

ノ ー ト

カラムによる脱窒過程 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$
分別係数の測定*川西琢也**・木方展治***
尾崎保夫***・米山忠克***キーワード 脱窒, 同位体分別, ^{15}N

1. はじめに

近年、農地一とくに畑地一が窒素の面的発生源である可能性が指摘されており、窒素の利用効率を高める合理的施肥法の検討など、農地における総合的な窒素管理技術の確立が環境保全の観点からも重要な課題となっている。

この一端として、農地下層土における脱窒量を把握する必要があるが、圃場におけるマス・バランスよりこれを推算する方法は、労力とコストを要し、多くの圃場におけるデータの収集には不適當である。また、土壤の脱窒速度は、単一圃場内でも部分により大きく異なっており^{4,8)}、圃場の一部における脱窒速度測定により全体を代表させるのには無理がある。

一方、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 (fractionation) が生じることが知られている⁵⁾。この現象を利用して、土壤溶液中あるいは地下水中の硝酸態窒素の ^{15}N 自然存在比を測定することにより、比較的容易に脱窒量を推算できると考えられる。例として MARIOTTI らの地下水における検討⁷⁾があるが、室内規模の実験結果と地下水における測定結果とは分別係数 (fractionation factor, 2章に後述) が異なること等が指摘されており、実用的な定量法を確立するには、検討すべき課題が多い。

Takuya KAWANISHI, Nobuharu KIHOU, Yasuo OZAKI and Tadakatsu YONEYAMA: Measurement of Denitrification Fractionation Factor by Using Column Apparatus

* 本研究は科学技術庁振興調整費による重点基礎研究「 ^{15}N 自然存在比を利用した作物生産系の窒素動態解析手法の開発」によって行われた。

** 金沢大学工学部 (920 金沢市小立野 2-40-20)

*** 農業研究センター (305 つくば市緑音台 3-1-1)

1990年10月20日受理

日本土壤肥料学雑誌 第62巻 第4号 p.424~426(1991)

著者らは、この $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ の分別を圃場における脱窒量の定量に応用することを目指して研究をすすめているが、その一環として、カラムを用いて分別係数を測定する手法を開発し、それにより種々の条件下における分別係数を、回分法よりも比較的容易に測定することができることがわかったので、その結果を報告する。

2. 実験および解析の方法

1) 実験装置および方法

第1図に実験装置の概略を示す。土壌をカラムに充填し、培養液をローラーポンプで上向飽和流で連続的に供給し、流出液を捕集した。培養液は蒸留水に硝酸カリウムとグルコースおよび硝化抑制剤として AM (2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン) を加えたものである。用いた土壌の量、カラムの大きさ、培養液の組成等の実験条件を第1表に示す。土壌は長野県中信農業試験場内の圃場より採取した表層腐植質黒ボク土で、窒素、炭素、腐植をそれぞれ 0.38, 3.7, 6.3% 含み、風乾後、実験に供した。

流出液の経時的フラクションを採り、その一部を化学分析に、一部を濃縮して質量分析に供した。硝酸態窒素は、Technicon 社製オートアナライザーを用いて、ヒドラジン還元法²⁾で測定した。質量分析用試料は流出液の 200 ml から 400 ml を採取し、50 ml 以下に濃縮、飽和水酸化ナトリウム溶液を 10 ml 加え、2~3日放置してアンモニア態窒素分を揮散除去した後、デバルダ合金を加えて蒸留し、0.1 N 硫酸上に捕集、ブロムフェノールブルーを用いて 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液で滴定後、濃硫酸を 1, 2 滴滴下し酸性にしたうえで 2 ml 程度まで濃縮して調製した。質量分析には Finnigan 社製 MAT-251 を用いた⁹⁾。

2) 分別係数の計算方法

^{15}N の存在比 R と、存在比の変動を表すのによく用いられる指標 $\delta^{15}\text{N}$ を以下のように定義する。

$$R = \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \approx \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}} \quad (1)$$

$$\delta^{15}\text{N} = \left(\frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000 (\text{‰}) \quad (2)$$

