

シンポジウム

土壌微生物と気候変動

太田寛行^{1*}・西澤智康²

¹ 茨城大学, 〒310-8512 茨城県水戸市文京 2-1-1

² 茨城大学農学部, 〒300-0393 茨城県稲敷郡阿見町中央 3-21-1

Soil microbes and climate change

Hiroyuki Ohta^{1*} and Tomoyasu Nishizawa²

¹Ibaraki University, 2-1-1 Bunkyo, Mito, Ibaraki 310-8512, Japan

²Ibaraki University College of Agriculture, 3-21-1 Chuou, Ami, Ibaraki, 300-0393, Japan

Key words: GHGs, mineral-associated carbon, no-tillage, nitrogen cycle, *nosZ*

1. はじめに

土壌微生物研究の歴史をたどると、その一つは H. J. Conn に行き着く (太田, 2003)。Conn は土壌細菌の計数培地の問題に着目し、その多様性を見通した (Conn, 1914)。それは、今日での「培養できる土壌細菌は全体の 1% 程度」という理解につながっている。生きているけれど培養できない、または培養の方法が見つからない微生物グループが数多く存在するという多様性の理解が土壌微生物研究の第一段階 (“生物学”としての探究) と言える。第二段階 (“農学”として探究) は、農業との関係であり、植物栄養に関わる土壌での物質循環の担い手としての微生物である。ここでも、Conn は土壌中での窒素代謝と微生物の関係を研究し、彼自身が分類学的に位置づけた *Arthrobacter globiformis* の生理的特徴から、土壌固有型微生物が土壌中の窒素プールを構成すると考えた (Conn, 1948; 太田, 2003)。これは、その後には生まれる「土壌微生物バイオマス」の考え方に他ならない。土壌微生物研究の第三段階 (“地球化学”としての探究) は、地球環境における微生物の役割である。元素循環の様々な反応を担う微生物が特定され、微生物が地球全体の物質代謝を支えているという理解が深まった。

この第三段階のもう一つの側面が気候変動との関係である。気候変動の問題認識は、S. Arrhenius (1896) が、人間の二酸化炭素の放出による地球温暖化を示す最初の計算結果を発表したことが始まりである。ワートの著作 (2005) では、1988 年の「気候変動に関する政府間パネル (IPCC)」の設立によって、Arrhenius の仮説の立証が始まり、2001 年の IPCC 第三次報告書 (Third Assessment Report: Climate Change 2001)

に至って「地球温暖化の発見」が広く認識されたと捉えている。その第三次報告書の結論は、「過去 50 年間に観測された温暖化の大部分は温室効果ガス濃度の上昇が原因だったものと思われる」である (ワート, 2005)。土壌微生物研究の第三段階では、温室効果ガス濃度の変動と土壌微生物の関係に関して、IPCC の活動と速やかに連動する取組はなかったが、2019 年 6 月に 9 カ国 33 名の微生物学者が「人類への注意喚起: 微生物と気候変動」という合意声明の論文を発表した (Cavicchioli *et al.*, 2019)。その論文の趣旨は、微生物が気候変動の生物学において中心的な役割をもち、地球全体のシステムにおいても重要であることを立証し、さらに世界の人々に対して、地球環境の持続可能な未来を実現するためには、気候変動のインパクトは微生物の環境応答に大きく依存することを伝えようとするものであった。同時に、この声明に関する手紙が世界の微生物学関連団体の代表に送られ、同意へのアクションが依頼された。日本土壌微生物学会は、この要請を受けて、2020 年大阪大会で市民向けのシンポジウム、「気候変動と相互作用する土の微生物世界」(予定タイトル) を企画した。残念ながら、COVID-19 の広がりによって企画の実現には至らなかったが、気候変動の問題に対する土壌微生物研究者間の連携は今後も求められるであろう。

本稿では、(1) 土壌からの温室効果ガス (GHGs) の発生について概観し、(2) 土壌からの二酸化炭素 (CO₂) 発生に関わる微生物の分解作用と土壌有機物およびその存在様式との関係、(3) 土壌での一酸化二窒素 (N₂O) 生成に関わる微生物、に関して、最新の知見も含めて概説する。なお、本稿では GHGs として CO₂、メタン (CH₄)、N₂O の 3 つに絞って考察する。

2. 土壌からの温室効果ガスの発生の概要

まず、Oertel *et al.* (2016) の総説に依拠して地球レベルでの土壌からの GHGs 発生を概観する。彼らは、世界各地の

調査地点での GHG 発生活性測定データを収集し、陸地の生態系区分と GHGs 発生ポテンシャルの関係を分析した（表 1）。収集した調査地点データ数は 194 で、内訳は草地 47、森林地 22、荒廃地 17、耕作地 41、水田を含む湿地 67 である。表 1 には、彼らのデータから計算した、生態系被覆の割合を考慮した相対ポテンシャルも加えた。その調査結果の範囲で分かることは以下の 3 点である。(1) 湿地の被覆率は陸地全体の 2.7% 程度であるが、GHGs 発生ポテンシャルは一番高い。(2) 生態系の被覆割合を考慮すると、湿地よりも森林地や草地の方での GHGs 発生ポテンシャルが大きい。また、同様な見方では、(3) 水田を含めた湿地帯よりも耕作地（畑地）の方が 2 倍程度高い。

Oertel *et al.* (2016) のデータで、GHGs の種類別に湿地と耕作地を比べると、嫌気環境で発生する CH₄ で大きな違いが確認できる。湿地では（単位は $\mu\text{mol CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ）、温帯域の $-1.8 \sim 28$ (max. 810) と（亜）熱帯域の $<1 \sim 7800$ に対して、耕作地（温帯域）では $-0.41 \sim -0.16$ である。なお、（亜）熱帯域のデータはない。N₂O の場合はそれほど明確ではないが、（亜）熱帯域で耕作地 ($0.27 \sim 2.26 \mu\text{mol N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) よりも湿地 ($-7 \sim 27 \mu\text{mol N}_2\text{O m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) で高い傾向にある。

次に、地域レベルでの研究データを紹介する。Robertson *et al.* (2000) は、1991 ～ 1999 年にかけて、米国ミシガン州

の W. K. Kellogg Biological Station の畑地と植生を管理していない生態系の土壌からの GHGs の発生ポテンシャルを分析した（表 2）。調査地は、一年生（コーン・ダイズ・コムギの輪作）と多年生作物（アルファルファとポプラ）の畑地と測定開始の 2 年前（1989 年）から耕作を止めた未管理のサイト（遷移初期の生態系）を含む生態系である。3 種の GHGs の発生ポテンシャルは CO₂ 換算での Global Warming Potential (GWP, 単位は $\text{g CO}_2\text{e m}^{-2} \text{ y}^{-1}$) として表記し、一年生作物の耕起栽培畑地での土壌呼吸活性を基準にして相対化している。調査した試験地の GWP は一年生作物の耕起栽培畑地の 114 から遷移初期の生態系の -211 の範囲で分布し、土壌管理は土壌の GWP に大きく影響を与えと言える。表 2 のデータを詳しく見ると次の 4 点が指摘できる。(1) 一年生作物栽培畑地では、4 つの農法のいずれでも GHGs の発生緩和にはならない (GWP, 41 ～ 114)。しかし、農法の影響は大きく、特に、耕起から不耕起栽培に変えることによって、GHGs の発生ポテンシャルは 88% も減少する (GWP, 114 → 14)。また、マメ科カバークロップと低投入型または有機栽培との併用でも GHGs の発生は減少する。(2) 多年生作物栽培畑地と植生を管理しない生態系の調査地では発生緩和なしにニュートラルになる (GWP, $-211 \sim 1$)。(3) 耕作放棄後 10 年の遷移初期生態系の調査地では土壌炭素の大きな隔離が起こ

表 1 陸地生態系の土壌からの温室効果ガス (GHGs) の発生 *

	生態系 **				
	森林	草地	荒廃地	耕作地	湿地
陸地での被覆割合 (%) [A]	27.7	31.5	15.2	12.6	2.7
GHGs 発生活性 [B] ***	438.9 (22)	350 (47)	126.7 (17)	297.7 (41)	629.2 (67)
被覆割合を考慮した相対活性 {(A × B)/100}	122	110	19.2	37.5	17.0

* Oertel *et al.* (2016) のデータを用いて作成した。活性の単位は、CO₂ 換算で、 $\text{mg CO}_2\text{e m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ 。

