

溶存窒素化合物の窒素酸素安定同位体比による窒素循環解析 — N_2O を中心として—

木庭啓介*

1. はじめに：プールからフラックスへの模索

海洋生態系でも陸上生態系でも窒素の可給性が一次生産に大きく影響を与えることがよく知られている。そのため、窒素循環については長年研究が行われてきた。また近年では人為的な窒素負荷が全球レベルで増加しており、特に陸上にて沈着された窒素が集水域、河川を通じて濃縮した形で沿岸域へと供給され、貧酸素水塊が形成されるといったような生態系の変化を窒素がもたらしていることもよく知られている。

農地生態系は別として、陸上、森林生態系は比較的窒素が足りないとされている。そのため、窒素がどのように循環し、一次生産者へ供給されるかを理解することが健全な森林の維持管理に必須である。しかし海洋や陸水と比較して土壌を含む陸上の窒素循環は、土壌の持つ物理化学的かつ生物学的な不均一性の高さから、定量的な解析が極めて困難である。たとえば土壌中の無機態窒素（硝酸イオンやアンモニウムイオン）の濃度は、10 cm 離れた土壌では1桁ことなることが珍しくはない。また、降水パターンによって激しく土壌中の環境が異なるため、季節的な変化も大変大きい。このような状況のため、陸上の窒素循環研究は静的な（あまり大きな季節変化を持たない）プール、たとえば土壌中の全窒素プールや植物の窒素プールの変化を、いくつものサンプルを採取して空間的な平均値をとり追跡することで、窒素循環像を描いてきた。循環系とはフラックスとプールという2つの要素から構成されるため、プールのみの

測定では窒素循環は描けない。しかし、自然生態系において測定できる窒素フラックスは残念ながら少ない。私が研究を始めた1990年代前半では、森林生態系では植物リター（落葉落枝、枯れ葉などのこと）の供給速度と、土壌を長期培養して正味で生産される無機態窒素量（純無機化速度）程度の情報しか得られなかった。現在でもガスや水蒸気のフラックス観測には観測タワーなどの大掛かりな設備が必要であるし、森林からの流出を測定するには、長年のモニタリングを必須とする集水域の水収支についての情報が必要である。

海洋化学研究での濃度情報が持つ代表性の強さに対して、たとえば土壌や浅層地下水での濃度情報の示す代表性は、残念ながら高くはないと感じている。海洋化学と陸上での生態系生態学・生物地球化学とのアプローチの違いを考えると、この印象は的外れではないように思える。ほぼ液相のみで占められると考えられる多くの海洋環境と比較して、土壌では気相も少なからず存在する。固相の割合も高い。結果、比較的容易に採取および分析が可能な液相部分、つまり溶液試料の濃度が窒素プールそしてフラックスの手がかりとなりにくいのである。たとえば土壌水（土壌溶液）中の硝酸イオン濃度が30 μM といっても、果たして土壌中で局在している微生物、植物の根にとって、その濃度は高いのか低いのか、類推することが難しい。そもそもその溶液の存在状態が植物や微生物に利用可能な状態であるかという議論から始める必要がある。そのため、濃度をいくら測定して

*京大大学生態学研究センター教授

も「量」「速度」への手応えが得られず、結局の所濃度の高低を議論するにとどまるケースが多いと思う。平たく言えば、何をどのように採取して測定したら良いのか、直感的に理解することが難しいのが陸上での物質循環研究であると未だに感じる。

そんな中、海洋化学で進んできた窒素の安定同位体比による窒素化合物の動態解析というトピックは、大変魅力的に見える。Cline and Kaplan (1975) といった初期の海洋における硝酸塩窒素同位体比解析であっても、そのデータは大変美しい。長い歴史のある海洋化学での窒素同位体利用と比較して、私が研究を始めた90年代初頭、陸上での窒素安定同位体を用いた研究例は、まだまだ少なかった。とくに後述する脱窒課程についてはほとんど行われていなかった。その原因の最たるものは当時の職人芸的な窒素安定同位体自然存在比測定技術の煩雑さ、そして必要試料量の多さであった。そこで体力に任せ、大量の地下水（1試料約10L）を処理することで解決を試みるという手にでた。地下水での脱窒課程を硝酸イオンの窒素安定同位体比で追跡したMariotti et al. (1988)の有名な研究を参考にしながら、森林内浅層地下水中の脱窒について検討を行った（Koba et al. 1997）。本当に幸運なことに、たまたま嵐が来たときの地下水上昇と硝酸イオン濃度減少、それに伴う窒素安定同位体比（ $\delta^{15}\text{N}$ ）の上昇を捉えることができた。その結果、なんとか脱窒を捕まえられたということで、一応の形にはなった。しかし、非常にダイナミックな酸化還元環境の形成が浅層地下水では生じているのだろうというような曖昧な議論に留まり、クリアな結果は得られなかった。

