

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26740004

研究課題名(和文) 15N2ガス希釈法による湿地生態系における脱窒速度の評価

研究課題名(英文) Measurement of denitrification rate by 15N2 dilution method

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)・助教

研究者番号：80725606

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)：土壤微生物を攪乱することなく脱窒速度を測定可能な手法である15N希釈法を提案し、その利用可能性を見当した。脱窒速度の代表的な測定法であるトレーサー法と、希釈法により嫌気培養した土壌における脱窒速度を比較した。低濃度および高濃度硝酸添加時において、希釈法で得られた脱窒速度は、トレーサー法におけるそのそれぞれ4.5倍および1.3倍だった。本研究で検討した高濃度硝酸条件(10 $\mu\text{mol/g}$ soil)は自然環境では見られない。従って、バイアル瓶を用いた小規模での脱窒速度測定において、特に農地土壌のような窒素濃度の高い条件において希釈法が適用し得ることを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：We proposed 15N dilution method to measure denitrification rate without soil disturbance, and evaluated its applicability to measure soil denitrification. Denitrification rate was compared with tracer method (conventional method) and dilution method. Denitrification rates measured with dilution method were 4.5 and 1.3 times higher than those with tracer method, respectively. These suggest that the dilution method could be applicable for small batch test investigating denitrification rate in the soil received high amount of nitrogen, such as agricultural soil.

研究分野：環境工学

キーワード：脱窒速度 土壌 希釈法 トレーサー法

1. 研究開始当初の背景

ハーバー・ボッシュ法によるアンモニア (NH_3) の工業生産が実現してからは、化学肥料の使用により食糧生産が増大した。しかし、農地に過剰に施肥された肥料は溶脱・表面流出により、また、し尿・家畜ふん尿中のアンモニウム (NH_4^+) は排水処理施設を通じて環境中へ流出し、水域の富栄養化現象を促進してきた。

水田や湿原あるいは湖沼・河川・沿岸海域などの湿地生態系では、人間活動に伴って流入した NH_4^+ は硝化反応により硝酸 (NO_3^-) まで酸化される。この NO_3^- は水田土壌や底質のような無酸素条件下で脱窒細菌により窒素ガスまで還元 (脱窒) され、再び大気に戻る。従って、湿地生態系における脱窒は、人間活動に伴って過剰に流入する窒素の浄化を担っていると言える。湿地を含む陸域における脱窒速度は約 1 億トン/年と見積もられており、これは人間が肥料として環境中に投入している窒素量とほぼ同じである。このように、湿地生態系における脱窒量の評価は地球における窒素循環を明らかにする上で極めて重要である。

脱窒の産物である窒素ガス (N_2) は、大気中ガスの 78% を占める。従って、湿地生態系における脱窒計測における課題は、如何に大気中の窒素ガスと脱窒より生成される窒素ガスとを区別するかにある。アセチレン阻害法は、脱窒細菌の亜酸化窒素 (N_2O) 還元酵素をアセチレン (C_2H_2) により阻害し、 C_2H_2 未処理の系および C_2H_2 処理の系における N_2O 発生量を比較することで脱窒量を推定できる。この手法の問題点は、 C_2H_2 ガスの水中から土壌全体への拡散律速および C_2H_2 による硝化反応の阻害による土壌の窒素循環の攪乱である。 ^{15}N トレーサー法は、大気中窒素の 0.37% を占める質量数 15 の窒素 (^{15}N) で標識した化合物 (尿素や硫酸アンモニウム) を湿地生態系に添加し、脱窒より生成される ^{15}N で標識された N_2 ガス ($^{15}\text{N}_2$) を計測し、脱窒速度を評価する。本手法は、系に添加された窒素の挙動を追う場合に適しているが、水や土壌に元々存在する窒素の脱窒量の評価はできない。さらに、堆肥などは容易に ^{15}N による標識ができない。また、人工的に窒素を系に加えるため、自然な状態での脱窒量を見積っているとは言い難い。このように、より正確な脱窒計測法の発展のためには湿地生態系を攪乱せずに自然な状態での測定法が必要である。

そこで、反応基質を ^{15}N で標識せずに環境中の生成物の変化速度を測定する希釈法による硝化速度の推定 (Koike and Hattori, 1978) に注目した。本手法では、 ^{15}N で標識された硝化反応の生成物 ($^{15}\text{NO}_3^-$) を予め水中に一定量添加しておく。水中に元々存在する基質 ($^{14}\text{NH}_4^+$) が生成物 ($^{14}\text{NO}_3^-$) に変化すると、水中の生成物 ($^{15}\text{NO}_3^-$ と $^{14}\text{NO}_3^-$) の ^{15}N 存在比が変化する。この ^{15}N 存在比の変化を利用

