

別寒辺牛川における窒素由来の環境負荷除去能力の調査

濱本亨¹、茂木宏仁¹、伊藤月乃²、内田義崇¹

¹北海道大学大学院農学院、²北海道大学大学院国際食資源学院

1. はじめに

別寒辺牛川流域は、原始的自然がよく保存された地域である。同時に、別寒辺牛川が注ぐ厚岸湖はカキやアサリなどの養殖漁業に活用され、また、酪農をはじめとする農業がさかんな地域でもある。一方、近年、肥料や飼料等による過剰な栄養投入が原因とされる河川水汚染が懸念されている。農業生産活動に伴う水質への環境負荷低減は、自然環境およびその他産業との両立のために重要な課題である。河川流域土壌は、窒素の河川への流出を防ぎ、環境負荷を軽減する機能をもつ。特に、土壌微生物は流出した硝酸態窒素を窒素ガス (N_2) または亜酸化窒素 (N_2O) に変え、大気中に放出するはたらき (脱窒能) を持つ。この脱窒能は、環境汚染浄化機能のひとつと考えられる。脱窒は N_2 を生成する完全脱窒、 N_2O を生成する不完全脱窒に分けられる。しかし、 N_2O は地球温暖化の要因で、二酸化炭素と比べ、298倍の温室効果を持つ (IPCC, 2013)。したがって、別寒辺牛川流域土壌における、脱窒作用による無害化の定量、また、脱窒作用によって発生する温室効果ガスの定量が重要である。

2. 研究目的

本研究では、別寒辺牛川流域における土壌の脱窒活性を測定し、その土壌の物理化学性や土壌微生物との関連を調べた。具体的には、別寒辺牛川の上流から下流まで、土壌サンプリングを行い、(1) 土壌理化学性、(2) 脱窒能、(3) 微生物群集を調査した。これらの結果から、別寒辺牛川の価値を向上させ、保全方法のさらなる改善・提案や周辺地域開発のための情報を得た。また別寒辺牛川流域における環境汚染浄化機能を定量した。

3. 方法

3.1. 土壌サンプリング

土壌サンプルの採取は2017年8月4日、5日に行った。サンプリング地点は別寒辺牛川の上流から下流にかけて15か所を選択した (図1)。各地点において、土壌コア (100 cm³、直径5cm) および土壌サンプル (深さ5 cm、三地点から採取し混合) を採取した。土壌コアおよび土壌サンプルは解析まで冷蔵保存 (4°C) した。

