

博士論文

土壤の可給態窒素の実態と作物によるその特異的吸収

島根県農業試験場
環境部土壤環境科
松本真悟

目次

	頁
第1章 序	1
第2章 ホウレンソウにおける化学肥料の減肥，緩効性肥料の施用と 比較した有機質肥料の肥効特性	5
第3章 有機物施用条件下での窒素吸収量の作物間差異	21
第4章 中性リン酸緩衝液および希硫酸抽出による土壌の可給態窒素 の推定と抽出される有機態窒素の特性	38
第5章 有機物を施用された土壌の有機態窒素の動態およびその起源	52
第6章 チンゲンサイ，ニンジンおよびホウレンソウによる土壌有機 態窒素の直接吸収	64
第7章 総合考察	79
謝辞	93
引用文献	94

第1章 序

現代の農業は、戦後の食糧増産政策をもとに集約的な多肥型の施肥管理体系が発展し、耐肥性品種の導入により収量の向上を実現してきた。他方、近年の社会的な環境保全意識の高揚により、農地から排出される環境負荷に厳しい目が向けられるようになってきた。特に肥料成分由来の硝酸態窒素による河川・湖沼の汚染は深刻な問題となりつつある (Singh and Sekhon, 1979; Ritter, 1989)。生産現場においても、化学肥料や農薬の多用による土壌の化学性や生物性の悪化のため、作物の栄養生理異常や病害が多発している。このような背景をもとに、近代農業技術における弊害を反省し、化学肥料や化石エネルギーの投入量を減らし、環境との調和を図りながら高品質農産物を求める Low Input Sustainable Agriculture (LISA) への関心が高まっている (Stenholm and Waggoner 1990)。これにともない、化学肥料に代わる養分供給手段として緑肥、畜産廃棄物、集落排水汚泥等の各種有機物の多面的、効率的な利用が求められている。

土壌に対する有機物の施用意義としては、粗大有機物などの施用によって特徴付けられるような土壌物理性の改善、土壌微生物相の改善による病害抑制 (新田 1986) などがあげられる。また、窒素は作物の反応がもっとも大きい養分であり、その供給源として、堆肥・厩肥などをはじめとする有機物資材が化学肥料のない時代から用いられてきた。その結果、作物栄養的な面からは窒素に関する数多くの研究が行われている。特に有機物からの窒素の無機化を予測する試みとその中心となってきた。何故ならば、Liebig(1840)による無機栄養説が提唱されて以来、「作物は無機態窒素を吸収しているであろう」から、土壌中においても有機物から無機化された窒素のみを吸収すると考えられてきたためである。実際、インキュベーション法 (三木・出井 1965, Grunes et al. 1963, Stanford and Smith 1972) や速度論的な解析 (吉野・出井 1977, 杉原ら 1986, 山室 1988, 上野ら 1990) によって予測される無機態窒素量は作物が吸収する全窒素との相関が高いことが明らかにされている。

しかしながら、植物の切断組織や培養細胞が有機物を吸収することは今

や常識であり、培地に添加した種々の有機物を吸収させることによって誘導される植物の質的、量的変化を利用して薬学、農学、育種学など様々な研究が進展してきた。また、「無機栄養説批判」として森（1979a, 1979b, 1986）が行った一連の研究結果によると、窒素源として水耕培養液に添加されたアミノ酸、タンパク質、核酸をイネや裸麦が無機態窒素よりも優先的に吸収する場合がある。すなわち、植物が無機態窒素だけでなく、有機態窒素をも窒素源として生育することは明らかである。ただし、これらの実験はいずれも無菌的であったり、水耕培養液などに高濃度に添加された純粋な有機物に対する実験結果であり、土壤微生物の存在下におけるほ場レベルの試験を対象に行っていないため、有機物の直接吸収の可能性を指摘したことに意義がある。しかし、有機物由来の有機態窒素が農業現場での程度、窒素吸収や作物生産に関与するのはいまだ不明と思われる。そのため、今日においてもなお、作物が吸収する窒素は無機化によって生成する無機態窒素であることが前提とされ、数多くの試験が実施されている。この前提によると、作物の窒素吸収量は土壤中の無機態窒素量を反映するため、窒素吸収量と土壤中の残存窒素量を加えた値はその時点での無作付け土壤中の無機態窒素量と等しくなると仮定される。

ところが、これまでに、有機物を施用した栽培実験の中には作物の窒素吸収量と無機化窒素量が相関しない事例も少なからず認められる。Mattingly（1973）らは、バレイショ、ビートなどでは化学肥料だけを施用した時よりも、緑肥、堆肥などの有機物を施用した方が収量が高く、窒素利用率も高いと報告している。また、山縣ら（1996）はC/N比を20に調整した米ぬかと稲わらの4:1混合物を土壤に施用した場合、リクトウはトウモロコシや大豆よりも多くの窒素を吸収し、有機物を施用した場合の窒素吸収反応には作物間差があることを認めている。さらに、1993年から1998年にかけて行われた農林水産省の環境保全型栽培基準設定調査事業における各県の報告データを検証していくと、バレイショ、ビート、ニンジン、トウモロコシ、ハウレンソウ、モモにおいて、稲わら堆肥やバーク堆肥を施用したときの窒素吸収量が、栽培期間中に土壤から生成される無機態窒素量を上回る場合がある（農林水産省農産園芸局 1999）。このように有機

物を施用して作物を栽培した場合には、化学肥料のみを施用した場合とは異なる窒素吸収反応を示す事例が認められる。

現在、栽培植物として栽培される主要な作物の原産地は、環境条件を異にする世界中の地域にまたがっており、元来はその気候風土に適応して進化したものといえる。たとえば、ツンドラ地帯に生育するスゲ族植物はオムギと比べて無機態窒素よりもアミノ酸を好んで吸収しており、これは、有機物の分解が著しく遅く、窒素の主要な存在形態がアミノ酸であるツンドラ地帯特有の土壌条件に適応したことによるものである (Chapin et al. 1993)。また、落葉などの有機物が長年月にわたって堆積している森林地帯の林木は無機態窒素よりもアミノ酸を優先的に吸収している (Nasholm et al. 1998)。このような視点で有機物と植物の窒素吸収反応をとらえると、作物が単に土壌中の有機物の無機化過程で生じた無機態窒素を吸収しているという前提は曖昧なものとなってくる。

土壌中で無機化される窒素の主要な給源は高度に重合された腐植物質ではなく、比較的易分解性の有機態窒素であることが明らかにされており、これを可給態窒素と定義している。可給態窒素に占める遊離アミノ酸はわずか3%であり (Nemeth 1988)、土壌の無機化窒素の供給源はタンパク様の物質であると考えられている (Stevenson 1982)。このため、多くの研究者によって酸加水分解性有機態窒素の分画定量が試みられてきた。このうち、特に Bremner (1965) の方法が広く用いられており、酸加水分解性窒素の40%を占めるアミノ酸態画分の土壌中での分布は深さとともに減少し、耕作、施肥等により影響を受けることが指摘されている。一方、有機物を施用した土壌において、有機化される窒素の特性を Bremner (1965) の方法によって検討した場合、有機化窒素の化学組成と同窒素の放出特性 (無機化) との間に必ずしも一定の量的関係が認められなかったことが指摘されている (樋口ら 1981)。

従来、土壌の可給態窒素の評価法としては、土壌を一定温度、一定水分で培養し、培養期間中に放出される無機態窒素を定量するインキュベーション法が一般的に行われてきた (Stanford and Smith 1972, Janzen 1987, Campbell et al. 1988, Mengel 1991)。しかしこの方法では、培養に要す

る期間やその後に窒素を定量する過程などに時間がかかるという欠点がある。この欠点を補い、迅速な評価法として、土壌の可給態窒素の供給源となる有機態窒素を適当な抽出液で抽出し、定量する試みが行われてきた (Keeney 1982, Keeney and Bremner 1966, Dolmat 1980, 樋口 1981, 小川ら 1988, 斉藤 1988, 藤井ら 1990, Numan et al. 1998)。その中でも特に 1/15M 中性リン酸緩衝液抽出法がインキュベーション法との相関が高く現在日本で可給態窒素の簡易な推定法として広く普及している。

化学肥料の施用量を抑え、有機物投入量が増加するという今後の農業が直面する条件において、環境保全的で生産性の高い施肥管理技術を確立するには、有機物を施用した場合の作物個々の窒素吸収特性を明らかにすることが望まれる。そのためには、有機物の無機化窒素量を把握するだけでなく、無機化される前の有機態窒素の土壌中での動態について多面的な解析が必要となる。

本研究では、ハウレンソウのほ場試験において、有機態窒素が吸収利用されている証拠を得た後、同様の反応を示す作物をポット試験により検索した。また、有機態窒素に対する作物からの作用を検討するために、その前提として、リン酸緩衝液によって抽出される有機態窒素の特性を種々のクロマトグラフィーおよび電気泳動によって解析し、土壌に施用された種々の有機物の動態を明らかにした。更に、有機物施用効果が高いと認められた作物に対して、この有機態窒素の直接吸収の可能性について仮説を提案し、その証明を行った。

第2章 ホウレンソウにおける化学肥料の減肥，緩効性肥料の施用と比較した有機質肥料の肥効特性

2-1 目的

近年，消費者が野菜に求める品質には変化が見られ，色，つや，形などの外観的品質以外に，栄養価，安全性などの成分品質が重要になってきている（Jong and Kim 1995）．これらの観点から，野菜生産農家や消費者の間では有機質肥料を施用した栽培への関心が高くなっているが，有機質肥料の施用が野菜の成分品質に及ぼす影響については未だに不明な点が多い．そこで，成分品質として好ましいアスコルビン酸，好ましくない硝酸，シュウ酸がそれぞれ高い含量で含まれるホウレンソウを供試して，化学肥料の減肥および被覆肥料を施用した場合と比較することによって，有機質肥料の施用がホウレンソウの生育および品質成分に及ぼす影響を検討する．

2-2 方法

2-2-1 耕種概要

島根県出雲市芦渡町の島根県農業試験場の灰色低地土・灰色系（鴨島統）圃場でホウレンソウ‘マジック’（*Spinacia oleracea* L. cv Magic）を栽培した．処理および施肥量は第1表に示した．施肥基準量（島根県農林水産部，1989）を①慣行区とし，基肥として窒素 140kg ha^{-1} ，リン酸 140kg ha^{-1} ，カリ 100kg ha^{-1} ，追肥として窒素 80kg ha^{-1} ，カリ 40kg ha^{-1} を硫酸，過石，硫加で施用した．同基準量を三要素とも10%削減した②10%減肥区，同様に20%削減した③20%減肥区，施肥基準量と同量の窒素を全量基肥として被覆リン硝安カリ（15-15-15，70日溶出型）で施用した④被覆肥料区，施肥基準量と同量の窒素の大半を大豆油かす（7.2-2.0-1.0）で施用し，リン酸の不足分を蒸製骨粉（3.5-20-0）で補填して施用した⑤大豆油かす区，同様になたね油かす（5.3-2.0-1.0）と蒸製骨粉で施用した⑥なたね油かす区の6処理区を設けた．被覆肥料区は窒素分量で慣行区にあわせたためにリン酸およびカリが増施されることになった．大豆油かす区およびなたね油かす区のリン酸施用量は追肥時の大豆油かすおよびなたね油かすに含

まれるリン酸量分，慣行区よりも多くなった．また，これらの区は有機質肥料だけで施用することを前提としたため，カリの施用量が少なくなったが特に調整は行わなかった．試験は1区 30 m²で，2反復とした．

基肥の施用は1994年3月19日に行い，同年4月25日（播種後30日）に追肥を行った．播種は3月26日に行い，1.2mのうね幅に2条播きとし，40株 m⁻²の栽植密度になるように4月26日までに間引きを行った．収穫は5月16日（播種後50日）に行った．

2-2-2 植物体の採取および調整

植物体を4月26日，5月6日，5月16日に採取した．採取した試料は直ちに105℃で1時間通風乾燥して酵素の失活処理を行い，60℃で通風乾燥させた後，ボールミルで粉碎し，品質成分の分析に供した．但し，アスコルビン酸の分析はこれらの処理を行わず，試料採取後4℃に保たれた冷蔵庫に保管し，その日のうちに分析に供した．

2-2-3 植物体の分析

全窒素の分析はガンニング変法（大山 1990）で行った．硝酸の抽出は粉末試料 0.5 g に純水 50 mL を加え，またシュウ酸の抽出は粉末試料 0.5 g に 1 N 塩酸 50 mL を加えてそれぞれ1時間振とうした後ろ過して行い，この抽出液を適宜希釈してイオンクロマトグラフィーでそれぞれの成分を測定した（渡邊ら 1994）．イオンクロマトグラフは DIONEX 社製 QIC Analyzer を用い，次のような条件で行った．カラム IonPac AS4A-SC，溶離液 3 mM Na₂CO₃/1 mM NaHCO₃，除去液 50 mM H₂SO₄．

アスコルビン酸の分析は生鮮試料 10 g に 10% メタリン酸 100 mL を加えて磨砕し，終濃度 5% となるように純水で希釈して 200 mL に定容した後ろ過し，ヒドラジン法で定量した（渡邊ら 1994）．

2-2-4 各処理区土壌のインキュベーション試験

各処理区の窒素の無機化や化学形態変化を把握するために3月26日，4月26日，5月6日に条間の土壌（深さ0～15cm）を採取し，土壌のイン

キュベーション試験を行った。採取した土壌試料を2 mm の篩に通した後、100mL 容のプラスチック容器に40 g 採取し、最大容水量の60%に水分を調節して容器の口をポリエチレンフィルムで被覆した。3月26日に採取した土壌は、播種から追肥までの同日数である30日間、4月26日および5月6日に採取した土壌はそれぞれ10日間、20℃に保たれた恒温器内で培養を行った後の無機態窒素、アミノ酸およびタンパク質の存在量を測定した。

2-2-5 土壌の分析

無機態窒素は生土10 g に2 Mの塩化カリウム溶液100 mLを加えて1時間振とうした後ろ過し、オートアナライザー（テクニコン）により硝酸態窒素およびアンモニア態窒素を定量した。

アミノ酸の分析は生土10 g に0.1M硫酸20 mLを加え、1時間振とうした後ろ過し、ニンヒドリン法で定量した（早野 1992）。標準にはロイシンを用い、ロイシンに換算したアミノ酸量を算出した。

タンパク質の分析は生土10 g にpH7の1/15 Mリン酸緩衝液20 mLを加え、1時間振とうした後ろ過し、ローリー法により定量した（石塚 1985）。標準には卵白アルブミンを用い、アルブミンに換算したタンパク質量を算出した。

2-3 結果

2-3-1 ホウレンソウの生育および窒素吸収量

4月26日（播種後30日）から収穫日の5月16日（播種後50日）までのホウレンソウの乾物重の推移を第1図に示した。播種後40日以降の乾物重は窒素施用量の低下にともなって減少したが、その差はわずかであった。収穫量は、慣行区に対して、10%減肥区が3.3%、20%減肥区が6.3%の減少に留まったが、有意差は認められなかった。一方、慣行区と同量の窒素を施用した被覆肥料区、大豆油かす区、およびなたね油かす区では、有意差は認められなかったものの、慣行区の生育を上回る傾向を示した。第2図に同時期の窒素吸収量の推移を示した。ホウレンソウの窒素吸収量は減肥によって低下し、播種後40日以降に慣行区との間に有意差が認められ、

収穫日までにこの差は更に広がった。20%減肥区は10%減肥区よりも低く推移したが、有意差は認められなかった。

被覆肥料区およびなたね油かす区はいずれの時期においても、有意差は認められないものの、慣行区以上の窒素吸収量を示す傾向にあった。大豆油かす区は、播種後40日以降、慣行区よりも低く推移したが、有意差は認められなかった。すなわち、被覆肥料区および有機質肥料を施用した2処理区においては、いずれの時期においても慣行区と同等の窒素を吸収していたものと考えられる。

2-3-2 各処理区の土壌中の窒素形態の推移

培養後の土壌の無機態窒素の現存量を第2表に示した。播種直後から追肥までの期間に相当する30日間培養した播種時の土壌の無機態窒素量は慣行区が最も高くなった。また、減肥によって無機態窒素量は低下し、その差は窒素施用量を反映しており、追肥直後および追肥10日後に採取した土壌の培養後の無機態窒素量もほぼ同様に推移した。被覆肥料区、大豆油かす区、およびなたね油かす区において、播種後に採取して30日間培養した土壌の無機態窒素量は20%減肥区よりも低く、窒素の無機化が遅いことが示された。大豆油かす区、およびなたね油かす区は、これ以降に採取した土壌においても他の区よりも培養後の無機態窒素量は低く推移した。一方、被覆肥料区では、追肥直後（播種40日）および追肥10日後に採取した土壌の10日間培養後の無機態窒素量は、慣行区よりも高くなる傾向を示した。

第3表に各処理区土壌の培養後のアミノ酸およびタンパク質含量の推移を示した。いずれの時期においても大豆油かす区およびなたね油かす区で高く、追肥直後に採取して10日間培養した土壌では慣行区の約3倍量が存在していた。化学肥料を施用した区においては、慣行区が最も高く、減肥によって低下する傾向が認められた。また、被覆肥料区が最も低くなった。追肥直後から追肥10日後にかけて採取した土壌のアミノ酸含量は低下したが、大豆油かす区およびなたね油かす区以外の処理区はこの期間に半減したのに対し、この2処理区は20%程度しか低下しなかった。土壌中の

タンパク質含量もアミノ酸とほぼ同様な傾向を示した。

第4表に追肥直後、追肥10日後に採取した土壌のそれぞれ10日間培養後における無機態窒素と易分解性有機態窒素(アミノ酸およびタンパク質)の合計量に占めるそれぞれの窒素形態の存在割合を示した。被覆肥料区は処理区の中で硝酸態窒素の占める割合が約84%と最も高く、アンモニア態窒素、アミノ態窒素、タンパク態窒素の割合はそれぞれ最も低かった。慣行区、10%減肥区および20%減肥区ではそれぞれの窒素の存在割合に違いはみられなかった。大豆油かす区およびなたね油かす区では化学肥料が施用された他の処理区に比べて硝酸態窒素の占める割合が低く、アンモニア態窒素、アミノ態窒素、タンパク態窒素の割合は他の区に比べて高くなった。

2-3-3 ホウレンソウのアスコルビン酸、シュウ酸、硝酸含量

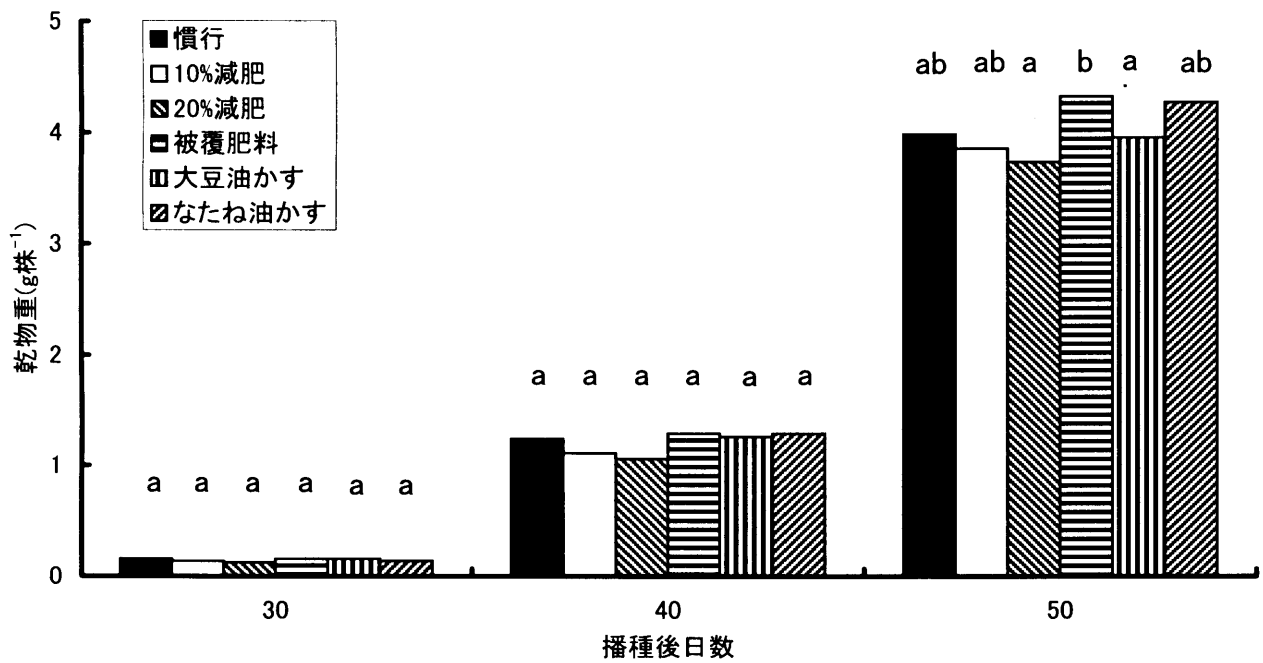
第5表に収穫時のアスコルビン酸含量とシュウ酸含量を示した。アスコルビン酸含量およびシュウ酸含量には処理間で明確な差が見られず、大豆油かすやなたね油かすのような有機質肥料の施用による品質改善効果は認められなかった。

第3図に硝酸含量の推移を示した。全処理区とも生育ステージが進むにつれて、硝酸含量は増加した。いずれの時期においても慣行区が最も高い値を示した。また、減肥によって硝酸含量は低下し、播種後40日以降に20%減肥区で慣行区との間に有意差が認められ、収穫時(播種後50日)には、慣行区に対して、10%減肥区が21%、20%減肥区が33%低下した。被覆肥料区は、いずれの時期においても慣行区よりも低い傾向にあったが、有意差は認められなかった。一方、有機質肥料を施用した2処理区では、播種後30日から顕著な差が見られた。すなわち、これらの2処理区の硝酸含量は慣行区の半分程度の値であり、有意差が認められた。播種後30日以降も他の処理区と比較して有意に低く推移し、収穫時の硝酸含量は、慣行区に対してなたね油かす区が45%、大豆油かす区が42%低下し、有機質肥料の施用による硝酸低減効果が認められた。

第1表 本試験における処理区及びその施肥量(kg ha⁻¹)

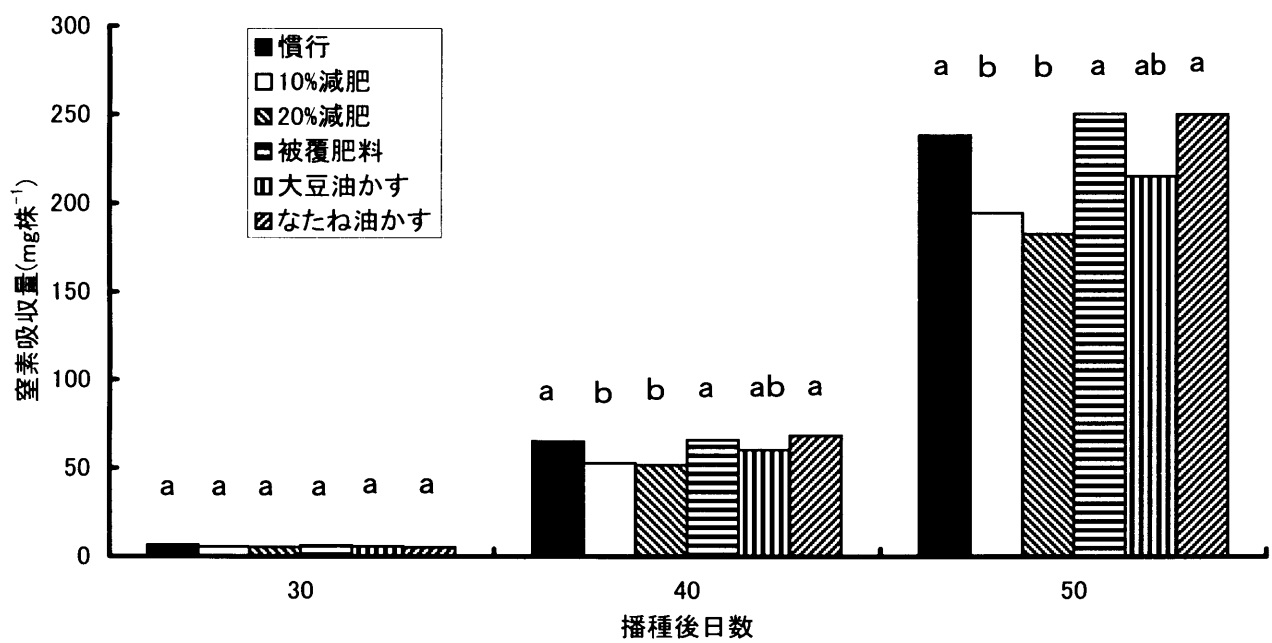
処 理 区	基肥			追肥			合計		
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
慣 行	140	140	100	80	0	40	220	140	140
10%減肥	126	126	90	72	0	36	198	126	126
20%減肥	112	112	80	64	0	32	176	112	112
被覆肥料*	220	220	220	0	0	0	220	220	220
大豆油かす	140	140	14	80	23	6	220	163	20
なたね油かす	140	140	19	80	30	8	220	170	27

* 被覆リン硝安カリ (15-15-15, 70日溶出型)



第1図 化学肥料の減肥, 被覆肥料および有機質肥料の施用がホウレンソウの乾物重に及ぼす影響

注) 同一グループの異なるアルファベット間に有意差 ($p < 0.05$) があることを示す (DUNCAN'S new multiple range test, $n=40$).



第2図 化学肥料の減肥、被覆肥料および有機質肥料の施用がホウレンソウの窒素吸収量に及ぼす影響

注) 同一グループの異なるアルファベット間に有意差($p < 0.05$)があることを示す(DUNKAN'S new multiple range test, $n=20$).

第2表 各処理区土壌の培養後の無機態窒素現存量(mgkg⁻¹ 乾土)

処 理 区	播種時の土壌 (30日間培養)			追肥直後の土壌 (10日間培養)			追肥10日後の土壌 (10日間培養)		
	硝酸態窒素	アンモニア態窒素	無機態窒素	硝酸態窒素	アンモニア態窒素	無機態窒素	硝酸態窒素	アンモニア態窒素	無機態窒素
慣 行	150.3 a*	32.2 a	182.5 a	203.1 a	53.7 a	256.8 a	177.4 a	27.8 a	205.5 a
	(82.4) **	(17.6)		(79.1)	(20.9)		(86.4)	(13.6)	
10% 減 肥	133.2 ab	20.7 b	153.8 b	172.7 b	30.5 b	203.2 b	146.6 b	25.9 a	172.6 ab
	(86.6)	(13.4)		(85.0)	(15.0)		(84.9)	(15.1)	
20% 減 肥	115.9 bc	24.2 b	140.1 b	154.4 b	32.6 b	187.0 b	138.9 b	29.5 a	168.5 b
	(82.7)	(17.3)		(82.6)	(17.4)		(82.5)	(17.5)	
被 覆 肥 料	105.3 c	14.3 c	119.6 c	236.9 a	29.7 b	266.6 a	201.8 a	25.0 a	226.8 a
	(88.0)	(12.0)		(88.9)	(11.1)		(89.0)	(11.0)	
大豆油かす	78.6 d	24.1 b	102.7 c	85.0 c	48.4 ab	133.4 c	115.2 c	38.4 b	153.6 b
	(76.5)	(23.5)		(63.7)	(36.3)		(75.0)	(25.0)	
なたね油かす	86.0 d	35.6 a	121.6 c	90.4 c	60.4 c	150.8 c	117.7 c	48.2 b	165.9 b
	(70.7)	(29.3)		(59.9)	(40.1)		(70.9)	(29.1)	

* 同列の異なるアルファベット間には有意差(p<0.05)があることを示す (DUNCAN'S new multiple range test, n=3)

** カッコ内の数字は無機態窒素に占めるそれぞれの窒素形態の割合 (%) を示す。

第3表 各処理区土壌の培養後のアミノ酸およびタンパク質の現存量の推移
(mgkg⁻¹ 乾土)

処 理 区	追肥直後の土壌 (10日間培養)		追肥10日後の土壌 (10日間培養)	
	アミノ酸	タンパク質	アミノ酸	タンパク質
慣 行	13.0 a*	184.4 a	6.6 a	158.2 a
10% 減 肥	10.7 ab	174.5 a	5.6 a	122.8 a
20% 減 肥	9.8 ab	175.7 a	5.9 a	148.8 a
被 覆 肥 料	9.2 b	122.5 b	5.4 a	104.6 b
大豆油かす	21.5 c	265.0 c	16.8 c	218.4 c
なたね油かす	19.8 c	292.2 c	17.0 c	238.6 c

* 同列の異なるアルファベット間には有意差 (p<0.05) があることを示す.

