

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658133

研究課題名(和文) 安定同位体比情報を用いた森林土壌中の総硝化量の原位置推定

研究課題名(英文) Estimation of the actual gross nitrification rate in forest soils using stable isotope information

研究代表者

大手 信人(Ohte, Nobuhito)

京都大学・情報学研究科・教授

研究者番号：10233199

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)：本研究では、従来からの培養実験では求められなかった森林土壌における実際の総硝化速度を、硝酸( $\text{NO}_3^-$ )の酸素安定同位体比( $\delta^{18}\text{O}$ )の変化を把握することと、 $^{15}\text{N}$ トレーサーを用いる同位体希釈法を併用することで明らかにすることを目的とした。東京大学田無演習林において、土壌中のN動態に関する定期的な調査を行った。この結果 $\text{NO}_3^-$ の $\delta^{18}\text{O}$ はリター層とその直下で急激に低下し、降水で供給された $\text{NO}_3^-$ が速やかに不動化され、硝化菌によって生成された $\text{NO}_3^-$ に置き換わる状況が明らかになった。また同位体希釈法による総硝化速度、総不動化速度の測定値は、上記の $\text{NO}_3^-$ の置換現象を詳細に裏付けるものであった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the actual gross nitrification rate of forest soils using isotope tracer techniques, which could not be measured by conventional incubation approach. We proposed combined usage of the  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{NO}_3^-$  measurements of field water samples and the pool dilution method using  $^{15}\text{N}$  tracers. Experimental results at the University of Tokyo, Tanashi Forest showed that the  $\delta^{18}\text{O}$  of  $\text{NO}_3^-$  decreased drastically at the organic litter layer and the surface part of mineral soil horizon. This indicated that the  $\text{NO}_3^-$  supplied by atmospheric deposition was rapidly immobilized and replaced by the  $\text{NO}_3^-$  produced by nitrifying microbes. The gross nitrification and immobilization rates measured using the pool dilution method evidenced the  $\text{NO}_3^-$  replacement processes consistently.

研究分野：森林生態学、水文学、生物地球化学

キーワード：森林生態系 窒素循環 安定同位体 硝化 総硝化量 不動化量

### 1. 研究開始当初の背景

森林生態系における窒素循環はその系内に生息する全ての生物の活動を維持する最も基礎的な物質循環の一つである。同時に、森林生態系を構成する複数の機能群に属する生物群集によって駆動されている極めて複雑な循環構造を持っている。そのシステムを維持する主要なメンバーは植物、微生物、動物であるが、中でも水溶性の窒素を利用する植物と微生物は、しばしば可給性窒素である無機態窒素 ( $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ )、低分子の有機態窒素について競争関係にある。このように窒素が生態系内で循環したり、利用可能な窒素を巡って植物と微生物との間に競争が生じたりするのは、生態系内の可給性の窒素量が生態系の構成員である多くの生物、特に一次生産者にとって成長の制限要因になっていることに起因する。

しかしながら、産業革命以降、化石燃料の燃焼や化学肥料の製造、農地での使用が増加し、生物にとっての利用可能性が高い窒素の大気への放出が劇的に増大した。その結果、降水物として地表の生態系にもたらされる窒素量も増大した。

1980年代以降、先進国の温帯森林を中心に「窒素飽和現象」が報告され始めた。これは、大気沈着による生物にとっての可吸性の高い無機態の窒素のインプットが多い地域の森林で、土壌中の  $\text{NO}_3^-$  の現存量が増大していたり、水系に高濃度で  $\text{NO}_3^-$  が流出したりすることで現象が認知されてきた (例えば Stoddard 1994)。窒素飽和現象のメカニズムに関する議論は今日まで続いているが、窒素沈着量が多い森林における土壌中での窒素動態についての詳細なプロセス研究は未だ限られている。

