

氏名	サムエル ムニヤカ キマニ <b>SAMUEL MUNYAKA KIMANI</b>
本籍（国籍）	ケニア共和国
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研 788 号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 2 3 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学
学位論文題目	<b>Utilization of Azolla in rice cultivation for climate change adaptation and mitigation（気候変動の適応と緩和のための稲作におけるアゾラの利用）</b>
学位審査委員	主査 山形大学教授 程 為国 副査 俵谷 圭太郎(山形 教授),青山 正和(弘前 教授),立石 貴浩 (岩手 准教授)

### 論文の内容の要旨

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most important crops in the world. And with a predicted population increase in the near future, an increase in rice production to meet its demands is inevitable. This projected rise in production however faces several threats occasioned by climate change. These threats mainly include; (1) irrigation water shortages as a result of competition for water from other uses as well as the threat of droughts, (2) soil fertility and organic matter loss as a consequence of chemical fertilizer overuse and low manure amendments, and (3) increasing global warming as a result of anthropogenic greenhouse gas (GHGs) emissions. However, rice is not just a victim of climate change but also a major contributor, as paddy fields are considered the most important sources of anthropogenic GHGs; methane (CH<sub>4</sub>) and nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emissions. Therefore, adaptation and mitigation strategies are needed to cope with the effects of climate change on rice production as well as reduce water loss and GHGs emissions from rice fields. Azolla is a genus of small aquatic ferns that is naturally found in temperate and tropical regions worldwide, particularly in constantly flooded paddy ecosystems. Through its symbiosis with the cyanobacterium *Anabaena azollae*, Azolla is capable of fixing atmospheric nitrogen (N) and has thus been successfully utilized as green manure in lowland rice fields. However, the mitigation efficiency of Azolla on GHGs emissions from rice paddies remains contradictory. Furthermore, literature on its influence on water loss remains scarce. Within this context, this research study aimed to determine the potential of Azolla application not only as a promising alternative to chemical fertilizers but also as a possible water saver and a likely management practice to decrease the CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions from flooded paddy ecosystems.

First, to determine the influence of the rapidly growing Azolla cover on evapotranspiration (ET), two independent pot experiments were conducted in an incubation chamber (experiment 1) and greenhouse (experiment 2). The results showed that Azolla cover significantly decreased ET losses on average by 17.3% (experiment 1) and 20.0% (experiment 2) compared with open water surfaces and both open water surfaces and green polyester covered mats (analogous to plant cover), respectively. The ET reduction potential by Azolla in both experiments was attributed to, but not limited to, its anatomy,

horizontal placement of its leaves, and smaller leaf area, which possibly restricted simultaneous evaporation-transpiration losses by shielding much of the water surface.

Second, to investigate the effect of Azolla cover on simultaneous CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions from the constantly flooded rice paddies, an outdoor pot experiment was setup in a single rice-growing season in 2016. Two treatments, control (rice plant only) and Azolla cover (rice plus Azolla covering on the flooding water) were established in four replications. The bulk alluvial soil used in this experiment was collected from a rice field at the University Farm. Results showed that dual cropping of Azolla with rice significantly suppressed CH<sub>4</sub> emissions by 34.7% compared with the control, likely due to an increase in dissolved oxygen concentration and redox potential at the soil-water interface between the flooding water and soil surface. However, the Azolla cover did not significantly affect N<sub>2</sub>O emissions from both treatments. This implied that Azolla cover did not affect extra N<sub>2</sub>O flux from dual Azolla and rice cropping ecosystems.

