

## 水田土壤生態系におけるメタンの生成・酸化に関わる 微生物の生態に関する研究

浅川 晋

### 1. はじめに

メタンは温暖化への寄与が大きい温室効果ガスであり、水田はメタンの主要な発生源の一つである。メタン生成古細菌による生成量とメタン酸化細菌による酸化量の差が正味のメタンの放出量となるため、両微生物群は水田からのメタン発生に重要な役割を果たしている。水田からのメタン発生は物質代謝の面から多くの研究が行われていたが、メタンの生成・酸化反応を担う微生物群の生態には未解明の点が多かった。

土壌より分離した微生物株の分類学的位置づけを明らかにし、正式名を確定することは単に名称の問題だけでなく、微生物生態研究の出発点となる微生物学的基盤として極めて重要であると考え、水田土壤生態系に生息するメタン生成古細菌とメタン酸化細菌を分離し、種レベルの同定と特性解明を行った。加えて、各種の水田圃場において、それら微生物群集の菌群構成と存在量、およびその動態を解析した。水田でメタン生成・酸化を担う微生物群の生態を明らかにすることにより、水田からのメタン放出の予測や制御に向け、基盤となる知見を得ようとした。

### 2. 水田土壌に生息するメタン生成古細菌の分離・同定とその特性

水田土壌に生息するメタン生成古細菌を分離し、種レベルで同定した。メタン生成古細菌を構成する分類群の中で *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* のそれぞれの目に属する3菌株のメタン生成古細菌を分離した。分離株について細胞形態、基質利用性等の生理的性質、膜脂質の特徴、DNAのG+C含量、DNAの相同性を調査し、2株を *Methanobrevibacter arboriphilus* (Asakawa *et al.*, 1993) および *Methanosarcina mazei* (Asakawa *et al.*, 1995) と同定した。*Methanomicrobiales* に属する1株については、同様に表現形質および遺伝的・系統遺伝的特性を調査し、新種 *Methanoculleus*

*chikugoensis* として記載した (Dianou *et al.*, 2001)。 *M. chikugoensis* の同定研究の中で *Methanoculleus* 属の分類体系に問題があることが判明したため、整理・再構築した (Asakawa and Nagaoka, 2003)。また、分離株の生理・生態的特性の解析を行い、*M. mazei* の細胞形態変化に関わる酵素をコードする遺伝子を同定した (Osumi *et al.*, 2008)。加えて、硫酸還元細菌と分離株のメタン生成共生培養におけるヒドロゲナーゼ遺伝子群の発現パターンの変化を明らかにした (Baba *et al.*, 2017)。

### 3. 水田土壤生態系に生息するメタン生成古細菌の菌群構成

異なる地域や様々な管理が行われている水田圃場の作土、下層土、水稻根、土壌中に鋤き込まれた稲わら、稲わら堆肥などの水田生態系を構成する種々の部位を対象に、生息するメタン生成古細菌の主要な構成菌群を明らかにした。培養法および脂質分析による解析では *Methanosarcinaceae* 科のメタン生成古細菌が主要な菌群の一つであることが示された (Asakawa and Hayano, 1995; Asakawa *et al.*, 1998)。16S rRNA 遺伝子を対象にした変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) によるメタン生成古細菌の群集解析法を確立した (Watanabe *et al.*, 2004)。この方法により遺伝子の系統解析を行った。水田の作土・下層土 (Watanabe *et al.*, 2006, 2010b; Wang *et al.*, 2010; Dubey *et al.*, 2014)、土壌中の稲わら (Sugano *et al.*, 2005)、稲わら堆肥 (Cahyani *et al.*, 2004) では *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanocellales* (Rice cluster I)、水稻根 (Ikenaga *et al.*, 2004; Hashimoto-Yasuda *et al.*, 2005) では *Methanomicrobiales*, *Methanocellales* (Rice cluster I) が主要な菌群であった。一方、干拓地水田の主要な菌群は *Methanocellales* (Rice cluster I)、*Methanosarcinales*, *Methanobacteriales* であり、沖積水田などとはやや異なっていた (Watanabe *et al.*, 2009a)。これらの各部位間における菌群構成の比較、さらに水田以外の環境中の菌群構成との比較を行い、水田生態系に生息するメタン生成古細菌の菌群構成の特徴を明らかにした (Watanabe *et al.*, 2010a)。