### 2. 研究の目的

以上のようなこれまでの研究の展開のなかで、今日的には、土壌中での微生物が関与する窒素の形態変化速度を、安定同位体トレーサーを用いた添加培養によって定量する方法や  $\text{NO}_3^-$  の酸素と窒素の安定同位体比を同時に測定する新たな手法を、より詳細なプロセス研究を進めるために適用していくことが可能な状況になってきている。本研究では、森林土壌中の総硝化量とそれに関連する窒素の形態変化速度を、原位置の条件に近い状態では測定するプロトコルを確立することを目的とし、対象として窒素沈着量の多い都市近郊林において適用することを試みた。

### 3. 研究の方法

野外観測と土壌試料、水試料などのサンプリングは、東京都西東京市に位置する東京大学農学生命科学研究科附属田無演習林内 (35°44'N, 139°32'E) で実施した。調査地の標高は約 60 m、年平均気温は 14.6 °C (2009-2012)、平均年降水量は 1718 mm (2009-2012) であった。対象林分としてこ

の地域として典型的なスギ (*Cryptomeria japonica*) 人工林とクヌギ (*Quercus acutissima*) が優占する落葉広葉樹二次林を選定した。

対象とする二つの林分において、2012~2013年の3年間、大気降水物量の観測と、降水、樹幹流、土壌水等、森林へのインプットから土壌中の雨水浸透過程における無機態窒素濃度と、 $\text{NO}_3^-$  の窒素、酸素安定同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}$ 、 $\delta^{18}\text{O}$ ) の測定を行った。加えて、2012~2013年に、主として植生の成長期において、土壌の理化学性、窒素の無機化、硝化特性の測定を4回実施した。

降水 (林外雨、林内雨)、樹幹流、土壌水中の  $\text{NO}_3^-$  の安定同位体比は、微生物脱窒菌法 (Sigman et al. 2001; Casciotti et al. 2002) を用いて  $\delta^{15}\text{N}$ 、 $\delta^{18}\text{O}$  の同時測定を行った。この方法は 2001 年に開発された水試料の前処理方法で、測定したい試料水中の  $\text{NO}_3^-$  を培養された脱窒菌を用いて  $\text{N}_2\text{O}$  ガスに変換する。 $\text{N}_2\text{O}$  はガスクロマトグラフィー・インターフェイスを介して質量分析計に導入され、 $\delta^{15}\text{N}$  と  $\delta^{18}\text{O}$  の測定が行われる。 $\text{NO}_3^-$  の  $\delta^{15}\text{N}$  と  $\delta^{18}\text{O}$  の値は、 $\text{NO}_3^-$  が生成される前の起源物質の安定同位体比の情報を保存していたり、 $\text{NO}_3^-$  が形態変化を起こす時に変化したりする (同位体分別など) する。例えば、 $\text{NH}_4^+$  の酸化によって  $\text{NO}_3^-$  が生じる場合、前駆物質である  $\text{NH}_4^+$  が、化学合成によって生成された肥料由来の場合、 $\delta^{15}\text{N}$  は低く、-10~5 ‰ であるのに対し、尿由来の場合、0~25 ‰ と高くなる。他方、 $\delta^{18}\text{O}$  は、大気中で生成された  $\text{NO}_3^-$  の場合、60~95 ‰ であるのに対し、土壌中で微生物によって  $\text{NH}_4^+$  から生成される場合、-15~15 ‰ と顕著な差がある。この差異は、 $\text{NO}_3^-$  を構成する酸素が生成される場の酸素ガスと水の酸素に由来することから、ある程度普遍的に生じることであり、ある試料水中の  $\text{NO}_3^-$  の含まれる大気由来の  $\text{NO}_3^-$  と土壌微生物生成由来の  $\text{NO}_3^-$  の存在比率を推定するために有力な情報となる (図-1)。

