

# 季節的な土壌凍結が一酸化二窒素生成・排出動態に及ぼす 影響：室内実験から野外観測への示唆

柳井洋介<sup>1</sup>

Effect of seasonal soil-freezing on N<sub>2</sub>O production in soil followed by the emission from soil: Implications from in-vitro soil incubation to in-situ monitoring.

Yosuke YANAI<sup>1</sup>

## 1. はじめに

筆者は、2007年の日本土壌肥科学会全国大会で「窒素循環における冬季の位置づけ」なるセミナーに参画し、広域にわたる通年での物質循環をどう捉えるかを討論する機会を得た(柳井ら, 2008)。当時の筆者は室内実験の結果しか有していなかったものの、培養実験で感じ取ったメカニズムが現場でどう作用しているかを知りたくて仕方がなかった。幸いなことにこのセミナーの前後で居住地を東京から北海道へ移し、同時に主たる研究の手法を実験室内での土壌や微生物菌体の培養から試験圃場での観測へ変えることとなった。本稿では、室内実験から圃場でのモニタリングに移って感じたことおよび得られた結果の背景を記す。

## 2. 研究対象

筆者が関心を寄せたのは、季節的に凍結した土壌が融解する際に短期集中的に一酸化二窒素(以下 N<sub>2</sub>O)を排出するという現象である。Flessa et al. (1995) は、年最大 N<sub>2</sub>O 排出速度を施肥後ではなく冬季に凍結した土壌が融ける時に観察した。通年にわたる観測で得られた N<sub>2</sub>O 排出量 9.4-16.8 kg N<sub>2</sub>O-N ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup> は Bouwman (1990) が推計した排水良好な耕地における年間排出量より高く、このことの原因として、N<sub>2</sub>O 排出速度の計測が必ずしも通年で行われていないこと = 土壌凍結が起こる温帯から寒帯の地域での推計値が過小評価となっている可能性を指摘した。実際、Röver et al. (1998) の観測では1年間365日のうち3月から11月の275日間の N<sub>2</sub>O 排出量は年間値の22% (無施肥区) および33% (施肥区) であり、土壌の凍結融解が起こる12月から2月の90日間のデータを含めない(観測せずゼロとみなす)ことによる年間排出量の過小評価を如実に例示している。Flessa et al. (1995) は、結論において広域評価や

将来予測に向けた観測方針にも言及している: ①農耕地からの N<sub>2</sub>O 排出量を正確に推定するためには長期に渡り観測を続けることが必要である②その際、通年での観測を基本とし密な時系列データを取得するべきである③耕地土壌での N<sub>2</sub>O 生成強度は土壌の理化学性だけでなく営農管理形態にも依存することは明白であるから、地域の土壌や管理形態をよく代表する場所を網羅して観測計画を立案すべきである④そうすることで土壌・気象・営農管理などの要因がどのように土壌からの N<sub>2</sub>O 排出速度を制御しているかを知ることとなり⑤知見の積み重ねにより、実測し得ない広大な地域に渡る N<sub>2</sub>O 排出挙動を予測したり将来の N<sub>2</sub>O 排出量を予測したりする際に利用できるツールの開発に貢献するだろう。筆者はこれを参考に「通年での定点観測の実施」が実態解明と広域評価と将来予測の第一歩であると考えに至った。そこで、冬季の地温や水移動特性が異なる試験区(除雪により土壌凍結をより発達させる区と融雪材の散布により消雪日を早める区)を1筆の試験圃場の中に作りモニタリングを行う計画を立案し実施した。この実験計画は、屋外での観測ではあるものの管理された農地のあるがままを観測するのとは異なる、小規模野外操作実験(仲間, 2008)の範疇にあるものである。

## 3. アプローチ

### 3.1. 発散した室内実験

この計画の立案に至るに先立ち、「現場での N<sub>2</sub>O 排出速度の計測は時空間変動が大きくて難しい、したがって N<sub>2</sub>O の生成に関与する微生物の生態メカニズムから N<sub>2</sub>O 排出量を逆算して広域評価につなげよう」とするモデリングの発想で研究を行っていた時期があった。研究史上では、季節凍土が排出する N<sub>2</sub>O は脱窒の産物であるとされていたことから(柳井ら, 2007)、土壌の凍結融解による N<sub>2</sub>O 還元活性の損失もしくは N<sub>2</sub>O 還元酵素を持たない微生物の優占化が生成された N<sub>2</sub>O を大気へ漏らしている、と仮説を立て実験を行っていた。結果として、実験室内で行う土壌の凍結融解処理が現場と異なっていたからなのか、土壌凍結によって N<sub>2</sub>O 還元酵素の活性が下がるというデータはほとんど得られな

<sup>1</sup>NARO Institute of Vegetable and Tea Science Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan.

