

# 博士論文

## 水田土壌の窒素循環を担う微生物群集の オミクス法を用いた網羅的解析

東京大学大学院  
農学生命科学研究科  
応用生命化学専攻  
博士課程  
平成 26 年度進学  
平成 28 年度修了

増田 曜子

# 目次

## 第 1 章 序論

1.1	水田土壌と微生物	1
1.2	本研究で解析対象とする窒素循環反応	3
1.3	先行研究について(PCRからメタゲノムまで)	7
1.4	本研究の目的	8
1.5	本研究の内容	9

参考文献

Figures

## 第 2 章 新潟水田土壌における窒素循環反応に関わる

### 微生物群集の概観

2.1	緒言	19
2.2	実験手法	
2.2.1	圃場	20
2.2.2	土壌サンプリング	20
2.2.3	土壌の層別分取	21
2.2.4	土壌理化学性・生物活性の測定	
2.2.4.1	含水率	21
2.2.4.2	酸化還元電位 (Eh)	21
2.2.4.3	アンモニア態窒素・2 価鉄	21
2.2.4.4	脱窒活性	22
2.2.4.5	硝化活性	22
2.2.5	土壌 RNA の抽出と精製	22
2.2.6	シーケンシングライブラリ調製	23



2.2.7	シーケンシング	23
2.2.8	インフォマティクス解析	23
2.3	結果と考察	
2.3.1	土壌の層別プロファイル	
2.3.1.1	圃場管理とサンプリング	24
2.3.1.2	土壌理化学性・生物活性の変動	
2.3.1.2.1	酸化還元電位 (Eh)	24
2.3.1.2.2	アンモニア態窒素・2価鉄濃度	25
2.3.1.2.3	脱窒活性・硝化活性	26
2.3.1.3	土壌の層別プロファイルのまとめ	27
2.3.2	rRNA 配列情報に基づく微生物群集構造の層別・時期別変動	
2.3.2.1	シーケンシング結果	27
2.3.2.2	細菌群集構造	27
2.3.2.3	古細菌群集構造	29
2.3.3	新潟水田土壌における窒素循環駆動微生物の概観	
2.3.3.1	アンモニア酸化関連遺伝子 ( <i>amo</i> )	31
2.3.3.2	脱窒関連遺伝子	
2.3.3.2.1	硝酸還元 ( <i>narG/napA</i> )	32
2.3.3.2.2	亜硝酸還元 ( <i>nir</i> )	33
2.3.3.2.3	一酸化窒素還元 ( <i>nor</i> )	34
2.3.3.2.4	一酸化二窒素還元 ( <i>nos</i> )	34
2.3.3.2.5	脱窒反応のまとめと考察	35
2.3.3.3	DNRA 関連遺伝子 ( <i>nrf</i> )	36
2.3.3.4	窒素固定関連遺伝子 ( <i>nif</i> )	37
2.4	本章のまとめ	38

参考文献

Figures

### 第3章 湛水期・落水期の層別

#### 水田土壌メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析

3.1 緒言	74
3.2 実験手法	
3.2.1 土壌サンプリング	75
3.2.2 土壌分取	75
3.2.3 核酸の抽出と精製	75
3.2.4 定量 PCR	76
3.2.5 シーケンシングライブラリ調製	76
3.2.6 シーケンシング	77
3.2.7 インフォマティクス解析	77
3.3 結果と考察	
3.3.1 細菌の定量と群集構造	
3.3.1.1 細菌の 16S rRNA・rDNA の定量	78
3.3.1.2 rRNA・rDNA 配列情報に基づく 微生物群集の層別・時期別変動	
3.3.1.2.1 シーケンシング結果	78
3.3.1.2.2 細菌群集構造	79
3.3.1.2.3 古細菌群集構造	81
3.3.1.3 細菌の定量と群集構造のまとめ	82
3.3.2 窒素循環関連遺伝子の層別・時期別変動	
3.3.2.1 アンモニア酸化関連遺伝子 ( <i>amo</i> )	84
3.3.2.2 脱窒関連遺伝子	
3.3.2.2.1 硝酸還元 ( <i>nar/napA</i> )	87
3.3.2.2.2 亜硝酸還元 ( <i>nir</i> )	89
3.3.2.2.3 一酸化窒素還元 ( <i>nor</i> )	90
3.3.2.2.4 一酸化二窒素還元 ( <i>nos</i> )	92

3.3.2.2.5 脱窒反応のまとめ	94
3.3.2.3 DNRA 関連遺伝子 ( <i>nrf</i> )	95
3.3.2.4 窒素固定関連遺伝子 ( <i>nif</i> )	97
3.4 本章のまとめ	99
参考文献	
Figures	

## 第4章 全国の水田土壌、畑・雑草地・森林土壌、底泥の メタゲノム解析

4.1 緒言	139
4.2 実験手法	
4.2.1 土壌サンプリング	140
4.2.2 土壌 DNA の抽出	140
4.2.3 定量 PCR	140
4.2.4 シーケンシングライブラリ調製	141
4.2.5 シーケンシング	141
4.2.6 インフォマティクス解析	141
4.3 結果と考察	
4.3.1 細菌群集構造	
4.3.1.1 細菌の 16S rDNA の定量と <i>Anaeromyxobacter</i> , <i>Geobacter</i> 属細菌の分布	142
4.3.1.2 rDNA 配列情報に基づく細菌群集構造	143
4.3.2 様々な環境の土壌において還元的窒素循環を駆動する微生物	
4.3.2.1 脱窒関連遺伝子	144
4.3.2.1.1 硝酸還元 ( <i>narG/napA</i> )	144
4.3.2.1.2 亜硝酸還元 ( <i>nir</i> )	145
4.3.2.1.3 一酸化窒素還元 ( <i>nor</i> )	145

4.3.2.1.4 一酸化二窒素還元 ( <i>nos</i> )	146
4.3.2.1.5 脱窒反応のまとめと考察	147
4.3.2.2 DNRA 関連遺伝子 ( <i>nrf</i> )	148
4.3.2.3 窒素固定関連遺伝子 ( <i>nif</i> )	148
4.4 本章のまとめ	149

参考文献

Figures

## 第5章 総合考察

5.1 本研究の概要	164
5.2 水田土壌では <i>Deltaproteobacteria</i> 網細菌が優占する	168
5.3 水田土壌における <i>Deltaproteobacteria</i> 網細菌による還元的窒素循環反応	168
5.4 <i>Anaeromyxobacter</i> , <i>Geobacter</i> 属細菌は 窒素循環反応の活性を有するのか	169
5.5 <i>Anaeromyxobacter</i> , <i>Geobacter</i> 属細菌による還元的窒素変換経路	170
5.6 なぜ <i>Deltaproteobacteria</i> 網細菌由来の還元的窒素循環関連遺伝子は 今まで検出されてこなかったのか	173
5.7 今後の展望	175

参考文献

Figures

本論文の要旨	192
謝辞	196

# 第 1 章

## 序論

### 1.1 水田土壌と微生物

水田において栽培される水稻は、畑において栽培されるトウモロコシ・ムギとともに世界の三大穀物に数えられており、人類にとってなくてはならない農作物の一つである。水田は中国、インド、インドネシア、バングラディシュ、ベトナム、タイなどアジア諸国に広がっており、他の地域と比較して収穫面積が多いことが知られている (FAO, 2013)。水田は、日本だけでなくアジア地域において主要な農地利用形態の一つである。水田では窒素肥沃度が自律的に維持されており、無窒素施肥や低窒素施肥でも高い水稻収量が得られる (久馬, 1994)。これは畑にはない特徴である。

水田が畑と最も大きく異なる点は、一年のうち少なくとも三ヶ月以上もの間、その土壌に水が湛えられるということである。湛水下の水田土壌は地表からの深さによって酸素濃度が大きく異なるため、複雑な土壌環境が形成される。一般的な日本の水田においては、非耕作期間に排水されて土壌が空気にさらされ、好気的な環境が耕土層全体に広がる。一方、耕作期間には圃場に水が引き入れられ、大気から土壌への酸素の供給が緩やかになる。すると、日数の経過とともに、耕土層の表層では酸化層と還元層の分化が起こる。酸化層は田面水と接している土壌表面から数ミリ厚の層であり、浸透水が溶存酸素を供給する好気的環境が維持される (Noll *et al.*, 2005; Kimura, 2000)。したがって、酸化層は酸素呼吸・硝化・メタン酸化などの酸化反応が進行する場であると考えられている。一方、還元層では土壌への酸素の供給速度よりも土壌中での消費速度が上回る

ため、次第に酸素濃度が低下して嫌氣的な環境が形成される。この酸素が消費されていく過程において、脱窒・アンモニア生成型硝酸還元・マンガン還元・鉄還元・硫酸還元・メタン生成といった異化的な還元反応が逐次的に進行する。また、根圏や表層土壌においては、大気中に由来する窒素 ( $N_2$ ) をアンモニア態に変換する窒素固定反応が起きることがわかっている(Kimura, 2000)。

アンモニア生成型硝酸還元反応は、アンモニア酸化反応によって生成された硝酸を溶脱しにくい形態であるアンモニアに変換するものであり、水田土壌において実際に起きていることが報告されている (Yin *et al.*, 2002)。また、窒素ガスをアンモニア態に還元する窒素固定反応は *Cyanobacteria* 門細菌や根圏細菌、および根粒菌が行っているとされ、畑土壌より水田土壌において活発に行われていることが報告されている(Ishii *et al.*, 2011; Mårtensson *et al.*, 2009; 久馬, 1994)。これらの還元的窒素循環反応は、水田の窒素保持性に大きく寄与すると考えられている。一方、脱窒反応は硝酸を窒素ガスに変換することにより、土壌からの硝酸の溶脱を防いでいる。実際、脱窒反応は還元的な環境を持つ水田土壌において畑土壌より盛んに起きており、その結果水田土壌では硝酸の溶脱が畑土壌に比べて少ないことが報告されている(Akiyama *et al.*, 2005; Bouwman *et al.*, 2002)。上述した様々な還元的窒素循環反応(Figure 1.1)は、主として水田土壌中の微生物が駆動していると考えられている。水田は、これら土壌微生物が駆動する還元的窒素循環反応により、畑にはない『硝酸の低溶脱』『窒素肥沃度の維持』という利点を得ているのである。

したがって、水田土壌における脱窒反応、アンモニア生成型硝酸還元反応、窒素固定反応に代表される還元的窒素循環反応を駆動する微生物群を包括的に解明することは、学術的に重要であるのみならず環境の保全や生産性の維持向上につながり応用的にも極めて重要である。

## 1.2 本研究で解析対象とする窒素循環反応

1.1 において述べた様に、脱窒反応、アンモニア生成型硝酸還元反応、窒素固定反応に代表される還元的窒素循環反応は、水田の環境保全性や窒素肥沃度維持において重要な役割を果たしている。脱窒反応やアンモニア生成型硝酸還元反応は、土壌有機物の分解や施肥によって供給されたアンモニア態窒素が酸化（硝化）されて生じる亜硝酸や硝酸が起点となる。つまり、硝化反応と還元的窒素循環反応は密接に関わっているのである。そのため本研究では、硝化反応、脱窒反応、アンモニア生成型硝酸還元反応、窒素固定反応に関わる微生物を研究対象とした。

### (1) 硝化反応

硝化反応は、アンモニアから亜硝酸、硝酸への酸化反応である (**Figure 1.2A.**)。19 世紀の中頃、硝化は微生物による反応であることが見いだされ、1890 年に初めて硝化細菌が分離された (Winogradsky, 1890)。その後多くの研究が行われ、20 世紀までにアンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌はそれぞれ 25 種と 8 種以上が分離された (Koops and Pommerenint-Roser, 2001)。また、近年ではアンモニア酸化を行う古細菌 (Könneke *et al.*, 2005) や、硝化反応の全て (アンモニア酸化反応、亜硝酸酸化反応) を 1 つの微生物が行う Commamox (complete ammonia oxidiser) も分離されている (Kessel *et al.*, 2015; Daims *et al.*, 2015)。このように様々な微生物によって駆動される硝化反応においては、アンモニアから亜硝酸への酸化反応が律速となることが知られている (Kowalchuk and Stephaer, 2001)。アンモニアから亜硝酸への酸化反応は、アンモニアからヒドロキシルアミン、ヒドロキシルアミンから亜硝酸への酸化という 2 段階の反応である。1 段階目の反応は、膜結合型の酵素 (Amo) によって触媒される (Ensign *et al.*, 1993)。この酵素 (Amo) をコードする遺伝子は *amoA*, *amoB*, *amoC* であり (Hallam *et al.*, 2006)、

中でも *amoA* の塩基配列に基づく系統は 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統分類と対応性が高いことから多くの研究対象となっている (Purkhold *et al.*, 2003)。一方、2 段階目のヒドロキシルアミンを亜硝酸に酸化する反応については、未だ解明されていない点が残っている。この反応を触媒する酵素として Hao が現在知られているが、いくつかの古細菌においては、Hao 以外の何らかの機構によって同反応が触媒されていると考えられている。AOA である *Candidatus Cenarchaeum symbiosum* は Hao をコードする遺伝子である *hao* のホモログを保有していない (Hallam *et al.*, 2006)。また、同じく AOA である *Candidatus Nitrosopumilus maritimus* においても、ヘムを中心とした Hao ではなく銅を中心とした酵素によって 2 段階目の反応を触媒する、もしくは、ヒドロキシルアミンではなく次亜硝酸を亜硝酸に酸化すると考えられている (Walker *et al.*, 2010)。このように、2 段階目の硝化反応については酵素がはっきりと確立されていないのである。そこで本研究では、これまでに多く研究対象とされてきており、遺伝子情報のデータベースが充実していると考えられる *amo* を研究対象とすることとした。

## (2) 脱窒反応

脱窒反応は、アンモニア酸化によって生成された硝酸や亜硝酸が一酸化窒素 → 一酸化二窒素 → 窒素へと還元される反応である (Figure 1.2B.)。脱窒反応は湛水された水田土壌を用いた室内実験において初めて観測され(塩入・青峰, 1937,1938)、還元層において脱窒菌により駆動されていることが明らかとなった(塩入, 1942)。その後の研究から、*Betaproteobacteria* 綱 *Burkholderiales*, *Rhodocyclales* 目, *Alphaproteobacteria* 綱 *Bradyrhizobium* 属細菌が主に水田土壌における脱窒反応を駆動していることが示されている (Ishii *et al.*, 2011)。

脱窒反応の 1 段階目は硝酸を亜硝酸に還元する反応であり、膜結合型の酵素



(NarG) , ペリプラズム型の酵素 (NapA) によって触媒される(Bru *et al.*, 2007)。これらの遺伝子は、細菌によっては両方を保有することがわかっている (Richardson *et al.*, 2007)。脱窒反応の 2 段階目は亜硝酸を一酸化窒素に還元する反応であり、シトクロム型の酵素 (NirS) , 銅型の酵素 (NirK) によって触媒される(Glockner *et al.*, 1993)。これらの酵素遺伝子両方を保有する微生物として *Azoarcus* sp.KH32C や *Methylobacterium denitrificans* が知られているが (Kits *et al.*, 2015)、これら両方の酵素遺伝子を保有する微生物は極めて少ないと考えられている (Rinaldo *et al.*, 2007, Graf *et al.*, 2014)。脱窒反応の 3 段階目は一酸化窒素を一酸化二窒素に還元する反応であり、シトクロム c 依存型の酵素 (cNor) ,キノン依存型の酵素(qNor)によって触媒される (Vries *et al.*, 2002)。cNor のサブユニットである NorB は、qNor の本体とホモログであることが知られている (Shiro, 2012)。脱窒反応の最終段階は一酸化二窒素を窒素へ還元する反応であり、活性中心に銅が存在する酵素 (NosZ) によって触媒される(Zumft *et al.*, 1990)。NosZ は、オゾン層破壊効果と温室効果を持つ一酸化二窒素を還元して除去する酵素である (Philippot *et al.*, 2009)。

### (3) アンモニア生成型硝酸還元 (DNRA) 反応

アンモニア生成型硝酸還元 (DNRA) は、硝酸を亜硝酸に還元する反応と、亜硝酸をアンモニアに還元する反応に分かれている (**Figure 1.2C.**)。硝酸を亜硝酸に還元する反応は脱窒反応の 1 段階目と共通しており、NarG, NapA によって触媒される。一方、亜硝酸をアンモニアに還元する反応は、シトクロム c 依存型の酵素(NrfA)によって触媒される。この酵素をコードする遺伝子である *nrfA* は、*Gammaproteobacteria* 綱細菌(*Escherichia coli*)において初めて報告された (Fujita and Sato, 1966; Cole, 1968)。その後の研究において、*Proteobacteria* 門の *Gamma*-, *Deltaproteobacteria* 綱、*Firmicutes* 門のうちいくつかの属の細菌が DNRA 活性を

持つことが報告されている (Rütting *et al.*, 2011)。

#### (4)窒素固定反応

窒素ガスは安定な分子であり、大気中に約 80%存在している。その安定な窒素ガスがアンモニアに変換される主な経路として、ハーバーボッシュ法による化学合成、もしくは窒素固定菌による生物的窒素固定 (**Figure 1.2D.**) が挙げられる。化学合成によるアンモニアの年間生産量は 1.71 億トンであり (化学経済, 2013)、窒素固定菌による窒素固定は 1.8 億トンである (川島・新藤, 2002)。このように、自然界において窒素ガスをアンモニアに変換するためには、窒素固定菌による窒素固定反応が不可欠なのである。これまでに窒素固定細菌として、ヘテロシストを形成する *Anabaena* 属, *Nostoc* 属細菌 (*Cyanobacteria*)、根粒菌である *Rhizobiales* 目細菌 (*Alphaproteobacteria*) , *Burkholderiales* 目細菌 (*Betaproteobacteria*) , *Frankia* 属細菌 (*Actinobacteria*)、協同的窒素固定細菌である *Klebsiella* 属細菌 (*Gammaproteobacteria*) , *Azospirillum* 属細菌 (*Alphaproteobacteria*) , *Gluconacetobacter* 属細菌 (*Alphaproteobacteria*) , *Herbaspirillum* 属細菌 (*Betaproteobacteria*) 等が報告されている (渡辺, 1992; 米山・赤尾, 1998; 澤田, 2003)。これらの細菌が関与する窒素固定反応は、ニトロゲナーゼによって触媒される。ニトロゲナーゼは、2 つの構成単位 (成分 I, 成分 II) を有する酵素である。酵素の活性中心を有する成分 I は、ニトロゲナーゼ二量体(dinitrogenase, モリブデン-鉄タンパク質)であり、*nifD* と *nifK* 遺伝子によってコードされる。成分 II は、ニトロゲナーゼ二量体を還元するニトロゲナーゼ還元酵素 (dinitrogenase reductase, 鉄タンパク質) のホモ二量体であり、*nifH* 遺伝子によってコードされる。窒素固定反応を触媒するニトロゲナーゼは、これらのヘテロ四量体が機能単位であることがわかっている (Rubio and Ludden, 2005)。

(1)から(4)で述べたように、本研究において研究対象とした窒素循環反応には様々な酵素が関与している (**Figure 1.2**)。本研究では、上述した各反応に関わる主要な酵素をコードする遺伝子 (アンモニア酸化: *amo*, 硝酸還元: *narG*, *napA*, 亜硝酸還元: *nir*, 一酸化二窒素還元: *norB*, 一酸化二窒素還元: *nosZ*, アンモニア生成型硝酸還元: *nrfA*, 窒素固定: *nif*) の解析を行うこととした。

### 1.3 先行研究について (PCR からメタゲノムまで)

これまでは、水田土壌における上述の還元的窒素循環反応を駆動する微生物群を明らかにするために、各反応ごとに単発的に行う PCR ベースの手法が多く用いられてきた (Yoshida *et al.*, 2009,2011; Ishii *et al.*, 2012)。しかしながら近年、PCR ベースの手法はその条件設定やプライマーのミスマッチにより、群集構造の多様性を低く見積もってしまう可能性が指摘されている (Hong *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2013)。これらの PCR バイアスを解消するため、また、単発的ではなく包括的な解析を行うため、環境 DNA や RNA を直接シーケンサーに供し、大量のシーケンスデータを得るメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析 (オミクス解析) が利用されはじめている。

しかしながら、水田土壌におけるオミクス解析は発展途上であると言える。Shrestha ら (Shrestha *et al.*, 2008) は水田土壌モデル系の酸化層と還元層について、サンガーシーケンサーを用いた expressed sequence tag 解析 (EST 解析) を試みたが、得られた mRNA が極めて少なく、窒素循環反応に関する情報がほとんど得られなかった。また、彼らが用いたモデル系はイネの栽培がなく、光の照射もない条件の下に構築されており、実際の圃場の水田土壌における様子が反映されているかは不明である。近年では、Kim ら (Kim *et al.*, 2015) によって次世代シーケンサーを用いた水田土壌の層別のメタトランスクリプトーム解析が行わ

れたが、それでもなお得られた機能遺伝子転写産物の配列数が少なく、個々の機能遺伝子に関する詳細な記述や考察は成されていない。一方、伊藤は圃場の水田土壌についてメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析を試み、微生物群集や機能遺伝子群の構造を明らかにした（伊藤博論, 2012）。しかし、これらの解析に用いた土壌試料は、田面水を除いた深さ 10 cm の土壌を混合したものであったため、酸化層や還元層それぞれの微生物群集や機能遺伝子の詳細な構造や、季節・層別の変動は不明である。また、Kim らの結果と同様に、メタトランスクリプトーム解析においては機能遺伝子転写産物の検出が極めて少量であった。このように、これまでに実施された水田土壌のオミクス解析では、各種反応に関わる微生物群の変遷が捉えられていない。そのため、還元的窒素循環反応を駆動する微生物についての包括的な理解は、未だ達成されていないのである。

#### 1.4 本研究の目的

上述したように、これまでに行われてきた水田土壌におけるメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析は、次の様な問題点があった。

1. 小規模なシーケンシングが行われたため、得られる機能遺伝子転写産物の配列数が少ない。
2. 層別のモデル系、もしくは層を分けないで行う圃場の土壌のシーケンシングのみが行われており、実際に層が分化した圃場における様子が不明である。

これらの問題点により、水田土壌を特徴づける還元的窒素循環反応に関わる微生物群の詳細は未だ明らかにされていないと言える。そこで本研究では、圃場の水田土壌の酸化層や還元層について大規模なオミクス解析を行い、水田土壌における窒素循環反応(アンモニア酸化、脱窒、アンモニア生成型硝酸還元、

窒素固定)に関わる微生物群集構造と機能遺伝子の検出量、およびその局在と変遷を明らかにすることを試みた。

## 1.5 本研究の内容

本研究では、まず 1 年を通して経時的に層別の土壌サンプリング、理化学性と生物活性の測定、土壌 RNA のシーケンシング（簡易的メタトランスクリプトーム解析）を行った（第 2 章）。その後、第 2 章の結果から水管理による環境変化を最も反映していると考えられた湛水期・落水期の土壌核酸の大規模シーケンシング（メタゲノム解析・ディープなメタトランスクリプトーム解析）を行った（第 3 章）。これらによって明らかになった新潟水田土壌と他の水田・耕作地・底泥土壌を比較し、水田土壌における還元的窒素循環反応に関わる微生物群集・機能遺伝子群を特徴づけた（第 4 章）。最後に、本研究結果が明らかにした還元的窒素循環反応に関わる微生物群集・機能遺伝子群と既往研究との相違について述べ、違いを生み出した原因について考察・総括した（第 5 章）。

## 参考文献

伊藤博士論文. (2012) メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析法を用いた  
水田土壌微生物群集の構造と機能の網羅的解明

小野敏忠. (1973) 日本陸稲品種の来歴について. 育雑. 23:207-211.

化学経済. (2013) 化学工業日報編, pp.143 化学工業日報社

川島博之・新藤純子. (2002) 酸性雨と地球規模の窒素循環. 環科誌 15:281-286.

久馬一剛. (1994) 水田農業と農業土木. 農土誌. 62:7-10.

澤田宏之. (2003) 根粒菌の系統分類-過去・現在・将来-. 土と微生物. 57:39-64.

塩入松三郎・青峰重範. (1937) 水田状態の土壌中におけるアンモニア態窒素の消  
長について. 土肥誌. 11:389 -392

塩入松三郎・青峰重範. (1938) 湛水状態の土壌中における窒素の形態変化. 土肥  
誌. 12:406 -410

塩入松三郎. (1942) 水田の脱窒現象に就て. 土肥誌. 16:104 -116

米山忠克・赤尾勝一郎. (1998) 非マメ科植物に共生窒素固定系を賦与するための  
研究戦略と問題点. 土肥誌. 69:403-409.

渡辺巖. (1992) ラン藻とアゾラの共生. 化学と生物. 12:820-829.

Akiyama H, Yagi K. (2005) Direct N<sub>2</sub>O emissions from rice paddy fields: Summary of available data. Global Biogeochem Cy. 19:GB1005.

Bouwman AF, Boumans LJ, Batjes NH. (2002) Emissions of N<sub>2</sub>O and NO from fertilized fields. Summary of available measurement data. Global Biogeochem Cy. 16:1058

Bru D, Sarr S, Philippot L. (2007) Relative abundances of Proteobacterial membrane-bound and periplasmic nitrate reductases in selected environments. Appl Environ Microbiol. 73:5971-5974.

Cole JA. (1968) Cytochrome C<sub>552</sub> and nitrite reduction in *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta. 162:356-368.

Daims H, Lebedeva EV, Pjevac P, Han P, Herbold C, Albertsen M, *et al.* (2015) Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. Nature. 528:504-509.

Ensign SA, Hyman MR, Arp DJ. (1993) In vitro activation of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* by copper. J Bacteriol. 175:1971-1980.

Fujita T, and Sato R. (1966) Studies on soluble cytochromes in enterobacteriaceae. III. Localization of cytochrome C<sub>552</sub> in the surface layer of cells. J. Biochem. 60:568-577.

Glockner AB, Jüngst A, Zumft WG. (1993) Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome cd1-free background (NirS<sup>-</sup>) of *Pseudomonas stutzeri*. Arch Microbiol. 160:18-26.

Graf DR, Jones CM, Hallin S. (2014) Intergenomic Comparisons Highlight Modularity of the Denitrification Pathway and Underpin the Importance of Community Structure for N<sub>2</sub>O Emissions. PLoS One. 9:e114118.

Hallam SJ, Mincer TJ, Schleper C, Preston CM, Roberts K, Paul M. Richardson, DeLong EF. (2006) Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine *crenarchaeota*. PLoS Biol. 4: 0521-0536

Hong S, Bunge J, Leslin C, Jeon S, Epstein SS. (2009) Polymerase chain reaction primers miss half of rRNA microbial diversity. ISME J. 3:1365-1373.

Ishii S, Ikeda S, Minamisawa K, Senoo K. (2011) Nitrogen cycling in rice paddy environments: past achievements and future challenges. Microbes Environ. 26:282-292.

Kessel MA, Speth DR, Albertsen M, Nielsen PH, Op den Camp HJ, Kartal B, *et al.* (2015) Complete nitrification by a single microorganism. Nature. 528;555-559.

Kim Y. and Liesack W. (2015) Differential assemblage of functional units in paddy soil microbiomes. PLoS One. 10:e0122221.



Kimura M. (2000) Anaerobic microbiology in waterlogged rice fields. In Soil Biochemistry vol. 10, Bollarg JM, Stotzky G. (eds) New York: Marcel Dekker, pp. 35-138.

Kits KD, Klotz MG, Stein LY. (2015) Methane oxidation coupled to nitrate reduction under hypoxia by the Gammaproteobacterium *Methylomonas denitrificans*, sp. nov. type strain FJG1. Environ Microbiol. 17:3219-3232.

Könneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. Nature. 437: 543-546

Koops HP, Pommerening-Roser A. (2001) Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. FEMS Microbiol Ecol. 37: 1-9

Kowalchuk GA, Stephen JR. (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. Annu Rev Microbiol. 55: 485-529

Ishii S, Ikeda S, Minamisawa K, Senoo K. (2011) Nitrogen cycling in rice paddy environments: past achievements and future challenges. Microbes Environ. 26:282-292.

Jones CM, Graf DR, Bru D, Phillippot L, Hallin S. (2013) The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. ISME J. 7:417-426.

Mårtensson L, Diez B, Warttinen I, Zheng W, El-Shehawy R, Rasmussen U. (2009) Diazotrophic diversity, *nifH* gene expression and nitrogenase activity in a rice paddy field in Fujian, China. *Plant Soil*. 325:207-218.

Noll M, Matthies D, Frenzel P, Derakshani M, Liesack W. (2005) Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. *Environ Microbiol*. 7:482-395.

Philippot L, Cuhel J, Saby NP, Chèneby D, Chronáková A, Bru D, Arrouays D, Martin-Laurent F, Simek M. (2009) Mapping field-scale spatial patterns of size and activity of the denitrifier community. *Environ Microbiol*. 11:1518-1526.

Purkhold U, Pommerening-Roser A, Juretschko S, Schmid MC, Koops HP, Wagner M. (2000) Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. *Appl Environ Microbiol*. 66:5368-5382.

Richardson JD, van Spanning RJM, Ferguson SJ. (2007) The prokaryotic nitrate reductases. *Biology of the Nitrogen Cycles* (Bothe H, Ferguson SJ, Newton NE eds), pp. 21-35. Elsevier, Amsterdam.

Rinaldo S, Cutruzzola F. (2007) Nitrite reductases in denitrification. *Biology of the Nitrogen Cycles* (Bothe H, Ferguson SJ, Newton NE eds), pp. 37-55. Elsevier, Amsterdam.

Rubio LM and Ludden PW. (2005) Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle. *J Bacteriol.* 187:405-414.

Rütting T, Boeckx P, Müller C, Klemetsson L. (2011) Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle. *Biogeosciences.* 8:1779-1791.

Shiro Y. (2012) Structure and function of bacterial nitric oxide reductases: Nitric oxide reductase, anaerobic enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 1817:1907-1913.

Shrestha PM, Kube M, Reinhardt R, Liesack W. (2009) Transcriptional activity of paddy soil bacterial communities. *Environ Microbiol.* 11:960-970.

Sorokin DY, Lückner S, Vejmelkova D, Kostrikina NA, Kleerebezem R, Rijpstra WI, *et al.* (2012) Nitrification expanded: discovery, physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the phylum *Chloroflexi*. *ISME J.* 6:2245-2256.

Usui Y. (2013) A review of improvements to methods for the measurement of dissolved oxygen, pH, and soil redox potential and the discovery of convective flow in ponded water of paddy fields. *Clim Biosphere.* 13:25-32.

Vries S, and Schröder I. (2002) Comparison between the nitric oxide reductase family and its aerobic relatives, the cytochrome oxidases. *Biochem Soc Trans.* 30:662-667.

Walker CB, de la Torre JR, Klotz MG, Urakawa H, Pinel N, Arp DJ, *et al.* (2010) *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107: 8818-8823

Winogradsky S. (1890) Recherches sur les Organisms de la Nitrification. *Ann Inst Pasteur*. 4:213-231.

Yin SX, Chen D, Chen LM, Edis R. (2002) Dissimilatory nitrate reduction to ammonium and responsible microorganisms in two Chinese and Australian paddy soils. *Soil Biol Biochem*. 34:1131-1137.

Yoshida M, Ishii S, Fujii D, Otsuka S, Senoo K. (2012) Identification of active denitrifiers in rice paddy soil by DNA- and RNA-based analysis. *Microbes Environ*. 27:456-461.

Zumft WG, Viebrock-Sambale A, Braun C. (1990) Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. *Eur J Biochem*. 192:591-599.

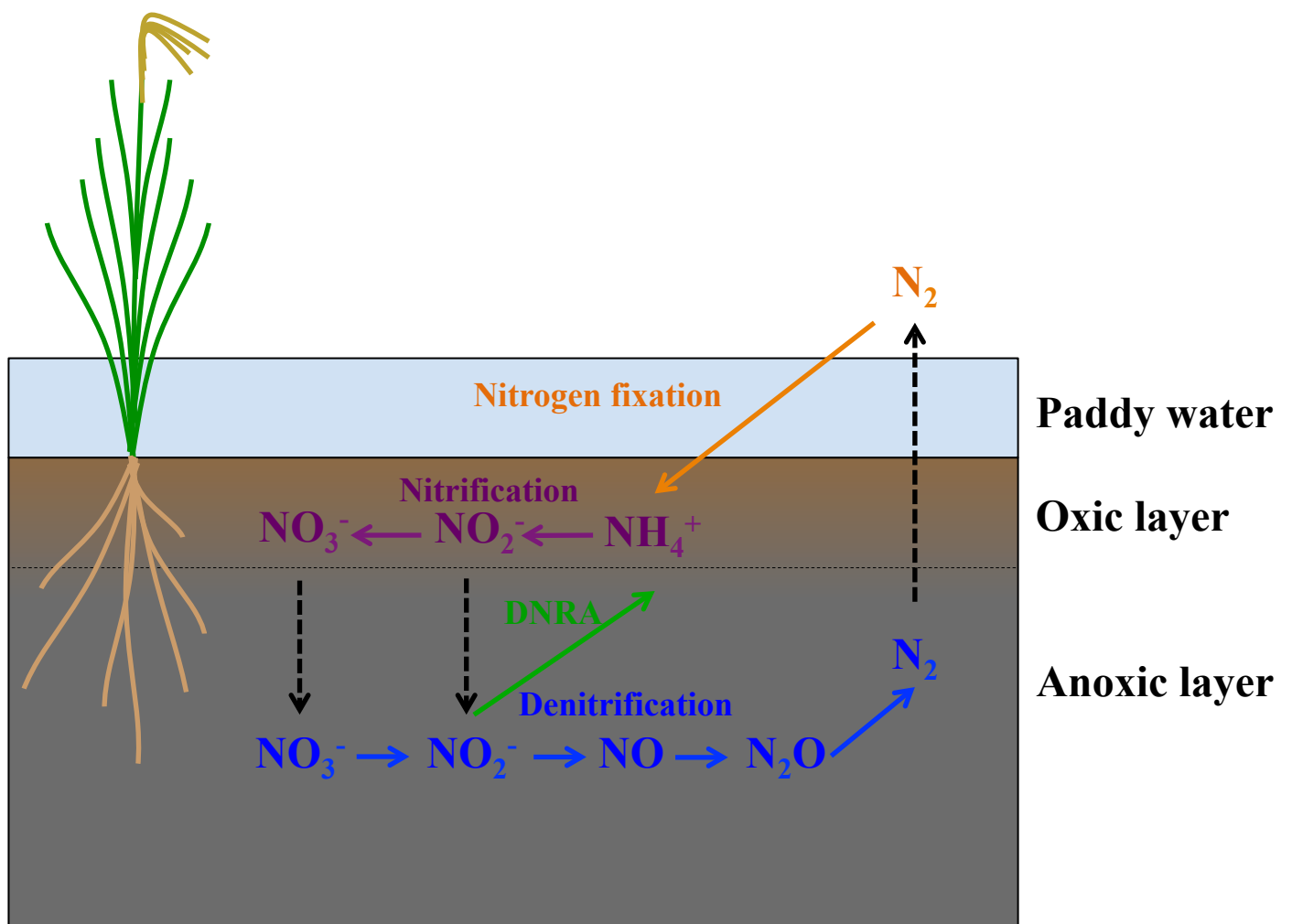
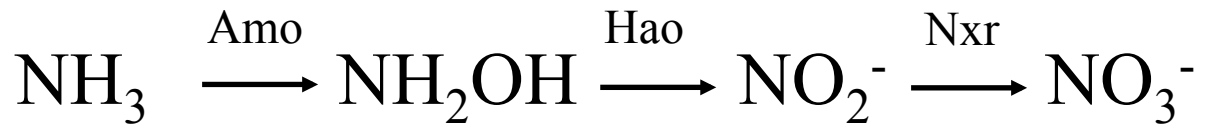


Figure 1.1. Overview of nitrogen transformations in rice paddy soils.

**A Nitrification(Ammonia oxidation)**



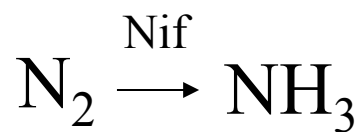
**B Denitrification**



**C DNRA**



**D Nitrogen fixation**



**Figure 1.2.** Key enzymes involving nitrification (A), denitrification (B), DNRA(C), and nitrogen fixation (D).

## 第 2 章

# 新潟水田土壌における窒素循環反応に関わる微生物群集の概観

### 2.1 緒言

水田における微生物群集や還元的窒素循環反応に関わる機能遺伝子群の構造解析は、これまでに 16S rRNA 遺伝子や特定の機能遺伝子をターゲットとした PCR ベース手法を用いて多く研究されてきた。しかしながら近年、第 1 章で述べた様に、PCR ベースの解析はその群集構造の多様性を低く見積もる可能性がある。これを回避するため、水田土壌においてもメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析が行われてきた (Shrestha *et al.*, 2008; 伊藤博士論文, 2012; Kim *et al.*, 2015)。

しかしながら、これまでに行われたメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析は、室内モデル水田を用いたものや小規模解析のもの、酸化層土壌と還元層土壌をまとめて解析したものであり、実際の圃場の土壌各層を対象とした経時的かつ大規模な解析は行われていない。つまり、水田土壌の各部位・各時期において高い活性を持つ微生物の群集構造は、未だ解明されていないのである。

メタトランスクリプトーム解析の対象となる RNA は、メタゲノム解析の対象となる DNA より半減期が短い。また、DNA 解析のみでは、その遺伝子が実際に転写されたか判別することは不可能である。そのため第 2 章では、実際に遺伝子を転写している活性度の高い微生物が対象となるメタトランスクリプトーム解析を層別・時期別に行い、得られた rRNA 遺伝子配列に基づいて水田土壌における微生物群集の構造とその変遷を明らかにすることを試みた。また、得られた機能遺伝子配列も活用し、窒素循環に関わる微生物を概観することも試みた。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 圃場

本研究で解析対象とした水田圃場は、新潟県農業総合研究所内(新潟県長岡市; 37°26'N, 138°52'E)の連作水田である。本圃場では、2003 年度から水稻栽培が行われており、毎年の水管理は次のとおりである。4 月下旬-5 月上旬：湛水・田植え、6 月中旬：中干し、7-8 月：間断灌漑、9 月：落水。また、2012 年度の施肥は次の要領で行われた。基肥：塩加磷安 1 号（高度化成肥料）3kg/10a（4 月 25 日）、追肥：硫安 1kg/10a（7 月 18 日）、硫安 1kg/10a（7 月 25 日）。本圃場は東京大学土壌圏科学研究室の伊藤らの先行研究によって、高純度・高収量の土壌 RNA の抽出方法が確立されており、PCR-DGGE およびクローンライブラリー法による土壌微生物群集構造の季節変動の調査（Itoh *et al.*, 2013）、試験的メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析（伊藤博士論文）が行われてきている。同時にメタンガスフラックスや土壌理化学性の季節変動についても調査されており、土壌の微生物性および理化学性の基本情報が蓄積されている。このことから、この水田圃場を本研究の解析対象とした。

### 2.2.2 土壌サンプリング

土壌サンプリングは、2012年度の耕作期間の①代掻き直後(5月7日)、②代掻き二週間後(5月23日)、③中干し直前(6月18日)、④間断灌漑期(8月28日)、⑤稲刈り後（10月1日）の計5回行った。代掻き直後の土壌は、田面水を除いた深さ10 cmの土壌を、先端部を切断した50 ml容の円筒のシリンジを用いて採取し、速やかに液体窒素で凍らせた。②-④の時期の土壌は、直径10 cm、深さ15cmの亚克力筒を土壌に挿入して筒ごと土壌を回収し、回収した亚克力筒上部に溜まっている田面水をシリンジで取り除いた後、すぐに液体窒素で凍らせた。凍結した土壌はドライアイスと共に梱包して実験室に持ち帰り、



-80℃で保存した。生物活性の測定に用いる土壌は、アクリル筒のまま保冷剤を入れた発泡スチロールボックスに入れて持ち帰り、4℃で保存した。

### 2.2.3 土壌の層別分取

酸化還元電位 (2.2.4.2) が最も低かった 6 月 18 日の土壌の酸化層・還元層に分化した層の厚さを基準とし、0-1cm の層を X 層 (6 月 18 日土壌の酸化層)、1-3cm の層を Y 層 (同酸化層直下)、5-7cm の層を Z 層 (同還元層) としてそれぞれ分取した。分取したサンプルは、土壌理化学性の測定を随時行った。

### 2.2.4 土壌理化学性・生物活性の測定

#### 2.2.4.1 含水率

まず、予め乾燥させた 10 ml バイアル瓶を秤量した (X g)。次に、土壌サンプルをそのバイアル瓶に入れ、秤量した (Y g)。その後、110℃で24時間乾燥し、再度秤量した (Z g)。得られた X, Y, Z を以下の式に代入し、含水率を算出した。

$$\text{含水率} = (Y - Z) / (Y - X) \times 100 (\%)$$

#### 2.2.4.2 酸化還元電位 (Eh)

白金電極を圃場の 5 箇所に埋設し (深さ 5 cm) た。土壌採取の際に、PRN-41 ポータブル土壌 Eh 計 (Fujiwara Scientific, Tokyo, Japan) を用いて測定した。

#### 2.2.4.3 アンモニア態窒素・2 価鉄

アンモニア態窒素( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )は、2 M KCl を用いて土壌抽出液を調製し、インドフェノール青吸光光度法 (土壌養分分析法, 1970) を用いて測定した。2 価鉄 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) は、1M 酢酸アンモニウム(pH 3)を用いて土壌抽出液を調製し、1,10-フェナントロリン吸光光度法

(Kumada and Asami, 1958) を用いて測定した。

#### 2.2.4.4 脱窒活性

凍結せず低温で持ち帰った土壌 1 g を 10 ml バイアル瓶に入れ、滅菌水 2 ml、コハク酸ナトリウム 0.5 mg-C/g-soil、硝酸ナトリウム 0.1 mg-N/g-soil を添加した。ブチルゴム栓で密閉して Ar:C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> =90:10 混合ガスで気相置換し、20 °C で 24 h 静置培養した。培養後の気相を 0.5 ml 採取し、ガスクロマトグラフィー (Shimadzu GC-14B) に供し、N<sub>2</sub>O 濃度を測定した (Yoshinari and Knowles, 1976)。

#### 2.2.4.5 硝化活性の測定

低温で持ち帰った土壌 1 g を 10 ml バイアル瓶に入れ、滅菌水 2 ml、硫酸アンモニウム 0.3mg-N/g-soil を添加し、シリコ栓をして 20 °C で 2 週間静置培養した。培養後にフィルター濾過して得られた抽出液を、陰イオン分析用カラムを装着したイオンクロマトグラフィー (Shimadzu HIC6A) に供して硝酸濃度を測定した (土壌養分分析法, 1970)。

### 2.2.5 土壌 RNA の抽出と精製

-80 °C で凍結保存した土壌試料 1 g から、RNA PowerSoil Total RNA Isolation kit (MoBio Laboratories, Solana Beach, CA, USA) を用いて RNA を粗抽出した。抽出した RNA から TURBO DNA-free Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて残存していた DNA を除去し、RNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research, Irvine, CA, USA) を用いて精製した。精製した RNA は RNA 6000 Pico Kit を用いて蛍光標識した後にゲルを充填したマイクロチップにアプライし、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) に供して LSU, SSU ピーク比からその分解度を確認した。その後、Qubit RNA Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて RNA 試料を蛍光色素により着色し、

Qubit 2.0 Fluorometer(Invitrogen)に供して定量した。精製ならびに調製法は、いずれも付属のプロトコルに従った。なお、1 土壌試料あたり 3 回 RNA を抽出し、それぞれ独立させて以降の解析に用いた。13 種の土壌試料それぞれから 3 反復で RNA を調製したため、合計で 39 ライブラリを調製した。

### 2.2.6 シーケンシングライブラリ調製

定量した RNA から、NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina® (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)を用いてシーケンシングライブラリを調製した。調製法は、付属のプロトコルに従った。

### 2.2.7 シーケンシング

調製したライブラリは、MiSeq Reagent kit v2 500 cycle(Illumina, San Diego, CA, USA) のプロトコルに従い、Illumina Miseq sequencer (Illumina)に供して Paired end シーケンスした。1 ランあたり、レプリケートを 3 とした 3 サンプル (計 9 サンプル) のシーケンシングを行った。

### 2.2.8 インフォマティクス解析

Miseq シーケンサーより出力された Paired end の塩基配列 (fastq ファイル) は、fastq-join を用いて連結した (overlapped length > 30bp, mismatch rate < 10%)。得られた fastq ファイルから PRINSEQ(Schmieder *et al.*, 2011)を用いて Q-score 30 以上の配列を選出し、fasta 形式に変換した。rRNA 配列は MG-RAST server v.3 (Meyer *et al.*, 2008)上で M5RNA データベースを用いて BLAT 検索を行った (e-value < 10<sup>-5</sup>, alignment length > 30bp)。mRNA 配列は MG-RAST server v.3 上で M5NR データベースを用いて BLAT 検索 (e-value < 10<sup>-5</sup>, alignment length > 30aa)を行い、機能遺伝子としてアノテーションされた配列は BLASTX

検索 (e-value < 10<sup>-5</sup>, alignment length >30aa)を行った。このように、機能遺伝子配列については二重の相同性検索を行い、よりアノテーション精度を高めた。

