

令和 2 年 6 月 27 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00594

研究課題名（和文）N₂O同位体アナライザを用いた発酵残渣の品質と土壌のN₂O生成反応との関係解明研究課題名（英文）Influence of digestate quality on N₂O production mechanism in the soil using isotopic N₂O analyzer

研究代表者

利谷 翔平（Riya, Shohei）

東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：80725606

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：発酵残渣炭化物を施用した土壌におけるN₂Oの削減効果と生成機構を評価した。水田および畑状態の土壌に炭化物を施用した際、炭化温度が高いほどN₂O削減効果が高かった。炭化物を添加していない土壌でN₂OアナライザによるSP値を解析したところ、畑状態の土壌では硝化、水田状態土壌では脱窒によるN₂O生成が示された。従って、炭化物でこれらの反応の抑制が示唆された。

さらに、炭化物抽出液を土壌に施用した際のN₂O生成を、炭化物を添加した場合と比較したところ、炭化温度が高いほどN₂O削減における抽出液（炭化物中溶存成分）の寄与が高くなった。従って、炭化物によるN₂O削減における溶存成分の重要性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではN₂Oアナライザにより土壌から発生する亜酸化窒素の生成機構を明らかにしたとともに、発酵残渣の炭化物が土壌から発生する亜酸化窒素（N₂O）を削減する作用があることを明らかにした。炭化物のN₂O削減機構に関しては炭化物そのものの作用が研究されていたが、本研究では炭化物の溶存成分がN₂Oの削減にどう影響するかを調査した。その結果、調製温度が高い炭化物ほど溶存成分がN₂O削減に寄与することが示唆された。この成果は、炭化物を調製する際に、溶存成分を制御することも重要であることを示している。

研究成果の概要（英文）：We evaluated N₂O reduction and its mechanism in the soil amended with digestate biochar. Biochar produced at higher temperature showed higher N₂O mitigation than those at lower ones for both flooded and non-flooded soil. SP value analysis suggested that N₂O was produced by nitrification in the oxic condition and denitrification in the anoxic condition. Therefore, biochar addition would mitigate these reactions in the soil.

Furthermore, we evaluated how soluble matter in the biochar affect N₂O mitigation. Biochar extract addition showed reduction of N₂O emission. By comparing with results of biochar added soil, contribution of soluble matter in biochar to N₂O mitigation was higher for biochar produced at higher temperature. These results suggest control of soluble matter would be important in the biochar production for N₂O mitigation.

研究分野：環境工学

キーワード：亜酸化窒素 発酵残渣 炭化物 安定同位体 SP

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

メタン発酵は、食品や農業廃棄物を、再生可能エネルギーのバイオガスに変換できる。メタン発酵の残渣（発酵残渣）には窒素など肥料成分が含まれているため、化石燃料由来の化学肥料と代替できる。従って、発酵残渣は低環境負荷な肥料として期待できる。

一方、発酵残渣を施用した農地土壌からは温室効果ガスかつ強力なオゾン層破壊物質である亜酸化窒素（ N_2O ）の放出が報告されている。 N_2O はこれまで、化学肥料の施用に伴う放出が多く調査されてきた。発酵残渣の利用は日本ではまだ限定的であるが、欧州ではすでに広く行われている。従って、発酵残渣利用に伴う N_2O 放出の抑制は世界的にも喫緊の課題である。今後の資源循環の必要性を考えると、発酵残渣施用農地に由来する N_2O 放出の削減策を講じるために N_2O 生成機構を解明する必要がある。土壌中の N_2O 生成は、酸化環境でアンモニア酸化細菌による硝化反応、無酸素環境では脱窒細菌による脱窒反応で N_2O が生成する。しかし、どのような反応が発酵残渣を施用した土壌の N_2O 生成において支配的になるかは明らかとされていない。

2. 研究の目的

本研究では、メタン発酵残渣の品質が N_2O 生成反応に与える影響を明らかにする。この目的を達成するために、申請者らは以下のことを実施した。なお、研究開始当初は湿式メタン発酵残渣を土壌に施用した際の N_2O 発生を調査する予定であったが、すでに研究例がすでに多くあったため、乾式メタン発酵残渣を施用した土壌の N_2O 発生を行うこととした。また、乾式メタン発酵残渣は、堆肥化や炭化による利用が検討されている。特に、炭化物は土壌肥沃性の改善だけでなく、 N_2O 削減効果が期待されているが、 N_2O 削減機構の解明がなされていないことから、発酵残渣の炭化物を用いた生成反応の解明を目的とした。