2. 一酸化二窒素：窒素循環の理解を示すバロメーター？

一酸化二窒素（ N_2O ）は強力な温室効果ガスであり、同時に近年では最も強力にオゾン層を破壊してしまうガスとして知られている。この N_2O

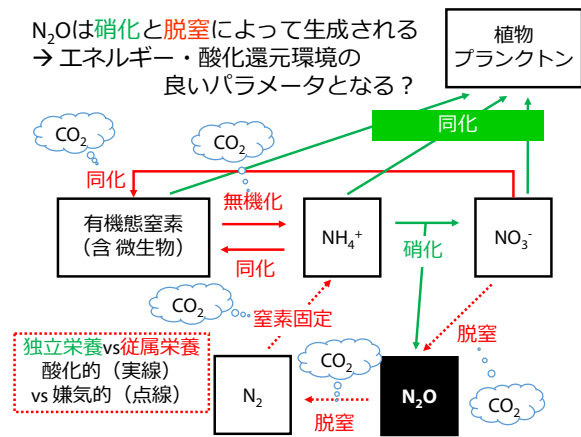


図1. 窒素循環の概略図、エネルギー（独立栄養 vs 従属栄養）、酸化還元状態がことなるプロセスが共存していることに注意。

というガスについては一般的に2つの生成過程と1つの消費過程が考えられている（図1）。生成過程であり同時に消費過程であるのが、貧酸素環境での従属栄養微生物による硝酸呼吸、いわゆる脱窒である。これは硝酸イオンが亜硝酸イオンに、さらに一酸化窒素、 N_2O 、そして窒素ガス（ N_2 ）まで還元される反応である。この脱窒の最終段階である N_2O 還元にはその前段階よりも低い酸素濃度環境が必要であろうと考えられている。しかしどのような要因が現場での N_2O 還元を支配しているかについては未だによくわかっていない。もう1つの N_2O 生成過程は硝化（アンモニア酸化+亜硝酸酸化）の前半部分、アンモニア酸化である。アンモニウムイオン（実際にはアンモニア）を硝化細菌・古細菌が酸化して亜硝酸イオンを生成する際の副生成物として N_2O は生成されると考えられている。硝化細菌・古細菌は独立栄養微生物とされている。またアンモニアを酸化するため、アンモニア酸化には酸化的な環境が必要である。さらに硝化細菌・古細菌による N_2O の顕著な還元はないと考えられている。

これらをまとめて考えてみると、 N_2O の重要性がわかってくる。この脱窒と硝化という2つの N_2O の生成プロセスは、窒素循環を考える際に常に留意すべき生態系のエネルギー状態（従属栄養微生物が活発に活動できるエネルギー（炭素）リッチな環境か、独立栄養微生物が従属栄養微生物と

競合できるエネルギー（炭素）プアーな環境か）、そして酸化的か還元的かという状態の2軸 (Helton et al. 2015) において相反する特徴を有しているのである。逆に言えば、 N_2O の生成消費プロセスの解明は、複雑な窒素循環を制御しているエネルギー環境と酸化還元環境という重要な要素を一気に提供してくれる可能性がある。また、 N_2O はガスであり、実際に生成消費が盛んに行われている場所（いわゆるホットスポット）から比較的容易に抜け出すことが考えられる。となれば、 N_2O というガスを通じて、観察が困難な、ホットスポットでの酸化還元環境、エネルギー環境についての情報を引き出すことが可能かもしれない。たとえば土壌から放出される N_2O の性質から、土壌中の酸化還元環境についての手がかりを得ることができる可能性がある (Bai and Houlton 2009)。海洋中でも沈降粒子中の微小嫌気環境を、溶存している N_2O から類推することができるかもしれない。また、 N_2O というガスは環境中で低濃度であるが、比較的容易に GC-ECD により濃度測定が可能であり、その小さな濃度変化（たとえば数 nM の変化）を追跡することが他の溶存窒素化合物と比較すると楽な測定対象である。ある中栄養湖の湖水における溶存窒素化合物濃度を調べてみると、これまで脱窒での研究で議論されていた NO_3^- や生成物である N_2 ガスは大変高濃度

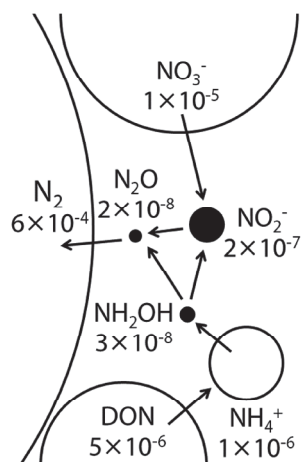


図2. 木崎湖（長野県北部、中栄養湖）における溶存窒素化合物濃度（木庭ら未発表データ、数字は濃度 (mole-N/L)）
矢印は予想される窒素循環プロセス。

(μM レベル) で存在している (図2)。であるので、たとえば 100 nM の変化は NO_3^- のプールサイズと比較すると遥かに小さく、検出することが困難である。それに対し、 N_2O は極めて低濃度である (nM オーダー；図2)。となれば、その生成（消費）プロセスを解析するにあたって濃度観測感度が高く、さらに生態系を記述する重要な2つの異なる軸についての情報を含んでいる N_2O という物質は、大変好都合な対象に見えてくる。そして逆に N_2O についての理解レベルは、まさに我々の窒素循環についての理解レベルの試金石となりえると考えられるのである。