## 2.3 結果と考察

### 2.3.1 土壌の層別プロファイル

#### 2.3.1.1 圃場管理とサンプリング

本圃場における 2012 年の水管理、施肥、土壌サンプリングの実施日ならびに酸化還元電位を **Figure 2.1.** にまとめた。本研究では、代掻き直後 (5/7、田植え前)、代掻き 2 週間後 (5/23、酸化還元電位の降下が見られる時期)、中干し直前 (6/18、酸化還元電位が最も降下した時期)、間断灌漑期 (8/28、酸化還元電位の上昇・下降が断続的に起こる時期)、落水期 (10/1、完全に落水し、酸化還元電位が最も上昇した時期) の計 5 回サンプリングを行った。

土壌を層別に分取するための層位分けの指標とした 6 月 18 日採取の土壌コアの断面と外観を **Figure 2.2.** に示した。表層の酸化層が茶褐色、下層の還元層は青灰色であり、酸化層と還元層が分化していることが視覚的に判断できた。これに基づいて、深さ 0 - 1 cm、1 - 2 cm、5 - 7 cm の土壌をそれぞれ X 層 (6/18 採取土壌における酸化層)、Y 層 (同じく酸化層直下)、Z 層 (同じく還元層) と規定し、他の時期に採取した土壌についてもこの層位分けを適用した。

#### 2.3.1.2 土壌理化学性・生物活性の変動

##### 2.3.1.2.1 酸化還元電位 (Eh)

水管理に伴う土壌 Eh の変動を **Figure 2.1.** に示した。同様の水管理が行われた 2009 年における土壌 Eh の変動 (伊藤博士論文) を参考として併記した。代掻き直後の土壌 Eh は  $+206.8 \pm 56.0$  mV であったが、湛水 2 週間後は  $-85.4 \pm 104.9$  mV、中干し直前は  $-162.8 \pm 74.8$

mV であったことから、湛水してから日数が経つにつれて土壌が還元的な状態へと変化したことが示された。8 月 28 日においては圃場に田面水はなく、Eh も湛水期と比較して上昇していたことから、土壌環境が酸化的な状態へと変化したことが考えられた。なお、10 月 9 日の Eh は検出限界 ( $> 800$  mV) を超えており酸化的な状態が広がっていると考えられた。

#### 2.3.1.2.2 アンモニア態窒素・2 価鉄濃度

水田土壌中の  $\text{NH}_4^+$  は、湛水前から中干し直前と比較して間断灌漑期以降は少ない傾向が見られ、 $\text{NH}_4^+$  濃度は湛水直後 (B.C) と湛水期 (Jun) において間断灌漑期 (Aug) と落水期 (Oct) より有意に高かった ( $P < 0.01$ ) (**Figure 2.3A.**)。本圃場では、4 月 25 日、7 月 18、25 日に窒素養分の施肥が行われたが、施肥によって  $\text{NH}_4^+$  濃度が著しく増加する様子は見られなかった。これは、水稻が幼穂形成期以降に窒素をより多く吸収するため (樋口ら, 1986)、もしくは、間断灌漑により土壌が一時的に酸化的になり硝化反応が盛んに起きたためであると考えられる。

土壌中の  $\text{Fe}^{2+}$  濃度は、土壌の酸化・還元程度の良い指標となる。中干し直前の湛水期 (6/18) に採取した土壌の Z 層において  $\text{Fe}^{2+}$  濃度が最も高かった (**Figure 2.3B.**)。このことから、この時期に土壌の還元が最も進行していることが示された。2009 年度にバルク土壌のサンプルを用いて測定した結果においても、湛水期に  $\text{Fe}^{2+}$  濃度が上昇する結果が得られている (伊藤博論, 2012)。水田土壌における  $\text{Fe}^{2+}$  は、中干し期・間断灌漑期を経て好氣的な環境に移行するとともに、溶解しにくい  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  の形態となることが報告されている (Nakanishi *et al.*, 2006)。本研究においても、中干し期以降の 8 月 28 日、10 月 1 日の土壌では  $\text{Fe}^{2+}$  濃度が湛水期の Z 層と比較して著しく減少した。そのため、本研究の対象水田においても、落水期には  $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_3$  の反応が促進されることが示唆された。

水田では、還元層の発達に伴って  $\text{Fe}^{3+}$  が還元されて  $\text{Fe}^{2+}$  が生成するに伴い、土壌の色は褐色から青灰色に変化することが知られている（檜原ら, 1976）。本研究では、その現象を考慮した視覚的な判断により 6/18 採取土壌を層別に分け（0 - 1 cm の酸化層: X 層、1 - 2 cm の酸化層直下の層: Y 層、5 - 7 cm の還元層: Z 層）、分取を行った。この分け方に従い、他の時期に採取した土壌についても層別に土壌の分取を行って解析に供した。そのため、それぞれの層の  $\text{Fe}^{2+}$  濃度を測定することで、この層別の分け方の妥当性を検証した。湛水期（5/23 ならびに 6/18）に採取した土壌の X, Y, Z 層において  $\text{Fe}^{2+}$  濃度の勾配（X 層 < Y 層 < Z 層の順に  $\text{Fe}^{2+}$  濃度が高くなっている）がはっきりしており、層別の分取は適切であったと考えられる。

#### 2.3.1.2.3 脱窒活性・硝化活性

水田土壌における硝化反応や脱窒反応の進行を把握することはメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析の結果の解釈のために重要である。しかしこれらの反応を現場で実測することは困難である。そこで、これらの反応が起こりうるポテンシャルを知るために、採取した土壌サンプルの硝化活性ならびに脱窒活性を測定した。

落水期（10/1）に採取した土壌の Y, Z 層土壌の脱窒活性は、他の土壌サンプルと比べて低い傾向が見られ（**Figure 2.4A.**）、落水により土壌が好気的な状態にあることがうかがえた。層別の脱窒活性の違いは中干し直前の湛水期（6/18）に採取した土壌では、Z 層の脱窒活性が X・Y 層のそれより有意に高かった（ $P < 0.05$ ）。この結果からも、6 月 18 日は還元状態の進行により酸化層と還元層が最も顕著に分化しており、Z 層が還元的な状態にあることが示された。

硝化活性は、落水期において湛水期より高まる傾向が見られた（**Figure 2.4B.**）。硝化反応は好気的な環境条件下で進行するため、これは妥当な結果である。本圃場では 7 月 18 日、25 日に施肥が行われている。そのため、土壌中で増加した  $\text{NH}_4^+$  からの硝化反応

が進行し、間断灌漑期（8月28日）に硝化活性が高まったと考えられた。

### 2.3.1.3 土壌の層別プロファイルのまとめ

土壌 Eh の時期別変動、 $\text{Fe}^{2+} \cdot \text{NH}_4^+$ 濃度、脱窒・硝化活性の層別・時期別変動を調べた（**Figure 2.1 - 2.4**）結果、水田土壌では、中干し直前の湛水期に最も還元層が発達し、間断灌漑期・落水期を経て土壌が酸化的に戻っていくことが確認された。また、本研究において適用した土壌の層別分取の方法は適切であったと考えられた。

## 2.3.2 rRNA 配列情報に基づく微生物群集の層別・時期別変動

### 2.3.2.1 シーケンシング結果

2.2.7 に記述したシーケンシングによって得られた配列数、平均解読長ならびに MG-RAST データベース上におけるアクセッションナンバーを、**Table 2.1.** に示した。すべてのシーケンシングにおいて、rRNAseq, non-rRNAseq はほとんど同数の配列数が得られた。しかしながら、non-rRNAseq の中で protein-coding gene としてアノテーションされた配列は極めて少なく、本研究においてターゲットとしている窒素循環反応に関与する遺伝子数は rRNA seq の 1%程度であった（**Data not shown**）。

### 2.3.2.2 細菌群集構造

細菌群集構造の解析結果を **Figure 2.5** に示した。本水田土壌では調べたすべての時期・層において *Proteobacteria* 門細菌が最も優占しており、中でも *Deltaproteobacteria* 綱細菌の優占度が高い（13.4 – 28.1%）ことが明らかになった(**Figure 2.5A.**)。この結果は、これまでの水田土壌における細菌群集の解析結果と一致している (Noll *et al.*, 2005; Itoh *et al.*, 2013; 伊藤博論, 2012; Shrestha *et al.*, 2009)。

*Deltaproteobacteria* 綱の中では、*Anaeromyxobacter* 属 (2.00 – 7.72%), *Geobacter* 属( 1.61 –

6.69%)細菌がすべての時期・層の土壌において優占しており、特にZ層において顕著であった(**Figure 2.5B, 2.6.**)。 *Anaeromyxobacter* 属細菌は、嫌気条件を好むが微好気条件でも生育できる細菌であり (Sanford *et al.*, 2002)、鉄還元・ウラン還元・ヒ酸還元能を持つ菌として土壌から単離されている (Wu *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2008; Kudo *et al.*, 2013)。また、*Geobacter* 属細菌は、偏性嫌気性細菌であり、鉄還元・ウラン還元能を持つ菌として単離されている (Prakash *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2010)。そのため、これらの細菌が嫌気的な環境であるZ層の土壌において優占していることは妥当であると考えられた。

**Figure 2.6.**に各分類群の層別の相対存在量の勾配を示した。この結果からも、*Deltaproteobacteria* 綱細菌は酸化層から還元層に向かうにつれて優占度が高くなることがわかった。また、湛水期・落水期双方において層別の相対存在量に有意差があった (**Figure 2.6.**)。このことから、X層よりZ層において *Deltaproteobacteria* 綱細菌は活性が高い状態にある可能性が示唆された。

一方、土壌が酸化的になる間断灌漑期 (Aug)・落水期 (Oct) (Water-drained) には、*Deltaproteobacteria* 綱細菌の中でも *Chondromyces* 属 (1.07–4.17 %)や *Sorangium* 属 (1.28–3.27 %)細菌の割合が増加することが明らかになった(**Figure 2.5B.**)。これらの細菌は好気性細菌であり、いくつかの株はセルロース分解能を持つ菌として単離されている (Brenner *et al.*, 2005; Schneiker *et al.*, 2007)。本水田土壌においても、これらの細菌は落水期の稲わらの分解に関与している可能性が考えられた。先行研究では、水田において優占している *Deltaproteobacteria* 綱細菌は嫌気性細菌であるとの報告が多くなされていた (Shrestha *et al.*, 2009; Itoh *et al.*, 2013)。しかしながら本研究において、初めて好気性の *Deltaproteobacteria* 綱細菌も落水期に増加することが明らかになった。

*Deltaproteobacteria* 綱に続いて優占していた細菌は、*Acidobacteria* 門 (4.65 - 13.5 %)である(**Figure 2.5A.**)。 *Acidobacteria* 門細菌の中では、*Candidatus Koribacter* 属, *Candidatus*



*Solibacter* 属, *Acidobacterium* 属が優占していた。これらは、セルロース分解菌、亜硝酸・硝酸還元菌として知られている細菌である (Ward *et al.*, 2009)。*Acidobacteria* 門細菌は、湛水期においては X 層から Z 層に向かうに従って増加する傾向が見られた(Figure 2.5A, 2.6)。*Acidobacteria* 門の中でも *Candidatus Koribacter* 属, *Candidatus Solibacter* 属細菌は好気性微生物として単離されている(Ward *et al.*, 2009)が、*Acidobacterium* 属細菌は通性嫌気性微生物であると報告されている (Kishimoto *et al.*, 1991)。本結果では、嫌氣的な Z 層においても *Candidatus Koribacter* 属, *Candidatus Solibacter* 属細菌由来の rRNA が検出された。このことから、これらの属の細菌も *Acidobacterium* 属細菌と同様に嫌気条件でも生育できる可能性が考えられた。

*Cyanobacteria* 門細菌は、湛水期・落水期どちらにおいても X 層で最も優占していた (1.55 – 21.5 %)(Figure 2.5A, 2.6)。*Cyanobacteria* 門細菌は、光合成を行う独立栄養細菌が多く含まれることで知られており (Castenholz, 2015)、土壌表面の光の届きやすい X 層において優占しているのは妥当であると考えられた。

細菌群集構造の主成分分析の結果を Figure 2.7.に示した。Figure 2.7A.は、全ての時期・層の土壌を分析対象とし、Figure 2.7B.は、10 月以外の全ての時期・層の土壌を分析対象とした。10 月の X 層が他の土壌と比べて著しく異なる群集構造を持つことが示唆された (Figure 2.7A.)。この原因として、同土壌において *Cyanobacteria* の割合が著しく上昇していることが挙げられた。10 月の土壌を除外した主成分分析(Figure 2.7B.)からは、5 月・6 月の湛水期を経て 8 月の間断灌漑期には湛水前の微生物群集構造に戻っていく傾向にあることが伺えた。

### 2.3.2.3 古細菌群集構造

古細菌の群集構造解析の結果を Figure 2.5C.に示した。本水田土壌では *Methanomicrobia* 綱 (24.7 – 70.4 %), *unclassified Thaumarchaeota* 門 (10.5 - 42.1 %) が優占

していることが明らかになった (**Figure 2.5C.**)。 *Methanomicrobia* 綱は、 *Euryarchaeota* 門に属するメタン生成菌であり、絶対嫌気性古細菌として知られている (Garsia *et al.*, 2000; Valentine *et al.*, 2007; Sakai *et al.*, 2008)。 *Methanomicrobia* 綱の古細菌は特に、中干し直前の湛水期 (Jun) の Z 層において優占していた (約 70 %)。同時期は最も還元層が発達する時期であるため、絶対嫌気性古細菌である同綱の微生物の優占度が上昇するのは妥当であると考えられる。2009 年度におけるガスフラックス測定においても、同時期にメタンフラックスが上昇することが報告されている (伊藤博論, 2012)。また、mRNA に基づく解析において、 *Euryarchaeota* 門の *Methanomicrobia* 綱 (48.9 %), *Candidatus Methanoperedens* (17.5 %)由来の *mcrA* (メタン生成に関わる鍵酵素遺伝子)転写産物が多く検出された(**Figure 2.S1., Table 2.S1.**)。これらのことから、本水田土壌におけるメタン生成には *Methanomicrobia* 綱古細菌が大きく関与しており、土壌が 1 年のうちで最も還元が進行した状態になると考えられる中干し直前の湛水期 (Jun) の Z 層においてその活性が高まっていることが考えられた。

*Methanomicrobia* 綱の次に優占していた *Thaumarchaeota* 門の中では、 *Nitrosopumilus*, *Nitrososphaera*, *Cenarchaeum* 属が優占していた(**Data not shown**)。 *Thaumarchaeota* 門は、 *Euryarchaeota* 門、 *Crenarchaeota* 門に続いて 2008 年に提案された 3 番目の古細菌の門であり、 *Nitrososphaera* 綱, *Nitrosopumilus* 綱, *Candidatus Cenarchaeum* 綱が含まれる (Brochier-Armanet *et al.*, 2008)。これらの古細菌は *amo*(アンモニア酸化関連遺伝子)を保有しており、 *Nitrososphaera* 綱, *Nitrosopumilus* 綱古細菌はアンモニア酸化活性を持つことが報告されている (Martens- Habbena *et al.*, 2011; Men *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2013)。 *Thaumarchaeota* 門古細菌は、還元層が最も発達する 6 月 18 日の Z 層において優占度が減少し、落水期の全層において上昇する傾向が見られた (**Figure 2.5C**)。 *Thaumarchaeota* 門の中でも優占していた *Nitrososphaera* 綱, *Nitrosopumilus* 綱, *Candidatus Cenarchaeum* 綱古細菌は好気性である(Konneke *et al.*, 2005; Stieglmeier *et al.*, 2014; Hallam *et al.*, 2006)ことか

ら、土壌がより好氣的になる落水期においてこれらの割合が増加することは妥当であると考えられた。

### 2.3.3 新潟水田土壌における窒素循環駆動微生物の概観

2.3.2 において示した rRNA に基づく群集構造では、層別・時期別の変動を追うことができた。しかしながら、窒素循環に関わる機能遺伝子の群集構造は、得られた機能遺伝子転写産物の配列数が少なかったことから層別・時期別の解析が困難であった。そこで本章では、全ての層・時期の土壌から得られた配列をまとめた解析を行った。

#### 2.3.3.1 アンモニア酸化関連遺伝子 (*amo*)



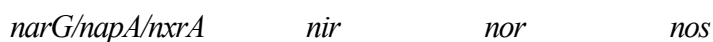
上記のアンモニア酸化に関わる鍵酵素遺伝子は、*amo* (ammonia monooxygenase)である。本研究は主に還元的窒素循環反応をターゲットとしているが、脱窒反応の始点となる硝酸が生成されるために不可欠な *amo* についても解析対象とした。

これまでに、アンモニア酸化細菌 (AOB) として *Proteobacteria* 門 *Betaproteobacteria* 綱の *Nitrosomonas* 属や *Nitrospira* 属細菌、*Gammaproteobacteria* 綱の *Nitrosococcus* 属細菌が、アンモニア酸化古細菌 (AOA) として *Thaumarchaeota* 門 *Nitrososphaera* 綱, *Nitrosopumilus* 綱, *Candidatus Cenarchaeum* 綱古細菌が報告されてきた (Fujii *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2015)。アンモニア酸化微生物の群集構造については、海洋・畑・水田において複数の報告がある。海洋においては AOB より AOA が、畑などの耕作地では AOA より AOB が優占していることが明らかとなっている (Ishii *et al.*, 2011)。水田土壌では、AOA と AOB 双方の遺伝子が検出されており、湛水期より落水期においてその存在量が多くなることが明らかになっている (Fujii *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011)。

本研究では、*Gammaproteobacteria* 綱細菌(31.5%), *Thaumarchaeota* 門古細菌(30.8%), *Alphaproteobacteria* 綱細菌(21.7%)由来の *amo* 転写産物が多く検出された(Figure 2.8., Table 2.2.)。この結果から、これまでの報告と同様に、水田土壌におけるアンモニア酸化には AOA・AOB 双方が関わっており、特に *Thaumarchaeota* 門古細菌、*Alpha-, Gammaproteobacteria* 綱細菌がアクティブにアンモニア酸化を行っている可能性が示唆された。

### 2.3.3.2 脱窒関連遺伝子

脱窒反応の経路と、反応に関わる鍵酵素遺伝子を以下に示した。2.3.3.2 では、脱窒反応に関わる微生物群集構造とその遺伝子の転写量について述べる。



#### 2.3.3.2.1 硝酸還元 (*narG/napA*)

硝酸還元に関わる酵素をコードする遺伝子は、*narG/napA* (nitrate reductase)である。これまで *narG/napA* を保有する微生物として、*Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilonproteobacteria* 綱、*Firmicutes* 門、*Bacteroidetes* 門 *Actinobacteria* 門細菌等が報告されている (Watkins *et al.*, 2014; Philippot, 2005)。水田をはじめとした様々な土壌における硝酸還元微生物の群集構造については、PCR ベースの手法による解析例が多くあり、*Alpha-, Beta-, Gamma-, Deltaproteobacteria* 綱細菌が多く検出されてきた (Chen *et al.*, 2012a; Smith *et al.*, 2007; Reyna *et al.*, 2010)。また、伊藤らによる水田土壌のメタゲノム解析においても、PCR ベースの手法による解析と同様の結果が得られている (伊藤博論, 2012)

本研究においては、*Betaproteobacteria* 綱(30.4%), *Deltaproteobacteria* 綱(16.7%)細菌由来の *narG/napA* 転写産物が高頻度に検出された(**Figure 2.9A., Table 2.3.**)。このことから、新潟水田土壌では主に *Betaproteobacteria* 綱, ならびに *Deltaproteobacteria* 綱細菌が硝酸還元を担っている可能性が示された。

#### 2.3.3.2.2 亜硝酸還元 (*nir*)

亜硝酸還元に関わる酵素をコードする遺伝子は *nir* (nitrite reductase)である。これまでにゲノム解読された *nirS*, *nirK* を保有する微生物のうち約 90%が *Alpha*-, *Beta*-, *Gammaproteobacteria* 綱細菌であることが知られている(Jones *et al.*, 2008)。水田やその他の土壌においては、これまでに PCR ベースの手法による多様性解析が多く用いられ、*Alpha*-, *Beta*-, *Gammaproteobacteria* 綱細菌由来の *nirS*, *nirK* が高頻度に検出されてきた(Yoshida *et al.*, 2009, 2010; Smith *et al.*, 2007; Braker *et al.*, 2000)。しかしながら近年、*Actinobacteria* 門, *Bacteroidetes* 門, *Chloroflexi* 門, *Nitrospirae* 門, *Spirochetes* 門, *Planctomycetes* 門細菌, *Euryarchaeota* 門古細菌由来の *nirS*, *nirK* が primer のミスマッチによって検出されてこなかった可能性が示された (Wei *et al.*, 2015)。一方、伊藤らによる水田土壌のメタゲノム解析からは、PCR ベースの手法による解析と同様に *Alpha*-, *Beta*-, *Gammaproteobacteria* 綱細菌由来の *nirS*, *nirK* が高頻度に検出された(伊藤博論, 2012)。

本研究においては、*Thaumarchaeota* 門古細菌(37.6%), *Betaproteobacteria* 綱細菌(26.7%), *Gammaproteobacteria* 綱(14.6%)細菌由来の *nir* 転写産物が多く検出された(**Figure 2.9B., Table 2.4.**)。本研究において見いだされた *Thaumarchaeota* 門古細菌は *Candidatus Nitrosotalea* 属であったが、同古細菌は AOA としても知られており、これまでに NO<sub>2</sub> を生成する経路を触媒する酵素も保有していることがわかっている (Lehtovirta-Morley *et al.*, 2016)。このことから、同属古細菌は、アンモニア酸化によって自ら生成した NO<sub>2</sub> を還元している可能性が考えられた。

#### 2.3.3.2.3 一酸化窒素還元 (*nor*)

一酸化窒素還元に関わる酵素をコードする遺伝子は *nor*(nitric oxide reductase)である。これまでにゲノム解読された *norB* を保有する微生物のうち約 80%が *Alpha*-, *Beta*-, *Gammaproteobacteria* 綱細菌であることが知られている (Jones *et al.*, 2008)。水田土壌やその他の土壌においては、これまでに PCR ベースの手法による多様性解析が多くなされ、*Alpha*-, *Beta*-, *Gammaproteobacteria* 綱細菌由来の *norB* が高頻度に検出されてきた (Chen *et al.*, 2012a; Dandie *et al.*, 2007; Pastorelli *et al.*, 2011)。一方、伊藤らによる水田土壌のメタゲノム解析からは、特に *Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の *norB* が多く検出された(伊藤博論, 2012)。

本研究においては、*Deltaproteobacteria* 綱 (31.3%)、*Acidobacteria* 門 (22.8%), *Gammaproteobacteria* 綱(10.8%)細菌由来の *nor* 転写産物が多く検出された(Figure 2.9C., Table 2.5.)。このことから、伊藤らのメタゲノム解析において検出されていた *Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の *nor* は、実際に転写されていることが確認できた。

#### 2.3.3.2.4 一酸化二窒素還元 (*nos*)

一酸化二窒素還元に関わる酵素をコードする遺伝子は *nosZ*(nitrous oxide reductase)である。これまでにゲノム解読された *nosZ* を保有する微生物のうち約 85%が *Alpha*-, *Beta*-, *Gammaproteobacteria* 綱であることが知られている (Jones *et al.*, 2008)。これまでに様々な土壌における一酸化二窒素還元微生物の多様性解析に PCR ベースの手法が多く用いられ、*Alpha*-, *Beta*-, *Gammaproteobacteria* 綱細菌由来の *nosZ* が多く検出されてきた (Chen *et al.*, 2012b; Pastorelli *et al.*, 2011; Zumft *et al.*, 2007)。しかしながら近年、従来の *nosZ*-primer を用いた場合、微生物群集の多様性を低く見積もってしまう可能性があることが報告されている (Jones *et al.*, 2013)。一方、伊藤らによる水田土壌のメタゲノム解析では、従来の PCR ベースの手法では見落とされてきた *Deltaproteobacteria* 由来の *nosZ* が多く検出さ

れた (伊藤博論, 2012)。

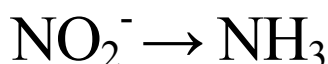
本メタトランスクリプトーム解析においては、*Deltaproteobacteria* 綱(19.6%), *Bacteroidetes* 門(13.4%), *Betaproteobacteria* 綱(10.5%)由来の *nos* 転写産物が多く検出された (Figure 2.9D., Table 2.6.)。このことから、伊藤らのメタゲノム解析において検出されていた *Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の *nosZ* は、実際に転写されていることが確認できた。

#### 2.3.3.2.5 脱窒反応のまとめと考察

これまで脱窒反応は、*Alpha*-, *Beta*-, *Gammaproteobacteria* に代表される Typical な脱窒菌が一連の反応全てを行っていると考えられてきた (Sanford *et al.*, 2012; Ishii *et al.*, 2011)。本研究で解析した水田土壌においては、*Beta*-, *Alpha*-, *Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の *nar* 転写産物、*Thaumarchaeota* 門古細菌、*Beta*-, *Gamma*-, *Alphaproteobacteria* 綱細菌由来の *nir* 転写産物、*Delta*-, *Beta*-, *Gammaproteobacteria* 綱細菌由来の *nor* 転写産物、*Deltaproteobacteria* 綱、*Bacteroidetes* 門細菌由来の *nos* 転写産物が多く検出された (Figure 2.9A-D.)。また、全ての脱窒反応の全てのステップを総合して転写産物が最も多く検出された門は *Proteobacteria* 門であった。中でも、*Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, *Deltaproteobacteria* 綱細菌の脱窒遺伝子転写産物が優占していたが、それぞれの遺伝子転写産物が由来する微生物については全く異なる群集組成が見られた。特に *nir* については *Deltaproteobacteria* 由来の転写産物が全く検出されず、Typical な脱窒菌として多く研究されてきた *Alpha*-, *Betaproteobacteria* 綱細菌の検出頻度が *Deltaproteobacteria* 綱細菌と比べて高かった。*nar*, *nor*, *nos* 転写産物が多く検出された *Deltaproteobacteria* 綱細菌は Atypical な脱窒菌 (Sanford *et al.*, 2012) であり、同綱の中で *nir* を保有する細菌として KEGG に登録されている属は *Bdellovibrio* のみである (Ellis *et al.*, 2007)。つまり、ほとんどの *Deltaproteobacteria* 綱細菌は  $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$  のステップを担う酵素をコードする遺伝子を持っていないのである。

これらの結果から、水田土壌における脱窒反応は、従来知られてきた *Alpha-*, *Beta-*, *Gammaproteobacteria* に代表される Typical な脱窒菌のみならず *Deltaproteobacteria* の様な Atypical な脱窒菌も大きく貢献している可能性が考えられた。

### 2.3.3.3 DNRA 関連遺伝子 (*nrf*)



上記の反応に関わる酵素をコードする遺伝子は、*nrf*(nitrite reductase cytochrome c-552) である。これまでに水田土壌においては、安定同位体でラベルした硝酸を用いた実験から、DNRA が起こっている可能性が報告されてきた (Buresh *et al.*, 1978; Yin *et al.*, 2002)。しかしながら、水田土壌における DNRA に関わる微生物群集についての知見が得られているのは伊藤らのメタゲノム解析のみである (伊藤博論, 2012)。このメタゲノム解析によって、水田土壌では *Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の *nrf* が優占していることが明らかとなったが、その *nrf* 遺伝子が転写されているのか否かは未だ不明のままであった。また、水田土壌以外においては、河口の堆積物や畑土壌中の *nrf* の DNA ベースによる多様性解析が数例報告されているのみである (Smith *et al.*, 2007; Welsh *et al.*, 2014)。これら培養に依存しない解析手法においては、*nrf* は主に *Deltaproteobacteria* 綱細菌由来のものが検出されている。一方、培養に依存しない解析手法が確立する前に広く行われていた培養依存法では、DNRA 細菌として単離されたものの多くが *Firmicutes* 門, *Gammaproteobacteria* 綱細菌であった (Smith *et al.*, 1981)。

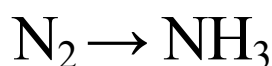
本研究におけるメタトランスクリプトーム解析では、*Deltaproteobacteria* 綱(71.5 %)、*Verrucomicrobia* 門 (5.5%)細菌由来の *nrf* 転写産物が検出された(Figure 2.9E., Table 2.7.)。

RNA を用いた本解析において、DNRA 反応は主に *Deltaproteobacteria* 綱細菌が担っていることが示唆された。従来の培養依存法で多く検出されてきた *Firmicutes* 門,



*Gammaproteobacteria* 綱細菌は、非培養依存法である PCR やメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析では検出頻度が低いことがわかった。この理由として、本解析において優占していた *Deltaproteobacteria* 綱細菌は難培養性であり、これまでに多く培養されてきた DNRA 能を持つ *Firmicutes* 門, *Gammaproteobacteria* 綱細菌と比較して培養されにくいいため、培養依存法ではその寄与が見落とされてきたのではないかと考えられた。

#### 2.3.3.4 窒素固定関連遺伝子 (*nif*)



上記の反応に関わる酵素をコードする遺伝子は、*nif*(nitrogenase)である。水田土壌における窒素固定微生物は、古くから培養法や非培養法を用いて研究されてきた。Islam らによって行われたアセチレン還元活性測定と *nifH* スクリーニングでは、水田における窒素固定微生物として *Alpha-*, *Beta-*, *Gammaproteobacteria* 綱、*Firmicutes* 門細菌が検出された (Islam *et al.*, 2010)。PCR ベースの手法を用いた研究では、これまでに様々な土壌において *Alpha-*, *Beta-*, *Gammaproteobacteria* 綱、*Firmicutes* 門細菌由来の *nifH* が検出されている (Widmer *et al.*, 1999; Poly *et al.*, 2001; Coelho *et al.*, 2008; Shu *et al.*, 2012; Wartainen *et al.*, 2008; Mårtensson *et al.*, 2009)。一方、Mårtensson らによる水田土壌を対象とした Clone library 解析からは、*Alpha-*, *Beta-*, *Gammaproteobacteria* 綱、*Firmicutes* 門細菌だけでなく *Deltaproteobacteria* 綱の *Geobacter* 属細菌も複数検出されている (Mårtensson *et al.*, 2009)。また、パイロシーケンシングを用いた *nifH* の多様性解析においても、*Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, *Deltaproteobacteria* 綱、*Firmicutes* 門細菌が検出されている (Collavino *et al.*, 2014)。本研究では、*Cyanobacteria* 門(55.5%)ならびに *Deltaproteobacteria* 綱細菌(32.9%)由来の *nif* 転写産物が多く検出された (Figure 2.9F., Table 2.8.)。

本研究では、これまでほとんど着目されてこなかった *Deltaproteobacteria* 綱細菌が水

田土壌の窒素固定に大きく寄与している可能性が示唆された。

## 2.4 本章のまとめ

本研究における土壌 Eh の時期別変動、 $\text{Fe}^{2+} \cdot \text{NH}_4^+$ 濃度、脱窒・硝化活性の層別・時期別変動は、2009 年度の詳細なプロファイルと一致していた (**Figure 2.1. – 2.4.**)。このことから、上記のパラメータに関しては、同様の変化が毎年起こっていることが示唆された。

水田土壌における細菌の群集構造は、これまでの研究において *Deltaproteobacteria* 綱細菌、特に *Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌が優占していることが明らかになっていた (Itoh *et al.*, 2013; Shrestha *et al.*, 2009)。本研究では初めて、*Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌が湛水期の下層部において特に優占していることが明らかになった (**Figure 2.3A.**)。また、*Deltaproteobacteria* 綱細菌の中でも好氣的な *Chondromyces* 属・*Sorangium* 属細菌が、落水期において増加することも示唆された(**Figure 2.3B.**)。古細菌の中では *Methanomicrobia* 綱, *unclassified Thaumarchaeota* 門の優占が見られ、本研究において初めて、湛水期の Z 層でメタン生成古細菌として知られる *Methanomicrobia* 綱の割合が増加することがわかった(**Figure 2.3C.**)。これらのことから、優占している微生物門に大きな層別・時期別の変動はなかったものの、綱・属レベルでは層別・時期別の変動が見られることが確認された。本研究では、年間を通した水田土壌における層別の微生物群集構造の変動を初めて明らかにした。

本研究における機能遺伝子の解析から、水田土壌の窒素循環反応に関与する微生物群集の詳細も明らかになった。特に還元的窒素循環に関わる微生物群集については、これまでの PCR をメインとした解析のみによって推定されてきたものと大きく異なっており、 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$  のステップ以外において *Deltaproteobacteria* 綱の優占が見られた(**Figure 2.10.**)。 *Deltaproteobacteria* 綱細菌は *Bdellovibrio* 属を除いて *nir* を保有していないことは

先述した(Ellis *et al.*, 2007)。しかしながら、*Deltaproteobacteria* 綱細菌の多くは  $\text{NO}_2^-$  を還元する手段を持たないのではなく、 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_3$  の反応を担う *nrf* を保有しており、*nir* を保有する同綱細菌と比較して多様性が高いことがわかっている(**Table 2.9**)。このことから、*Deltaproteobacteria* 綱細菌は、**Figure 2.11** に示したような、部分的な脱窒反応と亜硝酸を還元する DNRA、窒素固定といった還元的窒素循環反応を主に担っている可能性が初めて示唆された。

## 参考文献

伊藤博士論文. (2012) メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析法を用いた水田土壌微生物群集の構造と機能の網羅的解明.

土壌養分分析法. (1970) 土壌養分測定法委員会編, pp.185. pp.430 養賢堂

檜原剛士, 宇佐美正一郎. (1976) 水田土壌における還元過程の微生物学的研究 (第 1 報) : 根箱土壌の還元過程について. 土肥誌. 47:367-372.

樋口太重, 吉野喬 (1986) 高収性水稻の窒素吸収特性について. 土肥誌. 57:134-141.

Akiyama H, Yan X, Yagi K. (2000) Estimation of emission factors for fertilizer-induced direct  $\text{N}_2\text{O}$  emissions from agricultural soils in Japan: Summary of available data. Soil Sci Plant Nutr 52:774-787.

Anderson RT, Vrionis HA, Ortiz-Bernad I, Resch CT, Long PE, Dayvault R, *et al.* (2003). Stimulating the in situ activity of *Geobacter* species to remove uranium from the groundwater of a uranium-contaminated aquifer. Appl Environ Microbiol. 69:5884-5891.

Bazylinski DA, Dean AJ, Schuler D, Phillips EJ, Lovley DR. (2000)  $\text{N}_2$ -dependent growth and nitrogenase activity in the metal-metabolizing bacteria, *Geobacter* and *Magnetospirillum* species. Environ Microbiol. 2:266-273.

Braker G, Zhou J, Wu L, Devol AH, Tiedje JM. (2000) Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Appl Environ Microbiol.* 66:2096–2104.

Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, Forterre P. (2008) Mesophilic *Crenarchaeota*: proposal for a third archaeal phylum, the *Thaumarchaeota*. *Nat Rev Microbiol.* 6:245-252.

Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. (2001) In George M Garrity ed. *The Proteobacteria, part c the alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria, bergey's manual of systematic bacteriology* 2nd edn, vol, Two, Springer: New York, NY, USA.

Buresh RJ, and Patrick WH. (1978) Nitrate reduction to ammonium in anaerobic soil. *Soil Sci Soc Am J.* 42:913–918.

Castenholz RW. (2001) In George M Garrity ed. *The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria, bergey's manual of systematic bacteriology* 2nd edn, vol, One, Springer: New York, NY, USA.

Chen X, Zhang LM, Shen JP, Wei WX, He JZ. (2011) Abundance and community structure of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in an acid paddy soil. *Biol Fert Soils.* 47:323-331.

Chen Z, Liu J, Wu M, Xie X, Wu J, Wei W. (2012a) Differentiated response of denitrifying communities to fertilization regime in paddy soil. *Microb Ecol.* 63:446-59.

Chen Z, Hou H, Zheng Y, Qin H, Zhu Y, Wu J, Wei W. (2012b) Influence of fertilization regimes on a *nosZ*-containing denitrifying community in a rice paddy soil. *J Sci Food Agric*. 92:1064-1072.

Coelho MR, de Vos M, Carneiro NP, Marriel IE, Paiva E, Seldin L. (2008) Diversity of *nifH* gene pools in the rhizosphere of two cultivars of *sorghum* (*Sorghum bicolor*) treated with contrasting levels of nitrogen fertilizer. *FEMS Microbiol Lett*. 279:15-22.

Collavino MM, Tripp HJ, Frank IE, Vidoz ML, Calderoli PA, Donato M, *et al.* (2014) *nifH* pyrosequencing reveals the potential for location-specific soil chemistry to influence N<sub>2</sub>-fixing community dynamics. *Environ Microbiol*. 16:3211-3223.

Daims H, Lebedeva EV, Pjevac P, Han P, Herbold C, Albertsen M, *et al.* (2015) Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*. 528;504-509.

Dandie CE, Miller MN, Burton DL, Zebarth BJ, Trevors JT, Goyer C. (2007) Nitric oxide reductase-targeted real-time PCR quantification of denitrifier populations in soil. *Appl Environ Microbiol*. 73:4250-4258.

Ellis MJ, Grossmann JG, Eady RR, Hasnain SS. (2007) Genomic analysis reveals widespread occurrence of new classes of copper nitrite reductases. *J Biol Inorg Chem*. 12:1119-1127.

Fujii C, Nakagawa T, Onodera Y, Oatsutani N, Sasada K, Takahashi R, Tokuyama T. (2010) Succession and community composition of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in bulk soil of a Japanese paddy field. *Soil Sci Plant Nutr*. 56:212-219.

Garcia JL, Patel BKC, Ollivier B. (2000) Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe*. 6:205-226.

Hallam SJ, Mincer TJ, Schleper C, Preston CM, Roberts K, Richardson PM, *et al.* (2006) Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine *Crenarchaeota*. *PLoS Biol* 4, e95 10.1371

Holmes AJ, Costello A, Lidstrom ME, Murrell JC. (1995) Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiol Lett*. 132:203-208.

Hori T, Müller A, Igarashi Y, Conrad R, Friedrich MW. (2010) Identification of iron-reducing microorganisms in anoxic rice paddy soil by <sup>13</sup>C-acetate probing. *ISME J*. 4:267-278.

Ishii S, Ikeda S, Minamisawa K, Senoo K. (2011) Nitrogen cycling in rice paddy environments: past achievements and future challenges. *Microbes Environ*. 26:282-292.

Islam R, Trivedi P, Madhaiyan M, Seshadri S, Lee G, Yang J, *et al.* (2010) Isolation, enumeration, and characterization of diazotrophic bacteria from paddy soil sample under long-term fertilizer management experiment. *Biol Fertil Soils*. 46:261-269.

Itoh H, Ishii S, Shiratori Y, Oshima K, Otsuka S, Hattori M, Senoo K. (2013) Seasonal transition of active bacterial and archaeal communities in relation to water management in paddy soils. *Microbes Environ* 28:370-380.

Jones CM, Stres B, Rosenquist M, Hallin S. (2008) Phylogenetic Analysis of Nitrite, Nitric Oxide, and Nitrous Oxide Respiratory Enzymes Reveal a Complex Evolutionary History for Denitrification. *Mol Biol Evol.* 25:1955-1966.

Jones CM, Graf DR, 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.

Kim Y. and Liesack W. (2015) Differential assemblage of functional units in paddy soil microbiomes. *PLoS One.* 10:e0122221.

Kishimoto N, Nosako Y, Tano T. (1991) *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov.: An Acidophilic Chemoorganotrophic Bacterium Containing Menaquinone from Acidic Mineral Environment. *Curr Microbiol.* 22:1-7.

Könneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437:543–546.

Kudo K, Yamaguchi N, Makino T, Ohtsuka T, Kimura K, Dong DT, Amachi S. (2013) Release of arsenic from soil by a novel dissimilatory arsenate-reducing bacterium, *Anaeromyxobacter* sp. strain PSR-1. *Appl Environ Microbiol.* 79:4635-4642.

Kumada K, Asami T. (1958) A new method for determining ferrous iron in paddy soils. *Soil Plant Food.* 3: 187–193.



Lehtovirta-Morley LE, Sayavedra-Soto LA, Gallois N, Schouten S, Stein LY, Prosser JI, Nicol GW. (2016) Identifying Potential Mechanisms Enabling Acidophily in the Ammonia-Oxidizing Archaeon "*Candidatus Nitrosotalea devanater*". Appl Environ Microbiol. 82:2608-2619.

Martens-Habben W, Stahl DA. (2011) Nitrogen metabolism and kinetics of ammonia-oxidizing archaea. Methods Enzymol. 496:465-487.

Mårtensson L, Diez B, Wartiainen I, Zheng W, El-Shehawy R, Rasmussen U. (2009) Diazotrophic diversity, *nifH* gene expression and nitrogenase activity in a rice paddy field in Fujian, China. Plant Soil. 325:207-218.

Méthé BA, Webster J, Nevin K, Butler J, Lovley DR. (2005) DNA microarray analysis of nitrogen fixation and Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. Appl Environ Microbiol. 71:2530-2538.

Men Y, Han P, Helbling DE, Jehmlich N, Herbold C, Gulde R, *et al.* (2016) Biotransformation of Two Pharmaceuticals by the Ammonia-Oxidizing Archaeon Nitrososphaera gargensis. Environ Sci Technol. 50:4682-4692.

Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M, *et al.* (2008) The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. BMC Bioinformatics. 19: 386.

Nakanishi H, Ogawa I, Ishimaru Y, Mori S, Nishizawa N. (2006) Iron deficiency enhances cadmium uptake and translocation mediated by the Fe<sup>2+</sup> transporters OsIRT1 and OsIRT2 in rice. *Soil Sci Plant Nutr.* 52: 464-469.

Narasingarao P, Häggblom MM. (2007) *Pelobacter seleniigenes* sp. nov., a selenate-respiring bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57:1937-1942.

Noll M, Matthies D, Frenzel P, Derakshani M, Liesack W. (2005) Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. *Environ Microbiol.* 7:382-395.

Park SJ, Kim JG, Jung MY, Kim SJ, Cha IT, Ghai R, Martín-Cuadrado AB, Rodríguez-Valera F, Rhee SK. (2012) Draft genome sequence of an ammonia-oxidizing archaeon, "*Candidatus Nitrosopumilus sediminis*" AR2, from Svalbard in the Arctic Circle. *J Bacteriol.* 194:6948-6949.

Pastorelli R, Landi S, Trabelsi D, Piccolo R, Mengoni A, Bazzicalupo M, *et al.* (2011) Effects of soil management on structure and activity of denitrifying bacterial communities. *Appl Soil Ecol.* 49:46-58.

Philippot L. (2005) Tracking nitrate reducers and denitrifiers in the environment. *Biochem Soc Trans.* 33:200-204.

Poly F, Ranjard L, Nazaret S, Gourbière F, Monrozier LJ. (2001) Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. *Appl Environ Microbiol.* 67:2255-2262.

Prakash O, Gihring TM, Dalton DD, Chin KJ, Green SJ, Akob DM, Wanger G, Kostka JE.(2010) *Geobacter daltonii* sp. nov., an Fe(III)- and uranium(VI)-reducing bacterium isolated from a shallow subsurface exposed to mixed heavy metal and hydrocarbon contamination. Int J Syst Evol Microbiol. 60:546-553.

Reyna L, Wunderlin DA, Genti-Raimondi S. (2010) Identification and quantification of a novel nitrate-reducing community in sediments of Suquí a River basin along a nitrate gradient. Environ Pollut. 158:1608-1614.

Riederer-Henderson MA, Wilson PW. (1970) Nitrogen fixation by sulphate-reducing bacteria. J Gen Microbiol. 61:27-31.

Sakai S, Imachi H, Hanada S, Ohashi A, Harada H, Kamagata Y (2008). *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order *Methanocellales* ord. nov.”. Int J Syst Evol Mixrobiol. 58:929-936.

Sanford RA, Cole JR, Tiedje JM. (2002) Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halorespiring facultative anaerobic myxobacterium. Appl Environ Microbiol. 68:893-900.

Sanford RA, Wagner DD, Wu Q, Chee-Sanford JC, Thomas SH, Cruz-García C, *et al.* (2012) Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils. Proc Natl Acad Sci USA. 109:19709-19714.

Schmieder, R. and R. Edwards. (2011) Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*. 27:863-864.

Schneiker S, Perlova O, Kaiser O, Gerth K, Alici A, Altmeyer MO *et al.* (2007) Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nat Biotechnol*. 25(11):1281-1289.

Shen T. L., Stieglmeier M., Dai J. L., Urich T., Schleper C. (2013) Responses of the terrestrial ammonia-oxidizing archaeon *Ca. Nitrososphaera viennensis* and the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrospira multiformis* to nitrification inhibitors. *FEMS Microbiol Lett*. 344:121–129.

Shrestha PM, Kube M, Reinhardt R, Liesack W. (2009) Transcriptional activity of paddy soil bacterial communities. *Environ Microbiol*. 11:960-970.

Shu W, Pablo GP, Jun Y, Danfeng H. (2012) Abundance and diversity of nitrogen-fixing bacteria in rhizosphere and bulk paddy soil under different duration of organic management. *World j Micobiol Biotechnol*. 28:493-503.

Silveira CM, Besson S, Moura I, Moura JJ, Almeida MG. (2010) Measuring the cytochrome C nitrite reductase activity-practical considerations on the enzyme assays. *Bioinorg Chem Appl*. pii:634597.

Smith CJ, Nedwell DB, Dong LF, Osborn AM. (2007) Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nrfA*), and their transcripts in estuarine sediments. *Appl Environ Microbiol*. 73:3612-3622.

Smith MS, Zimmerman K. (1981) Nitrous oxide production by non-denitrifying soil nitrate reducers. *Soil Sci Soc Am J.* 45:865–871.

Steppe TF, Paerl HW. (2002) Potential N<sub>2</sub> fixation by sulfate-reducing bacteria in a marine intertidal microbial mat. *Aquat Microb Ecol.* 28:1-12.

