

博士論文

亜硝酸動態解析による森林土壌の
窒素維持・放出機構の解明

黒岩 恵

目次

第 1 章 序論 . . . 1

- 1.1 地球規模での窒素循環の攪乱とその影響
- 1.2 森林生態系における窒素フロー
- 1.3 森林土壌の窒素循環と硝化の重要性
- 1.4 窒素循環、とくに硝化における NO_2^- の重要性
- 1.5 土壌中における NO_2^- 消費プロセス
- 1.6 $^{15}\text{NO}_2^-$ を用いた NO_2^- 消費経路の推定
- 1.7 NO_2^- 変換速度の推定と NO_2^- の制御因子の解明
- 1.8 本研究の既存研究に対する位置づけと目的

第 2 章 亜硝酸の抽出条件の検討 . . . 19

2.1 緒言

- 2.1.1 土壌からの NO_2^- を含む、無機態窒素の回収法
- 2.1.2 アルカリ性条件での NO_2^- 回収法とその問題点
- 2.1.3 土壌抽出溶液の NO_2^- を含む無機態窒素濃度・同位体比測定法
- 2.1.4 本研究で用いる NO_2^- 濃度定量法(アザイド法)の概要

2.2 方法

- 2.2.1. アザイド法による NO_2^- の N_2O への変換
- 2.2.2 アザイド変換効率と試料溶液 pH の関係の検証
- 2.2.3 アザイド変換効率と試薬濃度の関係の検証
- 2.2.4 アザイド法におけるマトリックス効果の検証
 - 2.2.4.1 pH 変化におけるマトリックス効果
 - 2.2.4.2 NO_2^- 変換効率におけるマトリックス効果
- 2.2.5 土壌抽出処理中における NO_2^- の安定性の検討
 - 2.2.5.1 土壌の抽出条件の検討；土壌中に存在する低濃度 NO_2^- の測定
 - 2.2.5.1.1 試料
 - 2.2.5.1.2 土壌抽出と NO_2^- 濃度の測定

2.2.4.2 土壌の抽出条件の検討； $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加条件下での高濃度 NO_2^- の測定

2.2.4.2.1 試料

2.2.4.2.2 土壌抽出

2.2.4.3 NO_2^- 同位体比の算出

2.3 結果と考察

2.3.1 アザイド変換効率と試料溶液 pH の関係

2.3.2 アザイド変換効率と試薬濃度の関係

2.3.3 アザイド法におけるマトリックス効果

2.3.3.1 pH 変化におけるマトリックス効果

2.3.3.2 NO_2^- 変換効率におけるマトリックス効果

2.3.4 土壌抽出処理中における NO_2^- の安定性

2.3.4.1 土壌中に存在する低濃度 NO_2^- の測定

2.3.4.2 $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加条件下での高濃度 NO_2^- の測定

2.4 結論

第3章 森林表層土壌における亜硝酸生成・消費速度と消費経路の解析

・・・ 48

3.1 緒言

3.1.1 土壌中の無機態窒素変換速度の算出

3.1.2 NH_4^+ , NO_3^- 変換速度の解析解の算出における前提条件の検証

3.1.3 NO_2^- 変換速度の解析解を得るうえでの問題点

3.1.4 実験の目的

3.2 方法

3.2.1 土壌試料

3.2.2 土壌への $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加培養

3.2.3 無機態・溶存有機態窒素の濃度・ ^{15}N 比測定

3.2.3.1 NO_3^- の濃度・同位体比測定

3.2.3.2 全溶存態窒素(TDN)の濃度・同位体比測定

3.3 結果と考察

3.3.1 土壌中の $^{14+15}\text{NO}_2^-$ 濃度、 $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度、 NO_2^- 同位体比の経時変化

3.3.2 NO_2^- の生成と消費の速度を算出するための前提条件

3.3.3 培養期間および添加する NO_2^- 濃度が NO_2^- 生成と消費の速度に及ぼす影響

3.3.3.1 培養期間と NO_2^- 生成・消費速度との関係

3.3.3.2 NO_2^- 添加濃度と NO_2^- 生成・消費速度との関係

3.3.4. 森林土壌中の NO_2^- 生成速度

3.3.5 NO_2^- 消費プロセスの相対的寄与

3.4 結論

4 章 斜面森林土壌における亜硝酸動態とその制御要因の解析

・・・74

4.1 緒言

4.1.1 研究サイトの概要

4.1.2 研究サイトの土壌理化学性、 NH_4^+ ・ NO_2^- 動態の特徴

4.2 方法

4.2.1 土壌採取

4.2.2 NO_2^- 添加培養と土壌抽出

4.2.3 溶存無機・有機態窒素の測定

4.2.3.1 NH_4^+ の測定

4.2.4 統計処理

4.3 結果

4.3.1 NO_2^- 濃度

4.3.2 NO_2^- 生成・消費速度と平均滞留時間(MRT)

4.3.3 NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- 生成消費速度間の相関解析

4.3.4 NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- 生成速度間の比

4.3.5 NO_2^- 生成速度と土壌理化学性の関係

4.3.6 袋山沢の土壌における NO_2^- 消費経路の検出

4.4 考察

4.4.1 森林斜面の表層土壌における NO_2^- 濃度、生成・消費速度、MRT

4.4.2 芦生と袋山沢における硝化の制御機構の違い

4.4.2.1 NH_4^+ から NO_2^- までの酸化過程

4.4.2.2 NO_2^- から NO_3^- までの酸化過程

4.4.3 NO_2^- 生成速度の制御要因(土壌理化学性)

4.4.4 袋山沢における NO_2^- の消費経路

4.5 結論

5 章 各論のまとめ . . . 109

参考文献

謝辞

付録

第 1 章 序論

1.1 地球規模での窒素循環の攪乱とその影響

Rockström らは 2009 年に、人間活動に伴って引き起こされ、人類の活動に影響を及ぼすと考えられる 9 項目の環境問題（気候変動・海洋酸性化・成層圏オゾンの減少・窒素／リンの生物地球化学的循環の変化・地球規模での淡水利用の増加・土地利用変化・生物多様性の減少・大気エアロゾルの負荷・化学物質による汚染）について、人類が安全に活動できる境界値：Planetary boundaries を提唱した。このうち、「窒素の生物地球化学的循環の変化」は「気候変動」と「生物多様性の減少」とともに人類が安全に活動できる「地球の境界」をすでに超えている 3 つの項目のひとつであると指摘している。彼らは、境界値の内側では、生態系の回復力によって基本的な機能を維持することが可能であり、人類が安全に活動できるが、この境界値を超えてしまうと大陸・地球規模での非線形かつ突然の環境変動が生じる可能性があるとの警鐘を鳴らしている(Rockström et al. 2009a, Rockström et al. 2009b)。Rockström らの境界値の設定方法には今後の議論の余地があり、地球規模で一律の境界値を設定することは困難であるとの意見もある。しかしながら、現在人為活動により地球上の窒素循環が大きく攪乱され、それがさまざまな気候、環境や生態系の変化と連動していることは疑いが無く、数多の研究により支持されている。

たとえば、工業活動、化石燃料やバイオマスの燃焼、微生物による窒素の異化的変換の過程で放出される N_2O の現在の大気中濃度(324 ppb, 2011 年)は、工業化以前の水準より 20%高く、ほぼ一定の速度で増加を続けている(IPCC, 2013)。さらに、現在の大

気中濃度は過去 80 万年間の氷床コアの記録による最高濃度を大幅に超えており、過去 1 世紀にわたる大気中濃度の平均増加率は、非常に高い確信度で過去 2 万 2 千年間に前例がないことが報告されている(IPCC, 2013)。このことは、現在の生態系が数十万年単位の長期間にわたって経験したことのない窒素に富んだ環境にさらされている可能性を示し、窒素の負荷が低濃度の窒素環境に適応してきた生態系の生物相に与える影響が懸念され、議論されている。さらに、大気中 N_2O 濃度の変化は環境や気候システムに影響を与えうることが知られている。 N_2O は成層圏オゾンを破壊する物質として、単独では最も重要な物質である(Ravishankara et al. 2009)。また、 N_2O は温室効果ガスでもあり、正の放射強制力をもたらすことで気候システムを変化させうる。 N_2O の温暖化への寄与率は 5%にとどまると見積もられているものの(IPCC, 2013)、寄与率の最も大きい CO_2 と比較しても重要な温室効果ガスのひとつであると考えられる。なぜなら、一分子あたりの温室効果が CO_2 の 298 倍と高く、大気中での寿命が 118-131 年と長いため、全球的な排出が安定してからも大気中濃度が安定するまでに 1 世紀以上を要し、長期にわたって環境影響を及ぼすポテンシャルがあるためである。これらの観測事実や見積もりは、人為的に固定された窒素の生態系への負荷が気候変動を促進する方向に作用することを示しているが、一方で緩和する方向への作用も指摘されている。たとえば、多くの場合、窒素は生態系の生産性を制限しており、大気中 CO_2 濃度増加の影響を陸域生態系が自然に打ち消す能力を制限していると考えられている。Wang and Houlton (2009) は、窒素固定が CO_2 濃度の変化と気候変動に対してどのように応答するかを考慮して、窒素が炭素の固定量に及ぼす影響を評価した。その結果、これまでの窒素の影響を考慮しないモデルは炭素固定量の将来予測値を大きく過剰評価しており、実際には窒素制限によってより少ない量の炭素しか陸域生態系に固定されないと予測

した。このように、窒素負荷の増大が環境へ及ぼす影響は複雑であり、総合的な影響を評価することは容易ではない。しかし、すくなくとも、人類の健康や生活に対して多面的な損失を与えていることは明らかであると考えられている。たとえば、Erisman et al. (2013) は人為的な固定窒素の負荷が生態系や人類の健康に対して及ぼす影響を 8 項目にわたって整理した。その項目は、(1)硝酸・亜硝酸の摂取、(2)大気汚染(健康影響)、(3)大気汚染(作物生産)、(4)淡水域の汚染、(5)生物多様性の損失、(6)沿岸域の嫌気水塊、(7)気候変動、(8)成層圏オゾン、であり、これらの各項目に対する人為的な固定窒素による「過剰な」効果はそれぞれ、70, 60, 4, 10, 50, 80, 20, 20%であると見積もった。例えば、(1)については、世界人口の 70%が推奨されるレベル以上の NO_3^- または NO_2^- を大気、水、食料から摂取していること、また、(5)については、生物多様性のホットスポットの総面積のうち 50%が $5 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ の大気からの窒素負荷を受けていることを根拠に示している。

このような窒素循環の攪乱は、1913 年にカール・ボッシュとフリッツ・ハーバーがアンモニア合成法（ハーバー・ボッシュ法）を工業規模で確立してからわずか 100 年ほどの間に急速に進行している。1970 年代にはハーバー・ボッシュ法による大気窒素の固定量が自然由来の大気窒素固定を上回るようになったと考えられており (Galloway et al. 2003)、大量に生態系へと持ち込まれた人為的な固定窒素は、食料の増産と世界人口の急速な増加を可能にした。現在では世界人口の 50%がハーバー・ボッシュ法に由来する窒素起源の食料生産によって維持されていると見積もられている (Erisman et al. 2008)。しかし、工業的窒素固定によって新たに生態系に持ち込まれた窒素のうち、食料として収穫されて利用される窒素はごく一部に過ぎず、大半の窒素は生産の過程でガス態として、あるいは土壌からの流出によって失われる。つまり、土

壊生態系に負荷された窒素は、さまざまな酸化還元状態へと変換されながら生態系内を循環し、水系や大気の輸送プロセスに容易に拡散する。この循環プロセスの各々の過程は地球環境に異なった影響を及ぼすが、それは各過程のフロー、つまり速度に依存し、生態系への影響は施肥効果のように有益なものにも、富栄養化のように有害なものにもなりうる。Galloway らはこのような考え方を “nitrogen cascade” と定義し、生態系を循環する窒素の逐次的な変換とそれらの連関、その速度の重要性を強調した(Galloway and Cowling 2002)。窒素循環のフローに依存して環境影響が決定しうることに加え、環境影響にともなって窒素循環フローが変化しうる点もまた重要である。たとえば、Aber et al. (1998)は、森林への窒素流入量の増加が窒素循環の攪乱を段階的に引き起こすと考え、その変化をあらわす「窒素飽和モデル」を提唱した。すなわち、もともと窒素制限下にある森林において(ステージ0)、継続的に窒素負荷が加わることによってはじめは生産性が高まるが(ステージ1)、次第に硝化速度が増加し生成した NO_3^- の溪流・地下水などへの流出や脱窒による N_2O の生成が増加し(ステージ2)、最終的には植物や微生物の要求量を超える NO_3^- の流出やガス態としての放出のさらなる増加に加え、土壌酸性化が進行し森林の衰退を引き起こす(ステージ3)というものである。このように、系への窒素流入量の増加に伴って窒素の循環速度が変化し、相対的な変換経路の重要性が変化することにより、それまで系内で保持されていた窒素が系外に放出・流出していくと考えられている。実際に窒素飽和現象が森林生態系において生じているのか否かについては、窒素流入量の増加に伴った正味生態系生産量(NEP)の減少がみられない(Magnani et al. 2007)ことから疑問が呈されているが、この論文においては窒素の挙動(濃度・変換速度・流出量など)についてデータが提示されていない一方で、窒素飽和モデルに符合した知見は多くの森林においてみられることから(Aber et al. 1998, Fenn et

al. 1996, Aber et al. 2003, Venterea et al. 2004)窒素飽和モデルで提唱されている現象が重要であるとの見解は一般的に支持されている(An De Schrijver et al. 2008)。これらのことから、窒素循環フローやその変化の解析は、環境影響の予測や、環境変動に対して生態系がどのような状態にあるのかを知ることができる可能性がある点で重要である。

1.2 森林生態系における窒素フロー

日本は国土の 67%を森林が占め(林野庁, 2010 森林・林業白書)、森林生態系の生産性や物質循環は国土環境に大きな影響を与えていると想定される。窒素は多くの森林生態系において植物の生長と微生物の活動を制限する主要な元素であり(Vitousek and Howarth 1991)、窒素の循環、保持・流出機構を明らかにすることは森林の生産性の維持・向上のためにきわめて重要な課題である。多くの森林生態系では窒素の流入(インプット)と流出(アウトプット)が比較的釣り合った状態にあると特色づけられ、流出入する窒素量は森林に蓄積されている窒素および土壌生態系のなかで内部循環している窒素量と比較して非常に小さい(Bothe et al. 2007)。さらに、森林土壌中の窒素化合物は 90%以上が土壌有機物中に固定された有機態窒素であり、それ以外のほとんどは植物体バイオマスが占め、無機態窒素は 1%にも満たない(Bormann et al. 1977)。すなわち、窒素は森林生態系内部で保持される傾向にあり、わずかにしか存在しない、生物に利用可能な形態の窒素(低分子の有機態窒素および無機態窒素)の活発な循環が森林の生産性を支えている。したがって、この「利用可能な窒素」の生成や変換、消費がどのような速度で生じ、それらの速度がどのような要因によって変化するかは、森林生態系を構成する多様な生命がどのように維持され、生態系内に存在する・もしくは流出していく

物質が地球上の物質(養分)循環にどのように作用し、それが近い将来の環境変動に対応してどのように変化していくかを理解・予測・管理するうえで決定的に重要な情報である。

そこで、従来は単位時間あたりの無機態窒素蓄積量を土壌中の無機態窒素のフローとみなして、議論が行われてきた。しかし実際には、これは生成と消費の差分にすぎず、真の生成速度ではない。この困難を克服するために、基質または生成物のプールを ^{15}N でラベルし、ある系における同位体の動きを時系列で追うことで、生じている反応経路を特定する、あるいは反応速度を定量する手法が発展してきた。たとえば、Davidson et al. (1992) は、ほとんど NO_3^- が蓄積しない土壌においても顕著な NO_3^- 生成と NO_3^- 消費が生じていることを、 ^{15}N を用いた NO_3^- の生成速度・消費速度の測定によって明らかにした。このことは、従来硝化活性の指標として用いられてきた単位時間あたりの NO_3^- 蓄積速度(濃度の変化)は指標として不十分であり、生成や消費の速度を定量する必要があることを示している。

1.3 森林土壌の窒素循環と硝化の重要性

無機態窒素の生成プロセスのうち、 NH_4^+ の生成は、補食や土壌動物・土壌微生物による有機物分解の結果生じると考えられている。放出された NH_4^+ は迅速に微生物によって同化されうるが、それに加え、 NH_4^+ は植物による吸収、土壌鉱物への吸着によって消費される。 NH_4^+ のうちの一部は硝化微生物によって酸化され、 NO_3^- へと変換される (Schlesinger and Bernhardt 2013)。 NO_3^- は脱窒の基質となってガス態窒素への還元を通じて生態系からの窒素の放出の起点となる。また、アニオンであるために一般的に土壌に保持されづらく、アニオン吸着の程度も他のアニオンと比較して弱い (PO_4^{3-} >

$\text{SO}_4^{2-} > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^-$) ため、容易に水系への流出の起点ともなる。一方で、 NO_3^- の拡散係数は NH_4^+ のそれと比較して1オーダー程度大きく（体積含水率が10-26%のとき NH_4^+ で $0.4-2.3 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, NO_3^- で $0.5-4.3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$; Gregory 2006）土壤中で拡散しやすいために植物にとって重要な窒素源となる可能性がある。実際に、関東のヒノキ林において植物葉、土壤中の無機態窒素、溶存有機態窒素の窒素自然安定同位体比を測定した研究からは、硝酸濃度が高い森林において、植物の窒素源として硝酸の相対的寄与が大きくなることが示唆されている(Takebayashi et al. 2010)。また、硝化と脱窒の過程からはそれぞれ NO や N_2O が生成し、硝化は脱窒の基質を生成するプロセスであるので、これらのガスの発生量は基本的に硝化速度に依存すると考えられている(Firestone and Davidson 1989)。このように、 NO_3^- の生成(硝化)がどの程度生じているのかは生態系からの窒素の放出を引き起こす点と、養分供給の点の双方から重要である。

1.4 窒素循環、とくに硝化における NO_2^- の重要性

硝化はアンモニア酸化アーキア(ammonia-oxidizing archaea ; AOA)やアンモニア酸化細菌(ammonia-oxidizing bacteria ; AOB)が担う NH_4^+ から NO_2^- までの酸化と、 NO_2^- 酸化細菌(nitrite-oxidizing bacteria ; NOB)が担う NO_2^- から NO_3^- の酸化の二段階の反応である。しかし、物質循環の分野では NH_4^+ 酸化と NO_2^- 酸化という本来異質な反応を硝化($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^-$)という一連の反応として捉えてきたために、微生物の情報と物質動態の情報を併せた精確な議論が出来ていない。たとえば、硝化活性の測定において、物質循環の分野においては硝酸生成速度の測定を行う。一方で、微生物生態学の分野で硝化について議論する際には、アンモニア酸化微生物がもつアンモニア酸化酵素(ammonia monooxygenase ; AMO)をコードする遺伝子(*amoA*)、または、これらの分類

群に特異的な 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を対象として分析を行う。前者が対象としているプロセスは NO_3^- 生成であり、後者が対象としているのは NH_4^+ 酸化、つまり NO_2^- 生成である。これらアンモニア酸化微生物の量や活性が土壌中の NO_3^- 生成活性と相関する例は少なく、その一因として、上記のように、対象としている物質のミスマッチが考えられる。

生物に利用可能な窒素の動態解析はこれまで、アンモニウム(NH_4^+)や硝酸(NO_3^-)、あるいは一酸化二窒素(N_2O)を中心に解析されてきた。一方で、環境中の濃度が低く、反応性が高いために、検出ならびにトレースが困難である NO_2^- は、その動態についてほとんど着目されてこなかった。 NO_2^- を考慮にいれないことの正当性は、 NO_2^- が環境中に蓄積しないことから硝化の律速段階がアンモニア酸化であり、生成した NO_2^- に依存した NO_2^- 消費が迅速に生じるであろうという前提によって担保されてきた。しかし実際には、複数の研究によって、 NO_2^- は NO_3^- 以外にもガス態窒素(NO や N_2O)へと化学的にも変換されること (Venterea and Rolston 2000)、 NO_3^- とともに主要な窒素溶脱源となりうる溶存有機態窒素(dissolved organic nitrogen ; DON)へと、容易に変換されうること (Davidson et al. 2003) が示されている。さらに、 NO_2^- は硝化過程だけでなく、脱窒過程(NO_3^- 還元)やその他の異化的変換反応 (嫌気性アンモニア酸化(アナモックス)、異化的硝酸還元、亜硝酸依存の嫌氣的メタン酸化) のすべてに関わる、窒素循環の中で極めて重要な中間生成物である (Schreiber et al. 2012)。これまでの多くの研究は異化的な窒素循環の末端、つまり酸化数が最大(+5, NO_3^-)か最小(-3, NH_4^+)の物質のみの挙動を追っているに過ぎず、プロセスの中心に位置する中間生成物に関する情報が圧倒的に不足している。このため、仮に、中間生成物 (NO_2^-) の段階で窒素のロスが生じる場合は、系全体の窒素収支を精確に把握できない。さらに逐次反応だけでなく系の内部

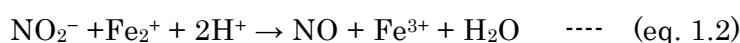
での循環が生じている場合、系を制御しているメカニズムについて精確な把握ができない。これらのことは、 NO_2^- の動態を把握することなく、森林土壌における窒素の維持・放出機構について十分に明らかにできないことを意味している。

1.5 土壌中における NO_2^- 消費プロセス

NO_2^- は土壌中で複数の生物学的・化学的経路によって消費されうる。

まず、生物学的プロセスとしては、(1) NO_2^- の NH_4^+ への還元、(2) NO への還元、(3) NO_3^- への酸化、(4)同化が考えられる。(1)の NH_4^+ への変換は、異化的硝酸還元によるアンモニア化成(dissimilatory nitrate reduction to ammonium : DNRA)の経路の一部であり、DNRA 細菌によって行われる。森林表層土壌においては、 NO_3^- からの NH_4^+ 生成活性が検出されることは稀であるため(Stevens et al. 1997, Laughlin and Stevens 2002, Dail et al. 2011)、一般的には重要であるとは考えられていない。(2)の NO への変換は、アンモニア酸化細菌(AOB)・亜硝酸酸化細菌(NO_B)・脱窒微生物・アナモックス細菌・DNRA 細菌・亜硝酸依存型の嫌氣的メタン酸化細菌、という窒素の異化的変換に関わるすべての微生物によって行われうる(Pilegaard 2013)。このように多様な微生物がこの経路を担うことから、まさに異化的な窒素循環の中心となる反応であるが、 NO_2^- や NO の安定同位体比測定に伴う困難さからフラックスや経路を推定することはほとんど行われていない。(3)の NO_3^- への変換は、これまで好氣的な森林表層土壌で NO_2^- 消費の主要なプロセスであると考えられてきた経路であり、NO_Bによって行われる。また、アナモックスもこの経路を行うポテンシャルを有しているが土壌中での重要性は明らかではない。これら異化的な変換以外に、(4)の菌体への同化も生じうる(Gates et al. 2011)。

化学的プロセスとしては、主に、(1)NO への還元、(2)N₂O への還元、(3)N₂ への還元、(4) NO₃⁻への酸化、(5)有機態 N への変換、が考えられる。(1), (2), (3),による NO,N₂O,N₂ の生成は、これらの経路をまとめて化学的脱窒(定義は NO₂⁻の不安定性と関連したガス態 N 損失 ; chemodenitrification)と呼ばれてきた(Clark 1962)。これまでの研究から NO₂⁻の NO, N₂O への変換反応は以下の eq 1.1-1.3 のように生じると考えられている(Chalk and Smith 1983, Pilegaard 2013)。



eq 1.1-1.3 の反応式において、左辺に H⁺があることから分かるように、NO₂⁻のガス態への変換は pH に依存して生じると考えられており、pH5.5 以下の条件で酸性度が大きくなるにつれて生成する HNO₂ が反応の中間体として重要であると考えられている (Venterea et al. 2000, Mørkved et al. 2007)。また、近年新たに、NO₂⁻から生成された HNO₂ が直接ガス態として土壌から放出されることも提唱されている (eq. 1.4)。



これは、土壌中の NO₂⁻が HONO のソースとなることで、大気中の OH ラジカル供給源となり、大気化学的にも重要な役割をなしている (Su et al. 2011)。また、NO₃⁻の生成は一般的には微生物反応によると解釈されるが、NO₂⁻の化学的な変

換においても NO_3^- は生成しうる (eq. 1.1, Venterea and Rolston 2002, Van Cleemput and Baert 1984)。さらに、(5) の有機態への変換については、Bremmer らが初めて NO_2^- が土壤有機物に固定されうることに言及して以来多数の研究により示されており、これは有機物のニトロ化(nitration)やニトロソ化(nitrosation)による非生物的な固定であると考えられている (Bremmer 1957, Bremmer and Fuhr 1966, Thorn and Mikita 2001, Davidson et al. 2003)。また、 NO_2^- と有機物の反応においても、同時にガス態窒素(NO , N_2O , N_2)が生成することが知られている (Bremmer 1957, Stevenson et al. 1970)。

1.6 $^{15}\text{NO}_2^-$ を用いた NO_2^- 消費経路の推定

NO_2^- の消費経路は 1.5 に示したように生物的にも非生物的にも生じ、その反応は多岐に渡り、非常に複雑である。土壤中での NO_2^- の消費経路にはどのようなものが存在し、それぞれの反応は環境中でどの程度重要なのであろうか。そのことを検証するため、 ^{15}N もしくは ^{13}N を土壤に添加して培養を行い、添加した同位体をトレースすることで変換経路を同定することがこれまで行われてきた。

Nelson and Bremner (1969) は、土壤中に $^{15}\text{NO}_2^-$ を添加した際に生じる ^{15}N の損失 (回収できない ^{15}N の割合、ガス態へ変換されたものと解釈される) と土壤に有機態として固定される ^{15}N の割合 (2M KCl で抽出後の土壤に存在する ^{15}N) が土壤の条件や抽出条件によってどのように変化するかを明らかにした。その結果、 ^{15}N の損失と土壤に固定される ^{15}N の割合は pH と反比例し、同時に土壤の全炭素量によっても制御されることを示した (土壤 pH が 5-7 の範囲では一定の pH における ^{15}N の損失と土壤への固定は土壤炭素量に依存し、 $\text{pH} < 5$ では、土壤炭素量の増加にともなって土壤への固定は増加したが、 ^{15}N 損失は減少した)。また、 ^{15}N の損失と土壤への固定は、 NO_2^- 添

加濃度、培養時間、培養温度に依存して増加すること、含水率の増加は ^{15}N の損失を低下させたが土壌への固定には影響しないこと、オートクレーブによる土壌の滅菌は ^{15}N の損失と土壌への固定にほとんど影響せず化学的反応の寄与が大きいことを示した。

Nelson と Bremner のこの研究は、ごく初期の NO_2^- 動態研究でありながら、綿密な条件検討を行っており重要性の高い研究であるが、問題点も存在する。 NO_2^- の添加濃度が NO_2^- の消費経路の相対的な重要性にどのように影響するかを検証した例は著者の知る限りこの一例しか存在しないが（また、Fitzhugh らも論文中においてそのように述べている; Fitzhugh et al. 2003a）、そのときに用いている NO_2^- 添加濃度は $9.8\text{--}980\text{ mg N kg}^{-1}$ という非常に高濃度の条件であり、その他の条件検討に用いている NO_2^- 濃度も湿土 3 g あたりに $600\text{ }\mu\text{g N}$ （含水率を 50% とすると 300 mg kg^{-1} ）という高濃度の添加条件で行われている。Firestone et al. (1979), Firestone et al. (1980) は、土壌の懸濁液に ^{13}N でラベルされた微量の NO_2^- を添加することで、 NO_2^- が脱窒の最終生成物に与える影響について研究を行った。 N_2O と N_2 の生成をモニタリングすることで、微量の NO_2^- 濃度の上昇は生成する N_2O と N_2 の総量には影響しないが、 N_2O と N_2 の相対的な比率には顕著に影響を与え、 N_2O の比率を増加させることを明らかにした。

このことは NO_2^- 濃度の上昇が N_2O から N_2 への還元を減少させることを示唆しており、 NO_2^- が $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$ 比に与える影響は等量の NO_3^- と比較してはるかに大きかった。Smith and Chalk (1980) は土壌中における NO_2^- の化学的な消費の重要性を明らかにするため、 γ 線滅菌を行った 3 種類の土壌に、 242 mg kg^{-1} の濃度で $^{15}\text{NO}_2^-$ を添加し 4 日間 30°C で培養した後に、有機物として回収される ^{15}N は $1.3\text{--}40.3\%$ 、ガス態として回収される割合は $23.6\text{--}41.2\%$ であったことを報告した。また、このとき回収されなかった ^{15}N 量は有機物への変換量が多いほど少なかった。また、Fitzhugh et al. (2003b) は、 3.64 mg

kg^{-1} の濃度で $^{15}\text{NO}_2^-$ を添加し、1 日後と 30 日後における、土壤有機物、無機態窒素、微生物バイオマス、 N_2 、 N_2O 中の ^{15}N 回収率を算出した。この結果、有機態に 0–62.7% の添加 ^{15}N が回収され、土壤有機物中の ^{15}N 量の平均値は 1 日後と 30 日後で差がみられず、安定的に存在していることを示した。また、微生物バイオマスへの取り込み、 N_2O への変換、 N_2 への変換の割合はそれぞれ測定を行った土壤中の最大値でも 10% 以下であり、消費経路として相対的に重要ではなかった。Fitzhugh et al. (2003a) においては、 $^{15}\text{NH}_4^+$ 、 $^{15}\text{NO}_3^-$ の添加と比較して、 $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加条件下では、土壤有機物から回収される ^{15}N の割合が高いことを示した。さらに、 HgCl_2 溶液を溶媒として調整した $^{15}\text{NO}_2^-$ 溶液の添加により微生物活性を抑制した場合と、純水を溶媒とし生物活性がある条件での培養との比較において、生物活性がある場合は土壤有機物として回収される割合が減少することから、生物反応と非生物(化学)反応が NO_2^- の消費において競合している可能性を示した。しかし、これらの先行研究では、抽出法が統一的ではなく、さらに抽出時間が 1 時間 (Smith and Chalk 1980) から 1 日 (Fitzhugh et al. 2003a, 2003b) という長時間にわたっているため、抽出中の有機物との反応や NO_2^- の損失が無視できない可能性がある。また、土壤有機物への ^{15}N の取り込みの見積もりにおいて、全窒素から無機態窒素の合計を差し引いているために、有機物へ取り込まれた窒素が土壤に結合して存在するのか、溶存有機態窒素(DON)として存在するかの区別はなされていない。DON は特に窒素の負荷が少ない森林においては、生態系から流出する主要な窒素形態となることが示されている(Perakis and Hedin 2002)。さらに、低分子の DON は微生物だけでなく、植物も直接窒素源として利用できることが示されているため(Chapin et al. 1993, Lipson et al. 2001)、生物にとって固相に吸着された窒素よりも利用しやすい窒素であると考えられる。したがって、 NO_2^- が DON へと変換されるのか、土壤の固

相に吸着されるのかは生態系における窒素の保持と放出を明らかにするうえで非常に重要である。これについて、Dail et al. (2001) は $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加を行ったのちに 15 分と 24 時間の培養を行い、添加した ^{15}N の 4–5 割が 0.5M K_2SO_4 では抽出されない土壌有機物へと変換されることを示した。また、この反応は添加 15 分の時点で完了しており、24 時間においても有機物へと固定された ^{15}N 量がほとんど変化しないこと、滅菌（オートクレーブと γ 線滅菌）を行っても有機物への変換が生じることから、この反応が非生物的な反応であることが強く支持された。一方で、Isobe et al. (2012) は $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加直後から 6 日後にかけて、添加した ^{15}N の 6.6–17.8% が DON として回収されることを示した。

これらの先行研究から、 NO_2^- が生物的にだけでなく、ガス態窒素や有機態へ直接変換されうること、その反応が NO_2^- の消費経路において量的に重要になりうることを示されている。さらに、 NO_2^- から生成された有機態窒素は土壌中で比較的安定に存在し、長期間残存する可能性が示されている (Bremner 1957, Smith and Chalk 1979, Fitzhugh et al. 2003b)。しかし、一般的に NO_2^- は環境中に蓄積しないため、化学的なガス態窒素生成反応は NO や N_2O の生成プロセスを考える際にはほとんど無視されてきた (Tiedje 1988, Chapin et al. 2002)。また、一般的に、土壌中の窒素循環において、有機態窒素と NO_2^- の反応についても考慮されていない。したがって、 NO_2^- から NO_3^- を介さずに直接ガス態や有機物態窒素へと変換される反応が生態系の中でどのように重要であるかはほとんど議論がなされていない。加えて、近年の研究により、 NO_2^- と土壌有機物との反応は、 NO_3^- の土壌生態系への保持という観点からも重要であることが明らかになってきている。Dail et al. (2001) は、 $^{15}\text{NO}_3^-$ を土壌に添加した際には、顕著な割合の ^{15}N が DON へと変換されることを示し、そのメカニズムとして NO_3^- の

溶存鉄による NO_2^- への還元(酸化された鉄はその後還元体の有機炭素の酸化とカップリングして再生される)と、 NO_2^- の有機物との反応が提唱されている。(Davidson et al. 2003)。この反応の重要性に関しては、DON 測定の方法論に関する議論(溶存鉄がフローインジェクション法による NO_3^- 定量に影響することによる NO_3^- 濃度の過小評価が DO^{15}N の過大評価になるとする指摘(Colman et al. 2007)) と、それに対する反論(Torres-Canabate et al. 2008, Davidson et al. 2008)) があるものの、複数の研究において NO_3^- が DON に変換されることは示されている(Torres-Canabate et al. 2008, Corre et al. 2007, Dail et al. 2001)。一方で、環境中で見られるような低濃度の NO_2^- (0–20 mg N L⁻¹)と DOC 濃度(15–60 mg C L⁻¹)では DOC/DON 比が 13.4–25.4 のレンジにおいて、DOC と NO_2^- の反応は生じないことから、 NO_2^- または NO_3^- と有機物との反応は環境中において重要ではないという主張も存在し(Schmidt and Matzner 2009)、環境中における NO_2^- や NO_3^- と有機物との反応の重要性は明らかになっていない。以上のことから、土壌における窒素の維持と放出について精確な理解を得るためには、土壌中における NO_2^- からのガス態窒素生成や有機態窒素生成の重要性を明らかにし、その制御について議論する必要がある。

1.7 NO_2^- 変換速度の推定と NO_2^- の制御因子の解明

添加 ^{15}N をトレースすることで変換経路について推定するほかに、 ^{15}N でラベルされた無機態窒素を土壌に添加・培養することで、 NO_2^- の生成・消費速度を算出する研究もこれまでに行われてきた。こうした土壌中の NO_2^- 動態研究はこれまで主に、農耕地土壌からの NO , N_2O 生成プロセスの定量とメカニズム解析の目的で行われてきたが、 NO_2^- 消費経路の解析(1.6)と比較してその例は限られている。また、 NO_2^- の生成速度や

消費速度が環境中でどのような条件に制御されているかについて実際に明らかにした例はこれまで存在しない。NO₂⁻濃度についての空間分布とその制御に関する研究は 1 例のみ存在し、Burns et al. (1995a) は、窒素の負荷(100 または 500 kg N ha⁻¹ yr⁻¹)を受けている牧草地斜面において、12 m × 132 m のプロットを設定し、4 m 間隔で格子状に 99 点から土壌を採取することで、NO₂⁻濃度の分布、NO₂⁻濃度と土壌の特性(pH, K・Mn・Mg・NH₄⁺・NO₃⁻濃度, 含水率, 斜面位置)との相関解析を行った。その結果、窒素負荷が大きな土壌であっても、概して NO₂⁻は低濃度にとどまることを明らかにした。具体的には、NO₂⁻濃度は 100 kg N ha⁻¹ yr⁻¹ の窒素負荷があるプロットにおいて、採取土壌の 90%以上で < 0.1 mg N kg⁻¹ であり、500 kg N ha⁻¹ yr⁻¹ の窒素負荷があるプロットにおいても大部分が < 0.5 mg N kg⁻¹ に分布し、最高でも約 3 mg N kg⁻¹ であった。また、NO₂⁻濃度は空間変動が大きく、NO₂⁻濃度の変動と有意な相関がみられた土壌特性は主に NO₃⁻濃度と pH であったが、NO₂⁻濃度の説明変数をステップワイズ法による重回帰分析によって選択したモデルは、最高でも決定係数が $R^2=0.28$ にとどまり、NO₂⁻変動のわずかな部分しか説明できなかった。この研究で示されたように、概して NO₂⁻は NO₃⁻に比べてはるかに低い濃度でしか土壌中に存在しないが、この濃度の存在比は環境中での重要性和必ずしも一致しない。たとえば Venterea は NO₂⁻が幅広い O₂ 濃度において容易に N₂O へと変換され、この変換速度は等量の NO₃⁻と比較して、<0.1% O₂ では 3 倍、O₂ ≥ 5% では 100 倍に達することを示した(Venterea 2007)。

1.8 本研究の既存研究に対する位置づけと目的

1.7 に記したように、Burns らの研究においては、NO₂⁻濃度の変化を説明する有力な説明変数(環境要因)を見いだすことができなかった(Burns et al. 1995a)。このことの一

因は、 NO_2^- が濃度としてはわずかにしか存在しないため、環境要因の変動が NO_2^- 動態に与える影響を、濃度の変化からは検出できなかった可能性が考えられる。さらに、同年に出版された別の研究では、 NO_2^- の回収効率を高めるには通常の土壌抽出法とは異なり、アルカリ条件での抽出を行う必要があることが報告されているが、Burns らの研究ではこの手法は用いられていない(Stevens and Laughlin 1995, Burns et al. 1995a)。そのため、 NO_2^- 濃度の測定値そのものが精確ではない可能性も指摘できる。

また、 NO_2^- の存在量は NO_2^- の生成と消費の結果でしかないが、生成速度と消費速度のそれぞれを制御する環境要因は異なると考えられるために、 NO_2^- 濃度と土壌の性質の間に有力な関係性が見いだせなかったとも考えられる。これまでの研究において NO_2^- の生成・消費速度を報告した例は NH_4^+ や NO_3^- の生成・消費速度の算出に用いるのと同様の計算によって求めた例が 2 例(Burns et al. 1995b, Isobe et al. 2012)、またモデル計算によって求めた例が 3 例(Rutting and Muller 2008, Stange et al. 2013, Muller et al. 2014)存在するのみである。これらの報告によると、 NO_2^- の生成・消費速度は NH_4^+ や NO_3^- 生成・消費速度と比較可能か、あるいはそれよりも大きく、 NO_2^- の変換速度と土壌の性質との関係を検証することで制御要因についてより鋭敏かつ精確に把握できると考えられる。

ところで、これまで述べてきたように、 NO_2^- の動態に関わる研究は農地土壌以外の土壌においてはほとんど行われていない。森林生態系は日本の国土の多くを占める主要な生態系であり、森林の生産性にとって硝化はキープロセスである(1.3)。 NO_2^- は硝化の中間生成物であるが、 NO_2^- は多様な経路で消費されうる物質であり(1.5)、従来考えられてきた硝化、すなわち NH_4^+ から NO_3^- への酸化過程において、これまで考慮してこなかった窒素の維持や放出が生じている可能性が指摘できる。さらに、 NO_2^- の動態

を明らかにすることは、窒素循環を担う微生物の情報との対応についてより精確な議論を可能にすると考えられる(1.4)。また、農地などの他の土壤生態系を含めても、 NO_2^- の動態およびその制御要因に関する知見は重要性に比して限定的であり(1.6, 1.7)、とくに NO_2^- 生成・消費のプロセス解析にとどまらず、土壤生態系中での挙動の実態や制御を明らかにした例はほとんど存在しない。このような現状において、土壤中における NO_2^- 動態がどのような環境要因と関係があるのかを明らかにすることは、土壤の窒素循環に関する理解を格段に深めるはずである。