Third, to investigate the influence of Azolla incorporation as green manure and its subsequent growth as a dual crop in conjunction with chemical fertilizers, on CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions from flooded paddy soil planted with rice, an outdoor pot experiment was setup in a single rice-growing season in 2017 with three treatments, chemical fertilizer (NPK) as control, incorporation of Azolla as green manure (AGM), and AGM plus basal chemical fertilizer (NPK + AGM). Results showed that AGM and NPK + AGM treatments significantly increased seasonal CH<sub>4</sub> emissions by 31.5% and 43.5%, and decreased seasonal N<sub>2</sub>O emissions 3.4 and 4.6 folds compared to NPK, respectively. Both the CH<sub>4</sub> increase and N<sub>2</sub>O decrease were attributed to the effect of the incorporated Azolla particularly at the early rice growth stages. Significantly higher grain yields were observed under AGM (32.5%) and NPK+ AGM (36.3%) compared to NPK. There were no significant differences in the CH<sub>4</sub> emissions per grain yield among treatments, however, compared to NPK, AGM and NPK+ AGM treatments significantly reduced N<sub>2</sub>O emissions per grain yield by 78.7% and 84.1%, respectively.

Fourth, in the same batch of experiments as highlighted in the third section above, we investigated the effects of poultry-litter biochar (hereinafter biochar) amendment and its co-application with NPK and AGM (i.e., NPK + biochar and AGM + biochar) on the simultaneous CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions. The main objective was to determine the influence of AGM (incorporated as green manure and its successive growth as a cover) co-applied with biochar in lowland rice paddies on simultaneous CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions. Results showed that compared with AGM and NPK + biochar treatments, AGM + biochar did not significantly influence cumulative CH<sub>4</sub> emission during the whole rice growth period. Conversely, AGM + biochar significantly reduced N<sub>2</sub>O emissions by 76.4%-95.9% compared with the other treatments, with a significantly high interaction ( $P < 0.01$ ) between biochar and fertilizer amendments. Additionally, compared with all other treatments, AGM + biochar significantly increased rice grain yield by 27.3%–75.0%, and consequently, decreased both yield equivalent CH<sub>4</sub> emissions by 24.7%–25.0% and N<sub>2</sub>O emissions by 81.8%–97.7%. These results suggest that the co-application of Azolla and biochar offers a novel approach to increase yield while mitigating CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions.

Fifth, to determine the effect of biochar application and its co-treatment with NPK and/or Azolla as green manure on rice yield, N uptake, and N use efficiency, eight treatments were compared; no amendment (control), NPK, AGM, NPK+ AGM, without and with biochar amendment. Biochar was the main factor, with fertilizer N sources (NPK and AGM) as the sub-factors. Results showed biochar

amendment significantly increased grain yield (32.4%), grain N uptake (23.9%), apparent N recovery efficiency (28.1%), agronomic N efficiency (50.0%), and internal N utilization efficiency (35.9%), and decreased the soil N dependence rate (-15.2%) compared with the without biochar amended treatments. No significant synergistic interactions between biochar and the fertilizer N sources were observed on all determined parameters in this study setup.

In conclusion, the utilization of *Azolla* in rice cultivation has the potential to reduce chemical fertilizer application needs and irrigation water, increase rice yield, and reduce and/or mitigate CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions. However, these results were based on pot experiment setups in the laboratory and glasshouse, and on in situ outdoor setups during single rice cropping systems. Thus, long-term field studies should be carried out to validate the findings.