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.

Sung Y, Fletcher KE, Ritalahti KM, Apkarian RP, Ramos-Hernández N, Sanford RA, *et al.* (2006) *Geobacter lovleyi* sp. nov. strain SZ, a novel metal-reducing and tetrachloroethene-dechlorinating bacterium. *Appl Environ Microbiol.* 72:2775-2782.

Thomas SH, Wagner RD, Arakaki AK, Skolnick J, Kirby JR, Shimkets LJ, Sanford RA, Löffler FE. (2008) The mosaic genome of *Anaeromyxobacter dehalogenans* strain 2CP-C suggests an aerobic common ancestor to the delta-proteobacteria. *PLoS One* 3:e2103.

Turner S, Pryer KM, Miao VP, Palmer JD. (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among *cyanobacteria* and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Eukaryot Microbiol.* 46:327-338.

Valentine DL. (2007) Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nat Rev Microbiol.* 5:316-323.

Ward NL, Challacombe JF, Janssen PH, Henrissat B, Coutinho PM, Wu M, *et al.* (2009) Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Appl Environ Microbiol.* 75:2046-2056.

Wartiainen I, Eriksson T, Zheng W, Rasmussen U. (2008) Variation in the active diazotrophic community in rice paddy—*nifH* PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. *Appl Soil Ecol.* 39:65-75.

Watkins CS, Stolz JF, Basu P. (2014) Nitrate and periplasmic nitrate reductases. *Chem Soc Rev.* 43:676-706.

Wei W, Isobe K, Nishiawa T, Zhu L, Shiratori Y, Ohte N, *et al.* (2015) Higher diversity and abundance of denitrifying microorganisms in environments than considered previously. *ISME J.* 9:1954-1965.

Welsh A, Joanne C, Chee-Sanford, Connor LM, Löffler FE, Sanford RA. (2014) Refined *NrfA* phylogeny improves PCR-based *nrfA* gene detection. *Appl Environ Microbiol.* 80:2110-2119.

Widmer F, Shaffer BT, Porteous LA, Seidler RJ. (1999) Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon cascade mountain range. *Appl Environ Microbiol.* 65:374-80.

Wu Q, Sanford RA, Löffler FE. (2006) Uranium(VI) reduction by *Anaeromyxobacter dehalogenans* strain 2CP-C. *Appl Environ Microbiol.* 72:3608-3614.

Yin SX, Chen D, Chen LM, Edis R. (2002) Dissimilatory nitrate reduction to ammonium and responsible microorganisms in two Chinese and Australian paddy soils. *Soil Biol Biochem.* 34:1131–1137.

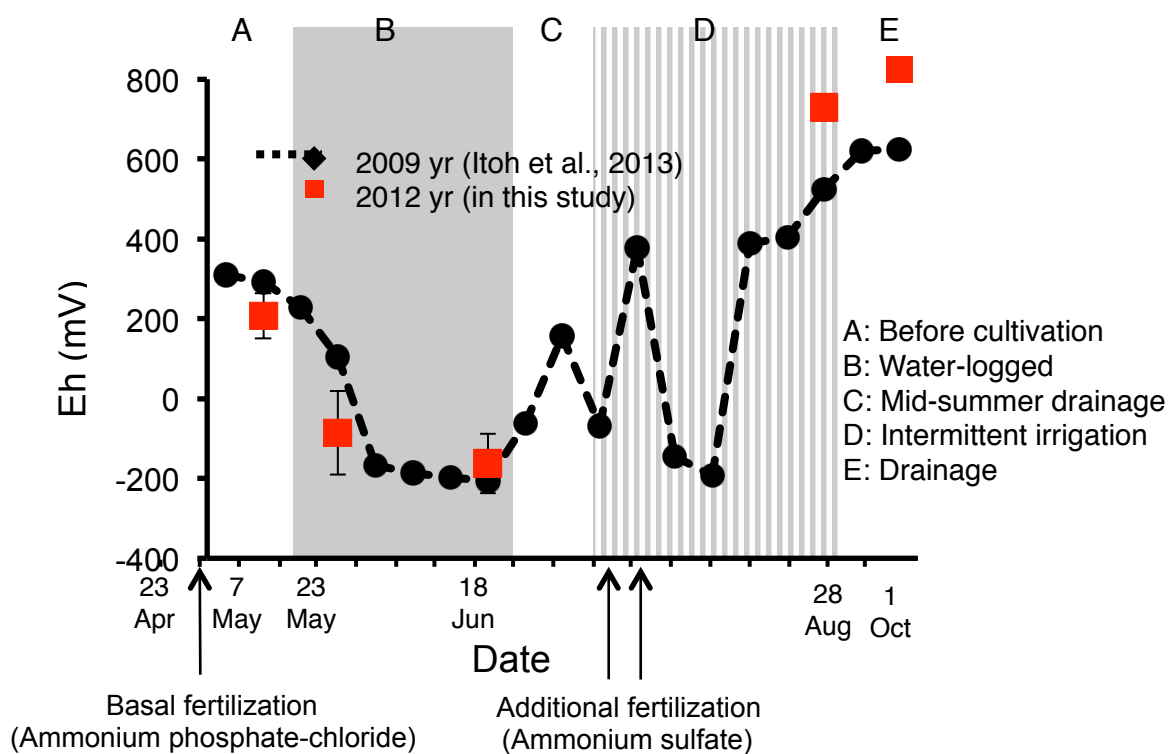
Yoshida M, Ishii S, Otsuka S, Senoo K. (2009) Temporal shifts in diversity and quantity of *nirS* and *nirK* in a rice paddy field soil. *Soil Biol Biochem.* 41:2044-2051.

Yoshida M, Ishii S, Otsuka S, Senoo K. (2010) *nirK*-harboring denitrifiers are more responsive to denitrification inducing conditions in rice paddy soil than *nirS*-harboring bacteria. *Microbes Environ.* 25:45-48.

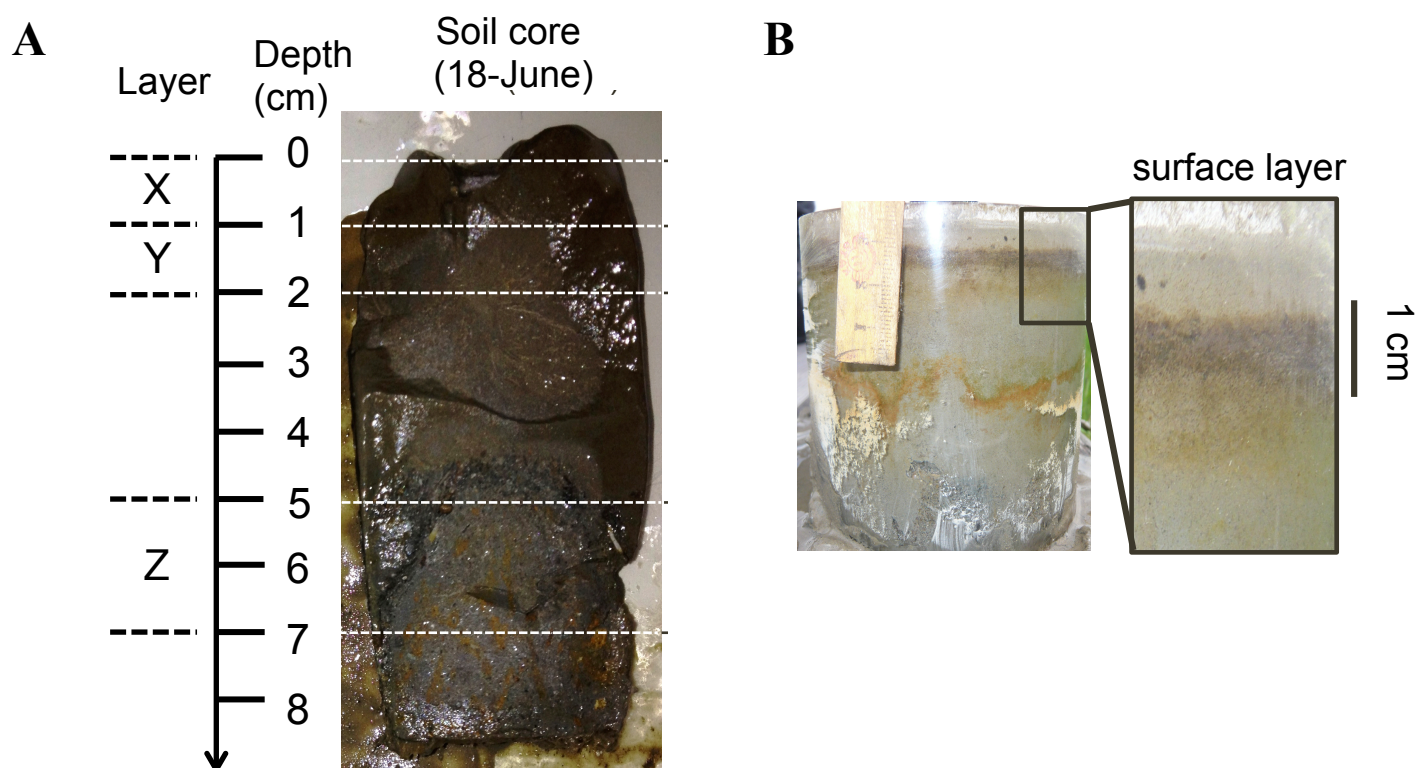
Yoshinari T, and Knowles R. (1976) Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. *Biochem Biophys Res Comm.* 69:705-710.

Zhao J, Wang B, Jia Z. (2015) Phylogenetically distinct phylotypes modulate nitrification in a paddy soil. *Appl Environ Microbiol.* doi: 10.1128.

Zumft WG, Kroneck PM. (2007) Respiratory transformation of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) to dinitrogen by Bacteria and Archaea. *Adv Microb Physiol.* 52:107-227.

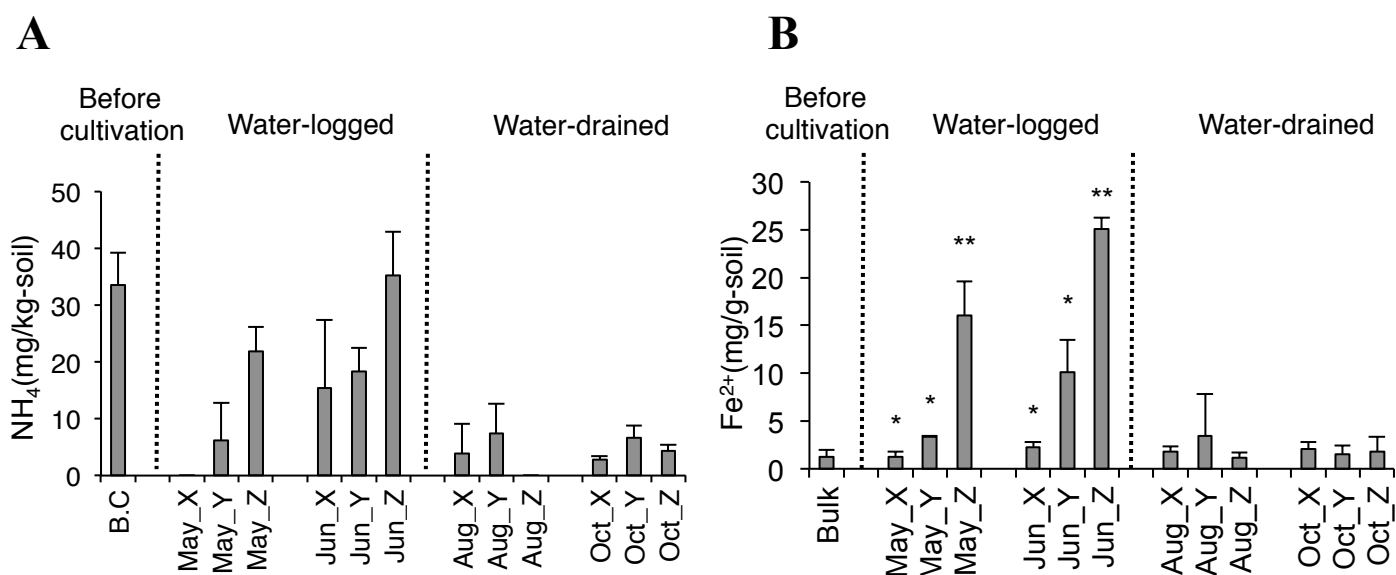


**Figure 2.1.** Cultivation and water management in the studied paddy field. Picture and separation of oxidation, reduction and intermediate layers (X, Z and Y).

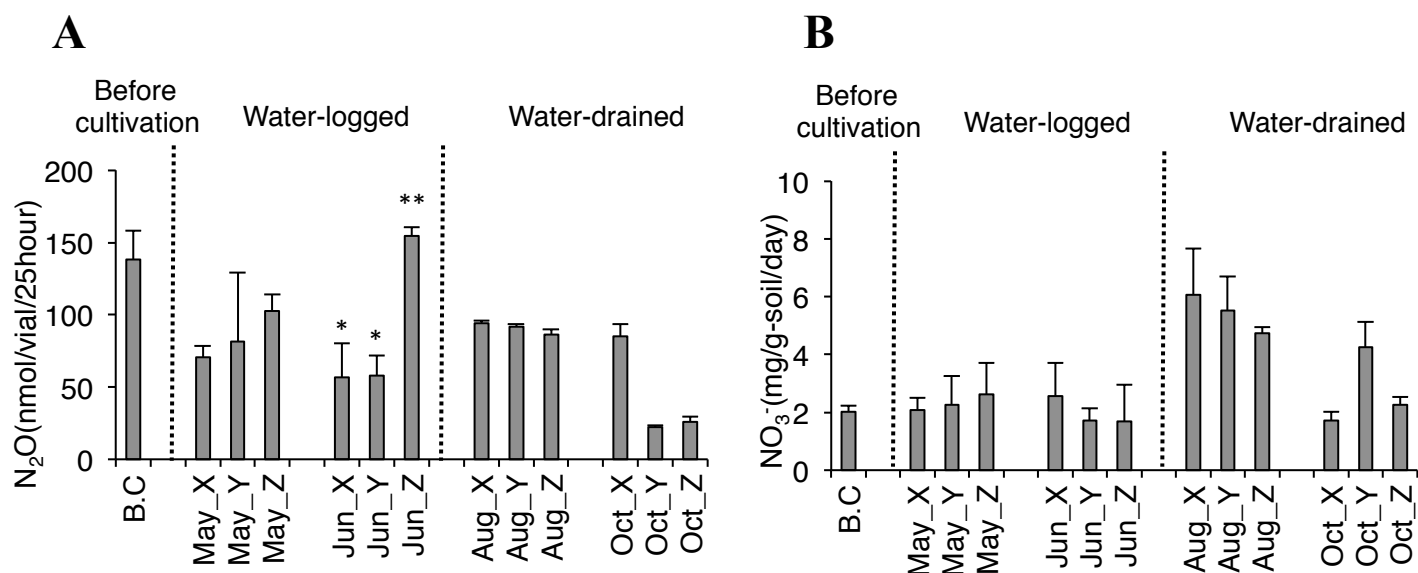


**Figure 2.2.** Soil cores collected from the paddy field. Photographs (A:cross-section; B:whole) for the soil core collected on 18 Jun 2012 were shown. Three layers, X, Y and Z were sampled from soil cores collected during the cultivating season and examined in this study (A).

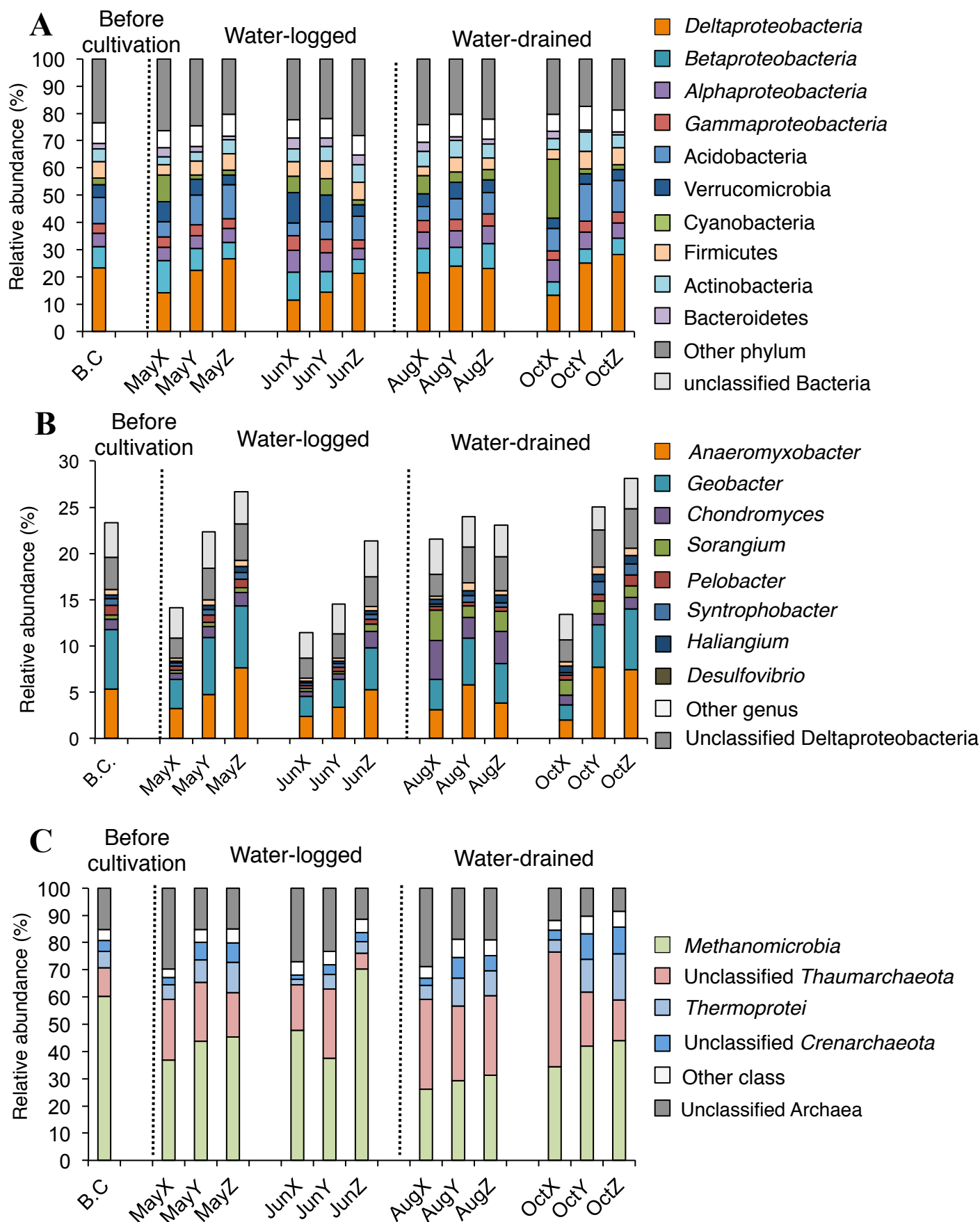




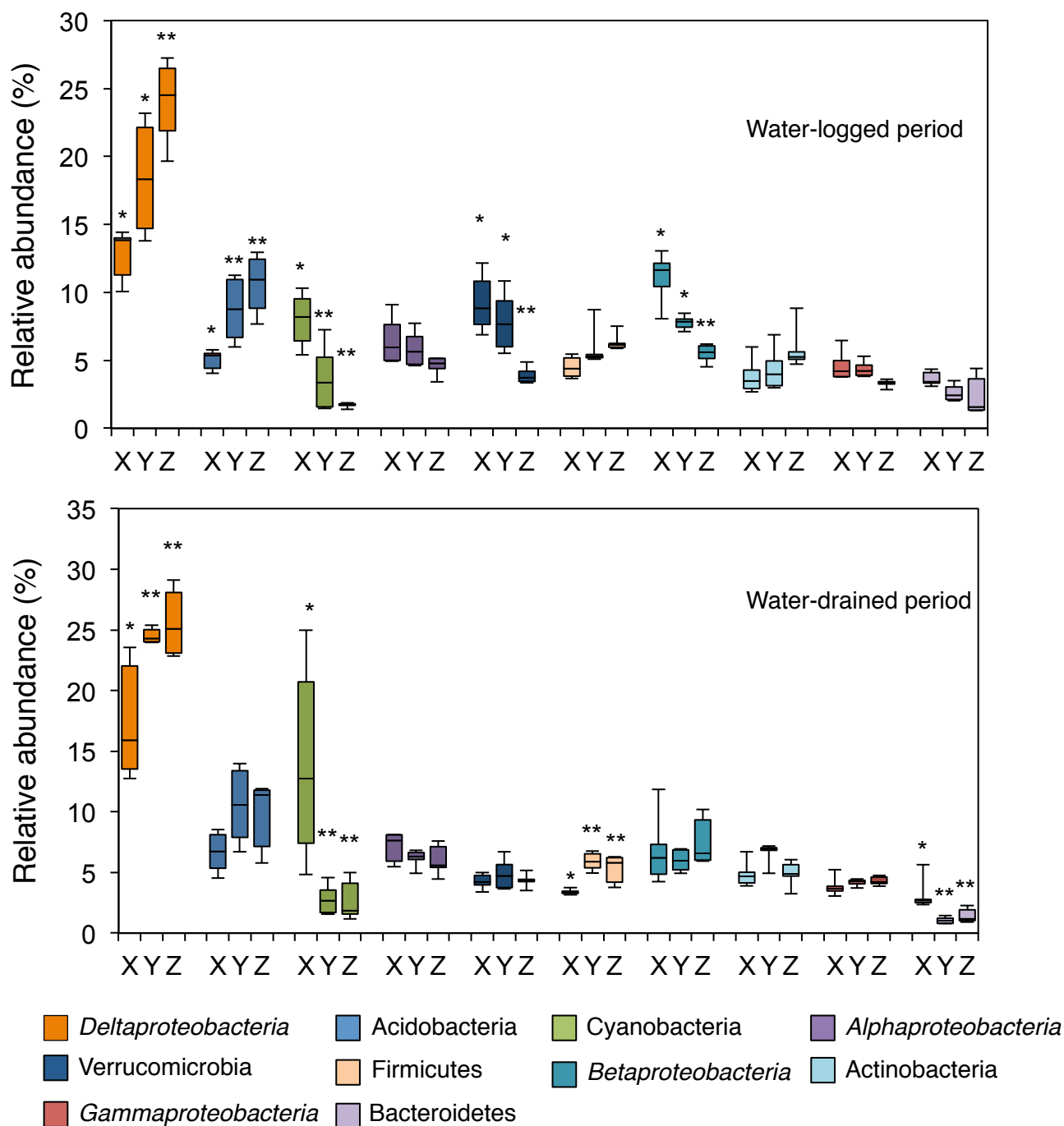
**Figure 2.3.** Concentrations of reduced  $\text{NH}_4^+$  (A) and iron (B) in the paddy soils from three depth (X, Y, and Z) in different periods. Data is shown as mean value with standard error of three replicates.



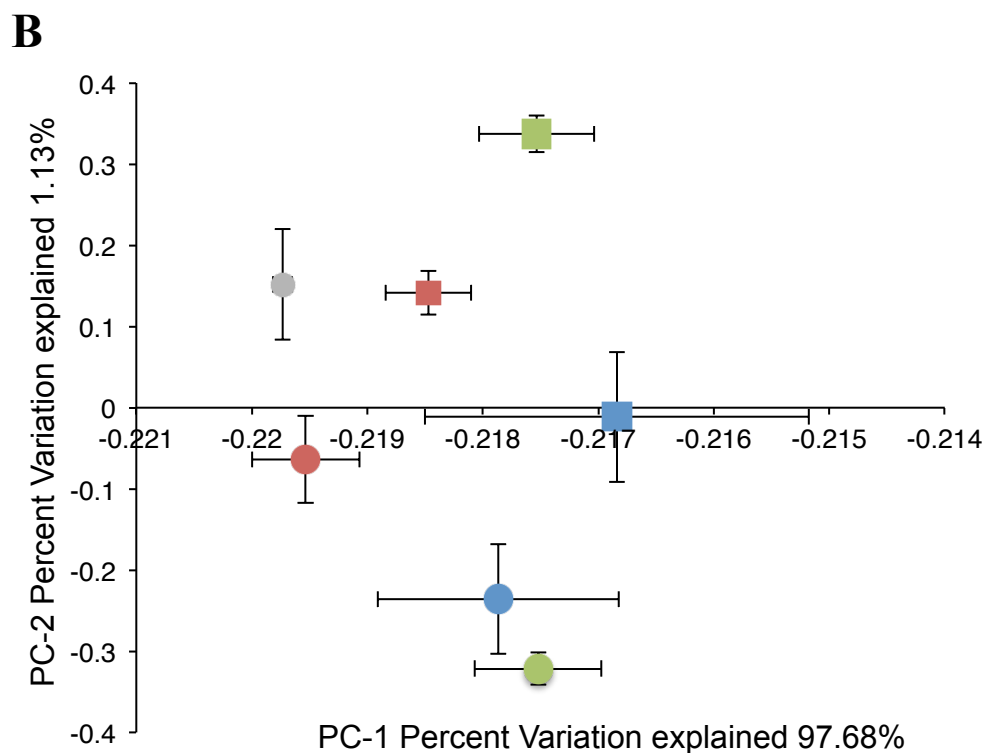
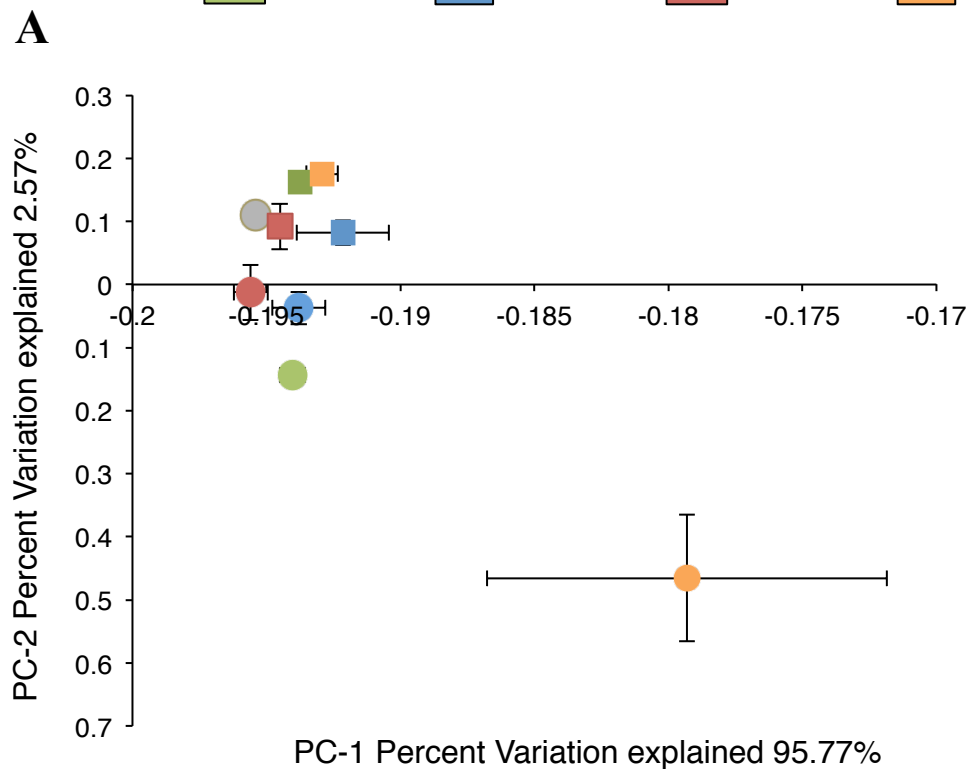
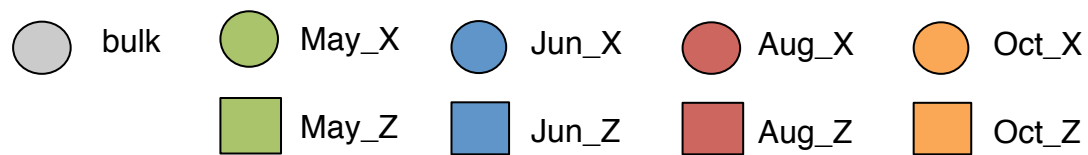
**Figure 2.4.** Denitrification activity (A) and Nitrification activity (B) in the paddy soils from three depth (X, Y, and Z) in different periods. Data is shown as mean value with standard error of three replicates. Different asterisks indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).



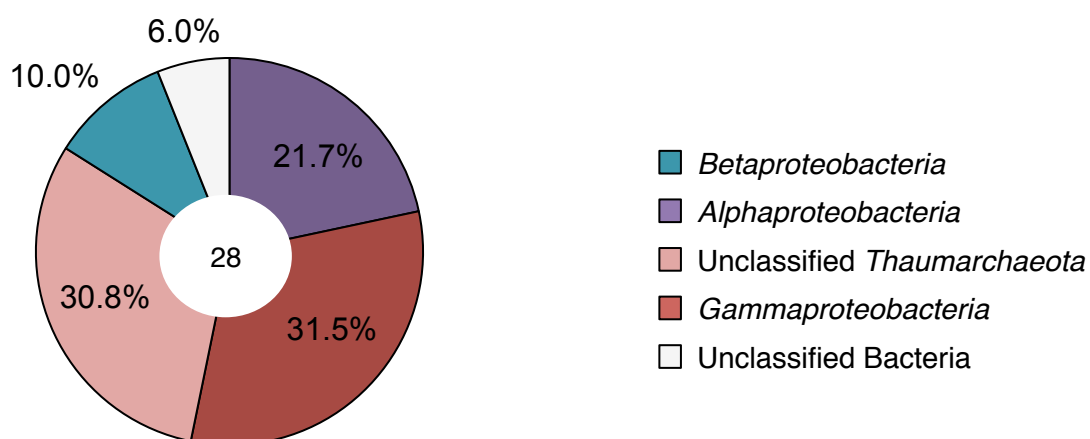
**Figure 2.5.** Relative abundance of rRNA of (A) Bacterial phyla, (B) *Deltaproteobacterial* genera and (C) Archaeal class in metatranscriptome in the paddy soils from three depth (X, Y, and Z) in different periods. Most dominant bacterial phyla, Proteobacteria, was classified and shown at the class level as *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, and *Delta*-proteobacteria in Figure (A). Data is shown as mean value of three replicates.



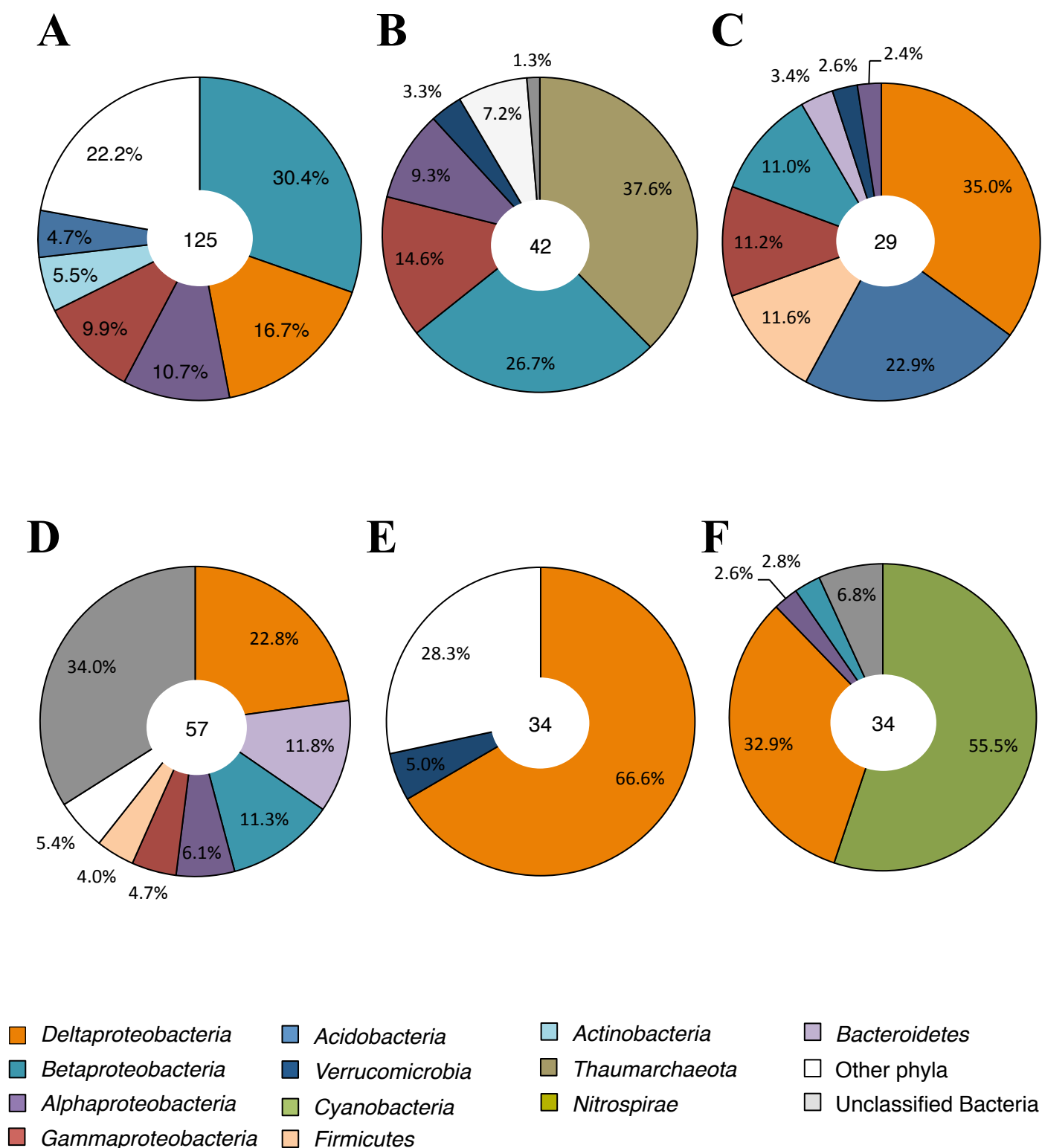
**Figure 2.6.** Change in the relative abundance of rRNA of proteobacterial class and other bacterial phylum in metatranscriptome with soil depth (X, Y, and Z) in the water-logged and drained periods in the paddy field. Data is shown as mean value with standard error of three replicates. Different astarisks indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).



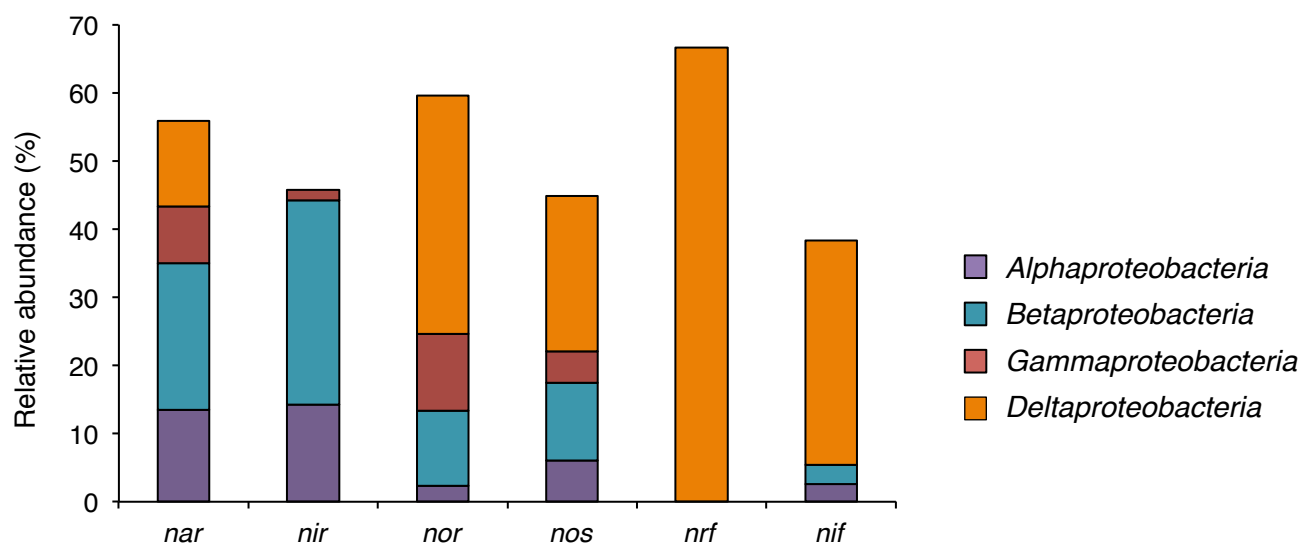
**Figure 2.7.** Principal Coordinate Analysis (PCoA) plots based on rRNAseq of Bacteria among all samples(A) and except for October(B). PCoA plots were generated by using the Fast UniFrac analysis based on weighted algorithm with normalization. The values in parentheses show the percentage of community variation explained by each coordinate. Data is shown as mean value of three replicates.



**Figure 2.8.** The Composition of genes relevant to ammonia oxidation (*amo*) assigned Bacterial phyla and Archaeal class in the paddy soils. Most dominant bacterial phyla, Proteobacteria, was classified and shown at the class level as *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, and *Delta*-proteobacteria. Number in the center circles indicate the sum of annotated sequences.

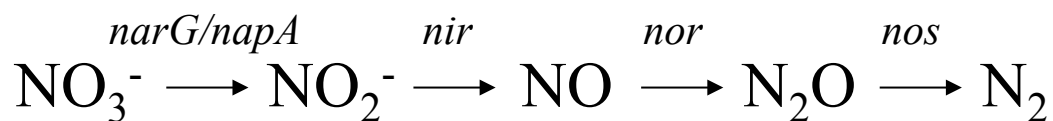


**Figure 2.9.** The composition of genes relevant to denitrification(*nar*:A, *nir*:B, *nor*:C, *nos*:D), DNRA(*nrf*:E), and nitrogen fixation (*nif*:F) assigned bacterial phylum in the paddy soils. Most dominant bacterial phyla, Proteobacteria, was classified and shown at the class level as *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, and *Delta*-proteobacteria. Number in the center circles indicate the sum of annotated sequences.



**Figure 2.10.** Composition of the assigned proteobacterial class for mRNA relevant to denitrification (*nar*, *nir*, *nor* and *nos*), nitrite reduction to ammonium (*nrf*), nitrogen fixation (*nif*) in metatranscriptome grouped together which was obtained from all paddy soils examined. Data is shown as mean value of three replicates.

## Typical denitrifier



## *Deltaproteobacteria* as RNT(reductive nitrogen transformation) players in this study.



### *Deltaproteobacteria* as atypical denitrifiers in previous studies

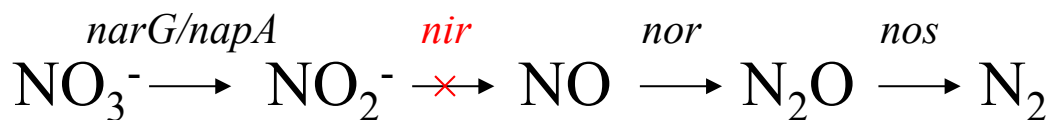
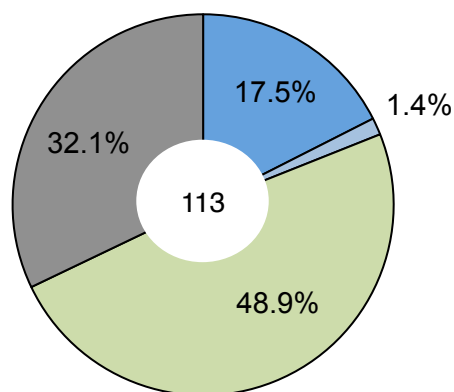


Figure 2.11. Key enzymes involving reductive nitrogen transformations.



**A**

*Betaproteobacteria*

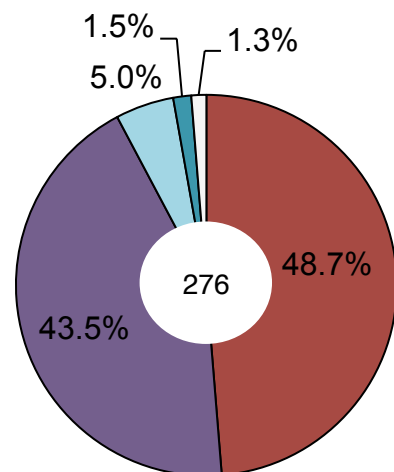
*Alphaproteobacteria*

*Gammaproteobacteria*

*Actinobacteria*

*Methanomicrobia*

*Methanobacteria*

**B**

*Candidatus Methanoperedens*

Unclassified Bacteria

Unclassified Archaea

**Figure 2.S1.** The composition of genes relevant to *mcrA*(A) and *pmmo*(B) assigned bacterial phylum and archaeal class in the paddy soils. Most dominant bacterial phyla, Proteobacteria, was classified and shown at the class level as *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, and *Delta*-proteobacteria. Number in the center circles indicate the sum of annotated sequences.

