

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26252020

研究課題名(和文) 渓流水100mLでの森林窒素代謝評価：新安定同位体水質指標の開発と展開

研究課題名(英文) The use of stable isotope ratios of nitrate in the forest ecosystems for the better understanding of nitrogen status

研究代表者

木庭 啓介 (Koba, Keisuke)

京都大学・生態学研究センター・教授

研究者番号：90311745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,700,000円

研究成果の概要(和文)：森林集水域へ供給される硝酸性窒素および森林渓流水に溶存し森林より流出する硝酸性窒素について窒素酸素同位体比および酸素同位体比異常の測定を行い、既存の計算手法に改良を加えることで、日本と中国のさまざまな窒素沈着速度を持つ森林を対象に、総硝化速度そして脱窒速度を求めることができ、この結果はPNAS誌に掲載された。また、この結果から、森林においても、窒素除去効率の窒素不可に伴う低下がみとめられ、このことは、東アジアで窒素沈着が大きくなってゆくことを考えると、たいへん大きな問題となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is crucial to explore the nitrogen status of the forest ecosystems due to the management of the healthy forested ecosystems. However, due to the high spatiotemporal variations in nitrogen dynamics even in a small watershed, it is difficult to grasp its nitrogen status. We applied the isotope technique to estimate the gross nitrification rate and the denitrification with the help of the isotopic fractionation factors for different nitrogen processes occurring in the watershed. We found the high gross nitrification rates and denitrification rates in the watershed with more N deposition. However, the efficiency of the nitrogen removal by the denitrification was relatively low in high N deposition sites, indicating that the removal of nitrogen cannot work effectively in nitrogen-polluted sites.

研究分野：同位体生態学

キーワード：窒素循環 脱窒 硝化 集水域 安定同位体

1. 研究開始当初の背景

健全な森林の維持管理は、防災、治水、水質浄化、温室効果ガス削減など様々な生態系サービスの維持管理に不可欠である。一般に森林では窒素の供給が植物成長を律速しているため、森林全体の窒素代謝の把握は、植物成長の把握、つまりは健全な森林の維持管理に必須である。一方で、近年の人間活動はこの足りない窒素を、酸性雨などを通じて大量に森林に供給し、逆に窒素を使い切れない森林（窒素飽和林）を生じさせている。

この窒素飽和林には土壌酸性化、植物成長抑制、温室効果ガス吸収能低下、下流生態系への多量窒素流出などの問題がある。しかし降水窒素が使い切れない不健全な窒素飽和林がどれだけ国内にあるのか、というような森林窒素代謝の実態は、実はほとんど把握できていない。それには森林窒素代謝の特徴付けにおける下記のような大きな問題がある。

- * 困難な森林窒素代謝の基礎情報収集（長期間の窒素収支観測が必要：大変なコストがかかり、限られた集水域のみで可能）
- * 単純な室内土壌培養系ですら困難な森林土壌窒素代謝の特徴付け（窒素の回転速度は速くその野外での測定は困難、さらに窒素ガス（N₂）のように濃度測定できない化合物もある：包括的な窒素代謝の把握が困難）
- * 大変困難な集水域レベルでの森林土壌窒素代謝把握（土壌の持つ高い空間的異質性：集水域全体の窒素代謝を把握するのに多数の試料が必要）

