

令和 2 年度 修士論文

水分移動をともなう黒ボク土中の有機物の無機化と硝化

Mineralization and nitrification of soil organic matter in Andosol with water flow

三重大学大学院生物資源学研究科  
共生環境学専攻 地球環境学講座  
土壌圏システム学教育研究分野

519M202 岡田華保



# 目次

第1章	はじめに.....	1
第2章	土中での有機物分解にともなう反応と用いたモデル .....	3
2-1	土壌微生物と微生物量の測定法 .....	3
2-2	無機化, 有機化.....	3
2-3	硝化.....	5
2-4	アンモニア揮散.....	5
2-5	脱窒.....	6
2-6	土中における水分・ $\text{NH}_4\text{-N}$ の移動および化学反応モデル .....	6
第3章	試料と方法.....	10
3-1	試料.....	10
3-2	実験で使用した器具 .....	13
3-2-1	吸光光度計 (DR6000) .....	13
3-2-2	ルミテスター.....	14
3-2-3	CHN 元素分析装置 .....	16
3-2-4	液体クロマトグラフィ .....	17
3-2-5	4 極センサ.....	17
3-2-6	pH, EC の測定.....	21
3-3	保温静置実験の方法 .....	22
3-4	浸透実験の方法 .....	22
第4章	保温静置実験の結果と考察 .....	26
4-1	2.5 cm 深さの保温静置実験の結果.....	26
4-2	10 cm 深さの保温静置実験の結果.....	31
4-3	保温静置実験の考察 .....	36
第5章	浸透実験.....	38
5-1	予備実験.....	38
5-2	水分移動が 10 cm 油粕をすきこみ土層の無機化と硝化に与える影響.....	41
5-3	流速が有機物分解と無機化・硝化に与える影響 .....	50
5-4	異なる有機物濃度が浸透下の無機化に及ぼす影響.....	54
第6章	浸透実験の反応速度定数・硝化開始のタイミングの決定 .....	57
6-1	計算条件と結果, 考察.....	57
6-2	保温静置実験・浸透実験の比較と考察 .....	63
第7章	おわりに.....	64
参考文献	.....	65
謝辞	.....	67
付録	.....	68

A	$\text{NH}_4\text{-N}$ , $\text{NO}_3\text{-N}$ の測定 .....	68
A-1	抽出 .....	68
A-2	吸光光度計 (DR6000) .....	70
B	ルミテスターを用いた ATP の測定方法 .....	77
C	全自動元素分析装置の測定方法 .....	82
D	浸透実験に用いたデータロガーのプログラム .....	84

## 第1章 はじめに

植物にとって窒素は、作物の体を作るたんぱく質、体内での様々な反応に寄与する酵素、葉緑体などの構成養分であり、生命維持に重要な役割を果たしていると同時に、土中で最も不足しがちな成分である（松中，2011）。土中の窒素不足を補うため、有機肥料が施用されることがある。土中で、有機肥料中の有機態窒素  $\text{Org-N}$  は有機物分解菌によりアンモニア態窒素  $\text{NH}_4\text{-N}$ （無機化）、硝化菌により硝酸態窒素  $\text{NO}_3\text{-N}$ （硝化）に形態変化をする。植物は、これら生成物を吸収する。しかし、これらが過剰にあると、土中の水分移動とともに地下へ流出するか、窒素ガス  $\text{N}_2$ （脱窒）や亜酸化窒素ガス  $\text{N}_2\text{O}$ 、アンモニアガス  $\text{NH}_3$ （アンモニア揮発）として大気へ放出される。 $\text{NO}_3\text{-N}$  や  $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{NH}_3$  は地下水汚染や大気汚染の原因となりうる。すなわち、適正量の施肥をしなければ、環境汚染の原因となりうる。農業現場での適正量の施肥のため、水分移動をともなう窒素の形態変化を予測する必要がある。

ところで、無機化、硝化はそれぞれ土壌微生物反応であり、土壌水分や温度、溶存酸素濃度、大気とのガス交換のしやすさの影響を受ける。そのため、これらの反応を見る際は、含水率や温度、深さ、水分移動を考慮する必要があると考えられる。土中の硝化に関する研究では、硝化反応を一次分解反応式で表したときの硝化速度定数  $k_{\text{nit}}$  と含水率、温度、微生物活性の指標である ATP 量との間に相関があるという報告がある。例えば、水分に関して中村・取出（2007）は、黒ボク土では水分飽和度 80% のとき  $k_{\text{nit}}$  が最大になることを示した。温度に関して戸田（1994）は、森林土壌において 20°C で硝化が抑制されることを示した。また、武藤ら（2019）は 26°C、24°C、22°C の岩手黒ボク土の  $k_{\text{nit}}$  は 26°C で最も高く、22°C で最も低いことを示した。さらに、 $k_{\text{nit}}$  と微生物活性の指標である ATP 量に相関があることを示唆した。さらに中西（2019）は、水分移動を考慮した浸透実験を行い、0.8 cm/d 程度の水分移動は  $k_{\text{nit}}$  に影響を与えないこと、浸透下では吸着態の  $k_{\text{nit}}$  よりも溶存態の  $k_{\text{nit}}$  が大きいということを明らかにした。

一方、土中の無機化と硝化どちらも考慮した研究では、木村（2017）は、有機物分解中の  $\text{NH}_4\text{-N}$  と  $\text{NO}_3\text{-N}$  を測定し、無機化期間中は硝化がほとんど生じないことを明らかにした。さらに、無機化、硝化反応による  $\text{NH}_4\text{-N}$  の増加、減少と  $\text{NO}_3\text{-N}$  の増加がそれぞれ一次分解反応式で表現できることを確認した。有機物分解の温度依存性や水分依存性に関する研究も進められている。しかし、これらの実験には遠沈管や 50 mL サンプラといった容器が用いられており、容器の大きさや深さはあまり考慮されていない。水分移動をともなう無機化、硝化に関する研究では、木村（2017）は有機物添加土壌に上端から 0.05 cm–2.5 cm/d の水を滴下し任意の日の土中と排液の  $\text{NH}_4\text{-N}$  と  $\text{NO}_3\text{-N}$  を測定した結果、水分移動は無機化反応に影響を及ぼさなかったとしている。他にも、溶質の流出に焦点をあてた有機物添加土壌の浸透実験の研究例はある（David Laird et al, 2010）。しかし、土中の  $\text{NH}_4\text{-N}$

N 分布や  $\text{NO}_3\text{-N}$  分布は明らかになっていない。

そこで本研究では、深さや水分移動が土中の有機物分解の無機化と硝化反応に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、異なる含水率の岩手黒ボク土に対し深さが異なる円筒容器を用いた保温静置実験と浸透実験、およびその数値解析を行った。それぞれの実験で、無機化・硝化過程の ATP 量も測定し、無機化・硝化反応時の微生物活性も観察した。保温静置実験では含水率や深さが  $k_{\min}$ ,  $k_{\text{nit}}$  に及ぼす影響を検討した。浸透実験と数値解析では、水分移動のある土層での無機化、硝化反応がいつ、どの程度生じ、どのように移動するか、水分移動は無機化、硝化に影響を及ぼすか、ということを保温静置実験との比較から考察した。

## 第2章 土中での有機物分解にともなう反応と用いたモデル

この章では、土壤微生物をはじめ、土中に有機物が添加されたときの反応やそれらに関するこれまでの研究などを記す。また、窒素の移動と分解を表現する土中の水分・溶質移動、化学反応モデルの理論を示す。

### 2-1 土壤微生物と微生物量の測定法

土中には多数の微生物が生息しており、物質循環を動かすエンジンとして常に働いている（犬伏，2019）。土壤微生物は、大きく分けると細菌、古細菌、真核生物に分類される。

細菌は、プロバクテリアやグラム陽性菌、シアノバクテリアなどからなり、有機物の分解を担う。プロバクテリアには光合成を営む細菌（紅色硫黄細菌，紅色非硫黄細菌など），化学合成独立栄養細菌（硝化菌，硫黄酸化菌，鉄酸化菌，水素細菌，メタン酸化菌など），化学合成従属栄養細菌など，多種多様な生活様式をもった種類によって構成されている。グラム陽性菌には，放線菌などがある。

古細菌は，クレンアーキアやユリアーキオータからなる。

真核生物は，菌類，藻類，原生生物からなる。菌類は，糸状菌やキノコ，酵母などの形態が知られている。従属栄養性であり，有機物の分解者としての役割を担っている。藻類は，光合成を営む生物である。原生生物は，降水などによって水が供給されると運動性を示し，周囲の微生物を捕食する（犬伏，2019）。

土中での生化学反応は土壤微生物によって引き起こされることから，土壤微生物量を測定する意義がある。土壤微生物重量を示す土壤微生物バイオマスの推定には，土壤微生物体中 C の重量である微生物バイオマス C が指標にされてきており，バイオマス C を測定するのにクロロホルム燻蒸抽出（FE）法，基質誘導呼吸（SIR）法など様々な手法が確立されてきた。そのうちの一つに，アデノシン 5'-三リン酸（ATP）法がある。ATP は，地球上のすべての生物の細胞内に存在するエネルギー分子である。生菌体内に存在し，細胞死および細胞外で速やかに分解されることから，バイオマス C の指標になるとされている（犬伏，2019）。本研究では，この ATP 法により微生物量の推定をした。

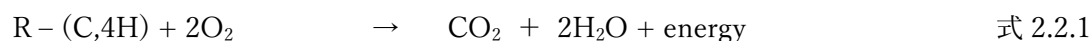
### 2-2 無機化，有機化

土中に有機物が投入されると，有機態窒素  $\text{Org-N}$  がアンモニア態窒素  $\text{NH}_4\text{-N}$  になる無機化と， $\text{NH}_4\text{-N}$  が  $\text{Org-N}$  になる有機化と呼ばれる反応が生じる。一般に，これらの反応のいずれが優勢になるかは投入した有機物の炭素と窒素の比である C/N によって決まる。C/N が高い有機物が土中に投入されれば，有機化が優勢に，C/N が低い有機物が投入され

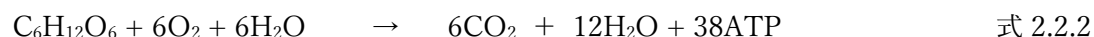
れば無機化が優勢に生じる（松中，2011）。具体的には，C/N が約 11.3 以下の有機物が土中に添加された場合，ただちに有機態窒素の無機化が起こる。一方，C/N が 15.3 以上の有機物の場合にはいったん有機化過程を経てから有機態窒素の無機化過程が開始され，かつ無機化が開始するのは C/N が大きいほど遅くなる（広瀬，1973）。

これらの反応は，土壤微生物が関与しているため，土壤微生物の C/N と有機物の C/N の関係を考えることで理解ができる。例えば，土中微生物の C/N が平均して 8 であると仮定する。微生物は，使用する炭素の約 1/3 を細胞に取り入れる。残り約 2/3 は呼吸によって CO<sub>2</sub> として体外に放出する。よって，微生物は C:N=24:1 で取り入れなければ体内の C/N を 8 で保つことができない。C/N が 25 以上の有機物が投入されたとき，微生物がこれを餌として食べるが足りない窒素分は土中から補給して自身の体を合成していく必要がある。このとき，土中の NH<sub>4</sub>-N が使用され，微生物のタンパク質となる。これが有機化である。微生物に取り込まれた窒素は微生物に分解されたりして再び土中で利用される。一方，炭素は呼吸により消失していく。そのため次第に C/N が低くなり，土中に NH<sub>4</sub>-N が放出され始める。これが無機化である。一般に，有機物分解で働く微生物の C/N は，細菌で 5，放線菌で 6，菌類で 10 と言われている（Brady and Weil, 2017）。また，好気性土壤微生物の細胞質の平均的な C/N は 10 前後であるという報告もある（服部・宮下，2000）。よって，C/N が 16 - 30 以上の有機物を土中に投入した際は有機化が生じる可能性があると言える。今回の実験では C/N が 7 の有機物（油粕）を使用したため，有機化は考慮しなかった。

有機物が土中に投入されると，糸状菌，細菌，放線菌等の土壤微生物により Org-C は以下の式 2.2.1 のように分解される（Brady and Weil, 2017）。



例えば R-(C,4H) が C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> のとき，



式 2.2.2 が好気呼吸であり，38 mol の ATP が生成される。

一方，Org-N は土壤微生物により，細かく分解され，リシン（CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>COOH）やアラニン（CH<sub>3</sub>CHNH<sub>2</sub>COOH）といった単純なアミノ酸，またはアミノ基（R<sup>1</sup>-NH<sub>2</sub>）になる。次にアミノ基が加水分解され，NH<sub>4</sub><sup>+</sup>として放出される（Brady and Weil, 2017）。



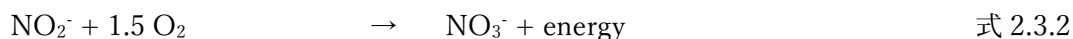
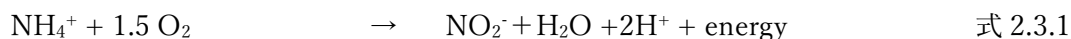
---

<sup>1</sup> R はアミノ基が結合している有機分子の部分を表す。



## 2-3 硝化

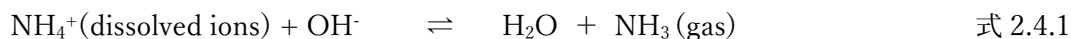
土中に放出された  $\text{NH}_4\text{-N}$  はアンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌により、硝酸態窒素  $\text{NO}_3\text{-N}$  へと形態を変化させる。この二つの細菌を、硝化菌と呼んでいる。



$\text{NO}_2\text{-N}$  は植物に有害であるが、ほとんど土壌に蓄積することはない(Weil et al., 2017)。硝化が進行することによって  $\text{H}^+$  が生成されるため土壌は酸性になる。

## 2-4 アンモニア揮散

土中の  $\text{NH}_4\text{-N}$  の一部は、 $\text{NH}_3$  ガスとして大気に放出されることがある。これを、アンモニア揮散という。以下の化学平衡式 2.3.1 が右に動いたとき、揮散する(Brady and Weil)。



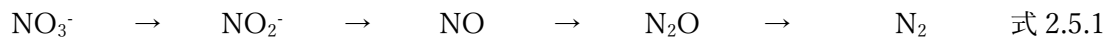
$\text{NH}_3$  ガスは、 $\text{NH}_4^+$  と平衡状態にあるが、式より  $\text{OH}^-$  濃度が高い場合、すなわち pH が高い場合に  $\text{NH}_3$  ガスが大气へ放出されること、また、 $\text{NH}_3$  ガスや水が多いときは反応が左に進み、pH が上昇することが分かる。実際、苗木ら(2007)は土壌 pH が高いとアンモニア揮散率が高いという報告をしている。また、 $\text{NH}_4^+$  濃度が高いほどアンモニア揮散率が指数関数的に高くなるという報告(Rochette et al, 2013)や、温度が高いほど、アンモニア揮散率が高いという報告もある(例えば、松中・千徳, 2002)。

これらの反応が生じることで、土中窒素の損失だけでなく、大気に揮散した  $\text{NH}_3$  が大気中の硫酸基と結合してより強い酸性雨の発生をもたらす。ほかにも、降下する  $\text{NH}_4\text{-N}$  により自然植生の生育かく乱、土壌中での硝化にともなう土壌 pH の低下とそれに伴う土壌養分バランスの悪化、植物養分の吸収阻害など、様々な環境への悪影響が発生する(松下, 2011)。

アンモニア揮散は、肥料を表面に撒くよりも数 cm すきこむことで 25 - 75%削減できる(Brady and Weil, 2017)。また、灌漑や雨水によって、表面に施用された肥料が土中へ浸潤し、アンモニア揮散を抑えることができる(Holcomb et al., 2011)。しかし、今回の実験では酸性である畑土壌中の有機物の無機化、硝化反応であり、これらの反応は生じにくいとして考慮していない。

## 2-5 脱窒

生成された  $\text{NO}_3^-$ -N や  $\text{NO}_2^-$ -N などの窒素酸化物が  $\text{N}_2$  や  $\text{N}_2\text{O}$  といったガス態窒素に還元される現象を脱窒という (式 2.5.1)。 $\text{N}_2$  や  $\text{N}_2\text{O}$  は気体であるため、ほとんど大気へ放出される。脱窒は、嫌気性細菌である脱窒菌によって引き起こされる。団粒構造の発達した不飽和土壌には、団粒間に好気空間が、団粒内には有機物分解にともない嫌気空間が形成され、無機化や硝化、脱窒が同時に起こりうる (西尾, 1994)。木村 (2017) の有機物添加の保温静置実験でも、硝化の開始とともに脱窒が生じた可能性が示唆されている。



## 2-6 土中における水分・ $\text{NH}_4$ -N の移動および化学反応モデル

土中の水分・ $\text{NH}_4$ -N 移動は、鉛直一次元を考えた場合、また、蒸気層を無視できると考えた場合、それぞれ式 2.6.1、式 2.6.2 により表現できる (Jury and Horton, 2004)。

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} \left[ K(h) \left( \frac{\partial h}{\partial z} + 1 \right) \right] \quad \text{式 2.6.1}$$

$$\frac{\partial C_T}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial z} \left( D_e \frac{\partial C_l}{\partial z} \right) - \frac{\partial}{\partial z} (J_w C_l) - (\rho_b r_a + \theta r_l) \quad \text{式 2.6.2}$$

ここで、 $\theta$  [ $\text{cm}^3/\text{cm}^3$ ] は体積含水率、 $t$  [d] は時間、 $z$  [cm] は深さ、 $K(h)$  [cm/d] は不飽和透水係数、 $h$  [cm] は土中水圧力、 $C_T$  [ $\text{mol}/\text{cm}^3\text{-soil}$ ] は全量の濃度、 $D_e$  は有効拡散分散拡散係数 [ $\text{cm}^2/\text{d}$ ]、 $C_l$  [ $\text{mol}/\text{cm}^3\text{-water}$ ] は溶質の溶存濃度、 $J_w$  [ $\text{cm}^2/\text{d}$ ] は土中水フラックス、 $\rho_b$  [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ] は乾燥密度、 $C_a$  [ $\text{mol}/\text{g-soil}$ ] は溶質の吸着量、 $r_a$  [ $\text{mol}/(\text{g-soil} \cdot \text{d})$ ]、 $r_l$  [ $\text{mol}/(\text{cm}^3 \cdot \text{d})$ ] は溶質の吸着態と溶存態のそれぞれの分解等にもなう湧出/消失速度である。リチャーズ式 2.5.1 では、水の移動を体積含水率  $\theta$  と土中水圧力  $h$  の関係を表す水分保持曲線のモデルを用いて計算する。移流分散方程式と呼ばれる 2.6.2 式は溶質ごとに立式し、それらを同時に計算する。

移流分散方程式の  $C_T$  [ $\text{mol}/\text{cm}^3\text{-soil}$ ] は、溶質の吸着量と溶存量を合わせた全量であり、 $\rho_b C_a + \theta C_l$  と表される。溶質の全量に対する吸着量および溶存量の割合は、吸着等温線モデルやイオン交換モデルにより別に求める。本研究では、イオン交換モデルにより再現した。

イオン交換モデルでは、土の陽イオン交換容量 CEC に対し、イオン間の吸着平衡式を土中の主要なイオンすべてについて連立し、イオンの吸着量  $C_a$  と溶存量  $C_l$  を求める。

土中のイオン間の交換は可逆的に行われると仮定し、化学平衡式で表す。例えば、土粒子

の吸着サイト X に  $\text{Na}^+$  が吸着しており，そこに  $\text{K}^+$  溶液が流れたときの反応は以下の化学平衡式 2.6.3 で表される。



この式の平衡定数  $K_{\text{Na/K}}$  は，

$$K_{\text{Na/K}} = \frac{[\text{KX}][\text{Na}^+]}{[\text{NaX}][\text{K}^+]} \quad \text{式 2.6.4}$$

式 2.6.4 からわかるように， $K_{\text{Na/K}}$  は値が大きいほど正反応が進んでいることを意味する。すなわち，式 2.6.4 で言うと， $\text{K}^+$  の方が  $\text{Na}^+$  よりも吸着されやすいことを意味する。吸着されなかった  $\text{Na}^+$  は溶存イオンとして扱われる。

この  $K_{\text{Na/K}}$  は，式 2.6.5，2.6.6 の各物質毎の化学平衡式を連立することで求めることができる。



それぞれの平衡定数は，

$$K_{\text{Na}} = \frac{[\text{Na}^+][\text{X}^-]}{[\text{NaX}]} \quad \text{式 2.6.7}$$

$$K_{\text{K}} = \frac{[\text{K}^+][\text{X}^-]}{[\text{KX}]} \quad \text{式 2.6.8}$$

以上より，式 2.6.4 式は，

$$K_{\text{Na/K}} = \frac{[\text{KX}][\text{Na}^+]}{[\text{NaX}][\text{K}^+]} = K_{\text{Na}}/K_{\text{K}} \quad \text{式 2.6.9}$$

と表せる。

各イオンの平衡定数  $K_i$  に固有値を与え，次の式 2.6.10 - 2.6.17 を連立してイオン間の平衡定数を決定できる。式 2.6.18 は，吸着サイト数  $X_{\text{total}}$  と各イオンの吸着濃度との関係である（中西，2017）。 $X_{\text{total}} [\text{mol}_c / 1000\text{cm}^3_{\text{-soil}}]$  と  $\text{CEC} [\text{cmol}_c / \text{kg}_{\text{-soil}}]$  は，体積および質量あたりの吸着サイト数で，式 2.6.10 が成り立つ。

$$X_{\text{total}} = \frac{\text{CEC} \times \rho_b}{100} \quad \text{式 2.6.10}$$

$$\frac{[\text{NaX}]}{[\text{Na}^+][\text{X}^-]} = K_{\text{Na}} \quad \log K_{\text{Na}} = 0 \quad \text{式 2.6.11}$$

$$\frac{[\text{KX}]}{[\text{K}^+][\text{X}^-]} = K_{\text{K}} \quad \log K_{\text{K}} = 0.7 \quad \text{式 2.6.12}$$

$$\frac{[\text{NH}_4\text{X}]}{[\text{NH}_4^+][\text{X}^-]} = K_{\text{NH}_4} \quad \log K_{\text{NH}_4} = 0.6 \quad \text{式 2.6.13}$$

$$\frac{[\text{MgX}_2]}{[\text{Mg}^{2+}][\text{X}^-]^2} = K_{\text{Mg}} \quad \log K_{\text{Mg}} = 0.6 \quad \text{式 2.6.14}$$

$$\frac{[\text{CaX}_2]}{[\text{Ca}^{2+}][\text{X}^-]^2} = K_{\text{Ca}} \quad \log K_{\text{Ca}} = 0.8 \quad \text{式 2.6.15}$$

$$\frac{[\text{HX}]}{[\text{H}^+][\text{X}^-]} = K_{\text{H}} \quad \log K_{\text{H}} = 1 \quad \text{式 2.6.16}$$

$$X_{\text{total}} = [\text{NaX}] + [\text{KX}] + [\text{NH}_4\text{X}] + 2[\text{MgX}_2] + 2[\text{CaX}_2] + [\text{HX}] \quad \text{式 2.6.17}$$

このように、イオン交換反応では、すべてのイオンが互いに作用し吸着量が決定される。任意のイオンの溶存濃度に対する吸着量は、他のイオンの挙動により変化する。

Org-N から  $\text{NH}_4\text{-N}$  への無機化反応,  $\text{NH}_4\text{-N}$  から  $\text{NO}_3\text{-N}$  の硝化反応は式 2.6.2 の反応項である左辺にあたり, それぞれ一次分解反応式 (式 2.6.18, 2.6.19) で表現できる。

<無機化>

$$\begin{aligned}\frac{d}{dt}C_{\text{Org-N}} &= -k_{\text{min}}C_{\text{NH}_4\text{-N}} \\ \frac{d}{dt}C_{\text{NH}_4\text{-N}} &= k_{\text{min}}C_{\text{NH}_4\text{-N}}\end{aligned}\quad \text{式 2.6.18}$$

<硝化>

$$\begin{aligned}\frac{d}{dt}C_{\text{NH}_4\text{-N}} &= -k_{\text{nit}}C_{\text{NH}_4\text{-N}} \\ \frac{d}{dt}C_{\text{NO}_3\text{-N}} &= k_{\text{nit}}C_{\text{NH}_4\text{-N}}\end{aligned}\quad \text{式 2.6.19}$$

ここで,  $k_{\text{min}}$  や  $k_{\text{nit}}$  [ /d]は無機化・硝化の硝化速度定数である。式 2.6.18 および式 2.6.19 では,  $\text{NH}_4\text{-N}$  の吸着態と溶存態を合わせた,  $\text{NH}_4\text{-N}$  全量に対する無機化速度定数, 硝化速度定数を与えている。

本研究では, 土中における水分・溶質の移動およびイオン交換や一次分解反応の解析に HYDRUS - 1D と PhreeqC を連結したプログラムである HP1 を用いた。HP1 は, 2 つのプログラムを行き来し, HYDRUS - 1D で土中の水分や溶質の移動を, PhreeqC で物質の化学反応やそれにともなうイオン交換を計算する。

イオン交換には, 土中の主要な陽イオンである  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$  の 6 種類を組み入れた。陰イオン ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) については, 吸着は考慮しなかった。式 2.6.11 - 2.6.18 により, 各イオンの吸着量  $C_a$  と溶存濃度  $C_i$  を求め, それらを移流分散式に代入し計算した。この際, 各イオンの平衡定数  $K_i$  (式 2.6.11 - 2.6.16 中の  $\log K_i$ ) には, PhreeqC Data base (Parkhurst and Appelo, 1999 ; Appelo and Postma, 2005) の値を用いた。

### 第3章 試料と方法

#### 3-1 試料

##### \* 土試料

試料には、2019年6月に岩手大学附属農場休耕畑から採土された黒ボク土（以下、岩手黒ボク土）2mm篩通過分を使用した。実験前に通水できる土試料は水洗しなかったが、実験前に通水できない土試料（例えば、保温静置実験や浸透実験の油粕すきこみ層に用いる土）は、事前に水洗した。水洗は、容器に2mm篩通過分の土を入れ、2PV以上の蒸留水を流した。以後、風乾させ、再び2mm篩にかけて使用した。

図3.1.1に岩手黒ボク土の水分特性（水分保持曲線（a）と不飽和透水係数曲線（b））を示す。水分特性曲線は、乾燥過程において吸引法、加圧板法、鏡面冷却式水ポテンシャル計により測定し、Dual-Van Genuchten 式（式3.1.1）を適合した。

$$\begin{aligned} S_e &= \frac{\theta - \theta_r}{\theta_s - \theta_r} \\ S_e &= S_{e1} + S_{e2} \\ &= w_1[1 + (\alpha_1 h)^{n_1}]^{-m_1} + w_2[1 + (\alpha_2 h)^{n_2}]^{-m_2}, \quad m = 1 - \frac{1}{n} \end{aligned} \quad \begin{array}{l} \text{式} \\ 3.1.1 \end{array}$$
$$K(S_e) = K_s \frac{(w_1 S_{e1} + w_2 S_{e2})^l \left( w_1 \alpha_1 \left[ 1 - (1 - S_{e1}^{\frac{1}{m_1}})^{m_1} \right] + w_2 \alpha_2 \left[ 1 - (1 - S_{e2}^{\frac{1}{m_2}})^{m_2} \right] \right)}{(w_1 \alpha_1 + w_2 \alpha_2)^2}$$

ここで、 $S_e[-]$ は有効飽和度、 $\theta_r[\text{cm}^3/\text{cm}^3]$ は残留体積含水率、 $\theta_s[\text{cm}^3/\text{cm}^3]$ は飽和体積含水率、 $\alpha, \alpha_2[1/\text{cm}]$ 、 $n, n_2[-]$ は水分特性曲線の形を決めるパラメータ、 $K_s[\text{cm/d}]$ は飽和透水係数、 $l[-]$ は間隙結合定数、 $w_2(=1-w_1)[-]$ は二つの水分特性曲線の重みづけを表す。水分保持曲線の従属変数である含水率 $\theta$ は、有効飽和度 $S_e$ により求める。