**Table 2.1. summary of sequencing and accession numbers.**

Date	Layer	MG-RAST ID No.	bp	No. of seqs	Mean length	rRNAseq	non-rRNAseq
7-May	X	4574619.3	189,331,855	1,145,090	165±30	576,001	569,069
		4574620.3	336,555,976	2,055,449	163±28	1,015,226	1,040,191
		4574621.3	302,664,777	1,986,908	152±30	969,567	1,017,231
		4572585.3	267,192,860	1,232,072	216±57	473,017	758,736
		4571599.3	359,252,515	1,937,439	185±54	765,814	1,171,130
23-May	Y	4572782.3	112,499,711	688,359	163±30	314,520	373,560
		4571600.3	374,274,101	1,957,441	191±56	865,975	1,090,921
		4572588.3	147,580,488	651,706	226±51	294,982	356,650
		4572783.3	43,288,814	249,038	173±26	135,638	113,331
		4572781.3	382,977,664	1,923,602	199±59	869,955	1,053,345
	Z	4572805.3	339,341,644	2,274,209	149±31	1,090,802	1,182,937
		4572786.3	127,962,960	811,392	157±31	418,671	392,500
	X	4566479.3	172,906,980	1,223,076	141±27	509,364	712,825
		4566762.3	167,113,971	1,181,211	141±26	501,178	679,209
		4574613.3	85,246,037	428,896	198±39	183,858	244,834
18-Jun	Y	4566763.3	270,884,359	1,876,648	144±25	877,159	999,111
		4566682.3	170,514,832	1,174,260	145±26	554,087	620,012
		4574457.3	155,372,388	801,714	193±40	370,947	430,636
		4572787.3	371,376,134	2,468,737	150±31	1,090,899	1,377,681
		4567420.3	254,268,226	1,742,462	145±26	863,178	879,243
	Z	4574668.3	306,016,452	1,584,681	193±37	735,959	848,694
		4573386.3	381,453,877	1,677,325	227±50	672,510	1,004,742
	X	4573391.3	303,120,096	1,387,337	218±56	568,071	819,156
		4574614.3	250,130,602	1,344,673	186±39	588,238	756,372
		4573392.3	439,976,480	2,033,968	216±46	916,393	1,117,559
28-Aug	Y	4573387.3	476,775,823	2,064,354	230±45	926,725	1,137,616
		4574615.3	162,391,416	831,513	195±38	416,216	415,269
		4573395.3	361,621,213	1,668,613	216±49	693,161	975,429
		4573390.3	349,387,372	1,493,309	233±50	609,227	884,059
		4574618.3	154,322,621	813,068	189±41	422,682	390,349
	Z	4582024.3	32,976,430	146,904	224±34	73,918	71,196
		4582027.3	353,236,158	1,588,017	222±34	663,169	907,738
		4582030.3	373,171,022	1,829,917	203±38	811,707	1,000,317
	X	4582025.3	303,025,209	1,380,323	219±35	686,881	687,951
		4582028.3	425,114,710	1,942,559	218±35	936,628	997,075
1-Oct	Y	4584099.3	986,345,286	4,705,214	209±37	2,158,863	2,530,935
		4582026.3	2,099,308	9,578	219±34	6,352	2,614
		4582029.3	279,374,771	1,270,223	219±35	612,031	651,773
	Z	4582049.3	90,249,926	413,131	218±34	226,876	185,286

**Table 2.2. Taxonomic distribution and abundance of *amo* transcripts.**

accession No.	NCBI-nr annotation	organism	hits
<b>Amo</b>			
WP_041514880.1	ammonia monooxygenase	Nitrosospira sp. NpAV	1
AIF18867.1	ammonia monooxygenase/methane monooxygenase subunit C (amoC)	uncultured marine thaumarchaeote KM3_84_F11	1
ACU64710.1	Amo/PmoC-like protein	uncultured bacterium	3
WP_026016563.1	ammonia monooxygenase	Methylocystis parvus	6
AIC17128.1	ammonia monooxygenase, subunit C	Nitrososphaera viennensis EN76	4
WP_014963876.1	ammonia monooxygenase/methane monooxygenase subunit C	Candidatus Nitrosopumilus koreensis AR1	1
WP_014965814.1	ammonia monooxygenase/methane monooxygenase subunit C	Candidatus Nitrosopumilus sp. AR2	1
AAU91113.1	ammonia monooxygenase/methane monooxygenase, subunit C family protein	Methylococcus capsulatus str. Bath	7
WP_041514848.1	ammonia monooxygenase	Nitrosospira sp. NpAV	1
AAB87793.1	ammonia monooxygenase 2 subunit B	Nitrosospira sp. NpAV	1
WP_015020805.1	ammonia monooxygenase	Candidatus Nitrososphaera gargensis	2
WP_023494956.1	methane monooxygenase/ammonia monooxygenase, subunit C	Methyloglobulus morosus	1
WP_026610999.1	ammonia monooxygenase	Methylocaldum szegediense	2
WP_015019970.1	ammonia monooxygenase/methane monooxygenase subunit C	Candidatus Nitrososphaera gargensis Ga9.2	1
WP_036503907.1	ammonia monooxygenase	Nitrosococcus oceanii	1
WP_041515065.1	ammonia monooxygenase	Nitrosospira sp. NpAV	1
WP_042683559.1	ammonia monooxygenase	Thaumarchaeota archaeon MY2	1
AIC15387.1	ammonia monooxygenase subunit C	Nitrososphaera viennensis EN76	1

# Table 2.3. Taxonomic distribution and abundance of *narG/napA* transcripts.

Accession No.	NCBI-nr annotation	organism	hits
<i>Nar</i>			
AMY06969.1	Assimilatory nitrate reductase catalytic subunit	Acidobacteria bacterium DSM 100886	1
WP_056808030.1	MULTISPECIES: nitrate reductase	Rhizobacter	1
WP_042628678.1	MULTISPECIES: nitrate reductase subunit beta	Burkholderia	1
KPK34518.1	nitrate reductase	Betaproteobacteria bacterium SG8_40	2
WP_028065758.1	nitrate reductase	Solirubrobacter soli	1
WP_066704833.1	nitrate reductase	Curvibacter delicatus	1
WP_024740519.1	nitrate reductase	Tenacibaculum maritimum	1
KPK34517.1	nitrate reductase	Betaproteobacteria bacterium SG8_40	2
WP_028875246.1	nitrate reductase	Tepidiphilus margaritifera	1
WP_013429029.1	nitrate reductase	Paraburkholderia rhizoxinica	1
WP_067989049.1	nitrate reductase	Rhizobiales bacterium CCH10-E5	1
WP_068515234.1	nitrate reductase	Caldimicrobium thiodismutans	1
WP_038047969.1	nitrate reductase	Thermoanaerobaculum aquaticum	2
KPK34520.1	nitrate reductase	Betaproteobacteria bacterium SG8_40	1
WP_066879970.1	nitrate reductase	Dechloromonas denitrificans	1
WP_066610241.1	nitrate reductase	Bosea sp. PAMC 26642	2
WP_033301161.1	nitrate reductase	Streptomyces atroolivaceus	1
WP_056151234.1	nitrate reductase	Duganella sp. Leaf126	1
EGBS9657.1	nitrate reductase	Escherichia coli M863	1
WP_049209031.1	nitrate reductase	Serratia marcescens	1
KKU19706.1	Nitrate reductase (Alpha subunit), partial	Candidatus Saccharibacteria bacterium GW2011_GWA2_46_10	1
CQR42930.1	nitrate reductase 1, alpha subunit	Thiomonas sp. CB3	1
SBT08785.1	nitrate reductase 1, alpha subunit	Candidatus Accumulibacter aalborgensis	1
SBT10278.1	nitrate reductase 1, beta (Fe-S) subunit (fragment)	Candidatus Propionivibrio aalborgensis	1
KXK06953.1	nitrate reductase alpha subunit	Acidobacteria bacterium OLB17	2
EDN65643.1	Nitrate reductase alpha subunit	Beggiatoa sp. PS	2
WP_012525020.1	nitrate reductase catalytic subunit	Anaeromyxobacter sp. K	1
WP_014659616.1	nitrate reductase catalytic subunit	Helicobacter cetorum	1
WP_034583805.1	nitrate reductase catalytic subunit	Helicobacter pametensis	1
WP_038454628.1	nitrate reductase catalytic subunit	Campylobacter iguaniarum	1
WP_014811890.1	nitrate reductase catalytic subunit	Desulfomonile tiedjei	1
WP_053830363.1	nitrate reductase catalytic subunit	Helicobacter heilmannii	1
WP_014785090.1	nitrate reductase catalytic subunit	Terriglobus roseus	1
WP_009029109.1	nitrate reductase catalytic subunit	Bradyrhizobium sp. ORS 375	1
WP_039529351.1	nitrate reductase catalytic subunit	Ruegeria sp. ANG-S4	1
WP_015258139.1	nitrate reductase catalytic subunit	Thioalkalivibrio nitratireducens	1
WP_012633045.1	nitrate reductase subunit alpha	Anaeromyxobacter dehalogenans	1
WP_054155207.1	nitrate reductase subunit alpha	beta proteobacterium AAP51	2
WP_020524363.1	nitrate reductase subunit alpha	Catelliglobospora koreensis	1
WP_019013542.1	nitrate reductase subunit alpha	Eliaera tepidiphila	1
WP_012468292.1	nitrate reductase subunit alpha	Geobacter lovleyi	1
WP_013704625.1	nitrate reductase subunit alpha	Marinithermus hydrothermalis	4
WP_019170966.1	nitrate reductase subunit alpha	Pseudaminobacter salicylatoxidans	1
WP_027491911.1	nitrate reductase subunit alpha	Rhodanobacter sp. OR444	1
WP_062364855.1	nitrate reductase subunit alpha	Variovorax paradoxus	1
WP_012098400.1	nitrate reductase subunit alpha	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	5
WP_025917516.1	nitrate reductase subunit alpha	Hermiimonas sp. CN	1
WP_051772361.1	nitrate reductase subunit alpha	Saccharothrix sp. NRRL B-16314	1
WP_016329282.1	nitrate reductase subunit alpha	Thermus oshimai	1
WP_062309720.1	nitrate reductase subunit alpha	Polynucleobacter sinensis	2
WP_051713302.1	nitrate reductase subunit alpha	Spirillospora alba	1
WP_069053861.1	nitrate reductase subunit alpha	Bosea sp. RAC05	2
WP_059436536.1	nitrate reductase subunit alpha	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	1
WP_027714573.1	nitrate reductase subunit alpha	Desulfuromonas sp. TF	1
WP_047865773.1	nitrate reductase subunit alpha	Rubrobacter aplysinae	1
WP_068020003.1	nitrate reductase subunit alpha	Rhodoplanes sp. Z2-YC6860	2
WP_054391719.1	nitrate reductase subunit alpha	Thermus scotoductus	2
WP_056711390.1	nitrate reductase subunit alpha	Bosea sp. Leaf344	1
WP_012405390.1	nitrate reductase subunit alpha	Paraburkholderia phymatum	1
WP_061502990.1	nitrate reductase subunit alpha	Ramlibacter tataouinensis	1
WP_012525755.1	nitrate reductase subunit alpha	Anaeromyxobacter sp. K	1
WP_057675147.1	nitrate reductase subunit alpha	Curvibacter sp. PAE-UM	1
WP_012964838.1	nitrate reductase subunit alpha	Ferroglobus placidus	1
WP_011365654.1	nitrate reductase subunit alpha	Geobacter metallireducens	1
WP_056264557.1	nitrate reductase subunit alpha	Hydrogenophaga sp. Root209	1
WP_012590530.1	nitrate reductase subunit alpha	Methylocella silvestris	1
WP_059097611.1	nitrate reductase subunit alpha	Mycobacterium sp. IS-1742	1
WP_013156801.1	nitrate reductase subunit alpha	Meiothermus silvanus	2
WP_038041963.1	nitrate reductase subunit alpha	Thermus tengchongensis	2
WP_059594017.1	nitrate reductase subunit alpha	Burkholderia diffusa	1
WP_066727835.1	nitrate reductase subunit alpha	Desulfuromonas sp. DDH964	1
WP_027891931.1	nitrate reductase subunit alpha	Meiothermus chlarophilus	1
WP_018230291.1	nitrate reductase subunit alpha	Methyloversatilis universalis	1
WP_029917027.1	nitrate reductase subunit alpha	Pelobacter selenigenes	1
WP_067111358.1	nitrate reductase subunit alpha	Sphingopyxis granulii	1
WP_028875244.1	nitrate reductase subunit alpha	Tepidiphilus margaritifera	1
WP_012525754.1	nitrate reductase subunit beta	Anaeromyxobacter sp. K	1
WP_027389142.1	nitrate reductase subunit beta	Chrysiogenes arsenatis	1
WP_012468293.1	nitrate reductase subunit beta	Geobacter lovleyi	1
WP_004512302.1	nitrate reductase subunit beta	Geobacter metallireducens	2
WP_055423061.1	nitrate reductase subunit beta	Tepidiphilus thermophilus	1
WP_012372756.1	nitrate reductase subunit beta	Burkholderia ambifaria	1
WP_031445323.1	nitrate reductase subunit beta	Arenibacter algicola	1
WP_013011336.1	nitrate reductase subunit beta	Denitrovibrio acetiphilus	1
WP_013517408.1	nitrate reductase subunit beta	Alicyciphilus denitrificans	1
KXK31706.1	nitrate reductase, alpha subunit	Omnitrophica bacterium OLB16	4
EEA04409.1	nitrate reductase, alpha subunit	Burkholderia sp. H160	1
KXK31707.1	nitrate reductase, beta (Fe-S) subunit	Omnitrophica bacterium OLB16	1
EAQ33965.1	nitrate reductase, beta subunit	Nitrobacter sp. Nb-311A	1
CDH46406.1	nitrate reductase, large subunit	Candidatus Contendobacter odensis Run_B_J11	1
CAL91917.1	nitrate reductase, partial	Desulfuromusa kysingii	1
EPN40782.1	nitrate reductase, partial	Pseudomonas syringae pv. actinidiae ICMP 18807	1
WP_035355771.1	nitrite reductase	Edaphobacter aggregans	1
KFB69441.1	Respiratory nitrate reductase 1 alpha chain	Candidatus Accumulibacter sp. SK-01	1
EWS65597.1	Respiratory nitrate reductase 2 alpha chain	Hydrogenophaga sp. T4	1
KFB69440.1	Respiratory nitrate reductase 2 beta chain	Candidatus Accumulibacter sp. SK-01	1
EHCT2458.1	Respiratory nitrate reductase alpha chain, partial	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Mississippi str. A4-633	1
ABI96842.1	respiratory nitrate reductase alpha chain, partial	Comamonas denitrificans	1
CDL41898.1	Respiratory nitrate reductase beta chain	Escherichia coli ISC11	2
KRT74987.1	respiratory nitrate reductase subunit beta, nitrate reductase	Deltaproteobacteria bacterium CSP1-8	1

**Table 2.4. Taxonomic distribution and abundance of *nir* transcripts.**

Accession No.	NCBI-nr annotation	organism	hits
<i>nir</i>			
WP_029000517.1	nitrite reductase	Azohydromonas australica	1
WP_042340392.1	nitrite reductase	Bradyrhizobium oligotrophicum	1
WP_051609276.1	nitrite reductase, copper-containing	Fodinicurvata fenggangensis	1
CUR52369.1	NirK, nitrite reductase multicopper oxidase	Candidatus Nitrosotalea devanattera	14
EMJ85857.1	putative copper-containing nitrite reductase	Leptospira meyeri serovar Semarang str. Veldrot Semarang 173	1
WP_005793436.1	nitrite reductase	Acidovorax delafieldii	1
WP_017905160.1	nitrite reductase	Pseudomonas fuscovaginae	1
WP_061501064.1	nitrite reductase, copper-containing	Ramlibacter tataouinensis	1
WP_066710706.1	nitrite reductase	Curvibacter delicatus	1
EQB63186.1	Copper nitrite reductase	candidate division Zixibacteria bacterium RBG-1	1
WP_042422807.1	nitrite reductase	Comamonas granuli	1
WP_051101845.1	nitrite reductase, copper-containing	Solimonas variicoloris	1
WP_059423846.1	nitrite reductase	Sulfuricella sp. T08	1
WP_035039989.1	nitrite reductase	Aquabacterium sp. NJ1	2
CDI05991.1	NirK, nitrite reductase multicopper oxidase	Thaumarchaeota archaeon N4	1
KPK25232.1	nitrite reductase	Nitrospira bacterium SG8_3	1
WP_006980565.1	nitrite reductase, copper-containing	Chthoniobacter flavus	1
WP_062535522.1	nitrite reductase, copper-containing	Mizugakiibacter sediminis	1
ADB24711.1	NirS	Methylomonas sp. 16a	1
BAO96022.1	nitrite reductase	Ralstonia sp. UNPF2a	1
ALA60904.1	putative Copper-containing nitrite reductase (NO-forming)	Nitrospira moscoviensis	1
BAO96030.1	nitrite reductase	Pseudoalteromonas haloplanktis	1
WP_013032146.1	nitrite reductase	Nitrosococcus halophilus	1
WP_046033715.1	nitrite reductase, copper-containing	Agrobacterium tumefaciens	1
WP_066339008.1	nitrite reductase	Azohydromonas lata	1
WP_067110644.1	cytochrome C	Methylobacillus sp. MM2	1
ABI94573.1	nitrite reductase	Nitrosospira tenuis	1
CAA12209.1	nitrite reductase	Bradyrhizobium denitrificans	1

**Table 2.5. Taxonomic distribution and abundance of *nor* transcripts.**

accession No.	NCBI-nr annotation	organism	hits
<i>Nor</i>			
WP_039642718.1	nitric-oxide reductase	Geobacter sp. GSS01	1
WP_008434727.1	nitric-oxide reductase	Rhodanobacter thiooxydans	1
WP_034151192.1	nitric oxide reductase	Pseudomonas fluorescens	1
ETJ20559.1	Nitric oxide reductase	Veillonella sp. DORA_A_3_16_22	1
WP_041859363.1	nitric oxide reductase large subunit	Candidatus Solibacter usitatus	1
WP_043646031.1	nitric-oxide reductase	Desulfovibrio putealis	1
WP_028987379.1	nitric oxide reductase	Thermicanus aegyptius	1
WP_027493448.1	nitric-oxide reductase	Rhodanobacter sp. OR444	1
WP_038119513.1	nitric-oxide reductase	Verrucomicrobia bacterium LP2A	1
WP_039596498.1	nitric oxide reductase large subunit	Ralstonia sp. A12	1
WP_041248390.1	nitric-oxide reductase	Geobacter sp. M18	1
WP_011521171.1	nitric-oxide reductase	Candidatus Koribacter versatilis	2
BAL77979.1	nitric oxide reductase subunit E	Bradyrhizobium sp. S23321	1
AJP49583.1	nitric-oxide reductase	Rhodocyclaceae bacterium PG1-Ca6	1
WP_036304415.1	MULTISPECIES: nitric-oxide reductase	Methylomicrobium	1
YP_001613919.1	anaerobic nitric oxide reductase transcriptional regulator	Sorangium cellulosum	2
WP_018608373.1	nitric-oxide reductase	Uliginosibacterium gangwonense	1
WP_012097560.1	nitric-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	2
WP_026853729.1	nitric-oxide reductase	Geothrix fermentans	3
WP_040495926.1	nitric oxide reductase large subunit	Fulvivirga intechensis	1
WP_041449203.1	cytochrome C	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	1
WP_014149481.1	Anaerobic nitric oxide reductase transcription regulator norR	Methylomicrobium alcaliphilum 20Z	1
EGK70974.1	Anaerobic nitric oxide reductase transcription regulator NorR	Methyloversatilis universalis FAM5	1
WP_039744910.1	nitric-oxide reductase	Geobacter pickeringii	1

**Table 2.6. Taxonomic distribution and abundance of *nos* transcripts.**

accession No.	NCBI-nr annotation	organism	hits
<b>Nos</b>			
AFB35560.1	nitrous oxide reductase	uncultured bacterium	1
AFX81651.1	nitrous oxide reductase	uncultured bacterium	1
WP_021004240.1	putative nitrous oxide reductase expression regulator NosR	Variovorax paradoxus	1
WP_021091082.1	Nitrous-oxide reductase	Campylobacter concisus	1
WP_041355904.1	nitrous oxide reductase	Melioribacter roseus	1
ACA83735.1	nitrous oxide reductase	Rhodothermus marinus	2
AFB35571.1	nitrous oxide reductase	uncultured bacterium	2
CDL72854.1	Cytochrome c nitrous oxide reductase cNos subunit NosZ	uncultured epsilon proteobacterium	2
BAL58532.1	nitrous-oxide reductase	Candidatus Acetothermus autotrophicum	3
ACJ39148.1	nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	2
AFB35565.1	nitrous oxide reductase	uncultured bacterium	6
WP_011311901.1	nitrous-oxide reductase	Thiobacillus denitrificans	1
AFB35566.1	nitrous oxide reductase	uncultured bacterium	1
WP_012632836.1	nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	2
AFX71895.1	nitrous oxide reductase	uncultured bacterium	1
AFX81552.1	nitrous oxide reductase	uncultured bacterium	1
BAL58530.1	nitrous-oxide reductase	Candidatus Acetothermus autotrophicum	1
WP_012525512.1	nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. K	1
WP_014904216.1	nitrous oxide reductase	Desulfosporosinus meridei	1
WP_026898803.1	nitrous oxide reductase	Pedobacter oryzae	1
WP_041065396.1	cytochrome C	gamma proteobacterium Hiromi1	1
WP_011984568.1	nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	3
AFX81466.1	nitrous oxide reductase	uncultured bacterium	2
CCQ73153.1	Nitrous-oxide reductase	Magnetospira sp. QH-2	2
AFX60430.1	NosZ	uncultured microorganism	2
AFB35570.1	nitrous oxide reductase	uncultured bacterium	1
AFX71918.1	nitrous oxide reductase	uncultured bacterium	1
AFX81640.1	nitrous oxide reductase	uncultured bacterium	1
WP_035811537.1	nitrous-oxide reductase	Cupriavidus basilensis	1
WP_041440645.1	NosL	Syntrophobacter fumaroxidans	1
AFB35567.1	nitrous oxide reductase	Bacillus sp. ET	1
WP_029133254.1	cytochrome C	Sedimenticola selenatireducens	1
AFX60408.1	NosZ	uncultured microorganism	1
BAP57181.1	nitrous oxide reductase	Thioploca ingrica	1
WP_039447307.1	nitrous oxide reductase	Pedobacter glucosidilyticus	1
ACO49873.1	nitrous oxide reductase	uncultured bacterium	1
AFX81461.1	nitrous oxide reductase	uncultured bacterium	1
EME70912.1	nitrous oxide reductase	Magnetospirillum sp. SO-1	1
WP_009206857.1	cytochrome C	Sulfuricella denitrificans	2

**Table 2.7. Taxonomic distribution and abundance of *nrfA* transcripts.**

accession No.	NCBI-nr annotation	organism	hits
<b>Nrf</b>			
WP_013044643.1	nitrite reductase	Coralimargarita akajimensis	1
WP_015724665.1	cytochrome C nitrite reductase subunit c552	Desulfohalobium propionicus	1
WP_020733883.1	nitrite reductase	Sorangium cellulosum	1
WP_028323829.1	cytochrome C nitrite reductase	Desulfatirhabdium butyrivorans	3
WP_011421954.1	nitrite reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	2
WP_011985270.1	nitrite reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	2
WP_011419968.1	nitrite reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	3
WP_012648182.1	cytochrome C	Geobacter daltonii	2
WP_013561276.1	cytochrome c-552	Anaerolinea thermophila	1
WP_011342651.1	nitrite reductase	Pelobacter carbinolicus	1
WP_041448855.1	Nitrite reductase (cytochrome; ammonia-forming)	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	2
WP_043401184.1	nitrite reductase	Cystobacter violaceus	2
WP_013450612.1	nitrite reductase	Calditerrivibrio nitroreducens	3
WP_002649260.1	nitrite reductase	Planctomyces maris	1
KFE62650.1	Cytochrome c552 precursor	Hyalangium minutum	1
WP_012545985.1	MULTISPECIES: cytochrome C nitrite reductase	Thermodesulfobivrio	2
ABR01125.1	NrfA	uncultured Geobacter sp.	1
WP_004514005.1	cytochrome C nitrite reductase	Geobacter metallireducens	1
WP_011735123.1	cytochrome C nitrite reductase	Pelobacter propionicus	1
WP_042724568.1	nitrite reductase	Chthoniobacter flavus	1
WP_012526984.1	nitrite reductase	Anaeromyxobacter sp. K	1
WP_040920184.1	nitrite reductase	Leptonema illini	1

**Table 2.8. Taxonomic distribution and abundance of *nif* transcripts.**

accession No.	NCBI-nr annotation	organism	hits
<b>Nif</b>			
WP_012647654.1	nitrogenase iron protein	Geobacter daltonii	1
WP_013190626.1	nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain	Trichormus azollae	1
AAA22011.1	nitrogenase reductase	Anabaena oscillarioides	1
AFW96173.1	nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain NifD	Anabaena sp. 90	1
WP_041458528.1	nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha	Anabaena sp. 90	1
WP_042491091.1	nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha	Anabaena sp. PCC 7108	1
WP_039201005.1	nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	Aphanizomenon flos-aquae	1
WP_041555581.1	nitrogenase reductase	Nostoc sp. PCC 7524	1
WP_011737276.1	nitrogenase iron protein	Pelobacter propionicus	1
WP_037220497.1	nitrogenase reductase	Richelia intracellularis	1
WP_037223171.1	nitrogenase reductase	Richelia intracellularis	1
WP_014199514.1	nitrogenase iron-iron protein alpha chain	Azospirillum brasilense	1
WP_041448393.1	nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	1
EXI92728.1	Nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain	Candidatus Accumulibacter sp. BA-94	1
WP_015284795.1	nitrogenase subunit NifH (ATPase)	Methanoregula formicica	1
WP_012097841.1	nitrogenase iron protein	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	1
WP_015402631.1	nitrogenase molybdenum-iron protein, alpha and beta chain	Desulfocapsa sulfexigens	1
WP_031386911.1	nitrogenase reductase	Desulfonatronum thiodismutans	1
WP_027362992.1	nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha	Desulfospira joergensenii	1
WP_027185450.1	nitrogenase	Desulfovibrio inopinatus	1
WP_011697884.1	nitrogenase reductase	Syntrophobacter fumaroxidans	1
ABO64216.1	nitrogenase reductase	Burkholderia caryophylli	1
WP_014247088.1	nitrogenase iron protein, nifH; dinitrogenase reductase	Azospirillum lipoferum	1
ACO37593.1	dinitrogenase reductase	uncultured bacterium	2
WP_044107031.1	nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	cyanobacterium endosymbiont of Epithemia turgida	1
WP_015954152.1	nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	Cyanothece sp. PCC 7424	1
WP_006194560.1	Nitrogenase iron protein	Nodularia spumigena	1
AEG80203.1	nitrogenase beta subunit	Nostoc sp. PCC 9405	1
WP_019499566.1	nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain	Pseudanabaena sp. PCC 6802	1
WP_026103162.1	nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha	Pseudanabaena sp. PCC 6802	1
AAW57050.1	nitrogen fixation protein D	cyanobacterium endosymbiont of Rhopalodia gibba	1
WP_015720184.1	nitrogen fixation protein	Geobacter sp. M18	1
WP_015720181.1	nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	Geobacter sp. M18	1

**Table 2.9. *nirK* and *nrfA*-harboring *Deltaproteobacteria***

<i>nirK</i>	<i>nrfA</i>
Bdellovibrio bacteriovorus	Geobacter sulfurreducens
	Geobacter metallireducens
	Geobacter uraniireducens
	Geobacter lovleyi
	Geobacter bemidjiensis
	Geobacter sp. M21
	Geobacter sp. M18
	Geobacter pickeringii
	Geoalkalibacter subterraneus
	Pelobacter carbinolicus
	Pelobacter propionicus
	Desulfuromonas sp. WTL
	Desulfovibrio vulgaris
	Desulfovibrio desulfuricans
	Desulfovibrio magneticus
	Desulfovibrio salexigens
	Desulfovibrio aespoeensis
	Desulfovibrio africanus
	Desulfovibrio gigas
	Desulfovibrio fairfieldensis
	Lawsonia intracellularis
	Desulfomicrobium baculatum
	Desulfomicrobium orale
	Bdellovibrio bacteriovorus
	Desulfotalea psychrophila
	Desulfobulbus propionicus
	Anaeromyxobacter dehalogenans
	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5
	Anaeromyxobacter sp.K
	Myxococcus xanthus
	Myxococcus fulvus
	Myxococcus stipitatus
	Corallococcus coralloides
	Archangium gephyra
	Vulgatibacter incomptus
	Sorangium cellulosum
	Syntrophus aciditrophicus
	Syntrophobacter fumaroxidans

Ref; KEGG database: [www.genome.jp/kegg/kegg2.html](http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html)



**Table 2.S1. Taxonomic distribution and abundance of *mcrA* transcripts.**

accession No.	NCBI-nr annotation	organism	hits
<b><i>mcrA</i></b>			
WP_019264905.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanobrevibacter smithii	1
WP_012899267.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanocella paludicola	1
WP_011449111.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanospirillum hungatei JF-1	1
AFI62036.1	methyl coenzyme M reductase gamma subunit	uncultured archaeon	1
AGF92168.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	1
AGF92174.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	1
AGF92428.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	5
WP_011695757.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanosaeta thermophila PT	7
KCZ72672.1	methyl-coenzyme M reductase, gamma subunit	Candidatus Methanoperedens nitroreducens	4
WP_012106123.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanoregula boonei	2
KCZ72670.1	methyl-coenzyme M reductase, beta subunit	Candidatus Methanoperedens nitroreducens	5
KCZ72673.1	methyl-coenzyme M reductase, alpha subunit	Candidatus Methanoperedens nitroreducens	29
WP_013718625.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanosaeta concilii	9
KCZ72671.1	methyl-coenzyme M reductase operon protein D	Candidatus Methanoperedens nitroreducens	1
AGF92483.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	1
AGF92322.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	4
AFI62040.1	methyl coenzyme M reductase gamma subunit	uncultured archaeon	1
WP_013718623.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanosaeta concilii	4
WP_012035374.1	methyl-coenzyme M reductase beta subunit	Methanocella arvoryzae	1
WP_012899264.1	methyl-coenzyme M reductase beta subunit	Methanocella paludicola	1
WP_015052761.1	methyl-coenzyme M reductase gamma subunit	Methanobolus psychrophilus R15	1
WP_012618909.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanosphaerula palustris	1
WP_007314360.1	methyl-coenzyme M reductase gamma subunit	Methanosphaerula palustris E1-9c	1
AEG42707.1	methyl-coenzyme M reductase	uncultured Methanobolus sp.	1
WP_012106122.1	methyl-coenzyme M reductase gamma subunit	Methanoregula boonei	2
AGF92253.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	8
BAL63107.1	methyl-coenzyme M reductase alpha subunit	Methanosaeta concilii	2
WP_014405506.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanocella conradii	9
WP_012106125.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanoregula boonei	3
WP_012035373.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanocella arvoryzae	4
1E6Y_B	Chain B, Methyl-Coenzyme M Reductase From Methanosarcina Barkeri	Methanosarcina barkeri	1
WP_014586065.1	Methyl-coenzyme M reductase, alpha subunit	Methanosaeta harundinacea	1
WP_013898158.1	methyl-coenzyme M reductase subunit alpha	Methanosalsum zhilinae	1

accession No.	NCBI-nr annotation	organism	hits
<b>mcrA</b>			
WP_020449396.1	Methyl coenzyme M reductase alpha subunit	Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis	1
WP_011954235.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanobrevibacter smithii	1
WP_014405504.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanocella conradii	1
WP_011305916.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanosarcina barkeri	1
AGB07531.1	methyl-coenzyme M reductase alpha subunit	Methanosarcina mazei	1
AGB07532.1	methyl-coenzyme M reductase alpha subunit	Methanosarcina mazei	1
WP_012618913.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanosphaerula palustris	1
WP_013296337.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanothermobacter marburgensis	1
AFA53845.1	methyl-coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	1
AGF92175.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	1
AGF92181.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	1
AGF92212.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	1
AGF92226.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	1
AGF92279.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	1
AGF92283.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	1
AGF92373.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	1
AGF92392.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	1
AGF92440.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	1
AGF92509.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	1
AGF92534.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	1
AGF92571.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	1
AHB23987.1	methyl-coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	1
ACB38909.1	methyl-coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured methanogenic archaeon	1
ACB38915.1	methyl-coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured methanogenic archaeon	1
AFI79975.1	methyl coenzyme M reductase	uncultured methanogenic archaeon	1
ADB85703.1	methyl-coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured organism	1
WP_013718622.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanosaeta concilii	10
WP_012899265.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanocella paludicola	2
WP_012899266.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanocella paludicola	2
WP_013718624.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanosaeta concilii	2
BAI45226.1	methyl-coenzyme M reductase alpha subunit	Methanospirillum lacunae	2
AGF92467.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	2
AFI62037.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	3
AGF92171.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	3
AGF92364.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	3
AGF92450.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	3
WP_012035370.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanocella arvoryzae	4
WP_012106121.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanoregula boonei	4
WP_015286563.1	methyl-coenzyme M reductase, alpha subunit	Methanoregula formicica	4
BAD21109.1	methyl-coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured Methanosarcinales archaeon	4
WP_012035372.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanocella arvoryzae	5
AGF92161.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	5
AGF92169.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	5
WP_012899268.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanocella paludicola	8
BAL63106.1	methyl-coenzyme M reductase alpha subunit	Methanosaeta pelagica	1
AGF92162.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	2
AGF92202.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	1
AGF92375.1	methyl coenzyme M reductase alpha subunit	uncultured archaeon	3
WP_007314359.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanoregula boonei	1
WP_014586062.1	methyl-coenzyme M reductase	Methanosaeta harundinacea	1

**Table 2.S2. Taxonomic distribution and abundance of *pmmo* genes.**

accession No.	NCBI-nr annotation	organism	hits
<b>pMMO</b>			
WP_020158143.1	MULTISPECIES: methane monooxygenase	Methylobacter	3
WP_005374465.1	MULTISPECIES: methane monooxygenase	Methylobacterium	8
WP_019865089.1	methane monooxygenase	Methylovulum miyakonense	3
BAJ17640.1	particulate methane monooxygenase G-subunit	Methylovulum miyakonense HT12	4
WP_024298806.1	methane monooxygenase	Methylosarcina lacus	3
AHI95954.1	particulate methane monooxygenase subunit C	Methylocystis sp. JTC3	16
WP_026597566.1	methane monooxygenase	Methylococcus capsulatus	15
ABD57884.1	particulate methane monooxygenase subunit C	uncultured Methylocystis sp. GSC357	23
WP_016919336.1	methane monooxygenase	Methylocystis parvus	29
WP_026609852.1	methane monooxygenase	Methylocaldum szegediense	20
WP_023494958.1	particulate methane monooxygenase alpha subunit	Methyloglobulus morosus	3
WP_024298804.1	methane monooxygenase	Methylosarcina lacus	3
BAH28854.1	particulate methane monooxygenase protein B	Methylo Marinum vadi	1
WP_020483731.1	MULTISPECIES: methane monooxygenase	Methylomonas	1
WP_035498102.1	methane monooxygenase	Burkholderia sp. MP-1	1
WP_036284221.1	methane monooxygenase	Methylocystis sp. ATCC 49242	1
3RFR_C	Chain C, Crystal Structure Of Particulate Methane Monooxygenase (Pmmo) From Methylocystis Sp. Strain M	Methylocystis sp. M	12
WP_013817027.1	methane monooxygenase	Methylomonas methanica	4
BAO51827.1	particulate methane monooxygenase	Methylocaldum sp. S8	3
WP_026611456.1	methane monooxygenase	Methylocaldum szegediense	3
WP_020564882.1	methane monooxygenase	Methylosarcina fibrata	10
WP_026609850.1	methane monooxygenase	Methylocaldum szegediense	3
WP_008919789.1	methane monooxygenase	Burkholderia sp. H160	2
4PHZ_K	Chain K, Crystal Structure Of Particulate Methane Monooxygenase From Methylocystis Sp. Atcc 49242 (rockwell)	Methylocystis sp. ATCC 49242	12
WP_027159171.1	methane monooxygenase	Methylobacter luteus	4
3RFR_A	Chain A, Crystal Structure Of Particulate Methane Monooxygenase (Pmmo) From Methylocystis Sp. Strain M	Methylocystis sp. M	4
WP_036287217.1	methane monooxygenase	Methylocystis sp. ATCC 49242	8
BAJ17642.1	particulate methane monooxygenase B-subunit	Methylovulum miyakonense HT12	1
WP_031433837.1	methane monooxygenase	Methylo Marinum vadi	1
WP_026610999.1	methane monooxygenase	Methylocaldum szegediense	4
WP_016922174.1	methane monooxygenase	Methylocystis parvus	11
BAF49661.1	particulate methane monooxygenase	Methylocaldum sp. T-025	3
WP_010961049.1	methane monooxygenase	Methylococcus capsulatus	5
WP_026016564.1	methane monooxygenase	Methylocystis parvus	5
CAJ01562.1	pmoB	uncultured bacterium	1
CBI62689.1	methane monooxygenase	uncultured bacterium	1

accession No.	NCBI-nr annotation	organism	hits
<b>pMMO</b>			
WP_006891796.1	methane monooxygenase	Methylobacter tundripaludum	1
WP_013817025.1	methane monooxygenase	Methylomonas methanica	1
WP_017841992.1	methane monooxygenase	Methylomicrobium buryatense	1
WP_022947314.1	methane monooxygenase	Methylohalobius crimeensis	1
WP_022947316.1	methane monooxygenase	Methylohalobius crimeensis	1
WP_026597603.1	methane monooxygenase	Methylococcus capsulatus	1
WP_029085592.1	methane monooxygenase	Bradyrhizobium sp. th.b2	1
WP_031437563.1	methane monooxygenase	Methylobacter tundripaludum	1
WP_031437565.1	methane monooxygenase	Methylobacter tundripaludum	1
ABD57885.1	particulate methane monooxygenase subunit A	uncultured Methylocystis sp. GSC357	2
BAH22841.1	methane monooxygenase	Methylomarinum vadi	2
WP_028060361.1	methane monooxygenase	Solirubrobacter sp. URHD0082	3
ABD57886.1	particulate methane monooxygenase subunit B	uncultured Methylocystis sp. GSC357	2
WP_027148840.1	methane monooxygenase	Methylobacter tundripaludum	3
WP_041361524.1	methane monooxygenase	Methylococcus capsulatus	4
AHA46879.1	methane monooxygenase protein C	Methylococcaceae bacterium WF1	1
BAH22846.1	methane monooxygenase protein B	Methylococcaceae bacterium SF-BR	1
WP_003612568.1	methane monooxygenase	Methylosinus trichosporium	1
WP_014147020.1	methane monooxygenase subunit C	Methylomicrobium alcaliphilum 20Z	1
WP_014147022.1	methane monooxygenase subunit B	Methylomicrobium alcaliphilum 20Z	1
WP_019865091.1	methane monooxygenase	Methylovulum miyakonense	1
WP_023494956.1	methane monooxygenase/ammonia monooxygenase, subunit C	Methyloglobulus morosus	1
WP_014892305.1	methane monooxygenase	Methylocystis sp. SC2	2
WP_040574018.1	methane monooxygenase	Methylocystis rosea	3
WP_036246336.1	methane monooxygenase	Methylococcus capsulatus	2
WP_005374468.1	MULTISPECIES: methane monooxygenase	Methylomicrobium	2
WP_020564880.1	methane monooxygenase	Methylosarcina fibrata	2
WP_036281095.1	methane monooxygenase	Methylocystis sp. ATCC 49242	6
CCJ06303.1	Particulate Methane Monooxygenase subunit C	Methylocystis sp. SC2	1
WP_028150062.1	methane monooxygenase	Bradyrhizobium japonicum	1
AEA22892.1	Methane monooxygenase	Pseudonocardia dioxanivorans CB1190	1
WP_028075702.1	methane monooxygenase	Solirubrobacterales bacterium URHD0059	1
WP_033379839.1	methane monooxygenase	Kibdelosporangium aridum	2
CBX89816.1	methane monooxygenase	uncultured bacterium	1
WP_029310481.1	methane monooxygenase	Acidiphilium angustum	1
WP_040588333.1	methane monooxygenase	Sciscionella marina	1
1YEW_A	Chain A, Crystal Structure Of Particulate Methane Monooxygenase	Methylococcus capsulatus str. Bath	2
EWM11443.1	methane monooxygenase	Kutzneria sp. 744	1
WP_015664605.1	methane/phenol/toluene monooxygenase alpha subunit	Bradyrhizobium oligotrophicum	1
WP_015664607.1	methane/phenol/toluene monooxygenase beta subunit	Bradyrhizobium oligotrophicum	1
WP_034511073.1	methane monooxygenase	Agrobacterium rhizogenes	1
WP_044434593.1	methane monooxygenase	Skermanella aerolata	1
AJJ24418.1	methane monooxygenase	Amycolatopsis methanolica 239	2
WP_034215699.1	methane monooxygenase	Actinoplanes sp. RP-AC33	1
WP_034951956.1	methane monooxygenase	Geodermatophilaceae bacterium URHB0048	1
WP_036245890.1	methane monooxygenase	Methylococcus capsulatus	1
WP_037052654.1	methane monooxygenase	Pseudonocardia autotrophica	1
WP_028934350.1	methane monooxygenase	Pseudonocardia spinosissima	2

**Table 2.S3. Taxonomic distribution and abundance of Nxr genes.**

Accession No.	NCBI-nr annotation	organism	hits
<i>nxr</i>			
WP_006668909.1	nitrate oxidoreductase subunit alpha	Arthrospira maxima	1
WP_053381688.1	nitrate oxidoreductase subunit beta	Nitrospira moscoviensis	2
KPQ44267.1	Nitrite oxidoreductase alpha subunit	Candidatus Methanoperedens sp. BLZ1	1
AHA36491.1	nitrite oxidoreductase beta subunit, partial	Nitrospira moscoviensis	8
AHA36492.1	nitrite oxidoreductase beta subunit, partial	Nitrospira moscoviensis	5
AHA36493.1	nitrite oxidoreductase beta subunit, partial	Nitrospira moscoviensis	2
AHA36539.1	nitrite oxidoreductase beta subunit, partial	Nitrospira calida	1
AHA36531.1	nitrite oxidoreductase beta subunit, partial	Nitrospira sp. Ecomares 2.1	1
KRT69487.1	putative nitrate oxidoreductase subunit beta, nitrate reductase	Candidatus Rokubacteria bacterium CSP1-6	2

## 第 3 章

### 湛水期・落水期の層別水田土壌

#### メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析

##### 3.1 緒言

第 2 章において、メタトランスクリプトーム解析により、水田土壌における細菌・古細菌の微生物群集構造と窒素循環反応に関わる機能遺伝子群の群集組成を明らかにした。第 2 章におけるシーケンシングによって得られた rRNA 配列数は十分な量であり、時期・層別の変遷を追うことができたが、機能遺伝子 (mRNA) 配列数は少量であり、時期・層別の変遷を追うことができなかった。そのため、第 2 章において示唆された *Deltaproteobacteria* 綱細菌が主導する還元的窒素循環反応は、どの時期・どの層においても起きているのか、十分な配列数が得られた場合にも同様のことが言えるのかは不明である。

そこで本章では、第 2 章において明らかにした土壌理化学性や rRNA 配列情報に基づく微生物群集構造の結果から、年間を通してその差が最も大きいと考えられた湛水期・落水期の X 層 (上層)・Z 層 (下層) を解析対象とし、機能遺伝子 (mRNA) 配列数が十分量が得られるよう、「ディープな」メタトランスクリプトーム解析を行った。また、第 2 章で対象としなかった土壌 DNA も本章では対象としてメタゲノム解析を行い、実際に転写されている遺伝子 (メタトランスクリプトーム解析) との比較を行うと同時に、2012 年度に伊藤らによって行われたメタゲノム解析との比較も行うこととした。

## 3.2 実験手法

### 3.2.1 土壌サンプリング

土壌サンプリングに用いた手法は **2.2.2** と同様である。本章においては、中干し直前の湛水期（6 月 18 日）、稲刈り後の落水期（10 月 1 日）のサンプルを用いた。

### 3.2.2 土壌分取

土壌分取に用いた手法は **2.2.3** と同様である。

### 3.2.3 核酸の抽出と精製

-80 °C で凍結保存した土壌試料 1 g から、RNA PowerSoil Total RNA Isolation kit (MoBio Laboratories, Solana Beach, CA, USA)を用いて RNA を粗抽出した。抽出した RNA から TURBO DNA-free Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて残存していた DNA を除去し、RNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research, Irvine, CA, USA)を用いて精製した。これと同時に、RNA PowerSoil DNA Elution Accessory Kit (MoBio Laboratories)を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA から RNase A(TAKARA BIO INC., Otsu, Shiga, Japan) を用いて残存していた RNA を除去し、DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research)を用いて精製した。精製した RNA は RNA 6000 Pico Kit を用いて蛍光標識した後にゲルを充填したマイクロチップにアプライし、Agilent 2100 Bioanalyzer( Agilent Technologies, Palo Alto, CA,USA)に供してLSU, SSU ピーク比からその分解度を確認した。精製した DNA は、Nano Drop ND-1000(NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)を用いて夾雑物が混入していないことを確認した。その後、Qubit RNA Assay Kit・Qubit dsDNA HS Assay Kit を用いて DNA ・RNA 試料双方を蛍光色素により着色し、Qubit 2.0 Fluorometer(Invitrogen, Carlsbad, Ca,USA)に供して定量した。

### 3.2.4 定量 PCR

3.2.1において得られたRNA100 ngを鋳型として、SuperScript III Reverse Transcriptase (2000 units)(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)とRandom primer 6 mer (Takara Bio, Otsu, Japan)を用いてcDNAを合成した。調製したDNA・cDNA各3連を鋳型として、SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)とStep One System (Applied Biosystems)を用いて、細菌の16S rRNA遺伝子を定量PCRした。PCR反応液は20 µl系で調製した。組成は、DNA・cDNA溶液1 µl, SYBR Green PCR Master Mix 10 µl, 10 µM の細菌用プライマー (338F, 518R(Klammer, *et al.*, 2008)) 各0.4 µl, 5 mg/ml BSA 2.0µl, ROX reference dye(50×) 0.4 µl, 滅菌水 5.8 µlとした。PCRの条件は、95°C for 30 sに続いて、95°C for 5 s, 55°C for 30 s, 72°C for 30 sのステップを40回繰り返した。検量線は、pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA)に細菌のタイプストレイン(*Pseudomonas stutzeri* JCM 5965)の16S rRNA 遺伝子を挿入したプラスミド溶液の希釈シリーズを用いて作成した。

### 3.2.5 シーケンシングライブラリ調製

定量した RNA から、NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina® (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)を用いてシーケンシングライブラリを調製した。調製法は、付属のプロトコルに従った。

定量した DNA は、Covaris M220(Covaris Inc., Woburn, MA, USA)を用いて~300bp のフラグメントになる様に切断した。断片化した DNA から、NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina®(New England Biolabs)を用いてシーケンシングライブラリを調製した。調製法は、付属のプロトコルに従った。



### 3.2.6 シーケンシング

調製したライブラリは、MiSeq Reagent kit v2 (Illumina, San Diego, CA, USA) のプロトコルに従い、Illumina Miseq sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA)に供した。すべてのランにおいて、Paired end シーケンシングを行った。メタゲノム解析はレプリケートを3とした4サンプル(計12サンプル)を同時に1回行った。また、メタトランスクリプトームは、レプリケートを3とした1サンプル(計3サンプル)を時期別に計4回行った。シーケンシングによって得られた配列数や平均解読長、MG-RAST データベース上におけるアクセッションナンバーは、**Table. 3.1.**に示した。

### 3.2.7 インフォマティクス解析

得られた Paired end の塩基配列 (fastq ファイル) から、30bp 以上の重複・10%未満のミスマッチを含む配列同士を結合し、シングルリード配列とした。得られた fastq ファイルから PRINSEQ(Schmieder *et al.*, 2011.)を用いて Q-score 30 以上の配列を選出し、fasta 形式に変換した。rRNA, rDNA 配列はMG-RAST 上でM5RNA データベースを用いて BLAT 検索を行った(  $e\text{-value} < 10^{-5}$ , alignment length  $> 30\text{bp}$ )。mRNA, functional gene 配列はMG-RAST 上でM5NR データベースを用いて BLAT 検索( $e\text{-value} < 10^{-5}$ , alignment length  $> 30\text{aa}$ )を行い、機能遺伝子としてアノテーションされた配列はBLASTX 検索 ( $e\text{-value} < 10^{-5}$ , alignment length  $> 30\text{aa}$ )を行った。

### 3.3 結果と考察

#### 3.3.1 細菌の定量と群集構造

##### 3.3.1.1 細菌の 16S rRNA・rDNA の定量

土壌 RNA と DNA に基づく定量 PCR の結果から、細菌由来の 16S rRNA と 16S rDNA (16S rRNA gene) のコピー数は Z 層より X 層において多いことがわかった (**Figure 3.1**)。RNA ベースの解析においては、湛水期・落水期の 16S rRNA のコピー数は同程度であった。一方、DNA ベースの解析においては、16S rDNA のコピー数は湛水期より落水期において多かった。すなわち、還元的な環境（湛水期や Z 層）よりも酸化的な環境（落水期や X 層）において 16S rRNA と 16S rDNA のコピー数が多くなる傾向が見られた。好気呼吸は嫌気呼吸よりエネルギー獲得効率が高いことが知られている。そのため、好気呼吸の微生物が多く存在する酸化的な環境において、嫌気呼吸の微生物が多く存在する還元的な環境より微生物の活性が高く数が多いことは合理性があると考えられる。

