

機関番号：12605

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20780113

研究課題名（和文） 土壌のメタン・一酸化二窒素生成・消費の解明：新たな同位体比測定による総速度測定

研究課題名（英文） Gross production and consumption measurement of N₂O and CH₄ by using stable isotope tracer technique

研究代表者

木庭啓介（KOBAYASHI KEISUKE）

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：90311745

研究成果の概要（和文）：土壌はメタンや一酸化二窒素の放出源であると共に吸収源であるともされている。土壌がこれら温室効果ガスをどれだけ放出し同時に吸収するかを簡便に測定するための同位体測定手法の開発を試みた。一酸化二窒素については ¹⁵N と ¹⁸O でラベルした N₂O を生成する手法を立ち上げ、土壌に添加することで、N₂O の生成と消費を分離することができるようになったが、現在のところ N₂O を吸収する土壌は見つかっていない。

研究成果の概要（英文）：Soil can act as a sink and a source of methane and nitrous oxide. To distinguish between production and consumption of these gases, I attempted to develop a new, handy analytical method for isotope tracer. Dual labeled N₂O is now produced via ¹⁵N- and ¹⁸O-labelled nitrogen compound, and it is possible to separate N₂O production and consumption for a single soil sample.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物地球化学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：窒素同位体、メタン、一酸化二窒素

1. 研究開始当初の背景

メタンや一酸化二窒素という温室効果ガスがどのように土壌によって吸収され、放出されるかについては、複雑なメカニズムが存在しているために、よりよい理解が不可欠である。通常の測定では、これらのガスの濃度変化を追跡するだけであり、実際にどれだけ生産され、どれだけ消費されているか、この生産と消費というプロセスを分離することは不可能である。しかし、例えばメタンについては、メタンを生成する微生物と消費する微生物は全く異なる微生物であり、これら 2 つ

の微生物プロセスをまとめた純濃度変化でメタンの挙動を解析することは元々無理がある。

2. 研究の目的

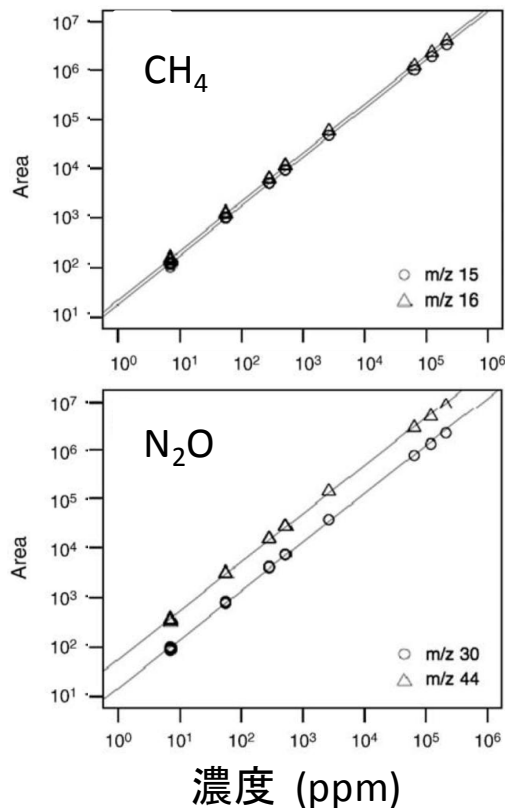
そこで本研究では、比較的容易に利用できる四重極質量分析計を用い、容易にメタンや一酸化二窒素の生成と消費を分離できる測定法の開発を目指した。この測定法が確立することで、土壌のように、特にメタンについて生成と消費が両方同時に起きていると考えられる試料について、より詳細な解析が可能

となると考えられる。

3. 研究の方法

まず、土壌から放出されるメタン及び一酸化二窒素の濃度を連続的にモニタリングするために、膜導入型質量分析計を立ち上げた。既存の四重極質量分析計に作成した膜導入入口を設置し、メタンや一酸化二窒素の濃度をまずは測定することを試みた。水試料に溶存した状態のこれらのガスについては比較的良好な結果が見られたものの、密閉空間にいた土壌から放出してくるこれらのガスについては、濃度がそれほど高くないこと、また夾雑物がかなり入っており、メタンについては水蒸気、酸素などの妨害物質、一酸化二窒素については一酸化窒素、窒素、酸素、二酸化炭素などの妨害物質のシグナルをフラグメントイオン感度の情報から除去することを試みてきたが、満足するレベルのデータは得られなかった。

