

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32641

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06621

研究課題名(和文)モデル環境下での培養実験による亜硝酸動態の制御メカニズム解明

研究課題名(英文)Elucidation of controlling factors of soil nitrite dynamics by incubation experiments under model environment

研究代表者

黒岩 恵 (Kuroiwa, Megumi)

中央大学・理工学部・助教

研究者番号：00761024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、森林土壌中での亜硝酸(NO_2^-)生成・消費速度、消費経路の制御要因を明らかにするために、 NO_2^- 生成活性が異なる3種類の土壌を3段階の重量含水率(20, 32.5, 45%)で培養した。培養期間を通じて NO_2^- 生成速度と消費速度は連動して変化し、含水率は各土壌の NO_2^- 生成及び消費速度の違いを部分的に説明した。また、 NO_2^- 酸化(NO_3^- 生成)ポテンシャルが、 N_2O 放出量を制御することが示唆された。 NO_2^- の生成は非生物的には生じなかったが、消費は顕著に生じた。滅菌土からの N_2O 生成は未滅菌土の7.1-41%に相当し、非生物的な N_2O 生成が相対的に重要な場合があることが示された。

研究成果の概要(英文)：We incubated 3 soils that has gradient of NO_2^- production rate at 3 gravimetric water content (20, 32.5, 45%) to elucidate the controlling factors of NO_2^- transformation rates and processes. NO_2^- production rates changed in conjunction with NO_2^- consumption rates thorough the incubation period. Water content partially explained the differences in NO_2^- production and consumption rates. It is suggested that N_2O production was regulated by NO_2^- oxidation (NO_3^- production) potential. While abiotic NO_2^- production was not observed, abiotic NO_2^- consumption was significant. N_2O production from autoclaved soil accounted for 7.1-41% of one from non-autoclaved soil, indicating significant contribution of abiotic N_2O production in some case.

研究分野：農学

キーワード：森林土壌 亜硝酸 15Nトレーサー 亜酸化窒素 硝化

1. 研究開始当初の背景

多様な窒素化合物のなかでも、亜硝酸(NO_2^-)は硝化や脱窒を含む窒素の異化的変換反応のすべてに関わる中間生成物である(Schreiber et al. 2012 Front Microbiol.)。そのため、 NO_2^- 動態の記述を付加することで、窒素の維持や放出・流出プロセスの理解は格段に深まる。しかし NO_2^- を土壌から抽出(回収)する手法的な困難さ(Stevens and Laughlin 1995 SSSAJ)から、従来の土壌窒素循環は有機態窒素、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 N_2O を中心に解析され、 NO_2^- の挙動についてはほとんど理解がなされてこなかった。そこで申請者は、東京大学千葉演習林のスギ・ヒノキが優占する人工林内の斜面を対象に、 NO_2^- を含む無機態窒素生成速度の空間分布について ^{15}N トレーサーを用いて明らかにしてきた(特別研究員奨励費 13J08161 代表:黒岩恵、挑戦的萌芽研究 25550009 代表:妹尾啓史)。その結果、斜面上部から下部にかけて NH_4^+ 生成速度には一定の傾向が見られなかった一方で、 NO_2^- 濃度、 NO_2^- 生成・消費速度、 NO_3^- 濃度、 NO_3^- 生成速度は上部から下部にかけて上昇することを見出した。このことから、この斜面においては、 NO_2^- 生成が NO_3^- 生成を制御していることが示唆された。また、 NO_2^- 生成速度と土壌理化学性の空間パターンの関係から、 NO_2^- 生成の制御要因として含水率が最も有力な因子であることが明らかになった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、 NO_2^- 動態の制御因子として有力であることが示唆されたファクターである含水率を操作し、長期の室内培養実験を行った。期間内の NO_2^- 生成・消費速度、 NO_2^- の消費経路の変化および相互の関係性を解析することで、 NO_2^- 動態が含水率にどのように制御を受けるかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

千葉県房総半島に位置する東京大学大学院農学生命科学研究科附属千葉演習林内の袋山沢試験地(北緯 $35^\circ 12' 21''$ 東経 $140^\circ 6' 7''$)内の斜面に、幅 8m 全長 100m のプロットを設置した。斜面上部を起点として 0-30m、30-70m、70-100m の 3 区画に分け、各区画内の 5 か所から鉍質土層(0~10cm)を採取した。採取土壌はふるい(4mm)にかけて植物根や石を取り除いたのちに、4 で保存した。各区画内で採取した 5 つの試料を等量ずつ混合し、斜面上・中・下部を代表する 3 種の土壌(以下では、それぞれを土壌 U、土壌 M、土壌 L とする)を調整し、培養の試料とした。含水率が各土壌の NO_2^- 動態に与える影響を明らかにするために、土壌 U、M、L のそれぞれを、斜面上・中・下を模した 3 段階の重量含水

