稲わら施用による農地土壌からの窒素流出の抑制
—安定同位体窒素を用いた施肥窒素の追跡—

山田 夕月[1,#]，山田 奈直[1,#]，サンソンパイサン・ナパコッド[2]，中島 健吾[2]，柴田 誠[3]，渡邉 哲弘[2,3*]，舟川 晋也[2,3]

[1]京都教育大学附属高等学校，[2]京都大学大学院農学研究科，[3]京都大学大学院地球環境学堂

要旨

化学肥料の過剰な施用に伴う農地からの窒素の流出は，環境を汚染する．本研究では，微生物の基質である稲わらを土壌に加えることにより，微生物を増加させ窒素を吸収させることで，その流出の低減を試みた．化学肥料施用区（化肥区），化学肥料＋稲わら施用区（稲わら区）のポットでトウモロコシを 10 週間栽培した．^{15}N で標識した化学肥料を用いその追跡を行った．栽培中の窒素溶脱量と微生物量，栽培終了時の植物窒素吸収量と土壌窒素量を測定した．トウモロコシは化肥区で稲わら区より大きく成長した．微生物量は栽培期間を通して稲わら区で多かった．窒素溶脱量は化肥区で稲わら区よりも多かった．化学肥料由来の窒素は，化肥区では土壌，トウモロコシ，溶脱水中に半分ほどが残存しており，残りは脱窒したと考えられた．一方，稲わら区では約 9 割が土壌に残った．作物生育の向上という課題は残るが，稲わらの施用は化学肥料由来の窒素の溶脱と脱窒を抑制した．

重要語句：^{15}N，化学肥料，溶脱，脱窒，環境汚染

序論

近代農業では生産性を保つために化学肥料に依存している．一方で，過剰な化学肥料の施用に由来する窒素は，農地の土壌から硝酸（NO_3^-）態で水系に流出し水質汚染を引き起こすとともに，脱窒により亜酸化窒素として大気中に放出され地球温暖化の原因となっている[1,2]．そのため，これらの汚染源である窒素の農地での適正な制御が求められている．

土壌に十分な量の基質を加えると，土壌中の微生物量が増え，その微生物が NH_4^+ と NO_3^- を吸収することが知られている[3,4]．この基質の添加により窒素の溶脱を抑制できる可能性が指摘されている[5,6]．

また，安定同位体窒素で標識した肥料を用いることで，化学肥料由来の窒素を追跡することができる[7,8]．

本研究は，基質を添加し微生物量を増加させた条件下で作物を栽培した際の，窒素の追跡を目的として行った．そのため，化学肥料施用区と化学肥料および稲わら施用区において，トウモロコシをポット栽培した．溶脱量，植物吸収量，土壌残存量を測定し，また施肥された窒素の追跡を安定同位体比に基づいて行った．

試料と方法

ポット栽培試験

対照区，化学肥料施用区（以下，化肥区），化学肥料および稲わら施用区（以下，稲わら区）の 3 処理を行ったポット（開口部の面積 710 cm^2）において，トウモロコシ栽培を各 5 連で行った．栽培のための土壌は赤玉土：3.5 kg，腐葉土：0.50 kg，バーミキュライト：1.0 kg を用い，稲わら区には，粉砕機（ニューパワーミル PM-2005m，大阪ケミカル，大阪）で長さ約 1 cm に細かくした稲わらを 550 g 加えた．稲わらの添加量は，栽培土壌と稲わらを混合した後の CN 比が 24 となるように決定した．施肥として，化肥区と稲わら区に ^{15}N 10% の硫酸アンモニウムを，播種 1 週間前に 4.98 g（150 kg-N ha^{-1} 相当），播種 3 週間後に 1.66 g（50 kg-N ha^{-1} 相当）を水やりの水に溶かして与えた．

栽培は温室内で行った．土壌の準備と施肥は，5 月 7 日に行い 1 週間の間 350 mL $日^{-1}$ の水を与え，その間に溶脱した水はポットに戻した．5 月 14 日に播種を行い，栽培終了時（7 月 23 日）まで，微生物量の測定のための土壌サンプリングをする前日を除き，500 mL $日^{-1}$ の水を与えた．