##### 3.3.1.2 rRNA・rDNA 配列情報に基づく微生物群集の層別・時期別変動

###### 3.3.1.2.1 シーケンシング結果

**3.2.6** に記述したシーケンシングによって得られた配列数、平均解読長ならびに MG-RAST データベース上におけるアクセッションナンバーを、**Table 3.1** に示した。すべてのメタゲノム解析において、rRNAseq の配列数は protein coding genes に比べて顕著に少なかった。また、すべてのメタトランスクリプトーム解析において、rRNAseq の配列数は protein coding genes (mRNAseq) より多い傾向にあった。DNA では、ゲノム全体のうち rRNA をコードしている部位は機能遺伝子をコードしている部位と比較して少ない。一方、転写産物は rRNA の割合が mRNA より顕著に多いことが知られている (Giannoukos *et al.*, 2012)。本結果も、それらの知見に合致したものであった。

### 3.3.1.2.2 細菌群集構造

rDNA 配列情報に基づく細菌群集構造の解析結果を **Figure 3.2A., 3.3A., 3.4A.**に示した。本研究において解析した新潟水田土壌では、調べたすべての時期・層の土壌において *Proteobacteria* 門が最も優占していることが明らかになった。*Proteobacteria* 門の中で、湛水期・落水期いずれにおいても X 層では *Alphaproteobacteria* 綱(14.4%, 15.7%)の、Z 層では *Deltaproteobacteria* 綱(15.8%, 14.7%)の優占が見られた。また、湛水期・落水期いずれにおいても *Deltaproteobacteria* 綱細菌が X 層より Z 層において優占しており、*Alphaproteobacteria* 綱細菌が Z 層より X 層において優占していることが示された ( $P < 0.05$ ) (**Figure 3.2A.**)。これらの次に優占していた *Betaproteobacteria* 綱細菌(7.59 - 11.5%)については、X 層と Z 層に有意差は見られなかった。*Deltaproteobacteria* 綱細菌の中では *Anaeromyxobacter* 属 (13.4 - 22.8%)・*Geobacter* 属 (21.5 - 27.5%) 細菌が、*Alphaproteobacteria* 綱細菌の中では *Bradyrhizobium* 属細菌(19.8 - 32.8%)がすべての土壌において優占していた(**Figure 3.3A., 4A.**)。 *Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌は嫌気性細菌であり (Sanford *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2003)、 *Bradyrhizobium* 属細菌は好気性細菌である (Preisig *et al.*, 1993)。そのため、これらの結果は優占している細菌の性状に合致するものであると考えられる。ここで言及していない綱・門の細菌群集構造については **Figure. 3.S1A. – S6A.**に示した。

rRNA 配列情報に基づく細菌群集構造の解析結果を **Figure 3.2B., 3.3B., 3.4B.**に示した。すべての時期・層の土壌において *Proteobacteria* 門が最も優占していることが確認された (**Figure 3.2B.**)。また、湛水期の X 層以外のすべてのサンプルにおいて *Deltaproteobacteria* 綱細菌の優占が見られた。*Deltaproteobacteria* 綱細菌の相対存在量は、湛水期の X 層の土壌において 10.6%、その他の層において 19.9 - 27.9%であり、湛水期の X 層より Z 層においてその割合が著しく増加していた ( $P < 0.01$ )。 *Deltaproteobacteria* 綱細菌の次に優占していた *Betaproteobacteria* 綱細菌(5.13 - 15.3%)については、湛水期の Z 層より X 層に

においてその割合が増加していた ( $P < 0.05$ )。 *Deltaproteobacteria* 綱細菌の中では *Anaeromyxobacter* ならびに *Geobacter* 属細菌が優占していたが、落水期には *Sorangium*・*Chondromyces* 属細菌の増加が見られた。これらは湛水に伴った好気・嫌気環境の変化に対応していると考えられる。 *Deltaproteobacteria* 綱細菌の次に優占していた *Betaproteobacteria* 綱細菌の中では、*Methylibium* 属、*Leptothrix* 属、*Burkholderia* 属の優占が見られた(**Figure 3.5B.**)。これらは好気環境を好む細菌である(Kane *et al.*, 2007; Veen *et al.*, 1978; Master *et al.*, 1998)ため、嫌気環境が発達する湛水期の Z 層より好気環境が保たれる X 層においてその割合が高くなるのは妥当であると考えられた。ここで言及していない綱・門の細菌群集構造については **Figure. 3.S1B. – S6B.**に示した。

rDNA 配列と rRNA 配列に基づく各細菌の門レベル・*Proteobacteria* の綱レベルの相対存在量の関係性を、rRNA/rDNA の比を用いて示した (**Figure 3.6.**)。湛水期・落水期双方の Z 層において、rRNA に基づく *Deltaproteobacteria* 綱細菌の相対存在量は、rDNA に基づく相対存在量よりも著しく高かった。また、落水期の X 層において、rRNA に基づく *Cyanobacteria* 門細菌の相対存在量は、rDNA に基づく相対存在量よりも高かった。これらのことから、*Deltaproteobacteria* 綱細菌は特に Z 層において、*Cyanobacteria* 門細菌は落水期の X 層において活性化している可能性が示唆された。本水田土壌で検出された *Deltaproteobacteria* 綱細菌の中では *Anaeromyxobacter* ならびに *Geobacter* 属が優占しており、これらは嫌気性細菌であることは上述した。また、*Cyanobacteria* 門細菌は、光合成を行う独立栄養細菌が多く含まれることで知られている (Castenholz, 2001)。そのため、これらの細菌がそれぞれ嫌気的な Z 層、土壌表面の光の届きやすい X 層において活性化しているのは妥当であると考えられた。

本章のメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析では、*Proteobacteria* 門細菌、中でも *Deltaproteobacteria* 綱の *Anaeromyxobacter* ならびに *Geobacter* 属細菌の優占が見られた。*Anaeromyxobacter* 属細菌は、鉄還元・ウラン還元・ヒ酸還元能を持つ菌として土壌から

単離されている (Wu *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2008; Kudo *et al.*, 2013)。また、*Geobacter* 属細菌は、鉄還元・ウラン還元能を持つ菌として単離されている (Prakash *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2010)。第 2 章の理化学性解析において、本水田土壌では 2 価鉄の濃度が湛水期の Z 層で高くなることがわかっている (Figure 2.3A.)。このことから、これらの菌は少なくとも本水田土壌における鉄還元に関与しており、他の金属還元も行っている可能性が考えられた。

### 3.3.1.2.3 古細菌群集構造

rDNA ならびに rRNA の配列情報に基づく古細菌群集構造解析の結果を Figure 3.7 に示した。本水田土壌では、*Methanomicrobia* 綱と *Thaumarchaeota* 門古細菌が優占していることが明らかになった。特に湛水期の Z 層においてメタン生成菌として知られている *Methanomicrobia* 綱古細菌 (Garsia *et al.*, 2000) の割合が顕著に増加していた ( $P < 0.05$ )。また、湛水期の Z 層において *Methanomicrobia* 綱古細菌由来の *mcrA* 転写産物が多く検出された (Data not shown)。これらの結果は第 2 章に記述したメタトランスクリプトーム解析の結果とも整合していた。これらの結果から、湛水期の還元層において *Methanomicrobia* 綱古細菌が活発にメタン生成を行っていることが強く示唆された。

*Methanomicrobia* 綱古細菌の次に優占していた *Thaumarchaeota* 門古細菌については、rDNA・rRNA 双方の解析において、湛水期の Z 層より X 層において優占度が高かった ( $P < 0.01$ ) (Figure 3.7.)。 *Thaumarchaeota* 門の *Candidatus* *Cenarchaeum* 綱古細菌ならびに *Nitrososphaera* 綱 *Nitrosopumilus* 綱古細菌 (Martens-Habben *et al.*, 2011; Men *et al.*, 2016) が優占しており (Figure 3.8.)、第 2 章の解析結果と整合していた。rDNA と比較して rRNA は 1000 倍以上の古細菌由来のリード数が得られているが (Table 3.2A., 2B.)、rRNA の解析においてはこれらの古細菌の優占度が Z 層に比べて X 層において高い傾向がより顕著に見られた。これらの古細菌は好気性古細菌であり、*amo*(アンモニア酸化関連遺伝子)

を保有しており、*Nitrososphaera* 綱, *Nitrosopumilus* 綱古細菌はアンモニア酸化活性を持つことが報告されている (Martens- Habben *et al.*, 2011; Men *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2013)。そのため、これらの古細菌が X 層において硝化に関与している可能性が考えられた。

このように、細菌群集構造と同様に門・綱レベルの微生物群集構造では rDNA と rRNA に基づく解析結果に差異が見られなかったが、属レベルでは大きな違いが見られた。古細菌の rDNA の検出量は rRNA の検出量より顕著に少なく (Table 3.2A., 2B.)、rRNA が転写されているにも関わらず rDNA は検出されない種が多数存在した。この原因として、メタゲノム解析で得られた rDNA 配列数が不十分であったと考えられた。このことから、本シーケンシングにおける rDNA 配列情報に基づく古細菌群集構造は、本来の土壌における群集構造を反映しきれていない可能性が考えられた。また、古細菌は細菌に比べて活発に rDNA を転写している可能性も考えられた。

### 3.3.1.3 細菌の定量と群集構造のまとめ

本章における 16S rRNA 遺伝子をターゲットとした定量 PCR から、湛水期・落水期どちらにおいても X 層より Z 層におけるコピー数が多いことがわかった (Figure 3.1.)。

また、本章では第 2 章で行ったものより配列数の多いディープなメタトランスクリプトームと、土壌にそもそも存在している微生物群集を確認するためのメタゲノムによる群集構造解析を行った。本章の解析から、ポテンシャルとしての 16S rDNA、活性としての 16S rRNA 双方の配列情報に基づく群集構造を明らかにすることができた。

メタゲノム・メタトランスクリプトームによって得られた rDNA・rRNA 配列情報から、古細菌と細菌の相対存在量の割合の比較を行った (Table 3.2A., 2B.)。rRNA 配列に基づく解析では、湛水期・落水期双方とも X 層より Z 層において古細菌の割合が顕著に高いことが示された ( $P < 0.01$ )。rDNA 配列に基づく解析においても同様の傾向が見られたが、落水期のみ有意差が見られた ( $P < 0.05$ )。また、古細菌は rDNA より rRNA 配列に基

づく群集構造において、検出頻度が高い傾向にあった。このことから、古細菌は個体数が少ないながらも転写を活発に行っていると考えられた。

**3.3.1.2.1** において述べた通り、メタゲノム解析では rDNA の検出量が機能遺伝子の検出量より顕著に少なく、メタトランスクリプトーム解析では rRNA の検出量が機能遺伝子転写産物の検出量より顕著に多かった。そのため、rRNA に基づく群集構造解析は、rDNA に基づくものより多様性を過小評価してしまう危険性が少ないと考えられる。また、RNA は DNA より半減期が短いため、よりアクティブな微生物群集を追いやすく、これまでも 16S rRNA 配列情報は群集構造解析を行う際に多く用いられてきた。これらのことから、本結果においても、rRNA に基づく群集構造は rDNA に基づくものより信頼性が高いと考えられる。

### 3.3.2 窒素循環関連遺伝子の層別・時期別変動

#### 3.3.2.1 アンモニア酸化関連遺伝子 (*amo*)

アンモニア酸化に関わる鍵酵素遺伝子(*amo*)とその転写産物は、メタゲノムよりメタトランスクリプトームにおいて全機能遺伝子に対する検出頻度が高かった。双方の解析において、時期・層毎の検出頻度に有意差は見られなかったが、湛水期の X 層において Z 層の土壌より検出頻度が高くなる傾向が見られた(Figure 3.9A.)。 *amo* とその転写産物の検出頻度は 0.00 – 0.01%であり、後述する他の窒素循環関連遺伝子と比較して極めて低頻度に検出された。

DNA 配列情報に基づくアンモニア酸化微生物の群集組成では、*Thaumarchaeota* 門古細菌(18.7 - 100%)由来の *amo* が全てのサンプルにおいて検出され、 湛水期・落水期の X 層において *Gammaproteobacteria* 綱細菌由来の *amo* も検出された(18.7 - 40.0%)(Figure 3.9B.)。 *Thaumarchaeota* 門の中では *Nitrososphaera* 綱・*Nitrospira* 綱古細菌、*Gammaproteobacteria* 綱の中では *Methylococcaceae* 科細菌由来の *amo* が検出された (Data not shown)。

RNA 配列情報に基づく群集組成においては、*Thaumarchaeota* 門古細菌(25.0 - 50.0%)、*Nitrospirae* 門細菌(50.0 - 100%)、*Alphaproteobacteria* 綱細菌(44.4 – 62.5%)由来の *amo* 転写産物が優占していた。*Alphaproteobacteria* 綱細菌と *Gammaproteobacteria* 綱細菌由来の *amo* 転写産物は湛水期のみ、*Nitrospirae* 門細菌由来の *amo* 転写産物は落水期にのみ検出された(Figure 3.9B.)。 *Thaumarchaeota* 門の中では *Nitrososphaera* 綱・*Nitrospira* 綱・*Nitrosopumilus* 綱古細菌、*Nitrospirae* 門の中では *Nitrospira* 属細菌、*Alphaproteobacteria* 綱の中では *Methylocystis* 属細菌由来の *amo* 転写産物が検出された (Table 3.3.)。

第 2 章と同様に、本章におけるメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析からも、水田土壌におけるアンモニア酸化には AOA・AOB 双方が寄与していることが示唆された。*Thaumarchaeota* 門古細菌、*Alpha*-, *Gamma*-*proteobacteria* 綱細菌由来の *amo* とその転



写産物はメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析双方において検出された。一方で、*Nitrospirae* 門はメタトランスクリプトーム解析のみで検出された。本解析において検出された *Nitrospirae* 門細菌は *Nitrospira* 属であり、同属の細菌は近年 Commamox (complete ammonia oxidizer) として報告されている (Daims *et al.*, 2015; Kessel *et al.*, 2015)。Commamox は、*amo*, *hao*, *nxr* の 3 つの酵素によって触媒される  $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$  の反応を担う細菌である。本メタトランスクリプトーム解析では、*hao* 転写産物は全く検出されなかったが、*Nitrospira* 属由来の *nxrA* 転写産物は複数検出された (Table 2.S3., 3.S1.)。また、rRNA 配列情報による群集組成においても、*Nitrospirae* 門細菌は全サンプルで検出されている (Table 3.S2.)。これらのことから、本水田土壌においても Commamox は存在しており、完全硝化を行っている可能性が考えられた。

また、メタトランスクリプトーム解析では湛水期の X 層において Z 層の土壌より *amo* 転写産物の検出頻度が高くなる傾向が見られたことから、本水田土壌においては同時期の X 層において活発にアンモニア酸化反応が起きている可能性が考えられた。

水田土壌におけるアンモニア酸化は、AOA と AOB 双方によって行われており、湛水期より落水期においてそれらの存在量が増加することが報告されていた (Fujii *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011)。本水田土壌においても、先述の通り AOA(*Thaumarchaeota* 門古細菌), AOB(*Alpha-*, *Gammaproteobacteria* 綱, *Nitrospirae* 門細菌)双方が検出されており、この結果はこれまでの知見と整合していた。一方で、*amo* 転写産物は湛水期の X 層において他の土壌より高い傾向が見られたため、これまでの知見と不整合であった。しかしながら、*amo* 転写産物の配列数は少なく、有意差も示されていない。

本研究で得られた *amo* の配列数は少量であったが、*amo* の配列は *pmo* の配列 (methane monooxygenase) と類似していることが報告されている (Holmes *et al.*, 1995)。実際、検出された *amo* の配列のうちいくつかは ammonia monooxygenase/ methane monooxygenase として NCBI-nr データベースに登録されている配列と近縁であった (Table 3.3.)。本研究に

において *amo* の転写産物が検出された *Methylocystaceae* 科、および *Methylococcaceae* 科細菌は、従来メタン酸化細菌とされてきた微生物であるが、これらの科に属する *Methylocystis* 属、*Methylobacter* 属および *Methylosinus* 属細菌は、アンモニア酸化能を持つことが既に明らかとなっている (Cáceres *et al.*, 2014; King *et al.*, 1994)。また、Comammox (Complete ammonia oxidizer) 由来の *amoA* のうちいくつかの配列は、未培養の *Alpha*-, *Gamma*-*proteobacteria* (メタン酸化菌) として登録されていたことも報告されている (Daims *et al.*, 2015)。これらのことから、本研究においてメタン生成が起こらないと考えられる落水期に多く検出された *pmo* 転写産物 (Table 2. S2., Table 3.S3.) は、アンモニア酸化に関与しているか、もしくは *amo* 転写産物のミスアノテーションである可能性も考えられた。

これらのことから、メタン酸化細菌とアンモニア酸化細菌は双方とも互換性を持ってメタン酸化とアンモニア酸化に貢献している可能性と、ミスアノテーションされている可能性が示唆された。*amo* と *pmo* の配列は非常に似通っており、ゲノム情報のみからメタン酸化細菌・アンモニア酸化細菌を区別して検出するのは困難であると考えられる。そのため、従来のメタン菌や Comammox を初めとした *amo/pmo* like protein をコードする遺伝子を持つ細菌のアンモニア酸化への寄与を明確にするには、以下の様な手法を行う必要があると考えられた。

1. 単離培養された従来のメタン菌や Comammox を用いて、Keluskar *et al.*, 2013 の手法に従って  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  濃度を測定すると同時に培養液の濁度を測定し、アンモニア酸化を行いながら増殖していることを確認する。
2. 1.においてアンモニア酸化を行っている菌株の RNA を抽出し、*amo* が発現されていることを確認し、その配列を同定する。

### 3.3.2.2 脱窒関連遺伝子

#### 3.3.2.2.1 硝酸還元(*narG/napA*)

硝酸還元に関わる鍵酵素遺伝子 (*narG/napA*) とその転写産物は、メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析双方において高頻度に検出された。メタゲノム解析においては時期・層別の検出頻度に差異はなかったが、メタトランスクリプトーム解析においては湛水期・落水期ともにX層よりZ層の土壌において顕著に検出頻度が多かった ( $P<0.05$ ) (Figure 3.10A)。

DNA 配列情報に基づく硝酸還元微生物の群集組成については、*Betaproteobacteria* 綱 (16.6 - 25.7%), *Alphaproteobacteria* 綱 (7.45 - 20.5%), *Deltaproteobacteria* 綱 (9.33-18.9%) 由来の *narG/napA* が優占していた (Figure 3.10B)。中でも、*Betaproteobacteria* 綱の *Burkholderia* 属 (155seqs)、*Alphaproteobacteria* 綱の *Bradyrhizobium* 属 (157seqs)・*Hyphomicrobium* 属 (112seqs)、*Deltaproteobacteria* 綱の *Geobacter* 属 (195seq)・*Anaeromyxobacter* 属 (105seqs) 由来の *narG/napA* が多く検出された (Data not shown)。最も多く検出された *Deltaproteobacteria* 綱の中では、*Anaeromyxobacter*・*Geobacter*・*Sorangium* 属由来の *narG/napA* が優占していた (Figure 3.10A)。*Anaeromyxobacter* 属由来の *narG/napA* はすべてのサンプルで同程度検出されたが、*Geobacter* 属はX層よりZ層で、*Sorangium* 属はZ層よりX層で顕著に多く検出された ( $P<0.05$ )。

RNA 配列情報に基づく群集組成では、*Betaproteobacteria* 綱 (14.3-38.9%), *Deltaproteobacteria* 綱 (16.7 - 23.9 %), *Alphaproteobacteria* 綱 (8.17 - 10.9%) 由来の *narG/napA* 転写産物が優占していた (Figure 3.10B.)。 *Betaproteobacteria* 綱の中では *Candidatus Accumulibacter* 属, *Burkholderia* 属細菌、 *Alphaproteobacteria* 綱の中では *Bradyrhizobium* 属細菌由来の *narG/napA* 転写産物が複数検出された (Table 3.4.)。 *Deltaproteobacteria* 綱の中では、*Anaeromyxobacter*・*Geobacter* 属由来の *narG/napA* 転写産物が優占していた (Figure 3.10C)。これらの属は、X層よりZ層に置いて顕著に優占度が高いことがわかった

( $P < 0.05$ )。

本章のメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析では、層別・時期別の *narG/napA* とその転写産物の検出頻度、ならびに群集構造の変動が明らかになった。第 2 章においては、*narG/napA* 転写産物の配列数が不足していたため、層別の検出頻度の変動は明らかにできなかった。一方、本章では、*narG/napA* の検出頻度には有意差が見られなかったが、*narG/napA* 転写産物の検出頻度は X 層に比べて Z 層において高いことが明らかとなった(Figure 3.10A)。本反応は還元反応であるため、X 層より Z 層の土壌において高頻度に検出された本結果は妥当であると考えられる。転写産物の配列数の不足から全ての時期・層をまとめて行った第 2 章の硝酸還元細菌群集の構造解析においては、*Proteobacteria* 門、中でも *Betaproteobacteria* 綱細菌由来の *narG/napA* 転写産物が多く検出された (Figure 2.9A。) 一方、第 2 章において優占していた *Betaproteobacteria* 綱細菌は、本章の解析においては Z 層に比べて X 層において検出頻度が高く、*Deltaproteobacteria* 綱細菌は X 層に比べて Z 層において検出頻度が高いことが明らかとなった(Figure 3.10A, 10B)。 *Betaproteobacteria* 綱細菌の中で優占していた *Candidatus Accumulibacter* 属細菌は好気・嫌気環境どちらにおいても生育できる細菌であるが (Lu et al., 2006)、 *Burkholderia* 属細菌は好気性細菌である (Jianlong et al., 2002)。一方、 *Deltaproteobacteria* 綱細菌の中で優占していた *Anaeromyxobacter* 属ならびに *Geobacter* 属細菌は先述の通り嫌気性細菌である。そのため、好氣的な X 層、嫌氣的な Z 層においてこれらの割合に差が生じるのは妥当であると考えられた。これらの結果から、本水田土壌における硝酸還元は X 層においては *Betaproteobacteria* 綱細菌、Z 層においては *Deltaproteobacteria* 綱細菌が主に担っている可能性が示された。また、*narG/napA* 転写産物は X 層に比べて Z 層において高頻度に検出されたことから、より嫌氣的な Z 層において硝酸還元が活発に行われていることが考えられた。

#### 3.3.2.2.2 亜硝酸還元(*nir*)

亜硝酸還元に関わる酵素遺伝子 (*nir*) とその転写産物は、*narA/napG* と比べて低頻度に検出された。メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析双方において X 層と Z 層の検出頻度の間には有意差が見られなかった。しかし、メタトランスクリプトーム解析において X 層より Z 層の土壌において検出頻度が高い傾向が見られた(**Figure 3.11A**)。本反応は還元反応であるため、X 層より Z 層の土壌において高頻度に検出された本結果は妥当であると考えられる。

DNA 配列情報に基づく亜硝酸還元微生物の群集組成では、*Betaproteobacteria* 綱(14.5 - 25.0%), *Gammaproteobacteria* 綱(15.9 - 21.1%) , *Alphaproteobacteria* 綱(8.14 - 15.5%)由来の *nir* が優占していた(**Figure 3.11B**)。一方、同じ *Proteobacteria* 門に属する *Deltaproteobacteria* 綱の中では、同綱の中で *nir* を保有している希少な属である *Bdellovibrio* 由来の *nir* 配列が少量(0.00 - 1.50%)検出されたのみであった (**Figure 3.11C**)。優占していた *Betaproteobacteria* 綱の中では *Burkholderia* 属細菌(30seqs)、*Gammaproteobacteria* 綱の中では *Pseudomonas* 属細菌(35seqs)、*Alphaproteobacteria* 綱の中では *Bradyrhizobium* 属細菌(32seqs) 由来の *nir* が多く検出された (**Data not shown**)。

RNA 配列情報に基づく群集組成においては、*Betaproteobacteria* 綱(28.0 - 67.4%)細菌由来の *nir* 転写産物が全サンプルで最も優占していた(**Figure 3.11B**)。続いて優占していた *Gammaproteobacteria* 綱(0.00 - 29.4%), *Alphaproteobacteria* 綱(0.00 - 6.67%)細菌に関しては、それら由来の *nir* 転写産物が検出されないサンプルも複数あった。*Betaproteobacteria* 綱の中では *Burkholderia* 属細菌、*Alphaproteobacteria* 綱の中では *Bradyrhizobium* 属細菌由来の *nir* 転写産物が複数検出された。*Gammaproteobacteria* 綱細菌由来の *nir* 転写産物として同定された配列は、unclassified *Gammaproteobacteria* が最も多く、詳細な微生物種は不明であった(**Table 3.5**)。また、DNA 配列情報に基づく解析において極めて低頻度に検出された *Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の *nir* 転写産物は、RNA 配列情報に基づく解析に

おいては全く検出されなかった。

これまで水田土壌において亜硝酸還元に関わる細菌として多数検出されてきた *Alpha-, Beta-, Gammaproteobacteria* 綱細菌は、本メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析双方においても高頻度に検出された。また、最も優占していた *Betaproteobacteria* 綱の中では *Burkholderia* 属由来の *nir* とその転写産物が高頻度に検出され、*Deltaproteobacteria* 綱由来のものはほとんど検出されなかった。

本章のメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析では、第 2 章において明らかにできなかった層別・時期別の *nir* とその転写産物の検出頻度、ならびに群集構造の変動が明らかになった。第 2 章では、*Thaumarchaeota* 門古細菌由来の *nir* 転写産物が最も多く検出されたが(Figure 2.9B)、本章における解析では *Alpha-, Beta-, Gammaproteobacteria* 綱細菌由来の *nir* 転写産物が優占していた。第 2 章の解析において得られた *nir* 転写産物のリード数は本章の解析の 1/5 程度であり、亜硝酸還元微生物の多様性を網羅しているとは考えにくい。これらのことから、本水田土壌における亜硝酸還元は、*Alpha-, Beta-, Gammaproteobacteria* 綱細菌と *Thaumarchaeota* 門古細菌が担っている可能性が示唆された。また、*nir* 転写産物は X 層に比べて Z 層において高頻度に検出される傾向が見られたことから、亜硝酸還元は硝酸還元と同様に X 層に比べて Z 層において活発に行われていることが考えられた。

#### 3.3.2.2.3 一酸化窒素還元(*nor*)

一酸化窒素還元遺伝子(*nor*)とその転写産物は、層間の検出頻度に有意差が見られた( $P<0.05$ )。メタゲノム解析では、湛水期・落水期ともに X 層より Z 層の土壌において、メタトランスクリプトーム解析では、湛水期の X 層より Z 層の土壌において *nor* とその転写産物が多く検出された(Figure 3.12A.)。

DNA 配列情報に基づく一酸化窒素還元微生物の群集組成では、*Deltaproteobacteria* 綱

(28.8 - 50.4%), *Acidobacteria* 門(12.2 - 16.7%)細菌由来の *nor* が優占していた(**Figure 3.12B.**)。 *Deltaproteobacteria* 綱細菌は、X 層より Z 層において割合が高かった ( $P<0.05$ )。硝酸・亜硝酸還元微生物群集において優占していた *Alphaproteobacteria* 綱, *Betaproteobacteria* 綱, *Gammaproteobacteria* 綱細菌の割合は、一酸化窒素還元微生物群集においてはそれぞれ 2.36 - 3.47%, 6.13 - 8.07%, 4.52 - 11.3%であり、 *Deltaproteobacteria* 綱・*Acidobacteria* 門と比較すると少量であった。優占していた *Acidobacteria* 門の中では、*Geothrix* 属(95seqs)、*Thermoanaerobaculum* 属(75seqs)、*Candidatus Solibacter* 属 (64seqs)細菌由来の *nor* が高頻度に検出された (**Data not shown**)。 *Deltaproteobacteria* 綱の中では、*Anaeromyxobacter* 属 (9.64 - 19.2 %)・*Geobacter* 属(44.7 - 60.7 %)由来の *nor* が最も優占していた(**Figure 3.12C.**)。

RNA 配列情報に基づく群集組成においては、*Deltaproteobacteria* 綱(46.2 - 71.9%)細菌由来の *nor* 転写産物が全サンプルで最も優占していた(**Figure 3.12B.**)。続いて優占していた *Betaproteobacteria* 綱(0.00 - 27.7%), *Acidobacteria* 門(0.00 - 19.4%), *Gammaproteobacteria* 綱 (0.00 - 14.0%)細菌に関しては、それら由来の *nor* 転写産物が検出されないサンプルが複数あった(**Table 3.6.**)。最も優占していた *Deltaproteobacteria* 綱細菌の中では、*Anaeromyxobacter* 属由来の *nor* 転写産物が最も多く検出され (33.3 - 60.0 %)、*Geobacter*・*Desulfovibrio*・*Syntrophobacter* 属由来のものも複数検出された (**Figure 3.12C., Table 3.6.**)。

伊藤らのメタゲノム解析と同様に、本メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析双方においても *Deltaproteobacteria* 綱の *Anaeromyxobacter*・*Geobacter* 属由来の *nor* とその転写産物が多く検出された (伊藤博論, 2012)。

本章のメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析では、**第 2 章**において明らかにできなかった層別・時期別の *nor* とその転写産物の検出頻度、ならびに群集構造の変動が明らかになった。**第 2 章**においては、*nor* 転写産物の配列数が不足していたため、層別の検出頻度の変動は明らかにできなかった。一方、本章では、X 層に比べて Z 層において *nor* の検出頻度が高く、*nor* 転写産物も湛水期の X 層に比べて Z 層において高いこと

が明らかとなった(Figure 3.12A)。本反応は還元反応であるため、X 層より Z 層の土壌において高頻度に検出された本結果は妥当であると考えられる。第 2 章では、全ての時期・層をまとめて解析を行い、*Deltaproteobacteria* 綱細菌、*Acidobacteria* 門細菌の *nor* 転写産物が優占していることが示された (Figure 2.9C.)。一方、本章では全てのサンプルにおいて *Deltaproteobacteria* 綱細菌、中でも *Anaeromyxobacter* 属ならびに *Geobacter* 属細菌由来の *nor* とその転写産物が最も優占しており、メタゲノム解析に比べてメタトランスクリプトーム解析において特に *Anaeromyxobacter* 属細菌由来の *nor* 転写産物の割合が高い傾向が見られた。このことから、*nor* を保有する細菌の中で *Anaeromyxobacter* 属細菌は極めて活発にその転写を行っていることが考えられた。これらの結果から、本水田土壌における一酸化窒素還元は、主に *Anaeromyxobacter* 属ならびに *Geobacter* 属に代表される *Deltaproteobacteria* 綱細菌が担っており、特に *Anaeromyxobacter* 属細菌が活発に一酸化窒素還元に関与している可能性が示された。また、*nor* 転写産物は X 層に比べて Z 層において高頻度に検出される傾向が見られたことから、より嫌氣的な Z 層において一酸化窒素還元が活発に行われていることが考えられた。

#### 3.3.2.2.4 一酸化二窒素還元(*nos*)

一酸化二窒素還元遺伝子(*nos*)とその転写産物は、メタゲノム解析においては湛水期・落水期ともに X 層より Z 層の土壌において顕著に検出頻度が高かった ( $P<0.05$ )。一方メタトランスクリプトーム解析では、X 層より Z 層の土壌において *nos* 転写産物の検出頻度が高い傾向は見られたが、有意差はなかった(Figure 3.13A.)。

DNA 配列情報に基づく一酸化二窒素還元微生物の群集組成では、*Bacteroidetes* 門(14.0 - 30.1%), *Deltaproteobacteria* 綱(8.29 - 14.1%), *Verrucomicrobia* 門(6.50 - 9.13%)細菌由来の *nos* が優占していた(Figure 3.13B.)。 *Bacteroidetes* 門の中では *Rhodothermus* 属(32seqs), *Flavobacterium* 属(23seqs), *Deltaproteobacteria* 綱の中では *Anaeromyxobacter* 属(129seqs),



*Verrucomicrobia* 門の中では unclassified *Opitutaceae* 科および *Optitus* 属細菌(76 seqs) 由来の *nos* が多く検出された (**Data not shown**)。属レベルでは先述の通り *Deltaproteobacteria* 綱の *Anaeromyxobacter* 属由来の *nos* が優占していたが、同綱の他属では *Bdellovibrio* が湛水期の X 層で数リード検出されたのみであった(**Figure 3.13C.**)。一方で、様々な属が検出された *Bacteroidetes* 門が、門・綱レベルの組成においては優占する結果となった。

RNA 配列情報に基づく群集組成においては、*Deltaproteobacteria* 綱 (35.0 - 59.6%) 細菌由来の *nos* 転写産物が全サンプルで最も優占していた(**Figure 3.13B.**)。続いて優占していた *Bacteroidetes* 門(0.00 - 35.0%), *Alphaproteobacteria* 綱(0.00 - 50.0%), *Verrucomicrobia* 門(0.00 - 7.23%)細菌に関しては、それら由来の *nos* 転写産物が検出されないサンプルが複数あった。最も優占していた *Deltaproteobacteria* 綱細菌の中では、*Anaeromyxobacter* 属、および unclassified *Myxococcales* 科細菌由来の *nos* 転写産物が多数検出された(**Table 3.7., Figure 3.13C.**)。

DNA 配列情報に基づく群集組成は、属レベルでは *Anaeromyxobacter* 由来の *nos* が優占していたが、綱・門レベルでは *Bacteroidetes* 門由来の *nos* が優占する結果となった。一方で、RNA 配列情報に基づく群集組成では、*Deltaproteobacteria* 綱の *Anaeromyxobacter* 属由来の *nos* とその転写産物が最も多く検出され、*Bacteroidetes* 門由来のものに比べて全サンプルにおいてその割合が高かった。これまでに多く検出されてきた *nosZ* を保有する細菌は、*Alpha-, Beta-, Gamma-proteobacteria* 綱細菌であり、これらは *nosZ* の Clade I に分類される。一方、2013 年に Jones らによって新規プライマーが作成されるまでは、Clade II に分類される *Deltaproteobacteria* 綱と *Bacteroidetes* 門細菌の検出は不可能であった (Jones *et al.*, 2013)。また、メタトランスクリプトーム解析において最も優占していた *Anaeromyxobacter* 属細菌は、改良されたプライマーを用いても増幅できないことが報告されている (Jones *et al.*, 2013)。このように、新規なプライマーを用いても PCR による解析ではバイアスを回避できず、メタトランスクリプトーム解析の重要性が伺える結果

となった。

第2章では、全ての時期・層をまとめて解析を行い、*Deltaproteobacteria* 綱細菌の *nos* 転写産物が優占していることが示された (Figure 2.9D.)。一方、本章では全てのサンプルにおいて *Deltaproteobacteria* 綱細菌、中でも *Anaeromyxobacter* 属細菌由来の *nos* とその転写産物が最も優占しており、メタゲノム解析に比べてメタトランスクリプトーム解析において *Deltaproteobacteria* 綱細菌の割合が高い傾向が見られた。このことから、メタゲノム解析において最も優占していた *Bacteroidetes* 門細菌に比べて *Deltaproteobacteria* 綱細菌は活発に *nos* の転写を行っていることが考えられた。これらの結果から、本水田土壌における一酸化二窒素還元は、主に *Anaeromyxobacter* 属に代表される *Deltaproteobacteria* 綱細菌が担っている可能性が示された。また、*nos* やその転写産物は X 層に比べて Z 層において高頻度に検出される傾向が見られたことから、より嫌氣的な Z 層において一酸化二窒素還元が活発に行われていることが考えられた。

#### 3.3.2.2.5 脱窒反応のまとめ

本章のメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析において、*Beta-*, *Alpha-*, *Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の *narG/napA* とその転写産物、*Beta-*, *Gamma-*, *Alphaproteobacteria* 綱細菌由来の *nirS*, *nirK* とその転写産物、*Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の *norB* とその転写産物、*Deltaproteobacteria* 綱, *Bacteroidetes* 門細菌由来の *nosZ* とその転写産物が多く検出された。このように、本水田土壌においては、それぞれのステップにおいて優占していた脱窒菌の分類群は異なっていた。脱窒反応の全体に対してどのような分類群の脱窒菌がより大きく寄与しているかを詳細に見るために、全ての土壌サンプルにおいて2つ以上のステップの脱窒遺伝子を転写していた属を調べた (Table 3.11.)。その結果、水田土壌においてこれまでに脱窒菌として多く単離されてきた *Betaproteobacteria* 綱の *Burkholderia* 属、*Alphaproteobacteria* 綱の *Bradyrhizobium* 属よりも

*Anaeromyxobacter* 属、*Geobacter* 属細菌の脱窒遺伝子が複数のステップを同時に担っていることがわかった。特に *Anaeromyxobacter* 属は、記載した全てのサンプルにおいて2つ以上の脱窒遺伝子の転写産物が検出された。このことから、全ての時期の土壌において *Anaeromyxobacter* 属細菌は部分的に脱窒反応を駆動している可能性が強く示された。

層別の脱窒機能遺伝子とその転写産物の検出頻度は、X層に比べてZ層において高い傾向が見られた。脱窒反応は還元的な反応であり、X層に比べてより還元的なZ層においてその検出頻度が高いという結果は妥当なものであると考えられた。先述したように、*nir* とその転写産物以外の群集構造において優占が見られた *Deltaproteobacteria* 綱細菌は、rRNA に基づく群集構造解析においてもZ層で特に優占していた。

これらの結果から、水田土壌では *nir* を持たない *Deltaproteobacteria* 綱細菌が  $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$  以外の全てのステップに大きく貢献しており、特にZ層において活発に部分的な脱窒反応を駆動していることが示された。

### 3.3.2.3 DNRA 関連遺伝子 (*nrf*)

DNRA 関連遺伝子 (*nrf*) とその転写産物は、メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析ともに湛水期のX層よりZ層の土壌において顕著に検出頻度が高かった ( $P < 0.05$ )。落水期にも同様の傾向であったが、有意差は見られなかった(Figure 3.14A.)。

DNA 配列情報に基づく DNRA 微生物の群集組成では、*Deltaproteobacteria* 綱細菌(51.1 - 57.7%)由来の *nrf* が優占していた。また、*Verrucomicrobia* 門(5.14 - 11.0%), *Acidobacteria* 門(2.31 - 6.03%)細菌, *Betaproteobacteria* 綱(0.67 - 6.41%)由来の *nrf* も全サンプルで検出された(Figure 3.14B.)。 *Deltaproteobacteria* 綱の中では *Geobacter* 属(25.2 - 42.1 %), *Anaeromyxobacter* 属(14.0 - 29.1%)細菌由来の *nrf* が最も優占していた (Figure 3.14C.)。続いて優占していた *Verrucomicrobia* 門の中では *Chthoniobacter* 属細菌(40seqs), *Acidobacteria* 門の中では *Geothrix* 属細菌(18seqs), *Betaproteobacteria* 綱の中では *Sutterella*

属細菌(26seqs) 由来の *nrf* が多く検出された (**Data not shown**)。

RNA 配列情報に基づく群集組成においても、*Deltaproteobacteria* 綱 (60.9 - 85.7%) 細菌由来の *nrf* 転写産物が全サンプルで最も優占していた。*Verrucomicrobia* 門(0.00 - 16.8%), *Acidobacteria* 門(0.00 - 2.97%)細菌由来の *nrf* 転写産物も、湛水期 Z 層・落水期 X 層において検出された(**Figure 3.14B.**)。 *Deltaproteobacteria* 綱の中では *Anaeromyxobacter* 属(25.0 - 36.4 %), *Geobacter* 属(16.7 - 34.2 %)由来の *nrf* 転写産物が最も優占していた(**Figure 3.14C.**)。また、*Verrucomicrobia* 門の中では *Opitutus* 属由来の *nrf* 転写産物が複数検出された(**Table 3.8.**)。本研究において多く検出された *Deltaproteobacteria* 綱細菌の中では、いくつかの種の *Anaeromyxobacter*, *Geobacter*, *Pelobacter* 属細菌や *Desulfovibrio* 属等の硫酸還元菌が DNRA 活性を持つことが既に明らかになっている (Sanford *et al.*, 2002; Sung *et al.*, 2006; Narasingarao *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2010)。

第 2 章では、全ての時期・層をまとめて解析を行い、*Deltaproteobacteria* 綱細菌の *nrf* 転写産物が優占していることが示された (**Figure 2.9E.**)。一方、本章では全てのサンプルにおいて *Deltaproteobacteria* 綱細菌、中でも *Anaeromyxobacter* 属, *Geobacter* 属細菌由来の *nrf* とその転写産物が最も優占していた。水田土壌における DNRA 微生物の群集構造について解析されたのは、これまで伊藤らのメタゲノム解析のみであった。本メタゲノム解析においても同様の傾向が見られたが、実際に *nrf* が転写されていることは本メタトランスクリプトーム解析において初めて明らかになった。

これらの結果から、本水田土壌における DNRA は、主に *Anaeromyxobacter* 属, *Geobacter* 属に代表される *Deltaproteobacteria* 綱細菌が担っている可能性が示された。また、*nrf* やその転写産物は湛水期の X 層に比べて Z 層において高頻度に検出される傾向が見られたことから、より嫌氣的な湛水期の Z 層において DNRA が活発に行われていることが考えられた。

### 3.3.2.4 窒素固定関連遺伝子 (*nif*)

窒素固定関連遺伝子 (*nif*) とその転写産物は、メタゲノム解析においては湛水期・落水期ともに X 層より Z 層の土壌において顕著に検出頻度が高かった ( $P<0.05$ )。一方メタトランスクリプトーム解析では、湛水期の X 層より Z 層の土壌において検出頻度が高い傾向にあったが、有意差はなかった(Figure 3.15A.)。

DNA 配列情報に基づく窒素固定微生物の群集組成では、*Deltaproteobacteria* 綱細菌 (46.2 - 52.5%)由来の *nif* が最も優占しており、続いて *Alphaproteobacteria* 綱(7.36 - 15.4%)、*Betaproteobacteria* 綱(4.35 - 6.77%)細菌由来の *nif* が優占していた(Figure 3.15B.)。*Deltaproteobacteria* 綱の中では *Geobacter* 属(43.1 - 57.0 %), *Anaeromyxobacter* 属(8.13 - 19.7 %), *Desulfobacca* 属(5.15 - 22.0 %)由来の *nif* が優占していた(Figure 3.15C.)。また、*Alphaproteobacteria* 綱の中では *Bradyrhizobium* 属(35seqs)細菌由来の *nif* が多く検出された (Data not shown)。

RNA 配列情報に基づく群集組成においても、*Deltaproteobacteria* 綱細菌 (52.3 - 100%) 由来の *nif* 転写産物が最も優占していた(Figure 3.15B.)。 *Deltaproteobacteria* 綱の中では *Geobacter* 属(50.0 - 66.7 %)由来の *nif* 転写産物が最も優占しており、*Anaeromyxobacter* 属 (0 - 25.0 %), *Desulfobacca* 属 (4.17 - 50.0 %)細菌由来の *nif* 転写産物も複数検出された (Table 3.9., Figure 3.15C.)。

第 2 章の全時期をまとめた群集構造の結果においては、*Cyanobacteria* 門と *Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の *nif* 転写産物が多く検出された(Figure 2.9F.)。一方で、本章におけるメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析では、最も優占していた *Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の *nif* とその転写産物の割合が *Cyanobacteria* 門のものより顕著に高かった。

これまで水田における窒素固定菌として、*Cyanobacteria* 門細菌、*Alpha*-, *Beta-proteobacteria* 等の根圏細菌が注目されてきた (辻村, 2000; Reinhold-Hurek and Hurek,

1998)。しかしながら本研究では、これまで鉄還元菌として知られてきた *Deltaproteobacteria* 綱の *Geobacter* ならびに *Anaeromyxobacter* 属細菌、硫酸還元菌として知られてきた *Desulfobacca* 属細菌由来の *nif* とその転写産物が全ての時期・層の土壌において優占していることが明らかとなった。これらの属の細菌は、先述した通り嫌気性細菌として知られている。これらの結果から、本水田土壌における窒素固定は、主に *Deltaproteobacteria* 綱細菌が担っている可能性が示された。また、*nif* は X 層に比べて Z 層において高頻度に検出されたことから、より嫌氣的な Z 層において嫌気性 *Deltaproteobacteria* 綱細菌による窒素固定が活発に行なわれていることが考えられた。

実際、本研究において *nif* 転写産物が検出された *Deltaproteobacteria* 綱に属する細菌のうちいくつかの種は、窒素固定活性を持つことが報告されている。例えば、硫酸還元菌として知られている *Desulfovibrio africanus*, *Desulfomicrobium baculatum*, *Desulfovibrio salexigens*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfotomaculum orientis* は、窒素欠乏培地において生育できることが報告されている (Steppe *et al.*, 2002; Riederer-Henderson *et al.*, 1970)。また、鉄還元菌として知られている *Geobacter metallireducens*, *Geobacter sulfurreducens* も、窒素欠乏培地で生育可能であり、アセチレン還元活性も持つことが報告されている (Bazylnski *et al.*, 2000; Methe *et al.*, 2005)。先述した通り、本研究において *nif* 転写産物が検出された *Anaeromyxobacter*, *Geobacter* 属細菌は、嫌気状態を好む細菌として知られている (Sanford *et al.*, 2002; Prakash *et al.*, 2010)。そのため、これまで培養法によってこれらが検出されてこなかった理由として、窒素固定細菌として古くから知られてきた *Rhizobiales* 属や *Cyanobacteria* 門細菌と同様に好気環境で分離が試みられてきたことが多かったことが考えられた。また、PCR ベースの手法においても、細菌の種類によって *nif* 遺伝子が検出できる場合とできない場合がある (Mårtensson *et al.*, 2009) ことから、プライマーや PCR 条件が不適切である可能性も考えられた。

### 3.4 本章のまとめ

水田土壌における細菌の群集構造は、メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析とともに *Deltaproteobacteria* 綱細菌、特に *Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌が優占していることが確認された。嫌気環境を好むこれらの細菌は、湛水期・落水期ともに下層部において特に優占していた。一方、*Deltaproteobacteria* 綱の中でも好気環境を好む *Chondromyces* 属・*Sorangium* 属細菌は、落水期の X 層においてその割合が増加していることがわかった。このように、水田土壌において優占している細菌は *Deltaproteobacteria* 綱細菌であるが、湛水・落水という水管理による環境の変化に伴い、属レベルの群集組成が変化することが示された。古細菌の群集構造では、*Methanomicrobia* 綱, *unclassified Thaumarchaeota* 門古細菌の優占が見られ、湛水期の Z 層でメタン生成菌として知られる *Methanomicrobia* 綱古細菌の割合が増加することがわかった。また、メタトランスクリプトーム解析においては、Z 層に比べて X 層においてアンモニア酸化古細菌を多く含む *unclassified Thaumarchaeota* 門古細菌の優占が顕著に見られた。このことから、湛水期 Z 層において *Methanomicrobia* 綱古細菌によるメタン生成が、X 層において *unclassified Thaumarchaeota* 門古細菌によるアンモニア酸化が行われている可能性が考えられた。

細菌・古細菌群集構造に関するこれらの知見は、第 2 章で得られたものと概ね一致していた。このことから、メタトランスクリプトーム解析によって得られる rRNA 配列をベースとした群集構造解析においては、シーケンシングバイアスは小さいということが示唆された。

本研究における機能遺伝子の解析から、水田土壌における窒素循環反応に関与する遺伝子とその転写産物の検出頻度の変遷が初めて明らかになった。アンモニア酸化に関してはメタトランスクリプトーム解析において湛水期の Z 層より X 層で転写量が高くなる結果が得られた。一方、その他の還元的窒素循環反応に関しては、遺伝子とその転写産物の検出頻度に有意差が見られたものは、全て X 層より Z 層において高いという結果が

得られた。これらの結果は、嫌気反応である還元的窒素循環が、嫌気状態の保たれる Z 層において X 層より活発に行われていることを示唆するものである。

また、還元的窒素循環反応に関与する微生物群集の組成からは、*Deltaproteobacteria* 綱細菌の優占が見られた。同綱の細菌は、亜硝酸還元 (*nir*) 以外の還元的窒素循環反応に関わる全ての遺伝子とその転写産物において優占していた。中でも、*Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属の優占が顕著であった (**Figure 3.17B.**)。これらの細菌は、前述の通り嫌気状態を好む細菌である。そのため、これらの遺伝子とその転写産物の検出頻度が Z 層において高いという結果(**Figure 3.17A.**)は妥当なものであると考えられる。第 2 章の全時期・層を合わせた群集構造解析において、*Deltaproteobacteria* 綱細菌は部分的な脱窒、DNRA、窒素固定といった還元的窒素循環反応を主に担っている可能性が示唆された。本章の解析では、全ての時期の全ての層において *Deltaproteobacteria* 綱細菌、中でも *Anaeromyxobacter* 属、および *Geobacter* 属細菌由来の還元的窒素循環関連遺伝子とその転写産物が高頻度に検出され、特に還元的な環境である Z 層においてこれらの細菌が **Figure 3.16** に示したような還元的窒素循環反応を活発に駆動していることが示された。

メタトランスクリプトーム解析では、メタゲノム解析と比較して還元的窒素循環反応に関わる微生物群集構造における多様性が低い傾向が見られた(**Table 3.10.**)。このことから、還元的窒素循環反応に関わる遺伝子を保有していても、積極的に転写していない微生物が多数存在する可能性が考えられた。しかしながら、どの微生物由来の機能遺伝子がどの程度存在しているのかを確認するという意味において、ポテンシャルを知ることができるメタゲノム解析は重要な役割を持つと考えられる。

本章では、第 2 章において配列数が不足していたために確認できなかった「窒素循環関連微生物の群集構造とその転写産物の検出頻度の変遷」が初めて示された。



## 参考文献

辻村茂男(2000)土壤藻類の働きと利用, 新・土の微生物(7)生態的に見た土の原生動物・藻類, 日本土壤微生物学会編, p.127-158, 博友社, 東京

Anderson RT, Vrionis HA, Ortiz-Bernad I, Resch CT, Long PE, Dayvault R, *et al.* (2003) Stimulating the in situ activity of *Geobacter* species to remove uranium from the groundwater of a uranium-contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol.* 69:5884-5891.

