

多摩川における亜酸化窒素生成細菌の生態と  
窒素動態における役割の解明

2011年

多羅尾 光徳  
東京農工大学農学部 准教授

## 要 旨

本研究では多摩川上流（鳩ノ巣）・中流（拝島橋）・下流（丸子橋）の河川水および石面付着微生物膜における亜酸化窒素生成脱窒微生物の分布を明らかにし，河川からの亜酸化窒素（ $N_2O$ ）放出と亜酸化窒素生成脱窒微生物との関連を推測することを目的とした。河川水および石面付着微生物膜には，有機態炭素および硝酸態窒素濃度が 70 および  $7\text{ mg L}^{-1}$  の低濃度の培地を用いたときのほうが，硝酸塩肉エキス培地のような有機態炭素および硝酸態窒素濃度が 3,900 および  $70\text{ mg L}^{-1}$  もの高濃度の培地を用いたときよりも 10～1,000 倍も多く全脱窒微生物を検出した。また，これらの全脱窒微生物の多くは，硝酸を  $N_2O$  にまでしか還元することのできない亜酸化窒素生成脱窒微生物であると推察された。多摩川の河川水から分離された亜酸化窒素生成脱窒細菌は硝酸の大部分を亜硝酸に還元し，さらにその約半分を  $N_2O$  にまで還元したが，分子窒素（ $N_2$ ）にまでは還元できない細菌であった。多摩川上流および下流から採取した河川水と微生物膜が付着する石を密閉容器にて培養したところ，上流の試料においては生じた気体状窒素のほとんどは分子窒素であったのに対して，下流の試料においてはほとんどが  $N_2O$  であった。河川水および石面付着微生物膜の亜酸化窒素生成脱窒微生物は，多摩川からの  $N_2O$  放出に寄与している可能性が示された。

## 1 はじめに

亜酸化窒素（一酸化二窒素，笑気ガス。分子式  $\text{N}_2\text{O}$ ）は大気中に 319 ppb(体積ベース)（2005 年時点。IPCC, 2007）含まれる気体状窒素化合物である。二酸化炭素（ $\text{CO}_2$ ）の 379 ppm(体積ベース)と比較して低いものの、 $\text{CO}_2$  の 310 倍もの温室効果を有しているため、放射強度は  $0.16 \text{ W m}^{-2}$  と、二酸化炭素の 1.66 の約 10 分の 1 にも達する（IPCC, 2007）。しかも、大気中では 114 年の寿命がある安定な気体であるため、地球の平均気温の上昇や気候変動を予測・対応するうえで考慮すべき重要な気体である。さらに、 $\text{N}_2\text{O}$  は成層圏オゾン層の破壊にも寄与することが知られている（Ravishankara *et al.*, 2009 ; Waibel, 1999）。

$\text{N}_2\text{O}$  の発生源には自然起源と人為起源とがある。自然起源は海洋・土壌からの放出，およびアンモニアの大気中における酸化である（IPCC, 2007）。人為起源としては窒素肥料の施用による農地からの放出，バイオマス燃焼，化石燃料燃焼，家畜飼育，淡水環境・海洋からの放出などがあげられる（IPCC, 2007; Nevison *et al.*, 1995; Seitzinger & Kroeze, 1998）。人為起源  $\text{N}_2\text{O}$  の発生量は自然起源とほぼ同じと推定されている。窒素肥料の施用によって農地から  $\text{N}_2\text{O}$  が放出される理由は、微生物が硝酸イオン（ $\text{NO}_3^-$ ）を脱窒したり，アンモニウムイオン（ $\text{NH}_4^+$ ）を硝化したりする過程において，副生成物として  $\text{N}_2\text{O}$  を発生するためである（Hayatsu *et al.*, 2009; Yoshinari, 1990）。窒素肥料の世界全体の施用量は 2002 年には  $8.64 \times 10^7 \text{ t-N}$  であったのが，2009 年には  $1.05 \times 10^8$  と，増加傾向にある（FAOSTAT）。それにともない，人為起源  $\text{N}_2\text{O}$  の放出量も増加している（Kulkarni *et al.*, 2008）。

農地に施用された窒素肥料は，一部は作物に吸収され，一部は土壌微生物により脱窒され大気に放出されるが，さらに一部は地下深部に侵入したり，土壌表面の侵食によって農地の外へ流出したり（Duxbury & Mosier, 1993）して，地下水・河口域・湿地・河川などの生態系を経て最終的に海洋へと流入する。これらの過程において，各生態系において微生物による脱窒・硝化を受けて  $\text{N}_2\text{O}$  が生成される。施肥され

た窒素肥料の最大 30% が農地の外へ流出すると見積られている (IPCC, 2007)。

農地からの  $\text{N}_2\text{O}$  の放出に関する研究は 1,000 例以上が報告されており,  $\text{N}_2\text{O}$  の放出にかかわる制限要因 (Stehfest & Bouwman, 2006) や,  $\text{N}_2\text{O}$  生成にかかわる微生物に関して数多くの知見が得られている (Anderson & Levine, 1986; Braker & Conrad, 2011; Robertson & Tiedje, 1987; Tago *et al.*, 2011)。そのいっぽう, 農地の外に流出した窒素化合物による他の生態系, とりわけ河川からの  $\text{N}_2\text{O}$  の放出に関する研究例はきわめて少なく, 未解明なことが多いのが現状である (Nevison, 2000)。しかも,  $\text{N}_2\text{O}$  の生成にかかわる微生物の河川における分布・季節変動・群集構造と, 河川からの  $\text{N}_2\text{O}$  生成との間の関連については知見がほとんどない。河川由来の  $\text{N}_2\text{O}$  は, 水界環境から放出されるうちの 20% を占めると推定されている (Seitzinger & Kroeze, 1998)。したがって, 河川からの  $\text{N}_2\text{O}$  放出のメカニズムやそれに関与する微生物についての知見を蓄積することが求められる。

亜酸化窒素は脱窒または硝化などの微生物過程によって生成される (Anderson & Levine, 1986; Braker & Conrad, 2011; Robertson & Tiedje, 1987; Tago *et al.*, 2011)。亜酸化窒素生成脱窒微生物のうち, 本研究では脱窒を行う微生物 (脱窒微生物) に注目した。脱窒とは, 微生物が嫌気条件下において  $\text{NO}_3^-$  または  $\text{NO}_2^-$  を呼吸の電子受容体として用い, 以下の過程を経て  $\text{N}_2\text{O}$  または分子窒素 ( $\text{N}_2$ ) にまで還元する反応である。



脱窒微生物は細菌・古細菌・真菌の幅広い分類群にまたがっている (Hayatsu *et al.*, 2008; Philippot *et al.* 2007)。 $\text{N}_2\text{O}$  は  $\text{N}_2$  までの脱窒過程の副生成物として生じることが知られており, その量は全脱窒量の 1% を占めることもある。また, 脱窒微生物の中には  $\text{NO}_3^-$ ・ $\text{NO}_2^-$  を  $\text{N}_2$  まで還元せずに  $\text{N}_2\text{O}$  にまでしか還元することのできない微生物 (亜酸化窒素生成脱窒微生物) も存在する (Bazylinski *et al.*, 1986; Betlach & Tiedje, 1981; Blaszczyc, 1993; Greenberg & Becker, 1977; Okada *et al.*, 2005; Philipot *et al.*, 2010; Tago *et al.*, 2011; van Rijn

*et al.*, 1996; Wood *et al.*, 2001)。近年，土壌においては分子生物学的な手法を用いて，全脱窒微生物（分子窒素生成脱窒微生物および亜酸化窒素生成脱窒微生物）のうち，亜酸化窒素生成脱窒微生物がどの程度の割合存在し， $N_2O$  生成にどのように関与しているかを推測する試みが進められている（Baker & Conrad, 2011; Cavigelli & Robertson, 2001; Ma *et al.*, 2011）。それに対して，河川において亜酸化窒素生成脱窒微生物の分布・季節変動や， $N_2O$  生成への寄与について明らかにした報告例は著しく限られている。

そこで本研究では，多摩川を対象に，河川における亜酸化窒素生成脱窒微生物の分布を明らかにし，河川からの  $N_2O$  放出と亜酸化窒素生成脱窒微生物との関連を推測することを目的とした。まず，多摩川の河川水と石面付着微生物膜における全脱窒微生物の分布・季節変動を調査した（第2章）。次に，全脱窒微生物に占める亜酸化窒素生成脱窒微生物の割合を推定した（第3章）。続いて，亜酸化窒素生成脱窒細菌を分離しその脱窒特性を調べた（第4章）。最後に，多摩川の窒素循環における亜酸化窒素生成脱窒微生物の役割を解明するため，多摩川の河川水と石面付着微生物膜を用いたシミュレーション培養を行い，多摩川からの  $N_2O$  放出の可能性を検討した（第5章）。

なお，本研究では脱窒微生物を以後，分子窒素生成脱窒微生物（ $NO_3^-$  または  $NO_2^-$  を  $N_2$  にまで還元することのできる脱窒微生物）と，亜酸化窒素生成脱窒微生物（ $NO_3^-$  または  $NO_2^-$  を  $N_2O$  にまでしか還元することのできない脱窒微生物）のふたつに区別し，両方を総称するときには全脱窒微生物と記す。

## 2 多摩川における全脱窒微生物の分布・季節変動

### 2.1 はじめに

全脱窒微生物のような特定の機能を有する微生物群の数を計測する方法として、最確数 (most probable number, MPN) 法が広く用いられている。これは、段階的に希釈した試料の一部をあらかじめ用意した複数の液体培地にそれぞれ接種して培養した後、それぞれの希釈段階において微生物の増殖、基質の消失、または代謝物の生成が認められた培地の数から、もとの試料中に存在していた対象とする微生物の密度を推計学に基づいた手法で推定する方法である。求められた値を MPN と呼ぶ。

硝酸塩肉エキス (nitrate nutrient broth, NNB) 培地は、全脱窒微生物を計数するための MPN 法において用いられてきた代表的な培地である (Tiedje, 1994)。この培地には有機態炭素が  $3,900 \text{ mg L}^{-1}$ 、硝酸態窒素が 70 と高濃度に含まれる。ところが、自然環境中に存在する細菌のほとんどは、貧栄養細菌 (oligotrophic bacteria) と呼ばれる、有機態炭素が  $100 \text{ mg L}^{-1}$  や 10 以下のような低濃度において増殖し、機能を発揮する細菌であることが知られている (Kuznetsov *et al.*, 1979; Morita, 1997; Yanagita *et al.*, 1978)。このことは、NNB 培地のような高濃度の培地を用いては、自然環境中の全脱窒微生物の数を過少評価していた可能性を予想させる。

貧栄養性の全脱窒細菌の報告例はきわめて限られている。Hashimoto *et al.* (2006) は土壌において、100 分の 1 に希釈した肉エキス培地を用いたときには、希釈しない肉エキス培地を用いたときよりも 100 倍も多く全脱窒微生物を計数できることを報告し、さらに土壌から貧栄養性脱窒細菌を分離している (Hashimoto *et al.*, 2009)。中西 (2004) は、有機態炭素が  $70 \text{ mg L}^{-1}$ 、硝酸態窒素が 7 と、NNB 培地に比べて有機態炭素が約  $1/60$ 、硝酸態窒素が  $1/10$  の低濃度の MS-NAY (mineral solution with nitrate, acetate, and yeast extract) 培地を開発し、NNB 培地を用いた場合と比べて 10~100 倍の高い全脱窒微生物 MPN を得ている。これらの結果は、有機態炭素や硝酸態窒素

が低濃度において脱窒能を発揮できる微生物が環境中には多く存在していることを示唆している。しかしながら、土壌における報告例はあるものの、淡水環境にも貧栄養性の全脱窒微生物が分布しているかについては、中西（2004）の報告例をのぞいてまったく知られていない。

そこで本章では、MS-NAY 培地を用いた MPN 法に関してさらなる知見を得ることを目的とし、多摩川において MS-NAY 培地と NNB 培地の双方を用いて全脱窒微生物群を計数し、季節変化や場所ごとの違いがあるのか調査した。また、本研究では、河川水だけでなく、河川等の流水中において微生物が機能するにあたり重要な役割を果たす微生物膜（Pusch, 1998）にも注目し、全脱窒微生物 MPN を調査した。

## 2.2 材料と方法

### 2.2.1 培地

NNB 培地（Table 1）と MS-NAY 培地（Tables 2 & 3）を用いた。NNB 培地の有機態炭素は  $3,900 \text{ mg L}^{-1}$ 、硝酸態窒素は 70 であった。MS-NAY 培地の有機態炭素は  $70 \text{ mg L}^{-1}$ 、硝酸態窒素量は 7、全窒素は 9 であった。

### 2.2.2 試料

2010 年 1・4・7・10 月に多摩川の上流（鳩ノ巣小橋付近）・中流（拝島水道橋付近）・下流（丸子橋付近）にて、河川水と石面付着微生物膜を採取した。河川水の採水日時および水質データを Table 4 に示した。河川水は、河川中央付近にて表層水を滅菌済 1 L 容ネジ口瓶に、気相が生じないように採取した。石面付着微生物膜は、河川中央付近にて川底の任意に選んだ 3 個の石の表面から、ミクロスパーテルを用いて  $10 \text{ cm}^2$  ずつ削り取り、滅菌イオン交換水 30 mL に懸濁した。これらを氷上にて冷却しながら研究室に持ち帰り、その日のうちに培養に供した。

