

添加有機物の種類と量が湛水土壌の硝酸代謝に及ぼす影響

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者	佐藤, 立夫 関根, 靖彦 和田, 秀徳
巻/号	60巻2号
掲載ページ	p. 134-139
発行年月	1989年4月

添加有機物の種類と量が湛水土壤の硝酸代謝に及ぼす影響*

佐藤立夫**・関根靖彦***・和田秀徳**

キーワード 水田土壤, 脱窒, 異化的硝酸還元, 嫌氣的代謝

1. 緒 言

土壤中の脱窒に及ぼす有機物の影響を調べた従来の研究は、多くの場合わらや堆肥^{1,2)}, 下水污泥³⁾など、複雑かつ不均一な有機物やグルコース^{2,4,5)}を対象とし、有機物の添加は通常、土壤の脱窒を促進すると結論している。しかし、和田ら⁶⁾は数種の糖類や、アミノ酸、有機酸の溶液を土壤の微小部位に注入して脱窒活性を調べ、有機物の中には脱窒を促進するものと抑制するものがあることを報告している。

ところで、根圏土壤では比較的単純な有機化合物が植物根より高濃度に供給されている。また、環境中には故意に、あるいは事故等により多種の有機化合物が多量に放出されている。これらの有機化合物は土壤中での脱窒に影響を及ぼしているはずである。一方、有機化合物の種類によって脱窒が変化する状況を詳しく解析すれば、脱窒に関連している生化学反応や微生物の種類、脱窒の制御等に対して重要な知見が得られると期待される。

前報⁷⁾では、三角フラスコ中で土壤試料を各種水分状態に保ち、二重ゴム栓で密封した系にアセチレンブロック法を適用すれば、24時間の培養液に脱窒量を正確・迅速に測定できることを報告した。本報においては、この実験方法を用いて、種々の有機化合物が湛水土壤中の脱窒をはじめとする多様な硝酸代謝とそれに関連する土壤微生物の代謝に与える影響を調べた。

2. 実験方法

1) 供試土壤

供試土壤の性質を第1表に示した。土壤の酸化還元電位、微生物フロラ等の差異による脱窒の違いを検討する

* 湛水土壤中における脱窒と異化的硝酸還元(第2報)
本研究の概要は昭和62年度日本土壤肥料学会北海道大会において発表した。

** 東京大学農学部(113 東京都文京区弥生 1-1-1)

*** 同上(現在、東京大学応用微生物研究所 113 東京都文京区弥生 1-1-1)

1988年9月29日受理

日本土壤肥料学雑誌 第60巻 第2号 p. 134~139 (1989)

ため、風乾土と湿潤土を用いた。湿潤土は風乾土を湛水し2~3カ月間30°Cで保温静置したものの還元層で、酸化還元電位約-220 mVであった。

2) 添加有機化合物

添加有機化合物は、①単糖類・少糖類、②アミノ酸、③低級脂肪酸、④その他のカルボン酸、⑤アルコール、⑥高分子化合物、⑦その他を用いた。以上の区分は実験結果の図の化合物名の右に番号で示した。

3) 試料の保温静置法(風乾土)

30 ml 容三角フラスコに乾土 1.75 g 相当量の風乾土を取り、硝酸ナトリウム 1 mg (乾土 100 g 当り硝酸態窒素 9.3 mg 相当量)、有機化合物(乾土 100 g 当り炭素 0~100 mg 相当量)、蒸留水 3 ml を加えた。この三角フラスコを二重ゴム栓で密封⁸⁾し、アセチレン約10%を含むアルゴンで気相を置換し、30°Cで24時間保温静置した。

4) 試料の保温静置法(湿潤土)

30 ml 容三角フラスコに湿潤土を 2 ml (乾土 1.25 g に相当)取り、硝酸ナトリウム、有機化合物(2)に記したのから代表的なものを選んだ)、蒸留水をそれぞれ風乾土の場合と同量加えた(乾土 100 g 当り硝酸態窒素量は 13 mg、有機化合物の炭素量は 0~140 mg に相当)。これを風乾土の場合と同様に密封・保温静置した。