Cáceres M, Gentina JC, Aroca G. Oxidation of methane by *Methylobacterium album* and *Methylocystis* sp. in the presence of H<sub>2</sub>S and NH<sub>3</sub>. *Biotechnol Lett.* 36:69-74.

Castenholz RW. (2001) In George M Garrity ed. *The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria, bergey's manual of systematic bacteriology* 2nd edn, vol, One, Springer: New York, NY, USA.

Daims H, Lebedeva EV, Pjevac P, Han P, Herbold C, Albertsen M, *et al.* (2015) Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature.* 528;504-509.

Garcia JL, Patel BKC, Ollivier B. (2000) Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe.* 6:205-226.

Giannoukos G, Ciulla DM, Huang K, Haas BJ, Izard J, Levin JZ, *et al.* (2012) Efficient and robust RNA-seq process for cultured bacteria and complex community transcriptomes. *Genome Biol.* 13:R23

Jianlong W, Xiangchun Q, Liping Hm Yi Q, Hegemann W. (2002) Microbial degradation of quinolone by immobilized cells of *Burkholderia pickettii*. Water Res. 36:2288-2296.

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.

Kane SR, Chakicherla AY, Chain PS, Schmidt R, Shin MW, Legler TC, *et al.* (2007) Whole-genome analysis of the methyl tert-butyl ether-degrading beta-proteobacterium *Methylibium petroleiphilum* PM1. J Bacteriol. 189:1931-1945.

Kessel MA, Speth DR, Albertsen M, Nielsen PH, Op den Camp HJ, Kartal B, *et al.* (2015) Complete nitrification by a single microorganism. Nature. 528;555-559.

Klammer S, Knapp B, Insam H, Dell'Abate MT, Ros M. (2008) Bacterial community patterns and thermal analyses of composts of various origins. Waste Manag Res. 26:173-187.

Lu H, Oehmen A, Virdis B, Keller J, Yuan Z. (2006) Obtaining highly enriched cultures of *Candidatus Accumulibacter* phosphates through alternating carbon sources. Water Res. 40:3838-3848.

Martens-Habben W, Stahl DA. (2011) Nitrogen metabolism and kinetics of ammonia-oxidizing archaea. Methods Enzymol. 496:465-487.

Master ER, Mohn WW. (1998) Psychrotolerant bacteria isolated from Arctic soil that degrade polychlorinated biphenyls at low temperatures. *Appl Environ Microbiol.* 64:4823-4829.

Men Y, Han P, Helbling DE, Jehmlich N, Herbold C, Gulde R, *et al.* (2016) Biotransformation of Two Pharmaceuticals by the Ammonia-Oxidizing Archaeon *Nitrososphaera gargensis*. *Environ Sci Technol.* 50:4682-4692.

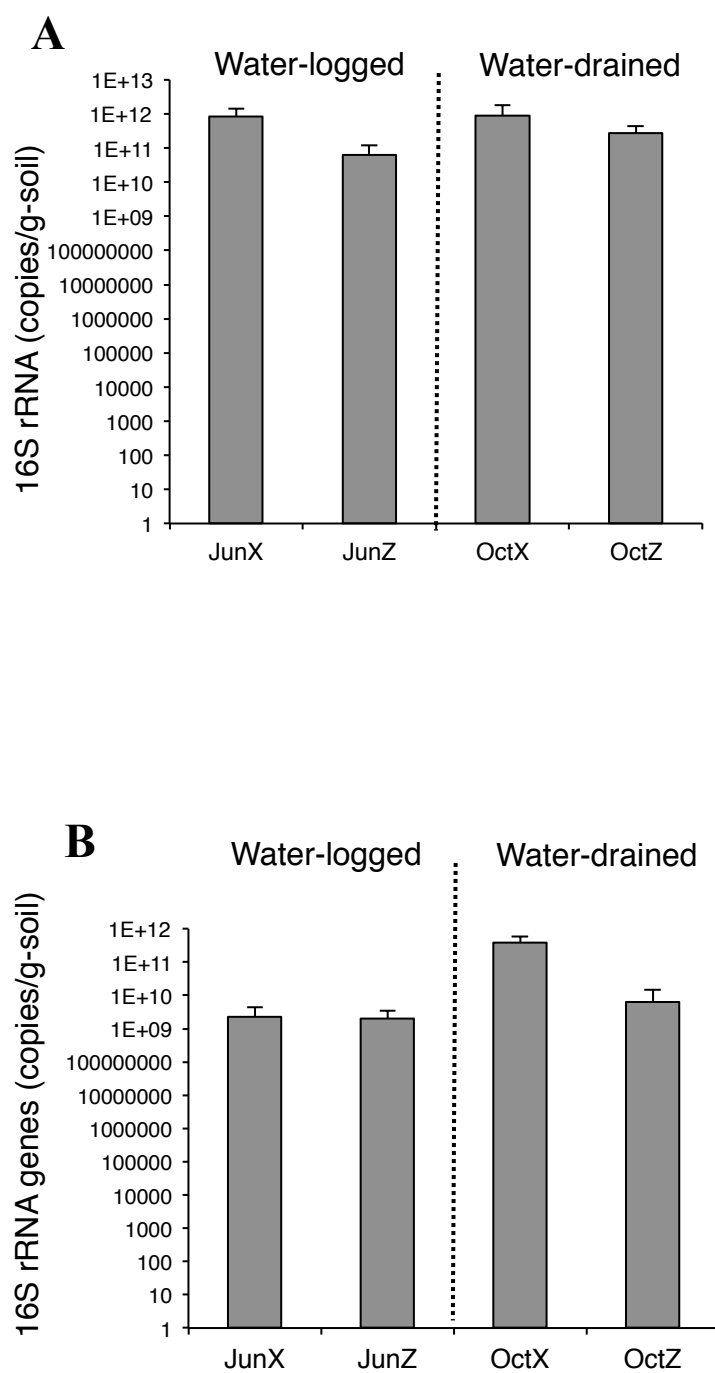
Preisig O, Anthamatten D, Hennecke H. (1993) Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:3309-3313.

Reinhold-Hurek B, and Hurek T. (1998) Life in grasses: Diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol.* 6:139-144.

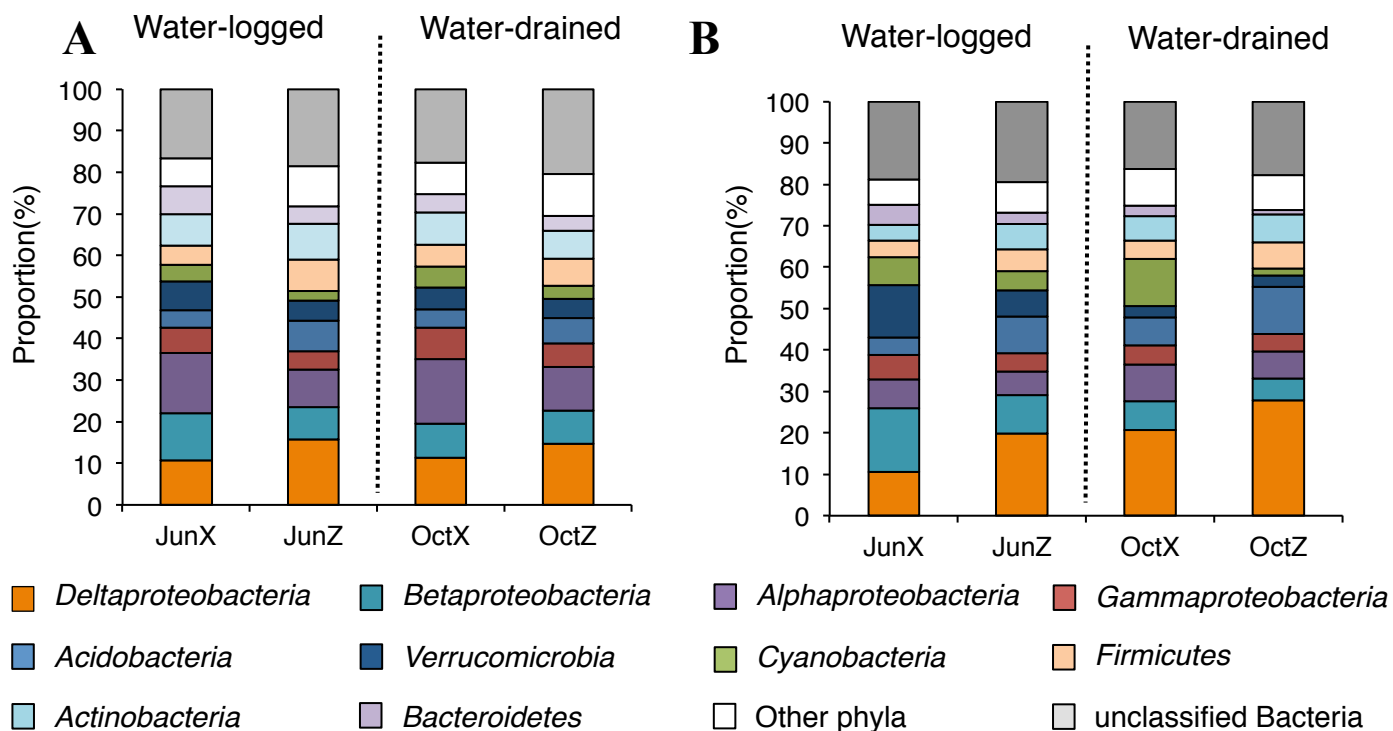
Sanford RA, Cole JR, Tiedje JM. (2002) Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halo-respiring facultative anaerobic myxobacterium. *Appl Environ Microbiol.* 68:893-900.

Schmieder, R. and R. Edwards. (2011) Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics.* 27:863-864.

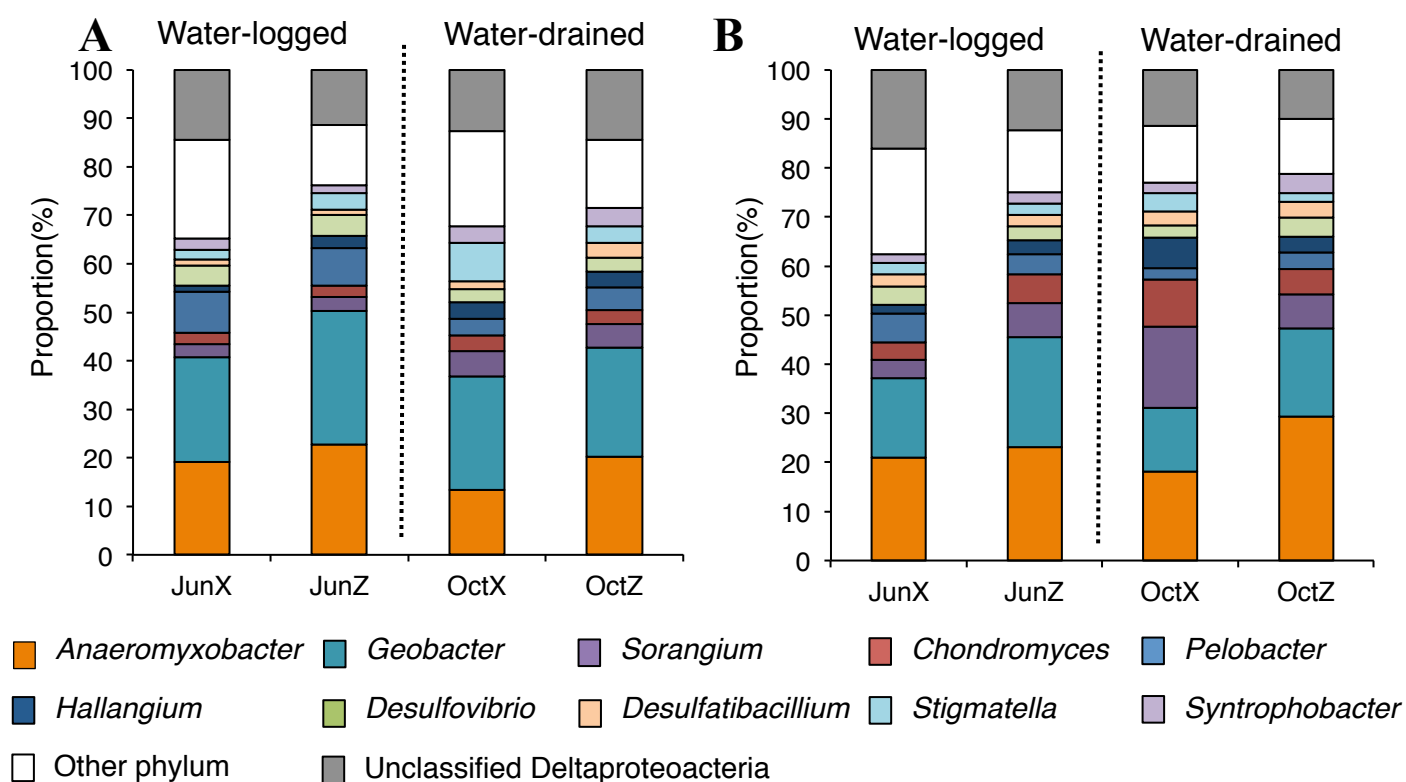
Veen WL, Mulder EG, Deinema MH. (1978) The *Sphaerotilus-Leptothrix* group of bacteria. *Microbiol Rev.* 42:329-356.



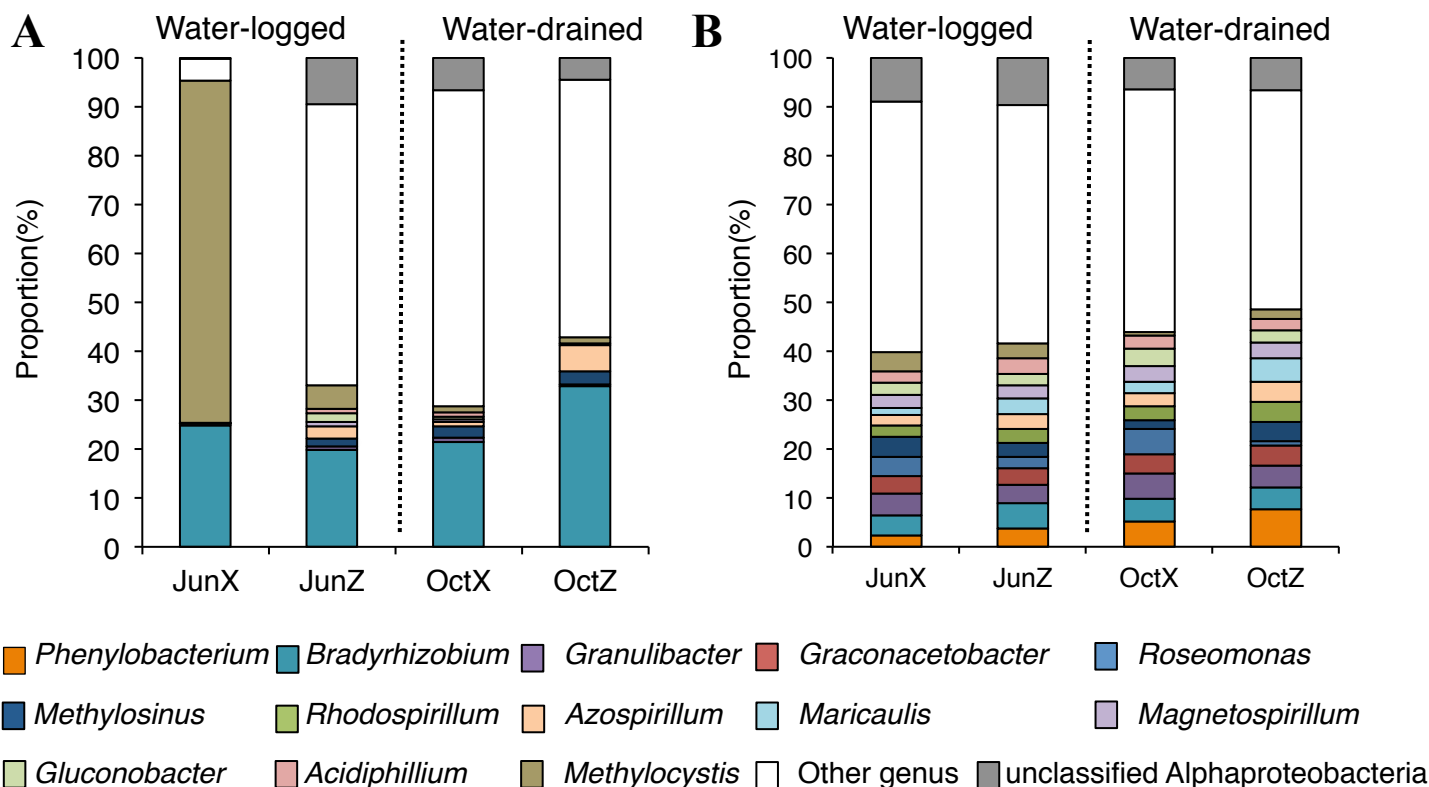
**Figure 3.1.** Copy number of bacterial 16S rRNA(A) and 16S rRNA genes(B).



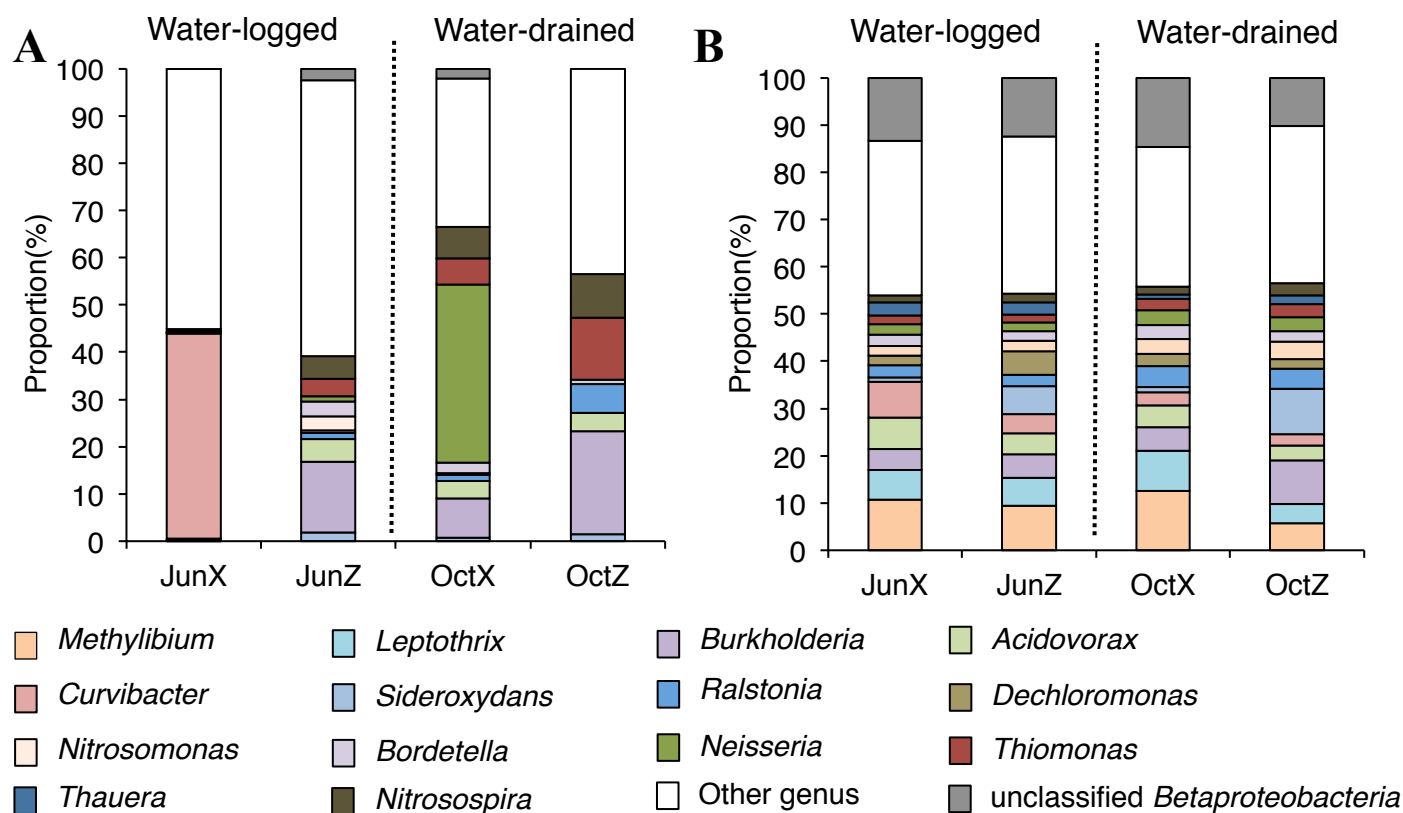
**Figure 3.2.** Relative abundance of rDNA of bacterial phylum in metagenome(A) and rRNA of bacterial phyla in metatranscriptome (B) in the paddy soils from two depth (X and Z) in two different periods. Most dominant bacterial phylum, Proteobacteria, was classified and shown at the class level as *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, and *Delta*-proteobacteria. Data is shown as mean value of three replicates.



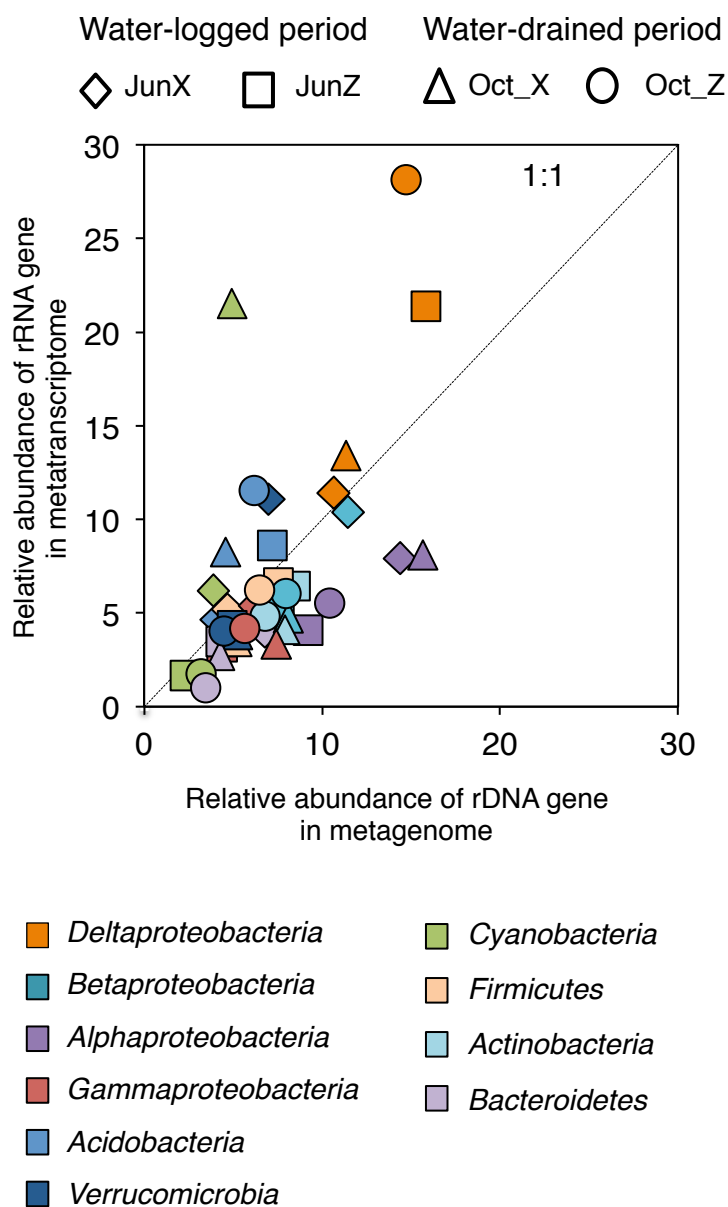
**Figure 3.3.** Relative abundance of rDNA of Deltaproteobacterial genus in metagenome (A) and rRNA of Deltaproteobacterial genera in metatranscriptome (B) in the paddy soils from two depth (X and Z) in two different periods. Data is shown as mean value of three replicates.



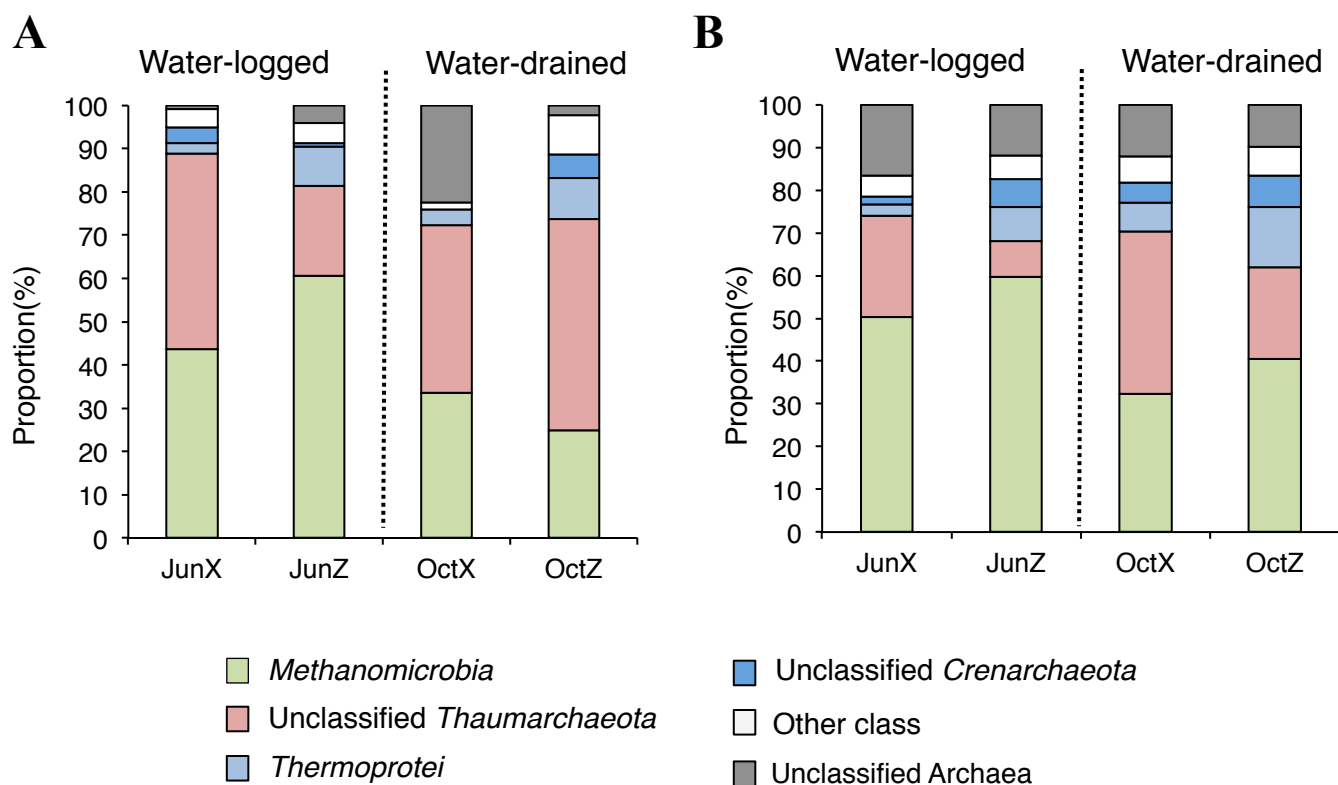
**Figure 3.4.** Relative abundance of rDNA of Alphaproteobacterial genera in metagenome (A) and rRNA of Alphaproteobacterial genus in metatranscriptome (B) in the paddy soils from two depth (X and Z) in two different periods. Data is shown as mean value of three replicates.



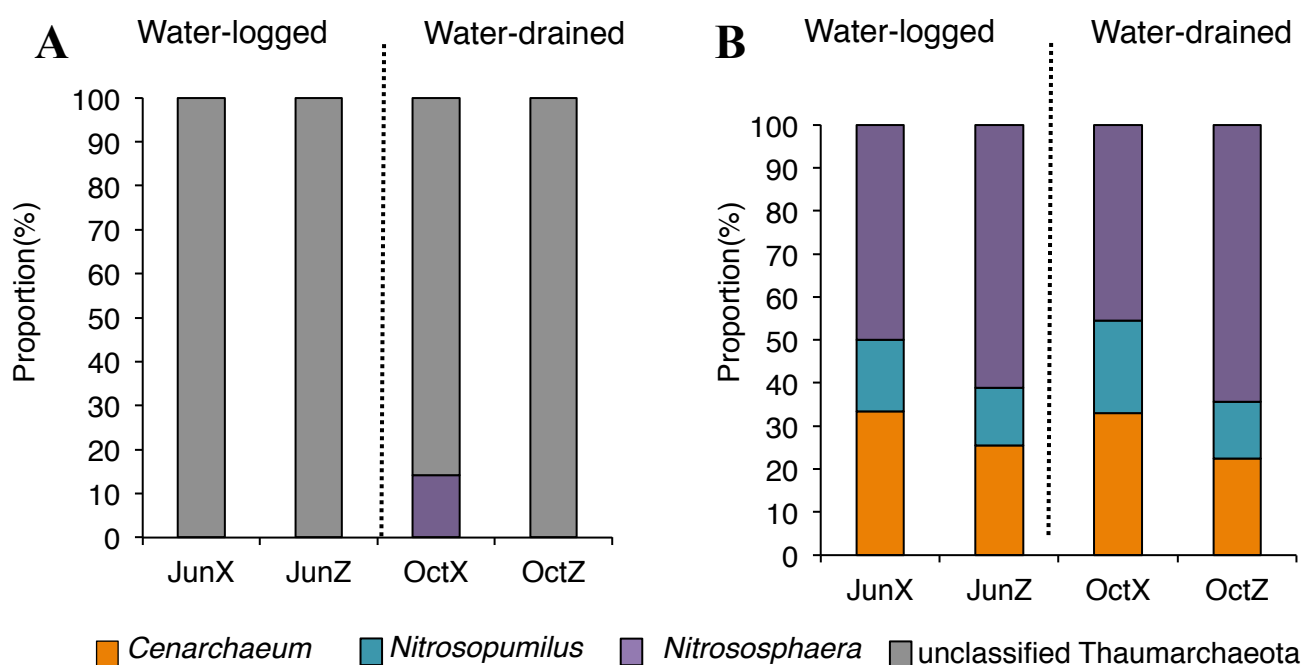
**Figure 3.5.** Relative abundance of rDNA of Betaproteobacterial genera in metagenome (A) and rRNA of Betaproteobacterial genus in metatranscriptome (B) in the paddy soils from two depth (X and Z) in two different periods. Data is shown as mean value of three replicates.



**Figure 3.6.** Relationship of relative abundance of rRNA of bacterial phyla in metagenome and metatranscriptome in the paddy soils from two depth (X and Z) in two different periods. Most dominant bacterial phylum, Proteobacteria, was classified and shown at the class level as *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, and *Delta*-proteobacteria. Data is shown as mean value of three replicates.

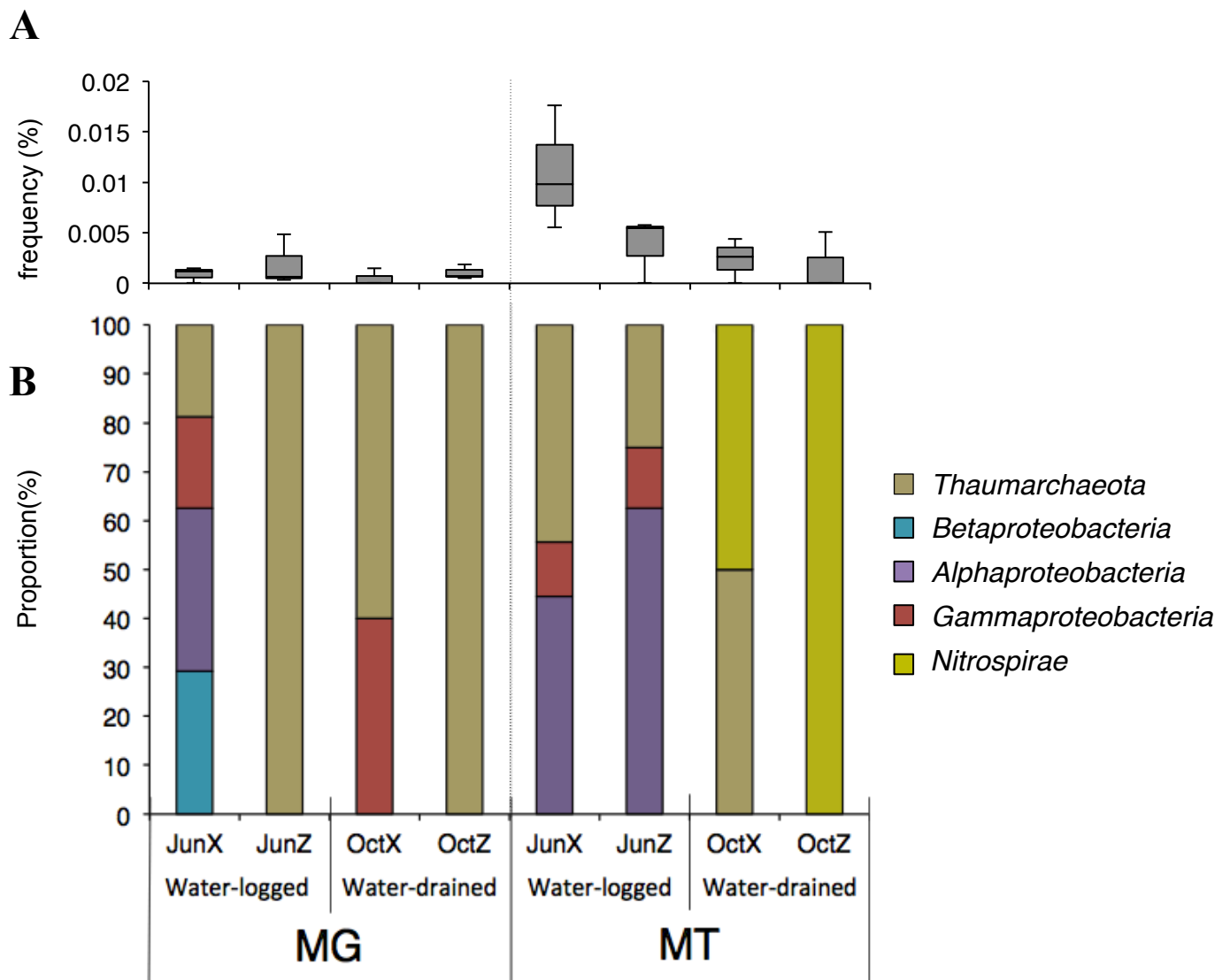


**Figure 3.7.** Relative abundance of rDNA of archaeal class in metagenome (A) and rRNA of archaeal class in metatranscriptome (B) in the paddy soils from two depth (X and Z) in two different periods. Data is shown as mean value of three replicates.

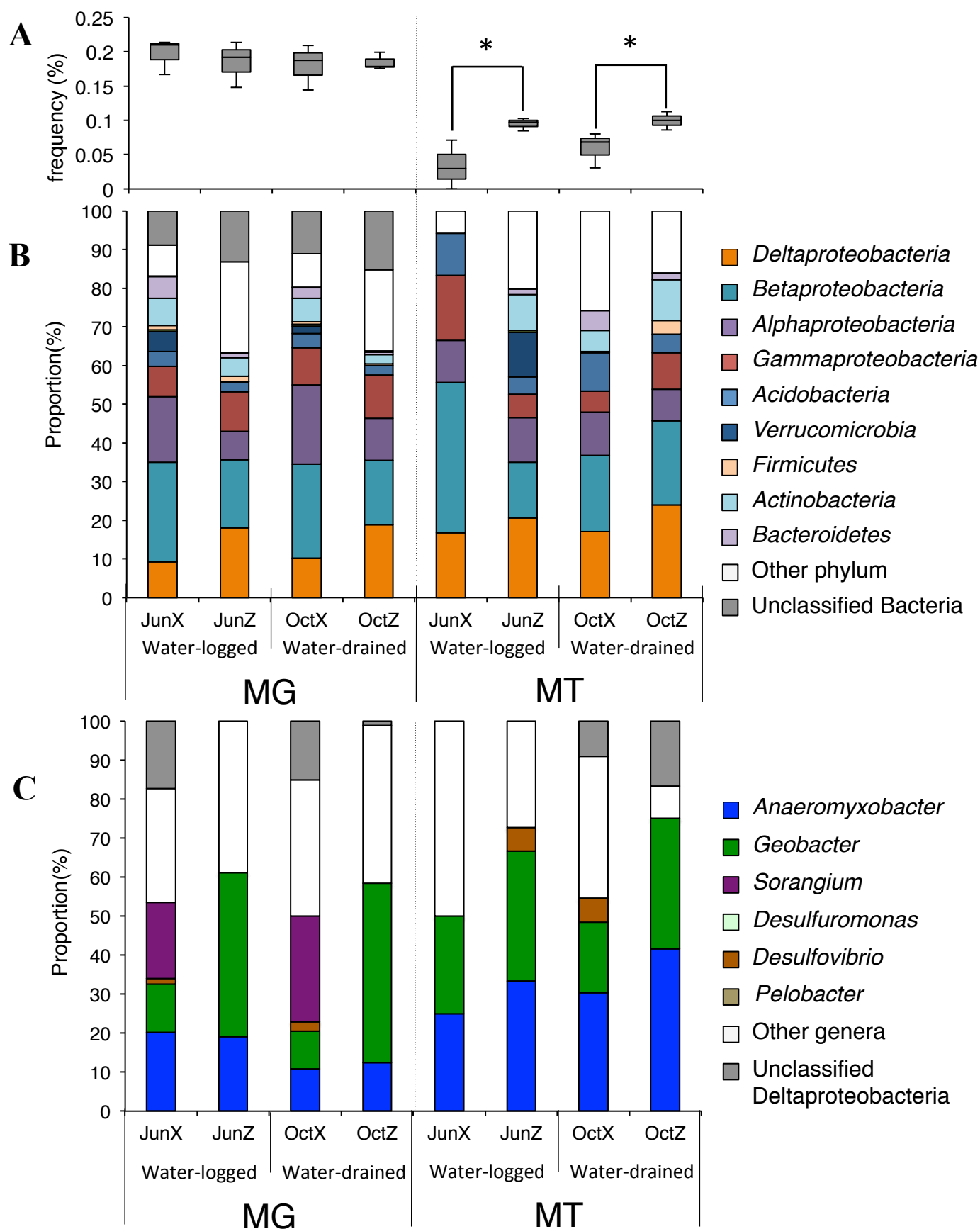


**Figure 3.8.** Relative abundance of rDNA of (A) Thaumarchaeota-genus in metagenome and rRNA of (B) Thaumarchaeota-genus in metatranscriptome in the paddy soils from two depth (X and Z) in two different periods. Data is shown as mean value of three replicates.