そこで、本研究では、森林土壤について以下の 3 点を目的とした研究をおこなった。

- (1) NO_2^- 生成・消費速度がさまざまな性質の森林土壤でどのような値を示すのかを明らかにする。
- (2) NO_2^- はさまざまな性質の森林土壤でどのような経路によって消費されるのかを明らかにする。
- (3) NO_2^- 生成・消費速度がどのような環境要因と相関を有するか、すなわち、森林土壤中でどのような要因が NO_2^- 動態を制御しうるのかを明らかにする。

また、上記の目的を達成するために、 NO_2^- 濃度・同位体比測定をさまざまな土壤において行う条件の検討を行った。

第2章 亜硝酸の抽出条件の検討

2.1 緒言

土壌中の亜硝酸(NO_2^-)の動態を明らかにするためには NO_2^- を土壌から適当な手法で回収（抽出）する必要がある。しかし NO_2^- は化学的に不安定な物質であるため、抽出中の土壌懸濁液の pH、抽出時間、土壌と抽出溶液の比率など、多様な条件が NO_2^- の回収率に影響を与えることが指摘されてきた。また、 NO_2^- とアザイドの反応を利用した NO_2^- の濃度・同位体比測定の際には抽出溶液の pH が反応の進行に影響を与えることも指摘されている。そこで本研究ではまず、多様な理化学性をもつ多数の土壌を用いた解析にも適用できるように、土壌からの NO_2^- 抽出法の検討ならびに NO_2^- の濃度・同位体比測定法の検討を行った。

ここでは、まずこれまで用いられてきた土壌中からの無機態窒素(NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^-)の回収法について述べ、次いで多様な土壌から NO_2^- の回収を行ううえでの問題点について述べる。

2.1.1 土壌からの NO_2^- を含む、無機態窒素の回収法

1 章にて述べたように、森林土壌における無機態窒素プールは小さく、その変換速度は大きいために、土壌中の無機態窒素の変換速度の算出はこれまで ^{15}N を用いて行われてきた。具体的には、土壌中に $^{15}\text{NH}_4^+$, $^{15}\text{NO}_3^-$, $^{15}\text{NO}_2^-$ を添加し、短時間あたりの濃度と同位体比($^{15}\text{N}/(^{14}\text{N}+^{15}\text{N})$)変化から無機態窒素の生成と消費の速度を算出することが可能である(Davidson et al. 1992, Burns et al. 1995、詳細は 3.1 に記述)。つまり、 NO_2^-

NO_2^- の生成・消費速度を算出するためには土壌中から NO_2^- を回収し、濃度と同位体比の測定を行う必要がある。

一般的に、土壌から無機態窒素を回収して存在量を測定するためには、塩溶液による土壌の抽出が用いられてきた。Bremner and Keeney (1966) は pH や有機物含量の異なる 8 種類の土壌を用いて、 NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- の抽出法（抽出時間・抽出溶媒の濃度・土壌と抽出溶媒の比率）について検討を行った。抽出時間について NO_2^- や NO_3^- は水や希釈した KCl 溶液を溶媒として、短時間（5-10 分）で抽出可能であった。しかし、 NH_4^+ は乾土：抽出溶媒の比率を 1:10 とし、抽出に用いる KCl 溶液の濃度を 2M、抽出（振とう）時間を 60 分としたときに土壌抽出溶液中の濃度が最大となることを報告した。さらに、乾土：2M KCl の比率が 1:10、振とう時間が 1 時間の条件で、KCl の添加直後に既知濃度の NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- を混合したスタンダード溶液を添加した場合は NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- のすべてについて $\leq 99\%$ の添加 N が回収された。また、スタンダード溶液を土壌に添加した直後に KCl を添加した場合には NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- のそれぞれについて、79.8-97.4%, 99.4-100.6%, 93.0-99.1%の添加 N が回収された。これらのことから、その後土壌中の抽出可能な（exchangeable）無機態窒素の測定を行う際には乾土：2M KCl が 1:10 の比率で 1 時間振とうを行い、その後ろ過をして抽出液を得るという手法が一般的な土壌調査法として採用されてきた(Sperks 1996)。

2.1.2 アルカリ性条件での NO_2^- 回収法とその問題点

Bremner and Keeney (1966) の研究ののち、Stevens and Laughlin (1995) は土壌に ^{15}N ラベル NO_2^- を添加し、その回収率を算出することで抽出処理中の NO_2^- 安定性について検証した。この研究では、有機物含量や pH が異なる（水抽出 pH：5.3-6.6, 有

機態炭素量：33-204 g kg⁻¹, 全窒素量：2.3-9.9 g kg⁻¹) 6 地点の草地土壌について、(A) 土壌と抽出溶媒の比率 (湿土：抽出溶媒=1:10/湿土：抽出溶媒=1:1) と(B)抽出時間 (10 分間/70 分間) について試験した。(A)の試験は、一般に NO₂⁻は環境中に低濃度でしか存在しない(Burns et al. 1995 a)のために、土壌と抽出溶媒の比率を低下させ、NO₂⁻の濃縮を行うための検討である。(B)の抽出時間について、ここでは振とうからろ過までに要する時間を指す。10 分間の抽出は ¹⁵NO₂⁻の添加直後に KCl を添加し、30 秒間手で激しく振とうしたのち遠心・ろ過を行い、70 分間の抽出は 60 分間振とう機で振とうののち、遠心・ろ過を行うことで試験がなされた。その結果、湿土：抽出溶媒=1:10 の場合、¹⁵NO₂⁻の回収率は 10 分間の抽出では 90.1-99.5%であり、70 分間の抽出では 77.2-93.8%であった。湿土：抽出溶媒 = 1:1 の場合には、NO₂⁻の回収率は湿土：抽出溶媒 = 1:10 の場合と比較して低下し、10 分間の抽出で 74.0-93.8%, 70 分間の抽出で 0.7-52.1%であった。湿土：抽出溶媒 = 1:1 の条件では ¹⁵NO₂⁻の損失とともに ¹⁵NO₃⁻が多量に検出され、NO₂⁻の NO₃⁻への酸化が抽出中に生じることが示された。しかし、NO₂⁻+NO₃⁻としての ¹⁵N の回収率は、10 分間の抽出で 85.0-99.4%, 70 分間の抽出で 53.4-87.3%であり、NO₃⁻以外への変換も生じたことが示唆された。さらに著者らは、抽出中の土壌懸濁液の pH を調整することで ¹⁵NO₂⁻の損失を低下させ、回収率を高めることが可能であることを示した。実際に、pH や有機物含量の条件が異なる 20 の草地土壌について、湿土：抽出溶媒 = 1:1, pH8, 10 分間の抽出で添加 ¹⁵NO₂⁻の回収率を求めたところ、回収率は 89.0-103.3%であった。著者らは最終的に、95%以上の NO₂⁻回収率を得るためには抽出中の土壌懸濁液を pH8 に調整し、抽出作業に要する時間を 40 分以内にし、土壌懸濁液を孔径 0.7 μm フィルターでろ過したのち、4℃で保存した抽出液を 2 日以内に測定する必要があると結論づけた(Stevens and Laughlin 1995)

この研究以降、近年の NO_2^- 動態解析研究では土壌と抽出溶媒の比率を通常よりも低下させ、抽出中の pH 条件を 8 程度に調整して NO_2^- の抽出が行われてきた (Laughlin and Stevens 2002, Muller et al. 2006, Isobe et al. 2012, Muller et al. 2014)。ただし、このときの土壌と抽出溶媒の比率は必ずしも Stevens and Laughlin (1995) に記述されている 1:1 の比率ではなく、抽出に用いる KCl の濃度が 3M である場合もある。また、一部の研究ではアルカリ性に調整を行わない 1M KCl で湿土 : KCl = 1:5 として抽出が行われている (Stange et al. 2007, Russow et al. 2009)。このように、 NO_2^- の抽出に用いられてきた手法は統一的ではない。

さらに、Stevens and Laughlin (1995) で用いられた手法を多数の土壌における NO_2^- 動態の比較に適用するには、以下に示す(1)–(3)の問題点が存在する。

(1) 通常 NH_4^+ や NO_3^- の測定のための抽出溶液は、pH を調整しない 2M KCl 溶液で 1 時間振とうして得られるために、他の研究によってえられた NH_4^+ や NO_3^- のデータや動態研究との比較が困難である。また、溶存有機態炭素・窒素などの他の化学成分に関しても比較が困難である。

(2) アルカリ条件において、($\text{NH}_3 + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+$; $\text{pK}_a=9.25$) の平衡に基づいて、 NH_4^+ は NH_3 として揮発するため、アルカリ条件の抽出では同一の抽出溶液から NH_4^+ の精確な測定値を得ることができない。そのため、 NH_4^+ の同位体比や濃度の測定を行う場合、一般的なアルカリ性に調整しない抽出法によっても抽出を行う必要がある。

(3) 多数のサンプルにおいて抽出時の pH 条件を一律に設定することは非常に困難である。なぜならば、ある pH の KCl を添加したとき、土壌そのものの pH や pH 緩衝能はそれぞれ異なるため、土壌との相互作用の結果達成される抽出中の pH 条件は土壌の種類や性質によって大きく変動するためである。

このように、pH 調整や抽出時間の制限に伴う作業の煩雑さのため、 NO_2^- の動態に関する研究例は非常に限られており、さらに、上記(1)–(3)に示した問題のために、多くの土壌で比較を行う必要のある NO_2^- の生態学的な研究は、これまでまったく行われていない。

2.1.3 土壌抽出溶液の NO_2^- を含む無機態窒素濃度・同位体比測定法

これまで、土壌中の NH_4^+ や NO_3^- の動態の研究は数多く行われてきたが、 NO_2^- の動態解析は主にアイルランドとドイツの2つのチームに限定して行われてきた。これらの NO_2^- 動態研究において、抽出液中の NO_2^- 濃度はフローインジェクション法 (Burns et al. 1995a, Burns et al. 1995b, Smith et al. 1997) や比色法 (Stevens and Laughlin 1995, Venterea 2004, Clough et al. 2001, Laughlin and Stevens 2002, Venterea and Rolstone 2000, Muller et al. 2006, Muller et al. 2012) によって行われてきた。また、 NO_2^- の同位体比の測定は HNO_2 と NH_2OH の反応により NO_2^- を N_2O への変換し (Stevens and Laughlin 1994)、 N_2O を同位体比質量分析計 (Isotope Ratio Mass Spectrometry ; IRMS) で測定することによって行われてきた (Burns et al. 1995b, Stevens and Laughlin 1995, Burns et al. 1996, Smith et al. 1997, Clough et al. 2001, Laughlin and Stevens 2002, Muller et al. 2006, Muller et al. 2012)。同位体比測定に IRMS を用いる方法では1日に100サンプル程度のサンプルの前処理が可能であり、オートサンプラーを用いた場合、24時間で100サンプル程度の分析も可能である。しかし、IRMSは低濃度の ^{15}N を精度良く分析するために設計されているために、高濃度の ^{15}N の測定には適していない。土壌中の無機態窒素変換速度の算出は添加した ^{15}N が土壌中に十分残存している期間に測定を行う必要がある。そのため ^{15}N は培養期間中に残

存する十分量を添加する必要がある。しかし、土壌中の無機態窒素濃度は一般に低く、特に NO_2^- 濃度はきわめて低レベルであることから、添加によるかく乱を最小限にとどめるためには、添加する無機態窒素の同位体比を極力濃くし、添加量を少なくすることが望ましい。高濃度の ^{15}N を添加して培養する場合には、試料溶液中の ^{15}N は環境試料と比較して～ 300 倍程度の高濃度になる(^{15}N の安定同位体自然存在比は 0.366 atom% であり、高濃度の ^{15}N 試薬は 100 atom% 近いものを用いる)。そのため、IRMS での測定では ^{15}N が飽和して測定が行えない場合がある。また、IRMS 法では濃度の定量が困難であるため、濃度を別の手法で求める必要がある。上述したように、濃度の測定は一般に比色法によって行われるが、土壌をアルカリ抽出した場合は腐植が抽出されることにより強度の着色がみられることがあり、比色法での濃度測定が困難な場合がある。さらに、IRMS は高価な分析機器であり、容易に維持管理できる分析機器ではない。また、短時間に多数のサンプルを処理するためには分析の自動化が必要となるが、これには多額の費用を要する。

ドイツの研究チームは近年、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 NO_2^- の濃度と同位体比分析を特殊なガス変換ユニットを接続した四重極型マスペクトロメーター(Quadrupole Mass Spectrometer; QMS)によって行う手法を開発し(SPINMAS 法: Stange . 2007)、これを用いて NO_2^- の動態解析を行った(Russow et al. 2009, Stange et al. 2013)。この手法では、前処理を行うユニットにおいて、 NH_4^+ は NaOH 溶液中で NaOBr を用いて N_2 へと酸化、 NO_3^- は HCl 溶液中で V(III)Cl_3 を用いて NO へと還元、 NO_2^- は H_3PO_4 溶液中で KI により NO へと還元し、これらの無機態窒素種をオンラインで自動分析することが可能である。この手法では、微量の NO_2^- の濃度・同位体比測定が可能であり(必要な窒素量: $0.03 \mu\text{g-N}$)、手動での前処理を必要とせず、1 日に 100 サンプル程度の測定が

可能である。しかし、測定ではガス態への変換を行う特殊なユニットを自作して QMS の前に接続しており、ガス態への変換反応はそれぞれ温度の調整が必要であること (NH_4^+ :60°C, NO_3^- :85°C, NO_2^- : 50°C)、発生したガスを分離せず直接 QMS へと導入するため事前に H_2O と CO_2 をクライオトラップで除去する必要があるなど、技術的に困難な点が多く存在する。実際、現在までにこの手法は発表を行ったドイツのラボ以外では用いられておらず、汎用性に乏しい。

われわれの研究室ではこれまでに、これら既存の無機態窒素濃度・同位体比測定法のいくつかの問題点について解決が可能な手法が開発されている。この方法では、 NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- のそれぞれについて、生物的・化学的に N_2O へと変換する前処理を行い、これを GCQMS で分析することによって NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- 濃度・同位体比の測定を行う (Isobe et al. 2011)。たとえば NO_2^- の濃度・同位体比測定を行う場合は、事前に NO_2^- を化学的に N_2O へと変換する前処理が必要であるが、特殊な機器の改変を伴わず、ガスの測定にはヘッドスペース法を用いるため、測定操作はドイツのチームと比較して格段にシンプルである。また、1 日に 100 サンプル以上の測定を行うことが可能であり、濃度と同位体比のダイナミックレンジが広い ($\sim 1000 \mu\text{M}$, 0.37–99.3%, Isobe et al. 2011) ため、IRMS 法では不可能な低濃度から高濃度までの多様なサンプルについて濃度と ^{15}N 比の同時測定を行うことが可能である。

このように、 NO_2^- を含む、無機態窒素の濃度・同位体比の測定を従来法と比較しても簡便・迅速に行うことが可能な環境がすでに確立されている。しかし、2.1.2 にて述べたように、近年主に NO_2^- の抽出に用いられてきた手法では、多数の性質が異なるサンプルから NO_2^- を含む、無機態窒素を同時に回収することが困難である。また、その困難さは、(1) 土壌と抽出溶媒の比率を通常の抽出法よりも顕著に低下させていること、

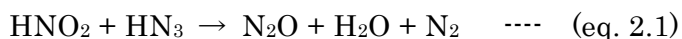
または、(2)土壌からの NO_2^- の回収にアルカリ性に調整した抽出溶媒を用いていること、に起因する。

そこで、本研究においてはまず、(1')土壌と抽出溶媒の比率が 1:10 の条件で抽出を行い、その場合に(2')抽出時の pH 条件に対して NO_2^- 濃度・同位体比測定値がどのように影響を受けるかを試験した。そのためには、さまざまな pH の KCl で抽出した NO_2^- 濃度・同位体比を精確に測定することが必要になる。しかし、2.1.4 にて詳しく述べるように、本研究で用いる NO_2^- を N_2O へと変換する化学反応（以下アザイド法）は、アルカリ抽出を行った土壌抽出溶液の測定に適用できない可能性があった。そこで、アザイド法の適用について検討したうえで、この手法を用いて(2')の検討を行った。

2.1.4 本研究で用いる NO_2^- 濃度定量法(アザイド法)の概要

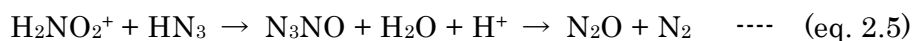
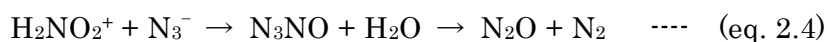
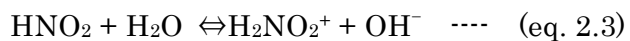
アザイド法は NO_2^- を化学的に N_2O へと還元し、この N_2O を分析することによって、 NO_2^- の窒素・酸素安定同位体自然存在比を求める手法として開発された (McIlvin and Altabet 2005)。この手法を GCMS での N_2O 測定と組み合わせることで、トレーサーレベルの「濃い ^{15}N 比」をもった NO_2^- についての測定が可能であることが示されている (Isobe et al. 2011)。

この手法において NO_2^- の N_2O への還元は HNO_2 とアジ化水素の酸化還元によって生じる (eq. 2.1)

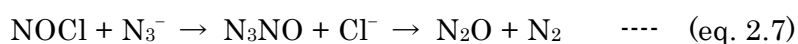
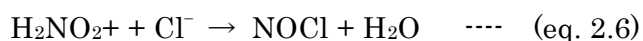


NO_2^- とアジ化水素の反応は以下のように進むと考えられており、中心的な役割をなす

のは HNO_2 から生成する H_2NO_2^+ である (eq. 2.4, 2.5)。



Cl^- の存在下では、以下のメカニズムに基づく触媒作用によりこの変換は促進されと
考えられている。



したがって、この反応速度は、 pH 、 HNO_2 濃度、 Cl^- 濃度に依存している (eq 2.2–2.7)。

アザイド法はもともと淡水または海水中の NO_3^- および NO_2^- の安定同位体自然存在比解析の手法としてデザインされたため、サンプルの液性はほぼ中性であることを前提としている。本研究ではサンプルが強アルカリ性である場合があるため、反応時の pH が低下することで NO_2^- の N_2O への変換を不完全になる可能性がある。また、仮に試料溶液の高い pH が N_2O への変換過程に影響を及ぼす場合、反応試薬中の酢酸またはアジ化水素濃度を上昇させ、 HNO_2 濃度を上昇させることによって改善できる可能性が考えられる。 Cl^- 濃度については扱う試料が 2M という高濃度の KCl 溶液であり、オリジナルの手法においては Cl^- 濃度が 0.6M 程度である (McIlvin and Altabet 2005) ので、律速要因にはならないと考えた。

また、アザイド法は HNO_2 と HN_3 との反応に基づく(eq. 2.1)が、 HNO_2 は化学的な反応性が高く、有機物との反応(ニトロソ化)によって有機態窒素へと変換されうることや、それと同時にガス態窒素(NO , N_2O , N_2)が生成することが指摘されている(Thorn and Mikita 2001, Stevenson et al. 1970)。土壌抽出溶液中には、多様な無機イオン、有機態炭素・窒素が含まれ、特にアルカリ抽出を行った土壌抽出液中にはアルカリ可溶成分である腐植酸やフルボ酸などの有機物が多量に含まれていると考えられる。したがって、これらの共存物質がアザイド反応に影響を及ぼす可能性が考えられた。

そこで、アザイド法において、試料溶液 pH が NO_2^- の N_2O への変換におよぼす影響を、(1)試料溶液の pH、(2)反応試薬量、(3)マトリックス効果、の面から検証することを行った。(1)については pH 条件の異なる NO_2^- 標準溶液の測定値から強アルカリ性の試料における N_2O への変換効率を検証した。(2)については、 HN_3 溶液の最終濃度が既存の手法(2.2.1(1))の 1~3 倍になるように HN_3 溶液を添加し、試薬濃度が NO_2^- の N_2O への変換効率に与える影響を検討した。(3)については、標準溶液と土壌抽出液について 20%酢酸溶液添加に対する pH の変動を比較し、反応時の pH 条件に違いが生じるかどうかを検証した。また、アルカリ抽出を行った土壌抽出液中に微量の $^{15}\text{NO}_2^-$ を添加し、アザイド法による NO_2^- の N_2O への変換率が抽出液と KCl 標準溶液で異なるか、また、この変換効率が抽出溶液の pH 条件に影響を受けるかどうかを検証した。そののちに、アザイド法を用いて抽出時の pH 条件に対して NO_2^- 濃度・同位体比測定値がどのように影響を受けるかを試験した。

2.2 方法

2.2.1. アザイド法による NO_2^- の N_2O への変換

アザイド法は以下の手順に基づいて行った。(McIlvin and Altabet 2005, Isobe et al. 2011) 作業の過程で発生する HN_3 は毒性を有するので、以下の作業はすべてドラフト内で行った。

(1) HN_3 溶液の作成

ガラスバイアルに 2M NaN_3 溶液を採取し、ブチルゴム栓とアルミシールで密栓した後、バイアルの気相にニードルを刺した状態で NaN_3 溶液と等量の 20%(v/v)酢酸溶液をシリンジで添加した。この溶液の液相にニードルを用いて He を 30 分以上通気し、溶液中にもともと存在する N_2O を除去した。

(2) サンプル中の NO_2^- と HN_3 の反応

NO_2^- の標準溶液またはサンプル 5 mL を 10 mL ガラスバイアルに分注し、ブチルゴム栓とアルミシールで密栓した。ここに(1)で作製した 0.3 mL の HN_3 溶液を 1 mL シリンジで添加し、穏やかに混合したのち、12 時間ドラフトに静置して NO_2^- を N_2O に還元した。

(3) 反応の停止

反応を停止させ、有毒な HN_3 の放出を防ぐため、6M NaOH を 0.3 mL 添加した。

(4) N_2O の測定

アザイド法により N_2O へと変換し、GCMS (GCMS-QP2010 ultra, SHIMADZU)によって生成した N_2O に由来するシグナル(m/z 44, 45, 46)の面積値を比較した。

2.2.2 アザイド変換効率と試料溶液 pH の関係の検証

pH12.8 に調整した2M KCl と pH を調整していない2M KCl (pH5.2)を溶媒として NO_2^- 濃度が 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50 μM のスタンダードを作成した。これを 2.2.1 の方法にしたがって、 N_2O へと変換して定量を行った。

2.2.3 アザイド変換効率と試薬濃度の関係の検証

2M KOHを用いてpHを12.8, 12.6, 9.0に調整したKClを溶媒として NO_2^- 濃度標準溶液を作製した。これを 2.2.1.1 の方法にしたがって、アザイド法により N_2O へと変換した。この際、pH12.8については HNO_2 溶液の最終濃度が 2.2.1.1、(1) に記載の方法の1 倍、2 倍、pH12.6 と pH9.0 については1 倍、2 倍、3 倍になるように HN_3 溶液を添加し、20%酢酸および HNO_2 濃度が NO_2^- の N_2O への変換効率に与える影響を検討した。

2.2.4 アザイド法におけるマトリックス効果の検証

2.2.4.1 pH 変化におけるマトリックス効果

試料には京都大学フィールド科学教育研究センター芦生研究林(以下、芦生研究林)にて採取した表層土壌をもちいた。土壌は天然広葉樹林の斜面の異なる 2 地点から、有機物層と 0-10 cm 土壌を採取した。これらの湿土 2.5g に 2M KOH 溶液で pH を 12.78 に調整した 2M KCl 25mL を添加し、振とう器(TAITEC NR-10)にて 200 min^{-1} で 10 分間浸とうしたのち、3,000G で 5 分間遠心分離(KUBOTA # 4000)し、上澄みを即座にガラス繊維ろ紙(GF/F ; Whatman Int. Ltd., Maidstone, UK)でろ過をして抽出液を得た。抽出液は測定まで 4°C で保存した。なお、土壌抽出に用いる KCl とガラス繊維ろ紙は、ブランクを低下させるために、 450°C で 4 時間加熱したものをを用いた。ここで得た

土壌抽出液、2M KOH によって pH を 9.5–12.8 に調整した 2M KCl 溶液、HCl によって pH を 2.46–3.93 に調整した 2M KCl 溶液に 20%(v/v) 酢酸を添加し、pH の変化を比較した。添加する 20%(v/v) 酢酸濃度は段階的に設定し、最大でアザイド反応 (2.2.1.1 に記載) で用いるのと同じの濃度まで添加を行った。pH は pH メーター(twin pH AS-212)で測定した。

2.2.4.2 NO₂⁻変換効率におけるマトリックス効果

試料には 2.2.3.1 と同様に芦生研究林で採取した有機物層と 0–10 cm 土壌を用いた。生土 3.5 g に 2M KOH で pH を 11.92, 12.45, 12.85 に調整した 2M KCl 35mL を添加し、10 分間振とう (200 min⁻¹) の後、遠心分離 (3,000 G, 7 分) し、ガラス繊維濾紙でろ過をし、4°C で保存した。この土壌抽出溶液に、添加 ¹⁵NO₂⁻ の最終濃度が 1, 2, 5, 10, 50 μM になるように Na¹⁵NO₂⁻ 溶液を添加した。これを 2.2.1.1 の手順に基づきアザイド法で処理し、生成した N₂O を GCMS によって分析した。

抽出 pH が現場土壌中の (添加していない) NO₂⁻ 回収効率に与える影響を除外するため、濃度と同位体比の解析は、標準添加を行ったサンプル (¹⁵NO₂⁻ 濃度 : 2, 5, 10, 50 μM) の N₂O のシグナル (m/z 44, 45, 46 の面積値の合計) から標準添加を行っていないサンプル (¹⁵NO₂⁻ 濃度 : 0 μM) の N₂O のシグナルを差し引いて行った。

2.2.5 土壌抽出処理中における NO₂⁻ の安定性の検討

2.2.5.1 土壌の抽出条件の検討 ; 土壌中に存在する低濃度 NO₂⁻ の測定

2.2.5.1.1 試料

東京都八王子市に位置する、東京農工大学農学部附属広域都市圏フィールドサイエン

ス教育研究センターFM 多摩丘陵（以下 FM 多摩）にて 2 地点から、0-10 cm, 10-20 cm 土壌を採取した。また、芦生研究林にて 2 地点から有機物層と 0-10 cm 土壌を採取した。

2.2.4.1.2 土壌抽出と NO_2^- 濃度の測定

FM 多摩丘陵にて採取した土壌に関しては、土壌抽出液の pH が 8 前後になるように土壌の緩衝能を考慮して、抽出に用いる KCl 溶液の pH を設定した。1 日間 25°C で培養した生土 2.5 g に 2M KOH を用いて pH を 11.5, 11.6, 11.7, 11.8, 11.9, 12.0 に調整した 2M KCl 25 mL を添加し、振とうののち、遠心分離(3,000 G, 7 分)し、すぐにガラス繊維濾紙でろ過をして、測定まで 4°C で保存した。振とうは、30 秒間手で混合しすぐに遠心分離を行った。芦生研究林で採取した土壌に関しては、1 日間 25°C で培養した生土 3.5 g に 2M KOH で pH を 11.92, 12.45, 12.85 に調整した 2M KCl 35mL を添加し、10 分間振とう(200 min^{-1})の後、遠心分離(3,000 G, 7 分)し、ガラス繊維濾紙でろ過をして、測定まで 4°C で保存した。 NO_2^- 濃度測定はアザイド法による N_2O への変換と N_2O の GCMS での測定によって行った(2.2.1.1)。土壌抽出中の pH 測定は試料の汚染につながることで、また、抽出時間に応じた平衡の変化により pH が変化してしまうことから行わず、ここでは抽出溶液の pH を土壌抽出中の pH の指標として測定した。

2.2.4.2 土壌の抽出条件の検討； $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加条件下での高濃度 NO_2^- の測定

2.2.4.2.1 試料

FM 多摩丘陵にて採取した 0-10cm 鈹質土壌を用いた。土壌は採取後、4 mm のふるいを通し、抽出まで 4°C で保存した。

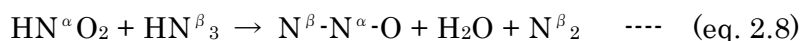
2.2.4.2.2 土壌抽出

土壌抽出液の pH が 8 前後になるように土壌の緩衝能を考慮して、抽出に用いる KCl 溶液の pH を設定した。2M KOH を用いて pH を 11.5, 11.6, 11.7, 11.8, 11.9, 12.0 に調整した 2M KCl を作成し、そこに 2.5 mM Na¹⁵NO₂ (99 atom%) 溶液 1 mL を添加した (¹⁵NO₂⁻ 終濃度 : 96 μM)。これを 50 mL プラスチックチューブに分取して 1 日間 25 °C で培養した生土 2.5g に添加し、振とうののち、遠心分離(3,000 G, 7 分)し、すぐにガラス繊維濾紙でろ過をして、測定まで 4°C で保存した。振とうは、30 秒間手で混合しすぐに遠心分離を行う場合と、10 分間振とう器で振とう(200min⁻¹)する場合との 2 つの方法で行った。えられた抽出液はアザイド法により測定を行い、抽出液中の ¹⁵NO₂⁻ 濃度と NO₂⁻ の同位体比、添加 ¹⁵ NO₂⁻ の回収率を算出した。土壌抽出中の pH 測定は試料の汚染につながることで、また、抽出時間に応じた平衡の変化により pH が変化してしまうことから行わず、ここでは抽出溶液の pH を土壌抽出中の pH の指標として測定した。

2.2.4.3 NO₂⁻同位体比の算出

NO₂⁻同位体比は以下の方法で算出した。

アザイド反応(eq. 2.1)により生成する N₂O の 2 分子の N のうち、一分子は NO₂⁻ の N に、もう一分子は HN₃ の N に由来する。N₂O は N-N-O という非対称な分子構造を有するが、この反応で生成する N₂O の末端の N は HN₃ に、中心の N は NO₂⁻ に由来する。これを式で表すと以下のようなになる。



N₂O における、窒素と酸素の同位体の組み合わせは以下のように表すことができる。

$$^{44}I = ^{14}\text{N } ^{14}\text{N } ^{16}\text{O}$$

$$^{45}I = ^{15}\text{N } ^{14}\text{N } ^{16}\text{O} + ^{14}\text{N } ^{15}\text{N } ^{16}\text{O} + ^{14}\text{N } ^{14}\text{N } ^{17}\text{O}$$

$$^{46}I = ^{15}\text{N } ^{15}\text{N } ^{16}\text{O} + ^{14}\text{N } ^{15}\text{N } ^{17}\text{O} + ^{15}\text{N } ^{14}\text{N } ^{17}\text{O} + ^{14}\text{N } ^{14}\text{N } ^{18}\text{O}$$

I はマスマスペクトロメトリーで測定された際のシグナル強度を示し、それぞれの m/z におけるピークのエリア面積によって表される。

ここで、N₂O の末端の N(N^β-N^α-O における N^β) における ¹⁵N の存在確率を P_β、N₂O の中心の N(N^β-N^α-O における N^α) における ¹⁵N の存在確率を P_α、とする。また、酸素原子中の ¹⁶O の存在確率を P₁₆₀、¹⁷O の存在確率を P₁₇₀ とおく。

このとき、全 N₂O 分子中の分子量 M=44, M=45 の存在確率 P⁴⁴、P⁴⁵ は、以下のように表すことができる。

$$^{44}P = (1-P_{\alpha}) \times (1-P_{\beta}) \times P_{160} \quad \text{---- (eq. 2.9)}$$

$$^{45}P = P_{\alpha} \times (1-P_{\beta}) \times P_{160} + (1-P_{\alpha}) \times P_{\beta} \times P_{160} + (1-P_{\alpha}) \times (1-P_{\beta}) \times P_{170} \quad \text{---- (eq. 2.10)}$$

eq. 2.8 より、N₂O の中心の N は HN₃ 由来なので、P_β は ¹⁵N の安定同位体自然存在に、P₁₆₀、P₁₇₀ はそれぞれ ¹⁶O と ¹⁷O の安定同位体自然存在比に相当し、これは定数として与えられる。(P_β = 0.00366 , P₁₆₀ = 0.99757, P₁₇₀ = 0.00038)

ここで、P₁₇₀ は非常に小さいので簡略化のために eq. 2.10 においてこの項を省く。

$$^{45}P = P_{\alpha} \times (1-P_{\beta}) \times P_{160} + (1-P_{\alpha}) \times P_{\beta} \times P_{160} \quad \text{---- (eq. 2.10 ')}$$

eq. 2.9 と eq. 2. 10 ' を用いると、

$$^{45}I / (^{44}I + ^{45}I) = ^{45}P / (^{44}P + ^{45}P)$$

$$= \{P_{\alpha} \times (1-P_{\beta}) + (1-P_{\alpha}) \times P_{\beta}\} / \{(1-P_{\alpha}) \times (1-P_{\beta}) + P_{\alpha} \times (1-P_{\beta}) + (1-P_{\alpha}) \times P_{\beta}\}$$

$$= (P_{\alpha} + P_{\beta} - 2 \times P_{\alpha} \times P_{\beta}) / (1 - P_{\alpha} \times P_{\beta})$$

したがって、NO₂⁻の同位体比は以下のように表せ、m/z 44, 45 の面積値と ¹⁵N の安定同位体自然存在比から算出した。(eq. 2.11)

$$\text{atom\% of NO}_2^- = P_{\alpha}$$

$$= 100 \times \{^{45}\text{I} / (^{44}\text{I} + ^{45}\text{I}) - P_{\beta}\} / \{1 - 2 \times P_{\beta} + ^{45}\text{I} / (^{44}\text{I} + ^{45}\text{I}) \times P_{\beta}\} \quad \text{---- (eq. 2.11)}$$

2.3 結果と考察

2.3.1 アザイド変換効率と試料溶液 pH の関係

pH12.8 に調整した 2M KCl と pH を調整していない 2M KCl (pH5.2) を溶媒として作成した NO₂⁻ 濃度スタンダードをアザイド法によって N₂O へと変換し、GCMS で測定を行った結果を Fig 2.1 に示した。どちらの pH 条件においても、濃度が 0-50 μM の範囲において、NO₂⁻ 濃度と N₂O のシグナル(m/z 44)は直線性を示し、回帰直線は pH12.8 において y=38649x-5470, pH5.2 において y=39050x-5438 であった ($R^2 \geq 0.999$, n=3)。両者の回帰直線の傾きはよく一致し、傾きから pH12.8 の試料における NO₂⁻ の N₂O への変換率は pH5.2 の場合の 0.99 倍であった。したがって、アザイド反応は pH12.8 までの範囲で試料溶液の pH には影響されず、NO₂⁻ 濃度の測定に用いることが可能であると考えられた。

2.3.2 アザイド変換効率と試薬濃度の関係

NO₂⁻ の還元を用いる HN₃ 溶液濃度を 2.2.1 (1) に記載の方法の 1-3 倍の条件で比較

した結果を Fig 2.2 に示した。pH が 12.8, 12.6, 9.0 のそれぞれの条件において、アザイド反応中の HN_3 溶液濃度が 2 倍、3 倍の条件では 1 倍の条件よりも回帰直線の傾きは変わらないか、もしくは低下した。 N_2O への変換率は検量線の傾きから、1 倍の条件と比較して、pH12.8 で試薬濃度 2 倍の場合は 0.88 倍、pH12.6 で試薬濃度 3 倍の場合は 0.88 倍、pH9.0 で試薬濃度 3 倍の場合は 0.92 倍であった。したがって、 HN_3 溶液濃度の増加によって、変換率はむしろ低下するため、2.2.1 (1)の濃度条件で反応を行うのが適当であると考えられた。

2.3.3 アザイド法におけるマトリックス効果

2.3.3.1 pH 変化におけるマトリックス効果

アルカリ抽出を行った土壌抽出液と、アルカリ性・または酸性に調整した 2M KCl 溶液に 20%(v/v) 酢酸を段階的な濃度で添加し、溶液 pH を測定した結果を Fig 2.3 に示した。土壌抽出液とアルカリ性の 2M KCl 溶液において、酢酸添加量の増加とともに溶液 pH は低下し、最終的にすべて $\text{pH}<5$ まで低下した。アザイド反応において、反応全体(eq. 2.1)の反応速度は $\text{pH}>5$ で顕著に低下することが示されている(Mellvin and Altabet 2005)。2.3.1 にて示されたように、pH12.8 の条件でもアザイド反応の効率は減少しなかったが、一部のアルカリ KCl の pH は最終段階で pH5 の上限に近接していた。一部の抽出サンプルは、KCl スタンダードと比較して等量の酢酸添加に対して pH が低下しづらかった(Fig 2.3 : O2 と pH9.5, M6 と pH12)。しかし、抽出液の初期 pH と、アザイド法と等量の酢酸添加後の最終的な pH との変化量は、土壌抽出液とアルカリ性・酸性の KCl スタンダードでほぼ差がみられなかった(Fig 2.4)。このことから、サンプルにおいてもアザイド反応中の pH 条件は、試料溶液の初期 pH 条件に依存して

決定されたと考えられた。したがって、土壌抽出液中の土壌由来成分がアザイド反応中の pH 条件におよぼす相互作用は無視できると考えられた。

2.3.3.2 NO₂⁻変換効率におけるマトリックス効果

pH 条件の異なる土壌抽出液に既知濃度の ¹⁵NO₂⁻を添加し、12 時間、4 °Cで保存したのちにアザイド法により NO₂⁻を N₂O へと変換し、定量した結果を Fig 2.5 に示した。

添加 ¹⁵NO₂⁻濃度が 1μM の低濃度条件であっても、pH が 3.57–12.17 の広い範囲で N₂O 変換量は安定しており、NO₂⁻標準溶液との差異も認められなかった。このことから、NO₂⁻が低濃度にしか存在しない条件においても、アザイド反応における土壌抽出溶液中の共存物質との反応は考慮しなくてよいことが示された。

2.3.4 土壌抽出処理中における NO₂⁻の安定性

2.3.4.1 土壌の抽出条件の検討；土壌中に存在する低濃度 NO₂⁻の測定

FM 多摩丘陵の土壌において、抽出液の pH は 6.22–9.33 の範囲に分布し、pH の上昇とともに NO₂⁻濃度も上昇する傾向がみられた(Fig 2.6 (a))。また、芦生研究林の土壌において、抽出液の pH は有機物層で 3.57–11.62、0–10cm 土壌で 4.67–12.17 に分布し、抽出液 pH の上昇とともに、NO₂⁻濃度が上昇した(Fig 2.6 (b))。また、どの土壌においても、抽出液 pH が 5–6 を下回る条件では NO₂⁻濃度はブランクの値を下回り、検出ができなかった。どちらのサイトにおいても、同一の土壌を pH が異なる KCl で抽出した場合、pH の上昇に従って NO₂⁻濃度が上昇することから、アルカリ性に調整した KCl 溶液で抽出することにより、(A)抽出中の(土壌けん濁液中の)NO₂⁻の保存性が高まる可能性が考えられた。しかし、それとは異なる可能性として、(B)もともと NO₂⁻

以外の形態として存在している窒素化合物から、アルカリ抽出中に NO_2^- が生成する可能性も指摘できる。また、(C) 土壌抽出溶液の保存中における NO_2^- の安定性が pH に依存する可能性も考えられた。しかし、抽出溶液に微量の $^{15}\text{NO}_2^-$ の添加を行った結果 (2.3.3.2) から、短期の保存であれば低濃度の NO_2^- 測定に土壌溶液の pH が及ぼす影響は見られず、pH に伴った NO_2^- 濃度の上昇は、(A) または (B) によることが示唆された。

2.3.4.2 $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加条件下での高濃度 NO_2^- の測定

土壌抽出液の pH と $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度の関係を Fig 2.7 (a) に、土壌抽出液の pH と NO_2^- の atom% ($^{15}\text{NO}_2^- / ^{14+15}\text{NO}_2^-$) の関係を Fig 2.7 (b) に、土壌抽出液の pH と ^{15}N 回収率の関係を Fig 2.7 (c) に、示した。