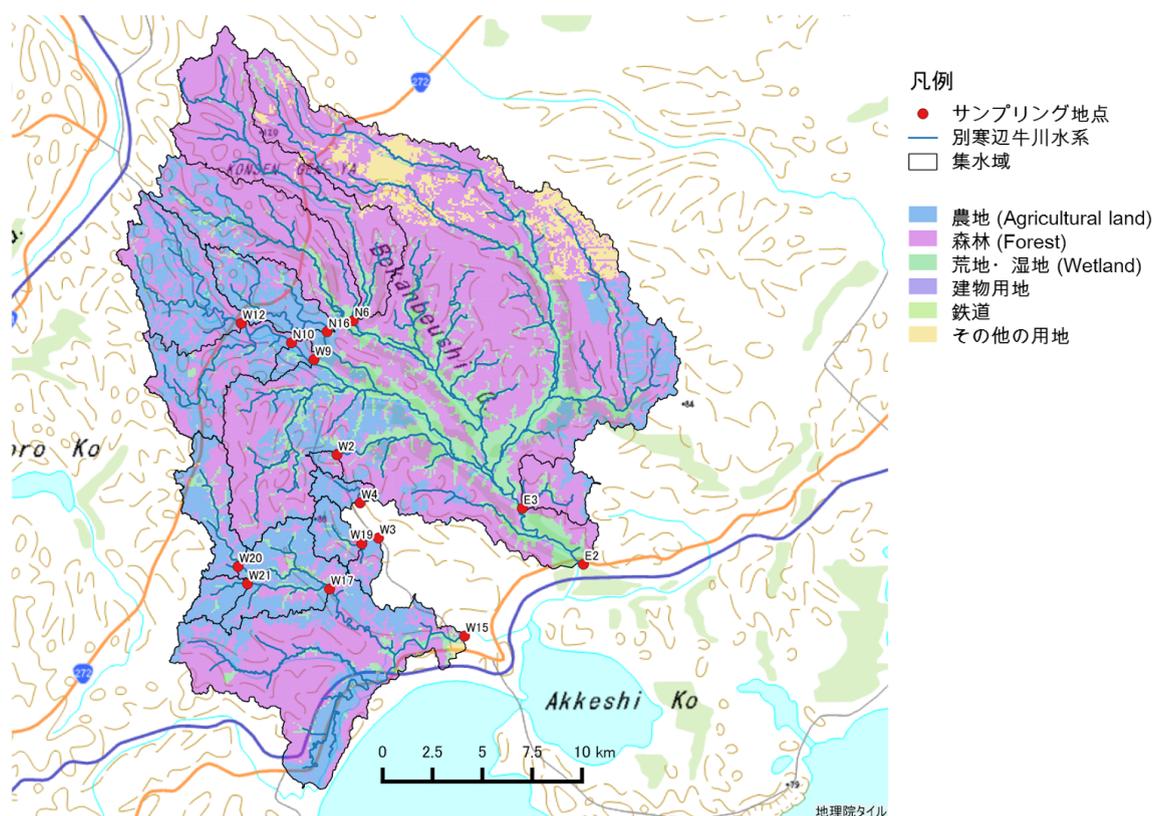


図1：サンプリング地点（赤点）および流域（黒線）。青線は別寒辺牛川を示す。土地利用データは、国土交通省の国土数値情報を利用し、背景地図は国土地理院より入手した。

3.2. 土壌化学分析

土壌水分量は採取した土壌サンプルを105°Cで24時間以上乾燥させ、その前後の重量変化から求めた。土壌密度は乾燥させた土壌コアの重量を土壌コアの体積で除して求めた。無機態窒素 (NO_3^- -N、 NH_4^+ -N) の測定では、3 gの湿潤土壌サンプルを15 mLの10%KCl溶液で30分間振とうし、抽出を行った。抽出した溶液は1 μm のろ紙 (Toyo Roshi Kaisha No.5C filter paper, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan) でろ過し、フローインジェクションアナライザー (AQLA-700, Aqualab Co., Ltd., Japan) を使用して、比色法により無機態窒素を計測した。土壌pHの測定には、土壌サンプルを10%KClで振とう抽出した溶液を使用し、pHセンサー (AS800, AS ONE Co., Japan) を用い測定した。全炭素量、全窒素量は、2400 Series II CHNS/O Elemental Analyzer (PerkinElmer Co., US) を用いて測定した。

3.3. 脱窒能 (DEA)

脱窒活性 (DEA) は培養期間における N_2O 濃度の上昇から推定した。総DEA、完全DEA (N_2 生成活性)、不完全DEA (N_2O 生成活性) の三つを測定するため、 N_2 充填下および $\text{N}_2+10\%$ アセチレン充填下の二つの条件で培養を行った。脱窒活性の測定にはJin *et al.* (2010) のプ

ロトコールを改変して使用した。まず、湿潤状態の土壌サンプル3 gを100 mLのガラス瓶に量り取り、3 mLのDEA溶液 (KNO_3 0.72 g L⁻¹、グルコース 0.5 g L⁻¹、クロラムフェニコール 1 g L⁻¹) を加えた。ガラス瓶はセプタとアルミニウムキャップで封をし、ヘッドスペースを >99% N₂ で置換した。さらに、総DEAを測定するために、ヘッドスペースの約10%をアセチレンで置換したガラス瓶も用意した。各サンプルは25°Cで2時間、振とうしながら培養した。2時間の培養後、ヘッドスペースの気体を30~40 mL採取した。採取した気体はガスクロマトグラフ (GC-2014, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) で測定し、N₂O濃度の増加を脱窒活性として用いた。完全DEAは総DEAと不完全DEAの差から求めた。

3.4.土壌微生物群集解析

土壌微生物群集解析の解析のため、以下、Toda and Uchida (2017) の手法を参考とした。土壌DNAの抽出にはPowersoil DNA extraction kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, USA) を使用し、製品のプロトコールに従って抽出を行った。続いて抽出したDNAを二段階のPCRに供した。一段階目のPCRでは、16S rRNAのV4領域の増幅を行った。各PCRサンプルについて、Ampli Taq Gold® 360 Master Mix (Applied Biosystems™, USA) 10 µL、Forward PrimerおよびReverse primer 各0.4 µL (amplicon size = 250 bp, forward primer = 515F:

