



日本土壤肥料学会監修

続・環境負荷を予測する

—モニタリングとモデリングの発展—

波多野隆介 編
犬伏 和之



博友社

4	脱窒活性の実測例	163
5	現場条件での脱窒の測定	166
1)	チャンバー法と未攪乱土壌法	166
2)	畑圃場における脱窒の測定と脱窒量の推定	167
3)	下層土の脱窒活性の測定	169
6	むすび	169

4-Ⅱ 窒素負荷の同位体利用

程 為国・中島 泰弘

1	はじめに（窒素負荷の現状）	172
2	窒素の安定同位体	173
1)	窒素安定同位体比の表示法	173
(1)	^{15}N 存在率	173
(2)	^{15}N 過剰百分率	174
(3)	$\delta^{15}\text{N}$	174
2)	窒素安定同位体比の測定法	174
3)	窒素の同位体分別	176
3	窒素の安定同位体を用いた窒素負荷の研究	177
1)	重窒素トレーサー法を用いた灌漑水中硝酸体窒素の浄化機能評価	177
2)	窒素自然安定同位体を用いた灌漑水中硝酸体窒素の作用の評価	179
3)	重窒素トレーサー法を用いた大気由来窒素のヨーロッパ 針葉林における動態解析	181
4)	窒素自然安定同位体を用いた森林生態系における窒素循環の把握	182
5)	窒素自然安定同位体を用いた農耕地からの亜硝酸化窒素の 発生源の特定	183
4	おわりに	184

4-Ⅲ 黒ボク土畑からの N_2O , NO および NO_2 の フラックスのモニタリングと発生削減

秋山 博子

1	はじめに	187
---	------	-----

4 - II 窒素負荷の同位体利用

程 為国・中島泰弘

1 はじめに（窒素負荷の現状）

地球には大量の窒素 ($197 \times 10^{21} \text{g}$) が種々の形態で存在しており、全窒素の約 97.8 % ($193 \times 10^{21} \text{g}$) は地殻岩石に、約 0.2 % ($0.4 \times 10^{21} \text{g}$) は地表の水成岩中に含まれる。空気中には約 2 % ($4.0 \times 10^{21} \text{g}$) が分子態窒素 (N_2) として存在するといわれている。また、全体量の中で、微量といえる約 $1.39 \times 10^{18} \text{g}$ の窒素は、土壌圏、水圏、生物圏などに存在する¹⁾。大気中の N_2 は化学的に不活性であり、ほとんどの生物にとって利用が不可能である。一方、生物圏で生物が利用しうるのは「固定された窒素」である。その固定された窒素は、生物による窒素固定と非生物による窒素固定に大別される。このような固定された窒素の循環過程に、さらに窒素固定が加わると、生物圏の固定窒素量は増大する一方になるが、窒素固定とバランスをとるものとしては、硝酸を窒素酸化物 (NO や N_2O) および N_2 に変えて大気に戻す反応がある。この反応を脱窒 (denitrification) と呼び、生物的にも非生物的にも行なわれる。一方、アンモニアから硝酸までの硝化作用 (nitrification) でも NO や N_2O が副生成物として生成される。

産業革命以前は、地球上での生物学的および非生物学的な窒素固定量と脱窒によって大気に戻る量とは、ほぼバランスがとれていたものと思われる。しかし、産業革命以後、地球上での窒素固定量と脱窒のバランスが失われた。特に、大気圏と生物圏の間で物理・化学・生物学的反応に関与する窒素が増加し続けている。この増加した反応性窒素 (reactive nitrogen) は、主に Haber-Bosch 法による工業的な窒素固定、化石燃料の燃焼に伴う NO_x の大気への放出および窒素固定作物の栽培面積の拡大の 3 つが挙げられる²⁾。表 1 は、産業革命初期 (1860 年)、現在 (1990 年代)、将来 (2050 年) の反応性窒素量を比較したものである。表 1 からわかるように、現在、人為的に増加した反応性窒素のうち、Haber-Bosch 法による工業的な窒素固定が 100Tg N yr^{-1} になっており、そのうち 86 % が化学肥料として使われていた。また、窒素固定作物の栽培による反応性窒素は 31.5Tg yr^{-1} であった。両者を合わせると、化学肥料施与量および農地における窒素固定が、人為的な起源の反応性窒素の 75 % を占めていた²⁾。一

表1 過去、現在および将来におけるグローバルでの反応性窒素量の変化
(Galloway et al. 2004). 単位: Tg N yr⁻¹ (=10⁶ トン N/年)

年	1860	1990s	2050
自然的な起源			
大気中での放電	5.4	5.4	5.4
陸域における生物窒素固定	120	107	98
海洋における生物窒素固定	121	121	121
自然的な起源の総量	246	233	224
人為的な起源			
Haber-Bosch による化学合成	0	100	165
窒素固定作物の栽培	15	31.5	50
化石の燃焼	0.3	24.5	52.2
人為的な起源の総量	15	156	267
総反応性窒素	262	389	492

方、世界の人口は1860年の13億から現在の65億までに増えており、2050年には90億に達すると予想されている。世界の人口増加および人間の生活水準の向上に対応するために、さらなる食料生産の増加が求められることは間違いない。反応性窒素は食料生産の増加に不可欠である一方、富栄養化、地下水の硝酸態窒素汚染、亜酸化窒素発生による地球温暖化、酸性降下物の増加など様々な地域および地球規模の環境負荷をもたらしている。

2 窒素の安定同位体

同位元素は放射性同位元素と安定同位元素に大別される。窒素の同位元素は7種あり、そのうち放射性同位元素は5種 (¹²N, ¹³N, ¹⁶N, ¹⁷N, ¹⁸N)、安定同位元素は2種 (¹⁴N, ¹⁵N) である。そのうち、生物学のトレーサー実験に利用できる放射性同位元素は¹³N (β^+ , 半減期9.96分) のみであり、他の4種放射性同位元素はその半減期が秒のオーダーでまったく利用できない。自然界で窒素の安定同位元素¹⁵Nと¹⁴Nの存在率はそれぞれ0.3663%と99.6337%である。適当な方法で濃縮すれば、100%近い¹⁵N (重窒素) をトレーサーとして利用できる。

