



Title	北方圏における亜酸化窒素消去微生物の探索
Author(s)	高津, 祐太
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14818号
Issue Date	2022-03-24
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k14818">https://doi.org/10.14943/doctoral.k14818</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/85523">https://hdl.handle.net/2115/85523</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Takatsu_Yuta.pdf



北方圏における亜酸化窒素消去微生物の探索

北海道大学 大学院農学院

生命フロンティアコース 博士課程後期

高津 祐太

# 目次

1. 緒論 .....	1
1-1. 温室効果ガスとしての亜酸化窒素 .....	1
1-2. 土壌微生物による N <sub>2</sub> O 生成 .....	1
1.2.1. 硝化 .....	2
1.2.2. 脱窒 .....	3
1.2.3. 硝化細菌の脱窒 .....	4
1.2.4. 硝酸アンモニア化成または異化型硝酸塩還元 (DNRA) .....	5
1-3. N <sub>2</sub> O 生成に関わる酵素および機能性遺伝子 .....	6
1-4. 土壌微生物による N <sub>2</sub> O 消去 .....	7
1-5. 北方泥炭地における N <sub>2</sub> O 放出 .....	8
1-6. 黒ボク土壌の特徴 .....	8
1-7. パルサ丘陵地の特徴 .....	9
1-8. N <sub>2</sub> O 放出要因 .....	9
1-9. 本研究目的 .....	10
2. 実験材料および方法 .....	11
2-1. 北海道大学附属静内圃場の特徴 .....	11
2-2. フィンランド, キルピスヤルビ近郊パルサ崩壊地の特徴 .....	11
2-3. 土壌微生物培養基の設計と調製 .....	11
2-4. 土壌微生物群衆培養物中に生息する微生物由来の DNA 抽出と 16S rRNA 遺伝子領域 の PCR 条件 .....	13
2-5. N <sub>2</sub> O 測定法 .....	15
2-6. アセチレン抑制試験 .....	17
2-8. シークエンシング .....	17
2-9. PCR-DGGE 法による菌叢解析 .....	19
2-10. バクテリアのハイスループットシークエンシング .....	21
3. 静内圃場における N <sub>2</sub> O 消去微生物の探索 .....	26
3-1. はじめに .....	26
3-2. 実験材料 .....	26
3-3. 異なる pH の培地による N <sub>2</sub> O 放出量の測定および N <sub>2</sub> O 消去微生物の探索 .....	27
概要および実験方法 .....	27
結果 .....	28
3-4. N <sub>2</sub> O 消去菌の分離 .....	30
概要および実験方法 .....	30
結果 .....	31

考察	35
4. <i>Chitinophaga</i> sp. Sac-f1 株の N <sub>2</sub> O 消去機構の推定	37
4-1. はじめに	37
4-2. アセチレン阻害試験および Typical- <i>nosZ</i> 遺伝子の検出	37
概要および実験方法	37
結果	37
考察	40
5. <i>Chitinophaga</i> sp. Sac-f1 株を用いた N <sub>2</sub> O 放出抑制試験	42
5-1. はじめに	42
5-2. <i>Chitinophaga</i> sp. Sac-f1 株の農薬に対する応答	42
概要および実験方法	42
結果	42
5-3. N <sub>2</sub> O 放出細菌 <i>Pseudomonas</i> sp. 15-6d 株と N <sub>2</sub> O 消去細菌 <i>Chitinophaga</i> sp. Sac-f1 株との 共培養における N <sub>2</sub> O 放出の抑制効果の検証	45
概要および実験方法	45
結果	45
5-4. N <sub>2</sub> O 放出黒ボク土壌での抑制試験	46
概要および実験方法	46
結果	47
5-6. <i>Chitinophaga</i> sp. Sac-f1 株を黒ボク土壌へ接種時における抑制効果の検証	51
概要および実験方法	51
結果	52
考察	57
6. フィンランド・パルサ丘陵地における N <sub>2</sub> O 放出	59
6-1. はじめに	59
6-2. パルサにおける N <sub>2</sub> O 放出量測定	60
概要および実験方法	60
結果	60
6-3. Peera-1, Peera-2, Iitto, Kiljusuo 土壌および Peera-1, plot 5 の培養物の菌叢解析	67
概要および実験方法	67
結果	67
考察	71
7. 総合考察	73
7-1. N <sub>2</sub> O 消去微生物 <i>Chitinophaga</i> sp. Sac-f1 株の N <sub>2</sub> O 消去能評価	73
7-2. パルサ崩壊に伴う pH 変化に対する N <sub>2</sub> O 放出および細菌叢	74
7-4. 結論	75

参考文献 .....	76
------------	----

## 1. 緒論

### 1-1. 温室効果ガスとしての亜酸化窒素

現在、様々な要因で気候変動が生じている。この要因には、地球の軌道や火山の噴火、そして温室効果ガスの濃度の変化が挙げられている (Florides and Christodoulides, 2009)。地球温暖化は科学の世界だけでなく、一般社会にも着目されている非常に重大な問題である。国連気候変動に関する政府間パネル (the Intergovernmental Panel on Climate Change: IPCC)によると、大気中の温室効果ガスの濃度が増加したために平均気温が上昇したとの報告がある (IPCC, 2007)。温室効果ガスは地球温暖化および気候変動に大きく寄与している。人間活動によって増加した主な温室効果ガスには、二酸化炭素、メタンがある。二酸化炭素は地球温暖化に大きく影響を及ぼす温室効果ガスである。石炭や石油の消費、セメントの生産などにより大量の二酸化炭素が大気中に放出される (IPCC, 2007)。メタンは、湿地や池、水田で枯れた植物を分解する際に発生する。さらに亜酸化窒素 ( $N_2O$ )も温室効果ガスの一種であり、等モルあたり二酸化炭素の約 300 倍もの強さを示す非常に強力な温室効果ガスである (Ussiri and Lal, 2013)。現在、大気中の  $3.24 \times 10^{-5}\%$  占めており (Ussiri and Lal, 2013)、さらに 21 世紀最大のオゾン層破壊原因物質ともされる物質である (Ravishankara *et al.*, 2009)。海から 25%、 $N_2O$  の発生は化石燃料・バイオマスの使用および工業的過程により 13%であるが、農地からの  $N_2O$  放出量は全体の 62%を占めている (Fowler *et al.*, 2015)。人口増加とともに食料の需要量も増加しているため、農地の開拓、大量の化成窒素肥料の投入が  $N_2O$  放出量の増加の遠因となっている。以上のように様々な要因が  $N_2O$  放出に関連しているが、農地で発生する  $N_2O$  の 87% ( $18.8 \text{ Tg N yr}^{-1}$ )は微生物の硝化および脱窒作用により生じている (Syakila and Kroeze, 2011)。すなわち、 $N_2O$  を放出する微生物の動向が  $N_2O$  放出抑制の鍵になると考えられる。

### 1-2. 土壌微生物による $N_2O$ 生成

土壌中の  $N_2O$  生成は主に微生物が原因とされており、一般的には細菌や真菌によるものと考えられている (Bollag and Tung, 1972; Bleakley and Tiedje, 1982; Kurakov *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2014)。一方、古細菌の働きについてはよく知られていなかった (Baggs and Philippot, 2010)。しかし、Stieglmeier *et al.* (2014)が土壌から単離したアンモニア酸化古細菌、*Nitrososphaera viennensis* から  $N_2O$  が放出されていることを観測した。アンモニア酸化古細菌は、好気条件下でアンモニアと亜硝酸塩を  $N_2O$  に変換していると考えられている。 $N_2O$  を生成する経路は複数存在している。土壌微生物による  $N_2O$  生成は硝化、脱窒 (Firestone and Davidson, 1989)する経路 (Fig. 1-1, Fig. 1-2)、硝化細菌による脱窒 (Hooper, 1968; Wrag *et al.*, 2001; Kool *et al.*, 2011)する経路 (Fig. 1-1, Fig. 1-3)、硝酸アンモニア化成または異化型硝酸塩をアンモニアに還元 (Smith and Zimmerman, 1981; Stevens *et al.*, 1998; Burgun and Hamilton, 2007)する経路を介し生じている (Fig. 1-1, Fig. 1-4)。

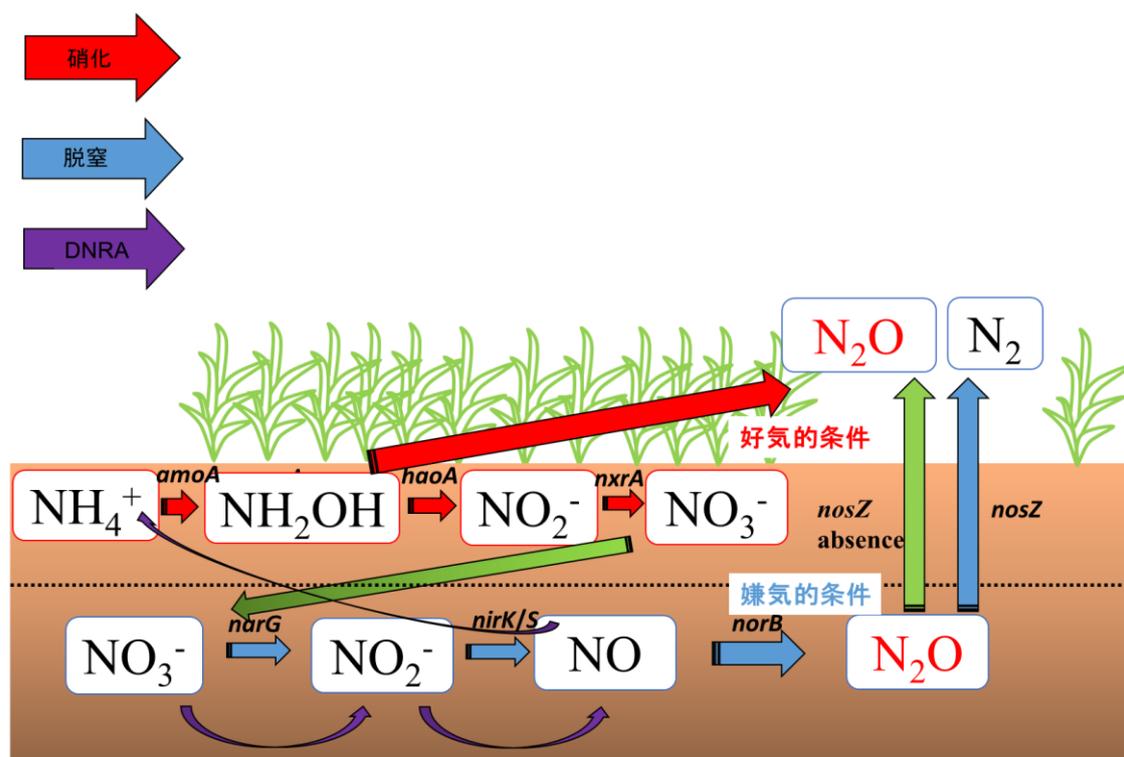


Fig. 1-1. 微生物が関与する N<sub>2</sub>O 生成経路

赤矢印は硝化反応による進行, 青矢印は脱窒反応による進行, 紫矢印は硝酸アンモニア化または異化型硝酸塩への還元: DNRA (Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium)による進行.

*amoA* (*amo*: Ammonia Mono Oxygenase): NH<sub>4</sub><sup>+</sup>から NH<sub>2</sub>OH へと酸化させる酵素をコードする遺伝子. *haoA* (*hao*: Hydroxyl Amine Oxygenase): NH<sub>2</sub>OH から NO<sub>2</sub><sup>-</sup>へと酸化させる酵素をコードする遺伝子. *nxrA* (*nxr*: Nitrous Oxide Reductase): NO<sub>2</sub><sup>-</sup>から NO<sub>3</sub><sup>-</sup>へと酸化させるコードをする遺伝子. *narG* (*nar*: Nitrate Reductase): NO<sub>3</sub><sup>-</sup>から NO<sub>2</sub><sup>-</sup>へと還元させる酵素をコードする遺伝子. *nirK/S* (*nir*: Nitrite Reductase): NO<sub>2</sub><sup>-</sup>から NO へと還元させる酵素をコードする遺伝子. *norB* (*nor*: Nitric Oxide Reductase): NO から N<sub>2</sub>O へと還元させる酵素をコードする遺伝子. *nosZ* (*nos*: Nitrous oxide Reductase): N<sub>2</sub>O を N<sub>2</sub>へと還元させる酵素をコードする遺伝子.

遺伝子. *haoA* (*hao*: Hydroxyl Amine Oxygenase): NH<sub>2</sub>OH から NO<sub>2</sub><sup>-</sup>へと酸化させる酵素をコードする遺伝子. *nxrA* (*nxr*: Nitrous Oxide Reductase): NO<sub>2</sub><sup>-</sup>から NO<sub>3</sub><sup>-</sup>へと酸化させるコードをする遺伝子. *nxrB* (*nxr*: Nitrous Oxide Reductase)NO<sub>3</sub><sup>-</sup>から N<sub>2</sub>O へと変換させるコード

### 1.2.1. 硝化

好気的条件下の硝化の過程では, アンモニア酸化微生物 (Ammonia oxidizing bacteria: AOB)によりアンモニアから亜硝酸塩へと酸化し, 最終的に N<sub>2</sub>O が生成される (Fig. 1-2). アンモニア酸化古細菌 (Ammonia oxidizing archaea: AOA)も亜硝酸塩へとアンモニアを酸化

し、同様に亜硝酸塩から  $\text{N}_2\text{O}$  を生成しており、さらに土壌中では AOB よりも優占している。しかし、AOA の  $\text{N}_2\text{O}$  生成機構はいまだに解明されていない。

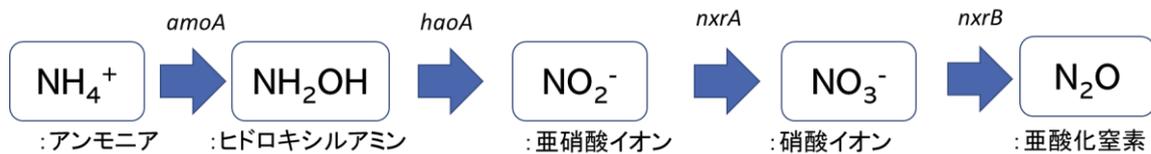


Fig. 1-2. 硝化経路

Source: Adapted from Baggs and Philippot, 2010

*amoA* (*amo*: Ammonia Mono Oxygenase):  $\text{NH}_4^+$  から  $\text{NH}_2\text{OH}$  へと酸化させる酵素をコードする

### 1.2.2. 脱窒

嫌氣的条件下の脱窒過程は、好氣的条件下の硝化過程と異なり、最終生成物、好氣的条件下の中間体で  $\text{N}_2\text{O}$  が生じているため、硝化の過程よりも注目されている経路である (Fig. 1-3)。脱窒による  $\text{N}_2\text{O}$  生成は多くの研究者によってさまざまな条件が明らかにされている。1) 嫌気条件で  $\text{N}_2\text{O}$  は生成される (Zumft, 1997)。2)  $\text{N}_2\text{O}$  還元酵素遺伝子 (*nosZ*) (Wood *et al.*, 2001; Philippot *et al.*, 2011) を欠いた脱窒菌もしくは低 pH 条件に *nosZ* が機能していない脱窒菌によって  $\text{N}_2\text{O}$  放出が確認されている (Wood *et al.*, 2001; Philippot *et al.*, 2011)。脱窒は嫌気条件で行われることはよく知られているが、好気条件でも脱窒する *Alcaligenes faecalis* (Joo *et al.*, 2005) や *Acinetobacter* sp. HA2 (Yao *et al.*, 2013), *Pseudomonas stutzeri* (Ji *et al.*, 2014) が確認されている。これらの報告は従来の考え方を大きく変えたものである。

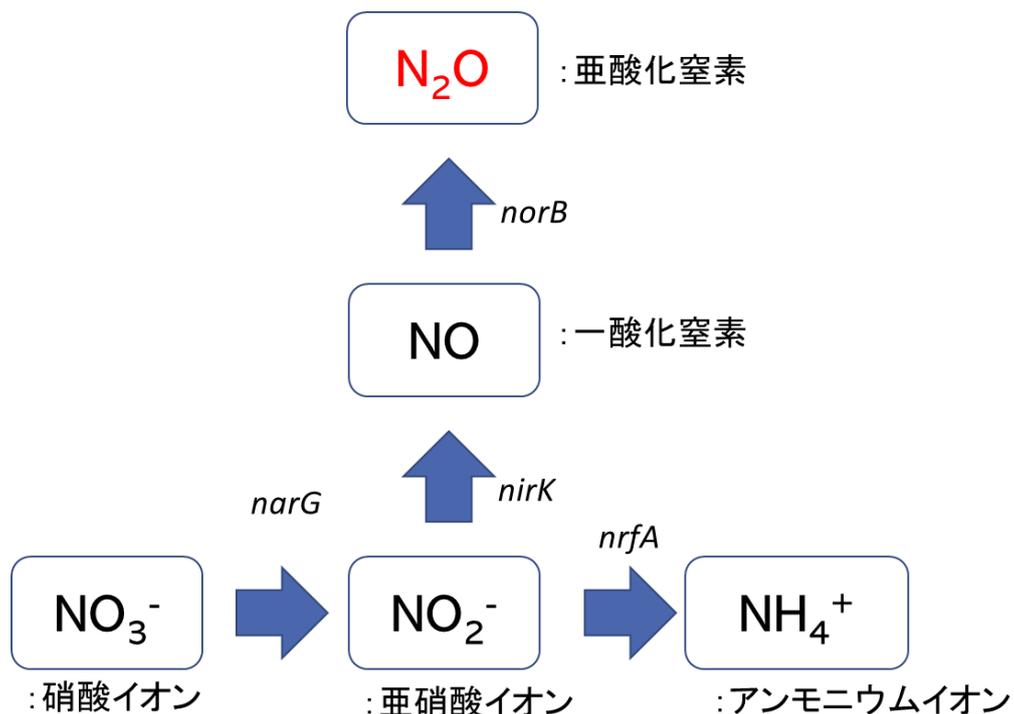


Fig. 1-3. 脱窒による  $\text{N}_2\text{O}$  生成経路

Source: Adapted from Baggs and Philippot, 2010

*narG* (*nar*: Nitrate Reductase):  $\text{NO}_3^-$  から  $\text{NO}_2^-$  へと還元させる酵素をコードする遺伝子. *nirK/S* (*nir*: Nitrite Reductase):  $\text{NO}_2^-$  から  $\text{NO}$  へと還元させる酵素をコードする遺伝子. *norB* (*nor*: Nitric Oxide Reductase):  $\text{NO}$  から  $\text{N}_2\text{O}$  へと還元させる酵素をコードする遺伝子. *nrfA* (*nrfA*: nitrite reductase)

### 1.2.3. 硝化細菌の脱窒

硝化細菌による脱窒は AOB により  $\text{NH}_3$  を  $\text{NO}_2^-$  へと酸化し、 $\text{NO}_2^-$  を  $\text{N}_2\text{O}$  へと還元し、また  $\text{N}_2$  までに還元することもある (Fig. 1-4). 純粋培養したものからこの経路であると報告されており (Hooper, 1968; Ritchie and Nicholas, 1972), 全般的にベータプロテオバクテリアの特徴であると考えられており、それらは土壌中のアンモニア酸化細菌である. 特に、脱窒に最適な高湿度条件で  $\text{N}_2\text{O}$  が土壌中から放出されている (Kool *et al.*, 2011).

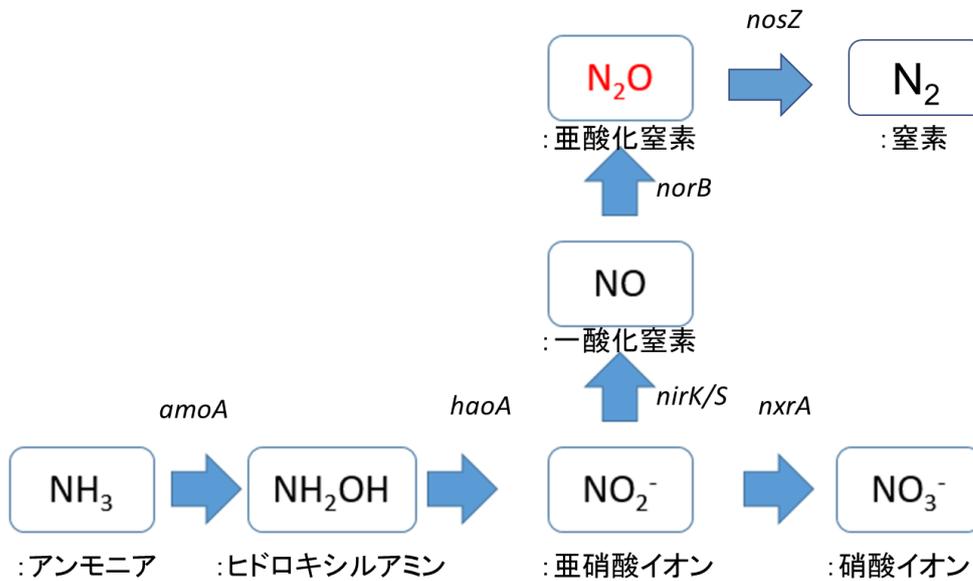


Fig. 1-4. 硝化細菌の脱窒が関与する N<sub>2</sub>O 生成経路

Source: Adapted from Baggs and Philippot, 2010

*amoA* (*amo*: Ammonia Mono Oxygenase): NH<sub>4</sub><sup>+</sup>から NH<sub>2</sub>OH へと酸化させる酵素をコードする遺伝子. *haoA* (*hao*: Hydroxyl Amine Oxygenase): NH<sub>2</sub>OH から NO<sub>2</sub><sup>-</sup>へと酸化させる酵素をコードする遺伝子. *nxrA* (*nxr*: Nitrous Oxide Reductase): NO<sub>2</sub><sup>-</sup>から NO<sub>3</sub><sup>-</sup>へと酸化させるコードをする遺伝子. *narG* (*nar*: Nitrate Reductase): NO<sub>3</sub><sup>-</sup>から NO<sub>2</sub><sup>-</sup>へと還元させる酵素をコードする遺伝子. *nirK/S* (*nir*: Nitrite Reductase): NO<sub>2</sub><sup>-</sup>から NO へと還元させる酵素をコードする遺伝子. *norB* (*nor*: Nitric Oxide Reductase): NO から N<sub>2</sub>O へと還元させる酵素をコードする遺伝子. *nosZ* (*nos*: Nitrous oxide Reductase): N<sub>2</sub>O を N<sub>2</sub> へと還元させる酵素をコードする遺伝子.

#### 1.2.4. 硝酸アンモニア化成または異化型硝酸塩還元 (DNRA)

この過程では、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>は NO<sub>2</sub><sup>-</sup>を介して、アンモニアへと還元される (Fig.1-5). これらの変換は、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌の両方で行われており、アンモニアに還元すると同時に N<sub>2</sub>O が生じている.

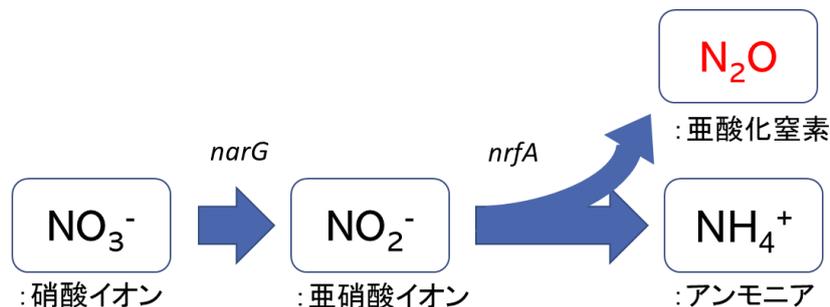


Fig. 1-5. 硝酸アンモニア化成または異化型硝酸塩への還元 (DNRA)による  $\text{N}_2\text{O}$  生成経路

Source: Adapted from Baggs and Philippot, 2010

*narG* (*nar*: Nitrate Reductase):  $\text{NO}_3^-$ から  $\text{NO}_2^-$ へと還元させる酵素をコードする遺伝子.

*nrfA* (*nrfA*: nitrite reductase):  $\text{NO}_2^-$ から  $\text{N}_2\text{O}$ へと還元する酵素をコードする遺伝子.

### 1-3. $\text{N}_2\text{O}$ 生成に関わる酵素および機能性遺伝子

$\text{NH}_3$  または  $\text{NH}_4^+$  のヒドロキシルアミン ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) への酸化過程は、*amoABC* にコードされている膜結合マルチサブユニット酵素、アンモニアモノオキシゲナーゼ (AMO) によって触媒される (Hyman *et al.*, 1988; Klots *et al.*, 1997).  $\text{NH}_2\text{OH}$  は *Hao* 遺伝子にコードされているヒドロキシルアミン酸化還元酵素 (HAO) によってから  $\text{NO}$  へと酸化される (Hopper and Terry, 1979; Bergmann *et al.*, 1994). 加えて、HAO により供給された電子はシトクロム P450 (CYP) タンパク質、*cycA* 遺伝子にコードされているシトクロム C554 に取り込まれる (McTavish *et al.*, 1993).

$\text{NO}_3^-$  から  $\text{N}_2$  への脱窒過程は *napA/narG*, *nirS/nirK*, *norB*, *nosZ* にそれぞれコードされる硝酸還元酵素, 亜硝酸還元酵素, 亜酸化窒素還元酵素により行われる (Fig. 1-1, 青矢印).

$\text{NO}_3^-$  を  $\text{NO}_2^-$  に還元する二つの異化型硝酸還元酵素がある. 一つ目は、*narGHJI* にコードされる膜結合型硝酸還元酵素 (NAR) で、脱窒過程における最初の段階における重要な酵素であり (Zumft, 1997), NAR の  $\alpha$ -サブユニットをコードする *narG* は環境中における脱窒細菌の評価によく使用される (Henry *et al.*, 2006; Palmer *et al.*, 2009). 二つ目は、*napEDABC*, *napDAGHB* によりコードされるペリプラスミック硝酸還元酵素 (NAP) であり (Simpson *et al.*, 2010). その中で *napA* は巨大な NAP のサブユニットをコードしている (Siddiqui *et al.*, 1993).  $\text{NO}_2^-$  を  $\text{NO}$  に還元する過程は二種の亜硝酸還元酵素 (NIR) により行われる (Fig. 1-1). 一つは *nirK* 遺伝子によりコードされ、銅を含んでおり、もう一つは、*nirS* にシトクロム-cd<sub>1</sub> がコードされている. これら二つの遺伝子は一つの菌株に対しどちらか一方しか存在しえない (Zumft, 1997). さらに、*nirS* を保持する脱窒細菌は *nirK* を保持する脱窒細菌より多く存在している. しかし、*nirK* を保持する脱窒細菌は原核生物全体で多様なコミュニティを作っている (Coyne *et al.*, 1989).

硝酸還元酵素 (NOR)は NO から N<sub>2</sub>O への還元を触媒する酵素で *norBC* にコードされる (Fig.1-1). NOR の巨大なサブユニットをコードしている *norB* は, シトクロム *bc-cnorB* とキノール酸化サブユニット *qnorB* の 2 種に分類されている (Braker and Tiedje, 2003).

N<sub>2</sub>O から N<sub>2</sub> への反応は、亜酸化窒素還元酵素 (N<sub>2</sub>OR)に触媒され、N<sub>2</sub>OR の  $\alpha$ -サブユニットをコードする *nosZ*にコードされている (Fig. 1-1)(Cuypers *et al.*, 1992; Pauleta *et al.*, 2013). *nosZ* の発現量が増加したとき、土壌中の N<sub>2</sub>O 放出を抑制する (Liu *et al.*, 2014). 一方、*Agrobacterium tumefaciens* C58 のような *nosZ* 遺伝子を欠いている不完全脱窒細菌は活発に N<sub>2</sub>O を放出する (Wood *et al.*, 2001; Philippot *et al.*, 2011). 先行研究では、*nosZ* を欠いたまたは保持している脱窒細菌が分離されており、熱帯土壌からは数種の *Burkholderia* spp.が分離されており (Hashidoko *et al.*, 2010), デントコーンの黒ボク圃場からは *Pseudomonas* が分離されている (Li *et al.*, 2014). また、脱窒細菌ではない *Anaeromyxobacter* sp.から脱窒細菌が保持する *nosZ* 遺伝子の DNA 配列と異なる非定型の *nosZ* (Atypical-*nosZ*)が発見されている (Sanford *et al.*, 2012)が、この Atypical-*nosZ* にコードされる N<sub>2</sub>OR による N<sub>2</sub>O 還元の詳細なメカニズムは明らかにされていない。

#### 1-4. 土壌微生物による N<sub>2</sub>O 消去

土壌中における N<sub>2</sub>O の消去は近年、再発見された事象であり、様々な生態系で報告されていることから、N<sub>2</sub>O の消去は *nosZ* が関連していると考えられている (van Groenigen *et al.*, 2014). よって、*nosZ* 遺伝子によってコードされている亜酸化窒素還元酵素 (N<sub>2</sub>OR)は脱窒の最終段階に関連する酵素であり、N<sub>2</sub>O を N<sub>2</sub> へと消去する唯一の経路とされている (Fig.1-1). 通常 *nosZ* 遺伝子は脱窒に関連する遺伝子すべてをもつアルファ、ベータ、ガンマプロテオバクテリアに存在している (Zumft and Korneck, 2007; Sanford *et al.*, 2012). これらは完全脱窒細菌としても知られている. Itakura *et al.* (2013)による *nosZ* 遺伝子に関する報告では、N<sub>2</sub>OR の活性を高める *Bradyrhizobium japonicum* を大豆の生態系へと接種した場合、N<sub>2</sub>O の放出が約 55%減少することが確認された。

Sanford *et al.* (2012)と Jones *et al.* (2013)により、非脱窒菌由来の Atypical-*nosZ* 遺伝子の存在が確認されており、土壌において、Atypical-*nosZ* 遺伝子を有する微生物は、定型 *nosZ* (Typical-*nosZ*)遺伝子を持つ微生物より多く存在していることが報告されている。すなわち、Atypical-*nosZ* が N<sub>2</sub>O 放出抑制に大きく関与していることが推察される (Sanford *et al.*, 2012). これらの研究は、N<sub>2</sub>O 消去が脱窒菌だけに依存するのではなく、嫌気条件、微好気条件、好気条件、好冷条件、高塩条件等の幅広い環境での多様な代謝をもつ非脱窒菌が N<sub>2</sub>O 消去に寄与していることを示している (Sanford *et al.*, 2012; Orellana *et al.*, 2014). N<sub>2</sub>O を還元する能力は他の微生物から水平伝搬されたものか、もしくは DNRA を行う間に発現する (Conrad, 1996; Mania *et al.*, 2014). DNRA を行う微生物の *nosZ* は、Atypical-*nosZ* 遺伝子と考えられている (Sanford *et al.*, 2012).