5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3', reverse primer = 806R:

5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')、DNA抽出液1-3µL、Nuclease free water 8.2-6.2 µLを混合して計20 µLとし、95°C10分、続いて95°C30秒、57°C30秒、72°C1分を20サイクル、最後に72°Cで7分の加熱を行った。PCR産物はAgencourt AMPure XP Kit (Beckman Coulter, Fullerton, USA) で精製した。二段階目のPCRでは、Ion Torrent sequencing (Life Technologies) においてサンプルを識別するために、Ion Xpress Barcode Adapters 1-64 Kit (Life Technologies) を取り付けた515F forward primer およびIon P1 adaptor (Life technologies) を取り付けた806R reverse primerを使用した。

各PCRサンプルについて、Ampli Taq Gold® 360 Master Mix (Applied Biosystems™, Foster City, USA) 10 µL、Forward PrimerおよびReverse primer 各0.4 µL、精製済みPCR産物4 µL、Nuclease free water 5.2 µLを混合して計20 µLとし、95°C10分、続いて95°C30秒、57°C30秒、72°C1分を5サイクル、最後に72°C7分で保持した。PCR産物はAgencourt AMPure XP Kit (Beckman Coulter, Fullerton, USA) で精製した。精製後のPCR産物はQubit ds DNA HS Assay Kit (Invitrogen, USA) で濃度を測定し、Low TE (Tris-EDTA; 10 mM Tris base, 0.1 mM EDTA, Life Technologies) を用いて50 pMに希釈した。各サンプルはThe Ion Chef Instruments (Life Technologies, USA) および、Ion PGM Hi-Q Chef kitを使用してIon 318 chip (Life Technologies, USA)に充填した。

3.5.統計解析

土地利用の解析には、国土数値情報の土地利用細分メッシュ（国土交通省）と、解析ソフトウェアとしてQGIS ver. 2.10.1を用いた。また、流域解析には、基盤地図情報の数値標高モデル（国土地理院）と、解析ソフトウェアとして、MapWindow GIS ver. 4.8.8を用いた。DNA配列の解析には、Ion PGM Sequencer（Ion Torrent Life Technologies, USA）およびIon PGM 400 Kitsを使用した。DNA配列のデータはTorrent Suite Software V5.6（16S Metagenomics workflow V5.0）によりオンライン上で解析した。各DEA、土壌化学性の解析には、単回帰分析を使用した。単回帰分析は、解析ソフトウェアとしてR ver. 3.3.1を用いた。

4. 結果と考察

4.1.脱窒能（DEA）

今回測定したサンプルにおいて、総DEA、完全DEA、不完全DEAの値はそれぞれ、59～7811、13～2541、46～6252 ng N₂O-N kg⁻¹ soil h⁻¹の範囲であった。これら三種のDEAはそれぞれ相互に正の相関を示していた（p<0.01）。すなわち、総DEAが高い地点においてはNO₃⁻除去能力が高いが、それと同時にN₂O発生量も高く、地球温暖化を進行させるリスクが高いと考えられる。しかし、不完全DEAと総DEAの比（N₂O/N₂O+N₂）は、総DEAの増加に伴い変化しない、または減少していた。さらに、不完全DEAと完全DEAの比（N₂O/N₂）においては、より顕著にこの傾向が見受けられた。これらの結果はNO₃⁻除去能力の増加率がN₂O発生量の増加率を上回ることを示唆している。