### 2.2.3 水質の測定

水温および電気伝導度は試料採取の際にアルコール棒温度計および電気伝導度計（ES-14, HORIBA）でそれぞれ測定した。

河川水を研究室に持ち帰った後、pHをpHメータ（カスターニーLAB pHメータ M-12, HORIBA）にて、アルカリ度をドロップテスト（M）アルカリ度（WAD-AL-M, 共立理化化学研究所）にて、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>およびNO<sub>2</sub><sup>-</sup>濃度をイオンクロマトグラフィー（本体, 883 Basic IC plus 1, Metrohm; カラム, Metrosep A supp 4-250, 4 mm×250 mm, 粒径 9.0 μm; 溶離液, 1.7 mM NaHCO<sub>3</sub>/1.8 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>）にてそれぞれ測定した。

#### 2.2.4 全脱窒微生物密度の計数

河川水 1 mL または石面付着微生物膜懸濁液 1 mL を滅菌イオン交換水にて 10<sup>-1</sup> 倍ずつ段階的に希釈した。希釈試料 1 mL をネジ口試験管（全長 150 mm, 口径 15 mm）内の MS-NAY 培地 9 mL またはネジ口試験管（全長 100 mm, 口径 15 mm）内の NNB 培地 9 mL に接種し、ブチル W 栓（太陽興業）で密封した。各希釈段階につき 3 本の試験管を用意した。また、無菌区として、滅菌イオン交換水 1 mL を接種した試験管をそれぞれの培地に設けた。NNB 培地を含むネジ口試験管の気相には体積比で 10% となるように孔径 0.1 μm のフィルターで滅菌したアセチレン（C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>）を注入し、N<sub>2</sub>O から N<sub>2</sub> への還元と、硝化を阻害した。暗所 25°C で適宜かくはんしながら、MS-NAY 培地では 21 日間、NNB 培地では 14 日間、静置培養した。

培養後、試験管内における脱窒反応の有無を判定した。各希釈段階において脱窒反応を示した（脱窒陽性）試験管の数から MPN コードを求め、コード表（下水試験方法, 1997）から全脱窒微生物の MPN を求めた。

脱窒陽性は以下の基準にもとづき判定した。すなわち、MS-NAY 培地では、培地中の全窒素濃度が無菌区に比べて 2 割以上低下、すなわち、気体状窒素に変換されたもの（中西, 2003）を脱窒陽性とした。NNB 培地では培地中に NO<sub>3</sub><sup>-</sup> または NO<sub>2</sub><sup>-</sup> が残留しておらず、かつ N<sub>2</sub>O が硝酸態窒素の 20% 以上生成していたものを脱窒陽性とした（Tiedje, 1994）。

#### 2.2.5 全窒素濃度, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>・NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, および N<sub>2</sub>O 濃度の測定方法

全窒素濃度は全窒素計（本体, TOC-V<sub>E</sub> TNM-1, 島津製作所; キャ



リアガス，高純度空気；キャリアガス流圧，200 kPa；キャリアガス流速，150 mL min<sup>-1</sup>；電気炉温度，720℃；除湿器（電子式クーラ）温度，1.0℃）を用いて測定した。測定の前処理として試験管中の培地にペルオキシ二硫酸カリウム（K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>）0.2 gを加え，オートクレーブで121℃，30分間加熱処理した。

培地中のNO<sub>3</sub><sup>-</sup>またはNO<sub>2</sub><sup>-</sup>の有無は，硫酸ジフェニルアミン溶液の呈色の有無によって判定した。すなわち，培地を一部採取し，2 g L<sup>-1</sup>硫酸ジフェニルアミン溶液を滴下し，青色に呈色した場合は培地中にNO<sub>3</sub><sup>-</sup>またはNO<sub>2</sub><sup>-</sup>が含まれ，呈色しなかった場合は含まれていないと判断した。

N<sub>2</sub>O濃度はガスクロマトグラフィ（本体，GC-2014，島津製作所；検出器，<sup>63</sup>Ni電子捕獲型検出器，島津製作所；カラム，ステンレスカラム3 mm × 3 m；カラム充填剤，Porapak Q，島津製作所；キャリアガス，ゴールド窒素ガス（99.999%N<sub>2</sub>）；カラム流速，30 mL min<sup>-1</sup>；インジェクション温度，80℃；カラム温度，60℃；検出器温度，300℃）を用いて測定した。気相中のN<sub>2</sub>O濃度より，試験管中の全N<sub>2</sub>O量を以下の式（Tiedje, 1994）から算出した。

$$M = Cg(Vg + VI\alpha)$$

ここで， $M$ は試験管中の全N<sub>2</sub>O量を， $Cg$ は気相のN<sub>2</sub>O濃度を， $Vg$ は気相の体積（6 mL）を， $VI$ は液相の体積（10 mL）を， $\alpha$ はBunsenの吸収計数（25℃，1 atmにおけるN<sub>2</sub>Oの計数；0.544）を，それぞれ表わす。

### 2.2.6 従属栄養微生物密度の計数

MS-NAY培地，NNB培地のいずれにおいても，目視で白濁が認められたものについて，従属栄養微生物が存在すると判定し，従属栄養微生物の増殖陽性とした。コード表から従属栄養微生物のMPNを求めた。

## 2.3 結果と考察

### 2.3.1 全脱窒微生物の計数におけるMS-NAY培地とNNB培地の比較

NNB培地およびMS-NAY培地を用いて測定された全脱窒微生物MPNおよび従属栄養微生物MPNを，採水時期ごとおよび採水地点に

における河川水および石面付着微生物膜ごとに Figs. 1~4 に示した。

多くの試水および石面付着微生物膜において、MS-NAY 培地で得られた全脱窒微生物 MPN のほうが NNB 培地で得られた MPN よりも有意に（95%信頼区間が重ならない）高かった。すなわち、1月の河川水（上流・中流）、および石面付着微生物膜（上流・中流・下流）、4月の石面付着微生物膜（中流）、7月の河川水（下流）および石面付着微生物膜（中流）、10月の石面付着微生物膜（中流）の合計 9 試料であった（Figs. 1~4, Table 5）。いっぽう、MS-NAY 培地を用いたときの全脱窒微生物 MPN のほうが NNB 培地で得られた MPN よりも有意に低い地点は観察されなかった。

これらの結果から、MS-NAY 培地では NNB 培地に比べてより多くの全脱窒微生物を計数することが可能であり、多摩川において窒素循環に参与している全脱窒微生物の密度をより正確に見積ることができると考えられた。また、多摩川の河川水・微生物膜中においては土壌における場合（Hashimoto *et al.*, 2006）と同様に、貧栄養性の全脱窒微生物が全脱窒微生物の多数派を占めている可能性が示された。

### 2.3.2 従属栄養微生物 MPN に対する全脱窒微生物 MPN の割合

河川水において、MS-NAY 培地を用いたときの全脱窒微生物 MPN は、従属栄養微生物の 1/5~1/100 程度であった（Figs. 1~4）。いっぽう、NNB 培地を用いたときの全脱窒微生物 MPN は従属栄養微生物の 1/5~1/4,200 程度であった。

石面付着微生物膜において、MS-NAY 培地を用いたときの全脱窒微生物 MPN は従属栄養微生物の 1/3~1/630 程度であった（Figs. 1~4）。いっぽう、NNB 培地を用いたときの全脱窒微生物 MPN は従属栄養微生物の 1/2~1/2,400 程度であった。

河川水・石面付着微生物膜のいずれにおいても、従属栄養微生物 MPN に対する全脱窒微生物 MPN の割合は、NNB 培地を用いたときに比べ、MS-NAY 培地を用いた方が低かった。このことから、MS-NAY 培地を用いるとより多くの全脱窒微生物を計数できると考えられた。

### 2.3.3 MS-NAY 培地を用いた全脱窒微生物 MPN の地点・季節ごとの比較

河川水においては、上流の全脱窒微生物 MPN は年間を通じてほぼ

$10^2$  MPN mL<sup>-1</sup>, 中流では  $10^2 \sim 10^3$  であり, 明確な季節変化が認められなかった (Fig. 5(A)). いっぽう, 下流では 7 月に  $10^5$  MPN mL<sup>-1</sup> と, 他の季節の  $10^2 \sim 10^3$  を大きく上回った。また, 7 月には全脱窒微生物 MPN は下流 > 中流 > 上流の順で 3 地点の間で有意な差が見られたが, 他の季節では地点間の明確な差が認められなかった。

石面付着微生物膜においては, 地点ごとに異なる傾向が見られた (Fig. 5(B)). すなわち, 上流においては 1 月と 10 月に全脱窒微生物 MPN が高かったが, 中流においては 7 月に MPN が高くなる傾向が見られた。下流においては 1 月に MPN がもっとも高かった。また, MPN は年間を通して下流 > 中流  $\geq$  上流の順に高い傾向が見られた。これは, Table 4 に示したように, 下流 > 中流 > 上流の順に河川水中の NO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度やアルカリ度が高く栄養塩類が多く含まれていることや, 水温が高いことに起因すると考えられる。石面付着微生物膜は河川における微生物の増殖・代謝の場である (Pusch, 1998)。一般に, 栄養素が多く含まれれば微生物の増殖は促進され, また, 温度が高ければ微生物の活性は高められる。いっぽう, 河川水においては 7 月を除いて, 全脱窒微生物 MPN の地点間の明確な差が認められなかったことは, 河川水質は河川水中の全脱窒微生物密度の変動にはさほど影響しないことが考えられる。

同一採水地点において, MS-NAY 培地を用いて求められた全脱窒微生物 MPN を, 河川水と石面付着微生物膜との間で比較した (Fig. 6)。上流・中流・下流のいずれにおいても, 採水地点・季節にかかわらず, 石面付着微生物膜のほうが河川水のほうよりも全脱窒微生物 MPN は有意に高かった。全脱窒微生物 MPN の季節変化が河川水と石面付着微生物膜との間で類似していたのは中流のみであり (Fig. 6(B)), 上流 (Fig. 6(A)) および下流 (Fig. 6(C)) においては明確な類似性が見られなかった。これらの傾向が見られた理由として, 河川水質は石面付着微生物膜の全脱窒微生物 MPN の変動に影響を及ぼすいっぽう, 河川水中の全脱窒微生物 MPN にはさほど影響しないためであることが考えられる。

### 3 全脱窒微生物に占める脱窒性亜酸化窒素生成脱窒微生物の割合の推定

#### 3.1 はじめに

前章において、MS-NAY 培地を用いるとより多くの全脱窒微生物 MPN を計数できることが示された。それではこれらの全脱窒微生物は、 $\text{NO}_3^-$  を  $\text{N}_2$  にまで還元することができる分子窒素生成脱窒微生物のみであろうか？あるいは、 $\text{N}_2\text{O}$  にまでしか還元できない亜酸化窒素生成脱窒微生物も含むのであろうか？

そこで、多摩川の全脱窒微生物に占める亜酸化窒素生成脱窒微生物の割合を推定するため、第2章で行った MS-NAY 培地を用いた MPN 法において、MPN 培地中の全窒素の減少量に対する  $\text{N}_2\text{O}$  の生成量の割合を、以下の仮説に基づいて測定した。

すなわち、全脱窒微生物に占める亜酸化窒素生成脱窒微生物の割合が高く、分子窒素生成脱窒微生物よりも多い場合には、希釈段階が上昇すると、ある希釈段階において分子状窒素生成微生物が含まれず、亜酸化窒素生成脱窒微生物のみが含まれる希釈段階が得られると期待される。そのような希釈段階の試料を接種した培地においては、培地中から脱窒によって失われた全窒素量に相当する量の  $\text{N}_2\text{O}$  が生じると予想される。各希釈段階の試料を接種した培地において、その培地中の全窒素減少（脱窒）量に対する  $\text{N}_2\text{O}$  生成量の割合を求めることにより、亜酸化窒素生成脱窒微生物が全脱窒微生物の多数派として存在している希釈段階を得ることができると考えた。

#### 3.2 材料と方法

##### 3.2.1 試料

第2章において全脱窒微生物の計数に用いた試料に加え、2010年12月に多摩川の中流（拝島水道橋付近）にて採取した試料を用いた。河川水の水質は Table 4 に示した。

##### 3.2.2 培養方法

河川水 1 mL または石面付着微生物膜懸濁液 1 mL を滅菌イオン交換

水にて  $10^{-1}$  倍ずつ段階的に希釈した。次に，希釈水または希釈石面付着微生物膜懸濁液 1 mL をネジ口試験管（全長 150 mm，口径 15 mm）内の MS-NAY 培地 9 mL に接種し，ブチル W 栓で密封した。また，無菌区として，滅菌イオン交換水 1 mL を接種した区（無菌区）を設けた。このとき，各希釈段階につき 3 本の試験管を用意した。適宜かくはんしながら暗所 25°C で 21 日間静置培養した。培養後，培地中の全窒素濃度と気相中の  $N_2O$  濃度を測定した。

なお，2010 年 12 月に採取した試料については，培地中の溶存酸素濃度も測定した。

### 3.2.3 $N_2O$ 濃度および全窒素濃度の測定方法

$N_2O$  濃度は 2.2.5 と同様にガスクロマトグラフィを用いて測定した。全窒素濃度は 2.2.5 と同様に全窒素計を用いて測定した。全窒素濃度測定の際には， $N_2O$  濃度を測定した後の試験管中の培地にペルオキシ二硫酸カリウム 0.2g を加え，オートクレーブで 121°C，30 分間加熱処理した。溶存酸素濃度は溶存酸素計（DO meter Model 850，Orion）を用いて測定した。

### 3.2.4 培地中の全窒素減少（脱窒）量に対する $N_2O$ 生成量の割合の算出

測定した培地中の全窒素減少（脱窒）量と，算出した全  $N_2O$  量から，培地中の全窒素減少（脱窒）量に対する  $N_2O$  生成量の割合を百分率にて算出した。

