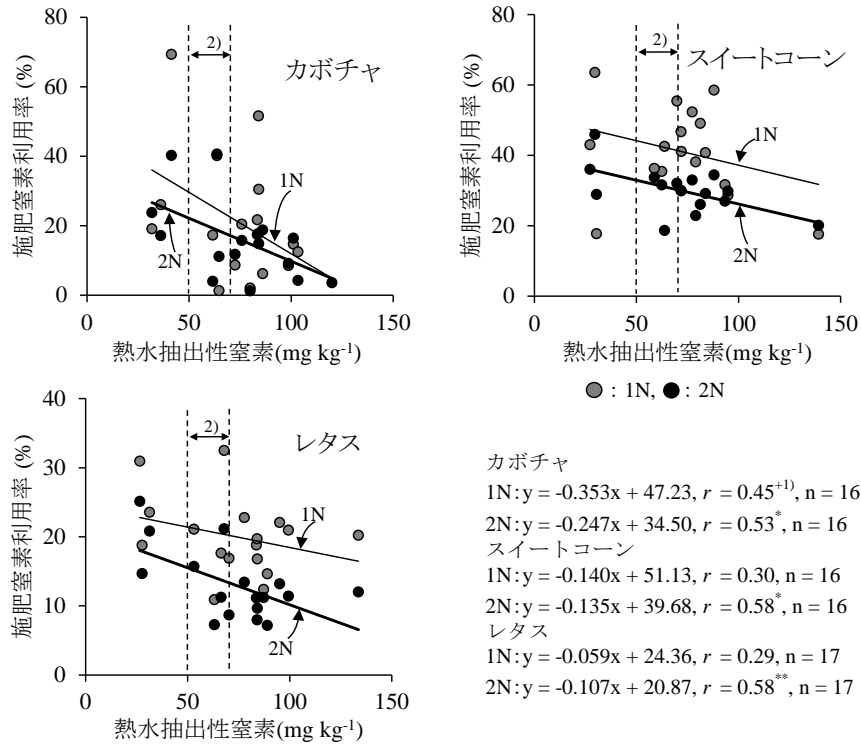


図 3-2-4 土壌の熱水抽出性窒素と各作物の施肥窒素利用率の関係 (2008~2010 年)

<sup>1)</sup> \*, + : 5%, 10% 水準で有意.

<sup>2)</sup> 土壌窒素診断基準値.

#### 4. 考察

##### 1) 窒素施肥対応の設定方法

以上の結果に基づき、図 3-2-5 の設定方法に従って窒素施肥対応を構築する。先述のように、窒素施肥量は目標窒素吸収量 (A)、窒素無施用条件での窒素吸収量 (B)、施肥窒素利用率 (C) の 3 項目を求め、目標窒素吸収量から窒素無施用条件での窒素吸収量を差し引き (A-B)、それを施肥窒素利用率で除して算出する。ただし、窒素無施用条件での窒素吸収量および施肥窒素利用率は窒素肥沃度によって変動する。窒素肥沃度は中辻ら (2008) に従い熱水抽出性窒素によって評価し、その区分は北海道施肥ガイド 2020 (北海道農政部, 2020) に準じて 3 区分とした。

##### 2) 目標窒素吸収量

図 3-2-2 に示すように窒素吸収量の増加に伴って収量は増え、1N 区の多くで慣行栽培の基準収量以上の収量が得られた。有機栽培でも慣行栽培に匹敵する収量が確保された要因として、マルチの使用が考えられる。マルチ栽培は土壌の保温および水分保持効果などで窒素の無機化を促進させる (小野寺・中本, 2007) だけでなく、雑草の発生を抑制するなど有機栽培での各種リスクを補償する効果があったと考えられる。また、病害虫の被害が少なかったことも要因として挙げられる。カボチャとレタスは害虫等の防除

がなくても慣行栽培比で 80% 以上の収量が得られる有機栽培に適した作物 (赤池・窪田, 2002) との報告があるように、3 年間の試験期間中、スイートコーンを含めた 3 作物における病害虫の発生程度は小さかった。

このように、有機栽培でも適切な栽培管理、作物選択を行うことで一定の収量が確保できたことから、有機栽培における目標収量として慣行栽培の基準収量を準用することとした。図 3-2-2 から、目標窒素吸収量を推定すると、カボチャ  $105 \text{ kg ha}^{-1}$ 、スイートコーン  $125 \text{ kg ha}^{-1}$ 、レタス  $50 \text{ kg ha}^{-1}$  程度と見積もられた。

##### 3) 土壌窒素診断基準値の設定

一般に土壌診断基準値とは、標準的な施肥量で目標とする収量・品質を得るのに必要な土壌養分量と定義されている (北海道農政部, 2020)。図 3-2-2 に示した通り、慣行栽培での施肥標準窒素量を施与した 1N 区の多くで目標収量を達成できたことから、本論文での土壌窒素診断基準値は 1N の窒素施肥量で目標窒素吸収量が得られるような熱水抽出性窒素の範囲とした。こうすることにより、有機質肥料の多量施用で生成する恐れのあるアンモニアガスや有機酸による生育障害を回避できる。図 3-2-3 から目標窒素吸収量が得られる熱水抽出性窒素の値を求めると、カボチャで  $65 \text{ mg kg}^{-1}$ 、スイートコーンで  $71 \text{ mg kg}^{-1}$ 、

レタスで  $48 \text{ mg kg}^{-1}$  と、おおよそ  $50 \sim 70 \text{ mg kg}^{-1}$  の範囲にあった。

この範囲は、慣行栽培における土壌窒素診断基準値（熱水抽出性窒素  $30 \sim 50 \text{ mg kg}^{-1}$ ）よりもおおよそ  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  高く、有機栽培が慣行栽培よりも土壌の窒素肥沃度に強く依存する農法である（桑原，2012）ことを示唆している。一般に、野菜に対する有機質肥料の窒素肥効率（化学肥料の窒素利用率を 100 としたと

きの利用率の割合）は 80%程度と化学肥料にやや劣る（中本，2012）。したがって、有機栽培の土壌窒素診断基準値として、慣行栽培よりもやや高い熱水抽出性窒素レベルに設定することは、有機質肥料の窒素肥効率の観点から妥当と判断される。以上から、有機栽培露地野菜畑における土壌窒素診断基準値を熱水抽出性窒素で  $50 \sim 70 \text{ mg kg}^{-1}$  とした。

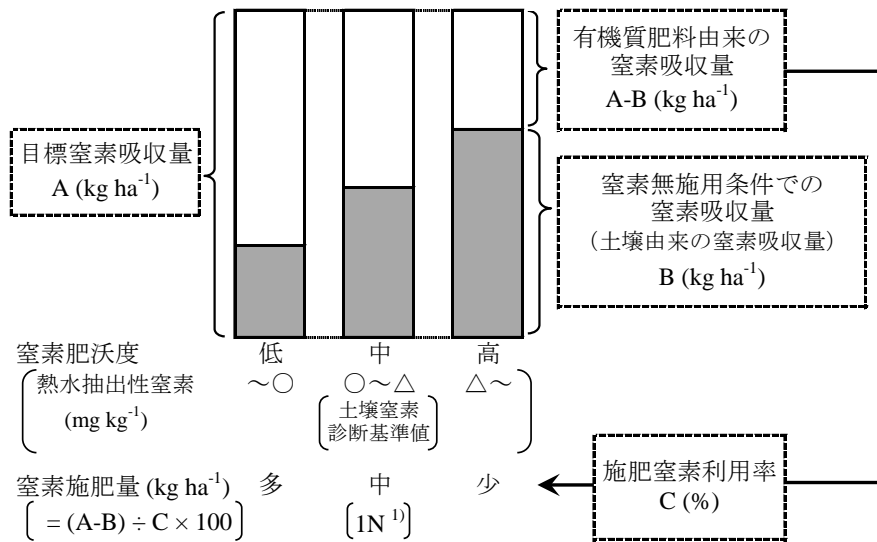


図 3-2-5 窒素施肥対応の設定方法

1) 施肥標準窒素量。

#### 4) 窒素無施用条件での窒素吸収量

土壌窒素診断基準値の定義により、熱水抽出性窒素が基準値内の場合の窒素施肥量は 1N（施肥標準窒素量）であるが、基準値未満、あるいは基準値以上での窒素施肥量を別途設定する必要がある（図 3-2-5）。それにはまず、基準値未満および基準値以上について、窒素無施用条件での窒素吸収量を算定しなければならない。

簡便化のため基準値未満の熱水抽出性窒素を  $40 \text{ mg kg}^{-1}$ 、基準値以上の同窒素を  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  と一律に仮定し、図 3-2-3 に示す 0N 区の回帰直線から基準値未満または基準値以上における窒素吸収量を算出すると、カボチャは各々  $68, 96 \text{ kg ha}^{-1}$ 、スイートコーンは  $53, 82 \text{ kg ha}^{-1}$ 、レタスは  $21, 37 \text{ kg ha}^{-1}$  であった。よって、これらの値を土壌窒素診断基準値未満または基準値以上における窒素無施用条件での窒素吸収量とした（表 3-2-5）。

#### 5) 施肥窒素利用率

次に、基準値未満および基準値以上での施肥窒素利用率を算定する。前項と同様に、基準値未満の熱水抽出性窒素を  $40 \text{ mg kg}^{-1}$ 、基準値以上の同窒素を  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  とし、図 3-2-4 を基に窒素肥沃度別の施肥

窒素利用率をみると、窒素施肥量が一定の場合、窒素肥沃度の上昇に伴って施肥窒素利用率は低下した（表 3-2-4）。これは、土壌由来の窒素供給の増大に伴う全窒素供給量の増加によって、有機質肥料に由来する供給窒素の寄与が相対的に低下したことを意味する。なお、作物により施肥窒素利用率に差がみられるが、これを生育期間や根域の違いを反映したものと考えられた。

ところで、窒素施肥対応では目標窒素吸収量を得るのに必要な窒素施肥量を窒素肥沃度に応じて増減させるため、基準値未満では 1N より多くの、基準値以上では 1N より少ない窒素施肥量となる（図 3-2-5）。一般に、窒素施肥量が増加すると施肥窒素利用率は低下する傾向にあり（山本，2009）、本論文でも同様の結果が得られている（表 3-2-4）。よって、熱水抽出性窒素が低い場合の施肥窒素利用率は高い傾向にある反面、このような場面で必要となる窒素増肥は施肥窒素利用率を低下させる。一方、熱水抽出性窒素が高い場合の施肥窒素利用率は低くなるが、その際の窒素減肥は施肥窒素利用率を向上させる。

このように、窒素肥沃度に応じて窒素施肥量を加減する窒素施肥対応では、窒素肥沃度と窒素施肥量

が施肥窒素利用率に対して相反する方向に作用するため、基準値未満および基準値以上の施肥窒素利用率として、基準値内の1Nにおける施肥窒素利用率（カボチャ25%、スイートコーン45%、レタス20%程度）を用いても実用上の問題は少ないと判断した（表3-2-5）。

#### 6) 窒素施肥対応の構築

これまでに求めた目標窒素吸収量、窒素無施用条件下での窒素吸収量、施肥窒素利用率から、図3-2-5に基づいて窒素施肥量を算出した（表3-2-5）。その結果、土壤窒素診断基準値未満および基準値以上における窒素施肥量は、北海道施肥ガイド2020（北海道農政部，2020）に記載の慣行栽培における同区分での窒素施肥量に近似し、両者の差は3作物平均で14 kg ha<sup>-1</sup>と小さかった。よって、少なくとも本試験で対象としたカボチャ、レタス、スイートコーンの有機栽培については、慣行栽培の窒素施肥対応における窒素

肥沃度区分を熱水抽出性窒素でそれぞれ20 mg kg<sup>-1</sup>上方修正することで活用できると判断した（表3-2-6）。

野菜に対する有機質肥料の施与効果を化学肥料と対比した山崎・六本木（1998）および中本（2012）によれば、作物の窒素吸収量と収量との相関関係には供試した資材による差異は認められず、同一の目標収量を得るために必要な窒素吸収量は慣行栽培と有機栽培で大差は無い。一方、すでに指摘したように、有機質肥料の肥効率は80%程度と化学肥料よりもやや劣るため、慣行栽培と同等の窒素施肥量であれば有機栽培での収量性はやや劣る。ただし、本施肥対応は土壤診断基準値を慣行栽培よりも一段階高く設定したため、結果として慣行栽培よりも土壤からの窒素供給に多く依存することで、化学肥料よりもやや劣る有機質肥料の肥効率を補填できる内容となっている。

表3-2-4 窒素肥沃度別の施肥窒素利用率（%）<sup>1)</sup>

作物名	窒素施肥量		土壤窒素診断		
	水準 (kg ha <sup>-1</sup> )		基準値未満 <sup>2)</sup>	基準値内 <sup>3)</sup>	基準値以上 <sup>4)</sup>
カボチャ	1N	80	33	26	19
	2N	160	25	20	15
スイートコーン	1N	120	46	43	40
	2N	240	34	32	29
レタス	1N	120	22	21	20
	2N	240	17	14	12

<sup>1)</sup> 図3-2-4における回帰式から算出。

<sup>2)</sup> 熱水抽出性窒素40 mg kg<sup>-1</sup>として算出。

<sup>3)</sup> 熱水抽出性窒素60 mg kg<sup>-1</sup>として算出。

<sup>4)</sup> 熱水抽出性窒素80 mg kg<sup>-1</sup>として算出。

表3-2-5 土壤窒素診断基準値未満および基準値以上における窒素施肥量の算出

作物名	目標窒素吸収量 (kg ha <sup>-1</sup> )	窒素無施用条件下での窒素吸収量 <sup>1)</sup> (kg ha <sup>-1</sup> )		施肥窒素利用率 (%)	算出された (参考) 慣行栽培の施肥対応における窒素施肥量 <sup>5)</sup> (kg ha <sup>-1</sup> )			
		基準値未満 <sup>2)</sup>	基準値以上 <sup>3)</sup>		窒素施肥量 <sup>4)</sup> (kg ha <sup>-1</sup> )		おける窒素施肥量 <sup>5)</sup> (kg ha <sup>-1</sup> )	
					基準値未満 <sup>2)</sup>	基準値以上 <sup>3)</sup>	基準値未満 <sup>6)</sup>	基準値以上 <sup>7)</sup>
カボチャ	105	68	96	25	146	37	120	50
スイートコーン	125	53	82	45	160	96	150	90
レタス	50	21	37	20	144	65	140	100

<sup>1)</sup> 図3における0Nの回帰式から算出。 <sup>2)</sup> 熱水抽出性窒素50 mg kg<sup>-1</sup>未満。 <sup>3)</sup> 熱水抽出性窒素70 mg kg<sup>-1</sup>以上。

<sup>4)</sup> (目標窒素吸収量-窒素無施用条件下での窒素吸収量)÷施肥窒素利用率×100 (図3-2-5)。

<sup>5)</sup> 北海道施肥ガイド2020 (北海道農政部, 2020)。 <sup>6)</sup> 熱水抽出性窒素30 mg kg<sup>-1</sup>未満。 <sup>7)</sup> 熱水抽出性窒素50 mg kg<sup>-1</sup>以上。

表3-2-6 有機栽培露地野菜畑の窒素施肥対応<sup>1), 2)</sup> (kg ha<sup>-1</sup>)

作物名	目標収量 (Mg ha <sup>-1</sup> )	土壤窒素診断		
		基準値未満 (～50) <sup>3)</sup>	基準値内 (50～70)	基準値以上 (70～)
カボチャ	20.0	120	80	50
スイートコーン	12.0～15.0	150	120	90
レタス	20.0	140	120	100

<sup>1)</sup> 対象とする有機質肥料は、窒素肥効が速効性のものとする（魚かす、なたね油かすなど）。

<sup>2)</sup> 堆肥施用量20 Mg ha<sup>-1</sup>程度までは、窒素減肥しない。

<sup>3)</sup> 熱水抽出性窒素 (mg kg<sup>-1</sup>) の範囲を示し、以上～未満とする。

ところで、道内の有機栽培露地野菜畑の熱水抽出性窒素を調査した結果（北海道立中央農業試験場，2007）によれば，32 調査地点のうち本基準値内は 9 地点と 3 割弱に過ぎず，基準値以上が 14 地点，基準値未満が 9 地点と多くは基準値を外れた．基準値外の場合は，本施肥対応を活用して適正な施肥を行うことが基本となるが，基準値を大きく上回る場合は，堆肥の施用を控えるなどの取り組みが，また基準値を大きく下回る場合には，堆肥や緑肥などの有機物を供給することで窒素肥沃度を高める営農管理が重要と考えられる．

#### 7) 本施肥対応の活用上の留意点

本施肥対応に適応する資材は，栽培試験で供試した魚かすやなたね油かすなどの窒素肥効が速効的な有機質肥料である．ただし，実際の営農場面ではリン酸やカリの供給量についても考慮しながら，有機質資材を適切に施用する必要がある．小野寺・中本（2007）は，各種有機質資材の窒素，リン酸，カリの養分供給特性に基づいて，有機質資材を適切に組み合わせる手順を整理した無化学肥料栽培法を開発している．これを本論文の成果と合わせることで，窒素肥沃度に応じた窒素施肥量の設定はもちろんのこと，リン酸やカリ施肥量にも配慮した有機質資材の選択とその施用量の設定が可能となり，有機栽培露地野菜畑における総合的な施肥技術として活用できるものと考えられる．

## 5. 要約

北海道における有機栽培露地野菜畑向けの土壌窒素診断基準値と，カボチャ，スイートコーン，レタスを対象とした窒素施肥対応を設定するため，有機質肥料としてなたね油かすおよび魚かすを施用した窒素用量試験を実施した．

- 1) 慣行栽培の施肥標準窒素量（1N）に相当する有機質肥料の施用によって，概ね慣行栽培の基準収量（カボチャ  $20 \text{ Mg ha}^{-1}$ ，スイートコーン  $12 \sim 15 \text{ Mg ha}^{-1}$ ，レタス  $20 \text{ Mg ha}^{-1}$ ）以上の収量が得られた．よって，有機栽培の目標収量は慣行栽培の基準収量とし，その収量を得るのに必要な窒素吸収量（目標窒素吸収量）はカボチャ  $105 \text{ kg ha}^{-1}$ ，スイートコーン  $125 \text{ kg ha}^{-1}$ ，レタス  $50 \text{ kg ha}^{-1}$  程度であった．
- 2) 1N 相当の有機質肥料の施用によって，目標窒素吸収量が得られる窒素肥沃度は熱水抽出性窒素で  $50 \sim 70 \text{ mg kg}^{-1}$  であり，この範囲を有機栽培露地野菜畑における土壌窒素診断基準値とした．なお，この範囲は，慣行栽培の土壌窒素診断基準値（ $30 \sim 50 \text{ mg kg}^{-1}$ ）よりも高く，有機栽培が

慣行栽培よりも土壌の窒素肥沃度に依存する農法であることが示唆された．

- 3) 熱水抽出性窒素  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  未満および  $70 \text{ mg kg}^{-1}$  以上の領域における窒素施肥量を，目標窒素吸収量から窒素無施用条件での窒素吸収量を差し引き，それを施肥窒素利用率で除して算出したところ，慣行栽培での熱水抽出性窒素  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  未満および  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  以上の窒素施肥量に近似した．したがって，有機栽培露地野菜畑の窒素施肥対応としては，慣行栽培の窒素施肥対応における窒素肥沃度区分を熱水抽出性窒素でそれぞれ  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  上方修正することで活用できると判断した．

### 第3節 タマネギ、バレイシヨの窒素施肥対応

#### 1. はじめに

前節ではカボチャ (*Cucurbita maxima* Duch.), スイートコーン (*Zea mays* L.), レタス (*Lactuca sativa* L.) を対象とした窒素施肥対応, すなわち土壌分析値に応じた施用すべき窒素施肥量を設定した(第3章第2節関連論文(櫻井ら, 2013b)). 一方, 北海道の主要農産物であるタマネギ (*Allium cepa* L.), バレイシヨ (*Solanum tuberosum* L.) については, それぞれ中村ら(2007), 田村ら(2015)により有機栽培における基本的な施肥法が示されているが窒素施肥対応の設定には至っていない。

本節では, 窒素肥沃度の異なる圃場での窒素用量試験の結果に基づき, 有機栽培のタマネギおよびバレイシヨの窒素施肥対応を策定することを目的とした。

#### 2. 試験方法

##### 1) タマネギ

2012~2014年の3カ年, 北海道立総合研究機構中央農業試験場の褐色森林土および褐色低地土で熱水抽出性窒素が32~99 mg kg<sup>-1</sup>の6圃場で窒素用量試験を実施した。なお, リン酸肥沃度の低い圃場ではタマネギの生育および球肥大が不良となり, 収量が大きく低下する(相馬ら, 1983)ことから, 本試験では熔成リン肥を施用するなどしてリン酸肥沃度を高めたため, 供試圃場の有効態リン酸(トルオーグ法)は900~960 mg kg<sup>-1</sup>の範囲であった。

窒素施肥量は無窒素(0N), 慣行栽培での施肥標準窒素量に相当する150 kg ha<sup>-1</sup>(1N), 300 kg ha<sup>-1</sup>(2N)の3水準で, タネバエによる被害が少ないとされる鶏ふん堆肥(青木, 2013)により施肥窒素の全量を施用した。道内では農家慣行として有機質資材を前年秋に施用されているが, 有機質資材の一部を翌春の定植時に分施することで, 生育初期の土壌無機態窒素量が増加し, 収量が向上したとの報告(第3章第2節関連論文(櫻井ら, 2013b))にならぬように, 本試験では窒素施肥量の3分の2を前年秋(秋施用; 9月下旬~10月上旬)に, 残りの3分の1を定植時(春施用; 4月下旬~5月上旬)に施用した。また, 鶏ふん堆肥の窒素無機化特性(橘田ら, 2002)を考慮し, 秋施用には窒素含有量の低いもの, 春施用には窒素含有量の高いものを用い, 土壌中の無機態窒素が確保されるよう配慮した。秋施用と春施用に用いた鶏ふん堆肥の養分含有率は表3-3-1の通りである。

表 3-3-1 鶏ふん堆肥の成分組成<sup>1)</sup>

資材名	T-N	T-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	T-K <sub>2</sub> O	C/N比
	(g kg <sup>-1</sup> )			
秋施用	16	60	38	7.4
春施用	49	41	29	5.6

<sup>1)</sup> 現物あたりで各年の平均値。

リン酸およびカリの施肥量は土壌分析値に基づき北海道施肥ガイド2020(北海道農政部, 2020)の施肥対応を準用し, 鶏ふん堆肥で不足する量をそれぞれグアノ, 天然硫酸カリで施用した。

タマネギの有機栽培では病害虫の被害軽減に早生品種の栽培が有効である(中村ら, 2007)ことから, 2012, 2013年は「早次郎」, 2014年は「北はやて2号」の早生品種をそれぞれ供試した。定植は4月下旬~5月上旬に行い, 栽植密度303030株 ha<sup>-1</sup>

(畝間30 cm, 株間11 cm), 1区面積6.75 m<sup>2</sup>の3反復とした。収穫は8月上中旬に実施し, 変形, 分球等を除いた球径5 cm以上のものを収量とした。

##### 2) バレイシヨ

2011~2014年の4カ年, 北海道立総合研究機構中央農業試験場の褐色森林土および未熟土で熱水抽出性窒素が35~115 mg kg<sup>-1</sup>の4圃場で窒素用量試験を実施した。なお, 供試圃場の有効態リン酸(トルオーグ法)は230~690 mg kg<sup>-1</sup>の範囲であった。

窒素施肥量は無窒素(0N), 80 kg ha<sup>-1</sup>(1N), 160 kg ha<sup>-1</sup>(2N)の3水準で, 窒素の無機化が速やかで収量確保に有効なたね油かす(田村ら, 2015)により施肥窒素の全量を施用した。なたね油かすの養分含有率は, C/N比5.8, T-N 58.9 g kg<sup>-1</sup>, T-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 37.8 g kg<sup>-1</sup>, T-K<sub>2</sub>O 22.0 g kg<sup>-1</sup>であった(現物当たり, 4カ年の平均値)。リン酸およびカリの施肥量はタマネギと同様の対応とし, なたね油かすで不足する量をそれぞれグアノ, 天然硫酸カリで施用した。

バレイシヨの有機栽培では疫病に強い品種を用いることで生産性が安定する(田村ら, 2012)ことから, 本試験では疫病抵抗性の「さやあかね」を供試した。施肥および定植は5月上中旬に行い, 栽植密度38950株 ha<sup>-1</sup>(畝間75 cm, 株間35 cm), 1区面積13.1 m<sup>2</sup>の3反復とした。収穫は8月下旬~9月上旬に実施し, 変形, 丸イモ, 緑化, 2次生長を除いた20 g以上の塊茎を収量とした。

タマネギを含め供試圃場は有機JASの認証を取得していないが, 栽培管理は有機JASに準拠し, 病害虫の発生により作物の生育が妨げられると判断した場合に, 有機JASに適合する農薬を必要最小限使用した。除草は耕うん機による整地および手取りにより実施し, 作物と雑草による養分競合が起きないよ



う管理した。なお、栽培期間中に湿害などの窒素用量以外の要因によって生育が妨げられた試験区については、解析から除外した。

相関解析にあたっては、JMP5.1.2 (SAS Institute Japan) を用いた。

### 3. 結果および考察

#### 1) タマネギ

窒素施肥量の設定にあたっては第3章第2節関連論文(櫻井ら, 2013b)にならない、目標窒素吸収量(A),

窒素無施用条件での窒素吸収量(B), 施肥窒素利用率(C)の3項目を求め、目標窒素吸収量から窒素無施用条件での窒素吸収量を差し引き(A-B), それを施肥窒素利用率で除して算出した(図3-3-1)。

なお、目標窒素吸収量は1Nにおける平均的な収量レベルを前提とした。これによって、有機質資材の多量施用で生成する恐れのあるアンモニアガスや有機酸による生育障害を回避しつつ(第3章第1節関連論文(櫻井ら, 2013a)), 環境負荷や資材コストの増大を抑えることができる。

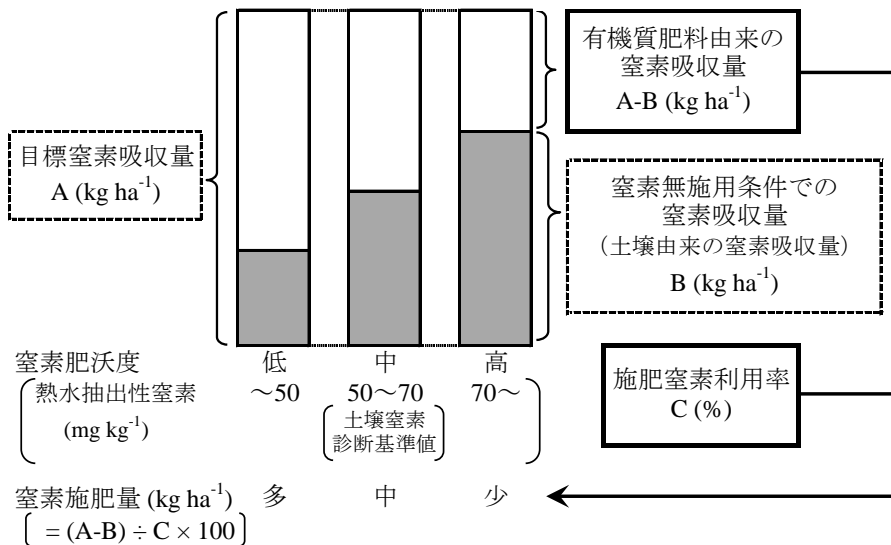


図 3-3-1 窒素施肥対応の設定方法

窒素吸収量と収量の関係を図3-3-2に示す。窒素吸収量と収量の間には0.1%水準の有意な関係が認められた。0N, 1N, 2Nの平均収量はそれぞれ20.2, 36.9, 41.8  $\text{Mg ha}^{-1}$ であった。1Nの平均収量での窒素吸収量は図3-3-2より56  $\text{kg ha}^{-1}$ と算出され、これを目標窒素吸収量とした。図3-3-3に窒素無施用条件での熱水抽出性窒素と窒素吸収量の関係を示す。両者の間には0.1%水準の有意な相関関係が認められた。前報に従い、土壌窒素診断基準値未満(熱水抽出性窒素50  $\text{mg kg}^{-1}$ 未満)の代表熱水抽出性窒素を40  $\text{mg kg}^{-1}$ , 基準値内(50~70  $\text{mg kg}^{-1}$ )の同窒素を60  $\text{mg kg}^{-1}$ , 基準値以上(70  $\text{mg kg}^{-1}$ 以上)の同窒素を80  $\text{mg kg}^{-1}$ と仮定すると、図3-3-3の回帰直線から算出される窒素吸収量は基準値未満24  $\text{kg ha}^{-1}$ , 基準値内32  $\text{kg ha}^{-1}$ , 基準値以上40  $\text{kg ha}^{-1}$ で、これらを窒素無施用条件での窒素吸収量とした。

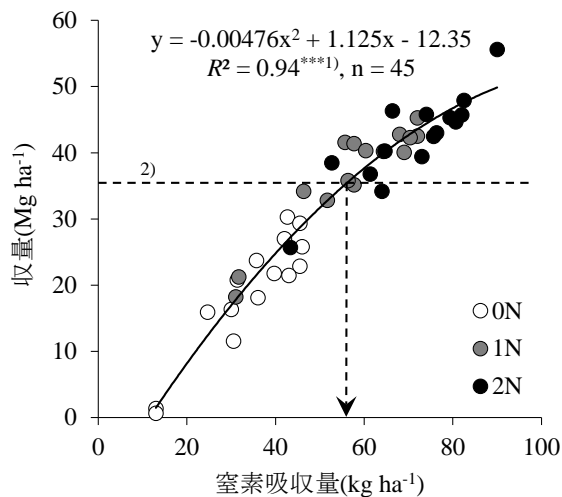


図 3-3-2 有機栽培タマネギにおける窒素吸収量と収量の関係

1) \*\*\* : 0.1%水準で有意。

2) 1Nの平均収量。

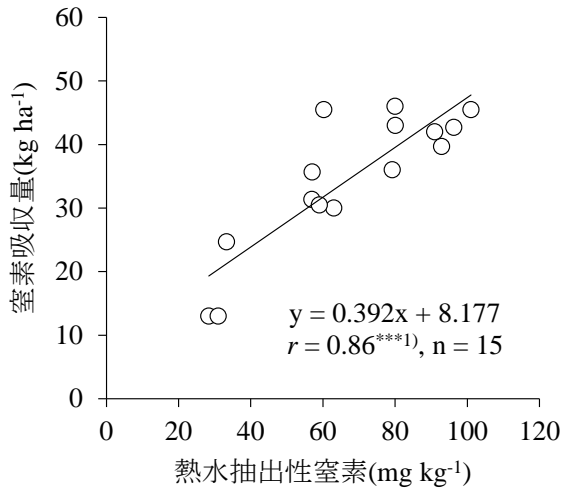


図 3-3-3 有機栽培タマネギにおける窒素無施用条件下での熱水抽出性窒素と窒素吸収量の関係

1) \*\*\* : 0.1%水準で有意。

図 3-3-4 に熱水抽出性窒素と施肥窒素利用率の関係を示す。施肥窒素利用率は1N または2N の窒素吸収量と 0N のそれとの差を窒素施肥量で除して求めた。1N, 2N の施肥窒素利用率の平均値はそれぞれ 15.3%, 12.1% とその差は小さく、熱水抽出性窒素と施肥窒素利用率との間に一定の傾向は認められなかった。窒素施肥量が一定の場合、窒素肥沃度が上昇すると土壌由来の窒素供給量の増大に伴う全窒素供給量の増加により、有機質資材に由来する供給窒素の寄与が相対的に小さくなり、施肥窒素利用率は低下することが多い。しかし、本試験では窒素肥沃度が上昇しても、施肥窒素利用率の明らかな低下は認められなかった。このように、窒素施肥量や窒素肥沃度による施肥窒素利用率の変動が小さいことから、窒素施肥量の算出に用いる施肥窒素利用率は、各水準一律で1Nの平均値である15%とした。