*nosZ* 遺伝子を介し N<sub>2</sub>O を消去する形式として、N<sub>2</sub>OR により N<sub>2</sub> に還元され、この還元さ

れた  $N_2$  をニトロゲナーゼにより窒素固定される。ニトロゲナーゼは高い還元力をもつ電子を用いて窒素分子をアンモニアへと還元する酵素である。この消去形式は触媒とニトロゲナーゼにより起こり、 $N_2O$  を  $NH_4^+$  へと変換する (Fig. 1-6)。間接的にこの消去形式はニトロゲナーゼと  $N_2OR$  を必要としており、 $N_2O$  も  $N_2$  へと還元されていく (van Groenigen *et al.*, 2014)。この形式の  $N_2O$  消去の例としては、*Pseudomonas stutzeri* があり、これはニトロゲナーゼと  $N_2OR$  の両方をもつ独特なものである (Pomowski *et al.*, 2011)。*P. stutzeri* は  $N_2O$  を唯一の窒素源、そして電子受容体とし、生育させることができる (Desloover *et al.*, 2014)。

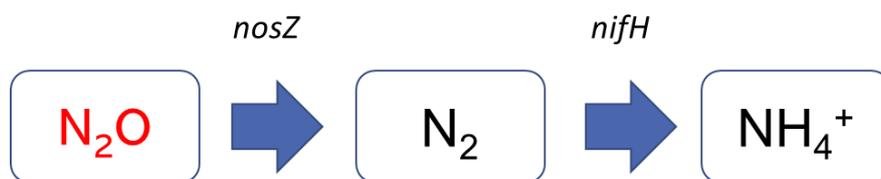


Fig. 1-6.  $N_2O$  からアンモニア生成経路

*nosZ* (*nos*: Nitrous oxide Reductase):  $N_2O$  を  $N_2$  へと還元させる酵素をコードする遺伝子。 *nifH* (*nifH*: Nitrogenase):  $N_2$  から  $NH_4^+$  へと変換する酵素をコードする遺伝子

#### 1-5. 北方泥炭地における $N_2O$ 放出

泥炭地は全世界の土壤炭素の約 3 分の 1 を占めていることが知られている (Eurola and Hicks, 1984)。C/N が低いとき、 $N_2O$  を大量に放出し、逆に C/N が高いと  $N_2O$  が放出されないことが報告されており (Bortone *et al.*, 1992; Baggs *et al.*, 2000; Kishida *et al.*, 2004)。実際、C/N 比が低い泥炭地では  $N_2O$  が活発に放出されている (Regina *et al.*, 1999; Repo *et al.*, 2009)。一方、北方の泥炭地は一般的に C/N 比が高く、 $N_2O$  の放出レベルが低いことが知られており、北方圏の泥炭地は  $N_2O$  の放出地としては除外されていた (Pendea and Chmura, 2012)。しかし、19 世紀中盤から 21 世紀にかけて泥炭地の年間 N 堆積量が 15 Tg から 187 Tg に増加し (Galloway *et al.*, 2008)、北方圏における C 流出量が増加している (Bragazza *et al.*, 2006; Kivimäki *et al.*, 2013)。そのため、C/N 比が低くなり  $N_2O$  の放出レベルが高くなってきている可能性がある。

フィンランドにおいても、約 3 分の 1 を泥炭地が占めており (Eurola and Hicks, 1984)、 $N_2O$  の放出はフィンランド南部の農地や凍結した泥炭土壌から放出されている (Regina *et al.*, 2004; Repo *et al.*, 2009)。さらにフィンランド北部、ラップランドにおけるパルサ丘陵地からも  $N_2O$  が放出されていることが報告されている (Palmer and Horn, 2012)。

#### 1-6. 黒ボク土壌の特徴

日本最大の農業地帯の一つである北海道の東部は、黒ボク土壌と呼ばれる火山灰土壌に覆われている (Tani *et al.*, 2010)。黒ボク土壌は、主として火山灰を母材とし、良好な排水条

件における母材の風化と平行して有機物が集積したことによる黒い表層をもつ土壌である。黒ボク土壌は、保水性や透水性が良く、密度が低く、耕起が容易であることから他の土壌に比べ、物理性は良い。低 pH のため有機物含量は高い (Miyazawa *et al.*, 2013)。台地での黒ボク土壌は時折、土壌 pH を向上させ、リンを吸収させやすいものに変換することができる。それは土壌を耕すことで土壌中の炭素源が分解されることによって生じている (Takata *et al.*, 2011)。したがって、黒ボク土壌の炭素源を保つために定期的に炭素源を入れる必要がある (Ohta, 2011)。

黒ボク土壌は、畑として広く利用されており、日本の畑の約 40% は黒ボク土壌が分布している。しかし、世界的には黒ボク土壌は稀少であり、その分布は全陸域の 1% 未満にすぎない。日本の黒ボク土壌において、多量の N<sub>2</sub>O 放出が放出されており、黒ボク土壌での N<sub>2</sub>O 放出と微生物の活性について関係性について検証していく必要があると考えられている (Inubushi *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2002)。農地では窒素肥料が多量に投入されており、N<sub>2</sub>O の放出が増加してきている傾向がある (Mosier, 1994; Bouwman, 1996)。北海道の黒ボク土壌でも肥料が投入されており、N<sub>2</sub>O の放出が確認されている (Kitamura, *et al.*, 2021)。

### 1-7. パルサ丘陵地の特徴

パルサは地下の氷核が発達することにより形成された丘陵地である。この氷核はピートモスの湿潤な表層と厚い氷層により発達していく。その氷核がピートの氷層を持ち上げ、パルサを丘陵地のサイズまでに成長させる (Seppälä, 1986)。その分布は、年平均気温が低く、比較的薄い積雪、冬季が 0°C 以下の気候などの気候要因に依存している。氷核を夏期の暖かい空気の影響に対して断熱するのに十分な厚さの泥炭層もまた必要である (Seppälä, 1986)。パルサは、通常、永久凍土の外境界を画定しており (Seppälä, 1986; Sollid and Sørbel, 1998)、気候変動の影響を受けやすい。多くの研究がパルサの変動を気候変動の指標としており、パルサの中心領域、もしくは典型的なパルサ丘陵地に焦点を置いている (Laberge and Payette, 1995; Sollid and Sørbel, 1998; Nihlen, 2000; Zuidhoff and Kolstrup, 2000)。

### 1-8. N<sub>2</sub>O 放出要因

土壌由来の N<sub>2</sub>O 放出に大きく影響している物理的要因として pH、水分含量、温度、C/N 比のような要因があげられる (Regina *et al.*, 1996; Pfenning and McMahon, 1997; Klemmedtsson *et al.*, 2005)。土壌 pH が 6.1 以上のとき N<sub>2</sub>O 生成が活性化し、N<sub>2</sub>O は N<sub>2</sub> へと脱窒される (Liu *et al.*, 2014)。フィンランドの泥炭地で優占して生息している *Sphagnum* は土壌を酸性環境にし、嫌氣的条件で *Sphagnum* はゆっくりと分解される (Dorrepaal *et al.*, 2005)。嫌気条件では、脱窒が加速的に進行する。一方で低 pH は N<sub>2</sub>O 生成の活性を阻害し、N<sub>2</sub> への還元が行われなない。この 2 つの要因は N<sub>2</sub>O 放出に大きく影響している (Liu *et al.*, 2014)。化学的要因として、農地に多量の N 含有肥料が散布されることで土壌中の微生物の脱窒作用を活性化させてい

る (Charles *et al.*, 2017).

生物学的要因として、脱窒は従属的過程であり、炭素基質の酸化中に  $\text{NO}_3^-$  を最終電子受容体として使用される (Groffman *et al.*, 2006).

#### 1-9. 本研究目的

$\text{N}_2\text{O}$  は、等モルあたり二酸化炭素の約 300 倍もの強さを示す温室効果ガスであり、21 世紀最大のオゾン層破壊原因物質ともされ、 $\text{N}_2\text{O}$  の発生抑制は急務とされている。 $\text{N}_2\text{O}$  放出量の約 7 割は農地であり、圃場への大量の化成窒素肥料の投入が  $\text{N}_2\text{O}$  放出の遠因となっている。多数の報告が、農地や酸性土壌からの  $\text{N}_2\text{O}$  放出においては、 $\text{N}_2\text{O}$  還元酵素遺伝子に欠陥があるか、あるいはその遺伝子自体が欠落した (*nosZ* absence) 脱窒細菌群がおこなう硝酸塩呼吸 (不完全な脱窒反応) で、70~90% の  $\text{N}_2\text{O}$  が生成しているとしている。土壌に蓄積した過剰な  $\text{NO}_3^-$  は、多くの場合、降雨後の一時的な嫌気的条件下で脱窒細菌による硝酸塩呼吸に使用され、大量の  $\text{N}_2\text{O}$  として大気中に放出されている。一部の完全脱窒細菌には、土壌ガス中の  $\text{N}_2\text{O}$  を硝酸塩呼吸系における最終電子受容体として利用し、 $\text{N}_2$  を最終産物として大気中に放出するものも知られている。

窒素をエネルギーとして資化する場合、窒素固定を行うよりも  $\text{N}_2\text{O}$  を資化したときの方がエネルギー効率がよい (Kryachko *et al.*, 2001)。さらに、土壌中の窒素源は他の細菌や植物との競合が激しいため、土壌中で利用できる窒素は限られている (Kaye and Hart, 1997)。すなわち、これらの観点から、大量に  $\text{N}_2\text{O}$  が放出されている地点では、 $\text{N}_2\text{O}$  を取り込んで資化した方が生存しやすいと考えられる。すなわち  $\text{N}_2\text{O}$  を資化している細菌が存在しているのではないかと仮定をした。そのため、本研究のサンプリングサイトとして  $\text{N}_2\text{O}$  が多量放出されていることが確認されている北海道大学附属静内牧場内のデントコーン圃場黒ボク土から、 $\text{N}_2\text{O}$  消去細菌を探索した。

また、地球温暖化の影響で永久凍土が溶解している地点での  $\text{N}_2\text{O}$  の放出も活発化している (Palmer and Horn, 2012)。近年、地球温暖化の影響でパルサ丘陵地の内部の氷も溶け、パルサ丘陵地が崩壊してきている。パルサ丘陵地の生態系は永久凍土と土壌環境の影響を受けている。従って、永久凍土と土壌環境で菌叢が大きく異なると予想した。永久凍土が溶けることにより、酸性土壌 (3.4-4.6) であるパルサの土壌は永久凍土が溶解して生じる池の pH (4.8-6.28) に近づいていくと考えられる。pH が変動することで  $\text{N}_2\text{O}$  の放出量が変化することが予想される。すなわち、パルサの土壌培養物に対し、pH を変化させ  $\text{N}_2\text{O}$  放出量の多い条件と少ない条件における菌叢を比較し、pH 変化に伴う  $\text{N}_2\text{O}$  放出に関する細菌群の役割を推定した。

## 2. 実験材料および方法

### 2-1. 北海道大学附属静内圃場の特徴

北海道大学附属静内圃場 (N42°25'9" E142°29'1")は、日高山脈の西側山麓、標高約 110~360 m に位置する。地形は静内川河畔の河岸段丘上を流れるケバウ川を中心とする小扇状地であり、土質は火山性土壌である弱酸性黒ボク土壌である。年平均気温約 7°C、8月の平均気温約 20°C、2月の平均気温は約-5°Cである。年間降雨量はおよそ 120 mm で夏季に多い。積雪期間は約 100 日程度である。本研究では 2016 年に 4月にデントコーン畑から黒ボク土を採取した。

### 2-2. フィンランド、キルピスヤルビ近郊パルサ崩壊地の特徴

フィンランドの北西に位置し (N69°2'E20°48'), 標高 600 m 付近に森林限界があり、それ以上の標高域では樹木の生えない亜寒帯ツンドラ域になっている。年間平均気温は-2.7°C、年間降水量は 422 mm である (Järvinen, 1987)。

### 2-3. 土壌微生物培養基の設計と調製

土壌微生物培養には、Winogradsky's 無機塩無窒素培地 (Tchan and New, 1984)を基本培地として使用し、ゲランガムで固化あるいはソフトゲル化した培地、もしくは液体培地を用いた。ゲル化剤の有無や濃度、ならびに添加した炭素源や窒素源の濃度等はその都度記載する。Winogradsky's 無機塩無窒素培地は土壌中に生息する単生窒素固定細菌 *Azotobacter* 分離のために開発された完全合成培地である。この培地にはニトロゲナーゼの活性中心に必要なモリブデンおよび鉄が必要量含まれている。一般的に、Rennie 培地や NFb 培地が窒素固定細菌用の培地として汎用されている。しかし、これらの培地には窒素源となり得る成分が含まれているため、窒素量や窒素源を変え、応答を観測することは難しい。従って、窒素源を含まない Winogradsky's 無機塩無窒素培地を使用した方が異なる量あるいは分子種の窒素源の影響をより直接的に観測することができる。Winogradsky's 無機塩無窒素培地の組成は Table. 2-1 に示す。

Winogradsky's 無機塩無窒素培地の調製には、まず無機塩溶液 (stock solution)を調合する。Milli Q 1 L に対し、Table. 2-1 に示した試薬を溶解し、オートクレーブで 121°C、20 分の湿熱滅菌にかけ、これを 20×stock solution とした。Table. 2-2 に示した組成である stock solution, Milli Q, 微粉性炭酸カルシウムを混合し、適宜、炭素源 (sucrose), 窒素源 (任意)を加え、1~4 規定の H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>または KOH で pH を調整した。pH 値はその都度記載する。pH 調整後に親水性 PTFE メンブレンフィルター (polytetrafluoroethylene membrane, 0.45 μm, Millipore, Massachusetts, USA)によってフィルター濾過を行い、培地作成時に生じる不溶物を除去した。

Table. 2-1. Winogradsky's mineral solution (stock solution×20)の組成

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5.0 (g/L)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.5 (g/L)
$\text{NaCl}$	2.5 (g/L)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 (g/L)
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1 (g/L)
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.1 (g/L)

Table. 2-2. Winogradsky's medium の組成 (1 L)

Milli Q water	950 mL
Stock solution	50 mL
$\text{CaCO}_3$ (fine powdery type)	100 mg

ゲルマトリックスとしてゲランガム (Wako)を用いた。ゲランガムソフトゲル培地の調製には0.5%ゲランガムを用いた。

## 2-4. 土壌微生物群衆培養物中に生息する微生物由来の DNA 抽出と 16S rRNA 遺伝子領域の PCR 条件

### 1) 土壌培養物の DNA 抽出

土壌培養物中の細菌の菌叢解析を目的として、土壌懸濁液 (100  $\mu$ L) を Winogradsky's 無機塩無窒素ゲランガムソフトゲル培地 (10 mL) に接種し、7~21 日培養した培養物から菌体を回収した。ゲランガムソフトゲル培地全量を 50 mL フェルコンチューブに入れ、TE buffer を等量加え、ソフトゲルを完全に液化するため 10 秒間ボルテックスし、遠心分離 (10,000 $\times$ g, 15 min) を行った。これにより得られた菌体ペレット全量を DNA 抽出に供した。これ以降の DNA 抽出操作は ISOPLANT II のプロトコルに従った。

### 2) 16S rRNA 遺伝子領域の PCR

16S rRNA 遺伝子領域を対象とした PCR には、AmpliTaq (AmpliTaq GOLD 360 Master Mix, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用した。PCR 条件を Table. 2-3 に示す。16S rRNA 遺伝子領域の増幅には Table. 2-4 に示したプライマーを用いた。また、 $N_2O$  を  $N_2$  へ脱窒する  $N_2OR$  をコードする *nosZ* 遺伝子の検出も PCR により検出することができ、同様に PCR 条件、プライマーを Table. 2-5 および 2-6 に示す。なお、遠心分離で得られるペレットに含有される少量のジェランガムは PCR を阻害しないことが報告されている (Rath and Schmidt, 2001)。

Table. 2-3. PCR の反応条件

Reaction mixture (20  $\mu$ L)

Solution	Volume
AmpliTaq GOLD	10 $\mu$ L
Primer (forward)	0.4 $\mu$ L
Primer (reverse)	0.4 $\mu$ L
Sterilized distilled water	Up to 20 $\mu$ L

Thermal cycling program for eubacteria 16S rRNA universal primer

Initial activation	95°C	10 min	} 30 cycles
Denaturation	95°C	30 sec	
Annealing	55°C	30 sec	
Extension	72°C	1 min/ kb	
Final extension	72°C	7 min	

Table. 2-4. 16S rRNA 遺伝子用ユニバーサルプライマー

Primer	Sequence
27F	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'
341R	5'-CCT ACG GGA GGC AGC A-3'
518R	5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTGG-3'
907R	5'-CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT-3'
1112F	5'-GTC CCG CAA CGA GCG CAA C-3'
1389R	5'-ACG GGC GGT GTG TGT ACA AG-3'
1525R	5'-AAA GGA GGT GAT CCA GCC-3'

Table. 2-5. *narG* および *nosZ* 検出時における PCR の反応条件

Initial activation	95°C	10 min	} 35 cycles
Denaturation	95°C	60 sec	
Annealing	50°C	60 sec	
Extension	72°C	1 min/ kb	
Final extension	72°C	7 min	

Table. 2-6. *narG* および *nosZ* の primer

Primer	Sequence
NosZ-912F	5'-CGTCCCCGGCCTCGTG -3'
NosZ-1853R	5'-GAGCAGAAGTTCGTGCAGTAGTAGGG -3'
NarG-2168F	5'-TCGGGCAAGGGCCACGAATAC-3'
NarG-2411R	5'-TGDATRAANGGRTGCATRTC -3'

## 2-5. N<sub>2</sub>O 測定法

本研究では培養微生物の N<sub>2</sub>O 放出量および N<sub>2</sub>O 消去量を評価した。

以下に N<sub>2</sub>O 測定法を示す。

### 1) 培養容器

N<sub>2</sub>O 測定では培養に密閉容器が求められるため、本研究では 30 mL のガスクロバイアル (SVG-30, Nichiden Rika Glass Co., Kobe, Japan)を用いた。このバイアルはブチルゴム栓 (液状用)で蓋をし、その上から穴のあいたメラミン樹脂製のスクリュキャップで押し付けて密閉する構造になっている。10 mL の培地を分注した容器内の気相容積は 22.57 mL であった (Hara *et al.*, 2010)。

### 2) 培地の分注および培養

ゲルマトリックスを十分に溶解させて 60°C程度まで冷却し、N<sub>2</sub>O 放出用または N<sub>2</sub>O 消去用培地を分注器 (SocorexSH, Socorec Isba S.A., Ecublens, Swizerland)で 10 mL ずつガスクロバイアルに分注し、固まるまで冷却した。培地に菌懸濁液または土壌懸濁液を 100 μL 接種した後、ボルテックスでよく攪拌した。

### 3) N<sub>2</sub>O の封入

N<sub>2</sub>O 消去微生物の場合、はじめに N<sub>2</sub>O 消去能を評価するためにはじめに N<sub>2</sub>O ガスを封入する必要がある。注射用針 (1.2 mm×38 mm, NIPRO, Osaka, Japan)を装着した 100 mL 用シリンジ (ジェイ・エム・エス, Hiroshima, Japan)を使用し、高純度 N<sub>2</sub>O ガス (純度 99.5%, ジーエルサイエンス, Tokyo, Japan)を封入する。封入するとき、使用する注射針は湿熱滅菌 (121°C, 15 min)しており、ガスクロバイアル内の余分な空気を排出するため、ブチルゴム栓に注射針を刺した状態で N<sub>2</sub>O ガスを封入した。Fig. 2-1 に N<sub>2</sub>O 封入方法を示す。

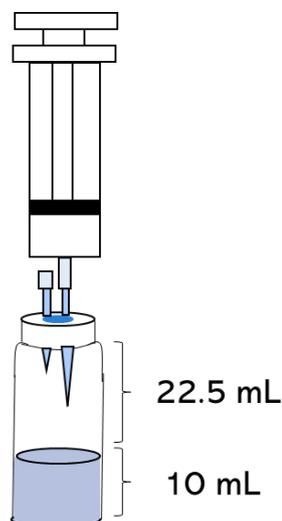
### 4) N<sub>2</sub>O 検出

N<sub>2</sub>O 封入後、実際に N<sub>2</sub>O がどの程度封入されているかを確認するために、封入直後、ヘッドスペース内の N<sub>2</sub>O 量を電子補足検出器 (ECD: Electron Capture Detector)-ガスクロ

マトグラフィー (Shimadzu GC-14B) (SHIMADZU, Kyoto, Japan)により計測した。測定機器条件を Table. 2-7 に示す。ECD-ガスクロマトグラフィーは、コレクタに捕集されるイオン電流を一定にするための電圧値の変化を読み取り、検出する。検量線を作成する際に標品として高純度 N<sub>2</sub>O ガスを使用した。また、N<sub>2</sub>O 放出微生物の場合、菌懸濁液を接種後、1 週間 25°C で培養後、ヘッドスペースに蓄積した N<sub>2</sub>O を測定した。

Table. 2-7. 測定機器条件

カラム	PORAPAK Q (50-80 mesh, 3.2 mm, 3.1 m)
キャリアガス	N <sub>2</sub> 80 kPa (20 m;/min)
メイクアップガス	N <sub>2</sub> 75 kPa
カラムオープン温度	70°C
気化室温度	130°C
検出器温度	250°C
カレント	0.05 nA
レンジ	10 <sup>0</sup>



### ガスクロバイアル

Fig. 2-1. N<sub>2</sub>O 封入方法

シリンジから封入される N<sub>2</sub>O によりバイアル内の空気がブチルゴム栓に刺した注射針を通して排出されることでガスクロバイアル内に N<sub>2</sub>O が気相と置換され封入される。

## 2-6. アセチレン抑制試験

アセチレン抑制試験は土壌微生物の脱窒の評価に使用されている手法である (Balderston *et al.*, 1976; Yoshinari and Knowles, 1976; Groffman *et al.*, 2006; Hayakawa *et al.*, 2012). アセチレンは  $N_2OR$  の酵素活性を阻害するため、本来  $N_2$  へ還元されるべき  $N_2O$  全量がヘッドスペースへ放出される。アセチレン 10%存在下で促進された  $N_2O$  放出量から、微生物の完全脱窒を定量することができ、 $N_2OR$  機能の存在を確認することができる。従って、アセチレン抑制試験では、 $N_2O$  除去が  $N_2$  への還元によるものか、さらには  $N_2O$  除去細菌か完全脱窒菌かを評価することができる。本研究において、この手法を用いて  $N_2O$  除去細菌の脱窒能を評価する。2-6 節と同様の手法でアセチレンガスをガスクロバイアルのヘッドスペースに注入する (Fig. 2-2).

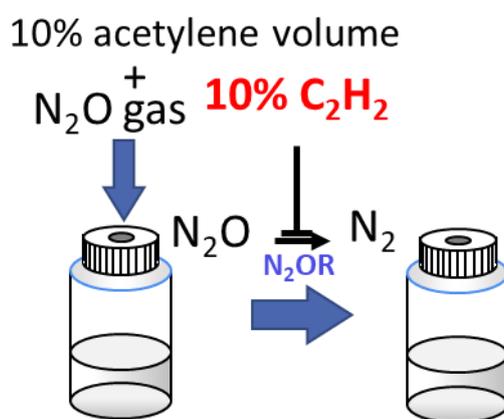


Fig. 2-2. アセチレン抑制

アセチレンガスが  $N_2OR$  の活性を阻害し、 $N_2O$  から  $N_2$  へと脱窒できなくなり、 $N_2O$  が蓄積される。

## 2-8. シークエンシング

土壌微生物群集培養物中に生息する微生物の DNA にコードされる 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は BigDye™ Terminator v3.1 キットを用いてシーケンス PCR を行い、ABI PRISM 310 (Applied Biosystems)によって決定した。16S rRNA 遺伝子のシーケンス PCR に用いたプライマーを Table. 2-8 に、シーケンス PCR の反応条件を Table. 2-9, Table. 2-10 に示す。

Table. 2-8. 16S rRNA 遺伝子シーケンス PCR 用プライマー

プライマー	塩基配列 (5'→3')
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
341F	CCTACGGGAGGCAGCAG
518R	GTATTACCGCGGCTGCTGG
907R	CCGTCAATTCCTTTYAGTTT
16S-rDNA 1080MR	ACGAGCTGACGACA
1112F	GTCCCGCAACGAGCGCAAC
1389R	ACGGGCGGTGTGTACAAG
1525R	AAAGGAGGTGATCCAGCC

Table. 2-9. シーケンス PCR 反応液構成内容

Solution	Volume
5×sequencing buffer	3.8 μL
Primer (1 μM)	3.2 μL
Pre-mix (×1/4)	2.0 μL
Template PCR amplicon	1.0 μL
Milli Q	10 μL
Total	20 μL

Table. 2-10. シーケンス PCR thermal cycling program

Cycle	Temperature (°C)	Time (sec)
Initial activation step	96	300
Denaturation	96	30
Annealing	50	15
Extension	60	240
Storage	8	∞

説明書に従ってシーケンス PCR 産物から不純物を取り除き, オートシーケンサー (ABI PRISM 310, Applied Biosystems)により遺伝子の解析を行った. 解析した塩基配列は細菌株ごとにアッセンブリーソフト (AutoAssembler ver. 2.0, Applied Biosystems)でアッセンブルし, 完成した塩基配列を DNA データバンク (DDBJ)にアクセスして BLAST 検索することにより, 当該細菌の同定を行った.

## 2-9. PCR-DGGE 法による菌叢解析

従来の微生物研究は純粋分離・培養を基本としており、環境中などの複合系に存在する微生物の種類や機能解析を行うには、同様に微生物の培養が必要とされてきた。しかし、環境中の微生物の90%以上は培養が困難であり、土壌から分離・培養可能な微生物はわずか0.3%と言われている。このような分離・培養を介さず、環境中の微生物の全てのゲノムを回収し、網羅的な解析を行うメタゲノム解析技術の確立によって、環境中の微生物群集の系統的な多様性や機能性遺伝子の解析が可能となった (Amann *et al.*, 1995)。

DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis, 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動)法は、濃度勾配があるゲルを用いた電気泳動法である。二本鎖DNAの分子量と塩基配列の違いによって、泳動距離が異なることを利用し、本来は二本鎖DNAの塩基配列の点変異検出用に開発された技術であるが、分離能が高いことから Muyzer らによって微生物群集解析へ応用された (Muyzer *et al.*, 1993)。培養過程を経ずに微生物叢を解析することが可能な方法として汎用されてきた。これには16S rRNA 遺伝子を標的としたPCR法と組み合わせたPCR-DGGE法が用いられ、微量な対象物から環境中の微生物由来標的遺伝子を増幅することによって、微生物叢の変動をバンドとして可視化し、観察することができる。

DGGEは、DNA変性剤として用いる尿素とホルムアミドで濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲルによって、1塩基の違いを検出するための手法である。二本鎖DNAを濃度勾配の低い部分から高い部分に向かって泳動する。ゲル中二本鎖DNAが特定の変性剤濃度の領域に到達すると変性によって一本鎖に開裂したDNAは泳動が進行しにくくなる。

分解能を高めるために、GC-clamp (GCに富んだ配列)と呼ばれる40塩基程度のG-C豊富な配列5'側に付加されたプライマーを用いるのが一般的である (Sheffield *et al.*, 1989)。このGC-clamp付のプライマーを用いて増幅したPCR産物を泳動すると、変性剤の濃度上昇と共に二本鎖DNAの開裂のしやすさ、つまり塩基配列の違いによって、移動度の異なる場所にバンドを形成する。配列の異なる微生物種の16S rRNA 遺伝子を標的としたDGGEでは属レベルでの同定は可能であるが、長過ぎる塩基配列では分離能が下がるため、相同性領域の塩基配列からデザインしたGC-clamp付のプライマーを用いて増幅した。GC-clamp付のプライマーとして341F-gc (5'-(GC clump\*)-CCTACGGGAGGCAGCA-3', GC-clamp; 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC-3)を使用した。GC-clampの配列は500 bp以下の二本鎖DNAを分析にかけるのが妥当である。DGGEのバンドパターンおよびシーケンシングによる各バンドの同定によって、群集構造や菌叢遷移を評価することができる。

本研究においては、培養物中の細菌をターゲットとし、N<sub>2</sub>O放出およびN<sub>2</sub>O消去が行われている環境中での菌叢解析をPCR-DGGE解析により行った。

### 1) テンプレート調製

PCR-DGGE 法による菌叢解析に用いた DNA テンプレートは、土壌培養物から回収した菌体 DNA を用い、GC-clamp 付のプライマーペアで目的の領域を増幅し、DGGE 解析用 DNA 断片を得た。

### 2) 変性剤濃度勾配ゲル調製・電気泳動

DCode (Bio-Rad, USA)を用いて変性剤濃度勾配ゲル (16 cm×16 cm)を調製し、電気泳動を行った。変性剤濃度勾配ゲルの調製、電気泳動はプロトコルに従った。よりシャープなバンドを得るために、本研究では、100 V で 16 時間の泳動を標準手法としたため、泳動バッファーには 1×TAE バッファーを用いた。泳動後のゲルは 1×TAE バッファー中で Syber Green I (Takara Bio Inc., Otsu, Japan)を用いて、30 分振盪し染色した。染色後のゲルは Typhoon Trio (GE healthcare, Little Chalfont, UK)でスキャンした。

### 3) バンドの切り出し・同定

DNA 損傷を防ぐため、バンドの切り出しには、青色 LED 照射装置 (NF-1050-B, Nihon Eido Co. Ltd, Tokyo, Japan)を用いた。切り出すバンドをイエローチップで 2-3 回突き刺し、10  $\mu$ l の滅菌 Milli Q に懸濁した。このうち、1  $\mu$ L をテンプレートとして PCR を行った。この PCR 産物は BigDye™ Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems)を用いてシーケンス PCR を行い、ABI Prism 310 (Applied Biosystems)によって配列を決定した。16S rRNA 遺伝子のシーケンス PCR に用いたプライマーは Table. 2-4 に、シーケンス PCR 条件は Table. 2-9 と同様である。シーケンシングによって得た塩基配列は DNA データバンク (NCBI または DDBJ)の BLAST 検索によって細菌の仮同定を試みた。

## 2-10. バクテリアのハイスループットシーケンシング

北海道大学附属静内圃場黒ボク土壌およびパルサ崩壊地の真正細菌のメタゲノム解析は、次世代シーケンサーの Ion Torrent Personal Genome Machine (Life Technologies, CA, USA)を用いて行った。真正細菌 16S rRNA 遺伝子領域は可変領域をカバーするため V2-4-8, V3-6, 7-9 領域を増幅するプライマーセット (Life Technologies)を用いて増幅した。Thermal Cycling Program は、キットに付属するマニュアルに従った。得られたアンプリコンを AMPure XP (Beckman Coulter, CA, USA)によりマニュアルに沿って精製した。DNA 量は Qubit dsDNA HS assay kit (Life Technologies)を用いて定量した。

バクテリアの 16S rRNA ライブラリは Ion Plus Fragment Library Kit (Life Technologies)と Ion Xpress Barcode Adapter 1-16 Kit (Life Technologies)を用いてマニュアルに沿って作成した。アダプターライゲーションと nick-repaired libraries はキットのマニュアルに沿った。また場合によって真正細菌 16S rRNA 遺伝子領域の V4 可変領域をカバーできるプライマー (Table. 2-11, Table. 2-12)を用いてライブラリ作成を行った (Fig. 2-3)。PCR 条件を Table. 2-13, Table. 2-14 に示す。ポリメラーゼは AmpliTaq Gold を用いた。First PCR はプライマー 515F/806R で、アンプリコンを作成し、Second PCR のプライマーにバーコード付き 515F/PI を用いてライブラリを作成した。

増幅したライブラリは Agilent 2100 Bioanalyzer with High Sensitivity DNA Analysis Kits (Agilent Technology, CA, USA)を用いて目的配列の DNA 量を定量した。各ライブラリを 26 pM に希釈し、Ion OneTouch 2 system (Life Technologies)を使用してイオン球形粒子 (ISPs)上でシーケンシングテンプレートを増幅するためのエマルジョン PCR に供し、Ion PGM 21 Template OT2 400 Kit (Life Technologies)を用いて Ion OneTouch ES (Life Technologies)によりテンプレートを作成した (Fig. 2-4)。テンプレートは Ion PGM system (Life Technologies), Ion PGM Sequencing 400 Kit (Life Technologies)および Ion 316 Chip v2 (Life Technologies)を用いて 850-flows でシングルエンドシーケンシングを行った (Fig. 2-5)。真正細菌配列は MicroSEQ 16S Reference Library v2013. 1 (Life Technologies)および Greengenes v13.5 (The Greengene Database Consortium, <http://greengene.secondgenome.com/>)のリファレンスに基づく Ion Torrent プラットフォーム特有のパイプラインソフトウェア Ion Reporter 5.0 16S Metagenomics Workflow を使用して、解析を行った。Workflow のパラメーター条件は Table. 2-15 に示す。基本的に 10 コピー未満のコピー数の配列を除去したが、目的によってはすべての配列を解析した。

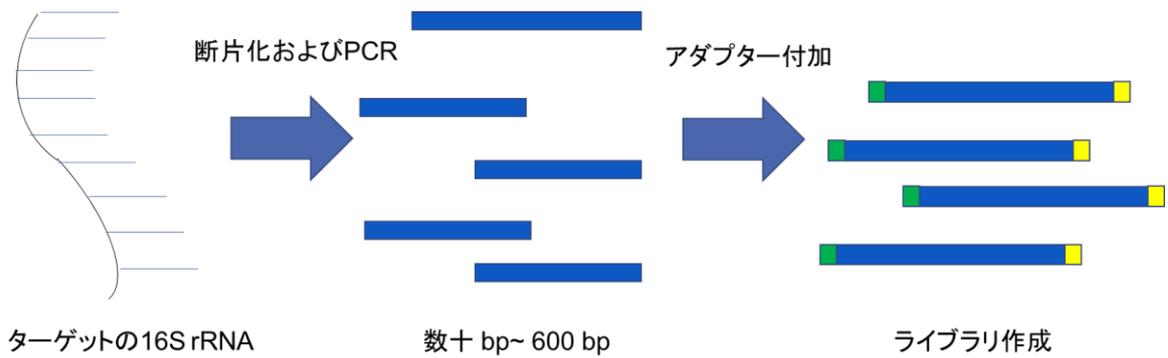


Fig. 2-3. ライブラリの作成

ターゲットの 16S rRNA を断片化し，PCR により増幅し，アダプターライゲーションを行いライブラリを作成.