N_2O は様々な微生物反応で生成し、さらに脱窒反応により N_2 へと還元（消費）される。このような複雑な N_2O の生成・消費反応を解明するために、 N_2O 生成経路を解明するためのアプローチとして、 N_2O アナライザーによる反応経路推定を試みた。 N_2O アナライザーでは、 N_2O 分子内の ^{15}N の位置を推定可能なレーザー分光計により、 N_2O 分子中の ^{15}N 分布（SP 値）が、 N_2O の生成反応によって異なることを利用したものである。以上から、本研究では目的を達成するために以下3点を行った。

- (1) N_2O アナライザーによる N_2O 放出、生成経路の連続評価の検討
- (2) 炭化物の生成条件と N_2O 削減の関係
- (3) 炭化物の溶存成分が N_2O 生成に及ぼす影響

3. 研究の方法

- (1) N_2O アナライザーによる N_2O 放出、生成経路の連続評価の検討

N_2O アナライザーによる SP 値の推定がどのような N_2O 濃度でも正確にできるかどうかを明らかにするために、SP 値の N_2O 濃度依存性を確認した。これにより、SP 値評価を行うことができる N_2O 濃度範囲を明らかにした。

N_2O アナライザーを用いて複数の土壌充填ポットから発生する N_2O を連続的に定量するためのシステムを構築した。このシステムを用いて、同じ水田土壌を充填した二つのポットから発生する N_2O 濃度と同位体情報の定量および N_2O 生成メカニズムの推定を試みた。湛水状態の水田土壌に窒素源（ N_2O の原料）として硫酸アンモニウムを添加し、浸透により表面水を消失させて

N₂O の発生を促した。この間、アナライザーを用いて連続的にポットのヘッドスペース空気中の N₂O を測定した。ポットの減水深を調整することで、脱窒あるいは硝化反応由来の N₂O を生成しやすい環境をつくりだし、N₂O アナライザーで測定される SP 値もそれらに応じたものになるかどうかを確認した。

(2) 異なる温度で調製した炭化物を施用した土壌における N₂O 生成機構

水田土壌から放出される亜酸化窒素の炭化物の添加による削減効果および削減メカニズムの推定をアセチレン阻害法および N₂O アナライザーにより行った。炭化温度 400 °C, 500 °C, 600 °C の 3 種類の炭化物を評価した。湛水土壌（水田状態）と非湛水状態（畑状態）の土壌で炭化物による削減作用や削減機構が異なるかを評価するために、各温度で調製した炭化物を、湛水土壌および非湛水土壌に添加した。窒素源として、水田状態では硝酸、畑状態ではアンモニウムを添加した。なお、畑状態で実験を行った際、N₂O アナライザーは調整を行っていたため、SP 値は測定していない。

(3) 炭化物の溶存成分が N₂O 生成に与える影響の評価

炭化物中の溶存成分がどのように N₂O 生成に影響するかを調べるために、上記炭化物から溶存成分を抽出した。さらに、その抽出液を土壌に施用して N₂O の発生を調査した。また、N₂O の消費速度をアセチレン阻害法により推定し、さらに N₂O アナライザーによる N₂O 生成メカニズム推定も行った。

4. 研究成果

(1) N₂O アナライザーによる N₂O 放出、生成経路の連続評価の検討

N₂O 標準ガスの N₂O 濃度を変えながら、SP 値を測定したところ、0~1.5 ppm および 10 ppm 以上の N₂O 濃度において、SP 値の大きな変動がみられた。従って、1.5~10 ppm の濃度であれば安定して SP 値を評価できることが分かった。

ポット試験では、減水深が小さいポット（自然蒸発のみ）および減水深が大きいポット（自然蒸発+土壌浸透）それぞれから、N₂O 濃度の連続的な上昇が確認され、N₂O の生成が起きていることが確認された。さらに、SP 値が安定する濃度域における SP 値を確認したところ、SP 値は、減水深により大きく異なった。減水深が小さいポットでは、SP 値が 0% 付近を示したが、減水深の大きいポットでは、30~40% の SP 値を示した（図 1）。既往の研究から、脱窒反応で生成した N₂O は SP 値が 0 付近になること、また、硝化反応では 30~40% になると考えられている

