

# 西南暖地の堆肥及び化学肥料長期連用水田の土壌微生物と その活性

## 水稻と小麦の根圏及び非根圏の比較

|       |                        |
|-------|------------------------|
| 誌名    | 九州農業試験場報告              |
| ISSN  | 03760685               |
| 著者名   | 早野,恒一<br>渡邊,克二<br>浅川,晋 |
| 発行元   | 農林省九州農業試験場             |
| 巻/号   | 28巻3号                  |
| 巻号補足  |                        |
| 掲載ページ | p. 139-155             |
| 発行年月  | 1995年2月                |

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 西南暖地の堆肥及び化学肥料長期連用水田の 土壌微生物とその活性 — 水稻と小麦の根圏及び非根圏の比較 —

早野恒一<sup>1)</sup>・渡邊克二・浅川 晋

(1994年3月14日受理)

### 要 旨

早野恒一・渡邊克二・浅川晋(1995)西南暖地の堆肥及び化学肥料長期連用水田の土壌微生物とその活性—水稻と小麦の根圏及び非根圏の比較—,九州農試報告 28:139-155. 九州農業試験場水田利用部(福岡県筑後市)にある堆肥連用と化学肥料連用の長期試験水田の根圏微生物とその活性を水稻生育下の中干し前,中干し後,落水後及び小麦作付け下の土壌について測定し,以下の結果を得た。土壌中の細菌密度は堆肥連用区の中干し後の根圏と小麦作付期間の根圏で高くなる場合を除いておおむね小さな変動で推移した。水稻生育期の糸状菌,放線菌及び嫌気性菌の密度は生育時期や土壌管理の相違に関係なく一定に推移した。供試した水稻の微生物に対する根圏効果は低く,生育の良い水稻(堆肥連用区)の根圏効果と生育の劣る水稻(化学肥料連用区)の根圏効果との間には一定の傾向がみられなかった。微生物密度とは対照的に土壌のプロテアーゼ,ホスファターゼ及び $\beta$ -グルコシダーゼ活性は堆肥連用区が化学肥料連用区に比べて高く,根圏が非根圏に比べて高かった。分離した細菌菌株の中のプロテアーゼ陽性株の検出率と30℃,24時間保温静置した時に土壌から放出されるアミノ酸態窒素量は堆肥連用区が化学肥料連用区よりも,また,根圏が非根圏よりも高かった。堆肥連用区の窒素固定菌の密度は中干し前の時期のみ化学肥料連用区よりも高かったが,他の時期には明確な差は認められなかった。水稻根片から分離したニトロゲナーゼ陽性株の大部分はオキシダーゼ陽性で糖から酸化的に酸を生成するグラム陰性菌であった。脱窒菌群は落水期から小麦作期にかけて低く推移する傾向があった。土壌管理と収量性の異なる二つの水田土壌の根圏及び非根圏土壌の微生物とその活性を分析した結果に基づいて,根圏微生物とそれらを規制する要因との関連について考察した。

キーワード：水田,根圏,土壌,微生物,堆肥

### I. 緒 言

植物根の近傍の根の影響の及ぶ範囲の環境は根圏(Rhizosphere)とよばれており,土壌で

九州農業試験場生産環境部土壌微生物研究室:861-11 熊本県菊池郡西合志町大字須屋2421

1)現,農業環境技術研究所

生育する植物は無菌状態でない限り、根圏を介して微生物と相互に関連しあっている。植物病原菌、菌根菌や根粒菌のような寄生菌や共生菌以外の土壤微生物も、養分低濃度時には養分競合により植物に負の影響を与えるが、他方不溶態や高分子態の養分の可溶化や低分子化を通じて植物根による養分の摂取に寄与している。一方、植物も根からの各種物質の分泌や根組織の剥離を通して微生物の生育に寄与しており、根圏は非根圏に比べて種々の微生物の密度とその活性が高いことは周知のことである（鈴木・石沢, 1965; DAVTYAN, 1958）。畑状態で生育する植物の根圏微生物の研究に比べて湛水状態で生育する植物の根圏微生物に関する知見は少ない。

本村ら（1977a, 1977b, 1977c）は、ポットで生育した水稻の根圏微生物におよぼす生育ステージや土壤管理の影響を研究し、それらが多様な環境要因の影響を受けて変動していることを明らかにしている。本研究は隣接する圃場で土壤管理と収量性の異なる二つの水田土壌の水稻及び小麦作付期間中の根圏及び非根圏の微生物密度とその活性の相違を明らかにする目的で行われた。

本研究を行うにあたって当時の九州農業試験場環境第二部土壤肥料第1研研究室早坂 猛室長、小野信一主任研究官（現四国農業試験場生産環境部土壤管理研究室長）、水田利用部水田土壤管理研究室吉野 喬室長（現九州農業試験場生産環境部長）の各位には試験圃場からの試料の採取について了解と便宜を賜った。また、本研究の一部は1986年から5年間にわたる農林水産省一般別枠研究「根圏環境の動態解明と制御技術の開発」の研究費によって実施された。ここに記して関係各位に感謝の意を表する。

## II. 試 験 方 法

### 1. 土壤及び根圏試料の採取

九州農業試験場水田利用部（福岡県筑後市）の堆肥連用区（1.25a）及び化学肥料連用区（1.25a）の灰色低地土水田圃場を供試した。これらの圃場は1963年から水稻作下、1985年から水稻・小麦二毛作下で連用試験が継続されており、堆肥連用区には1986年以降は小麦収穫後に稲藁堆肥が毎年 $20\text{t} \cdot \text{ha}^{-1}$ 施用されている。施肥窒素はha当たり代かき時に基肥として40kg、つなぎ肥に30kg、穂肥として50kg施用、化学肥料連用区には堆肥区よりも基肥と穂肥が10kgずつ多く施用されてきた。毎年6月下旬に水稻（レイホウ）を移植し、7月下旬から8月上旬にかけて1週間程中干しを行い、10月7日前後に落水し、10月下旬には刈り取った。小麦作については11月下旬に、1987年はアサカゼコムギを、1988年にはシロガネコムギを播種し、6月上旬に刈り取った。小麦作期の施肥窒素量は基肥が11月中旬にha当たり50kg、追肥が2月中旬に50kgであった。

当時の圃場管理を担当していた環境第二部土壤肥料第1研究室的調査によると1987年の堆肥連用区の収量はha当たり5830kg、化学肥料連用区の収量はha当たり5390kgであった。玄米収量は一貫して堆肥連用区が化学肥料連用区よりも高く、1982-1984年における堆肥連用区及び化学肥料連用区における玄米の平均収量はそれぞれ、6370及び5480kgであった（九州農試環境第二部土肥1研：1988年九州農業研究成果情報3, 84-85）。1987年及び1988年の水稻作付期間中の試料の採取は中干し前（1987年は7月27日、1988年は7月26日）、中干

し後（8月11日）及び落水後（10月15日）に行った。小麦作付期間中の試料の採取は1989年2月22日及び1990年3月9日（嫌気性細菌用には4月25日）に行った。根系試料は稲あるいは小麦株を中心として直径15cm、深さ20cmの円柱状ブロックとして採取した。それぞれの試験区で畦畔から5-7株離れた地点で、なるべく平均的な生育状態の株を視察により選別し、1株採取した。根圏試料は水中振とう法（木村ら、1977a）によって調製した。1987年度堆肥連用区根圏（OMR）、堆肥連用区非根圏（OMN）、化学肥料連用区根圏（CFR）及び化学肥料連用区非根圏（CFN）試料については、細菌・放線菌・糸状菌・脱窒菌・硝酸還元菌・アンモニア酸化菌及びアゾトバクター数と3種類の酵素（プロテアーゼ、ホスファターゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ）活性を分析し、1988年度のOMR、OMN、CFR及びCFN試料については細菌・放線菌・嫌気性菌・窒素固定菌及び原生動物数とアセチレン還元活性陽性根片数を分析した。