### 要旨和訳：

イネは世界で最も重要な作物の 1 つであり、人口増加に伴うコメの増産は避けられない。しかし、コメの増産は、気候変動から幾つかの脅威に直面している。それらの脅威は主に次の 3 つが挙げられる。(1) 他の用途からの水との競争および干ばつや降水パターンらが齎した灌漑用水の不足、(2) 過剰な化学肥料と少ない有機物資材の施用による土壌肥沃度の低下、(3) 増加し続ける温室効果ガスの人為的な排出による地球温暖化。また、水田は温室効果ガスのメタン (CH<sub>4</sub>) と一酸化二窒素 (N<sub>2</sub>O) の重要な発生源であるため、稲作は気候変動の被害者だけではなく、気候変動の加害者でもある。従って、稲作における気候変動の適応と緩和戦略として、節水栽培と温室効果ガスの削減は必要である。アゾラは、温帯および熱帯地域に分布する水生シダ植物で、藍藻の *Anabaena azollae* との共生関係を持ち、大気中の窒素を固定できるため、昔から水田の緑肥として利用されてきた。しかし、今までの研究で、水田からの温室効果ガス放出量に及ぼすアゾラの影響は相違があり、またアゾラ施用の節水効果に関する研究はまだ報告されていない。上述の研究背景を踏まえ、本研究では、稲作生産における化学肥料の代わりになる有機質肥料だけでなく、節水栽培と温室効果ガス CH<sub>4</sub> と N<sub>2</sub>O 排出量を削減するために、アゾラ応用の可能性を明らかにすることを目的とした。

第一に、水面からの蒸発散量 (ET) に及ぼすアゾラの影響を調べるために、2 つのポット実験を人工培養器 (実験 1) と温室 (実験 2) で行った。アゾラに覆われているポットからの ET は、覆われていないポットとグリーンポリエステルマット (植物カバーの類似物) に覆われているポットからの ET より、実験 1 で 17.3%、実験 2 で 20.0% 有意に減少したことを示した。アゾラに覆われている両方のポット実験における ET の減少は、アゾラ葉の水平配置および小さい葉面積など解剖学的構造の特徴により、アゾラに覆われている水面からの蒸発と蒸散は同時に制限されることを示唆した。

第二に、常時湛水の水田土壌からの CH<sub>4</sub> と N<sub>2</sub>O の放出量に及ぼすアゾラ被覆の影響を調査するために、対照 (稲のみ) とアゾラ被覆の 2 つの処理区を設け、4 反復の室外ポット実験を 2016 年に行った。実験用土壌は山形大学農場から採集した沖積土であった。その結果、アゾラに覆われている被覆区の水田土壌か

らの CH<sub>4</sub>排出量は、対照区と比べると 34.7%で有意に抑制された。これは、アゾラ被覆区の表水層と土壌表面の間に溶存酸素濃度と酸化還元電位がアゾラ被覆によって上昇され、CH<sub>4</sub>の酸化が促進されたと考えられる。一方、両処理区からの N<sub>2</sub>O 放出量は大きな差がなく、アゾラの被覆は N<sub>2</sub>O 放出量に与える影響がなかったことを示唆した。

第三に、アゾラを緑肥として水田土壌にすき込んだ後、引き続きアゾラに覆われている水田土壌からの CH<sub>4</sub>と N<sub>2</sub>O の放出量を調査した。対照の化学肥料 (NPK)、アゾラをすき込み (AGM)、AGM と化学肥料両方施用 (NPK+AGM) の 3 つの処理区も設け、2017 年に室外ポット実験を行った。NPK と AGM 区の窒素施肥は、同量であった。その結果は、イネ生育期間中に、AGM および NPK+AGM 処理区から CH<sub>4</sub>放出量は、NPK と比べると、31.5%および 43.5%有意に増加したが、逆に N<sub>2</sub>O 放出量は、それぞれ 3.4 倍および 4.6 倍で有意に減少した。CH<sub>4</sub>の増加と N<sub>2</sub>O の減少は、主にイネの初期成長段階で生じたもので、すき込んだアゾラに影響されたと考えられる。しかし、NPK と比べると、AGM と NPK+AGM 区の籾収量は、それぞれ 32.5%と 36.3%で、有意に高かったため、処理間で籾収量あたりの CH<sub>4</sub>放出量は、3 処理区の間には有意差がなかった。一方、籾収量あたりの N<sub>2</sub>O 放出量は、AGM と NPK+AGM 処理区が、NPK よりそれぞれ 78.7%と 84.1%で有意に削減された。

