

令和元年6月11日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07642

研究課題名(和文) 土壌還元消毒に伴う酸化還元電位および一酸化二窒素発生予測モデルの開発

研究課題名(英文) Modeling redox potential and nitrous oxide production in soil during biological

研究代表者

前田 守弘 (Morihiro, Maeda)

岡山大学・環境生命科学研究所・教授

研究者番号：00355546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：化学物質を用いない防除技術として土壌還元消毒に対する期待は大きい。しかし一方で、同過程における一酸化二窒素(N<sub>2</sub>O)の発生が懸念されている。本研究では、土壌還元消毒過程における酸化還元電位とN<sub>2</sub>O発生機構をモデル化することを目的とする。はじめに、水分不飽和土壌の酸化還元電位を安定的に測定するため、塩橋の使用を検討した。その結果、KCl濃度10%の塩橋が適していた。実験および数値シミュレーションの結果、土壌還元消毒時の初期NO<sub>3</sub>-N含有量が高い場合はEh低下速度が減少するため、N<sub>2</sub>O放出が長時間継続することがわかった。また、無機化、硝化に続く脱窒由来のN<sub>2</sub>O発生が重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

土壌還元消毒時におけるN<sub>2</sub>O放出機構について実験的かつ数値シミュレーションで検討した。土壌還元消毒時には、作土の一部で窒素の無機化、硝化、脱窒の連続プロセスが生じており、それが一酸化二窒素放出に強く影響していることを示した。また、硝酸イオンはN<sub>2</sub>Oの基質であるとともに、高濃度に土壌残存した状態で土壌還元消毒を行うと、土壌還元速度が低下し、N<sub>2</sub>Oが排出されやすい状態が長期間維持されることを理論的に示した。これらの点は大いに意義がある。

研究成果の概要(英文)：Biological soil disinfection is a promising method to suppress soil-borne pathogens under reductive soil conditions produced by the application of organic matter and water irrigation with plastic film. On the other hand, nitrous oxide (N<sub>2</sub>O), which is a greenhouse gas, may be more emitted as an intermediate product of denitrification during biological soil disinfection. The objective of the study was to develop a model describing soil redox potential and N<sub>2</sub>O emissions during biological soil disinfection.

We proposed the use of salt bridges with 10%-KCl agar to measure redox potential in unsaturated soil. Our experimental results and simulations using PHREEQC showed that high NO<sub>3</sub>- remaining in soil suppressed soil Eh decrease, leading to more N<sub>2</sub>O emissions over many hours. Production of N<sub>2</sub>O during denitrification following nitrogen mineralization and nitrification should be emphasized even in biological soil disinfection.

研究分野：土壌肥料学，農業環境工学

キーワード：一酸化二窒素 酸化還元 有機物 灌漑

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

病原性微生物による土壌病害を防除する方法として、臭化メチル燻蒸がこれまでは一般的であった。しかし、臭化メチルはモントリオール議定書においてオゾン層破壊物質に指定され、現在は使用が禁止されている。化学物質を用いない代替防除技術として土壌還元消毒（作物の端境期に、コメヌカなどの易分解性有機物を土壌にすき込んだ後にポリフィルム（マルチ）で土壌表面を被覆する方法であり、土壌微生物による急激な有機物分解と灌水によって、土壌を還元状態にし、病原性微生物の死滅を図る技術）が有望視されている。一方、作付け後には作土に硝酸態窒素（ $\text{NO}_3\text{-N}$ ）が残存していることが多く、土壌消毒に伴って温室効果ガスである  $\text{N}_2\text{O}$  が発生しやすい条件になると考えられる。

土壌還元状態の進行は、主として、灌漑水の侵入と有機物分解に伴う酸素濃度の低下による。酸化還元状態の進行については、ネルンストの式が用いられる。一般に、ネルンストの式は固体、気体を含む水溶液系の平衡反応に用いられ、土壌還元消毒時のように、不飽和条件で土壌表面から徐々に還元が進行するような複雑な場に適用された事例はみあたらない。