表 3.1.1 Dual VG 式のパラメータ

$\theta_r$	$\theta_s$	$\alpha$ [1/cm]	n	$K_s$ [cm/d]	l	W2	$\alpha_2$ [1/cm]	n2
0	0.58	0.03	1.8	40	-0.1	0.41	0.0001	1.4

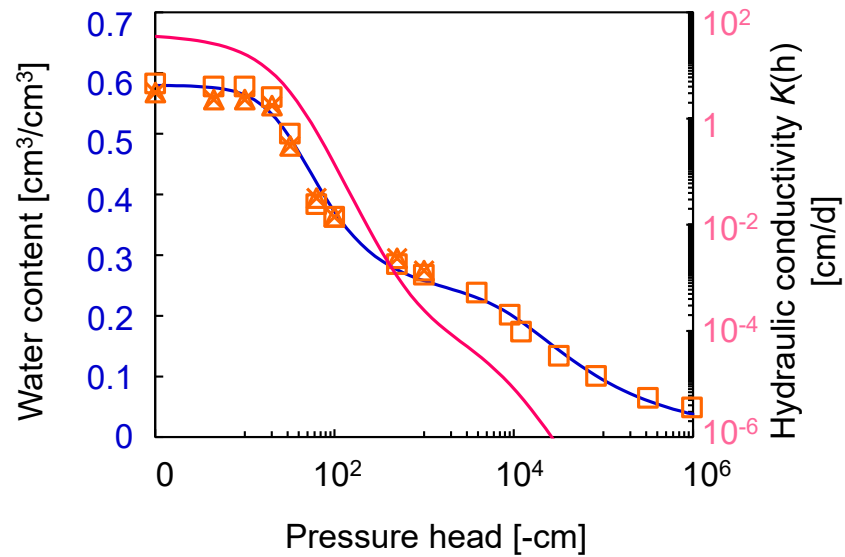


図 3.1.1 水分特性曲線と不飽和透水係数曲線

また、岩手黒ぼく土の CEC は草深（2017）より 46.4 [cmol<sub>c</sub>/kg] とした。C/N は、10.9 だった（2020 年 10 月測定）。

\* 有機物試料

試料として、2018 年 4 月に購入した油粕（J- オイルミルズ）を使用した（図 3.1.2）。



図 3.1.2 有機物試料として用いた油粕

試料の C 量, N 量, C/N などは以下の表 3.1.2 とおりである。C/N は経年変化している可能性があるため、使用前に確認すべきである。

表 3.1.2 実験で用いた油粕の C/N

測定日	C/N	C 量[ mg/100gDW]	N 量[ mg/100gDW]
2018/11/12	7.378	46567	6311
2019/12/28	6.695	44213	6605



### 3-2 実験で使用した器具

#### 3-2-1 吸光光度計 (DR6000)

土中水や浸透排液の  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$  の濃度測定に、HACH 社製の吸光光度計 DR6000 (図 3.2.1.1) を使用した。試料には、土壌からの水、塩化カリウム KCl 抽出液および排液を用いた。DR6000 では、専用の 10 mL セル内で、液中の被測定物質と試薬を反応させ、変化した液色により濃度を出力する。液色の補色光の透過率を測定し、吸光度および溶液濃度に換算する。透過率の測定原理や無機塩の測定方法は、付録に記した。



図 3.2.1.1 吸光光度計 (DR6000)

### 3-2-2 ルミテスター

ATP（土壌微生物）の測定には、キッコーマンバイオケミファ社のルミテスターC-1000（図 3.2.2.1）を使用した。ルミテスターは、発光量を測定することで生細胞数を評価することのできる機械である。ルミテスターC-1000 はホタルルシフェラーゼ発光法の原理を使っている。ホタルルシフェラーゼ発光は、ホタル腹部の発光器の中で起きている酵素反応である（図 3.2.2.2）。ATP はルシフェリンと酵素の存在下でルシフェラーゼを反応させることにより AMP に変化する。このときに光エネルギーが放出され、その発光量を測定する。発光量と ATP 濃度は正の相関があり、その検量式より ATP 濃度を求めることができる（図 3.2.2.3）。測定方法は付録を参照されたい。



図 3.2.2.1 ルミテスター

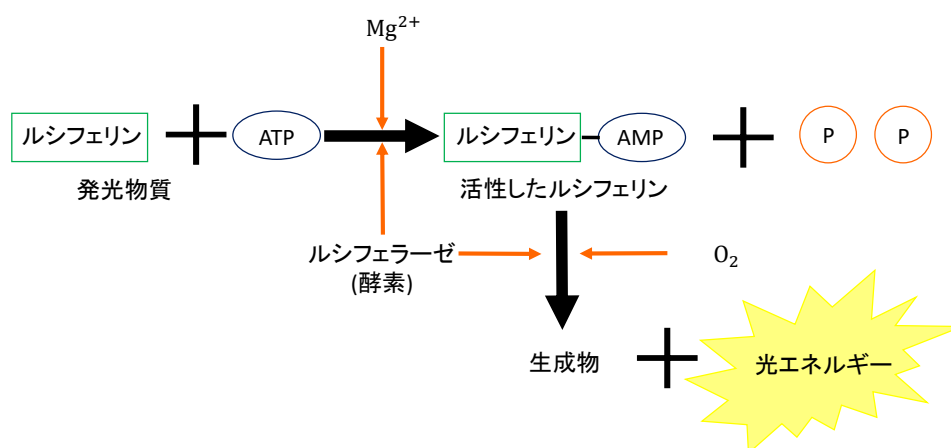


図 3.2.2.2 ホタルルシフェラーゼ発光

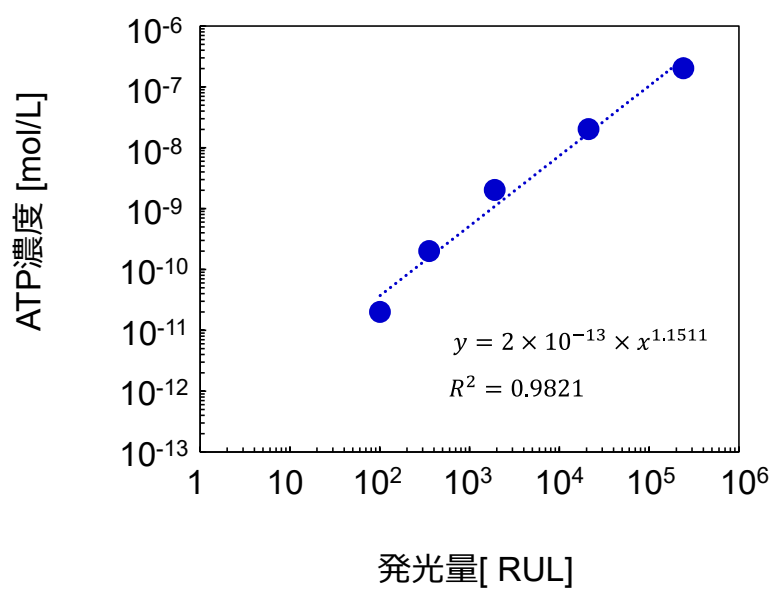


図 3.2.2.3 発光量と ATP 濃度の検量線

### 3-2-3 CHN 元素分析装置

本実験では、土中の全窒素の測定に Elementar 社の全自動元素分析装置 vario EL cube (図 3.2.3.1) を使用した。元素分析機は、試料中の C, H, N を燃焼し  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}_x$  ガスに変え分離する機械である。 $\text{NO}_x$  は、装置内部の還元銅により還元され  $\text{N}_2$  として測定される。機械内の流路には一定速度でヘリウムガスを流し、そこに燃焼したガスを流し入れる。気体となった C, H, N は、流路に設置された吸湿剤や  $\text{CO}_2$  吸収管を通る際に流路から除去される。その前後の熱伝導率の変化を測定し、クロマトグラフの面積を求める。C, H, N の割合が既知のアセトアニリド ( $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}$  (N : 10.36%ow, C : 71.09%ow, H : 11.84%ow) で 5 点、熱伝導率のクロマトグラフの面積と C, H, N の質量を検量することで、試料の熱伝導率の測定により C, H, N の質量を求めることができる。

本研究では、土壌サンプルは 2 回測定、植物サンプルは 3 回測定したものの平均値をとってそれを全 N 量、全 C 量とした。測定方法は付録を参照されたい。



図 3.2.3.1 全自動元素分析装置

#### 3-2-4 液体クロマトグラフィ

本実験では、土中水や浸透排液中の陽イオンの溶存濃度の測定に島津製作所の液体クロマトグラフィー（図 3.2.4.1）を使用した。試料には土壌からの抽出液および排液を用いた。液体クロマトグラフィは、イオン交換物質を充填したカラムを用いて溶液中のイオン種を分離する機械である。機械内の流路には、一定速度で規定の移動相を流し、そこに試料を流し入れる。試料中の各イオンは、カラム内で一旦吸着された後、移動相内のイオンにより再度交換しカラム外へ流れる。各イオンがカラム内に保持される時間は異なるため、各イオンは決まった時間にカラム下流に流れ出てくる。この時、カラム下流の EC の変化を測定し、クロマトグラフの面積を求める。イオン濃度が既知の標準溶液で、EC クロマトグラフの面積と各イオンの濃度を検量することで、試料の EC の測定により各イオンの濃度を求めることができる。



図 3.2.4.1 液体クロマトグラフィ

#### 3-2-5 4 極センサ

本実験では、浸透過程にある土中の EC（電気伝導率）の測定に、4 極センサを使用した。使用したのは、外径 1.25 mm の 4 本のステンレス棒の電極を、内径 5 cm のアクリル製カラムの側面に平行に挿入したものである（図 3.2.5.1 (a)）。外側の 2 本が電流供給電極、内側の 2 本が電圧測定電極である。

##### <測定原理>

4 極センサの測定回路を以下の図 3.2.5.1 (b) に示す（竹内，2015）。内側の電極間電圧  $V_1$  と外側の電極間電圧  $V_2$  との比 ( $V_1/V_2$ ) は、媒体の EC（電気伝導率）に比例する（井上ら，1994）。外側の電流供給電極の回路には抵抗値既知の抵抗  $R$  が入っており、電流を流した際、抵抗  $R$  の両端の電位差が  $V_1$  となる。媒体の電圧比 ( $V_1/V_2$ ) と別途測定した EC を検量することで  $V_1/V_2$  測定により媒体の EC を求めることができる。媒体にかかる電圧比を測定する方法は交流 4 極法と呼ばれ、分極などの局所的な抵抗の影響を避けることが

できる。電圧比  $V_1/V_2$  は温度に影響を受ける値である。そのため、本実験では室内に置いた水温 RefTemp を測定し、それを用いて温度補正した電圧比  $g$  を求めた。補正式は以下の式 3.2.5.1 である。

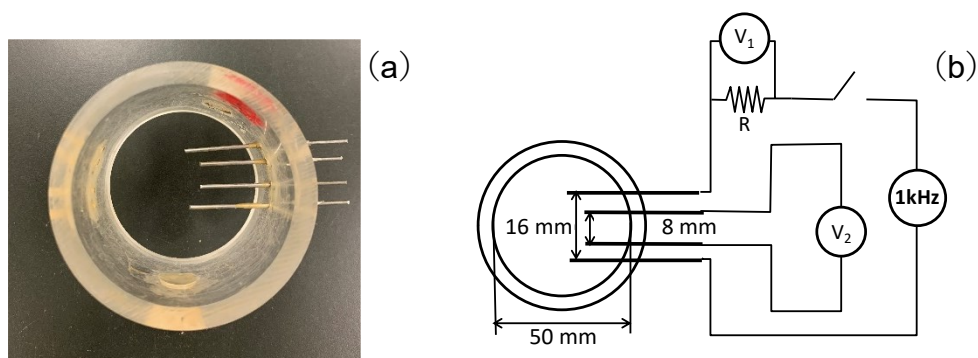


図 3.2.5.1 実際に用いた四極センサ (a) とその回路 (b)

$$g = \frac{V_1/V_2}{1 + 0.0199(\text{RefTemp} - 25)} \quad \text{式 3.2.5.1}$$

#### <検量方法>

4 極センサの出力値（電圧比  $V_1/V_2$ ）から EC を読み取るため、任意の溶液を用いて検量を行った。検量には硫酸アンモニウム  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を使用した。500 mL 容のビーカーに、5 cmol/L の  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を約 300 mL 入れ、カラム内側のセンサ 4 本を溶液内に沈めた（図 3.2.5.2）。カラム外側のセンサは電極に繋ぎ、溶液の電圧比を測定した。電極はデータロガーに繋ぎ、1 分毎に値を出力するよう設定した。4 極センサを溶液内に入れ電圧を読み取ったあと、4 極センサを取り出し、電気伝導率電極 D-24（図 3.2.5.3）により溶液の EC を測定した。次に、その溶液を用い、濃度が約半分の溶液を作り、同様に電圧比と EC を測定した。以下の図これを 4 回繰り返し、測定した電圧比の平均に対する EC の検量線を作成した（図 3.2.5.4）。検量線は、実験前に必ず作成するようにした。

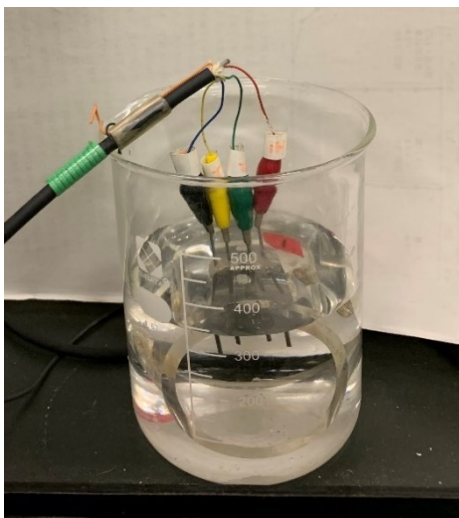


図 3.2.5.2 四極センサの検量の様子



図 3.2.5.3 電気伝導率電極

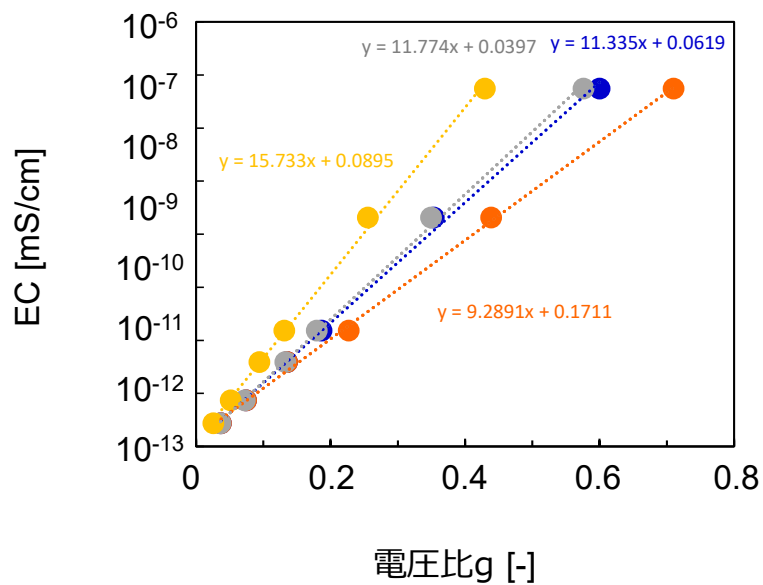


図 3.2.5.4 EC を求める検量線

また、土を詰めたカラムで測定される電圧比は、土粒子の影響により、溶液のみで測定した値よりも小さい値となる。よって、浸透実験における EC の値は、土中水そのものの値 ( $EC_w$ ) ではなく、土粒子とともにある土中水の値 ( $EC_a$ ) である。それらの関係は、 $EC_w > EC_a$  であり、Rhoades モデル (式 3.2.5.2) によって表すことができる。本実験では、土中の EC は、



土中各深さのイオン濃度の時間変化を観察する目的で測定したため、 $EC_a$  から  $EC_w$  への変換は省略した。

$$EC_a = EC_w \theta T_c + EC_s \quad \text{式 3.2.5.2}$$

ここで、 $\theta$ は体積含水率である。 $T_c$ は伝達係数と呼ばれ、土粒子間隙の屈曲などによる土中水中の EC の減少割合を表す。また、 $EC_s$ は土粒子表面の吸着イオンによる粒子表面の伝導成分である。

### 3-2-6 pH, EC の測定

pH の測定, EC の測定にはそれぞれ堀場製作所のコンパクト pH メータ B - 711 (図 3.2.6.1 (a)), コンパクト電気伝導率計 B - 711 (図 3.2.6.1 (b)) を使用した。

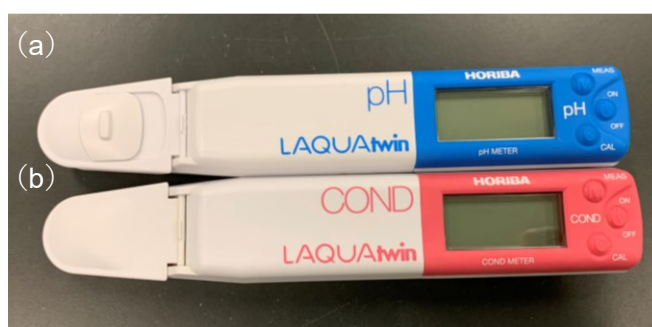


図 3.2.6.1 HORIBA (a) pH, (b) EC の測定機器

また、4 極センサの検量、浸透実験の排液の pH, EC の測定には既出の堀場製作所の電気伝導率電極 D - 24 (図 3.2.5.3) を用いた。

### 3-3 保温静置実験の方法

#### \* 2.5 cm 深さ保温静置実験の方法

2.5 cm 深さの保温静置実験は、2 回行った。期間は、1 回目：2020/4/2～、2 回目：2020/9/27～である。まず、土試料を含水率  $\theta = 0.33, 0.37, 0.43$ （最大容水量の 57, 64, 74%）に調整した。このとき、均一に蒸留水が混ざるように霧吹きを使用した。調整後、油粕を有機態炭素 Org - C : 400 mg/100g<sub>DW</sub> となるように添加し、50mL サンプラに  $\rho_b = 0.9 \text{ g/cm}^3$  で充填し、25°C の暗所でデシケータ内にて保温静置した。任意の日（おおよそ 1, 2, 3, 4, 6, 9, 13, 16, 20, 25, 35 日目）に取り出し、含水比、土中  $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$  量、ATP 量、一部の試料で pH、EC を測定した。

#### \* 10 cm 深さ保温静置実験の方法

まず、土試料を含水率  $\theta = 0.41 \text{ [cm}^3/\text{cm}^3]$ （最大容水量の 73%）に調整した。このとき、均一に蒸留水が混ざるように霧吹きを使用した。調整後、有機物試料を Org - C : 400 mg/100g<sub>DW</sub> となるように添加し、100mL サンプラ 2 つをテープで結合したものに  $\rho_b = 0.9 \text{ g/cm}^3$  で充填した。3, 7, 18 日目に試料を 1 cm ごとに解体し、含水比、土中の  $\text{NH}_4\text{-N}$  量、 $\text{NO}_3\text{-N}$  量、ATP 量を測定した。

### 3-4 浸透実験の方法

図 3.4 に浸透実験の模式図を示す。浸透実験には、内径 2.5 cm、高さ 15 cm のアクリルカラムを用いた。土試料は  $\rho_b = 0.9 \text{ g/cm}^3$  で充填した。上端から一定流速で純水を滴下し、下端から - 35 cm で吸引し、定常流れとなるようにした。通水期間中は、2.5 cm、7.5 cm、12.5 cm 深にテンシオメータと四極センサを設置し、土中水圧力と電気伝導度 EC を測定した。下端から排出される溶液（以下、排液）は 30 - 50 mL 毎に採取し、重量、吸光光度計にて  $\text{NH}_4\text{-N}$  や  $\text{NO}_3\text{-N}$  濃度を、液体クロマトグラフィを用いて各陽イオン濃度を、電気伝導率電極やコンパクト電気伝導率計、コンパクト pH メータを用いて EC と pH を測定した。カラム解体時には、含水比、吸光光度計にて土中  $\text{NH}_4\text{-N}$  量や  $\text{NO}_3\text{-N}$  量を、ルミテスターにて土中 ATP 量を、コンパクト電気伝導率計やコンパクト pH メータを用いて、土中 pH や EC を測定した。なお、いくつかの実験では測定を省略した項目もある。

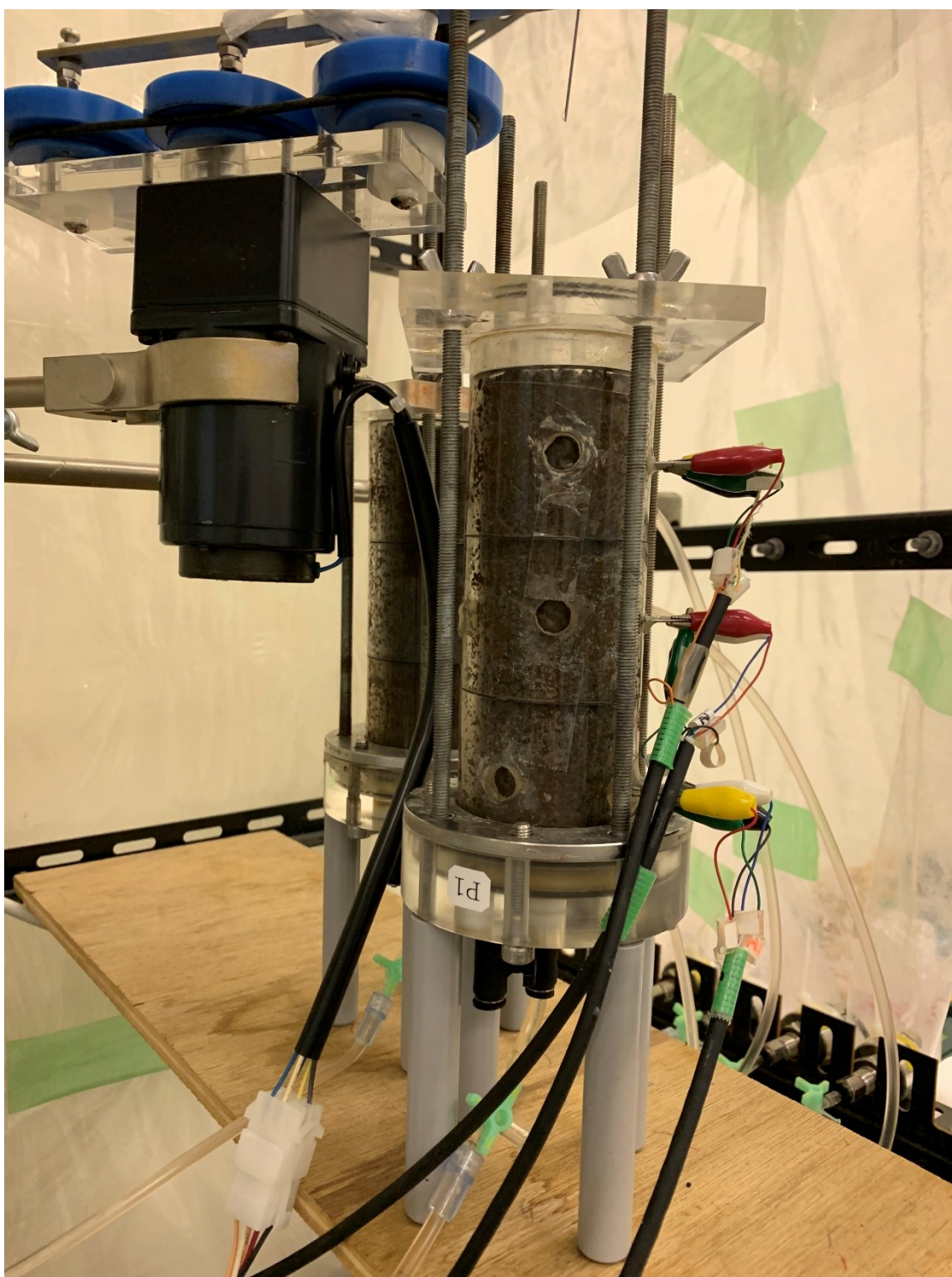


図 3.4 浸透実験の様子

#### \* 予備実験の方法

予備実験では、水分移動をとまなう土中の有機物分解の実験をするにあたりどのように実験したらよいか確認するための予備実験である。2 mm 篩で通過分の岩手黒ボク土をアクリルカラムに充填したのち、8 日間通水した。8 日間というのは、EC が全層で低下したのを確認するまでの期間である。その後、アクリルカラム全層の乾土に対して油粕を Org - C が 400 mg/100g<sub>DW</sub> となるように上層に敷設し、 $q = 1.0$  cm/d で再び 9 日間通水した。途中排水を回収し、NH<sub>4</sub>-N 量、NO<sub>3</sub>-N 量、陽イオン濃度、pH、EC を測定した。その後、カラムを解体した。解体時には、油粕敷設層、0 - 1, 1.5 - 3.5, 4 - 6, 6.5 - 8.5, 9 - 11, 11.5 - 13.5, 13.5 - 15 cm と 1 cm - 2 cm ごとに試料を回収し、土中 NH<sub>4</sub>-N 量、NO<sub>3</sub>-N 量、ATP 量、pH、EC、を測定した。

#### \* 条件 1 の方法

水洗した 2 mm 篩通過分の岩手黒ボク土をアクリルカラムに充填した。この時、上端から 10 cm の土試料に油粕を Org - C が 400 となるように添加し、すきこんだ。 $q = 0.5$  cm/d で上端から滴下、通水した。排水を回収し、NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、陽イオンを測定した。4 日目、7 日目、18 日目、31 日目にカラムを解体し、4 日目は、上端から 4 cm までは 1 cm 毎、それ以深で 2 cm 深毎に採取した。7、18、31 日目は上端から 14 cm 深まで 2 cm 毎に、14 - 15 cm は 1 cm 分採土した。土中 NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、ATP を測定した。

#### \* 条件 2 の方法

岩手黒ボク土 2 mm 篩通過分を、アクリルカラムに充填し、26 日間（3 PV 程度）通水した。その後、水洗した岩手黒ボク 2 mm 篩通過分をカラム 1 cm 分用意し、これに対して油粕が Org - C : 400 mg/100g<sub>DW</sub> となるように添加し（油粕すきこみ層）、これを上端に追加して  $q = 0.5$  cm/d で再び通水をした。排水は pH、EC を測定した。通水 9、16 日後にカラムを 0 - 1, 1 - 3, 3 - 5, 5 - 7, 7.5 - 9.5, 10 - 12, 12.5 - 14.5, 14.5 - 16 cm というように解体し、土中 NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、ATP を測定した。

#### \* 条件 3 の方法

岩手黒ボク土 2 mm 篩通過分を、アクリルカラムに充填し、17 日間（3.4 PV 程度）通水した。その後、水洗した岩手黒ボク 2 mm 篩通過分をカラム 1 cm 分用意し、これに対して油粕が Org - C : 400 mg/100g<sub>DW</sub> となるように添加し（油粕すきこみ層）、これを上端に追加して  $q = 1.0$  cm/d で再び通水をした。排水は NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、pH、EC を測定した。

通水 9, 16 日後にカラムを 0-1, 1-2, 2.5-4.5, 5-7, 7.5-9.5, 10-12, 12.5-14.5, 14.5-16 cm というように解体し, 土中  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ , ATP を測定した。

**\* 条件 4 の方法**

岩手黒ボク土 2 mm 篩通過分を, アクリルカラムに充填し, 26 日間 (2.4 PV 程度) 通水した。その後, 水洗した岩手黒ボク 2 mm 篩通過分をカラム 1 cm 分用意し, これに対して油粕が  $\text{Org-C} : 400 \text{ mg}/100\text{g}_{\text{DW}}$  となるように添加し (油粕すきこみ層), これを上端に追加して  $q = 1.0 \text{ cm}/\text{d}$  で再び通水をした。排液は  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ , pH, EC を測定した。通水 9, 16 日後にカラムを 0-1, 1-3, 3-5, 5-7, 7-9, 10-12, 12.5-14.5, 14.5-16 cm というように解体し, 土中  $\text{NH}_4\text{-N}$ , ATP を測定した。

