

令和 5 年 10 月 27 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21295

研究課題名（和文）陸域物質循環のカギを握る土壌団粒内で起こる炭素・窒素動態の解明

研究課題名（英文）Carbon and nitrogen dynamics inside of soil aggregates

研究代表者

和穎 朗太（Wagai, Rota）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境研究部門・上級研究員

研究者番号：80456748

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：植物が生育する土壌は団粒構造を持つ。本課題では、黒ボク土を対象に標識アミノ酸添加培養・土壌物理分画実験を行い、土壌微生物の駆動するCN動態は土壌団粒の階層構造の影響を受けていることを初めて明らかにした。また、団粒最表面の有機・無機成分の化学組成変化の規則性、数百年以上埋没した黒ボク土の有機無機複合体と団粒構造の関係性、酸化還元履歴が複合体に及ぼす影響について新知見を得ることができ、国際誌に発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

陸上最大の炭素（C）や窒素（N）プールである土壌において、微生物によるCN代謝は物質循環の要であるが、これまでの研究では、微生物の住み家であり土壌諸反応の場である団粒構造はほとんど無視されてきた。また、団粒や土壌粒子の最表面（反応面）で生じる有機物と無機物の相互作用について知見に乏しい。同位体標識CNのトレーサー実験、同位体顕微鏡分析、これまで我々が培ってきた団粒階層構造の評価手法を組み合わせることで得られた本成果は、CN代謝を団粒構造という物理環境に則して定量評価する新手法であり、土壌CN動態予測モデルの高度化、更に土壌における物理学・化学・生物学の融合に向けた重要な成果と言える。

研究成果の概要（英文）：Surface soils where plants grow typically have aggregate structure. While soil is the biggest terrestrial reservoir of C & N and their cycles are largely driven by microbes, how soil aggregate structure is functionally linked to microbial C & N transformation remain virtually unknown. By combining soil incubation with isotope tracers, soil physical fractionation, and chemical characterization of each fraction (e.g., EA, SEM, and NanoSIMS), we showed that the fate of microbially-metabolized C & N was strongly regulated by aggregate hierarchy. We also examined the long-term fate of C & N in organo-mineral aggregates using the two buried Andisol horizons (burial age: ca 500 & 4600 yrs). We found significant linear relationship between C and pyrophosphate-extractable Al and Fe across all horizons, layers, and the size fractions we obtained after maximum dispersion of aggregates. We also assessed the effect of soil redox regimes on the interaction of organic matter with Al and Fe.

研究分野：土壌科学

キーワード：土壌団粒 炭素循環 窒素循環 土壌有機物 同位体生態学 生物地球化学 土壌炭素隔離 物質循環

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

植物が生育する土壌には「団粒構造」が発達している。この構造は、ナノからマイクロサイズの有機物および鉱物粒子の結合を基点とし（図 1 右）、これら複合体と粗大土壌粒子（砂、リター等）が結合し、ミリメートルサイズの 3 次元構造が形成されると考えられている（図 1 左側）。

この物理構造が、土壌の担う物理、化学、生物生態学的な諸機能と密接に関係していることは良く知られているが、微生物による C や N の代謝などの土壌プロセス研究において、「反応の場」である土壌物理構造をほとんど無視されてきた。

団粒の多孔質性および動態（形成・崩壊）には、この構造を繋ぎとめる接着物質（中でも有機物）の働きが重要であり、異なる接着物質の働きにより団粒構造は階層性を持つと考えられる（図 1）。よって、団粒構造と土壌プロセスを統合的に理解するには、この団粒の階層構造がカギになると考え、本研究では、団粒階層構造と有機物（C, N）の関係について、以下 3 つの研究を行った。