(DUNCAN'S new multiple range test n=3)

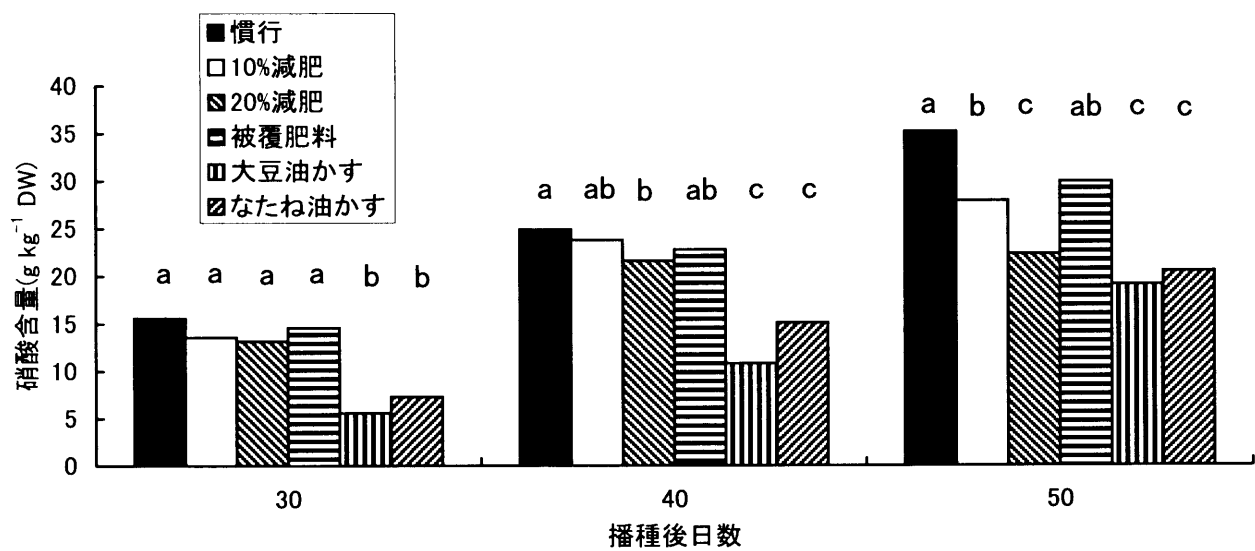
第4表 培養後の土壤窒素の形態別存在割合(%)

処 理 区	追肥直後の土壤 (10日間培養)				追肥10日後の土壤 (10日間培養)			
	硝酸態窒素	アモニア態窒素	アミノ酸態窒素	タンパク態窒素	硝酸態窒素	アモニア態窒素	アミノ酸態窒素	タンパク態窒素
慣 行	71.9	19.0	0.6	8.5	78.3	12.3	0.4	9.0
10%減肥	76.0	13.4	0.6	10.0	77.5	13.7	0.4	8.4
20%減肥	73.1	15.4	0.6	10.9	73.7	15.6	0.4	10.3
被覆肥料	83.5	10.5	0.4	5.6	83.7	10.4	0.3	5.6
大豆油かす	49.8	28.4	1.6	20.2	62.5	20.8	1.2	15.5
なたね油かす	47.2	31.6	1.3	19.9	59.1	24.2	1.1	15.6

第5表 収穫時のアスコルビン酸およびシュウ酸含量

処 理 区	総アスコルビン酸 (mg kg ⁻¹ FW)	総シュウ酸 (g kg ⁻¹ DW)
慣 行	722 ± 60	103 ± 11
10 % 減 肥	—	105 ± 7
20 % 減 肥	—	102 ± 9
被 覆 肥 料	736 ± 39	106 ± 10
大豆油かす	734 ± 13	99 ± 9
なたね油かす	751 ± 74	99 ± 11

平均値 ± S D, n=10



第3図 化学肥料の減肥、被覆肥料および有機質肥料の施用がホウレンソウの硝酸含量に及ぼす影響

注) 同一グループの異なるアルファベット間に有意差($p < 0.05$)があることを示す(DUNKAN'S new multiple range test, $n=20$).

2-4 考察

化学肥料の減肥によって第2図に示したように窒素吸収量は減少したが、乾物重の減少程度は小さく、20%減肥区においても慣行区に対して6.3%の減少に留まった。この際、ホウレンソウ中の硝酸含量は有意に低下し、成分品質が向上した。伊達ら(1980)は野菜の正常な生育を確保するには一定濃度以上の硝酸を確保する必要があることを指摘しているが、目黒ら(1991)は、ホウレンソウの収量と硝酸含量の相関から、新鮮物中3000 mg kg⁻¹ FW以上の硝酸が含まれる場合は、収量は頭打ちになることを認めている。本試験における収穫時の硝酸含量は慣行区が35.2 g kg⁻¹ DW、10%減肥区が27.9 g kg⁻¹ DW、20%減肥区が22.3 g kg⁻¹ DWであったことから、水分率を90%と仮定すれば、それぞれ、3520 mg kg⁻¹、2790 mg kg⁻¹、2230 mg kg⁻¹となる。本試験において、慣行区に対する10%減肥区および20%減肥区の乾物重の減少率はそれぞれ3.3%、6.3%とわずかであり、有意差も認められなかった。これらの結果は3000 mg kg⁻¹を境に収量が頭打ちになるとする目黒らと同様な結果が得られたものと考えられる。

硝酸同様、健康に好ましくないとされるシュウ酸の含量は、処理間に差が見られず、減肥による低減効果は認められなかった。吉川ら(1988)は馬ふん堆肥、牛ふん堆肥の施用(60 t ha⁻¹)によりホウレンソウ中のシュウ酸が化学肥料のみを施用された場合よりも20%程度低減されたことを報告している。また、建部ら(1996)は被覆リン安を条施用してホウレンソウを栽培することにより47~72%のシュウ酸含量の低下を認めた。これは収穫期においても土壌深0~15cmの位置にアンモニア態窒素が乾土当たり161 mg kg⁻¹存在しており、この一部がホウレンソウに吸収されたためではないかと考察している。本試験において、有機質肥料施用区である大豆油かす区およびなたね油かす区では、他の処理区に比べて土壌のアンモニア態窒素の比率が高く推移していたにもかかわらず、シュウ酸含量の低下は認められなかった。この点に関しては今後更に検討する必要があると思われた。

大豆油かす区およびなたね油かす区では、慣行区に比べてホウレンソウ中の硝酸含量が低減した。減肥によっても硝酸含量は低減したが、これは

土壤中の硝酸態窒素の存在量および窒素吸収量の低下に起因するものと考えられた。すなわち，慣行区，10%減肥区，20%減肥区では土壤中の窒素の形態別存在割合に差がみられないので，減肥による土壤中の硝酸態窒素の低下によってハウレンソウ中の硝酸含量も低下したと考えられる。一方，有機質肥料を施用した土壤では窒素の無機化および硝酸化成の遅れによって，他の処理区に比べて土壤中の硝酸態窒素の存在量は低く，アンモニア態窒素，アミノ酸態窒素およびタンパク態窒素の割合が高くなり，硝酸態窒素の割合は低くなった。特に4月25日の追肥直後（播種後30日）に採取して培養した土壤では，無機態窒素に対するアンモニア態窒素の比率は，大豆油かす区が36.3%，なたね油かす区が40.1%と非常に高くなった。前述したように建部らは被覆肥料を条施用することによってアンモニア態窒素が相対的に多く吸収され，ハウレンソウ中の硝酸含量が低下することを報告している。この結果と同様に，本試験における有機質肥料区でのハウレンソウの硝酸含量の低下の一因は，土壤中の硝酸態窒素量が少ないこと，および無機態窒素に占めるアンモニア態窒素の比率が他の区と比較して高いので，相対的に硝酸態窒素の吸収割合が低下したことによるものと考えられる。

一方，有機質肥料を施用した区の窒素吸収量は土壤中の無機態窒素量が低く推移したにもかかわらず，慣行区とほぼ同等であった（第2図）。一般に，有機質肥料の施用効果として，その緩効的な肥効が上げられる。これは，化学肥料に比べて無機化が遅いため，降雨等による溶脱を受けにくく，利用率が高まるというものである。この点を比較するために被覆肥料を施用した処理区を設定した。被覆肥料施用区では，窒素吸収量は慣行区と同等であったが，ハウレンソウ中の硝酸含量は低下せず，処理区の中では最も高い値を示した。土壤中の無機態窒素は，生育初期には慣行区よりも低くなったが，生育後期にはこれを上回る値を示し，特に本試験の処理区の中では硝酸態窒素の割合が最も高くなった。これは，被覆肥料から溶出された窒素が速やかに硝化されたためであり，被覆肥料区においても吸収窒素の主体は硝酸態窒素であったと思われた。このため，ハウレンソウ中の硝酸含量は低下しなかったと考えられる。すなわち，有機質肥料区におい

て、ハウレンソウ中の硝酸含量が低下したにも関わらず、慣行区と同等の窒素吸収量を示したことは、その緩効的な肥効以外の要因を考えざるを得ない。すなわち、有機質肥料区において、栽培期間を通じて常に化学肥料区よりも高い値を示したアミノ酸態窒素およびタンパク態窒素を窒素源として利用していた可能性を検討する必要がある。

2-5 要約

島根県の標準施肥量を施用した慣行区、その10%減肥区、20%減肥区、同施肥基準量を被覆肥料で施用した被覆肥料区、同様に有機質肥料として大豆油かす区、およびなたね油かす区の6処理区を設定してハウレンソウを露地栽培し、生育、品質成分および土壌に及ぼす影響を検討した。

減肥することによってハウレンソウの窒素吸収量が減少した結果、体内硝酸含量が低下し、成分品質が向上した。ただし、アスコルビン酸およびシュウ酸の含量は処理間に差が見られず、減肥や有機質肥料の施用による制御はできなかった。

有機質肥料を施用した場合、慣行区に比べて土壌の無機態窒素量は低く推移したが、土壌のアミノ酸含量およびタンパク質含量は収穫時まで常に高い値を示した。

有機質肥料区のハウレンソウの体内硝酸含量は慣行区に比べて45%程度低減された。この一因として、土壌中での、窒素の無機化、硝化の遅れによって硝酸態窒素の吸収が抑制された結果であると考えられた。しかしながら、窒素吸収量は慣行区とほぼ同等であったことから、有機質肥料区に豊富に存在したアミノ酸態窒素およびタンパク態窒素が吸収利用された可能性を認めた（松本ら、1999）。

第3章 有機物施用条件下での窒素吸収量の作物間差異

3-1 目的

第2章において、ハウレンソウに有機質肥料を施用して栽培した場合、土壌中の無機態窒素含量が栽培期間中を通して化学肥料施用区よりも低く推移していたにもかかわらず、同等以上の窒素を吸収し、さらに体内硝酸含量が低いことを認めた。一方、農林省による環境保全型栽培基準設定調査事業において、各県で有機物を施用した栽培実験が取り組まれる中で、これと同様な事例が報告されている場合がある。すなわち、バレイショ、ビート、ニンジン、トウモロコシ、ハウレンソウ、モモにおいて、稲わら堆肥やパーク堆肥を施用したときの窒素吸収量が、栽培期間中に土壌から生成される無機態窒素量を上回る場合があることが示されている（農林水産省農産園芸局 1999）。これらの事例から、有機物を施用した場合の作物の窒素吸収反応にはその作物の種類により差異があるのではないかと推察される。そこで、有機物を施用した土壌で9種類の野菜をポット栽培し、土壌中の窒素の存在形態およびその窒素吸収反応の差異を比較検討した。

3-2 方法

3-2-1 実験1：C/N比の高い(19)有機物を施用した場合のポット栽培実験

パーミキュライトと農業環境技術研究所内ほ場の黒ボク土(41.7g C kg⁻¹, 3.4g N kg⁻¹)を体積比 4:1 の割合で混合したものを供試土壌とした。これは、土壌由来の窒素の量を極力少なくするためである。この土壌に稲わらと米ぬかの4:1(重量比)混合物(RBS, 25.0 g N kg⁻¹, C/N比: 18.9)を100 mg N kg⁻¹ soil 施用した土壌をRBS区とした。RBS無施用の土壌を対照区とした。両土壌ともに過リン酸石灰(150mg P kg⁻¹)と硫酸カリ(100 mg K kg⁻¹)を施用し、最大容水量の60%となるように水分を調整して室温で2週間培養した。

ピーマン(*Capsicum annum* L. cv. 京みどり), ダイコン(*Raphanus sativus* L. cv. 耐病総太り), ブロッコリー(*Brassica oleracea* L. var. *italica* L.

cv. 緑帝), キャベツ (*Brassica oleracea* var. *capitata* L. cv. YR-泰山), チンゲンサイ (*Brassica campestris* L. cv. 長陽 2 号), ホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L. cv. マジック), カブ (*Brassica napiformis* Bailey cv. 耐病ひかり), リーフレタス (*Lactuca sativa* L. cv. レッドファイアー), ニンジン (*Daucus carota* L. cv. あすべに 5 寸) の種子をパーライト上で発芽させ, 1997 年 7 月 26 日に上記培養土壌を詰めた 500mL ポットに移植し, ガラスハウスで栽培した. 栽培期間中の土壌の窒素動態を把握するために無作付けのポットも用意し, 作付けされたポットと同様に管理を行った. 植物体を移植後 14 および 28 日に, 無作付けポットの土壌を移植後 1, 7, 14, 21, 28 日にそれぞれ採取した.

採取した植物体の試料は 3 日間 70°C で通風乾燥して乾物重を測定した後, ボールミルで粉碎し, 分析に供した. 全窒素を NC アナライザー (Model NC-80, Sumitomo Chemicals Co. Ltd., Japan) で測定した. 植物対中の硝酸は水で抽出し, 適宜希釈してイオンクロマトグラフィー (QIC Analyzer, Dionex Co. Ltd.) によって測定した. 土壌の無機態窒素 (硝酸態窒素, アンモニア態窒素) は 2 M KCL で抽出し, 抽出液の濃度をオートアナライザー (Auto Analyzer, Technicon Instruments Corp., New York, USA) により比色定量した. 土壌のアミノ酸は 0.2M 硫酸で抽出し, 抽出液中の濃度を L-leucine を標準物質としてニンヒドリン法で測定した (Smith and Stockel 1954). 土壌のタンパク質は 1/15M 中性リン酸緩衝液で抽出し, 抽出液中の濃度を卵白アルブミンを標準物質としてローリー法 (Stotzky 1964, Rej 1974) で測定した.

3-2-2 実験 2 : C/N 比の低い (7-10) 有機物施用を施用した場合のポット栽培実験

実験 1 と同様な土壌を供試した. 有機物としてなたね油かす (RC, 50.0 g N kg⁻¹, C/N 比:7.0), 乾燥牛ふん (DCF, 15.6 g N kg⁻¹, C/N 比:10.0) をそれぞれ 100 mg N kg⁻¹ 供試土壌に施用した区をそれぞれ RC 区および DCF 区とした. また, 無機態窒素として硫安を 100 mg N kg⁻¹ 施用した区を AS 区とし, 有機, 無機態窒素の施用を行わなかった土壌を対照区とした. リン

酸およびカリの施用および 14 日間の培養を実験 1 と同様に行った。

パーライト上で発芽させた 2 週間経過したピーマン、リーフレタス、ニンジン、チンゲンサイ、ハウレンソウの実生を 1997 年 8 月 11 日に培養土壌を充填した 500mL ポットに移植し、ガラス室内で栽培した。作物体および土壌の採取は実験 1 と同様に行った。

3-3 結果

3-3-1 実験 1 : C/N 比の高い(19)有機物施用に対する作物の窒素吸収反応

栽培期間中の対照区の無機態窒素含量は $35.0-44.5\text{mgkg}^{-1}$ であったのに対し、RBS 区の無機態窒素含量は移植後 1-14 日までは対照区よりもおよそ 37.5% 低く推移し、移植 28 日になってほぼ同じ水準となった(第 4 図)。これは、RBS の C/N 比が 19 と高く、有機化により本来土壌中に存在していた無機態窒素の取り込みが起こったためと考えられる。移植後 1-17 日までの RBS 区の硝酸態窒素含量 ($0.3 - 4.3 \text{ mg kg}^{-1}$) は対照区 ($20.2 - 25.1 \text{ mg kg}^{-1}$) よりも極めて低く、移植 28 日までに徐々に増加したが、対照区を上回ることはなかった。アンモニア態窒素の含量は栽培期間中に両処理区ともほぼ同じ水準で経過した。

RBS 区のアミノ酸含量は対照区よりも高く推移したが、徐々に減少し、対照区のレベルに近づいていった。RBS 区のタンパク質含量は栽培期間中を通じてほぼ一定の値を示し、対照区の 3 倍であった(第 5 図)。

移植 14 および 28 日におけるピーマンとリーフレタスの窒素吸収量はいずれも RBS よりも対照区の方が高くなった(第 6 図)。これらの結果は、土壌の硝酸態窒素含量の値を反映していた。ニンジン、チンゲンサイおよびハウレンソウの窒素吸収量はピーマンとリーフレタスとは対照的に、土壌の無機態窒素含量が低いにも関わらず対照区よりも RBS 区の方が高くなった。

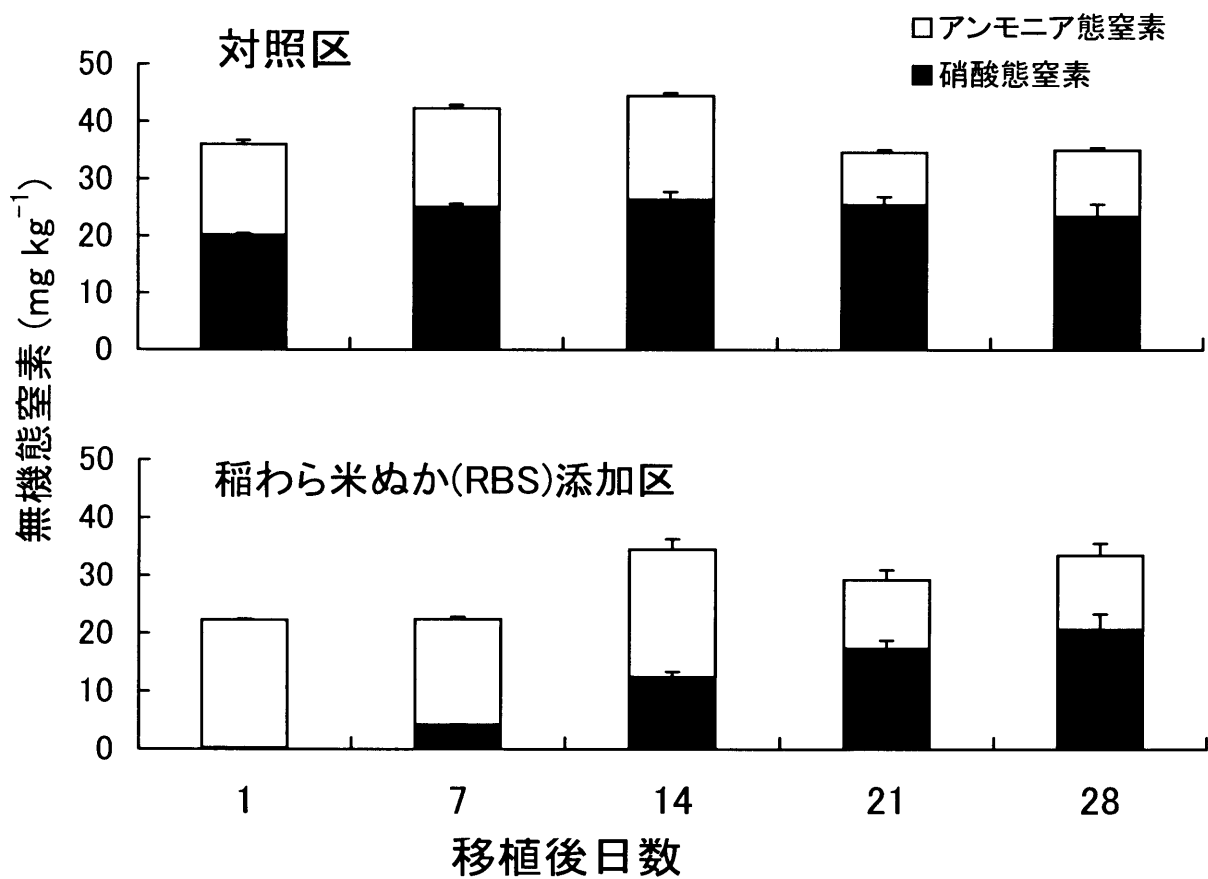
3-3-2 実験 2 : C/N 比の低い(7-10)有機物施用に対する作物の窒素吸収反応

栽培期間中の土壌の無機態窒素含量は対照区(無窒素)が $28\sim 50\text{mgkg}^{-1}$, AS 区が $90\sim 133\text{mgkg}^{-1}$ であった(第7図). RC 区の無機態窒素および硝酸態窒素含量は徐々に増加していったが, AS 区のレベルには至らなかった. DCF 区では, 硝酸態窒素含量の増加に伴って無機態窒素含量も徐々に増加していったが, 常に対照区よりも低かった.

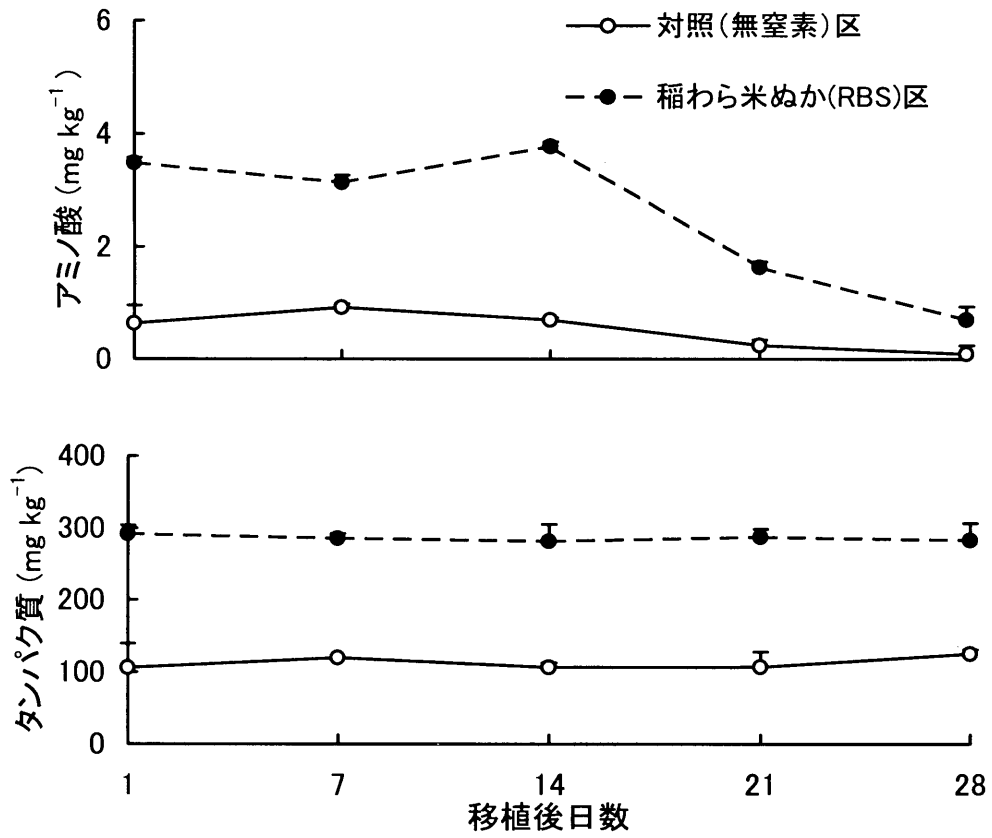
RC 区および DCF 区のアミノ酸態窒素(第8図)およびタンパク態窒素(第9図)含量は AS 区および対照区よりも高い水準であった.

各処理区における作物の窒素吸収反応は作物の種類により異なっていた(第10図). ピーマンとリーフレタスにおける移植 14 および 28 日後の窒素吸収量は AS 区が最も高く, 次いで RC 区, 対照区, DCF 区となり, この順位は 4 処理区間の土壌の無機態窒素含量を反映したものであった. これに対し, 移植 28 日後におけるニンジン, チンゲンサイおよびホウレンソウの窒素吸収量は, AS 区に比べて土壌中の無機態窒素が低かった RC 区の方が AS 区よりもそれぞれ 34.3, 46.3, 25.9% 高くなった. 同様に, これらの作物の窒素吸収量は, 対照区に比べて土壌中の無機態窒素含量が低かった DCF 区の方が対照区よりも高くなった.

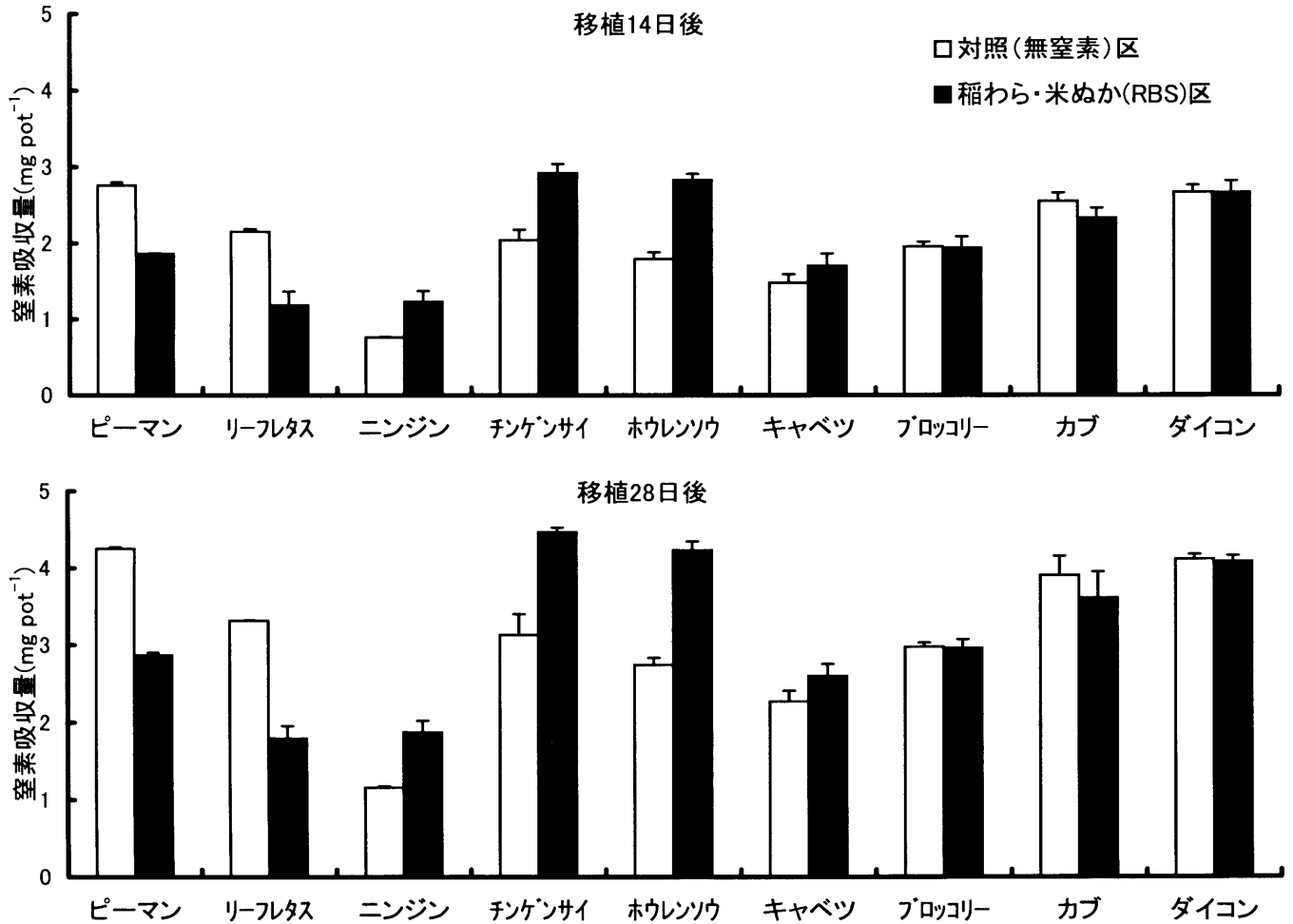
AS 区と RC 区における供試した 5 作物の全窒素含量および硝酸態窒素含量を第6表に示した. ピーマンとリーフレタスの窒素含量および硝酸態窒素含量は AS 区よりも RC 区がそれぞれ低くなった. 全窒素に対する硝酸態窒素の比率は AS 区(ピーマン: 11.5%, リーフレタス: 12.2%)と RC 区(ピーマン: 10.0%, リーフレタス: 14.3%)の間に違いは認められなかった. これに対し, ニンジン, チンゲンサイおよびホウレンソウでは全窒素含量は処理間に差は認められなかったが, 硝酸態窒素含量は AS 区よりも RC 区の方が有意に低くなった. そのため, 全窒素に対する硝酸態窒素の比率も RC 区(ニンジン: 7.1%, チンゲンサイ: 8.5%, ホウレンソウ: 9.9%)が AS 区(ニンジン: 13.1%, チンゲンサイ: 14.6%, ホウレンソウ: 14.2%)よりも有意に低くなった.



