

# 農耕地からの N<sub>2</sub>O 発生削減技術の開発に向けた多面的アプローチ

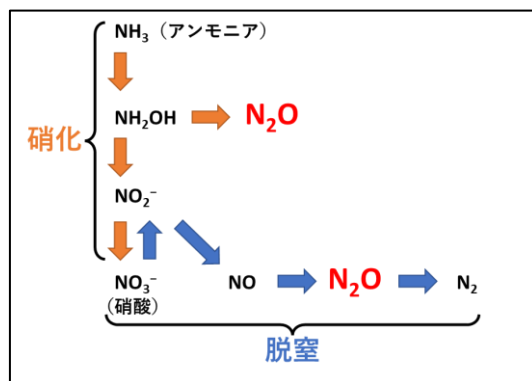
内田義崇 (北海道大学 大学院農学研究院)

uchiday@chem.agr.hokudai.ac.jp

近代農業において土壌への窒素肥料の施用は農作物の安定的生産のために不可欠である。一方で、施用された窒素に由来する大気圏や水圏の汚染は世界規模の課題となっており、強力な温室効果ガスである一酸化二窒素 (N<sub>2</sub>O) の発生もその一つである。本研究では、農耕地土壌から発生する N<sub>2</sub>O ガスの削減を目指し、土壌密度や水分等の土壌環境要因と、それにより制御される N<sub>2</sub>O 生成微生物の動態を解析した。さらに、土壌から分離した N<sub>2</sub>O 消去能力の高い微生物をダイズ畑に接種し、収穫期前後の土壌由来 N<sub>2</sub>O 発生量を 28% 減少させることを確認した。これはフィールドにおいて微生物の接種による N<sub>2</sub>O 発生抑制を確認した世界初の事例である。

## 1. 土壌密度など N<sub>2</sub>O 発生を制御する土壌環境要因の解析

土壌へ施用される化学肥料や家畜ふん尿に含まれる窒素は、微生物による酸化還元反応を経て一部が N<sub>2</sub>O となる。具体的には、アンモニアが硝酸となる「硝化」反応中の副産物として、また硝酸が N<sub>2</sub> ガスとなる「脱窒」反応の中間産物として N<sub>2</sub>O は発生する (土壌中には他にも N<sub>2</sub>O を発生させる反応があるがここでは主な N<sub>2</sub>O 発生源である硝化と脱窒のみに着目する)。硝化は酸化反応、脱窒は還元反応であるため、土壌由来の N<sub>2</sub>O 発生量は土壌中酸素濃度の増減によって大きく変化する。



この土壌中酸素濃度は、土壌の構造や、農業機械や家畜による踏圧 (土壌締め固め) など、さまざまな要因により制御される。本研究では、酪農牛放牧地における踏圧、土壌団粒サイズと N<sub>2</sub>O 発生の関係性に着目した。酪農産業が盛んなニュージーランドや北海道では、放牧地において家畜尿が散布された場所 (尿パッチ) が N<sub>2</sub>O 排出源となることがわかっていたが、家畜による土壌踏圧の強度と尿パッチ由来 N<sub>2</sub>O 発生量の関係はよくわかっていなかった。家畜による踏圧は面積あたりの放牧牛頭数や放牧牛の体重によって増減するため、営農によりある程度制御することができる。そのため、この実験で N<sub>2</sub>O の過剰発生を引き起こさない放牧法の確立に向けた情報を蓄積できると考えた。また、団粒とは土壌粒子が結合した集合体であり、一般的には団粒サイズが小さければ土壌が嫌気状態になりやすく、団粒サイズが大きければ団粒と団粒の間に隙間ができるため土壌が好氣的になりやすい。そのため土壌団粒サイズは N<sub>2</sub>O 発生量と関連があると考えられるが、これまで団粒サイズ、踏圧、尿散布の相互関係については不明点が多かった。