当然 N_2O について多くの研究が行われてきた。繰り返しになるが N_2O 生成プロセスとしては、酸素濃度が低く利用できそうな炭素が豊富な環境では脱窒が、酸素が豊富であれば硝化が重要であろうというのは、学部生でも容易に予想できる。しかし、実際にはそれを示すことが極めて難しい。アセチレンブロック法 (Yoshinari and Knowles 1976) の開発により、脱窒における最終過程である N_2O 還元を阻害することが可能となった。さらに低濃度のアセチレンの利用により硝化も抑制することができるため、これらを組み合わせた実験室での硝化と脱窒による N_2O 生成、そして N_2O 還元を定量的に議論できるようになった (Davidson et al. 1986)。しかし、そもそもアセチレンガスを野外で利用し、 N_2O 生成消費の現場（ホットスポット）へ導入することは大変困難である。また、数々の挑戦的な研究が行われてきているものの、脱窒の最終生成物である N_2 ガスの定量は未だに困難である。脱窒の測定について Groffman et al. (2006) が包括的に問題を提起から早10年がたつ。しかし、未だに N_2O そして脱窒についての研究はその重要性の割には進んでいないというのが現状であると思われる。

3. 溶存 N_2O の安定同位体比： N_2O 生成消費プロセスの手がかりを与えるか？

海洋・陸水における溶存窒素化合物の窒素安定

同位体比研究は図2にあるように、比較的濃度が高く、脱窒の基質であるとともに硝化の生成物であり、植物プランクトンに重要な窒素源である硝酸塩について進んできた。一方、微量にしか存在しない溶存 N_2O の窒素安定同位体比については、多くの先駆的な研究が日本人によって行われている。特に Yoshida (1988) により、硝化細菌が特異的な低い窒素同位体比 ($\delta^{15}N$) をもつ N_2O を放出するという発見は、硝化と脱窒の分離について大きな可能性をもたらした。つまり、低い $\delta^{15}N$ を N_2O が取っていれば硝化由来、比較的高い $\delta^{15}N$ であれば脱窒、さらに脱窒における N_2O 還元も受けている) と判定できると考えられるのである(図3)。2000年代に入るまで溶存 N_2O の同位体比はまさに職人芸で、世界での限られたラボのみで測定が可能であり、いくらかの先駆的な研究が特に海洋において行われた。Yoshida et al. (1984) では熱帯東太平洋での N_2O の $\delta^{15}N$ について、Yoshida et al. (1989) では北西太平洋での N_2O と硝酸塩の $\delta^{15}N$ について先駆的な取り組みがなされている。しかし残念ながら、硝化なのか脱窒なのか、どちらが重要な N_2O 生成プロセスであるのかについては決定的な証拠は得られなかった。

そこで N_2O の酸素同位体比 ($\delta^{18}O$) についても着目されるようになった。特殊な分光測定を用いた1985年の論文(Whalen and Yoshinari, 1985; Yoshinari and Whalen 1985)、大量の試料を用いた Kim and Craig (1990) から、 N_2O の生成プロセスによって、 $\delta^{18}O$ にも特徴が現れると期待された。これらの論文以降なかなか研究は進まなかったが、同位体比質量分析計へ N_2O としてそのまま導入

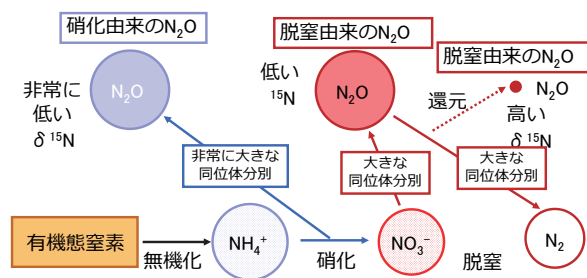


図3. 窒素同位体比 ($\delta^{15}N$) による N_2O 生成・消費プロセスの分離

する方法が開発されたことにより (Tanaka et al. 1995)、オンラインでの N_2O の $\delta^{15}N \cdot \delta^{18}O$ 同時測定が現実となった。溶存 CH_4 での低温濃縮技術を応用し、Dore et al. (1998) では亜熱帯北太平洋の溶存 N_2O について、一方で Naqvi et al (1998) ではアラビア海の溶存 N_2O について $\delta^{15}N$ と $\delta^{18}O$ を測定した。しかし、ここでも残念ながら硝化と脱窒について明確な判定は叶わなかったように思われる。Dore et al. (1998) では、大気へ放出される N_2O については硝化が主な N_2O 生成プロセスであろうと議論しているが、これは表層近くの N_2O の $\delta^{15}N$ が低くなっていていることによるものであり、定量的な議論ではない。そもそも基質 (たとえば硝酸塩) の同位体比が生成物 (たとえば N_2O) の同位体比に (同位体分別を受けた上で) 大きく影響していることから、本来であれば基質と生成物の両方について同位体比情報が必要である。基質についての同位体比測定はさらに負担が大きいものであり、多くの研究では行われてこなかったが、Naqvi et al. (1998) では硝酸塩の $\delta^{15}N$ についても測定して議論を行っている。しかしそれにもかかわらず、硝化なのか、脱窒なのか、については明らかにすることができなかった。

