

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月21日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07650

研究課題名(和文) 土壌中の亜硝酸イオンの定量法開発と動態解明

研究課題名(英文) Improvements of the method for determining nitrite content in soil and elucidation of the dynamic behavior of nitrite in field soils

研究代表者

江口 定夫 (Eguchi, Sadao)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター・ユニット長

研究者番号：30354020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、土壌中の亜硝酸イオン含量を分析するための従来法に大きな問題があり、2 M塩化カリウム溶液による抽出中に亜硝酸イオンの非生物還元反応が生じるため、大幅な過小評価につながることを明らかにすると共に、より正確な分析法として、0.01 M水酸化ナトリウム溶液による抽出と、抽出液中の腐植酸を前もって取り除いた後に亜硝酸イオン濃度の定量分析をイオンクロマトグラフ法または吸光度法によって行う方法を提案した。また、黒ボク土野菜畑を対象として、0.01 M水酸化ナトリウム溶液による抽出法により、深さ2 m付近の腐植に乏しい深層土壌中の亜硝酸イオン/硝酸イオン含量のモル比の季節変動等を調査した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

亜硝酸イオンは、硝化や脱窒の中間生成物であり、地球上の窒素循環の最も中心に位置する窒素化合物である。特に、強力な温室効果ガスであると共にオゾン層破壊物質でもある一酸化二窒素の前駆体であるという点で、土壌中における亜硝酸イオンの動態解明に関する研究は、学術的意義だけでなく社会的意義が非常に大きい。新たに提案した分析法が広く普及し、現場土壌中の亜硝酸イオン動態に関わる実測データが多く蓄積されれば、土壌からの一酸化二窒素排出メカニズム解明や排出削減のための新たな対策技術の創出に結びつく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study revealed that the conventional method for determining nitrite content in soil causes significant underestimation due to abiotic reduction of nitrite during soil extraction with 2 M potassium chloride solution and proposed more appropriate method; i.e., soil extraction with 0.01 M sodium hydroxide solution and determination of nitrite concentration by ion chromatography or colorimetry after removing humic acid from the extract. Moreover, nitrite behavior in a vegetable field of Andosol was investigated to show the seasonal changes in the nitrite/nitrate molar ratio in deep soil with less humus at a depth of 2 m by applying the soil extraction with 0.01 M sodium hydroxide solution.

研究分野：土壌学、生物地球化学、物質循環学

キーワード：亜硝酸イオン 非生物的還元 土壌酸度 希アルカリ溶液 腐植酸 黒ボク土

1. 研究開始当初の背景

亜硝酸イオン (NO_2^-) は、硝化や脱窒の中間生成物であり、地球上の窒素循環の最も中心に位置する窒素化合物である。特に、強力な温室効果ガスであると共にオゾン層破壊物質でもある一酸化二窒素 (N_2O) の前駆体であるという点で、土壤中における NO_2^- の動態解明が強く求められている。しかしその重要性にも拘わらず、現場土壤中における NO_2^- 含量は定量限界または検出限界以下と報告されることが多く、現場土壤中における NO_2^- 動態に関する定量的知見は非常に乏しい。これについては、国内外で標準的に用いられている従来の土壤中 NO_2^- の分析法に主な原因があると考えられる。即ち、土壤中 NO_2^- を抽出する溶液としては、高濃度の中性塩溶液、一般に 2 M 塩化カリウム (KCl) 溶液、が用いられるが、同時に抽出される土壤酸度 (soil acidity) によって懸濁液 pH が低下し、 NO_2^- の非生物的還元 (abiotic reduction) が生じることが指摘されており (Homyak et al 2015; Medinets et al 2015)、これが土壤中 NO_2^- 含量の著しい過小評価を引き起こしている可能性が高い。

