

# 堆肥施用条件下におけるハウレンソウの 窒素吸収特性と可給態窒素の評価法

小田島 ルミ子\*1

## 目 次

### 第1章 緒言

- 1 岩手県のハウレンソウ
- 2 ハウレンソウの特徴
- 3 有機物利用による課題
- 4 有機物利用による作物の窒素吸収特性
- 5 研究の目的

### 第2章 有機物施用条件下における雨よけハウレンソウ栽培の実態

- 1 材料および方法
- 2 結果および考察
- 3 まとめ

### 第3章 PEON 定量法を用いた土壌中および導管液中の PEON の検出

- 1 ハウレンソウ導管液中の PEON 様抗原の検出
- 2 ハウレンソウ導管液中の PEON 様抗原の定量
- 3 ハウレンソウ栽培跡地土壌中の PEON 量
- 4 まとめ

### 第4章 土壌中に蓄積している窒素の形態分別法の検討

- 1 逐次抽出 A

- 2 逐次抽出 B

- 3 まとめ

### 第5章 ハウレンソウの窒素吸収能特性とその栽培跡地土壌の窒素の形態

- 1 ハウレンソウの有機態窒素吸収能の検討
- 2 逐次抽出による栽培跡地土壌の窒素形態
- 3 まとめ

### 第6章 “雨よけハウレンソウ”に適した土壌窒素供給量の評価法の提案

- 1 0.4 M 硫酸で抽出した溶液の吸光度法(UV)による土壌の窒素肥沃度の簡易推定
- 2 ハウレンソウの窒素吸収量と 0.4M 硫酸による抽出窒素量との関係
- 3 0.4 M 硫酸による抽出法による窒素供給量に基づいたハウレンソウの適正施肥の提案

### 第7章 総合考察

#### 摘要

#### 謝辞

#### 引用文献

## 第1章 緒 言

### 1 岩手県のハウレンソウ

岩手県は夏季冷涼な気象条件や有機物の豊富な条件を最大限に活用して、ハウスで1年に4~5作連続栽培するハウレンソウ(*Spinacia oleracea* L. 以下、雨よけハウレンソウ)の生産を拡大している。また、土壌診断による施肥・土壌管理によって土壌消毒を行わない、かん水を極力抑える栽培が中心であり、他産地には見られない特徴ともなっている<sup>35)</sup>。こうした栽培から高品質のハウレンソウが作られ、夏場においては他産地より常に高値で取引されている。1993年には34億円の販売実績を記録し、岩手県の野菜の主力品目として位置づけられている<sup>36)</sup>。一方、ハウレンソウ

ウの安定出荷および産地ブランドの育成のためには品質を向上させることが必要であり、糖、ビタミンCなどの栄養素を増加させ、硝酸およびシュウ酸などを減少させることが求められている<sup>96)</sup>。ハウレンソウの安定生産、産地ブランドの維持および農業者所得向上のためにも、立地条件を活かした栽培技術の確立が求められている。

### 2 ハウレンソウの特徴

ハウレンソウ(*Spinacia oleracea* L.)はコーカサス地方の原産でヨーロッパ、アメリカに伝播した西洋系と中国、日本に伝播した東洋系に分かれる。西洋系は丸葉品種が多く、多収であるが土臭い特徴がある。一方、東洋系は剣葉品種が多く、抽だいしやすい、高温に弱いなどの特徴があつ

\*1 旧土壌作物栄養研究室(現 農林水産部農業普及技術課)

た。現在では、東洋と西洋の良さを取り入れた F1 品種が多く開発されている。

ハウレンソウをはじめとするアカザ科は根の内部に共生する VA (Vesicle Arbuscule) 菌根菌をもたない。VA 菌根菌が植物の根につくと、土壤中に菌糸を伸ばし、リン酸、マグネシウム、鉄などのミネラルや水分を効率よく吸収して植物に与え、植物からの光合成で生産した糖分を与えられる。ハウレンソウは、その VA 菌根菌がないため、土壤中の養分は植物自身の吸収能とその他の根圏内微生物により産生された有機酸によってハウレンソウ体内に取り込まれる。また、アカザ科作物の根圏から単離された細菌が極めて高い有機酸生成能を示した<sup>45)</sup>。土壌有用微生物の 1 つである *Pseudomonas fluorescens* (シュードモナス・フルオレッセンス) は、ハウレンソウの根面に共生し、フザリウムやバーテシリウムなどの菌を抑制するとともにシデロフォアを産生する。シデロフォアは鉄キレーター的一种で鉄を効率よく取り込む機能を持っている。また、シデロフォアは、鉄量の低い環境でよく産生される。岩手県のハウレンソウ産地は、火山灰土壌が多いが、ハウレンソウの生育条件を整えるために pH を 6.5~7.0 に矯正するところが多い。したがって、水に溶解難い水酸化第二鉄の形態となっているため遊離鉄および遊離アルミニウムが少ない状態となり、シデロフォアが生産されていると考えられる。このようにハウレンソウは、他作物と異なる性質をもつ作物であり、その養分吸収特性についても他作物と異なる可能性がある。

ハウレンソウの体内硝酸濃度については、窒素施肥法の改善によって減少が期待できるとされ、そのためにも、施肥法の確立が重要である。栄養生長の途中で収穫されるハウレンソウでは、土壤中の硝酸態窒素を硝酸還元酵素の能力以上に過剰に吸収した場合、余剰の硝酸を液胞に蓄積し、蓄積された硝酸は再利用されにくい<sup>98)</sup>。そのため、土壌からの窒素供給量の違いによって、生長量は同じでも体内硝酸濃度に違いがあるとも考えられる。すなわち、土壌からの窒素供給量を過小評価し、過剰な施肥が行われれば、品質の低下も懸念される。

### 3 有機物利用による課題

近年、化学肥料や化石エネルギーの投入量を減らし、それに代わる養分供給手段として緑肥、畜産廃棄物、集落排水汚泥等の各種有機物の多面的、効率的な利用を促進し、耕地をめぐる肥料成分の循環を高めていくことが求められている。農業生産現場では土壌の理化学性の向上を目的に「土づくり」として、農業改良普及センター、JA などの指導のもとに堆肥などの有機物施用が奨励されている。

岩手県でも特産野菜を中心に堆肥の施用が指導されており、耕畜連携の観点から主に家畜ふん堆肥が施用されている。オガクズ、イナワラ、バーク(樹皮)などの副資材を混入した牛ふん堆肥は C/N 比が 20 前後であり、土壌に施用された場合、含有窒素の多くが土壌微生物に取り込まれて、無機化が抑制される「窒素取り込み型」として分類され、肥料としての効果よりも土壌物理性の改善効果が高いとされている。しかし、このような窒素取り込み型の堆肥においても、長期連年施用していく間に、蓄積した有機物から無機態窒素が放出されることが認められた<sup>4), 6), 9), 22)</sup>。すなわち、C/N 比の高い有機物資材を施用した場合でも、連年による無機態窒素の放出量を想定した肥培管理がなされなければ無機態窒素が放出され、硝酸態窒素による地下水汚染が危惧される。茶園では肥培管理の特性上、圃場面積の 1/6 に当るうね間に多量の肥料や有機物が投入されている。このため茶園のうね間土壌では、過剰な有機物施用の影響が顕著に認められた。有機物が多施用される鹿児島県の茶園では、表層土壌で水抽出される有機態窒素が多いほど、暗渠排水中の硝酸態窒素濃度が高かった<sup>62)</sup>。また、適正な施肥量を考慮せずに有機物を長期にわたり連年施用していくと、蓄積した有機物から無機態窒素が過剰に放出されることで野菜における高濃度の硝酸の蓄積を引き起こすことが危惧される。硝酸の蓄積は、土壌からの硝酸態窒素の植物への吸収量と植物体内に吸収された硝酸の同化量との関係によって決定されるが、植物への硝酸吸収量は、窒素施肥量によって制御が可能である。

### 4 有機物利用による作物の窒素吸収特性

近年、有機物を施用した作物栽培において、作物は単に有機物から無機化される無機態窒素だけではなく、土壌中に増加する有機物由来の易分解性有機態窒素も利用していると指摘がなされた。ツンドラに生育するスゲのアミノ酸吸収能力が高いが、実際に土壌中に存在する遊離アミノ酸量は極めて少なかった<sup>11)</sup>。針葉樹林や寒帯の農作物がアミノ酸を吸収した<sup>67)</sup>。ローザムステッドにおける長期連用試験の結果では、バレイショ、ビート栽培時の収量ならびに窒素利用率が、化成肥料区より有機物施用区において高くなった<sup>58)</sup>。トウモロコシの収量は有機物施用区よりも化成肥料区でより高いが、リクトウでは有機物施用区の方が高い<sup>95)</sup>などの報告があった。また、バレイショ、ビート、ニンジンに有機物を施用して栽培したところ、植物による窒素吸収量が土壌中の無機態窒素量より多くなるなどの現象も観察された<sup>69)</sup>。Matsumotoら<sup>48)</sup>は、ニンジンとチング

ンサイにおいて、Okamotoら<sup>72)</sup>は、イネ、ソルガムにおいてC/N比=10の菜種油かすを用いて試験を行い、化学肥料区と比べ土壌中の無機態窒素が少ない状態であっても生育および窒素吸収量が上回ったと報告した。三浦・阿江<sup>62)</sup>は、土壌中無機態窒素だけでは茶の収量品質は説明がつかない場合があることを報告した。即ち、栽培試験結果を個々の作物ごとに考察すると、無機栄養説に該当しない事例がいくつか報告された。また、VA菌根菌と共生するヘラオオバコ(Ribwort Plantain, *Plantago lanceolata*)は土壌中の有機態窒素から放出した低分子量の窒素を菌糸から取り込むことが報告された<sup>30)</sup>。さらに、土壌中の有機態窒素は自然存在比で<sup>15</sup>Nより $\delta^{15}\text{N}$ を多く持っており<sup>31), 85)</sup>、いくつかの植物の葉は $\delta^{15}\text{N}$ 同位体を多く含んでいた<sup>61)</sup>ことからVA菌根菌を持つ植物は土壌中の有機態窒素を間接的に利用できることが報告された。土壌中の窒素の約90%が有機態窒素であるが、植物が利用する窒素の形態が無機態窒素のみという説は効率よく養分を吸収するシステムとは言いがたい。

上記の事例から推察すると、無機態窒素以外の窒素を利用する可能性のある植物が存在する可能性が示唆された。したがって、作物の窒素施肥に関しては有機態窒素の動態も留意する必要がある。

## 5 研究の目的

有機物施用を前提とした栽培を続けるために、有機物施用を考慮した土壌管理法を提案する必要がある。そこで本研究では、(1)有機物施用条件下で土壌中の有機・無機態窒素の動態がハウレンソウの生育、窒素吸収反応および品質に及ぼす影響について調査する。(2)無機態窒素以外の窒素としてリン酸緩衝液で抽出される有機態窒素(以下、PEON)に注目し、植物の導管液中および土壌中での検出とELISA法を用いて導管液中のPEON定量、土壌中のPEON定量を行う。(3)無機態窒素以外に、作物が利用できる土壌中の有機態窒素の存在形態について把握するため逐次抽出法を開発する。(4)ハウレンソウが吸収できる可給態窒素を評価する。(5)現場で実施できるハウレンソウ栽培に適した土壌窒素の簡易評価法の開発を行い、ハウレンソウの窒素吸収特性を利用した施肥法を提案する。これをもって有機物施用を前提とした土壌管理法を提案することを目的とした。

## 第2章 有機物施用条件下における 雨よけハウレンソウ栽培の実態

岩手県の主要品目であるハウレンソウを対象に、県内で多量に生産されるオガクズ牛ふん堆肥を用いて数年間の連用試験を行い、土壌中の有機・無機態窒素の動態がハウレンソウの生育、窒素吸収反応および品質に及ぼす影響について調査した。

## 1 材料および方法

### (1) 試験圃場・土壌条件

本試験は、所内の表土を、縦3m、横4m、深さ1mの有底コンクリート枠に充填した精密圃場(ライシメーター)で実施した。充填土壌は、非アロフェン質黒ボク土に属し、pH=5.6、土性LiC、全炭素3.2%、全窒素0.2%および可給態窒素は0.57 mg/kgであった。試験区枠内の表層から0~40 cmまでの透水係数は $2.9\sim 4.0\times 10^{-3}$  m/sec(20°C)、浸透率は54~65%であった。ライシメーターの上にビニルハウスを設置し、栽培期間である4月から11月までビニルを被覆した。11月から翌年の3月まではビニルを除去した。

### (2) 試験区の構成

1998年から2001年の4年間行い、ハウレンソウを年間2~4回作付けした。化学肥料区には、窒素を硝安で、リン酸を重過石、カリを塩加カリで施用し、播種前日に施肥した。化学肥料の施用量は岩手県の栽培指針<sup>35)</sup>に従い、1作目は、Nを9g/m<sup>2</sup>、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>を13g/m<sup>2</sup>、K<sub>2</sub>Oを9g/m<sup>2</sup>で施肥した。2作目は、Nを7g/m<sup>2</sup>、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>を7g/m<sup>2</sup>、K<sub>2</sub>Oを7g/m<sup>2</sup>で施肥した。3作目は、Nを4g/m<sup>2</sup>、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>を4g/m<sup>2</sup>、K<sub>2</sub>Oを4g/m<sup>2</sup>で施肥した。4作目は無施用とした。

堆肥区では、1作目播種の2週間前にオガクズ牛ふん堆肥を生重で8 kg/m<sup>2</sup>施用し、2作目以降は、無施用とした。岩手県で定めている土作りとして施用する牛ふん主体の堆肥施用量は4 kg/m<sup>2</sup>であるが、肥料としても活用できるかの検討を行うため、肥効率50%の施肥量を設定した。堆肥の成分は、4年間の平均で生重あたり水分66.7%、pH(H<sub>2</sub>O)=8.6、C/N比23.7、窒素0.6%、リン酸0.5%、カリ0.9%、石灰0.7%、苦土0.2%であった。4年間の作付けおよび施肥量を表1に示す。

### (3) 供試品種

4月~8月播種時にはアクティブ、9月以降播種時にはアトランタを用いた。

### (4) 栽植様式

栽植密度は100株/m<sup>2</sup>(株間8cm×条間12.5cm)とし、シーダーテープ1粒播種により栽培を行った。かん水量は播種前には50mm/m<sup>2</sup>を、播種後には15 mm/m<sup>2</sup>をスミスチューブを用いて均一に行った。気温が高い場合は、適宜かん水を均一に行った。

表1 ホウレンソウ栽培試験の概要と供試品種および施肥量

年度	作期	播種日	収穫日	施肥量(g/m <sup>2</sup> )										品種
				化学肥料区					たい肥区					
				窒素	リン酸	カリ	石灰	苦土	窒素	リン酸	カリ	石灰	苦土	
1998	第1作	7月7日	8月20日	9	13	9	7	0.4	52	40	66	63	26	アクティブ
	第2作	10月6日	11月24日	7	7	7	4	0.2	0	0	0	0	0	アトランタ
1999	第1作	5月16日	6月21日	9	13	9	7	0.4	45	40	71	61	21	アクティブ
	第2作	7月19日	9月2日	7	7	7	4	0.2	0	0	0	0	0	アクティブ
	第3作	9月11日	11月1日	4	4	4	2	0.1	0	0	0	0	0	アトランタ
2000	第1作	6月12日	7月19日	9	13	9	7	0.4	39	34	55	32	11	アクティブ
	第2作	8月24日	9月28日	7	7	7	4	0.2	0	0	0	0	0	アクティブ
	第3作	10月6日	11月28日	4	4	4	2	0.1	0	0	0	0	0	アトランタ
2001	第1作	4月27日	6月28日	9	13	9	7	0.4	46	43	85	63	20	アクティブ
	第2作	6月29日	8月1日	7	7	7	4	0.2	0	0	0	0	0	アクティブ
	第3作	8月8日	9月19日	4	4	4	2	0.1	0	0	0	0	0	アクティブ
	第4作	9月27日	11月14日	0	0	0	0	0.0	0	0	0	0	0	アトランタ

### (5) 試料の採取法

地上部試料は、収穫時に 1m<sup>2</sup> 枠内のホウレンソウを収穫し、各試験区で中庸な 20 株を選択して試料とした。生育調査後、作物体窒素分析用と体内硝酸態窒素分析用に等分した。土壌試料は、試験区内 4 端付近と中央付近の 5 か所からルートオーガーを用いて 0~20 cm の土壌を採取した。表層から 2cm までの土壌は除いた。

### (6) 試料の分析法

ホウレンソウ地上部の窒素吸収量は、全窒素含有率は、風乾した作物体を粉碎した後、ガンニング変法<sup>81)</sup>により湿式分解してアンモニア態窒素とし、オートアナライザー(ブランルーベ社 AA II 型、以下、同機使用)を用いて分析した。同機種によるアンモニア態窒素の定量はインドフェノール法による比色定量であった。ホウレンソウの硝酸態窒素は、収穫後速やかに細断し、サンプル管(アズワン製、ガラスサンプル管瓶)に 5g 秤量した。この試料に、15mL の蒸留水を加え、ポルトロンで磨砕し、水を加えて洗いながら 50mL に定容した。これを No.2 のろ紙でろ過し、10mL のろ液を遠沈管に取り、10,000rpm で 1 分間遠心分離して、上清を得た。上清中の硝酸イオンを HPLC で定量した。無機態窒素は、風乾土 10g に 10% 塩化カリウム 100mL を加えて室温で 1 時間振とうした後、No.5B のろ紙でろ過し、ろ液を分析試料とした。オートアナライザーを用いて分析し、アンモニア態窒素はインドフェノール法、硝酸態窒素は銅・カドミウム還元-ナフチルエチレンジアミン法によりそれぞれ比色定量した<sup>14)</sup>。

地下への窒素溶脱量は、ライシメーター地下へ溶脱した無機態窒素量、全窒素量を浸透水中の濃度と浸透水量から算出した。無機態窒素は、ろ過後オートアナライザーを用いて分析し、アンモニア態窒素はインドフェノール法、硝酸態窒素は

銅・カドミウム還元-ナフチルエチレンジアミン法によりそれぞれ比色定量した。全窒素は、総和法<sup>12)</sup>により蒸留・分解を行い、100ml に定量した試料をインドフェノール法で定量した。

## 2 結果および考察

### (1) ホウレンソウ収穫時の外観形質、収量および窒素吸収量

表2に収穫時の外観形質を示す。4 年間の栽培試験を通じて、葉数、草丈および葉幅ともに、年次や作期により若干の変動はあるものの、堆肥区で化学肥料区よりも上回る傾向が認められ、収穫時の生育は堆肥区で進んでいた。

表3にホウレンソウの収量、収穫時の窒素含有率および窒素吸収量を示す。作期ごとの変動はあるものの全重、調整重および乾物収量の年次別合計は、いずれの年次も堆肥区が化学肥料区を上回る傾向が認められた。両処理間の差は試験開始当初よりも堆肥の連用年数が進んだ 2000 年、2001 年にかけて明瞭となった。窒素含有率は、2000 年を除いたその他の 3 年間は化学肥料区で高い傾向があった。窒素吸収量は乾物収量と同様に、例外的な作期はあるものの堆肥区の方が化学肥料区よりも高く、4 年 12 作の合計では約 1.5 倍となった。この結果は菜種油かすを施用した条件で、ホウレンソウは窒素吸収量および乾物重が増加し、有機物の施用効果が高いとするこれまでの報告<sup>40)</sup>とも一致した。

一般に堆肥施用により土壌物理性が変化し、生育や収量に影響が生じることが知られている<sup>92)</sup>。しかし、本試験においては処理の違いによる透水係数、土壌硬度の顕著な差は認められず(データ省略)、堆肥施用による土壌物理性の変化がホウレンソウの生育、収量に及ぼす影響は大きなものではなかったと推察された。

表2 たい肥の連用がハウレンソウの草丈、葉数、葉幅に及ぼす影響

年次	作期	草丈 <sup>z</sup> (cm)		葉数 <sup>z</sup> (枚)		葉幅 <sup>z</sup> (cm)	
		化学肥料	たい肥	化学肥料	たい肥	化学肥料	たい肥
1998	1	15.4 ± 0.5	16.2 ± 0.4	13.6 ± 1.0 a	20.4 ± 1.1 b	5.7 ± 0.1 a	6.2 ± 0.2 b
	2	16.5 ± 0.4 a <sup>y</sup>	21.3 ± 0.6 b	11.1 ± 0	11.9 ± 0	4.9 ± 0.2 a	6.1 ± 0.2 b
1998年の平均		16.0	18.8	12.4	16.2	5.3	6.2
1999	1	18.4 ± 0.5 a	21.4 ± 0.5 b	12.8 ± 0.3 a	14.1 ± 0.4 b	6.1 ± 0.2	6.2 ± 0.4
	2	20.7 ± 0.7 a	17.9 ± 0.9 b	23.9 ± 0.3 a	14.3 ± 0.3 b	4.8 ± 0.3	4.5 ± 0.2
	3	15.7 ± 0.5 a	24.4 ± 0.5 b	10.0 ± 1.0	9.6 ± 1.3	4.0 ± 0.2 a	5.5 ± 0.1 b
1999年の平均		18.3	21.2	15.6	12.7	5.0	5.4
2000	1	8.7 ± 0.3 a	18.9 ± 0.5 b	10.4 ± 0.5 a	23.5 ± 1.0 b	2.5 ± 0.2 a	6.7 ± 0.9 b
	2	10.5 ± 0.3 a	19.6 ± 0.5 b	12.0 ± 0.4 a	22.3 ± 1.9 b	2.6 ± 0.1 a	6.1 ± 0.3 b
	3	15.3 ± 0.2 a	21.2 ± 0.3 b	17.1 ± 0.4 a	11.6 ± 0.2 b	3.3 ± 0.1 a	4.0 ± 0.1 b
2000年の平均		11.5	19.9	13.2	19.1	2.8	5.6
2001	1	24.1 ± 0.7 a	33.4 ± 1.2 b	17.5 ± 1.1	14.7 ± 2.7	4.6 ± 0.2	4.9 ± 0.3
	2	11.9 ± 0.2 a	12.9 ± 0.2 b	11.2 ± 0.4	10.4 ± 0.3	4.0 ± 0.3	4.3 ± 0.1
	3	12.4 ± 0.3 a	18.1 ± 0.5 b	16.6 ± 0.9	17.6 ± 1.0	3.8 ± 0.1 a	5.3 ± 0.2 b
	4	13.3 ± 0.2 a	22.7 ± 0.6 b	13.3 ± 0.3	12.7 ± 0.5	3.4 ± 0.1 a	6.4 ± 0.2 b
2001年の平均		15.4	21.8	14.7	13.9	4.0	5.2
1998~2001の平均		15.2	20.7	14.1	15.2	4.1	5.5

<sup>z</sup> 平均±標準誤差(n=20)<sup>y</sup> 同項目、同行で異なる文字は、分散分析により5%水準で有意差あり

表3 たい肥の連用がハウレンソウの収量および窒素吸収に及ぼす影響

年次	作期	乾物収量 <sup>z</sup> (g/m <sup>2</sup> )		窒素含有率 <sup>z</sup> (g/kg DW)		窒素吸収量 <sup>z</sup> (g/m <sup>2</sup> )	
		化学肥料	たい肥	化学肥料	たい肥	化学肥料	たい肥
1998年	1	124 ± 6.2 a <sup>y</sup>	157 ± 7.2 b	48.7	43.8	6.0 ± 0.3 a	6.9 ± 0.3 b
	2	102 ± 8.1 a	147 ± 8.9 b	47.5	41.0	4.8 ± 0.4 a	6.0 ± 0.4 b
1998年合計		226	304	-	-	10.9	12.9
1999	1	119 ± 4.9 a	191 ± 7.1 b	41.4	29.7	4.9 ± 0.2 a	5.7 ± 0.2 b
	2	123 ± 4.6 a	81 ± 5.2 b	44.4	43.4	5.5 ± 0.2 a	3.5 ± 0.2 b
	3	50 ± 7.4	57 ± 8.2	49.6	42.8	2.5 ± 0.4	2.4 ± 0.4
1999年合計		293	329	-	-	12.9	11.6
2000	1	35 ± 1.8 a	189 ± 8.6 b	36.2	42.1	1.3 ± 0.1 a	8.0 ± 0.4 b
	2	56 ± 2.2 a	273 ± 23 b	41.9	41.6	2.4 ± 0.1 a	11.4 ± 1.0 b
	3	122 ± 0.6	121 ± 3.9	46.1	50.9	5.6 ± 0.0	6.2 ± 0.2
2000年合計		213	584	-	-	9.3	25.5
2001	1	161 ± 7.5 a	213 ± 27 b	39.1	32.9	6.3 ± 0.3	7.0 ± 0.9
	2	48 ± 2.6	53 ± 2.1	38.7	30.0	1.9 ± 0.1	1.6 ± 0.1
	3	95 ± 3.1 a	177 ± 9.0 b	44.9	38.5	4.3 ± 0.1 a	6.8 ± 0.4 b
	4	94 ± 3.2 a	318 ± 17 b	43.0	35.9	4.0 ± 0.1 a	11.4 ± 0.6 b
2001年合計		399	761	-	-	16.5	26.8
1998~2001の合計		1131	1978	-	-	49.6	76.9