1) 窒素安定同位体比の表示法

(1) ¹⁵N 存在率 (atom% ¹⁵N)

¹⁵N 存在率は窒素の総原子個数に対する¹⁵N原子の割合を%で示したものである。

すなわち、

$$\text{atom}\%^{15}\text{N} = \frac{^{15}\text{N}}{(^{14}\text{N} + ^{15}\text{N})} \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

(2) ^{15}N 過剰百分率 (atom% ^{15}N excess)

^{15}N 過剰百分率は重窒素のトレーサー実験でよく利用されている。 ^{15}N 過剰百分率は、サンプルの窒素の ^{15}N (atom% $^{15}\text{N}_{\text{sample}}$) 存在率からバックグラウンドの ^{15}N 存在率 (atom% $^{15}\text{N}_{\text{background}}$) を差し引いた値である。すなわち、

$$\text{atom}\%^{15}\text{N excess} = \text{atom}\%^{15}\text{N}_{\text{sa}} - \text{atom}\%^{15}\text{N}_{\text{ba}} \dots\dots\dots(2)$$

バックグラウンドの ^{15}N 存在率は、一般的に自然界の ^{15}N 存在率の 0.3663 が使われている。実際には自然界の各プールでは、 ^{15}N の自然存在率は窒素の循環過程の中で起こる物理的、化学的または生化学的反應過程で質量数の違いによる同位体分別が生じるため、各プールで有意な変異があるので注意を要する。例えば、自然の土壌と植物の atom% ^{15}N や植物器官 atom% ^{15}N には、0.365~0.370 程度の差異がある²⁰⁾。

(3) $\delta^{15}\text{N}$ (‰)

前述のように、自然界の各プールにおける窒素自然存在率はわずかに変動することがある。そのような小さな変動をわかりやすく表すために、同位体組成は、標準試料の同位体比からのずれとして用いられてきた。よって、その同位体組成は絶対比ではなく、次のように定義される $\delta^{15}\text{N}$ を使って表される。

$$\delta^{15}\text{N} = (R_{\text{sa}} - R_{\text{re}}) / R_{\text{re}} \times 1000 (\text{‰}) \dots\dots\dots(3)$$

ここで、 R_{sa} と R_{re} はそれぞれサンプルと標準試料の窒素の安定同位体比 ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) である。窒素の標準試料としては大きな N プールである空気中の N_2 を用い、 R_{re} の値は 0.003676 となる。従って、空気中の N_2 の $\delta^{15}\text{N}$ 値は 0 ‰ となる。

2) 窒素安定同位体比の測定法

窒素安定同位体比 ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) の測定法は、分光分析法と質量分析法に大別される。分光分析法は、試料調製装置を用いて作製した窒素ガス (N_2) を封入した石英またはパイレックス管を高周波で励起させると、 $^{28}\text{N}_2$ 、 $^{29}\text{N}_2$ 、 $^{30}\text{N}_2$ の 3 種の波長に分かれることを利用し、それぞれの波形の高さを測定して ^{15}N の存在比を求める方法である。一方、質量分析法は、試料から作製された N_2 が真空中でイオン化されると、質量と電荷の比 m/e が 28、29、30 の三つのイオン ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}^+$ 、 $^{14}\text{N}^{15}\text{N}^+$ 、 $^{15}\text{N}^{15}\text{N}^+$) となることを利用し、これらのイオンを磁場または電圧をかけることで分離させ、各イオンの強度から ^{15}N の存在比を求める方法である。近年になって、全自動窒素炭素同位体質量分析計 (EA-MS) やガスクロ—燃焼—質量分析計 (GC/C/MS) など新しい分析機器の開発により、これまで試料から N_2 精製までの複雑だった手順が省略され、より簡便、

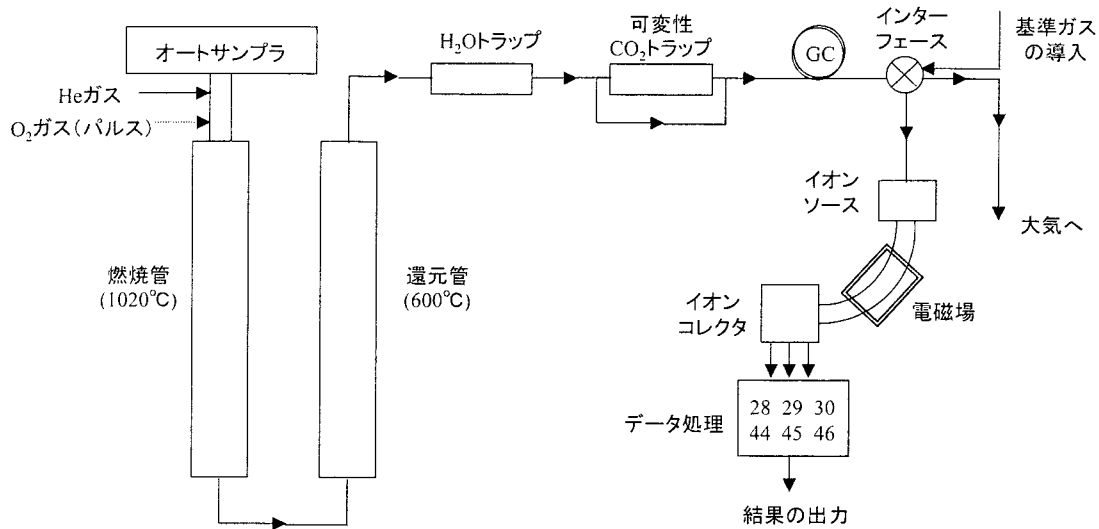


図1 窒素炭素同位体比質量分析計の構成図 (EA-MS)