まず、 $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度と ^{15}N 回収率は抽出液 pH に依存した一定の傾向を示さなかった (Fig 2.7 (a), (c))。このことから、すくなくとも、 $5.5 < \text{pH} < 9$ の範囲においては、土壌懸濁液中の NO_2^- の安定性は pH の影響を受けないと考えられた。しかし、一方で NO_2^- の atom% つまり全 NO_2^- に対する $^{15}\text{NO}_2^-$ の比率は抽出液 pH の上昇とともに低下した (Fig 2.7 (b))。これは、抽出時の pH 条件の上昇とともに、(A') 土壌中にもともと存在する低濃度の NO_2^- の抽出効率(安定性)の増加、(B') ラベルされていない基質からの $^{14}\text{NO}_2^-$ の生成による希釈、または、(C') ラベルされていない $^{14}\text{NO}_2^-$ と添加した $^{15}\text{NO}_2^-$ の交換反応、が生じたと考えられた。

土壌中にもともと存在する低濃度 NO_2^- の測定結果 (2.3.4.1) においても、(A') または (B') の可能性が示唆されている。 $^{15}\text{NO}_2^-$ を添加条件下で、最も低い pH 条件 (pH 11.5) で抽出を行ったときの NO_2^- 濃度は約 $76\mu\text{M}$ であり、このときの NO_2^- の同位体比 ($^{15}\text{NO}_2^- / ^{14+15}\text{NO}_2^-$) は 98.5 atom% であった (Fig 2.7)。また、環境中の低濃度 NO_2^- の抽出実験に

において、この土壌と同じ土壌における、抽出液 pH の変化に伴った土壌中からの NO_2^- 抽出濃度の変化量は約 $0.65 \mu\text{M}$ であった(2.3.4.1, Fig 2.6 (a) ; 0-10cm B)。これと同等の土壌由来 NO_2^- が抽出液 pH の上昇に伴って供給されたとした場合、 $^{15}\text{NO}_2^-$ を添加した条件で観測される同位体比は pH12.0 の KCl で抽出を行ったとき、

$$(98.5/100 \times 76) / (76 + 0.65) \times 100 = \underline{97.7 \text{ atom\%}}$$

と予想され、実際に観測された同位体比(98.0atom% ; pH12.0, Fig 2.7 (b))とほぼ同程度の値が得られた。したがって、ここでみられた抽出時の pH に依存した同位体比の希釈は、高 pH における土壌中の NO_2^- の抽出効率の上昇(2.3.4.1)と整合的に説明され、(A') または(B')の単独の効果によって説明されうる。

30 秒間と 10 分間の抽出条件の比較においては、 $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度、 NO_2^- の atom%、 ^{15}N 回収率のいずれに関しても違いがみられなかった。土壌の抽出に用いた $^{15}\text{NO}_2^-$ を含む pH11.5~12.0 の 2M KCl のみをプラスチックチューブに入れて土壌が共存しない条件で 10 分間振とう・遠心・ろ過した場合でも、 ^{15}N 回収率は 96%程度であった(Fig 2.7 (c); STD(no soil))。このことから、振とうからろ過までの一連の抽出操作そのもので、アルカリ KCl 中であっても一部の NO_2^- が損失するが、その割合は小さいと考えられた。

2.4 結論

pH が 12.7 に達するような強アルカリ性の試料であっても、アザイド法での NO_2^- の定量が可能であることが認められた(2.3.1-2.3.3)。土壌由来の低濃度 NO_2^- の抽出においては、pH の上昇とともに抽出液中 NO_2^- 濃度は上昇し、(1)抽出時の pH 上昇に伴って NO_2^- の安定性が上昇する、もしくは、(2)抽出時の pH 上昇に伴って NO_2^- 以外の窒素化合物からの NO_2^- 生成が促進される可能性があった(2.3.4.1)。アルカリ抽出においてみ

られる土壌由来の NO_2^- 濃度の上昇がこのいずれのメカニズムによるものか、現段階で結論づけることは出来ない。しかし、抽出液 $\text{pH} < 6$ の範囲では複数の有機物層・鉱質土層のすべてにおいて NO_2^- が検出できないことから、まずはアルカリ抽出によって土壌由来の NO_2^- を回収し、そのようにして得られた土壌由来の NO_2^- が NO_2^- の変換速度とどのような関係にあるのかについて 5 章で議論した。

一方で、 NO_2^- を添加した条件では、抽出中の NO_2^- 安定性は、すくなくとも土壌抽出液が $5.5 < \text{pH} < 9$ の範囲で pH の影響を受けなかった(2.3.4.2)。このことから、Stevensらの添加 NO_2^- の安定性が pH に対して敏感に応答しないのであれば、アルカリ性に調整しない KCl によって抽出を行うことは、同一のサンプルにおいて $\text{NH}_4^+ \text{NO}_3^-$ についても測定を行える点、これまでの既存研究との比較を可能にする点から有益である。実際に土壌への $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加培養による土壌中の NO_2^- 動態の把握において、抽出 KCl の pH がおよぼす影響については、3 章でさらに検討を行った。

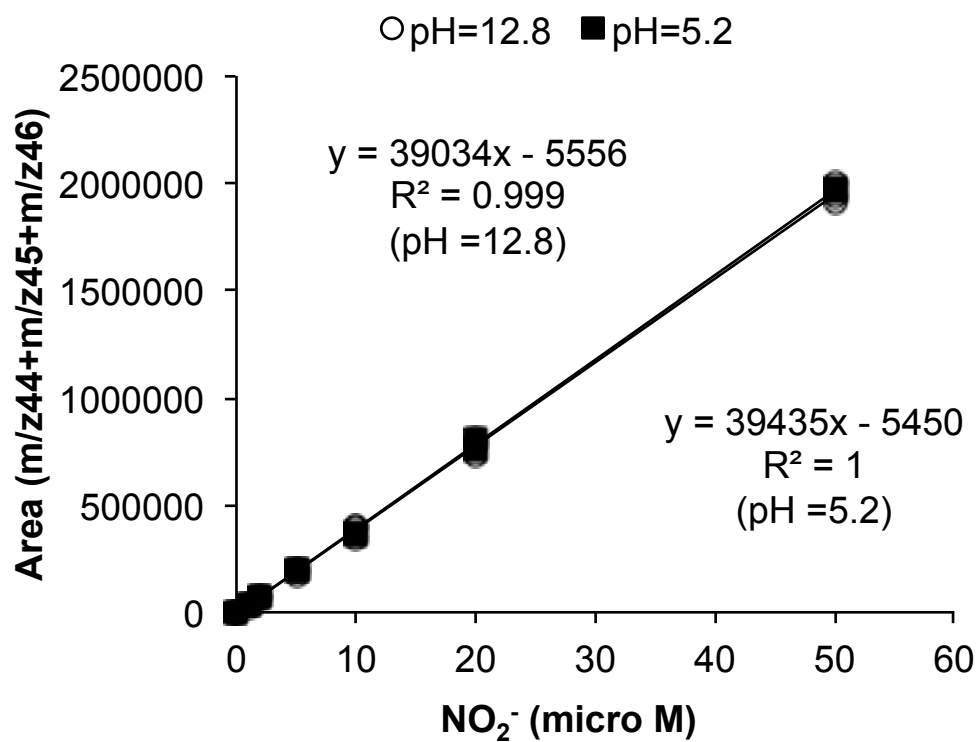
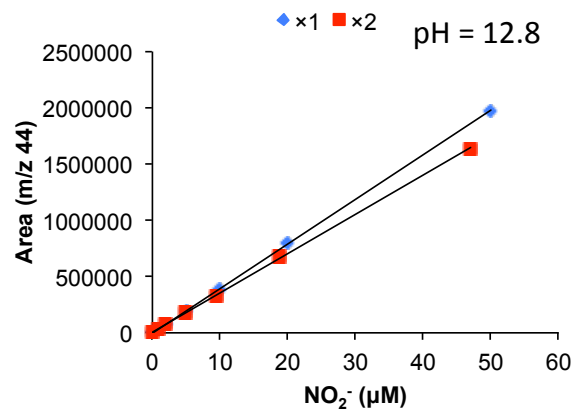


Fig 2.1. 異なる pH の試料にアザイド法を用いた際の NO_2^- 濃度と N_2O ピークエリアの関係 (n=3)

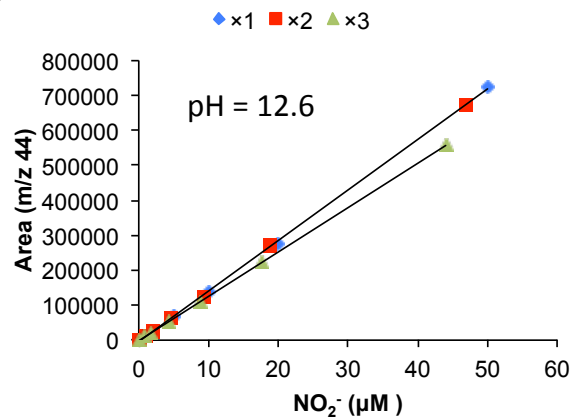
N_2O のピークエリア(m/z 44)はブランク値を差し引いた値で表示した。

○ : NO_2^- 標準溶液, pH12.8, ■ : NO_2^- 標準溶液, pH5.2

(a)



(b)



(c)

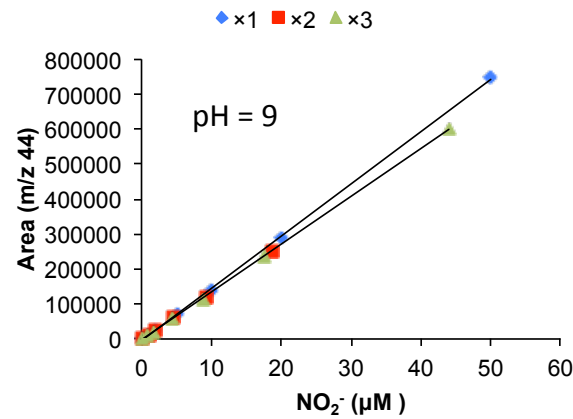


Fig 2.2 アザイド法における HN_3 溶液濃度と N_2O ピークエリアの関係($n=1$)
 HN_3 溶液濃度は(2.2.1)に記載の方法の 1 倍($\times 1$), 2 倍($\times 2$), 3 倍($\times 3$)の濃度で試験を行った。

(a) NO_2^- 標準溶液, pH12.8, (b) NO_2^- 標準溶液, pH12.6, (c) NO_2^- 標準溶液, pH9

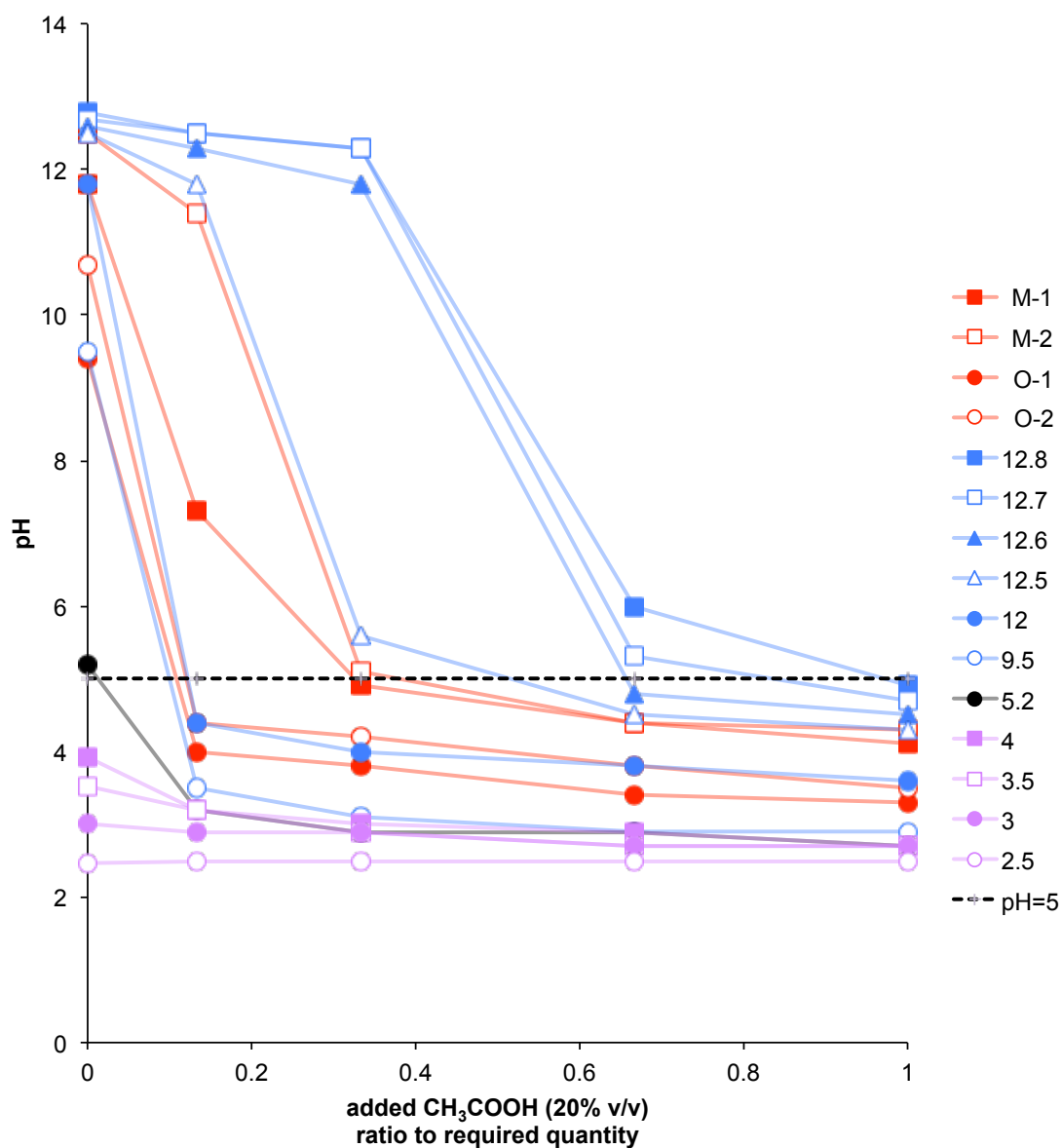


Fig 2.3 20% CH₃COOH 溶液の添加に対する 2M KCl と土壌のアルカリ抽出液における pH 変化

土壌抽出溶液については赤色のシンボルで、アルカリ性(pH9.5~12.8)に調整した KCl については青色のシンボルで、酸性(pH2.5~4)に調整した KCl については紫のシンボルで示した。CH₃COOH 添加は 2.2.1 に記載の手法と等量まで行い、横軸は最大の添加量に対する比で表した。点線は pH5 のラインを示す。土壌抽出溶液について、M-1, M-2 : 0-10cm 土壌 (芦生)、O-1, O-2 : 有機物層 (芦生) を示す。

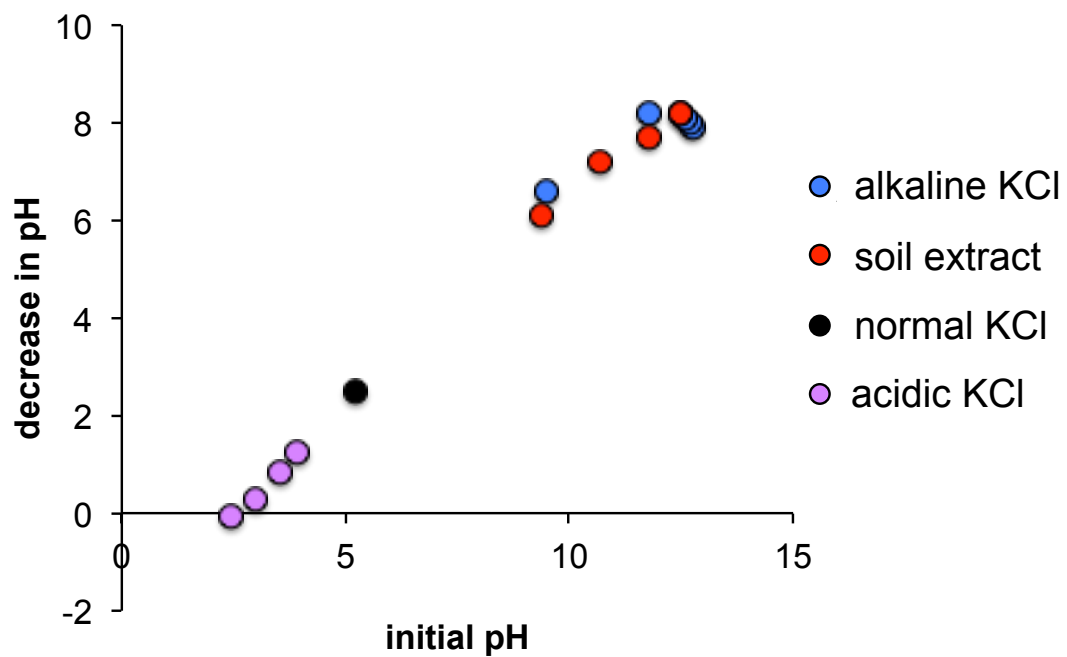


Fig 2.4 Fig 2.3 における初期 pH と CH_3COOH 添加による pH の変化量の関係
 縦軸に示される pH の変化量は初期 pH と CH_3COOH を最大量添加した後の pH との差分から求めた。

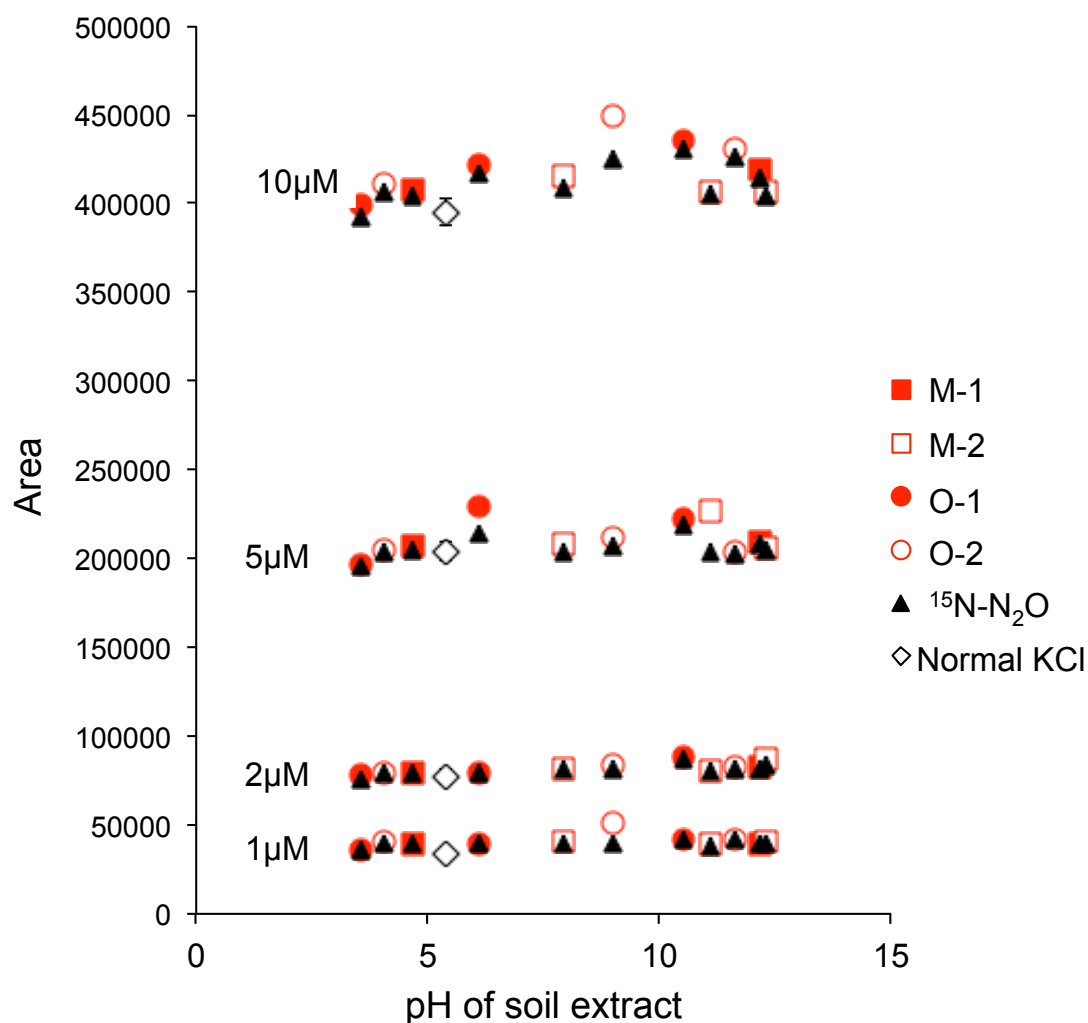


Fig 2.5 土壌抽出液に低濃度 $^{15}\text{NO}_2^-$ を標準添加し Azide 法による変換を行った際の土壌抽出液と N_2O ピークエリアの関係 ($n=1$, ◇のみ $n=3$)

0-10cm 土壌のアルカリ抽出液(M-1, M-2)と、有機物層のアルカリ抽出液(O-1, O-2)について $^{15}\text{NO}_2^-$ の添加を行い、Azide 法による変換で生成した N_2O ($m/z=44+45+46$) のピークエリアを示した。ここで、 $^{15}\text{N}\text{-}\text{N}_2\text{O}$ は $^{15}\text{NO}_2^-$ に由来する N_2O をさし、各測定値から以下のように算出した。

$$^{15}\text{N}\text{-}\text{N}_2\text{O} = \text{N}_2\text{O のピークエリア}(m/z\ 44+45+46) \times (\text{NO}_2^- \text{の atom\%}) / 100$$

Normal KCl は pH 未調整の 2M KCl 溶液を溶媒として調整した NO_2^- 濃度スタンダードであり、値は平均値で示し、エラーバーは標準誤差を示した(エラーバーは小さいために、視認できない場合がある)。

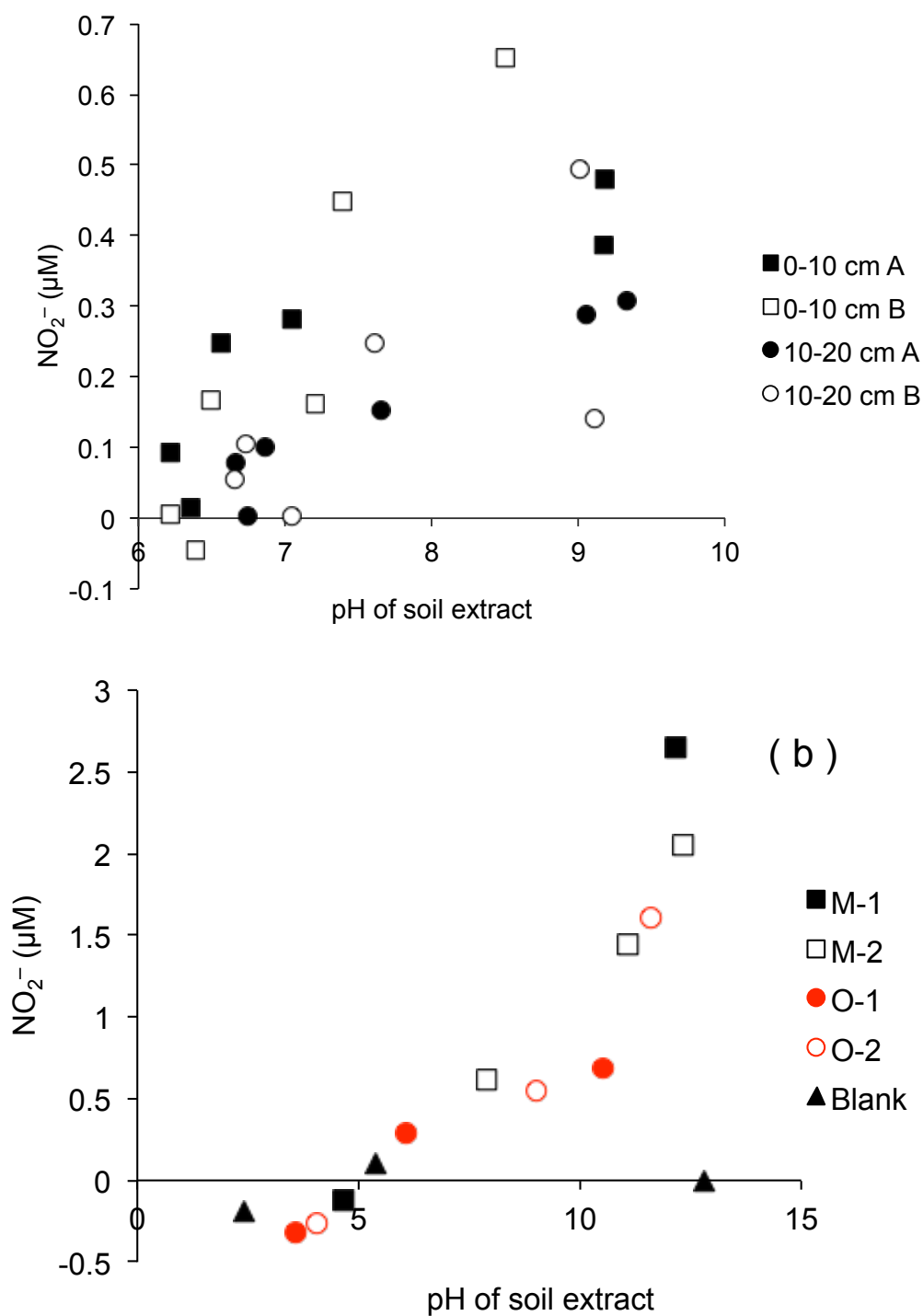


Fig 2.6 土壌抽出液の pH と抽出液中 NO₂⁻濃度の関係 (n=1)

(a) FM 多摩丘陵の A, B 地点にて採取された 0-10 cm 土壌および 10-20 cm 土壌

(b) 芦生研究林の 0-10cm 土壌 (M-1, M-2) および有機物層 (O-1, O-2)

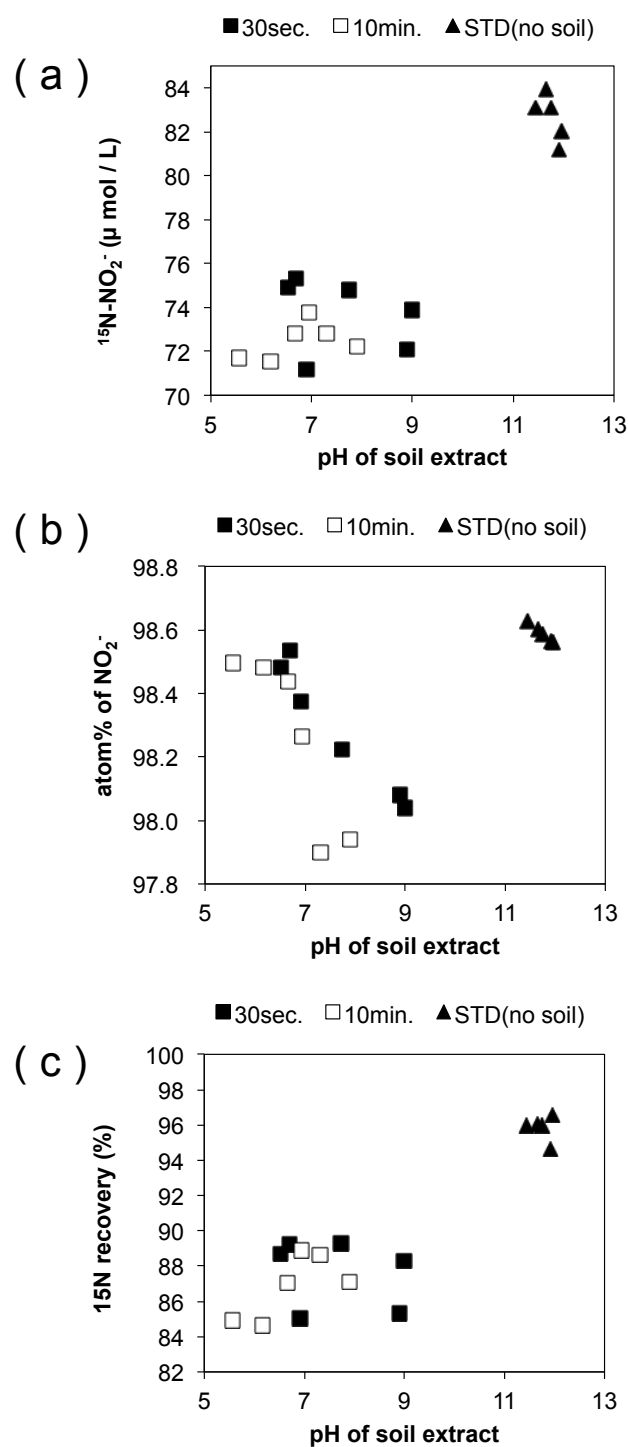


Fig 2.7 $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加条件における、土壌抽出液 pH と(a) $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度、
(b) NO_2^- の atom%、(c) ^{15}N 回収率の関係
抽出時間は 30 秒(■)、10 分(□)で行い、土壌を添加せずに同様の操作をおこなった区は▲で示した。

第3章 森林表層土壌における亜硝酸生成・消費速度 と消費経路の解析

3.1 緒言

2章では、アザイド法とGCMS測定により、アルカリ抽出によって得られた高いpHをもつ土壌抽出液であっても、 NO_2^- の濃度定量および同位体比測定が可能な条件を決定した。また、添加した高濃度の NO_2^- の回収率は抽出溶液のpHが5.5から9の範囲で変動しないことを示した。これを用いて、本章では森林土壌を用いて ^{15}N でラベルした NO_2^- を3段階の濃度で添加、培養し、各培養時間における NO_2^- 濃度と同位体比を定量することで（1）森林土壌における NO_2^- の生成・消費速度を算出し、また（2） ^{15}N の変換を追跡することで NO_2^- がどのような形態へと変換されるのかについて検討した。また（1）について NO_2^- の抽出条件、添加する $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度、土壌の培養時間が NO_2^- 生成・消費速度の算出に与える影響を検討した。

3.1.1 土壌中の無機態窒素変換速度の算出

NO_2^- は濃度が小さく、大きな速度で生成と消費が同時に起きていることが想定されるため本研究では ^{15}N を利用して、その速度を算出する。従来、土壌中の NH_4^+ や NO_3^- の生成速度は、土壌を一定期間培養し、その期間の NH_4^+ や NO_3^- の濃度変化から求められてきた。このようにして得られた速度を純速度(net rate)といい、単位時間あたりの無機態窒素の蓄積量をさす。しかし、森林土壌は一般的に無機態窒素濃度が低く、窒素に制限された系であるために、生成された無機態窒素は迅速に消費されうる。したがっ

て、生成速度と消費速度の差分でしかない蓄積速度では実際の無機態窒素の挙動を十分に表すことができない。そこで、現在では ^{15}N を利用して真の生成速度、すなわち総速度(gross rate)を算出する解析が広く用いられている。たとえば1990年代までは、かく乱を受けていない針葉樹林土壌の多くで NO_3^- 濃度は低く、森林を伐採した後に NO_3^- の蓄積が見られるまでに長い期間を要することから、これらの森林土壌では NO_3^- 生成活性は低く、 NO_3^- の同化は重要ではないと考えられてきた(Vitousek et al. 1982)。しかしその後、1990年代初頭になると、ほとんど NO_3^- が蓄積しない針葉樹林土壌においても、顕著な NO_3^- 生成と NO_3^- 消費が生じていることが ^{15}N を用いた真の NO_3^- の生成速度、消費速度の測定によって明らかにされてきた (Davidson et al. 1992, Stark and Hart 1997)。なお、以降で生成速度と表記した際には、すべて総速度(gross rate)をさすものとする。

これらの生成・消費速度の値は、ある無機態窒素プールのサイズ(濃度)の時間変化と、プール中の同位体比の時間変化の測定値をいくつかの仮定を前提としたモデル式に代入して算出される。モデル式にはいくつかのパターンが存在するがこれらはいずれもNの全量と ^{15}N の量の時間変化を記述する微分方程式であり、代数的に解析解を得るためのもの(Kirkham and Bartholomew 1954, Kirkham and Bartholomew 1955, Blackburn 1979, Nishio et al. 1985, Barraclough et al. 1985)と、近似的に数値解を得るためのもの(Myrold and Tiedje 1986, Bjarnason 1988, Wessel and Tietema 1992, Smith et al. 1994, Booth et al. 1998, Muller et al. 2004)の2種類に大別される。解析解を得るための方程式として、Kirkham and Bartholomew (1954)はラベルされた無機態窒素プールの生成速度と消費速度をラベルされたプールのNの全量($^{14}\text{N}+^{15}\text{N}$)と ^{15}N 量の関数として示した。この式は高濃度の ^{15}N 添加と短期間の培養において有効である。その後Blackburn(1979)はこれに簡単な変更を加え、自然状態で存在する微量の ^{15}N を

考慮にいられたことで低濃度の ^{15}N 添加にも適用できるようにした。それ以降、ラベルした無機態窒素プールの生成・消費速度の解析解を計算するためには一般的に Blackburn(1979)のバージョンが用いられてきたが、この式は Kirkham and Bartholomew (1954)に示される式と微分方程式の定式化における本質的な差異はない。そのため、一般には Kirkham and Bartholomew (1954)を引用して Blackburn(1979)の式を適用することが行われている。また、 Barracloughら(1985)、 Nishioら(1985)の式も Kirkham and Bartholomew (1954)に示された式を別の表現で示したものであり、本質的な違いはない(Wessel and Tietema 1992, Smith et al. 1994)。以下には Blackburn(1979)の速度計算式を示した。 Kirkham and Bartholomew (1954)に示されている式はeq. 3.1および3.2において $k=0$ の場合に等しい。

$$\text{生成速度} = (M_0 - M_t)/t \times \ln\{(f_t - k)/(f_0 - k)\} / \ln(M_t/M_0) \quad \cdots (\text{eq. 3.1})$$

$$\text{消費速度} = (M_0 - M_t)/t \times [1 + \ln\{(f_t - k)/(f_0 - k)\} / \ln(M_t/M_0)] \quad \cdots (\text{eq. 3.2})$$

M_0 : 初期 $^{14+15}\text{N}$ プール [$\mu\text{gN/g dw}$]

M_t : 培養 t 時間後の $^{14+15}\text{N}$ プール [$\mu\text{gN/g dw}$]

t : 培養開始からの時間[h]

f_0 : 初期の ^{15}N 存在比(同位体比)

f_t : 培養 t 時間後の ^{15}N 存在比(同位体比)

k : ^{15}N 自然存在比

以下では、この速度式の原理を説明する。

ある系（例えば土壌）のなかで、 $A \rightarrow B \rightarrow C$ という物質変換過程が存在するとき、 ^{15}N

でラベルされた B（以降では $^{15}\text{N-B}$ とする）を系に添加すると、培養時間とともに、A からラベルされていない B が生成する。これにともない、B 全体にしめる $^{15}\text{N-B}$ の比率は低下するが、 $^{15}\text{N-B}$ の全量は保存される。これを B のプールにおける同位体比が希釈される、と表現する。一方で、B が消費される過程において同位体比は変動せず、 $^{15}\text{N-B}$ 量が減少する。また、B の一定時間内の変化量は、その時間内の B の生成と消費の差分で表される。これらのことから、B の濃度と同位体比の変化をモニタリングすることで、 NO_2^- の生成速度と消費速度のそれぞれを算出することができる。同位体比は B 全量に対する ^{15}N 量の比率で表され、単位は atom% と表記する (eq. 3.3)。

$$\text{Atom\% of B} = ^{15}\text{N-B} / (^{14}\text{N-B} + ^{15}\text{N-B}) \times 100 (\%) \quad \text{---- (eq. 3.3)}$$

なお、eq. 3.1, 3.2 を導く過程では、以下の条件(A)–(C)を仮定している。

- (A) ^{14}N と ^{15}N は土壌中で、また消費プロセスにおいて同じように振る舞う
- (B) 対象とする物質の生成・消費速度は培養期間を通じて一定である。
- (C) 対象とする物質のプールから消費された ^{15}N が再び同じプールへと循環することは考慮に入れない。

この手法は ^{15}N 希釈法と呼ばれ、とくに森林土壌など窒素の循環速度が大きく、無機態窒素が蓄積しないような系においては窒素の動態を把握するための強力なツールとして用いられてきた。原理的には $^{15}\text{N-B}$ の代わりに ^{15}N でラベルした $^{15}\text{N-A}$ を基質として系に添加し、培養期間中の $^{15}\text{N-B}$ 生成量を見積もることで B の生成速度を算出すること

もできる。それと比べて ^{15}N 希釈法は、基質添加とならないために、実環境により即した速度の見積もりが可能である。

土壌中の NH_4^+ や NO_3^- の生成・消費速度を算出するために ^{15}N 希釈法は広く用いられているが (Davidson et al. 1992, Hart et al. 1994, Stark and Hart 1997, Venterea et al. 2004, Silver et al. 2005, Corre et al. 2007, Templer et al. 2008, Kuroiwa et al. 2011, Isobe et al. 2012, Schütt et al. 2014, Corre et al. 2014)土壌中の NO_2^- の生成・消費速度の算出への適用は限られている (Burns et al. 1995, Isobe et al. 2011)。

3.1.2 NH_4^+ , NO_3^- 変換速度の解析解の算出における前提条件の検証

ここでは、 ^{15}N 希釈法を用いるうえでの前提となる条件(A)–(C)の正当性に関する詳細を既往研究の結果にしたがって記す。 NH_4^+ と NO_3^- の変換速度を算出するための前提条件としてとしては、これまでさまざまな検証が行われてきた (Bjarnason 1988, Davidson et al. 1991, Watson et al. 2000, Cliff et al. 2002, Herrmann et al. 2005, Luxhøy et al. 2003, Luxhøy et al. 2004)。仮定(A)–(C)のうち、(A)の条件は、N消費における ^{14}N と ^{15}N の選択に偏りが無いことを意味している。この条件を担保するためには、(i)生物学的・化学的な消費反応における選択のバイアスがないこと、および、(ii)土壌系において ^{14}N および ^{15}N が均一に混合していること、が必要である。(i)については厳密には正しくはなく、微生物反応や化学反応の際には ^{15}N , ^{14}N の利用に偏りが生じる (同位体分別) ことが示されているが (Delwiche and Steyn 1970)、この選別の程度は ^{15}N を濃縮した窒素を添加培養したときにみられる同位体比変化の大きさと比較してごくわずかであるために、 ^{15}N を添加培養する場合には無視できる (Hart et al. 1994)。(ii)については、通常 ^{15}N の添加はシリンジなどの器具を用いて土壌に ^{15}N を含む水溶液を混合させることによって行われ、その後好気的な培養に供されるため、 ^{15}N の完全に均一な