Corresponding author: 柳井洋介, <sup>1</sup>農研機構野菜茶業研究所  
2012年9月18日受稿, 2012年10月15日受理  
土壌の物理性 122号, 41-44 (2012)

かった。その代わりに、土壌凍結によって脱窒能（硝酸塩を  $N_2O$  に還元する活性）は高まるというデータを多数得た (Yanai et al., 2007b)。後者の結果は、凍結融解で微生物菌体由来の有機物が可溶化すること (Yanai et al., 2004) と密接に関連している可能性が高いが、当時はそのように考えられなかった。また、 $N_2O$  還元酵素を有さず温度が下がっても活性がそれほど下がらない糸状菌が凍結融解条件下の土壌での  $N_2O$  生成に関与しているのではないかと考え、脱窒能を有する糸状菌の分離・検定方法を確立したが (Yanai et al., 2007a)、実際には時間的な制約で検証に至らなかった。一方で、土壌の凍結条件に着目した実験では、凍結前の水分条件次第で融解時に  $N_2O$  が排出されないことがあること、また、炭素源の添加で融解時の  $N_2O$  排出量が増えることを見出した (未発表)。結局、モデリングの発想で研究に着手したはずが定性的な事実の列挙に終始し、定量的な議論に達することなく「土壌凍結は脱窒反応”straightforward denitrification (Mørkved et al., 2006)”の誘発因子である」と研究史の再現および言い換えに留まってしまった。

### 3.2 仮説を練り直して野外観測へ

以上で室内実験は締切に追われるように完結することとなったが、当時の議論を思い出したある日、「凍結融解条件で脱窒、生化学的な硝酸還元反応が起きていると言っているようだが、それは土壌中で  $N_2O$  分圧が上がると同時に酸素分圧が下がっているということではないか」「酸素分圧の低下が起きていると連呼しているように聞こえるが、一度でも測ったのか」と批判的な考えが頭をよぎった。「凍結融解条件で微小嫌気部位が存在することを考察する論文はあるけれども、そう考察することで実測不可能とみなしているだけではないか」「微生物の細胞膜近傍の酸素分圧はわからなくても、酸素分圧の低下はマクロポアでもある程度検知できるのではないか」とみるみる思い立ち、検証したくなった。実施するにあたっての問題は、土壌が凍結融解する条件で土壌ガスを採取して分析する方法と、観測に適したサイトを見つけることであった。しかし、大きな困難に遭遇することなく解決した。酸素は空気中の多量成分なので熱伝導度検出器で検出できる。しかし、カラムでの酸素とアルゴンの分離が難しく、専用のシステムを組む必要がある (Yoh et al., 1998) のだが、分析システムを開発者から借りることができた。また、土壌中からガスを採取するにあたって、融解期の表層土壌は永久凍土地帯の活動層下端と同じで体積含水率が非常に高く、土壌孔隙からガスを吸引採取しようとする水との混入が不可避であることが予想され、安定的な試料採取の妨げとなると考えられた。このことは、水を通さずガスのみを通す孔のない高分子膜を土壌中にあらかじめ埋設しておくこと (柳井・常田, 2009) により回避したことに加え、空間代表性の高い試料を得る手段ならびに酸素センサーと連結することで連続自動計測の手段にまで拡張することができた。サイトについては、2006年に永久凍土帯 (ヤクーツク) での土壌ガス組成調査に行った直後に参加したあ

る研究会での出会いがきっかけとなって解決した。これらの結果として、現場 (北海道河西郡) での予備試験を2007年11月から行い、本試験を2008年11月から2010年10月まで実施し、土壌凍結が発達した条件で融雪開始から消雪にかけて、土壌ガス中で  $N_2O$  分圧が上昇するときに酸素分圧が低下することを観察することに成功した (Yanai et al., 2011)。

## 4. 観測による仮説検証を終えて

### 4.1 現象理解とモデリング・広域評価へのギャップ

予備試験と本試験1年目は室内実験の結果から予想される範囲の観測結果、すなわち「土壌凍結が発達するほど土壌中で酸素分圧が低下して  $N_2O$  分圧が上昇する」を得ることができた。一方で、本試験2年目には「土壌凍結が発達しても酸素分圧の低下はわずかで  $N_2O$  賦存量の増加も小さい」としか言いようのない結果を得ることとなった。本試験1年目の結果では、土壌が雪水で覆われる11月から4月の半年間にわたる  $N_2O$  排出量は土壌の積算寒度もしくは年最大土壌凍結深だけで近似できていた (Yanai et al., 2011)。しかし、本試験2年目の結果も包括する説明をしようとする、融解期の積雪深が無視しえない役割を果たしているかもしれないとする解釈を得たが (柳井ら, 2012)、その検証に着手することはできず、現象のモデル化には至らなかった。本稿ではその詳細には触れないが、その代わりに、野外観測で得た結果をモデル化したり広域評価に利用しようとしたとき、もしまた培養実験で物質循環研究にアプローチできる境遇にあったらどのようなことをしうるかを想像して本稿の結びとする。