測定

トウモロコシの成長を追うために，その背丈を 5 月 28 日，6 月 18 日，7 月 9 日，7 月 23 日に測定した．また，トウモロコシの栽培終了時の乾燥重量を測定した．栽培期間中の土壌中の微生物量を，5 月 14 日，6 月 18 日，7 月 23 日に採取した土壌について，基質誘導呼吸法[9] により測定した．溶脱による窒素の損失を調べるため，栽培期間中の溶脱水はすべてポリボトルに集め，週毎に溶脱水の量とその中に含まれる全窒素，NH_4^+，NO_3^- の濃度を測定した．溶脱水中の全窒素濃度は，全有機体炭素計（TOC-L，島津製作所，京都）を用いて行い，NH_4^+，NO_3^- 濃度は，流れ分析装置（AQLA-700，アクア・ラボ，東京）を用いて測定した．栽培後のトウモロコシは，根，茎，葉，穂，実に分け，乾燥後に重量を測定した．また，栽培後の土壌を絶乾しその重量を測定した．トウモロコシと土壌の窒素濃度と安定同位体比は，安定同位体質量分析装置（IsoPrime, Isoprime, Cheadle）を用いて測定した．

サンプル中における化学肥料由来の窒素の量は，以下の二つの式（1, 2）により求めた．（1）式は，$\delta^{15}N$ を定義する．

$$\delta^{15}N_{Spl} = \left\{\frac{(^{15}N/^{14}N)_{Spl}}{(^{15}N/^{14}N)_{Air}}\right\} \times 1000 \quad (1)$$

山田夕月と山田奈直は貢献度の等しい筆頭著者である．

* 内容に関する連絡先：nabe14@kais.kyoto-u.ac.jp

また，今回調べたトウモロコシおよび土壌サンプル中の窒素は，主に化学肥料か土壌に由来する．したがって，以下の式が成立する．

$$\delta^{15}N_F \times NdfF + \delta^{15}N_S \times NdfS = \delta^{15}N_{Spl} \quad (2)$$

ここで $\delta^{15}N_F$，$\delta^{15}N_S$，$\delta^{15}N_{Spl}$ は，それぞれ化学肥料，施肥前の土壌，サンプル中の $\delta^{15}N$ であり，NdfF と NdfS はそれぞれ肥料，土壌由来の窒素の比である．ここで化学肥料の $\delta^{15}N$ は 29000，土壌の $\delta^{15}N$ は 21 であり，肥料の $\delta^{15}N$ に比べて土壌の $\delta^{15}N$ が極めて小さく，(2) 式中の第 2 項は無視することができるため，以下の式に変形できる．

$$NdfF = \frac{\delta^{15}N_{Spl}}{\delta^{15}N_F} \quad (3)$$

この NdfF と全窒素量の値を用い，サンプル中の化学肥料に由来する窒素の量を求めた．

統計

トウモロコシの背丈，土壌中の微生物量の指標，溶脱水量について，処理区間の多重比較をチューキーの方法によって行った．

結果

トウモロコシの生育

トウモロコシの背丈は化肥区，稲わら区，対照区の順に高かった（図 1）．対照区では，トウモロコシの背丈が低く，葉が小さく，また葉先が黄色くなっているものもあった．化肥区は成長が早く，また栽培終了時の背丈が最も大きかった．化肥区の葉は青みが強く，実を付けるまで成長していた．稲わら区は化肥区に劣るものの，葉は青く中には小さいが実をつけるものもあった．化肥区のトウモロコシの成長は生育後期で緩やかになったが，稲わら区のトウモロコシは後期に伸びていた．栽培終了時のトウモロコシの乾燥重量は，対照区，化肥区，稲わら区で，それぞれ 0.99 ± 0.08 g，40 ± 8 g，12 ± 2 g であった．

微生物量

微生物量は，対照区や化肥区に比べ，常に稲わら区で多かった（表 1）．3 処理区とも時間がたつにつれ減少傾向にあった．

溶脱水の量

溶脱水量は栽培初期で低く，中期で多くなり，後期に少なくなった（図 2）．また，処理区間では，初期では稲わら区からの溶脱量が多く，中期から後期では化肥区で少なかった．

窒素溶脱量

栽培期間中の総溶脱量を比較すると，化肥区からは 54 mg の窒素が溶脱していた（表 2）．化肥区からの流出した窒素の形態は，多くが NO_3^- 態であった．一方，稲わら区では 24 mg の窒素が，主に有機態で溶脱していた．対照区では窒素の溶脱量は小さく，7.2 mg であった．

流出を時間軸で比較すると，化肥区では 1 度目の NO_3^- の流出のピークは NH_4^+ のピークの 1 週間後，2 度目のピークは NH_4^+ のピークの 2 週間後であった（図 3）．対照区，稲わら区では明瞭なピークを示さなかった．