迅速、かつ自動的に $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を測定できるようになった。したがって、分光分析法と比べ、質量分析法による $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ の測定が現在主流になっている。また、質量分析法では、 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ だけではなく、生体成分元素である炭素の安定同位体比 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) の測定をすることも可能である。ここでは、固体試料または液体試料（凍結乾燥処理した後）を分析するための全自動窒素炭素同位体質量分析計 (EA-MS) および気体試料を分析するためのガスクロ—燃焼—質量分析計 (GC/C/MS) について簡単に紹介する。

EA-MS 装置、GC/C/MS 装置のどちらも、試料の精製を行う前処理部、精製された二酸化炭素および窒素ガスの濃度、炭素窒素同位体比を測定する質量分析部およびデータ処理部とからなる。

EA-MS 装置では、前処理部は元素分析計として一般に用いられているシステムと同様であり、基本的にはオートサンプラー、燃焼管および還元管とガスクロからなる (図1)。オートサンプラーには試料を入れた錫製のカプセルを載せる。燃焼管には、三酸化二クロム、四酸化三コバルト / 銀などの酸化触媒を充填する。燃焼炉は通常 1020°C 程度に保持され、試料の有機物は燃焼管で二酸化炭素、窒素酸化物および水に酸化される。還元管には還元銅が充填されており、 600°C 程度に保たれる。この還元管を燃焼ガスが通過する際に、燃焼時に導入された酸素が除去されるとともに、窒素酸化物が窒素ガス (N_2) へと還元される。還元管からのガスは、過塩素酸マグネシウムが充填された水吸収管を通過した後、ガスクロのカラムによって二酸化炭素と窒素ガスに分離される。その後、インターフェースを通して、質量分析部へ導かれる。質量分析部は、イオンコレクターを備えた磁場型の質量分析計からなる。窒素 (N_2) の

分析の場合は質量数 28, 29, および 30 を, 炭素 (CO₂) の分析の場合は質量数 44, 45, および 46 を測定する。測定した結果はデータ処理システムにより専用のソフト上で計算される。また, 分析条件の設定, 機器の操作なども専用のソフト上で行なわれる³⁾。

また, ガスクロ—燃焼—質量分析計 (GC/C/MS) は, 主に CO₂, CH₄, N₂O などの微量ガスの分析を目的としたものである。GC/C/MS 装置では, 前処理部は気体濃縮部, ガスクロおよび燃焼管からなる。大気レベルの亜酸化窒素 (N₂O) を分析する場合は, ガス試料を封入したサンプル容器を He ガスでパージし, 水吸取管を通過した後, 液体窒素でトラップする。トラップした N₂O はクライオフォーカス部で濃縮を行い, ガスクロに導入し, 各成分を分離する。その後, インターフェースを通して, 質量分析部へ導かれる。それ以降は EA-MS 装置の質量分析部と共通している。N₂O の分析は質量数 44, 45, および 46 を測定する。分析値は ¹⁷O が影響を及ぼす質量数 45 の値を補正した後, 質量数 45/44 の値から ¹⁵N/¹⁴N を求め, また質量数 46/44 の値から ¹⁸O/¹⁶O を求める。

3) 窒素の同位体分別

自然界の窒素循環は, 有機化・無機化, 固定・脱窒, 硝化・還元など様々な化学・生物的反応と物理的な移動・拡散により成り立っている。これらの反応過程で質量数の違いにより同位体分別が生じることが知られている。そのなかでも, アンモニア (NH₃) から硝酸 (NO₃⁻) への硝化反応, NO₃⁻ や亜硝酸 (NO₂⁻) の窒素ガス (N₂) 化 (脱窒反応) と NH₃ のガス拡散の三つの過程では大きな同位体分別が起こる⁷⁾。このような同位体分別が起こる場合, その度合いは同位体分別係数 (α) または同位体濃縮係数 (ε) で表される。

$$\alpha_{S-P} = R_S / R_P \dots\dots\dots(4)$$

$$\varepsilon = (1 - \alpha) \times 1000 \dots\dots\dots(5)$$

ここで, R_P と R_S はそれぞれ生成物質と基質の窒素の安定同位体比 (¹⁵N/¹⁴N) である。

一般的に, 軽い ¹⁴N を含む分子が重い ¹⁵N を含むものより速く反応する。例えば, 脱窒 (NO₃⁻ → N₂) 反応では, その生態系から軽い ¹⁴N が最初にガス化され, 残った NO₃⁻ は ¹⁵N を多く含み, δ¹⁵N は上昇する。よって, 一般に ε は負の値を示す。このように, 自然安定同位体を測定することより, 自然界での窒素循環のメカニズムや, 循環量などを推定することができる。

4) 窒素の安定同位体利用法

窒素の安定同位体利用法は、重窒素トレーサー利用法と自然同位体利用法に大別される。重窒素トレーサー利用法では、高濃度の¹⁵Nでラベルした標的物質をその生態系に与え、バックグラウンドの¹⁵N存在率を対照として、その行方を追跡する。この方法では、高濃度¹⁵Nを使用することによって、自然同位体のわずかな同位体分別を無視できる。一方、自然同位体利用法は、自然同位体のわずかな同位体分別を利用し、自然的に窒素の行方を追跡する。この二つの利用法は、各自の長所と短所がある。どちらの利用法を選択するかは研究の目的による。例えば、大きなスケールで長期的な結果を求めるときには、自然同位体利用法が有利になると考えられる。

3 窒素の安定同位体を用いた窒素負荷の研究

前述のように、産業革命以後、地球規模での反応性窒素は増加しつつある。陸域での森林、農地、草地など各生態系においては、局地的あるいは全体的に窒素の負荷がなされている。反応性窒素の負荷源からみれば、直接的に大量の窒素肥料の投入がなされる農耕地生態系と、間接的に降水などによって大気環境からの自然負荷がなされる森林生態系が挙げられる。ここで、農耕地生態系と森林生態系での応用例を幾つか紹介する。