** 草地は牧草地を、湿地は水田を含む。その他の生態系として、氷雪帯 (9.7%) と都市等の人工地帯 (0.6%) がある。

*** 括弧内の数値は測定調査地点数を示す。

表 2 アメリカ中西部の農地生態系からの温室効果ガスの発生

農業生態系の管理状況	CO ₂				N ₂ O	CH ₄	Net GWP
	土壌炭素	窒素肥料	石灰	燃料			
一年生作物（コーン / 大豆 / 小麦の輪作）							
通常耕起	0	27	23	16	52	-4	114
不耕起	-110	27	34	12	56	-5	14
低投入型 + マメ科カバー作物	-40	9	19	20	60	-5	63
有機栽培 + マメ科カバー作物	-29	0	0	19	56	-5	41
多年生作物							
アルファルファ	-161	0	80	8	59	-6	-20
ポプラ	-117	5	0	2	10	-5	-105
耕作放棄後の生態系（放棄年）							
遷移初期（1989）	-220	0	0	0	15	-6	-211
遷移中期（耕起栽培の中止, 1950）	-32	0	0	0	16	-15	-31
遷移中期（林地から草地に, 1959）	0	0	0	0	18	-17	1
遷移後期（森林）	0	0	0	0	21	-25	-4

Robertson *et al.* (2000) のデータより。1991 ～ 1999 年の測定データで、数値の単位は CO₂ 換算値 ($\text{g CO}_2\text{e m}^{-2} \text{ y}^{-1}$)。

り、GHGsの発生緩和は最大になるが(GWP, -211)、放棄後50年の遷移中期生態系の調査地ではGWPは-31に下がる。それは土壌炭素の隔離が低下すること(Soil C, -220 → -32)に起因する。(4) どの農法によっても、またどの遷移生態系においても、N₂Oの発生緩和は起こらない(GWP, 10 ~ 60)。特に、マメ科カバークロップの施用や、多年生でもアルファルファではGWPが高い:前者で60、後者で59。一方、調査した試験地の全体でCH₄の消費(酸化)が起きている(GWP, -4 ~ -25)。

不耕起栽培とGHGsの発生緩和の関係は時間スケールも重要な観点である。Six *et al.* (2004b)は、湿潤及び乾燥地帯の耕起/不耕起栽培地からのGHGs発生測定データセットを分析して、不耕起栽培がGHGsの発生に及ぼす影響は10年以上の時間スケールで見る必要性を指摘している。特に、不耕起栽培地でのN₂Oの発生ポテンシャルは5年間と10年間でも緩和されず(湿潤地で耕起栽培地との差分ポテンシャル(kg ha⁻¹ y⁻¹)は、それぞれ3.8と1.1)、20年たつてようやく差分ポテンシャルが負になった(-4.2)。なお、乾燥地でのN₂O発生の差分ポテンシャルは、5 → 10 → 20年で、1.3 → 0.9 → 0.0である。彼らが計算した20年間の累積差分GWP(g CO₂e m⁻²)を見ると、湿潤地において土壌炭素の-1629.6(標準誤差, 88)という大きな無機化抑制に対してN₂O発生は502.7(370.6)、乾燥地では土壌炭素の-712.8(11.5)に対して、N₂O発生は510.5(581.4)であり、N₂O発生の緩和には至らず、標準誤差も大きい。これはN₂O発生のメカニズムの複雑さと関わる微生物の多様性に起因することが考えられる。この点は後節で考察する。

3. 土壌有機物の存在状態と微生物との関わり

一般に、有機物の分解抵抗性、すなわち安定性は有機物の分子構造と有機物の物理的及び化学的状态に依存する

(Davidson and Janssens, 2006; Schmidt *et al.*, 2011; 和穎, 2016)。難分解性の分子構造の特徴は、リグニンのように芳香族化合物を含む点と、構造に規則性がないことである。後者はセルロースのような構造の規則性がないために特異的な加水分解酵素の進化をもたらさなかったと考えられている(フェンチェルら, 2015)。化学構造が特定されない腐植物質も同様である。有機物の物理的状态に起因する安定性については、土壌の団粒階層の概念(Tisdall and Oades, 1982)を基にした「団粒のライフサイクル」(Six *et al.*, 2000; 2002; 2004a)モデルで説明されてきた。このモデルでは、耕起等の土壌攪乱がマクロ団粒(>250 µm)のターンオーバー速度を速めることによって、マクロ団粒内の新たなミクロ団粒(20-250 µm)の形成が弱まり、ミクロ団粒内への有機物保持(有機物の物理的な保護)が進まず、分解者や菌体外酵素のアクセスが可能な有機物が分解(無機化)されると考えている。

土壌有機物の物理的保護と化学的保護を統合した研究が進展している。ここでは、Plaza *et al.* (2013)の研究例を紹介する。彼らの実験では、土壌有機物を保護のメカニズムの違いによって5つの画分に分けている。すなわち、団粒外にある①溶存態(dissolved organic matter (OM))と②遊離態(free OM)、そして③マクロ団粒内(intra-macroaggregate OM)、④ミクロ団粒内(intra-microaggregate OM)、⑤鉱物会合態(mineral-associated OM)である。溶存態と遊離態は保護されていない有機物である。マクロ団粒内とミクロ団粒内の画分は、それぞれ、分解者から弱くおよび強く物理的に保護されている有機物である。この弱い保護と強い保護の違いは、団粒のターンオーバー速度の違いであり、マクロ団粒の方が速く、耕起等で保護する有機物を損失しやすい。鉱物会合態は化学的に微生物分解から保護されている有機物である。図1に彼らのデータを図示化した。図1(A)から明らかなように、鉱物会合態が有機物全体の半分以上を占めている(不耕起区土壌で55.7%, 耕起区土壌で54.4%)。次に多い順で見ると、

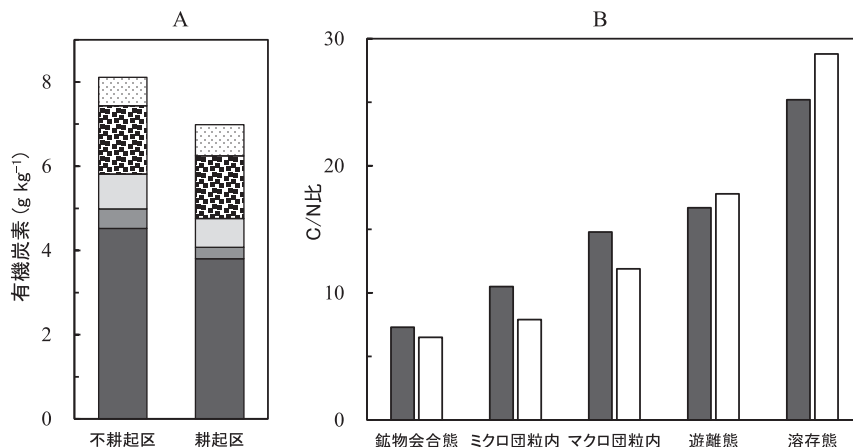


図1 不耕起及びチーゼル耕起畑地土壌の有機物分画と各画分の炭素量(A)とC/N比(B)の比較。Plaza *et al.* (2013)のデータを図示化した。供試土壌は25年間の長期試験圃場(オオムギ栽培畑地:スペイン,トレド)から夏季に採取(2011年)。(A)土壌有機物を5画分(溶存態; 遊離態; マクロ団粒内; ミクロ団粒内; 鉱物会合態)に分画して、バルク土壌あたりの量で表示。有機炭素の回収率は不耕起区で97.5%, 耕起区で99.6%。(B)不耕起区(黒); 耕起区(白)。

遊離態 (20.0%, 21.3%), マクロ団粒内 (10.3%, 9.8%), 溶存態 (8.3%, 10.6%), ミクロ団粒内 (5.7%, 3.9%) となる。全体で見れば, 不耕起区土壌は耕起区土壌よりも 1.16 倍多い有機炭素を含み, その増分の 65% は鉱物会合態の有機物である。また, 有機物の C/N 比は, 溶存態 > 遊離態 > マクロ団粒内 > ミクロ団粒内 > 鉱物会合態の順で低くなり, 鉱物会合態の C/N 比は微生物菌体の値とほぼ一致する (図 1 (B))。