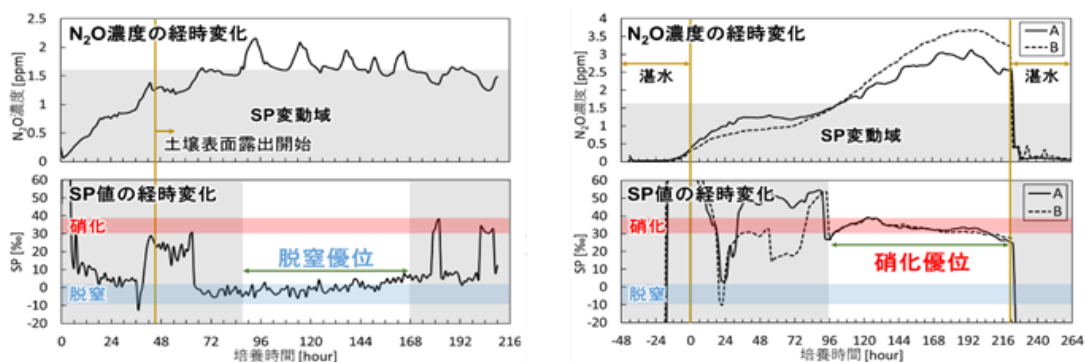


図 1 異なる減水深の水田土壌充填ポットにおけるヘッドスペースの N₂O 濃度および SP 値 (左：減水深小（自然蒸発のみ）、右：減水深大（自然蒸発+土壌浸透）)

(Decock and Six, 2013)。減水深が小さいポットは土壌中へ酸素が侵入しにくいいため、無酸素環境による脱窒が起こりやすい。一方、減水深が大きいポットでは硝化が起こりやすい。従って、異なる減水深のポットより放出される N_2O の SP 値は、そこで起こっていると考えられる N_2O 生成反応を反映していると考えられた。

これより、以後の研究では N_2O アナライザーにより土壌から発生する N_2O の生成経路の評価を行った。

(2) 異なる温度で調製した炭化物を施用した土壌における N_2O 生成機構

水田状態の土壌に炭化物 (400 °C, 500 °C, 600 °C) を施用すると、正味の N_2O 生成量は減少した。炭化温度が高いほどその効果は高く、正味の N_2O 生成量は最大 42% 減少した。アセチレン阻害法で測定した N_2O 消費量については、有意差は認められないものの、炭化物を添加した系の方が、対照系に比べて増加する傾向が見られた。したがって、水田状態の土壌への炭化物の添加は亜酸化窒素放出の抑制に効果的であることが分かった。

嫌気的な条件下で培養を行っているため、 N_2O 生成反応は、脱窒反応が起こると推定される。すべての系において、SP 値は脱窒反応で生成した N_2O を示す約 -10 ~

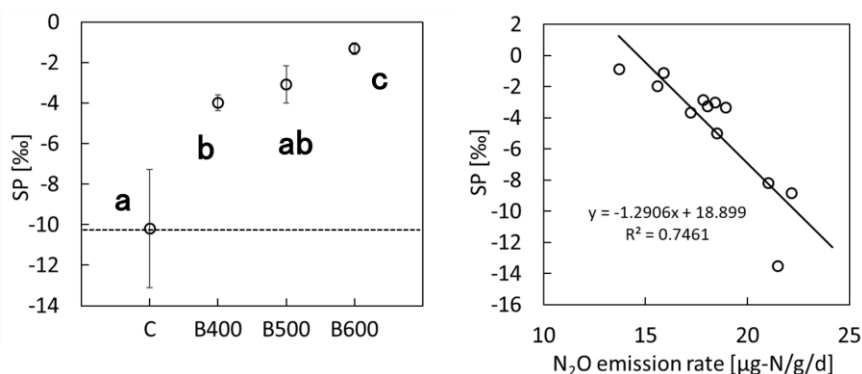


図3 N_2O の SP 値 (左) および N_2O 放出速度と SP 値との関係 (右)