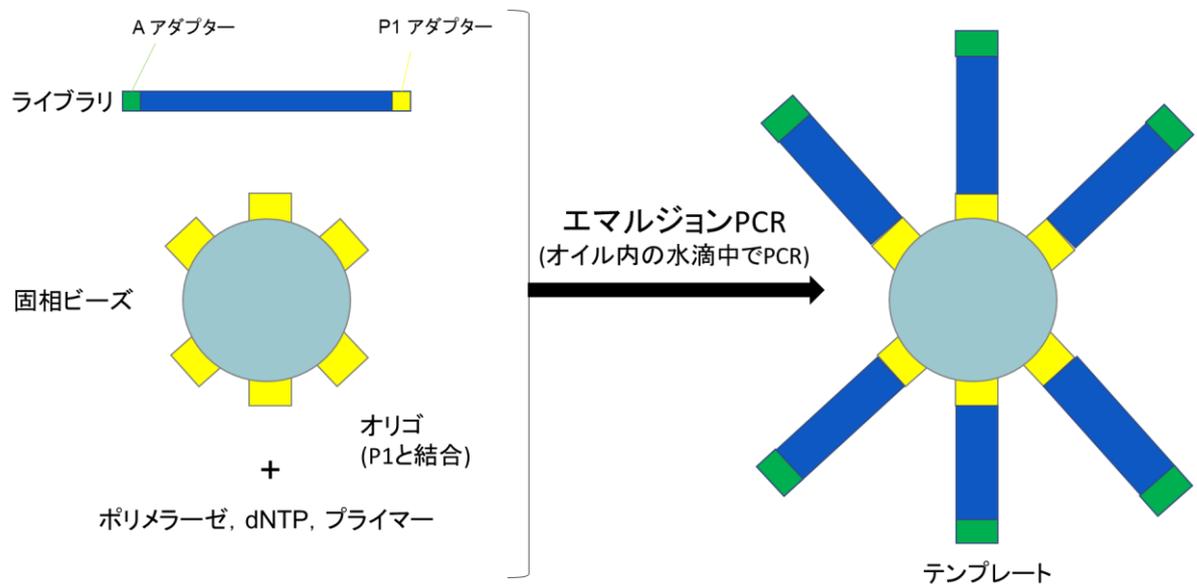


Fig. 2-4. テンプレート調製

固相ビーズが P1 アダプターと結合しライブラリを固定させ，ポリメラーゼ，dNTP，プライマーを混合し，エマルジョン PCR に供することでテンプレートを調製

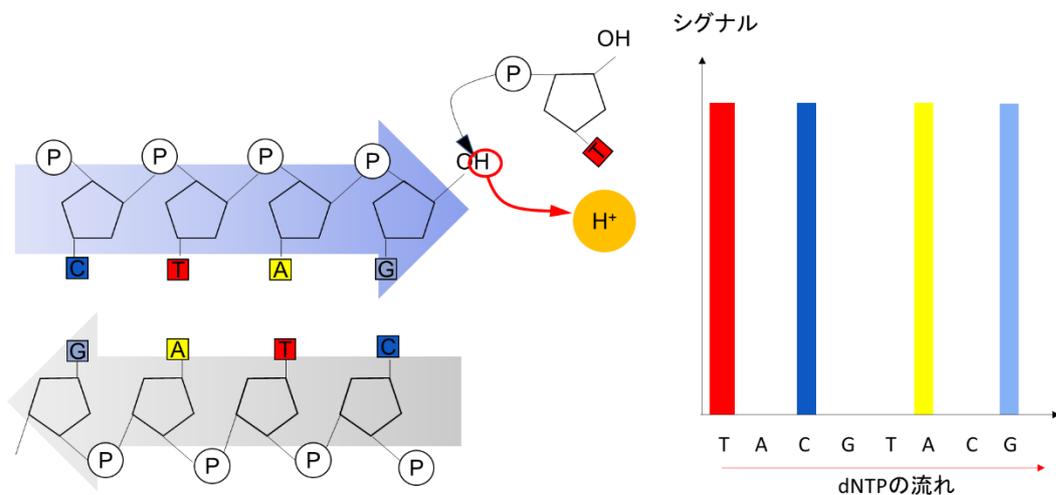


Fig. 2-5. シークエンス反応

テンプレートは Ion PGM system (Life Technologies), Ion PGM Sequencing 400 Kit (Life Technologies)および Ion 316 Chip v2 (Life Technologies)を用いて 850-flows でシングルエンド シークエンシングをおこなった。

Table. 2-11. ハイスループットシークエンス用プライマー

プライマー	塩基配列 (5'→3')
515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
806F	GGACTACVSGGGTATCTAAT
16S- rDNA Barcode added 515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA- Barcode
PI	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGGACTACVSGGGTATCTAAT

Table. 2-12. ハイスループットシーケンス用プライマーに用いたバーコード

バーコード	塩基配列 (5'→3')	バーコード	塩基配列 (5'→3')
IonXpress_049	TCCTAACATAAC	IonXpress_061	TCACTCGGATC
IonXpress_050	CGGACAATGGC	IonXpress_062	TTCCTGCTTCAC
IonXpress_051	TTGAGCCTATTC	IonXpress_063	CCTTAGAGTTC
IonXpress_052	CCGCATGGAAC	IonXpress_064	CTGAGTTCCGAC
IonXpress_053	CTGGCAATCCTC	IonXpress_065	TCCTGGCACATC
IonXpress_054	CCGGAGAATCGC	IonXpress_066	CCGCAATCATC
IonXpress_055	TCCACCTCCTC	IonXpress_067	TTCCTACCAGTC
IonXpress_056	CAGCATTAATTC	IonXpress_068	TCAAGAAGTTC
IonXpress_057	TCTGGCAACGGC	IonXpress_069	TTCAATTGGC
IonXpress_058	TCCTAGAACAC	IonXpress_070	CCTACTGGTC
IonXpress_059	TCCTTGATGTTC	IonXpress_071	TGAGGCTCCGAC
IonXpress_060	TCTAGCTCTTC	IonXpress_072	CGAAGGCCACAC

Table. 2-13. AmpliTaq Gold thermal cycling program for NGS

Cycle	Temperature (°C)	Time (sec)
Initial activation step	95	600
Denaturation	95	30
Annealing	*1 55	30
Extension	72	20
Final extension	72	420
Storage	8	∞

\*1 電気泳動によるバンドの有無によってサイクル数を 20~30 cycles の間で調整するが、基本的に 24 cycles で行った。

\*2 電気泳動によるバンド有無により 50°C~60°C 間で調整するが、基本的に 55°C で行った。

Table. 2-14. Adaptor ligated and nick-repaired libraries

Cycle	Temperature (°C)	Time (sec)
Initial activation step	95	300
Denaturation	95	15
Annealing	55	15
Extension	70	60

Table 2-15. ハイスループットシーケンスに用いた Workfolw パラメーター

Workflow parameters	
Primer Detected	Single end
Read Length Filter	150 reads
Minimum Alignment Coverage	90%
Read Abundance Filter	10 reads
Genus Cutoff	97.0%
Species Cutoff	99.0%
Slash ID Reporting Percentage	0.2%

### 3. 静内圃場における N<sub>2</sub>O 消去微生物の探索

#### 3-1. はじめに

土壌の C/N が低いとき、N<sub>2</sub>O が大量に放出され、逆に C/N が高いと N<sub>2</sub>O が放出されないことが報告されている (Bortone *et al.*, 1992; Baggs *et al.*, 2000; Kishida *et al.*, 2004). つまり、窒素量が多い場合に硝酸塩呼吸が活発になる。

そのため、一部の完全脱窒細菌には、土壌ガス中の N<sub>2</sub>O を硝酸塩呼吸系における最終電子受容体として利用し、N<sub>2</sub> を最終産物として大気中に放出するものも知られている (Hutchins, 1991; Wunsch and Zumft, 2005). 嫌氣的条件においても、N<sub>2</sub>O を利用することで細胞の生存を助けているという報告もある (Park *et al.*, 2017). N<sub>2</sub>O の資化を考えた場合、N<sub>2</sub>O が豊富に存在した場合、N<sub>2</sub> を固定するよりも N<sub>2</sub>O は亜硝酸に変換したほうがエネルギー的に効率が良い (Kryachko *et al.*, 2001). 土壌中の亜硝酸は植物、他の微生物が資化しており (Yang *et al.*, 2004; Breteler and Luczak, 1982) 競争率が非常に高いため、大量に放出される N<sub>2</sub>O を資化した方が生存戦略的に有利と考えられる。したがって、利用しやすい N<sub>2</sub>O を積極的に資化利用する細菌が存在するのではないかと推測される。しかし、N<sub>2</sub>O を資化している細菌の存在は明らかになっていない。

本研究では、過剰な N 環境すなわち C/N が低い環境では不完全脱窒細菌により高濃度の N<sub>2</sub>O が発生することから、豊富な N<sub>2</sub>O を積極的に取り込み資化利用する菌がいるのではないかと仮説を立てた。この仮説は N<sub>2</sub>O の放出量が少量では、これらの細菌が長期的に生育できないと考えられる。なぜなら、N<sub>2</sub>O を栄養源としていた場合、N<sub>2</sub>O 量が少ないと十分に生育できなくなるためと考えたからである。そのため、多量に N<sub>2</sub>O が放出されている黒ボク土壌をターゲットとした。これを検証するために、以下の実験を進めた。使用する土壌として北海道大学附属静内圃場の黒ボク土壌を使用した。静内圃場の黒ボク土壌は多量の肥料が投入されており、N<sub>2</sub>O が多量に放出されている (Kitamura *et al.*, 2021). 培地の pH を強酸性 (pH 4.5) から強塩基性 (pH 9.0) で土壌を培養し、N<sub>2</sub>O 放出挙動を経時的に計測した。経時測定中に、N<sub>2</sub>O の蓄積量が増加するのではなく減少していく培養物を見だし、強力な N<sub>2</sub>O 消去微生物を探索した。

#### 3-2. 実験材料

2016 年 4 月に採取した北海道大学附属静内牧場のデントコーン圃場で採取した黒ボク土 (MF: Manure and chemical fertilizer input soil, F: Chemical fertilizer input soil) を N<sub>2</sub>O 計測試験に用いた (Fig. 3-1).

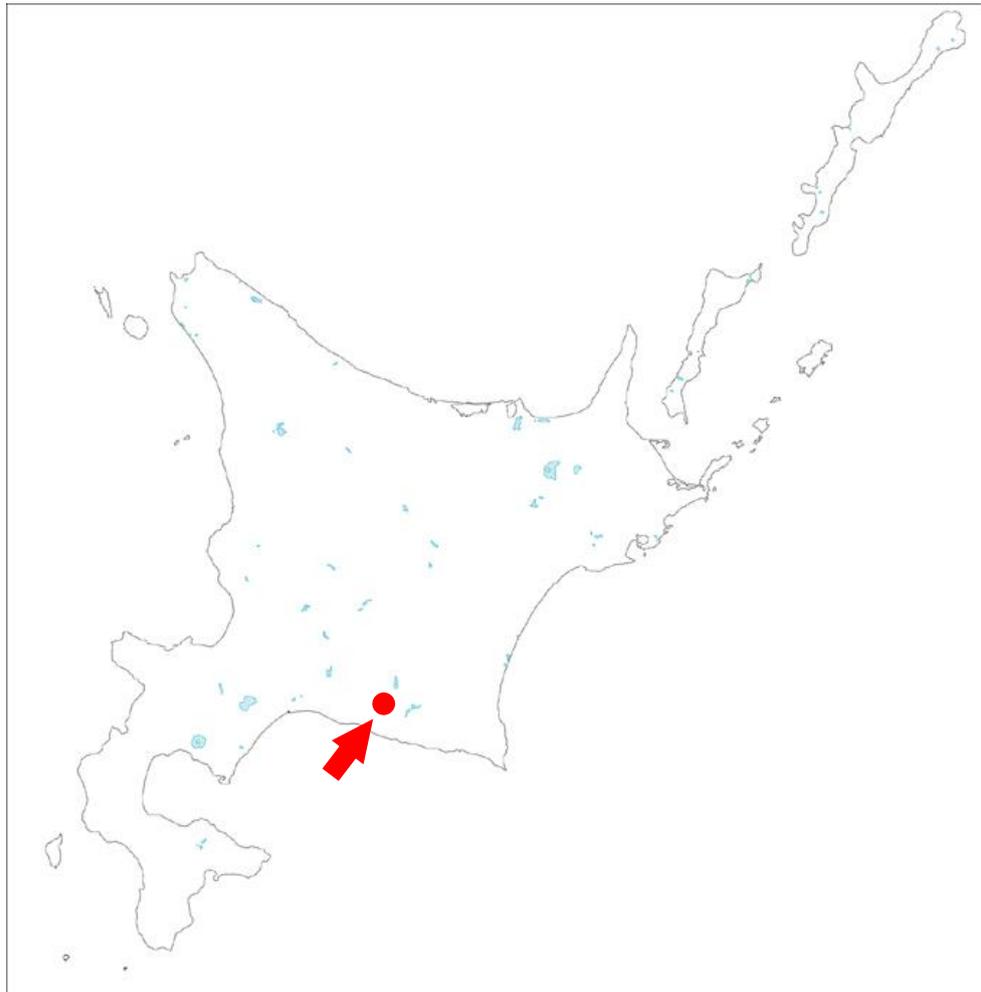


Fig. 3-1. 静内研究牧場土壌サンプリング地点

赤矢印はサンプリング地点，北海道大学附属静内圃場 (N42°25'9" E142°29'1")を示す。

### 3-3. 異なる pH の培地による N<sub>2</sub>O 放出量の測定および N<sub>2</sub>O 消去微生物の探索

#### 概要および実験方法

北海道大学附属静内圃場における N<sub>2</sub>O 放出量の測定 N<sub>2</sub>O 消去微生物を探索するために pH によるスクリーニングを行った。

Winogradsky's 無機塩無窒素培地を基本培地とし，炭素源として(0.5% (w/v))sucrose, KNO<sub>3</sub> 0.52 g/L, pH を 10 区 (4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0)設定し，スクリーニングを反復数 5 で行った。使用した土壌は，①静内附属牧場・圃場 (堆肥添加黒ボク土壌, MF : SHD W1 MF 0-10 cm), ②静内附属牧場・圃場 (化学肥料添加黒ボク土壌, F, コード : SZN W4 M-MF 0-10 cm)とした。それぞれの土壌の約 0.2 g を滅菌水 10 mL に懸濁し，そのうち 100 μL 培地に接種し 1 週間，2 週間，3 週間と経時的に N<sub>2</sub>O 放出量を検出した。本実験では黒ボク土壌における N<sub>2</sub>O 放出量を測定するために，N<sub>2</sub>O を封入せず培養を行った。

## 結果

①静内付属牧場・圃場黒ボク土壌 (MF)では、pH 4.5–pH 7.0 では N<sub>2</sub>O 放出が確認され、pH 7.0 で N<sub>2</sub>O 放出量の最大値 (3859 ppmv)が計測され (Fig. 3-2a), N<sub>2</sub>O 放出微生物の最大活性と考えられる、pH 7.5 以降で N<sub>2</sub>O が経時的に前週と比較し、減少していることが観察された (Fig. 3-2a). ②静内付属牧場・圃場黒ボク土壌 (F)では、pH 4.5–pH 7.5 で N<sub>2</sub>O 放出が確認され、pH 7.5 で N<sub>2</sub>O 放出量の最大値 (5779 ppmv)が計測され (Fig. 3-2b), N<sub>2</sub>O 放出微生物の最大活性と考えられる. pH 8.5 では経時的に計測をするにつれ、N<sub>2</sub>O が減少していくことが確認できた (Fig. 3-2b). 以上の結果を Table に示した (Table. 3-1).

Table. 3-1. pH の違いによる N<sub>2</sub>O の最大放出活性および消去活性を示す培地 pH

	N <sub>2</sub> O放出	N <sub>2</sub> O消去
MF	7.0	7.5~9.0
F	4.5~7.5	8.5

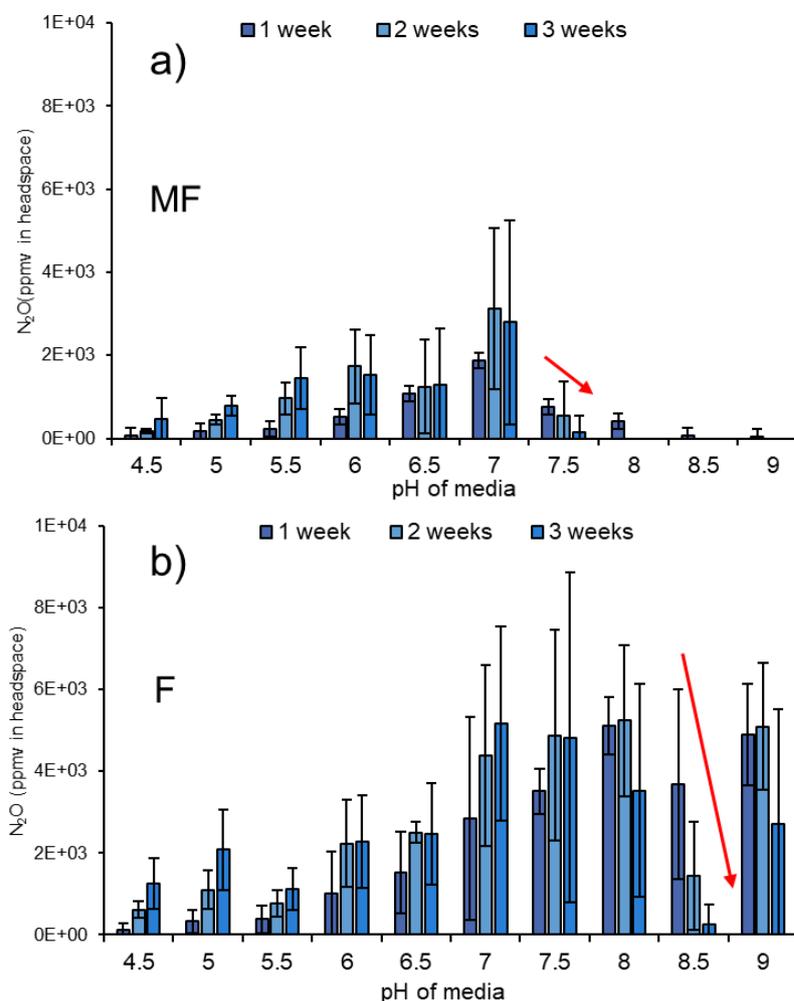


Fig. 3-2. 静内圃場土壌培養物からの N<sub>2</sub>O 消去微生物スクリーニング  
 a) 静内附属牧場・圃場 (堆肥添加黒ボク土壌, MF : SHD W1 MF 0-10 cm). b) 静内附属牧場・圃場 (化学肥料添加黒ボク土壌, F, コード : SZN W4 M-MF 0-10 cm). 各 pH における Winogradsky's 無機塩無窒素培地を基本培地での N<sub>2</sub>O 放出能を示す. pH を 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 に設定し, 窒素源として KNO<sub>3</sub> (0.52 g/L), n=3, エラーバーは平均±SE. 縦軸は N<sub>2</sub>O 残存量, 横軸は培地 pH を示す.

### 3-4. N<sub>2</sub>O 消去菌の分離

#### 概要および実験方法

Winogradsky's 無機塩無窒素培地を基本培地とし, 3-3節で N<sub>2</sub>O 蓄積量の減少が確認された条件である pH 8.5 に調整し, 窒素源として KNO<sub>3</sub> (0.52 g/L), 炭素源として sucrose (0.5% (w/v)), ジェランガム (0.5% (w/v))を加えた平板培地を作成した. その後, 3-3節で N<sub>2</sub>O を消去した土壌 (MF)由来の培養物 (pH 8.5)を 1000 倍希釈し, 100 μL を平板培地に接種し, 出

現したコロニーを形態の異なっていた 15 種を回収し、その菌株を A-O と表記した。

同様の培地組成をガスクロバイアルに 10 mL 分注し、その後、1 mL の滅菌水に回収したコロニー (A-O) を懸濁し、同様の培地組成の培地に 100  $\mu$ L 接種し、N<sub>2</sub>O を約 2,000 ppmv をヘッドスペースに封入し、ガスクロマトグラフィーにより 1 日目、4 日目の N<sub>2</sub>O 残存量を計測した。

その後、N<sub>2</sub>O の消去が確認された培養物から菌体を回収し、菌体の 16S rRNA を 27F/1389R のプライマーペアで増幅し、sequence PCR を行い、細菌の同定を試みた。

## 結果

顕著に N<sub>2</sub>O を消去していた分離株 A が確認された。この分離株 A は、培養 4 日目において約 500 ppmv の消去した (Fig. 3-3)。分離株 H-O では消去ではなく、N<sub>2</sub>O の放出が確認された。

この分離された細菌の 16S rRNA を PCR (27F/1389R) で増幅し得た配列は、*Chitinophaga eiseniae* と最も高い 96.35% の相同性を示した。MEGA X を使用した近隣結合法に基づいて系統発生分析をおこない (Kumar *et al.*, 2018) (Fig. 3-4)、本分離株を *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株とした。また、現在明らかにされている *Atypical-nosZ* 遺伝子を持つ細菌の 16S rRNA と比較することで本菌株が *Atypical-nosZ* 遺伝子を持っている細菌であることを示した (Fig. 3-5)。

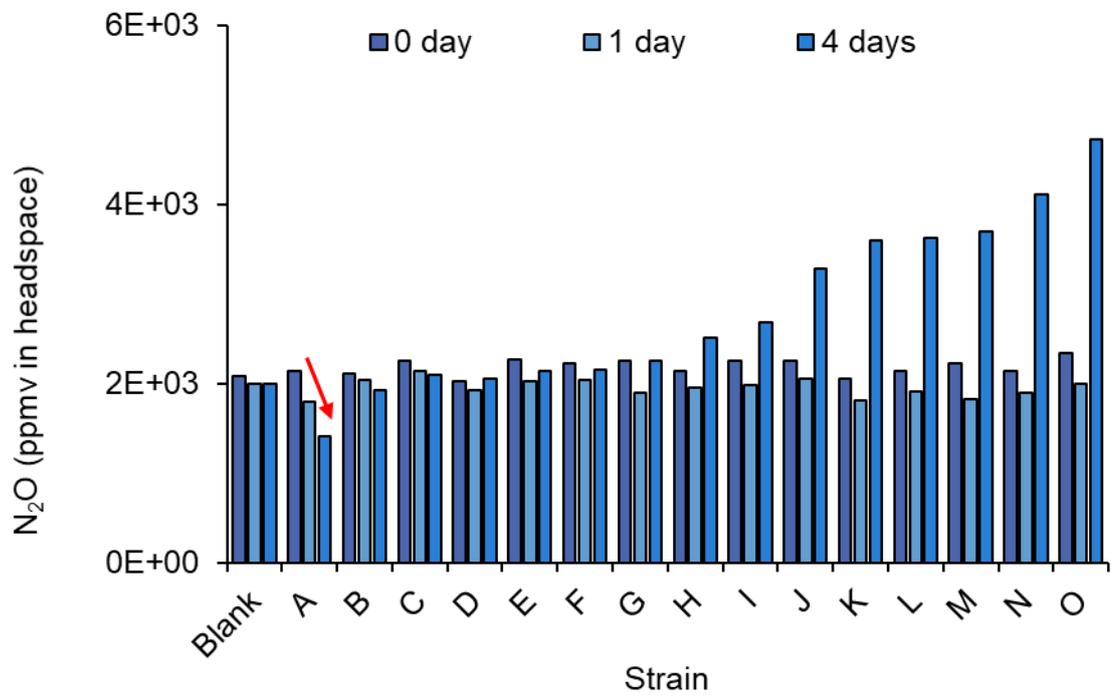


Fig. 3-3. 分離株の N<sub>2</sub>O 消去能評価

各アルファベットは分離株を示し，培養条件は Fig. 3-1 と同様．計測日数は 1 日，4 日．矢印は N<sub>2</sub>O 残存量が減少していることを示している．

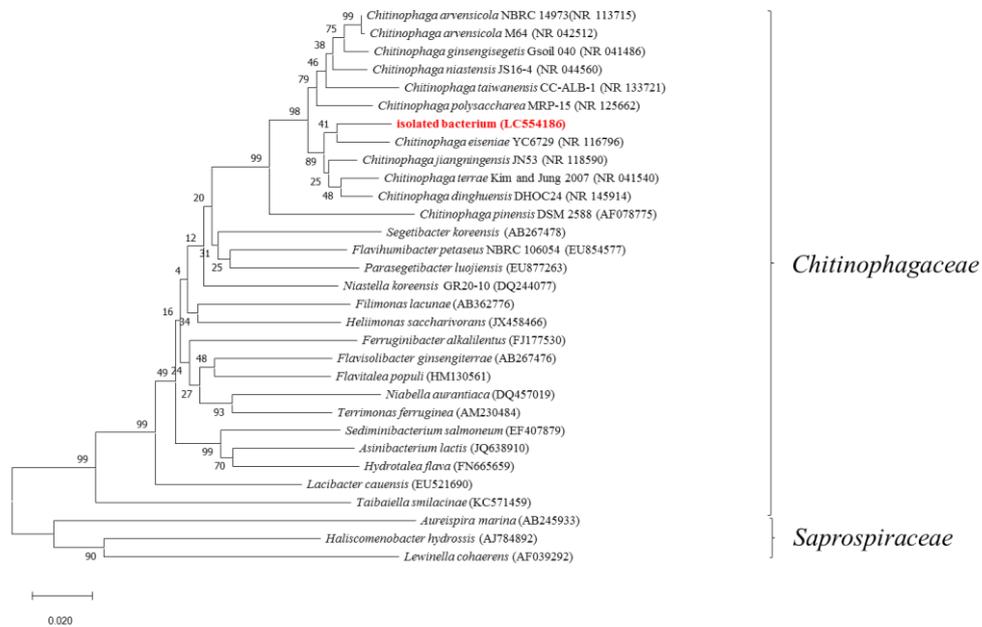


Fig. 3-4. *Chitinophagaceae* の 16S rRNA に基づく Neighbor-joining 法による系統樹  
 系統樹は 1362 bp の 16S rRNA 遺伝子フラグメントに基づき、*Chitinophagaceae* の 16S rRNA  
 をリファレンスに取り、Neighbor-joining 法により作成した。bootstrap を 1000 回試行し、Tree  
 node に示してある数字は boots trap 値を表している。スケールバーは各集団の進化距離を示  
 している。図内部のカッコ内は accession number を表している。本分離株の遺伝子は赤字で  
 示した。

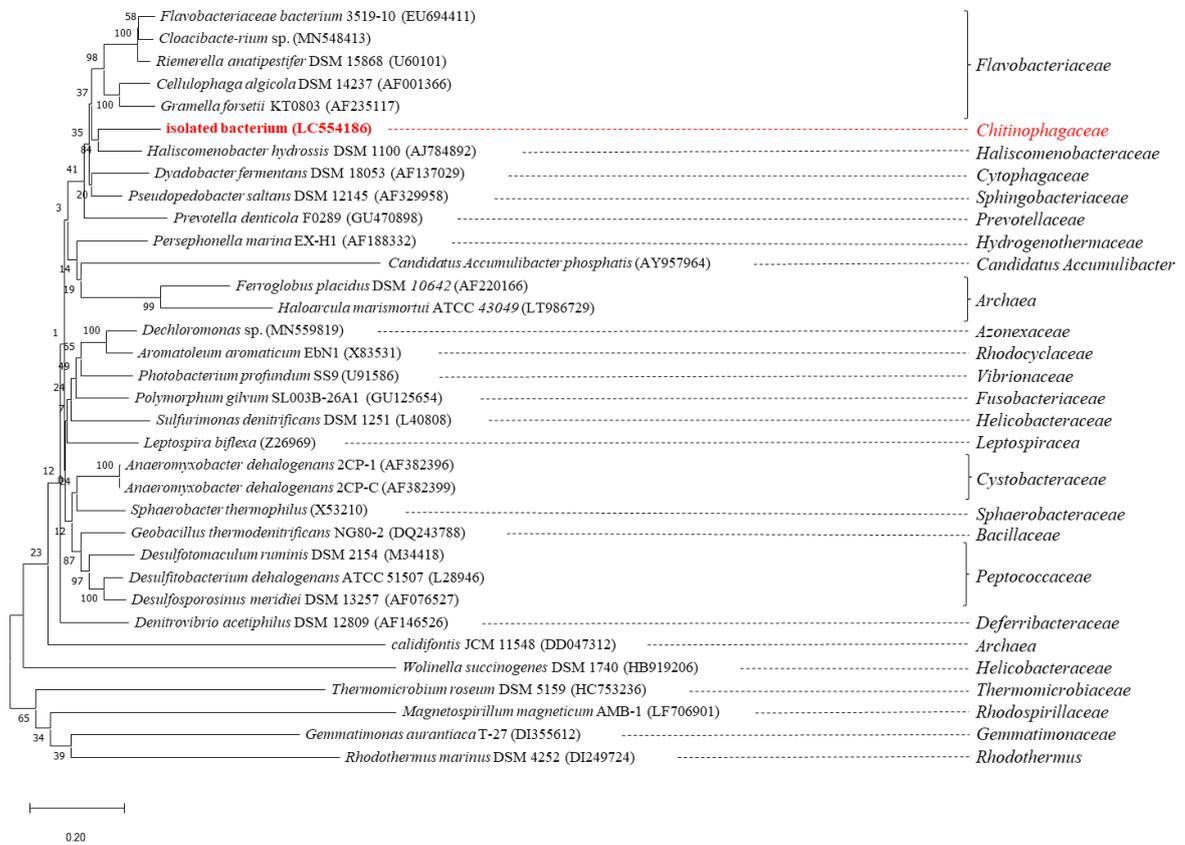


Fig. 3-5. Atypical-*nosZ* 遺伝子を持つ微生物の 16S rRNA に基づく Neighbor-joining による系統樹

この系統樹は Atypical-*nosZ* 遺伝子を持つ微生物の 16S rRNA 遺伝子フラグメントに基づき、Neighbor-joining 法により作成した。作成方法は Fig. 3-3 と同様である。