年次	作期	全重 <sup>z</sup> (g/m <sup>2</sup> )		調整重 <sup>z</sup> (g/m <sup>2</sup> )	
		化学肥料	たい肥	化学肥料	たい肥
1998年	1	1226 ± 67 a	1504 ± 69 b	1082 ± 59 a	1338 ± 66 b
	2	888 ± 98 a	1268 ± 119 b	799 ± 92 a	1170 ± 103 b
1998年合計		2114	2772	1881	2508
1999	1	1267 ± 78 a	1843 ± 96 b	1104 ± 66 a	1546 ± 84 b
	2	2016 ± 82 a	1440 ± 91 b	1908 ± 77 a	1267 ± 89 b
	3	672 ± 131 a	1133 ± 219 b	576 ± 122 a	989 ± 206 b
1999年合計		3955	4416	3588	3802
2000	1	324 ± 26 a	1698 ± 105 b	283 ± 20 a	1522 ± 100 b
	2	371 ± 15 a	2231 ± 204 b	341 ± 14 a	2079 ± 192 b
	3	835 ± 5 a	1035 ± 46 b	720 ± 5 a	831 ± 38 b
2000年合計		1531	4965	1344	4432
2001	1	1871 ± 126 a	2461 ± 398 b	1769 ± 119	2045 ± 374
	2	651 ± 38 a	812 ± 34 b	577 ± 35	697 ± 30
	3	766 ± 37 a	1548 ± 116 b	694 ± 33 a	1403 ± 104 b
	4	645 ± 33 a	2184 ± 166 b	560 ± 28 a	1896 ± 146 b
2001年合計		3933	7006	3600	6040
1998~2001の合計		11533	19158	10412	16782

<sup>z</sup> 平均±標準誤差(n=20)<sup>y</sup> 同項目、同行で異なる文字は、分散分析により5%水準で有意差あり

堆肥区の窒素施用量は表1に示すとおり、全量堆肥由来窒素として1年当たり45g/m<sup>2</sup>であり、化学肥料の施用量である16~20g/m<sup>2</sup>よりも大幅に多い。一般に作物は有機物に含まれる窒素を直接吸収・利用するのではなく、微生物により無機化された窒素がその吸収源と考えられている。そのため、本研究においては、堆肥から無機化された窒素量が化学肥料のそれを上回ったことにより、堆肥区のホウレンソウの生育および窒素吸収量が化学肥料区よりも大きかったのではないかと考えられた。しかしながら、無機化窒素推定パラメータに基づいた計算<sup>88)</sup>によると、堆肥から無機化されると想定される窒素量は、連用1年目の1998年において4.8g/m<sup>2</sup>であり、その後、若干増加する傾向にあるものの連用4年目の2001年においても8.3g/m<sup>2</sup>であった。これらは、化学肥料により施用される無機態窒素量20g/m<sup>2</sup>より極めて低い値であった(表4)。

また、実際に試験期間の全作期において作付終了後の無機態窒素量を測定した場合、堆肥区の硝酸態窒素は化学肥料区に比べて極めて低い値で推移し(図1 A)、アンモニア態窒素は両処理区間に明瞭な差が認められなかった(図1 B)。アンモニア態窒素は硝酸態窒素に比べれば極めて低い値であることから、結果的に土壌中の無機態窒素量は常に堆肥区

が化学肥料区よりも低い値で推移した。したがって、堆肥区において乾物収量、窒素吸収量が化学肥料区に比べ増加したのは、堆肥からの窒素の無機化量が化学肥料の施用量を上回ったことによるものではないと推察された。

表4 1年間で牛ふんたい肥から無機化される窒素推定

年度	化学肥料区 (g/m <sup>2</sup> )	無機化窒素 推定量 <sup>2</sup> (g/m <sup>2</sup> )
1998	16.0	4.8
1999	20.0	6.6
2000	20.0	7.6
2001	20.0	8.3

<sup>2</sup> 1999年以降は、前年と当年に施用したたい肥の積算無機化推定量から前年に無機化したと推定される窒素量を差し引いた値

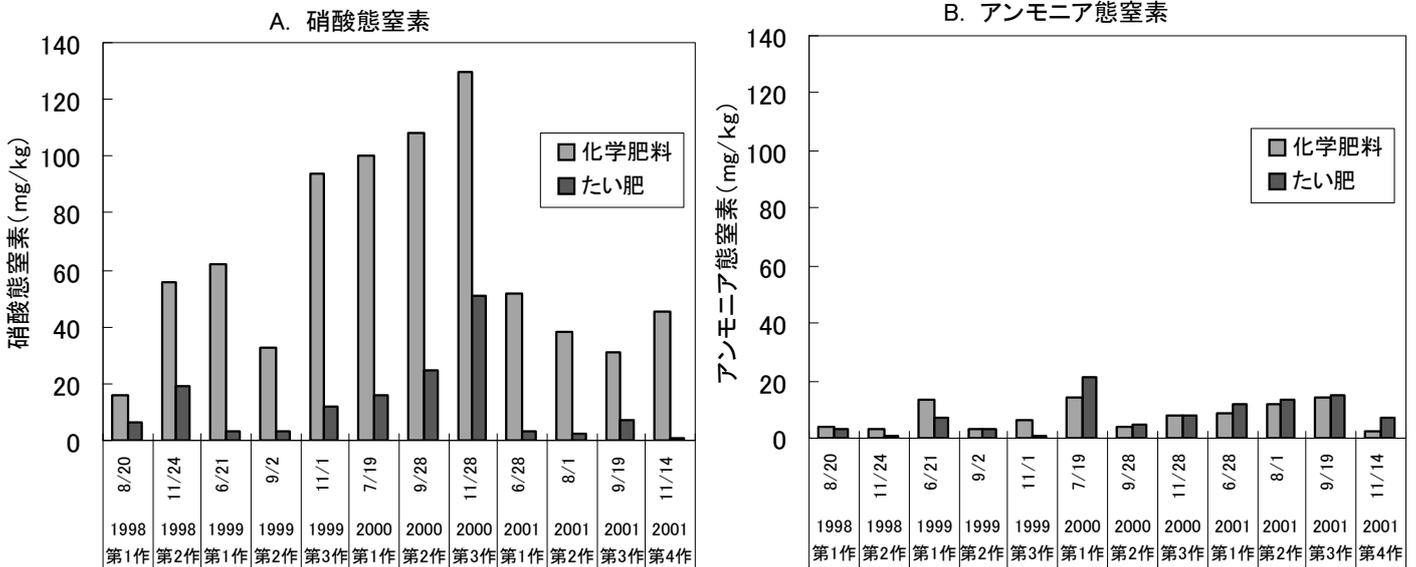


図1 跡地土壌の無機態窒素含量の推移(A:硝酸態窒素, B:アンモニア態窒素)

## (2) ハウレンソウの体内硝酸態窒素

ハウレンソウ中の硝酸態窒素含量は、一部の作期を除いて、堆肥区が化学肥料区より極めて低い値を示した(表5)。さらに、ハウレンソウ中の全窒素に占める硝酸態窒素の比率も化学肥料区に比べて堆肥区では極めて低くなった。建部ら<sup>91)</sup>は被覆肥料を条施用することにより、慣行栽培よりもハウレンソウ中の硝酸含量が低下することを報告し、その原因について被覆肥料の条施用により土壌中での硝化が抑制され、ハウレンソウ根域土壌ではアンモニアが主要な窒素形態として存在した結果、アンモニア態窒素が相対的に多く吸収されるためとした。本試験では前述の通り、4年間の栽培期間を通して、堆肥区の土壌中の硝酸態窒素含量は化学肥料区よりも極めて低い値で推移しており、このためハウレンソウ中に蓄積される硝酸態窒素含量が化学肥料区よりも低くなったものと推察された。一方

で土壌中のアンモニア態窒素含量は両処理間に大きな差は認められなかった(図1)ことから、化学肥料区に比べて堆肥区では、土壌中の無機態窒素に占めるアンモニア態窒素の比率が相対的に高くなったことも原因の一つかもしれない。しかし、水耕栽培において、培地の硝酸態窒素とアンモニア態窒素の比率が2:8でもハウレンソウの両形態窒素吸収量は等量であることが示されていた<sup>90)</sup>ことから、アンモニア態窒素の比率が高い場合であってもハウレンソウが優先的にアンモニア態窒素を吸収したとは考えにくい。そのため本試験において、堆肥区の窒素吸収量が化学肥料区を上回る値を示したことについて、土壌中の無機態窒素量および硝酸態窒素とアンモニア態窒素の比率から推定することには疑問があると言わざるを得ない。

表5 収穫時のハウレンソウ中の硝酸態窒素及び全窒素含量

	作期	硝酸態窒素 <sup>z</sup> (g/kg DW)		全窒素 (g/kg DW)		硝酸態窒素/全窒素 (%)	
		化学肥料		たい肥		化学肥料 たい肥	
		化学肥料	たい肥	化学肥料	たい肥	化学肥料	たい肥
1998年	第1作	15.9 ± 0.2 a <sup>y</sup>	2.4 ± 0.0 b	48.7	43.8	32.7	5.4
	第2作	5.4 ± 0.1 a	7.2 ± 0.0 b	47.5	41.0	11.5	17.6
1998年平均		10.7	4.8	48.1	42.4	22.1	11.5
1999	第1作	15.0 ± 0.0 a	0.8 ± 0.0 b	41.4	29.7	36.2	2.6
	第2作	17.8 ± 0.1 a	1.0 ± 0.0 b	44.4	43.4	40.0	2.3
	第3作	10.2 ± 0.0 a	12.6 ± 0.1 b	49.6	42.8	20.5	29.5
1999年平均		14.3	4.8	45.1	38.6	32.3	11.4
2000	第1作	12.0 ± 0.2 a	3.1 ± 0.0 b	36.2	42.1	33.1	7.3
	第2作	8.2 ± 0.1 a	5.8 ± 0.1 b	41.9	41.6	19.5	14.0
	第3作	-	7.2 ± 0.0	46.1	50.9	-	14.1
2000年平均		10.1	5.4	41.4	44.9	26.3	11.8
2001	第1作	8.4 ± 0.1 a	1.7 ± 0.0 b	39.1	32.9	21.5	5.1
	第2作	16.0 ± 0.0 a	1.8 ± 0.1 b	38.7	30.0	41.3	6.0
	第3作	5.7 ± 0.1 a	0.7 ± 0.0 b	44.9	38.5	12.7	1.9
	第4作	8.8 ± 0.1 a	0.2 ± 0.0 b	43.0	35.9	20.5	0.7
2001年平均		10.2	0.9	42.2	34.8	24.8	2.9
1998~2001 の平均		11.2	3.7	43.5	39.4	26.3	8.9

z 平均±標準誤差(n=3)

y 同項目、同行で異なる文字は、分散分析により5%水準で有意差あり

## (3) 地下水へ溶脱した窒素量

図2および図3に地下水へ溶脱した無機態窒素量および全窒素量を示す。無機態窒素の溶脱量は、堆肥区が化学肥料区より少なかった。全窒素の溶脱量も、堆肥区が化学肥料区より少なかった。以上のことから、毎年無機化されると推定される堆肥区の無機態窒素は、化学肥料区より少なく、かつ、利用率が高いことが示唆された。

ライシメーターは、コンクリート枠の下に貯蔵タンクを設けており、このタンクから採水した。平成9年(1997年)は、土壌を充填した年で、無作付の状態の間年9~14kg/10a溶脱した。この結果から、仮に溶脱していたとしても、化学肥料区に比べ、有機物の多い堆肥区で、溶脱した無機態窒素量が化学肥料区より少ないことから、無機態窒素が溶脱したということは、考えにくい。

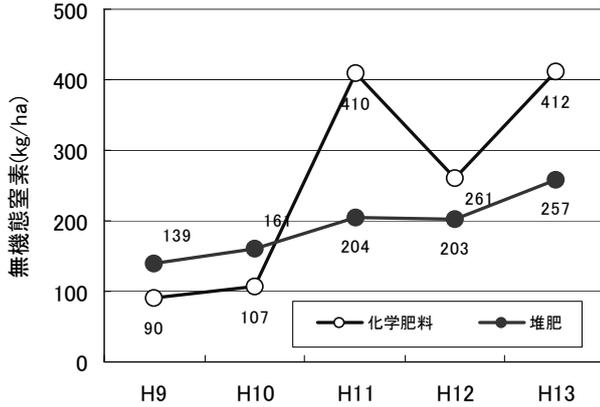


図2 精密圃場による無機態窒素溶脱量(kg/10a/年)

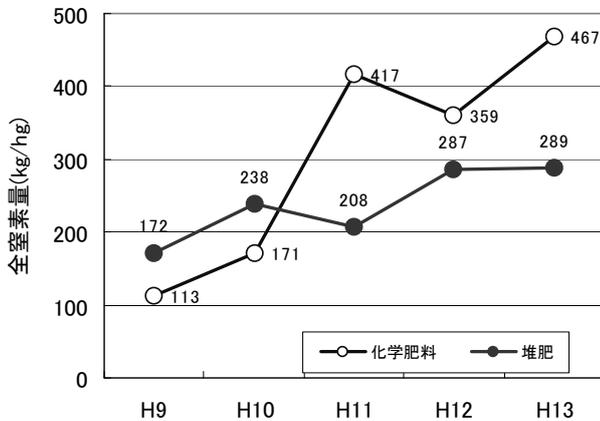


図3 精密圃場による全窒素溶脱量(kg/10a/年)

### 3 まとめ

本試験から、ハウレンソウは、土壤中に無機態窒素が少ない状態でも窒素を吸収し、生育を確保できる能力があることが確認された。

近年、土壤中の無機化窒素量推定のために、培養法に代わる抽出法の検討が行われる一方、抽出される有機態窒素の理化学性についても検討が加えられ、可給態窒素の実態を明らかにする研究が進められていた<sup>54)</sup>。欧米では0.1M CaCl<sub>2</sub>、0.5M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>などの塩溶液による抽出法<sup>8)</sup>、日本では樋口<sup>25)</sup>によって提案された1/15M 中性リン酸緩衝液抽出法が普及している。Matsumoto・Ae<sup>54)</sup>は、これらの溶液によって抽出される有機態窒素のC/N比、アミノ酸組成は極めて類似しており、本質的には同様の有機態窒素が抽出されているのではないかと推察した。また、Matsumotoら<sup>49)</sup>は、中性リン酸緩衝液によって抽出される易分解性の有機態窒素が、土壤の種類および肥培管理の違いにかかわらず、分子量8,000~9,000の比

較的均一な物質群として存在し、いずれの有機物においても一定期間を経てこの物質群に収斂され、可給態窒素の給源となることを報告した。近年、植物がこれら土壤中の無機化前の可給態窒素を吸収・利用している可能性を示す報告が行われ<sup>11), 65), 67), 72), 96)</sup>、土壤中における植物の吸収窒素源は単に土壤や施用有機物から無機化された無機態窒素のみに限定されないのではないかと指摘されるようになった。それらの試験の多くはポット栽培や水耕栽培条件下によるものであるが、ほ場条件下で行われた本試験においても、4年間の栽培試験期間を通じて土壤中の無機態窒素量は堆肥区が化学肥料区に比べて低く推移していたにもかかわらず、堆肥区の窒素吸収量が化学肥料区を上回ることが認められた。高分子有機態窒素である腐植物質の吸収も報告された<sup>66)</sup>が、4年間の圃場試験で考えられる窒素形態として、腐植物質に結びつけるのは考えにくい。なぜなら、供試した土壤は非アロフェン質黒ボク土で比較的腐植の多い土壤である。腐植物質の吸収であれば、化学肥料区でも窒素吸収量が増加するはずである。また、土壤中の窒素は90%が有機態窒素で占められているが、その窒素は主にタンパク質態であり、窒素複素環態はそれほど多くないことを示した<sup>86)</sup>。近年の報告では、ハウレンソウが吸収可能な窒素形態について、PEON (Phosphate-buffer Extractable Organic Nitrogen, p30 参照)と考えられた<sup>46)</sup>ので、これについて、詳しく調査をする必要がある。

## 第3章 PEON 定量法を用いた土壤中および導管液中の PEON の検出

第2章でハウレンソウが吸収可能な窒素形態はPEONである可能性について言及した。そこで、土壤中抽出液および植物導管液中のPEONを検出するためにウエスタンブロッティング法とELISA法に基づいたPEON定量法を用いた<sup>56)</sup>。この方法の概要は次の通りである(図4)。火山灰土壤から精製されたPEONを使ってウサギから抗PEON抗体を作成した。精製PEONをSDS-PAGEした後にセミドライウエスタンブロッティング法に供試し、PEON成分をメンブレンに転写した。一次抗体は、PEONに反応性を有する抗PEON Ig抗体を用い、メンブレン上のPEON成分に一次抗体を結合させた。次いで、一次抗体に抗原性を持つHRP標識二次抗体を反応させた。そして、二次抗体に標識された西洋ワサビペルオキシダーゼ(Horse radish peroxidase, HRP)の酵素活性に基づく発色反応を利用して、メンブレン上のPEON成分を検出した。次に抗PEON抗体を用いて、ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)法<sup>33)</sup>に基づき、定量を行った。ELISAプレートに精製

PEON の 1mg/mL PBS 溶液 (pH7.4) をコーティングバッファー (pH9.7) で 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280, 2560 倍希釈した精製 PEON 溶液を、それぞれ 0.1mL/ウェルずつ、96 ウェル ELISA プレートに分注し、室温で一晩おいて吸着させた。次いで、ウェル内の溶液を捨て、ブロッキング試薬を 0.1mL/ウェルずつ分注し、室温で1時間静置した。さらに、ウェル内の溶液を捨て、希釈した抗 PEON 一次抗体または陰性対照の抗体を 0.1mL/ウェルずつ分注し、室温で 1.5 時間静置し、反応させた。反応後、TBS-T を用いて、ウェルを 3 回洗浄した後、HRP 標識した抗ウサギ IgG 抗体 (2,000 倍希釈) を、0.1mL/ウェルずつ分注し、室温で1時間静置し、反応させた。なお、それぞれの抗体の希釈には TBS-T を用いた。その後、TBS-T でウェルを 3 回洗浄し、反応の強さは TMB 試薬を 0.1mL/ウェルずつ分注して発色させ、さらに等量の 1N 塩酸にて反応を停止させ、マイクロプレートリーダー (日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株)) で 450nm の吸光度を測定すると、PEON 量に応じて吸光度の値が高くなること示された (図5)。この方法を用いて、有機態窒素を吸収する能力があると考えられるホウレンソウを使用し、植物導管液中の PEON の定量および土壌中の PEON 量の測定を行った。

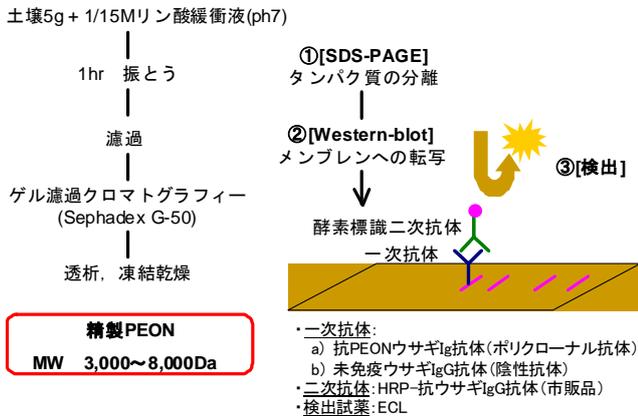


図4 ウェスタンブロットング法による PEON 検出の概要

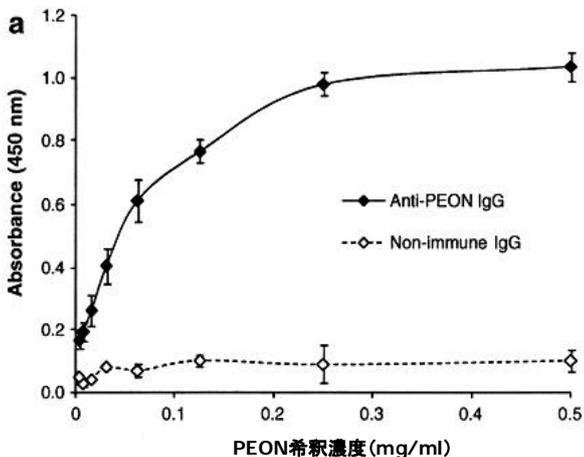


図5 ELISA 法を用いた PEON の検出

## 1 ホウレンソウ導管液中の PEON 様抗原の検出

### (1) 材料および方法

ホウレンソウの導管液は以下のようにして採取した。各栽培条件のホウレンソウ茎部分を露出させ、蒸留水で洗浄した。水耕栽培の場合は茎の下端で、また土壌栽培の場合は茎の生え際(地面から 0cm の部分)で茎を鋭利に切断し、80%エタノールで切り口を清浄にした。エッペンドルフチューブに、1N 塩酸およびエタノールで洗浄し乾燥させた脱脂綿を詰め、これを茎の切り口にかぶせた。また周囲の土壌には、キムワイブなどの清浄な紙あるいはアルミホイルを敷き、土壌からのサンプルの混入を防いだ。16~20 時間後に脱脂綿に含まれた導管液を採取し、 $\phi 0.45 \mu\text{m}$  のフィルターで濾過しサンプルとした。

導管液 1.5mL を凍結乾燥で濃縮し、これを図4の方法に従ってウェスタンブロットを行った。導管液 1.5mL 凍結乾燥品は、PBS 0.15mL に溶解させて使用した。ウェスタンブロットを行ったホウレンソウは、①水耕栽培、②堆肥施用、③化学肥料・堆肥混合施用、④化学肥料施用、の栽培条件のものを用いた。なお、対照抗体として非免疫ウサギの血清から精製した IgG を用いてウェスタンブロットを行った。

### (2) 結果および考察

結果を図6に示す。"M"は分子量マーカであり、"P"は精製 PEON である(陽性対照)。レーン 1 は水耕栽培により、レーン 2, 3, 4 は土壌栽培により、それぞれ育成したホウレンソウから採取した導管液であった。非免疫ウサギ IgG 抗体では、いずれのサンプルでも反応が見られなかった(レーン 2 および 4 の低分子領域に見られる強い陽性バンドは、土壌由来の非特異的なバンドである)。これに対して抗 PEON 抗体は、"P"レーンの精製 PEON と反応すると同時に、土壌で栽培したホウレンソウの導管液とも反応し、複数の PEON または PEON 様抗原が検出された。しかし水耕栽培されたホウレンソウの導管液とは反応しなかった。

以上の結果から、水耕栽培では PEON または PEON 様抗原が植物導管液には存在せず、有機物施用・化学肥料施用に関わらず土耕栽培では PEON または PEON 様抗原が植物導管液に存在することが明らかになった。即ち、植物導管液中の抗 PEON 抗体が反応する PEON または PEON 様抗原は、土壌由来のものであることが示唆された。よって、土耕栽培条件の違いが植物導管液中の PEON または PEON 様抗原に与える影響について検討するには、ウェスタンブロットング法では十分でなく、ELISA による PEON または PEON 様抗原量の比較が必要であることが明らかになった。

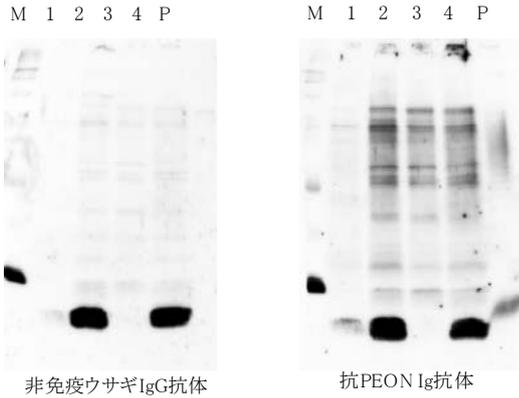


図6 各種栽培条件のホウレンソウ導管液のウエスタンブロット

M:分子量マーカー ; 1:水耕栽培 ;  
 2:土耕栽培(化学肥料) ;  
 3:土耕栽培(化学肥料+堆肥) ;  
 4:土耕栽培(堆肥8t) ;  
 P:精製PEON

2 ホウレンソウ導管液中の PEON 様抗原の定量

(1) 材料および方法

実験に用いたホウレンソウは、①水耕栽培、②化学肥料・堆肥 2t 混合施用、③化学肥料・堆肥 4t 混合施用、④化学肥料・堆肥 8t 混合施用、⑤化学肥料施用、のものを用いた。ホウレンソウ導管液調製法は 1、(1)に準じた。得られたホウレンソウ導管液 1.5mL 凍結乾燥品を PBS 1.5mL で溶解させ、さらにコーティングバッファーで 5 倍希釈し、PEON 定量 ELISA に基づいて<sup>55)</sup>、PEON または PEON 様抗原の定量を行った。なお、精製 PEON を標準品として検量線を作成した。

(2) 結果および考察

結果は図7に示す。5 倍希釈した各栽培条件のホウレンソウ導管液の吸光度を、精製 PEON の検量線(図8)に代入し、ホウレンソウ導管液に含まれる PEON 様抗原量を算出した。数式は以下に、結果は図9に示す。

$$x=(y+0.022)/0.0691 \times 5$$

x:ホウレンソウ導管液中の PEON 様抗原量(ug/mL)

y:5 倍希釈ホウレンソウ導管液の ELISA における吸光度

ホウレンソウ導管液中の PEON 様抗原量は、水耕栽培<化学肥料<化学肥料+堆肥 2t<化学肥料+堆肥 4t<化学肥料+堆肥 8t、の順となった。水耕栽培において、栽培過程で PEON が生成することはない。一方で、水耕栽培したホウレンソウ導管液の ELISA において 0.1 程度の吸光度が見られるが、非免疫ウサギ抗体による PEON 検出 ELISA においても、ABS0.1 程度の吸光度があったことから、抗 PEON Ig 抗