土壌還元消毒に用いられる有機物は、コメヌカ、モミガラ、作物残渣、家畜ふん堆肥などさまざま、各地域で入手可能な有機資材を組み合わせ用いられる。一般圃場において、収穫後の作物残渣を土壌にすき込んだ場合、分解速度が早い作物ほど  $\text{N}_2\text{O}$  発生量が多くなる。これは有機物の供給によって、有機物分解に伴って溶存酸素が速やかに消費され、土壌が還元的になる、脱窒を促進する易分解性炭素が供給される、 $\text{N}_2\text{O}$  の基質となる  $\text{NO}_3\text{-N}$  が土壌に供給されるためとされる。有機物の易分解性画分を評価するため、Maeda et al. (2014) は生物化学的酸素要求量と溶存有機態炭素が有望であることを示したが、定量的な評価および適用可能な有機物の種類には検討の余地が残っている。一般には、C/N 比の小さい有機物で分解速度が早い。

以上のように、土壌還元消毒に伴う酸化還元電位および  $\text{N}_2\text{O}$  発生モデル化については、土壌還元消毒時の観測データ不足、有機物分解特性の評価、非平衡、水分不飽和の場合のネルンストの式の適用等の課題をクリアする必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、以上の課題を実験的に検討し、土壌還元消毒過程における酸化還元電位と  $\text{N}_2\text{O}$  発生機構をモデル化することを目的とする。具体的には、灌漑、有機物、マルチ被覆など異なる条件における、高温・高水分不飽和土壌の還元状態の空間分布を経時的に観測し、そのメカニズムを明らかにする。また、有機物の易分解性を BOD、DOC、溶存態画分の C/N 比などを用いて評価する手法を提案する。さらには、炭素・窒素循環とネルンストの式を組み合わせ、土壌中の酸化還元電位、 $\text{N}_2\text{O}$  発生を予測できる数学モデルを開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 塩橋を用いた不飽和土壌における酸化還元電位の測定

土壌還元消毒過程における一酸化二窒素（ $\text{N}_2\text{O}$ ）発生機構を解明するには土壌酸化還元電位（Eh）のデータが重要である。ところが、同過程では土壌水分が不飽和になるため、Eh 測定は困難である。本研究では、塩橋を用いた不飽和土壌の Eh 測定法を検討した。

寒天 4%、KCl 5～35% 溶液で塩橋を作成した。含水比 55% に調整した畑地黒ボク土をガラスびん（155 mL 容）に入れ、深さ 3 cm に塩橋と白金電極を設置した。銀 - 塩化銀電極を土壌に直接接触させる従来法と塩橋を用いる方法を比較した。

#### (2) 土壌還元消毒を模した小型びん試験（水分一定条件）

飼料用トウモロコシ 0.2% を混合した同土壌に対し、含水比を最大保水量（WHC）の 90%、初期  $\text{NO}_3\text{-N}$  含有量を 100 または 200  $\text{mg kg}^{-1}$  に調整し、ガラスびん（155 mL 容）に入れた。次いで、ガラスびんを塩ビフィルム（S-2000, 0.05 mm）で覆った後、50 で 72 時間静置した。寒天 4%、KCl 10% の塩橋を用いて深さ 3 cm の土壌 Eh を測定した。また、 $\text{N}_2\text{O}$  フラックスを経時的に計測した。