## 2. 微生物、酵素及びアミノ酸の分析方法

細菌は加藤（1992）に従い、放線菌は宮下（1992）に従ってアルブミン寒天培地で2週間培養後に、糸状菌は新田（1992）に従ってローズベンガル寒天培地で5日間培養後に、嫌気性細菌は武田（1992）に従ってシステイン含有アルブミン寒天培地でのロールチューブ法により2週間培養後に、それぞれのコロニー形成単位を計数した。脱窒菌は西尾（1992）に従いGiltayの培地で2週間培養後のガスの発生、硝酸還元菌は同じくGiltayの培地で2週間培養後の培地の色の変化、窒素固定菌は浅沼（1992）に従ってRENNIE（1981）の培地で6日間培養後のアセチレン還元活性を指標とした最確値法によって分析した。培養はいずれも30℃で行った。

原生動物は栗原（1975）のリング法を改変したマイクロプレート法によった。すなわち、1ケースが4×6列状の24ウェル（1ウェルの面積が2.0cm<sup>2</sup>、容積6.7ml）からなるマイクロプレートに食塩寒天水を注ぎ、その各ウェルをリング法における各リングの代わりに用いた。細菌捕食性原生動物用の培地には堆肥連用区から分離したグラム陰性細菌（MNB003株）を用い、腐生性原生動物用の培地には稲藁の煎汁を用いた。

プロテアーゼ、ホスファターゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性の測定は早野（1992）に従ってそれぞれ、ベンジルオキシカルボニル-L-フェニルアラニル-L-ロイシン（Z-Phe-Leu）、p-ニトロフェニルりん酸、p-ニトロフェニル- $\beta$ -グルコシドを基質として用いて測定し、30℃で1秒間に1nmolの基質を分解する酵素の量を1nkatと定義した。

細菌菌株の分離は1988年の試料について実施した。アルブミン寒天培地上に生育してくるコロニーを無作為に釣菌し、駒形（1975）の方法に従って仕分けを行った。純粋分離と生理テスト等の過程で死滅した菌株が生じたため、最終的な供試菌株数はOMR、OMN、CFR及びCFNでそれぞれ、26、31、32及び26株となった。各試料区分の中で中干し前、中干し後及び落水後の試料から分離した供試菌株数はそれぞれ、OMRで11、5及び10株、OMNで17、4及び10株、CFRで17、3及び12株、CFNで12、6及び7株であった。

窒素固定菌の分析に供した水稻根片は根圏土壌として採取した試料中の根片から調製した。すなわち、土壌採取後の根片をさらに滅菌蒸留水でリンスした後、鋏で1cm程の長さのチップにして浅沼（1992）の方法に従いRENNIE（1981）の培地に入れて6日間培養し、その後ラバーキャップに替えてアセチレンガスに置換し2日間保温静置後、アセチレン還元活性

(ARA) を分析した。

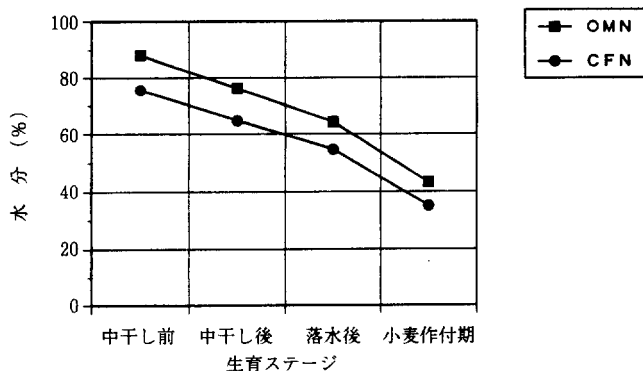
ARA陽性の根片が含まれる試験管の培養物について滅菌水による希釈液を調製し、1.5%寒天を含むRENNIE (1981) の培地を平板にしたシャーレに希釈液を接種し、その上に素寒天を重層し、2日間培養した。生じたコロニーを釣菌し、さらに純粋分離を繰り返して、得られたARA陽性コロニーについて駒形 (1975) の方法に従って仕分けした。各試験区分からのARA陽性供試菌株数は、中干し前、中干し後及び落水後で、堆肥連用区からの根では、それぞれ、33、8及び3株であり、化学肥料連用区からの根では、それぞれ、25、6及び0株であった。

インキュベーション後に放出されるアミノ酸量の評価は金沢・早野 (1992) の方法によって土壌試料をトルエン存在下で30℃、24時間インキュベートした。土壌からの遊離アミノ酸の抽出は10%炭酸アンモニウムを抽出剤とする山室 (1980) の方法によった。アミノ酸含量は日立アミノ酸分析計 L-8500 によって分析した。

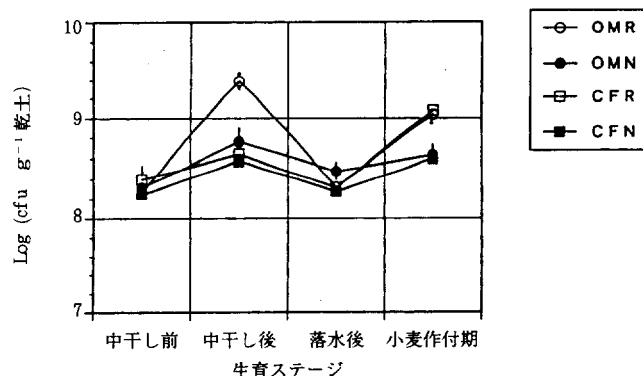
### Ⅲ. 結 果

#### 1. 微生物密度の推移

第1図に水田土壌の水分含量、第2図に2年間の平均の好気性・通性嫌気性細菌密度の水田土壌における推移を示した。中干し前は最も還元の状態を発達する時期 (GOTOH and YAMASHITA, 1966; 長谷部, 1990)、中干し後は乾土効果により可給態養分の豊富な時期、落水後は還元条件から酸化条件への移行の時期、小麦作期は土壌が畑状態となった時期である。水田土壌の細菌密度は $10^8 \sim 10^9 \text{ g}^{-1}$ 乾土台で、堆肥連用区の中干し後の根圏で高くなること、小麦作期の根圏で高くなること以外はおおむね安定した推移を示した。水稻生育期における糸状菌 (第3図)、2年間の平均の放線菌 (第4図) の密度は一定に推移し、小麦作期では水稻作期よりも密度が高



第1図 水田土壌の水分含量 (乾土%)



