塩化カリウム抽出液中の硝酸態窒素の簡易定量法

誌名	日本土壌肥料學雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者名	金子,真司 稲垣,昌宏 森下,智陽
発行元	日本土壌肥料學會
巻/号	80巻4号
掲載ページ	p. 392-395
発行年月	2009年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

ノ　ー　ト

塩化カリウム抽出液中の硝酸態窒素の簡易定量法*

金子真司・稲垣昌宏・森下智陽

キーワード　簡易定量法，硝酸態窒素，可給態窒素，窒素無機化，森林土壌

1．はじめに

窒素は高等植物が必要とする無機元素のなかで最も重要な成分である．そのため，可給態窒素量や窒素無機化速度は土壌の肥沃度の指標として使われる．可給態窒素量は2 Mまたは10％の塩化カリウム（KCl）溶液によって土壌から抽出される無機態窒素量で評価される（小川，1997）．窒素無機化速度も，培養前後の土壌からKCl溶液で抽出される無機態窒素量から求められる．

土壌中に存在する無機態窒素はほとんどが硝酸イオン（NO_3^-）とアンモニウムイオン（NH_4^+）である．そのうちNH_4^+はインドフェノール青吸光光度法（日高，1997）など比較的労力がかからない方法で測定できる．それに対して，NO_3^-は還元―水蒸気蒸留法や銅・カドミウム還元―ナフチルエチレンジアミン吸光光度法等（日高，1997）で測定されるが，操作が煩雑な上に重金属を含む廃液をともなう欠点がある．NO_3^-は紫外域で強い吸光を示すため，NO_3^-以外の成分による吸光がないか，無視できる場合には210 nmや220 nmの吸光度から定量が可能である（大山，1990）．しかし土壌から無機態窒素をKCl溶液で抽出する際には紫外域で吸光を示す溶存有機炭素（DOC）も抽出されるので，紫外吸光度からNO_3^-濃度を定量することはできない．Cataldo法（大山，1990）は試料に試薬を添加して吸光度を測定する簡便な方法であるが，試料に対して100倍量の水酸化ナトリウムを添加する必要がある．森林などの自然土壌からのKCl抽出液中のNO_3^-濃度は普通10 mg L^{-1}以下と低濃度であるので，Cataldo法は適さない．ヒドラジン還元法によるNO_3^-測定（林ら，1997）も迅速な方法であるが，各種試薬の添加や加熱処理等の操作が煩雑な上，50倍以上の希釈を必要とすることからNO_3^-濃度の低い自然土壌には適さない．阪田（2000）はNorman and Stucki（1981）の方法がわが国の森林土壌に適応可能であることを明らかにした．この方法は，還元剤によってNO_3^-の形態を変化させたKCl抽出液と無処理のKCl抽出液の紫外吸光度（210 nm）を測定し，両者の差からNO_3^-濃度を定量するものである．測定に使用する試料液量が5 mLと少ないことに加えて，他の測定に比べると簡便である．しかし還元処理では60 ℃，35分間の加熱が必要であり，処理がやや煩雑である．

先に述べたように，土壌溶液中のDOCは紫外域全般で吸光を示す．予備的にKCl抽出液を測定したところ，短波長になるほど吸光度が高まる傾向が認められた．NO_3^-をほとんど含まない試料でも同様の傾向であった．それに対して，NO_3^-溶液では250 nmより長波長側の紫外域での吸光は認められなかった．すなわち，NO_3^-とDOCを含む溶液では250 nmより長波長側ではDOC単独の吸光であるのに対して，短波長側ではNO_3^-とDOCをあわせた吸光である．そこで短波長側のDOCの吸光度が長波長側の吸光度から推定できれば，全吸光度からDOC分の吸光度を引くことでNO_3^-の吸光度を求めることができ，NO_3^-濃度の定量が可能となるはずである．この考えに基づき，紫外吸光度からNO_3^-の濃度を推定する方法を検討した．