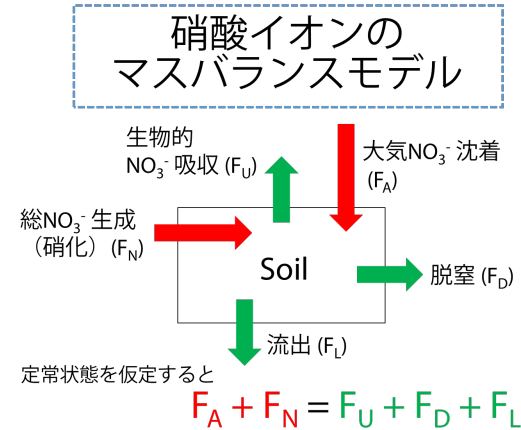
2. 研究の目的

上記の問題を鑑みるに、「高い空間的異質性を持つ森林集水域での窒素代謝を包括的にとらえ、その平均的な特徴を与える」、さらに、「広域にわたる様々な、多数の森林の窒素代謝を把握する必要があるため、簡便かつ迅速に適用できる」、つまり「集水域を丸ごと扱う」全く新たなアプローチが健全な森林の維持管理に向けて必要であると考えられる。近年 NO₃⁻の窒素（δ¹⁵N）酸素（δ¹⁸O）安定同位体比、酸素同位体異常（Δ¹⁷O; ¹⁶O/¹⁷O/¹⁸O 比の地球表面環境値からの変化）を用いて降水 NO₃⁻がどれだけ森林で除去されるかを定量する試みが進んでおり（たとえば Brookshire et al. 2012, Nat. Geosci. ）、我々の研究グループもこの手法を用いて研究を行っている。この手法は森林集水域の窒素代謝情報を時間的・空間的に集約した渓流水という試料から、詳細に集水域全体での窒素代謝の一部に関する情報を取り出せる、画期的な手法である。そこでこの手法をさらに発展させることで、渓流水のみから集水域全体の窒素代謝の特徴を容易に抽出することができるような、新たな渓流水指標を作成することが可能である、と着想し、同位体の利用

手法を確立すること目標とすることとした。

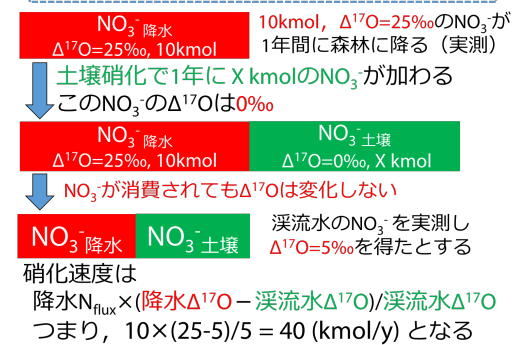
3. 研究の方法

窒素化合物の中でも最も重要な形態の1つである NO₃⁻に着目し、その集水域での生成と消費を推定する。森林集水域での NO₃⁻の挙動を下図のように考えてみる。

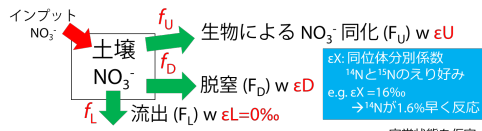


ここで Δ¹⁷O が降水 NO₃⁻で高く（たとえば 25%）、土壌 NO₃⁻が 0%と全く異なる値を持ち、さらに NO₃⁻の消費では Δ¹⁷O は不変であるという特徴を用いると、降水 NO₃⁻の流入速度および降水 NO₃⁻と渓流水 NO₃⁻の Δ¹⁷O により、これまで不可能であった集水域レベルでの総硝化速度（F_N）の推定が可能である（下図； Tsunogai et al. 2011; Dejawakh et al. 2012 ）。

Δ¹⁷Oによる集水域総硝化速度推定法



さらにこの手法の展開について議論をすすめるうちに、当初は考慮していなかった δ¹⁵N の渓流水と土壌での変化を用いることで、総 NO₃⁻消費速度（F_D+F_U）を、さらに適切な同位体分別係数を用いることで、脱窒の大きさ（F_D）を定量的に議論できるのではないかと可能性が出てきた（下図）。もしもこれが実現すれば、集水域への入り口と出口調査によって、複雑な集水域内の窒素循環、特にこれまで観測が難しかった硝化、そして脱窒についての情報を得ることができると期待される。そこで、特に集中して観測している東京農工大学 FM 多摩丘陵、FM 大谷山、そして窒素飽和状態にある Dinguhushan 林、一方で大気窒素沈着速度が低く、健全な窒素循環状態にあると考えられる Jianfengling 林



$$\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3\text{-input}} = f_D \times (\delta^{15}\text{N}_{\text{soilNO}_3\text{-}} - \epsilon_D) + f_U \times (\delta^{15}\text{N}_{\text{soilNO}_3\text{-}} - \epsilon_U) + f_L \times \delta^{15}\text{N}_{\text{soilNO}_3\text{-}}$$

$$f_D + f_U + f_L = (F_D + F_U + F_L) / (F_A + F_N) = 1$$

$$F_D = \frac{(F_A + F_N) \times (\delta^{15}\text{N}_{\text{soilNO}_3\text{-}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3\text{-input}} - \epsilon_U) + F_L \times \epsilon_U}{(\epsilon_D - \epsilon_U)}$$