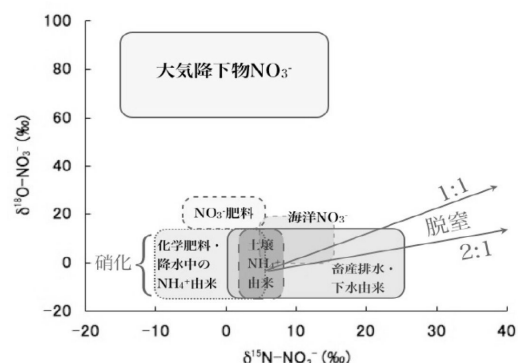


図-1 種々の起源 N 化合物から生じる  $\text{NO}_3^-$  の典型的な  $\delta^{15}\text{N}$ 、 $\delta^{18}\text{O}$  値。2 つの矢印は  $\text{NO}_3^-$  が脱窒を受ける場合、残存する  $\text{NO}_3^-$  の  $\delta^{15}\text{N}$ 、 $\delta^{18}\text{O}$  値に想定される傾きを示している (Kendall et al. 2007 から一部改変)。

土壌中の有機態窒素の無機化と硝化は、微生物の活動によって進行し、植物や微生物自身の生存のために必要な養分としての溶存窒素（無機態窒素、低分子の有機態窒素）を生成する。また、微生物はこの溶存窒素を吸収することで再度の有機化を進め（不動化）結果、窒素は土壌中で循環する。この一連の窒素の形態変化は、これまで土壌試料を一定環境条件下で培養し、培養前後の  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$  の存在量の増減から、無機化速度、硝化速度を評価する手法によって記述されてきた。これらの速度は、それぞれ純無機化速度、純硝化速度と呼ばれる。実際には、例えば、 $\text{NH}_4^+$  の現存量は有機物の無機化による  $\text{NH}_4^+$  の生成と、微生物による硝化と不動化による消費の差で決まるものなので、それぞれ機能がことなる微生物の実際の活動量（速度）が評価できない。実際の形態変化速度（総無機化速度、総硝化速度）を測定する手法として、 $^{15}\text{N}$  トレーサーを利用した同位体希釈法が 1990 年代に提案され (Davidson et al. 1992)、これまでに多くの森林土壌で適用されてきている。

この 2 つの安定同位体比技術を用いた窒素動態の把握のための手法は、これまでに同じサイトの調査において適用された例はほとんどなく、本研究の方法論的な新規性は極めて高い。本研究の場合、前者の安定同位体比技術は、大気沈着由来の窒素流入の実態把握に有用で、後者の  $^{15}\text{N}$  トレーサーを用いた技術は、その流入窒素の土壌中の窒素循環の中にどのように取り込まれるかを記述するために極めて有用である。

#### 4. 研究成果

##### (1) $\text{NO}_3^-$ の $\delta^{18}\text{O}$ からわかる硝化活性

$\text{NO}_3^-$  濃度は、スギ林のプロットでは、A 層表層部で最も高く、下層でも明らかな減少が見られないのに対して、クヌギ林のプロットでは A 層以下の鉍質土層で徐々に減少することがわかった。溶存  $\text{NO}_3^-$  の  $\delta^{18}\text{O}$  は、スギ林とクヌギ林の両方のプロットで、林内雨、樹幹流では中央値が 60~70‰ であるのに対し、A 層の表層部で 2~7‰ と急激に低下していることが明らかになった。このことは、大気沈着として流入した  $\text{NO}_3^-$  が、リター層、A 層表層部で微生物によって生成された  $\text{NO}_3^-$  と混合し、質量比としては大半が微生物生成由来の  $\text{NO}_3^-$  となっていることを意味している。スギ林プロットでは、この変化はリター層よりも A 層表層部で顕著に生じているのに対し、クヌギ林プロットでは季節的な変化があり、成長期（着葉期）ではリター層において明らかな  $\delta^{18}\text{O}$  の低下が見られ、リター層中における微生物による  $\text{NO}_3^-$  供給が顕著であることが示唆された（図-2）。