2．方　　法

1）DOC吸光曲線の作成

筑波山および加波山で採取した適潤性褐色森林土（B_D）および適潤性褐色森林土偏乾亜型（B_D (d)）の表層土壌14点の土壌を用いた（林業試験場どじょう部，1976）（表1）．未風乾土壌20 gに対して超純水100 mLを加え，1時間振とうした後，No.6濾紙で濾過した．濾液40 mLにあらかじめ調整したイオン交換樹脂（純水で繰り返し洗浄した，オルガノIR120B（H^+型）とオルガノIRA410（OH^-型）を等量混合）を約10 g加えて30分間振とうし，水抽出液中の陽イオン・陰イオンを取り除いた（脱イオン処理）．水抽出液の上澄み液を分取して，分光光度計（Shimadzu UVmini-1240）で200～300 nmの吸光度を10 nm間隔で測定した．この抽出液の260 nmの吸光度に対する220 nmの吸光度の比率（全試料の平均）を後に述べる紫外吸光法の際の係数$K_{220/260}$とした．NO_3^-標準液（10 mg-N L^{-1}）についても同様に200～300 nmの吸光度を測定した．

2）紫外吸光法（本法）と銅・カドミウム還元―ナフチルエチレンジアミン吸光光度法（定法）の比較

筑波山のヒノキ林およびスギ林の土壌断面（ヒノキ林1.4 m深，スギ林1.3 m深）の層位別および土壌深10 cm毎に採取した土壌計39点の土壌を用いた（表1）．これら土壌

Shinji KANEKO, Masahiro INAGAKI and Tomoaki MORISHITA: The raid determination of nitrate concentration in potassium chloride extracts.

* 本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金（課題番号8580156）と環境省地球環境保全等試験研究費「大都市圏の森林における窒素飽和による硝酸態窒素流出に関する研究」の予算を用いて行った．また本研究の一部は2008年9月の日本土壌学会愛知大会で発表した．

独立行政法人森林総合研究所（305-8687 つくば市松の里1）

2008年11月10日受付・2009年3月11日受理
日本土壌肥料学雑誌 第80巻 第4号 p.392～395（2009）

表1　本研究に用いた土壌の採取地点の情報と試料数

地点名	緯度	経度	林相	土壌型＊	母材	水抽出試料数	KCl 抽出試料数
筑波山	36° 10′	140° 10′	ヒノキ	B_D	火山灰・片麻岩	2	20
筑波山	36° 10′	140° 10′	スギ	B_D	火山灰・片麻岩	4	19
加波山	36° 18′	140° 9′	落葉広葉樹	$B_{D(d)}$	火山灰・花崗岩	8	−
高　知	33° 28′	133° 00′	ヒノキ	Bl_D	火山灰	−	7
神　戸	34° 43′	135° 10′	スギ	B_D	新第三系堆積岩	−	6
愛　媛	33° 53′	132° 52′	モウソウチク	$B_{D(d)}$	ホルンフェルス	−	4

＊B_D：適潤性褐色森林土，$B_{D(d)}$：適潤性褐色森林土偏乾亜型，Bl_D：適潤性黒色土

を対象に2M KCl溶液抽出を行った．この2M KCl溶液抽出は保温静置法（小川，1997）に従い，土壌窒素無機化ポテンシャルを把握する目的で行ったものである．同一土壌（生土）10gに対して2M KCl溶液100mLによる抽出を培養前後計2回行った．この抽出液の220nmと260nmの吸光度を測定し，以下に示す（1）式にあてはめ220nmにおけるNO_3^-の吸光度（$[UV220]_{NO_3}$）を推定した．

$$[UV220]_{NO_3} = [UV220] - [UV260] \times K_{220/260} \quad (1)$$

ここで［UV220］と［UV260］はそれぞれ抽出液の220nmと260nmの吸光度である．$K_{220/260}$は脱イオン処理後の土壌抽出液（14試料）の260nmの吸光度に対する220nmの吸光度の比率の平均値を用いた．

吸光度を測定した抽出液のNO_3^-濃度を，全リン・窒素自動分析装置（ダイアインスツルメンツ FI-N50）に用いて分析した．この装置におけるNO_3^-の定量は銅・カドミウム還元―ナフチルエチレンジアミン吸光光度法（日高，1997）であり，この測定方法を本報告における定法とした．検量線は，2M KClを含むNO_3^-標準液の220nmの吸光度を測定することで作成した．

3）他森林土壌への適用

本法による推定が他の地域の土壌についても適応可能であるかどうかを検討するため，神戸市，愛媛県，高知県の褐色森林土および黒色土の2MKCl抽出溶液（保温静置法（小川，1997）の培養前後の抽出液）に対しても本法をテストした（表1）．