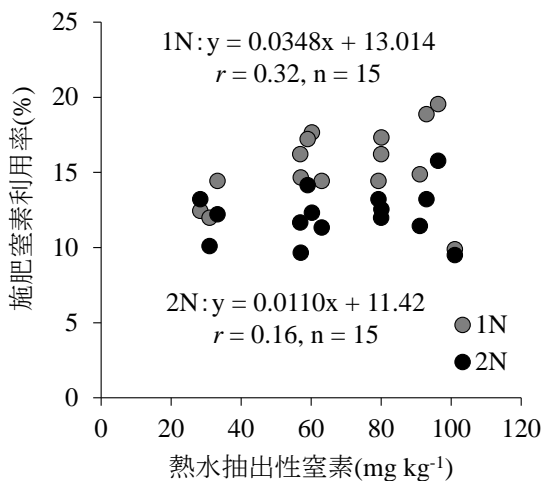


図 3-3-4 有機栽培タマネギにおける熱水抽出性窒素と施肥窒素利用率の関係

以上から、図 3-3-1 を基に窒素施肥量を算出すると、基準値未満は  $210 \text{ kg ha}^{-1}$  程度、基準値内は  $160 \text{ kg ha}^{-1}$  程度、基準値以上は  $110 \text{ kg ha}^{-1}$  程度であった。北海道では環境に配慮した持続的な農業を展開するため、有機物の施用などによる健全な土づくりを基本に、化学肥料や化学合成農薬の使用を必要最小限にとどめる「クリーン農業」を推進している。一定の基準を満たしたクリーン農産物を認証する「北のクリーン農産物表示制度」では、環境に負荷を与えない範囲で収量と品質を維持するための総窒素施用量上限値が設けられ、タマネギではその値が  $180 \text{ kg ha}^{-1}$  と定められている（北海道クリーン農業推進協議会, 2013）。一方、先に算出した窒素施肥量のうち、基準値未満はその上限値を上回る  $210 \text{ kg ha}^{-1}$  であった。仮に、基準値未満の窒素施肥量を算出値の  $210 \text{ kg ha}^{-1}$  から総窒素施用量上限値の  $180 \text{ kg ha}^{-1}$  に  $30 \text{ kg ha}^{-1}$  減じると、施肥窒素利用率 15% の条件下では窒素吸収量が  $4.5 \text{ kg ha}^{-1}$  減少することから、1割程度の減収が見込まれる（図 3-3-2）が、クリーン農業と同様に環境への配慮を重んじる有機栽培にとって、窒素施肥量は総窒素施用量上限値内に収まることが望ましい。よって、基準値未満の窒素施肥量は算出値の  $210 \text{ kg ha}^{-1}$  から  $180 \text{ kg ha}^{-1}$  に減じた上で、各水準の窒素施肥量の3分の2を秋施用、3分の1を春施用とした窒素施肥対応を策定した（表 3-3-2）。

ところで、本施肥対応の想定収量  $36.0 \text{ Mg ha}^{-1}$  は有機栽培タマネギの目標収量  $44.0 \text{ Mg ha}^{-1}$ （白井, 2007）に達していない。本供試圃場を含む多雪地帯では、秋施用の有機質資材に含まれる窒素成分の多くが融雪水等で流亡する（第3章第2節関連論文（櫻井ら, 2013b））ため、タマネギの生育に必要な窒素量の確保が困難であったと推察された。なお、春施用の割合をさらに高めることで収量性の改善が見込めることから、多雪地帯では本施肥対応を当面の対応とし、今後の試験研究の進展による改訂の余地が残されている。

表 3-3-2 有機栽培タマネギ・バレイシヨの窒素施肥対応 (kg ha<sup>-1</sup>)<sup>1)</sup>

作物名	想定収量 (Mg ha <sup>-1</sup> )	土壌窒素診断		
		基準値未満 (~50) <sup>1)</sup>	基準値内 (50~70)	基準値以上 (70~)
タマネギ	36.0 <sup>2)</sup>	120+60 <sup>3)</sup>	100+50	80+40
バレイシヨ <sup>4)</sup>	26.0	120	80	40

<sup>1)</sup> 熱水抽出性窒素(mg kg<sup>-1</sup>)の範囲を示し、以上~未満とする。

<sup>2)</sup> 基準値未満については、窒素施肥量を図1に基づく算出値(210 kg ha<sup>-1</sup>)から「北のクリーン農産物表示制度(北海道グリーン農業推進協議会, 2013)」で定める総窒素施用量上限値(180 kg ha<sup>-1</sup>)に減じたため、1割程度の減収が見込まれる。

<sup>3)</sup> 秋施用+春施用の配分を示す。 <sup>4)</sup> 疫病抵抗性品種(さやあかね)を前提。

2) バレイシヨ

窒素吸収量と収量の関係を図 3-3-5 に示す。窒素吸収量と収量の間には 0.1%水準の有意な関係が認められた。0N, 1N, 2N の平均収量はそれぞれ 17.6, 26.3, 31.3 Mg ha<sup>-1</sup> であった。1N の平均収量を想定収量とし、これを得るのに必要な窒素吸収量である 65 kg ha<sup>-1</sup> を目標窒素吸収量とした。

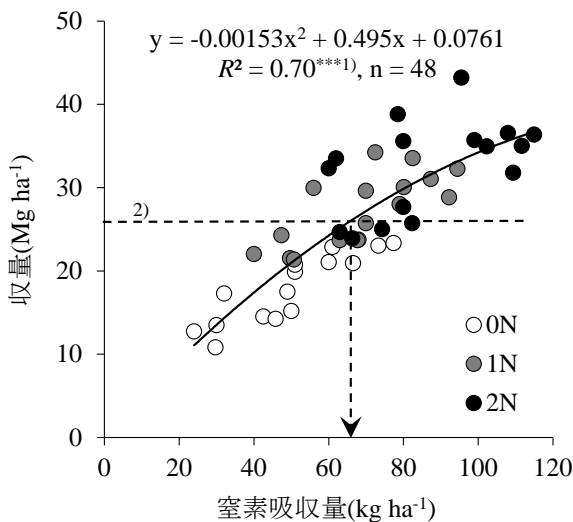


図 3-3-5 有機栽培バレイシヨにおける窒素吸収量と収量の関係

<sup>1)</sup> \*\*\* : 0.1%水準で有意。

<sup>2)</sup> 1N の平均収量。

図 3-3-6 に窒素無施用条件での熱水抽出性窒素と窒素吸収量の関係を示す。両者の間には 0.1%水準の有意な相関関係が認められた。図 3-3-6 の回帰直線から推定される各水準の窒素吸収量をタマネギと同様の方法で算出すると、基準値未満は 37 kg ha<sup>-1</sup>、基準値内は 46 kg ha<sup>-1</sup>、基準値以上は 55 kg ha<sup>-1</sup> となり、これらを窒素無施用条件での窒素吸収量とした。なお、1N, 2N の施肥窒素利用率の平均値はそれぞれ 23.2%, 21.5%とその差は小さく、熱水抽出性窒素と施肥窒素利用率との間に一定の傾向は認められなかったことから、窒素施肥量の算出に用いる施肥窒素利用率は、各水準一律で 1N の平均値である 23%とした。

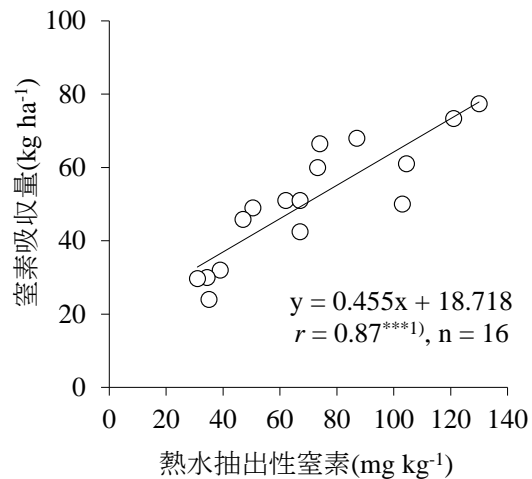


図 3-3-6 有機栽培バレイシヨにおける窒素無施用条件での熱水抽出性窒素と窒素吸収量の関係

<sup>1)</sup> \*\*\* : 0.1%水準で有意。

以上から、図 3-3-1 を基に算出される窒素施肥量は、基準値未満は 120 kg ha<sup>-1</sup>程度、基準値内は 80 kg ha<sup>-1</sup>程度、基準値以上は 40 kg ha<sup>-1</sup>程度で、これらを有機栽培バレイシヨの窒素施肥対応としてまとめた(表 3-3-2)。

3) 留意点

有機栽培タマネギにおける有機質資材の秋施用にあたっては、無機化した窒素成分が融雪水に伴って流亡する恐れがあるため、地温が低下してから実施する。また、春施用には未熟有機物の施用を避け、定植は融雪後早期に実施するのが望ましく、遅くとも 5 月上旬までに終えてハエ類の被害軽減に努める。

有機栽培バレイシヨにおいては、本試験で供試したなたね油かすなどの窒素肥効が速効的な有機質資材を施用し、円滑な窒素供給によって初期の生育量を確保することが収量を確保する上で重要である。

#### 4. 要約

北海道の主要農産物であるタマネギ、バレイショについては有機栽培向けの窒素施肥対応が設定されていない。そこで、窒素肥沃度の異なる圃場での窒素用量試験の結果に基づき、以下の結果を得た。

- 1) タマネギでは窒素施肥量の 3 分の 2 を定植前年秋に、残りの 3 分の 1 を当年春にそれぞれ施肥することで、前年秋に窒素施肥量の全量を施肥する慣行法に比べ 2 割強増収した。
- 2) この結果を基に土壌窒素診断基準値である熱水抽出性窒素  $50\sim 70\text{ mg kg}^{-1}$  とその基準値未満、基準値以上の 3 水準についてそれぞれ窒素施肥量を設定した。
- 3) バレイショについて想定収量  $26\text{ Mg ha}^{-1}$  を前提とした窒素施肥量として、基準値未満では  $120\text{ kg ha}^{-1}$ 、基準値内では  $80\text{ kg ha}^{-1}$ 、基準値以上では  $40\text{ kg ha}^{-1}$  が適当であった。

## 第4節 春全量施肥を前提としたタマネギの窒素施肥対応

### 1. はじめに

前節では北海道の主要な有機農産物であるタマネギ (*Allium cepa* L.) を対象とした窒素施肥対応について検討し、窒素施肥量の3分の2を定植前年秋(秋施用)に、残りの3分の1を当年春(春施用)にそれぞれ施肥することで、前年秋に窒素施肥量の全量を施肥する慣行法に比べ2割強増収することを明らかにした(第3章第3節関連論文(櫻井ら, 2016))。しかし、この施肥体系での収量水準は36 Mg ha<sup>-1</sup>程度と経営的に成り立つ収量水準とされる44 Mg ha<sup>-1</sup>(白井, 2007)に達していない。

有機質資材を秋施用するとそれに含まれる窒素成分の多くが融雪に伴って溶脱し、タマネギ生育に必要な窒素量を確保できない恐れがある。また、有機栽培タマネギの生産にあたっては、生産者の経験則に基づく養分管理が行われていることが多く、養分供給の過不足を招き易い(三木ら, 2017)。有機質資材の施用コストの低減や窒素の過剰供給から生じる環境への悪影響を低減する上でも、新たな施肥体系に基づく窒素施肥対応を確立する必要がある。

本節では、増収に向けた手立てとして施肥窒素の全量を当年春に供給する春全量施肥の有効性を評価するとともに、それに適した有機質資材について検討した。また、春全量施肥を前提とした窒素施肥対応の構築を目的とした。

### 2. 試験方法

#### 1) 供試圃場および耕種概要(共通項目)

供試圃場は北海道立総合研究機構中央農業試験場の褐色森林土(地点A)および褐色低地土(地点B)で、堆肥の施用により窒素肥沃度の異なる6圃場を適宜使用して後述の試験を実施した(表3-4-1)。

なお、供試圃場は本道のタマネギ主産地である空知管内に位置し、融雪に伴う窒素溶脱のリスクが高い多雪地帯である。これらの圃場では有機JASの認証を取得していないが、栽培管理は有機JASに準拠し、病害虫の発生によりタマネギ生育が妨げられると判断した場合のみ、有機JASに適合する農薬を必要最小限使用した。除草は耕うん機による整地および手取りにより実施し、タマネギと雑草による養分競合が起きないように管理した。なお、リン酸肥沃度の低い土壌ではタマネギの生育および球肥大が不良となる(相馬ら, 1983)ため、本試験ではタマネギの土壌診断基準値である有効態リン酸600~800 mg kg<sup>-1</sup>(北海道農政部, 2020)を下回ることのない

よう、熔成リン肥を施用するなどしてリン酸肥沃度を予め高めた。

病害虫の被害を軽減するためには早生系品種の活用が有効である(中村ら, 2007)ことから、2013年は「早次郎」、2014~2016年は「北はやて2号」の極早生品種をそれぞれ供試した。定植は4月下旬~8月上旬に行い、栽植密度303030株ha<sup>-1</sup>(畝間30 cm, 株間11 cm)、1区面積6.75 m<sup>2</sup>の3反復とした。収穫は8月上旬中旬に実施し、栽培期間中に湿害などで生育不良となった試験区については、解析から除外した。

#### 2) 春全量施肥の効果(試験1)

2013~2016年を定植年として、地点AおよびBの6圃場で栽培試験を実施した。試験区は、窒素100 kg ha<sup>-1</sup>を前年秋(9月下旬~10月上旬:秋施用)に、窒素50 kg ha<sup>-1</sup>を翌春の定植前(4月下旬~5月上旬:春施用)に施肥する春分施肥区と、春施用にのみ窒素150 kg ha<sup>-1</sup>を施肥する春全量施肥区とし、両区の全窒素施肥量は150 kg ha<sup>-1</sup>に揃えた(窒素無施用区も併設)。窒素成分の供給には鶏ふん堆肥を用いたが、その窒素無機化特性(橘田ら, 2002)を考慮して秋施用には窒素含有率の低いもの、春施用には窒素含有率の高いものを使用し、生育期間の土壌無機態窒素が確保されるよう配慮した。秋施用と春施用に用いた鶏ふん堆肥の養分含有率は表3-4-2の通りである。

リン酸およびカリの施肥は北海道施肥ガイド2020(北海道農政部, 2020)の施肥対応を準用し、鶏ふん堆肥で不足する量をそれぞれグアノ、天然硫酸カリにより補給した。

秋施用した鶏ふん堆肥の翌春における窒素配分を調査するため、2013~2014年に埋設試験および資材施用試験を実施した。埋設試験は、ナイロン製のプランクトンネットに入れた鶏ふん堆肥5 gを前年の10月上旬に圃場B-1の深さ10 cmに埋設し、翌4月上旬に回収して窒素含有量を分析した。資材施用試験は、埋設試験と同時期に秋施用した鶏ふん堆肥を圃場B-1へ窒素150 kg ha<sup>-1</sup>相当施用し(無施用区も併設)、翌春、埋設試験の回収時期に合わせてタマネギの主要根域土層である0~40 cm(三木, 2002)の土壌を採取し、無機態窒素を測定した。

#### 3) 春全量施肥に適した有機質資材の選定(試験2)

2015~2016年に、圃場A-1にて栽培試験を実施した。供試した有機質資材は鶏ふん堆肥2種類とぼかし肥料2種類の計4種類で、各資材の特徴は表3-4-3の通りである。いずれも窒素施肥量は150 kg ha<sup>-1</sup>とし、リン酸およびカリの施肥対応は試験1に準じた。

#### 4) 春全量施肥を前提とした窒素施肥対応の構築 (試験3)

窒素施肥対応の構築に必要なデータを取得するため、2013～2016年の4カ年、地点AおよびBの6圃場で春全量施肥による窒素用量試験を実施した。窒素施肥量は0(0N), 75(0.5N), 150(1N), 225(1.5N) kg ha<sup>-1</sup>の4水準で、鶏ふん堆肥により施肥窒素の全量を供給した。鶏ふん堆肥の養分含有率は以下の通りである。C/N比 5.0, T-N 51.9 g kg<sup>-1</sup>, T-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 39.4 g kg<sup>-1</sup>, T-K<sub>2</sub>O 26.7 g kg<sup>-1</sup> (現物当たり, 4カ年の平均値)。リン酸およびカリの施肥対応は試験1に準じた。

窒素施肥量は著者らが報告した有機栽培野菜3品目の窒素施肥対応(第3章第2節関連論文(櫻井ら, 2013b))にならひ、目標窒素吸収量(A)、窒素無施用条件での窒素吸収量(B)、施肥窒素利用率

(C)の3項目を求め、目標窒素吸収量から窒素無施用条件での窒素吸収量を差し引き(A-B)、それを施肥窒素利用率で除し、算出した。なお、窒素肥沃度は熱水抽出性窒素により区分し、有機栽培露地野菜畑の土壌窒素診断基準値である熱水抽出性窒素50～70 mg kg<sup>-1</sup>(水準Ⅱ)を中心に、同50 mg kg<sup>-1</sup>未満の水準Ⅰ、同70 mg kg<sup>-1</sup>以上の水準Ⅲの計3区分とした。

#### 5) 調査分析方法

##### (1) 土壌分析

熱水抽出性窒素は秋施用の約1週間前に採取した作土(0～20 cm)の風乾土を試料とした。本試料10

gに脱塩水100 mLを加え、オートクレーブにより105℃で1時間加熱後放冷し、No.5Cのろ紙でろ過して抽出液を得た。抽出液中の有機態窒素を分解し、その分解液中のアンモニア態窒素をインドフェノール法(Dorich and Nelson, 1983)で定量し、これを熱水抽出性窒素とした(北海道立総合研究機構農業研究本部, 2012)。

無機態窒素は所定の時期に採取した作土の生土を試料とした。100 g L<sup>-1</sup>塩化カリウムで無機態窒素を抽出し、オートアナライザー(BLTEC, SYNCA)でアンモニア態窒素と硝酸態窒素を測定し、これらの合計量を無機態窒素とした。

##### (2) タマネギ収量および窒素吸収量

タマネギの収量は、変形、分球等を除く球径5 cm以上の出荷基準を満たす規格内収量とした(花・野菜技術センター, 2020)。窒素吸収量は、収穫部位とそれ以外の部位に分け、70℃で48時間以上乾燥して粉砕したものを試料とした。その試料を硫酸一過酸化水素分解法(水野・南, 1980)で灰化後、インドフェノール法(Dorich and Nelson, 1983)により窒素含有率を定量した。それにそれぞれの乾物重を乗じ、各部位の合計を窒素吸収量とした。なお、試験1の埋設試験における鶏ふん堆肥の窒素含有量についても本法を準用した。

得られたデータの統計解析には、JMP 5.1.2(SAS Institute Japan)を用い、分散分析とTukey-Kramer法、相関解析を実施した。

表3-4-1 供試圃場の主要土壌化学

圃場	pH (H <sub>2</sub> O)	熱水抽出性窒素 <sup>1)</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	有効態リン酸 <sup>2)</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	交換性塩基(mg kg <sup>-1</sup> )		
				K <sub>2</sub> O	MgO	CaO
A-1	6.6	72	892	617	752	5115
A-2	6.9	94	944	1211	867	4876
A-3	6.9	99	1052	1674	1004	4908
A-4	7.1	122	1103	1791	887	4273
B-1	7.5	37	1041	511	1311	3378
B-2	7.5	74	1194	1021	1158	3484

<sup>1)</sup>北海道立総合研究機構農業研究本部(2012)。

<sup>2)</sup>トルオーグ法。

表3-4-2 鶏ふん堆肥の成分組成<sup>1)</sup>

資材名	T-N	T-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	T-K <sub>2</sub> O	C/N比
	(g kg <sup>-1</sup> )			
秋施用	17	57	37	6.6
春施用	52	39	27	5.0

<sup>1)</sup>現物あたりで各年の平均値。

表 3-4-3 鶏ふん堆肥およびぼかし肥料の成分組成とその特徴<sup>1)</sup>

資材名	T-N	T-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	T-K <sub>2</sub> O	C/N比	特徴
	(g kg <sup>-1</sup> )				
鶏ふん堆肥1	52	36	24	4.7	
鶏ふん堆肥2	22	51	31	6.2	
ぼかし肥料1	42	54	25	6.2	動物の内臓・肉・血・卵殻などを発酵させたもの
ぼかし肥料2	45	26	10	7.2	魚かすを主体に植物かす、アミノ酸かすを発酵させたもの

<sup>1)</sup> 現物あたり、2カ年の平均値

### 3. 結果および考察

#### 1) 春全量施肥の効果 (試験 1)

春分施肥区と春全量施肥区の収量、窒素吸収量を比較すると、春全量施肥区の収量は平均 49.2 Mg ha<sup>-1</sup>で、春分施肥区 (平均 44.0 Mg ha<sup>-1</sup>) よりも有意に増収した (表 3-4-4)。また、春全量施肥区の窒素吸収量は春分施肥区より有意に多く、施肥窒素利用率も平均 7.5 ポイント高かった。

融雪後における作土の無機態窒素は、春分施肥区が平均 6.0 mg kg<sup>-1</sup>で、春全量施肥区 (平均 4.9 mg kg<sup>-1</sup>) よりも有意に高かったが、その差は秋施用の窒素施肥量に比して小さかった (表3-4-4)。この要因を秋施用した鶏ふん堆肥の翌春における窒素配分、すなわち①翌春まで鶏ふん堆肥中に留まった難分解性窒素 (難分解性窒素)、②融雪後のタマネギの主要根域土層0~40 cm (三木, 2002) に存在する鶏ふん堆肥由来の無機態窒素 (無機態窒素)、③①と②以外の窒素 (その他) の3区分することにより考察した。なお、「難分解性窒素」の割合は埋設試験で回収した試料の窒素含有量を埋設時の窒素含有量で除することで、「無機態窒素」の割合は資材施用試験の0~40 cm土層における無機態窒素と無施用区の無機態窒素との差を窒素施肥量で除することでそれぞれ求めた。その結果、「難分解性窒素」の割合は35%前後、「無機態窒素」の割合は5%前後、「その

他」の割合は60%前後で、大部分が「その他」に配分された (表3-4-5)。試験を実施した長沼町では融雪期に該当する3月に100 mm以上の土壌浸透水が発生するとの推定結果 (中辻ら, 2014) を鑑みると、「その他」は融雪に伴って鶏ふん堆肥由来の硝酸態窒素が40 cm以深に溶脱したことが一因と推察された。よって、秋施用主体の春分施肥区は融雪の影響を強く受けるために収量の確保が困難であったと考えられた。

一方、球肥大始期における作土の無機態窒素は、春分施肥区の平均 19.7 mg kg<sup>-1</sup>に対し、春全量施肥区は平均 31.8 mg kg<sup>-1</sup>と有意に高く、その差は大きかった (表 3-4-4)。春全量施肥区は秋施用を行わないことから、融雪の影響を考慮する必要がなく窒素成分を確保し易い。相馬 (1988) によれば、タマネギは基肥重点の窒素施肥により葉の生長を促しつつ、球肥大始期にも一定の窒素量が必要な直接的結球型野菜で、球肥大始期における土壌無機態窒素として 30~50 mg kg<sup>-1</sup>が望ましいとされている。春全量施肥区の無機態窒素はこの範囲を満たしており、春全量施肥の有効性を追認できる。なお、施肥法間で欠株率に差がなかったように、春全量施肥はハエ類の被害を助長しなかった (表 3-4-4)。

以上から、春全量施肥は有機栽培タマネギの収量確保に有効で、球肥大始期における作土の無機態窒素の確保がその要因と推察された。

表 3-4-4 春分施肥区と春全量施肥区における収量性と作土の無機態窒素 (試験 1, 2013~2016 年, n=23)

施肥法	窒素施肥量 (kg ha <sup>-1</sup> )			収量 (Mg ha <sup>-1</sup> )	窒素吸収量 (kg ha <sup>-1</sup> )	施肥窒素利用率 <sup>1)</sup> (%)	作土の無機態窒素 (mg kg <sup>-1</sup> )		欠株率 <sup>4)</sup> (%)
	秋施用	春施用	合計				融雪後 <sup>2)</sup>	球肥大始期 <sup>3)</sup>	
春分施肥区	100	50	150	44.0	62.9	13.6	6.0	19.7	0.5
春全量施肥区	0	150	150	49.2	74.1	21.1	4.9	31.8	0.5
分散分析									
施肥法				* <sup>5)</sup>	*	**	*	**	ns
年次				**	*	ns	**	**	*
施肥法×年次				ns	ns	ns	ns	ns	ns

<sup>1)</sup> 春分施肥区および春全量施肥区の窒素吸収量と窒素無施用区のそれとの差を窒素施肥量で除した。

<sup>2)</sup> 2013年は4月22日, 2014年は4月18日, 2015年は4月8日, 2016年は4月5日に採土。

<sup>3)</sup> 2013年は6月12日, 2014年は6月11日, 2015年は6月8日, 2016年は6月7日に採土。

<sup>4)</sup> 2015年と2016年のみ調査。

<sup>5)</sup> \*\*, \* はそれぞれ1%, 5%水準で有意差あり。nsは有意でない。

表 3-4-5 秋施用した鶏ふん堆肥の翌春における窒素配分(%)

(試験 1, 圃場 B-1, 2013~2014 年)

年次 <sup>1)</sup>	難分解性窒素 <sup>2)</sup>	無機態窒素 <sup>3)</sup>	その他 <sup>4)</sup>
	(a)	(b)	
2013	39.8	3.0	57.2
2014	29.8	7.1	63.1

<sup>1)</sup> 2013年は前年10月9日埋設, 当年4月10日回収.

2014年は前年10月3日埋設, 当年4月9日回収.

<sup>2)</sup> 埋設試験で回収した試料の窒素含有量を埋設時の窒素含有量で除した.<sup>3)</sup> 資材施用試験で, 0~40 cm土層の無機態窒素と無施用区の無機態窒素との差を窒素施肥量で除した.<sup>4)</sup> 100-a-b

## 2) 春全量施肥に適した有機質資材の選定 (試験 2)

表 3-4-6 に 4 種類の有機質資材を施用した栽培試験の結果を示す. 施用資材と年次による分散分析の結果, 施用資材間差は欠株率を除く調査項目で認められた. また, 年次による有意差は全ての調査項目で認められたが, 施用資材と年次の交互作用は認めら

表 3-4-6 春全量施肥における有機質資材種の影響 (試験 2, 圃場 A-1, 2015~2016 年)

施用資材	資材の 施用量 <sup>1)</sup> (kg ha <sup>-1</sup> )	作土の 無機態窒素 <sup>2)</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	収量 (Mg ha <sup>-1</sup> )	平均一球重 (g)	窒素吸収量 (kg ha <sup>-1</sup> )	欠株率 (%)
鶏ふん堆肥1(51.5) <sup>3)</sup>	2915	18.9 a <sup>4)</sup>	54.0 a	185 a	78.5 a	0.8 a
鶏ふん堆肥2(22.1)	6779	11.1 b	46.7 b	161 b	64.3 c	1.9 a
ぼかし肥料1(41.6)	3610	13.1 ab	51.7 a	180 a	74.5 ab	0.8 a
ぼかし肥料2(45.0)	3332	12.9 ab	53.7 a	183 a	71.2 b	1.1 a
分散分析						
施用資材		* <sup>5)</sup>	**	**	**	ns
年次		**	**	**	**	*
施用資材×年次		ns	ns	ns	ns	ns

<sup>1)</sup> 窒素施肥量が150 kg ha<sup>-1</sup>になる量.<sup>2)</sup> 2015年は6月8日, 2016年は6月7日に採土(球肥大始期).<sup>3)</sup> ( )内は各資材の窒素含有率(g kg<sup>-1</sup>).<sup>4)</sup> 同一の英文字を付した数値間には, Tukey-Kramer法による有意差がない ( $p < 0.05$ ).<sup>5)</sup> \*\*, \* はそれぞれ1%, 5%水準で有意差あり. nsは有意でない.

## 3) 春全量施肥を前提とした窒素施肥対応の構築 (試験 3)

これまでの検討により, 有機栽培タマネギの収量確保には窒素含有率 40 g kg<sup>-1</sup> 以上の有機質資材を春全量施肥することが有効であったことから, これを前提とした窒素施肥対応を構築する.

## (1) 窒素用量試験

図3-4-1に熱水抽出性窒素と窒素吸収量の関係を窒素施肥量別に示す. 窒素施肥量が増えるにつれて窒素吸収量は増加し, 0N, 0.5N, 1N, 1.5Nにおける窒素吸収量の平均値はそれぞれ42, 65, 74, 86 kg ha<sup>-1</sup>であった. また, 熱水抽出性窒素の上昇に伴って窒素吸収量は増加する傾向であった.

れなかった. 窒素含有率 40 g kg<sup>-1</sup> 以上である鶏ふん堆肥 1, ぼかし肥料 1, ぼかし肥料 2 の収量はいずれも 50 Mg ha<sup>-1</sup> 以上である一方, 窒素含有率 22.1 g kg<sup>-1</sup> の鶏ふん堆肥 2 の収量は 46.7 Mg ha<sup>-1</sup> と他の 3 資材より有意に低下した.

鶏ふん堆肥は窒素含有率が高いほど窒素無機化が速やかで, 窒素肥効も上昇する(棚橋・矢野, 2004). また, 畑条件で利用される主な有機質資材の窒素肥効についても概ね同様の傾向である(佐藤, 2010) ことから, 有機質資材の窒素肥効は各資材の窒素含有率により概ね判断可能である. これを裏付けるように, 球肥大始期における作土の無機態窒素は有機質資材の窒素含有率に対応する傾向であった(表 3-4-6).

以上から, 春全量施肥では窒素含有率の高い資材で多収が見込め, 窒素含有率 40 g kg<sup>-1</sup> 以上の有機質資材を選択することが有効と考えられた.

## (2) 目標窒素吸収量

窒素吸収量と収量の関係を図 3-4-2 に示す. 各年次で両者の間に 2 次回帰の関係が認められたが, その傾向は年次によってやや異なった. タマネギは圃場が乾燥すると養分吸収が抑えられ, 生育や肥大が低下し易い作物である(大西・田中, 2012). 球肥大が始まる 6 月上旬から 7 月中旬までの降水量は 2013 年が 91 mm(平年比 64%), 2014 年が 111 mm(同 79%), 2015 年が 174 mm(同 124%), 2016 年が 239 mm(同 171%) と年次により異なり, このことが収量性に影響したものと考えられた.

