

(5) 土壌の脱窒過程で生成される N_2O の濃度に及ぼす細菌類と真菌類の影響

EFFECTS OF BACTERIA AND FUNGI ON N_2O CONCENTRATION
PRODUCED BY DENITRIFICATION IN SOIL ENVIRONMENTS

大石京子*、楠田哲也*

Kyoko OISHI and Tetsuya KUSUDA

ABSTRACT ; The relative contributions of bacteria and fungi to N_2O production by denitrification in acidic tea soils amended with farmyard manure or chemical fertilizer, were studied with laboratory experiments using selective inhibitors. The pHs of these soils were kept at 4.8 and 5.5 *in situ*, respectively. Fungal denitrification accounted for about 30% and 15% of the total denitrification in the farmyard manure-amended soil and chemical fertilizer-amended, respectively. The main final product by bacterial denitrification was N_2 and the concentration of N_2O as intermediate increased in the denitrification process from nitrate rather than from nitrite. On the other hand, the final product of fungal denitrification was N_2O independent of pH values and kinds of substrates. The increases of N_2O concentration by denitrification in acidic soils were due to the decrease of N_2O reduction activities by bacteria and the increase of fungal denitrification. Bacteria had an important role in reducing N_2O produced by fungi in natural environment. These results suggest that the agricultural soils acidified by the excessive use of nitrogen fertilizer may be one of the major sources of N_2O in natural system and the use of farmyard manure increases both bacterial and fungal denitrifications.

KEYWORDS ; nitrous oxide (N_2O), bacterial denitrification, fungal denitrification, tea soils, pH

1. はじめに

一酸化二窒素 (N_2O) は CH_4 や CO_2 と並んで地球温暖化ガスの一つでありその削減が急がれている。しかし、その放出源や消失源については未だに明確にされていない。特に自然生態系における放出源やその量については不明な点が多く残されているが、主な放出源は森林土壌や農耕地土壌における硝化・脱窒であろうと考えられている¹⁾。これまで脱窒は細菌類を代表とする原核生物に固有の機能であると考えられていたが、最近では糸状菌や酵母などの真核生物 (真菌類) にも同様の機能があることが認められている^{2)~4)}。しかも真菌類の脱窒は、特殊な菌によるものではなく、*Fusarium*, *Cylindrocarpum*, *Trichoderma*, *Chaetomium* 等土壌中に一般的に存在する種であり、真菌類の脱窒は普遍的現象であると考えられている。さらにそれらの脱窒の電子伝達経路は、細菌類の脱窒経路と大きく異なることが報告されている⁴⁾。細菌類の脱窒系は最終産物が N_2 であり、NO還元酵素としてチトクロムb及びcが関与しているのに対し、真菌脱窒系の最大の特徴は主な最終産物が N_2O であること、NO還元酵素としてチトクロムP-450が関与すること、さらに、硝酸塩や亜硝酸塩以外の窒素化合物も脱窒の基質となり得ることである。また、脱窒能を有する真菌類の中には硝酸塩還元酵素を欠くものも多いと言われている³⁾。

真菌類は農地や森林土壌において、団粒形成^{5)~7)} や物質循環⁸⁾ に重要な役割を担っている。坂本ら⁷⁾ は有機物の中でも、特に稲藁は鶏糞に比べて真菌類を選択的に増大させ、粒径2mm以上の比較的大きな団粒の

*九州大学工学部建設都市工学科(Department of Civil Engineering, Faculty of Engineering, Kyushu University)

形成を促進させることを報告している。このように土壌において物質代謝への真菌類の寄与率が大きいことが予測される。しかし、真菌類の脱窒に関しては純粋培養で得られた知見のみであり、自然界における真菌類による脱窒量や N_2O 濃度への寄与率については明らかにされていない。

そこで、本研究では、脱窒に対する真菌類の寄与が大きいと考えられる土壌の中で、特に N_2O の生成量が大きい茶畑の土壌を対象とした。茶畑の中で真菌類のバイオマスを増大させることが報告されている¹³⁾有機資材を含む堆肥が施肥されている有機肥料区と化学肥料区を選定し、これらの土壌の脱窒過程で生成される N_2O の挙動とそれに対する細菌類と真菌類の影響について検討した。さらに高分子有機物が真菌類のバイオマスや真菌脱窒に与える影響について考察を加えた。

