

高窒素負荷環境にある
中国亜熱帯林土壌における
窒素フローと硝化微生物群集

東京大学大学院農学生命科学研究科
応用生命化学専攻

平成20年度博士課程 磯部 一夫
指導教員名 妹尾 啓史

目次

第1章 序論 -----	1
1.1 緒言	1
1.2 窒素循環	1
1.2.1 地球規模の窒素循環	2
1.2.2 森林の窒素循環とキーププロセスとしての硝化	3
1.2.3 窒素制限から窒素飽和への進行	4
1.3 硝化微生物群集	6
1.3.1 アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌	7
1.3.2 アンモニア酸化アーキア	9
1.3.3 従属栄養硝化微生物	11
1.4 森林の窒素循環と微生物群集とのリンク	12
1.5 研究課題と本研究の目的	14
1.6 調査地の概要	16
1.6.1 ロケーション	16
1.6.2 森林と土壌	16
1.6.3 長期にわたる土壌の酸性化	17
1.6.4 窒素動態	17
1.6.5 窒素添加試験区	19
1.6.6 土壌採取	19
1.7 本論文の内容	20
第2章 GC/MS を用いた微生物の代謝ガスの同時定量法の確立 -----	36
2.1 緒言	36
2.2 方法	38
2.2.1 装置と測定条件	38
2.2.2 標準ガスサンプルの作成	39
2.2.3 本手法の有用性の検証: 脱窒細菌の培養におけるガス代謝のモニタリング	40
2.3 結果と考察	41
2.3.1 9種のガスの同時検出	41
2.3.2 検出限界と分析のダイナミックレンジ	42
2.3.3 バックグラウンドガスがガス検出感度に及ぼす影響	44
2.3.4 脱窒細菌のガス代謝のモニタリング	45
2.4 結論	46
第3章 GC/MS を用いた土壌中の窒素化合物の ^{15}N / ^{14}N の測定法の確立 -----	55

3.1	緒言	55
3.2	方法	58
3.2.1	濃度測定および同位体比 ($^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$) 測定用の標準溶液の作成	59
3.2.2	diffusion 法による NH_4^+ の回収	60
3.2.3	NH_4^+ の NO_3^- への過硫酸酸化	60
3.2.4	TDN の NO_3^- への過硫酸酸化	61
3.2.5	脱窒菌法による NO_3^- の N_2O への還元	61
3.2.6	アザイド法による NO_2^- の N_2O への還元	62
3.2.7	GCMS による N_2O の濃度と ^{15}N atom% の測定	63
3.3	結果	64
3.3.1	N_2O の分離と検出	64
3.3.2	2 M KCl 溶液中の NO_3^- 、TDN、 NH_4^+ の濃度および ^{15}N 分析	65
3.3.3	0.5 M K_2SO_4 溶液中の TDN の濃度および ^{15}N 分析	66
3.3.4	2 M KCl 溶液中の NO_2^- の ^{15}N 分析	66
3.4	考察	66
第4章	高窒素負荷環境にある中国亜熱帯林土壌における窒素フローの解析 -----	76
4.1	緒言	76
4.2	方法	77
4.2.1	供試土壌	77
4.2.2	NH_4^+ と NO_3^- 濃度の測定	78
4.2.3	窒素フローの総速度測定	78
4.2.3.1	土壌培養および ^{15}N 測定	78
4.2.3.2	総生成・消費速度の算出	79
4.2.3.3	総不動化速度の算出	80
4.2.4	統計解析	81
4.3	結果	81
4.4	考察	82
4.4.1	森林土壌中の硝酸生成	82
4.4.2	窒素の不動化プロセス	83
4.4.3	森林の窒素飽和程度	84
4.4.4	森林の総硝化速度	84
第5章	窒素流入量の増大が土壌中の窒素フローに及ぼす影響 -----	92
5.1	緒言	92
5.2	方法	93
5.2.1	供試土壌	93

5.2.2	土壌の理化学性および微生物バイオマスの測定	94
5.2.3	窒素フローの総速度測定	94
5.2.4	統計解析	95
5.3	結果	96
5.3.1	土壌の理化学性と微生物バイオマス	96
5.3.2	土壌中の ^{15}N 動態	96
5.3.3	土壌中の窒素フロー速度	97
5.4	考察	99
5.4.1	森林間（コントロール区）での窒素フローの比較	99
5.4.2	窒素添加区およびコントロール区における窒素フローに比較	102
5.4.3	独立栄養硝化と従属栄養硝化	104
第6章 高負荷窒素環境にある中国亜熱帯林土壌における硝化微生物群集の解析		114
6.1	緒言	114
6.2	方法	115
6.2.1	供試土壌	115
6.2.2	DNA 抽出および RNA 抽出と cDNA 合成	116
6.2.3	AOA、AOB、NOB 群集の PCR 検出	117
6.2.4	AOA、AOB、NOB 群集のクローンライブラリー解析	118
6.2.5	amoA コピー数の定量	119
6.2.6	MPN 法による AOB 群集の検出と定量	119
6.3	結果	120
6.3.1	AOB 群集	120
6.3.2	AOA 群集	121
6.3.2	NOB 群集	122
6.4	考察	123
6.4.1	DHSBR および HSD において硝化を担っている微生物群集	123
6.4.2	DHSBR の AOA の系統	124
6.4.3	AOA と AOB の生態	125
第7章 総合考察		139
参考文献		149
謝辞		172

略語

NH_4^+ : アンモニウムイオン (ammonium)

NO_3^- : 硝酸イオン (nitrate)

NO_2^- : 亜硝酸イオン (nitrite)

DON : 溶存有機態窒素 (dissolved organic nitrogen)

DIN : 溶存無機態窒素 (dissolved inorganic nitrogen)

N_2O : 亜酸化窒素、一酸化二窒素 (nitrous oxide)

NO : 一酸化窒素 (nitric oxide)

NO_x : 窒素酸化物 (nitrogen oxide)

SO_x : 硫黄酸化物 (sulfur oxide)

Org-N : 有機態窒素 (organic nitrogen)

SMB-N : 土壌微生物バイオマス窒素 (soil microbial biomass-nitrogen)

C_2H_2 : アセチレン (acetylene)

^{15}N : 窒素安定同位体 (nitrogen-15, stable isotope of nitrogen)

$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$: 窒素安定同位体比 (isotope ratio of nitrogen)

^{15}N atom% : atomic percent of ^{15}N

m/z : 質量電荷比 (mass-to-charge ratio)

AOB : アンモニア酸化細菌 (ammonia-oxidizing bacteria)

AOA : アンモニア酸化アーキア (ammonia-oxidizing archaea)

NOB : 亜硝酸酸化細菌 (nitrite-oxidizing bacteria)

amoA : アンモニアモノオキシゲナーゼ遺伝子 (ammonia monooxygenase gene)

hao : ヒドロキシルアミン酸化酵素遺伝子 (hydroxylamine oxidase gene)

nirA : 亜硝酸酸化還元酵素遺伝子 (nitrite oxidoreductase gene)

16S rRNA : 16S リボソーム RNA (16S ribosomal RNA)

PCR : polymerase chain reaction

MPN : 再確値 (most probable number)

DHSBR : Dinghushan Biosphere Reserve

HSD : Heishiding Nature Reserve

第 1 章 序論

1.1 緒言

森林生態系において、窒素循環はどのように制御されているのか。また、環境の変化は窒素循環にどのような影響を与えるのか。これらは森林生態学の一貫した主要な研究テーマであり続けている。さらに近年、窒素循環の地球規模的な変化にともなって各地域の森林生態系における窒素循環も変化していることが相次いで報告され、これらの研究の重要性は一層大きくなっている。これまで、森林の窒素循環に関する研究は様々な環境要因（気候、植生、土壌の理化学性など）との関連で行われてきた。しかし、その多くは、窒素循環に大きく関わるあるいはそのプロセスを担っているはずの微生物群集の情報をほとんど含んでこなかった。その一方で、近年の分子生態学的手法の発展によって、我々は微生物群集の生態について以前より遥かに多くの情報を得ることができるようになってきた。窒素循環のプロセスや速度とそれを担う微生物群集の情報をリンクする事で、先に述べた研究テーマについてより良く理解できるはずである。

本章では、まず、森林生態系における窒素循環とその変化、硝化を担う微生物群集の既存の研究のレビューを行い、そして、本研究の目的および調査地の概要を述べ、本論文の内容について述べる。

1.2 窒素循環

Fritz Haber が N_2 と H_2 から NH_3 を合成する方法を発見して以来 100 年もの間に、人類は急速な食料増産と人口増加を成し遂げた (Erisman et al. 2008)。しかし、その反面、大量の NH_3 が合成され、環境中に拡散することで窒素循環は世界的に大きく変化しつつある (Galloway et al. 2008)。その結果、地球温暖化や窒素汚染・富栄養化といった地球規模的あるいは地域的な新たな環境問題が起きている。このセクションでは窒素循環の変化とそれが森林生態系におよぼす影響について概説する。

1.2.1 地球規模の窒素循環

地球上で窒素の大部分は窒素分子 (N_2) として存在し、大気の 79% を占めている。しかし N_2 の三重結合を切るためには大きなエネルギーが必要であるため、 N_2 はニトロゲナーゼをもつ一部の細菌など限られた生物しか利用できない。その他の多くの生物は、窒素固定によって生成された還元態窒素や雷によって生じる窒素酸化物といった「反応性の高い」窒素しか利用できない。従って人為的な影響が加わる以前、窒素循環速度は微生物による窒素固定速度によって決定され、生態系は窒素制限下にあったと考えられる。

世界規模の窒素循環は Haber-Bosch 法の実現によって大きく変化した。現在、Haber-Bosch 法によって作られる「反応性の高い」窒素の量は生物的窒素固定や化石燃料の燃焼によって得られる量を遥かに超えている (Figure 1-1)。そして、その 80% は NH_4NO_3 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 、尿素などの肥料の製造に用いられ、それが土壤に投入されている (Erisman et al. 2007; Galloway et al. 2008)。現在、世界で使用されている窒素肥料のうち約 60% をアジアが、さらにその半分以上を中国が占めている (新藤 2004)。

肥料のために合成される窒素化合物のうち 10-30% 程度は植物などの最終生産物の構成要素となるが、残りのほとんどは、アンモニア (NH_3) や一酸化窒素 (NO)、亜酸化窒素 (N_2O) として大気に揮散し、また硝酸イオン (NO_3^-) として土壤から溶脱している (Smil 2001)。化石燃料の燃焼に伴って排出される NO の増大と並行して、農業に伴って揮散する NH_3 の量は、20 世紀の間にそれ以前に比べて 3-5 倍にまで膨れ上がっており、世界の NH_3 や NO の排出はそのほとんどが陸域起源となっている (Dentener et al. 2006)。大気中で NH_3 は NH_4^+ に、 NO は窒素酸化物 (NO_x) になり、陸域や海域へと降下する (Figure 1-2)。

化学肥料や化石燃料の使用量の増加は、結果的に、大気から陸上生態系への窒素沈着量を増大させている。大気からの窒素沈着量はすでに産業革命以前の 3 から 10 倍程度

に増加している (Galloway et al. 1995)。NO や NH₃ の排出は多くの地域で 21 世紀の間もさらに増大すると予想され (Galloway et al. 2004; Dentener et al. 2006)、その結果、気候変動に関する政府間パネル (Intergovernmental Panel on Climate Change: IPCC) の予想 (A2 emissions シナリオ) によれば、世界の窒素沈着量は 2030 年までに 2000 年と比較して 50 から 100%増加すると試算されている (Figure 1-3、Reay et al. 2008)。特に東アジアでは、著しい経済発展と人口増加が予想される事から、その増加傾向がもっとも顕著になっている。

1.2.2 森林の窒素循環とキーププロセスとしての硝化反応

窒素は生物にとって必須な元素であり、様々な化学形態をとりながら森林生態系内を循環している。森林土壌中に内在する窒素化合物は、その 90%以上が土壌有機物中に固定された有機体窒素であり、それ以外のほとんどは植物体に含まれるバイオマス窒素である。それと比較して、土壌微生物や植物が吸収利用できるアンモニウム (NH₄⁺) や硝酸 (NO₃⁻) といった無機態窒素は全体の 1%にも満たない (Bormann et al. 1977)。そのため多くの森林生態系の一次生産力は、様々な養分元素の中でも窒素の供給によって制限されている。さらにカチオンである NH₄⁺は通常負に帯電している森林土壌に吸着・保持されるのに対し、アニオンである NO₃⁻はほとんど吸着・保持されず溶脱されやすい。こうしたことから、無機態窒素の動態の把握は森林生態系全体の窒素循環を理解する上で極めて重要であると言える。

NH₄⁺や NO₃⁻を中心として描いた森林の窒素循環を模式的に Figure 1-4 に示す。主な可給態窒素は NH₄⁺や NO₃⁻である。また溶存有機態窒素 (dissolved organic nitrogen: DON) の可給性が、特に窒素制限下の森林で注目されつつある (Neff et al. 2003; Schimel and Bennet 2004)。森林の窒素循環における主な微生物プロセスは、無機化 (有機物分解とアンモニア生成)、硝化、微生物同化、脱窒である。主な窒素不動化 (保持) プロセスとして、植物による吸収、微生物同化、土壌への物理化学的吸着が考えられ、流出プロ

セスとして、 NO_3^- 溶脱や脱窒が考えられる。

本研究で着目する硝化は、窒素の循環や流出に大きく関わるキーとなる微生物プロセスである。基質 (NH_3) と生成物 (NO_3^-) がともに植物や土壌微生物が吸収・利用する可給態窒素であり、そのバランスを決める反応であると同時に、 NO_3^- 溶脱や脱窒といった窒素流出プロセスへとつながる反応である。 NO_3^- 溶脱は地下水や溪流の水質を低下させる。脱窒の過程で生成する NO および N_2O はオゾン層破壊ガスおよび温室効果ガスである。 NO や N_2O は硝化の過程でも生成する。また硝化は土壌の酸性化を促進する (Van Miegroet and Cole 1984)。さらに硝化速度や土壌からの NO_3^- の溶脱量の増大は、次のセクションで述べる森林生態系の窒素飽和の始まりの指標と考えられている。

1.2.3 窒素制限から窒素飽和への進行

従来は人為的な窒素の流入が非常に少ないと考えられていた森林生態系においても、近年、窒素の過剰な流入が世界規模で相次いで報告されている。窒素流入量の増大に対する森林生態系の応答については、その影響が最も早く現れたヨーロッパや北米を中心に、1980年代よりさかんに研究されてきた (Aber et al. 1989, 1998, 2003; Gundersen et al. 1998)。その結果から Aber et al. (1998) は「窒素飽和モデル」と呼ばれる概念モデルを提唱した。窒素飽和モデルの中で、Aber et al. (1998) は、以下に示す4つのステージを経て、森林生態系の窒素循環が、系外への流出が抑制されている閉鎖系から、余剰の窒素が系外へと放出される開放系へと段階的に変化するというモデルを提案した (Figure 1-5) :

(ステージ0) 外部からの窒素負荷は小さく、生態系は窒素制限下にある。 NH_4^+ 、 NO_3^- はそのほとんどが植物や土壌微生物に利用される。そのため正味の NO_3^- 生成速度 (純硝化速度：後述) は小さく、 NO_3^- の溶脱も少ない。また N_2O 発生はほとんど確認されない。

(ステージ1) 増加する窒素流入量に伴って、生態系は徐々に窒素制限下になくなる。

しかしむしろ、流入した窒素は植物の吸収や土壌有機物プールへの吸収によって窒素循環系に入り、循環速度が増加し、森林の成長が促進される。

（ステージ2）土壌中の窒素が生物の必要とする量を超え始め、森林は窒素飽和状態となる。 NH_4^+ として土壌に蓄積されている間は生態系に大きな影響を与えないが、硝化活性が高まることで、 NO_3^- 溶脱と N_2O の発生が促進される。それに伴い土壌や溪流水の酸性化が促進される。窒素制限の温帯林においては、著しい NO_3^- 溶脱の始まりが窒素飽和の初期サインと考えられている（Dise and Wright 1995; McDonald et al. 2003）。

（ステージ3）モデルの最終段階であり、硝化活性が顕著に増大し、それに伴う NO_3^- 溶脱や NO 、 N_2O 発生が著しく増加する。酸性化が進行することで、土壌カチオンが枯渇し、毒性の強い Al_3^+ が溶出し始める（Likens et al. 1996; Gundersen and Rasmussen 1989; Bowman et al. 2008）。結果として、森林成長速度やバイオマスが減少し、森林生態系が窒素のソースとなる。すなわち大気からの流入量を超えて窒素が流出する。最終的に森林は減退する（Nihlgård 1985）。

この窒素制限から窒素飽和への進行はヨーロッパや北米の温帯林で見られた現象を良く説明している（Dise and Wright 1995; Tietema and Beier 1995; McDonald et al. 2003; Venterea et al. 2004）。しかし、これらの森林でさえも、どのようなスピードでステージ0からステージ3へと窒素飽和の程度が変化するのかはよくわかっていない（Galloway et al. 2003）。さらに増大する窒素流入に対して、必ずしも世界の全ての森林が同様の反応を示すわけではなく、気候（Matson et al. 2002）、植生（Magill et al. 2004）、土壌年代（Vitousek and Farrington 1997）、森林の利用形態の歴史（Fang et al. 2009）によって異なる。例えば、熱帯地域の多くの自然林では、窒素は必ずしも森林の生産性に対しての主要な制限要因になっているとはいえない（Hall and Matson 1999）。これらの森林では土壌が著しく風化しており、カルシウムやリンなどの供給量が元々少ないため、これらの元素がしばしば主な制限要因となっている（Vitousek 1984; Jordan 1985; Davidson et al. 2007）。従って、熱帯地域の多くの森林生態系では、温帯林とは窒素負荷に対する反応

が異なり、窒素飽和への進行が早いと予想されている (Tao and Fenn 2000; Chen and Mulder 2007; Fang et al. 2009)。

東アジアには熱帯、亜熱帯地域が広がり、急速な経済発展と相まって、上述 (セクション 1.2.1) のように大気からの著しい窒素沈着が確認され、今後も増加の一途を辿ると予測されている。しかし、これら地域での研究は依然限られているため、この地域の現在の窒素循環プロセスや窒素飽和の程度はほとんどわかっておらず、今後予想される大気からの窒素沈着量の増大にともなう森林生態系の変化については予測できない状況にある。そのためこれらの地域での研究の重要性が急速に高まっている (Hicks et al. 2008; Reay et al. 2008)。

以上のように、窒素流入量の増大が、結果的に硝化を活性化させ、 NO_3^- 溶脱や $\text{NO} \cdot$ 、 N_2O 発生を促進させる。またそれが窒素飽和現象の進行程度のサインとなっている。硝化は土壌微生物が担う反応プロセスであるために、硝化活性の増大は、それを担う微生物群集の変化と相まっている可能性が高い。

1.3 硝化微生物群集

硝化は、無機化や脱窒と比べて、系統的に比較的限られたグループの微生物によって担われている。硝化は従来、化学合成独立栄養性のアンモニア酸化細菌 (ammonia-oxidizing bacteria: AOB) と亜硝酸酸化細菌 (nitrite-oxidizing bacteria: NOB) による、アンモニア酸化 ($\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^-$) と亜硝酸酸化 ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$) の逐次反応と考えられてきた (Schmidt and Belser 1983) (Figure 1-6)。そのほか一部の従属栄養性の細菌やカビによる有機態窒素や NH_4^+ からの NO_2^- や NO_3^- の生成も知られている。さらに近年、クレンアーキオータに属する一部のアーキアがアンモニア酸化を担うことが発見された (Könneke et al. 2005)。このセクションでは、AOB、NOB、アンモニア酸化アーキア (ammonia-oxidizing archaea: AOA)、従属栄養性硝化微生物の系統や生理、土壌中での硝化活性について概説する。

1.3.1 アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌

AOB は 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統から、現在 3 つの属 *Nitrosomonas* (*Betaproteobacteria*) 、 *Nitrospira* (*Betaproteobacteria*) 、 *Nitrosococcus* (*Gammaproteobacteria*) に分類されている (Head et al. 1993) (Figure 1-7)。土壌中の AOB の存在量や多様性は、主に分類群に特異的な 16S rRNA 遺伝子の塩基配列または *amoA* の検出や解析を通して研究されてきた。*amoA* はアンモニア酸化の前段階のステップを担うアンモニアモノオキシゲナーゼ (AMO) のサブユニット A をコードしている遺伝子である (Figure 1-6)。16S rRNA 遺伝子は系統分類を、*amoA* は機能を、それぞれ反映している。また *amoA* の塩基配列に基づく系統は 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統分類と良く対応していることから、*amoA* を対象とする解析が AOB の解析のための主要なツールとなっている (Purkhold et al. 2003; Junier et al. 2010)。土壌では *Betaproteobacteria* の *Nitrosomonas* 属と *Nitrospira* 属が検出され、海洋では、それに加えて *Nitrosococcus* 属 (*Gammaproteobacteria*) もしばしば検出される。*Nitrosomonas* 属と *Nitrospira* 属は様々な環境から得られた 16S rRNA 遺伝子の配列に基づいて、9 クラスターに分類され (*Nitrospira*, clusters 0-4; *Nitrosomonas*, clusters 5-8) (Prosser 2007)、土壌では *Nitrospira* clusters 0, 2, 3, and 4 に属する AOB が優占している (Jiang and Bakken 1999; Bruns et al. 1999; Fierer et al. 2009)。NOB は細胞の形態や 16S rRNA 遺伝子の配列に基づいて、現在 4 つの属、 *Nitrobacter* (*Alphaproteobacteria*)、 *Nitrospina* (*Deltaproteobacteria*)、 *Nitrococcus* (*Gammaproteobacteria*)、 *Nitrospira* (class *Nitrospira*, phylum *Nitrospirae*) に分類されている (Teske et al. 1994) (Figure 1-7)。NOB については *Nitrobacter* と *Nitrospira* を中心に研究され、*Nitrobacter* については亜硝酸酸化還元酵素をコードする *nxrA* がマーカー遺伝子として用いられている (Figure 1-6)。しかし、アンモニア酸化が硝化の律速段階にあり、亜硝酸はほとんどの環境で蓄積しないこともあり (Kowalchuck and Stephen 2001)、土壌の硝化微生物の研究は主に AOB を中心に行

われ、NOB の土壌中での多様性や活性はほとんど知られていない (Freitag et al. 2005)。

近年、農耕地や草地土壌中の AOB、NOB 群集の生態と硝化活性との関連について重要な知見が提供されている。Okano et al. (2004) は硫酸アンモニウムを添加した農耕地土壌において、硝化ポテンシャルの増大とともに、土壌中の AOB の *amoA* 存在量が増加する事を示した。さらに土壌のアンモニア酸化の反応速度パラメーターが培養株の *Nitrosospira* のそれとほぼ一致していることを示した。Hawkes et al. (2005) は草地土壌において、総硝化速度 (gross nitrification rate) と AOB の *amoA* 存在量に相関がある事を見だし、外来植物の移入に伴う硝化速度の変化は土壌の AOB 群集の変化によって大部分が説明できる事を示した。Attard et al. (2010) は農耕地土壌において、*Nitrobacter* の *nxrA* 存在量と亜硝酸酸化ポテンシャルの間に正の相関がある一方で、*Nitrosospira* の 16S rRNA 遺伝子量との間に負の弱い相関があることを見だし、窒素の可給性が高い土壌では *Nitrobacter* が機能的に重要な NOB グループであることを示した。これらの結果は土壌の硝化速度が AOB や NOB の群集サイズ (population size) によって大きくコントロールされていることを示唆している。加えて、Webster et al. (2005) は合成羊尿を添加した農耕地土壌を用いたマイクロコズム実験にて、土壌中で硝酸が生成されるまでの期間は、土壌中に存在している AOB 群集の生理学的性質に依存する事を示した。この結果は、硝化の開始やその速度が AOB の群集サイズだけでなく、群集組成 (community composition) によっても大きくコントロールされていることを示唆している。

その一方で、農耕地土壌とは異なり、酸性森林土壌においては、AOB の生態や硝化への寄与はほとんどわかっていない。AOB は基質として NH_3 を利用する (Figure 1-6)。 NH_4^+ の pKa は高く ($\text{NH}_3 + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+$; pKa=9.25)、酸性土壌では NH_3 は NH_4^+ へとイオン化するため、 NH_3 の AOB への可給性 (供給量) は大きく低下 (減少) する。また、既知の AOB の培養株のほとんどは酸性条件 (pH < 6.5) では生育できない。実際に多くの酸性森林土壌で AOB は検出される (De Boer and Kowalchuk 2001; Burton and Prosser

2001; Laverman et al. 2001; Mintie et al. 2003; Nugroho et al. 2006) が、その存在量は中性土壌に比べて遥かに少ないことが報告されている (Laverman et al. 2005; Schmidt et al. 2007)。これらが、酸性森林土壌における AOB の生態や硝化への寄与が未解明である主要な原因である。

1.3.2 アンモニア酸化アーキア

アーキアは従来、高温環境などの極限環境に偏在していると考えられてきたが、近年のクローン解析から極限環境以外にも広く分布していることが明らかになった。さらにアーキアドメインの中の 4 つの界の 1 つであるクレンアーキオータが、森林、農耕地、草地などの土壌から検出され (Bintrim et al. 1997; Jurgens et al. 1997; Buckley et al. 1998)、さらに土壌由来の 43-kbp メタゲノムフラグメントの解析から、それらクレンアーキオータがアンモニア酸化能をもっている可能性が指摘された (Treusch et al. 2005)。すなわち、そのフラグメントにはクレンアーキオータに由来する 16S rRNA 遺伝子とともに細菌 (AOB) の *amoA* および *amoB* にわずかに類似する配列が含まれていた。またサルガッソ海におけるメタゲノム研究の結果からも、クレンアーキオータによる硝化の可能性が指摘された (Venter et al. 2004; Schleper et al. 2005)。最終的にシアトル水族館から中温性クレンアーキオータ、*Nitrosopumilus maritimus* SCM1 株が分離されたことでクレンアーキオータによる硝化が確認された (Könneke et al. 2005) (Figure 1-7)。*N. maritimus* SCM1 株は、 NH_3 を唯一のエネルギー源として化学合成独立栄養的に増殖し、 NH_3 を NO_2^- に酸化した。

さらに、クレンアーキオータの *amoA* の相同塩基配列がほとんどの陸域、水域から検出され、その存在量は、細菌 (AOB) の *amoA* よりも多く、場所によっては数桁多かった (Leininger et al. 2005; Francis et al. 2005; Beman et al. 2010)。それにより、これまで考えられてきた環境中での硝化のパラダイムは大きく変化した。

では、クレンアーキオータはその大きな存在量が示す通り、実際に硝化に大きく寄与

しているのであろうか。海洋でのいくつかの研究において、アンモニア酸化速度は、細菌の *amoA* 存在量よりアーキアの *amoA* 存在量あるいはクレンアーキオータの細胞数とはるかに良い相関があることが示された (Wuchter et al. 2006; Beman et al. 2008)。さらに AOA の唯一の単離株である、海洋環境から単離された *N. maritimus* SCM1 株の生理学的研究から、SCM1 は貧栄養の外洋でみられるような低い NH_3 濃度 (10 nM) に適応することが明らかとなった (Martens-Habbena et al. 2009)。これらの研究から、クレンアーキオータの一部が海洋の硝化に大きく寄与していると考えられている。

しかし、海域における状況とは異なり、土壌環境においてはクレンアーキオータが硝化に大きく寄与しているのかどうか、未だ不明確のままである。上述 (セクション 1.2.1) の通り、AOB の存在量や群集組成の動態と硝化速度には正の相関があり (Okano et al. 2004; Hawkes et al. 2005; Webster et al. 2005)、また AOB による硝化の反応速度パラメーターは培養株のそれとも良く一致した (Okano et al. 2004)。これらの結果は新たなアンモニア酸化微生物の存在を示唆していない。Jia and Conrad (2009) は農耕地土壌において、 NH_4^+ 添加にともなう硝化速度の変化は細菌の *amoA* 存在量の動態と対応し、アーキアのそれと対応しないことから、農耕地土壌では AOB が AOA よりもはるかに優占してアンモニア酸化を担っていると結論づけた。Di et al. (2009) も尿素を添加した土壌において、硝化速度と AOB の *amoA* 存在量との間に正の相関を見だし、AOA との間には見いだせなかったことから、同様の結論を示した。

しかし Offre et al. (2009) は、マイクロコズム実験で、硝化活性の高い農耕地土壌において AOA のみの増殖を確認した。さらにアセチレン (C_2H_2) の添加により AOA の増殖と硝化が同時に抑制されたことから、AOA が優占してアンモニア酸化を担っていると報告した。Chang et al. (2010) も農耕地土壌を用いたマイクロコズム実験で、AOA のアンモニア酸化活性を示した。しかし彼らのマイクロコズム実験で増殖やそのアンモニア活性が示唆された AOA は、系統的に海洋の AOA が多く含まれる group 1.1a に位置していた。多くの土壌では group 1.1b に位置するクレンアーキオータが検出されてお

り、土壌に豊富に存在する group 1.1b に位置するアーキアが、土壌のアンモニア酸化を本当に担っているかどうかは明らかでない。

1.3.3 従属栄養性硝化微生物

系統的に多岐にわたる従属栄養性の細菌やカビは、有機態・無機態の窒素化合物を酸化できるために、従属栄養性硝化のポテンシャルを持っている (Focht and Verstraete 1977)。独立栄養性硝化との重要な違いは、従属栄養性硝化は細胞の増殖に結びついていないことにある (Wood 1987; Killham 1990)。古くから、特に酸性森林土壌では従属栄養性硝化が重要だと考えられてきた。それは主に、酸性条件では AOB の硝化活性が阻害されると考えられてきたことによる (前述、Allison and Prosser 1991)。

いくつかの酸性森林土壌では、多かれ少なかれ従属栄養性硝化の存在が示されてきた (Schimel et al. 1984; Stroo et al. 1986; Pederson et al. 1999; Brierley and Wood 2001; Grenon et al. 2004; Jordan et al. 2005)。加えて、いくつかの研究では ^{15}N を利用した総硝化速度の測定と、 C_2H_2 などの独立栄養性硝化の阻害物質を併用して、総独立栄養性硝化速度と総従属栄養性硝化速度をそれぞれ定量している (Hart et al., 1997; Pederson et al. 1999; Grenon et al. 2004; Perakis et al. 2005; Islam et al. 2007; Kuroiwa et al. in review)。その結果、Hart et al. (1997)は酸性針葉樹林土壌において、硝化全体のうち 60%以上が従属栄養性硝化であると報告した。また Grenon et al. (2004)は伐採された森林の酸性土壌において、従属栄養性硝化はほぼ 100%に上ると報告した。しかし、その一方で、数多くの研究結果は、酸性森林土壌であっても従属栄養性硝化の寄与は大きくないことを示している (De Boer et al. 1989, 1992; Tietema et al. 1992; Pennington and Ellis 1993; Barraclough and Puri 1995; Rudebeck and Persson 1998; Islam et al. 2007; Kuroiwa et al. in review)。また従属栄養性微生物の単離株は AOB の 10^3 分の 1 あるいは 10^4 分の 1 以下の硝化活性しか示さず (Focht and Verstraete 1977)、ほとんどの単離株は酸性の培養条件では硝化活性を示さない (De Boer and Kowalchuk 2001)。これらの研究によると、従属栄養性硝化は酸性土

壤において必ずしも優占的なプロセスとはいえない。これらの相反する研究結果の説明として、後者の研究の土壌では、耐酸性あるいは好酸性の独立栄養性硝化微生物が存在し、硝化を担っていると考えられてきた (Hart et al. 1997)。事実、多くの酸性森林土壌において AOB の *amoA* 遺伝子が検出されており (De Boer and Kowalchuk 2001; Burton and Prosser 2001; Laverman et al. 2001; Mintie et al. 2003; Nugroho et al. 2006)、*Nitrosospira* clusters 2 および 4 に属する AOB には酸性耐性が強い一群が含まれている可能性が高い (Nugroho et al. 2005, 2006)。しかし、その存在量は少なく、それらの AOB のみによって酸性森林土壌のアムモニア酸化が担われているかはわかっていない (Laverman et al. 2005; Schmidt et al. 2007)。そのため、近年発見された AOA が、酸性土壌での硝化 (アムモニア酸化) に寄与するプレーヤーの新たな候補として考えられる。

1.4 森林の窒素循環と微生物群集とのリンク

このセクションでは、窒素循環メカニズムの理解に向けて、窒素循環プロセスと窒素循環に大きく関わるあるいはそのプロセスを担っている微生物群集とのリンクの重要性について、またそのリンクを解明するための課題について述べる。このリンクの模式図を Figure 1-8 に示す。

これまで、窒素循環メカニズムは様々な環境要因 (例えば気候、植生や、土壌 pH、炭素・窒素含量、水分含量などの土壌の物理化学的特性、関連する窒素フローの速度など) との関連から議論されてきた (Booth et al. 2005) (Figure 1-8A)。その一方で、窒素変換プロセスを担う微生物群集の情報はほとんど含まれてこなかった。その理由の一つとして、分子生態学的手法の発展以前には、微生物群集の生態と窒素変換プロセスをつなぐような *in situ* の微生物群集の研究が困難であったことがあげられる (Zak et al. 2006)。しかし、上述 (セクション 1.2) のように、現在では *in situ* の微生物群集に関する多くの情報を得る事ができ、その多くは農耕地土壌を対象としたものではあるが、窒素変換プロセスとそれを担う微生物群集の特性 (存在量、群集組成、活性) との関連を

科学的に記述する試みも行われつつある (Figure 1-8B)。従来の知見 (Figure 1-8A) に加え、環境要因の変化によって微生物群集がどのように改変し (Figure 1-8B)、またそれによって群集の生態系機能としての窒素循環プロセスがどう変化するのか (Figure 1-8C)、それらの情報を併せることで、森林生態系における窒素循環の全体像をより深く理解できることは明らかである (Schimel et al. 2005; Philippot and Hallin 2005; Zak et al. 2006)。

しかし、森林生態系における窒素循環プロセスと微生物群集の情報をリンクさせるためには、未だに高いハードルがある。その一つは窒素循環プロセスの把握である。それは、多くの森林生態系は窒素制限下にあるために、無機態窒素の動態が著しく、窒素循環速度が大きいことに由来する。森林土壌中の窒素の動態を理解するためには、まず窒素のフローとプールを分けて考える必要がある。フローは無機化や硝化などのプロセス (Figure 1-4の矢印) であり、プールは NH_4^+ や NO_3^- などの各窒素化合物の仮想的な集合 (Figure 1-4のボックス) である。一般的に森林生態系は、無機態窒素のプールのサイズは小さいが (前述1.2.2)、フローの速度は大きいという特徴をもつ (Bormann et al. 1997)。したがってプールとしてどれだけ存在しているかという情報だけでなく、どれだけのフローがあるのかといった情報を得ることが重要である。しかしフローの速度の測定はプールのサイズの測定に比べて一般的に難しい。土壌中のプールサイズは、例えば、土壌抽出液中の NH_4^+ や NO_3^- 濃度を測定する事で求められる。一方、フローの速度について硝化を例にとると、硝化速度とは単位時間当たりの NO_3^- 生成量である。それは、多くの場合、一定期間土壌をフィールドや実験室で培養し、培養前と培養後の NO_3^- 濃度の変化から算出される (見かけの硝化速度：純硝化速度)。しかし、 NO_3^- 濃度変化から算出した純硝化速度は、あくまで単位時間当たりの正味の NO_3^- 生成量であり、実際の NO_3^- 生成量 (真の硝化速度：総硝化速度) を表していない。なぜならば、硝化によって生成した NO_3^- は、同時に微生物同化や脱窒などのプロセスによって消費されるからである。つまり、純硝化速度は実際の硝化速度 (総硝化速度) に比べて小さい (Davidson et al. 1992)。

そのため、無機態窒素の動態が著しい森林土壌において窒素循環プロセスは、窒素フローの総速度にもとづいて解析する必要がある。

また、硝化微生物群集の機能は直接的には、 NO_3^- のプールサイズや純硝化速度ではなく、総硝化速度に反映されている。したがって、硝化微生物群集の特性（存在量、群集組成、活性）とその生態系機能としての硝化をリンクするためにも、総硝化速度の測定が不可欠である。

これまで、森林土壌中の総硝化速度や総無機化速度が窒素安定同位体 (^{15}N) を用いて測定されてきた。具体的には土壌に $^{15}\text{NH}_4^+$ や $^{15}\text{NO}_3^-$ を添加し、その NH_4^+ や NO_3^- の窒素安定同位体比 ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) と濃度の単位時間あたりの変化から総速度を算出してきた。しかし、従来行われてきた窒素化合物の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を測定する方法は、微生物を材料として生態学的・生理学的研究を行う研究者にとっては未だハードルが高い。分析行程が煩雑であること、高価な同位体比質量分析計 (isotope ratio mass spectrometry; IRMS) を用い、化学トラップ (chemical trap)、クライオフォーカスユニット (cryofocusing units) などの特殊な前処理が多くの場合必要とされることなどが原因である。そのため、総速度を測定するための簡便な手法の開発が必要である。

1.5 研究課題と本研究の目的

森林生態系において、窒素循環はどのように制御されているのか、また窒素負荷の増大は窒素循環にどのような影響を与えるのか、という観点から、増大する窒素負荷（セクション 1.1）、森林の窒素循環の変化（セクション 1.2）、硝化微生物群集（セクション 1.3）、窒素循環プロセスと微生物群集のリンクの重要性（セクション 1.4）について述べた。その中でいくつかの問題点を提示した。すなわち、

- (1) 窒素負荷の増大に伴う森林の窒素循環系の変化は世界的な問題である。それにも関わらず、今後最も窒素負荷が顕著になると予想される東アジアの熱帯・亜熱帯林における窒素循環プロセスや窒素飽和程度はほとんどわかっていない。

(2) 硝化微生物群集は土壌中の硝酸生成の主要なプレーヤーである。しかし酸性森林土壌において各微生物群集（AOB、AOA、従属栄養性微生物、NOB）がそれぞれの程度硝化を担っているのか、ほとんど明らかになっていない。

(3) 硝化菌群集の特性（存在量、群集組成、活性）とその生態系機能としての硝化をリンクするためには、窒素フローのプロセスや速度を定量的に測定する必要がある。しかし、そのための分析手法が微生物を材料として生態学的・生理学的研究を行う研究者にとっては容易ではない。

東アジアの熱帯・亜熱帯林における、 NO_3^- 生成プロセスの全体像や窒素飽和程度を明らかにし、今後予想される窒素負荷の増大にともなう窒素循環プロセスの変化を予測するためには、(1) 土壌における窒素フローの速度を算出し、その特徴を明らかにすること、(2) NO_3^- 生成を担っている硝化微生物群集を特定すると同時に、その硝化微生物群集の特性（存在量、群集組成および活性）と NO_3^- 生成速度との関係を明らかにすること、(3) 窒素流入量の増大にともなう窒素フローの変化を明らかにすることが必要である。上記の問題を解決してこれらを実行するために、本研究では以下の4つの目的を設定した。

(1) 土壌中の窒素フローのプロセスや速度を定量的に測定するための簡便な手法を確立する。

続いて、高窒素負荷を受けている中国南部に位置する酸性亜熱帯林土壌において、

(2) 土壌中の窒素フローの速度を定量的に算出し、窒素フローの特徴と窒素流入量の増大に対する窒素フローの変化を明らかにする。

(3) 硝化を担っている微生物群集を特定し、それら微生物群の NO_3^- 生成への寄与を定量的に明らかにする。

これらを通して、

(4) 亜熱帯林土壌中の NO_3^- 生成メカニズムの全体像を明らかにし、今後予想される窒素負荷の増大にともなう窒素循環プロセスの変化を予測する。

1.6 調査地の概要

本研究の調査地としては、窒素沈着量が今後、最も顕著になると予想される中国南部にある亜熱帯林を選んだ（セクション 1.2.1、Figure 1-3）。この調査地は中国科学院によって長年、利用・管理され、モニタリングデータの蓄積がある。また、環境要因が窒素循環や微生物群集に与える影響を評価するために、植生や林齢、また窒素流入量の異なる森林を含めた。

1.6.1 ロケーション

調査地はともに亜熱帯気候域の中国南部に位置する Dinghushan Biosphere Reserve (DHSBR) と Heishiding Nature Reserve (HSD) である (Figure 1-9)。DHSBR (112° 10' E and 23° 10' N) は広東省の中央部に位置する。大都市 Guangzhou (広州市) から約 90 km 北西に、比較的小さな都市 Zhaoqing (肇慶市：人口 33 万人) から約 20 km 北東に位置している。気候は季節的であり、年間雨量は 1927 mm、そのうち約 75% が 3 月から 8 月 (wet-warm season) に、わずか 6% が 12 月から 2 月 (dry-cool season) に降る (Huang and Fan, 1982)。平均湿度は 80%、平均気温は 21.0°C、月平均気温は、12.6°C から 28.0 °C である (Huang and Fan 1982)。一方、HSD (112° 00' E and 23° 30' N) は、広州市から約 160 km 北西に、肇慶市から約 70 km 北西に位置している。年間雨量は約 1800 mm である。年平均気温は 19.6°C であり、月平均気温は、10.6°C から 28.0°C である (Wang and Liu 1987)。

1.6.2 森林と土壌

DHSBR には常緑広葉樹林、松林、松-広葉樹混合林が存在する (Figure 1-9、1-10)。広葉樹林は極相林であり、近くの寺院によって 400 年以上保護されてきた (Wang et al. 1982)。広葉樹林の主要な樹種は *Castanopsis chinensis*、*Machilus chinensis*、*Schima superba*、

Cryptocarya chinensis および *Syzygium rehderianum* である。松林と松-広葉樹混合林はともに 1930 年代の伐採とその後の松のプランテーションに由来する。しかし、その後の人為的攪乱の歴史は異なっている (Wang et al. 1982)。混合林では原生の広葉樹林の移入によって、植生が大きく変化した (優占種は *Pinus massoniana*、*S. superba* および *C. chinensis*)、一方で、松林では 1990 年まで人為的攪乱 (主に低木層やリター層の収穫) が続いたため未だに *P. massoniana* が優占している。

一方、HSD には常緑広葉樹林があり、樹齢 200 年以下だと予想されている (Chan et al. 2002)。主要な樹種は *Castanopsis nigrescens*, *Castanopsis kawakamii*, *Cyclobalanopsis chungii*, *Ixonanthes chinensis*, *Castanopsis carlesii*, *P. massoniana*, *Castanopsis fabri*, *Altingia chinensis*, *Artocarpus styracifolius*, および *Xanthophyllum hainanense* である。

土壌はともにラテライト性赤色土、土壌区分は Ultisols (USDA soil taxonomy) または Acrisols (FAO soil classification) である。DHSBR は 砂岩が母材になっており、HSD は 花崗岩が母材になっている (Fang et al. 2010)。

1.6.3 長期にわたる土壌の酸性化

DHSBR では、長期間にわたって NO_x や硫黄酸化物 (SO_x) などの酸性酸化物の沈着を受けている。そのため年々、土壌の酸性化が進行している (Liu et al. 2010)。Figure 1-11 に DHSBR の各森林における、1980 年から 2005 年までの表層 0cm から 20cm の土壌の土壌 pH の変遷を示す。また土壌の酸性化の結果、土壌中は高濃度の可溶態アルミニウムが確認されている (広葉樹林、松林、混合林においてそれぞれ、423、337、312 mg-Al₃⁺ kg-soil⁻¹、Liu et al. 2010)。

1.6.4 窒素動態

DHSBR と HSD では大気からの窒素沈着量が大きく異なる。Table 1-1 に DHSBR と HSD の降雨由来の窒素沈着量を示す (Fang et al. 2010)。DHSBR は世界的に見ても、著

しい窒素負荷を受けている。HSD は窒素負荷が世界的に見て少ないわけではないが、DHSBR に比べて低く、中国南部の森林の中でも低いため (Fang et al. 2010)、本研究では窒素負荷の影響評価のための参照サイトとして加えた。続いて、DHSBR と HSD の広葉樹林内を流れる溪流水の pH と NO_3^- 濃度を Table 1-1 に示す。DHSBR の広葉樹林内の溪流水は、HSD の広葉樹林内の溪流水に比べて著しく酸性化しており、高い濃度の NO_3^- が確認されている。また DHSBR の広葉樹林内の溪流水、土壌、降雨に含まれる NO_3^- の窒素と酸素の自然安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$ 、 $\delta^{18}\text{O}$) を 3 年間にわたって解析した結果、溪流水中に含まれる NO_3^- のほとんどは、降雨中に含まれる NO_3^- に由来するのではなく、土壌中で硝化によって生成した NO_3^- に由来することが強く示唆されている (Figure 1-12) (Fang et al. in review)。

DHSBR の中でも植生および森林の年齢 (林齢) によって、窒素の保持能が異なる事が明らかになっている。Table 1-2 に DHSBR の広葉樹林、松林、混合林の表層 0cm から 20cm の土壌における窒素の流入量、流出量および保持量を示す (Fang et al. 2009)。各森林には同程度の窒素量が流入している。流入する窒素形態は Table 1-1 に示した通りであるが、水の移動に伴って流出する窒素形態はほとんどが NO_3^- である (Fang et al. 2009)。極相林 (成熟林) である広葉樹林では流入する以上に流出している。このことから、森林が窒素のソースになっており、窒素飽和モデル (Aber et al., 1998) の最終段階 (ステージ 3) にあると考えられている。一方、若い遷移過程にある松林および混合林からの窒素の溶脱量は少なく、土壌中に保持されるため、これらの森林はより前段階のステージにあると考えられる (Fang et al. 2009)。

またこのような森林間の窒素保持能の違い、窒素飽和程度の違いは林齢の観点からも説明されている (Fang et al. 2009)。一般的に、森林が成長するにつれて植物や土壌中に窒素が蓄積されていく (Vitousek and Reiners 1975; Pregitze and Euskirchen 2004; Davidson et al. 2007)。その結果、成熟林では窒素のプールサイズや窒素循環速度が大きくなり、窒素の可給性が高くなる。すなわち大気からの窒素流入量の増大に関わらず、窒素飽和

に近い生態系になっていくと考えられている。(Figure 1-5; Succession)。DHSBR において広葉樹林は 400 年以上保護された極相林(成熟林)であり、長年にわたって窒素が蓄積されてきた。その一方、松林や混合林は若い森林であり、加えて低木層やリターが収穫されてきた。その結果、広葉樹林と松林を比較すると、広葉樹林の方が窒素のプールサイズや窒素循環速度(リター生成、分解速度(Mo et al., 2006))が大きいことが報告されている(Table 1-3)。このような理由から、大気からの窒素負荷に関わらず広葉樹林は松林や混合林に比べて、より窒素飽和状態にあると推察されている(Fang et al. 2006)。

1.6.5 窒素添加試験区

窒素負荷の増大が森林生態系に及ぼす影響を評価するために、DHSBR の各森林の中に試験区が設置され、2003 年から人為的な窒素添加実験が行われている。各森林内に 10 m×20 m の窒素添加区および窒素無添加区(コントロール区)が 3 プロットずつある。プロット間は 10m 以上離れている。窒素添加区では、100 kg-N/ha/yr の硝酸アンモニウム(NH_4NO_3)が 2003 年 7 月から毎月等量添加されている。添加する窒素は 20 L の水に溶解し、林床に撒かれている。またコントロール区には等量の水が撒かれている(Fang et al. 2006)。窒素添加区における窒素添加の様子を Figure 1-13 に示す。

1.6.6 土壌採取

本研究では 3 回の土壌採取を行った。3 回の採取の時期、採取場所、土壌サンプルの処理について以下(1)から(3)に示す。

- (1) 2008 年、9 月に DHSBR の広葉樹林(コントロール区)、松林(コントロール区)、混合林(コントロール区)で採取した。土壌は各森林内の 6 地点からそれぞれ 500 グラム程度を採取した。それらの土壌を個々に 2 mm のふるいに通した。1 つのプ

ロットから 6 つの土壌サンプルを得た。

- (2) 2009 年、8 月に DHSBR の広葉樹林（コントロール区、窒素添加区）、松林（コントロール区、窒素添加区）、HSD の広葉樹林で採取した。土壌は各プロット内の 12 地点からそれぞれ 200 グラム程度を採取した。それらの土壌を個々に 2 mm のふるいに通した。その後、同一プロットから採取した土壌は一つに混合した。すなわち、1 つのプロットから 1 つの混合土壌サンプルを得た。
- (3) 2009 年、10 月に DHSBR の広葉樹林（コントロール区）で採取した。土壌はプロット内 4 地点からそれぞれ 500 グラム程度を採取した。それらの土壌を個々に 2 mm のふるいに通した。その後、それらの土壌は一つに混合した。

1.7 本論文の内容

本論文の構成について、各章で行ったことを模式的に図示したものを Figure 1-14 に示す。本論文は、まず、第 2 章と第 3 章において、窒素安定同位体 (^{15}N) を用いた森林土壌中の窒素フロー速度の簡便な解析法の確立を行った。具体的には、第 2 章において、窒素安定同位体比 ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) 測定に用いるガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) の改良を行い、第 3 章において、土壌中の窒素化合物の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を簡便に測定するための分析手法の確立を行った。第 4 章から第 6 章では、上述（セクション 1.6.6）の調査地から採取した土壌を用いて各種解析を行った。具体的には、第 4 章において DHSBR の広葉樹林、松林、混合林における土壌中の窒素フローの解析を、また第 5 章において、DHSBR の広葉樹林、松林および HSD の広葉樹林において、土壌中の窒素フローとともに、窒素流入量の増大にともなう窒素フローの変化を、それぞれ解析した。第 6 章においては、硝化微生物群集の解析を行い、第 4、5 章の窒素フロー速度の結果と併せることで、硝化を担っている微生物群集の特定を試みた。第 7 章において、本研究の結果から総合考察を行った。

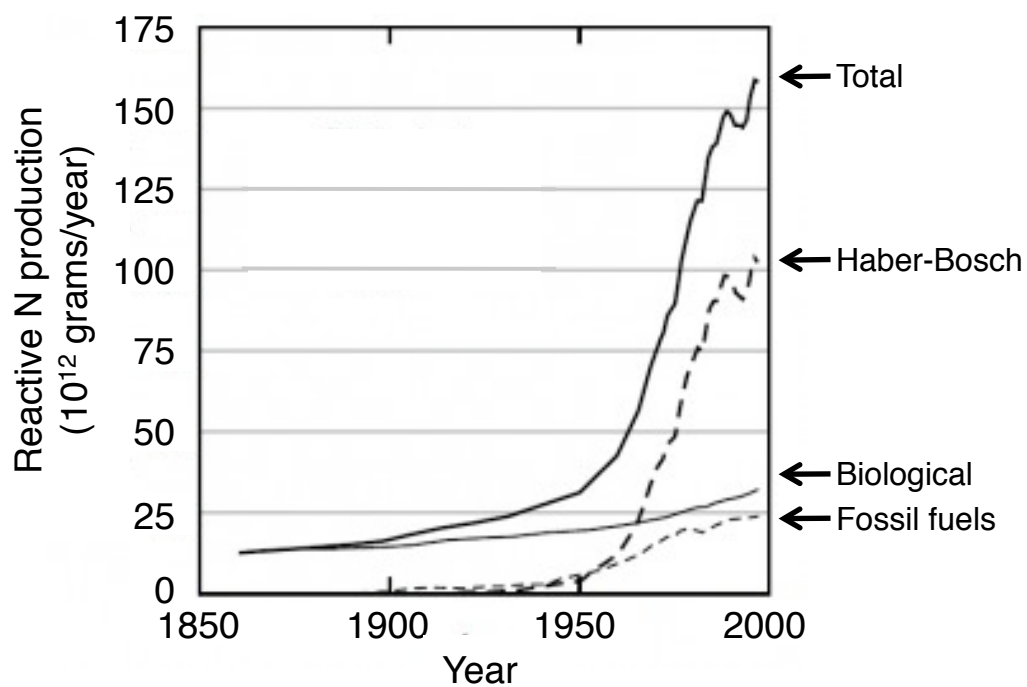


Figure 1-1. Global trends of reactive N production from 1860 to 2000 (Elisman et al. 2008). “Haber-Bosch” represents N creation through the Haber-Bosch process, including production of ammonia for nonfertilizer purposes. “Biological” represents N creation from cultivation of legumes, rice, and sugarcane. “Fossil fuel” represents N created from fossil fuel combustion. “Total” represents the sum created by these three processes.