1) 重窒素トレーサー法を用いた灌漑水中硝酸態窒素の浄化機能評価

これは鹿児島県農業試験場の上籬ら¹⁶⁻¹⁸⁾の研究事例である。鹿児島県は、畜産をはじめ露地および施設野菜、茶および果樹等の永年作物の栽培が盛んで、畜産廃棄物および農耕地から流亡した硝酸態窒素によって、地下水、河川の水質の汚染が懸念されている。そこで、重窒素トレーサー法を用いて、水稻および水田転作作物（飼料稲とサトイモ）を利用した灌漑水中の硝酸態窒素の浄化効果を検討した。方法としては、灌漑水に¹⁵N（10～30atom%）標識硝酸カリウムを添加して、灌漑水中の硝酸態窒素濃度を水道水基準の10mgN L⁻¹に調整した。水稻および飼料稲は湛水条件で、サトイモは定期的に畦間灌漑した。試験終了後、作物と土壌試料を採集し、その中に含まれた窒素の量および¹⁵N同位体比をケルダール法および質量分析計を用いて分析した。灌漑水由来窒素の作物吸収量、土壌残存量、溶脱量、脱窒量（ガス化量）は下記の式により算出した。

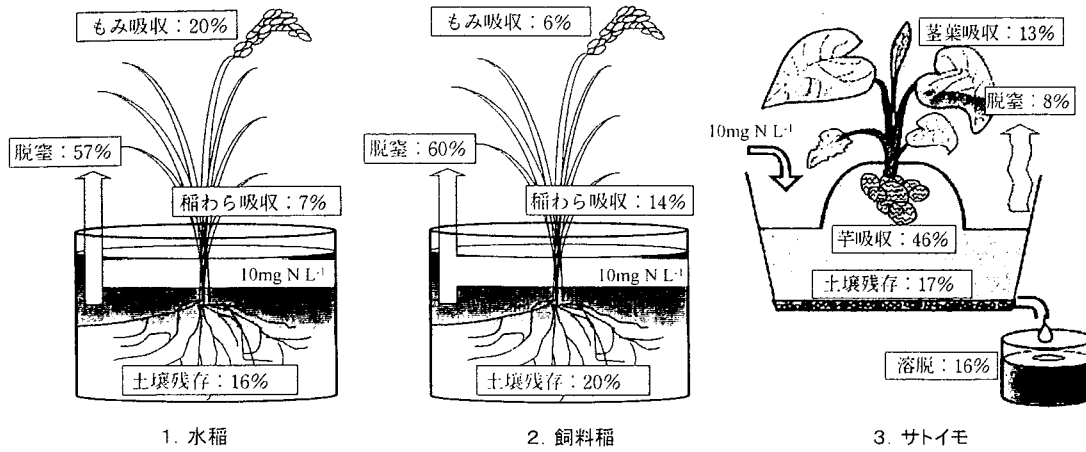


図2 重窒素を用いた各作物における灌漑水由来窒素の収支の推定 (上蘭ら, 2003, 2005a, b)

表2 重窒素を用いた水田と水田転換畑における灌漑水窒素の利用
および浄化機能の評価 (上蘭ら, 2003, 2005 aとb)

	水稻	飼料稲	サトイモ
土壌に施用した窒素量 (g m ⁻²)	7.00	7.00	15.00
灌漑水由来の窒素供給量 (g m ⁻²)	5.01	7.82	6.60
作物に吸収された全窒素量 (g m ⁻²)	9.10	10.21	15.92
灌漑水由来の窒素吸収量 ⁽¹⁾ (g m ⁻²)	1.35	1.60	3.89
灌漑水窒素の寄与率 ⁽²⁾ (%)	14.9	15.7	24.4
灌漑水窒素の利用率 ⁽³⁾ (%)	27.1	20.4	58.8

- (1)：灌漑水由来の窒素吸収量は重窒素トレーサーによる計算したもの
- (2)：寄与率 = 灌漑水窒素吸収量 / 全窒素吸収量
- (3)：利用率 = 灌漑水窒素吸収量 / 灌漑水由来の窒素供給量

$$\text{試料中の } ^{15}\text{N 由来窒素量} = \text{試料中の全窒素} \times \frac{\text{試料中の } ^{15}\text{N atom\% excess}}{\text{供試K}^{15}\text{NO}_3 \text{の } ^{15}\text{N atom\% excess}} \dots(6)$$

$$^{15}\text{N atom\% excess} = \text{試料中の } ^{15}\text{N atom\%} - ^{15}\text{N の自然存在率} \dots(7)$$

$$\text{脱窒量 (ガス化量)} = \text{供試K}^{15}\text{NO}_3 \text{の } ^{15}\text{N 量} - \text{回収された } ^{15}\text{N 量 (作物 + 土壌 + 溶脱)} \dots(8)$$

ここで試料は作物, 土壌, 溶脱水をさしている。また, バックグラウンドの¹⁵N存在率は0.366%とした。

その結果は図2と表2に示したように, 作物に吸収された灌漑水由来窒素は, 水稻, 飼料稲, サトイモがそれぞれ27%, 20%, 59%となった。土壌中の残留は16%, 20%, 17%となった。湛水栽培の水稻と飼料稲の脱窒量がそれぞれ57%と60%となっ

た、一方、水田転換畑のサトイモは脱窒が8%と少なく、地下の溶脱量が16%となった。灌漑水由来窒素の作物への寄与率と利用率については、サトイモを栽培した水田転換畑のほうは、水稲および飼料稲を栽培した湛水水田より遥かに上回った。灌漑水由来窒素の作物吸収量と脱窒量を合わせると、水稲、飼料稲とサトイモではそれぞれ84%、80%と67%を占めており、灌漑水窒素の浄化機能が高かった。ただし、空気中に脱窒された部分のうち温室効果ガスである亜酸化窒素が占める割合について検討していないため、地球温暖化に及ぼす影響については不明である。

