

## 論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻

平成 24 年度博士課程 入学

氏名 黒岩 恵

指導教員名 妹尾 啓史

## 論文題目

### 亜硝酸動態解析による森林土壌の窒素維持・放出機構の解明

#### 背景

日本は国土の 67%を森林が占め、森林生態系が有する生産性やそこでの物質循環は国土環境に大きな影響を与えていると想定される。窒素は多くの森林生態系において植物の生長と微生物の活動を制限する主要な元素である。森林土壌中の窒素化合物は 90%以上が土壌有機物中に固定された有機態窒素であり、それ以外のほとんどは植物バイオマスが占めている。生物に利用可能な形態の窒素（低分子の有機態窒素および無機態窒素）のうち無機態窒素は 1%にも満たない。すなわち、わずかにしか存在しない生物が「利用可能な」窒素の循環が森林の生産性を支えている。したがって、この「利用可能な」窒素の生成や消費ならびに流出の様相や、それらの制御要因を明らかにすることは森林の生産性の維持・向上のためにきわめて重要である。ひいては森林生態系を構成する多様な生命がどのように維持され、生態系内に存在する・もしくは流出していく物質が地球上の物質循環にどのように作用し、それが近い将来の環境変動に対応してどのように変化していくかを理解・予測・管理するうえで決定的に重要な情報である。

これまで森林土壌における「利用可能な」窒素の動態解析はアンモニウム( $\text{NH}_4^+$ )、硝酸( $\text{NO}_3^-$ )、一酸化二窒素( $\text{N}_2\text{O}$ )を中心に解析されてきた。一方で、亜硝酸 ( $\text{NO}_2^-$ ) は土壌において濃度が低く、反応性が高いために、検出ならびにトレースが困難であることから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異化的変換反応に関わる、窒素循環の中で極めて重要な中間生成物である。それに加え、 $\text{NO}_2^-$ は $\text{NO}_3^-$ 以外にもガス態窒素( $\text{NO}$ や $\text{N}_2\text{O}$ )へと化学的にも変換されること、 $\text{NO}_3^-$ とともに主要な窒素溶脱源となりうる溶存有機態窒素(DON)へと、容易に変換されることが示されている。このことは森林土壌において $\text{NO}_2^-$ を起点とする窒素損失が重要であることを示唆しており、 $\text{NO}_2^-$ の詳細な動態を明らかにすることで、森林土壌における窒素の維持・放出機構について、これまでにない精度で明らかにすることが出来ると考えた。本研究では森林土壌中の無機態窒素の動態(生成や消費)を、特に亜硝酸に着目し、重窒素( $^{15}\text{N}$ )を利用することで詳細に明らかにすることを目的とした。

#### 土壌中 $\text{NO}_2^-$ の抽出法および濃度・同位体比定量法の条件検討

土壌中の $\text{NO}_2^-$ の動態を明らかにするためには土壌から回収(抽出)する必要がある。しかし $\text{NO}_2^-$ は化学的に不安定な物質であるため、土壌から $\text{NO}_2^-$ を回収(抽出)する際に抽出時の抽出溶液 pH、抽出時間、土壌と抽出溶液の比率など、多様な条件が $\text{NO}_2^-$ の回収率に影響を与えるため通常の土壌抽出法を用いることができないことが既存研究により指摘されている。また、 $\text{NO}_2^-$ とアザイドの反応を利用した $\text{NO}_2^-$ の濃度・同位体比測定の際には抽出溶液の pH が反応の進行に影響を与えることも指摘されている。そこで本研究ではまず、多様な理化学性をもつ多数の土壌を用いた解析にも適用できるように土壌からの $\text{NO}_2^-$ の回収(抽出)法の検討ならびに $\text{NO}_2^-$ の濃度・同位体比測定法の検討を行った。これらの結果から最適な抽出条件ならびに測定法を確定し、以下に示す森林土壌における $\text{NO}_2^-$ の動態解析を行った。

#### 森林表層土における $\text{NO}_2^-$ 生成・消費速度の算出

森林土壌中の、特に表層土における $\text{NO}_2^-$ 生成・消費速度の算出を行った。具体的には土壌に $^{15}\text{NO}_2^-$ を添加し、同位体希釈法により算出した。 $\text{NO}_2^-$ は通常濃度が低く、反応性に富むため添加する濃度が生成・消費速度に影響を及ぼすと考えられた。そこで本研究でまず、添加する $^{15}\text{NO}_2^-$ の濃度を3段階( $6 \text{ mg-N kg}^{-1}$ ,  $30 \text{ mg-N kg}^{-1}$ ,  $150 \text{ mg-N kg}^{-1}$ )設定し、添加濃度が $\text{NO}_2^-$ 生成・消費速度の大きさと、 $\text{NO}_2^-$ の消費経路に与える影響を検証した。その結果、 $\text{NO}_2^-$ 生成速度は6, 30,  $150 \text{ mg-N kg}^{-1}$ 添加のそれぞれで8.5, 12.5,  $12.2 \text{ mg-N kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であり、生成速度は添加濃度に対して大きくは変動しなかったことから、 $\text{NO}_2^-$ がごく低濃度にしか存在しない環境中においても $\text{NO}_2^-$ が大きな速度で生成されていることが示唆された。また、 $\text{NO}_2^-$ 消費速度は添加した $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度の増加とともに著しく増加した。これらの結果から、環境中において $\text{NO}_2^-$ の消費ポテンシ