を対象に、詳細な同位体比測定を行い、まず総硝化速度の $\Delta^{17}\text{O}$ による推定を行った後に、 $\delta^{15}\text{N}$ の変化から脱窒速度の推定を試みた。実際には脱窒速度の推定のためには、流出 NO_3^- 量の情報が必要であるため、対象となる集水域は限られたものとなってしまった。さらに、国内の様々な森林に対して、どれだけの $\delta^{15}\text{N}$ 上昇が認められるかを確かめるために、渓流水 NO_3^- についての同位体比測定を行った。

また、同時にガス態窒素の損失についての $\delta^{15}\text{N}$ 情報を得るために、これまで測定が殆ど行われてこなかった一酸化窒素について、その $\delta^{15}\text{N}$ 測定法の開発に取り組み、土壌から失われる $\delta^{15}\text{N}$ がこれまで言われているように低い値なのかどうかの検証に取り組んだ。

4. 研究成果

日本と中国のさまざまな窒素沈着速度を持つ6つの森林を対象に、集水域へ入ってくる NO_3^- 、出て行く NO_3^- そして土壌中の NO_3^- についての同位体比測定を行うことで、総硝化速度そして脱窒速度を求めることができた(下表)。

表1 本研究での調査地とその窒素循環の特徴。並びに同位体比解析により計算された総硝化速度と脱窒速度

場所・気候帯	尖峰峠		藤湖山	FM 大谷山	FM 大谷山	FM
	一次林	二次林	常緑林	常緑林	常緑林	多摩丘陵
年平均降水量 (mm)	2449	2449	1997	1743	1743	1780
年平均気温 (°C)	19.8	19.8	21.0	9.7	9.7	14.0
窒素沈着速度*	6.1	6.1	23.5	11.3	11.3	14.8
計算された総硝化速度*	48	43	116	88	119	118
NO_3^- 流出速度*	2.5	2.4	18.4	13.0	12.4	13.3
計算された脱窒速度*	15.4	5.6	30.1	12.1	19.7	22.3
計算された $\text{N}_2\text{O}(\text{N}_2\text{O}+\text{N}_2)$ 法による脱窒速度*	3.0	6.0	9.4	0.2	0.2	1.8
窒素損失における脱窒の寄与 (%)	86	70	62	48	61	63

*: 単位は $\text{kg N ha}^{-1} \text{yr}^{-1}$

総硝化速度は43-119 kg-N/ha/yr 、そして脱窒速度は6-30 kg-N/ha/yr と推定された。これらの値はこれまで測定されたものではなく、単純な比較を他の研究と行うことができないものの、数十 kg-N/ha/yr 程度の窒素内部循環が森林で行われているというレベルは妥当なものと考えられた。

ここで特筆すべき点は、窒素損失(F_D+F_L)における脱窒の割合が、窒素沈着が大きい森林で小さくなっていることである。これは、窒素が大量に供給される生態系でこそ脱窒によって窒素が除去されることが好ましいのたいして、実際の生態系はむしろ逆の状態、つまり、窒素が過剰な生態系では効率よく脱窒によって窒素が大気へと戻ってゆかない、ということを示している。この窒素除去効率の窒素不可に伴う低下は、これまで湖

沼 (Finley et al. 2013) や沿岸帯 (Lunau et al. 2013) で報告されてきたが、本研究ではその状況が森林でも認められることを世界で初めて明らかにしたものである。今後、東アジアで窒素沈着が大きくなってゆくことを考えると、この窒素除去効率低下はたいへん大きな問題となると考えられ、より多くの生態系において検討を行う必要があると考えられる。