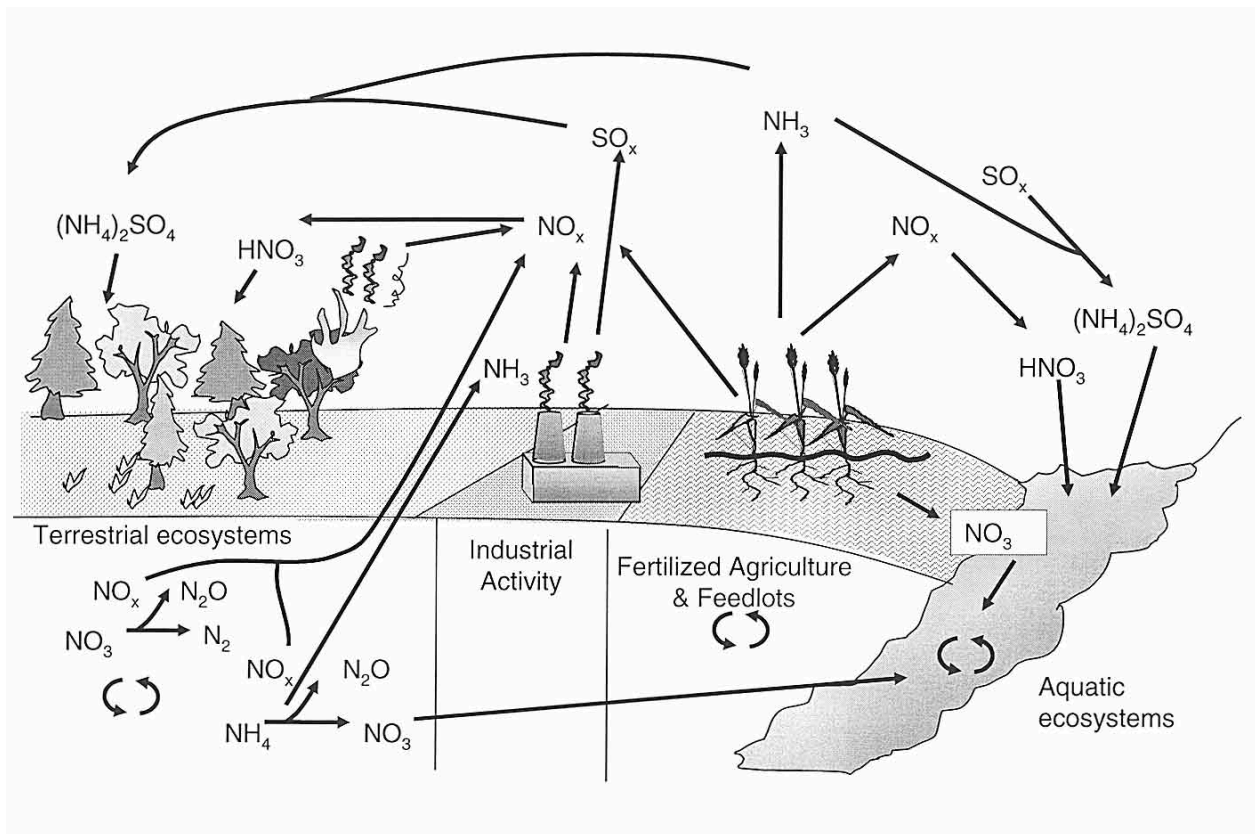


Figure 1-2. Rapid transport and transformation of nitrogen from industrial and agricultural activities to natural terrestrial and aquatic systems. Biomass burning, fossil-fuel combustion, and soil microbial activity are the primary sources of NO_x emissions, while agricultural activities, including fertilized agriculture and livestock, are the primary sources of NH_3 emissions to the atmosphere. Closed, circular black arrows represent soil and aquatic nitrogen transformations, including N mineralization, immobilization, nitrification, and denitrification (Matson et al. 2002).

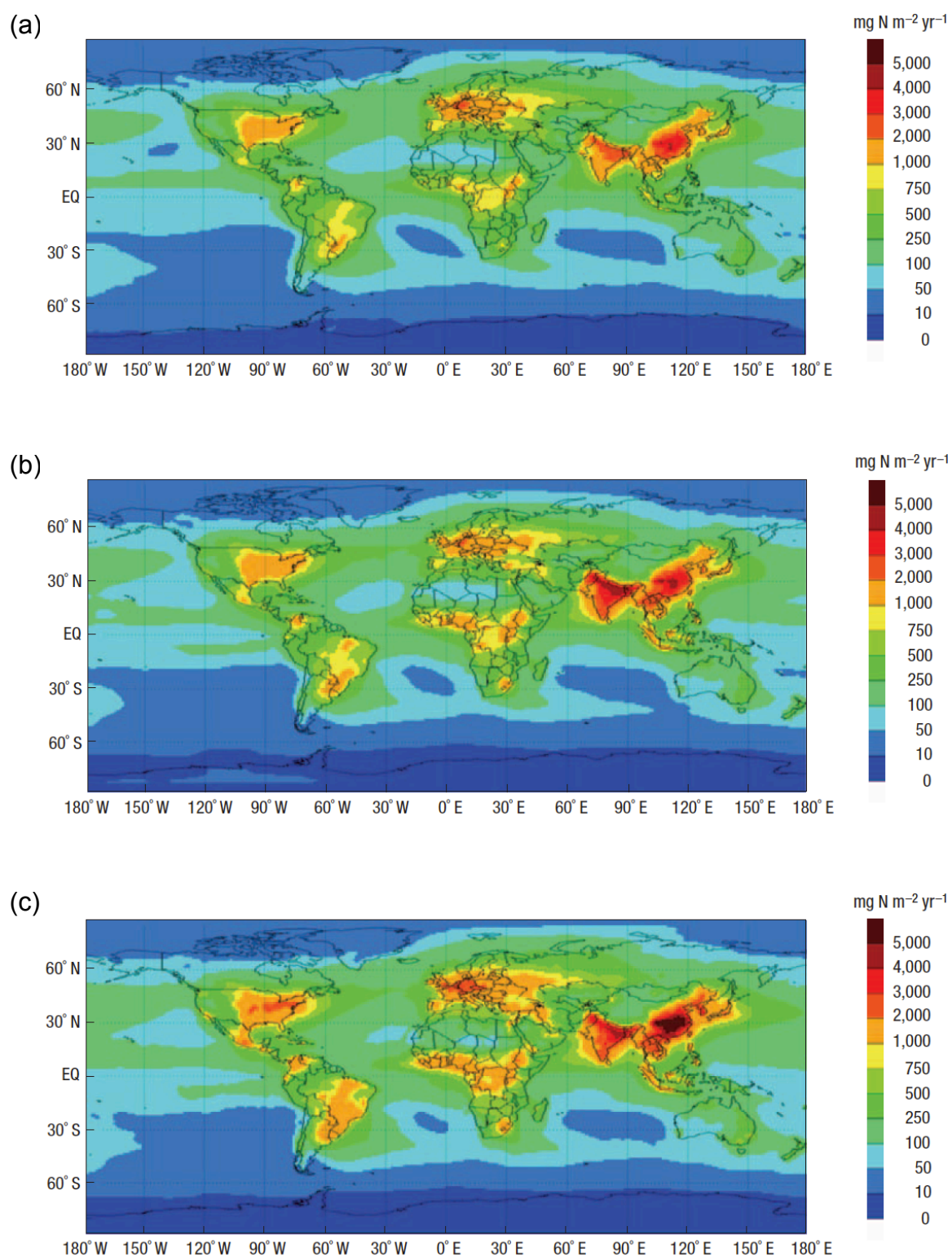


Figure 1-3. Global distribution of total N. (a) Year 2000 deposition field (denoted as S1). (b) Year 2030 deposition field using a current emissions legislation scenario. (c) Year 2030 deposition field using the SRES A2 emissions scenario of ICPP. Reay et al. (2008).

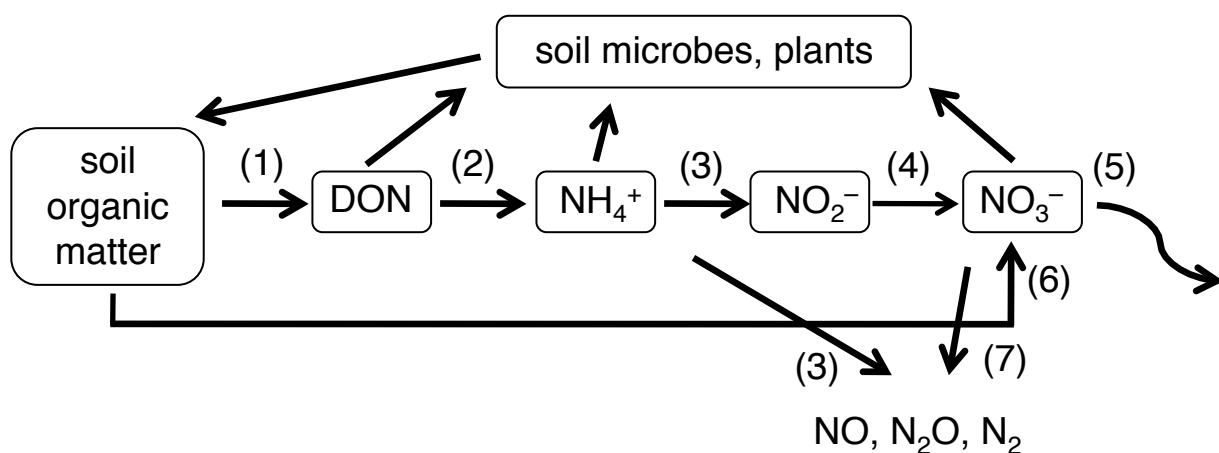


Figure 1-4. A simplified model of nitrogen (N) cycling and loss of available N. Ammonium (NH_4^+) and nitrate (NO_3^-) are the main N species available to soil microbes and plants. Dissolved organic N (DON) was recently suggested as available N especially in N-limiting environments (Neff et al. 2003; Schimel and Bennet 2004). Ammonia oxidation is often the rate-limiting step in nitrification (3-4), and thus, NO_2^- rarely accumulates in most soil environments (Kowalchuck and Stephen 2001). (1-2) mirereralization; (3) autotrophic ammonia oxidation; (4) nitrite oxidation; (5) nitrate leaching; (6) heterotrophic nitrification; (7) denitrification.

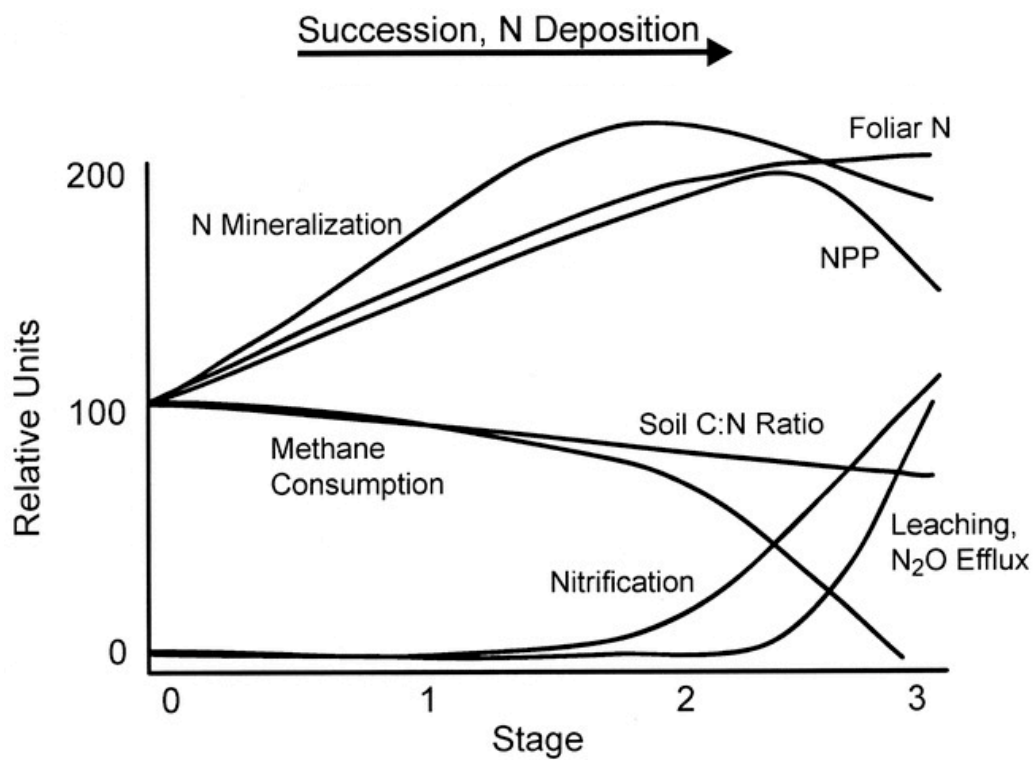


Figure 1-5. Changes in several ecosystem functions with increasing N availability or degree of N saturation (modified from Aber et al.1998). Abbreviations: C, carbon; N, nitrogen; N₂O, nitrous oxide; NPP, net primary productivity (Galloway et al. 2003).

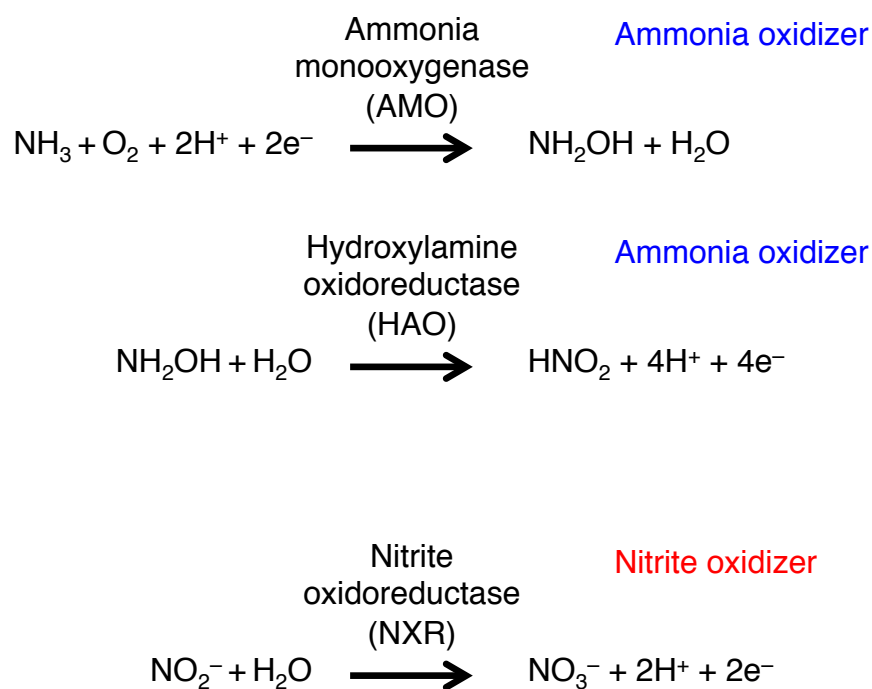


Figure 1-6. Aerobic ammonia oxidation reactions catalyzed by Amo and Hao enzymes of AOB, and nitrite oxidation reactions catalyzed by Nxr enzymes of NOB. In AOB, ammonia is oxidized to nitrite via the intermediate, hydroxylamine. No HAO homologue has yet been identified in archaea, and oxidation of ammonia to nitrite may occur via a different biochemical pathway.

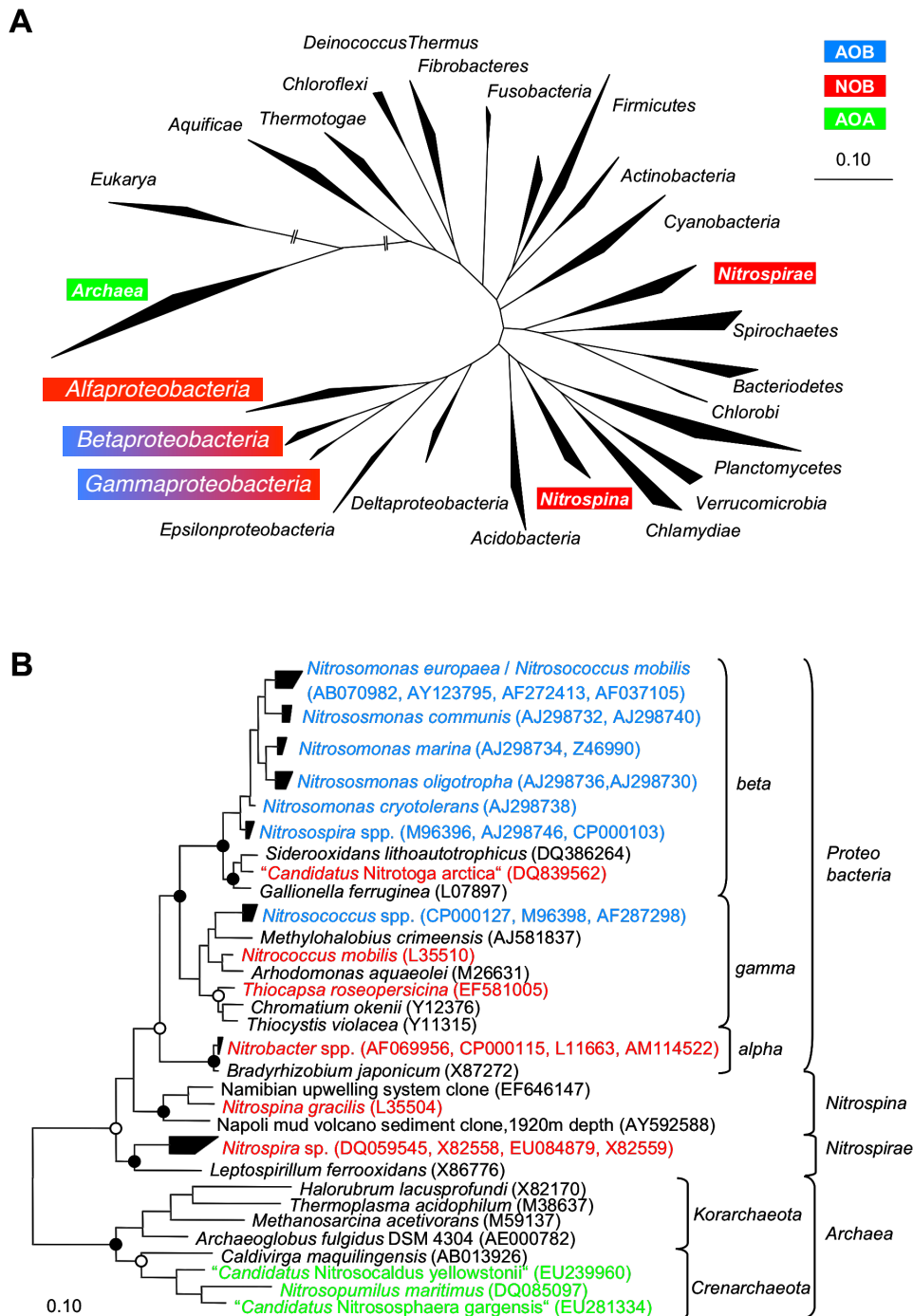


Figure 1-7. 16S rRNA-based Maximum Likelihood trees displaying the phylogenetic affiliation of nitrifying microorganisms. Nitrite-oxidizing bacteria (NOB) are highlighted in red, ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and archaea (AOA) are highlighted in blue and green, respectively. The tree in Fig. 4/A gives a general overview of the distribution of nitrifiers in the “tree of life”, whereas the tree in Fig. 4/B illustrates a close-up view of Fig.4/A representing all currently known nitrifying bacterial and archaeal genera and species. The partially filled circles at the tree nodes in Fig. 4/B represent quartet puzzling reliability values $\geq 70\%$ and filled circles symbolize additional high parsimony bootstrap support ($\geq 90\%$) based on 100 iterations. The bar indicates 10 % estimated sequence divergence.

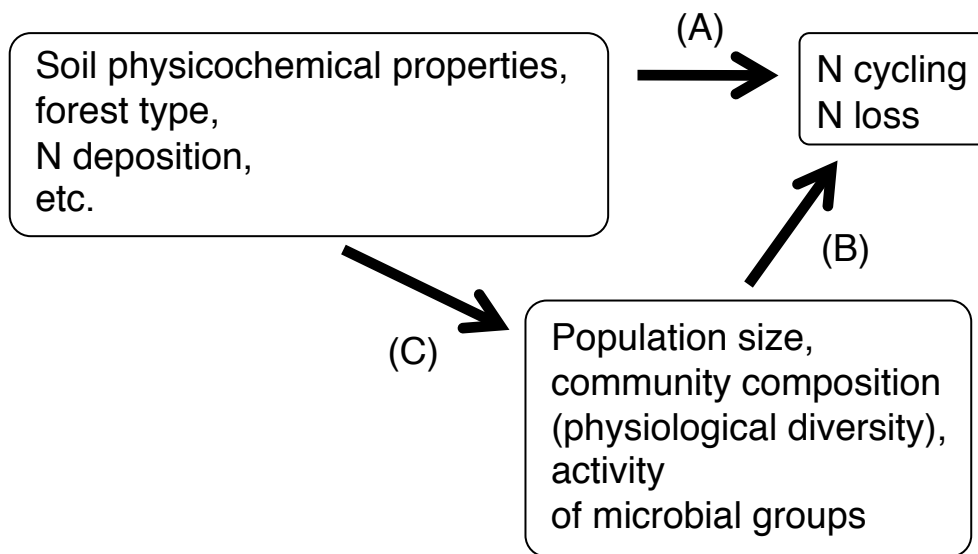


Figure 1-8. Factors affecting nitrogen (N) cycling and loss in forest ecosystems. N cycling and loss are largely controlled by characteristics of microbial communities such as population sizes, community compositions and activities (B) as well as other factors such as soil physiochemical properties, forest type, and N depositions (A). These environmental factors also control the characteristics of microbial communities (B).

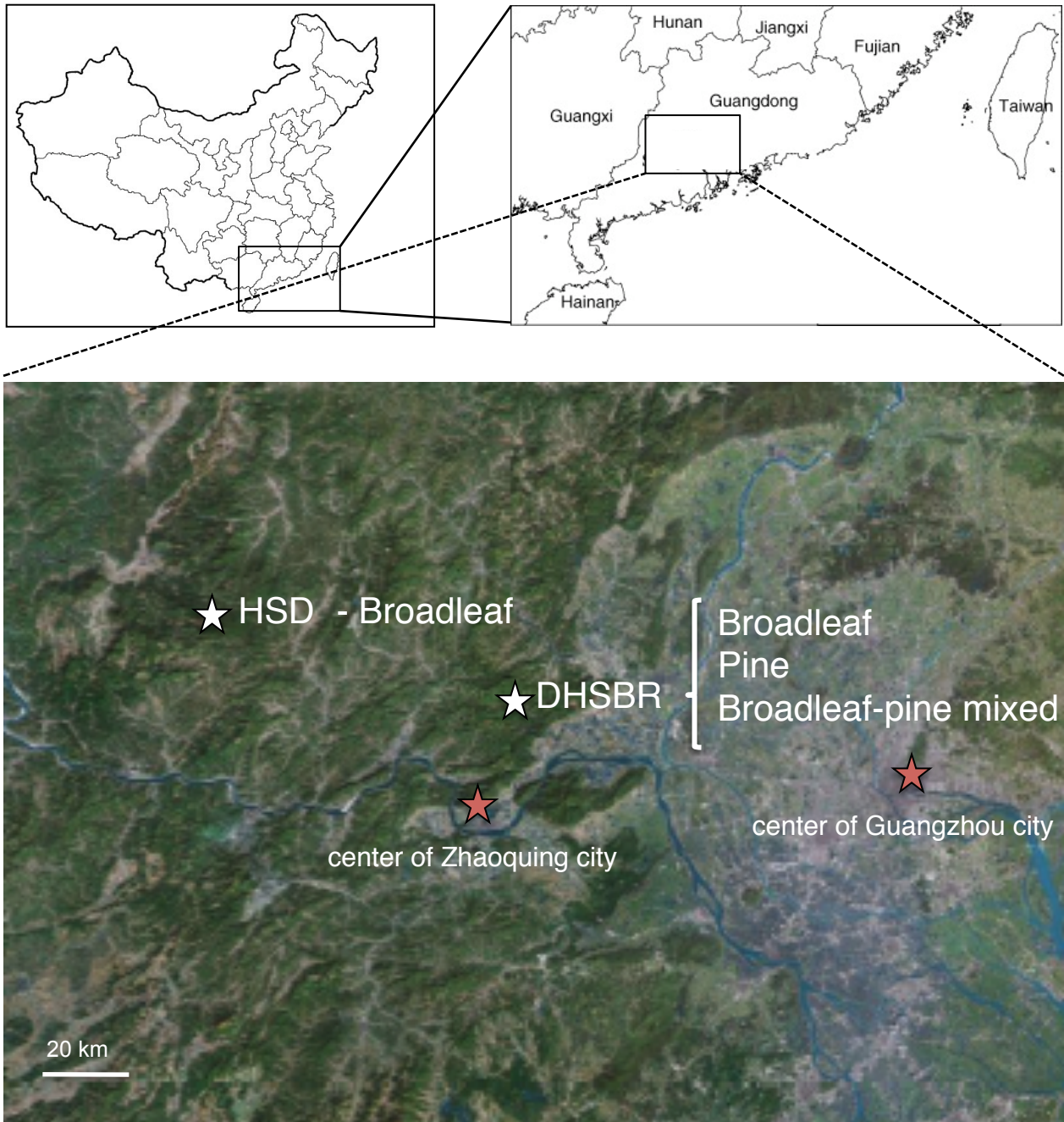


Figure 1-9. Location of the two study sites, Dinghushan Biosphere Reserve (DHSBR) and Heishiding Nature Reserve (HSD) in Guangdong province, southern China. DHSBR includes broadleaf, pine and broadleaf-pine mixed forests, and HSD include a broadleaf forest.

(A)



(B)



(C)



Figure 1-10. Pictures of interiors of (A) broadleaf, (B) pine and (C) broadleaf-pine mixed forests at DHSBR.

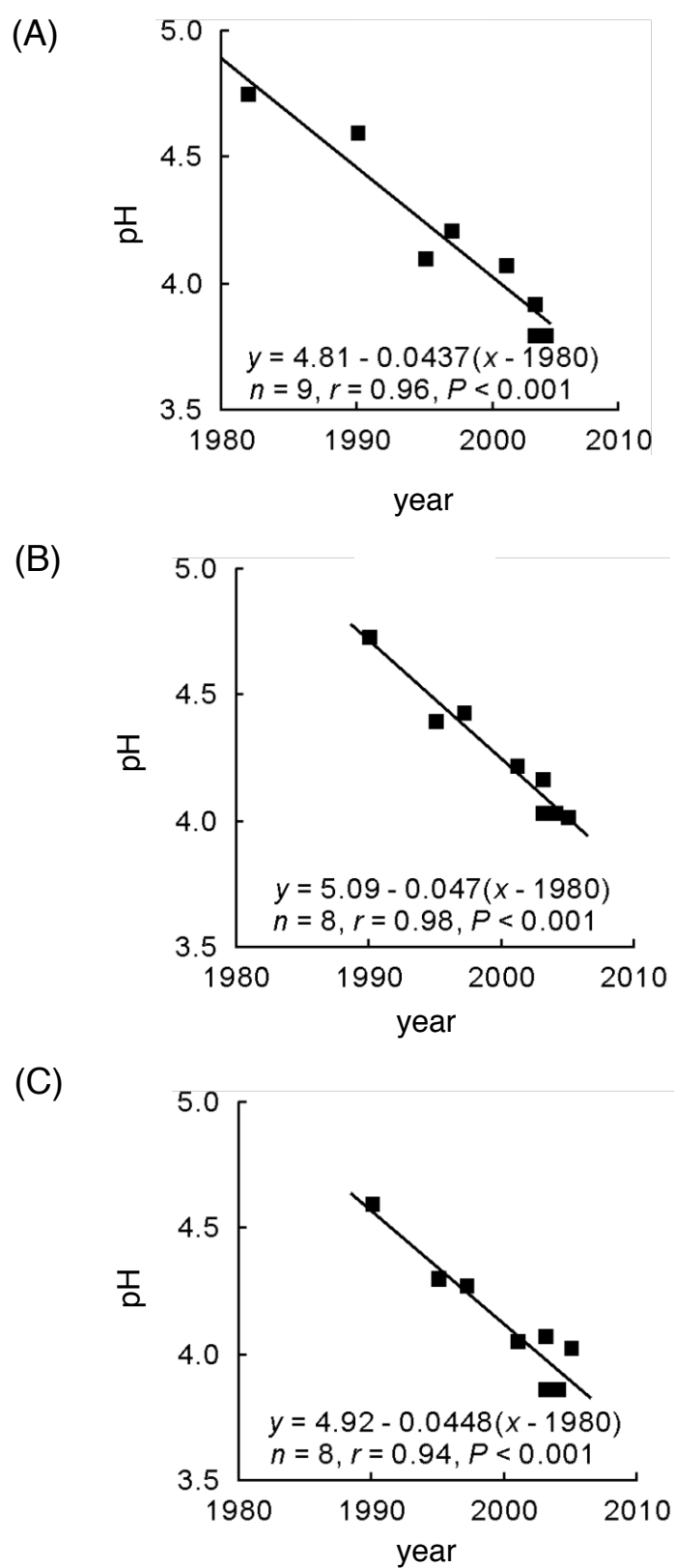


Figure 1-11. Change of pH of 0-20 cm soils in (A) broadleaf (B) pine (C) mixed forests at DHSBR (Liu et al., 2010).

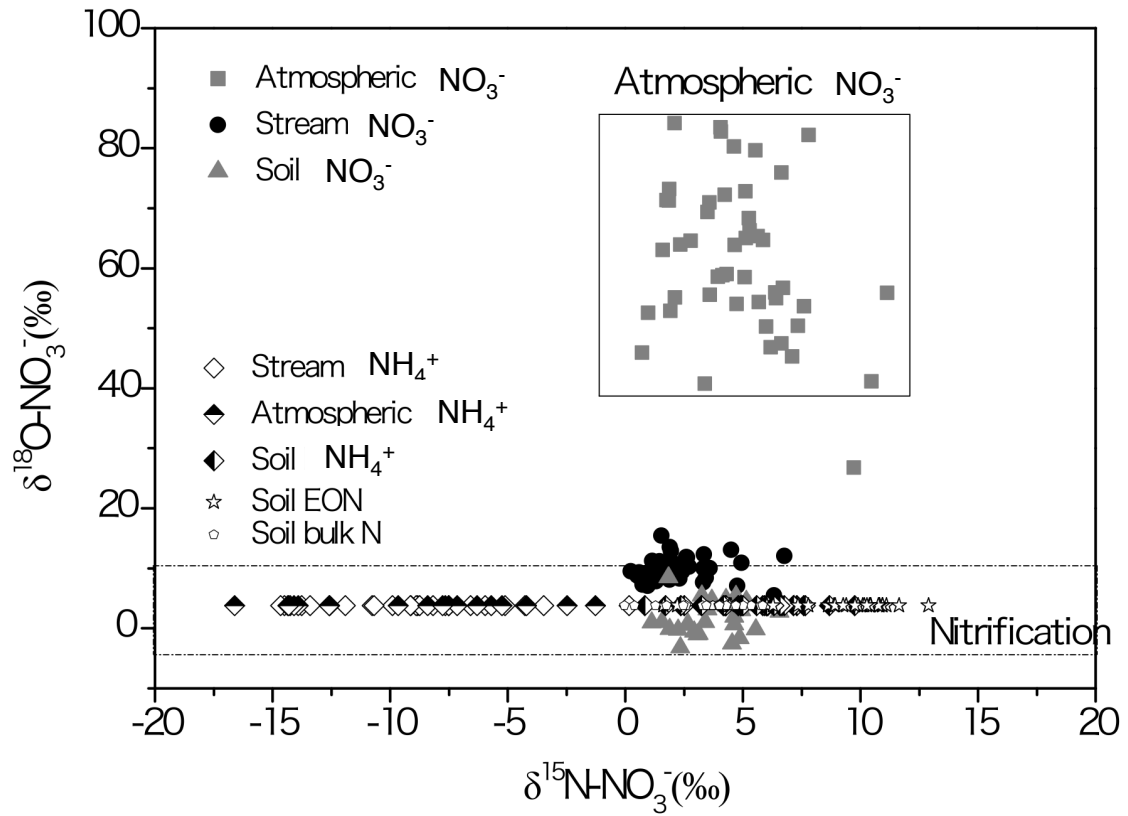


Figure 1-12. Dual nitrate (NO_3^-) isotopic source plot based on $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of NO_3^- in broadleaf forest at DHSBR. According to $\delta^{18}\text{O}$ value of NO_3^- in precipitation, soil and stream water, large part of NO_3^- in stream could be derived from nitrified NO_3^- in soil (Fang et al. in review).

Table1-1 N Concentration of DIN in precipitation, and NO_3^- concentration and pH in stream water drained from broadleaf forests at DHSBR and HSD

Site	Precipitation (kg-N/ha/yr)			Stream	
	NH_4^+	NO_3^-	DIN	NO_3^- (mg-N/l)	pH
DHSBR	20.8 (0.8)	13.3 (0.6)	34.1 (1.3)	4.3 (0.8)	4.1 (0.1)
HSD	10.0 (0.4)	8.1 (0.4)	18.1 (0.5)	0.8 (0.1)	7.2 (0.1)

Fang et al. (2010)

Table1-2 Total leaching loss and retention of N (kg-N/ha/yr) of precipitation inputs in the broadleaf, pine, and mixed forests at DHSBR

	2004			2005		
	broadleaf	pine	mixed	broadleaf	pine	mixed
N precipitation	34	34	34	32	32	32
total N leaching losses	42	15	14	48	20	14
Ecosystem N retention	-8	19	20	-16	12	18

Fang et al. (2008)

Table 1-3 Total N in vegetation and 0-20 cm soil (kg-N/ha), and litter N production (kg-N/ha/yr) in the broadleaf, pine, and mixed forests at DHSBR.

	broadleaf	pine	mixed
Total N in vegetation	1546	307	-
Total N in 0-20 cm soil	1862	1276	1220
Litter N production	128	16	-

Fang et al. (2009)



Figure 1-13. Picture of N amendments. 100kg-N/ha/yr of NH_4NO_3 have been sprayed every month since 2003 to the forest floors in N-addition plots in broadleaf and pine forests at DHSBR.

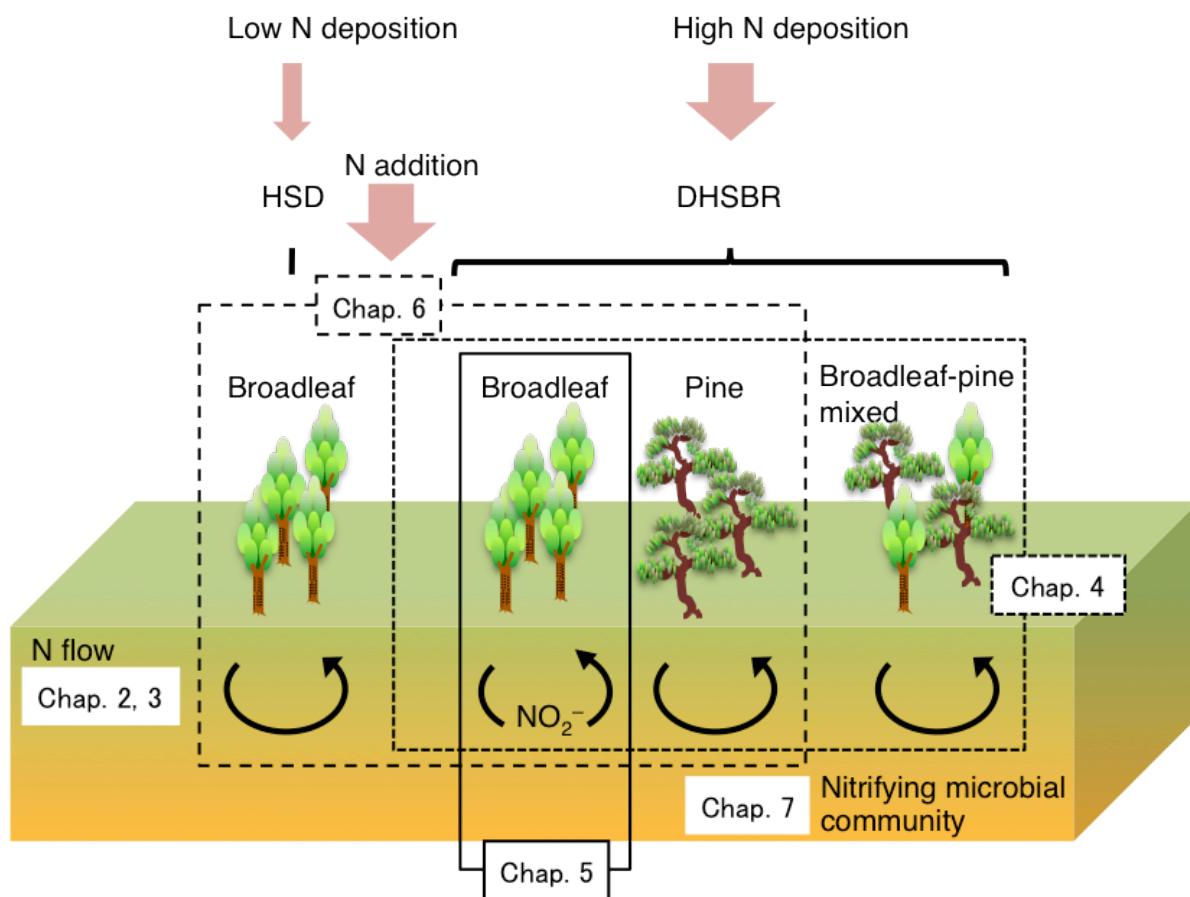


Figure 1-14. Contents of each chapter in this thesis. In chap. 2, methodological developments are carried out for determining various kinds of gaseous metabolites of microorganisms by using a GC/MS. In chap. 3, methodological developments are carried out using the modified GC/MS for analyses of ¹⁵N of ammonium, nitrate, nitrite and total dissolved N in soil extracts. In chap. 4, Characteristics of soil N flow rates and N-saturation status among broadleaf, pine and mixed forests at DHSBR are discussed. In chap. 5, Change of soil N flows in broadleaf and pine forest at DHSBR due to N amendments are discussed. Soil N flows in broadleaf forest at HSD are also discussed. In chap. 6, abundances, community compositions and activities of nitrifying communities and their ecological functions in soils at DHSBR and HSD are discussed.

第2章 GC/MSを用いた微生物の代謝ガスの同時定量法の確立

2.1 緒言

この章で記述する研究において、商用のガスクロマトグラフ質量分析装置 (gas chromatograph mass spectrometry: GC/MS) を改良するとともに、測定条件を最適化することによって、微生物の代謝に関わる様々なガス種を同時に、簡便かつ迅速に測定する方法の確立に成功した。第3章以降で鍵となる窒素フローの速度の測定は、この章で確立した方法を用いて行ったものである。

微生物の代謝プロセスにおいて様々なガス化合物 (例えば H_2 、 N_2 、 O_2 、 CO 、 NO 、 CH_4 、 CO_2 、 N_2O) が生成され、消費される (Hughes 1985; Conrad 1996)。土壌のような環境においても、微生物活動の結果、それらのガスが放出され、吸収される。微生物の代謝プロセスの中で見られるガスの生成と消費は相互に関連し合っているため (例えば酸素呼吸の過程で O_2 を消費し、 CO_2 を生成する)、様々なガス種を同時に測定するための方法の開発は、微生物の生理や生態を明らかにするためには非常に有用である。

これまで、これらのガス種は、主にいくつかの検出器やいくつかの分離カラムをそれぞれ組み合わせたガスクロマトグラフ (GC) システムによって測定されてきた (reviewed by Crill et al. 1995)。例えば、 H_2 、 N_2 、 O_2 、 CO_2 は基本的に熱伝導度検出器 (thermal conductivity detector: TCD) を用いて、 N_2O は電子捕獲型検出器 (electron capture detector: ECD) を用いて、 CO や CH_4 は水素炎イオン化検出器 (flame ionization detector: FID) を用いて検出されてきた。そのためこれらのガス種を一度に測定するためには、いくつもの GC が必要となる。そこで、単一の装置を用いて、これらの微生物の代謝に関わるガスを測定する手法が開発されてきた。例えば、様々な分離カラムや検出器を備え、流路をバルブで切り替える GC システムなどである (Hedley et al. 2006; Sitaula et al. 1992;

Wang and Wang 2003; Yoh et al. 1998)。しかし、これらの GC システムは多くの構成パーツを必要とし、またガスの流路を適切に切り換えるための高い技術が要求される。

一方、GC/MS はアミノ酸、糖、有機酸などの微生物の代謝物質の同定に広く用いられている (Koek et al. 2006; Strelkov et al. 2004; Tian et al. 2009) が、同時にいくつかの微生物の代謝ガスの検出にも用いられてきた (Amano et al. 2008, 2011; Bazyliniski et al. 1986; DeRito et al. 2005; Garber and Hollocher 1982; Goretski and Hollocher 1990; Liou et al. 2008; Liu et al. 2006; Shoun and Tanimoto 1991; Waki et al. 2010)。さらに近年の GC/MS 技術の展開、特に検出感度の上昇によって、CH₄、CO₂、N₂O などの環境中の低濃度ガスの測定にも利用するのが可能になりつつある (Ekeberg et al. 1994)。このように GC/MS には大きな利用可能性がある一方で、これまでの GC/MS システムは、微生物の代謝に関わる複数のガス種を一度に測定すること、またそれらのガスを迅速にかつ幅広いダイナミックレンジで測定することを目的に設計されていない。微生物の培養サンプルや環境サンプルでは、微生物の個体群や群集によって、様々なガス種が様々な濃度で生成され、また同時に消費される。そのため、複数のガス種を一度に、迅速に、幅広いダイナミックレンジで測定できるような GC/MS システムを設計・改良することの重要性は明らかである。また N₂ や O₂ は微生物代謝の主要な基質・生成ガスである。しかし、サンプル中に低濃度 (例えば 100 ppm 程度) でしか存在していない場合、これらのガスを精確に、再現性良く測定するのはこれまで困難であった。その主な理由は、N₂ や O₂ は大気の主成分であるために、ガスサンプルを導入口から導入する際に、大気からこれらのガスが混入してしまうことによる。したがって、サンプル導入の間の大気の混入を防ぐことが、上記の目的を達成するためには鍵となる。

以上の事柄を背景にして、この章で記述される研究においては、微生物の代謝に関わる複数のガス種を一度に、迅速に、幅広いダイナミックレンジで測定できるような GC/MS システムを設計することを目的に、以下の 3 点を実施した。

(1) サンプル注入時の大気の混入を軽減するため、四重極型の GC/MS の導入口を改良した。

(2) GC/MS の測定条件を最適化し、微生物の代謝に関わる様々なガス種を ppm (10^{-6} vol. vol.⁻¹) レベルから % (10^{-2} vol. vol.⁻¹) レベルまで、迅速にかつ同時に定量することを試みた。その感度とダイナミックレンジを算出した。

(3) 上記により確立した分析手法を、第 3 章以降に用いる脱窒細菌 *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* ATCC 13985^T を用いたモデル実験に適用し、その有用性について検証した。

2.2 方法

2.2.1 装置と測定条件

Figure 2-1 に本研究で用いた四重極型 GC/MS システム (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu, Kyoto, Japan) の概略図を示す。分離カラムには CP-PoraPLOT Q-HT column (25 m × 0.32 mm) (Varian, Inc., CA, USA) を用いた。商用の GC/MS は、通常セプタム導入口 (Figure 2-1, septum injection port) からガスタイトシリンジを用いてガスサンプルを導入する。しかし、ガスサンプルを導入する際の大気の混入が不可避であった。そのため、分析時の大気からの混入を軽減するため、ガスサンプルの導入法の改良を行った。

ガスサンプル導入は、導入量を精確にするためにサンプルループを付けたバルブを通して行った。ガスサンプルを導入する際の大気混入を軽減させるために、以下のように GC/MS システムの改良を行った。まず (1) ガスサンプル導入から、ガスサンプルが GC カラムへ導入されるまでの経路の周りをすべて He 流で被った。すなわち、ガス導入口 (EN2SI, ZF2SI, and SI4G, Valco Instruments Co. Inc., Houston, TX) と 8 方バルブ (2C8WE-PH, Valco Instruments Co. Inc.) をジャケットで被い、そこに高純度のヘリウム (He) を 40 ml min^{-1} で流した。導入口の写真を Figure 2-2 に示す。また (2) サンプルを導入していない間にも、導入口とガスサンプルが GC カラムへ導入されるまでの経

路の中に高純度の He を常に流した。(3) ガスを採取するためのガスタイトシリンジの針とシリンジについても、採取の直前に He 流で洗浄した。さらに(4) スプリット用のガス排出口とセプタム導入用のパージガス排出口において、大気の逆流による混入を防ぐために、コイル状にしたステンレスの銅管を(50 cm × 1 mm in diameter) を接続した (Figure 2-1、injection port purging vent、split vent)。

サンプル測定時は 200 µl のガスサンプルをガスタイトシリンジ (PS-050033, Valco Instruments Co. Inc.) で採取し、8 方バルブに接続した 25 または 50 µl のサンプルループ (AL25CW, SL50CW, Valco Instruments Co. Inc.) を通して導入した。導入したガスサンプルによりサンプルループが満たされたら、バルブを手動で切り替えて、ガスサンプルを GC 分離カラムへと導入した。2 つのサンプルループを接続した 8 方バルブを用いることで、異なる量 (25、50 µl) のサンプルを精確に導入することが可能である。