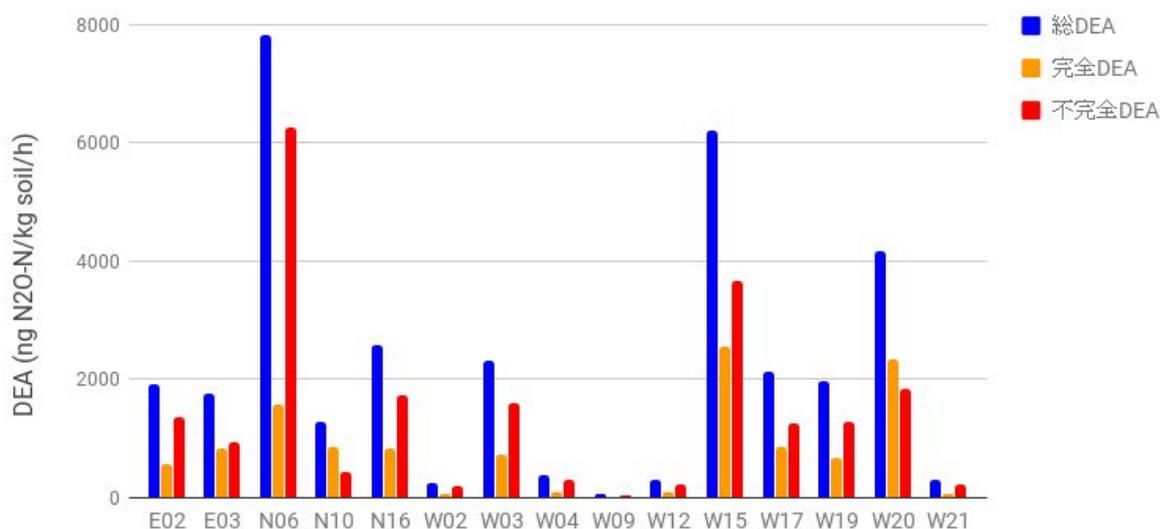


図2：各サンプリング地ごとの総DEA、完全DEA、不完全DEA

4.2.脱窒能（DEA）と環境要因（土地利用および土壌物理化学性）

今回の調査においては、土壌水分量と有機物含量がDEAを制御する主要因であった。すなわち、三種のDEAは採取時の土壌水分量、土壌有機物量（総炭素量および総窒素量）と正の相関を、土壌密度と負の相関を示していた（表1）。この結果は過去の知見とも一致している（Groffman and Crawford, 2003）。このとき、土壌密度は土壌水分量、土壌有機物量とそれぞれ負の相関を示していた。土壌水分量とDEAが相関を示していたのは、水分量が多いと土壌が還元状態になり、脱窒が起きやすい状態になるからであると考えられる（Schindlbacher *et al.*, 2004）。土壌有機物に含まれる硝酸は、脱窒を引き起こす微生物のエネルギー源となる。

総DEAと不完全DEAは、集水域中の土地利用における、農地と森林の割合に対して、それぞれ、負と正の相関関係にあった（表2）。農地割合と森林割合は、この地域ではトレードオフ（負）の関係にある、すなわち、森林を開発して農地として利用していたと考えられる。農地は、森林と比較して、有機物（枯葉などのリター）供給量は小さいと考えられる（Inwood *et al.*, 2007）。脱窒の基質としては、硝酸と有機炭素があげられるが、特に、今回の実験でも、硝酸よりも有機物の影響が強く見られたことから、流域からの炭素流入量も、別寒辺牛川沿岸の脱窒活性に影響を与えている要因かもしれない。農地で脱窒活性が低く、森林では高いという傾向は、厚岸地域において、土地利用による土壌の脱窒活性の変化を調査したHayakawa *et al.*（2005）の報告とも合致する。将来、この地域における農地の拡大が起これば、河川における炭素流入量変動を通して、河畔域の脱窒活性減少が起きる可能性がある。

表1：各種脱窒活性と各種土壌化学性・物理性とのピアソンの相関係数（マイナスは負の相関）。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ （両者とも太字で示した）。

	N ₂ /N ₂ O比	全窒素	全炭素	土壌密度	含水率	硝酸態窒素	アンモニウム 態窒素	pH(KCl)
総DEA	0.07	0.94**	0.93**	-0.71**	0.88**	-0.16	-0.08	-0.10
完全DEA	0.40	0.86**	0.84**	-0.72**	0.74**	-0.02	-0.09	0.08
不完全DEA	-0.10	0.88**	0.88**	-0.63*	0.87**	-0.21	-0.06	-0.16

表2：各種脱窒活性と集水域における土地利用割合とのピアソンの相関係数（マイナスは負の相関）。* $p < 0.05$ （太字で示した）。

	農地（耕地・放牧地）	森林	荒地・湿地
総DEA	-0.52*	0.49	0.37
完全DEA	-0.30	0.24	0.39
不完全DEA	-0.58*	0.56*	0.32