それぞれの条件を以下の表 3.4.1 にまとめた。

**表 3.4.1 各実験の条件まとめ**

	油粕添加 N 量 [mg]	油粕の状態	上端 [cm/d]	通水期間
予備実験	143.7	敷設	1.0	2019/7/4~2019/7/21
条件 1	95.52	10cm すきこみ	0.5	2020/9/25~2020/10/26
条件 2	10.56	1 cm すきこみ	0.5	2020/2/10~2020/4/14
条件 3	9.552	1 cm すきこみ	1.0	2019/8/16~2019/9/18
条件 4	47.76	1 cm すきこみ	1.0	2019/11/13~2019/12/27

条件 2 と 3 を比較することで流速が及ぼす影響を, 条件 3 と 4 を比較することで異なる有機物濃度が分解に与える影響を考察する。

## 第 4 章 保温静置実験の結果と考察

### 4-1 2.5 cm 深さの保温静置実験の結果

この節では、50 mL サンプラを用いた高さ 2.5 cm の保温静置実験の結果を記す。図 4.1.1 に含水率毎の保温静置実験の解体時の試料表面の写真を示す。 $\theta=0.33$  の保温静置実験では、2 日目からカビのような白い斑点が確認でき、9 日目以降は白い斑点が減少、さらに 36 日目には再び白い斑点が確認できた。一方、 $\theta=0.37$  の試料は 3 日目に白い斑点が確認できたもののわずかで、白い斑点が大部分で確認できるのは 6 日目だった。13 日目には白い斑点が減少し、36 日目にはほとんど確認できなかった。 $\theta=0.43$  の試料は、6 日目に白い斑点が確認できたが、20 日目にはほとんど確認できなくなった。

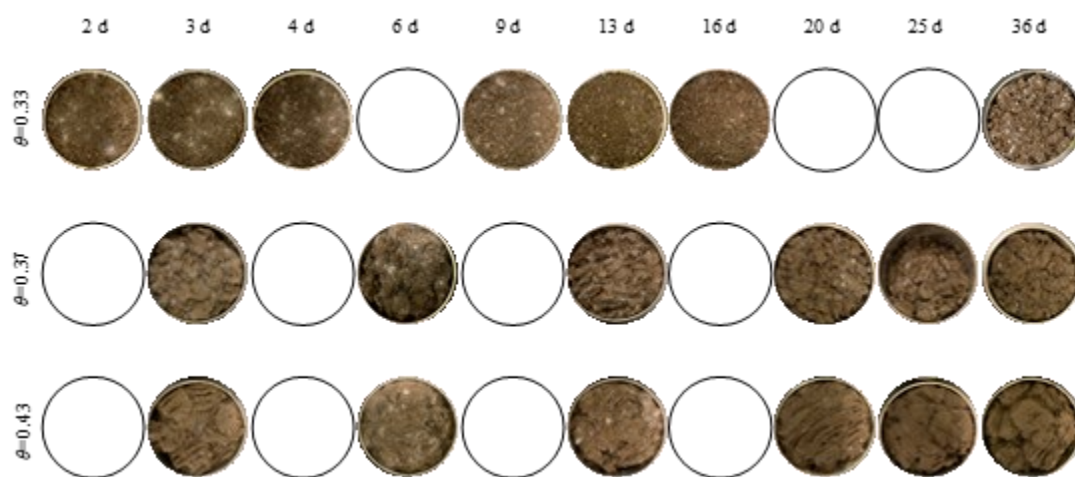


図 4.1.1 保温静置実験のカラム解体時の試料表面の写真

異なる含水率で調整した保温静置実験の含水率、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、Inorg - N、ATP 量の経時変化を図 4.1.2 に示す。

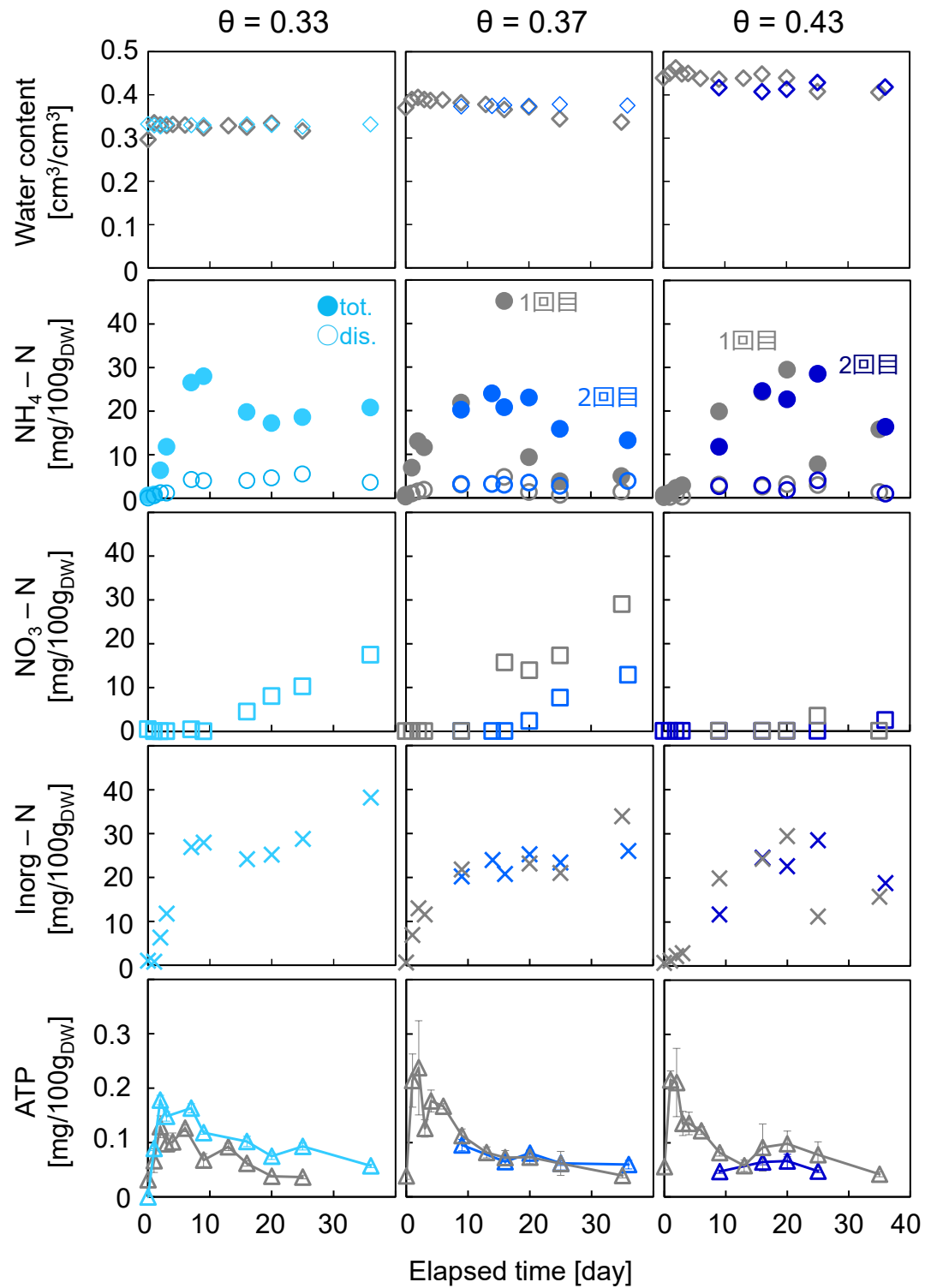


図 4.1.2 異なる含水率の保温静置実験の経時変化

(a) 含水率, (b)  $\text{NH}_4\text{-N}$ , (c)  $\text{NO}_3\text{-N}$ , (d) Inorg-N, (e) ATP 量



$\theta = 0.33, 0.37, 0.43$  はそれぞれ 2 回実験を行っており、1 回目を灰色、2 回目を青色で示した。 $\theta = 0.33$  の 1 回目の  $\text{NH}_4 - \text{N}$ 、 $\text{NO}_3 - \text{N}$  は解体日から 5 か月後に測定したが、無機化がみられず硝化の進行がみられたため記さなかった。

それぞれ期間中の含水率  $\theta$  は、0.33, 0.37, 0.43 で期間中ほぼ一定だった。

$\theta = 0.33$  の保温静置実験では、 $\text{NH}_4 - \text{N}$  が 9 日目にかけて  $28 \text{ mg}/100\text{g}_{\text{DW}}$  (添加 Org - N の 47%) に増加した。無機化が生じたと考えられる。その後  $\text{NH}_4 - \text{N}$  は減少し一定となり、 $\text{NO}_3 - \text{N}$  が 9 日目から増加した。硝化が生じたと考えられる。 $\text{NO}_3 - \text{N}$  は 36 日目には  $18 \text{ mg}/100\text{g}_{\text{DW}}$  まで上昇した。 $\text{NH}_4 - \text{N}$  と  $\text{NO}_3 - \text{N}$  を足した Inorg - N は、9 日目にかけて上昇しその後一定となったが、36 日目にかけて再び上昇した。最終的には添加 Org - N の 64%にあたる  $38 \text{ mg}/100\text{g}_{\text{DW}}$  まで増加した。硝化が生じてから、無機化速度は低下したものの無機化が生じ続けたとみなせる。ATP 量は 2 日目にかけて増加し、その後減少と増加をして、硝化の始まる 9 日目ごろから一定になった。

$\theta = 0.37$  の保温静置実験では、 $\text{NH}_4 - \text{N}$  は 13 - 16 日目にかけて  $45 \text{ mg}/100\text{g}_{\text{DW}}$  (添加 Org - N の 76%)、 $24 \text{ mg}/100\text{g}_{\text{DW}}$  (40%) まで増加した。無機化が生じたと考えられる。その後  $\text{NH}_4 - \text{N}$  は減少、 $\text{NO}_3 - \text{N}$  が 20 日目から増加した。硝化が生じたと考えられる。 $\text{NH}_4 - \text{N}$  と  $\text{NO}_3 - \text{N}$  を足した Inorg - N は、20 日目にかけて添加 Org - N の 42%にあたる  $25 \text{ mg}/100\text{g}_{\text{DW}}$  まで増加し、その後ほぼ一定になった。無機化が ATP は、2 日目にかけて  $0.238 \text{ mg}/100\text{g}_{\text{DW}}$  まで急増加後減少し、硝化の始まる 20 日ごろから一定値となった。無機化・硝化の傾向は木村 (2017) による油粕を加えた保温静置実験 ( $\theta = 0.40$ ) とほぼ同様だった。

$\theta = 0.43$  の保温静置実験では、 $\text{NH}_4 - \text{N}$  が 20 日目にかけて  $30 \text{ mg}/100\text{g}_{\text{DW}}$  (添加 Org - N の 49%)、25 日目にかけて  $29 \text{ mg}/100\text{g}_{\text{DW}}$  (48%) 上昇した。無機化が生じたと考えられる。その後、 $\text{NH}_4 - \text{N}$  は減少した。 $\text{NO}_3 - \text{N}$  は 36 日目にわずかに検出された。Inorg - N は 25 日目にかけて上昇し、その後 36 日目には減少した。脱窒が生じたとみなせる。ATP は、1 日目、2 日目に  $0.21 \text{ mg}/100\text{g}_{\text{DW}}$  に一気に上昇し、その後 16 日目にかけて減少、16, 20, 25 日目に上昇したが 35 日後には減少した。

いずれの含水率においても、硝化が無機化に遅れて生じた。また、油粕を添加してから土壌微生物が急激に増殖または活性化し、その後低下、硝化期間には一定となった。しかし、含水率が異なると、無機化が生じる期間やその程度、また硝化の生じるタイミングとその程度が異なった。

ここで、Org - N の無機化と  $\text{NH}_4 - \text{N}$  の硝化を一次分解で表現できると仮定し、一次分解速度定数を決定した。 $\text{NH}_4 - \text{N}$  が増加している期間を無機化期間、 $\text{NH}_4 - \text{N}$  が減少、 $\text{NO}_3$



-N が増加している期間を硝化期間とし、それぞれ以下の式 4.1.1, 4.1.2 で示した。

<無機化>

$$C_{\text{NH}_4-\text{N}} = C_{\text{org}-\text{N}_0} \times (1 - e^{(k_{\text{min}}t)}) + C_{\text{NH}_4-\text{N}_0} \quad \text{式 4.1.1}$$

ここで、 $C_{\text{org}-\text{N}_0}$ は、添加した易分解性 N 量（木村（2017）より、添加有機態 N の 85%）である。 $C_{\text{NH}_4-\text{N}_0}$ は 0 日目の  $\text{NH}_4-\text{N}$  量である。

<硝化>

$$\begin{aligned} C_{\text{NH}_4-\text{N}} &= C_{\text{NH}_4-\text{N}_x} \times e^{(-k_{\text{nit}}t)} \\ C_{\text{NO}_3-\text{N}} &= C_{\text{NH}_4-\text{N}_x} \times (1 - e^{(-k_{\text{nit}}t)}) \end{aligned} \quad \text{式 4.1.2}$$

ここで、 $C_{\text{NH}_4-\text{N}_x}$ は、 $\text{NH}_4-\text{N}$  が最大となる日（ $t=x$ ）の、一次分解反応式<無機化>により求めた  $\text{NH}_4-\text{N}$  量である。

この式を最小二乗法によりフィッティングした結果を以下の図 4.1.3 に示す。

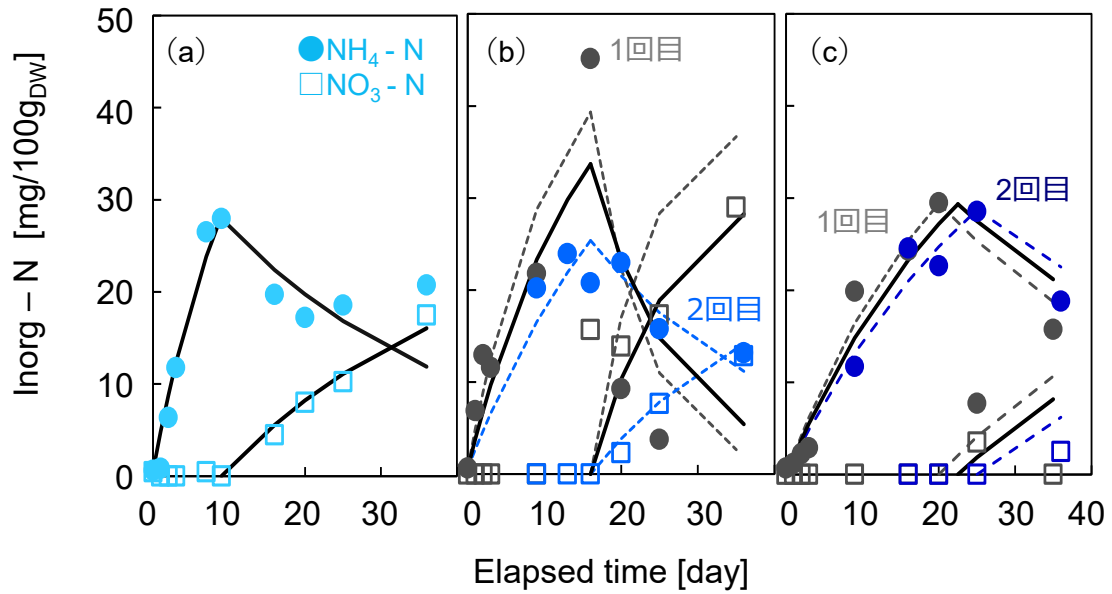


図 4.1.3 分解速度定数の決定

(a)  $\theta=0.33$ , (b)  $\theta=0.37$ , (c)  $\theta=0.43$

図中、破線は各実験に対する一次分解のフィッティングを、実線は二回の実験の平均値をそれぞれ示す。いずれの含水率の保温静置試験についても無機化と硝化反応をそれぞれ一次分解反応式で概ね表せることが確認できた。この際、無機化と硝化の速度定数  $k_{\text{min}}$  と  $k_{\text{nit}}$  は、 $\theta=0.33$  で  $k_{\text{min}}=0.087/\text{d}$ ,  $k_{\text{nit}}=0.032/\text{d}$ ,  $\theta=0.37$  で  $0.066/\text{d} \pm 0.024$ ,  $k_{\text{nit}}=0.091 \pm 0.050$ ,

$k_{\min}=0.038/\text{d} \pm 0.0050$ ,  $k_{\text{nit}}=0.026 \pm 0.0040$  だった。ここで、含水率に対する  $k_{\min}$ ,  $k_{\text{nit}}$  を図 4.1.4 に示す。

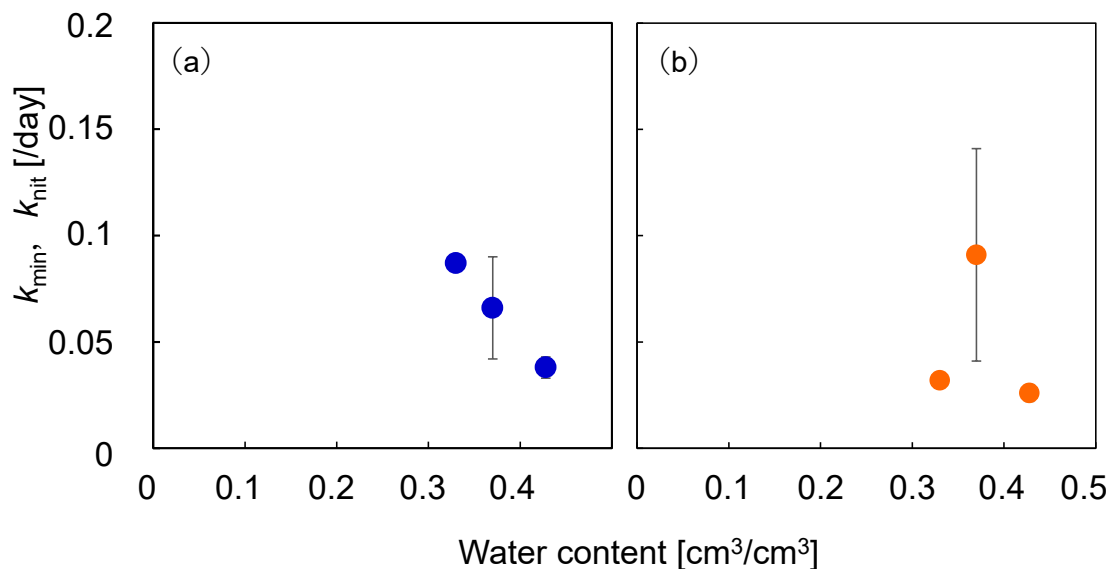


図 4.1.4 含水率と分解速度定数  
(a)無機化速度定数  $k_{\min}$ , (b) 硝化速度定数  $k_{\text{nit}}$

$k_{\min}$  は  $\theta=0.33$  の試料で大きくなり,  $k_{\text{nit}}$  は  $\theta=0.37$  の試料で一番大きくなった。  $\theta=0.37$  の試料で, 1 回目と 2 回目の差が大きかった。

以上の結果を以下の表 4.1.1 にまとめた。なお, 無機化期間は  $\text{NH}_4\text{-N}$  が減少しはじめる期間まで, 硝化開始は  $\text{NH}_4\text{-N}$  が減少し始めたときである。

表 4.1.1 異なる含水率の保温静置実験の結果

	$\theta=0.33$	$\theta=0.37$	$\theta=0.43$
無機化期間[day]	9	16	$22.5 \pm 2.5$
最大 $\text{NH}_4\text{-N}$ 量 [ mg/100gDW]	28.0	$34.5 \pm 10.59$	$29.5 \pm 0.47$
$k_{\min}$ [1/day]	0.087	$0.066 \pm 0.024$	$0.038 \pm 0.0050$
硝化開始	9	16	25
最大 $\text{NO}_3\text{-N}$ 量 [ mg/100gDW]	17.5	12.8	2.47
$k_{\text{nit}}$ [1/day]	0.032	$0.091 \pm 0.050$	$0.026 \pm 0.0040$

含水率が低いほど、無機化期間が短く  $k_{\min}$  も大きくなった。また、硝化開始が早かった。

#### 4-2 10 cm 深さの保温静置実験の結果

10 cm 深さの保温静置実験の結果を図 4.2.1 に示す。0 日目のデータは、 $\theta = 0.37$  の 2.5 cm 深さの保温静置実験の 0 日目の値を使用した。

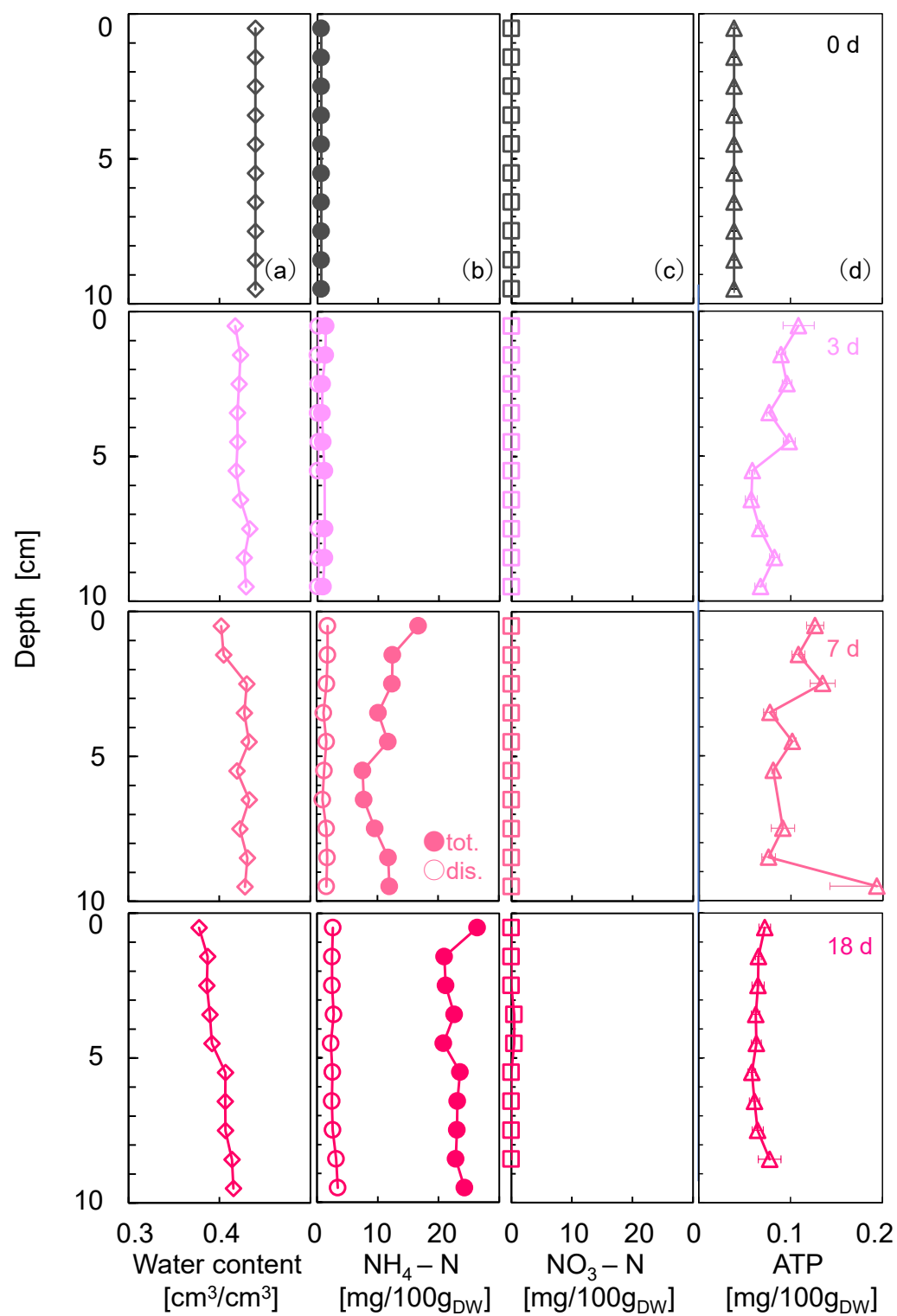


図 4.2.1 10 cm 深さの保温静置実験の  
含水率  $\theta$  (a),  $\text{NH}_4\text{-N}$  (b),  $\text{NO}_3\text{-N}$  (c), ATP (d) の分布

含水率は表層でわずかに減少した。 $\text{NH}_4\text{-N}$  は3日目にはほとんどなく、7日目に上昇した。7日目は0.5 cm 深で 17 mg/100g<sub>DW</sub> と高く、それ以深で 13 mg/100g<sub>DW</sub> 以下となった。18日目も、7日目と同様 0.5 cm 深で 26 mg/100g<sub>DW</sub> と高く、それ以深は 24 mg/100g<sub>DW</sub> だった。 $\text{NO}_3\text{-N}$  は、18日目に 3.5 cm 深、4.5 cm 深で 0.5 mg/100g<sub>DW</sub> 程度検出されたが、それ以外では検出されなかった。硝化はほとんど生じなかったと言える。18日の時点で  $\text{NO}_3\text{-N}$  が検出されなかったのは、2.5 cm 深さの保温静置実験 ( $\theta=0.43$ ) と同じ結果である。微生物活性は、0 日目は 0.04 mg/100g<sub>DW</sub> だったのに対して、3 日目は全層平均して 0.08 mg/100g<sub>DW</sub> と 0 日目より上昇した。一番高かったのは 0.5 cm 深で 0.11 mg/100g<sub>DW</sub> だった。7 日目にはわずかに上昇して全層平均して 0.11 mg/100g<sub>DW</sub> だった。18 日目には減少し、全層平均して 0.07 mg/100g<sub>DW</sub> となった。わずかではあるが、上昇して減少する傾向を確認できた。

ここで、比較のため含水率が同程度である 2.5 cm 深さの保温静置実験 ( $\theta=0.43$ ) と 10 cm 深さ保温静置実験の  $\text{NH}_4\text{-N}$  の経時変化を図 4.2.2 に示す。なお、10 cm 深さの保温静置実験の結果は、表層 (0 - 1 cm 深) と表層以外 (1 - 10 cm 深) で分けて示した。

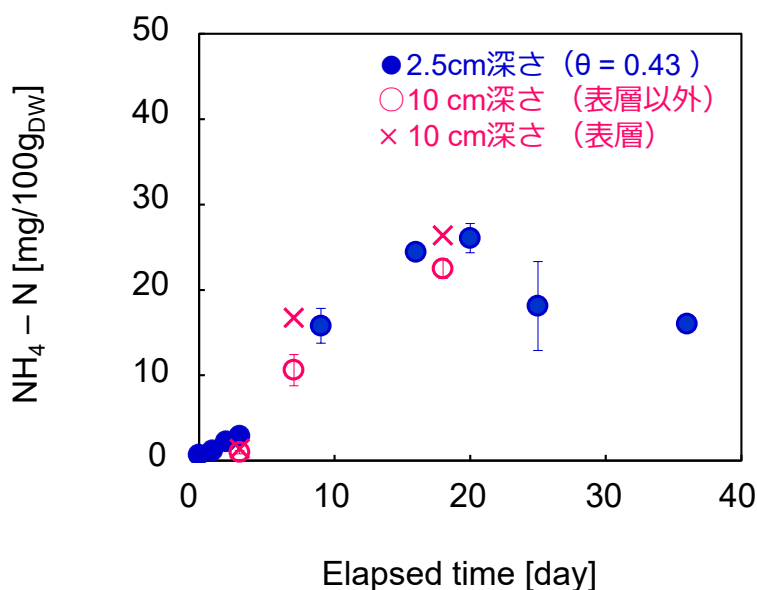


図 4.2.2 10 cm 深さの  $\text{NH}_4\text{-N}$  の経時変化

10 cm 深さの保温静置実験は、2.5 cm 深さの保温静置実験と同程度、無機化した。18 日目の時点で、10 cm 深さの保温静置実験では添加 Org - N の 39% 分解したのに対し、20 日目の時点で、2.5 cm 深さの保温静置実験 ( $\theta = 0.43$ ) では 38% だったので、ほぼ同量分解したと言える。しかし、10 cm 深さの保温静置実験の表層と表層以外を比較すると、表層の方