5) 分析方法

保温静置後、すべての三角フラスコにつき、土壤から発生する二酸化炭素と亜酸化窒素の量をガスクロマトグラフィーで分析した。一部の三角フラスコについては、土壤を浸出して硝酸態窒素、亜硝酸態窒素、アンモニア態窒素、2価鉄および2価マンガンを分析した⁷⁾。

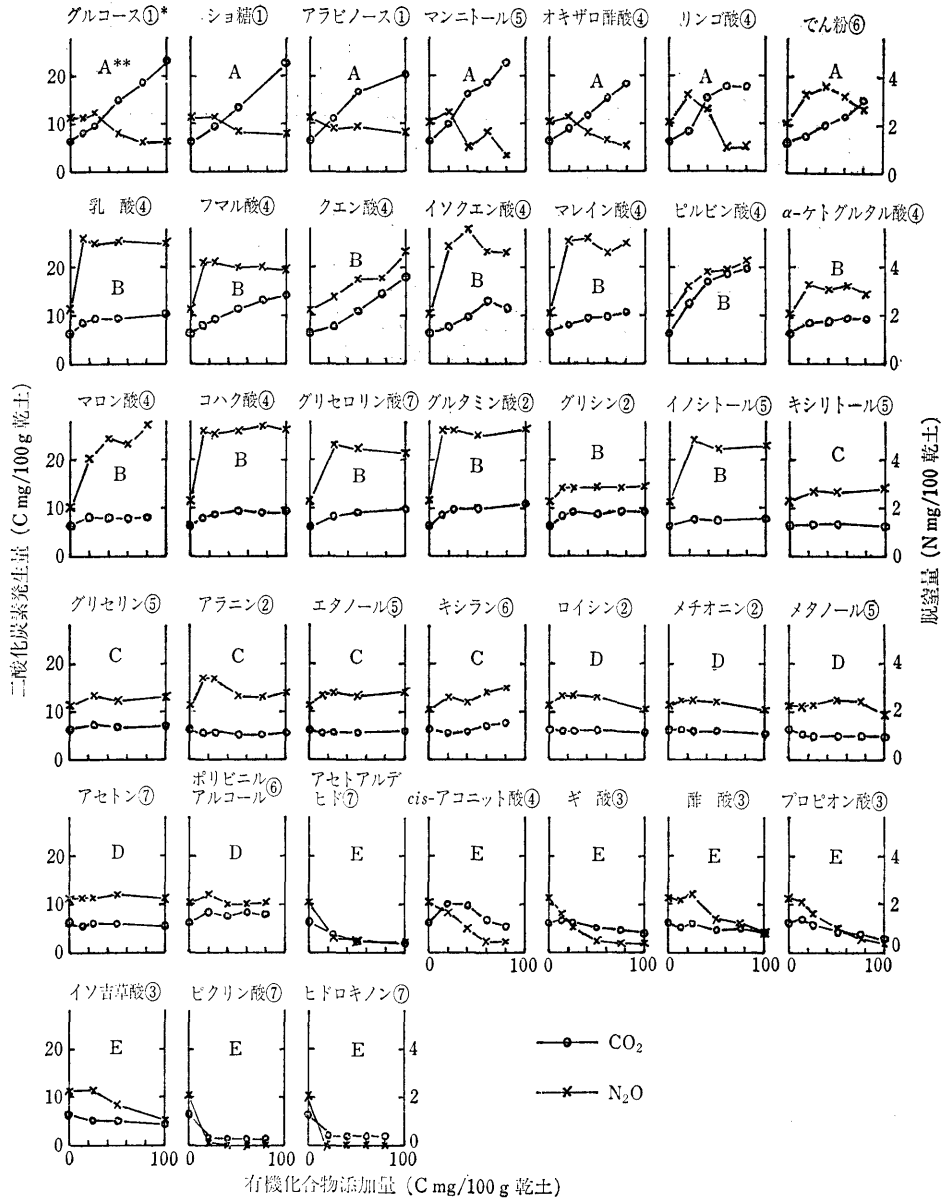
3. 実験結果

風乾土の場合の気相の分析結果を第1図に示した。各有機化合物の添加が二酸化炭素発生量と脱窒量に及ぼす影響はA~Eの5つのパターンに分類できた(第2表)。また、湿潤土の場合の気相の分析結果を第2図に示した。各有機化合物の添加の影響は、A, B, D, Eの4つのパターンに分類された(第3表)。