混合は不可能である。そこで、どの程度の混合であれば速度の算出値に影響を与えないかが検証されてきた。たとえば、Davidson et al. (1991) は土壌の孔隙（マイクロサイト）における ^{15}N の分布の不均一性が同位体希釈法による速度計算に与える影響を、土壌のマイクロサイトを想定した二次元のモデルを用いて ^{15}N 分布の偏りに対する感度解析を行い検証した。ここでは、 ^{14}N と ^{15}N の濃度のそれぞれと、 N の生成・消費速度（微生物活性）がマイクロサイト間で均一である場合、ランダムである場合、バイアスが生じている場合で条件を設定し、インプットとして設定した速度の平均値と、シミュレーションによって最終的に各マイクロサイトで達成された ^{14}N と ^{15}N 濃度の平均値をもとにeq. 3.1, 3.2によって算出された速度が、どの程度の差異を持つかを検証した。その結果、計算結果の誤差は土壌中に元々存在する ^{14}N の分布の不均一性と添加した ^{15}N の分布の不均一性の双方によって引き起こされ、ランダムな分布を仮定した場合に比べて ^{15}N の分布にバイアスがある場合ではより大きな誤差が生じることを示したが、そのいずれの場合も誤差の程度は小さかった(<10%)。ただし、 ^{15}N の分布と微生物活性の双方にバイアスが生じている場合に限定して顕著な誤差がみられ(>40%)、特に土壌コアの培養など非均一性の大きなサンプルを用いて速度の算出を行う場合には注意が必要であることを指摘した。その後の研究において、特に NH_4^+ は土壌中での拡散速度が遅い (Gregory 2006) ために、土壌中での分布の不均一性が速度に影響を及ぼすことが指摘されてきた(Cliff et al. 2002, Watson et al. 2000, Herrmann et al. 2005)。しかし、これらの指摘に示される速度の見積もりの誤差は、土壌表面に ^{15}N 溶液を滴下するだけで混合を十分に行わないといった実験の手法に起因するものであり、 ^{15}N 溶液を良く土壌に混合した場合は回避が可能であることも指摘されている(Luxhøy et al. 2003, Luxhøy et al. 2004)。仮定(B)については、窒素サイクルが実際には平衡状態ではなく、変換速度や濃度が時系列で変化することが NH_4^+ や NO_3^- について(Bjarnason 1988, Powlson

and Barraclogh 1993)、また、 NO_2^- についても指摘されている(Burns et al. 1995)。したがって、eq. 3.1および3.2を適用するためには、0次反応に近似が可能な時間間隔で速度の算出を行う必要がある。この期間は、 NH_4^+ や NO_3^- については数日(Hart et al. 1994)から10日程度(Bjarnason 1988, Powlson and Barraclogh 1993, Kirkham and Bartholomew 1954)が推奨されており、添加後2時間と26時間の ^{14}N , ^{15}N 濃度の測定値を用いて算出されることが一般的である。一方で、 NO_2^- については生成・消費速度が1日間の培養でも著しく変化することが示されている (Burns et al. 1995, Isobe et al. 2012)。したがって、 NH_4^+ や NO_3^- と比較して短期間の培養が必要であり、複数の土壌を比較する際には同じ培養期間の値を用いるべきだと考えられる。仮定(C)について、Bjarnason(1988)は ^{15}N 添加から1週間後の時点でこの仮定が有効ではなかったことを報告し、Bristowら(1987)は微生物バイオマスへの ^{15}N の取り込みが添加から2日のうちに生じ、添加から6日以内に取り込まれた ^{15}N の再放出が生じたことを報告した。これらのことから、厳密には ^{15}N の再循環は生じるが、この誤差は短期間の培養(1~2日)においてはeq. 3.1, 3.2による算出値に大きな影響を与えないことが NH_4^+ や NO_3^- を想定したモデルのシミュレーション結果からは示されている(Boutton and Yamasaki 1996)。これら(A)–(C)の前提について、Kirkham と Bartholomewは前提(B)と(C)を排除した微分方程式についても定式化している(Kirkham and Bartholomew 1955)。しかし、この場合は系全体で窒素の全量と ^{15}N の全量が保存されることを前提とする必要があり、つまりは完全な閉鎖系においてしか適用できない。したがってこの式は NH_4^+ を添加した場合に限って前提を伴って(ガス態としてのNの損失が無視できる場合に)適用されてきた。これ以外の ^{15}N の循環を含むモデルの解は数値解法によってのみ得られる。

これらのことから、 NH_4^+ や NO_3^- の変換速度の解析解を得ることは、一般に、(A)の条件を満たすために ^{15}N でラベルされた無機態窒素をできる限り均一に土壤に添加し、(B)や(C)の条件が成立する時間単位(1日間など)での培養を行い、その期間内の ^{14}N 量と ^{15}N 量の変化をBlackburn(1979), Kirkham and Bartholomew (1954)が示した式に代入することで行われてきた。解析解法に対して、数値解法ではより複雑な(実際の環境に即した)モデルを用いて速度の推定を行うことが可能だが、これを実際に無機態窒素動態の生態学的な研究に用いるにはいくつか困難な点が存在する。まず、数値解法においてモデルに用いるパラメータを最適化するためには各無機態窒素プールの ^{14}N 濃度、 ^{15}N 濃度に関する時系列での測定値が必要になる。さらに、これらのパラメータは個々の土壤によっても異なるため、さまざまな土壤間で速度の数値解を比較する場合、その測定数は膨大なものになり現実的ではない。そのため、無機態窒素動態に関する生態学的な研究においてはもっぱら解析解法が用いられてきた。

3.1.3 NO_2^- 変換速度の解析解を得るうえでの問題点

これまで示したように ^{15}N 希釈法を用いて土壤中の NH_4^+ や NO_3^- の生成・消費速度を算出するための研究が広く行われてきたが、 NO_2^- の総速度の算出に適用された例は少ない。そのため NO_2^- 変換速度の解析解を得るための条件を最適化する必要があると考えられた。前提条件の(A)については ^{15}N 溶液を土壤に一様に添加することで $^{15}\text{NH}_4^+$ や $^{15}\text{NO}_3^-$ の際と同様に有効となると想定した。しかし前提条件の(B)と(C)に関しては検証が必要となる。解析解(Burns et al. 1995, Isobe et al. 2012)および数値解(Rutting and Muller 2008, Stange et al. 2013, Muller et al. 2014)の算出に基づく既往研究の結果から、 NO_2^- は NH_4^+ や NO_3^- と比較可能な速度で生成・消費されるが、その濃度は NH_4^+ や NO_3^- よりもきわめて低く、滞留時間が短いと想定される。そのため添加した ^{15}N は迅

速に消費されると想定される。前提条件の(B)と(C)は短期間の培養において成立すると考えられるが、 NO_2^- においてその期間は NH_4^+ や NO_3^- に比べて短いと想定される。また、添加によるかく乱を最小限にとどめるために、可能な限り低い ^{15}N 添加量にすることも重要であると考えられた。

3.1.4 実験の目的

そこで、(1) 培養期間および(2) 添加する $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度に着目し、 NO_2^- 生成・消費速度の最適な解析条件を検討したうえで森林表層土壌における亜硝酸の生成・消費速度の算出と消費される亜硝酸の変換経路の推定を行うことを目的とした。

3.2 方法

3.2.1 土壌試料

東京農工大学農学部附属広域都市圏フィールドサイエンス教育研究センターFM 多摩丘陵（以下 FM 多摩）から採取した土壌を実験に用いた。FM 多摩丘陵は都市域の郊外(東京都八王子市)に位置するために大気からの窒素流入量が多く ($9.7 \text{ kg-N ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$; Kimura et al. 2009)、結果として土壌や溪流水の無機態窒素濃度が高く（交換態 NO_3^- 濃度: $4.5\text{--}11.8 \text{ mg-N kg}^{-1}$, 溪流水中硝酸濃度: $1.7\text{--}2.3 \text{ mg-N L}^{-1}$; Takebayashi et al. 2010)、窒素の過剰化が進行していると考えられている。森林内の 2 地点(地点 A, B)から表層 0–10 cm 土壌を採取し、4 mm のふるいでふるった土壌を実験に用いた。

3.2.2 土壌への $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加培養

土壌 3.5 g を 50 mL プラスチックチューブに分取し、25 °C に 12 時間置いて前培養を行った。その後、1 mM, 5 mM, 25 mM の $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ 水溶液をそれぞれ 1 mL 添加し(添

加濃度は 6 mg-N kg^{-1} , 30 mg N kg^{-1} , 150 mg N kg^{-1} に相当)、 26.5°C で培養した。地点 B の土壌については 0, 1, 4, 8, 21, 24 時間の培養時間において 2M KOH で pH を 11.9 に調整した 2M KCl 35 mL を添加し、振とう (200 min^{-1} , 10 分)、遠心 ($3,000 \text{ G}$, 7 分) ののち、ガラス繊維濾紙 (GF/F) でろ過をした。抽出液は測定まで 4°C で保存した。0, 8, 24 時間の培養時間については pH を調整していない KCl での抽出も行った。また、地点 A の土壌については 0, 4, 8 時間の培養のみを行い、pH を 11.9 に調整した 2M KCl で抽出を行った。 NO_2^- 濃度・同位体比測定はアザイド法による NO_2^- の N_2O への変換と GCMS 測定によって行った (2.2.1.1)。また、土壌抽出液は、脱窒菌法での NO_3^- 濃度・同位体比測定、パーサルフェイト酸化および脱窒菌法による全溶存態窒素 (TDN) 濃度・同位体比測定に供した。

3.2.4 無機態・溶存有機態窒素の濃度・ ^{15}N 比測定

3.2.4.1 NO_3^- の濃度・同位体比測定

NO_3^- の濃度・同位体比測定は脱窒菌法 (Sigman et al. 2001, Casciotti et al. 2002, McIlvin et al. 2011) によって行った。これは、 N_2O 還元酵素が欠失した *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* (ATCC # 13985, NBRC # 3521) を利用して、 NO_3^- と NO_2^- を N_2O へと変換する手法である。変換した N_2O は GCMS により分析を行い (Isobe et al. 2011)、 $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ の濃度と同位体比を算出した (Stevens et al. 1997)。そののち、脱窒菌法によって求めた $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ の濃度と同位体比から、 $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ プール中の $^{14+15}\text{N}$ 量と ^{15}N 量を算出し、アザイド法で求めた NO_2^- の濃度と同位体比から求めた NO_2^- プールの $^{14+15}\text{N}$ 量と ^{15}N 量を差し引くことで、 NO_3^- の濃度と同位体比を算出した。なお、脱窒菌法の手順は以下のようにおこなった。

菌は以下の組成の液体培地で培養し、脱窒活性が十分に誘導されていると考えられる

培養開始後 5~10 日の期間のものを測定に用いた (McIlvin et al. 2011)。測定に用いる前に、培地への NO_2^- の蓄積がなく、菌の発育が十分であることを培地の一部にグリース・ロイミン亜硝酸試薬 (WAKO, 077-01852) を適量添加し、呈色の有無によって確認した。本研究にて行った測定の限りでは該当するケースはなかったが、仮にこの際培地に赤色の着色が見られる場合は培地中に NO_2^- が残存していることを示すため、使用を取りやめる。培地の組成は以下の通りに作成した (McIlvin et al. 2011)。

《培地組成》

Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco Laboratories, 211825) : 30 g / L

リン酸二水素カリウム (WAKO, 169-04245) : 36 mM

硝酸カリウム (WAKO, 160-04035) : 10 mM

塩化アンモニウム (WAKO, 017-02995) : 7.5 mM

また、脱窒菌の培養と菌液の濃縮は McIlvin et al. (2011) を参考に以下の手順で行った。

(1) 500 mL がバイアル (実際の体積 : 約 580 mL) に攪拌子と 475 mL の培地をいれ、50 分間オートクレーブにかけた。オートクレーブ終了後は、ある程度低温になるまでオートクレーブのふたをあけずに、放置した。

(2) *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* (NBRC # 3521) のフリーズストックから試験管の液体培地 (組成は同上、5 mL、20 分間オートクレーブしたもの) に植菌し、一晩振盪培養 (暗所、25°C) した。この菌液 1 mL を、シリンジを用いて①の培地に植えついだ。その後、マグネチックスターラー上で 25°C、暗所で培養した。

(3) 植えついでから 5-10 日後の培地を 500 mL の遠沈管に分取し、20℃、4000 rpm で 30 分間遠心して菌体を回収した。菌体の回収は必要な菌液量の 5 倍量の培地に関して行った(5 倍濃縮)。

(4) 測定の前日に上の培地組成において硝酸カリウムを含まないものを必要量調整して、30 分間メジューム瓶でオートクレーブを行った。この培地に回収した菌体をけん濁し、この後の曝気作業における培地の泡立ちを防ぐために、消泡剤 PE-L(Wako, 013-17201)を培地 100mL あたり 0.1mL 添加した。その後、He で最短でも 2 時間曝気を行った。

(5) 菌液 10 mL ガラスバイアル瓶に 2mL 分取し、ゴム栓、アルミシールで密栓後、個々のバイアル瓶ごとに、気相と菌液に存在する O₂および N₂O を十分に置換するため、再び曝気を 30 分以上行った。その後、バイアル瓶に 1 mL の試料溶液を注入し、その重量を記録した。サンプル注入の翌日に気体の流出入に注意しながら 6mM NaOH

(WAKO, 199-08621, 窒素測定用) 0.3mL を添加した。この高濃度の NaOH の添加は以下の目的(A)、(B)のために行った。

(A) 溶液中の脱窒菌の活動を停止し、反応を止める。菌体の分解に由来する窒素の放出やそれが脱窒過程を経て N₂O に変換されることを防ぐ。

(B) N₂O と同じ質量数(M=44)をもつ CO₂ を $2\text{NaOH} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{H}_2\text{O}$ の反応によって除去する。

3.2.4.2 全溶存態窒素(TDN)の濃度・同位体比測定

全溶存態窒素(TDN)は過硫酸酸化によって NO₃⁻へと変換後、脱窒菌法によって NO₃⁻を N₂O へと変換し、GCMS で測定を行った(Solorzano & Sharp 1980, Koba et al. 2010, Isoobe et al. 2011)。N₂O の測定値から、TDN の濃度と同位体比を求め、次の式に基づ

いて溶存態有機窒素(DON)を算出した。

$$\text{DON} = \text{TDN} - (\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+)$$

なお、本章において、アルカリ抽出を行っているサンプルに関しては、 NH_4^+ は損失していると仮定し、

$$\text{DON} = \text{TDN} - (\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-)$$

の式を用いて算出を行った。

過硫酸酸化は以下の手順で行った。

ネジ付き試験管(Iwaki, TST-SCR16-100,)に試料溶液 1 mL を分注し、過硫酸酸化試薬(POR)溶液(組成は以下参照)を 2mL を添加のうえ、直ちにテフロンライナーパッキン付きキャップ(Iwaki, 9998CAP415-15)で密栓した。その後オートクレーブ(121℃, 1hr)を行い NH_4^+ を NO_3^- に酸化した。これを脱窒菌法で N_2O に変換し測定を行った。

《POR 溶液組成》

水酸化ナトリウム (WAKO, 199-08621, 窒素測定用) 1.52g

ホウ酸 (WAKO, 021-02195) 3g

ペルオキシ二硫酸カリウム(窒素リン測定用, WAKO, 169-11891) 5g

上記の試薬を水酸化ナトリウム、ホウ酸、ペルオキシ二硫酸カリウムの順番に超純水 100 mL に溶解させて作成した。

3.2.5 培養サンプルヘッドスペース中の N_2O の測定

NO_2^- が N_2O として放出を定量的に明らかにするために、50mL ガラスバイアルに 3.5

g の土壌をはかりとり、1mM, 5mM, 25mM $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ 溶液を 1mL 添加した。添加後すぐにゴム栓とアルミシールで密封し、 $^{15}\text{NO}_2^-$ -添加後、15 分、1 時間、2 時間、4 時間におけるヘッドスペースの N_2O 濃度を GCMS を用いて測定した。

3.3 結果と考察

3.3.1 土壌中の $^{14+15}\text{NO}_2^-$ -濃度、 $^{15}\text{NO}_2^-$ -濃度、 NO_2^- -同位体比の経時変化

Fig. 3.1 には、地点 A および地点 B の土壌 (soilA および soilB) 中の $^{14+15}\text{NO}_2^-$ -濃度 (Fig 3.1 (a)–(c))、 $^{15}\text{NO}_2^-$ -濃度 (Fig 3.1 (d)–(f))、 NO_2^- -同位体比 (atom%) (Fig. 3.1 (g)–(i)) の経時的な変化をしめした。土壌 B については pH 未調整の KCl (normal KCl) とアルカリ KCl (alkali KCl) を用いて抽出した NO_2^- の経時変化について示した。soilA と soilB の両方において、 $^{15}\text{NO}_2^-$ を添加した直後から $^{14+15}\text{NO}_2^-$ 濃度および $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度は迅速に減少した。6, 30 mg N kg^{-1} 添加区において $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度はそれぞれ添加 4, 21 時間後には $<0.5 \text{ mg N kg}^{-1}$ となった (Fig 3.1 (d),(e))。150 mg N kg^{-1} 添加区においても $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度は経時的に減少したが添加 24 時間後の時点においても残存し、検出された (Fig 3.1 (f))。続いて NO_2^- の同位体比に着目すると同位体比は soilA と soilB の両方において経時的に減少した (Fig 3.1 (g)–(i))。このことから $^{14}\text{NO}_2^-$ が生成されていることが示され、 NO_2^- は土壌中で生成されると同時に消費されていた。

normal KCl を用いて NO_2^- の濃度定量および同位体比測定が可能な条件を検証した結果を Fig. 3.3 に示す。pH 未調整の KCl で抽出を行った場合、アルカリ KCl での抽出と比較して、 $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度はわずかに低下した。アルカリ抽出を行った場合の $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度と、pH 未調整の KCl で通常の抽出を行った場合の $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度の関係は直線関係を示し (Fig. 3.3 (a); $y=0.948x-0.243$ $R^2=0.9995$)、 NO_2^- 添加濃度に関わらず抽出 pH の違いによる NO_2^- 濃度の減少率はほぼ一定であった。また、回帰直線の傾きから、通

常の抽出を行った場合の $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度はアルカリ抽出の約 95%であることが示された。

これは 2 章における、比較的高濃度で NO_2^- が存在する条件下では NO_2^- の定量に抽出時の pH が及ぼす影響は小さいという結論と一致した。このことから通常の抽出法 (pH を調整しない 2M KCl による抽出) の適用が可能であると判断された。そのため、4 章における解析では、normal KCl を用いて定量した値を用いた。

3.3.2 NO_2^- の生成と消費の速度を算出するための前提条件

上述の通り eq. 3.1, 3.2 は生成・消費速度は培養期間を通じて一定であるという仮定 (前提条件 B) を置いている。多くの研究において NH_4^+ や NO_3^- の生成速度を算出する際には培養 $t=t_0$ と $t=t_1$ (例えば $t_0=2$ 時間、 $t_1=26$ 時間) において濃度と同位体比を測定し、その間では生成・消費速度は一定と仮定して算出している。しかし、Fig. 3.1(d) - (f) のように培養期間全体を通すと $^{15}\text{NO}_2^-$ の濃度変化率は一定ではなかった。

濃度の減少が 1 次反応による場合、以下の関係式が成り立つ。

消費速度 = $-d[^{15}\text{NO}_2^-] / dt = k[^{15}\text{NO}_2^-]$ より、

$$\ln [^{15}\text{NO}_2^-]_t = -kt + \ln [^{15}\text{NO}_2^-]_0$$

$$\log [^{15}\text{NO}_2^-]_t = \ln 10 \times (-kt) + \ln [^{15}\text{NO}_2^-]_0$$

$^{15}\text{NO}_2^-$ の初期濃度 : $[^{15}\text{NO}_2^-]_0$

培養時間 = t のときの $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度 : $[^{15}\text{NO}_2^-]_t$

$^{15}\text{NO}_2^-$ 消費速度の速度定数 : k

そこで、Fig. 3.1 (d) - (f) の $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度の経時変化について、対数プロットを示した (Fig 3.2)。 $\log [^{15}\text{NO}_2^-]$ は培養期間において (6mg-N: 0-8h; 30 mg-N: 0-24h; 150 mg-N: 1-21h) 直線的に減少したことから、 $^{15}\text{NO}_2^-$ の消費は $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度に依存する 1

次反応であると考えられた。しかし、培養の初期において $^{15}\text{NO}_2^-$ の濃度変化はほぼ直線的に生じたため (Fig 3.1 (d)-(f))、培養初期の測定値を用い、培養期間を十分短く設定することで、0 次反応での近似が可能であると考えられた。そこで 3.3.3 においては短い培養期間、すなわち各抽出時間の間のそれぞれについてその間の濃度変化は一定 (0 次反応) と仮定して eq. 3.1, 3.2 を用いて NO_2^- の生成・消費の算出を行った。

3.3.3 培養期間および添加する NO_2^- の濃度が NO_2^- の生成と消費の速度に及ぼす影響

3.3.2 での結果・考察に基づいて eq. 3.1, 3.2 を用いて、土壌における NO_2^- の生成速度・消費速度を算出した結果を Table 3.1 および 3.2 に示した。速度の算出は添加した $^{15}\text{NO}_2^-$ が検出される範囲の各培養期間、すなわち A 地点については 0-4, 4-8 hr, B 地点については 0-1, 1-4, 4-8, 8-21, 21-24 hr において行った。以下、算出した生成・消費速度と培養期間および添加した $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度の関係について述べる。

3.3.3.1 培養期間と NO_2^- 生成・消費速度との関係

SoilA と SoilB の両方において NO_2^- 生成・消費速度は培養時間に伴って低下した (Table 3.1, Table 3.2)。培養を経るにしたがって NO_2^- 生成速度が低下する理由として、(i) NO_2^- 添加によるかく乱の影響による培養初期における生成速度の過大評価、(ii) 消費された $^{15}\text{NO}_2^-$ の ^{15}N が再び NO_2^- プールへと循環する影響による培養後期における生成速度の過少評価の可能性が考えられる。(i) は生成物の濃度に生成プロセスが正のフィードバックをうける場合には起こりうると考えられるが、 NO_2^- 濃度が NO_2^- 生成プロセスを促進するという報告は著者の知る限りではない。一方、(ii) については NO_3^- からの NO_2^- 生成がひとつの可能性として考えられる。例えば、Burns et al. (1996) によると好気的な土壌においても、 NH_4^+ 由来 (硝化由来) と NO_3^- 由来 (脱窒由来) の双方から

NO₂⁻が生じうる。好氣的な土壤において NO₃⁻由来の NO₂⁻生成は NH₄⁺由来の NO₂⁻生成と比較してわずかであることが示されているが(Smith et al. 1997)、それ以外の反応を含めても NO₂⁻プールから消費された ¹⁵N が再び NO₂⁻プールに循環してくるリスクは ¹⁵N 添加後の経過時間が長くなるほど高いと推察される。すなわち培養期間が長くなることで速度計算式 eq. 3.1, 3.2 の前提条件(C)が成立しなくなると考えられた。

NO₂⁻消費速度の低下は 3.3.2 に述べた通りであり、NO₂⁻の消費速度は NO₂⁻濃度に依存するためと考えられた。

以上から、仮に NH₄⁺や NO₃⁻と同様に 1 日間の培養を行って速度を算出する場合、計算式 eq. 3.1, 3.2 の前提条件(B)「培養期間中の生成・消費速度が一定」と(C)「対象とする物質のプールから消費された ¹⁵N が再び同じプールへと循環することは考慮に入れない」は成り立たない。このことは、NO₂⁻の場合は培養期間をより短く設定することが重要であることが示された。

3.3.3.2 NO₂⁻添加濃度と NO₂⁻生成・消費速度との関係

SoilA と SoilB の両方において NO₂⁻生成速度は NO₂⁻添加濃度の影響をあまりうけなかった。NO₂⁻添加濃度が速度の値に大きくは影響しなかったことから、3.3.3.1 の(i)について NO₂⁻濃度が NO₂⁻生成速度に影響を与える可能性は小さいことが示唆された。以上から培養期間を短くすることで、添加濃度に関わらず森林土壤中の NO₂⁻生成速度が測定可能であると考えられた。

一方、SoilA と SoilB の両方において NO₂⁻添加濃度の増加にしたがって NO₂⁻消費速度は顕著に増加した(Table 3.1, Table 3.2)。このことから NO₂⁻の消費速度は NO₂⁻濃度に依存すると考えられた。

3.3.4 森林土壌中の NO_2^- 生成速度

3.3.2-3.3.3 の結果・考察から培養初期の $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加 1-4 時間後の NO_2^- 生成・消費速度を用いて森林土壌中の NO_2^- 生成速度について考察を行う。

$^{15}\text{NO}_2^-$ 添加濃度が 6, 30, 150 mg N kg^{-1} の時の NO_2^- 生成速度は 8.5, 12.5, 12.2 $\text{mg-N kg}^{-1} \text{ soil d}^{-1}$ であった (Table 3.2)。この値は過去に行われた $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加培養初期の NO_2^- 生成速度と比較可能な程度であった (草地土壌：およそ 5-20 $\text{mg N kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$; Burns et al. 1995, 酸性森林土壌：28.3-32.1 $\text{mg N kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$: Isobe et al. 2012)。また、用いた森林土壌の NO_2^- 濃度は $<0.7 \text{ mg N kg}^{-1}$ であった (Fig 2.6 (a))。一方で、過去に本研究の土壌採取地点と同一のサイトにおいて観測された NO_3^- 生成速度は 0.6 mg N day^{-1} であり、 NO_3^- 濃度は 18.8 mg N kg^{-1} であった (Ikutani et al., unpublished data)。採取した季節や地点、また培養期間が異なるために一概には比較できないが、このことから NO_2^- は NO_3^- に比べて濃度が著しく小さいが、生成速度は大きいことが示唆された。また他の既往研究における森林土壌の NO_3^- 生成速度は 0-6.08 $\text{mg N kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ であり、(Hart et al. 1997, Silver et al. 2005, Corre et al. 2007 Templer et al. 2008, Boyle-Yarwood et al. 2008, Kuroiwa et al. 2011)、これらと比較しても NO_2^- 生成速度は大きかった。

3.3.5 NO_2^- 消費プロセスの相対的寄与

好気的な土壌において、一般的に NO_2^- は迅速に NO_3^- へと酸化されると考えられている。しかし 3.3.3 でしめたように NO_2^- 生成速度は NO_3^- 生成速度に比べて大きい。そのため生成された NO_2^- は NO_3^- へと酸化される以外に、他の窒素化合物へと変換される可能性が示された。そこで本研究では NO_3^- の他に DON へと変換される可能性を検証した。また添加した NO_2^- 濃度の NO_3^- と NO_3^- 以外の窒素化合物への変換に対する影響を検証した。添加した $^{15}\text{NO}_2^-$ がそれぞれの培養時間において NO_3^- , DON として回

収された割合とこれらの溶存態窒素としては回収されなかった割合を $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加濃度ごとに Fig. 3.4 に示した(Fig 3.4 (a)-(c))。また、 $^{15}\text{NO}_2^-$, $^{15}\text{NO}_3^-$, DO^{15}N 濃度の時間変化から、 $^{15}\text{NO}_2^-$, $^{15}\text{NO}_3^-$, DO^{15}N 濃度の増加速度を算出し、Fig. 3.4 に示した(Fig 3.4 (d)-(f))。まず、添加した $^{15}\text{NO}_2^-$ の迅速な消費とともに $^{15}\text{NO}_3^-$ の生成が生じたが、 NO_2^- が NO_3^- へと変換される割合は 100%ではなく、また添加濃度によってその割合は異なった(Fig 3.4 (a)-(f))。具体的には、 6 mg-N kg^{-1} 添加区では、 NO_3^- への変換が主な NO_2^- の消費プロセスであったが(Fig 3.4 (a),(d))、 30 mg-N kg^{-1} 添加区では、 NO_3^- への変換は 24 時間経過時点で 27%に、 150 mg-N kg^{-1} 添加区では 16%にとどまった(Fig 3.4 (b),(c))。一方で DON として回収される ^{15}N はほとんど検出されず、 6 mg-N kg^{-1} 添加区の一部の培養時間においてのみ検出された(Fig 3.4 (a)-(c))。また、 6 mg-N kg^{-1} 添加区においても、 DO^{15}N への変換は培養初期には生じず、 NO_3^- への変換に対して重要ではないと考えられた(Fig 3.4 (d))。

24 時間時点で全溶存態窒素として回収される窒素量も添加濃度によって変化し、 6 mg-N kg^{-1} , 30 mg-N kg^{-1} , 150 mg-N kg^{-1} 添加区のおおの、およそ 65, 25, 50%であった。そのため溶存態窒素以外の窒素化合物への変換が考えられた。その可能性として(i)ガス態の窒素(NO , N_2O , N_2 など)として放出された、(ii) NH_4^+ として存在し、アルカリ条件下での抽出により揮散した、(iii)抽出されない有機態窒素として抽出後の土壌に残存したことが考えられた。そこで(i)のガス態窒素として N_2O へと変換される ^{15}N 量がどの程度存在するかについて測定を行った。その結果、 N_2O としての ^{15}N 回収率は 6 mg-N kg^{-1} , 30 mg-N kg^{-1} , 150 mg-N kg^{-1} 添加区において、培養開始から 4 時間経過時点でおおの 2.4, 6.8, 1.4%であり(Fig 3.5)、 $^{15}\text{NO}_2^-$ の N_2O への変換が生じたことが示された。以上から N_2O 以外のガス態窒素へと変換、もしくは上記(ii)、(iii)の反応も重要である可能性があった。

3.4 結論

(1) 培養期間および(2) 添加する $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度に着目し、 NO_2^- 生成・消費速度の最適な解析条件を検討したうえで森林表層土壌における NO_3^- の生成・消費速度の算出と消費される NO_3^- の変換経路の推定を行うことを目的とした。その結果、 NO_2^- の滞留時間は短く、0次反応および ^{15}N の循環はおきないと仮定して生成・消費速度を算出するためには、 NH_4^+ や NO_3^- の生成速度の算出時に比べて、培養期間を著しく短くする必要があることが明らかとなった。また添加する $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度は生成速度には大きな影響を及ぼさないが、消費速度は添加する $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度の影響を強く受けることが明らかとなった。最適化した条件で NO_2^- 生成・消費速度を算出した結果、 NO_2^- フローの測定を行うためには以下の点(1)-(3)が重要であると考えられた。

(1) $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加濃度は極力低濃度に留める

(2)添加初期の値を速度の算出に用いる

(3)速度の算出に用いる培養期間を短くすることで0次反応での近似を行う

また、 NO_2^- は NH_4^+ や NO_3^- に比べて土壌中に低濃度にしか存在しないが、 NO_2^- 生成は NO_3^- 生成に比べて大きな速度で生じていることが推察された。加えて、消費された NO_2^- は NO_3^- 以外の形態に変換されること、その割合は添加 NO_2^- 濃度に伴って変化することが示された。

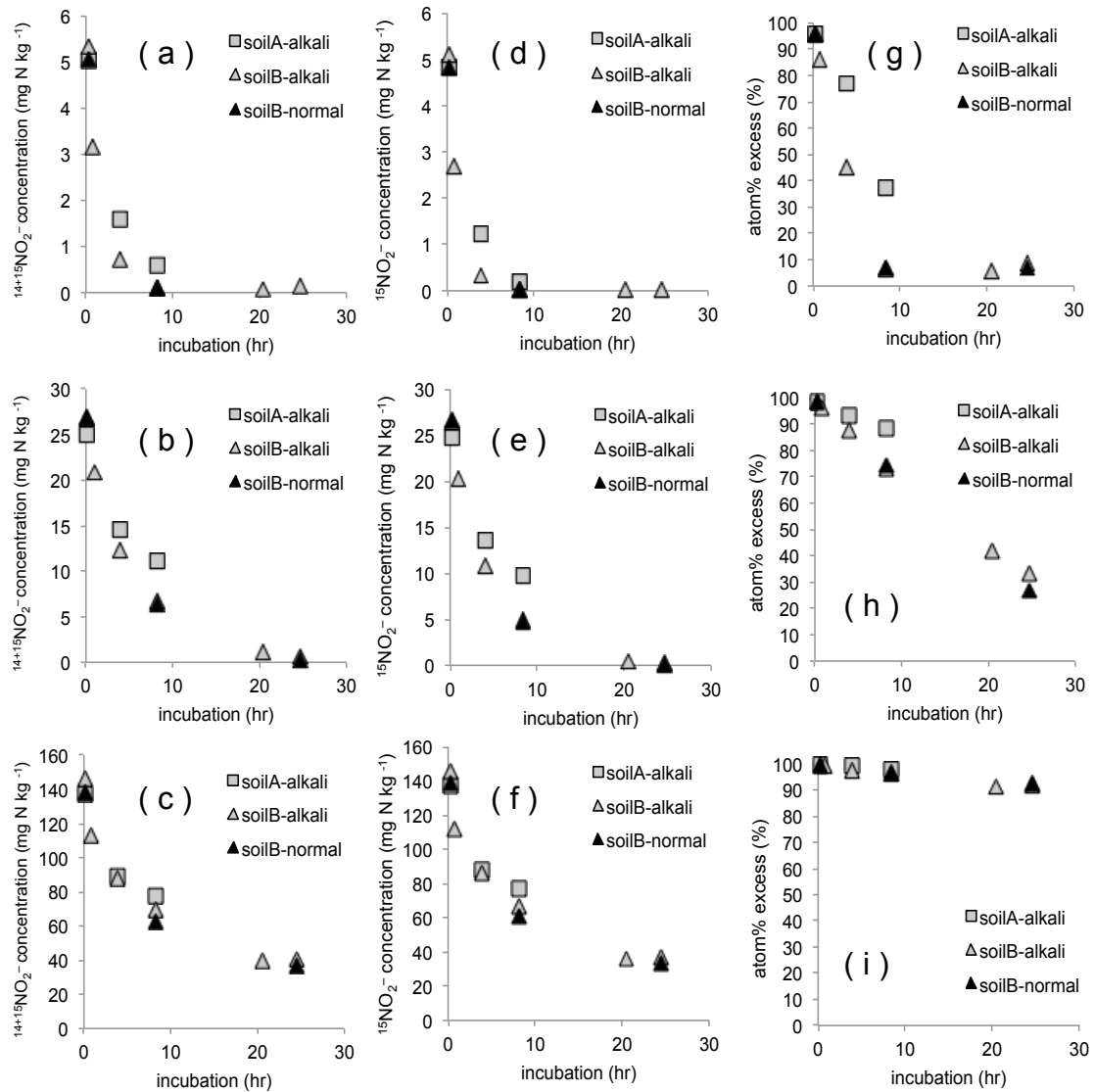


Fig 3.1 $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加培養期間中における $^{14+15}\text{NO}_2^-$ 濃度, $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度, 同位体比の変化

(a),(b),(c) : $^{14+15}\text{NO}_2^-$ 濃度, (d),(e),(f) : $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度, (g),(h),(i) : NO_2^- 同位体比

(a),(d),(g) : 6 mg N kg^{-1} , (b),(e),(h) : 30 mg N kg^{-1} , (c),(f),(i) : 150 mg N kg^{-1}

atom% excess = atom% - 窒素安定同位体自然存在比(0.366 atom%)

soilA soilB はともに FM 多摩丘陵で採取された 0-10cm 土壌である。

Alkali, normal は抽出に用いた 2MKCl の pH 条件をさす。

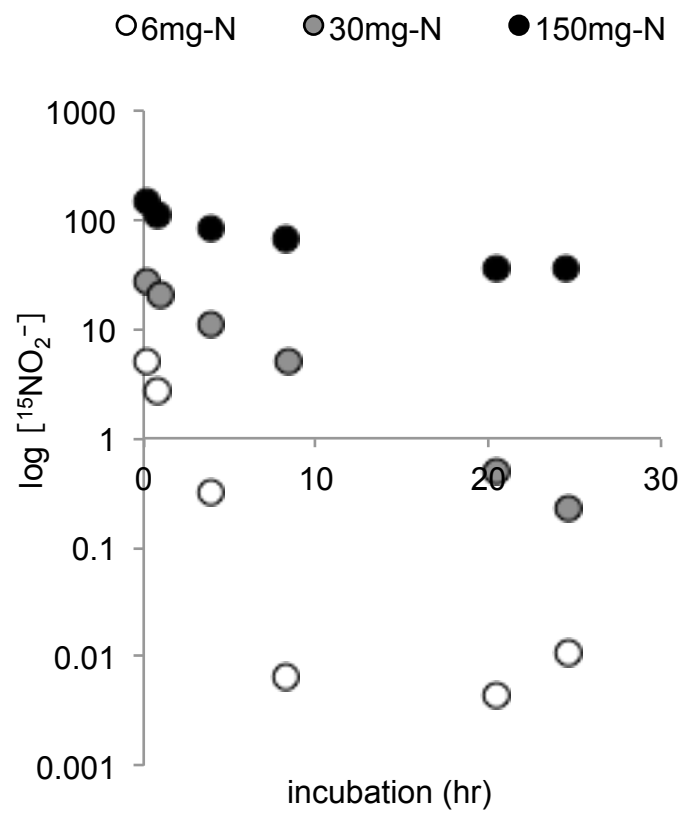


Fig 3.2 培養期間における $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度の対数プロット

Table 3.1 NO₂⁻ production and consumption rates in Tama, soil A (n=1)

Table 5. KCl production and consumption rates in alkali soil A (mg N kg^{-1})						
added 15N mg N kg^{-1}	KCl	Site	0-4hr		4-8hr	
			p	c	p	c
			mg N kg^{-1} soil d^{-1}			
6	alkali	A	4.5	27.0	4.0	9.6
30	alkali	A	7.1	73.6	4.0	23.1
150	alkali	A	6.4	317.1	3.4	62.1

p: production rate , c: consumption rate

Table 3.2 NO₂⁻ production and consumption rates in Tama, soilB (n=1)

added 15N mg N kg ⁻¹	KCl	Site	0-1hr		1-4hr		4-8hr		8-21hr		21-24hr	
			p	c	p	c	p	c	p	c	p	c
			mg N kg ⁻¹ soil d ⁻¹									
6	alkali	B	20.0	111.6	8.5	27.2	3.4	6.9	0.0	0.1	n.d.	n.d.
30	alkali	B	20.9	215.7	12.5	79.8	9.7	40.0	3.6	14.7	1.2	4.1
150	alkali	B	n.d.	1246.1	12.2	209.3	7.4	109.5	5.2	63.6	n.d.	n.d.

p: production rate , c: consumption rate

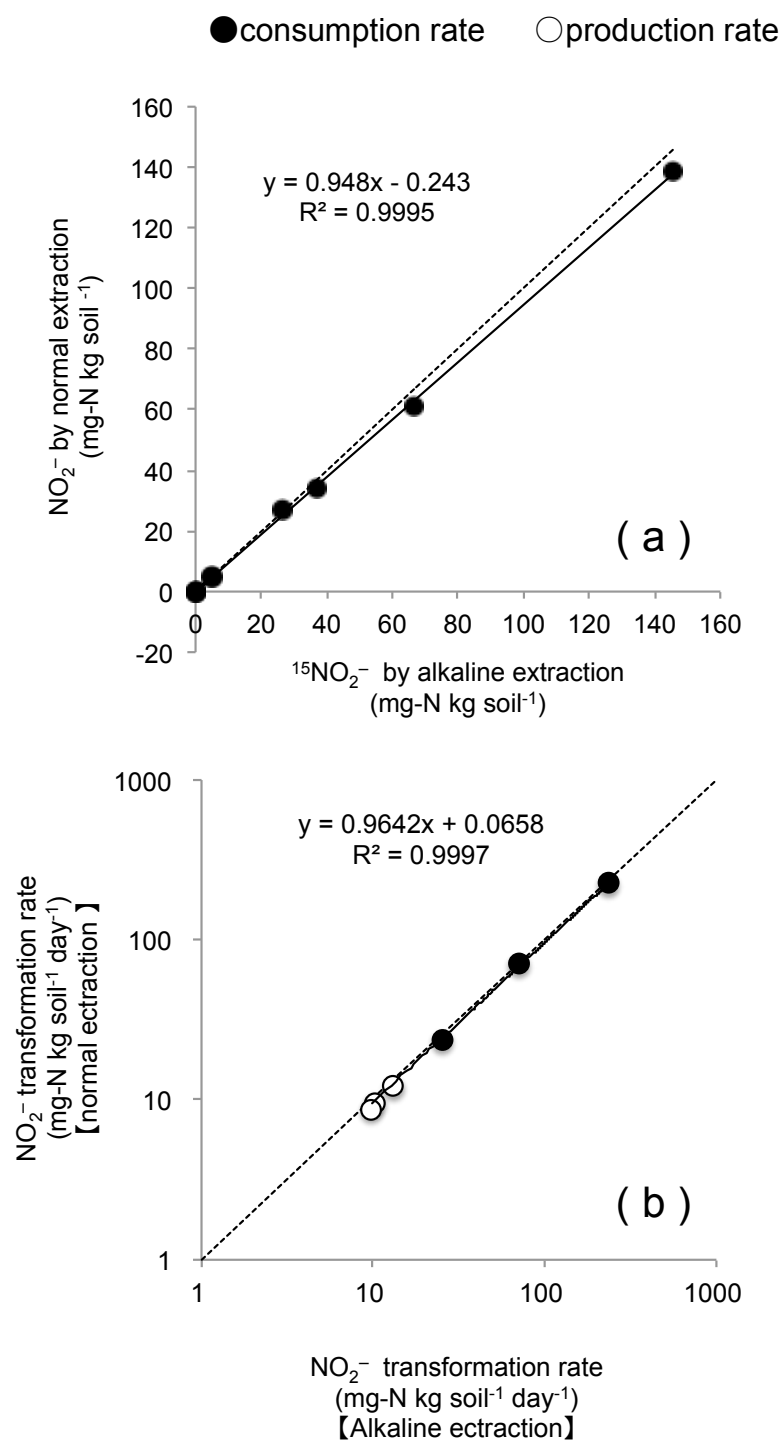


Fig 3.3 アルカリ抽出と pH 未調整の抽出の比較

(a) アルカリ抽出による抽出溶液中 $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度と通常の KCl 抽出による抽出溶液中 $^{15}\text{NO}_2^-$ 濃度の関係