土壌有機物の NMR 分析等が展開し, 鉱物会合態の有機物は微生物由来であることが分かってきた (Golchin *et al.*, 1994; Kögel-Knabner *et al.*, 2008; Plaza *et al.*, 2013; Robertson *et al.*, 2019)。Lünsdorf *et al.* (2000) に従えば, 微生物が菌体外に代謝産物などを産生して鉱物粒子にアンカー (錨) をおろした状態になった結果, 死滅後も菌体および代謝産物がトラップされたままの状態にあると推察される。従来, 土壌の難分解性有機物は植物遺体が微生物分解を経て生じるポリフェノールやキノン類が縮重合した腐植物質が主体であると考えられてきた。しかし, そのプロセスとは異なって, 植物遺体の成分が微生物の異化と同化作用によって微生物菌体に変換され, 鉱物会合態となって化学的に保護される有機物の方が主体であることは新たな知見である。この新しい有機物形成モデルの詳細については和穎 (2016) や Robertson *et al.* (2019) 等を, また, 土壌の炭素循環と気候変動の関係については, 藤嶽 (2020) を参照されたい。

4. 土壌中での N_2O の生成と消費のプロセス

地球上全体の N_2O 発生の中かで, 農地土壌から発生する割合は 1995 年で 51%, 2005 年には 55% に増え, 2030 年には 59% まで増えることが推定されている (Hu *et al.*, 2015)。従来, N_2O は硝化菌の硝化反応の副産物として生成する経路と脱窒菌の脱窒反応の中間産物として生成する経路が主体として考えられてきた。しかし, N_2O をめぐる微生物代謝や化学反応は複雑であり, 関わる微生物の種類も多いことが分かってきた (Hayatsu *et al.*, 2008)。図 2 には, N_2O をめぐる窒素代謝の概要を Butterbach-Bahl *et al.* (2013), Hu *et al.* (2015), Hallin *et al.* (2018) および Wu *et al.* (2020) を基にして図示化した。以下に, N_2O の生成と消費に関わる経路を概観する。

4.1. 硝化菌が関係する経路

従来, アンモニア酸化の中間体であるヒドロキシルアミン (NH_2OH) や反応産物の亜硝酸イオン (NO_2^-) は化学分解されて, 副産物として N_2O が生成すると考えられてきた。しかし, 硝化菌は脱窒反応も行うことが分かっており (Hooper, 1968), 亜硝酸イオン (NO_2^-) を還元して N_2O を生成し, また亜硝酸酸化の産物である硝酸イオン (NO_3^-) を還元して N_2O を生成する (“硝化菌脱窒”) (Wrage *et al.*, 2001; Kool *et al.*, 2011; Wrage-Mönnig *et al.*, 2018)。このように, 研究が進むにつれて, 菌の命名は必ずしも機能とは一致しなくなっている。硝化菌脱窒は, 酸素制限または酸素濃度が変化しやすく, NO_2^- 濃度が高い条件で起こり, 温度や炭素量によって影響を受けやすい (Wrage-Mönnig *et al.*, 2018)。

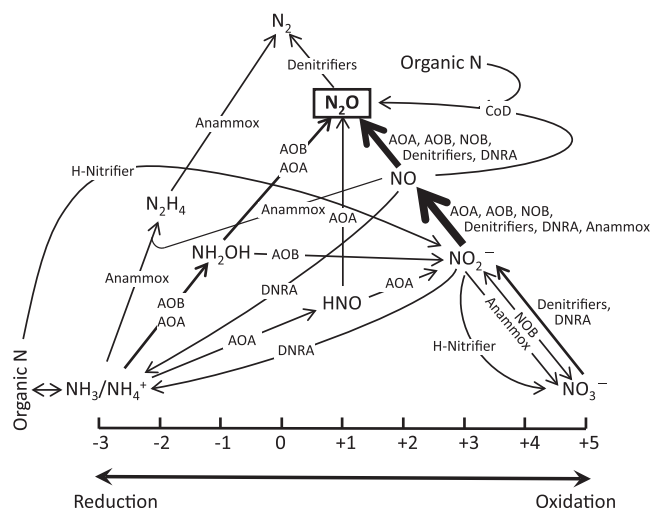


図 2 微生物の窒素代謝と N_2O 生成。Butterbach-Bahl *et al.* (2013), Hallin *et al.* (2018), Hu *et al.* (2015), Wrage-Mönnig *et al.* (2018) および Wu *et al.* (2020) 総説または論文を基にして作図した。Anammox, アナモックス菌; AOA, アンモニア酸化アーキア; AOB, アンモニア酸化細菌; Denitrifiers, 脱窒菌 (細菌と糸状菌, 糸状菌は $N_2O \rightarrow N_2$ を欠く); CoD, 共脱窒; DNRA, アンモニア生成異化硝化還元; H-Nitrifier, 従属栄養性硝化菌; NOB, 亜硝酸酸化菌。硝化菌 (AOA, AOB, NOB) による $NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O$ の反応が硝化菌脱窒に相当する。太い矢印ほど関わる微生物の種類数が多い。

アンモニア酸化アーキア (AOA) では, アンモニア酸化の中間体として, NH_2OH とニトロキシル (HNO) を生じ, NH_2OH の化学分解以外に, HNO が推定上のニトロキシル酸化還元酵素 (putative nitroxyl oxidoreductase) などの触媒によって N_2O を生成する (Stieglmeier *et al.*, 2014)。AOA による N_2O 生成には, その他に 3 つの経路が知られており, 合計 5 つの経路がある (Wu *et al.*, 2020)。

独立栄養微生物だけでなく, 従属栄養性微生物も硝化反応を行うことが知られている (Odu and Adeoye, 1970; Kulinska and Drozdowicz, 1983; Kester *et al.*, 1997)。この従属栄養性硝化反応は細菌よりも糸状菌に広く分布し, 酸性土壌で起こる硝化では糸状菌の役割は大きい (Lang and Jagnow, 1986; Stroo *et al.*, 1986; Wrage *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2015)。

4.2. 脱窒菌が関係する経路

脱窒反応は一連の素反応からなるプロセスである。各ステップで関わる酵素を記して示すと, NO_3^- (Nar/Nap) $\rightarrow NO_2^-$ (Nir) $\rightarrow NO$ (Nor) $\rightarrow N_2O$ (Nos) $\rightarrow N_2$ である。亜硝酸還元酵素 (Nir) には, 銅含有タンパク質 (NirK) とシトクロム *c* および *d* をもつヘムタンパク質 (NirS) の 2 群があり, この違いによって脱窒菌は大別される (Zumft, 1997)。脱窒菌は必ずしも全ステップの遺伝子を保有していない。したがって, 最終ステップの $N_2O \rightarrow N_2$ を触媒する一酸化二窒素還元酵素の遺伝子 (*nosZ*) を保有しない脱窒菌は N_2O が反応の最終産物になる。Graf *et al.* (2014) は, 個々の脱窒菌における *nosZ* と *nirK/nirS* の保有性を 18 門にわたる 652 の微生物ゲノムについて解析した。その結果, *nirK* を持つゲノム ($n = 458$) では, その 70% が *nosZ* を保有しないの

に対して, *nirS* を持つタイプ ($n = 110$) では *nosZ* を保有しないものの割合は低かった (20%)。したがって, 環境条件にも依存するが, *nirK* タイプに比べて, *nirS* タイプの方が N_2 まで完全に還元する脱窒系を持ち (“完全還元型”), N_2O を生成しにくいものが多いと考えられる。このことを支持する例としては, コムギ圃場 (ローザムステッド, ブロードボーク) では, 土壌の N_2O 生成活性と *nirK* コピー数とは正の相関があり, *nirS* とは相関がなかったという報告がある (Clark *et al.*, 2012)。なお, 一酸化窒素還元酵素遺伝子 (*nor*) についても, *nirK* タイプでは 35% が保有せず, *nirS* タイプではわずか 3.6% であった。

nosZ には 2 つのクレード (clade I, II) があり, clade II は土壌中に広く分布する (Sanford *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2013; Orellana *et al.*, 2014; Hallin *et al.*, 2018)。Graf *et al.* (2014) のデータでは, *nosZ* を保有するゲノム ($n = 300$) のなかで clade I を持つタイプは 62%, clade II のタイプは 38% であった。clade I タイプでは, 84% が *nor* と *nir* の遺伝子の両方を持つ完全還元型であるのに対して, clade II タイプでは完全還元型は 35% であった (表 3)。このような *nosZ* 保有菌の脱窒遺伝子構成から見ると, clade I タイプは完全還元型脱窒菌に, clade II タイプは “非脱窒性 N_2O 還元菌 (non-denitrifying N_2O reducers)” に分類される (Hallin *et al.*, 2018)。*nosZ* の clade I と clade II のタイプの細菌の増殖実験では, N_2O に対する親和定数 (whole-cell half-saturation constants, K_s) は clade II タイプの方が小さく (Yoon *et al.*, 2016), 環境中の N_2O 濃度が低い場合, clade I タイプよりも N_2O の利用性で優位になることが推察される。