### 4. 水田土壌のメタン生成古細菌の動態

各種水田圃場の土壌を対象に、菌群構成とともに、培養による生菌数測定、脂質や遺伝子などの定量によりメタン

Susumu ASAKAWA: Ecological studies on methanogenic and methane-oxidizing microorganisms in paddy soil ecosystem

名古屋大学大学院生命農学研究科 (464-8601 名古屋市千種区不老町)

日本土壤肥料学雑誌 第91巻 第5号 p. 309~312 (2020)

生成古細菌の存在量を解析した。施肥や水管理などの圃場管理 (Asakawa and Hayano, 1995; Asakawa *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 2004, 2006, 2007, 2009b, 2013; Liu *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013; Bao *et al.*, 2014; Ikeda *et al.*, 2014; Kaneko *et al.*, 2014), 開放系大気 CO<sub>2</sub> 増加処理 (Okubo *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016), 立地や土壌の深さ (Watanabe *et al.*, 2009a, 2010b; Wang *et al.*, 2010), 開田 (Watanabe *et al.*, 2020), 二毛作 (Asakawa and Hayano, 1995; Asakawa *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 2006, 2007, 2009b), 田畑輪換 (Liu *et al.*, 2015, 2018) がメタン生成古細菌の菌群構成と存在量に及ぼす影響を明らかにした。これらの様々な環境変化に対し菌群構成や存在量は大きな影響を受けない場合が多く、水田土壌生態系に生息するメタン生成古細菌は意外に頑強な安定性を示すことが明らかになった (浅川, 2011; 浅川・渡邊, 2013)。なかでも、メタン生成古細菌は絶対嫌気性でありながら、通常の水田では湛水・落水条件に関わらず菌群構成と存在量がほとんど変化しなかった。この現象は培養法を用いた25年以上前の解析ですでに明らかになっていたが、未だ十分には解明されておらず、現在でも解析や研究が続いている (Conrad, 2020)。

さらに、メタン生成古細菌は酸化条件下でも炭素の同化活性を有し (Watanabe *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012), 活性を有する菌群が湛水と落水時の間で異なることを見出した (Watanabe *et al.*, 2009b)。一方、田畑輪換圃場では菌の存在量が連年水田圃場の1/10に減少し (Liu *et al.*, 2015), 畑転換2年後には mRNA 量に基づく菌群の活性はさらに大きく低下することを見出し (Liu *et al.*, 2018), 転換畑からの復元田では連年水田よりもメタン放出量が低下する現象にメタン生成古細菌の活性低下が関与している可能性を示した。

#### 5. 水田土壌生態系に生息するメタン酸化細菌の菌群構成と新規株の分離・同定

作土 (Jia *et al.*, 2007a), 水田に施用された稲わら (Jia *et al.*, 2007b), 田面水中の水生生物 (Niswati *et al.*, 2004) に生息するメタン酸化細菌の菌群構成を遺伝子の系統解析により、田面水、作土表層およびバルク土壌、根圏土壌、水稻の根および茎に生息するメタン酸化細菌を菌群特異的核酸プローブを用いた蛍光観察 (Dianou *et al.*, 2012) により調査し、分離例の少ない Gammaproteobacteria に属するタイプ I メタン酸化細菌が水田生態系に生息する主な構成菌群の一つであることを示した。これらの結果を受け、水田生態系に生息するタイプ I メタン酸化細菌の分離株を取得することを目指し、水田生態系を構成する様々な部位 (田面水、作土表層およびバルク土壌、根圏土壌、水稻の根、茎および刈り株) より多数のメタン酸化細菌の分離を行った (Dianou *et al.*, 2012)。新規株として得たタイプ I メタン酸化細菌2株について形態や生理的性質などの表現形質、化学分類学的特性および遺伝的・系統遺伝的的特性を調査し、田面水から分離された菌