#### (3) 土壌還元消毒を模したカラム試験（灌漑による水分変動条件）

上記（2）では水分一定条件で試験を行ったが、ここでは灌漑に伴って土壌水分が変化する条件でカラム試験を行った。有機物施用条件（トウモロコシ、ナス残さ、無施用）が異なる土壌カラムに灌漑を施し、その後の土壌水分、Eh、 $\text{N}_2\text{O}$  放出量の推移を調べた。灰色低地土を充填した土壌カラム（直径 11 cm、長さ 31 cm）の表層 10 cm を  $\text{NO}_3\text{-N}$ （100  $\text{mg kg}^{-1}$ ）に調整した。同層にトウモロコシまたはナス残さ（微粉碎、重量比 0.2%）を混和し、加えて、有機物無施用処理を設けた。土壌カラムは 50 の恒温器内に設置し、24 時間で 150 mm の灌漑を行った。その後、土壌表面を塩ビフィルム（S-2000, 0.05 mm）で被覆し、21 日間静置した。水分は TDR、Eh は白金電極と塩橋、 $\text{N}_2\text{O}$  はチャンパー法で測定した。

#### (4) 緑肥およびその灰化物施用の影響

上記（3）の結果、土壌還元消毒においては、脱窒のみならず、硝化由来の  $\text{N}_2\text{O}$  発生が無視できないことがわかった。そこで、初期土壌に  $\text{NH}_4\text{-N}$  を添加した緑肥混合土壌における  $\text{N}_2\text{O}$  発生機構を調べる目的で、硝化、脱窒に関連する機能性遺伝子の増減を調べた。緑肥として、27 日間栽培したトウモロコシを用いた。また最近では、緑肥からのエネルギー回収が一部で検討されており、トウモロコシ灰についても検討した。

水分条件が異なる畑地土壌（灰色低地土，表層 10 cm）に  $\text{NH}_4\text{-N}$ （ $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ）とトウモロコシ（CC）またはトウモロコシ灰（CC 灰）（重量比 0.1%）を混合し，WHC の 60%，75%，90% 条件において 25 °C で 15 日間培養した．比較対照としてトウモロコシ無添加処理を作成した．培養期間中に  $\text{N}_2\text{O}$ ， $\text{CO}_2$  放出速度，土壌無機態窒素，電気伝導度（EC），pH を測定した．培養前後の土壌 DNA を抽出・精製し，定量 PCR を用いて *amoA*（AOB，AOA），*napA*，*narG* の機能性遺伝子コピー数を測定した．

#### （5）PHREEQC を用いた有機物分解に伴う酸化還元電位低下のモデル化

易分解性有機物を添加した際の Eh の低下について，残存硝酸態窒素濃度の影響を調べた．解析には地球科学コード PHREEQC（米国地質調査所）を用いた．易分解性有機物投入量を変数とし， $0 \sim 1 \text{ mmol L}^{-1}$  の範囲で段階的に与えた．また，初期  $\text{NO}_3\text{-N}$  濃度を 0，1，10  $\text{mg L}^{-1}$  の条件で，pH，Eh，溶存酸素（DO）， $\text{NO}_3\text{-N}$ ， $\text{SO}_4\text{-S}$  濃度の変化を計算した．

## 4．研究成果

### （1）塩橋を用いた不飽和土壌における酸化還元電位の測定

不飽和土壌における酸化還元電位を測定するため，塩橋を用いた方法を検討し，寒天および KCl 濃度，塩橋形状が測定結果などに及ぼす影響を調べた．その結果，寒天濃度 4%，KCl 濃度 10%，シリンジを用いた縦型の塩橋を用いることで不飽和土壌でも酸化還元電位がすみやかに測定できることがわかった．しかし，高 KCl では，塩橋から KCl が溶出するため土壌 EC が高くなった．KCl 10% 条件では，土壌 EC の上昇が小さく，Eh 測定結果が良好であった．