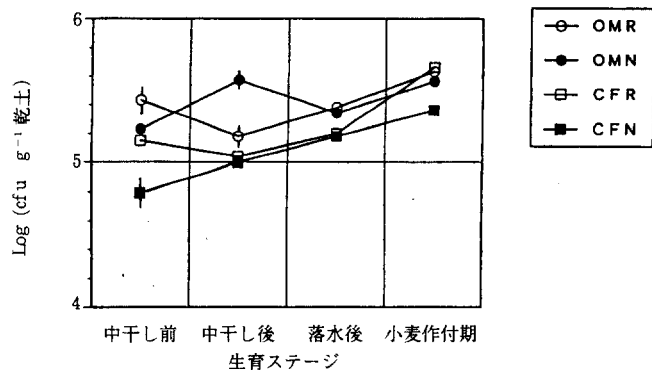
第2図 土壌の細菌密度の推移

注) 図中のたて棒は誤差範囲

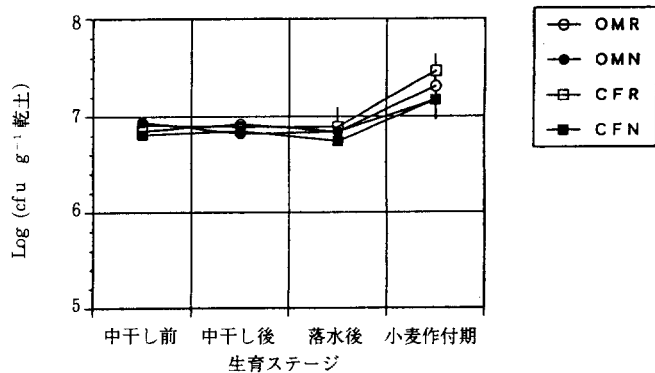
くなる傾向があった。嫌気性細菌（第5図）は水稻～小麦各生育時期を通じて  $10^4 \sim 10^6$  台を維持したが、小麦作期ではやや低下する傾向があった。

窒素固定菌密度（第6図）は年間を通じて  $10^5 \sim 10^6$  台で推移した。中干し前の堆肥連用区の窒素固定菌密度が化学肥料連用区のそれより高い例を除いて二つの処理区間では明瞭な違いはみられなかった。窒素固定菌の中のアゾトバクターは概ね  $10^3$  台で推移した（第7図）。水稻作期間中のアンモニア酸化菌数は  $10^4 \sim 10^5$  台で推移した（第8図）。脱窒菌密度（第9図）は湛水期間中に比べて小麦作期でやや低い傾向がみられたが、いずれの時期にも堆肥連用区と化学肥料連用区で差異はみられなかった。硝酸塩還元菌（第10図）も水稻、小麦及び二つの連用区間で差異はみられなかった。水稻と小麦の両作期で測定した微生物の中で、窒素固定菌を除いたいずれの微生物についても小麦作期では根圏の密度の測定値は非根圏のそれを上回っていた（第2～10図）。

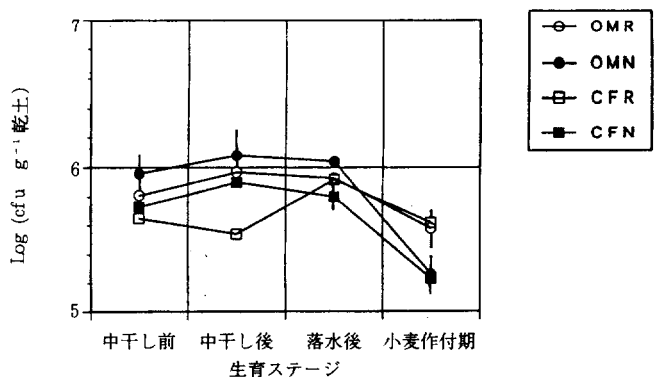
細菌捕食性（第11図）及び腐生性（第12図）の原生動物密度はおおむね  $10^3$  台で推移し、化学肥料連用区の



第3図 土壌の糸状菌密度の推移  
注) 図中のたて棒は誤差範囲



第4図 土壌の放線菌密度の推移  
注) 図中のたて棒は誤差範囲



第5図 土壌の嫌気性細菌密度の推移  
注) 図中のたて棒は誤差範囲

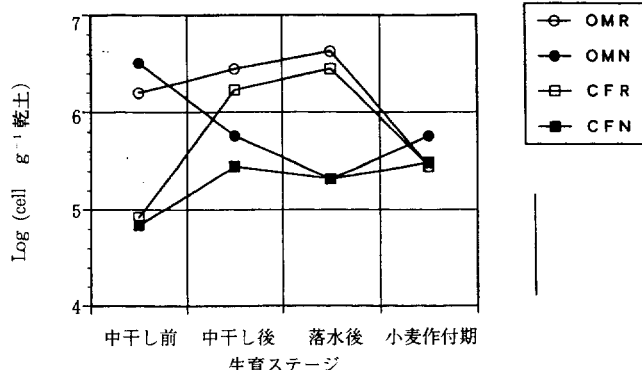
非根圏を除いて中干し後に高くなる傾向があった。細菌捕食性の原生動物密度は細菌及び窒素固定菌密度と正の相関を示したが、腐生性の原生動物密度は細菌、放線菌、嫌気性菌、窒素固定菌密度と相関しなかった(第1表)。

## 2. 三種の加水分解酵素活性の推移

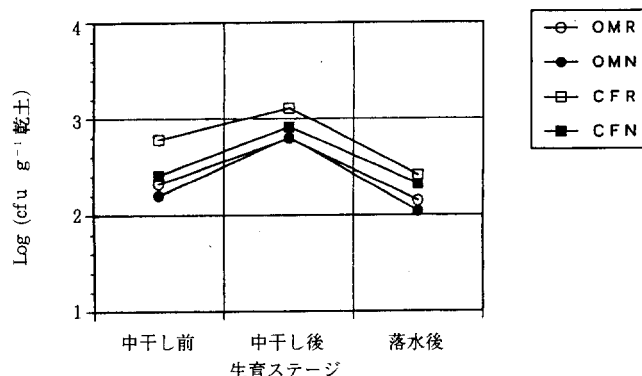
水稻作期間中に測定された根圏及び非根圏土壌のプロテアーゼ(第13図)、ホスファターゼ(第14図)及び $\beta$ -グルコシダーゼ活性(第15図)はいずれも非根圏よりも根圏で高く、また、中干し後の $\beta$ -グルコシダーゼの場合を除いて、堆肥連用区で化学肥料連用区よりも高かった。

## 3. 根圏効果の比較

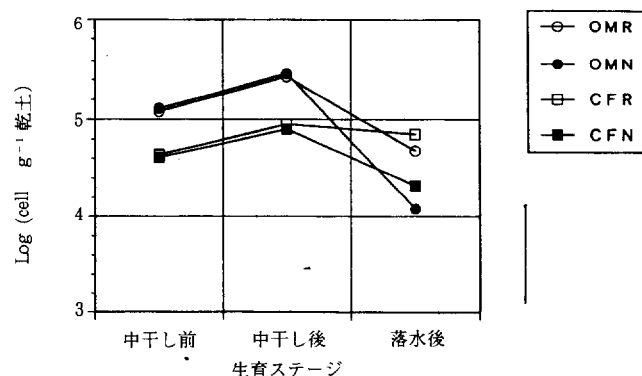
水田土壌の根圏効果(根圏の微生物密度/非根圏の微生物密度比、以下R/Sと表記)を第2表に示した。水稻作期間中の細菌、糸状菌、放線菌の根圏効果は平均すると1に近く、生育時期によっては1以下に評価される例もあった。この傾向は嫌気性菌で特に著しかった。小麦作期では比較的明瞭に根圏効果が表れていた。生育の良い稲(堆肥連用区)のR/Sと相対的に生育の劣る稲(化学肥料連用区)のR/Sとの間でも明確な