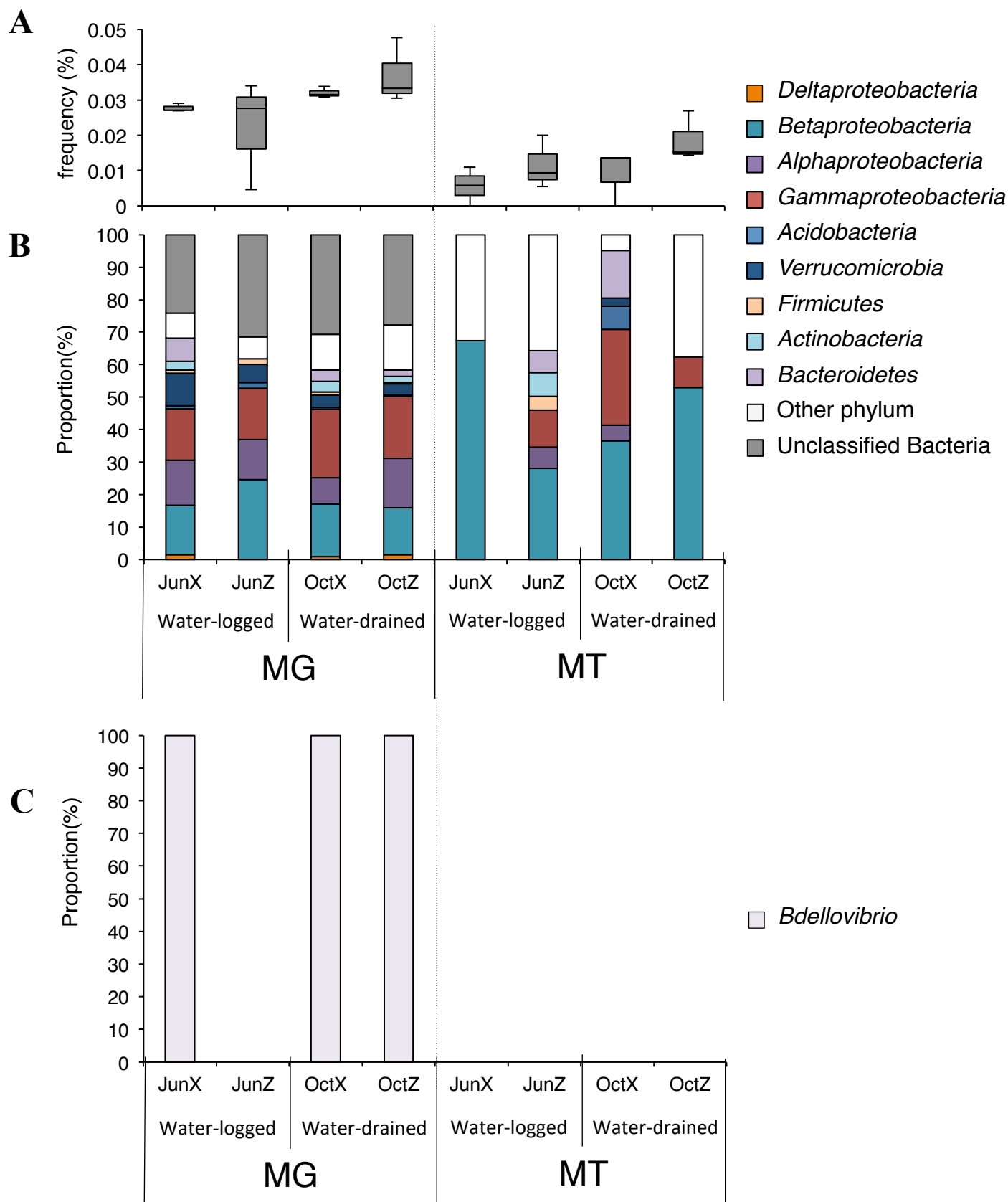




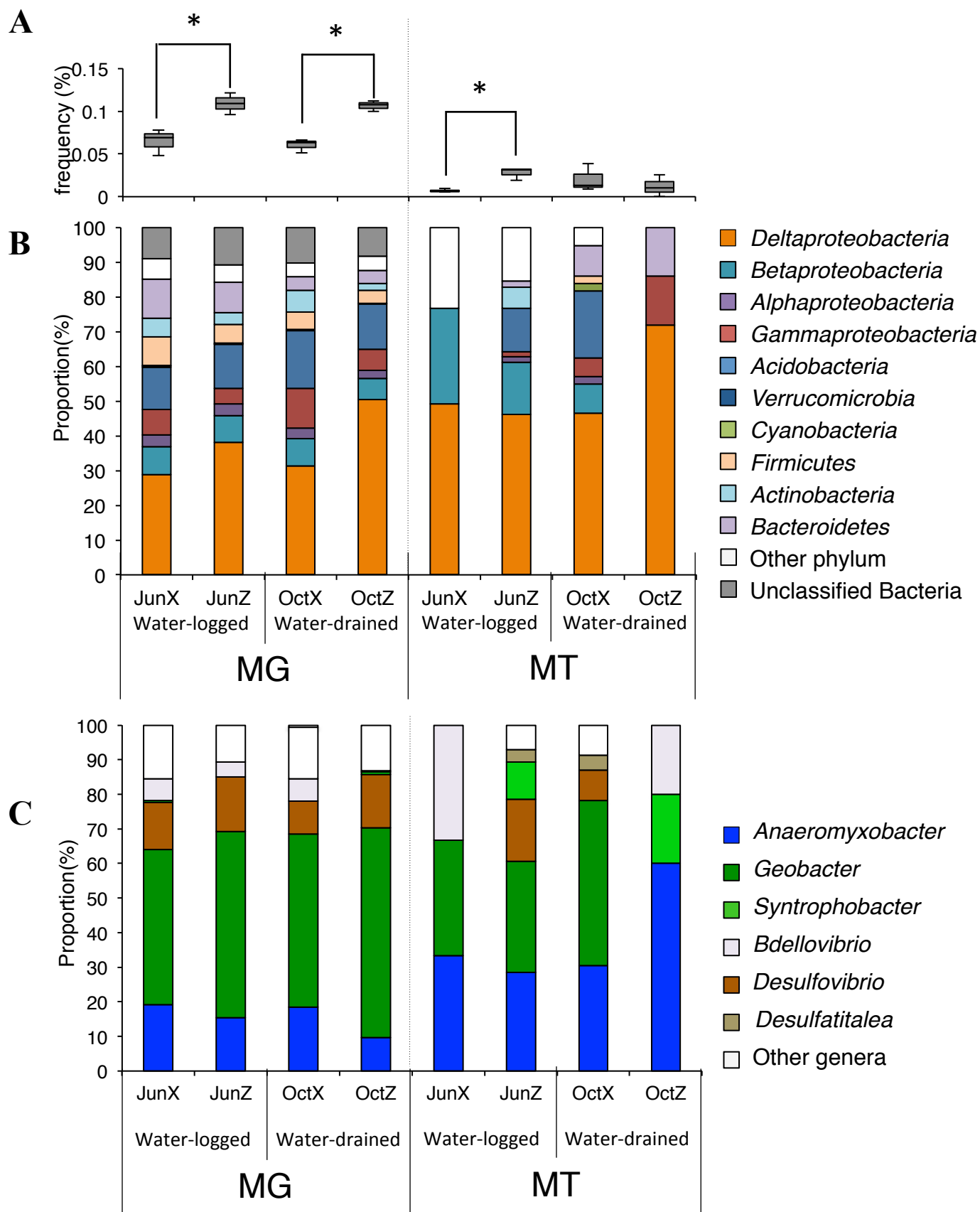
**Figure 3.9.** Relative abundance of genes in all protein-coding genes relevant to ammonia oxidation(*amo*) (A) and the composition of the the assigned bacterial phyla and archaeal class (B) in metagenome (MG) and metatranscriptome(MT) in the paddy soils from two depth (X and Z) in different periods. Data is shown as mean value of three replicates.



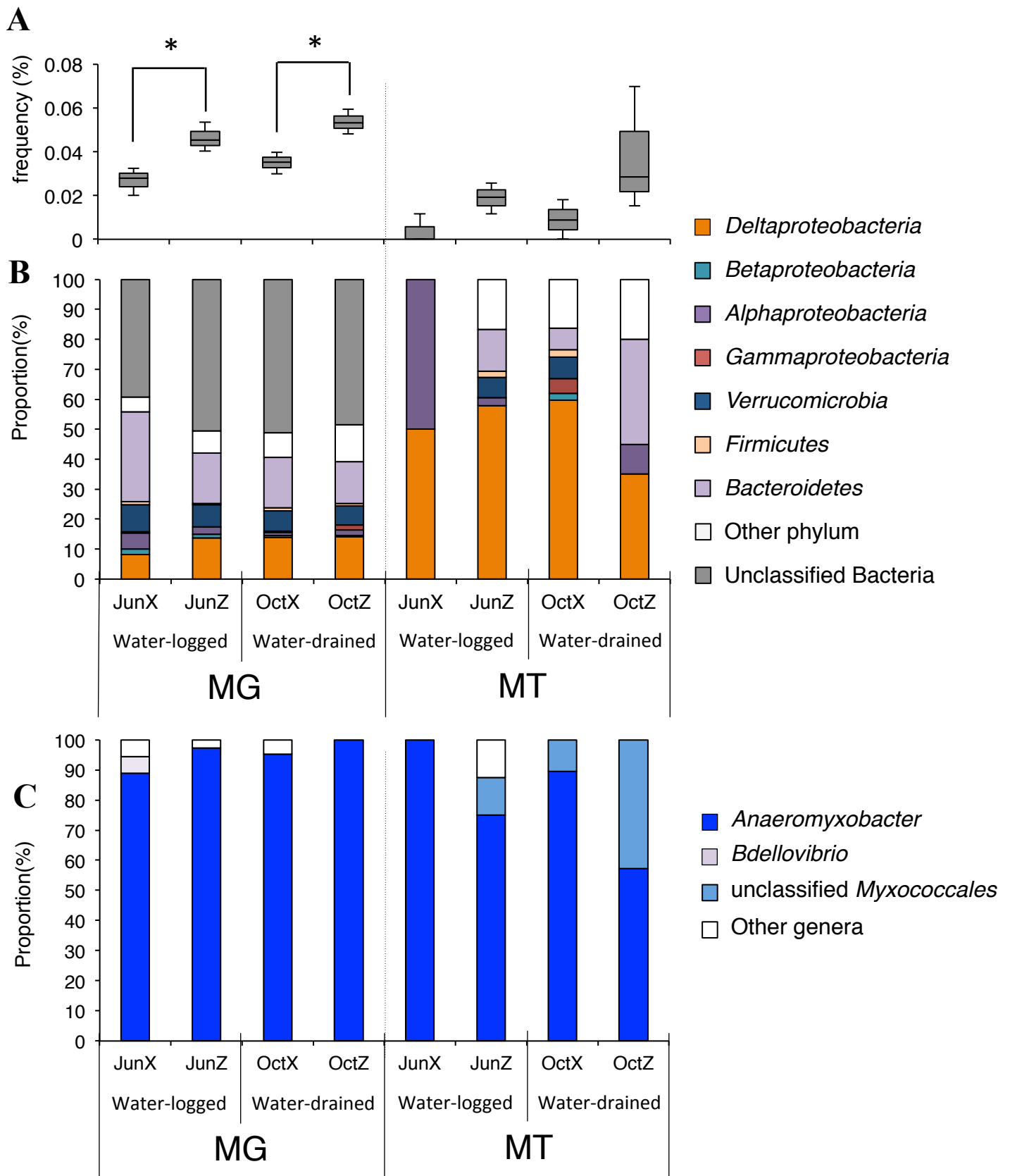
**Figure 3.10.** Relative abundance of genes in all protein-coding genes relevant to nitrate reduction(*narG/napA*) (A) and the composition of the assigned bacterial phyla(B) and Deltaproteobacterial genera (C) in metagenome (MG) and metatranscriptome(MT) in the paddy soils from two depth (X and Z) in different periods. Data is shown as mean value of three replicates. Asterisks indicate statistically significant differences (Mann-Whitney U test; \*,  $P < 0.01$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ).



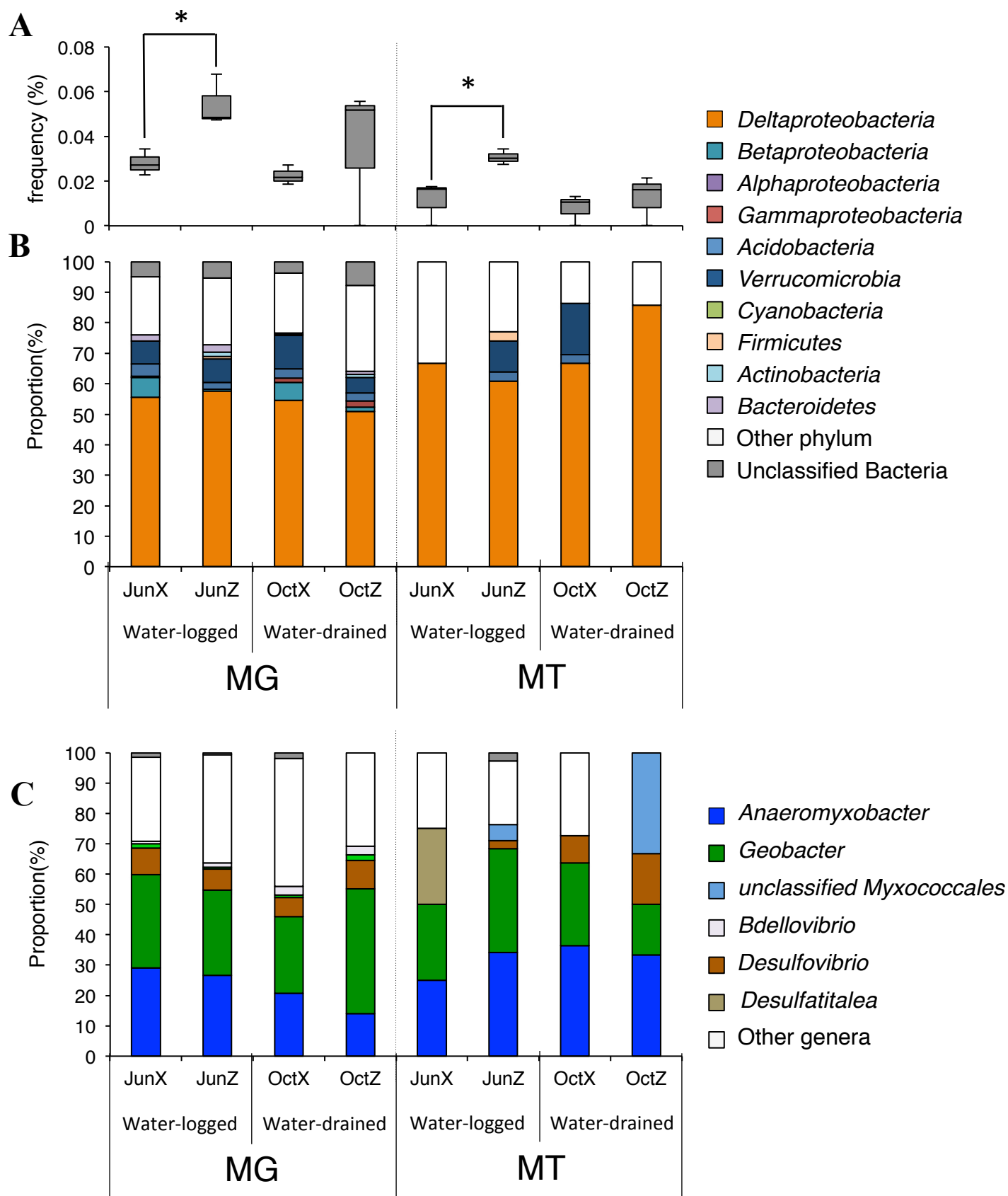
**Figure 3.11.** Relative abundance of genes in all protein-coding genes relevant to nitrite reduction(*nir*) (A) and the composition of the the assigned bacterial phyla (B) and Deltaproteobacterial genera (C) in metagenome (MG) and metatranscriptome(MT) in the paddy soils from two depth (X and Z) in different periods. Data is shown as mean value of three replicates. Asterisks indicate statistically significant differences (Mann-Whitney U test; \*,  $P < 0.01$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ).



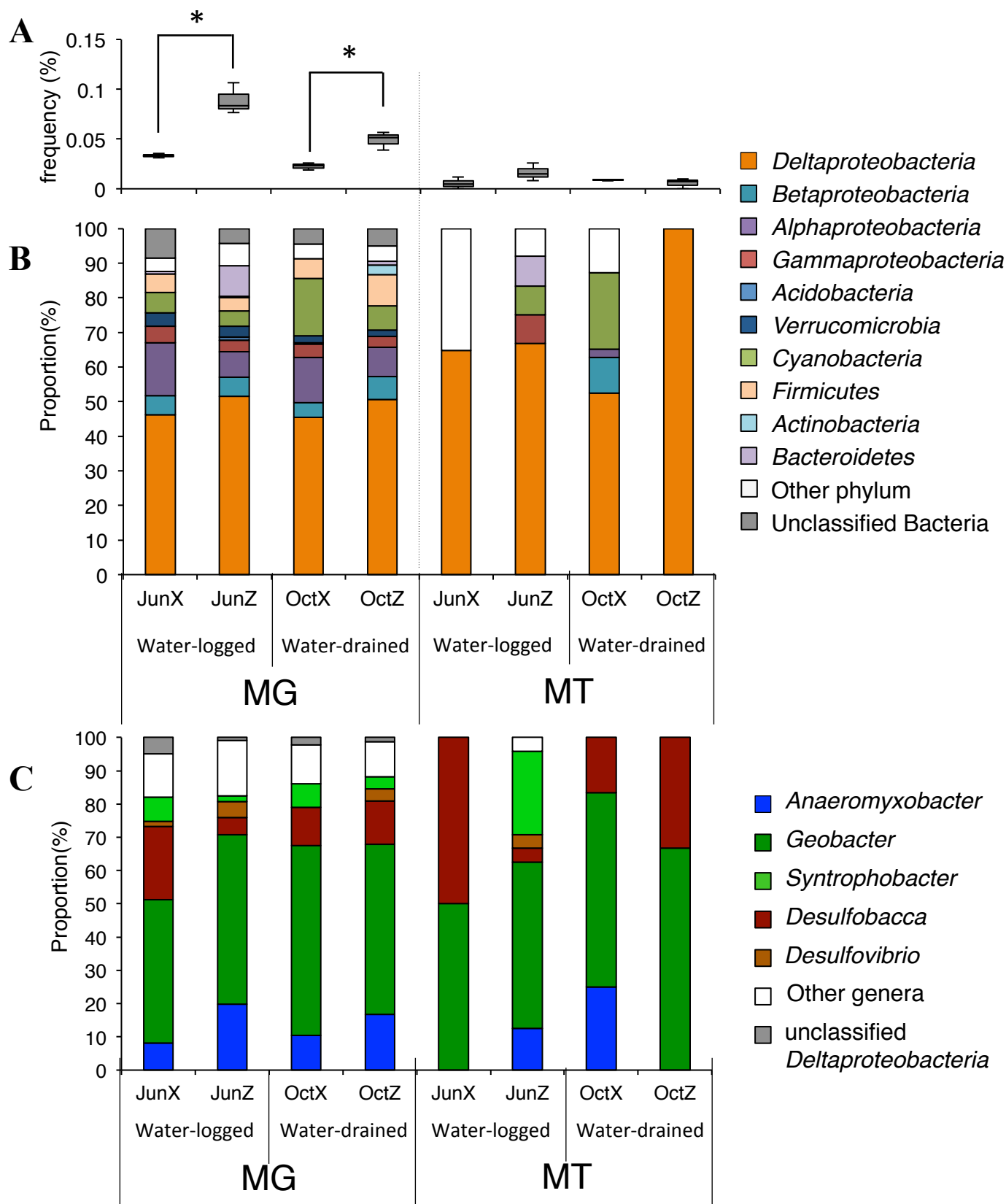
**Figure 3.12.** Relative abundance of genes in all protein-coding genes relevant to nitric oxide reduction(*nor*) (A) and the composition of the assigned bacterial phyla (B) and Deltaproteobacterial genera (C) in metagenome (MG) and metatranscriptome (MT) in the paddy soils from two depths (X and Z) in different periods. Data is shown as mean value of three replicates. Asterisks indicate statistically significant differences (Mann-Whitney U test; \*,  $P < 0.01$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ).



**Figure 3.13.** Relative abundance of genes in all protein-coding genes relevant to nitrous oxide reduction(*nos*) (A) and the composition of the the assigned bacterial phyla (B) and Deltaproteobacterial genera (C) in metagenome (MG) and metatranscriptome(MT) in the paddy soils from two depth (X and Z) in different periods. Data is shown as mean value of three replicates. Asterisks indicate statistically significant differences (Mann-Whitney U test; \*,  $P < 0.01$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ).

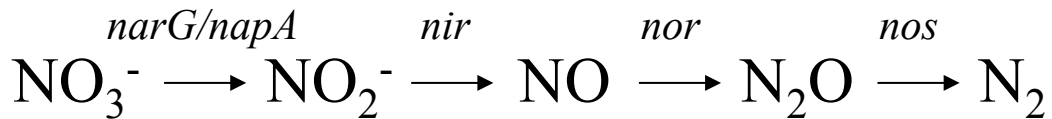


**Figure 3.14.** Relative abundance of genes in all protein-coding genes relevant to nitrite reduction to ammonium(*nrf*) (A) and the composition of the assigned bacterial phyla (B) and Deltaproteobacterial genera (C) in metagenome (MG) and metatranscriptome (MT) in the paddy soils from two depth (X and Z) in different periods. Data is shown as mean value of three replicates. Asterisks indicate statistically significant differences (Mann-Whitney U test; \*,  $P < 0.01$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ).



**Figure 3.15.** Relative abundance of genes in all protein-coding genes relevant to nitrogen fixation(*nif*) (A) and the composition of the the assigned bacterial phyla (B) and Deltaproteobacterial genera (C) in metagenome (MG) and metatranscriptome(MT) in the paddy soils from two depth (X and Z) in different periods. Data is shown as mean value of three replicates. Asterisks indicate statistically significant differences (Mann-Whitney U test; \*,  $P < 0.01$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ).

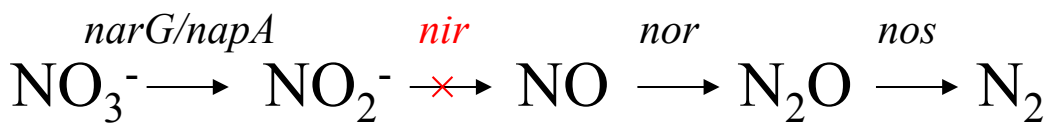
## Typical denitrifier



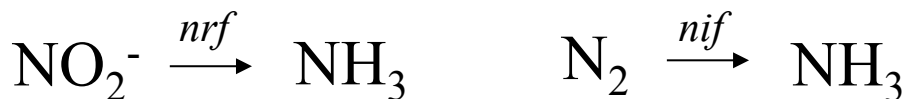
### Anaeromyxobacter as RNT players in this study.



#### Anaeromyxobacter as atypical denitrifiers in previous studies



### Geobacter as RNT players in this study.



#### Geobacter as atypical denitrifiers in previous studies

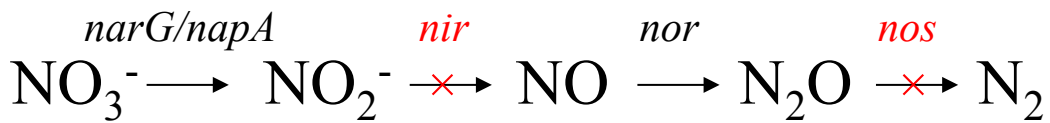
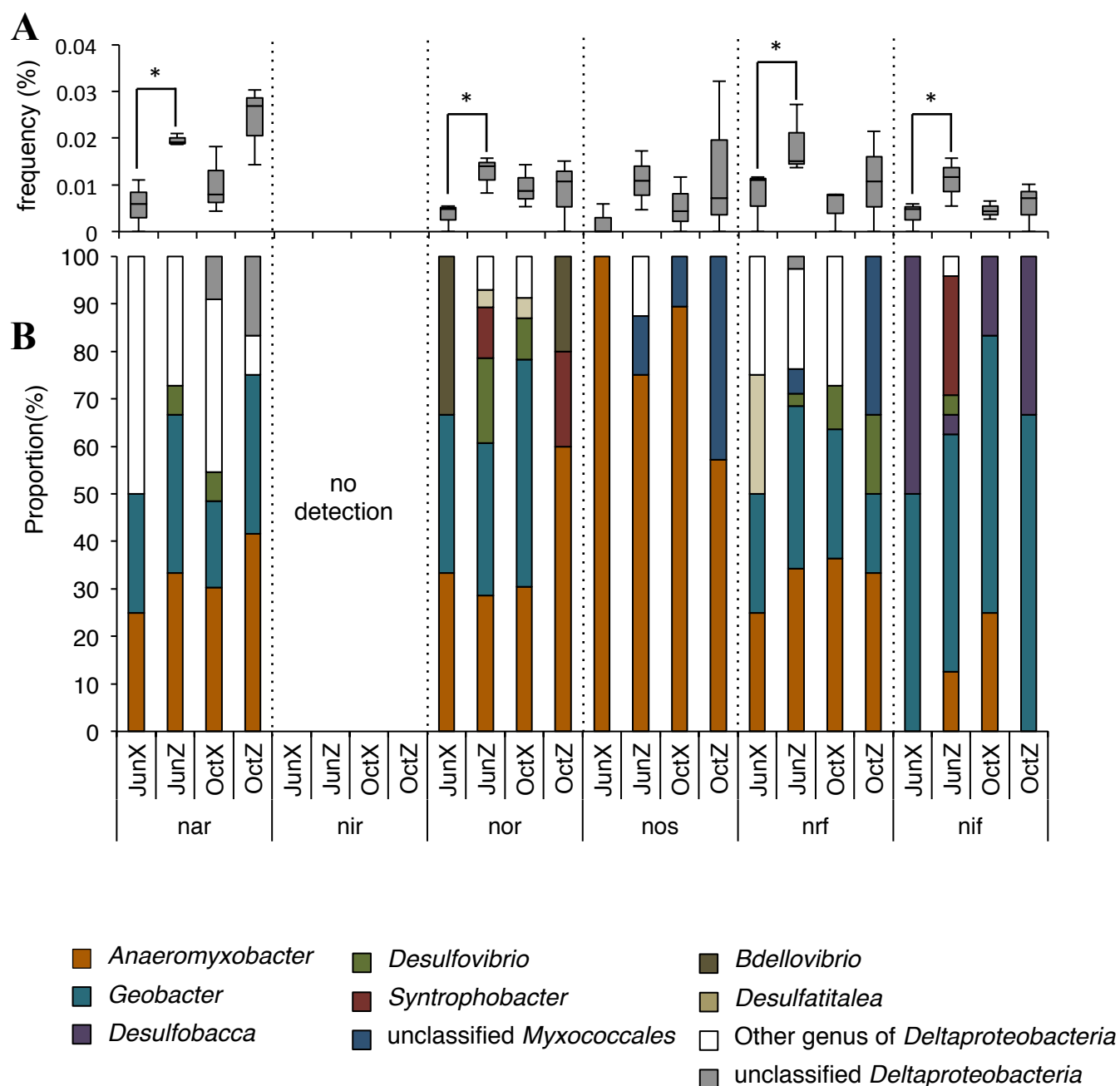
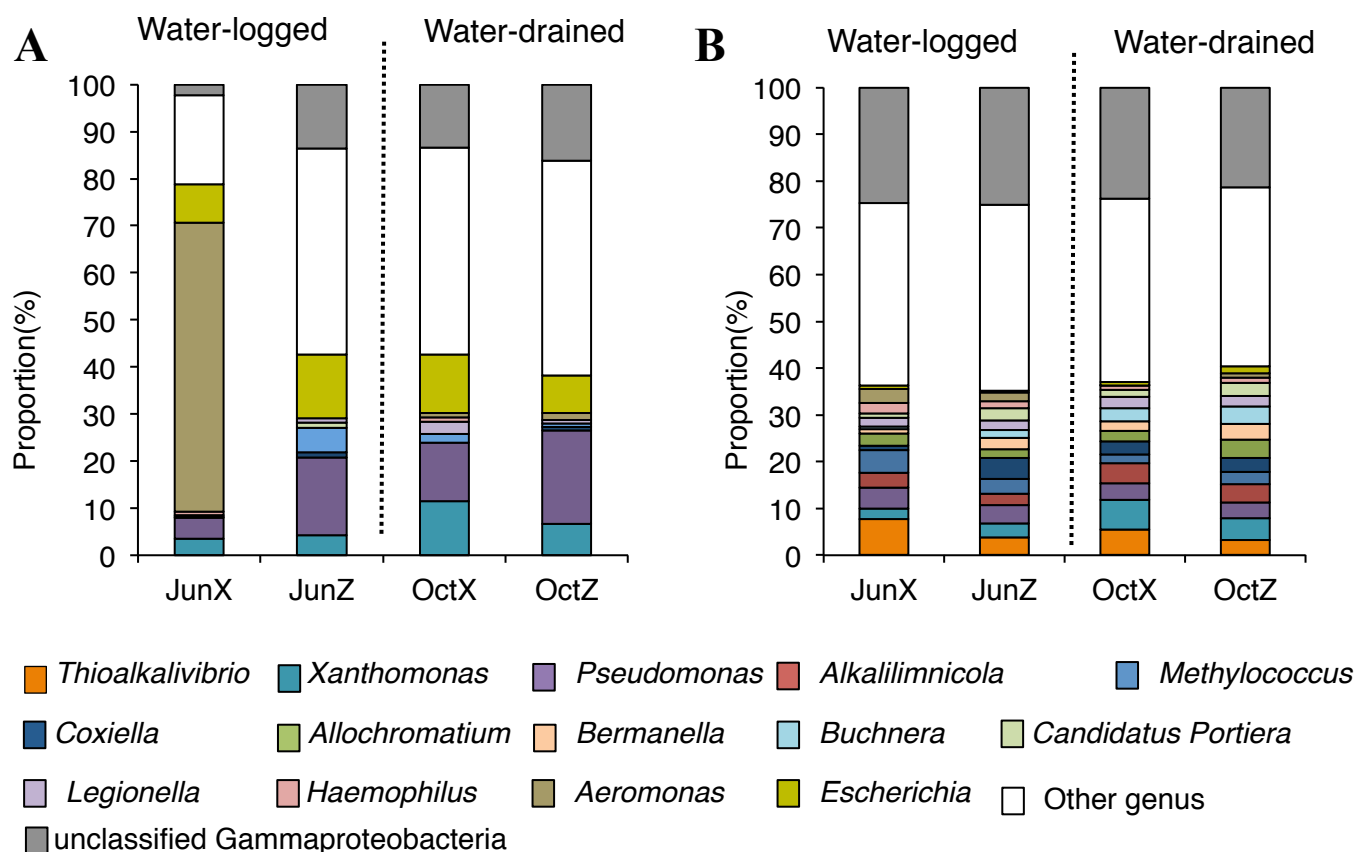


Figure 3.16. Key enzymes involving reductive nitrogen transformations.

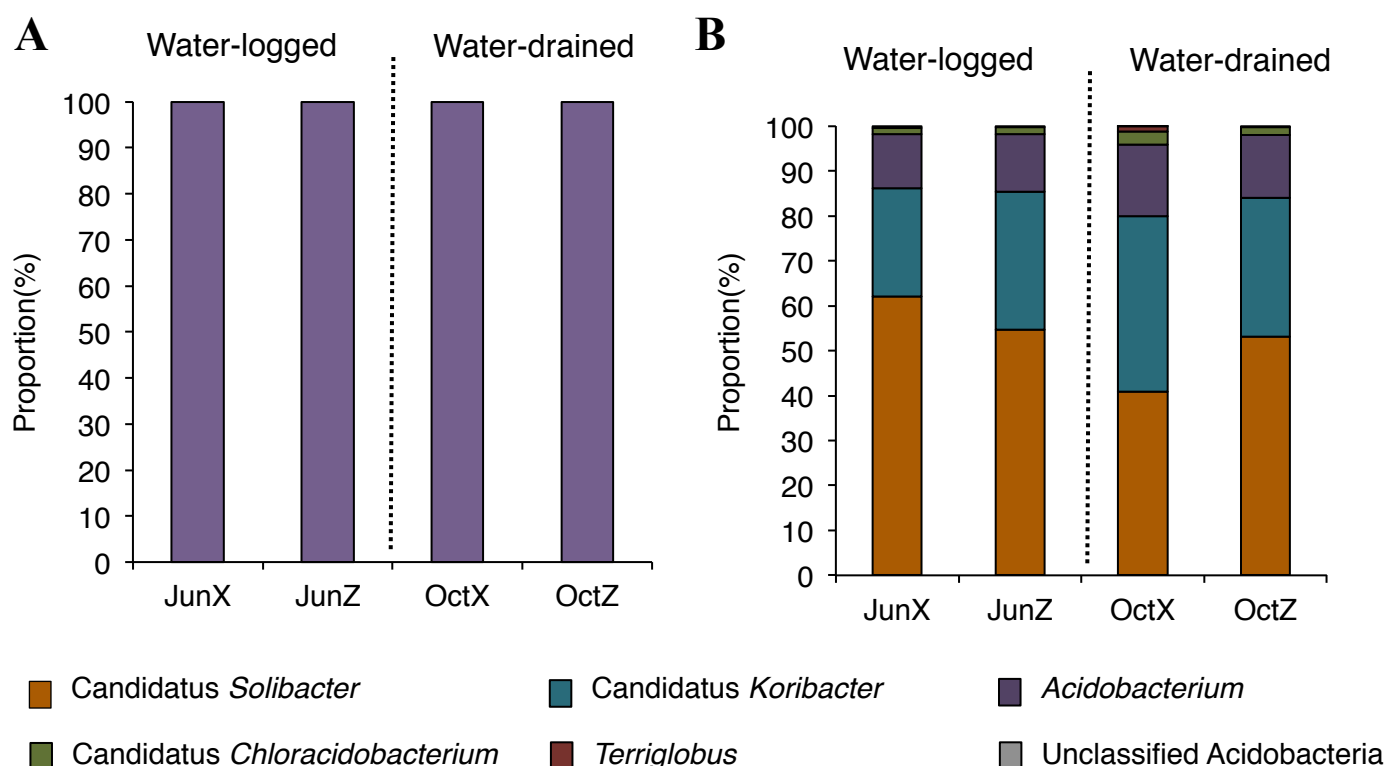




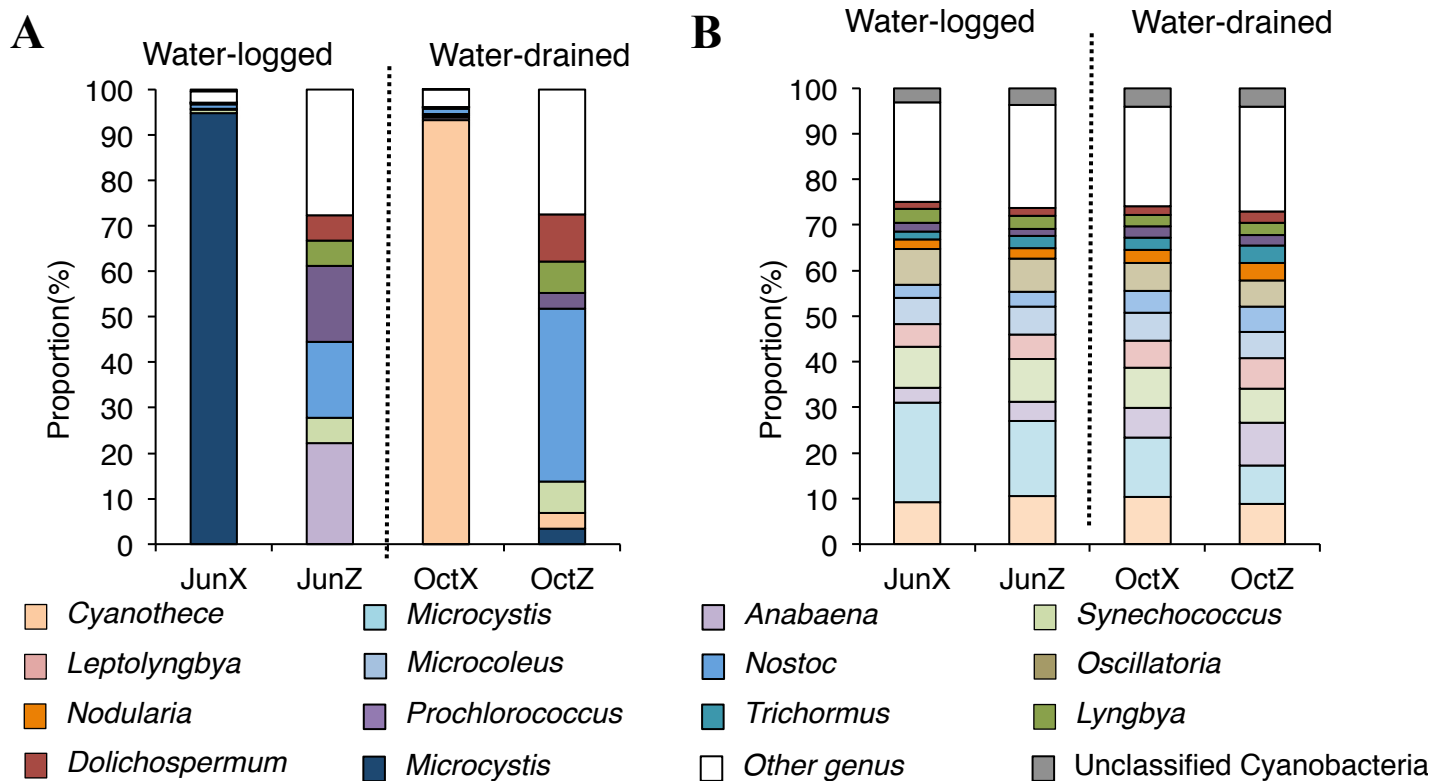
**Figure 3.17.** Relative abundance of deltaproteobacterial genes in all protein-coding genes relevant to denitrification (*nar*; *nir*; *nor* and *nos*), nitrite reduction to ammonium (*nrf*) and nitrogen fixation (*nif*) (A) and the composition of the assigned deltaproteobacterial genera (B) in metatranscriptome in the paddy soils from two depth (X and Z) in different periods. Data is shown as mean value of three replicates. Asterisks indicate statistically significant differences (Mann-Whitney U test; \*,  $P < 0.01$ ).



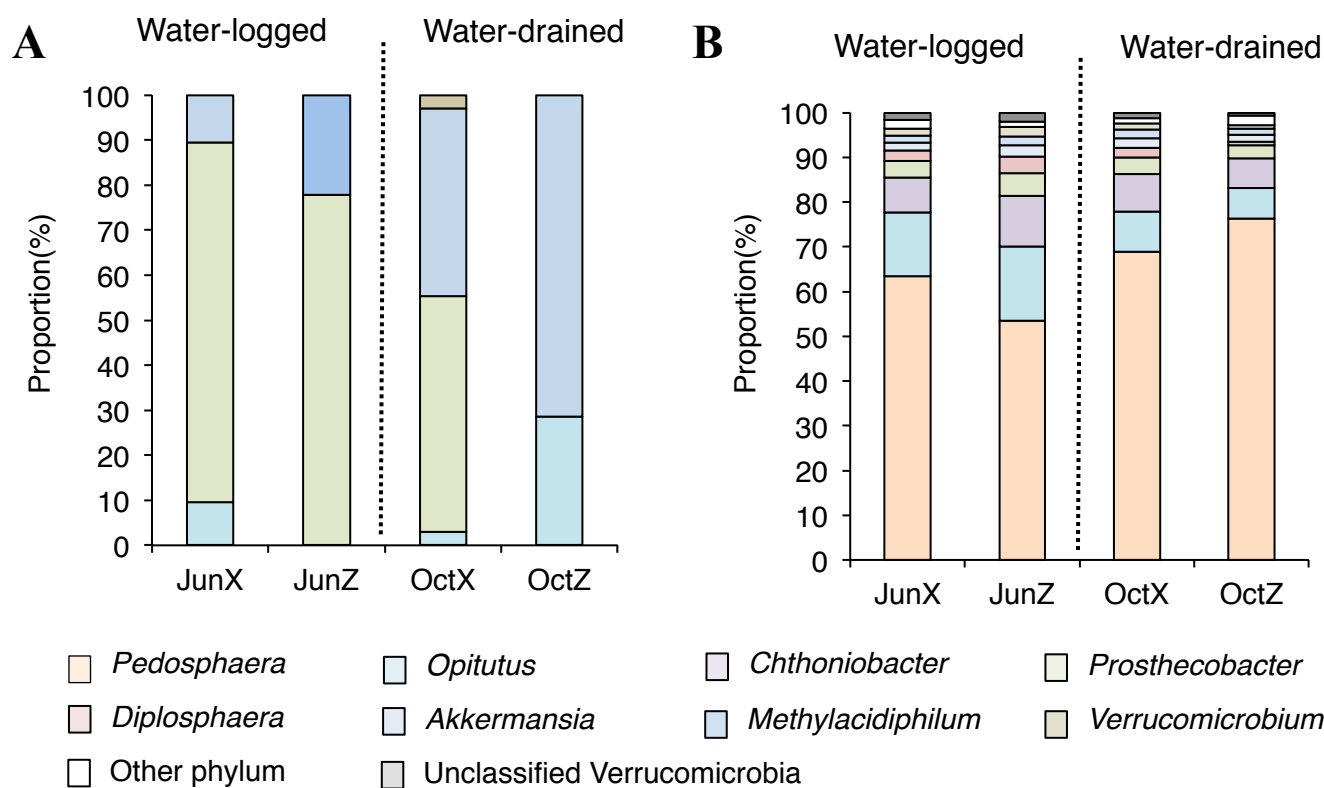
**Figure 3.S1.** Relative abundance of rDNA of (A) Gammaproteobacterial genus in metagenome and rRNA of (B), gammaproteobacterial genus in metatranscriptome in the paddy soils from two depth (X and Z) in two different periods. Data is shown as mean value of three replicates.



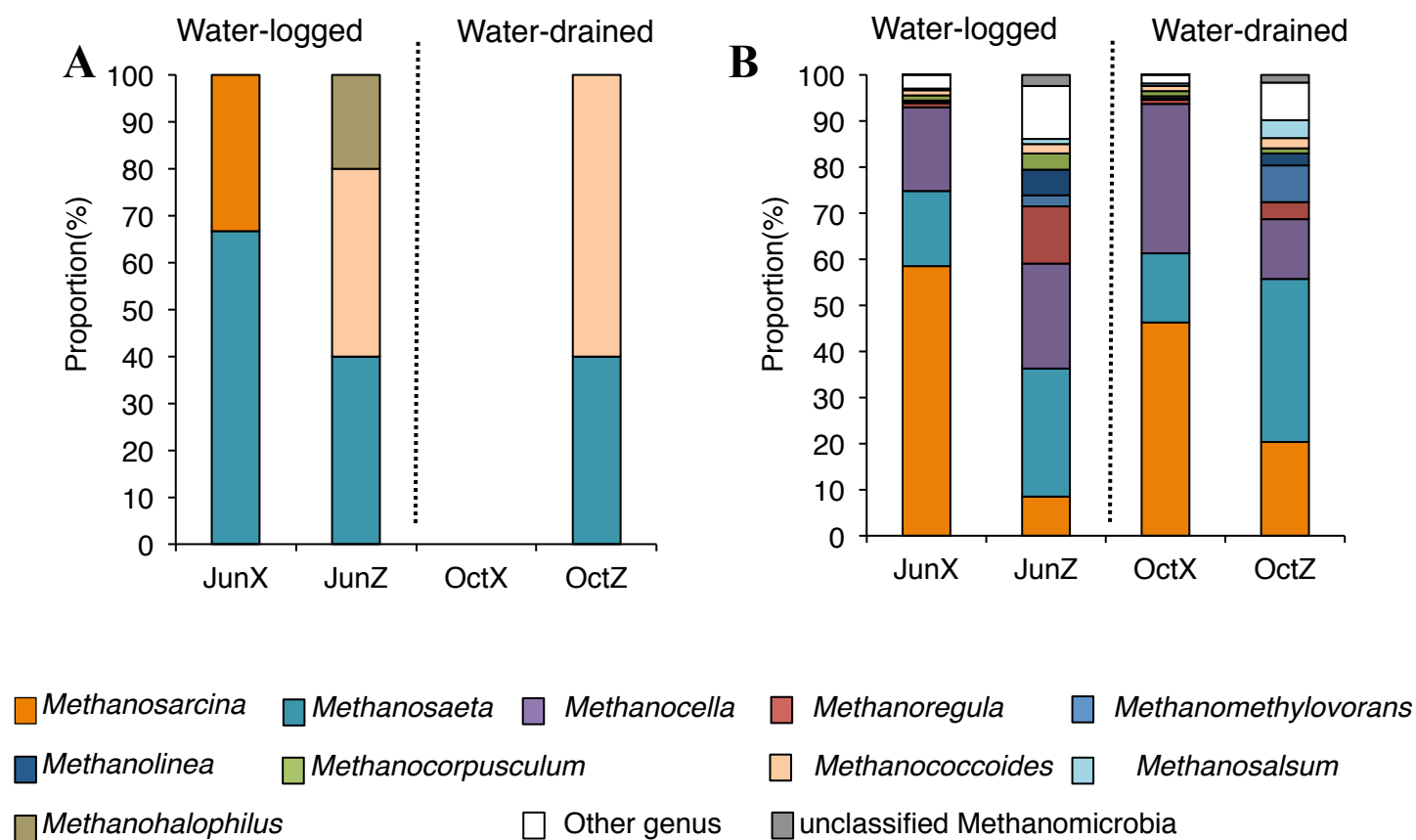
**Figure 3.S2.** Relative abundance of rDNA of (A) Acidobacterial genus in metagenome and rRNA of (B) Acidobacterial genus in metatranscriptome in the paddy soils from two depth (X and Z) in two different periods. Data is shown as mean value of three replicates.



**Figure 3.S3.** Relative abundance of rDNA of (A) Cyanobacterial genus in metagenome and rRNA of (B) Cyanobacterial genus in metatranscriptome in the paddy soils from two depth (X and Z) in two different periods. Data is shown as mean value of three replicates.



**Figure 3.S4.** Relative abundance of rDNA of (A) Verrucomicrobial genus in metagenome and rRNA of (B) Verrucomicrobial genus in metatranscriptome in the paddy soils from two depth (X and Z) in two different periods. Data is shown as mean value of three replicates.



**Figure 3.S6.** Relative abundance of rDNA of (A) Methanomicrobial genus in metagenome and rRNA of (B) Methanomicrobial genus in metatranscriptome in the paddy soils from two depth (X and Z) in two different periods. Data is shown as mean value of three replicates.