第1表 供試土壤の性質

土壤名	土壤群	土性	pH (H ₂ O)	pH (KCl)	水分(生土あたり) 湿润土	風乾土	最大容水量 (乾土あたり%)	全炭素 (%)	全窒素 (%)	
鴻巣NF*	水田作土層	灰色低地土	CL	6.3	5.1	29.0	2.04	57	2.1	0.19

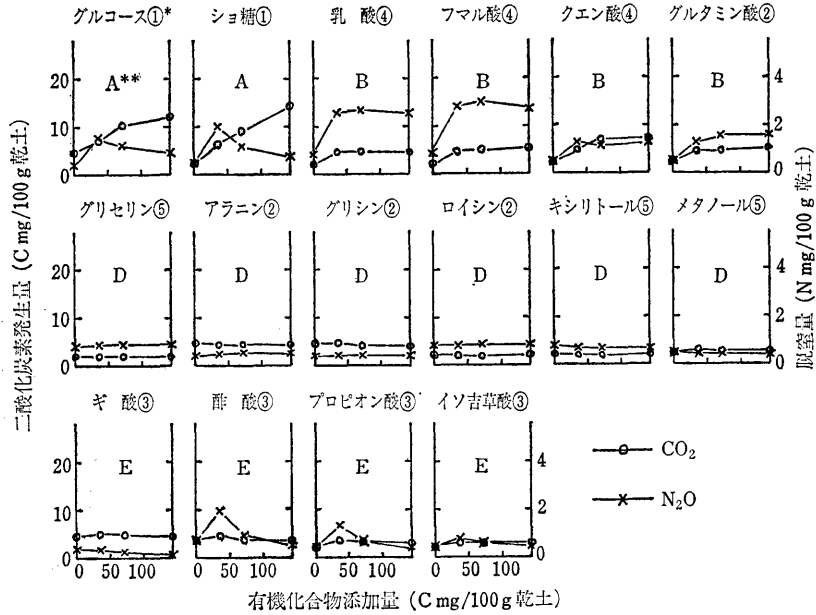
* 農林水産省農業研究センター旧鴻巣試験地長期肥料連用圃場内の水田無肥料区



第1図 添加有機化合物の種類と量の違いによる二酸化炭素発生量と脱窒量の変化(風乾土)

* 本文2.2) 添加有機化合物の項に示した分類番号

** パターン名



第 2 図 添加有機化合物の種類と量の違いによる二酸化炭素発生量および脱窒量の変化 (湿潤土)

* 本文 2. 2) 添加有機化合物の項に示した分類番号

** パターン名

第 2 表 二酸化炭素発生量および脱窒量による各種有機化合物の分類 (風乾土)

パターン	CO ₂ *	N ₂ O*	有機化合物名
A	直線的に増加	増加後減少	グルコース, ショ糖, アラビノース, マンニトール, オキサロ酢酸, リンゴ酸, デンプン
B	増加	増加	イノシトール, 乳酸, フマル酸, クエン酸, イソクエン酸, マレイン酸, ピルビン酸, α-ケトグルタル酸, マロン酸, コハク酸, グリセロリン酸, グルタミン酸, グリシン
C	変化なし	やや増加	キシリトール, グリセリン, アラニン, エタノール, キシラン
D	変化なし	変化なし	ロイシン, メチオニン, メタノール, アセトン, ポリビニルアルコール
E	減少	減少	アセトアルデヒド, cis-アコニット酸, ギ酸, 酢酸, プロピオン酸, イソ吉草酸, ピクリン酸, ヒドロキノン

* 有機化合物添加量を増加させた際の各気体発生量の変化の傾向

第 3 表 二酸化炭素発生量および脱窒量による各種有機化合物の分類 (湿潤土)