3．結　　果

1）脱イオンした土壌水の紫外吸光特性

脱イオン処理した土壌水抽出液の吸光度は，波長が短くなるにしたがって徐々に大きくなっていた（図1）．それに対してNO_3^-溶液は300～250nmでは吸光を示さないが，240nm付近を境にしてそれより波長が短くなると吸光度を増し，220～200nmで吸光が大きかった．土壌水抽出液の260nmの吸光度［UV260］に対する220nmの吸光度［UV220］の比率（$K_{220/260}$）は，平均±標準偏差が1.543 ± 0.077で，最大，最小がそれぞれ1.726, 1.456であった（表2）

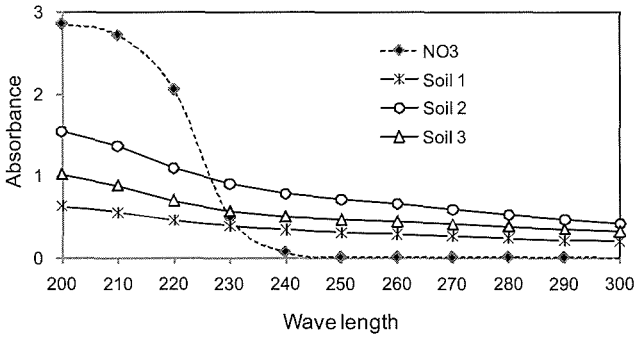

図1　脱イオン処理した土壌水抽出液およびNO_3^-標準液（10mM）の吸光曲線

表2　脱イオン処理した森林土壌の水抽出液の220, 260nmの吸光度およびその比率

地点名	林相	土壌深度	土壌型	UV220	UV260	UV220/UV260
筑波山	ヒノキ	0− 5cm	B_D	1.054	0.637	1.655
筑波山	ヒノキ	0− 5cm	B_D	0.526	0.330	1.594
筑波山	スギ	0− 5cm	B_D	0.681	0.446	1.527
筑波山	スギ	0− 5cm	B_D	0.645	0.443	1.456
筑波山	スギ	0− 5cm	B_D	0.569	0.375	1.517
筑波山	スギ	20−25cm	B_D	0.309	0.179	1.726
筑波山	落葉広葉樹	0− 5cm	$B_{D(d)}$	2.382	1.551	1.536
加波山	落葉広葉樹	5−15cm	$B_{D(d)}$	2.901	1.953	1.485
加波山	落葉広葉樹	15−30cm	$B_{D(d)}$	0.457	0.287	1.592
加波山	落葉広葉樹	0− 5cm	$B_{D(d)}$	2.868	1.938	1.480
加波山	落葉広葉樹	5−15cm	$B_{D(d)}$	0.310	0.204	1.520
加波山	落葉広葉樹	15−30cm	$B_{D(d)}$	0.409	0.261	1.567
加波山	落葉広葉樹	0−10cm	$B_{D(d)}$	1.059	0.717	1.477
加波山	落葉広葉樹	20−30cm	$B_{D(d)}$	0.912	0.620	1.471
平均						1.543
最大値						1.726
最小値						1.456
標準偏差						0.077

2) 紫外吸光法（本法）と定法の比較

(1) 式に筑波山土壌の2M KCl抽出液の［UV220］,［UV260］および先に求めた$K_{220/260}$=1.543を代入してNO_3^-濃度を推定した．この値と定法との比較を行ったところ，本法によるNO_3^-推定値（X）と定法によるNO_3^-測定値（Y）は，

$$Y=1.040X-0.124\ (R^2=0.993) \quad ①$$

であり，両者にはほぼ1：1の関係が認められた（図2）．本法による推定値と定法による測定値の差は，NO_3^-濃度が高低に関わりなくほぼ一定であり，その平均は0.08 mg-N L^{-1}であった．