率(それぞれ 20%、32.5%、45%)に調整して、25 で培養した。培養 1, 22, 43, 63, 84 日目に無機態窒素濃度の測定と ^{15}N NO_2^- 添加培養実験を行った。 ^{15}N NO_2^- 添加条件での NO_2^- 濃度と同位体比の時間変化から NO_2^- 生成・消費速度を算出した(^{15}N 同位体希釈法)。 NO_2^- 濃度・同位体比はアザイド法によって NO_2^- を N_2O へと化学的に還元した後に、 N_2O を GCMS(GCMS-QP2010 ultra, SHIMADZU)に導入して行った。また、 NO_2^- の N_2O への還元過程が、 NO_2^- 生成速度と含水率に受ける影響を明らかにするために、 ^{15}N NO_2^- 添加直後にバイアルを密閉し、以後 1 日に渡り継時的にヘッドスペースの N_2O 濃度・同位体比を GC/MS で測定した。さらに、非生物的に生じる NO_2^- 生成・消費の寄与について明らかにするために、培養 84 日目の土壌(土壌 M、L については含水率 45%の処理区のみ)をオートクレープし、滅菌後の土壌に ^{15}N NO_2^- 溶液を添加して NO_2^- 生成・消費速度算出と、 N_2O 生成をモニタリングした。

4. 研究成果

1) 亜硝酸生成・消費速度を制御する要因

全培養期間を通じて NO_2^- 生成と NO_2^- 消費は強い正の相関を示し($R^2=0.80$)、連動して変化した。培養開始時には NO_2^- 生成がほとんど生じなかった斜面上部の土壌であっても、含水率 45%で培養を開始してから 43 日目には、培養開始時の斜面下部の土壌に匹敵する顕著な NO_2^- 生成活性を示した。また、斜面中部と下部の土壌の含水率を 20%に低下させて培養した結果、含水率を 32.5%あるいは 45%で培養した場合と比較して、培養期間を通じて一貫して NO_2^- 生成活性は低かった(図 1)。このことから、斜面上部においてほとんど NO_2^- 生成が生じず、斜面中部~下部にかけて NO_2^- 生成が生じるという空間分布は、含水率によって NO_2^- 生成を担うアンモニア酸化微生物群の生育または活性が制限された結果であることが示唆された。一方で、斜面中部の土壌の含水率を斜面下部を模擬した 45%

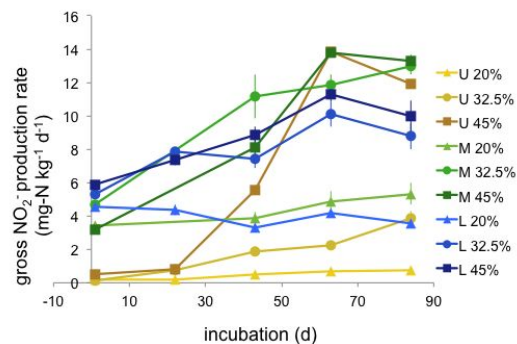


図 1. 培養期間中の亜硝酸生成速度の変化 U; 上部、M; 中部、L; 下部の土壌を指す。値は 3 連の培養の平均値、エラーバーは標準誤差を示す。

に上昇させた場合、あるいは斜面下部の土壌の含水率を斜面中部を模擬した 32.5%に低下させた場合には、各々の土壌を含水率 32.5%および 45%で培養した場合と比べて有意な NO_2^- 生成速度の差は生じなかった (図 1)。したがって、斜面中部から下部にかけての NO_2^- 生成速度の空間的分布の差を生み出す要因として、含水率は支配的ではないことが示唆された。これらのことから、100 m スケールの同一斜面内であっても、 NO_2^- 生成を制御する環境要因が空間的に変化することが示唆された。

土壌呼吸は斜面下部で斜面上部・中部よりも小さく、その差は培養開始時点で最も明確であったが、培養後期にかけて差が小さくなる傾向にあった (図 2)。このことから、斜面下部では上・中部よりも従属栄養微生物活性が低い、あるいは炭素利用効率が高いことが推定され、下部の土壌がより炭素制限の状態にあることが示唆された。この炭素制限環境が、独立栄養的に NH_4^+ (NH_3) を利用するアンモニア酸化微生物の従属栄養微生物に対する優位性を高めることで、 NO_2^- 生成を活性化することが考えられたが、土壌 M と L では培養中の NO_2^- 生成速度に有意な差異は認められなかった (図 1)。