これに対して、これまで、pH を弱アルカリ性に調整した KCl 溶液 (Stevens & Laughlin 1995) や純水 (Homyak et al 2015) による抽出法が提案されてきた。しかし、これらの研究は窒素濃度の低い森林土壌等を対象としており、窒素濃度が高い農地土壌における知見は乏しい。また、日本の農地土壌面積の約半分を占める黒ボク土 (Andosols) における知見が無い。黒ボク土は、陰イオン吸着容量 (AEC) を発現する変異荷電土壌であり、水抽出法では固相吸着態の NO_2^- を十分に抽出できない可能性がある。黒ボク土では、高 pH の希アルカリ溶液 (dilute alkaline solution)、例えば 0.01 M 水酸化ナトリウム (NaOH) 溶液、による硝酸イオン (NO_3^-) 等の主要無機陰イオンの抽出 (Katou et al 1996) も行われているが、 NO_2^- 抽出への適用事例は見当たらない。また、アルカリ溶液で抽出した場合、土壤の腐植酸 (humic acid) が同時に抽出され、 NO_3^- に比べてずっと低濃度である NO_2^- の定量精度の低下 (Homyak et al 2015) も懸念される。

以上のように、従来の標準的な土壤中 NO_2^- 分析法には大きな問題 (著しい過小評価) があり、日本の農地土壌面積の約半分を占める黒ボク土にも適用可能な、新たな分析法を開発する必要がある。

2. 研究の目的

本課題では、土壤中 NO_2^- の新たな分析法 (土壤中 NO_2^- の抽出法及び抽出液中 NO_2^- 濃度の定量法) を開発すると共に、それを現場土壤中 NO_2^- の動態解明に適用することを主な目的とする。また、表層土壌に比べて、これまで土壤中 NO_2^- 含量が殆ど測定されていない深層土壌 (浅層地下水帯を含む) への適用性の検討及びそれに基づく NO_2^- の動態解明も重視して、研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 火山灰を母材とする黒ボク土を中心として、土壤の母材、腐植含量、粘土鉱物組成等が大きく異なる農地土壌試料 (表層 ~ 深層土壌) 数十点を用意し、その風乾細土を分析に供した。抽出溶液としては、純水、中性塩溶液 (2 M KCl)、弱アルカリ性塩溶液 (2 M KCl + 水酸化カリウム [KOH])、希アルカリ溶液 (0.01 M NaOH、0.01 M KOH) 等を用いた。土壌試料に対して固液比 1:10 または 1:100 の割合で抽出溶液を添加し、1 時間振とう後、孔径 0.20 μm のメンブレンフィルターを用いて濾液を採取した。濾液の pH をガラス電極法によって測定すると共に、濾液中の NO_2^- 濃度をイオンクロマトグラフ法 (IC 法) 及びフローインジェクション比色法 (FI 法) (連続流れ分析によるナフチルエチレンジアミン吸光光度法) によって定量した。また、濾液中の NO_3^- 濃度及びアンモニウムイオン (NH_4^+) 濃度についても、IC 法及び FI 法 (NH_4^+ はインドフェノール青吸光光度法) によって同時に定量した。

(2) 主な調査対象圃場として、農環研内の野菜畑 (面積約 10 a) を選定した。作土から深層まで (深さ 0~210 cm) の土壌試料を異なる時期にボーリング採取 (直径約 2.5 cm) し、深さ 10 cm 毎に切断して深さ別の土壌試料とした。これらの風乾細土を上記(1)の分析に供し、表層から深層までの土壤中 NO_2^- 、 NO_3^- 及び NH_4^+ 含量の鉛直分布を得た。また、セラミックポーラスカップを圃場の深さ 200 cm に埋設し、減圧吸引法によって採取した土壌水中の NO_2^- 及び NO_3^- 濃度を、IC 法によって測定した。更に、浅層地下水位観測井 (内径 2.5 cm の塩ビ管、壁面に多数の通水孔) を圃場に設置し、地下水位を定期的に測定した。なお、本圃場の土壌は、立川ローム及び武蔵野ロームから成るアロフェン質黒ボク土に分類され、深さ 200 cm 付近以深には難透水性の常総粘土層 (ハロイサイトを主体とする凝灰質粘土層、AEC は定量限界以下) が出現する。圃場観測の結果、多くの時期で、黒ボク土層と常総粘土層の境界付近 (深さ 200 cm 前後) に、浅層地下水が形成されていた。また、作土 (0~20 cm)、耕盤 (20~30 cm)、下層 (30~200 cm) 及び深層 (200 cm 以深) における土壤の全炭素含量は、それぞれ、4~5%、3~4%、0.5~3% 及び 0.5% 以下であった。

