

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15723

研究課題名（和文）生物利用可能リンはどのように形成されるか？ リン酸酸素同位体比を用いた培養実験

研究課題名（英文）Incubation experiments using phosphate oxygen isotope ratios for evaluating bioavailable phosphorus dynamics in soil systems

研究代表者

石田 卓也 (Ishida, Takuya)

広島大学・先進理工系科学研究科（総）・助教

研究者番号：70759571

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、作物生産を制御する土壌中の生物利用可能なリンがどのようにして形成されるのかを明らかにすることを目的とし、リン動態を質的に捉えることができるリン酸酸素安定同位体比を用いた土壌培養実験を行った。水田土壌を対象とした培養実験の結果は、有機態リンの無機化が生物利用可能リンの主要な形成過程であることが示していた。また水田農法の一つである冬季湛水を行うことで、リンが効率的に土壌へ吸収されることも明らかにした。さらに本研究では、リン酸酸素安定同位体比の分析方法の改良にも取り組み、簡略化することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

作物の生産量に直結する土壌中のリン動態を明らかにすることは、人口増加に伴う食糧要求の増大に面している現代社会において非常に重要である。本研究では、先端技術であるリン酸酸素安定同位体比を用いることで、リン動態を精微に評価できることを示した。本研究結果を元に実験、調査を進めることで、効果的なリン施肥法や河川・湖沼を保全する農法を考えることができる。またリン酸酸素安定同位体比は分析法が非常に困難であったことから普及が進んでいなかったため、本研究の簡略化した方法は同分析法の普及を進め、リン動態研究が深化させることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to clarify the dynamics of bioavailable phosphorus in soil systems, which controls crop production. Incubation experiment using phosphate oxygen isotope, which is a tracer for phosphorus, was conducted using rice field soil. The results shows that mineralization of organic phosphorus is the main process for forming bioavailable phosphorus. It was also revealed that phosphorus is efficiently absorbed into the soil by winter flooding practice, which is one of the traditional farming practices. In addition, this study succeeded to simplify the analytical method of phosphate oxygen isotope.

研究分野：土壌学

キーワード：リン動態 土壌養分 リン酸酸素安定同位体比 混合モデル

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 土壌における生物利用可能なリンの形成機構の解明に向けて

生物に利用可能なリンがどのように循環しているのかを明らかにすることは、リン循環研究において重要なテーマとなってきた。土壌におけるリンは粘土鉱物などにより強く固定されるため、生物にとって利用可能量が少なく、しばしば生物生産の制限要因となる。そのため、土壌微生物や植物は、細胞外酵素や有機酸を産出し、リンを速く循環させることで生物生産を維持している。しかし、複雑なリン循環経路のうち、どのプロセスが最も生物利用可能なリンの形成に寄与しているかは十分明らかになっていない。その要因の一つにリンにトレーサーとなる安定同位体が存在しないということが挙げられる。

リンに安定核種は 1 種類 ( $^{31}\text{P}$ ) しか存在しないが、リンの主要形態であるリン酸 ( $\text{PO}_4$ ) に含まれる酸素には 3 種類の安定同位体が存在し、その酸素安定同位体比 ( $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ ) のことをリン酸酸素安定同位体比 ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$ ) という。炭素や窒素安定同位体比と同様に、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  は起源や動態評価に利用することができる (Ishida et al., 2019)。土壌中のリン動態は、物理化学的なプロセスと酵素などによる生物的なプロセスの影響を受けている。そのうち物理化学プロセスは、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  値に影響を与えないため、起源となるリンの  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  値を保持することになる。一方、酵素による生物的プロセスは、リンと酸素の結合を切断するため  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  値を変化させる。その変化は、触媒する酵素反応に特異的で周囲の水酸素安定同位体比 ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$ ) と温度によって決定する。