先述した経営的に成立可能な収量水準である 44 Mg ha<sup>-1</sup> (白井, 2007) を目標収量とした場合, そ



れを得るのに必要な窒素吸収量は、2013年が69 kg ha<sup>-1</sup>、2014年が80 kg ha<sup>-1</sup>、2015年が68 kg ha<sup>-1</sup>、201

6年が46 kg ha<sup>-1</sup>で、これらの4カ年平均である66 kg ha<sup>-1</sup>を目標窒素吸収量とした。

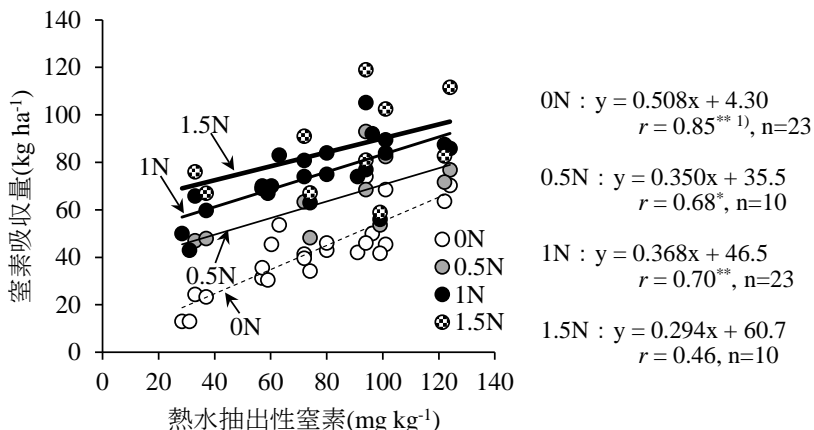


図 3-4-1 窒素施肥量別の熱水抽出性窒素と窒素吸収量の関係 (試験 3, 2013~2016 年, 2013・2014 年は 0N と 1N のみ)

1) \*\*: \* : 1%, 5%水準で有意。

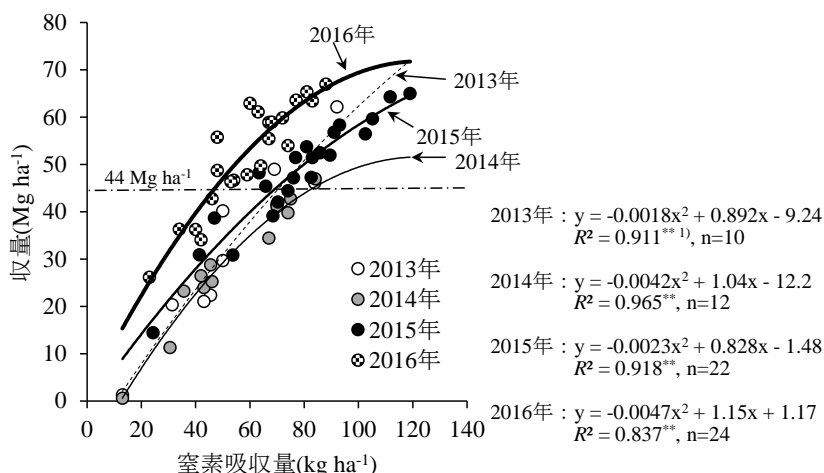


図 3-4-2 窒素吸収量と収量の関係 (試験 3, 2013~2016 年)

1) \*\*: \* : 1%水準で有意。

### (3) 窒素無施用条件での窒素吸収量

窒素無施用条件 (0N) での熱水抽出性窒素と窒素吸収量の間には 1%水準の有意な正の相関が認められた (図 3-4-1)。窒素肥沃度水準 I (熱水抽出性窒素 50 mg kg<sup>-1</sup> 未満) における熱水抽出性窒素の代表値を 40 mg kg<sup>-1</sup>、水準 II (熱水抽出性窒素 50~70 mg kg<sup>-1</sup>) の同値を 60 mg kg<sup>-1</sup>、水準 III (熱水抽出性窒素 70 mg kg<sup>-1</sup> 以上) の同値を 80 mg kg<sup>-1</sup> とすると、0N の回帰直線から算出される窒素吸収量は水準 I : 25 kg ha<sup>-1</sup>、水準 II : 35 kg ha<sup>-1</sup>、水準 III : 45 kg ha<sup>-1</sup> で、これらを窒素無施用条件での窒素吸収量とした。

### (4) 施肥窒素利用率

図3-4-3に熱水抽出性窒素と施肥窒素利用率の関係を示す。施肥窒素利用率は窒素施肥区である0.5N, 1N, 1.5Nの窒素吸収量と0Nのそれとの差を窒素施肥量で除して求めた。0.5N, 1N, 1.5Nにおける施肥窒素利用率の平均値は22.0%, 21.3%, 16.4%であった。窒素施肥量が一定の場合、熱水抽出性窒素の上昇に伴って施肥窒素利用率は低下したが、これは土壌由来の窒素供給の増大に伴う全窒素供給量の増加によって、有機質資材に由来する供給窒素の寄与が相対的に低下したためと推察された。土壌窒素診断基準値である水準 II (熱水抽出性窒素50~70 mg kg<sup>-1</sup>) では、目標窒素吸収量66 kg ha<sup>-1</sup>を得るためには概ね1Nの窒素施肥が必要であることから (図3-

4-1), 水準Ⅱの施肥窒素利用率は1Nの回帰直線と基準値内の熱水抽出性窒素の代表値 (60 mg kg<sup>-1</sup>) との交点である22.5%とした (図3-4-3).

窒素施肥対応の運用にあたっては窒素肥沃度に応じて窒素施肥量を増減させるため, 水準Ⅰでは水準Ⅱより多くの, 水準Ⅲでは水準Ⅱより少ない窒素施肥量となる. 熱水抽出性窒素が低い水準Ⅰでは施肥窒素利用率は高くなる傾向にある (図3-4-3) が, この水準で必要となる窒素増肥は施肥窒素利用率を低下させる. 一方, 熱水抽出性窒素が高い水準Ⅲでは施肥窒素利用率は低くなるが, その水準での窒素減肥は施肥窒素利用率を向上させる. このように, 窒素肥沃度に応じて窒素施肥量を増減させる窒素施肥対応では, 窒素肥沃度と窒素施肥量が施肥窒素利用率に対して相反する方向に作用する (第3章第2節関連論文 (櫻井ら, 2013b)) ため, 水準Ⅰおよび水準Ⅲの施肥窒素利用率についても水準Ⅱの利用率である22.5%を適用しても実用上支障ないと判断した.

#### (5) 窒素施肥対応の構築とその活用

目標窒素吸収量から窒素無施用条件での窒素吸収量を差し引くことで求められる有機質肥料由来の窒素吸収量は水準Ⅰ: 41, 水準Ⅱ: 31, 水準Ⅲ: 21 kg

ha<sup>-1</sup>で, これらを施肥窒素利用率で除するにより算出される窒素施肥量は水準Ⅰ: 182, 水準Ⅱ: 138, 水準Ⅲ: 93 kg ha<sup>-1</sup>であった (図3-4-4).

最終的には生産現場における実用性等を加味して, 土壌窒素診断基準値である水準Ⅱの窒素施肥量を140 kg ha<sup>-1</sup>とし, 窒素肥沃度の高低により窒素施肥量を40 kg ha<sup>-1</sup>増減させる窒素施肥対応を構築した (表3-4-7). 本施肥対応は春分施肥体系の窒素施肥量以下でありながら目標収量が44 Mg ha<sup>-1</sup>と, 春分施肥体系の想定収量36 Mg ha<sup>-1</sup> (第3章第3節関連論文 (櫻井ら, 2016)) よりも2割程度増収可能な設定となっている.

ところで, 本試験は5月上旬までに移植を終えることでハエ類の被害を回避したが, 年次による気象変動を加味し, 本技術の適応にあたっては移植を4月末までに終わることが望ましい. また, 堆肥施用に伴う窒素減肥を行っていないなど, 有機栽培野菜3品目の窒素施肥対応 (第3章第2節関連論文 (櫻井ら, 2013b)) と同様の試験条件であることから, 本施肥対応も前報と同じく堆肥施用量20 Mg ha<sup>-1</sup>までは堆肥施用に伴う窒素減肥をしない旨を注記に加えた (表3-4-7).

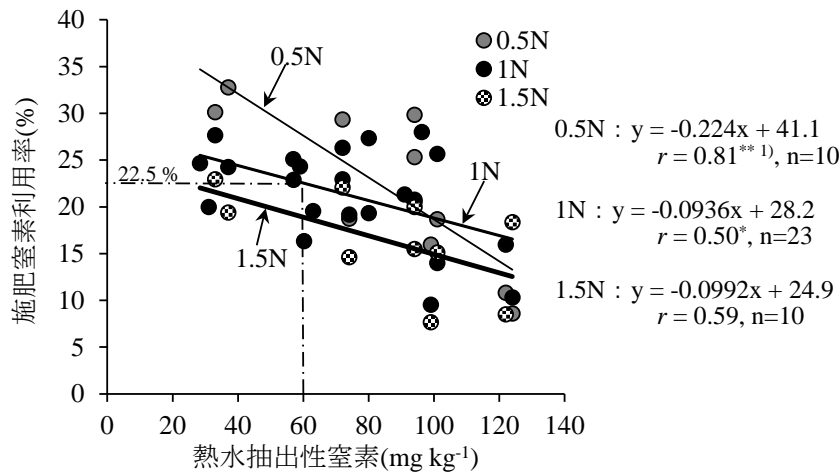


図3-4-3 熱水抽出性窒素と施肥窒素利用率の関係  
(試験3, 2013~2016年, 2013・2014年は1Nのみ)

¹)\*\*,\* : 1%, 5%水準で有意.

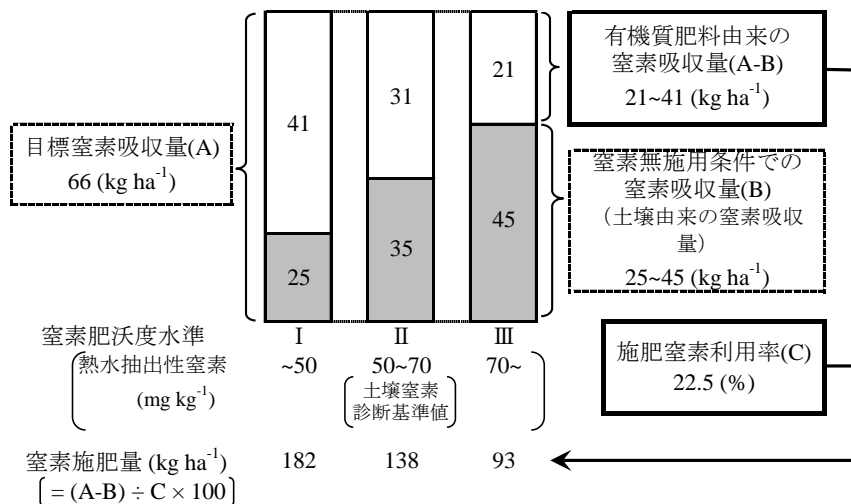


図 3-4-4 窒素施肥量の算出 (試験 3)

表 3-4-7 春全量施肥を前提とした有機栽培タマネギの窒素施肥対応<sup>1), 2), 3)</sup>

窒素肥沃度水準 熱水抽出性窒素 (mg kg <sup>-1</sup> )	I ~50	II 50~70 (土壌窒素診断基準値)	III 70~
窒素施肥量 (kg ha <sup>-1</sup> )	180	140	100

<sup>1)</sup> 極早生品種を前提とし、想定収量は44 Mg ha<sup>-1</sup>。

<sup>2)</sup> 窒素含有率40 g kg<sup>-1</sup>以上の有機質資材により、窒素施肥量の全量を移植前に施肥する。  
なお、ハエ類の被害回避のため、移植は4月末までに終わるのが望ましい。

<sup>3)</sup> 堆肥施用量20 Mg ha<sup>-1</sup>までは、堆肥施用に伴う窒素減肥をしない(牛ふん麦稈堆肥の場合)。

#### 4. 要約

有機栽培タマネギの収量性向上を目的に、有機 JAS に準拠した広範な窒素肥沃度の圃場で窒素施肥試験を実施し以下の結果を得た。

- 1) 施肥窒素の全量を当年春に施肥する春全量施肥は、窒素施肥量の 3 分の 2 を前年秋に、残りの 3 分の 1 を当年春に施肥する春分施よりも有意に増収した。
- 2) 春全量施肥に窒素含有率 40 g kg<sup>-1</sup> 以上の有機質資材を用いた場合、資材間に収量差はなかった。一方、窒素含有率 20 g kg<sup>-1</sup> 前後の資材では有意に減収した。
- 3) 有機栽培タマネギの目標収量である 44 Mg ha<sup>-1</sup> を得るための窒素施肥量を、目標窒素吸収量から窒素無施用条件での窒素吸収量を差し引き、それを施肥窒素利用率で除することで算出した。その結果、標準的な窒素肥沃度 (熱水抽出性窒素 50~70 mg kg<sup>-1</sup>) における窒素施肥量として 140 kg ha<sup>-1</sup> が適正で、窒素肥沃度の高低により窒素施肥量を 40 kg ha<sup>-1</sup> 増減さ

せる窒素施肥対応を構築した。

## 第4章 有機栽培畑における地力の醸成と施肥対応の総合化

### 第1節 窒素収支に基づく有機栽培畑の堆肥施用上限量

#### 1. はじめに

良質な有機農産物を安定的に供給する上で土づくりの重要性については言及するまでもなく、その一環として堆肥が施用されることは多い。堆肥の施用は作物への養分供給のみならず、土壌の理化学性の改善や生物性の維持・増進などの効果をもたらす(西尾, 2007) 一方、堆肥の過剰施用は農産物の品質低下のみならず硝酸性窒素の流亡等による環境汚染を招く恐れがある(中津ら, 2000)。そもそも有機農業は、「農業生産に由来する環境への負荷をできる限り低減した農業生産の方法を用いて行われる農業」と定義され(農林水産省, 2006)、自然環境に配慮する生産方法の中で先導的な役割を担っており、環境面から堆肥施用の上限を設ける意義は大きい。北海道では、慣行栽培における堆肥連用時の施用上限量は、年1作の場合  $25 \text{ Mg ha}^{-1}$  程度と定められている(北海道農政部, 2020) が、有機栽培における設定はされていない。

本節では、窒素収支の考え方を基本に、有機栽培畑の堆肥施用上限量について検討した。

#### 2. 試験方法

##### 1) 供試圃場および栽培体系

供試圃場は、北海道長沼町の北海道立総合研究機構中央農業試験場内の褐色森林土である。堆肥の施用量は  $0, 20, 40, 60 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$  の4水準で2006年から毎年1回施用した。施用した堆肥は牛ふん麦稈堆肥で、含水率  $0.50 \text{ kg kg}^{-1}$ 、C/N比 9.5、T-N  $5.4 \text{ g kg}^{-1}$ 、T- $\text{P}_2\text{O}_5$   $7.5 \text{ g kg}^{-1}$ 、T- $\text{K}_2\text{O}$   $13.8 \text{ g kg}^{-1}$ であった(現物当たり、各年の平均値)。供試圃場における主要土壌化学性は表 4-1-1 の通りである。

2011~2014年の4ヵ年、スイートコーン (*Zea mays* L., 品種「味来390」) とレタス (*Lactuca sativa*

L., 品種「エムラップ231」) を交互に栽培した。スイートコーンは5月下旬に播種し、8月中旬に収穫した。レタスはガラス温室内で育苗した苗を6月上旬に圃場へ定植し、7月中旬に収穫した。栽植密度は、スイートコーン  $38095 \text{ 株 ha}^{-1}$  (条間  $75 \text{ cm}$ , 株間  $35 \text{ cm}$ )、レタス  $55556 \text{ 株 ha}^{-1}$  (条間  $60 \text{ cm}$ , 株間  $30 \text{ cm}$ ) で、スイートコーンはグリーンマルチを、レタスは白黒ダブルマルチをそれぞれ使用した。1区面積  $11.3 \text{ m}^2$  の3反復とした。

栽培管理は有機JAS(農林水産省, 2017)に準拠し、病害虫の発生により作物の正常な生育が妨げられる恐れがある場合に、有機JASに適合する農薬を必要最小限使用した。除草は耕うん機による整地および手取りにより実施し、作物と雑草による養分競合が起きないように管理した。なお、収穫残渣をすき込み後、無施肥にてエンバク (*Avena sativa* L., 品種「とちゆたか」) を後作緑肥として栽培し、10月中旬までにすき込んだ。

##### 2) 施肥管理

窒素施用量は有機栽培露地野菜畑の窒素施肥対応(第3章第2節関連論文(櫻井ら, 2013b))により算出し、スイートコーンにはなたね油かす、レタスには魚かすを用い、これらで施肥窒素の全量を施与した(表 4-1-2)。なたね油かすおよび魚かすの成分組成は表 4-1-3 の通りである。なお、後作緑肥のエンバクの生育量が一定量確保された場合は、北海道緑肥作物等栽培利用指針(改訂版)(北海道農政部, 2004)を参照し、エンバクからの窒素供給を見込んで次作の窒素施用量を減じた。

窒素が作物生育の制限因子になるよう、リン酸およびカリ施用量は土壌分析値に基づき北海道施肥ガイド2020(北海道農政部, 2020)の施肥対応を準用して設定し、なたね油かすや魚かすで不足する量を、それぞれグアノ、天然硫酸カリで施与した。これらの肥料は全量基肥施用とした。

表 4-1-1 供試圃場の主要土壌化学性 (2014年・施肥前)

堆肥施用量 ( $\text{Mg ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$ )	pH ( $\text{H}_2\text{O}$ )	熱水抽出性窒素 <sup>1)</sup> ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	有効態リン酸 <sup>2)</sup> ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	交換性塩基( $\text{mg kg}^{-1}$ )		
				CaO	MgO	$\text{K}_2\text{O}$
0	5.6	58	386	2809	493	391
20	5.7	78	415	3129	697	913
40	5.9	97	491	3417	873	1225
60	6.1	110	561	3172	956	1428

<sup>1)</sup> 熱水抽出性窒素は2011~2014年の平均値。

<sup>2)</sup> トルオーグ法。

表 4-1-2 各試験区の窒素施肥量

堆肥施用量 (Mg ha <sup>-1</sup> y <sup>-1</sup> )	窒素施肥量(kg ha <sup>-1</sup> )			
	2011年 (スイートコーン)	2012年 (レタス)	2013年 <sup>1)</sup> (スイートコーン)	2014年 (レタス)
0	120	120	100	120
20	90	100	70	100
40	70	80	50	80
60	50	60	30	60

<sup>1)</sup>2012年におけるエンバクの生育量が一定量確保されたことから、窒素施肥量を20 kg ha<sup>-1</sup>減じた。

表 4-1-3 なたね油かす、魚かすの成分組成<sup>1)</sup>

資材名	T-N	T-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	T-K <sub>2</sub> O	C/N比
	(g kg <sup>-1</sup> )			
なたね油かす	57	37	20	6.0
魚かす	66	63	1	5.2

<sup>1)</sup>現物あたりで各年の平均値。

### 3) 窒素収支等の評価

#### (1) 土壌溶液中の硝酸性窒素濃度

土壌溶液は各試験区の中央部にポーラスカップ(大起理化学工業社製ミズツール)を埋設し、融雪時および降雨直後に適宜吸引採取した。ポーラスカップの埋設深は、露地野菜の窒素吸収根域が概ね60 cmまでである(三木, 2002)ことを考慮して60 cmとした。土壌溶液中の硝酸性窒素濃度は、銅・カドミウム還元法(BLTEC社製SYNCA)により測定した。なお、ポーラスカップを用いた土壌溶液の採取は、土壌構造の不均一性のためにその濃度が各試験区の代表値を得るためには相応のサンプル数を確保する必要がある(波多野, 2002)ことから、土壌溶液中の硝酸性窒素濃度は各試験区3反復を平均することにより、不均一性の影響を極力回避した。

#### (2) 余剰窒素量

余剰窒素量の算定にあたっては、後作緑肥すき込み後からの一年間を調査の単位とし、2011年10月から2014年9月までの3ヵ年を調査対象とした。余剰窒素量は式(1)により算出し、投入窒素量から持出窒素量を差し引いて求めた。

余剰窒素量 (kg ha<sup>-1</sup>)

= 投入窒素量 (kg ha<sup>-1</sup>)

- 持出窒素量 (kg ha<sup>-1</sup>) …式(1)

投入窒素量は式(2)により算出した。

投入窒素量 (kg ha<sup>-1</sup>)

= 堆肥由来窒素放出量 (kg ha<sup>-1</sup>)

+ 有機質肥料由来窒素放出量 (kg ha<sup>-1</sup>)

+ 収穫残渣由来窒素放出量 (kg ha<sup>-1</sup>)

+ 後作緑肥由来窒素放出量 (kg ha<sup>-1</sup>) …式(2)

堆肥由来窒素放出量は、農林水産技術会議事務局(1985)の予測式によって窒素放出率を求め、それに堆肥の窒素含有量を乗じて算出した。なお、本試験で用いた堆肥の窒素含有量は北海道施肥ガイド2020(北海道農政部, 2020)に示されている5 kg Mg<sup>-1</sup>に近似していることから、便宜上5 kg Mg<sup>-1</sup>とした。

有機質肥料由来窒素放出量は、有機質肥料の窒素含有量の80%が初年目に放出するとした(小野寺・中本, 2007)。

収穫残渣および後作緑肥由来窒素放出量は、小川ら(1988)の予測式によって窒素放出率を求め、それに窒素吸収量を乗じて算出した。すなわち、収穫残渣はトウモロコシ茎葉の窒素放出率にスイートコーン茎葉の窒素吸収量を、後作緑肥はオーチャードグラスの窒素放出率にエンバクの窒素吸収量をそれぞれ乗じて算出し、これらは次期調査年度から窒素の放出が進行すると仮定した。なお、レタスの収穫残渣に相当する外葉部分は、すき込み後速やかに分解されることから、本項目では考慮しなかった。

投入された有機物の多くは、1年以上経た後も窒素の放出が継続することから、堆肥、収穫残渣、後作緑肥に由来する窒素については、投入した当年のみならずそれ以降の窒素放出も考慮した。

持出窒素量は式(3)により算出した。

持出窒素量 (kg ha<sup>-1</sup>)

$$= \text{野菜の窒素吸収量 (kg ha}^{-1}\text{)} \\ + \text{後作緑肥の窒素吸収量 (kg ha}^{-1}\text{)} \cdots \text{式 (3)}$$

野菜の窒素吸収量について、スイートコーンは全地上部、レタスは外葉部分を除いた結球部を対象とした。雌穂と茎葉(スイートコーン)、結球部(レタス)の乾物重を測定し、それぞれの窒素含有率を乗じることで窒素吸収量を求めた。後作緑肥の窒素吸収量は、地上部の全乾物重に窒素含有率を乗じて求めた。窒素含有率は、70℃で48時間以上乾燥して粉碎した試料を、レタスについてはガンニング変法(北海道立総合研究機構農業研究本部, 2012)で、その他については硫酸一過酸化水素分解法(水野・南, 1980)で灰化後、インドフェノール法により定量した(Dorich and Nelson, 1983)。

### (3) 超過窒素量

超過窒素量は式(4)により算出し、3カ年の余剰窒素量の平均値から硝酸性窒素残存許容量を差し引いたものとした。

超過窒素量 (kg ha<sup>-1</sup>)

$$= \text{余剰窒素量の平均値 (kg ha}^{-1}\text{)} \\ - \text{硝酸性窒素残存許容量 (kg ha}^{-1}\text{)} \cdots \text{式 (4)}$$

硝酸性窒素残存許容量とは、一定の土層内に存在する硝酸性窒素が全て流出したとしても地下浸透水の硝酸性窒素濃度が人の健康の保護に関する環境基準(以下、環境基準)に定められた硝酸性窒素濃度10 mg L<sup>-1</sup>以下(環境省, 2018)に維持しうる量である(三木ら, 2000)。調査対象とした3カ年の硝酸性窒素残存許容量は、Capacity modelをもとにした簡易推定モデル(中辻ら, 2014)により算出した年間浸透水量の平年値520 mmに硝酸性窒素濃度として10 mg L<sup>-1</sup>を乗じて求めた52 kg ha<sup>-1</sup>とした。なお、環境基準では硝酸性窒素を硝酸態窒素と亜硝酸態窒素の含量としているが、亜硝酸態窒素の検出量は微量であることから本論文では硝酸態窒素のみを対象とした。

### 4) 収量調査

各作物の収量は、出荷基準を満たした規格内収量(生重)とし、スイートコーンは皮付き1穂重が300 g以上の雌穂、レタスは1球重が450 g以上の結球部を対象とした(花・野菜技術センター, 2020)。

相関解析にあたっては、JMP5.1.2(SAS Institute Japan)を用いた。

## 3. 結果

### 1) 土壌溶液中の硝酸性窒素濃度

全般的に、土壌溶液中の硝酸性窒素濃度はレタス栽培時に高く、スイートコーン栽培時に低い傾向であった(図4-1-1)。調査対象とする2011年10月から2014年9月までの3カ年における浸透水中硝酸性窒素濃度の平均値を土壌溶液中の硝酸性窒素濃度とCapacity modelをもとにした簡易推定モデル(中辻ら, 2014)から求めた当該期間の浸透水量(中辻ら, 2014)の加重平均により算出した。その結果、堆肥施用量0, 20, 40, 60 Mg ha<sup>-1</sup> y<sup>-1</sup>における硝酸性窒素濃度はそれぞれ4.0, 5.3, 4.9, 4.9 mg L<sup>-1</sup>で、環境基準である10 mg L<sup>-1</sup>以下を満たした。なお、堆肥施用量間における硝酸性窒素濃度の変動は小さかった。

### 2) 窒素収支に基づく窒素負荷評価

2012~2014年の各試験年次における余剰窒素量を表4-1-4, 4-1-5, 4-1-6に示す。投入窒素量の大部分は堆肥と有機質肥料由来であり、堆肥由来は堆肥施用量に対応して大きい値となった。収穫残渣由来については、窒素放出率が小さいことから投入量としては少なく見積もられた。後作緑肥由来の投入量はすき込み1年目の窒素放出率が6割弱と多いことから、特に生育期間が十分確保されるレタス跡の後作緑肥で投入量が多くなった。持出窒素量は作物によって収穫部位の窒素吸収量が異なり、スイートコーンで大きい値となった(表4-1-5)。一方、レタスの窒素吸収量はスイートコーンに比べてかなり小さいが、レタス跡では後作緑肥の窒素吸収量が大きくなった(表4-1-4, 4-1-6)。

余剰窒素量の3カ年平均値から硝酸性窒素残存許容量52 kg ha<sup>-1</sup>を差し引いた超過窒素量は、堆肥施用量0, 20, 40, 60 Mg ha<sup>-1</sup> y<sup>-1</sup>ではそれぞれ-42, -30, 13, 40 kg ha<sup>-1</sup>で、堆肥を40 Mg ha<sup>-1</sup>以上連用すると超過窒素量はプラスとなった。

### 3) スイートコーン、レタスの収量性

スイートコーン、レタスの収量性を表4-1-7に示す。レタスについては堆肥施用量により収量や窒素吸収量に差が認められる場合があった。なお、スイートコーン、レタスともに有機栽培における目標収量以上であり、両作物の生育は良好と判断された。

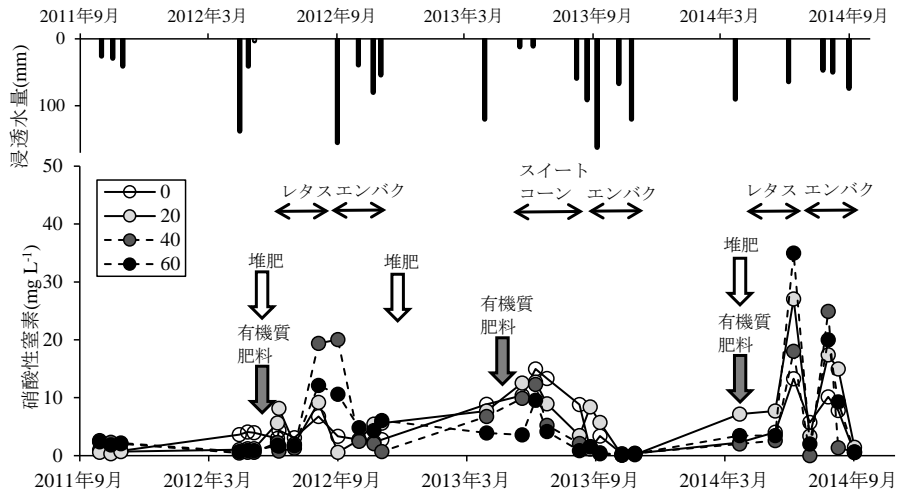


図 4-1-1 土壤溶液中の硝酸性窒素濃度の推移 (2011年10月～2014年9月)

表 4-1-4 余剰窒素量 (2012年<sup>1)</sup>)

堆肥施用量 (Mg ha <sup>-1</sup> y <sup>-1</sup> )	投入窒素量(kg ha <sup>-1</sup> )					持出窒素量(kg ha <sup>-1</sup> )			余剰窒素量 (kg ha <sup>-1</sup> )
	堆肥 <sup>2)</sup>	有機質肥料	収穫残渣 <sup>3)</sup>	後作緑肥 <sup>4)</sup>	合計	レタス	後作緑肥	合計	
0	0	96	6	7	110	34	86	120	-10
20	43	80	9	9	141	39	91	130	12
40	86	64	5	7	162	36	78	114	48
60	130	48	6	9	192	40	73	113	79

- 対象期間：2011年10月～2012年9月
- 現物あたり窒素含有量に連用年数に応じた窒素放出率（農林水産技術会議事務局，1985）を乗じて算出。  
現物あたり窒素含有量5 kg Mg<sup>-1</sup>（北海道農政部，2020），窒素放出率（完熟たい肥）連用6年目43.2%  
（本試験以前からの堆肥連用を考慮）。
- 2011年のスイートコーン残渣の窒素吸収量に窒素放出率（小川ら，1988）を乗じて算出。  
（トウモロコシ茎葉の値を引用，すき込み後1年目11.3%）
- 2011年の後作緑肥の窒素吸収量に窒素放出率（小川ら，1988）を乗じて算出。  
（オーチャードグラスの値を引用，すき込み後1年目58.8%）

表 4-1-5 余剰窒素量 (2013年<sup>1)</sup>)

堆肥施用量 (Mg ha <sup>-1</sup> y <sup>-1</sup> )	投入窒素量(kg ha <sup>-1</sup> )					持出窒素量(kg ha <sup>-1</sup> )			余剰窒素量 (kg ha <sup>-1</sup> )
	堆肥 <sup>2)</sup>	有機質肥料	収穫残渣 <sup>3)</sup>	後作緑肥 <sup>4)</sup>	合計	スイートコーン	後作緑肥	合計	
0	0	80	7	53	139	130	14	144	-5
20	46	56	10	56	168	157	17	174	-6
40	92	40	5	48	185	129	13	142	43
60	138	24	7	45	214	148	16	164	50

- 対象期間：2012年10月～2013年9月
- 現物あたり窒素含有量に連用年数に応じた窒素放出率（農林水産技術会議事務局，1985）を乗じて算出。  
現物あたり窒素含有量5 kg Mg<sup>-1</sup>（北海道農政部，2020），窒素放出率（完熟たい肥）連用7年目46.0%  
（本試験以前からの堆肥連用を考慮）。
- 2011年のスイートコーン残渣の窒素吸収量に窒素放出率（小川ら，1988）を乗じて算出。  
（トウモロコシ茎葉の値を引用，すき込み後2年目12.3%）
- 2011, 2012年の後作緑肥の窒素吸収量に窒素放出率（小川ら，1988）をそれぞれ乗じて算出。  
（オーチャードグラスの値を引用，すき込み後1年目58.8%，2年目17.0%）

表 4-1-6 余剰窒素量 (2014 年<sup>1)</sup>)

堆肥施用量 (Mg ha <sup>-1</sup> y <sup>-1</sup> )	投入窒素量(kg ha <sup>-1</sup> )					持出窒素量(kg ha <sup>-1</sup> )			余剰窒素量 (kg ha <sup>-1</sup> )
	堆肥 <sup>2)</sup>	有機質肥料	収穫残渣 <sup>3)</sup>	後作緑肥 <sup>4)</sup>	合計	レタス	後作緑肥	合計	
0	0	96	15	24	135	23	66	89	46
20	49	80	20	27	176	28	86	114	61
40	97	64	13	22	197	28	64	92	105
60	146	48	16	23	232	33	52	85	147

1) 対象期間：2013年10月～2014年9月

2) 現物あたり窒素含有量に連用年数に応じた窒素放出率（農林水産技術会議事務局，1985）を乗じて算出。

現物あたり窒素含有量 5 kg Mg<sup>-1</sup>（北海道農政部，2020），窒素放出率（完熟たい肥）連用8年目48.5 %。  
（本試験以前からの堆肥連用を考慮）。