本研究では、ニュージーランド南島において放牧地土壌を採集し団粒サイズ 0-1 mm、1-2 mm、2-4 mm、4-5.6 mm にふるい分け、PVC パイプに充填した後 4 段階の強度で締め固め、牛尿散布後の N<sub>2</sub>O 発

生量を比較した。その結果、団粒サイズが小さいほど、さらに締固め強度が強いほど  $\text{N}_2\text{O}$  発生量が増加することがわかった。一方で、4mm以上の大きさのマクロ団粒区では、強い締固めが起きても  $\text{N}_2\text{O}$  の発生が起きにくかった。この研究によって4mm以上のマクロ団粒形成を促進することを目指した土づくりを行うことで、家畜の踏圧による  $\text{N}_2\text{O}$  排出の増加を抑制できる可能性が示唆された<sup>1)</sup>。

## 2. $\text{N}_2\text{O}$ 発生の微生物プロセス解明と土壤管理法の提案

化学肥料を施用する畑地土壤などでは、化学肥料のタイプを変化させることで  $\text{N}_2\text{O}$  排出量が削減できる。例えば、化学肥料をポリマーなどでコーティングし、植物の吸収速度と合わせゆっくりと成分が溶け出すように加工した被覆肥料という資材がある。被覆肥料はコーティングされていない化学肥料と比較して施用後の土壤由来  $\text{N}_2\text{O}$  排出を削減する効果がある。しかし、被覆肥料施用による  $\text{N}_2\text{O}$  発生量の削減効果は、日本を代表する二つの土壤タイプである黒ボク土と灰色低地土で大きく異なっており、その理由が不明確であった。

この理由を調べるため、本研究は複数の  $\text{N}_2\text{O}$  生成反応に着目した。先述したように  $\text{N}_2\text{O}$  は主に硝化と脱窒という二つのプロセスから発生するが、どちらの反応が優占するかは土壤中の酸素濃度など土壤の物理化学性によって大きく変化するからである。黒ボク土と灰色低地土はこの物理化学性が大きく異なることが知られていた。

そこで、 $\text{N}_2\text{O}$  排出が硝化由来なのか脱窒由来なのかを定量するために、被覆肥料もしくは尿素（化学肥料）散布後の土壤に、二種類の  $^{15}\text{N}$  でラベリングされた硝酸アンモニウム ( $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$  または  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ ) のどちらかを加え、直後の  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  排出量を調べた。その結果、同じ土壤水分量（充水間隙率、Water-filled pore space, WFPS）に調整しているにも関わらず、黒ボク土では硝化由来の  $\text{N}_2\text{O}$  発生が被覆肥料添加区と尿素添加区両方で優占しており、一方で灰色低地土では、硝化由来の  $\text{N}_2\text{O}$  発生量の増加は被覆肥料添加区のみで観察され、アンモニア態窒素の急激な増加が見られた尿素添加区では硝化由来  $\text{N}_2\text{O}$  発生は起きにくいことがわかった。また、被覆肥料散布による  $\text{N}_2\text{O}$  発生量削減効果は灰色低地土で黒ボク土より低かった<sup>2)</sup>。

この結果は、灰色低地土においては被覆肥料添加区で、尿素添加区では観察されない多量の硝化由来  $\text{N}_2\text{O}$  発生が起きてしまい、そのことが被覆肥料散布による  $\text{N}_2\text{O}$  発生量削減効果を減少させていることを示唆している。土壤によってアンモニア態窒素の増加速度と硝化菌群の応答の関係が異なっている可能性があり、このような土壤微生物群集の窒素施用応答に合わせた施肥管理が持続的な農地管理に繋がる可能性がある。