2. 実験試料および実験方法

(1) 試料とその調整

主に有機肥料(堆肥)又は化学肥料が使用されている2ヶ所の茶畑で、土壌養分分析法⁹⁾に準じて表面の敷草を除いて5～10cm深さの土壌を採取した。これらの土壌を篩にかけ2mmの篩を通過したものを試料とした。それらの特性を表1に示す。土壌のpHは土壌養分分析法⁹⁾に準じ、試料10gと蒸留水25mlをよく混合し、2時間程度放置した後ガラス電極で測定した。全炭素(TC)及び全窒素(TN)は真空凍結乾燥後、CNコーダーで測定した。化学肥料区の土壌には魚粉、硫酸、リン酸アンモニウム、油粕の混合物が年間約100kgN/ha程度施肥されている。有機肥料区にはこれらの化学肥料と厩肥(堆肥化物)とが併用されているが、有機肥料の施肥量については把握できなかった。

各試料を40gづつ4グループに分けてM/15のリン酸緩衝液(pH=5.0)を100ml加え、それぞれにクロラムフェニコール又はシクロヘキシミド、クロラムフェニコールとシクロヘキシミドの両方を5mgづつ加え、残りを空試験として30℃で24時間培養した。抗生物質で培養した試料については、この一部をとって下記の培地で、細菌類と真菌類の相互汚染がないことを確認した。これらを1500xGで10分間遠心分離して脱窒試験に用いた。採取した2種類の土壌のpHは4.8～5.5の範囲にあったため*in situ*条件としてpH=5.0、脱窒の至適pHとして7.2に調整した。

細菌類と真菌類の分離用培地として、それぞれ一般細菌用標準寒天培地とポテト・デキストロース寒天培地を、細菌類と真菌類の増殖阻害剤として、それぞれクロラムフェニコールとシクロヘキシミドを使用した。使用量は予備実験により決定した。

(2) 脱窒活性及び N_2O の生成

70mlのバイアルに上記の方法で前処理した土壌を乾燥質量換算で3gをとり、亜硝酸ナトリウム又は硝酸カリウムの2mgN/mlを0.5ml、フマル酸ナトリウム4mgC/mlを0.5ml、前処理に用いた同じ阻害剤0.1mgを取り、リン酸緩衝液(pH=5.0又は7.2)を2ml加えた。これを窒素ガスで置換した。2グループに分けて、その一方にアセチレン(10kPa)を加えた。これらを30℃の恒温槽で振盪培養し、経時的にヘッドスペースの N_2O の濃度をECD付きガスクロマトグラフで測定した。分離用カラムとしてモレキュラシーブ5A、分析条件としてカラム温度200℃、検出/注入温度330℃、キャリアガスとして N_2 を、その流速を40ml/minとした。ブンゼン吸収係数とヘンリー定数で溶存 N_2O を考慮してバイアル内の濃度を算出した¹⁰⁾。すべての培養は同一系について5本以上行い、結果はその平均値とした。この方法で、上記の2種類の試料についてpHが5と7.2の場合に生成する N_2O の濃度を測定した。

表1 供試土壌の特性

	有機肥料区	化学肥料区
含水比(%)	77	32
pH(H ₂ O)	4.8	5.5
強熱減量(%)	27.4	7.5
TC(%)	11.3	3.0
TN(%)	0.96	0.37

3. 実験結果

アセチレンで N_2O の還元を阻害したすべての系において、残りの基質(NO_2-N+NO_3-N)と生成した N_2O-N による窒素の回収率は92~103%であった。図1に、*in situ*のpH (pH=5.0)での有機肥料区の土壌による亜硝酸塩及び硝酸塩を基質とした細菌・真菌混合系(抗生物質未処理泥; 混合系)、細菌系(シクロヘキシミド処理泥)、真菌系(クロラムフェニコール処理泥)のそれぞれの脱窒活性と N_2O の挙動を示す。いずれの系でも亜硝酸塩を基質とした場合の脱窒活性は硝酸塩の場合に比べて若干大きい値を示した。また、いずれの基質でも混合系の脱窒がほぼ終了するまで細菌系と真菌系のそれぞれの脱窒量の和がほぼ混合系の脱窒量であり、その中で真菌類による脱窒は全脱窒量の約30%を占めていた。アセチレンを添加していない系では、亜硝酸塩からの脱窒で生成した N_2O の濃度は混合系及び細菌系で急速に減少した。特に、細菌系では混合系に比べて N_2O の減少速度が大きく、脱窒開始から極く初期において N_2O は消失した。しかし、真菌系の脱窒では生成された N_2O の濃度はアセチレンが添加されている系とはほぼ同じであった。これらの結果は、細菌脱窒は中間産物として一時的に N_2O を生成するが最終産物は N_2 であり、真菌脱窒は N_2O を最終産物とし、後者によって生成された N_2O は前者によって N_2 へ還元されていることを示している。硝酸塩を基質とした細菌脱窒は亜硝酸塩の場合に比べて N_2O の還元速度は低下したものの、最終産物はやはり N_2 であった。また、真菌脱窒は N_2O を最終産物とし、亜硝酸塩および硝酸塩のどちらの基質とも脱窒活性に殆ど差はなかった。