(b) アルカリ抽出溶液の測定値から算出した NO_2^- 生成・消費速度と通常の KCl 抽出溶液の測定値から算出した NO_2^- 生成・消費速度の関係

○ $^{15}\text{NO}_2^-$, △ $^{15}\text{NO}_3^-$, × DO^{15}N , □ unrecovered ^{15}N

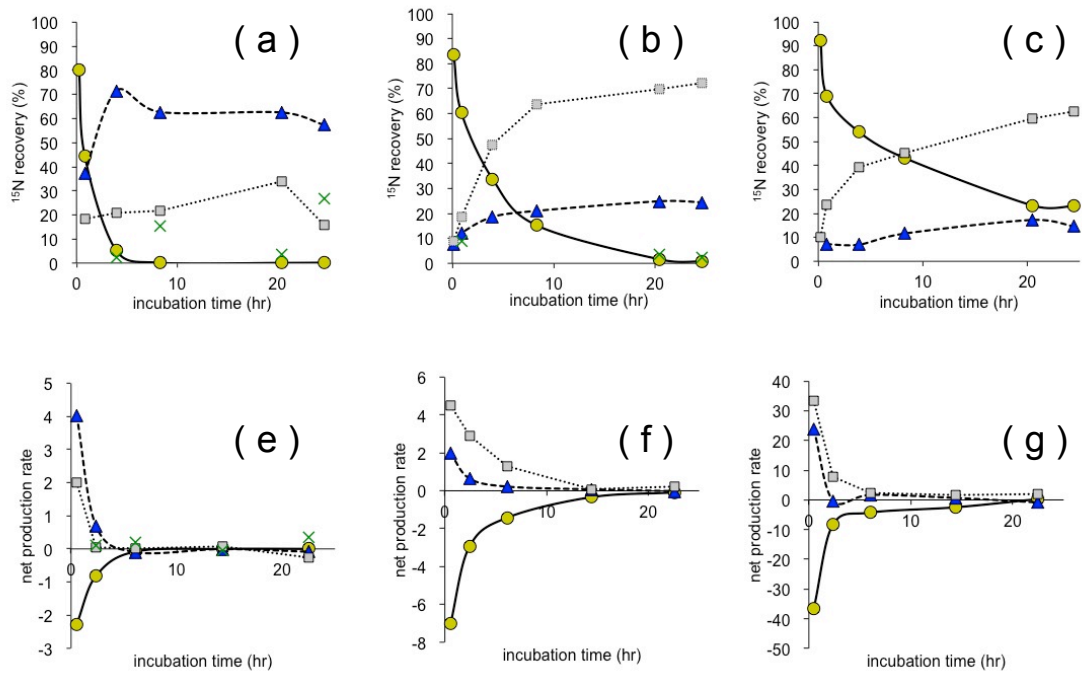


Fig 3.4 培養期間中における添加 ^{15}N の変換と ^{15}N 濃度変化の速度

(a)–(c) : $^{15}\text{NO}_2^-$, $^{15}\text{NO}_3^-$, ^{15}DON としての ^{15}N 回収率の変化

(e)–(g) : $^{15}\text{NO}_2^-$, $^{15}\text{NO}_3^-$, ^{15}DON 濃度変化の速度(蓄積速度)

いずれも soil B, アルカリ抽出の測定値を示した。

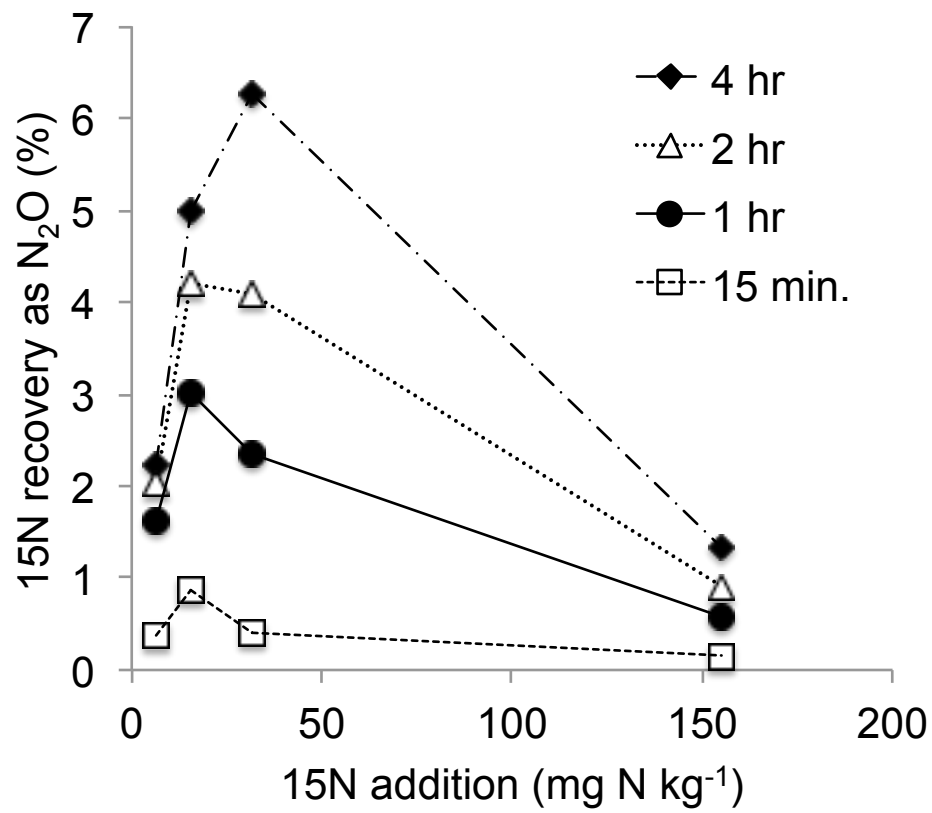


Fig 3.5 $^{15}\text{NO}_2^-$ -添加量と $^{15}\text{N}_2\text{O}$ としての ^{15}N 回収率 の関係
 凡例は ^{15}N 添加後の培養時間を示す。

4 章 斜面森林土壌における亜硝酸動態とその制御要因の解析

4.1 緒言

3 章において NO_2^- は土壌中に低濃度でしか存在しないが、より高濃度に存在する NO_3^- よりも大きな速度で生成されている可能性が示唆された。そこで、本章では 3 章までに設定した速度解析の条件を用いて、さまざまな性質の土壌において NO_2^- の生成・消費速度の測定を行った。また、森林表層土壌での NO_2^- 動態と硝化のメカニズムを明らかにするために、算出された NO_2^- の生成・消費速度と既往研究の NH_4^+ 生成・消費速度および NO_3^- 生成・消費速度の関係性を解析した。また、 NO_2^- 生成・消費速度はどのような環境要因に制御されうるのかを明らかにするために、 NO_2^- 生成・消費速度と土壌理化学性との相関解析を行った。

また、3 章において、 NO_2^- は NO_3^- 以外の形態にも多量に変換されうることが示され、 NO_2^- 濃度によって、 NO_2^- の消費経路が変化しうることが示唆された。そこで本章では、森林表層土壌における NO_2^- の消費経路とその制御要因について明らかにすることを目的に、2 つの培養時間において NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ , DON の濃度・同位体比測定をおこない、添加 $^{15}\text{NO}_2^-$ がどのような窒素化合物に変換されるかを明らかにした。

4.1.1 研究サイトの概要

条件の異なる 2 地点の森林斜面プロットにおいて、斜面上部から下部までの表層土壌を連続的に採取し、 $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加培養による NO_2^- 生成消費速度の算出と、変換径路の推

定を行った。研究サイトは京都大学芦生研究林(以下芦生)の天然広葉樹林東京大学千葉演習林袋山沢試験地(以下袋山沢)の人工針葉樹林を対象とした(Fig 4.1)。この2地点は、近年全国の森林土壌において行われた窒素循環に関する一斉調査の対象となっており、そのデータは一般に公開されているため(Urakawa et al. 2014)、土壌の理化学性やなどについての特徴付けが容易である。一斉調査のデータから両森林の特徴を比較すると、芦生は袋山沢のサイトと比較して年平均降水量については大きな差はないが、標高が高く、年平均気温が低く、12月-4月にかけては積雪が見られる。芦生は天然広葉樹林であるが、袋山沢は人工針葉樹林であり、下層植生も異なる。土壌型は千葉が乾性褐色森林土、芦生が適潤性褐色森林土である。土壌の化学性に関する比較では、芦生では全窒素量、全炭素量、水溶性有機炭素濃度が総じて高いが、袋山沢はこれらの有機態炭素・窒素の蓄積が全国的に見ても少ない土壌である。ただし、C/N比に関してはどちらも18程度であり、大きな違いは見られなかった。また、芦生では土壌の酸性化が進行しており土壌pHが全国的にみても非常に低く(一斉調査を行った全国38森林中で最も低い)、土壌の水抽出液中のAl濃度も高いが、袋山沢は全国的に見ても表層土壌のpHが高い特徴を有する。芦生の斜面土壌では、これまでに、斜面上部に比べて下部で植物の生育が良いこと(Osada et al. 2004)、斜面下部において土壌を培養したときの NH_4^+ や NO_3^- 蓄積速度が大きいこと(Tateno et al. 2004)、斜面下部では植物が窒素源として NO_3^- を利用していること(Tateno et al. 2005)が明らかになっている。これらの知見は、斜面の上部から下部にかけて、窒素循環の経路や速度に変化があること、 NO_3^- 生成が斜面の下部で上部に比べて顕著に生じることを示唆しているが、そのメカニズムについては明らかにされていない。また、袋山沢の斜面土壌においては、窒素動態の詳細な研究はこれまで行われてこなかった。近年、加藤らは芦生と袋山沢の双方において、土壌

理化学性と NH_4^+ 生成・消費速度、 NO_3^- 生成・消費速度の解析を行い、斜面系列に沿った土壌理化学性の変化と NH_4^+ 、 NO_3^- 生成・消費速度の変化があることを見いだした(加藤 修士論文, 2015)。これについては以下の項で詳細に述べる。

4.1.2 研究サイトの土壌理化学性、 NH_4^+ ・ NO_3^- 動態の特徴

ここでは、それぞれの斜面における土壌の特性を特徴づけるために、加藤修士論文(2015)の報告をもとに、芦生と袋山沢の森林表層土壌の理化学性と NH_4^+ 生成、 NO_3^- 生成速度の結果について概説する。なお、芦生では同一の斜面位置における、土壌採取の繰り返しが存在しないために、統計による処理は行っていない。まず、芦生において、A0 層、0-10cm 土壌ともに、pH は極めて低かった(Fig4.2 (a))。特に、0-10cm の斜面上部では $\text{pH} < 4$ となる地点も存在し、これは国内の他の森林土壌(Urakawa et al. 2014)と比較しても非常に低い値であり、強度に酸性化しているといえる。また、含水率は 0-10cm 土壌においては斜面下部(180, 200 m)において上部(0, 20, 40m)よりも高い値が観測されたが、有機物層においては斜面下部にいくにつれて値が低下した((Fig4.2 (b))。袋山沢において、pH は A0 層で 5.5-6.2, 0-10cm 土壌で 5.2-6.2 に分布し(Fig 4.3(a))、全国の森林土壌(Urakawa et al. 2014)と比較において高い値を示した。含水率は、A0 層においては斜面上部からの距離に付随した変化は無かったが、0-10cm 土壌においては斜面下部にいくにつれて上昇した(Fig 4.3(b))。また、A0 層において全炭素、全窒素濃度は位置による変動が大きく、斜面最上部からの距離の変化にともなった一定の傾向は見られなかったが(補遺 4.1)、両者の比率である C/N 比は斜面最上部でもっとも高く、斜面の中部で低く、下部では中部よりも高くなる傾向がみられた(Fig 4.3 (c))。0-10 cm 土壌に関しては、全炭素、全窒素濃度に斜面上部からの距離による違いはみられなかつ

たが(補遺 4.1)、C/N 比には違いがみられ、斜面最上部でもっとも高く、下部にかけてやや低下する傾向がみられた(Fig 4.3(c))。

芦生の 0-10cm 土壌において NH_4^+ 生成速度は斜面下部にかけて増加した(Fig 4.2(c))。また、 NO_3^- 生成速度については、1 地点(40m)においてきわめて大きな値をしめしたが、これを除外すると斜面の下部にかけて上昇した(Fig 4.2(d))。袋山沢においては、 NH_4^+ 濃度と生成速度には斜面系列での変化が見られなかったが(Fig 4.3(d),(f))、 NO_3^- 濃度と生成速度は斜面の下部で増加する傾向を示した(Fig 4.3(e),(g))。

このように、芦生と袋山沢では NH_4^+ 濃度と生成速度の傾向に差異が見られた。さらに、 NO_3^- 濃度と生成速度は斜面系列での傾度が存在した。したがって、これらの斜面土壌において、硝化の中間生成物である NO_2^- の動態を明らかにすることで、森林表層土壌における硝化のメカニズムについてより詳細に明らかにできると考えられた。

4.2 方法

4.2.1 土壌採取

芦生研究林では、全長 200 m の斜面の上部から下部にかけて、20 m ごとに 11 点から有機物層(以降 A0 層)と 0-10cm 土壌のサンプリングを行った。袋山沢では、8 m×100 m のプロットを設定し、斜面の高さ方向に 10m おきに 11 点、横方向には 2m おきに 5 点から採取をおこなった。つまり、メッシュ状に 11×5=55 点から、A0 層と 0-10cm 土壌のサンプリングを行った。芦生の斜面では、A0 層は斜面上部の 4 点にしか採取できる量存在しなかった。また、袋山沢では斜面の上部にいくにつれ A0 層は薄くなり、最上部では A0 層の採取ができなかった。採取した土壌は 4 mm のふるいでふるったのちに、培養まで 4℃で保存した。

4.2.2 NO₂⁻添加培養と土壌抽出

第3章におけるFM多摩丘陵の土壌を用いた実験から、低い添加濃度においては、NO₂⁻は迅速に消費され、長期の培養は生成・消費速度の過小評価につながると考えられた。そのため、培養期間は30分と2時間で行った。また、NO₂⁻添加が土壌中の窒素フローに与える影響を最小限に留めるために、約3mg N kg⁻¹の低濃度で添加を行った。¹⁵NO₂⁻添加培養と抽出の詳細は以下の通りである。

芦生研究林にて採取した土壌については、土壌3.5 gを50 mLプラスチックチューブに分取し、12時間25℃に置いて前培養を行った。その後、1mMのNa¹⁵NO₂水溶液を0.5 mL添加し、25℃で30分または2時間培養した。2M KOHでpHを12.8に調整した2M KCl 35 mLを添加し、振とう(200 min⁻¹, 10分)、遠心(3,000 G, 10分)を行い、ガラス繊維濾紙 (GF/F)でろ過をした。抽出液は測定まで4℃で保存した。また、初期NO₂⁻濃度測定用に、¹⁵NO₂⁻添加のかわりに超純水を0.5 mL添加し、その直後に同様の手法で抽出を行った。

袋山沢で採取した土壌については、土壌3.5 gを50 mLプラスチックチューブに分取し、12時間25℃に置いて前培養を行った。その後、1mMのNa¹⁵NO₂水溶液を1 mL添加し、25℃で30分または2時間培養した。pHを調整していない2M KCl 35 mLを添加し、振とう(200 min⁻¹, 10分)、遠心(3,000 G, 5分)を行い、ガラス繊維濾紙(GF/F)でろ過をした。抽出液は測定まで4℃で保存した。また、初期NO₂⁻濃度測定用には、2M KOHでpHを12.31に調整した2M KCl 35 mLを添加し、振とう(200 min⁻¹, 10分)、遠心(3,000 G, 10分)して抽出液をえた。

4.2.3 溶存無機・有機態窒素の測定

NO_2^- の濃度・同位体比測定はアザイド法 (2.2.1.1)で行った。また、袋山沢試験地の $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加培養サンプルに関しては、脱窒菌法による NO_3^- の濃度・同位体比測定 (3.2.4.1)と過硫酸酸化による TDN 濃度・同位体比測定(3.2.4.2)、ディフュージョン法と過硫酸酸化による NH_4^+ の濃度・同位体比測定(4.2.3.1)を行い、 NO_2^- がどの形態へと変換されたのかを定量的に明らかにした。

4.2.3.1 NH_4^+ の測定

ディフュージョン法(Holmes et al. 1998)を用いて、アンモニウム態窒素を回収したのち、それらを酸化して硝酸態窒素に変え、それをさらに脱窒菌法にて N_2O へ変換し、測定を行った。測定の手順をいかに示す。

(1) Diffusion 法による NH_4^+ の回収

ディフュージョン法は、 H_2SO_4 溶液をしみ込ませたガラス繊維ろ紙を、液体は通さず気体は通過させるテフロンテープで包み、サンプル溶液中に入れることで $2\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の反応によって NH_4^+ を捕集する方法である。ガラス繊維濾紙(Watman, GF/D, Whatman Int. Ltd., Maidstone, UK; 450°Cで 4h 加熱済み)に 1:20 H_2SO_4 を 25 μL 染み込ませ、テフロンテープ(Sigma-Aldrich, #Z221880)で包んだもの(以後フィルターパックとよぶ) および、予め薬包紙に包んでおいた MgO (WAKO, 135-00285, 450°Cで 4hr 加熱済み) 0.03g を 20mL ポリ瓶に分取した土壌抽出液 10mL に加え、きつく栓をしめ、1 日間振盪しながらよく混和させた。この間にサンプル溶液は MgO によってアルカリ性になり、溶存する NH_4^+ が NH_3 ガスとなつてろ紙上に捕集

される。一日後にフィルターパックの取り出しを行い、取り出したフィルターパックは超純水で洗浄後、パック内のフィルターを取り出し、過硫酸酸化の処理を行った。過硫酸酸化については(3.2.4.2)の方法に準ずる。ただし、(3.2.4.2)において試料溶液を 1mL 分注するかわりに、回収したフィルターをネジ付き試験管に入れ、超純水を 1mL 添加した。

4.2.4 統計処理

統計処理は‘R’(Version 2.10.1 <http://www.r-project.org>)を用いた。

袋山沢試験地に関して得られたデータについて、斜面最上部から距離が同一である 5 点を繰り返しとして扱い、斜面位置による土壌の理化学性および窒素変換速度の比較を Tukey-Kramer 法による多重比較検定 (ANOVA with post hoc Tukey-Kramer tests) によって行った。また、各速度と環境要因との相関を明らかにするために、線形回帰を用いた。有意水準は 5%にて検定を行った。

4.3 結果

4.3.1 NO₂⁻濃度 (芦生 : Fig 4.4(a), 袋山沢 : Fig 4.5(a))

NO₂⁻濃度はどちらのサイトにおいても、NH₄⁺濃度や NO₃⁻濃度と比較して低い値を示した。NO₂⁻濃度は芦生研究林において、A0 層で 0.22–0.54mg N kg⁻¹、0–10cm 土壌で 0.15–1.67mg N kg⁻¹であった。袋山沢試験地においてはA0層で0.13–0.27mg N kg⁻¹、0–10cm 土壌で 0.08–0.18 mg N kg⁻¹であった。このように NO₂⁻濃度はサイトや斜面位置に一貫して非常に低い値を示したが、NO₂⁻濃度の分布にはサイト間や斜面の位置で変化が見られた。芦生研究林における NO₂⁻濃度の最低値は袋山沢試験地における濃度

の最大値と同程度であり、濃度の最大値の比較では、芦生の土壌は袋山沢の土壌に比べ、A0層において2倍、0-10cm土壌において約9倍濃度が高かった。袋山沢のA0層、0-10cm土壌の双方において、 NO_2^- 濃度の最低値は斜面最上部、最高値は斜面最下部で観測され、斜面上部から下部にかけて NO_2^- 濃度は増加した。芦生においては統計的な判断ができないが、0-10cm土壌において、斜面最上部からの距離が120 m以上の地点では NO_2^- 濃度は 0.4 mg N kg^{-1} よりも大きな値をとり、斜面下部で濃度が高い傾向は両サイトで一致した。また、 NO_2^- 濃度はどちらのサイトにおいてもA0層で0-10cm土壌より高い傾向にあった。

4.3.2 NO_2^- 生成・消費速度と平均滞留時間(MRT)

(芦生 : Fig 4.4(b)-(d), 袋山沢 : Fig 4.5(b)-(d))

NO_2^- 生成速度および消費速度はどちらのサイトにおいても NO_2^- 濃度に比べて1~2オーダー大きな値を示した(Fig 4.4 (a)-(c), Fig 4.5 (a)-(c))。 NO_2^- 生成速度は芦生研究林において、A0層では $10.9\text{--}33.4 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 、0-10cm土壌では $6.8\text{--}117.2 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ であった(Fig 4.4 (b))。袋山沢試験地ではA0層で、 $2.4\text{--}17.9 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 、0-10cm土壌で $0.4\text{--}6.5 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ であった(Fig 4.5(b))。 NO_2^- 消費速度は NO_2^- の添加によって強く影響されるために、環境中での速度を反映した定量的な把握は困難であるが(3章)、用いた条件においては、芦生研究林のA0層で $22.0\text{--}52.5 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 、0-10cm土壌で $8.5\text{--}151.9 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ の速度を示した(Fig 4.4 (c))。袋山沢試験地のA0層では $18.5\text{--}47.1 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 、0-10cm土壌では $4.4\text{--}20.8 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ の速度を示した(Fig. 4.5(c))。 NO_2^- 濃度と同様に、 NO_2^- 生成・消費速度についてもサイト間や斜面の位置で変化が見られ、その傾向は NO_2^- 濃度においてみられた傾向と一致した。すなわち、芦

生は袋山沢よりも大きい速度を示し、どちらのサイトにおいても NO_2^- -生成速度および消費速度は斜面上部から下部にいくにつれ増加する傾向がみられた(Fig. 4.4(b),(c), Fig. 4.5(b),(c))。土壌の層位による比較では、同一の斜面位置で比較した場合、どちらのサイトにおいても概して A0 層において、0-10cm 土壌よりも大きな生成・消費速度を示し、その差は NO_2^- 濃度の土壌層位間の差と比較して明瞭であった(Fig. 4.4(b),(c), Fig. 4.5(b),(c))。

現場土壌中の NO_2^- 濃度を NO_2^- の生成速度の値で割ることで求まる NO_2^- の平均滞留時間(MRT)は、 NO_2^- の定常状態を仮定したときに土壌中で NO_2^- としてどの程度の時間存在するかの指標である。その値は芦生では A0 層で 0.01 日、0-10cm 土壌で 0.01-0.08 日(Fig. 4.4(d))、袋山沢では A0 層で 0.01-0.06 日、0-10cm 土壌で 0.03-0.39 日(Fig. 4.5(d))であり、いずれも数十分～数時間という範囲を示した。斜面位置での違いについて、芦生の 0-10cm 土壌では斜面の中部で長い MRT が算出されたが、統計的な判断はできない(Fig. 4.4(d))。また、袋山沢においては A0 層、0-10cm 土壌ともに、斜面下部で MRT は短くなる傾向がみられた(Fig. 4.5(d))。

4.3.3 NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- 生成消費速度間の相関解析

NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- 生成・消費速度間の相関解析の結果について芦生の結果を Table 4.2 に、袋山沢の結果を Table 4.3 に示した。芦生と袋山沢の双方で、 NO_2^- 生成速度と NO_2^- 消費速度は強い相関を有した。また、芦生と袋山沢の双方において、0-10cm 土壌では NO_2^- 生成速度と NH_4^+ 生成速度は相関を有したが、袋山沢の 0-10cm 土壌ではその傾向は弱かった(芦生 : $R^2=0.89$, $p<0.0001$, 袋山沢 : $R^2=0.15$, $p<0.01$)。さらに、袋山沢の A0 層では NH_4^+ 生成速度と NO_2^- 生成速度との間に有意な相関関係はみられなか

った。芦生の 0-10cm 土壌では NO_2^- 生成速度と NH_4^+ 消費速度の間にも有意な相関がみられたが、袋山沢では土壌の層位によらず有意な関係はみられなかった。袋山沢の 0-10cm 土壌では NO_2^- 生成速度は NO_3^- 生成速度とつよい相関関係を示した ($R^2=0.83$, $p<0.0001$) が、芦生の 0-10cm 土壌と、袋山沢の A0 層においては有意な関係はみられなかった。

4.3.4 NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- 生成速度間の比

芦生と袋山沢において、(A) NO_2^- 生成速度と NO_2^- 消費速度の比 ($\text{PNO}_2/\text{CNO}_2$)、(B) NO_2^- 生成速度と NH_4^+ 生成速度の比 ($\text{PNO}_2/\text{PNH}_4$)、(C) NO_3^- 生成速度と NO_2^- 生成速度の比 ($\text{PNO}_3/\text{PNO}_2$) を算出し、芦生の結果について Fig. 4.6 に、袋山沢の結果について Fig. 4.7 に示した。3 章より、本研究において消費速度は基質 (NO_2^-) 添加条件で算出されているために過大評価されており、基質が過剰に存在する条件での消費ポテンシャルを示すと考えられた。一方で、 NO_2^- 生成速度は添加条件に大きく影響されないと考えられた (3 章)。したがって、(A) は NO_2^- の消費ポテンシャルに対する環境中での NO_2^- 生成速度の指標として示した。また、(B) と (C) はそれぞれ無機態窒素の酸化過程： $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ の 1 段階目の酸化と 2 段階目の酸化における (生成物の生成速度)/(基質の生成速度) を意味する。すなわち、生成した基質のうちどの程度の割合が硝化のプロセスによって酸化されるかを示す指標として用いた。(A) NO_2^- 生成速度/ NO_2^- 消費速度比は、芦生において A0 層で 0.50-0.66、0-10cm 土壌において 0.36-0.86 であり (Fig. 4.6(a))、袋山沢では A0 層で 0.13-0.41、0-10cm 土壌で 0.09-0.3 の値を示した (Fig. 4.7(a))。芦生では袋山沢よりも高い値を示し、芦生では斜面系列に沿った変化がみられなかったが、袋山沢では層位に共通して斜面の下部で値が大きくなる傾向がみら

れた(Fig. 4.6(a), Fig. 4.7(a))。 (B) NO_2^- 生成速度/ NH_4^+ 生成速度比は芦生の A0 層で 1.1–5.8、0–10cm 土壌で 1.1–8.3 であり(Fig. 4.6(b))、袋山沢の A0 層で 0.29–1.5、0–10cm 土壌で 0.17–1.9 であった(Fig. 4.7(b))。 芦生では袋山沢よりも大きな値を示し、芦生では斜面系列に沿った変化がみられなかったが、袋山沢では層位に共通して斜面の下部で値が大きくなる傾向がみられた(Fig. 4.6(b), Fig. 4.7(b))。 (C) NO_3^- 生成速度/ NO_2^- 生成速度比は、芦生の A0 層で 0.11–0.29、0–10cm 土壌で 0.03–1.0 であり(Fig. 4.6(c))、袋山沢の A0 層で 0.17–0.64、0–10cm 土壌で 0.12–0.50 であった(Fig. 4.7(c))。 芦生においては突出して高い値を示した地点(0–10cm, 40m)があったが、それをのぞくと概して袋山沢において芦生よりも大きな値を示した。また、双方のサイト、層位に共通して斜面系列に沿った変化はみられなかった(Fig. 4.6(c), Fig. 4.7(c))。

4.3.5 NO_2^- 生成速度と土壌理化学性の関係 (芦生 : Table. 4.4, 袋山沢 : Table 4.5)

芦生研究林と袋山沢試験地の斜面プロットで得られた土壌の理化学性と NO_2^- 生成速度の測定結果をもとに、両者の間の相関解析を線形回帰により行った。なお、芦生の A0 層についてはデータ数が少ないため解析から除外した。芦生については現場土壌中の NO_2^- 濃度と含水率、袋山沢については pH、含水率、全窒素(TN)量、全炭素(TC)量、C/N 比、全溶存有機態窒素(DON)濃度 (0–10cm 土壌のみ)、全溶存有機態炭素(DOC)濃度 (0–10cm 土壌のみ)、DOC/DON 比 (0–10cm 土壌のみ)、現場土壌中の NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- 濃度との解析を行った。

芦生と袋山沢の双方で、土壌の層位によらず、 NO_2^- 生成・消費速度は現場土壌中の NO_2^- 濃度と強い相関を示した。さらに、袋山沢においては現場土壌中の NO_3^- 濃度とも強い相関を有した(芦生においては同一土壌について現場土壌中の NO_3^- 濃度データが

ないために解析を行っていない)。また、芦生と袋山沢の双方で、土壌の層位によらず、 NO_2^- 生成・消費速度は土壌中の含水率と有意な相関を示した。袋山沢においては、有機物層で NO_2^- 生成・消費速度と全窒素量(TN)、全炭素量(TC)との間に有意な正の相関が検出された。また、0-10cm 土壌では NO_2^- 生成・消費速度と DOC/DON 比の間に有意な負の相関、土壌 pH との間に有意な正の相関が検出された。相関が検出されたこれらの因子は、 NO_2^- 生成活性に直接的に影響する以外に、 NH_4^+ 消費における NO_2^- 生成の相対的な優位性を変化させることを介して NO_2^- 生成活性を制限する可能性が考えられる。そこで、後者の可能性についても検討するために、これらの土壌理化学性と NO_2^- 生成速度・ NH_4^+ 生成速度の比について線形回帰による相関解析を行った。その結果、A0 層において NO_2^- 生成速度/ NH_4^+ 生成速度比と含水率、全窒素量、全炭素量は有意な相関を示さなかった。また、0-10cm 土壌において、 NO_2^- 生成速度/ NH_4^+ 生成速度比と含水率は有意な相関を示したが、その程度は非常に弱かった($R^2=0.12$, $p<0.01$)。DOC/DON 比は線形回帰において有意な相関がみられなかったが、 NO_2^- 生成速度/ NH_4^+ 生成速度比と DOC/DON 比は非線形の関係性を有した(Fig. 4.8(a))。具体的には、DOC/DON 比が 5 以下の条件で NO_2^- 生成速度/ NH_4^+ 生成速度比が上昇する傾向があった。DOC/DON 比は NH_4^+ 生成速度、 NO_2^- 生成速度、 NO_3^- 生成速度のそれぞれとも非線形の関係を示し(Fig. 4.8(b))、DOC/DON 比が 5 以下の条件でそれぞれの速度は上昇する傾向を示した。また、 NH_4^+ 生成は $\text{DOC/DON}>5$ においても大きな速度を示したが、 NO_2^- 生成、 NO_3^- 生成は $\text{DOC/DON}>5$ となる領域ではほとんど生じなかった。

4.3.6 袋山沢の土壌における NO_2^- 消費経路の検出

袋山沢の土壌について、 ^{15}N 添加後 0.5 時間と 2 時間の時点で DON, NO_3^- , NO_2^- ,

NH_4^+ へと変換された ^{15}N の割合を、A0 層のついて Fig 4.9 に、0-10cm 土壌について Fig 4.10 に示した。これらの図において、上記の無機態・有機態窒素として回収されなかった ^{15}N は uncollected ^{15}N として記載した。uncollected ^{15}N は 2M KCl では抽出されない有機物として土壌に残存しているか、ガス態へと変換されることで土壌から失われたと推定される。図中の数値の詳細と、斜面系列での数値の変化の検定(多重比較)結果については補遺 4.2 (A),(B)として収録した。

A0 層と 0-10cm 土壌の双方において、 NO_3^- 以外に DON への変換と NH_4^+ への変換が検出され、uncollected ^{15}N も顕著な割合で存在した。このうち、 NH_4^+ への変換は層位・培養時間に共通して少なかったが、DON と NO_3^- への変換は層位によって傾向がことなり、A0 層では培養時間によっても傾向がことなった。

$^{15}\text{NO}_2^-$ 添加後 0.5 時間後の時点では、A0 層、0-10cm 土壌とも、20-30%が NO_2^- として残存していたが、 NO_2^- の消費経路は A0 層と 0-10cm 土壌で異なった。A0 層では 27.2-62.3%の ^{15}N が DON へと変換され、 NO_3^- への変換はわずかにしか生じなかった。また、 NO_3^- への変換に斜面系列での変化はみとめられなかった。 NH_4^+ への変換は最大で 1.5%であり、 NO_2^- の消費経路としての相対的重要性は低かった。uncollected ^{15}N は 3.8-24.7%であった。0-10cm 土壌においても、同様に DON への変換がみられたが、その程度は A0 層と比較して小さかった。 NO_3^- へと変換された ^{15}N は 16.1-68.4%であり、0-10cm 土壌では NO_2^- の添加後、迅速に NO_3^- が生成した。添加 ^{15}N が NO_3^- へと変換される割合の平均値は斜面上から下にかけて増加したが、その差は有意ではなかった。また、 NH_4^+ への変換は、0-10cm 土壌においても 2.5%未満にとどまり、消費プロセスとしての寄与は小さかった。uncollected ^{15}N の比率は斜面上で斜面下に比べて大きく、44%に達した。

$^{15}\text{NO}_2^-$ 添加後、2時間の培養の後では、A0層において残存する $^{15}\text{NO}_2^-$ は 1.0–14.2% であり、9割程度の添加 NO_2^- は 2時間までに消費されていた。変換された ^{15}N は主に NO_3^- または DON として回収され、 NO_3^- への変換は斜面下にかけて増加する傾向があり、DON への変換はこれとは逆に、斜面上部にかけて上昇する傾向を示した。A0 層の斜面最上部では、0.5 時間の時点より多量の ^{15}N が DON として回収され、 NO_2^- が DON へと変換される反応が培養期間中に進行したことが示唆された。一方で、斜面の中部から下部では 0.5 時間と比較して DON としての ^{15}N 回収量は減少し、 NO_3^- としての ^{15}N 回収量が増加した。このことから、DON の消費と NO_3^- の生成との関連性が示唆された。実際に、0.5 時間から 2 時間にかけての $^{15}\text{NO}_3^-$ 濃度の変化量と DO^{15}N の変化量には強い相関関係がみられ $((30 \text{ 分}-2 \text{ 時間における } ^{15} \text{NO}_3^- \text{生成量}) = -0.8716 \times (30 \text{ 分}-2 \text{ 時間における } \text{DO}^{15}\text{N} \text{ 生成量}) + 0.367 \text{ } R^2=0.897, p<0.0001, \text{ Fig 4.11(a)})$ 、DON と NO_3^- がほぼ 1:1 の比率で相互に変換される反応が生じた可能性が示唆された。0–10cm 土壌においては、10.5–26.9%の ^{15}N が NO_2^- として残存しており、 NO_3^- への変換は斜面下部にかけて上昇する傾向がみられた。また、DON への変換も 0–29.7%生じ、 NO_2^- の重要な消費経路である可能性が示された。uncollected ^{15}N の割合は、11.6–55.2%であった。

4.4 考察

4.4.1 森林斜面の表層土壌における NO_2^- 濃度、生成・消費速度、MRT

本研究の 3 章において、 NO_2^- 濃度は非常に低いものの、 NO_2^- 生成速度は大きく、 NO_3^- 生成速度を上回る程度に生じていることが示唆された。本章における結果は 3 章の結果を支持し、どちらのサイトにおいても NO_2^- 濃度は一貫して低かったが、生成・消費速

度はそれよりも 1~2 オーダー大きい値を示した(Fig. 4.4(a)-(c), Fig. 4.5 (a)-(c))。また、どちらのサイトにおいても、層位によらず、 NO_2^- 濃度は NO_2^- 生成・消費速度と強い相関関係を示した(Table 4.4, Table 4.5)。このことから、アルカリ条件での抽出における NO_2^- 濃度の値は NO_2^- 生成・消費速度の指標として有用であることが示唆された。また、 NO_2^- の MRT は数十分~数時間であると見積もられた(Fig. 4.4(d), Fig 4.5(d))。一般的に報告される NH_4^+ や NO_3^- の MRT (同様の方法で算出) は数時間から数日であることが多い(Davidson et al. 1992, Tokuchi et al. 2000, Hirobe et al. 2003)。同一の土壌についての比較では、袋山沢において NH_4^+ の MRT は、A0 層で 0.3-3.9 日、0-10 cm 土壌で 0.6-2.6 日であり、 NO_3^- の MRT は A0 層で 1.1-9.0 日、0-10cm 土壌で 1.9-38.8 日であった(Kato 2015 より算出, 補遺 4.3)。したがって、 NH_4^+ , NO_3^- の MRT と比較すると、 NO_2^- の MRT は 1-2 オーダー短く、どちらのサイトにおいても NO_2^- プールは NH_4^+ や NO_3^- プールと比較して活発に回転する特性があると考えられた。

これらの結果から、さまざまな理化学性を有する土壌において、一般的に NO_2^- 濃度は低いが、 NO_2^- 生成速度は大きく、 NO_2^- プールの滞留時間は NH_4^+ や NO_3^- と比較して非常に短いことが明らかになった。

4.4.2 芦生と袋山沢における硝化の制御機構の違い

4.4.2.1 NH_4^+ から NO_2^- までの酸化過程

芦生の 0-10cm 土壌では、斜面の上部から下部にかけて NH_4^+ 生成速度、 NO_2^- 生成速度が上昇する傾向がみられ(Fig. 4.2(c), Fig. 4.4(b))、 NH_4^+ 生成速度と NO_2^- 生成速度は強い相関関係を示した(Table 4.2)。このことから、芦生の 0-10cm 土壌では NH_4^+ 生成と NO_2^- 生成が連動して生じており、 NH_4^+ 生成は NO_2^- 生成を制限する要因であること

が示唆された。袋山沢においては、 NH_4^+ 生成速度が斜面系列に伴った変化を示さなかった一方で、 NO_2^- 生成速度は斜面の上部から下部にかけて上昇する傾向を示した(Fig. 4.3(c), Fig. 4.5(b))。また、 NH_4^+ 生成速度と NO_2^- 生成速度間には 0-10cm 土壌においてのみ弱い相関関係がみられた(Table 4.3)。これらのことから、袋山沢の土壌において、 NH_4^+ 生成と NO_2^- 生成は必ずしも連動して生じず、 NH_4^+ 生成以外の要因が NO_2^- 生成の制御要因となっていることが推察された。