さらに、干ばつ後の豪雨等により乾燥した土壤が急激に湿潤すると大量の  $\text{N}_2\text{O}$  が短期的に発生する現象のメカニズム解明に取り組んだ。我々はこの現象をバーストピーク (Burst-peak) と名付けており、先行研究によって、一部のフィールドでは一年間に土壤から排出される  $\text{N}_2\text{O}$  の半分以上が大雨后数十時間以内に起きるバーストピーク由来であることが分かっていた。そこで、これまでバーストピークが観察されていたフィールドから土壤を採取し、乾燥・湿潤処理を施しバーストピーク  $\text{N}_2\text{O}$  発生の再現を試みた。その結果、多くの土壤培養実験で行われているような、土壤を採取後ふるいにかけて均質化する方法ではバーストピークは再現できなかったが、土壤を最低限のかく乱でコアとして採取することでバーストピークを実験室内でも再現することができた。特に、土壤表面の状態が変化

するとバーストピークは起きないことがわかったため、土壌表面で $\text{N}_2\text{O}$ 発生に関わる微生物が重要なのではないかと考えた。

そこで、バーストピーク $\text{N}_2\text{O}$ 排出前後の土壌コアを数センチ単位でスライスし、それぞれの層からメッセンジャーRNA (mRNA) を抽出し、脱窒系酵素遺伝子発現量を測定したところ、コア表面、0-1 cmの脱窒菌 mRNA のコピー数が短期的 $\text{N}_2\text{O}$ 大量排出と関係していた<sup>3,4</sup>。この関係はDNAコピー数では観察されなかった。長期的な干ばつ後であっても、 $\text{N}_2\text{O}$ 発生に関わる微生物は湿潤後数時間以内に活性を回復させ、大量の $\text{N}_2\text{O}$ 排出に貢献しうることがこの研究から初めてわかった。土壌微生物とフィールドレベルの物質循環を紐づける試験においては、このように土壌の物理性や微生物遺伝子発現の時空間的不均一性を理解することが今後さらに必要である。

### 3. $\text{N}_2\text{O}$ 消去微生物接種法の圃場レベルでの効率向上に向けた研究

先述したように、脱窒反応において $\text{N}_2\text{O}$ は中間産物であり、一部の脱窒菌は $\text{N}_2\text{O}$ を温室効果ガスではない $\text{N}_2$ ガスへと還元し $\text{N}_2\text{O}$ 発生を制御することができる。そのため、これら $\text{N}_2\text{O}$ 還元微生物を人工的に増殖させ畑に接種すれば、 $\text{N}_2\text{O}$ 排出を抑制することができるのではないかと考え研究を進めた。この研究ではダイズ畑をモデル生態系として用いたが、その理由は、根粒菌と呼ばれる根圏でダイズと共生する微生物が $\text{N}_2\text{O}$ 発生源として重要であることが先行研究において十分理解されていたからである。この根粒菌が $\text{N}_2\text{O}$ を $\text{N}_2$ へと還元する能力を持っているかどうかで、ダイズ根圏からの $\text{N}_2\text{O}$ 発生量が増減することが先行研究でわかっていた。また、根粒菌は大気中の窒素を土壌へ固定しダイズの栄養素として提供する能力があるため、ダイズ播種時に根粒菌を土壌へ接種する農法は世界でも広く行われており、接種法が確立されていることもダイズ畑を本研究に用いた理由である。

ここでは、 $\text{N}_2\text{O}$ 還元能力を持つ根粒菌を培養し、ダイズ播種時に畑へ接種する大規模フィールド実証試験を農研機構の圃場(つくば市)を用いて行った。本研究の初期段階においては、培養した $\text{N}_2\text{O}$ 還元型根粒菌を播種時にダイズ種子へ散布接種するだけでは接種菌由来の根粒がダイズ根にほとんど生成されず、 $\text{N}_2\text{O}$ を $\text{N}_2$ へ還元する能力の無い土着の根粒菌由来の根粒が優占してしまうことが大きな課題であった。この課題を解決するために、培養液中の接種菌濃度を向上させ、土着根粒菌のいない土壌やバーミキュライトをペーパーポットに充填し、培養液接種後にこのポットで育苗してからフィールドに移植する、などの方法を用い接種菌由来の根粒を大幅に増加させることができた。また、ダイズ栽培系での $\text{N}_2\text{O}$ 発生タイミングは予測が困難であった。そのため、自動開閉チャンバーを用いることで $\text{N}_2\text{O}$ ガス発生測定頻度を高めた試験を行った(右写真)。