第4図 栽培期間中の無作付け土壌の無機態窒素含量の推移(実験1)
Vertical bars indicate standard error of mean(n=3).

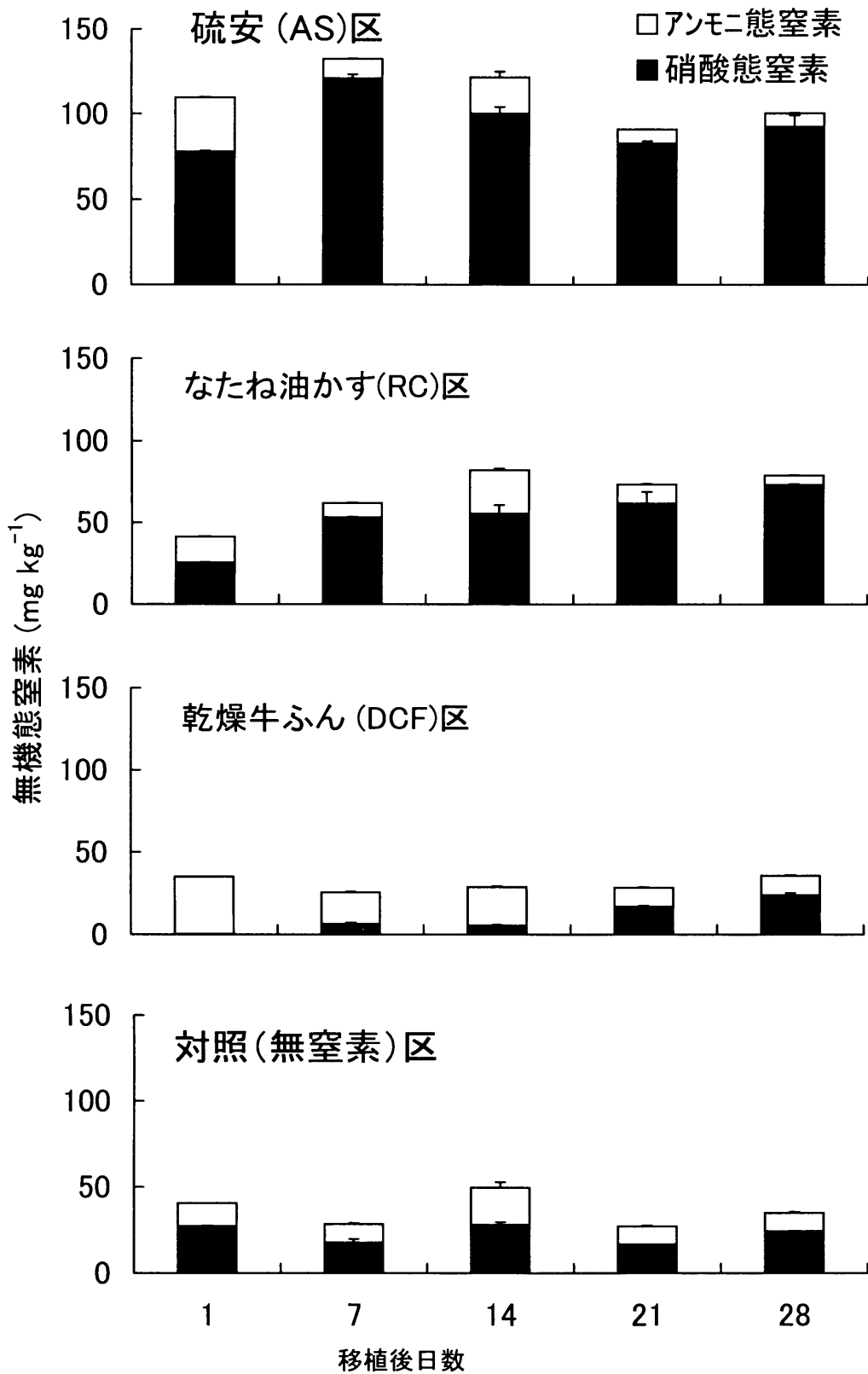


第5図 栽培期間中の無作付け土壌のアミノ酸およびタンパク質含量の推移(実験1)
Vertical bars indicate standard error of mean(n=3).

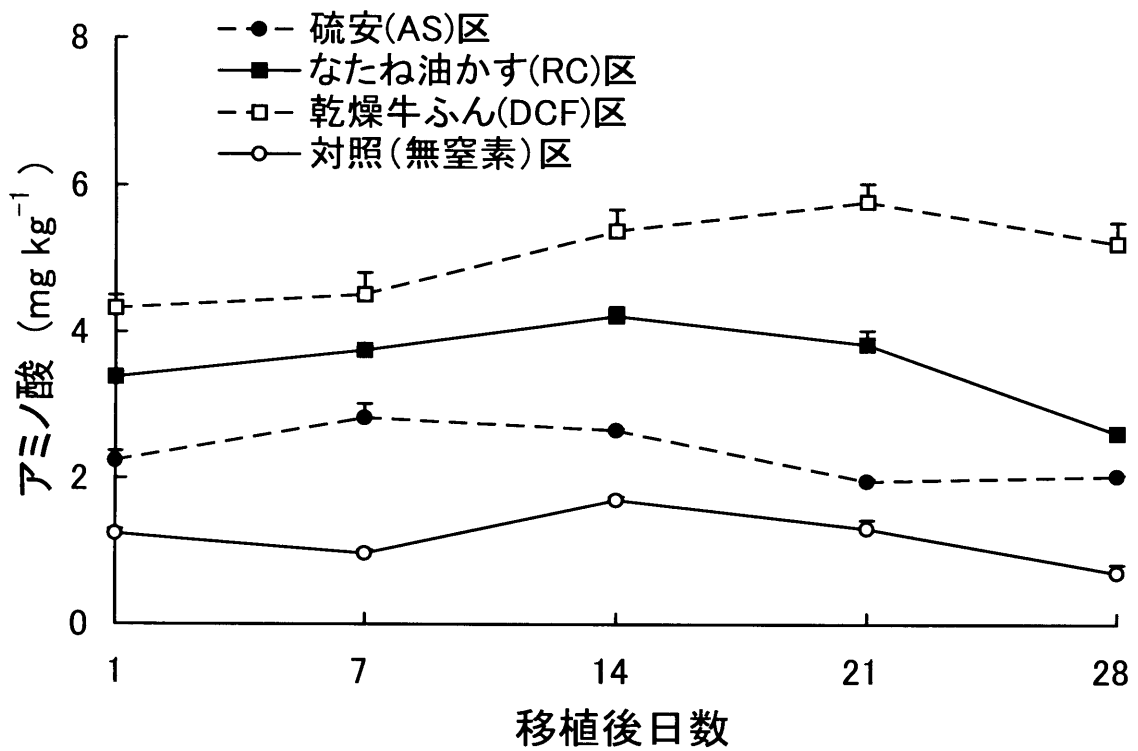


第6図 移植14および28日後の作物の窒素吸収量(実験1)

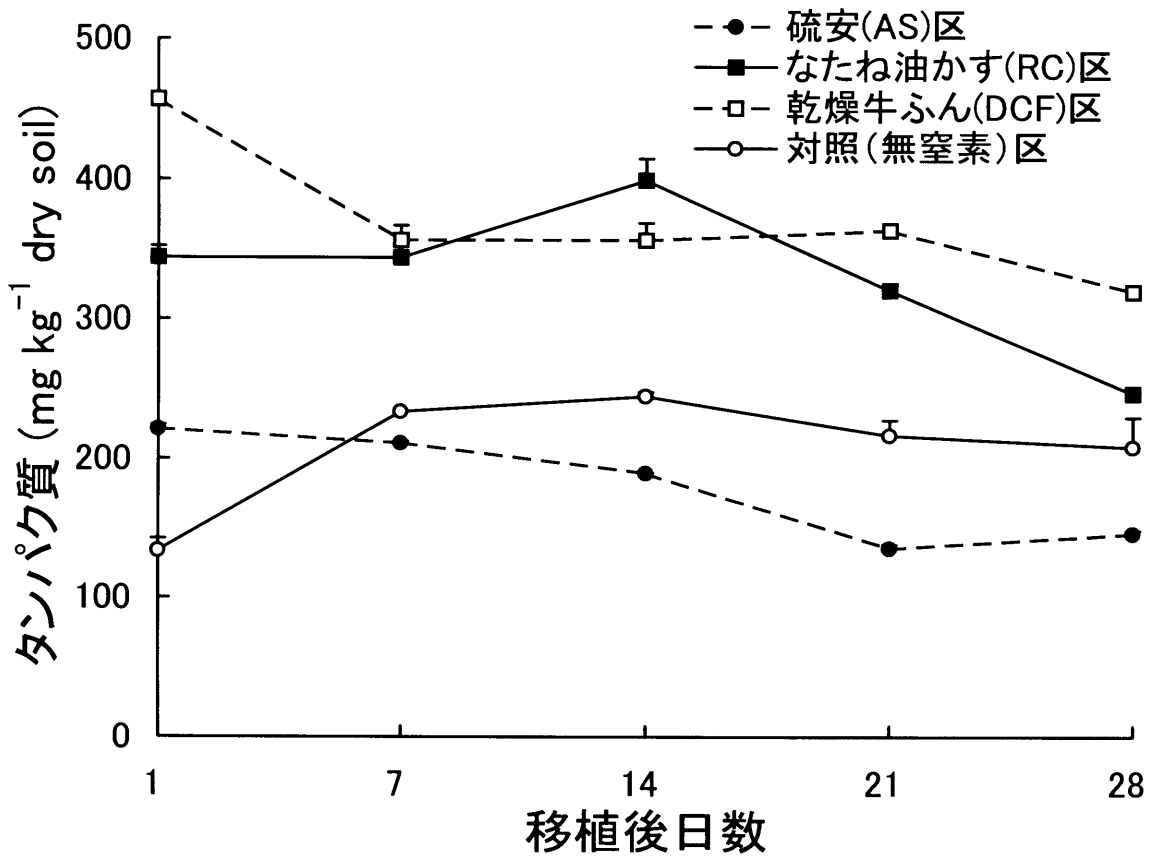
Vertical bars indicate standard error of mean(n=3).



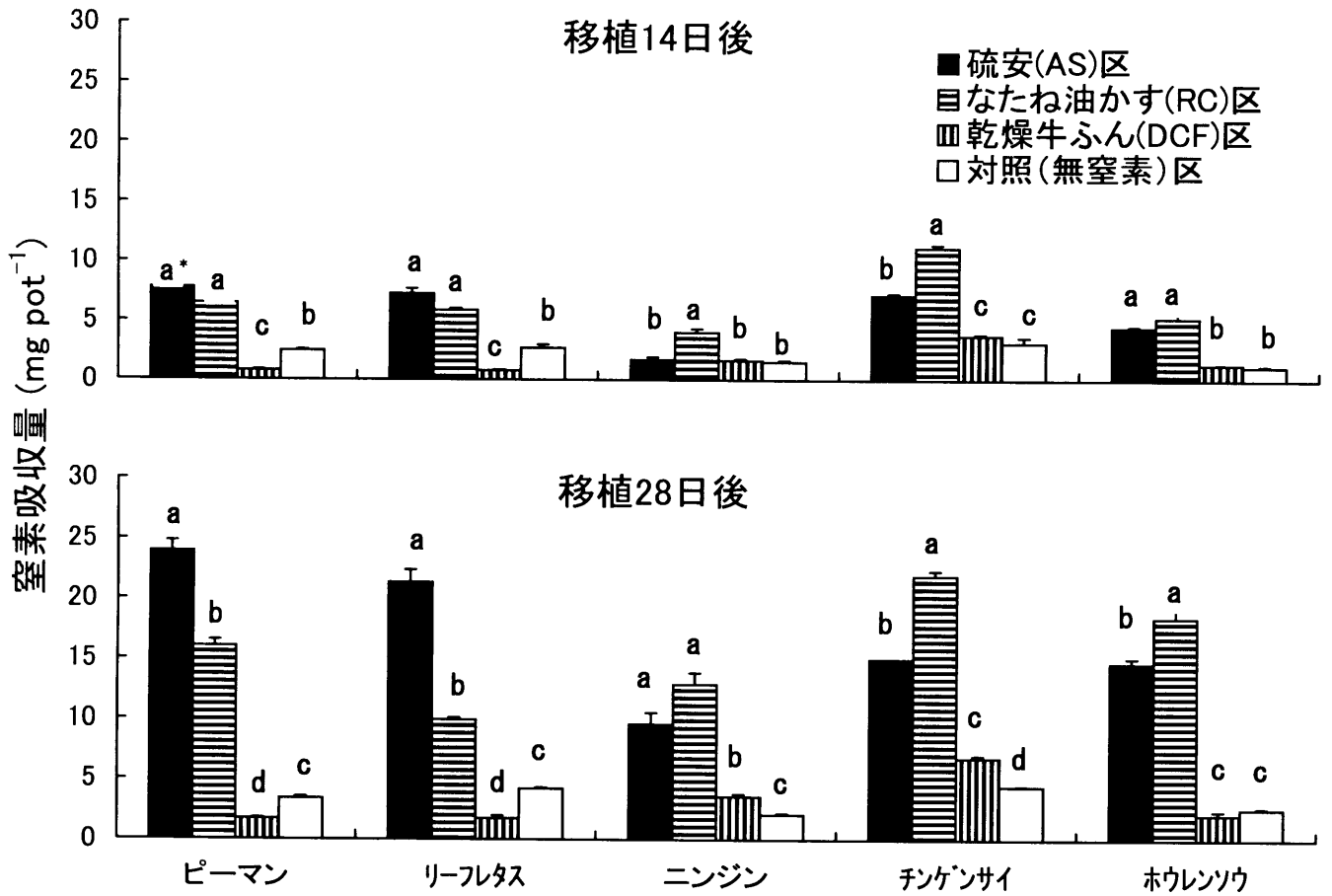
第7図 栽培期間中の無作付け土壌の無機態窒素含量の推移(実験2)
Vertical bars indicate standard error of mean(n=3).



第8図 栽培期間中の無作付け土壌のアミノ酸含量の推移(実験2)
Vertical bars indicate standard error of mean(n=3).



第9図 栽培期間中の無作付け土壌のタンパク質含量の推移(実験2)
Vertical bars indicate standard error of mean(n=3).



第10図 移植14および28日後におけるピーマン, リーフレタス, ニンジン, チンゲンサイおよびホウレンソウの窒素吸収量(実験2)

* 同一作物の異なるアルファベット間に有意差があることを示す(Duncan's new multiple range test, $P < 0.05$, $n=3$).

第6表 移植28日後における作物中の全窒素および硝酸態窒素含有率に及ぼす有機物施用の影響(実験2)

作物	窒素形態	処理区	
		硫安(AS)	なたね油かす(RC)
ピーマン	全窒素 (mg kg ⁻¹ D.W.)	26.1 a *	21.0 b
	硝酸態窒素 (mg kg ⁻¹ D.W.)	3.0 a	2.1 b
	硝酸態窒素/全窒素 (%)	11.5 a	10.0 a
リーフレタス	全窒素 (mg kg ⁻¹ D.W.)	34.4 a	23.0 b
	硝酸態窒素 (mg kg ⁻¹ D.W.)	4.2 a	3.3 b
	硝酸態窒素/全窒素 (%)	12.2 a	14.3 a
ニンジン	全窒素 (mg kg ⁻¹ D.W.)	34.4 a	32.3 a
	硝酸態窒素 (mg kg ⁻¹ D.W.)	4.5 a	2.3 b
	硝酸態窒素/全窒素 (%)	13.1 a	7.1 b
チンゲンサイ	全窒素 (mg kg ⁻¹ D.W.)	21.3 a	21.3 a
	硝酸態窒素 (mg kg ⁻¹ D.W.)	3.1 a	1.8 b
	硝酸態窒素/全窒素 (%)	14.6 a	8.5 b
ハウレンソウ	全窒素 (mg kg ⁻¹ D.W.)	34.5 a	32.3 a
	硝酸態窒素 (mg kg ⁻¹ D.W.)	4.9 a	3.2 b
	硝酸態窒素/全窒素 (%)	14.2 a	9.9 b

* 同一行の異なるアルファベット間に有意差があることを示す (Duncan's new multiple range test, P<0.05, n=3)

3-4 考察

実験1においてピーマンとリーフレタスも窒素吸収量はRBS区よりも対照区（無窒素）の方が高くなった。しかし，ニンジン，チンゲンサイおよびホウレンソウの窒素吸収量は逆に対照区よりもRBS区の方が高く，作物の種類によって有機物に対する窒素吸収反応に差異が認められる結果となった。これらの相反する窒素吸収反応を示した5種類の作物について，RBSよりもC/N比の低いRCおよびDCFを施用して実験を行った。DCF区の土壌の無機態窒素含量（25.5 - 35.8 mg kg⁻¹）はRC区（41.3 - 82.8 mg kg⁻¹）よりもかなり低く，5種類の作物の生育もRC区やAS区よりも大きく劣った。そのため，有機態窒素に対する窒素吸収反応の違いを解析するに当たってはAS区とRC区および対照区とDCF区との間でそれぞれ行われることが適当であると考えられた。この視点に立てば，ニンジン，チンゲンサイおよびホウレンソウはピーマンとリーフレタスよりも，有機物を施用した土壌においてより多くの窒素を吸収したと考えられる。

有機態窒素に対する作物間の窒素吸収反応の違いおよびニンジン，チンゲンサイおよびホウレンソウが有機物施用区でより多くの窒素を吸収したことについてその要因として，

- 1) 土壌の無機態窒素における硝酸態窒素とアンモニア態窒素の比率
- 2) 有機物施用に伴う土壌物理性の改善
- 3) 生長促進物質
- 4) 植物体中の硝酸含有率
- 5) ニンジン，チンゲンサイ，ホウレンソウによる有機態窒素の利用

が考えられる。それぞれについて，以下に検討する。

1) 土壌中の無機態窒素における硝酸態窒素とアンモニア態窒素の比率

溶液栽培において培養液の硝酸態窒素とアンモニア態窒素の比率が作物の窒素吸収に影響を及ぼすことが報告されている(Ikeda et al. 1983)。例えば，レタス，キュウリ，ニンジンはアンモニア態窒素の比率が高くなるにつれて良好な生育を示すが，ハクサイ，ホウレンソウ，ダイコンは硝酸態窒素の比率が高い方が生育が良かったことが報告されている(Moritsugu et al. 1995)。しかしながら，これらの報告は本試験の結果と必ずしも一

致しているとはいえない。すなわち、実験 1 において、対照区よりもアンモニア態窒素の比率が高かった RBS 区において、レタスの生育は劣ったがハウレンソウの生育は RBS 区の方が良好であった。また、アンモニア態窒素の比率がほぼ同等であった RC 区と AS 区において、レタスは AS 区で良好な生育を示したのに対し、ハウレンソウは RC 区の方が AS 区よりも良好な生育を示した。それゆえ、土壌中でのアンモニア態窒素と硝酸態窒素の比率の差異によって本試験の結果を十分には説明できないと考えられる。

2) 有機物施用に伴う土壌物理性の改善

土壌に有機物を施用する事によって土壌の物理性が改善され、その結果根の発達が進められ、窒素を含む無機栄養の吸収が促進されることが知られている。しかしながら本試験はこれらの影響を排除するために栽培土壌の 80% にバーミキュライトを使用した。さらに、ポット条件試験であるために作物の根域は制限されている。そのため、有機物の施用による根の発達によるその機能と量が作物の窒素吸収反応に及ぼした影響は必ずしも大きくないと考えられる。

3) 生長促進物質

有機物には植物の窒素吸収を増加させる促進物質が含まれていることが知られている (Orzolec 1983; Ozawa et al. 1981)。しかしながら、本試験で使用された有機物にそのような物質が含まれていることはこれまでに報告されておらず、本試験に使用した作物がそのような物質に反応を示すことについても十分に解明されていない。また、植物ホルモンなどの物質は、基本的に植物の質的な転換を促すことを特徴としているため、これを窒素吸収量の増加といった量的な促進について議論することは疑問である。

4) 植物体中の硝酸含有率

AS 区と RC 区におけるピーマンとリーフレタスの植物体中の全窒素に対する硝酸態窒素の比率には差がみられなかったことから、これらの作物の窒素吸収反応は土壌の硝酸態窒素含量に対応したものであるといえる。こ

れに対し、ニンジン、チンゲンサイおよびホウレンソウの全窒素に対する硝酸態窒素の含有率はAS区よりもRCの方が有意に低くなった。これらの結果は窒素吸収反応が必ずしも土壌中の硝酸態窒素含量を反映するわけではないことを示唆している。これと同様に、アンモニア態窒素についても、生育期間中を通じてRC区の土壌中のアンモニア態窒素含量はAS区と同程度もしくはそれ以下の水準にあった。このため、有機物を施用したときの作物の窒素吸収量は土壌中の無機態窒素含量を必ずしも反映しないことが示唆される。そのため、AS区や対照区よりもRC区の方に多量存在した有機態窒素が植物の窒素吸収に及ぼす影響を考慮する必要がある。

5) ニンジン、チンゲンサイおよびホウレンソウによる有機態窒素の利用

ニンジン、チンゲンサイおよびホウレンソウが有機物施用土壌においてピーマンやリーフレタスよりも高い窒素吸収反応を示した原因については次の2つの仮説が考えられる。まず、これらの3作物がピーマンやリーフレタスに比べて根圏土壌における有機物分解活性が高く、その無機化が促進された結果という考え方である。作物根圏土壌においては、菌密度が非根圏土壌よりもはるかに高く、それに伴い有機物の分解活性も非根圏土壌よりも高いとされている。作物根が微生物の増殖を促進するような物質を分泌するならば、結果的に土壌中の有機物の分解が促進される(根圏効果, Clarholm 1985, Hart et al. 1979, Moister 1987)。この活性に違いがあれば窒素吸収量にも作物間差が現れるものと考えられる。しかし、栽培作物の根圏土壌における酵素活性について、早野(1983)、Hayano(1986)および Hayano et al.(1995)は phosphatase, phosphomonoesterase, phosphodiesterase and β -glucosidase については作物間に差が認められたが、プロテアーゼの活性は根圏、非根圏ともに作物間にその差は認められなかったと報告している。また、Kanazawa(1988)はプロテアーゼ活性は非根圏土壌に比べて根圏で非常に高いが、作物間には差が認められないことを報告した。さらに、山縣ら(1996)は有機態窒素として米ぬかを施用して作物を栽培したとき、リクトウがトウモロコシよりも多くの窒素を吸収することを報告し、土壌中の有機態窒素の低分子化の第一段階であるプロ

テアーゼ活性について検討した結果，リクトウの方がトウモロコシよりも低かったことから，プロテアーゼ活性による根圏効果は有機態窒素施用区でのリクトウの優位性の要因ではないと報告している（1997b）．これらの報告からも，根圏効果による作物間の窒素吸収反応の差は見いだされていない．

次にニンジン，チンゲンサイおよびハウレンソウが他の作物に比べて有機態窒素を利用する能力に優れているという考え方である．山縣ら（1997a）は， ^{15}N で標識された米ぬかを施用して作物を栽培したとき，土壤に残存した無機態窒素中の ^{15}N 濃度には作物間に差がみられなかったのに対し，リクトウが吸収した窒素の ^{15}N 濃度がトウモロコシやダイズよりも高かったことから，リクトウはトウモロコシやダイズに比べ，米ぬか窒素が無機化して土壤中に存在する無機態窒素により希釈される前の有機態窒素を吸収した可能性があるかと推察している．本試験においても同様の現象が考えられたため，後の章において有機態窒素と作物の窒素吸収反応についてさらに検討した．

3-5 要約

有機態窒素として稲わらと米ぬかの重量比4：1混合物（RBS，C/N19）を施用して9種類の野菜についてポット試験を行った．RBS区の無機態窒素量は無施用区よりも低く推移し，ピーマン，リーフレタスの窒素吸収量は無施用区の方がRBS区よりも高くなった．これに対し，チンゲンサイ，ニンジン，ハウレンソウの窒素吸収量はRBS区の方が無施用区よりも高くなった．すなわち，有機物を施用したときの作物の窒素吸収反応には差違が認められた．対照的な反応を示した上記5作物について，RBSよりもC/N比が低く，より土壤中の無機態窒素の高い条件での反応を見るために，なたね油かす（RC，C/N比7），乾燥牛ふん（DCF，C/N比10）を施用して，硫酸を対照区としてポット試験を行った．無作付け土壤のRC区の無機態窒素量は硫酸区よりも低く推移したが，チンゲンサイ，ニンジン，ハウレンソウの窒素吸収量はRC区のほうが硫酸区よりも高く，ピーマン，リーフレタスの窒素吸収量は硫酸区の方がRC区よりも高く，RBSを施用した試験と

同様な傾向が認められた。有機物を施用した場合の土壌中のアミノ酸、タンパク質の濃度はいずれも無施用区および硫安施用区よりも高く推移していたため、無機態窒素量の低い条件でも高い窒素吸収反応を示したチンゲンサイ、ニンジン、ホウレンソウが土壌中の有機態窒素を吸収利用している可能性を認めた (Matsumoto et al. 1999)。

第4章 土壤の可給態窒素と推定される中性リン酸緩衝液抽出有機態窒素の特性

4-1 目的

第2, 3章において有機物の施用土壤における作物の窒素吸収反応には作物間差が認められ, これは土壤中の有機態窒素に対する反応に違いがあるためと推察した. そこで, この仮説を検証するためには土壤中の有機態窒素の動態を明らかにする必要があると考えた. 本稿では, 可給態窒素の評価法として広く普及している 1/15M中性リン酸緩衝液抽出法とインキュベーション法の比較を行うとともに, 抽出される有機態窒素の特性を明らかにするために, 2種類の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析を行った. さらに, ゲルろ過クロマトグラフィーにより, 分子量ごとの画分を得た後, そのタンパク質濃度を測定し, タンパク質の分布を調査した.

