

クロボク土壌における地力関連化学形質の 紫レーザー励起蛍光分析

井上直人*¹⁾・織井孝治¹⁾・関沼幹夫¹⁾・吉田清志²⁾

¹⁾信州大学 農学部

長野県上伊那郡南箕輪村

²⁾長野県野菜花き試験場

長野県塩尻市大字宗賀字床尾1066-1

要 約

潜在的な土壌の生産力を簡易に把握するため、レーザー励起蛍光 (Laser Induced Fluorescence : LIF) を解析する装置を開発した。励起波長は紫領域 (405nm) で475~900nm の分光を行って非接触で分析して推定した。サンプルは長野県東信地域の高冷地~準高冷地にある黒ボク土壌の30点で、いずれも畑作である。風乾した後に土壌可給態窒素、全窒素、全炭素、C/N、可給態リン酸や陽イオン置換容量 (CEC) を推定した。一次微分値を PLS 回帰分析した結果、風乾土壌の粉碎サンプルから直接、可給態窒素、全窒素、全炭素、可給態リン酸、CEC などの地力にかかわる化学形質が推定できた。これらは土壌有機化合物からの蛍光に由来し、クロボク土壌の畑作における地力の実態を迅速に把握するのに有効で、実用的と考えられた。

キーワード：化学数学，クロボク土，炭素，窒素，土壌，レーザー

はじめに

高冷地の作物収量を高めるための「地力」の維持と環境負荷の低減や省資源との両立が求められている。それには施肥設計が重要であり、その基礎となるのは土壌の無機態窒素の供給力をモニターすることで (赤塚・坂柳, 1964), 特に計測する意義が大きいのは可給態窒素である (久馬編, 1997; Matsumoto and Ae, 2004)。この評価は風乾土を30°Cで4週間保温静地培養し、微生物の働きによって無機化してくる窒素量をデバルタ合金還元・水蒸気蒸留法などを用いて測定するといった、生物・化学的手法が適している (久馬編, 1997)。培養法によって評価した可給態窒素の量と植物の利用する窒素量との間には強い相関がみられることから、栽培環境情報として利用されている。しかし、培養に4週間もかかるという難点があったので、簡易抽出法が開発され (樋口, 1983; 松本ら, 2000), さらに高冷地に代わる方法として可視吸光分光法 (小川ら, 1989) や、紫外吸光分光法 (斉藤, 1988; 佐藤ら, 1997) も試みられてきた。

潜在的な土壌の生産力を把握するには、可給態窒

素以外の地力関連化学形質も同時に測定する必要がある。ところが、それらの測定にもかなりの化学薬品と時間と労力がかかるため、こうした総合的な情報が十分に活用されているとは言い難いのが現状である。この問題を解消するため、ppbレベルの微量な化学物質も非破壊で検出できる可能性があるレーザー励起蛍光 (Laser Induced Fluorescence : LIF) を解析する装置を開発した。一方これを用いて、風乾土を蒸留水によって分散した後に SDS-PAGE のタンパク染色試薬である「Oriole」を用いた蛍光取得や液相沈降分析など試みたが、良好な推定結果は得られなかった (未発表)。

そこで本研究では、水や試薬による前処理自体が蛍光計測の障害になっていると考え、風乾土壌をそのまま用いて同時・非接触計測が可能かどうか検討した。また、励起光源としては、低コストで、光ファイバーに誘導が可能で、励起力も比較的強い紫の波長を用いた。こうした理由から、紫レーザー励起蛍光 (V-LIF) の分光分析を行い、ブロードなスペクトルの分析に適したケモメトリクス (尾崎ら, 2002) を適用して土壌可給態窒素などの主な地力関連化学形質を推定した。

なお、この研究成果は信州大学の「特願 2012-154235」であり、2013年の北陸作物学会講演

受付日 2013年12月3日

受理日 2013年12月3日

会と、2013年度 JST 新技術説明会（東京・市ヶ谷，2013年8月2日）でその一部を報告した。

材料および方法

サンプルは長野県東信地域の高冷地～純高冷地にある黒ボク土壌（上田市菅平，軽井沢町発地，川上村居倉）の30点で，いずれも畑作である。これらは，県が土壌の定点観測をしている場所で，土壌は風乾した後に乳鉢で微細化したものである。土壌可給態窒素は4週間培養法（土壌標準分析・測定法委員会編，1986），窒素肥沃度と関係深い全窒素，腐植の進行や窒素の有機化に關与する全炭素や C/N 比は燃焼法，可給態リン酸はトルオーグ法，CEC は全農の簡便法で求めた。