また、 NO_2^- 生成速度と NH_4^+ 生成速度の比は芦生においては斜面系列に沿った傾向がみられなかった一方、袋山沢では層位に共通して斜面下部にいくにつれて増加する傾向を示した(Fig. 4.6(b), Fig. 4.7(b))。この比は生成した NH_4^+ のうちどの程度が NO_2^- 生成に寄与するかを示し、競合する NH_4^+ 消費プロセス(NH_4^+ の同化など)に対する NO_2^- 生成の相対的な優位性を反映すると考えられる。したがって、芦生では斜面の上下で NH_4^+ 消費における NO_2^- 生成の優位性が変化しないが、袋山沢では斜面の下部で NH_4^+ 消費における NO_2^- 生成の優位性が高まると考えられた。このように、 NH_4^+ 消費における NO_2^- 生成の優位性が斜面位置によって変化することが、 NH_4^+ 生成速度と NO_2^- 生成速度が同一の傾向を示さない一因であると考えられた。

4.4.2.2 NO_2^- から NO_3^- までの酸化過程

サイトや土壌層位に共通して、 NO_2^- 生成速度は斜面上部から下部にかけて上昇する傾向があり、現場土壌の NO_3^- 濃度と強い相関を示した(Table 4.4, Table 4.5)。これらのことから、 NO_2^- の生成は森林斜面における NO_3^- 生成を強く制御していることが示唆された。しかしこの仮説に反して、 NO_2^- 生成速度と NO_3^- 生成速度の相関解析の結果では、袋山沢の 0-10cm 土壌においてのみ有意な相関が検出され、芦生の 0-10cm と袋山

沢の A0 層では有意な相関は検出されなかった。ただし、芦生の 0-10cm では NO_3^- 生成速度が 40m 地点で突出して大きな値を示しており (Fig 4.2(d))、この測定においては繰り返しが設定されていない ($n=1$) ために異常値の影響を大きく受けている可能性が考えられた。実際にこの値を取り除いた場合では、 NO_2^- 生成速度と NO_3^- 生成速度間には有意な相関が検出された ($R^2=0.42$, $p<0.05$)。したがって、芦生においては、速度測定の繰り返を設定したうえで、今後さらに検証を行う必要があると考えられた。なお、袋山沢の A0 層において、 NO_2^- 生成速度と NO_3^- 生成速度の相関がみられない一方で、 NO_2^- 生成速度と NO_3^- 濃度との相関がみられた理由については 4.4.4 にて考察を行う。

4.4.3 NO_2^- 生成速度の制御要因(土壌理化学性)

袋山沢においては、 NH_4^+ 生成に NO_2^- 生成が制御されず、他の要因によって NO_2^- 生成が制御される可能性が示唆された。そこで、 NO_2^- 生成速度の制御機構を明らかにするために、 NO_2^- 生成速度と環境要因との相関解析を行った。 NO_2^- 生成速度と土壌理化学性の相関解析の結果から、A0 層においては含水率、全窒素量、全炭素量が、0-10cm 土壌においては含水率、DOC/DON 比、pH が NO_2^- 生成速度と有意な相関を示し、 NO_2^- 生成速度を制御する要因である可能性が示唆された (Table 4.5)。これらの因子がどのように NO_2^- 生成速度を制御するかを明らかにするために、 NO_2^- 生成速度/ NH_4^+ 生成速度比と環境要因との相関を解析したところ、A0 層の含水率、全窒素量、全炭素量、0-10cm 土壌の pH は NO_2^- 生成速度/ NH_4^+ 生成速度比と有意な相関を示さなかった。また、0-10cm 土壌において含水率は NO_2^- 生成速度/ NH_4^+ 生成速度比と有意な相関を示したが ($R^2=0.12$, $p<0.01$)、その程度は NO_2^- 生成速度と含水率の相関 ($R^2=0.68$, $p<0.0001$) と比較すると弱かった。これらのことから、A0 層においては含水率、全窒素量、全炭素量

が、また 0-10cm 土壌においては pH、含水率が、 NO_2^- 生成活性に直接影響を与えることで NO_2^- 生成速度を制御する可能性が示唆された。

一方で 0-10cm 土壌において、DON/DOC 比は NO_2^- 生成速度/ NH_4^+ 生成速度比と非線形の関係性を有し、 NH_4^+ 消費における NO_2^- 生成の相対的な優位性を変化させることを介して NO_2^- 生成速度に作用すると考えられた。この現象を説明するために、まず、土壌中の炭素・窒素の比率が無機態窒素変換速度に影響を及ぼす理論的な背景について述べる。土壌の全炭素・全窒素の比、すなわち C/N 比は無機態窒素の可給性を規定する要因として一般的に用いられる指標である。微生物が C/N 比が高い基質を用いる場合、微生物体に必要な炭素に対して窒素が相対的に不足するため、無機化よりも不動態が優先されると考えられる。たとえば、仮に微生物体の C/N 比が 10 であり、吸収した C 源の 50%を呼吸により代謝する場合、C/N 比が 20 以上の土壌では炭素に対して窒素が不足し、窒素制限の状態にあると考えられる。したがって、C/N 比が高い条件では従属栄養微生物の窒素要求量が多く、 NH_4^+ 生成速度が小さいことが想定される。また、生成された NH_4^+ は不動態されやすく、生成された NH_4^+ のうち NO_2^- 生成へと供される割合は低いと想定される。さらに、 $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$ を担うアンモニア酸化細菌やアンモニア酸化古細菌は独立栄養性であり、炭素が窒素に対して不足した条件でも炭素制限を受けることなく NH_4^+ を利用することが可能である。したがって、C/N 比が低い条件では炭素に依存する従属栄養細菌の NH_4^+ 利用に対してアンモニア酸化微生物による NH_4^+ 利用の優位性が高まり、生成された NH_4^+ が NO_2^- 生成に供される割合は高くなることが予想される。このように、土壌中の炭素と窒素の比の増減によって微生物の代謝が窒素制限また炭素制限へと切り替わることが予想され、無機化とそれに続く硝化過程は基質の炭素と窒素の比によって制限されると考えられる。本研究では基質の炭素と窒素の比

をあらわす指標として DOC/DON 比を用いた。DOC/DON 比と NH_4^+ 生成速度・ NO_2^- 生成速度・ NO_3^- 生成速度および NO_2^- 生成速度/ NH_4^+ 生成速度比の間には非線形の関係がみられ、DOC/DON 比と速度間の関係は上述した予想と一致した。具体的には、DOC/DON が閾値(DOC/DON=5)以下で無機態窒素(NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-)生成速度が上昇する傾向を示し、DOC/DON>5 の条件では従属栄養微生物による窒素の要求が大きいために窒素の無機化(NH_4^+ 生成)とその後の硝化が抑制されると解釈された。また、 $5 < \text{DOC/DON} < 8$ の領域でも NH_4^+ 生成は生じたが、 NO_2^- 生成は生じず(Fig 4.8(b))、 NO_2^- 生成速度/ NH_4^+ 生成速度比は低い値で推移した(Fig 4.8(a))ことから、この領域においては共存する NH_4^+ 消費プロセスに対する NO_2^- 生成プロセスの優位性は低く、生成された NH_4^+ のうち NO_2^- 生成へと供される割合は低いことが示唆された。DOC/DON<5 の領域においてはDOC/DON比の減少にともなって NO_2^- 生成速度/ NH_4^+ 生成速度比が上昇し、炭素制限の条件に移行するにつれ、 NH_4^+ 消費プロセスに対する NO_2^- 生成プロセスの優位性が高まると考えられた。

なお、本研究では C/N 比と無機態窒素生成速度間の関係は明瞭ではなかったが、上述したように DOC/DON 比との関係は明瞭であった。土壌中のすべての炭素・窒素のうち、微生物が利用できる物質はごく一部であり、溶存態である DOC や DON は全窒素量や全炭素量と比較して微生物への可給性をより反映した指標であると考えられる。そのため、C/N 比にかわり、DON/DOC 比を用いることで、炭素・窒素制限と無機態窒素動態との関係を明確にすることができたと考えられた。

4.4.4 袋山沢における NO_2^- の消費経路

袋山沢の土壌をもちい、 NO_2^- として添加した ^{15}N がどのような形態へと変換される

かを追跡した結果から、 NO_3^- 以外に DON への変換が顕著に生じ、回収できない ^{15}N も多量に存在することが示された。また、 NH_4^+ への変換はわずかにしか生じなかった (Fig 4.9, Fig. 4.10)。これらのことから(1) NO_3^- への変換、(2)DON への変換、(3) KCl 抽出において不溶性の土壤有機物またはガス態窒素への変換、の 3 つの経路が NO_2^- の消費プロセスとして重要であると推察された。

NO_3^- への変換は ^{15}N 添加後 2 時間の時点では、A0 層でも 0-10cm 土壌でも同様の傾向を示し、添加 ^{15}N が $^{15}\text{NO}_3^-$ として存在する割合は斜面の下部で上昇した。これは斜面系列においてみられる NO_3^- 生成速度や現場土壌の NO_3^- 濃度の分布と同様の傾向であり、速度解析の結果および現場土壌の理化学性の解析結果と整合的であった。

一方で、 ^{15}N 添加後 0.5 時間の時点では A0 層と 0-10cm 土壌で大きく傾向が異なり、A0 層では $^{15}\text{NO}_3^-$ の生成はほとんど生じなかったが、0-10cm 土壌では添加した ^{15}N が主に $^{15}\text{NO}_3^-$ として存在していた。このことから、まず、0.5 時間までに A0 層で生成した $^{15}\text{NO}_3^-$ は迅速に他の形態へと変換され、 NO_3^- として蓄積しなかった可能性が考えられた。この場合、0.5 時間の時点で A0 層において ^{15}N は主に DON として存在したため、 NO_3^- の消費プロセスとして DON への変換が重要である可能性がある。さらに、0.5 時間から 2 時間にかけて、 ^{15}DON と $^{15}\text{NO}_3^-$ は増減し、両者の増加量または減少量はほぼ 1:1 の直線関係を示した(Fig 4.11(a))ことから、DON と NO_3^- の相互作用(平衡)の結果として、斜面系列でみられる NO_3^- 濃度の分布が達成される可能性が示唆された。また、0-10cm 土壌においては 0.5 時間から 2 時間にかけて $^{15}\text{NO}_3^-$ が減少し、 DO^{15}N が増加する傾向が斜面系列に一貫して見られた。さらに、0.5 時間から 2 時間の期間における、 ^{15}DON の変化量と $^{15}\text{NO}_3^-$ の変化量は、A0 層での関係ほど明確ではないものの直線関係を示した(Fig. 4.11(b))。これらのことから、0-10cm 土壌でも同様に DON と

NO_3^- の相互作用は存在するが、A0 層と比較して NO_3^- の DON への変換速度が小さく、その結果として生成した $^{15}\text{NO}_3^-$ が残存している可能性が示唆された。

また、他の仮説として、A0 層と 0-10cm 土壌では NO_2^- 消費プロセス間の相対的な速度が異なる可能性が考えられた。すなわち、A0 層では NO_2^- の NO_3^- への変換に対して DON への変換が優先して生じ、0-10cm 土壌では DON への変換が NO_3^- への変換に対して優先して生じた可能性である。この場合は、A0 層において 0.5 時間までに NO_2^- の DON への変換が迅速に生じ、0.5-2 時間にかけて DON の NO_3^- への変換が生じたと解釈できる。しかし、これは NO_3^- 生成速度が A0 層において 0-10cm 土壌よりも大きいとする速度解析の結果(Fig. 4.3(g))とは整合的ではない。本研究の内容からは、どちらかの仮説を採用することはできないが、いずれの仮説も DON と NO_3^- の相互作用が重要であることを示唆し、今後の研究においてこの反応の重要性とメカニズムをさらに検討する必要があると考えられた。

ところで、A0 層においては NO_2^- 生成速度と NO_3^- 濃度の相関関係が見られた一方、 NO_2^- 生成速度と NO_3^- 生成速度の相関関係がみられなかった(4.4.2.2.)。この現象は、 NO_2^- の消費経路をトレースした結果から示唆されたように、 NO_2^- あるいは NO_3^- と DON の反応が A0 層でのみ顕著に生じたことによるかもしれない。たとえば、 NO_2^- 以外に、DON から NO_3^- が生成する場合、 NO_2^- 生成速度と NO_3^- 生成速度の傾向の不一致を生み出す原因になると考えられる。ただし、DON と NO_3^- の変換反応は NO_2^- を介して生じると考えられており (Davidson et al. 2003)、実際にこのような反応が生じうるかについては今後慎重な検証が必要である。

4.5 結論

さまざまな性質の土壤に共通して NO_2^- 濃度は低いものの、 NO_2^- の生成や消費速度は濃度より 1~2 オーダー大きい値を示し、活発な生成と消費が生じていることが示唆された。サイトや土壤の層位によらず、アルカリ抽出条件を行った場合の現場土壤の NO_2^- 濃度は NO_2^- 生成・消費速度と強い相関をもち、 NO_2^- フローの指標として有用であると考えられた。また、サイトや土壤の層位によらず、現場土壤の NO_3^- 濃度と NO_2^- 生成・消費速度は強い相関をもち、 NO_2^- 生成速度は森林表層土壤の NO_3^- 濃度分布を制御する重要な要因である可能性が示唆された。

サイトや層位に関わらず、 NO_2^- 生成速度と消費速度は強い相関をもち、 NO_2^- 消費は NO_2^- 生成に依存して生じることが示唆された。芦生においては、 NO_3^- 生成速度のひとつの測定値(Fig 4.2(d), 40m)をのぞいた場合、 NH_4^+ 生成速度と NO_2^- 生成速度、 NO_2^- 生成速度と NO_3^- 生成速度の間には相関関係がみられた。そのため、芦生では硝化プロセスの制御を考えるうえで、 NH_4^+ 生成の段階が重要であると考えられる。ただし、芦生では土壤採取の繰り返しを設定していないため、この関係性を確認するためには今後さらに重点的な研究を行う必要があると考えられる。一方で、袋山沢においては、 NH_4^+ 生成速度と NO_2^- 生成速度の斜面系列での分布は一致せず、相関がみられなかった。 NO_2^- 生成速度は現場土壤の NO_3^- 濃度と強い相関を示したことから、土壤中の NO_3^- 濃度をコントロールする要因を考えるうえでは、 NO_2^- 生成を制御する環境要因を明らかにすることが重要であると考えられた。 NO_2^- 生成は土壤層位によらず、含水率と強い相関をもち、含水率が NO_2^- 生成活性を制御する重要な要因である可能性が示唆された。また、A0 層では TC, TN、0-10cm 土壤では DOC/DON 比も NO_2^- 生成速度と相関をもち、そのうち DOC/DON 比は NH_4^+ 利用の競合関係に非線形の影響をおよぼすことで、

NO_2^- 生成を制御することが示唆された。 NO_2^- 生成速度と NO_2^- 濃度の強い相関が検出された一方で、袋山沢の A0 層においては NO_2^- 生成速度と NO_3^- 生成速度の相関関係は検出されなかった。袋山沢の 0-10cm 土壌と A0 層における差異は添加 ^{15}N の変換をトレースした結果から、DON との反応性の違いに起因する可能性が示唆された。すなわち、0-10cm 土壌では NO_2^- または NO_3^- が DON へと変換される速度が遅い一方、A0 層ではその速度が早いことが示唆された。この DON との相互作用を経た結果、 $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加後 2 時間の時点で A0 層における $^{15}\text{NO}_2^-$ の存在量は斜面下部にかけて増加し、実際に斜面においてみられる濃度分布を再現した。このことから、A0 層における NO_3^- の生成プロセスや NO_3^- 濃度の制御メカニズムは 0-10cm とは異なる可能性がある。これまで一般的に、 NO_2^- が DON へと変換される現象は指摘されてきたが(Bremmer 1957, Bremmer and Fuhr 1966, Thorn and Mikita 2001, Davidson et al. 2003)、 NO_3^- が直接的に DON へと変換されるという報告は著者の知る限りでは存在しない。本研究から示唆された NO_2^- あるいは NO_3^- の DO^{15}N との反応がどのようなメカニズムによるのかについては、今後さらに検証が必要である。

Table 4.1 Study site characteristics

Site	latitude	longitude	Altitude	Slope aspect	MAT °C	MAP mm	FSD	USDA	Forest type	Dominant tree species	Understory
Fukuroyamasawa	35° 12' 20" N	140° 6' 11" E	180	E	14.0	2310	BD	Inceptisols	Artificial coniferous forest (planted in 1928-1931)	<i>Cryptomeria japonica</i> , <i>Chamaecyparis obtusa</i>	<i>Aucuba japonica</i>
Ashiu	35° 21' 4" N	135° 45' 25" E	780	NW	11.9	2250	BB	Inceptisols	Cool temperate deciduous broadleaved forest	<i>Fagus crenata</i> , <i>Clethra barbinervis</i> , <i>Lyonia ovalifolia</i> var. <i>elliptica</i>	<i>Pteris japonica</i>

FSD:Classification of Japanese forest soils by Forest Soil Division (1976)
USDA:Soil classification by US Soil Taxonomy (2014)

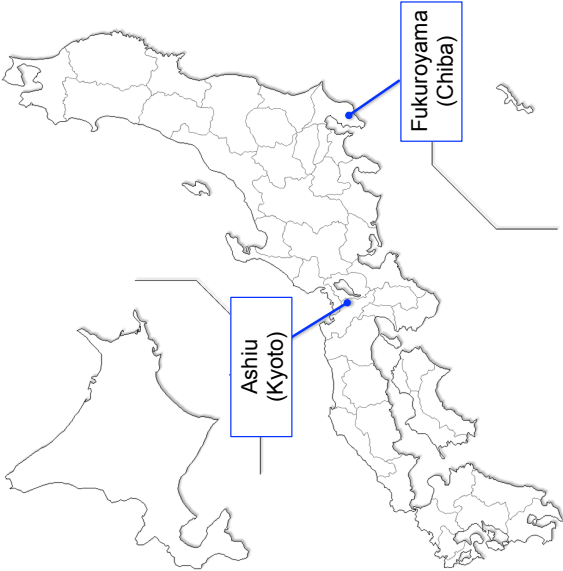


Fig. 4.1 研究サイトの位置

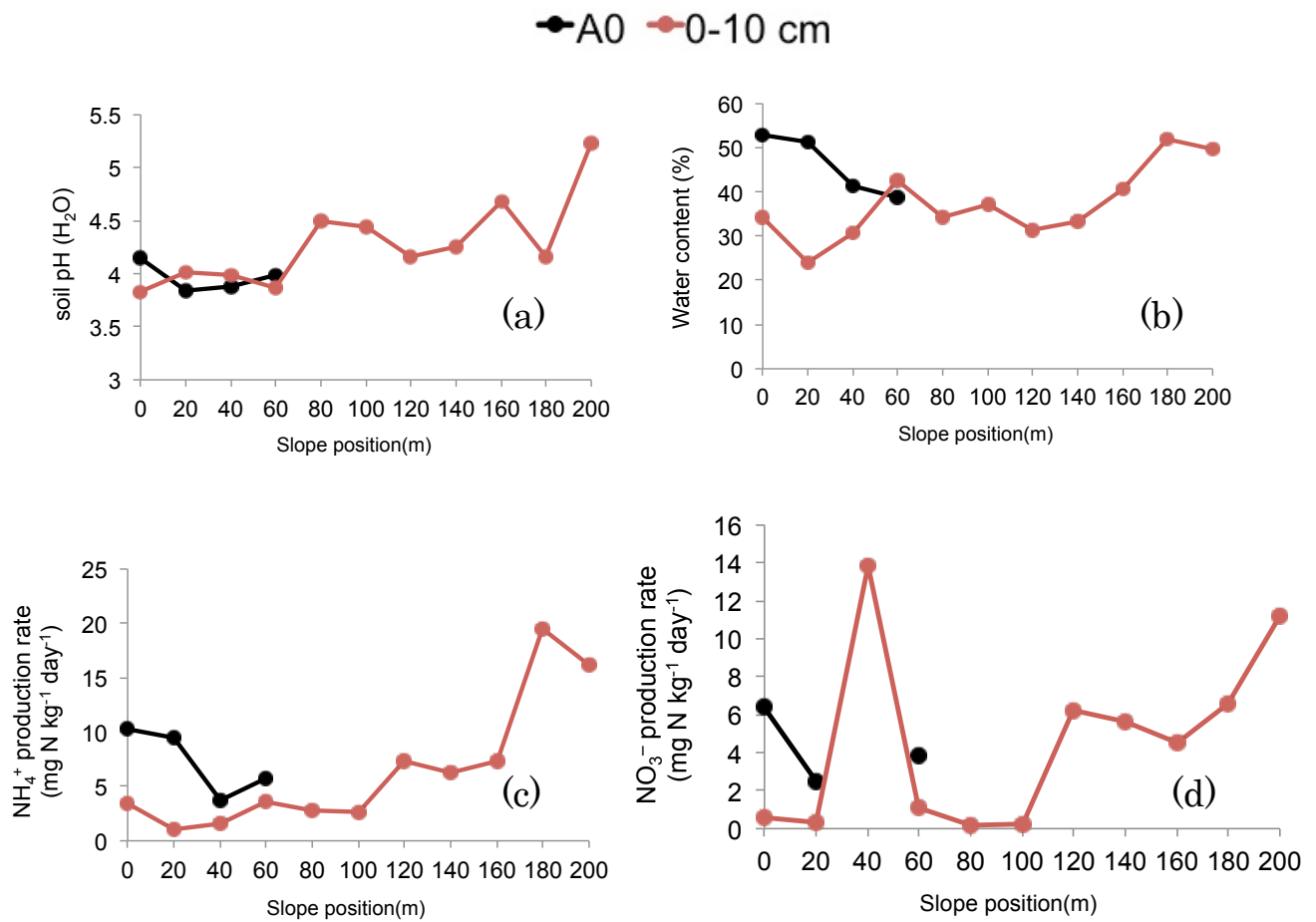


Fig 4.2 土壌の理化学性と NH_4^+ , NO_3^- 生成速度(芦生, n=1)
 (a) 土壌 pH (b) 含水率 (c) NH_4^+ 生成速度 (d) NO_3^- 生成速度
 データは加藤修士論文(2014 年度)より引用

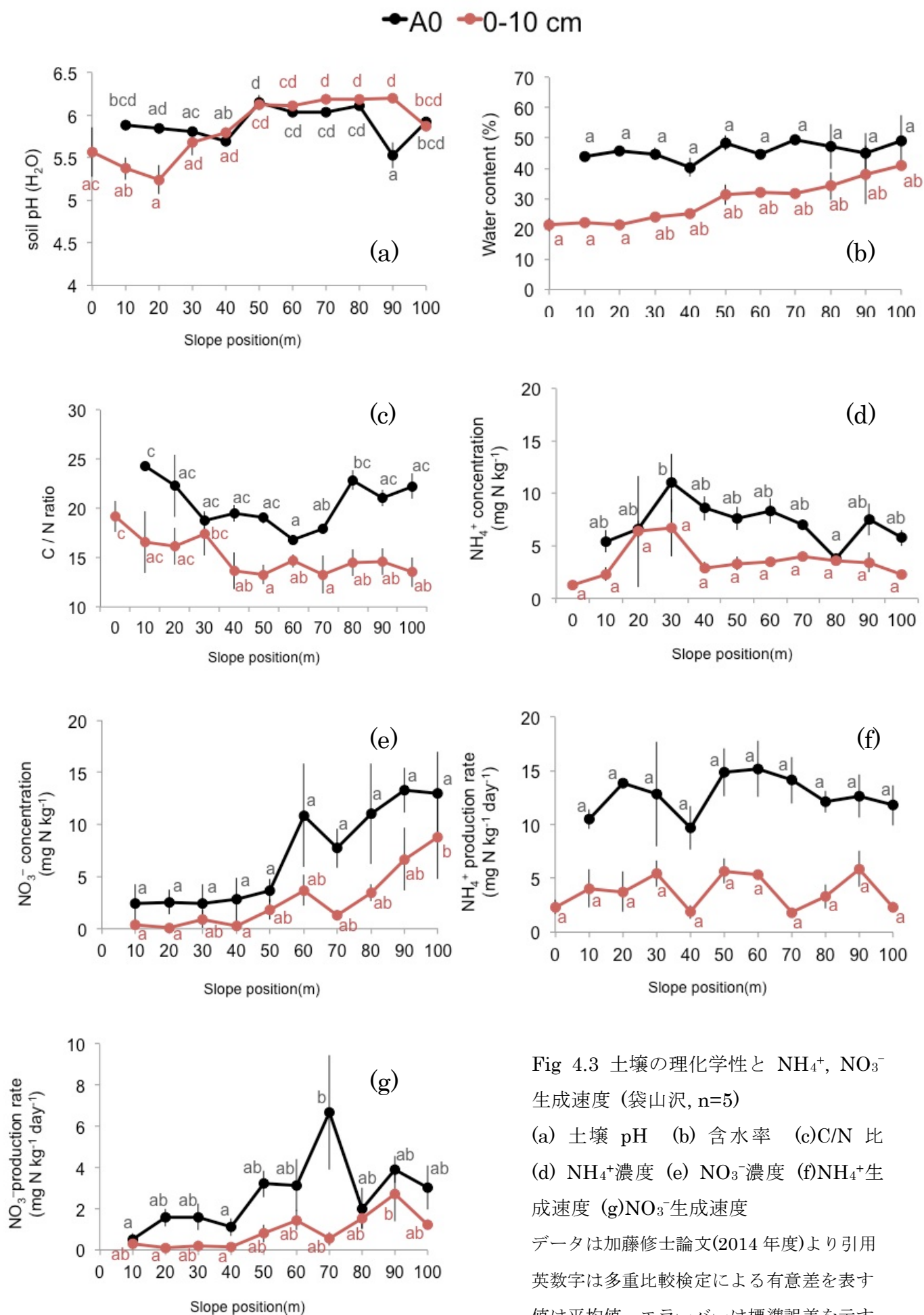


Fig 4.3 土壌の理化学性と NH_4^+ , NO_3^- 生成速度 (袋山沢, n=5)

(a) 土壌 pH (b) 含水率 (c) C/N 比
(d) NH_4^+ 濃度 (e) NO_3^- 濃度 (f) NH_4^+ 生成速度 (g) NO_3^- 生成速度

データは加藤修士論文(2014 年度)より引用
英数字は多重比較検定による有意差を表す
値は平均値、エラーバーは標準誤差を示す

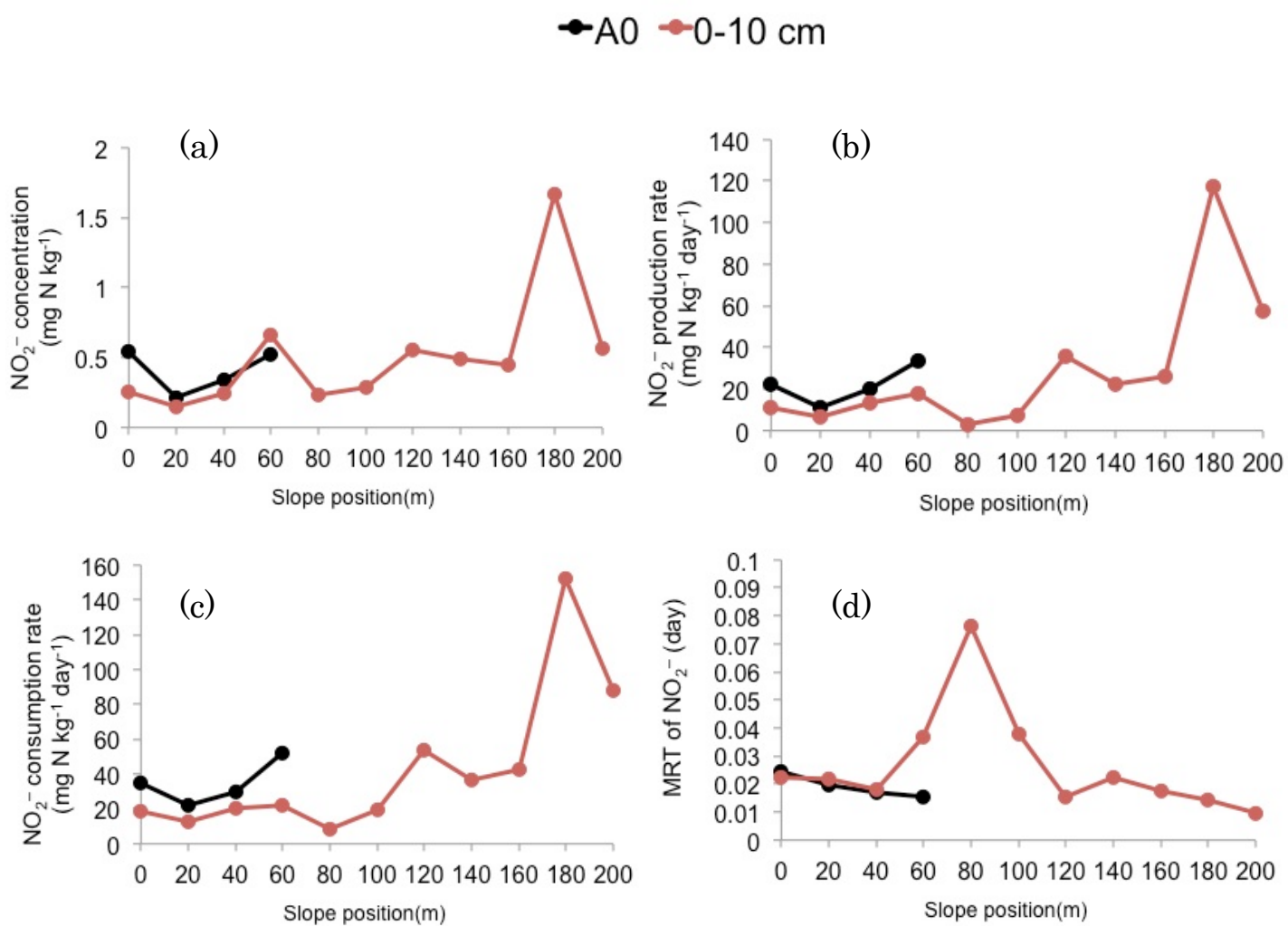


Fig 4.4 NO_2^- 濃度・変換速度・滞留時間の結果 (芦生, n=1)

(a) NO_2^- 濃度 (b) NO_2^- 生成速度 (c) NO_2^- 消費速度 (d) NO_2^- 平均滞留時間

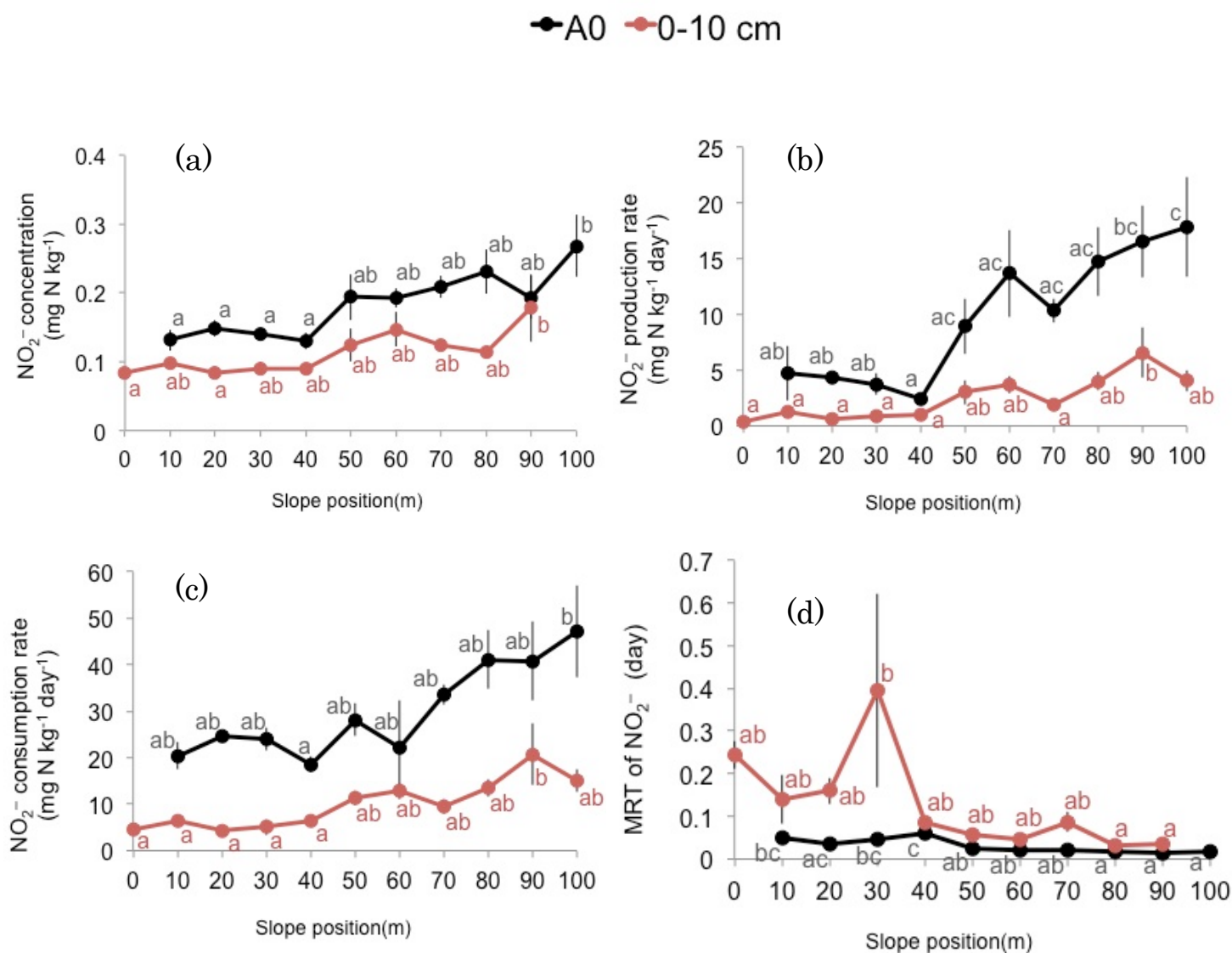


Fig 4.5 NO_2^- 濃度・変換速度・滞留時間の結果 (袋山沢 n=5)

(a) NO_2^- 濃度 (b) NO_2^- 生成速度 (c) NO_2^- 消費速度 (d) NO_2^- 平均滞留時間

英数字は多重比較検定による有意差を表す

値は平均値、エラーバーは標準誤差を示す

Table 4.2 Relation between NO_2^- transformation rates in Ashiu soils

			<i>R</i>	<i>R</i> ²	<i>n</i>
0-10cm soil	NO_2^- production	vs. NO_2^- consumption rate	0.99	0.99***	10
		NH_4^+ production rate	0.94	0.89***	10
		NH_4^+ consumption rate	0.88	0.77**	10

Simple regression analysis was used to investigate the relationships.

*** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.01$

Table 4.3 Relation between NO_2^- transformation rates in Fukuroyama soils

			<i>R</i>	<i>R</i> ²	<i>p</i>
A0	NO_2^- production rate	vs. NO_2^- consumption rate	0.95	0.90	***
0-10 cm	NO_2^- production rate	NO_2^- consumption rate	0.96	0.93	***
		NO_3^- production rate	0.91	0.83	***
		NH_4^+ production rate	0.39	0.15	*
		NO_3^- consumption rate	0.37	0.14	*
0-10cm soil	NO_2^- consumption rate	NO_3^- production rate	0.89	0.79	***
		NO_3^- consumption rate	0.42	0.17	*
		NH_4^+ production rate	0.40	0.16	*

Simple regression analysis was used to investigate the relationships.

*** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.01$

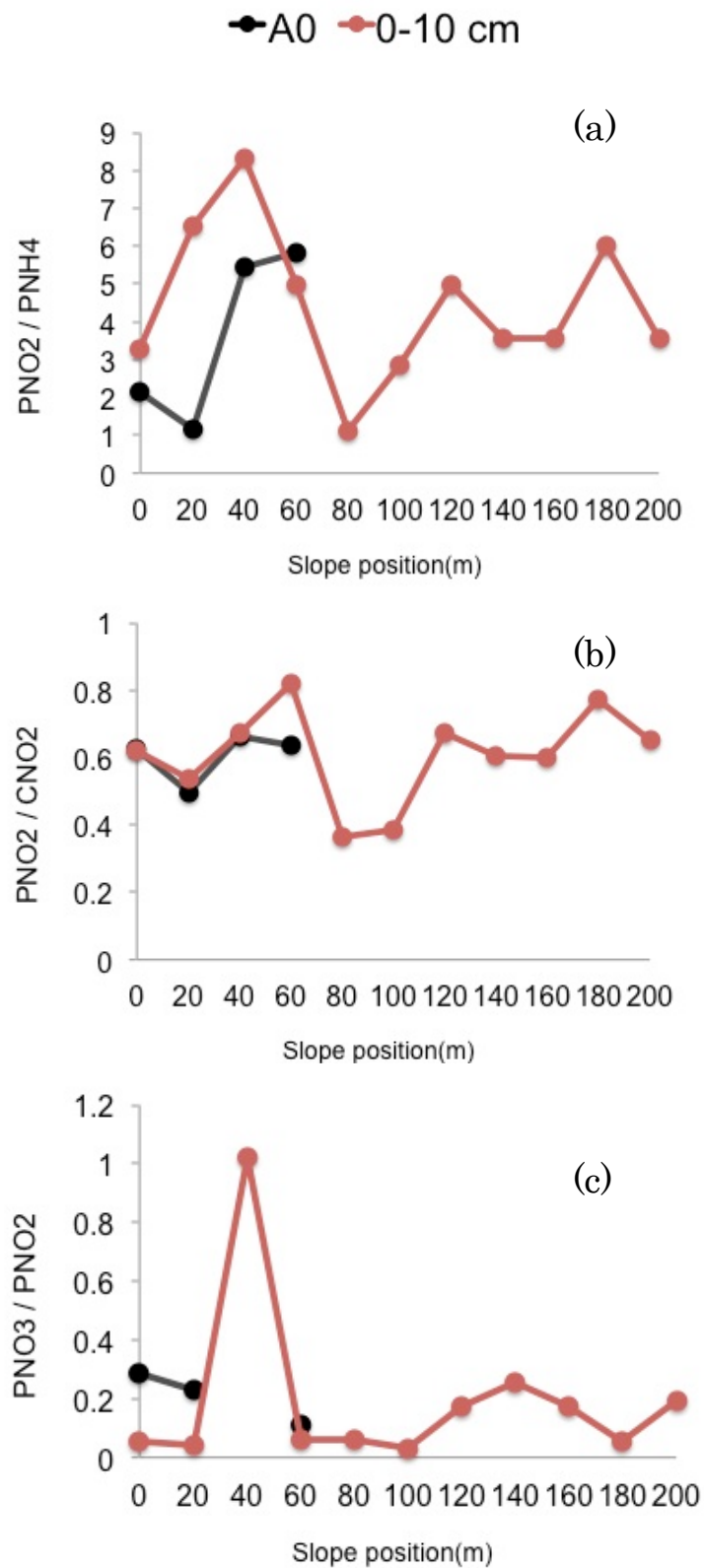


Fig 4.6 無機態窒素変換速度間の比 (芦生, n=1)

(a) NO_2^- 生成/ NO_2^- 消費 (b) NO_2^- 生成/ NH_4^+ 生成 (c) NO_3^- 生成/ NO_2^- 生成

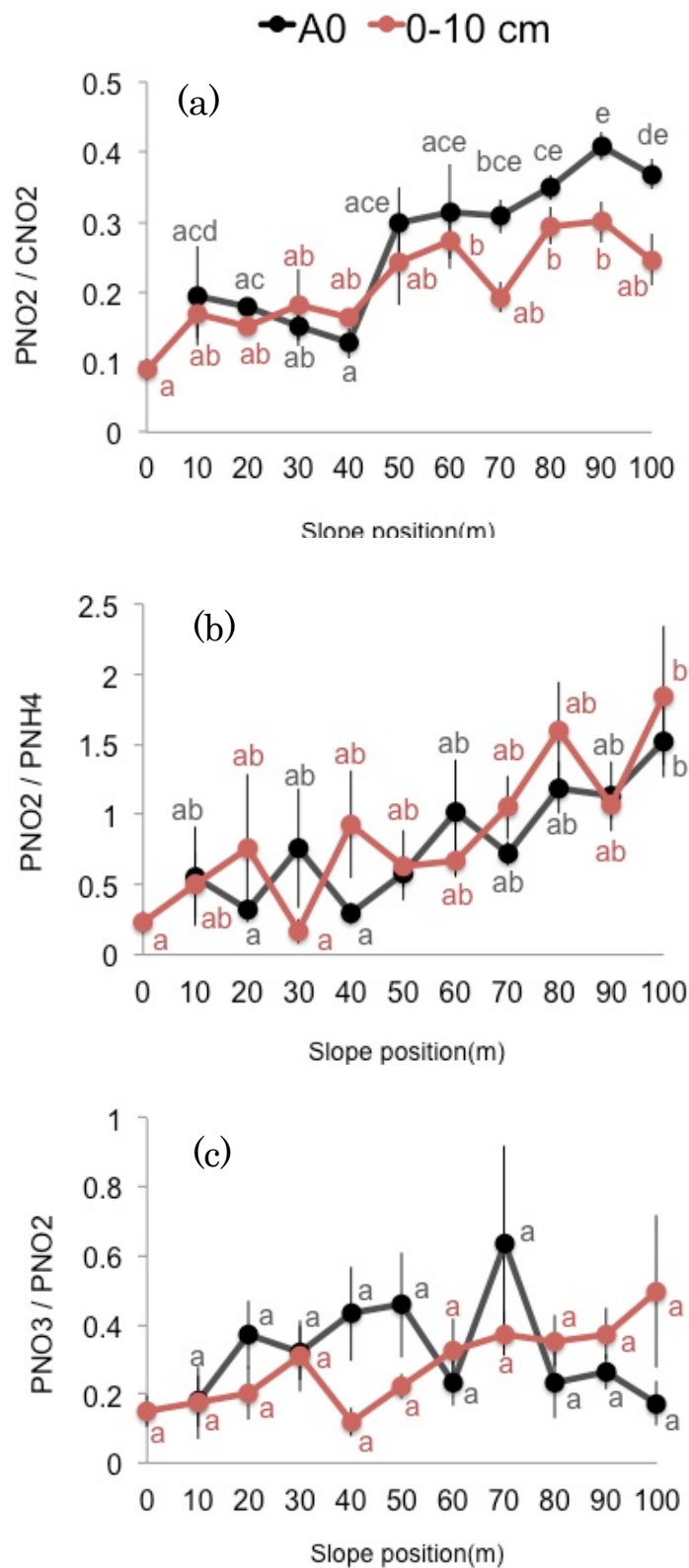


Fig 4.7 無機態窒素変換速度間の比 (袋山沢, n=5)

(a) NO_2^- 生成/ NO_2^- 消費 (b) NO_2^- 生成/ NH_4^+ 生成 (c) NO_3^- 生成/ NO_2^- 生成

英数字は多重比較検定による有意差を表す

値は平均値、エラーバーは標準誤差を示す

Table 4.4 Relation between NO_2^- transformation rates and environmental factors in Ashiu soils

			<i>R</i>	<i>R</i> ²	<i>p</i>	<i>n</i>
0-10cm soil	NO_2^- production rate	vs. NO_2^- pool size (Initial)	0.94	0.89	***	10
		water content	0.75	0.57	*	10
	NO_2^- consumption rate	vs. NO_2^- pool size (Initial)	0.91	0.83	***	10
		water content	0.77	0.59	*	10

Simple regression analysis was used to investigate the relationships.

*** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.01$

Table 4.5 Relation between NO_2^- transformation rates environmental factors in Fukuroyama soils

			<i>R</i>	<i>R</i> ²	<i>p</i>	<i>n</i>
A0	NO_2^- production rate	vs. NO_2^- pool size (Initial)	0.88	0.77	***	49
		NO_3^- pool size (Initial)	0.80	0.65	***	49
		water content	0.55	0.30	***	49
		Total N	0.48	0.23	**	49
		Total C	0.41	0.16	**	49
	NO_2^- consumption rate	vs. NO_2^- pool size (Initial)	0.92	0.85	***	48
0-10cm soil	NO_2^- production rate	NO_3^- pool size (Initial)	0.78	0.61	***	48
		water content	0.72	0.52	***	48
		Total N	0.51	0.26	**	48
		Total C	0.47	0.22	**	48
	NO_2^- production rate	vs. NO_2^- pool size (Initial)	0.88	0.77	***	50
		NO_3^- pool size (Initial)	0.80	0.63	***	54
		water content	0.82	0.68	***	55
		DOC/DON	-0.46	0.21	**	54
		pH	0.36	0.13	*	55
	NO_2^- consumption rate	vs. NO_2^- pool size (Initial)	0.88	0.78	***	50
		NO_3^- pool size (Initial)	0.79	0.62	***	54
		water content	0.86	0.68	***	55
		DOC/DON	-0.48	0.23	**	54
		pH	0.36	0.13	*	55

Simple regression analysis was used to investigate the relationships.

*** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.01$

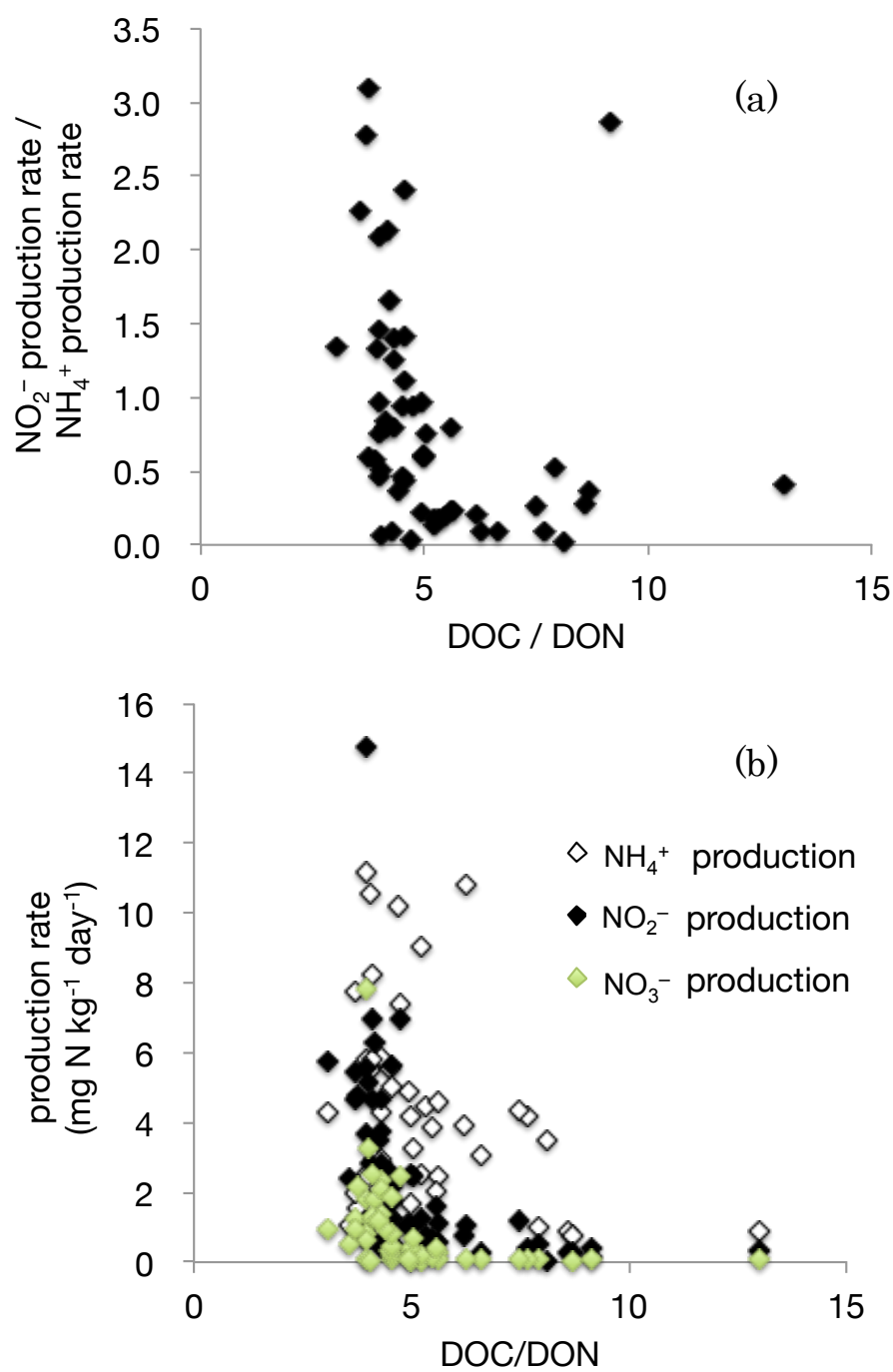


Fig 4.8 DOC/DON 比による無機態窒素生成速度の制御（袋山沢 0-10 cm 土壌）

(a) NO_2^- 生成/ NH_4^+ 生成比と DOC/DON 比の関係

(b) 無機態窒素生成速度と DOC/DON 比の関係

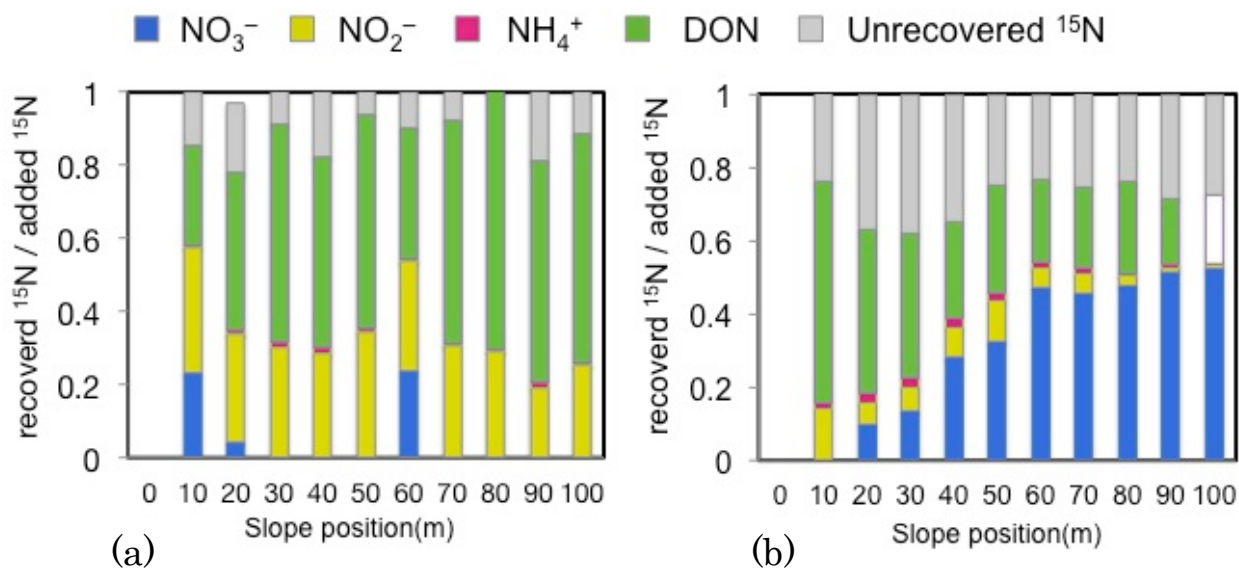


Fig. 4.9 A0 層における $^{15}\text{NO}_3^-$, $^{15}\text{NO}_2^-$, $^{15}\text{NH}_4^+$ DO ^{15}N としての ^{15}N 回収率
(袋山沢)

(a) 0.5 時間 (b) 2 時間

各バーは $n=5$ の平均値を示す

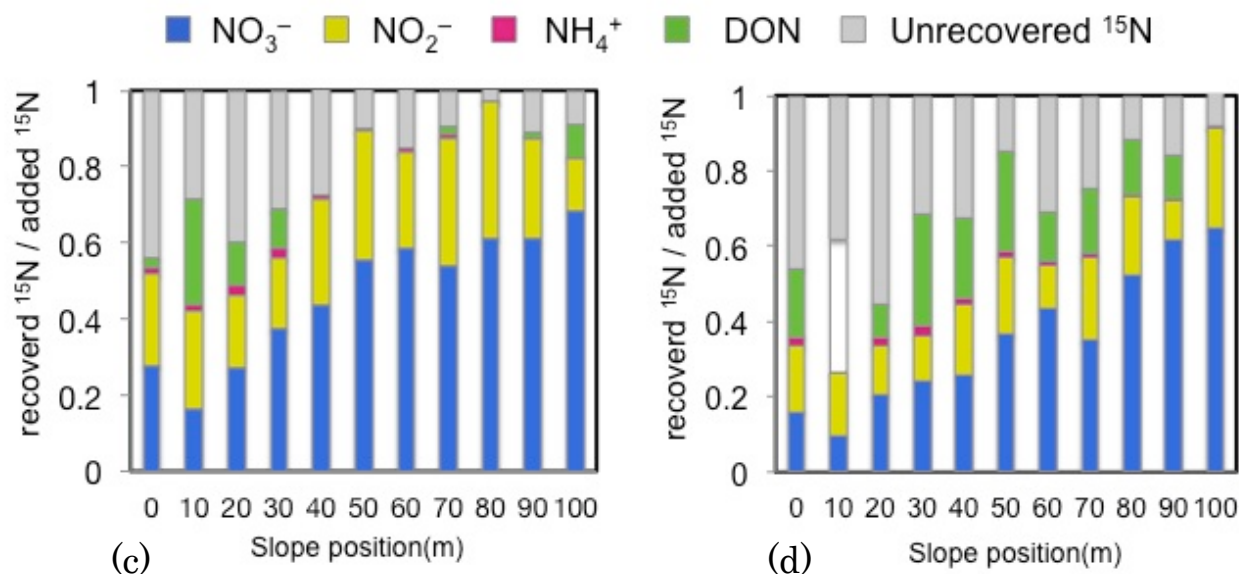


Fig. 4.10 0-10cm 土壌における $^{15}\text{NO}_3^-$, $^{15}\text{NO}_2^-$, $^{15}\text{NH}_4^+$ DO ^{15}N としての ^{15}N 回収率
(袋山沢)

(a) 0.5 時間 (b) 2 時間

各バーは $n=5$ の平均値を示す

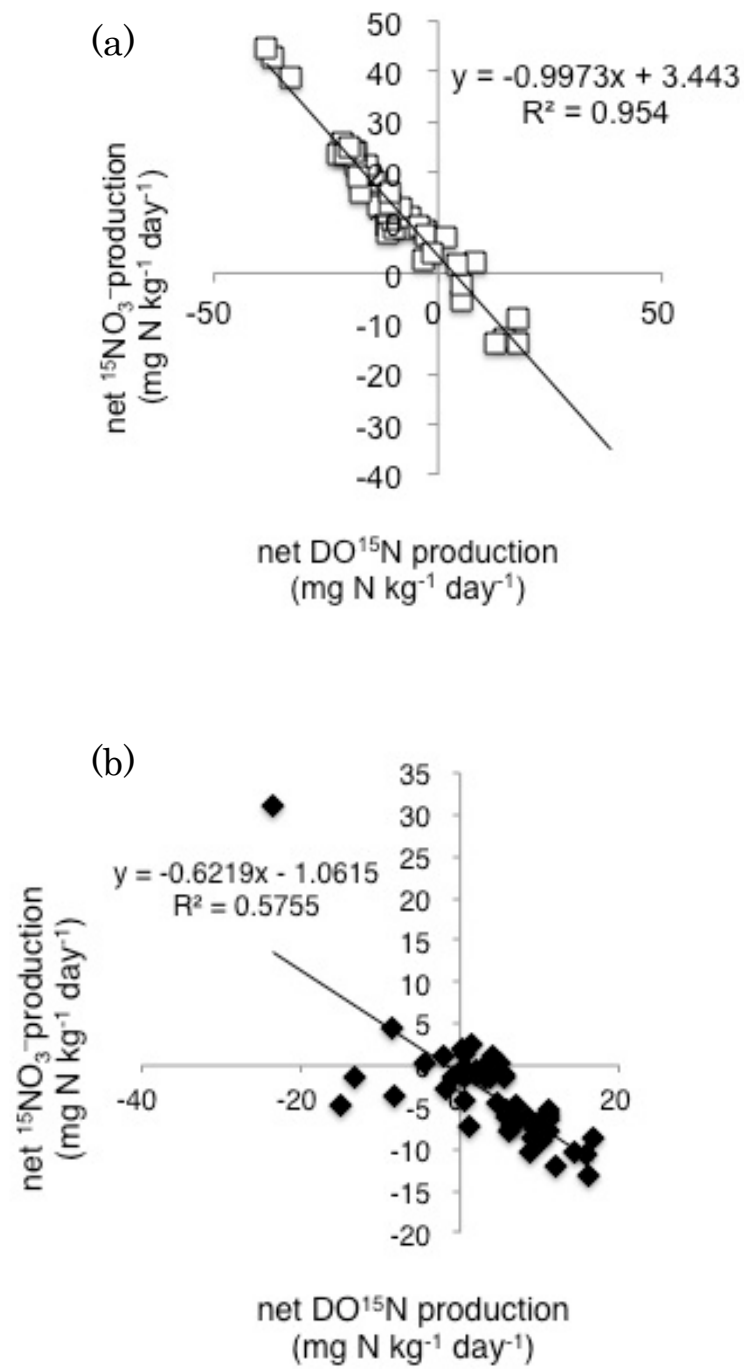


Fig. 4.11 0.5-2 時間の期間における $^{15}\text{NO}_3^-$ と DO^{15}N の変化量の関係
(袋山沢)

(a) A0 層 (b) 0-10cm 土壌

5 章 各論のまとめ

1 章では、これまでの森林表層土壌で考えられてきた窒素循環を概説し、 NO_2^- に関する知見の不足と、その重要性を指摘した。 NO_2^- の挙動は現在のところ、土壌中でほとんど考慮されていないが、実際にはその化学的な反応性の高さゆえに、有機物との反応や化学的にもガス態へと変換されることが知られている。そのため、本研究では、(1) NO_2^- 生成・消費速度がさまざまな性質の森林土壌でどのような値を示すのかを明らかにすること、(2) NO_2^- はさまざまな性質の森林土壌でどのような経路によって消費されるのかを明らかにすること、(3) NO_2^- 生成・消費速度がどのような環境要因と相関を有するか、すなわち、森林土壌中でどのような要因が NO_2^- 動態を制御しうるのかを明らかにすること、を目的に行った

まず 2 章では、 $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加条件で NO_2^- の生成・消費速度の測定が可能な条件と、また、環境中の低濃度の NO_2^- の測定が可能な条件の決定を行った。まず、 NO_2^- を N_2O へと変換する手法であるアザイド法を、土壌のアルカリ抽出液の測定に適用するために、試料 pH がアザイド反応の変換効率に影響するかどうかの検討を行った。次に、アルカリ条件により抽出される有機物など、土壌抽出液中の共存する物質が pH 条件、また、アザイド反応の効率に影響しないかを確認した。そののちに、土壌の抽出条件が土壌中にもともと存在する低濃度の亜硝酸の回収に及ぼす影響と、 $^{15}\text{NO}_2^-$ を添加した条件で、添加 NO_2^- の回収に及ぼす影響を、アザイド法を用いて評価した。これらの結果から、まず、 NO_2^- を添加していない土壌から、もともと土壌中に存在する NO_2^- を回収する際

には pH をアルカリ性に調整した 2M KCl で抽出する必要性が示唆された。これは、抽出時の pH に依存して土壌 NO_2^- 濃度が上昇したことによるが、この pH 上昇にともなった NO_2^- 濃度の上昇は、抽出中の NO_2^- の安定性が高まること以外に、 NO_2^- 以外の形態として存在している窒素の NO_2^- への変換が増加する可能性も考えられた。しかし、アルカリ抽出を行わず、通常の抽出法、すなわち pH 未調整の KCl による抽出を行った場合は、 NO_2^- は検出されなかったことから、以後の実験では環境中の NO_2^- 濃度を評価する際にアルカリ条件での抽出を採用した。この、アルカリ抽出によって回収される NO_2^- 濃度がどのような指標になりうるかは、4 章において考察を行った。さまざまな性質の土壌において測定した NO_2^- 生成速度と NO_2^- 濃度はつよい正の相関関係があったことから、アルカリ抽出による NO_2^- 濃度は、土壌中の NO_2^- の動態を表す指標として、有用であると考えられた。

2 章において、 $^{15}\text{NO}_2^-$ 添加条件下では、添加 ^{15}N の回収率と、土壌抽出液 pH の関係から、抽出中の pH 条件が ^{15}N の回収に与える影響は少ないと考えられたため、3 章にて実際に土壌に $^{15}\text{NO}_2^-$ を添加・培養して土壌の抽出条件ごとに算出された速度の比較をおこなった。その結果、アルカリ抽出と通常の抽出における、 $^{15}\text{NO}_2^-$ の回収率はほぼ一致し、通常の抽出法では、 6 mg N kg^{-1} から 150 mg N kg^{-1} の幅広い添加濃度において、アルカリ抽出の約 95% の効率で ^{15}N を回収できることが示された。また、実際に両方の抽出法を用いて見積もられた速度の値はほぼ一致した。これらのことから、土壌に $^{15}\text{NO}_2^-$ を添加・培養して NO_2^- 生成・消費速度を算出する際には、通常の抽出法を用いることが可能であると考えられた。

3 章においては実際に森林土壌中に $^{15}\text{NO}_2^-$ を添加培養し、速度の算出を行った。 ^{15}N 希釈法を用いて NO_2^- 生成消費速度の算出をおこなうには、他の無機態窒素と比較して短期の培養を行う必要があることを明らかにし、この条件で速度の算出を行った。また、 NO_2^- 生成速度は添加濃度によらずほぼ一定の値を示し、 NO_2^- が低濃度でしか存在しない環境中であっても活発な NO_2^- 生成が生じていることが推察された。さらに、添加 ^{15}N が変換される物質をトレースすることで、 NO_2^- の消費経路の相対的な重要性を明らかにすることを試みた。結果として、 NO_2^- の消費経路は NO_2^- の添加濃度によって異なり、低濃度 (6 mg N kg^{-1}) の場合は、 NO_3^- への変換が主要な消費経路であったが、 NO_2^- 添加濃度が 30 mg N kg^{-1} 、 150 mg N kg^{-1} の場合、全溶存有機態窒素としては回収できない窒素が培養開始から 1 日後の時点で 6 割を超えていた。また、 6 mg N kg^{-1} 添加区であっても、回収できない窒素が 20%~40% 程度存在し、 NO_3^- 以外の形態へ変換される NO_2^- が存在することが示唆された。この回収できない窒素は、 KCl では抽出できない有機態へと変換され、土壌に残存しているか、または培養中にガス態として放出されたと推定される。そのため、土壌に NO_2^- を添加した条件で N_2O へと変換される ^{15}N 量を培養サンプルのヘッドスペースをモニタリングすることで定量した。その結果、 30 mg N kg^{-1} では ^{15}N が N_2O へと変換される割合が最も高く、添加後 4 時間の時点で約 6% の ^{15}N が N_2O へと変換された。これらのことから、示唆的にはあるが、 NO_2^- の存在量が複数の NO_2^- 消費経路のバランスに作用すること、窒素循環の経路や速度をかえうることが示された。

そこで、4 章では、実際に環境中における NO_2^- 生成・消費速度の分布とその制御要因を調査した。これらの斜面では、斜面上部から下部にかけて、 pH や含水率の条件が

変化するため、斜面上部から下部にかけて段階的にサンプリングを行い、とくに袋山沢の斜面プロットでは、土壤理化学性の異なる土壤間での NO_2^- 動態の比較と、 NO_2^- 消費経路の詳細な比較を行った。これら 2 つの森林土壤では共通して NO_2^- 濃度は低かったが、 NO_2^- 生成・消費速度は大きな値を示し、いずれの土壤でも NO_2^- の平均滞留時間は数十分から数時間の値を示した。既往研究(2013 年度村林卒業論文および 2014 年度加藤修士論文)で得られた NH_4^+ 生成速度と NO_3^- 生成速度の値を用いて、硝化における 2 段階の酸化過程がそれぞれどのような関係にあるかを解析した。その結果、 NH_4^+ 生成速度、 NO_2^- 生成速度、 NO_3^- 生成速度の関係はサイトや層位によって異なり、硝化プロセスの制御において、 NH_4^+ 生成、 NO_2^- 生成、 NO_3^- 生成のそれぞれが重要である場合があることが示唆された。 NO_2^- 生成速度と土壤理化学性との相関解析からは、含水率、土壤有機物の量や質に関連する指標(全窒素、全炭素、DOC/DON 比)が有意な相関を示し、制御要因として重要であると考えられた。また、 NO_2^- は NO_3^- だけでなく、短時間のうちに DON や NH_4^+ へと変換され、特に DON への変換は NO_2^- の重要な消費プロセスである可能性が示された

NO_2^- 動態の環境中での役割を明らかにした例はこれまでにほとんど存在せず、近年になってようやく圃場スケールでガス態窒素の放出と NO_2^- の関連性の重要性が示されたばかりである。たとえば、Maharjan と Venterea は畑地において 3 種類の肥料と 2 種類の方法で施肥を行い、 N_2O 放出の制御要因について研究を行った。その結果、生育期間中の N_2O フラックスの積算値が、土壤中の NH_4^+ や NO_3^- 濃度の積算値とは有意な相関がない一方で NO_2^- 濃度の積算値によってはよく(N_2O 変動の 44% 以上)説明されることを見だし、畑地土壤の NO_2^- 蓄積を減少させる管理が N_2O 放出を減少させるため

に有効であることを示した(Maharjan and Venterea 2013)。

また、それ以外には、 NO_2^- の生成ポテンシャル(土壌懸濁液の培養中の NO_2^- 蓄積量により算出する)が長期間の気候変動によりどのような影響を受けるかを明らかにした例が存在する。Niboyet らは草地生態系において、 CO_2 濃度、気温の上昇、降雨の増加、窒素供給量の増加が土壌の窒素循環にどのような影響を及ぼすのかについて、長期(7-8年)にわたる野外操作実験を行い、ポテンシャルの NO_2^- 酸化速度は、ポテンシャルの NH_4^+ 酸化速度と異なる環境要因に影響をうけることを示した。具体的には、窒素添加は NH_4^+ 酸化ポテンシャルを増加させたが、 NO_2^- 酸化ポテンシャルには有意な影響を及ぼさなかった。また、降雨の増加は NO_2^- 酸化ポテンシャルを減少させる一方、 NH_4^+ 酸化ポテンシャルを増加させた。これらのことは、 NH_4^+ 酸化と NO_2^- 酸化のプロセスは、気候変動や窒素流入量の増加に伴って、異なる応答を示唆している(Niboyet et al. 2011)。

本研究では(1) NO_2^- のがどのような物質へと変換されるのかを直接測定する、という手法と、(2) NO_2^- 生成速度を算出し、 NO_3^- の生成速度との量的な関係を比較する、という2つの方法で、 NH_4^+ から NO_3^- までの酸化過程の間に、窒素が NO_3^- 以外の形態へも変換されることで、系からの損失(ガス態への変換)、あるいは系への保持(有機物への変換)が生じうることを明らかにした。また、 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- 生成速度の関係性からは、硝化の1段階目($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$)と2段階目($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$)では、異なった制御がはたらきうることが示唆された。このように、 NO_2^- の挙動をプロットレベルで明らかにした研究はこれまでになく、 NO_2^- の動態を多様な土壌において実測することで初めて明らかになった知見である。 NO_2^- を実測することの利点の一つは、微生物が行う窒素の変換と直接比較可能なフローの情報をえられることであり、(たとえば、アンモニア酸

化微生物のアバンダンスや活性と NO_2^- 生成速度)今後微生物情報とあわせて議論を行うことで、窒素循環の理解が深まることが期待される。また、 NO_2^- が有機態窒素へと変換されるメカニズムや、それが土壌にどの程度保持されうるのか、ガス態への変換として、どのような物質(HONO , NO , N_2O など)への変換が重要であるのかを、明らかにしていく必要があると考えられる。

参考文献

- Aber J.D., Goodail. C.L., Ollinger S.V., Smith M.-L., Magill A.H., Martin M.E., R.A. Hallett, Stoddard J.L. (2003). "Is Nitrogen Deposition Altering the Nitrogen Status of Northeastern Forests?." Bioscience. 53(4):375-389
- Aber J.M., William H. (1998). "Nitrogen Saturation in Temperate Forest Ecosystems." Bioscience. 48(11):921-934
- Anthonisen A.C., Loehr R.C., Prakasam T.B.S., Srinath E.G. (1976) "Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid" J. Water Pollution Control Federation 48(5): 835-852
- Barracclough D., Geens E.L., Davies G.P., Maggs J.M. (1985) " Fate of fertilizer nitrogen.III. The use of single and double labelled ^{15}N ammonium nitrate to study nitrogen uptake by ryegrass" J. of Soil Science 36(4) 593-603
- Bjarnason S. (1988). "Calculation of gross nitrogen immobilization and mineralization in soil" J. of SoilScience. 39:393-406

- Blackburn T.H. (1979). "Method for Measuring Rates of NH_4^+ Turnover in Anoxic Marine Sediments, Using a ^{15}N - NH_4^+ Dilution Technique." Appl. Environ. Microbiol. 37(4):760-765
- Booth M., Recous S., Robin D. (1998) "A model for calculating nitrogen flux in soil using ^{15}N tracing" Soil Biol. Biochem. 30(14):1963-1979
- Booth M.S., Stark J.M., Edward R. (2005) "Controls on nitrogen cycling in terrestrial ecosystems : A synthetic analysis of literature data." Ecological Monographs 75(2):139-157
- Bothe H., Ferguson S.J., Newton W.E. (2007) Biology of the Nitrification Cycle. Elsevier, pp207-222
- Bormann F.H., Likens G.E., Melillo J.M. (1977). "Nitrogen Budget for an Aggrading Northern Hardwood Forest Ecosystem." Science. 981-983
- 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. Microb. 2956-2965

Bremner J.M., Fuhr F. (1966) "Tracer studies of the reaction of soil organic matter with nitrite" In The use of isotopes in soil organic matter studies (1st ed.) Pergamon Press Ltd. pp337-346

Burens L.C., Stevens R.J., Smith R.V., Cooper J.E. (1995 a) "The occurrence and possible source of nitrite in a grazed fertilized grassland soil" Soil. Biol. Biochem 27(1): 47-59

Burns L.C., Laughlin R.J. (1995) "Determination of the simultaneous production and consumption of soil nitrite using ^{15}N ." Soil. Biol. Biochem. 6:839-844

Burns L.C., Stevens R.J., Laughlin R.J. (1996). "Production of nitrite in soil by simultaneous nitrification and denitrification." Soil. Biol. Biochem. 28:609-616

Casciotti K.L., Sigman D.M., Galanter Hastings M., Bohlke 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

Chapin F.S., Moilanen L., Kielland K. (1993) "Preferential use of organic nitrogen for growth by a non-mycorrhizal arctic sedge" Nature 361: 150

- Chapin, F.S., Matson, P.A. and Vitousek, P.M. (2002). "Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology 1st edition." Springer
- Chalk P.M., Smith C.J. (1983) "Chemodenitrification ". In: GASEOUS LOSS OF NITROGEN FROM PLANT-SOIL SYSTEMS. Freney J.R., Simpson J.R. (eds.), pp.65-89
- Cliff J.B., Bottomley P.J., Haggerty R., Myrold D.D. (2002). "Modeling the Effects of Diffusion Limitations on Nitrogen-15 Isotope Dilution Experiments with Soil Aggregates." Soil Sci. Soc. Am. J. 66:1868-1877
- Clough T.J., Stevens R.J., Laughlin R.J., Sherlock R.R., Cameron K.C. (2001). "Transformations of inorganic-N in soil leachate under differing storage conditions." Soil. Biol. Biochem. 33:1473-1480
- Cleveland C.C., Liptzin D. (2007). "C:N:P stoichiometry in soil: is there a Redfield ratio for the microbial biomass?" Biogeochemistry. 85:235-252
- Colman B.P., Fierer N., Schimel J.P., (2007). "Abiotic nitrate incorporation in soil: is it real?" Biogeochemistry. 84:161-169

Corre M.D., Brumme R., Veldkamp E., Beese F.O. (2007). "Changes in nitrogen cycling and retention processes in soils under spruce forests along a nitrogen enrichment gradient in Germany." Global Change Biology. 13:1-19

Corre M.D., Sueta J.P., Veldkamp E. (2014) "Nitrogen-oxide emissions from tropical forest soils exposed to elevated nitrogen input strongly interact with rainfall quantity and seasonality" Biogeochemistry 118:103–120

Dail D.B., Davidson E.A., Chorover J., (2001)"Rapid abiotic transformation of nitrate in an acid forest soil" Biogeochemistry 54:131-146

Davidson E.A., Chorover J., Dail D.B. (2003). "A mechanism of abiotic immobilization of nitrate in forest ecosystems: the ferrous wheel hypothesis." Global Change Biology. 9:228-236

Davidson E.A., Dail B.D., Chorover J. (2008). "Iron interference in the quantification of nitrate in soil extracts and its effect on hypothesized abiotic immobilization of nitrate." Biogeochemistry. 90:65-73

Davidson E.A., Hart S.C., Firestone M.K. (1992). "Internal Cycling of Nitrate in Soils of a Mature Coniferous Forest." Ecology. 73(4):1148-1156

- Davidson E.A., Hart S.C., Shanks C.A., Firestone M.K. (1991). "Measuring Gross Nitrogen Mineralizaion, Immobilization, and Nitrification by N Isotopic Pool Dilution In Intact Soil Cores." Soil Science. 42:335-349
- Delwiche C.C., Steyn P.L. (1970). "Nitrogen isotope fractionation in soils and microbial reactions." Environ. Sci. Tech. 4(11):929-935
- Erisman J.W., Sutton M.A., Galloway J., Klimont Z., Winiwarter W. (2008) "How a century of ammonia synthesis changed the world" Nature Geoscience 1:636 - 639
- Erisman J.W., Galloway J.N., Seitzinger S., Bleeker A., Dise N.B., Roxana Petrescu A.M., Leach A.M., Wim de Vries (2013). "Consequences of human modification of the global nitrogen cycle." Phil. Trans. R. Soc. B 368: 20130116.
- Fenn M.E., Poth M.A., Johnson D.W. (1996). "Evidence for nitrogen saturation in the San Bernardino Mountains in southern California." Forest Ecology and Management 82(1):211-230
- Fierer N., Strickland M.S., Liptzin D., Bradford M.A., Cleveland C.C. (2009). "Global patterns in belowground communities." Ecology Letters. 12:1238-1249

Firestone M.K., Davidson E.A. (1989). "Microbiological basis of NO and N₂O production and consumption in soil." Exchange of Trace Gases Terrestrial Ecosystems and the Atmosphere Andreae and Schimel ed. pp.7-21

Firestone M.K., Firestone R.B., Tiedje J.M. (1980). "Nitrous Oxide from Soil Denitrification: Factors Controlling Its Biological Production." Science. 208:749-751

Firestone M.K., Smith M.S., Firestone R.B., Tiedje J.M. (1979). "The Influence of Nitrate, Nitrite, and Oxygen on the Composition of the Gaseous Products of Denitrification in Soil." Soil Sci. Soc. Am. J.43:1140-1144

Firestone M.K., Stark J.M. (1995). "Mechanisms for Soil Moisture Effects on Activity of Nitrifying Bacteria." Appl. Environ. Microbiol. 61(1):218-221

Fitzhugh R.D., Christenson L.M., Lovett G.M. (2003)a. "The Fate of ¹⁵NO₂ Tracer in Soils under Different Tree Species of the Catskill Mountains, New York." Soil Sci. Soc. Am. J. 67:1257-

Fitzhugh R.D., Lovett G.M., Venterea R.T. (2003)b. "Biotic and abiotic immobilization of ammonium, nitrite, and nitrate in soils developed under different tree species in the Catskill Mountains, New York, USA." Global Change Biology. 9:1591-1601

Gates A.J., Luque-Almagro V.M., Goddard A.D., Ferguson S.J., Roldan M.D.,

Richardson D.J. (2011) "A composite biochemical system for bacterial nitrate and nitrite assimilation as exemplified by *Paracoccus denitrificans*" Biochem.J. 435:743-753

Galloway J.N., Aber J.D., Erisman J.W., Seitzinger S.P., Howarth R.W., Cowling E.B.,

Cosby B.J. (2003). "The Nitrogen Cascade." Bioscience. 53(4) 341-356

Galloway J.N., Cowling E., Seitzinger S.P., Socolow R.H. (2002). "Reactive nitrogen: Too much of a good thing?" Ambio. 31(2): 60-63

Gregory P.J. (2006) "Plant Roots: Growth, Activity and Interactions with the Soil"

Oxford Blackwell Publishing pp112

Hart S.C., Binkley D.B., Perry D.A. (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., Myrold D.D. (1997) "¹⁵N tracer studies of soil nitrogen transformations" in

Mass Spectrometry of Soils Boutton T.W., Yamasaki S.(Eds) Journal of the American

Society for Mass Spectrometry pp 225-245

Hart S.C., Nason G.E., Myrild D.D., Perry D.A. (1994). "Dynamics of Gross Nitrogen Transformations in an Old-Growth Forest: The Carbon Connection." Ecology. 75(4):880-891

Hart S.C., Stark J.M., Davidson E.A., Firestone M.K. (1994). "Nitrogen Mineralization, Immobilization, And Nitrification." in Methods of Soil Analysis, Part2. Norman A.G. (Eds.) American Society of Agronomy pp985-1018

Hattori, I. Koike. A. (1978). "Simultaneous determinations of nitrification and nitrate reduction in coastal sediments by a ^{15}N dilution technique. ." Appl. Environ. Microbiol. 35(5):853-857

Herrmann A., Witter E., Kätterer E. (2005) "A method to assess whether 'preferential use' occurs after ^{15}N ammonium addition; implication for the N isotope dilution technique" Soil Biol. Biochem. 37:183-186

Hirobe M., Koba K., Tokuchi N. (2003). "Dynamics of the internal soil nitrogen cycles under moder and mull forest floor types on a slope in a *Cryptomeria japonica* D. Don plantation." Ecological Research. 18:53-64

Holmes R.M., McClelland J.W., Sigman D.M., Fry B., Peterson B.J. (1998). "Measuring $^{15}\text{N-NH}_4^+$ in marine, estuarine and fresh waters: An adaptation of the ammonia diffusion method for samples with low ammonium concentrations." Marine Chemistry. 60:235-243

IPCC, 2013: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 pp.

Isobe K., Koba K., Suwa Y., Ikutani J., Kuroiwa M., Fang Y., Yoh M., Mo J., Otsuka S., Senoo K. (2012). "Nitrite transformations in an N-saturated forest soil." Soil. Biol. Biochem. 52:61-63

Isobe K., Suwa Y., Ikutani J., Kuroiwa M., Makita T., Takebayashi Yu, Yoh M., Otsuka S., Senoo K., Ohmori M., Koba K. (2011). "Analytical Techniques for Quantifying $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ of Nitrate, Nitrite, Total Dissolved Nitrogen and Ammonium in Environmental Samples Using a Gas Chromatograph Equipped with a Quadrupole Mass Spectrometer." Microbes and Environments. 26(1):46-53

Kaneda S., Kaneko N. (2008) "Collembolans feeding on soil affect carbon and nitrogen mineralization by their influence on microbial and nematode activities" Biol. Fertil. Soils 44:435–442

Kimura S.D., Saito M., Hara H., Xu Y.H., Okazaki M. (2009). "Comparison of Nitrogen Dry Deposition on Cedar and Oak Leaves in the Tama Hills Using Foliar Rinsing." Water, Air and Soil Pollution. 202:369-377

Kirchman D.L. (2012) "Processes in Microbial Ecology" Oxford University Press. pp79-98

Kirkham D., Bartholomew W.V. (1954) "Equations for Following Nutrient Transformations in Soil, Utilizing Tracer Data " Soil Science Society Proceeding 33-34

Kirkham D., Bartholomew W.V. (1955). "Equations for Following Nutrient Transformations in Soil, Utilizing Tracer Data: II." Soil Science Society Proceeding 189-193

Koba, K. Inagaki, Y. Sasaki, Y. Takebayashi, M. Yoh.(2010) Nitrogen isotopic analysis of dissolved inorganic and organic nitrogen in soil extracts. In: N. Ohkouchi, I.