細菌だけでなく糸状菌も脱窒反応を行う (“糸状菌脱窒”) (Shoun *et al.*, 1992; 鯨島, 2014; Maeda *et al.*, 2015)。これまで知られている限りでは, 脱窒性糸状菌は *nosZ* を欠き, 主要な代謝産物は N_2O である (Shoun *et al.*, 1992; Philippot *et al.*, 2011; Graf *et al.*, 2014)。土壌からの N_2O 生成での糸状菌の寄与率は 17% から 89% になると推定され (Laughlin and Stevens, 2002; McLain and Martens, 2006; Zhong *et al.*, 2018), 乾燥地土壌での N_2O 生成では糸状菌脱窒の役割が大きい (Marusenko *et al.*, 2013)。また, 畑地の糸状菌バイオマスと土壌の N_2O 生成活性との間には正の相関があり, カバークロップを施用し

た不耕起栽培の畑地では, 糸状菌バイオマスの増加による N_2O 生成活性の上昇が推察される (Zhaorigetu *et al.*, 2008)。

硝化菌脱窒は同一の微生物で起こる反応であるが, 土壌のような微生物生態系では微生物間で硝化と脱窒が共役する関係もある (Abbasi and Adams, 2000; Wrage *et al.*, 2001)。すなわち, 硝化菌が生産する NO_2^- や NO_3^- を近接する脱窒菌が直ちに利用する関係で, 硝化菌の酸素消費による微小部位の嫌気化で脱窒がより好適になる相互関係と見ることもできる。

4.3. アンモニア生成型異化的硝酸還元 (Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonia, DNRA または Respiratory ammonification)

DNRA は NO_3^- を電子受容体とした異化反応で, 脱窒とは異なって NH_4^+ が産物なので, 気体として土壌系外への窒素の放出は起こらない。反応経路 (かっこ内は酵素) は, NO_3^- —(Nar/Nap) $\rightarrow$ NO_2^- —(Nrf) $\rightarrow$ NH_4^+ である (Hu *et al.*, 2015)。有機物含量が高い湿潤地土壌で DNRA 活性が検出されている (Rütting *et al.*, 2011)。また, 根圏で DNRA による N_2O 生成の寄与が高くなるモデル (Baggs, 2011) がある一方で, 砂質土壌での寄与率は無視できるという報告もある (Kool *et al.*, 2011)。Sanford *et al.* (2012) は細菌及びアーキアのゲノム内での *nosZ* 遺伝子の分布を解析し ($n = 136$), clade I *nosZ* を保有するゲノム ($n = 77$) と対照的に, clade II *nosZ* を保有するゲノム ($n = 55$) の約 30% は *nirK/S* を欠き, DNRA の鍵酵素遺伝子 (*nrfA*) を保有することを報告している。しかし, DNRA 菌である *Photobacterium profundum* や *Shewanella loihica* は clade I *nosZ* を持っており (Yoon *et al.*, 2015), clade II *nosZ* + *nrfA* という遺伝子構成に合わない菌種もある。

4.4. アナモックス (anaerobic ammonium oxidation, anammox)

アナモックスは, 3 つのステップ (亜硝酸還元, ヒドラジン合成, ヒドラジン酸化) で構成される反応で, 最終産物は N_2 である。この反応に関わる酵素は, Nir ($NO_2^- \rightarrow NO$), ヒドラジン合成酵素 ($NO + NH_4^+ \rightarrow N_2H_4$), ヒドラジン脱水酵素 ($N_2H_4 \rightarrow N_2$) である (Kartal *et al.*, 2011)。最初の反応で生じる NO が, 共存する硝化菌, 脱窒菌, あるいは DNRA 細菌によって利用 (還元) され, N_2O が生じる。乾燥地の土壌クラストでは, 従属栄養性の脱窒に比べると, アナモックス菌の N_2O 生成は非常に低いと報告されている (Abed *et al.*, 2013)。土壌中でのアナモックス菌の分布については, Zhu *et al.* (2011) や Qin *et al.* (2020) を参照されたい。

4.5. 共脱窒 (co-denitrification)

共脱窒は, 1 分子の NO と共基質 ($R-NH_2$) 由来の N 原子が結合して hybrid- N_2O または hybrid- N_2 を生成する反応であり, 脱窒性糸状菌 *Fusarium oxysporum* で報告された (Tanimoto *et al.*, 1992; Su *et al.*, 2004; 鯨島, 2014)。共基質はアザイド, NH_2OH , アミン系有機態窒素などであり, 反応の詳細は Spott *et al.* (2011) を参照されたい。放牧地土壌では, 家畜尿負荷した場合, 発生する N_2 の 95% は共脱窒由来であることが, 発生する極少量の N_2O は通常の脱窒由来であることが

表 3 *nosZ* 遺伝子を保有するゲノムの脱窒遺伝子構成 *

タイプ	Clade I <i>nosZ</i> ($n = 187$) +			Clade II <i>nosZ</i> ($n = 113$) +		
	<i>nor</i>	<i>nir</i>	%	<i>nor</i>	<i>nir</i>	%
完全還元型	+	K	51	+	K	18
	+	S	32	+	S	17
	+	—	6	+	—	22
非脱窒 N_2O 還元型	—	K	1	—	K	12
	—	S	0	—	S	1
	—	—	10	—	—	30

* Graf *et al.* (2014) のデータ ($n = 300$) を基に作成した。+, 保有する; —, 保有しない; K, *nirK*; S, *nirS*。 *nor*, *nir*, *nosZ* のすべて保有するものを完全還元型, 一つでも欠くものを非脱窒 N_2O 還元型とした。

報告されている (Selbie *et al.*, 2015)。Rex *et al.* (2019) は、放牧地土壌を用いた室内実験で、ウシの尿排泄を模して予め尿素を加えた土壌に ^{15}N ラベルの共基質 (グリシン, フェニルアラニン, NH_2OH) を加え、細菌および糸状菌の阻害剤を用いて、 N_2O の生成を調べた。その結果では、両アミノ酸からの N_2O 生成は糸状菌阻害剤で 40% 低下するのに対して、細菌阻害剤では 14% の低下であり、糸状菌が共脱窒に関わる割合が高いことが示唆されている。なお、彼らの実験では、 NH_2OH を共基質とした場合、hybrid- N_2O 生成は両アミノ酸の場合よりも 2 オーダー高く、両阻害剤である程度抑えられるだけでなく、滅菌土壌でも発生した (生土壌での発生量の約 28% に相当)。これは、土壌中で生成される NH_2OH は非生物的な化学分解で N_2O に変換されることを示している。この化学反応については次項で概説する。

4.6. NH_2OH の化学分解

非生物的な N_2O 生成として、硝化反応の中間体である NH_2OH の化学分解と化学脱窒 (chemodenitrification) がある (Zhu-Barker *et al.*, 2015)。ここでは、前者の研究例として Heil *et al.* (2015) の結果を紹介する。彼らは、森林、草地および畑地からの土壌を用いて、室内実験で NH_2OH を添加した土壌からの N_2O 発生を調べている。まず、土壌の違いによって N_2O 発生は大きく異なり、森林土壌で低いのと対照的に、草地土壌では高く、 $\text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ への変換速度 (6 時間) は 44%、畑地土壌ではさらに高く、変換速度は 56% であった。また、非生物的な反応であることは、畑地土壌では、オートクレーブ処理しても N_2O 発生は 50% までしか低下せず、クロロホルム燻蒸によっても 20% 程度しか下がらなかったことから支持された。この NH_2OH の化学分解による N_2O 生成は土壌の pH と正の相関があり、低 pH ほど発生速度が低い。これは NH_2OH の pK_a は 5.95 であり、この pH 以下ではプロトン化 (NH_3OH^+) されて安定になる割合が高くなるためと考えられている。その他にも、 NH_2OH の化学分解は土壌の C/N 比と負の相関を示し、Mn 含量とは正の相関が見られている。

4.7. 化学脱窒 (chemodenitrification)