図2に、*in situ*のpHが約5であった有機肥料区の土壌をpH=7.2に調整した場合の結果を示す。硝酸塩及び亜硝酸塩の両基質とも脱窒活性はいずれの系でもpH=5の場合より低下し、また真菌類の全脱窒への寄与率も若干低下した。生成した N_2O の減少速度はpH=5の場合より小さく、これは基質が亜硝酸塩の場合に顕著であった。

図3に化学肥料区の土壌による亜硝酸塩及び硝酸塩を基質とした混合系、細菌系、真菌系のそれぞれの脱窒活性と N_2O の挙動を示す。化学肥料区の土壌は有機肥料区に比べて脱窒活性が小さく、また、全脱窒量に対する真菌脱窒の寄与率も約15%と低かった。また、細菌類による N_2O の還元速度も有機肥料区に比べてかなり低下した。有機肥料区と同様に、真菌

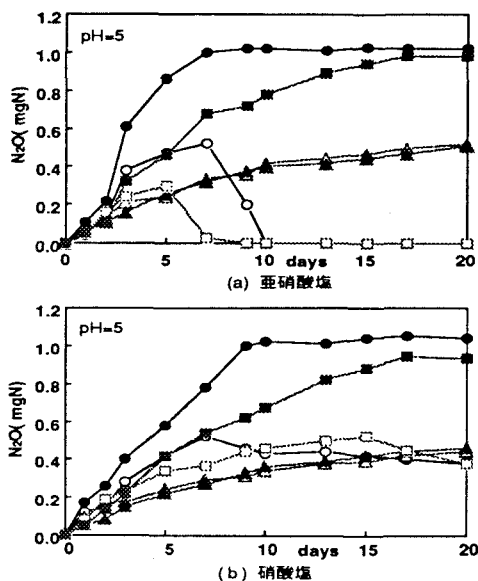


図1 有機肥料区土壌のpH=5における脱窒活性と N_2O の挙動に及ぼす基質の影響

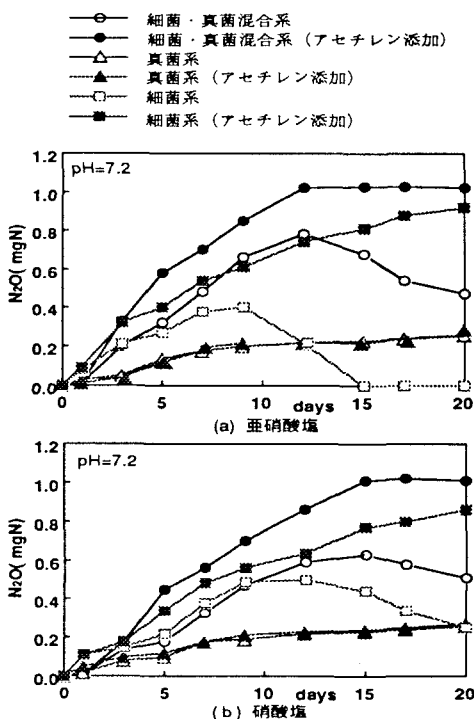


図2 有機肥料区土壌のpH=7.2における脱窒活性と N_2O の挙動に及ぼす基質の影響

脱窒の主な最終産物は両基質とも N_2O であった。

図4は *in situ* の pH が約5であった化学肥料区の土壌を pH=7.2 に調整した場合の結果である。pH の増加に伴う脱窒活性の低下と細菌脱窒による N_2O の還元能の低下など有機肥料区の土壌の場合と同じ傾向を示した。