4-2 方法

4-2-1 1/15M中性リン酸緩衝液抽出法による可給窒素の推定

島根県内各地で採取されたグライ土5点, 灰色低地土2点, 黒ボク土4点, 褐色森林土6点, 砂丘未熟土3点の計20点を分析に供試した. 風乾土10gをガラス培養瓶にとり, 最大容水量の60%となるように純水を加えた後, ポリエチレンフィルムで被覆し, 30℃に保たれた恒温器中で28日間培養した. 培養後, 2M塩化カリウムで無機態窒素を抽出し, 水蒸気蒸留法によって定量した. 培養前にあらかじめ同様な方法で求めた無機態窒素量を差し引いた値を可給態窒素とした. 一方, 抽出法による土壤の可給態窒素量を推定するために, 培養前の風乾土10gに1/15M中性リン酸緩衝液(リン酸一カリウムとリン酸二ナトリウム3.9:6.1の混合液)40mLを加えて室温で1時間振とうした後ろ過し, ろ液中の有機態窒素をケルダール分解後, 水蒸気蒸留法によって定量した. この値から分解前に求めた濾液の無機態窒素量を差し引いた値を抽出有機態窒素とした. また, リン酸緩衝液抽出液中のタンパク質含量をブラッドフォード法 (Bradford, 1976)

により定量した。標準物質には γ -グロブリンを用い、これに換算したタンパク質含量を算出した。

4-2-2 土壌抽出液の HPLC 分析

1/15M リン酸緩衝液によって得られた上記の土壌の抽出液をサイズ排除 HPLC およびイオン交換 HPLC で分析した。それぞれの HPLC 条件は以下の通りである。サイズ排除 HPLC: カラム; Shimpack diol 150 (Shimazu Co. Ltd.), 移動相; 50 mM リン酸緩衝液 (含 0.3 M NaCl, pH 7.0), 流速; 2.0 ml min^{-1} , サンプル量; 20 μL , 検出器; UV-280 nm. イオン交換 HPLC: カラム; IEC DEAE-825 (Shodex co. Ltd.), 移動相; A: 20 mM トリス-塩酸 (pH 8.2), B: A+0.5M NaCl, A \rightarrow B リニアグラジエント (60 分), 流速; 1.0 ml min^{-1} , サンプル量; 20 μL , 検出器; UV-280 nm.

4-2-3 有機態窒素および有機化窒素のタンパク質の分画

島根県三刀屋町で採取された黒ボク土壌 (28.5 g C kg^{-1} , 1.7 g N kg^{-1}) を供試して、リン酸緩衝液によって抽出される有機態窒素および有機化窒素のタンパク質についてゲルろ過クロマトグラフィーにより分子量ごとに分画し、タンパク質の分布を調べた。乾土 10 g あたり硫酸を窒素として 4 mg, グルコースを炭素として、40, 80 および 160 mg 添加し、水分を最大容水量の 60% に保ち、 30°C で 2 週間保温整置培養した。対照区としてグルコースおよび硫酸の無添加区を設けた。培養後の土壌に 4 倍量の 1/15M 中性リン酸緩衝液を加えて 1 時間振とうした後ろ過した。この抽出液 1 mL を Sephadex G-25 を充填したカラム (1 cm \times 50 cm) の上端に整置し、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7) により溶出し、フラクションコレクターにより分子量ごとの画分を得た。得られた画分を centrifugal vaporizer で 20 倍に濃縮し、画分中のタンパク質含量をブラッドフォード法により測定した。標準物質には γ -グロブリンを用い、 γ -グロブリンに換算したタンパク質含量を算出した。

4-3 結果

4-3-1 抽出法による可給窒素の推定

供試土壌の全窒素は $0.1\sim 5.8\text{mgkg}^{-1}$ 、全炭素は $1.2\sim 58.5\text{mgkg}^{-1}$ の範囲にあった（第7表）。培養期間中の無機化窒素量は $13\sim 363\text{mgkg}^{-1}$ 、リン酸緩衝液抽出有機態窒素は $20\sim 250\text{mgkg}^{-1}$ 、リン酸緩衝液抽出液中のタンパク態窒素は $9.0\sim 60.0\text{mgkg}^{-1}$ であった（第8表）。無機化窒素量と全炭素、全窒素、リン酸緩衝液抽出有機態窒素、リン酸緩衝液中のタンパク態窒素にはそれぞれ相関関係が認められた（第9表）。その中でも、無機化窒素量とリン酸緩衝液抽出有機態窒素 ($r=0.91^{***}$, $n=20$)、リン酸緩衝液抽出タンパク態窒素 ($r=0.91^{***}$, $n=20$) にはそれぞれ強い相関関係が認められた。

4-3-2 土壌抽出液の HPLC 分析

1/15M リン酸緩衝液抽出物の HPLC クロマトグラムを第11図に示した。土壌の種類にかかわらず、サイズ排除 HPLC クロマトグラムは同様なパターンを示し、保持時間 8.4 分に単一のピークのみが認められた。標準物質 (Gel filtration standard, Bio-rad co. Ltd.) の保持時間から、このピークの分子量は 8000~9000 程度と推定された。イオン交換 HPLC クロマトグラムにおいても同様に土壌の種類にかかわらず保持時間 2.8 分に単一のピークのみが認められた。また、両 HPLC で検出された単一のピークの面積とリン酸緩衝液抽出有機態窒素量（第12図 A; $r = 0.95^{***}$ サイズ排除 HPLC, 第12図 B; $r = 0.93^{***}$ イオン交換 HPLC）およびリン酸緩衝液抽出タンパク態窒素量（第13図 A; $r = 0.96^{***}$ サイズ排除 HPLC, 第13図 B; $r = 0.92^{***}$ イオン交換 HPLC）の間にはそれぞれ極めて高い相関関係が認められた。

4-3-3 有機態窒素および有機化窒素中のタンパク質の分子量分布

ゲルろ過クロマトグラフィーにより分画されたタンパク質の分布はサイズ排除 HPLC と同様な傾向を示した（第14図）。すなわち、分子量 8000-9000 をピークとするようにタンパク質が分布していた。また、硫安とグルコースを添加して培養した場合、C/N 比が高くなるにつれてこれらの画分中のタンパク質含量が増加した。

第7表 供試土壌の理化学性

土壌サンプル	土壌タイプ*	土性	全炭素 (g C kg ⁻¹)	全窒素 (g N kg ⁻¹)	pH(H ₂ O)
1	Andosol	loam	50.8	4.6	6.0
2	Andosol	loam	30.3	2.6	5.0
3	Andosol	loam	53.7	4.4	5.7
4	Andosol	clay loam	58.5	5.3	5.9
5	Cambisol	loam	58.0	5.8	7.4
6	Cambisol	loam	15.1	1.4	6.6
7	Cambisol	loam	20.8	1.6	6.8
8	Cambisol	loam	46.0	3.8	6.2
9	Cambisol	loam	22.3	2.0	6.5
10	Cambisol	loam	32.1	2.6	6.7
11	Fluvisol	loam	9.8	0.9	5.7
12	Fluvisol	loam	50.6	4.5	5.7
13	Gleysol	light clay	12.3	1.1	5.3
14	Gleysol	light clay	15.9	1.3	5.7
15	Gleysol	light clay	31.6	3.4	4.8
16	Gleysol	clay loam	19.7	1.8	5.5
17	Gleysol	clay loam	12.2	1.0	6.2
18	Regosol	sandy loam	4.1	0.4	6.4
19	Regosol	sandy loam	1.2	0.1	6.2
20	Regosol	sandy loam	5.5	0.5	5.8

* FAO soil classification system (FAO, 1989)により分類.

第8表 供試土壌の無機化窒素量およびリン酸緩衝液によって抽出される窒素

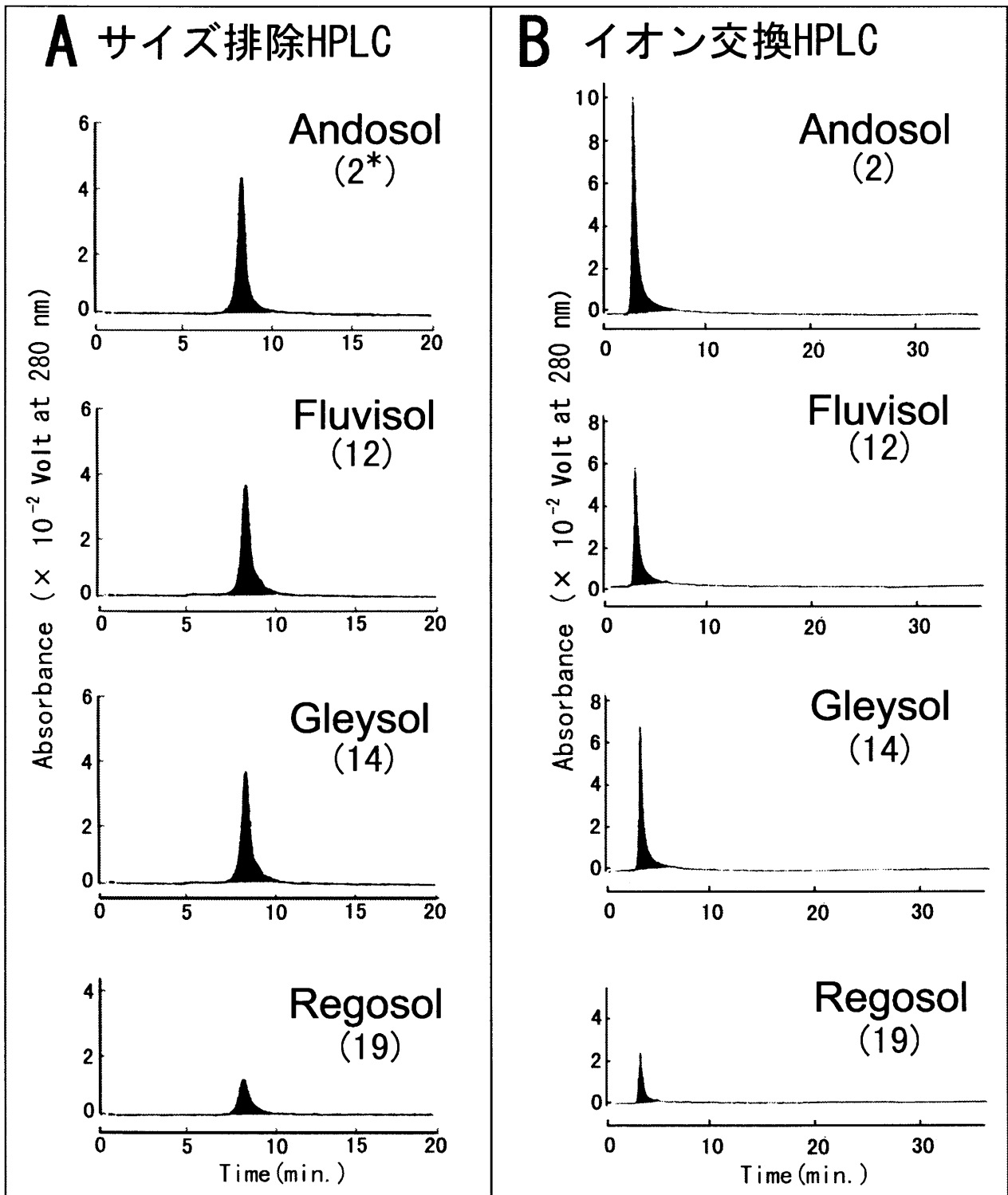
土壌サンプル	無機化窒素* (mg kg ⁻¹ 乾土)	リン酸緩衝液抽出	リン酸緩衝液抽出
		有機態窒素 (mg kg ⁻¹ 乾土)	タンパク態窒素 (mg kg ⁻¹ 乾土)
1	351	224	52.9
2	327	182	50.8
3	215	189	42.7
4	225	210	44.7
5	363	250	60.0
6	178	90	32.9
7	120	136	33.9
8	118	102	26.9
9	180	137	37.9
10	240	130	36.9
11	68	70	25.8
12	170	105	34.0
13	253	207	51.7
14	203	115	40.7
15	251	174	38.7
16	284	215	53.0
17	135	75	20.3
18	16	27	12.2
19	13	20	9.0
20	71	90	19.6

* 30℃, 4週間培養

第9表 培養法による無機化窒素量と各形態の窒素量および炭素量との相関

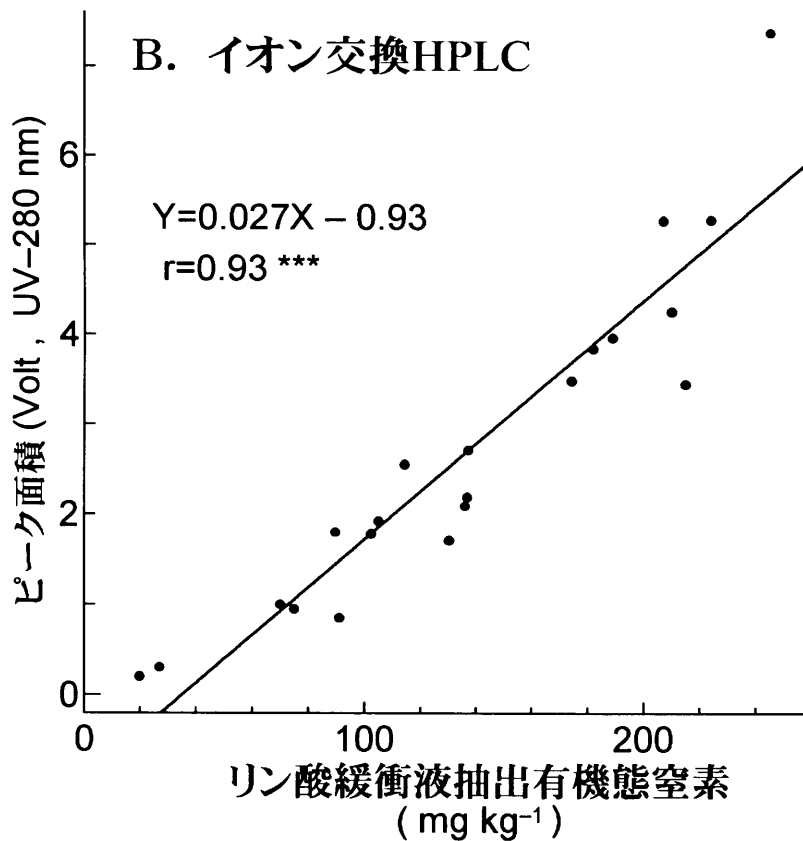
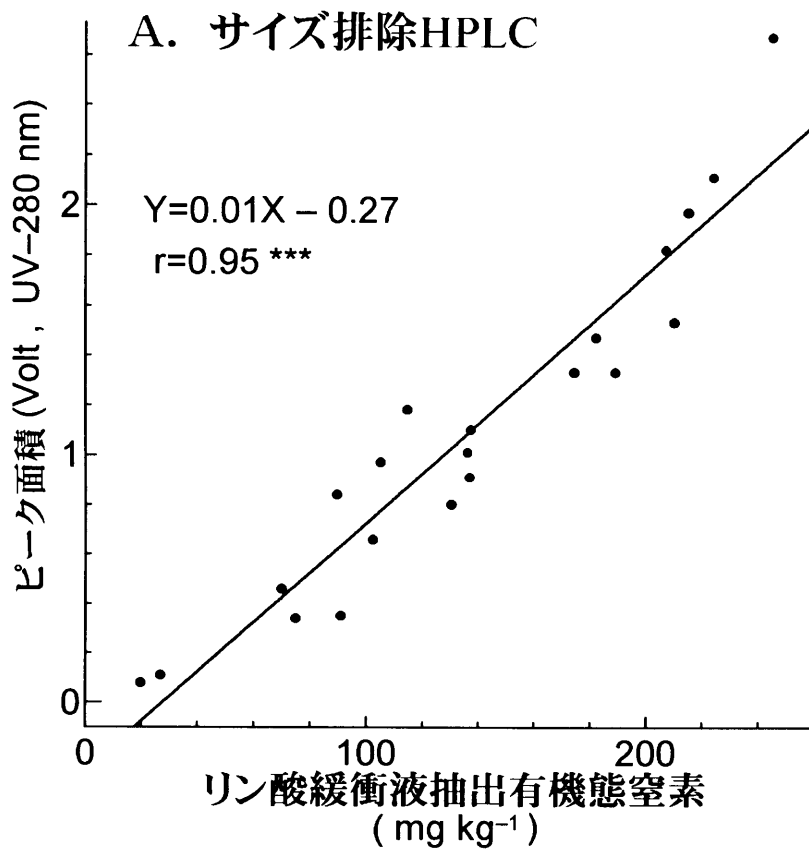
窒素および炭素の形態	相関係数 (r)
全窒素	0.65 **
全炭素	0.62 **
リン酸緩衝液抽出有機態窒素	0.91 ***
リン酸緩衝液抽出タンパク態窒	0.91 ***

** 1% , *** 0.1%で有意

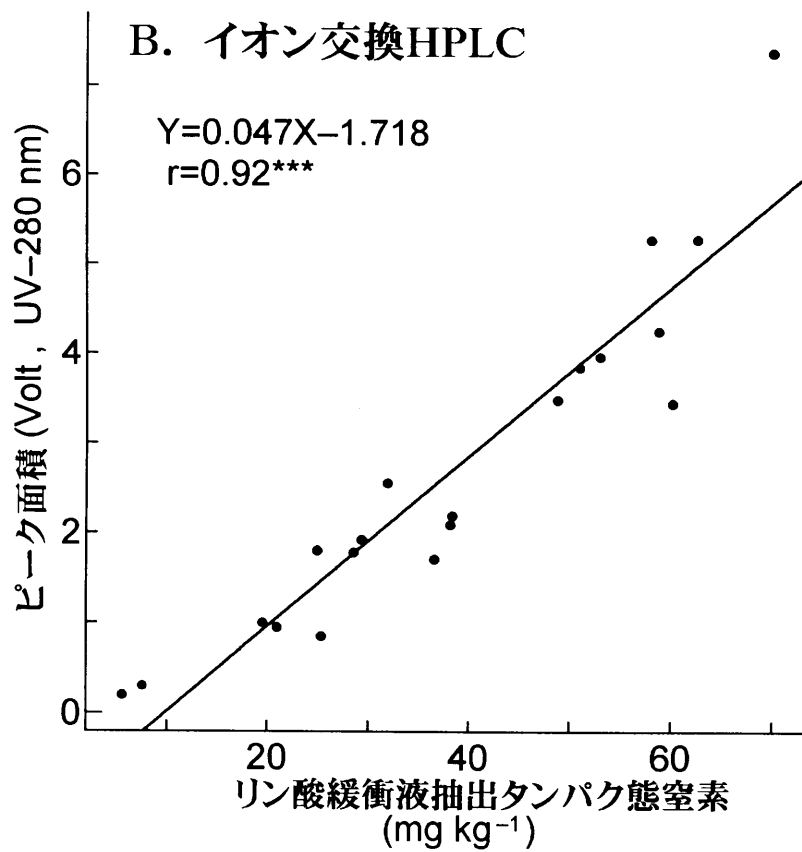
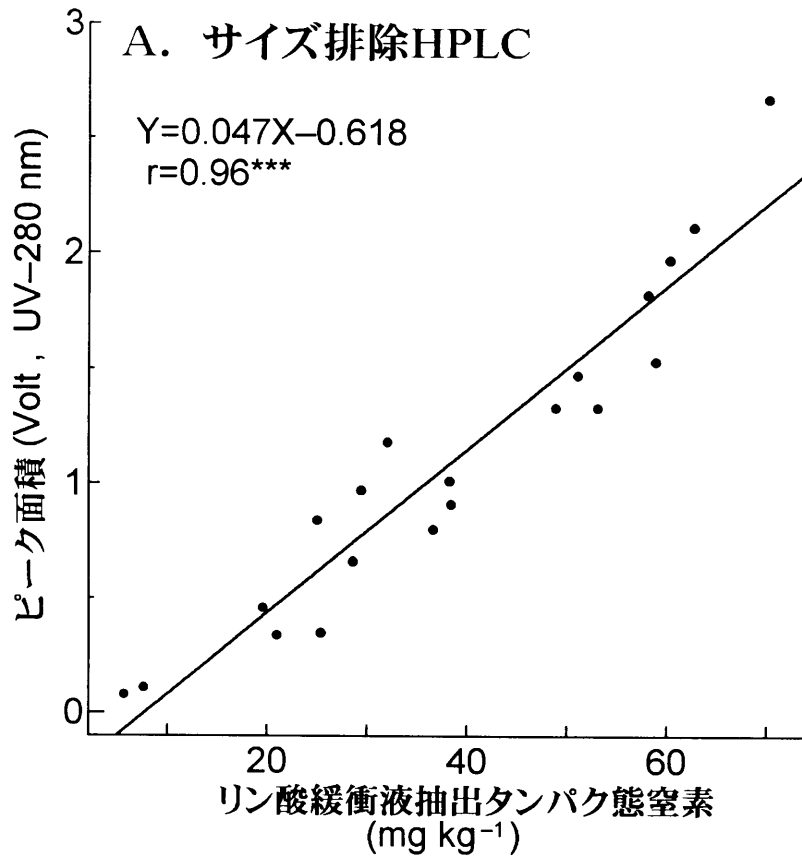


第11図 土壌の中性リン酸緩衝液抽出液のHPLCクロマトグラム

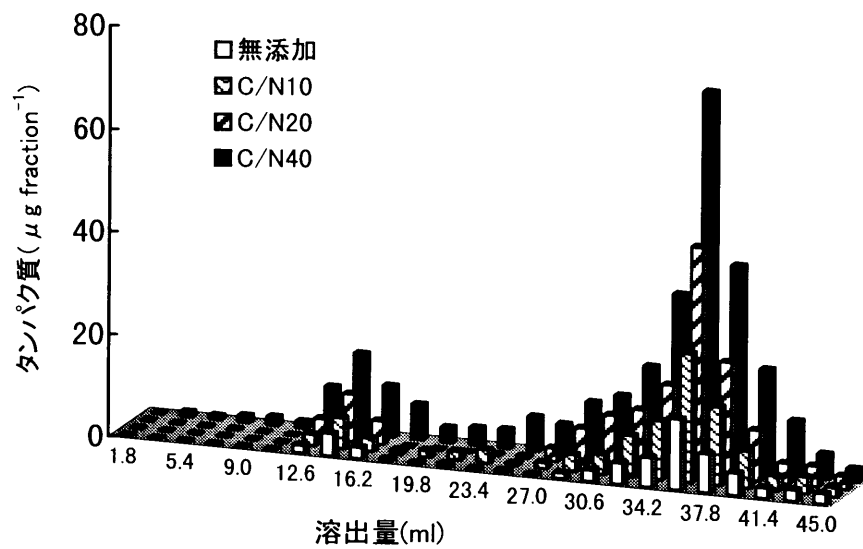
* 数字は第7表中の試料番号を示す



第12図 サイズ排除 (A) およびイオン交換 (B) HPLCによって検出された単一ピーク面積とリン酸緩衝液抽出有機態窒素量との関係



第13図 サイズ排除 (A) およびイオン交換 (B) HPLCによって検出された単一ピーク面積とリン酸緩衝液抽出タンパク態窒素との関係



第14図 土壤に硫酸とグルコースを添加して14日間培養した土壤のリン酸緩衝液抽出液のゲルろ過クロマトグラフィーによるタンパク質の分布

4-4 考察

供試した 20 土壌において、リン酸緩衝液抽出窒素が全窒素に占める割合は、平均 8.3%であった。湿潤培養条件において、リン酸緩衝液抽出窒素と無機化窒素量の相関係数は全窒素と無機化窒素量および全炭素と無機化窒素量のそれよりもはるかに高い値を示した。これまでも、窒素肥沃度を推定する際に、土壌の全炭素および全窒素量が必ずしもこれを反映しないことが報告されている (Stanford, 1982; Mahli et al., 1992)。また、Nemeth (1988) らはエレクトロウルトラフィльтраクション法によって抽出される遊離のアミノ酸量は抽出される有機態窒素のわずか 3% にすぎないことを報告している。実際、遊離のアミノ酸は速やかに分解されるため、土壌に大量に蓄積されることはない。すなわち、本試験の結果からも明らかのように、土壌からの無機化窒素の供給源は遊離のアミノ酸や高度に重合された腐植などではなく、リン酸緩衝液によって抽出されるような易分解性の有機態窒素であることを示唆する。

そこで、中性リン酸緩衝液によって抽出される有機態窒素の特性を調べるために 2 種類の HPLC 分析を行ったところ、いずれも単一のピークしか認められず、その分子量は 8000-9000 であることが推定された。本試験の HPLC 分析では、検出器として紫外分光光度計を用い、280nm における吸光度を測定した。これは、土壌中で無機化される窒素の供給源がタンパク様物質であると考えられているためである。実際、佐藤 (1992) は、近年タンパク質の定量に広く使用されている色素結合法の一種であるブラッドフォード法 (Bradford, 1976) により定量される 1/15M リン酸緩衝液中のタンパク質濃度が、同抽出液中の有機態窒素量を反映することを報告している。また、斉藤 (1988) はオートクレーブされた土壌の塩化カリウム抽出液の紫外部吸収スペクトルを分析し、280nm 付近に肩状吸収があることを認め、これがタンパク様物質が抽出されている根拠であると報告している。同様に Numan ら (1998) も土壌の 50mM 硫酸カリウム抽出液の 280nm における吸光度と同抽出液の 6N 塩酸加水分解物中のニンヒドリン反応を示す窒素量との間に極めて高い相関関係があることを明らかにしている。Mengel et al. (1999) は土壌窒素の無機化を予想する際、全窒素との相関が $r=0.52$ と低か

ったのに対し、エレクトロウルトラフィльтраクション法によって抽出される有機態窒素を加水分解して得られるアミノ酸を定量することにより、その予測精度($r=0.81$)を大幅にあげることが可能であったとし、アミノ酸化合物が土壌窒素の無機化の給源として最も重要な存在であることを報告した。本試験においても、HPLCにより検出された単一のピークの面積とリン酸緩衝液抽出液中のタンパク質濃度には極めて高い相関関係が認められた。また、ゲルろ過クロマトグラフィーにより分子量毎に分画された画分中のタンパク質濃度を測定したところ、そのタンパク質の分布は UV280nm で検出したサイズ排除 HPLC によるものと同様のパターンを示した。すなわち、HPLC 分析において検出された単一のピークがタンパク様の物質であることおよびそのタンパク様物質が極めて均一な物質であることが示唆される。このことを支持する報告として、1/15M リン酸緩衝液によって抽出される有機態窒素のアミノ酸組成が土壌の種類にかかわらず、極めて類似しているという報告が樋口(1983)によって行われている。また、Wenzl (1990) は可溶性窒素を分子量により分画した結果、抽出剤の種類に関わりなく(H_2O , $CaCl_2$, 中性リン酸緩衝液)、有機態窒素として、分子量 15000 以下の画分と 90000 以上の画分を抽出液中に検出し、90000 以上の画分では、タンパク質の存在を示す folin and ninhydrin 反応が見られなかったのに対し、15000 以下の画分にはこれらの反応が認められたことを報告している。この 15000 以下の画分が、本試験で検出したピークと同一のものではないかと考えられる。これらの報告は、本試験の結果、すなわち、タンパク様物質およびリン酸緩衝液抽出全窒素がインキュベーション法によって無機化する窒素の給源であるとともに、それが比較的均一なタンパク質から構成されていることを支持するものと考えられる。

しかしながら、本試験に供試した土壌のリン酸緩衝液抽出窒素に対するタンパク態窒素の比率は平均約 30%であった。これと同様の結果がこれまでに報告されている。すなわち、エレクトロウルトラフィльтраクション法および $CaCl_2$ によって抽出される有機態窒素のうち、加水分解されるアミノ酸によって構成された有機態窒素は 23-53%であり、アミノ酸以外の構成成分については未同定の物質と報告されている(Appel and Mengel

1992, 1993, Groot and Houba, 1995).