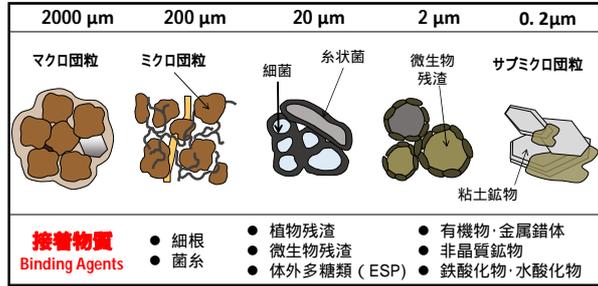


図 1. 土壌団粒の階層性モデル Tisdall & Oades (1982)を基に作図。一部改良。

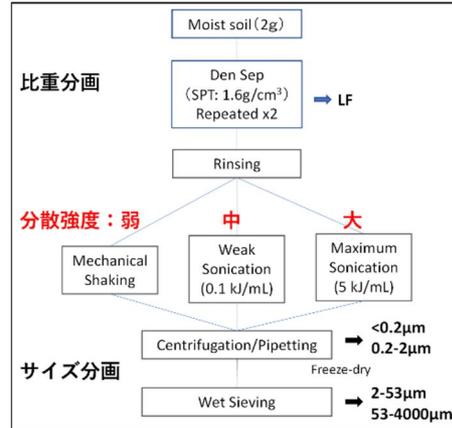


図 2. 本研究の土壌物理分画のフロー図。異なる強度の分散により、3つの階層レベルにあるサイズ分画を分離した。

2. 研究の目的

A) 団粒階層性 × C, N代謝 :

微生物に代謝された有機物と土壌鉱物の結合が土壌 C, N の安定化に重要であるため (e.g., Wagai et al. 2020, Heckman et al. 2022)、微生物に代謝された C, N が階層的団粒構造のどこで代謝され、安定化されるかを同位体標識アミノ酸添加・土壌培養実験により、定量的に評価することを目的とした。更に、NanoSIMS を用いて、標識同位体元素をサブミクロスケールでイメージ解析し、微生物が代謝した C, N の安定化機構の評価に挑戦した。

B) 土壌団粒最表面の化学組成 :

土壌中のリターや一次鉱物粒子の多くは微細鉱物や有機無機複合体で被覆されている (Asano & Wagai, 2014; Wagai et al., 2015)。つまり、土壌粒子の大部分は広義の団粒である。では「反応の場」である団粒表面の性質にどの程度の幅があり、その変異を規定する要因は何か？ X線光電子分光法 (XPS) を用いてこの問いに答えることを目的とした。

C) C, N 長期安定化と団粒構造の関係 :

特に火山灰を母材とする黒ボク土では、団粒内の有機物 (OM) の多くは活性アルミニウム (Al) および鉄 (Fe) と複合体化して安定化していると考えられるが、この有機無機複合体と呼ばれるものの実態は驚くほど分かっていない。そこで、複合体の化学組成および物理構造の数千年スケールでの安定性の評価を目的とした。

3. 研究の方法

A) 団粒階層性 × C, N代謝 :

我々のこれまでの研究から、団粒階層性の低次にある強固で微細な団粒 (有機無機複合体) において C, N が最も安定化しているという作業仮説が成り立つ。逆に言えば、同じ微細団粒でも、高次階層構造にある崩れやすい (おそらくマクロ団粒表面に位置する) ものは C, N 代謝回転速度が速いはずである。

これを検証するため、アロフェン質黒ボク土表層 (Ap 層) を対象に、¹³C, ¹⁵N 標識グルタミン酸添加培養実験を好気条件 (最大容水量の 50%) で行なった。1 か月および 10 か月後、低比重画分の分離後、3 段階の分散強度条件で粒径分画を行い (図 2)、異なる階層レベルの各粒径画分に移行した ¹³C, ¹⁵N を定量した。分画法の詳細は Asano & Wagai (2014) 参照。¹³C, ¹⁵N 濃度は EA/IRMS により測定。

B) 土壌団粒最表面の化学組成 :