その結果、 $\text{N}_2\text{O}$ 還元型根粒菌の接種により、課題であった収穫期前後のダイズ畑からの $\text{N}_2\text{O}$ 発生量を非接種の場合と比べて28%削減することに成功した<sup>5</sup>。この研究は、土壌微生物を単離株レベルで

研究するグループと、主にフィールドで窒素循環を研究するグループが連携することで成功しており、多面的なアプローチを用いて研究することの重要性が際立っていた<sup>9)</sup>。

#### 4. 今後に向けて

これら土壌由来  $\text{N}_2\text{O}$  排出量削減に関する研究は、地球規模で今後推進する必要がある窒素循環の制御と関連する。窒素循環を制御し適正化することは、今後の食料生産を取り巻く課題を解決するために極めて重要である。我々は生命を維持するために窒素が必要だが、枯渇性資源（天然ガスなど）を利用して生産される窒素肥料は、我々の生命を支えるのに必要な窒素の量に比べて何倍も多いことが知られている。つまり、現代農法において大量に用いられている化学肥料中の成分の多くは、土壌表面に散布されているが我々の食料とはなっていない。食料生産を維持しながら化学肥料を削減するためには、 $\text{N}_2\text{O}$  発生を削減するだけでなく、窒素循環全体を包括的に捉え、 $\text{N}_2\text{O}$  のような化学肥料として散布されたが食料とはならなかった窒素の動態を正確に把握することが重要となる。北海道を拠点として研究を推進している現在は、集約的な畜産業を有する市町村と連携し、コミュニティが主導する窒素循環の適正化をどのように達成できるかを研究している。また、さらなる多面的アプローチとして、家畜ふん尿を原料としたエネルギー生産を研究するグループや家畜を改良する研究者らとの連携を開始している。こうした研究を通して、枯渇性資源に依存しない食料生産の達成に強く貢献していきたい。

#### 謝辞

本受賞にあたり推薦を頂いた日本土壌肥料学会・妹尾啓史会長、藤原徹、神山和則両副会長、木村武常務理事に深く御礼申し上げます。また、本研究の推進にあたってご指導いただいた、秋山博子博士、早津雅仁博士（農研機構）、南澤究先生（東北大）をはじめとした多くの共同研究者に心より感謝を申し上げます。北海道大学・環境生命地球化学研究室の学生メンバー、スタッフの皆様にも深く感謝致します。

#### 引用文献

- 1) Uchida, Y., Clough, T. J., Kelliher, F. M., Sherlock, R. R.: *Soil Biol Biochem* 40(4): 924–931 (2008).
- 2) Uchida, Y., von Rein, I., Akiyama, H., Yagi, K.: *Soil Sci Plant Nutr* 59(1): 46–55 (2013).
- 3) Wang, Y., Uchida, Y., Shimomura, Y., Akiyama, H., Hayatsu, M.: *Sci Rep* 7(1): 803 (2017).
- 4) Uchida, Y., Wang, Y., Akiyama, H., Nakajima, Y., Hayatsu, M.: *FEMS Microbiol Ecol* 88 (2): 407–423 (2014).
- 5) Itakura, M., Uchida, Y., Akiyama, H., Hoshino, Y. T., Shimomura, Y., Morimoto, S., Tago, K., Wang, Y., Hayakawa, C., Uetake, Y., Sánchez, C., Eda, S., Hayatsu, M., Minamisawa, K.: *Nat Clim Change* 3(3): 208–212 (2013).
- 6) Uchida, Y., Akirama, H.: *Soil Sci Plant Nutr* 59(4): 477–487 (2013).