このような状況の中、 ^{15}N の分子内同位体分布が N_2O の分解過程の解析に有効であるという提案がなされ (Yung and Miller 1997)、実際に ^{15}N 分子内同位体分布が東京工業大学の豊田栄先生と吉田尚弘先生のグループによって測定できるようになった (Toyoda and Yoshida 1999, Yoshida

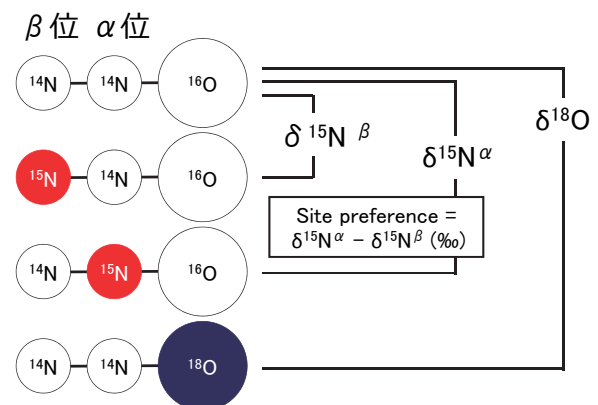


図4. N_2O の ^{15}N 分子内分布

and Toyoda 2000). 微生物による N_2O 生成にこの測定を応用したミシガン州立大のグループにより, ^{15}N 分子内同位体分布 (Site Preference; 図4) が硝化 (アンモニア酸化) の場合大きく, 脱窒の場合は小さいことが明らかとなり (Sutka et al. 2006), 全く新たな可能性が開かれた.

そこで, 2002年から2005年にかけて, 1997年の研究では不完全な結果しか得られなかった滋賀県の集水域に戻り, もう一度 N_2O を中心に据えて脱窒の検討を行うこととした. すでに N_2O の濃度については, 0.6ha と狭い森林集水域にもかかわらず, ことなる井戸から採水される地下水が大きな変動を持っていることがわかっていた (Osaka et al. 2006). 井戸のタイプ別に脱窒が駆動しているところとそうでないところ, といった議論が各種溶存物質濃度の相関解析によりある程度議論可能であったが, より詳細な検討が可能であろうと期待して, 浅層地下水中の溶存 N_2O の $\delta^{15}N$ と $\delta^{18}O$ と Site Preference を測定した. さらに基質の同位体比の重要性を考え, 同じ地下水中に存在する硝酸イオンの $\delta^{15}N$ と $\delta^{18}O$ についても当時まだ珍しかった脱窒菌法 (Sigman et al. 2001; Casciotti et al. 2002) を用いて測定を行った. 完全嫌気な地下水ではないため, 地下水中には硝化の基質であるアンモニウムイオンはほぼ枯渇しており, アンモニウムイオンについての測定は叶わなかった.

まず濃度データを見てみるが, 脱窒が重要であれば, DO 濃度, 硝酸イオン濃度と N_2O 濃度には逆相関が, DOC と N_2O には正の相関が認められると予想されるが, 明確な傾向は認められなかった (図5). また硝化が重要であれば硝酸イオン濃度と N_2O 濃度には正の相関が期待されるが, そのような傾向も認めにくい.

そこで次に N_2O と硝酸イオンの $\delta^{15}N$ と $\delta^{18}O$ から脱窒と硝化の議論を試みた. これまでの知見から, 硝化由来, 脱窒由来の N_2O がどのような同位体比を取るかについては情報が集まりつつあった. そのため, 実際に測定した硝酸イオンの $\delta^{15}N$

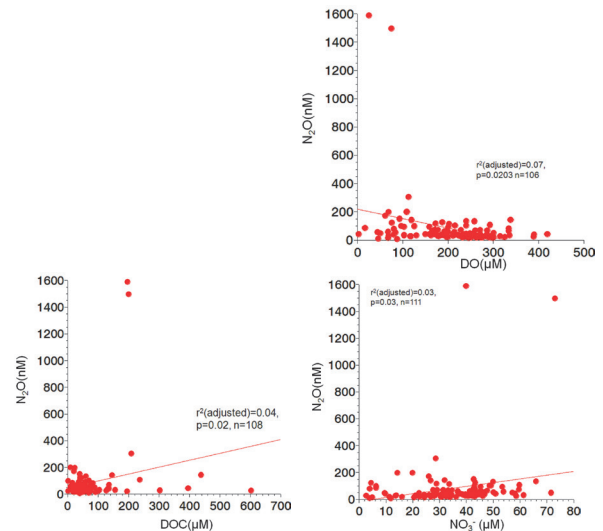


図5. 森林地下水中の DO, DOC, 硝酸イオン濃度と溶存 N_2O 濃度の関係 (Koba et al. 2009 より改訂)

と $\delta^{18}O$ と, 脱窒における同位体分別の情報から (詳細は Koba et al. 2009 を参照されたい), 脱窒で生成する N_2O がとり得る $\delta^{15}N$ と $\delta^{18}O$ の範囲が決まる (図6のDの長方形). 硝化については情報がほとんどないが, アンモニウムイオンの $\delta^{15}N$ はアンモニウムイオンがほぼ100%硝化で硝酸イオンへ変換されていたことから, 硝酸イオンの $\delta^{15}N$ と等しいと仮定, その他 DO や H_2O の $\delta^{18}O$ についての過程を置くことで予想範囲を推定した