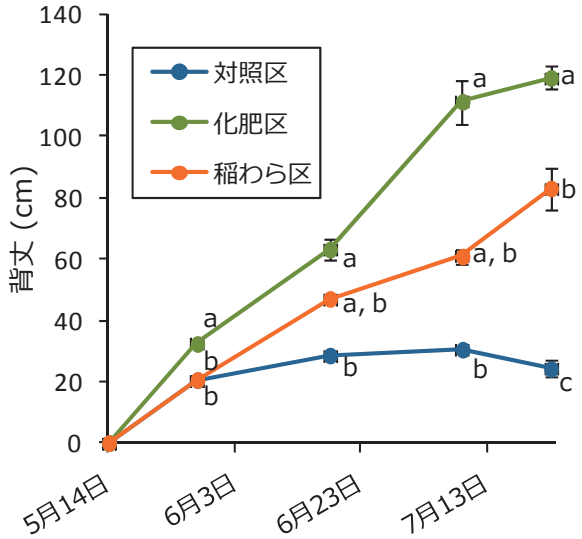

図 1. 栽培期間中のトウモロコシの背丈．異なるアルファベットは処理区間で統計的に有意な差があることを示す（$P < 0.05$）．

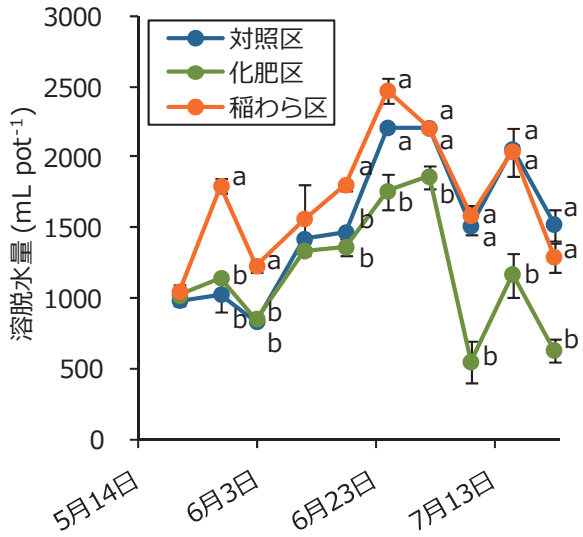

図 2. 栽培期間中の溶脱水量 . 異なるアルファベットは処理区間で統計的に有意な差があることを示す（$P < 0.05$）．

表 1. 基質誘導呼吸法による土壌中の微生物量の指標値（平均値±標準誤差（ugCO$_2$-C g soil^{-1} h^{-1}））．

	5 月 14 日			6 月 18 日			7 月 23 日		
対照区	2.9	± 0.5	b	4.3	± 0.4	b	0.63	± 0.05	b
化肥区	4.4	± 0.7	b	4.9	± 0.5	b	2.5	± 0.2	b
稲わら区	95	± 17	a	17	± 3	a	15	± 3	a

異なるアルファベットは処理区間で統計的に有意な差があることを示す（$P < 0.05$）．

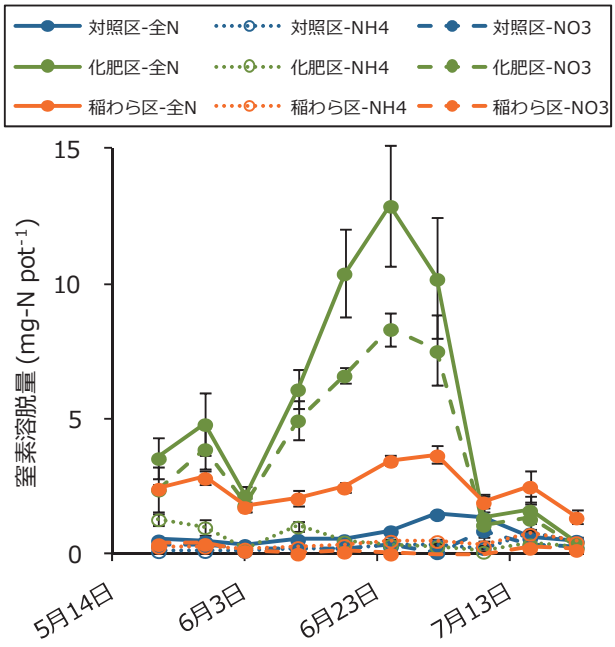

図 3. 栽培期間中の窒素の溶脱量 .