0% となっており、図 1 の結果とも一致する。炭化物を加えた系のほうが高い SP 値を示し、炭化温度が高いほどその傾向が強まっていた。 N_2O の N_2 への還元が起こると、SP 値は増加すると、既往の研究で考えられている (Jinuntuya-Nortman et al., 2008; Ostrom et al., 2007)。そのため、炭化温度が高い炭化物であるほど N_2O 還元反応 (N_2O 消費) が起こっていると考えられた。炭化温度が高い炭化物では表面積や pH が高くなっており、 N_2O の炭化物への吸着や脱窒細菌の活性への影響が考えられた。

畑状態の土壌に炭化物を施用すると、炭化物無施用土壌と比較して、炭化温度 400 °C で調製した炭化物では、30% N_2O 放出量が増加したのに対し、500 および 600 °C では 88 および 99% の削減率を示した。この傾向は、水田状態で培養した場合と同様だった。さらに、土壌中の無機態窒素は、高温で調製した炭化物を入れた系ほど、硝化反応の基質であるアンモニウム濃度が高かった。好気的な条件では硝化反応による N_2O の生成が示唆されていたため (図 1)、炭化物の投入により硝化反応が抑制されたものと推察された。

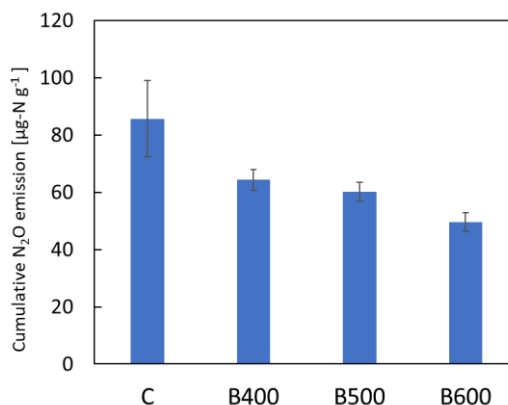


図2 水田土壌における累積 N_2O 放出 (C: 炭化物なし、B400: 400°C炭化物、B500: 500°C炭化物、B600: 600°C炭化物)

(3) 炭化物の溶存成分が N₂O 生成に与える影響の評価

土壌のみの系 (C 系) に比べ、未抽出の炭化物 (図 4 左) あるいは抽出液を施用した系 (図 4 右) の方が N₂O 放出量は低くなる傾向にあった。さらに、アセチレン阻害法により N₂O 還元速度も評価したところ、炭化物抽出液を施用すると、N₂O 還元速度が増加する傾向がみられた (図 5)。ただし、SP 値からは N₂O 還元が進行したかどうか判断ができなかったため、さらなる検討が必要である。N₂O 削減に炭化物の固形分および溶存成分がそれぞれどれほど寄与しているか推定したところ、400°C では溶存成分の寄与は 4% だったが、600°C では 46% にまで増加した (図 6)。この成果は、炭化物を調製する際に、溶存成分の制御も重要であることを示している。

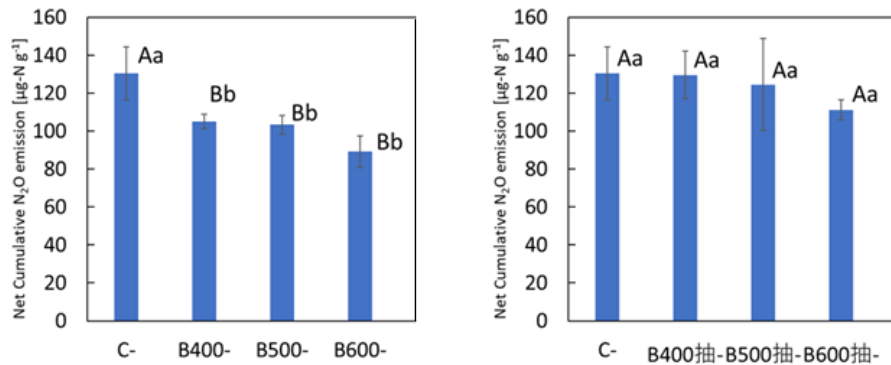


図 4 炭化物 (左) および炭化物抽出液 (右) を添加した嫌気土壌の N₂O 放出量 (10 日間累積)