風乾した土壌サンプルに，紫色（405nm）を中心波長とする28mW の CW 半導体レーザーを照射した。分光器で計測したところ，レーザーの実際を中心波長は405nm，半値幅 5 nm であった。ロング・パス・フィルターをかけ，470から900nm の V-LIF を分光して取得するシステムを試作した（図1）。

励起光源はレーザーユニット SU-61C-405-40（オーディオテクニカ），レーザーユニット駆動用電源 SUP-60M（オーディオテクニカ）を用いた。レーザー電源は DC+9V の設定で用いた。レーザーは材料に対して45度の角度で照射し，レーザーユニット先端から材料のレーザー照射部までの距離は1.5cmとした。材料からの蛍光は暗箱中に取り込んだファイバーの先端で受光した。受光部には励起光を遮蔽するため470nm 以下の光を遮断する短波長カットフィルター VIS470nmφ25（朝日分光）を組み込んだ。受光部は材料の上部45度の角度に設置し，その距離は4.5cmとした。レーザーの出

力は，光パワーメーター（日置電気）を用いて測定したところ，土壌表面において28mW/cm²だった。

スペクトル解析にはマルチチャンネル検出器 PMA-11（C7473-36，浜松ホトニクス）を用いた。分析対象は470-900nm の可視～近赤外領域の蛍光スペクトルである。PMA-11の検出データは2 nm 間隔に変換した。2 nm 間隔のスペクトルの隣り合う5波長の移動平均をとり，これを1サンプルから得られる蛍光スペクトルとして解析に用いた。

一次微分値を用いた PLS 回帰分析（Partial Least Squares Regressions）によるスペクトル解析を行った。蛍光の微分値（100ポイント）を説明変数とする PLS 回帰分析をした。PLS 回帰分析は，Wold（1975）により開発されたケモメトリクス手法で，説明変数間の相関が高い場合でも，それらを潜在変数と呼ばれる中間変数に集約した上で分析を進める。そのために多重共線性があるデータでも安定したパラメータの推定ができ，有効な回帰モデルが得られる特徴を持った分析法である。また，分光データのように独立変数が目的変数（化学分析データ数）に比べて多い場合に有効な手法である。ここで用いた統計分析ソフトウェアは Excel 多変量解析 ver.6（株エスミ）である。最適な潜在変数と回帰係数はクロスバリデーション法（推定と較正を同時に実施する方法）を用いて決定した。

PLS 回帰による推定は，蛍光微分値の偏差に回帰係数を乗じた数値の和に全サンプルの平均値を加えることで算出される。その式は以下の通りである。

$$\hat{Y}_n = b_1[x_{1,n} - \bar{x}_1] + b_2[x_{2,n} - \bar{x}_2] + \dots + b_m[x_{m,n} - \bar{x}_m] + \bar{y}$$

- \hat{Y}_n = 推定値（従属変数，サンプル番号 1～n）
- x_m = 説明変数（蛍光の微分値，1～m）
- b_m = PLS 回帰係数（1～m）
- \bar{y} : 平均値（サンプル番号 1～n の平均値）

結果および考察

V-LIF で取得した蛍光スペクトルと微分スペクトルの例を図2に示した。2 nm 間隔の値をもとにスペクトルをとると，470nm から800nm 後半にかけての範囲に蛍光が見られた。また，520nm と570 nm 付近に特にピークが検出された。この蛍光は多くの有機化合物が発する領域であり，土壌中の有機物によるものと考えられる。可給態窒素や可給態リン酸などに関係が深い土壌中の腐植の量を反映したものと推察されるので，スペクトル解析を進めることにした。