2) 窒素自然安定同位体を用いた灌漑水中硝酸態窒素の脱窒作用の評価

灌漑水中の硝酸態窒素は、 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ の順でガス化され、大気中に放出される。この微生物による脱窒過程において、 ^{14}N がわずかながら ^{15}N より優先的に脱窒され、同位体分別が生じることは先に述べた。Mariottiらは、この原理を利用してフランス北部の地下水における硝酸態窒素の脱窒について数量的に解析した⁶⁾。同様の手法を用いて水田の灌漑水中における硝酸態窒素の ^{15}N 自然存在比を測定することにより、脱窒量を推算することが考えられる。ここで朴と熊澤の研究事例¹⁰⁾を紹介する。彼らは、すでに埼玉県榑引台地の露地野菜畑からの浸透水を調査し、硝酸態窒素濃度が非常に高いことと、その起源物質が有機肥料および畜産廃棄物であることを ^{15}N 自然存在比の測定($\delta^{15}\text{N}$ 法)によって明らかにした。また、高濃度の硝酸態窒素を含有しているこの地下水を低地水田地帯で灌漑水として利用すると、その後の硝酸態窒素濃度が減少することを観察し、水田の表面水では相当量の脱窒が起こるがあることを推定した。さらに、水田の条件を室内実験でつくり、脱窒の進行と $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化の関係を数式化し、 $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化を測定することにより、灌漑水として流入した NO_3^- の脱窒による損失の程度を推定した。具体的には、埼玉県熊谷市の水田褐色土壌を1Lの広口ポリビンに入れ、蒸留水を300mL加え、室内で25℃、3週間前培養した後、表面水を取り除き、新たに埼玉県榑引台地より湧き出した水田灌漑水300mLを加え、三日間経時的にその表面水を全量サンプリングし、その中の硝酸態窒素濃度と $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化を調べた。実験の結果は表3で示している。時間経過に伴って、いずれも硝酸態窒素の濃度が減少し、 $\delta^{15}\text{N}$ 値が増加した。ここで、Mariottiら⁶⁾により提案されているいわゆるRayleigh式を当てはめてみると、図3中に示した数量式が求められた。

すなわち

$$\delta_s = \delta_{s0} + \epsilon \ln(C/C_0) \dots\dots\dots(9)$$

ここで、 δ_s と δ_{s0} はそれぞれ試料と測定開始の試料の $\delta^{15}\text{N}$ 値(‰)であり、 C と C_0

表3 脱窒による表面水中硝酸態窒素濃度と $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化(朴・熊澤, 1998)

	時間	$\text{NO}_3^- \text{-N}$ (mg L^{-1})	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
実験1	灌漑原水	20.4	8.9
	3時間後	18.2	8.8
	7.5時間後	16.8	9.9
	11.5時間後	15.1	10.3
	18.5時間後	12.6	10.7
	24時間後	13.2	12.4
	48時間後	8.8	12.9
	60時間後	7.0	13.8
	72時間後	6.1	15.7
実験2	灌漑原水	11.4	8.7
	3時間後	11.2	9.3
	6時間後	10.4	9.2
	9時間後	9.5	9.4
	12時間後	9.4	9.5
	18時間後	8.5	10.2
	24時間後	7.6	11.9
	36時間後	4.7	12.7
	48時間後	4.5	14.6
60時間後	1.5	17.1	

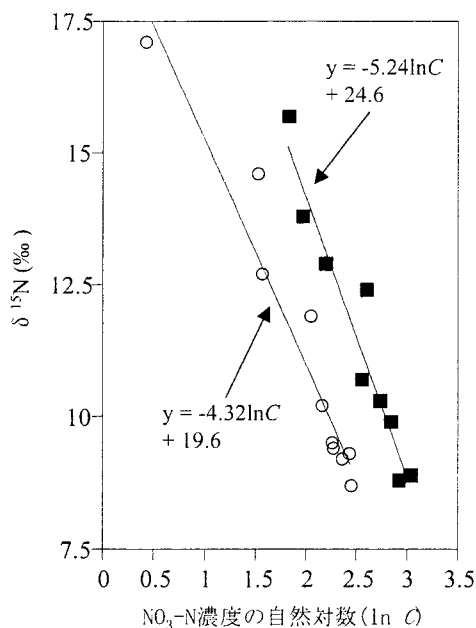


図3 脱窒に伴う $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 濃度の自然対数と $\delta^{15}\text{N}$ との関係

■実験1。○実験2。C: $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 濃度, y: $\delta^{15}\text{N}$ 値(朴・熊澤, 1998)。

はそれぞれ試料と測定開始の試料の硝酸態窒素濃度 (mg L^{-1}) である。また, ϵ は濃縮係数(enrichment factor)という定数で, 実験的に求められる。(9)式で, $\delta_{\text{so}} - \epsilon \ln C_0$ の値を定数 a とすると, (9)式は(10)式に変化することができる。

$$\delta_{\text{s}} = a + \epsilon \ln C \dots\dots\dots(10)$$

今回の朴・熊澤の実験から求めた濃縮係数(ϵ)は実験1と2において, それぞれ-5.24と-4.32であった。その平均値は-4.78になった。

また, 同一の反応系での濃度 C_1 から C_2 までの脱窒による $\delta^{15}\text{N}$ 値の変化 ($\delta_{\text{s}2} - \delta_{\text{s}1}$) を $\Delta \delta^{15}\text{N}$ 値にすると, (9)式は下式に変化することができる。

$$C_2/C_1 = e^{(\Delta \delta^{15}\text{N}/\epsilon)} \dots\dots\dots(11)$$

ここで, 上式より $\Delta \delta^{15}\text{N}$ 値と ϵ 値が分かれば, 脱窒率を推定することができる(表4)。例えば, $\Delta \delta^{15}\text{N}$ 値が2‰と8‰であるとき, 濃縮係数(ϵ)を平均値の-4.78にすると, 脱窒率がそれぞれ34.2%と81.2%になる。ただし, 濃縮係数が脱窒の状況(温度, 硝酸態窒素の初期濃度など)により変わるので, 正確な脱窒率を求めることはさらに工夫の必要がある。