して物質の変化速度 (この場合、硝化速度) を決定できる。希釈法は、環境水中の硝化速度の測定に応用されている。本研究では、この希釈法に着想を得て、 $^{15}\text{N}_2$ ガスを用いた $^{15}\text{N}_2$ ガス希釈法を提案する。具体的には、水-植物-土壌系をチャンバーで囲い、 $^{15}\text{N}_2$ を一定量添加しておく。脱窒により気相内に $^{14}\text{N}_2$ が増加すると、結果として ^{15}N 存在比が変化する。この ^{15}N 存在比変化から脱窒速度を求める。すなわち、水-植物-土壌系を攪乱せずに自然な状態での脱窒速度の評価が可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、 $^{15}\text{N}_2$ ガス希釈法による脱窒速度の測定手法の開発を最終目的とする。目的を達成するために、 $^{15}\text{N}_2$ ガス希釈法のコンセプトが妥当であることを実験室スケールで明らかにした。

3. 研究の方法

本実験では、上記の手法により脱窒速度を求めることが出来るかどうかを明らかにするために、ラボスケールのバイアル試験を実施した。 $^{15}\text{N}_2$ ガス希釈法による脱窒速度測定の可能性を明らかにするため、 ^{15}N ガス希釈法とトレーサー法 (従来法) とで脱窒速度の比較を行った。

培養瓶に、 NO_3^- を除去した水田土壌懸濁液を添加し、密閉した。培養瓶気相の真空吸引とヘリウム (He) パージを 3 回繰り返す。培養瓶中の N_2 濃度を低下させた。再度ポンプによる吸引を行った後、トレーサー法では気相に He と $^{28}\text{N}_2$ ガス (0.37 atom%)、希釈法では気相に He と $^{30}\text{N}_2$ (99.9 atom%) および $^{28}\text{N}_2$ ガスを添加した。基質として、トレーサー法では ^{15}N で標識した NO_3^- (99.6 atom%) とグルコースを添加した。一方、希釈法では未標識の NO_3^- とグルコースを添加した。上記のガスおよび基質を添加後、 30°C 、暗所で 140 rpm で振とう培養した。

培養中、定期的に気相中の各種質量数 (28、29 および 30) の N_2 ガス濃度を GC-MS で定量し、トレーサー法および希釈法における脱窒速度を推定した。トレーサー法では培養期間中の $^{30}\text{N}_2$ 濃度変化から脱窒速度を推定した。希釈法による脱窒速度は、培養期間中の気相中の N_2 量および N_2 の ^{15}N 存在比変化から推定した。

4. 研究成果

図 1 および図 2 にトレーサー法および希釈法による培養におけるバイアル瓶ヘッドスペース中の N_2 濃度および N_2 中 ^{15}N 存在比の変化を示す。いずれの系においても、培養初期 (0~2 day) においては概ね 15vol% で推移し、8 日後には若干の上昇が見られた (図 1a および 2a)。

トレーサー法で培養したバイアル瓶のヘッドスペース中 N_2 の ^{15}N 存在比は (図 1b)、

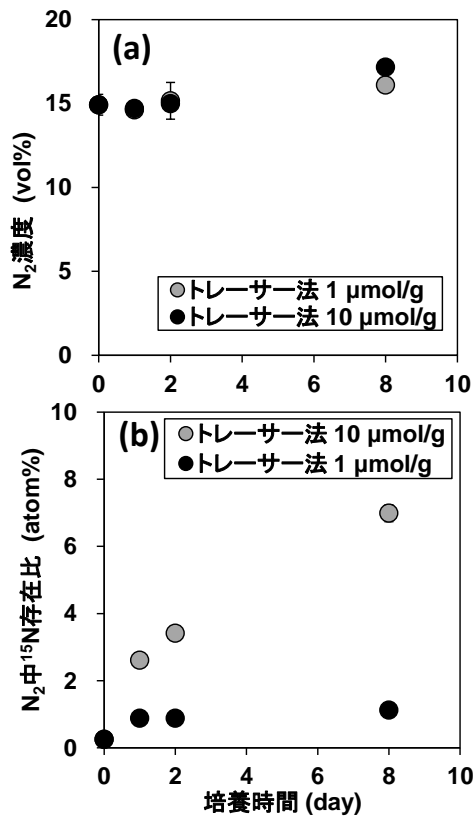


図1 トレーサー法における N_2 濃度 (a) および ^{15}N 存在比 (b)