4.3.脱窒能（DEA）と土壌微生物

各土壌サンプルに含まれる微生物群集を科レベルで比較したところ、DEAが高かった2地点（N6、W15）においては、3種の特徴的な微生物（*Anaerolineaceae*、*Methanobacteriaceae*、*Nitrososphaeraceae*）が確認された。このうち*Methanobacteriaceae*は嫌気状態でメタンを生成する細菌であることから、これら2地点の土壌はサンプル採取時において嫌気状態であったことが示唆される（Madigan *et al.*, 2011）。また、*Nitrososphaeraceae*に関しては、アンモニアを酸化し亜硝酸を生成する細菌である（Madigan *et al.*, 2011）。亜硝酸はさらに酸化されると硝酸となり、脱窒の基質になることから、*Nitrososphaeraceae*は間接的に脱窒を促進していると考えられる。つまり、別寒辺牛川流域における土壌微生物群集構造は脱窒能力に起因して変化すると考えられる。さらに、これらの結果で得られた脱窒活性が高い地点を長期的にモニタリングし、季節変動や年次変動を追うことで、別寒辺牛川流域における環境浄化能力をより適切に示すことが可能である。



図3：科レベルでの土壌微生物コミュニティ構造。（いずれかのサンプルで2%以上占めたもののみ記載した。）

5. おわりに

本研究では、別寒辺牛川流域における、窒素流入の環境負荷に対する軽減能力を定量した。これらの調査は、同流域の保全方法のさらなる改善・提案や周辺地域開発のための環境影響評価の一助となるべく行われた。本研究では、別寒辺牛川流域に棲む微生物群集を初めて明らかにした。また、脱窒活性の高い地点において、微生物群集構造が類似しており、脱窒に寄与する特徴的な微生物が見られた。脱窒能力の正確な把握は、農地等からの別寒辺牛川流域への窒素流入による環境負荷を定量的に調べることに繋がると示唆された。この成果は、別寒辺牛川流域を保全していくためには、どの程度の窒素流入量が限界であるのか、という問いの答えの一助となるだろう。また、本研究では、夏季にサンプリングを行ったが、

春の雪解け時期等では土壌から多量の窒素放出があるとされている。したがって、より長期的なモニタリングが必要であるだろう。

6. 謝辞

研究の実施にあたり、厚岸水鳥観察館の澁谷辰生氏に大変お世話になりました。この場をお借りして感謝申し上げます。また、サンプルの採取から解析まで力を貸してくれた、環境生命地球化学研究室一同にも感謝の意を表します。

7. 引用文献

- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). "Fifth Assessment Report: Climate Change 2013, WG1, Chapter 8" (2013) 714.
- Groffman, P. M., M. K. Crawford. "Denitrification Potential in Urban Riparian Zones." *Journal of Environmental Quality* 32 (2003): p1144–1149.
- Hayakawa, A., M. Shimizu, K. P. Woli, K. Kuramochi, R. Hatano. "Evaluating Stream Water Quality through Land Use Analysis in Two Grassland Catchments." *Journal of Environmental Quality* 35 (2006): p617–627.
- Inwood, S. E., J. L. Tank, M. J. Bernot. "Factors Controlling Sediment Denitrification in Midwestern Streams of Varying Land Use." *Microbial Ecology* 53 (2007): p247–58.
- Jin, T., M. Shimizu, S. Marutani, A. R. Desyatkin, N. Iizuka, H. Hata, R. Hatano. "Effect of Chemical Fertilizer and Manure Application on N₂O Emission from Reed Canary Grassland in Hokkaido, Japan." *Soil Science & Plant Nutrition* 56 (2010): p53–65.
- Madigan, M., J. Martinko, D. Stahl, D. Clark. *Brock Biology of Microorganisms Thirteenth Edition*. Pearson Education (2011): p70, 510
- Schindlbacher, A., S. Zechmeister-Boltenstern, K. Butterbach-Bahl. "Effects of Soil Moisture and Temperature on NO, NO₂, and N₂O Emissions from European Forest Soils." *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 109 (2004): D17302.
- Toda, M., Y. Uchida. "Long-Term Use of Green Manure Legume and Chemical Fertiliser Affect Soil Bacterial Community Structures but Not the Rate of Soil Nitrate Decrease When Excess Carbon and Nitrogen Are Applied." *Soil Research* 55 (2017): p524–533.