そこで、一般によく用いられている GC/MS を用いてまずはメタン及び一酸化二窒素の濃度が測定できるかの確認を行った。GC/MS のインジェクション部分の改良を加えることで、大気からのコンタミネーション及び希釈を押さえることができ、比較的良好な検量線を濃度について求めることができた。



図：メタンと N2O の濃度検量線

そこで、まず N2O について 15N と 180 でラベルした N2O を作成し、そのラベルされた N2O を土壌を含んだ密閉空間に添加し、N2O の濃度変化と、15N および 180 ラベル濃度の変化をあわせることで、N2O の消費と生成を分離することを試みた。

まず、15N と 180 の両方がラベルされた N2O は一般に販売されておらず、作成を依頼すると大変高価なため、実験室内で作成するプロトコルを立ち上げた。具体的には、15N でラベルされた亜硝酸塩と 180 でラベルされた水を用い、既報 (McIlvin and Casciotti 2007 Analytical Chemistry) の方法を応用し、様々な濃度での 15N および 180 レベルをもつ N2O を生成することができるようになった。しかし、15N と 180 の両方を高比率でラベルした化合物について、GC/MS の出力 (質量数 30/31/32/33/44/45/46/47/48) をどのように計算して最終的に 15N と 180 の濃度というデータに換算するかについては予想よりも困難であり、現在努力中である。具体的には、N2O の生成反応における 15N と 180 の分布がランダムに分布するときとそうでないときがあり、その結果、予想される 15N ないし 180 濃度とは異なるシグナルが GC/MS で検出されるという問題が生じている。これについては、現在よりも高濃度の N2O を生成し、GC/MS にてより精度良く様々なフラグメントイオンを、質量数 14 から 48 までスキャンし、14N と 15N、160 と 170 そして 180 のシグナルを直接拾う努力を現在行っているところである。

4. 研究成果

土壌を密閉容器に培養し、15N と 180 でラベルされた N2O を気相に存在させ、N2O の挙動の追跡を試みた。

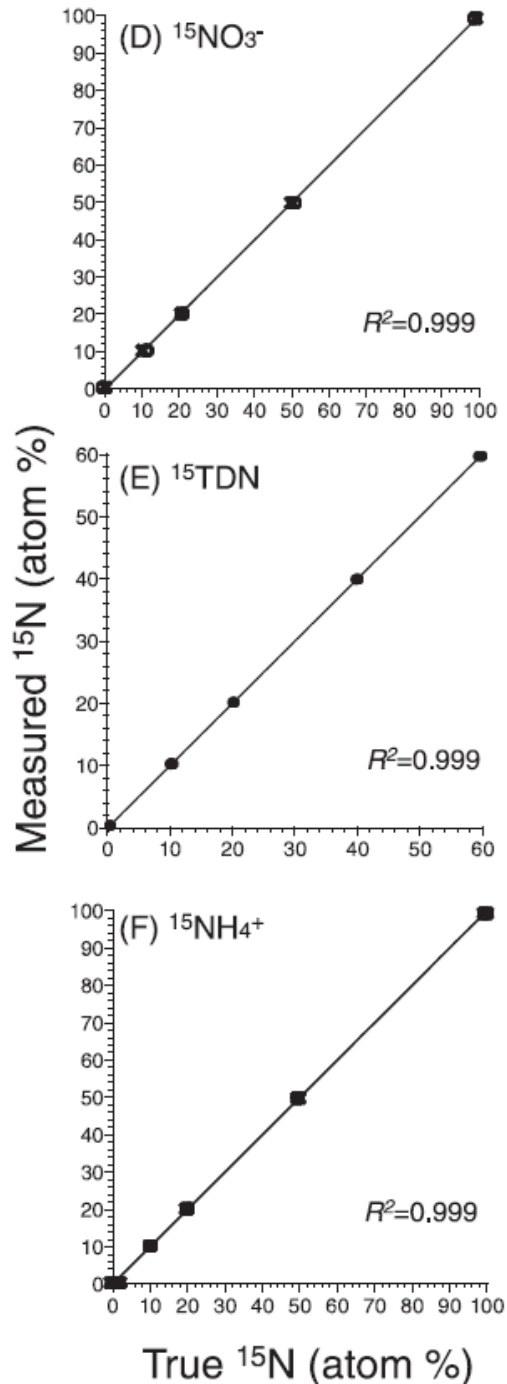
sample 1		
MS area	t=t	t=3h
44(N2O)	1293.3	1113.3
45(N2O)	2800.0	3043.3
46(N2O)	9918.3	11450.0
47(N2O)	95.0	58.3
48(N2O)	193.3	100.0

