

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25550009

研究課題名(和文) 森林土壌における亜硝酸と一酸化窒素を介した窒素保持・放出プロセスの詳細解明

研究課題名(英文) Elucidation of the processes of N retention and emission through nitrite and nitric oxide in forest soils

研究代表者

妹尾 啓史 (Senoo, Keishi)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：40206652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では窒素安定同位体( $^{15}\text{N}$ )を用いて森林表層土壌中の亜硝酸の変換速度を求め、消費の経路を追跡した。結果として、土壌理化学性が様々に異なる土壌において普遍的に亜硝酸は活発に生成・消費され、その速度や消費経路は土壌の条件によって異なった。従来は考慮されてこなかった溶存有機態窒素への変換や一酸化窒素としての放出が重要であることが示唆され、これらの知見は、植物や微生物に利用可能な窒素が土壌中でどのように維持あるいは放出されるかを明らかにする上で重要である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we calculated nitrite transformation rates and traced the fates of nitrite to detect its consumption pathway using nitrogen stable isotope ( $^{15}\text{N}$ ) in forest surface soils. As a result, fast production and consumption of nitrite was observed universally. Nitrite transformation rates and consumption pathway vary according to soil conditions. It was indicated that the conversion to dissolved organic nitrogen and nitric oxide were important as the pathway of nitrite consumption. These findings are required to elucidate the mechanisms of conservation / emission of available nitrogen for plants and microbes in soils.

研究分野：土壌学

キーワード：森林土壌 トレーサー 窒素 亜硝酸 一酸化窒素 溶存有機体窒素

### 1. 研究開始当初の背景

窒素は多くの森林生態系において植物の生長を制限する主要な元素であり、窒素の循環・保持・放出機構を明らかにすることは森林の生産性の維持や向上のために極めて重要である。これまで森林土壌における窒素の循環、保持・放出機構は有機態窒素、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{N}_2\text{O}$  を中心に解析されてきた。その一方で  $\text{NO}_2^-$  や  $\text{NO}$  は反応性の高さゆえに、検出やトレースが困難であり、その動態についてほとんど着目されてこなかった。しかし、 $\text{NO}_2^-$  は  $\text{NH}_4^+$  酸化(硝化過程)や  $\text{NO}_3^-$  還元(脱窒過程)を含む全ての無機態窒素の変換反応に関わる、窒素循環の中で極めて重要な中間生成物である。また、ガス態の窒素や  $\text{NO}_3^-$  とともに主要な窒素溶脱源である溶存有機態窒素(DON)に容易に変換されることが申請者らによって示されている(Isobe et al. 2012)。また  $\text{NO}$  は硝化・脱窒過程で生成する  $\text{N}_2\text{O}$  の中間生成物でもある。以上から、 $\text{NO}_2^-$  および  $\text{NO}$  の動態を把握することなしには、森林土壌における窒素の保持・放出機構について十分に明らかにできない。

$\text{NO}_2^-$  および  $\text{NO}$  は反応性が高いために、その挙動を明らかにするうえで窒素や酸素の安定同位体( $^{15}\text{N}$ 、 $^{18}\text{O}$ )の利用が不可欠である。しかし、現状では  $^{15}\text{N}$  トレーサーについてのみであってもその測定はきわめて限定的にしが行われていない。たとえば、 $\text{NO}_2^-$  の場合、申請者らのチームを除きイギリスとドイツの2つのラボにおいて測定が行われているにすぎない。また、従来  $\text{NO}$  は主に化学発光法によって濃度の測定がなされ、その結果、多くの森林土壌において  $\text{NO}$  生成が確認されている。しかし、従来法では  $\text{NO}$  の安定同位体については検出できず、そのため、その生成プロセスについての情報はほとんど得られていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は上記のように、これまでほとんど考慮されてこなかった  $\text{NO}_2^-$  の生成・消費速度および  $\text{NO}$  を含めた消費の経路を定量的に解析することで、森林土壌における  $\text{NO}_2^-$  の動態を定量的に把握することにある。これにより、 $\text{NO}_2^-$  を起点とする窒素保持・放出プロセスについての全体像を解明することを目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

本研究の目的を実現するための手法として、以下(1)-(3)を行った。

#### (1) GC/MS を用いた $^{15}\text{NO}$ 濃度測定

$\text{NO}$  の測定に関して最も問題となるのは大気成分との分離およびカラムとの相互作用であるため、四重極型 GCMS と PLOT カラムおよびモレキュラーシーブカラムを用いて大気成分との分離とピークの検出が可能な分析条件を設定した。

#### (2) 森林表層土壌中における短期の $\text{NO}_2^-$ 動態解析と $\text{NO}_2^-$ 動態を制御する環境要因

試料として千葉県東京大学千葉演習林に位置するスギ人工林斜面プロット(8 × 100m)内の有機物層・鉱質土層(0-10cm)を55点からメッシュ状に採取した。これらについて以下の測定を行った。