3) 2011, 2013年のスイートコーン残渣の窒素吸収量に窒素放出率（小川ら，1988）を乗じて算出。

（トウモロコシ茎葉の値を引用，すき込み後1年目11.3 %，3年目10.6 %）

4) 2011, 2012, 2013年の後作緑肥の窒素吸収量に窒素放出率（小川ら，1988）をそれぞれ乗じて算出。

（オーチャードグラスの値を引用，すき込み後1年目58.8 %，2年目17.0 %，3年目10.0 %）

表 4-1-7 スイートコーン，レタスの収量性

堆肥施用量 (Mg ha <sup>-1</sup> y <sup>-1</sup> )	2012年 (レタス) <sup>1)</sup>			2013年 (スイートコーン)			2014年 (レタス)		
	収量 (Mg ha <sup>-1</sup> )	窒素吸収量(kg ha <sup>-1</sup> )		収量 (Mg ha <sup>-1</sup> )	窒素吸収量(kg ha <sup>-1</sup> )		収量 (Mg ha <sup>-1</sup> )	窒素吸収量(kg ha <sup>-1</sup> )	
		結球	外葉		雌穂	茎葉		結球	外葉
0	25.3	34.0	24.0	15.2	51	79	19.7	22.7	23.6
20	31.3	39.0	29.0	15.2	55	102	22.7	28.2	29.0
40	29.5	36.0	31.0	14.0	51	78	22.7	28.0	31.4
60	32.5	40.0	30.0	16.8	62	87	23.9	33.3	34.6
窒素施肥対応に おける目標収量	20			12～15			20		
分散分析									
堆肥施用量	** <sup>1)</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	**	**	**

<sup>1)</sup> \*\* \* はそれぞれ1%, 5%水準で有意差あり。nsは有意でない。

#### 4. 考察

##### 1) 堆肥施用量が窒素収支等へ及ぼす影響

堆肥施用量が多くなるに伴って超過窒素量は増加する一方，土壤溶液中の硝酸性窒素濃度は堆肥施用量による変動は小さかった。この要因としては，有機物施用に伴う脱窒活性の向上が想定される。脱窒は主に従属栄養性の通性嫌気性細菌が担っている（Payne, 1974）ため，有機質資材の施用は脱窒による土壤から大気圏への窒素フローを加速する要因である（西尾，1994）。本論文では持出窒素量に脱窒を設けておらず，堆肥などの有機物が多量に施用された場合には窒素超過量が過大評価となる可能性がある。ゆえに，養分供給を有機質資材に依存する有機栽培は，収量性を考慮した場合には脱窒活性を高め易い農法と推察されるが，脱窒の程度は有機物施用のみならず土壤水分変動に伴う土壤条件に違いによって大きく影響を受ける（井上・西尾，2006）。よって，多様な圃場条件において安定的に浸透水中の硝酸性窒素濃度を 10 mg L<sup>-1</sup> 以下とするためには，脱窒を考慮せずあくまで超過窒素量をゼロ以下とすることを基本に検討することが適当と判断された。なお，脱窒に伴って一酸化二窒素などの温室効果ガスが発生する可能性がある点については留意が必要である。

##### 2) 超過窒素量を考慮した堆肥施用上限の設定と

##### その対応

図 4-1-2 に堆肥施用量と超過窒素量の関係を示す。本試験では，堆肥施用量が 40 Mg ha<sup>-1</sup> 以上で超過窒素量がプラスとなったように，多量の堆肥連用下では，後作緑肥の導入によって余剰窒素量の改善を図っても，堆肥の窒素放出に由来する投入窒素量の増加によって，余剰窒素量を硝酸性窒素残存許容量以下に抑えることは困難であった。堆肥施用量と超過窒素量の間には有意な正の相関関係が認められ，超過窒素量がゼロとなる堆肥施用量は約 33 Mg ha<sup>-1</sup> であった。

この値は，北海道施肥ガイド 2020 に示されている堆肥連用時の施用上限量（畑作物 30 Mg ha<sup>-1</sup> 程度，露地野菜年 1 作の場合 25 Mg ha<sup>-1</sup> 程度）に近似している。また，浸透水中の硝酸性窒素は地下への浸透過程での希釈や深層土層での脱窒（江口，2008）などにより低下する場合も想定されることから，本考察における堆肥施用量の算出は，実際の地下水汚染リスクに対し，ある程度の安全を見込んだものと考えられる。よって，これまでの検討で導かれた概ね 30 Mg ha<sup>-1</sup> を有機栽培畑における堆肥施用上限量とすることで窒素負荷リスクを低減できると判断された。

なお，土壤溶液中の硝酸性窒素濃度は平均値で見ると堆肥施用量を問わず 10 mg L<sup>-1</sup> 以下であったもの



の、堆肥施用量  $40 \text{ Mg ha}^{-1}$  以上の水準では硝酸性窒素濃度が  $10 \text{ mg L}^{-1}$  を超過することが度々観測された。このように、一時的な硝酸汚染を回避する観点からも堆肥施用量の上限を  $30 \text{ Mg ha}^{-1}$  とすることは一定の整合性を有する。

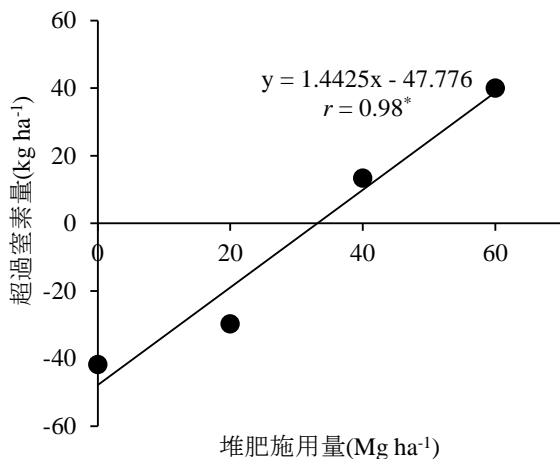


図 4-1-2 堆肥施用量と超過窒素量の関係 (2012～2014 年の平均)

### 3) 堆肥施用上限量の適用条件

本試験条件 (硝酸性窒素残存許容量  $52 \text{ kg ha}^{-1}$ , 堆肥連用 6～8 年) よりも硝酸性窒素残存許容量が小さく、堆肥連用年数が長期に亘るなど、超過窒素量がプラスとなる可能性が高い圃場では、堆肥施用量を減じて堆肥由来の窒素投入量を抑制する必要がある。

後作緑肥導入の効果は、土壌に残存した硝酸性窒素を溶脱しにくい有機態窒素に変換したこと、すなわち後作緑肥が吸収した窒素分に由来する持出窒素量の増大によるもので、特に窒素吸収量に比して窒素施肥量が多いレタスではその効果が大きかった (表 4-1-4, 4-1-6)。野菜畑とりわけ葉菜類では、収穫跡地に残存する無機態窒素や圃場に還元される収穫残渣由来の窒素が多量に存在する (小野寺・唐, 2009)。また、北海道では 8 月下旬から 9 月にかけて降水量が多いため、硝酸性窒素が流亡する危険性が高い (三木ら, 2000) ことから、後作緑肥の導入は超過窒素量と土壌溶液中の硝酸性窒素濃度の低減に有効な手法である。なお、すき込まれた後作緑肥からも一定量の窒素放出が見込まれ、レタス跡のように後作緑肥の生育量が十分得られた場合には、すき込まれた後作緑肥からの窒素放出を見込んで次作物の窒素を減肥することが重要となる。

## 5. 要約

北海道では、慣行栽培における堆肥連用時の施用上限量は、年 1 作の場合  $25 \text{ Mg ha}^{-1}$  程度であるが、有機栽培における設定はされていない。そこで、窒素収支の考え方を基本に、有機栽培畑の堆肥施用上限量について検討した

- 1) 堆肥施用量が増えるにつれて超過窒素量は増大し、堆肥を多量に連用すると超過窒素量をゼロ以下に抑えることが困難であった。
- 2) 堆肥施用量と超過窒素量の間には有意な正の相関が認められ、超過窒素量がゼロとなる堆肥施用量は約  $33 \text{ Mg ha}^{-1}$  であった。
- 3) 以上から、有機栽培畑における堆肥施用の上限を概ね  $30 \text{ Mg ha}^{-1}$  とした。

## 第2節 有機栽培畑への転換を前提とした 緑肥導入モデル

### 1. はじめに

有機 JAS (農林水産省, 2017) に則った生産方式での施肥管理等を明らかにする中で、有機栽培畑における望ましい窒素肥沃度として慣行栽培よりもやや高め熱水抽出性窒素  $50\sim 70\text{ mg kg}^{-1}$  が適当で、これを有機栽培畑における土壌窒素診断基準値として設定した (第3章第2節関連論文 (櫻井ら, 2013b))。一方、有機栽培に取り組んで間もない圃場では窒素肥沃度が十分醸成されていないために収量性が不安定となることが多く、その対応が求められている。窒素肥沃度を高める手段としては堆肥の施用があるが、近隣に畜産施設がないため堆肥の入手が困難な地域もあれば、堆肥を散布する労力が確保出来ない事例も見受けられる。緑肥は地力の向上はもちろんのこと、病虫害や雑草の抑制、有用微生物の増加などの効果を有する (北海道農政部, 2004) ことから、化学肥料や化学合成農薬に依存しない有機栽培にとって緑肥を導入する意義は大きい。有機 JAS では有機栽培に取り組むにあたって播種または植付けの時点から遡り2年以上、化学肥料や化学合成農薬を使用しない転換期間を設ける必要があるが、この転換期間に緑肥を活用して窒素肥沃度を高める方策は土壌生物性を維持、向上させる観点からも有益である (唐澤, 2020)。

本節では、有機栽培への転換期間に緑肥を導入することに伴う生産性の向上を主に窒素肥沃度の指標である熱水抽出性窒素によって評価し、有機栽培畑における望ましい窒素肥沃度を確保するための緑肥導入モデルを検討した。

### 2. 試験方法

#### 1) 供試圃場および耕種概要

##### (1) 供試圃場

2011年からの4カ年、北海道立総合研究機構中央農業試験場内の粘質な褐色低地土に壤土を客土した圃場 (表4-2-1) で試験を実施した。本圃場は有機 JAS の認証を取得していないが、栽培管理は有機 JAS に準拠し、化学肥料や化学合成農薬を不使用とした (農林水産省, 2017)。なお、後述する野菜類の栽培では、病虫害の発生により作物の正常な生育が妨げられる恐れがある場合、有機 JAS に適合する農薬を必要最小限使用した。また、耕うん機による整地および手取りにより除草し、作物と雑草による養分競合が起きないよう管理した。

##### (2) 転換期間に相当する期間の耕種概要 (試験

##### 1, 2年目)

有機栽培への転換期間に相当する試験1, 2年目には緑肥の作付体系の異なる4試験区を設けた (表4-2-2)。試験区1 (緑肥無作付区) は、試験1, 2年目にレタス (*Lactuca sativa* L.) 「エムラップ231」のみを栽培した対照区である。試験区2 (後作+後作区) は、試験区1に後作緑肥としてヘアリーベッチ (*Vicia villosa* Roth) 「まめ助」を導入した体系である。試験区3 (休閒+後作区) は、試験1年目に休閒緑肥としてアカクローバ (*Trifolium pratense* L.) 「はるかぜ」を栽培し、試験2年目は試験区2と同様の体系である。試験区4 (休閒2カ年区) は、休閒緑肥としてアカクローバを2カ年通して栽培した体系で、アカクローバの種子落下と雑草類の発生を抑えるために試験1年目に2回、試験2年目に1回刈り払い、植物体はそのまま放置した。試験区4の試験1年目を除き、緑肥は9月下旬に刈り払い機で細断した後、ロータリー耕により概ね20cm深にすき込んだ。1区面積12m<sup>2</sup>の4反復とした。

緑肥の播種量は後作緑肥  $50\text{ kg ha}^{-1}$ 、休閒緑肥  $30\text{ kg ha}^{-1}$  とした (北海道農政部, 2004)。また、後作緑肥、休閒緑肥ともに  $30\text{ kg-N ha}^{-1}$  となるよう、鶏ふん堆肥 (鶏ふん区) または牛ふん麦稈堆肥 (堆肥区) により窒素分を供給した。なお、牛ふん麦稈堆肥からの窒素供給量は現物  $1\text{ Mg}$  あたり  $1\text{ kg}$  とした (北海道農政部, 2020)。鶏ふん堆肥と牛ふん麦稈堆肥の成分組成は表4-2-3の通りである。

レタス栽培にあたっては、定植のおよそ1週間前に魚かすを全面に散布した後、ロータリー耕により概ね20cm深に全層施肥し、白黒ダブルマルチを施した。窒素施肥量は櫻井ら (2013b) の窒素施肥対応を参考に全試験区  $120\text{ kg-N ha}^{-1}$  とした。魚かすの成分組成は表4-2-3の通りである。リン酸施肥量は  $120\text{ kg-P}_2\text{O}_5\text{ ha}^{-1}$ 、カリ施肥量は  $140\text{ kg-K}_2\text{O ha}^{-1}$  で、それぞれリン酸質グアノ、天然硫酸カリを施用することで不足するリン酸、カリ分を補充した。ガラス温室内で育苗した苗を栽植密度  $55556\text{ 株 ha}^{-1}$  (条間60cm, 株間30cm) にて5月下旬に定植し、7月上旬に収穫した。

##### (3) 転換後に相当する期間の耕種概要 (試験3, 4年目)

有機栽培転換後に相当する試験3年目にスイートコーン (*Zea mays* L.) 「味来390」、4年目にレタス「エムラップ231」を全試験区で栽培することで、緑肥導入に伴う生産力向上効果を評価した。

スイートコーン栽培にあたっては、播種のおよそ1週間前になたね油かすを全面に散布した後、ロータリー耕により概ね20cm深に全層施肥し、グリー

ンマルチを施した。窒素施肥量は櫻井ら (2013b) の窒素施肥対応を参考に全試験区 120 kg-N ha<sup>-1</sup> とした。なたね油かすの成分組成は表 4-2-3 の通りである。リン酸施肥量は 150 kg-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup>、カリ施肥量は 130 kg-K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup> で、それぞれリン酸質グアノ、天然硫酸カリを施用することで不足するリン酸、カリ分を補充した。栽植密度 38095 株 ha<sup>-1</sup> (条間 75 cm, 株間 35 cm) にて 5 月下旬に播種し、8 月中旬に収穫した。なお、レタス栽培は先述の (2) と同様である。

2) 調査および分析方法

(1) 収量および窒素吸収量

緑肥の収量は、すき込み直前の地上部 0.25 m<sup>2</sup> 相当刈り取り、70 °C で 72 時間以上乾燥した乾物収量とした。なお、試験区 4 の乾物収量について、試験 1 年目は刈り払った 2 回の合計量、試験 2 年目は刈り払った 1 回とすき込み直前の地上部の合計量とした。野菜類の収量は販売可能な規格内収量とし、スイートコーンは包葉付 1 穂重 300 g 以上の雌穂、レタスは 1 球重 450 g 以上の結球部とした (花・野菜技術センター, 2020)。

窒素吸収量は部位別の窒素含有率を分析し、これに部位別乾物重を乗じその合計とした。なお、緑肥は全地上部を、野菜類は収穫部位とその他の部位を乾

燥・粉碎し、硫酸一過酸化水素分解法 (水野・南, 1980) で灰化後、インドフェノール法により窒素含有率を定量した (Dorich and Nelson, 1983)。

(2) 土壌分析

熱水抽出性窒素は有機栽培転換後に相当する試験 3, 4 年目の施肥前 (5 月) に、採土器で採取した作土 (0~20 cm) を分析試料とした。風乾試料 10 g に脱塩水 100 mL を加え、オートクレーブにより 105 °C で 1 時間加熱後放冷し、No.5C のろ紙でろ過して抽出液を得た。抽出液中の有機態窒素を硫酸一過酸化水素分解法 (水野・南, 1980) により分解し、その分解液中のアンモニア態窒素をインドフェノール法 (Dorich and Nelson, 1983) で定量し、これを熱水抽出性窒素とした。その他の土壌理化学性については北海道立総合研究機構農業研究本部 (2012) に従った。

畑土壌における微生物活性の指標である α-グルコシダーゼ活性は、試験 4 年目のレタス栽培前の作土を分析試料とし、4-Methylumbelliferyl-α-D-glucoside を基質とする蛍光法により測定した (小野寺ら, 2004)。

(3) 統計解析

得られたデータの統計解析には JMP14 (SAS Institute Japan) を用い、Tukey-Kramer 法により検定した。

これらの肥料は全量基肥施用とした。

表 4-2-1 供試圃場の土壌理化学性 (2011 年)

層位	深さ (cm)	硬度 <sup>1)</sup>	土性 <sup>2)</sup>	容積重 (g L <sup>-1</sup> )	pH (H <sub>2</sub> O)	熱水抽出性窒素 (mg kg <sup>-1</sup> )	有効態リン酸 <sup>3)</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	交換性塩基 (mg kg <sup>-1</sup> )		
								K <sub>2</sub> O	MgO	CaO
1	0 ~ 23	9	L	780	6.0	47	267	324	345	1013
2	23 ~ 47	23	CL	1520	6.6	39	276	254	1280	1589
3	47 ~	21	CL	1500	6.7	42	259	228	1261	1478

<sup>1)</sup> 山中式硬度計 (mm). <sup>2)</sup> 国際法. <sup>3)</sup> トルオーグ法.

表 4-2-2 試験区一覧

試験区	試験	転換期間に相当										転換後に相当		
		年次	1年目(2011年)					2年目(2012年)					3年目(2013年)	4年目(2014年)
			月	5	6	7	8	9	10	~	5	6		
1 緑肥無作付区 (対照区)	緑肥への窒素供給	—	レタス <sup>2)</sup>					レタス <sup>2)</sup>					スイートコーン <sup>1)</sup>	レタス
2 後作+後作区	鶏ふん区堆肥区	レタス <sup>2)</sup>	鶏堆肥	ヘアリーベッチ						レタス <sup>2)</sup>	鶏堆肥	ヘアリーベッチ		
3 休閑+後作区	鶏ふん区堆肥区	鶏堆肥	アカクローバ					レタス <sup>2)</sup>	鶏堆肥	ヘアリーベッチ				
4 休閑2か年区	鶏ふん区堆肥区	鶏堆肥	アカクローバ					鶏堆肥	1年目ですき込まない					

①: 鶏ふん堆肥の施用時期 ②: 牛ふん麦稈堆肥の施用時期

<sup>1)</sup> 窒素施肥量 120 kg ha<sup>-1</sup> (なたね油かす) <sup>2)</sup> 窒素施肥量 120 kg ha<sup>-1</sup> (魚かす)

表 4-2-3 鶏ふん堆肥, 牛ふん麦稈堆肥, 魚かす, なたね油かすの成分組成<sup>1)</sup>

資材名	T-N	T-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	T-K <sub>2</sub> O	C/N比
	(g kg <sup>-1</sup> )			
鶏ふん堆肥	51.0	39.8	29.1	5.4
牛ふん麦稈堆肥	5.3	7.8	13.8	8.7
魚かす	70.8	55.1	16.0	4.5
なたね油かす	60.8	38.4	21.4	5.6

<sup>1)</sup> 現物あたりで各年の平均値.

### 3. 結果

#### 1) 転換期間に相当する期間の作物生育

緑肥の乾物収量は、試験1年目でヘアリーベッチ(試験区2)が1.9~2.3 Mg ha<sup>-1</sup>、アカクロバ(試験区3, 4)が4.8~6.4 Mg ha<sup>-1</sup>であった(表4-2-)。また、試験2年目ではヘアリーベッチ(試験区2, 3)が1.4~2.3 Mg ha<sup>-1</sup>、アカクロバ(試験区4)が4.7~7.1 Mg ha<sup>-1</sup>と、アカクロバはヘアリーベッチよりも乾物収量が多い傾向で、窒素吸収量も同様であった(表4-2-5)。試験2年目におけるレタスの収量は、統計的な有意差はないものの試験区1に比べて、試験区2, 3でやや増加する傾向であった。

なお、試験1, 2年目を通して緑肥の乾物収量およびレタスの収量は、本道での標準的な収量水準(ヘアリーベッチ1.5~3.0 Mg ha<sup>-1</sup>、アカクロバ4.0~7.0 Mg ha<sup>-1</sup>、レタス20 Mg ha<sup>-1</sup>、北海道農政部, 2004; 北海道農政部, 2020)を概ね確保したことから、これらの生育は順調であったと判断された(表4-2-4, 4-2-5)。

#### 2) 転換後に相当する期間の作物生育と土壌環境

スイートコーンを栽培した試験3年目では緑肥導入による増収効果が大きく、試験区3, 4は試験区1より有意に増収し、窒素吸収量も同様の傾向であった(表4-2-6)。試験区2は統計的な有意差はないものの、試験区1よりも概ね15%増収した。試験4年目のレタス(表4-2-7)を含めた収量比の2カ年平均で、試験区2, 3, 4の鶏ふん区では試験区1よりそれぞれ10, 20, 30%程度増収した(表4-2-8)。また、堆肥区は鶏ふん区に比べて6ポイント程度増収した。

転換期間における緑肥導入は転換後の熱水抽出性窒素を高め、特に、アカクロバを2年間継続して栽培した試験区4ではその傾向が顕著であった(表4-2-8)。試験4年目における試験区2, 3, 4の鶏ふん区における熱水抽出性窒素は試験区1よりそれぞれ7.4, 10.4, 16.5 mg kg<sup>-1</sup>高く、さらに堆肥区では平均6 mg kg<sup>-1</sup>程度向上し、熱水抽出性窒素の一層の向上をもたらした。α-グルコシダーゼ活性も緑肥の導入によって上昇する傾向で、試験区4では試験区1より有意に向上した(図4-2-1)。

表4-2-4 転換期間に相当する期間の作物生育(試験1年目)

試験区	緑肥	緑肥への窒素供給	レタス			緑肥 <sup>1)</sup>			C/N比	
			規格内収量 (Mg ha <sup>-1</sup> )	窒素含有率(g kg <sup>-1</sup> )		窒素吸収量 (kg ha <sup>-1</sup> )	乾物収量 (Mg ha <sup>-1</sup> )	窒素含有率 (g kg <sup>-1</sup> )		窒素吸収量 (kg ha <sup>-1</sup> )
			結球	外葉						
1	緑肥無作付区 (対照区)		27.7 a <sup>2)</sup>	28.9 a	25.6 a	41 a	-	-	-	-
2	後作+後作区	鶏ふん区	27.6 a	27.5 a	25.1 a	42 a	2.3 c	23.4 a	53 b	16 a
		堆肥区	28.4 a	28.0 a	25.1 a	42 a	1.9 c	23.3 a	43 b	16 a
3	休閑+後作区	鶏ふん区	-	-	-	-	4.8 b	23.6 a	114 a	16 a
		堆肥区	-	-	-	-	5.6 ab	23.7 a	133 a	17 a
4	休閑2カ年区 <sup>3)</sup>	鶏ふん区	-	-	-	-	5.4 ab	23.0 a	124 a	17 a
		堆肥区	-	-	-	-	6.4 a	21.9 a	140 a	18 a

<sup>1)</sup> 試験区2はヘアリーベッチ、試験区3および4はアカクロバ。

<sup>2)</sup> 同一の英文字を付した数値間には、Tukey-Kramer法による有意差がない(p<0.05)。

<sup>3)</sup> 刈り払った2回の合計量。

表4-2-5 転換期間に相当する期間の作物生育(試験2年目)

試験区	緑肥	緑肥への窒素供給	レタス			緑肥 <sup>1)</sup>			C/N比	
			規格内収量 (Mg ha <sup>-1</sup> )	窒素含有率(g kg <sup>-1</sup> )		窒素吸収量 (kg ha <sup>-1</sup> )	乾物収量 (Mg ha <sup>-1</sup> )	窒素含有率 (g kg <sup>-1</sup> )		窒素吸収量 (kg ha <sup>-1</sup> )
			結球	外葉						
1	緑肥無作付区 (対照区)		33.2 a <sup>2)</sup>	27.1 a	29.4 a	63 b	-	-	-	-
2	後作+後作区	鶏ふん区	34.2 a	30.1 a	31.2 a	72 ab	1.4 c	40.1 a	58 b	9 b
		堆肥区	35.5 a	31.7 a	30.5 a	73 ab	1.8 c	40.9 a	73 b	9 b
3	休閑+後作区	鶏ふん区	35.4 a	31.0 a	32.2 a	74 ab	1.8 c	41.1 a	76 b	9 b
		堆肥区	36.7 a	31.3 a	31.2 a	77 a	2.3 bc	38.1 a	90 b	10 b
4	休閑2カ年区 <sup>3)</sup>	鶏ふん区	-	-	-	-	4.7 b	43.8 a	204 a	19 a
		堆肥区	-	-	-	-	7.1 a	35.7 a	253 a	19 a

<sup>1)</sup> 試験区2および3はヘアリーベッチ、試験区4はアカクロバ。

<sup>2)</sup> 同一の英文字を付した数値間には、Tukey-Kramer法による有意差がない(p<0.05)。

<sup>3)</sup> 刈り払った1回とすき込み直前の地上部の合計量。

表 4-2-6 転換後に相当する期間の作物生育（試験 3 年目）

試験区		スイートコーン(試験3年目)				
緑肥	緑肥への窒素供給	規格内収量		窒素含有率(g kg <sup>-1</sup> )		窒素吸収量(kg ha <sup>-1</sup> )
		(Mg ha <sup>-1</sup> )	比	雌穂	茎葉	
1	緑肥無作付区(対照区)	11.9 d <sup>1)</sup>	(100)	16.1 a	9.5 b	109 d
2	後作+後作区 鶏ふん区	13.2 cd	112	16.4 a	11.8 ab	132 bcd
	堆肥区	14.1 bcd	119	15.6 a	12.7 ab	136 bcd
3	休閑+後作区 鶏ふん区	15.2 bc	128	17.3 a	14.2 a	158 abc
	堆肥区	15.4 abc	130	17.3 a	15.1 a	164 abc
4	休閑2ヵ年区 鶏ふん区	16.7 ab	141	17.4 a	14.5 a	156 ab
	堆肥区	18.1 a	153	17.5 a	15.9 a	192 a

<sup>1)</sup> 同一の英文字を付した数値間には、Tukey-Kramer法による有意差がない ( $p < 0.05$ ) .

表 4-2-7 転換後に相当する期間の作物生育（試験 4 年目）

試験区		レタス(試験4年目)				
緑肥	緑肥への窒素供給	規格内収量		窒素含有率(g kg <sup>-1</sup> )		窒素吸収量(kg ha <sup>-1</sup> )
		(Mg ha <sup>-1</sup> )	比	結球	外葉	
1	緑肥無作付区(対照区)	21.3 c <sup>1)</sup>	(100)	25.0 a	23.6 a	55.1 d
2	後作+後作区 鶏ふん区	22.5 bc	105	26.7 a	24.1 a	55.7 cd
	堆肥区	22.8 bc	107	28.9 a	24.2 a	59.4 abcd
3	休閑+後作区 鶏ふん区	24.2 abc	114	28.2 a	24.7 a	62.7 ab
	堆肥区	24.9 ab	117	27.4 a	24.6 a	62.3 abc
4	休閑2ヵ年区 鶏ふん区	24.7 ab	116	28.4 a	25.7 a	63.2 ab
	堆肥区	26.7 a	125	29.5 a	25.4 a	65.8 a

<sup>1)</sup> 同一の英文字を付した数値間には、Tukey-Kramer法による有意差がない ( $p < 0.05$ ) .

表 4-2-8 転換後に相当する期間の熱水抽出性窒素（試験 3~4 年目）

試験区		熱水抽出性窒素(mg kg <sup>-1</sup> )			
緑肥	緑肥への窒素供給	試験3年目		試験4年目	
		1	緑肥無作付区(対照区)	42.2 c	
2	後作+後作区 鶏ふん区	49.0 bc	(6.8)	43.4 cd	(7.4)
	堆肥区	57.0 b	(14.8)	48.8 bc	(12.8)
3	休閑+後作区 鶏ふん区	48.9 bc	(6.7)	46.4 bcd	(10.4)
	堆肥区	57.3 b	(15.1)	50.8 bc	(14.8)
4	休閑2ヵ年区 鶏ふん区	67.5 a	(25.3)	52.5 ab	(16.5)
	堆肥区	72.9 a	(30.7)	60.5 a	(24.5)

<sup>1)</sup> ( )は、緑肥無作付区(対照区)に対する増加量を示す.

<sup>2)</sup> 同一の英文字を付した数値間には、Tukey-Kramer法による有意差がない ( $p < 0.05$ ) .

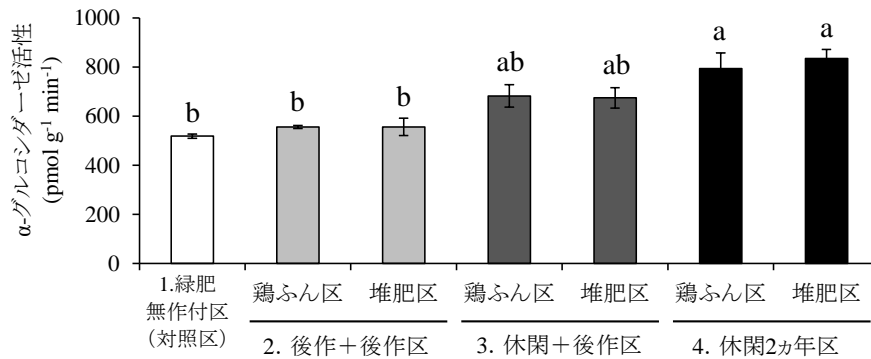


図 4-2-1 転換後に相当する期間の  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性 (試験 4 年目)

- 1) 同一の英文字を付した数値間には, Tukey-Kramer 法による有意差がない ( $p < 0.05$ ).
- 2) エラーバーは標準誤差.

#### 4. 考察

##### 1) 緑肥導入に伴う生産性向上の要因

転換期間に相当する 2 ヶ年に休閒および後作緑肥を導入した試験区 2, 3, 4 では, 転換後の野菜類が 10~30%増収し生産性の向上が認められた(表 4-2-6, 4-2-7). この一因として熱水抽出性窒素の向上に伴う窒素供給量の増加がある. 本試験で供試したアカクロバ, ヘアリーベッチはいずれもマメ科緑肥で, 窒素施肥をあまり必要としない上に, 根粒菌との共生により空中窒素の固定を行うため, それらをすき込んだ場合には窒素供給源として有益である. 一般に, 有機物中の有機態窒素は直接土壌中の可給態窒素とは成りえず, 微生物バイオマスを一旦経由すると考えられている(坂本, 1998). よって, これらマメ科緑肥に由来する有機態窒素も土壌生物・微生物によって分解, 低分子化されることで熱水抽出性窒素の給源になったと推察される. また, その有機態窒素の一部は無機化によって無機態窒素まで分解される. 本試験では有機栽培への転換後における生産性を評価する観点から, スイートコーン, レタスへの窒素施肥量は全試験区均一とし, 緑肥すき込みに伴って放出される窒素分を考慮しなかったが, マメ科緑肥のすき込みに伴う窒素放出が生じていることは, 野菜類の窒素吸収量からも推察されるところである(表 4-2-6, 4-2-7).

緑肥導入に伴うもう一つの増収要因として  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性の向上がある.  $\alpha$ -グルコシダーゼは糖の  $\alpha$ -1,4-グルコシド結合の加水分解を司る酵素(田上, 2014)で, 細菌(Guffanti and Corpe, 1976; Li and Chan, 1983; Morimoto *et al.*, 2008)や糸状菌(Pazur and French, 1951; Yamasaki *et al.*, 1973; Kita *et al.*, 1991)に幅広く存在する. また,  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性は土壌の養分状態や透排水性などを総体的に反映する指標として本道の慣行栽培畑を対象に標準値が設定されてお

り(奥村ら, 1996; 小野寺ら, 2004), 有機栽培においても土壌微生物活性の総体的な指標として活用可能である(櫻井ら, 2011). 本試験では緑肥の導入により  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性は上昇する傾向で, 特に乾物収量が多かった試験区 4 では試験区 1 より有意に上昇した(図 4-2-1). 養分供給の円滑化を担う土壌微生物の活動が高まることは, 養分供給を有機物に依存する有機栽培においてはとりわけ有益と考えられる.