表：土壌サンプルから放出されている N2O の測定結果

実際には上の表のようなデータがそれぞれの土壌サンプルについて得られた。これから、質量数 45 と 46 という 15N が 1 つまたは 15 が 2 つついた N2O が生成していること、また質量数 47 という 15N が一つ、180 が 1 つついた N2O が消費され、15N が 2 つ、180 が 1 つついた質量数 48 の N2O が消費されていることがわかる。

しかし残念ながら N2O だけの情報で N2O の消費を見積もることは難しいことがわかった。異なる質量数ごとに方程式を立てる必要があり、実際には、異なる質量数を持つ N2O がどれだけ生成してくるか、さらにはその N2O を生み出す基質の 15N および 18O の濃度測定が必要であることがわかってきた。

そこで、N2O の測定と同時に、より詳細に N2O



図：硝酸など N2O の基質についての 15N トレーサー検量線

基質であるアンモニウム、硝酸、亜硝酸、溶存有機物についても 15N および 18O トレーサー濃度を測定する方法論の開発が急務となったため、これらについても本研究の中で行った。具体的には、土壌抽出液という 2M の KCl や 0.5M の K2SO4 といった特殊な溶液中に存在している上記窒素化合物の濃度及び 15N トレーサー濃度を測定することが不可欠であり、N2O のトレーサー測定で培った技術を用い、GC/MS で比較的容易にこれらの 15N トレーサー測定を行えるようなプロトコルを作成することができた。これについては、非常に汎用性の高い、ニーズの大きな測定法が開発できたために、論文としてまとめ、国際学会誌に掲載をすることができた。また、この手法によって土壌中の上記の窒素動態についての研究も進めることができるようになった。

現在、この N2O の基質についてのトレーサー測定と、放出してきた N2O のトレーサーレベルとの比較を行いつつ、得られたデータの解析及び論文の登校準備中である。

一方メタンについては、 $^{13}\text{CH}_4$ について、N2O と同様に測定が可能となった。しかし、現在まで測定を行っているサンプルについては、メタンの吸収 ($^{13}\text{CH}_4$ 濃度の減少) は認められるものの、同時にメタンの放出 ($^{12}\text{CH}_4$ 濃度の増大) を示しているものがなく、 $^{12}\text{CH}_4$ 測定の感度が不十分であるという可能性について検討を行っている状態である。また、 $^{13}\text{CH}_4$ については、購入すると大変高価なため、 ^{13}C でラベルされた化合物から生成することを試みたが、現在のところうまくいっておらず、夾雑物が混じってしまう。この点については今後大幅な改善が必要である。

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 5 件)

① Fang Y, Yoh M, Koba K (他 7 名)

Nitrogen deposition an doforest nitrogen cycling along an urban-rural transect in southern China, *Global Change Biology*, 17, 872-885, 2011, 査読有

② Isobe K ら (他 11 名中 11 番目) Analytical Techniques for quantifying $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ of nitrate, nitrite, total dissolved nitrogen and ammonium in environmental samples using a gas chromatograph equipped with a quadrupole mass spectrometer, *Microbes and Environments*, 26, 46-53, 2011, 査読有

③Fang Y, Koba K (他 6 名) Anthropogenic imprints on nitrogen and oxygen isotopic composition of precipitation nitrate in a nitrogen-polluted city in southern China, Atmospheric Chemistry and Physics, 11, 1313-1325, 2011, 査読有

④Tobari Y, Koba, K (他 7 名) Contribution of atmospheric nitrate to stream-water nitrate in Japanese coniferous forest revealed by the oxygen isotope ratio of nitrate, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 24, 1281-1286, 2010, 査読有

⑤Takebayashi Y, Koba K (他 3 名), The natural abundance of ^{15}N in plant and soil-available N indicates a shift of main plant N resources to NO_3 to NH_4 along the N leaching gradient, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 24, 1001-1008, 2010, 査読有

[学会発表] (計 2 件)

①自然安定同位体比を用いた一酸化二窒素生成プロセスの解析, 木庭啓介、日本微生物生態学会、2009 年 11 月

②

Nitrogen cycling in Lake Kizaki elucidated by isotopic analysis, Y. Sasaki, K. Koba (他 7 名)、International Symposium on Isotopomers, 2008 年 10 月

[その他]

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~keikoba/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木庭啓介 (KOBA KEISUKE)

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：90311745

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：