本研究は、生物的プロセスを通じて形成された  $\text{PO}_4$  の  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  値が  $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$  と温度によって制御可能なこと、一方物理化学プロセスは元の値を維持することという性質から、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  から土壌中の生物利用可能なリンがどのプロセスを通じて形成されているのかを明らかにできるのではないかとこの着想に至った。特に各プロセスの寄与を定量的に評価できれば、生物利用可能なリンの形成メカニズムを明らかにする上で非常に有用な情報となる。

### (2) $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$ 分析法の改良

上記で述べたように  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  分析は、リン循環を評価するうえで非常に有用であるが、前処理法が非常に困難であるため、その利用は世界でも限られている。 $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  値は、試料中の  $\text{PO}_4$  から純粋なリン酸銀を形成し、質量分析計によって測定される。リン酸銀を生成する純化処理のためには多大な労力と経験に基づく調整が必要であった。今後、本研究を迅速に進行させるために、そして  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  分析が普及しリン循環研究を深化していくためには、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  分析法の簡略化が必要となる。

## 2. 研究の目的

### (1) 生物利用可能なリンの形成機構

本研究の一つ目の目的は、土壌における生物が直接利用可能な  $\text{PO}_4$  プールに対する生物体からの直接放出、有機態リンからの分解、無機態リンの溶解の 3 つの寄与率を推定する培養実験系を提案することである。安定同位体比を用いて寄与率を推定するためには混合モデルを解く必要がある。混合モデルを解くにあたり、変数の数は推定できる起源数、精度に直結する。しかし、リンのトレーサーとなる変数は  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  の一つであるため (例えば、窒素ならば硝酸 ( $\text{NO}_3$ ) の  $\delta^{15}\text{N}$  と  $\delta^{18}\text{O}$  の二変数を利用できる)、混合モデルを用いて定量的に寄与率を推定することができない。そこで本研究では  $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$  を操作することで、一つしかない変数を疑似的に二つに増やす培養実験系を提案・検討を行う。

### (2) $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$ 分析法の改良

二つ目の目的は、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  分析法の簡略化するための前処理法を開発することである。そこで  $\text{PO}_4$  を特異的に吸着するジルコニウム担持樹脂を用いた固相抽出法の検討を行う。ジルコニウム担持樹脂は、 $\text{PO}_4$  を吸着するが  $\text{NO}_3$  や塩化物イオンとは反応しないという特徴を持つ (Okumura et al., 2001)。ジルコニウム担持樹脂を用いることでそれらの不純物から  $\text{PO}_4$  を効率的に純化できる可能性がある。

## 3. 研究の方法

### (1) 生物利用可能なリンの形成機構

培養実験は、冬季湛水を行った水田と行わなかった水田の土壌を対象に行った。冬季湛水は、通常乾田化している冬季の水田に水を張り人為的な湿地を作ることによって生物の生息地を提供できる環境保全型農法の一つである。培養は  $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$  が異なる ( $-7.0\text{‰}$ ・ $89.1\text{‰}$ ) 培養水を用いて湛水状態とし、30 日間 15℃で行った。培養期間中の培養水のリン濃度をモニタリングし、さらに培養前後の土壌中の生物利用可能な画分リン、安定無機態リンの  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  値と濃度をそれぞれ測定した。生物によって循環された  $\text{PO}_4$  (吸収と放出) と有機態リンの無機化によって生成された  $\text{PO}_4$  の  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  値はピロホスファターゼとアルカリホスファターゼの同位体分別係数 (Chang and Blake, 2015) と培養条件である  $^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$ 、水温から推定した。寄与率は、培養前後の土壌中  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$

値と上記の各プロセスの推定値から、ベイズ混合モデルを用いて推定した。

#### (2) $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$ 分析法の改良

ジルコニウム担持樹脂 (ZrME カラム) は市販のキレート樹脂カラムに、硝酸酸化ジルコニウム溶液を加えることで作成した。今回提案する前処理法 (ZrME 法) は、市販の有機物除去カラム (HLB カラム) と ZrME カラムを連結させ  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  分析に必要な  $\text{PO}_4$  を溶解有機物 (DOM) 等の不純物から分離することができる (図 1)。実験として、既知の  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  値を持つ試薬と土壌抽出液、河川水を対象に ZrME 法と既存の方法を用いて  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  値を分析した。そしてそれらの値を比較することで ZrME 法の妥当性を検証した。