## 3.3 結果と考察

### 3.3.1 培地中の全窒素減少（脱窒）量に対する $N_2O$ 生成量の割合

2010 年 1・4・7・10 月の河川水および石面付着微生物膜を接種した MS-NAY 培地において，培地中の全窒素の減少（脱窒）量と， $N_2O$  生成量とを比較した（Tables 6~9）。ここで，全窒素量の微小な減少は測定誤差の可能性が排除できないため，培地中の全窒素量が無菌区に比べて 2 割以上減少した，すなわち，全窒素の 2 割以上が脱窒された試験管を，MS-NAY 培地における脱窒陽性とし，考察の対象とした。

いずれの採取月・地点における河川水および石面付着微生物膜にお

いても、最低希釈段階（河川水においては  $10^0$  希釈、石面付着微生物膜においては  $10^{-1}$  希釈）の試料を接種した培地の全窒素減少（脱窒）量に対する  $N_2O$  生成量の割合は 0%であった。すなわち、低希釈段階の試料中の脱窒微生物は、脱窒した  $NO_3^-$  のほとんどを  $N_2O$  どまりではなく  $N_2$  にまで還元した。

いっぽう、高希釈段階（河川水においては  $10^{-1}$  希釈以上、石面付着微生物膜においては  $10^{-2}$  希釈以上）の試料を接種した培地においては、全窒素減少（脱窒）量に対する  $N_2O$  生成量の割合は最高で 100%（10月の下流河川水の  $10^{-4}$  希釈）であった。高希釈段階の試料を接種した培地において全窒素減少（脱窒）量の 20%以上が  $N_2O$  にまでしか還元されなかった試験管が 1 本以上確認されたのは、河川水においては 1 月の上流・中流を除く 10 試料であり、石面付着微生物膜においては、1 月の上流、7 月の下流、10 月の上流・下流を除く 8 試料であった (Tables 6~9)。すなわち、これらの試料においては、亜酸化窒素生成脱窒微生物の密度は分子窒素生成脱窒微生物と同じかそれ以上であると考えられた。

しかしながら、高希釈段階の試料を接種した培地において脱窒量に対する  $N_2O$  生成量の割合が 20%以上の試験管が存在した試料のなかには、むしろ最高希釈段階の試料を接種した培地においては 20%を下回った試験管が存在する場合は観察された (Tables 6~9)。すなわち、河川水においては 4 月の上流、7 月の上流・下流、10 月の上流・中流・下流であり、石面付着微生物膜においては 1 月の中流および 10 月の中流であった。本実験の仮説によれば、試料中に亜酸化窒素生成脱窒微生物の密度が分子窒素生成脱窒微生物よりも同じかそれ以上である場合には、高い希釈段階の試料を接種された培地では、全窒素減少（脱窒）量に対する  $N_2O$  生成量の割合が高まることになる。したがって、高希釈段階の試料を接種した培地において  $N_2O$  生成量の割合が 20%以上の試験管が存在するにもかかわらず、最高希釈段階の試料を接種した場合においてはむしろ 20%を下回る培養区は、本仮説の前提に合致しない。このような現象が観察された理由として、分子窒素生成脱窒微生物が最高希釈段階以前の希釈段階および最高希釈段階の試料のい

ずれにおいても存在していながら，最高希釈段階以前の希釈段階の試料を接種された培地においては脱窒活性を発揮しなかったことが考えられる。MPN法は脱窒や人工化学物質分解などの，特定の機能を有する微生物群を計数する手法として広く用いられている。しかしながら，比較的低い希釈段階の試料を接種した培地においては目的の機能を発揮せず，むしろ高い希釈段階を接種した培地において機能を発揮する現象がしばしば報告されている（瀬戸・河端，1992）。今回，多摩川の分子窒素生成脱窒微生物においても，このような現象が生じたのかもしれない。ただし，比較的高希釈段階の試料を接種した培地においては  $N_2O$  生成量の割合は高いため，亜酸化窒素生成脱窒微生物は比較的高密度に存在していたと思われる。

高希釈段階の試料を接種した培地において全窒素減少（脱窒）量に対する  $N_2O$  生成量の割合が高かった試料を Table 10 にまとめた。最低希釈段階の試料を接種した培地において  $N_2O$  生成量の割合が 0%であり，かつ，最高希釈段階の試料を接種した場合は  $N_2O$  生成量の割合が脱窒量の 20%以上であった培養区は，河川水においては 6 培養区，石面付着微生物膜においては 2 培養区であった。また，最低希釈段階の試料を接種した培地において  $N_2O$  生成量の割合が 0%であり，かつ，それ以上の希釈段階の試料を接種した場合は脱窒量の 20%以上でありながら，最高希釈段階の試料を接種した試料においては  $N_2O$  生成量の割合が 20%以下であった培養区は，河川水においては 4 培養区，石面付着微生物膜においては 6 培養区であった。さらに，いずれの希釈段階の試料を接種した培地においても  $N_2O$  生成量の割合が 20%未満であった培養区は，河川水においては 2 培養区，石面付着微生物膜においては 4 培養区であった。高希釈段階の試料を接種した培地において  $N_2O$  生成量の割合が全窒素減少（脱窒）量の 20%以上であった試料には，亜酸化窒素生成脱窒微生物が全脱窒細菌の多数派を占めていると考えられた。また，亜酸化窒素生成脱窒微生物が全脱窒細菌の多数派を占めている可能性のある試料は，河川水のほうが石面付着微生物膜のほうがよりも多かった。このことから，河川の脱窒において重要な役割を果たすと考えられる石面付着微生物膜においては，河川水に比べて分

子窒素生成脱窒微生物の割合が比較的高い可能性が考えられる。

以上より，多摩川には季節や場所によらず，亜酸化窒素生成脱窒微生物が全脱窒微生物の大きな割合を構成している可能性が考えられた。

### 3.3.2 N<sub>2</sub>O 生成量の割合と溶存酸素濃度の関係

高希釈段階の試料を接種した培地において全窒素減少（脱窒）量に対する N<sub>2</sub>O 生成量の割合が高くなる現象が観察される理由として，高希釈段階の試料を接種した培地では培養開始時の微生物量が少ないために培養初期に培地内が十分に嫌気条件にならず，N<sub>2</sub>O 生成量が多くなった可能性が否定できない。なぜなら，微好気条件や好気条件においては，分子窒素生成細菌は NO<sub>3</sub><sup>-</sup>や NO<sub>2</sub><sup>-</sup>を N<sub>2</sub>まで還元せずに，N<sub>2</sub>O を生成することが知られているからである（Baumann *et al.*, 1996; Okada *et al.*, 2005）。本実験においては培養容器（試験管）の気相を N<sub>2</sub>で置換するなどの嫌気処理を施さず，培養中に従属栄養微生物が培地中の有機態炭素を消費する際に酸素も消費することで嫌気条件を確保する手法をとった。そこで，MPN 法において各希釈段階の試料を接種した培地中の溶存酸素濃度を測定し，嫌気条件が確保できていたかを確認した（Table 11）。

河川水・石面付着微生物膜のいずれにおいても，培地中の全窒素量が無菌区に比べて 2 割以上減少した（MS-NAY 培地を用いた MPN 法における脱窒判定陽性）培地では，従属栄養微生物の増殖を目視によって確認できなかった培地に比べて，溶存酸素濃度が半分以下に低下していた。しかしながら，脱窒活性を阻害しない溶存酸素濃度の最大上限とされている 0.32 mg L<sup>-1</sup>（Tiedje, 1988）以下となった培地はなかった。すなわち，MS-NAY 培地を用いた全脱窒微生物の培養法では十分な嫌気条件が確保できていなかった可能性がある。しかしながら，培地中の全窒素減少（脱窒）量に対する N<sub>2</sub>O 生成量の割合が 0%であった培地と 20%以上であった培地との間では，溶存酸素濃度にほとんど差がなかった。すなわち，十分な嫌気条件が確保されていなかった場合においても，脱窒された NO<sub>3</sub><sup>-</sup>はすべて N<sub>2</sub>にまで還元されていた。したがって，今回の培養条件では脱窒細菌による NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の N<sub>2</sub>までの還元を阻害することはなかったと言えよう。Table 6～10 の結果は，多摩



川の河川水や石面付着微生物には亜酸化窒素生成脱窒微生物が全脱窒微生物の大きな割合を構成している可能性を示していると考えられる。

## 4 亜酸化窒素生成脱窒細菌 *Janthinobacter* 属細菌 MS-1 株の分離とその脱窒特性

### 4.1 はじめに

前章において、多摩川には亜酸化窒素生成脱窒細菌が全脱窒微生物の大きな割合を構成している可能性が考えられた。そこで本章では、MS-NAY 培地を用いて多摩川の河川水より亜酸化窒素生成脱窒細菌を分離することを目的とした。さらに、分離した脱窒細菌の脱窒特性を、NNB 培地のような有機態炭素・硝酸態窒素が高濃度の培地を用いて分離された既知の脱窒細菌と比較しつつ、明らかにすることを目的とした。

### 4.2. 材料と方法

#### 4.2.1. 試料および脱窒微生物の分離

前章において、MS-NAY 培地を用いたときのほうが NNB 培地を用いたときよりも全脱窒微生物 MPN が高かった試料より、全脱窒微生物を以下の手法により分離した。まず、MS-NAY 培地において脱窒陽性を示した最高希釈段階の試験管より菌液 1 白金耳を採取し、MS-NAY 培地 10 mL および NNB 培地に接種した。次に、暗所 30°C にて 14 日間培養した後、MS-NAY 培地において脱窒陽性を示し、NNB 培地において示さなかった場合、MS-NAY 培地より菌液 1 mL を採取し、適宜段階希釈し、寒天 15 g L<sup>-1</sup> で固化した MS-NAY 平板寒天培地に塗抹した。続いて、N<sub>2</sub> 置換したデシケータ内にて 30°C、7 日間培養した後、出現した単一集落を 1,000 集落採取し、それぞれの集落を MS-NAY 平板寒天培地に塗抹した。この操作を繰返して、細菌を純粋分離した。純粋分離した細菌を MS-NAY 培地および NNB 培地にて培養し、MS-NAY 培地にて脱窒陽性を示し、NNB 培地にて示さなかった菌株を得た。

#### 4.2.2. 分離脱窒細菌の脱窒能判定

分離脱窒細菌の硝酸還元能・脱窒能の判定には、微生物判定のために一般的に用いられている教科書である *Manual of Methods for General Bacteriology* (1981) に記載されている Smibert & Krieg の

方法を用いた。この方法では半流動培地中の気泡の発生および  $\text{NO}_3^- \cdot \text{NO}_2^-$  の有無を試験することにより細菌の硝酸還元能・脱窒能を判定する。

NNB 培地にて 1 日間培養した MS-1 株 1 白金耳を、寒天を 0.1% 含む NNB 培地 (NNB 半流動培地) 10 mL に穿刺接種し、培地中に発生する気泡を定期的に観察した。さらに培養 10 日目には、培地中に  $\text{NO}_2^-$  が残留しているか、すなわち、脱窒過程で  $\text{NO}_3^-$  が  $\text{NO}_2^-$  に還元され、さらに  $\text{NO}_2^-$  が脱窒で消費されたかを確認するため、以下の操作を行った。すなわち、培地 0.1 mL を 2 mL の蒸留水にて希釈し、さらに  $200 \text{ mg L}^{-1}$  N-(1-Naphtyl)-ethylenediamine dihydrochloride 溶液と  $10 \text{ g L}^{-1}$  スルファニル酸溶液を 1 mL ずつ添加した。 $\text{NO}_2^-$  が存在するときは N-(1-Naphtyl)-ethylenediamine dihydrochloride が反応して赤ないし桃色を呈する。呈色しなかったとき、すなわち  $\text{NO}_2^-$  が残留していないと判定された場合は、 $\text{NO}_3^-$  が  $\text{NO}_2^-$  に還元されなかった可能性もあるため、さらに亜鉛粉末 20 mg を添加して  $\text{NO}_3^-$  を  $\text{NO}_2^-$  に還元し、呈色の有無を調べた。気泡が発生し、かつ  $\text{NO}_3^- \cdot \text{NO}_2^-$  が培地中に残留しなかった場合、脱窒反応陽性とした。なお、硝酸還元能・脱窒能の判定方法を Table 12 にまとめて示した。

また、分離脱窒細菌の他に対照として、分子窒素生成細菌 *Pseudomonas aeruginosa* IAM1514,  $\text{NO}_3^-$  を  $\text{NO}_2^-$  までにしか還元しない硝酸還元細菌 *Escherichia coli* IAM12060,  $\text{NO}_3^-$  を還元しない細菌 *Lysinibacillus sphaericus* JCM2502T の 3 種類の細菌を用いた。

#### 4.2.3. NNB 培地または MS-NAY 培地における分離脱窒細菌の脱窒

分離脱窒細菌をアセチレン ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ) 雰囲気下または非雰囲気下にて培養して  $\text{N}_2\text{O}$  から  $\text{N}_2$  への還元を阻害した条件の下での  $\text{N}_2\text{O}$  生成量をアセチレン非雰囲気下で培養した場合との間で比較した。まず、分離脱窒細菌を MS-NAY 培地にて 3 日間培養し、さらにこの培養液 1 mL を無機塩培地 100 mL に接種して暗所  $30^\circ\text{C}$  にて 1 日間培養した。次に、脱窒細菌の培養液 1 mL を NNB 培地または MS-NAY 培地 9 mL が入った 17 mL 容ネジロ試験管に分離菌密度  $7 \times 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$  となるように接種し、ダブルブチル栓で密封し、暗所  $30^\circ\text{C}$  にて 17 日間培養した。