Milori *et al.* (2006) は，LIF スペクトルの積分

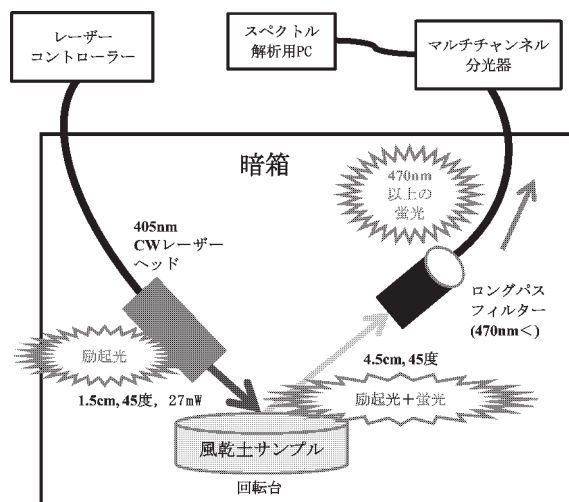


図1 紫レーザー励起蛍光スペクトル計測システム

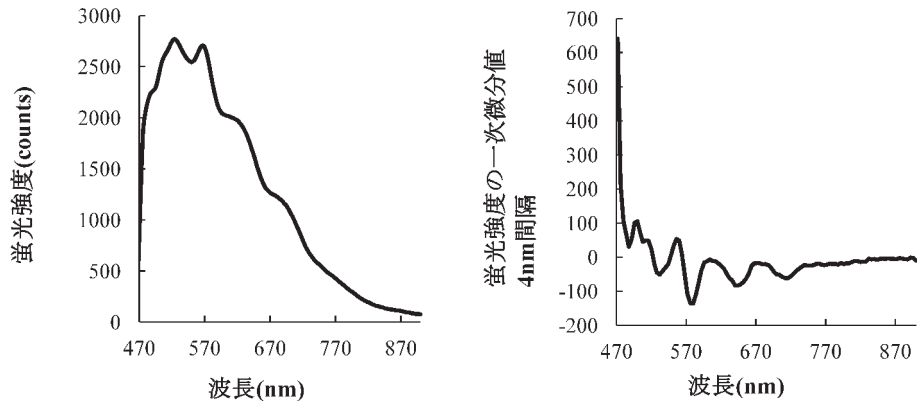


図2 風乾土壌から得られた紫レーザー励起蛍光スペクトル

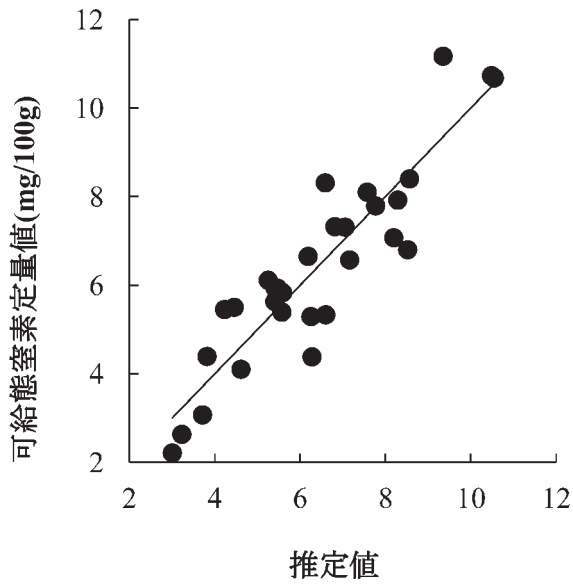


図3 可給態窒素の推定

潜在変数：5, $y = x - (9E-14)$, $R^2 = 0.828$

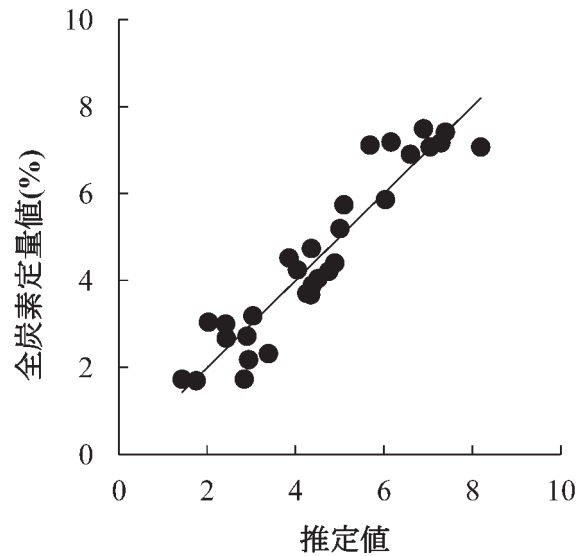


図5 全炭素の推定

潜在変数：4, $y = x + (E-13)$, $R^2 = 0.889$

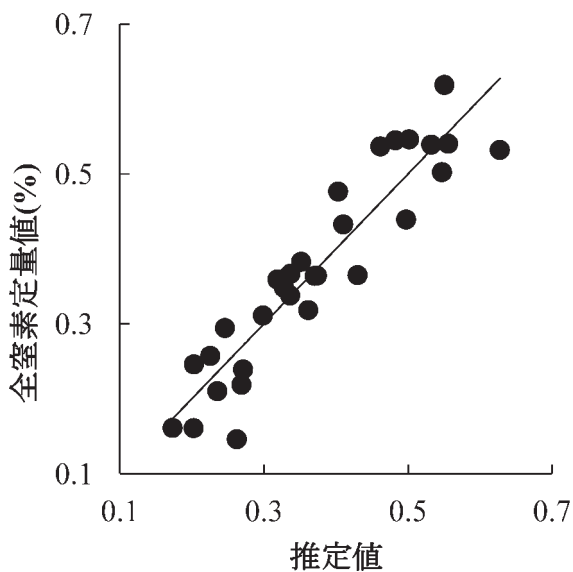


図4 全窒素の推定

潜在変数：4, $y = x - (3E-14)$, $R^2 = 0.861$