表4 $\Delta \delta^{15}\text{N}$ 値および濃縮係数(ε)による脱窒率(%)の推定

	仮定 $\Delta \delta^{15}\text{N}$ 値	2	4	6	8
ε					
-4.32		37.1	60.4	75.1	84.3
-4.78		34.2	56.7	71.5	81.2
-5.24		31.7	53.4	68.2	78.3

3) 重窒素トレーサー法を用いた大気由来窒素のヨーロッパ針葉林における動態解析

窒素は林木の生育にとっての多量必須元素であり、森林生態系においてのその供給量は通常限られているため、林木成長の制限因子の一つとして考慮されてきた。しかしながら、前述のように、盛んな人間活動に伴い、地球レベルでの反応性窒素が増加しつつある。それが森林生態系への大気からの窒素負荷をもたらし、森林での窒素が限られた状態から過剰な状態に変化しつつある⁹⁾。大気からの窒素降下物が森林生態系に及ぼす影響を調べた研究例として、北西ヨーロッパを中心に展開された NITREX (NITrogen saturation Experiments) プロジェクトが挙げられる¹⁹⁾。ここで、NITREX プロジェクトの中に、Koopmans らが行なった重窒素トレーサー法を用いたヨーロッパ針葉林における大気由来窒素の動態解析の研究結果⁵⁾を紹介する。Koopmans らは、オランダでの窒素負荷量が多いモミ (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco.) 針葉林とマツ (*Pinus sylvestris*. L) 針葉林において、人工降雨施設を用いて、自然降雨と同量の ^{15}N ラベルした雨水を1年間森林生態系に与え、重窒素トレーサー法でその窒素の行方を追跡した。処理区は窒素降下物量により2つ設けられた。高窒素区では、窒素降下物量はほぼ現在の窒素降下物と同量の $44\text{--}55\text{ kg N ha}^{-1}\text{ yr}^{-1}$ に設定された。一方、低窒素区では、窒素降下物量は産業革命以前レベルの $4\text{--}6\text{ kg N ha}^{-1}\text{ yr}^{-1}$ に設定された。実験開始の9ヶ月後および1年9ヶ月後に植物、土壌、溶脱などのプールごとに分け、サンプルを採集し、ラベルした ^{15}N の分配を次のようなマスバランス式で求め、各プールでの回収率を計算した⁸⁾。

$$m_{lab} = m_f \times (\delta^{15}\text{N}_f - \delta^{15}\text{N}_i) / (\delta^{15}\text{N}_{lab} - \delta^{15}\text{N}_i) \dots\dots\dots(12)$$

ここで

m_{lab} は各プールに含まれた、ラベルした ^{15}N 由来の ^{15}N 量；

m_f はサンプリング時点における各プール窒素量；

$\delta^{15}\text{N}_f$ はサンプリング時点における各プール窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値；

$\delta^{15}\text{N}_i$ は実験開始時点における各プール窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値；

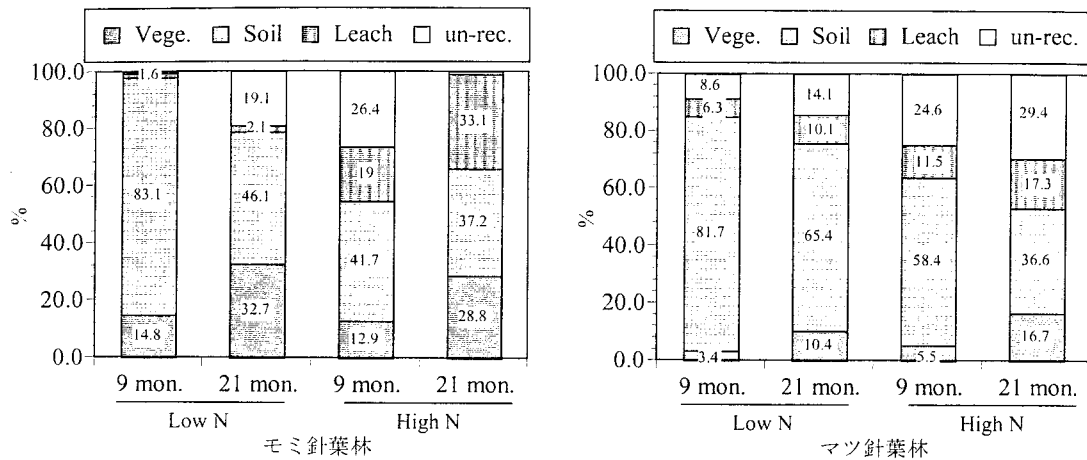


図4 オランダのモミ針葉林とマツ針葉林において、 N^{15} ラベルした水を自然降雨と同量に1年間(1992年5月から1993年5月まで)に森林生態系に与え、その開始後の9ヶ月(1993年2月)と21ヶ月(1994年2月)に、重窒素トレーサー法を用いて求めた各プールからの回収率(%)

Vege.: 植物; Soil: 土壌; Leach: 溶脱; un-rec.: 未回収。
Koopmansら(1996)の元データより作成。

$\delta^{15}N_{lab}$ はラベルした ^{15}N の $\delta^{15}N$ 値。

その結果は図4に示したように、ラベルした ^{15}N の71~100%は植物(針葉、枝、辺材、心材など)、土壌(有機質土層から地下70cmまで)、溶脱地下水(深さ90cm)などから回収された。全体からみると、 ^{15}N は土壌中に最も多く分配された。どちらの針葉林とも、土壌に集積された窒素の割合は、高窒素区よりも低窒素区のほうが多かった。植物に同化された ^{15}N は、 ^{15}N を与え始めてから9ヶ月後と比べると、 ^{15}N を与え終わってから9ヶ月後(開始から21ヶ月)のほうが2~3倍に増え、また、地下水の溶脱量も1.5倍前後に増加した。このことより、土壌中に集積された ^{15}N 窒素は、 ^{15}N を与え終わった後に、森林生態系の内部窒素循環(植物同化と土壌中の有機化など)に関与し、また、外部の窒素負荷をもたらした(地下水での溶脱と大気への窒素酸化物の放出)と考えられる。

