

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 20 年度博士課程進学

氏 名 磯部 一夫

指導教員名 妹尾 啓史

論文題目

高窒素負荷環境にある中国亜熱帯林土壌における窒素フローと硝化微生物群集

窒素は生物にとって必須の元素であり、様々な化学形態をとりながら森林生態系内を循環している。森林生態系では土壌中に大量の窒素が蓄積しているものの、土壌微生物や植物が吸収利用できる無機態窒素 (NH_4^+ や NO_3^-) はその 1% にも満たない。さらに、 NH_4^+ は土壌に吸着・保持されるのに対し、 NO_3^- はほとんど吸着・保持されず溶脱されやすい。そのため、無機態窒素の挙動の把握が森林生態系の窒素循環プロセスを理解するために重要である。

その一方で、ハーバー・ボッシュ法の発明以来、大量の無機態窒素が合成され環境中に拡散することで、大気から森林生態系への無機態窒素の沈着量が増加している。特に中国においては、急速な経済発展と相まった著しい窒素沈着が確認され、今後も増加の一途を辿ると予測されている。その結果として、中国のいくつかの森林では生態系の処理能力を超える量の無機態窒素が蓄積し、土壌から多量の NO_3^- が水の移動にともなって溶脱していることが報告されている。しかし、そのような森林土壌における無機態窒素の動態はほとんどわかっておらず、今後の窒素沈着量の増大にともなう窒素循環プロセスの変化は予測できない状況にある。

そこで本研究では、高窒素負荷環境にある中国亜熱帯林を研究サイトとし、以下の3点を目的に土壌中の窒素のフロー（無機化、硝化、窒素不動化（主に微生物による NH_4^+ 、 NO_3^- 同化））ならびに硝化（ $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^-$ ）を担う微生物群集の解析を行った。すなわち、まず（1）窒素フロー速度の測定法を確立すること、（2）土壌中の窒素フローの速度を算出し、窒素フローの特徴と窒素流入量の増加に対する窒素フローの変化を明らかにすること、（3）硝化を担っている微生物群集を特定し、 NO_3^- 生成への寄与を定量的に明らかにすること、（4）これらを通して、亜熱帯林土壌中の NO_3^- 生成メカニズムの全体像を明らかにし、予想される窒素負荷の増大に対する窒素循環プロセスの変化を予測することを目的とした。

1. 土壌中の窒素フロー速度の簡便な測定法の確立

土壌中の窒素フロー速度の測定には窒素安定同位体 (^{15}N) を用いるのが有効だが、この方法では窒素化合物の安定同位体比 ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) を分析する必要がある。しかし、従来の分析手法は行程が煩雑なうえ、高価な同位体比質量分析計 (IRMS) やガス濃縮などの特殊な前処理が必要とされるなどの難点があった。そのため、これらの難点を解決し、窒素フロー速度を簡便に測定するための手法を開発した。

まず IRMS の代わりにガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) を用いて分析できるようにするため、GC/MS の改良および分析条件の最適化を行った。併せて、微生物の代謝に関わる様々なガス種を同時かつ迅速に測定するための方法を確立した。特に窒素フロー速度の測定にとって重要な N_2O については、2.5 分以内に 10^5 のダイナミックレンジで定量することを可能にした。

続いて、土壌中の NH_4^+ 、 NO_3^- 、 NO_2^- 、溶存全有機態窒素 (TDN) の濃度と $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を簡便に測定するための方法を確立した。この方法では、土壌抽出液中の NO_3^- は脱窒細菌を用いて N_2O に変換する。 NH_4^+ と TDN はそれぞれ化学的に NO_3^- に酸化した後、同様に N_2O に変換する。 NO_2^- は化学的に N_2O に変換する。最終的に各窒素化合物に由来する N_2O の濃度と $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を上記の GC/MS システムで測定する。この分析手法の確立により、土壌中の NH_4^+ 、 NO_3^- 、 NO_2^- 、TDN の濃度と $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ の測定を、従来手法の 1/10–1/100 の少量の試料で行うことが可能になった。この分析システムを用いて、次の森林土壌中の窒素フロー速度の解析を行った。

2. 中国亜熱帯林土壌における窒素フローの特徴と将来予測

35kg-N/ha/yr もの無機態窒素 ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$) が大気から流入する中国亜熱帯林において土壌中の窒素フローの解析を行った。林齢の異なる3つの森林、すなわち広葉樹林（極相林、林齢 > 400 年）、松林（80 年）ならびに広葉樹-松混合林（80

年)を対象とした。広葉樹林では、松林や混合林に比べて土壤中の NO_3^- 濃度が高く、水の移動にともない流入量以上の窒素が NO_3^- として土壤から溶脱している。それら3つの森林土壤中の無機化・硝化・窒素不動化速度を ^{15}N 同位体希釈法によって算出した。その結果、無機化および $\text{NH}_4^+ \cdot \text{NO}_3^-$ 不動化速度は森林間で差が見られなかった一方で、広葉樹林の硝化速度は、松林や混合林に比べて著しく大きいことが明らかになった。広葉樹林において土壤中の NO_3^- 濃度が高く、多量の NO_3^- が溶脱しているのは土壤中の硝化速度が高いことに起因すると考えられた。