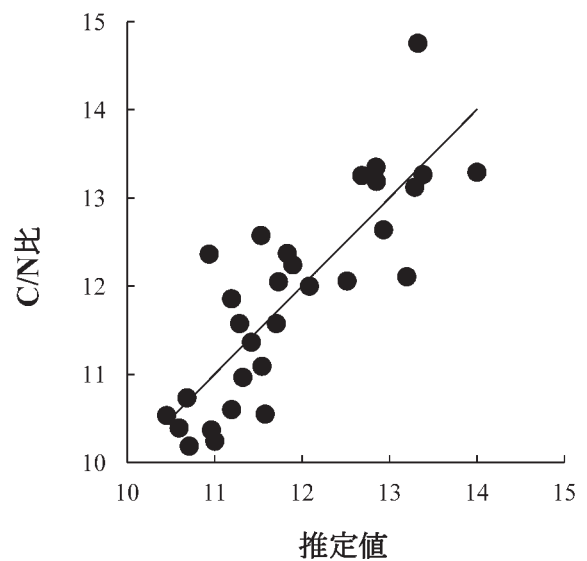


図6 C/N比の推定

潜在変数：4, $y = x - (3E-12)$, $R^2 = 0.699$

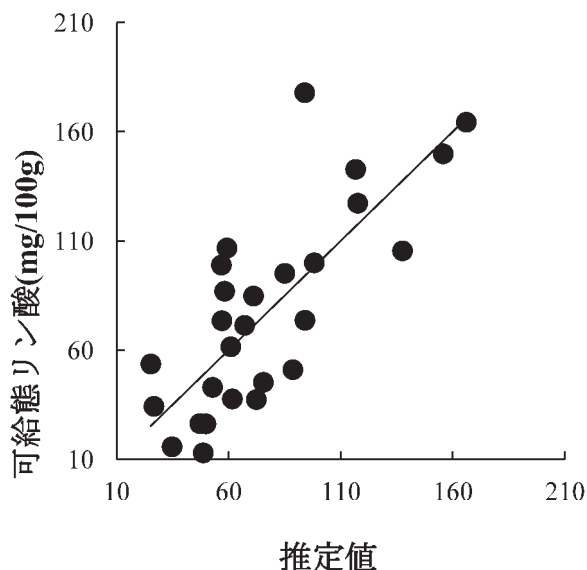


図7 可給態リン酸の推定

潜在変数：3, $y=x+(2E-13)$, $R^2=0.611$

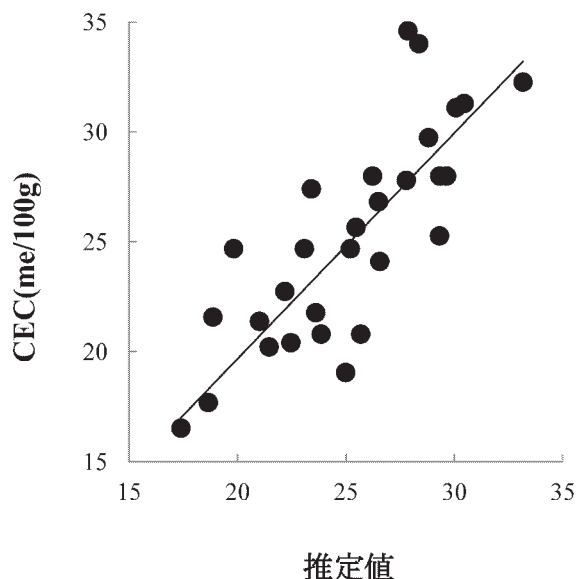


図8 陽イオン交換容量の推定

潜在変数：3, $y=1.028x-0.899$, $R^2=0.651$

値を用いて土壤有機物や腐食化程度の推定をしている。その報告を参考にして蛍光の積分値を用いて推定すると、決定係数は、全炭素、全窒素、可給態リン酸では0.4、C/N比では0.3、可給態窒素では0.2程度と実用性は極めて低いことがわかった。また、比較的強い蛍光が検出される500nm以上の蛍光を50nmずつ分割して積分値を用いても推定力は向上しなかった。