が多く分解した。

ここで3日，7日目，18日目の  $\text{NH}_4\text{-N}$  濃度から深さ毎の分解速度定数を求めた。以下の式 4.2.1 によりフィッティングした。

$$C_{\text{NH}_4\text{-N}} = C_{\text{org-N0}} \times (1 - e^{(k_{\text{min}}t)}) + C_{\text{NH}_4\text{-N0}} \quad \text{式 4.2.1}$$

$C_{\text{org-N0}}$ は，添加した易分解性 N 量（木村（2017）より，添加有機態 N の 85%）である。

$C_{\text{NH}_4\text{-N0}}$ は 0 日目の  $\text{NH}_4\text{-N}$  量である。

図 4.2.3 に深さ毎のフィッティングの結果を示す。

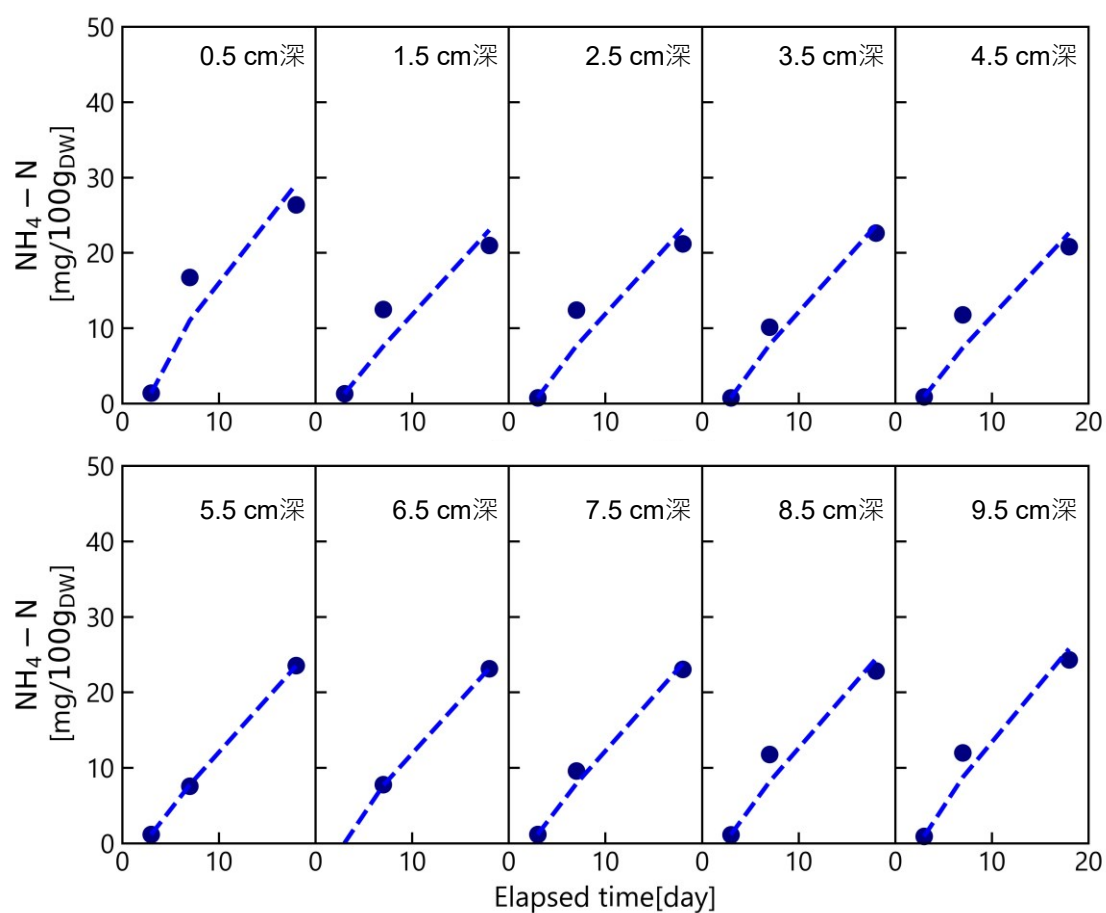


図 4.2.3 各深さ毎の分解速度定数（●：実測値，破線：一次分解反応式）

これらの結果を以下の表 4.2.1 と図 4.2.44.2.1 にまとめる。

表 4.2.1 深さ毎の無機化速度定数  $k_{\min}$

深さ [cm]	$k_{\min}$ [/day]
0 - 1	0.053
1 - 2	0.040
2 - 3	0.041
3 - 4	0.042
4 - 5	0.039
5 - 6	0.041
6 - 7	0.041
7 - 8	0.042
8 - 9	0.044
9 - 10	0.047
平均	0.043

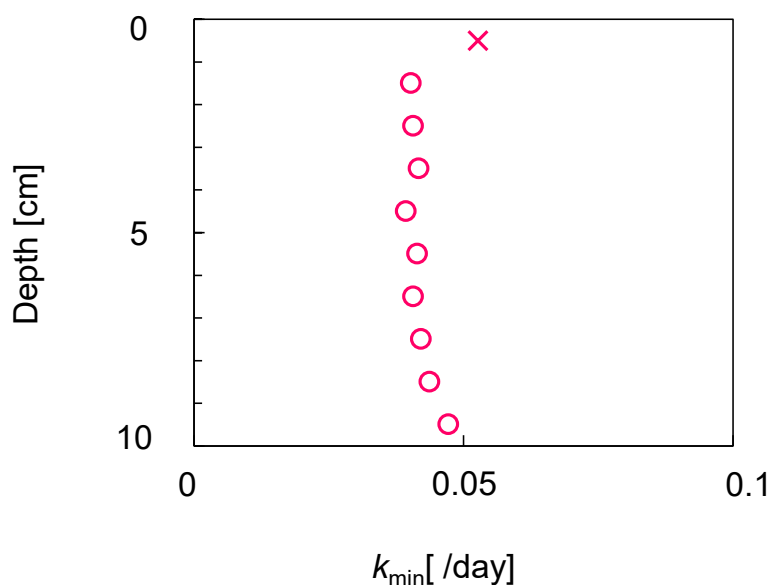


図 4.2.4 深さ毎の無機化速度定数  $k_{\min}$

わずかではあるが、0 - 1 cm のみ分解速度定数 0.053 /d と早く、それ以深では平均して 0.042 /d と低くなった。0 - 10 cm 全層の  $\text{NH}_4\text{-N}$  量を平均して算出した  $k_{\min}$  は、0.043 で、これは 2.5 cm 高の  $\theta=0.41$  以上の保温静置実験の  $k_{\min}$  ( $0.038 \pm 0.0050$  /d) の範囲内だった。深さ毎に見ると、0 - 1 cm 深と 9 - 10 cm 深のみ範囲外だった。 $k_{\min}$  は特に 0 - 1 cm 深で高くなった。含水率と 2.5 cm 高さの保温静置実験で算出した  $k_{\min}$ 、10 cm 高さの保温静置実

験で算出した  $k_{\min}$  の関係を以下の図 4.2.5 にプロットする。

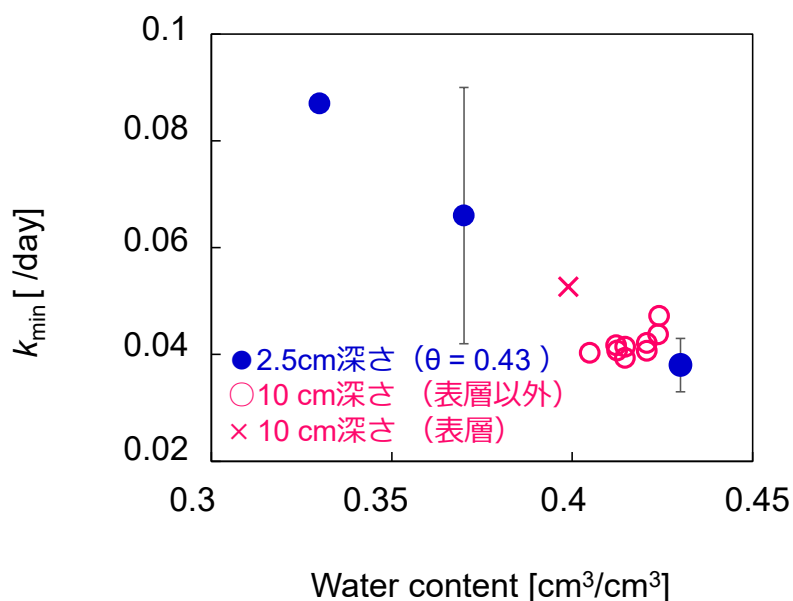


図 4.2.5 含水率と無機化速度定数  $k_{\min}$  の関係

10 cm 深さの保温静置実験では表層のみ  $k_{\min}$  が高くなったが、これは 2.5 cm 深さの保温静置実験の延長線上にあった。

#### 4-3 保温静置実験の考察

<全体を通しての考察>

$\text{NH}_4 - \text{N}$  は、どの含水率でも油粕添加後すぐに生成した。これは、油粕の C/N は低く、無機化がすぐに生じたためである。また、無機化が生じているとき硝化は生じず、 $\text{NH}_4 - \text{N}$  がある程度生成されてから硝化が開始した。木村（2017）と同様の結果である。硝化開始を決める要素の一つに、硝化菌のエネルギー源である  $\text{NH}_4 - \text{N}$  量があると考えられる。硝化菌は、 $\text{NH}_4 - \text{N}$  がないと活性しない。今回の実験ではどの含水率の結果を見てもタイミング関係なく  $\text{NH}_4 - \text{N}$  が約 30 mg/100g<sub>DW</sub> 生成されたときに硝化が開始している。よって、硝化が生じるのは  $\text{NH}_4 - \text{N}$  が約 30 mg/100g<sub>DW</sub> 以上になってからだと考えられる。

Inorg - N は、 $\theta = 0.33$  では硝化が開始してからも増加、 $\theta = 0.37$  では硝化が生じてから一定に、 $\theta = 0.43$  では硝化が生じてから減少した。 $\theta = 0.33$  では 9 日目以降無機化と硝化が同時に生じ、 $\theta = 0.43$  では 25 日目以降硝化と脱窒が同時に生じていると考えられる。 $\theta = 0.33$  の試料は酸素  $\text{O}_2$  が多く、硝化菌が活発になっていても有機物分解菌が活発になっている可能性がある。一方、 $\theta = 0.43$  の試料では、水分量が多く団粒内に嫌気的な空間が生じ、



脱窒菌が活性化した可能性がある。

<異なる含水率が微生物活性と無機化・硝化に及ぼす影響>

試料表面の写真を見ると、 $\theta = 0.33$ （最大容水量の 57%）の試料では 2 日目にカビのような白い斑点が確認できたのに対して、 $\theta = 0.37$ （64%）、 $\theta = 0.43$ （74%）の試料ではまだ確認できず、6 日目に確認できた。含水率によって微生物種が代わったと考えられる。最大容水量の 60–80% で細菌とカビ（糸状菌）が優性となり土壌微生物自体の活動が最も盛んになるが、60% 以下になると細菌の活性が落ち、糸状菌であるカビが優性になる（西尾, 1989）との報告同様、 $\theta = 0.33$  の試料ではカビが優性になったのだと考えられる。図 4.2.3 の ATP の経時変化からも、初期の ATP 量の増加具合が最大容水量の 57% である  $\theta = 0.33$  と、60–80% の  $\theta = 0.37, 0.43$  で異なり、これは細菌が活性化しているかどうかの差のようにも見える。

$\text{NH}_4\text{-N}$  を見ると、含水率によって分解速度定数が異なった。 $k_{\min}$  は  $\theta = 0.33 > 0.37 > 0.43$  の順になった。これは含水率が低いほど  $\text{O}_2$  が多く、好気呼吸が盛んに生じ無機化が促進したからだと考えられる。一方、 $\theta = 0.43$  の試料では、 $\text{O}_2$  が少なく、ゆっくり好気呼吸が行われ、 $\text{NH}_4\text{-N}$  が生成されたと考えられる。

$\text{NO}_3\text{-N}$  を見ると、含水率によって硝化が始まるタイミングや生成量、 $k_{\text{nit}}$  が異なった。硝化が始まるタイミングが早かったのは、 $\theta = 0.33$ 、遅かったのは  $\theta = 0.43$  だった。これは、 $\text{NH}_4\text{-N}$  量が約 30 mg/100g<sub>DW</sub> 生成される速さによると考えられる。また、 $\text{NO}_3\text{-N}$  生成量が  $\theta = 0.33$  で最も多かったのは、硝化開始のタイミングが早かったからである。 $k_{\text{nit}}$  は  $\theta = 0.37 > 0.33 > 0.43$  の順になった。これは、 $\theta = 0.4$  で最も  $k_{\text{nit}}$  が高いという武藤ら（2019）の報告と一致した。

<深さが無機化反応に与える影響>

$k_{\min}$  は表層で高かった。このことから、同じ水分量の条件下では、表層で  $\text{O}_2$  に触れている面積が多い方が無機化が促進されと考えられる。もしくは、表層で含水率が低下したとともに、大気とのガス交換がしやすくなり無機化が促進されたと考えられる。いずれにせよ、今回は最大容水量の 80% 以下の実験であり、有機物を分解する微生物が好気呼吸を行うために、 $\text{O}_2$  を供給しやすい表層で  $k_{\min}$  が高くなったのを見なせる。それ以深では、 $\text{O}_2$  が同程度だったため、好気呼吸が同程度行われ、 $k_{\min}$  が同程度となったのだろう。このように、 $k_{\min}$  は深さによっても異なる可能性が示唆された。このことから、土中の無機化・硝化反応は深さによっても  $k_{\min}$  が異なるため、土層での無機化反応を考える際には深さを考慮する必要がある。

## 第5章 浸透実験

### 5-1 予備実験

土中圧力変化，土中各深さの EC を図 5.1.1 に示す。なお，ここで示す土中各深さの EC は，土中水そのものの値 ( $EC_w$ ) ではなく，土粒子とともにある土中水の値 ( $EC_a$ ) である。しかし，本実験では土中各深さのイオン濃度の時間変化を観察する目的で測定したため， $EC_a$  から  $EC_w$  への変換は省略した。

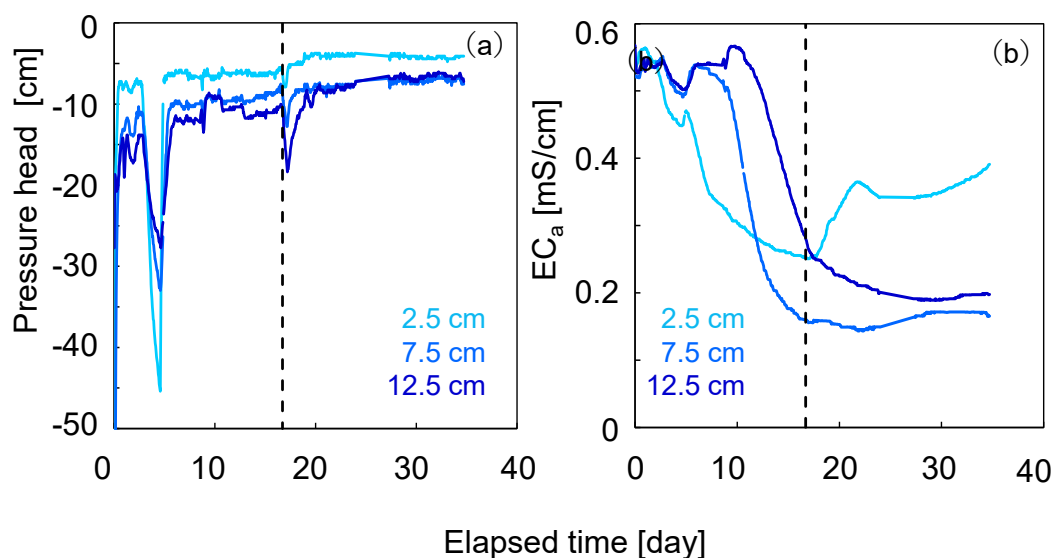


図 5.1.1 期間中の土中水圧力 (a) と土中 EC (b) の経時変化

図中点線は，油粕添加時である。土中水圧力は油粕添加時には  $-5.8\text{ cm}$  から  $-10.7\text{ cm}$  ( $\theta = 0.56 - 0.57\text{ cm}^3/\text{cm}^3$ ) で，含水率が全層でほとんど一定だった。EC は油粕添加時には全層で低下していたが，9日目までに  $2.5\text{ cm}$  深の EC が上昇した。

油粕敷設9日後のカラム解体時の敷設層の様子を図 5.1.2 に示す。



図 5.1.2 カラム解体時の油粕敷設層の様子

9日間の連続降水によって敷設したある程度油粕が黒ボク土となじんでいた。

カラム解体時の体積含水率、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、ATP の土中分布を図 5.1.3 (a) (b) (c) (d) にそれぞれ示す。(b) の  $\text{NH}_4\text{-N}$  の土中分布は、 $\text{NH}_4\text{-N}$  全量と  $\text{NH}_4\text{-N}$  溶存量を、それぞれ実線と破線で示した。

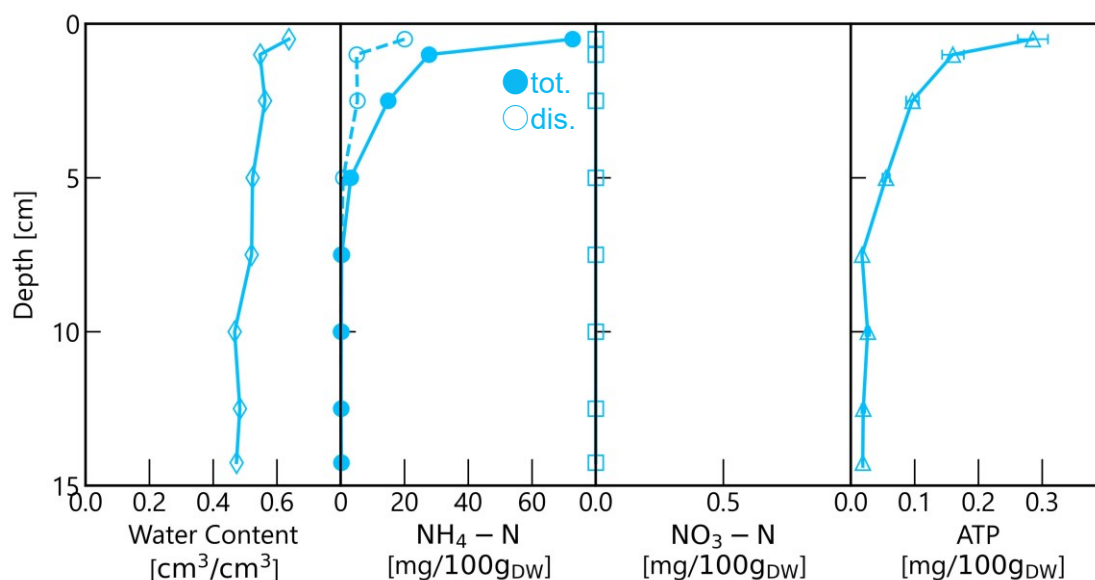


図 5.1.3 カラム敷設 9 日後の (a) 含水率 (b)  $\text{NH}_4\text{-N}$  (c)  $\text{NO}_3\text{-N}$  (d) ATP 分布

含水率は、油粕層で少し高かったものの、それ以深でおよそ  $0.51 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$  で一定だった。 $\text{NH}_4\text{-N}$  は油粕層で  $72 \text{ mg}/100\text{g}_{\text{DW}}$  と高くなり、下方ほど減少し、 $7.5 \text{ cm}$  以深ではほとんど検出されなかった。濃度分布の積算により求めた全層の  $\text{NH}_4\text{-N}$  量は  $36 \text{ mg}$  (添加 Org-N の 25%) で  $\theta = 0.43$  の保温静置実験の 9 日目の有機態 N 分解率と同程度だった。また、 $\text{NO}_3\text{-N}$  は検出されず、硝化が生じなかった。ATP は、生土で  $0.0058 \text{ mg}/100\text{g}_{\text{DW}}$  だったが、油粕を敷設して 9 日後には  $\text{NH}_4\text{-N}$  と同様、上層で高く油粕層で  $0.28 \text{ mg}/100\text{g}_{\text{DW}}$ 、下方ほど減少し、 $7.5 \text{ cm}$  以深ではおよそ  $0.02 \text{ mg}/100\text{g}_{\text{DW}}$  でほぼ一定だった。

続いて、排液の無機態窒素 ( $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ ) 濃度、pH、EC、陽イオンの時間変化を図 5.1.4 に示す。

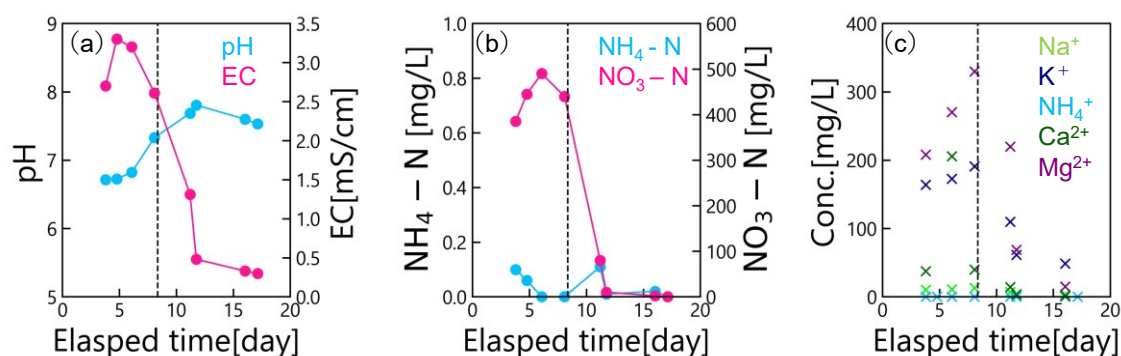


図 5.1.4 排液の経時変化

(a) pH と EC, (b)  $\text{NH}_4\text{-N}$  と  $\text{NO}_3\text{-N}$  濃度, (c) 陽イオン濃度

図中黒い破線は、油粕を添加した日を表す。油粕添加後に  $\text{NH}_4\text{-N}$  や  $\text{NO}_3\text{-N}$  濃度、各陽イオン濃度が減少し、12 日目にほとんどのイオンが洗い流されたことが確認できる。pH は、油粕添加以降増加した。また、EC は  $\text{NO}_3\text{-N}$  濃度と排液の結果が似ていることもわかる。陽イオン濃度を見ると、油粕添加前には土中で一番吸着力の高い  $\text{Mg}^{2+}$  が排出されていることが確認できた。

#### <考察と課題>

水の滴下により、土が乾燥密度  $0.9 \text{ g/cm}^3$  以上に押し固められる可能性がある。カラム解体時には、切り取った厚さ、重量を測定し、実際の乾燥密度を算出してから含水率を求めるべきである。

実験結果を解析するために油粕のみの保温静置実験が必要となる。しかし、ふわふわしたものが発生してしまい、試料として使えなかった。油粕をすきこんだ層であれば保温静置実験も可能であるため、以後油粕をすきこんだ層を用いて浸透実験を行った。

土中水圧力や EC はよく観察できた。土中の EC や排液の  $\text{NO}_3\text{-N}$ 、EC の結果より、油粕添加前の土中に  $\text{NO}_3\text{-N}$  が多く存在していたことが分かった。岩手黒ぼく土を使用して、 $\text{NO}_3\text{-N}$  を測定したい場合は、十分に洗い流してから実験を行った方が評価しやすい。

## 5-2 水分移動が 10 cm 油粕をすきこみ土層の無機化と硝化に与える影響

期間中の土中水圧力，土中各深さの EC の経時変化を図 5.2.1 に示す。

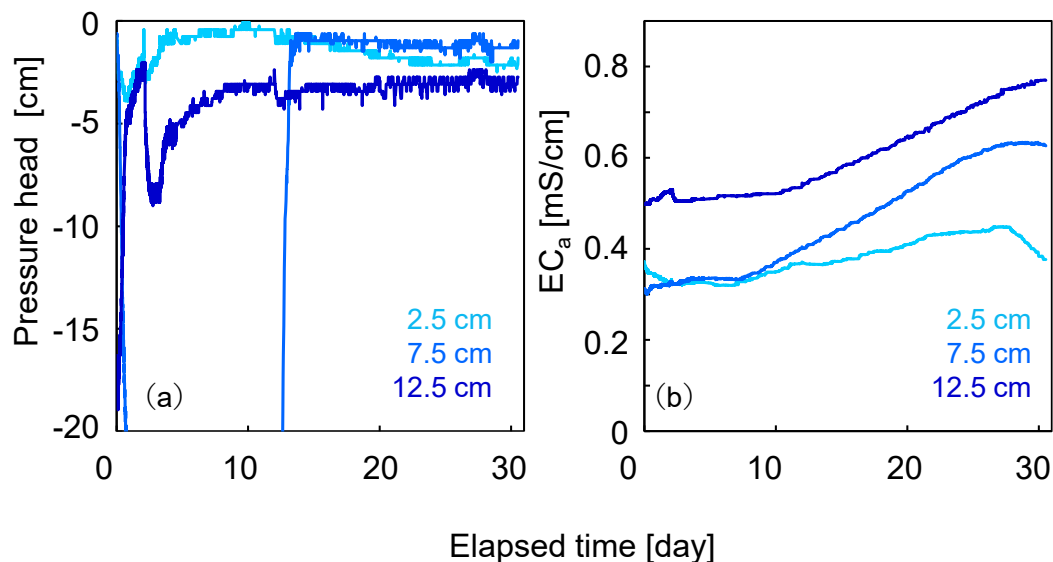
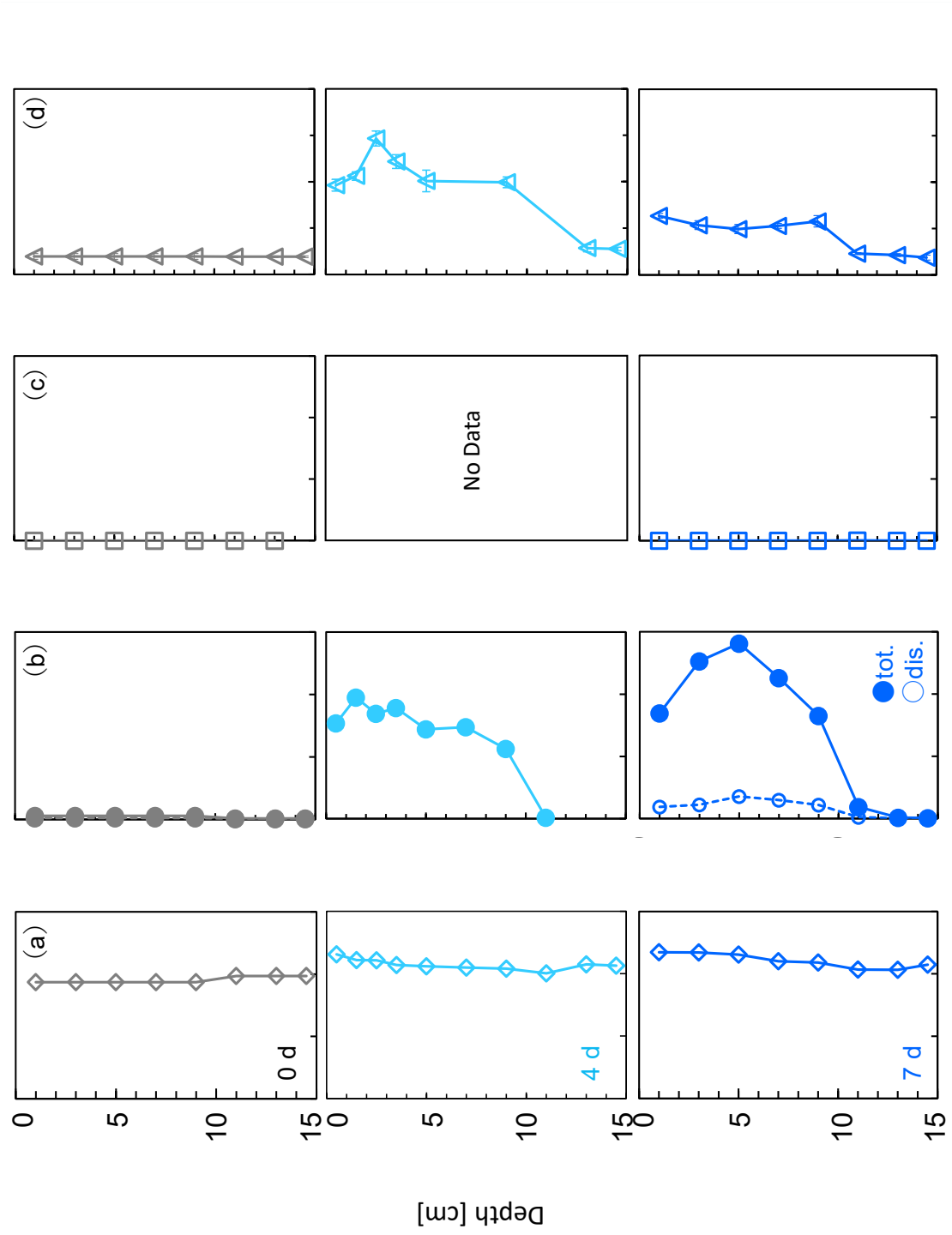