このとき、アセチレンを分圧約 100 hPa となるように注入した区としなかった区を設けた。培養後、培地中の  $\text{NO}_3^- \cdot \text{NO}_2^- \cdot \text{N}_2\text{O}$  量を測定した。

#### 4.2.4. $^{15}\text{N}$ で標識した $\text{NO}_3^-$ を含む培地における分離脱窒細菌による $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ および $^{15}\text{N}^{14}\text{N}$ の生成

分離脱窒細菌を 4.2.3. で示した手法に準じて、 $^{15}\text{N}$  で標識した  $\text{KNO}_3$  (99.8 atom% , 昭光通商) を 1 L あたり 7 mg N 含む NNB 培地または MS-NAY 培地にて 11 日間、培養した。培養後に培地中の  $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$  および  $^{15}\text{N}^{14}\text{N}$  量をガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) にて測定した。

#### 4.2.5. 分離脱窒細菌の 16S rDNA 塩基配列に基づく系統解析

MS-NAY 培地で 3 日間培養した分離脱窒細菌の培養液 27 mL を 50 mL 容コーニングチューブに入れ、遠心分離した (4 °C, 5000×g, 15 min.)。上澄み液を除去し、チューブに MS-NAY 培地 1.5 mL を入れて菌体を懸濁させた。この懸濁液 1.5 mL をマイクロチューブに移し、遠心分離した (4 °C, 15000×g, 5 min.)。上澄み液をアスピレータで除去した。このマイクロチューブを -20 °C にて静置した。1 日後、ISOPLANT DNA 抽出キット (NIPPON GENE) を用いて菌体を溶解し、DNA を抽出・精製した。マイクロチューブを遠心しチューブ内の懸濁物を分離した (4 °C, 6000×g, 1 min.)。上澄み液を除去した後、チューブにバッファ B1 90 μL, リゾチーム 10 μL, RNase A 20 μL を加え、ボルテックスミキサで細菌細胞を浮遊させ、60 °C, 1200 rpm で 10 分間培養した。その後チューブにバッファ B2 2.5 μL, Dep 水 87.5 μL, バッファ B3 10 μL を加え、ボルテックスミキサで細菌細胞を浮遊させ、60 °C, 120 rpm で 30 分間振とうした。以上の操作により細菌細胞を溶解させた。チューブの溶解液 120 μL をクリーンカラムに入れ、室温で 3 分間静置したのち、遠心分離した (700×g, 1 min.)。カラムを通過したろ過液のうち 5 μL をアガロース電気泳動し、DNA の精製を確認した。ろ過液 5 μL と 5×Firol mix 1.7 μL を混合し、混合液 5 μL をアガロースゲル (1×TAE 30 mL にアガロース 0.45 g を加えて、電子レンジで加熱・溶解後、ゲル型で作成) のウェルに注

入した。このゲルを 1×TAE buffer で満たされたサブマリン型電気泳動槽 (Mupid, コスモバイオ) で 30 分間泳動したあと, エチジウムブロミド溶液に 30 分間浸して染色した。さらにゲルを蒸留水に 10 分間浸し, 余分な染色液を除去した。このゲルに紫外線 530 nm を照射し, DNA バンドを検出した。ゲル撮影装置 AE-6911CX (ATTO) にてバンドの撮影を行った。蛍光発光した唯一本のバンドを確認した。これにより, 分離脱窒細菌の DNA の精製を確認した。

次に, 以下の操作より, 分離脱窒細菌の DNA のうち, 16S rRNA 遺伝子の領域を増幅し, PCR 産物を精製した。まず, 分離脱窒細菌の 16S rDNA 領域をポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) にて増幅した。DNA ポリメラーゼは Phusion (Finnzymes), プライマは 27F (塩基配列 5'-agagtttgatcctggctcag-3'), 1525R (塩基配列 5'-aaaggaggtgatccagcc-3') をそれぞれ用いた。サーマルサイクラ (Thermal cycler Dice, タカラバイオ) の設定を Table 13 に示した。次に, 得られた PCR 産物のうち 5  $\mu$  L をアガロース電気泳動し, 16S rDNA 領域の増幅を確認した。続いてこの PCR 産物を GFx™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Health care) を用いて精製した。なお, DNA シーケンサ が 1 回の測定で読み取れる塩基数は 700 から 800 程度であるため, 塩基数が約 1500 の精製産物をこのままでは測定することはできない。そのため, 得られた精製産物を 4 つのマイクロチューブに 10  $\mu$  L ずつ分け, プライマ 27F および 1525R に加えて, プライマ 785F (5'-ggattagataccctggtag-3') および 907R (5'-ccccgtcaattcctttgagttt-3') も用いて, さらに塩基数の少ないオリゴヌクレオチド断片となるように PCR にて増幅した。サーマルサイクラの設定は Table 14 に示した。得られた PCR 産物に 3M 酢酸ナトリウム 3  $\mu$  L, 95 % エタノール 62.5  $\mu$  L, Dep 水 24.5  $\mu$  L を加え, 室温にて 15 分間培養した。最後に, これらのチューブを遠心分離し (9000×g, 15 min, 20 °C), 上澄み液を除去した。これらのチューブに 70 % エタノールを加え, 遠心分離 (9000×g, 15 min, 20 °C) した後, 上澄み液を除去し, 約 5 分間風乾した。

続いて, この PCR 産物の塩基配列を解読し, 近縁種検索を行った。

PCR産物の泳動にはDNAシーケンサABI PLISM377 (PE Applied Biosystems)を用いた。検出された蛍光シグナルのパターンより塩基配列を得た。その塩基配列データを解析プログラム(GENETYX-MAC, software Development CO., Ltd)を用いて編集し、連続したDNA配列データとして完成させた。得られた16S rRNA配列データに対して、インターネット上のDDBJ (DNA Date Bank of Japan)の提供するBLASTプログラム(Altschul *et al.* 1990)により、分離脱窒細菌の近縁種検索を行った。

### 4.3. 結果と考察

#### 4.3.1 脱窒細菌の分離

MS-NAY平板寒天培地上に形成された細菌の1,000集落のうちから、脱窒細菌を1菌株、分離した。なお、この菌株を以後、MS-1株と表記する。

#### 4.3.2. Smibert & Kriegの方法を用いたMS-1株の脱窒能判定

NNB培地における10日間の培養期間ではMS-1株を接種した培地にN<sub>2</sub>気泡の発生は確認されなかった(Table 15)。また、培養10日目に行ったNO<sub>2</sub><sup>-</sup>残留確認試験では培地が赤紫色を呈した、すなわちNO<sub>2</sub><sup>-</sup>が残留していた。MS-1株が示したこれらの反応は、硝酸還元菌である*E. coli*の反応と同じであった(Table 15)。すなわち、Smibert & Krieg (1981)の方法を用いた場合、MS-1株は硝酸還元能を有するが、脱窒能を有しない細菌と判定された。

MS-1株がN<sub>2</sub>の気泡を生じさせなかった理由は、MS-1株が脱窒によって生成する気体状窒素化合物の大部分がN<sub>2</sub>Oであったためと考えられる。気体の液体への溶けやすさを示すBunsenの吸収係数(25℃, 1 atm)は、N<sub>2</sub>は0.0145, N<sub>2</sub>Oが0.544である(Tiedje, 1994)。すなわち、N<sub>2</sub>は全発生量の2%弱しか液相に溶解するにすぎないが、N<sub>2</sub>Oは全発生量の54%が溶解する。MS-1株を接種したにもかかわらず、培地にN<sub>2</sub>の気泡が生じなかったのは、MS-1株が生成したN<sub>2</sub>Oのうちのかなりの部分が培地に溶け込んだためと考えられた。NNB培地10 mLにはNO<sub>3</sub><sup>-</sup>として窒素50 μmolが含まれる。このNO<sub>3</sub><sup>-</sup>がすべてN<sub>2</sub>Oに還元されたとして、生じるN<sub>2</sub>Oは25 μmol, 体積では0.56 mL,

このうちの 54% が溶解すると、気泡として生じるのは 0.22 mL である。この体積の気体は半流動培地では気泡として目視にて十分に確認可能である。したがって、MS-1 株は培地中の硝酸の全量ではなく一部の量のみを  $N_2O$  に還元したと思われる。

#### 4.3.3. NNB 培地または MS-NAY 培地における MS-1 株の脱窒

MS-1 株を NNB 培地にて培養したとき、アセチレン雰囲気下または非雰囲気下であるかに関わらず、 $NO_3^-$  はほぼ全量が消費され、その約 70% を  $NO_2^-$  に変換した (Fig. 7(A))。また、アセチレン雰囲気下においては  $NO_3^-$  の初期量の 41 % を、アセチレン非雰囲気下においては 32 % を  $N_2O$  に変換した。

MS-1 株を MS-NAY 培地にて培養したとき、アセチレン雰囲気下においては  $NO_3^-$  をほぼ全量消費し、それに匹敵する量の  $N_2O$  を生成した (Fig. 7(B))。いっぽう、アセチレン非雰囲気下においては  $NO_3^-$  の初期量の約 49 % を  $NO_2^-$  に、47% を  $N_2O$  に変換した。

これらのことから、MS-1 株は NNB 培地およびアセチレン非雰囲気下の MS-NAY 培地においては、ほとんどの  $NO_3^-$  を  $NO_2^-$  までには還元し、さらにそのうちの一部のみを  $N_2O$  にまで還元するものの、 $N_2$  にまでは還元できないと考えられた。

#### 4.3.4. $^{15}N$ で標識した硝酸を含む培地における分離脱窒細菌による $^{15}N^{15}N$ および $^{15}N^{14}N$ の生成

MS-1 株を  $^{15}N$  で標識した  $KNO_3$  を含む NNB 培地および MS-NAY 培地にて培養したとき、硝酸態窒素の初期量の 1.3% に相当する量しか  $^{15}N^{15}N$  および  $^{15}N^{14}N$  を生じなかった (Table 16)。すなわち、MS-1 株が NNB 培地および MS-NAY 培地において脱窒によって生成する気体状窒素化合物は、大部分が  $N_2O$  であった。

以上の結果より MS-1 株は  $NO_3^-$  を  $N_2O$  にまでしか還元せず、 $N_2$  を生成しない脱窒細菌、すなわち亜酸化窒素生成脱窒細菌であることが明らかとなった。なお、アセチレン雰囲気下の MS-NAY 培地においてはすべての  $NO_3^-$  が  $N_2O$  まで還元されたいっぽう、非雰囲気下においては一部が  $NO_2^-$  として残留した理由として、アセチレンが MS-1 株の増殖または脱窒のための炭素源として寄与したことが考えられた。な

ぜなら、1) MS-NAY 培地の炭素量は  $70 \text{ mg L}^{-1}$  と、NNB 培地の  $3,900$  と比較して著しく低いこと、2) アセチレン  $100 \text{ hPa}$  は  $100 \text{ mg L}^{-1}$  の炭素に相当し、MS-NAY 培地の全有機炭素の初期量  $70 \mu \text{g mL}^{-1}$  に対して無視できない量の炭素源であると考えられたためである。

MS-1 株は亜酸化窒素生成脱窒細菌であるにも関わらず、NNB 培地のような有機物、硝酸を多量に含む培地を用いた従来の方法では脱窒能を有することが見逃されてきた可能性が高く (Table 15)、また脱窒に際して  $\text{NO}_3^-$  の大部分を  $\text{NO}_2^-$  と  $\text{N}_2\text{O}$  に変換する (Fig. 7) 細菌であった。脱窒に際して  $\text{NO}_2^-$  を一時的に蓄積する、もしくは生成する気体状窒素化合物の大部分が亜酸化窒素であるような脱窒細菌は数多く報告されている (Bazylinski *et al.*, 1986; Betlach & Tiedje, 1981; Blaszczyc, 1993; Greenberg & Becker, 1977; Okada *et al.*, 2005; Philipot *et al.*, 2010; Tago *et al.*, 2011; van Rijn *et al.*, 1996)。しかしながら、MS-1 株のように 17 日間の長期にわたって  $\text{NO}_2^-$  を残留させ続ける例は知られていないようである。

MS-1 株は脱窒が生じたと判定された最高希釈段階の培地から分離されたという事実から、多摩川には MS-1 株のように脱窒に際して  $\text{NO}_2^-$  蓄積し生成する気体状窒素化合物の大部分が  $\text{N}_2\text{O}$  であるような脱窒細菌が優占している可能性が考えられる。さらにそのような脱窒細菌は、培地からの  $\text{NO}_3^-$  および  $\text{NO}_2^-$  の消失または半流動培地における気泡の発生によって脱窒が生じたと判定する、Smibert & Krieg の方法のような従来の方法では見逃されていた可能性がある。今回、本研究でおこなったような、MS-NAY 培地のような  $\text{NO}_3^-$  が低濃度の培地を用い、全窒素濃度の減少から脱窒を判定する方法は、MS-1 株のような脱窒能を有する細菌を検出するのに有効であると考えられる。MS-NAY 培地で検出できる全脱窒細菌の数やそのような全脱窒細菌がどのような脱窒を行うのかを調べていくことは環境中における窒素循環のメカニズムを解明するうえで、重要であろう。

#### 4.3.5. MS-1 株の 16S rRNA 塩基配列に基づく系統解析

MS-1 株は中温湖の細菌プランクトンとして分離された Oxalobacteraceae 科の細菌 MWH73 株 (Hahn *et al.*, 2004) と最も