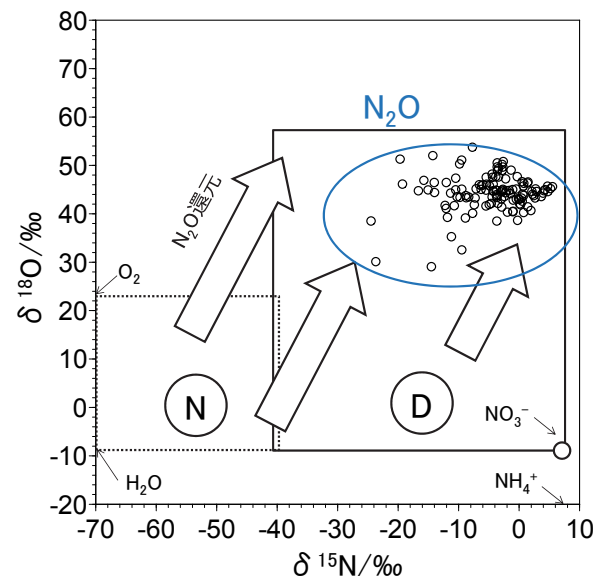


図6. N_2O の $\delta^{15}N$ と $\delta^{18}O$ マップ (Koba et al. 2009 より改訂)

予想される脱窒由来 (D), 硝化由来 (N) が描かれている. N_2O 還元が生じると右上向きにデータが移動すると考えられる. 実データは脱窒由来の部分に収まった.

(図6のNの長方形). 実測した溶存 N_2O のデータはグラフの右上, 脱窒の予想範囲に収まった. しかし, これでこの N_2O が脱窒由来であると結論付けることはできなかった. というのも, 我々が観測できる N_2O は色々なプロセスを経てきたあとの最後の残り物であり, それまでにこの生態系で還元を受けてきて右上に配置されているだけという可能性があり, さらには, その前に脱窒由来と硝化由来の N_2O が混合しているという可能性を排除できないのである.

そこで Site Preference を組み込んだ解析を考えた (図7). 図6と同様にこれまで得られている硝化由来 N_2O , 脱窒由来 N_2O がとり得る Site Preference, そして基質と N_2O の $\delta^{15}N$ の差分 ($\Delta\delta^{15}N$) の範囲を定め, N_2O が還元を受ける際にデータがどのように動くか (図中の矢印) を決めると図7のようになった. Site Preference の値については脱窒では0%, 硝化では33%として検討を行った. また脱窒, 硝化それぞれで生成した N_2O は地下水柱で混じり合い, さらに還元的な環境に触れた場合には N_2O 還元を受け, $\delta^{15}N$ は上昇 ($\Delta\delta^{15}N$ では減少), Site Preference も上昇するとした (設定の詳細については Koba et al. 2009 を参照).

結果は図8のようになった. 図6と同様の傾向,

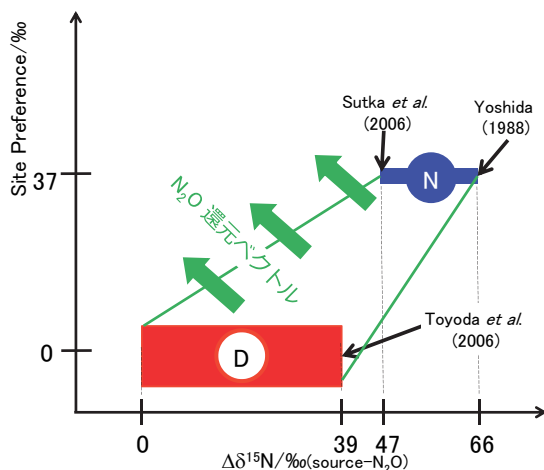


図7. N_2O の $\Delta\delta^{15}N$ と Site Preference マップ (Koba et al. 2009 より改訂)
 予想される脱窒由来 (D), 硝化由来 (N) が描かれている. N_2O 還元が生じると左上向きにデータが移動すると考えられる.

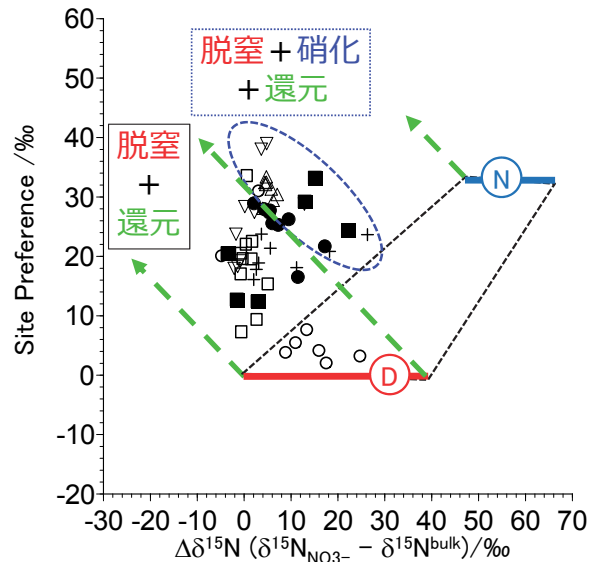


図8. $\Delta\delta^{15}N$ と Site Preference マップに実際のデータを載せたもの (Koba et al. 2009 より改訂)
 脱窒と還元だけで説明できない上半分のデータについては硝化を考慮せざるを得ない. つまり硝化が N_2O 生成に貢献していることが明らかとなった.