栽培試験後の植物中および土壌中の窒素量

栽培試験後の全窒素は，対照区ではトウモロコシ中に 7.1 mg, 土壌中に 6800 mg, 溶脱水中に 7.2 mg, 含まれていた（表 2）．化肥区では，トウモロコシ中に 330 mg，土壌中に 7400 mg，溶脱水中に 54 mg，含まれていた（表 2）．稲わら区では，トウモロコシ中に 84 mg，土壌中に 16000 mg，溶脱水中に 24 mg，含まれていた．

土壌中の窒素は，いずれの区でも多くが有機態であった（表 2）．NH_4^+ 態と NO_3^- 態の割合は，対照区と稲わら区で NH_4^+ 態が多く，化肥区で NH_4^+ 態と NO_3^- 態ほぼ等量であった．

安定同位体による窒素の追跡

トウモロコシおよび土壌の $\delta^{15}N$ に基づき，施肥した化学肥料中の窒素 1400 mg を追跡した結果，化肥区では，トウモロコシに 130 mg，土壌中に 470 mg の化学肥料由来の窒素が含まれていた（表 2）．稲わら区では，トウモロコシ中に 27 mg，土壌中に 1200 mg の化学肥料由来の窒素が含まれていた．

栽培後の土壌 pH

栽培後の土壌の pH は，対照区，化肥区，稲わら区で，それぞれ 6.3 ± 0.1，5.6 ± 0.1，6.2 ± 0.1 であった．

考察

トウモロコシの成長

トウモロコシの成長は化肥区，稲わら区，対照区の順に大きく，化学肥料の施用効果が明瞭に見られた．化肥区では後期に緩やかになったが，稲わら区では最後に急速に伸びていた．これは，化肥区ではトウモロコシが成熟したのに対し，稲わら区では養分状態が良くないために成長が遅く栽培終了時も成長を続けていたためと考えられる．より長い期間の栽培期間では化肥区との差は小さくなったと予測される．稲わら区で養分状態が悪かった原因として，トウモロコシと微生物の間での窒素の競合（窒素飢餓）が起きたことが考えられる．トウモロコシの背丈が大きくなった栽培後期において溶脱水量が減少しており，これは化肥区でより明瞭であった．この後期における溶脱水量の違いは，化肥区においてトウモロコシがより成長したために蒸散量が増加したためと考えられる．

窒素溶脱

施肥肥料に由来する窒素の流出は，稲わらの施用により大きく減少した（表 2）．これは，微生物の基質である稲わらを施用したことにより，微生物が増加し（表 1）窒素を取り込んだことによると考えられる．稲わら区については，施肥した窒素 1400 mg のうち，土壌中に残った窒素は 1200 mg であり，化学肥料由来の窒素の多くが土壌中に残っていた．また，栽培後に土壌に存在した無機態窒素の量は少なく，多くが有機態で存在していた（表 2）．これは，土壌中の微生物が流出しやすい無機態窒素を吸収し，体内に蓄えることで，結果として窒素が有機態として土壌中に残ったためと考えられる．

化肥区における窒素流出の形態は，NO_3^- 態が NH_4^+ 態よりも多かった（表 2，図 3）．これは一般に土壌コロイドの負電荷量が正電荷量よりも多いため，NH_4^+ は土に吸着し溶脱が起きにくいのに対し，NO_3^- は吸着されにくく溶脱しやすいため[10] と考えられる．一方，稲わら区における窒素流出の形態は有機態であり，稲わらの施用により多くなったと考えられる．有機態の窒素は土壌に吸着しやすいため[11]，実際の圃場においては水系への溶脱は限られると考えられる．

NO_3^- と NH_4^+ の流出におけるピークの時期に違いが見られ，NH_4^+ の流出ピークの 1 ～ 2 週間後に NO_3^- の流出ピークが見られた（図 3）．NO_3^- は，NH_4^+ が硝化菌による硝化作用によって NO_3^- となった後に流出するため，NH_4^+ よりも流出する時期が遅くなったと考えられる．また溶脱水量のピークと NO_3^- の流出ピークが一致しており（図 2, 図 3），NO_3^- が土壌中の水に溶け，その水が流出したと考えられた．