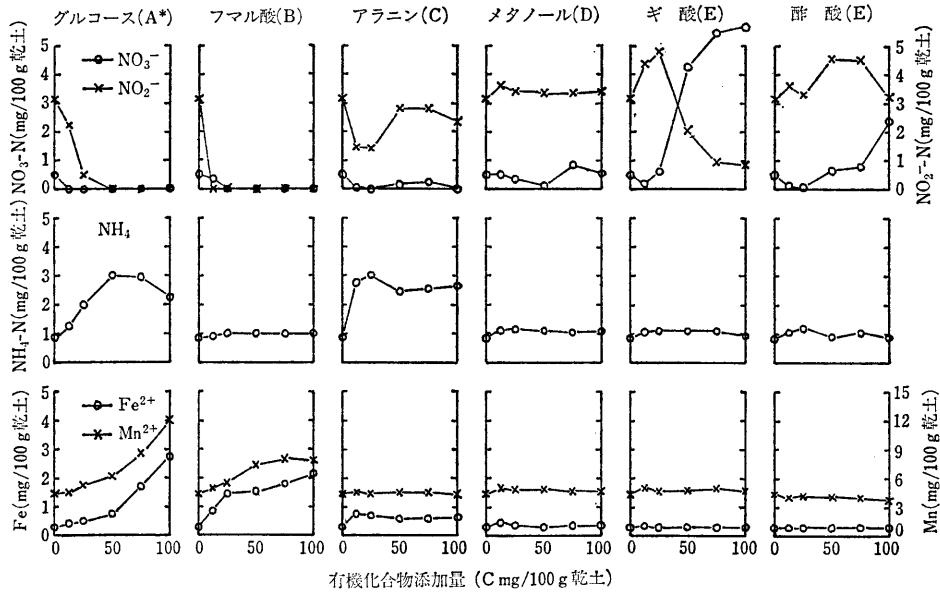
パターン	CO ₂ *	N ₂ O*	有機化合物名
A	直線的に増加	増加後減少	グルコース, ショ糖
B	増加	増加	乳酸, フマル酸, クエン酸, グルタミン酸
D	変化なし	変化なし	キシリトール, グリセリン, アラニン, グリシン, ロイシン, メタノール
E	減少	減少	ギ酸, 酢酸, プロピオン酸, イソ吉草酸

* 有機化合物添加量を増加させた際の各気体発生量の変化の傾向

湿潤土を用いた実験では風乾土の場合にみられたパターン C と D との差がなくなったことを除けば、風乾土を用いた実験と湿潤土を用いた実験の結果は基本的に同じであった。ただし、同一パターンを示す有機化合物であ

っても、湿潤土の二酸化炭素発生量が風乾土の場合の概ね半分になるなどの相違はみられた。

次に第 2 表の各パターンを代表する化合物を選び、風乾土を用いてこれらの化合物の添加が土壤中の各種の代



第3図 添加有機化合物の種類と量の違いによる各種生化学反応の変化

* パターン名

謝に与える影響を調べた(第3図)。

以下に各パターンの特徴を述べる。

1) パターンA(単糖類・少糖類など)

二酸化炭素発生量は有機化合物の添加量の増加にほぼ比例して増加した。脱窒量は有機化合物 25 mg(乾土 100g 当たり炭素として、以下同様)程度までの添加によって増加するが、さらに添加量を増すと減少した。この脱窒量の減少にともなってアンモニア生成量が増加するが、有機化合物の添加量が 50 mg 以上になるとアンモニア生成量も低下した。硝酸残存量は有機化合物 12.5 mg の添加で 0 になった。また、有機化合物添加量の増加にともなって 2 価のマンガン・鉄の生成量が増加した。

2) パターンB(低級脂肪酸以外の有機酸など)

二酸化炭素発生量は有機化合物 12.5 mg の添加で増加したが、それ以上添加した場合、必ずしも増加は顕著ではなかった。脱窒量は有機化合物 12.5 mg の添加によって劇的に増加したが、それ以上に添加しても脱窒量はあまり変化しなかった。硝酸残存量は有機化合物 12.5 mg の添加で 0 になったが、添加量増加にともなうアンモニア生成量の増加はまったくみられなかった。有機化合物添加量の増加にともなう 2 価のマンガン・鉄の生成量の変化は二酸化炭素発生量と同様の傾向を示した。

3) パターンC(グリセリン, アラニンなど)