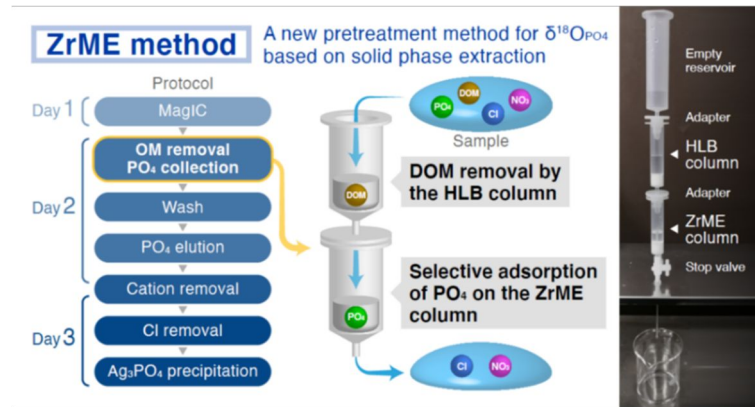


図 1 ZrME 法の概略

### 4. 研究成果

#### (1) 生物利用可能なリンの形成機構

培養前後の水田土壌における生物利用可能リンは培養水の  $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$  に応じて初期値の 19.8‰ から 21.9‰ と 4.4‰ にそれぞれ変化した。各プロセスから形成される  $\text{PO}_4$  の  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  推定値から生物利用可能リンの形成において、有機態リンの無機化が主要因であることが示唆された。さらに混合モデルによる寄与率の定量的評価を試みたが、培養後の生物利用可能リンの  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  値を説明するプロセスが不足しており解くことができなかった。これは想定していたプロセスが不足、または  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  の初期値や無機化に伴う同位体分別係数に伴う誤差が原因として考えられる。

培養水のリン濃度は、冬季湛水を行った土壌培養系で有意に低くなった (図 2)。これは、冬季湛水を行うことで培養水中のリンが速やかに土壌に吸収されることを示している。この現象は、稲へのリン吸収効率を高め、水田から河川・湖沼へ流出するリンを抑制できることを示唆しており、冬季湛水が水質保全への効果を持つとして、本成果を国際学術誌で発表した (Ishida et al., 2020)。

本研究期間内に  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  と  $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$  を組み合わせた培養実験系のひな型を示すことができた。今後、生物利用可能リンの形成に関して定性的な評価から定量的な評価に向けて更なる研究が望まれる。

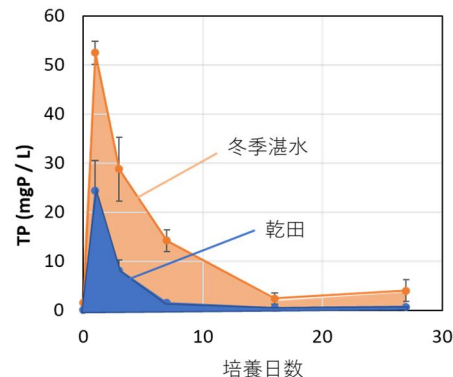


図 2 培養水中のリン濃度の時間変化

#### (2) $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$ 分析法の改良

ZrME 法は、対象とした全ての試料で既存の前処理法と同じ  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  値を示し、既存の方法と同等の分析精度を持つことを証明できた。本方法は、5 日以上の複雑な操作を必要とした既存の方法と比較し、単純なカラム操作を中心として 3 日間で前処理を終えることができる。そのため ZrME 法は  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  分析法の新たな標準法になり、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$  分析の普及が拡大していくことが期待される。本成果は国際学術誌で発表予定である (under minor revision)。