### （2）土壌還元消毒を模した室内実験

黒ボク土に飼料用トウモロコシを混合し，土壌還元消毒を模した土壌水分一定条件（WHC 90%）において初期  $\text{NO}_3\text{-N}$  含有量が土壌酸化還元電位および  $\text{N}_2\text{O}$  放出量の推移を調べた．その結果， $\text{N}_2\text{O}$  放出は，初期  $\text{NO}_3\text{-N}$  によらず，Eh が 0.35 V まで低下した 12 時間後に生じた．初期  $\text{NO}_3\text{-N}$   $100 \text{ mg kg}^{-1}$  では，Eh が 0.24 V まで低下した 48 時間後に  $\text{N}_2\text{O}$  放出は停止した．一方， $200 \text{ mg kg}^{-1}$  では Eh が 0.3 V 以上で推移し， $\text{N}_2\text{O}$  放出は最後まで継続した．72 時間後の土壌  $\text{NO}_3\text{-N}$  を比較すると，後者でのみ  $5.5 \text{ mg kg}^{-1}$  残存していた． $\text{N}_2\text{O}$  放出を抑制するには，土壌還元消毒前の土壌  $\text{NO}_3\text{-N}$  含有量をなるべく低くする必要がある．

### （3）土壌還元消毒を模したカラム試験

土壌還元消毒を模した室内カラム実験を行い，土壌水分が変化する条件下で有機物の施用が土壌 Eh の変化や  $\text{N}_2\text{O}$  発生に及ぼす影響を調べた．その結果，深さ 10 cm の Eh は，有機物（トウモロコシ，ナス残渣）施用では 3 日後に約 -0.2 V まで低下したが，無施用では終始 +0.150 ~ 0.30 V と高かった．表層  $\text{NO}_3\text{-N}$  は灌漑によって全て下方移動したが，無施用では 21 日後までに再び増加し，硝化の痕跡が認められた． $\text{N}_2\text{O}$  放出フラックスは，有機物処理によらず，24 時間までに第 1 ピーク，1 週間後により大きな第 2 ピークがみられた．第 1 ピークは初期の Eh 低下と対応していることから脱窒由来，第 2 ピークは深さ 10 cm の Eh が高く維持された無施用でより大きかったことから，無機化に続く硝化由来と考えられる．以上より，土壌還元消毒時の  $\text{N}_2\text{O}$  放出には，脱窒よりも硝化過程が重要であると思われた．

### （4）緑肥およびその灰化物施用の影響

緑肥混合土壌において，硝化を含む  $\text{N}_2\text{O}$  発生機構を明らかにするため，土壌水分を離れた条件で  $\text{N}_2\text{O}$  発生と硝化，脱窒に関連する機能性遺伝子の関係を調べた．CC，CC 灰を 0.1% 添加しても， $\text{NH}_4\text{-N}$  添加土壌における  $\text{N}_2\text{O}$  放出に影響しなかった．一方， $\text{NH}_4\text{-N}$  を添加した条件にもかかわらず，どの処理においても高水分条件で  $\text{N}_2\text{O}$  放出量は増加した．特に，CC 灰処理における 60% WHC，90% WHC 間で有意差があった（ $p < 0.05$ ）．機能性遺伝子解析によって，硝化に続く，脱窒活性の増大が  $\text{N}_2\text{O}$  放出量の増加につながったこと等が明らかとなった．

### （5）PHREEQC を用いた有機物分解に伴う酸化還元電位の低下のモデル化

項目（2）の結果，初期  $\text{NO}_3\text{-N}$  含有量の違いが土壌 Eh の低下および  $\text{N}_2\text{O}$  放出量に影響することがわかった．そこで，易分解性有機物量に加えて， $\text{NO}_3\text{-N}$  濃度が Eh 低下に及ぼす影響を数値シミュレーションによって検討した．その結果，易分解性炭素濃度の増加に伴って，まず DO が低下し，その後 Eh が大きく低下する様子が示された（図 a，b，c）．また，Eh が 0 V 以下に減少した後は  $\text{SO}_4^{2-}$  が減少し， $\text{H}_2\text{S}$  還元が進行したことがわかる．さらには，初期  $\text{NO}_3\text{-N}$  濃度が高い場合は Eh 低下速度が減少することがわかった（図 b，c）．項目（1）の試験結果では， $\text{N}_2\text{O}$  の発生は Eh が 0.2 ~ 0.4 V の時に増大することが示された．これは，高  $\text{NO}_3\text{-N}$  濃度では Eh 低下速度が減少するために，結果として， $\text{N}_2\text{O}$  が放出しやすい Eh を示す期間が長くなるためと考えられる．