鉄酸化 ($\text{Fe(II)} \rightarrow \text{Fe(III)}$) と NO_2^- 還元 ($\rightarrow \text{N}_2\text{O}$) が共役する化学反応である (Kampschreur *et al.*, 2011; Zhu-Barker *et al.*, 2015)。デンマークの沿岸域海底堆積物を用いた室内実験では、 FeCl_2 と Na NO_2^- を添加した堆積物からの N_2O 生成の 15 ~ 25% は化学脱窒で、残りは微生物作用であると測定された (Otte *et al.*, 2019)。嫌気環境という点で海底堆積物と類似する水田土壌を用いたマイクロゾム実験 (Wang *et al.*, 2020) では、脱窒、DNRA と化学脱窒が並行して起こり、 Fe(II) 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、有機炭素の濃度に依存して、全体の N_2O 生成活性のなかでの化学脱窒の割合は 6.8% から 67.6% まで変化した。脱窒系だけでなく、鉄の酸化還元サイクルにも微生物が関わるので、化学脱窒と微生物による脱窒は相互に関係する。嫌気環境において鉄サイクルと共役する窒素代謝のモデルについては Wankel *et al.* (2017) や Otte *et al.* (2019)

を参照されたい。

5. 土壌の環境条件と N_2O 生成

土壌での N_2O 生成に影響する主な非生物因子として、土壌の酸素濃度、水分含量、pH、温度、 NO_2^- 濃度、有機炭素量、無機微量栄養素、窒素と炭素の利用性、凍結-融解、 H_2S 濃度がある (Hu *et al.*, 2015)。土壌中の酸素濃度と水分含量は負の相関があるので、両者は相互に関係する (フェンチェルら, 2015)。前節で述べたように、土壌中での N_2O 生成プロセスは複雑である。Hu *et al.* (2015) は、従属栄養性脱窒、アンモニア酸化、そして硝化菌脱窒に着目して、それらの反応と酸素濃度および pH との関係を模式化している (図 3)。図 3 に示すように、酸素濃度との関係では、酸素が制限されると、 N_2O 生成量は増加する。特徴的な N_2O 発生プロファイルは硝化菌脱窒で、微好気条件でピークを示す。Zhu *et al.* (2013) のデータでは、施肥した粘土質壤土の場合、0.5 ~ 3% O_2 の条件で、全体の N_2O 生成のなかでの各反応が占める割合は、硝化菌脱窒が 34 ~ 66%、従属栄養性脱窒が 34 ~ 50%、アンモニア酸化が 0 ~ 18% であった。酸素濃度が高い条件では、アンモニア酸化による N_2O 生成が主体となり、反応中間体の NH_2OH 由来の N_2O 生成が大きいと推察される。一方、酸素がない条件では、アンモニア酸化の基質としての酸素が得られず、 $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^-$ の反応が起こらないため、硝化菌脱窒も起こらないと言える。従属栄養性脱窒による N_2O 生成は、酸素濃度の上昇とともに低下する。これは、脱窒系酵素の酸素への感受性、特に *nosZ* の発現が酸素によって抑制されることで説明されている (Hu *et al.*, 2015)。酸素を含めた環境因子が脱窒系の遺伝子発現に及ぼすメカニズムについては、Gaimster *et al.* (2018) を参照されたい。

土壌 pH の影響については、低 pH ほど N_2O 生成は上昇する (図 3)。この説明としては、 NH_3 、 NO_2^- 、 NO の還元が $\text{pH} < 7$ の条件で高まり、また *nosZ* の発現が低 pH で抑制されて、 $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ の還元がダウンすることである (Richardson *et al.*, 2009; Bergaust *et al.*, 2010)。酸性土壌でのアンモニア酸化の主な担い手はアーキア (AOA) であることがわかってきた (Zhang *et al.*, 2012)。また、酸性土壌から分離された AOA では N_2O 生成活性が検出されているので (Jung *et al.*,

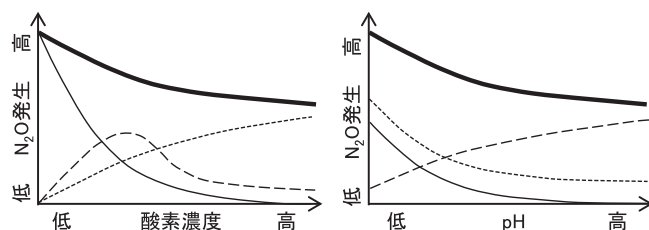


図 3 土壌からの N_2O 発生の酸素濃度と pH への依存性の模式図 (Hu *et al.* (2015) より一部改変)。全体の N_2O 発生 (—); 従属栄養性脱窒 (---); 硝化菌脱窒 (---); アンモニア酸化 (---)。Hu *et al.* (2015) は 23 の文献データをもとに作成している。引用元のデータの詳細については、Hu *et al.* (2015) を参照されたい。

2014), 酸性土壌でのアンモニア酸化に起因する N_2O 生成は AOA の寄与が大きいと考えられる。土壌 pH の低下にともなう硝化菌脱窒由来の N_2O 生成が下がるメカニズムはまだ十分にはわかっていない (Hu *et al.*, 2015)。しかし、一因として, Wragge *et al.* (2001) のギブス自由エネルギーの計算によれば, アンモニア酸化 ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^-$) と硝化脱窒 ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3 \rightarrow \text{N}_2\text{O}$) の値は, pH 7 $\rightarrow$ pH 4 の変化で低下する。したがって, これが, 低 pH 条件での硝化菌脱窒への負の影響になる熱力学的な理由と考えられる。なお, pH 7 $\rightarrow$ pH 4 の変化で亜硝酸酸化 ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$) のギブス自由エネルギーに変化はなく, 脱窒 ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2\text{O}$) の方は上昇する。

図 2 を概観すれば, $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ の反応に関わる微生物の種類が最も多い。環境中の NO_2^- 濃度と反応に関わる微生物との関係について, Wragge-Mönnig *et al.* (2018) は図 4 のようなモデルを提示している。そのモデルでは, 反応に関わる微生物グループが窒素基質 (有機態, $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, NO_3^-) と NO_2^- 濃度の違いで分かれる。例えば, NO_2^- 濃度の上昇とともに, 独立栄養性硝化菌 $\rightarrow$ アンモニア酸化アーキア (AOA) $\rightarrow$ 硝化菌脱窒/アナモックス菌の順に担い手が代わる。なお, AOA は低 NH_4^+ 濃度条件 (Hink *et al.*, 2017) や酸性条件 (Zhang *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2014) で優勢となるが, NO_2^- も利用する (図 2)。有機態窒素の場合は, 従属栄養性硝化と共脱窒は NO_2^- 濃度の違いでニッチェが分かれる。なお, 従属栄養性脱窒は低 C/N 比条件 (電子供与体制限の増殖条件) で, DNRA は高 C/N 比条件 (電子受容体制限の増殖条件) で起こり, DNRA は pH > 7 で好適になる (Yoon *et al.*, 2015)。

次に, N_2O 生成経路の特定に関して, ^{15}N トレーサーを用いた実験の結果を紹介する。Müller *et al.* (2014) は草地土壌を用いた 12 日間の室内実験で, 発生する N_2O の経路を硝化菌脱窒 ($\text{N}_2\text{O}_{\text{nit}}$), 従属栄養性脱窒 ($\text{N}_2\text{O}_{\text{den}}$), 有機態窒素の酸化と共役した NO_2^- 還元 ($\text{N}_2\text{O}_{\text{org}}$), 共脱窒 ($\text{N}_2\text{O}_{\text{cod}}$) に分けたモデルで各経路の寄与率を推定した。

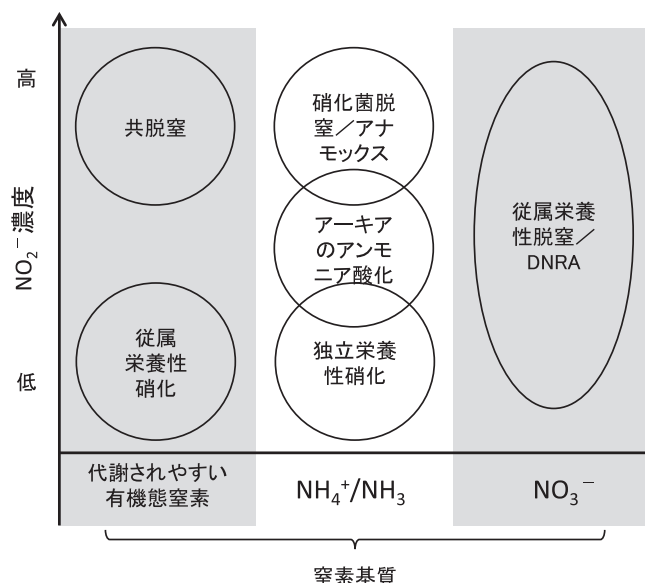


図 4 窒素基質の違いと NO_2^- 濃度で分類した N_2O 生成代謝 (Wragge-Mönnig *et al.* (2018) より)。説明は本文を参照。