加えて、クヌギ林プロットでは、特に成長期（着葉期）において樹幹流中の  $\text{NO}_3^-$  の  $\delta^{18}\text{O}$  が林外雨や林内雨に比べて明らかに低い場合がしばしばみられた。このことは、樹体表

面において微生物が  $\text{NO}_3^-$  を生成し、その  $\text{NO}_3^-$  が大気沈着由来の  $\text{NO}_3^-$  と混合、流下していること示唆していた。樹体や葉表面における微生物による  $\text{NO}_3^-$  生成については、これまでに微生物学的な研究事例はわずかにあるが、 $\text{NO}_3^-$  の同位体比変化から検証が行われたのは本研究が最初である。

##### (2) 同位体希釈法による総硝化速度の把握

以上のような大気沈着としての  $\text{NO}_3^-$  の流入過程の実態を踏まえて、土壌中での微生物活動による窒素の形態変化を明らかにし、両者から現状の土壌中での  $\text{NO}_3^-$  濃度の鉛直分布や変化に関する考察を行った。

スギ林、クヌギ林、両林分のリター層、A 層表層部では、大気降沈着で供給される  $\text{NO}_3^-$  が微生物によって生成される  $\text{NO}_3^-$  と混合しているが、大部分が微生物由来の  $\text{NO}_3^-$  によって占められていることは、 $\text{NO}_3^-$  の  $\delta^{18}\text{O}$  の変化を見ることで明らかになったが、 $^{15}\text{N}$  トレーサーを用いた同位体希釈法によって測定された総

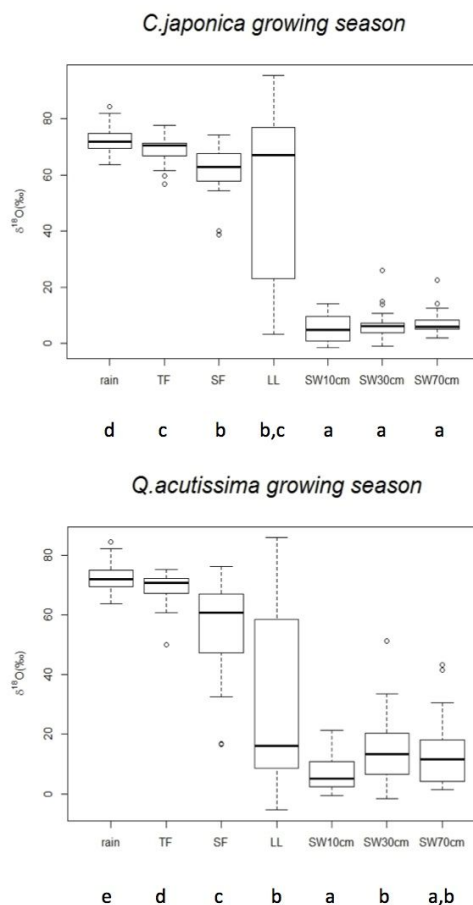


図-2 スギ林 (*C. japonica*) とクヌギ林 (*Q. acutissima*) における降水 (rain)、林内雨 (TF)、樹幹流 (SF)、有機物層通過水 (OH)、土壌水 (SW) の  $\text{NO}_3^-$  の  $\delta^{18}\text{O}$  値。ボックスプロットのボックス内の線は中央値、上下の辺は、それぞれ 75、25 パーセントイル、ボックス外の細線は、90、10 パーセントイルを示している。付与されている異なるアルファベットはサンプルタイプ間に有意な差があることを示している。

硝化能の高さはこれを裏付けるものであった(図-3)。また、クヌギ林のプロットでは、A層表層より深い部位においてNO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度の急激な減少が見られた。このことは、この部位において成長期を通じて総不動化速度が総硝化速度を上回っていることと対応しており、微生物活動による窒素の保持機構が機能していることが明らかになった。一方、スギ林のプロットでは、常に総硝化速度が総不動化速度を上回っていた。この結果は、クヌギ林分の場合とことなりA層以下の鉱質土層中でもNO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度が減少しないことと対応していた。