他方、微分値を用いてPLS回帰をすると、可給態窒素(図3)、全窒素(図4)、全炭素(図5)において高い推定精度が得られ、またそれらよりも推定精度は低いものの、可給態リン酸(図7)、C/N比(図6)、CEC(図8)の推定も可能なことが示唆された。

決定係数は全炭素(0.889)、全窒素(0.861)、可給態窒素(0.828)、C/N比(0.699)、陽イオン交換容量(0.651)、可給態リン酸(0.611)の順で高い数値を示した。可給態窒素、全炭素、全窒素を従属変数としたとき、決定係数は0.82以上と高い数値を示した。井上ら(1991)は風乾土壤を粉碎しただけのサンプルを用いて、近赤外反射分光分析法による土壤中の全窒素、全炭素及び抽出有機態窒素の測定を試みたが、抽出有機態窒素だけは推定できなかった。それに対して、本報告のV-LIFのスペクトルをもとにしたPLS回帰の結果は、いずれも極めて良好だった。PLS回帰分析はケモメトリクス(尾崎ら, 2002)の手法の一つであり、植生などの生態系の評価に用いられている(井上ら, 2008)。このV-LIFスペクトル分析の結果は、風乾土壤の

粉碎サンプルから可給態窒素、全窒素、全炭素、可給態リン酸、CECなどの地力にかかわる化学形質がおおまかではあるが推定できることが示され、低環境負荷型化学分析法(green chemistry)としても発展性があると考えられた。

可給態リン酸を従属変数としたときの決定係数は0.611であった。可給態リン酸の簡易推定法の試みとして、高感度反射式光度計を用いた簡易推定法(茨城県農業総合センター, 2002)があり、可給態リン酸の定量値と推定値の相関における決定係数は0.82と本実験よりも高い数値を示している。本実験におけるLIFの手法はサンプルの土壤が異なるので直接比較はできないが、これと比べ精度は落ちるものの抽出等の前処理の必要が無く、多項目を同時に推定できるという利点があるため、今後は精度を向上させることが課題である。

可給態リン酸とCECは有機物の量と粘土鉱物の質と関係が深いので、これらの推定結果は有機物由来の蛍光がV-LIFに反映していると考えられる。土壤表面は粉碎しても粗であるため、この推定精度を向上するためには工学的な改善も必要と考えられる。レーザー照射面積の拡大ができる簡単なサンプル回転台を設置したところ、計測できる土壤表面の領域を大幅に拡大でき、測定値が安定したので、さらに検討する必要がある。また、多重波長励起法(杉山ら, 2010)による蛍光指紋も有望な手法と考えられ、今後検討の余地がある。

C/N比を従属変数とした時、決定係数は0.699と比較的高い値を示した。C/N比はそれぞれの定量

値の比から算出するのが一般的であり、その数値自体を直接推定するという試みはほとんどない。本実験の結果から、V-LIFを用いたC/N比の直接推定の可能性が示された。これは、堆肥等の有機質肥料の堆肥化の指標としても重要であり(久馬編, 1997), 水耕栽培の安定性を左右する溶液中のC/N比の推定・制御にも応用できると考えられた。また紫の波長だとファイバーで伝送して計測器に導入できるので、計測装置の低コスト化と情報集中処理に有望と考えられるので、継続して調査中である。

この試験結果から、黒ボク土壌では乾土100gあたり数mgしか含まれない可給態窒素量~数%の炭素までの広い範囲の化学的形質が迅速かつ簡便に多項目計測するための基礎的知見を得られたと考える。次のステップとして、土壤微生物集団の資源利用に関する表現型やメタゲノム解析による遺伝子型の多様性の解析の結果を、土壤可給態窒素量などの化学形質と照らし合わせることを課題の一つである。つまり、土壤の化学性と生物性の評価を同時に行うことによって低環境負荷型の作物生産の追及ができると考えられる。

謝 辞

土壤肥料学関係の共同研究においてお世話になった、元野菜花き試験場の佐藤 強研究員とCEC分析に協力いただいた出澤文武研究員に感謝いたします。

引用文献

赤塚 恵・坂柳迪夫(1964)畑土壌における窒素の供給力検定方法に関する二三の考察. 北海道農試彙報 83: 64-70.
井上直人・浅井貴之・山田和義・樋口太重(1991)近赤外反射分光分析法による土壌中の全窒素全炭素及び抽出有機態窒素の測定. 北陸作物学会報 26: 105-108.
井上吉雄・ミア ギャッシュェイン・境谷栄治・中野憲司・川村健介(2008)ハイパースペクトル計測に基づく正規化分光指数NDSIマップおよび波長選択型PLSによる植物・生態系変量の評価. 日本リモートセンシング学会誌 28(4): 317-330.