体が非特異的に反応したもの(PEON 様抗原以外のエピトープに反応したもの)と考えられた。土耕栽培については、化学肥料のみの施用区より、堆肥を併用した区の方が、ホウレンソウ導管液中の PEON 様抗原は増加した。さらに、堆肥施用量が増加するほど、ホウレンソウ導管液中の PEON 用抗原量は多かった。土壌中には有機物施肥の有無にかかわらず、普遍的に PEON が存在しているが、有機物として堆肥を施用することで、土壌中の PEON 様抗原が増加し、ホウレンソウによって吸収された可能性が示唆された。これを検証するには、堆肥施用区土壌の PEON 様抗原量を測定する必要がある。

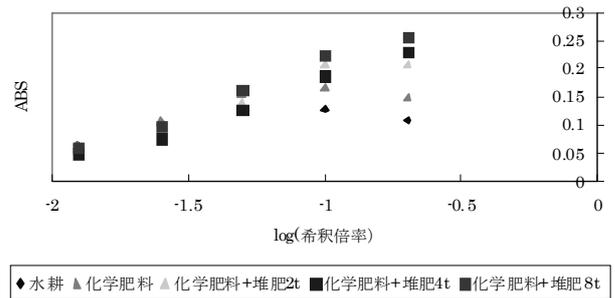


図7 各種栽培条件のホウレンソウ導管液の ELISA

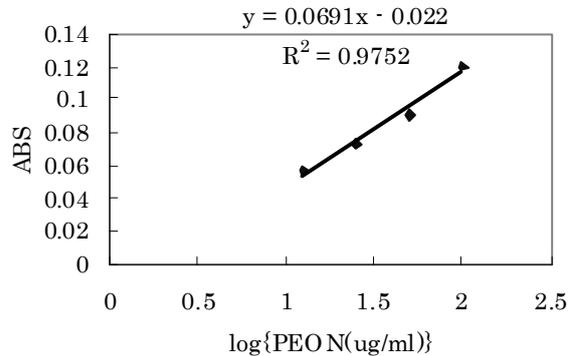


図8 精製 PEON の ELISA 検量線

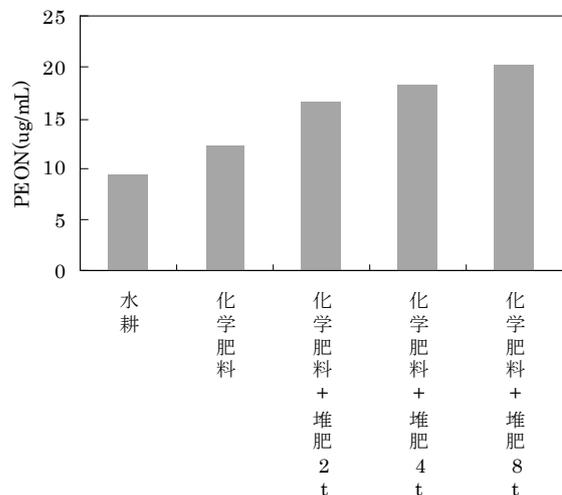


図9 各種栽培条件のホウレンソウ導管液の PEON 様抗原の定量

### 3 ホウレンソウ栽培跡地土壌中の PEON 量

#### (1) 材料および方法

実験に用いた土壌は、①化学肥料施用、②堆肥 8t 施用を用いた。土壌中の PEON 量は、風乾土 300 mg に 1/15 M リン酸緩衝液を 3 ml 加えて、室温で 1 時間振とうした後、シリンジフィルター (ADVANTEC 製, 0.45  $\mu$ m) でろ過したろ液を分析試料とし<sup>25)</sup>、全窒素量を乾式燃焼法<sup>14)</sup>で測定した。

#### (2) 結果および考察

土壌中の無機態窒素に代わる窒素供給源として中性リン酸緩衝液抽出窒素に注目すると、実験開始年である 1998 年の作付前土壌では堆肥区と化学肥料区ではほぼ同程度であったが、堆肥を 4 年間連用した跡地の土壌では、化学肥料区で実験開始前よりも減少し、堆肥区では 1998 年比の 130% 増加した (表 6)。堆肥を連用することで土壌中の PEON 態窒素量は増加した。平田<sup>28)</sup>は、淡色黒ボク土を用いてリン酸緩衝液で抽出した有機態窒素量と ELISA 法による PEON 量との間に高い正の関係があることを報告した。すなわち、堆肥 8t 施用区の PEON 量は、化学肥料施用区の PEON 量よりも多いことを示した。有機物多施用で、PEON が大量に生成されれば、浸透水とともに PEON が地下水へ溶脱した<sup>62)</sup>が、第 2 章において溶脱した全窒素量が少ない結果から (第 2 章, 表 3), PEON は溶脱したとは考えにくい。しかし、堆肥区で増加した可給態窒素が直接的にハウレンソウの窒素吸収量に及ぼす影響については、本試験の結果からは不明であった。無機態窒素量が低い堆肥区の窒素吸収量が増加する原因について考察するには、本試験の結果は示唆に富んだデータであり、ハウレンソウが吸収可能な窒素形態については土壌中の無機態窒素だけではなく、有機物施用によって増加する易分解性有機態窒素の動態も含めてさらに詳しく調査をする必要がある。

#### 4 まとめ

導管液中で PEON に反応する抗 PEON 抗体を用いたところ PEON は検出された。土壌中でも火山灰土壌、赤土、灰色低地土のタイプにかかわらず、土壌中の PEON は ELISA 法による PEON 定量の可能性が示された (図 10)。すなわち、同法により、導管液中の PEON と土壌中の PEON が検出された。以上より、ハウレンソウは PEON を直接吸収利用する可能性が高いことが示された。しかし、施肥管理の評価として有機態窒素を考慮する場合、PEON 以外にも熱水抽出法<sup>5)</sup>、酸加水分解法<sup>75)</sup>、アルカリ酸化分解法<sup>20)</sup>、希硫酸法<sup>17), 53)</sup>が報告された。無機態窒素含量

の高い土壌では、洗滌法<sup>80)</sup>など有機態窒素を評価する方法がある。また、PEON が鉄やアルミニウムと結合している有機態窒素であれば、難溶解性の有機態窒素を吸収する可能性もある。これらの有機態窒素が PEON と異なる形態であるかどうかを確認し、ハウレンソウが利用吸収できる窒素の形態を整理する必要がある。

表 6 化学肥料区及び堆肥区の PEON 態窒素量

	(mg/kg)	
	1998 作付前	2001 作付後
化学肥料区	97.8	90.9
堆肥区	98.0	127.8

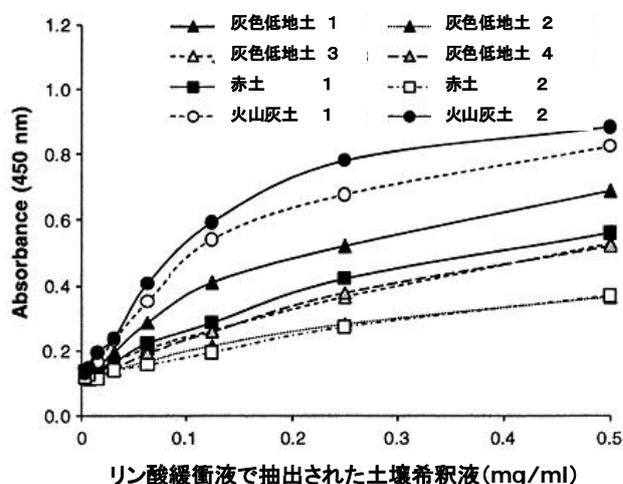


図 10 3種の土壌タイプを用いた ELISA 法による未精製 PEON の検出

### 第4章 土壌中に蓄積している窒素の形態分別法の検討

第3章でハウレンソウは PEON を直接吸収利用する可能性が高いことが示された。しかし、施肥管理の評価として有機態窒素を考慮する場合、PEON 以外にも報告されている窒素肥沃度の評価方法について検討をする必要がある。現在広く用いられている窒素肥沃度の評価方法は、微生物的方法と化学的方法がある。前者は、培養静置法<sup>14)</sup>と呼ばれている。これは、温度 30°C で 4 週間培養し、生成した無機態窒素を測定するが、これには培養に時間がかかり、現場に対応した測定方法とはいえない。後者は、Keeney and Bremner<sup>39)</sup>をはじめ、種々の溶液による抽出法が提案された<sup>15), 24), 37), 50)</sup>。

これら化学的方法のうち、樋口<sup>24)</sup>が開発したリン酸緩衝液抽出法で抽出される有機態窒素化合物は、タンパク様性質を示す物質であった<sup>70)</sup>。さらに松本ら<sup>51)</sup>は、希硫酸に

よる可給態窒素の抽出を検討した結果、希硫酸の濃度が0.4M以下ではその濃度に応じて抽出される有機態窒素が増加することを確認した。また、0.4M 硫酸とリン酸緩衝液で抽出される有機態窒素の推定分子量が 8,000~9,000程度であることを確認した<sup>51)</sup>。さらに、1/15M リン酸緩衝液によって抽出される有機態窒素量と、0.2M 硫酸溶液によって抽出される有機態窒素量はほぼ同じであり、0.4M 硫酸溶液は、それより多い有機態窒素量を抽出することが明らかにされた<sup>33)</sup>。一方、有機物が大量に施用された畑土壌では、0.2M 以上の硫酸濃度で抽出される有機態窒素が頭打ちとなり、その量はリン酸緩衝液抽出法と同程度になった<sup>33)</sup>。このことから、0.2M 以上の硫酸とリン酸緩衝液で抽出される窒素の土壌中での存在形態を把握する必要がある。また、種々の希硫酸で抽出される土壌中の窒素は、タンパク様物質とそれに結合している金属イオンが結合の強弱に応じて抽出されると考えられているが、土壌中の窒素形態の分別については、さらに詳しく検討がされていない。

そこで本章では、有機態窒素が窒素肥沃度を考慮した施肥管理の評価として利用されるため、逐次抽出を用いて窒素形態の分別定量を行った。このとき、タンパク様物質を土壌中で保持している可能性が高い金属は鉄、アルミニウムであるが<sup>33), 54)</sup>、土壌中での存在形態を探るために金属イオンの結合状態について検討した。さらに、リン酸緩衝液抽出法では、金属イオンが一部沈殿するため、硫酸の濃度を変えた逐次抽出も行った。

## 1 逐次抽出 A

### (1) 材料および方法

#### ① 供試土壌

供試土壌は、岩手県北上市と岩手県遠野市のホウレンソウハウス土壌(非アロフェン質黒ボク土<sup>78)</sup>)、岩手県西根町のホウレンソウハウス土壌(アロフェン質黒ボク土<sup>78)</sup>)、茨城県つくば市の大豆畑土壌(アロフェン質黒ボク土<sup>57)</sup>)、および埼玉県大里の未耕地土壌(沖積土)の 5 土壌を用

いた(表7)。非アロフェン質黒ボク土、およびアロフェン質黒ボク土それぞれ2種類については、トルオーグ法による可給態リン酸含量の異なる土壌を選択、供試した。

ホウレンソウハウス土壌は、2003年9月10~13日、ホウレンソウ跡地土壌、作土層から採取した。大豆畑土壌は、2003年9月12日、大豆の収穫跡地土壌、作土層から採取した。沖積土は、2003年9月12日、独立行政法人農業技術研究機構中央農業総合研究センター内で保管されていた土壌を供試した。いずれの土壌も風乾して2mmの篩で篩別した。

#### ② 抽出方法

図11および下記に示した。本法では、定本らの土壌中の重金属の形態分別法<sup>59), 76)</sup>に従った。各土壌4反復で実験を行った。

土壌中の窒素の形態分別を以下の方法で行った。

#### a 水溶態窒素

3gの風乾細土試料に30mlの水を加えて1時間振とうし、遠心分離(10,000rpm, 5分)した。この上清液を水溶態抽出液とした。

#### b 無機態窒素<sup>14)</sup>

水溶態抽出残渣に30mlの10%塩化カリウム溶液を加えて1時間振とうしたのち、遠心分離(10,000rpm, 5分)した。この上清液を無機態抽出液とした。

#### c 無機結合態窒素(酢酸抽出)<sup>34)</sup>

無機態抽出残渣に30mlの1M(5.7%)酢酸を加えて1時間振とうしたのち、遠心分離(7,000rpm, 5分)した。抽出残渣に10mlの水を加え、手で試験管を振り、遠心分離した。上清液は、酢酸抽出液に混ぜ、ここまです酢酸抽出液とした。

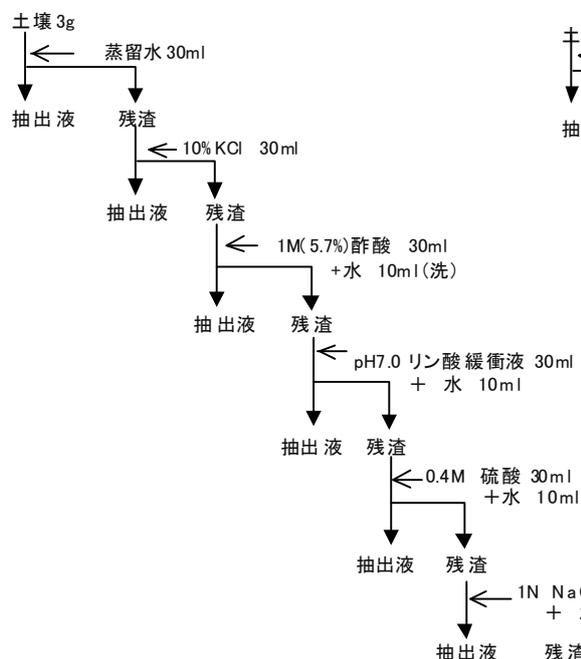
#### d 易分解性有機態窒素1(リン酸緩衝液抽出)<sup>24)</sup>

無機結合態抽出残渣に30mlの1/15Mリン酸緩衝液を加えて1時間振とうしたのち、遠心分離(7,000rpm, 5分)した。抽出残渣に10mlの水を加え、洗浄した。この上清液を、リン酸緩衝液抽出液に加え、ここまですリン酸緩衝液抽出液とした。

表7 供試土壌の一般的性質

	採取場所	土壌タイプ	pH (H <sub>2</sub> O)	全炭素 (%)	全窒素 (%)	C/N	可給態リン酸 (mg/kg)
北上土壌	岩手県北上市	非アロフェン質黒ボク土	6.3	4.09	0.28	14.6	200
遠野土壌	岩手県遠野市	非アロフェン質黒ボク土	6.0	6.76	0.50	13.5	2000
つくば土壌	茨城県つくば市	アロフェン質黒ボク土	7.1	4.67	0.41	11.4	76
西根土壌	岩手県西根町	アロフェン質黒ボク土	6.5	4.53	0.43	10.5	2000
大里土壌	埼玉県大里	灰色低地土	6.9	0.92	0.07	13.1	156

## [抽出方法 A]



## [抽出方法 B]

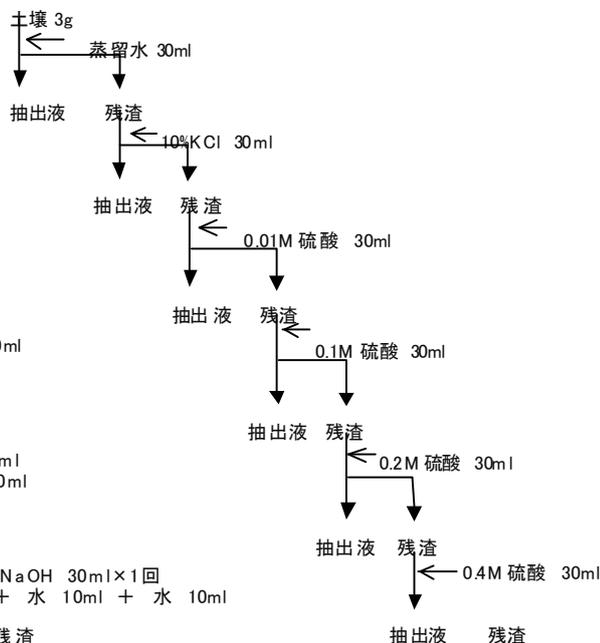


図11 本実験で開発した逐次抽出法(AおよびB法)

e 易分解性有機態窒素 2(硫酸抽出)<sup>49), 51)</sup>

易分解性有機態 1 の残渣に 30ml の 0.4M 硫酸を加え、1 時間振とうしたのち、遠心分離 (7,000rpm, 5分)した。抽出残渣に 10ml の水を加え、洗浄した。この上清液を、0.4M 硫酸抽出液に加えた。この洗浄操作を 2 回繰り返す、ここまです 0.4M 硫酸抽出溶液とした。

f 難分解性有機態窒素(水酸化ナトリウム抽出)<sup>13)</sup>

易分解性有機態窒素 2 残渣に 30ml の 1N 水酸化ナトリウム溶液を加え、一晩静置し、1 時間振とう、遠心分離した。抽出残渣に 10ml の水を加え、一晩静置し、1 時間振とう、遠心分離した。上清液は、1N 水酸化ナトリウム抽出液に混ぜた。抽出残渣に 10ml の水を加え、1 時間振とう、遠心分離した。この上清液を、1N 水酸化ナトリウム抽出液に加えて、ここまです 1N 水酸化ナトリウム抽出溶液とした。

## ③ 分析方法

それぞれの抽出液を  $0.45 \mu\text{m}$  のメンブランフィルター (アドバンテック製) に通した。その濾液をインドール法でアンモニア態窒素、銅・カドミウム還元 - ナフチルエチレンジアミン比色法で硝酸態窒素と亜硝酸態窒素分析をし、乾式燃焼法で全窒素を分析した。全窒素から無機態窒素を差し引いて有機態窒素を算出した。また、抽出液中の分子量を検討するため、分子篩 HPLC による分析を行った。その際、タンパク質が紫外部に吸光を示す性質<sup>79)</sup>を利用し、280nm における吸光度を測定した。それぞれの HPLC の条件は、Matsumoto らの方法<sup>49), 51)</sup>を用いた。

逐次抽出後の残渣は、風乾させたのち、微粉碎して乾式燃焼法<sup>14)</sup>で全窒素を測定した。

## (2) 結果および考察

水抽出で、抽出された全窒素の 90%~100%が硝酸態窒素であった。10%塩化カリウム溶液による抽出では、抽出された全窒素の 16%~55%が硝酸態窒素、25%~53%がアンモニア態窒素、合計で 41%~94%が無機態窒素であった。酢酸で抽出された全窒素の 10%~48%がアンモニア態窒素、

52%~90%が有機態窒素であった。易分解性有機態 1 で抽出された全窒素の 98~100%が有機態窒素であった。易分解性有機態 2 で抽出された全窒素の 99~100%が有機態窒素であった。1N 水酸化ナトリウム溶液で抽出された全窒素の 13~66%がアンモニア態窒素、37~87%が有機態窒素であった(表 8)。

表 8 抽出方法 A による窒素の存在形態

			北上土壌	遠野土壌	西根土壌	つくば土壌	大里土壌
全窒素	(mg/kg)		2830	4980	4250	4120	650
抽出窒素総量	(mg/kg)		1073	1661	1387	1346	175
抽出割合	(%)		37.9	33.4	32.6	32.7	27.0
抽出総量	(mg/kg)		2413	3101	3297	3336	525
回収率			85%	62%	78%	81%	81%
水溶態窒素	無機態窒素	硝酸態窒素	60.3	58.7	76.1	27.2	27.5
		アンモニア態窒素	1.0	1.1	0.8	0.8	1.0
	有機態窒素		-0.2	0.6	1.3	3.9	0.4
	全窒素		61.1	60.4	78.2	32.0	28.9
	無機態/全窒素		100%	99%	98%	88%	99%
無機態窒素	無機態窒素	硝酸態窒素	8.0	7.0	8.0	3.5	2.0
		アンモニア態窒素	9.0	4.3	5.7	5.4	2.7
	有機態窒素		1.1	1.3	2.5	12.9	0.4
	全窒素		18.1	12.7	16.3	21.8	5.1
	無機態/全窒素		94%	90%	85%	41%	92%
酢酸抽出	無機態窒素	硝酸態窒素	-	-	-	-	-
		アンモニア態窒素	3.1	2.3	3.1	2.3	1.4
	有機態窒素		10.2	21.2	20.8	12.6	1.5
	全窒素		13.3	23.5	23.9	14.9	2.9
	無機態/全窒素		23%	10%	13%	15%	48%
リン酸緩衝液抽出	無機態窒素	硝酸態窒素	-	-	-	-	-
		アンモニア態窒素	1.9	1.0	1.0	0.1	0.0
	有機態窒素		80.4	71.1	88.1	71.0	29.1
	全窒素		82.3	72.1	89.1	71.1	29.1
	無機態/全窒素		2%	1%	1%	0%	0%
硫酸抽出	無機態窒素	硝酸態窒素	-	-	-	-	-
		アンモニア態窒素	0.3	0.6	0.7	0.8	0.0
	有機態窒素		134.1	139.9	96.4	205.8	35.4
	全窒素		134.4	140.5	97.1	206.7	35.4
	無機態/全窒素		0%	0%	1%	0%	0%
水酸化ナトリウム抽出	無機態窒素	硝酸態窒素	-	-	-	-	-
		アンモニア態窒素	137.3	227.5	179.0	134.1	48.6
	有機態窒素		627.0	1124.5	903.8	865.1	25.4
	全窒素		764.3	1352.0	1082.8	999.2	74.0
	無機態/全窒素		18%	17%	17%	13%	66%
残渣	全窒素		1340	1440	1910	1990	350

図 12 に各抽出液中の分子量の分布を分子篩 HPLC で分析した結果を示す。分子量の推定は、標準物質 (Gel filtration standard, Bio-rad Co., Ltd.) で得られる保持時間の異なった 5 つのピークと分子量から検量線を作成し、各ピークの分子量を推定した<sup>51)</sup>。北上土壌では、酢酸で抽出した有機態窒素は、2 つのピークに分かれた。図 13 に各抽出液中の全窒素量とピーク面積との関係を示す。波長 280nm で検出される物質と土壌から抽出される各画分の全窒素量との

間に高い相関が認められれば、土壌の種類に関わらず共通して存在する有機態窒素であると認識できる。従って、酢酸によって検出された 2 のピークのうち、8 分台のピークはそれに相当し、推定分子量は 4,000~5,000 であった(図 13A)。易分解有機態窒素 1, 2 は、ほぼ均一なピークが 1 本認められ、推定分子量 8,000 であった。この 2 つの抽出液は、いずれも抽出液中の全窒素量とピーク面積の間に高い相関が認められた。リン酸緩衝液の  $r^2=0.91$ 、0.4M 硫酸の  $r^2=0.73$  で、

いずれも1%水準で有意であった(図 13 B, C). 以上の結果, 抽出された有機態窒素の分子量は4,000~5,000, あるいは, 8,000 であると考えられる. 1N水酸化ナトリウム抽出液中には, 分子篩 HPLC の排除限界にある高分子量と推定分子量 8,000~

9,000 および推定分子量 200 の3ヵ所のピークが認められた. このうち, 最も広いピーク面積を占めた物質の分子量は 8,000~9,000 と推定した. この結果は, 他の土壌についても同様の傾向であった.