##### 2) 有機栽培畑への転換を前提とした緑肥導入モデル

土壌中の可給態窒素の起源は主に微生物バイオマスに由来すると考えられている(坂本, 1998). 先述したように, 有機物中の有機態窒素は直接土壌中の可給態窒素とは成りえず, 微生物バイオマスを一旦経由するため, 熱水抽出性窒素の主要成分であるタンパク質などの易分解性の有機態窒素(斎藤, 1988)も微生物菌体に由来すると考えるのが自然である. 緑肥の導入による熱水抽出性窒素の向上は, 緑肥が土壌微生物の基質として作用した後, 微生物菌体に由来する易分解性有機態窒素が増加したことを意味するが, 特にアカクロバでは熱水抽出性窒素への効果が高かった. アカクロバはヘアリーベッチよりも窒素吸収量が多く, そもそも窒素供給量の相違が大きき要因ではあるが, 植物残渣の無機化はそれ自体の化学成分組成によって変動し, その多くは C/N 比の低いものほど窒素無機化が進行しやすい(今野・菊地, 1996). 本試験でアカクロバの C/N 比はヘアリーベッチよりも高い傾向であった(表 4-2-5)ことから, アカクロバでは窒素無機化が緩慢となったことでより多くの易分解性有機態窒素が残存したものと考えられた. このことは, ヘアリーベッチすき込み後の分解がアカクロバより早く進行したことを指摘した鄭ら(2008)の報告からも推察されるところ

である。なお、佐藤ら (2019) は鋤き込まれたヘアリーベッチ由来窒素の半分以上は土壌に残存したことを重窒素トレーサー法により確認した上で、ヘアリーベッチの栽培は窒素肥沃度の維持、向上に有効な手法と言及している。本試験でも 2 ヶ年にわたってヘアリーベッチを導入した試験区 2 において熱水抽出性窒素が上昇する傾向を示し (表 4-2-8)、ヘアリーベッチについてもアカクロバよりも低いものの易分解性有機態窒素の給源として一定の効果を有していることが示唆された。

このように、緑肥の種類によって窒素肥沃度への効果は異なるが、その導入にあたっては実際の営農状況を加味する必要がある。休閒緑肥の導入は休閒した収益作物からの収入がなくなる一方で、①春先および収穫時の農作業が分散できる、②連作障害回避のための輪作年限を延長できる、③緑肥作物の生育期間を確保しやすく最大限の乾物生産が可能となる、④そのため、緑肥のもつ土づくりなどの効果を最大限引き出せる可能性がある、等の長所がある。また、後作緑肥は休閒緑肥ほどの乾物収量が得られないことから、土づくりとしての効果はやや劣るものの、収益作物の収穫後の栽培となるため収益作物からの収入が確保されるなど営農上のメリットがある。生産者が休閒・後作緑肥におけるこれらの長所や短所を考慮した上で、それぞれの営農形態に適応する緑肥の作付体系を選択できるよう、これまでの結果を基に、有機栽培畑への転換を前提とした緑肥導入モデルを表 4-2-9 に提案する。

モデル A は、試験区 2 に相当し収益性の確保に重点を置いた作付体系である。試験 4 年目における試験区 1 との熱水抽出性窒素の差 (表 4-2-8) を勘案すると、転換開始時の熱水抽出性窒素が  $45 \text{ mg kg}^{-1}$  程度であれば、転換後に有機栽培露地野菜畑の土壌窒素診断基準値の下限である熱水抽出性窒素  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  への到達が見込める。後作緑肥は休閒緑肥ほどの乾物生産が得られないことから窒素肥沃度への効果はやや劣るが、収益作物の収穫後に緑肥を栽培するため収入が確保されるなどのメリットがある。なお、データは示していないが後作緑肥としてエンバクや混播 (ヘアリーベッチとエンバクの混合播種) を導入してもヘアリーベッチと同程度の窒素肥沃度向上効果が見込める。

モデル C は、試験区 4 に相当し、アカクロバを 1 年目の春に播種したのち 2 年目の秋まですき込まないことで、転換期間の作業を軽減するとともに転換後の生産力向上に重点を置いた作付体系である。転換開始時の熱水抽出性窒素  $35 \text{ mg kg}^{-1}$  程度が導入の目安となる。アカクロバの代わりにクリムソン

クローバやエンバクを導入することもできるが、これらは越冬不能で窒素吸収量もアカクロバに劣る (櫻井, 2015) ことから、窒素肥沃度の上昇程度はアカクロバより小さい。

モデル B は、試験区 3 に相当しモデル A と C の中間的な作付体系で、転換開始時の熱水抽出性窒素  $40 \text{ mg kg}^{-1}$  程度が導入の目安となる。なお、アカクロバの代わりにクリムソンクローバやエンバクを、ヘアリーベッチの代わりにエンバクや混播を導入することも可能である (櫻井, 2015)。

本試験では緑肥への窒素供給として鶏ふん堆肥または堆肥を施用したが、いずれのモデルでも堆肥を施用した場合には鶏ふん堆肥よりも熱水抽出性窒素が  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  程度高まった (表 4-2-8)。堆肥には植物性有機物に由来するリグニンなどの難分解性成分が多く含まれ (樋口・栗原, 1978)、無機化までに至る分解が緩慢であることから、窒素肥沃度の給源として有効に作用したと考えられた。一方、鶏ふん堆肥は家畜ふんの中では比較的速効性の資材に位置付けられ (村上ら, 2007)、その窒素含有量が高まるほど無機化も速やかになる (日置ら, 2001; 棚橋・矢野, 2004)。本試験で施用した鶏ふん堆肥は窒素含有量が  $51.0 \text{ g-N kg}^{-1}$  と鶏ふん堆肥の中でも高い部類であるため、無機化が速効的である反面窒素肥沃度に対する上昇効果は小さくなったと推察された。このような熱水抽出性窒素への効果を鑑みて、転換期間に堆肥を施用する場合には導入の目安となる熱水抽出性窒素を  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  低く見積もることとした。

### 3) 本モデル活用上の留意点

マメ科緑肥は透排水性の影響を強く受けるため (北海道農政部, 2004)、排水性不良等により乾物収量が十分確保されない場合には、表 4-2-9 に示す熱水抽出性窒素の上昇程度に達しない恐れがある。また、本試験の供試圃場と比較して容積重が大きく異なる圃場では土壌の重量当たりの乾物収量も変動するため、表 4-2-9 の熱水抽出性窒素の上昇程度との差が大きくなると想定される。特に、粘土含量の高い細粒質土壌では容積重が大きいことに加え、透排水性が不良である場合が多いことから、熱水抽出性窒素の上昇程度は小さくなる恐れがある。

本試験では転換開始から 5 年目以降の窒素肥沃度については未検討である。熱水抽出性窒素の維持にはその給源となる緑肥や堆肥などの有機物供給が必要であるが、堆肥を施用する場合には露地野菜畑の地力維持に必要とされる  $20 \text{ Mg ha}^{-1}$  程度を当面の施用量とし、環境面への影響を考慮して  $30 \text{ Mg ha}^{-1}$  程度を上限とする (櫻井ら, 2018a; 北海道農政部, 2020)。

表 4-2-9 有機栽培畑への転換を前提とした緑肥導入モデル

モデル	・特徴 ・導入の目安 <sup>1,2)</sup> (熱水抽出性窒素)	転換期間中に相当				転換後に相当(3,4年目)	
		1年目		2年目		熱水抽出性窒素の上昇程度 <sup>2)</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	作物の増収程度 <sup>3)</sup>
A	後作緑肥＋ 後作緑肥 ・収益性の確保 ・45 mg kg <sup>-1</sup> 程度	収益作物	ヘアリーベッチ・ 混播・エンバク	収益作物	ヘアリーベッチ・ 混播・エンバク	小(5)	小(10%)
B	休閒緑肥＋ 後作緑肥 ・AとCの中間的モデル ・40 mg kg <sup>-1</sup> 程度	アカクロバ・クリムゾンローバ・エンバク		収益作物	ヘアリーベッチ・ 混播・エンバク	中(10)	中(20%)
C	休閒緑肥 (2年間) ・転換後の効果が大 ・35 mg kg <sup>-1</sup> 程度	アカクロバ(雑草発生やアカローバの種子落下を防ぐため、適宜掃除刈りする)・クリムゾンローバ <sup>4)</sup> ・エンバク <sup>4)</sup>				大(15)	大(30%)

<sup>1)</sup> 有機栽培露地野菜畑の土壌窒素診断基準値(50~70 mg kg<sup>-1</sup>)への到達が見込まれる熱水抽出性窒素レベル、排水性不良等で緑肥の生育量が十分得られない場合、基準値に達しない恐れがある。

<sup>2)</sup> 転換期間中に堆肥を施用する場合、熱水抽出性窒素はさらに5 mg kg<sup>-1</sup>程度上昇するため、導入の目安となる熱水抽出性窒素を各モデルで5 mg kg<sup>-1</sup>低く見積もる。

<sup>3)</sup> 転換期間中に堆肥を施用した場合、さらに5%程度増収する。なお、( )内はスイートコーン(3年目)、レタス(4年目)を付し、緑肥すき込みに伴う窒素減肥を行わない場合の値である。

<sup>4)</sup> クリムゾンローバ・エンバクは越冬不能で、2年目に再播種が必要である。また、転換後の生産力はアカクロバより劣る。

## 5. 要約

有機栽培に取り組んで間もない圃場では窒素肥沃度が十分に高くなっていないため低収となることが多い。播種または植付けの時点から遡り2年以上、化学肥料や化学合成農薬を使用しない転換期間にマメ科緑肥を栽培することで、有機栽培畑として望ましい窒素肥沃度(熱水抽出性窒素 50~70 mg kg<sup>-1</sup>)に達するための方策を圃場試験で検討した。

- 1) 転換期間に相当する1, 2年目に後作緑肥(ヘアリーベッチ)または休閒緑肥(アカクロバ)を栽培することにより、熱水抽出性窒素は5~15 mg kg<sup>-1</sup>程度上昇した。この結果は、緑肥が熱水抽出性窒素の主成分である易分解性有機態窒素の給源として有効に作用したことを示している。
- 2) それに伴い、有機栽培転換後に相当する3, 4年目に栽培した野菜類も10~30%程度増収した。また、畑土壌における微生物活性の指標である $\alpha$ -グルコシダーゼ活性は緑肥のすき込み量に応じて上昇する傾向であった。
- 3) 以上から、有機栽培への転換期間に緑肥を導入することにより窒素肥沃度を高めるモデルを提案した。



### 第3節 有機栽培畑におけるリン酸施肥対応

#### 1. はじめに

有機農産物に対する消費者からの信頼を確固たるものとするためには、有機農産物を安定的に供給することが重要である。また、農家経営にとっても収量の高位安定化は必須である。これらに対応するため、露地野菜畑における窒素肥沃度の目安を示すと共に、カボチャ、レタス、スイートコーン、タマネギ、パレイショを対象とした窒素施肥対応が設定されている（第3章第2節関連論文（櫻井ら，2013b）；第3章第3節関連論文（櫻井ら，2016）；第3章第4節関連論文（櫻井ら，2018b））一方で、リン酸の施肥対応は未設定である。

本節では、有機栽培露地野菜畑のリン酸肥沃度に応じたリン酸施肥量の増減肥法（施肥対応）を検討した。

#### 2. 試験方法

##### 1) 供試圃場および耕種概要

###### (1) 供試圃場

2015年からの4カ年、北海道立総合研究機構中央農業試験場内の非火山性土（褐色低地土；リン酸吸収係数450~1070）および火山性土（同1520）の計6圃場でスイートコーン（*Zea mays* L.）「ゴールドラッシュ」、レタス（*Lactuca sativa* L.）「エムラップ231」を供試したリン酸用量試験を実施した。本圃場は有機JASの認証を取得していないが、栽培管理は有機JASに準拠し、化学肥料や化学合成農薬を不使用とした（農林水産省，2017）。なお、後述する野菜類の栽培では、病害虫の発生により作物の正常な生育が妨げられる恐れがある場合、有機JASに適合する農薬を必要最小限使用した。また、耕うん機による整地および手取りにより除草し、作物と雑草による養分競合が起きないように管理した。

###### (2) リン酸施肥量

慣行栽培における施肥量の目安を示した北海道施

肥ガイド2020（北海道農政部，2020；以下，施肥ガイド）を基に、各有機質資材の全リン酸ベースで設定した。

① 有効態リン酸（トルオーグ法）600 mg kg<sup>-1</sup>未満  
施肥ガイドのリン酸レベル「やや低い」～「高い」に相当する水準である。施肥ガイドに従い、各圃場の有効態リン酸に基づいて求めたリン酸施肥量に対する、各試験区のリン酸施肥量の割合を「リン酸充足率」と定義し（八木ら，2014），充足率50～250%以上の4水準を設定した（表4-3-1）。なお，充足率100%は施肥ガイド相当である。

② 有効態リン酸600 mg kg<sup>-1</sup>以上  
施肥ガイドのリン酸レベル「極めて高い」に相当する水準である。施肥ガイドではリン酸施肥が不要となる水準であるが，有機質資材には少なからずリン酸が含まれており無リン酸区の設定は困難であることから，リン酸施肥量を最小限とした「少」を含め，3水準設定した（表4-3-2）。

###### (3) リン酸調整源

有機質資材はリン酸のみならず窒素も含まれているため，リン酸施肥量の設定にあたっては各資材の窒素，リン酸比（N/P比）に配慮する必要がある。本試験では牛ふん堆肥および植物質資材の組み合わせ（大豆油かす，なたね油かす，脱脂米ぬか）の2パターンを設けた。

##### 2) 調査および分析方法

###### (1) 生育初期および収量調査

生育初期については，定植後4週間後を目安に地上部を刈り取り，70℃で72時間以上乾燥して乾物重を測定した。また，収量は販売可能な規格内収量とし，スイートコーンは包葉付1穂重300g以上の雌穂，レタスは1球重450g以上の結球部とした（花・野菜技術センター，2020）。

###### (2) 統計解析

得られたデータの統計解析にはJMP14（SAS Institute Japan）を用いた。

表4-3-1 リン酸施肥量 (kg ha<sup>-1</sup>)

作物名	リン酸充足率	有効態リン酸 (mg kg <sup>-1</sup> )			
		やや低い (~150)	基準値 (150~300)	やや高い (300~450)	高い (450~600)
スイートコーン	50%	100	75	50	-
	100%(施肥ガイド相当)	200	150	100	50
	170%	333	250	167	83
	250%以上	-	375	250	250
レタス	50%	90	60	40	-
	100%(施肥ガイド相当)	180	120	80	40
	170%	300	200	133	67
	250%以上	-	300	200	200

表 4-3-2 リン酸施肥量 (kg ha<sup>-1</sup>)

作物名	リン酸施肥量	有効態リン酸 (mg kg <sup>-1</sup> )
		極めて高い (600~)
スイート コーン	少(施肥ガイド相当)	最小限
	中	83
	多	250
レタス	少(施肥ガイド相当)	最小限
	中	67
	多	200

3. 結果

1) 有効態リン酸 600 mg kg<sup>-1</sup> 未満

リン酸調整源が牛ふん堆肥の場合、非火山性土のリン酸充足率 50%、100%、170%、250%以上における生育初期の乾物重比はそれぞれ 85、91、95、99 で、充足率 50%と 250%以上の間で有意差が認められた。火山性土のリン酸充足率 50%、100%、170%における生育初期の乾物重比はそれぞれ 81、90、100 で、充足率 50%と 170%の間で有意差が認められた。リン酸調整源が植物質資材の場合、非火山性土のリン酸充足率 50%、100%、170%、250%以上における生育初期の乾物重比はそれぞれ 79、89、94、97 で、充足率 50%と 170%、250%以上の間で有意差が認め

られた。火山性土のリン酸充足率 50%、100%、170%における生育初期の乾物重比はそれぞれ 85、93、97 で、充足率間の乾物重比に有意差は認められなかった (図 4-3-1)。

リン酸調整源が牛ふん堆肥の場合、非火山性土のリン酸充足率 50%、100%、170%、250%以上における収量比はそれぞれ 87、95、98、96 で、充足率 50%では有意に収量が低下した。火山性土のリン酸充足率 50%、100%、170%における収量比はそれぞれ 83、93、100 で、充足率 50%では有意に収量が低下した。リン酸調整源が植物質資材の場合、非火山性土のリン酸充足率 50%、100%、170%、250%以上における収量比はそれぞれ 84、95、99、95 で、充足率 50%では有意に収量が低下した。火山性土のリン酸充足率 50%、100%、170%における収量比はそれぞれ 90、96、100 で、リン酸充足率間に有意差は認められなかった (図 4-3-2)。

以上から、有効態リン酸 600 mg kg<sup>-1</sup> 未満では、リン酸調整源を問わずリン酸充足率 100%、170%、250%以上の間で生育初期の乾物重、収量に有意差はなかった一方、充足率 50%では有意に低下する場合があった。

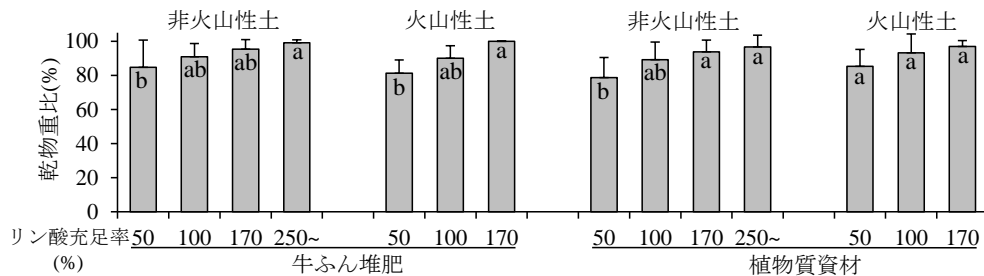


図 4-3-1 生育初期の乾物重に及ぼすリン酸充足率の影響 (2015~2018 年)

- 1) 乾物重比は、各試験年次の各圃場で最高となった試験区を 100 とした相対値の平均。
- 2) エラーバーは標準偏差。
- 3) 同一の英文字を付した数値間には、リン酸充足率間で Tukey-Kramer 法による有意差がない ( $p < 0.05$ )

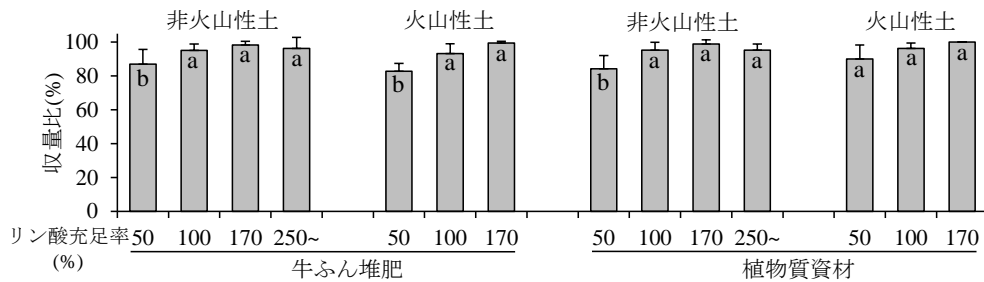


図 4-3-2 収量に及ぼすリン酸充足率の影響 (2015~2018 年)

- 1) 収量比は、各試験年次の各圃場で最高となった試験区を 100 とした相対値の平均。
- 2) エラーバーは標準偏差。
- 3) 同一の英文字を付した数値間には、リン酸充足率間で Tukey-Kramer 法による有意差がない ( $p < 0.05$ )。

2) 有効態リン酸 600 mg kg<sup>-1</sup> 以上

リン酸施肥量少, 中, 多における生育初期の乾物重比は牛ふん堆肥の場合, それぞれ 89, 88, 98 でリン酸施肥量間に有意差は認められなかった. 植物質資材ではそれぞれ 88, 97, 92 でリン酸施肥量間に有意差は認められなかった (図 4-3-3).

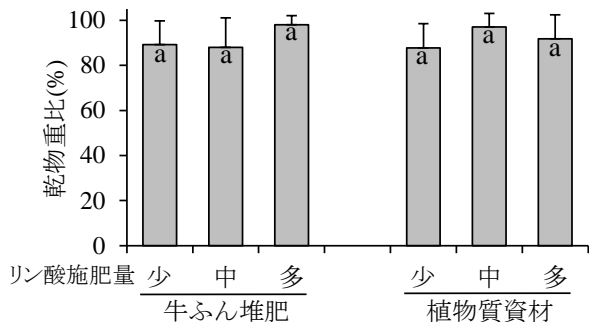


図 4-3-3 生育初期の乾物重に及ぼすリン酸施肥量の影響 (2015~2018年, 非火山性土)

- 1) 乾物重比は, 各試験年次の各圃場で最高となった試験区を 100 とした相対値の平均.
- 2) エラーバーは標準偏差.
- 3) 同一の英文字を付した数値間には, リン酸施肥量間で Tukey-Kramer 法による有意差がない ( $p < 0.05$ ).

リン酸施肥量少, 中, 多における収量比は牛ふん堆肥の場合, それぞれ 87, 91, 99 でリン酸施肥量間に有意差は認められなかった. 植物質資材ではそれぞれ 91, 94, 100 でリン酸施肥量間に有意差は認められなかった (図 4-3-4).

以上から, 有効態リン酸 600 mg kg<sup>-1</sup> 以上では, リン酸調整源を問わずリン酸施肥量を極力少なくしても生育初期の乾物重や収量は低下しなかった.

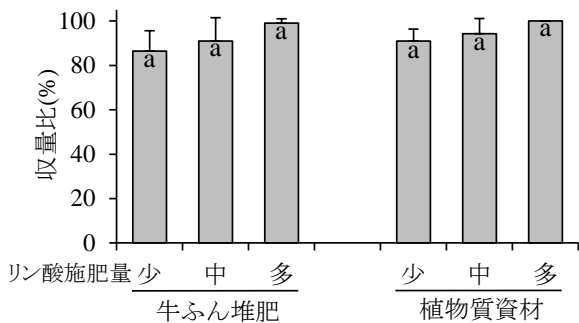


図 4-3-4 収量に及ぼすリン酸施肥量の影響 (2015~2018年, 非火山性土)

- 1) 収量比は, 各試験年次の各圃場で最高となった試験区を 100 とした相対値の平均.
- 2) エラーバーは標準偏差.
- 3) 同一の英文字を付した数値間には, リン酸施肥量間で Tukey-Kramer 法による有意差がない ( $p < 0.05$ ).

4. 考察

1) 施肥ガイドのリン酸施肥対応を適用する妥当性  
施肥ガイドに示されている作物への養分供給と収量, 環境負荷の関係を図 4-3-5 に示す.

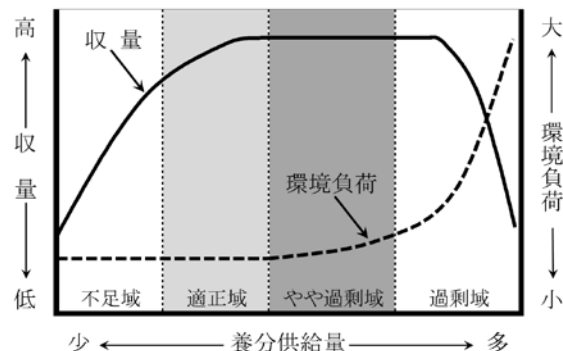


図 4-3-5 作物への養分供給と収量, 環境負荷の関係 (北海道農政部, 2020)

収量だけを目指るとすれば養分供給量は「やや過剰域」で管理することで確実性が増すが, 作物により吸収されない余分な養分は資源の無駄となり, 環境負荷のリスクを増大させる. 地域の有機物資源を活用し, かつ外部への環境負荷を最小限にとどめることを基本とする有機栽培にとって, 余剰養分の発生は最小限に抑えることが求められる. よって, 有機栽培における適正なリン酸施肥量についても, 収量性と環境面の両立が図られる「適正域」を探ることで設定しようとした.

栽培期間に相当する5月から8月までの平均気温 (中央農試) をみると, 2016年は平年並みであったが, 2015年は平年よりも0.2 °C低く, 2017年も0.3 °C低く, 2018年は0.7 °Cの大幅な低下であった. このように平年よりも気温が低い条件下でも, 有効態リン酸600 mg kg<sup>-1</sup>未満ではリン酸調整源を問わずリン酸充足率100%, 170%, 250%以上の間で収量に有意差はなかった (図4-3-2). また, 有効態リン酸600 mg kg<sup>-1</sup>以上ではリン酸調整源を問わずリン酸施肥量を極力少なくしても収量は低下しなかった (図4-3-4). リン酸の過剰施用は土壌へのリン酸蓄積を招くことで, 環境負荷はもちろんのこと微量元素欠乏や土壌病害の発生を助長する. このようなリン酸蓄積を抑制するためには, 収量が確保できる最小限のリン酸施肥量にするのが適当で, 資材コストの低減にも有効である.

以上から, 有機栽培露地野菜畑におけるリン酸施肥量の設定には, 施肥ガイドのリン酸施肥対応を適用するのが妥当であり, 施肥ガイドでリン酸施肥が不要となる水準では, 極力少ないリン酸施肥量で十

分と判断した。ところで、火山性土と非火山性土との間ではリン酸吸着特性が大きく異なるが、本試験では土壌区分を問わず施肥ガイドベースのリン酸施肥量で収量が概ね上限に達した(図4-3-2, 4-3-4)ことから、土壌区分を特段設ける必要性は認められなかった。この要因として、堆肥などの有機物は土壌と接触する面積が小さく、安定した可給態としてリン酸を土壌中に保持できること(西尾, 2019)、堆肥や作物残渣等に由来する溶存腐植物質や低分子有機酸が土壌中に存在することで、リン酸の吸着抑制効果と作物への吸収促進効果を高めたこと(谷, 2021)が考えられた。

## 2) 施肥ガイドを適用するにあたっての留意事項

### (1) 有機質資材の種類について

本試験では、リン酸調整源として牛ふん堆肥および植物質資材を用い、全リン酸ベースでの用量試験を実施した結果、リン酸調整源の間で生育初期の乾物重や収量の傾向に大きな相違はなかった(図4-3-1, 4-3-2, 4-3-3, 4-3-4)。これまでに、脱脂米ぬか、大豆油かす、なたね油かすなどの植物質資材のリン酸肥効は動物質資材と概ね同等であること(小野寺・中本, 2007)、牛ふん堆肥、鶏ふん堆肥、脱脂米ぬかのリン酸肥効は概ね同等であること(林, 2014)が報告されていることから、有機栽培露地野菜畑のリン酸施肥量の算出にあたって有機質資材の種類を問わないのが適当と判断された。なお、リン酸肥沃度が極めて低い圃場では有機質資材や土壌から供給される有効態リン酸の絶対量が不足して、作物生育に悪影響を及ぼすことも想定される。そのような圃場では、溶リンなど有機JASに適合したリン酸資材の施用によりリン酸肥沃度を予め高めることも手段の一つとして考えられる。

### (2) 作物の適用範囲について

本試験では、スイートコーンとレタスを供試したが、過去の窒素施肥試験で供試したカボチャ、タマネギ、パレイシヨについても施肥ガイドに準じたリン酸施肥量で、概ね収量が確保されている(第3章第2節関連論文(櫻井ら, 2013b); 第3章第3節関連論文(櫻井ら, 2016); 第3章第4節関連論文(櫻井ら, 2018b))。これら5作物は果菜類(スイートコーン, カボチャ)、葉茎菜類(レタス, タマネギ)、根菜類(パレイシヨ)に分類される。果菜類は栄養生長と生殖生長が同時に進行するのに対し、葉茎菜類や根菜類は栄養生長の後に生殖生長が進行するなど、野菜の分類によって養分吸収特性に特徴がある。

このように、様々な養分吸収特性を有する露地野菜を対象としても、施肥ガイドに準じたリン酸施肥量により収量性が確保されたことから、施肥ガイド

のリン酸施肥対応を露地野菜全般に適用しても特段支障ないと考えられた。なお、5作物(カボチャ, レタス, スイートコーン, タマネギ, パレイシヨ)以外の収量性は未検討であり、施肥ガイドの基準収量は慣行栽培を前提としたものであることに留意する必要がある。

## 5. 要約

有機栽培露地野菜畑のリン酸肥沃度に応じたリン酸施肥量の増減肥法(施肥対応)の設定を目的に、有機JASに準拠した広範なリン酸肥沃度の圃場でリン酸施肥試験を実施した。

- 1) リン酸供給源として動物質と植物質との間で、生育初期の乾物重や収量の傾向に大きな相違はなかった。また、慣行栽培における標準量相当のリン酸施肥量以上では生育初期の乾物重や収量に有意差は認められなかった。
- 2) 以上から、有機栽培露地野菜畑におけるリン酸施肥量の設定に北海道施肥ガイドのリン酸施肥対応が適用可能であった。施肥ガイドでリン酸施肥が不要となる水準では、極力少ないリン酸施肥量で足りる。なお、リン酸施肥量の算出にあたり有機質資材の種類は問わない。

## 第4節 施肥対応の総合化

### 1. はじめに

有機栽培は化学肥料の代わりに堆肥や有機質肥料などの有機質資材を施用するが、有機質資材の肥効は概して化学肥料よりも緩慢であるため、より確実な効果を求めて必要以上に資材を投入する傾向にある。実際、北海道内の有機栽培畑では熱水抽出性窒素や有効態リン酸、交換性カリなどの土壌養分が慣行栽培畑よりも蓄積している(桑原, 2012)。

そもそも、有機農業は農業生産に由来する環境への負荷を低減する農法(農林水産省, 2017)であり、土壌養分が過剰に蓄積しては生産の持続性が損なわれるだけでなく、余剰な養分が排出されて環境汚染

に繋がる。また、営農面ではコスト低減の観点からも好ましくない。有機質資材は1成分のみを含む単肥ではなく、2成分以上含む複合肥料に相当するため、窒素、リン酸、カリの施肥量を目標値に調整することが難しいことも養分蓄積を助長している一因と考えられる。

本節では、通常のPC環境があれば誰にでも使用可能なツールとして普及させることを目的に、有機栽培露地野菜畑を対象とした施肥設計ツールTORVE(トルベ)について検討した(図4-4-1)。なお、TORVEはFertilization design tool for organic vegetables in Hokkaidoの下線部を組み合わせた名称で、表計算ソフトMicrosoft Excel®上で稼働する。

有機栽培露地野菜畑の施肥設計ツール 「かぼちゃ、レタス、スイートコーン、えだまめ、たまねぎ用」



図 4-4-1 TORVE による施肥設計の一例<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 「カボチャ、レタス、スイートコーン、エダマメ、タマネギ用」シート。

## 2. TORVE の基本内容

### 1) 概要

TORVE は、これまでの試験結果から導き出された有機栽培に適した施肥量を基本に、土壌の分析値や堆肥の施用、緑肥等のすき込みによる減肥調整を反映した施肥量目標値が算出される。さらに、その目標値に合致するように、窒素、リン酸、カリの成分割合を考慮しながら有機質肥料の施用量を設定するツールである(図4-4-2)。

本ツールでは、本道の有機栽培で作付が多いカボチャ (*Cucurbita maxima* Duch.), レタス (*Lactuca sativa* L.), スイートコーン (*Zea mays* L.), エダマメ (*Glycine max* Merr.), タマネギ (*Allium cepa* L.) の 5 作物を対

象とした「カボチャ、レタス、スイートコーン、エダマメ、タマネギ用」シートと、露地野菜全般を対象に柔軟な施肥設計に対応した「マニュアル用」シートを設けている。なお、生育期間が全般的に短い野菜類の特性を鑑み、地域区分や土壌区分を設けていない。

### 2) 施肥量の算出

#### (1) 窒素

有機質肥料の窒素肥効は化学肥料と比べ緩やかであり、その利用率は低い傾向にある(中本, 2012)。そのため、慣行栽培における窒素肥沃度の基準である熱水抽出性窒素 30~50 mg kg<sup>-1</sup> 程度の圃場で有機栽培に取り組んでも収量の確保は難しい。また、多収を重視してむやみに窒素施肥量を増やし