4. 考察

Anderson と Domsch⁸⁾ は抗生物質の選択性を利用して土壌からの CO_2 の発生量を求め、それらの結果から真菌と細菌のバイオマスの割合を求めている。現在でもこの方法は真菌と細菌の選択に利用されているが、最近問題点が指摘されている¹¹⁾¹²⁾。特に Wu と Knowles¹²⁾ は細菌類の増殖阻害剤であるクロラムフェニコールは脱窒プロセスの様々な経路を阻害し、 N_2O や NO を蓄積させることを *Fluexibacter canadensis* と *Pseudomonas denitrificans* の純粋培養実験で報告している。阻害剤の影響は、その濃度や菌株、更に実験条件によって大きく異なるため、純粋培養系で得られた結果は必ずしも環境試料にそのまま適用できるとは限らない。本実験では、脱窒活性や N_2O の生成実験に供する前に、土壌試料をクロラムフェニコールで前培養して土壌を真菌系に調整しているため、新たに添加したクロラムフェニコールの細菌脱窒に対する影響は無い、あったとしても極めて小さいと考えられる。図1~4において、混合系の脱窒がほぼ終了するまでは細菌及び真菌類による脱窒量の和がほぼ全脱窒量となっていること、クロラムフェニコールとシクロヘキシミドの両方で培養し、かつアセチレンを添加した系では N_2O の生成が認められなかったことから、脱窒は主に細菌類と真菌類によるものであると考えられる。脱窒の最終産物を確認する必要性から、本実験では培養時間が長くなり薬剤耐性菌が増殖した可能性がある。薬剤耐性菌については特に検討しなかったが、実験の開始時と終了時に、それぞれシャーレ10枚程度を用いた平板培養で細菌と真菌の相互汚染を検査した。その結果、数個の細菌のコロニーが検出されたので、いくらかは相互汚染があったものと思われる。しかし、本実験の結果から、細菌と真菌の相互汚染の程度は全体的な傾向を左右する程大きな影響は無かったと評価できる。

有機肥料区の土壌では化学肥料区に比べて脱窒活

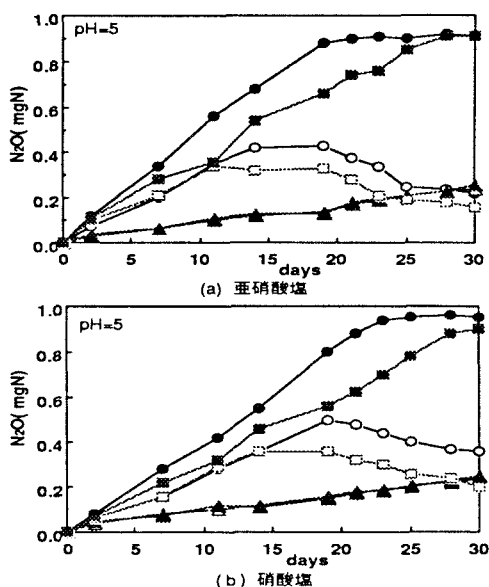


図3 化学肥料区土壌のpH=5における脱窒活性と N_2O の挙動に及ぼす基質の影響

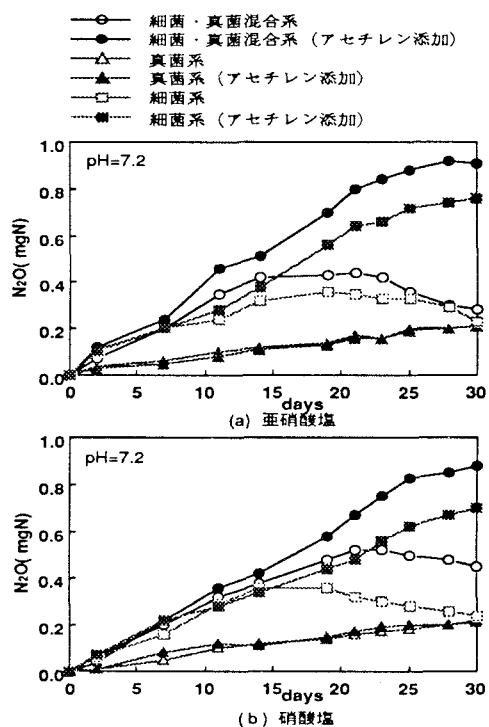


図4 化学肥料区土壌のpH=7.2における脱窒活性と N_2O の挙動に及ぼす基質の影響

- 細菌・真菌混合系
- 細菌・真菌混合系 (アセチレン添加)
- △ 真菌系
- ▲ 真菌系 (アセチレン添加)
- 細菌系
- 細菌系 (アセチレン添加)