第四に、アゾラと家禽厩肥からできたバイオチャー（以下にバイオチャと省略）の同時施用は、どのように水田土壌からの CH<sub>4</sub>と N<sub>2</sub>O の放出量に与える影響を明らかにするため、上記の第三実験の NPK 区と AGM 区と合わせて、バイオチャー同時施用区 (NPK +バイオチャー区と AGM +バイオチャー区) を加えて、第三実験と同様な調査を行った。その結果は、NPK+バイオチャー区と AGM と比較して、生育期間中に AGM+バイオチャー区からの CH<sub>4</sub>放出量は、有意な差がなかった。逆に、AGM +バイオチャー区は、他の処理と比較して N<sub>2</sub>O 排出量が 76.4%~95.9%で有意に削減された。バイオチャーとアゾラ施用の相互作用も有意であった ( $P < 0.01$ )。さらに AGM +バイオチャー区の籾収量は、他処理区より 27.3%~75.0%で有意に増加し、次第に籾収量あたりの CH<sub>4</sub>放出量は 24.7%~25.0%で、籾収量あたりの N<sub>2</sub>O 排出量も 81.8%~97.7%で減少した。これらの結果は、アゾラとバイオチャーの同時施用は、イネの収量の増加や CH<sub>4</sub>と N<sub>2</sub>O 放出量の削減に効果的なアプローチであることを示唆した。

第五に、バイオチャーとアゾラ緑肥の同時施用は、どのようにイネの収量、窒素吸収量、窒素利用率に及ぼす影響を明らかにするため、8 つの処理のポット実験を用いて、2 つ因子の統計解析を行った。処理区には、無施肥 (対照)、化学肥料施用 (NPK)、アゾラ緑肥施用 (AGM)、AGM と化学肥料両方施用 (NPK+AGM) の 4 つの処理区に、バイオチャーを施用した 4 つの処理区を加えた。バイオチャーが主因子とし、その他が副因子とした。その結果は、バイオチャーの施用により、籾収量 (32.4%)、籾窒素吸収量 (23.9%)、窒素の見かけの回収率 (28.1%)、実用施肥窒素効率 (50.0%)、内部窒素利用効率 (35.9%) らは、有意に増加した。一方、土壌 N 依存率 (-15.2%) が減少した。なお、バイオチャーと他肥料因子の間に有意な相互作用は認められなかつ

た。

以上のことから、稲作におけるアゾラの利用は、 $\text{CH}_4$ と $\text{N}_2\text{O}$ の放出量を軽減または緩和しながら、化学肥料の施用量と用水量を減らし、米の収量を増やすのは、可能であることが示唆された。ただし、これらの結果は、それぞれ単年度の室内外のポット実験に基づいたもので、実際の水田圃場での連続的な長年調査はさらに必要である。

## 論文審査の結果の要旨

世界人口増加に伴うコメの増産は、気候変動による灌漑用水の不足や、土壌肥沃度の低下や、地球温暖化など幾つかの脅威に直面している。稲作における気候変動の適応と緩和戦略として、節水栽培と温室効果ガスの削減は必要である。アゾラは、温帯および熱帯地域に分布する水生シダ植物で、藍藻の *Anabaena azollae* との共生関係を持ち、大気中の窒素を固定できるため、昔から水田の緑肥として利用されてきた。本論文では、稲作生産における化学肥料の代わりになる有機質肥料だけでなく、節水栽培と温室効果ガス  $\text{CH}_4$ と $\text{N}_2\text{O}$  排出量を削減するために、アゾラ応用の可能性を明らかにするために以下の5つの研究内容をまとめた。

第一に、水面からの蒸発散量に及ぼすアゾラの影響を調べるために、2つのポット実験を人工培養器と温室で行った。アゾラに覆われているポットからの発散量は、対照区よりより、17.3%~20.0%有意に減少したことを示唆した。