脱窒

化肥区においては，脱窒が起こったと考えられる．施肥した窒素が 1400 mg であるのに対し，トウモロコシには 130 mg，土壌中には 450 mg しか残っておらず，窒素が測定項目以外の経路から流出したと考えられる（図 4）．一般に，脱窒は還元条件下で起きるが，この条件は栽培後の窒素の形態に表れていたと考えられる．栽培後の化肥区には NH_4^+ と NO_3^- がほぼ等量存在しており，硝化が速やかに進んでいない．栽培後の土壌の pH は 5.5 であり，低 pH による硝化抑制ではなく土壌中の還元条件による抑制があったと考えられる．この還元条件が，硝酸の脱窒に寄与したと考えられる．栽培期間の潅水量（490 mm）は，栽培期間の京都における降水量の平年値（470 mm）と概ね一致しており，過剰ではなかったと考えられる．ポットからの排水は良好であったが，ポット内が部分的に還元状態になっていたと考えられる．

稲わらの施用により，脱窒も抑えられたと考えられる．稲わ

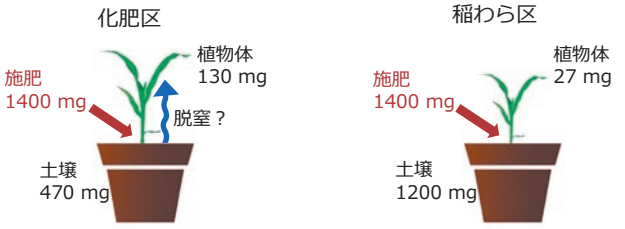

図 4. 窒素同位体比より求めた栽培後の化学肥料由来の窒素（1400 mg）の分配.

表 2. 栽培後の植物体，土壌，溶脱水中の窒素量，$\delta^{15}N$ および肥料由来の窒素量（平均値±標準誤差）．

		全窒素 (mg pot^{-1})	$\delta^{15}N$ (‰)	肥料由来の窒素 (mg pot^{-1})
対照区	植物体	7.1 ± 0.7		0.0 ± 0.0
	根	4.3 ± 0.6	96 ± 12	0.0 ± 0.0
	地上部	2.7 ± 0.1	68 ± 8	0.0 ± 0.0
	土壌	6800 ± 600	21 ± 1	4.8 ± 0.3
	NH_4^+ 態	26 ± 1	n.d.	n.d.
	NO_3^- 態	2.7 ± 0.0	n.d.	n.d.
	溶脱水	7.2 ± 1.0	n.d.	n.d.
	NH_4^+ 態	2.9 ± 0.1	n.d.	n.d.
	NO_3^- 態	3.0 ± 0.9	n.d.	n.d.
化肥区	植物体	330 ± 50		130 ± 20
	根	150 ± 50	11000 ± 300	55 ± 16
	茎	46 ± 9	18000 ± 400	28 ± 6
	葉	78 ± 5	9100 ± 900	25 ± 4
	穂	11 ± 1	11000 ± 1000	3.9 ± 0.4
	実	49 ± 18	11000 ± 200	19 ± 7
	土壌	7400 ± 500	1800 ± 100	470 ± 60
	NH_4^+ 態	34 ± 2	n.d.	n.d.
	NO_3^- 態	34 ± 8	n.d.	n.d.
	溶脱水	54 ± 5	n.d.	n.d.
	NH_4^+ 態	5.3 ± 0.7	n.d.	n.d.
	NO_3^- 態	38 ± 2	n.d.	n.d.
稲わら区	植物体	84 ± 16		27 ± 6
	根	31 ± 6	8700 ± 400	9.1 ± 1.6
	茎	17 ± 3	11000 ± 1000	6.6 ± 1.1
	葉	33 ± 12	9300 ± 100	10 ± 4
	穂	3.6 ± 0.6	6100 ± 900	0.8 ± 0.2
	土壌	16000 ± 1000	2200 ± 100	1200 ± 100
	NH_4^+ 態	59 ± 2	n.d.	n.d.
	NO_3^- 態	4.4 ± 0.4	n.d.	n.d.
	溶脱水	24 ± 1	n.d.	n.d.
	NH_4^+ 態	3.9 ± 0.2	n.d.	n.d.
	NO_3^- 態	1.4 ± 0.2	n.d.	n.d.

n.d.: 測定無し

ら区の無機態窒素は主に NH_4^+ 態であり，化肥区と同様に硝化の阻害が起きる程度まで還元条件となっていたと考えられる．溶脱と同じく，脱窒も窒素が微生物に取り込まれることで抑制されたと考えられる．

結論

化学肥料に由来する窒素が環境中に流出することを抑制するために，稲わらの施用により増殖した微生物体内に窒素をためることを，トウモロコシを栽培したポット試験で試みた．稲わらを施用した処理区では，微生物量が栽培期間を通して多く，溶脱および脱窒による土壌からの窒素の流出を防ぐことができた．一方で，トウモロコシの成長は稲わらを施用したことでやや落ちており，稲わら施用の適正な量を調べる必要があると考えられた．

参考文献

1. Rockstrom, J. *et al*. A safe operating space for humanity. Nature 461: 472-475. (2009).
2. Steffen, W. *et al*. Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. Science 347: 736. (2015).
3. Kanchikerimath, M. & D. Singh. Soil organic matter and biological properties after 26 years of maize-wheat-cowpea cropping as affected by manure and fertilization in a Cambisol in semiarid region of India. Agric. Ecosyst. Environ. 86: 155-162. (2001).