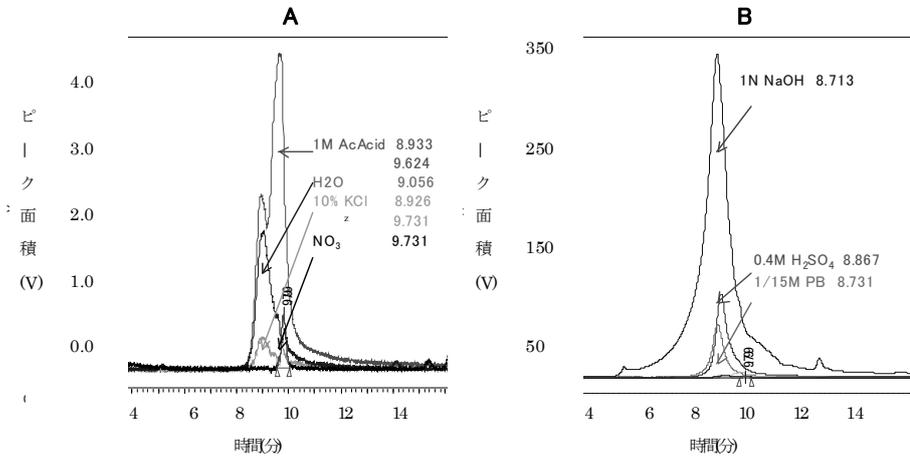


図 12 各抽出液の分子篩 HPLC によるクロマトグラム(北上土壌)

A: 水溶態~酢酸抽出までの抽出液  
 B: リン酸緩衝液抽出~1N水酸化ナトリウム抽出までの抽出液  
 z NO<sub>3</sub>は, 100mg/L硝酸カリウム溶液のピーク

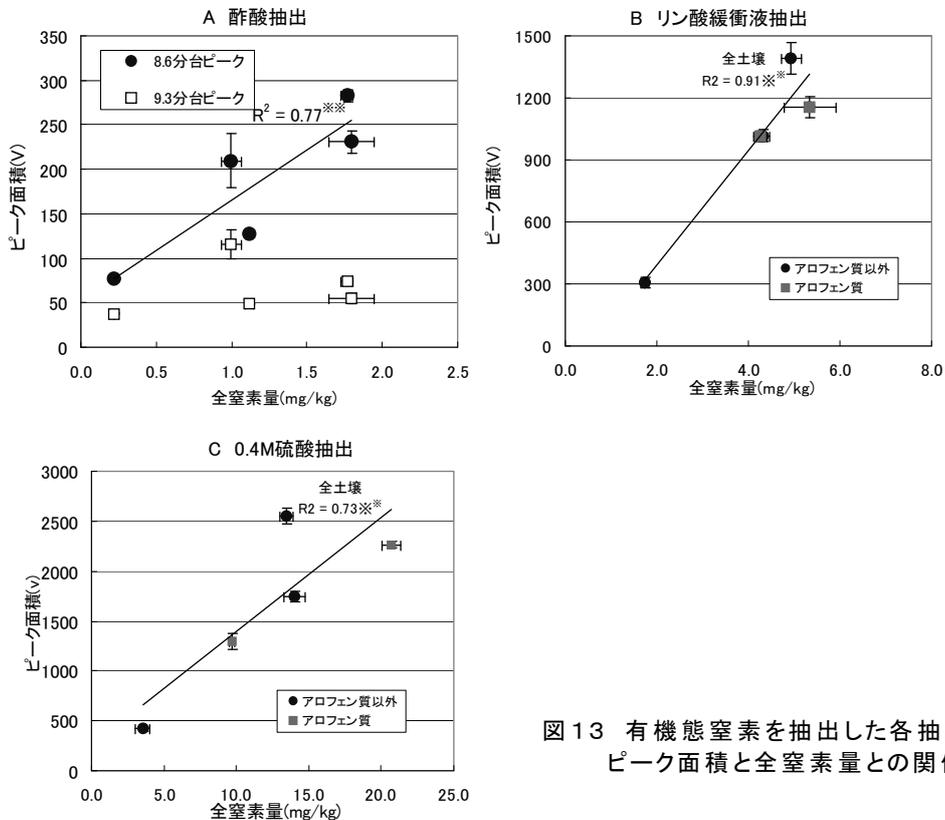


図 13 有機態窒素を抽出した各抽出液のピーク面積と全窒素量との関係

水と 10%KCl 溶液により水溶態窒素と無機態窒素である無機態窒素画分を抽出した. その際, 降雨やかん水により流亡しうる無機態窒素の量を把握するため, 硝酸態窒

素とアンモニア態窒素を区別した.

続いて, 温度の上昇によって無機化が起こる場合, 細菌が容易に切り離せる有機態窒素を抽出するために, 1M 酢

酸を用いた。現在、交換性塩基を測定するために1M酢酸アンモニウムが用いられているが、本研究では水溶性や交換態の画分を把握する際、抽出過程で窒素の混入を防止したため、1M酢酸を用いた。この抽出液では、傾向が二つ認められた。第一に大里土壌は、他の黒ボク土に比べ、全窒素量に対しアンモニウム態窒素の割合が48%と多かった。第二にトルオーグ法による可給態リン酸（以下、Truog-P）が多い土壌（表8）では、抽出される全窒素量が多かった。沖積土は、黒ボク土に比べ、有機物が少なく、有機物と粘土鉱物の複合体が少ないことから、pH4.0の1M酢酸で容易に分解されたことから、アンモニウム態窒素が多く抽出されたと考えられる。2.5%（0.42M）酢酸でカルシウム型リン酸を抽出する方法がある<sup>76)</sup>。この1M酢酸で抽出した窒素形態は、カルシウムと結合している部分から抽出された可能性が高い。そのため、窒素とアルミニウムの結合割合が少なく、リン酸とアルミニウムの結合割合が多いと考えられる。Truog-Pが高い土壌で全窒素が多く抽出される可能性が示唆された。

リン酸緩衝液、および0.4M硫酸液で抽出された有機態窒素量は、今回供試した土壌では逐次抽出の各過程が進むほど増加した。したがって、リン酸緩衝液と0.4M硫酸溶液では、0.4M硫酸溶液の方が有機態窒素を多く抽出できるものと考えた。また、易分解性有機態窒素を画分したリン酸緩衝液を用いた場合、4つの黒ボク土ではほぼ同量の窒素が抽出された。大里土壌では、黒ボク土の約1/3の窒素量が抽出された。一方、0.4M硫酸を用いた場合、非アロフェン質黒ボク土は、北上土壌と遠野土壌でほぼ同量の窒素量が抽出された。アロフェン質黒ボク土では、つくば土壌の窒素量が西根土壌の窒素量の2倍多く抽出された。大里土壌では、黒ボク土の1/4量の窒素が抽出された。

分子篩 HPLC で検出されたピーク面積と抽出液中の全窒素量の関係は、酢酸抽出液では8.6分台のピークで ( $r^2=0.77^{***}$ )、リン酸緩衝液 ( $r^2=0.91^{***}$ )、0.4M硫酸緩衝液 ( $r^2=0.73^{***}$ ) で、それぞれ1%水準で有意に相関が認められた（図13）。

ただし、リン酸緩衝液で抽出されるアロフェン質黒ボク土壌の全窒素量は、ばらつきが大きく、窒素肥沃度を評価する場合に信頼性が低くなる可能性がある。アロフェン質黒ボク土の全窒素量のばらつきが大きい理由について、活性アルミニウムの強弱が関係していると思われるが、今後の検討が必要である。

土壌腐植が解膠を起こせる程度の中性塩類を添加し、たん水静置すると無機化する現象を利用して、腐植を

分解する方法<sup>23)</sup>を逐次抽出法に用いた。その結果、1N水酸化ナトリウムで抽出された窒素の約半分がアンモニウム態窒素、残りが有機態窒素であった。このアンモニウム態窒素は、抽出中に加水分解によって腐植の一部が無機化したものと考えられる。また、この抽出液を分子篩 HPLC による分析の結果、大部分はリン酸緩衝液や希硫酸液と同じ8分台にピークが認められたことから、この分子量が安定した形態として土壌中に存在している可能性が示唆された。

## 2 逐次抽出 B

### (1) 材料および方法

#### ① 供試土壌

第4章、1、(1)、①と同様の土壌を供試した。

#### ② 抽出方法

有機態窒素は鉄やアルミニウムと結合しており、土壌の腐植がカルシウム、鉄、アルミニウムと結合して複合体や不活性化していると報告された<sup>33)、54)</sup>。カルシウムとマグネシウムが0.01M硫酸で抽出した溶液に含まれていること<sup>33)</sup>、また0.01M硫酸を用いた方法と、0.1M硫酸から段階的に硫酸濃度を上昇させるに応じて有機態窒素量が増加した<sup>51)</sup>。これを参考にして本法を開発し（図11）、土壌窒素の抽出に伴う金属イオンの動態について検証した。

- a 水溶態窒素の抽出は、抽出実験 A, aに準じた。
- b 無機態窒素の抽出は、抽出実験 A, bに準じた。
- c 易分解性有機態窒素1(0.01M硫酸)

無機態抽出残渣に30mlの0.01M硫酸を加えて1時間振とうしたのち、遠心分離(7,000rpm, 5分)した。この上清液を0.01M硫酸抽出液とした。

- d 易分解性有機態窒素2(0.1M硫酸)

易分解性有機態窒素1抽出残渣に30mlの0.1M硫酸を加えて1時間振とうしたのち、遠心分離(7,000rpm, 5分)した。この上清液を0.1M硫酸抽出液とした。

- e 易分解性有機態窒素3(0.2M硫酸)

易分解性有機態窒素2残渣に30mlの0.2M硫酸加えて1時間振とうしたのち、遠心分離(7,000rpm, 5分)した。この上清液を0.2M硫酸抽出液とした。

- f 易分解性有機態窒素4(0.4M硫酸)

易分解性有機態窒素3残渣に30mlの0.4M硫酸を加えて1時間振とうしたのち、遠心分離(7,000rpm, 5分)した。この上清液を0.4M硫酸抽出液とした。

- g 易分解性有機態窒素5(0.5M硫酸)

易分解性有機態窒素4残渣に30mlの0.5M硫酸を加えて1時間振とうしたのち、遠心分離(7,000rpm, 5分)した。

この上清液を0.5M 硫酸抽出液とした。

### ③ 分析方法

それぞれの抽出液の無機態窒素、全窒素、分子量は第4章、1、(1)、③に準じた。抽出液中の金属イオンの濃度は、腐植と結合していると言われていたアルミニウム、鉄は ICP 発光分光法<sup>14)</sup>で定量した。

### (2) 結果および考察

水抽出、10%塩化カリウム溶液で抽出された全窒素の内訳は、抽出実験 A と同様であった。0.01M 硫酸および0.5M 硫酸による抽出では、全窒素の100%が有機態窒素であった。0.1M~0.2M 硫酸による抽出では、抽出された全窒素量のうち、黒ボク土壌で1%未満、沖積土壌で5.3~8%がアンモニア態窒素であり、90~99%が有機態窒素であった。0.4M 硫酸による抽出では、抽出された全窒素量のうち、黒ボク土壌で1%、沖積土壌で2%がアンモニア態窒素、98~99%が有機態窒素であった(表9)。

大里土壌以外の土壌で1/15M リン酸緩衝液で抽出された窒素より0.2M 硫酸で抽出された窒素の方が多かった。これは、逐次抽出 B で抽出していくごとに酸性の強い抽出液を用いたため、土壌からの窒素が多く抽出されたと考えられる。一般に黒ボク土はアルミニウムが多く含まれる土壌であるが、非アロフェン黒ボク土は pH が5以下で、腐植とアルミニウムが安定な複合体を形成している。一方、アロフェン質黒ボク土は pH5 以上であり、遊離で活性の高いアルミニウムは非アロフェン質黒ボク土より少ない<sup>7)</sup>。すなわち、アルミニウム活性がアロフェン質黒ボク土より低い非アロフェン質黒ボク土では、腐植あるいは有機態窒素と結合しているアルミニウムとの結合は、アロフェン質黒ボク土の有機物との結合よりも強いと想定される。したがって、同一抽出の条件下で遊離する窒素量は非アロフェン質黒ボク土より、アロフェン質黒ボク土で多くなると予想される。

表9 抽出法Bによる窒素の存在形態

		北上土壌	遠野土壌	西根土壌	つくば土壌	大里土壌	
	全窒素 (mg/kg)	2830	4980	4250	4120	650	
	抽出窒素総量 (mg/kg)	896	863	937	2066	180	
	抽出割合 (%)	31.7	17.3	22.1	50.1	27.7	
	抽出総量 (mg/kg)	2831	4912	4456	4190	567	
	回収率	100%	99%	105%	102%	87%	
水溶態窒素	無機態窒素	硝酸態窒素	60.3	58.7	76.1	27.2	27.5
		アンモニア態窒素	1.0	1.1	0.8	0.8	1.0
	有機態窒素		-0.2	0.6	1.3	3.9	0.4
	全窒素		61.1	60.4	78.2	32.0	28.9
	無機態/全窒素		100%	99%	98%	88%	99%
無機態窒素	無機態窒素	硝酸態窒素	8.0	7.0	8.0	3.5	2.0
		アンモニア態窒素	9.0	4.3	5.7	5.4	2.7
	有機態窒素		1.1	1.3	2.5	12.9	0.4
	全窒素		18.1	12.7	16.3	21.8	5.1
	無機態/全窒素		94%	90%	85%	41%	92%
0.01M 硫酸	無機態窒素	硝酸態窒素	-	-	-	-	-
		アンモニア態窒素	-	-	-	-	-
	有機態窒素		21.9	24.9	24.8	13.5	11.6
	全窒素		21.9	24.9	24.8	13.5	11.6
	無機態/全窒素		0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
0.1M 硫酸	無機態窒素	硝酸態窒素	-	-	-	-	-
		アンモニア態窒素	1.6	4.3	4.3	2.1	1.6
	有機態窒素		111.0	156.9	122.6	107.2	28.4
	全窒素		112.6	161.2	126.8	109.3	30.0
	無機態/全窒素		1.4%	2.6%	3.4%	1.9%	5.3%
0.2M 硫酸	無機態窒素	硝酸態窒素	-	-	-	-	-
		アンモニア態窒素	2.1	3.2	4.3	4.3	2.1
	有機態窒素		269.1	306.8	307.8	499.5	24.5
	全窒素		271.2	310.0	312.0	503.8	26.7
	無機態/全窒素		0.8%	1.0%	1.4%	0.8%	8.0%
0.4M 硫酸	無機態窒素	硝酸態窒素	-	-	-	-	-
		アンモニア態窒素	2.1	2.7	4.8	5.9	1.6
	有機態窒素		408.8	291.0	374.2	1379.4	76.1
	全窒素		411.0	293.7	379.0	1385.2	77.7
	無機態/全窒素		0.5%	0.9%	1.3%	0.4%	2.1%
0.5M 硫酸	無機態窒素	硝酸態窒素	-	-	-	-	-
		アンモニア態窒素	-	-	-	-	-
	有機態窒素		47.5	28.6	91.0	82.8	66.2
	全窒素		47.5	28.6	91.0	82.8	66.2
	無機態/全窒素		0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
残渣		1935.4	4049.3	3518.9	2124.3	386.9	

図 14 に逐次抽出法 B で抽出された有機態窒素と鉄およびアルミニウム量を示す。カルシウムとマグネシウムは、有機態窒素の抽出量と関係が見られなかったことから、データを省略した。すべての土壌で 0.1M 硫酸から 0.2M 硫酸にかけて有機態窒素量の増加とともにアルミニウム量が増加した。一方鉄量は、0.1M 硫酸と 0.4M 硫酸で抽出量が増加し、0.2M 硫酸と 0.5M 硫酸では抽出

量が減少した。つくば土壌(アロフェン質黒ボク土、可給態リン酸含量 76mg/kg)は、他の土壌に比べ、アルミニウム量が鉄量と同じく 0.2M 硫酸で抽出量が一度減少したが、抽出量は他土壌より多かった。鉄量は、0.4M 硫酸から 0.5M 硫酸で多量に抽出された。北上、西根、遠野土壌に比べ可給態リン酸が少ないつくば土壌では、アロフェン質の性質が顕著に現れた。すなわち、アロフェンは、

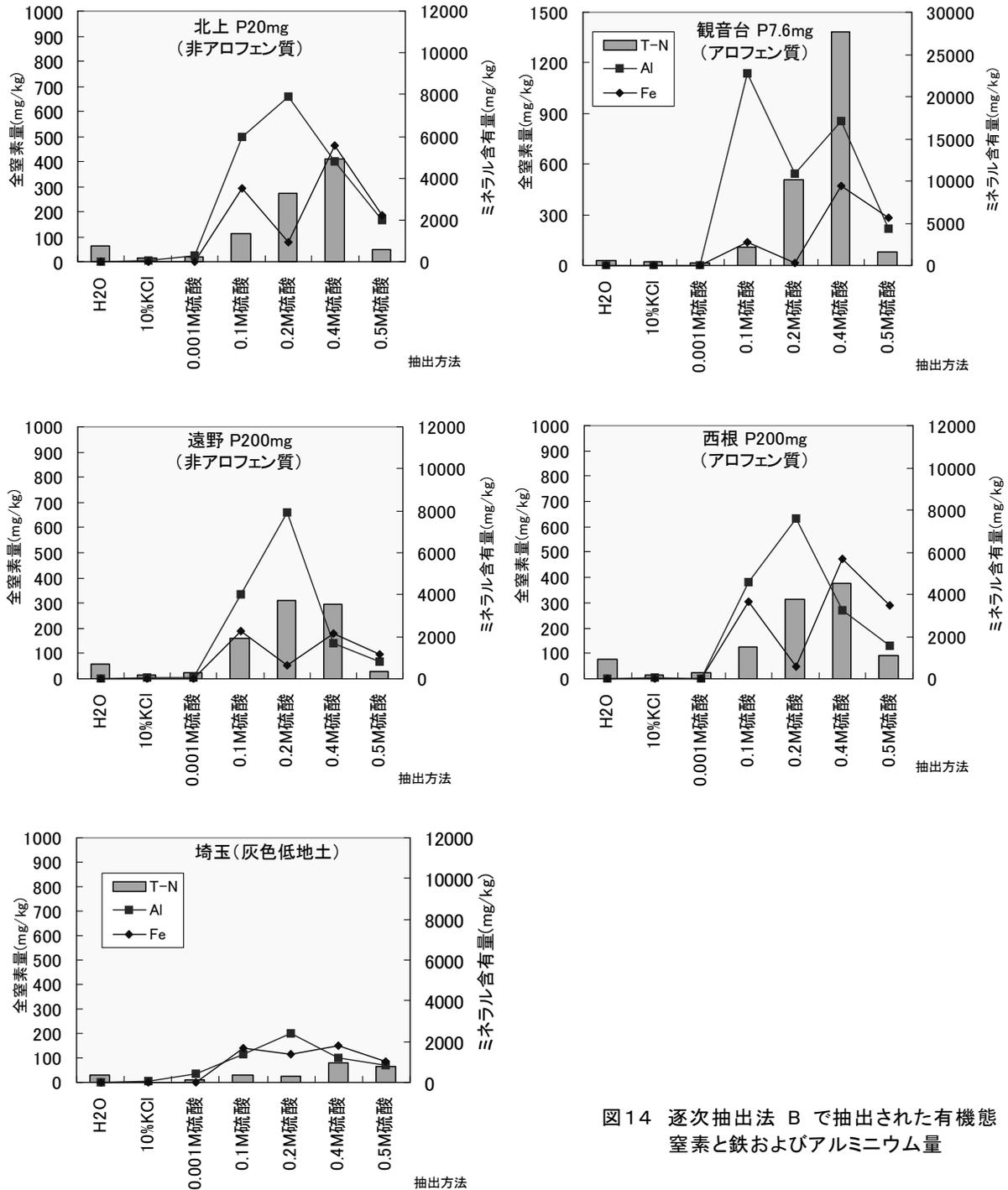


図 14 逐次抽出法 B で抽出された有機態窒素と鉄およびアルミニウム量

非晶質鉱物であり、アロフェンからアルミニウムが遊離しやすい構造を有している。したがって、濃度の薄い硫酸によっても多くのアルミニウムが抽出されると考えられる。リン酸の施用量が多く、可給態リン酸量が多いアロフェン質黒ボク土の西根土壤では、遊離しやすいアルミニウムはすでにリン酸と結合しており、リン酸と結合していない遊離しやすいアルミニウムは少ない。したがって、リン酸施用の少ないアロフェン質黒ボク土より、高い濃度の硫酸によって、アルミニウムが抽出されると考えられる。一方、リン酸施用量の少ない、つくばのアロフェン質黒ボク土では、リン酸施用量の多い西根土壤と比較して、より薄い濃度の硫酸で多くのアルミニウムが溶出される。他の3土壤は、2:1型鉱物であり、アロフェンに比べて安定しており、0.2M 硫酸でアルミニウムと有機態窒素の結合部位が容易に切断できると考えられる。一方、鉄は、0.1M 硫酸と 0.4M 硫酸で多く抽出された。しかし、0.1M 硫酸では、アルミニウム含量から比べると少なかった。0.4M 硫酸では、アルミニウムに比べ、鉄の抽出量が多かった。そこで、0.1M 硫酸と 0.4M 硫酸により抽出された画分中の窒素 1 分子当りのアルミニウム、鉄の存在比を調べたところ、0.1M 硫酸では圧倒的に、アルミニウムの存在比が高く、0.4M 硫酸では鉄の存在比が高かった(表 10)。このことは、薄い濃度でもアルミニウムは容易に遊離され、鉄は 0.4M の濃度で遊離される強い結合を持つことを示している。これは、腐植の成分であるフルボ酸との錯体の安定度が、鉄>アルミニウム>カルシウムの順であること<sup>29)</sup>と同じ結果となった。この有機態窒素とフルボ酸との関係については興味があり、これも今後の検討

課題としたい。今回の結果から、遊離された鉄、アルミニウムを考慮しないで考えられる土壤中構造モデルを図 15 に示した。

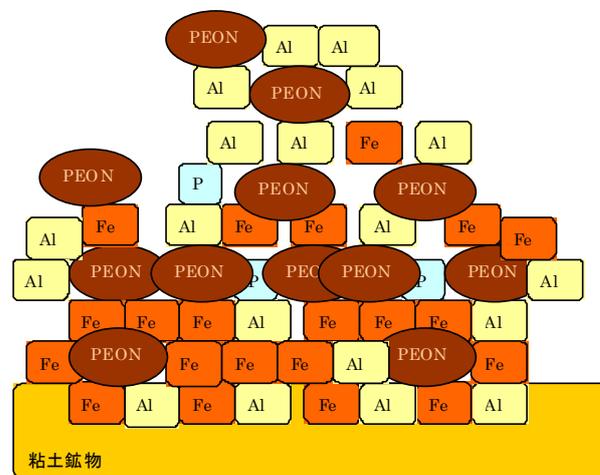


図 15 抽出法 A, B から考えられる PEON の存在形態

### 3 まとめ

逐次抽出法 A では、水、10%KCl による抽出以降の操作では、ほぼ PEON および PEON 様の有機態窒素が抽出された。PEON は、土壤コロイド中の鉄やアルミニウムと結合して比較的難分解性となり、無機化窒素の給源として存在していると考えられている<sup>33)</sup>。腐植を分解して有機態窒素を抽出する 1N 水酸化ナトリウム溶液で得られた有機態窒素の分子量も 8,000~9,000 のピークで得

表 10 抽出された窒素 1 分子当たりと結合していると考えられるアルミニウムおよび鉄の存在比

抽出方法		北上土壤	遠野土壤	西根土壤	つくば土壤	大里土壤
アルミニウム/窒素水	水	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
	10%塩化カリ	2.6	3.9	2.8	2.2	40.0
	0.01M硫酸	14.6	1.8	0.4	0.9	38.8
	0.1M硫酸	<b>53.0</b>	<b>25.0</b>	<b>35.9</b>	<b>208.0</b>	<b>46.3</b>
	0.2M硫酸	29.2	25.5	24.4	21.6	90.1
	0.4M硫酸	11.7	5.8	8.5	12.4	15.5
鉄/窒素	水	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
	10%塩化カリ	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
	0.01M硫酸	0.1	0.0	0.0	0.0	0.6
	0.1M硫酸	31.2	14.1	29.0	25.3	56.4
	0.2M硫酸	3.5	2.0	1.9	0.4	52.9
	0.4M硫酸	<b>13.6</b>	<b>7.4</b>	<b>15.0</b>	<b>6.8</b>	<b>23.1</b>

られた部分が大部分であった。土壌の有機態窒素は主にタンパク質態であり<sup>86)</sup>、土壌タンパク質は、腐植物質の包接により難分解性化する<sup>100)</sup>、腐植物質と複合体を形成することにより分解抵抗性を持つことを示す証拠が得られている<sup>41), 89)</sup>。また、海洋中では、1-10kDaの比較的低分子の有機物が安定で、有機物の貯蔵庫の役割を果たしている可能性が指摘されている<sup>21)</sup>ことから土壌中の有機態窒素の1単位がPEONおよびPEON様の有機態窒素であると推察される。

逐次抽出を行うと、0.4M以上の硫酸で抽出した場合、酸によって有機態窒素も一部結合が切り離され、低分子の有機態窒素が抽出されるものと考えられる。つまり、アルミニウムと結合したタンパク様物質は、比較的易分解性の画分として存在し、鉄と結合したタンパク様物質は、難分解性の画分として存在していることが推察される。

逐次抽出法Bでは、(PEONおよびPEON様)有機態窒素と結合している主たる金属は、鉄とアルミニウムであることが示された。アルミニウムはPEON様物質と結合し、比較的溶解されやすい形態として、土壌粒子表面に存在し、鉄は難溶解性の画分に存在し、アルミニウムと同様にPEONと結合し、土壌粒子の内部に存在することが示された。ニンジンやハウレンソウのように、いくつかの作物で土壌中の有機態窒素を吸収する可能性が示されている<sup>53)</sup>。そこで、ハウレンソウが栽培期間中に利用できる形態の有機態窒素を開発した逐次抽出法によって検討し、窒素肥沃度を考慮した施肥管理につなげることが期待できる。

## 第5章 ハウレンソウの窒素吸収能特性とその栽培跡地土壌の窒素の形態

リン酸緩衝液で抽出されるタンパク様物質は、可給態窒素の推定法にも用いられている<sup>24)</sup>が、0.4M硫酸で抽出される有機態窒素も本質的に同一物質であると推察された<sup>33), 51)</sup>。したがって、リン酸緩衝液で抽出される窒素だけが可給態窒素、あるいは、作物が利用可能な有機態窒素とはいえない。第4章において、土壌中の窒素を逐次抽出する方法を開発し、土壌中に蓄積する有機態窒素の形態を分別し、各抽出液で抽出される有機態窒素は同一物質であることを確認した。

ハウレンソウが有機態窒素を利用する可能性があることは第2章、第3章において述べたが、どのような形態の

有機態窒素をハウレンソウが吸収できるのかは不明である。そこで、本章では、ハウレンソウとトウモロコシを用いてポット条件で栽培し、この栽培跡地土壌について上記の逐次抽出方法を適用し、ハウレンソウが利用している可能性のある窒素の形態を推察することを目的とした。