近縁であった (99%, 1399 / 1408) (Fig. 8)。また, 低温の泉から分離された *Duganella* 属の細菌 LT1-9 株 (98%, 1407 / 1429) や, 南極の湖の底泥から分離された *Janthinobacterium* 属の細菌 An8 (97%, 1399 / 1429) とも近縁であった。 *Duganella* 属および *Janthinobacterium* 属はいずれも Oxalobacteraceae 科に含まれることから, MS-1 株は Oxalobacteraceae 科に属すると考えられる。

MS-1 株, Oxalobacteraceae 科のすべての属の type species, およびいくつかの種の type strains の 16S rRNA 塩基配列に基づいて系統樹を作成した (Fig. 9)。MS-1 株は *Duganella* 属および *Janthinobacterium* 属の細菌が形成するクラスターに含まれた (Fig. 9)。Staley *et al.* (2005) によれば *Duganella* 属の細菌は脱窒能を有しない。いっぽう *Janthinobacterium* 属の細菌の中には脱窒能を有する種が存在する (Gillis & Logan, 2005)。また, 泥炭から分離された *Janthinobacterium* 属の細菌は, 培地に含まれる  $\text{NO}_3^-$  の約 0.7% を  $\text{N}_2\text{O}$  に変換する脱窒細菌であったことが報告されている (Hashidoko, 2008)。

## 5 多摩川における亜酸化窒素の生成

### 5.1 はじめに

MS-NAY 培地を用いることにより，多摩川の河川水や石面付着微生物膜において，亜酸化窒素生成脱窒微生物が高密度に存在している可能性が示された。また，多摩川の試料から亜酸化窒素生成脱窒細菌を分離することにも成功した。では，多摩川からは  $N_2O$  が多量に放出されているのであろうか？

土壌や湿地においては，これらの環境における全脱窒微生物の群集構造と  $N_2O$  放出速度との間に関連のあることが報告されている (Baker & Conrad, Cavigelli & Robertson, 2001; 2011; Ma *et al.*, 2011)。それに対して，河川における全脱窒微生物の群集構造と  $N_2O$  放出速度との間に関連については知見がいちじるしく不足している。そこで本章では，亜酸化窒素生成脱窒微生物が全脱窒微生物の多数派を占めていると考えられる多摩川からの  $N_2O$  の放出量を推定することを目的とした。

実環境からの  $N_2O$  の放出を推定するには，チャンバー実験等によって現場における放出量を測定することが求められる (Bealieu *et al.*, 2008; Bealieu *et al.*, 2011; Clough *et al.*, 2006)。しかしながら，本研究で対象とした多摩川上流では礫が大きく，また下流では水深が深い等，河床がチャンバー設置に適さず，現場における  $N_2O$  放出量を測定することは困難であった。そこで，多摩川の河川水と石面付着微生物膜が付着した河床の石を実験室にて培養瓶内にて培養し，多摩川における脱窒をシミュレートすることによって，多摩川における  $N_2O$  放出量を推定した。

### 5.2 材料と方法

#### 5.2.1 試料採取方法

2011年1月に多摩川の上流(鳩ノ巣小橋付近)と下流(丸子橋付近)にて，試料を採取した。河川水は，河川中央付近にて表層水をネジ口瓶に採取した。石面付着微生物膜は，河川中央付近の川底より，同程

度の大きさの石を任意に選び付着している石ごと採取した。これらを氷上で冷却しながら研究室に持ち帰り，その日のうちに実験に供試した。河川水の水質は Table 4 に示した。

### 5.2.2 培養方法

乾熱滅菌したセパラブルフラスコ 3 個に，それぞれ石 1 個と河川水を合わせて 350 mL，気相体積を 200 mL となるように入れた (Fig. 10)。セパラブルフラスコとふたとの間のつなぎ目にはバルカーテープシール（日本バルカー工業株式会社）を巻き，クランプで固定した。セパラブルフラスコの口にはブチル W 栓（太陽興業）をして密閉した。1 個のセパラブルフラスコには，気相に体積比で 10% となるように孔径 0.1  $\mu\text{m}$  のフィルターで滅菌したアセチレンを注入し， $\text{N}_2\text{O}$  から  $\text{N}_2$  への還元と，硝化を阻害した。これをアセチレン阻害区とした。アセチレンを注入しなかった残り 2 個の培養区を，アセチレン非阻害区とした。暗所 25  $^{\circ}\text{C}$  にて 3 日間静置培養した。培養開始時から 0，6，12，24，48，72 時間目に気相中の  $\text{N}_2\text{O}$  濃度と液相中の  $\text{NO}_3^- \cdot \text{NO}_2^-$  濃度を測定した。測定用の試料を採取するときのみかくはんを行い，採取した試料と同量の滅菌空気，または滅菌イオン交換水を注入してセパラブルフラスコ内の気圧を一定に保った。気相試料の採取は A から，液相試料の採取は B から，それぞれ採取した (Fig. 10)。

### 5.2.3 測定方法

気相中の  $\text{N}_2\text{O}$  濃度はガスクロマトグラフィにて，液相中の  $\text{NO}_3^- \cdot \text{NO}_2^-$  濃度はイオンクロマトグラフィーにて，それぞれ測定した。

## 5.3 結果と考察

### 5.3.1 多摩川上流の河川水と石面付着微生物膜を用いたシミュレーション培養

アセチレンを注入し， $\text{N}_2\text{O}$  から  $\text{N}_2$  への還元を阻害したアセチレン阻害区においては，気相中の  $\text{N}_2\text{O}$  濃度は大気濃度 (0.3 ppmv) から著しく上昇し，培養終了時には約 54 ppmv となった (Fig. 11(A))。いっぽう，アセチレン非阻害区においてはアセチレン阻害区に比べて  $\text{N}_2\text{O}$  の増加量は少なく，培養終了時においても 1.2~5 ppmv 程度であった。

アセチレン阻害区においては、 $N_2O$  から  $N_2$  への還元、および硝化が阻害されていたため、ここで観察された  $N_2O$  の増加分は、放出された  $N_2O$  量と  $N_2$  量の合計値である。したがって、アセチレン阻害区において放出された 54 ppmv の  $N_2O$  のほとんどは  $N_2$  であると考えられる。これより、多摩川上流においては、脱窒された気体状窒素化合物のほとんどは  $N_2$  であり、 $N_2O$  として放出される割合はきわめて少ないと考えられた。

なお、液相中の  $NO_3^-$  濃度は、アセチレン阻害区・非阻害区のいずれにおいても、初期濃度の約  $3 \text{ mg-N L}^{-1}$  から、培養終了時には約  $2 \text{ mg-N L}^{-1}$  まで低下した (Fig. 12(A))。また、 $NO_2^-$  濃度はアセチレン阻害区・非阻害区のいずれにおいても培養期間中、約  $0.1 \sim 0.2 \text{ mg-N L}^{-1}$  で推移していた (Fig. 13(A))。 $NO_3^-$  濃度は、硝化による生成と脱窒や同化による消費などの影響を受けて変化する。 $NO_3^-$  濃度は、硝化が阻害されているアセチレン阻害区だけでなく、非阻害区においても低下していたことから、多摩川上流において  $NO_3^-$  は、硝化による生成よりも脱窒や同化による消費が優先していると考えられた (Fig. 14(A))。

### 5.3.2 多摩川下流の河川水と石面付着微生物膜を用いたシミュレーション培養

アセチレン阻害区と非阻害区において、 $N_2O$  濃度の増減について、両者の間に明確な差は見られなかった (Fig. 11(B))。すなわち、いずれの培養区においても、気相中の  $N_2O$  濃度は培養開始時の大気濃度 ( $0.3 \text{ ppmv}$ ) から上昇し、培養終了時には  $12 \sim 15 \text{ ppmv}$  となった。したがって、多摩川下流においては上流とは異なり、脱窒された気体状窒素化合物の多くは  $N_2O$  として放出されると考えられた。なお、非阻害区のみふたつの培養区のうち、一方では  $N_2O$  濃度が培養 24 時間目までに約  $35 \text{ ppmv}$  にまで増加した後に、培養終了時には  $15 \text{ ppmv}$  にまで減少した (Fig. 11(B)の○)。いったん増加した  $N_2O$  濃度が減少した理由として、亜酸化窒素生成脱窒微生物によって気相中に放出された  $N_2O$  が分子窒素生成脱窒微生物によって  $N_2$  にまで還元されと考えられる。本実験は閉鎖系の培養器内において培養したため、いったん気相中に放出された  $N_2O$  が分子窒素生成脱窒微生物によってさらに還元

されたと思われる。しかしながら、実環境は開放系であるため、亜酸化窒素生成脱窒微生物によって生成された  $N_2O$  は、そのまま大気中に放出されているであろう。また、非阻害区のふたつの培養区のもう一方では、亜酸化窒素は培養時間とともに増加し、減少することはなかった (Fig. 11(B)の $\Delta$ )。これは、亜酸化窒素生成脱窒微生物によって生成された  $N_2O$  が分子窒素生成脱窒微生物によって  $N_2$  まで還元されることがなかったか、 $N_2O$  の生成速度が  $N_2O$  還元速度を上回っていたかのどちらかであろう。非阻害区の二つの培養系の間で気相中の亜酸化窒素濃度の経時変化に大きな差が生じた理由は、石面付着微生物に存在する亜酸化窒素生成脱窒微生物と分子窒素生成脱窒微生物の量比が大きく異なっていたためと考えられる。

多摩川上流の試料を用いた場合にはほとんどが  $N_2$  であったのについて、下流の試料を用いた場合にはほとんどが  $N_2O$  であった理由は何であろうか？ このシミュレーション培養中では、ほとんどの全脱窒微生物が石面微生物膜中に存在する。上流においては石面付着微生物中の亜酸化窒素生成脱窒微生物が生成した  $N_2O$  は、引き続いて分子窒素生成脱窒微生物によって  $N_2$  にまで還元されたことが考えられる (Fig. 14(A))。いっぽう、下流においては硝酸の大部分は石面付着微生物中の亜酸化窒素生成脱窒微生物によって消費されて  $N_2O$  へと還元されるが、分子窒素生成脱窒微生物の代謝が不活発であったため、 $N_2$  にまで還元されなかったことが考えられる (Fig. 14(B))。考えられるもうひとつの理由は、上流においては石面付着微生物中の亜酸化窒素生成脱窒微生物の代謝活性が不活発であったため、硝酸のほとんどは分子窒素生成脱窒微生物によって  $N_2$  まで還元されるいっぽう、下流においては分子窒素生成脱窒微生物の代謝が不活発であったため  $N_2$  にまで還元されず  $N_2O$  が生じたことである。第3章において、上流および下流の石面付着微生物には分子窒素生成脱窒微生物の方が亜酸化窒素生成脱窒微生物と同じかそれよりも多く存在するものの (Table 10), 亜酸化窒素生成脱窒微生物は全脱窒微生物の大きな割合を構成していることが示されている。しかしながら、亜酸化窒素の放出量は、全脱窒微生物に占める亜酸化窒素生成脱窒微生物の量に必ずしも対応する

わけではないようである。

液相中の  $\text{NO}_3^-$ 濃度は、硝化による生成が阻害されているアセチレン阻害区では培養期間中ほとんど変化しなかったのに対し、非阻害区では培養終了時までには  $30\sim 45 \text{ mg-N L}^{-1}$ にまで上昇していた (Fig. 12(B))。また、 $\text{NO}_2^-$ 濃度は、アセチレン阻害区では培養期間中に著しく低下して培養終了時までには約  $0.1 \text{ mg-N L}^{-1}$ となったのに対して、非阻害区では培養期間中ほとんど変化せずに約  $1 \text{ mg-N L}^{-1}$ であった (Fig. 13(b))。 $\text{NO}_3^- \cdot \text{NO}_2^-$ 濃度のいずれも、アセチレン阻害区に比べて非阻害区において高くなったことから、多摩川下流において  $\text{NO}_3^-$ は、脱窒や同化による消費よりも硝化による生成が優先していると考えられた (Fig. 14(b))。硝化も脱窒とならんで  $\text{N}_2\text{O}$  の発生源の一つである (Anderson & Levine, 1986; Braker & Conrad, 2011; Robertson & Tiedje, 1987)。したがって、多摩川下流における  $\text{N}_2\text{O}$  の生成は、硝化由来の寄与も無視できないと考えられる。

以上より、亜酸化窒素生成脱窒微生物は多摩川からの  $\text{N}_2\text{O}$  の放出に関与している可能性が示された。また、生じた  $\text{N}_2\text{O}$  は分子窒素生成脱窒微生物によりさらなる還元を受ける可能性も考えられた。今後は、亜酸化窒素生成脱窒微生物が実際の環境における  $\text{N}_2\text{O}$  生成にどの程度関与しているかを定量化することや、亜酸化窒素生成脱窒微生物や分子窒素生成脱窒微生物の活性を支配する環境要因、亜酸化窒素生成脱窒微生物および硝化細菌などその他の微生物が生成した  $\text{N}_2\text{O}$  が分子窒素生成脱窒微生物にどの程度利用可能であるかを明らかにすることが求められるであろう。