GC/MS の測定条件は、GC 分離についてカラム温度、スプリット比、キャリアガス流量を、MS 検出について検出器電圧を調整した。すなわち、まず N₂O を 2 分程度で検出できるように、カラム温度を 50°C、キャリアガス流量を 2.0 ml min⁻¹にした。続いて、5ppm 程度から 20% (= 20×10⁴ ppm) の濃度レンジの CH₄、CO₂、N₂O を同時に測定できるように、スプリット比を 30、検出器電圧は 0.8 kV とした。キャリアガスには高純度 He (>99.99995%) を用いた。マススペクトルは高感度、高選択性のために選択イオン検出 (selected ion monitoring: SIM) モードで測定した。その他のガス導入、GC 分離、MS 検出のための詳細な条件は Table 2-1 に示した。

2.2.2 標準ガスサンプルの作成

GC/MS 分析の検出限界と測定のダイナミックレンジを求めるため、標準ガス O₂、N₂、H₂、CH₄、CO₂ (>99.9%; GL Sciences, Inc. Tokyo, Japan)、N₂O (>99.5%; GL Sciences, Inc.) を用いて、ppm (10⁻⁶ vol. vol.⁻¹) から % (10⁻² vol. vol.⁻¹) オーダーの希釈系列を、バックグラウンドガスに高純度 He (>99.99995%) を用いて作成した。各標準ガス種の希釈系

列を Table 2-2 に示す。また Ar、NO、CO についても本研究の GC/MS システムで検出の可否を検討した。その際、CO と NO については安定同位体でラベルされたもの (^{13}CO , ^{15}NO , SI Science Co. Ltd., Saitama, Japan) を用いた。またバックグラウンドガスの影響を検証するため、高純度 He (>99.99995%) と高純度 N_2 (>99.99995%) をそれぞれバックグラウンドガスとした O_2 の希釈系列を作成した。He バックグラウンドガスについては 1.25%、2.46%、4.82%、9.35%、17.2%、20.7%、23.9%、 N_2 バックグラウンドガスについては 1.23%、2.43%、4.76%、9.30%、21.4%、25.6% の O_2 標準ガスを作成した。

標準ガスの希釈の行程は次の通りである。(1) ブチルゴム栓で密閉したガラスバイアルの容積を、水を充填したバイアルと充填していないバイアルの重量の差から精確に算出した。(2) そこにバックグラウンドガスである He または N_2 を約 1.5 atm になるようにガス置換装置 (Sanshin Industrial Co. Ltd., Kanagawa, Japan) で充填した。(3) そこに標準ガスを既知量、ガスタイトシリンジで注入した。(4) 最後に、バイアル内の圧力を圧力計 (Nidec Copal Electronics Co., Tokyo, Japan) で測定し、ガス濃度を計算した。バイアル内の希釈ガスは、バイアルの中にスターラーバーを入れ、使用前に 12 時間以上攪拌することで均一化させた。大気の混入を防ぐために、ガスタイトシリンジによるガスの採取や注入、また圧力計によるバイアル内の圧力の測定は、すべて He 流を充てながら行った。

2.2.3 本手法の有用性の検証：脱窒細菌の培養におけるガス代謝のモニタリング

第 3 章以降で用いる *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* ATCC 13985^T を用いてモデル実験を行い、 O_2 、 CO_2 、 N_2O の定量に改良 GC/MS システムを適応し、その有効性を検証した。*P. aureofaciens* ATCC 13985^T は脱窒の最終生成物として N_2O を生成する (Casciotti et al. 2002; Firestone et al. 1979; Matsubara and Zumft 1982; Sigman et al. 2001)。まず *P. aureofaciens* ATCC 13985^T を 120 ml のブチルゴム栓で密閉したバイアルに入れた 80 ml の液体培地の中で、23 °C で一晚増殖させた。液体培地の組成は DifcoTM Tryptic Soy

Broth (Becton Dickinson, NJ, USA)、10 mM KNO₃、1 mM NH₄Cl、36 mM KH₂PO₄である。培養はスターラーバーによって攪拌しながら行った。培養後、その培養液を濁度が A₆₀₀ = 0.01 となるように、ブチルゴム栓で密閉した 120 ml のバイアル中の 80 ml の新鮮な液体培地に添加した。シリンジを用いてヘッドスペースが 1.5 atm になるように大気を加えて加圧した。その後、この培養液をスターラーバーで攪拌しながら、23 °C で 48 時間培養した。また 4 時間おきにヘッドスペースからガスを 200 µl 採取し、改良 GC/MS に導入し、上記の方法により O₂、CO₂、N₂O を定量した。また細菌の増殖を、培養液の濁度 (A₆₀₀) の測定によりモニタリングした。

2.3 結果と考察

2.3.1 9 種のガスの同時検出

9 種のガス (H₂、N₂、O₂、Ar、¹³CO、¹⁵NO、CH₄、CO₂、N₂O) からなる混合ガスを、バックグラウンドガスに He を用いて作成し、GC/MS を用いて、9 種それぞれをその保持時間と質量電荷比 (mass-to-charge ratios: m/z) から同定した。検出したそれぞれのガス種のイオン種とその m/z を Table 2-3 に示す。9 種混合ガスのマスキロマトグラムを Figure 2-3 の (a) から (i) に H₂、N₂、O₂、Ar、¹³CO、¹⁵NO、CH₄、CO₂、N₂O の順に示す。本研究の GC/MS システムで、CO と NO の検出の可否を明確に検証するため、安定同位体でラベルした ¹³CO (m/z 29) と ¹⁵NO (m/z 31) を用いた。結果的に N₂、CO、NO は保持時間の違いによって分離されたが、当初は ¹²CO (m/z 28) と ¹⁵NO (m/z 30) は N₂ の ¹⁴N-¹⁴N (m/z 28) や ¹⁵N-¹⁵N (m/z 30) のピークと重なる可能性が考えられた。そのため、CO と NO が N₂ と分離できていることを確認するために、¹³CO (m/z 29) と ¹⁵NO (m/z 31) を用いた。結果として、Figure 2-3 に示した通り、混合ガス中の全てのガス種を保持時間や分子イオンまたはフラグメントイオンの m/z 値によって単独ピークとして検出することができた。

上述の同定に際し、いくつかの注意点があげられる。例えば、数種のガス（例えば N_2 、 O_2 、 CO 、 NO 、 CH_4 ）の保持時間は近接している。そのために、特定のガス種の濃度が高いときには、GC による分離のみでは異なるガス種同士のピークが重なる可能性がある。そのような場合には、分子イオンとともにいくつかのフラグメントイオンも同時にモニタリングする必要がある。例えば、 CH_4 と O_2 が GC による分離のみでは互いのピークが重なっている場合、 CH_4 の分子イオンである CH_4^+ (m/z 16) は、 O_2 のフラグメントイオン O^+ (m/z 16) の存在によって、単独ピークとして検出することができない。そのような場合には、 O_2 からは m/z 15 のフラグメントイオンが生成しないことを利用して、 CH_4 のフラグメントイオン、 CH_3^+ (m/z 15) も同時に検出することで、 CH_4 を同定することが出来る。GC/MS は第 3 章で述べる同位体質量分析装置 (isotope ratio mass spectrometry: IRMS) とは異なり、多くの m/z 値を同時にモニタリングできることができる。そのため、分子イオン以外にいくつかのフラグメントイオンもモニタリングすることで、正確な測定が可能となる。ガス種の分離あるいは単独ピークの検出のためのその他のオプションとしては、キャリアガスの流速を下げることで、GC ピークの分離能を上げることが挙げられる。また、微生物の代謝ガスをモニタリングする場合には、基質に安定同位体でラベルされた化合物を用いることで、生成するガスの分子・フラグメントイオンの m/z 値を他のガス種と重ならないようにすることも重要なオプションである。

本研究の分析アプローチを用いることで、微生物の代謝で生成・消費される主要なガスを一度に同定することが可能になった。一度の分析時間は 2.5 min であり、既往研究の GC システムの分析時間と比較して同等あるいは著しく迅速である (Hedley et al. 2006; Sitaula et al. 1992; Wang and Wang 2003; Yoh et al. 1998)。

2.3.2 検出限界と分析のダイナミックレンジ

H₂、N₂、O₂、CH₄、CO₂、N₂O の検出限界 (limit of detection: LOD) を国際純正・応用化学連合 (International Union of Pure and Applied Chemistry: IUPAC) 基準 (Long and Winefordner 1983) を用いて算出した。LOD の算出式は次の通りである。

$$\text{LOD} = k \times \text{sd} / m$$

k: 信頼区間を決めるためのファクター (信頼水準 90%以上として、k=3)

sd: 残差の標準偏差

m: 回帰直線の傾き

各ガス種の回帰直線は、Table 2-2 に示した濃度のうち最も低濃度の 3 つのガスを用いて作成した。各ガス種の回帰直線式と算出された LOD を Table 2-3 に示す。分子イオンに対するフラグメントイオンの強度は回帰直線の傾きから算出し、Table 2-3 に示した。y 切片について、N₂、O₂ などの大気中に高い濃度で存在するガス種において正の値をとっているのは、標準ガスの希釈系列の作成時やガスの採取・導入時における混入が大きく影響していると考えられる。一方、H₂やN₂O などの大気中にほとんど存在していないガス種において y 切片が負の値をとることについては、標準ガス作成時の系統誤差のためと考えられる。

全てのガス種について作成した標準曲線において、O₂、CO₂、N₂、N₂O、CH₄は 20×10^4 ppm (=20%) まで、H₂は 100×10^4 ppm (=100%) までガス濃度とピークエリアとの間で直線性が得られた (Table 2-3、Figure 2-4)。IUPAC 基準 (1997) において、ダイナミックレンジはガス濃度とピークエリアの間で直線関係が維持される最大濃度と LOD の比として定義されている。各ガス種の算出されたダイナミックレンジを Table 2-3 に示す。本研究において、検出器電圧 (0.8 kV) とサンプルの導入量を決定するスプリット比 (30) は CH₄、CO₂、N₂O を 5ppm 以下から 20%までのレンジで同時に測定できる

ように設定した。5ppm 以下から 20%までのレンジで測定できれば、ほとんどの微生物の培養実験に対応できるからである。また N_2 や O_2 についても 70 ppm から 20%までのレンジで測定できるため、微生物の代謝で生成・消費される主要なガス種の動態を一度にモニタリングすることが可能である。より低い濃度のガスを測定する場合には、検出器電圧を上げる、またはスプリット比を下げ、カラムへの導入量を上げることによって検出限界を下げることも可能である。例えば、検出器電圧を 1.2 kV に上げ、スプリット比を 10 に下げること、大気中の N_2O (310 ppb) を検出することが出来る。同様に、スプリット比をさらに上げ、カラムへの導入量を下げること、より高濃度のガスを定量することが可能である。

H_2 の検出感度は他のガス種に比べて低い。これは H_2 のフラグメンテーション効率が高く、大部分が H^+ (m/z 1)になるためと考えられる。 m/z 1 は本研究で用いた GC/MS のセットアップでは検出することが出来ない(Table 2-3)。しかし、通常の培養実験でみられる水素濃度は一般的に本研究の H_2 の LOD より高いため (Aguilar et al. 2004; Boga et al. 2007; Cadillo-Quiroz et al. 2008; Hetzer et al. 2008) 、 H_2 の検出感度が低いことは GC/MS の有用性に影響を与えないと考えられる。

2.3.3 バックグラウンドガスがガス検出感度に及ぼす影響

バックグラウンドガスがガス検出感度に及ぼす影響を検証するため、 N_2 バックグラウンドと He バックグラウンドの O_2 の検出感度を比較した。Figure 2-5 に示すように、He バックグラウンドの方が、 N_2 バックグラウンドに比べて大きな傾きが得られ、 O_2 の検出感度が高い。これは次のように説明できる。(1) 分離カラムにおける N_2 の保持時間は O_2 のそれと近接している。(2) そのため、ほぼ同時にイオン化チャンバーに導入される。(3) 結果的に高濃度の N_2 の存在によって、 O_2 のイオン化が抑制され、イオン化されない O_2 は検出されないために検出感度が低減する。

したがって、例えば O_2 や CO のような、保持時間がバックグラウンドガス (N_2) の保持時間と近接しているようなガス種を測定する場合には、検量線を作成するための標準ガスについても、バックグラウンドガスを N_2 にする必要がある。また同様に、バックグラウンドガスが N_2 以外であっても、バックグラウンドガスは高濃度であるため、バックグラウンドガスのピークのテーリングによって測定するガス種の検出感度が低下する可能性がある。従って、検量線を作成するための標準ガスは、実際に測定するサンプルのバックグラウンドガスと同一のガスで作成する必要がある。

2.3.4 脱窒細菌のガス代謝のモニタリング

本研究の改良 GC/MS システムの有用性を検討するため、脱窒細菌 *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* ATCC 13985^T の培養時のヘッドスペースの O_2 、 CO_2 、 N_2O の濃度変化を 48 時間モニタリングした (Figure 2-6)。細菌の増殖と脱窒活性から 3 つのフェーズに分けられた。すなわち、(1) 好気生育状態、(2) 一時的な増殖停止状態、(3) 嫌気生育状態の 3 つである。この結果は明らかに、*P. aureofaciens* ATCC 13985^T は培養当初は酸素呼吸を行うが、ヘッドスペースの O_2 濃度が 10% を下回るにつれて、硝酸呼吸に切り替えることを示唆している。とりわけ、硝酸呼吸の開始は細胞の増殖と連動しておらず、むしろ一時的な増殖の停止が確認された。このような現象をはっきりと示した研究はほとんどない。本研究において、基質となるガス、生成されるガス、また細胞の増殖を同時に測定することで、今後の新たな研究課題になりうる *P. aureofaciens* の呼吸形態の切り換えと増殖に関する興味深い現象が観察された。

これまで脱窒細菌に関する生理学的研究のほとんどは嫌気条件あるいは微好気条件下で行われ (Zumft 1997)、好気から嫌気、あるいはその逆といった O_2 濃度の連続変化が脱窒活性 (Kester et al. 1997; Kornaros and Lyberatos 1998; Molstad et al. 2007; Otte et al. 1996; Thomas et al. 1994) や他の微生物のガス生成 (Kampschreur et al. 2008; Yu et al. 2010) に及ぼす影響に関する生理学的研究は限られている。その主な原因の一つは、

O₂や他の基質・生成ガスを同時にモニタリングするための適切かつ簡便な分析手法が限られているためと考えられる。好気・嫌気などの O₂ 濃度は微生物のライフスタイル、またそれゆえ物質循環を決定づける主要因の一つである (Brune et al. 2000; Megonigal et al. 2004)。本研究で達成されたガス代謝分析の大きな進展は微生物の生理学あるいは生態学の今後の研究に大きく役に立つと考えられる。

2.4 結論

改良 GC/MS システムを用いた分析法の確立によって、微生物の代謝でみられるガス化合物のほとんどを同時に分析することが可能となった。しかも、2.5 分で定量可能であり (Figure 2-2)、また、高感度かつ広いダイナミックレンジでの測定が可能となった (Table 2-3, Figure 2-4)。また、ガス導入口を He 流で被い、ガスの採取も He 流の中で行うことで (Figure 2-1, 2-2)、ガスの採取あるいは導入時の大気の混入を軽減し、N₂ や O₂ についても同様に測定することが可能となった (Table 2-3, Figure 2-4)。この改良 GC/MS システムは微生物学研究のみならず、植物のガス代謝などの他の生物学的研究にも適用できる。さらに、微生物学研究へのさらなる利用として、安定同位体を用いたトレーサー法と併せることで、微生物個体群や微生物群集の代謝経路や代謝反応速度論をより詳細に解析することが可能となる。その応用例の一つとして、次章で述べる研究では、土壌中の可給態窒素の窒素安定同位体比の測定技術として、可給態窒素を *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* s ATCC 13985^T を用いて N₂O に変換し、その N₂O の窒素安定同位体比 (¹⁵N/¹⁴N) をこの改良 GC/MS システムを用いて測定する手法を確立した。

Table 2-1 Operational conditions of GC/MS

Injection	Split ratio	30
	Injection volume	200 μ L
	Temperature	100 $^{\circ}$ C
GC Separation	Total flow	61.3 mL/ min
	Head pressure	38.0 kPa
	Column flow	2.03 mL/min
	Linear velocity	56.6 cm/sec
	Temperature program:	
MS detection	50 $^{\circ}$ C (2.5 min) $\xrightarrow{100\text{ }^{\circ}\text{C/ min}}$	110 $^{\circ}$ C (0.2min)
	Ionization energy	70 eV
	Ion source temperature	200 $^{\circ}$ C
	Interface temperature	250 $^{\circ}$ C
	Detection voltage	0.80 kV
	Analytical mode	SIM

Table2-2 Concentrations of gas species prepared for standard calibration. All of standard gas preparations listed here were quantified successfully, except one marked with asterisk.

Gas species	Diluted gas concentration for calibration (ppm)
H ₂	10.8 $\times 10^2$, 26.9 $\times 10^2$, 53.5 $\times 10^2$, 63.6 $\times 10^3$, 12.1 $\times 10^4$, 21.9 $\times 10^4$, 100 $\times 10^4$ (=100 %)
N ₂	541, 10.8 $\times 10^2$, 26.9 $\times 10^2$, 53.5 $\times 10^2$, 63.5 $\times 10^3$, 12.0 $\times 10^4$, 20.6 $\times 10^4$ (=20.6 %)
O ₂	541, 10.8 $\times 10^2$, 27.0 $\times 10^2$, 53.8 $\times 10^2$, 64.2 $\times 10^3$, 12.1 $\times 10^4$, 21.0 $\times 10^4$ (=21.0 %)
CH ₄	7.2, 57.3, 287, 529, 26.7 $\times 10^2$, 63.8 $\times 10^2$, 12.3 $\times 10^4$, 21.7 $\times 10^4$ (=21.7 %)
CO ₂	7.2*, 57.3, 287, 529, 26.7 $\times 10^2$, 64.0 $\times 10^2$, 12.0 $\times 10^4$, 21.0 $\times 10^4$ (=21.0 %)
N ₂ O	7.2, 57.3, 287, 529, 26.7 $\times 10^2$, 63.9 $\times 10^2$, 12.1 $\times 10^4$, 21.4 $\times 10^4$ (=21.4 %)

* peak was too small for m/z 28 of CO₂ to quantify at this concentration.

Table 2-3 The linear regression equations, estimated limits of detection (LODs), linear dynamic ranges and relative intensity of fragment ion. The three lowest concentrations quantified were used to obtain linear regressions (n=10 for each concentration). Correlation coefficient, R^2 , of all equations was approximated to 1.00.

Gas species	m/z	Ion species	Equation for standard curve	LOD (ppm)	Linear dynamic range	Relative intensity of fragment ion (%)
H ₂	2	H ₂ ⁺	$y = 0.2x - 34.0$	335.9	3.0×10^3	100
N ₂	28	N ₂ ⁺	$y = 49.1x + 4469.0$	60.5	3.4×10^3	100
	14	N ⁺	$y = 1.8x - 32.0$	81.8	2.5×10^3	3.7
O ₂	32	O ₂ ⁺	$y = 36.9x + 1522.7$	69.6	3.0×10^3	100
	16	O ⁺	$y = 1.4x + 14.1$	79.6	2.6×10^3	3.8
CH ₄	16	CH ₄ ⁺	$y = 21.2x + 3.1$	3.3	6.6×10^4	100
	15	CH ₃ ⁺	$y = 17.4x + 3.3$	3.8	5.7×10^4	82.1
CO ₂	44	CO ₂ ⁺	$y = 74.6x + 61.3$	5.1	7.2×10^4	100
	28	CO ⁺	$y = 6.2x + 93.7$	29.2	2.8×10^4	8.3
N ₂ O	44	N ₂ O ⁺	$y = 52.8x - 17.6$	2.2	9.7×10^4	100
	30	NO ⁺	$y = 14.0x - 0.4$	5.5	3.9×10^4	26.5

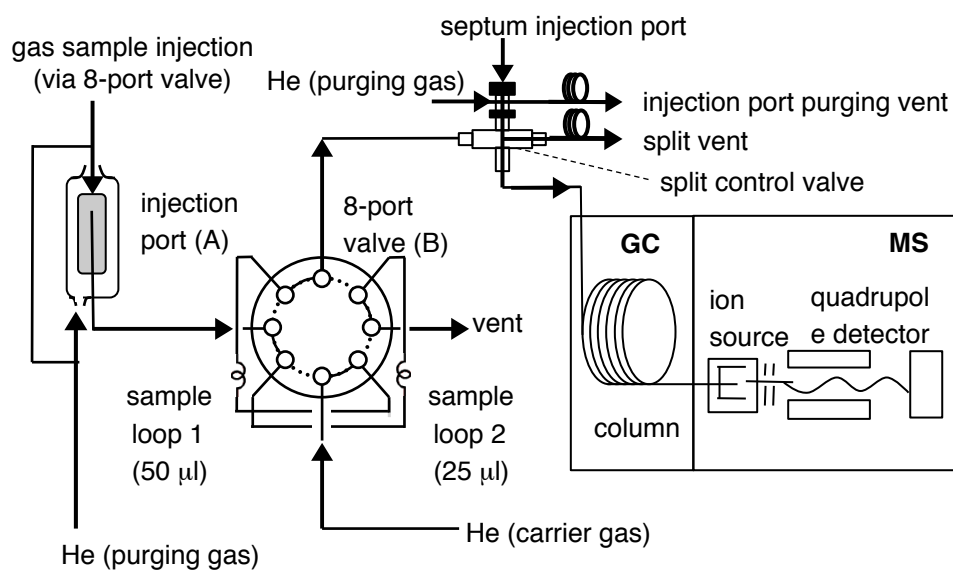


Figure 2-1. Schematic diagram of the commercial quadrupole GC/MS analytical system modified in this study. Gas samples were injected using a gas-tight syringe via the injection port (A) into one of the two sample loops fitted to the 8-port valve (B). The injection port and the 8-port valve were enveloped by He flowing in the surrounding jacket to avoid contamination with ambient air. Once the sample loop was filled with the injected sample, the valve was switched and the gas sample present in either of the sample loops was subsequently loaded on the streamline and conveyed by the carrier gas stream into the GC separation column. The gas components of the sample were separated on the separation column and each gas species was detected by the specific mass-to-charge ratio in the quadrupole detector.

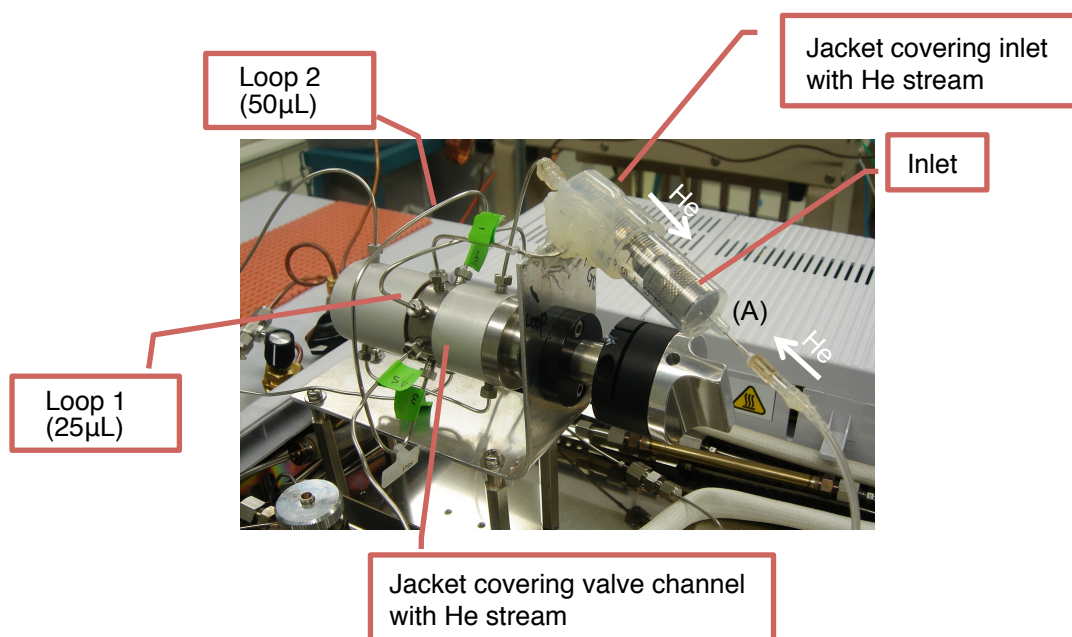


Figure 2-2. Picture of modified injection port and 8-port valve. Injection port was consisted mainly of an inlet and a jacket covering it. To avoid contamination from ambient air, inlet and 8-port valve were covered with He stream. For measurements, a 200- μ l gas sample was injected using a gas-tight syringe from the part, (A) in the picture into either a 25 or 50 μ l sample loop. Between sample injections, the injection port and the two sampling loops were flushed with ultrapure He as described in the picture.

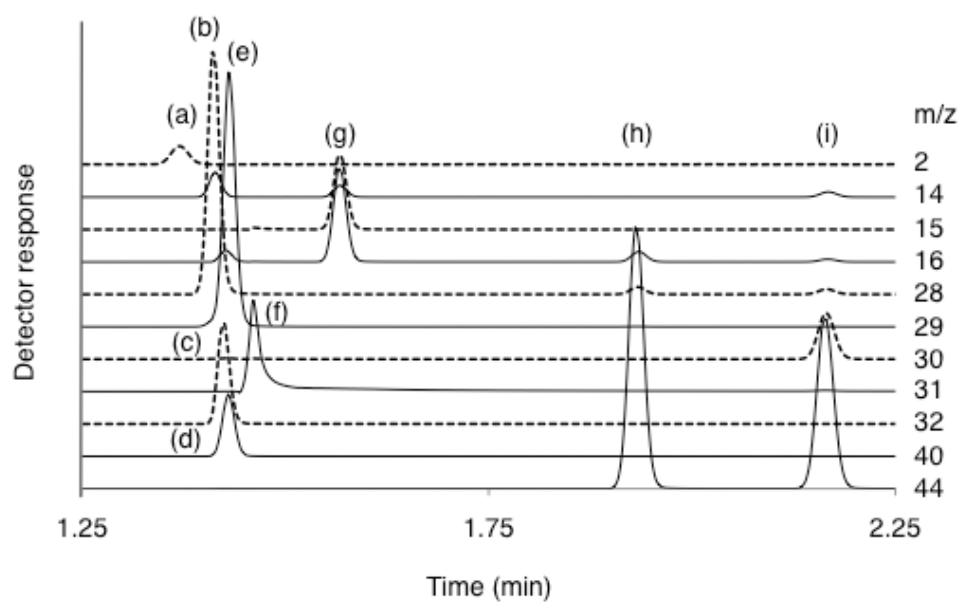


Figure 2-3. The mass chromatogram of a mixture of nine gasses species; H_2 (a, m/z 2), N_2 (b, m/z 14, 28), O_2 (c, m/z 16, 32), Ar (d, m/z 40), ^{13}CO (e, m/z 29), ^{15}NO (f, m/z 31), CH_4 (g, m/z 15, 16), CO_2 (h, m/z 28, 44), and N_2O (i, m/z 30, 44) in a He matrix.

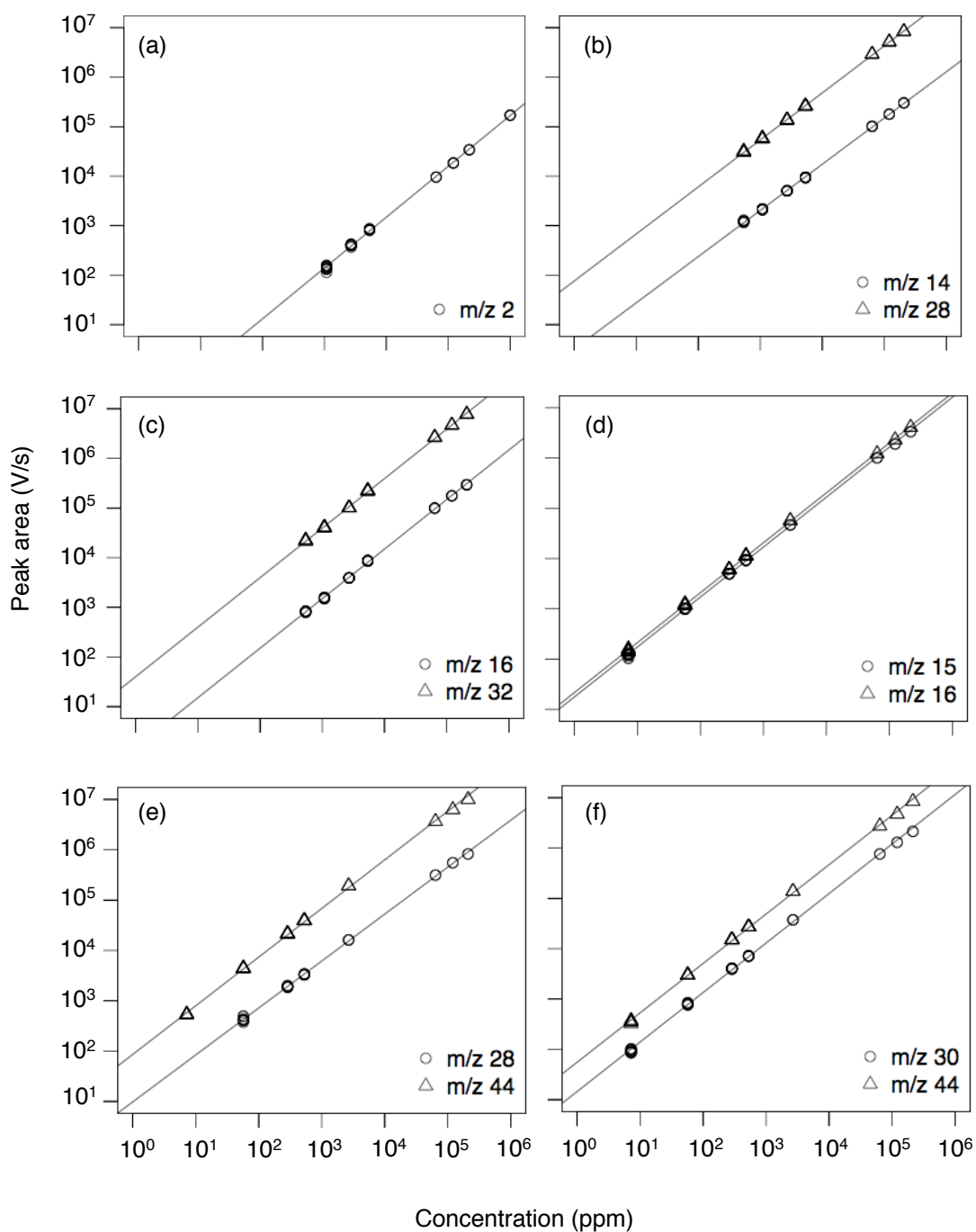


Figure 2-4. Standard curves on a double logarithmic scale for the estimation of dynamic ranges for H_2 (a, m/z 2), N_2 (b, m/z 14, 28), O_2 (c, m/z 16, 32), CH_4 (d, m/z 15, 16), CO_2 (e, m/z 28, 44), and N_2O (f, m/z 30, 44) in a He matrix. The square of the sample correlation coefficient, R^2 , of all the regression lines on the double logarithmic scale were above 0.999. Ten replicate injections for the three lowest concentrations, and four replicate injections for the higher concentrations were carried out.

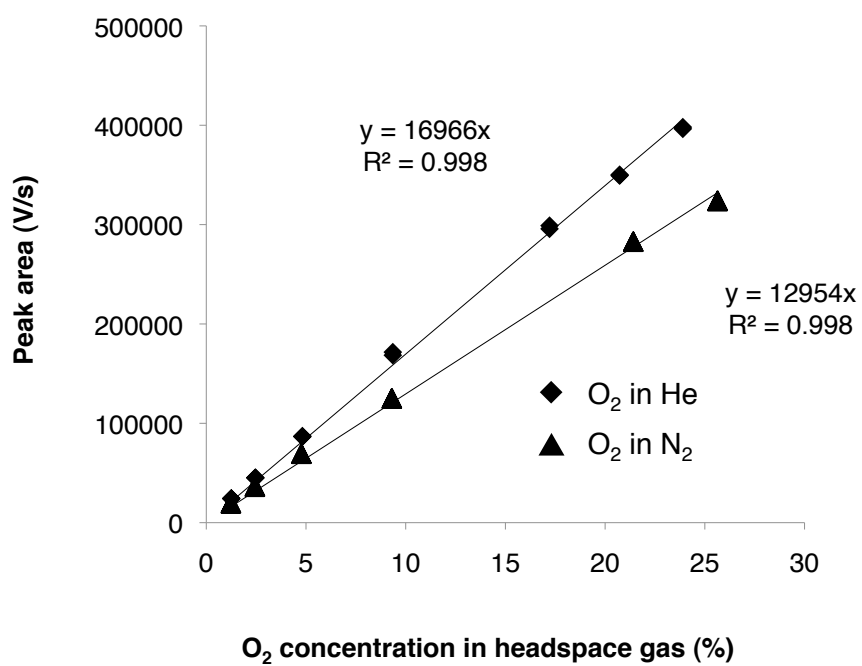


Figure 2-5. Standard curves for the O₂ concentration in He and N₂ matrices. All data are shown as the mean of n=2.

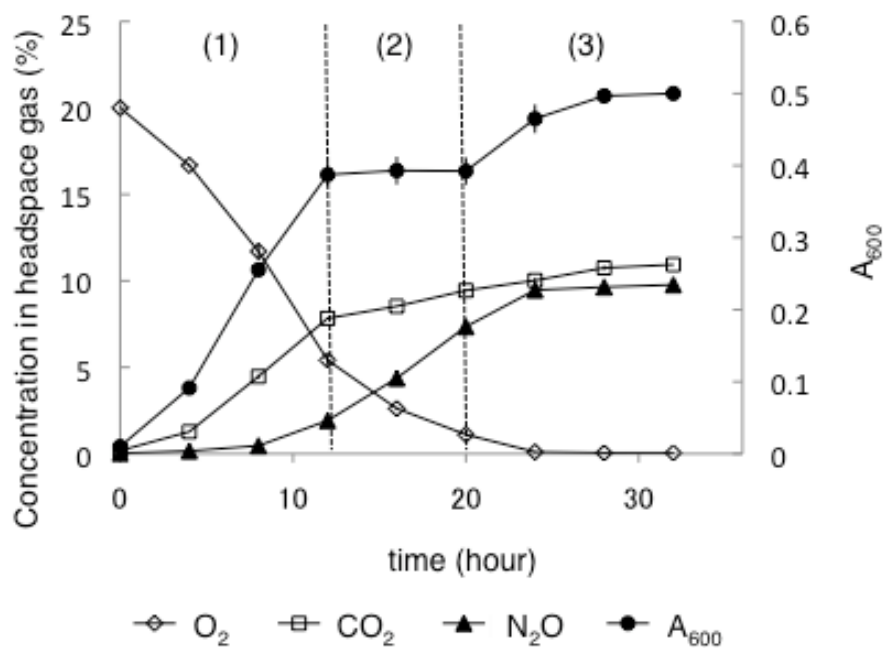


Figure 2-6. Concentrations of O_2 , CO_2 , and N_2O in the headspace of a rubber-stoppered serum bottle containing a culture of *P. aureofaciens* in 10mM nitrate-amended medium. The gas concentrations and A_{600} of the culture after a 48-h incubation period were 11.5 ± 0.0 % for CO_2 , 10.1 ± 0.0 % for N_2O , 0.05 ± 0.01 % for O_2 , and 0.51 ± 0.01 for A_{600} . Error bars represent the standard errors of means ($n=3$), although some error bars are masked by the symbols.

第3章 GC/MSを用いた土壌中の窒素化合物の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ の測定法の確立

3.1 緒言

森林土壌中では様々な窒素変換プロセスが同時並行しておこる。そのため窒素の動態や循環を理解するためには、それぞれのプロセスの窒素フロー速度の精確な測定が不可欠である。窒素フローの速度の測定には、従来から窒素安定同位体 (^{15}N) が用いられ、そこでは土壌中の窒素の安定同位体比 ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) を精確に測定する必要がある。そこで本章に記述する研究では、近年開発された脱窒菌法やアザイド法 (後述) に、第2章で記述した改良 GC/MS システムを組み合わせることによって、土壌中の窒素化合物の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を簡便かつ精確に測定する方法を新たに確立した。

前述 (第1章、セクション 1.4) の通り、土壌中で無機態窒素は生成と同時に消費されるため、実際のフローの速度 (真の速度、総速度) はプールサイズ (濃度) の変化から算出する速度 (見かけの速度、純速度) より大きい。そのため土壌中の窒素循環プロセスは、窒素フローの総速度にもとづいて解析する必要がある。また硝化を例にとると、硝化菌群集の機能は、硝酸のプールサイズや純硝化速度ではなく、総硝化速度に反映される。そのため硝化菌群集の生態系機能を明らかにするためには、総硝化速度を知ることが不可欠である。すなわち物質循環研究、微生物生態研究の両面から見ても窒素フローの総速度の測定は非常に重要である。

^{15}N の利用は、窒素フローの総速度を測定するための強力な分析ツールである。これまで ^{15}N を用いて、土壌中の無機化や硝化の総速度測定が行われてきた (Davidson et al. 1992)。具体的には土壌に $^{15}\text{NH}_4^+$ や $^{15}\text{NO}_3^-$ を添加し、 NH_4^+ や NO_3^- の濃度と $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ の単位時間あたりの変化から総速度を算出してきた。すなわち総速度の測定には、土壌中の窒

窒素化合物の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を精確に測定する必要がある。

窒素化合物の ^{15}N 測定について、これまで多くの改良が行われてきた。しかし、いまだにその分析行程は煩雑であり、同位体比質量分析装置 (Isotope ratio mass spectrometry: IRMS) のような高価な分析装置を必要とする。そのため、微生物を材料として生態学的・生理学的研究を行う研究者にとって、その重要性とは反面、総速度を測定するハードルは高い。また、環境サンプルの中でも、土壌サンプルは特に総速度を測定するのが困難である。土壌は不均一な系であるゆえ、一般に多くのサンプルを測定しなければいけない (分析の繰り返し数が多い)。そのため煩雑な分析行程や、分析に多量の窒素 (すなわち多量の土壌抽出液) を必要とする測定法は好ましくない。また土壌からの窒素化合物の抽出には通常 2M KCl や 0.5M K_2SO_4 溶液を用いるため、高塩濃度抽出液に対応した分析法が必要とされる。

従来、土壌抽出液中の窒素化合物に含まれる ^{15}N と ^{14}N の比 ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) は、これらの化合物を最終的にガス態の N (例えば N_2) に変換した後に、IRMS を用いて測定する、という行程で測定されてきた。従来法による NH_4^+ 、 NO_3^- 、全溶存窒素 (total dissolved nitrogen: TDN) の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 測定の行程を Figure 3-1 に示す。この行程でこれまで最も用いられてきた手法は diffusion 法 (Stark and Hart 1996) である。diffusion 法を用いた行程 (Figure 3-1) では、土壌抽出液からまず NH_4^+ のみを回収し、続いて NO_3^- を回収する。具体的には、土壌抽出液 (2M KCl または 0.5M K_2SO_4) をアルカリ条件下にして、液中の NH_4^+ を NH_3 として揮発させ、それを酸性のガラスフィルターを用いて NH_4^+ として回収する (diffusion 法)。 NH_4^+ がすべて回収されたら、土壌抽出液にデバルダ合金を加え、土壌抽出液中の NO_3^- を化学的に NH_4^+ に還元し、それを再度 diffusion 法で回収する。TDN の場合であれば、過硫酸との反応により、土壌抽出液中の TDN を NO_3^- に化学的に酸化し、デバルダ合金により NH_4^+ に還元した後、diffusion 法で回収する。 NH_4^+ としてそれぞれ回収された、土壌抽出液中の NH_4^+ 、 NO_3^- 、TDN は、元素分析装置 (elemental analyzer: EA) 付き IRMS (EA-IRMS) の中で燃焼して N_2 にした後、その $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を $^{28}\text{N}_2$ 、 $^{29}\text{N}_2$ 、

$^{30}\text{N}_2$ の比によって算出する。しかし、diffusion 法と EA-IRMS の組み合わせにはいくつかの測定上の問題点がある。例として次の (A) - (D) を挙げる。

(A) 抽出液中の NO_3^- の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を測定するためには、その前に NH_4^+ を抽出液から diffusion 法によって回収しておく必要がある。そのため、 NH_4^+ の回収が不完全であれば、全ての測定に大きな誤差を与えてしまう。

(B) 試薬、特にデバルダ合金は不純物として窒素を含んでおり、その高い窒素ブランクを考慮しなければいけない (Stephan and Kavanagh 2009)。

(C) 最終生成物である N_2 は大気の主成分であるため、分析時に大気からの N_2 の混入により測定精度が低下するリスクが高い。そのため、精確に分析するためには、サンプルの窒素量を相対的に多く IRMS 分析システムに導入する必要がある。そのため分析には多くの窒素量 (e.g. 60 $\mu\text{g-N}$)、すなわち多くの抽出液が必要とされる。

(D) 多くの IRMS は自然安定同位体比程度すなわち 0.366 ^{15}N atom% (^{15}N atom% = $100 \times ^{15}\text{N} / (^{14}\text{N} + ^{15}\text{N})$ (%)) 程度を中心に、微量の ^{15}N の変動 (例えば 0.363 ^{15}N atom% と 0.372 ^{15}N atom% の差) を測定するために設計されている。しかし、総速度は、土壤に ^{15}N を加えて測定するために、それに比べて多量の ^{15}N の変動 (例えば 10 ^{15}N atom% と 30 ^{15}N atom% の差異) を扱う。そのため、総速度測定に IRMS を用いると、多量の ^{15}N が IRMS に導入されるため、IRMS の検出器 (ファラデーカップ) が飽和して測定できない。その場合、抽出液中の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を希釈する (^{15}N atom% を下げる) 必要が生じる。抽出液中の窒素化合物の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ の希釈は、その窒素化合物の ^{14}N を抽出液にスパイクすることで行う。しかし、そのようなスパイクによる $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ の希釈は、作業行程が煩雑になるだけでなく、大きな誤差を生む可能性がある。

これらの問題点を補うためのいくつかのオプションも提示されてきた (Risgaard-Petersen et al. 1993; Stevens and Laughlin 1994; Christensen and Tiedje 1988; Sigman et al. 2001; Stange et al. 2007)。その中でも、Sigman et al. (2001) が開発した脱窒菌法は上記の (A) - (C) をクリアし、実験室内でのハンドリングが最も容易な方法で

ある。Sigman et al. (2001) は、デバルダ合金による還元および diffusion 法の代わりに、脱窒菌を用いて NO_3^- を N_2O に還元し、その $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を IRMS を用いて測定する方法を確立した。 N_2O は大気中の濃度が小さいための、大気からの混入による影響はほとんどない。

しかし、Sigman et al. (2001) の方法も、微量の ^{15}N の変動を測定する目的に開発された測定法である。つまり IRMS を使用するために、上述の問題点 (D) は解決されていない。さらに、クライオトラップなどのガス濃縮のための前処理を行うために分析が煩雑である。従って総速度測定のためには分析行程のさらなる改良が必要である。しかし、第 2 章で示した改良 GC/MS システムを用いれば、容易に解決できる可能性が高い。GC/MS システムは、 N_2O の検出に前処理を必要とせず、また N_2O の濃度定量に対して 10^5 のダイナミックレンジを示す (第 2 章)。それゆえ、 ^{15}N atom% に対しても幅広いレンジすなわち 0.366 ^{15}N atom% から 100 ^{15}N atom% での定量が可能であることが予想される。

そこで、本章では、土壌中の窒素フローの総速度測定の簡便な測定法の確立のために、微量の ^{15}N の変動を測定する目的に近年開発された脱窒菌法やアザイド法 (後述) と第 2 章で示した GC/MS システムを組み合わせることで、土壌中の可給態窒素 (NH_4^+ 、 NO_3^- 、 NO_2^- 、TDN) の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を簡便かつ精確に測定するための分析法を確立することを目的とした。

3.2 方法

本研究の行程を Figure 3-2 に示す。この分析システムにおいて、 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、TDN の測定が 0.366 ^{15}N atom% から 100 ^{15}N atom% までのレンジで可能かどうか、それぞれの窒素化合物の 2M KCl または 0.5 M K_2SO_4 を用いて作成した標準溶液に対して適用し、検討した。また、GC/MS はそれぞれの窒素化合物の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ のみならず濃度も同時に測定できると考えられることから、濃度の標準溶液についても作成し、同様の検討を

行った。

具体的には、 NH_4^+ は、抽出液から diffusion 法によって回収し（後述: 3.2.2）、過硫酸酸化法によって NO_3^- へと酸化した（後述: 3.2.3）。TDN は、過硫酸酸化法によって NO_3^- へと酸化した（後述: 3.2.4）。従来法の分析行程（Figure 3-1）では、 NO_3^- および TDN を NH_4^+ として回収するが、本研究の行程（Figure 3-2）では NH_4^+ および TDN を NO_3^- に変換した。 NO_3^- および NO_3^- とした NH_4^+ 、TDN はそれぞれ、第 2 章で用いた脱窒菌 *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* ATCC 13985^Tを用いて N_2O に還元した（後述: 3.2.5）。 N_2O とした NH_4^+ 、 NO_3^- 、TDN をそれぞれ、GC/MS システムを用いて濃度と $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ の同時定量を行った（後述: 3.2.7）。

また、これまでの総速度測定法においてほとんど対象とされてこなかった NO_2^- も対象とするために、 NO_2^- の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ の簡便な測定法の確立を目指した。 NO_2^- はアジ化水素との反応により化学的に N_2O に還元し（後述: 3.2.6）、その $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を GC/MS システムを用いて定量した（後述: 3.2.7）。

3.2.1 濃度測定および同位体比（ $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ）測定用の標準溶液の作成

一般的に、土壌中の可溶態窒素の抽出には 2 M KCl 溶液が用いられる。そのため 2 M KCl 溶液を用いて、 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、TDN の標準溶液を作成した。また、一般的に、土壌微生物バイオマス窒素の測定には 0.5 M K_2SO_4 溶液が用いられる。すなわち土壌微生物バイオマス窒素は、土壌をクロロホルム燻蒸する前後に 0.5 M K_2SO_4 溶液で抽出された土壌中の TDN の差から算出される。そのため 0.5 M K_2SO_4 溶液を用いて、TDN の標準溶液を作成した。

$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 測定用に 0.37、10.3、20.2、49.8、99.3 ^{15}N atom% の標準溶液を、濃度測定用に 0、10、20、50、100 $\mu\text{M-N}$ (NH_4^+) または 0、100、200、500、1000 $\mu\text{M-N}$ (NO_3^- 、TDN) の標準溶液を作成した。TDN の測定のためには、標準物質としてグリシンを用いた。 ^{15}N 標準溶液には ^{15}N ラベルされた窒素化合物 (NH_4Cl 、 NaNO_2 、 KNO_3 、グリシン、99.3 ^{15}N

atom%; Isotec Inc., OH, USA) を用いた。その他の試薬は Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan) の製品を用いた。分析に使用した KCl、MgO、K₂SO₄ には不純物として窒素が含まれているために、使用前に 450°C で 4 hr 熱する事で、不純物の窒素を揮発させ、結果として測定の際の窒素ブランクを軽減させた。

これらの標準溶液を用いて、以下 3.2.2-3.2.7 を行った。

3.2.2 diffusion 法による NH₄⁺の回収 (Figure 3-2、Diffusion to collect NH₄⁺)

2 M KCl 溶液中の NH₄⁺は diffusion 法によって回収した。手順は以下の通りである。(1) まず NH₃ ガスをトラップするためのテフロンパックを作成した。これは、ガラスフィルター (GF/D, 1 cm diameter, muffled at 450°C for 4 hr; Whatman Int. Ltd., Maidstone, UK) に 2 M H₂SO₄ を 20 µL 滴下し、それをガス透過性のテフロンテープ (2.5 cm × 5-6 cm, #Z221880; Sigma-Aldrich) で包んだ。気体である NH₃ のみがテフロンテープを透過し、酸性のガラスフィルターによって (NH₄)₂SO₄ としてトラップされるという仕組みである。(2) 続いて、10mL の NH₄⁺標準溶液を高密度ポリエチレンボトル (60 ml, NL2114-0002, Nalgene; Thermo Fisher Scientific K.K., Yokohama, Japan) に入れ、そこにテフロンパックを加え、MgO を 0.03 g 加えた。ボトルはすぐに蓋を密に閉めた。MgO を加える事で溶液はアルカリ条件化になり、溶液中の NH₄⁺は NH₃ となり揮発する。(3) これを 37°C で 1 週間インキュベートした後、NH₃ をトラップしたテフロンパックを回収した。

3.2.3 NH₄⁺の NO₃⁻への過硫酸酸化 (Figure 3-2、Persulfate oxidation of NH₄⁺ to NO₃⁻)

トラップした NH₄⁺を、過硫酸との反応により NO₃⁻にまで酸化した。手順は以下の通りである。(1) まず NH₄⁺を NO₃⁻にまで酸化するために過硫酸酸化反応液 (Persulfate-oxidizing reagent: POR) を作成した。POR は、蒸留水 100 ml に対して、NaOH を 1.52g、K₂S₂O₈ を 5 g、ホウ酸を 3g 加えて作成し、pH 試験紙で pH12 程度であることを確認した。(2) 次に、テフロンパック中の NH₄⁺を溶出させた。すなわち、テフロンパ