3) 他森林土壌への適用

神戸，愛媛，高知土壌のKCl抽出液に対して（1）式を用いて［UV220］,［UV260］からNO_3^-濃度を推定し（$K_{220/260}$=1.543とした），定法との比較を行ったところ，本法によるNO_3^-推定値Xと定法によるNO_3^-測定値Yの関係は，

$$Y=1.099X-0.421\ (R^2=0.989) \quad ②$$

と筑波山試料の場合と同じように高い相関関係がみられた（図3）．ただし筑波山土壌の回帰式①に比べて回帰式の傾きやY切片がやや大きく，NO_3^-濃度が高い場合に本法による推定値が定法の測定値よりわずかに低くなり，0.5 mg L^{-1}以下の低濃度では本法がやや過大になる傾向がみられた．回帰式②からNO_3^-濃度が10.00 mg-N L^{-1}の場合に本法では9.48 mg-N L^{-1}と定法に比べて約5%低く，またNO_3^-濃度が0.00 mg L^{-1}の場合に本法では0.38 mg L^{-1}高く見積もられた．本法と定法との差の平均も0.35 mg-N L^{-1}と筑波山土壌に比べてやや大きかった．

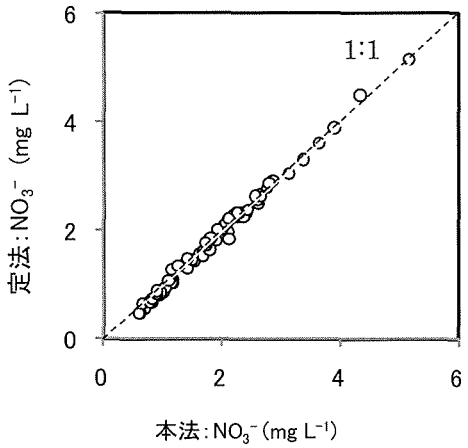

図2　筑波山土壌における本法によるNO_3^-濃度の推定値と定法による測定値の比較

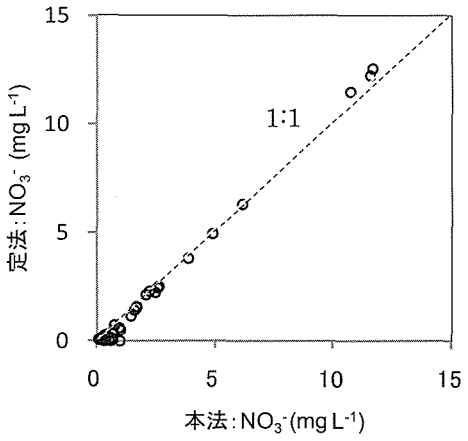

図3　神戸，愛媛，高知土壌における本法によるNO_3^-濃度の推定値と定法による測定値の比較

4．考　　察

本研究では，DOCの$K_{220/260}$がすべての自然土壌で一定であると仮定し，［UV260］と［UV220］の測定値からNO_3^-濃度を推定する方法を考案した．以下，この方法の問題点に関する考察をおこなう．

まず，KCl抽出液中に220 nmの吸光のある物質がNO_3^-とDOC以外に存在する場合の緩衝作用が考えられる．2M KCl溶液は220 nmにおいてNO_3^-を含まない場合も0.022の吸光を示した．これは塩化物イオンによる吸光であると推察されるが，標準液と試料溶液のKClの濃度は等しいので定量には影響しないはずである．なお220 nmで強い吸光度を示す物質として臭化物イオンが知られている（都築・内野，1996）が，自然土壌には測定に影響するほど多くの臭化物イオンは存在しないであろうから，この点は問題にならないであろう．

次に，KCl抽出液のDOCの$K_{220/260}$が水抽出液のそれと異なる場合が考えられる．2M KCl溶液によって抽出されるDOCの$K_{220/260}$が水抽出液のそれに等しいと仮定してNO_3^-濃度を推定できた（図2）ことから，2M KCl抽出のDOCと水抽出のDOCの紫外吸光特性に大きな違いはないと考えられる．厳密には2MKCl溶液からNO_3^-を取り除いた溶液の［UV220］と［UV260］を測定して水抽出の場合と比較し両者に違いがないことを確認する必要がある．

最後に，DOCの$K_{220/260}$が土壌型や植生などで異なる場合が考えられる．茨城県の筑波山・加波山土壌の結果から得た$K_{220/260}$の値を用いて，神戸，愛媛，高知土壌のKCl抽出液中のNO_3^-濃度を推定したところ，NO_3^-濃度が高い場合には本法による推定値が定法の測定値より低くなり，低濃度では本法が定法に対して過大になる傾向がみられた（図3）．本法による推定値と定法の測定値の差は採取地毎に異なった（表3）．この差は愛媛土壌で0.65 mg L^{-1}と最も大きく，次いで高知土壌が0.39 mg L^{-1}であり，筑波山，神戸土壌は0.10 mg L^{-1}以下であった．差の最も