つまり脱窒が重要であるということには変わりないものの, 図8では還元によってデータが左上へと引っ張られていることがわかる. さらに, 楕円で囲まれている部分については, 脱窒と N_2O 還元では説明できない, つまり硝化の寄与がどうしても否定できない, という結果となった. ここまで来てようやく, 硝化がやはり何らかの影響をしているという手がかりを得ることができた. 前述したとおり, 一度硝化で N_2O が生成されれば, 硝化の生じる環境では N_2O は還元されることはない. 地下水のような滞留時間の長い試料 (研究を行った集水域では数ヶ月と推定されている; Kabeya et al. 2007) では, さまざまな反応の履歴が N_2O には反映されているはずである. N_2O の濃度, その $\delta^{15}N$ と $\delta^{18}O$ では足りず, N_2O の Site Preference, そして基質の $\delta^{15}N$ までを動員しなければ, 複雑な N_2O の履歴は紐解くことできなかった. 試みに必要な同位体分別の大きさ (同位体分別係数) を文献値から指定し, 硝化, 脱窒, 還元の割合を計算してみると図9のようになる. 全体として平均すると硝化の貢献は3%程度, 一方の脱窒は97%であり, 脱窒がメインと

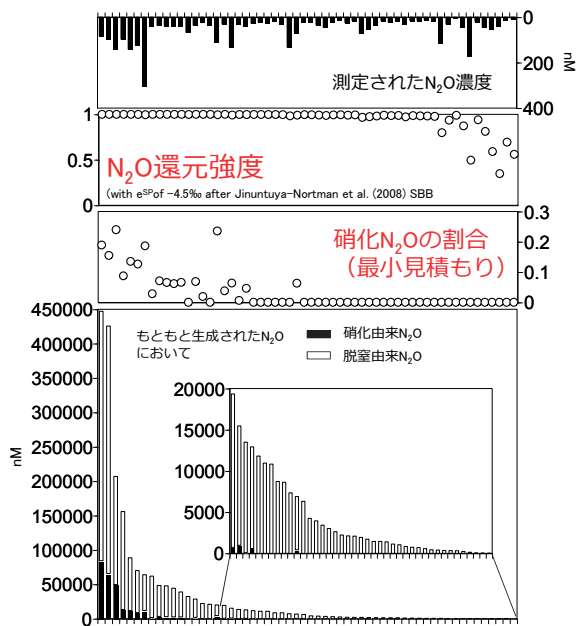


図9. 同位体分別を仮定して、計算された硝化、脱窒、還元割合 (Koba et al. 2009 より改訂). 上から実測された N_2O 濃度, N_2O 還元強度 (1 なら 100% 還元), 硝化割合, もともと存在していたと思われる N_2O の濃度とその硝化(脱窒)由来の割合を示している. 一つ一つのデータは観測できた地下水を表している.

なるということになるが、サンプル(井戸)によっては 20% 以上が硝化由来の N_2O と計算されるものもあった (図9 中段). また硝化由来と脱窒由来の N_2O が混合したあとにどれだけ還元を受けているかについては、94% という計算になり、我々が観測できる N_2O はそのほとんどが還元を受けてしまっているということになった. たしかにこれでは単純な濃度の相関解析 (図5) では N_2O の挙動を解析することは不可能に近いだろう.

N_2O の複雑性の一端を垣間見ることができたような気がするが、大きな問題がすでに山積している. 常に安定同位体自然存在比を用いる際に問題となるのが同位体分別の大きさである. 今回であれば硝化、脱窒、還元、それぞれについて Site preference, $\delta^{15}N$ そして $\delta^{18}O$ の変動を、同位体分別係数を手がかりに解析するわけだが、この係数の大きさについては未だに観測例が少なく、その変動を十分に説明するだけの知見が得られていない. そのため、解析に必須なこの係数の値を少し変えるだけで結論が大きく変わってしまう可能性

がある. もう一つは 2000 年代に入ってから特に顕著であり、2003 年の嫌気性アンモニア酸化 (アナモックス) が良い例 (Kuypers et al. 2003) であるが、分子生物学的アプローチの発展により、生態系内で生じる可能性のある新規窒素循環プロセスが次々に見つかっていることが挙げられる. N_2O についていえば、2005 年 (Könneke et al. 2005) に発見された硝化古細菌 (AOA) が N_2O を生成すること、そしてその $\delta^{15}N$ がこれまで研究されてきた硝化細菌 (AOB) とはかなり違うことが明らかになった (Santoro et al. 2011). この情報を先程の図7に入れるとかなり大きく変わることがわかる (図10). ある生態系で AOB と AOA どちらが優占か、どちらがどれだけ硝化に、そして N_2O 生成に寄与しているか、についてはいまだに殆どわかっていないが、海洋 N_2O の $\delta^{15}N$ についてはこれまでの AOB で得られた同位体分別係数を用いた議論よりも、AOA の同位体分別係数に即した解析のほうが理解しやすく、AOA の abundance がかなり海洋では大きいとされていることもあり、海洋表層では、AOB ではなく AOA が N_2O の生成に大きく寄与しているということが考えられている (Santoro et al. 2011). この結果はこれまでの N_2O 同位体データ解析を根本的に見直す必要を示しているが、一方で同位体比によって、単なるプロセスにとどまらず、どのような生物種がそのプロセスをになって