## 1 ハウレンソウの有機態窒素吸収能の検討

### (1) 材料および方法

#### ① 供試土壌

第4章に準じた5土壌を供試土壌とした(表7)。

#### ② 試験区の構成

土耕栽培では、ハウレンソウ、トウモロコシ(*Zea mays* L.)、無作付の試験区を設け、5反復で栽培を行った。水耕栽培では、ハウレンソウ、トウモロコシの試験区を設け、5反復で栽培を行った。ハウレンソウの品種はアランタ、トウモロコシの品種はスノーデント123を供試した。

トウモロコシは、有機物に対して反応がないこと<sup>95)</sup>、すなわち、トウモロコシの根圏土壌では、タンパク様窒素の濃度が減少しないこと<sup>3)</sup>から、トウモロコシを、対照作物とした。

#### ③ 栽培方法

土耕栽培(ポット栽培)では、窒素が溶脱しないよう、有底のポット(高さ13cm×内径9cm、容積532ml)に土壌を400ml充填した。水は、最大容水量の60%を維持するように1日置きに重さを量って補給した。水耕栽培のハウレンソウとトウモロコシについては、あらかじめ、バーミキュライト上で14日間発芽させた後、水耕栽培用のベットに移植した。水耕栽培用の溶液は、硫酸アンモニウム142.9g/L、硝酸カリウム36.1g/L、硝酸カルシウム29.3g/L、硫酸マグネシウム111.98g/L、硫酸カリウム31.3g/L、リン酸カリウム191.5g/L、塩化カルシウム253.9g/L、硫酸マンガン1g/L、ホウ酸3g/L、硫酸銅0.1g/L、硫酸亜鉛0.2g/L、エチレンジアミン四酢酸鉄7.69g/Lを1,000倍に薄めて灌水した。水耕栽培の期間中は、2日置きに水耕溶液のpHを測定し、pHの調節をした。水温は、20℃前後であった。2003年9月18日から2003年11月3日の46日間栽培した。

#### ④ 試料の分析方法

地上部は、株元から切り取り、速やかに風乾した(50℃, 48時間)。

導管液の採取<sup>48)</sup>は、水耕栽培と遠野土壌、西根土壌で栽培したハウレンソウ、トウモロコシの根元を各試験区5個体、収穫時に切り取り、切り口を80%エタノールで消毒したあと、消毒した脱脂綿を切り口に於て、6時間、導

管液を採取した。採取後、試験区ごとに脱脂綿を一つにまとめ、この脱脂綿を 0.5ml の 1/15M リン酸緩衝液で溶かし、分子篩 HPLC にて導管液に含まれる物質の分子量分布を 280nm における吸光度で調べた。

地上部の窒素吸収量、土壌の無機態窒素は第 2 章, 1, (6)に準じた。

0.4M 硫酸で抽出した土壌中の有機態窒素は、栽培前の土壌 5g に 0.4M 硫酸 50ml を加えて 1 時間振とうしたのち、ろ紙 (No.5B) でろ過し、メンブランフィルター (0.45 μm) に通したものを分析試料とした。この分析試料を分子篩 HPLC にて物質の分子量分布を 280nm における吸光度で調べた。本試験の分子篩 HPLC は、カラム: Shimpack diol 150 (排除限界分子量 10<sup>5</sup>, 溶出限界分子量 5×10<sup>3</sup>) (Shimadzu.co.ltd), 移動相: 50mM リン酸緩衝液 (pH7.0 に調整した 0.3M 塩化ナトリウム溶液を含む), 検出器は紫外分光光度計を用い、280nm の吸光度で測定した。

土壌中の全窒素は乾式燃焼法<sup>14)</sup>で定量した。

(2) 結果および考察

① 生育および窒素吸収量

表 11 にハウレンソウ、トウモロコシの乾物重、窒素濃度、窒素吸収量を示す。トウモロコシの窒素吸収量は、大里土壌<つくば土壌<遠野土壌<北上土壌<西根土壌の順に増加した。一方ハウレンソウの窒素吸収量は、大里土壌<つくば土壌<西根土壌<北上土壌<遠野土壌の順に増加した。

図 16 に播種前の土壌中の無機態窒素含量と乾土 1kg 当りの作物体窒素吸収量との関係を示す。これは、ポット当りの窒素吸収量とポット当りの乾土重から算出したものである。播種前の無機態窒素含量の順に表記すると、大里土壌<つくば土壌<遠野土壌<北上土壌<西根土壌の順に多くなり、トウモロコシではこの順に窒素吸収量が増加した。また、この時の無機態窒素含量とトウモロコシの窒素吸収量との間に高い相関が認められた (r<sup>2</sup>=0.99)。一方、ハウレンソウについては、大里土壌<つくば土壌<西根土壌<北上土壌<遠野土壌の順に窒素吸収量が増加し、播種前の土壌中の無機態窒素含量とハウレンソウの窒素吸収量との間に高い相関は認められず (r<sup>2</sup>=0.47)、ハウレンソウの窒素吸収量は、土壌中の無機態窒素量に対応していなかった。

表 11 試料採取時の地上部窒素濃度、乾物重、窒素吸収量

	ハウレンソウ			トウモロコシ		
	窒素濃度 <sup>※1</sup> (%)	乾物重 (g)	吸収量 (mg/株)	窒素濃度 (%)	乾物重 (g)	吸収量 (mg/株)
北上	2.5 ± 0.17	0.8 ± 0.05	20.1 ± 0.5	1.7 ± 0.19	1.4 ± 0.16	23.1 ± 0.8
遠野	4.2 ± 0.10	0.6 ± 0.03	25.7 ± 0.9	1.1 ± 0.04	2.1 ± 0.06	22.5 ± 1.1
西根	4.9 ± 0.12	0.3 ± 0.03	16.3 ± 1.0	1.8 ± 0.14	1.7 ± 0.16	29.4 ± 2.4
つくば	1.8 ± 0.07	0.6 ± 0.06	10.3 ± 0.6	1.3 ± 0.24	0.9 ± 0.07	12.3 ± 1.6
大里	2.1 ± 0.12	0.4 ± 0.01	7.8 ± 0.6	0.8 ± 0.02	0.9 ± 0.07	6.6 ± 0.4

※1 平均±標準誤差 (n=5)

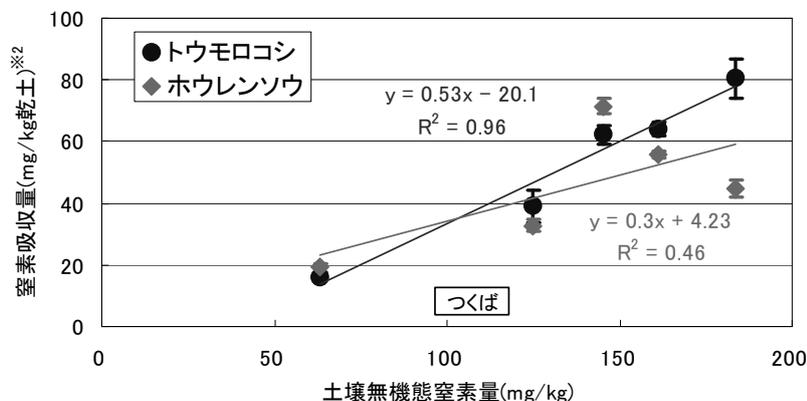


図 16 作物体窒素吸収量と作付前土壌中無機態窒素量との関係

※1 エラーバーは標準誤差 (n=5)

※2 窒素吸収量 (mg/kg 乾土) は、窒素吸収量 (mg/株) から算出した

## ② 導管液に含まれる物質分子量

遠野土壤(図 17 A)と西根土壤(図 17 B)で栽培したホウレンソウとトウモロコシの導管液, 水耕で栽培したホウレンソウの導管液, 及び, 土壤の 0.4M 硫酸抽出液の結果を図 17 に示す. この 2 土壤は, 土壤中の無機態窒素量に対してトウモロコシの窒素吸収量以上にホウレンソウの窒素吸収量が多かった遠野土壤と土壤中の無機態窒素に対してトウモロコシの窒素吸収量よりホウレンソウの窒素吸収量が低い西根土壤であり, 作物の吸収能について顕著な違いを検証するため選定した. ホウレンソウの導管液には, 保持時間 8.7 分, すなわち, 0.4M 硫酸抽出液中に検出された推定分子量 8,000~9,000 の窒素(以下, 0.4M 硫酸抽出窒素)と重なる同じ位置にピークが検出された. 一方, トウモロコシの導管液には, 0.4M 硫酸抽出窒素と一致するピークは確認できなかった. また, 無機養分のみを含む水耕で生育したホウレンソウの導管液(図 17)には, 0.4M 硫酸抽出窒素と一致す

るピークは確認できなかった.

両作物の導管液を分子篩 HPLC 分析し, 分子量分布を検討した. もし, 有機態窒素が直接吸収されるとすると, 導管液中の吸収した有機態窒素の一部あるいは分解・修飾された有機態窒素の痕跡が導管液中に存在すると考えられる. このことは, 有機態窒素の吸収が跡地土壤の分析結果と併せて, ホウレンソウが有機態窒素を吸収できる可能性を示すものと考えられた.

トウモロコシの窒素吸収量と播種前の土壤に存在する無機態窒素含量との間には高い正の相関が認められたが, ホウレンソウの窒素吸収量と無機態窒素含量の間には高い正の相関が認められなかった. 栽培期間中に無機化する窒素量については, 播種前の土壤でも逐次抽出を行い, 可給態窒素量の推定法として用いられているリン酸緩衝液で抽出した窒素量を調べたが, ホウレンソウの窒素吸収量と正の相関が認められなかった(データ省略).

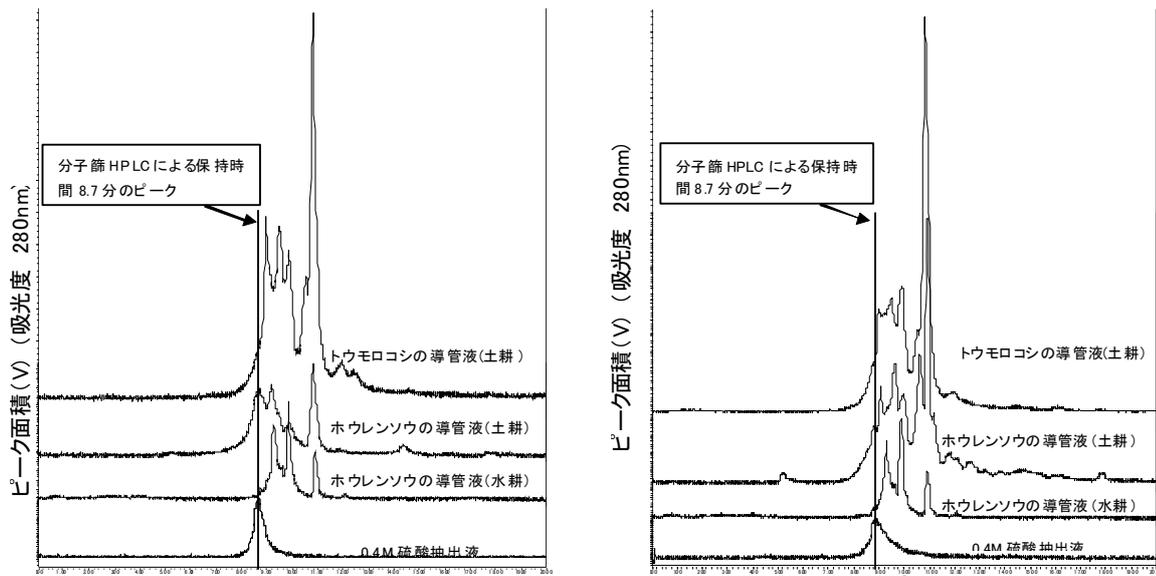


図 17 無肥料で栽培したホウレンソウとトウモロコシの導管液, 水耕で栽培したホウレンソウの導管液, 及び土壤を 0.4M 硫酸で抽出した抽出液の分子篩 HPLC カラムクロマトグラム(検出波長 280nm)  
A: 遠野土壤 B: 西根土壤

導管液は, 根から葉への一方向を基本とし, 循環しない<sup>84)</sup>と考えられ, 導管液は作物の吸収したものの一部を反映している. そこで, 地際の茎を切断し, 導管液を採取し, それを分析することによって根から吸収された物質を間接的, あるいは, 直接的に知ることができる. その結果, ホウレンソウの導管液には, 土壤の 0.4M 硫酸抽出窒素と重なる同じ位置にピークが検出

されたが, トウモロコシの導管液には, 0.4M 硫酸抽出窒素と一致するピークは確認できなかった. また, 無機養分のみを含む水耕で栽培されたホウレンソウの導管液に 0.4M 硫酸抽出窒素と一致するピークが検出されなかった. 遠野土壤, 西根土壤ともにピークの大きさに違いはあるものの, 土壤の 0.4M 硫酸抽出窒素と重なる同じ保持時間にピークが検出されたことは, この物質

がハウレンソウの体内で代謝生成される物質ではないことを示し、土壌中のタンパク様窒素をハウレンソウが吸収し、その一部が導管液中に漏出したものとするのが妥当である<sup>48)</sup>。ペプチドやタンパク質等の高分子物質が導管液により根から地上部へ移動することに関しては、Sato, et al.<sup>82), 83)</sup>によってすでに報告されている。したがって、ハウレンソウの導管液中で抽出されたタンパク様物質が根から地上部へ移動していたと考えられた。このことから、ハウレンソウは、土壌中の有機態窒素を吸収できる能力があることを強く示唆した。また、トウモロコシは、この有機態窒素を吸収できる能力が低いことを示した。

なお、有機態窒素量は土壌中で同じであっても結合されている土壌粘土鉱物の違いによって抽出される有機態窒素量が異なる<sup>73)</sup>。したがって、この2土壌のピーク強度が異なるのは、非アロフェン質土壌(2:1型鉱物)とアロフェン質土壌(非結晶体)の違いにより、0.4M硫酸抽出液で抽出される有機態窒素量が異なることによると考えられた。

## 2 逐次抽出による栽培跡地土壌の窒素形態

### (1) 材料および方法

第5章、1、(1)、②の栽培試験でハウレンソウとトウモロコシの窒素吸収量の違いが現れた遠野土壌と西根土壌の2点について検討した。

#### ① 土壌採取方法

ポット調製から栽培までの46日間無作付で通した土壌、およびハウレンソウ、トウモロコシを栽培した後の土壌を用いた。土壌は根がまわりきったポットから取り出し、根をほぐしながら土壌を採取し、よく攪拌した後、風乾・粉碎した。

#### ② 土壌窒素の逐次抽出

栽培跡地土壌の窒素の形態については、抽出液の全窒素を微量全窒素分析装置(TN-100, 三菱化学(株))で測定した。逐次抽出方法は第4章、1、(1)、②の抽出実験Aを用いた。

### (2) 結果および考察

表12に逐次抽出による跡地土壌の窒素形態と作物体窒素吸収量を示した。遠野土壌では、ハウレンソウの窒素吸収量  $71 \pm 2.5 \text{mg/kg}$  に対してトウモロコシの窒素吸収量が  $62 \pm 3.1 \text{mg/kg}$  であった。また、水抽出、10%塩化カリウム溶液抽出の無機態窒素画分でハウレンソウを作付した土壌(以下、ハウレンソウ土壌)、トウモロコシを作付けした土壌(以下、トウモロコシ土壌)では有意な差が認められなかった。しかし、ハウレンソウ土壌の0.4M硫酸で抽出された窒素に関しては、無作付、トウモロコシ土壌のそれよりも有意に減少していた。一方、西根土壌では、ハウレンソウの窒素吸収量  $45 \pm 2.7 \text{mg/kg}$  に対してトウモロコシの窒素吸収量が  $80 \pm 6.5 \text{mg/kg}$  であった。トウモロコシ土壌の窒素の形態に関しては、ハウレンソウ土壌より、水抽出の無機態窒素画分が有意に少なかった。その他の画分ではトウモロコシ土壌、ハウレンソウ土壌との間に有意な差が認められなかった。しかし、リン酸緩衝液で抽出された窒素は、無作付土壌に比べてトウモロコシ土壌、ハウレンソウ土壌ともに増加した。

可給態窒素の給源となるタンパク様物質は、その全てが有機・無機膠質物と結合しているわけではなく、ある画分は遊離した状態、あるいは非常に結合の弱い状態で存在していることが考えられている<sup>33)</sup>。従って、栽培期間中に、有機化、無機化が行われるとしても、同じ条件で栽培した場合、利用される窒素が作物によって異なると思われた。

表12 各抽出液で抽出された全窒素量(mg/kg)及び作物体窒素吸収量(mg/kg)

	遠野土壌 <sup>※1</sup>			西根土壌 <sup>※2</sup>		
	無作付 <sup>※3</sup>	ハウレンソウ	トウモロコシ	無作付	ハウレンソウ	トウモロコシ
水	129 ± 9.8 a <sup>※4</sup>	48 ± 5.8 b	50 ± 4.4 b	148 ± 15.0 a	96 ± 1.5 c	56 ± 0.2 b
抽出	217 ± 14.2 a	29 ± 0.6 b	29 ± 0.4 b	31 ± 7.1 b	32 ± 1.5 b	26 ± 0.9 b
方	43 ± 16.9 a	90 ± 8.1 b	42 ± 0.2 a	17 ± 0.9 c	53 ± 2.9 a	48 ± 2.4 a
法	54 ± 11.2 a	70 ± 3.8 a	64 ± 0.5 a	26 ± 13.9 a	76 ± 6.3 b	77 ± 0.6 b
0.4M硫酸	302 ± 18.3 a	212 ± 14.5 b	269 ± 15.7 a	282 ± 22.5 a	267 ± 15.2 a	229 ± 12.5 a
1N水酸化ナトリウム	4330 ± 61.5 a	5081 ± 22.3 b	4415 ± 102 a	4112 ± 39.2 a	4478 ± 84.3 a	4279 ± 78.9 a
窒素吸収量		71 ± 2.5	62 ± 3.1		45 ± 2.7	80 ± 6.5

※1 遠野土壌:ハウレンソウの窒素吸収量( $71 \pm 2.5 \text{mg/kg}$ )がトウモロコシの窒素吸収量( $62 \pm 3.1 \text{mg/kg}$ )より多い土壌

※2 西根土壌:ハウレンソウの窒素吸収量( $45 \pm 2.7 \text{mg/kg}$ )がトウモロコシの窒素吸収量( $80 \pm 6.5 \text{mg/kg}$ )より少ない土壌

※3 平均値±標準誤差(n=5)

※4 同行で異なる文字は、Tukey法による多重分析、1%有意差あり

遠野土壌のハウレンソウ土壌では、0.4M 硫酸で抽出された窒素が無作付土壌、トウモロコシ土壌に比べて有意に減少していた。一方、リン酸緩衝液で抽出される窒素は、無作付土壌に比べてトウモロコシ土壌、ハウレンソウ土壌ともに増加していた。この増加は、脱落した根などの有機物によるとも考えられる。しかし、分析試料は、風乾し、2mm の篩にかけた後、攪拌して試料を採取しているので根が混入したとは考えにくい。よって、有機態窒素は、随時、結合の強いところから弱いところへと形態を変化するので、リン酸緩衝液で抽出された形態の窒素は、土壌中で最も安定した形で存在すると考えられた。なぜなら、リン酸緩衝液により抽出される有機態窒素は、土壌微生物によって無機化・有機化が繰り返される中で有機物質材施用の有無によらず、単一なものとなることが明らかにされているからである<sup>71)</sup>。リン酸緩衝液や酢酸などの0.4M 硫酸に比べて比較的無機物との結合の弱い形態の窒素が抽出される部分に窒素形態が移行した可能性もあるが、0.4M 硫酸で抽出された窒素を利用してハウレンソウは生育している可能性も示唆された。

また、ハウレンソウの吸収量が少なかった西根土壌の0.4M 硫酸で抽出された窒素画分も、無作付土壌に比べ、ハウレンソウ土壌、トウモロコシ土壌の窒素量が少ない傾向があった(表 12)。これは、栽培期間中に0.4M 硫酸で抽出された窒素をハウレンソウとトウモロコシが利用していると考えられた。ただし、トウモロコシの導管液では0.4M 硫酸抽出窒素と同じ保持時間にピークが認められなかったので、直接吸収利用されているとは考えにくい。一方、ハウレンソウの導管液では、遠野土壌と同様に0.4M 硫酸抽出窒素と同じ保持時間にピークが認められていたので、0.4M 硫酸で抽出された窒素の一部が直接的に吸収利用されている可能性が高い。この実験では量的な把握を行っていないが、ハウレンソウの生育を無機態窒素量だけで説明できない理由として、0.4M 硫酸で抽出された窒素がハウレンソウの生育に影響を及ぼす可能性が考えられた。

根から分泌する有機酸は、植物の生育や環境ストレスに関与しており、鉄やアルミニウムと結合した有機態窒素を溶解する<sup>1), 2), 18), 19)</sup>。また、タンパク様物質を土壌中で保持している可能性の高い金属は、鉄とアルミニウムであるが、畑土壌では、アルミニウムの寄与が非常に大きく、鉄はより難溶解性のタンパク様物質との結合が示唆されている<sup>33)</sup>。小田島ら<sup>42)</sup>は、タンパク様物質と有機・無機膠質物との結合度合いは、0.4M

硫酸が強く、次いでリン酸緩衝液、1M 酢酸の順で比較的均質な物質を遊離させていることを示唆した。これらの報告と本試験で得られた結果から以下のことが推察された。すなわち、ハウレンソウでは根から分泌される有機酸によって、鉄やアルミニウムと結合していた有機態窒素を溶解し、有機態窒素をそのまま吸収する可能性があった。さらに、畑土壌中の窒素形態は、易分解性の有機態窒素は大部分がアルミニウムと結合しており、また、さらに、難溶解性の有機態窒素は大部分が鉄と結合しており<sup>33)</sup>、ハウレンソウは、この難溶解性の有機態窒素も吸収していると考えられる。すなわち、ハウレンソウは、無機態窒素のみならず、有機態窒素まで様々な形態の窒素を吸収していると考えられる。一方、トウモロコシにおいても根有機酸を分泌すると思われるが、そのキレート能力が少ないだけでなく、溶解した有機態窒素を吸収できる能力も少ないとも考えられる。なぜなら、ハウレンソウよりトウモロコシの窒素吸収量が多かった西根土壌では、トウモロコシを栽培した跡地土壌の逐次抽出の結果、水で抽出された窒素を多く吸収利用していたことを示しているからである(表 12)。

### 3 まとめ

ハウレンソウが0.4M 硫酸で抽出された窒素を溶解・吸収できるという直接的な証拠については現在まだ提示できていないが、ハウレンソウ、トウモロコシの2つの作物間で吸収能力が異なると思われた。また、本試験では、有機態窒素の吸収量について量的な把握が検討できなかった。なぜなら、①導管液が定量的に漏出する保証がない、②導管液の漏出量は、作物の生育状況によって異なるだけでなく、漏出量の予測が不可能である、③吸収したタンパク様窒素が定量的に分解、あるいは再合成される保証がないからである。直接的な証拠を示す無菌条件下での内容の実験なども含めて、今後の検討課題としたい。

## 第6章 “雨よけハウレンソウ”に適した 土壌窒素供給量の評価法の提案

第5章においてハウレンソウの吸収窒素源は、中性リン酸緩衝液抽出画分よりも難溶解性の0.4M 硫酸抽出画分にまで及ぶことを確認したことから、可給態窒素の評価法においても、0.4M 硫酸抽出法の適用を考慮する必要があった。一方で、普及センターでの分

析を考慮すれば、より簡易な評価法が求められており、リン酸緩衝液抽出法においても、抽出液の全窒素を測定するのではなく、比較的簡易に取り扱うことのできる抽出液の吸光度の測定が採用されている。そこで、本研究では簡易な可給態窒素量の推定を行う目的で、岩手県内の主要なハウレンソウ産地から採取した土壌を用いて、リン酸緩衝液抽出法との比較をもとに 0.4 M 硫酸抽出溶液の紫外吸光度法の妥当性を検証した。また、現地栽培農家の圃場で窒素施用を行わずにハウレンソウを栽培し、作付け前に行った 0.4 M 硫酸抽出法による窒素供給量の推定とハウレンソウの窒素吸収量との関係を検討した。更に、0.4 M 硫酸抽出法による肥沃度の異なる圃場において慣行栽培を行い、ハウレンソウの生育と品質に及ぼす影響を検討し、“雨よけハウレンソウ”の施肥管理基準を策定するための土壌肥沃度の評価法を検証した。

## 1 0.4 M 硫酸で抽出した溶液の吸光度法(UV)による土壌の窒素肥沃度の簡易推定

### (1) 材料および方法

#### ① 供試土壌

岩手県の 32 地点からハウスでハウレンソウ栽培した跡地土壌(深さ 2~20 cm)を採取し供試土壌とした。その内訳は、黒ボク土 25 点、グライ台地土 1 点、黄色土 1 点、褐色低地土 1 点、灰色低地土 4 点であった。それぞれの採取地点では、岩手県の施肥基準に基づいた慣行栽培が行われており、“雨よけハウレンソウ”栽培を行った。その耕種概要は、3 月から 11 月まで 4~5 作のハウレンソウを栽培し、1 年に 1 回土づくり資材として、牛ふん堆肥の場合 4t/10a、鶏ふん堆肥の場合 1.2t/10a 施用する。施肥は化学肥料で行い、1 作目に、窒素を 9kg/10a、リン酸を 13kg/10a、カリを 9kg/10a 施用した。2 作目には、窒素、リン酸、カリをそれぞれ 7kg/10a、3 作目に窒素、リン酸、カリをそれぞれ 4kg/10a 施用し、4 作目以降は無施用とした。