### 引用

- Chang, S.J., Blake, R.E., 2015. Precise calibration of equilibrium oxygen isotope fractionations between dissolved phosphate and water from 3 to 37°C. *Geochim. Cosmochim. Acta* 150, 314–329. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2014.10.030>
- Ishida, T., Uehara, Y., Ikeya, T., Haraguchi, T.F., Asano, S., Ogino, Y., Okuda, N., 2020. Effects of winter flooding on phosphorus dynamics in rice fields. *Limnology* 21, 403–413. <https://doi.org/10.1007/s10201-020-00621-3>
- Ishida, T., Uehara, Y., Iwata, T., Cid-Andres, A.P., Asano, S., Ikeya, T., Osaka, K., Ide, J., Privaldos, O.L.A., Jesus, I.B.B. De, Peralta, E.M., Triño, E.M.C., Ko, C.-Y., Paytan, A., Tayasu, I., Okuda, N., 2019. Identification of Phosphorus Sources in a Watershed Using a Phosphate Oxygen Isoscape Approach. *Environ. Sci. Technol.* 53, 4707–4716. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05837>

Okumura, M., Tong, L., Fujinaga, K., Seike, Y., 2001. A simple and rapid in situ preconcentration method for the determination of phosphate in environmental waters by use of solid-phase extraction, and its applications to brackish lake waters. *Fresenius. J. Anal. Chem.* 370, 104–107. <https://doi.org/10.1007/s002160100739>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishida T., Uehara Y., Ikeya T., Haraguchi T., Asano S., Ogino Y., Okuda N.	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of winter flooding on phosphorus dynamics in rice fields	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Limnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10201-020-00621-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 石田卓也	4. 巻 3
2. 論文標題 土壌中のリン動態の解明に向けて リン酸酸素安定同位体比の可能性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 月刊アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 65-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takuya Ishida, Yusuke Tomozawa, Xin Liu, Jun Qian, Mitsuyo Saito, Shin-ichi Onodera, Noboru Okuda, Syuhei Ban
2. 発表標題 Distribution of phosphate oxygen isotope in boring core samples for evaluation of phosphorus cycling in groundwater.
3. 学会等名 Japan Geoscience Union Meeting 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田卓也
2. 発表標題 リン酸酸素安定同位体比を用いた土壌における可給態リン形成機構の解明
3. 学会等名 第10回同位体環境学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田卓也
2. 発表標題 水田の生物多様性と栄養循環を高める超学際研究の展開
3. 学会等名 第67回日本生態学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takuya Ishida, Yusuke Tomozawa, Xin Liu, Mitsuyo Saito, Shin-ichi Onodera, Noboru Okuda, Syuhei Ban
2. 発表標題 Identification of enriched phosphate in groundwater: insights from distribution of phosphate oxygen isotope ratio in aquifer sediments
3. 学会等名 Japan Geoscience Union Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田卓也
2. 発表標題 The incubation method using 18O-water and phosphate oxygen isotope for quantitative evaluation of bioavailable phosphate in soil.
3. 学会等名 日本地球惑星連合大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田卓也, 奥田昇, 友澤祐介, 齋藤光代, 小野寺真一, 後藤直哉, 伴修平
2. 発表標題 琵琶湖における湖底堆積物中の無機態リン濃度とそのリン酸素安定同位体比分布: 地下水によるリン供給評価を目指して
3. 学会等名 日本陸水学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田卓也
2. 発表標題 リン酸酸素安定同位対比を用いた可給態リンの形成機構
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田卓也
2. 発表標題 ジルコニウム担持樹脂を用いた新たなリン酸酸素安定同位体分析法の開発
3. 学会等名 第11回同位体環境学シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 脇田 健一、谷内 茂雄、奥田 昇、石田卓也（他35名）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 京都大学学術出版会	5. 総ページ数 470
3. 書名 流域ガバナンス	

1. 著者名 石田卓也	4. 発行年 2020年
2. 出版社 総合地球環境学研究所	5. 総ページ数 101
3. 書名 同位体環境学がえがく世界：2020年版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------