図 5.2.1 期間中の土中水圧力 (a) と土中 ECa (b) の経時変化

土中水圧力は，7.5 cm 深で 13 日目頃まで測定できていなかったが，これはチューブと圧力変換器の接続部に気泡が入っていたのが原因だった。そのため，期間途中から脱気水を接続部に注入した。これにより測定され，算出された値が正しいとすると，全層でおよそ -4 cm から -1 cm 程度（およそ  $\theta = 0.57$ ）であり，およそ全層の圧力分布は一定であると言える。土中 EC<sub>w</sub> は，2.5 cm 深ではあまり上昇せず，28 日目以降から低下していった。7.5 cm 深では上昇していき，28 日目以降から一定になった。12.5 cm 深では 7.5 cm 深と比較して，遅れて，緩やかに上昇していった。

通水開始 4，7，18，31 日後にカラムを解体したときの含水率， $\text{NH}_4\text{-N}$ ， $\text{NO}_3\text{-N}$ ，ATP の土中分布を図 5.2.2 (a) (b) (c) (d) に示す。なお，0 日目のデータは  $\theta = 0.37$  で行った保温静置実験の 0 日目のデータを引用した。



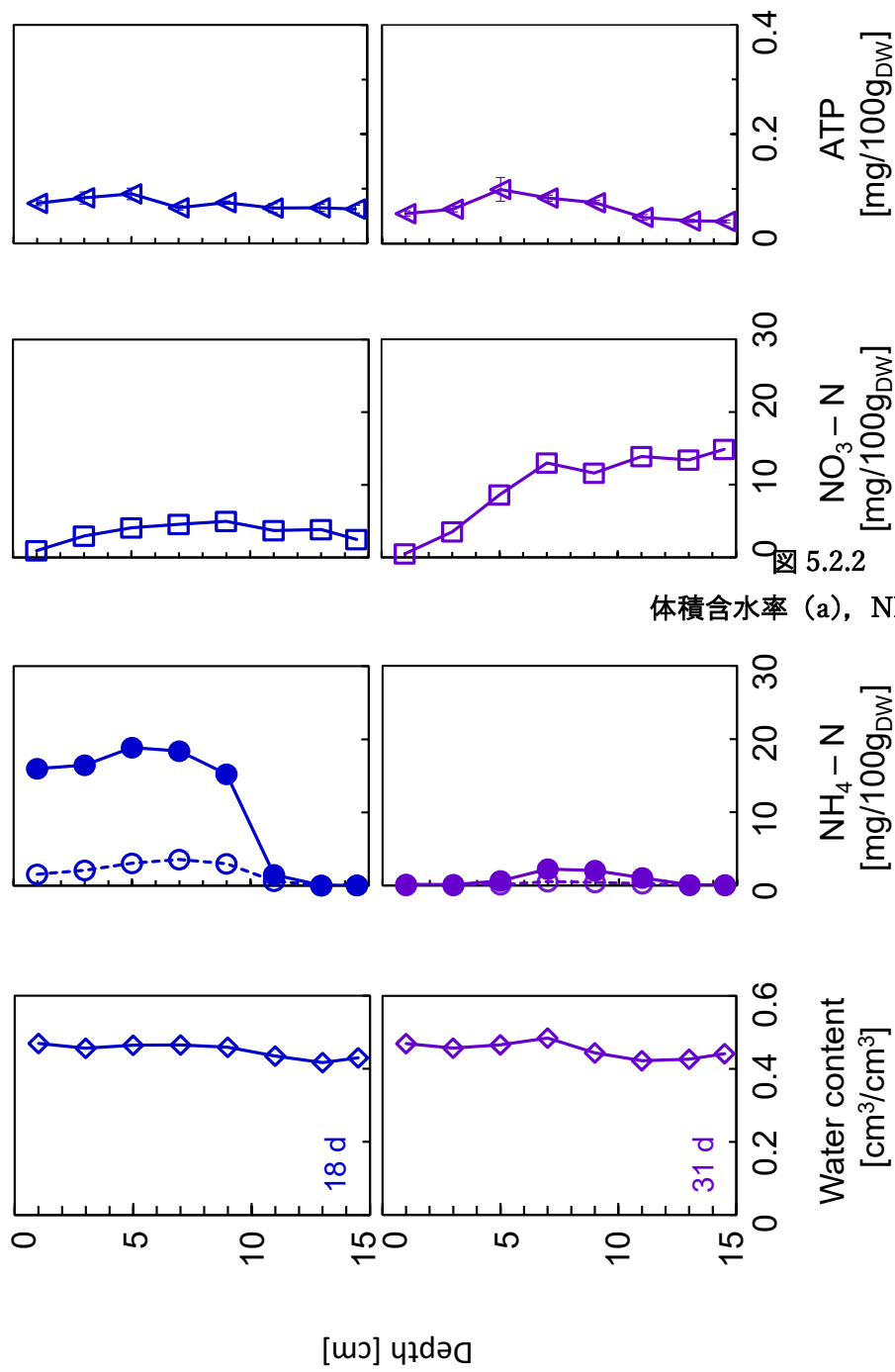


図 5.2.2 通水 0, 4, 7, 18, 31 日目の  
体積含水率 (a), NH<sub>4</sub>-N (b), NO<sub>3</sub>-N (c), ATP (d)

4 日目, 7 日目, 18 日目, 31 日目の含水率はおおよそ 0.45 - 0.50 と全層で一定になった。

4 日目の  $\text{NH}_4 - \text{N}$  は 0 - 8 cm 深で 14 - 19 mg/100g<sub>DW</sub> とほとんど同程度検出された。ATP は油粕をすきこんだ 10 cm 深まで等しく 0.2 mg/100g<sub>DW</sub> 程度まで上昇した。特に 2.5 cm 深で 0.29 mg/100g<sub>DW</sub> と最も高かった。

7 日目の  $\text{NH}_4 - \text{N}$  は 1 cm 深で 17 mg/100g<sub>DW</sub>, 3 cm 深で 25 mg/100g<sub>DW</sub> と徐々に増加していき, 5 cm 深で最も高く 28 mg/100g<sub>DW</sub>, 7 cm 深で 23 mg/100g<sub>DW</sub>, 9 cm 深で 17 mg/100g<sub>DW</sub> だった。11 cm 深で 1.9 mg/100g<sub>DW</sub> で, それ以深ではほとんど検出されなかった。 $\text{NO}_3 - \text{N}$  は全層で検出されなかった。ATP は油粕をすきこんだ 10 cm 深まで等しく 0.11 mg/100g<sub>DW</sub> まで上昇した。

18 日目の  $\text{NH}_4 - \text{N}$  は 9 cm 深までほぼ同じ濃度で, 上層から 16, 17, 19, 18, 15 mg/100g<sub>DW</sub> だった。それ以深は 7 日目と同程度で 11 cm 深は 1.5 mg/100g<sub>DW</sub>, 13 cm 以深ではほとんど検出されなかった。 $\text{NO}_3 - \text{N}$  は 1 cm 深で低く 0.10 mg/100g<sub>DW</sub>, それ以深で上から 0.31, 0.41, 0.45, 0.50, 0.34, 0.40, 0.05 mg/100g<sub>DW</sub> だった。ATP は全層でほぼ一定だった。10 cm 深までの平均値は 0.07 mg/100g<sub>DW</sub>, 11 cm 以深の平均値は 0.06 mg/100g<sub>DW</sub> だった。

31 日目の  $\text{NH}_4 - \text{N}$  は 18 日目までと比べて減少した。上から順に, 1 cm 深で 0.13 mg/100g<sub>DW</sub>, 3 cm 深で 0.10 mg/100g<sub>DW</sub> でほぼ一定だった。5, 7, 9, 11 cm 深で 0.65 mg/100g<sub>DW</sub>, 13 cm 深で 2.25 mg/100g<sub>DW</sub>, 14.3 cm 深で 2.03 mg/100g<sub>DW</sub> だった。13 cm 深, 14.5 cm 深ではほとんど検出されなかった。 $\text{NO}_3 - \text{N}$  は上層では低く, 下層ほど濃度が高くなった。1 cm 深で, 上から 0.14, 0.35, 0.86, 1.30, 1.16, 1.39, 1.34 mg/100g<sub>DW</sub>, 14.5 cm 深で 1.48 mg/100g<sub>DW</sub> だった。

このときの全 N, 全 C, それらから得られた C/N を図 5.2.3 に示す。



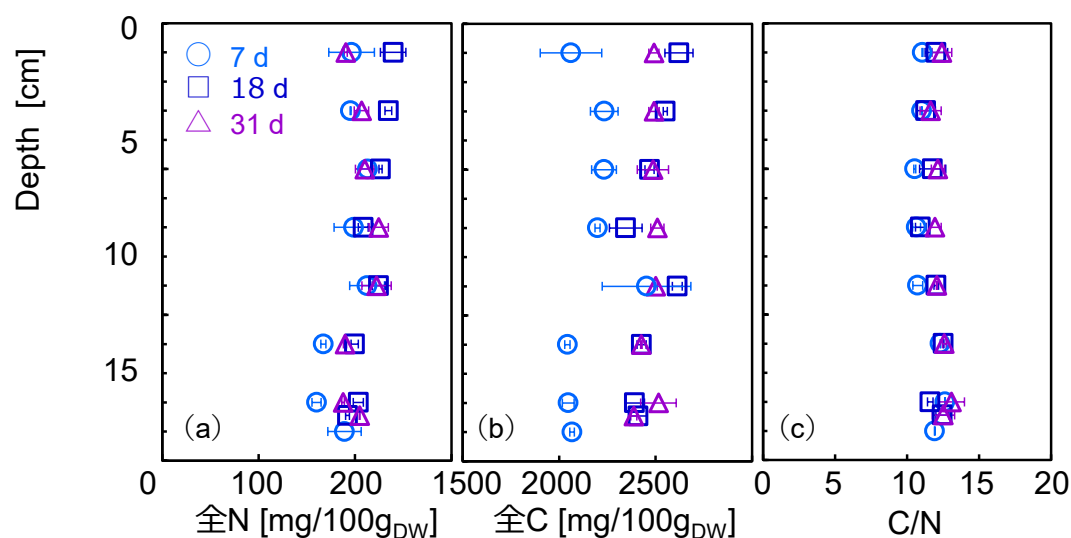


図 5.2.3 通水開始 7, 18, 31 日目の全 N (a), 全 C (b), C/N (c)

N は 18 日目にかけて上昇, 31 日目にかけて減少したように見えるが, 誤差も大きいので断  
定はできない。C/N は 10–13 とほぼ一定で有機物分解が落ち着いたと考えられる。。

排液の結果を図 5.2.4 に示す。

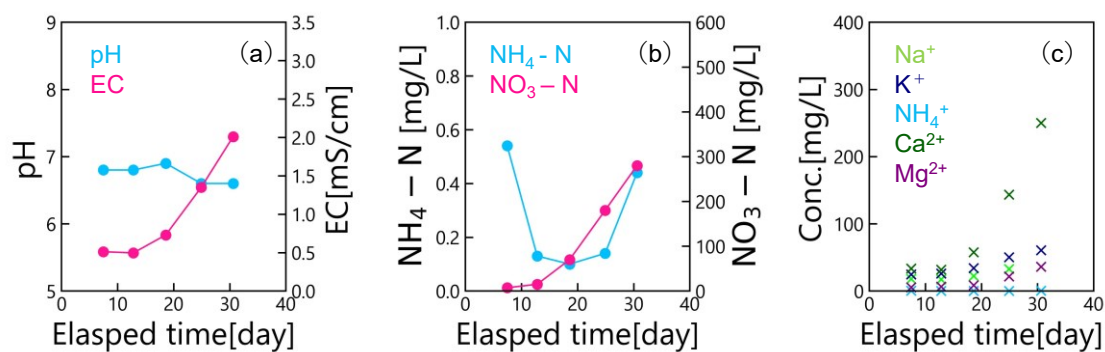


図 5.2.4 排液の結果

(a) pH と EC, (b)  $\text{NH}_4\text{-N}$  と  $\text{NO}_3\text{-N}$  濃度, (c) 陽イオン濃度

$\text{NO}_3\text{-N}$  は 13 日目以降急激に上昇した。EC も似たような挙動を示した。pH は 18 日目以  
降から減少した。

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  は 1.4 PV にあたる 13 日目以降から濃度が上昇し始めた。 $\text{NH}_4\text{-N}$  の  
み 18 日目以降から上昇した。

水分移動が無機化・硝化に及ぼした影響を確認するため、10 cm 深さの保温静置実験の結果と比較した。3, 4 日目, 7 日目, 18 日目の結果を以下の図 5.2.5 に示す。

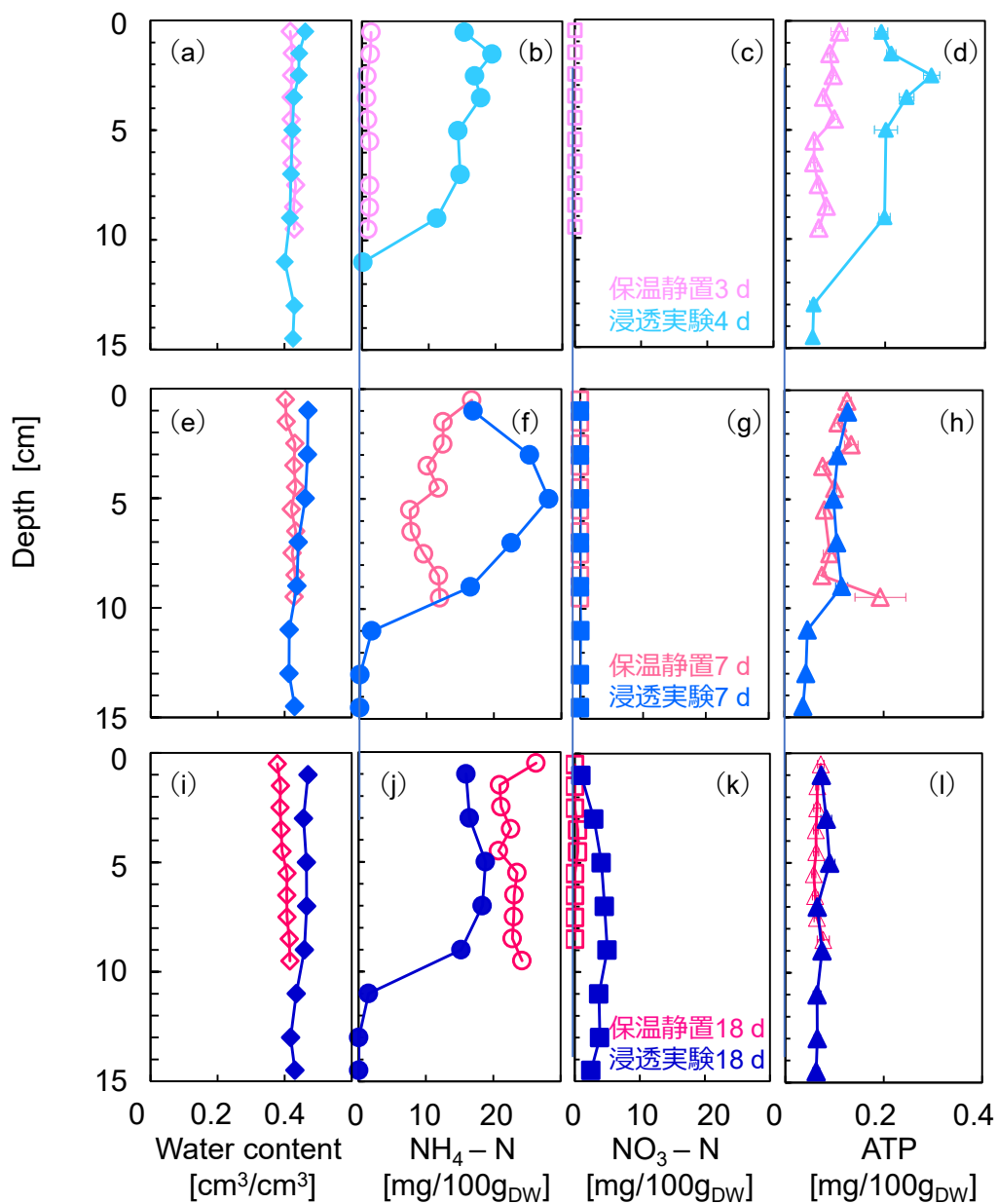


図 5.2.5 水の流れあり条件となし条件の比較  
(a) - (d) 3, 4 日目, (e) - (h) 7 日目, (i) - (l) 18 日目

3, 4 日目の時点で,  $\text{NH}_4\text{-N}$  は水分移動なしの実験ではほとんど検出されていないのに対し, 水分移動ありの実験では多く検出された。ATP も水分移動なしの実験と比較して水分移動ありの実験では 2 倍近くなった。

7 日目には,  $\text{NH}_4\text{-N}$  は水分移動なしの実験では上層で高く下層で低い結果となっているが, 流れのある実験では 5 cm で最も高くなった。 $\text{NO}_3\text{-N}$  はどちらも生じなかった。ATP は油粕すきこみ層ではどちらも同程度だった。

18 日目には,  $\text{NH}_4\text{-N}$  は水分移動がない方が多かった。一方,  $\text{NO}_3\text{-N}$  は水分移動がある方の全層で検出され, 硝化が生じた。微生物活性は同程度だった。

土中と排液の  $\text{Inorg-N}$  濃度を考慮し, 窒素収支を水の流れがあるものと 10 cm 深さ保温静置実験の結果と比較した (図 5.2.6)。

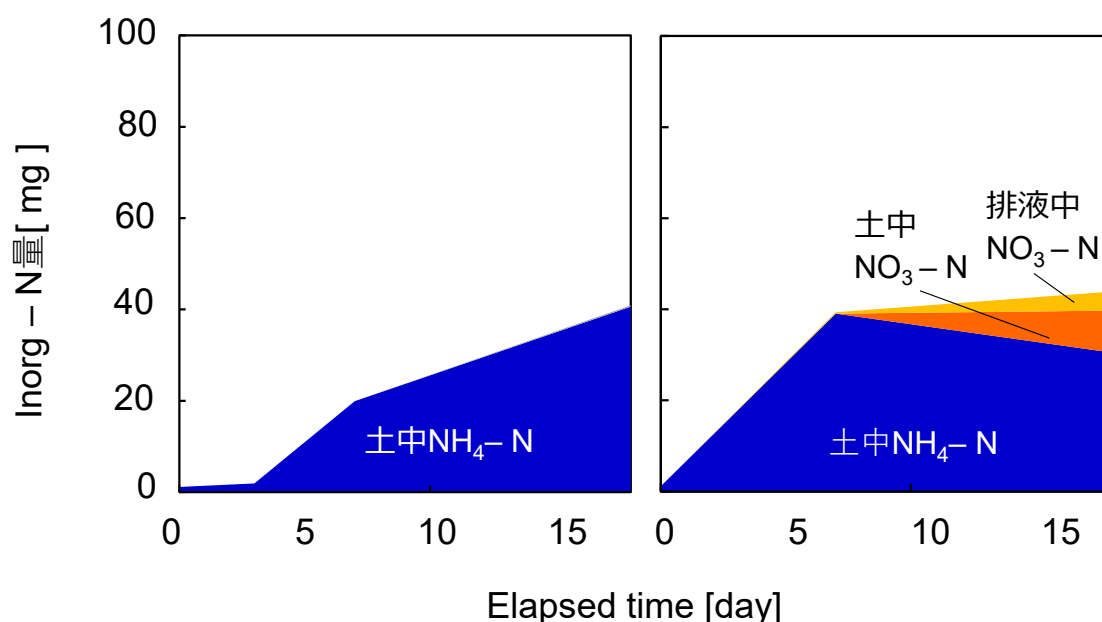


図 5.2.6 10 cm 深さの保温静置実験とカラム浸透実験の比較

どちらの実験も, 添加  $\text{Org-N}$  は 105 mg だったのに対し, 18 日目までに生成された最大  $\text{Inorg-N}$  は水の流れありで 39 mg (37%), なしで 41 mg (38%) と同程度だった。これは,  $\theta=0.43$  の保温静置実験の結果 9 d の結果 (33%) とほぼ同程度だった。しかし, 水の流れのない方では 18 日目にはまだ  $\text{NH}_4\text{-N}$  が増加しており,  $\text{NO}_3\text{-N}$  が検出されなかったが, 水の流れがある方はすでに  $\text{NH}_4\text{-N}$  が減少しており,  $\text{NO}_3\text{-N}$  がわずかに検出された。

## <考察>

### \*水の流れのある実験の無機化と硝化

7日目のカラム解体時には、 $\text{NH}_4\text{-N}$ が5 cm 深で高く検出された。これは、表層で生成された $\text{NH}_4\text{-N}$ が、5 cm 深まで流れたからだと考えられる。7日目は、0.4 PV、すなわち今回のカラムでは6 cm 水分移動しているため、5–7 cm 深で確認されたものは表層での $\text{NH}_4\text{-N}$ の影響を受けていると考えられる。また、 $\text{NO}_3\text{-N}$ は検出されておらず、硝化は生じていないといえる。さらに、微生物に関しては油粕をすきこんだ10 cm 深まで活性が高くなったが、それ以深では活性は低かった。これは、油粕や微生物が土壌に強く吸着していることを意味する。土壌微生物の細胞壁はプラスとマイナスの両方の部分を持っているが、pHが4~8の間ではマイナスの部分が多い(西尾, 1989)。土壌微生物は油粕層で活性し、生成された $\text{NH}_4\text{-N}$ や他の陽イオンと吸着、微生物 – 土粒子複合体を形成していると考えられる。

18日目の3–9 cm 深の $\text{NH}_4\text{-N}$ は減少し、 $\text{NO}_3\text{-N}$ が生成された。硝化が生じているとみなせる。全層で均一に無機化が停止し、硝化が同じ速度で生じていたら、上端で $\text{NH}_4\text{-N}$ は減少するはずである。しかし、減少していないため、上端ではまだ無機化が生じている、もしくは、硝化開始がかなり遅いと考えられる。しかし、12日目には下端から $\text{NO}_3\text{-N}$ が検出されたため、12日目以降はどこかの層で硝化が生じていると考えられる。また、7日目と同様、 $\text{NH}_4\text{-N}$ は10 cm 以深でほとんど検出されなかった。 $\text{NH}_4\text{-N}$ は土壌中に強く吸着しているといえる。

31日目には、ほとんど $\text{NH}_4\text{-N}$ が検出されなかった。さらに、 $\text{NO}_3\text{-N}$ も上層では検出されなかった。このことから、発生した $\text{NH}_4\text{-N}$ がほとんど硝化され流下していること、さらに上層でほとんど $\text{NO}_3\text{-N}$ が生成されていないことが確認できた。

### \*水分移動のある実験とない実験を比較して

水の流れのない10 cm 深さの保温静置実験と比較して、水分移動のある実験は、7日目に $\text{NH}_4\text{-N}$ が5 cm 深で最も高くなるという分布が形成された。これは、水分移動の影響だと考えられる。上層で多く、それ以深ではほぼ同一に $\text{NH}_4\text{-N}$ が生成されたが、水の流れがあったことで5 cm 深で最も高い分布が生じた。また、7日目の $\text{NH}_4\text{-N}$ 生成量は水の流れのある実験よりも多かった。これより、無機化が水の流れによって促進されていると考えられる。さらに、水の流れのある実験では18日目には $\text{NH}_4\text{-N}$ が減少、 $\text{NO}_3\text{-N}$ が増加しているが、水の流れのない実験では $\text{NH}_4\text{-N}$ がまだ増加しており、 $\text{NO}_3\text{-N}$ が生成されていない。このことから、水の流れは硝化の開始を早めたと考えられる。水が常に供給され、水中の溶存酸素により実験開始直後の微生物の活性が高まり、無機化が促進された、さらに、無

機化の促進にともない硝化菌も早くから活性化し，硝化が促進されたと考えられる。

### 5-3 流速が有機物分解と無機化・硝化に与える影響

上端から流速  $q=0.5$  cm/d で与えた条件 2 と,  $q=1.0$  cm/d で与えた条件 3 の実験を比較することで, 流速が無機化と硝化にどの程度影響を与えたかを検討する。

まず, 期間中のそれぞれの土中水圧力, 土中各深さの EC の経時変化を図 5.3.1 に示す。

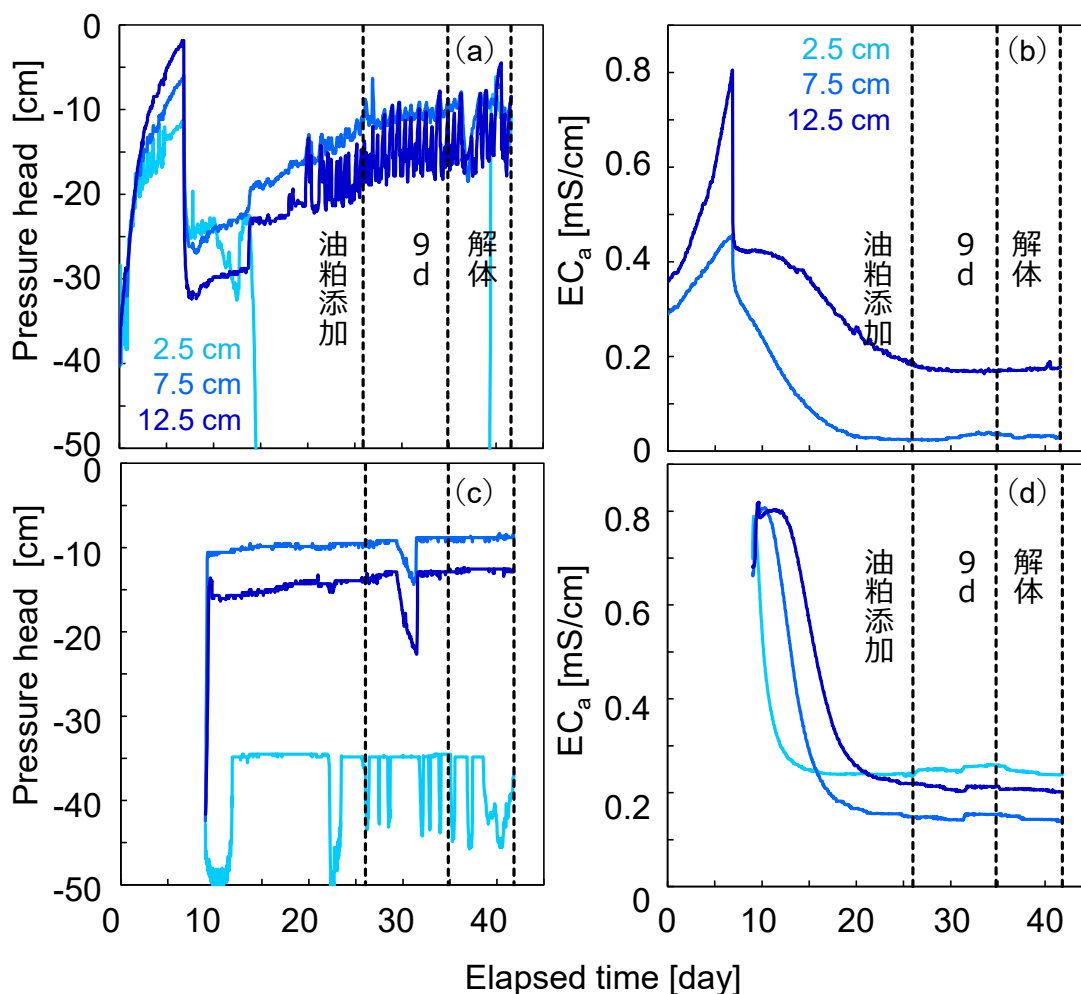


図 5.3.1 期間中の土中水圧力 (a)  $q=0.5$  cm/d (c)  $q=1.0$  cm/d, EC (b)  $q=0.5$  cm/d (d)  $q=1.0$  cm/d の経時変化