ても濃度障害や環境負荷，コスト高を招きかねない。有機栽培畑では，窒素肥沃度を慣行栽培よりもやや高めに設定することで，土壌からの窒素供給量が増加するだけでなく，有機物の分解促進に伴う施肥効率の向上が認められた（中辻ら，2008）。そこで現在では，熱水抽出性窒素は  $50\sim 70\text{ mg kg}^{-1}$  を基準とした上で，窒素施肥量は概ね慣行栽培並に設定することが適切であることが見出された（第3章第2節関連論文（櫻井ら，2013b））。

本ツールでも上記の考え方を踏襲し，窒素の肥沃度水準を慣行栽培よりも熱水抽出性窒素で  $20\text{ mg kg}^{-1}$  高く見積もった上で，慣行栽培の適正施肥量を示した北海道施肥ガイド2020（北海道農政部，2020；以下，施肥ガイド）を適用した。なお，カボチャをはじめとする5作物は具体的な窒素施肥対応が設定されていることからこれらに従った（表4-4-1；第3章第2節関連論文（櫻井ら，2013b）；第3章第3節関連論文（櫻井ら，2016）；第3章第4節関連論文（櫻井ら，2018b））。

堆肥施用に伴う窒素減肥可能量は施肥ガイドの基準を用いている。施肥ガイドでの減肥可能量は化学肥料を前提としているため，有機質資材に適用するためには肥効率を考慮する必要があるが，環境への窒素負荷が生じないように堆肥施用量は概ね  $30\text{ Mg ha}^{-1}$  を上限としている（櫻井ら，2018a）。よって，減肥可能な窒素量は限定的であることから実用上支障ないと判断した。

ところで，施肥対応によって施肥量が計算上ゼロ

となる場合においても，初期生育確保の観点からスターター窒素量（初期生育を確保する上で最低限必要な窒素施肥量）を下限とする設定としている（表4-4-1；北海道農政部，2020）。

#### （2）リン酸，カリ

有機質資材に含まれるリン酸，カリの肥効は窒素に比べ高い傾向にある（牛尾ら，2004）。そのため，窒素肥効のみを考慮して資材を施用すると，必要以上にリン酸やカリが投入される恐れがあるため，これらの肥効を評価し，肥沃度に応じた施肥対応を行う必要がある。

リン酸については，本道において露地野菜を供試した栽培試験を概観すると，脱脂米ぬか，大豆油かす，なたね油かすなどの植物質資材のリン酸肥効は動物質資材と概ね同等であった（小野寺・中本，2007；林，2014；櫻井・谷藤，2019）。また，有機栽培下でのリン酸用量試験では，その供給源を問わず慣行栽培の施肥対応による適正施肥量で初期生育や収量は頭打ちとなった（櫻井・谷藤，2019）ことから，リン酸施肥量は有機質資材の種類を問わず，慣行栽培の施肥対応を適用した（表4-4-2）。

カリについては，有機質資材に含まれるカリのほとんどがク溶性である（内藤・佐藤，2015；小柳ら，2004）。また，本道ではカリの主要供給源となる堆肥類の肥効率を100%に設定している（北海道農政部，2020）ことに鑑み，有機質資材のカリ肥効は化学肥料と概ね同等と判断してカリ施肥量は慣行栽培の施肥対応を適用した（表4-4-3）。

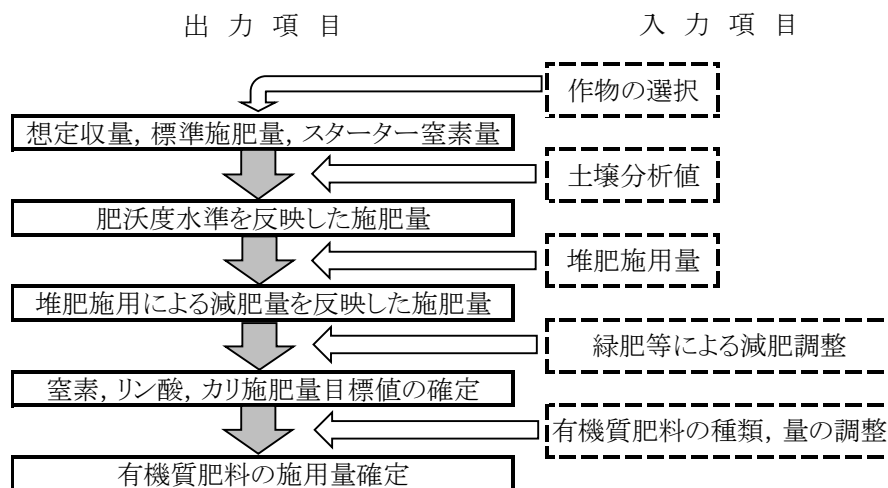


図4-4-2 TORVEにおける入出力の流れ<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>「カボチャ，レタス，スイートコーン，エダマメ，タマネギ用」シート。

表 4-4-1 窒素施肥対応<sup>1)</sup>とスターター窒素<sup>2)</sup> (kg ha<sup>-1</sup>)

作物名	肥沃度水準			スターター窒素
	(熱水抽出性窒素 <sup>3)</sup> :mg kg <sup>-1</sup> )			
	I (~50)	II(基準値) (50~70)	III (70~)	
カボチャ	120	80	50	20
レタス	140	120	100	40
スイートコーン	150	120	90	20
エダマメ	20	20	20	20
タマネギ	180	140	100	40

<sup>1)</sup>有機栽培向け窒素施肥対応(櫻井ら, 2013b; 櫻井ら, 2016; 櫻井ら, 2018b).

<sup>2)</sup>北海道施肥ガイド2020(北海道農政部, 2020).

<sup>3)</sup>熱水抽出性窒素の範囲は, 「以上」~「未滿」である.

表 4-4-2 リン酸施肥対応 (kg ha<sup>-1</sup>)<sup>1)</sup>

作物名	肥沃度水準				
	(有効態リン酸 <sup>2)</sup> :mg kg <sup>-1</sup> )				
	やや低い (~150)	基準値 (150~300)	やや高い (300~450)	高い (450~600)	極めて高い (600~)
カボチャ	150	100	70	30	0
レタス	180	120	80	40	0
スイートコーン	200	150	100	50	0
エダマメ	150	100	70	30	0
タマネギ	低い (~300)	やや低い (300~600)	基準値 (600~800)	やや高い (800~1000)	高い (1000~)
	300	200	150	80	0

<sup>1)</sup>北海道施肥ガイド2020(北海道農政部, 2020).

<sup>2)</sup>有効態リン酸(トルオーグ法)の範囲は, 「以上」~「未滿」である.

表 4-4-3 カリ施肥対応 (kg ha<sup>-1</sup>)<sup>1)</sup>

作物名	肥沃度水準				
	(交換性カリ <sup>2)</sup> :mg kg <sup>-1</sup> )				
	低い (~80)	やや低い (80~150)	基準値 (150~300)	やや高い (300~600)	高い (600~)
カボチャ	140	110	80	50	0
レタス	250	200	140	70	0
スイートコーン	200	170	130	70	0
エダマメ	160	120	80	40	0
タマネギ	300	200	150	100	0

<sup>1)</sup>北海道施肥ガイド2020(北海道農政部, 2020).

<sup>2)</sup>交換性カリの範囲は, 「以上」~「未滿」である.

### 3. 施肥設計の手順

「カボチャ、レタス、スイートコーン、エダマメ、タマネギ用」シートを例に施肥設計の手順を述べる。

#### 1) 作物の選択および土壌分析値の入力

5作物から作物を選択すると、想定収量と標準施肥量、スターター窒素が表示される。想定収量はカボチャ 20、レタス 20、スイートコーン 12~15、エダマメ 8~10、タマネギ 44 Mg ha<sup>-1</sup>である。標準施肥量は窒素、リン酸、カリの各肥沃度水準の基準値に相当する施肥量である(表4-4-1, 4-4-2, 4-4-3)。

次に、熱水抽出性窒素、有効態リン酸(トルオーグ法)、交換性カリの分析値を入力すると、各要素の肥沃度水準が表示されるとともに、その水準に応じて施肥量が調整される(表4-4-1, 4-4-2, 4-4-3)。

#### 2) 堆肥施用量の入力

堆肥の施用量を入力すると、表4-4-4に示す減肥可能量を減じた施肥量に調整される。基本的に、窒素成分量の2割、リン酸およびカリ成分量の全量が減肥される設定となっている。なお、本道の有機栽培畑では堆肥施用量 20 Mg ha<sup>-1</sup>までは窒素減肥しない(第3章第2節関連論文(櫻井ら, 2013b))対応が取られているため、窒素については 20 Mg ha<sup>-1</sup>を超過した分についてのみ考慮される。ここでの堆肥とは牛ふん麦稈堆肥を指しており、堆肥の成分量がわかる場合は含有成分を入力すると、より正確な施肥量調整が可能となる。

表4-4-4 堆肥の成分量と減肥可能量<sup>リ</sup>

成分量(kg 現物Mg <sup>-1</sup> )			減肥可能量(kg 現物Mg <sup>-1</sup> )		
窒素	リン酸	カリ	窒素	リン酸	カリ
5.0	5.0	4.0	1.0	5.0	4.0

<sup>リ</sup>北海道施肥ガイド2020(北海道農政部, 2020)。

#### 3) 緑肥等による減肥調整

施肥ガイドでは施肥量適正化の観点から、緑肥および圃場副産物を利用した場合の減肥可能量を設定しており、これを準用できるように項目を設けた。ただし、この量はテンサイ等の生育期間の長い作物を対象にした最大減肥可能量であり、生育期間の短い野菜類についてはこれよりも少ない量とする。なお、C/N比が高いものをすき込むと窒素飢餓が生じ、作物生育に悪影響を及ぼす恐れがあるので留意する。

ここまでの段階で、窒素、リン酸、カリの施肥量目標値が確定する。

#### 4) 有機質肥料の種類、量の調整

窒素肥効の安定性を考慮し、窒素が概ね4%以上含まれる有機質肥料(第3章第4節関連論文(櫻井ら, 2018b))の中から、3要素の含有割合を参考に、窒素、

リン酸、カリ施肥量目標値の比率に近い有機質肥料を選定し、窒素の施肥量目標値近くになるよう施用量を調整する。その際、リン酸、カリの施肥量はその目標値を超過しないようにする。有機質肥料の養分含有率は、肥料袋等に記載されている保証成分量などを活用し、不明の場合は肥料取締法の公定規格で定める最小量などを参照することで、実際の養分投入量が施肥量目標値を下回るリスクを回避できる。

次に、リン酸とカリを調整する。リン酸が不足している場合は、脱脂米ぬかなどの山型肥料を施用することで施肥量目標値近くに調整する。脱脂米ぬかのように窒素含有率が低い有機質肥料は、窒素肥効が緩効的であることから、施用割合が過多にならないよう留意する。カリは、草木灰などのカリを多く含む資材を用いて施肥量目標値近くに調整する。予め、リン酸、カリの供給源として優れた堆肥類の施用も検討する。有機質肥料の種類によっては窒素分も少なからず含まれているため、窒素施肥量が超過した場合は窒素源を減じる。なお、本ツールでは各施肥量の誤差許容量を±20 kg ha<sup>-1</sup>以内としている。

### 4. TORVE 使用上の留意点と普及方法

#### 1) 留意点

TORVEの適用対象は露地野菜畑であり、施設野菜畑は適用外である。また、本ツールは基肥のみの対応であり、定期的に追肥する作物には適用できない。土壌分析は3~4年に1度は実施し、圃場の養分状態を定期的に把握することが望ましい。

本ツールで算出される施肥量は、比較的良好な気象・土壌条件で、適切な栽培管理により有機栽培として到達可能な収量性の確保を前提としたもので、慣行栽培並の収量性を保証したものではない。

#### 2) 普及方法

TORVEは北海道立総合研究機構の農業試験場を通じて道内の各農業改良普及センターへ技術伝達された。本ツールは北海道立総合研究機構農業研究本部が運営するホームページ「農業技術情報広場」で公開され、無償で入手できる(北海道立総合研究機構農業研究本部, 2019)。

### 5. 要約

有機質資材は1成分のみを含む単肥ではなく、2成分以上含む複合肥料に相当するため、窒素、リン酸、カリの施肥量を目標値に調整することは難しい。そこで、通常のPC環境があれば誰にでも使用可能なツールとして普及させることを目的に、有機栽培露地野菜畑を対象とした施肥設計ツールTORVE(トルベ)を開発した。



- 1) TORVE は、これまでの試験結果から導き出された有機栽培に適した施肥量を基本に、土壌の分析値や堆肥の施用、緑肥等のすき込みによる減肥調整を反映した施肥量目標値が算出される。さらに、その目標値に合致するよう、窒素、リン酸、カリの成分割合を考慮しながら有機質肥料の施用量を設定するツールである。
- 2) TORVE では、本道の有機栽培で作付が多いカボチャ、レタス、スイートコーン、エダマメ、タマネギの5作物を対象とした「カボチャ、レタス、スイートコーン、エダマメ、タマネギ用」シートと、露地野菜全般を対象に柔軟な施肥設計に対応した「マニュアル用」シートを設けた。
- 3) TORVE の適用対象は露地野菜畑であり、施設野菜畑は適用外である。また、本ツールは基肥のみの対応であり、定期的に追肥する作物には適用できない。土壌分析は3~4年に1度は実施し、圃場の養分状態を定期的に把握することが望ましい。

## 第5章 総合考察

有機物施用を主体する栽培様式において、有機物は作物生産を維持するために欠くことのできない養分供給源であるが、土壤微生物の基質として作用し、分解、無機化を経由することではじめて作物による養分吸収が可能になる。本論文では、窒素とリン酸代謝に関わる土壤微生物群集を対象に有機物施用の影響を解析するとともに作物生産と環境保全を両立する総合的な施肥対応技術を確立することを目的に検討を重ねた。本章では、有機栽培を中心に作物生産を安定化させる上で重要となる土壤微生物と養分供給の相互関係について、これまでに得られた結果を基に考察するとともに、今後の展開について言及する。

### 1. 有機栽培における作物への養分供給の流れ

通常、生産現場で有機物を施用する主な目的は土づくりであるが、有機栽培のように養分供給源を有機物に依存する栽培様式では作物への養分供給の意

味合いが必然的に強くなる。一方、土壤微生物にとって有機物はエサ、すなわち基質であり、作物への養分供給の前段階として重要な過程となる。基本的に無機成分で構成される化学肥料とは異なり、有機物による養分供給の流れが複雑になるのはそのためである。有機物の施用が作物への養分供給と土壤微生物に及ぼす影響について理解を深めるにあたり、有機物中の養分が作物へ吸収されるまでの過程をダムに例えてみた(図5-1-1)。まず、施用された有機物に由来する易分解性の養分をダムの貯水池とみなし、その貯水量は土壤の潜在的な養分供給量とした。窒素については北海道の窒素肥沃度指標として活用されている熱水抽出性窒素が適当と考えた。熱水抽出性窒素は易分解性の有機態窒素で、その大半はタンパク質などの有機態窒素化合物である(斎藤, 1988)ためである。

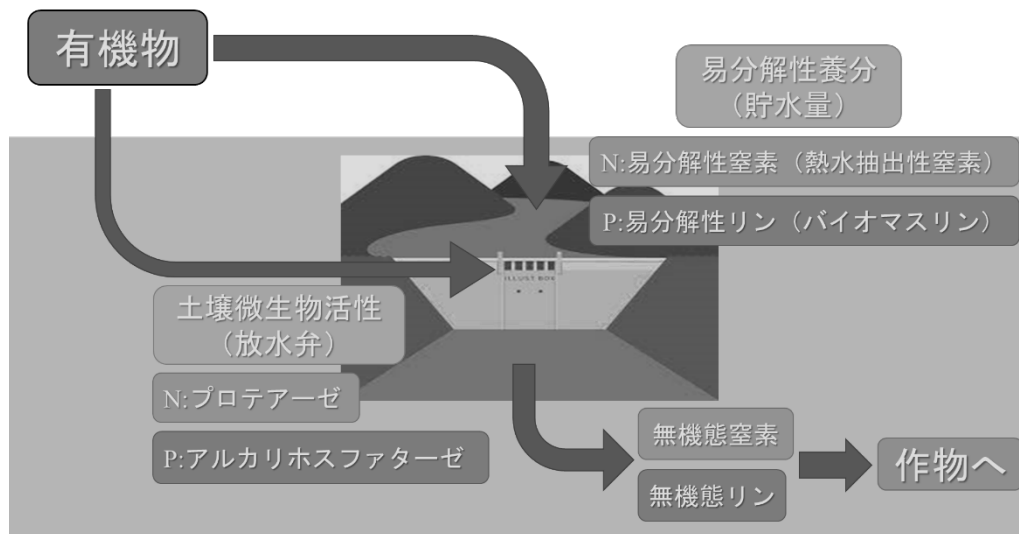


図 5-1-1 有機物施用に伴う作物への養分供給のイメージ

一方、ダムに蓄えられた窒素分は放水弁を通して放水されることではじめて作物により利用可能となる。この放水弁の調整を担うのが土壤微生物に由来する酵素の働きとした。第2章では有機態窒素の分解過程で作用するプロテアーゼについて有機物施用の影響を検討し、プロテアーゼ活性は有機物施用に伴って上昇した(第2章第1節関連論文(Sakurai et al., 2007))。家畜ふん堆肥の連用によってプロテアーゼ活性が高まるとの既往の報告例(大村ら, 1988; 進

藤, 1992)と同様の傾向であり、養分供給源を有機物に依存する有機栽培ではプロテアーゼ活性の上昇に伴ってダムの放水弁が慣行栽培よりも大きくなることが想定された。後述するように、堆肥の施用や緑肥のすき込みは熱水抽出性窒素の向上に結びつくことから(第4章第2節関連論文(櫻井ら, 2021))、有機物の施用は易分解性の有機態窒素が貯留されているダムの貯水量と放水弁の両面を強化することに結びつくものと推察された。第3章では有機栽培に適

した熱水抽出性窒素レベルについて検討し、慣行栽培の基準値よりも  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  高い  $50 \sim 70 \text{ mg kg}^{-1}$  が適当とした(第3章第2節関連論文(櫻井ら, 2013b)). 有機栽培の熱水抽出性窒素レベルを慣行栽培よりも高く設定したことは、ダム貯水量を増加させることで慣行栽培に比べて窒素供給が大きく劣ることのないよう手当てしたことを意味する。有機栽培での生産安定化には施用された有機物が土壌中で適宜分解され、作物の養分吸収パターンに見合った円滑な養分供給がなされる必要があるが、中辻ら(2008)は熱水抽出性窒素が有機栽培畑での窒素肥沃度指標のみならず有機物分解能を反映すると報告している。よって、熱水抽出性窒素の向上はダムの放水弁の開放程度を大きくさせる方向に作用すると推察されることから、有機栽培の熱水抽出性窒素レベルを慣行栽培よりも高くすることには一定の整合性がある。

一方で、過度の有機物施用はダムの貯水量と放水弁の開放程度が必要以上に大きくなることで、ダムの「放出量」が作物の養分吸収量以上となって、窒素過剰に伴う窒素汚染を招く恐れがある。これに対応するべく、有機栽培に適した窒素施肥量を検討した結果、概ね慣行栽培で施用する化学肥料の標準量が適当であった(第3章第2節関連論文(櫻井ら, 2013b); 第3章第3節関連論文(櫻井ら, 2016); 第3章第4節関連論文(櫻井ら, 2018b)). また、生産性と窒素負荷低減が両立しうる堆肥の施用上限量は  $30 \text{ Mg ha}^{-1}$  が適当であり、堆肥等の有機物の入手が困難な場合にはアカクロバやヘアリーベッチなどの緑肥を活用することで有機栽培畑に適した窒素肥沃度への対応策を示した(第4章第2節関連論文(櫻井ら, 2021)). さらに、第4章で検討した総合施肥設計ツール「TORVE」を活用することで、施肥設計が難しい有機質肥料の施用量設定の手立てを示した(第4章第4節関連論文(櫻井・谷藤, 2020)). これらはいずれも生産現場で活用が可能であり、「貯水量」と「放水弁」との調整を図る上で有用なツールとしてその活用が期待される。

リンは窒素に次いで重要な作物の必須元素であるが、その養分供給の流れとしてダムの貯水池に該当するのは易分解性の有機態リンで主に土壌微生物バイオマスリンと考えられる。土壌微生物は土壌中でリンの形態変化に重要な役割を果たしていると同時に、その菌体中のリン含有率は6%程度と高く(河野, 1996)、その多くが細胞質内や細胞膜表面に存在し、速やかに土壌溶液中に放出され、作物へのリン供給源として重要である(杉戸, 2011)ためである。第2章では有機態リンの分解過程で作用するアルカリホスファターゼについて有機物施用の影響を検討した

が、アルカリホスファターゼ活性は有機物施用に伴って上昇するとともに、作物体のリン含有率も化学肥料を施用した場合よりも高かった(第2章第2節関連論文(Sakurai *et al.*, 2008)). また、アルカリホスファターゼ活性は有効態リンと正の相関関係が認められた。土壌微生物等に含まれるリン酸ジエステルはホスホジエステラーゼによってリン酸モノエステルに変換され、これがさらにホスホモノエステラーゼによる加水分解によって無機態リン酸が生成し、作物などに取り込まれる(國頭ら, 2019)。リン酸ジエステルは分解しやすく、ホスホモノエステラーゼによるリン酸モノエステルの分解が律速段階となるため、有機態リンの総無機化速度は、ホスホモノエステラーゼ活性と正の相関を示す場合がある(Bünemann, 2015)。このホスホモノエステラーゼの代表選手がアルカリホスファターゼである(Nannipieri *et al.*, 2011)。これらを鑑みると、有機物施用によるアルカリホスファターゼ活性の上昇は有機態リンから有効態リンへの変換を促し、作物が利用可能なリン供給量の増加を意味するものと考えられた。(第2章第2節関連論文(Sakurai *et al.*, 2008)).

第4章で有機栽培におけるリン酸施肥対応を検討した結果、土壌のリン酸診断基準値、リン酸施肥量ともに慣行栽培並が適当であった。この要因としては、先述したアルカリホスファターゼ活性の上昇に伴う有効態リンの供給促進があるが、有機物は土壌と接触する面積が小さく、安定した可給態としてリン酸を土壌中に保持できること(西尾, 2019)。堆肥や作物残渣等に由来する溶存腐植物質や低分子有機酸が土壌中に存在することで、リン酸の吸着抑制効果と作物への吸収促進効果を高めたこと(谷, 2021)も一因として想定されよう。窒素と同様に総合施肥設計ツール「TORVE」を活用することで、リン酸施肥を加味した施肥設計が可能である(第4章第4節関連論文(櫻井・谷藤, 2020)).

## 2. 有機物施用が窒素、リンの可給化に関与する土壌微生物群集に及ぼす影響～土壌診断技術の高度化に向けて～

土壌中におけるプロテアーゼは微生物により供給されていると考えられているが、その主要な供給源はこれまで不明であった。その要因としては、平板法では供給源となっている微生物の検出に限界があること、プロテアーゼの供給源となっている特定微生物の特異的検出法がないためであった(渡邊, 1996)。本研究の中性金属プロテアーゼを対象としたDGGE解析では、バンド6本の内5本が *Bacillus. megaterium* に近縁であった。須賀ら(2017)は、本研究の基とな

った Bach *et al.*, (2001) のプライマーセットを用いて茨城県つくば市で採取した農家土壌を対象にクローンライブラリ解析を行った結果、得られたクローンの塩基配列から推定したアミノ酸部分配列の多くは *Bacillus* 属と類似性が高かったことから、*Bacillus* 属が主要なプロテアーゼ生産細菌であると考えられた。なお、本研究で用いたプライマーセットは主に *Bacillus* 属の配列を用いて作成されている (Bach *et al.*, 2001) ため、*Bacillus* 属が優先した可能性が考えられるが、Baraniya *et al.* (2016) の報告において、本プライマーセットによって *Bacillus* 属以外の細菌種について多く検出されており、その可能性は低いと考えられた。よって、本研究の手法は土壌中の中性金属プロテアーゼの生成に関与する細菌の検出方法として概ね適切であったと判断された。

本研究では、土壌中の金属プロテアーゼを対象に DGGE 解析を実施したところ、アルカリ金属プロテアーゼと中性金属プロテアーゼの生成細菌群集は有機物施用により有意に変動した (第 2 章第 1 節関連論文 (Sakurai *et al.*, 2007))。この結果は、肥培管理に基づく土壌養分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 (諸, 2015)。一方、須賀ら (2017) は中性金属プロテアーゼの生成細菌群集について栽培法や土壌の採取時期に関わらず、農家間で異なる傾向が見られたと述べている。本論文の研究は一圃場内での試験であるため、須賀ら (2017) の報告と直接の比較はできないが、今後同様な調査事例を積み上げることによりプロテアーゼ生成細菌群集の違いに影響を及ぼす要因が明らかになることが期待される。

アルカリホスファターゼについても有機物施用によってその活性は上昇するとともに、アルカリホスファターゼ生成細菌の群集構造は有意に変化した (第 2 章第 2 節関連論文 (Sakurai *et al.*, 2008))。細菌のアルカリホスファターゼには *PhoA*, *PhoD*, *PhoX* の 3 タイプがあり、これらアルカリホスファターゼをコードしている遺伝子は、それぞれ *phoA*, *phoD*, *phoX* である (國頭ら, 2019)。3 タイプのアルカリホスファターゼ遺伝子で土壌中では *phoD* が最も多く、約半分の細菌が持っていることが報告されている (Neal *et al.*, 2017)。第 2 章で作出したプライマーは *phoD* を増幅するものであるが、本プライマーを活用した解析手法はアルカリホスファターゼ生成細菌の群集解析に多く用いられ (Wang *et al.*, 2012 ; Chhabra *et al.*, 2013 ; Tan *et al.*, 2013 ; Jorquera *et al.*, 2014)、本研究の進展に活用されている。例えば、本研究で使用したプライマーセットを用いて長野県野菜花き試験

場の有機物・三要素連用圃場を対象に DGGE 解析を行ったところ、プロファイルから算出したシャノンの多様性指数とアルカリホスファターゼ活性との間に有意な負の相関を認めている (國頭ら, 2019)。同様の関係は他の畑土壌でも報告されており (Chen *et al.*, 2019 ; Chhabra *et al.*, 2013 ; Fraser *et al.*, 2015 ; Luo *et al.*, 2017)、アルカリホスファターゼ活性がアルカリホスファターゼ生成細菌群集の影響を受けることが考えられた。このように、作物生育に不可欠な窒素とリンに関与する主要な酵素活性に対して、各々の細菌群集が大きな影響を及ぼしていることが示された。

ところで、土壌の理化学性に基づくこれまでの土壌診断は、①基本的に単一の指標が次作の作物生育に対して制限要因となっているかを判定し、②その指標の望ましい値からの差異を算出し、③その差異を修正するための改善手法・資材を作物の種類、作型、気象要因、土壌タイプ等の関連で選定し、④修正のために必要な程度・量を確定する、という手順が一般的である (堀, 1994)。土壌の可給態窒素で言えば、圃場で栽培された作物の窒素吸収量から求めるのが最も正確であるが、それには多大な労力と費用を要することから、簡便な分析法として化学的な抽出法が開発されてきた (Bremner, 1965 ; 井田ら, 1970)。本道の畑土壌の窒素肥沃度指標である熱水抽出性窒素はその一例で、その簡便さと有用性から道内で広く活用されているが、土壌型の影響を受けることが指摘されており (松永・森泉, 2012)、泥炭土や腐植が多い一部の黒ボク土で適用を除外する場合がある (北海道農政部, 2020)。このことは、既往の土壌理化学性診断の限界を示唆しており、土壌の化学性のみでは説明できない生産不安定要因が存在していることを意味する。この不安定要因としては土壌微生物が介在していると考えられる。実際、土壌を一定期間培養して土壌中の有機態窒素が微生物分解により生成した無機態窒素量を測定する培養法は、抽出法よりも可給態窒素との整合性は高い (松永・森泉, 2012)。このように、化学的な抽出法の精度を向上させるためには、土壌の有機態窒素の大部分を占めるタンパク (ペプチド) 態の分解を担う土壌微生物特性を組み入れることは自ずと想定されることで、本研究で評価したプロテアーゼ生成細菌の特性を加味することで精度向上が期待される。

また、リンについて我が国では肥沃度指標としてトルオーグ法やブレイ法により抽出された無機態リン量が用いられているが、これらの方法では有機態リンは考慮されていない。本道の畑土壌ではトルオーグ法が適用されているが、トルオーグ法では作物

のリン酸吸収量との相関がない場合がある（杉戸，2011）などの問題が指摘されている。リン酸肥沃度の評価にはトルオーグ法やブレイ法といった化学的方法以外に，生物指標である土壌微生物バイオマスリンを含めるべきとの提案がある（武田，2010）。また，同じく生物指標として，酵素の資源配分モデルもリン酸肥沃度の指標として利用できる可能性がある（藤田ら，2019）。リン酸肥沃度評価におけるこれら生物指標の有用性について，今後さらなる検討が期待される。

## 第6章 摘要

本研究の目的は、有機栽培をはじめとする有機物施用を主体とした栽培様式において、窒素とリン酸代謝に関わる土壌微生物群集構造を解析するとともに作物生産と環境保全を両立する総合的な施肥対応技術を確立することである。

窒素に関してプロテアーゼ、リンに関してアルカリホスファターゼを対象酵素として、有機物施用による酵素活性の変動とその生成細菌群集構造との関係を解析した。

次に、有機栽培畑の土壌診断に基づく窒素施肥対応を確立するために、生産現場での活用が期待される鶏ふん堆肥の窒素肥効を評価し、有機物施用を主体とした栽培様式に適した資材を選定した。また、有機栽培畑に適した土壌窒素診断基準値を設定するとともに、本道の主要な作物であるカボチャ、スイートコーン、レタス、タマネギ、バレイショについて、窒素施肥対応を検討した。

有機栽培で施用されることの多い堆肥について、窒素収支の観点からその施用上限量について検討した。また、有機栽培畑へ転換する際の生産安定化に資する緑肥導入モデルについて提案した。さらに、有機栽培畑における適正なリン酸施肥量をリン酸肥沃度別に設定するとともに、これまでの検討結果を活用しながら、有機栽培畑に適した窒素、リン酸、カリの施肥量目標値を算出し、有機質肥料の施用量を簡易に設定できる総合施肥設計ツールを開発した。

研究成果の概要は以下の通りである。

### 1. 有機物施用による土壌微生物活性とその生成細菌群集構造との関係

#### 1) プロテアーゼ生成細菌群集の解析手法と栽培様式による変動

有機物と化学肥料の施用が非根圏土壌と根圏土壌のプロテアーゼ活性とプロテアーゼ生成細菌の群集構造に与える影響について、レタスを供試作物として解析した。

- (1) 有機物施用によるプロテアーゼ活性は化学肥料施用に比べ常に高かった。また、根圏土壌のプロテアーゼ活性は非根圏土壌よりも高かった。
- (2) アルカリ金属プロテアーゼ遺伝子と中性金属プロテアーゼ遺伝子を対象とした DGGE 法により細菌群集構造を解析した結果、アル

カリ金属プロテアーゼ生成細菌は主に *Pseudomonas fluorescens*、中性金属プロテアーゼ生成細菌は *Bacillus megaterium* に近縁であった。これらの結果は、既往の培養法による結果と一致し、本研究の DGGE 法がアルカリ金属プロテアーゼ遺伝子と中性金属プロテアーゼ遺伝子に対して高い特異性を持っていることを意味する。