以上のように、同位体希釈法による総硝化速度の直接測定と、原位置土壌溶液中のNO<sub>3</sub><sup>-</sup>のδ<sup>18</sup>O測定の適用を通して、大気沈着としてもたらされる窒素が森林に流入する過程、土壌中で窒素の内部循環に取り込まれる過程の実態が明らかになった。

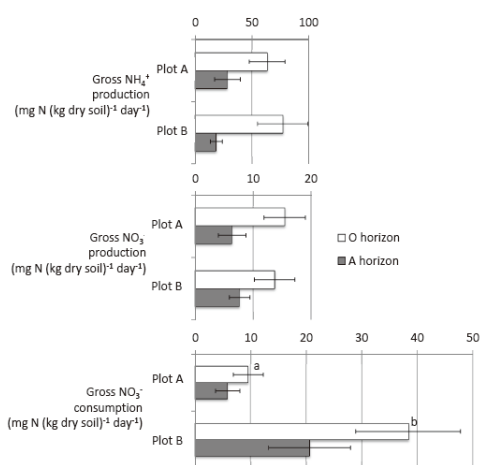


図-3 スギ林 (Plot A) とクヌギ林 (Plot B) の有機物層(0層)とA層における窒素総無機化速度、総硝化速度、総消費速度。バーに付与されている異なるアルファベットは、有意な差があることを示している。

#### < 引用文献 >

- Casciotti, K. L., D. M. Sigman, M. G. Hastings, J. K. Böhlke, and A. Hilkert. 2002. Measurement of the Oxygen Isotopic Composition of Nitrate in Seawater and Freshwater Using the Denitrifier Method. *Analytical Chemistry* **74**:4905-4912.
- Davidson, E. A., S. C. Hart, and M. K. Firestone. 1992. Internal Cycling of Nitrate in Soils of a Mature Coniferous Forest. *Ecology* **73**:1148-1156.
- Kendall, C., E. M. Elliott, and S. D. Wankel. 2007. Tracing anthropogenic inputs of nitrogen to ecosystems. Pages 375-449 in R. Michener and K. Lajtha, editors. *Stable isotopes in ecology and environmental science*, 2nd edn. Blackwell, Malden.

- Sigman, D. M., K. L. Casciotti, M. Andreani, C. Barford, M. Galanter, and J. K. Böhlke. 2001. A Bacterial Method for the Nitrogen Isotopic Analysis of Nitrate in Seawater and Freshwater. *Analytical Chemistry* **73**:4145-4153.
- Stoddard, J. L. 1994. Long-term changes in watershed retention of nitrogen. Pages 223-284 in L. A. Baker, editor. *Environmental chemistry of lakes and reservoirs, advances in chemistry series*. American Chemical Society, Washington.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

- Wei, W., K. Isobe, T. Nishizawa, L. Zhu, Y. Shiratori, N. Ohte, K. Koba, S. Otsuka, and K. Senoo. 2015. Higher diversity and abundance of denitrifying microorganisms in environments than considered previously. *ISME J.* DOI: 10.1038/ismej.2015.9.
- Shi, J., N. Ohte, N. Tokuchi, K. Isobe, R. Urakawa, N. Imamura, T. Oda, and M. Suzuki. 2015. Soil nitrogen transformation dynamics in a suburban forest near Tokyo Metropolitan Area under high nitrogen deposition: A case study using stable isotope tracer techniques. *Bulletin of University of Tokyo Forest* **132**:17-34. <http://hdl.handle.net/2261/56595>.
- Shi, J., N. Ohte, N. Tokuchi, N. Imamura, M. Nagayama, T. Oda, and M. Suzuki. 2014. Nitrate isotopic composition reveals nitrogen deposition and transformation dynamics along the canopy-soil continuum of a suburban forest in Japan. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **28**:1-11. DOI: 10.1002/rm.7050.
- Isobe, K., and N. Ohte. 2014. Ecological Perspectives on Microbes Involved in N-Cycling. *Microbes and Environments* **29**:4-16. DOI: 10.1264/j sme2. ME13159.