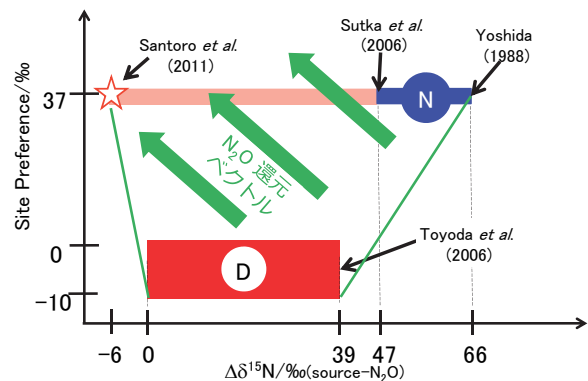


図10. AOA の情報を入れた N_2O の $\Delta\delta^{15}N$ と Site Preference マップ改訂版. AOA が優占する生態系では AOA による違う同位体シグナルを持った N_2O の寄与を考慮する必要がある.

いるか、というプレーヤーについての情報も提供できる可能性を有していることを示す重要なトピックであるとも考えられる。

4. おわりに

複雑な生態系での窒素循環について、その複雑性についての重要な情報を N_2O から得られる可能性があるのではないかと、現在でも考えている。ただし、そのためのアプローチとして、これまで紹介してきた安定同位体情報だけでなく、分子生物学的なアプローチを積極的に組み合わせ、そこから考えられる基質物質、生成物質についての検討が必要であろうと考える。たとえば、硝化がもしも海洋 N_2O について重要であれば、これまで観測されている海洋での低いアンモニウム塩濃度で説明がつくのか？ 違う基質が実は使われているのではないか（例えば尿素）、そのような可能性が分子生物学的なアプローチから出てくるのであれば、海洋化学の分野からは、その濃度、そして同位体比の測定を通じ、そのような基質物質が本当に重要であるかの検討を行う、ということが必要だと思う。実際、分子生物学的な研究からは、これまで考えられていたよりも遥かに複雑な窒素循環像が提案されてきている（Schreiber et al. 2012）。これまで海洋化学は（私自身はその営みを外野から眺めていただけであるが）、丁寧な微量物質濃度測定技術を開発しては物質循環像を一新してきた。窒素循環は長年研究なされているにもかかわらず、まだまだプロセスにしてもそのプレーヤーにしても、その基質物質にしても、わからないことが山積されている。今後も日本の海洋化学の高いレベルに圧倒されながらも、なんとかそのエッセンスの一部だけでも咀嚼して、陸上での研究へフィードバックすることでよりよい理解へとつなげていきたいと考えている。

5. 謝辞

海洋の専門家でない私に講演ならびに本稿を執筆させていただく機会を下さりました宗林由樹先

生並びに公益財団法人海洋化学研究所の皆様感謝いたします。

6. 引用文献

- E. Bai, B. Z. Houlton (2009) Coupled isotopic and process-based modeling of gaseous nitrogen losses from tropical rain forests, *Global Biogeochemical Cycles*, 23, GB2011.
- K. L. Casciotti, D. M. Sigman, M. Galanter Hastings, J.L. Böhlke, A. Hilkert (2002) Measurement of the oxygen isotopic composition of nitrate in seawater and freshwater using the denitrifier method, *Analytical Chemistry*, 74, 4905–4912.
- J. D. Cline, I. R. Kaplan (1975) Isotopic fractionation of dissolved nitrate during denitrification in the Eastern Tropical North Pacific Ocean, *Marine Chemistry*, 3, 271–299.
- E. A. Davidson, W. T. Swank, T. O. Perry (1986) Distinguishing between nitrification and denitrification as sources of gaseous nitrogen production in soil, *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 1280–1286.
- J. Dore, B. N. Popp, D. M. Karl, F. J. Sansone (1998) A large source of atmospheric nitrous oxide from subtropical North Pacific surface water, *Nature*, 396, 63–66.
- F. Schreiber, P. Wunderlin, K. M. Udert, G. F. Wells (2012) Nitric oxide and nitrous oxide turnover in natural and engineered microbial communities: biological pathways, chemical reactions, and novel technologies, *Frontiers in Microbiology*, 3, Article 372.
- P. M. Groffman, M.A. Altabet, J. K. Böhlke, K. Butterbach-Bahl, M. B. David, M. K. Firestone, A. E. Giblin, T. M. Kana, L. P. Nielsen, M.A. Voytek (2006) Methods for measuring denitrification: diverse approaches to a difficult problem, *Ecological*

Applications, 16, 2019–2122.