株を新種 *Methylomonas koyamae* (Ogiso *et al.*, 2012) として、根圏土壌から分離された菌株を新属新種 *Methylo-magnam ishizawai* (Khalifa *et al.*, 2015) として記載した。

#### 6. 水田土壌生態系のメタン酸化細菌の動態

開放系大気 CO<sub>2</sub> 増加処理、温度上昇および窒素施肥が作土や水稻根に生息するメタン酸化細菌の菌群構成や存在量に及ぼす影響を解析した (Bao *et al.*, 2014; Ikeda *et al.*, 2014; Okubo *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016)。土壌中のメタン酸化細菌の存在量は CO<sub>2</sub> 増加、温度上昇および無窒素条件下では減少することを明らかにし、メタン生成古細菌よりもメタン酸化細菌の変化が水田からのメタン発生量に影響を及ぼす可能性を示した。

#### 7. おわりに

以上の研究により、水田土壌生態系に生息するメタン生成古細菌とメタン酸化細菌に関し、新種や新属新種を含む新規菌株を分離し、その種類と特性を明らかにした。また、水田圃場で、それらの微生物群集の菌群構成の特徴、様々な圃場管理や処理が群集の動態に及ぼす影響の特徴を明らかにした。今後、水田土壌生態系より得られたメタン生成古細菌・メタン酸化細菌の分離株の全ゲノム配列の決定や土壌中での動態に関わる生理生態的特性の解明など、水田からのメタン放出の予測・制御技術の基盤となる知見を得るための研究をさらに進めていきたいと考えている。

謝辞：メタン生成古細菌の研究は九州農業試験場土壌微生物研究室および国内留学先の産業医科大学化学教室 (生体物質化学) で始めたものです。共同研究者である元静岡大学教授早野恒一博士、産業医科大学名誉教授古賀洋介博士、同大学教授森井宏幸博士、元南九州大学教授故松下昌世博士より暖かいご指導とともに研究に関し様々ご教授を賜り、以後現在まで研究を進める上での大切な指針をいただきました。心より感謝しております。メタン酸化細菌の研究は、その後異動した名古屋大学土壌生物化学研究室で、ブルキナファソ農業科学技術高等研究所教授 Dayéri Dianou 博士との共同研究として始め、学生、大学院生、研究員の皆さんと進めたものです。名古屋大学土壌生物化学研究室では同大学名誉教授木村真人博士の下で多くの学生、大学院生、海外からの研究者などの皆さんと一緒に、主として分子生態学的な面からこれらの研究を大きく発展させることができました。関係の皆様に深く感謝申し上げます。特に、同大学講師渡邊健史博士および中国科学院成都生物研究所研究員劉冬艶博士の多大なご貢献がなければ研究は遂行できませんでした。大変感謝しております。また、研究試料の採取や様々な形での共同研究として、数多くの試験研究機関・大学の皆様から多大なるご協力とご支援をいただきました。旧九州農業試験場環境第二部・生産環境部・水田利用部、産業医科大学化学教室および名古屋大学土壌生物化学研究室・土壌圏物質循環学研究室の皆様を始め、愛知県農業総合試験場、東北農業研究

センター，九州沖縄農業研究センター，旧農業環境技術研究所，東北大学，東京大学など多くの方々大変お世話になりました。紙幅の都合で，それぞれお名前を記すことができず誠に申し訳ありませんが，ご協力ご支援くださいました皆様および共同研究者の方々心より感謝し，厚くお礼申し上げます。最後に，本賞へのご推薦の労をお執りくださいました東北大学名誉教授齋藤雅典博士，東京大学教授妹尾啓史博士，農業環境変動研究センター早津雅仁博士に改めまして深甚なる謝意を表します。