### 4.2 モデルと観測をつなぐ培養実験と学理の構築

ひとつは、物質循環を表現する既存のモデルの勉強とその改良に必要な速度論パラメータの取得である。最善は自らシミュレーションモデルを構築することであるが、例えばDNDC (Li et al., 1992) やecosys (Grant and Pattey, 1999) といった物質循環に関する既存のシミュレーションモデルで硝酸化成や脱窒といった  $N_2O$  生成プロセスがどのように記述されているかを知り、自らの実感や観測しているサイトの状況を説明するためにどういったパラメータを調整するか、そのパラメータを取得するためにどういった実験系を組む必要があるかを考案することが、次善の策ではないかと考えている。これまでに筆者が行ってきた実験、例えば菌密度の測定 (柳井ら, 2003) や生育曲線の取得・解析 (Yanai et al., 2007b, Yanai et al., 2008) は、経験と勘を養うには十分であったがモデル化という出口に対しては必ずしも適切ではなかった。土壌の硝酸化成能や脱窒能のモデル化、すなわち見かけのミカエリス定数の取得や温度依存性の評価ができていなかったのは、設計段階での勉強不足を認めざるを得ない。

もうひとつは、土壌中での生成・消失反応と移動現象を区別する論理の構築である。筆者が実施した観測 (Yanai et al., 2011) では土壌ガス分圧を4深度で測定し

たが、質量保存則に基づいて定量的な解析を試みようとする、時折よくわからない解析解（土壌中ガス賦存量変化量が地表面フラックスと比べて異様に小さい、消費反応を無視しうる二酸化炭素でも生成項がマイナスになるときがある、など）に直面する。このことは、試験設計が解析に相応しくなかったためなのか、もしくはそういう現象・事実として受け入れなければならないのか、思案し続けている。ガスの土壌中賦存量を計算すると、水への溶解度が高い  $N_2O$  は液相に溶存している量の方が気相中に存在している量より多い場合が少なくない。賦存量変化の時系列をみていると、 $N_2O$  の地表面排出と同時に地下への溶脱も起きていることが示唆されるものの、環境影響評価として、また単に解析解として、どのように表現すべきかいいアイデアが浮かばない。こういった懸念は、土壌物理学の基礎に立ち返ると、水移動の解析手法を理解することなく、溶質の挙動を考慮しないで、ガスの生成・移動に興味のままに論じようとしていたことに起因するのかもしれないと思えてくる。このことは、 $N_2O$  や硝酸塩の安定同位体比の解析に着手してから（山崎ら、2011、柳井ら、2011）強く思うようになった。データは恐らく真実を物語っている、しかしそれをうまく汲み取れなければ意味がない、なぜ一意的な解釈ができないのか、複雑系であるが故のやむを得ないことなのか、もっと基礎的・基本的・単純な系であれば適切に解釈できるのか、と悩みは尽きない。

## 5. おわりに

悩むのは研究の上では大事なことである。一方で、農業活動の環境負荷を明らかにする目的を果たすことも忘れてはなるまい。たとえ限られた事例調査が基であったとしても、その挙動がある程度の広さをもった地域で生じているとしたら…と実空間における現象として解釈を拡張して思考することを「不正確さ」を理由に避けていては、議論の進展は望めない。問題の解決を阻む内外に潜む要因を明らかにしていくためにも、筆者自身も未着手の解析をどういう形であれ進めていかなければなるまいと、本稿の執筆を通じて痛感した次第である。

## 引用文献

Bouwman, A.F. (1990) : Exchange of greenhouse gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere. Bouwman A.F., Soils and the Greenhouse Effect, pp61-127, John Wiley and Sons Inc., New York.  
 Flessa, H., Dörsch, P., and Beese, F. (1995) : Seasonal variation of nitrous oxide and methane fluxes in differently managed arable soils in southern Germany. *Journal of Geophysical Research*, 100 : 23115-23124.  
 Grant, R.F. and Pettey, E. (1999) : Mathematical modeling of nitrous oxide emissions from an agricultural field during spring thaw. *Global Biogeochemical Cycles*, 13 : 679-694.  
 Li, C.S., Frolking, S. and Frolking, T.A. (1992) : A model of