4) 窒素自然安定同位体を用いた森林生態系における窒素循環の把握

森林生態系における窒素循環経路としては、降雨・窒素固定による窒素の森林への供給と、脱窒・流失による森林外への損失からなる外部循環系と、窒素を植物が吸収し、その植物の落葉または遺体が森林土壌中の微生物によって無機化され、その無機化窒素が植物に再吸収されるという内部循環系がある。森林が成立していく過程、つまり遷移初期から極相林までの森林の時系列的変化において、森林生態系の窒素自然

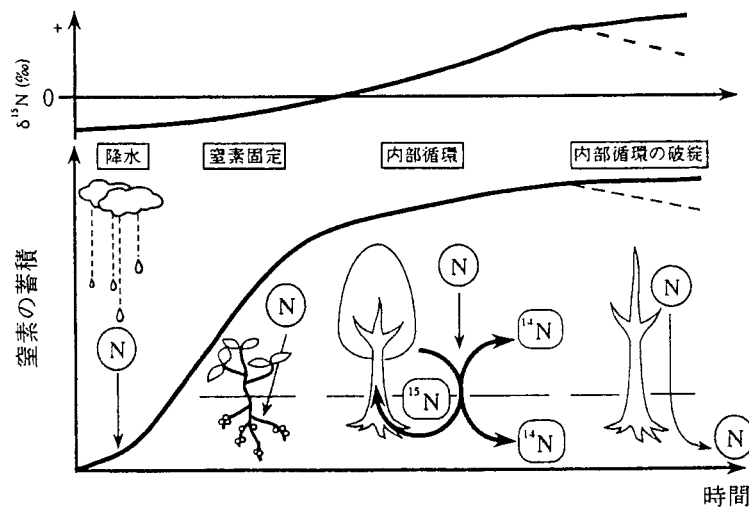


図5
森林の成立に伴う
生態系の窒素の蓄積
と同位体比の変動
(原図：木庭, 1995)

安定同位体の変化は、この循環に関する様々な変動を反映している。森林の成立に伴う土壌・植物体の同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$ 値) は、図5のように変動すると考えられている⁴⁾。遷移初期の森林土壌と植物体は、非常に低い同位体比を持つとされている。降雨中の窒素 ($\delta^{15}\text{N}$ 値は $-7.7 \sim -1.2\%$) の供給に依存していることを反映して、 $\delta^{15}\text{N}$ 値がマイナスになる。森林の成立に伴って、窒素固定による窒素 ($\delta^{15}\text{N}$ 値は $0 \sim -2\%$) の森林への供給は、降雨より多くなり、窒素の同位体比は、窒素の蓄積量の増加と共に上昇する。また、窒素の蓄積量の増加が窒素の内部循環を加速し、同位体分別により重い ^{15}N が系内に蓄積し、軽い ^{14}N が系外へ流出することも森林生態系内の窒素同位体比が上昇する原因であると考えられる。また、酸性雨による森林内部循環の破綻または森林土壌利用変化により、 $\delta^{15}\text{N}$ 値が低下してくることも明らかになった。例えば、Piccola らは、森林土壌が開墾されて畑地となる過程での同位体比の変動を公表した¹⁴⁾。それによると、森林表層土壌の同位体比は $9.8 \sim 13.6\%$ と高い値をとったが、開墾後畑地となり、時間の経過に伴い同位体比は減少し、20年たった畑地では $1 \sim 2\%$ の減少が見られた。この原因として、非共生窒素固定菌による多量の窒素固定が、土壌に軽い窒素肥料を供給したことをあげている。

5) 窒素自然安定同位体を用いた農耕地からの亜酸化窒素の発生源の特定

陸域生態系から発生する N_2O は、主に硝化過程の副産物として、あるいは脱窒過程の中間生成物として生成される。両過程とも反応が起きる際に同位体分別が起こるが、その分別係数が異なる。硝化過程で N_2O が生成される場合は、その反応が $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ と複雑な過程を経て同位体分別が起こるため、その同位

体濃縮係数 ϵ は純粋培養系では -45.3 から -66.5% までの低い値をとる¹²⁾。一方、脱窒過程で N_2O が生成される場合、その $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ の ϵ は純粋培養系では -28.6% であるが、自然界では生成された N_2O の大部分は N_2 まで還元されるため、 N_2O 生成の同位体分別と N_2O 分解の同位体分別が相殺しあって見かけ上の ϵ は小さくなる。このように、硝化と脱窒の同位体分別の違いを利用して N_2O の発生源を特定することが可能となる。

Perez らは、この同位体分別の違いを利用して、尿素を施肥した土壌から発生した N_2O の起源を推定している¹³⁾。それによると、尿素施肥後1週間は $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ の ϵ が -44 から -54% という低い値をとる一方、2週目は $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ の ϵ が 7 から -29% という高い値をとった。純粋培養系で得られたそれぞれの同位体濃縮係数の値から、最初の1週間は硝化によって N_2O が生成され、次の1週間は脱窒によって N_2O が生成されたとしている。

以上、農耕地生態系における脱窒および亜酸化窒素の生成と森林生態系における窒素負荷に関する問題について、重窒素トレーサー利用法と自然同位体利用法を用いた研究事例を紹介した。それ以外に、アメリカでは、重窒素トレーサー利用法を用いた渓流水からの窒素の流出での応用例もある¹¹⁾。