## 文 献

- Conrad, R. 2020. Methane production in soil environments—anaerobic biogeochemistry and microbial life between flooding and desiccation. *Microorganisms*, **8**, 881.
- 浅川 晋 2011. 酸化還元研究の新展開—土壌の酸化還元がもたらす現象を追う—2. 水田の湛水・落水に伴う土壌微生物群集の変化—分子生物学的手法による解析—. 土肥誌, **82**, 428–433.
- Asakawa, S., Morii, H., Akagawa-Matsushita, M., Koga, Y., and Hayano, K. 1993. Characterization of *Methanobrevibacter arboriphilus* SA isolated from a paddy field soil and DNA-DNA hybridization among *M. arboriphilus* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **43**, 683–686. (Erratum., 1994. **44**, 185.)
- Asakawa, S., Akagawa-Matsushita, M., Morii, H., Koga, Y., and Hayano, K. 1995. Characterization of *Methanosarcina mazei* TMA isolated from a paddy field soil. *Curr. Microbiol.*, **31**, 34–38.
- Asakawa, S., and Hayano, K. 1995. Populations of methanogenic bacteria in paddy field soil under double cropping conditions (rice-wheat). *Biol. Fertil. Soils*, **20**, 113–117.
- Asakawa, S., Akagawa-Matsushita, M., Koga, Y., and Hayano, K. 1998. Communities of methanogenic bacteria in paddy field soils with long-term application of organic matter. *Soil Biol. Biochem.*, **30**, 299–303.
- Asakawa, S., and Nagaoka, K. 2003. *Methanoculleus bourgenensis*, *Methanoculleus olentangyi* and *Methanoculleus oldenburgensis* are subjective synonyms. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 1551–1552.
- 浅川 晋・渡邊健史 2013. 水田からのメタン発生とメタン生成古細菌. 遺伝, **67**, 579–585.
- Baba, R., Morita, M., Asakawa, S., and Watanabe, T. 2017. Transcription of [FeFe]-hydrogenase genes during H<sub>2</sub> production in *Clostridium* and *Desulfovibrio* spp. isolated from a paddy field soil. *Microbes Environ.*, **32**, 125–132.
- Bao, Z., Watanabe, A., Sasaki, K., Okubo, T., Tokida, T., Liu, D., Ikeda, S., Imaizumi-Anraku, H., Asakawa, S., Sato, T., Mitsui, H., and Minamisawa, K. 2014. A rice gene for microbial symbiosis, *Oryza sativa* *CcaMK*, reduces CH<sub>4</sub> flux in a paddy field with low nitrogen input. *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 1995–2003.
- Cahyani, V.R., Matsuya, K., Asakawa, S., and Kimura, M. 2004. Succession and phylogenetic profile of methanogenic archaeal communities during the composting process of rice straw estimated by PCR-DGGE analysis. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **50**, 555–563.
- Dianou, D., Miyaki, T., Asakawa, S., Morii, Y., Oyaizu, H., and Matsumoto, S. 2001. *Methanoculleus chikugoensis* sp. nov., a novel methanogenic archaeon isolated from a paddy field soil in Japan and DNA-DNA hybridization among *Methanoculleus* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 1663–1669.
- Dianou, D., Ueno, C., Ogiso, T., Kimura, M., and Asakawa, S. 2012. Diversity of cultivable methane-oxidizing bacteria in microsites of a rice paddy field: Investigation by cultivation method and fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Microbes Environ.*, **27**, 278–287.
- Dubey, S.K., Singh, A., Watanabe, T., Asakawa, S., Singla, A., Arai, H., and Inubushi, K. 2014. Methane production potential and methanogenic archaeal community structure in tropical irrigated Indian paddy soils. *Biol. Fertil. Soils*, **50**, 369–379.