粘土鉱物組成が大きく異なる3つの土壌タイプの表層土壌を対象に、土壌粒子は主に有機無機複合体（団粒）として存在しているため、団粒表面の化学組成は低比重から高比重に向けて予想的・連続的に変化するという仮説を検証した。比重分画では、ポリタングステン酸ナトリウム溶液に分散させる必要があるため、機械振とうで崩れない団粒、つまり高次階層構造を壊し、比較的強固な中レベルの階層構造を持つ団粒（および粒子）を対象とした。XPS 分析には島津/Kratos AXIS を用いた。

C) C, N 長期安定化と団粒構造の関係：

南九州（都城）の調査地点において 2m + 深さの土壌断面調査を行い、約 500 年と 4600 年に埋没した表層土壌（埋没層 2A、4A それぞれ厚み約 30 cm）を 5 cm 刻みで採取した計 12 点を研究対象とした。また、各層の 6 点のうち最も C, N 濃度が高い試料を対象に、最大分散処理を行った後、サイズ分画を行った。

4. 研究成果

A) 団粒階層性 × C, N 代謝：

弱い分散（振とう）条件では、重量の 5 割弱、全炭素・全窒素量の 3 割が砂画分（ $> 53 \mu\text{m}$ ）に存在した。超音波による中レベルおよび最大レベル分散条件では、砂画分の重量割合は 2 割（中）から 1 割弱（最大分散）に、炭素・窒素割合は 1 割弱から検出限界以下に低下し、 $> 53 \mu\text{m}$ サイズ団粒が段階的に崩壊したこと、つまり団粒構造の階層性が確認された。

培養一か月後において ^{13}C 富化は $< 0.2 \mu\text{m}$ 画分で最大であるのに対し、 ^{15}N 富化は低比重画分（LF）、その次に $< 0.2 \mu\text{m}$ 画分であった。これは $< 0.2 \mu\text{m}$ 画分で比表面積が最も高いこと、易分解性基質を多く含む LF には活発な微生物群集が局在するためと解釈できる。10 カ月後には無機化が進み標識 CN 濃度は全体として低下するものの、微生物に再利用されやすい ^{15}N については、1 カ月後に比べて以下の画分で顕著な富化が見られた：すべてのサイズ画分（分散：弱）、 $< 53 \mu\text{m}$ のすべての画分（分散：中）、 $0.2 - 53 \mu\text{m}$ 画分のみ（分散：大）。

各サイズ画分の ^{13}C , ^{15}N 濃度をそれぞれの重量で重みづけし、添加した標識 C, N の行方を調べた（図 2, ^{15}N もほぼ同じ傾向のため省略）。分散（弱）において、 ^{13}C (^{15}N も) の多くは $0.2 - 2.0 \mu\text{m}$ 画分に存在し、 $> 53 \mu\text{m}$ 画分にもかなりのシグナルが検出された。これは、分散しやすい $0.2 - 2.0 \mu\text{m}$ 径の複合体が微生物ホットスポットとなっており、また $> 53 \mu\text{m}$ の耐機械振とう性マイクロ・マクロ団粒中の微生物も ^{13}C を代謝していたことを示唆する。分散強度が上がるに従い、粗大画分の ^{13}C の低下および微細画分の ^{13}C の上昇という連続的な変化が見られた（図 2 b, c）。この結果は、 $> 53 \mu\text{m}$ ミクロ・マクロ団粒 ^{13}C の大部分は中レベル分散で、 $2 - 53 \mu\text{m}$ 団粒 ^{13}C の大部分は消滅し、それらの団粒に内在していた微細粒子（特に $< 0.2 \mu\text{m}$ 画分）が遊離したための解釈できる。