第6図 土壌の窒素固定菌密度の推移  
注) 右側のたて棒は誤差範囲, 全測定値に共通



第7図 土壌のアゾトバクター密度の推移



第8図 土壌のアモニア酸化菌密度の推移  
注) 右側のたて棒は誤差範囲, 全測定値に共通

差異は認められなかった。

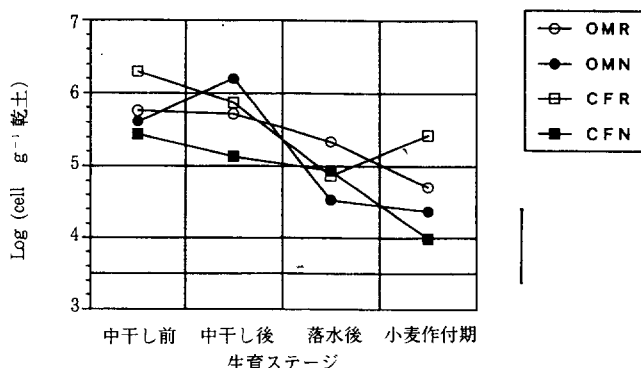
#### 4. 分離菌株の性質の比較

水稻の根圏と非根圏土壌から各約30株の細菌をアルブミン寒天培地を用いて分離し、形態観察及び生理テストによって類別化を試みた(第3表)。堆肥連用区からはグラム陰性桿菌で糖から発酵的に酸を生成する菌株が比較的多く分離され、化学肥料連用区からはグラム陰性桿菌で糖を分解せずプロテアーゼを生産しない菌株が比較的多く分離された。堆肥連用区は化学肥料連用区よりも、また、根圏は非根圏よりもプロテアーゼ陽性株の検出率が高かった(第3表)。

水稻根片のアセチレン還元活性(ARA)陽性率は化学肥料区に比べて堆肥連用区で高かった(第4表)。これらの根片から分離したARA陽性株の大部分はオキシダーゼ陽性で糖から酸化的に酸を生成するグラム陰性桿菌であった(第5表)。この傾向は両連用区で同じであった。大部分の菌株は大気下の無窒素培地でよく生育した。

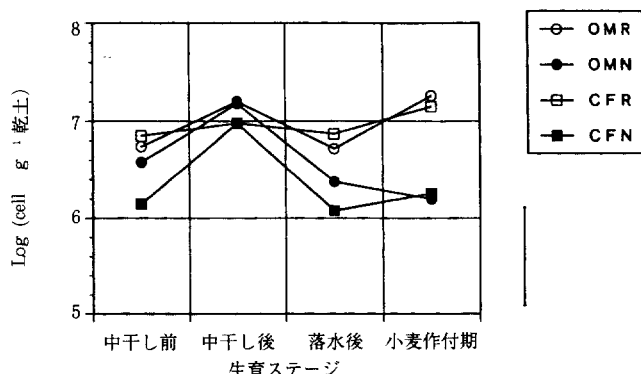
#### 5. アミノ酸の存在量及び放出量の比較

土壌から10%炭酸アンモニウムで抽出される遊離アミノ酸由来のアミノ態窒素



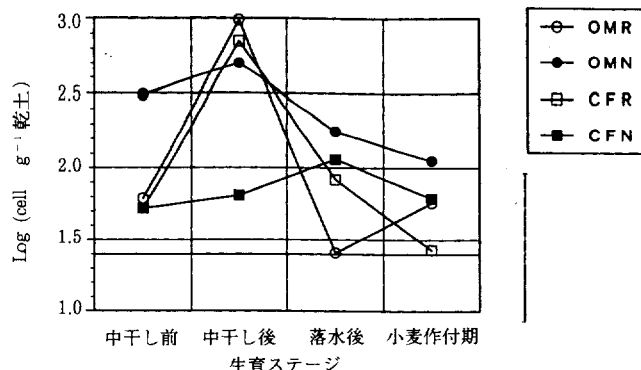
第9図 土壌の脱窒菌密度の推移

注) 右側のたて棒は誤差範囲, 全測定値に共通



第10図 土壌の硝酸塩還元菌密度の推移

注) 右側のたて棒は誤差範囲, 全測定値に共通

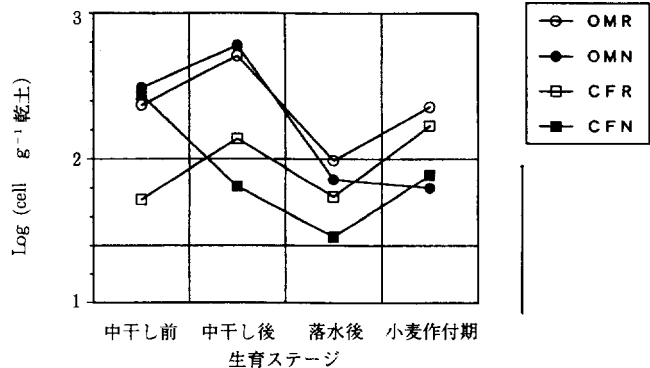


第11図 土壌の細菌捕食性原生動物密度の推移

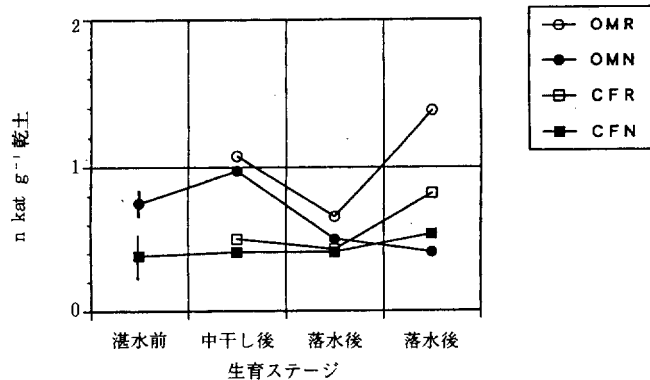
注) 右側のたて棒は誤差範囲, 全測定値に共通

含量は土壌の全窒素量の0.044～0.085%に相当した。根圏が非根圏よりも、堆肥連用区が化学肥料連用区よりも高かった(第16図及び第6表)。土壌抽出液はアスパラギン酸、スレオニン、セリン、グルタミン酸、グリシン、アラニン、システイン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、リジン、ヒスチジン、アルギニンを含んでいた。

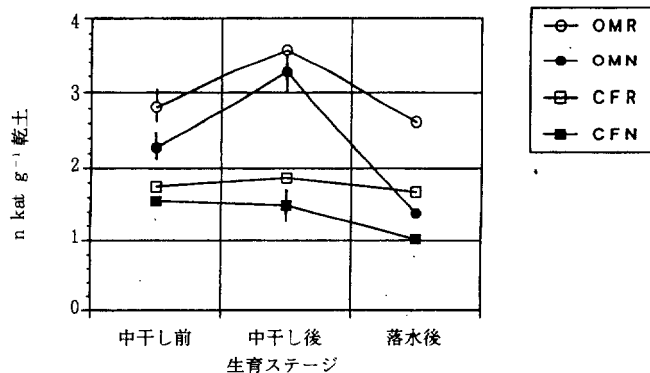
土壌を静菌剤存在下で30℃、24時間保温静置後に測定された遊離アミノ酸に由来するアミノ態窒素量も保温静置前の遊離アミノ態窒素量と同様の傾向を示した(第6表)。保温静置後と前の遊離アミノ態窒素量の差(加水分解アミノ態N)はバイオマス窒素からプロテアーゼ作用によって加水分解された遊離アミノ酸に由来するアミノ態窒素量とみなすことができる。この窒素量は土壌の全窒素量の0.0017%に相当し、別に測定してある本土壌試料の微生物バイオマス窒素量(金沢・早野, 1992)の0.3%に相当した。