- (3) DGGE プロファイルに基づく主成分分析の結果、有機物施用と化学肥料施用の間で、アルカリ金属プロテアーゼや中性金属プロテアーゼ生成細菌の群集構造が異なった。また、プロテアーゼ活性を目的変数、主成分分析の第一主成分と第二主成分を説明変数とした重回帰モデルはアルカリ金属プロテアーゼ、中性金属プロテアーゼともに有意であった。
- (4) 以上から、各々のプロテアーゼ生成細菌は量や特異性の異なるプロテアーゼを放出し、アルカリ金属プロテアーゼと中性金属プロテアーゼの生成細菌群集構造がプロテアーゼ活性の変動に対して大きな影響を及ぼしていることが示唆された。

### 2) アルカリホスファターゼ生成細菌群集の解析手法と栽培様式による変動

有機物と化学肥料の施用が非根圏土壌と根圏土壌のアルカリホスファターゼ活性とアルカリホスファターゼ生成細菌の群集構造に与える影響について、レタスを供試作物として解析した。

- (1) 有機物施用のアルカリホスファターゼ活性は化学肥料施用に比べ常に高く、根圏土壌のアルカリホスファターゼ活性は非根圏土壌よりも高かった。アルカリホスファターゼ活性と有効態リン、バイオマスリンとの間に正の相関関係が認められた。また、有機物施用におけるレタスのリン含有率は化学肥料施用に比べ高かった。これらの結果から、有機物施用によるアルカリホスファターゼ活性の上昇は有機態リンから有効態リン、バイオマスリンへの変換を促し、作物が利用可能なリンが増加したことが示唆された。
- (2) DGGE 法によりアルカリホスファターゼ生成細菌群集構造を解析した結果、サンプリング時期、施肥処理、土壌採取部位を問わず、多くの DNA 断片が得られたことから、多種多様

なアルカリホスファターゼ生成細菌が存在することが示唆された。得られた DNA 断片は、主に *Mesorhizobium loti* や *Pseudomonas fluorescens* に近縁であった。

- (3) DGGE プロファイルに基づく主成分分析の結果、アルカリホスファターゼ生成細菌の群集構造は施肥処理や土壌採取部位によって有意に変化した。また、アルカリホスファターゼ活性を目的変数、主成分分析の第一主成分と第二主成分を説明変数とした重回帰モデルは有意であった。
- (4) 以上から、各々のアルカリホスファターゼ生成細菌は量や特異性の異なるアルカリホスファターゼを放出し、アルカリホスファターゼ生成細菌群集がアルカリホスファターゼ活性の変動に大きな役割を果たしていることが示唆された。

## 2. 有機栽培畑の土壌診断に基づく窒素施肥対応

### 1) 有機物施用を主体とした栽培様式に適した有機質資材の選定

窒素含有量の異なる鶏ふん堆肥の施用が特別栽培バレイショの収量性に及ぼす影響を、培養試験に基づく窒素無機化特性の調査を含め解析した。供試した鶏ふん堆肥は、現物当たり窒素含有量が  $20 \text{ g kg}^{-1}$  前後（低 N 鶏ふん）、 $30 \text{ g kg}^{-1}$  前後（中 N 鶏ふん）、 $40 \text{ g kg}^{-1}$  以上（高 N 鶏ふん）の 3 種類で、総窒素施肥量  $100 \text{ kg ha}^{-1}$  の内、北海道の慣行レベルの半量に相当する  $55 \text{ kg ha}^{-1}$  を硫酸で、残りの  $45 \text{ kg ha}^{-1}$  を鶏ふん堆肥で施用した。

- (1) 窒素無機化は、高 N 鶏ふん堆肥が最も速く、中 N 鶏ふん堆肥、低 N 鶏ふん堆肥の順であり、含有する尿酸の量を反映した。窒素無機化に及ぼす培養温度 ( $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) の影響は、高 N 鶏ふんでは少なかったのに対し、低 N および中 N 鶏ふんは  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$  で無機態窒素率が低く推移した。よって、高 N 鶏ふんは地温に左右されず安定した窒素肥効を示す資材と考えられた。
- (2) これを裏付けるように、収穫期におけるバレイショの規格内収量や窒素吸収量は、窒素含有量の高い鶏ふん堆肥ほど多くなる傾向で、鶏ふん堆肥の窒素無機化特性が、バレイショ生育に強く影響を及ぼしていた。一方、鶏ふん堆肥間でのでんぷん価に有意差は認められなかった。
- (3) 以上から、バレイショの特別栽培において、高 N 鶏ふん堆肥の施用の有効性が確認された。

### 2) 土壌窒素診断基準値とカボチャ、スイートコーン、レタスの窒素施肥対応

北海道における有機栽培露地野菜畑向けの土壌窒素診断基準値と、カボチャ、スイートコーン、レタスを対象とした窒素施肥対応を設定するため、有機質肥料としてなたね油かすおよび魚かすを施用した窒素用量試験を実施した。

- (1) 慣行栽培の施肥標準窒素量に相当する有機質肥料の施用によって、概ね慣行栽培の基準収量（カボチャ  $20 \text{ Mg ha}^{-1}$ 、スイートコーン  $12 \sim 15 \text{ Mg ha}^{-1}$ 、レタス  $20 \text{ Mg ha}^{-1}$ ）以上の収量が得られた。よって、有機栽培の目標収量は慣行栽培の基準収量とし、その収量を得るのに必要な窒素吸収量（目標窒素吸収量）はカボチャ  $105 \text{ kg ha}^{-1}$ 、スイートコーン  $125 \text{ kg ha}^{-1}$ 、レタス  $50 \text{ kg ha}^{-1}$  であった。
- (2) 慣行栽培の施肥標準窒素量に相当する有機質肥料の施用によって、目標窒素吸収量が得られる窒素肥沃度は熱水抽出性窒素で  $50 \sim 70 \text{ mg kg}^{-1}$  であり、この範囲を有機栽培露地野菜畑における土壌窒素診断基準値とした。なお、この範囲は、慣行栽培の土壌窒素診断基準値 ( $30 \sim 50 \text{ mg kg}^{-1}$ ) よりも高く、有機栽培が慣行栽培よりも土壌の窒素肥沃度に依存する農法であることが示唆された。
- (3) 熱水抽出性窒素  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  未満および  $70 \text{ mg kg}^{-1}$  以上の領域における窒素施肥量を、目標窒素吸収量から窒素無施用条件での窒素吸収量を差し引き、それを施肥窒素利用率で除して算出したところ、慣行栽培での熱水抽出性窒素  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  未満および  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  以上の窒素施肥量に近似した。したがって、有機栽培露地野菜畑の窒素施肥対応としては、慣行栽培の窒素施肥対応における窒素肥沃度区分を熱水抽出性窒素でそれぞれ  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  上方修正することで活用できると判断した。

### 3) タマネギ、バレイショの窒素施肥対応

北海道の主要農産物であるタマネギ、バレイショについては有機栽培向けの窒素施肥対応が設定されていない。そこで、窒素肥沃度の異なる圃場での窒素用量試験の結果に基づき、以下の結果を得た。

- (1) タマネギでは窒素施肥量の 3 分の 2 を定植前年秋に、残りの 3 分の 1 を当年春にそれぞれ施肥することで、前年秋に窒素施肥量の全量を施肥する慣行法に比べ 2 割強増収した。
- (2) この結果を基に土壌窒素診断基準値である熱水抽出性窒素  $50 \sim 70 \text{ mg kg}^{-1}$  とその基準値未満、基準値以上の 3 水準についてそれぞれ窒

素施肥量を設定した。

- (3) バレイショについて想定収量  $26 \text{ Mg ha}^{-1}$  を前提とした窒素施肥量として、基準値未満では  $120 \text{ kg ha}^{-1}$ 、基準値内では  $80 \text{ kg ha}^{-1}$ 、基準値以上では  $40 \text{ kg ha}^{-1}$  が適当であった。

#### 4) 春全量施肥を前提としたタマネギの窒素施肥対応

有機栽培タマネギの収量性向上を目的に、有機 JAS に準拠した広範な窒素肥沃度の圃場で窒素施肥試験を実施し以下の結果を得た。

- (1) 施肥窒素の全量を当年春に施肥する春全量施肥は、窒素施肥量の3分の2を前年秋に、残りの3分の1を当年春に施肥する春分施よりも有意に増収した。
- (2) 春全量施肥に窒素含有率  $40 \text{ g kg}^{-1}$  以上の有機質資材を用いた場合、資材間に収量差はなかった。一方、窒素含有率  $20 \text{ g kg}^{-1}$  前後の資材では有意に減収した。
- (3) 有機栽培タマネギの目標収量である  $44 \text{ Mg ha}^{-1}$  を得るための窒素施肥量を、目標窒素吸収量から窒素無施用条件での窒素吸収量を差し引き、それを施肥窒素利用率で除することで算出した。その結果、標準的な窒素肥沃度（熱水抽出性窒素  $50\sim70 \text{ mg kg}^{-1}$ ）における窒素施肥量として  $140 \text{ kg ha}^{-1}$  が適正で、窒素肥沃度の高低により窒素施肥量を  $40 \text{ kg ha}^{-1}$  増減させる窒素施肥対応を構築した。

### 3. 有機栽培畑における地力の醸成と施肥対応の総合化

#### 1) 窒素収支に基づく有機栽培畑の堆肥施用上限量

北海道では、慣行栽培における堆肥連用時の施用上限量は年1作の場合  $25 \text{ Mg ha}^{-1}$  程度であるが、有機栽培における設定はされていない。そこで、窒素収支の考え方を基本に、有機栽培畑の堆肥施用上限量について検討した。

- (1) 堆肥施用量が増えるにつれて超過窒素量は増大し、堆肥を多量に連用すると超過窒素量をゼロ以下に抑えることが困難であった。
- (2) 堆肥施用量と超過窒素量の間には有意な正の相関が認められ、超過窒素量がゼロとなる堆肥施用量は約  $33 \text{ Mg ha}^{-1}$  であった。
- (3) 以上から、有機栽培畑における堆肥施用の上限を概ね  $30 \text{ Mg ha}^{-1}$  とした。

#### 2) 有機栽培畑への転換を前提とした緑肥導入モデル

有機栽培に取り組んで間もない圃場では窒素肥沃

度が十分に高くなっていないため低収となることが多い。播種または植付けの時点から遡り2年以上、化学肥料や化学合成農薬を使用しない転換期間にマメ科緑肥を栽培することで、有機栽培畑として望ましい窒素肥沃度（熱水抽出性窒素  $50\sim70 \text{ mg kg}^{-1}$ ）に達するための方策を圃場試験で検討した。

- (1) 転換期間に相当する1, 2年目に後作緑肥（ヘアリーベッチ）または休閒緑肥（アカクローバ）を栽培することにより、熱水抽出性窒素は  $5\sim15 \text{ mg kg}^{-1}$  程度上昇した。この結果は、緑肥が熱水抽出性窒素の主成分である易分解性有機態窒素の給源として有効に作用したことを示している。
- (2) それに伴い、有機栽培転換後に相当する3, 4年目に栽培した野菜類も  $10\sim30\%$  程度増収した。また、畑土壌における微生物活性の指標である  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性は緑肥のすき込み量に応じて上昇する傾向であった。
- (3) 以上から、有機栽培への転換期間に緑肥を導入することにより窒素肥沃度を高めるモデルを提案した。

#### 3) 有機栽培畑におけるリン酸施肥対応

有機栽培露地野菜畑のリン酸肥沃度に応じたリン酸施肥量の増減肥法（施肥対応）の設定を目的に、有機 JAS に準拠した広範なリン酸肥沃度の圃場でリン酸施肥試験を実施した。

- (1) リン酸供給源として動物質と植物質との間で、生育初期の乾物重や収量に大きな相違はなかった。また、慣行栽培における標準量相当のリン酸施肥量以上では生育初期の乾物重や収量に有意差は認められなかった。
- (2) 以上から、有機栽培露地野菜畑におけるリン酸施肥量の設定に北海道施肥ガイドのリン酸施肥対応が適用可能であった。施肥ガイドでリン酸施肥が不要となる水準では、極力少ないリン酸施肥量で足りる。なお、リン酸施肥量の算出にあたり有機質資材の種類は問わない。

#### 4) 施肥対応の総合化

有機質資材は1成分のみを含む単肥ではなく、2成分以上含む複合肥料に相当するため、窒素、リン酸、カリの施肥量を目標値に調整することは難しい。そこで、通常の PC 環境があれば誰にでも使用可能なツールとして普及させることを目的に、有機栽培露地野菜畑を対象とした施肥設計ツール TORVE（トルベ）を開発した。

- (1) TORVE は、これまでの試験結果から導き出された有機栽培に適した施肥量を基本に、土



壤の分析値や堆肥の施用，緑肥等のすき込みによる減肥調整を反映した施肥量目標値が算出される。さらに，その目標値に合致するよう，窒素，リン酸，カリの成分割合を考慮しながら有機質肥料の施用量を設定するツールである。

- (2) TORVE では，本道の有機栽培で作付が多いカボチャ，レタス，スイートコーン，エダマメ，タマネギの5作物を対象とした「カボチャ，レタス，スイートコーン，エダマメ，タマネギ用」シートと，露地野菜全般を対象に柔軟な施肥設計に対応した「マニュアル用」シートを設けた。
- (3) TORVE の適用対象は露地野菜畑であり，施設野菜畑は適用外である。また，本ツールは基肥のみの対応であり，定期的に追肥する作物には適用できない。なお，土壌分析は3～4年に1度は実施し，圃場の養分状態を定期的に把握することが望ましい。

## 謝 辞

本研究をとりまとめるにあたり、北海道大学大学院農学研究院作物栄養学研究室教授 信濃卓郎博士には、本論文作成に係るご配慮のみならず、第 2 章の基盤となった北海道大学創成科学共同研究機構での派遣研修および北海道大学農学部在籍当時の指導教官として、長きにわたり終始懇切なるご指導を賜った。ここに深甚なる謝意を表す。

同じく作物栄養学研究室准教授 渡部敏裕博士には、本稿のご校閲を賜っただけでなく、北海道大学創成科学共同研究機構での派遣研修および北海道大学農学部在籍時に終始懇切なるご指導を賜った。また、北海道大学大学院農学研究院土壌学研究室教授 当真要博士には、本稿のご校閲を賜りご指導を頂いた。北海道大学大学院農学研究院名誉教授 大崎 満博士には、北海道大学創成科学共同研究機構での派遣研修および北海道大学農学部在籍時に甚大なるご配慮を賜った。広島大学大学院統合生命科学研究科教授 和崎 淳博士には、北海道大学創成科学共同研究機構での派遣研修および北海道大学農学部在籍時に終始懇切なるご指導を賜るとともに、投稿論文の共著者としてご校閲頂いた。

第 3 章以降の研究は、北海道立総合研究機構中央農業試験場で実施したもので、直属の上司であった北海道立総合研究機構法人本部研究戦略部長 中辻敏朗博士のご指導で開始したものであり、研究のきっかけを与えていただくとともに、終始ご指導を頂いた。また、ホクレン農業協同組合連合会函館支所特任技師 日笠裕治博士，花・野菜技術センター技術研修グループ研究主幹 古館明洋氏，十勝農業試験場生産技術グループ主査 坂口雅己博士，中央農業試験場水田農業グループ主査 細淵幸雄氏，中央農業試験場環境保全グループ研究主幹 谷藤 健氏には、直属の上司として土壌肥料に係る包括的なご指導を頂くとともに、投稿論文の共著者としてご校閲頂いた。また、道南農業試験場生産技術グループ研究主幹 小野寺政行氏，農業研究本部企画調整部

(原子力環境センター駐在) 主査 富沢ゆい子氏には、野菜栽培に係るご指導を頂くとともに、投稿論文の共著者としてご校閲頂いた。ホクレン農業協同組合連合会特任技監 志賀弘行博士，名寄市立大学保健福祉学部栄養学科教授 加藤 淳博士，上川農業試験場長 安積大治氏，TOMATEC 株式会社札幌営業所技術顧問 長尾明宣氏，十勝農業試験場長 中本

洋氏には、所属部の長として包括的なご指導を頂くとともに、投稿論文についてご校閲頂いた。

この他にも、北海道大学および北海道立総合研究機構中央農業試験場で同室となった方々をはじめ、多くの方々のご協力を得て本論文の取りまとめを行うことができた。ここに記して、各位のご厚情に感謝の意を表す。

## 引用文献

- 赤池一彦・窪田 哲 2002. 高冷地で有機栽培が可能な露地野菜の品目と栽培時期. 山梨総農試研報, **11**, 35-44.
- Al-niemi, T. S., Summers, M. L., Elkins, J. G., Kahn, M. L., and McDermott, T. R. 1997. Regulation of the Phosphate Stress Response in *Rhizobium meliloti* by PhoB. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4978-4981.
- 青木元彦 2013. 枝豆の有機栽培におけるタネバエ及びダイズわい化病被害軽減対策. 道総研農試集報, **97**, 39-44.
- Asmar, F., Eiland, F., and Nielsen, N.E. 1992. Interrelationship between extracellular enzyme activity, ATP content, total counts of bacteria and CO<sub>2</sub> evolution. *Biol. Fertil. Soils*, **14**, 288-292.
- Asmar, F., Singh, T., Gahoonia, and Nielsen, N. E. 1995. Barley genotypes differ in activity of soluble extracellular phosphatase and depletion of organic phosphorus in the rhizosphere soil. *Plant Soil*, **172**, 117-122.
- Avrahami, S., Liesack, W., and Conrad, R. 2003. Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. *Environ. Microbiol.* **5**, 691-705.
- Bach, H. J., and Munch, J. C. 2000. Identification of bacterial sources of soil peptidases. *Biol. Fertil. Soils*, **31**, 219-224.
- Bach, H. J., Hartmann, A., Schloter, M., and 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. *Journal of Microbiological Methods*, **44**, 173-182.
- Baraniya, D., Puglisi, E., Ceccherini, M. T., Pietramellara, G., Giagnoni, L., Arenella, M., Nannipieri, P., and Renella, G. 2016. Protease encoding microbial communities and protease activity of the rhizosphere and bulk soils of two maize lines with different N uptake efficiency. *Soil Biol. Biochem.*, **96**, 176-179.
- Bremner, J. M. 1965. Nitrogen availability indexes. In C. A. Black, D. D. Evans, L. E. Ensminger, J. L. White, F. E. Clark, and R. C. Dinauer (ed.) *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*, p. 1324-1345. American Society of Agronomy, Madison.
- Brookes, P. C., Powlson, D. S., and Jenkinson, D. S. 1982. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biol. Biochem.*, **14**, 319-329.
- Bünemann, E. K. 2015. Assessment of gross and net mineralization rates of soil organic phosphorus-A review. *Soil Biol. Biochem.*, **89**, 82-98.
- Chen, X., Jiang, N., Condrón, L. M., Dunfield, K. E., Chen, Z., Wang, J., and Chen, L. 2019. Impact of long-term phosphorus fertilizer inputs on bacterial *phoD* gene community in a maize field, Northeast China. *Sci. Total Environ.*, **669**, 1011-1018.
- Cheng, K. J., Ingram, J. M., and Costerton, J. W. 1970. Release of alkaline phosphatase from cells of *Pseudomonas aeruginosa* by manipulation of cation concentration and of pH. *J. Bacteriol.*, **104**, 748-753.
- Chhabra, S., Brazil, D., Morrissey, J., Burke, J., O'Gara, F., and Dowling, D.N. 2013. Fertilization management affects the alkaline phosphatase bacterial community in barley rhizosphere soil. *Biol. Fertil. Soils*, **49**, 31-39.
- Dinkelaker, B., and Marschner, H. 1992. In vivo demonstration of acid phosphatase activity in the rhizosphere of soil-grown plants. *Plant Soil* **144**, 199-205.
- Dorich, R. A., and Nelson, D. W. 1983. Direct colorimetric measurement of ammonium in potassium chloride extracts of soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **47**, 833-836.
- Dunfield, K. E., and Germida, J. J. 2003. Seasonal Changes in the Rhizosphere Microbial Communities Associated with Field-Grown Genetically Modified Canola (*Brassica napus*). *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 7310-7318.
- 江口定夫 2008. モデルによる土壌、農耕地、流域における窒素動態の理解 3. 地形連鎖系スケールの窒素動態—調査技法とモデル化手法—. 土肥誌, **79**, 213-227.
- Fraser, T., Lynch, D. H., Entz, M. H., and Dunfield, K. E. 2015. Linking alkaline phosphatase activity with bacterial *phoD* gene abundance in soil from a long-term management trial. *Geoderma*, **257-258**, 115-122.
- Friedberg, I., and Avigad, G. 1967. Some properties of alkaline phosphatase of *Pseudomonas fluorescens*. *Eur. J. Biochem.*, **1**, 193-198.
- Ghoshal, N., and Singh, K. P. 1995. Effects of farmyard

- manure and inorganic fertilizer on the dynamics of soil microbial biomass in a tropical dryland agroecosystem. *Biol. Fertil. Soils*, **19**, 231-238.
- Girvan, M. S., Bullimore, J., Ball, A. S., Pretty, J. N., and Osborn, A. M. 2004. Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 2692-2701.
- Grayston, S. J., Wang, S., Campbell, C. D., and Edwards, A.C. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*, **30**, 369-378.
- Guffanti, A. A., and Corpe, W. A. 1976. Partial purification and characterization of alpha-glucosidase from *Pseudomonas fluorescens* W. *Arch. Microbiol.*, **107**, 269-276.
- Guschin, D. Y., Mobarry, B. K., Proudnikov, D., Stahl, D. A., Rittmann, B. E., and Mirzabekov, A. D. 1997. Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2397-2402.
- 花・野菜技術センター 2020. 園芸作物に関する調査要領.  
[http://www.hro.or.jp/list/agricultural/research/hanaya\\_sai/04hana\\_yasai\\_info/02youryou/youryou.htm](http://www.hro.or.jp/list/agricultural/research/hanaya_sai/04hana_yasai_info/02youryou/youryou.htm)
- 橋本秀教 1981. 有機物施用の理論と応用, p. 13-128. 農文協, 東京.
- 波多野隆介 2002. 暗渠排水を利用した硝酸溶脱のモニタリングとモデリング. 長谷川周一・波多野隆介・岡崎正規編 環境負荷を予測する, p.57-74. 博友社, 東京.
- 早野恒一 1997. 植物の窒素, リン栄養と微生物, 新・土の微生物 (2) 植物の生育と微生物, 土壤微生物研究会編, p. 133-165. 博友社, 東京.
- 林 哲央 2014. 畑作物と野菜のリン酸肥料を節約できる! (有機物の肥効評価と局所施肥を活用したリン酸減肥指針). 土づくりとエコ農業, **46**, 11-16.
- 日高秀俊・新妻成一・大澤元成・久保省三 2004. 各種鶏ふんの窒素無機化量の簡易評価法. 土肥誌, **75**, 21-28.
- 日置雅之・久野智香子・北村秀教・加藤 保 2001. 愛知県で生産される家畜ふん堆肥の窒素肥効特性. 愛知農総試研報, **33**, 245-250.
- 樋口太重・栗原 淳 1978. 有機物の形態と施肥窒素の行動に関する研究 (第2報). 各種有機物の形態組成と硫酸窒素の有機化. 土肥誌, **49**, 65-70.
- 北海道 2003. 「特別栽培農産物に係る表示ガイドライン」に基づく化学肥料の慣行レベル.  
<http://www.pref.hokkaido.lg.jp/ns/shs/grp/06/hiryou.pdf>
- 北海道グリーン農業推進協議会 2010. 北のグリーン農産物表示制度生産集団登録基準, 別表2 肥料及び化学肥料の使用基準等.  
<http://www.yesclean.jp/crop/files/b02.pdf>
- 北海道農政部 2004. 北海道緑肥作物等栽培利用指針改訂版, p. 1-101. 北海道.
- 北海道農政部 2010. 平成21年度「有機農業者アンケート」結果, p. 1-46. 北海道.
- 北海道農政部 2020. 北海道施肥ガイド2020, p. 1-226. 北海道.
- 北海道立中央農業試験場 2007. 有機栽培野菜畑の窒素肥沃度指標の選定とその簡易分析法.  
<http://www.agri.hro.or.jp/center/kenkyuseika/gaiyosho/h19gaiyo/f3/2007304.html>
- 北海道立総合研究機構農業研究本部 2012. 土壌・作物栄養診断のための分析法 2012, p. 1-193.
- 北海道立総合研究機構農業研究本部 2019. 有機栽培露地野菜畑向け施肥設計ツール「TORVE」.  
<http://www.hro.or.jp/list/agricultural/center/torve/index.html>
- 堀 兼明 1994. 農耕地における土壌診断の研究ならびに診断指標と手法の開発. 3 土壌の微生物特性診断. 土肥誌, **65**, 578-584.
- 堀 兼明・福永亜矢子・浦嶋泰文・須賀有子・池田順一 2002. 有機栽培農家圃場の土壌の実態. 近中四農研報, **1**, 77-94.
- 藤田一輝・諸 人誌・大塚重人・長岡一成・國頭 恭 2019. 土壌中の養分利用性と微生物による酵素生産との関係:資源配分モデルを中心に. 土と微生物, **73**, 10-23.
- 井田 明・深山政治・森 哲郎・徳永美治・赤塚 恵 1970. 可給態窒素. 土壌養分測定法委員会編, 肥沃度測定のための土壌養分分析法, p. 205-209. 養賢堂, 東京.
- 井上健一・西尾 隆 2006. 畑土壌の脱窒に及ぼす土壌含水率, 仮比重, 乾燥豚ふん施用の影響とそれらの相互関連性の評価. 土肥誌, **77**, 659-665.
- Jorquera, M.A., Martinez, O.A., Marileo, L.G., Acuna, J.J., Saggari, S., and 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.
- Kandeler, E., Marschner, P., Tschirko, D., Gahoonia, T. S., and Nielsen, N. E. 2002. Microbial community

- composition and functional diversity in the rhizosphere of maize. *Plant Soil*, **238**, 301-312.
- 環境省 2018. 人の健康の保護に関する環境基準.  
<http://www.env.go.jp/kijun/wt1.html>
- 唐澤敏彦 2020. 緑肥の導入や有機栽培が土壌の有用微生物に与える影響とその利用の可能性. *土と微生物*, **74**, 8-12.
- Kita, A., Matsui, H., Somoto, A., Kimura, A., Takata, M., and Chiba, S. 1991. Substrate specificity and subsite affinities of crystalline  $\alpha$ -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2327-2335.
- 橘田安正・茂角正延・水落勁美 2002. 採卵鶏由来鶏糞の窒素成分と窒素無機化率との関係. *土肥誌*, **73**, 263-269.
- 今野一男・菊地晃二 1996. 緑肥窒素の無機化に及ぼす化学成分の影響. *土肥誌*, **67**, 419-421.
- 河野憲治 1996. 土壌バイオマス形成とリンのフロー. *土肥誌*, **67**, 716-725.
- 小柳渉・安藤義昭・水沢誠一・森山則男 2004. 家畜糞堆肥中の塩類組成の特徴. *土肥誌*, **75**, 91-93.
- 國頭 恭・諸人誌・藤田一輝・美世一守・長岡一成・大塚重人 2019. リン可給性をめぐる土壌微生物群集. *土と微生物*, **73**, 41-54.
- 倉島健次 1983. 家畜ふん尿処理利用研究会会議資料, p. 45-49, 畜産試験場.
- 桑原真人 2012. 有機農業における土壌診断の意義と活用. *北海道有機農業技術研究年報*, **22**, 30-35.
- Ladd, J. N., and Butler, J. H. A. 1972. Short term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biol. Biochem.*, **4**, 19-30.
- Lee, J. J., Park, R. D., Kim, Y. W., Shim, J. H., Chae, D. H., Rim, Y. S., Sohn, B. K., Kim, T. H., and Kim, K. Y. 2004. Effect of food waste compost on microbial population, soil enzyme activity and lettuce growth. *Bioresour. Technol.*, **93**, 21-28.
- Li, H., Xu, X., Chen, H., Zhang, Y., Xu, J., Wang, J., and Lu, X. 2013. Molecular analyses of the functional microbial community in composting by PCR-DGGE targeting the genes of the  $\beta$ -glucosidase. *Bioresour. Technol.*, **134**, 51-58.
- Li, K. B., and Chan, K. Y. 1983. Production and properties of  $\alpha$ -glucosidase from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1380-1387.
- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., and Forney, L. J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4516-4522.
- Luo, G., Ling, N., Nannipieri, P., Chen, H., Raza, W., Wang, M., Guo, S., and Shen, Q. 2017. Long-term fertilisation regimes affect the composition of the alkaline phosphomonoesterase encoding microbial community of a vertisol and its derivative soil fractions. *Biol. Fertil. Soils*, **53**, 375-388.
- 前田守弘 2007. 農業生産における有機性資源に関連した窒素負荷の現状と今後の課題. *水環境学会誌*, **30**, 337-342.
- Mandal, A., Patra, A.K., Singh, D., Swarup, A., and Mastro, R. E. 2006. Effect of long-term application of manure and fertilizer on biological and biochemical activities in soil during crop development stages. *Bioresour. Technol.*, **98**, 3585-3592.
- Marilley, L., and Aragno, M. 1999. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Applied Soil Ecology*, **13**, 127-136.
- Marschner, P., Grierson, P. F., and Rengel, Z. 2005. Microbial community composition and functioning in the rhizosphere of three *Banksia* species in native woodland in Western Australia. *Appl. Soil Ecol.*, **28**, 191-201.
- Marschner, P., Kandeler, E., and Marschner, B. 2003. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biol. Biochem.*, **35**, 453-461.
- 松永俊朗・森泉美穂子 2012. 土壌の可給態窒素分析法と課題. *土肥誌*, **83**, 625-629.
- 三木直倫 2002. 硝酸態窒素の土層内動態をモニタリングする. 長谷川周一・波多野隆介・岡崎正規編 環境負荷を予測する, p. 37-56. 博友社, 東京.
- 三木直倫・安積大治・橋本 均 2000. 北海道農耕地土壌における硝酸態窒素残存許容量と流れ易さの区分. *土肥誌*, **71**, 396-399.
- 三木直倫・前田善夫・小野寺政行 2017. 北海道オホーツク地域の有機栽培タマネギにおける養分収支. *北農*, **84**, 357-365.
- 水野直治・南 松雄 1980. 硫酸-過酸化水素による農作物中 N, K, Mg, Ca, Fe, Mn 定量のための迅速前処理法. *土肥誌*, **51**, 418-420.
- Morimoto, N., Wang, Y., Ito, S., Takehana, T., and Matsui, H. 2008. Purification and some properties of an  $\alpha$ -glucosidase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain HM-127. *J. Appl. Glycosci.*, **55**, 183-185.
- Morimoto, S., Togami, K., Ogawa, N., Hasebe, A., and Fujii, T. 2005. Analysis of a bacterial community in