#### ② 抽出溶液の吸光度による窒素含量の推定

リン酸緩衝液による抽出法<sup>14)</sup>は、上記 32 地点の風乾細土(2 mm 篩)5 g に 1/15 M リン酸緩衝液 50 ml 加えて 1 時間振とうした後、ろ過し、ろ液を 20 倍に希釈し、その希釈液を波長 280nm の吸光度で測定した。一方、このろ液をフィルター(0.45  $\mu$ m, Advantec 製)に通したものの全窒素量を全窒素分析計(TN-100 三菱化学(株))で測定した。

0.4 M 硫酸による窒素の抽出<sup>51)</sup>は、風乾細土(2 mm

篩)5 g に 0.4 M 硫酸溶液 50 ml を加えて 1 時間振とうした後ろ過し、ろ液を 100 倍に希釈した。その希釈液を波長 280 nm の吸光度で測定した。一方、このろ液をフィルター(0.45  $\mu$ m, Advantec 製)に通したものの全窒素量を全窒素分析計(TN-100 三菱化学(株))で測定した。

### (2) 結果および考察

図 18 にリン酸緩衝液および 0.4 M 硫酸溶液で抽出した溶液中の全窒素量と 280 nm の吸光度で示す値との関係を示す。リン酸緩衝液で抽出される有機態窒素は、無機化窒素の給源と考えられており、土壌型や土地利用形態の違いによらず、アミノ酸組成、C/N 比および分子量分布が類似しており、比較的均質な窒素化合物であった<sup>54)</sup>。また、0.4M 硫酸で抽出される有機態窒素もリン酸緩衝液抽出有機態窒素と同様な特性を示すことが報告された<sup>51)</sup>。したがって、0.4 M 硫酸による抽出法もリン酸抽出と同様に 280 nm による吸収で検出が可能と思われた。図 18 に示すように 0.4 M 硫酸による抽出液の全窒素量と 280nm の吸光度の間には、0.1% 水準で有意な正の関係が認められた( $r^2=0.84$ )。この 0.4 M 硫酸で抽出された有機態窒素量は、1/15 M リン酸緩衝液で抽出される有機態窒素の 2~6 倍の値を示した。また、リン酸緩衝液抽出法よりも回帰直線は高い値を示し、広範な肥沃度の土壌に対応できることがうかがわれた。

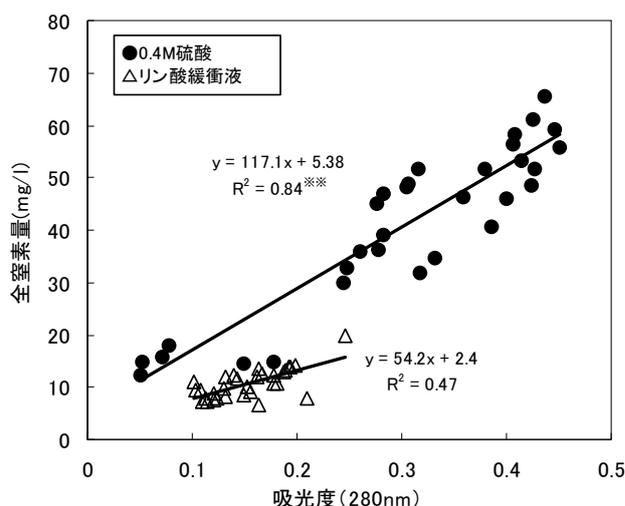


図 18 0.4 M 硫酸およびリン酸緩衝液で抽出した溶液の全窒素量とその吸光度(280 nm)

\*\*\*は、1%水準で有意を表す

一方、リン酸緩衝液抽出法では、抽出液中の全窒素量と 280 nm の吸光度との間に相関が認められたが、0.4 M 硫酸のそれよりも弱く、抽出される有機態窒素量の範囲も 0.4 M 硫酸抽出法より限定的であった。日置ら<sup>27)</sup>は淡色黒ボク土、厚層多腐植質黒ボク土、灰色低地土、黄色土で同様の検討を行い、厚層多腐植質黒ボク土では広い範囲の有機態窒素量が同一の吸光度になることを明らかにした。松本ら<sup>51)</sup>は供試したすべての土壌とリン酸緩衝液との間に 0.1%水準で有意な相関関係を認めたが、リン酸緩衝液よりも 0.4 M 硫酸の方が高い相関が認められたと報告した。藤井ら<sup>17)</sup>はグライ土で同様の検討を行い、肥沃度の高い土壌では 0.5 M 硫酸抽出法が適していることを認めた。これらの知見と本研究の結果を考慮すれば、黒ボク土を主体とする岩手県のハウレンソウ栽培においては、0.4 M 硫酸抽出法による窒素肥沃度の推定は、窒素肥沃度がより広範囲の土壌にも、適応できることが明らかになった。岩手県では耕作地の 8 割が黒ボク土であることから、黒ボク土で適合性が高く、簡易で、しかも迅速な土壌の窒素供給量の評価法が求められている。第 5 章において、ハウレンソウへ可給化される窒素が中性リン酸緩衝液抽出画分よりも更に難溶性の 0.4 M 硫酸抽出画分にも及ぶことを認めたことから、本試験では、ハウレンソウ栽培土壌における可給態窒素の推定法として 0.4 M 硫酸抽出法を採用した。このことから、0.4M 硫酸で抽出された土壌溶液の 100 倍希釈液の吸光度を、0.4M 硫酸で抽出された土壌溶液の全窒素量の回帰式(図 18)に代入し、土壌有機態窒素推定量を算

出した。数式は以下に示す。

$$Y=117.1x+5.38$$

x:0.4M 硫酸で抽出された土壌溶液の 100 倍希釈液の吸光度(280nm)

y:0.4M 硫酸で抽出された土壌溶液の全窒素推定量

## 2 ハウレンソウの窒素吸収量と 0.4M 硫酸による抽出窒素量との関係

ハウレンソウを年間 3 作栽培している現地農家でその栽培経過を観察した。また、同様の栽培を所内圃場でも実施した。無肥料栽培区を設け、ハウレンソウによる年間窒素吸収量と 0.4M 硫酸で抽出した栽培前の土壌中有機態窒素量を測定した。

### (1) 材料および方法

2003~2004 年まで、ハウレンソウを年間 3 作栽培している現地農家で栽培経過を観察した。また、同様の栽培を所内でも行った。各圃場の作付前の土壌条件を表 13 に示す。この一連の圃場試験では、無肥料栽培を行い、ハウレンソウによる年間窒素吸収量と栽培前の土壌中の有機態窒素量を上述の吸光度法(UV)によって測定した(リン酸緩衝液抽出法および 0.4 M 硫酸抽出法)。8 ヲ所の栽培前土壌養分は、無機態窒素 11~147mg/kg, 可給態リン酸 198~3014mg/kg, 交換性カリ 356~1416mg/kg であった。一般的なハウレンソウの年間吸収量は窒素 160g/m<sup>2</sup>, リン酸 80g/m<sup>2</sup>, カリ 600g/m<sup>2</sup> であり、2 年目の 1 部圃場(B 圃場)のカリ以外はハウレンソウが生育するためのリン酸、カリが十分あったと考えられる。

表 13 栽培試験を行った圃場の来歴と栽培前の土壌の化学性

圃場 <sup>2</sup>	場所	ハウレンソウ 作付年数	土壌型	0.4 M硫酸抽出 有機態窒素 推定量 (mg/kg)	無機態 窒素量 (mg/kg)	作付前可給態 リン酸 (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> mg/kg)	作付前交換性 カリ (K <sub>2</sub> O mg/kg)
A	遠野市	6	非アロフェン質黒ボク土	370	35	2,157	646
	遠野市	7	非アロフェン質黒ボク土	380	22	2,656	717
B	八幡平市	11	アロフェン質黒ボク土	430	11	389	356
C	八幡平市 西根平笠	10	アロフェン質黒ボク土	440	20	414	790
	北上市	7	非アロフェン質黒ボク土	520	63	222	928
D	北上市	6	非アロフェン質黒ボク土	540	65	198	1,175
E	八幡平市 西根帷子	8	アロフェン質黒ボク土	570	104	3,014	1,416
F	八幡平市 西根帷子	7	アロフェン質黒ボク土	620	147	2,924	1,175

<sup>2</sup> アルファベットがついた圃場は、実験 3 を実施した圃場

## ① 試験圃場

試験圃場は以下の4ヵ所、すなわち遠野市(農家圃場, 非アロフェン質黒ボク土), 北上市(所内, 非アロフェン質黒ボク土), 八幡平市西根平笠(農家圃場, アロフェン質黒ボク土), 八幡平市西根帷子(農家圃場, アロフェン質黒ボク土)のハウス栽培土壌で行った(表13).

## ② 供試品種

ハウレンソウ品種は, 各産地の推奨品種を用いた. その詳細を表14に示す. すなわち, 3~5月期には抽だ

いの遅い‘アクティブ’および‘イーハトーブ’, 6~8月期にかけては, 栽培期間が短くても収量性の高い‘プリウス’および‘サンライズ’である.

## ③ 試料の採取および分析

第2章, 1, (5)および(6)に準じた.

## ④ 土壌中の有機態窒素量

第6章, 1, (1), ②に準じ吸光度法(UV)によって測定した吸光度の値を第6章, 1で得られた回帰式に代入して算出した.

表14 栽培試験に用いたハウレンソウ品種と栽培経過

圃場 <sup>2</sup>	場所	実施年度	第1作			第2作			第3作		
			播種日	収穫日	品種	播種日	収穫日	品種	播種日	収穫日	品種
A	遠野市	2004	3月30日	5月7日	イーハトーブ	5月24日	6月28日	サンライズ	7月5日	8月11日	アクティブ
	遠野市	2003	4月6日	5月14日	イーハトーブ	5月24日	6月18日	サンライズ	7月1日	7月30日	アクティブ
B	八幡平市 西根平笠	2004	3月20日	5月13日	アクティブ	6月5日	7月6日	プリウス	7月18日	8月31日	サンライズ
C	八幡平市 西根平笠	2003	5月7日	6月12日	アクティブ	7月16日	8月19日	サンライズ	8月22日	9月18日	サンライズ
	北上市	2003	4月26日	5月24日	アクティブ	6月2日	7月7日	アクティブ	7月25日	8月20日	アクティブ
D	北上市	2004	4月24日	5月27日	アクティブ	6月5日	7月8日	アクティブ	8月1日	9月6日	アクティブ
E	八幡平市 西根帷子	2004	3月30日	5月6日	サンライズ	6月25日	7月27日	サンライズ	9月10日	10月13日	サンライズ
F	八幡平市 西根帷子	2003	4月20日	5月22日	アクティブ	6月20日	7月22日	サンライズ	8月17日	9月16日	サンライズ

<sup>2</sup> アルファベットがついた圃場は, 実験3を実施した圃場

## (2) 結果および考察

図19に現地農家圃場6ヵ所および所内圃場2ヵ所, 合わせて8ヵ所の圃場で行われたハウレンソウ栽培の窒素吸収量(年間3作の合計量)と, 栽培前に採取した土壌の0.4M硫酸溶液による抽出液の吸光度(280nm)による推定有機態窒素量との関係を示す. 調査圃場全体では両者に有意な相関は認められなかったものの, 0.4M硫酸抽出有機態窒素推定量の増加により, ハウレンソウの窒素吸収量も増加する傾向が認められた. 一方, 最も高い有機態窒素量(620mg/kg)であったF圃場において, ハウレンソウの窒素吸収量は減少する傾向が認められたことから, ハウレンソウの窒素吸収における0.4M硫酸抽出有機態窒素推定量の有効な範囲を確認するために, 窒素吸収効率を検討した結果を図19Bに示した. ハウレンソウの窒素吸収量(gN/m<sup>2</sup>)を栽培前の0.4M硫酸抽出有機態窒素推定量(gN/kg単位に換算)で除した値を窒素吸収効率係数とした場合, 0.4M硫酸抽出有機態窒素推定量の増加に伴って, 窒素吸収効率係数は増加するものの, 0.4M硫酸抽出

有機態窒素推定量が500mg/kg以上になると頭打ちとなり, さらに減少する傾向が認められた. すなわち, これらの結果は, 土壌の0.4M硫酸抽出有機態窒素推定量が一定範囲を超えた場合には, 必ずしもハウレンソウの窒素吸収量を増加させるものではないことを示唆していると考えられる.

一般に, 土壌肥沃度の向上を目的として堆肥などの有機物が施用されるが, その基準は明確ではない. 堆肥の連年施用によって, 可給態リン酸, 交換性カリなどの養分が集積される<sup>36)</sup>. 本研究においても, 供試した圃場では, 0.4M硫酸抽出有機態窒素推定量が高い圃場ほど交換性カリ含量も高い値を示していた(表13より,  $Y=3.64X+831$ ,  $r^2=0.68^*$ , Y:交換性カリ含量, X:0.4M硫酸抽出有機態窒素推定量). さらに, 供試土壌の中でも抽出された有機態窒素量が最も高いFおよびそれに続くE圃場では, 極めて多量の可給態リン酸と交換性カリが集積されていた. すなわち, F圃場においてハウレンソウの窒素吸収量ならびに窒素吸収効率係数が減少した要因の一つとして,

堆肥の連用による塩類集積により、ハウレンソウの生育が抑制された可能性も考えられる。一方、これまでに小田島ら<sup>43)</sup>は、ハウレンソウの生育には無機態窒素の存在量だけではなく、易分解性有機態窒素を考慮する必要があることを示し、0.4M 硫酸で抽出される窒素もハウレンソウに利用されることを示してきた。以上のことから、土壌の0.4M 硫酸抽出液の紫外部吸光度を測定する方法は、ハウレンソウ栽培における土壌窒素供給量およびハウレンソウの吸収窒素量を推定する方法の一つとして有効であると考えられる。ただし、堆肥の連用に伴って生じる塩類集積による生育抑制も考慮に入れてその施用を検討する必要があることが示唆された。

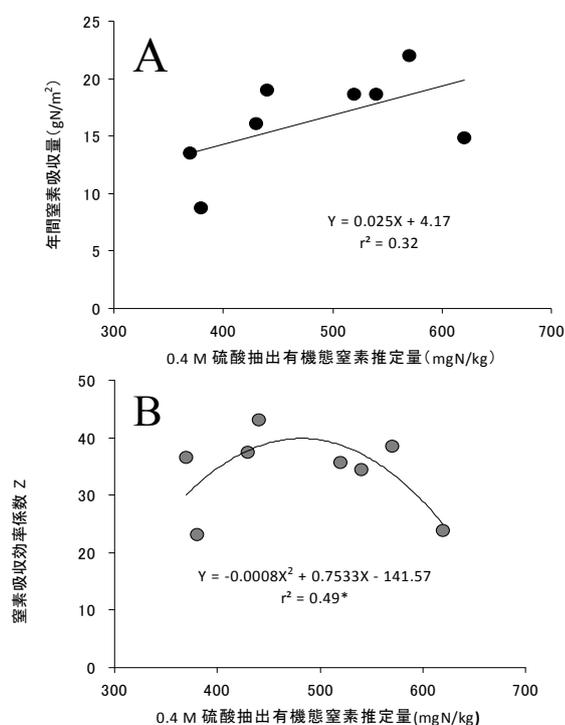


図19 無肥料で栽培したハウレンソウの年間窒素吸収量(3作合計)と土壌の0.4M 硫酸抽出有機態窒素推定量の関係(A)およびハウレンソウの窒素吸収効率係数と0.4M 硫酸抽出有機態窒素推定量との関係(B)

Z ホウレンソウの窒素吸収量(gN/m²)÷0.4 M 硫酸抽出有機態窒素推定量(mgN/kg)

\*は、5%水準で有意を表す

### 3 0.4M 硫酸による抽出法による窒素供給量に基づいたハウレンソウの適正施肥の提案

第6章、1および2で0.4M 硫酸抽出溶液によりハウレンソウ栽培前の土壌を抽出し、その溶液を波長280 nmでの吸光度を測定することで、ハウレンソウの窒素吸収量を予測できる可能性のあることを示した。一方、ハウレンソウ土壌では窒素が過剰に施用されているためハウレンソウ体内の硝酸濃度が増加しやすい。そこで、この方法を用いて土壌窒素供給量に応じて施肥量を調整し、体内硝酸濃度を低減できないか試みた。そのために、0.4M 硫酸法で予測した土壌中の有機態窒素量が異なる圃場を対象に、化学肥料施用区、化学肥料+堆肥の施用区および堆肥区の3処理区を設けて、栽培試験を行った。

#### (1) 材料および方法

第6章、2に用いた8カ所の圃場のうち、5カ所の現地農家および所内(北上市)、合わせて6カ所の圃場(A, B, C, D, E, F)で年間3作のハウレンソウを栽培した。試験区は、堆肥施用の有無や化学肥料の有無を評価するために化学肥料区、化学肥料+堆肥区、堆肥区の3処理を行った。化学肥料区は、化学肥料で施肥を行い、1作目に、窒素を9kg/10a、リン酸を13kg/10a、カリを9kg/10a施用した。2作目には、窒素、リン酸、カリをそれぞれ7kg/10a、3作目に窒素、リン酸、カリをそれぞれ4kg/10a施用した。化学肥料+堆肥区は、1作目作付前に堆肥4t/10a(現物)を施用し、化学肥料区と同等量の施肥を化学肥料で行った。堆肥区は、1作目作付前に堆肥4t/10a(現物)を施用した。その後の2作目、3作目では、無施用とした。堆肥の成分は、現物あたり水分66.7%、pH(H<sub>2</sub>O)8.6、C/N23.7、窒素1.1%、リン酸1.0%、カリ1.7%、石灰1.3%、苦土0.5%であった。

試料の採取及び分析は、第2章、1、(5)および(6)に準じた。

#### (2) 結果および考察

表15に表13で示したA~F圃場でハウレンソウを年間3作栽培し、その1作あたりの平均収量と体内硝酸濃度に基づき土壌の0.4M 硫酸抽出有機態窒素推定量および化学肥料と堆肥施用の影響を示す。

各圃場土壌の0.4M 硫酸抽出有機態窒素推定量と収量の関係には一定の傾向がみられず、有意差は認められなかった。しかし、施肥の違いと収量には有意差が認められた。化学肥料+堆肥区では他の2処理区に比べて高い収量となった。堆肥区と化学肥料区では有意差は認められなかったものの堆肥区で高い傾向を示した。これらの結果から、堆肥の施用はハウレンソウの収量向上に効果的であ

と考えられた。ハウレンソウの収量が堆肥の施用により化学肥料と同等以上であったことは、小田島ら<sup>44)</sup>と一致し、ハウレンソウ栽培における有機態窒素の重要性が示唆された。

ハウレンソウ中の硝酸濃度は 0.4M 硫酸抽出有機態窒素推定量の増加とともに上昇した。E 圃場および F 圃場では、他の区に比べてハウレンソウ中の硝酸濃度が高い値を示した。これらの結果は、0.4M 硫酸で抽出される有機態窒素量が高いほど無機化窒素量が多くなり、ハウレンソウの体内に蓄積する硝酸が増えたためと考えられる。

一方、堆肥区の硝酸含量は化学肥料区に比べて低い値を示した。また、化学肥料+堆肥区でも堆肥区よりもやや高くなるものの、化学肥料区よりも低下する傾向が認められた。これらの結果は、堆肥の施用により、土壌中の無機態窒素が有機化され、ハウレンソウに吸収される硝酸が化学肥料区に比べて減少したためと考えられる。

表15 ハウレンソウの収量と体内硝酸濃度(年間3作の平均)に及ぼす土壌の0.4M硫酸抽出有機態窒素推定量および化学肥料と堆肥施用の影響

処理区	収量 (kg/m <sup>2</sup> /作)	硝酸濃度 (mg/kg)
A圃場(370 <sup>z</sup> )	1.33 a <sup>x</sup>	1,858 a
B圃場(430)	1.90 a	2,259 a
C圃場(440)	1.76 a	1,270 a
D圃場(540)	1.78 a	3,317 a
E圃場(570)	1.40 a	3,720 b
F圃場(620)	1.67 a	3,985 b
化学肥料	1.37 a	3,280 a
化学肥料+堆肥	1.84 b	2,659 b
堆肥	1.71 a	2,266 b

二元配置の分散分析 <sup>y</sup>		
圃場	ns	**
施肥	*	**
圃場×施肥	ns	ns

<sup>z</sup> 作付前土壌の0.4M硫酸抽出窒素量(mg N/kg)を示す  
<sup>y</sup> 圃場と施肥の2要因で二元配置の分散分析を行い、5%水準で有意差があった場合に Tukey 法による多重検定を行った  
 \*, \*\* はそれぞれ5%, 1%水準で有意差があることを示し、nsは有意差がないことを示す  
<sup>x</sup> 異なるアルファベット間に Tukey 法による5%水準の有意差があることを示す

図20に土壌の0.4M硫酸抽出有機態窒素推定量とハウレンソウ中の硝酸濃度との関係を示す。土壌の0.4M硫酸抽出有機態窒素推定量の増加に伴っていずれの施肥処理においてもハウレンソウ中の硝酸濃度は増加する傾向が認められた。

化学肥料区のハウレンソウの硝酸濃度は、0.4M硫酸抽出有機態窒素推定量が540mg/kgのD圃場で3,000mg/kg以上となり、570, 620mg/kgのEおよびF圃場ではそれぞ

れ4,000mg/kg以上の高い値を示した。一般に、ハウレンソウの体内硝酸濃度として3,000mg/kgが一つの目安として出荷されており、これを数値目標にしている産地の事例もある<sup>60), 99)</sup>。これらの圃場においても、0.4M硫酸抽出有機態窒素推定量が500mg/kg以下であったA, BおよびC圃場と同様に、化学肥料+堆肥区および堆肥区では化学肥料区よりもハウレンソウの体内硝酸濃度は低下する傾向を示したが、3,000mg/kgを超える硝酸濃度となった。すなわち、0.4M硫酸抽出有機態窒素推定量が540mg/kg以上であった圃場では、堆肥施用による無機態窒素の有機化の効果よりも、肥沃度の向上による土壌からの窒素無機化量が大幅に増加したためではないかと推察された。そのため、堆肥区のハウレンソウの硝酸濃度が3,000mg/kgを超えるのがD圃場(0.4M硫酸抽出有機態窒素推定量が540mg/kg)であることから推察すると、0.4M硫酸抽出窒素量が500~550mg/kg以上の圃場では、成分品質を考慮すれば、化学肥料の施肥量および堆肥の施肥量を再検討する必要があると考えられる。以上のことから、単に窒素量だけではなく、塩類などの他養分の集積程度も反映していることも考えられるが、土壌の0.4M硫酸抽出液の紫外外部吸光度を測定する方法は、雨よけハウレンソウ栽培における化学肥料と堆肥の施用を検討する際の簡易な方法として有効であると考えられる。これらの知見は、1年間の多収を目指すために多肥傾向にある雨よけハウレンソウ土壌を見直す端緒となり、長期安定生産を行なうための土作りとして有効な技術になると考えられる。また、今後、雨よけハウレンソウ以外のハウス栽培作物にも適応できるような検討も必要である。

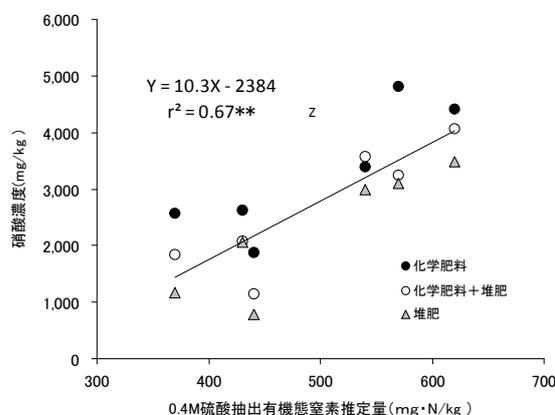


図20 化学肥料および堆肥を施用したハウレンソウ栽培における土壌の0.4M硫酸抽出有機態窒素推定量とハウレンソウ中の硝酸濃度(年間3作平均)の関係

<sup>z</sup> \*\*は、1%水準で有意を表す。

## 第7章 総合考察

ホウレンソウを対象に4年間、オガクズ牛ふん堆肥の連用試験を行い、年間2~4作のホウレンソウを作付けして、生育、窒素吸収反応に及ぼす影響について調査した。

その結果、堆肥区の草丈、葉幅、葉数は化学肥料区のを上回った。また、乾物収量、窒素吸収量も堆肥区が化学肥料区より多かった。各作付後の跡地土壌の無機態窒素含量は堆肥区が化学肥料区より低かった。さらに、ホウレンソウ中の全窒素に占める硝酸態窒素の比率は、化学肥料区に比べて堆肥区は極めて低い値を示した。溶脱した無機態窒素量および全窒素量は、化学肥料区より少ない。これらの結果は、堆肥を施用した場合、ホウレンソウの生育および窒素吸収量が栽培期間中の土壌中の無機態窒素量に対応していないことを示唆するものであった。