第12図 土壌の腐生性原生動物密度の推移  
(注) 右側のたて棒は誤差範囲, 全測定値に共通



第13図 土壌のプロテアーゼ活性の推移  
(注) 図中のたて棒は誤差範囲



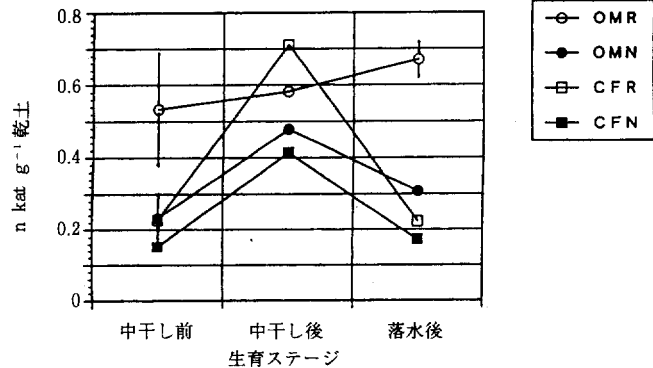
第14図 土壌のホスモノエステラーゼ活性の推移  
(注) 図中のたて棒は誤差範囲

## IV. 考 察

細菌の密度が中干し後に高くなるのは乾土効果による可給態養分の増加に対する発酵型細菌群の速いレスポンスによるものとみられる。小麦作期で糸状菌、放線菌密度が増加したのは土壌が酸化になったためとみられる。原生動物は実体顕微鏡下で観察し、計数したため、大型で、運動性の

あるもの（例えばテトラヒメナ類、ユーグレナ類、コルボータ類）が計測され、小型のものや運動性のないもの及びシスト状のものは計測されていない。このことが比較的低い測定値をもたらした原因であろう。KIMURA et al (1989) はポット中の水稻生育下の水田土壌で大型で運動性のある *Euglena* sp., *Paramecium* sp., *C. olpoda* sp. 等の存在を観察している。

窒素固定菌群は年間を通じて  $10^5 \sim 10^6$  台で推



第15図 土壌のβ-グルコシダーゼ活性の推移  
注) 図中のたて棒は誤差範囲

第1表 水田土壌の原生動物密度と微生物密度との相関性 (df=9)

|       | 細菌捕食性 | 腐生性   |
|-------|-------|-------|
| 細菌    | 0.763 | 0.533 |
| 放線菌   | 0.139 | 0.259 |
| 嫌気性菌  | 0.141 | 0.515 |
| 窒素固定菌 | 0.635 | 0.413 |

第2表 水田土壌微生物の根圏効果

|       | 堆肥連用区 |      |      |      |      |  | 化学肥料連用区 |      |      |      |      |  |
|-------|-------|------|------|------|------|--|---------|------|------|------|------|--|
|       | 中干し前  | 中干し後 | 落水後  | 平均   | 小麦作期 |  | 中干し前    | 中干し後 | 落水後  | 平均   | 小麦作期 |  |
| 細菌    | 0.88  | 4.30 | 0.70 | 1.96 | 2.56 |  | 1.22    | 1.17 | 1.11 | 1.17 | 3.00 |  |
| 糸状菌   | 1.58  | 0.41 | 1.09 | 1.03 | 1.19 |  | 2.26    | 1.20 | 1.07 | 1.51 | 2.00 |  |
| 放線菌   | 0.81  | 1.23 | 1.01 | 1.02 | 1.33 |  | 1.27    | 1.09 | 1.39 | 1.25 | 2.00 |  |
| 嫌気性菌  | 0.71  | 0.83 | 0.82 | 0.79 | 2.11 |  | 0.83    | 0.45 | 1.46 | 0.91 | 2.47 |  |
| 窒素固定菌 | 0.50  | 5.96 | 2.05 | 2.84 | 0.58 |  | 1.22    | 6.07 | 1.41 | 2.90 | 1.13 |  |
| 脱窒菌   | 1.40  | 0.33 | 6.35 | 2.69 | 2.10 |  | 7.14    | 5.44 | 0.84 | 4.47 | 27.0 |  |

移したが、アゾトバクター菌群は  $10^2$  台であるので筑後市の水田土壌では小勢力とみられた。水稻根片から分離したARA陽性株はオキシダーゼ陽性でO/FテストでO反応を示すグラム陰性桿菌であり（第5表）、*Pseudomonas* 属や *Azospirillum* 属などがこれらの範ちゅうに入るが、星・吉田（1989）は水稻根から分離したこれらの菌群の菌株を *Pseudomonas* sp. と同定している。ASANUMA et al. (1979) は水耕イネ実生根面から分離された細菌の6割

第3表 水稻根圏及び非根圏土壌からの細菌分離株

|       |            |          | 堆肥連用区 |     | 化学肥料連用区 |     |
|-------|------------|----------|-------|-----|---------|-----|
|       |            |          | 根圏    | 非根圏 | 根圏      | 非根圏 |
| グラム陰性 |            |          |       |     |         |     |
| 球 菌   |            |          | 0     | 0   | 0       | 0   |
| 桿 菌   | 糖から発酵的に酸生成 | プロテアーゼ陽性 | 4     | 3   | 3       | 0   |
|       |            | 陰性       | 5     | 10  | 2       | 1   |
|       | 糖から酸化的に酸生成 | プロテアーゼ陽性 | 3     | 1   | 1       | 0   |
|       |            | 陰性       | 0     | 2   | 2       | 3   |
|       | 糖から酸を生成しない | プロテアーゼ陽性 | 0     | 1   | 0       | 2   |
|       |            | 陰性       | 7     | 4   | 9       | 10  |
| グラム陽性 |            |          |       |     |         |     |
| 球 菌   | 糖から発酵的に酸生成 | プロテアーゼ陽性 | 0     | 0   | 0       | 0   |
|       |            | 陰性       | 0     | 3   | 2       | 0   |
|       | 糖から酸化的に酸生成 | プロテアーゼ陽性 | 1     | 0   | 0       | 0   |
|       |            | 陰性       | 0     | 0   | 0       | 2   |
|       | 糖から酸を生成しない | プロテアーゼ陽性 | 1     | 1   | 1       | 0   |
|       |            | 陰性       | 1     | 4   | 4       | 2   |
| 桿 菌   | 糖から発酵的に酸生成 | プロテアーゼ陽性 | 4     | 2   | 0       | 0   |
|       |            | 陰性       | 0     | 0   | 2       | 1   |
|       | 糖から酸化的に酸生成 | プロテアーゼ陽性 | 0     | 0   | 0       | 0   |
|       |            | 陰性       | 0     | 0   | 0       | 2   |
|       | 糖から酸を生成しない | プロテアーゼ陽性 | 0     | 0   | 1       | 0   |
|       |            | 陰性       | 0     | 0   | 3       | 2   |

第4表 A R A陽性根片率の推移

|          | A R A陽性根片率の割合 |      |        | 分離菌株A R A陽性株率 |      |       |
|----------|---------------|------|--------|---------------|------|-------|
|          | 中干し前          | 中干し後 | 落水後    | 中干し前          | 中干し後 | 落水後   |
| 堆肥連用水稻根片 | 9/10          | 9/10 | 8.5/10 | 33/38         | 9/22 | 15/22 |
| 化肥連用水稻根片 | 7/10          | 7/10 | 6.5/10 | 25/38         | 6/17 | 11/31 |

近くが*Pseudomonas* sp.であることを観察している。これらの知見と大気下の無N培地でよく生育したこと等から、本研究の水稻根面のA R A陽性株も*Pseudomonas*属ではないかと推察した。