茨城県農業総合センター(2002)土壤の可給態リン酸は高感度反射式光度計で簡易に定量できる. 農業研究所情報 213: 11.

小川吉雄・加藤弘道・石川 実(1989)リン酸緩衝液抽出による可給態窒素の簡易測定法. 日本土壤肥料学雑誌 60(2): 160-163.

尾崎幸洋・宇田明史・赤井俊雄(2002)化学者のための多変量解析—ケモメトリックス入門. 講談社, p.50-70.

久馬一剛編(1997)最新土壌学. 朝倉書店, 東京, p.43-53, 193-194.

斎藤雅典(1988)土壤可給態窒素量の紫外外部吸光度法による評価. 日本土壤肥料学雑誌 59(5): 493-495.

佐藤 強・上沢正志(1997)紫外微分スペクトルによる水田土壌可給態窒素の迅速評価法. 日本土壤肥料学雑誌 68(5): 568-570.

杉山武裕・藤田かおり・蔦 瑞樹・杉山純一・柴田真理朗・粉川美踏・荒木徹也・鍋谷浩志・相良泰行(2010)励起蛍光マトリクスによるそば粉と小麦粉の混合割合の推定. 日本食品科学工学会誌 57(6): 238-242.

土壤標準分析・測定法委員会編(1986)土壤標準分析・測定法, 博友社, 東京, p.94-124.

橋本淳樹・田中 豊(2010)PLS回帰におけるモデル選択. アカデミア, 情報理工学編 10: 39-49.

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, 農業技術研究所報告 B, 土壌・肥料 (34): 1-81.

松本真悟・阿江教治・山縣真人(2000)中性リン酸緩衝液および希硫酸抽出による土壌の可給態窒素の推定と抽出される有機態窒素の特性. 日本土壤肥料学雑誌 71(1): 86-89.

Milori, D., H. Galetiab, L. Martin-Netoa, J. Dieckow, M. Péreza, C. Bayer and J. Saltone (2006) Organic Matter Study of Whole Soil Samples Using Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy. Soil Science Society of America Journal 70: 57-63.

Wold, H. (1975) Soft modeling by latent variables: the Nonlinear Iterative Partial Least Squares Approach, Perspectives in Probability and Statistics, Papers in Honour of M. S. Bartlett, pp.520-540, Academic Press.
Matsumoto, S. and N. Ae (2004) Characteristics of Extractable Soil Organic Nitrogen Determined by Using Various Chemical Solutions and Its Significance for Nitrogen Uptake by Crops. Soil science and plant nutrition 50(1): 1-9.

Violet-laser induced fluorescence analysis of soil chemical characteristics related to crop productivity in Andosol

Naoto INOUE*¹⁾, K. ORII¹⁾, M. SEKINUMA¹⁾ and S. YOSHIDA²⁾

¹⁾Shinshu University, Minamiminowa, 399-4598 Japan

²⁾Vegetable and Ornamental Crops Exp. Stn. of Nagano,
Shiojiri, Nagano, 399-6461 Japan

Summary

A new system of violet laser induced fluorescence (V-LIF) was developed for monitoring the potential soil productivity. The excitation wavelength was 405nm by CW laser and fluorescence data from 470 to 900nm were detected by compact multichannel spectrophotometer. The dried samples of Andosol soil were prepared from 30 points at the cool upland fields in the eastern part of Nagano prefecture. The contents of available nitrogen, total nitrogen (N), total carbon(C), C/N ratio, available phosphate and cation exchange capacity (CEC) were estimated by spectrum analysis. From the results of partial least squares regression, the first derivative values of fluorescence spectrum were useful to estimate the available nitrogen, N, C, C/N ratio, available phosphate and CEC in the soil. The V-LIF suggested to be affected by the organic carbon compounds in the soil and to have the information for upland soil productivity of Andosol.

Key word : Andosol, Carbon, Chemometrics, Laser, Nitrogen, Soil