一方、土壌中の腐植物質も紫外領域の波長に吸光を示すことが知られている (Katayama 1986, Berden and Berggren 1990,). 本試験で用いた中性リン酸塩溶液では、高度に重合された腐植は容易に抽出されないと考えられるが、重合度の低い腐植物質は容易に抽出される (本田, 1980). このように、タンパク様物質や腐植物質など紫外領域の波長に吸光を示す物質が抽出されていることが考えられるにもかかわらず、本試験における2種類のHPLC分析では、いずれも単一のピークしか認められなかったことから、これらの物質が結合状態で存在しているものと推察される。

土壌にグルコースと硫酸を添加して培養した場合、添加するグルコースの量が増加するにしたがって土壌固有の分子量 8000-9000 と推定される画分中のタンパク質含量が増加した。樋口 (1983) は本試験と同様に土壌にグルコースと硫酸を施用して培養した土壌のリン酸緩衝液抽出液中のアミノ酸組成を調べた結果、土壌固有のアミノ酸組成と、グルコースと硫酸の添加によって有機化された窒素のアミノ酸組成がおおむね一致することから、土壌の有機態窒素と有機化される窒素は本質的に同様なタンパク様物質で、微生物菌体に由来するものであるとしている。本試験においてグルコースと硫酸の添加によって土壌固有のタンパク様物質が増加したことは樋口の報告を裏付けるものと考えられる。

以上の結果、無機化窒素の給源となる土壌の可給態窒素は、土壌の種類にかかわらず、分子量 8000~9000 程度で化学的にも均一な有機態窒素であり、これは重合度の低い腐植物質と菌体由来のタンパク様物質が結合した状態で土壌コロイドに吸着されているものと考えられる。

4-5 要約

土壌の可給態窒素量を推定するために 1/15M 中性リン酸緩衝液抽出法についてインキュベーション法と高い相関を得た。抽出される有機態窒素の特性をサイズ排除 HPLC およびイオン交換 HPLC によって分析した結果、いずれも単一のピークしか認められなかった。このピークの分子量は 8000-9000 程度と推定された。さらにこのピーク面積と抽出液中のタンパ

ク質含量は極めて高い相関を示した。また、ゲルろ過クロマトグラフィーにより分子量毎の画分を得た後、画分中のタンパク質濃度を測定したところ、サイズ排除 HPLC と同様なパターンを示した。これらのことから、土壌の無機化窒素の給源となる有機態窒素は極めて均一なタンパク様物質であることが示唆された（松本ら 2000, Matsumoto et al. 2000a）。

第5章 有機物を施用された土壌の有機態窒素の動態およびその起源

5-1 目的

従来、土壌への有機物の施用については、その無機化を中心に研究が行われてきたが、有機物施用に伴う土壌中の有機態窒素の存在状態および形態変化に関する研究は十分に行われていない。第4章ではリン酸緩衝液により抽出されるタンパク様物質が無機化窒素の給源であり、これは土壌の種類に関わらず、微生物菌体由来のタンパク質と腐植物質が結合した比較的均一な有機態窒素であることを推察した。本稿では種々の有機物の施用によって、有機物由来の有機態窒素の消長および第4章で明らかにされたタンパク様物質との関係をリン酸緩衝液抽出液のサイズ排除 HPLC および SDS-PAGE パターンを解析することにした。また、有機物と同時に抗生物質を添加して培養することにより、可給態窒素の形成に及ぼす微生物の影響を調査する。

5-2 方法

5-2-1 有機物添加土壌のタンパク様物質の動態

5-2-1-1 リン酸緩衝液抽出物のサイズ排除 HPLC

第7表における No.11 の沖積土壌 200 g にグルコース+硫安 (GLA, C/N20 に調製), 稲わらと米ぬかの重量比 4 : 1 混合物 (RBS, 25.0 g N kg⁻¹, C/N ratio: 18.9) およびアルブミン (ALB) を窒素として 80mg 添加し, 水分を最大容水量の 60% に調節し, 30°C で静置培養した。培養 1, 5, 7, 14 日目に土壌を取り出し, 第4章と同様な方法でリン酸緩衝液により有機態窒素を抽出し, サイズ排除 HPLC に供した。

5-2-1-2 リン酸緩衝液抽出物の SDS-PAGE

第7表における No.13 の黒ボク土壌にグルコース+硫安 (GLA, C/N比 20 に調製), 稲わらと米ぬかの重量比 4 : 1 混合物 (RBS, 25.0 g N kg⁻¹, C/N比 18.9) およびなたね油かす (RC, 50.0 g N kg⁻¹, C/N比 7.0) を窒素として 64mg 添加し, 上記と同様な方法で培養および有機態窒素の抽出を行った。得られたリン酸緩衝液抽出物をセロファンチューブ (分子量 3500) で

透析し、透析物を 15 倍に濃縮し、限外ろ過膜により分子量 30000 以上の画分を排除した試料を SDS-PAGE に供した。SDS-PAGE には 15% ポリアクリルアミドゲル（アトー株式会社，SPU-15S 型）を用い、付属のトリスートリシン緩衝液中で電気泳動し（20mA），銀染色法（Budowle 1984）により染色した。

5-2-2 有機物を添加した土壌のリン酸緩衝液抽出物のアミノ酸組成

50 mL 容のねじ口瓶に石英砂を 20g とり、最大容水量の 50% となるように水を加え、これにグルコースと硫安 (GLA, CN 比を 20 に調整) およびなたね油かす (RC) を N として 2gkg^{-1} になるように添加し、さらに 2% 相当の黒ボク土 (41.7g C kg^{-1} , 3.4g N kg^{-1}) を種菌として加え、21 日間 30°C で静置培養した。培養中に水を適宜添加し、水分量がほぼ一定となるようにした。培養後 4 倍量の $1/15\text{M}$ リン酸緩衝液 (pH 7) を加えて 1 時間振とう後、 $7,000\text{rpm}$ で 10 分間遠心分離した。得られた上澄みをセルロースチューブ (分子量 8,000 相当) で透析した。アミノ酸組成の分析のため、GLA 区、RC 区それぞれについて、透析した内液 60mL をエバポレーターで乾固し、これに 2 mL の 6M 塩酸を加え、脱気した試験管の中で 110°C 、22 時間加水分解した。加水分解後、分解液をエバポレーターで乾固し、これに 10mL の 0.02M 塩酸を加えて孔径 $0.2\mu\text{m}$ のメンブレンフィルター (セルロースアセテート製) でろ過した試料 $50\mu\text{l}$ をアミノ酸分析に供した。分析は、アミノ酸自動分析計 (日立 L-8500) により、生体液分析用パックドカラム (4.6mm、日立) を用いた生体液分析法で行った。アミノ酸はニンヒドリンにより発色させ、570 および 440nm の吸光を検出した。各アミノ酸は保持時間により同定し、一点検量線で濃度を算出した。同様にして、培養前の土壌についても分析し、培養土壌の分析値と比較した。

5-2-3 可給態窒素の形成に対する微生物の影響

可給態窒素の起源を推定するために、有機物と同時に抗生物質を添加し、リン酸緩衝液によって抽出されるタンパク様物質の動態をサイズ排除

HPLC および SDS-PAGE により調査した。5-2-1-1 の処理区を基本に、抗カビ剤としてシクロヘキシミド、抗バクテリア剤としてクロラムフェニコールをそれぞれ 1000mgkg^{-1} 添加する区を設定して同様な条件で培養を行い、リン酸緩衝液抽出物を得た後、それぞれサイズ排除 HPLC および SDS-PAGE 分析に供した。両分析条件とも上記と同様な方法で行った。

5-3 結果

5-3-1 リン酸緩衝液の HPLC 分析と SDS-PAGE

GLA 区の培養 1 日後の HPLC クロマトグラムには保持時間 8.4 分にブロードなピークが認められた (第 15 図 A)。このピークは培養の進行に伴ってより明瞭になり高くなっていった。RBS 区の培養 1 日後においては保持時間 5.3 分から 14.2 分の間に RBS 由来と推定される複数のピークが検出された。これらのピークは培養 14 日目までに消失し、保持時間 8.4 分の主要なピークに収れんされた (第 15 図 B)。ALB 区の培養 1 日目には、6.9 分にアルブミンのピークが認められたが、RBS 区と同様にこのピークは速やかに消失し、8.4 分の土壌固有のピークに収れんされた (第 15 図 C)。すなわち、本試験において、有機物の施用により培養初期にみられたピークは速やかに消失し、培養の進行に伴って土壌固有のピークに収れんされ、その高さが高くなるという共通の特徴を示した。

一方、SDS-PAGE パターンも HPLC 分析と同様な傾向が認められた (第 16 図)。すなわち、施用有機物の種類に関わらず、培養初期に検出されたバンドは、培養 14 日までに消失し、分子量 8000-9000 と推定される土壌固有のバンドが明瞭となった。検出されたバンドの推定される分子量は HPLC によって示されたピークとほぼ一致していた。

5-3-2 有機物を添加した土壌のリン酸緩衝液抽出物のアミノ酸組成

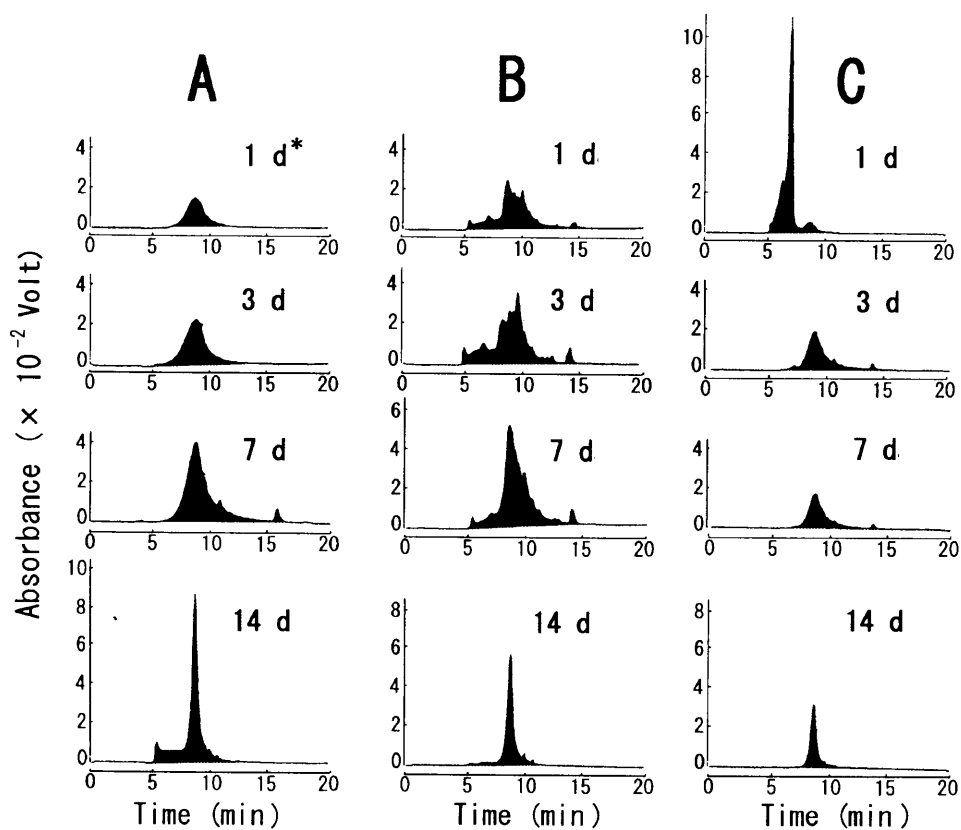
培養初期の GLA 区および RC 区のアミノ酸組成は、培養前の土壌に比べて大きな違いがみられた (第 17 図)。すなわち、培養当初、GLA 区ではアミノ酸がほとんど検出されず、RC 区ではアミノ酸組成は大きく異なっていた。

しかし，培養 14 日後，21 日後には両者のアミノ酸組成はほぼ同じのものとなった。

5-3-3 可給態窒素の形成に対する微生物の影響

RBS と同時にクロラムフェニコールを添加した土壌の培養 14 日後のリン酸緩衝液抽出液のサイズ排除およびイオン交換 HPLC クロマトグラムにはそれぞれ複数のピークが検出された（第 18 図）。このうち，土壌固有のピークはいずれの HPLC においても他の処理区よりも小さかった。一方，シクロヘキシミドを添加した場合，抗生物質無添加区と同様に土壌固有のピーク以外に他のピークは検出されなかった。

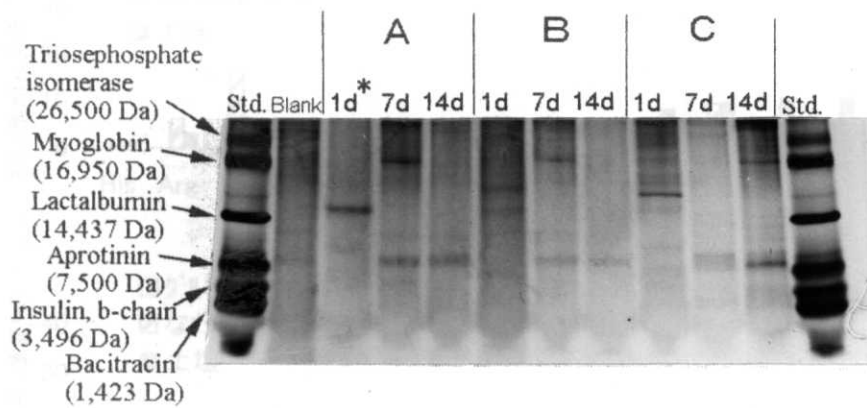
このような傾向は SDS-PAGE による分析でも同様であった。すなわち，クロラムフェニコールを同時に添加した場合，いずれの有機物処理区においても培養 14 日後においても複数のバンドが残ったままで，分子量 8000-9000 付近のバンドは判然としなかった（第 19 図）。これに対し，シクロヘキシミドを添加した場合，抗生物質無添加区と同様に分子量 8000-9000 のバンド以外に明瞭なバンドは検出されなかった。



第15図 培養の経過にともなう有機物施用土壌のリン酸緩衝液抽出液のサイズ排除HPLCクロマトグラムの変化

A: グルコース+硫安 (GLA), B: 稲わら・米ぬか (RBS), C: アルブミン (ALB)

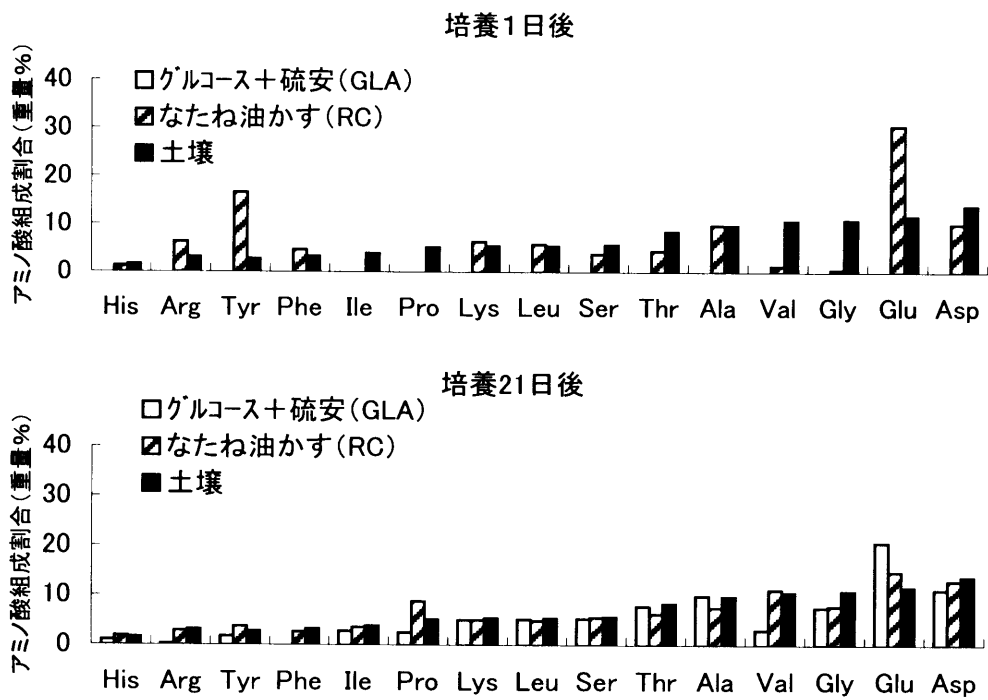
* 培養経過日数



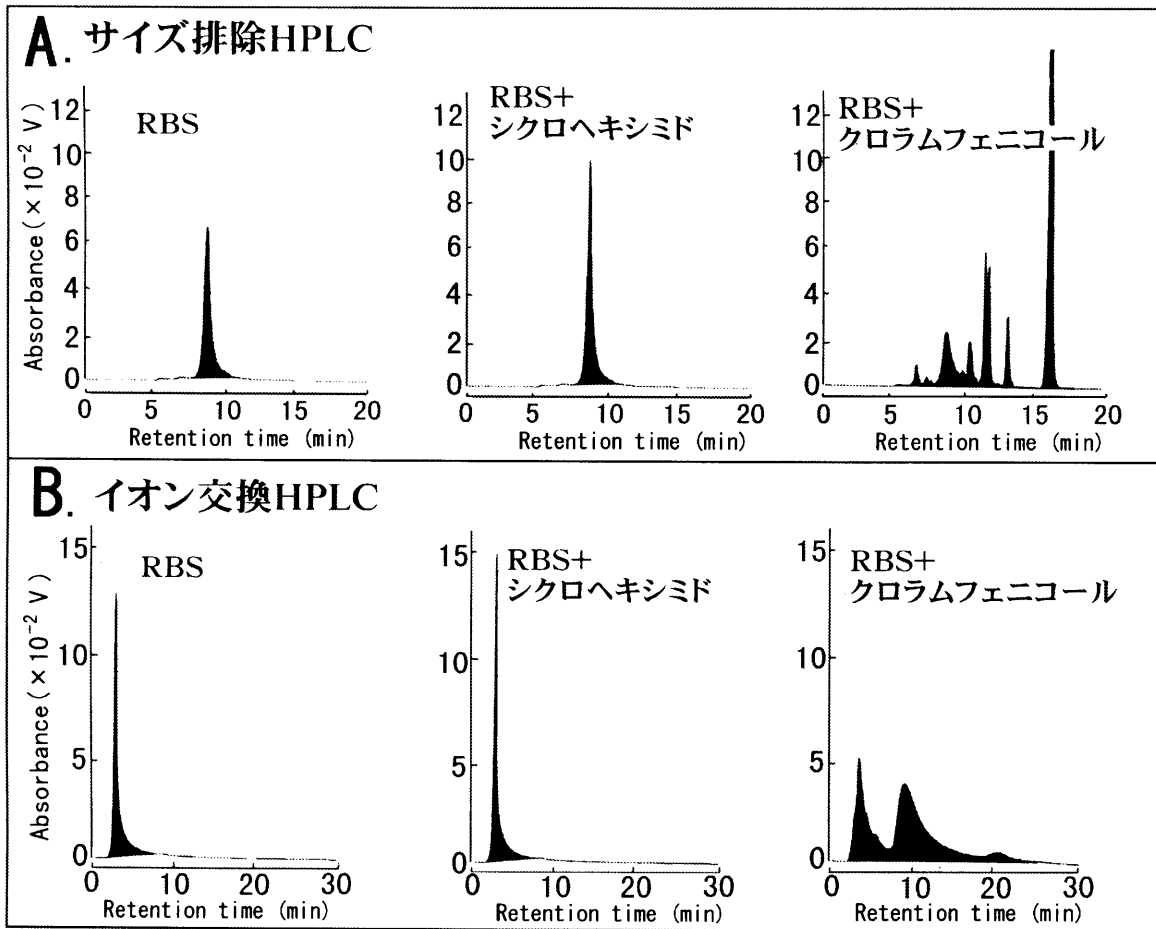
第16図 培養の経過にともなう有機物施用土壌のリン酸緩衝液抽出液のSDS-PAGEパターンの変化

A:なたね油かす(RC), B:グルコース+硫酸(GLA), 稲わら・米ぬか(RBS)

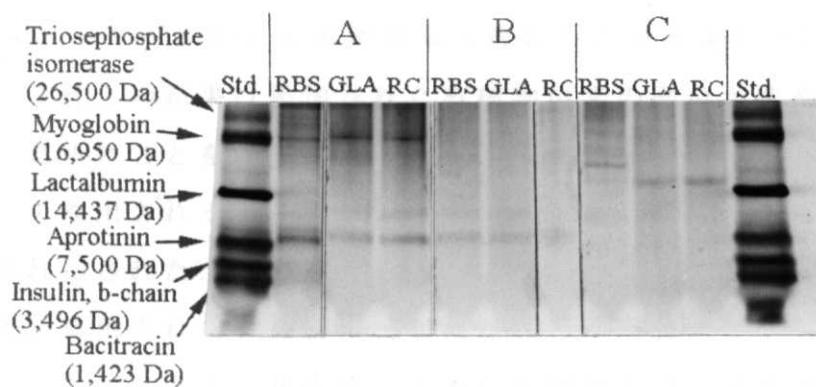
* 培養経過日数



第17図 有機物を施用して培養した土壌のリン酸緩衝液抽出液中のアミノ酸組成の変化



第18図 稲わら米ぬか（RBS）と抗生物質を同時に施用して2週間培養した土壌のリン酸緩衝液抽出液のHPLCクロマトグラム



第19図 有機物と抗生物質を施用して2週間培養した土壌のリン酸緩衝液抽出液のSDS-PAGEパターン

A: シクロヘキシミド添加, B: 抗生物質無添加, C: クロラムフェニコール添加

5-4 考察

土壌に有機物を施用した場合，それらは土壌微生物によって分解され，菌体に取り込まれる．近年，その微生物の代謝は極めて迅速に行われることが明らかになってきた．Bremner and van Kessel (1990)は土壌に添加した¹⁴Cでラベルされたグルコースが48時間以内にバイオマスCに変換されることを報告しており，Urquiga et al. (1998)は土壌に添加された作物残渣が土壌微生物によって速やかに分解されることを炭酸ガスの濃度が5日以内に最高に達することから推測している．本試験においても種々の有機物を土壌に添加したとき，リン酸緩衝液抽出液のサイズ排除 HPLC および SDS-PAGE パターンから有機物由来の複数の画分は速やかに消失した．すなわち，これらの結果は添加された有機物由来の画分が速やかに微生物菌体に取り込まれことを示すものである．一方，培養の進行に伴って，両分析によって検出される画分は，分子量 8000-9000 と推定される土壌固有の画分に収められた．また，これらの結果は，リン酸緩衝液抽出液のアミノ酸組成が施用された有機物の種類に関わらず培養前の土壌のアミノ酸組成に近似したこととも一致する．丸本らも同様にライグラスを土壌に添加した培養実験で，ライグラス添加土壌のアミノ酸組成は，培養後比較的短期間でももとの土壌固有のアミノ酸組成に近づくことを報告している．本試験のアミノ酸組成を樋口，丸本らが報告したアミノ酸組成と比較すると(第4図)，それらの組成は概ね一致していた．また，その主要なアミノ酸が微生物細胞壁のアミノ酸と近似していることが Kai et al. 1973, Marumoto et al. 1982, Chantigny et al. 1997, Degens, 1998 によって報告されている．すでに第4章において，土壌の無機化窒素の供給源であるこれらの画分が極めて均一なタンパク様物質であることを述べたが，これらは，これまで報告されたようなアミノ酸の組成からも裏付けられる．さらに，本試験の HPLC および SDS-PAGE パターンの分析から，土壌に添加された有機物は土壌微生物菌体に速やかに取り込まれ，その代謝過程で生じる菌体由来する均一な物質が土壌に集積していくことが示唆される．

そこで，土壌に集積されるタンパク様物質の形成に及ぼす微生物の影響を明らかにするために，抗菌剤としてクロラムフェニコール，抗カビ剤とし

てシクロヘキシミドの2種類の抗生物質を添加して培養を行った。HPLCおよび SDS-PAGE とともにクロラムフェニコールによってタンパク様物質の形成が抑制されることを確認した。すなわち、培養14日後においても施用有機物由来の画分とは異なる複数の画分が認められた。土壤にクロラムフェニコールを施用するとバクテリアの増殖が抑制されることにより、糸状菌の増殖が促進されることが知られている（阿江ら、1977）。すなわち、この場合の HPLC および SDS-PAGE パターンは、添加された有機物が糸状菌により分解されて菌体に取り込まれ、糸状菌由来の画分が生成・蓄積されたことを示すものである。また、バクテリアの増殖が抑制された状態では、それ以後の反応が進まず、タンパク様物質の形成が抑制されたことが示唆される。一方、シクロヘキシミドを添加して培養した場合、クロラムフェニコール添加区のように複数の画分は認められず、対照区と同様に主要な画分のみが認められ、その形成は対照区よりもやや促進された。すなわち、細菌の増殖が旺盛な条件でタンパク様物質の形成が促進されると考えられた Sowden ら（1977）は藻類、細菌、糸状菌および酵母のアミノ酸組成を比較した結果、細菌のアミノ酸組成が土壤有機物のそれと最も相同性が高いことを報告しており、本試験の実験結果と一致している。

以上の結果より、土壤に施用された有機物は、微生物によって分解され、最終的には細菌の働きにより、土壤固有のタンパク様物質が形成され、土壤の有機・無機コロイドに吸着されて無機化窒素の給源となるものと考えられる。

5-5 要約

土壤に種々の有機物を添加して湿潤条件で培養し、培養土壤のリン酸緩衝液抽出物をサイズ排除 HPLC により分析した。培養初期には有機物由来の複数のピークが検出されたが、培養の進行に伴ってそれらのピークは消失し、添加された有機物の種類にかかわらず、土壤固有のピークに収められた。同様な傾向は、抽出物の SDS-PAGE で検出されるタンパク質のバンドパターンでも確認された。また、リン酸緩衝液抽出物のアミノ酸組成も培

養初期には施用有機物の種類によって大きく異なっていたが，培養の進行に伴って土壌固有のアミノ酸組成とほぼ同じ組成に変化した．この現象は，サイズ排除 HPLC によるピーク，および SDS-PAGE によるバンドの収れんと同様な時期に起こった．すなわち，土壌に添加された有機物は比較的短時間に微生物菌体に取り込まれ，菌体由来のタンパク様物質が可給態窒素の給源として準安定化された状態で土壌の有機・無機コロイドに吸着されていることが示唆された (Matsumoto, et al. 2000b, 荻内ら 2000)．

第6章 チンゲンサイ，ニンジンおよびホウレンソウによる土壌有機態窒素の直接吸収

6-1 目的

第3章において有機物を施用して野菜を栽培した場合，その窒素吸収反応には作物間差が認められ，チンゲンサイ，ニンジンは有機物施用効果が高く，ピーマンはその効果が低いことを認めた．そして，これらの差異は，有機物を施用する事によって土壌中に増加するタンパク様物質に対する反応の違いによると推察した．そして，土壌中の無機態窒素が化学肥料よりも少ないにも関わらず，有機物施用区の窒素吸収量が高かったチンゲンサイ，ニンジン，ホウレンソウでは，かなりの割合で有機物由来の有機態窒素を吸収していると考えられる．従来，有機物由来窒素の吸収量を推定する方法は， ^{15}N で標識した有機物を施用して作物を栽培し，収穫後の作物の ^{15}N atom%を測定することにより行われてきた（山室1990）．この方法では，吸収全窒素に対する有機物由来窒素の割合は推定可能だが，有機物由来窒素がどのような形態で吸収されたかについては正確に把握することはできない．山縣ら（1997a）は ^{15}N で標識した米ぬかを施用したリクトウの ^{15}N atom%がトウモロコシやダイズのそれよりも高いことから，リクトウが有機態窒素を吸収した結果であるとしているが，その考察は，米ぬか由来窒素の ^{15}N 濃度が土壌中に元々存在している無機態窒素によって希釈される前に吸収されたためであるという間接的なものであり，吸収された有機態窒素の形態については言及されていない．