## 考察

以上の実験より、静内附属牧場・圃場の黒ボク土壌では、堆肥肥料もしくは化学肥料を添加した場合、pH が中性で放出量が最大になること、*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を N<sub>2</sub>O 消去細菌として決定することができた。

N<sub>2</sub>O 消去能をもつ微生物は pH 7.5–pH 9.0 で存在が示唆されているが (Fig. 3-2a), N<sub>2</sub>O 消去量で有意な差を確認できず、至適 pH を特定することができない。②静内附属牧場・圃場の黒ボク土壌では、pH 7.0, pH 7.5 で N<sub>2</sub>O 放出量が最大になっていることから、N<sub>2</sub>O 放出能をもつ微生物は至適 pH が中性付近であると考えられる (Fig. 3-2b)。pH 8.0–pH 9.0 では N<sub>2</sub>O 消去能が確認されているが、最初の 1 週目で N<sub>2</sub>O の放出が確認され、その後、N<sub>2</sub>O が消去されていることから、N<sub>2</sub>O 消去微生物は十分量の N<sub>2</sub>O が気層中に存在しないと培養できない可能と考えられる。すなわち、この培養物中に強力な N<sub>2</sub>O を資化している細菌の可能性はある。しかし、この細菌属が硝酸から N<sub>2</sub>O を生成する経路を持たないが、N<sub>2</sub>O から N<sub>2</sub> への脱窒経路を持ち、Non-denitrifier (Payne *et al.*, 1982; Simon *et al.*, 2004; Hallin *et al.*, 2018) と呼ばれる細菌である可能性はある。Non-denitrifier は Typical-*nosZ* 遺伝子ではなく Atypical-*nosZ* 遺伝子を保持している (Hallin *et al.*, 2018)。Atypical-*nosZ* は多様性に富んだ遺伝子であるそのため、すべての Atypical-*nosZ* 遺伝子配列は明らかにされていない。そのため、まずは *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株が Typical-*nosZ* 遺伝子を保持しているかを調べる必要がある。加えて、アセチレン還元試験を行うことにより、脱窒により N<sub>2</sub>O を消去していることを示す必要がある。

*Chitinophagaceae* は分類定義としてキチン分解微生物となっている (Sangkhol and Skerman, 1981)。最も高い相同性を示した *Chitinophaga eiseniae* は堆肥が散布された土壌から分離されているグラム陰性細菌である (Yasir *et al.*, 2011)。本菌株も黄色のコロニーを作成しており、報告されている菌株も同様に黄色のコロニーを作成していることもあり (Yasir *et al.*, 2011)、この細菌種である可能性が非常に高い。生育条件も pH 6.5–8.5 である。このことから消去活性の適正 pH が塩基性条件であると考えられる。

本実験圃場からは N<sub>2</sub>O 消去細菌ではなく、N<sub>2</sub>O 放出細菌の分離が報告されている (Takeda *et al.*, 2012; Nie *et al.*, 2016)。これらの細菌種は全て pH 4.5–6.5 の間で強い放出活性があるとされているが、*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株は pH 8.5 で活性を示しており、消去株の分離においては pH に勾配をつけることが重要と考えられる。しかし、土壌が塩基性になることは多くはなく、この分離株が N<sub>2</sub>O 農業資材として利用できるかを幅広い pH 区画での消去試験を行う必要があると考えられる。

*nosZ* 遺伝子を持ち N<sub>2</sub>O により還元するもの (Wunsch and Zunft, 2005) が知られている。*nosZ* の酵素活性は pH 6.5 のときに恒常的に発現しているが、pH 8.0 でも発現するものの時間がたつにつれ発現しなくなることが報告されている (Liu *et al.*, 2010)。しかし、pH 7.5–8.5 で *nosZ* の発現量が最大となる (Liu *et al.*, 2010)。すなわち、現段階では、この分離株、

*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株が *nosZ* 遺伝子による N<sub>2</sub>OR により還元している可能性が高いと考えられる。そのため、Typical-*nosZ* 検出試験を行い、*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株がどのように消去しているかを検証する必要がある。

系統樹から *Chitinophagaceae* に属していることは間違いないが、この属において新しい脱窒細菌である可能性が高いと考えられる (Fig. 3-4, 5)。 *Chitinophagaceae* は Fig. 3-5 に示されるように Atypical-*nosZ* 遺伝子を保持している微生物群の中に存在しており、本菌株が Atypical-*nosZ* 遺伝子によって発現した N<sub>2</sub>OR により消去している可能性がある。さらに、*Chitinophagaceae* は Typical-*nosZ* を保持しているアルファ・ベータ・ガンマプロテオバクテリアではなく、バクテロイデス門に属している。そのため、脱窒により消去しているのであれば Atypical-*nosZ* 遺伝子により発現した N<sub>2</sub>OR により消去していると推察できる。

#### 4. *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株の N<sub>2</sub>O 消去機構の推定

##### 4-1. はじめに

N<sub>2</sub>O 消去細菌スクリーニング試験で経時的に計測した結果、N<sub>2</sub>O の蓄積量が減少している培養物から分離された *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株は、強力な N<sub>2</sub>O 消去能力を示したものの N<sub>2</sub>O を資化しているかもしくは N<sub>2</sub> へと脱窒している可能性もある。そこで、*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株がどのように N<sub>2</sub>O を消去しているかを推定するためにアセチレン阻害試験を供し、脱窒によるものかそれとも別の経路によるものかを推定した。アセチレンを封入することにより N<sub>2</sub>O から N<sub>2</sub> への脱窒を行う N<sub>2</sub>OR を阻害する。N<sub>2</sub>O 量が減少しなくなることで、N<sub>2</sub>OR をコードする Typical-*nosZ* 遺伝子を検出することができる。また、PCR を行い、*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株の Typical-*nosZ* 遺伝子の検出を試みることで *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株の N<sub>2</sub>O 消去経路を推定した。

##### 4-2. アセチレン阻害試験および Typical-*nosZ* 遺伝子の検出

###### 概要および実験方法

今回、単離した N<sub>2</sub>O 消去細菌 *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株は N<sub>2</sub>O 消去経路として N<sub>2</sub>O を N<sub>2</sub> へと脱窒する経路が考えられる。N<sub>2</sub>O から N<sub>2</sub> へと脱窒する遺伝子として *nosZ* 遺伝子が確認されており、acetylene (10% (v/v)) を封入することによって、Nitrous oxide reductase (N<sub>2</sub>OR) を阻害することができる (Yoshinari and Knowles, 1976; Ryden *et al.*, 1979)。

本実験では、第 3 章と同様の培地組成で培養を行った。N<sub>2</sub>O を約 10,000 ppmv を封入し、一部の培養物には acetylene (10% (v/v)) (2.25 mL) を封入した。25°C で培養を行い、2, 3, 6 週間後のガスクロバイアルのヘッドスペースの N<sub>2</sub>O を計測した。*amoA* の系統解析は 16S rRNA のシークエンスを基に行われている (Purkhold *et al.*, 2003)。分離株における脱窒に関する *nar*, *nir*, *nor*, および *nos* 遺伝子配列の系統を比較する研究では、機能遺伝子の系統が多かれ少なかれ 16S rRNA 遺伝子の系統と一致しないことを示されている (Delorme *et al.*, 2003; Heylen *et al.*, 2007)。しかし、Jones *et al.* (2008) は、*nirS* と 16S rRNA 遺伝子配列の間の遺伝子系統発生において、より高いレベルの類似性があるという報告をした。一方で、脱窒性の *Pseudomonas* 属の間では、16S rRNA と *nosZ* の系統パターンに類似性は確認されなかった (Delorme *et al.*, 2003)。本実験では、このことを踏まえ、アセチレン阻害があった場合のことを考慮し、事前に脱窒経路を保持しているかを調べるために PCR により *nosZ* 遺伝子および *narG* 遺伝子の検出を試みた。ポジティブコントロールとして、*Pseudomonas denitrificans* NBRC 12442 を使用した。*Pseudomonas denitrificans* は Typical-*nosZ* 遺伝子を保持している代表的な脱窒細菌であるため (Scala and Kerkhof, 1998; Shapleigh, 2013)、ポジティブコントロールとして適当である。PCR 条件を Table. 2-5, Table. 2-6 に示す。

###### 結果

アセチレン封入区では、N<sub>2</sub>O の消去は確認されず、封入していない培養物では、N<sub>2</sub>O の消

去が確認された (Fig. 4-1).よって, N<sub>2</sub>O の消去は脱窒であると決定した.

また, *nosZ* および *narG* の検出結果では, Fig. 4-2 の電気泳動結果から, ポジティブコントロールである NRBC12694N ではバンドが確認され, *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株には, *nosZ* 遺伝子, *narG* 遺伝子は検出されず, ブランクでもバンドが確認されなかったことから, *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株には Typical-*nosZ* 遺伝子及び *narG* 遺伝子を持っていない (Fig. 4-2). すなわち, Typical な脱窒遺伝子を保持していないことが明らかになった.

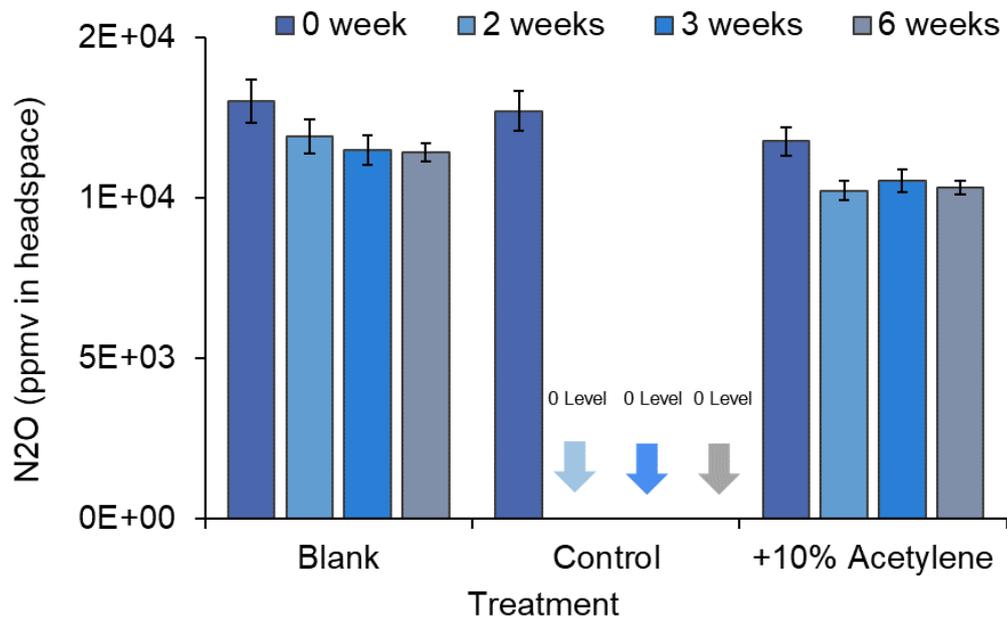


Fig. 4-1. *Chitinophaga* sp. Sacf-1 株による N<sub>2</sub>O 消去のアセチレン阻害試験  
 培養条件は Fig. 3-1 と同様. Blank: *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種せず, 培地のみであり, N<sub>2</sub>O のみを封入した培養物. Control: 10% アセチレンを封入せず, *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種した培養物. +10% Acetylene: 10% アセチレンを封入し, *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種した培養物. n=3, エラーバーは平均±SE.

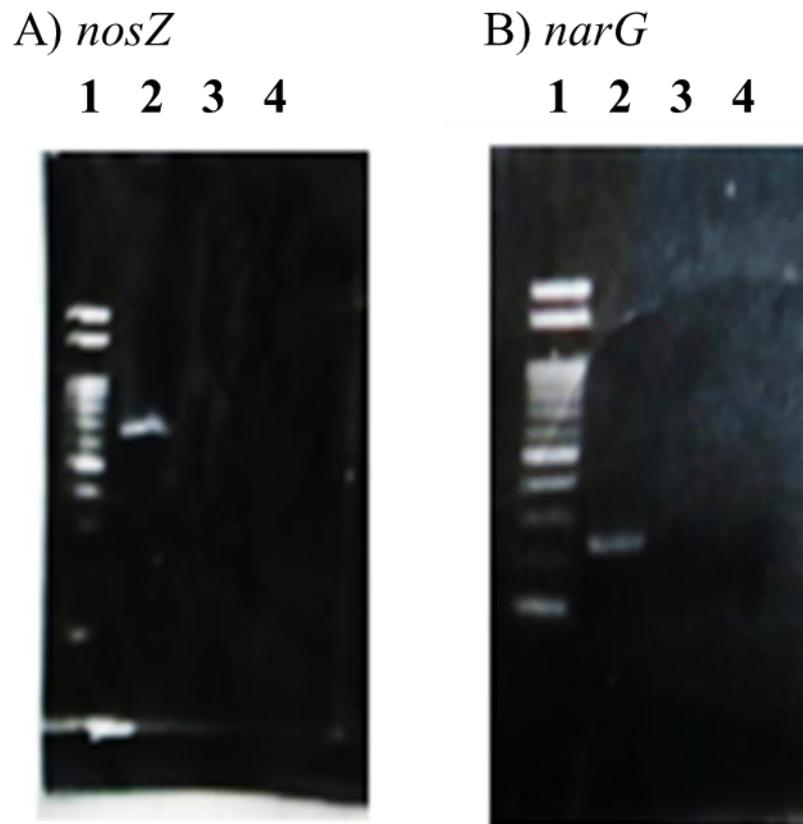


Fig. 4-2. 電気泳動による Typical-*nosZ* 遺伝子および *narG* 遺伝子の検出結果

A) *nosZ* 検出結果. B) *narG* 検出結果.

A) 1: 100-bp marker, 2: NosZ-912F および NosZ-1853R により増幅した脱窒細菌として知られる *Pseudomonas denitrificans* NBRC 12442 の PCR 産物. 3: NosZ-912F および NosZ-1853R により増幅した *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株の PCR 産物. 4: DNA テンプレートを加えず, NosZ-912F および NosZ-1853R により増幅を行った PCR 産物.

B) 1: 100-bp marker, 2: NarG-2168F および NarG-2411R により増幅した脱窒細菌として知られる *Pseudomonas denitrificans* NBRC 12442 の PCR 産物. 3: N NarG-2168F および NarG-2411R により増幅した *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株の PCR 産物. 4: DNA テンプレートを加えず, NarG-2168F および NarG-2411R により増幅を行った PCR 産物.

#### 考察

以上の実験より, アセチレン阻害試験で  $N_2O$  の消去が阻害されたことから, *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株は脱窒により  $N_2O$  を消去している可能性が高いと考えられた. しかし, *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株は Typical-*nosZ* 遺伝子を含む脱窒関連遺伝子を保持していなかった (Fig. 4-2). Atypical-*nosZ* 遺伝子を持つ微生物種は完全脱窒菌と異なり, 他の脱窒遺伝子を持

たないとされており (Sanford *et al.*, 2012), *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株も *Atypical-nosZ* 遺伝子を保持することにより,  $N_2OR$  が活発に  $N_2O$  を  $N_2$  に還元している可能性がある. *Non-denitrifier* も *Typical-nosZ* ではなく *Atypical-nosZ* 遺伝子を持っており,  $N_2O$  の生成を抑制していることが報告されている (Jones *et al.*, 2013; Hallin *et al.*, 2018). 加えて,  $N_2O$  を電子受容体として使用している可能性もあり, 呼吸系の最終的な還元酵素として働いており, この *NosZ* タンパク質の働きが *Wolinella*, *Campylobacter* および *Geobacillus* で確認されている (Payne *et al.*, 1982; Simon *et al.*, 2004; Kern and Simon, 2009; Liu *et al.*, 2008). このように  $N_2O$  を還元することでエネルギーに変換していることも明らかになっており, 完全脱窒菌と比較したとき, 硝酸呼吸におけるエネルギー効率もよいという報告もある (Sanford *et al.*, 2012). *Typical-NosZ* と *Atypical-NosZ* ではタンパク質を運搬する分泌経路が異なっている (Zumft and Kroneck, 2007). すべての *Typical-NosZ* が twin-arginine translocation (Tat) シグナルペプチドを保持している一方で, *Atypical-NosZ* は *Cloroflexi* を除き, N-terminal Sec-type シグナルペプチドを保持している. 加えて, これらのタンパク質が異なっている点として, 7つの保護された触媒銅の結合に関連するヒスチジン残基のうち, 2つから生じる (Zumft and Kroneck, 2007; Zumft, 2005). 77の *Typical-NosZ* のうち, 銅は2つのヒスチジン, DxHHxH, EPHD と結合する (Sanford *et al.*, 2012). *Atypical-NosZ* ではこれらのヒスチジンに銅の結合は確認されていない (Sanford *et al.*, 2012). すなわち, タンパク質の構造やメカニズムが異なっていることに加え, *Typical-nosZ* 遺伝子と異なり, *Atypical-nosZ* 遺伝子は多様性に富んでいることから (Hallin *et al.*, 2018), 検出するのが困難である. そのため, *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株の  $N_2O$  消去経路を同定するためには全ゲノム解析を行う必要があり, それにより本菌株が *Non-denitrifier* として非常に有望であるものとして  $N_2O$  抑制資材として有効活用できると考えられる. また, 実際に  $N_2O$  抑制資材として活用できるかを  $N_2O$  放出細菌との共培養試験や  $N_2O$  が放出されている土壌での試験を行う必要があると考えられる.

## 5. *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を用いた N<sub>2</sub>O 放出抑制試験

### 5-1. はじめに

N<sub>2</sub>O を抑制するために様々な取り組みが行われている (Dalal *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2008). 例えば、バイオチャーと呼ばれる N<sub>2</sub>O 抑制資材を土壌に散布することで pH の上昇をはかり、土壌中の C/N 比に影響を与えることにより N<sub>2</sub>O 放出を抑制する (Woolf *et al.*, 2010; Obia *et al.*, 2015). 窒素肥料の利用効率化上昇させることで、N<sub>2</sub>O の放出を抑制するという手法も取られている (Aulakh *et al.*, 1991; Mosier *et al.*, 1996). これは土壌に還元されるよりも植物体へと取り込まれる方が多いことを利用し、N<sub>2</sub>O 放出速度を低減かつ硝化を阻害することで N<sub>2</sub>O 放出を抑制している (Freney, 1997). また、農薬を添加することで N<sub>2</sub>O の放出が抑制されていることも報告されている (Li *et al.*, 2014). しかし、農薬のような有機化合物を散布することで、土壌微生物の多様性を喪失したり、有機化合物が土壌中に残留したりと様々な問題が生じている (Stolte *et al.*, 2016. Silva *et al.*, 2018). 他の手法を使用することが求められている. 根粒菌を用いて N<sub>2</sub>O の放出を抑制するという手法が開発されているように (Akiyama *et al.*, 2016), N<sub>2</sub>O の放出を抑制する微生物はますます注目を集めている (Hallin *et al.*, 2018).

したがって、*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株が新たな N<sub>2</sub>O 抑制資材として利用できるかを検証した.

### 5-2. *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株の農薬に対する応答

#### 概要および実験方法

農薬が添加された土地での影響を想定し、*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株に対し、Bipyridine 系農薬である Paraquat (Fig. 5-1A), Diquat (Fig. 5-1B), Tropolone (Fig. 5-1C)をそれぞれ終濃度 3 区間 (1.0 μM, 10.0 μM, 100.0 μM)設定したものをソフトゲル培地に添加し、N<sub>2</sub>O 消去の応答を調査した.

農薬を上記 3 区間の終濃度になるよう DMSO で調整した. Winogradsky's 無機塩無窒素培地を基本培地とし、上記 3 区間の農薬終濃度の異なる培地を使用した. ゲルマトリックスには、0.5% (w/v)ジェランガムを用いた. 接種菌体 OD<sub>660</sub> を 0.6 に統一し、25°C で 3 日、6 日と経時的にヘッドスペースに注入した N<sub>2</sub>O (約 10,000 ppmv)の残量をガスクロマトグラフィーにより計測した.

#### 結果

Paraquat を添加した培地での *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株の N<sub>2</sub>O 消去能は、コントロールと変わらず大きな抑制は確認できなかったが、3 日目の N<sub>2</sub>O 残量をコントロールと比較すると N<sub>2</sub>O 消去の促進が確認された (Fig. 5-2). Diquat 処理区では、100 μM で 3 日目まで有意に N<sub>2</sub>O 消去能が抑制されているのが確認できたが、6 日目では有意な差は確認されなかった (Fig. 5-3). Tropolone 処理区では、0 μM まで大きな変化は確認できなかったが、100 μM

の処理区では、3日目、6日目に大きな抑制効果が確認された (Fig. 5-3).

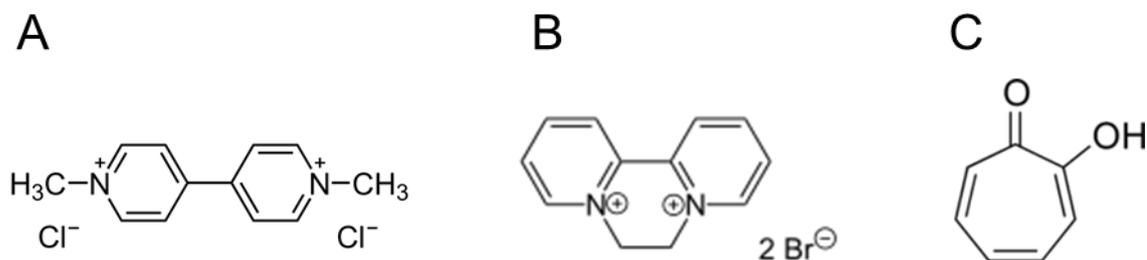


Fig. 5-1. 農薬試験における使用化合物の構造  
A) Paraquat の構造, B) Diquat の構造, C) Tropolone の構造.

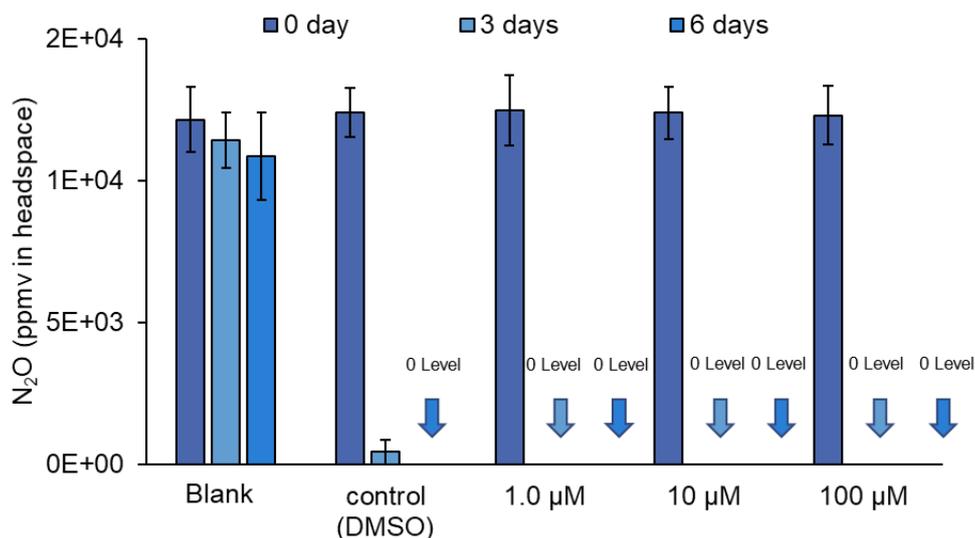


Fig. 5-2. Paraquat 添加による  $\text{N}_2\text{O}$  消去能の評価

Winogradsky's 培地に 1.0, 10, 100  $\mu\text{M}$  の Paraquat を添加した培地で *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を培養し、25°C暗所で培養を行った。Blank: *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種せず、Paraquat も添加していない培養物。control (DMSO): *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種し、Paraquat の溶媒である DMSO のみを添加した培養物。1.0  $\mu\text{M}$ : *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種し、Paraquat 1.0  $\mu\text{M}$  を添加した培養物。10  $\mu\text{M}$ : *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種し、Paraquat 10  $\mu\text{M}$  を添加した培養物。100  $\mu\text{M}$ : *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種し、Paraquat 100  $\mu\text{M}$  を添加した培養物。n=3, エラーバーは平均±SE.

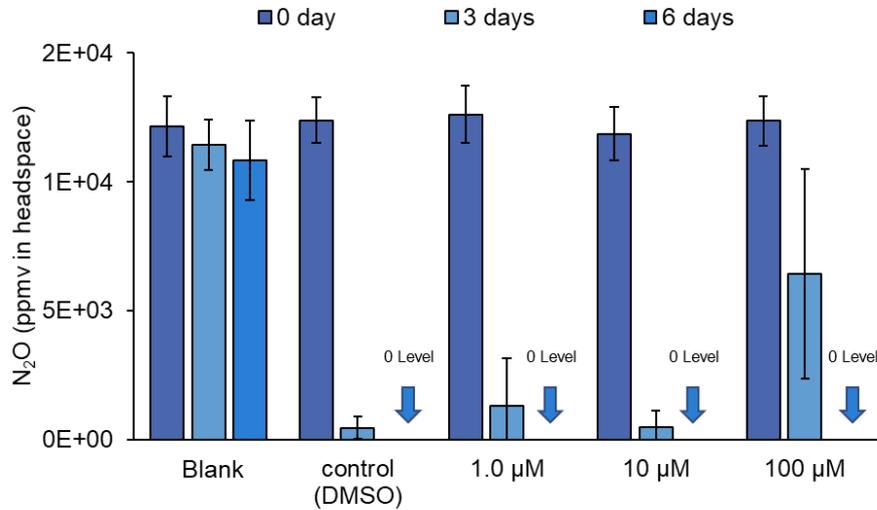


Fig. 5-3. Diquat 添加による N<sub>2</sub>O 消去能の評価

Winogradsky's 培地に 1.0, 10, 100 μM の Diquat を添加した培地で *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を培養し、25°C暗所で培養を行った。Blank: *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種せず、Diquat も接種していない培養物。control (DMSO): *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種し、Diquat の溶媒である DMSO のみを添加した培養物。1.0 μM: *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種し、Diquat 1.0 μM を添加した培養物。10 μM: *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種し、Diquat 10 μM を添加した培養物。100 μM: *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種し、Diquat 100 μM を添加した培養物。n=3, エラーバーは平均±SE.

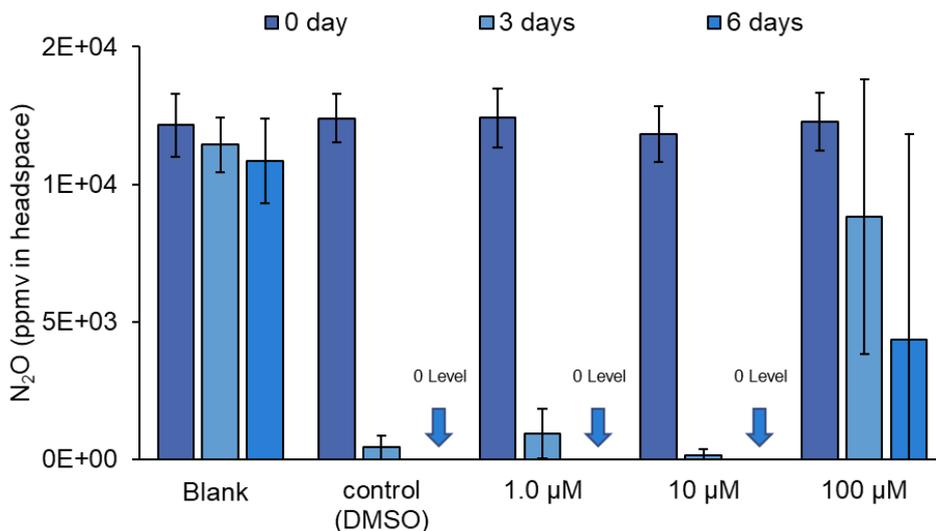


Fig. 5-4. Tropolone 添加による N<sub>2</sub>O 消去能の評価

Winogradsky's 培地に 1.0, 10, 100 μM の Tropolone を添加した培地で *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を培養し、25°C暗所で培養を行った。Blank: *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種せず、

Tropolone も接種していない培養物. control (DMSO): *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種し, Tropolone の溶媒である DMSO のみを添加した培養物. 1.0  $\mu$ M: *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種し, Diquat 1.0  $\mu$ M を添加した培養物. 10  $\mu$ M: *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種し, Tropolone 10  $\mu$ M を添加した培養物. 100  $\mu$ M: *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種し, Tropolone 100  $\mu$ M を添加した培養物. n=3, エラーバーは平均 $\pm$ SE.

### 5-3. N<sub>2</sub>O 放出細菌 *Pseudomonas* sp. 15-6d 株と N<sub>2</sub>O 消去細菌 *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株との共培養における N<sub>2</sub>O 放出の抑制効果の検証

#### 概要および実験方法

本実験では, N<sub>2</sub>O 消去細菌である *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株と N<sub>2</sub>O 放出株 *Pseudomonas* sp. 15-6d 株との共培養試験を行い, *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株が N<sub>2</sub>O 放出抑制資材として有用で  
きるかを検証した.

窒素源として KNO<sub>3</sub>, 5 mM となるように調整したもので試験を行った. 本実験も Winogradsky's ジェランガムソフトゲル培地 (pH 8.5)を使用し, 菌体 OD<sub>660</sub> =0.3 で統一し, ヘッドスペースを統一するため, 菌体懸濁液の合計が 100  $\mu$ L になるように調整した. 共培養においては, OD<sub>660</sub>=0.6 の菌体懸濁液を用い, それぞれ 50  $\mu$ L ずつ接種した. 25°C暗所静置条件で2週間培養し, ガスクロバイアル内の N<sub>2</sub>O 濃度を計測した.