続いて、窒素負荷の増大が及ぼす影響を評価する目的として広葉樹林と松林に設置された、 NH_4NO_3 を人為的に添加する窒素添加区ならびに添加しない無添加区の土壤を用いて解析を行った。広葉樹林では窒素添加区の微生物バイオマスが無添加区に比べて小さく、窒素 ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$) 不動化速度が無添加区の42%程度にまで低下していたのに対して、松林では微生物バイオマスには差がなかったが、窒素不動化速度は136%程度に増大していた。それに加えて広葉樹林の窒素添加区では、無添加区と比較して土壤中の NO_3^- 濃度が高い一方、 NO_3^- 不動化速度は小さかった。このことは、広葉樹林の窒素添加区では無添加区に比べて土壤中 NO_3^- が不動化されるまでの時間が長い、すなわち生成あるいは流入した NO_3^- は NO_3^- のまま土壤中に長く滞留し得ることを意味している。これらのことから、松林に比べ広葉樹林では、今後予想される窒素負荷の増大に応じて、土壤微生物バイオマスが小さくなり窒素不動化速度が低下することで、土壤から NO_3^- がさらに溶脱されやすくなると考えられた。

3. 中国亜熱帯林土壤における硝化微生物群集の解析

各森林土壤間の窒素フロー速度の差異は硝化速度において顕著であったことから、それぞれの土壤中 NO_3^- を担っている微生物群集を解析した。硝化の第1段階であるアンモニア酸化は独立栄養性のアンモニア酸化細菌 (AOB) が主に担っていると長年考えられてきたが、最近、その新たな担い手としてアンモニア酸化アーキア (AOA) が発見された。高窒素負荷環境にあり酸性化が進行している本研究サイトの土壤においては AOA が硝化に寄与している可能性が考えられた。

広葉樹林、松林、混合林の各土壤から抽出した DNA を用い、AOB の *amoA* (アンモニアモノオキシゲナーゼ遺伝子) をターゲットとして PCR を行ったところ、いずれの土壤からも増幅は見られなかった。培養法 (MPN 法) によっても AOB は検出されなかった。これに対し、AOA の *amoA* をターゲットとした PCR ではいずれの土壤からも増幅産物が得られ、定量 PCR により AOA *amoA* は各土壤1グラムあたり 10^8 から 10^9 コピー程度存在することが示された。また、各土壤の AOA

amoA の存在量と硝化速度との間には正の相関が認められた。さらに、土壌から抽出した RNA 中の AOA *amoA* の存在量と硝化速度との間にも正の相関が認められた。これらの結果から、本研究サイトの森林土壌においては AOA がアンモニア酸化を担っている主要な微生物群であると考えられた。これまで土壌において主に AOA がアンモニア酸化を担っていることを硝化速度とともに示唆した事例はなく、微生物生態学的に重要な発見である。

各土壌より得られた AOA *amoA* の塩基配列から系統解析を行った結果、中国の土壌に由来する AOA *amoA* からなる特徴的な系統群が存在している事が示唆された。また硝化の第2段階を担う亜硝酸酸化細菌 (NOB) である *Nitrosospira* 属細菌が各土壌に存在していることが、PCR により得られた 16S rRNA 遺伝子の塩基配列から系統解析を行った結果、明らかになった。

以上の結果から、本研究サイトの森林土壌では AOA と *Nitrosospira* 属を含む NOB が硝化を担い、その速度は AOA の存在量によって大きくコントロールされていると考えられた。

4. まとめ

本研究において、まず窒素フローの速度を測定するための簡便な分析手法を確立した。その手法を用いて、高窒素負荷環境にある中国亜熱帯林土壌における窒素フロー速度を算出した。それにより窒素流入量が同じであっても、森林の林齢および植生によって土壌中の硝化速度が異なることを明らかにした。また硝化速度が大きいことで土壌中の NO_3^- 濃度が高くなり、それゆえ多量の NO_3^- が溶脱していることを示唆した。さらに、微生物群集の解析により、これらの土壌においては主に AOA がアンモニア酸化を担っており、AOA の存在量が硝化速度を大きくコントロールしている可能性を示した。また、極相林である広葉樹林においては、今後も窒素負荷が続くことで土壌微生物バイオマスが小さくなり、窒素不動化速度が低下することが予測され、 NO_3^- の溶脱が加速していくと考えられた。本研究が提供する手法と知見は、今後予想される窒素負荷の増大に対して、窒素循環だけでなく森林生態系全体がどのように変遷していくのかを予測する上で極めて重要であると考えられる。

1) Isobe et al. (2011) A simple and rapid GC/MS method for the simultaneous determination of gaseous metabolites. *J. Microbiol. Methods*, **84**, 46-51

2) Isobe et al. Novel analytical techniques for ^{15}N -labelled compounds in the environmental samples with denitrifier and GC/MS. *Microbes and Environ.*, in press