土中水圧力は, 2.5 cm 深でうまく測定できていなかった。それ以外ではおよそ -10 cm から -20 cm の範囲となっており, 定常流に近かったと言える。EC は, (b)  $q=0.5$  cm/d の 2.5 cm 深はうまく測定できていなかった。それ以外では油粕添加前は高かった。油粕添加後は, (b) の 7.5 cm 深, (d) の 2.5 cm, 7.5 cm, 12.5 cm 深でわずかに上昇したように見えるが明らかに上昇したとは言い難い。油粕添加量がわずかであったため EC もあまり上昇しなかったと言える。

カラム解体時（9 d, 16 d）の含水率， $\text{NH}_4\text{-N}$ ， $\text{NO}_3\text{-N}$ ，ATP の結果を図 5.3.2 に示す。

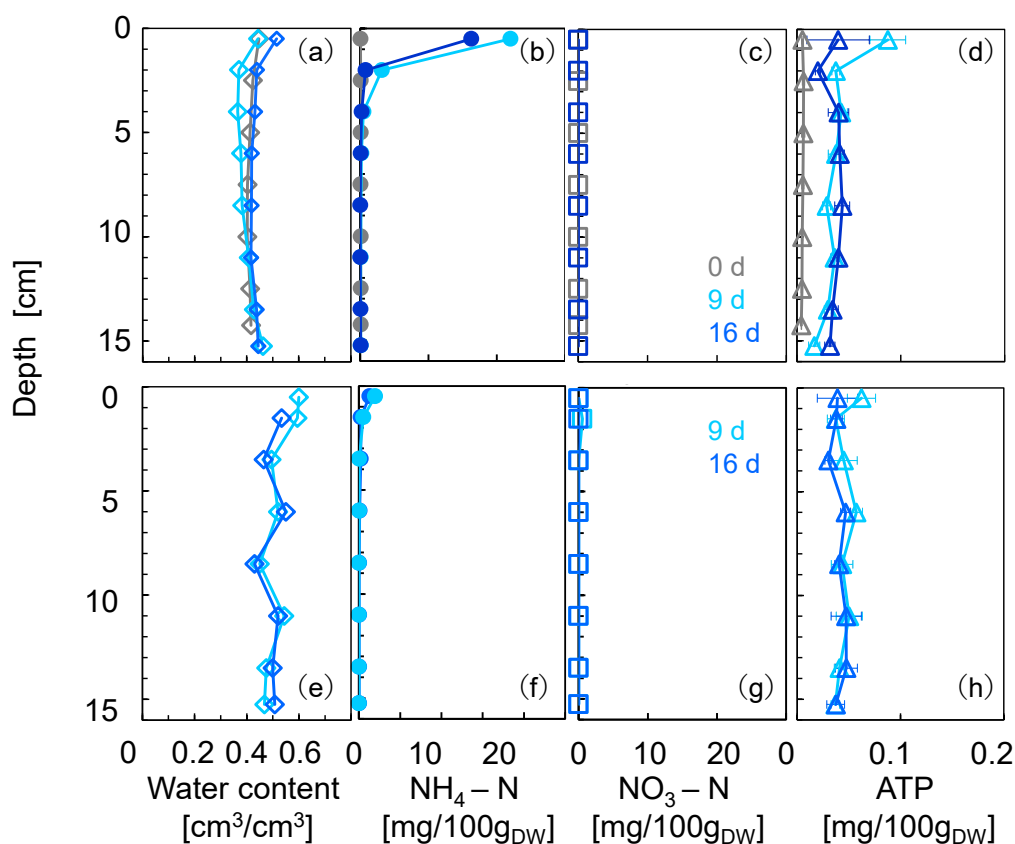


図 5.3.2  $q = 0.5 \text{ cm/d}$  (a) - (d) と  $q = 1.0 \text{ cm/d}$  (e) - (h) の通水 0, 9, 16 日目の含水率 (a) (e),  $\text{NH}_4\text{-N}$  (b) (f),  $\text{NO}_3\text{-N}$  (c) (g), ATP (d), (h) の結果

条件 2:  $q = 0.5 \text{ cm/d}$  で流したものの結果について記す。含水率は、油粕すきこみ層で若干高かったものの、おおよそ  $0.37\text{--}0.46$  だった。16 日目の方が若干高めだった。 $\text{NH}_4\text{-N}$  は、9 日目には上から 22, 3.2,  $0.50 \text{ mg/100g}_{\text{DW}}$  で、6 cm 以深でほとんど検出されなかった。 $\text{NO}_3\text{-N}$  は 2 cm 深で  $0.10 \text{ mg/100g}_{\text{DW}}$  検出されたが、それ以外ではほとんど検出されなかった。ATP は、油粕すきこみ層で  $0.087 \text{ mg/100g}_{\text{DW}}$ 、それ以深で平均  $0.033 \text{ mg/100g}_{\text{DW}}$  だった。16 日目には  $\text{NH}_4\text{-N}$  は上から 16,  $0.80 \text{ mg/100g}_{\text{DW}}$  で、6 cm 以深でほとんど検出されなかった。9 日目と比較して、全体的に減少した。一方、16 日目の  $\text{NO}_3\text{-N}$  も検出されなかった。微生物活性も、全層でほぼ一定になり、平均して  $0.036 \text{ mg/100g}_{\text{DW}}$  だった。

条件 3:  $q = 1.0 \text{ cm/d}$  については、含水率は、上層で少し高かったが、それ以深ではおおよそ  $0.50 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$  だった。9 日目の  $\text{NH}_4\text{-N}$  は上から 12,  $3.3 \text{ mg/100g}_{\text{DW}}$  で、3.5 cm 以深でほとんど検出されなかった。 $\text{NO}_3\text{-N}$  は 1.5 cm 深で  $0.55 \text{ mg/100g}_{\text{DW}}$  となったが、それ

以外では検出されなかった。ATP は油粕すきこみ層で  $0.062 \text{ mg}/100\text{g}_{\text{DW}}$  と高かったものの、それ以深ではおおよそ一定で  $0.044 \text{ mg}/100\text{g}_{\text{DW}}$  となった。16 日目は、 $\text{NH}_4 - \text{N}$  は減少し、上から 7.9, 1.4,  $0.62 \text{ mg}/100\text{g}_{\text{DW}}$  で、8.5 cm 以深でほとんど検出されなかった。 $\text{NO}_3 - \text{N}$  は全層で検出されなかった。ATP は全層でおおよそ  $0.041 \text{ mg}/100\text{g}_{\text{DW}}$  とほぼ一定になった。

2 つの結果を比較すると、 $q = 0.5 \text{ cm}/\text{d}$  の方が 9 日目には微生物の活性が高く  $\text{NH}_4 - \text{N}$  濃度が高かった。16 日目の  $\text{NH}_4 - \text{N}$  分布から、 $q = 0.5 \text{ cm}/\text{d}$  よりも  $q = 1.0 \text{ cm}/\text{d}$  の方が下方へ移動した。さらに、 $q = 1.0 \text{ cm}/\text{d}$  では上端で  $\text{NO}_3 - \text{N}$  が検出された。

続いて、台形則により求めた土中の  $\text{NH}_4 - \text{N}$  量と  $\text{NO}_3 - \text{N}$  量を以下の図 5.3.3 に示す。台形則で求める際、 $\text{NH}_4 - \text{N}$  と  $\text{NO}_3 - \text{N}$  は外挿により求めた。

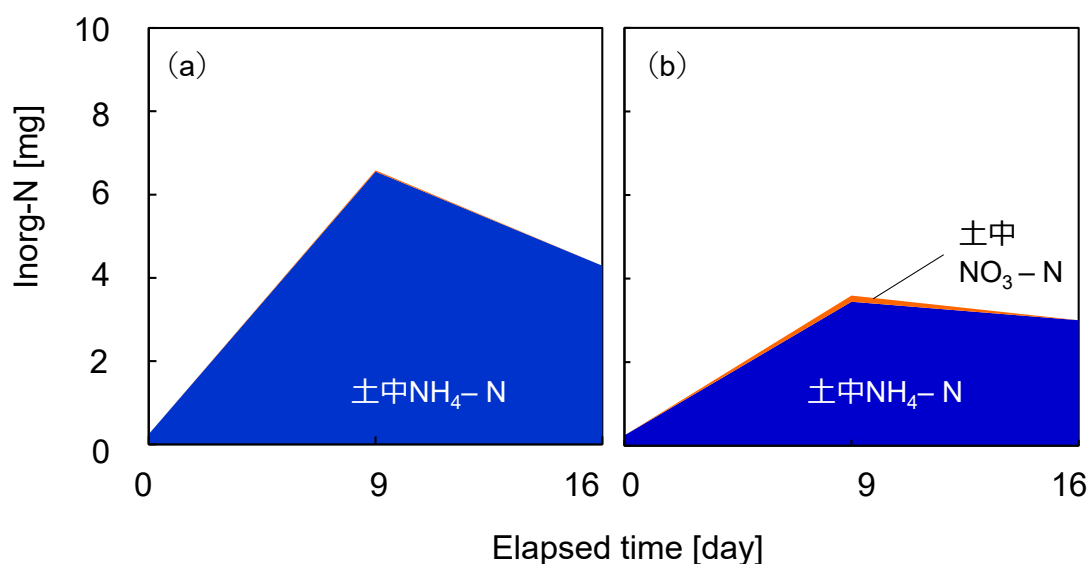


図 5.3.3 土中の  $\text{NH}_4 - \text{N}$ ,  $\text{NO}_3 - \text{N}$  量の経時変化

(a)  $q = 0.5 \text{ cm}/\text{d}$ , (b) :  $q = 1.0 \text{ cm}/\text{d}$

添加した有機態 N は  $9.55 \text{ mg}$  である。条件 3 の排水は測定できていないが、図 5.3.2 (a) - (d) より下端排出  $\text{NH}_4 - \text{N}$ ,  $\text{NO}_3 - \text{N}$  はほとんどないと考えられる。 $q = 0.5 \text{ cm}/\text{d}$  の実験では、最大 Inorg-N 量が添加 Org-N の 62% だったのに対して、 $q = 1.0 \text{ cm}/\text{d}$  では、34% だった。 $q = 1.0 \text{ cm}/\text{d}$  は、下端排水を考慮しても 35% だった。 $q = 1.0 \text{ cm}/\text{d}$  の結果は、 $\theta = 0.43$  の保温静置実験と同程度だった。



#### <考察>

##### \*異なる流速が無機化・硝化に及ぼす影響

9日目の時点における Org-N の分解率が異なった。 $q = 0.5 \text{ cm/d}$  の実験では添加 Org-N の 62%,  $q = 1.0 \text{ cm/d}$  の実験では 34% の Inorg-N が生成され、2 倍近く異なった。 $q = 1.0 \text{ cm/d}$  の実験の有機物分解率は、 $\theta = 0.43$  の 2.5 cm 深さの保温静置実験と同程度だった。5-2 節より、 $q = 0.5 \text{ cm/d}$  程度の流速は有機物分解を促進するため、2.5 cm 深さの保温静置実験より有機物分解率が多かったことは納得できる。しかし、 $q = 1.0 \text{ cm/d}$  程度の流速の時の有機物分解率が 2.5 cm 深さの保温静置実験と同程度だったのは、その程度の流速で有機物分解に影響を与えない可能性、あるいは硝化と脱窒が早く始まって同程度になった可能性がある。後者に関しては、流速が早いほど  $\text{O}_2$  供給量も多くなり、無機化・硝化反応が早まると考えることもできる。いずれにせよ今回の結果だけでは判断できず、これを検証するためには、より詳細な時間間隔での測定が必要と考えられる。

#### 5-4 異なる有機物濃度が浸透下の無機化に及ぼす影響

1 cm 土層に油粕を有機態炭素 C : 400 mg/100g<sub>DW</sub> (以下, C<sub>400</sub>) となるように与えた条件 3 と, 2000 mg/100g<sub>DW</sub> (以下, C<sub>2000</sub>) となるように与えた条件 4 を比較することで, 浸透下の無機化に有機物濃度が及ぼす影響を検討した。なお, どちらも上端からの流速は  $q=1.0$  cm/d で与えた。

期間中のそれぞれの土中水圧力, 土中各深さの EC の経時変化を図 5.4.1 に示す。

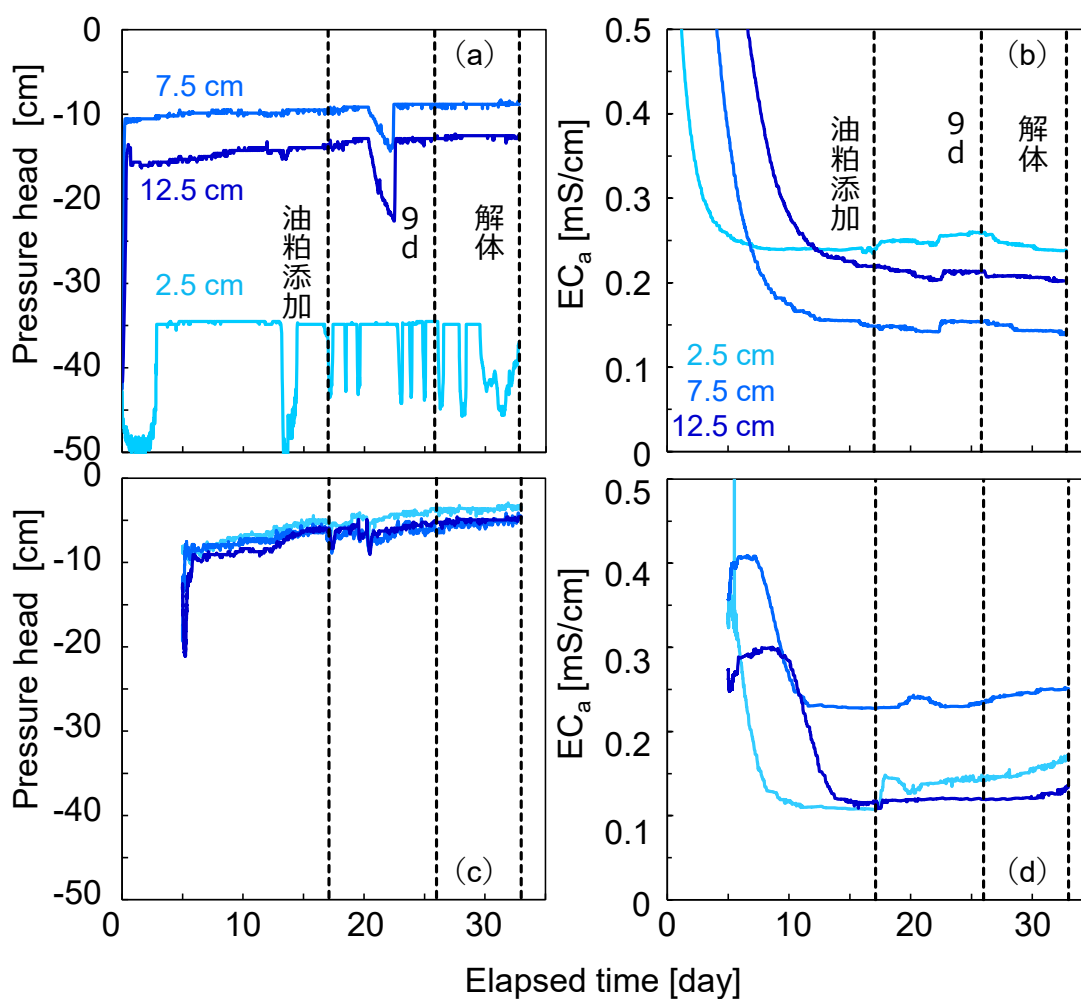


図 5.4.1 期間中の土中水圧力 (a) C<sub>400</sub> (c) C<sub>2000</sub> と EC (b) C<sub>400</sub> (d) C<sub>2000</sub> の経時変化

土中水圧力は, 条件 3 (SOC : 400 mg/100g<sub>DW</sub>) も, 条件 4 (SOC : 1200 mg/100g<sub>DW</sub>) もほとんど -10 cm から -20 cm の間にあり, どちらもほぼ定常流だったと言える。EC は, 条件 4 は, 条件 3 よりも油粕添加後に 2.5 cm, 7.5 cm 深の順に上昇しているのが確認できた。条件 3 (C<sub>400</sub>), 条件 4 (C<sub>2000</sub>) の含水率, NH<sub>4</sub>-N, ATP の結果をそれぞれ図 5.4.2 に示す。

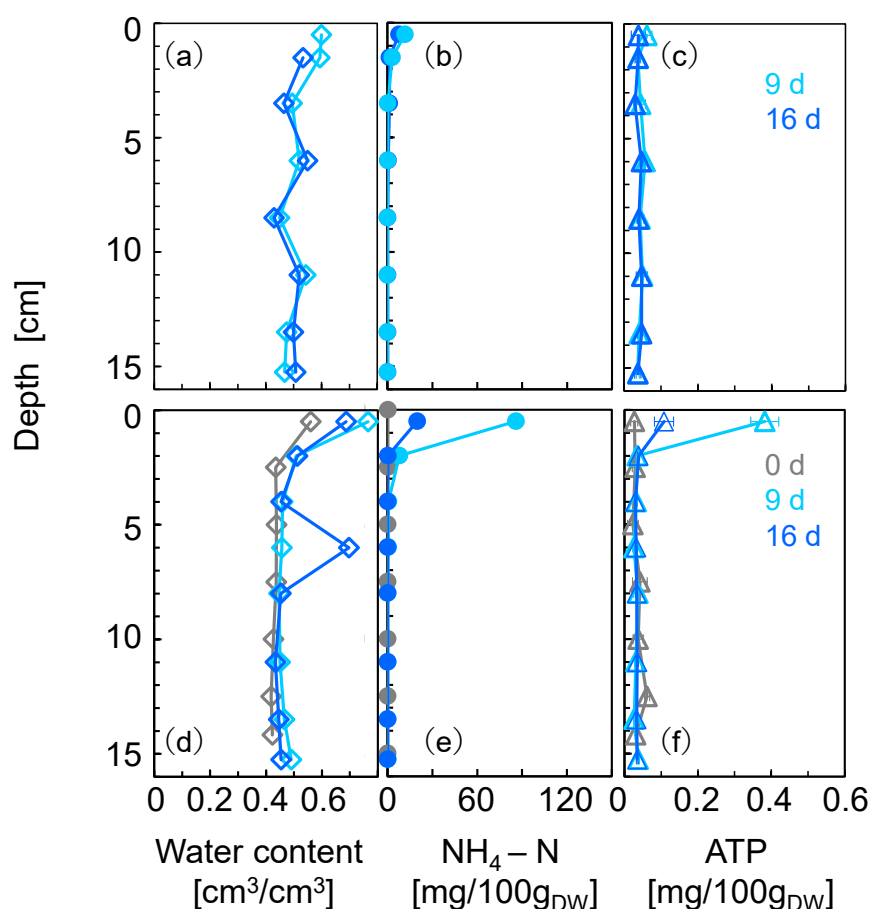


図 5.4.2 C<sub>400</sub> (a), (b), (c) と C<sub>1200</sub> (d) (e) (f) の通水 0,9,16 日目の含水率 (a) (d), NH<sub>4</sub>-N (b) (e), ATP (c) (f) の結果

条件 3 : C<sub>400</sub> の結果は上述のとおりである。

条件 4 : C<sub>2000</sub> の結果について記す。含水率は油粕すきこみ層で高かったものの、それ以深で 9 日目はおよそ 0.47 cm<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup>, 16 日目は 0.46 cm<sup>3</sup>/cm<sup>3</sup> だった。NH<sub>4</sub>-N は 9 日目に油粕すきこみ層で 85.9 mg/100g<sub>DW</sub> と、C<sub>400</sub> の時より 7 倍近くの量が生成された。2 cm 深で 7.8 mg/100g<sub>DW</sub>, それ以深でほとんど検出されなかった。16 日目には減少し、油粕すきこみ層で 19.8 mg/100g<sub>DW</sub>, 2 cm 深で 0.18 mg/100g<sub>DW</sub>, それ以深でほとんど検出されなかった。ATP は油粕すきこみ層で C<sub>400</sub> の時のおおよそ 6 倍となる 0.38 mg/100g<sub>DW</sub> と高い値を示したが、それ以深では Org-C : 400 mg/100g<sub>DW</sub> と同程度で 0.031 mg/100g<sub>DW</sub> だった。16 日目にはこれが減少し、上層で 0.11 mg/100g<sub>DW</sub>, それ以深で 0.034 mg/100g<sub>DW</sub> だった。

土中 NH<sub>4</sub>-N 総量の経時変化を以下の図 5.4.3 に示す。条件 4 で土中 NO<sub>3</sub>-N が測定できていないため、土中の NH<sub>4</sub>-N のみの比較である。

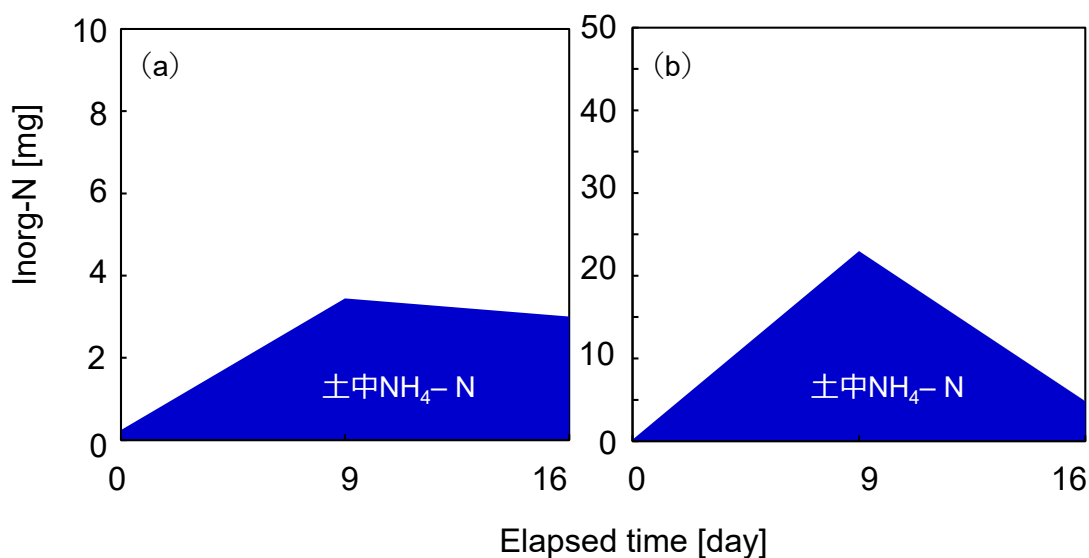


図 5.4.3 土中  $\text{NH}_4\text{-N}$  の経時変化  
(a)  $\text{C}_{400}$  (b)  $\text{C}_{2000}$

$\text{C}_{400}$  の実験では、添加  $\text{Org-N}$  の 39%が  $\text{NH}_4\text{-N}$  に変化した。一方、 $\text{C}_{2000}$  の実験では 43%の  $\text{NH}_4\text{-N}$  が生成された。ほぼ、同程度であると言える。しかし、その後 16 日目にかけて、 $\text{C} : 400 \quad \text{mg}/100\text{gDW}$  の方ではほとんど減少しなかったが、 $\text{C}_{2000}$  の実験では 34%も減少した。

#### <考察>

##### \*異なる有機物濃度が無機化・硝化に及ぼす影響

まず、有機物が多い方が、微生物活性が高まることが確認できた。 $\text{Org-N}$  の量と微生物活性に相互関係があることが確認できた。それにともない、 $\text{NH}_4\text{-N}$  量も上昇した。ただ、有機物の量が 5 倍だからと言って微生物や  $\text{NH}_4\text{-N}$  が 5 倍になるというわけではなかった。

$\text{NH}_4\text{-N}$  生成速度はほぼ同程度で、有機物濃度は分解に影響を与えないと考えられる。しかし、その後 16 日目にかけて、 $\text{C}_{400}$  の方ではほとんど減少しなかったが、 $\text{C}_{2000}$  の実験では 34%も減少した。これは、硝化菌が活性化したためだと考えられる。実際、16 日目の油粕すきこみ層では、微生物活性が  $\text{C}_{2000}$  のものは  $\text{C}_{400}$  と比較して 2.8 倍だった。 $\text{NH}_4\text{-N}$  量が多く、硝化菌も活発になり  $\text{NH}_4\text{-N}$  が一気に減少したと考えられる。

## 第6章 浸透実験の反応速度定数・硝化開始のタイミングの決定

数値解析では、浸透実験における無機化・硝化の反応速度定数と硝化の始まるタイミングを決定し、10 cm 深さ保温静置実験の無機化速度定数、2.5 cm 深さ保温静置実験の硝化速度定数とそのタイミングと比較することにより水分移動がどれほど無機化・硝化反応に影響を与えたかを明らかにすることを目的に行った。土中の有機物の無機化と硝化が一次分解反応で表されると仮定し、5-2 節で示した水分移動のある浸透実験の実測に基づき、無機化の速度定数や無機化が止まるタイミング、硝化の速度定数や硝化が始まるタイミングについて数値解析により検討した。

### 6-1 計算条件と結果、考察

計算条件は以下のとおりである。表 6.1.1、図 6.1.1 に土壌特性を、表 6.1.2 に計算条件を示す。

表 6.1.1 土性のパラメータ

$\theta_r$	$\theta_s$	$\alpha$ [1/cm]	n	Ks [cm/d]	l	W2	$\alpha_2$ [1/cm]	n2
0	0.58	0.03	1.8	40	-0.1	0.41	0.0001	1.4

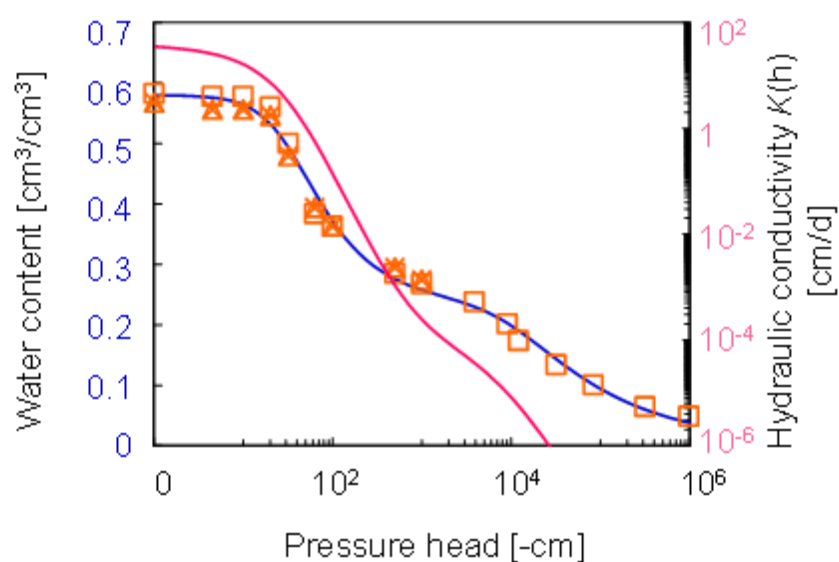


図 6.1.1 水分保持曲線と不飽和透水係数曲線

表 6.1.2 水の流れのある土中の窒素動態 計算条件

初期条件	土 中 水 圧 力 h[cm]	上端	-50		
		下端	-35		
	イオンの 初期濃度 [mol/L]	Na <sup>+</sup>	0.00017	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.0020
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0	Cl <sup>-</sup>	0.0018
		K <sup>+</sup>	0.00153	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0
		Mg <sub>2</sub> <sup>+</sup>	0.00060	SOM	0.0051
	Ca <sub>2</sub> <sup>+</sup>	0.00145			
境界条件	上端	-0.5 cm			
		NaCl 溶液 : Na <sup>+</sup> 0.000001 mol/L, Cl <sup>-</sup> 0.000001 mol/L			
	下端	土中水圧力-35 cm			
計算土層		鉛直方向に 15 cm（一次元）			
計算日数[d]		31			
陽イオン交換容量 CEC [cmol <sub>c</sub> /kg <sub>DW</sub> ]		40			
土性 $\theta_s$ [cm <sup>3</sup> /cm <sup>3</sup> ]		0.58			