- Hashimoto-Yasuda, T., Ikenaga, M., Asakawa, S., Kim, H.-Y., Okada, M., Kobayashi, K., and Kimura, M. 2005. Effect of free-air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE) on methanogenic archaeal communities inhabiting rice roots in a Japanese rice field. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **51**, 91–100.
- Ikeda, S., Sasaki, K., Okubo, T., Yamashita, A., Terasawa, K., Bao, Z., Liu, D., Watanabe, T., Murase, J., Asakawa, S., Eda, S., Mitsui, H., Sato, T., and Minamisawa, K. 2014. Low nitrogen fertilization adapts rice root microbiome to low nutrient environment by changing biogeochemical functions. *Microbes Environ.*, **29**, 50–59.
- Ikenaga, M., Asakawa, S., Muraoka, Y., and Kimura, M. 2004. Methanogenic archaeal communities in rice roots grown in flooded soil pots: Estimation by PCR-DGGE and sequence analyses. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **50**, 701–711.
- Jia, Z., Kikuchi, H., Watanabe, T., Asakawa, S., and Kimura, M. 2007a. Molecular identification of methane-oxidizing bacteria in rice field soils. *Biol. Fertil. Soils*, **44**, 121–130.
- Jia, Z.-J., Sugano, A., Asari, N., Tun, C.C., Ishihara, R., Asakawa, S., and Kimura, M. 2007b. Molecular characterization of methane-oxidizing bacteria associated with rice straw decomposition in a rice field. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **53**, 729–739.
- Kaneko, M., Takano, Y., Chikaraishi, Y., Ogawa, N.O., Asakawa, S., Watanabe, T., Shima, S., Krüger, M., Matsushita, M., Kimura, H., and Ohkouchi, N. 2014. Quantitative analysis of coenzyme F<sub>430</sub> in environmental samples: A new diagnostic tool for methanogenesis and anaerobic methane oxidation. *Anal. Chem.*, **86**, 3633–3638.
- Khalifa, A., Lee, C.G., Ogiso, T., Ueno, C., Dianou, D., Demachi, T., Katayama, A., and Asakawa, S. 2015. *Methylomagnum ishizawai* gen. nov., sp. nov., a mesophilic type I methanotroph isolated from rice rhizosphere. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **65**, 3527–3534.
- Lee, C.G., Watanabe, T., Murase, J., Asakawa, S., and Kimura, M. 2012. Growth of methanogens in an oxic soil microcosm: Elucidation by a DNA-SIP experiment using <sup>13</sup>C-labeled dried rice callus. *Appl. Soil Ecol.*, **58**, 37–44.
- Li, Y., Watanabe, T., Murase, J., Asakawa, S., and Kimura, M. 2013. Growth of hydrogenotrophic and acetoclastic methanogens on substrate from rice plant callus cells in anaerobic soil: An estimation to the role of slough-off root cap cells to their growth. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **59**, 548–558.
- Liu, D., Ishikawa, H., Nishida, M., Tsuchiya, K., Takahashi, T., Kimura, M., and Asakawa, S. 2015. Effect of paddy-upland rotation on methanogenic archaeal community structure in paddy field soil. *Microb. Ecol.*, **69**, 160–168.
- Liu, D., Nishida, M., Takahashi, T., and Asakawa, S. 2018. Transcription of *mcrA* gene decreases upon prolonged non-flooding period in a methanogenic archaeal community of a paddy-upland rotational field soil. *Microb. Ecol.*, **75**, 751–760.