ックを洗浄したハサミで開封し、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ としてトラップしたガラスフィルターを取り出し、14 ml のねじ口ガラス試験管（71-063-006; Iwaki, AGC Techno Glass Co. Ltd., Chiba, Japan）に移した。試験管に 2 ml の蒸留水を入れ、ねじロキャップ（71-028-004; Iwaki）をしめ、10 分程度放置することで、 NH_4^+ を溶出させた。(3) 続いて、試験管に 2 ml の POR を試験管に入れ、すぐにねじロキャップを密にしめた。この試験管を 121°C で 1 時間、オートクレーブにかけることで、 NH_4^+ をすべて NO_3^- に酸化した。オートクレーブ終了後、溶液の pH が 6 程度になっていることを確認した。試験管は次の分析まで 4°C で保存した。

3.2.4 TDN の NO_3^- への過硫酸酸化 (Figure 3-2、Persulfate oxidation of TDN to NO_3^-)

全溶存窒素 (TDN = $\text{DON} + \text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) についても同様に過硫酸との反応によって NO_3^- にまで酸化した。まず 2M KCl および 0.5M K_2SO_4 溶液で作成したグリシン標準溶液 1 ml を試験管に入れ、POR を 2 ml 加えた。その後の分析条件ならびに行程は全て NH_4^+ 溶液の場合と同様である。

3.2.5 脱窒菌法による NO_3^- の N_2O への還元

(Figure 3-2、Reduction of NO_3^- to N_2O by denitrifier)

NO_3^- および NO_2^- に酸化した NH_4^+ と TDN をそれぞれ脱窒菌法によって N_2O に還元した。手順は以下の通りである。(1) まず、 N_2O 還元能のない脱窒菌、*P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* ATCC 13985^T を Casciotti et al. (2002) にしたがって培養した。すなわち 120 ml のガラスバイアル (0501-09, vial No. 8, Maruemu Corp. Co. Ltd. Osaka, Japan) に培養液 100 ml を入れ、ブチルゴム栓とアルミシールで密閉し、 121°C で 1 時間オートクレーブ滅菌した。培養液の組成は DifcoTM Tryptic Soy Broth (Becton Dickinson, NJ, USA)、10 mM KNO_3 、7.5 mM NH_4Cl 、36 mM KH_2PO_4 である。この培養液にシリンジを用いて、同じ組成の培地で 6-10 日間前培養した *P. aureofaciens* ATCC 13985^T の培養液を 1ml 添加した。6-10 日（培養液中の NO_3^- が全て N_2O になり、*P. aureofaciens* ATCC 13985^T が飢餓状態と

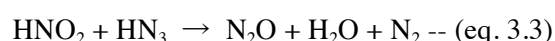
なる) 26.5°C で静置培養した。(2) 培養後、 NO_2^- の生成がないことを比色検定により確認し、遠心 (9600 × g、10 min) によって菌体密度を 6 倍に濃縮した。(3) 続いて、濃縮した培養液を He でパージし、溶存している N_2O を完全に取り除いた。(4) その培養液 2 mL を 20 mL のガラスバイアル (Autosampler Vial, 20-CV; Chromacol, Welwyn Garden City, UK) に分注したのち、ブチルゴム栓 (Anaerobic stopper, Kanda Co., Tokyo, Japan) とアルミキャップで密閉した。これをさらに 30 分間 He で再度パージする事で、バイアル中の O_2 と N_2O をすべて He で置換した。(5) ここに、 NO_3^- および NO_3^- に酸化した NH_4^+ と TDN の標準溶液をシリンジで 1 ml 添加した。添加量は添加前と添加後の重さの差から、重量で記録した。(6) 添加後、バイアルはオーバーナイトで培養し、 NO_3^- を全て N_2O に還元した。(7) 培養後、6 M NaOH を 0.3 mL シリンジで添加し、殺菌した。この操作は殺菌によって反応を停止させると同時に、培養液をアルカリ性にするため、気相中の CO_2 を液相に溶存させる。最後にシリコンシーリング剤 (KE-42-T; Shin-Etsu Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan) をセプタムの表面に塗り、 N_2O がバイアルから抜けて行く可能性を除外した。

3.2.6 アザイド法による NO_2^- の N_2O への還元

(Figure 3-2、Reduction of NO_2^- to N_2O with azide)

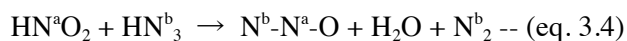
本研究では、これまでの総速度測定法においてほとんど対象とされてこなかった NO_2^- についても対象とするために、 NO_2^- の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ の簡便な測定法の確立を目指した。

NO_2^- はアザイド法 (McIlvin and Altabet 2005) によって N_2O に還元した。すなわち HNO_2 をアジ化水素 (HN_3) との反応により化学的に N_2O に還元した。 HNO_2 と HN_3 の反応式は以下の通りである。



なお、この反応により生成する N_2O の 2 分子の N にうち、一分子は NO_2^- の N に、もう

一分子の N は HN_3 の N に由来する。また N_2O の構造式は N-N-O であり、一番目の N は NO_2^- の N に、2 番目の N は HN_3 の一分子の N に由来する。それを反応式で次に示す。



手順は以下の通りである。(1) まずアジ化ナトリウム (NaN_3) を酸性条件下におき、 HN_3 溶液を作成した。すなわち、20 ml のバイアルに 2 M NaN_3 溶液を 5 ml 加え、ブチルゴム栓とアルミシールで密閉した。そのバイアルをドラフト内に移し、短いニードルを気相に刺し、20% 酢酸溶液 5 ml をシリンジでバイアルに添加した。続いてアザイド／酢酸バッファー溶液を He で 30 分以上パージして、溶液中の N_2O を短いニードルを通して除去した。(2) 続いて、 HNO_2 と HN_3 との反応により N_2O を生成させた。すなわち、 NO_2^- の標準溶液 5mL を 10ml のバイアルに加え、ブチルゴム栓とアルミシールで密閉し、ドラフト内に移した。そこにパージしたアザイド／酢酸バッファー溶液を 0.3 ml、シリンジで添加した (McIlvin and Altabet 2005)。バイアルを数秒穏やかに振り、30 分間ドラフト内に静置し、 NO_2^- をすべて N_2O に還元した。(3) 最後に 6 M NaOH を 0.3 ml 加え、反応を停止させた。

HN_3 は毒性のガスでもあるので、全ての操作はドラフト内で行った。

3.2.7 GCMS による N_2O の濃度と ^{15}N atom% の測定

(Figure 3-2、 N_2O concentration and its ^{15}N atom% measurement by GC/MS)

NH_4^+ 、 NO_3^- 、TDN、 NO_2^- からそれぞれ生成した N_2O の濃度および $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を、第 2 章で示した GC/MS システムを用いて測定した。GC/MS の検出器電圧は 1.2 kV に設定し、その他の分析条件は第 2 章に記載した条件を用いた。測定は、バイアルのヘッドスペースから 250 μL をガスタイトシリンジ (Series A-2, VICI; Valco Instruments) で採取し、50 μL のサンプルループを通して、GC/MS へ導入した。

本実験で検出される N_2O の主な分子量は次の通りである。 m/z 44 (^{14}N - ^{14}N - ^{16}O)、 m/z 45

(^{15}N - ^{14}N - ^{16}O 、 ^{14}N - ^{15}N - ^{16}O)、 m/z 46 (^{15}N - ^{15}N - ^{16}O 、 ^{14}N - ^{14}N - ^{18}O) と、それらがフラグメンテーションを受けた m/z 30 (^{14}N - ^{16}O)、 m/z 31 (^{15}N - ^{16}O)。そこで、 m/z 44、45、46 の存在比から、それぞれの窒素化合物の ^{15}N atom% を Stevens et al. (1993, 1997) の式を用いて算出した。

$$^{15}\text{N atom\% in N}_2\text{O} = 100 \times (^{45}\text{R} + 2 \times ^{46}\text{R} - ^{17}\text{R} - 2 \times ^{18}\text{R}) / (2 + 2 \times ^{45}\text{R} + 2 \times ^{46}\text{R}) \text{ -- (eq. 3.5)}$$

^{45}R : m/z 45 のピークエリア / m/z 44 のピークエリア

^{46}R : m/z 46 のピークエリア / m/z 44 のピークエリア

^{17}R : $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$ ($= 379.9 \times 10^{-6}$, Li et al., 1998)

^{18}R : $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ($= 2005.2 \times 10^{-6}$, Baertschi 1976)

3.3 結果

3.3.1 N_2O の分離と検出

Figure 3-3 に本研究の GC/MS システムで得られた典型的な 2 つのクロマトグラムを示す。Figure 3-3 の (a)、(b) は 0、100、200、500、1000 $\mu\text{M-N}$ の NO_3^- (0.37 ^{15}N atom%) を N_2O に還元し、分析し、得られたクロマトグラムである。(a) は m/z 44 (^{14}N - ^{14}N - ^{16}O) を、(b) は m/z 30 (^{14}N - ^{16}O 、 ^{14}N - ^{14}N - ^{16}O のフラグメントイオン) をモニタリングした結果である。Figure 3-3 の (c)、(d)、(e) は 0.37、10.3、20.2、49.8、99.3 ^{15}N atom% の NO_3^- (100 $\mu\text{M-N}$) を N_2O に還元し、分析し得られたクロマトグラムである。(c) は m/z 44 (^{14}N - ^{14}N - ^{16}O)、(b) は m/z 45 (^{15}N - ^{14}N - ^{16}O 、 ^{14}N - ^{15}N - ^{16}O)、(c) m/z 46 (^{15}N - ^{15}N - ^{16}O 、 ^{14}N - ^{14}N - ^{18}O) をモニタリングした結果である。Figure 3-4 に Fig. 3-3 (c) - (e) の 20.2 ^{15}N atom% のピークの拡大図を示す。

N_2O (^{14}N - ^{14}N - ^{16}O) と CO_2 (^{16}O - ^{12}C - ^{16}O) は同じ分子量 (MW = 44) をもつ。しかし、

第2章で示した通り、本研究の GC/MS 分析システムにおいては CO_2 と N_2O はガスクロマトグラフによって完全に分離されており、 N_2O は単独ピークとして検出される。Figure 3-4 においても、 CO_2 と N_2O は完全に分離されている。また Figure 3-4 において CO_2 のピークが N_2O のピークに比べてはるかに小さいのは、脱窒菌法において、最終的に NaOH を添加し (3.2.5)、気相の CO_2 を溶存させたことによる。

本研究では、測定の妥当性をチェックするためにも、 m/z 44、45、46 だけでなく、 m/z 30、31 も同時にモニタリングした。 m/z 30、31 のモニタリングでは N_2O の主なフラグメントイオン NO^+ ($^{14}\text{N}-^{16}\text{O}$ 、 $^{15}\text{N}-^{16}\text{O}$) は検出されるが、 CO_2 の主なフラグメントイオン CO^+ ($^{12}\text{C}-^{16}\text{O}$ 、 m/z 28) は検出されない。

3.3.2 2 M KCl 溶液中の NO_3^- 、TDN、 NH_4^+ の濃度および ^{15}N 分析

Figure 3-5 の (a) - (c) に 2 M KCl 溶液中の NO_3^- 、TDN、 NH_4^+ のそれぞれの濃度とピークエリアの関係 (濃度の標準曲線) を示す。 N_2O のピークエリアは分子イオン (N-N-O) の m/z 44+45+46 とフラグメントイオン (N-O) の m/z 30+31 から作成した。その結果、Figure 3-5 の (a) と (b) において、 NO_3^- と TDN について、濃度 0-1000 μM とピークエリア (m/z 44+45+46 および m/z 30+31) との間で良い直線性が得られた ($R^2 > 0.999$)。Figure 3-5 の (c) において、 NH_4^+ について、濃度 0-100 μM とピークエリア (m/z 44+45+46 および m/z 30+31) の間で良い直線性が得られた ($R^2 > 0.999$)。

Figure 3-5 の (d) - (f) に 2 M KCl 溶液中の NO_3^- 、TDN、 NH_4^+ のそれぞれの実際の ^{15}N atom% とピークエリアから算出した ^{15}N atom% の関係 (^{15}N atom% の標準曲線) を示す。ピークエリアからの ^{15}N atom% の算出は、得られた N_2O ピークの m/z 44、45、46 のエリア値から eq. 3.5 をもとに算出した。その結果、Figure 3-5 の (d) - (f) において、 NO_3^- 、TDN、 NH_4^+ について、0.37-99.3 ^{15}N atom% のレンジで、実際の ^{15}N atom% とピークエリアから算出した ^{15}N atom% の間で良い直線性が得られた ($R^2 > 0.999$)。

Figure 3-5 の (f) の差し込み図に、0.37、0.46、1.05、2.54、5.07、9.26 ^{15}N atom% の NH_4^+

で作成した標準溶液を用いて作成した ^{15}N atom% の標準曲線を示す。 NH_4^+ は NO_3^- や TDN に比べて、その $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を精確に定量するのが困難である。 NH_4^+ は、 N_2O に変換するまでに、 NO_3^- や TDN と比べて diffusion など、より多くの前処理を必要とするので、特にその ^{15}N atom% が小さいときには難しいはずである。それにもかかわらず、 NH_4^+ の標準曲線は低い ^{15}N atom% (0.37 - 9.26) のレンジにおいても良い直線性が得られた ($R^2 > 0.999$)。

3.3.3 0.5 M K_2SO_4 溶液中の TDN の濃度および ^{15}N 分析

Figure 3-6 の (a) に 0.5 M K_2SO_4 溶液中の TDN の濃度とピークエリアの関係 (濃度の標準曲線) を示す。濃度 0-1000 μM とピークエリア (m/z 44+45+46 および m/z 30+31) の間で良い直線性が得られた ($R^2 > 0.999$)。続いて、Figure 3-5 の (b) - (f) に 0.5 M K_2SO_4 溶液中の TDN の実際の ^{15}N atom% とピークエリアから算出した ^{15}N atom% の関係 (^{15}N atom% の標準曲線) を示す。0.37-99.3 ^{15}N atom% のレンジで、実際の ^{15}N atom% とピークエリアから算出した ^{15}N atom% の間で良い直線性が得られた ($R^2 > 0.999$)。

3.3.4 2 M KCl 溶液中の NO_2^- の ^{15}N 分析

Figure 3-7 に 2 M KCl 溶液中の NO_2^- の実際の ^{15}N atom% とピークエリアから算出した ^{15}N atom% の関係 (^{15}N atom% の標準曲線) を示す。ピークエリアからの ^{15}N atom% の算出は、得られた N_2O ピークの m/z 44、45、46 のエリア値から eq. 3.5 の式をもとに算出した。その結果、0.37-99.3 ^{15}N atom% のレンジで、実際の ^{15}N atom% とピークエリアから算出した ^{15}N atom% の間で良い直線性が得られた ($R^2 > 0.999$)。 HNO_2 と HN_3 との反応で生成する N_2O の 2 分子の N にうち、一分子は HNO_2 の N に、もう一分子の N は HN_3 の N に由来するため (eq. 3.4)、回帰直線の傾きは 0.5 に近くなった (0.475)。

3.4 考察

本研究は、 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、TDN をそれぞれ、同位体比として 0.37 ^{15}N atom% から 99.3 ^{15}N atom% のレンジで、濃度として 0 - 1000 μM (0 - 100 μM - NH_4^+) のレンジで測定が可能かどうかを、標準溶液を用いて検討した。その結果、すべての窒素化合物の ^{15}N atom% の標準曲線、また濃度の標準曲線において良い直線性 ($R^2 > 0.999$) が得られた。すなわち本研究の分析行程によって、2M KCl 中の NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、TDN の同位体比と濃度が一度に測定できるようになった。総速度測定の際に見られる土壌抽出液中の窒素化合物の濃度および $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ は、ほとんどの場合、本研究での測定レンジ (0 - 1000 μM -N (0 - 100 μM - NH_4^+) および 0.37 - 99.3 ^{15}N atom%) に含まれる。

まず本研究では、従来、0.366 ^{15}N atom% 程度を中心に、微量の ^{15}N の変動 (例えば 0.363 ^{15}N atom% と 0.372 ^{15}N atom% の差) を測定するために開発された脱窒菌法やアザイド法を、総速度測定のために、0.37 ^{15}N atom% から 99.3 ^{15}N atom% のレンジでの ^{15}N 解析法に適用した。それにより、diffusion 法と EA-IRMS を用いた行程 (Figure 3-1) で見られる問題点 (A) - (C) (前述: 3.1) を以下のように解決できた。すなわち、(A) NH_4^+ を diffusion 法によって回収するという行程を経ずして、 NO_3^- の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を測定することが可能となった。また、(B) NO_3^- および TDN の測定の際、デバルタ合金による NH_4^+ への還元と diffusion 法による回収というプロセスを経ずして、一度に N_2O に還元できるので、行程が短縮されると同時に、従来の方法で見られる高い窒素ブランクは見られなかった。さらに、(C) 最終的に大気中の 78% を占める N_2 ではなく、310 ppb 程度しか存在していない N_2O に変換して測定するため、大気の混入による測定精度の低下のリスクは著しく軽減された。

続いて、第 2 章で示した GC/MS システムを用いたことによって、IRMS で見られた分析行程上の問題点 (D) (前述: 3.1) についても以下のように解決できた。すなわち、(D) 0.37 ^{15}N atom% から 99.3 ^{15}N atom% のレンジでの ^{15}N 解析が可能なおから、抽出液中の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を装置の測定可能なレベルに合わせるように希釈する必要がない。それにより、分析作業が煩雑になることなく、精確な測定が可能である。GC/MS システム

を用いる利点は、他にもある。(1) - (3) に示す。

- (1) GC/MS は IRMS に比べて、はるかに安価であり、微生物の代謝解析に広く使用されている (第 2 章)。そのため、微生物を材料として生態学的・生理学的研究を行う多くの研究室において使用可能な分析装置である。
- (2) 分析の前処理に化学トラップ (chemical traps) やクライオフォーカスユニット (cryofocusing units) などのガス濃縮のための前処理を必要としないヘッドスペース法であるために、測定が格段にシンプルである。
- (3) IRMS では通常、濃度は測定できないが、GCMS では Figure 3-5 (a) - (c) および Figure 3-6 (a) で示したように、 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ と同時に濃度も測定できる。

すなわち、GC/MS システムを用いたことによって、土壌中の窒素フローの総速度はこれまでにないほどに簡便に測定できるようになった。これは、微生物の生態学や生理学を研究対象とするような研究者においても十分に実行可能な手法である。

本研究では、上述の GC/MS 分析システムによって 6 サンプルの分析を 12 分で行うことができた。すなわち、一日に 100 サンプル以上の測定が可能である。また、各窒素化合物の ^{15}N 測定を 1-10 ml の抽出液を用いて、解析することができる。これは多くの窒素量 (e.g. 60 $\mu\text{g-N}$)、すなわち多くの土壌抽出液を必要とした従来の分析手法 (Figure 3-1) の 1/10-1/100 倍の量である。このように少量の抽出液を試料として、多くの測定が可能になったことは、多数のサンプルを分析しなければならない土壌を対象とする研究にとっては非常に重要な利点である。

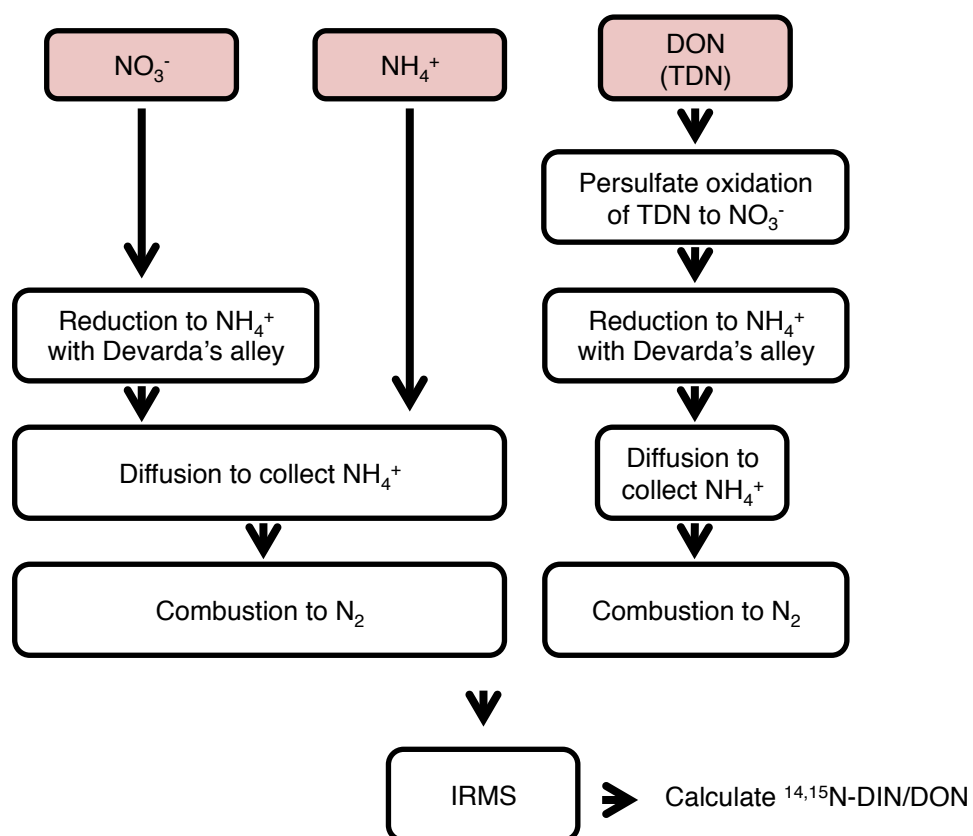


Figure 3-1. Flowchart showing most popular analytical procedures to data for different N forms.

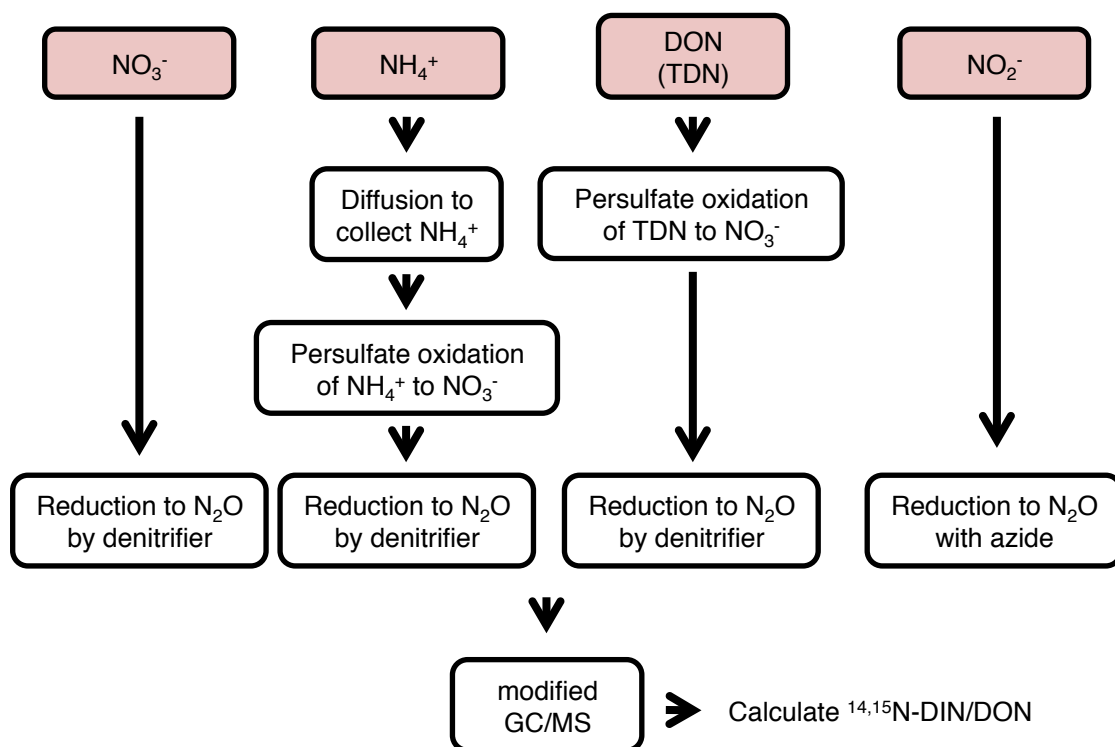


Figure 3-2. Flowchart showing analytical procedures for different N forms in this study.

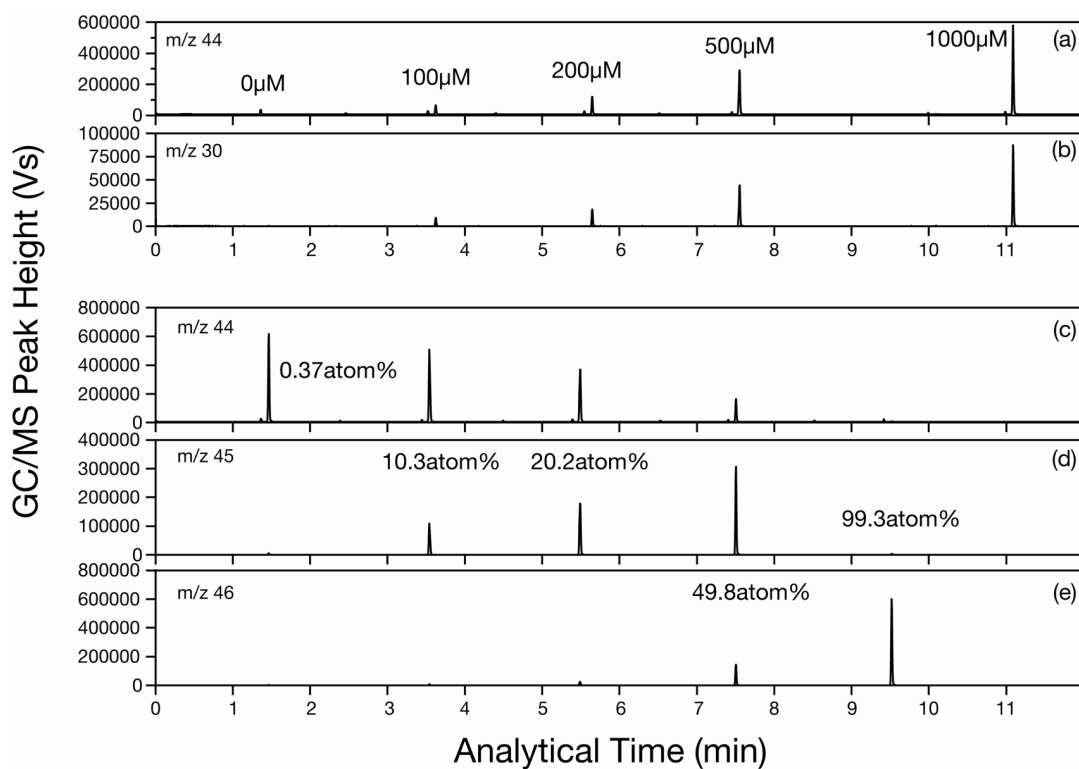


Figure 3-3. Typical chromatograms of our analytical method. The upper two graphs show the chromatograms with constant 0.37 ^{15}N atom% with different concentrations (0, 100, 200, 500, and 1000 μM) scanning m/z 44 (A) and m/z 30 (B). The lower three graphs show the chromatograms with constant 100 μM with different ^{15}N atom% (0.37, 10.3, 20.2, 49.8, and 99.3 ^{15}N atom%) scanning m/z 44 (C), m/z 45 (D) and m/z 46 (E).

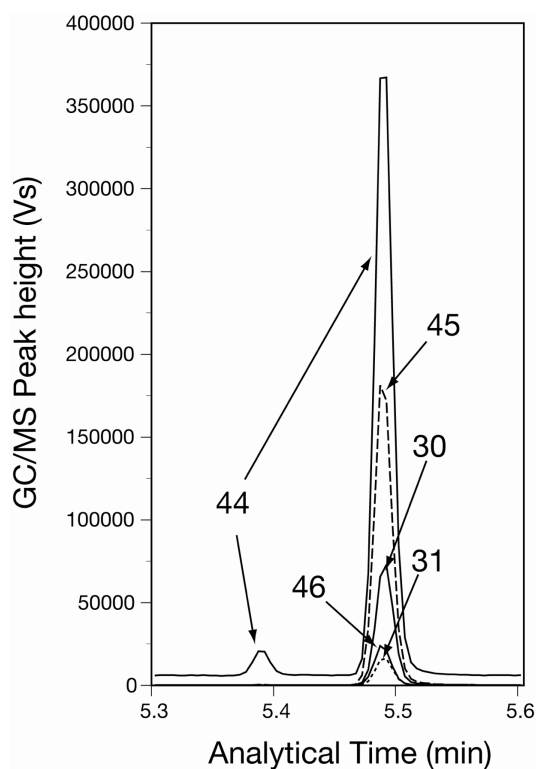


Figure 3-4. Closeup of the chromatogram (20.2 ^{15}N atom% in Figs. 3-3C-3E). The tiny peak at the analytical time of ca. 5.4 min was CO_2 with no signal of m/z 30 or 31. This CO_2 peak is caused by air contamination and CO_2 in the vial that is not trapped by NaOH . Although it is quite difficult to eliminate this CO_2 , good separation of CO_2 from N_2O (at 5.5 min) was established using our analytical procedures

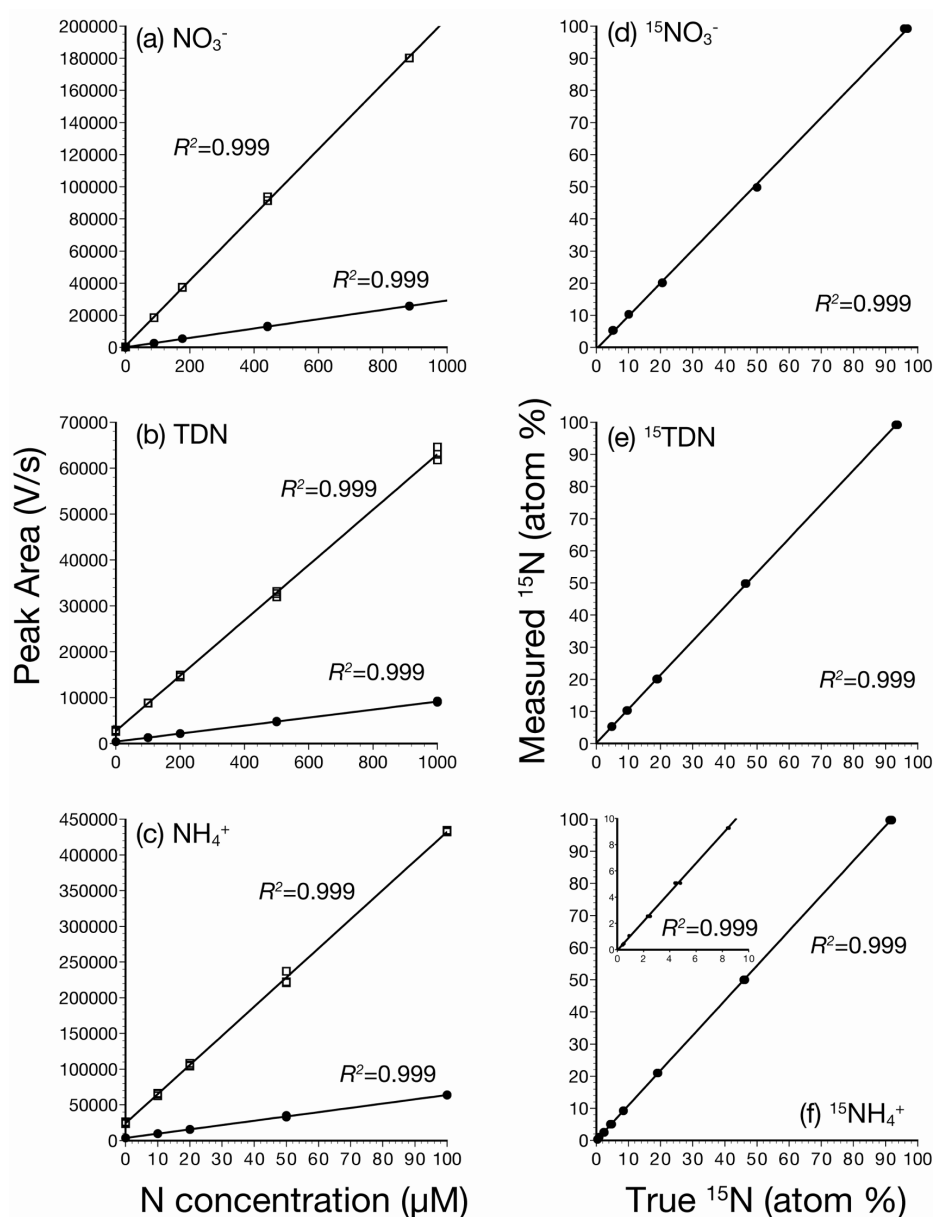


Figure 3-5. Calibration curves between concentrations and peak area (m/z 44+45+46 or 30+31; A, B, C) with ¹⁵N atom% of 0.37%, and between calculated and true ¹⁵N atom% (D, E, F with concentration of 100 μM) for different N forms (A and D for NO_3^- , B and E for TDN and C and F for NH_4^+) dissolved in 2 M KCl. Regression curves for concentration (A, B and C) with peak area of m/z 44+45+46 (open square) and m/z 30+31 (solid circle) each produced sufficient quality ($R^2 > 0.999$ in all cases). We checked ¹⁵N analysis with low ¹⁵N contents (< 10 ¹⁵N atom%) for NH_4^+ (inset in F) using the most complicated procedure (Fig. 3-2). Our analytical procedures showed a good relation between measured and true ¹⁵N atom % (inset in F).

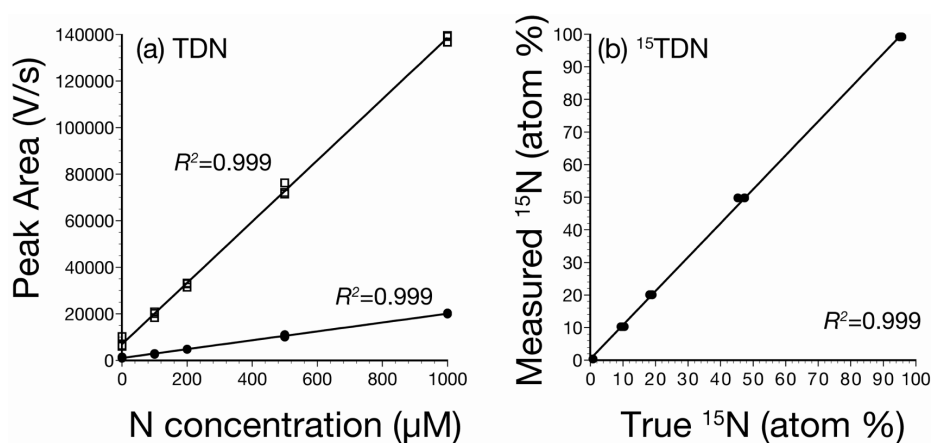


Figure 3-6. Calibration curves between concentrations and the peak area (m/z 44+45+46) with ^{15}N atom% of 0.37%, and between the calculated and true ^{15}N atom% with concentration of 100 μM for TDN in 0.5 M K_2SO_4 . To produce the N_2O to measure, 1 mL out of 10 mL of the persulfate-oxidized solution (mixture of 2 mL POR plus 8 mL of standard solution) was fed to the denitrifier. Regression curves for concentration (A) with peak area of m/z 44+45+46 (open squares) and m/z 30+31 (solid circles) produced sufficient quality ($R^2 > 0.999$). For ^{15}N contents (B), high correlation ($R^2 > 0.999$) confirmed the applicability of our analytical procedures.

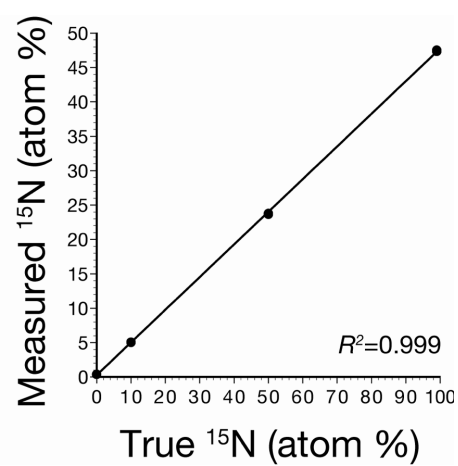


Figure 3-7. Calibration curve for ^{15}N content for NO_2^- in 2 M KCl with the constant concentration of 100 μM : 1 mL of the solution was reacted with azide buffer in a 10 mL headspace vial. The azide method incorporates one N atom from azide and one atom from NO_2^- , resulting in the low slope of the regression line (0.475).

第4章 高窒素負荷環境にある中国亜熱帯林土壌における窒素 フローの解析

4.1 緒言

この章では、第3章で確立した手法を用いて、窒素フローの総速度を算出し、調査地である DHSBR（第1章、セクション 1.6）の広葉樹林、松林、混合林のコントロール区における窒素フローの特徴を明らかにすることを目的とした。これら3つの森林は同程度の量の無機態窒素が大気から流入している ($32\text{--}34\text{ kg N ha}^{-1}\text{ yr}^{-1}$ of $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$) (Table 1-2)。しかし、窒素の流出量は大きく異なる (Table 1-2)。特に広葉樹林からは、表層 0 cm から 20 cm の土壌において、松林と混合林に比べて多量の NO_3^- が流出している（広葉樹林： $42\text{--}48\text{ kg-N/ha/yr}$ 、松林および混合林： $14\text{--}20\text{ kg-N/ha/yr}$ (Table 1-2)）。したがって、広葉樹林では、松林や混合林に比べて、土壌中の NO_3^- 生成（硝化）速度が高いと推測される。しかし、これら3つの森林の窒素フローの速度は明らかになっていない。そこで、この章に記述する研究では、これら3つの森林それぞれの窒素フローの速度を算出し、上記の推測の妥当性を検証した。またそれらの窒素フローの情報から3つの森林の窒素飽和程度を考察した。

本研究では窒素フローの測定に ^{15}N 同位体希釈法を用いた。硝化を例にとると、総硝化速度は $^{15}\text{NO}_3^-$ を土壌に加えた後の、 NO_3^- の濃度 ($^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}$) の変化速度および NO_3^- の窒素安定同位体比 ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) の“希釈”速度から算出することができる。原理は次の通りである。 NO_3^- の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ は、硝化 ($^{14}\text{NH}_4^+$ からの $^{14}\text{NO}_3^-$ の生成) によって $^{14}\text{NO}_3^-$ のみが生成されるために希釈される ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ の値が小さくなる)。一方、微生物による同化や脱窒などの消費プロセスによって、 NO_3^- の濃度は変化するが、 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ は変化しない（その時点における $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ をもつ NO_3^- が消費されるため $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ の値は変化しない）。

すなわち、生成プロセスのみが NO_3^- の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を変化させるために、 NO_3^- 生成の総速度とそれに続く NO_3^- 消費の総速度をそれぞれ分けて算出することが出来る。それを数式で表すと (eq.4.1 - 4.2) のようになる。 ^{14}N と ^{15}N はある時間の $^{15}\text{NO}_3^-$ と $^{14}\text{NO}_3^-$ の濃度である。

$$\frac{d(^{14}\text{N} + ^{15}\text{N})}{dt} = \text{production} - \text{consumption} \quad \text{-- (eq. 4.1)}$$

$$\frac{d(^{15}\text{N})}{dt} = \text{consumption} \times \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}} \quad \text{-- (eq. 4.2)}$$

このように、 $^{15}\text{NO}_3^-$ を土壌に加え、 $^{15}\text{NO}_3^-$ と $^{14}\text{NO}_3^-$ の濃度変化から、総硝化速度および総 NO_3^- 消費速度を算出することができる。総無機化速度についても同様である。 $^{15}\text{NH}_4^+$ を土壌に加え、 $^{15}\text{NH}_4^+$ と $^{14}\text{NH}_4^+$ の濃度変化から、総無機化速度および総 NH_4^+ 消費速度を算出することができる (Hart et al. 1994)。

^{15}N 同位体希釈法は、従来からよく用いられている他の方法 (純硝化速度測定、 ^{15}N トレーサー法) でみられる問題点を解決している。問題点とはすなわち、(1) NO_3^- 濃度の単位時間当たりの正味の変化である純硝化速度は (eq. 4.1) で表され、実際の硝化速度 (総硝化速度) より小さい (2) ^{15}N トレーサー法つまり、 $^{15}\text{NH}_4^+$ を土壌に加え $^{15}\text{NO}_3^-$ の生成を見る方法では、硝化の基質を加えるために硝化を促進させる可能性がある。また生成した $^{15}\text{NO}_3^-$ は同時に消費される可能性があるため、実際の速度を反映しない可能性がある。これらのことから、無機態窒素の動態が他の生態系に比べて著しいと考えられている森林土壌における窒素フローの総速度解析には、 ^{15}N 同位体希釈法が最もよく用いられている (Hart et al. 1994)。

4.2 方法

4.2.1 供試土壌

供試土壌は 2008 年 9 月に採取した土壌である（第 1 章、セクション 1.6）。すなわち、DHSBR の広葉樹林、松林、混合林のコントロール区内 6 カ所ずつから採取し、それぞれ 2mm のふるいを通した土壌である。

4.2.2 NH_4^+ と NO_3^- 濃度の測定

土壌中の NH_4^+ と NO_3^- 濃度は 2 M KCl 溶液を用いて測定した。土壌 10 g に対して、2 M KCl 溶液を 50 ml を加え、1 時間振とうし、遠心（7000 × g、10min）した後、ガラスフィルター（GF/F; Whatman Int. Ltd., Maidstone, UK）を用いてろ過した。ろ液中の NH_4^+ と NO_3^- 濃度はオートアナライザー（TRAACS 800; Bran+Luebbe, Tokyo, Japan）を用いて測定した。

4.2.3 窒素フローの総速度測定

4.2.3.1 土壌培養および ^{15}N 測定

各森林内 6 地点から採取した土壌サンプルそれぞれから、7 g の土壌サンプル（サブサンプル）を 2 つ、別々にねじロプラスチックチューブ（50 ml, Corning, Corning Inc. NY, USA）に入れ、26°C で 24 時間、前培養した。スクリュウキャップは緩めて開放系にした。総無機化速度の測定は以下の手順で行った。(1) 各サブサンプルに 5 mM NH_4Cl (99.3 ^{15}N atom%, SI Science Co., Ltd., Saitama, Japan) を 350 μL 加えた。 ^{15}N 溶液は土壌中で均一に広がるように、シリンジ（25 G × 6 mm, Top Corporation, Tokyo, Japan）と細いニードル（25 G × 6 mm, Top Corporation）を用いて一滴ずつ加え、土壌を緩やかに混合した。

(2) 2 つのサブサンプルのうち 1 つは 15 分間、もう 1 つはさらに 24 時間、いずれも 26°C でインキュベートした。(3) インキュベート後、2 M KCl 溶液を 35 mL 加えた。1 時間振とうし、遠心（7000 × g、10min）した後、ガラスフィルター（GF/F; Whatman Int. Ltd.）を用いてろ過した。ろ液は 4 °C で保存した。

総硝化速度の測定には、同様に各森林内 6 地点から採取した土壌サンプルそれぞれか

ら 7 g の土壌サンプル (サブサンプル) を 2 つ別々にプラスチックチューブに入れ、26°C で 24 時間前培養した。その後、各サブサンプルに NH_4Cl ではなく、5mM KNO_3 (99.3 ^{15}N atom%, SI Science Co., Ltd.) を添加し、上記と同様の手順を繰り返した。

ろ液中の NH_4^+ と NO_3^- の濃度と $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ の測定は第 3 章で記述した方法で行った。すなわち、ろ液中の NO_3^- は脱窒菌法によって N_2O に還元し、濃度と $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を第 2 章で記述した GC/MS システムを用いて測定した。ろ液中の NH_4^+ について、濃度は分光光度計 (JASCO corporation, Tokyo, Japan) を用いてインドフェノールブルー法 (Keeney and Nelson 1982) によって比色定量した。 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ は diffusion 法の後、過硫酸酸化によって NO_3^- にした後、上記の方法と同様に測定した。

4.2.3.2 総生成・消費速度の算出

総速度は Kirkham and Bartholomew (1954) の式に基づいて算出した。総無機化速度を 1 日当たりの NH_4^+ の生成量として、その算出式を以下に示す。

$$m = \frac{[\text{NH}_4^+]_0 - [\text{NH}_4^+]_t}{t} \cdot \frac{\log(\text{APE}_0 / \text{APE}_t)}{\log([\text{NH}_4^+]_0 / [\text{NH}_4^+]_t)} \quad \text{-- (eq. 4.3)}$$

$$c_A = m - \frac{[\text{NH}_4^+]_t - [\text{NH}_4^+]_0}{t} \quad \text{-- (eq. 4.4)}$$

m: 総無機化速度 (gross N mineralization rate) ($\text{mg N kg-soil}^{-1} \text{ day}^{-1}$)

c_A : 総 NH_4^+ 消費速度 (gross NH_4^+ consumption rate) ($\text{mg N kg-soil}^{-1} \text{ day}^{-1}$)

t: 培養期間、1 日

APE_0 : time-0 における NH_4^+ の ^{15}N atom % excess

(^{15}N atom % excess = ^{15}N 添加後の ^{15}N atom % - ^{15}N 添加前の ^{15}N atom %

(バックグラウンド : 0.366atom%- ^{15}N))

APE_t : time-t における NH_4^+ の ^{15}N atom % excess

$[\text{NH}_4^+]_0$: time-0 における NH_4^+ 濃度 (mg N kg-soil^{-1})

$[\text{NH}_4^+]_t$: time-t における NH_4^+ 濃度 (mg N kg-soil^{-1})

総硝化速度（総 NO_3^- 生成速度）および総 NO_3^- 消費速度は上記の式の NH_4^+ を NO_3^- に置き換えて算出した。純硝化速度は一日当たりの NO_3^- の変化として算出した。総無機化速度と総 NH_4^+ 消費速度、総硝化速度と総 NO_3^- 消費速度は、それぞれ 15 分および 24 時間 15 分培養のサブサンプル中の NH_4^+ と NO_3^- の濃度 ($^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}$) および $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を用いて算出した。

Kirkham and Bartholomew (1954) の式、(eq. 4.3) および (eq. 4.4) は、以下の 3 つの仮定 (1) – (3) のもと、(eq. 4.1) および (eq. 4.2) を変形したものである。

- (1) ^{15}N と ^{14}N は土壌中で、また微生物の取り込みの際、同じように振る舞う
- (2) 対象とする窒素フローの速度は培養期間中一定である
- (3) 培養期間中に同化された ^{15}N は再び無機化することはない。

実際には、これらの仮定は必ずしも成立しないが、培養期間が短期間（1～2 日）であればその誤差は小さいと考えられている (Davidson et al. 1991)。

4.2.3.3 総不動化速度の算出

消費速度は微生物による同化、土壌有機物への吸着、ガスによる揮散など全ての消費プロセスの速度の合計である。本研究では、既往研究 (Tietema and Wessel 1992; Tietema 1998) にもとづいて NH_4^+ の消費プロセスは不動化 (immobilization、微生物同化や土壌有機物への吸着) と硝化という仮定のもと、以下の式から NH_4^+ の総不動化速度を算出した (Davidson et al., 1991)。

$$\text{総 } \text{NH}_4^+ \text{ 不動化速度} = \text{gross } \text{NH}_4^+ \text{ 消費速度} - \text{総硝化速度} \quad \text{-- (eq. 4.5)}$$

NO_3^- の消費については、既往研究 (Tietema and Wessel 1992; Tietema 1998) にもとづいて、主に NO_3^- の不動化（微生物同化や土壌有機物への吸着）によるものとした。

$$\text{総 NO}_3^- \text{不動化速度} = \text{gross NO}_3^- \text{消費速度} \text{ -- (eq. 4.6)}$$

本実験は植物による NO_3^- の吸収や水移動にともなう NO_3^- 溶脱などによる NO_3^- 消費プロセスのない条件下で行われ、かつ好気条件での培養のため、脱窒活性は抑制されていると考えられるため、他の消費プロセスすなわち植物による吸収ならびに溶脱、脱窒については考慮しない。また本章では NO_3^- 生成はすべて NH_4^+ からの生成とした。本章で対象としたプロセスについて Figure 4-1 に示す。

4.2.4 統計解析

森林間の窒素フロー速度の有意差検定は一次元分散分析 (one-way analysis of variance (ANOVA) with Turkey's test) で行った。純硝化速度と NO_3^- 濃度との間で相関分析を行った。また総硝化速度と以下のパラメーター、すなわち総無機化速度、総 NH_4^+ 不動化速度、総 NO_3^- 不動化速度、純硝化速度および NO_3^- 濃度との間で相関分析を行った。 α レベル 0.05 を有意差の指標とした。全ての統計解析は R software (R Development Core Team, 2007) を用いて行った。

4.3 結果

DHSBR の広葉樹林、松林、混合林のコントロール区から採取した土壌の pH、 NH_4^+ と NO_3^- 濃度、CN 比 (全炭素量/全窒素量: C/N) を Table 4-1 に示す。土壌はすべて酸性であり、広葉樹林は松林や混合林に比べて土壌の pH が低い。また C/N は広葉樹林、松林、混合林の順に高くなる。森林間で NH_4^+ 濃度について有意差はみられなかったが、広葉樹林の NO_3^- 濃度は松林や混合林の NO_3^- 濃度より高かった。

