

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780055

研究課題名(和文) 土壌における硝酸からアンモニウムへの異化的還元反応の実態解明

研究課題名(英文) Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium in Soil

研究代表者

磯部 一夫 (Kazuo, Isobe)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：30621833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：土壌における硝酸からアンモニウムへの異化的還元(DNRA)反応を担う微生物群の特定とDNRA反応の重要性について検証した。水田土壌および転換畑土壌から分離された100株前後の硝酸還元菌を用いてDNRA活性の有無を検証した。その結果、優占種であるBacillus属、Paenibacillus属、Enterobacter属、Ralstonia属細菌においてDNRA活性を有することが明らかになった。さらに糖やアルコールを電子供与体とした場合にその活性が高くなることが明らかとなった。しかし、採取した水田土壌にグルコースを添加した場合においても硝酸からのアンモニウム生成はわずかであった。

研究成果の概要(英文)：We studied about (1) which microorganisms have the ability to dissimilatorily reduce nitrate to ammonium (DNRA) in soil and (2) how important the reaction is in soils. Firstly, we investigated the DNRA activity of about 100 bacterial strains which have been isolated from the paddy and cropland soils. We found that bacteria belonging to the genus, Bacillus, Paenibacillus, Enterobacter, Ralstonia have the ability. We also found that glucose or alcohol as the electron donor increase the activity. However, significant DNRA was not observed in the paddy soil after the addition of glucose as the electron donor.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：DNRA 硝酸還元 水田土壌

## 1. 研究開始当初の背景

陸上生態系において、 $\text{NH}_4^+$ や $\text{NO}_3^-$ などの無機態窒素の供給が植物の一次生産を制限している。特に、多くの植物は窒素源として $\text{NH}_4^+$ を好んで吸収すること、 $\text{NO}_3^-$ は陰イオンであるため土壌から溶脱しやすいことから、土壌中での $\text{NH}_4^+$ の生成を把握することは生態系の窒素代謝を把握する上で極めて重要である。従来の窒素循環図では無機化、硝化、脱窒、同化(吸収)、 $\text{NO}_3^-$ 溶脱を中心に描かれてきた。その一方で、古くから一部の硝酸還元菌は最終生成物として $\text{NH}_4^+$ を生成( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$ )する、すなわち $\text{NO}_3^-$ から $\text{NH}_4^+$ への異化的還元(dissimilatory nitrate reduction to ammonium; DNRA)活性を有することが知られている。しかし実際の環境中でこのような反応が起こり得るのは、主に極めて嫌氣的かつ養分供給の多い畜産廃水のようなどころであると考えられ、土壌中でのDNRA反応についてはほとんど着目されてこなかった。しかし近年、嫌氣的部位を含有しながらも好氣的であり、かつ貧栄養と考えられる土壌においてもDNRA反応が起きているという報告がされ始めている。土壌のDNRA反応の実態とその重要性、すなわちDNRA反応がどのような微生物群によって担われ、どの程度起きている、それが窒素循環の中でどれだけの重要性を持っているのかを明らかにすることは、土壌の窒素保持機構や土壌から植物への養分供給の仕組みを明らかにする上で極めて重要である。

## 2. 研究の目的

(1) 水田や畑土壌から分離された硝酸還元活性を有する細菌群についてDNRA活性を有する細菌群を特定する。  
(2) 上記で得られたDNRA活性を有する細菌群に対して、どのような条件において活性が向上するのか、電子供与体の種類に着目して明らかにする。

(3) 水田土壌中でのDNRA反応の速度論的解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 水田土壌および畑地土壌から得られた硝酸還元細菌からゲノムDNAを抽出した。16S rRNA遺伝子のほぼ全長をPCRで増幅し、前半500bpの塩基配列を解読し、同定した。  
(2) それらの菌株に対してDNRA活性の有無を測定した。分離時に利用した培地(1/100NB培地+3.3mMコハク酸)に重窒素( $^{15}\text{N}$ )でラベルした硝酸(3mM)を加え、嫌気条件で培養し、添加した硝酸に由来する $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{N}_2$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ を測定した。  
(3) 培地・電子供与体の種類を変え、DNRA活性が向上する条件を特定した。培地として1/100NB培地、リン酸無機培地、1/10R2A培地、1/100TSB培地を検討した。また電子供与体としてコハク酸の他にグルコース、グリセロール、アミノ酸、有機酸を検討した。DNRA活性の測定方法は(2)と同様である。  
(4) 水田土壌中のDNRA活性を測定した。まずバイアル瓶に水田土壌を充填した。嫌気条件で2日間培養し、硝酸を消費させた。続いて $^{15}\text{N}$ でラベルした硝酸(1mM-N)と電子供与体(7mM-C)を加え、嫌気条件で6時間培養し、添加した硝酸に由来する $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{N}_2$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ を測定した。