#### 結果

*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株は N<sub>2</sub>O 放出が確認されず, *Pseudomonas* sp. 15-6d 株からは約 2000 ppmv の N<sub>2</sub>O が検出された. また, *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株と *Pseudomonas* sp. 15-6d 株の共培養ではわずかに抑制されたように計測されたが, 有意な差が見られる抑制効果は確認されなかった (Fig. 5-5).

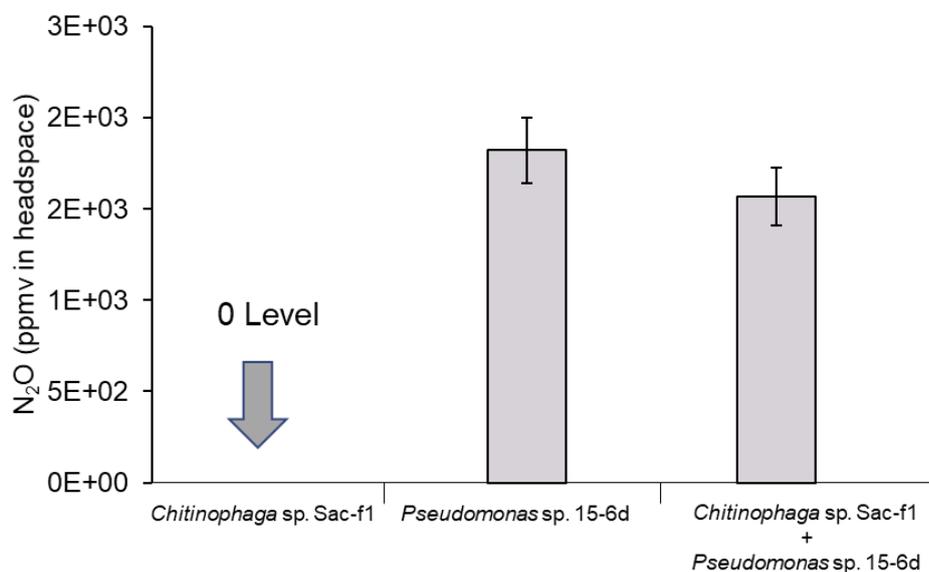


Fig. 5-5. N<sub>2</sub>O 消去細菌 *Chitinophaga sp. Sac-f1* と N<sub>2</sub>O 放出細菌 *Pseudomonas sp. 15-6d* の共培養による N<sub>2</sub>O 放出量

Winogradsky's 培地を基本培地とし、*Chitinophaga sp. Sac-f1* 株もしくは N<sub>2</sub>O 放出細菌 *Pseudomonas sp. 15-6d* また両細菌種を接種量 100 μL になるように加え、25°C 暗所で 2 週間培養を行い、N<sub>2</sub>O 放出量を計測した。*Chitinophaga sp. Sac-f1*: *Chitinophaga sp. Sac-f1* をのみを接種した培養物。*Pseudomonas sp. 15-6d*: *Pseudomonas sp. 15-6d* をのみを接種した培養物。*Chitinophaga sp. Sac-f1*+*Pseudomonas sp. 15-6d*: *Chitinophaga sp. Sac-f1* および *Pseudomonas sp. 15-6d* を接種した培養物。n=3, エラーバーは平均±SE.

#### 5-4. N<sub>2</sub>O 放出黒ボク土壌での抑制試験

##### 概要および実験方法

*Chitinophaga sp. Sac-f1* 株が強力な N<sub>2</sub>O 消去能を有していることが第 4 章までで確認することができた。この試験においては、N<sub>2</sub>O 放出が確認されている北海道大学附属静内圃場黒ボク土壌の懸濁液を用い、抑制することができるかどうかを検証した。

本実験も同様の培地組成、培養条件を使用した。黒ボク土壌は 10 mL の滅菌水に約 5 mg 懸濁し、その上澄み液をこの試験で使用した。菌体と土壌懸濁液の添加量の合計が 100 μL になるように調整し、ガスクロバイアル内のヘッドスペースの容量を統一し、25°C で 2 週間、培養した。その後、N<sub>2</sub>O 消去後における培養物中で *Chitinophaga sp. Sac-f1* が優占しているかを DGGE により黒ボク土壌そのものとの菌叢を比較することで確認した。

また、使用する黒ボク土壌の菌叢解析を行い、土壌中にはどれほどの *Chitinophagaceae* がどれほどいるかを検証した。黒ボク土壌に対して DNA Isolation Kit ISOIL Large for Beads ver.2 (株式会社ニッポンジーン)を用い、DNA 抽出を行い、次世代シーケンサーにより、菌叢解

析を行った。

## 結果

*Chitinophaga* sp. Sac-f1 は N<sub>2</sub>O の放出が確認されず、土壤懸濁液を接種した培養物からは約 1,000 ppmv の N<sub>2</sub>O が放出された (Fig. 5-6)。 *Chitinophaga* sp. Sac-f1 と土壤懸濁液との共培養試験では、N<sub>2</sub>O の放出が抑制されたかのように見えたが統計的には有意な差が確認することができなかった。

培養後における *Chitinophaga* sp. Sac-f1 が共培養しているかを確認したところ、土壤懸濁液との共培養においても、2 週間の培養では、優占していた (Fig. 5-7)。

次世代シーケンサーによる菌叢解析の結果、*Chitinophagaceae* は存在が確認された (Fig. 5-8)。しかし、Family レベルでの優占率は 1%未満であった。

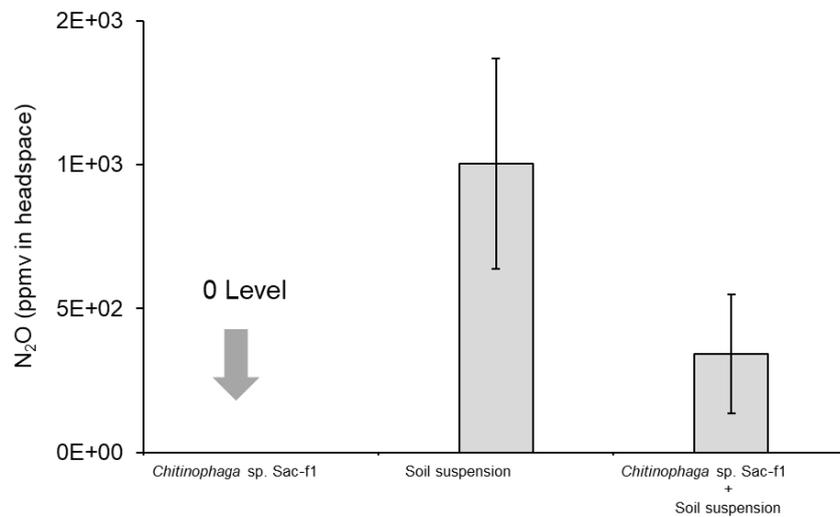


Fig. 5-6. N<sub>2</sub>O 放出黒ボク土壌での抑制試験

Winogradsky's 培地を基本培地とし、*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株もしくは黒ボク土壌懸濁液また両方を接種量 100  $\mu$ L になるように加え、25°C暗所で2週間培養を行い、N<sub>2</sub>O 放出量を計測した。*Chitinophaga* sp. Sac-f1: *Chitinophaga* sp. Sac-f1 をのみを接種した培養物。Soil suspension: 黒ボク土壌懸濁液のみを接種した培養物。*Chitinophaga* sp. Sac-f1+Soil suspension: *Chitinophaga* sp. Sac-f1 および黒ボク土壌懸濁液を接種した培養物。n=3, エラーバーは平均 $\pm$ SE.

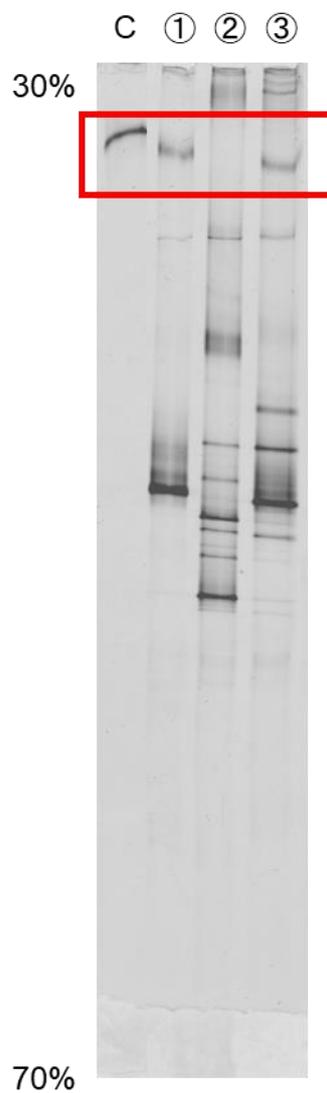


Fig. 5-7. 北海道大学附属静内圃場黒ボク土壌懸濁液と *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株  
共培養後の DGGE

Fig. 5-6 で確認した培養物を 341F-gc, 806R のプライマーで増幅し，アクリルアミド 6%，30%-70%の変性剤濃度勾配ゲルで，100 V，16 時間，60°Cで泳動した．SYBR Green I で 30 分間染色し，ゲル撮影装置で撮影した．C は Control を表し，数字は培養条件を示す．①*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株のみで培養，②黒ボク土壌懸濁液のみで培養，③*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株および黒ボク土壌懸濁液の共培養．枠線で囲まれたバンドは *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を示す．

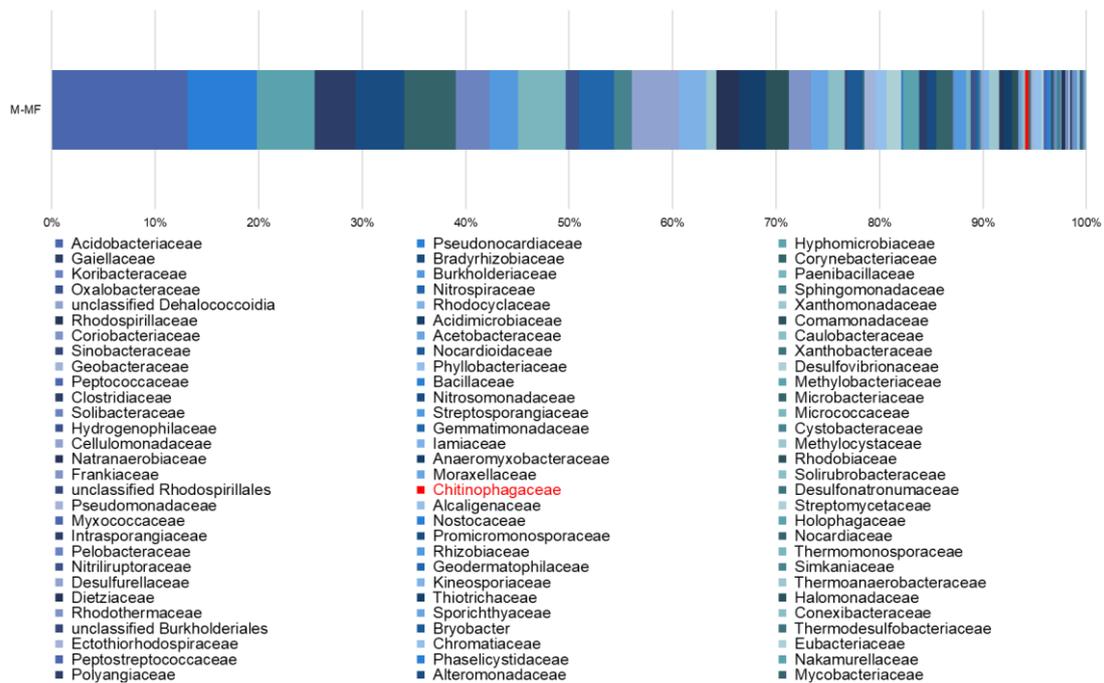


Fig. 5-8. 次世代シーケンサーによる北海道大学附属静内圃場黒黒ボク土壌の Family レベルでの菌叢解析  
 黒ボク土壌, MF : SHD W1 MF 0-10 cm から DNA Isolation Kit ISOIL Large for Beads ver.2 を  
 用いた菌叢解析結果. (■) Chitinophagaceae を示す. リード数は 16169 reads

## 5-6. *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を黒ボク土壌へ接種時における抑制効果の検証 概要および実験方法

本実験では、N<sub>2</sub>O 放出が確認されている北海道大学附属静内圃場黒ボク土壌そのものに N<sub>2</sub>O 消去細菌 *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を添加し、ソフトゲル培地だけでなく、黒ボク土壌でも抑制することができるかを検証した。

まず、土壌中の菌体の影響を除き、土壌中の成分で N<sub>2</sub>O を消去できるかを検証した。北海道大学附属静内圃場黒ボク土壌を 121°C, 20 min, オートクレーブにかけ、土壌中の菌体を滅菌し、OD<sub>660</sub> =0.3 の *Chitinophag* sp. Sac-f1 株を 100 μL を滅菌土壌 10 g に添加した。一度だけの高圧加湿滅菌だけでは土壌中の芽胞までを滅菌することができていないが、ほぼ滅菌されている。また、*Chitinophag* sp. Sac-f1 株が十分に生育できない可能性を踏まえ、培養条件として、A: 窒素源および炭素源なし、B: 窒素源 (KNO<sub>3</sub>, 5 mM), 炭素源なし、C: 窒素源なし、炭素源 (sucrose 0.5% (w/v)), D: 窒素源 (KNO<sub>3</sub>, 5 mM), 炭素源 (sucrose, 0.5% (w/v)) を設定した。その後、ガスクロバイアルのヘッドスペースに N<sub>2</sub>O ガスを約 10,000 ppmv を注入した。1 週間後のヘッドスペースの N<sub>2</sub>O 濃度をガスクロマトグラフィーにより用いて計測した。

また、ほぼ滅菌された土壌での培養だけではなく、実際には多様な細菌が存在している中で N<sub>2</sub>O の放出を抑制しているかを検証する必要がある。ほぼ滅菌された土壌だけではなく、非滅菌土壌で実験室レベルではあるが黒ボク土壌そのものに *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を 100 μL, 200 μL, 300 μL, 400 μL, 500 μL 接種し、十分に抑制できる菌体量の確認を行った。

その後、適正な菌体量を黒ボク土壌に接種し、ほぼ滅菌した黒ボク土壌と同様の培養条件を設定し、ガスクロバイアルのヘッドスペースに N<sub>2</sub>O を約 10,000 ppmv を注入した。1 週間後のヘッドスペースの N<sub>2</sub>O 濃度をガスクロマトグラフィーにより用いて計測した。Control の培養物として、*Chitinophaga* sp. Sac-f1 を接種していない黒ボク土壌も同時に培養した。

本実験では黒ボク土壌の密度を 1.0 g/L と仮定し、実験を進めた。*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を PD 培地に添加し、バッフルで振盪 80 rpm, 25°C で培養し、1 週間後、50 mL のファルコンチューブで菌体を回収し、滅菌水に溶かし OD<sub>660</sub> =0.3 に統一した。

## 結果

ほぼ滅菌した土壌での培養は土壌成分でのみだけでも十分に N<sub>2</sub>O の消去を行うことが確認でき、どの培養物においても N<sub>2</sub>O の消去が N<sub>2</sub>O 注入初日と比較し、有意に N<sub>2</sub>O を消去していることが確認された ( $p < 0.01$ ) (Fig. 5-9).

添加物なし場合において、黒ボク土壌で培養を供したとき、100 および 200  $\mu$ L の接種では減少している培養物も存在していたが、安定的に抑制していなかったため、有意に抑制しているとは統計的に示すことができなかった (Fig. 5-10). しかし、黒ボク土壌に対し、300  $\mu$ L 以上の接種することで 0 レベルまで抑制することができた. すなわち、非滅菌土壌に対しては 300  $\mu$ L の接種が適当であると考えられた.

非滅菌土壌での最初から N<sub>2</sub>O を封入した場合においては、多量に N<sub>2</sub>O が存在しているためか *Chitinophaga* sp. Sac-f1 を接種していない条件であっても N<sub>2</sub>O の消去が活発的に行われており、7 日目における N<sub>2</sub>O の消去はどの条件においても有意に消去していることが確認された ( $p < 0.01$ ) (Fig. 5-11).

*Chitinophaga* sp. Sac-f1 を接種している場合においても、どの培養条件においても有意に N<sub>2</sub>O の消去が行われていることが確認された ( $p < 0.01$ ) (Fig. 5-12). しかしながら、どの培養条件も *Chitinophaga* sp. Sac-f1 を接種していない場合と比較したとき、有意に抑制はしていなかった.

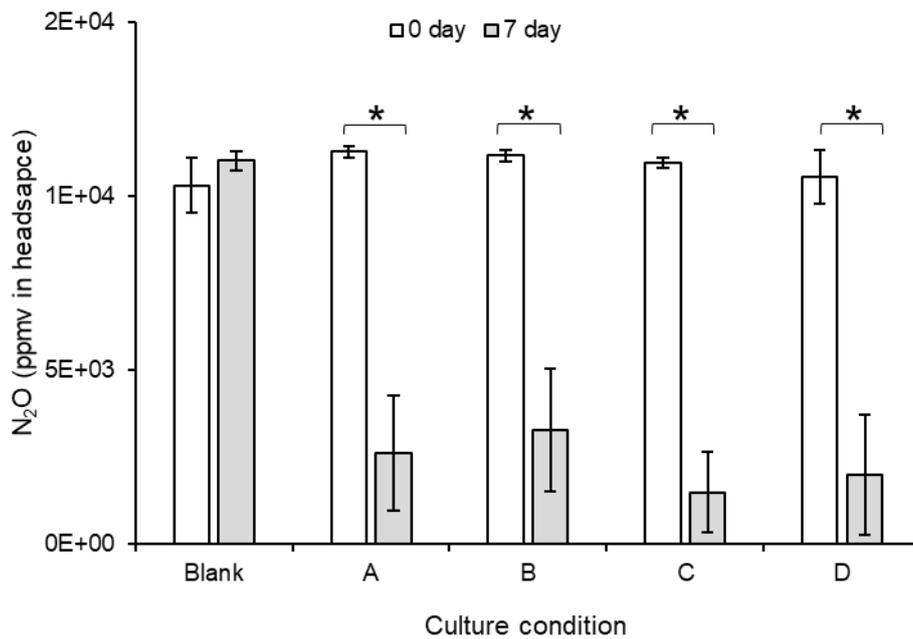


Fig. 5-9. ほぼ滅菌した黒ボク土壌中での *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株の N<sub>2</sub>O 消去  
 ほぼ滅菌した黒ボク土壌に *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種し、N<sub>2</sub>O を約 10,000 ppmv を封入し、1 週間 25℃暗所で培養を行った。各アルファベットは培養条件を示す。A: 窒素源および炭素源なし、B: 窒素源 (KNO<sub>3</sub> 5 mM)、炭素源なし、C: 窒素源なし、炭素源 (sucrose 0.5% (w/v))、D: 窒素源 (KNO<sub>3</sub> 5 mM)、炭素源 (sucrose 0.5% (w/v))。n=3, エラーバーは平均 ±SE。\*T 検定による p-value < 0.01

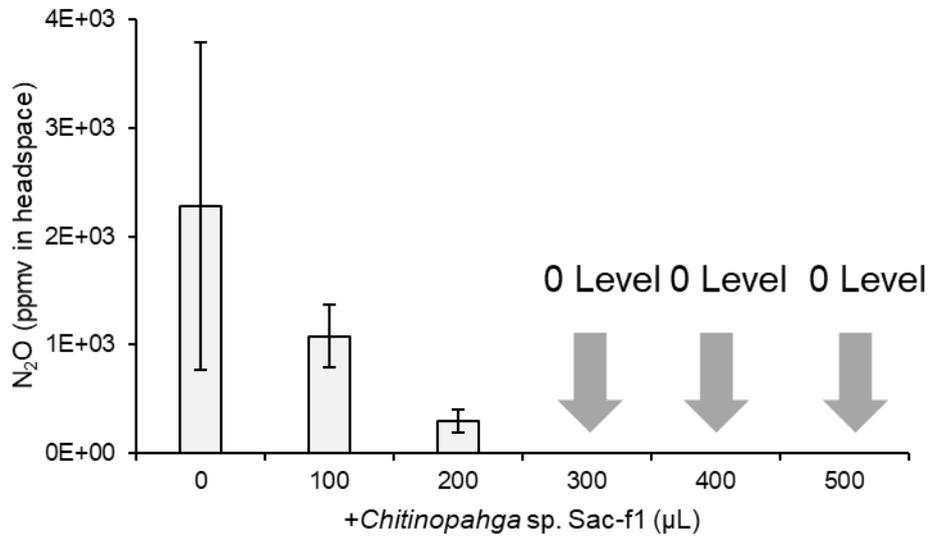


Fig. 5-10. 黒ボク土壌における *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種時における N<sub>2</sub>O 放出抑制効果

黒ボク土壌に *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種し、1 週間 25°C 暗所で培養を行った。横軸は *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株の接種量を示す。n=3, エラーバーは平均±SE.

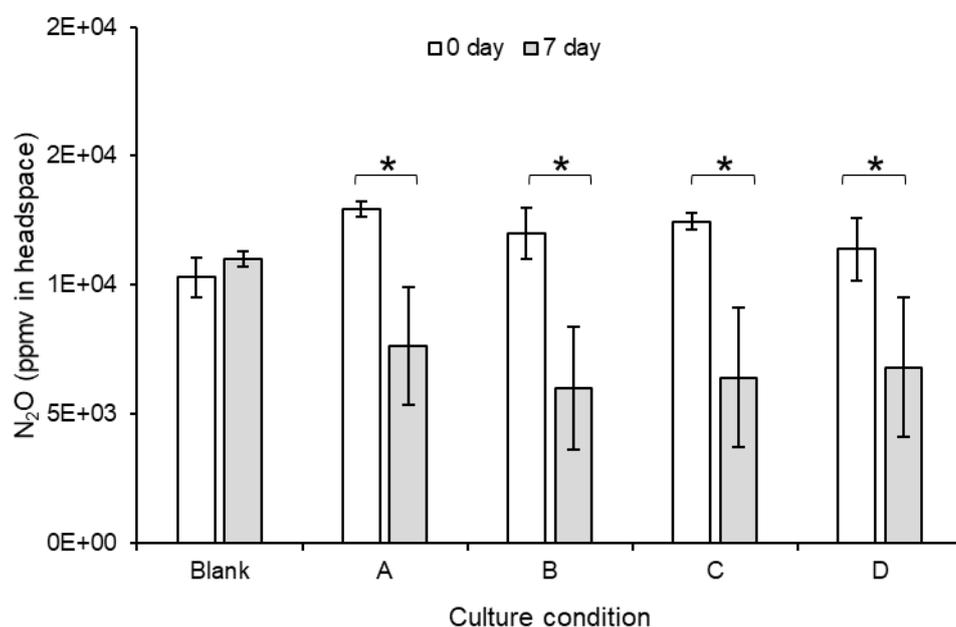


Fig. 5-11. 黒ボク土壌のみの培養による N<sub>2</sub>O 消去

黒ボク土壌に *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種し、1 週間 25°C 暗所で培養を行った。各アルファベットは培養条件を示す。A: 窒素源および炭素源なし, B: 窒素源 (KNO<sub>3</sub> 5 mM), 炭素源なし, C: 窒素源なし, 炭素源 (sucrose 0.5% (w/v)), D: 窒素源 (KNO<sub>3</sub> 5 mM), 炭素源 (sucrose 0.5% (w/v)). n=3, エラーバーは平均±SE. \*T 検定による p-value < 0.01

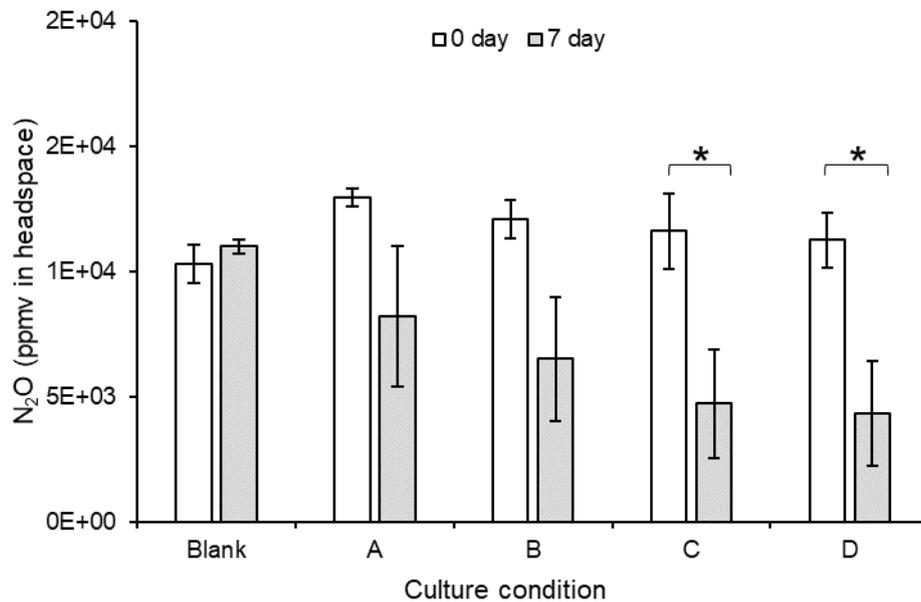


Fig. 5-12. 黒ボク土壌および *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株培養による N<sub>2</sub>O 消去  
 黒ボク土壌に *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を接種し、1 週間 25°C 暗所で培養を行った。各アルファベットは培養条件を示す。A: 窒素源および炭素源なし, B: 窒素源 (KNO<sub>3</sub> 5 mM), 炭素源なし, C: 窒素源なし, 炭素源 (sucrose 0.5% (w/v)), D: 窒素源 (KNO<sub>3</sub> 5 mM), 炭素源 (sucrose 0.5% (w/v)). n=3, エラーバーは平均±SE. \*T 検定による p-value < 0.01

## 考察

以上の実験より、農薬のような有機化合物が *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株の N<sub>2</sub>O 消去能を亢進または阻害することおよび黒ボク土壌中でも N<sub>2</sub>O の放出を抑制できると決定することができた。

本章の結果、*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株は Paraquat 処理区で、N<sub>2</sub>O の消去が促進されたことから培地中で電子が奪われることにより、消去能が活性化した可能性が推察される。または、電子奪った際に生じるラジカルからイオンに戻る際に生じる活性酸素により、消去能が活性化された可能性がある。この仮説を立証するために、他の電子伝達阻害系の農薬で追試を行うべきだと考える。

Diquat 処理区では、コントロールに比べ大きな変化が確認できず、100 μM において3日目の N<sub>2</sub>O 消去量が少なかったが、6日目には完全に消去していることが確認できたため、*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株の N<sub>2</sub>O 消去能に大きな影響がないものと考えられる (Fig. 5-2)。Bipyridine 系の農薬が消去能に関与しない可能性が示唆されたため、同様の Bipyridine 系の農薬を用いて追試験を行う必要があると考えられる。

Tropolone は農薬ではないが、*Burkholderia plantarii* が産生する物質であり、イネ苗立枯れ病の原因物質であるが (Coenye and Vandamme, 2003; Azegami *et al.*, 1985), 10 μM まではコントロールと有意な差が確認できなかったが、100 μM では3日目、6日目で有意な阻害効果が確認された。このことから Tropolone がイネ苗立枯れ病を引き起こすだけでなく、N<sub>2</sub>O 消去阻害に関与することが示唆された。

無機窒素代謝に関連する酸化還元酵素は、農薬に対する反応に特異的であることが多い。鉄含有ヘム依存性シトクロム c を不活性化するトロポロンまたはオキシドレダクターゼを含む鉄硫黄クラスターは、*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株による N<sub>2</sub>O 消去による比較的高い抑制を示した。

黒ボク土壌中では、わずかながら *Chitinophagaceae* の存在が確認でき (Fig. 5-8), *Chitinophagaceae* の N<sub>2</sub>O 消去能が上昇し、強く抑制されたと考えられる。

*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株は、N<sub>2</sub>O の放出が確認されなかったことから、脱窒経路を保持していないと考えられ、脱窒経路以外で N<sub>2</sub>O を消去している可能性が高いと考えられる。北海道大学附属静内圃場黒ボク土壌の懸濁液では、N<sub>2</sub>O の放出が確認できず、黒ボク土壌の N<sub>2</sub>O 放出要因は脱窒菌が主要だと考えられる。共培養時には、黒ボク土壌培養時に比べ有意に消去していることが確認でき、*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株が黒ボク土壌に対して N<sub>2</sub>O 放出の抑制効果が十分に期待できると考えられる。

また、DGGE 法により、*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株のバンドを確認できたが、黒ボク土壌中では主要な細菌ではないということが考えられる。黒ボク土壌との共培養では、バンドが薄くなっているものの存在を確認することができたが、薄くなっているということを考慮すると長期間の培養を視野に入れたとき、抑制効果が弱くなるということが予想される。そのため、長期間での抑制効果を検証する必要があると考えられる。

滅菌土壌での培養は、添加物の有無にかかわらず、有意に  $N_2O$  を消去していることが確認でき、各培養条件で有意な差が確認できなかった (Fig. 5-9). このことは *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株の  $N_2O$  消去能力を阻害する物質が存在している可能性が低いと考えられる. 土壌に *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株 ( $OD_{660}=0.3$ ) $300 \mu l$  以上接種した場合に安定的に  $N_2O$  を抑制したが (Fig. 5-10), 始めから高濃度の  $N_2O$  がヘッドスペースに存在しているとき, *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株の接種の有無にかかわらず, 減少していくことが確認できたが (Fig. 5-11, 12), この接種の違いによる有意差は確認できなかった.  $N_2O$  は簡単に拡散していくということもあり, 安定的に  $N_2$  に還元することができないとの報告があり (Webster and Hopkins, 1996), さらに  $N_2O$  の放出量は  $N_2$  への還元に影響を及ぼすことも報告されている (Elmi *et al.*, 2003). すなわち, このことから  $N_2O$  が高濃度に存在していたために,  $N_2O$  を放出する脱窒細菌よりも  $N_2O$  を還元していく作用が強く働いたと考えられる.

しかし, *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株は  $N_2O$  放出を十分に抑制できることが  $N_2O$  放出細菌との共培養試験, 黒ボク土壌への接種試験により明らかになっていることもあり, 実際に黒ボク土壌に添加しても大きく生態系を崩さないと考えられる (Fig. 5-12). 北海道の黒ボク土壌においては,  $N_2O$  放出抑制資材として有用と考えられるが, 実際に圃場へ接種したときに Fig. 5-12 のように抑制効果を示さない可能性もあるため,  $N_2O$  消去活性を高める手法も検討する必要があると考えられる.

## 6. フィンランド・パルサ丘陵地における N<sub>2</sub>O 放出

### 6-1. はじめに

永久凍土は気候変動の影響を受けやすく、どれくらい地球温暖化が進んでいるかを知る指標となっている (Romanovsky *et al.*, 2002). 実際にフィンランドにあるパルサ丘陵地の永久凍土が溶けているという報告がある (Luoto and Seppälä, 2003; Fronzek *et al.*, 2006). パルサは、泥炭と土壌コアが永久に凍結することで形成される地形である (Seppälä, 2006).