続いて、 ^{15}N 同位体希釈法により算出した各森林の総無機化速度、総硝化速度、総 NH_4^+ 不動化速度、総 NO_3^- 不動化速度、総 N ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$) 不動化速度を Table 4-2 に示す。

また、各森林土壌の窒素フローの概念図を Tietema and Wessel (1992) および Tietema (1998) にもとづいて Figure 4-2 に示す。本章では硝化は NH_4^+ から NO_3^- の生成とした。すなわち従属栄養性硝化（有機体窒素からの NO_3^- 生成）は考慮していない（第 5 章参照）。Table 4-2 において、総無機化速度、総 NH_4^+ 不動態化速度、総 NO_3^- 不動態化速度、総 N 不動態化速度は森林間で有意差は見られなかった。その一方で総硝化速度は大きく異なった ($p < 0.001$)。すなわち、広葉樹林の総硝化速度 ($5.0 \text{ mg N kg-soil}^{-1} \text{ day}^{-1}$) は松林 ($1.2 \text{ mg N kg-soil}^{-1} \text{ day}^{-1}$) および混合林 ($0.5 \text{ mg N kg-soil}^{-1} \text{ day}^{-1}$) に比べてはるかに大きかった。

NO_3^- 濃度の日当たりの正味の変化、すなわち NO_3^- の蓄積速度でもある純硝化速度 (= 総硝化速度 - 総 NO_3^- 不動態化速度) についても、広葉樹林では松林や混合林に比べて高かった ($p < 0.001$, Table 4-2)。また、全ての土壌サンプルにおける純硝化速度と NO_3^- 濃度との間に正の相関が見られた ($p < 0.001$, $\text{NO}_3^- \text{ concentration} = 2.5 \times \text{net nitrification rate} + 1.5$, $R^2 = 0.88$) (Figure 4-3)。総硝化速度についても、純硝化速度と同様に、 NO_3^- 濃度との間に相関が見られた (Table 4-3, $p < 0.001$)。また総硝化速度と総無機化速度、総 NH_4^+ 不動態化速度、総 NO_3^- 不動態化速度、総 N 不動態化速度、 NH_4^+ 濃度との間に相関は見られなかった (Table 4-3)。

4.4 考察

4.4.1 森林土壌中の硝酸生成

各森林の土壌中の無機態窒素について、広葉樹林では NO_3^- 濃度が松林と混合林に比べて高かった。各森林の窒素フローについて、森林間で総硝化速度に大きな差が見られた。すなわち、広葉樹林では総硝化速度、純硝化速度ともに松林や混合林にくらべて著しく大きかった (Figure 4-2, Table 4-2)。また、 NO_3^- 濃度と純硝化速度および総硝化速度との間に強い相関が見られた (Figure 4-3, Table 4-3)。これらのことから、広葉樹林土壌において土壌中の NO_3^- 濃度が高いのは、硝化速度が大きいことに由来すると考え

られた。アニオンである NO_3^- は土壤中で移動し易く、それゆえ浸透水によって容易に溶脱するため、土壤中での NO_3^- の蓄積は NO_3^- 溶脱へと繋がる。このことから、広葉樹林土壌の表層 0 cm から 20 cm の土壌において、松林や混合林より多量の NO_3^- が水の移動にともなって流出しているのは、土壌中の硝化速度が高いことに由来すると考えられた。またこのような傾向が別の時期に採取した土壌でもみられるかどうかについて第 5 章でさらに検討する。

4.4.2 窒素の不動態化プロセス

一般的に NH_4^+ と NO_3^- の不動態化が森林土壌中の主な窒素保持プロセスである。DHSBR では総 NH_4^+ 不動態化速度、総 NO_3^- 不動態化速度ともに森林間で差はなく、総 NH_4^+ 不動態化速度は総 NO_3^- 不動態化速度より遥かに大きかった。したがって、 NH_4^+ の不動態化が DHSBR の 3 つの森林土壌の主な窒素保持プロセスだと考えられた。窒素負荷がより小さい他の熱帯林では、 NO_3^- の NH_4^+ への異化的還元 (dissimilatory nitrate reduction to ammonium: DNRA) や微生物による NO_3^- 同化といったプロセスによって、生成した NO_3^- の大部分が不動態化されることが報告されている (Silver et al. 2001; Templer et al. 2008; Huygens et al. 2008)。しかし、DHSBR の 3 つの森林土壌では、総硝化速度に比べて総 NO_3^- 不動態化速度ははるかに小さいことから、そのようなプロセスの卓越は見られなかった。

4.4.3 森林の窒素飽和程度

森林の窒素飽和程度を、 NH_4^+ の消費プロセスである硝化と NH_4^+ 不動態化（主に微生物による同化）のバランスの観点から考察する。本研究では森林間で NH_4^+ 不動態化速度に大きな差は見られないが、総硝化速度は広葉樹林において、松林および混合林に比べて高かった (Figure 4-2)。このことから広葉樹林では硝化微生物群集への NH_4^+ の可給性が高いことが示唆される。土壌中の NH_4^+ は従属栄養性微生物による同化と硝化微生物による硝化によって競合される。これまでに、窒素制限状態にあると NH_4^+ の大部分は

従属栄養性微生物により同化 (NH_4^+ 不動態) されるが、窒素の可給性が高くなるにつれて、 NH_4^+ は硝化微生物にも利用され、硝化速度が増大することが示唆されている

(Verhagen et al. 1992; Hart et al. 1994)。また窒素制限林から窒素飽和林の進行の過程において、土壌微生物に対する窒素の可給性が高くなり、 NO_3^- が過剰に生成されやすくなることが予想されている (Galloway et al. 2003)。これらのことから窒素の可給性が高く、また硝化速度が大きい広葉樹林は、松林や混合林に比べてより窒素飽和状態にあることが示唆される。

また、これまでに総硝化速度の総 NH_4^+ 不動態速度に対する比を、森林の窒素飽和程度の指標として用いることも提案されてきた (Aber 1992; Tietema and Wessel 1992; Murphy et al. 2003)。森林の窒素飽和現象が進行するにつれて NH_4^+ は従属栄養性微生物によって同化されるよりも、硝化微生物に利用されるようになり、その比が大きくなる。Goulding et al. (1998) は窒素飽和状態になると、その比が 1 より大きい、すなわち硝化速度が NH_4^+ 不動態速度を上回るようになると考察している。本研究において、優占する NH_4^+ の消費プロセスは森林間で異なり、広葉樹林では硝化、松林と混合林では NH_4^+ の不動態であった (Figure 4-2)。結果として、純硝化速度の NH_4^+ 不動態速度に対する比は広葉樹林 (3.1) において、松林 (0.4) や混合林 (0.2) に比べて著しく高かった (Table 4-2)。そのため、広葉樹林は松林や混合林に比べて、窒素飽和現象がより進行している状態にあると考えられた。これらの結果は、既往の DHSBR での研究、すなわち、フィールドでの窒素動態 (Fang et al. 2009、Table 1-2) に関する研究から導きだされた結果と整合するものである。

森林間の窒素飽和程度の差異については、第 5 章において窒素添加区と無添加区における窒素フローの比較から、さらに詳細に検討する。また、本章では従属栄養性硝化 (Org-N あるいは $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^-$) を考慮していないために、独立栄養性硝化 ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^-$) の速度を過大評価している可能性がある。その点についても第 5 章において独立栄養性硝化と従属栄養性硝化をそれぞれ評価して、さらに詳細に検討する。

4.4.4 森林の総硝化速度

大気からの窒素流入量が同程度であっても、森林間で総硝化速度は大きく異なっていた (Fig. 4-1、Table 4-2)。特に、総無機化速度、総 NH_4^+ 不動化速度、総 NO_3^- 不動化速度は森林間で有意差が見られない一方で、広葉樹林の硝化速度は松林および混合林の硝化速度より高かった。硝化速度はこれまで、様々な環境要因によってコントロールされていると考えられてきた (Figure 1-8 A)。例えば、 NH_4^+ の可給性や、炭素と窒素の可給性のバランスなどが個々の森林土壌中の硝化速度に影響を与えているが示唆されてきた。その中でも、Booth et al. (2005) は森林、灌木地、草地、農耕地で行われた 100 もの個々の解析データを合わせて再解析し、総硝化速度は総無機化速度および土壌中の全炭素、全窒素、 NH_4^+ 濃度と最も相関があることを示した。Kuroiwa et al. (in review) は日本の 4 カ所の森林において、総硝化速度と総無機化速度および土壌中の全炭素、全窒素、 NH_4^+ 濃度との間に強い相関を見だし ($p < 0.001$)、総硝化速度は、特に総無機化速度によって大きく決まっていることを示唆した。しかし、本研究においては、総硝化速度と総無機化速度や NH_4^+ 濃度との間に相関は見られなかった (Table 4-3)。

また窒素だけでなく、炭素と窒素の可給性のバランスも硝化速度をきめる環境要因であると指摘されてきた。従来から、そのバランスの指標として CN 比 (C/N) が用いられてきた。例えば、Yoh et al. (2001) は日本の森林において C/N が 20 を下回る土壌で純硝酸生成がみられ、C/N が低くなるにつれて純硝化速度が大きくなることを示している。また Galloway et al. (2003) は窒素飽和現象が進行するにつれて土壌の C/N は低下し、純硝化速度が増大する可能性を指摘している (Figure 1-5)。C/N を指標として用いることの主な根拠は次の通りである。微生物細胞の C/N が 5 程度 (Fagerbakke et al. 1996) と考えられており、土壌の C/N に比べるとはるかに低い。従って、土壌の C/N が高い (C に対して N が少ない) と、土壌微生物は窒素制限状態にあり土壌中の NH_4^+ のほとんどは従属栄養性微生物の同化によって使われるが、土壌の C/N が低くなり (C に対し

て N が多くなり) 窒素の可給性が高くなると同時に NH_4^+ は硝化微生物にも利用され、硝化が促進されるという考えにもとづいている (Bengtsson et al. 2003)。実際に DHSBR においても土壌の C/N は、総硝化速度が大きい広葉樹林 (22) において、松林 (25) や混合林 (28) より低い (Fang et al. 2006) ことから、炭素と窒素の可給性のバランスが硝化速度を決める重要な要因である可能性がある。しかし、C/N はあくまで森林土壌中の全炭素量と全窒素量の比であり、森林間によって炭素と窒素の構成成分は異なる上、可給態炭素と可給態窒素の比ではない。そのため C/N を指標とするのは必ずしも妥当ではない可能性がある (Booth et al. 2005)。

また硝化は硝化微生物群集の機能である。Figure 1-8 を参照すると、C/N が低くなるにつれて硝化速度が大きくなるのであれば、それは C/N が低くなることで硝化微生物群集に対する NH_4^+ の可給性が大きくなり、それによって硝化微生物群集の構造が変化する (Figure 1-8C)。その結果、総硝化速度が大きくなる (Figure 1-8B) と考えるのが妥当であろう。すなわち、上記のような環境要因とは別に、このような森林間における総硝化速度の差異は、硝化を担っている微生物群集の特性 (存在量、群集組成、活性) の差異に起因すると考えられる (Figure 1-8B)。そこで第 6 章において、森林間の総硝化速度の差異を硝化微生物群集の観点から考察する。

Table 4-1. Chemical properties of soils in broadleaf, pine and mixed forest soils at DHSBR.

	broadleaf	pine	mixed	p value
pH*	3.83 (0.02)b	4.04 (0.04)a	3.95 (0.01)a	0.003
NH ₄ ⁺ (mg-N/g-soil)	3.1 (1.4)	3.3 (0.7)	5.9 (1.5)	0.23
NO ₃ ⁻ (mg-N/g-soil)	11.9 (2.8)a	4.7 (1.4)b	2.0 (0.4)b	<0.001
C/N*	22.1 (1.3)b	25 (1.1)ab	28 (0.7)a	0.05

Data are shown as mean (standard error), n=6

Different letters following the values indicate significant differences among forests (p<0.05) based on one-way analysis of variance (ANOVA) with Turkey's HSD

*Data from Fang et al. (2009)

Table 4-2. Gross and net N transformation rates (mg-N/g-soil/day), and gross nitrification/ gross NH₄⁺ immobilization of soils in broadleaf, pine and mixed forest soils at DHSBR

	broadleaf	pine	mixed	p value
gross minaralization	3.5 (0.5)	3.9 (0.7)	2.4 (0.3)	0.17
gross NH ₄ ⁺ immobilization	2.3 (0.6)	2.7 (1.3)	2.4 (0.7)	0.93
gross nitrification	5.0 (0.8)a	1.2 (0.6)b	0.5 (0.1)b	<0.001
gross NO ₃ ⁻ immobilization	0.2 (0.1)	0.2 (0.0)	0.1 (0.0)	0.15
gross N (NH ₄ ⁺ +NO ₃ ⁻) immobilization	2.5 (0.6)	2.9 (1.3)	2.5 (0.7)	0.82
net nitrification	4.8 (0.8)a	1.0 (0.6)b	0.4 (0.2)b	<0.001
nitrification/ NH ₄ ⁺ immobilization	3.1 (0.8) a	0.4 (0.6) b	0.2 (0.2) b	<0.001

Data are shown as mean (standard error), n=6

Different letters following the values indicate significant differences among forests (p<0.05) based on one-way analysis of variance (ANOVA) with Turkey's HSD

Table 4-3. Relation between gross nitrification rates and other gross rates or soil chemical properties of soils in broadleaf, pine and mixed forest soils at DHSBR.

		R ²	p value
gross nitrification vs	gross mineralization	0.008	0.72
	gross NH ₄ ⁺ immobilization	0.08	0.23
	gross NO ₃ ⁻ immobilization	0.2	0.055
	NH ₄ ⁺ pool size	0.003	0.82
	NO ₃ ⁻ pool size	0.89	<0.001

Regression analysis was used to investigate the relationships.

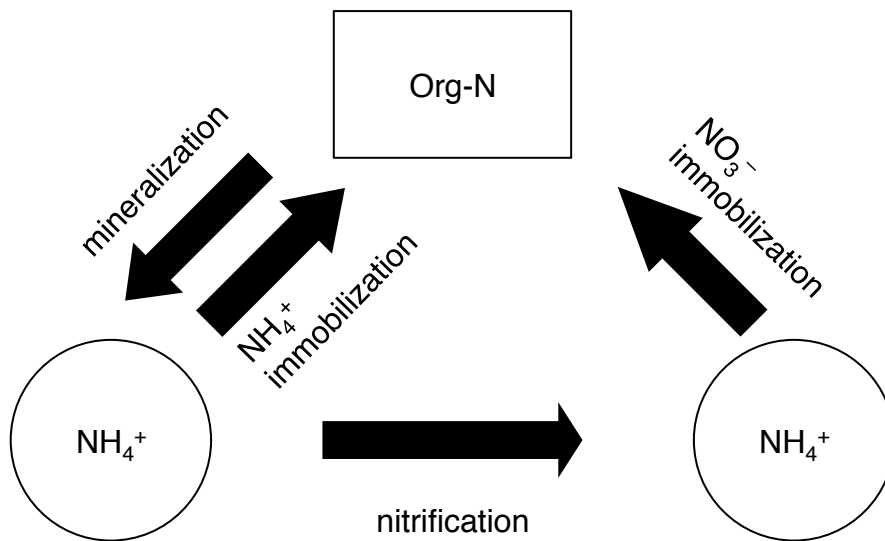


Figure 4-1. Schematic representations of the major processes affecting NH_4^+ and NO_3^- pool sizes in forest soils discussed in Chap. 4 . Net and gross rates of N mineralization and nitrification are measured in the absence of plant uptake and leaching and under conditions that minimize denitrification. Under these conditions net rate estimates are still influenced by both productive and consumptive processes. For the NH_4^+ pool, gross mineralization is the productive process; consumptive processes include abiotic sinks, gross nitrification, microbial immobilization, and plant uptake. For the NO_3^- pool, gross nitrification is the productive process; consumptive processes include denitrification, leaching, microbial immobilization, and plant uptake.

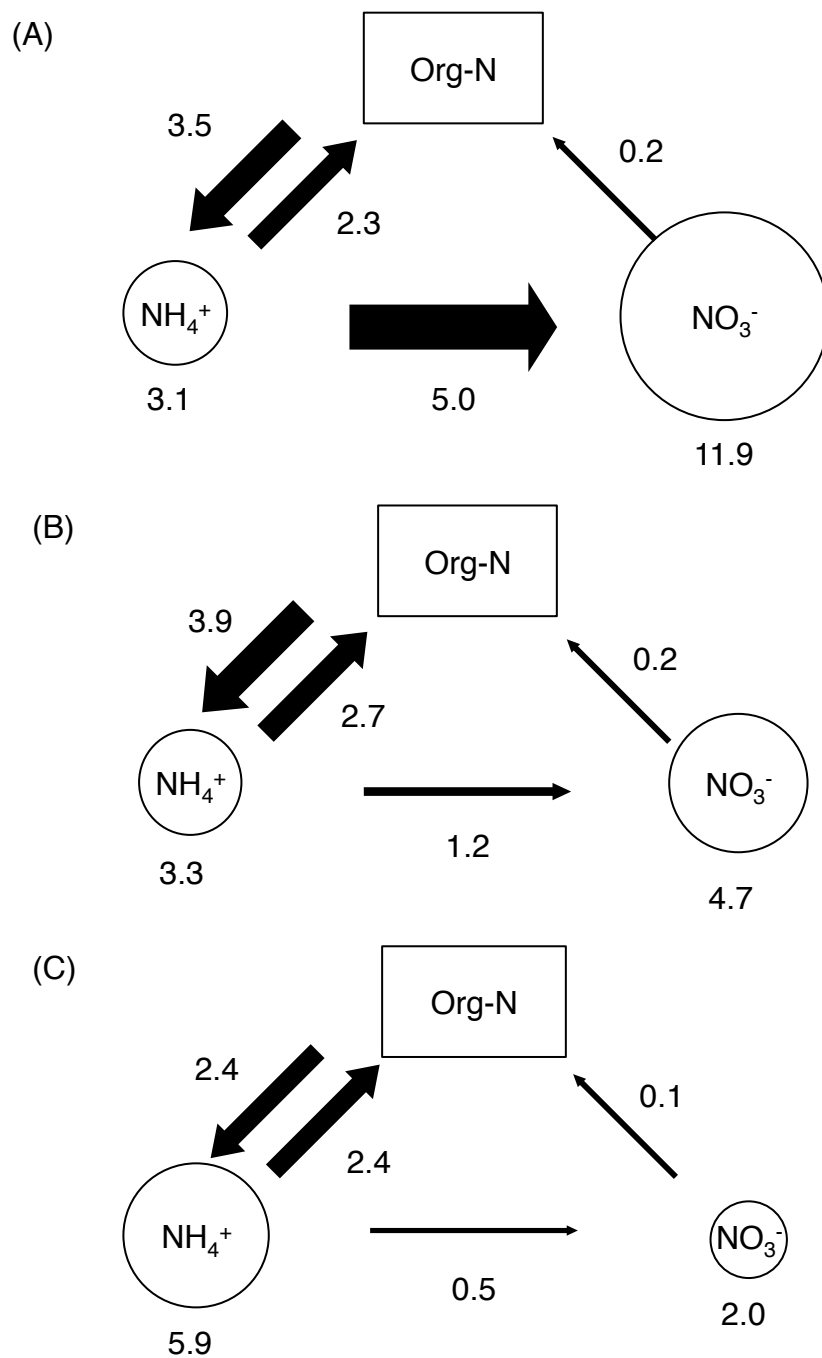


Figure 4-2. Characteristics of N transformations in (A) broadleaf, (B) pine and (C) mixed forest soils at DHSBR. Arrows indicate the following: from Org-N (organic N) to NH_4^+ -N, gross mineralization; from NH_4^+ -N to Org-N, NH_4^+ immobilization; from NH_4^+ -N to NO_3^- -N, gross nitrification; from NO_3^- -N to Org-N, gross NO_3^- immobilization. The figures adjacent to each arrow and below the circle show the rates ($\text{mg-N kg-soil}^{-1} \text{ day}^{-1}$) and pool size (mg-N kg-soil^{-1}). Gross NH_4^+ immobilization rate was calculated by subtracting gross nitrification rate from gross NH_4^+ consumption rate.

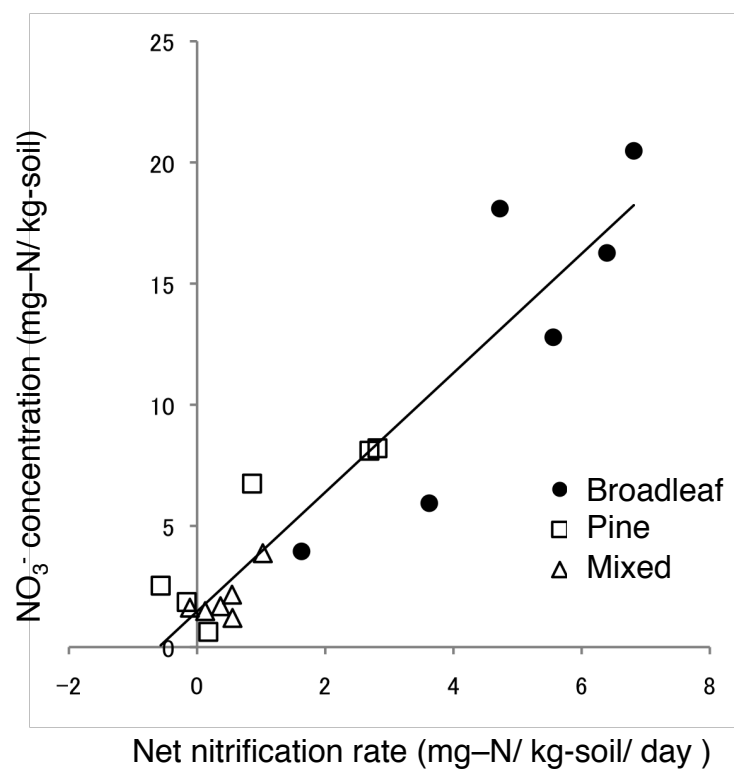


Figure 4-3. Relationship between net nitrification rate and NO₃⁻ concentration in old-growth, pine and mixed forest in DHSBR. A significant correlation between them was found ($p < 0.001$, $\text{NO}_3^- \text{ concentration} = 2.5 \times \text{net nitrification rate} + 1.5$, $R^2 = 0.88$)

第 5 章 窒素流入量の増大が土壤中の窒素フローに及ぼす影響

5.1. 緒言

前章では、2008 年に採取した土壌を用いて、研究サイト DHSBR（第 1 章参照）の広葉樹林、松林、混合林のコントロール区の窒素フロー速度を比較した結果、広葉樹林において、松林と混合林に比べて総硝化速度ならびに純硝化速度が大きいことを示した。本章では、その結果を踏まえて、定量的なデータを新たに求めて以下の 3 点を議論する。すなわち (1) 2008 年に採取した土壌で見られた上記のような森林間の窒素フローの傾向は、2009 年に採取した土壌でも見られるのか、(2) 窒素流入量の増大にともない、窒素フローはどのように変化するのか、(3) 従属栄養性硝化は NO_3^- 生成に対してどれだけ寄与しているのか。

DHSBR では土壌中の無機態窒素量が季節によって大きく変動する。例えば、雨期であり、また森林の成長期でもある夏期には、水分移動にともなう溶脱や植物の吸収が著しくなるため、森林土壌中の無機態窒素量は少なくなることが報告されている (Fang et al. 2006)。従って、窒素フローの速度も季節や土壌採取時期によって大きく変動していると予想される。そこで、まず DHSBR の広葉樹林および松林のコントロール区の窒素フロー速度を算出し、両森林の窒素フローの傾向を、2008 年採取土壌から得られた結果と比較する。

続いて、DHSBR を含む中国南部では、今後も大気からの窒素沈着量が増大することが予想されている（第 1 章、セクション 1.2、Figure 1-3）。したがって、窒素流入量の増大にともなう土壌中の窒素フローの変化を明らかにできれば、今後の森林生態系の窒素循環の変化を予測する上で重要な情報を提供しうる。また成熟林である広葉樹林は若い松林に比べて、窒素飽和現象がより進行した状態にあると考えられる（第 4 章および第 1 章セクション 1.6）。そのため、窒素流入量の増大に対して、広葉樹林と松林では異なった窒素フローの変化を示すことが予想される。そこで、DHSBR の広葉樹林および

松林のコントロール区と窒素添加区における窒素フロー速度を算出し、両森林の違いを検討する。

最後に、酸性森林土壌ではしばしば従属栄養性微生物による NO_3^- （あるいは NO_2^- ）生成（従属栄養性硝化）経路の存在が示唆されている（第 1 章）。そこで本章では独立栄養性微生物による硝化（独立栄養性硝化）を阻害することによって、従属栄養性硝化速度を定量的に算出することを試みる。独立栄養性アンモニア酸化がアセチレン (C_2H_2) によって阻害されることが示されて以来 (Hynes and Knowles 1983)、 C_2H_2 は独立栄養性硝化と従属栄養性硝化を区別して評価するために最もよく用いられている (DeBoer and Kowalchuk 2001)。 C_2H_2 はアンモニア酸化細菌 (AOB) のアンモニアモノオキシゲナーゼ (AMO) 活性を阻害することが知られており (Hyman and Wood 1985)、またアンモニア酸化アーキア (AOA) の AMO 活性も阻害することが示唆されている (Offre et al. 2009; Lehtovirta et al. 2010)。そこで C_2H_2 と ^{15}N 同位体希釈法（第 4 章）を併用することで、独立栄養性硝化と従属栄養性硝化速度を定量的に算出する。

また、前章ではターゲットとするプロセス（無機化および硝化）の生成物 (NH_4^+ および NO_3^-) の ^{15}N を添加した後、その生成物の濃度と $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ のみを定量した。本章ではさらに、添加した ^{15}N をトレースすることによって、土壌中の窒素フローをより詳細に解析する。

5.2 方法

5.2.1 供試土壌

供試土壌は、2009 年 8 月に、DHSBR の広葉樹林（コントロール区、窒素添加区）、松林（コントロール区、窒素添加区）、および HSD の広葉樹林から採取した土壌である（第 1 章、セクション 1.6）。各プロット内 12 カ所ずつから採取し、それぞれ 2mm のふるいを通し、その後、同一プロットから採取した 12 の土壌を一つに混合した。すなわち、1 つのプロットに由来する 1 つの混合土壌サンプルを供試した。

5.2.2 土壌の理化学性および微生物バイオマスの測定

土壌中の NH_4^+ 、 NO_3^- 、土壌微生物バイオマス窒素 (soil microbial biomass-N: SMB-N)、および溶存有機態窒素 (dissolved organic N: DON) 濃度を測定した。 NH_4^+ 、 NO_3^- 、DON 濃度は 2 M KCl 溶液を用いて、SMB-N については 0.5 M K_2SO_4 溶液を用いて、第 4 章と同様に土壌抽出し測定した。抽出液中の NH_4^+ 濃度はインドフェノールブルー法 (Keeney and Nelson 1982) によって比色定量し、 NO_3^- 濃度は脱窒菌法 (第 3 章) によって定量した。DON 濃度は、まず全溶存窒素濃度 (TDN) を測定し (第 3 章)、その値から NH_4^+ と NO_3^- 濃度を引いて算出した。SMB-N はクロロホルム燻蒸法によって測定した。すなわち、クロロホルム燻蒸前後の土壌中の TDN 濃度の差から以下の式を用いて SMB-N 濃度とした。係数 (2.22) は土壌環境分析法 (2003) による。

$$\text{SMB-N} = ((\text{燻蒸後の TDN-N}) - (\text{燻蒸前の TDN-N})) \times 2.22$$

土壌 pH は水抽出により pH (H_2O , 1:5) として測定し、全窒素量および全炭素量については NC アナライザー (Sumigraph NC Analyzer NC-90A; Sumika Chemical Analysis Service, Ltd., Osaka, Japan) を用いて測定した。

5.2.3 窒素フローの総速度測定

各森林の各プロット内から採取し混合した土壌サンプルそれぞれから、16 の土壌サンプル (サブサンプル、20 g) を、別々に広口ガラスバイアル (200 mL, 0501-09, vial No. 8, Maruemu Corp. Co. Ltd., Osaka, Japan) に入れ、26°C で 24 時間、前培養した。このとき、小さな穴を数カ所に空けたパラフィルムで広口ガラスバイアルに蓋をして開放系にした。総無機化速度の測定は以下の手順で行った。(1) 各サブサンプルに 5 mM NH_4Cl (99.3 ^{15}N atom%, SI Science Co., Ltd., Saitama, Japan) を 1 mL 加えた。 ^{15}N 溶液は土壌中で均一に広がるように、シリンジ (25 G \times 6 mm, Top Corporation, Tokyo, Japan) と細いニードル (25 G \times 6 mm, Top Corporation) を用いて一滴ずつ加え、土壌を緩やかに混合

した。(2) 16 のサブサンプルのバイアルをブチルゴム栓とアルミキャップで蓋をし、16 のサブサンプルのうち 8 つに C_2H_2 ガス ($Ar : C_2H_2$) を 1 kPa になるように 20 mL 加え、残りの 8 つに Ar ガスを 20 mL 加えた (Figure 5-1)。(3) 気相にそれぞれ C_2H_2 ガスおよび Ar ガスを加えたサブサンプル 8 つのうち、4 つは 2 時間、残り 4 つはさらに 24 時間、いずれも $26^{\circ}C$ でインキュベートした。(3) インキュベート後、ブチルゴム栓とアルミキャップを開け、ゆるやかに混合し、土壌抽出用に 7g を遠心チューブ (50 ml, Corning, Corning Inc. NY) に入れた。残りは DNA および RNA 抽出 (第 6 章) 用に液体窒素で凍結し、 $-80^{\circ}C$ で保存した。(4) 土壌を入れた遠心チューブに 2 M KCl 溶液を 35 mL 加え、1 時間振とうし、遠心 ($7000 \times g$, 10min) した後、ガラスフィルター (GF/F; Whatman Int. Ltd.) を用いてろ過した。ろ液は $4^{\circ}C$ で保存した。

総硝化速度の測定には、まず前述と同様に、各森林の各プロット内から採取し、混合した土壌サンプルそれぞれから 16 の土壌サンプル (サブサンプル、20 g) を、別々に広口ガラスバイアルに入れ、 $26^{\circ}C$ で 24 時間前培養した。その後、各サブサンプルに NH_4Cl の代わりに 5mM KNO_3 (99.3 ^{15}N atom%, SI Science Co., Ltd.) を添加し、上記と同様の手順を繰り返した。

ろ液中の NH_4^+ と NO_3^- の濃度と $^{15}N/^{14}N$ は第 4 章で記載した方法によって測定した。総無機化速度、総 NH_4^+ 消費速度、総硝化速度、総 NO_3^- 消費速度は、それぞれ 2 時間および 26 時間培養のサブサンプル中の NH_4^+ と NO_3^- の濃度 ($^{14}N + ^{15}N$) および $^{15}N/^{14}N$ を用いて、第 4 章で記載した方法と同様に算出した。本章で対象としたプロセスについて Figure 5-2 に示す。

5.2.4 統計解析

土壌の窒素フロー速度の標準誤差は、2 時間および 26 時間培養のサブサンプル中の NH_4^+ と NO_3^- の濃度 ($^{14}N + ^{15}N$) および $^{15}N/^{14}N$ の平均値と標準誤差をもとに、誤差伝播式 (Luxhøj and Brochhoff 2004) を用いて算出した。森林間の窒素フロー速度の有意差

検定は二次元分散分析 (two-way analysis of variance (ANOVA) with Turkey's test) および一次元分散分析 (one-way analysis of variance (ANOVA) with Turkey's test) で行った。すなわち、異なるサイトにおけるコントロール区間における比較、および同一サイト内のコントロール区と窒素添加区における比較については二次元分散分析を用いて統計解析を行った。また、純硝化速度および総硝化速度と NO_3^- 濃度との間で相関分析を行った。 α レベル 0.05 を有意差の指標とした。p 値については <0.05 、 <0.01 、 <0.001 を記述した。全ての統計解析は R software (R Development Core Team 2007) を用いて行った。

5.3 結果

5.3.1 土壌の理化学性と微生物バイオマス

DHSBR の広葉樹林 (コントロール区、窒素添加区)、松林 (コントロール区、窒素添加区)、および HSD の広葉樹林から採取した土壌の pH および NH_4^+ 、 NO_3^- 、DON、SMB-N、全窒素濃度 (Total nitrogen: T-N)、CN 比 (C/N) を Table 5-1 に示す。DHSBR において、2008 年採取土壌と同様に、広葉樹林の NO_3^- 濃度は松林より高かった。ただし、 NH_4^+ 濃度については松林の方が広葉樹林より高かった。HSD の広葉樹林の NO_3^- 濃度は DHSBR の広葉樹林より低く、松林と同程度であった。DON 濃度は DHSBR および HSD の広葉樹林において、DHSBR の松林より高かった。SMB-N 濃度も DHSBR および HSD の広葉樹林において DHSBR の松林よりも高かった。また DHSBR の広葉樹林において、窒素添加区の SMB-N 濃度はコントロール区より小さかった。T-N 濃度は DHSBR の広葉樹林において HSD の広葉樹林および DHSBR の松林よりも高かった。C/N は、DHSBR の松林のコントロール区では広葉樹林よりも高かったが、同じ松林の窒素添加区では広葉樹林と同程度であった。

5.3.2 土壌中の ^{15}N 動態

^{15}N 同位体希釈法において $^{15}\text{NH}_4^+$ および $^{15}\text{NO}_3^-$ を添加した後の、培養 2 時間および 26

時間における NH_4^+ と NO_3^- の ^{15}N 濃度を Table 5-2 に示す。まず、 $^{15}\text{NO}_3^-$ を添加した系 (+ $^{15}\text{NO}_3^-$ 、Table 5-2) について、全てのプロットの土壌において、 $^{15}\text{NH}_4^+$ 濃度は 2 時間と 26 時間の間で変化しなかった。すなわち $^{15}\text{NO}_3^-$ からの $^{15}\text{NH}_4^+$ の生成は見られなかった。続いて、 $^{15}\text{NH}_4^+$ を添加し C_2H_2 を充填した系 (+ $^{15}\text{NO}_3^- + \text{C}_2\text{H}_2$ 、Table 5-2) について、全てのプロットの土壌において、 $^{15}\text{NO}_3^-$ 濃度は 2 時間と 26 時間の間で変化しなかった。すなわち、 C_2H_2 により独立栄養性硝化を阻害した系において、 $^{15}\text{NH}_4^+$ からの $^{15}\text{NO}_3^-$ の生成は見られなかった。

5.3.3 土壌中の窒素フロー速度

^{15}N 同位体希釈法により算出した総無機化速度を Figure 5-3 (A) に、総硝化速度および総従属栄養性硝化速度を Figure 5-3 (B) に、総 NH_4^+ 不動態化速度、総 NO_3^- 不動態化速度および総 N ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$) 不動態化速度を Figure 5-3 (C) に、それぞれ示す。また、各森林土壌の窒素フローの概念図を Tietema and Wessel (1992) および Tietema (1998) にならって Figure 5-4 に示す。

まず、DHSBR の広葉樹林と松林のコントロール区における窒素フロー速度を二次元分散分析により比較する。総無機化速度について、DHSBR の森林間、すなわち広葉樹林コントロール区 ($2.4 \text{ mg N kg-soil}^{-1} \text{ day}^{-1}$) と松林コントロール区 ($2.5 \text{ mg N kg-soil}^{-1} \text{ day}^{-1}$) との間で有意差は見られなかった。また総 NH_4^+ 不動態化速度についても広葉樹林コントロール区 ($2.0 \text{ mg N kg-soil}^{-1} \text{ day}^{-1}$) と松林コントロール区 ($1.7 \text{ mg N kg-soil}^{-1} \text{ day}^{-1}$) との間で、総 NO_3^- 不動態化速度についても広葉樹林コントロール区 ($0.9 \text{ mg N kg-soil}^{-1} \text{ day}^{-1}$) と松林コントロール区 ($0.7 \text{ mg N kg-soil}^{-1} \text{ day}^{-1}$) との間で有意差は見られなかった。一方、総硝化速度については、広葉樹林コントロール区 ($2.1 \text{ mg N kg-soil}^{-1} \text{ day}^{-1}$) では、松林コントロール区 ($0.7 \text{ mg N kg-soil}^{-1} \text{ day}^{-1}$) に比べて大きかった ($p < 0.001$)。また、HSD の広葉樹林において、総無機化速度 ($3.3 \text{ mg N kg-soil}^{-1} \text{ day}^{-1}$) は DHSBR の広葉樹林と松林のコントロール区と比較して大きかった ($p < 0.01$)。総硝化速度 (1.6 mg

N kg-soil⁻¹ day⁻¹) は DHSBR の広葉樹林コントロール区より小さいが ($p<0.001$)、松林コントロール区より大きかった ($p<0.01$)。また総 NH₄⁺不動態化速度 (1.9 mg N kg-soil⁻¹ day⁻¹) および総 NO₃⁻不動態化速度 (1.2 mg N kg-soil⁻¹ day⁻¹) については広葉樹林と松林のコントロール区と同程度であった。

続いて、DHSBR の広葉樹林と松林におけるコントロール区と窒素添加区を二次元分散分析により比較する。総無機化速度について、広葉樹林の窒素添加区 (1.9 mg N kg-soil⁻¹ day⁻¹) ではコントロール区に比べて小さかったが ($p<0.01$)、松林では窒素添加区 (2.5 mg N kg-soil⁻¹ day⁻¹) とコントロール区で有意差は見られなかった。総硝化速度について、広葉樹林では窒素添加区 (2.3 mg N kg-soil⁻¹ day⁻¹) とコントロール区との間に有意差は見られなかった。その一方、松林において窒素添加区 (0.1 mg N kg-soil⁻¹ day⁻¹) ではコントロール区に比べて有意に小さかった ($p<0.01$)。総 NH₄⁺不動態化速度は、広葉樹林の窒素添加区 (1.0 mg N kg-soil⁻¹ day⁻¹) ではコントロール区に比べて有意に小さいが ($p<0.001$)、松林では窒素添加区 (3.1 mg N kg-soil⁻¹ day⁻¹) の方が有意に大きかった ($p<0.001$)。一方、総 NO₃⁻不動態化速度は、広葉樹林と松林ともに、窒素添加区 (0.2, 0.2 mg N kg-soil⁻¹ day⁻¹) ではコントロール区に比べて有意に小さかった ($p<0.05$)。結果として、総 N 不動態化速度は、広葉樹林の窒素添加区 (1.2 mg N kg-soil⁻¹ day⁻¹) ではコントロール区に比べて有意に小さいが ($p<0.001$)、松林では窒素添加区 (3.3 mg N kg-soil⁻¹ day⁻¹) の方が有意に大きかった ($p<0.05$)。

続いて、独立栄養性硝化と従属栄養性硝化について述べる。C₂H₂ によって独立栄養性硝化を阻害した系において、DHSBR の広葉樹林コントロール区 (0.4 mg N kg-soil⁻¹ day⁻¹)、松林窒素添加区 (0.6 mg N kg-soil⁻¹ day⁻¹) および HSD 広葉樹林 (0.2 mg N kg-soil⁻¹ day⁻¹) で硝酸生成が見られた (Figure. 5-3)。高い硝化活性が見られた DHSBR の広葉樹林コントロール区および HSD 広葉樹林においては、ともに総硝化速度の 80% が C₂H₂ によって阻害されたため、80% 程度が独立栄養性微生物による硝化と考えられた。

最後に、Table 5-3 に純硝化速度 (= 総硝化速度 - 総 NO₃⁻不動態化速度) を示す。森林

間を比較すると、純硝化速度は DHSBR の広葉樹林において、松林に比べて著しく大きかった。松林では総硝化速度と総 NO_3^- 不動化速度が同程度であるために、正味の NO_3^- 生成は見られなかった。DHSBR の広葉樹林と松林におけるコントロール区と窒素添加区を比較すると、純硝化速度は広葉樹林と松林ともに、コントロール区と窒素添加区で有意差は見られなかった。また、DHSBR の広葉樹林（コントロール区、窒素添加区）、松林（コントロール区、窒素添加区）、および HSD の広葉樹林において、純硝化速度と NO_3^- 濃度の間に正の相関が見られた（Figure 5-5、 $p < 0.01$ 、 $\text{NO}_3^- \text{ concentration} = 5.3 \times \text{net nitrification rate} + 6.6$ 、 $R^2 = 0.93$ ）。一方、総硝化速度と NO_3^- 濃度の間には正の相関が見られなかった（ $p = 0.1$ ）。

5.4 考察

5.4.1 森林間（コントロール区）における窒素フローの比較

DHSBR の広葉樹林と松林のコントロール区における窒素フロー速度を比較する。まず NH_4^+ 生成プロセスについて、全てのプロットの土壌で $^{15}\text{NO}_3^-$ からの $^{15}\text{NH}_4^+$ の生成は見られなかったことから（Table 5-2）、 NH_4^+ 生成は有機態窒素の無機化によるものと考えられた。その総無機化速度は、DHSBR の広葉樹林コントロール区と松林コントロール区の間で有意差は見られなかった（Figure 5-3, 5-4）。総 NH_4^+ 不動化速度および総 NO_3^- 不動化速度についても、広葉樹林コントロール区と松林コントロール区の間で有意差は見られなかった（Figure 5-3, 5-4）。一方で、広葉樹林の総硝化速度は松林に比べて高かった（Figure 5-3, 5-4）。これら 2009 年の夏期に採取された土壌から得られた窒素フローと、2008 年の夏期に採取された土壌から得られた窒素フロー（第 4 章）を比較すると、各プロセスの速度は異なるものの、総無機化速度および総 N ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$) 不動化速度には森林間に大きな差は見られないが総硝化速度は広葉樹林で松林および混合林よりも大きいという共通の傾向が認められる。DHSBR の広葉樹林および松林の土壌中の NH_4^+ 濃度および NO_3^- 濃度が季節を通じ変動すること（Fang et al. 2006）を考慮に入れる

と、上記の傾向が年間を通じて安定であるかどうか不明だが、少なくとも土壌の採取時期であった夏期においては見られる特徴であると考えられる。

第4章では、森林間の窒素飽和程度の違いを、 NH_4^+ の消費プロセスである硝化と NH_4^+ 不動態化（主に微生物による同化）のバランスの観点から考察した。2009年採取土壌について、DHSBRの広葉樹林（コントロール区、窒素添加区）、松林（コントロール区、窒素添加区）、およびHSDの広葉樹林の総硝化速度と総 NH_4^+ 不動態化速度の比を Table 5-3 に示す。DHSBRにおいて、優占する NH_4^+ の消費プロセスは広葉樹林と松林で異なり、広葉樹林では硝化、松林では NH_4^+ 不動態化であった（Figure 5-3, 5-4）。結果として、純硝化速度の NH_4^+ 不動態化速度に対する比は、松林コントロール区（0.6）より広葉樹林コントロール区（1.1）において著しく高かった（Table 4-2）。そのため、DHSBRの広葉樹林は松林に比べて、より窒素が飽和している状態にあることが示唆された。これらの結果は2008年採取土壌（第4章）から得られた結果と同様である。またHSDの広葉樹林における総硝化速度の NH_4^+ 不動態化速度に対する比（0.7）はDHSBRの広葉樹林コントロールにおける比より小さく、窒素流入量が多いDHSBR広葉樹林の方が、HSD広葉樹林に比べて、より窒素が飽和している状態にあると考えられた。森林間の窒素飽和程度の差異について、次のセクション（5.4.2）においてコントロール区と窒素添加区における窒素フローの差異にもとづいてさらに考察する。

一般に NH_4^+ と NO_3^- の不動態化が森林土壌中の主な窒素保持プロセスである。 NH_4^+ 不動態化速度はDHSBRの広葉樹林コントロール区と松林コントロール区の間で差はなく、ともに NO_3^- 不動態化速度より大きかった（Figure 5-3, 5-4）。したがって、 NH_4^+ の不動態化がDHSBRの3つの森林土壌の主な窒素保持プロセスだと考えられた。この結果は2008年採取土壌（第4章）から得られた結果と同様である。しかし、2008年採取土壌では総 NO_3^- 不動態化速度が総N不動態化速度に対して、ほとんど無視できる程度だったのに対して、2009年に採取した土壌では、総 NO_3^- 不動態化速度が総N不動態化速度の30%程度を占めていた（Figure 5-3, 5-4）。このことから NH_4^+ だけでなく、 NO_3^- の不動態化も重要な窒

素保持プロセスだと考えられた。HSD の広葉樹林についても、総 NO_3^- 不動態化速度が総 N 不動態化速度の 40% 程度を占め (Figure 5-3, 5-4)、 NH_4^+ の不動態化と NO_3^- の不動態化の両方が重要な窒素保持プロセスだと考えられた。

純硝化速度は、広葉樹林で松林より著しく大きく、全てのプロットの土壌において純硝化速度と NO_3^- 濃度との間に正の相関が見られた (Figure 5-5)。このことから、広葉樹林土壌において土壌中の NO_3^- が高いのは、高い純硝化速度、すなわち総硝化速度が総 NO_3^- 不動態化速度に比べて著しく大きいことに起因することが強く示唆された。これは 2008 年採取土壌から得られた結果 (第 4 章) と同様である。その一方で、2009 年採取土壌では総 NO_3^- 不動態化速度が大きいために、総硝化速度と NO_3^- 濃度の間には相関が見られなかった。すなわち土壌中の NO_3^- 濃度は、総硝化速度と総 NO_3^- 不動態化速度によって大きくコントロールされていると考えられる。

5.4.2 窒素添加区およびコントロール区における窒素フローの比較

DHSBR の広葉樹林および松林の窒素添加区とコントロール区における土壌微生物バイオマスや窒素フロー速度を比較することで、窒素流入量の増大にともなう窒素フローの変化および森林の窒素飽和程度について考察する。

窒素添加区とコントロール区の比較から、広葉樹林と松林では、窒素流入量の増加にともなう土壌微生物バイオマスの変化と N 不動態化速度の変化が、異なる傾向をもつことが示された。まず、土壌微生物バイオマス窒素について、広葉樹林ではコントロール区より窒素添加区において小さかったが、松林では有意差はなかった (Table 5-1)。Mo et al. (2008) は DHSBR の広葉樹林と松林の窒素添加区およびコントロール区の土壌微生物バイオマス炭素について、同様の結果を報告している。一方、総 N ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$) 不動態化速度については、広葉樹林において窒素添加区ではコントロール区の 42% 程度に減少したのに対して、松林においては 136% 程度に増加した (Figure 5-3)。窒素を同化 (不動態化) する土壌微生物バイオマスが減少することによって、窒素不動態化速度が低下

する（あるいは、窒素同化速度が低下することによって土壌微生物バイオマスが減少する）ことは推察できる。既往研究においても多くの森林生態系において、窒素添加直後は窒素制限条件下にあるため微生物バイオマスが増加するが（Hart and Stark 1997: Zhang and Zak 1998）、長期にわたる添加によって減少することが報告されている（Soderstrom et al. 1983: Nohrstedt et al. 1989: Smolander et al. 1994: Arnebrant et al. 1996: Fisk and Fahey 2001: Corre et al. 2003: Lee and Jose 2003: DeForest et al. 2004: Compton et al. 2004; Wallenstein et al. 2005）。また、Aber et al. (1992) は窒素制限下においては森林土壌中の N 不動態化速度は窒素流入量の増大に応じて増加するが、森林が極めて窒素飽和の状態（Figure 1-5：ステージ 3）になると減少する可能性を指摘している。これらの結果から、広葉樹林は窒素飽和状態、特にその最終段階（ステージ 3）にあると考えられる一方で、松林は窒素流入量の増大に応じて、総 N 不動態化速度が増加していることから、未だに窒素制限状態であることが示唆される。さらに今後予想される大気からの窒素負荷の増大にともない、窒素飽和林である広葉樹林においては窒素制限林である松林に比べて、土壌微生物バイオマスの減少と窒素不動態化能の低下といった負の影響がより早く表れると予測される。

総 NO_3^- 不動態化速度について、広葉樹林、松林ともに、窒素添加区においてコントロール区に比べて低いことが示された（Figure 5-3, 5-4）。これに着目して、 NO_3^- の動態（turnover rate）を示すために“見かけの”滞留時間（pseudo-residence time, Frissel, 1981）を算出した。 NO_3^- 濃度を総 NO_3^- 不動態化速度で割った値が、 NO_3^- が不動態化されるまでの見かけの滞留時間となる（Tietema and Wessel, 1992）。実際には不動態化以外にも溶脱や植物の吸収などのプロセスによって NO_3^- が消費されるため、不動態化までの滞留時間を正確に表している訳ではないが、見かけの滞留時間は土壌中の NO_3^- が不動態化されるまでにどれだけの時間がかかるかを知る指標となる。その NO_3^- の見かけの滞留時間を Table 5-3 に示す。 NO_3^- の見かけの滞留時間は、広葉樹林、松林ともに、窒素添加区の方がコントロール区より大きい。つまり、窒素添加区ではコントロール区に比べて NO_3^-

が土壤中で不動化されるまでに時間がかかる。それゆえ、生成あるいは大気から流入した NO_3^- は NO_3^- のまま土壤中に長く滞留し、降雨等による水の移動にともなって流出しやすくなると考えられる。また同じ広葉樹林でも、窒素流入量がより多い DHSBR では HSD に比べて見かけの滞留時間が長かった (Table 5-3)。これらの結果は、窒素流入量の増大に応じて、総 NO_3^- 不動化速度が小さくなり、土壤中での NO_3^- の見かけの滞留時間が長くなる、すなわち NO_3^- が流出し易い環境になることを示唆している。

ただし、窒素流入量の増大にともなう総 NO_3^- 不動化速度の低下および見かけの滞留時間の増加という現象について、広葉樹林と松林ではそのメカニズムが異なること、それゆえ、そのような現象は広葉樹林においてより起こり得るということが窒素フローの解析結果から示唆される。まず、広葉樹林においては、窒素添加区ではコントロール区に比べて、土壌微生物バイオマス、総 NH_4^+ 不動化速度、および総 NO_3^- 不動化速度が小さい。一方、松林では土壌微生物バイオマスは変化せず、総 NH_4^+ 不動化速度は増大し、総 NO_3^- 不動化速度は低下している。一般的に土壌微生物は無機態窒素源として NO_3^- よりも NH_4^+ を好むと考えられてきた (Rice and Tiedje 1989; Jackson et al. 1989)。本研究においても主要な窒素不動化プロセスは NH_4^+ の不動化であることが示されている。すなわち、窒素制限下にあると考えられる松林においては、窒素流入量の増大にともなう総 NH_4^+ 不動化速度の増大と総 NO_3^- 不動化速度の低下は連動していると示唆される。従って、土壌微生物バイオマスの減少と総 NO_3^- 不動化速度の低下がみられる窒素飽和状態の広葉樹林と、総 NH_4^+ 不動化速度の増大と総 NO_3^- 不動化速度の低下がみられる窒素制限下にある松林では、総 NO_3^- 不動化速度の低下という共通の現象の背後にあるメカニズムが異なることが示唆される。これらを考慮すると、今後予想される窒素負荷の増大にともなって、総 NO_3^- 不動化速度の低下と見かけの滞留時間の増加が同時に起こり易くなる、すなわち NO_3^- の溶脱が発生し易くなるのは、すでに窒素飽和状態にあり、土壌微生物バイオマスが減少すると推察される広葉樹林であると予測できる。

本章でみられたような現象が年間を通じて、あるいは流入する無機態窒素量と関連し

で見られるのか、他の季節における現象、あるいは窒素流入量を段階的に変化させたプロットの土壌における現象についても考慮して、詳細に解析する必要があると考えられる。

5.4.3 独立栄養性硝化と従属栄養性硝化

本研究では、 C_2H_2 による独立栄養性硝化の阻害を利用して、独立栄養性硝化と従属栄養性硝化をそれぞれ定量した。まず C_2H_2 を添加した系において、基質として加えた $^{15}NH_4^+$ に由来する $^{15}NO_3^-$ の生成は見られなかった (Table 5-2)。このことから、(1) 独立栄養性硝化は C_2H_2 により効果的に阻害されており、(2) 従属栄養性硝化の経路は NH_4^+ ではなく有機体窒素からの NO_3^- (または NO_2^-) 生成と考えられた。従属栄養性硝化は、DHSBR の広葉樹林コントロール区、松林窒素添加区および HSD 広葉樹林で見られた (Figure 5-3)。硝化速度が大きい DHSBR の広葉樹林コントロール区および HSD 広葉樹林においては、いずれも従属栄養性硝化が占める割合は総硝化速度の 20%程度であると考えられた。したがって、硝化速度が大きい DHSBR 広葉樹林において、主に独立栄養性微生物の働きによって硝酸が生成していると考えられた。これまで、いくつかの酸性森林土壌では、従属栄養性硝化の存在が示唆されてきた (Schimel et al. 1984; Stroo et al. 1986; Pederson et al. 1999; Brierley and Wood 2001; Grenon et al. 2004; Jordan et al. 2005)。その中でも、Hart et al. (1997) は本研究と同様に、 ^{15}N 同位体希釈法と C_2H_2 を併用し、総従属栄養性硝化速度を定量的に算出した。その結果、北米の酸性針葉樹林土壌において、従属栄養性硝化は総硝化速度 ($0-5 \text{ mg N kg-soil}^{-1} \text{ day}^{-1}$) の 60%以上を占めていると報告した。しかし、その一方で、他の多くの研究事例は、酸性森林土壌であっても従属栄養性硝化の寄与は大きくないことを示している (De Boer et al. 1989, 1992; Tietema et al. 1992; Pennington and Ellis 1993; Barraclough and Puri 1995; Rudebeck and Persson 1998; Islam et al. 2007; Kuroiwa et al. in review)。これらの相反する研究結果の説明として、後者の研究の土壌では、耐酸性あるいは好酸性の独立栄養性硝化微生物が存在し、硝化を

担っていると考えられてきた (De boer et al. 1991, 1992 Hart et al. 1997、第 1 章)。本研究では、第 6 章で記述する研究において、硝化微生物群集に焦点を当て、それらの耐酸性／好酸性微生物が本研究サイトの土壌に実際に存在し、また硝化を担っているのかどうかについて考察する。

Table 5-1. Chemistry of soils of control and N-addition plots in broadleaf forest, and control and N-addition plots in pine forest at DHSBR and broadleaf forest at HSD

	DHSBR				HSD
	Broadleaf Control	Broadleaf N-addition*	Pine Control	Pine N-addition*	Broadleaf
pH	3.7	3.6	3.8	3.8	4.2
NH ₄ (mg-N/ kg-soil)	5.0 (0.2)d	8.4 (0.1)c	16.9 (0.3)a	15.5 (0.3)b	5.2 (0.2)d
NO ₃ (mg-N/ kg-soil)	14.4 (1.3)b	19.4 (0.2)s	6.9 (0.1)c	6.6 (0.1)c	7.4 (0.9)c
DON (mg-N/ kg-soil)	30.8 (1.4)a	30.9 (0.4)a	18.5 (0.4)c	14.6 (0.8)d	25.1 (0.6)b
SMB-N** (mg-N/ kg-soil)	90.6 (8.3)b	62.8 (1.3)c	23.5 (1.3)d	20.7 (2.2)d	103.5 (3.7)a
Total N (mg-N/ kg-soil)	2593.3 (112.5)a	2520.5(70.8)a	1717.1 (141.7)c	1634.1 (107.1)c	1928.0(66.6)b
C/N	21.7 (0.4)b	21.7 (0.8)b	23.9 (1.5)a	21.5 (1.4)b	21.0 (0.3)b

*N-addition plot where 100 kg-N/ha/yr as NH₄NO₃ has been amended every month since 2003.