- A. Helton, M. Ardón, E. S. Bernhardt (2015) Thermodynamic constraints on the utility of ecological stoichiometry for explaining global biogeochemical patterns, *Ecology Letters*, 18, 1049–1056.
- N. Kabeya, M. Katsuyama, M. Kawasaki, N. Ohte, A. Sugimoto (2007) Estimation of mean residence times of subsurface waters using seasonal variation in deuterium excess in a small headwater catchment in Japan, *Hydrological Processes*, 21, 308–322.
- K.-R. Kim, H. Craig (1992) Nitrogen-15 and oxygen-18 characteristics of nitrous oxide: a global perspective, *Science*, 262, 1855–1857.
- K. Koba, N. Tokuchi, E. Wada, T. Nakajima, G. Iwatsubo (1997) Intermittent denitrification: The application of a ^{15}N natural abundance method to a forested ecosystem, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61, 5043–5050.
- K. Koba, K. Osaka, Y. Tobari, S. Toyoda, N. Ohte, M. Katsuyama, N. Suzuki, M. Itoh, H. Yamagishi, M. Kawasaki, S. J. Kim, N. Yoshida, T. Nakajima (2009) Biogeochemistry of nitrous oxide in groundwater in a forested ecosystem elucidated by nitrous oxide isotopomer measurements, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73, 3115–3133.
- M. Könneke, A. E. Bernhard, J. R. de la Torre, C. B. Walker, J. B. Waterbury, D. A. Stahl (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon, *Nature*, 437, 543–546.
- M. M. M. Kuypers, A. O. Sliekers, G. Lavik, M. Schmid, B. B. Jørgensen, J. G. Juenen, J. S. S. Damsté, M. Strous, M. S. M. Jetten (2003) Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea, *Nature*, 422, 608–611.
- A. Mariotti, A. Landreau, B. Simon (1988) ^{15}N isotope biogeochemistry and natural denitrification process in groundwater: Application to the chalk aquifer of northern France, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 52, 1869–1878.
- S. W. A. Naqvi, T. Yoshinari, D. A. Jayakumar, M. A. Altabet, P. V. Narvekar, A. H. Devol, J. A. Brandes, L. A. Codispoti (1998) Budgetary and biogeochemical implications of N_2O isotope signatures in the Arabian Sea, *Nature*, 394, 462–464.
- K. Osaka, N. Ohte, K. Koba, M. Katsuyama, T. Nakajima (2006) Hydrologic controls on nitrous oxide production and consumption in a forested headwater catchment in central Japan, *Journal of Geophysical Research-Biogeosciences*, 111, G01013.
- D. M. Sigman, K. L. Casciotti, M. Andreani, C. Barford, M. Galanter, J. K. Böhlke (2001) A bacterial method for the nitrogen isotopic analysis of nitrate in seawater and freshwater, *Analytical Chemistry*, 73, 4145–4153.
- A. Santoro, C. Buchwald, M. R. McIlvin, K. L. Casciotti (2011) Isotopic signature of N_2O produced by marine ammonia-oxidizing archaea, *Science*, 333, 1282–1285.
- R. L. Sutka, N. E. Ostrom, P. H. Ostrom, J. A. Breznak, H. Gandhi, A. J. Pitt, F. Li (2006) Distinguishing nitrous oxide production from nitrification and denitrification on the basis of isotopomer abundances, *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 638–644.
- N. Tanaka, D. M. Rye, R. Rye, H. Avak, T. Yoshinari (1995) High precision mass spectrometric analysis of isotopic abundance ratios in nitrous oxide by direct injection of

- N_2O , *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 142, 163–175.
- S. Toyoda, N. Yoshida (1999) Determination of nitrogen isotopomers of nitrous oxide on a modified isotope ratio mass spectrometer, *Analytical Chemistry*, 71, 4711–4718.
- M. Whalen, T. Yoshinari (1985) Oxygen isotope ratios in N_2O from different environments, *Nature*, 313, 780–782.
- N. Yoshida (1988) ^{15}N -depleted N_2O as a product of nitrification, *Nature*, 335, 528–529.
- N. Yoshida, A. Hattori, T. Saino, S. Matsuo, E. Wada (1984) $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratio of dissolved N_2O in the eastern tropical Pacific Ocean, *Nature*, 307, 442–444.
- N. Yoshida, H. Morimoto, M. Hirano, I. Koike, S. Matsuo, E. Wada, T. Saino, A. Hattori (1989) Nitrification rates and ^{15}N abundances of N_2O and NO_3^- in the western North Pacific, *Nature*, 342, 895–897.
- N. Yoshida, S. Toyoda (2000) Constraining the atmospheric N_2O budget from intramolecular site preference of N_2O isotopomer, *Nature*, 305, 330–334.
- T. Yoshinari, R. Knowles (1976) Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 69, 705–710.
- T. Yoshinari, M. Whalen (1985) Oxygen isotope ratios in N_2O from nitrification at a wastewater treatment facility, *Nature*, 317, 349–350.
- Y. L. Yung, C. E. Miller (1997) Isotopic fractionation of stratospheric nitrous oxide, *Science*, 278, 1778–1780.