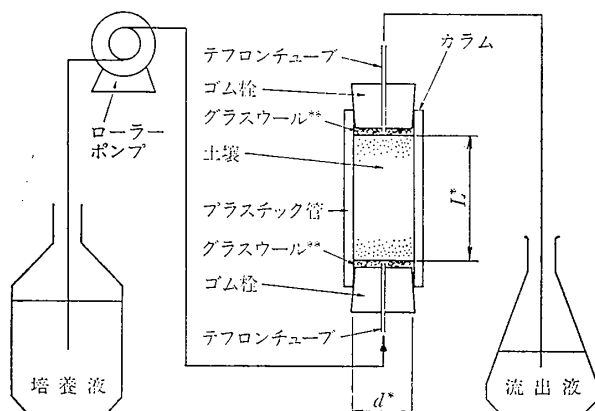
ここに、 R_{standard} は大気中の窒素における値である。脱窒反応における分別係数は、(3) 式のように定義される。

$$\alpha_{p/s} = \frac{d^{15}\text{N}_p/d^{14}\text{N}_p}{^{15}\text{N}_s/^{14}\text{N}_s} \quad (3)$$

$d^{15}\text{N}_p = -d^{15}\text{N}_p$, $d^{14}\text{N}_p = -d^{14}\text{N}_s$ であるから、

$$\alpha_{p/s} = \frac{d^{15}\text{N}_s/^{15}\text{N}_s}{d^{14}\text{N}_s/^{14}\text{N}_s} \quad (4)$$

添字 p は生成物を、s は基質を示す。



第1図 実験装置

* L, d の値は第1表に記す。

** ガラスウール層厚さは 2~4 mm である。

第1表 実験条件

項目	単位	run-1	run-2
カラム内径 (第1図の d)	cm	2.8	1.3
土壌層高さ (第1図の L)	cm	4.5	3.2
土壌量 (70°C 風乾土壌重量)	g	20.1	3.1
培養液流量	ml/d	434	384
培養液硝酸態窒素濃度	mg/l	25	5
培養液グルコース濃度	mg/l	75	30
培養液 AM*(硝化抑制剤) 濃度	mg/l	20	20
温度	°C	25	25

* 2-amino-4-chloro-6-methyl-pyrimidine.

また、 $\alpha_{p/s}$ は 1 に近い値になるので、その変動を議論する場合には、これと 1 との差を千分率で表した次の表記がよく用いられる。

$$\epsilon_{p/s} = (\alpha_{p/s} - 1) \times 1000 \quad (5)$$

$\epsilon_{p/s}$ は per mil enrichment factor と呼ばれる。脱窒過程で $\alpha_{p/s}$ は 1 より小さく、 $\epsilon_{p/s}$ は負の値となり、その絶対値が大きいくほど分別効果が大いことになる。

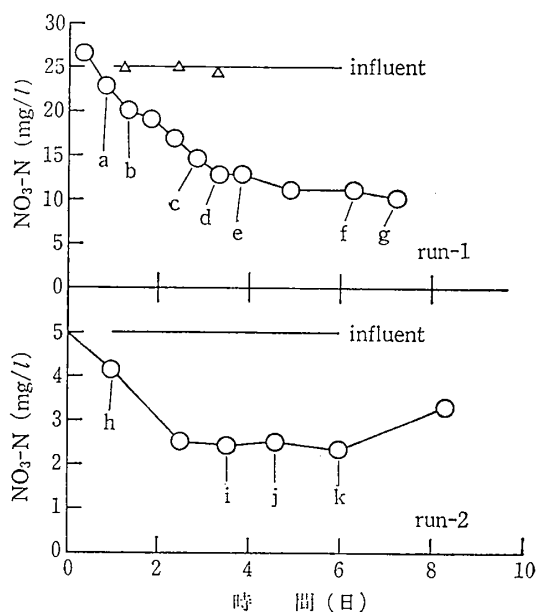
ここでの実験条件では、カラムの大きさに対して流量が大きく、カラム内の混合の効果は無視しうる。したがって、データの取扱いは回分法でのそれと同様でよい。すなわち、(4) 式を積分して、(6) 式を得る。

$$\alpha_{p/s} \ln \left[\frac{^{14}N_s}{^{14}N_{s,0}} \right] = \ln \left[\frac{^{15}N_s}{^{15}N_{s,0}} \right] \quad (6)$$