この結果は、これまでに報告された栽培試験結果を個々の作物ごとに考察すると、無機栄養説に該当しない事例<sup>48), 47), 58), 62), 63), 69), 72), 94), 95)</sup>と一致した。上記の事例から推察すると、無機態窒素以外の窒素を利用する可能性のある植物が存在する可能性が示唆される。以上から、有機態窒素の動態に関しても留意する必要があることが示唆された。

土壌中有機態窒素の測定法の一つに1/15M中性リン酸緩衝液で抽出する方法があり、我が国の土壌中可給態窒素の診断法として用いられている<sup>24), 25)</sup>。Matsumoto and Ae<sup>54)</sup>は、この測定法で得られる抽出物をPEON (Phosphate-buffer Extractable Organic Nitrogen)と定義した。PEONは、280nmに吸収をもち<sup>79)</sup>、タンパク質特有の呈色反応を示すなど、タンパク質としての性質を示す<sup>10)</sup>。また、HP-SECおよびHPLCに供試したところ、土壌の種類に関わらず常に単一のピークを示し、そのピーク面積とPEON量の間には極めて高い相関が認められた。このことから、PEONはイオンのにも分子量的にも均一な物質であると考えられた<sup>48), 50)</sup>。また、加水分解によるアミノ酸組成分析から、PEONの20~30%がアミノ酸由来の成分であり、その組成は微生物細胞壁の組成に類似しており、PEONは微生物由来の「タンパク様態窒素」であると考えられた<sup>26)</sup>。

本試験の土壌中PEON量は、化学肥料区で実験開始前よりも減少し、堆肥区では増加した。

土壌中PEON量がホウレンソウの生育および窒素吸収量に影響を及ぼしている可能性が示されたので、土壌中およびホウレンソウの導管液中のPEON定量を行った。

PEON定量は、ウエスタンブロッティング法とELISA法に

基づいたPEON定量法を用いた<sup>56)</sup>。PEONは、抗PEON Ig抗体を使ったウエスタンブロッティング法により14kDa以下の1本のバンドと高分子領域ではしご状の染色パターンが検出された。

Watanabe and Yoshikawa<sup>93)</sup>は、PEONは限外ろ過とサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によって、少なくとも分子量の異なる3つの画分からなることを報告した。Miyazawa and Murayama<sup>64)</sup>は、PEONを分取サイズ排除クロマトグラフィーによって11画分に分け、各画分をSECと疎水的相互作用クロマトグラフィー(HIC)によって分析し、画分ごとで疎水性が異なっており、PEONは均一な物質ではないと示唆した。このようにPEONは、異種の構成成分からなる物質群であることが報告されているが、土壌有機物中の加水分解されたアミノ酸構造と土壌微生物由来のアミノ酸構造は関係があり、土壌中の有機態窒素やアミノ酸は、微生物由来で作られると示唆された<sup>16)</sup>。また、土壌種類や分子量に関わらず中性リン酸緩衝液による抽出物のアミノ酸構造はほぼ均一であり、土壌微生物や腐植物質のアミノ酸構造と類似した<sup>93)</sup>ことから、PEONを構成する最小の成分は各画分を通じて共通であり、分子量の違いはその成分の重合度に依存すると予想される。以上から、均一な物質であると考えられているPEONが1本のバンドで検出されなかった現象は、ウエスタンブロッティング法の工程でPEONの結合・分解が行われたものと考えられる。

よって、抗PEON Ig抗体を用いることによりPEONを検出し、ELISA法に基づき、抗PEONウサギIg抗体を用いた精製PEON定量法を開発することができた。さらに、TNアナライザーで測定された土壌中の有機態窒素量と、ELISA法により検出されたPEON様抗原量の間に関係が認められた。すなわち、抗PEON抗体のPEON様抗原に対する有用性が確認され、土壌中の可給態窒素のひとつであると考えられるPEONの検出・定量が、本法によって簡便かつ迅速に行えることが示された。

肥料管理が異なる条件下で栽培したホウレンソウ導管液中のPEON様抗原の検出・定量を行った。その結果、水耕栽培したホウレンソウ導管液にPEON様抗原は認められず、土耕栽培したホウレンソウにはPEON様抗原が認められた。ホウレンソウ導管液中のPEON様抗原量は、化学肥料施用(土耕) < 化学肥料および堆肥2t混合施用(土耕) < 化学肥料および堆肥4t混合施用(土耕) < 化学肥料および堆肥8t混合施用(土耕)の順に多く検出された。以上の結果から、土壌中に普遍的にPEONが存在することを確認した。土耕栽培でも、無機物施用したホウレンソウ導管液より、有機物施用した導管液でPEON様抗原が多く

存在し、有機物施用量の増加に従って、導管液中の PEON 様抗原が増加した。すなわち、有機物施用によって土壤中 PEON が生成、増加し、ハウレンソウが PEON を窒素源として吸収する可能性が示された。ハウレンソウは、有機態窒素を利用できる植物であると報告された<sup>3)</sup>が、栽培条件がハウレンソウに与える影響は、その収量および窒素吸収量によって推察されてきた。

本研究の結果から、PEON 検出ウエスタンブロットティング法および ELISA 法によって、ハウレンソウが土壤中の有機態窒素を積極的に利用する可能性がより直接的に示唆され、施肥条件がハウレンソウに与える影響を、導管液中の PEON 量の差として表現できた。また、ハウレンソウ導管液では、精製 PEON と比較してアミノ酸および糖類の含有量は少なかったが、アミノ酸組成については、ハウレンソウ導管液と精製 PEON で大きな差は見られなかった<sup>28)</sup>報告から、ハウレンソウが PEON を直接吸収利用している可能性が強くなった。

一方、土壤中の有機態窒素を評価する方法は多数報告されており、PEON 以外の有機態窒素が PEON と異なる形態であるかどうかを確認し、ハウレンソウが利用できる窒素形態を把握するために逐次抽出を用いて窒素形態の分別を試みた。

本報告では、下記2つの逐次抽出(A, B)で検討し、窒素形態について検討した。

(A) 水、塩化カリウム溶液、酢酸、リン酸緩衝液、硫酸、水酸化ナトリウム溶液の順で逐次抽出を行った。

(B) 水、塩化カリウム溶液、0.01M 硫酸、0.1M 硫酸、0.2M 硫酸、0.4M 硫酸の順で逐次抽出を行った。

水抽出で硝酸態窒素、塩化カリウム溶液でアンモニア態窒素が抽出された。逐次抽出 A 法の酢酸、リン酸緩衝液、硫酸は有機態窒素を抽出した。また、これらの有機態窒素は、比較的均質な分子量である可能性が高いことが示された。水酸化ナトリウム溶液ではアンモニア態窒素と有機態窒素が抽出された。分子量は多様であったが、大部分は、逐次抽出 A に用いられた溶液と同様の分子量であった。強アルカリによって分解されたタンパク質がアンモニア態窒素となって抽出されたと考えられた。

逐次抽出 B 法の各抽出液で抽出した有機態窒素は、比較的均質な分子量である可能性が高いことが示された。そこで、これらが抽出される際に同時に抽出される元素を調べることにより、土壤中の可給態窒素の結合形態を推定する試みが行われた。伊藤・阿江<sup>33)</sup>は、0.4M 硫酸によって抽出される有機態窒素量は培養法による無機化窒素量と相関が高いことを示し、さらに有機態窒素の抽出量とアルミニ

ウムおよび鉄の抽出量に高い相関が認められることから、可給態窒素の給源となる有機態窒素は土壤中の鉄およびアルミニウムと結合して安定して存在していると指摘した。

また、有機態窒素が鉄やアルミニウムと結合している報告から、各抽出液中の鉄、アルミニウム量を測定した。その結果、アルミニウムと結合した有機態窒素は、比較的易分解性の画分として存在し、鉄と結合した有機態窒素は、難分解性の画分として存在していることが推察された。

逐次抽出法によって抽出される有機態窒素は PEON および PEON 様物質であったことから、本法を用いて、栽培跡地土壤の有機態窒素を評価した。ハウス土壤を用いて無肥料でハウレンソウとトウモロコシを栽培した。トウモロコシの窒素吸収量は、播種前の土壤中無機態窒素量に応じて増加したが、ハウレンソウの窒素吸収量は、それに対応していないことを示すものであった。ハウレンソウとトウモロコシの2つの作物間で吸収能は異なることが示された。

そこで、各作物の導管液を採取し、分子篩 HPLC で分子量分布を調べた。土耕栽培のハウレンソウの導管液中には、0.4M 硫酸で抽出される土壤中の有機態窒素と同じ保持時間のピークが検出された。この保持時間のピークは無機養分で栽培した水耕のハウレンソウでは検出されなかった。さらに、逐次抽出法を用いてトウモロコシとハウレンソウが利用している有機態窒素の形態を調査した。その結果、ハウレンソウの窒素吸収量がトウモロコシの窒素吸収量よりも多かった遠野土壤で無作付、トウモロコシ土壤に比べ、0.4M 硫酸の画分で抽出された窒素がハウレンソウ土壤で減少した。ハウレンソウの窒素吸収量がトウモロコシの窒素吸収量より少なかった西根土壤では、無作付、ハウレンソウ土壤、トウモロコシ土壤で 0.4M 硫酸の画分で抽出された窒素に有意な差が認められなかった。このことから、土壤の違いはあるが、ハウレンソウは土壤中の有機態窒素を吸収する可能性が示唆された。

作物の鉄型・アルミ型リン酸溶解機構には根分泌中の有機酸が多様な役割を担っていることが知られている。可給態窒素が土壤中のアルミニウムおよび鉄と結合していると考えれば、根分泌中の有機酸は可給態窒素の溶解にも関与しているのではないかと推察される。

Matsumoto ら<sup>55)</sup>は、数種類の有機酸による土壤中の有機態窒素の溶解能力を検討した。コハク酸、およびグルタミン酸では溶液濃度にかかわらず、有機態窒素はほとんど抽出されなかったのに対し、シュウ酸、マロン酸、酒石酸、クエン酸およびリンゴ酸は溶液濃度の上昇とともに抽出される有機態窒素量が増加した。さらに、供試した有機酸の中で最も多くの有機態窒素を抽出したクエン酸による有機

態窒素の抽出量とリン酸緩衝液抽出窒素量および培養法による無機化窒素量の間にはそれぞれきわめて高い相関が認められた。すなわち、有機酸によって抽出される有機態窒素は土壌の可給態窒素の重要な構成成分であり、根分泌中の有機酸が根圏における有機態窒素の無機化に重要な役割を果たしていることを示唆した。

ハウレンソウなどの根面に共生する細菌の中にシュードモナス・フローレンセスがあり、シデロフォア、フェナジン、ダイ・アセチル・フェログルシノールなどの抗生物質を産生し、土壌病原菌を抑える。シデロフォアは鉄キレーター的一种で鉄を効率良く取り込む働きを持つ。連作を重ねることで抗生物質が増加するため、この物質が鉄を取り込む際に有機態窒素が遊離され、ハウレンソウに吸収利用される可能性も考えられる。

ハウレンソウ栽培土壌における可給態窒素量の推定法として0.4M 硫酸抽出法を採用し、抽出液の280nmにおける吸光度と抽出窒素量との関係を検証したところ、両者には極めて高い正の相関が認められた。

この結果に基づき、土壌の0.4M 硫酸抽出液における吸光度(280nm)から求めた有機態窒素推定量を算出し、無肥料で栽培したハウレンソウ(年3作)の窒素吸収量との関係を検討した。その結果、土壌の有機態窒素推定量の増加に伴ってハウレンソウの窒素吸収量も増加する傾向が認められたが、土壌の有機態窒素推定量が540 mg/kg以上の圃場では、ハウレンソウの窒素吸収効率は低下する傾向が認められた。0.4M 硫酸抽出有機態窒素推定量が異なる圃場で化学肥料および堆肥を施用してハウレンソウを年間3作した場合、堆肥の施用により増収となり、硝酸濃度を低減する効果も認められた。一方、堆肥の施用によりハウレンソウ中の硝酸濃度は化学肥料区よりも低くはなるものの、0.4M 硫酸抽出有機態窒素推定量が540mg/kg以上の圃場では、3,000mg/kgを超える値となった。化学肥料および堆肥の施用量を判断する簡易な方法として0.4M 硫酸によって抽出される土壌有機態窒素量を280nmの吸光度によって測定する方法が有効であると考えられた。

以上のことから、ハウレンソウの生育、窒素吸収量は、土壌中の無機態窒素の存在量だけでなく、土壌中の0.4M 硫酸によって抽出される有機態窒素についても考慮する必要があることを示した。

ハウレンソウが利用吸収している可能性がある PEON と土壌中の PEON 評価法について検討してきたが、課題も残されている。1つは、PEON の構造や由来に関する情報が限られていることである。

甲斐ら<sup>38)</sup>は、D 体アミノ酸含量から、土壌中の有機態窒素

の20%~60%がペプチドグリカンなど細胞壁成分由来だと推定した。平田<sup>28)</sup>は、精製 PEON と植物導管液のアミノ酸組成が微生物細胞壁のアミノ酸組成とのクラスター分析により類似していることから、PEON が微生物細胞壁由来の成分を含むことを明らかにした。さらに、動物遺体由来の成分は検出されなかったことから、精製 PEON の約30%は微生物由来の易分解性成分と思われた微生物細胞壁由来の易分解性分と、難分解性腐植様コロイドからなる構造単位が、重合して PEON を形成していることを予測した。Knicker and Hatcher<sup>40)</sup>は、土壌や底質中などでタンパク質が難分解性化する構造として腐植物質によるタンパク質の encapsulation (包接)を提案し、Zang et al<sup>100)</sup>は、腐植物質の包接によるタンパク質の難分解性を支持した。PEON は多分散性であり、UV 領域から可視光領域にかけて減少する吸光スペクトルをもつこと<sup>7), 64)</sup>、負電荷を帯びており、分子量の大きい画分ほどC/N比が小さく窒素組成に占めるアミノ酸の割合が高いこと<sup>93)</sup>など、腐食物質がもつ性質と共通点が多いことから、PEON の構造に関する予測を指示した。しかし、酸加水分解されなかった精製 PEON の約70%の組成が不明であるなど、PEON の構造や由来に関する情報は限られており、この仮説を立証するには至っていない。PEON の構造や由来を明らかにすることで、植物による PEON の吸収利用機構や土壌中での生成過程について新しい知見が得られる。

もう1つは、植物による PEON の吸収利用機構の解明が必須である。ハウレンソウが PEON および PEON 様物質を吸収利用できる機構については推察の域を超えない。イネにおいて溶解したタンパク様窒素を細胞膜にある「エンドサイトシス(「飲作用」であり、巨大分子を取り込む作用であり、巨大分子を取り込む機能)」あるいは「トランスポーター(細胞膜にあり、特定の物質を透過させる機能)」によって直接取り込む<sup>68)</sup>ことや VA 菌根菌植物である *Hakea actites* と菌根のない植物である *Arabidopsis thaliana* の2種も他組織からの補助なく窒素源としてタンパク質を供給できることも示された<sup>74)</sup>が、今後の課題として残されている。解決すべき課題は多いが、「植物が有機態窒素を利用する」という仮説の立証は、作物栽培において化学肥料だけではなく、有機態窒素も考慮した土壌管理法を提案するきっかけとなる。

## 摘 要

岩手県では、過剰に排出される有機物の有効利用を前提とした適切な土壌管理法を提案する必要があった。本

研究では、①有機物施用条件下におけるハウレンソウの生育・収量反応および土壌から溶脱する硝酸態窒素のモニタリング、②ハウレンソウが吸収利用できる可給態窒素の実態把握、③ハウレンソウ栽培に適した土壌窒素の簡易評価法の開発、④有機物施用条件下における適切な窒素施用量の提案を行った。

岩手県で行われている「雨よけハウレンソウ」栽培を対象に、有機物としてオガクズ牛ふん堆肥の連用試験を4年間行った。ハウレンソウを年間2~4作栽培し、生育および窒素吸収反応を調査した。化学肥料区には、年間で窒素を硝安で16~20g/m<sup>2</sup>、リン酸を重過石で20~24g/m<sup>2</sup>、カリを塩加カリで16~20g/m<sup>2</sup>、施肥した。堆肥区では、1作目播種の2週間前にオガクズ牛ふん堆肥を45gN/m<sup>2</sup>施用し、2作目以降は無施用とした。その結果、堆肥区の草丈、葉幅、葉数は化学肥料区のそれを上回った。また、堆肥区の乾物収量、窒素吸収量は化学肥料区より倍以上多かった。作付跡地土壌の無機態窒素含量は堆肥区が化学肥料区より低かった。この傾向は4年間同じであり、堆肥区における土壌の無機態窒素濃度は、化学肥料区よりも少なく推移していた。さらに、ハウレンソウの体内における硝酸態窒素濃度は化学肥料区よりも堆肥区で極めて少なかった。すなわち、化学肥料区の土壌中の硝酸態窒素濃度は高く推移し、ハウレンソウ体内の硝酸態窒素濃度もそれに比例して高かった。地下へ溶脱した無機態窒素量および全窒素量は、堆肥区では化学肥料区より少なかった。これらの結果は、堆肥を施用した場合、栽培期間中の堆肥区の土壌の無機態窒素量が化学肥料区よりも少なく経過しているにもかかわらず、ハウレンソウの生育が旺盛となり、窒素吸収量も多いことを示している。すなわち、ハウレンソウの生育は土壌中の無機態窒素に対応していないことを示している。

土壌に施用された有機物にハウレンソウが反応することが明らかになったが、ハウレンソウが吸収できる有機態窒素として、最も有力な存在はPEONであると考えられた(PEONとは土壌をリン酸緩衝液で抽出したものであり、分子量が8,000でUV吸収能を持ち、タンパク質と同様な反応をする(Bradford法で陽性の反応))。PEONを土壌から抽出し、これをウサギに注射し、PEON抗体を作成し、土壌中のPEONの定量が可能であることを確かめた。また、ハウレンソウの導管液を採取し、この抗PEON抗体を用いてELISA法によるPEONの定量を試みた。堆肥栽培の導管液では抗PEON抗体とは高い反応が認められ、化学肥料区から採取した導管液では抗PEON抗体との反応は低かった。この結果は、ハウレンソウがPEONを直接吸収利用

する可能性が高いことを示している。さらに有機物施用土壌においては、無機態窒素だけでなく、PEON形態の窒素の動態を把握することによって、ハウレンソウの生育および窒素吸収量を説明できることを示唆している。

PEONがハウレンソウの生育に重要な役割を果たしているが、PEON以外の有機態窒素についても検討する必要がある。ハウレンソウが利用できる土壌窒素の形態を把握するために、逐次抽出法(A, B)を開発した。

①逐次抽出A法 水、10%塩化カリウム溶液、1M酢酸、1/15Mリン酸緩衝液、0.4M硫酸、1M水酸化ナトリウム溶液の順とした。

②逐次抽出B法 水、10%塩化カリウム溶液、0.01M硫酸、0.1M硫酸、0.2M硫酸、0.4M硫酸、0.5M硫酸の順とした。

水抽出では、硝酸態窒素が、塩化カリウム溶液でアンモニウム態窒素が検出された。次いで、逐次抽出A法の酢酸、リン酸緩衝液、硫酸では有機態窒素が抽出されたが、HP-SECによるとこれらの有機態窒素はPEONと同じ保持時間にピークが検出された。

逐次抽出B法における様々な硫酸濃度で抽出された有機態窒素は、どの抽出溶液においても比較的均質な分子量を持ち、それはPEONと同様なMW=8,000であった。また、この有機態窒素は鉄やアルミニウムと結合していることが明らかになった。すなわち、土壌有機物の窒素はPEONを1つの単位として、これが鉄やアルミニウムを介して、重層的な構造をつくりあげていると想像された。植物の根から分泌するクエン酸やハウレンソウからのシュウ酸などの有機酸によってこのPEONが溶解し、これをハウレンソウは直接吸収していると推察した。

逐次抽出法によって抽出される土壌有機態窒素はPEONあるいはPEON様物質であったことから、逐次抽出A法を用いて、栽培跡地土壌の有機態窒素を評価した。ハウス土壌を用いて無肥料でハウレンソウとトウモロコシを栽培した。各作物の導管液を採取し、HP-SECで分子量分布を調べた。土耕栽培のハウレンソウの導管液中には、0.4M硫酸で抽出される土壌中の有機態窒素と同じ保持時間のピークが検出された。無機養分で栽培した水耕のハウレンソウでは、この保持時間のピークは検出されなかった。さらに、逐次抽出法を用いてハウレンソウが利用している有機態窒素の形態を調査した。トウモロコシを栽培した土壌を対照にハウレンソウを栽培した土壌の逐次抽出を試みた結果、ハウレンソウ栽培土壌の0.4M硫酸で抽出された画分の窒素が減少していた。すなわち、ハウレンソウは土壌中の有機態窒素に関しては0.4M硫酸で抽出される

画分の窒素までも利用できることが示唆された。

ホウレンソウ栽培土壌における可給態窒素量の推定法として0.4M 硫酸抽出法を採用し、抽出液の280nmにおける吸光度と抽出窒素量との関係を検証したところ、両者には極めて高い正の相関が認められた。この結果に基づき、土壌の0.4M 硫酸抽出液における吸光度(280nm)から求めた有機態窒素推定量を算出し、無肥料で栽培したホウレンソウ(年3作)の窒素吸収量との関係を検討した。その結果、土壌の有機態窒素推定量の増加に伴ってホウレンソウの窒素吸収量も増加する傾向が認められたが、土壌の有機態窒素推定量が540mg/kg以上の圃場では、ホウレンソウの窒素吸収効率は低下する傾向が認められた。0.4M 硫酸抽出有機態窒素推定量が異なる圃場で化学肥料および堆肥を施用してホウレンソウを年間3作した場合、堆肥の施用により増収となり、硝酸濃度を低減する効果も認められた。一方、堆肥の施用によりホウレンソウ中の硝酸濃度は化学肥料区よりも低くはなるものの、0.4M 硫酸抽出有機態窒素推定量が540 mg/kg以上の圃場では3,000mg/kgを超える値となった。化学肥料および堆肥の施用量を判断する簡易な方法として0.4M 硫酸によって抽出される土壌有機態窒素量を280nmの吸光度によって測定する方法が有効であると考えられた。

## 謝 辞

本研究は、岩手県農業研究センターと神戸大学大学院農学研究科において、著者並びに共同研究者が行った研究成果をまとめたものです。神戸大学大学院農学研究科土壌学研究室教授 阿江教治博士(現 酪農学園大学大学院酪農学研究科 特任教授)には、本研究の端緒を与えられたものであり、終始、助言、討論、激励をいただきました。また、本研究の遂行にあたって、島根大学農学部 松本真悟准教授には、研究上の貴重な助言、激励を頂きました。本論文の審査に際して神戸大学農学部伊藤一幸博士、杉本敏男博士には、貴重なご助言を頂きました。

元 岩手県農業研究センター所長 武田眞一氏、元同センター生産環境部土壌作物栄養研究室長 小野剛志博士、元 同室長 多田勝郎氏、元 同室 佐藤喬氏、元 同室 高橋正樹氏、元 同室 高橋良学博士、元 同部病理昆虫研究室 勝部和則博士には、配属当時から研究の遂行に助力と助言をいただきました。

本研究を始めるきっかけとなった農業環境技術研究所における依頼研究員研修時より、農業環境技術研究所の杉山恵氏、村上政治氏、石川覚博士、吉光寺徳子氏(現

栃木県那須農業振興事務所)、鹿児島県農業開発総合センターの三浦伸之博士には、本研究の遂行にご指導いただきました。

(株)ニッピバイオマトリックス研究所 小山洋一博士、飯嶋克明氏、神戸大学大学院農学研究科平田真理氏には、本研究の遂行にあたり、分析の協力と助言、激励をいただきました。

元 一関農業改良普及センター所長児玉勝雄氏、元同センター普及課長渡辺芳幸氏、元 盛岡農業改良普及センター小笠原義明氏並びに両農業改良普及センターの皆様には、本論文の取りまとめに際して激励、配慮をいただきました。

岩手県農業研究センター佐藤広昭氏、猪澤哲哉氏、非常勤職員伊藤静子氏並びに歴代スタッフには実験遂行にあたり、多大なご協力をいただきました。本研究をすすめるにあたり、神戸大学土壌学研究室の皆様には多大なご支援を受けました。ここに記して、以上のみなさまに厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) Ae, N., Arihara, J., Okada, K., Yoshihara, T. and Johansen, C. (1990) Phosphorus uptake by pigeon pea and its role in cropping systems of the Indian subcontinent. *Science*, 48, 477-480.
- 2) 阿江教治・吉光寺徳子(2004)アポプラストと植物栄養—無機栄養を中心として—。土肥誌, 75, 715-721.
- 3) 阿江教治・松本真悟・山縣真人(2001)新しい世紀への植物栄養の展望4.土壌に蓄積する有機態窒素の作物による直接吸収。土肥誌, 72, 114-120.
- 4) Ahmad, Z., Kai, Y. and Harada, T. (1973) Factors affecting immobilization and release of nitrogen in soil and chemical characteristics of the nitrogen newly immobilized IV. Chemical nature of the organic nitrogen becoming decomposable due to the drying of soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 19, 287-298.
- 5) 赤塚 恵・坂柳迪夫(1964)畑土壌における窒素供給力の検定方法に関する2,3の考察。北農試彙法, 83, 64-70.
- 6) 赤塚 恵・杉原 進(1970)畑における施肥窒素の行動、とくにその有機化と無機化について。土肥誌, 41, 314-318.
- 7) Aoyama, M. (2006) Properties of neutral phosphate buffer extractable organic matter in soils revealed using size exclusion chromatography and fractionation with