**SMB-N; soil microbial biomass N

S.D. in parentheses, $n = 4$

Different letters following the values indicate significant differences among forests ($p < 0.05$) based on one-way analysis of variance (ANOVA) with Turkey's HSD

Table 5-2. $^{15}\text{NH}_4^+$ and $^{15}\text{NO}_3^-$ concentration 2 and 26 hours after ^{15}N addition in soils of (A) control and (B) N-addition plots in broadleaf forest and (C) control and (D) N-addition plots in pine forest at DHSBR and (E) broadleaf forest at HSD

Plot	(mg-N/kg-soil)		+ $^{15}\text{NH}_4^+$	+ $^{15}\text{NH}_4^+$ + C_2H_2	+ $^{15}\text{NO}_3^-$	+ $^{15}\text{NO}_3^-$ + C_2H_2
(A)	$^{15}\text{NH}_4^+$	t=2h	4.4 (0.4)	4.8 (0.2)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
		t=26h	2.9 (0.2)	4.1 (0.5)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
	$^{15}\text{NO}_3^-$	t=2h	0.3 (0.0)	0.1 (0.0)	6.1 (0.4)	6.2 (0.4)
		t=26h	1.6 (0.1)	0.1 (0.0)	5.8 (0.4)	6.0 (0.3)
(B)	$^{15}\text{NH}_4^+$	t=2h	3.9 (0.2)	4.1 (0.1)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
		t=26h	3.2 (0.1)	3.8 (0.3)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
	$^{15}\text{NO}_3^-$	t=2h	0.1 (0.0)	0.1 (0.0)	5.7 (0.3)	5.7 (0.2)
		t=26h	0.6 (0.0)	0.1 (0.0)	5.6 (0.1)	5.7 (0.1)
(C)	$^{15}\text{NH}_4^+$	t=2h	4.0 (0.2)	4.1 (0.3)	0.1 (0.0)	0.1 (0.0)
		t=26h	3.6 (0.2)	3.8 (0.0)	0.1 (0.0)	0.1 (0.0)
	$^{15}\text{NO}_3^-$	t=2h	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	5.4 (0.1)	5.0 (0.1)
		t=26h	0.1 (0.0)	0.0 (0.0)	5.1 (0.1)	5.2 (0.1)
(D)	$^{15}\text{NH}_4^+$	t=2h	4.0 (0.1)	4.0 (0.2)	0.1 (0.0)	0.1 (0.0)
		t=26h	3.4 (0.1)	3.5 (0.1)	0.1 (0.0)	0.1 (0.0)
	$^{15}\text{NO}_3^-$	t=2h	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	5.6 (0.1)	5.6 (0.2)
		t=26h	0.1 (0.0)	0.0 (0.0)	5.5 (0.1)	5.6 (0.1)
(E)	$^{15}\text{NH}_4^+$	t=2h	5.0 (0.1)	5.0 (0.2)	0.1 (0.0)	0.1 (0.0)
		t=26h	4.7 (0.1)	4.7 (0.2)	0.1 (0.0)	0.1 (0.0)
	$^{15}\text{NO}_3^-$	t=2h	0.1 (0.0)	0.0 (0.0)	5.7 (0.2)	4.1 (0.1)
		t=26h	0.1 (0.0)	0.0 (0.0)	5.3 (0.0)	5.3 (0.0)

S.D. in parentheses, $n = 4$

Table 5-3. Net nitrification rates, and NH_4^+ and NO_3^- dynamics in soils of control and N-addition plots in broadleaf forest, and control and N-addition plots in pine forest at DHSBR and broadleaf forest at HSD

	DHSBR				HSD
	Broadleaf		Pine		Broadleaf
	Control	N-addition	Control	N-addition	
Net nitrification (mg-N/ kg-soil/ day)	1.8 (0.2)b	2.1 (0.1)a	0.0 (0.0)d	0.0 (0.0)d	0.4 (0.0)c
autotrophic nitrification / mineralization*	1.1 (0.1)b	2.3 (0.2)a	0.6 (0.1)c	0.0 (0.0)d	0.7 (0.0)c
Pseudo-residence time of NO_3^- (day)**	15.3 (2.2)c	92.4 (9.7)a	9.3 (1.0)d	58.4 (5.5)b	6.0 (0.8)d

S.E. in parentheses, $n = 4$

Different letters following the values indicate significant differences among forests ($p < 0.05$) based on one-way analysis of variance (ANOVA) with Turkey's HSD



Figure 5-1. Picture of a 20-g soil sample in a 200-ml vial. incubated for estimating N flow rates using the ^{15}N isotope dilution technique. The vial are clamp-sealed with butyl-rubber stopper after ^{15}N addition. C_2H_2 was injected into gas phase to inhibit autotrophic ammonia oxidation.

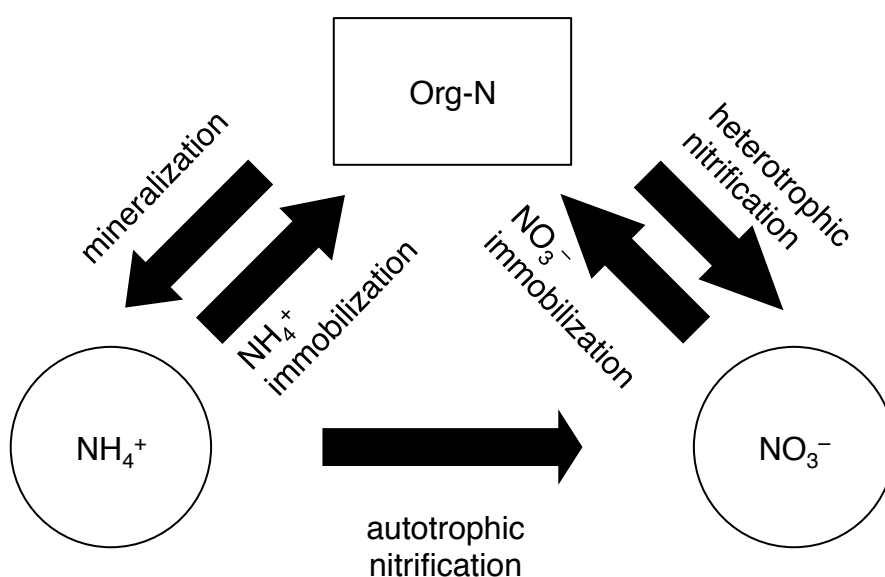


Figure 5-2. Schematic representations of the major processes affecting NH_4^+ and NO_3^- pool sizes in forest soils discussed in Chap. 5. Net and gross rates of N mineralization and nitrification are measured in the absence of plant uptake and leaching and under conditions that minimize denitrification. Under these conditions net rate estimates are still influenced by both productive and consumptive processes. For the NH_4^+ pool, gross mineralization is the productive process; consumptive processes include abiotic sinks, gross nitrification, microbial immobilization, and plant uptake. For the NO_3^- pool, gross nitrification is the productive process; consumptive processes include denitrification, leaching, microbial immobilization, and plant uptake.

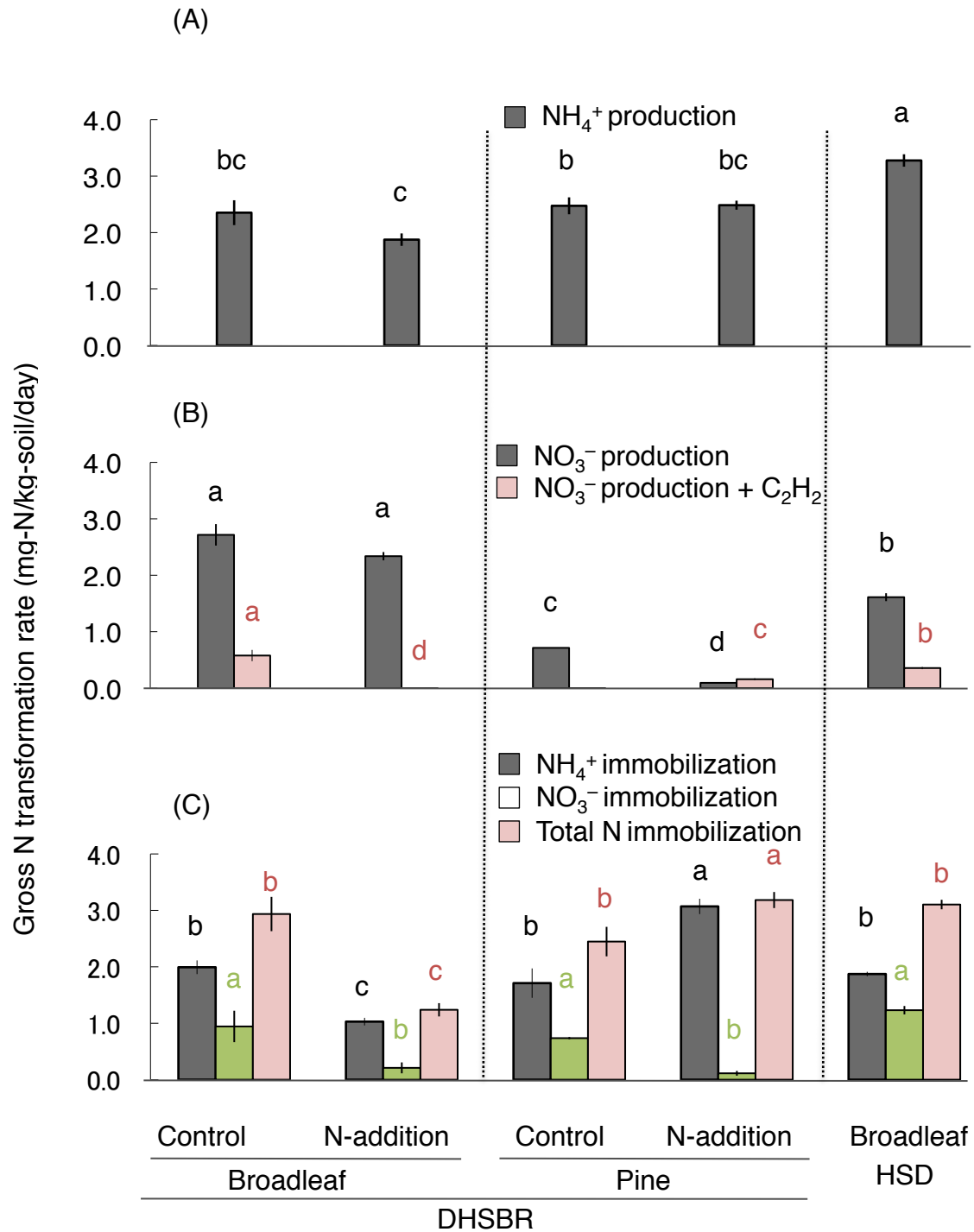


Figure 5-3. Gross rates of (A) mineralization, (B) nitrification, and (C) N immobilization in soils of control and N-addition plots in broadleaf forest, and control and N-addition plots in pine forest at DHSBR, and broadleaf forest at HSD, Error bars represent S.E. (n=4). Different letters above the bars indicate significant differences among forests ($p < 0.05$) based on one-way analysis of variance (ANOVA) with Turkey's HSD

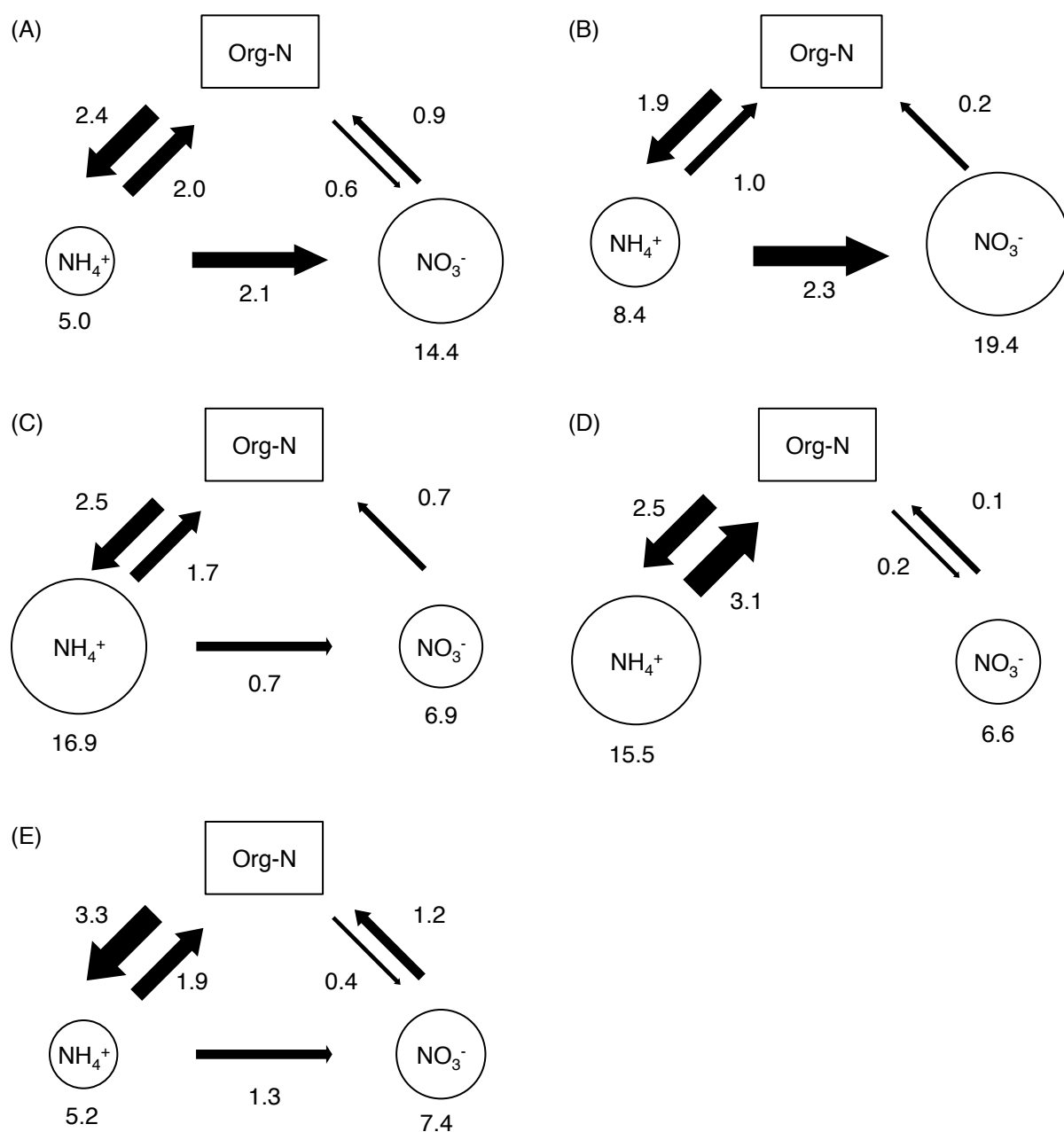


Figure 5-4. Characteristics of N transformations in in soils of (A) control and (B) N-addition plots in broadleaf forest and (C) control and (D) N-addition plots in pine forest at DHSBR, and (E) broadleaf forest at HSD. Arrows indicate the following: from Org-N (organic N) to NH_4^+ -N, gross mineralization; from NH_4^+ -N to Org-N, NH_4^+ immobilization; from NH_4^+ -N to NO_3^- -N, gross nitrification; from NO_3^- -N to Org-N, gross NO_3^- immobilization. The figures adjacent to each arrow and below each circles show the rates ($\text{mg-N kg-soil}^{-1} \text{ day}^{-1}$) and pool size (mg-N kg-soil^{-1}), respectively. Gross NH_4^+ immobilization rate was calculated by subtracting gross nitrification rate from gross NH_4^+ consumption rate.

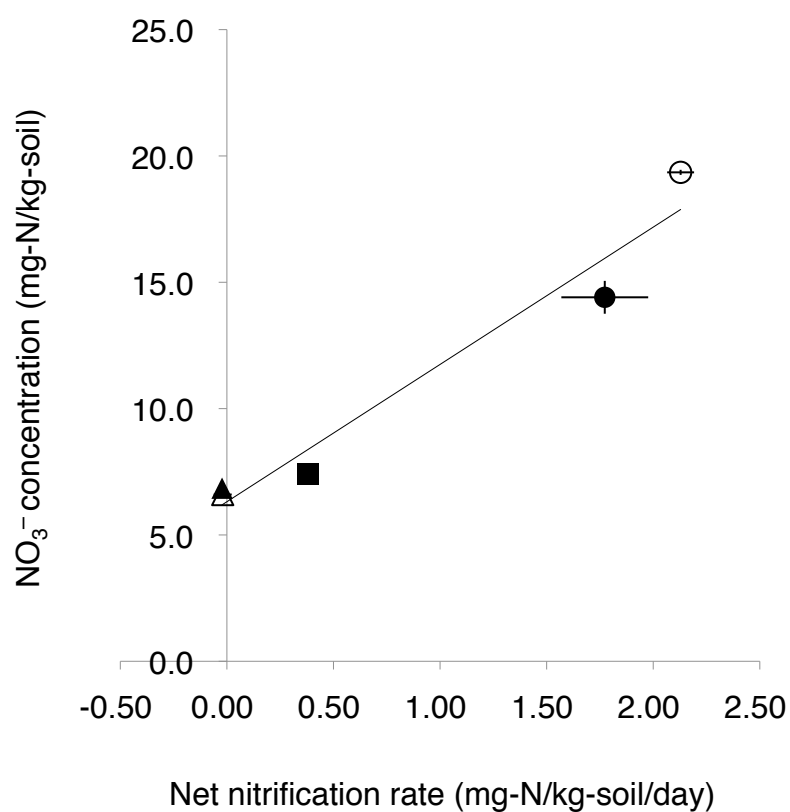


Figure 5-5. Relationship between net nitrification rate and NO_3^- concentration in soils of control and N-addition plots in broadleaf forest (● and ○) and control and N-addition plots in pine forest (▲ and △) at DHSBR, and broadleaf forest at HSD (■). A significant correlation between them was found ($p < 0.01$, NO_3^- concentration = $5.3 \times$ net nitrification rate + 6.6, $R^2 = 0.93$). Error bars represent S.E. ($n=4$).

第 6 章 高窒素負荷環境にある中国亜熱帯林土壌における

硝化微生物群集の解析

6.1 緒言

第 4 章、第 5 章に記述したように、DHSBR の広葉樹林、松林、混合林の窒素フローを比較した結果、森林間で総硝化速度に大きな差が見られた。また、第 5 章において、高い硝化速度をともなう硝酸生成の大部分は独立栄養性微生物によることも確認された。したがって上記のような硝化速度の違いは、硝化を担っている独立栄養性微生物の存在量や群集組成、活性の違いに由来している可能性が考えられる。本章に記述する研究では、第 4、5 章で用いた土壌中の硝化微生物群集について解析を行い、上記の推測の妥当性を検証した。

アンモニア酸化 ($\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^-$) 反応は硝化 ($\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_3^-$) 反応の第 1 段階であり、かつ律速段階である。従来、独立栄養性のアンモニア酸化細菌 (AOB) と亜硝酸酸化細菌 (NOB) が土壌中の硝化を主に担っていると考えられてきた。しかし、これまでも酸性森林土壌において AOB の存在が確認されているが、その存在量は少なく、AOB が硝化にどれほど寄与しているのかほとんどわかっていない (Bäckman et al. 2003; Laverman et al. 2005; Schmidt et al. 2007)。その一方で、近年発見されたアンモニア酸化アーキア (AOA) (Könneke et al. 2005) の *amoA* の存在量は、多くの酸性土壌において AOB の *amoA* の存在量と比べて同程度あるいは多いことが報告され (Leininger et al. 2006; He et al. 2007; Nicol et al. 2008; Chen et al. 2008; Gubry-Rangin et al. 2010)、AOA が酸性森林土壌で硝化を担う微生物の新たな候補となっている (第 1 章、セクション 1.3)。

ただし、これまでに土壌からアンモニア酸化能をもつアーキアが分離された報告例がないため、*amoA* を保有しアンモニア酸化能を有するアーキアが本当に土壌中に存在し、土壌中で実際に硝化を担っているのかどうかは不明である。しかし、多くの論文になら

って、本章では便宜上 *amoA* を保有するアーキアを AOA と呼ぶことにする。

本章では、DHSBR および HSD の土壌における、AOB および AOA の存在量、群集組成、RNA 存在量に基づく活性、および第 4、5 章で算出した総硝化速度との関係性を検討し、どのような微生物群が土壌中で硝化を主に担っているのかを考察する。具体的には、下記 (1) から (3) を行う。

- (1) 第 4 章において窒素フローの解析を行った供試土壌を用い、その中の硝化微生物群集を解析する。まず土壌から抽出した DNA を材料とし、AOB、AOA に由来する土壌中の *amoA* 存在量の定量およびクローン解析を行う。その *amoA* 存在量と第 4 章で算出した総硝化速度との相関をについて検討する。また *Nitrosospira* 属 NOB を対象としたクローン解析を行う。
- (2) 第 5 章において窒素フローの解析を行った供試土壌を用い、その中の硝化微生物群集の解析を行う。ここでは、土壌から抽出した DNA と RNA の両方を材料とし、AOB および AOA に由来する土壌中の *amoA* 存在量の定量を行い、その存在量と第 5 章で算出した総独立栄養性硝化速度との相関について検討する。
- (3) 上記 (1)、(2) の分子生態学的手法に加え、培養依存的手法による検出ならびに定量を行う。上記の土壌とは別に 2009 年 10 月に採取した土壌を用いて、AOB の存在量を最確値 (Most probable number: MPN) 法によって算出する。

6.2 方法

6.2.1 供試土壌

供試土壌は、次の 3 組である。

(土壌 1) 2008 年 9 月に採取した土壌 (第 4 章の供試土壌)。この土壌は DHSBR の広葉樹林、松林、混合林のコントロール区内 6 カ所ずつから採取し、それぞれ 2mm のふるいを通した (第 1 章、セクション 1.6)。研究サイトから東京大学

土壌圏科学研究室に輸送した後、本章で記述する実験に使用するまでは -20°C で冷凍保存した。

(土壌 2) 2009 年 8 月に採取した土壌 (第 5 章の供試土壌)。この土壌は DHSBR の広葉樹林 (コントロール区、窒素添加区)、松林 (コントロール区、窒素添加区)、および HSD の広葉樹林の各プロット内 12 カ所ずつから採取し、それぞれ 2mm のふるいを通した後、プロット毎に混合した (第 1 章、セクション 1.6)。 $^{15}\text{NO}_3^-$ を添加して 2 時間培養した後の土壌 (第 5 章) を、その時点で液体窒素を用いて凍結させ、本章で記述する実験に使用するまでは -80°C で冷凍保存した。

(土壌 3) 2009 年 10 月に採取した土壌。この土壌は DHSBR の広葉樹林 (コントロール区) のプロット内 4 カ所から採取し、それぞれ 2mm のふるいを通した後、混合した (第 1 章、セクション 1.6 参照)。研究サイトから東京大学土壌圏科学研究室に輸送した後 4°C で冷蔵保存し、本章で記述する実験に使用する前に 26°C で 72 時間前培養した。

6.2.2 DNA 抽出および RNA 抽出と cDNA 合成

2008 年 9 月採取土壌 (土壌 1) について、各土壌サンプル 0.5 g から DNA を抽出した。抽出には ISOIL kit for bead beating (Nippon Gene, Toyama, Japan) を用いた。抽出 DNA 溶液 (終容積: $100\ \mu\text{l}$) は滅菌水で 20 倍希釈した後、PCR テンプレートとして使用した。

2009 年 8 月採取土壌 (土壌 2) について、各土壌サンプル 2 g から Wang et al. (2009) の方法にもとづき、RNA PowerSoil Total RNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc., CA, USA) と RNA PowerSoil DNA Elution Accessory Kit (MO BIO Laboratories Inc.) を用いて、DNA と RNA を同時に抽出した。抽出 DNA 溶液 (終容積: $100\ \mu\text{l}$)、抽出 RNA 溶液 (終容積: $100\ \mu\text{l}$) とともに、混入している腐植物質を除去するため核酸精製カラム (illustra MicroSpinTM S-400 HR Columns, GE Healthcare, UK) を用いて精製した。精製した抽出

DNA 溶液は滅菌水で 20 倍希釈した後、PCR テンプレートとして使用した。精製した抽出 RNA 溶液は cDNA 合成へと供した。手順は以下の通りである。(1) まず、混入 DNA を除去するため DNase 処理を行った。TURBO DNA-free Kit (Applied Biosystems Inc., CA, USA) を用いて行った。(2) 続いて DNase の除去を、RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research Co., CA, USA) を用いて行った。(3) 最後に逆転写 PCR と cDNA 合成を、ランダムプライマー (6mer, deoxyribonucleotide mixture, Takara Bio Inc., Shiga, Japan) と SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, CA, USA) を用いて行った。DNase 処理および逆転写 PCR と cDNA 合成の反応液組成と反応条件を Figure 6-1 に示す。

6.2.3 AOA、AOB、NOB 群集の PCR 検出

2008 年 9 月採取土壌 (土壌 1) について、AOB、AOA、NOB を対象として PCR を行った。AOB を対象とした PCR として、AOB の 16S rRNA 遺伝子と *amoA* をターゲットに、それぞれ特異的プライマー CTO189f-CTO654r (CTO プライマー) (Kowalchuk et al. 1997) および *amoA*1f-*amoA*2r (Rotthauwe et al. 1997) を用いて、PCR を行った。AOB の 16S rRNA 遺伝子をターゲットに nested PCR も行った。(1) まず全細菌の 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を細菌用ユニバーサルプライマー m27f -m1492r (Tyson et al. 2004) を用いて増幅した。(2) 続いて、その PCR 産物溶液から、未反応の dNTPs やプライマーを DNA 精製カラム (Wizard PCR Preps DNA Purification System, Promega, Madison, WI, USA) を用いて除去した。(3) その PCR 産物溶液を 50 倍希釈した溶液をテンプレートにして、CTO プライマーを用いて再度 PCR を行った。

続いて、AOA を対象とした PCR として、アーキアの *amoA* をターゲットに、特異的プライマー CrenamoA23f-CrenamoA616r (Könneke et al. 2005; Tourna et al. 2008) を用いて、PCR を行った。最後に、NOB の中でも土壌環境で優占する 1 グループである *Nitrospira* 属細菌を対象とした PCR を行った。この PCR では、ユニバーサルプライマー m27f (上述) と特異的プライマー Nspira705r (Fritag et al. 2005) を組み合わせて用いた。

全ての PCR 反応は、非特異的増幅を抑えるためにホットスタート法で行った。反応液 (25 μ l) の組成は以下の通りである。10 \times reaction buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)、DNA テンプレート (1 μ l)、プライマー (0.2 μ M)、dNTPs (0.2 mM each)、MgCl₂ (250 μ M)、ウシ血清アルブミン (250 μ M)、AmpliTaq Gold® DNA polymerase (2 unit) (Applied Biosystems)。PCR 条件は Table 6-1 にまとめた。PCR 産物のサイズはアガロースゲル電気泳動で確認した。増幅が見られない場合には、PCR 条件を次のように修正した。アニーリング温度を-1°C または -2°C 下げ、DNA テンプレートを 10 倍希釈し、サイクル数を 35 まで増やした。

6.2.4 AOA、AOB、NOB 群集のクローンライブラリー解析

上述 (6.2.3) で得られた PCR 産物溶液は DNA 精製カラム Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega) を用いて精製した。続いて pGEM-T Easy Vector (Promega) を用いてライゲーションを行い、コンピテントセル *Escherichia coli* strain JM109 high efficiency competent cells (Promega) を用いて形質転換を行った。各クローンのインサートの DNA をベクタープライマー T7-1 (5'-AATACGACTCACTATAG-3') と SP6 (5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3')を用いて PCR 増幅し、増幅に用いたのと同じプライマーを用いて、ドラゴンジェノミクスセンター (TaKaRa Bio, Mie, Japan) の受託解析により塩基配列を解読した。

塩基配列の相同性検索は NCBI データベース (McEntyre and Ostell 2005) を用いて、Blastn (Altschul et al. 1997) によって行った。本研究で得られた配列と相同性の高い配列を、系統解析のレファレンス配列として用いた。また、*Nitrosomonas* 属 (AOB)、*Nitrospira* 属 (AOB)、*Nitrospira* 属 (NOB) の細菌の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank データベースから得た。本研究で得られた塩基配列とレファレンス塩基配列のアライメント解析を行い、距離行列にした。その距離行列をもとに Clustalw version 2.0 (Larkin et al. 2007)を用いて、ギャップ部位および多重置換部位を除

去後、乱数シードを 111、ブートストラップ試行数を 1000 として近隣結合法により系統樹を作成した。

6.2.5 *amoA* コピー数の定量

上述 (6.2.2) で得られた 2008 年 9 月採取土壌 (土壌 1) 由来の抽出 DNA 溶液および 2009 年 8 月採取土壌 (土壌 2) 由来の抽出 DNA および RNA 溶液について、AOA の *amoA* コピー数を定量 PCR によって算出した。CrenamoA23f-CrenamoA616r をプライマーとして、StepOne real-time PCR system (Applied Biosystems) を用いて行った。反応液 (20 μ l) の組成は、1x Power SYBR green PCR master mixture (Applied Biosystems)、DNA テンプレート (2 μ l)、プライマー (0.2 μ M each)、およびウシ血清アルブミン (250 μ M) であった。標準曲線 (10^3 to 10^8 copies per reaction mixture) は、本研究で得られた AOA の *amoA* フラグメントを用いて作成した。反応条件は、95°C で 15 分に続き、95°C で 30 秒、58°C で 30 秒、72°C で 30 s を 40 サイクルとした。PCR 産物のサイズが正しいことはアガロースゲル電気泳動で確認した。また、2009 年 8 月採取土壌由来の抽出 DNA および RNA 溶液について、AOB の *amoA* をターゲットに定量 PCR を行った。プライマーには amoA1f-amoA2r を用いて、同様の反応液組成で行った。標準曲線 (10^2 to 10^7 copies per reaction mixture) は、*Nitrosospira multiformis* (ATCC 25196^T) の *amoA* フラグメントを用いて作成した。反応条件は、95°C で 15 分に続き、95°C で 30 秒、58°C で 30 秒、72°C で 30 s を 40 サイクルとした。

6.2.6 MPN 法による AOB 群集の検出と定量

広葉樹林土壌の AOB の存在量を MPN 法 (Schmidt and Belser 1983; Suwa et al. 1994) によって算出した。これまで多くの研究でアンモニア酸化微生物の検出および定量に、培養をともなう MPN 法が用いられてきた。しかしこれまで、この MPN 法の実験条件下で AOA が培養されたことはなく、したがって、この方法では AOA の活性は検出さ

れないと考えられる。そこで本研究では、MPN 法によって検出される微生物に AOA は含まれないと見なし、本実験を“AOB の”検出と定量と位置づける。

MPN 法の手順は以下の通りである。(1) 2009 年 10 月採取土壌（土壌 3）20 グラム（乾燥重量でおよそ 10 グラム）に蒸留水 190 mL を加え、ワーリングブレンダーで攪拌した。(2) 蒸留水を用いて、 10^{-2} 倍から 10^{-8} 倍までの 10 倍希釈系列を作成した。(3) MPN 法の液体培地として、“低 pH 培地”（pH 5.5）と“中 pH 培地”（pH 7.5）を作成した。液体培地の組成について Table 6-2 に示す。窒素源かつエネルギー源として、濃度の異なる硫酸アンモニウム $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ または尿素 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ を用いた。すなわち、低 pH 培地には 66、661、6608 mg/L の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ または 3、30 mg/L の $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ を、中 pH 培地には 6.6、66 mg/L の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を用いた。培地の pH は最終的に HCl または Na_2CO_3 溶液で調整した。培地は孔径 0.2 μm のメンブレンフィルター（Corning、Tokyo、Japan）を用いて滅菌ろ過した後、4 ml を滅菌試験管に分注した。(4) そこに 1 ml の 10 倍希釈系列の土壌懸濁液を加え、アルミキャップをした。各希釈系列につき 8 から 10 連の試験管を用いた。(5) 25°C で 6 週間、12 週間培養し、Schmidt and Belser (1983)、Suwa et al. (1994) にしたがって、 NO_2^- および NO_3^- の生成をグリース・イロスベイ反応によって確認した。

6.3 結果

6.3.1 AOB 群集

2008 年 9 月採取土壌（土壌 1、DHSBR の広葉樹林、松林、混合林のコントロール区）について、AOB をターゲットにした PCR において、Table 6-1 で示した条件では 16S rRNA 遺伝子および *amoA* のいずれの増幅も見られなかった。また、上述（6.2.3）のとおりに PCR 条件を変更したが、同様に増幅が見られなかった。ただし、AOB の 16S rRNA 遺伝子をターゲットにした nested PCR では、広葉樹林から得られた 6 サンプルのうち 2 サンプルで AOB 由来の 16S rRNA 遺伝子フラグメントとほぼ同じサイズの DNA フラグ

メントの増幅が確認された (Figure 6-2)。しかし、その塩基配列に基づく系統解析の結果、増幅された DNA はこれまで知られている betaproteobacteria に属する AOB、すなわち *Nitrosospira* および *Nitrosomonas* の系統とは異なる細菌に由来する 16S rRNA 遺伝子であることが示された (Figure 6-3)。

2009 年 8 月採取土壌 (土壌 2、DHSBR の広葉樹林 (コントロール区、窒素添加区) および松林 (コントロール区、窒素添加区)、HSD の広葉樹林) について、AOB の *amoA* をターゲットに定量 PCR を行ったが、増幅が見られなかった。*Nitrosospira multiformis* (ATCC 25196^T) の *amoA* を用いて作成した標準曲線から AOB の *amoA* 遺伝子の検出限界は 5×10^4 copies g-soil⁻¹ と算出された。

2009 年 10 月採取土壌 (土壌 3、DHSBR の広葉樹林 (コントロール区)) について、AOB をターゲットとした MPN 法において、培地組成および土壌の希釈倍率が異なるすべての試験管において、グリース・イロスベイ反応による呈色すなわち、 NO_2^- および NO_3^- の生成は確認されなかった。すなわち AOB は検出されなかった。なお、MPN 法による AOB の検出限界は 1×10^3 copies g-soil⁻¹ と算出された。

6.3.2 AOA 群集

2008 年 9 月採取土壌 (土壌 1、DHSBR の広葉樹林、松林、混合林のコントロール区) について、AOA の *amoA* は全ての土壌サンプルから PCR 法において増幅が見られた。広葉樹林、松林、混合林からそれぞれ、10、11、11 クローンの *amoA* の塩基配列を解読し、系統解析をして得られた近隣結合系統樹を Figure 6-4 に示す。系統樹上では、本研究で得られた *amoA* は 3 つのクラスター (クラスター I、II、III) に分かれた。広葉樹林に由来する 10 クローンのうち 4 クローンと、松林および混合林に由来する全てのクローンは、クラスター II に、広葉樹林由来の残りのクローンのうち 1 クローンはクラスター I に、4 クローンはクラスター II に位置した。本研究で得られたすべてのクローンは、データベースに登録されていた土壌由来のクローンと高い塩基配列相同性を示し、

Nitrosopumilus multimus SCM1 や海綿 *Cenarchaeum symbiosum* 中の AOA といった海洋環境に由来する AOA とは系統的に異なっていた。

続いて定量 PCR 法により AOA の *amoA* 存在量を定量した結果を Table 6-3 に示す。AOA の *amoA* コピー数には広葉樹林と混合林の間で有意差が見られた。また、AOA の *amoA* コピー数は第 4 章で算出した総硝化速度との間に弱い相関 ($p = 0.003$ 、 $\text{Gross nitrification rate} = 3.4 \times 10^{-9} \times \text{abundance of AOA } amoA \text{ gene} - 0.5$ 、 $r^2 = 0.43$ 、 $n=18$) を示した (Figure 6-5)。

2008 年 9 月採取土壌 (土壌 1、DHSBR の広葉樹林、松林、混合林のコントロール区) については、定量 PCR 法により抽出した RNA および DNA の両方を用いて AOA の *amoA* 存在量を定量した。その結果を Table 6-4 に示す。AOA の *amoA* コピー数は森林間で異なり、DHSBR の松林、HSD の広葉樹林、DHSBR の広葉樹林の順に大きくなり、窒素添加区とコントロール区では差は見られなかった。また、cDNA 量によって表される *amoA* の mRNA コピー数についても、DNA コピー数と同様の傾向を示した。さらに、DNA にもとづく *amoA* 存在量と第 5 章で算出した総独立栄養性硝化速度との間に有意な相関 ($p < 0.05$ 、 $\text{Gross nitrification rate} = 7.0 \times 10^{-10} \times \text{abundance of AOA } amoA \text{ gene} + 0.2$ 、 $r^2 = 0.86$ 、 $n=5$) が認められた (Figure 6-6)。また mRNA にもとづく *amoA* 存在量と総独立栄養性硝化速度との間にも有意な相関 ($p < 0.05$ 、 $\text{Gross nitrification rate} = 1.9 \times 10^{-9} \times \text{abundance of archaeal } amoA \text{ transcript} + 0.3$ 、 $r^2 = 0.86$ 、 $n=5$) が認められた (Figure 6-6)。

6.3.2 NOB 群集

2008 年 9 月採取土壌 (土壌 1、DHSBR の広葉樹林、松林、混合林のコントロール区) について、NOB の中でも土壌環境において優占していると考えられている *Nitrospira* 属細菌を対象に PCR を行った。その結果、全ての土壌サンプルにおいて、*Nitrospira* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列から予測されるサイズと同程度のサイズをもつ DNA フラグメントが得られた。広葉樹林、松林、混合林からそれぞれ、10、7、4 クローン

の DNA フラグメント配列を解読し、系統解析を行った (Figure 6-7)。その結果、*Nitrospira* 門には属するが、NOB として知られている *Nitrospira* 属には属さない細菌由来の塩基配列も得られたが、広葉樹林、松林、混合林から得られたクローンの中に、*Nitrosospora* 属細菌が含まれることが確認された。このことから広葉樹林、松林、混合林の土壌中には *Nitrosospora* 属の NOB が存在することが示された。

6.4 考察

6.4.1 DHSBR および HSD において硝化を担っている微生物群集

全ての土壌サンプルから、AOB の 16S rRNA 遺伝子や *amoA* は PCR によって増幅されなかった。AOB の 16S rRNA 遺伝子を対象とする CTO プライマーを用いた nested PCR では、増幅産物が得られたが、塩基配列解読の結果、それらは AOB 以外の細菌に由来するものであった (Figure 6-3)。既往研究においても、AOB の存在量が小さい土壌からは、CTO プライマーを用いても AOB 以外の細菌に由来する遺伝子フラグメントが増幅されることが報告されている (Bäckman et al. 2003; Mahmood et al. 2006)。しかし、これらの研究は主に PCR 反応を介した方法による。したがって、これまで用いられてきたプライマーのミスマッチによって検出されなかった可能性は否定できない。その可能性を検討するため培養依存的手法である MPN 法を行ったが、AOB の活性ならびに増殖は確認されなかった。これらのことから、DHSBR および HSD の森林土壌では AOB 群集の存在量が極めて小さいと考えられる。既往研究においても、酸性森林土壌では AOB の存在量が小さいことが報告されている (Bäckman et al. 2003; Schmidt et al. 2007; Stopnišek et al. 2010)。その中でも、Bäckman et al. (2003) は酸性針葉樹林土壌において、6 年間もの石灰の添加による中和作業を施した結果、添加前には AOB の存在が検出されなかったが、土壌 pH の上昇とともに AOB の増殖が見られたことを報告した。これらのことから、DHSBR および HSD の森林土壌で AOB の存在量が小さいのは、土壌 pH が極めて低いことによる可能性が考えられる。

AOB とは異なり、AOA の存在量は極めて大きいことが明らかになった。すなわち、本研究のすべての土壌サンプルにおいて 10^8 - 10^9 g-soil⁻¹ オーダーの AOA の *amoA* が存在が認められた。これは、既往研究における他の酸性森林土壌 (5×10^6 - 6×10^7 g-soil⁻¹) (Boyle-Yahwood et al. 2008; Stopnišek et al. 2010) や酸性農耕地土壌 (2×10^6 - 1×10^8 g-soil⁻¹) (Leininger et al. 2006; He et al. 2007; Nicol et al. 2008; Chen et al. 2008; Gubry-Rangin et al. 2010) で報告された値より大きい。また、DHSBR の広葉樹林 (コントロール区)、松林 (コントロール区)、混合林 (コントロール区) の AOA *amoA* の存在量と第 4 章で算出した総硝化速度との間に相関が見られた。また、DHSBR の広葉樹林 (コントロール区、窒素添加区)、松林 (コントロール区、窒素添加区)、HSD の広葉樹林の DNA および mRNA にもとづく AOA *amoA* の存在量と第 5 章で算出した総独立栄養性硝化速度との間にも、それぞれ有意な相関が見られた (Figure 6-5、6-6)。これらのことから、植生や窒素流入量が異なっているにもかかわらず、本研究サイトの森林土壌においては AOA がアンモニア酸化を担っている主要な微生物群であると考えられた。またそれと同時に、各森林土壌中の総硝化速度は AOA の存在量によって大きくコントロールされていることが示唆された (Figure 1-8B)。

NOB に関して、DHSBR の広葉樹林、松林、混合林において NOB の 1 グループである *Nitrosospira* 属細菌の存在が確認された。したがって、少なくとも DHSBR においては、AOA と NOB が硝化 (それぞれ、アンモニア酸化と亜硝酸酸化) を担っている主要な微生物群であることが示唆された。

6.4.2 DHSBR の AOA の系統

DHSBR の広葉樹林、混合林、松林のコントロール区から得られた AOA の *amoA* クローンのほとんどは、データベースに登録されている中国の土壌に由来する参照クローンの *amoA* 塩基配列から推定されるアミノ酸配列と高い相同性を示した (Figure 6-4 参照)。得られた 33 クローンのうち 26 クローンのアミノ酸配列は中国の農耕地土壌から得られ

た参照クローンのアミノ酸配列とともに 1 つのクラスターを形成した (Cluster II)。Cluster III の Group 2 に含まれる AOA の *amoA* のアミノ酸配列についても、中国の果樹園土壌から得られた “clone AOA C4” のアミノ酸配列と同一であった (Huaiying Yao, Zhejiang University, pers. comm.)。Ying et al. (2010) も、中国の同じ省の異なるフィールドから得られた AOA の *amoA* アミノ酸配列が互いに高い相同性を示すことを報告している。これらの結果は AOA の *amoA* の系統と地理的分布との間に関係があること、さらには中国の土壌に由来する AOA *amoA* からなる特徴的な系統群が存在することを示唆している。