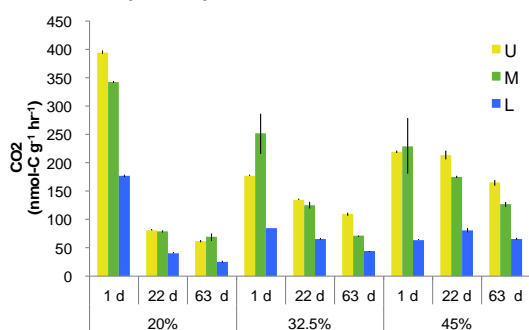


図 2. 培養期間中の土壌呼吸の変化
U; 上部、M; 中部、L; 下部の土壌を指す。
値は 3 連の培養の平均値、エラーバーは標準誤差を示す。

2) NO_2^- の N_2O への還元を制御する要因

^{15}N 標識された NO_2^- を添加してから 1 日間で放出された N_2O の総量は、土壌の種類によって顕著に異なり、放出量が大きかった順に、斜面上部(U)、中部(M)、下部(L)の土壌であった。土壌 U では含水率の高い土壌ほど放出量が大きかった一方で、土壌 M と L では含水率が低いほど放出量は大きかった。さらに、 NO_2^- 生成速度が小さいほど N_2O 放出量が多い傾向を示した (図 3)。これまでの研究代表者らの研究により、この斜面プロットにおける NO_2^- 生成速度と NO_3^- 生成速度の分布はよく一致し、 NO_2^- 生成速度に依存的に NO_3^- 生成が生ずることが示唆されている。さらに近年 Giguera

らは NO_2^- 酸化微生物の添加によって NO_3^- 生成活性を強めることで、 N_2O 放出が低減されることを示した (Giguera et al., 2017 SBB)。これらのことから、同程度の NO_2^- 負荷が加えられた場合、 NO_2^- 生成速度が低く NO_3^- 生成ポテンシャルが小さい土壌ほど N_2O へと変換される NO_2^- の割合が相対的に増加したと推察された。さらに、土壌 M、L では高い含水率ほど N_2O 生成量が低下したが、明確な $^{15}\text{N}_2$ の生成は検出できなかった。よって、含水率の上昇による NO_2^- 還元促進 (*nir* の発現誘導) よりも、基質を競合するプロセスである NO_2^- 酸化 (NO_3^- 生成) ポテンシャルによる N_2O 放出の制御の方が支配的であることが示唆された。

土壌 U の含水率 45% の処理区は、培養後期にかけて高い NO_2^- 生成活性を示すようになるにもかかわらず、 N_2O 放出量が多い傾向を保持したままであり、例外的な挙動を示した。これはアンモニア酸化微生物群と NO_2^- 酸化微生物群の数あるいは機能的なインバランスによるものであると仮説を立て、土壌 DNA 中の機能遺伝子数を定量することで、今後さらに検証を進める予定である。

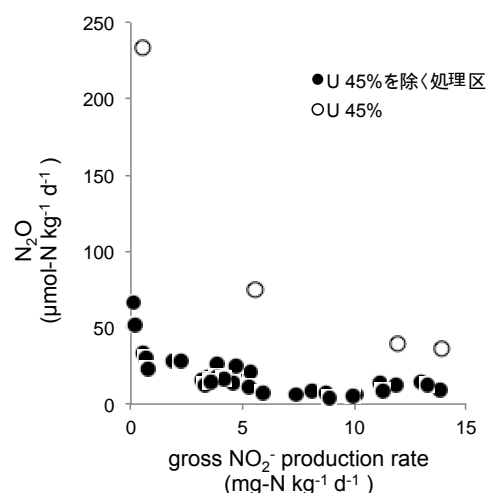


図 3. 亜硝酸生成速度と N_2O 生成速度の関係
値は 3 連の培養の平均値を示す。

3) 非生物的な NO_2^- 生成および消費

オートクレーブ土における NO_2^- 生成活性は検出されず、培養期間中の NO_2^- 生成速度の変化は微生物性の変化によることが確認された。一方で、オートクレーブ土における NO_2^- 消費は顕著に生じ、未オートクレーブ土における NO_2^- 消費速度の 28-89% に達した。非生物的な N_2O 生成を見積もった結果、滅菌土壌における $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加後 1 日間の N_2O 放出は、未滅菌土壌の 7.1-41% に相当した。斜面下の土壌が最も高い非生物反応の寄与率を示し、特に斜面下部では非生物的な N_2O 生成が相対的に重要である可能性が示された。

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)

論文投稿準備中であり、出版済み発表論文等は無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒岩 恵 (KUROIWA MEGUMI)

中央大学 理工学部 助教

研究者番号： 00761024