性が高く、全脱窒に対する真菌脱窒の割合も大きかった。これは有機肥料区と化学肥料区における脱窒機能を有する微生物のバイオマスの違いと考えられる。土壌微生物の種やそれらのバイオマスに影響を与える主要因として肥料の成分が挙げられる。坂本と大羽¹³⁾は各種有機物資材の土壌への施用が土壌中の糸状菌と細菌のバイオマスに与える影響について検討した結果、化学肥料区に比べて有機物肥料区において微生物のバイオマスが増大すること、更に麦藁や稲藁及びそれらの堆肥のように炭水化物含有率の高い有機物資材は糸状菌バイオマスを増大させるのに対し、牛糞や豚糞およびそれらの堆肥のようなタンパク質含有率が高い有機物資材は糸状菌と細菌の両方のバイオマスを増大させることを報告している。その理由として、牧草、藁、家畜尿尿などで作られた堆肥には、炭素率の高いリグニンやセルロースといった高分子多糖類が多く含まれており、これらの物質の分解の主役は真菌類であること、細菌類は真菌類によって低分子化された有機物を摂取していることなどが考えられる。本実験に用いた化学肥料区の土壌には、魚粉や油粕など若干の有機物が含まれているが、真菌類を選択的に増殖される成分は含まれていない。真菌類と細菌類のすべてが脱窒機能を有するとは限らないため、本実験ではそれらのバイオマスや個数について定量的に測定していないが、平板培養の結果からやはり真菌、細菌類共に化学肥料区に比べて有機土壌区で多かった。一般に、脱窒で生成される N_2O の濃度には生分解性有機物と硝酸塩（又は亜硝酸塩）の比（C/N）が影響因子のひとつとされている^{14) 15)}。本実験では土壌中の有機物について生分解性及びその量を把握していないため、脱窒に効率良く利用できる有機物としてフマル酸ナトリウムを、添加した硝酸塩や亜硝酸塩を完全に N_2 へ還元できる充分な量を加えており、脱窒活性や N_2O の消長にC/Nは影響していないものと考えられる。混合系と細菌系の N_2O の挙動を比較すると、後者では前者に比べて脱窒の進行過程の極く初期において N_2O が減少する傾向を示し、特に基質が亜硝酸塩のとき顕著であった（図1と2）。これは混合系において真菌類による脱窒で生成した N_2O が細菌類によって N_2 へ還元されていることを示しており、細菌脱窒は N_2O の濃度を抑制する重要な役割を担っていると考えられる。

*in situ*のpH条件下(pH=5)と脱窒の至適pHである中性域(pH=7.2)における細菌類の脱窒活性と生成した N_2O の濃度を比較すると（図1と2及び図3と4）、*in situ*のpH条件下の方が脱窒活性が高く、生成される N_2O の濃度はやや低い傾向が見られる。これは酸性条件下では脱窒による N_2O の生成量が多くなるという一般的な知見と矛盾する。一方で、Parkin *et al.*¹⁶⁾は酸性土壌と中性土壌の脱窒速度を様々なpH条件下で測定し、酸性、中性に関わらず*in situ*のpHに近い条件下で脱窒速度の最大値を示し、各pH条件に適応した脱窒機能を有する微生物が集積しており、急激なpHの変化は脱窒プロセスや活性に影響を与えることを報告している。彼らは、pHの変動に伴う N_2O 生成量の変化や真菌脱窒の寄与については検討していないが、脱窒活性という点においては本実験と同様の結果を示している。脱窒へのpHの影響は、真菌脱窒より細菌脱窒に対して比較的大きかった（図1と2及び図3と4）。本研究で用いた茶畑土壌において、脱窒によって生成される N_2O の濃度が高くなるのは、主に土壌pHの低下による細菌類の N_2O 還元力の低下と真菌脱窒によるものと考えられる。また、AndersonとDomsch⁸⁾は真菌類の集積はpHに依存しないことを示しており、本研究の結果及び坂本らの結果^{7) 13)}を総合すると真菌脱窒の寄与率はpHより高分子有機物の存在に大きく依存すると考えられる。本実験で用いた土壌において真菌脱窒の寄与率は15～30%程度であったが、その最終産物は N_2O であるため、土壌の酸性化を防止すると共に N_2O 還元能の高い細菌類の集積について今後検討する必要がある。