6.4.3 AOA と AOB の生態

AOA の発見 (Könneke et al. 2005) 以来、AOA の生態や窒素循環に対する役割について多くの研究がなされている (第 1 章、セクション 1.3)。しかし、土壌環境において AOA がどれだけ硝化に寄与しているのかについては、未だその大部分が未解明である。多くの既往研究では、酸性土壌において AOA の存在量が AOB に比べて多いことが報告されている。しかし、これまで酸性土壌に関わらず、土壌中の AOA の *amoA* コピー数と総硝化速度との間に有意な相関を見出した研究例はない。むしろ多くの研究例 (Nicol et al. 2008; Shen et al. 2008; Di et al. 2010; Ying et al. 2010) では、AOB の *amoA* 存在量の方が、AOA の *amoA* 存在量に比べて、土壌中の硝化速度 (純硝化速度や硝化ポテンシャル) と高い相関を示すことを報告している。また Jia and Conrad (2009) や Di et al. (2009) は、農耕地または牧草地土壌において、AOA の硝化への寄与は AOB の寄与に比べて遥かに小さいという結論を報告している。

これらの状況について、本研究および既往研究の結果をもとに、土壌中の AOB と AOA のアンモニア酸化活性の違いから考察する。まず本研究において、第 4 章と本章の結果から総硝化速度と AOA *amoA* のコピー数の式、

$$(\text{総硝化速度}) = 3.4 \times 10^{-9} \times (\text{AOA } amoA \text{ コピー数}) - 0.5$$

を得た。また第5章と本章の結果から総独立硝化速度と AOA *amoA* のコピー数の式、

$$(\text{総独立栄養性硝化速度}) = 7.0 \times 10^{-10} \times (\text{AOA } amoA \text{ コピー数}) + 0.2$$

を得た。一方、Hawkes et al. (2005) は草地土壌において AOB の存在量と総硝化速度との間に有意な相関を見出し ($P < 0.001$)、

$$(\text{総硝化速度}) = 8.9 \times 10^{-6} \times (\text{AOB 16S rRNA 遺伝子コピー数}) + 0.813$$

を得た。ここで次の2つの仮説を立てる、すなわち (1) 草地土壌においては AOB が主に硝化を担っている (Di et al. 2009)、(2) 細胞内の *amoA* コピー数は2、16S rRNA 遺伝子コピー数は1である (Norton et al. 2008)。この2つの仮説を採用すると、上記の AOA および AOB に関する式の傾きから、土壌中の AOA の一細胞あたりのアンモニア酸化活性は AOB の 0.4×10^{-4} - 1.9×10^{-4} 程度と推測できる。実際には AOB、AOA とともに一細胞あたりの活性は個体ごとに異なり、かつすべての個体が土壌中で活動的であるとは限らない。しかし、AOA の一細胞あたりのアンモニア酸化活性は AOB の活性に比べてはるかに低いことが推察される。(AOA の一細胞あたりのアンモニア酸化活性 / AOB の一細胞あたりのアンモニア酸化活性) = 0.4×10^{-4} - 1.9×10^{-4} という数値を採用すると、AOA と AOB の存在比が少なくとも 10^3 程度以上でないと土壌中の AOA のアンモニア酸化活性はほとんどみられないと推察できる。代表的な既往研究で見出された様々な土壌中の AOA *amoA* のコピー数と AOB *amoA* のコピー数の比を Table 6-5 にまとめる。ほとんどの土壌で AOA *amoA* のコピー数が AOB *amoA* のコピー数を上回っているが、その比は Stopnišek et al. (2010) を除けば 10^3 以下である。したがって上記のような土壌の多くでは AOA の硝化への寄与は AOB に比べて遥かに小さいと推察される。Table 6-5 においても、Stopnišek et al. (2010) は酸性ピート森林土壌を用いたマイクロコズム実験を行い、AOA の *amoA* が 10^7 g-soil⁻¹ のオーダーで確認された一方で、AOB は検出されず、AOA が主に硝化を担っていることを示唆している (Stopnišek et al. 2010)。

このような AOA と AOB の一細胞あたりのアンモニア酸化活性の差異は、AOA の細胞のサイズが、AOB の細胞のサイズに比べて著しく小さいことに起因するのかもしれ

ない。中温性 AOA の唯一の単離株である *Nitropumilus multimus* SCM1 の細胞サイズは小さく、幅 0.17 - 0.22 μm 、長さ 0.5 - 0.9 μm の桿菌状である (Könneke et al. 2005)。それに比べて代表的な AOB である *Nitrosospira multiformis* (幅 1.0 - 1.5 μm 、長さ 1.0 - 2.5 μm 、小葉状) や *Nitrosomonas europaea* (幅 0.8 - 0.9 μm 、長さ 1.0 - 2.0 μm 、短桿菌状) の細胞サイズ (Watson et al., 1989) は大きい。これら 3 株すべてを円柱状と仮定して計算すると、*N. multimus* SCM1 の細胞サイズは *N. multiformis* および *N. europaea* の 10^{-2} 倍程度である。

それではなぜ、DHSBR および HSD の森林土壌において、AOA が AOB に比べて著しく優占しているのか。それは DHSBR および HSD の土壌が“極限環境”的であることに起因している可能性がある。DHSBR、HSD とともに亜熱帯林土壌であるため風化が進み酸性物質に対する緩衝能がもともと低い性質の土壌を有しているうえ、長期にわたる酸性物質の降下によってさらに酸性化が進行している (Liu et al. 2010)。したがって AOB および AOA の基質となる NH_3 はその高い pK_a (≈ 9.25) ゆえに大部分は NH_4^+ へとイオン化している (Allison and Prosser 1991)。本研究と既往研究の結果から AOA の 1 細胞あたりアンモニア酸化能は AOB の 10^{-4} 倍程度と推察されたことは同時に、AOA の 1 細胞がその活性を維持するのに必要な NH_3 は AOB に比べてはるかに少ないことを意味する。これは *N. multimus* SCM1 の至適 NH_3 濃度 (あるいは apparent K_m 値) が AOB の単離株に比べて著しく (10^3 倍程度) 低いこととも整合する (Martens-Habbena 2009)。リソース (基質) の量が極めて限定されている条件においては、1 細胞当たりの必要するリソースの量が多い個体よりも少ない個体の方が生存競争上有利であると考えられる (Fierer et al. 2007)。このような理由から AOA は、AOB には利用できないほどの限定したリソース (NH_3) を利用することで、酸性土壌においてもその存在量及び活性を維持している可能性が考えられる。

また既往研究が示している通り、AOA は AOB が生育するのに適さないような環境にも適応しうる可能性が高い。例えば、酸性土壌 (Leininger et al. 2006; He et al. 2007;

Boyle-Yahwood et al. 2008; Nicol et al. 2008; Chen et al. 2008) の他に、温泉 (de la Torre et al. 2008; Reigstad et al. 2008)、 NH_4^+ 濃度の低い外洋などの環境において、AOA の存在量または活性が AOB のそれより高いことが知られている。また、これまでに培養されている 3 種(各 1 株)の AOA についても、温泉 (*Candidatus Nitrososphaera gargensis*, *Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii*) あるいは外洋環境 (*N. multimus* SCM1) から単離され、かつそれらの至適アンモニア濃度は、AOB の単離株より遥かに低い (de la Torre et al. 2008; Hatzenpichler et al. 2008; Martens-Habbena et al. 2009)。その一方で、施肥により NH_3 の可給性が高い農耕地土壌においては AOB が主にアンモニア酸化を担っており、AOA の寄与は遥かに小さいことが報告されている (Jia and Conrad 2009; Di et al. 2009)。これらのことから、DHSBR および HSD の森林土壌は AOB にとって “過酷な” 環境であるが、AOA にとっては生育可能な (あるいは生育に適した) 環境であると考えられる。

Table 6-1. Primers and PCR amplification conditions

Primer set	Target gene	Thermocycling program	
		Annealing temp. (°C)	Extension time (s)
CTO189f - CTO654r	AOB (16S rRNA gene)	55	45
m27f - m1492r	Eubacteria (16S rRNA gene)	50	120
amoA1f - amoA2r	AOB (<i>amoA</i>)	55	45
CrenamoA23f - CrenamoA616r	Archaea (<i>amoA</i>)	52	60
m27f - Nspira705r	genus Nitrospira (16S rRNA gene)	52	80

The general thermocycling program used was as follows: 10 min at 94°C; 25 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at the specified annealing temperature, and the specified extension time at 72°C and a 10-min final extension at 72°C.

Table 6-2. Media composition for culturing ammonia oxidizers (mg/L)

pH*	5.5	5.5	7.5
KH ₂ PO ₄	20.4	20.4	
K ₂ HPO ₄			26.1
Na ₂ HPO ₄			
MgSO ₄ • 7H ₂ O	5	5	5
CaCl ₂ • 2H ₂ O	2	2	2
Fe-EDTA solution**	0.1mL	0.1mL	0.1mL
NaHCO ₃	5	5	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.6, 66, 661, 6608		6.6, 66
(NH ₂) ₂ CO		3, 30	
ATCC 1573 trace element solution***	0.1mL	0.1mL	0.1mL

*pH was finally adjusted with HCl or Na₂CO₃

**Fe-EDTA solution (mg/L)

FeSO ₄ • 7H ₂ O	24.6
EDTA disodium	33.1

***ATCC 1573 trace element solution (mg/L)

Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	100
MnCl ₂ • 4H ₂ O	200
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	100
CoCl ₂ • 6H ₂ O	2
CuSO ₄ • 5H ₂ O	20

Table 6-3. Abundance of archaeal *amoA* gene (/g-soil) in soils of broadleaf, pine and mixed forest at DHSBR

	broadleaf	pine	mixed
Archaeal <i>amoA</i> gene	1.2 ± 0.1×10 ⁹ a	9.3 ± 2.0×10 ⁸ ab	3.2 ± 0.4×10 ⁸ b

Data are shown as mean ± standard error, n=4

Different letters following the values indicate significant differences among forests (p<0.05) based on one-way analysis of variance (ANOVA) with Turkey's HSD

Table 6-4. Abundance of archaeal *amoA* gene and transcript (/g-soil) in soils of control and N-addition plots in broadleaf forest and control and N-addition plots in pine forest at DHSBR, and broadleaf forest at HSD.

	DHSBR				HSD
	Broadleaf Control	Broadleaf N-addition*	Pine Control	Pine N-addition*	Broadleaf
Archaeal <i>amoA</i> gene	2.7 ± 1.2×10 ⁹ a	3.2 ± 0.5×10 ⁹ a	5.5 ± 1.6×10 ⁸ b	4.8 ± 2.0×10 ⁸ b	1.5 ± 0.2×10 ⁹ c
Archaeal <i>amoA</i> transcript	1.0 ± 0.2×10 ⁹ a	9.7 ± 2.0×10 ⁸ b	1.2 ± 0.5×10 ⁸ b	6.3 ± 3.2×10 ⁷ c	5.2 ± 0.1×10 ⁸ a

Data are shown as mean ± standard error, n=4

Different letters following the values indicate significant differences among forests (p<0.05) based on one-way analysis of variance (ANOVA) with Turkey's HSD

Table 6-5. The ratio of gene abundance of *amoA* of AOA to that of *amoA* of AOB in various types of soil.

soil type	pH	AOA : AOB*	reference
agricultural	4.9 – 7.5	32 - 125	Nicol et al. (2008)
agricultural	8.3-8.7	7.8 - 276	Shen et al. (2008)
agricultural	6.9-7.0	54 - 217	Jia and Conrad (2009)
agricultural	4.5	1.8 - 3.7	Gubry-Rangin et al. (2008)
agricultural	6	0.7 - 3.5	Gubry-Rangin et al. (2008)
agricultural	5.5-7.3	2.3 - 232	Leininger et al. (2005)
pristine	6.9-7.1	14 - 53	Leininger et al. (2005)
pasture	5.7-6.5	3.0 - 254	Di et al. (2009)
paddy rhizosphere	6.8	1.2 - 69.3	Chen (2008)
forest	4	0.42 - 1.80	Boyle-Yahwood et al. (2008)
forest	5	n.d.**	Boyle-Yahwood et al. (2008)
forest	4.1	$< 2.6 \times 10^7$ - 3.9×10^7	Stopnišek et al. (2010)
forest	3.6 – 4.2	$>9.6 \times 10^3$ - 6.4×10^4 ****	this study

•AOA : AOB represents the ratio of gene abundance of *amoA* of AOA to that of *amoA* of AOB.

***amoA* gene of AOA were not detected from the soil. The detection limit was 5×10^4 copies g⁻¹ of soil

****amoA* gene of AOB were not detected from the soil. The detection limit were not described.

****The detection limit was 5×10^4 copies g⁻¹ of soil

(A)

RNA template	100 μL
10 x buffer	11 μL
<u>DNase</u>	<u>2 μL</u>
Total	112 μL

↓
37°C, 30 min

(B)

Random Primer (6 mers) (50 μM)	2 μL (100 pmol)
dNTP mixture (2.5 mM each)	4 μL (1 mM)
RNA template	1 μL (approx. 100 ng)
<u>RNase-free water</u>	<u>6 μL</u>
Total	13 μL

↓
65 °C, 5 min
↓
on ice for at least 1 min
↓

RNA/ primer mixture	13 μL
5 x First-Strand Buffer	4 μL
DTT (0.1 M)	1 μL
RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor (20 U/ μL)	1 μL
<u>Reverse Transcriptase (200 U/μL)</u>	<u>1 μL</u>
Total	20 μL

↓

25 °C	5 min
50 °C (random primers)	60 min
70 °C	15 min
4 °C	∞

Figure 6-1. Compositions of mixture and conditions for (A) DNase reaction and (B) Reverse Transcription PCR



Figure 6-2. Picture of electrophoresis of DNA fragment amplified using CTO primers (Kowalchuk et al. 1997) targeting 16S RNA gene of ammonia oxidizing bacteria. Lane 1, 22: size marker, 2-7: DNA extracted from broadleaf forest soils, 8-13: DNA from pine forest soils, 14-19: DNA from mixed forest soils, 20: positive control (DNA obtained from agricultural soil), 21: negative control (sterilized water).

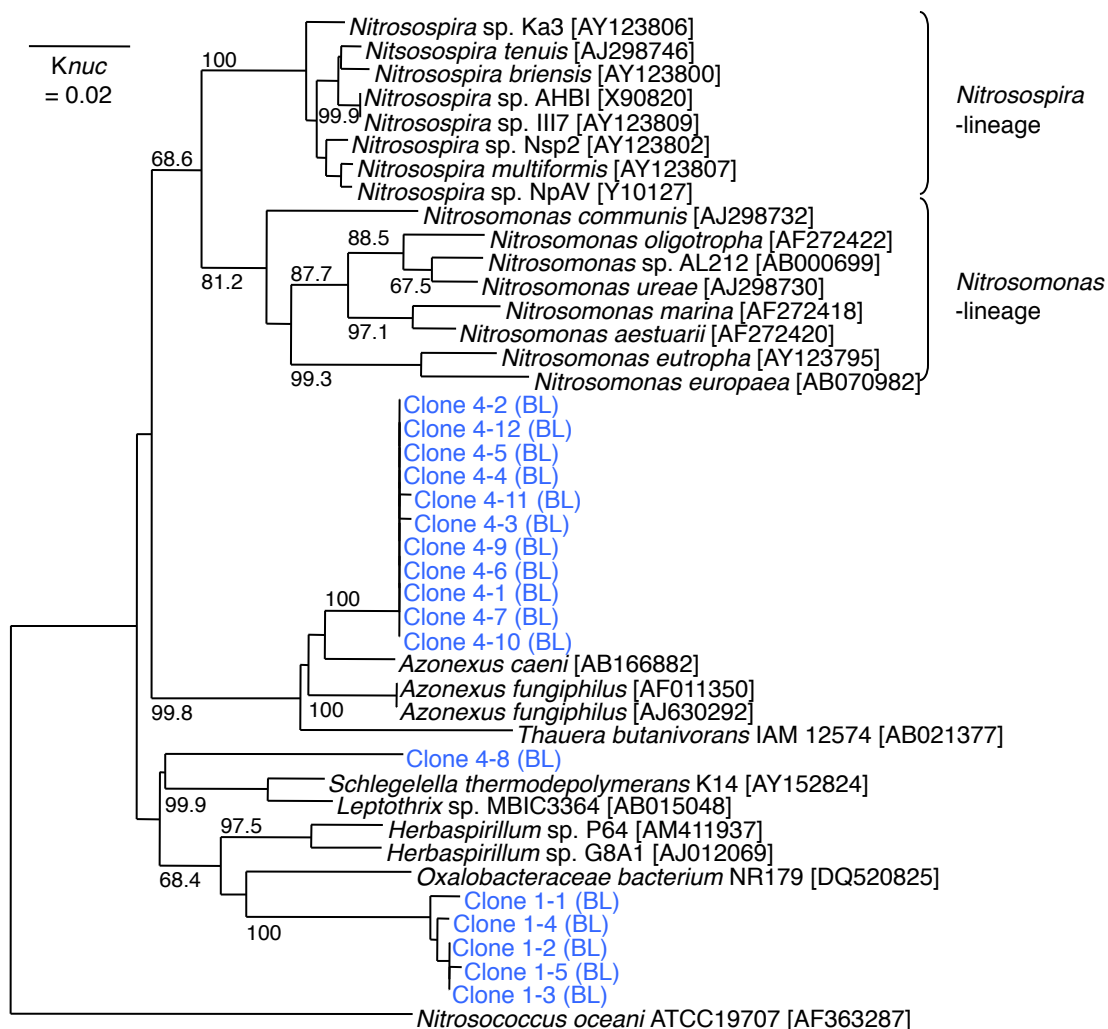


Figure 6-3. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences obtained by amplification using primers, CTO189f and CTO654r. Bootstrap values higher than 65% are indicated at nodes. The names beginning with “Clone” denote the sequences obtained in the present study. BL in the parentheses represent the broadleaf forest, from which the clones were originated. Taxonomic units with each grey square background shared an identical sequence within the region analysed. Accession numbers in DDBJ/EMBL/GenBank for the reference sequences are indicated in the square brackets.

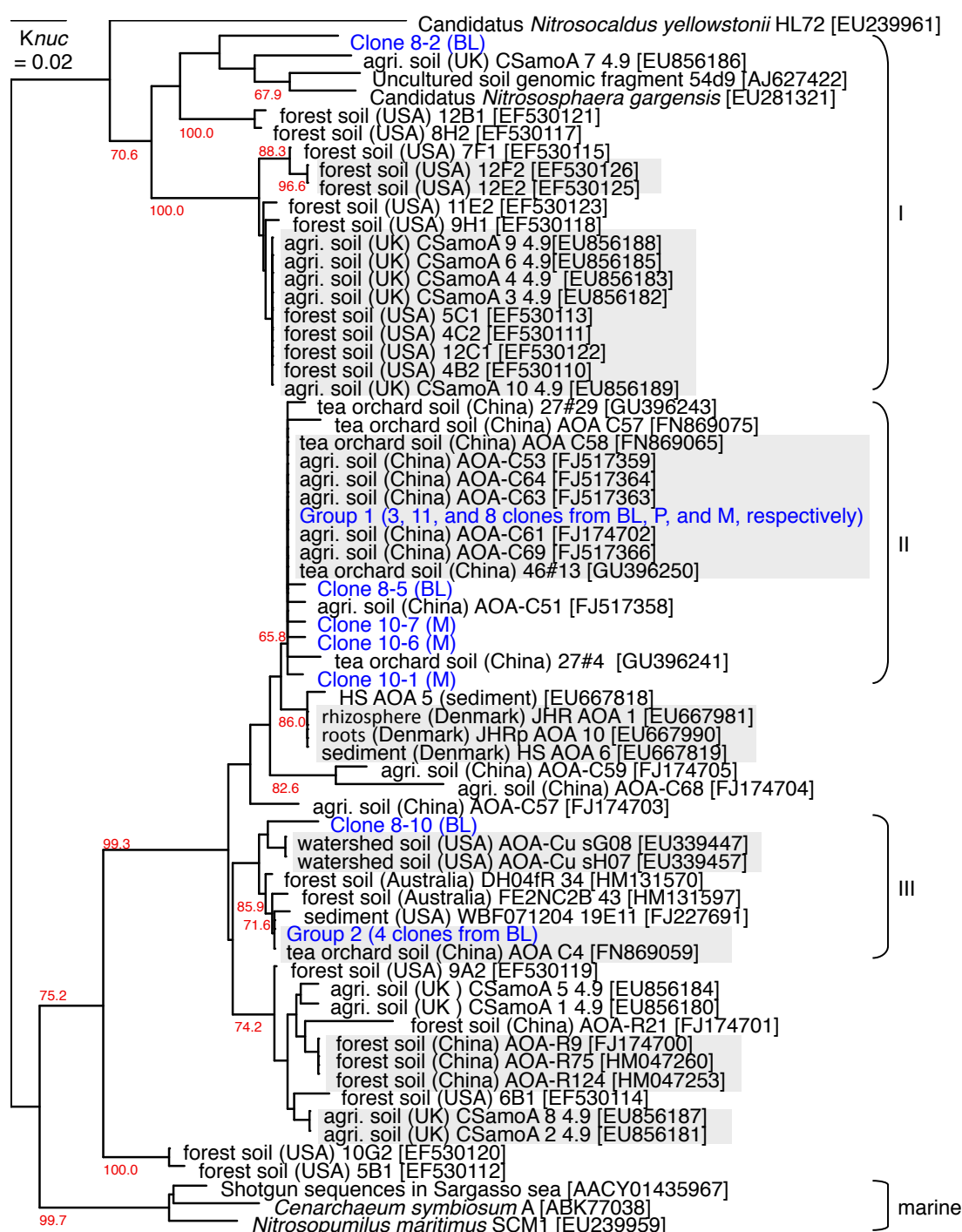


Figure 6-4. Neighbour-joining phylogenetic tree based on amino acid sequences of AOA-*amoA*. Bootstrap values higher than 65% are indicated at nodes. The names beginning with “Clone” and “Group” denote the sequences obtained in the present study; the clones of a Group shared an identical sequence. BL, P, and M in the parentheses represent the broadleaf, pine, and mixed forests at DHSBR, respectively, from which the clones were originated. Taxonomic units with each grey square background shared an identical sequence within the region analysed. Accession numbers in DDBJ/EMBL/GenBank for the reference sequences are indicated in the square brackets.

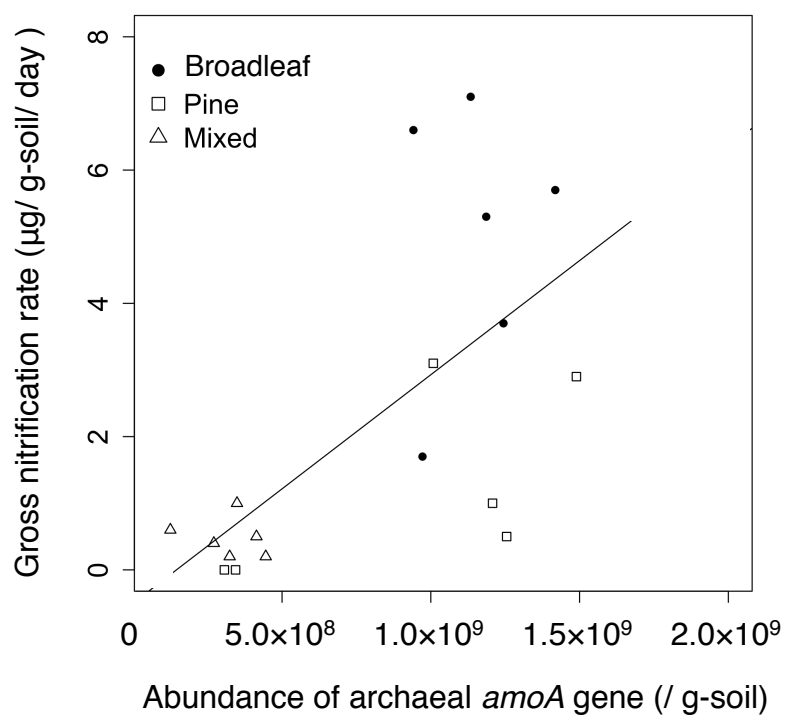


Figure 6-5. Relationship between abundance of archaeal *amoA* gene and gross nitrification rate in soils of control plots in broadleaf (●), pine (□) and mixed forest (△) at DHSBR. A significant correlation between them was found ($p = 0.003$, Gross nitrification rate = $3.4 \times 10^{-9} \times$ abundance of archaeal *amoA* gene $- 0.49$, $r^2 = 0.43$).

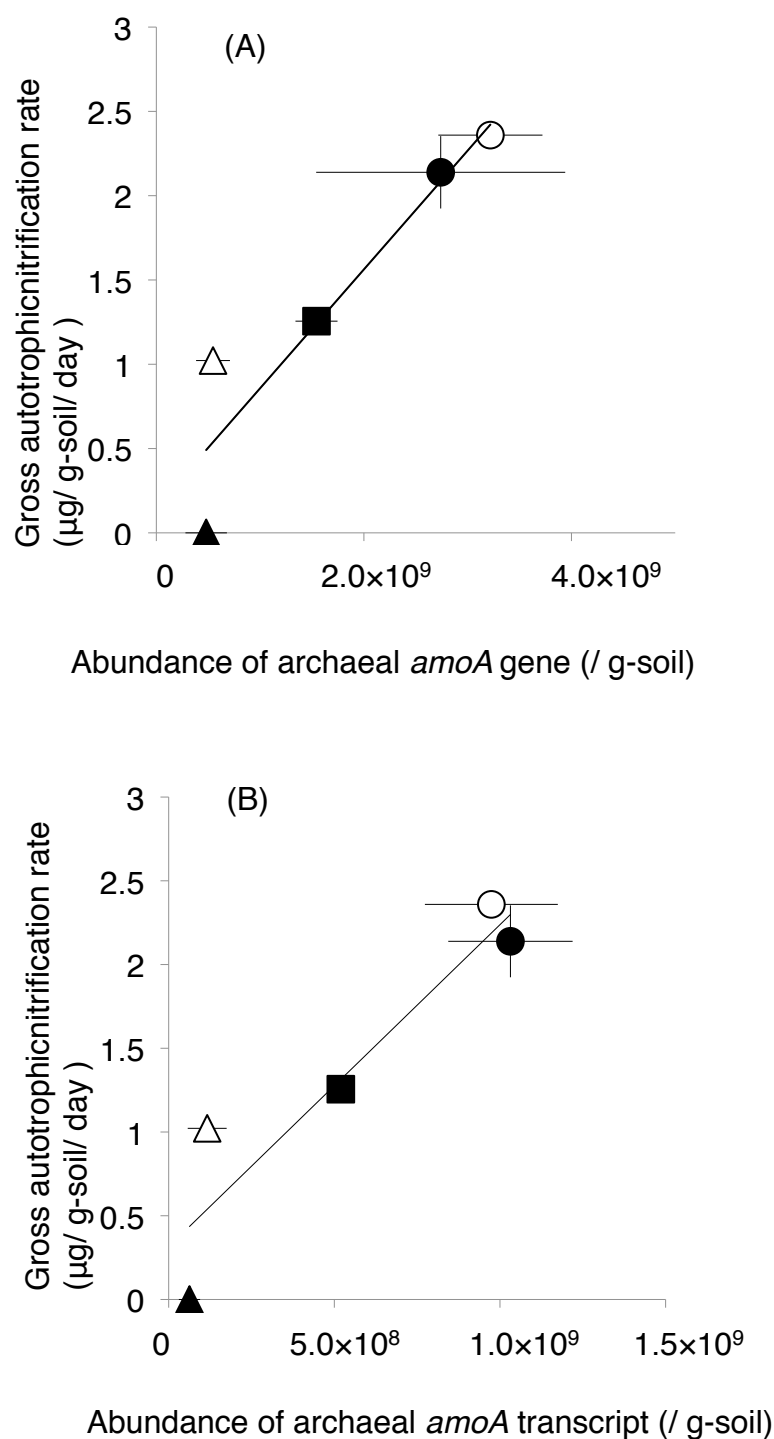


Figure 6-6. Relationship between abundance of archaeal *amoA* gene (A) and *amoA* transcripts (B) and gross autotrophic nitrification rates in soils of control and N-addition plots in broadleaf forest (● and ○) and control and N-addition plots in pine forest (▲ and △) at DHSBR, and broadleaf forest at HSD (■). A significant correlation between them were found ((A), $p < 0.05$, Gross autotrophic nitrification = $7.0 \times 10^{-10} \times$ abundance of archaeal *amoA* gene + 0.2, $R^2 = 0.86$), ((B) $p < 0.05$, Gross autotrophic nitrification = $1.9 \times 10^{-9} \times$ abundance of archaeal *amoA* transcript + 0.3, $R^2 = 0.86$). Error bars represent S.E. (n=4).

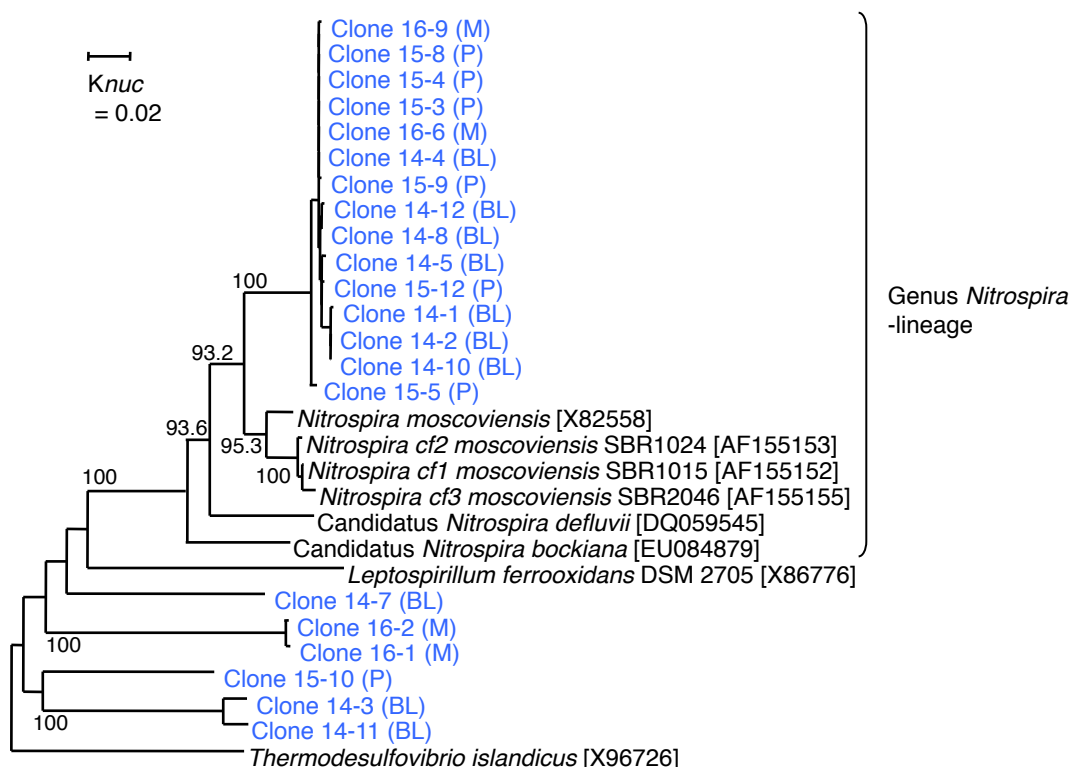


Figure 6-7. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of Phylum *Nitrospira*. Bootstrap values higher than 85% are indicated at nodes. The names beginning with “Clone” denote the sequences obtained in the present study. BR, P and M in the parentheses represent the broadleaf, pine and mixed forest, from which the clones were originated. Taxonomic units with each grey square background shared an identical sequence within the region analysed. Accession numbers in DDBJ/EMBL/GenBank for the reference sequences are indicated in the square brackets.

第 7 章 総合考察

本研究では、第 1 章において既往研究のレビューを行い、同時に以下に示す 3 つの解決すべき問題を提示した。

- (1) 窒素負荷の増大にともなう森林の窒素循環の変化は世界的な問題である。それに関わらず、今後最も窒素負荷が顕著になると予想される東アジアの熱帯・亜熱帯林における窒素循環プロセスや窒素飽和程度はほとんどわかっていない。
- (2) 硝化微生物群集は土壌中の硝酸生成の主要なプレーヤーである。しかし酸性森林土壌において各微生物群集（AOB、AOA、従属栄養性微生物、NOB）がそれぞれどの程度硝化を担っているのか、ほとんど明らかになっていない。
- (3) 硝化菌群集の特性（存在量、群集組成、活性）とその生態系機能としての硝化をリンクするためには、窒素フローのプロセスや速度を定量的に測定する必要がある。しかし、そのための分析手法が微生物を材料として生態学的・生理学的研究を行う研究者にとっては容易ではない。

これらの問題に取り組むために、まず（1）土壌中の窒素フローのプロセスや速度を定量的に測定するための簡便な手法を確立すること、続いて、高窒素負荷を受けている中国南部に位置する酸性亜熱帯林土壌において、（2）実際に土壌中の窒素フローの速度を定量的に算出し、窒素フローの特徴と窒素流入量の増加に対する窒素フローの変化を明らかにすること、さらに（3）硝化を担っている微生物群集を特定し、それら微生物群の硝酸生成への寄与を定量的に明らかにすること、最終的に、これらを通して、（4）亜熱帯林土壌中の NO_3^- 生成メカニズムの全体像と、今後予想される窒素負荷の増大にともなう窒素循環プロセスの変化を予測することを目的に研究を行った。

7.1 本研究の成果

7.1.1 土壌中の窒素フロー速度の簡便な測定法の確立

窒素フロー速度の測定に GC/MS を用いるため、まず商用の GC/MS の改良および分析条件の最適化を行った（第 2 章）。併せて、微生物の代謝に関わる様々なガス種を同時に、簡便かつ迅速に測定するための方法を確立した。この手法により、微生物の代謝に関わるガス（ H_2 、 N_2 、 O_2 、 CO 、 NO 、 CH_4 、 CO_2 、 N_2O ）について ppm（ 10^{-6} vol. vol. $^{-1}$ ）レベルから %（ 10^{-2} vol. vol. $^{-1}$ ）レベルまでの幅広い濃度の、様々なガス種を短時間で定量することが可能になった。特に窒素フロー速度の測定にとって重要な N_2O については、2.5 分以内に 10^5 のレンジで定量することを可能にした。

続いて、土壌中の NH_4^+ 、 NO_3^- 、 NO_2^- 、全溶存有機態窒素（TDN）の濃度および $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を簡便に測定するための方法を確立した（第 3 章）。この方法では、近年開発された脱窒菌法、アザイド法と第 2 章において改良した GC/MS システムを併用することにより、上記の窒素化合物の濃度および $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を広レンジ（0 – 1000 μM 、0.37 – 99.3 ^{15}N atom%）で測定することが可能になった。この分析手法の確立によって、土壌中の NH_4^+ 、 NO_3^- 、 NO_2^- 、TDN の濃度および $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ の測定を、従来の分析手法の 1/10 – 1/100 の少量の試料で行うことができ、土壌中の窒素フロー速度の解析が簡便かつ迅速に行えるようになった。さらに上述のガス分析とあわせることで、土壌中の無機態窒素の動態に加えて、硝化、脱窒、アナモックスの過程で生成する窒素ガス（ N_2 、 N_2O 、 NO ）の生成速度も算出ができる。すなわちこれらの手法の確立によって、微生物活動に関わる窒素の主要なフローの速度をほぼ完全に測定することが可能になった。

本研究によって新たに確立した分析手法が広く用いられることで、森林の窒素循環および微生物群集の生態系機能をこれまで以上に精密に評価し、窒素循環研究と微生物生態研究の積極的なリンクがなされることが期待できる。

7.1.2 中国亜熱帯林土壌における硝酸生成

年間に 34kg-N/ha もの無機態窒素が大気から流入する中国南部の亜熱帯林 Dinghushan Biosphere Reserve (DHSBR) の広葉樹林（極相林、林齢>400 年）、松林（80 年）ならびに広葉樹-松混合林（80 年）および年間に 18kg-N/ha もの無機態窒素が流入する Heishiding Nature Reserve (HSD) の広葉樹林において、土壌中の窒素フロー（無機化・硝化・窒素 (NH_4^+ ・ NO_3^-) 不動化速度）の解析を行った（第 4、5 章）。その結果、DHSBR の広葉樹林（コントロール区）、松林（コントロール区）、混合林（コントロール区）において土壌中の総無機化、 NH_4^+ 不動化、および NO_3^- 不動化の速度には森林間で有意差は見られなかった一方、成熟林である広葉樹林の硝化速度は、若い松林や混合林に比べて著しく高かった。また C_2H_2 阻害法を用いて、総従属栄養性硝化速度と総独立栄養性硝化速度をそれぞれ算出したところ、高い硝化速度が見られた DHSBR および HSD の広葉樹林において、独立栄養性硝化が総硝化速度の 80%以上を占めた（第 5 章）。

そこで硝化微生物群集の解析を行った（第 6 章）。その結果、AOB は検出されなかった一方で、AOA の *amoA* は各土壌 1 グラムあたり 10^8 から 10^9 コピー程度存在することが明らかになった。さらに土壌中の AOA *amoA* の DNA コピー数および mRNA コピー数と総独立栄養性硝化速度との間に正の相関が認められた。このことから、植生や窒素流入量が異なっても、本研究サイトの森林土壌では AOA がアンモニア酸化を担っている主要な微生物群であると考えられた。また NOB も検出されたことから AOA 群集と NOB 群集が硝化を主に担っていることが示唆された。同時に、各森林土壌中の総硝化速度は AOA の存在量によって大きくコントロールされ、森林間の総硝化速度の差異は AOA の存在量および活性の差異によるものであることが示唆された。

では本研究サイトの森林土壌において、なぜ主に AOA がアンモニア酸化を担い、AOB による独立栄養性硝化や従属栄養性硝化の卓越は見られないのであろうか。そ

の主な要因の一つは研究サイトの森林土壌が“極限環境的”であるためと考えられる。亜熱帯林土壌であるため風化が進み酸性物質に対する緩衝能がもともと低い性質を有しているうえ、長期にわたる酸性物質の降下によってさらに酸性化が進行している (Liu et al. 2010)。したがって AOB および AOA の基質となる NH_3 はその高い pKa ゆえに大部分は NH_4^+ へとイオン化している。そのため AOB にとっては基質となる NH_3 の供給が著しく制限されるために、存在量が極めて小さいと考えられる。その一方で、AOA の存在量は他の酸性土壌（森林、農耕地、牧草地）において報告された値と比べても多い。本研究と既往研究の比較から、AOA の 1 細胞あたりアンモニア酸化能は AOB の 10^{-4} 程度であることが示唆された。このことは同時に AOA の 1 細胞がその活性を維持するのに必要な NH_3 の量が AOB に比べてはるかに少ないことを意味する。これは中温性 AOA の唯一の単離株である *Nitrosopumilus multimus* SCM1 の至適 NH_3 濃度（あるいは apparent K_m 値）が AOB の単離株に比べて著しく (10^3 倍程度) 低いこととも整合する (Martens-Habbena 2009)。リソース（基質）の量が極めて限定されている条件においては、1 細胞当たりの必要するリソースの量が多い個体よりも少ない個体の方が生存競争上有利であると考えられる (Fierer et al. 2007)。このような理由から AOA は、AOB には利用できないほどの限定したリソース (NH_3) を利用することで、酸性土壌においてもその存在量及び活性を維持している可能性が考えられる。

従属栄養性硝化について、系統的に多岐にわたる微生物が有機態窒素あるいは NH_4^+ を利用する際に NO_3^- や NO_2^- を生成することがこれまでに知られている (Focht and Verstraete 1977)。しかし、従属栄養性微生物の硝化活性は AOB の単離株の活性に比べて遥かに低い ($10^{-3} - 10^{-4}$ 倍以下) ことが報告されている (Focht and Verstraete 1977)。それにもかかわらず、従属栄養性硝化が酸性森林土壌で卓越するとこれまで考えられてきた主な理由は、AOB が酸性土壌環境には適応できない（酸性森林土壌においても AOB は存在し得るが存在量が小さい）にも関わらず、酸性森林土壌

において硝化が認められることによる (Allison and Prosser 1991, Hart et al. 19997)。
しかし、本研究においては、AOA が酸性森林土壌においてアンモニア酸化を担っている主要な微生物群であることが強く示唆された。これにより、酸性土壌では独立栄養性硝化よりも従属栄養性硝化が卓越するという従来の仮説の妥当性は再検証されるべきであると考えられる。

7.1.3 中国亜熱帯林土壌の窒素飽和程度

DHSBR のフィールドにおける窒素動態から広葉樹林は窒素飽和状態にあり、松林および混合林はその前段階にあることが予測されている (第 1 章)。そこで本研究では、土壌中の窒素フローから森林の窒素飽和程度をさらに考察した。まず DHSBR の森林間における NH_4^+ 消費のプロセスの差異から各森林の窒素飽和程度の差異を検討した。森林間で総 NH_4^+ 不動態化速度に有意差は見られなかった一方で、総硝化速度は広葉樹林において、松林および混合林に比べて著しく大きかった (第 4、5 章)。このことから広葉樹林において松林や混合林に比べて土壌微生物に対する窒素の可給性が高く、それゆえ窒素飽和がより進行している状態にあることが推測された。続いて、広葉樹林と松林に設置された窒素添加区ならびに無添加区 (コントロール区) の土壌中の微生物バイオマスと窒素フローを比較した結果、広葉樹林では窒素添加区の土壌微生物バイオマス窒素が無添加区に比べて小さく、窒素不動態化速度が無添加区の 42%程度にまで低下していたのに対して、松林では土壌微生物バイオマス窒素については差がなかったが、窒素不動態化速度は 136%程度に増大していた (第 5 章)。このことから広葉樹林は窒素飽和現象の最終段階 (第 1 章) にある一方で、松林は未だ窒素制限状態にあることが示唆された。

このような窒素飽和程度の差が、主に植生の差によるものなのか林齢によるものなのか、本研究の結果からのみでは判断できない。しかし、一般的に森林が成長するにつれて植物や土壌中に窒素が蓄積されていく (Vitousek and Reiners 1975;

Pregitze and Euskirchen 2004; Davidson et al. 2007)。その結果、極相林では窒素のプールサイズや循環速度が大きくなり、窒素の可給性が高くなる。すなわち窒素飽和に近い生態系になっていくと考えられている。(第 1 章)。DHSBR において広葉樹林は 400 年以上保護された極相林(成熟林)であり、長年にわたって窒素が蓄積されてきた。その一方、松林や混合林は若い森林であり、加えて低木層やリターが収穫されてきた。その結果、広葉樹林と松林を比較すると、広葉樹林の方が窒素のプールサイズや窒素循環速度が大きいことが報告されている(第 1 章)。このような理由から、これまで受けてきた窒素負荷に関わらず研究サイトの広葉樹林は松林に比べて窒素飽和に近い状態にあることが推察される。

比較対象とした研究サイト HSD の各森林の窒素飽和程度はどうであろうか。HSD の広葉樹林において総 NH_4^+ 不動化速度は DHSBR の森林と同程度であったが、総硝化速度は DHSBR の松林より高く、広葉樹林より低かった。純硝化速度についても同様である。また HSD の広葉樹林の林齢も DHSBR の松林に比べて大きく、広葉樹林に比べて小さいと予想されている。これらのことから、HSD の広葉樹林は DHSBR の松林に比べて窒素飽和が進行している状態にあるが、広葉樹林ほど進行していないと推察される。

7.1.4 予想される窒素負荷の増大にともなう窒素循環プロセスの変化

DHSBR の広葉樹林において、松林や混合林に比べて土壌中の NO_3^- 濃度が高く、また表層 0cm から 20cm において水の移動にともなって多量の NO_3^- が溶脱していることも報告されている。本研究において、HSD の広葉樹林土壌も含め、純硝化速度(=総硝化速度 - 総 NO_3^- 不動化速度)と土壌中の NO_3^- 濃度との間で正の相関が認められた(第 4、5 章)。このことから、DHSBR の広葉樹林では土壌中の総硝化速度が総 NO_3^- 不動化速度に比べて著しく高いために、土壌中の NO_3^- 濃度が高くなり、またそれゆえ多量の NO_3^- が溶脱していると考えられた。そこで、窒素負荷の増大が

土壤中の窒素フローに及ぼす影響について、 NO_3^- の動態に着目し評価した。 NO_3^- の動態を示すために NO_3^- の“見かけの”滞留時間を算出した。広葉樹林、松林ともに窒素添加区では無添加区に比べて NO_3^- の見かけの滞留時間が長く、生成あるいは流入した NO_3^- は NO_3^- のまま土壤中により長く滞留し得ると考えられた。すなわち、予想される大気からの窒素負荷の増大にともなって、土壌から NO_3^- が加速度的に溶脱されやすくなると推察できる。ただし、窒素飽和森林と推察される広葉樹林と窒素制限林と推察される松林ではその背後にあるメカニズムが異なった。広葉樹林では、土壌微生物バイオマスが減少と NO_3^- 不動態化速度の低下が起き、土壌中の NO_3^- 濃度の増大が相まって滞留時間が長くなったと考えられた。一方、窒素制限林の松林では、土壌微生物の窒素要求性が高いために、総 NH_4^+ 不動態化速度の増大と総 NO_3^- 不動態化速度の低下が連動していると考えられた。またフィールドにおいても、松林では森林が成長段階にあるため植物の窒素要求性が高い。これらのことを総合して考えると、すでに窒素飽和状態にある広葉樹林において、今後予想される大気からの窒素負荷の増大にともなって、土壌から NO_3^- が加速度的に溶脱されやすくなると考えられた。

7.2 中国亜熱帯林における窒素制限から窒素飽和への進行

本研究で得られた知見（上述）および既往の研究報告に基づき、中国亜熱帯林土壌がどのようにして窒素制限状態から窒素飽和状態へ進行するのか、窒素フローの変化から考察する。ただし、本研究の知見は林齢および植生の異なる森林から得られたことに注意する必要がある。

まず林齢の低い森林（あるいは窒素制限林）においては総硝化速度が小さく、 NH_4^+ の大部分は不動態化される（DHSBR 松林コントロール区および混合林から得られたデータより）。この段階では森林の窒素循環速度（リター生成、分解速度）は小さい（Mo et al. 2006; Fang et al. 2009）。窒素流入量の増大に応じて NH_4^+ の不動態化が促

進される（DHSBR 松林窒素添加区から得られたデータより）。また、森林が成長する（あるいは窒素飽和状態が進行する）にしたがって、植物や土壌中に窒素が蓄積されて窒素循環速度が大きくなり（Vitousek and Reiners 1975; Pregitze and Euskirchen 2004; Davidson et al. 2007）、土壌微生物バイオマス量も大きくなっていく（DHSBR および HSD の広葉樹林から得られたデータおよび Pregitze and Euskirchen (2004) より）。また、土壌の C/N あるいは土壌微生物が吸収・利用する可給態 C・N 源の C/N が低下する（C に対して N が多くなる）（Galloway et al. 2003; Fang et al. 2006）。結果的に土壌微生物に対する窒素の可給性が大きくなり、 NH_4^+ が硝化微生物（AOA）にも利用されるようになり、AOA の存在量および総硝化速度が大きくなっていく（DHSBR 広葉樹林、松林、混合林から得られたデータより）。また、それにより土壌の酸性化が促進される（Van Miegroet 1984）。純硝化速度も次第に大きくなり、土壌中の NO_3^- 濃度が高くなる（DHSBR および HSD の広葉樹林から得られたデータより）。そのため NO_3^- の溶脱量が増加する（Fang et al. 2010）。ただし、土壌微生物相は NH_4^+ とともに NO_3^- についても同化するため、純硝化速度は総硝化速度に比べて小さい（HSD 広葉樹林から得られたデータおよび Davidson et al. (1992) より）。森林の成長（あるいは窒素飽和状態の進行）にしたがって、やがて窒素の流入量と流出量がほぼ同程度になり、さらに大気から流入する窒素が加わって流出量の方が大きくなる（Fang et al. 2009 および DHSBR 広葉樹林コントロール区から得られたデータより）。この後さらに窒素流入量が増大すると、土壌微生物による窒素同化速度の低下と土壌微生物バイオマスの減少がおきる（DHSBR 広葉樹林窒素添加区から得られたデータより）。大気からの窒素流入量が増大する一方で、独立栄養性 AOA の存在量および総硝化速度の減少は見られず、土壌中の NO_3^- 濃度は増大していく（DHSBR 広葉樹林窒素添加区から得られたデータより）。結果的に、水の移動にともない土壌から NO_3^- が加速度的に溶脱していく（Ohte et al. 2003; Fang et al. 2009）。窒素制限状態から窒素飽和状態への進行を、このような窒素フローの変化から推察

することが可能である。

7.3 今後の展望

第1章に述べたとおり、窒素循環メカニズムを理解するためには、窒素循環プロセスと、その窒素循環に大きく関わる（あるいはそのプロセスを担っている）微生物群集とをリンクさせることが重要である（Figure 1-8）。本研究では、AOA の存在量及び活性が研究サイトの土壌における総硝化速度を大きくコントロールしていることを、それぞれの定量値に基づいて示すことができた（Figure 1-8 (B)）。しかし、どのような環境要因が AOA の存在量や活性を規制するのかについては、直接的な観測に至らなかった。本研究では、既往研究との比較から AOA 群集の生態的特性について考察した。環境要因と微生物機能の関係をより詳細に解明するためには、その AOA 群集の生理学および遺伝学的性質から解明する必要がある。そのためには AOA を土壌から分離し解析する必要がある。これまでに中温性 AOA としてわずか1株、*N. multimus* SCM1 が海洋環境から単離されたのみであり、土壌環境からの単離の報告は未だにない。窒素循環メカニズムの解明のためには土壌 AOA の分離と培養は不可欠なステップであると考えられる。

第1章において、今後最も窒素負荷が顕著になると予想される東アジアの熱帯・亜熱帯林を対象とした窒素循環に関する研究の重要性を述べた。一方、ヨーロッパや北米においては、1980年代から窒素循環に関する研究が盛んに行われてきている。しかしながら、ヨーロッパや北米の森林土壌においても、窒素循環に大きく関わるあるいはそのプロセスを担っている微生物群集についての研究はほとんど行われていない（Compton et al. 2004; Nugroho et al. 2005）。本研究で得られた知見が中国亜熱帯林のみでみられるユニークな現象なのか、他の地域あるいは気候区分における酸性化した森林土壌でもみられる現象なのか、さらなる研究が必要である。

7.4 最後に

本研究の最も際立つ特徴は、従来の物質循環研究と微生物生態学研究を組み合わせることである。そのために必要な窒素化合物の ^{15}N 分析のための手法を確立して窒素フローを定量し、また近年確立された分子生態学的手法を用いて土壌微生物群集の解析を行い、それらのデータをリンクさせることができた。すなわち、窒素飽和程度の異なる森林間において土壌の総硝化速度に大きな差異があること、また、その差異が硝化微生物群集の存在量および活性によって説明できることを示すことができた。

これまでの森林の窒素循環に関する研究では、気候、植生、土壌の理化学性などが窒素循環を規制する主要な環境要因として解析されてきた。1980 年代より、窒素負荷の増大に対する森林生態系の応答について盛んに研究されるようになり、環境要因と硝化速度の関係が注目されるようになった。しかしこれまで、硝化を担う微生物群集と森林の窒素循環を結びつける研究はほとんどなかった。本研究で得られた知見は、窒素循環研究において微生物群集の動態を考慮に入れることの重要性を提示している。

我々は、森林生態系などの環境における微生物群集について、以前より遥かに多くの情報を得られるようになった。その結果、どのような微生物がどのような場所にいるのかという情報は蓄積しつつある。しかし、環境中の微生物に関する研究の多くは“ある微生物群集が存在している”あるいは“活動的である”ことを示すにとどまり、微生物群集の存在量や組成とその生態系機能を直接的に結びつけることに成功した研究は非常に少ない。これはつまり、解析技術が進歩したとは言え、ある微生物群集が生態系の機能を維持するためにどれだけ重要であるのかを定量的に示すことは依然として困難であることを意味する。それでもやはり、微生物群集の組成と機能を結びつける研究への取り組みは、微生物生態学において重要である。これが本研究の訴えるところである。

参考文献

- Aber, J.D., McDowell, W., Nadelhoffer, K., Magill, A., Berntson, G., Kamakea, M., McNulty, S., Currie, W., Rustad, L. & Fernandez, I. (1998) Nitrogen saturation in temperate forest ecosystems. *BioScience* 48: 921 - 934.
- Aber, J.D. (1992) Nitrogen cycling and nitrogen saturation in temperate forest ecosystems. *Trends Ecol Evol* 7: 220-224.
- Aber, J.D., Goodale, C.L., Ollinger, S.V., Smith, M.-L., Magill, A.H., Martin, M.E., Hallett, R. A & Stoddard, J.L. (2003) Is nitrogen deposition altering the nitrogen status of northeastern forests? *BioScience* 53: 375.
- Aber, J.D., Nadelhoffer, K.J., Steudler, P. & Melillo, J.M. (1989) Nitrogen Saturation in Northern Forest Ecosystems. *Bioscience* 39: 378-386.
- Aguiar, P., Beveridge, T.J., Reysenbach, A.L., 2004. Sulfurihydrogenibium azorense, sp. nov., a thermophilic hydrogen-oxidizing microaerophile from terrestrial hot springs in the Azores. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 33-39.
- Allison, S.M. & Prosser, J.I. (1991) Urease activity in neutrophilic autotrophic ammonia-oxidizing bacteria isolated from acid soils. *Soil Biol Biochem* 23: 45-51.
- Altschul, S. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
- Amano, T., Yoshinaga, I., Okada, K., Yamagishi, T., Ueda, S., Obuchi, A., Sako, Y., and Suwa, Y., 2008. Detection of anammox activity and diversity of anammox bacteria-related 16S rRNA genes in coastal marine sediment in Japan. *Microbes Environ.* 22: 232-242.
- Attard, E., Poly, F., Commeaux, C., Laurent, F., Terada, A., Smets, B.F., Recous, S. & Roux, X.L. (2010) Shifts between Nitrospira- and Nitrobacter-like nitrite oxidizers underlie the response of soil potential nitrite oxidation to changes in tillage practices. *Environ Microbial.*

12: 315-26.