永久凍土地帯においても N<sub>2</sub>O の放出が報告されている (Marushchak *et al.*, 2011; Elberling *et al.*, 2010). 永久凍土の中にも、脱窒細菌の存在が確認されている (Hultman *et al.*, 2015). 永久凍土が溶けた地点では、溶けていない地点よりも脱窒細菌のバイオマスが多いことが報告されている (Sharma *et al.*, 2006). 永久凍土のツンドラ気候において、N<sub>2</sub>O の放出量と脱窒細菌群のバイオマス量には正の相関があることが報告されている (Palmer *et al.*, 2012). さらに、脱窒細菌の中には N<sub>2</sub>O 還元酵素 (N<sub>2</sub>OR) をコードする遺伝子、*nosZ* が欠けているものがあるため、N<sub>2</sub>O が加速的に放出される (Zumft, 1997). 永久凍土においては、この遺伝子の量が少ないことが報告されている (Palmer *et al.*, 2012). N<sub>2</sub>OR が欠いている細菌群のバイオマスが増えるにつれて、N<sub>2</sub>O 放出量が増えていることも報告されている (Philippot *et al.*, 2011). N<sub>2</sub>O の放出量は、*nosZ* を含む脱窒遺伝子とその細菌群が強く関わっており、これらのメカニズムは将来的に N<sub>2</sub>O 放出抑制に役に立つと考えられている (Graf *et al.*, 2014).

土壌 pH は土壌細菌叢を変化させる (Lauber *et al.*, 2009). 加えて、農場での実験において、土壌 pH は一部の脱窒細菌群のバイオマスに影響を与えていることが報告されている (Čuhel *et al.*, 2010). 高 pH では、N<sub>2</sub>OR を持つ細菌群が増加することにより、N<sub>2</sub>O の放出量が減少することも報告されている (Philippot *et al.*, 2009). 加えて、酸性条件よりも中性にした方がコミュニティに多様性があり、pH を変えることによりパルサでの新規脱窒細菌の検出もしやすくなる (Palmer *et al.*, 2012). 酸性、中性、アルカリ性に pH を変え、細菌叢を調べることにより、パルサにおける N<sub>2</sub>O 抑制に関する脱窒細菌種を見出すことができる.

低 pH 条件では N<sub>2</sub>O の放出が活発になる (Stevens *et al.*, 1998). これは N<sub>2</sub>OR が低 pH 条件で活性が落ちるため、N<sub>2</sub>O は N<sub>2</sub> に還元されず、大気中に放出される (Stevens *et al.*, 1998). 溶けつつあるパルサも低 pH であることから (Pengerud *et al.*, 2013), N<sub>2</sub>O の放出の一因であると考えられる. 逆に高 pH 条件では、N<sub>2</sub>OR が十分に機能し、N<sub>2</sub>O の放出は抑制される (Zou *et al.*, 2016). このことを利用し、土壌を高 pH にすることによって、熱帯における酸性土壌での N<sub>2</sub>O 放出を抑制している (Obia *et al.*, 2015).

本研究では、溶解しつつあるパルサから放出される N<sub>2</sub>O は pH を変化させることにより抑制できると予想した. N<sub>2</sub>O の放出が最も活発なサンプルで本研究を行うために、土地の高さの勾配を取り、N<sub>2</sub>O の放出と微生物群集の調査を試みた. 永久凍土の溶解はパルサ崩壊を生じたとき、低 pH 土壌 (pH 3.4-4.6) (Marushchak *et al.*, 2011; Pengerud *et al.*, 2013; Palmer *et al.*, 2012) が周りにある池の pH (pH 4.8, pH 5.58, 6.28 at Laasa, pH 5.63 at Peera, pH 5.25 at Iitto) に近づき (Marushchak *et al.*, 2011; Haraguchi, A., unpublished data, 2015), pH が変化する. し

たがって、土壌懸濁液を接種した培地 pH を変化させることによりその影響を推測した。N<sub>2</sub>O の放出が多く認められた培養物と少量な培養物の微生物群集を解析することにより、パルサにおける N<sub>2</sub>O 放出に関わる微生物群集の役割の解明を目指した。

## 6-2. パルサにおける N<sub>2</sub>O 放出量測定

### 概要および実験方法

N<sub>2</sub>O の放出状況を知るために、サンプリングサイト、Peera-1 (N 68°53'03.98" E 021°03'15.50"), Peera-2 (N 68°53'05.18" E 021°03'07.11"), Iitto (N 68°43'26.76" E 021°25'19.85"), Kiljusuo (N 68°42'41.64" E 021°25'18.38")におけるパルサで土地の高さの勾配を取り、各プロットの土壌を採取した (Fig. 6-1, 2, 3, 4, 5)。また、パルサにおける pH の影響を確かめるために酸性から塩基性まで処理区を設定し、検証した。

培地組成および培養条件は第3章と同様である。pH を9区 (4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5)設定することでスクリーニングを反復数3で行った。作成した培地 10 ml をガスクロバイアルに入れ、各サンプリング地点の土壌 5 mg を滅菌水 10 mL に懸濁し、土壌懸濁液を作成し、100 μL を培地に接種し、2週間後、ガスクロマトグラフィーによりガスクロバイアルのヘッドスペースの N<sub>2</sub>O 濃度を測定した。



Fig. 6-1. フィンランド、キルピスヤルビのパルサ崩壊地サンプリング地点  
赤矢印はサンプリングを行ったパルサ丘陵地 (N69°2' E20°48')を示す。

### 結果

パルサ土壌 Peera-1, Peera-2, Iitto, Kiljusuo を培養し N<sub>2</sub>O 放出量を測定したその結果、

Peera-1 では、Plot 1~Plot 3 (パルサの未崩壊地点)に、大量の N<sub>2</sub>O 放出が確認されることはなかったが、Plot 4 (半崩壊地)では他のプロット地点と比較し、N<sub>2</sub>O の累積残留量が確認された (Fig. 6-6). Plot 5 (完全崩壊地)では、Plot 4 と同レベルの N<sub>2</sub>O の放出が確認された (Fig. 6-6). さらに強酸性、強塩基条件下で強い活性が示されたが、pH 8.0 では全く N<sub>2</sub>O の放出が確認されなかった (Fig. 6-6).

Peera-2 では、Plot 1, Plot 2 で強い N<sub>2</sub>O 放出活性が確認されなかったが、Plot 3 (完全崩壊地)では、他の地点に比べて強い活性を示した (Fig. 6-7).

Iitto では、未崩壊地点から完全崩壊地点にかけて、Peera に比べて強い N<sub>2</sub>O 放出活性が確認されなかった (Fig. 6-8).

Kiljusuo では、Plot 3 (完全崩壊地点) よりも Plot 1 (未崩壊地点)で N<sub>2</sub>O 放出活性が強かった (Fig. 6-9). さらに、塩基性条件下で強い N<sub>2</sub>O 放出活性が示されず、酸性条件下でのみ N<sub>2</sub>O の放出活性が確認された.

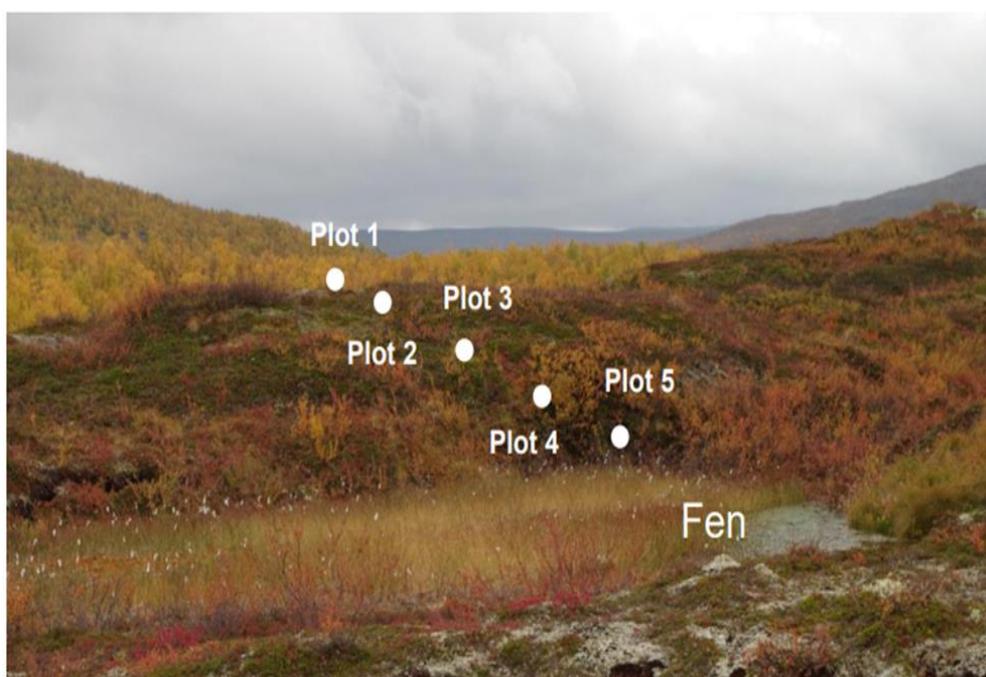


Fig. 6-2. フィンランド土壌サンプリングサイト  
Peera-1 (N 68°53'03.98" E 021°03'15.50")

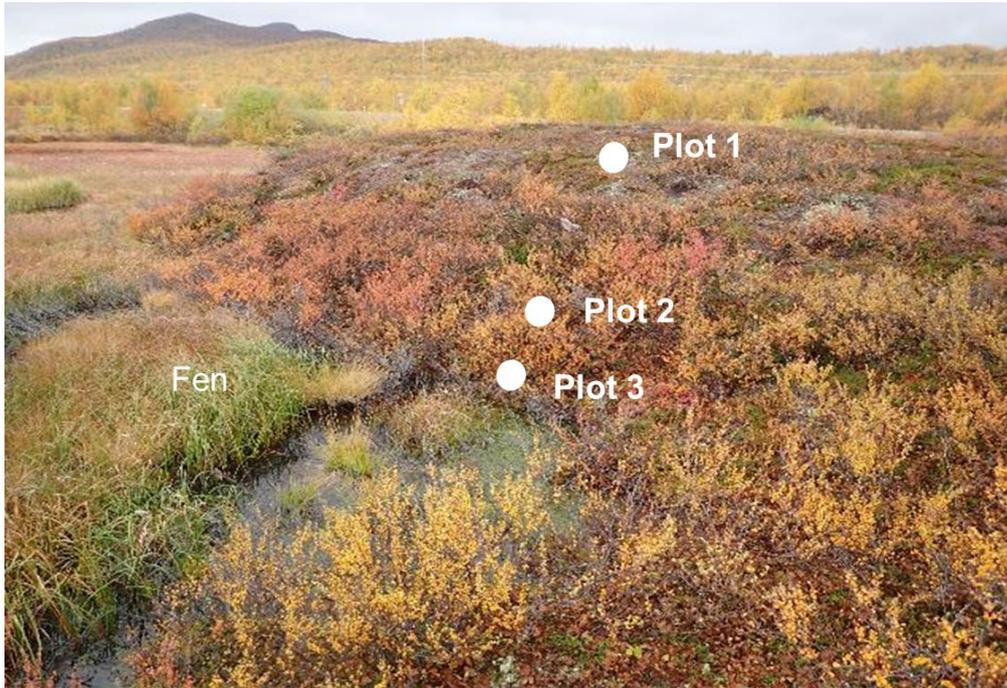


Fig. 6-3. フィンランド土壌サンプリングサイト  
Peera-2 (N 68°53'05.18" E 021°03'07.11")

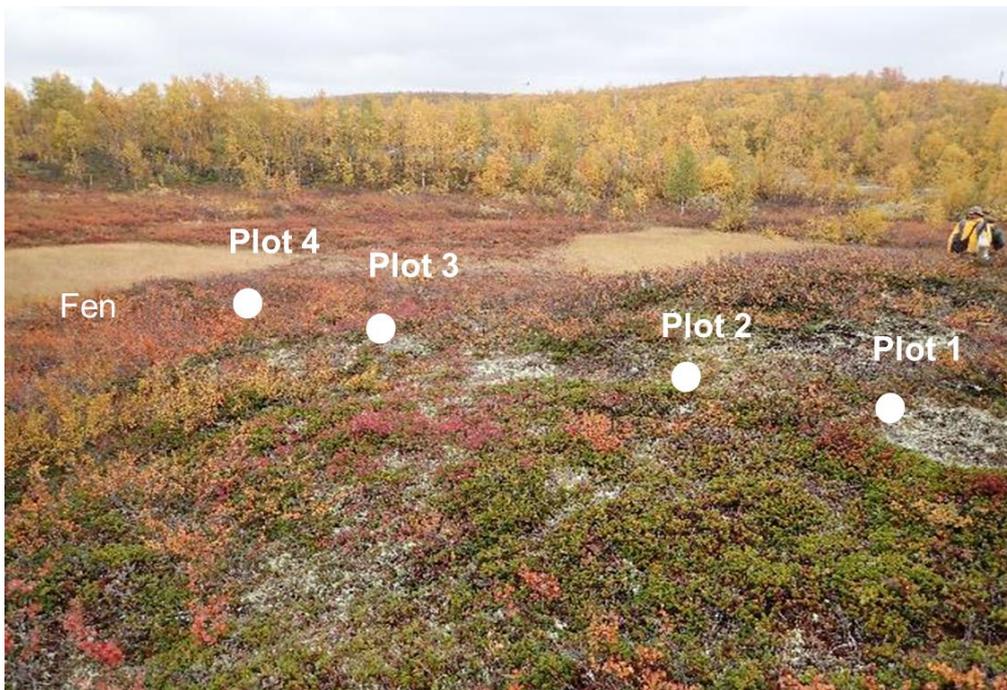


Fig. 6-4. フィンランド土壌サンプリングサイト  
Iitto (N 68°43'26.76" E 021°25'19.85")



Fig. 6-5. フィンランド土壌サンプリングサイト  
Kiljusuo (N 68°42'41.64" E 021°25'18.38")

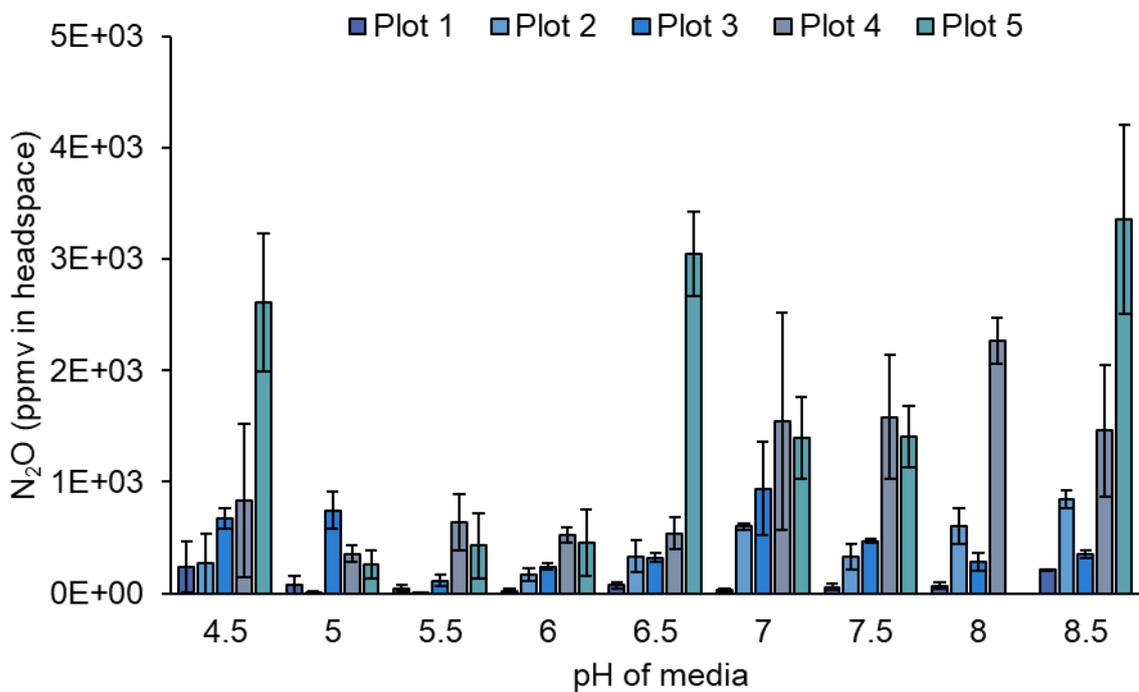


Fig. 6-6. Peera-1 における各プロット土壌培養物から N<sub>2</sub>O 放出量  
Winogradsky's 培地を基本とし、pH を 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 に調整し、  
Peera-1 の土壌懸濁液を 100 μL 接種し、25°C 暗所で 1 週間培養した。培養開始時は N<sub>2</sub>O 濃  
度は 0 ppmv である。n=3, エラーバーは平均±SE.

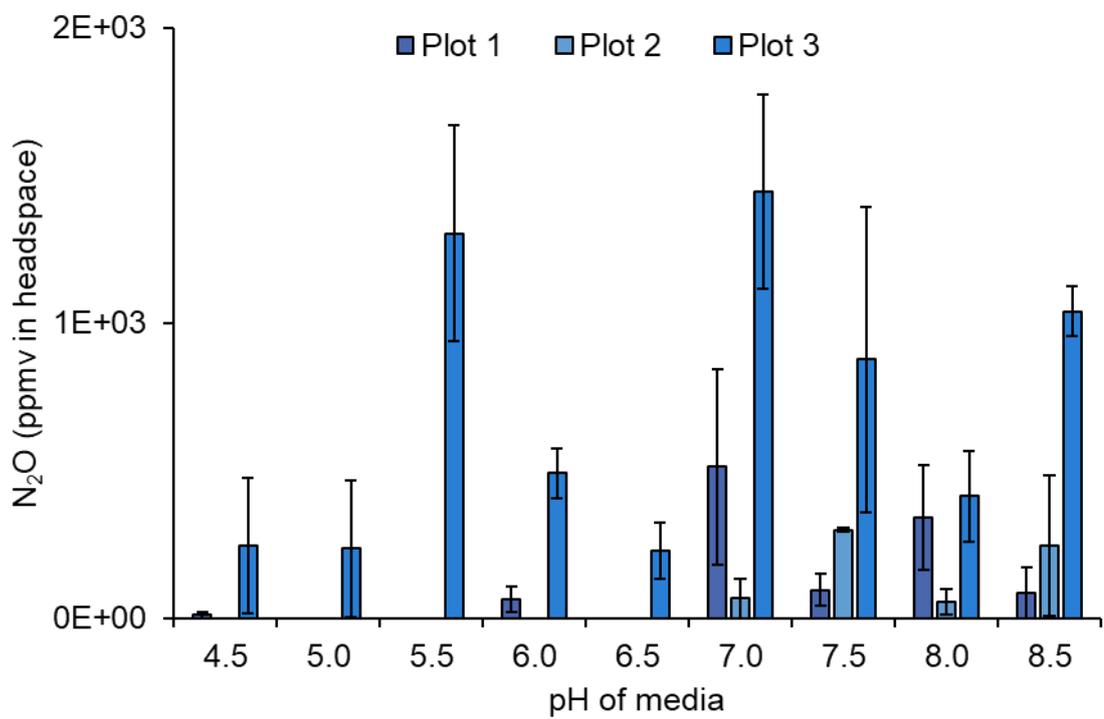


Fig. 6-7. Peera-2 における各プロット土壤培養物からの N<sub>2</sub>O 放出量  
 土壤懸濁液は Peera-2 の土壤から調整し、培養条件は Fig. 6-5 と同様. n=3, エラーバーは平均±SE.

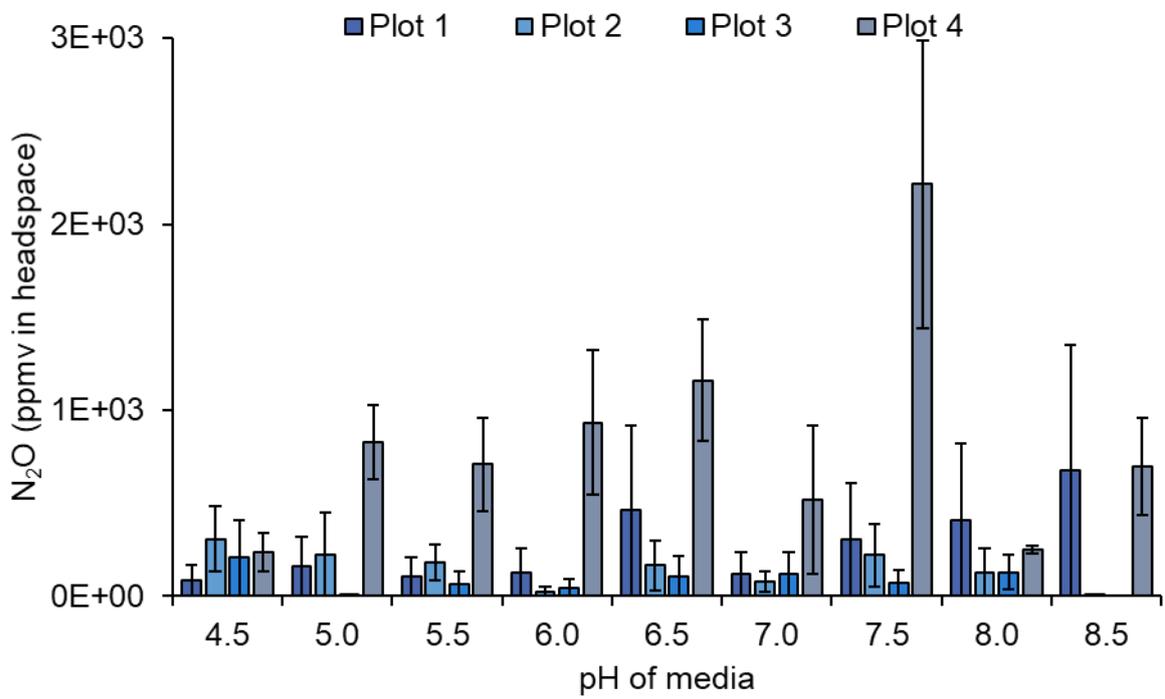


Fig. 6-8. iitto における各プロット土壤培養物からの N<sub>2</sub>O 放出量  
 土壤懸濁液は iitto の土壤から調整し，培養条件は Fig. 6-5 と同様. n=3, エラーバーは平均 ±SE.

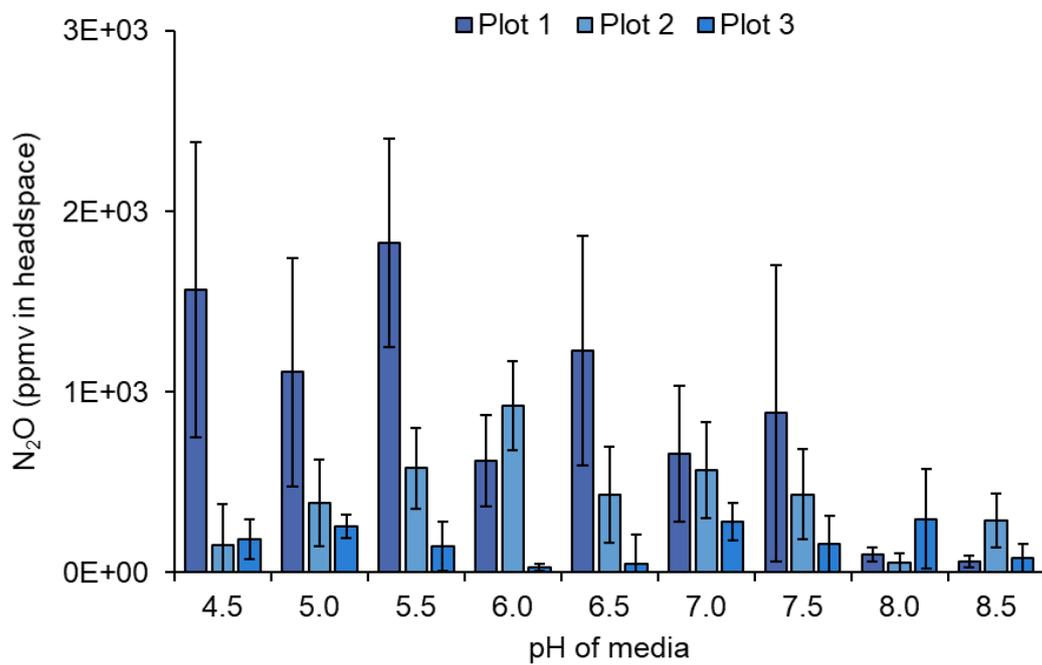


Fig. 6-9. Kiljusuo における各プロット土壌培養物からの N<sub>2</sub>O 放出量  
 土壌懸濁液は Kiljusuo の土壌から調整し，培養条件は Fig. 6-5 と同様. n=3, エラーバーは平均±SE.

### 6-3. Peera-1, Peera-2, litto, Kiljusuo 土壌および Peera-1, plot 5 の培養物の菌叢解析

#### 概要および実験方法

各サンプリングサイトにおける菌叢が N<sub>2</sub>O の放出との因果関係がある可能性が考えられる。すなわち、菌叢解析を行うことによって、主要な N<sub>2</sub>O 放出細菌が明らかになるのではないかと考えた。

また、Peera-1 における Plot 5 では、酸性条件 (pH 4.5)、中性条件 (pH 6.5)でも N<sub>2</sub>O 放出が確認されたが、塩基性条件下 (pH 8.5)で N<sub>2</sub>O の放出が確認された (Fig. 6-6)。通常、N<sub>2</sub>O 放出は弱酸条件下で行われるため (Zumft, 1997)、塩基性条件下での N<sub>2</sub>O 放出がどのように行われているかは解明されていない。すなわち、酸性条件下とどのように菌叢が異なっているかを調べることにより、塩基性条件下における N<sub>2</sub>O 放出の原因が明らかになる可能性がある。加えて、pH 8.0 では全く N<sub>2</sub>O が放出されていなかったことから、菌叢が pH 8.5 と異なり、N<sub>2</sub>O 消去細菌の存在を示唆できる可能性がある。実際に、脱窒細菌の至適培養および脱窒、硝化が pH 7-8 で行われる (Saggar *et al.*, 2013)ということを利用して考える。

これらの土壌および培養物に対し、次世代シーケンサーによる菌叢解析を行った。

#### 結果

土壌の菌叢解析の結果、Peera-1 の Plot 4 および Plot 5 を除くサンプリング地点で Chthoniobacteraceae が全体のリード数に占めている割合が多かった。以下にそのリード数を記載する。Peera-1 において、Plot 1, 2 および 3 では Chthoniobacteraceae がそれぞれ 35%, 17%, 13%で優占していたが、Plot 4 および 5 ではそれぞれ 2%, 3%と優占していなかった (Fig. 6-9)。Peera-2 では、Plot 1-3 それぞれ、6.49%, 15.65%, 14.55%であった (Fig. 6-11)。litto では、Plot 1-4, それぞれ 10.38%, 12.36%, 8.15%, 9.45%であった (Fig. 6-12)。Kiljusuo では、9.67%, 11.86%, 8.82%であった (Fig. 6-13)。

Peera-1, Plot 5 の pH 別の菌叢解析を行った結果、現地で考えられる pH (pH 4.5)と崩壊後に考えられる pH (pH 5.0-6.0)を比較したとき、Pseudomonadaceae が pH 4.5 では、全体のリード数の 82%占めていたが、pH 5.0-6.0 では、39%, 52%, 58%であった (Fig. 6-14)。Burkholderiaceae は pH 4.5 で割合が大きく、約 8%であったにも関わらず、pH 5.0-6.0 では、1.5%未満であった (Fig. 6-14)。pH 6.5-8.5 でこれらの細菌は、Pseudomonadaceae は 30-60%、Burkholderiaceae は 0-0.14%であった (Fig. 6-14, 15)。塩基性条件に着目したところ、全体のリード数の 1%以上を占める脱窒細菌が確認できなかったため、1%未満の細菌に着目した。Rhizobiaceae のいくつかの属では、完全脱窒細菌として知られていることから (Wang *et al.*, 2012)、この細菌に着目した。pH 8.0 でのみ存在しており、0.01%を占めていた (Fig. 6-15)。また、pH 8.5 で N<sub>2</sub>O の放出しており (Fig. 6-6)、同様に少数の細菌に着目したところ、脱窒細菌として知られている Alcaligenaceae (Schalk-Otte *et al.*, 2000) (0.01%)が pH 8.5 でのみ存在しており、塩基性条件下で培養できることが報告されている (Behera *et al.*, 2017)。

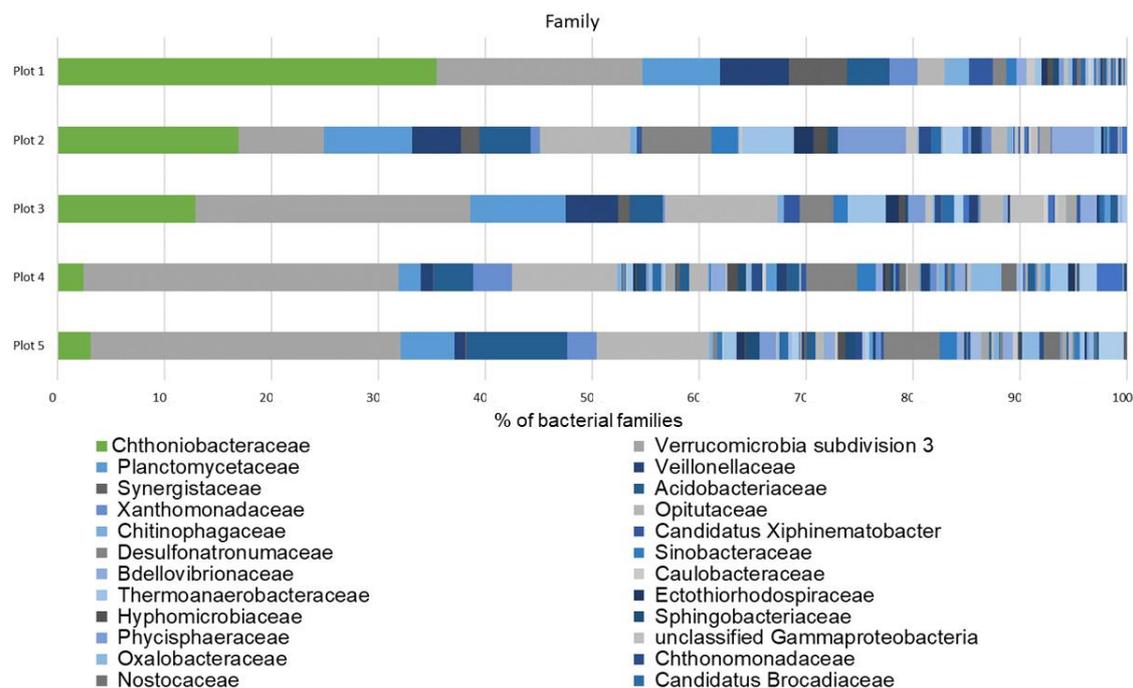


Fig. 6-10. Peera-1 の各 Plot における菌叢解析結果

Peera-1 における各 Plot の土壌における菌叢解析結果. 各 Plot のリード数は, それぞれ, Plot 1 (29584), Plot 2 (25052), Plot 3(26374), Plot 4 (21868), Plot 5 (20492)であった.