一方，第4，5章において，有機物を施用された土壌には施用有機物の種類に関わらず，菌体由来の分子量8000-9000のタンパク様物質が集積することを明らかにした．チンゲンサイやニンジンが有機態窒素を利用する能力を持っているのであれば，このタンパク様物質を吸収・利用する可能性が高いと考えられる．これは，土壌中には遊離のアミノ酸はきわめて少なく，腐植などの高度に重合された難分解性の窒素化合物を除けば，分子量8000-9000のタンパク様物質が有機態窒素の主要な貯蔵形態と考えられるからである．

植物における組織間の肥料成分の主要な移動経路は維管束であり、根から地上部へと流れる有機・無機成分を含む導管液により植物の活性が維持されている。チンゲンサイやニンジンによって土壌中のタンパク様物質が吸収されていると仮定すれば、導管液の組成は無機栄養のみで生育した場合や、有機物の効果が認められなかったピーマンとは異なり、導管液中に土壌タンパク様物質に関連した物質が見いだされるのではないかと推察される。そこで、この仮説を検証するために、有機物施用に対して対照的な反応を示したチンゲンサイ、ニンジンおよびピーマンの導管液を採取し、サイズ排除 HPLC 分析により比較検討を行った。さらに、これらの窒素吸収反応が共生微生物を介して行われているか、あるいは直接吸収しているのかを検証するために、土壌タンパク様物質を添加した培地で無菌的にチンゲンサイ、ニンジンおよびピーマンを栽培し、その窒素吸収反応を検討した。

6-2 方法

6-2-1 土壌タンパク様物質とチンゲンサイ、ニンジンおよびピーマンの導管液の比較

第3章における土壌および作物体を供試した。移植28日後の無作付け土壌を採取し、リン酸緩衝液によりこれまでと同様な方法でタンパク様物質を抽出した。なたね油かすを施用して28日間ポットで栽培されたチンゲンサイ、ニンジンおよびピーマン（第3章におけるRC区）の地上部を地際部から1cm残して切除し、切断面に50%アルコールを塗布して殺菌した後、あらかじめ80%アルコールで洗浄・乾燥した脱脂綿を詰めた1.5mL容プラスチックチューブを切断面に垂直に押し当て、分泌される導管液を採取した。この操作を午前9:00に行い、午後5:00にプラスチックチューブを回収した。一方、有機物を含まない条件で栽培された植物体の導管液を対照区とするために、第3章における無窒素区のチンゲンサイとピーマンをホアグランド液(Aiello and Graves, 1997)を満たした50L容プラスチックコンテナに移して水耕栽培を行った。溶液は毎日pH6.5に調節し、金魚鉢用ポンプで通気を行った。14日間栽培を行った後、上記と同様な手順で導

管液を採取した。採取された導管液と土壌のリン酸緩衝液抽出液をこれまでと同様な条件でサイズ排除 HPLC 分析を行った。更に、チンゲンサイの導管液の HPLC 分析において、カラム通過後の溶離液を 20 秒毎に採取し、それぞれの画分中に含まれる窒素を微量窒素分析計 (Mitsubishi Chemical Co. Ltd. Model TN-05) で分析した。

6-2-2 無菌培養条件下で培地に添加されたリン酸緩衝液抽出窒素がチンゲンサイ、ニンジンおよびピーマンの生育に及ぼす影響

チンゲンサイ、ニンジンおよびピーマンの種子を 5% 次亜塩素酸ナトリウムに 20 分間浸漬した後、滅菌水で 3 回洗浄し、120℃、1.2 気圧でオートクレーブされたパーミキュライトに播種した。発芽後 2 週間経過した実生を以下に示す手順で用意した培地に移植した。300ml フラスコに無機態窒素を除いた MS 液体培地 (Murashige and Skoog 1962) を添加し、パーミキュライト 25 g を支持剤とし、120℃、1.2 気圧で滅菌した。このうち、MS 液体培地の 10% および 20% (体積比) を土壌のリン酸緩衝液抽出液で代替する区を設け、0.2 μ m のメンブランフィルター (Steradisk, Kurabo Co. Ltd.) でろ過滅菌しながら培地に添加し、いずれの培地も 50ml となるようにした。土壌のリン酸緩衝液抽出液は、あらかじめ 200 g の土壌にグルコース (1.6 g) と硫酸 (0.16 g) を添加して 2 週間培養した後、リン酸緩衝液で抽出した。この抽出液をセロファンチューブ (分子量 3500 以下を排除, Spectrapor 3, Wako Co. Ltd.) により 4℃ に保たれた純水中で 3 日間透析し、無機塩類および遊離アミノ酸を除いた。透析後の抽出液中のタンパク態窒素濃度は 88.2mgL⁻¹ であった。移植した実生を 20℃、16 時間日長、3000lx 照明下で 28 日間栽培した。

6-3 結果

6-3-1 土壌のリン酸緩衝液抽出液の HPLC 分析

第 20 図に移植 28 日後の AS 区と RC 区の無作付け土壌のリン酸緩衝液抽出液のクロマトグラムを示した。両処理区ともにサイズ排除クロマトグラ

フィーにおいて 8.4 分，イオン交換クロマトグラフィーにおいて 2.8 分にそれぞれ単一のピークが認められた。これらのピークの高さと面積は AS 区よりも RC 区の方が高くなった。この順位は抽出液中のタンパク質濃度に対応したものであった。

6-3-2 導管液の HPLC 分析

RC 区のチンゲンサイから採取された導管液のサイズ排除 HPLC クロマトグラムには，保持時間 8.4, 8.9, 9.5, 10.6, 11.4, 12.4 分にピークが検出された（第 21 図）。これらのピークのうち，8.4 分のピークは土壤抽出液に検出された主要なピークと保持時間が一致していた。同様にニンジンの導管液中にもこのピークが検出された（第 22 図）。無機栄養素のみで構成された Hoagland 液で栽培されたチンゲンサイから採取された導管液では保持時間 8.9, 9.5, 10.1, 10.6, 11.4, 12.2 分に RC 区と類似するピークが検出されたが，RC 区で検出された 8.4 分のピークは検出されなかった（第 21 図）。これに対し，ピーマンでは，いずれの栽培条件においても，土壤の抽出液で検出される 8.4 分のピークは検出されなかった。

RC 区で栽培されたチンゲンサイから採取した導管液のサイズ排除 HPLC の溶離液を 20 秒ずつ分画して窒素を分析したところ，HPLC パターンと同様なパターンで窒素が検出された（第 23 図）。そして，8.4 分のピークを含む画分にも窒素が検出された。すなわち，この 8.4 分のピークは，分子量 8000-9000 と推定される分子量の窒素化合物であると結論した。一方，水耕栽培されたチンゲンサイの導管液を同様に分析した場合も，HPLC と同様なパターンを示した。HPLC 分析において，水耕栽培区では 8.4 分のピークは検出されなかったが，この画分中に検出される窒素量は RC 区に比べて極めて低かった。

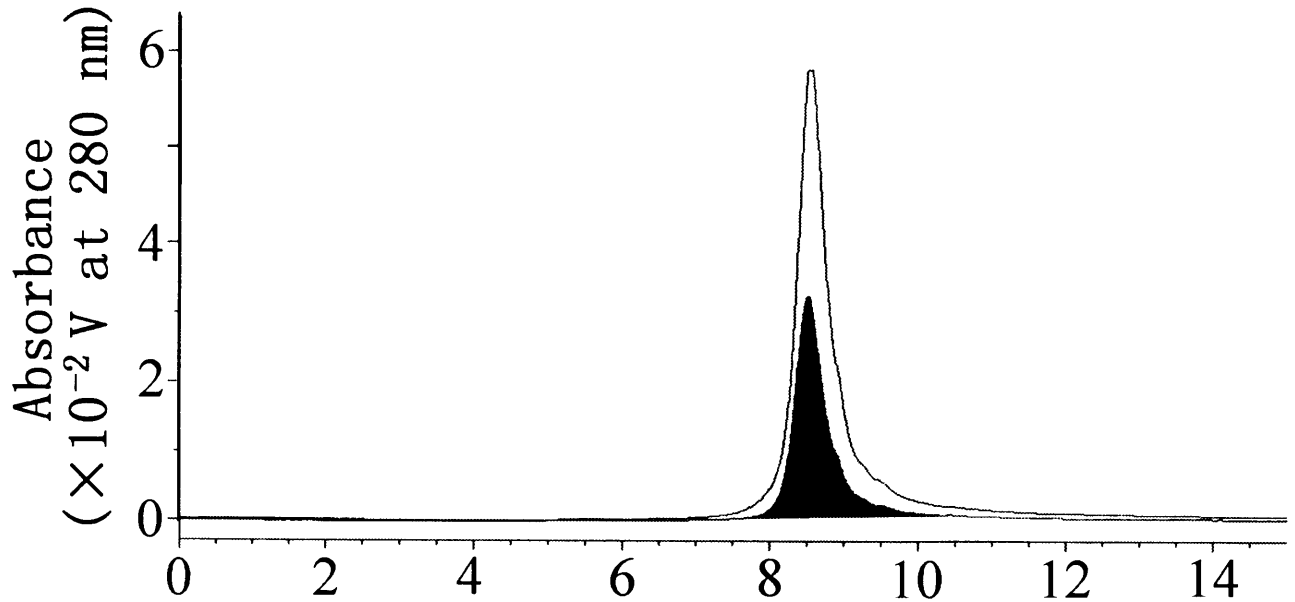
6-3-3 無菌条件下での作物の窒素吸収

無菌条件下で，チンゲンサイとニンジンは土壤抽出液の添加によって生育が良好となった（第 24 図）。一方，土壤抽出液の添加は，ピーマンの生育には効果が認められなかった。チンゲンサイとニンジンの窒素吸収量は

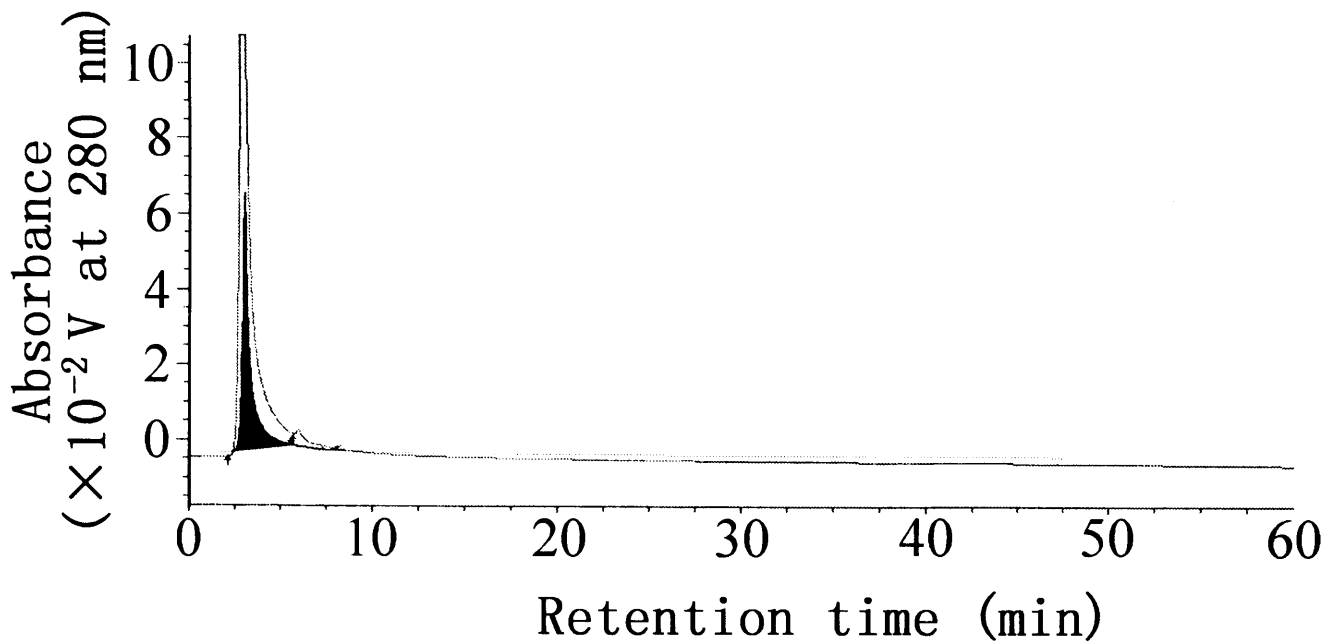
土壌抽出液の添加量が増加するにつれて高くなったが、ピーマンの窒素吸収量は増加しなかった（第 10 表）。

■ 硫安 (AS) 区
□ なたね油かす (RC) 区

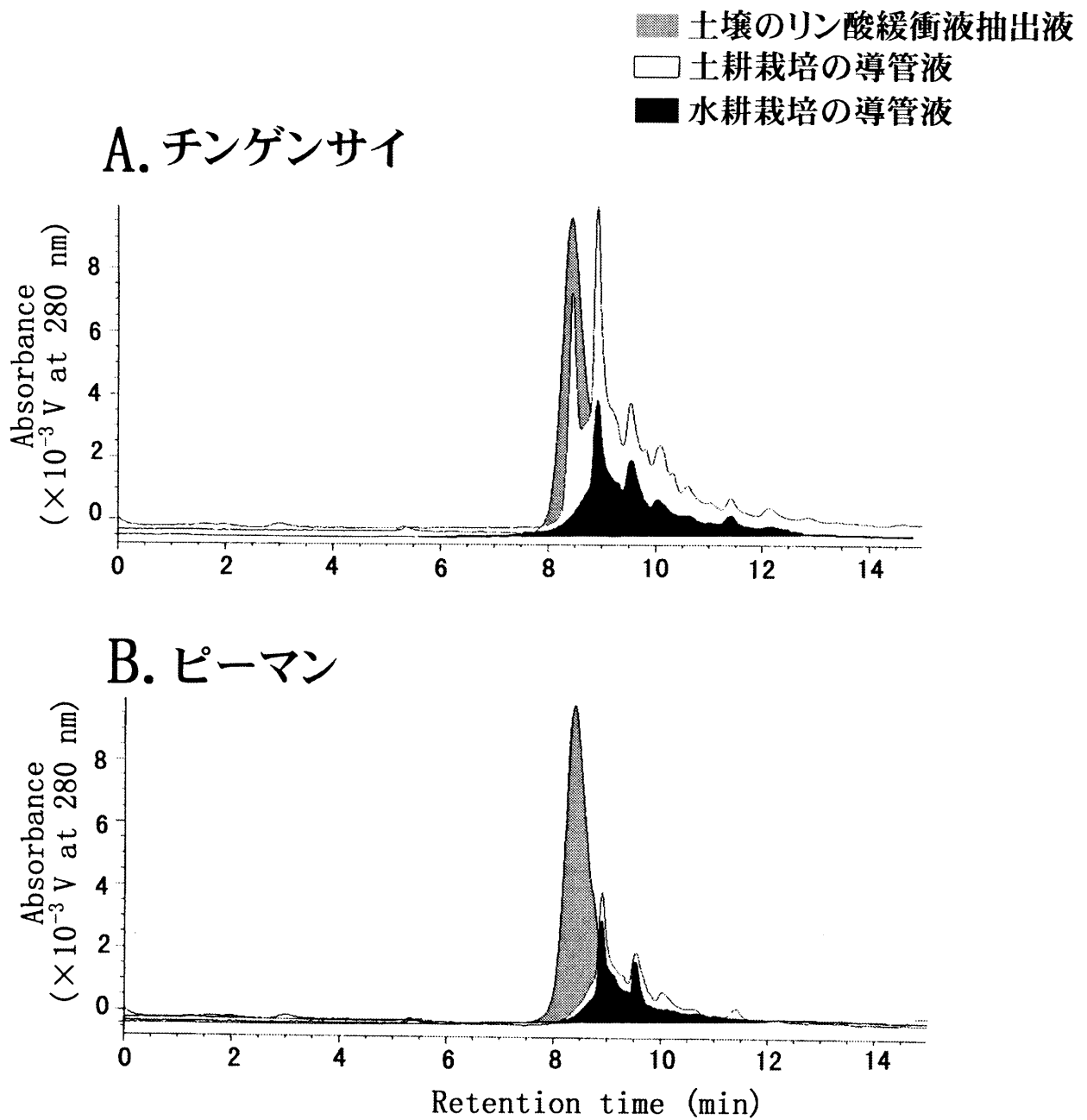
A. サイズ排除HPLC



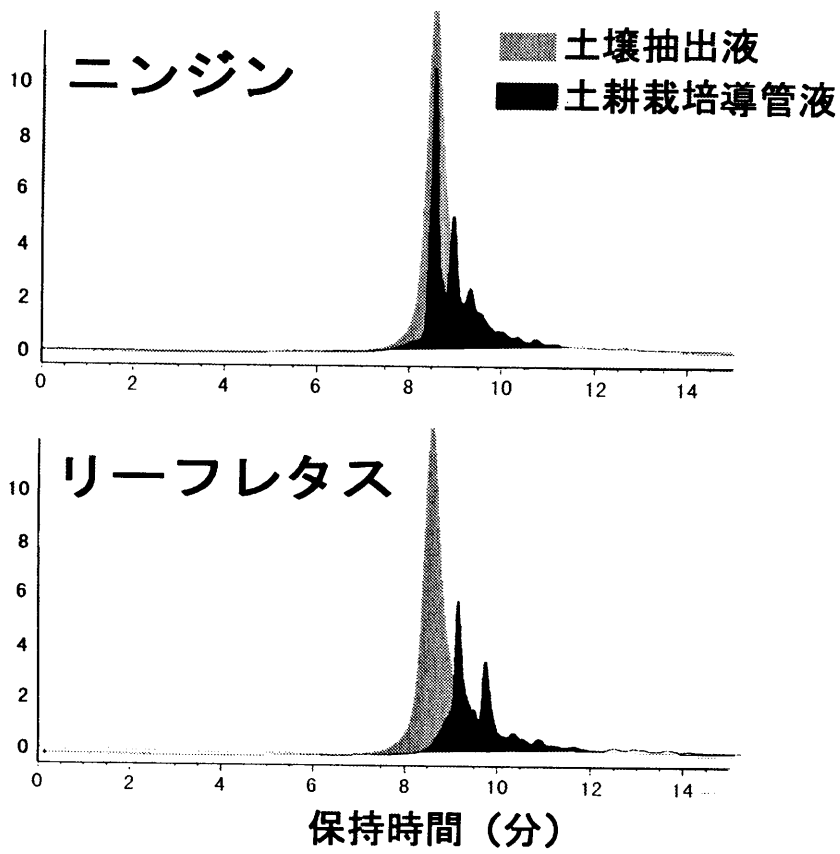
B. イオン交換HPLC



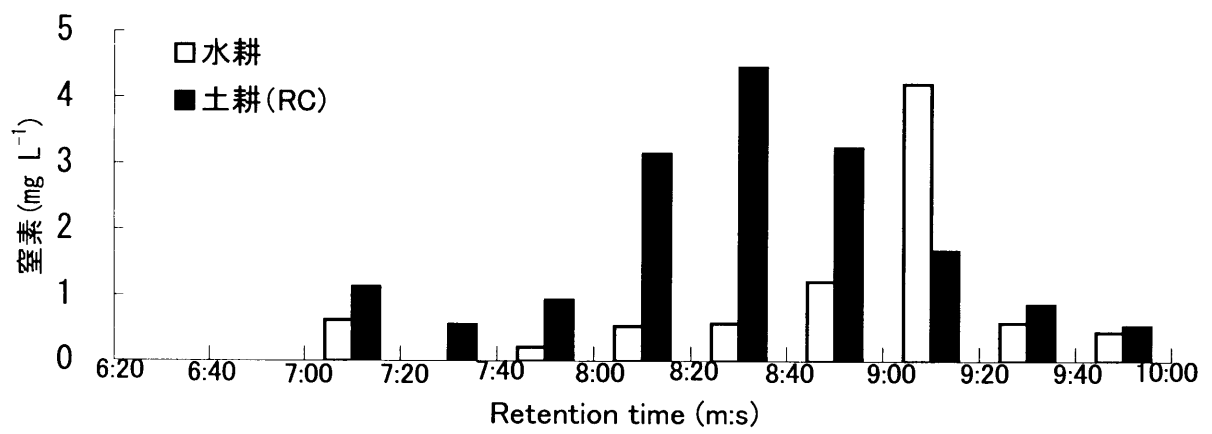
第20図 移植28日後における無作付け土壌のリン酸緩衝液抽出液のHPLCクロマトグラム



第21図 土耕（なたね油かす区）および水耕栽培されたチンゲンサイとピーマンの導管液のサイズ排除HPLCクロマトグラム



第22図 土耕栽培されたニンジンおよびリーフレタスの導管液と土壌のリン酸緩衝液抽出液のサイズ排除HPLCクロマトグラム



第23図 サイズ排除HPLCによって分画されたチンゲンサイ導管液中の窒素分布



第24図 無菌条件下において窒素フリーMS培地に
 土壌有機態窒素を添加して栽培されたチン
 ゲンサイ (A), ニンジン (B) およびピー
 マン(C) の生育

左：抽出液20%添加，中央：抽出液10%添加，右：無添加

第10表 無機態窒素を除いたMS培地に土壤有機態窒素を添加し，無菌条件下で栽培された作物の窒素吸収量

処理	作物		
	ピーマン ($\mu\text{g N flask}^{-1}$)	ニンジン ($\mu\text{g N flask}^{-1}$)	チンゲンサイ ($\mu\text{g N flask}^{-1}$)
無添加	73.8 \pm 1.3	23.0 \pm 0.9	54.0 \pm 0.9
10%添加	69.9 \pm 1.6	69.8 \pm 1.4	86.3 \pm 1.2
20%添加	76.5 \pm 1.4	167.8 \pm 1.8	153.5 \pm 2.3

Mean \pm S.E., n=8

6-4 考察

水耕栽培および土耕栽培（RC区）で採取されたチンゲンサイの導管液中には、サイズ排除 HPLC において比較的 low molecular weight で両者に類似するピーク（8.9, 9.5, 10.1, 10.6, 11.4, 12.2 分）が検出された。これらのピークの高さはいずれも土耕栽培の方が高くなった。植物の導管をペプチドが移動することはすでに報告されており、Cataldら（1988）は、それらの一部が重金属の輸送に関与しているとしている。本試験において水耕栽培および土耕栽培の両方で認められたこれらのピークには窒素が含まれていることから、それらに相当すると考えられる。

一方、RC区から採取されたチンゲンサイの導管液中には土壌の抽出液と同様の保持時間（8.4分）にピークが検出された。この画分は窒素を含んでいることから、タンパク様の窒素化合物であると推定される。しかしながら、この8.4分に検出されたピークは、水耕栽培されたチンゲンサイの導管液中には検出されなかった。そのため、このピークに相当する窒素化合物がチンゲンサイ自身によって代謝された物質ではないことが示唆される。また、この導管液と土壌抽出液を混合した場合、両者のピークはほぼ一致した。ニンジンの導管液中にも土壌抽出液と同じ保持時間にピークが検出された。これに対し、ピーマンの導管液からはいずれの栽培条件においてもこのピークは検出されなかった。すなわち、有機物の施用効果の高かったチンゲンサイ、ニンジンの導管液中にのみ、土壌のタンパク様物質と同様な画分が検出されたことになる。このことは、無機態窒素が低い有機物施用条件下でも化学肥料区と同等以上の窒素を吸収したチンゲンサイとニンジンが、土壌に集積しているタンパク様物質を窒素源として利用する能力がある可能性を示すものと考えられる。

一般に、土壌中の肥料成分は根端から根に供給される。植物における組織間の肥料成分の主要な移動経路は維管束であり、木部と師部で構成されている。木部は主に導管で形成されており、一種のアポプラスチックな空間となり、導管液が根から地上部の組織へと流れている。これらの組織の活性は、根で代謝された有機・無機成分を含む導管液により維持されている（Nooden and Mauk 1987）。Satoh et al. (1992)はカボチャ実生におい

て数種のタンパク質（分子量 75000, 40000, 32000, 19000, 14000）が導管液中を移動することを報告した。これらのタンパク質は水の移動とともに、細胞壁または細胞のアポプラスチックな空間を通過して導管液中に移動する。キュウリにおいても分子量 30000 と推定されるタンパク質が根から導管を通過して葉や芽などの地上部の組織に移動することが Sakuta et al. (1998) によって報告されている。更に、Cleve et al. (1991) はポプラの貯蔵タンパク質（分子量 30000）が休眠打破期間中に導管液中に検出されることから、植物の組織間を移動するのは糖やアミノ酸だけではなく、タンパク質の様な高分子も可能であると報告している。チンゲンサイやニンジンの導管液中に検出された 8.4 分のピークが土壌に蓄積されたタンパク様物質と同じ物質であると結論するには更に詳細な検証が必要であるが、以上の報告からすれば、分子量 8000-9000 と推定されるタンパク様物質が植物によって吸収され、導管中に見いだされることは可能であり、チンゲンサイやニンジンがその能力を有している可能性は高いと推察される。

植物の肥料成分の吸収反応における共生微生物の役割が大きいことはすでに数多く報告されており、代表的な例に AM 菌によるリン酸吸収の助長があげられる。近年、AM 菌が作物の窒素吸収をも促進することが報告されるようになってきた (Chen et al. 1999, Cairney et al. 2000)。有機物の施用効果が高かった作物のうち、ニンジンが AM 菌と共生することは知られているが、チンゲンサイはアブラナ科の植物であり、これまでに AM 菌との共生がみられた事例は報告されていない (Tompson, 1991)。このように、有機物施用による窒素吸収促進の要因として、AM 菌との共生が影響したかどうかは明確ではない。そこで、本試験では無菌培養条件を設定することにより共生微生物の影響を排除し、培地に添加された土壌タンパク様物質に対するチンゲンサイ、ニンジンおよびピーマンの直接的な吸収反応を検証した。これらの条件下では AM 菌との共生は不可能であり、窒素源として添加したタンパク様物質が根圏微生物によって無機化されることもない。

この無菌栽培条件下においても、導管液中に土壌タンパク様物質と同じ保持時間にピークが検出されたチンゲンサイとニンジンの窒素吸収量は土壌タンパク様物質の添加によって増加した。これに対し、導管液中に土壌

タンパク様物質と同様なピークが検出されなかったピーマンでは土壤タンパク様物質を添加しても窒素吸収量は増加しなかった。本試験では基本培地に無機態窒素を添加していないことから、チンゲンサイとニンジンの窒素吸収量の増加は、添加された土壤タンパク質に由来することは明らかである。すなわち、チンゲンサイとニンジンは共生微生物や根圏での無機化によらず、培地から直接タンパク様物質を吸収したことが強く示唆される。また、ピーマンはそのような直接吸収能力を有していないと思われる。以上の結果から、第3章において有機物を施用して栽培した場合に認められた窒素吸収反応の作物間差の主要な要因は、土壤に集積するタンパク様物質を窒素源として吸収する能力の違いにあると考えられる。

土壤タンパク様物質は土壤の有機・無機コロイドに吸着され、鉄やアルミニウムと結合して不溶態となっており、土壤溶液中にはほとんど溶出されない。このため、チンゲンサイやニンジンが土壤タンパク様物質を吸収するためには、まずこれを可溶化する必要がある。本試験においては、まだこの機構を言及するには至っていない。これらの機構に関しては、難溶性の成分を可溶化する際に作物根から分泌されるキレート能を有する有機酸に関連した機構(Chaney et al., 1972, Ae et al. 1990)や、近年 Ae and Otani(1997)よって提唱されている細胞壁による難溶性成分の接触溶解機構などが関与しているのではないかと推察される。

次に、土壤タンパク様物質が根の細胞壁および細胞膜を通過して体内に取り込まれる機構を明らかにする必要がある。タンパク質等の高分子が作物根に取り込まれて吸収される機構については、Nishizawa and Mori(1977, 1980)により明らかにされている。水耕培養液に窒素源としてヘモグロビンを添加してイネを生育させると、根細胞にくびれ(invaginations of the plasmalemma)が多く観察されるようになり、ヘモグロビン分子は細胞膜のこのくびれにとらえられて細胞内に取り込まれ(endocytosis)、これが液胞化するタイプII、あるいは液胞に取り込まれるタイプIの機構で消化される。本研究において推察した土壤タンパク様物質の分子量はヘモグロビンよりはるかに小さいため、このような機構がチンゲンサイやニンジンそのまま当てはまるかは不明であるが、今後この点についても詳細に検討す