- Bäckman, J.S.K., Hermansson, A., Tebbe, C.C. & Lindgren, P.E. (2003) Liming induces growth of a diverse flora of ammonia-oxidising bacteria in acid spruce forest soil as determined by SSCP and DGGE. *Soil Biol Biochem* 35: 1337-1347.
- Barracough D, Puri G (1995) The use of ^{15}N pool dilution and enrichment to separate the heterotrophic and autotrophic pathways of nitrification. *Soil Biol Biochem* 27:17-22
- Bazylinski, D.A., Soohoo, C.K., Hollochers, T.C., 1986. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* on nitrous oxide. *Appl Environ Microbiol.* 51: 1239-1246.
- Beman, J.M., Popp, B.N. & Francis, C.A. (2008) Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the Gulf of California. *ISME j* 2: 429-41.
- Bengtsson, G. (2003) Gross nitrogen mineralization-, immobilization-, and nitrification rates as a function of soil C/N ratio and microbial activity. *Soil Biol Biochem*, 35: 143-154.
- Bintrim SB (1997) Molecular phylogeny of Archaea from soil. *Proc Nat Acad Sci USA* 94:277-282
- Boga, H.I., Ji, R., Ludwig, W., Brune, A. 2007. *Sporotalea propionica* gen. nov. sp. nov., a hydrogen-oxidizing, oxygen-reducing, propionigenic firmicute from the intestinal tract of a soil-feeding termite. *Arch Microbiol.* 187: 15-27.
- Booth MS, Stark JM, Rastetter E (2005) Control on nitrogen cycling in terrestrial ecosystem: a synthetic analysis of literature data. *Ecol Monogr* 75:139-157
- Bormann FH, Likens GE, Melillo JM (1977) Nitrogen budget for an aggrading northern hardwood forest ecosystem. *Science* 196: 981-983
- Bowman WD, Cleveland CC, Halada Ľ, Hreško J, Baron JS (2008) Negative impact of nitrogen deposition on soil buffering capacity. *Nature Geosci* 1: 767-770
- Boyle-Yarwood, S.A., Bottomley, P.J. & Myrold, D.D. (2008) Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in soils under stands of red alder and Douglas fir

- in Oregon. *Environ Microbiol* 10: 2956-65.
- Brierley EDR, Wood M (2001) Heterotrophic nitrification in an acid forest soil: isolation and characterisation of a nitrifying bacterium. *Soil Biol Biochem* 33: 1403-1409
- Brooks, P.D. 2001. The soil microbial biomass: concept, measurement and applications in soil ecosystem research. *Environ Microbiol*. 16: 131-140.
- Brune, A., Frenzel, P., Cypionka, H., 2000. Life at the oxic-anoxic interface: microbial activities and adaptations. *FEMS Microbiol Rev*. 24: 691-710.
- Buckley DH, Graber JR, Schmidt TM (1998) Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom Crenarchaeota and their diversity and abundance in soils. *Appl Envir Microbiol* 64: 4333-4339
- Burton SA, Prosser JI (2001) Autotrophic ammonia oxidation at low pH through urea hydrolysis. *Appl Environ Microbiol* 67: 2952-2957
- Cadillo-Quiroz, H., Yashiro, E., Yavitt, J.B., Zinder, S.H., 2008. Characterization of the archaeal community in a minerotrophic fen and terminal restriction fragment length polymorphism-directed isolation of a novel hydrogenotrophic methanogen. *Appl Environ Microbiol*. 74: 2059-2068.
- Carnol, M., Kowalchuk, G.A. & De Boer, W. (2002) Nitrosomonas europaea-like bacteria detected as the dominant β -subclass Proteobacteria ammonia oxidisers in reference and limed acid forest soils. *Soil Biol Biochem* 34: 1047-1050.
- Casciotti, K.L., D.M. Sigman, M. Galanter Hastings, J.K. Böhlke, and A. Hilkert. 2002. Measurement of the oxygen isotopic composition of nitrate in seawater and freshwater using the denitrifier method. *Anal Chem*. 74: 4905-4912.
- Casciotti, K.L., Sigman, D.M., Hastings, M.G., Böhlke, J.K., Hilkert, A., 2002. Measurement of the oxygen isotopic composition of nitrate in seawater and freshwater using the denitrifier method. *Anal Chem*. 74: 4905-4912.

- Chen, X.Y. & Mulder, J. (2007) Indicators for nitrogen status and leaching in subtropical forest ecosystems, South China. *Biogeochem* 82: 165-180.
- Christensen, C., and J.M. Tiedje. 1988. Sub-parts-per-billion nitrate method: use of an N_2O -producing denitrifier to convert NO_3^- or $^{15}\text{NO}_3^-$ to N_2O . *Appl Environ Microbiol.* 54: 1409-1413.
- Christenson, L.M., Lovett, G.M., Weathers, K.C. & Arthur, M.A. (2009) The Influence of Tree Species, Nitrogen Fertilization, and Soil C to N ratio on Gross Soil Nitrogen Transformations. *Soil Sci Soc Am J* 73: 638-646.
- Conrad R., 1996. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H_2 , CO, CH_4 , OCS, N_2O , and NO). *Microbiol. Rev.* 60: 609-640.
- Crill, P., Butler, D., Cooper, D., Novelli, P., 1995 Standard analytical methods for measuring trace gases in the environment. In: Matson, P., Harriss, R. (Eds.), Biogenic trace gases: measuring emissions from soil and water. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 164-205.
- Davidson EA, Hart SC, Firestone MK (1992) Internal cycling of nitrate in soils of a mature coniferous forest. *Ecology* 73:1148
- Davidson, E.A., Hart, S.C., Shanks, C.A. & Firestone, M.K. (1991) Measuring gross nitrogen mineralization, and nitrification by ^{15}N isotopic pool dilution in intact soil cores. *Eur J Soil Sci* 42: 335-349.
- Davidson, E.A., Carvalho, C.J.R. de, Figueira, A.M., Ishida, F.Y., Ometto, J.P.H.B., Nardoto, G.B., Sabá, R.T., Hayashi, S.N., Leal, E.C., Vieira, I.C.G. & Martinelli, L.A. (2007) Recuperation of nitrogen cycling in Amazonian forests following agricultural abandonment. *Nature*, **447**, 995-8.
- De Boer W (1989) Urea stimulated autotrophic nitrification in suspensions of fertilized, acid heath soil. *Soil Biol Biochem* 21:349-354
- De Boer W, Kowalchuk GA (2001) Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms.

Soil Biol Biochem 33: 853-866

- De Boer W, Tietema A, Gunnewiek P, Laanbroek H (1992) The chemolithotrophic ammonium-oxidizing community in a nitrogen-saturated acid forest soil in relation to pH-dependent nitrifying activity. *Soil Biol Biochem* 24:229-234
- Dentener, F., Drevet, J. & Lamarque, J.F. (2006) Nitrogen and sulfur deposition on regional and global scales: A multimodel evaluation. *Global Biogeochem Cycles* 20:
- DeRito, C.M., Pumphrey, G.M., Madsen, E.L., 2005. Use of field-based stable isotope probing to identify adapted populations and track carbon flow through a phenol-degrading soil microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7858-7865.
- Di, H.J., Cameron, K.C., Shen, J.P., Winefield, C.S., O'Callaghan, M., Bowatte, S. & He, J.Z. (2009) Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils. *Nature Geo* 2: 621-624.
- Ekeberg, D., Ogner, G., Fongen, M., Joner, E.J., Wickstrom, T., 2004. Determination of CH₄, CO₂ and N₂O in air samples and soil atmosphere by gas chromatography mass spectrometry, GC-MS. *J. Environ. Monit.* 6: 621-623.
- Erguder, T.H., Boon, N., Wittebolle, L., Marzorati, M. & Verstraete, W. (2009) Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. *FEMS microbiol rev* 33: 855-69.
- Erisman, J.W., Sutton, M.A., Galloway, J., Klimont, Z. & Winiwarter, W. (2008) How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geo*, 1: 636-639.
- Fagerbakke, K., Heldal, M. & Norland, S. (1996) Content of carbon, nitrogen, oxygen, sulfur and phosphorus in native aquatic and cultured bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 10: 15-27.
- Fang, Y., Yoh, M., Koba, K., Zhu, W., Takebayasho, Y., Xiao, Y., Lei, C., Mo, J., Zhang, W. & Lu, X. (2010) Nitrogen deposition and forest nitrogen cycling along an urban-rural transect

in southern China. *Global Change Biology*.

Fang, Y., Zhu, W., Mo, J., Zhou, G. & Gundersen, P. (2006) Dynamics of soil inorganic nitrogen and their responses to nitrogen additions in three subtropical forests, south China. *J Environ Sci* 18: 752-9.

Fang, Y.T., Gundersen, P., Mo, J.M. & Zhu, W.X. (2008) Input and output of dissolved organic and inorganic nitrogen in subtropical forests of South China under high air pollution. *Biogeosci* 5: 339-352.

Fang, Y.T., Gundersen, P., Mo, J.M. & Zhu, W.X. (2009) Nitrogen leaching in response to increased nitrogen inputs in subtropical monsoon forests in southern China. *Forest Ecol Manag* 257: 332-342.

Fierer, N., Bradford, M.A. & Jackson, R.B. (2007) Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, **88**, 1354-1364.

Fierer, N., Carney, K.M., Horner-Devine, M.C. & Megonigal, J.P. (2009) The biogeography of ammonia-oxidizing bacterial communities in soil. *Microbial ecology*, 58: 435-45.

Firestone, M.K., Firestone, R.B., Tiedge, J.M., 1979. Nitric oxide as an intermediate in denitrification: Evidence from nitrogen-13 isotope exchange. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91: 10-16.

Focht DD, Verstraete W 1977: Biochemical ecology of nitrification and denitrification. In: Alexander M (eds) *Advances in Microbial Ecology* Vol. 1. Plenum Press, New York, pp. 135–214

Francis CA, Roberts KJ, Beman JM, Santoro AE, Oakley BB (2005) Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc Nat Acad Sci USA* 102:14683-14688

Freitag, T.E., Chang, L., Clegg, C.D. & Prosser, J.I. (2005) Influence of inorganic nitrogen management regime on the diversity of nitrite-oxidizing bacteria in agricultural grassland

- soils. *Appl Environ Microbiol* 71: 8323-34.
- Frissel M. J. (1981) The definition of residence times in ecological models. In *Terrestrial Nitrogen Cycles* (F. E. Clark and T. Roswall, Eds), Vol. 33, pp. 117-122. *Ecological Bulletins*, Stockholm.
- Galloway JN, Schlesinger WH, Levy II H, Michaels A, Schnoor JL (1995) Nitrogen fixation: Anthropogenic enhancement and environmental response. *Global Biogeochem Cycles* 9:235-252
- 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, J.H., Townsend, A.R. & Vosmart, C.J. (2004) Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry*, 70: 153-226.
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L.A., Seitzinger, S.P. & Sutton, M.A. (2008) Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, 320, 889-92.
- Garber, E., Hollocher, T., 1982. ^{15}N , ^{18}O tracer studies on the activation of nitrite by denitrifying bacteria. Nitrite/water-oxygen exchange and nitrosation reactions as indicators of electrophilic catalysis. *J Biol Chem.* 257: 8091-8097.
- Goretski, J., Hollocher, T., 1990. The Kinetic and Isotopic Competence of Nitric Oxide as an Intermediate in Denitrification. *J Biol Chem.* 265: 889-895.
- Goulding, K.W.T., Bailey, N.J., Brandbury, N.J., Hargreaves, P., Howe, M., Murphy, D.V., Poulton, P.R. & Willison, T.W. (1998) Nitrogen deposition and its contribution to nitrogen cycling and associated soil processes. *New Phytol* 139: 49-58.
- Grenon F, Bradley RL, Titus BD (2004) Temperature sensitivity of mineral N transformation rates, and heterotrophic nitrification: possible factors controlling the post-disturbance mineral N flush in forest floors. *Soil Biol Biochem* 36:1465-1474

- Gundersen, P. (1998) Impact of nitrogen deposition on nitrogen cycling in forests: a synthesis of NITREX data. *Forest Ecol Manag* 101: 37-55.
- Hall, S.J. & Matson, P.A. (1999) Nitrogen oxide emissions after nitrogen additions in tropical forests. *Nature* 400: 152-155.
- Hart SC, Binkley D, Perry DA (1997) Influence of red alder on soil nitrogen transformations in two conifer forests of contrasting productivity. *Soil Biol Biochem* 29:1111-1123
- Hart, S.C., Nason, G.E., Myrold, D.D. & Perry, D.A. (1994) Dynamics of Gross Nitrogen Transformations in an Old-Growth Forest: The Carbon Connection. *Ecology*, 75, 880.
- Hart, S.C., Stark, J.M., Davidson, E.A. & Firestone, M.K. Nitrogen mineralization, immobilization, and nitrification. Methods of soil analysis. Part 2. (eds R. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicek, S. Smith, A. Tabatabai & A. Wollum), p. 985–1018. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.
- Hatzenpichler, R., Lebedeva, E.V., Spieck, E., Stoecker, K., Richter, A., Daims, H. & Wagner, M. (2008) A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *PNAS* 105: 2134-9.
- Hawkes, C.V., Wren, I.F., Herman, D.J. & Firestone, M.K. (2005) Plant invasion alters nitrogen cycling by modifying the soil nitrifying community. *Ecol Lett* 8: 976-985.
- He, J., Chen, Z. & Liang, Y. (1982) The soil of Ding Hu Shan. *Trop Subtrop For Ecosyst* 1: 25-38.
- He, J., Shen, J., Zhang, L., Zhu, Y., Zheng, Y., Xu, M. & Di, H. (2007) Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environmen Microbiol* 9: 3152-3152.
- Head IM, Hiorns WD, Embley TM, McCarthy AJ, Saunders JR (1993) The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA

- gene sequences. *Microbiology*, 139:1147-1153
- Hedley, C., Saggar, S., Tate, K., 2006. Procedure for fast simultaneous analysis of the greenhouse gases: methane, carbon dioxide, and nitrous oxide in air samples. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 37: 1501-1510.
- Hetzer, A., McDonald, I.R., Morgan, H.W., 2008. *Venenivibrio stagnispumantis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium isolated from Champagne Pool, Waiotapu, New Zealand. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58: 398-403.
- Hicks, W.K., Kuylensstierna, J.C.I., Owen, A., Dentener, F., Seip, H.-M. & Rodhe, H. (2008) Soil Sensitivity to Acidification in Asia: Status and Prospects. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 37: 295-303.
- Huang, D.Y., Xu, Y.G., Zhou, B., Zhang, H.H. & Lan, J.B. (2010) Wet deposition of nitrogen and sulfur in Guangzhou, a subtropical area in South China. *Environ. Monit. Assess*
- Huang, Z. & Fan, Z. (1982) The climate of Ding Hu Shan. *Trop Subtrop For Ecosyst* 1: 11-23.
- Hughes, M.N., 1985. The inorganic chemistry of microbial gas metabolism. In: Poole, R. K., Dow, C. S. (Eds.), *Microbial Gas Metabolisms: Mechanistic, Metabolic and Biotechnological Aspects* (Special Publications of the Society for General Microbiology, Vol. 14). Academic press, London, pp. 3-27.
- Huygens, D., Boeckx, P., Templer, P., Paulino, L., Van Cleemput, O., Oyarzún, C., Müller, C. & Godoy, R. (2008) Mechanisms for retention of bioavailable nitrogen in volcanic rainforest soils. *Nature Geo* 1: 543-548.
- Hyman, M.R. & Wood, P.M. (1985) Suicidal inactivation and labelling of ammonia mono-oxygenase by acetylene. *Biochem j*, 227: 719-25.
- Hynes, R.K. & Knowles, R. (1983) Inhibition of Chemoautotrophic Nitrification by Sodium Chlorate and Sodium Chlorite: a Reexamination. *Appl. Envir. Microbiol.*, 45: 1178-1182.
- Islam A, Chen D, White R (2007) Heterotrophic and autotrophic nitrification in two acid pasture

- soils. *Soil Biol Biochem* 39: 972-975
- Isobe, K., Suwa, Y., Ikutani, J., Kuroiwa, M., Makita, T., Takebayashi, Y., Yoh, M., Otsuka, S., Senoo, K., Koba, K., (in press) Novel analytical techniques for ¹⁵N-labelled compounds in the environmental samples with denitrifier and GC/MS. *Microbes Environ.*
- IUPAC, 1997. Compendium of chemical terminology (2nd edition). Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Jackson, L.E., Schimel, J.P. & Firestone, M.K. (1989) Short-term partitioning of ammonium and nitrate between plants and microbes in an annual grassland. *Soil Biol Biochem* 21: 409-415.
- Jia, Z. & Conrad, R. (2009) Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environ. Microbiol* 11: 1658-1671.
- Jordan, C.F. (1982) The Nutrient Balance of an Amazonian Rain Forest. *Ecology*, 63: 647.
- Jordan, F.L., Cantera, J.J.L., Fenn, M.E. & Stein, L.Y. (2005) Autotrophic ammonia-oxidizing bacteria contribute minimally to nitrification in a nitrogen-impacted forested ecosystem. *Appl Environ Microbiol* 71: 197-206.
- Junier, P., Kim, O.-S., Hadas, O., Imhoff, J.F. & Witzel, K.-P. (2008) Evaluation of PCR primer selectivity and phylogenetic specificity by using amplification of 16S rRNA genes from betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol* 74: 5231-6.
- Jurgens G, Lindstrom K, Saano A (1997) Novel group within the kingdom Crenarchaeota from boreal forest soil. *Appl Envir Microbiol* 63: 803-805
- Kampschreur, M.J., Tan, N.C., Kleerebezem, R., Picoreanu, C., Jetten, M.S., Loosdrecht, M.C., 2008. Effect of dynamic process conditions on nitrogen oxides emission from a nitrifying culture. *Environ. Sci. Technol.* 42: 429-435.
- Katsuyama, C., Kondo, N., Suwa, Y., Yamagishi, T., Itoh, M., Ohte, N., Kimura, H., Nagaosa,

- K., Kato. K., 2008. Denitrification Activity and Relevant Bacteria Revealed by Nitrite Reductase Gene Fragments in Soil of Temperate Mixed Forest. *Microbes Environ.* 23: 337-345.
- Keeney, D.R. & Nelson, D.W. (1982) Indophenol-blue method. Methods of soil analysis, part 2: chemical and microbiological properties. (eds A.L. Page, R.H. Miller & D.R. Keeney), pp. 674-676.
- Kester, R.a., De Boer, W., Laanbroek, H.J., 1997. Production of NO and N₂O by pure cultures of nitrifying and denitrifying bacteria during changes in aeration. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3872-3877.
- Killham K (1990) Nitrification in coniferous forest soils. *Plant Soil* 128: 31-44
- Kirkham, D. & Bartholomew, W.V. (1954) Equations for Following Nutrient Transformations in Soil, Utilizing Tracer Data1. *Soil Sci Soc Am J* 18: 33.
- Koek, M.M., Muilwijk, B., van Der Werf, M.J., Hankemeier, T. 2006. Microbial metabolomics with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem.* 78: 1272-1281.
- Könneke, M., Bernhard, A.E., La Torre, J.R. de, Walker, C.B., Waterbury, J.B. & Stahl, D.A. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437: 543-6.
- Kornaros, M., Lyberatos, G., 1998. Kinetic modelling of *Pseudomonas denitrificans* growth and denitrification under aerobic, anoxic and transient operating conditions. *Water Res.* 32: 1912-1922.
- Kowalchuk, G., Stephen, J., De Boer, W., Prosser, J., Embley, T. & Woldendorp, J. (1997) Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl Environ Microbiol* 63: 1489-1497.
- Kuroiwa M, Koba K, Isobe K, Tateno R, Nakanishi A, Inagaki Y, Toda H, Otsuka S, Senoo K, Suwa Y, Yoh M, Shibata H, Gross niitrification rates in four Japanese forest soils:

Heterotrophic versus autotrophic and the regulation factors for the nitrification. *J For Res*,
In review

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H.,
Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. & Higgins,
D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* (Oxford, England), 23:
2947-8.

Larssen, T., Lydersen, E. & Tang, D. (2006) Acid rain in China. *Environ Sci Technol* 40:
418-425.

Laverman, A., Braster, M., Roling, W. & Vanverseveld, H. (2005) Bacterial community
structure and metabolic profiles in a forest soil exhibiting spatially variable net nitrate
production. *Soil Biol Biochem* 37: 1581-1588.

Laverman, A.M., Speksnijder, A.G.C.L., Braster, M., Kowalchuk, G.A., Verhoef, H.A. & Van
Verseveld, H.W. (2001) Spatiotemporal Stability of an Ammonia-Oxidizing Community in
a Nitrogen-Saturated Forest Soil. *Microb ecol* 42: 35-45.

Lehtovirta, L.E., Prosser, J. I., Nicol, G. W. (2010) Cultivation of a novel acidophilic
ammonia-oxidizing archaeon from soil., ISME 13th conference.

Leininger, S., Urich, T., Schlöter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster,
S.C. & Schleper, C. (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in
soils. *Nature* 442: 806-9.

Likens, G.E., Driscoll, C.T. & Buso, D.C. (1996) Long-term effects of acid rain: response and
recovery of a forest ecosystem. *Science* 272: 244-246.

Liou, J.S., Derito, C.M., Madsen, E.L., 2008. Field-based and laboratory stable isotope probing
surveys of the identities of both aerobic and anaerobic benzene-metabolizing
microorganisms in freshwater sediment. *Environ Microbiol.* 10: 1964-1977.

Liu, D., Zhang, S., Zheng, Y., Shoun, H., 2006. Denitrification by the mix-culturing of fungi and

- bacteria with shell. *Microbiol. Res.* 161: 132-137.
- Liu, K., Fang, Y., Yu, F., Liu, Q., Li, F., & Peng, S. (2010) Soil Acidification in Response to Acid Deposition in Three Subtropical Forests of Subtropical China. *Pedosphere* 20: 399-408.
- Long, G.L., Winefordner, J.D., 1983, Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Anal Chem.* 55: 712A-724A.
- MacDonald, J.A., Dise, N.B., Matzner, E., Armbruster, M., Gundersen, P. & Forsius, M. (2002) Nitrogen input together with ecosystem nitrogen enrichment predict nitrate leaching from European forests. *Global Change Biol* 8: 1028-1033.
- Magill A, Aber J, Currie W, Nadelhoffer K, Martin M, McDowell W, Melillo J, Steudler P (2004) Ecosystem response to 15 years of chronic nitrogen additions at the Harvard Forest LTER, Massachusetts, USA. *For Ecol Manage* 196:7-28
- Martens-Habbena, W., Berube, P.M., Urakawa, H., La Torre, J.R. de & Stahl, D.A. (2009) Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature* 461: 976-9.
- Matson P, Lohse KA, Hall SJ (2002) The globalization of nitrogen deposition: consequences for terrestrial ecosystems. *AMBIO* 31: 113-119
- Matsubara, T., Zumft, W.G., 1982. Identification of a copper protein as part of the nitrous oxide-reducing system in nitrite-respiring (denitrifying) pseudomonads. *Arc Microbiol*, 132: 322-328.
- McEntyre, J. & Ostell, J. (2005) he NCBI Handbook. Bethesda, MD. National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine (US).
- McIlvin, M.R., and M.A. Altabet. 2005. Chemical conversion of nitrate and nitrite to nitrous oxide for nitrogen and oxygen isotopic analysis in freshwater and seawater. *Anal Chem.* 77: 5589-5595.

- Megonigal, J., Hines, M., Visscher, P., 2003. Anaerobic Metabolism : Linkages to trace gases and aerobic processes. In: Schlesinger, H.W. (Ed.), *Treatise on Geochemistry*. Elsevier, Amsterdam, pp. 317-424.
- Mincer, T.J., Church, M.J., Taylor, L.T., Preston, C., Karl, D.M. & DeLong, E.F. (2007) Quantitative distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey Bay and the North Pacific Subtropical Gyre. *Environ Microbiol* 9: 1162-75.
- Mintie AT, Heichen RS, Cromack K, Myrold DD, Bottomley PJ (2003) Ammonia-oxidizing bacteria along meadow-to-forest transects in the Oregon cascade mountains. *Appl Environ Microbiol* 69: 3129-3136
- Miyajima, T., Tanaka, Y. & Koike, I. (2005) Determining ^{15}N enrichment of dissolved organic nitrogen in environmental waters by gas chromatography/negative-ion chemical ionization mass spectrometry. *Limnol Oceanogr Meth* 3: 164-173.
- Mo, J., Brown, S., Lenart, M. & Kong, G. (1995) Nutrient dynamics of a human-impacted pine forest in a MAB reserve of subtropical China. *Biotropica* 27: 290-304.
- Mo, J., Brown, S., Xue, J., Fang, Y. & Li, Z. (2006) Response of Litter Decomposition to Simulated N Deposition in Disturbed, Rehabilitated and Mature Forests in Subtropical China. *Plant Soil* 282: 135-151.
- Mo, J.M., Peng, S.L., Brown, S., Kong, G.H. & Fang, Y.T. (2004) Nutrient dynamics in response to harvesting practices in a pine forest of subtropical China. *Acta Ecol Sin* 28: 810-822.
- Molstad, L., Dörsch, P., Bakken, L.R., 2007. Robotized incubation system for monitoring gases (O_2 , NO , N_2O , N_2) in denitrifying cultures. *J Microbiol Methods*. 71: 202-211.
- Murphy, D.V., Recous, S., Stockdale, E.A., Fillery, I.R.P., Jensen, L.S., Hatch, D.J. & Goulding, K.W.T. (2003) Gross nitrogen fluxes in soil : theory, measurement and application of ^{15}N pool dilution techniques. *Advances in agronomy*, 79: 69-118.

- Nicol, G.W., Leininger, S., Schleper, C. & Prosser, J.I. (2008) The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ Microbiol* 10: 2966-78.
- Nihlgård B (1985) The ammonium hypothesis: an additional explanation to the forest dieback in Europe. *Ambio* 14: 2-8
- Norton, J.M., Klotz, M.G., Stein, L.Y., Arp, D.J., Bottomley, P.J., Chain, P.S.G., Hauser, L.J., Land, M.L., Larimer, F.W., Shin, M.W. & Starkenburg, S.R. (2008) Complete genome sequence of *Nitrosospora multiformis*, an ammonia-oxidizing bacterium from the soil environment. *Appl Environ microbiol*, 74: 3559-72.
- Nugroho RA, Rölöing WF, Laverman AM, Verhoef HA (2006) Net nitrification rate and presence of Nitrosospora cluster 2 in acid coniferous forest soils appear to be tree species specific. *Soil Biol Biochem* 38:1166-1171
- Nugroho RA, Rölöing WF, Laverman AM, Zoomer HR, Verhoef HA (2005) Presence of Nitrosospora cluster 2 bacteria corresponds to N transformation rates in nine acid Scots pine forest soils. *FEMS Microb Ecol* 53: 473-481
- Offre P, Prosser JI, Nicol GW (2009) Growth of ammonia-oxidizing archaea in soil microcosms is inhibited by acetylene. *FEMS Microbiol Ecol* 70: 99-108
- Ohte, N., N. Tokuchi, M. Katsuyama, S. Hobara, Y. Asano, and K. Koba (2003) Episodic increases in nitrate concentrations in streamwater due to the partial dieback of a pine forest in Japan: Runoff generation processes control seasonality, *Hydrological Processes*, 17, 237-249.
- Okano Y, Hristova KR, Leutenegger CM, Jackson LE, Denison RF, Gebreyesus B, Lebauer D, Scow KM (2004) Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Appl Environ Microbiol* 70: 1008-1016

- Otte, S., Grobбен, N.G., Robertson, L.A., Jetten, M.S., Kuenen, J.G., 1996. Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions. *Appl Environ Microbiol.* 62: 2421-2426.
- Pedersen H, Dunkin KA, Firestone MK (1999) The relative importance of autotrophic and heterotrophic nitrification in a conifer forest soil as measured by ^{15}N tracer and pool dilution techniques. *Biogeochemistry* 44:135-150
- Pennington, P. & Ellis, R. (1993) Autotrophic and heterotrophic nitrification in acidic forest and native grassland soils. *Soil Biol Biochem*, 25: 1399-1408.
- Philippot L, Hallin S (2005) Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. *Curr Opin Microbiol* 8: 234-239
- Piña, R.G. & Cervantes, C. (1996) Microbial interactions with aluminium. *BioMetals* 9: 311-316.
- Prosser JI (2007). The ecology of nitrifying bacteria. In: Bothe H, Ferguson SJ, Newton WE (eds). *Biology of the Nitrogen Cycle*. Elsevier, Amsterdam, pp 223–243
- Purkhold, U., Wagner, M., Timmermann, G., Pommerening-Roser, A. & Koops, H. P. (2003) 16S rRNA and amoA-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 1485-1494.
- Reay, D.S., Dentener, F., Smith, P., Grace, J. & Feely, R.A. (2008) Global nitrogen deposition and carbon sinks. *Nature Geo* 1: 430-437.
- Reigstad, L.J., Richter, A., Daims, H., Urich, T., Schwark, L. & Schleper, C. (2008) Nitrification in terrestrial hot springs of Iceland and Kamchatka. *FEMS microbiol ecol* 64: 167-74.
- Rice, C., Tiedge, J. (1989) Regulation of nitrate assimilation by ammonium in soils and in isolated soil microorganisms. *Soil Biol Biochem* 21: 597-602.
- Risgaard-Petersen, N., S. Rysgaard, and N.P. Revsbech. 1995. Combined

- microdiffusion-hypobromite oxidation method for determining nitrogen-15 isotope in ammonium. *Soil Sci Soc Am J.* 59: 1077-1080.
- Rosenkranz, P., Dannenmann, M., Brüggemann, N., Papen, H., Berger, U., Zumbusch, E. & Butterbach-Bahl, K. (2010) Gross rates of ammonification and nitrification at a nitrogen-saturated spruce (*Picea abies* (L.)Karst.) stand in southern Germany. *Eur J Soil Sci* 61: 745-758.
- Rothauwe, J., Witzel, K. & Liesack, W. (1997) The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Envir Microbiol* 63: 4704-4712.
- Rudebeck A, Persson T (1998) Nitrification in organic and mineral soil layers in coniferous forests in response to acidity. *Environ Pollut* 102: 377-383
- Schimel JP, Bennet J, Fierer N (2005) Microbial community composition and soil nitrogen cycling: is there really a connection? In: Bardgett RD, Usher MB, Hopkins DW (eds) Biological diversity and function in soil. Cambridge university press, pp 171-188
- Schimel JP, Bennett J (2004) Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. *Ecology* 85: 591-602
- Schimel JP, Firestone MK, Killham KS (1984) Identification of heterotrophic nitrification in a Sierran forest soil. *Appl Envir Microbiol* 48: 802-806
- Schleper C, Jurgens G, Jonuscheit M (2005) Genomic studies of uncultivated archaea. *Nat Rev Microbiol* 3: 479-488
- Schleper, C. (2010) Ammonia oxidation: different niches for bacteria and archaea? *ISME J* 4: 1092-1094.
- Schmidt, C.S., Hultman, K.A., Robinson, D., Killham, K. & Prosser, J.I. (2007) PCR profiling of ammonia-oxidizer communities in acidic soils subjected to nitrogen and sulphur deposition. *FEMS microbiol ecol* 61: 305-16.

- Schmidt, E.L. & Belser, L.W. (1994) Autotrophic Nitrifying Bacteria. In *Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. (eds R. Weaver, S. Angle & P. Bottomley), pp. 159-177. SSSA Book Series, Madison, Wisconsin, USA.
- Shen, J., Zhang, L., Zhu, Y., Zhang, J. & He, J.. (2008) Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environ Microbiol* 10: 1601-11.
- Shoun, H., Tanimoto, T., 1991., Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P-450 in the respiratory nitrite reduction. *J Biol Chem*, 266: 11078-11082.
- Sigman, D.M., Casciotti, K.L., Andreani, M., Barford, C., Galanter, M. & Böhlke, J.K. (2001) A Bacterial Method for the Nitrogen Isotopic Analysis of Nitrate in Seawater and Freshwater. *Anal Chem* 73: 4145-4153.
- Sigman, D.M., Casciotti, K.L., Andreani, M., Barford, C., Galanter, M., Böhlke, J.K., 2001. A bacterial method for the nitrogen isotopic analysis of nitrate in seawater and freshwater. *Anal Chem*. 73: 4145-4153.
- Sitaula, B.K., Luo, J., Bakken, L.R., 1992. Rapid analysis of climate gases by wide bore capillary gas chromatography. *J Environ Qual*. 21: 493-496.
- Smil, V., (2001) *Enriching the earth: Fritz Haber, Carl Bosch and the Transformation of World Food Production* MIT Press: 411.
- Stark, J.M. & Hart, S.C. (1996) Diffusion technique for preparing salt solutions, Kjeldahl digests and persulfate digests for nitrogen-15 analysis. *Soil Sci Soc Am J* 60: 1846–1855.
- Stark, J.M. & Hart, S.C. (1997) High rates of nitrification and nitrate turnover in undisturbed coniferous forests. *Nature* 385: 61-64.
- Stark, J.M., and S.C. Hart. 1996. Diffusion technique for preparing salt solutions, Kjeldahl digests and persulfate digests for nitrogen-15 analysis. *Soil Sci Soc Am J*. 60: 1846-1855.

- Stephan, K., and K.L. Kavanagh. 2009. Suitability of the diffusion method for natural abundance nitrogen-15 analysis. *Soil Sci Soc Am J.* 73: 293-302.
- Stevens, R.J., and R.J. Laughlin. 1994. Determining nitrogen-15N in nitrite or nitrate by producing nitrous oxide. *Soil Sci Soc Am J.* 58: 1108-1116.
- Stevens, R.J., Laughlin, R.J., Atkins, G.J. & Prosser, S.J. (1993) Automated determination of nitrogen-15-labeled dinitrogen and nitrous oxide by mass spectrometry. *Soil Sci Soc Am J* 57: 981–988.
- Stevens, R.J., Laughlin, R.J., Burns, L.C., Arah, J.R.M. & Hood, R.C. (1997) Measuring the contributions of nitrification and denitrification to the flux of nitrous oxide from soil. *Soil Biol Biochem* 29: 139–151.
- Stevens, R.J., R. J. Laughlin, G.J. Atkins, and S.J. Prosser. 1993. Automated determination of nitrogen-15-labeled dinitrogen and nitrous oxide by mass spectrometry. *Soil Sci Soc Am J.* 57: 981-988.
- Stevens, R.J., R.J. Laughlin, L.C. Burns, J.R.M. Arah, and R.C. Hood. 1997. Measuring the contributions of nitrification and denitrification to the flux of nitrous oxide from soil. *Soil Biol. Biochem.* 29: 139-151.
- Stopnisek, N., Gubry-Rangin, C., Höfferle, S., Nicol, G.W., Mandic-Mulec, I. & Prosser, J.I. (2010) Thaumarchaeal ammonia oxidation in an acidic forest peat soil is not influenced by ammonium amendment. *Appl Environ Microbiol*
- Strelkov, S., von Elstermann, M., Schomburg, D., 2004. Comprehensive analysis of metabolites in *Corynebacterium glutamicum* by gas chromatography/mass spectrometry. *Biol. Chem.* 385: 853-861.
- Stroo HF, Klein TM, Alexander M (1986) Heterotrophic nitrification in an acid forest soil and by an acid-tolerant fungus. *Appl Envir Microbiol* 52:1107-1111
- Suwa, Y., Imamura, Y., Suzuki, T., Tashiro, T. & Urushigawa, Y. (1994) Ammonia-oxidizing

- bacteria with different sensitivities to $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in activated sludges. *Water Res* 28: 1523-1532.
- Tao, F. & Feng, Z. (2000) Terrestrial ecosystem sensitivity to acid deposition in South China. *Water Air Soil Pollut* 118: 231-244.
- Templer, P.H., Silver, W.L., Pett-Ridge, J., M. DeAngelis, K. & Firestone, M.K. (2008) Plant and microbial controls on nitrogen retention and loss on a humid tropical forest. *Ecology* 89: 3030-3040.
- Thomas, K.L., Lloyd, D., Boddy, L., 1994. Effects of oxygen, pH and nitrate concentration on denitrification by *Pseudomonas* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 118: 181-186.
- Tian, J., Sang, P., Gao, P., Fu, R., Yang, D., Zhang, L., Zhou, J., Wu, S., Lu, X., Li, Y., Xu, G., 2009. Optimization of a GC-MS metabolic fingerprint method and its application in characterizing engineered bacterial metabolic shift. *J Sep Sci.* 32: 2281-2288.
- Tietema A, Beier C (1995) A correlative evaluation of nitrogen cycling in the forest ecosystems of the EC projects NITREX and EXMAN. *For Ecol Manage* 71: 143-151
- Tietema, A. (1998) Microbial carbon and nitrogen dynamics in coniferous forest floor material collected along a European nitrogen deposition gradient. *Forest Ecol Manag* 101: 29-36.
- Tietema, A. & Wessel, W. (1992) Gross nitrogen transformations in the organic layer of acid forest ecosystems subjected to increased atmospheric nitrogen input. *Soil Biol Biochem* 24: 943-950.
- Torre, J.R. de la, Walker, C.B., Ingalls, A.E., Könneke, M. & Stahl, D.A. (2008) Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environ Microbiol* 10: 810-8.
- Tourna, M., Freitag, T.E., Nicol, G.W. & Prosser, J.I. (2008) Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environ microbiol* 10: 1357-64.

- Treusch AH, Leininger S, Kletzin A, Schuster SC, Klenk H, Schleper C (2005) Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol* 7:1985-1995
- Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, R.J., Richardson, P.M., Solovyev, V.V., Rubin, E.M., Rokhsar, D.S. & Banfield, J.F. (2004) Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428: 37-43.
- Van Miegroet, H. & Cole, D.W. (1984) The Impact of Nitrification on Soil Acidification and Cation Leaching in a Red Alder Ecosystem¹. *J Environ Quality*, **13**, 586.
- Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers Y, Smith HO (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66-74
- Venterea, R., Groffman, P., Verchot, L., Magill, A. & Aber, J. (2004) Gross nitrogen process rates in temperate forest soils exhibiting symptoms of nitrogen saturation. *Forest Ecol Manag* 196: 129-142.
- Vitousek PM, Farrington H (1997) Nutrient limitation and soil development: Experimental test of a biogeochemical theory. *Biogeochemistry* 37: 63-75
- Vitousek, P.M. (1984) Litterfall, Nutrient Cycling, and Nutrient Limitation in Tropical Forests. *Ecology*, 65: 285.
- Waki, M., Yasuda, T., Suzuki, K., Sakai, T., Suzuki, N., Suzuki, R., Matsuda, K., Yokoyama, H., Ogino, A., Tanaka, Y., Ueda, S., Takeuchi, M., Yamagishi, T. and Suwa, Y., 2010. Rate determination and distribution of anammox activity in activated sludge treating swine wastewater. *Bioresour Technol*, 101: 2685-2690.
- Wang, Y., Wang, Y., 2003. Quick measurement of CH₄, CO₂ and N₂O emissions from a

- short-plant ecosystem. *Adv Atmos Sci*. 20: 842-844.
- Wang, Z., He, D., Song, S., Chen, S., Chen, D. & Tu, M. (1982) The vegetation of Ding Hu Shan biosphere reserve. *Trop Subtrop For Ecosyst*, 1: 77-141.
- Wang, Y., Morimoto, S., Ogawa, N., Oomori, T. & Fujii, T. (2009) An improved method to extract RNA from soil with efficient removal of humic acids. *J appl microbiol* 107: 1168-77.
- Webster G, Embley TM, Freitag TE, Smith Z, Prosser JI (2005) Links between ammonia oxidizer species composition, functional diversity and nitrification kinetics in grassland soils. *Environ Microbiol* 7:676-84
- Wood PM 1987. Mono-oxygenase and free radical mechanisms for biological ammonia oxidation. In: Cole, J.A. and Ferguson, S.J., Editors, 1987. The Nitrogen and Sulphur Cycles Proceeding Symposium 42 of the Society for General Microbiology, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 219–243
- Wuchter C, Abbas B, Coolen MJ, Herfort L, van Bleijswijk J, Timmers P, Strous M, Teira E, Herndl GJ, Middelburg JJ, Schouten S, Sinninghe Damsté JS (2006) Archaeal nitrification in the ocean. *Proc Nat Acad Sci USA* 103: 12317-12322
- Ying, J., Zhang, L. & He, J. (2010) Putative ammonia-oxidizing bacteria and archaea in an acidic red soil with different land utilization patterns. *Environ Microbiol Rep* 2: 304-312.
- Yoh, M., Takeuchi, M., Toda, H., 1998. Simultaneous measurement of N₂, O₂, Ar, CO₂, CH₄, H₂ and CO in aqueous and gaseous samples: a detection of N₂/Ar shifts in environments. *Jpn J Limnol*. 59: 147-157.
- Yu, Q.F. & Wen, D.Z., D.Q. (1998) Long-term monitoring of the lower subtropical evergreen broad-leaved forest in Dinghushan Biosphere Reserve (VIII) Biological cycle of nutrient elements in the community of *Castanopsis chinensis*, *Cryptocarya concinna*. *Trop Subtrop For Ecosyst* 8: 53–63.
- Yu, R., Kampschreur, M.J., van Loosdrecht, M.C., Chandran, K., 2010. Mechanisms and

- specific directionality of autotrophic nitrous oxide and nitric oxide generation during transient anoxia. *Environ Sci Technol*. 44: 1313-1319.
- Zak DR, Blackwood CB, Waldrop MP (2006) A molecular dawn for biogeochemistry. *Trends Ecol Evol* 21: 288-295
- Zhang, L.-M., Offre, P.R., He, J.-Z., Verhamme, D.T., Nicol, G.W. & Prosser, J.I. (2010) Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea. *PNAS* early eds.
- Zhou, G. & Yan, J. (2001) The influences of regional atmospheric precipitation characteristics and its element inputs on the existence and development of Dinghushan forest ecosystems. *Acta Ecol Sin* 12: 2002-2012.
- Zumft, W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 533-616.
- 新藤純子 (2004) 人間活動に伴う窒素負荷の増大と生態系影響、地球環境 9: 3-10.

謝辞

本研究を遂行するうえで多大なるご指導をいただくと同時に、素晴らしい研究環境を作っていただいた、東京大学・妹尾啓史教授に深く感謝致します。

的確なご助言をいただき、多くの相談に乗っていただいた東京大学・大塚重人准教授に深く感謝致します。

多くのご助言をいただき、多くの議論をさせていただき、多くの励ましをいただいた、東京農工大学・木庭啓介特任准教授に深く感謝致します。

本研究の多くは東京農工大学・幾谷純子氏との共同作業を通して行った。共に土壌を採取し、窒素フローの解析を行った。幾谷氏の多大なる貢献をここに記すとともに、幾谷氏に深く感謝致します。

本研究の GC/MS 分析は全て中央大学・諏訪裕一教授のもとで行った。高価な GC/MS を自由に使用させていただき、また研究の遂行の仕方、息拔きの重要性も教えていただいた諏訪教授に深く感謝致します。

研究や現地調査に多大なご助力をいただいた、東京農工大学・楊宗興教授、また Jianming Mo 教授、Yunting Fang 博士を初めとする中国科学院のスタッフの皆様に深く感謝致します。

本研究を遂行するうえで多くの実験を手伝っていただいた東京農工大学・竹林佑氏、黒岩恵氏、牧田朋子氏、佐々木雄二氏に深く感謝致します。

投稿論文を執筆するうえで、共著者として有益なご助言をいただいた、中央大学・原山重明教授、大森正之教授、日本大学・上田眞吾准教授に深く感謝致します。

本研究の審査を快く引き受けていただいた、東京大学・石井正治准教授、大手信人准教授、東京農工大学・木庭啓介准教授に深く感謝致します。

研究生を送るうえで、多くの議論をし、共に切磋琢磨し、かけがえのない時間を共に過ごさせていただいた土壌圏科学研究室の先輩、同輩、後輩に深く感謝致します。

最後に、いつも応援していただいた両親に深く感謝致します。