ここで、 $N_{s,0}$ は初期の量 (モル)、すなわち流入液中の窒素量、 N_s は反応しなかった分、すなわち流出液中の窒素量である。

MARIOTTI ら⁶⁾ にならって、初期の窒素量に対する未反応窒素量の割合を (7) 式のように f と定義すると、 $\alpha_{p/s}$, f , R について (8) 式が成立する。

$$f = \frac{N_s}{N_{s,0}} = \frac{^{14}N_s + ^{15}N_s}{^{14}N_{s,0} + ^{15}N_{s,0}} \approx \frac{^{14}N_s}{^{14}N_{s,0}} \quad (7)$$



第2図 流出液中の硝酸態窒素濃度の経時変化
 図中△印は流入濃度を確認したデータである。
 図中 a~k は、¹⁵N/¹⁴N 比の得られたサンプルを示し、第2表の記号に対応する。

第2表 脱窒進行度合 1-f と $\delta^{15}N$ の測定値

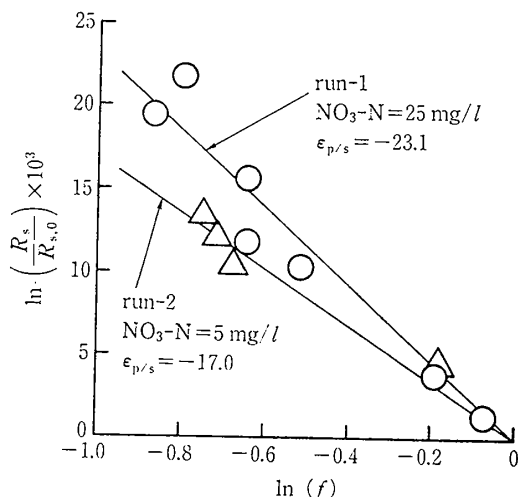
第2図と対応する記号	run-1		run-2	
	1-f	$\delta^{15}N$ (%)	第2図と対応する記号	1-f $\delta^{15}N$ (%)
a	0.069	1.3	h	0.168 4.6
b	0.179	3.8	i	0.511 12.2
c	0.401	10.4	j	0.491 10.6
d	0.475	11.9	k	0.527 13.4
e	0.476	15.8		
f	0.548	22.1		
g	0.579	19.6		

$$(\alpha_{p/s} - 1) \ln f = \ln \frac{R_s}{R_{s,0}} \quad (8)$$

ここで R_s , $R_{s,0}$ はそれぞれ流出液、流入液中の ¹⁵N の存在比である。流入液の ¹⁵N 自然存在比は大気中のそれとほぼ等しいので、 $R_s/R_{s,0}$ は $(\delta^{15}N \times 10^{-3} + 1)$ に相当し、この式により $\alpha_{p/s}$ を求めることができる。

3. 結果および考察

第2図に、流出液中の硝酸態窒素濃度の経時変化を示す。時間の経過とともにカラムの脱窒能が高まり、流出液中の硝酸態窒素濃度が減少した。¹⁵N の量は ¹⁴N の量に比べて著しく少ないので、(7) 式に示した f の値は、流出液硝酸態窒素濃度の流入液硝酸態窒素濃度に対する比としてよい。得られたサンプルの量による制限等により、第2図上のいくつかの点については ¹⁵N/¹⁴N 比の測定ができなかった。¹⁵N/¹⁴N 比が得られたサンプルに



第3図 $\ln(f)$ と $\ln(R_s/R_{s,0})$ との関係と $\epsilon_{p/s}$ 値

については、第2図上に、アルファベットの小さい文字 (a~k) を添えて示してある。

第2表に、脱窒の進行と $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 比との関係を、脱窒の進行度合 $1-f$ と、 $\delta^{15}\text{N}$ との関係の形に整理する。表中にあるアルファベットの小さい文字は、第2図のデータと対応している。多少のばらつきはあるが、脱窒が進行するほど、すなわち $1-f$ が大きくなるほど、 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 比は大きくなり、 $\delta^{15}\text{N}$ 値が大きくなった。