以上から、微生物代謝された C, N の多くは分散されやすい微細団粒（ $< 2 \mu\text{m}$ ）に貯留し、強度の分散条件によって初めて崩れる堅牢なマイクロ・サブマイクロ団粒には ^{13}C , ^{15}N が到達しづらいたことが示された。つまり、微生物代謝による土壌中の CN 移行は、土壌粒子のサイズや比重だけでなく、団粒構造の階層性の影響を強く受けていることを初めて明らかにできたと考えられる。尚、分画試料の一部を対象に、ドイツ TUM グループとの共同研究として同位体顕微鏡分析（NanoSIMS）を行った。解析途中ではあるが、 ^{13}C , ^{15}N の主要な移行先であった $0.2 - 2.0 \mu\text{m}$ 画分の粒子の中でも微小粒子（ $< 2 \mu\text{m}^2$ ）の有機物被覆がある部分に ^{13}C , ^{15}N が局在する傾向が分かってきた。

B) 土壌団粒最表面の化学組成：

アロフェン質黒ボク土、2:1 型粘土に富む Mollisol、1:1 型粘土に富む Ultisol の A 層を連続比重分画により、 $< 1.6 \text{ g cm}^{-3}$ から 2.5 g cm^{-3} まで 6 ~ 7 画分に分け、それぞれの XPS 分析を行った。その結果、図 4 に黒ボク土の例を示すとおり、すべての土壌に共通して、有機物（N）に対する主要鉱物構成元素（Fe, Al, Si）の比が比重に対応して増加する傾向が示された。つまり、幅広い土壌タイプにおいて、低比重の土壌粒子（団粒）ほど有機物による被覆度が高く、高比重画分ほど粒子表面は鉱物質である一般性の高い傾向があることが示された。

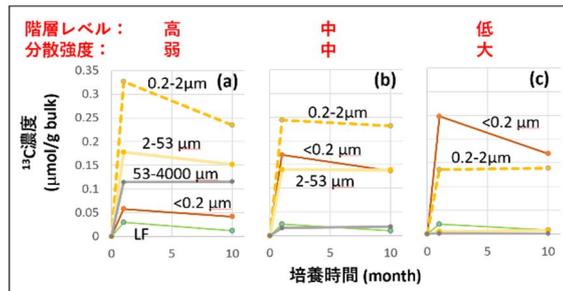


図 3. 異なる階層レベルの各サイズ画分への標識Cの移行の時間変化（培養1~10ヵ月間）。Y軸：バルク土壌当りの各画分中 ^{13}C 濃度

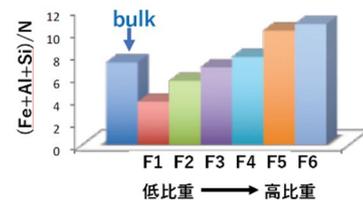


図 4. アロフェン質黒ボク土（Ap層）の粒子比重に応じた表面化学性の変化

更に、アルゴンスパッタによる深さ方向のXPS分析から、熱による試料損傷の可能性は完全には否定できないものの、土壌粒子表面の情報として解釈が可能な連続的な変化が示された。具体的には、易分解性と考えられる酸素やNと結合したCは最表層に多く(図5)、Fe, Al, Siと複合体化して耐機械振とう性団粒の最表層に多く存在している可能性が明らかになった。

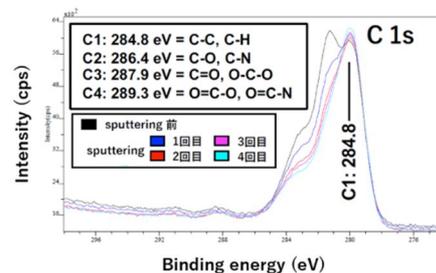


図5. Ar+ sputtering (1kV, 30sec, 4回繰り返し)によるCスペクトルの変化。アロフェン質黒ボク土

C) C, N 長期安定化と団粒構造の関係

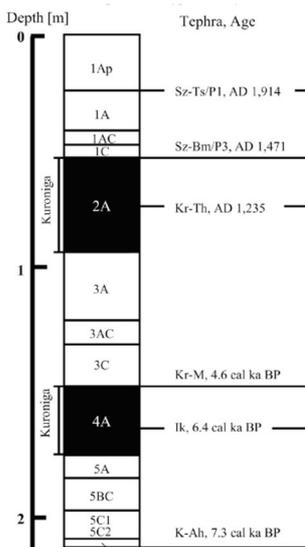


図6. 調査地の土壌層位と観察された鍵テフラの降下年代 (Shimada et al. 2022)