##### $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加培養による $\text{NO}_2^-$ 変換速度算出

$\text{NO}_2^-$  の土壌中における変換速度を定量するために、 $^{15}\text{NO}_2^-$  を添加したのち、好氣的に30分または2時間の培養を行い、 $^{15}\text{N}$  希釈法により亜硝酸生成・消費速度を算出した。

##### $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加培養による $\text{NO}_2^-$ 変換経路推定

$\text{NH}_4^+$ 、全溶存態窒素、 $\text{NO}_3^-$  の濃度・同位体比について測定を行い、添加  $^{15}\text{N}$  が一定時間(30分/2時間)の後にどのような物質に変換されるかを追跡した。

##### 土壌理化学性

現場土壌の  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、含水率、pH、全窒素濃度、全炭素濃度、について測定を行い、 $\text{NO}_2^-$  動態を制御する環境因子について解析した。

#### (3) 森林表層土壌中における数週間単位の $\text{NO}_2^-$ の動態解析と $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 動態との関連

(2) で用いた斜面プロットにおいて、斜面の位置によりプロットを上/中/下の3区画に分けた。それぞれの区画のうち5点から採取した土壌を混合し  $^{15}\text{NH}_4^+$ 、 $^{15}\text{NO}_2^-$ 、 $^{15}\text{NO}_3^-$  の添加培養を行った。 $^{15}\text{NH}_4^+$ 、 $^{15}\text{NO}_2^-$ 、 $^{15}\text{NO}_3^-$  添加区についてそれぞれ、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$  の濃度および同位体比をモニタリングし、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$  生成・消費速度を算出した。培養期間は0-12日間にわたって10点設定した。また、 $\text{NO}_2^-$  生成における  $\text{NH}_4^+$  酸化と  $\text{NO}_3^-$  還元の経路の寄与について明らかにするために、 $\text{NH}_4^+$  および  $\text{NO}_3^-$  添加区においても  $\text{NO}_2^-$  の濃度と同位体比を測定した。 $\text{NO}_2^-$  添加区においては、培養初期(~12時間)において添加  $^{15}\text{N}$  が  $\text{NO}$ 、 $\text{N}_2\text{O}$  として放出される量をモニタリングした。

当初の計画では、 $^{15}\text{N}$  に加え  $^{18}\text{O}$  を併用することで、ガス態窒素の生成経路を解析することを計画に盛り込んでいたが、当初の方針を変更して  $^{15}\text{N}$ 、 $^{18}\text{O}$  デュアルトレーサー測定を行わず、3種( $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ )の  $^{15}\text{N}$  ラベルされた無機態窒素を添加、培養することで窒素循環の各経路の速度定量を行った(上記(3))。その理由は、上記(2)の試験の結果、ガス態窒素への変換に対して  $\text{NO}_3^-$  および DON への変換がより迅速に生じていると考えられたためにガス態窒素への変換に限らず、 $\text{NO}_2^-$  の変換速度および経路がどのように制御されているかを明らかにする意義がより大きいと考えたためである。

### 4. 研究成果

#### (1) $^{15}\text{NO}$ の測定法

PLOT カラムと冷却トラップを用いて  $\text{NO}$  の測定法を検討したところ、冷却トラップを用いた場合、 $\text{NO}$  の安定的な回収が困難であった。そのため、モレキュラーシーブカラムを用い

て大気成分と NO の分離が可能な GCMS の測定条件を決定し、 $^{15}\text{NO}$  の定量を行った。ただし、モレキュラーシーブカラムを用いた場合は NO の濃度検量線のダイナミックレンジが狭く、NO 濃度のレンジについて事前に検討が必要であった。また、モレキュラーシーブカラムは  $\text{CO}_2$  を吸着する性質があるため、高濃度の  $\text{CO}_2$  を含むサンプルでは連続的な分析が困難であった。したがって、今後幅広い性質のサンプルについて  $^{15}\text{NO}$  の測定を可能にするには測定法の更なる改善が必要である。