Tayasu and K. Koba. (Eds.) Earth, Life and Isotopes. Kyoto University Press.
pp17-36.

Kuroiwa M., Koba K., Isobe K., Tateno R., Nakanishi A., Inagaki Y., Toda H., Otsuka S.,
Senoo K., Suwa Y., Yoh M., Urakawa R., Shibata H. (2011). "Gross nitrification
rates in four Japanese forest soils: heterotrophic versus autotrophic and the
regulation factors for the nitrification." Journal of Forest Research.16:363-373

Laughlin R.J., Stevens R.J. (2002). "Evidence for Fungal Dominance of Denitrification
and Codenitrification in a Grassland Soil." Soil Sci. Soc. Am. J. 66:1540-1548

Lipson D, Naösholm D.(2001) "The unexpected versatility of plants: organic nitrogen
use and availability in terrestrial ecosystems" Oecologia 128:305-316

Luxhøi J., Nielsen N.E., Jensen L.S. (2003). "Influence of $^{15}\text{NH}_4^{+-}$ application on gross N
turnover rates in soil." Soil. Biol. Biochem. 35:603-606

Luxhøi J., Nielsen N.E., Jensen L.S. (2004). "Effect of soil heterogeneity on gross nitrogen
mineralization measured by ^{15}N -pool dilution techniques." Plant and Soil. 262:263-275

- Magnani F., Mencuccini M., Borghetti M., Berbigier P., Berninger F., Delzon S., Grelle A., Hari P., Jarvis P.G., Kolari P., Kowalski A.S., Lankreijer H., Law B.E., Lindroth A., Loustau D., Manca G., Moncrieff J.B., Rayment M., Tedeschi V., Valentini R., Grace J.(2007). "The human footprint in the carbon cycle of temperate and boreal forests." Nature. 447:848-850
- Maharjan B., Venterea R. T. (2013) "Nitrite intensity explains N management effects on N₂O emissions in maize " Environ. Sci. Tech.. 66:229-238
- Marianne S., Borken W., Spott O., Stange C.F., Matzner E. (2014). "Temperature sensitivity of C and N mineralization in temperate forest soils at low temperatures " Soil. Biol. Biochem. 69:320-327
- McGroddy M.E., Daufresne T., Hedin L.O. (2004) "Scaling of C: N: P stoichiometry in forests worldwide: implications of terrestrial Redfield-type ratios" Ecology 85:2390–2401.
- McIlvin A., Altabet M.A. (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

- McIlvin M.R., Casciotti K.L. (2011). "Technical Updates to the Bacterial Method for Nitrate Isotopic Analyses." Anal. Chem. 83(5):1850-1856
- Mørkved P.T., Dörsch P., Bakken L.R. (2007). "The N₂O product ratio of nitrification and its dependence on long-term changes in soil pH." Soil Biol. Biochem. 39:2048-2057
- Müller C., Laughlin R.J., Spott O., and Rütting T. (2014) "Quantification of N₂O emission pathways via a ¹⁵N tracing model ". Soil Biol. Biochem. 72:44-54
- Müller C., Rütting T., Kattge J., Laughlin R.J., Stevens R.J. (2007). "Estimation of parameters in complex ¹⁵N tracing models by Monte Carlo sampling." Soil. Biol. Biochem. 39:715-726
- Müller C., Stevens R.J. , Laughlin R.J. (2004) "A ¹⁵N tracing model to analyse N transformations in old grassland soil " Soil. Biol. Biochem 36(4):619–632
- Müller C., Stevens R. J., Laughlin R. J. (2006) "Sources of nitrite in a permanent grassland soilC. " Eur. J. of Soil Sci. 57(3):337–343
- Myrold D.D, Tiedje J.M. (1986). "Simultaneous estimation of several nitrogen cycle rates using ¹⁵N: theory and application." Soil. Biol. Biochem. 18(6):559-568

- Nelson D.W., Bremner J.M. (1969) "Factors affecting chemical transformations of nitrite in soils." Soil. Biol. Biochem. 1:229-239
- Niboyet A., Roux X. L., Dijkstra P., Hungate B. A., Barthes L., Blankinship J. C., Brown J. R., Field C. B., Leadley P. W. (2011). "Testing interactive effects of global environmental changes on soil nitrogen cycling." Ecosphere. 2(5): article56
- Nishio T., Kanamori T., Fujimoto T. (1985). "Nitrogen transformations in an aerobic soil as determined by a $^{15}\text{NH}_4^+$ dilution technique." Soil. Biol. Biochem. 17(2):149-154
- Osada N., Tateno R., Hyodo F., Takeda H., (2004) "Changes in crown architecture with tree height in two deciduous tree species: developmental constraints or plastic response to the competition for light?" 188:337-347
- Patricia Torres-Canbate, Davidson E.A., Bulygina E., Garci-Ruiz R., Carreira J.A. (2008). "Abiotic immobilization of nitrate in two soils of relic *Abies pinsapo*-fir forests under Mediterranean climate." Biogeochemistry. 91:1-11
- Perakis S.S., Hedin L.O. (2002). "Nitrogen loss from unpolluted South American forests mainly via dissolved organic compounds." Nature. 415:416-419

Pilegaard K. (2013). "Processes regulating nitric oxide emissions from soils." Phil. Trans. R. Soc. B 368: 20130126.

Ravishankara A.R., Daniel J.S., Portmann R.W. (2009) "Nitrous Oxide (N₂O): The Dominant Ozone-Depleting Substance Emitted in the 21st Century " Science 326(5949):123-125

Rockström J., Steffen W., Noone K., Persson A., Chapin F.S., Lambin E.F., Lenton T.M., Scheffer M., Folke C., Schellnhuber H.J., Nykvist B.; De Wit C.A., Hughes T., Van der Leeuw S., Rodhe H., Sörlin, S., Snyder P.K., Costanza R., Svedin U., Falkenmark M., Karlberg L., Corell R.W., Fabry V.J., Hansen J., Walker B., Liverman, D., Richardson K., Crutzen P. ; Foley J.A. (2009). "A safe operating space for humanity." Nature. 461:472-475

Rockström J., Steffen W., Noone K., Persson A., Chappin F.S., Lambin E., Lenton T.M., Scheffer M., Folke C., Schellnhuber H.J., Nykvist B., De Wit C.A., Hughes T., van der Leeuw S., Rodhe H., Sörlin S., Snyder P.K., Costanza R., Svedin U., Falkenmark M., Karlberg L., Corell R.W., Fabry V.J., Hansen J., Walker B., Liverman D., Richardson K., Crutzen P., Foley J.(2009), "Planetary Boundaries: Exploring the Safe Operating Space for Humanity." Ecology and Society 14 (2): 32

Russow R., Sich I., Neue H.-U.. (2000) "The formation of the trace gases NO and N₂O in soils by the coupled processes of nitrification and denitrification: results of kinetic ¹⁵N tracer investigations." Chemosphere. 359-366

Rutting T, Müller C., (2007) "¹⁵N tracing models with a Monte Carlo optimization procedure provide new insights on gross N transformations in soils. " Soil. Biol. Biochem 39(9): 2351-2361

Rutting T., Müller C. (2008). "Process-specific analysis of nitrite dynamics in a permanent grassland soil by using a Monte Carlo sampling technique." Eur. J. of Soil. Sci. 59:208-215

Schlesinger W.H, Bernhardt E.S. (2013) "Biogeochemical cycling in the soil " In Biogeochemistry : an analysis of global change 3rd ed. Elsevier pp195-217

Schmidt B.H.M., Matzner E. (2009). "Abiotic reaction of nitrite with dissolved organic carbon? Testing the Ferrous Wheel Hypothesis." Biogeochemistry. 93: 291-296

Schmidt S.K., Wilson K.L., Monson R.K., Lipson D.A. (2009). "Exponential growth of 都 now molds • at sub-zero temperatures: an explanation for high beneath-snow respiration rates and Q₁₀ values." Biogeochemistry. 95:13-21

Schreiber F., Wunderlin P., Udert K.M., Wells G.F. (2012). "Nitric oxide and nitrous oxide turnover in natural and engineered microbial communities: biological pathways, chemical reactions, and novel technologies." Frontiers in Microbiology.

Schrijver A.D., Verheyen K., Mertens J., Staelens J., Wuyts K., Muys B. (2008) "Nitrogen saturation and net ecosystem production ?." Nature. 451

Sigman D.M., Casciotti K.L., Andreani M., Barford C., Galanter M., Bohlke J.K. (2001). "A bacterial method for the nitrogen isotopic analysis of nitrate in seawater and freshwater." Anal. Chem. 73:4145-4153

Silver W.L., Thompson A.W., Reich A., Ewel J.J., Firestone M.K. (2005) "Nitrogen cycling in tropical plantation forests: potential controls on nitrogen retention." Ecol Appl 15:1604–1614

Solorzano L., Sharp J.H., (1980) "Determination of total dissolved nitrogen in natural water" Limnol. Oceanogr. 25(4):751-754

Smith C.J., Chalk P.M. (1980). "Fixation and Loss of Nitrogen During Transformations of Nitrite in Soils." Soil Sci. Soc. Am. J. 44: 288-291

Smith C.J., Chalk P.M., Crawford D.M., Wood J.T. (1994) "Estimating Gross Nitrogen Mineralization and Immobilization Rates in Anaerobic and Aerobic Soil Suspensions" Soil Sci. Soc. Am. J. 58(6):1652-1660

Smith RV, Doyle R.M., Burns L.C., Stevens R.J. (1997). "A model for nitrite accumulation in soils." Soil. Biol. Biochem 29(8):1241-1247

Sperks D.L. (1996) Method of Soil Analysis Part3- Chemical Methods
Nitrogen-Inorganic forms Soil Science Society of America, Inc. pp1129-1131

Stange F., Dohling F. (2005). "¹⁵N tracing model SimKIM to analyse the NO and N₂O production during autotrophic, heterotrophic nitrification, and denitrification in soils." ISOTOPES IN ENVIRONMENTAL AND HEALTH STUDIES.
41(3):261-274

Stange C.F., Spott O., Arriaga H., Menedez S., Estavillo J.M. , Merino P. (2013) "Use of the inverse abundance approach to identify the sources of NO and N₂O release from Spanish forest soils under oxic and hypoxic conditions " Soil. Biol. Biochem.
57 :451-458

- Stark J.M., Hart S.C. (1997). "High rates of nitrification and nitrate turnover in undisturbed coniferous forests." Nature. 385:61-64
- Stevenson F.J., Harrison R.M., Wetselaar R., Leeper R.A. (1970). "Nitrosation of Soil Organic Matter: III. Nature of Gases Produced by Reaction of Nitrite with Lignins, Humic Substances, and Phenolic Constituents Under Neutral and Slightly Acidic Conditions." Soil Sci. Soc. Am. J. 34:430-435
- 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**(2): 139-151.
- Stevens R.J., Laughlin R.J. (1995). "Nitrite transformations during soil extraction with potassium-chloride" Soil Sci. Soc. Am. J. 59:933-938
- Su H., Cheng Y., Oswald R., Behrendt T., Trebs I., Meixner F.X., Andreae M.O., Cheng P., Zhang Y., Pöschl U. (2011). "Soil Nitrite as a Source of Atmospheric HONO and OH Radicals." Science. 333:1616-1618
- Takebayashi Y., Koba K., Sasaki Y., Fang Y., Yoh M. (2010). "The natural abundance of ¹⁵N in plant and soil-available N indicates a shift of main plant N resources to

NO₃⁻ from NH₄⁺ along the N leaching gradient." Rapid Communications in Mass Spectrometry. 24:1001-1008

Tateno R., Hishi T., Takeda H. (2004). "Above- and belowground biomass and net primary production in a cool-temperate deciduous forest in relation to topographical changes in soil nitrogen." Forest Ecology and Management. 193:297-306

Tateno R., Osaka N., Terai M, Tokuchi N, Takeda H. (2005). " Inorganic nitrogen source utilization by *Fagus crenata* on different soil types." Trees. 19:477-481

Templer P.H., Silver W.L., Pett-Ridge J., DeAngelis K.M., Firestone M.K. (2008). "Plant and microbial controls on nitrogen retention and loss in a humid tropical forest" Ecology. 89(11):3030-3040

Thorn K.A., Mikita M.A. (2001). "Nitrite fixation by humic substances: Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance evidence for potential intermediates in chemodenitrification." Soil Sci. Soc. Am. J. 64:568-582

- Tiedje, J. (1988). "Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium." *Biology of Anaerobic Microorganisms*, John Wiley and Sons. pp179-244
- Tietema A, Wessel W.W. (1992). "Gross nitrogen transformations in the organic layer of acid forest ecosystems subjected to increased atmospheric nitrogen input." Soil. Biol. Biochem. 24(10):943-950
- Tokuchi N., Hiirobe M., Koba K. (2000). "Topographical Differences in Soil N Transformation Using ¹⁵N Dilution Method along a Slope in a Conifer Plantation Forest in Japan." Journal of Forest Research 5: 13-19
- Torres-Canabate,P., Davidson,E.A., Bulygina,E., Garcia-Ruiz,R. and Carreira,J.A.(2008) "Abiotic immobilization of nitrate in two soils of relic Abies pinsapo-fir forests under Mediterranean climate" Biogeochemistry 91:1-11.
- Urakawa R., Ohte N., Shibata H., Tateno R., Hishi T., Fukushima K., Inagaki Y., Hirai K., Oda T., Oyanagi N., Nakata N., Toda H., Kenta T., Fukuzawa K., Watanabe T., Tokuchi N., Nakaji T., Saigusa N., Yamao Y., Nakanishi A., Enoki T., Ugawa S., Hayakawa A., Kotani A., Kuroiwa M., and Isobe K. (2014). Biogeochemical nitrogen properties of forest soils in the Japanese archipelago. *Ecol Res.* (data paper)

Van Cleemput O., Baert L. (1984) "Nitrite: a key compound in N loss processes under acid condition?" Plant and Soil 76:233-241

Venterea R.T. (2007). "Nitrite-driven nitrous oxide production under aerobic soil conditions: kinetics and biochemical controls." GCB. 13:1-12

Venterea R.T., 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

Venterea R.T., Rolston D.E. (2000). "Mechanisms and kinetics of nitric and nitrous oxide production during nitrification in agricultural soil." Global Change Biology. 6:303-316

Venterea R.T., Rolston D.E. (2000). "Nitric and nitrous oxide emissions following fertilizer application to agricultural soil: Biotic and abiotic mechanisms and kinetics." JGR-atmos. 105:117-129

Venterea R.T., Rolston D.E. (2002) "nitrogen oxide trace gas transport and transformation: II model simulations compared with data" Soil Science 167(1):49-61

- Verhagen F.J.M, Laanbroek H.J. (1991) "Competition for Ammonium between Nitrifying and Heterotrophic Bacteria in Dual Energy-Limited Chemostats". Appl Environm Microbiol 57:3255–3263
- Vitousek P.M., Gosz J.R., Grier C.C., Melillo J.M., Reiners W.A. (1982). "A Comparative Analysis of Potential Nitrification and Nitrate Mobility in Forest Ecosystems." Ecological Monographs. 52(2):155-177
- Vitousek P.M., Howarth (1991). "Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur?" Biogeochemistry. 13:87-115
- Vrede T (1998) "Elemental composition (C:N:P) and growth rates of bacteria and *Rhodomonas* grazed by *Daphnia*. J. of Plankton Research " 20: 455-470
- Watson C.J., Travers G., Kilpatrick D.J., Laidlaw A. S., O'Riordan E. (2000) "Overestimation of gross N transformation rates in grassland soils due to non-uniform exploitation of applied and native pools" Soil Biol. Biochem. 32:2019-2030
- Wessel W.W., Tietema A. (1992). "Calculating gross N transformation rates of ¹⁵N pool dilution experiments with acid forest litter: Analytical and numerical approaches." Soil. Biol. Biochem. 10:931-94

参考文献（日本語）

森林・林業白書（2010）林野庁

村林翔 2013年度卒業論文

加藤宏有 2014年度修士論文

謝辞

本研究を遂行するうえで、ご指導いただき、かつ、研究に対して自由に取りくむことを尊重してくださった、東京大学・妹尾啓史教授、大塚重人准教授に深く感謝いたします。また、多くの議論と協力をしてくださった磯部一夫助教に深く感謝いたします。

GCMS をはじめとした機器や実験環境を快く提供してくださった、京都大学・大手信人教授に深く感謝いたします。

研究のことだけではなく、人生のことについても多くの対話をさせていただいた、そして多くの励ましをいただいた、東京農工大学・木庭啓介准教授に深く感謝いたします。

また、本研究の審査をお引き受けくださった、東京大学・藤原徹教授、吉村悦郎教授、京都大学・大手信人教授に深く感謝致します。

東京大学・砂防工学及び森林利水研究室のみなさまには、サンプリングをはじめ、実験においても多くのご助力とご助言をいただきました。ここに深く謝意を表します。

本研究を遂行する上で、研究室の先輩・後輩の皆様と共に議論し、また、息抜きをする時間はなくてはならないものでした。皆様に、深く感謝致します。

また、学外での、地球化学会若手会をはじめとする若手会やゼミにおいて、研究について、人生について多くの議論をさせていただいた先輩・同期・後輩の皆様に、深く感謝いたします。

また、最後に、見守り続け、応援していただいた両親に、深く、感謝致します。

補遺 4.1

Appendix 4.1. soil characteristics in Fukuroyama

layer	slope position (m)	pH	water content (%)	TC mgC g ⁻¹	TN mgN g ⁻¹	C/N	DOC mgC kg ⁻¹	DON mgN kg ⁻¹	DOC / DON
A0	0								
A0	10	5.9 ^{bcd} (0.1)	44.0 ^a (1.1)	193.6 ^{ad} (10.7)	8.0 ^{ab} (0.4)	24.3 ^c (0.5)			
A0	20	5.8 ^{ad} (0.1)	45.6 ^a (1.5)	245.1 ^{bcd} (16.1)	11.6 ^{bc} (1.1)	22.3 ^{ac} (3.1)			
A0	30	5.8 ^{ac} (0.0)	44.8 ^a (2.0)	148.6 ^a (27.0)	7.8 ^{ab} (1.1)	18.7 ^{ac} (0.9)			
A0	40	5.7 ^{ad} (0.0)	40.3 ^a (3.1)	135.2 ^a (21.8)	6.9 ^a (1.1)	19.5 ^{ac} (0.8)			
A0	50	6.2 ^d (0.1)	48.3 ^a (2.4)	182.5 ^{ac} (29.4)	9.5 ^{ac} (1.4)	19.0 ^{ac} (0.6)			
A0	60	6.0 ^{cd} (0.0)	44.7 ^a (0.5)	163.0 ^{ab} (14.2)	9.7 ^{ac} (0.8)	16.8 ^a (0.4)			
A0	70	6.0 ^{cd} (0.0)	49.5 ^a (1.8)	184.1 ^{ac} (15.6)	10.2 ^{ac} (0.7)	18.0 ^{ab} (0.3)			
A0	80	6.1 ^{cd} (0.0)	47.2 ^a (7.5)	290.0 ^d (14.7)	12.8 ^c (1.0)	22.9 ^{bc} (1.0)			
A0	90	5.5 ^a (0.2)	45.1 ^a (6.7)	227.4 ^{ad} (21.6)	10.8 ^{ac} (0.8)	21.0 ^{ac} (0.9)			
A0	100	5.9 ^{bcd} (0.0)	49.0 ^a (8.4)	270.3 ^{cd} (24.2)	12.1 ^{bc} (0.6)	22.3 ^{ac} (1.3)			
0-10 cm	0	5.6 ^{ac} (0.3)	21.4 ^a (2.2)	71.1 ^a (13.5)	3.6 ^a (0.6)	19.2 ^c (0.7)	101.1 ^a (31.9)	14.0 ^a (3.8)	6.5 ^{ab} (0.8)
0-10 cm	10	5.4 ^{ab} (0.1)	21.9 ^a (0.5)	65.3 ^a (8.1)	3.9 ^a (0.2)	16.6 ^{ac} (1.4)	243.5 ^a (122.2)	40.9 ^a (18.8)	5.7 ^{ab} (0.8)
0-10 cm	20	5.2 ^a (0.2)	21.4 ^a (1.6)	73.9 ^a (8.4)	4.6 ^a (0.5)	16.2 ^{ac} (0.8)	236.2 ^a (67.6)	33.8 ^a (9.7)	7.5 ^a (1.6)
0-10 cm	30	5.7 ^{ad} (0.1)	23.8 ^{ab} (1.2)	107.6 ^a (20.6)	6.0 ^a (0.8)	17.4 ^{bc} (1.0)	224.8 ^a (30.5)	38.7 ^a (7.3)	6.2 ^{ab} (0.8)
0-10 cm	40	5.8 ^{ad} (0.1)	25.0 ^{ab} (0.8)	46.6 ^a (8.1)	3.3 ^a (0.3)	13.7 ^{ab} (0.8)	133.3 ^a (35.7)	23.8 ^a (3.3)	5.3 ^{ab} (0.6)
0-10 cm	50	6.1 ^{cd} (0.1)	31.3 ^{ab} (3.4)	61.8 ^a (9.9)	4.6 ^a (0.6)	13.3 ^a (0.4)	109.4 ^a (23.3)	23.0 ^a (4.9)	4.8 ^{ab} (0.3)
0-10 cm	60	6.1 ^{cd} (0.0)	32.1 ^{ab} (1.5)	95.1 ^a (2.8)	6.5 ^a (0.3)	14.7 ^{ab} (0.3)	128.7 ^{†a} (15.7)	28.5 ^a (2.5)	4.5 ^{†ab} (0.2)
0-10 cm	70	6.2 ^d (0.1)	31.7 ^{ab} (1.2)	76.6 ^a (26.5)	5.4 ^a (1.5)	13.3 ^a (0.9)	103.3 ^a (30.4)	22.5 ^a (4.1)	4.4 ^{ab} (0.3)
0-10 cm	80	6.2 ^d (0.0)	34.2 ^{ab} (4.6)	52.3 ^a (8.0)	3.6 ^a (0.4)	14.5 ^{ab} (0.6)	69.8 ^a (7.4)	17.5 ^a (1.8)	4.0 ^b (0.2)
0-10 cm	90	6.2 ^d (0.0)	37.8 ^{ab} (9.6)	67.8 ^a (9.0)	4.6 ^a (0.5)	14.6 ^{ab} (0.6)	132.5 ^a (31.4)	30.9 ^a (8.8)	4.5 ^{ab} (0.3)
0-10 cm	100	5.9 ^{bcd} (0.1)	40.8 ^b (1.4)	60.2 ^a (12.2)	4.3 ^a (0.7)	13.5 ^{ab} (0.7)	103.4 ^a (15.3)	28.3 ^a (6.3)	3.8 ^b (0.2)

slope position means distance from top of the slope

Data are shown as mean with SE in parentheses. n=5 except for †(n=4).

Different letters denote significant differences among sites ($p < 0.05$) based on one-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Tukey-Kramer.

Data from Kato (2015)

補遺 4.2 (A)

Appendix. 4-2(A) ^{15}N recovery at 0.5 hr incubation

Appendix. 4-2(A) ¹⁵N recovery at 0-3 hr incubation

layer	slope position	NO ₂ ⁻		NO ₃ ⁻		NH ₄ ⁺		DON		unrecovered ¹⁵ N	
		(%)									
A0	0	N/A		N/A		N/A		N/A		N/A	
A0	10	34.4 ^b	(1.2)	23.0 ^{bc}	(4.2)	0.69 ^a	(0.1)	27.17 ^a	(6.5)	14.75 ^{ab}	(4.3)
A0	20	29.6 ^{ab}	(1.5)	4.1 ^{ab}	(3.8)	0.90 ^a	(0.1)	43.41 ^{ac}	(3.3)	18.86 ^{ab}	(3.9)
A0	30	30.2 ^{ab}	(2.5)	-10.2 ^a	(1.8)	1.37 ^a	(0.2)	59.65 ^{bcd}	(4.9)	18.91 ^{ab}	(3.8)
A0	40	28.4 ^{ab}	(2.7)	-7.0 ^a	(1.5)	1.51 ^a	(0.5)	52.43 ^{bcd}	(4.8)	24.66 ^b	(5.8)
A0	50	34.5 ^b	(1.8)	-2.9 ^a	(4.5)	0.76 ^a	(0.2)	58.76 ^{bcd}	(4.8)	9.55 ^{ab}	(2.0)
A0	60	30.1 ^{ab}	(2.6)	23.5 ^c	(8.1)	0.67 ^a	(0.2)	35.75 ^{ab}	(6.8)	9.90 ^{ab}	(2.3)
A0	70	30.6 ^{ab}	(1.5)	-4.0 ^a	(4.7)	0.72 ^a	(0.2)	61.16 ^{cd}	(5.3)	11.52 ^{ab}	(1.9)
A0	80	29.2 ^{ab}	(0.9)	-8.5 ^a	(3.1)	0.36 ^a	(0.0)	75.05 ^d	(3.3)	3.82 ^a	(0.9)
A0	90	19.2 ^b	(5.2)	-2.7 ^a	(2.9)	1.29 ^a	(0.6)	60.81 ^{cd}	(7.1)	21.34 ^{ab}	(8.9)
A0	100	25.1 ^{ab}	(1.1)	-2.7 ^a	(1.7)	0.54 ^a	(0.1)	62.76 ^{cd}	(2.6)	14.31 ^{ab}	(1.9)
0-10 cm	0	24.2 ^{ab}	(5.2)	27.8 ^a	(11.0)	1.64 ^{ab}	(0.5)	2.33 ^a	(11.5)	44.05 ^c	(6.7)
0-10 cm	10	26.2 ^{ab}	(3.9)	16.1 ^a	(4.9)	1.51 ^{ab}	(0.3)	27.82 ^a	(4.3)	28.37 ^{ac}	(8.0)
0-10 cm	20	19.1 ^{ab}	(5.3)	27.3 ^a	(8.2)	2.12 ^b	(0.6)	11.73 ^a	(12.4)	39.71 ^{bc}	(10.4)
0-10 cm	30	18.8 ^{ab}	(3.8)	37.3 ^a	(16.7)	2.27 ^b	(0.4)	10.21 ^a	(15.6)	31.36 ^{ac}	(6.7)
0-10 cm	40	28.0 ^{ab}	(2.7)	43.4 ^a	(8.7)	1.30 ^{ab}	(0.3)	-1.25 ^a	(9.5)	28.54 ^{ac}	(4.5)
0-10 cm	50	33.7 ^b	(2.3)	55.7 ^a	(16.6)	0.81 ^{ab}	(0.1)	-5.49 ^a	(17.0)	15.28 ^{ab}	(2.3)
0-10 cm	60	25.1 ^{ab}	(2.6)	58.6 ^a	(12.5)	0.92 ^{ab}	(0.4)	-7.47 ^a	(12.1)	22.87 ^{ac}	(4.6)
0-10 cm	70	33.4 ^b	(4.0)	54.1 ^a	(13.6)	0.89 ^{ab}	(0.3)	2.29 ^a	(16.1)	9.32 ^a	(4.4)
0-10 cm	80	35.7 ^b	(2.0)	61.3 ^a	(11.9)	0.22 ^a	(0.0)	-3.25 ^a	(13.0)	5.96 ^a	(2.1)
0-10 cm	90	26.3 ^{ab}	(1.3)	60.9 ^a	(11.5)	0.46 ^a	(0.1)	1.28 ^a	(14.5)	11.05 ^a	(3.9)
0-10 cm	100	13.7 ^a	(4.1)	68.4 ^a	(5.3)	0.32 ^a	(0.1)	8.58 ^a	(6.2)	8.97 ^a	(2.6)

Different letters denote significant differences among sites ($p < 0.05$) based on one-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Tukey-Kramer.

Data are shown as mean with SE in parentheses. n=5

N/A means Not Available

補遺 4.2 (B)

Appendix 4.2(B). ¹⁵N recovery at 2hr incubation

Appendix 4.2(B). N recovery at 2 hr incubation

layer	slope position	NO ₂ ⁻		NO ₃ ⁻		NH ₄ ⁺		DON		unrecovered ¹⁵ N	
		(%)									
A0	0	N/A		N/A		N/A		N/A		N/A	
A0	10	14.2 ^c	(2.2)	-3.5 ^a	(1.9)	1.7 ^{ab}	(0.3)	60.3 ^c	(8.2)	27.3 ^a	(6.2)
A0	20	6.1 ^{ac}	(1.7)	9.8 ^{ab}	(1.6)	2.3 ^{ab}	(0.4)	45.1 ^{bc}	(6.0)	36.7 ^a	(7.0)
A0	30	6.6 ^{ac}	(1.7)	13.4 ^{ac}	(2.2)	2.7 ^b	(0.4)	39.4 ^{ac}	(7.2)	37.9 ^a	(4.5)
A0	40	8.3 ^{ac}	(2.0)	28.2 ^{bcd}	(1.8)	2.6 ^{ab}	(0.5)	26.1 ^{ab}	(3.1)	34.9 ^a	(5.0)
A0	50	11.3 ^{bc}	(2.9)	32.5 ^{ce}	(2.7)	2.0 ^{ab}	(0.5)	29.2 ^{ab}	(2.7)	25.0 ^a	(1.4)
A0	60	5.3 ^{ab}	(2.3)	47.1 ^{def}	(3.2)	1.5 ^{ab}	(0.8)	22.6 ^{ab}	(3.9)	23.4 ^a	(4.3)
A0	70	5.5 ^{ab}	(1.8)	45.5 ^{def}	(2.9)	1.4 ^{ab}	(0.5)	22.3 ^{ab}	(3.1)	26.2 ^a	(1.8)
A0	80	2.6 ^a	(0.6)	48.0 ^{ef}	(4.9)	0.4 ^a	(0.1)	25.0 ^{ab}	(5.1)	24.0 ^a	(1.7)
A0	90	1.0 ^a	(0.6)	51.6 ^{ef}	(9.9)	1.0 ^{ab}	(0.4)	17.9 ^a	(7.6)	28.5 ^a	(4.2)
A0	100	1.4 ^a	(0.3)	52.3 ^f	(3.5)	N/A		N/A		27.6 ^a	(2.1)
0-10 cm	0	17.4 ^a	(5.0)	16.1 ^{ab}	(6.2)	2.4 ^c	(0.6)	18.1 ^{ab}	(6.6)	46.0 ^{bc}	(6.7)
0-10 cm	10	17.0 ^a	(3.8)	9.4 ^a	(6.1)	N/A		N/A		38.5 ^{ac}	(8.4)
0-10 cm	20	12.9 ^a	(5.0)	20.5 ^{ab}	(8.0)	2.3 ^{bc}	(0.5)	9.1 ^{ab}	(10.6)	55.2 ^c	(7.5)
0-10 cm	30	12.1 ^a	(2.5)	24.3 ^{ab}	(9.2)	2.6 ^c	(0.3)	29.7 ^b	(7.3)	31.3 ^{ac}	(4.7)
0-10 cm	40	18.8 ^a	(3.0)	25.6 ^{abc}	(6.0)	1.8 ^{ac}	(0.3)	21.2 ^{ab}	(6.4)	32.6 ^{ac}	(3.8)
0-10 cm	50	20.4 ^a	(3.1)	36.5 ^{ad}	(11.4)	1.6 ^{ac}	(0.2)	26.6 ^{ab}	(12.8)	14.9 ^a	(5.6)
0-10 cm	60	11.2 ^a	(2.0)	43.7 ^{ad}	(8.3)	1.2 ^{ac}	(0.4)	13.2 ^{ab}	(10.8)	30.7 ^{ac}	(6.1)
0-10 cm	70	21.9 ^a	(5.1)	35.0 ^{ad}	(7.9)	1.3 ^{ac}	(0.2)	17.2 ^{ab}	(10.9)	24.6 ^{ab}	(6.5)
0-10 cm	80	20.9 ^a	(3.3)	52.3 ^{bd}	(7.9)	0.5 ^a	(0.1)	14.6 ^{ab}	(7.3)	11.6 ^a	(2.0)
0-10 cm	90	10.5 ^a	(1.9)	61.7 ^{cd}	(3.4)	0.7 ^{ab}	(0.1)	11.4 ^{ab}	(5.6)	15.7 ^a	(2.7)
0-10 cm	100	26.9 ^a	(4.2)	64.6 ^d	(6.2)	0.3 ^a	(0.1)	0.0 ^a	(11.1)	23.4 ^{ab}	(8.9)

Different letters denote significant differences among sites ($p < 0.05$) based on one-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Tukey-Kramer.

Data are shown as mean with SE in parentheses.

n=5

N/A means Not Available

補遺 4.3

Appendix.4-3 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ transformation rates and MRT in Fukuroyama soils

layer	slope position m	NH_4^+				NO_3^-			
		concentration	production‡	consumption‡	MRT	concentration‡	production‡	consumption‡	MRT
		‡							
		mg N kg ⁻¹	mg N kg ⁻¹ d ⁻¹		d	mg N kg ⁻¹	mg N kg ⁻¹ d ⁻¹		d
A0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
A0	10	5.4 ^{ab} (1.0)	10.5 ^a (0.9)	11.8 ^a (1.3)	0.5 ^a (0.08)	2.4 ^a (1.9)	0.7 [†] ^a (0.3)	1.3 (0.8)	8.0 ^{††} (4.9)
A0	20	6.6 ^{ab} (0.8)	13.8 ^a (0.3)	16.8 ^a (0.8)	0.5 ^a (0.06)	2.6 ^a (1.2)	1.6 ^{ab} (0.4)	1.1 (0.2)	2.5 [†] (0.9)
A0	30	11.0 ^b (2.8)	12.8 ^a (4.9)	17.5 ^a (8.0)	3.9 ^a (3.21)	2.4 ^a (1.8)	1.3 ^{ab} (0.6)	1.3 [†] (1.0)	1.8 [†] (0.5)
A0	40	8.6 ^{ab} (1.2)	9.7 ^a (2.0)	13.9 [†] ^a (3.2)	1.0 ^a (0.22)	2.8 ^a (2.1)	1.1 ^a (0.4)	0.3 ^{†††}	2.0 (0.8)
A0	50	7.7 ^{ab} (1.1)	14.9 ^a (2.2)	11.9 ^a (6.4)	0.5 ^a (0.08)	3.6 ^a (1.1)	3.2 ^{ab} (0.7)	4.1 ^{†††}	1.1 (0.4)
A0	60	8.3 ^{ab} (1.2)	15.2 ^a (2.6)	14.7 ^a (1.1)	0.6 ^a (0.02)	10.9 ^a (5.0)	2.5 ^{ab} (1.3)	1.3 [†] (1.1)	2.3 ^{††} (0.4)
A0	70	7.0 ^{ab} (0.5)	14.1 ^a (2.2)	13.6 ^a (2.3)	0.6 ^{†a} (0.07)	7.7 ^a (1.9)	6.7 ^b (2.8)	8.3 ^{††} (4.2)	4.1 (3.8)
A0	80	3.8 ^a (0.4)	12.1 ^a (1.0)	13.5 ^a (1.1)	0.3 ^a (0.03)	11.1 ^a (4.9)	2.8 [†] ^{ab} (0.7)	1.2 ^{†††}	5.1 [†] (2.0)
A0	90	7.5 ^{ab} (1.5)	12.7 ^a (2.0)	20.5 ^a (7.4)	0.6 ^a (0.08)	13.3 ^a (2.1)	3.9 ^{ab} (0.7)	2.8 ^{†††}	3.6 (0.5)
A0	100	5.8 ^{ab} (0.8)	11.8 ^a (1.9)	12.2 ^a (1.6)	0.5 ^a (0.06)	13.0 ^a (4.1)	3.0 ^{ab} (1.1)	4.3 [†] (1.3)	9.0 (4.6)
0-10 cm	0	1.3 ^a (0.4)	2.3 ^a (0.7)	2.7 ^{ab} (0.7)	0.6 ^a (0.08)	n.d.	0.1 ^{††} ^{ab} (0.0)	0.1 ^{††} (0.0)	5.7 ^{†††}
0-10 cm	10	2.3 ^a (0.6)	4.1 ^a (1.8)	4.9 [†] ^{ab} (2.4)	0.8 ^{ab} (0.31)	0.4 ^a (0.5)	0.4 [†] ^{ab} (0.3)	0.1 [†] (0.1)	4.9 ^{††} (2.7)
0-10 cm	20	6.4 ^a (5.3)	3.7 ^a (1.9)	9.1 ^{ab} (6.7)	1.1 [†] ^{ac} (0.52)	0.1 ^a (0.2)	0.1 ^a (0.0)	0.1 (0.0)	38.8 ^{†††}
0-10 cm	30	6.7 ^a (2.7)	5.5 ^a (1.2)	17.0 ^b (6.6)	1.1 ^{ac} (0.30)	0.9 ^{ab} (0.9)	0.6 [†] ^{ab} (0.4)	0.1 ^{††††}	2.6 ^{†††}
0-10 cm	40	2.9 ^a (0.5)	1.9 ^a (0.7)	1.6 ^a (1.0)	2.6 ^c (0.80)	0.3 ^a (0.2)	0.1 ^a (0.0)	0.1 ^{††} (0.1)	4.0 ^{††} (2.2)
0-10 cm	50	3.3 ^a (0.7)	5.7 ^a (1.2)	8.8 ^{ab} (1.9)	0.7 ^a (0.12)	1.9 ^{ab} (1.0)	0.8 ^{ab} (0.4)	0.4 ^{††} (0.2)	3.4 ^{††} (0.8)
0-10 cm	60	3.5 ^a (0.2)	5.3 ^a (0.3)	1.0 [†] ^{ab} (4.6)	0.7 ^a (0.07)	3.7 ^{ab} (1.5)	1.4 ^{ab} (0.5)	1.1 ^{††} (0.9)	3.0 [†] (0.7)
0-10 cm	70	4.0 ^a (0.2)	1.9 ^a (0.4)	2.2 ^{ab} (0.5)	2.4 ^{bc} (0.32)	1.3 ^{ab} (0.5)	0.8 [†] ^{ab} (0.2)	0.2 ^{††} (0.1)	1.9 [†] (0.7)
0-10 cm	80	3.6 ^a (0.4)	3.3 ^a (1.2)	5.6 ^{ab} (1.6)	1.5 ^{ac} (0.42)	3.5 ^{ab} (0.8)	1.5 ^{ab} (0.5)	0.7 ^{††} (0.4)	2.8 (1.3)
0-10 cm	90	3.4 ^a (0.9)	5.9 ^a (1.7)	5.0 ^{ab} (1.2)	0.7 ^a (0.12)	6.7 ^{ab} (3.0)	2.7 ^b (1.3)	2.6 ^{††} (2.0)	2.6 (0.5)
0-10 cm	100	2.3 ^a (0.2)	2.4 ^a (0.5)	2.9 ^{ab} (0.6)	1.1 ^{ac} (0.1)	8.8 ^b (4.0)	1.2 ^{ab} (0.2)	1.2 ^{†††}	8.0 (4.4)

Different letters denote significant differences among sites ($p < 0.05$) based on one-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Tukey-Kramer.

Data are shown as mean with SE in parentheses. n=5 except for †(n=4), ††(n=3), †††(n=2) and ††††(n=1).

N/A means Not Available

The mean residence time (MRT) was calculated as $\text{MRT [d]} = \text{NH}_4^+ \text{ or } \text{NO}_3^- \text{ pool size} / \text{NH}_4^+ \text{ or } \text{NO}_3^- \text{ production rate}$

‡ Data from Kato (2015)