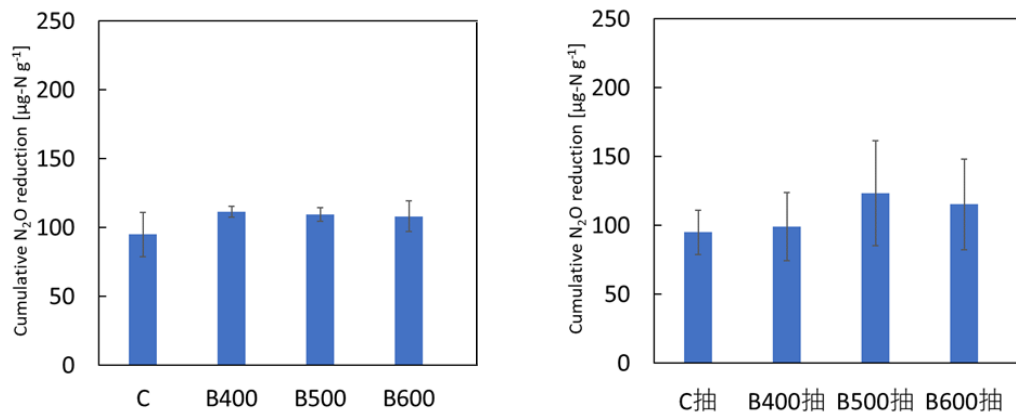


図 5 炭化物 (左) および炭化物抽出液 (右) を添加した土壌の N₂O 還元量 (10 日間累積)

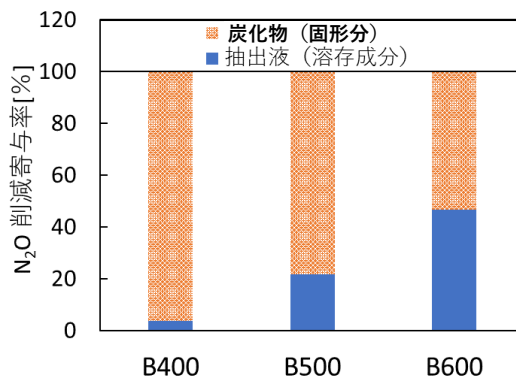


図 6 炭化物と抽出液の累積 N₂O (10 日間) 削減の寄与率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Meng Lingyu, Maruo Koki, Xie Li, Riya Shohei, Terada Akihiko, Hosomi Masaaki	4. 巻 277
2. 論文標題 Comparison of leachate percolation and immersion using different inoculation strategies in thermophilic solid-state anaerobic digestion of pig urine and rice straw	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioresource Technology	6. 最初と最後の頁 216 ~ 220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.011	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 Meng Lingyu, Xie Li, Riya Shohei, Terada Akihiko, Hosomi Masaaki	4. 巻 87
2. 論文標題 Impact of turning waste on performance and energy balance in thermophilic solid-state anaerobic digestion of agricultural waste	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Waste Management	6. 最初と最後の頁 183 ~ 191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.02.012	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 S. Riya, Y. Takeuchi, S. Zhou, A. Terada, M. Hosomi	4. 巻 24
2. 論文標題 Nitrous oxide production and mRNA expression analysis of nitrifying and denitrifying bacterial genes under floodwater disappearance and fertilizer application	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Environmental Science and Pollution Research	6. 最初と最後の頁 15852-15859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11356-017-9231-y	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 L. Meng, L. Xie, T. Suenaga, S. Riya, A. Terada, M. Hosomi	4. 巻 309
2. 論文標題 Eco-compatible biochar mitigates volatile fatty acids stress in high load thermophilic solidstate anaerobic reactors treating agricultural waste	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioresource technology	6. 最初と最後の頁 123366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123366	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤有里子, 利谷翔平, 寺田昭彦, 細見正明
2. 発表標題 同位体分析による落水後の水田における亜酸化窒素生成反応の解明
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2018年度神奈川大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 利谷翔平、竹内裕貴、寺田昭彦、細見正明
2. 発表標題 遺伝子発現と微小電極による水田の亜酸化窒素生成反応の推定
3. 学会等名 第82回日本陸水学会 仙北市田沢湖大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤 有里子, 細見 正明, 寺田 昭彦, 利谷 翔平
2. 発表標題 同位体分析による落水後の水田におけるN ₂ O 生成反応の解明とバイオ炭によるN ₂ O 削減の検討 (2 /
3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----