#### (2) 森林表層土壌における $\text{NO}_2^-$ 動態

$^{15}\text{NO}_2^-$  添加を行った土壌マイクロコスム試験において、添加  $\text{NO}_2^-$  は添加後 2 時間までの間に  $\text{NO}_3^-$  へと変換される以外に、 $\text{NH}_4^+$ 、DON、 $\text{NO}$ 、 $\text{N}_2\text{O}$  へと変換された。 $\text{NH}_4^+$  へ変換された  $^{15}\text{N}$  量は土壌の化学性によらず、測定を行ったすべての土壌でわずかであったが、DON への変換は顕著に生じる場合がみられた。また、培養容器ヘッドスペース中の  $\text{NO}$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{N}_2$  モニタリング結果より、培養の初期には  $\text{N}_2\text{O}$  と比較可能な量の  $^{15}\text{N}$  が  $\text{NO}$  として放出され (添加  $^{15}\text{N}$  の数%)、 $\text{NO}$ 、 $\text{N}_2\text{O}$  ともに有機物層よりも鉱質土層で放出量は多かった。また、斜面上部 > 中部 > 下部の順に放出量は多かった。従来好気的な土壌において生成した  $\text{NO}_2^-$  は迅速に酸化され、 $\text{NO}_3^-$  が生成すると考えられてきたが、本研究の結果はそれが必ずしも成立せず、硝化の途中で  $\text{NO}_2^-$  やガス態窒素の生成が顕著な割合で生じうることを示唆した。

スギ人工林斜面プロット内の有機物層・鉱質土層 (0-10cm) における無機態窒素変換速度の算出結果より、斜面の上部から下部にかけて、 $\text{NO}_2^-$  濃度、 $\text{NO}_2^-$  生成・消費速度には段階的な変化があり、上部から下部にかけて上昇することが明らかになった。一方で斜面位置によって  $\text{NH}_4^+$  の生成・消費速度は大きく変化しなかったことから、生成した  $\text{NH}_4^+$  が  $\text{NO}_2^-$  へと変換される段階での制御が、斜面位置による無機態窒素動態の差異を生み出していると考えられた。 $\text{NO}_2^-$  生成・消費速度と土壌の理化学性の解析から、 $\text{NO}_2^-$  生成速度は含水率と強い相関をもち、含水率が  $\text{NO}_2^-$  生成活性を制御する重要な要因である可能性が示唆された。また、有機物層では TC、TN、0-10cm 土壌では DOC/DON 比も  $\text{NO}_2^-$  生成速度と相関を示した。このうち DOC/DON 比は  $\text{NH}_4^+$  利用の競合関係に非線形の影響をおよぼすことで、 $\text{NO}_2^-$  生成を制御することが示唆された。さらに、 $^{15}\text{NH}_4^+$  添加条件における  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_2^-$ 、 $^{15}\text{NO}_3^-$  添加条件における  $\text{NO}_3^-$  と  $\text{NO}_2^-$  の同位体比の経時変化から、 $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  以外の物質からの  $\text{NO}_2^-$  生成が顕著に存在する可能性が示唆された。これは具体的には、有機物からの  $\text{NH}_4^+$  を介さない  $\text{NO}_2^-$  生成が考えられる。したがって、本研究からは  $\text{NO}_2^-$  の生成、消費経路の双方で有機態窒素との反応が重要であることが示唆され、従来の森林表層土壌における窒素循環

図が大きく書き換えられる可能性が示された。このように、 $\text{NO}_2^-$  の挙動をプロットレベルで明らかにした研究はこれまでになく、 $\text{NO}_2^-$  の動態を多様な土壌において実測することで初めて明らかになった知見である。

#### 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)

〔学会発表〕(計 4 件)

1) 黒岩恵、磯部一夫、小田智基、加藤宏有、大手信人、大塚重人、妹尾啓史、「森林表層土壌における亜硝酸生成・消費メカニズム」、日本土壌肥料学会、2014 年 9 月 12 日 (東京農工大学工学部)

2) 黒岩恵、磯部一夫、木庭啓介、稲垣善之、大手信人、大塚重人、妹尾啓史、「斜面森林土壌における亜硝酸の動態と制御要因について」、日本地球惑星科学連合大会、2014 年 4 月 30 日 (パシフィコ横浜)

3) 黒岩恵、磯部一夫、大塚重人、妹尾啓史、「森林土壌での亜硝酸動態とガス態窒素生成プロセスについて」、日本土壌肥料学会、2013 年 9 月 12 日 (名古屋大学東山キャンパス)

4) 黒岩恵、磯部一夫、木庭啓介、稲垣善之、大手信人、大塚重人、妹尾啓史、「森林表層土壌における亜硝酸の変換・放出プロセスについて」、日本地球惑星科学連合大会、2013 年 5 月 23 日 (幕張メッセ)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

妹尾 啓史 (SENŌ KEISHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：40206652

##### (2) 研究分担者

磯部 一夫 (ISOBE KAZUO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：30621833

##### (3) 連携研究者

大手 信人 (OHTE NOBUHITO)

京都大学・大学院情報学研究科・教授

研究者番号：10233199

木庭 啓介 (KŌBA KEISUKE)

東京農工大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：90311745

稲垣 善之 (YOSHIYUKI INAGAKI)  
独立行政法人森林総合研究所・四国支所・  
主任研究員  
研究者番号： 00353590