第二に、常時湛水の水田土壌からの  $\text{CH}_4$ と $\text{N}_2\text{O}$  の放出量に及ぼすアゾラ被覆の影響を調査するために、対照区とアゾラ被覆区を設け、2016年に室外ポット実験を行った。アゾラに覆われている被覆区からの  $\text{CH}_4$ 排出量は、対照区より34.7%で有意に抑制された。 $\text{N}_2\text{O}$ 放出量に与える影響がなかった。

第三に、アゾラを緑肥として水田土壌にすき込んだ後、引き続きアゾラに覆われている水田土壌からの  $\text{CH}_4$ と $\text{N}_2\text{O}$  の放出量を調査した。対照の化学肥料(NPK)、アゾラをすき込み (AGM)、AGMと化学肥料両方施用 (NPK+AGM) の3つの処理区も設け、2017年に室外ポット実験を行った。NPKと比べると、AGMとNPK+AGM区の籾収量は、それぞれ32.5%と36.3%有意に高かったため、処理間で籾収量あたりの  $\text{CH}_4$ 放出量は、3処理区の間には有意差がなかった。一方、籾収量あたりの  $\text{N}_2\text{O}$  放出量は、AGMとNPK+AGM処理区が、NPKよりそれぞれ78.7%と84.1%で有意に削減された。

第四に、アゾラと家禽厩肥バイオチャー（以下にバイオチャー）の同時施用は、どのように水田土壌からの  $\text{CH}_4$ と $\text{N}_2\text{O}$  の放出量に与える影響を明らかにするため、上記の第三実験のNPK区とAGM区と合わせて、バイオチャー同時施用区を加えて調査を行った。アゾラとバイオチャーの同時施用は、イネの収量の増加や  $\text{CH}_4$ と $\text{N}_2\text{O}$  放出量の削減に効果的なアプローチであることを示唆した。

第五に、バイオチャーとアゾラ緑肥の同時施用は、どのようにイネの収量と

窒素利用率等に及ぼす影響を明らかにするため、8つの処理のポット実験を用いて統計解析を行った。バイオチャーの施用により、籾収量、籾窒素吸収量、窒素の見かけの回収率等は、有意に増加した。一方、土壌 N 依存率が減少した。なお、バイオチャーとアゾラ緑肥の間に有意な相互作用は認められなかった。

以上のことから、稲作におけるアゾラの利用は、 $\text{CH}_4$ と  $\text{N}_2\text{O}$  の放出量を軽減または緩和しながら、化学肥料の施用量と用水量を減らし、米の収量を増やすのは、可能であることが示唆された。

よって本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

#### 学位論文の基礎となる学術論文

1. **Kimani, S.M.**, \*Cheng, W., Kanno, T., Nguyen-Sy, T., Abe, R., Oo, A.Z., Tawaraya, K., Sudo. S. (2018) Azolla cover significantly decreased  $\text{CH}_4$  but not  $\text{N}_2\text{O}$  emissions from flooding rice paddy to atmosphere. *Soil Science and Plant Nutrition*, 64(1): 68-76.
2. **Kimani, S.M.**, Kanno, T., Tawaraya, K., \*Cheng, W. (2020) Floating *Azolla* cover influences evapotranspiration from flooded water surfaces. *Wetlands*, 40(5): 1425-1432
3. **Kimani, S.M.**, Bimantara, P.O., Hattori, S., Tawaraya, K., Sudo. S. \*Cheng, W., (2020) Azolla incorporation and dual cropping influences  $\text{CH}_4$  and  $\text{N}_2\text{O}$  emissions from flooded paddy ecosystems. *Soil Science and Plant Nutrition*, 66(1): 152-162.
4. **Kimani, S.M.**, Bimantara, P.O., Hattori, S., Tawaraya, K., Sudo, S., Xu, X., \*Cheng, W. (2020) Synergistic effects of poultry-litter biochar and Azolla co-application on  $\text{CH}_4$  and  $\text{N}_2\text{O}$  emissions from rice paddy soils. *Heliyon*, 6(9): e05042