## 4. 研究成果

(1) 水田土壌および畑地土壌から分離された硝酸還元細菌は*Bacillus*属、*Pseudogulbenkiania*属、*Bradyrhizobium*属、*Ralstonia*属、*Mesorhizobium*属、*Burkholderia*属、*Pseudomonas*属、*Paenibacillus*属、*Sinorhizobium/Ensifer*属、*Cupriavidus*属の細菌であることがわかった。  
(2) 硝酸還元の最終産物は細菌の属レベルの系統分類で異なる傾向が見られた。特に優占

的に分離された *Bucillus* 属、*Pseudobacillus* 属細菌は  $\text{NH}_4^+$  を、*Pseudogulbenkiania* 属細菌は  $\text{N}_2$  を、*Ralstonia* 属細菌は  $\text{N}_2\text{O}$  を主な最終産物とした。*Bucillus* 属、*Pseudobacillus* 属細菌の他には *Enterobacter* 属、*Ralstonia* 属細菌の  $\text{NH}_4^+$  の生成が確認された。特に *Bucillus* 属細菌は脱窒をすることなく  $\text{NH}_4^+$  を生成したこと、また土壌中にも優占して存在していることから、土壌中で優占的に  $\text{NH}_4^+$  生成を担っている可能性が考えられた。

(3) 硝酸還元細菌の培養条件について、1/100TSB 培地を用いた場合（電子供与体はコハク酸またはグルコース）に、 $\text{NH}_4^+$  生成活性を有する細菌群の  $\text{NH}_4^+$  生成活性が高く維持されることが分かった。一方で、1/100NB 培地およびリン酸無機培地を用いた場合には多くの菌株において亜硝酸の蓄積が見られた。それにより増殖が阻害され、同時に  $\text{NH}_4^+$  生成が阻害されている可能性が高いことが考えられた。また電子供与体の C 量と硝酸の N 量の比も亜硝酸の蓄積に影響を与え、C/N（モル比）が 50 以下の場合に亜硝酸が顕著に蓄積した。続いて、 $\text{NH}_4^+$  生成活性と電子供与体の関係について検討した。その結果グルコースとグリセロールを電子供与体として用いた時に  $\text{NH}_4^+$  生成活性を有する細菌群の  $\text{NH}_4^+$  生成活性が高く維持された。一方で、アミノ酸や有機酸を用いた場合には脱窒活性を有する細菌群の脱窒活性の上昇は見られたが、 $\text{NH}_4^+$  生成活性を有する細菌群の  $\text{NH}_4^+$  生成活性は低下した。

(4) 水田土壌において電子供与体としてグルコースを添加し DNRA 活性（ $^{15}\text{NO}_3^-$  からの  $^{15}\text{NH}_4^+$  の生成）を測定した結果、 $^{15}\text{NO}_3^-$  は主に  $^{15}\text{N}_2$  または  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  に還元され、 $^{15}\text{NH}_4^+$  の生成はほとんど確認できなかった（添加した  $^{15}\text{NO}_3^-$  のうち 1%程度が  $^{15}\text{NH}_4^+$  として検出された）。また電子供与体をしてコハク酸、グリセロールやアミノ酸、有機酸を添加した場合にも同様であった。以上から供試した

水田土壌中には DNRA 活性を有する細菌群が多く存在してはいるが、その活性は高くないことが示唆された。しかしその一方で電子供与体として土壌中のアンモニウム濃度は常に低かったことから  $^{15}\text{NH}_4^+$  が生成しても同化されてしまい  $^{15}\text{NH}_4^+$  が検出できていない可能性も考えられた。今後は培養の条件と時間をさらに検討する必要があると考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kazuo Isobe and Nobuhito Ohte, Ecological Perspectives on Microbes Involved in N-Cycling. *Microbes and Environments*, 査読有, Vol. 29, 2014, p. 4-16.

DOI: 10.1264/jsme2.ME13159

Wei Wei, Kazuo Isobe, Yutaka Shiratori, Tomoyasu Nishizawa, Nobuhito Ohte, Shigeto Otsuka, Keishi Senoo,  $\text{N}_2\text{O}$  emission from cropland field soil through fungal denitrification after surface applications of organic fertilizer. *Soil Biology and Biochemistry*, 査読有, Vol. 69, 2014, p.157-167.

DOI: 10.1016/j.soilbio.2013.10.044

〔学会発表〕(計 1 件)

Kazuo Isobe, Nobuhito Ohte, Tomoki Oda, Hiroyuu Kato, Sho Murabayashi, Wei Wei, Ryunosuke Tateno, Naoko Tokuchi, Keishi Senoo, Close Relationship between Nitrogen Dynamics and Microbial Communities in Forest Soil, 6<sup>th</sup> EAFES International Congress, 2014 年 4 月 9 日～2014 年 4 月 11 日, Huandao Ti De Hotel( 中華人民共和国 )

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/soil-cosmology/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

磯部 一夫 ( ISOBE, Kazuo )

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号： 30621833