- polyvinylpyrrolidone. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 52, 378-386.
- 8) Appel, T. and Mengel, K. (1992) Nitrogen uptake of cereals on sandy soils as related to nitrogen fertilizer application and soil nitrogen fractions obtained by electroultrafiltration (EUF) and  $\text{CaCl}_2$  extraction. *Eur. J. Agron.*, 1, 1-9.
- 9) 浅見輝男 (1971) 水田土壌中における窒素化合物の有機化および無機化に関する研究 (第2報) 新たに有機化された窒素化合物の無機化過程と土壌有機態窒素の無機化過程の相違. *土肥誌*, 42, 22-25.
- 10) Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- 11) Chapin, F. S.III., Molianen, L. and Kielland, K. (1993) Preferential use of organic nitrogen for growth by a non-mycorrhizal arctic sedge. *Nature*, 361, 150-153.
- 12) 土壌, 水質及び植物体分析法 (2001) p190-194. 財団法人日本土壌協会, 東京.
- 13) 土壌養分測定法委員会編 (1970) “土壌養分分析法”. p238-239, 養賢堂, 東京.
- 14) 土壌養分測定法委員会編 (1997) “土壌環境分析”. p179-185, p225-228, p42-243, p251-253, p257-259, 博友社, 東京.
- 15) Dolmat, M. T., Patrick, W. H. and Peterson, F. J. (1980) Relation of available soil nitrogen to rice yield. *Soil Sci.*, 129, 229-237.
- 16) Friedel, J. K. and Scheller, E. (2002) Composition of hydrolysable amino acids in soil organic matter and soil microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 34, 315-325.
- 17) 藤井弘志・安藤 豊・佐藤之信・中西政則 (1990) 速度論的解析法によって得られた可分解性有機態窒素量の簡易推定法. *土肥誌*, 61, 92-93.
- 18) Gardner, W. K., Barber, D. A. and Parbery, D. G. (1983) The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. III. The probable mechanisms by which phosphorus movement in the soil/roots interface is enhanced. *Plant Soil.*, 70, 107-114.
- 19) Gardner, W. K., Parbery, D. G., Barber, D. A. and Swinden, L. (1983) The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. V. The diffusion of exudates away from roots: a computer simulation. *Plant Soil.*, 72, 13-29.
- 20) Ghosh, P. C. (1966) A comparison of some chemical tests for available soil nitrogen. *Plant soil.*, 25, 65-72.
- 21) Guo, L., Santschi, P.H., Cifuentes, L.A., Trumbore, S.E. and Southon, J. (1996) Cycling of high-molecular-weight dissolved organic matter in the Middle Atlantic Bight as revealed by carbon isotopic ( $^{13}\text{C}$  and  $^{14}\text{C}$ ) signatures. *Limnol. Oceanogr.*, 41, 1242-1252.
- 22) 原田登五郎 (1959) 農技研報 B, 9, 132, 農水省.
- 23) 原田登五郎 (1974) “水田土壌の地力窒素”, p24-25.
- 24) 樋口太重 (1981) 緩衝液による有機化窒素および土壌有機態窒素の抽出特性, *土肥誌*, 52, 481-489.
- 25) 樋口太重 (1982) 緩衝液で抽出される有機窒素化合物について, *土肥誌*, 53, 1-5.
- 26) 樋口太重 (1983) 土壌中における施用窒素の有機化と再無機化, *農技研報 B*, 34, 1-81.
- 27) 日置雅之・高橋 茂・伊藤純雄 (2003) 中性リン酸緩衝液抽出有機態窒素の簡易測定法の比較, 愛知農総試研報, 35, 39-42.
- 28) 平田真理 (2005) 土壌中に蓄積する有機態窒素の構造解析 (修士論文), 神戸大学大学院農学研究科.
- 29) 久馬一剛 編 (1997) 最新土壌学, p51-52, 朝倉書店, 東京.
- 30) Hodge, A., Colin, D.C. and Alastair, H. F. (2001) An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires directly from organic material. *Nature*, 413, 297-299.
- 31) Hogberg, P. (1997)  $^{15}\text{N}$  natural abundance in soil-plant system, *Tansley Review No.95. New phytologist.*, 137, 179-203.
- 32) 石川栄治 編 (1987) “酵素免疫測定法 第3版”, 医学書院, 東京.
- 33) 伊藤千春・阿江教治 (2000) 各種抽出液によって抽出される可給態窒素の土壌中の存在形態, *土肥誌*, 71, 777-785.
- 34) 岩崎貢三・櫻井克年 (1996) 土地利用履歴の異なる露地カンキツ栽培圃場における銅, 亜鉛, 鉄, マンガンの存在状態の比較, *土肥誌*, 67, 62-68.
- 35) 岩手県 (2004) “持続性の高い農業生産方式の導入に関する指針”. p1-5. 岩手県.
- 36) 岩手県農業研究センター (2003) “雨よけほうれんそう長期安定出荷マニュアル”, p14-16, 岩手県.
- 37) Jenkinson, D. S. (1968) Chemical test for potentially available nitrogen in soil. *J. Sci. Food. Agric.*, 19, 160-168.
- 38) 甲斐秀昭・河口定生・丸本卓哉 (1976) D-アミノ酸の土

- 壤中分布とその土壤窒素代謝における意義, 土と微生物, 18, 27-41.
- 39) Keeney, D. R. and Bremner, J. M. (1966) Comparison and evaluation of laboratory methods of obtaining an index of soil nitrogen availability. *Argon J.*, 58, 498-503.
- 40) Knicker, H. and Hatcher, P. G. (1997) Survival of protein in an organic-rich sediment: possible protection by encapsulation in organic matter. *Naturwissenschaften.*, 84, 231-234.
- 41) Knicker, H. (2004) Sabilization of N-compounds in soil and organic-matter-rich sediments –what is the difference? *Marine Chem.*, 92, 167-195.
- 42) 小田島ルミ子・阿江教治・吉光寺徳子・松本真悟 (2005) 土壤中に蓄積している窒素の形態分別法の検討, 土肥誌, 76, 833-842.
- 43) 小田島ルミ子・高橋正樹・平賀昌晃・小野剛志・阿江教治・松本真悟 (2006) オガクズ牛ふん堆肥の長期施用がハウレンソウの生育および窒素吸収に及ぼす影響, 園芸学研究, 5, 389-395.
- 44) 小田島ルミ子・阿江教治・松本真悟 (2007) ハウレンソウの窒素吸収能特性とその栽培跡地土壤の窒素の形態, 土肥誌, 78, 275-281.
- 45) 牧 浩之 (1997) 作物根圏から分離した蛍光性 *Pseudomonas* のリン溶解能. 平成 9 年度土壤肥料研究会資料, p4-1~4-3, 農業研究センター, つくば
- 46) Matsumoto, S., Ae, N. and Yamagata, M. (1999) Nitrogen uptake response of vegetable crops to organic materials. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 45, 269-278.
- 47) 松本真悟・阿江教治・山縣真人 (1999) 有機質肥料の施用がハウレンソウの生育および硝酸, シュウ酸, アスコルビン酸に及ぼす影響, 土肥誌, 70, 31-38.
- 48) Matsumoto, S., Ae, N. and Yamagata, M. (2000a) Possible direct uptake of organic nitrogen from soil by chingensai (*Brassica campestris* L.) and carrot (*Daucus carota* L.). *Soil Biol. Biochem.*, 32, 1301-1310.
- 49) Matsumoto, S., Ae, N. and Yamagata, M. (2000b) The Status and origin of Available Nitrogen in Soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 46, 139-149.
- 50) Matsumoto, S., Ae, N. and Yamagata, M. (2000c) Extraction of mineralizable organic nitrogen from soils by a neutral phosphate buffer solution. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 32, 1293-1299.
- 51) 松本真悟・阿江教治・山縣真人 (2000) 中性リン酸及び希硫酸抽出による土壤の可給態窒素の推定と抽出される有機態窒素の特性, 土肥誌, 71, 86-89.
- 52) 松本真悟・阿江教治・山縣真人 (2001) フィールドから展開される土壤肥料学—新たな視点でデータを採る・見る—, 3. 無機栄養説だけですべての作物の窒素吸収反応が説明できるのか? 土肥誌, 72, 698-706.
- 53) 松本真悟 (2002) 土壤の可給態窒素の実態と作物によるその特異的吸収, 土肥誌, 73, 261-262.
- 54) Matsumoto, S. and Ae, N. (2004) Characteristics of extractable soil organic nitrogen determined by using various chemical solutions and its significance for nitrogen uptake by crops. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 50, 1-9.
- 55) Matsumoto, S., Ae, N. and Matsumoto, T. (2005) Extraction of soil organic nitrogen by organic acids and role in mineralization of nitrogen in soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 51, 425-430.
- 56) Matsumoto, S., Ae, N., Koyama, Y., Iijima, K., Kodashima, R., Hirata, M., Kasuga, J. and Koga, N. (2008) Evaluation of the mineralizable organic nitrogen in soil using an immunological technique. *Biol Fertility Soils.*, 45, 107-111.
- 57) 松山信彦・三枝正彦・阿部篤郎 (1994) 関東および中部地方におけるアロフェン質黒ボク土と非アロフェン質黒ボク土の分布, 土肥誌, 65, 304-312.
- 58) Mattingly, G. E. G. (1973) The Woburn organic manuring experiment. II. Design, crop yields and nutrient balance, 1964-1972. *Rothamsted. Exp. Stn. Rep.*, 98-133.
- 59) McLawren, R. G. and Crawford, D. V. (1973) Studies on soil copper; I. The fractionation of copper in soils. *J. Soil Sci.*, 24, 172-181.
- 60) 目黒孝司・吉田企世子・山田次良・下野勝昭 (1991) 夏どりハウレンソウの内部品質指標, 土肥誌, 62, 435-438.
- 61) Michelsen, A., Schmidt, I. K., Jonasson, S., Quarmby, C. and Sleep, D. (1996) Leaf 15N abundance of subarctic plants provides field evidence that ericoid, ectomycorrhizal and non-arbuscular mycorrhizal species access different sources of soil nitrogen. *Oecologia.*, 105, 53-63.
- 62) 三浦伸之・阿江教治 (2005) 茶園表層土壤に存在する水溶性有機態窒素, 土肥誌, 76, 587-592.
- 63) 三浦伸之・阿江教治・内村浩二・松本真悟 (2006) 野菜類およびチャにおける導管液の分子量組成からみた土壤タンパク様窒素吸収の可能性, 土肥誌, 77, 549-554.

- 64) Miyazawa, K. and Murayama, T. (2007) Heterogeneity of neutral phosphate buffer extractable soil organic matter. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 53, 1-6.
- 65) 森 敏 (1979) 有機態窒素と無機態窒素の共存条件下での植物の窒素吸収能について(第1報)前処理窒素条件が本処理窒素の吸収に及ぼす影響, *土肥誌*, 50, 40-48.
- 66) Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A. and Vianello, A. (2003) Physiological effects of humic substances in higher plants. *Soil. Biol. Biochem.*, 34, 1527-1536.
- 67) Nashlom, T., Ekblad, A., Nordin, A., Giesler, R., Hogberg, M. and Hogberg, P. (1998) Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature*, 392, 914-916.
- 68) Nishizawa, N. and Mori, S. (1977) Invagination of plasmalemma; Its role in the absorption of macromolecules in rice roots. *Plant Cell Physiol.*, 18, 767-782.
- 69) 農林水産省農産園芸局(1999)環境保全型栽培基準設定調査事業成果概要集, 畑作・その他, 農水省, 東京.
- 70) 小川吉雄・加藤弘道・石川 実(1988)リン酸緩衝液抽出による可給態窒素の簡易測定法, *土肥誌*, 60, 160-163.
- 71) 荻内謙吾・中嶋直子・阿江教治・松本真悟(2000)リン酸緩衝液抽出物に含まれる有機態窒素のアミノ酸組成, *土肥誌*, 71, 385-387.
- 72) Okamoto, M., Okada, K., Watanabe, T. and Ae, N. (2003) Growth responses of cereal crops to organic nitrogen in the field. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 49, 445-452.
- 73) 尾崎恵太・阿江教治・鈴木武志・小山洋一・飯島克昌(2006)中性のピロリン酸 Na 溶液で抽出可能な PEON 様物質の蓄積様式の推定, 日本土壌肥料学会2006年度秋田大会講演要旨集, p127.
- 74) Paungfoo-Lonhienne, C., Thierry, G. A. L., Rentsch, D., Robinson, N., Christie, M., Webb, R. I., Gamage, H. K., Carroll, B. J., Schenk, P. M. and Schmidt, S. (2007) Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. *PNAS.*, 105, 4524-4529.
- 75) Purvis, E. R. and Leo, M. W. M. (1961) Rapid procedure for estimating potentially available soil nitrogen under greenhouse conditions. *J. Agr. Food Chem.*, 9, 15-17.
- 76) 定本裕明・飯村康二・本名俊正・山本定博(1994)土壌中重金属の形態分別法の検討, *土肥誌*, 65, 645-653.
- 77) 三枝正彦(1989)“11.黒ボク土, 「土の化学」”, p148-150, 日本化学会編, 東京.
- 78) 三枝正彦・松山信彦・阿部篤朗・井上克弘・古川栄一・飯塚文男・小野剛志(1991)東北地方に分布する黒ボク土の類型区分, 第1報 北東北に分布する黒ボク土, 東北大学川渡農場報告, 7, 7-13.
- 79) 斉藤雅典(1988)土壌可給態窒素量の紫外部吸光度法による評価, *土肥誌*, 59, 493-495.
- 80) 坂井 弘(1959)土壌の硝化作用に関する研究(第2報), *土肥誌*, 30, 53-56.
- 81) 作物分析法委員会編(1975)“栄養診断のための栽培植物分析測定法”, p64-69, 養賢堂, 東京.
- 82) Sakuta, C., Oda, A., Yamakawa, S. and Satoh, S. (1998) Root-specific expression of genes for novel glycine-rich proteins cloned by use of an antiserum against xylem sap proteins of cucumber. *Plant Cell Physiol.*, 39, 1330-1336.
- 83) Satoh, S., Iizuka, C., Kikuchi, A., Nakamura, N. and Fujii, T. (1992) Proteins and carbohydrates in xylem sap from squash root. *Plant Cell Physiol.*, 33, 841-847.
- 84) 佐藤 忍(2001)植物の根に関する諸問題(101)ー根から地上部器官へ送られる導管液有機物質ー, *農業および園芸*, 76, 1311-1316.
- 85) Schluzer, E. D., Chapin, F. S. III, and Gebauer, G. (1994) Nitrogen nutrition and isotope differences among life forms at the northern treeline of Alaska. *Oecologia.*, 100, 406-412.
- 86) Shulten, H. -R., and Schnitzer, M. (1998) The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biol. Fertil. Soils.*, 26, 1-5.
- 87) Stanford, G. and Demar, W. H. (1970) Extraction of soil organic nitrogen by autoclaving in water.: 3. Diffusible ammonia, an index of soil nitrogen availability. *Soil Sci.*, 109, 190-196.
- 88) 杉原 進・金野隆光・石井和夫(1986)土壌中における有機態窒素無機化の速度論的解析法, *農環研報告*, 1, 127-166.
- 89) Sutton, R. and Sposito, G. (2005) Molecular structure in soil humic substances: The new view. *Environ. Sci. Technol.*, 39, 9009-9015.
- 90) 建部雅子・石原俊幸・石井かおる・米山忠克(1995) 培地の窒素形態および Ca:K 比がハウレンソウとコマツナの硝酸, アスコルビン酸, シュウ酸含有率に与える影響, *土肥誌*, 66, 535-543.
- 91) 建部雅子・佐藤信仁・石井かおる・米山忠克(1996)

- 緩効性肥料の施用がハウレンソウのシュウ酸, アスコルビン酸, 糖, 硝酸含有率に与える影響, 土肥誌, 67, 147-154.
- 92) 土屋一成 (2004) 西南暖地の水田輪作における資材の適正利用と作物生産, 圃場と土壌, 第 10-11 号, p15-16.
- 93) Watanabe, S. and Yoshikawa, H. (2007) Characterization of neutral phosphate buffer extractable soil organic matter by electrophoresis and fractionation using ultrafiltration. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 53, 650-656.
- 94) Yamagata, M. and Ae, N. (1999) Direct acquisition of organic nitrogen by crops. *JARQ.*, 33, 15-21.
- 95) 山縣真人・阿江教治・大谷 卓 (1996) 作物の生育反応に及ぼす有機体窒素の効果, 土肥誌, 67, 345-353.
- 96) 山縣真人・中川建也・阿江教治 (1997)  $^{15}\text{N}$  利用による米ぬか窒素吸収の作物間比較, 土肥誌, 68, 291-294.
- 97) 野菜茶業研究所 (2006) 野菜の硝酸イオン低減化マニュアル.
- 98) 米山忠克・建部雅子 (1992) アスコルビン酸・シュウ酸・硝酸の代謝と相互関係, 農業および園芸, 67, 1005-1062.
- 99) 吉川年彦・中川勝也・小林 保・時枝茂行・永井耕介 (1988) 高品質ハウレンソウの生産・出荷に関する研究 (第 2 報), 近畿中国農研, 75, 77-81.
- 100) Zang, X., van Heemst, J. D. H., Dria, K. J. and Hatcher, P. G. (2000) Encapsulation of protein in humic acid from a histosol as an explanation for the occurrence of organic nitrogen in soil and sediment. *Org. Geochem.*, 31, 679-695.

## Effect of Nitrogen Uptake by Spinach (*Spinacia oleracea* L.) under Application of Manure Compost and Evaluation Method of Available Nitrogen for this crop in the Soils

Rumiko KODASHIMA\*<sup>1</sup>

\*1 Agricultural Reform, Promotion and Technology Division

### Summary

In Iwate Prefecture, there is an urgent need for proper soil management that effectively utilizes the large amount of organic waste produced from livestock. On the other hand, spinach is cultivated throughout Iwate Prefecture. I applied compost made from livestock waste into spinach production fields. The research consisted of the following four objectives:

- i) To observe the growth and nitrogen (N) absorption by spinach grown in fields applied with this compost and as well as to monitor any NO<sub>3</sub> leaching from the surface soil to ground water in these fields.
- ii) To understand the mechanism in which spinach absorbs and uses available N in soil.
- iii) To propose a simple evaluation method of available N in soil that is suitable to the cultivation of spinach.
- iv) To propose a suggestion of an appropriate nitrogen level for soil treated with compost

In a 4-year continuous experiment, the effects of a sawdust-like compost made from cattle feces on spinach growth were evaluated in a field covered by a plastic top to prevent rainfall. Spinach was harvested 2-4 times per year to analyze its growth and nitrogen absorption. The chemical fertilizer zone was fertilized annually with 16-20g/m<sup>2</sup> of ammonium nitrate, 20-24g/m<sup>2</sup> of monocalcium phosphate, and 16-20 g/m<sup>2</sup> of potassium chloride. The compost zone was fertilized annually with 45gN/m<sup>2</sup> of compost made of cattle feces 2 weeks before the first sowing of seeds, and was not fertilized after the 2<sup>nd</sup> sowing.

The results are as follows:

- 1) Plant length, leaf width, and number of leaves of spinach grown in the compost fertilizer zone were greater than those of spinach grown in the chemical fertilizer zone.
- 2) Dry matter yield and nitrogen absorption was twice as high in the compost fertilizer zone when compared to the chemical fertilizer zone.
- 3) Inorganic nitrogen content in soil that had spinach planted in it was lower in the compost zone than the chemical fertilizer zone. This tendency was the same through the entire 4-year experiment, and the density of inorganic nitrogen content in compost-added soil shifted to a level lower than the chemical fertilizer-added soil.
- 4) Moreover, the content of NO<sub>3</sub> within the spinach was found to be much lower in the compost zone than the chemical fertilizer zone. In other words, the content of NO<sub>3</sub> increased greatly in soil treated with chemical fertilizer, so the content of NO<sub>3</sub> within the spinach was also found to be high.
- 5) Less inorganic nitrogen and all other nitrogen content leached below ground in the compost zone than the chemical fertilizer zone.

These results show that spinach growth and nitrogen absorption are greater when compost is used as fertilizer, even though less inorganic nitrogen is found in the soil when compared to chemical fertilizer. In other words, the spinach growth is not responding to inorganic nitrogen in the soil.

It is clear that spinach responds to soil fertilized with organic compost, but is thought that the most influential organic nitrogen absorbed by spinach is PEON, a protein-like organic nitrogen that is extracted from soil with a 1/15M phosphate buffer (pH 7.0). PEON has a molecular weight of 8000, can absorb UV, and acts similarly to protein (by the Bradford method of protein assay). We extracted PEON from the soil and

injected it into rabbits, made PEON antibodies, and confirmed that it was possible to quantify PEON in soil. We took xylem sap from the spinach and used anti-PEON antibodies to quantify PEON content using the enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) method. The xylem sap of spinach fertilized with compost showed a high response to the anti-PEON antibodies, while the xylem sap of spinach fertilized with chemical fertilizer did not show much of a response at all. This result shows that spinach has a great ability to directly absorb PEON. Moreover, this explains the growth and nitrogen absorption in spinach grown in soil fertilized with compost, as we understand that this is through not just inorganic nitrogen but PEON as well.

PEON has been shown to play a big part in the growth of spinach, but other organic nitrogen must be considered. We developed a sequential extraction method (A, B) to understand the form of nitrogen in soil that can be used by spinach.

- 1) Sequential Extraction Method A: Water, 10% potassium chloride solution, 1M acetic acid, 1/15M phosphate buffer solution, 0.4M sulfuric acid, and 1M sodium hydroxide solution in sequence
- 2) Sequential Extraction Method B: Water, 10% potassium chloride solution, 0.01M acetic acid, 0.1M sulfuric acid, 0.2M sulfuric acid, 0.4M sulfuric acid, and 0.5M sulfuric acid in sequence

NO<sub>3</sub> was found during the water extraction, and ammonia nitrate in the potassium chloride solution. Next, organic nitrogen was found in sequential extraction method A with acetic acid, phosphate buffer solution, and sulfuric acid, but according to HP-SEC, the holding time levels of this organic nitrogen peaked just like PEON.

The organic nitrogen extracted through the various amounts of sulfuric acid content in method B all had a comparatively average molecular weight, which was the same as PEON at MW=8,000. Also, it was clear that this organic nitrogen was bonded to iron and aluminum. In other words, it was shown that nitrogen from compost-treated soil is a multilayered construction aided by iron and aluminum as PEON. Citric acid secreted from the roots of plants and oxalic acid secreted from the spinach are organic acids that dissolve PEON, which the spinach directly absorb.

Because the organic nitrogen extracted from the soil through the sequential extraction methods is PEON or PEON-like material, we used sequential extraction method A to evaluate the organic nitrogen level in soil used to grow plants. We cultivated spinach and corn in greenhouse soil without fertilizer. We took xylem sap from each plant harvest, and analyzed the molecular weight allocation using HP-SEC. A peak in retention time in the xylem sap of spinach cultivated in soil was found that was similar to the organic nitrogen extracted with the 0.4M sulfuric acid. Hydroponically-grown spinach fed with inorganic nutrients did not have this peak. Moreover, we analyzed the formulation of organic nitrogen used by spinach using sequential extraction methods. We used the same sequential extraction method on soil that had been used to grow corn. The results showed that the fraction of nitrogen that had been extracted with 0.4M sulfuric acid from spinach soil had decreased. In other words, the spinach was shown to have used the nitrogen even in the fraction extracted from 0.4M sulfuric acid.

As an estimation method of possible nitrogen content in soil used for the cultivation of spinach, we used the 0.4M sulfuric acid extraction method to verify the relationship between light absorption and extracted nitrogen content in 280nm of extracted liquid. There we found an extremely high level of correlation between the two. Following these results, we calculated the estimated organic nitrogen content from the light absorption level (280nm) within the 0.4M sulfuric acid extraction solution, and deliberated the relationship to the nitrogen absorption content in spinach that had been grown without fertilizer (3 harvests a year). As a result, it was shown that there is a tendency for the nitrogen absorption content in spinach to increase when the estimated organic nitrogen content in soil increases, but it was also found that nitrogen absorption efficiency in spinach decreases when estimated organic nitrogen content in the farm field is over 540mg/kg. We used chemical fertilizers or compost to cultivate spinach annually in fields with different estimated nitrogen contents, and the

compost zone yielded more spinach and reduced the amount of nitrate. On the other hand, even though the amount of nitrate within the compost spinach decreased when compared to spinach grown with chemical fertilizer, nitrate levels rose above 3,000mg/kg when fields had more than 540mg/kg of estimated organic nitrogen content. We propose that a simple method to determine the amount of chemical fertilizer or compost to be used can be efficiently determined measuring sulfate-extractable organic nitrogen content in soil with 280nm of light absorption.

Keywords: Nitrogen absorption response, fraction of nitrogen in soil, phosphate-buffer extracted organic nitrogen (PEON), soil fertility of nitrogen, appropriate fertilization methods