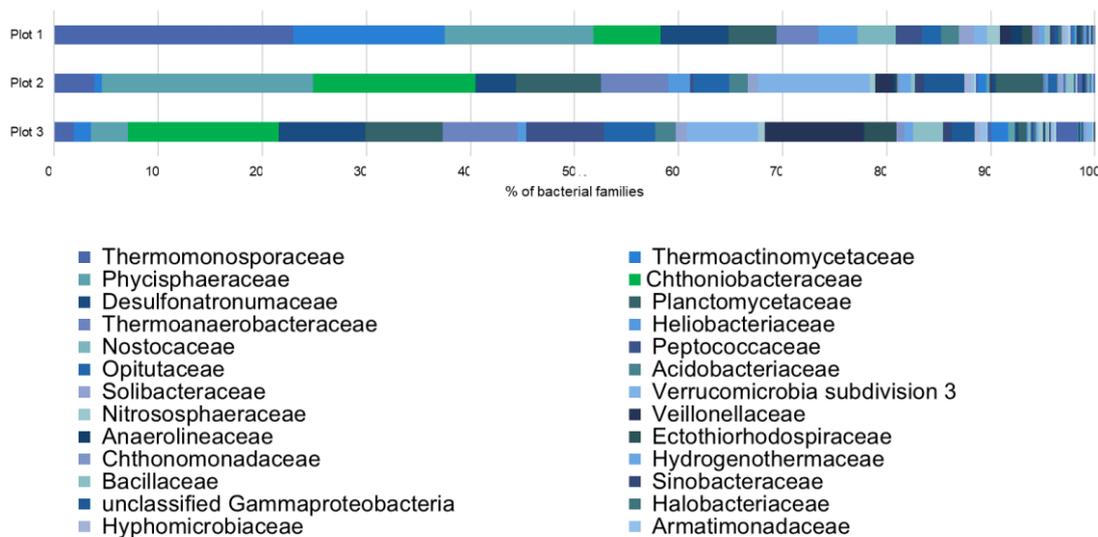


Fig. 6-11. Peera-2 の各 Plot における菌叢解析結果

Peera-2 における各 Plot の土壌における菌叢解析結果. 各 Plot のリード数は, それぞれ, Plot 1 (22176), Plot 2 (25885), Plot 3 (20805)であった.

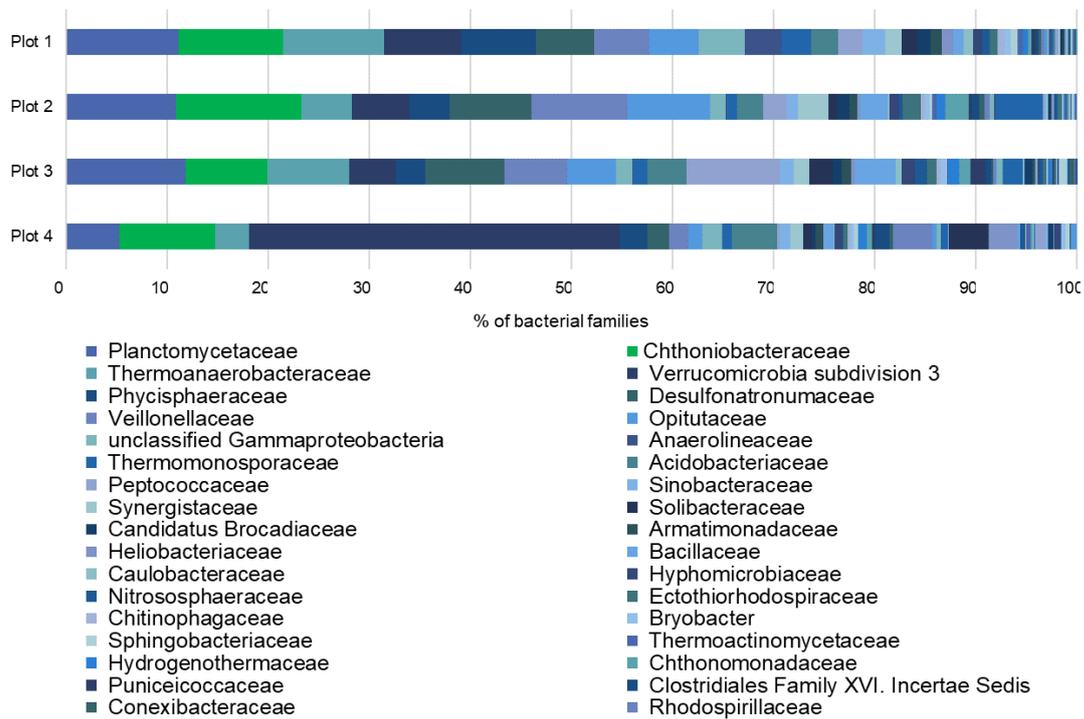


Fig. 6-12. Iitto の各 Plot における菌叢解析結果

Iitto における各 Plot の土壌における菌叢解析結果. 各 Plot のリード数は, それぞれ, Plot 1 (27080), Plot 2 (31283), Plot 3 (29761), Plot 4 (28613)であった.

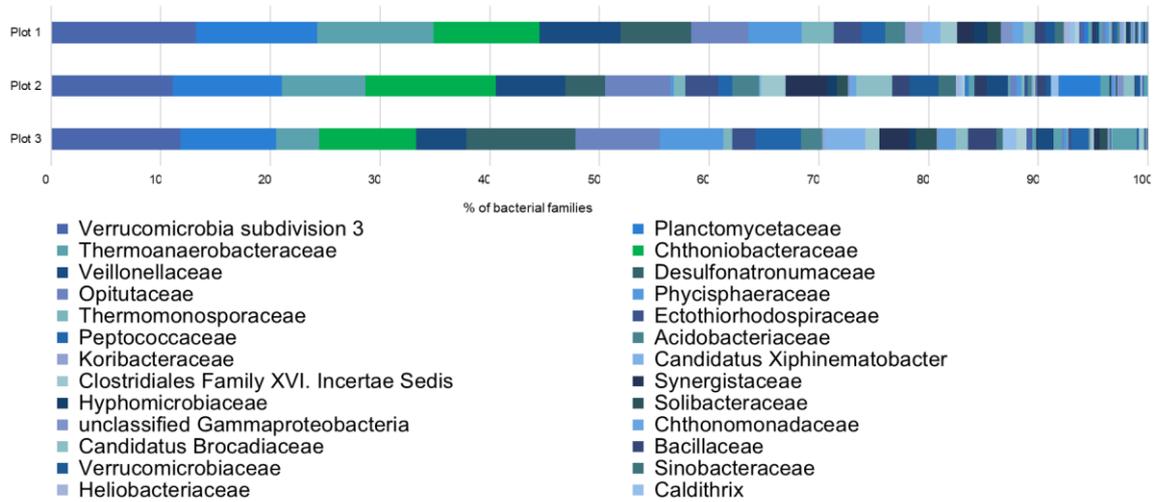


Fig. 6-13. Kiljusuo の各 Plot における菌叢解析結果

Kiljusuo における各 Plot の土壌における菌叢解析結果. 各 Plot のリード数は, それぞれ, Plot 1 (30435), Plot 2 (30392), Plot 3 (29986)であった.

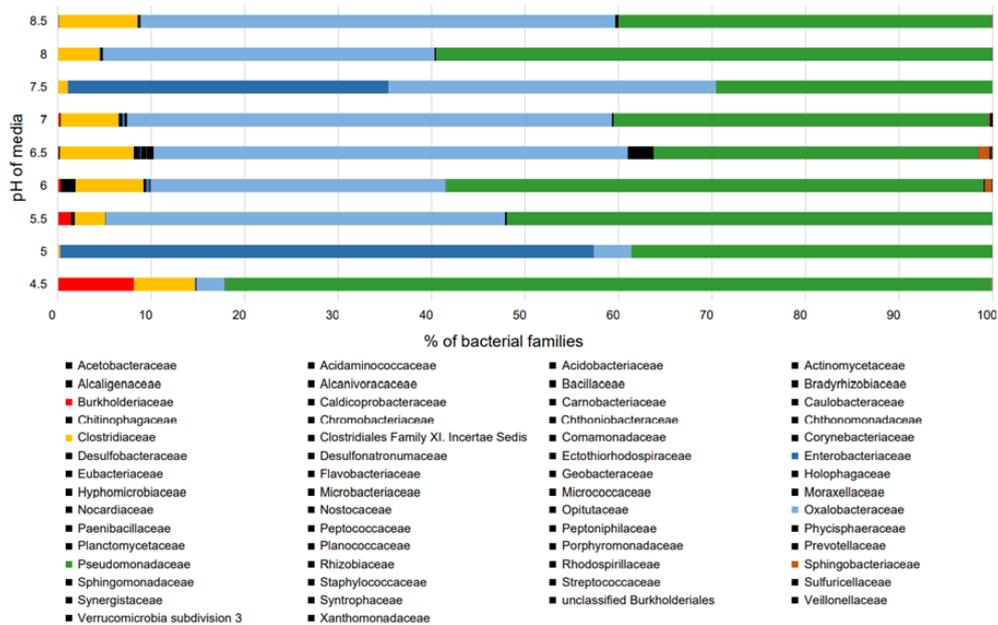


Fig. 6-14. Peera-1, 各 pH 条件における Plot 5 土壌培養物の菌叢結果

Peera-1, Plot 5 における各 pH における菌叢解析結果. 各 pH のリード数は, それぞれ, pH 4.5 (77706), 5.0 (39564), 5.5 (20326), 6.0 (52036), 6.5 (233277), 7.0 (239224), 7.5 (1861), 8.0 (164832), 8.5 (178584)であった.

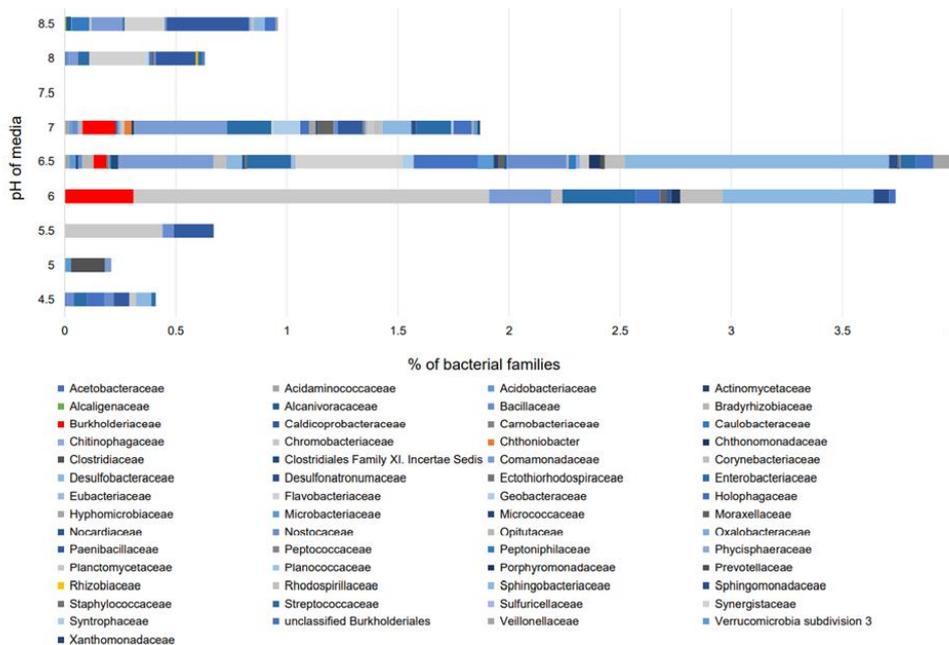


Fig. 6-15. Peera-1, 各 pH 条件における Plot 5 土壤培養物の総リード数の 1%未満の細菌科  
考察

以上の実験より、パルサ丘陵地において酸性条件だけでなく塩基性条件においても  $N_2O$  の放出が認められ pH の変化に伴い菌叢が大きく異なることが明らかになった。

パルサ土壤培養物の  $N_2O$  放出量は、各地点で違いが見られた。Peera-1, Peera-2 で大きな違いとしてサンプリングポイントの水質の差異がある。Peera-1 では、水の色が濁っており富栄養と考えられ、Peera-2 では、水の透明度が非常に高く貧栄養と思われ、それが大きく脱窒細菌の優占率に影響しているのではないかと考えられる。Peera-1 に比べ、 $N_2O$  放出量が少なく (Fig. 6-7)、パルサ崩壊地によるものだと考えられる。今後調査を行う上で近辺の水を採取し、成分分析を行う必要があると考える。他の地点、Iitto や Kiljusou でも多量の  $N_2O$  の放出が確認はできなかった。そのため、最も顕著に  $N_2O$  の放出が確認できた Peera-1 について考察をしていく。

顕著に  $N_2O$  の放出が確認された Peera-1 では、酸性条件下での  $N_2O$  放出も確認できたが、塩基性条件下でも多量の  $N_2O$  放出が確認された (Fig. 6-6)。一般的に、 $N_2O$  の放出は弱酸性条件下で起こりやすいとされており、多くの場合、塩基性条件下では  $N_2O$  放出が確認されることはない。実際に永久凍土における  $N_2O$  放出も酸性土壌から確認されている (Marushchak *et al.*, 2011; Elberling *et al.*, 2010)。しかし、Fig. 6-5 では Plot 5, pH 8.5 において、 $N_2O$  の放出が確認されており、従来知られている条件とは異なっている。一般的に硝化および脱窒の最適 pH は 7-8 とされており (Saggar *et al.*, 2013)、pH が低くなるにつれて、 $N_2O$  が阻害され、脱窒は行われなくなってくる。塩基性条件で  $N_2O$  の放出が行われているとい

うことは、 $\text{NO}_3^-$ が還元されている可能性が考えられる。 $\text{N}_2$ に脱窒されるよりも $\text{N}_2\text{O}$ が生成される速度の方が早かったため、塩基性条件下で $\text{N}_2\text{O}$ 放出が観察されたと考えられる。

一方、Plot 5, pH 8.0 では、塩基性条件下で $\text{N}_2\text{O}$ の放出が確認されなかった (Fig. 6-6)。わずかな pH の差で $\text{N}_2\text{O}$ の放出が行われなかったのは酵素活性が低くなったかもしくは、pH の影響で微生物群衆が大きく変動したために $\text{N}_2\text{O}$ の放出に影響があった可能性がある。

次世代シーケンサーによる解析結果のリード数は、バイオマスとして見なすことができる (Schenk *et al.*, 2019)。そのため、このリード数をバイオマス量として考え、考察を行う。土壌と懸濁液培養した細菌群集では培養により菌叢が変化したものと考えられる (Fig. 6-10, 14)。Chthoniobacteraceae は、典型的な *nosZ* 遺伝子を持つ脱窒細菌群として報告されており (Coyotzi *et al.*, 2017)、Peera-1 の Plot 1 および 2 で $\text{N}_2\text{O}$ 放出を抑制している可能性がある。さらに Iitto でも同様に優先しているため (Fig. 6-12)、Chthoniobacteraceae がパルサにおいて窒素循環  $\text{N}_2\text{O}$  放出に関与している可能性が高いと考えられる。パルサの崩壊地点 (Plot 5) は、低 pH 土壌 (pH 3.4-4.6) (Marushchak *et al.*, 2011; Pengerud *et al.*, 2013; Palmer *et al.*, 2012) と考えられる。土壌そのものの菌叢 (Fig. 6-10)と培養後の菌叢 (Fig. 6-14)では pH 4.0 付近で大きく異なっているが、土壌と培地では生育環境が大きく異なっており、そのために菌叢が大きく異なると考えられる。

脱窒菌として報告されている Burkholderiaceae および Pseudomonadaceae (Carlson *et al.*, 1983; Nie *et al.*, 2015)は、 $\text{N}_2\text{O}$ が放出されている培養物から検出された。酸性条件と塩基性条件では菌叢が異なっており、pH が微生物群衆に影響を与え、主な $\text{N}_2\text{O}$ 放出細菌が変わったものと考えられる。すなわち、酸性および塩基性における $\text{N}_2\text{O}$ 放出細菌を分離し、このことを確認する必要がある。

重要なことに、pH 8.0 の培養では $\text{N}_2\text{O}$ は放出されなかったが (Fig. 6-5)、pH 8.5 の培養では多量の $\text{N}_2\text{O}$ が放出された。pH 8.0 の菌叢と pH 8.5 の菌叢の間には、大きな違いはなく、優占種に他に強力な脱窒細菌が確認できなかった (Fig. 6-14)。すなわち、1つの可能性として、優占種ではなく、マイナーな細菌種による影響によるものと考えられる。pH 8.0 でのみ確認された Rhizobiaceae (Fig. 6-15)のいくつかの属は、完全脱窒細菌として知られている (Wang *et al.*, 2012)。そのため、この培養物でこの細菌が脱窒している可能性が高い。 $\text{N}_2\text{O}$ の放出が確認されている pH 8.5 の培養物における少量のバイオマスに着目すると、硝酸呼吸を行う Alcaligenaceae (0.01%)が存在しており (Fig. 6-15) (Schalk-Otte *et al.*, 2000)、塩基条件で培養できることも報告されている (Behera *et al.*, 2017)。このことはこの培養物における $\text{N}_2\text{O}$ 放出細菌である可能性を示唆している。pH の値を上げていくことで $\text{N}_2\text{O}$ の放出が行われるメカニズムは未だ明らかになっていない。 $\text{NO}_3^-$ の還元は pH 3.5 であるにもかかわらず、硝化および脱窒の適正 pH が 7-8 という可能性も存在している (Saggar *et al.*, 2013)。本結果は、高 pH 条件においても $\text{NO}_3^-$ の還元が行われていると考えられ、パルサにおいては、高 pH になればなるほど、 $\text{N}_2$ への還元よりも $\text{N}_2\text{O}$ の生成の速さが上回ったために $\text{N}_2\text{O}$ の放出量が上昇したのではないかと考えられる (Fig.1-3)。

## 7. 総合考察

### 7-1. N<sub>2</sub>O 消去微生物 *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株の N<sub>2</sub>O 消去能評価

本論文では、ガスクロバイアル中で培養した北海道大学附属静内牧場内のデントコーン圃場黒ボク土壌懸濁液は、1週目で N<sub>2</sub>O が生じたものの、2週目で N<sub>2</sub>O 蓄積量が減少した (Fig. 3-2a)。このことから土壌中に N<sub>2</sub>O を消去する微生物群の存在が示唆された。

北海道大学静内圃場デントコーン畑からは *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株が分離された。パルサ丘陵地においても *Chitinophagaceae* の存在が示唆されているが、分離に至らなかった。

*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株は塩基性条件下で分離されたが、塩基性条件だけではなく、酸性条件でも十分に N<sub>2</sub>O を消去できることから (4-2.節)、尿素やバイオチャーを過剰に投入して、pH を調整しなくても十分に N<sub>2</sub>O 抑制資材として利用できる可能性がある。

*Chitinophag* sp. Sac-f1 株の Atypical-nosZ 遺伝子の有無を明らかにすることが今後、重要となってくると考えられる。Typical-NosZ と Atypical-NosZ ではタンパク質を運搬する分泌経路が異なっている (Zumft and Kroneck, 2007)。すべての Typical-NosZ が twin-arginine translocation (Tat) シグナルペプチドを保持している一方で、Atypical-NosZ は *Cloroflexi* を除き、N-terminal Sec-type シグナルペプチドを保持している。77 の Typical-NosZ のうち、銅は 2 つのヒスチジン、DxHHxH、EPHD と結合する (Sanford *et al.*, 2012)。Atypical-NosZ ではこれらのヒスチジンに銅の結合は確認されていない (Sanford *et al.*, 2012)。すなわち、タンパク質の構造やメカニズムが異なっていることに加え、Typical-nosZ 遺伝子と異なり、Atypical-nosZ 遺伝子は多様性に富んでおり、至適 pH が塩基性条件で活性化することも考えられる。そのため、*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株が塩基性条件で N<sub>2</sub>O の消去活性が強いと推測される。尿素等の塩基性肥料を投入した場合においても、土壌からの N<sub>2</sub>O 放出を抑制できると推察される。すなわち、肥料投入段階から N<sub>2</sub>O を抑制でき、自然環境を乱すことなく、長期的な抑制効果が期待できる。そのためにもゲノム解析が急務と考えられる。

農薬の散布は環境を乱すことが考えられており (Stole *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2018)、農薬に加え、人工的な抑制資材の投入は大きく環境を変化させてしまう可能性がある。本研究で *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株が一部の農薬を添加した場合、N<sub>2</sub>O 消去活性が低下してしまうものの、抑制効果が期待できる (Fig. 5-2, 3, 4)。本実験は培地上での試験であったため、実際の土壌では別の挙動を示す可能性がある。無添加土壌においても N<sub>2</sub>O 消去活性が低下することなく、窒素源および炭素源の影響を受けることなく、抑制できることを示唆した (Fig. 5-9, 11, 12)。本実験で使用した土壌は肥料がすでに添加されているものを使用したため、本菌株は肥料が混入した土壌での N<sub>2</sub>O 放出を抑制できると考えられる。しかし、農薬のような有機化合物が土壌に接種された場合、安定的な N<sub>2</sub>O 放出抑制効果を示せるかを検証する必要があると考えられる。土壌でも十分な抑制効果を示すことができれば、Akiyama, *et al.* (2016) のように N<sub>2</sub>O 抑制に効果のある根粒菌を土壌中に散布することで大きく N<sub>2</sub>O 放出削減に貢献できると考えられる。本菌株が環境に優しい N<sub>2</sub>O 抑制資材として活用できると考えられる。さらに本分離株は Hallin *et al.* (2018) が提唱する Non-denitrifier である可能性が高

く、地球温暖化抑制に対して大きく寄与する可能性があり、本分離株の N<sub>2</sub>O 消去経路を明らかにすることにより、Non denitrifier の N<sub>2</sub>O 消去機構を明らかにすることができ、効率的な抑制手法が確立できると考えられる。

## 7-2. パルサ崩壊に伴う pH 変化に対する N<sub>2</sub>O 放出および細菌叢

Peera-1, Plot 5 は沼の近くに存在しており、パルサが崩壊したポイントであり、他の地点と比較し、N<sub>2</sub>O の放出が活発であった (Fig. 6-6)。永久凍土が溶けることにより、有機物の分解・無機化が促進され、硝酸態 N が増加したことにより、N<sub>2</sub>O の放出が促進されることが報告されている (Voigt *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2006)。夏季において、永久凍土の標高の高いところでは、植生が少なく吸収利用されないため硝酸態窒素が増加し、N<sub>2</sub>O 放出量が増大する (Palmer *et al.*, 2012; Repo *et al.*, 2009)。逆に、植生が活動的な場所では、窒素量が少なく、N<sub>2</sub>O の放出量が少ない (Repo *et al.*, 2009; Marushchak *et al.*, 2011)。本実験では、今回のサンプリング時期が冬季に近かったことから、植物が活動しておらず、比較的植生が発達している沼の近くでも硝酸態 N が豊富に存在していた可能性があると考えられる。

パルサの土壌 pH は、約 4.0 であり (Pengerud *et al.*, 2013)、本実験の pH 4.5 の培養物からは多量の N<sub>2</sub>O が放出されていた。しかし、パルサ周辺に存在する池の pH 5.0-6.0 (Marushchak *et al.*, 2011; Haraguchi, A., unpublished data, 2015) では、pH 4.5 に比べ、N<sub>2</sub>O の放出量が少なかった (Fig. 6-6)。この結果はパルサにおいても pH を上昇させることにより、N<sub>2</sub>O の放出を抑制できることを示唆している。*Burkholderia* spp. は、pH 4.5 で優占しており (リード数の約 8%)、*Burkholderia* spp. は不完全脱窒細菌として報告もある (Nie *et al.*, 2015)。pH 4.5 では、この細菌属が主要な N<sub>2</sub>O 放出細菌の可能性が高い。しかし、pH 5.0 - 6.0 にかけては *Burkholderia* 属の割合は少なくなっていた (Fig. 6-14)。このことは pH の違いにより、菌叢が変化し、N<sub>2</sub>O の放出が抑制された可能性も示唆している。*Pseudomonas* spp. は、すべての pH で優占 (リード数の約 30%以上) しており、*Pseudomonas* spp. は、不完全脱窒細菌としての報告がある (Carlson *et al.*, 1983)。pH によらず、これらの細菌が N<sub>2</sub>O 放出に関与している可能性がある。

また、N<sub>2</sub>O の放出が確認されなかった。pH 8.0 の培養物でのみ、*Kaistia* sp. (0.01%) が確認されており、この科に属する完全脱窒細菌としての報告がある (Wang *et al.*, 2012)。この細菌の存在のために N<sub>2</sub>O が N<sub>2</sub> へとすべて脱窒されているために pH 8.0 の培養物で N<sub>2</sub>O の放出が確認できなかったと考えられる。近年、高 pH で N<sub>2</sub>O を抑制する細菌が畑土壌に存在することが明らかにされている。したがって、パルサにおいても高 pH といった特殊な環境で消去する細菌がいるのかもしれない。pH 8.5 で N<sub>2</sub>O の放出が増大したことから、pH 8.5 でのみ N<sub>2</sub>O を放出する細菌がいる可能性ある。pH 8.5 の培養物でのみ存在が確認された *Alcaligenaceae* (0.1%) には N<sub>2</sub>O の放出能が確認されている *Alcaligenes* sp. (Schalk-Otte *et al.*, 2000) が属しており、かつ塩基性条件で培養可能なため (Behera *et al.*, 2017)、主要な N<sub>2</sub>O 放出細菌である可能性が非常に高い。これまでに知られる研究報告で、高 pH で N<sub>2</sub>O の放出が

増加した報告はないため、高 pH における N<sub>2</sub>O 放出増加のメカニズムは明らかにされていない。しかし、硝酸イオンの還元は pH 3.5 が至適ではあるけれども、脱窒および硝化は pH 7-8 で起こりうる (Verstraete and Focht, 1977; Saggar *et al.*, 2013)。したがって、本実験においても、高 pH でも硝酸イオンが還元されていた可能性がある。その結果、硝酸イオンから N<sub>2</sub>O の生成速度が N<sub>2</sub>O から N<sub>2</sub> への脱窒速度よりも速かったために、高 pH での N<sub>2</sub>O 放出増加が生じたと考えられる。

結論として、パルサにおいて、高 pH 条件で N<sub>2</sub>O が抑制されることもあるが、N<sub>2</sub>O が放出されることもある可能性が示された。この変動要因の一つとして、pH の僅かな違いが微生物群集を変化させてしまうことが考えられた。したがって、高 pH へ変化させることで N<sub>2</sub>O の放出を抑制するためには、適切な微生物群集へ誘導する必要がある。

#### 7-4. 結論

本研究において、北海道静内の黒ボク土壌から N<sub>2</sub>O 消去細菌 *Chitinophaga* sp. Sac-f1 株を分離した。Sac-f1 株は Typical-*nosZ* 遺伝子を保持していないにも関わらず、N<sub>2</sub>O を消去したことから、Atypical-*nosZ* を有することが示唆される。本菌株の Atypical-*nosZ* 遺伝子の存在を確認するために今後、全ゲノム解析によりその遺伝子の存在を確認することで、N<sub>2</sub>O の消去経路を推定することができる。

また、*Chitinophaga* sp. Sac-f1 株は塩基性条件 (pH. 8.5) で最大活性を示すが、黒ボク土壌においても十分に N<sub>2</sub>O 放出を抑制したことから (Fig. 5-9)、圃場においても、N<sub>2</sub>O の放出を抑制でき、N<sub>2</sub>O 消去資材としての利用が期待できる。

また、フィンランド、パルサ土壌を用いた N<sub>2</sub>O 放出実験より、パルサ崩壊後にパルサ泥炭がミネラル豊富な地下水に混合された場合、pH の上昇によって N<sub>2</sub>O が抑制されることを示唆した。しかし、最終的な崩壊の前に植生の変化と泥炭の露出のために、N<sub>2</sub>O 排出量が増加したと考えられる。N<sub>2</sub>O 排出量の変動を説明する要因の 1 つは、微生物群集の変化である。塩基性 pH 処理のいくつかの異常な結果は、パルサ泥炭の微生物群集が広範囲の溶融後の状態に適応する可能性があり、窒素循環に予期しない変動を引き起こす可能性がある。これらの結果は、N<sub>2</sub>O 活性に加えて、細菌群集の変化が N<sub>2</sub>O 排出の制御に重要である可能性を示した。

## 参考文献

- Akiyama, H., Hoshino, YT., Itakura, M., Shimomura, Y., Wang, Y., Yamamoto, A., *et al.* 2016. Mitigation of soil N<sub>2</sub>O emission by inoculation with a mixed culture of indigenous *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *Scientific Reports*. **6**: 32869.
- Amann, RI., Ludwig, W., and Schleifer, KH. 1995. Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial-cells without cultivation. *Microbiological Reviews*. **59**: 143-169.
- Aulakh, MS., Walters, DT., Doran, JW., Francis, DD and Mosier, AR. 1991. Crop residue and placement effects on denitrification and mineralization. *Soil Science Society of America Journal*. **55**: 1020-1025.
- Azegami, K., Nishiyama, K., Watanabe, Y., Suzuki, T., Yoshida, M., *et al.* 1985. Tropolone as a root growth-inhibitor produced by a plant pathogenic *Pseudomonas* sp. causing seedling blight of rice. *Annals of The Phytopathological Society of Japan*. **51**: 315–317.
- Baggs, EM., and Philpott, L. 2010. Microbial terrestrial pathways to N<sub>2</sub>O. In Smith KA (ed), Nitrous Oxide and Climate Change, Earthscan, London: 4-35.
- Baggs, EM., Rees, RM., Smith, KA., and Vinten, AJA. 2000. Nitrous oxide emission from soils after incorporating crop residues. *Soil Use and Management*. **16**: 82-87.
- Balderston, WL., Sherr, B., and Payne, WJ. 1976. Blockage by acetylene of nitrous oxide reduction in *Pseudomonas perfectomarinus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **31**: 504-508.
- Behera, BC., Yadac, H., Singh, SK., Serhi, BK., Mishra, RR., Kumari, S., and Thatoi, H. 2017. Alkaline phosphatase activity of a phosphate solubilizing *Alcaligenes faecalis*, isolated from Mangrove soil. *Biotechnology Research Innovation*. **1**: 101-111.
- Bergmann, DJ., Arciero, DM., and Hopper, AB. 1994. Organization of the *hao* gene cluster of *Nitrosomonas europaea*: genes for two tetraheme c cytochromes. *Journal of Bacteriology*. **176**: 3148-3153.

- Bleakley, BH., and Tiedje, JM. 1982. Nitrous oxide production by organisms other than nitrifiers and denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology*. **44**: 1342-1348.
- Bollag, JM., and Tung, G. 1972. Nitrous Oxide release by soil fungi. *Soil Biology and Biochemistry*. **4**: 271-276.
- Bortone, G., Gemelli, S., Rambaldi, A., and Tilehe, A. 1992. Nitrification, denitrification and biological phosphate removal in sequencing batch reactors treating piggery wastewater. *Water Science and Technology*. **26**: 977-985.
- Bouwman, AF. 1996. Direct emission of nitrous oxide from agricultural soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. **46**: 53-70.
- Bragazza, L., Freeman, C., Jones, T., *et al.* 2006. Atmospheric nitrogen deposition promotes carbon loss from peat bogs. *PNAS*. **103**: 19386-19389.
- Braker, G., and Tiedje, JM. 2003. Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 3476-3483.
- Breteler, H., and Luczak, W. 1982. Utilization of nitrite and nitrate by dwarf bean. *Planta*. **156**: 226-232.
- Burgun, AJ., and Hamilton, SK. 2007. Have we overemphasized the role of denitrification in aquatic ecosystem? A review of nitrite removal pathways. *Frontiers in Ecology and the Environment*. **5**: 89-96.
- Carlson, AC., and Ingraham, LJ. 1983. Comparison of denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology*. **45**: 1247-1253.
- Charles, A., Rochette, P., Whalen, JK., Angers, DA., Chantigny, MH., and Bertrand, N. 2017. Global nitrous oxide emission factors from agriculture soils after addition of organic amendments: A meta- analysis. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. **2**: 88-98.