nitrous-oxide evolution from soil driven by rainfall event. I. Model structure and sensitivity. *Journal of Geophysical Research-Atmosphere*, 97 : 9759-9776.  
 Mørkved, P.T., Dörsch, P., Henriksen, T.M. and Bakken, L.R. (2006) :  $N_2O$  emissions and production ratios of nitrification and denitrification as affected by freezing and thawing. *Soil Biology and Biochemistry*, 38 : 3411-3420.  
 仲岡雅裕 (2008) 気候変動にともなう沿岸生態系の変化-生物群集から考える. 大串隆之・近藤倫生・仲岡雅裕, 生態系と群集を結ぶ, pp179-204, 京都大学学術出版会.  
 Röver, M., Heinemeyer, O. and Kaiser, E.-A. (1998) : Microbial induced nitrous oxide emissions from an arable soil during winter. *Soil Biology and Biochemistry*, 30 : 1859-1865.  
 柳井洋介・片柳薫子・木村園子ドロテア (2008) : セミナー「窒素循環における冬季の位置づけ～戦略的な広域評価に向けて～」の開催報告. *日本土壌肥科学雑誌*, 79 : 244-245.  
 Yanai, Y., Hatano, R., Okazaki, M. and Toyota, K. (2008) : Analysis of the  $C_2H_2$  inhibition-based  $N_2O$  production curve to characterize the  $N_2O$ -reducing activity of denitrifying communities in soil. *Geoderma*, 146 : 269-276.  
 Yanai, Y., Hirota, T., Iwata, Y., Nemoto, M., Nagata, O. and Koga, N. (2011) : Accumulation of nitrous oxide and depletion of oxygen in seasonally frozen soils in northern Japan - Snow cover manipulation experiments. *Soil Biology and Biochemistry*, 43 : 1779-1786.  
 柳井洋介・根本学・岩田幸良・廣田知良 (2012) : 凍結融解土壌の亜酸化窒素生成・排出機構にせまる. *低温科学*, 70 : 145-151.  
 柳井洋介・常田岳志 (2009) : ガス透過性膜を用いた土壌ガス採取による土壌微生物活性の原位置計測の可能性. *土と微生物*, 63 : 26-31.  
 柳井洋介・豊田剛己・岡崎正規 (2003) : 土壌の凍結融解反復処理が土壌微生物群集に及ぼす影響の調査事例. *土と微生物*, 57 : 13-20.  
 Yanai, Y., Toyota, K. and Okazaki, M. (2004) : Effects of successive soil freeze-thaw cycles on soil microbial biomass and organic matter decomposition potential of soils. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50 : 821-829.  
 柳井洋介・豊田剛己・岡崎正規 (2007) : 土壌の凍結融解をめぐる土壌微生物学研究的進展-凍結融解土壌における亜酸化窒素発生の機構解明と関連して. *土と微生物*, 61 : 135-146.  
 Yanai, Y., Toyota, K., Morishita, T., Takakai, F., Hatano, R., Limin, S. H., Darung, U. and Dohong S. (2007a) : Fungal  $N_2O$  production in an arable peat soil in Central Kalimantan, Indonesia. *Soil Science and Plant Nutrition*, 53 : 806-811.  
 Yanai, Y., Toyota, K. and Okazaki M. (2007b) : Response of denitrifying communities to successive soil freeze-thaw cycles. *Biology and Fertility of Soils*, 44 : 113-119.  
 柳井洋介・山崎哲明・岩田幸良・服部祥平・豊田栄・吉田尚弘・廣田知良 (2011) : 除雪処理による作土中への硝酸イオンの保持. *日本土壌肥科学会講演要旨集*, 57 : 5.  
 山崎哲明・服部祥平・柳井洋介・豊田栄・吉田尚弘 (2011) : 季節性凍結土壌に生じる一酸化二窒素のアイソトポマー解析. *日本地球惑星科学連合 2011 年大会予稿*, MIS023-P05.  
 Yoh, M., Takeuchi, M. and Toda, H. (1998) : Simultaneous measurement of  $N_2$ ,  $O_2$ , Ar,  $CO_2$ ,  $CH_4$ ,  $H_2$  and CO in aqueous and gaseous samples : a detection of  $N_2$ /Ar shifts in environments. *Japanese Journal of Limnology*, 59 : 147-157.

## 要 旨

土壌の季節的な凍結融解がもたらす短期集中的な一酸化二窒素 ( $\text{N}_2\text{O}$ ) の排出について、実験室内での微生物生態生理学的な研究から得た示唆をもとに計画した観測の、方法と得られた結果を概観した。土壌中で  $\text{N}_2\text{O}$  分圧が上昇するときに酸素分圧の低下が伴うことを季節凍土で示すことはできたものの、季節凍土での土壌ガス中酸素分圧を決定するメカニズムの解明には至らず、現象の理解ならびに広域評価方法の提案に課題が残された。一方で、農地での環境負荷をモデリングするために必要な実験室内での培養実験もあるはずで、土壌微生物反応の定量化とともに物質の生成及び消費反応と移動現象を区別する学理の構築がより一層望まれる。

キーワード：培養実験，野外観測，脱窒，一酸化二窒素，モデリング