この結果についてはPNAS誌に掲載され、2016年6月に北海道大学にて開催された国際長期生態学研究ネットワーク主催のワークショップで、研究代表者が講師として諸外国から参加した若手研究者に対して紹介を行うとともに、2017年に出版予定の教科書に、窒素循環解析の例として取り上げられる予定となっている(現在査読中)。また、この研究が経緯となり、アメリカの科学者たちと、森林渓流水 NO_3^- についての議論を行い、総説としてまとめWater Resources Research誌へ出版した。また、森林窒素循環における同位体利用の専門家として、世界中の土壌 $\delta^{15}\text{N}$ データを解析する研究に招かれ、論文執筆に参加し、その報告はScientific Report誌に発表された。さらに、陸上窒素循環における同位体利用についての総説執筆にも招かれ、Plant and Soil誌に掲載された。

そのほかの森林についても、森林の持つ特徴に応じた研究を推進した。北海道大学雨龍研究林においては伐採された森林と伐採を受けていない森林における渓流水 NO_3^- についての測定を行い、ササが残っている伐採林では渓流水 NO_3^- 濃度レベルが低いまま保たれている原因は脱窒ではなく、おそらくササによる NO_3^- 吸収が原因であることを突き止め、学会発表にて議論を行い、現在論文執筆を開始している。この論文では先に紹介した硝化速度と脱窒速度の推定も行い、貧栄養な森林での窒素除去効率についての議論も展開する予定である。また、東京農工大学FM唐沢山においては、降雨イベントに対して大きな渓流水 NO_3^- 濃度変動が見られ、それに伴う $\delta^{15}\text{N}$ と $\delta^{18}\text{O}$ の変化はある程度あったものの、 $\Delta^{17}\text{O}$ では大きな変動が見られなかったことから、降雨イベントに伴う脱窒が検出されたと考えており、これについても現在論文執筆を開始している。

一酸化窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 測定については、最終的に捕集した一酸化窒素を一酸化二窒素に定量的に変換する手法を確立できた。 $\delta^{15}\text{N}$ 既知の亜硝酸塩を化学的に一酸化窒素へ変換し、その一酸化窒素を捕集、脱窒菌を用いて一酸化二窒素へと変換し、その $\delta^{15}\text{N}$ を測定するという測定手法がほぼ完成し、野外での測定を開始している。窒素飽和状態にあると思われる関東の森林において、土壌から大変低い $\delta^{15}\text{N}$ を持つ一酸化窒素が放出されていることを突き止め、この土壌由来の一酸化窒素が、

森林大気中の一酸化窒素へ少なからず貢献していることが明らかになってきた。この研究内容についてはまだ論文文化までは至っていないが、学会発表を行うことで議論を深め、現在国内外の研究者と論文執筆を開始している。2017年1月には米国 UC Davis 校から博士研究者が来日し、この測定技術についての指導を行うとともに、今後の共同研究についての話し合いを行った。また、この一酸化窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 測定、といった、本研究にて駆使している微量 NO_3^- 同位体比測定技術についての応用可能性を解説した総説をまとめ、現在投稿中である。

<引用文献>

E. N. Brookshire, L. O. Hedin, J. D. Newbold, D. M. Sigman, J. K. Jackson, 2012, Sustained losses of bioavailable nitrogen from montane tropical forests, *Nature Geoscience*, 5, 123-126, DOI: 10.1038/NNGEO1372.

U. Tsunogai, S. Daita, D. D. Komatsu, F. Nakagawa, A. Tanaka, 2011, Quantifying nitrate dynamics in an oligotrophic lake using $\Delta^{17}\text{O}$, *Biogeosciences*, 8, 687-702, www.biogeosciences.net/8/687/2011/.

N. R. DeJwach, T. Meixner, G. Michalski, F. McIntosh, 2012, Using ^{17}O to investigate nitrate sources and sinks in a semi-arid groundwater system, *Environmental Science and Technology*, 46, 745-751, dx.doi.org/10.1021/es203450z

J. C. Finley, G. E. Small, R. W. Sterner, 2013, Human influences on nitrogen removal in lakes, *Science*, 342, 247-250, DOI: 10.1126/science.1242575.