## 7 総括

河川は  $\text{N}_2\text{O}$  の発生源として無視できない生態系であると考えられる。 $\text{N}_2\text{O}$  の生成には脱窒微生物や硝化細菌などの微生物が関与している。本研究の特色はこれまでひと括りにされてきた全脱窒微生物を、亜酸化窒素生成脱窒微生物と分子窒素生成脱窒微生物とに分け、特に亜酸化窒素生成脱窒微生物の分布や河川の窒素収支における役割を解明しようとしたところにある。今回の研究で、多摩川には亜酸化窒素生成脱窒微生物が全脱窒微生物の大きな割合を構成していることが示され、この微生物が河川における  $\text{N}_2\text{O}$  生成に関与している可能性も示された。しかしながら、河川からは常に多量の  $\text{N}_2\text{O}$  が放出されているわけではないことも同時に示された。このことは、河川においては亜酸化窒素生成脱窒微生物・分子窒素生成脱窒微生物、ならびに硝化細菌などのさまざまな微生物が  $\text{N}_2\text{O}$  の生成・消費に関与しており、これら微生物の活性がさまざまな環境要因の支配を受けていることの反映であろう。今後は、亜酸化窒素生成脱窒微生物・分子窒素生成脱窒微生物・硝化細菌の河川における動態を解明し、それらが河川からの  $\text{N}_2\text{O}$  放出にどのように関与しているかを定量的に明らかにしていくことが求められる。

本研究ではまた、河川から亜酸化窒素生成脱窒細菌 MS-1 株を分離することに成功した。この細菌は硝酸の半分を亜酸化窒素にまで還元し、残りは亜硝酸として水塊中に残存するという、これまで知られている亜酸化窒素生成細菌とは異なるユニークな性質をもつ細菌であった。NNB 培地のような全脱窒微生物の検出や分離に用いられきた培地よりも、 $10\sim 1,000$  倍もの全脱窒微生物を検出できる MS-NAY 培地を用いて分離されたことから、MS-1 株のような性質を有する亜酸化窒素生成脱窒細菌は、他の水界環境にも存在するかもしれない。MS-1 株のような細菌の窒素循環における関与を定性的・定量的に解明することにも興味を持たれる。

## 謝辞

本研究は、とうきゅう環境浄化財団からの助成を受けて行いました。

本研究の実施にあたっては、永野博彦（現千葉大学大学院博士課程）、辻笑子（現横浜市）の各氏の協力を得ました。ガスクロマトグラフィの使用にあたっては、楊宗興博士（東京農工大学大学院農学研究院教授）と木村園子ドロテア博士（現東京農工大学大学院農学研究院准教授）から助言と協力を得ることができました。MS-1株による硝酸塩の還元能の検討にあたっては木庭啓介博士（現東京農工大学大学院農学研究院准教授）、諏訪裕一博士（中央大学理工学部教授）の協力を得ました。片山葉子博士（東京農工大学大学院農学研究院教授）からは、研究の節目ごとに有益な助言を受けました。試料の採取には山田元章氏（東京農工大学技術専門職員）の協力を得ました。以上の方々に記して感謝申し上げます。



## 引用文献

- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers & D. J. Lipman (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410.
- Amano, T., I. Yoshinaga, K. Okada, T. Yamagishi, S. Ueda, A. Obuchi, Y. Sako & Y. Suwa (2007) Detection of anammox bacteria-related 16S rRNA genes in coastal marine sediment in Japan. *Microbes Environ.*, 22: 232-242.
- Amano, T., I. Yoshinaga, T. Yamagishi, C. V. Thuoc, P. T. Thu, S. Ueda, K. Kato, Y. Sako & Y. Suwa (2011) Contribution of anammox bacteria to benthic nitrogen cycling in a mangrove forest and shrimp pond, Haiphong, Vietnam. *Microbes Environ.*, 26: 1-6.
- Anderson, I. C. & J. S. Levine (1986) Relative rates of nitric oxide and nitrous oxide production by nitrifiers, denitrifiers, and nitrate respirers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 938-945.
- Baker, G. & R. Conrad (2011) Diversity, structure, and size of N<sub>2</sub>O-producing microbial communities in soils—what matters for their functioning? *Adv. Appl. Microbiol.*, 75: 33-70.
- Baumann, B., M. Snozzi, A. J. Zehnder & J. R. Can Der Meer (1996) Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. *J. Bacteriol.*, 178: 4367-4374.
- Bazylnski, D. A., E. Palome, N. A. Blakemore & R. P. Blakemore (1986) Denitrification by *Chromobacterium violaceum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52: 696-699.
- Beaulieu, J. J., C. P. Arango, S. K. Hamilton & J. L. Tank (2008) The production and emission of nitrous oxide from headwater streams in the Midwestern United States. *Glob. Change Biol.* 14: 1-17.
- Beaulieu, J. J., J. L. Tank, S. K. Hamilton, W. M. Wollheim, R. O. Hall, Jr., P. J. Mulholland, B. J. Peterson, L. R. Ashkenas, L. W. Cooper, C. N. Dahm, W. K. Dodds, N. B. Grimm, S. L. Johnson, W. H. McDowell, G. C. Poole, H. Maurice Valett, C. P. Arango, M. J. Bernot, A. J. Burgin, C. L. Crenshaw, A. M. Helton, L. T. Johnson, J. M. O'Brien, J. D. Potter, R. W. Sheibley, D. J. Sobota & S. M. Thomas (2011) Nitrous oxide emission from denitrification in stream and river networks, *PNAS*, 108: 214-219.
- Betlach, M. R. & J. M. Tiedje (1981) Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42: 1074-1084.
- Blaszczyk, M. (1993) Effect of medium composition on the denitrification of nitrate by *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3951-3953.

- Braker, G. & R. Conrad (2011) Diversity, structure, and size of N<sub>2</sub>O-producing microbial communities in soils – What matters for their functioning? *Adv. Appl. Microbiol.*, 75: 33-70.
- Bazylnski, D. A., E. Palome, N. A. Blakemore & R. P. Blakemore (1986) Denitrification by *Chromobacterium violaceum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52: 696-699.
- Cavigelli, M. A. & G. P. Robertson (2001) Role of denitrifier diversity in rates of nitrous oxide consumption in a terrestrial ecosystem. *Soil Biol. Biochem.*, 33: 297-310.
- Clough, T. J., J. E. Bertram, R. R. Sherlock, R. L. Leonard & B. L. Nowicki (2006) Comparison of measured and EF5-r-derived N<sub>2</sub>O fluxes from a spring-fed river. *Glob. Change Biol.*, 12: 477-488.
- 土壤微生物学研究会 (1992) 新編 土壤微生物実験法, 養賢堂.
- Duxbury J. M. & A. R. Mosier (1993) Status and issues concerning agricultural emissions of greenhouse gases, pp.229-258, In H. M. Kaiser & T. E. Drennen (ed.) *Agricultural Dimensions of Global Climate Change*, St. Luice Press, Delray Beach, FL.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT, <http://www.faostat.fao.org/>
- Gillis, M. & N. A. Logan (2005) Genus *Janthinobacterium*, pp.636-642, In G. M. Garrity, D. J. Brenner & N. R. Krieg (ed.) *Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 2*, pringer Science + Business Media, Inc., New York.
- Greenberg, E. P. & G. E. Becker (1977) Nitrous oxide as end product of denitrification by strains of *fluorescent pseudomonads*. *Can. J. Microbiol.*, 23: 903-907.
- Hahn, M.W., H. Lünsdorf & L. Janke (2004) Exopolymer production and microcolony formation play an important role in protistan grazing defense of novel bacterial strains isolated from freshwater plankton. *Aquat. Microb. Ecol.*, 35: 297-308
- Hashidoko, Y., F. Takakai, Y. Toma, U. Darung, L. Melling, S. Tahara & R. Hatano (2008) Emergence and behaviors of acid-tolerant *Janthinobacterium* sp. that evolves N<sub>2</sub>O from deforested tropical peatland. *Soil Biol. Biochem.*, 40: 116-125.
- Hashimoto, T., K. Whang & K. Nagoya (2006) A quantitative evaluation and phylogenetic characterization of oligotrophic denitrifying bacteria harbored in subsurface upland soil using improved culturability. *Biol. Fertil. Soils*, 42: 179-185.
- Hashimoto, T., M. Koga & Y. Masaoka (2009) Advantages of a diluted nutrient broth medium for isolating N<sub>2</sub>-producing denitrifying bacteria of  $\alpha$ -Proteobacteria in surface and subsurface upland soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 55: 647-659.
- Hayatsu, M., K. Tago & M. Saito (2009) Various players in the nitrogen

- cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 54: 33-45.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (2007) IPCC Forth Assessment Report: Climate Change 2007.
- Kandeler, E., K. Deiglmayr, D. Tschirko, D. Bru & L. Philippot, (2006) Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* Genes of Denitrifying Bacteria during Primary Successions of a Glacier Foreland. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 5957-5962.
- 建設省都市局下水道部・厚生省生活衛生局水道環境部 (1997) 下水試験方法 (上巻) 1997年版, 社団法人日本下水道協会.
- Kulkarni, M. V., P. M. Groffman & J. B. Yavitt (2008) Solving the global nitrogen problem: it's a gas! *Front. Ecol. Environ.* 6: 199-206.
- Kuznetsov, S. I., G. A. Dubinina & N. A. Lapteva (1979) Biology of oligotrophic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 33: 377-387.
- Ma, W. K., R. E. Farrell & S. D. Siciliano (2011) Nitrous oxide emissions from ephemeral wetland soils are correlated with microbial community composition. *Front. Microbiol.* 2:110. doi: 10.3389/fmicb.2011.00110
- Morita, R. (1997) Bacteria in Oligotrophic Environment, Starvation-Survival Lifestyle, Chapman & Hall Microbiology Series.
- Mulder, A., A. A. van de Graaf, L. A. Robertson & J. G. Kuenen (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 16: 177-184.
- 中西健 (2003) 最確数法を用いた脱窒菌数計数のための低濃度培地の提案, 2003年度東京農工大学卒業論文.
- Nevison, C. D., R. F. Weiss & D. J. Erickson (1995) Global oceanic emissions of nitrous oxide. *J. Geophysic. Res.*, 100: 15809-15820.
- Nevison, C. (2000) Review of the IPCC methodology for estimation nitrous oxide emissions associated with agricultural leaching and runoff. *Chemosphere-Global Change Sci.* 2: 493-500.
- Okada, N., N. Nomura, T. Nakajima-Kambe & H. Uchiyama (2005) Characterization of the aerobic denitrification in *Mesorhizomium* sp. Strain NH-14 in comparison with that in related Rhisobia. *Microbes Environ.* 20:208-215.
- Philippot, L. & S. Hallin (2005) Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 234-239
- Philippot, L., S. Hallin & M. Schloter (2007) Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. *Adv. Agron.* 96:249-305.
- Philippot, L., J. Čuhel, N. P. A. Saby, D. Chèneby, A. Chroňáživá, D. Bru, D. Arrouays, F. Martin-Laurent & M. Šimek (2009) Mapping field-scale patterns of size and activity of the denitrifier community. *Environ. Microbiol.*, 11: 1518-1526.
- Philippot, L., J. Andert, C. M. Jones, D. Bru & S. Hallin (2010)

- Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for N<sub>2</sub>O emissions from soil. *Glob. Change Biol.* 17: 1497-1504.
- Pusch, M., D. Fiebig, I. Brettar, H. Eisenmann, B. K. Ellis, L. A. Kaplan, M. A. Lock, M. W. Naegeli & W. Traunspurger (1998) The role of micro-organisms in the ecological connectivity of running waters. *Freshwater Biol.*, 40: 453-495.
- Ravishankara, A. R., J. S. Daniel & R. W. Portmann (2009) Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science*, 326: 123-125.
- Robertson, G. P. & J. M. Tiedje (1987) Nitrous oxide sources in aerobic soils: Nitrification denitrification, and other biological processes. *Soil Biol. Biochem.*, 19: 187-193.
- Seitzinger, S. P. & C. Kroeze (1998) Global distribution of nitrous oxide production and N inputs in freshwater and coastal marine ecosystems. *Glob. Biogeochem. Cycl.*, 12: 93-113.
- 瀬戸昌之・河端利子(1992)いくつかの環境試水における 2,4-dichlorophenol の分解菌密度の検討. *人間と環境*, 17: 126-132.
- Smibert, M. S. & N. R. Krieg (1981) General characterization, pp.409-443, *In* P. Gerhardt, R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg & G. B. Phillips (eds.) *Manual of Methods for General Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington DC, USA.
- Staley, J. T., D. R. Boone, D. J. Brenner, P. D. Vos, G. M. Garrity, M. Goodfellow, N. R. Krieg, F. A. Rainey & K-H. Schleifer (2005) Genus *Duganella*, pp.628-629, *In* G. M. Garrity, D. J. Brenner & N. R. Krieg (ed.) *Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 2*, Springer Science + Business Media, Inc., New York.
- Stehfest E. & K. Bouwman (2006) N<sub>2</sub>O and NO emission from agricultural fields and soils under natural vegetation: summarizing available measurement data and modeling of global annual emissions. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.*, 74: 207-228.
- Tago, K., S. Ishii, T. Nishizawa, S. Otsuka & K. Senoo (2011) Phylogenetic and functional diversity of denitrifying bacteria isolated from various rice paddy and rice-soybean rotation fields. *Microbes Environ.*, 26: 30-35.
- Tiedje, J. M. (1988) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium, *In* *Biology of Anaerobic Microorganisms*, Wiley, Chichester, UK.
- Tiedje, J. M. (1994) Denitrifiers, pp.425-467, *In* R. W. Weaver, J. S. Angle & P. J. Bottomley (eds.) *Methods of Soil Analyses, Part 2: Microbiological and Biochemical Properties*, Soil Science Society of America, Madison, USA.