有機化合物の添加量が増加しても、二酸化炭素発生量

はあまり増加しなかった。脱窒量は有機化合物の添加によって若干増加したが、パターンBほど顕著ではなかった。アラニンの場合は添加量の増加にともないアンモニア生成量が急速に高まったが、50 mg 以上の添加ではやや減少した。有機化合物添加量の多少によらず硝酸の残存量はわずかであったが、亜硝酸の集積が認められた。なお、有機化合物の添加による二価のマンガン・鉄の生成量増加はまったくみられなかった。

4) パターンD(メタノールなど)

このグループの有機化合物は、ここで検討したすべての代謝にほとんど影響を与えなかった。

5) パターンE(低級脂肪酸など)

有機化合物の添加量の増加にともなって二酸化炭素発生量および脱窒量が減少した。また、硝酸の残存、亜硝酸の蓄積がみられ、とくに硝酸残存量は有機化合物添加量が増加すると急速に増加した。アンモニア・2 価のマンガン・鉄の生成量はほとんど変化しなかった。

4. 考 察

同一パターンを示す有機化合物であっても、風乾土で実験した場合と湿潤土で実験した場合との間で二酸化炭素発生量などに多少の違いがみられたが、この原因として土壤に含まれる易分解性有機物の量と微生物相とが異なっていたことが考えられる。つまり、Eh が -220

mV にまで低下している湿潤土では脱窒菌が利用しやすい有機物の分解はほぼ終了しており⁹⁾、また、偏性嫌気性菌が優先しているはずである。したがって、風乾土よりも湿潤土の方が二酸化炭素発生量や脱窒量が少ないのは、湿潤土には易分解性有機物量が少なく、脱窒菌数も少ないことの反映と判断できる。しかし、本実験のように一度に多量の易分解性有機化合物を土壌に加えれば、その有機化合物を利用する微生物が 24 時間以内に急速に集積してくるため、微生物代謝のパターンには風乾土と湿潤土との間に差が現れにくくなったものであろう。

以下に上述の各パターンの意味を個別に検討する。

1) パターン A: このグループの有機化合物は多様な微生物によって二酸化炭素にまで分解される。有機化合物添加量が 12.5 mg 程度で土壌の酸化還元電位が高い場合は脱窒菌が有機化合物を利用して脱窒する。しかし、添加量が 25 mg 以上になると土壌の酸化還元電位が二価の鉄・マンガンが生成する程度に低下し、偏性嫌気性菌が有機化合物を利用して硝酸を異化的にアンモニアに変える。添加量が 50 mg 以上になると無機態窒素の有機化が起こる。硝酸態窒素を異化的にアンモニアに還元する反応と、有機化する反応は互いに無関係に進行する(和田ら, 未発表)が、本実験の場合には有機化合物添加量の増加にともなって微生物が必要とする窒素量が増加し、有機化が優先するようになったと考えられる。

2) パターン B: このグループの有機化合物は 12.5 mg の添加で脱窒を劇的に促進するが、それ以上添加しても二酸化炭素発生量・脱窒量ともにあまり変化しない。この際、硝酸は完全に消失している。つまり、このグループの有機化合物は脱窒をきわめて効果的に促進するが、硝酸が存在しなければ利用されにくい。なお、添加量が増加しても、偏性嫌気性菌がこれらの化合物を利用して硝酸を異化的にアンモニアに変えることはない。

3) パターン C: このグループの有機化合物は脱窒菌の生育・硝酸呼吸に利用される程度が低い。また、いずれの嫌気性微生物にとっても良好な基質ではない。

4) パターン D: このグループの有機化合物は湛水土壌中に加えられても 24 時間では微生物によってまったく利用されず、微生物代謝に対する阻害作用もない。

5) パターン E: このグループの有機化合物は 24 時間では微生物によって基質として利用されにくい。さらにこれらの有機化合物は、添加量が多いほど湛水土壌中の微生物代謝に対して阻害的にはたらく。

以上の結果に基づけば、有機化合物の利用のされやすさは、その有機化合物の種類と量だけでなく、関与する

微生物の種類や代謝の種類によっても異なると言える。したがって、有機物の量が多ければ脱窒が起こりやすいという従来の考え方を改め、脱窒は系中に供給される有機物の種類と量によって規制されていると結論すべきである。また、目的にあった有機物を適切な量加えることにより脱窒を制御することもできると考えられた。