約4千年の埋没期間の違いのある2Aと4A層(図6)を比較することで、当時表層環境にあった2A、4A層で形成された団粒および有機無機複合体が、テフラの降下堆積によって、有機物供給が停止した後の時間経過に伴いどの様に変化するかを検証することができる。

驚くべきことに、2A、4A層のすべての深度のバルク土壌試料だけでなく、最大分散後のサイズ画分も含めたすべての試料に共通して、OMとピロリン酸可溶性 Al + Fe 濃度に強い相関があり(図7)、その量比は OC:metal=13.2+/-3.5 (mol:mol)であった。

この相関を生じさせるメカニズムを検討するために、各試料の炭素構造を固体 13C-NMRにより調べたところ、芳香族Cより脂肪族Cとの間で活性金属との強い相関がみられた。また、2A層より約4千年古い4A層における有機無機複合体の多くは、より微細なマイクロ団粒(<0.2μm画分)に存在することを明らかにし、国際誌に発表した(Shimada et al. 2022)。数千年スケールの有機物・鉱物の相互作用の詳細は不明であったため、インパクトは高く、この論文は、土壌科学のトップジャーナルである *Geoderma* の2022年5月の Editor's choice に選ばれた。

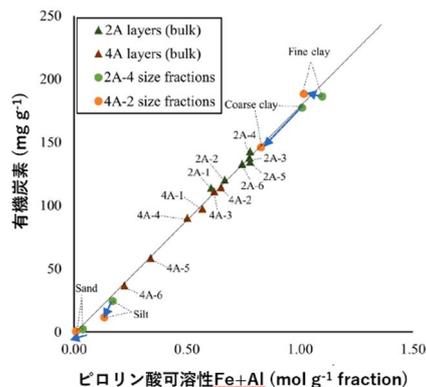


図7. 埋没層の異なる深度およびサイズ画分中の炭素とピロリン酸可溶性鉄+アルミニウム濃度の関係 (Shimada et al. 2022)

D) その他

ドイツ Leibniz Centre for Agricultural Landscape Research (ZALF)グループとの共同研究として行った土壌の乾湿条件が有機無機複合体の形成に及ぼす影響評価を、本科研費の一部を利用して進めた。湿地土壌中の有機無機複合体は、酸化的な環境ほど微生物分解が進んだOMがFe酸化物と、還元的・酸性な環境ほど分解程度が低いOMが遊離 Al と結合して存在することを明らかにした(Nitzsche et al. 2022)。

黒ボク土の強固な団粒形成および長期的 C, N の安定化の主要因の1つと考えられる活性アルミニウム(非晶質鉱物、アロフェン・イモゴライト成分)についてレビューをまとめた(Watanabe et al., 2023)。

引用文献(太字 = 本課題の成果) :