- Chen, H., Mothapo, NV., and Shi, W. 2014. The significant contribution of fungi to soil N<sub>2</sub>O production across diverse ecosystems. *Applied Soil Ecology*. **73**:70-77.
- Coenye, T., and Vandamme, P. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology*. **5**: 719–729.
- Conrad, R. 1996. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O, and NO). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **60**: 609-640.
- Coyne, MS., Arunakumari, A., Averill, BA., and Tiedje, JM. 1989. Immunological identification and distribution of dissimilatory heme cd1 and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**: 2924-2931.
- Coyotzi, S., Doxey, AC., Clark, ID., Lapen, DR., Cappellen, VP., and Neufeld, DJ. 2017. Agricultural soil denitrifiers possess extensive nitrite reductase gene diversity. *Environmental Microbiology*. **19**: 1189-1208.
- Čuhel, J., Šlmek, M., Laughlin, JR., Bru, D., Chêneby, D., Watson, JC., and Philippot, L. 2010. Insights into the effect of soil pH on N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> emissions and denitrifier community size and activity. *Applied and Environmental Microbiology*. **76**: 1870-1878.
- Cuypers, H., Viebrocksambale, A., and Zumft, WG. 1992. NosR, a membrane-bound regulatory component necessary for expression of nitrous oxide reductase in denitrifying *pseudomonas stutzeri*. *Journal of Bacteriology*. **174**: 5332-5339.
- Dalal, RD., Wang, W., Robertson, GP., and Parton, WJ. 2003. Nitrous oxide emission from Australian lands and mitigation options: a review. *Australian Journal of Soil Research*. **41**: 165-195.
- Delorme, S., Philippot, L., Edel-Hermann, V., Deulvot, C., Mougél, C., and Lemanceau, P. 2003. Comparative genetic diversity of the *narG*, *nosZ*, and 16S rRNA genes in fluorescent pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 1004-1012.

- Desloover, J., Roobroeck, D., Heylen, K., Puig, S., Boeckx, P., Verstraete, W., and Boon, N. 2014. Pathway of nitrous oxide consumption in isolated *Pseudomonas stutzeri* strains under anoxic and oxic conditions. *Environmental Microbiology*. **16**: 3143-3152.
- Dorrepaal, E., Cornelissen, JHC., Aerts, R., Wallen, B., and Van Logtestijn, RSP. 2005. Are growth forms consistent predictors of leaf litter quality and decomposability across peatlands along a latitudinal gradient? *Journal of Ecology*. **93**: 817-828.
- Elberling, B., Christiansen, HH., and Hansen, UB. 2010. High nitrous oxide production from thawing permafrost. *Nature Geoscience*. **3**: 332-335.
- Elmi, AA., Madramootoo, C., Hamel, C., and Liu, A. 2003. Denitrification and nitrous oxide to nitrous oxide plus dinitrogen ratios in the soil profile under three tillage systems. *Biology and Fertility of Soils*. **38**: 340-348.
- Eurola, S., and Hicks, S. 1984. Key to Finnish mires types. *European Mires*; 11-118.
- Firestone, MK., and Davidson, EA. 1989. Microbiological basis of NO and N<sub>2</sub>O production and consumption in soil. In Andreae MO, Schimel DS, Exchange of Trace Gases between Terrestrial Ecosystems and the atmosphere, John Wiley, New York: 7-21.
- Florides, GA., and Christodoulides, P. 2009. Global warming and carbon dioxide through sciences. *Environment International*. **35**: 390-401.
- Fowler, D., Steadman, D., Coyle, M., Rees, RM., Skiba UM., *et al.* 2015. Effects of global change during the 21<sup>st</sup> century on the nitrogen cycle. *Atmospheric Chemistry and Physics*. **15**: 13849-13893.
- Freney, JR. 1997. Emission of nitrous oxide from soils used for agriculture. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. **48**: 155-160.
- Fronzek, S., Luoto, M., and Carter, R.T. 2006. Potential effect of climate change on the distribution of palsa mires in subarctic Fennoscandia. *Climate Research*. **32**: 1-12.
- Graf, DRH., Jones, CM., and Hallin, S. 2014. Intergenomic Comparisons Highlight

Modularity of the Denitrification Pathway and Underpin the Importance of Community Structure for N<sub>2</sub>O Emissions. *PLoS ONE*. **9**: e114118.

Groffman, PM., Altabet, MA., Böhlke, JK., Butterbach-Bahl, K., David, MB., Firestone, MK., Giblin, AE., *et al.* 2006. Methods for measuring denitrification: diverse approaches to a difficult problem. *Ecological Applications*. **16**: 2091-2122.

Hallin, S., Philippot, L., Löffler, E.F., Sanford, A.R., and Jones, M.C. 2018. Genomics and ecology of novel N<sub>2</sub>O-reducing microorganisms. *Trends in Microbiology Reviews*. **26**: 43-55.

Hara, S., Hashidoko, Y., Desyatkin, RV., Morishita, T., and Hatano, R. 2010. Clear increases in acetylene reduction by soil bacteria from an East Siberian Taiga forest bed under conditions mimicking the natural soil environment. *Soil Science and Plant Nutrition*. **56**: 716-724.

Hashidoko, Y., Takeda, H., Hasegawa, S., Hara, S., Wijaya, H., Darung, U., Melling, L., and Hatano, R. 2010. Screening of N<sub>2</sub>O-emitting bacteria from acidic soils and their characteristics under acidic conditions. In 'Proceedings of Bogor Symposium and Workshop on Tropical Peatland Management, Borgor, Indonesia, 14-15 July 2009'. 52-56.

Hayakawa, A., Nakata, M., Jiang, R., Kuramochi, K., and Hatano, R. 2012. Spatial variation of denitrification potential of grassland, windbreak forest, and riparian forest soils in an agricultural catchment in eastern Hokkaido, Japan. *Ecological Engineering*. **47**: 92-100.

Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S., and Phillipot, L. 2006. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**: 5181-5189.

Heylen, K., Vanparys, B., Gevers, D., Wittebolle, L., Boon, N., and De Vos, P. 2007. Nitric oxide reductase (*norB*) gene sequence analysis reveals discrepancies with nitrite reductase (*nir*) gene phylogeny in cultivated denitrifiers. *Environmental Microbiology*. **9**: 1072-1077.

- Hooper, AB. 1968. A nitrite-reducing enzyme from *Nitrosomonas europaea*. Preliminary characterization with hydroxylamine as electron donor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. **162**: 49-65.
- Hooper, AB., and Terry, K. 1979. Hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas*: production of nitric oxide from hydroxylamine. *Biochimica et Biophysica Acta-Enzymology*. **571**: 12-20.
- Hultman, J., Waldrop, MP., Mackelprang, R., David, MM., McFarland, J., Blazewicz, SJ., *et al.* 2015. Multi-omics of permafrost, active layer and thermokarst bog soil microbiomes. *Nature*. **521**: 208-212.
- Hutchins, SR. 1991. Biodegradation of Monoaromatic Hydrocarbons by Aquifer Microorganisms Using Oxygen, Nitrate, or Nitrous Oxide as the Terminal Electron Acceptor. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**: 2403-2407.
- Hyman, MR., Murton, IB., and Arp, DJ. 1988. Interaction of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* with alkanes, alkenes, and alkynes. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**: 3187-3190.
- Inubushi, H., Naganuma, K., and Kitahara, S. 1996. Contribution of denitrification and autotrophic and heterotrophic nitrification to nitrous oxide production in andosols. *Biology and Fertility of Soils*. **23**: 292–298.
- IPCC. 2007. Intergovernmental panel on climate change, WMO, UNEP. Climate change 2007. the physical science basis, Summary for policymakers. IPCC WGI Fourth Assessment Report. SPM2feb07.
- Itakura, M., Uchida, Y., Akiyama, H., Hoshino, Y., Shimomura, Y., Morimoto, S., Tago, K., *et al.* 2013. Mitigation of nitrous oxide emissions from soils by *Bradyrhizobium japonicum* inoculation. *Nature Climate Change*. **3**: 208-212.
- Ji, B., Wang, H., and Yang, K. 2014. Tolerance of an aerobic denitrifier (*Pseudomonas stutzeri*) to high O<sub>2</sub> concentrations. *Biotechnology Letters*. **36**: 719-722.

- Jones, CM., Graf, DR., Bru, D., Philippot, L., and Hallin, S. 2013. The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. *ISME Journal*. **7**: 417-426.
- Jones, CM., Stres, B., Rosenquist, M., and Hallin, S. 2008. Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. *Molecular Biology and Evolution*. **25**: 1955-1966.
- Joo, HS., Hirai, M., and Shoda, M. 2005. Nitrification and denitrification in high-strength ammonium by *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnology Letter*. **27**: 773-778.
- Järvinen, A. 1987. Basic climatological data on the Kilpisjärvi area, NW Finnish Lapland. Kilpisjärvi Biological Station.
- Kaye, JP and Hart, SC. 1997. Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trend in Ecology and Evolution*. **12**: 139-143.
- Kern, M., and Simon, J. 2009. Electron transport chains and bioenergetics of respiratory nitrogen metabolism in *Wolinella succinogenes* and other Epsilonproteobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Bioenergetics*. **1787**: 646–656.
- Kishida, N., Kim, JH., Kimochi, Y., Nishimura, O., Sasaki, H., and Sudo, R. 2004. Effect of C/N ratio on nitrous oxide emission from swine wastewater treatment process. *Water Science and Technology*. **49**: 359–371.
- Kitamura, R., Sugiyama, C., Yasuda, K., Nagatake, A., Yuan, Y., Du, D., Yamaki, N., Taira, K., Kawai, M., and Hatano, R. 2021. Effects of Three Types of Organic Fertilizers on Greenhouse Gas Emissions in a Grassland on Andosol in Southern Hokkaido, Japan. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.649613>
- Kivimäki, SK., Sheppard, LJ., Leith, ID., and Grace, J. 2013. Long-term enhanced nitrogen deposition increases ecosystem respiration and carbon loss from a Sphagnum bog in the Scottish Borders. *Environmental and Experimental Botany*. **90**: 53-61.
- Klemedtsson, L., Arnold, KV., Weslien, P., and Gundersen, P. 2005. Soil CN ratio as a scalar parameter to predict nitrous oxide emissions. *Global Change Biology*. **11**: 1142-

1147.

Klotz, MG., Alzereca, J., Norton, JM. 1997. A gene encoding a membrane protein exists upstream of the *amoA/amoB* genes in ammonia oxidizing bacteria: a third member of the *amo* protein? **150**: 65-73.

Kool, DM., Dolfing, J., Wrage, N., and Groenigen, VJW. 2011. Nitrifier denitrification as a distinct and significant source of nitrous oxide from the soil. *Soil Biology and Biochemistry*. **43**: 174-178.

Kryachko, ES., Vinckier, C., and Nguyen, MT. 2001. Another look at the electron attachment to nitrous oxide. *Journal of Chemical Physiology*. **114**: 7911.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*. **35**: 1547-1549.

Kurakov, AV., Pakhnenko, OV., Kostina, NV., and Umarov, MM. 1997. Microscopic fungi producing nitrous oxide in nutrient media and sterile soil. *Eurasian Soil Science*. **30** : 1344-1349.

Laberge, M., and Payette, S. 1995. Long-Term Monitoring of Permafrost Change in a Palsa Peatland in Northern Quebec, Canada: 1983-1993. *Arctic and Alpine Research*. **27**: 167-171.

Lauber, CL., Hamady, M., Knight, R., and Fierer, N. 2009. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Applied and Environmental Microbiology*. **75**: 5111-5120.

Lau, SYL. 2015. Study on the diversity and vertical distribution of soil microorganisms in tropical peatland of Sarawak, Malaysia, and characterization of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O)-emitters and quenchers from the tropical peat soils. Hokkaido University Doctor thesis.

Li, L. Wang, M., Hatano, R., and Hashidoko, Y. 2014. Effect of methyl viologen dichloride and other chemicals on nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emission and repression by pseudomonad denitrifiers isolated from corn farmland soil in Hokkaido, Japan. *Journal*

*of Pesticide Science*. **39**: 115-120.

Li, X., Inubushi, K., and Sakamoto, K. 2002. Nitrous oxide concentrations in an Andisol profile and emissions to the atmosphere as influenced by the application of nitrogen fertilizers and manure. *Biology and Fertility of Soils*. **35**: 108-113.

Liu, B., Frostegård, Å., and Bakken, LR. 2014. Impaired reduction of N<sub>2</sub>O to N<sub>2</sub> in acid soils is due to a posttranscriptional interference with the expression of *nosZ*. *mBio*. **5**: <https://doi.org/10.1128/mBio.01383-14>

Liu, B., Mørkved, PT., Frostegard, A., and Bakken, LR. 2010. Denitrification gene pools, transcription and kinetics of NO, N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> production as affected by soil pH. *FEMS Microbiology Ecology*. **72**: 407-417.

Liu, X., Gao, C., Zhang, A., Jin, P., Wang, L., and Feng, L. 2008. The *nos* gene cluster from gram-positive bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 and functional characterization of the recombinant NosZ. *FEMS Microbiology Letters*. **289**: 46-52.

Liu, L., Shen, G., Sun, M., Cao, X., Shang, G., and Chen, P. 2014. Effect of biochar on nitrous oxide emission and its potential mechanisms. *Journal of the Air and Waste Management Association*. **64**: 894-902.

Luoto, M., and Seppälä, M. 2003. Thermokarst Ponds as Indicators of the Former Distribution of Palsas in Finnish Lapland. *Permafrost and periglacial process*. **14**: 19-27.

Mania, D., Heylen, K., Spanning., RJM., and Frostegard, A. 2014. The nitrate-ammonifying and *nosZ*-carrying bacterium *Bacillus vireti* is a potent source and sink for nitric and nitrous oxide under high nitrate conditions. *Environmental Microbiology*. **16**: 3196-3210.

Martikainen, PJ., Nykänen, H., Alm, J., and Silvola, J. 1995. Change in fluxes of carbon dioxide, methane and nitrous oxide due to forest drainage of mire sites of different trophic. *Plant and Soil*. **168**: 571-577.

Marushchak, E.M., Pitkämäki, A., Koponen, H., Biasi, C., Seppälä, M., and Martikainen,

- J.P. 2011. Hot spots for nitrous oxide emissions found in different types of permafrost peatlands. *Global Change Biology*. **17**: 2601-2614.
- McTavish, H., LaQuier, F., Arciero, D., Logan, M., Mundfrom, G. Fuchs, J., and Hooper, A. 1993. Multiple copies of genes coding for electron transport proteins in the bacterium *Nitrosomonsa europaea*. *Journal of Bacteriology*. **175**: 2445-2447.
- Miyazawa, M., Takahashi, T., Sato, T., Kanno, H., and Nanzyo, M. 2013. Factors controlling accumulation and decomposition of organic carbon in humus horizons of Andosols. *Biology and Fertility of Soils*. **49**: 1-10.
- Mosier, AR. 1994. Nitrous oxide emissions from agricultural soils. *Fertilizer research*. **37**: 191-200.
- Mosier, AR., Duxbury, JM., Freney, JR., Heinemeyer, O., and Minami, K. 1996. Nitrous oxide emissions from agricultural fields: assessment, measurement and mitigation. *Plant and Soil*. **181**: 95-108.
- Muyzer, G., Dewaal, EC., and Ulterlinden, AG. 1993. Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified gene-coding for 16S ribosomal-RNA. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**: 695-700.
- Nie, Y., Li, L., Isoda, R., Wang, M., Hatano, R., and Hashidoko, Y. 2016. Physiological and Genotypic Characteristics of Nitrous Oxide (N<sub>2</sub>O)-Emitting Pseudomonas Species Isolated from Dent Corn Andisol Farmland in Hokkaido, Japan. *Microbes and Environments*. **31**: 93-103.
- Nie, Y., Li, L., Wang, M., Tahvanainen, T., and Hashidoko, Y. 2015. Nitrous oxide emission potentials of *Burkholderia* species isolated from the leaves of a boreal peat moss *Sphagnum fuscum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **79**: 2086-2095.
- Nihlen, T. 2000. Palsas in härjedalen, sweden: 1910 and 1998 compared. *Geografiska Annaler: Series A, Physical Geography*. **82**: 39-44.
- Obia, A., Cornelissen, G., Mulder, J., and Dörsch, P. 2015. Effect of soil pH increase by

- biochar on NO, N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> production during denitrification in acid soils. *PLoS ONE*. **10**: e0138781.
- Ohta, K. 2011. Effects of organic material input on soil organic carbon in the long term experiment. *Soil and Water research Materials*. **28**: 23-30.
- Orellana, LH., Rodriguez-R, LM., Higgins, S., Chee-Sanford, JC., Sanford, RA., Ritalahti, KM., Löffler, FE., and Konstantinidis, KT. 2014. Detecting nitrous oxide reductase (*nosZ*) genes in soil metagenomes: methods development and implications for the nitrogen cycle. *mBio*. **5**: e01193-14
- Palmer, K., Biasi, C., and Horn, MA. 2012. Contrasting denitrifier communities relate to contrasting N<sub>2</sub>O emission patterns from acidic peat soils in arctic tundra. *The ISME Journal*. **6**: 1058-1077.
- Palmer, K., Drake, HL., and Horn, MA. 2009. Genome-derived criteria for assigning environmental *narG* and *nosZ* sequences to operational taxonomic units of nitrate reducers. *Applied and Environmental Microbiology*. **75**: 5170-5174.
- Palmer, K., and Horn, MA. 2012. Actinobacterial nitrate reducers and proteobacterial denitrifiers are abundant in N<sub>2</sub>O-metabolizing peat. *Applied and Environmental Microbiology*. **78**: 5584-5596.
- Park, D., Kim, H., and Yoon, S. 2017. Nitrous oxide reduction by an obligate aerobic bacterium, *Gemmatimonas aurantiaca* Strain T-27. *Applied and Environmental Microbiology*. **83**: e00502-17.
- Pauleta, SR., Dell'Acqua, S., and Moura, I. 2013. Nitrous oxide reductase. *Coordination Chemistry Reviews*. **257**: 332-349.
- Payne, W.J., Grant, M.A., Shapleigh, J., and Hoffman, P. (1982) Nitrous oxide reduction in *Wolinella succinogenes* and *Campylobacter* species. *Journal of Bacteriology*. **152**: 915-918.
- Pendea, F., and Chmura, GL. 2012. Calibration of pollen assemblages and carbon–nitrogen ratios to discriminate boreal wetland types. *Review of Palaeobotany and*

*Palynology*. **174**: 48-56.

Pengerud, A., Ce'cillon, L., Johnsen, LK., Rasse, DP., and Strand, LT. 2013. Permafrost distribution drives soil organic matter stability in a subarctic palsja peatland. *Ecosystems*. **16**: 934-947.

Pfenning, KS., and McMahon, PB. 1997. Effect of nitrate, organic carbon, and temperature on potential denitrification rates in nitrate-rich riverbed sediments. *Journal of Hydrology*. **187**: 283-295.

Philippot, L., Andert, J., Jones, CM., Bru, D., and Hallin, S. 2011. Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for N<sub>2</sub>O emissions from soil. *Global Change Biology*. **17**: 1497-1504.

Philippot, L., Čuhel, J., Saby, NPA., Chèneby, D., Chrončáková, A., Bru, D., Arrouays, D., Martin-Laurent, F., and Šimek, M. 2009. Mapping field-scale spatial patterns of size and activity of the denitrifier community. *Environmental Microbiology*. **11**: 1518-1526.

Pomowski, A., Zumft, WG., Kroneck, PMH., and Einsle, O. 2011. N<sub>2</sub>O binding at a 4Cu: 2S copper sulphur cluster in nitrous oxide reductase. *Nature*. **477**: 234-237.

Purkhold, U., Wagner, M., Timmermann, G., Pommerening-Roser, A., and Koops, HP. 2003. 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **53**: 1485-1494.

Rath, PM., and Schmidt, D. 2001. Gellan gum as a suitable gelling agent in microbiological media for PCR applications. *Journal of Medical Microbiology*. **50**: 108-109.

Ravishankara, AR., Daniel, JS., and Portmann, RW. 2009. Nitrous Oxide (N<sub>2</sub>O): the dominant ozone-depleting substance emitted in 21<sup>st</sup> century. *Science*. **326**: 123-125.

Regina, K., Nykänen, H., Silvola, J., and Martikainen, PJ. 1996. Fluxes of nitrous oxide from boreal peatlands as affected by peatland type, water table level and nitrification

- capacity. *Biogeochemistry*. **35**: 401-418.
- Regina, K., Silvola, J., and Martikainen, P.J. 1999. Short-term effects of changing water table on N<sub>2</sub>O fluxes from peat monoliths from natural and drained boreal peatlands. *Global Change Biology*. **5**: 183-189.
- Regina, K., Syväsalö, E., Hannukkala, A., and Esala, M. 2004. Fluxes of N<sub>2</sub>O from farmed peat soils in Finland. *European Journal of Soil Science*. **55**: 10.1111/j.1365-2389.2004.00622.x
- Repo, M.E., Susiluoto, S., Lind, S.E., Jokinen, S., Elsakov, V., Biasi, C., Virtanen, T., and Martikainen, P.J. 2009. Large N<sub>2</sub>O emissions from cryoturbated peat soil in tundra. *Nature Geoscience*. **2**: 189-192.
- Ritchie, G.A.F., and Nicholas, D.J.D. 1972. Identification of the sources of nitrous oxide produced by oxidative and reductive processes in *Nitrosomonas europaea*. *Biochemical Journal*. **126**: 1181-1191.
- Romanovsky, V., Burgess, M., Smith, S., Yoshikawa, K., and Brown, J. 2002. Permafrost temperature records: indicators of climate change. *Eos*. **50**: 589-600.
- Ryden, J.C., Lund, L.J., and Focht, D.D. 1979. Direct measurement of denitrification loss from soils: I. Laboratory evaluation of acetylene inhibition of nitrous oxide reduction. *Soil Science Society of American Journal*. **43**: 104-110.
- Saggar, S., Jha, N., Delippe, J., Bolan, N.S., Luo, J., Kim, D.G., Zaman, M., and Tillman, R.W. 2013. Denitrification and N<sub>2</sub>O: N<sub>2</sub> production in temperate grasslands: Processes, measurements, modelling and mitigating negative impacts. *Science of the Total Environment*. **465**: 173-195.
- Sanford, R.A., Wangner, D.D., Wu, Q., Chee-sanford, J.C., Thomas, S.H., CruzGarcia, C., Rodriguez, G., *et al.* 2012. Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils. *PNAS*. **109**: 19709-19714.
- Sangkhobol, V., and Skerman, V.B.D. 1981. *Chitinophaga*, a new genus of chitinolytic myxobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **31**: 285-293.

- Schalk-Otte, S., Seviour, R.J., Kuenen, J.G., and Jetten, M.S.M. 2000. Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) production by *Alcaligenes faecalis* during feast and famine regimes. *Water Research*. **34**: 2080-2088.
- Scala, D.J., and Kerkhof, L.J. 1988. Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three *nosZ* genes from marine sediments. *FEMS Microbiology Letters*. **162**: 61-68.
- Schenk, J, Geisen, S, Kleinbölting, N, and Traunspurger, W. 2019. Metabarcoding data allow for reliable biomass estimates in the most abundant animals on earth. *Metabarcoding and Metagenomics*. **3**: 117–126.
- Seppälä, M. 1986. The Origin of Palsas. *Geografiska Annaler: Series A, Physical Geography*. **3**: 141-147.
- Seppälä, M. 2006. Palsa mires in Finland. *The Finnish environment* **23**: 155-162.
- Shapleigh, J. 2013. Denitrifying prokaryotes. *The Prokaryotes*. **2**: 405-425.
- Sharma, S., Szele, Z., Schilling, R., Munch, J.C., and Schloter, M. 2006. Influence of freeze-thaw stress on the structure and function of microbial communities and denitrifying populations in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**: 2148-2154.
- Sheffield, V.C., Cox, D.R., Lerman, L.S., and Myers, R.M. 1989. Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *PNAS*. **86**: 232-236.
- Siddiqui, R., Warnecke-Ebers, U., Hengsberger, A., Schneider, B., Kostka, S., and Friedrich, B. 1993. Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Journal of Bacteriology*. **175**: 5867-5876.
- Silva, V., Mol, H.G.J., Zomer, P., Tienstra, M., Ritsema, C.J., and Geissen, V. 2018. Pesticide residues in European agricultural soils – a hidden reality unfolded. *Science of*

*the Total Environment*. **653**: 1532-1545.

Simon, J., Einsle, O., Kroneck, PMH., and Zumft, WG. 2004. The unprecedented *nos* gene cluster of *Wolinella succinogenes* encodes a novel respiratory electron transfer pathway to cytochrome c nitrous oxide reductase. *FEBS Letter*. **569**: 7–12.

Simpson, PJ., Richardson, DJ., and Codd, R. 2010. The periplasmic nitrate reductase in *Shewanella*: the resolution, distribution and functional implications of two NAP isoforms, NapEDABC and Nap DAGHB. *Microbiology*. **156**: 302-312.

Smith, P., Martino, D., Cai, Z., Gwary, D., Janzen, H., Kumar, P., McCarl, B., *et al.* 2008. Greenhouse gas mitigation in agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. **363**: 789-813.

Smith, MS., and Zimmerman, K., 1981. Nitrous oxide production by nondenitrifying soil nitrate reducers. *Soil Science Society of America Journal*. **45**: 865-871.

Sollid, JL., and Sørbel, L. 1998. Palsa bogs as a climate indicator: examples from Dovrefjell, Southern Norway. *Research for Mountain Area Development*. **27**: 287-291.

Stevens, RJ., Laughlin, RJ., and Malone, JP. 1998. Soil pH affects the processes reducing nitrate to nitrous oxide and dinitrogen. *Soil Biology and Biochemistry*. **30**: 1119-1126.

Stieglmeier, M., Mooshammer, M., Kitzler, B., Wanek, W., Zechmeister-Boltenstern, S., Richer, A., and Schleper, C. 2014. Aerobic nitrous oxide production through N-nitrosating hybrid formation in ammonia-oxidizing archaea. *ISME Journal*. **8**: 1135-1146.

Stolte, J., Tesfai, M., Øygarden, L., Kværnø, S., Keizer, J., Verheijen, F., *et al.* 2016. Soil threats in Europe. *Publications Office of the EU*.

Syakila, A., and Kroeze, C. 2011. The global nitrous oxide budget revisited. *Greenhouse Gas Measurement Management*. **1**: 17-26.

Tani, M., Kunimoto, A., Kato, T., and Koike, M. 2010. Effect of organic ligands on phosphate adsorption and availability in Andisols of eastern Hokkaido, Japan. *19<sup>th</sup>*

*World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World.* 52-55.

Takata, Y., Obara, H., Nakai, M and Kohyama, K. 2011. Process of the decline in the cultivated soil area with land use changes in Japan. *Japanese Journal of Soil Science Plant Nutrient.* **82**: 15–24.

Takeda, H., Takahashi, N., Hatano, R., and Hashidoko, Y. 2012. Active N<sub>2</sub>O emission from bacterial microbiota of Andisol farmland and characterization of some N<sub>2</sub>O emitters. *Journal of Microbiology.* **52**: 477-486.

Tchan, YT., and New, PB. 1984. Genus 1. *Azotobacter Beijerinck* 1907, 567.<sup>AL</sup>. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 8<sup>th</sup> Ed.* Edited by Krieg, NR., Holt, JG. Baltimore: Williams and Wilkins Co: 220-229.

Ussiri, D., and Lal, R. 2013. The role of nitrous oxide on climate change. In Ussiri D, Lal R (eds.), *Soil Emission of Nitrous Oxide and its Mitigation*, Springer, Dordrecht, the Netherlands: 1-28.

van, Groenigen, JW., Huygens, D., Boeckx, P., Kuiper, TW., Luebbers, I., Rutting, T., and Groffman, PM. 2014. The Soil N cycle: new insights and key challenges. *Soil Discuss.* **1**: 623-676.

Verstraete, W., and Focht, DD. 1977. Biochemical ecology of nitrification and denitrification. *Advances in Microbial Ecology.* **1**: 135-214.

Voigt, C., Marushchak, ME., Lamprecht, RE., Jackowicz-Korczynski, M., Lindgren, A., Mastepanov, M., and Granlund, L., *et al.* 2017. Increased nitrous oxide emissions from Arctic peatlands after permafrost thaw. *PNAS.* **114**: 1702902114.

Wang, C., Zhu, G., Wang, Y., Wang, S., and Yin, C. 2012. Nitrous oxide reductase gene (*nosZ*) and N<sub>2</sub>O reduction along the littoral gradient of a eutrophic freshwater lake. *Journal of Environmental Science.* **25**: 44-52.

Wrag, N., Velthof, GL., van Beusichem, ML., and Oenema, O. 2001. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology and Biochemistry.* **33**: 1723-1732.

- Webster, EA., and Hopkins, DW. 1996. Nitrogen and oxygen isotope ratios of nitrous oxide emitted from soil and produced by nitrifying and denitrifying bacteria. *Biology and Fertility of Soils*. **22**: 326-330.
- Wunsch, P., and Zumft, WG. 2005. Functional domains of NosR, a novel transmembrane iron-sulfur flavoprotein necessary for nitrous oxide respiration. *Journal of Bacteriology*. **187**: 1992-2001.
- Wood, DW., Setubal, JC., Kaul, RD., Monks, E., Kitajima, JP., Okura, VK., Zgou, Y., *et al.* 2001. The genome of the natural engineer *agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*. **294**: 2317-2323.
- Woolf, D., Amonette, JE., Street-perrott, FA., Lehannes, J., and Jo, S. 2010. Sustainable biochar to mitigate global climate change. *Nature Communications*. 10.1038/ncomms1053
- Yasir, M., Chung, EJ., Song, GC., Bibi, F., Jeon, CO., and Chung, YR. 2011. *Chitinophaga eiseniae* sp. nov., isolated from vermicompost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **61**: 2373-2378.
- Yang, S., Wang, J., Cong, W., Cai, Z., and Ouyang, F. 2004. Utilization of nitrite as a nitrogen source by *Botryococcus braunii*. *Biotechnology Letters*. **26**: 239–243.
- Yao, S., Ni, J., Ma, T., and Li, C. 2013. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacteria, *Acinetobacter* sp. HA2. *Bioresource Technology*. **139**: 80-89.
- Yoshinari, T., and Knowles, R. 1976. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **69**: 705-710.
- Zuidhoff, SF., and Kolstrup, E. 2000. Changes in permafrost distribution in relation to climate change in Laivadalén, northern Sweden, especially 1960–1997. *Permafrost and Periglacial Processes*. **11**: 55-69.

Zumft, WG. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **61**: 533-616.

Zumft, WG. 2005. Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme–copper oxidase type. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **99**: 194-215.

Zumft, WG., and Kroneck, H. 2007. Nitrous oxide reductases. In Bothe H, Fergusson SJ, Newton WE (eds), *Biology of the Nitrogen Cycle*, Elsevier, Amsterdam: 67-81.