その結果, 12 日間の平均値で寄与率の高い順から見ると, $\text{N}_2\text{O}_{\text{org}}$ (54%) > $\text{N}_2\text{O}_{\text{den}}$ (20%) > $\text{N}_2\text{O}_{\text{cod}}$ (18%) > $\text{N}_2\text{O}_{\text{nit}}$ (9%) となった。供試土壌の性状は, 有機炭素 6.6%, pH 6.2, 土壌の保温実験は, 水分含量 0.51 g g^{-1} , 20°C の暗条件である。この条件では従属栄養性のプロセス ($\text{N}_2\text{O}_{\text{org}}$, $\text{N}_2\text{O}_{\text{cod}}$) の役割が大きいと推察されるが, 水分条件 (酸素利用性) 等によっても変化すると考えられる。

6. 土壌からの N_2O 発生のコントロールに向けて

図 2 に示した窒素代謝経路のなかで, N_2O を消費する経路 ($\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$) は一つだけである。したがって, 土壌を N_2O の吸収源にするためには, この NO 還元反応を高める技術の開発が期待される (Chapuis-Lardy *et al.*, 2007)。実際に, 土壌の N_2O 吸収能は, 主に clade II *nosZ* を持つグループの存在量に依存することが報告されている (Jones *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2020)。また, 畑地の栽培管理と土壌の *nosZ* の量とコミュニティの関係を調べた研究 (Domeignoz-Horta *et al.*, 2015) では, clade I よりも clade II *nosZ* コミュニティーの方が環境変化に敏感であると報告されており, clade II *nosZ* グループの生態特性を明らかにすることで, 土壌の N_2O 吸収能を強化する技術の開発が期待される。直接的な技術として, clade II *nosZ* グループを土壌に接種する方法がある。Domeignoz-Horta *et al.* (2016) は, アイルランド, スウェーデン, イングランドの農業試験地から採取した土壌 (11 種) を用いたマイクロコズム実験で, clade II *nosZ* を持つ *Dyadobacter fermentans* NS114^T (Flavobacteriales 目, Cytophagaceae 科) を土壌に接種した場合の N_2O 発生を調べている。接種量は $10^6 \text{ cells g}^{-1}$ 乾土と $10^8 \text{ cells g}^{-1}$ 乾土であり, KNO_3 を添加し, WHC (water holding capacity) を 80% に保持して測定した。その結果, 供試土壌の 1/3 以上で N_2O 発生の抑制が起こり, 最大で 189% 減少した。土壌による効果の違いは, さらに探究することが必要であろう。

今後の気候変動に対する土壌の応答を把握する指標として, clade II *nosZ* の量とコミュニティ組成が考えられる。Xu *et al.* (2020) は, 温室実験で, 気温 $+3 \sim 5^\circ\text{C}$ の昇温と乾燥 (降雨の遮断) の条件を組み合わせ, 239 日間維持し (模擬気候変動下), その後に温室から室外にもどして 96 日間 (模擬ポスト気候変動下) 維持した実験を行っている。供試土壌には堆肥と尿素を添加した区 (施肥区) も設けた。その結果では, 模擬気候変動下では, *in situ* N_2O 発生は施肥区土壌では減少したが, 非施肥区土壌では上昇した。特徴的なことは, 施肥区でも非施肥区においても, 模擬気候変動下で clade II *nosZ* の量が増加した点である。*in situ* N_2O 発生と微生物コミュニティの関係を解析すると, 尿素区では, AOB と *nirK* 脱窒菌による N_2O 生成と clade II *nosZ* 菌による N_2O 消費のバランスが考えられた。一方, 堆肥区では, AOA と *nirS* 脱窒菌と clade II *nosZ* 菌とのバランスであり, 非施肥区では, N_2O 生成の主体は AOA と *nirK* を持つ脱窒性糸状菌に特定された。*nosZ* を含めた脱窒遺伝子の構成と微生物の系統群と生態との関係については, Graf *et al.* (2014) や Hallin

et al. (2018) を参照されたい。

7. 終わりに

気候変動の緩和に向けて、土壌での GHGs の発生メカニズムの解明を踏まえた技術開発が期待されている。土壌の炭素隔離能の向上では、土壌有機物の生成メカニズムに新たな知見（鉱物会合態有機物）が加わり、並行して展開している不耕起栽培の科学的根拠が明確になってきた。さらに、畑地ではカバークロップと不耕起栽培の併用によりさらに土壌炭素を維持する農法が展開している（例えば、Yagioka et al., 2015; Hashimi et al., 2020）。一方、 N_2O 生成に関しては、微生物学的な知見が急速に得られてきたが、その全貌はまだ見えていない。そして、clade II *nosZ* 菌に着目した技術開発も始まったばかりである。本学会が、土壌中での窒素代謝をさらに解明し、気候変動の緩和に貢献する中心の一つになることが期待される。

要 旨

9 カ国 33 名の微生物学者によって合意声明の論文「人類への注意喚起：微生物と気候変動」が発表された（2019 年 6 月）。本総説は、その合意声明を受けて、土壌からの温室効果ガス発生概要、土壌有機物の存在状態と微生物との関わり、土壌中での一酸化二窒素（ N_2O ）の生成と消費のプロセス、土壌の環境条件と N_2O 生成の関係、そして土壌からの N_2O 発生の制御に向けて、最近の知見を整理した。土壌炭素の隔離は、微生物の有機物分解に対する物理的保護（土壌団粒内）と化学的保護（土壌鉱物との会合）からなり、鉱物会合態の有機物は微生物菌体起源であることがわかってきた。 N_2O 生成は、その主体を硝化菌と脱窒菌に二分する見方から、硝化菌脱窒や糸状菌脱窒に代表される微生物の多様な代謝や化学脱窒等の化学反応を総合的に捉える方向にシフトしている。特に、遺伝子解析の進展は著しく、 N_2O 還元酵素遺伝子（*nosZ*）には 2 つの clade (I, II) があり、土壌中の clade II *nosZ* の存在量と N_2O 吸収能には正の相関があることがわかってきた。今後は、clade II *nosZ* 菌に着目した N_2O 発生緩和の技術開発が期待される。

引用文献

- Abbasi MK, Adams WA (2000) Gaseous N emission during simultaneous nitrification and denitrification associated with mineral N fertilization to a grassland soil under field conditions. *Soil Biol. Biochem.*, **32**, 1251–1259
- Abed RMM, Lam P, de Beer D, Stief P (2013) High rates of denitrification and nitrous oxide emission in arid biological soil crusts from the Sultanate of Oman. *ISME J.*, **7**, 1862–1875
- Arrhenius S (1896) On the influence of carbonic acid in the air upon the temperature of the ground. *Lond. Edinb. Dubl. Phil. Mag.*, **41**, 237–276
- Baggs EM (2011) Soil microbial sources of nitrous oxide: recent advances in knowledge, emerging challenges and future direction. *Curr. Opin. Environ. Sustain.*, **3**, 321–327
- Bergaust L, Mao Y, Bakken LR, Frostegård A (2010) Denitrification response patterns during the transition to anoxic respiration and posttranscriptional effects of suboptimal pH on nitrous oxide reductase in *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 6387–6396
- Butterbach-Bahl K, Baggs EM, Dannenmann M, Kiese R, Zechmeister-Boltenstern S (2013) Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.*, **368**, 20130122
- Cavicchioli R, Ripple WJ, Timmis KN, Azam F, Bakken LR, Baylis M, et al. (2019) Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**, 569–586
- Chapuis-Lardy L, Wrage N, Metay A, Chotte JL, Bernoux M (2007) Soils, a sink for N_2O ? A review. *Glob. Change Biol.*, **13**, 1–17
- Clark IM, Buchkina N, Jhurrea D, Goulding KWT, Hirsch PR (2012) Impacts of nitrogen application rates on the activity and diversity of denitrifying bacteria in the Broadbalk Wheat Experiment. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.*, **367**, 1235–1244
- Conn HJ (1914) Culture media for use in the plate method of counting soil bacteria. *N. Y. Agr. Exp. Sta. Tech. Bul.*, **38**
- Conn HJ (1948) The most abundant groups of bacteria in soil. *Bacteriol. Rev.*, **12**, 257–273
- Davidson EA, Janssens IA (2006) Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature*, **440**, 165–173
- Domeignoz-Horta LA, Putz M, Spor A, Bru D, Breuil MC, Hallin S, Philippot L (2016) Non-denitrifying nitrous oxide-reducing bacteria—An effective N_2O sink in soil. *Soil Biol. Biochem.*, **103**, 376–379
- Domeignoz-Horta LA, Spor A, Bru D, Breuil M-C, Bizouard F, Léonard J, Philippot L (2015) The diversity of the N_2O reducers matters for the $N_2O:N_2$ denitrification end-product ratio across an annual and a perennial cropping system. *Front. Microbiol.*, **6**, Article 971
- フェンチェル T・キング GM・ブラックバーン TH (2015) 微生物の地球化学—元素循環をめぐる微生物学, 第 3 版, 太田寛行・難波謙二・諏訪裕一・片山葉子 訳, 248 p, 東海大学出版部, 平塚
- 藤嶽暢英 (2020) 土壌の炭素循環と気候変動, 土と微生物, **74**, 54–59
- Gaimster H, Alston M, Richardson DJ, Gates AJ, Rowley G (2018) Transcriptional and environmental control of bacterial denitrification and N_2O emissions. *FEMS Microbiol. Lett.*, **365**, fnx277
- Golchin A, Oades JM, Skjemstad JO, Clarke P (1994) Soil structure and carbon cycling. *Aust. J. Soil Res.*, **32**, 1043–1068
- Graf DRH, Jones CM, Hallin S (2014) Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N_2O emissions. *PLoS One*, **9**, e114118
- Hallin S, Philippot L, Löffler FE, Sanford RA, Jones CM (2018) Genomics and ecology of novel N_2O -reducing microorganisms. *Trends Microbiol.*, **26**, 43–55
- Hashimi R, Kaneda S, Kaneko N, Ohta H, Komatsuzaki M (2020) Aggregate distribution and substrate-induced respiration under different tillage and mulching management systems