[学会発表](計10件)

- Jun Shi, Nobuhito Ohte, Naoko Tokuchi, Naohiro Imamura, Miyuki Nagayama, Tomoki Oda, Masakazu Suzuki, Nitrogen deposition and transformation dynamics along the canopy-soil continuum of a suburban forest in Japan. *Goldschmidt*

2015, 2015/8/16-8/21, Prague (Czech Republic)

Nobuhito Ohte, Kazuo Isobe, Naoko Tokuchi, Relevant approaches and strategies for investigation on the nitrogen saturation in forested catchments. Japan Geoscience Union, Meeting 2015, 2015/5/24-5/28, 幕張メッセ (千葉)

Kazuo Isobe, Nobuhito Ohte, Hiroyu Kato, Tomoki Oda, Ryunosuke Tateno, Close relationship between nitrogen dynamics and microbial communities in forest soil. The 6th EAFES International Congress, 2014/4/10-4/12, Haikou (China)

Naoko Tokuchi, Consideration of N dynamics in the forest ecosystem related with the anthropogenic N deposition, other element including carbon, water and environmental change. The 6th EAFES International Congress, 2014/4/10-4/12, Haikou (China)

Nobuhito Ohte, Naoko Tokuchi, Masanori Katsuyama, Ken'ichi Osaka, Satomi Yoneda, Natsuhito Ochiai, Strong nitrogen retention against the pine stands dieback by pinewilt disease in a temperate conifer deciduous forest in central Japan: Budget and mechanisms. American Geophysical Union, Fall Meeting 2013, 2013/12/9-12/13, San Francisco (USA)

大手信人・徳地直子, 森林集水域における窒素循環研究の今日的な課題とそれに対するストラテジー. 2013年度日本水文学会学会学術大会, 2013/10/19-10/20, 千葉商科大学 (千葉)

大手信人・徳地直子, 森林集水域における窒素循環研究の課題とストラテジー. 第124回日本森林学会, 2013/3/25-3/28, 岩手大学 (盛岡)

Nobuhito Ohte, Naoko Tokuchi, Masanori Katsuyama, Ken'ichi Osaka, Whole story of episodic high nitrate discharge due to the partial dieback of a pine forest in Japan: runoff generation processes control seasonality. US-Japan Joint Seminar on Responses of Catchment. Hydrology and Forest Biogeochemistry to Climatic and Environmental Change, 2013/3/4-3/7, Honolulu (USA)

Nobuhito Ohte, Chikage Yoshimizu, Ayatao Kohzu, Ichiro Tayasu, Ken'ichi Osaka and Toshi Nagata, Spatial distribution of nitrate sources of rivers in the Lake Biwa watershed, Japan: Controlling factors revealed by nitrogen and oxygen isotopes of nitrate. US-Japan Joint Seminar on Responses of

Catchment. Hydrology and Forest Biogeochemistry to Climatic and Environmental Change, 2013/3/4-3/7, Honolulu (USA)

Shi Jun, Nobuhito Ohte, Naohiro Imamura, Tomoki Oda and Miyuki Nagayama, Sources and processes of nitrate in forest soils: a case study at sites with heavy nitrogen deposition using nitrogen and oxygen isotopes. Japan Geoscience Union Meeting, 2012/5/20-5/25, 幕張メッセ (千葉)

[図書](計1件)

徳地直子・大手信人, 物質循環研究の今後の展開「森のバランス: 植物と土壌の相互作用」. 東海大学出版会, 2012, 300pp

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大手 信人 (Ohte, Nobuhito)  
京都大学・大学院情報学研究科・教授  
研究者番号: 10233199

### (2) 研究分担者

徳地 直子 (Tokuchi, Naoko)  
京都大学・フィールド科学教育研究センター・教授  
研究者番号: 60237071