- Asano, M. and R. Wagai (2014). "Evidence of aggregate hierarchy at micro- to submicron scales in an allophanic Andisol." *Geoderma* 216(0): 62-74.
- Nitzsche, K. N., et al. (2022).** "Divergent roles of iron and aluminum in sediment organic matter association at the terrestrial-aquatic interface." ***Biogeochemistry* 157(3): 355-378.**
- Shimada, H., et al. (2022).** "Millennium timescale carbon stability in an Andisol: How persistent are organo-metal complexes?" ***Geoderma* 417: 115820.**
- Wagai, R., et al. (2015). "Nature of soil organo-mineral assemblage examined by sequential density fractionation with and without sonication: Is allophanic soil different?" *Geoderma* 241-242(0): 295-305.
- Watanabe, T., et al. (2023).** "Short-range ordered aluminosilicates". ***Encyclopedia of Soils in the Environment (Second Edition)*. M. J. Goss and M. Oliver. Oxford, Academic Press: 121-134.**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimada Hiroaki, Wagai Rota, Inoue Yudzuru, Tamura Kenji, Asano Maki	4. 巻 417
2. 論文標題 Millennium timescale carbon stability in an Andisol: How persistent are organo-metal complexes?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Geoderma	6. 最初と最後の頁 115820 ~ 115820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.geoderma.2022.115820	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 Nitzsche Kai Nils, Kayler Zachary E., Premke Katrin, Gessler Arthur, Wagai Rota	4. 巻 157
2. 論文標題 Divergent roles of iron and aluminum in sediment organic matter association at the terrestrial/aquatic interface	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biogeochemistry	6. 最初と最後の頁 355 ~ 378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10533-021-00878-5	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 該当する
1. 著者名 井上弦	4. 巻 71
2. 論文標題 第四紀学における日本の土壌および関連するテフラの諸問題	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 号外地球	6. 最初と最後の頁 78-83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Watanabe Tetsuhiro, Harsh James B., Wagai Rota	4. 巻 -
2. 論文標題 Short-range ordered aluminosilicates	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Encyclopedia of Soils in the Environment (Second Edition)	6. 最初と最後の頁 121-134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-822974-3.00223-8	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 和穎朗太、梶浦雅子、早川智恵
2. 発表標題 土壌団粒内で起こる炭素・窒素動態の解明：同位体トレーサー法から団粒階層構造へ切り込む
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上弦、浅野眞希、和穎朗太
2. 発表標題 X線光電子分光法による有機無機複合体の表面化学性評価：問題点および展望
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 和穎朗太
2. 発表標題 地球環境の安定性を支える土壌の機能：その象徴として「土壌団粒」は土壌教育に有効か
3. 学会等名 日本土壌肥料学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松岡かおり、神野 城、島田紘明、和穎朗太
2. 発表標題 有機物存在下での岩石粉砕物の化学風化に伴う中比重団粒形成と炭素蓄積
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rota Wagai
2. 発表標題 Possible mechanism behind the stability of aggregates & soil organic matter
3. 学会等名 Department Seminar (Geography) University of Zurich (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rota Wagai, Masako Kajiura, Maki Asano, Yudzuru Inoue
2. 発表標題 Linking soil organic matter stabilization with mineral surface binding, aggregation, and microbial metabolism
3. 学会等名 American Geophysical Union (B063 - Soils in the Anthropocene: Mechanisms of Stabilization and Change) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020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
研究分担者	長尾 眞希 (浅野眞希) (Asano Maki) (80453538)	筑波大学・生命環境系・助教 (12102)	
研究分担者	井上 弦 (Inoue Yudzuru) (30401566)	長崎総合科学大学・総合情報学部・准教授 (37301)	

	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
研究協力者	ミュラー カースティン (Muller Carsten W.)	Geography	University of Copenhagen, Demark (formerly, Technical University of Munich, Germany)

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	シュバイツァー シュテフェン (Schweizer Steffen A.)		Technical University of Munich, Germany
研究協力者	ホーシェン カルメン (Hoeschen Carmen)		Technical University of Munich, Germany
研究協力者	ニーチェ カイ (Nitzsche Kai)		University of Darmstadt, Germany
研究協力者	ヘックマン ケイト (Heckman Katherine)		USDA Forest Service, USA

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
	ドイツ	Technical University of Munich	Leibniz Centre Agric. Landsc. Res.	
米国	USDA Forest Service	Dartmouth College	U.S. Geological Survey	他17機関