### （6）まとめ

土壌還元消毒過程における酸化還元電位と  $\text{N}_2\text{O}$  発生機構の関係を調べた．はじめに，高温・高水分不飽和土壌の酸化還元電位を安定的に測定するため，塩橋の使用を検討した．その結果，KCl 濃度 10% の塩橋が適していることがわかった．次いで，土壌還元消毒を模した土壌水分一定条件の実験からは，初期  $\text{NO}_3\text{-N}$  含有量が高い場合は Eh が高く推移し， $\text{N}_2\text{O}$  放出が長時間継続することがわかった．このことは，PHREEQC を使用した数値シミュレーションによっても裏付けされた．従って， $\text{N}_2\text{O}$  放出を抑制するには，土壌中に残存する  $\text{NO}_3\text{-N}$  含有量をなるべく低くしてから土壌還元消毒を行った方がよいことが示唆される．また，灌漑を模したカラム試験室内実験では  $\text{N}_2\text{O}$  フラックスに 2 つのピークがみられ，初期は脱窒由来，後期は無機化に続く硝化由

来の  $N_2O$  発生と考えられた。すなわち、土壌還元消毒過程においても硝化由来の  $N_2O$  発生が重要であることが示唆された。硝化過程の  $N_2O$  発生を調べるため、 $NH_4-N$  添加土壌に CC, CC 灰を混和した培養試験を行ったところ、これらの添加が  $N_2O$  放出に与える影響は認められなかったが、土壌水分の増加が  $N_2O$  放出量を有意に増加させた。また、機能性遺伝子解析によって、水分量増加による  $N_2O$  放出量の増加は、硝化後の脱窒活性の増大が原因であること等がわかった。