- in organic farming. *Soil Sci. Plant Nutr.*, doi.org/10.1080/00380768.2020.1824534
- 22) Hayatsu M, Tago K, Saito M (2008) Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **54**, 33–45
 - 23) Heil J, Liu S, Vereecken H, Brüggemann N (2015) Abiotic nitrous oxide production from hydroxylamine in soils and their dependence on soil properties. *Soil Biol. Biochem.*, **84**, 107–115
 - 24) Hink L, Nicol GW, Prosser JI (2017) Archaea produce lower yields of N₂O than bacteria during aerobic ammonia oxidation in soil. *Environ. Microbiol.*, **19**, 4829–4837
 - 25) Hooper AB (1968) A nitrite-reducing enzyme from *Nitrosomonas europaea*, Preliminary characterization with hydroxylamine as electron donor. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.*, **162**, 49–65
 - 26) Hu H-W, Chen D, He J-Z (2015) Microbial regulation of terrestrial nitrous oxide formation: Understanding the biological pathways for prediction of emission rates. *FEMS Microbiol. Rev.*, **39**, 729–749
 - 27) Jones CM, Graf DRH, Bru D, Philippot L, Hallin S (2013) The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. *ISME J.*, **7**, 417–426
 - 28) Jones CM, Spor A, Brennan FP, Breuil M-C, Bru D, Lemanceau P, Griffiths B, Hallin S, Philippot L (2014) Recently identified microbial guild mediates soil N₂O sink capacity. *Nat. Clim. Change*, **4**, 801–805
 - 29) Jung MY, Well R, Min D, Giesemann A, Park S-J, Kim J-G, Kim S-J, Rhee S-K (2014) Isotopic signatures of N₂O produced by ammonia-oxidizing archaea from soils. *ISME J.*, **8**, 1115–1125
 - 30) Kampschreur MJ, Kleerebezem R, de Vet WWJM, van Loosdrecht MCM (2011) Reduced iron induced nitric oxide and nitrous oxide emission. *Water Res.*, **45**, 5945–5952
 - 31) Kartal B, Maalcke WJ, de Almeida NM, Cirpus I, Gloerich J, Geerts W, *et al.* (2011) Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature*, **479**, 127–130
 - 32) Kester RA, De Boer W, Laanbroek HJ (1997) Production of NO and N₂O by pure cultures of nitrifying and denitrifying bacteria during changes in aeration. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3872–3877
 - 33) Kögel-Knabner I, Guggenberger G, Kleber M, Kandeler E, Kalbitz K, Scheu S, Eusterhues K, Leinweber P (2008) Organomineral associations in temperate soils: Integrating biology, mineralogy, and organic matter chemistry. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, **171**, 61–82
 - 34) Kool DM, Dolfing J, Wrage N, van Groenigen JW (2011) Nitrifier denitrification as a distinct and significant source of nitrous oxide from soil. *Soil Biol. Biochem.*, **43**, 174–178
 - 35) Kulinska D, Drozdowicz A (1983) Heterotrophic nitrification by fungi isolated from cerrado soils in Brazil. *Zentralbl. Mikrobiol.*, **138**, 187–193
 - 36) Lang E, Jagnow G (1986) Fungi of a forest soil nitrifying at low pH values. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **28**, 257–265
 - 37) Laughlin RJ, Stevens RJ (2002) Evidence for fungal dominance of denitrification and codenitrification in a grassland soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **66**, 1540–1548
 - 38) Lünsdorf H, Erb RW, Abraham W-R, Timmis KN (2000) ‘Clay hutch’: a novel interaction between bacteria and clay minerals. *Environ. Microbiol.*, **2**, 161–168
 - 39) Maeda K, Spor A, Edel-Hermann V, Heraud C, Breuil M-C, Bizouard F, *et al.* (2015) N₂O production, a widespread trait in fungi. *Sci. Rep.*, **5**, 9697
 - 40) Marusenko Y, Huber DP, Hall SJ (2013) Fungi mediate nitrous oxide production but not ammonia oxidation in aridland soils of the southwestern US. *Soil Biol. Biochem.*, **63**, 24–36
 - 41) McLain JET, Martens DA (2006). N₂O production by heterotrophic N transformations in a semiarid soil. *Appl. Soil Ecol.*, **32**, 253–263
 - 42) Müller C, Laughlin RJ, Spott O, Rütting T (2014) Quantification of N₂O emission pathways via a ¹⁵N tracing model. *Soil Biol. Biochem.*, **72**, 44–54
 - 43) Odu CTI, Adeoye KB (1970) Heterotrophic nitrification in soils—a preliminary investigation. *Soil Biol. Biochem.*, **2**, 41–45
 - 44) Oertel G, Matschullat J, Zurba K, Zimmermann F, Erasmí S (2016) Greenhouse gas emissions from soils—A review. *Chem. Erde-Geochem.*, **76**, 327–352
 - 45) 太田寛行 (2003) 土を住家とする細菌の探究—H. J. Conn によるアルスロバクターの生態研究とその展開を考える—, In 新・土の微生物 (10): 研究の歩みと展望, 日本土壤微生物学会編, pp. 36–56, 博友社, 東京
 - 46) Orellana LH, Rodriguez-R LM, Higgins S, Chee-Sanford JC, Sanford RA, Ritalahti KM, Löffler FE, Konstantinidis KT (2014) Detecting nitrous oxide reductase (*nosZ*) genes in soil metagenomes: method development and implications for the nitrogen cycle. *mBio*, **5**, e01193-14
 - 47) Otte JM, Blackwell N, Ruser R, Kappler A, Kleindienst S, Schmidt C (2019) N₂O formation by nitrite-induced (chemo) denitrification in coastal marine sediment. *Sci. Rep.*, **9**, 10691
 - 48) Philippot L, Andert J, Jones CM, Bru D, Hallin S (2011) Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for N₂O emissions from soil. *Glob. Change Biol.*, **17**, 1497–1504
 - 49) Plaza C, Courtier-Murias D, Fernández JM, Polo A, Simpson AJ (2013) Physical, chemical, and biochemical mechanisms of soil organic matter stabilization under conservation tillage systems: A central role for microbes and microbial by-products in C sequestration. *Soil Biol. Biochem.*, **57**, 124–134
 - 50) Qin H, Huan Deng H, Cheng Han C, Wenhui Zhong W (2020) Anammox bacterial abundance and biodiversity in greenhouse vegetable soil are influenced by high nitrate content. *Pedosphere*, **30**, 343–351
 - 51) Rex D, Clough TJ, Richards KG, Condon LM, de Klein CAM, Morales SE, Lanigan GJ (2019) Impact of nitrogen compounds on fungal and bacterial contributions to codenitrification in a pasture soil. *Sci. Rep.*, **9**, 13371
 - 52) Richardson D, Felgate H, Watmough N, Thomson A, Baggs E (2009) Mitigating release of the potent greenhouse gas N₂O from the nitrogen cycle—could enzymic regulation hold the key? *Trends Biotechnol.*, **27**, 388–397
 - 53) Robertson AD, Paustian K, Ogle S, Wallenstein MD, Lugato E, Cotrufo MF (2019) Unifying soil organic matter formation and persistence frameworks: the MEMS model. *Biogeosciences*, **16**, 1225–1248
 - 54) Robertson GP, Paul EA, Harwood RR (2000) Greenhouse gases in intensive agriculture: contributions of individual gases to the radiative forcing of the atmosphere. *Science*, **289**, 1922–1925
 - 55) Rütting T, Boeckx P, Müller C, Klemmedtsen L (2011) Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle. *Biogeosciences*, **8**, 1779–1791
 - 56) 鮫島 (齋藤) 玲子 (2014) 最近の脱窒糸状菌研究の動向