ヤルは非常に高く、 $\text{NO}_2^-$ はごく低濃度にしか存在しないものの、多量に生成されると同時に多量に消費されていると考えられた。さらに興味深いことに、これらの速度は森林土壌における一般的な  $\text{NO}_3^-$ 生成速度と比較して大きく、過去に同一のサイトにおいて観測された硝化速度( $0.6 \text{ mg-N kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ )に比べても非常に大きかった。これまで、 $\text{NO}_2^-$ は土壌中に蓄積しないことを根拠に、森林表層土壌で生成した  $\text{NO}_2^-$ は迅速に  $\text{NO}_3^-$ へ酸化されると考えられてきた。しかし、 $\text{NO}_2^-$ の生成・消費速度が非常に大きいことと、 $\text{NO}_3^-$ 生成速度とのミスマッチから  $\text{NO}_2^-$ が  $\text{NO}_3^-$ に酸化されずに直接  $\text{NO}_3^-$ 以外の物質に変換される経路が重要である可能性が示唆された。

#### 森林表層土壌における $\text{NO}_2^-$ 消費経路の解明

続いて、消費された  $\text{NO}_2^-$ がどのような化合物へと変換されるのかを定量的に明らかにするために、 $^{15}\text{NO}_2^-$ を添加した後の  $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、溶存有機態窒素、 $\text{N}_2\text{O}$  における  $^{15}\text{N}$ 濃度を求めた。その結果、 $\text{NO}_3^-$ や  $\text{N}_2\text{O}$  への変換が認められた。また、 $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加濃度はそれらへの変換の相対的な重要性に影響し、添加濃度に依存して  $\text{NO}_3^-$ や  $\text{N}_2\text{O}$  へと変換される  $^{15}\text{NO}_2^-$ の割合が変化した。以上から異なる  $\text{NO}_2^-$ 濃度では異なる  $\text{NO}_2^-$ 消費プロセスが機能し、 $\text{NO}_2^-$ の濃度や可給性が窒素循環全体の経路のバランスに影響を与える可能性が示された。

#### 森林土壌中での $\text{NO}_2^-$ 動態の制御要因

そこで、さらに、さまざまな性質の土壌において、 $\text{NO}_2^-$ の生成・消費はどのような速度で生じているのか、その速度はどのような環境要因により制御されるのかを明らかにするために、京都府と千葉県に位置する2地点の森林斜面プロットにおいて、斜面上から下までの表層土壌（有機物層、0-10 cm 土壌）を連続的に採取し、 $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加培養による  $\text{NO}_2^-$ 生成消費速度の算出を行った。これら2地点のサイトは、特に土壌の pH や、炭素・窒素の蓄積量の点で異なった性質を持つ。すなわち、京都府のサイトは全国の森林土壌との比較において全窒素量、全炭素量、水溶性有機炭素濃度が総じて高く、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 濃度も高い。一方で、千葉県のサイトはこれらの有機態炭素・窒素の蓄積が全国的に見ても少ない土壌であった。また、京都府のサイトの土壌は強度の酸性を示すが、千葉県のサイトの土壌は全国的にみても高い pH を示す点に違いがあった。両サイトにおいて、 $\text{NO}_2^-$ 生成・消費速度は斜面下に行くにつれて増加し、 $\text{NO}_2^-$ 生成・消費速度は京都>千葉であった。 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 生成速度の相関解析から、京都においては  $\text{NH}_4^+$ 生成速度によって  $\text{NO}_2^-$ 生成が制御されていると考えられたが、 $\text{NO}_2^-$ 生成速度は  $\text{NO}_3^-$ 生成速度を制御する重要な要因ではないことが示唆された。また、千葉においては、

$\text{NH}_4^+$ 生成速度による  $\text{NO}_2^-$ 生成速度の制御は明瞭ではなく、 $\text{NO}_2^-$ 生成速度による  $\text{NO}_3^-$ 生成速度の制御は 0-10 cm 土壌では重要であると考えられたが、有機物層においては有意な相関関係がみられなかった。したがって、森林表層土壌中の無機態窒素の酸化過程(硝化)において、(i)  $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$ の酸化反応が進行する段階での制御と、(ii)  $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ の酸化反応が進行する段階での制御、がそれぞれ重要であると考えられた。(i)については、 $\text{NH}_4^+$ 生成速度と  $\text{NO}_2^-$ 生成速度、土壌抽出液の全溶存有機態炭素/窒素比の関係から、従属栄養微生物の生育の基質となる有機物の炭素と窒素の比率が、従属栄養微生物と独立栄養微生物であるアンモニア酸化微生物の  $\text{NH}_4^+$ 獲得に関する競合のバランスを変化させ、 $\text{NO}_2^-$ 生成速度を制御していると考えられた。また、(ii)については、 $^{15}\text{NO}_2^-$ がどのような物質に変換されるかを  $^{15}\text{N}$  をトレースすることで追跡した結果、 $\text{NO}_2^-$ の消費プロセスとして、 $\text{NO}_3^-$ への酸化以外に、溶存有機態窒素への変換とガス態窒素への変換が重要であることが示唆され、 $\text{NO}_3^-$ 生成のポテンシャル以外に、溶存有機態窒素やガス態窒素生成のポテンシャルも同時に硝化過程を制御していることが示唆された。

## 総括

本研究では、プロットスケールでの土壌中の  $\text{NO}_2^-$ 動態を世界で初めて明らかにすることで、森林表層土壌において  $\text{NO}_2^-$ 起点とした窒素の放出や維持が生態学的に重要な役割をなしうることを定量的に明らかにした。

$\text{NH}_4^+$ 酸化と  $\text{NO}_2^-$ 酸化は系統的に異なる微生物が担う本来異質な反応であるが、物質循環の分野ではこれまで硝化( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^-$ )という一連の反応として捉えてきた。このように、 $\text{NO}_2^-$ を直接測定してその動態や制御要因を明らかにすることで、今後微生物の情報と物質動態の情報を併せた精確な議論が可能になると考えられる。