5. 摘 要

硝酸塩を含む水田土壌に各種有機化合物を添加して嫌氣的に培養し、微生物が有機化合物を利用する状況に基づいて、各化合物を以下の 5 群に分類した。

- 1) 単糖類・少糖類等: 多様な微生物によって利用される。添加量が少なく脱窒菌にも利用されるが、添加量が多くなると他の嫌気性菌に利用され易くなる。
- 2) フマル酸等: 脱窒の良好な基質として利用されるが、硝酸が存在しないと利用されにくい。
- 3) グリセリン等: 脱窒にごくわずかに利用される。
- 4) メタノール等: 土壌中の微生物代謝に対してまったく影響を与えない。
- 5) 低級脂肪酸等: 土壌中の代謝全般を阻害する。

以上の結果から、脱窒に及ぼす有機化合物の影響は、有機化合物の量だけでなく、有機化合物の種類によっても大きく規制されていると結論された。

文 献

- 1) 山室成一: 細粒質グライ土水田におけるたい肥および稲わら施用が土壤無機態窒素の動態に与える影響, 土肥誌, **59**, 131~139 (1988)
- 2) Kostov, O.: Study on the intensity of denitrification in connection with the oxidation-reduction potential under different sources of carbon. *Soil Sci. Agrochem.*, **15**, 87~93 (1980)
- 3) 久保井徹・陽 捷行・藤井国博・福士定雄: 下水汚泥施用土壌からのガス発生 I. 火山灰畑土壌, 国立公害研究所研究報告, **94**, 49~62 (1986)
- 4) STANFORD, G., DZIENIA, J.O.L.S. and SIMPSON, Jr., E.C.: Denitrification and associated nitrogen transformations in soils. *Soil Sci.*, **120**, 147~152 (1975)
- 5) 綿引正則・小島勝宏・相田徳二郎: 硝酸塩汚水を浸透した湛水土壌からの脱窒, 土肥誌, **52**, 420~426 (1981)
- 6) 和田秀徳・横山 正・高井康雄: 湛水土壌の微小部位における脱窒反応の *in situ* 測定法, 同上, **59**, 61~67 (1988)
- 7) 佐藤立夫・関根靖彦・和田秀徳: アセチレンブロック法による脱窒量測定法の検討, 同上, **59**, 557~562 (1988)
- 8) 佐藤立夫・和田秀徳: 二重ゴム栓によるガス代謝測定系の密閉法, 同上, **59**, 306~307 (1988)
- 9) 川口桂三郎編: 水田土壌学, p. 43~47, 講談社, 東京 (1978)

Effect of Various Organic Compounds on Nitrate Metabolism in Waterlogged Soils

Ritsuo SATO, Yasuhiko SEKINE and Hidenori WADA

(*Fac. Agric., Univ. Tokyo*)

The soil amended with nitrate was incubated for 24 hr by the method previously reported. Effects of organic compounds on NO_3 metabolism and related biochemical reactions in the soil were examined. It was found that the effects widely fluctuated according to both the kind and the amount of added organic compounds. On the basis of changes in the amount of CO_2 and N_2O production with increasing amount of the added organic compounds, various organic compounds were classified into the following 5 groups.

1) Glucose, sucrose, *etc.*: They were converted quickly and completely into CO_2 and strengthened reduced state of the soil at any level of their addition. Denitrification was enhanced only when their addition was small and was taken over by dissimilatory reduction of NO_3 into NH_3 when their addition became large.

2) Fumarate, lactate, *etc.*: When their addition was large, their conversion into CO_2 and enhancement of reduced state of the soil were somewhat retarded. Denitrification was not taken over by dissimilatory reduction of NO_3 into NH_3 even when a large amount of these compounds was added to the soil.

3) Xylitol, glycerol, *etc.*: They were not good substrates for any biochemical reaction.

4) Methanol, leucine, *etc.*: They were not utilized for any biochemical reaction.

5) Formate, acetate, *etc.*: They suppressed almost all the biochemical reactions. This was especially remarkable when their addition was large.

Key words: anaerobic metabolism, denitrification, dissimilatory nitrate reduction, paddy soil

(*Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr.*, **60**, 134-139, 1989)