表3　試料毎のNO_3^-濃度および本法と定法との測定値の差

試料名	試料数	NO_3^-濃度（定法）（平均±標準偏差）(mg L^{-1})	本法と定法の測定値の差（平均±標準偏差）(mg L^{-1})
筑波山	78	1.82±0.92	0.08±0.05
高　知	14	3.99±4.64	0.39±0.27
神　戸	12	1.25±1.51	0.10±0.08
愛　媛	8	1.62±4.29	0.65±0.15

大きかった愛媛土壌は本法の推定値が定法よりも高かったので，$K_{220/260}$ が推定に用いた1.543よりも大きかった可能性がある．愛媛土壌の林相はモウソウチク林であった．モウソウチク林は密生して生育するため林床は光不足となり他の植物が生育できず，いわゆる竹藪を形成する（鳥居，2006）．このように竹林の特殊な生態系が土壌有機物に影響し，DOCの性質が他の土壌とは異なる可能性がある．また高知の土壌では高 NO_3^- 濃度において本法の推定値が定法よりも高くなる傾向が見られた．このことはDOCの $K_{220/260}$ が推定に用いた1.543よりも小さいことを示唆する．高知土壌は今回分析した土壌の中で唯一黒色土である（表1）．米国土壌分類のMelanudands（Soil Survey Staff, 2006）に相当する土壌である．この土壌の腐植酸のタイプはA型であり，他の森林土壌に比べて土壌有機物の腐植化度が高い（大羽・本名，1984）．このためDOCの性質も他の森林土壌とは異なる可能性がある．以上より，NO_3^- 濃度の推定に用いる $K_{220/260}$ は，土壌型や植生などで異なる可能性が考えられる．そこで本定量法によって高い精度で NO_3^- 濃度を推定するためには，土壌型や植生などを考慮し対象とする土壌の $K_{220/260}$ を求めた方がよいであろう．

今回提案した方法は，2 M KCl溶液によって抽出される NO_3^- 濃度を抽出液の2波長の吸光度から求めるもので，従来の測定方法に比べてはるかに簡便な方法である．土壌型や植生の異なる森林土壌においても5%以下の誤差であったので，簡易定量法として実用に耐えうると判断した．ただし農耕地土壌に適応する場合には，NO_3^- やDOC以外に紫外吸光を示す物質が存在しないかどうか検討が必要であろう．

謝　辞：本研究の試料採取にあたり，愛媛県農林水産研究所林業研究センター豊田信行氏，木村光男氏，神戸大学大学院農学研究科金澤洋一教授，森林総合研究所四国支所（現，森林総合研究所立地環境研究領域）稲垣善之博士にご協力いただきました．関係者の皆さまに深く感謝いたします．

文　献

林　敦敏・坂本一憲・吉田冨男 1997. ヒドラジン還元法を用いた土壌中の硝酸態窒素量の迅速測定法．土肥誌, **68**, 322–326.

日高　伸 1997. 窒素．土壌環境分析法編集委員会編 土壌環境分析法, p. 231–255, 博友社．東京.

Norman, R. J., and Stucki, J. W. 1981. The determination of nitrate and nitrite in soil extracts by ultraviolet spectrophotometry. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **45**, 347–353.

小川吉雄 1997. 可給態窒素．土壌環境分析法編集委員会編 土壌環境分析法, p. 255–262. 博友社，東京.

大羽　裕・本名俊正 1984. 黒ボク土判定のための腐植の分析法．土肥誌, **55**, 55–61.

大山卓爾 1990. 無機態窒素（N）．植物栄養実験法編集委員会編 植物栄養実験法, p. 174–179. 博友社，東京.

林業試験場どじょう部 1976. 林野土壌の分類（1975）．林試研報, **280**, 1–28.

阪田匡司 2000. UV吸光度法を用いた土壌抽出液中の硝酸態窒素の定量．森林立地, **42**, 53–55.

Soil Survey Staff 2006. Keys to Soil Taxonomy 10th ed., p.333. USDA-Natural Resources Conservation Service, Washington, DC.

鳥居厚志 2006. 竹林の分布拡大の現状とその背景．林業と薬剤, **175**, 18–27.

都築俊文・内野栄治 1996. 全窒素．日本分析化学会北海道支部編 水の分析第4版, p. 266–269. 化学同人，京都.