る必要がある。

6-5 要約

なたね油かすを施用して栽培されたチンゲンサイおよびニンジンの導管液中には、サイズ排除 HPLC において、土壌タンパク様物質と同様な保持時間にピークが検出された。しかし、水耕栽培されたチンゲンサイの導管液からはこのピークは検出されなかった。すなわち、なたね油かす施用区での導管液から検出されたピークはチンゲンサイやニンジン自身による代謝産物ではないことが示唆された。一方、ピーマンの導管液からはいかなる栽培条件においてもこのピークは検出されなかった。第3章において有機物の施用効果が高いと認められたチンゲンサイとニンジンにのみ導管液中に土壌タンパク様物質と同様なピークが検出された。

また、チンゲンサイおよびニンジンは、無機態窒素を除去した培地で無菌的に栽培したとき、培地に土壌タンパク様物質を添加することにより、窒素吸収量が増加したが、ピーマンでは窒素吸収量の増加は認められなかった。すなわち、チンゲンサイおよびニンジンは培地に添加された土壌タンパク様物質を窒素源として直接吸収する能力に優れていると考えられる。以上の結果から、第3章において有機物を施用して栽培した場合に認められた窒素吸収反応の作物間差の要因は、土壌に集積するタンパク様物質を窒素源として吸収する能力の違いにあることが示唆された (Matsumoto et al. 2000c)。

第7章 総合考察

7-1 本研究の目的

土壌を一定温度で培養して無機化される窒素量（インキュベーション法による可給態窒素）は作物の窒素吸収量と相関が高く、有機物を施用した栽培条件においても、その無機化特性が中心に研究されてきた。しかしながら、1993年から1998年にかけて行われた農林水産省の環境保全型栽培基準設定調査事業における各県の報告データの中には、有機物を施用して栽培されたバレイショ、ビート、ニンジン、トウモロコシ、ハウレンソウ、モモなどの窒素吸収量が栽培期間中に土壌から生成される無機態窒素量を上回る事例が認められる。これらの事例は、有機物を施用して栽培したとき、その窒素吸収反応が必ずしも土壌中の無機態窒素量を反映しない場合があることを示唆するものと考えられる。そのため、有機物を施用した栽培における作物の窒素吸収反応を解析するためには、窒素の無機化特性だけでなく、土壌中での有機態窒素の存在状態について多面的な解析および有機態窒素に対する作物の作用を明らかにする必要があるとみて本研究に着手した。

7-2 本研究の結果

有機質肥料としてなたね油かすおよび大豆油かすを施用してハウレンソウを露地栽培し、化学肥料を減肥した場合および緩効性肥料を施用した場合とその窒素吸収量を比較した。化学肥料の減肥によって土壌中の無機態窒素量は低下し、これに対応してハウレンソウの窒素吸収量は低下した。しかし、有機質肥料を施用した場合には、土壌中の無機態窒素量が化学肥料区や緩効性肥料区よりも低く推移したにもかかわらず同等の窒素を吸収し、体内に蓄積される硝酸含量は40%程度低下した。この結果は、作物は有機物から無機化されて生じた無機態窒素のみを吸収するという従来からの前提に疑問を抱かざるを得ない現象であった。そこで、ハウレンソウと同様の窒素吸収反応を示す作物を検索するために9種類の野菜をポットで栽培した結果、ピーマンおよびリーフレタスは土壌中の無機態窒素の存在

量を明瞭に反映する窒素吸収反応を示したが、チンゲンサイおよびニンジン
は土壌中の無機態窒素が低くなる有機物施用条件下でも化学肥料区と同
等以上の窒素吸収反応を示すことを認めた。すなわち、有機物施用条件
下の作物の窒素吸収反応には作物間差が認められ、チンゲンサイ、ニン
ジンおよびハウレンソウは有機物施用によって土壌中に増加する有機
態窒素を利用している可能性が示唆された。

土壌中の有機態窒素のうち、遊離のアミノ酸量は極めて低く、その中心
はタンパク様の物質であると考えられる。そのため、中性リン酸緩衝液
によって抽出されるタンパク様物質についてサイズ排除 HPLC および
SDS-PAGE による分析を行ったところ、それが分子量 8000-9000 程度
の極めて均一なタンパク様物質であることが明らかになった。また、土
壌に有機物を施用した場合、その種類に関わらず、施用された有機態
窒素は培養 14-21 日までに分子量 8000-9000 のタンパク様物質に収
れんされることを認めた。この現象は、培養初期に、施用有機物の種
類によって異なっていたリン酸緩衝液抽出物のアミノ酸組成が、培
養の経過とともにほぼ同じ組成になることから裏付けられた。さら
に、有機物と同時にクロラムフェニコール（抗細菌剤）を添加して
培養した場合にこの現象が抑制されることから、土壌に集積する有
機態窒素は細菌により誘導され、その菌遺体由来すると推察された。

なたな油かすを施用して栽培したチンゲンサイとニンジンの導管液中
には土壌タンパク様物質と類似する画分が検出された。この画分は水
耕栽培されたチンゲンサイや有機物施用による効果が認められなかつ
たピーマンの導管液中には検出されないことから、チンゲンサイやニ
ンジンが土壌に集積するタンパク様物質を吸収していると考えられた。
また、無菌条件において、無機態窒素を含まない培地にこの土壌タン
パク様物質を添加して栽培した場合でもチンゲンサイとニンジンの窒
素吸収量が増加したことから、これらの窒素吸収反応は、菌根菌との
共生や根圏微生物による無機化を介して行われるのではなく、チン
ゲンサイやニンジンが土壌タンパク様物質を直接吸収する能力を有
していることによると考えられた。また、この能力の有無が、有機物
を施用して栽培した場合に認められた窒素吸収反

応の作物間差の主要な要因であることが示唆された。

7-3 ホウレンソウの窒素吸収反応における化学肥料の減肥と有機質肥料の施用の比較

野菜は糖，ビタミン，ミネラルの摂取源として欠かすことのできない食材ではあるが，葉菜類では，過剰な施肥による硝酸の蓄積が問題となっている。野菜に含まれる硝酸は人体に摂取された場合，一部は亜硝酸に還元され，これと肉類の消化過程で生じたアミン類が反応し，消化器官内において，微量で発ガン性のあるニトロソアミンが生成されると指摘されている（米山 1982）。また，欧米では高濃度の硝酸を含む葉菜類の摂取と私設水道水の飲用が原因で生後3ヶ月未満の乳児にブルーベビー症の発生が報告されている（Deeb and Sloan 1975）。このため，好ましい野菜の成分品質としては，できるだけ硝酸を低減させ，ビタミンや糖などを増加させることが求められている。本研究において，アスコルビン酸の含量には処理間に差が認められなかったが，化学肥料の減肥を行った場合，ホウレンソウ中の硝酸含量は減肥率が高くなるに従って低下し，成分品質が改善された。葉菜類における硝酸還元は主として葉で行われ，硝酸還元活性の能力以上に硝酸が供給された場合には他の器官，特に茎および葉柄に残留されるという（米山・建部 1992）。本試験において，採取された土壌の培養後の無機態窒素量は，化学肥料の施用量に対応したものであったことから，減肥によるホウレンソウ中の硝酸含量の低下は，土壌中の無機態窒素量の減少により窒素吸収量が低下したことに起因するものと考えられた。一方，有機質肥料を施用した場合にも減肥した場合と同様に土壌中の無機態窒素量は慣行区よりも低く推移し，ホウレンソウ中の硝酸含量は低下した。しかしこの場合，減肥した場合とは異なり，窒素吸収量は慣行区と同等以上であった。すなわち，有機質肥料の施用によってホウレンソウ中の硝酸含量が低下し，成分品質が向上したことは，単に窒素吸収量の低下に起因するものではなく，有機質肥料の施用によって土壌中に増加する有機態窒素がホウレンソウの窒素吸収反応に影響を及ぼしていると考えられる。

7-4 有機物施用条件下での窒素吸収反応の作物間比較

ハウレンソウを露地栽培した場合、有機質肥料と化学肥料では、その窒素吸収反応に差異を認めたことから、このような窒素吸収反応を示す作物が他にもあるのではないかと考え、9種類の作物について比較を行った。

一般に、作物の窒素吸収反応において、その根圏の違いは重要な要素となる。ほ場での有機物の混合深はせいぜい15cmにとどまると考えられる。根域の浅い作物では深い作物に比べて全根域に占める有機物の割合が大きいため、窒素吸収量に差が表れるかもしれない。そこで、ポット試験により、各作物の根域の大きさを等しくして3種類の有機物の施用試験を行った。

最初実験に用いた稲わら米ぬか混合物（RBS）はC/N比が18.9であり、油かすなどよりも分解が遅いという特徴がある（山縣ら、1996）。このように分解しにくい有機物を有機態窒素とした方が無窒素あるいは無機態窒素を施用した場合に比べて窒素量や窒素の無機化の様相を異にし、作物の生育初期には無機態窒素が不足した状態となり、無機態窒素が容易に吸収できる状態にあるときよりも、作物の窒素吸収能力の差が明確になるのではないかと考えた。このため、栽培期間中のRBS区の無作付け土壤中の無機態窒素は有機化による取り込みもあったため無施用区よりも低くなった。このような条件の中で、供試した9種類の作物の窒素吸収反応には作物の種類により違いが認められた。ピーマンおよびリーフレタスの窒素吸収量は土壤中の無機態窒素量の多かった無施用区で高く、RBS施用区で低かった。これに対し、チンゲンサイ、ニンジンおよびハウレンソウでは土壤中の無機態窒素量が低く推移したRBS区の窒素吸収量が無施用区を上回った。有機物施用に対して相反する窒素吸収反応を示した5種類の作物について、無機態窒素が十分にある条件における反応を見るために乾燥牛ふんおよびなたね油かすを施用してポット試験を行った。乾燥牛ふんは、そのC/N比が10とRBSよりも低かったが、土壤中の無機態窒素は無施用区よりも低くなった。土壤に施用された有機物の分解は、含まれる粗繊維、粗脂肪などの影響を受ける（樋口・栗原1978）ためにC/N比だけに左右されない。本試験における条件では有機化による取り込みが強かったためであろう。こ

の場合においても、RBS を施用した試験と同様に、ピーマンとリーフレタスの窒素吸収量は無施用区の方が多く、チンゲンサイ、ニンジンおよびホウレンソウでは乾燥牛ふん区の方が多かった。また、硫安施用区となたね油かす施用区を比較した場合でも、チンゲンサイ、ニンジンおよびホウレンソウの窒素吸収量は土壌中の無機態窒素が低く推移したなたね油かす区の方が多かった。

有機物を施用した区においては、無施用区や硫安施用区に比べてアンモニア態窒素の比率が高くなった。これまでに、作物の窒素吸収反応において、硝酸を好む作物とアンモニアを好む作物があることが認められている (Ikeda et al. 1983, Moritsugu et al. 1995)。チンゲンサイ、ニンジンおよびホウレンソウが硝酸よりもアンモニアを好んで吸収するのであれば、アンモニア態窒素の比率が高かった有機物施用区で窒素吸収量が増加したと考えることができるかもしれない。しかしながら、アンモニア態窒素の量は有機物施用区と無施用区および硫安施用区ではほぼ同等かもしくは有機物施用区が低い場合もあった。アンモニアまで無機化された窒素は速やかに硝化されたことがうかがえる。すなわち、各処理区の土壌から、アンモニアは等しく供給されていたと考えられるため、無機態窒素の存在量やその形態によってチンゲンサイ、ニンジンおよびホウレンソウの有機物施用区における窒素吸収反応は十分に説明できないと思われた。

有機物を施用した場合、土壌中の無機態窒素は硫安を施用した場合よりも低くなったが、有機態窒素は明らかに増加した。ニンジンやチンゲンサイおよびホウレンソウが無機態窒素が低い条件でより多くの窒素を吸収した場合には、その窒素源として、無機態以外の窒素、すなわち、有機態窒素を考える必要がある。そのため、チンゲンサイ、ニンジンおよびホウレンソウの窒素吸収反応を解析するためには土壌中の有機態窒素の動態を明らかにすることが不可欠であると考えた。

7-5 土壌有機態窒素の実態とその起源

土壌有機態窒素のうち年間作物に利用される窒素は1～5%といわれており、極めて難分解性である。しかし、土壌に乾燥、加熱、温度上昇、

機械的破碎，くん煙などの処理を施すと，難分解性の有機物の一部が無機化されやすくなることが知られている．このように，土壤に前処理することによってその無機化が促進される窒素は総称して易分解性有機態窒素と呼ばれ，可給態窒素の本体と見なされている．易分解性有機態窒素のうち，遊離アミノ酸の含量はきわめて少ないことが知られている．アミノ酸は土壤微生物による分解を受けやすく，遊離状態で土壤に多量に集積することはない．Nemeth(1988)らによれば，易分解性有機態窒素のうち，遊離アミノ酸はわずか3%にすぎず，ほとんどのアミノ酸が加水分解により検出される．このため，易分解性有機態窒素の主体はタンパク様の物質と考えられている．土壤のタンパク様物質の量を推定することは土壤の肥沃度を知る指標となるため，様々な抽出法が検討されてきたが，樋口（1981）により提案された中性リン酸緩衝液による抽出法が培養法による無機化窒素量との相関が高く，広く普及している．そのため本研究においては，中性リン酸緩衝液によって抽出されるタンパク様物質について解析を行った．

土壤のリン酸緩衝液抽出物のサイズ排除 HPLC クロマトグラムには土壤の種類に関わらず分子量 8000～9000 と推定されるピークのみが検出された．また，同様にイオン交換 HPLC においてもピークは1本しか検出されなかった．そして，この単一なピークの面積はそれぞれ土壤のリン酸緩衝液抽出物中のタンパク質濃度と極めて相関が高く，またゲルろ過クロマトグラフィーによる画分のタンパク質分布がサイズ排除 HPLC クロマトグラムと同様な形状を示したことから，リン酸緩衝液によって抽出される有機態窒素は極めて均一なタンパク様物質であると推察された．これらの結果は同有機態窒素のアミノ酸組成が土壤の種類に関わらず一定の組成を示すというこれまでの報告と一致する（樋口 1982）．中性リン酸緩衝液で抽出される有機態窒素は土壤有機態窒素と有機化窒素とに分けて考えられるが，両者のアミノ酸組成，炭素率，無機化特性などがきわめて類似していることが明らかにされている．それゆえ，土壤有機態窒素と有機化窒素はほぼ同一の物質であると推測されており，その起源は微生物の菌体に由来するタンパク質であると考えられている（樋口 1981）．丸本ら（1974）によれば，微生物菌体の細胞壁部分と易分解性有機態窒素のアミノ酸組成が一致

することから、易分解性有機態窒素の集積には菌体の細胞壁の寄与が大きいとしている。ただし、菌体の C/N 比が 4.0~6.1 の範囲にあるのに対し、同有機態窒素は 10 前後であることから、純粋なタンパク質ではなく、腐植物質やアミノ糖等の比較的炭素率の高い窒素化合物と結合した状態で糖タンパク質として存在しているのではないかと推論している。そして、Hayashi and Harada (1969)によれば、菌体由来のタンパク様物質は微生物の分解の影響を比較的受けにくい状態で土壌の有機無機コロイドに吸着されているとしている。

土壌の抽出液として希硫酸を用いた場合、リン酸緩衝液と同様に分子量 8000~9000 のタンパク様物質が抽出されるが、硫酸の濃度が増す (0.1~0.4M) につれて抽出量は増加する (松本ら 2000)。また、これにともない抽出液中の鉄やアルミニウムが著しく増加する (第 11 表) ことから、このタンパク様物質が土壌コロイドの鉄やアルミニウムと結合して不溶態となっていると考えられる。

重合度の高い腐植酸などはリン酸緩衝液によって抽出されないが、重合度の低い腐植物質は容易に抽出されることが知られており、それらの物質は紫外領域に吸光反応を示す (本田 1980)。本研究の HPLC 分析は UV280nm を検出器として用いたが、タンパク様物質や腐植物質など紫外部に吸光反応を示す物質が抽出されていると考えられるにもかかわらず、いずれも検出されたピークは 1 本であった。このことから、樋口や丸本が指摘したように、無機化窒素の給源となる易分解性の有機態窒素は重合度の低い腐植物質、アミノ糖などがタンパク質が結合したきわめて均一な窒素化合物であり、その起源は微生物の菌遺体に由来するものと考えられる。本研究において種々の有機物を土壌に添加して培養した場合でも、培養初期には添加有機物の種類によって異なっていたリン酸緩衝液抽出物のアミノ酸組成が比較的短期間 (14~21 日) の間に土壌固有のアミノ酸組成に近似するようになった。また、アミノ酸組成が変化するのにあわせて有機物由来のタンパク質が消失し、分子量 8000~9000 の土壌固有のタンパク様物質に収れんすることがサイズ排除 HPLC および SDS-PAGE によって確認された。これらの結果は土壌の易分解性有機態窒素の生成に対する微生物代謝の影響

第11表 種々の抽出液によって抽出したときにサイズ排除HPLCに検出される土壌タンパク様物質のピーク面積と金属イオン濃度

土壌	抽出液	タンパク様物質 (Volt-sec)	Na	K	Mg	Ca	Mn	Fe	Al
水田	リン酸緩衝液	2.07	-	-	-	-	-	-	-
	H ₂ O	0.00	0.15	0.07	0.04	0.13	0.00	0.00	0.05
	1M-酢酸アンモニウム	0.05	0.45	0.66	3.24	12.63	0.18	0.02	0.23
	0.001M-硫酸	0.00	0.20	0.06	0.21	0.62	0.02	0.00	0.00
	0.01M-硫酸	0.00	0.24	0.19	1.37	5.17	0.25	0.00	0.24
	0.1M-硫酸	0.87	0.57	0.24	2.56	9.74	1.19	6.77	15.06
	0.2M-硫酸	1.59	0.46	0.44	3.07	10.31	1.55	14.33	22.97
	0.3M-硫酸	1.90	0.49	0.55	3.40	10.78	1.72	17.78	26.69
	0.4M-硫酸	1.90	0.44	0.43	3.58	10.82	1.82	20.13	27.05
畑	リン酸緩衝液	2.40	-	-	-	-	-	-	-
	H ₂ O	0.00	0.19	0.14	0.04	0.47	0.00	0.00	0.05
	1M-酢酸アンモニウム	0.25	0.29	1.17	0.36	5.56	0.03	0.00	0.28
	0.001M-硫酸	0.00	0.07	0.13	0.07	0.80	0.01	0.00	0.04
	0.01M-硫酸	0.02	0.12	0.29	0.19	2.98	0.04	0.00	1.37
	0.1M-硫酸	1.53	0.02	0.41	0.34	5.32	0.32	0.12	49.12
	0.2M-硫酸	3.36	0.15	0.55	0.31	5.48	0.80	1.07	110.48
	0.3M-硫酸	4.87	0.23	0.83	0.44	5.85	1.33	7.11	155.47
	0.4M-硫酸	5.11	0.48	0.83	0.65	5.60	1.67	17.87	176.53

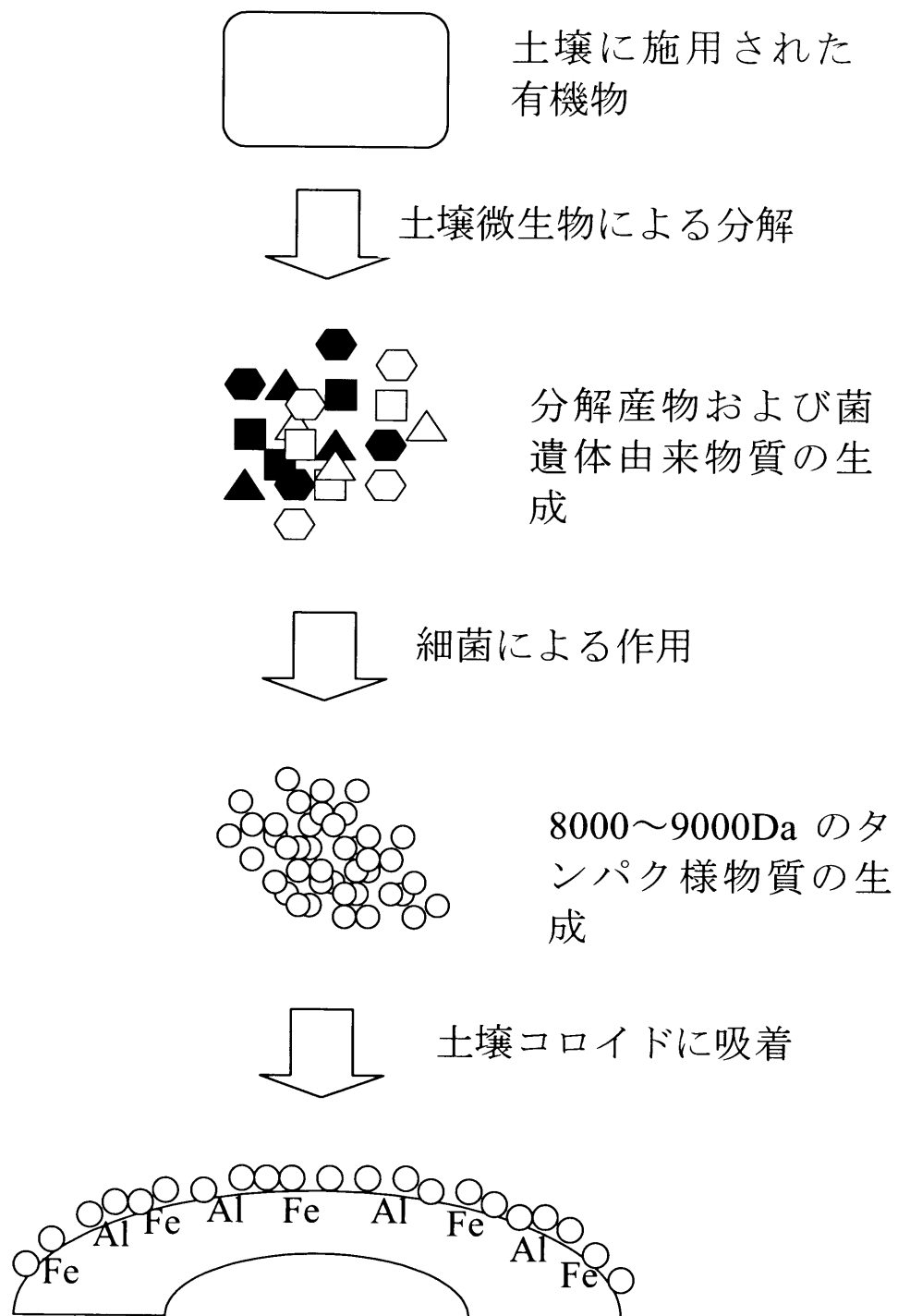
を物質的な動態としてとらえたものと考えられる。さらに、抗細菌剤によって土壌固有のタンパク様物質の集積が抑制されることから、リン酸緩衝液によって抽出される有機態窒素の形成には細菌の役割がきわめて大きいことが示唆された。

以上の結果と既知の知見から土壌の可給態窒素の給源と考えられるリン酸緩衝液抽出有機態窒素の本質について以下に総括すると、土壌に易分解性の有機物が供給された場合、それらが分解されていく過程でそのアミノ化合物の組成は土壌微生物による新たなアミノ酸およびアミノ糖の合成を通して組み換えられ、最終的には細菌の働きにより、分子量 8000~9000 程度の比較的均一なタンパク様物質が生成され、土壌の有機無機コロイドに吸着されて土壌中に集積すると考えられる。また、このタンパク様物質は土壌コロイドの鉄やアルミニウムと結合して比較的難分解性となり、無機化窒素の給源として存在しているものと考えられる（第 25 図）。

7-6 チンゲンサイおよびニンジンによる土壌有機態窒素の吸収

化学肥料区に比べて土壌中の無機態窒素含量が低い有機物施用区でも化学肥料区と同等以上の窒素吸収量を示したチンゲンサイやニンジンに、土壌中の有機態窒素を利用する能力があると考えられるならば、第 4 章において考察した分子量 8000-9000 のタンパク様物質を吸収窒素源にしていると推察される。これは、土壌中には遊離のアミノ酸はきわめて少なく、腐植などの高度に重合された難分解性の窒素化合物を除けば、分子量 8000-9000 のタンパク様物質が有機態窒素の主要な貯蔵形態と考えられるからである。そのため、有機物施用に対して相反する窒素吸収反応を示したチンゲンサイおよびニンジンとピーマンの導管液を採取してサイズ排除 HPLC により比較した。

なたね油かす区で生育したチンゲンサイおよびニンジンの導管液中には、有機物施用効果の低かったピーマンには認められないピークが検出された。このピークの保持時間は土壌タンパク様物質のそれとほぼ一致するものであった。無機塩類のみで水耕栽培されたチンゲンサイの導管液中にはこの



第 25 図 土壌に施用された有機物が土壌固有の有機態窒素に収れんされるまでの模式図

ピークが検出されないことから、なたね油かす区のチンゲンサイおよびニンジンの導管液中に検出された土壤タンパク様物質と類似するピークは、これらの作物自身により代謝されたものではなく、チンゲンサイやニンジンが土壤から吸収したものであることが示唆される。作物の組織間を導管液を通過して数万以上の分子量のタンパク質が移動することは可能であることが見いだされており (Cleve et al. 1991, Satoh et al. 1992, Sakuta et al. 1998), チンゲンサイやニンジンが土壤タンパク質を吸収する能力を有しているとするれば、分子量 8000-9000 程度のタンパク質が導管液中に見いだされるとしても不思議ではない。ただし、その濃度は土壤中の濃度に比べてかなり低く、吸収されたタンパク様物質がすべてそのまま導管液中に送られるとは考えにくい。その多くが根で代謝されているのではないかと推察されるが、本研究においては不明であり、更に詳細な検討が必要となる。いずれにしても、有機物施用効果の高かったチンゲンサイおよびニンジンの導管液中に土壤タンパク様物質と類似するピーク検出されたのに対し、有機物施用効果の認められないピーマンにはそれが検出されなかったことは、チンゲンサイおよびニンジンが土壤タンパク様物質を吸収して窒素源としていることの論拠になるものと考えられる。

一方、有機態窒素に対する窒素の吸収特性が作物により異なるならば、作物根圏土壤における有機物の分解(根圏効果)活性の違いが考えられる。この活性の違いがあれば窒素吸収量にも作物間差が表れるものとも考えられる。そこで、チンゲンサイとニンジンの有機物に対する窒素吸収反応が根圏効果に依存している可能性を無菌培地に土壤タンパク様物質を添加してその生育を見る方法により検証した。土壤タンパク様物質の添加によってチンゲンサイとニンジンの窒素吸収量は増加した。培地には無機態窒素を除いた MS 培地を用いたので、窒素源はタンパク様物質しかないことから、チンゲンサイとニンジンは添加された土壤タンパク質を吸収したものと考えられる。また、無菌的な条件であったことから、これらの窒素吸収反応が微生物による根圏効果によるものではなく、チンゲンサイとニンジンが直接この土壤タンパク様物質を吸収する能力を有していることが明らかとなった。これに対し、有機物施用効果のなかったピーマンでは土壤タンパ