微生物の種類にもよるが、畑土壌では根圏効果は明瞭に観測される。鈴木・石沢(1965)によればトウモロコシにおける細菌及び糸状菌の根圏効果はそれぞれ、34及び24であり、陸稲のそれらはそれぞれ、8及び33であった。筑後市の水田土壌の根圏効果は一連の微生物群で平均すると1に近く、場合によっては1以下に評価される場合もあった(第2表)。なぜ水稻ではこのように根圏効果が低いのかを以下に考察する。

水稻根の周囲には、苗を根箱に移植して2週間以後から根圏酸化帯と称される酸化鉄化合物様の黄色の集積帯の存在が認められる(熊田, 1948a)。この根圏酸化帯は酸化鉄の添加

第5表 水稻根からのN<sub>2</sub>固定細菌分離株

|            |          | 堆肥<br>連用区 | 化学肥料<br>連用区 |
|------------|----------|-----------|-------------|
| グラム陰性桿菌    |          |           |             |
| 糖から発酵的に酸生成 | プロテアーゼ陽性 | 1         | 0           |
|            | 陰性       | 0         | 0           |
| 糖から酸化的に酸生成 | プロテアーゼ陽性 | 39        | 25          |
|            | 陰性       | 4         | 6           |
| 糖から酸を生成しない | プロテアーゼ陽性 | 0         | 0           |
|            | 陰性       | 0         | 0           |

第6表 水稻根圏及び非根圏土壌における全N(%)  
及びアミノ態N含量(mg 100g<sup>-1</sup>乾土)

|         |     | 全N   | 遊離<br>アミノ態<br>N(A) <sup>a)</sup> | インキュー<br>ション後アミ<br>ノ態N(B) <sup>b)</sup> | 加水分解<br>アミノ態<br>N(B-A) |
|---------|-----|------|----------------------------------|-----------------------------------------|------------------------|
| 化学肥料連用区 | 根圏  | 2.12 | 0.0018                           | 0.042                                   | 0.040                  |
|         | 非根圏 | 2.02 | 0.0010                           | 0.036                                   | 0.035                  |
| 堆肥連用区   | 根圏  | 2.93 | 0.0020                           | 0.081                                   | 0.079                  |
|         | 非根圏 | 2.95 | 0.0016                           | 0.052                                   | 0.051                  |

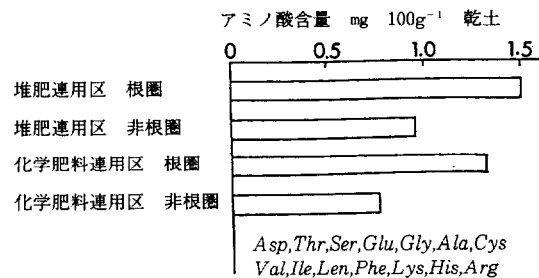
注) a) 炭酸アンモニウム抽出性アミノ酸

b) トルエン存在下で30℃, 24時間後に検出された遊離アミノ酸量

によって広がると報告されている(熊田, 1948b)。猶原・宇佐美(1976)は水稻根の先端部分(1~1.5 cm)では根圏酸化帯は形成されず, 好気性細菌及び色素耐性菌の根圏効果が明確にみられるのは根の先端部分であり, 根圏酸化帯を含む領域では根圏効果が低かったり時としてなかったと報告している。

本研究では木村ら(1977a)の方

法によって根圏試料を採取した。すなわち, 根系全体を垂直に2分し, 露出した面の深さ3 cm付近から根を鉋で切断し, 下方に伸びている根をピンセットを用いて摘出した。したがって, 根圏試料を調製するために取り扱った根系は主として根圏酸化帯を含むものである。しかしこの方法では摘出過程で根の先端部分が切れてしまうことがしばしばあり, 根圏酸化帯周辺の土壌を含む程度及び根先端周辺土壌の含有割合は一様ではなかったと思われる。このことが水稻では低い根圏効果をもたらし, R/S値がしばしばバラついた原因ではないかと推察された。小麦根でも根圏酸化帯が観察されることがある(猶原・宇佐見, 1976)が, 小



第16図 土壌の遊離アミノ酸含量

麦作付期に比較的明瞭に根圏効果が現れるのは、水稻に比べて小麦根では根圏酸化帯に相当する部分が少ないためであろう。湛水下では土壤水分が多いために根からの分泌物が非根圏に拡散して行きやすいため、非根圏においても根圏と変わらない微生物密度が保たれているという見解もある。しかし、この見解では落水後にもなお根圏効果が低いことを説明することができない。

本研究では水田土壤のホスファターゼ活性の測定のために基質としてp-ニトロフェニルりん酸を用いた。本基質はモノリン酸エステルの加水分解作用を検出できる。本基質の加水分解には酵素としてはアルカリホスファターゼ(3・1・3・1)、酸性ホスファターゼ(3・1・3・2)、5'-ヌクレオチダーゼ(3・1・3・5)及び2', 3'-サイクリックヌクレオシドモノリン酸ホスホジエステラーゼ(3・1・4・16)等が関与しうる。筑後市の水田土壤ではどのホスファターゼが主に働いているかは明確ではない。しかし、水田土壤のpHが酸性であること、土壤pHと土壤のホスファターゼ活性の最適pHとはよく相関すること(EIVAZI and TABATABAI, 1977; 大村・早野, 1987)、及び活性測定の際に用いた緩衝液が酸性(pH6.6)であったこと等を勘案すると主として酸性ホスファターゼ等酸性域に活性の最適域をもつホスファターゼによる活性を測定していたものと思われる。

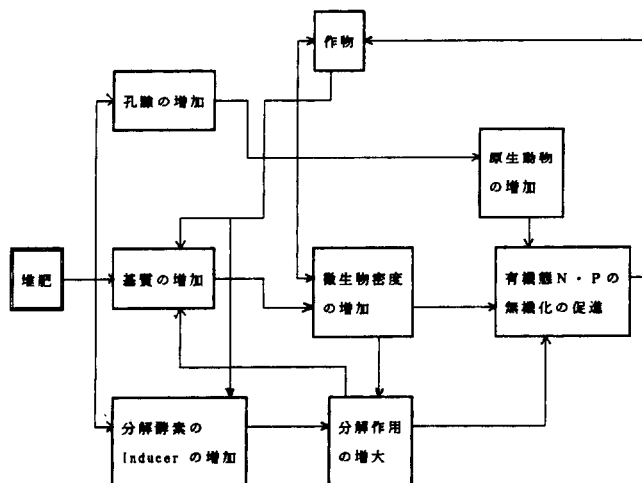
土壤の $\beta$ -グルコシダーゼにとってp-ニトロフェニル $\beta$ -グルコシドは分解性の高い基質であり、他のグリコシダーゼを検出する可能性は低い(HAYANO and SHIOJIMA, 1974; YOSIKURA et al. 1980)。施設栽培土壤のこの酵素の起源は糸状菌と見なされている(HAYANO and TUBAKI, 1986)が水田土壤における起源については不明である。

本研究で測定されたプロテアーゼ活性には分析に用いた基質の性質上カルボキシペプチダーゼやキモトリプシン等が関与しうる。筑後市の水田土壤から調製した酵素抽出液中のZ-Phe-Leu に対する加水分解活性は金属キレート剤(EDTA)及びSH基ブロッキング剤(PCMB)によって阻害される(HAYANO 1993)ことから、Z-Phe-Leu を基質として測定されるプロテアーゼは活性中心近傍にSH基をもった金属キレート剤感受性のカルボキシペプチダーゼが主体ではないかと推察した。水稻根圏におけるこれら3種類の酵素活性はいずれも非根圏よりも根圏において、また、化学肥料連用区に比べて堆肥連用区でおおむね高かった。各酵素活性が非根圏よりも根圏、化学肥料連用区よりも堆肥連用区で高かったのは相対的に酵素の生産能力の高い微生物が集積していた結果と思われる(HAYANO, 1993; WATANABE and HAYANO, 1993)。