- van Rijn, J., Y. Tal & Y. Barak (1996) Influence of volatile fatty acids on nitrite accumulation by *Pseudomonas stutzeri* strain isolated from a denitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2615-2620.
- Waibel, A. E., Th. Peter, K. S. Carslaw, H. Oelhaf, G. Wetzell, P. J. Crutzen, U. Pöschl, A. Tsias, E. Reimer & H. Fischer (1999) Arctic ozone loss due to denitrification. *Science*, 283: 2064-2069.
- Wood, D. W., J. C. Setubal, R. Kaul *et al.* (2001) The genome of the natural engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294:676-684.
- Yanagita, T., T. Ichikawa, T. Tsuji, Y. Kamata, K. Ito & M. Sasaki (1978) Two trophic groups of bacteria, oligotrophs and eutrophs: their distributions in fresh and sea water areas in the central northern Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 24: 59-88.
- Yoshinari, T. (1990) Emissions of N<sub>2</sub>O from various environments - the use of stable isotope composition of N<sub>2</sub>O as a tracer for the studies of N<sub>2</sub>O biogeochemical cycling, pp.129-150, *In* N. P. Revsbech & J. Sørensen (ed.) Denitrification in Soil and Sediment, Plenum Press, New York.

Table 1. Composition of nitrate nutrient broth (NNB)

Nutrient broth (Kyokuto)	3	g
Bacto™ Peptone	5	
KNO <sub>3</sub>	0.5	
Deionized water	1,000	mL

pH 6.6–6.8

Table 2. Composition of MS-NAY medium

Bacto™ yeast extract	25	mg
CH <sub>3</sub> COONa	205	
KNO <sub>3</sub>	50	
Inorganic medium	1,000	mL

pH 7.0–7.2

Table 3. Composition of inorganic medium

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.1	μM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.9	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	40	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10	
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	3	
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1	
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	1	
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	200	nM
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	5	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5	
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5	

pH 7.0–7.2

Table 4. Data of sample waters of river Tamagawa

Date	Site	Water temp. (°C)	EC ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	pH	Alkalinity ( $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>			
						(mg-N L <sup>-1</sup> )			
2010	Jan.	18	Hatonosu <sup>1)</sup>	4.0	93.1	7.4	35	2.6	0.0
		20	Haijima <sup>2)</sup>	5.0	135.2	8.1	45	3.7	0.0
		22	Marukobashi <sup>3)</sup>	17.5	508.0	7.3	100	16.6	1.5
	Apr.	5	Hatonosu	19.0	96.8	7.7	35	3.2	0.1
		7	Haijima	19.2	135.5	8.2	45	5.2	0.0
		9	Marukobashi	26.4	457.0	6.9	95	12.6	1.8
	Jul.	5	Hatonosu	16.0	83.0	7.5	30	3.0	0.0
		7	Haijima	20.0	127.7	7.5	45	4.8	0.0
		9	Marukobashi	27.0	429.0	7.0	90	10.0	0.8
	Oct.	18	Hatonosu	14.9	95.2	7.6	35	3.5	0.1
		20	Haijima	17.8	153.0	7.8	45	6.3	0.0
		22	Marukobashi	25.8	464.0	7.0	95	15.1	1.2
Dec.	27	Haijima	6.2	132.4	7.9	45	5.8	0.0	
2011	Jan.	11	Haijima	5.3	130.2	8.2	45	5.0	0.0
		17	Hatonosu	5.2	91.2	7.6	35	2.8	0.0
		24	Marukobashi	14.3	428.0	7.4	35	21.9	1.0

<sup>1)</sup> Upstream

<sup>2)</sup> Midstream

<sup>3)</sup> Downstream

Table 5. Comparison of MPN of total denitrifying microorganisms in river water (A) or biofilm attached on stone (B) of river Tamagawa estimated by MS-NAY medium with NNB

(A) River water

	Site		
	Haijima	Hatonosu	Marukobashi
Jan.	+	+	-
Apr.	-	-	-
Jul.	-	-	+
Oct.	-	-	-

+; MPN by MS-NAY > NNB

-; MPN by MS-NAY = NNB

(B) Biofilm attached on stone

	Site		
	Haijima	Hatonosu	Marukobashi
Jan.	+	+	+
Apr.	-	+	-
Jul.	-	+	-
Oct.	-	+	-



Table 6. Denitrification, the amount of TN decreased, the amount of N<sub>2</sub>O produced, and the ratio of N<sub>2</sub>O produced to TN decreased in MS-NAY media in test tubes inoculated with various dilution level of river water (A) or biofilm attached on stone (B) of river Tamagawa on January, 2010. Three MPN media were used at each dilution level.

(A) River water

Dilution level of inoculant	Hatonosu				Hajima				Marukobashi			
	Denitr. <sup>1)</sup>	TN <sup>2)</sup>	N <sub>2</sub> O <sup>3)</sup>	N <sub>2</sub> O/TN <sup>4)</sup>	Denitr.	TN	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> O/TN	Denitr.	TN	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> O/TN
		(μg-N test tube <sup>-1</sup> )		(%)		(μg-N test tube <sup>-1</sup> )		(%)		(μg-N test tube <sup>-1</sup> )		(%)
10 <sup>0</sup>	+	71	0.0	0	+	67	0.0	0	+	65	0.0	0
	+	70	0.0	0	+	65	0.0	0	+	56	0.1	0
	+	70	0.0	0	+	66	0.0	0	+	60	0.0	0
10 <sup>-1</sup>	+	71	0.0	0	+	64	0.0	0	+	60	0.0	0
	+	70	0.2	0	+	67	0.0	0	+	56	0.0	0
	+	72	0.3	0	+	53	0.0	0	+	65	0.0	0
10 <sup>-2</sup>	+	70	8.3	12	+	66	0.0	0	+	58	18.8	32
	+	66	0.0	0	+	65	0.0	0	+	65	20.3	31
	-				+	68	0.0	0	+	65	8.7	13
10 <sup>-3</sup>	-				+	60	0.0	0	+	66	0.1	0
	-				-				-			
	-				-				-			

<sup>1)</sup> +; The amount of TN decreased was 20% more than the amount of TN in MS-NAY medium uninoculated.  
 -; The amount of TN decreased was 20% less than the amount of TN in MS-NAY medium uninoculated.

<sup>2)</sup> The amount of TN decreased

<sup>3)</sup> The amount of N<sub>2</sub>O produced

<sup>4)</sup> The ratio of N<sub>2</sub>O-N produced to TN decreased

(Continued)

Table 6. (Continued)

## (B) Biofilm attached on stone

Dilution level of inoculant	Hatonosu				Haijima				Marukobashi			
	Denitr.	TN ( $\mu\text{g-N test tube}^{-1}$ )	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> O/TN (%)	Denitr.	TN ( $\mu\text{g-N test tube}^{-1}$ )	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> O/TN (%)	Denitr.	TN ( $\mu\text{g-N test tube}^{-1}$ )	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> O/TN (%)
10 <sup>-1</sup>	+	66	0.0	0	+	53	0.0	0	+	66	0.0	0
	+	64	0.0	0	+	61	0.0	0	+	64	0.0	0
	+	63	0.0	0	+	62	0.0	0	+	69	0.0	0
10 <sup>-2</sup>	+	64	0.0	0	+	58	25.2	43	+	66	0.0	0
	+	61	0.0	0	+	69	0.0	0	+	66	0.0	0
	+	59	0.0	0	+	69	0.0	0	+	64	0.0	0
10 <sup>-3</sup>	+	68	5.1	7	+	58	28.1	48	+	67	0.0	0
	+	66	0.0	0	+	51	28.5	56	+	62	0.0	0
	-				+	63	0.0	0	+	64	0.1	0
10 <sup>-4</sup>	+	69	0.0	0	-				+	64	0.2	0
	-				-				+	67	0.0	0
	-				-				+	66	0.0	0
10 <sup>-5</sup>	-				+	60	31.9	54	+	62	22.4	36
	-				-				+	66	0.1	0
	-				-				+	69	0.4	1
10 <sup>-6</sup>	-				-				+	48	27.7	58
	-				-				+	51	1.1	2
	-				-				-			
10 <sup>-7</sup>	-				-				+	53	35.0	66
	-				-				+	69	3.0	4
	-				-				-			
10 <sup>-8</sup>	-				-				+	43	3.0	7
	-				-				-			
	-				-				-			

Table 7. Denitrification, the amount of TN decreased, the amount of N<sub>2</sub>O produced, and the ratio of N<sub>2</sub>O produced to TN decreased in MS-NAY media in test tubes inoculated with various dilution level of river water (A) or biofilm attached on stone (B) of river Tamagawa on April, 2010. Three MPN media were used at each dilution level.

(A) River water

Dilution level of inoculant	Hatonosu				Haijima				Marukobashi			
	Denitr. <sup>1)</sup>	TN <sup>2)</sup> ( $\mu\text{g}\cdot\text{N test tube}^{-1}$ )	N <sub>2</sub> O <sup>3)</sup>	N <sub>2</sub> O/TN <sup>4)</sup> (%)	Denitr.	TN ( $\mu\text{g}\cdot\text{N test tube}^{-1}$ )	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> O/TN (%)	Denitr.	TN ( $\mu\text{g}\cdot\text{N test tube}^{-1}$ )	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> O/TN (%)
10 <sup>0</sup>	+	67	0.0	0	+	73	0.0	0	+	56	0.0	0
	+	67	0.1	0	+	70	0.0	0	+	55	0.1	0
	+	69	0.0	0	+	75	0.0	0	+	54	0.1	0
10 <sup>-1</sup>	+	64	0.3	0	+	73	0.0	0	+	60	0.6	1
	+	62	0.4	1	+	66	0.0	0	+	67	0.0	0
	+	54	4.0	7	+	70	0.0	0	+	63	0.1	0
10 <sup>-2</sup>	+	66	27.8	42	+	57	10.8	19	+	69	0.8	1
	+	69	28.7	41	+	25	9.0	36	+	71	0.4	1
	-				+	25	6.1	24	-			
10 <sup>-3</sup>	+	66	30.0	46	-				+	39	7.5	19
	-				-				+	72	1.7	2
	-				-				+	68	34.9	51
10 <sup>-4</sup>	-				-				-			
	-				-				-			
	-				-				-			

<sup>1)</sup> +; The amount of TN decreased was 20% more than the amount of TN in MS-NAY medium uninoculated.

-; The amount of TN decreased was 20% less than the amount of TN in MS-NAY medium uninoculated.

<sup>2)</sup> The amount of TN decreased

<sup>3)</sup> The amount of N<sub>2</sub>O produced

<sup>4)</sup> The ratio of N<sub>2</sub>O-N produced to TN decreased

(Continued)

Table 7. (Continued)

## (B) Biofilm attached on stone

Dilution level of inoculant	Hatonosu				Haijima				Marukobashi			
	Denitr.	TN ( $\mu\text{g-N test tube}^{-1}$ )	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> O/TN (%)	Denitr.	TN ( $\mu\text{g-N test tube}^{-1}$ )	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> O/TN (%)	Denitr.	TN ( $\mu\text{g-N test tube}^{-1}$ )	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> O/TN (%)
10 <sup>-1</sup>	+	57	0.1	0	+	72	0.0	0	+	63	0.0	0
	+	63	0.0	0	+	70	0.0	0	+	61	0.0	0
	+	56	0.0	0	+	70	0.0	0	+	66	0.0	0
10 <sup>-2</sup>	+	60	12.9	22	+	62	0.0	0	+	64	0.1	0
	+	67	0.0	0	+	72	0.1	0	+	63	0.0	0
	+	68	0.2	0	+	70	0.0	0	+	66	0.1	0
10 <sup>-3</sup>	+	68	30.3	45	+	71	13.6	19	+	61	1.6	3
	+	61	1.1	2	+	72	55.9	77	+	66	0.0	0
	-				+	72	18.9	26	+	64	0.0	0
10 <sup>-4</sup>	-				+	67	10.8	16	+	61	20.8	34
	-				+	65	0.0	0	+	63	3.9	6
	-				-				+	66	0.0	0
10 <sup>-5</sup>	-				-				+	64	7.1	11
	-				-				+	66	0.0	0
	-				-				+	46	1.8	4
10 <sup>-6</sup>	-				-				+	21	9.1	44
	-				-				+	30	7.7	26
	-				-				-			
10 <sup>-7</sup>	-				-				+	57	0.1	0
	-				-				-			
	-				-				-			

Table 8. Denitrification, the amount of TN decreased, the amount of N<sub>2</sub>O produced, and the ratio of N<sub>2</sub>O produced to TN decreased in MS-NAY media in test tubes inoculated with various dilution level of river water (A) or biofilm attached on stone (B) of river Tamagawa on July, 2010. Three MPN media were used at each dilution level.

(A) River water

Dilution level of inoculant	Hatonosu				Haijima				Marukobashi			
	Denitr. <sup>1)</sup>	TN <sup>2)</sup> ( $\mu\text{g}\cdot\text{N}$ test tube <sup>-1</sup> )	N <sub>2</sub> O <sup>3)</sup>	N <sub>2</sub> O/TN <sup>4)</sup> (%)	Denitr.	TN ( $\mu\text{g}\cdot\text{N}$ test tube <sup>-1</sup> )	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> O/TN	Denitr.	TN ( $\mu\text{g}\cdot\text{N}$ test tube <sup>-1</sup> )	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> O/TN
10 <sup>0</sup>	+	60	0.0	0	+	62	0.0	0	+	65	0.1	0
	+	62	0.0	0	+	67	0.0	0	+	48	0.1	0
	+	59	0.0	0	+	62	0.0	0	+	64	0.1	0
10 <sup>-1</sup>	+	58	0.1	0	+	67	0.0	0	+	70	0.0	0
	+	59	0.1	0	+	68	0.0	0	+	67	0.0	0
	+	59	0.9	2	+	69	0.0	0	+	68	0.0	0
10 <sup>-2</sup>	+	61	0.0	0	+	66	0.0	0	+	72	0.0	0
	+	62	1.1	2	+	67	0.1	0	+	68	0.0	0
	-				+	62	0.2	0	+	69	0.0	0
10 <sup>-3</sup>	+	60	40.0	66	+	68	0.2	0	+	65	0.2	0
	-				+	62	0.4	1	+	58	2.6	4
	-				+	58	35.0	61	+	73	0.0	0
10 <sup>-4</sup>	-				-				+	63	0.0	0
	-				-				+	65	0.5	1
	-				-				+	37	1.1	3
10 <sup>-5</sup>	-				-				+	69	30.0	44
	-				-				-			
	-				-				-			

<sup>1)</sup> +; The amount of TN decreased was 20% more than the amount of TN in MS-NAY medium uninoculated.