5. 結論

- 1) 脱窒活性は有機肥料（堆肥）区の土壌で高く、化学肥料区の土壌で小さかった。
- 2) 亜硝酸塩、硝酸塩いずれの基質でも混合系の脱窒がほぼ終了するまで細菌系と真菌系のそれぞれの脱窒量の和がほぼ混合系の脱窒量であり、その中で真菌脱窒の寄与率は有機肥料区の土壌で約30%、化学肥料区で約15%であった。
- 3) 細菌脱窒の最終産物は基質やpHによらず N_2 であった。中間産物として生成された N_2O の N_2 への還元速度は硝酸塩より亜硝酸塩からの脱窒で大きかった。

- 4) 真菌脱窒の最終産物は基質や pH に関わらず N_2O であった。
- 5) 真菌脱窒で生成した N_2O は細菌類によって N_2 へ還元されていた。
- 6) 土壌の酸性化は主に細菌脱窒に影響し、 N_2O の還元速度を低下させた。

謝辞

本研究の実施に当たり、土壌採取に御協力頂きました福岡県保健環境研究所の松尾 宏、馬場義輝の両氏、及び貴重な御助言を賜りました静岡大学農学部教授 仁王以智夫先生に深謝致します。

本研究は一部「財団法人 日本生命財団」の平成8年度一般研究助成を受けたものであり、関係者の方々にお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 陽 捷行編著：土壌圏と大気圏－土壌生態系のガス代謝と地球環境－，朝倉書店，pp85-105, 1994
- 2) Burth I. and J. C.G. Ottow : Influence of pH on the production of N_2O and N_2 by different denitrifying bacteria and *Fusarium solani*. *Ecological Bulletin* (stockholm) , Vol.35, pp207 - 215, 1983.
- 3) Shoun H., D. Kim, H. Uchiyama and J. Sugiyama : Denitrification by fungi, *FEMS Microbiology Letters* , Vol. 94, pp77 - 282, 1992.
- 4) Shoun H. and T.Tanimoto : Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P-450 in the respiratory nitrite reduction, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 266, pp11078 - 11082, 1991.
- 5) Harris R.S., G. Chesters, O.N. Allen and O.J. Attoe : Mechanics involved in soil aggregate stabilization by fungi and bacteria. *Soil Science Society America Proceedings*, Vol. 28, pp 529 - 532, 1964
- 6) Tisdal J. M. and Oades J. M : Organic matter and water-stable aggregation in soils. *Journal of Soil Science*, Vol. 33, pp 141 - 163, 1982.
- 7) 坂本一憲・大塚麻子・吉田富男：土壌の団粒粒径分布に及ぼす土壌微生物相の影響，日本土壌肥科学雑誌，第 67 巻、pp310 - 313, 1996.
- 8) Anderson J. P.E. and K.H. Domsch : Measurement of bacterial and fungal contributions to respiration of selected agricultural and forest soils, *Canadian Journal of Microbiology*, Vol.21, pp314 - 322, 1975.
- 9) 土壌養分分析法：土壌養分測定法委員会編，養賢堂，1980.
- 10) Weiss R.F. and B.A. Price : Nitrous oxide solubility in water and seawater. *Marine Chemistry*, Vol.8, pp347 - 359, 1980.
- 11) Newell S.Y., B. F. Sherr, E. B. Sherr and R. D. Fallon : Bacterial response to presence of eukaryote inhibitors in water from a coastal marine environment, *Marine Environmental Research*, Vol.10, pp147 - 157, 1983.
- 12) Wu O. and R.Knowles : Effect of chloramphenicol on denitrification in *Fluoribacter canadensis* and "*Pseudomonas denitrificans*", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61, pp434 - 437, 1995.
- 13) 坂本一憲・大羽 裕：各種有機資材の施用が土壌中の糸状菌と細菌のバイオマス比に及ぼす影響，日本土壌肥科学雑誌，第 66 巻，pp 418 - 421, 1995.
- 14) Burford J. R and J. M. Bremner : Relationships between the denitrification capacities of soils and total water-soluble and readily decomposable soil organic matter, *Soil Biological Biochemistry*, Vol. 7, pp389 - 394, 1975.
- 15) Pfenning K. S and P.B.McMahon : Effect of nitrate, organic carbon, and temperature on potential denitrification rates in nitrate-rich riverbed sediments, *Journal of Hydrology*, Vol.187, pp 283-295, 1996.
- 16) Parkin T. B., A.J. Sexstone and J.M. Tiedje : Adaptation of denitrifying populations to low soil pH, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.49, pp 1053 - 1056, 1985.