4. Hopkins, D. W. & R. S. Shiel. Size and activity of soil microbial communities in long-term experimental grassland plots treated with manure and inorganic fertilizers. Biol. Fertil. Soils 22: 66-70. (1996).
5. Sugihara, S., S. Funakawa, M. Kilasara & T. Kosaki. Effect of land management and soil texture on seasonal variations in soil microbial biomass in dry tropical agroecosystems in Tanzania. Appl. Soil Ecol. 44: 80-88. (2010).
6. Herai, Y., K. Kouno, M. Hashimoto & T. Nagaoka. Relationships between microbial biomass nitrogen, nitrate leaching and nitrogen uptake by corn in a compost and chemical fertilizer-amended regosol. Soil Sci. Plant Nutr. 52: 186-194. (2006).
7 Shen, S. M., P. B. S. Hart, D. S. Powlson & D. S. Jenkinson. The nitrogen-cycle in the Broadbalk wheat experiment: ^{15}N-labelled fertilizer residues in the soil and in the soil microbial biomass. Soil Biol. Biochem. 21: 529-533. (1989).
8. Yang, Y. M. et al. Fate of labeled urea-^{15}N as basal and topdressing applications in an irrigated wheat-maize rotation system in North China plain: II summer maize. Nutr. Cycl. Agroecosyst. 90, 379-389. (2011).
9. Horwath, W. R. & E. A. Paul. Microbial biomass. In: Weaver (ed). Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties. pp. 753-773. SSSA, Madison, WI. (1994).
10. Brady, N. C. & R. R. Weil. Nitrogen and sulfur economy of soils. In: The Nature and Properties of Soils. pp. 543-589. Prentice Hall, New Jersey. (2002).
11. Kalbitz, K., S. Solinger, J. H. Park, B. Michalzik & E. Matzner. Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: A review. Soil Sci. 165: 277-304. (2000).

Mitigation of Nitrogen Efflux from Agricultural Soil by Rice Straw Application: Determining Nitrogen Efflux from Chemical Fertilizer Using ^{15}N as a Tracer

Yuzuki Yamada[1,#], Nanao Yamada[1,#], Napakod Sangsompaisarn[2], Kengo Nakashima[2], Makoto Shibata[3], Tetsuhiro Watanabe[2,3*] & Shinya Funakawa[2,3]

[1]Senior High School Attached to Kyoto University of Education, [2]Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [3]Graduate School of Global Environmental Studies, Kyoto University

Abstract

Excess nitrogen derived from chemical fertilizer in agricultural fields causes environmental pollution. We hypothesize that rice straw application reduces nitrogen efflux from soil by increasing microbial biomass nitrogen. Maize was cultivated for 10 weeks in pots containing either chemical fertilizer (CF) or chemical fertilizer and rice straw (CF+RS). We used ^{15}N as a tracer in fertilizer. We measured nitrogen in the leaching solution and soil microbial biomass during the cultivation period, in addition to nitrogen in both the soil and plants at the end of cultivation. Maize height was greater in CF pots than in CF+RS pots. The microbial biomass was greater with CF+RS compared with CF alone throughout cultivation. The amount of nitrogen in the leaching solution from CF pots was greater than that from CF+RS pots. About half the nitrogen derived from chemical fertilizer remained in the soil, plant, and leaching solution under CF treatment while the other half of the nitrogen was released into the atmosphere via denitrification. In contrast, about 90% of the nitrogen derived from chemical fertilizer remained in the soil of CF+RS pots. Although plant growth should be improved, rice straw application decreased the amount of nitrogen efflux due to leaching and denitrification.

Key words: ^{15}N, Chemical fertilizer, Leaching, Denitrification, Environmental pollution

#Y. Yamada and N. Yamada have contributed equally as first authors.
*Correspondence Researcher: nabe14@kais.kyoto-u.ac.jp