-; The amount of TN decreased was 20% less than the amount of TN in MS-NAY medium uninoculated.

<sup>2)</sup> The amount of TN decreased

<sup>3)</sup> The amount of N<sub>2</sub>O produced

<sup>4)</sup> The ratio of N<sub>2</sub>O-N produced to TN decreased

(Continued)

Table 8. (*Continued*)

## (B) Biofilm attached on stone

Dilution level of inoculant	Hatonosu				Haijima				Marukobashi			
	Denitr.	TN	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> O/TN	Denitr.	TN	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> O/TN	Denitr.	TN	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> O/TN
		( $\mu\text{g-N test tube}^{-1}$ )	(%)	(%)		( $\mu\text{g-N test tube}^{-1}$ )	(%)	(%)		( $\mu\text{g-N test tube}^{-1}$ )	(%)	
10 <sup>1</sup>	+	60	0.0	0	+	60	0.0	0	+	65	0.1	0
	+	60	0.0	0	+	63	0.1	0	+	69	0.0	0
	+	59	0.0	0	+	66	0.1	0	+	70	0.0	0
10 <sup>-2</sup>	+	60	0.0	0	+	68	0.0	0	+	71	0.1	0
	+	60	0.2	0	+	65	0.1	0	+	71	0.0	0
	+	61	0.3	0	+	48	0.1	0	+	70	0.0	0
10 <sup>-3</sup>	+	41	38.0	94	+	56	0.1	0	+	66	0.0	0
	+	61	0.4	1	+	62	0.1	0	+	70	0.0	0
	-				+	54	0.3	1	+	66	0.0	0
10 <sup>-4</sup>	+	64	47.0	73	+	68	4.2	6	+	62	0.0	0
	+	30	7.2	24	+	68	4.8	7	+	71	0.0	0
	-				-				+	71	0.0	0
10 <sup>-5</sup>	+	62	0.1		+	29	12.0	41	+	65	0.0	0
	-				+	61	0.0	0	+	70	0.0	0
	-				+	54	0.5	1	+	39	0.4	1
10 <sup>-6</sup>	-				-				+	69	0.0	0
	-				-				+	65	0.0	0
	-				-				-			

Table 9. Denitrification, the amount of TN decreased, the amount of N<sub>2</sub>O produced, and the ratio of N<sub>2</sub>O produced to TN decreased in MS-NAY media in test tubes inoculated with various dilution level of river water (A) or biofilm attached on stone (B) of river Tamagawa on October, 2010. Three MPN media were used at each dilution level.

(A) River water

Dilution level of inoculant	Hatonosu				Hajijima				Marukobashi			
	Denitr. <sup>1)</sup>	TN <sup>2)</sup> ( $\mu\text{g-N test tube}^{-1}$ )	N <sub>2</sub> O <sup>3)</sup>	N <sub>2</sub> O/TN <sup>4)</sup> (%)	Denitr.	TN ( $\mu\text{g-N test tube}^{-1}$ )	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> O/TN (%)	Denitr.	TN ( $\mu\text{g-N test tube}^{-1}$ )	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> O/TN (%)
10 <sup>0</sup>	+	64	0.0	0	+	55	0.0	0	+	58	0.0	0
	+	50	0.0	0	+	57	0.0	0	+	57	0.0	0
	+	64	0.0	0	+	52	0.0	0	+	56	0.0	0
10 <sup>-1</sup>	+	65	0.0	0	+	58	0.0	0	+	58	0.0	0
	+	64	0.0	0	+	59	0.0	0	+	65	0.0	0
	+	62	0.2	0	+	53	0.8	1	+	60	0.0	0
10 <sup>-2</sup>	+	32	9.8	30	+	56	0.0	0	+	60	22.0	37
	+	66	24.3	37	+	57	15.6	27	+	61	3.3	5
	+	67	36.0	54	-				+	61	21.7	35
10 <sup>-3</sup>	-				+	39	23.2	60	+	48	0.3	1
	-				-				+	33	2.6	8
	-				-				-			
10 <sup>-4</sup>	-				-				+	35	35.0	100
	-				-				-			
	-				-				-			

(B) Biofilm attached on stone

Dilution level of inoculant	Hatonosu				Hajijima				Marukobashi			
	Denitr.	TN ( $\mu\text{g-N test tube}^{-1}$ )	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> O/TN (%)	Denitr.	TN ( $\mu\text{g-N test tube}^{-1}$ )	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> O/TN (%)	Denitr.	TN ( $\mu\text{g-N test tube}^{-1}$ )	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> O/TN (%)
10 <sup>-1</sup>	+	57	0.0	0	+	48	0.0	0	+	54	0.0	0
	+	61	0.0	0	+	51	0.0	0	+	54	0.0	0
	+	60	0.0	0	+	52	0.0	0	+	54	0.0	0
10 <sup>-2</sup>	+	53	0.0	0	+	56	0.0	0	+	61	0.0	0
	+	64	0.0	0	+	48	0.2	0	+	61	0.0	0
	+	63	0.0	0	+	56	0.0	0	+	63	0.0	0
10 <sup>-3</sup>	+	63	0.0	0	+	53	31.7	60	+	55	0.0	0
	+	59	0.0	0	-				+	61	0.0	0
	+	62	0.0	0	-				+	58	0.0	0
10 <sup>-4</sup>	+	64	0.0	0	+	51	0.7	1	+	46	0.0	0
	+	58	0.0	0	+	41	17.6	43	+	52	0.0	0
	+	61	0.0	0	+	24	11.3	47	+	55	0.0	0
10 <sup>-5</sup>	-				+	19	11.2	59	+	51	0.1	0
	-				-				+	64	0.7	1
	-				-				+	39	0.0	0
10 <sup>-6</sup>	-				-				+	21	2.0	10
	-				-				-			
	-				-				-			

<sup>1)</sup> +; The amount of TN decreased was 20% more than the amount of TN in MS-NAY medium uninoculated.

-; The amount of TN decreased was 20% less than the amount of TN in MS-NAY medium uninoculated.

<sup>2)</sup> The amount of TN decreased

<sup>3)</sup> The amount of N<sub>2</sub>O produced

<sup>4)</sup> The ratio of N<sub>2</sub>O-N produced to TN decreased

Table 10. River water (A) or biofilm attached on stone (B) in which the amount of N<sub>2</sub>O produced was 20% more than that of TN decreased in MS-NAY media in test tubes inoculated with high dilution levels (<10<sup>-1</sup>) of samples.

(A) River water				(B) Biofilm attached on stone			
	Hatonosu	Haijima	Marukobashi		Hatonosu	Haijima	Marukobashi
Jan.	–	–	+	Jan.	–	++	+
Apr.	++	+	+	Apr.	+	+	+
Jul.	++	+	++	Jul.	+	+	–
Oct.	++	++	++	Oct.	–	++	–

++; The ratio of the amount of N<sub>2</sub>O produced was 20% more than that of TN decreased in MS-NAY medium inoculated with the highest dilution level of sample.

+; The ratio of the amount of N<sub>2</sub>O produced was 20% more than that of TN decreased in MS-NAY medium inoculated with higher dilution levels of sample but was 20% less than that with the highest dilution level.

–; The ratio of the amount of N<sub>2</sub>O produced was 20% less than that of TN decreased in MS-NAY medium inoculated with any dilution levels of sample.



Table 11. Denitrification, the amount of TN decreased, the amount of N<sub>2</sub>O produced, the ratio of N<sub>2</sub>O produced to TN decreased, and the concentration of dissolved oxygen in MS-NAY media in test tubes inoculated with various dilution level of river water or biofilm attached on stone at Haijima sampled on December, 2010. Three MPN media were used at each dilution level.

Dilution level of inoculant	River water					Biofilm attached on stone				
	Denitr. <sup>1)</sup>	TN <sup>2)</sup> ( $\mu\text{g-N}$ test tube <sup>-1</sup> )	N <sub>2</sub> O <sup>3)</sup>	N <sub>2</sub> O/ TN <sup>4)</sup> (%)	DO <sup>5)</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Denitr.	TN ( $\mu\text{g-N}$ test tube <sup>-1</sup> )	N <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> O/ TN (%)	DO (mg L <sup>-1</sup> )
10 <sup>0</sup>	+	56	0.0	0	2.7					
	+	51	0.0	0	3.2					
	+	47	0.0	0	3.1					
10 <sup>-1</sup>	+	69	0.0	0	3.2	+	49	0.0	0	2.9
	+	46	0.0	0	3.2	+	44	0.0	0	2.8
	+	44	0.0	0	4.0	+	41	0.0	0	2.8
10 <sup>-2</sup>	+	51	41.0	80	3.9	+	54	17.0	32	3.3
	+	22	6.0	26	3.1	+	53	8.0	14	3.2
	-					+	53	0.5	1	3.4
10 <sup>-3</sup>	+	61	54.0	88	2.6	+	58	53.0	91	2.9
	-				3.0	+	50	22.0	44	3.3
	-				3.0	+	49	40.0	82	3.3
10 <sup>-4</sup>	-				6.1	+	52	54.0	104	2.5
	-				7.7	+	50	53.0	105	3.8
	-				8.0	+	34	34.0	99	2.8
10 <sup>-5</sup>	-				7.9	-				3.3
	-				8.3	-				3.4
	-				8.3	-				3.3
10 <sup>-6</sup>						-				2.4
						-				6.5
						-				8.0

<sup>1)</sup> +; The amount of TN decreased was 20% more than the amount of TN in MS-NAY medium uninoculated.

-; The amount of TN decreased was 20% less than the amount of TN MS-NAY medium uninoculated.

<sup>2)</sup> The amount of TN decreased

<sup>3)</sup> The amount of N<sub>2</sub>O produced

<sup>4)</sup> The ratio of N<sub>2</sub>O-N produced to TN decreased

<sup>5)</sup> Concentration of dissolved oxygen at 25°C of air temperature and 22°C of the medium

Note; cells colored with grey indicate test tubes in which growth of heterotrophic microorganisms was detected.

Table 12. Criterion for nitrate reduction or denitrification of bacterium by the method of Smibert & Krieg (1981)

Nitrate in medium	Nitrite in medium	Bubble formation	Criterion	
			Nitrate reduction	Denitrification
–	+/-	+	Positive	Positive
–	+	–	Positive	Negative
+	–	–	Negative	Negative

+; Detected

–; Not detected

Table 13. Condition of thermal cycler for PCR to amplify bacterial DNA of 16S rRNA region

Step	Temperature (°C)	Time (sec.)	Cycles
Initial denaturing	98	60	1
Denaturing	98	10	30
Annealing	57.1	5	30
Extension	72	45	30
Final extension	72	600	1
Hold	4	∞	

Table 14. Condition of thermal cycler for PCR to amplify and sequence bacterial DNA of 16S rRNA region.

Step	Temperature (°C)	Time (sec.)	Cycles
Initial denaturing	98	60	1
Denaturing	98	10	25
Annealing	57.1	5	25
Extension	72	240	25
Hold	4	∞	

Table 15. Ability of nitrate reduction or denitrification of bacterial strains tested by the method of Smibert & Krieg<sup>1)</sup>. Criterion was shown in Table 12.

Bacterial strain	Growth	Nitrate in medium	Nitrite in medium	Bubble formation	Nitrate reduction	Denitrification
Strain MS-1	+	–	+	–	Positive	Negative
<i>P. aeruginosa</i>	+	–	–	+	Positive	Positive
<i>E. coli</i>	+	–	+	–	Positive	Negative
<i>L. sphaericus</i>	+	+	–	–	Negative	Negative

+; Detected

–; Not detected

<sup>1)</sup> The test was repeated five times for each bacterial strain.

Table 16. Fate of  $^{15}\text{NO}_3^-$  in NNB or MS-NAY medium after 13 days incubation of strain MS-1

Medium	The ratio of the amount of nitrogen compound produced to the initial amount of $^{15}\text{NO}_3^-$			
	$^{15}\text{NO}_3^-$	$^{15}\text{NO}_2^-$	$^{15}\text{N}^{15}\text{NO}$ & $^{15}\text{N}^{14}\text{NO}$	$^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ & $^{15}\text{N}^{14}\text{N}$
NNB	1	73	24	1.3 (0.1) <sup>1)</sup>
MS-NAY	9	49	47	1.3 (0.9)

<sup>1)</sup> Value in parenthesis indicates standard deviation ( $n=3$ ).

多摩川における亜酸化窒素生成細菌の生態と窒素動態における役割の解明

(研究助成・学術研究VOL. 40—NO. 296)

著 者 多羅尾 光徳

発行日 2011年12月1日

発行者 公益財団法人とうきゅう環境財団

〒150-0002

東京都渋谷区渋谷1-16-14 (渋谷地下鉄ビル内)

TEL (03) 3400-9142

FAX (03) 3400-9141

<http://www.tokyuenv.or.jp/>