4. 研究成果

(1) 様々な農地土壌試料に対して、抽出溶液や固液比が異なる抽出方法を適用したところ、抽出液(濾液)のpHは、従来の中性塩溶液を用いた場合に、最も低い値を示した(表1)。Heil et al (2016)は、土壌中 NO_2^- の非生物的還元が生じにくい安定な pH 条件として $\text{pH} > 5.5$ を提示しており、従来の中性塩溶液を用いて抽出すると、殆どの場合、 $\text{pH} < 5.5$ となり(表1)土壌中 NO_2^- の非生物的還元が速やかに生じていたことが示唆された。また、固液比を大きく(1:10 1:100)すると、pH低下がより顕著になることが示された(表1)。これに対して、純水、弱アルカリ性塩溶液及び希アルカリ溶液を用いた場合は、今回供した土壌試料については、いずれも $\text{pH} > 5.5$ であり、 NO_2^- の非生物的還元が生じにくい条件だったと考えられる。

抽出溶液(固液比)	抽出液(濾液)のpH
純水	
純水(1:100)	5.7~6.2
中性塩溶液	
2M KCl(1:10)	4.8~6.2
2M KCl(1:100)	4.6~5.2
弱アルカリ性塩溶液	
2M KCl + KOH(1:10)	8.9~12.4
希アルカリ溶液	
0.01M NaOH(1:100)	10.1~11.0
0.01M KOH(1:100)	9.2~9.4

(2) 様々な土壌試料の NO_2^- 含量は、全体的に、従来の中性塩溶液や純水による抽出に比べて、希アルカリ溶液によって抽出した場合には、値が大きくなる傾向があった。この傾向は、特に黒ボク土で顕著であり、一般に1桁~2桁以上の差が見られた。また、弱アルカリ性塩溶液抽出による NO_2^- 含量もまた、全体的に、中性塩溶液や純水による抽出よりも高い値を示し、両者の差は1桁以内であった。また、中性塩溶液や純水による抽出では、しばしば、抽出液中の NO_2^- 濃度が検出限界以下となる場合があった。これらの差が生じた原因としては、低 pH 条件下における NO_2^- の非生物的還元だけでなく、弱アルカリ性塩溶液及び希アルカリ溶液によって抽出された腐植酸(図1、抽出された腐植酸が褐色を呈する)等の夾雑物が、FI法における吸光度やIC法における NO_2^- ピークの面積を過大評価する原因となっており、腐植に富む土壌ほどその傾向が大きいと考えられた。したがって、抽出液から腐植酸を前もって取り除いた後に、FI法やIC法に供すれば、これらの影響は軽減できると考えられる。また、腐植含量の低い(例えば、全炭素含量 $< 0.5\%$)土壌では、抽出液は無色透明に近く、希アルカリ溶液による抽出液をそのままFI法やIC法に供することで、従来法よりも NO_2^- 濃度を正確に定量できることが示された。



図1 希アルカリ溶液による抽出液

(3) 主な調査対象圃場である黒ボク土野菜畑の深さ200cm付近(常総粘土層)は、腐植含量が低く、従来のKCl抽出と希アルカリ抽出による NO_2^- の定量値を比較すると、ほぼ同等の結果が得られた(図2)。深さ200cmにおける土壌中の $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ モル比は、0.001~1の範囲内で変動し、ポーラスカップ吸引法により採取した土壌水中の $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ モル比よりもやや高い値を示した。このモル比の季節変動や地下水位変動との関係性については、データ数が限られていることもあり判然としませんが、夏季にモル比が低下する傾向や、地下水位の変動は見かけ上あまり影響しない可能性等が考えられた。これらについては、今後、更なるデータ取得及び解析が必要である。