- 3-cholorobenzoate-contaminated soil by PCR-DGGE targeting the 16S rRNA gene and benzoate 1,2-dioxygenase gene (*benA*). *Microbes and Environments*, **20**, 151-159.
- 森塚直樹 2006. 根圏土壌の化学性を評価する手法. 土肥誌, **77**, 591-595.
- 諸人誌 2015. 土壌酵素を用いた土壌の養分利用性評価. 信州大学審査学位論文, 1-107.
- 村上圭一・小阪幸子・原 正之 2007. 鶏ふん堆肥の尿酸測定による可給態窒素量の評価. 土肥誌, **78**, 85-87.
- 村上圭一・小阪幸子・藤原孝之・原 正之 2009. 三重県内で生産された鶏ふん堆肥の成分特性. 土肥誌, **80**, 165-167.
- 村上圭一・中村文子・後藤逸男 2004. 土壌のリン酸過剰とアブラナ科野菜根こぶ病発病の因果関係. 土肥誌, **75**, 453-457.
- 田村 元・加藤 淳・清水基滋・竹内晴信 2012. 北海道における有機栽培ばれいしょの安定生産技術 1. 収量・品質に対するジャガイモ疫病発生の影響と品種選択の効果. 北農, **79**, 34-39.
- 田村 元・中津智史・竹内晴信・加藤 淳 2015. 北海道における有機栽培ばれいしょの安定生産技術 2. 有機質肥料の施肥方法. 北農, **82**, 274-278.
- Murphy, J., and Riley, J. P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta.*, **27**, 31-36.
- Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, **2**, 317-322.
- Myers, R. M., Fischer, S. G., Lerman, L. S., and Maniatis, T. 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 3131-3145.
- 永田利男 1956. 馬鈴薯の話, p. 169-171. 北海道新聞社, 札幌.
- 内藤健二・佐藤一弘 2015. 土壌への過剰養分蓄積を抑えたい肥施用技術 (2) たい肥のリン酸, カリの肥効に基づく施肥. 埼玉農総研報, **14**, 8-15.
- 中本 洋 2012. 各種露地野菜における有機質肥料の化学肥料窒素代替. 道総研農試集報, **96**, 35-41.
- 中村隆一・古川勝弘・西田忠志・赤司和隆・志賀弘行・池谷美奈子・美濃健一・古館明洋 2007. 有機栽培たまねぎの生産安定化. 平成18年度研究成果情報(北海道農業), p. 62-63.
- Nakas, J. P., Gould, W. D., and Klein, D. A. 1987. Origin and expression of phosphatase activity in a semi-arid grassland soil. *Soil Biol. Biochem.*, **19**, 13-18.
- Nakatsu, C. H., Torsvik, V., and Ovreas, L. 2000. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **64**, 1382-1388.
- 中辻敏朗・笛木伸彦・中津智史・鈴木慶次郎・志賀弘行 2014. Capacity model をもとにした積雪寒冷地畑の月別土壌浸透水量簡易推定モデル. 土肥誌, **85**, 185-193.
- 中辻敏朗・坂口雅己・柳原哲司・小野寺政行・櫻井道彦 2008. 有機栽培野菜畑の窒素肥沃度指標とその簡易分析法. 土肥誌, **79**, 317-321.
- 中津智史・東田修司・山神正弘 2000. 淡色黒ボク土壌における堆きゅう肥の連用が畑作物の収量・品質および土壌環境に及ぼす影響. 土肥誌, **71**, 97-100.
- Nannipieri, P., Muccini, L., and Curdi, C. 1983. Microbial biomass and enzyme activities: production and persistence. *Soil Biol. Biochem.*, **15**, 679-685.
- Nannipieri, P., Giagnori, L., Landi, L., and Renella, G. 2011. Role of phosphatase enzymes in soil. In *Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling*, Soil Biology 26, (Ed.) Bünemann, E.K., Oberson, A., and Frossard, E. p. 215-243, Springer-Verlag.
- Neal, A. L., Rossmann, M., Brearley, C., Akkari, E., Guyomar, C., Clark, I. M., Allen, E., and Hirsch, P. R. 2017. Land-use influences phosphatase gene microdiversity in soils. *Environ. Microbiol.* **19**, 2740-2753.
- 日本土壌協会 2000. 堆肥等有機物分析法, p. 1-217. 東京.
- 西尾道徳 2007. 堆肥・有機質肥料の基礎知識, p. 137-154. 農文協, 東京.
- 西尾道徳 2019. 検証有機農業, p. 1-388. 農文協, 東京.
- 西尾 隆 1994. 耕地土壌の脱窒過程. 土肥誌, **65**, 463-471.
- 農林水産省 2006. 有機農業の推進に関する法律. <https://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/youuki/attach/pdf/sesaku-1.pdf>
- 農林水産省 2007. 特別栽培農産物に係る表示ガイドライン. [http://www.maff.go.jp/j/jas/jas\\_kikaku/pdf/tokusai\\_03.pdf](http://www.maff.go.jp/j/jas/jas_kikaku/pdf/tokusai_03.pdf)
- 農林水産省 2010. 農作物価統計調査. <http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/noubukka/index.html#l>

- 農林水産省 2017. 有機農産物の日本農林規格.  
[http://www.maff.go.jp/j/jas/jas\\_kikaku/attach/pdf/yuki-31.pdf](http://www.maff.go.jp/j/jas/jas_kikaku/attach/pdf/yuki-31.pdf)
- 農林水産省 2020. 有機農業をめぐる事情.  
<https://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/youki/attach/pdf/index-146.pdf>
- 農林水産技術会議事務局 1985. 農耕地における土壌有機物変動の予測と有機物施用基準の策定, p.1-138.
- Oberson, A., Friesen, D. K., Rao, I. M., Bühler, S., and Frossard, E. 2001. Phosphorus transformations in an oxisol under contrasting land-use systems: The role of the soil microbial biomass. *Plant Soil*, **237**, 197-210.
- 小川和夫・竹内 豊・片山雅弘 1988. 北海道の耕草地におけるバイオマス生産量及び作物による無機成分吸収量. 北農試研報, **149**, 57-91.
- Ogram, A., Sayler, G. S., and Barkay, T. 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods*, **7**, 57-66.
- 奥村正敏・美濃健一・三木直倫・鈴木慶次郎・山神正弘・北川 巖 1996. 道央火山性畑土壌の微生物活性 ( $\alpha$ -グルコシダーゼ活性) 標準値と向上方策, 平成 8 年度研究成果情報 (北海道農業), p. 180-181.
- 小野寺政行・中本 洋 2007. 北海道における堆肥と各種有機質肥料を用いた露地野菜の無化学肥料栽培. 土肥誌, **78**, 611-616.
- 小野寺政行・中本 洋・奥村正敏 2004. 粘質野菜畑土壌における  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性に基づいた土壌管理指針. 平成 15 年度新しい研究成果—北海道地域—, 113-119.
- 小野寺政行・唐 星児 2009. 後作緑肥の活用による汚染軽減対策. 北海道立農業試験場資料, **38**, 40-51.
- 大森裕子 2017. PCR-DGGE 解析法の最適化と農地土壌の微生物群集解析に関する研究. 筑波大学大学院学位論文, 1-116.
- 大村裕顕・室井栄一・佐々木功・栃木博美 1988. 施設栽培土壌の有機態窒素の無機化に関与する土壌酵素活性について. 土肥誌, **59**, 288-295.
- 大西忠男・田中静幸 2012. 肥大開始からはかん水と病害虫防除. タマネギの作業便利帳, p. 35. 農文協, 東京.
- Oved, T., Shaviv, A., Goldrath, T., Mandelbaum, R. T., and Minz, D. 2001. Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3426-3433.
- Pace, N. R., Stahl D. A., Lane D. J., and Olsen G. J. 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.*, **9**, 1-55.
- Payne, W. J. 1974. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriol. Rev.*, **37**, 409-452.
- Pazur, J. H., and French, D. 1951. The transglucosidase of *Aspergillus oryzae*. *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 3536.
- Perriere, G., and Gouy, M. 1996. WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie*, **78**, 364-369.
- Richardson, A. E. 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust. J. Plant Physiol.*, **28**, 897-906.
- 齊藤研二・安藤利夫・八槇 敦 2007. コカブの作型別窒素吸収特性と窒素施肥法. 千葉農総研研報, **6**, 1-11.
- 斎藤雅典 1988. 土壌可給態窒素量の紫外外部吸光度法による評価. 土肥誌, **59**, 493-495.
- Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for sequencing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406-425.
- 坂口雅己・櫻井道彦・中辻敏朗 2010. 土壌熱水抽出性窒素の簡易測定法の比較とトリプトファンを指標物質とした紫外外部吸光度法の確立. 土肥誌, **81**, 130-134.
- 坂本一憲 1998. 微生物バイオマスと土壌窒素肥沃度. 土と微生物, **51**, 35-47.
- 櫻井道彦・中辻敏朗・日笠裕治 2011. 有機栽培露地野菜畑の  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性標準値設定の試み. 土肥要旨集, **58**, 247.
- 櫻井道彦・中辻敏朗・日笠裕治 2013a. 特別栽培農産物(バレイショ)における窒素代替資材としての鶏ふん堆肥の利用. 土肥誌, **84**, 53-57.
- 櫻井道彦・中辻敏朗・日笠裕治 2013b. 有機栽培露地野菜畑の土壌診断に基づく窒素施肥対応の構築. 土肥誌, **84**, 285-292.
- 櫻井道彦・坂口雅己・日笠裕治 2015. 有機栽培畑への転換を目指した緑肥導入モデル. 土肥要旨集, **61**, 121.
- 櫻井道彦・坂口雅己・日笠裕治 2016. 北海道における有機栽培タマネギ・バレイショの窒素施肥対応. 土肥誌, **87**, 205-208.
- 櫻井道彦・坂口雅己・日笠裕治 2018a. 窒素収支に基づく有機栽培畑の堆肥施用上限量. 土肥要旨集, **64**, 118.
- 櫻井道彦・坂口雅己・日笠裕治 2021. 有機栽培畑へ

- の転換を前提とした緑肥導入モデルの検討—緑肥の導入が窒素肥沃度へ及ぼす影響—. 土肥誌, **92**, 192-199.
- 櫻井道彦・坂口雅己・古館明洋 2018b. 北海道における春全量施肥を前提とした有機栽培タマネギの窒素施肥対応. 土肥誌, **89**, 213-219.
- 櫻井道彦・谷藤 健 2019. 北海道の有機栽培露地野菜畑に適したリン酸施肥対応. 土肥要旨集, **65**, 119.
- 櫻井道彦・谷藤 健 2020. 有機栽培露地野菜畑に対応した施肥設計ツール「TORVE」. 土肥誌, **91**, 261-264.
- Sakurai, M., Suzuki, K., Onodera, M., Shinano, T., and 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., and Osaki, M. 2008. Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase genes in soil supplied with organic matter, *Soil Sci. Plant Nutr.*, **54**, 62-71.
- 佐藤紀男 2010. コマツナの連続栽培による各種有機質肥料の窒素肥効特性. 土肥誌, **81**, 557-562.
- 佐藤 孝・小野寺雄平・高階史章・保田謙太郎・石田朋子・渋谷 允・中川進平・渡辺恭平・金田吉弘 2019. 重粘土転換畑におけるヘアリーベッチ植栽がキャベツの窒素吸収および可取量に及ぼす影響. 土肥誌, **90**, 249-256.
- Seeling, B., and Zasoski, R. J. 1993. Microbial effects in maintaining organic and inorganic solution phosphorus concentrations in a grassland topsoil. *Plant Soil*, **148**, 277-284.
- 白井康裕 2007. たまねぎ有機農業が成立可能な収量水準. 平成18年度研究成果情報(北海道農業), p. 4-5.
- 進藤晴夫 1992. 畑土壌のプロテアーゼ,  $\beta$ -アセチルグルコサミニダーゼおよびアデノシンデアミナーゼ活性に及ぼす堆肥連用の効果ならびに酵素活性と窒素の無機化との関係. 土肥誌, **63**, 190-195.
- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., and Hajibabaei, M. 2012. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol. Ecol.*, **21**, 1794-1805.
- 植物栄養実験法編集委員会 1990. 植物栄養実験法, p. 174-203. 博友社, 東京.
- Smart, J. B., Dilworth, M. J., and Robson, A. D. 1984. Effect of phosphorus supply on phosphate uptake and alkaline phosphatase activity in Rhizobia. *Arch. Microbiol.*, **140**, 281-286.
- 相馬 暁 1988. 品質アップの野菜施肥, p. 187-228. 農文協, 東京.
- 相馬 暁・岩渕晴郎・多賀辰義 1983. 窒素・りん酸肥沃度に対応したタマネギの窒素施肥法. 北海道立農試集報, **50**, 1-12.
- Speir, T. W., and Cowling, J. C. 1991. Phosphatase activities of pasture plants and soils: relationship with plant productivity and soil P fertility indices. *Biol. Fertil. Soils*, **12**, 189-194.
- Stanier, R. Y., Palleroni, N. J., and Doudoroff, M. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *The Journal of General Microbiology*, **43**, 159-271.
- Stewart, J. W. B., and Tiessen, H. 1987. Dynamics of soil organic phosphorus. *Biogeochemistry*, **4**, 41-60.
- 須賀有子・長岡一成・唐澤敏彦・橋本知義 2017. 塩基配列解析に基づいた茨城県つくば市の露地野菜農家圃場における中性メタロプロテアーゼ生産細菌群集構造の解析. 土と微生物, **71**, 18-23.
- 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.
- Sun, H. Y., Deng, S. P., and Raun, W. R. 2004. Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 5868-5874.
- Tabatabai, M. A., and Bremner, J. M. 1969. Use of *p*-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.*, **1**, 301-307.
- 田上貴祥 2014. GH31  $\alpha$ -グルコシダーゼの基質特異性と構造の多様性. 化学と生物, **52**, 205-207.
- 瀧 勝俊・加藤 保 1998. 有機農業実践ほ場における土壌の特徴. 愛知農総試研報, **30**, 79-87.
- 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.
- 棚橋寿彦・矢野秀治 2004. 鶏ふんの堆肥の窒素含量に基づく肥効推定法. 土肥誌, **75**, 257-260.
- Tan, H., Barret, M., Mooij, M.J., Rice, O., Morrissey, J.P., Dobson, A., Griffiths, B., and 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.
- 谷 昌幸 2021. 有機物を通じた植物へのリン供給経路・動態 2. 土壌中におけるリン酸と溶存有機物との相互作用. 土肥誌, **92**, 48-54.
- Tarafdar, J. C., and Claassen, N. 1988. Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants



- through the activity of phosphatase produced by plant roots and microorganisms. *Biol. Fertil. Soils*, **5**, 308-312.
- Tarafdar, J. C., and 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, K. R. 1984. The biological transformation of P in soil. *Plant Soil*, **76**, 245-256
- Tesfaye, M., Dufault, N. S., Dornbusch, M. R., Allan, D. L., Vance, C. P., and Samac, D. A. 2003. Influence of enhanced malate dehydrogenase expression by alfalfa on diversity of rhizobacteria and soil nutrient availability. *Soil Biol. Biochem.*, **35**, 1103-1113.
- Torsvik, V., Daae, F. L., Sandaa, R. A., and Øvrea<sup>o</sup>. L. 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.*, **64**, 53-62.
- Torsvik, V., Goksoyr, J., and Daae, F. L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *American Society for Microbiology*, **56**, 782-787.
- Tourlomousis, P., Kemsley, E. K., Ridgway, K. P., Toscano, M. J., Humphrey T. J., and Narbad, A. 2010. PCR-denaturing gradient gel electrophoresis of complex microbial communities: a two-step approach to address the effect of gel-to-gel variation and allow valid comparisons across a large dataset. *Microb. Ecol.*, **59**, 776-786.
- Trsvik, V. L. 1980. Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biol. Biochem.*, **12**, 15-21.
- Truog, E. 1930. The determination of readily available phosphorus in soils. *J. Am. Soc. Agr.*, **23**, 874-882.
- 對馬誠也 2015. 土壤eDNA診断技術の現状と展望. 土と微生物, **69**, 75-79.
- 牛尾進吾・吉村直美・斉藤研二・安西徹郎 2004. 家畜ふん堆肥の成分特性と肥料的効果を考慮した施用量を示す「家畜ふん堆肥利用促進ナビゲーションシステム」. 土肥誌, **75**, 99-102.
- Wang, Y., Zhang, F., and 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.
- 渡邊克二 1996. 土壤プロテアーゼの生産に関与する土壤細菌の特定と分子生物学的検出手法の開発. 土肥誌, **67**, 255-256.
- 渡邊克二・早野恒一 1996. 土壤中のプロテアーゼ生産微生物. 土と微生物, **47**, 9-22.
- Watanabe, K., and Hayano, K. 1993. Source of soil protease in paddy fields. *Canadian Journal of Microbiology*, **39**, 674-680.
- Watanabe, K., and Hayano, K. 1994. Estimate of the source of soil protease in upland fields. *Biol. Fertil. Soils*, **18**, 341-346.
- 渡辺 和彦 2002. 原色野菜の要素欠乏・過剰症. p. 59-60. 農文協, 東京.
- Whipps, J.M. 1990. Carbon economy. In *The Rhizosphere*. Lynch, J.M. (ed.) p. 59-97. John Chichester, West Sussex, UK: Wiley & Son.
- Williamson, N., Brian, P., and Wellington, E. M. H. 2000. Molecular detection of bacterial and streptomycete chitinases in the environment. *Antonie van Leeuwenhoek*, **78**, 315-321.
- 山本二美 2009. 野菜栽培における窒素肥料低減化技術の開発に関する研究. 千葉農林総研特報, **1**, 1-51.
- 山崎晴民・六本木和夫 1998. 有機物施用が葉菜類の収量及び品質に及ぼす影響. 埼玉園試研報, **21**, 7-20.
- Yamasaki, Y., Miyake, T., and Suzuki, Y. 1973. Properties of crystalline  $\alpha$ -glucosidase from *Mucor javanicus*. *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 251-259.
- Yang, C., Yang, L., and Jianhua, L. 2006. Organic phosphorus fractions in organically amended paddy soils in continuously and intermittently flooded conditions. *J. Environ. Qual.* **35**. 1142-1150.
- 吉田重信 2014. 農耕地 eDNA データベース (eDDASs) の開発とその活用の方向性. (独) 農業環境技術研究所成果発表会資料, 31-38.
- Zak, J. C., Willig, M. R., Moorhead, D. L., and Wildman, H. G. 1994. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biol. Biochem.*, **26**, 1101-1108.
- 鄭 紹輝・中元博明・有馬 進 2008. ヘアリーベッチおよび赤クローバによる土壤窒素の補給効果. *Coastal Bioenvironment*, **12**, 41-45.

# Study on soil microbial community structures and comprehensive design for fertilizer application in cultivation styles mainly for organic matter application

Michihiko Sakurai

## Summary

The purpose of this study is to analyze soil microbial community structures involved in nitrogen and phosphate metabolism in cultivation styles that mainly apply organic matter, including organic farming, and to provide comprehensive design for fertilizer application that balances crop production and environmental conservation.

Proteases for nitrogen and alkaline phosphatases for phosphorus as target enzymes, were analyzed the relationship between the variation of the enzymatic activity by organic fertilizers and its generation bacterial community structures.

In order to establish design for nitrogen fertilizer application corresponding based on the soil diagnosis of organic farming fields, the nitrogen fertilizer efficiency of fermented poultry manure was evaluated. In addition, it sets soil nitrogen diagnosis standard suitable for organic farming fields, and examined design for nitrogen fertilizer application for pumpkin (*Cucurbita maxima* Duch.), maize (*Zea mays* L.), lettuce (*Lactuca sativa* L.), onion (*Allium cepa* L.), and potato (*Solanum tuberosum* L.).

With respect to manure, which is often applied in organic farming fields, the upper limit of application was examined from the perspective of nitrogen balance. In addition, it proposed for the green manure introduction models at the time of conversion to organic farming fields. Furthermore, by utilizing the results of the studies so far, it has developed a comprehensive fertilizer application design tool that can easily set the amount of organic fertilizer application by calculating the target values of nitrogen, phosphoric acid, and potassium fertilizers suitable for organic farming fields.

The outline of this study is as follows.

### 1. Relationship between enzyme activity of soil microorganisms and bacterial community structure by organic matter application

#### 1) Analysis method for community structure of protease-producing bacteria and change due to cultivation style

The effects of application of organic matter or chemical fertilizers on the protease activity of non-rhizosphere soil and rhizosphere soil, and the community structure of protease-producing bacteria were analyzed using lettuce as a prototype.

##### (1) The protease activity of the organic matter application was always higher than that of the chemical fertilizer application.

In addition, the protease activity in rhizosphere soil was higher than that in non-rhizosphere soil.

##### (2) As a result of analyzing the bacterial community structure by DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) for alkaline metalloprotease genes and neutral metalloproteinase genes, alkaline metalloprotease-producing bacteria are mainly related to *Pseudomonas fluorescens*, and neutral metalloprotease-producing bacteria are closely related to *Bacillus megaterium*. This result is consistent with the results of the previous culture method, and means that the DGGE in this study has high specificity for the alkaline metalloprotease gene and the neutral metalloprotease gene.

##### (3) As a result of evaluating the community structure of protease-producing bacteria by principal component analysis based on the DGGE profile, the community structure of alkaline metalloprotease and neutral metalloprotease-

producing bacteria was different between the organic matter application and the chemical fertilizer application. In addition, a significant relationship was found between each bacterial community structure and protease activity.

- (4) In conclusion, it is suggested that each protease-producing bacterium releases proteases with different amounts and specificities, and that the structure of the alkaline metalloprotease and neutral metalloprotease-producing bacterium communities has a great influence on the fluctuation of protease activity.

## 2) Analysis method for community structure of alkaline phosphatase-producing bacteria and change due to cultivation style

The effects of application of organic matter or chemical fertilizers on the alkaline phosphatase activity of non-rhizosphere soil and rhizosphere soil, and the community structure of alkaline phosphatase-producing bacteria were analyzed using lettuce as a prototype.

- (1) The alkaline phosphatase activity of the organic matter application was always higher than that of the chemical fertilizer application, the alkaline phosphatase activity in rhizosphere soil was higher than that in non-rhizosphere soil. Alkaline phosphatase activity was positively correlated with available phosphorus and biomass phosphorus. In addition, the phosphorus concentration of lettuce for organic matter application was higher than that for chemical fertilizer application. These results suggest that the increase in alkaline phosphatase activity due to organic matter application promoted the conversion of organic phosphorus to available phosphorus and biomass phosphorus, and increased the phosphorus available to crops.
- (2) As a result of analyzing the structure of the alkaline phosphatase-producing bacterial community by DGGE, many DNA fragments were obtained regardless of the sampling time, fertilization treatment, and soil sampling site. Therefore, it was suggested that various alkaline phosphatase-producing bacteria exist in soil. The DNA fragments were mainly related to *Mesorhizobium loti* and *Pseudomonas fluorescens*.
- (3) As a result of analyzing the community structure of alkaline phosphatase-producing bacteria by principal component analysis based on the DGGE profile, it was found that the community structure changed significantly depending on the fertilization treatment and the soil sampling site. In addition, a significant correlation was found between alkaline phosphatase activity and the community structure of alkaline phosphatase-producing bacteria.
- (4) In conclusion, it was suggested that each alkaline phosphatase-producing bacterium releases alkaline phosphatase having different amounts and specificities, and that the alkaline phosphatase-producing bacterial community plays a major role in the fluctuation of alkaline phosphatase activity.

## 2. Design for nitrogen fertilizer application based on the soil diagnosis of organic farming fields

### 1) Selection of organic materials suitable for cultivation styles mainly for organic matter application

The effect of applying fermented poultry manure with different nitrogen contents on the yield of potato in specially cultivated agricultural products was analyzed, including the investigation of nitrogen mineralization characteristics based on culture tests. The fermented poultry manure had a nitrogen content of around 20 g kg<sup>-1</sup> (low N), around 30 g kg<sup>-1</sup> (medium N), and 40 g kg<sup>-1</sup> or more (high N). The total amount of nitrogen fertilizer application was 100 kg ha<sup>-1</sup>, 55 kg ha<sup>-1</sup>, which is half the conventional level in Hokkaido, was applied with ammonium sulfate, and the remaining 45 kg ha<sup>-1</sup> was applied with fermented poultry manure.

- (1) Nitrogen mineralization was fastest in high N, followed by medium N, and low N, reflecting the amount of uric acid contained. The effect of culture temperature (10 or 30 °C) on nitrogen mineralization was small in high N, whereas nitrogen mineralization was delayed at 10 °C in low N and medium N. Therefore, high N was considered to be a material showing a stable nitrogen fertilizer effect regardless of the soil temperature.
- (2) The yield and nitrogen uptake amount of potato tended to increase as the nitrogen content of fermented poultry manure increased, and the nitrogen mineralization characteristics of fermented poultry manure had a strong influence on potato growth. On the other hand, no significant difference was observed in the starch content of potato among the three types of fermented poultry manure.
- (3) In conclusion, the application of high N was effective in the specially cultivated agricultural products of potato.

## 2) Soil nitrogen diagnosis standard and design for nitrogen fertilizer application for pumpkin, maize, and lettuce

According to field experiments applied rapeseed meal or fish meal as organic fertilizer, it was conducted to set the soil nitrogen diagnostic standard and design for nitrogen fertilizer application for pumpkin, maize, and lettuce in organic farming fields.

- (1) As organic fertilizer application equivalent to the standard of nitrogen fertilizer application for conventional farming, the yield was generally higher than the standard yield (pumpkin 20 Mg ha<sup>-1</sup>, maize 12 to 15 Mg ha<sup>-1</sup>, lettuce 20 Mg ha<sup>-1</sup>) for conventional farming. Therefore, the target yield of organic farming is the standard yield of conventional farming, and the optimum nitrogen uptake required to obtain that yield is pumpkin 105 kg ha<sup>-1</sup>, maize 125 kg ha<sup>-1</sup>, and lettuce 50 kg ha<sup>-1</sup>.
- (2) As organic fertilizer application equivalent to the standard of nitrogen fertilizer application for conventional farming, the nitrogen fertility at which the optimum nitrogen uptake was obtained was 50 to 70 mg kg<sup>-1</sup> for hot-water extractable nitrogen. This range was established as the soil nitrogen diagnosis standard in organic farming fields. This range was higher than the soil nitrogen diagnostic standard (30 to 50 mg kg<sup>-1</sup>) for conventional farming, suggesting that organic farming is a cultivation style that depends more on soil nitrogen fertility than conventional farming.
- (3) In the region of less than 50 mg kg<sup>-1</sup> and more than 70 mg kg<sup>-1</sup> for hot-water extractable nitrogen, the amount for nitrogen fertilizer application was calculated as (optimum nitrogen uptake - nitrogen uptake at no nitrogen application) / fertilizer nitrogen utilization rate. The calculated amounts were close to the amount of nitrogen fertilizer application for hot-water extractable nitrogen less than 30 mg kg<sup>-1</sup> and 50 mg kg<sup>-1</sup> or more in conventional farming. Therefore, design for nitrogen fertilizer application in organic farming field was utilized by upwardly modifying the nitrogen fertility classification of conventional farming by 20 mg kg<sup>-1</sup> for each of hot-water extractable nitrogen.

## 3) Design for nitrogen fertilizer application for onion and potato

Design for nitrogen fertilizer application for organic farming has not been set for onion and potato, which are the main agricultural products of Hokkaido. Therefore, the following results were obtained based on the experiments on application of organic fertilizer in fields with different nitrogen fertility.

- (1) The yield of onion was significantly higher after split nitrogen fertilizer application (2/3 applied in the previous autumn and 1/3 applied in the spring of the current year) than after single nitrogen fertilizer application in previous autumn.

(2) Based on these results, the amount of nitrogen fertilizer application was set for each of the three levels of hot-water extractable nitrogen 50 to 70 mg kg<sup>-1</sup>, which is the soil nitrogen diagnostic standard, less than the standard, and above the standard.

(3) As the amount of nitrogen fertilizer application assuming an estimated yield of 26 Mg ha<sup>-1</sup> in potato, 120 kg ha<sup>-1</sup> below the soil nitrogen diagnosis standard, 80 kg ha<sup>-1</sup> within the standard, and 40 kg ha<sup>-1</sup> above the standard are appropriate.

4) Design for nitrogen fertilizer application of onion on the premise of single nitrogen fertilizer application in current spring  
In order to improve the yield of organic onion, a nitrogen fertilizer examination was conducted in a wide range of nitrogen fertility compliant with the Japanese agricultural standard of organic agricultural products, and the following results were obtained.

(1) The yield of onion was significantly higher after a single nitrogen fertilizer application in spring than after a split application (2/3 applied in the previous autumn and 1/3 applied in the spring of the current year).

(2) There was no difference in yield of onion when organic fertilizers with nitrogen content of 40 g kg<sup>-1</sup> or more were used for the single fertilizer application in spring. On the other hand, the yield of onion was lower after application of fertilizers with nitrogen content of approximately 20 g kg<sup>-1</sup> than after application of fertilizers with nitrogen content of 40 g kg<sup>-1</sup> or more.

(3) In order to obtain the target yield of 44 Mg ha<sup>-1</sup> for organic onion, 140 kg ha<sup>-1</sup> is required as the amount of nitrogen fertilizer application at standard nitrogen fertility (hot-water extractable nitrogen 50 to 70 mg kg<sup>-1</sup>). When the soil nitrogen fertility was lower or higher than this range, it could be adjusted by increasing or decreasing the amount of nitrogen fertilizer applied by 40 kg.

### 3. Enrichment of soil fertility and comprehensive design for fertilizer application in organic farming fields

#### 1) Upper limit of manure application in organic farming fields based on nitrogen balance

In Hokkaido, the upper limit of application for continuous manure application in conventional farming is about 25 Mg ha<sup>-1</sup> for one crop per year, however it is not set for organic farming. Therefore, based on the concept of nitrogen balance, it was studied upper limit of manure application of the organic farming fields.

(1) The amount of excess nitrogen increased as the amount of manure application increased, and it was difficult to keep the amount of excess nitrogen below zero when a large amount of manure was used continuously.

(2) A significant positive correlation was found between the amount of manure application and the excess nitrogen amount. And the amount of manure application at which the excess nitrogen amount was zero was about 33 Mg ha<sup>-1</sup>.

(3) In conclusion, the upper limit of manure application in organic farming was set to approximately 30 Mg ha<sup>-1</sup>.

#### 2) Green manure introduction models for conversion to organic farming

In fields that have just started organic farming, the yield is often low because the nitrogen fertility is not high enough. This section aimed to develop methods to attain the desired nitrogen fertility of 50 to 70 mg kg<sup>-1</sup> hot-water extractable nitrogen for organic farming by cultivating legume green manure during the two-year conversion period.

(1) When the hairy vetch (*Vicia villosa*) green manure or red clover (*Trifolium pratense*) fallow green manure was cultivated during the two-year conversion period, the hot-water extractable nitrogen increased by approximately 5 to

15 mg kg<sup>-1</sup>. This result suggested that green manure was an effective source of easily decomposable organic nitrogen, which is the main component of hot-water extractable nitrogen.

- (2) With the introduction of green manure, the yield of vegetable crop increased by approximately 10 to 30% in the third and fourth years (the two years post-conversion to organic farming), and the  $\alpha$ -glucosidase activity was positively correlated with the green manure dry-matter yield.
- (3) In conclusion, it was proposed a model to increase soil nitrogen fertility by introducing green manure during the organic farming conversion period.

### 3) Design for phosphate fertilizer application for organic farming

In order to set the method of increasing or decreasing the amount of phosphate fertilizer application according to the phosphate fertility of the organic farming fields, a phosphate fertilization examination was conducted in a wide range of phosphate fertility based on the Japanese agricultural standard of organic agricultural products.

- (1) There was no significant difference in dry matter weight in the early stage of growth and yield between animal and plant sources as phosphate sources. In addition, there was no significant difference in dry matter weight in the early stage of growth and yield above the amount of phosphate fertilizer applied, which is equivalent to conventional farming.
- (2) In conclusion, it was possible to apply the design for phosphate fertilizer application of the Hokkaido fertilization guide to the setting of the phosphate fertilization amount in the organic farming field. The type of organic material does not matter when calculating the amount of phosphate fertilizer application.

### 4) Comprehensive design for fertilizer application

Since organic materials are not simple fertilizers containing only one component, but are equivalent to compound fertilizers containing two or more components, it is difficult to adjust the fertilizer application amount of nitrogen, phosphate, and potassium to the target amount. Therefore, it has developed TORVE, fertilizer application design tool for organic vegetables in Hokkaido.

- (1) TORVE calculates the amount target of fertilizer application that reflects the soil analysis, manure application, and fertilizer reduction adjustment by plow in green manure. In addition, it is a tool to set the amount of organic fertilizer application while considering the component ratios of nitrogen, phosphate, and potassium so as to meet the target amount.
- (2) In TORVE, "for pumpkin, lettuce, maize, green soybean, onion" sheet for 5 crops, which are often cultivated organically in Hokkaido, and "manual" sheet were provided to support flexible fertilizer application design.
- (3) The target of TORVE is the open field vegetable field, and the facility vegetable field is not applicable. In addition, this tool only supports basal application and cannot be applied to crops that are topdressing regularly. It is desirable to carry out soil analysis once every 3 to 4 years to regularly grasp the nutrient status of the field.