水稻の生育は土壤窒素に大きく依存している。土壤窒素の主要な形態であるバイオマス中のタンパク態窒素はアミノ酸を経由してアンモニアに無機化される。水稻根圏土壤は非根圏土壤に比べて遊離アミノ酸含量が高い(第15図)が、このような傾向は木村ら(1977d)によっても確認されている。第6表でみられるように堆肥連用区の土壤は化学肥料連用区の土壤よりも静菌剤としてのトルエンの存在下で24時間保温静置後に遊離するアミノ酸に由来するアミノ態窒素量(B-A)が多い。このトルエン処理は土壤の加水分解系の酵素は失活せしめないが、呼吸に関連した酵素の失活をもたらす処理であり(BARTHA and BORDELEAU, 1969; QUASTEL and WOOLDRIDGE, 1927; ROGERS, 1942)この24時間は有機化の系は働いていないとみなすことができる。したがって、このB-A値は現場の土壤の基質濃度で30°Cにおける実際のアミノ態窒素の放出速度に該当し、ha当りに換算すると

化学肥料連用区及び堆肥連用区の非根圏でそれぞれ、0.35kg及び0.51kg、そして根圏ではそれぞれ、0.40kg及び0.79kgのアミノ態窒素が1日に放出される勘定となる。栄養生長期の稲は土壌の可給態窒素を活発に取り込むので、根面の養分濃度は少し離れた根圏土壌の養分濃度よりも低いはずである。養分の放出速度の異なる二つの土壌を考えると、相対的に高い放出速度の堆肥連用区土壌は根表面に対して化学肥料連用区土壌より急な養分濃度の勾配を維持することになる。このことは堆肥連用区の水稲根による養分の吸収速度を化学肥料連用区の水稲根よりも大きく保つことにつながり、収量性の相違の一因となり得るであろう。このような状態をもたらす原因の一つは堆肥連用区の土壌は化学肥料連用区の土壌よりもバイオマス規模が大きい（金沢・早野 1992）ことである。バイオマスタンパクの無機化には遺体化したバイオマス濃度とプロテアーゼ活性が重要な因子となる。遺体化した微生物バイオマスは加水分解性アミノ酸の給源とみなすことができるが、GOTOH et al.(1986)は筑後市の堆肥連用区の水田の表層土の加水分解性N含量が化学肥料連用区のそれよりも高いことを報告している。酵素反応では基質濃度がミカエリス定数に比べて十分に低いときには基質濃度が反応速度の制限因子となる。土壌では一般に基質濃度が低いので、定常状態の土壌のバイオマスタンパクの無機化ではプロテアーゼ活性よりも基質としての遺体化したバイオマスタンパク濃度が無機化速度に影響しているであろう。中干し後のように、部分殺菌効果により遺体化したバイオマス由来のタンパク濃度が高くなる時には酵素活性の規模も無機化速度に影響してくるのではないと思われる。金沢・早野（1992）によって測定された非根圏土壌の堆肥連用区（ $162.5 \mu\text{gN g}^{-1}$ ）と化学肥料連用区（ $116.5 \mu\text{gN g}^{-1}$ ）の値から算出されるバイオマス態窒素規模の差は面積当たりに換算すると $46\text{kg窒素 ha}^{-1}$ である。堆肥連用区は化学肥料連用区に比べてha当たり窒素の施肥量が20kg少ないにもかかわらず、堆肥連用区は化学肥料連用区よりも水稻や微生物が利用可能な窒素が46kg多いことになる。この原因は堆肥の連用に求めることができる。稲わら堆肥の窒素含量を0.39%（橋元・石川，1964）とすれば、ha当たり20tの施用では78kgの窒素が毎年堆肥として供給されていることになり、両連用区におけるバイオマス窒素規模の差を十分にカバーしている。

最後に水田土壌の微生物性を規制する因子としての堆肥施用の影響について考察する（第17図）。湛水土壌では気相はなく固相と液相から成り立ち、水分含量が高いことは孔隙率が高いことを意味している。筑後の堆肥連用区では化学肥料連用区よりも土壌の水分含量が高い（第1図）ことは堆肥連用区のほうが土壌の孔



第17図 土壌の微生物性に影響を及ぼす要因としての堆肥の役割

隙率が高いことを示唆している。松口ら(1973)は土壌細菌数は土壌の液層率が大きい程高い値となることを観察している。堆肥の施用は土壌の物理性を改善することによって作物の生育を良好にすることは周知のことであるが、土壌の微生物や原生動物にも好適な生活空間をもたらすことでそれらの密度の増加に寄与したのであろう。堆肥は蛋白質、核酸、糖質等さまざまな有機化合物を含み、それらも微生物の栄養源としてその高い密度の維持に寄与するが、また、それらは微生物が生産する一連の加水分解酵素の誘導因子としての役割も果たしうる。本研究においても一連の酵素活性は堆肥連用区において高かった(第13~15図)。有機物の連用が一般にその分解速度を高めることは周知のことである(志賀, 1985)。原生動物は土壌微生物バイオマスの分解者とも位置付けられるが、この増加も有機物の分解速度を高めることに一定の寄与をしていると思われる。かくして、筑後市の水田土壌においても堆肥の施用はその物理性及び化学性への影響を介して土壌微生物バイオマスの存在量とその活性を化学肥料連用区よりも高め、結果として有機態窒素からの無機態窒素の放出の流れ等を大きくし、作物を扶養する能力を高めたのであろう。このことが「堆肥の連用が水田土壌の地力を高める」ということの側面を構成していたものと理解される。

#### 引用文献

- ASANUMA S., TANAKA S. and YATAZAWA M. (1979) Rhizoplain microorganisms of rice seedlings as examined by scanning electron microscopy. *Soil Sci. Plant Nutr.* **25** : 539-551.
- 浅沼修一(1992)単生窒素固定細菌の計数と分離.「新編土壌微生物実験法」(土壌微生物研究会編) p.23 3-242. 養賢堂, 東京.
- BARTHA R. and BORDELEAU L.(1969) Cell-free peroxidases in soil. *Soil Biol. Biochem.* **1** : 139-143.
- DAVTYAN G.S.(1958) Principles of the agrochemical characterization of soils. *Soviet Soil Sci.* **5** : 544-547.
- EIVAZI F. and TABATABAI M.A.(1977) Phosphatases in soils. *Soil Biol. Biochem.* **9** : 167-172.
- GOTOH S. and YAMASHITA K.(1966) Oxidation-reduction potential of paddy soil in situ with special reference to the production of ferrous iron, manganous manganese and sulfide. *Soil Sci. Plant Nutr.* **12** : 230-238.
- GOTOH S., ARARAGI M., KOGA H. and ONO S. (1986) Hydrolyzable organic forms of nitrogen in some rice soil profiles as affected by organic matter application. *Soil Sci. Plant Nutr.* **32** : 535-550.
- 橋元秀教・石川 実(1964)堆肥の成分組成に関する研究—土壌との関連について—. 茨城農試報 **6** : 1-29.
- 長谷部亮(1990)水田圃場における硝化脱窒に関する研究還元層の分化とアンモニア酸化菌の生態について. 北陸農試報 **32** : 123-170.
- 早野恒一(1992)土壌酵素活性の測定.「新編土壌微生物実験法」(土壌微生物研究会編)