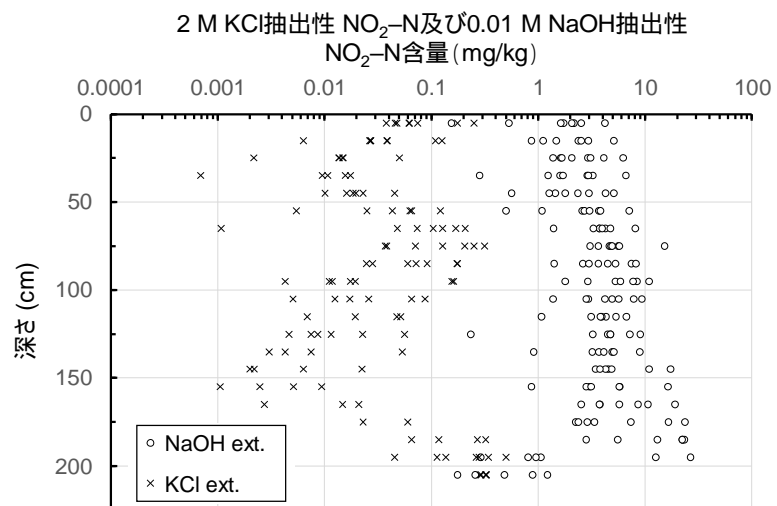


図2 黒ボク土野菜畑における NO_2^- -N 含量の鉛直分布 (圃場内8地点の測定データ)

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

(4) 土壌中の主要な無機態窒素(NO_3^- 、 NH_4^+)を同時に抽出する上で、従来の高濃度中性塩(KCl)溶液を用いた抽出法では、土壌から抽出される交換酸度によって懸濁液 pH が低下し、高 pH 条件だと揮散しやすい NH_4^+ の損失を防ぐことが出来るという大きな利点があった。一方、量的には 1~2 桁以下という微量の NO_2^- が、懸濁液 pH の低下による非生物的還元が生じ、抽出液中から損失することについては、重視されて来なかったと考えられる。これが、これまでその重要性にも拘わらず現場土壌中における NO_2^- の定量的知見が乏しかった主な原因と考えられる。したがって、土壌中の NH_4^+ を抽出する上では従来の KCl が適しており、 NO_2^- を抽出する際には、別途、希アルカリ溶液によって抽出作業を行うべきである。なお、土壌中 NO_3^- の抽出は、KCl 及び希アルカリ溶液のどちらでも問題なく、同等の結果が得られた。

< 引用文献 >

- Homyak PM et al (2015) Soil Science Society of America Journal 79:1237-1242
Medinets S et al (2015) Soil Biology & Biochemistry 80:92-117
Stevens RJ & Laughlin RJ (1995) Soil Science Society of America Journal 59:933-938
Katou H et al (1996) Soil Science Society of America Journal 60:1368-1375
Heil J et al (2016) European Journal of Soil Science 67:23-39

5 . 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

- Eguchi S, Yamaguchi N, Nakajima Y, Sudo S (2018) Examination of analytical method for determining nitrite content in soil. NARO-MARCO International Symposium on Nitrogen Cycling and Its Environmental Impacts in East Asia, p. 64
江口定夫, 中島泰弘, 山口紀子, 須藤重人 (2016) 土壌中の亜硝酸イオン定量法の問題点. 日本土壤肥料学会 2016 年度佐賀大会講演要旨集, p. 3

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：山口 紀子

ローマ字氏名：(YAMAGUCHI, Noriko)

所属研究機関名：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

部局名：農業環境変動研究センター

職名：ユニット長

研究者番号 (8 桁) : 80345090

研究分担者氏名：中島 泰弘

ローマ字氏名：(NAKAJIMA, Yasuhiro)

所属研究機関名：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

部局名：農業環境変動研究センター

職名：上級研究員

研究者番号 (8 桁) : 10354086

研究分担者氏名：須藤 重人

ローマ字氏名：(SUDO, Shigeto)

所属研究機関名：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

部局名：農業環境変動研究センター

職名：上級研究員

研究者番号 (8 桁) : 40354071