土中の主要陽イオンの初期濃度と CEC は、同じ圃場から採取した土の測定値(草深, 2017)を用いた。有機態窒素濃度 SOM は、0.001 [d]の時に実験で添加した油粕の易分解性 Org-N 濃度と一致となるように決定した。NH<sub>4</sub>-N と土粒子の吸着平衡定数  $\log k_{\text{NH}_4}$  は 0.6 とし、その他の平衡定数も PHREEQC のデータベースに従った (Parkhurst and Appelo, 1999)。

7 日目の NH<sub>4</sub>-N の分布と計算結果が合うように  $k_{\text{min}}$  を深さ毎に決定した。そのあと、18 日目、31 日目の NH<sub>4</sub>-N 分布が一致するように試行錯誤を重ねた。表 6.1.3 に計算条件を示す。条件 1-4 の  $k_{\text{min}}$  は、10 cm 高保温静置実験のように酸素供給量に応じて表層で高く、下層で低くした。条件 1 の  $k_{\text{nit}}$  は、2.5 cm 高の保温静置実験のように無機化と硝化が同時に始まるとし、NH<sub>4</sub>-N 分布が実測値に合うように決定した。条件 2-5 の  $k_{\text{nit}}$  は無機化中に硝化が生じたと仮定して NH<sub>4</sub>-N 分布が実測値に合うように決定した。なお、今回は吸着態と溶存態を分けて考慮しておらず、吸着態も溶存態も同じ分解速度定数を与えている。

表 6.1.3 無機化速度定数と無機化終了，硝化速度定数と硝化開始の組み合わせ

	$k_{\min}$			$k_{\text{nit}}$	無機化終了	硝化開始
	0 - 1 cm	1 - 6	6 - 10	全層一定		
条件 1	0.12	0.1	0.06	0.14	14	14
条件 2				0.08	13	7
条件 3				0.10	13	9
条件 4				0.12	13	11
条件 5				0.12	20	9

これらの条件のもと，計算した結果と実測値との  $\text{NH}_4\text{-N}$ ， $\text{NO}_3\text{-N}$  の比較を，図 6.1.2 に，排液と収支の比較を図 6.1.3 に示す。

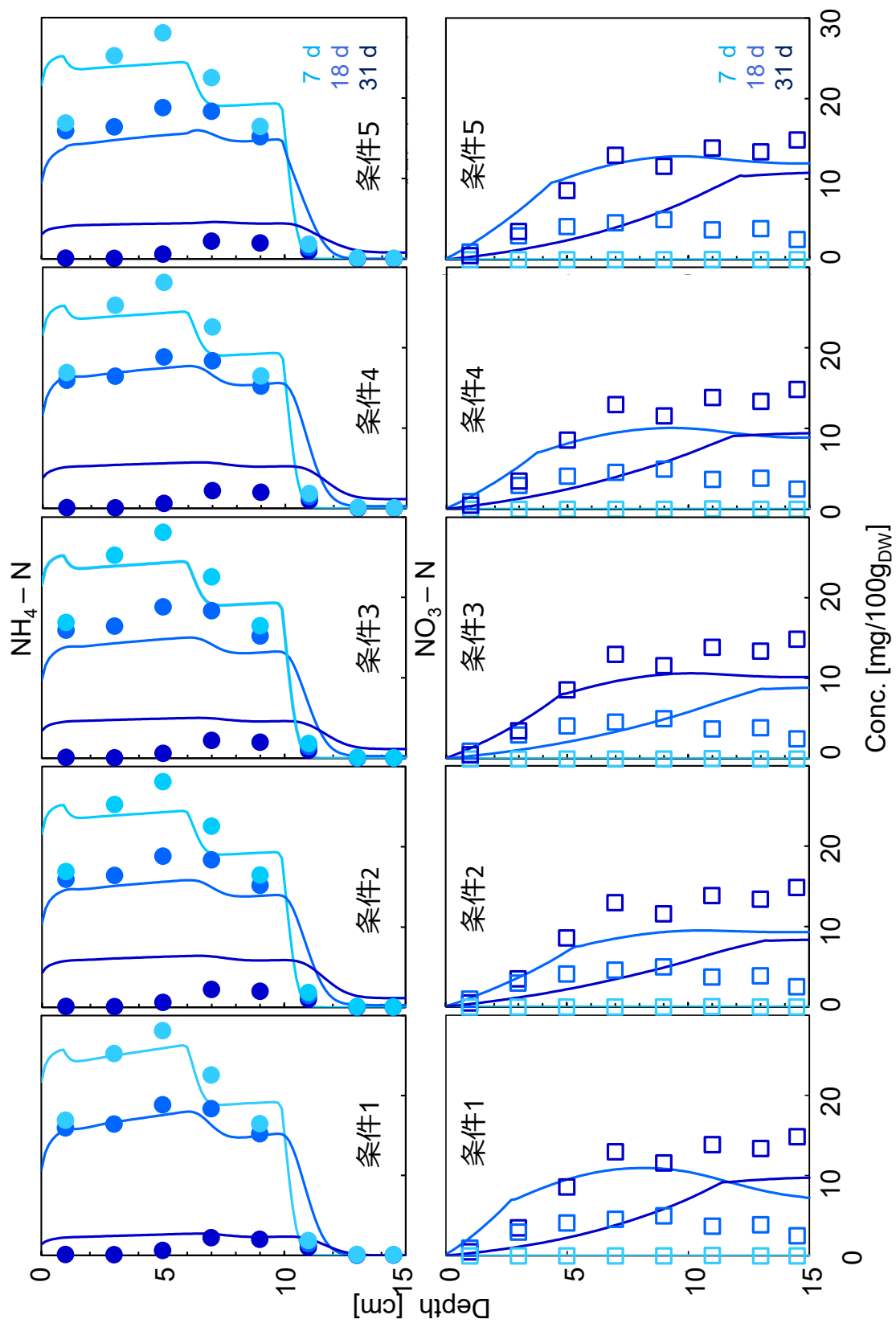


図 6.1.2 条件 1～5 の実測値（実線）と計算値（プロット）の比較





$k_{\min}$  は、0 - 1 cm 深で 0.12 /d, 1 - 6 cm 深で 0.10 /d, 6 - 10 cm 深で 0.06 /d とすると、流れのある浸透実験の  $\text{NH}_4 - \text{N}$  濃度分布の実測値をおおよそ表現した。この  $k_{\min}$  は、含水率が同程度であった 10 cm 深さの保温静置実験と比較すると全層で高かった。 $k_{\text{nit}}$  は、硝化開始と無機化終了のタイミングの与え方次第で、0.08 /d - 0.14 /d の範囲になった。 $k_{\text{nit}}$  も、 $\theta = 0.43$  の 2.5 cm 深さの保温静置実験試験の 3 - 5 倍高くなった。すべての条件において  $\text{NH}_4 - \text{N}$  濃度分布の時間変化をおおよそ再現できた。これらの中で、硝化が 7 日目から開始する条件 2 は実測値より  $\text{NO}_3 - \text{N}$  が排水されるのが早いため、棄却した。条件 1 と条件 4 はそれぞれ、31 日目の  $\text{NH}_4 - \text{N}$  濃度分布と排水の再現がよく、窒素収支の再現もよかった。

条件 1 の計算は実測の 7, 18, 31 日目の  $\text{NH}_4 - \text{N}$  濃度分布を再現した。一方、計算は 18 日目、31 日目の  $\text{NO}_3 - \text{N}$  濃度分布をとともに過大評価した。特に、18 日目の過大評価が大きかった。窒素収支を見ても、計算が 18 日目の土中  $\text{NO}_3 - \text{N}$  量のみを過大評価していることが確認できる。その影響もあり、 $\text{Inorg} - \text{N}$  は実測値では 7 日目でピークになっているのに対して、計算値では 18 日目でピークになった。

条件 4 は、条件 1 と同様に計算が実測の 7, 18, 31 日目の  $\text{NH}_4 - \text{N}$  濃度分布をおおよそ表現したが、18 日目、31 日目の  $\text{NO}_3 - \text{N}$  濃度分布を過大評価した。窒素収支は条件 1 とほとんど同じであるが、条件 1 よりも硝化開始が早い分、18 日目の  $\text{NH}_4 - \text{N}$  量が減少し、 $\text{Inorg} - \text{N}$  量も実測に近づいた。無機化と硝化が同時に生じている可能性がある。

18, 31 日目の  $\text{NO}_3 - \text{N}$  濃度分布の過大評価は、硝化速度定数が保温静置実験よりも 3 - 5 倍程度であり、全層で一斉に開始しているからだと考えられる。硝化が全層で一斉に 13 日目ないしは 11 日目から開始されたら 18 日目の時点では計算値のような分布になるはずである。しかし、実測値の  $\text{NO}_3 - \text{N}$  濃度分布はこれより少なくほぼ全層で一定である。これより、硝化は 18 日目の直前に全層で一斉に生じた可能性がある。あるいは、硝化速度定数が深さ毎に異なった、硝化が始まるタイミングが層毎で異なっていたという可能性も考えられる。前者は、18 日目と 31 日目の  $\text{NH}_4 - \text{N}$  分布が再現できない。さらに、 $\text{NH}_4 - \text{N}$  濃度分布は 10 - 15 cm 深でほとんどないため、 $\text{NO}_3 - \text{N}$  が少なくとも 5 cm は移動していることを考慮すると、可能性は低い。後者は、10 cm 高さの保温静置実験を硝化が生じるまで測定し、深さ毎の硝化速度定数を求め、そのうえで硝化が始まるタイミングを検討する必要がある。新鮮な水が常に供給され、上層ほど無機化が促進され、硝化の開始が早まる可能性もあるため、これらは今後の検討課題である。

## 6-2 保温静置実験・浸透実験の比較と考察

$k_{\min}$  は、10 cm 深保温静置実験では 0–1 cm で 0.053 /d, 1 cm 以深で 0.042 /d だったが、浸透実験では 0-1 cm で 0.12 /d, 1 - 6 cm で 0.10 cm/d, 6–10 cm 深で 0.06 /d と全層で高くなった。NO<sub>3</sub>–N 濃度分布には検討の余地が残るが、硝化速度定数が正しいとすると、硝化の速度定数は  $\theta=0.43$  の保温静置実験では 0.026 /d だったのに対して、浸透実験では 0.08 - 0.14 cm/d と高くなった。さらに、硝化が始まるタイミングは  $\theta=0.43$  の保温静置実験では 22.5 日目以降、10 cm 高さの保温静置実験でも 18 日目時点で硝化が生じていなかったのに対して、浸透実験では硝化が 13 日目ないしは 11 日目から生じるとなった。以上の結果より、 $q=0.5$  cm/d 水の流れの影響で無機化が促進されること、無機化の促進の程度は深さに依存すること、さらに硝化が早まり、その程度も大きくなることが分かった。

総括して、計算により水分移動をともなう土中の有機物の無機化・硝化反応を再現し、水の流れの影響を考察することができた。水の流れがあることにより、無機化・硝化反応が促進される可能性がある。また、無機化と硝化が同時に生じる可能性がある。さらに、深さによって硝化反応が始まるタイミングやその程度が異なる可能性がある。浸透実験のより詳細な時間間隔での測定をすることにより、水分移動をともなう無機化、硝化反応がより鮮明になるだろう。

## 第 7 章 おわりに

本研究では、有機物を施用した土中での無機化・硝化に深さや水分移動が及ぼす影響を明らかにすることを目的に、第 4 章で保温静置実験、第 5 章で浸透実験を行い、第 6 章ではこれらの実験結果の定量化を試みた。含水率  $\theta$  が異なる 2.5 cm 深さの保温静置実験では、含水率によって  $k_{\min}$  や  $k_{\text{nit}}$ 、硝化開始のタイミングが異なることが明らかになった。 $k_{\min}$  は含水率が低いほど高くなり、これは含水率が低い方が大気とのガス交換がしやすく有機物分解菌が活性化したためではないかと考えられた。 $\theta = 0.43$  の試料では  $k_{\min}$  は  $0.038 \pm 0.005$  [ /day ],  $k_{\text{nit}}$  は  $0.026 \pm 0.004$  [ /day ], 硝化開始のタイミングは 25 日以降だった。

10 cm 深さの保温静置実験においては、 $k_{\min}$  が表層のみ  $0.053$  [ /day ] と高い値を示し、それ以深では平均して  $0.042$  [ /day ] だった。これらの結果から、土層における無機化反応は深さにより  $k_{\min}$  が異なり、表層で特に高くなることが明らかになった。表層は大気とのガス交換が活発であったため、有機物分解菌が活性化し、 $k_{\min}$  が高くなったと考えられる。土層における無機化反応を考える際は深さを考慮する必要があることが示唆された。

浸透実験では、7 日目の土中の  $\text{NH}_4 - \text{N}$  は油粕すきこみ層で増加し、無機化が生じた。18 日目には土中の  $\text{NH}_4 - \text{N}$  が減少、 $\text{NO}_3 - \text{N}$  が増加し、硝化が生じた。31 日目には生じた  $\text{NO}_3 - \text{N}$  が流下した。10 cm 深さの保温静置実験と比較して、7 日目の  $\text{NH}_4 - \text{N}$  量は浸透実験で 2 倍多くなった。また、 $\text{NO}_3 - \text{N}$  が生成されるタイミングが早かった。このことから、水分移動が無機化を促進し、硝化開始のタイミングを早めたと言える。

浸透実験の結果に基づいて数値解析を行ったところ、 $k_{\min}$  は 0 – 1 cm で  $0.12$  [ /day ], 1 – 6 cm 深で  $0.10$  [ /day ], 6 – 10 cm 深で  $0.05$  [ /day ], 硝化は 14 日から開始し  $k_{\text{nit}}$  は全層で  $0.14$  [ /day ] と決定したとき、計算値は実測値をおよそ再現した。10 cm 深さ、2.5 cm 深さの保温静置実験と比較すると、 $k_{\min}$  は 6 cm 深まで 2 倍程度、 $k_{\text{nit}}$  は 5 倍程度、硝化開始のタイミングを 11 日程度促進することが明らかとなった。

本研究より、深さは無機化に影響を与えること、水分移動は  $k_{\min}$  を 2 倍程度、 $k_{\text{nit}}$  を 5 倍程度、硝化開始のタイミングを 14 日程度促進することが明らかとなった。今回の実験では雨が降り続ける条件で行った。さらに雨が降ったりやんだりする条件での実験などを行うことでより現場を模した実験となり、畑土中における無機化・硝化の予測に一步近づけると考えられる。

## 参考文献

Appelo and Postma(2005) , Geochemistry, groundwater and pollution , 2nd edition.A.A.Balkema Publishers.

David Laird (2010), Biochar impact on nutrient leaching from a Midwestern agricultural soil, Geoderma158, p.436－442

藤原 (2013), 土壌の基礎知識, 農村漁村文化協会 p.9, p.70-74

広瀬春朗 (1973), 各種植物遺体の有機態窒素の畑状態土壌における無機化について, 日本土壌肥料学会誌第 44 巻 第 5 号, p.157-163

服部・宮下 (2000), 土の微生物学, 養賢堂, p.68

Holcomb et al (2011) ,Soil Science Society of America Journal volume75 Issue 6, p.2341-2347

犬伏和之 (2019), 土壌生化学, 朝倉書店, p.11, p.26－28

井上光弘, 塩沢昌 (1994), 4 極法による土壌カラム内の電気伝導度測定とその応用, 土壌の物理性 第 70 号 p.23-28

Jury and Horton, 2004, Soil Physics 6th Edition (取出伸夫監訳), 築地書館

K.Khalil,2004,Nitrous oxide production by nitrification and denitrification in soilaggregates as affected by O<sub>2</sub>concentration,Soil Biology & Biochemistry 36, p.687-699

木村 (2017) 卒業論文, 異なる有機物を施用した土中における窒素の態の変化

草深 (2018) 卒業論文, 異なる温度の黒ボク土中におけるアンモニア態窒素の硝化

Matsunaka and Sentoku (2002), Impact ecaluation among factors affecting ammonia emmision from surface applied cattle slurry

松中照夫 (2011) ,土壌微生物学の基礎, 農文協, p.196-205

武藤由子ら (2019), 蒸発過程にある黒ボク土中における硝化を伴う窒素の挙動解析と ATP 量測定, 農業農村工学会論文集 IDRE Journal No. 309, p.281 – p.288

苗木ら (2007), 黒ぼく土からのアンモニア揮散に及ぼす土壌 pH・温度・施用窒素形態の影響, 土壌肥料学会誌 第 78 巻 第 3 号, p.309–312

西尾道徳 (1989), 土壌微生物の基礎知識, 農村漁村文化協会, p.178

西尾隆 (1994), 耕地土壌の脱窒過程, 日本土壌肥料学会雑誌 第 65 巻第 4 号 p.463-471

中村公人・取出伸夫 (2007), 形態変化を一次反応式により考慮した土中の窒素移動モデル, 土壌の物理性第 105 号, p.83-97

中西 (2017) 修士論文, 浸透過程にある不飽和土中の窒素の硝化と挙動に関する研究

太田清久, 酒井忠雄 (2004): 役に立つ化学シリーズ 4 分析化学. 朝倉書店

Parkhurst and Appelo(1999) , User's guide to PHREEQC(Version.2).Water-Resource Investigations Report 99-4259

Ray,R.Weil・Nyle C.Brady (2017), The nature and properties of soils, 15th edition, Pearson, p.532, 536-539, 587-596

Rochette et al (2013), NH<sub>3</sub> volatilization, soil NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration and soil pH following subsurface banding of urea at increasing rates, Canadian Journal of Soil Science, Volume 93, Number 2

染谷孝 (2020), 土壌微生物の世界, 築地書館, p.9

竹内萌実 (2015): 湛水土壌表面近傍の酸化還元過程の微視的観察

戸田浩人(1994), 森林土壌中における窒素無機化の反応速度論的解析(Ⅱ), 日林誌 76 p.540-546

## 謝辞

本論文を執筆するにあたり、非常に多くの方にお世話になりました。

一番に感謝を申し上げたいのは、手厚くご指導してくださった渡辺先生です。渡辺先生にはたくさん苦勞をかけてしまいました。それでも私の性質を理解してくださり、真正面から向き合い、そしてどう進むべきかを指図してくださったおかげで、無事、本論を執筆することができました。どこか空想的な私には先生の現実的な指摘が身に染みることがしばしばありましたが、先生の教えのおかげで私も物事を多面的にみられるようになったと思っています。

取出先生、これまで楽しい時間をありがとうございました。研究面で先生から指摘されることは、突き刺さるがゆえに心が折れることもありましたが、それとともに楽しい時間をたくさん提供していただいたと思っています。

坂井先生、配慮しながらの様々なご指摘、ありがとうございました。先生にはもしかすると心配をおかけしちゃっていたかもしれません。そうだったらごめんなさい。それでも最後まで優しく指摘していただけたのはありがたかったです。

その他、この論文の審査をしてくださった松尾先生、試料を送ってくださった武藤先生、実験を手伝ってくれた後輩、先輩、同期の皆さんのおかげで本論を執筆することができました。特に院生生活を共に過ごした清本君や三口さんには、たくさん励まされましたし、二人のおかげで楽しい時間を過ごすことができました。ありがとうございました。

最後に、これまで辛いときには手を差し伸べ、最後まで温かく見守ってくれた家族に感謝の意を示します。

## 付録

### A NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N の測定

#### A-1 抽出

NH<sub>4</sub>-N 全量は 10%KCl 溶液で、NH<sub>4</sub>-N の溶存量と NO<sub>3</sub>-N 量で抽出した。以下にそれぞれの抽出方法を述べる。まず、カラム解体時の湿潤土を、KCl 抽出は 3 g 程度、純水抽出は 5 g 程度測りとり、50 mL の遠沈管に入れた。土を入れた遠沈管に、KCl 抽出は 10% KCl 水溶液を 25 mL、純水抽出は純水を 40 mL を加え、震盪機で 1 時間震盪した。

震盪後、懸濁液を遠心分離機にかけ、土粒子を沈殿させた。遠心分離は、KCl 抽出は 4000 rpm で 10 分間、水抽出は 4000 rpm で 20 分間行った。水抽出は、10 分間の遠心分離で上澄み液がきれいになれば 10 分間でよいが、有機物添加土壌は 10 分間であまり分離しなかったため、20 分間行った。遠心分離後、30 mL シリンジに上澄み液を取り、孔径 0.45 μm のろ紙でろ過した。ろ紙にはアドバンテック社製の直径 25 mm のメンブレンフィルター(図 A.1.1)を、フィルターをセットするろ過装置には、専用のプラスチックホルダー PP25 (図 A.1.2)を使用した。フィルターを取り出す際には先の丸いピンセットを用い、フィルターに傷をつけないよう注意をした。ホルダーにシリンジを装着し、ろ過を行った。

純水での抽出液は、液中の細かい土粒子が 0.45 μm の孔隙を通過することにより、ろ液が濁る場合がある。その場合、フィルターに抽出液を通し、少し目詰まりさせ、シリンジの手ごたえを感じた後でろ液を回収すると、透明な液色のろ液を得られる。特に、有機物添加土壌は、あまり根詰まりしないまま抽出すると、ろ液が黄色になってしまい、DR6000 による NO<sub>3</sub>-N 濃度測定に影響を及ぼすため(詳しくは A-2-3-1 注意点参照)、できるだけ透明なろ液になったのを確認してから抽出するとよい。フィルターが完全に目詰まりした場合、根詰まりした土を吸い上げるように注射器を引く、または注射器とホルダーを外し、ホルダーを解体し、フィルターに溜まった土をキムワイプでふき取ることで、ろ過が再開できる。フィルターは試料ごとに替え、注射器とホルダーは試料ごとに洗浄し、キムタオルで水分を除き使用した。



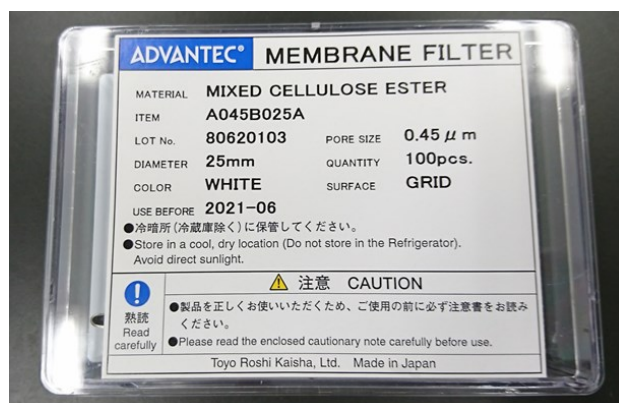


図 A.1.1 メンブレンフィルター



図 A.1.2 プラスチックホルダー

## A-2 吸光度計 (DR6000)

### A-2-1 測定原理

DR6000 では、液中の被測定物質と試薬をセル内で反応させ、変化した液色より濃度を出力する。液色の補色光の透過率  $T(\%)$  を測定し、吸光度  $A$  および溶液濃度  $C$  に換算する。

物体の色が濃いほど、その補色光は物体に吸収され、補色光の吸光度  $A$  は高くなる（太田ら，2004）。この時、吸光度  $A$  と透過率  $T$  には式 A.1 が成り立つため、物体の補色光の透過率  $T$  を測定することで、その吸光度  $A$  を求めることができる（図 A.2.1）。

$$\text{吸光度 } A = -\log \frac{I}{I_0} = -\log \frac{\text{透過率 } T [\%]}{100} \quad \text{式 A.1}$$

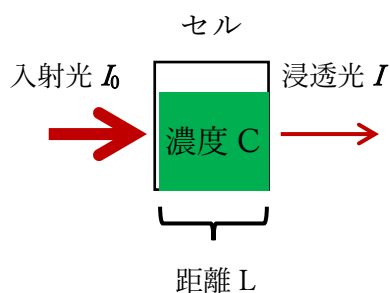


図 A.2.1 セルを通過する補色光

吸光度  $A$  と溶液濃度  $C$  には、ランバート・ベール則（式 A.2）が成り立つ。

$$\text{吸光度 } A = \varepsilon LC \quad \text{式 A.2}$$

$L$  は光が通過する距離， $C$  は溶液の濃度， $\varepsilon$  は比例定数である。この法則は、吸光度が、距離  $L$  と溶液濃度  $C$  との間に比例関係をもつことを示している。DR6000 は、この関係を用いて吸光度  $A$  から溶液濃度  $C$  を算出している。

## A-2-2 測定方法

DR6000 は、短期間使用しない場合スリープモードにしておく。スリープモードから立ち上げた際は 1 分ほど、自動で光源や電圧のテストなどの自己診断が行われる。自己診断が終了すれば使用可能となる。

本実験で用いたセルは角形 10 mL セル（図 A.2.2）である。セルは 2 つ 1 組となっており、同じ番号が記してある。NH<sub>4</sub>-N 測定には 588 と 984 を、NO<sub>3</sub>-N 測定には 642 と 074 を用いた。

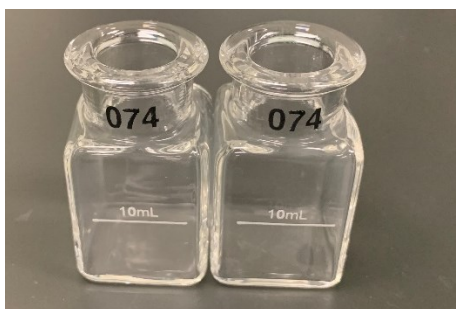


図 A.2.2 使用した角形 10 mL セル

### A-2-3-1 アンモニア態窒素の測定方法、原理、注意点

測定法 : サリチル酸塩法

測定範囲 : 0.01~0.50 mg/L

使用試薬 : サリチル酸アンモニア試薬

シアヌール酸アンモニア試薬

(TOADKK コード : HACH1389)

#### <測定方法>

1. DR6000 の画面上で、内蔵プログラムのサリチル酸塩法を選択する。
2. 1 組の 10 mL セルを用意し、1 つには土壌抽出液 10 mL、もう 1 つには純水 10 mL を入れる。
3. 2 つのセルにサリチル酸アンモニア試薬を加え、専用の栓をし、振って溶解させる。試料の振り方は図 A.3 に示した。
4. 3 分間の静置後、2 つのセルにシアヌール酸アンモニア試薬を加え、専用の栓をし、振って溶解させる。
5. 15 分間の静置後、純水を入れたセルを DR6000 のセルホルダ（図 A.4）に挿入し、DR6000 の画面上の「ゼロ」を押し、NH<sub>4</sub>-N 濃度 0.00 mg/L での吸光度を測定する。
6. 次に土壌抽出液を入れたセルをセルホルダに挿入し、画面上の「測定」を押し、その吸光度を測定する。その吸光度と NH<sub>4</sub>-N 濃度 0.00 mg/L での吸光度から、土壌抽出液の NH<sub>4</sub>-N 濃度が計算され、画面上に計算値が出力される。

#### <測定原理>

$\text{NH}_4\text{-N}$  は、塩化物と結合しモノクロアミンを形成する。モノクロアミンはサリチル酸塩と反応し、5-アミノサリチル酸塩を形成する。これが1つ目の試薬であるサリチル酸塩アンモニア試薬を加えた時の反応である。