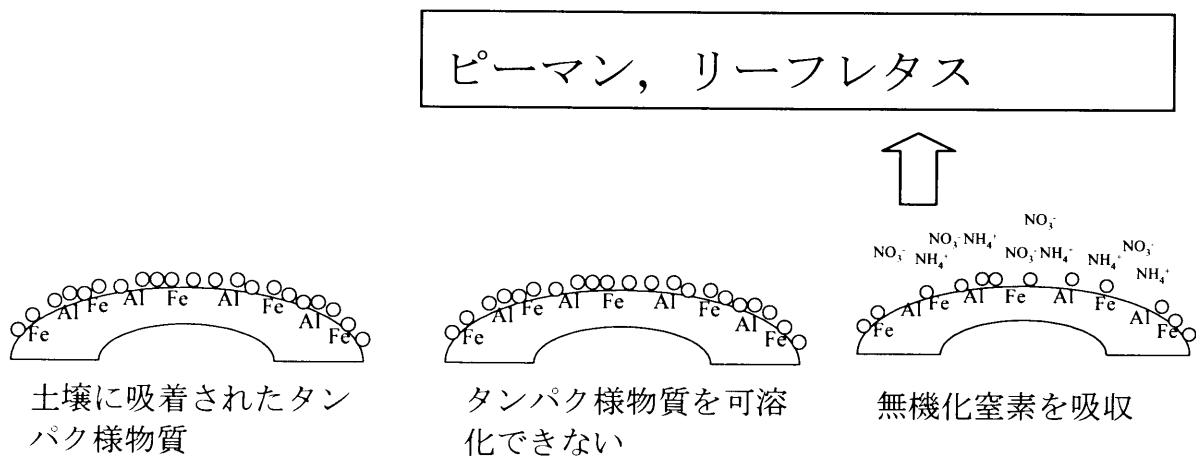
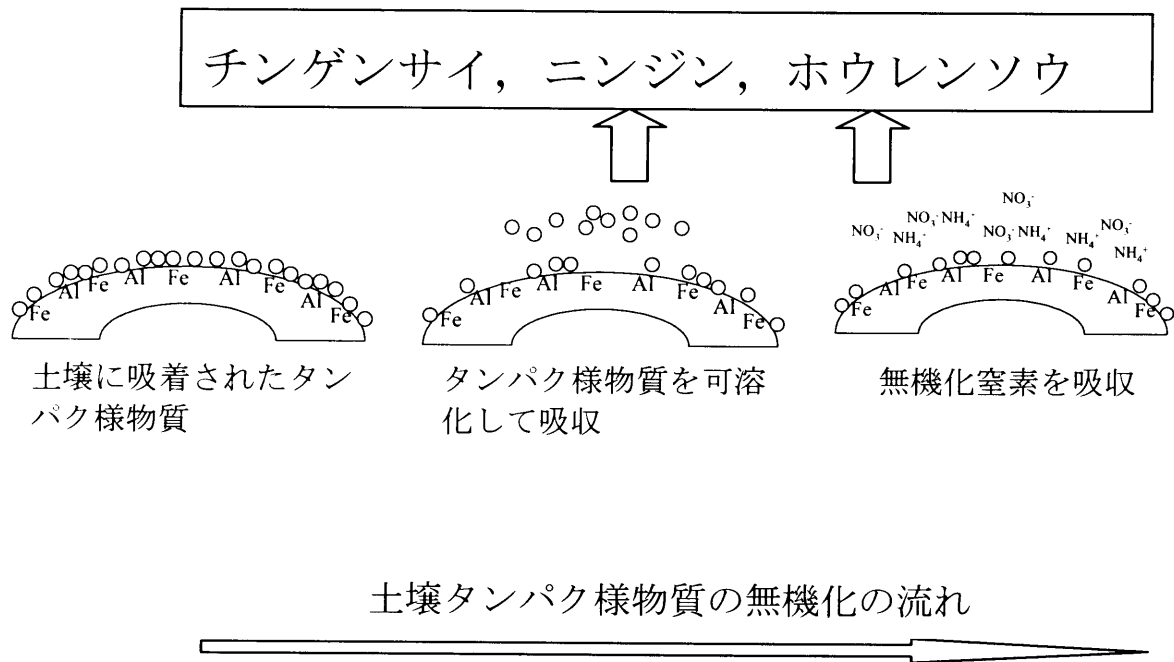
ク様物質を添加しても窒素吸収量の増加は認められなかった。すなわち、第3章において有機物を施用して栽培した場合に認められた窒素吸収反応の作物間差の要因は、土壌に集積するタンパク様物質を窒素源として吸収する能力の違いにあると考えられた（第26図）。

7-7 有機態窒素の吸収反応の高い作物を利用した農業生産

本研究は、全国の農業試験場で行われてきた有機物を施用した栽培試験の報告書の中に、土壌中の無機態窒素の存在量だけからその収量および窒素吸収量を説明することに疑問を抱かざるを得ない事例を見いだしたことを端緒として行われた。そして、その主要な要因が、有機態窒素に対する作物間の反応の違いに起因し、とりわけチンゲンサイ、ニンジン、ホウレンソウのように有機態窒素を吸収利用する能力を有する作物が存在することを認めた。

肥料成分に由来する河川・湖沼の汚染が指摘される現状において、窒素の溶脱を防ぎつつ、耕地をめぐる有機物の循環を高めていくためには、このような作物の養分吸収機構をふまえて、施用養分の吸収効率を高めていくことが求められる。その好例が、インドにおいて伝統的に行われている輪作の中に見いだされる。キマメとヒヨコマメは他の作物が利用できないようなきわめて難溶性の鉄型およびアルミ型リン酸を吸収する機構を有しており（Ae et al. 1990）、この二つの作物が引き起こす土壌の変化が、後作物の生産性の向上に大きく役立っていることが明らかにされた（Arihara et al. 1991）。これらの研究は、作物の養分吸収機構が一樣ではなく、作物個々の養分獲得戦略の違いを利用して、畑地の養分循環を高める技術としたことに大きな意義がある。これまで窒素においては作物に吸収される形態が無機態に限られるという前提があり、作物の窒素吸収機構には大きな差がないと考えられてきたため、作物の土壌への適応性、作付け体系、有機物施用効果などが軽視されてきた面がある。化学肥料の施用量を抑え、有機物投入量が増すという今後の農業には、本研究において示された作物の窒素吸収戦略の違いを理解したうえで作物を組み合わせた作付け体系を

構築していく必要があると思われる。



第 26 図 有機物施用土壌における窒素の動態と作物による窒素吸収反応の模式図

謝辞

本研究は、農業環境技術研究所土壌生化学研究室長阿江教治博士に端緒を与えられたものであり、終始、助言、討論、激励を頂いた。また、本研究の遂行にあたって、北海道農業試験場畑作研究センター生産技術チーム長山縣真人博士、農林水産省研究調査官大谷卓博士、農業研究センター豆類栽培生理研究室長有原文二博士、国際農林水産業研究センター主任研究官岡田謙介博士、片倉チッカリン株式会社筑波総合研究所副所長野口勝憲博士に討論していただいた。農業環境技術研究所 Dr. Matias Wissuwa, 株式会社地域科学研究所 Dr. Ancha Srinivasan には格別のご指導を頂いた。太田勝巳島根大学教授には適切な助言と激励を頂いた。

島根県農業試験場長常松定信氏、同次長門脇義行博士、同環境部長古山光夫氏、同土壌環境科長伊藤淳次氏には研究遂行に対して多大な尽力を頂いた。また、圃場およびポット試験では土壌環境科諸氏に協力いただいた。生物工学科春木和久博士、松本敏一博士には実験上の貴重な助言を頂いた。

本研究のとりまとめにあたって、森敏東京大学教授には終始、懇切なるご指導、ご助言を賜り、本稿のご校閲を賜った。ここに記して厚くお礼を申し上げる次第である。

引用文献

- 阿江教治, 小林達治, 高橋英一, 葛西善三郎 (1977): 土壤中のペクチン分解活性について, 連作障害の土壤微生物学的研究 (第3報), 土肥誌, 48, 502-506
- 上野正夫, 佐藤之信, 熊谷勝己, 大竹俊博 (1990): 速度論的解析法による土壤窒素発現予測システム, 土肥誌, 61, 273-281
- 大山卓爾 (1990): ケルダール法, 植物栄養実験法, 植物栄養実験法編集委員会編, p. 190-191 博友社, 東京
- 石塚潤爾 (1985): タンパク質, 核酸の抽出と定量法, 作物生理実験法, p. 313-314, 農業技術協会, 東京
- 小川吉夫, 加藤弘道, 石川 実 (1988): リン酸緩衝液抽出による可給態窒素の簡易測定法, 土肥誌, 60, 160-163
- 荻内謙吾, 中島直子, 阿江教治, 松本真悟 (2000): リン酸緩衝液抽出物に含まれる有機態窒素のアミノ酸組成, 土肥誌, 71, 385-387
- 齊藤雅典 (1988): 土壤可給態窒素量の紫外部吸光度法による評価, 土肥誌, 59, 493-495
- 佐藤 剛 (1992): 中性リン酸緩衝液抽出窒素量の色素結合法による簡易推定法, 平成4年度関東東海農業研究成果情報, 101-102 (1992)
- 島根県農林水産部 (1989): 土壤肥料対策指導指針, p. 46
- 杉原 進, 金野隆光, 石井和夫 (1986): 土壤中における窒素無機化の反応速度論的解析法, 農環研報, 127-166
- 建部雅子, 佐藤信仁, 石井かおる, 米山忠克 (1996): 緩効性肥料の施用がハウレンソウのシュウ酸, アスコルビン酸, 糖, 硝酸含有率に与える影響, 土肥誌, 67, 147-154
- 伊達昇, 米山徳造, 都田紘志, 加藤哲朗 (1980): 野菜の硝酸根蓄積に及ぼす肥培管理の影響, 東京都農業試験場研究報告, 13, 3-13
- 地力問題研究会編 (1985): 地力増進法解説, 54-86, 地球社, 東京
- 新田恒雄 (1986): 有機物施用による根圏微生物の制御, 有機物研究の新しい展望, 日本土壤肥料学会編, 43-84, 博友社, 東京
- 農林水産省農産園芸局 (1999): 環境保全型栽培基準設定調査事業成果概要

集，畑作・その他編

- 早野恒一（1983）：施設栽培土壌の酵素活性，農業技術研究所報告，B第35号，199-215
- 早野恒一（1992）：土壌酵素活性の測定，土壌微生物実験法，土壌微生物研究会編，p.371-372，養賢堂，東京
- 樋口太重（1981）：緩衝液による有機化窒素および土壌有機態窒素の抽出特性，土肥誌，52，481-489
- 樋口太重（1982）：緩衝液で抽出される有機窒素化合物について，土肥誌，53，1-5
- 樋口太重（1983）：土壌中における施用窒素の有機化と再無機化，農技研報B，34，1-81
- 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1報），各種有機物が硫酸窒素の有機化に及ぼす影響，土肥誌，49，58-64
- 藤井弘志，安藤 豊，佐藤之信，中西政則（1990）：速度論的解析法によって得られた可分解性有機態窒素量の簡易推定法，土肥誌，61，92-93
- 本田親史（1980）：酸により抽出される土壌有機物部分の性質（第1報），土肥誌，51，183-192
- 松本真悟，阿江教治，山縣真人（1999）：有機質肥料の施用がハウレンソウの生育および硝酸，シュウ酸，アスコルビン酸に及ぼす影響，土肥誌，70，31-38
- 松本真悟，阿江教治，山縣真人（2000）：中性リン酸緩衝液および希硫酸抽出による土壌の可給態窒素の推定と抽出される有機態窒素の特性，土肥誌，71，86-89
- 丸本卓哉，古川謙介，吉田 堯，原田登五郎（1974）：土壌の易分解性有機物に対する微生物体およびその細胞壁の寄与について（第1報），土肥誌，45，23-28
- 三木和夫，出井嘉光（1965）：畑土壌の窒素供給力に関する研究，第1報畑土壌の可給態窒素の測定法の検討，東海近畿農試報，14，55-67
- 目黒孝司，吉田企世子，山田次良，下野勝昭（1991）：夏どりハウレンソウ

の内部品質指標，土肥誌，62，435－438

森 敏 (1979 a) : 有機態窒素と無機態窒素の共存条件下での植物の窒素吸収能について (第1報) 前処理窒素条件が本処理窒素の吸収に及ぼす影響，土肥誌，50，40－48

森 敏 (1979 b) : 有機態窒素と無機態窒素の共存条件下での植物の窒素吸収能について (第2報) [U-¹⁴C]グルタミン，[2,3-³H]アルギニンおよび ¹⁵N-N03 の共存培地からいずれを優先的に吸収するか，土肥誌，50，49-54

森 敏 (1986) : リボ核酸の裸麦の生育に対する顕著な肥効，土肥誌，57，171-178

山縣真人，阿江教治，大谷卓 (1996) : 作物の生育反応に及ぼす有機態窒素の効果，土肥誌，67，345－353

山縣真人，中川建也，阿江教治 (1997a) : ¹⁵N 利用による米ぬか窒素吸収の作物間比較，土肥誌，68，291－294

山縣真人，阿江教治，大谷卓 (1997b) : 根圏土壤のプロテアーゼ活性の作物間比較，土肥誌，68，295－300

山室成一 (1988) : 水田における窒素の動態に関する ¹⁵N トレーサー法の理論的展開，土肥誌，59，538－548

山室成一 (1990) : 稲わら施用土壤における土壤および稲わら由来無機化窒素発現量とその有機化量の推移，土肥誌，61，499－505

吉川年彦，中川勝也，小林保，時枝茂行，永井耕介 (1988) : 高品質ハウレンソウの生産，出荷に関する研究 (第2報)，近畿中国農研，75，77－81

吉野 喬，出井嘉光 (1977) : 土壤窒素供給量の有効積算温度による推定法について，農事試研報，25，1－62

米山忠克 (1982) : 空気，土，水，植物における硝酸，亜硝酸，N－ニトロソ化合物，保健の化学 24，725－729

米山忠克，建部雅子 (1992) : アスコルビン酸，シュウ酸，硝酸の代謝と相互関係，農及園，67，1005－1062

渡邊容子，内山総子，吉田企世子 (1994) : 夏期および秋期栽培ハウレンソ

- ウの生育過程における部位別成分について, 園学雑, 62, 889-895
- Ae, N., Arihara, K., Okada, K., Yoshihara, T., Johansen, C. (1990) : Phosphorus uptake by pigeonpea and its role in cropping systems of Indian subcontinent. *Science*, 248, 477-480
- Ae, N. and Otani, T. (1997) : The role of cell wall components from groundnut roots in solubilizing sparingly soluble phosphorus in low fertility soils. *Plant and Soil*, 196, 265-270
- Aiello, A. S., Graves, W. R., 1997. Two leguminous tree species differ in growth and ion uptake in Hoagland solution. *J. Plant Nutr.*, 19, 1061-1073.
- Appel, T. and Mengel, K. (1992) : Nitrogen uptake of cereals on sandy soils as related to nitrogen fertilizer application and soil nitrogen fraction obtained by electroultrafiltration (EUF) and CaCl_2 extraction. *Eur. J. Agron.*, 1, 1-9
- Appel, T. and Mengel, K. (1993) : Nitrogen fractions in sandy soils in relation to plant uptake and organic matter incorporation. *Soil Biol. Biochem.*, 25, 685-691
- Arihara, J., Ae, N., Okada, K. and Johansen, C. (1991) : Improvement of soil productivity through legume-based cropping systems in Indian Alfisols and Vertisols under semi-arid environments. *Tropical Agriculture Reserch Series*, No. 24, 157-173
- Berden, M. and Berggren, D. (1990) : Gel filtration chromatography of humic substances in soil solutions using HPLC-determination of molecular weight distribution. *J. Soil Sci.*, 41, 61-72
- Berden, M., Berggren, D., 1990. Gel filtration chromatography of humic substances in soil solutions using HPLC-determination of molecular weight distribution. *Journal of Soil Science* 41, 61-72
- Bradford, M. M. (1976) : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254

- Bremner, J. M. (1965) : Organic forms of nitrogen methods of soil analysis, Part 2, American Society of Agronomy, pp1238-1255, Madison
- Bremner, E. and van Kessel, C. (1990) : Extractability of microbial ^{14}C and ^{15}N following addition of variable rates of labelled glucose and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to soil. *Soil Biol. and Biochem.* 22, 707-713
- Budowle, B. (1984) : Increasing the sensitivity of protein detection of a silver stain for agarose gels. *Electrophoresis* 5, 174-175
- Campbell C. A., Jame Y. W. and DeJong R. (1988) : Predicting net nitrogen mineralization over a growing season: Model verification. *Can. J. Soil Sci.*, 68, 537-552
- Cairney, J. W. G., Sawyer, N. A., Sharples, J. M. and Meharg, A. A. (2000) : Intraspecific variation in nitrogen source utilization by isolates of the ericoid mycorrhizal fungus *Hymenoscyphus Ericae* (Read) Korf and Kernan. *Soil Biol. and Biochem.* 32, 1319-1322
- Catald, A., Mcfadden, K., Garland, T. and Wildung, R. (1988) : Organic constituents and complexation of nickel(II), iron(III), cadmium(II), and plutonium(IV) in soybean xylem exudates. *Plant Physiol.*, 86, 734-739
- Chaney, R. L., Brown, J. C., Tiffin, L. O. (1972) : Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybean. *Plant Physiol.*, 50, 208-213
- Chantigny, M. H., Anger, D. A., Prevost, D., Vezina, L. P., Chalifour, F. P. (1997) : Soil aggregation and fungal and bacterial biomass under annual and perennial cropping system. *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, 61, 262-267.
- Chapin, F. S. III, Moilanen, L. and Kielland, K. (1993) : Preferential use of organic nitrogen for growth by a non-mycorrhizal arctic sedge. *Nature*, 361, 150-153
- Chen, A., Chambers, M., and Cairney, W. G. (1999) : Utilization of organic nitrogen and phosphorus sources by mycorrhizal endophytes of *Woollisia pungens* (Cav.) F. Muell., *Mycorrhiza*, 8, 181-187
- Clarholm, M. (1985) : Interactions of bacteria, protozoa and plants leading to mineralization of soil nitrogen. *Soil Biol. Biochem.*, 17, 181-187

- Cleve, B., Just, J. and Suter, J. (1991) Poplar storage protein in xylem sap. *J. Plant Physiol.*, 137, 763-764.
- Deeb, B. S. and Sloan, K. W. (1975) : Nitrates, Nitrites and Health, Illinois agric.Exp.Stn.Bull.,No750, 1-25
- Degens, B.P. (1998) : Microbial functional diversity can be influenced by the addition of simple organic substrates to soil. *Soil Biol. and Biochem.*, 30, 1981-1988
- Dolmat, M.T., Patrick, W.H. and Peterson, F.J. (1980) : Relation of available soil nitrogen to rice yield, *Soil Science*, 129, 229– 237
- FAO (1989) : Soil map of the world, Tech. Paper 20 ISRIC Wageningen, The Netherlands
- Groot, J. J. R. and Houba, V. J. G. (1995) : A comparison of different indices for nitrogen mineralization. *Biol. Fertil. Soils*, 19, 1-9
- Grunes, D.L., Haise, H.R., Turner, F., and Alessi, J. (1963) : Relationship between yields response to applied fertilizer and laboratory measures of nitrogen and phosphorus availability. *Soil Sci. Soc.Am.Proc.*, 27, 675-679
- Hart, P. B. S., Goh, K. M. and Ludecke (1979) : Nitrogen mineralization in fallow and wheat soils under field and laboratory conditions. *N. Z. J. Agri. Res.*, 22, 115-125
- Hayano, K. (1986) : Cellulase complex in a tomato field soil : induction, localization and some properties. *Soil Biol. Biochem.*, 18, 215-219
- Hayano,K., Watanabe,K. and Asakawa,S. (1995) : Behavior of selected microbial population and their activity in rice and wheat rhizosphere and non-rhizosphere soils in long term experimental paddy fields with and without organic material application in southwest Japan. *Bull. Kyushu Natl. Agric. Exp. Stn.*, 28 139-155
- Hayashi, R., Harada, T. (1969) : Characterization of the organic nitrogen becoming decomposable through the effect of drying of a soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 15, 226-234.
- Hodgkinson, A. (1978) : Evidence of increased oxalate absorption in patients

- with calcium-containing renal stones. *Clin. Sci. Mol. Med.*, 54, 291-294
- Ikeda, H., Yoshida, Y., and Osawa, T. (1985): Effects of ratios of NO₃/NH₄ and temperature of the nutrient solution on growth of Japanese honewort, garland chrysanthemum and welsh onion. *J.Jpn. Soc. Hort. Sci.*, 54, 58-65.
- Jansen, H. H. (1987) : Soil organic matter characteristics after long-term cropping to various spring wheat rotations. *Can. J. Soil Sci.*, 67, 845-856
- Jong, P. C. and Kim, H. (1995) : An analysis on marketing characteristics and marketing margin of organic farming products. *Korean J. Food Market. Economics*, 11, 1-18
- Kai, H., Ahmad, Z. and Harada, T. (1973) : Factors affecting immobilization and release of nitrogen in soil and chemical characteristics of the nitrogen newly immobilized. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 19, 275-286
- Kanazawa, S., Asakawa, S. and Takai, Y. (1988) : Effect of fertilizer and manure application on microbial numbers, biomass and enzyme activities in volcanic ash soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 34, 429-440
- Katayama, A., Hirai, M., Shoda, M. and Kubota, H. (1986) : High performance size exclusion chromatography of water extract from segawa sludge-soil mixture. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 32, 479-486
- Keeney, D. R. (1982) : Nitrogen-availability indices. In: A. L. Page, R. H. Miller, D. R. Keeney (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, 2nd ed. Soil Sci. Soc. Amer., Madison, pp. 711-733.
- Keeney, D. R. and Bremner, W. H. (1966) : Comparison and evaluation of laboratory methods of obtaining and index of soil nitrogen availability. *Agron. J.*, 58, 498 – 503
- Liebig, J. (1840) : *Die Organisch chemie in ihrer Anwendung Auf Agriculture und Physiologie.*
- Mahli, S. S., Nyborg M. and Healey D. J. (1992) : Potential for nitrogen mineralization in central Alberta soils. *Fertil. Res.*, 32, 321-325

- Marumoto, M., Shindo, H. and Higashi, T. (1980) : Effects of accumulation of readily mineralizable organic nitrogen in soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 26, 185 – 190
- Marumoto, T., Anderson, J. P. E., and Domsch, K. H. (1982). Decomposition of ¹⁴C- and ¹⁵N-labelled microbial cells in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 14, 461-467
- Matsumoto, S., Ae, N., Yamagata M. (1999) Nitrogen uptake response of vegetable crops to organic materials, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 45, 269-278
- Matsumoto, S., Ae, N., Yamagata M. (2000a) The status and origin of available nitrogen in soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 46, 139-149
- Matsumoto, S., Ae, N., Yamagata M., (2000b). Extraction of mineralizable organic nitrogen from soils by a neutral phosphate buffer solution. *Soil Biol. Biochem.*, 32, 1293-1299
- Matsumoto, S., Ae, N., Yamagata M., (2000c). Possible direct uptake of organic nitrogen from soil by Chingensai (*Brassica campestris* L.) and Carrot (*Daucus carota* L.). *Soil Biol. Biochem.*, 32, 1301-1310
- Mattingly, G. E. G. (1973): The Woburn organic manuring experiment. II. Design, crop yields and nutrient balance, 1964-72. *Rothamsted Exp. Stat. Rep.*, 98-133
- Mengel, K. (1991) : Available nitrogen in soils and its determination by the "Nmin-method" and by electroultrafiltration (EUF). *Fertil. Res.*, 28, 251-262
- Mengel, K., Schneider B., and Kosegarten, H. (1999): Nitrogen compounds extracted by electro-ultrafiltration (EUF) or CaCl₂ solution and their relationships to nitrogen mineralization in soils. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 162, 139-146
- Moister, A., Haider, K. and Heinemeyer, O. (1987) : Effects of plants on organic carbon and nitrogen turnover in soil. *Agronomy Abstracts 1987*, 188, American Society of Agronomy, Madison, WI

- Moritsugu, M., Kawasaki, T. and Suzuki, S. (1995) : Comparison of absorption rates between ammonium and nitrate nitrogen in Plant, Bull. Res. Inst. Bioresour. Okayama Univ., 3, 91-103
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) : A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15, 473-497.
- Nasholm, T., Ekblad, A., Nordin, A., Giesler, R., Hogberg, M. and Hogberg, P. (1998) Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature*, 392, 914-916
- Nemeth, K., Bartels, M., Vogel, M., and Mengel, K. (1988) : Organic nitrogen compounds extracted from arable and forest soils by electro-ultrafiltration and recovery rates of amino acids. *Biol. Fertil. Soils*, 5, 271-275.
- Nishizawa, N. and Mori, S. (1977): Invagination of plasmalemma : Its role in the absorption of macromolecules in rice roots. *Plant Cell Physiol.*, 18, 767-782
- Nishizawa, N. and Mori, S. (1980): Vacuole formation as a result of intracellular digestion. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 26, 525-540
- Nooden, L. D., Mauk, C. S. (1987): Changes in the mineral composition of soybean xylem sap during monocarpic senescence and alternations by depodding. *Physiol. Plantarum*, 70, 735-742
- Numan, N., Morgan, M. A. and Herlihy, M. (1998) : Ultraviolet absorbance (280 nm) of compounds release from soil during chloroform fumigation as an estimate of the microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 30, 1599-1603
- Orzolek, M. D. (1983) : The effect of growth promoting substances and gels on the emergence and dry weight of tomato and pepper. *J. Seed Tech.*, 8, 41-46
- Ozawa, M., Oshita, T. and Iwamoto, H. (1981) : Studies on growth promoting substances in chlorella extract. *Bull. Faculty of Agric. Meiji Unive.*, 55, 21-30
- Rej, R. (1974) : Interference by Tris buffer in the estimation of protein by the

- Lowry procedure. *Anal. Biochem.*, 62, 240-247
- Ritter, W. F. (1989) : Nitrate leaching under irrigation in the United States. *J. Environ. Sci. Health*, A24, 4, 349-378
- Sakuta, C., Oda, A., Yamakawa, S. and Satoh, S. (1998) Root-specific expression of genes for novel glycine-rich proteins cloned by use of an antiserum against xylem sap proteins of cucumber. *Plant Cell Physiol.*, 39, 1330-1336
- Satoh, S., Iizuka, C., Kikuchi, A, Nakamura, N., and Fujii, T. (1992) Proteins and carbohydrates in xylem sap from squash root. *Plant Cell Physiol.*, 33, 841-847.
- Singh, B. and Sekhon, G. S. (1979) : Nitrate pollution of ground water from farm use of nitrogen fertilizers. *Agric. Environ.*, 4, 207-225
- Smith, E. L., and Stockel, A. (1954). Amino acid composition of crystalline carboxypeptidase. *J. Biolo. Chem.*, 61, 586-589.
- Sowden, F. J., Chen Y. and Schnitzer, M. (1977) : The nitrogen distribution in soils formed under widely differing climatic conditions. *Geochim Cosmochim Acta*, 41, 1524-1256
- Stanford, G. (1982) : Assessment of soil nitrogen availability. In *Nitrogen in Agricultural Soils*, Ed. F. J. Stevenson, *Agronomy* 22, pp. 651-688,
- Stanford, G. and Smith, S. J. (1972) Nitrogen mineralization potentials of soils. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 36, 465-472
- Stenholm, C. W. and Waggoner, D. B. (1990) : Low input, sustainable agriculture: Myth or methods? *J. Soil and Water Conservation*, 45, 13-17
- Stevenson, F. J. (1982) : Organic form of soil nitrogen, In *Nitrogen in Agricultural Soils*, Ed. F. J. Stevenson, pp. 101-104, *Amer. Soc. Agron.*, Madison
- Stotzky, G. M. (1964) : *Methods of Soil Analysis*, *Amer. Soc. Agron.*, Wisconsin, Part 2, 1550
- Tompson J. P. (1991) : Improving the mycorrhizal condition of the soil through cultural practices and effects on growth and phosphorus uptake

by plants. In: Johansen, C, Lee, K. K., Sahrawat, K. L. (Eds.), Phosphorus Nutrition of Grain Legumes in the Semi-Arid Tropics, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru, pp. 117-137.

Urquiaga, S. Gadisch, G., Alves, B. J. R., Boddey, R. M., and Giller K. E. (1998) : Influence of decomposition of roots of tropical forage species on the availability of soil nitrogen. Soil Biol. Biochem., 30, 2099-2106

Wenzl, W. (1990) : Extraktion und Charakterisierung von stickstoffreichen Nichthuminsoffen einer Braunerde. VDLUFA-Schriftenreihe, 32, 337-344