- と今後の展望, 土と微生物, **68**, 15–20
- 57) Sanford RA, Wagner DD, Wu Q, Chee-Sanford JC, Thomas SH, Cruz-García, *et al.* (2012) Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 19709–19714
 - 58) Schmidt MWI, Torn, MS, Abiven S, Dittmar T, Guggenberger G, Janssens IA, *et al.* (2011) Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature*, **478**, 49–56
 - 59) Selbie DR, Lanigan GJ, Laughlin RJ, Di HJ, Moir JL, Cameron KC, *et al.* (2015) Confirmation of co-denitrification in grazed grassland. *Sci. Rep.*, **5**, 17361
 - 60) Shoun H, Kim D-H, Uchiyama H, Sugiyama J (1992) Denitrification by fungi. *FEMS Microbiol. Lett.*, **94**, 277–282
 - 61) Six J, Elliott ET, Paustian K (2000) Soil macroaggregate turnover and microaggregate formation: a mechanism for C sequestration under no-tillage agriculture. *Soil Biol. Biochem.*, **32**, 2009–2013
 - 62) Six J, Conant RT, Paul EA, Paustian K (2002) Stabilization mechanisms of soil organic matter: Implications for C-saturation of soils. *Plant Soil*, **241**, 155–176
 - 63) Six J, Bossuyt H, Degryze S, Denef K (2004a) A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil Tillage Res.*, **79**, 7–31
 - 64) Six J, Ogle SM, Breidt FJ, Conant RT, Moster AR, Paustian K (2004b) The potential to mitigate global warming with no-tillage management is only realized when practised in the long term. *Glob. Change Biol.*, **10**, 155–160
 - 65) Spott O, Russow R, Stange CF (2011) Formation of hybrid N₂O and hybrid N₂ due to codenitrification: First review of a barely considered process of microbially mediated N-nitrosation. *Soil Biol Biochem.*, **43**, 1995–2011
 - 66) Stieglmeier M, Mooshammer M, Kitzler B, Wanek W, Zechmeister-Boltenstern S, Richter A, Schleper C (2014) Aerobic nitrous oxide production through N-nitrosating hybrid formation in ammonia-oxidizing archaea. *ISME J.*, **8**, 1135–1146
 - 67) Stroo HF, Klein TM, Alexander M (1986) Heterotrophic nitrification in an acid forest soil and by an acid-tolerant fungus. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 1107–1111
 - 68) Su F, Takaya N, Sheun H (2004) Nitrous oxide-forming code-nitrification catalyzed by cytochrome P450nor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 473–447
 - 69) Tanimoto T, Hatano K, Kim DH, Uchiyama H, Shoun H (1992) Co-denitrification by the denitrifying system of the fungus *Fusarium oxysporum*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **93**, 177–180
 - 70) Third Assessment Report: Climate Change 2001 (2001) (日本語訳: 第1作業部会報告: 科学的根拠 (The Scientific Basis) (政策決定者向け要約), <https://archive.ipcc.ch/pdf/reports-nonUN-translations/japanese/tar-wg1-spm.PDF>)
 - 71) Tisdall JM, Oades JM (1982) Organic-matter and water-stable aggregates in soils. *J. Soil Sci.*, **33**, 141–163
 - 72) 和穎朗太 (2016) 陸域最大の炭素・窒素プールを制御する土壌微生物と土壌団粒構造, 土と微生物, **70**, 3–9
 - 73) Wang M, Hu R, Ruser R, Schmidt C, Kappler A (2020) Role of chemodenitrification for N₂O emissions from nitrate reduction in rice paddy soils. *ACS Earth Space Chem.*, **4**, 122–132
 - 74) Wankel SD, Ziebis W, Buchwald C, Charoenpong C, de Beer D, Dentinger J, Xu Z, Zengler K (2017) Evidence for fungal and chemodenitrification based N₂O flux from nitrogen impacted coastal sediments. *Nat. Commun.*, **8**, 15595
 - 75) ワート SR (2005) 温暖化の〈発見〉とは何か, 増田耕一・熊井ひろ美 共訳, 262 p, みすず書房, 東京 (原書: Weart SR (2003) The discovery of global warming, 240 p, Harvard University Press, Cambridge)
 - 76) Wrage N, Velthof GL, van Beusichem ML, Oenema O (2001) Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biol. Biochem.*, **33**, 1723–1732
 - 77) Wrage-Mönnig N, Horn MA, Well R, Müller C, Velthof G, Oenema O (2018) The role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide revisited. *Soil Biol. Biochem.*, **123**, A3–A16
 - 78) Wu L, Chen X, Wei W, Liu Y, Wang D, Ni B-J (2020) A critical review on nitrous oxide production by ammonia-oxidizing archaea. *Environ. Sci. Technol.*, **54**, 9175–9190
 - 79) Xu X, Liu Y, Singh, Yang Q, Zhang Q, Wang H, *et al.* (2020) NosZ clade II rather than clade I determine *in situ* N₂O emissions with different fertilizer types under simulated climate change and its legacy. *Soil Biol. Biochem.*, **150**, 107974
 - 80) Yagioka, A, Komatsuzaki M, Kaneko N, Ueno H (2015) Effect of no-tillage with weed cover mulching versus conventional tillage on global warming potential and nitrate leaching. *Agric. Ecosyst. Environ.*, **200**, 42–53
 - 81) Yoon S, Cruz-García C, Sanford R, Ritalahti KM, Frank E Löffler FE (2015) Denitrification versus respiratory ammonification: environmental controls of two competing dissimilatory NO₃⁻/NO₂⁻ reduction pathways in *Shewanella loihica* strain PV-4. *ISME J.*, **9**, 1093–1104
 - 82) Yoon S, Nissen S, Park D, Sanford RA, Löffler FE (2016) Nitrous oxide reduction kinetics distinguish bacteria harboring Clade I NosZ from those harboring Clade II NosZ. *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 3793–3800
 - 83) Zhang L-M, Hu H-W, Shen J-P, He J-Z (2012) Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils. *ISME J.*, **6**, 1032–1045
 - 84) Zhaorigetu, Komatsuzaki M, Sato Y, Ohta H (2008) Relationships between fungal biomass and nitrous oxide emission in upland rice soils under no tillage and cover cropping systems. *Microbes Environ.*, **23**, 201–208
 - 85) Zhong L, Wang S, Xu X, Wang Y, Rui Y, Zhou X, *et al.* (2018) Fungi regulate the response of the N₂O production process to warming and grazing in a Tibetan grassland. *Biogeosciences*, **15**, 4447–4457
 - 86) Zhu G, Wang S, Wang Y, Wang C, Risgaard-Petersen N, Jetten MSM, Yin C (2011) Anaerobic ammonia oxidation in a fertilized paddy soil. *ISME J.*, **5**, 1905–1912
 - 87) Zhu T, Meng T, Zhang J, Zhong W, Müller C, Cai Z (2015) Fungi-dominant heterotrophic nitrification in a subtropical forest soil of China. *J. Soils Sediments*, **15**, 705–709
 - 88) Zhu X, Burgerb M, Doaneb TA, Horwath WR (2013) Ammonia oxidation pathways and nitrifier denitrification are significant sources of N₂O and NO under low oxygen availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **110**, 6328–6333
 - 89) Zhu-Barker X, Cavazos AR, Ostrom NE, Horwath WR, Glass JB (2015) The importance of abiotic reactions for nitrous oxide production. *Biogeochemistry*, **126**, 251–267
 - 90) Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 533–616