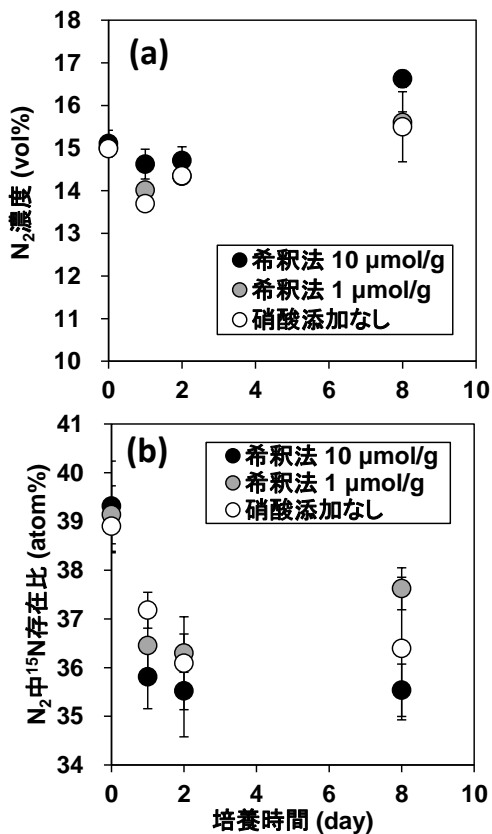


図2 希釈法における N_2 濃度 (a) および ^{15}N 存在比 (b)

培養とともに増加する傾向が見られた。また、窒素添加量が多い方が ^{15}N 存在比が多く、添加した $^{15}\text{NO}_3^-$ が N_2 ガスに変化していることがわかった。一方、希釈法の ^{15}N 存在比は (図 2b)、培養開始から 2 day にかけて急激な減少を示した。この傾向は硝酸添加をしなかった系においても見られた。その後、1 $\mu\text{mol/g}$ soil では ^{15}N 存在比が上昇し、10 $\mu\text{mol/g}$ soil では低下したままで推移した。従って、脱窒の進行とともにヘッドスペース中に $^{15}\text{N}_2$ が増加し、 ^{15}N 存在比が減少したと考えられた。

トレーサー法ではヘッドスペース中の $^{15}\text{N}_2$ 濃度の増加から、希釈法では総 N_2 および $^{15}\text{N}_2$ の収支に基づき、それぞれ培養 8 日間における脱窒速度を算出した (図 3)。いずれの脱窒測定手法においても、硝酸濃度が高くなるほど脱窒速度が高くなる傾向が見られた。硝酸濃度 1 $\mu\text{mol/g}$ soil の系において、希釈法において得られた脱窒速度はトレーサー法におけるその約 4.5 倍だった。一方、10 $\mu\text{mol/g}$ soil において、希釈法で得られた脱窒速度はトレーサー法の 1.3 倍だった。希釈法で得られた脱窒速度がトレーサー法のそれよりも高い理由は、若干の大気中 N_2 の混入に加えて、トレーサー法では窒素固定も含めた正味の脱窒速度が測定されているのに対し、希釈法では窒素固定の影響を除いた純脱窒速度が推定されているためと考えられる。本研究で検討した高濃度硝酸条件 (10 $\mu\text{mol/g}$ soil) は自然環境では見られないため、高窒素施肥を行う農業土壌における脱窒速度の推定に適していると考えられる。

以上より、バイアル瓶を用いた小規模での脱窒速度測定において、特に農地土壌のような窒素濃度の高い条件において希釈法が適用し得ることを示すことができた。

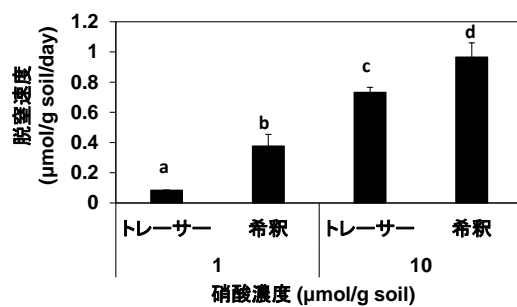


図3 種々の硝酸濃度におけるトレーサー法および希釈法による脱窒速度

<引用文献>

① Koike I. and Hattori A., Simultaneous Determination of Nitrification and Nitrate Reduction in Coastal Sediments by a ^{15}N Dilution Technique, Appl. Environ. Microbiol., 35, 1978, 853-857

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 3 件)

①利谷翔平、那須啓亮、寺田昭彦、細見正明、¹⁵N₂ ガス希釈法による脱窒速度の測定、第 51 回日本水環境学会年会、2017 年 3 月 15~17 日、熊本大学 (熊本県)

②利谷翔平、那須啓亮、高橋恵理加、寺田昭彦、細見正明、¹⁵N₂ ガス希釈法による脱窒測定、日本土壌肥料学会 2016 年度東京大会、2016 年 9 月 20~22 日、佐賀大学 (佐賀県)

③S. Riya、H. Nasu、A. Terada、M. Hosomi、Measurement of denitrification rate by ¹⁵N₂ dilution method、5th International Ecosummit、2016. 29. Aug.-1. Sept.、Montpellier (France)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

利谷 翔平 (RIYA, Shohei)

東京農工大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号：80725606