- p.366-376 養賢堂，東京。
- HAYANO K. and SHIOJIMA M.(1974) Estimation of  $\beta$ -glucosidase activity in soil. *Trans. 10th Int. Congr. Soil Sci.* 3: 136-142.
- HAYANO K. and TUBAKI K.(1985) Origin and properties of  $\beta$ -glucosidase activity of tomato-field soil. *Soil Biol. Biochem.* 17: 553-557.
- HAYANO K.(1993) Protease activity in a paddy field soil: origin and some properties. *Soil Sci. Plant Nutr.* 39: 539-546.
- 星 和浩・吉田富男(1989) 水稻根に分布する共同窒素固定細菌について. 土肥誌 60: 47-52.
- 金沢晋二郎・早野恒一(1992) 湛水条件下の水田土壌における微生物バイオマス窒素の測定法. トルエン処理による直接抽出法. 土 肥誌 63: 310-314.
- 加藤邦彦(1992) 土壌細菌の計数と分離、好気性細菌. 「新編土壌微生物実験法」(土壌微生物研究会編) p.15-22 養賢堂，東京。
- 木村真人・和田秀徳・高井康雄(1977a) 水稻根に関する研究(第2報) 根圏土壌の微生物学的研究(その1). 土肥誌 48: 91-95.
- 木村真人・和田秀徳・高井康雄(1977b) 水稻根圏に関する研究(第3報) 根圏土壌の微生物学的研究(その2). 土肥誌 48: 111-114.
- 木村真人・和田秀徳・高井康雄(1977c) 水稻根圏に関する研究(第5報) 畑苗代期水稻の根圏効果. 土肥誌 48: 546-550.
- 木村真人・和田秀徳・高井康雄(1977d) 水稻根圏に関する研究(第4報) 根圏土壌の理化学的性質(その2). 土肥誌 48: 540-545.
- KIMURA M., MURAKAMI H. and WADA H.(1989) Survival strategy of microfauna in a submerged paddy soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* 35: 1-7.
- 駒形和男(1975) 細菌の分類と同定(1) 好気性細菌. 「微生物の分類と同定」(長谷川武治編) p.203-245, 東大出版会，東京。
- 熊田恭一(1948a) 水稻幼植物の根圏土壌に関する研究(第1報). 土肥誌 19: 119-123.
- 熊田恭一(1948b) 水稻幼植物の根圏土壌に関する研究(第2報). 土肥誌 19: 124-128.
- 栗原 康(1975) 土壌原生動物実験法. 「土壌微生物実験法」(土壌微生物研究会編) p.126-136. 養賢堂，東京。
- 松口龍彦・蘭 道生・石沢修一・鈴木達彦(1973) 土壌構造と微生物の生育. 土壌の物理性 28: 9-14.
- 宮下清貴(1992) 土壌放線菌の計数と分離，同定. 「新編土壌微生物実験法」(土壌微生物研究会編) p.55-61. 養賢堂，東京。
- 猶原剛士・宇佐美正一郎(1976) 水稻根圏の微生物学的研究. 根圏での酸化・還元をめぐる. 土肥誌 47: 391-397.
- 新田恒雄(1992) 土壌糸状菌の計数，分離，同定. 「新編土壌微生物実験法」(土壌微生物研究会編) p. 62-73. 養賢堂，東京。
- 西尾 隆(1992) 脱窒作用の測定と脱窒菌の計数，分離. 「新編土壌微生物実験法」(土壌微生物研究会編) p.215-223. 養賢堂，東京。
- 大村裕顕・早野恒一(1987) 土壌のホスホジエステラーゼ活性の至適pHと土壌pHとの関係について. 土肥誌 58: 58-61.

- QUASTEL J. H. and WOOLDRIDGE W. R. (1927) XXII. The effects of chemical and physical changes in environment on resting bacteria. *Biochem. J.* **21** : 148-168.
- RENNIE R. J. (1981) A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soil. *Can. J. Microbiol.* **27** : 8-14.
- ROGERS H. T. (1942) Dephosphorylation of organic phosphorus compounds by soil catalysts. *Soil Sci.* **54** : 439-446.
- 志賀一一 (1985) 施用有機物の分解様式と地力・作物への影響. 「農耕地における有機物施用技術」(農林水産省農業研究センター編) p.8-25. 農林水産技術情報協会, 東京.
- 鈴木達彦・石沢修一 (1965) 畑土壌の微生物およびその活性と肥沃土. 農技研報 B15 : 92-186.
- 武田 潔 (1992) 土壌細菌の計数, 分離. 嫌気性細菌. 「新編土壌微生物実験法」(土壌微生物研究会編) p.23-35. 養賢堂, 東京.
- WATANABE K. and HAYANO K. (1993) Distribution and identification of proteolytic *Bacillus* spp. in paddy field soil under rice cultivation. *Can. J. Microbiol.* **139** : 674-680.
- 山室成一 (1980) 水田土壌中の遊離アミノ酸の定量法とその動態. 土肥誌 **51** : 131-135.
- YOSHIKURA J., HAYANO K. and TSURU S. (1980) Effect of drying and preservation on  $\beta$ -glucosidase in soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **26** : 37-42.

## Behavior of selected microbial populations and their activity in rice and wheat rhizosphere and non-rhizospheres soils in longterm experimental paddy fields with and without organic matter application in southwest Japan

Koichi HAYANO<sup>1)</sup>, Katsuji WATANABE and Susumu ASAKAWA

### Summary

A comparative study of the dynamics of microbial populations and their activity was made from 1987 to 1989 on rice and wheat rhizosphere and non-rhizosphere soils of two well controlled paddy field experimental plots at Chikugo in southwest Japan. Both experimental plots were in the same field (Gray Lowland Soils) where rice was cropped yearly from June to October for more than the past 20 years and, since 1985 rice was cropped in summer and wheat cropped from November to May.

One plot received an application of inorganic fertilizer at 140 kg N ha<sup>-1</sup>yr<sup>-1</sup>, and the other received an application of inorganic fertilizer at 120 kg N ha<sup>-1</sup>yr<sup>-1</sup> and rice straw compost at 20 ton ha<sup>-1</sup>yr<sup>-1</sup>.

Mid-summer drainage during the rice growing season increased the bacterial population in rhizosphere soil that received an application of rice straw compost. With the exception of this case, populations of bacteria, actinomycetes, fungi and anaerobes, were usually constant overtime regardless of growth stage and soil management.

The rhizosphere effect of rice on microorganisms examined here, was generally low irrespective of the rice growing stage, microbes examined, and soil management, while the rhizosphere effect of wheat was clear. In plots receiving rice straw compost, enzyme activity (protease, phosphomonoesterase and  $\beta$ -glucosidase), amino acid content, and release of amino acid-N after incubation of soil at 30°C for 24 hr in presence of toluene were higher than control plots. These estimates for rhizosphere soil in the rice growing stage were higher than in non-rhizosphere soil.

According to the results obtained here, the interaction between microbial populations and their activity in rhizosphere and non-rhizosphere soils and application of organic manure, and growth of crop plants, were discussed.

**Key words :** Paddy field, Rhizosphere, Soil, Microorganisms, Compost

---

Department of Agro-Environmental Management, Kyushu National Agricultural Experiment Station, Nishigoshi, Kumamoto 861-11 Japan.

Present address :

1) National Institute of Agro-Environmental Sciences.