4 おわりに

われわれ土壌肥料学分野の研究者が最初に窒素安定同位体利用法を用いたのは、有限な窒素肥料を有効に農作物に吸収させることによって、食料増産を計ることを目的としたことである。日本では、終戦直後の1947年に、旧農事試験場で始まった、重窒素を利用した窒素肥料の農作物による利用が、農業分野における窒素安定同位体利用法のスタートであったと思われる¹⁵⁾。しかし、半世紀を経た今、あちこちで溢れている窒素負荷が、地域環境または地球環境レベルで各面からわれわれの生活基盤を脅かしている。冒頭で説明したように、地球規模の反応態窒素は、世界の人口増加および人間生活水準の向上に対応するために、さらに増加していくと予想される。その背景に踏まえ、2004年10月に中国の南京で行なわれた第3回国際窒素会議では、窒素循環の最適化のため、「窒素管理に関する南京宣言 (INI)」が採択された。ただ、窒素循環の最適化については大きな課題をのこしており、そのため様々な生態系における窒素循環を正確に把握することと、また合理的かつ有効な技術の開発を行うことなどが不可欠である。この課題を解くことは、土壌学を含む、窒素循環に関する各専門分野の研究者の協力が必要である。また、かつて一部の専門家だけが扱える特殊な手法

であった安定同位体利用法は、安定同位体の測定技術の簡便化によって、様々な分野の研究者が手軽に利用できるようになったことにより、窒素安定同位体の利用がますます期待されている。

参考文献

- 1) Burns, R. C. and Hardy, R. W. F. (1975): Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants. Springer-Verlag. p1-189.
- 2) Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., Asner, G. P., Cleveland, C. C., Green, P. A., Holland, E. A., Karl, D. M., Michaels, A. F., Porter, H. J., Townsend, A. R. and Vorosmarty, C. J. (2004): Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, **70**, 153-226.
- 3) 濱 健夫・濱 順子 (1996): バイオサイエンスのためのアイソトープ測定機器 (第二シリーズ) VI. 質量分析, *RADIOISOTOPES*, **45**, 38-46.
- 4) 木庭啓介 (1995): 窒素同位体を用いた森林生態系における窒素循環の把握, *RADIOISOTOPES*, **44**, 81-82.
- 5) Koopmans, C. J., Tietema, A. and Boxman, A. W. (1996): The fate of ^{15}N enriched throughfall in two coniferous forest stands at different nitrogen deposition levels. *Biogeochemistry*, **34**, 19-44.
- 6) Mariotti, A., Landreau, A. and Simon, B. (1988): ^{15}N isotope biogeochemistry and natural denitrification process in groundwater: application to check aquifer of northern France. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **52**, 1869-1878.
- 7) 森田明雄 (2002): $\delta^{15}\text{N}$ 値を用いて窒素の流出起源を知る, 「環境負荷を予測する—モニタリングからモデリングへ—」, p79-94, 長谷川周一・波多野隆介・岡崎正規編, 博友社
- 8) Nadelhoffer, K. J. and Fry, B. (1994): Nitrogen isotope studies in forest ecosystems. *In* Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science (Eds: Lajtha K & Michener R) p22-44, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- 9) 大類清和 (1997): 森林生態系での "Nitrogen Saturation" —日本での現状—, 森林立地, **39**, 1-9.
- 10) 朴 光来・熊澤喜久雄 (1998): 灌漑水から流入した硝酸態窒素の脱窒作用に伴う窒素安定同位体存在比の変化, 土肥誌, **69**, 293-295.
- 11) Peterson, B. J., Wollheim, W. M., Mulholland, P. R., Webster, J. R., Meyer, J. L., Tank, J. L., Marti, E., Bowden, W. B., Valett, H. M., Hershey, A. E., McDowell, W. H., Dodds, W. K., Hamilton, S. K., Gregory, S. and Morrall, D. D. Control of nitrogen export from watersheds by headwater streams. *Science*, **292**, 86-90.
- 12) Perez, T. (2004): Factors that control the isotopic composition of N_2O from soil emissions. *In* Stable Isotopes and Biosphere-Atmosphere Interactions, Processes and Biological Controls (Eds: Flanagan, L. B., Ehleringer, J. R. and Pataki, D. E.) p69-84, Elsevier Academic Press, London.

- 13) Perez, T., Trumbore, S. E., Tyler, S. C., Matson, P. A., (2001) : Ortiz-Monasterio, I, Rahn, T. and Griffith, D. W. T. (2001) : Identifying the agricultural imprint on the global N_2O budget using stable isotopes. *Journal of Geophysical Research*, **106**, 9869-9878.
- 14) Piccolo, M. C., Neill, C. and Cerri, C. C. (1994) : ^{15}N natural abundance in soils along forest-to-pasture chronosequences in the Brazilian Amazon Basin. *Oecologia*, **99** : 112-117.
- 15) 渋谷政夫 (1979) : 農業試験研究における ^{15}N の利用と展望, 「重窒素利用研究法」, 三井進午・中根良平・吉川春寿・熊澤喜久雄編, 学会出版センター.
- 16) 上蘭一郎・長友 誠・上之蘭茂・中園充紀・上村幸廣 (2003) : シラス水田におけるかんがい水含有窒素の低減化, 鹿児島県農業試験場研究報告, **31**, 31-37.
- 17) 上蘭一郎・中園充紀・長友 誠・上村幸廣 (2005 a) : 飼料稲の窒素吸収特性とかんがい水中硝酸態窒素の浄化, 鹿児島県農業試験場研究報告, **33**, 9-20.
- 18) 上蘭一郎・中園充紀・長友 誠・上村幸廣 (2005 b) : 水田転作サトイモ栽培におけるかんがい水中硝酸態窒素の浄化, 鹿児島県農業試験場研究報告, **33**, 21-32.
- 19) Wright, R. F. and van Breemen, N. (1995) : The NITREX project: an introduction. *Forest Ecology and Management*, **71**, 1-5
- 20) 米山忠克 (1987) : 土壌—植物系における炭素, 窒素, 酸素, 水素, イオンの安定同位体自然存在比: 変異, 意味, 利用, 土肥誌, **58**, 252-268.