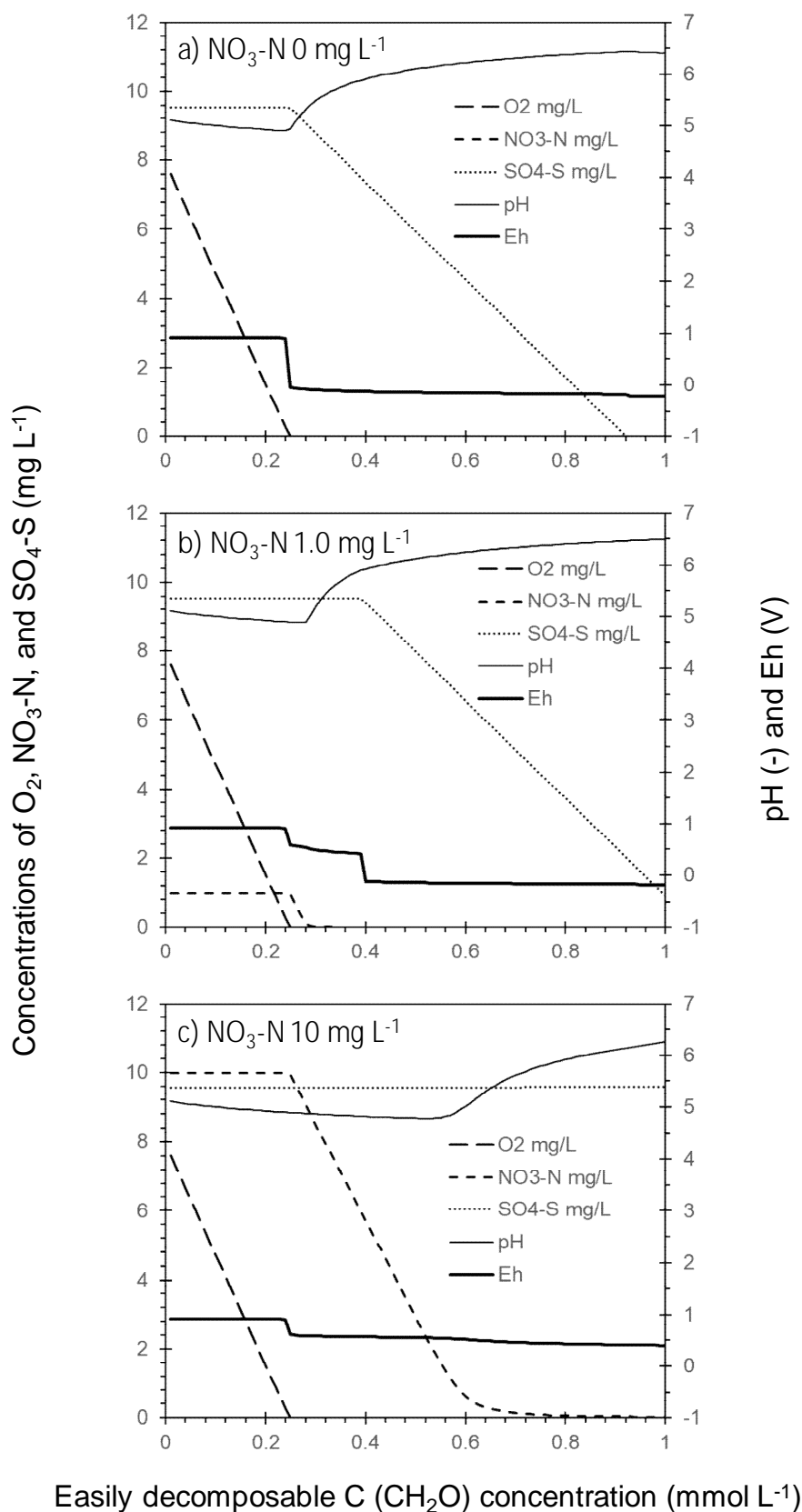


図 易分解性有機物および初期  $NO_3-N$  濃度の違いが pH, Eh, DO,  $NO_3-N$ ,  $SO_4-S$  に及ぼす影響

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計6件)

前田守弘, 西又麻衣: 土壌還元消毒を模したカラム内における酸化還元電位と亜酸化窒素発生, 日本土壌肥料学会 2018 年度神奈川大会, 2018

前田守弘, 亀川真由: 土壌還元消毒を模した条件での酸化還元電位の測定と一酸化二窒素の放出, 日本土壌肥料学会 2017 年度仙台大会, 2017

Morihiro Maeda: Nitrogen management in soil and water for our future earth, SLAAS Theme Seminar 2017: Engagement of Scientists in the Economic Development of Sri Lanka, 2017

前田守弘, 嶋田翔子, 井上大介: 土壌還元消毒時の亜酸化窒素発生に関連する脱窒微生物挙動の分子生物学的解析, 日本土壌肥料学会 2016 年度佐賀大会, 2016

前田守弘: 農地環境保全における土壌肥料学の新展開, 2016 年度日本土壌肥料学会・関西土壌肥料協議会講演会, 2016

Morihiro Maeda: Monitoring and modeling nitrate leaching in upland fields using lysimeters, NAS International Workshop "Applying the Lysimeter Systems to Water and Nutrient Dynamics, 2016

〔図書〕(計1件)

前田守弘, 第6章土壌の肥培管理と水質汚濁, 『土壌物理学』(西村拓編), 朝倉書店, pp212, 2019

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

岡山大学 環境理工学部 環境管理工学科 土壌圏管理学研究室ホームページ  
<http://www.eme.okayama-u.ac.jp/Sections/Lithosphere/lithosphere.html>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 嶋田 翔子, 亀川 真由, 西又 麻衣, 埋見 奈津希

ローマ字氏名: Shoko Shimada, Mayu Kamegawa, Mai Nishimata, Natsuki Uzumi