M. Lunau, M. Voss, M. Erickson, C. Dziallas, K. Casciotti, H. Ducklow, 2013, Excess nitrate loads to coastal waters reduces nitrate removal efficiency: mechanism and implications for coastal eutrophication, *Environmental Microbiology*, 15, 1492-1504, DOI: 10.1111/j.1462-2920.2012.02773.x

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6件)

柳井洋介, 木庭啓介, 印刷中, モニタリングとモデリングに基づく物質動態広域評価の最前線—広域における炭素・窒素・水の動態を探る—2. どのような観測が広域評価に貢献できるのか, *日本土壌肥料学会誌*, 査読有

S. Toyoda, N. Yoshida, K. Koba, 2017, Isotopocule analysis of biologically produced

nitrous oxide in various environments, *Mass Spectrometry Reviews*, 36, 2, 135-160, doi:10.1002/mas.21459. 査読有

Y. Fang, K. Koba, A. Makabe, C. Takahashi, W. Zhu, T. Hayashi, A. A. Hokari, R. Urakawa, E. Bai, B. Z. Houlton, D. Xi, S. Zhang, K. Matsushita, Y. Tu, D. Liu, F. Zhu, Z. Wang, G. Zhou, D. Chen, T. Makita, H. Toda, X. Liu, Q. Chen, D. Zhang, Y. Li, M. Yoh, 2015, Microbial denitrification dominates nitrate losses from forest ecosystems, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 5, 1470-1474, doi:10.1073/pnas.1416776112. 査読有

J. M. Craine, E. N. J. Brookshire, M. D. Cramer, N. J. Hasselquist, K. Koba, E. Marin-Spiotta, L. Wang, 2015, Ecological interpretations of nitrogen isotope ratios of terrestrial plants and soils, *Plant and Soil*, 396, 1, 1-26, DOI10.1007/s11104-015-2542-1. 査読有

L. A. Rose, S. D. Sebestyen, E. M. Elliott, K. Koba, 2015, Drivers of atmospheric nitrate processing and export in forested catchments, *Water Resources Research*, 51, 1333-1352, DOI10.1002/2014WR015716. 査読有

J. M. Craine, A. J. Elmore, L. Wang, L. Augusto, W. T. Baisden, E. N. J. Brookshire, M. D. Cramer, N. J. Hasselquist, E. A. Hobbie, A. Kahmen, K. Koba, (他 18 人), 2015, Convergence of soil nitrogen isotopes across global climate gradients, *Scientific Reports*, 5, 8280, DOI10.1038/srep08280. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

木庭啓介, 微量溶存窒素化合物の同位体比測定とその応用, 第6回同位体環境学シンポジウム(招待講演), 2016年12月22日, 総合地球環境学研究所(京都市北区)

木庭啓介, 微量溶存窒素化合物の同位体比測定について: 最新の測定技術とその応用, 平成27年度安定同位体利用技術研究会 2016年3月8日, 東京大学農学部(東京都文京区)

村田 恵理子, 木庭 啓介, 渡邊 未来, 仁科 一哉, 高津 文人, 竹中 千里, NO_x の窒素安定同位体被測定技術の開発, 日本地球惑星合同大会, 2015年5月27日, 幕張メッセ(千葉県幕張市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ecology.kyoto-u.ac.jp/~keikoba/>

プレスリリース

<http://www.tuat.ac.jp/documents/tuat/outline/disclosure/pressrelease/2014/20150121110843161073889.pdf>

6. 研究組織

(1)研究代表者

木庭 啓介（KOKA, Keisuke）

京都大学・生態学研究センター・教授

研究者番号：90311745

(2)研究分担者

戸田 浩人（TODA, Hiroto）

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00237091

大手 信人（OHTE, Nobuhito）

京都大学・情報学研究科・教授

研究者番号：10233199

五味 高志（GOMI, Takashi）

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30378921

勝山 正則（KATSUYAMA, Masanori）

京都大学・学際融合教育研究推進センター・特定准教授

研究者番号：40425426

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

柴田 英昭（SHIBATA, Hideaki）

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授

研究者番号：70281798

楊 宗興（YOH, Muneoki）

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50260526

(3)連携研究者

稲垣 善之（INAGAKI, Yoshiyuki）

森林総合研究所・立地環境研究領域・主任研究員

研究者番号：00353590

舘野 隆之輔（TATENNO, Ryunosuke）

京都大学・フィールド科学教育研究センター・准教授

研究者番号：60390712

渡邊 未来（WATANABE, Mirai）

国立環境研究所・地域環境研究センター・主任研究員

研究者番号：50455250

(4)研究協力者

なし