$\alpha_{p/s}$ あるいは $\epsilon_{p/s}$ の算出のため、(8)式に従って、第2表のデータを、 $\ln(f)$ と $\ln(R_s/R_{s,0})$ の関係にプロットしたものが第3図である。 $\alpha_{p/s}$ が一定値であれば、これらの点は直線上に乗り、その傾きは $1-\alpha_{p/s}$ (すなわち $\epsilon \times 0.001$) となる。データ数が少なく、ばらつきも大きいので、数値の詳細な検討はできないが、run-1, run-2 に対し図のような直線が引け、そこから算出された値は $\epsilon_{p/s}$ としてそれぞれ、 -23.1 および -17.0 であった。これらの値は、これまでに測定された、WELLMAN ら¹⁰⁾の -20 、DELWICHE ら³⁾の -17 、および CHIEN ら¹⁾の -19.1 等と近い値であった。また、本実験では低濃度の 5 mg/l において (run-2) 分別の効果はやや小さかったが、これが濃度の影響であるか誤差であるかについてはさらに検討を要するだろう。

データのばらつきの要因、硝酸態窒素初期濃度の差あるいは脱窒速度の差が分別係数に及ぼす影響については、今後詳細な検討が必要となるだろうが、今回の結果より、カラム法によって分別係数が測定できるとしてよいと考えられる。

4. まとめ

土壌中での脱窒過程における分別係数をカラムを用いて測定する手法を開発した。本法は、種々の条件下における分別係数を回分法に比べて容易に測定できる利点を持っている。

得られた分別係数は、これまでに報告された数少ない測定例に近い値であった。今後、希釈、拡散の影響など、圃場における定量上の問題点の検討とともに、種々の条件下における分別係数の測定を進め、データの蓄積を図る必要がある。

文 献

- 1) CHIEN, S. H., SHEARER, G. and KOHL, D. H.: The Nitrogen isotope effect associated with nitrate and nitrite loss from waterlogged soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 41, 63~69 (1977)
- 2) CLESCERI, L. S., GREENBERG, A. E. and TRUSSEL, R. R.: Standard methods for the examination of water and wastewater, 17th ed., p.140~141, American Public Health Association, Washington, D. C. (1989)
- 3) DELWICHE, C. C. and STEYN, P. L.: Nitrogen isotope fractionation in soils and microbial reactions. *Environ. Sci. Technol.*, 4, 929~935 (1970)
- 4) FOLORUNSO, O. A. and ROLSTON, D. E.: Spatial and spectral relationships between field-measured denitrification gas fluxes and soil properties. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 49, 1087~1093 (1985)
- 5) HUBNER, H.: Isotope effects of nitrogen in the soil and biosphere; in Handbook of environmental isotope geochemistry, Vol.2, ed. P. FRITZ and J. Ch. FONTES, p. 361~425, Elsevier, Amsterdam (1980)
- 6) MARIOTTI, A., GERMON, J. C., HUBERT, P., KAISER, P., LETOLLE, R., TARDIEUX, A. and TARDIEUX, P.: Experimental determination of nitrogen kinetic isotope fractionation: Some principles; Illustration for the denitrification and nitrification processes. *Plant Soil*, 62, 413~430 (1981)
- 7) MARIOTTI, A., LANDREAU, A. and SIMON, B.: ^{15}N isotope biogeochemistry and natural denitrification process in groundwater: Application to the chalk aquifer of northern France. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 52, 1869~1878 (1988)
- 8) PARKIN, T. B.: Soil microsites as a source of denitrification variability. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 51, 1194~1199 (1987)
- 9) YONEYAMA, T.: N_2 fixation and natural ^{15}N abundance of leguminous plants and *Azolla*. *Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resour.*, 4, 59~87 (1987)
- 10) WELLMAN, R. P. and COOK, F. D.: Nitrogen-15: Microbiological alteration of abundance. *Science*, 161, 269~270 (1968)