- Liu, D., Suekuni, C., Akita, K., Ito, T., Saito, M., Watanabe, T., Kimura, M., and Asakawa, S. 2012. Effect of winter-flooding on methanogenic archaeal community structure in paddy field under organic farming. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **58**, 553–561.
- Liu, D., Tago, K., Hayatsu, M., Tokida, T., Sakai, H., Nakamura, H., Usui, Y., Hasegawa, T., and Asakawa, S. 2016. Effect of elevated CO<sub>2</sub> concentration, elevated temperature and no nitrogen fertilization on methanogenic archaeal and methane-oxidizing bacterial community structures in paddy soil. *Microbes Environ.*, **31**, 349–356.
- Niswati, A., Murase, J., Asakawa, S., and Kimura, M. 2004. Analysis of communities of ammonia oxidizers, methanotrophs, and methanogens associated with microcrustaceans in the floodwater of a rice field microcosm. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **50**, 447–455.
- Ogiso, T., Ueno, C., Dianou, D., Van Huy, T., Katayama, A., Kimura, M., and Asakawa, S. 2012. *Methylomonas koyamae* sp. nov., a type I methane-oxidizing bacterium from floodwater of a rice paddy field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **62**, 1832–1837.
- Okubo, T., Liu, D., Tsurumaru, H., Ikeda, S., Asakawa, S., Tokida, T., Tago, K., Hayatsu, M., Aoki, N., Ishimaru, K., Ujiie, K., Usui, Y., Nakamura, H., Sakai, H., Hayashi, K., Hasegawa, T., and Minamisawa, K. 2015. Elevated atmospheric CO<sub>2</sub> levels affect community structure of rice root-associated bacteria. *Front. Microbiol.*, **6**, 136.
- Osumi, N., Kakehashi, Y., Matsumoto, S., Nagaoka, K., Sakai, J., Miyashita, M., Kimura, M., and Asakawa, S. 2008. Identification of the gene for disaggregatase from *Methanosarcina mazei*. *Archaea*, **2**, 185–191.
- Sugano, A., Tsuchimoto, H., Tun, C.C., Kimura, M., and Asakawa, S. 2005. Succession of methanogenic archaea in rice straw incorporated into a Japanese rice field: Estimation by PCR-DGGE and sequence analyses. *Archaea*, **1**, 391–397.
- Wang, G., Watanabe, T., Jin, J., Liu, X., Kimura, M., and Asakawa, S. 2010. Methanogenic archaeal communities in paddy field soils in north-east China as evaluated by PCR-DGGE, sequencing and real-time PCR analyses. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **56**, 831–838.
- Watanabe, T., Asakawa, S., and Hayano, K. 2020. Long-term submergence of non-methanogenic oxic upland field soils helps to develop methanogenic archaeal community as revealed by pot and field experiments. *Pedosphere*, **30**, 62–72.
- Watanabe, T., Asakawa, S., Nakamura, A., Nagaoka, K., and Kimura, M. 2004. DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil. *FEMS Microbiol. Lett.*, **232**, 153–163.
- Watanabe, T., Cahyani, V.R., Murase, J., Ishibashi, E., Kimura, M., and Asakawa, S. 2009a. Methanogenic archaeal communities developed in paddy fields in the Kojima Bay polder, estimated by denaturing gradient gel electrophoresis, real-time PCR and sequencing analyses. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **55**, 73–79.
- Watanabe, T., Hosen, Y., Agbisit, R., Llorca, L., Katayanagi, N., Asakawa, S., and Kimura, M. 2013. Changes in community structure of methanogenic archaea brought about by water-saving practice in paddy field soil. *Soil Biol. Biochem.*, **58**, 235–243. (Corrigendum 2014. **79**, 149.)
- Watanabe, T., Kimura, M., and Asakawa, S. 2006. Community structure of methanogenic archaea in paddy field soil under double cropping (rice-wheat). *Soil Biol. Biochem.*, **38**, 1264–1274.
- Watanabe, T., Kimura, M., and Asakawa, S. 2007. Dynamics of methanogenic archaeal communities based on rRNA analysis and their relation to methanogenic activity in Japanese paddy field soils. *Soil Biol. Biochem.*, **39**, 2877–2887.
- Watanabe, T., Kimura, M., and Asakawa, S. 2009b. Distinct members of a stable methanogenic archaeal community transcribe *mcrA* genes under flooded and drained conditions in Japanese paddy field soil. *Soil Biol. Biochem.*, **41**, 276–285.
- Watanabe, T., Kimura, M., and Asakawa, S. 2010a. Diversity of methanogenic archaeal communities in Japanese paddy field ecosystem, estimated by denaturing gradient gel electrophoresis. *Biol. Fertil. Soils*, **46**, 343–353. (Erratum 2011. **47**, 481–482.)
- Watanabe, T., Wang, G., Murase, J., Asakawa, S., and Kimura, M. 2011. Assimilation of glucose-derived carbon into methanogenic archaea in soil under unflooded condition. *Appl. Soil Ecol.*, **48**, 201–209.
- Watanabe, T., Wang, G., Taki, T., Ohashi, Y., Kimura, M., and Asakawa, S. 2010b. Vertical changes in bacterial and archaeal communities with soil depth in Japanese paddy fields. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **56**, 705–715.