5-アミノサリチル酸塩は、ニトロプルシドナトリウム触媒がある場合に酸化し、青色の混合物を形成する。2つ目の試薬であるシアヌール酸アンモニア試薬にはその触媒が含まれているため、 $\text{NH}_4\text{-N}$  濃度が高いほど青色混合物が生成され、青色が濃くなる。また、試薬は水溶液中で黄色であるため、最終的に緑色の水溶液となる。吸光度の測定には、655 nm（赤）の波長を用いる。

#### <測定精度>

硫酸アンモニウム ( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を用いて調整した水溶液を用いて  $\text{NH}_4\text{-N}$  が正しく測定できているかを確認した。以下の図 A.2.3.1 に、調整した  $\text{NH}_4\text{-N}$  溶液を測定した結果を示す。横軸は既知の調整濃度、縦軸は測定濃度である。測定の信頼範囲は 0.01–0.50 mg/L– $\text{NH}_4\text{-N}$  である。

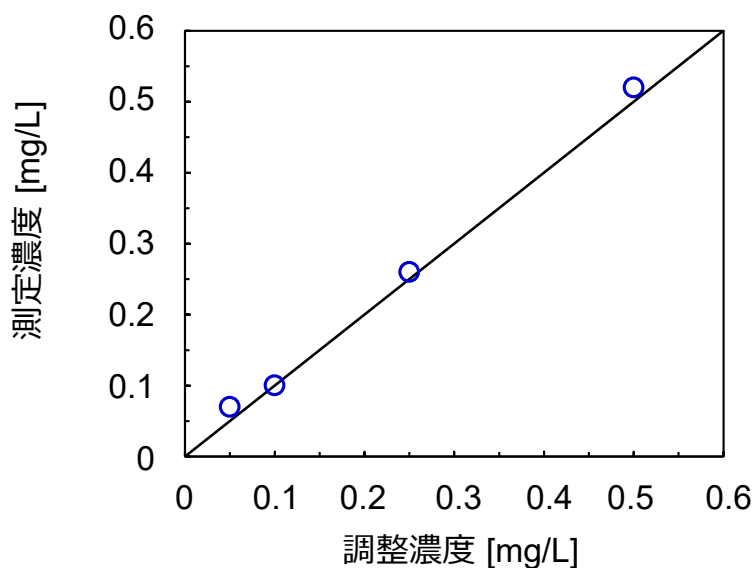


図 A.2.3.1 調整濃度と測定濃度

図 A.2.3.1 より、 $\text{NH}_4\text{-N}$  は精度よく測定できていると言える。しかし、これは土中水抽出時に用いる KCl の影響は考えていない。中西 (2016) は KCl の影響を検証するため、純水や KCl 溶液で様々な濃度に調整した硫酸アンモニウム ( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液を測定し、調整濃度と測定濃度の検量をしたところ、( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液に KCl が含まれると  $\text{NH}_4\text{-N}$  の測定値は 0.05 mg/L、 $\text{NH}_4\text{-N}$  の濃度が高い場合は 0.2 mg/L の過大評価をした。しかし、高濃度での過大評価は 2 倍ほどの希釈によって 0.05 mg/L の過大評価に抑えることができると考えられる。そのため、KCl 溶液で抽出したサンプルは、2 倍以上希釈すると精度よく測定できると言える。

#### <注意点>

試薬について： $\text{NH}_4\text{-N}$  測定の際に用いるサリチル酸アンモニア試薬、シアヌール酸アンモニア試薬の中には、つぶつぶの（一粒が大きな塊になっている）試薬もある。これを用いると、振盪時にすべて溶解しないものが多いので使用を控える。経験上、それぞれの試薬を添加、振盪して 2 分 30 秒以内に試薬が溶解しなければうまく測定できない試薬であることが多いため、早めに破棄するとよい。あまりにもつぶつぶの試薬が多ければ、先生に相談する。

### A-2-3-2 硝酸態窒素の測定

測定法 : カドミウム還元法

測定範囲 : 中濃度 0.1~10.0 mg/L , 高濃度 0.3~30.0 mg/L

使用試薬 : 硝酸塩試薬 (TOADKK コード : HACH0586)

#### <測定方法>

1. DR6000 の内蔵プログラムで、カドミウム還元法を選択する。今回は検出される  $\text{NO}_3\text{-N}$  濃度も微量だったため、中濃度を選択した。
2. 10 mL セルに土壌抽出液 10 mL を入れ、DR6000 のセルホルダに挿入する。DR6000 の画面上の「ゼロ」を押し、 $\text{NO}_3\text{-N}$  と試薬の反応前における吸光度を測定する。これで試薬ブランクの吸光度が測定される。画面には 0.0 mg/L  $\text{NO}_3\text{-N}$  と表示される。
3. セルに硝酸塩試薬を加え、専用の栓をし、1 分間上下に勢いよく振盪する (図 A.6)。
4. 5 分間の静置後、セルをセルホルダに挿入し、画面上の「測定」を押し、その吸光度を測定する。その際、中濃度範囲の測定であれば静置後 2 分以内に、高濃度範囲の測定であれば 7 分以内に測定を行う。この吸光度と試料ブランクの吸光度から、抽出液の  $\text{NO}_3\text{-N}$  濃度が計算され、画面上に計算値が出力される。
5. 測定された濃度は、 $\text{NO}_3\text{-N}$  と  $\text{NO}_2\text{-N}$  を合わせた濃度となっている。そのため測定濃度から  $\text{NO}_2\text{-N}$  濃度を引き、 $\text{NO}_3\text{-N}$  濃度を求める。しかし、硝化過程において  $\text{NO}_2\text{-N}$  はほとんど土壌に蓄積せず (例えば Weil et al. ,2017), 中西 (2016) も  $\text{NO}_2\text{-N}$  はほとんど検出されなかったとあるため、今回は  $\text{NO}_2\text{-N}$  濃度を引かなかった。

#### <測定原理>

試薬であるカドミウム金属は、抽出液中の硝酸塩を亜硝酸塩に還元する。亜硝酸塩イオンは酸媒体の中で、試薬中のスルファニル酸と反応し、ジアゾニウム塩という中間生成物を形成する。これが同じく試薬中のゲンチシン酸と反応し、琥珀色の溶液となる。吸光度の測定には、中濃度の測定であれば 400 nm（紫）、高濃度の測定であれば 500 nm（青緑）の波長を用いる。

#### <測定精度>

測定方法に、「1 分間上下に勢いよく振盪する」とあるが、「勢いよく」というのは個人差があり、場合によっては測定濃度が実際の濃度と異なる可能性がある。そのため、 $\text{NO}_3\text{-N}$  溶液を用いて濃度調整し、自分の振盪の仕方（1 秒間に 4 往復）で何分間振盪すればよいか検証した。

図 A.2.3.2 に、調整した  $\text{NO}_3\text{-N}$  溶液を測定した結果を示す。横軸は既知の調整濃度、縦軸は測定値である。測定の信頼範囲は 0.1 – 10 mg/L -  $\text{NO}_3\text{-N}$  である。なお、実際に行った保温静置実験、浸透実験の試料は測定濃度が 5 mg/L 以下だったため、5 mg/L 以下の範囲での検証となっている。

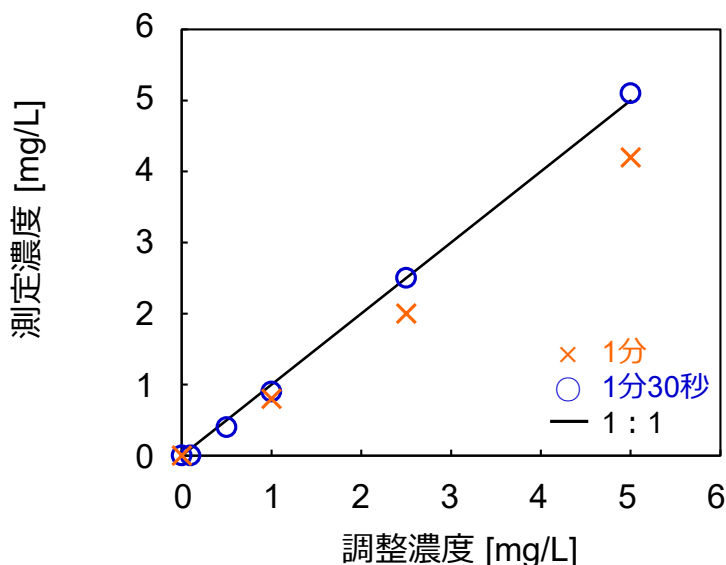


図 A.2.3.2.1 調整濃度と測定濃度

マーカーの種類は、「×」が表記通り 1 分間勢いよく振盪した場合の測定値、「○」が 1 分 30 秒勢いよく振盪した場合の測定値である。1 分間では、測定濃度は調整濃度を過小評価したが、1 分 30 秒では、測定濃度と調整濃度はおおそ一致した。よって、本研究で  $\text{NO}_3\text{-N}$  を測定する際は、「1 秒間に 4 往復する」速さで「1 分 30 秒」振盪した。

<注意点>

試薬について：カドミウム還元法で使用する硝酸塩試薬は白色の粉であるはずだが、中には黄色になっている試薬もいくつかある。黄色の試薬は不良品であり、これを用いるとうまく測定できない（上記のすべての調整濃度に対して測定濃度が 1.5 mg/L となる）ため、使用しない。あまりにも不良品の数が目立つようになってきたら、先生と相談のうえ、HACH 社に連絡すること。

抽出について：A-1 抽出にも記載したが、純水抽出で抽出した際、ろ液が黄色だと  $\text{NO}_3\text{-N}$  に影響が出る。以下の図 A.2.3.2.2 は、純水抽出液を 4 倍希釈、10 倍希釈したものを並べたものである。向かって右の 10 倍希釈の色だと測定に影響が出ないが、左の 4 倍希釈の色は影響が出て測定ができない。抽出時にできるだけ透明な色にするとよい。

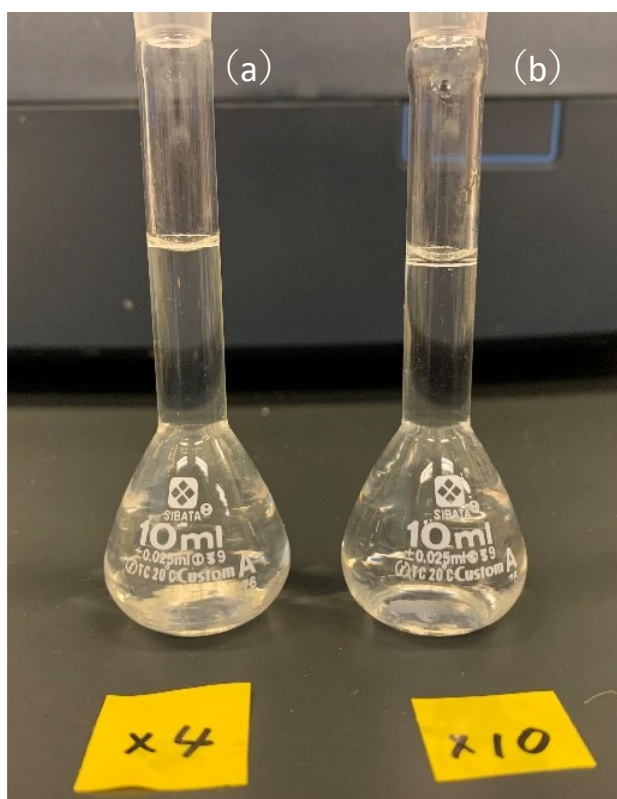


図 A.2.3.2.2 純水抽出液の 4 倍希釈 (a)，10 倍希釈 (b)



## B ルミテスターを用いた ATP の測定方法

ATP は生細胞外にも含まれるため、細胞外 ATP を除去した後に細胞内 ATP を抽出、発光量を測定することで生細胞数を評価する（図 B.1）。細胞外 ATP の除去、細胞内 ATP の抽出、発光には付属の ATP 消去試薬、ATP 抽出試薬、ATP 発光試薬を使用する。以下に ATP 消去試薬、ATP 抽出試薬、ATP 発光試薬の作成方法を記す。

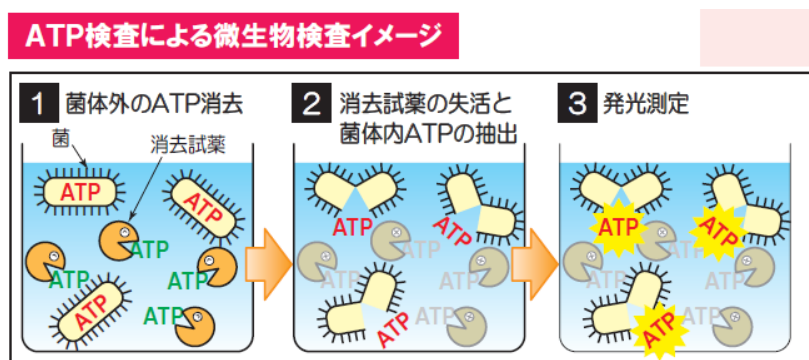


図 B.1 ATP 測定イメージ図（キッコマンバイオケミファ社から引用）

<ATP 消去試薬（ルシフェノール ATP 消去試薬セット）>

ATP 消去試薬ビン（図 B.2 (a)、ピンク）に ATP 消去試薬溶解液（図 B.2, (b) 黄色）を全量入れた。ATP 消去試薬ビンを開栓するときは、内容物が飛散しないように注意した。5 分間静置後、泡立ないように攪拌し、550  $\mu$ L ずつ 10 個に分けて冷凍保存した。

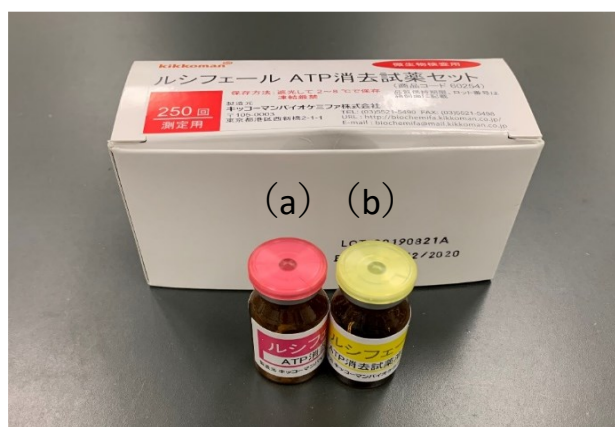


図 B.2 ATP 消去試薬

<抽出試薬（ルシフェノール 250 プラス）>

ATP 抽出試薬ビン（図 B.3 (a)，白）を開栓し，550  $\mu\text{L}$  ずつ 10 個に分けて冷凍保存した。

<発光試薬（ルシフェノール 250 プラス）>

まず，発光試薬ビン（図 B.3 (b)，緑）に発光試薬溶解液（図 B.3 (c)，ピンク）を全量入れた。発光試薬ビンを開栓するときは，内容物が飛散しないようにゴム栓をきりこみからゆっくり空気を入れるように持ち上げた。5 分間静置後，泡立てないように注意しながら攪拌した。550  $\mu\text{L}$  ずつ 10 個に分けて冷凍保存した。

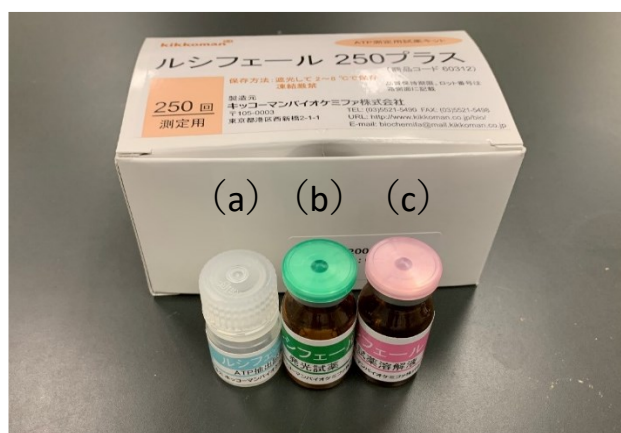


図 B.3 ATP 抽出試薬と発光試薬

以下，測定時に必要なリン酸緩衝液と ATP の検量線作成に必要な ATP 標準試薬の作成方法である。

<リン酸緩衝液>

リン酸二水素ナトリウム  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ，0.480 g を 400 mL の蒸留水に，リン酸水素二ナトリウム  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ，0.852 g を 600 mL の蒸留水に溶かした。その後リン酸二水素ナトリウム水溶液 320 mL とリン酸水素二ナトリウム水溶液 480 mL を混合し，pH を測定した。このとき，pH が 7.0 になるように調整した。

リン酸緩衝液は，上記どおりに作成しても pH が 7 よりも大きかったため，酸性のリン酸二水素ナトリウムを上記よりも多く作成した。

#### <標準試薬>

標準試薬ビン（図 B.4 (a)，オレンジ）に標準試薬溶解希釈液（図 B.4 (b)，紫）を 4.0 mL はかりとって入れた。標準試薬ビンを開栓するときも，内容物が飛散しないように注意した。

泡立てないように撹拌した。これで， $2 \times 10^{-6}$  mol/L の標準液となる。これを 100  $\mu$ L ずつ 40 個に分けて冷凍保存した。

実際に測定するときは，ルミチューブを 6 本（A～F）用意し，リン酸緩衝液を 450  $\mu$ L ずつ入れ，冷凍保存してある標準液を 50  $\mu$ L，ルミチューブ A に入れ，撹拌した。さらにルミチューブ A の液を 50  $\mu$ L，ルミチューブ B に入れ，撹拌した。これを F まで繰り返し，A： $2 \times 10^{-7}$ ，B： $2 \times 10^{-8}$ ，C： $2 \times 10^{-9}$ ，D： $2 \times 10^{-10}$ ，E： $2 \times 10^{-11}$ ，F： $2 \times 10^{-12}$  mol/L の 6 種類の標準液を作成した。A～F の濃度の標準液を 0.1 mL ずつルミチューブに入れ，ATP 抽出液を 0.1 mL 加えた。20 秒後，発光試薬を 0.1 mL 加えて撹拌し，20 秒後にルミテスター，スタンダードモードで発光量を測定した。作成した検量線は既出の以下の図 3.2.2.3 の通りである。



図 B.4 ATP 標準試薬  
(キッコーマンバイオケミファ社の HP より引用)

#### <測定方法>

まず、乾土相当量 1 g の土とリン酸緩衝液 100 mL を 5 分間振盪した。ルミチューブに懸濁液 1.0 mL 入れ、ATP 消去試薬を 0.1 mL 加え、攪拌した。30 分間静置後、新しいルミチューブを 5 本にルミチューブに入った懸濁液を攪拌してからそれぞれ 0.1 mL ずつ入れ、ATP 抽出試薬を 0.1 mL 加えて攪拌した。20 秒後、発光試薬を 0.1 mL 加え、攪拌した。20 秒後、ルミテスター、スタンダードモードで発光量を測定した。図 B.5 は測定時の様子である。

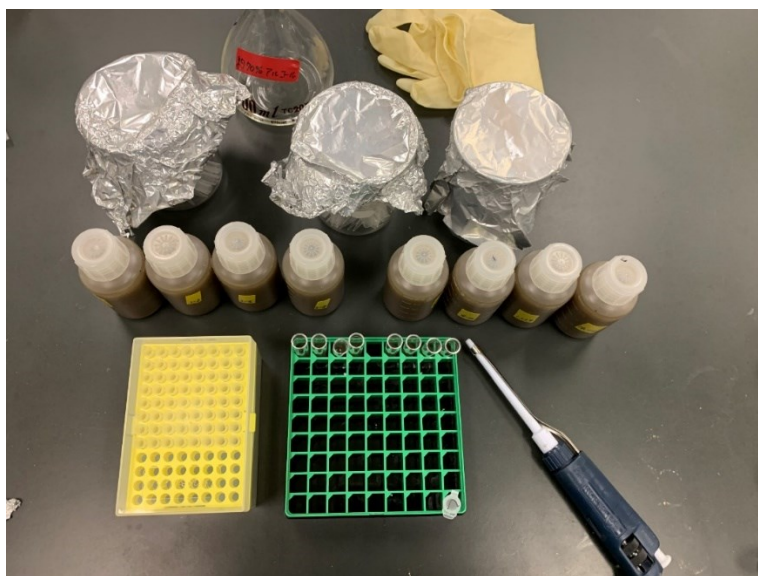


図 B.5 ATP 測定の様子

#### <注意点>

ATP 測定時に例えば指や手で直接触れるとコンタミネーションし、ATP 測定値が過大になってしまう。ATP 測定時にはゴム手袋を着用する、あらゆる実験器具を取り出すときも手ではなくピンセットを用いて捜査すること。また、実験器具事態に菌が付いている可能性がある。そのため、チップ、マイクロチューブ、ピンセット、ガラス棒などはオートクレーブ（図 B.6）により滅菌してから使用した。ルミチューブは溶けてしまうので、滅菌しないこと。滅菌は、121°Cで 20 分行った。滅菌時には図 B.7 のようにアルミホイルで覆った。オートクレーブ使用時には下のタンクに水が入っているかを確認してから使用する。水が足りない時には蒸留水を足した。



図 B.6 オートクレーブ



図 B.7 オートクレーブにかけるときのマイクロチューブとチップ



### C 全自動元素分析装置の測定方法

土壌サンプルは 105℃で 24 時間以上炉乾燥したものを、植物サンプルは 60℃で 24 時間以上炉乾燥したものを試料とした。移動の際には、水分が加わらないようデシケータに入れて移動した。測定は各試料 2 連または 3 連で行い、平均値から各元素量を求めた。作成時にはゴム手袋を着用して行った。まず、スズホイルで器を作った。マイクロ天秤（図 C.1）にのせ、マイクロ天秤の扉を閉めてから 0 に合わせた。スズホイルの扱いはピンセットを使用した。スズホイルを取り出し、試料を入れ、目的の重量（土試料は 30～40 mg、植物サンプルは 3～5 mg）とした。スズホイルの器は不安定な形状のため、中の試料をこぼさないように注意して作業した。スズホイルを試料が出ないように丸め、さらに圧縮して錠剤型にした。作成した試料を鏡の上に 3 回程度落として、中の試料が出てこないか確認した。確認できたら試料をマイクロ天秤にのせ、重量を記録した。作成した試料はどの試料か分からなくならないよう、順に容器に入れた。

各元素は、機械内蔵の検量線を用いて算出されるが、その検量線では低濃度あるいは高濃度の値が怪しくなることがある。そこで、本実験においては装置を使用する際、毎回自ら検量線を引いて求めた。検量線の引き方を以下に示す。試料を測定する前に、アセトアニリドをおよそ 0.1, 0.5, 1, 2, 3 [mg]の 5 点で測定した。その測定値から Blank の平均値を引き、アセトアニリドの重量と N, C, H の Area の検量線を引いた。検量線に本試料の N, C, H の Area を代入し、アセトアニリドの相当量を算出した。さらに、アセトアニリドの組成（N：10.36%，C：71.09%，H：6.71%，O：11.84%）をかけて N, C, H 含有量を算出した。

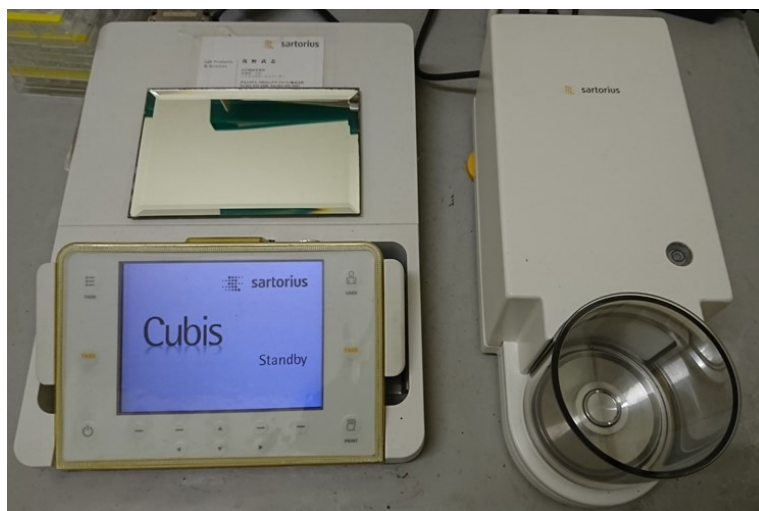


図 C.1 マイクロ天秤

<注意点>

装置を始業する前に、装置内の還元銅が十分に残っていることを確認し、灰分を取り除く。還元銅が無くなる恐れがあるため、一度に多量のサンプルを仕掛けない。一度に測定する試料数は 30 サンプル×2 連の 60 サンプル程度にすること。マイクロ天秤使用後は、専属の筆などを使い掃除をすること。

#### D 浸透実験に用いたデータロガーのプログラム

'CR1000 Series Datalogger

'CR1000 program to measure 4 tensiometer , weight , 4-needle EC sensors

'date:2017/5/6

'program author : Yuki Kusafuka

'editor Kaho

'Wiring of CR1000 and tensiometer

'12V----Brown

'G-----Blue

'Earth--Black

'Single end--White

'Wiring of CR1000 and AM416

' CR1000 -- AM16/32 (2x32)

' C1 ----- RES

' C2 ----- CLK

' 12V ----- 12V

' G ----- GND

' 1H ----- COM H2

' 1L ----- COM L2

' VX1(EX1)---- COM H1

' 2H ----- COM L1

'           |

'           R (resistance)

'           |

' 2L ---|

' AG ---|

'Wiring of CR1000 and A&D scale



'CR1000 -- A&D

'C7(Tx) ----- #2(RXD)

'C8(Rx) ----- #3(TXD)

'G ----- #7(SG)

'PipelineMode

'Declare Public Variables

Public Press(4)

'4-needle EC sensors:

Public Ptemp, batt\_volt

Public V1\_V2(4),g(4) 'Output of four-needle EC sensors

Public RefTemp 'Reference temperature

Public i

'scale commands

Public Weightstring As String \* 50, Wgram As String \* 20

Public Weight

Public StringtoSend As String \* 20

Const CRLF=CHR(13) + CHR(10)

'Subroutine for scale measurement

Sub ScaleMass

StringtoSend = "Q"+CRLF

SerialOut (Com4,StringtoSend,"",0,100)

SerialIn (Weightstring,Com4,100,13,100)

Wgram=Mid (Weightstring,5,11) 'A&D scale

Weight=Wgram

EndSub

'Define Data Tables

DataTable (kaho,1,-1)

```

DataInterval (0,30,Min,10) # 30 分に 1 回の記録
Sample (1,Ptemp,IEEE4)
Minimum (1,batt_volt,IEEE4,0,False)
Sample (1,Weight,IEEE4)
Sample (4,Press(),IEEE4,)
Sample (1,RefTemp,IEEE4,)
Sample (4,g(),IEEE4,)
EndTable

'Main Program
BeginProg
  SerialOpen (Com4,9600,10,100,10000)
  Scan (10,Min,0,0)
    PanelTemp (PTemp,_60Hz)
      Battery (batt_volt)
'Measurement of A&D Scale
  Call ScaleMass

'Measurement of pressure transducer
  VoltSe (Press(1),1,mV5000,6,1,0,_60Hz,-0.2560,235.92) # 検量式
  VoltSe (Press(2),1,mV5000,7,1,0,_60Hz,-0.2555,258.0)
  VoltSe (Press(3),1,mV5000,8,1,0,_60Hz,-0.2561,257.5)
  VoltSe (Press(4),1,mV5000,9,1,0,_60Hz,-0.2572,258.0)

'Measurements of four-needle EC sensor by AM416
'TCDiff (RefTemp,1,AutoRange,8,TypeT,Ptemp,True ,0,_60Hz,1.0,0)
TCSe (RefTemp,1,mV2_5,15,TypeT,Ptemp,1,0,_60Hz,1.0,0)
PortSet (1,1)
For i=1 To 4
  PulsePort (2,30000)
  BrHalf4W (V1_V2(i),1,mV2500,mV2500,1,Vx1,1,2500,True ,True ,0,_60Hz,1,0)
  Delay (0,1000,mSec)

```

```
g(i)=V1_V2(i)/(1+0.0199*(RefTemp-25))  
Next i  
PortSet (1,0)  
  
'Call Output Tables  
  CallTable kaho  
  NextScan  
  
EndProg
```