**Table 3.1. Summary of sequencing and accession numbers.**

Sequencing	Sample	MG-RAST ID No.	bp	No. of seqs	Mean length	rRNA seq	Protein coding genes
Metagenome	JunX	4670910.3	423,578,034	1,956,996	216±48	3,492	594,728
		4670906.3	421,409,011	1,752,741	240±49	2,384	672,120
		4670911.3	335,870,063	1,442,920	232±48	2,242	493,372
	JunZ	4670909.3	311,876,040	1,220,607	255±47	1,313	514,192
		4670907.3	503,771,192	2,016,340	249±49	2,048	829,603
		4670904.3	92,774,868	371,222	249±49	489	142,550
	OctX	4670905.3	370,389,890	1,543,953	239±49	1,755	487,420
		4670900.3	379,854,737	1,531,850	247±46	1,998	660,247
		4670908.3	482,356,560	2,029,399	237±47	2,092	809,440
	OctZ	4670902.3	361,665,527	1,455,142	248±47	1,818	467,382
		4670901.3	305,763,016	1,265,672	241±47	1,315	503,799
		4670903.3	279,562,817	1,142,084	244±48	1,296	435,977
Metatranscriptome	JunX	4675403.3	1,270,637,510	7,240,814	175±35	258,259	41,431
		4675404.3	1,045,221,002	6,017,177	173±37	262,640	38,518
		4675402.3	1,232,433,300	6,968,767	176±38	286,426	43,200
	JunZ	4678309.3	1,037,060,459	5,667,389	182±37	281,362	107,208
		4678318.3	966,499,361	5,170,274	186±37	189,023	110,956
		4678319.3	1,184,176,941	6,301,014	187±36	304,122	134,976
	OctX	4675332.3	1,163,765,689	5,917,478	196±35	233,190	42,081
		4675331.3	1,461,881,695	7,284,668	200±34	156,526	33,091
		4675333.3	1,088,562,242	5,699,284	191±35	154,874	38,844
	OctZ	4669534.3	1,364,446,940	7,264,805	187±33	289,047	48,996
		4669537.3	959,590,251	5,000,890	191±34	324,495	65,858
		4669538.3	1,236,300,141	6,969,617	177±33	174,159	210,899

**Table 3.2A.**  
**Number of rRNA seqs and ratio of Archaea/Bacteria in metatranscriptome.**

Sample	No. of rRNA seqs		Ratio(%)	AVERAGE
	Archaea	Bacteria	Archaea/Bacteria	
JunX	7577	3370822	0.22	0.27±0.05
	5837	1864842	0.31	
	5581	2066036	0.27	
JunZ	86138	2768277	3.11	1.83±1.14
	40398	2801915	1.44	
	38273	4079267	0.94	
OctX	11127	5500576	0.2	0.21±0.03
	8028	4530835	0.18	
	7992	3301631	0.24	
OctZ	78543	3936484	2	1.79±0.29
	46971	2469701	1.9	
	36662	2516721	1.46	

Asterisks indicate statistically significant differences (Mann-Whitney U test;  $P < 0.05$ ).

**Table 3.2B.**  
**Number of rDNA seqs and ratio of Archaea/Bacteria in metagenome.**

Sample	No. of rDNA seqs		Ratio(%)	AVERAGE
	Archaea	Bacteria	Archaea/Bacteria	
JunX	37	5768	0.64	0.52±0.13
	14	3686	0.38	
	26	4777	0.54	
JunZ	4	854	0.47	0.64±0.17
	43	5287	0.81	
	20	3151	0.63	
OctX	19	5027	0.38	0.26±0.18
	2	3836	0.05	
	15	4297	0.35	
OctZ	27	2851	0.95	0.83±0.13
	23	2692	0.85	
	29	4144	0.7	

Asterisks indicate statistically significant differences (Mann-Whitney U test;  $P < 0.05$ ).

**Table 3.3. Taxonomic assignments of *amo* transcripts.**

Sample	Replicate	NCBI-nr annotation	Organism	Bit score	Identity	E-value	Similarity	Accession No.
<b>JunX</b>	<b>1</b>	ammonia monooxygenase	Methylocystis parvus	76.3	100%	2.10E-14	100%	WP_026016563.1
	<b>2</b>	ammonia monooxygenase	Thaumarchaeota archaeon MY2	111	98%	1.10E-27	100%	WP_042683559.1
		ammonia monooxygenase subunit C	Nitrososphaera viennensis EN76	145	96%	8.10E-41	100%	AIC15387.1
	<b>3</b>	ammonia monooxygenase	Nitrosopumilus sp. SJ	183	99%	4.10E-55	100%	WP_016939485.1
		ammonia monooxygenase	Methylomonas sp. LW13	129	97%	6.10E-34	100%	WP_033159227.1
		ammonia monooxygenase	Methylocystis parvus	76.3	100%	2.10E-14	100%	WP_026016563.1
<b>JunZ</b>	<b>1</b>	ammonia monooxygenase	Methylocystis parvus	115	100%	9.10E-29	100%	WP_026016563.1
		ammonia monooxygenase	Methylocystis parvus	115	100%	9.10E-29	100%	WP_026016563.1
		ammonia monooxygenase	Methylocystis parvus	115	100%	9.10E-29	100%	WP_026016563.1
		ammonia monooxygenase/methane monooxygenase subunit C	Candidatus Nitrosopumilus koreensis	89	98%	3.10E-20	100%	AFS81497.1
	<b>3</b>	ammonia monooxygenase	Methylocystis parvus	107	100%	2.10E-25	100%	WP_026016563.1
		ammonia monooxygenase	Methylocystis parvus	107	100%	2.10E-25	100%	WP_026016563.1
		ammonia monooxygenase/methane monooxygenase subunit C	Candidatus Nitrosopumilus koreensis	119	100%	7.10E-32	100%	AFS81497.1
<b>OctX</b>	<b>1</b>	Ammonia monooxygenase, subunit C	Nitrospira sp. 1	154	94%	7.10E-43	96%	CUS33122.1
	<b>2</b>	ammonia monooxygenase subunit C	Nitrososphaera viennensis EN76	130	95%	5.10E-35	100%	AIC15387.1
<b>OctZ</b>	<b>1</b>	Ammonia monooxygenase, subunit C	Nitrospira sp. 1	174	95%	9.10E-51	99%	CUS33122.1

**Table 3.4A. Taxonomic assignments of *nar* transcripts in JunX.**

Sample	Replicate	NCBI-nr annotation	Organism	Bit score	Identity	E-value	Similarity	Accession No.
JunX	2	nitrate reductase	Geobacter metallireducens	139	100%	1.00E-35	71%	WP_011365654.1
		nitrate reductase	Herbaspirillum sp. TSA66	104	100%	4.00E-24	100%	WP_052452291.1
		nitrate reductase subunit alpha	Advenella kashmirensis WT001	149	97%	1.00E-42	83%	AFK60797.1
		nitrate reductase	Marinithermus hydrothermalis	88.6	100%	3.00E-18	65%	WP_013704625.1
		periplasmic nitrate reductase	Shewanella gelidimarina	83.2	100%	8.00E-17	92%	ADG96106.1
		nitrate reductase, beta subunit	Edwardsiella tarda ATCC 23685	77	74%	1.00E-14	80%	EFE24810.1
	3	nitrate reductase	Thauera sp. SWB20	87.4	100%	5.00E-19	72%	WP_043742292.1
		nitrate reductase	Acidovorax sp. JHL-9	144	99%	6.00E-26	84%	WP_026436273.1
		nitrate reductase	Geothrix fermentans	107	100%	1.00E-24	66%	WP_026852527.1
		nitrate reductase	Candidatus Thiomargarita nelsonii	137	100%	3.00E-35	81%	KHD06572.1
		nitrite reductase	Pyrinomonas methylaliphatogenes	92.4	100%	7.00E-20	81%	WP_041975004.1
		nitrate reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	86.7	98%	2.00E-17	53%	WP_012633045.1
		nitrate reductase	Betaproteobacteria bacterium SG_40	80.5	100%	8.00E-16	97%	KPK34517.1
		nitrate reductase A subunit beta	Polaromonas naphthalenivorans	123	85%	3.00E-31	93%	WP_011803122.1
		nitrate reductase	Caenimonas sp. SL110	95.5	96%	1.00E-20	72%	WP_048440378.1
		nitrate reductase	Bosea vaviloviae	145	98%	9.00E-38	89%	WP_054209647.1
		nitrate reductase A subunit alpha	Reyranella massiliensis	94.4	100%	3.00E-20	76%	WP_020694566.1
		nitrate reductase	Desulfobacterium autotrophicum	120	98%	5.00E-29	72%	WP_049770508.1



**Table 3.4C. Taxonomic assignments of *nar* transcripts in JunZ.**

Sample	Replicate	NCBI-nr annotation	Organism	Bit score	Identity	E-value	Similarity	Accession No.
		membrane bound nitrate reductase	uncultured bacterium	141	90%	7.10E-39	97%	ACM91860.1
		membrane bound nitrate reductase	uncultured bacterium	91.7	69%	5.10E-20	83%	ABF20896.1
		membrane bound nitrate reductase, partial	uncultured denitrifying bacterium	90.1	73%	1.10E-19	84%	AHA40560.1
		membrane bound nitrate reductase, partial	uncultured denitrifying bacterium	90.1	73%	1.10E-19	84%	AHA40560.1
		nitrate reductase beta subunit	Arthrosira	140	69%	2.10E-38	85%	WP_006621981.1
		nitrate reductase	Pedospaera parvula	86.7	78%	5.10E-17	82%	WP_007415860.1
		nitrate reductase	Hylemonella gracilis	87.4	87%	3.10E-17	93%	WP_035608658.1
		nitrate reductase	Planctomyces limnophilus	95.5	81%	4.10E-20	87%	WP_013111306.1
		nitrate reductase	Sorangium cellulosum	110	66%	3.10E-25	79%	WP_012241100.1
		nitrate reductase	Thermobaculum terrenum	124	76%	1.10E-29	86%	WP_012876459.1
		nitrate reductase	Thermobaculum terrenum	129	77%	9.10E-32	84%	WP_012876459.1
		nitrate reductase	Rhodopseudomonas palustris	139	77%	9.10E-35	85%	WP_011440648.1
		nitrate reductase	Desulfovibrio sp. A2	113	76%	3.10E-26	91%	WP_007526008.1
		nitrate reductase	Desulfovibrio sp. A2	111	74%	2.10E-25	89%	WP_007526008.1
		nitrate reductase	Brachymonas chironomi	73.9	74%	3.10E-13	83%	WP_018714604.1
		nitrate reductase	Brachymonas chironomi	73.9	74%	3.10E-13	83%	WP_018714604.1
		nitrate reductase	Streptomyces sp. 142MFC03.1	82.8	82%	2.10E-15	88%	WP_028800537.1
		nitrate reductase	Rhodoferrax ferrireducens	83.2	64%	2.10E-16	74%	WP_011465072.1
		nitrate reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	85.5	69%	4.10E-16	80%	WP_011421222.1
		nitrate reductase	Desulfuromonas sp. TF	85.9	67%	1.10E-16	81%	WP_027714573.1
		nitrate reductase	Pelobacter seleniigenes	88.6	78%	7.10E-18	92%	WP_029917026.1
		nitrate reductase	Pelobacter seleniigenes	88.6	78%	7.10E-18	92%	WP_029917026.1
		nitrate reductase	Actinotalea ferrariae	92.8	81%	2.10E-20	88%	WP_034225926.1
		nitrate reductase	Marinithermus hydrothermalis	92.8	72%	6.10E-19	84%	WP_013704625.1
		nitrate reductase	Polaromonas sp. EUR3 1.2.1	94.7	79%	6.10E-21	85%	WP_026781419.1
		nitrate reductase	Caulobacter sp. K31	100	79%	4.10E-23	89%	WP_012287884.1
		nitrate reductase	Caulobacter sp. K31	100	79%	4.10E-23	89%	WP_012287884.1
		nitrate reductase	Desulfobacterium autotrophicum	106	75%	1.10E-24	83%	WP_012662439.1
		nitrate reductase	Pelobacter seleniigenes	112	80%	9.10E-26	90%	WP_029917027.1
		nitrate reductase	Geobacter metallireducens	114	68%	7.10E-26	78%	WP_004513191.1
		nitrate reductase	Methyloversatilis sp. FAM1	115	96%	6.10E-28	98%	WP_024300625.1
		nitrate reductase	Methyloversatilis sp. FAM1	115	96%	6.10E-28	98%	WP_024300625.1
		nitrate reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	123	67%	4.10E-29	82%	WP_012633045.1
		nitrate reductase	Geobacter metallireducens	140	89%	3.10E-35	93%	WP_004513191.1
		nitrate reductase	Desulfuromonas sp. TF	140	74%	3.10E-35	88%	WP_027714573.1
		nitrate reductase	Anaeromyxobacter sp. K	148	93%	4.10E-38	100%	WP_012525755.1
		nitrate reductase 1, alpha subunit, partial	uncultured prokaryote	122	81%	5.10E-29	91%	BAL54613.1
		nitrate reductase 1, beta subunit	uncultured prokaryote	138	74%	1.10E-35	90%	BAL54612.1
		nitrate reductase 1, beta subunit	uncultured prokaryote	142	74%	4.10E-37	90%	BAL54612.1
		nitrate reductase A subunit alpha	endosymbiont of Tevnia jerichonana	89.4	74%	1.10E-17	83%	WP_006474372.1
		nitrate reductase A subunit alpha	Actinokineospora enzanensis	96.3	86%	3.10E-20	92%	WP_018681407.1
		nitrate reductase A subunit alpha	Streptomyces sulphureus	114	81%	2.10E-26	87%	WP_019544030.1
		nitrate reductase A subunit beta	Hermiinimonas arsenicocydans	97.1	68%	9.10E-21	84%	WP_011871146.1
		nitrate reductase A subunit beta	Geobacter metallireducens	103	66%	4.10E-23	82%	WP_004512302.1
		nitrate reductase A subunit beta	Geobacter metallireducens	103	66%	4.10E-23	82%	WP_004512302.1
		nitrate reductase A subunit beta	Acidovorax delafieldii	107	78%	1.10E-24	85%	WP_005795702.1
		nitrate reductase A subunit beta	Brevundimonas sp. BAL3	135	91%	2.10E-34	93%	WP_008261108.1
		nitrate reductase A subunit beta	Polaromonas sp. JS666	160	89%	1.10E-43	96%	WP_011485464.1
		Nitrate reductase alpha chain	Beggiatoa sp. SS	87	54%	8.10E-18	76%	EDN71867.1
		nitrate reductase alpha subunit	uncultured bacterium	127	70%	5.10E-33	86%	ACH48283.1
		nitrate reductase alpha subunit, partial	uncultured bacterium	88.6	84%	5.10E-19	88%	ACI45678.1
		nitrate reductase alpha subunit, partial	uncultured bacterium	123	100%	4.10E-32	100%	ACI45747.1
		nitrate reductase catalytic subunit	Wolinella succinogenes	73.6	63%	5.10E-17	75%	WP_011139051.1
		nitrate reductase NarB	Methyloglobulus morosus	179	90%	2.10E-49	93%	WP_023495976.1
		nitrate reductase subunit alpha	Burkholderiales bacterium JOSHI_001	99.8	75%	3.10E-21	86%	WP_009551969.1
		nitrate reductase subunit alpha	Polaromonas sp. CF318	142	89%	5.10E-36	96%	WP_007872369.1
		nitrate reductase, partial	Verrucomicrobium sp. BvORR106	74.3	80%	6.10E-13	84%	WP_038171330.1
		nitrate reductase, partial	Bradyrhizobium japonicum	160	90%	1.10E-44	95%	WP_035718001.1
		nitrate reductase, partial	Streptosporangium roseum	100	64%	2.10E-21	73%	WP_031173223.1
		Nitrate reductase	Niastella koreensis	132	94%	9.10E-33	97%	WP_014221467.1
		periplasmic nitrate reductase, partial	enrichment culture clone MAR56	72.4	77%	8.10E-13	88%	ABV48859.1
		Respiratory nitrate reductase 1 beta chain	Candidatus Accumulibacter sp. BA-91	120	83%	6.10E-31	95%	KFB70802.1
		Respiratory nitrate reductase 2 alpha chain	Hydrogenophaga sp. T4	75.1	94%	4.10E-14	100%	EW565598.1
		Respiratory nitrate reductase 2 alpha chain	Candidatus Accumulibacter sp. BA-91	134	87%	8.10E-34	94%	KFB72186.1
		Respiratory nitrate reductase 2 alpha chain	Candidatus Accumulibacter sp. BA-91	134	87%	8.10E-34	94%	KFB72186.1
		Respiratory nitrate reductase 2 beta chain	Afipia felis	88.2	89%	5.10E-20	93%	CEG07064.1

JunZ 2

**Table 3.4D. Taxonomic assignments of *nar* transcripts in JunZ.**

Sample	Repli cate	NCBI-nr annotation	Organism	Bit score	Identity	E-value	Similar ity	Accession No.
JunZ	3	dissimilatory membrane-bound nitrate reductase, partial	uncultured bacterium	102	73%	3.10E-24	87%	ACM91779.1
		membrane-bound nitrate reductase	uncultured bacterium	85.5	84%	3.10E-18	90%	ABW17445.1
		MULTISPECIES: nitrate reductase	Afipia	152	94%	2.10E-39	96%	WP_024919285.1
		nitrate reductase	Sulfitobacter sp. CB2047	71.2	77%	2.10E-11	87%	KFC24941.1
		nitrate reductase	Acidobacteriaceae bacterium KBS 96	77.4	64%	1.10E-13	80%	WP_020720055.1
		nitrate reductase	Streptomyces sp. C	78.2	76%	5.10E-14	87%	WP_007264618.1
		nitrate reductase	Galbibacter marinus	78.6	66%	4.10E-14	71%	WP_008990545.1
		nitrate reductase	Verrucomicrobiae bacterium DG1235	83.6	69%	8.10E-16	82%	WP_008098611.1
		nitrate reductase	Acidobacteriaceae bacterium KBS 96	84.7	82%	5.10E-16	86%	WP_020720055.1
		nitrate reductase	Pedosphaera parvula	87.4	65%	4.10E-17	82%	WP_007415860.1
		nitrate reductase	Pedosphaera parvula	87.4	65%	4.10E-17	82%	WP_007415860.1
		nitrate reductase	Pedosphaera parvula	88.6	64%	1.10E-17	83%	WP_007415860.1
		nitrate reductase	Chitinimonas koreensis	95.1	75%	1.10E-19	82%	WP_028447911.1
		nitrate reductase	Acidobacteriaceae bacterium KBS 96	95.5	75%	9.10E-20	88%	WP_020720055.1
		nitrate reductase	Methylobacterium sp. WSM2598	128	74%	3.10E-31	84%	WP_036271048.1
		nitrate reductase	Sorangium cellulosum	134	71%	1.10E-33	82%	WP_020741685.1
		nitrate reductase	Actinospica robiniae	71.2	75%	1.10E-11	81%	WP_034278825.1
		nitrate reductase	Geobacter lovleyi	80.1	56%	2.10E-14	77%	WP_012470696.1
		nitrate reductase	Chrysiogenes arsenatis	80.1	84%	3.10E-15	95%	WP_027389142.1
		nitrate reductase	Candidatus Accumulibacter sp. BA-91	81.3	88%	4.10E-16	95%	WP_034918846.1
		nitrate reductase	Desulfurispirillum indicum	87	76%	5.10E-17	86%	WP_013507029.1
		nitrate reductase	Desulfuromonas sp. TF	88.2	72%	2.10E-17	79%	WP_027714573.1
		nitrate reductase	Nitrobacter sp. Nb-311A	88.2	61%	3.10E-17	80%	WP_009800038.1
		nitrate reductase	Geobacter metallireducens	88.6	91%	1.10E-17	95%	WP_004512301.1
		nitrate reductase	Desulfuromonas sp. TF	91.3	66%	6.10E-19	81%	WP_027714572.1
		nitrate reductase	Desulfurispirillum indicum	92.4	69%	7.10E-19	93%	WP_013507029.1
		nitrate reductase	Meiothermus silvanus	96.3	68%	8.10E-20	88%	WP_013156801.1
		nitrate reductase	Curtobacterium sp. S6	98.6	61%	3.10E-21	80%	WP_030015074.1
		nitrate reductase	Desulfurispirillum indicum	99	85%	3.10E-21	92%	WP_013507029.1
		nitrate reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	99.8	86%	2.10E-21	98%	WP_012633045.1
		nitrate reductase	Anaeromyxobacter sp. K	102	81%	2.10E-22	90%	WP_012525755.1
		nitrate reductase	Geobacter lovleyi	105	81%	2.10E-23	93%	WP_012470696.1
		nitrate reductase	Meiothermus timidus	110	65%	1.10E-25	79%	WP_026234948.1
		nitrate reductase	Xanthobacter sp. 126	112	96%	5.10E-26	96%	WP_024277567.1
		nitrate reductase	Geobacter lovleyi	113	83%	5.10E-26	92%	WP_012470696.1
		nitrate reductase	Desulfuromonas sp. TF	113	73%	7.10E-26	85%	WP_027714573.1
		nitrate reductase	Desulfuromonas sp. TF	114	74%	2.10E-26	85%	WP_027714573.1
		nitrate reductase	Geobacter sp. M18	120	85%	2.10E-28	95%	WP_015720759.1
		nitrate reductase	Geothrix fermentans	123	76%	4.10E-29	77%	WP_026852527.1
		nitrate reductase	Geothrix fermentans	126	77%	3.10E-30	78%	WP_026852527.1
		nitrate reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	127	78%	8.10E-31	88%	WP_011421222.1
		nitrate reductase	Geobacter metallireducens	130	73%	1.10E-31	86%	WP_011365654.1
		nitrate reductase	Geothrix fermentans	134	76%	3.10E-33	88%	WP_026852527.1
		nitrate reductase	uncultured bacterium	139	96%	6.10E-38	97%	CBM20448.1
		nitrate reductase	Meiothermus silvanus	139	71%	2.10E-34	85%	WP_013156801.1
		nitrate reductase	Candidatus Omnitrophus fodinae	143	74%	4.10E-36	87%	WP_022807802.1
		nitrate reductase	Nocardioides halotolerans	146	94%	2.10E-37	100%	WP_028652547.1
		nitrate reductase	Meiothermus silvanus	158	97%	2.10E-41	97%	WP_013156801.1
		nitrate reductase	Geothrix fermentans	161	91%	1.10E-42	96%	WP_026852527.1
		nitrate reductase 1, beta subunit	uncultured prokaryote	101	69%	3.10E-22	78%	BAL54612.1
		nitrate reductase A subunit alpha	Microbacterium phosphovorus	95.1	77%	1.10E-19	88%	WP_013865507.1
		nitrate reductase A subunit alpha	Achromobacter xylosoxidans	97.8	76%	2.10E-20	88%	WP_013393593.1
		nitrate reductase A subunit alpha	Thiobacillus thioautotrophicus	99	77%	5.10E-21	87%	WP_018508023.1
		nitrate reductase A subunit alpha	Methylobacterium radiotolerans	99	81%	3.10E-21	87%	WP_012319550.1
		nitrate reductase A subunit alpha	actinobacterium acIB-AMD-7	100	85%	9.10E-22	94%	KGA10518.1
		nitrate reductase A subunit alpha	Nocardioides sp. JS614	124	79%	7.10E-30	91%	WP_011754808.1
		nitrate reductase A subunit beta	Candidatus Omnitrophus fodinae	70.1	71%	1.10E-11	89%	WP_022807803.1
		nitrate reductase A subunit beta	Maricaulis maris	109	84%	1.10E-25	93%	WP_011644635.1
		nitrate reductase A subunit beta	Anaeromyxobacter dehalogenans	117	77%	2.10E-28	86%	WP_011421223.1
		nitrate reductase A subunit beta	Geobacter lovleyi	127	81%	1.10E-31	84%	WP_012468293.1
		nitrate reductase A subunit beta	Methylophaga nitratireducens	135	89%	3.10E-34	100%	WP_014705673.1
		nitrate reductase alpha subunit	uncultured bacterium	86.7	72%	6.10E-18	82%	ACH48283.1
		nitrate reductase alpha subunit, partial	uncultured bacterium	106	75%	1.10E-25	84%	ACI45620.1
		nitrate reductase alpha subunit, partial	uncultured bacterium	144	80%	7.10E-40	94%	ACI45630.1
		nitrate reductase catalytic subunit	Bradyrhizobium sp. YR681	99	92%	3.10E-21	94%	WP_008131234.1
		nitrate reductase large subunit protein, partial	Rhizobium sp. Pop5	77.4	79%	4.10E-15	86%	WP_008527292.1
		nitrate reductase subunit alpha	Advenella kashmirensis	163	84%	4.10E-47	90%	WP_014748887.1
		nitrate reductase, partial	Verrucomicrobium sp. BvORR106	112	81%	3.10E-26	87%	WP_038171330.1
		nitrate reductase, partial	Burkholderia sordidicola	71.6	80%	6.10E-12	90%	WP_031364691.1
		nitrate reductase, partial	Nonomurea coxensis	75.5	64%	4.10E-13	75%	WP_033408511.1
		nitrate reductase, partial	uncultured bacterium	102	90%	2.10E-24	96%	CCH26237.1
		nitrate reductase, partial	Actinotalea ferrariae	148	83%	7.10E-39	85%	WP_034225943.1
		periplasmic nitrate reductase, large subunit	Campylobacter lari subsp. concheus	109	88%	6.10E-25	93%	AJC89380.1
		periplasmic nitrate reductase, partial	Vibrio diabolus	134	91%	2.10E-35	96%	AHN63209.1
		PERIPLASMIC NITRATE REDUCTASE, partial	Hydrogenivirga sp. 128-5-R1-1	124	81%	7.10E-30	89%	WP_008288061.1
		putative Assimilatory nitrate reductase catalytic subunit	Streptomyces aurantiacus JA 4570	94.7	62%	2.10E-19	74%	EPH43456.1
		putative dissimilatory membrane-bound nitrate reductase	uncultured bacterium	76.6	83%	8.10E-15	90%	AAM62257.1
		putative dissimilatory membrane-bound nitrate reductase	uncultured bacterium	119	69%	3.10E-30	81%	CBJ16946.1
		Putative nitrate reductase (beta subunit)	Tetrasphaera jenkinsii Ben 74	94	59%	1.10E-19	78%	CCI55036.1
		Respiratory nitrate reductase 1 beta chain	Afipia felis	157	95%	2.10E-43	97%	CEG07065.1
		Respiratory nitrate reductase alpha chain	Escherichia coli ISC56	85.5	92%	7.10E-18	100%	CDL53925.1
		Respiratory nitrate reductase alpha chain	Thioalkalivibrio nitratireducens	107	80%	9.10E-24	88%	WP_015258541.1
		Respiratory nitrate reductase beta chain	Enterobacter cloacae ISC8	133	85%	1.10E-35	95%	CDL34404.1
		respiratory nitrate reductase beta chain	Methyloceanibacter caenitipidi	152	91%	1.10E-40	96%	BAQ16578.1

**Table 3.4E. Taxonomic assignments of *nar* transcripts in Oct X.**

Sample Replicate	NCBI-nr annotation	Organism	Bit score	Identity	E-value	Similarity	Accession No.
OctX 1	Nitrate reductase	Desulfovibrio termitidis	124	100%	5.00E-31	75%	WP_035068007.1
	nitrate reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	82	100%	3.00E-16	71%	WP_011419966.1
	nitrate reductase	Sulfuricurvum kujiense	113	83%	1.00E-26	67%	WP_013449877.1
	nitrate reductase, partial	Streptomyces pluriotens	111	100%	2.00E-27	94%	KIE30400.1
	nitrate reductase	Geobacter metallireducens	124	99%	1.00E-18	93%	WP_011365654.1
	nitrate reductase	Desulfuromonas sp. TF	73.9	100%	4.00E-13	55%	WP_027714573.1
	nitrate reductase	Geobacter lovleyi	79.3	92%	7.00E-15	51%	WP_012470696.1
	nitrate reductase	Geobacter lovleyi	147	100%	2.00E-38	80%	WP_012470696.1
	nitrate reductase	Meiothermus timidus	89.7	100%	8.00E-19	81%	WP_018467777.1
	PERIPLASMIC NITRATE REDUCTASE	Hydrogenivirga sp. 128-5-R1-1	108	100%	2.00E-25	82%	WP_008288061.1
	nitrate reductase A subunit beta	Burkholderia sp. CCGE1003	121	100%	8.00E-31	98%	WP_013342295.1
	nitrate reductase A subunit beta	Polaromonas naphthalenivorans	122	98%	6.00E-31	88%	WP_011803122.1
	nitrate reductase A subunit beta	Rhodoferrax ferrireducens	97.8	98%	3.00E-22	92%	WP_011465071.1
	nitrate reductase	Rhizobacter sp. Root404	151	100%	2.00E-41	99%	WP_056465084.1
	nitrate reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	100	100%	2.00E-22	74%	WP_011421222.1
	nitrate reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	100	90%	3.00E-22	75%	WP_011421222.1
	nitrate reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	94.4	100%	3.00E-20	71%	WP_012633045.1
	nitrate reductase	Desulfuromusa kysingii	116	100%	6.00E-30	65%	CAL91917.1
	nitrate reductase	Pelobacter seleniigenes	87.4	100%	4.00E-18	84%	WP_029917027.1
	nitrate reductase	Desulfuromonas sp. TF	105	98%	5.00E-24	78%	WP_027714573.1
	nitrate reductase	Desulfuromusa kysingii	108	100%	5.00E-27	66%	CAL91917.1
	nitrate reductase	Cupriavidus sp. SK-3	87	100%	5.00E-19	69%	WP_035861243.1
	nitrate reductase	Meiothermus timidus	89.7	100%	8.00E-19	81%	WP_018467777.1
	nitrate reductase	Pseudolabrys sp. Root1462	120	100%	2.00E-29	96%	WP_056910695.1
	nitrate reductase A subunit alpha	Methyloversatilis universalis	144	100%	2.00E-37	93%	WP_018230291.1
	nitrate reductase	Desulfuromusa kysingii	108	100%	5.00E-27	66%	CAL91917.1
	respiratory nitrate reductase subunit gamma	Geobacter metallireducens	86.3	90%	8.00E-19	76%	WP_004512304.1
	Nitrate reductase (Alpha subunit)	Candidatus Saccharibacteria bacterium	120	100%	3.00E-29	77%	KKU19706.1
	nitrate reductase	Candidatus Thiomargarita nelsonii	117	98%	2.00E-28	81%	KHD06572.1
	nitrate reductase	Labrenzia alba	119	66%	1.00E-28	85%	WP_055674365.1
	nitrate reductase	Sulfurihydrogenibium sp. YO3AOP1	107	100%	2.00E-24	68%	WP_012459162.1
	nitrate reductase	Bradyrhizobium lablabi	175	100%	6.00E-49	99%	WP_057862226.1
	nitrate reductase	Achromobacter sp. DMS1	119	75%	8.00E-29	86%	WP_053244451.1
	nitrate reductase	Bradyrhizobium elkanii	81.6	69%	9.00E-16	80%	WP_028345502.1
	nitrate reductase, alpha subunit	Burkholderia pseudomallei 354a	97.4	100%	7.00E-23	86%	EIF77503.1
	nitrate reductase	Bosea vaviloviae	110	100%	4.00E-26	100%	WP_054209647.1
	nitrate reductase	Castellaniella defragrans	106	100%	1.00E-24	84%	WP_043684335.1
	MULTISPECIES: nitrate reductase subunit beta	Arthrospira	91.3	100%	5.00E-21	84%	WP_006621981.1
	nitrate reductase	Nitrobacter winogradskyi	84.3	81%	1.00E-17	62%	WP_011314092.1
	respiratory nitrate reductase subunit beta	gamma proteobacterium HdN1	90.9	87%	3.00E-20	74%	WP_013262078.1
	nitrate reductase subunit beta	Candidatus Halobonum tyrrellensis	106	92%	1.00E-25	72%	WP_023393129.1
	nitrate reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	134	98%	3.00E-34	84%	WP_012633045.1
	nitrate reductase	Rhodothermus marinus	80.1	100%	1.00E-15	73%	WP_014066120.1
	nitrate reductase	Methylobacterium sp. Leaf122	96.3	100%	6.00E-21	85%	WP_056117670.1
	nitrate reductase	Geobacter pickeringii	115	100%	5.00E-28	88%	WP_039739992.1
	nitrate reductase	Pelomonas sp. Root1217	122	98%	3.00E-32	67%	WP_057296403.1
	respiratory nitrate reductase subunit beta	Sulfurihydrogenibium azorense	127	98%	7.00E-33	72%	WP_012674022.1
	nitrate reductase subunit beta	Candidatus Halobonum tyrrellensis	106	92%	1.00E-25	72%	WP_023393129.1
	Nitrate reductase, alpha chain	Candidatus Methyloimabilis oxyfera	164	100%	2.00E-44	80%	CBE67843.1
	nitrate reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	150	100%	1.00E-39	86%	WP_011421222.1
	nitrate reductase	Streptomyces sp. NRRL WC-3773	81.3	92%	4.00E-16	96%	WP_031005731.1
	nitrate reductase	Spirillospora albida	167	98%	3.00E-45	89%	WP_051713302.1
	putative assimilatory nitrate reductase large subunit	Actinoplanes missouriensis 431	119	100%	6.00E-29	83%	BAL87108.1
	nitrate reductase	Thermobaculum terrenum	96.7	100%	2.00E-21	80%	WP_012876459.1
	nitrate reductase subunit beta, nitrate reductase 1	Armatimonadetes bacterium CSP1-3	122	100%	2.00E-31	69%	KRT77587.1
	nitrate reductase catalytic subunit	Desulfomonile tiedjei	127	100%	3.00E-32	92%	WP_014811890.1

**Table 3.4F. Taxonomic assignments of *nar* transcripts in Oct X.**

Sample	Replicate	NCBI-nr annotation	Organism	Bit score	Identity	E-value	Similarity	Accession No.
OctX	1	nitrate reductase A subunit beta	Thermus igniterrae	136	76%	6.00E-36	95%	WP_018112078.1
		nitrate reductase	Thermus tengchongensis	85.1	100%	1.00E-17	75%	WP_038041964.1
		nitrate reductase A subunit alpha	Salmonella enterica subsp. enterica serovar	105	100%	9.00E-28	94%	KDS04887.1
		respiratory nitrate reductase subunit beta, nitrate reductase	Deltaproteobacteria bacterium CSP1-8	116	100%	5.00E-29	82%	KRT74987.1
		nitrate reductase	Brucella ceti M13/05/1	144	100%	6.00E-39	89%	EEX91432.1
		nitrate reductase	Brucella ceti M13/05/1	115	100%	6.00E-29	93%	EEX91432.1
		respiratory nitrate reductase, alpha subunit	Desulfomonile tiedjei DSM 6799	82	98%	7.00E-16	62%	AFM23682.1
		nitrate reductase A subunit beta	Advenella kashmirensis WT001	122	95%	4.00E-31	93%	AFK60799.1
		nitrate reductase	Pseudolabrys sp. Root1462	103	100%	4.00E-24	93%	WP_056910694.1
		nitrate reductase	Bordetella petrii	134	100%	3.00E-35	81%	WP_026640912.1
		nitrate reductase A subunit beta	Hahella chejuensis	86.3	100%	6.00E-18	69%	WP_011397794.1
		nitrate reductase	Thermithiobacillus tepidarius	82.8	100%	8.00E-17	81%	WP_028989411.1
		nitrate reductase subunit beta	Desulfococcus multivorans	115	99%	1.00E-17	87%	WP_020876367.1
		nitrate reductase	Acidovorax sp. NO-1	95.1	98%	5.00E-22	75%	WP_008903134.1
		respiratory nitrate reductase subunit beta, nitrate reductase	Deltaproteobacteria bacterium CSP1-8	106	100%	3.00E-25	75%	KRT74987.1
		nitrate reductase A subunit beta	Thermus thermophilus	87	70%	5.00E-18	77%	WP_014511194.1
		nitrate reductase	Tepidiphilus thermophilus	133	100%	7.00E-34	89%	WP_055423062.1
		nitrate reductase	Ardenticatena maritima	111	100%	4.00E-26	64%	KPL86585.1
		nitrate reductase	Bosea vaviloviae	87	100%	5.00E-19	73%	WP_054209650.1
		MULTISPECIES: nitrate reductase	Hydrogenophaga	112	100%	2.00E-28	79%	WP_009520392.1
		nitrate reductase	Chrysiogenes arsenatis	107	100%	1.00E-24	81%	WP_027389143.1
		nitrate reductase beta subunit	Thermus thermophilus HB8	92.4	100%	5.00E-20	67%	CAA71211.1
		nitrate reductase	Burkholderia cenocepacia	133	100%	3.00E-35	93%	WP_049109251.1
		nitrate reductase catalytic subunit	Sulfuricurvum kujiense	120	100%	1.00E-29	83%	WP_013449877.1
		MULTISPECIES: nitrate reductase A subunit alpha	Afipia	145	100%	7.00E-38	91%	WP_009337376.1
		nitrate reductase subunit alpha	Afipia felis	115	100%	1.00E-27	89%	WP_002718581.1
		nitrate reductase A subunit alpha	Oligotropha carboxidovorans	97.1	100%	2.00E-21	91%	WP_012562208.1
		nitrate reductase	Candidatus Filomicrobium marinum	114	100%	2.00E-27	85%	WP_046479433.1
		nitrate reductase	Pseudolabrys sp. Root1462	95.5	91%	1.00E-20	81%	WP_056910695.1
		nitrate reductase	Pseudolabrys sp. Root1462	136	100%	1.00E-34	87%	WP_056910695.1
		nitrate reductase A subunit alpha	Hyphomicrobium denitrificans	138	100%	2.00E-35	93%	WP_015598330.1
		nitrate reductase	Pseudolabrys sp. Root1462	148	100%	6.00E-39	94%	WP_056910695.1
		nitrate reductase A subunit alpha	Caldimonas manganoxidans	172	100%	4.00E-47	95%	WP_019561177.1
		nitrate reductase alpha chain	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	109	100%	1.00E-25	85%	GAO02124.1
		nitrate reductase Z subunit alpha	Salmonella enterica subsp. enterica serovar	111	100%	5.00E-26	56%	ESB38699.1
		nitrate reductase catalytic subunit	Burkholderia sacchari	95.1	100%	6.00E-21	96%	WP_035525874.1
		nitrate reductase catalytic subunit	Azoarcus sp. KH32C	104	98%	5.00E-24	77%	WP_015433959.1
		nitrate reductase catalytic subunit	Azoarcus sp. BH72	83.6	100%	6.00E-17	81%	WP_011767664.1
		nitrate reductase	Hoeflea sp. IMCC20628	109	100%	2.00E-26	82%	WP_047029656.1
		nitrate reductase	Bradyrhizobium yuanmingense	135	100%	6.00E-35	97%	WP_057028012.1
		MULTISPECIES: nitrate reductase catalytic subunit	Bradyrhizobium	125	100%	2.00E-31	98%	WP_011089775.1
		nitrate reductase	Tepidiphilus margaritifera	147	98%	1.00E-38	89%	WP_028875244.1
		nitrate reductase A subunit alpha	Pseudaminobacter salicylatoxidans	122	100%	5.00E-30	90%	WP_019170966.1
		nitrate reductase	Rhizobacter sp. Root404	165	92%	1.00E-44	95%	WP_056465085.1
		nitrate reductase	Betaproteobacteria bacterium SG8_40	109	100%	2.00E-25	78%	KPK34517.1
		nitrate reductase	Pseudolabrys sp. Root1462	122	100%	3.00E-30	98%	WP_056910695.1
		nitrate reductase	Sorangium cellulosum	125	98%	5.00E-31	72%	WP_012241100.1
		nitrate reductase	Sorangium cellulosum	125	98%	5.00E-31	72%	WP_012241100.1
		nitrate reductase	Verrucomicrobium sp. BvORR106	97.1	100%	1.00E-21	96%	WP_038171330.1
		nitrate reductase	Schlesneria paludicola	92.4	100%	1.00E-19	62%	WP_010588385.1

**Table 3.4G. Taxonomic assignments of *nar* transcripts in Oct X.**

Sample	Replicate	NCBI-nr annotation	Organism	Bit score	Identity	E-value	Similarity	Accession No.
OctX	2	nitrate reductase	Sorangium cellulosum	133	100%	8.00E-34	67%	WP_020741685.1
		nitrate reductase	Geothrix fermentans	117	100%	4.00E-28	78%	WP_026852527.1
		respiratory nitrate reductase 2 alpha chain, partial	Klebsiella pneumoniae MGH 76	145	100%	3.00E-39	88%	KDM20964.1
		nitrate reductase	Pseudolabrys sp. Root1462	117	74%	5.00E-28	93%	WP_056910695.1
		nitrate reductase	Pseudonocardia asaccharolytica	65.1	100%	2.00E-10	64%	WP_028931926.1
		nitrate reductase catalytic subunit	Pirellula staleyi	66.2	91%	2.00E-10	64%	WP_044185224.1
		nitrate reductase	Tepidiphilus thermophilus	95.1	100%	3.00E-20	60%	WP_055423062.1
		nitrate reductase	Desulfuromonas sp. TF	70.9	100%	4.00E-12	45%	WP_027714572.1
		nitrate reductase	Ochrobactrum anthropi	126	100%	4.00E-35	93%	WP_036579591.1
		nitrate reductase	Flavobacteriales bacterium BRH_c54	98.6	100%	2.00E-22	78%	KJS04194.1
		nitrate reductase	Chrysiogenes arsenatis	82	100%	1.00E-16	72%	WP_027389142.1
		nitrate reductase A subunit alpha	Rubrobacter xylanophilus	126	98%	4.00E-31	79%	WP_011564189.1
		nitrate reductase catalytic subunit	Aquimarina latercula	103	88%	9.00E-24	70%	WP_027391487.1
		respiratory nitrate reductase 1 alpha chain	Pseudomonas aeruginosa BL16	152	100%	3.00E-43	91%	ERV33539.1
		nitrate reductase	Massilia sp. WF1	107	92%	6.00E-25	94%	WP_047824533.1
	3	MULTISPECIES: nitrate reductase	unclassified Betaproteobacteria (miscellaneous)	119	98%	8.00E-30	93%	WP_054139959.1
		nitrate reductase A subunit beta	Calymmatobacterium okutanii thioautotrophic gill symbiont	122	100%	1.00E-30	71%	WP_011930031.1
		Respiratory nitrate reductase alpha chain	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Baildon str. R6-199	152	98%	8.00E-44	91%	EHJ82725.1
		nitrate reductase	Betaproteobacteria bacterium SG8_40	108	100%	3.00E-25	80%	KPK34517.1
		nitrate reductase	Hyphomicrobium zavarzinii	84	100%	9.00E-18	77%	WP_020088040.1
		nitrate reductase	Rhodopseudomonas sp. B29	101	100%	6.00E-23	80%	WP_022721552.1
		nitrate reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	100	100%	2.00E-22	90%	WP_012633045.1
		nitrate reductase	Meiothermus chliarophilus	99.4	100%	3.00E-22	76%	WP_027891931.1
		nitrate reductase	Pseudolabrys sp. Root1462	147	100%	2.00E-38	91%	WP_056910695.1
		nitrate reductase A subunit alpha	Reyranella massiliensis	97.8	98%	1.00E-21	84%	WP_020694566.1
		nitrate reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	122	100%	1.00E-29	65%	WP_012098400.1
		nitrate reductase alpha chain	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	82.8	100%	2.00E-16	64%	GAO02124.1
		nitrate reductase A subunit alpha	Rhodoferrax ferrireducens	97.4	100%	1.00E-21	98%	WP_011465070.1
		Respiratory nitrate reductase 2 alpha chain	Candidatus Accumulibacter sp. BA-91	192	100%	3.00E-55	93%	KFB72186.1
		nitrate reductase	beta proteobacterium AAP51	129	77%	5.00E-32	95%	WP_054155207.1
		nitrate reductase	Lentisphaera araneosa	70.1	97%	3.00E-12	67%	WP_007277256.1

**Table 3.4H. Taxonomic assignments of *nar* transcripts in Oct Z.**

Sample	Replicate	NCBI-nr annotation	Organism	Bit score	Identity	E-value	Similarity	Accession No.
OctZ	1	nitrate reductase A subunit alpha	Cupriavidus basilensis	143	97%	3.00E-37	97%	WP_017226780.1
		nitrate reductase	Meiothermus chliarophilus	139	100%	8.00E-36	90%	WP_027891931.1
		nitrate reductase	Geobacter metallireducens	94.7	100%	1.00E-20	85%	WP_004512301.1
		nitrate reductase A subunit beta	Nitrolancea hollandica	116	100%	9.00E-29	84%	WP_008480725.1
		nitrate reductase	Rhizobacter sp. Root404	92.4	100%	8.00E-21	81%	WP_056465083.1
		nitrate reductase	Comamonas granuli	77.8	100%	7.00E-16	84%	WP_042425787.1
		nitrate reductase	Candidatus Thiomargarita nelsonii	75.5	90%	6.00E-14	61%	KHD12747.1
		nitrate reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	105	100%	3.00E-24	79%	WP_012633045.1
		nitrate reductase alpha chain	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	134	100%	4.00E-34	93%	GAO02124.1
		nitrate reductase	Rubrobacter radiotolerans	86.3	100%	2.00E-17	74%	WP_038680569.1
		nitrate reductase subunit beta, nitrate reductase 1, beta subunit	Chloroflexi bacterium CSP1-4	119	96%	3.00E-30	91%	KRT62544.1
		Respiratory nitrate reductase 2 alpha chain	Candidatus Accumulibacter sp. BA-91	132	100%	3.00E-34	98%	KFB72186.1
		nitrate reductase	Desulfuromusa kysingii	117	100%	3.00E-30	73%	CAL91917.1
		nitrate reductase	Halogeometricum borinquense	78.2	72%	2.00E-14	61%	WP_006054602.1
		nitrate reductase	Salinicoccus halodurans	107	100%	9.00E-25	81%	WP_046789162.1
		nitrate reductase	Micromonospora sp. HK10	96.7	100%	6.00E-21	69%	WP_046569424.1
		respiratory nitrate reductase subunit beta, nitrate reductase 1, beta subunit	Deltaproteobacteria bacterium CSP1-8	124	98%	5.00E-32	91%	KRT74987.1
	2	respiratory nitrate reductase subunit beta	Halosimplex carlsbadense	94.4	94%	2.00E-21	69%	WP_006885134.1
		nitrate reductase	Delftia tsuruhatensis	79	100%	6.00E-15	63%	WP_047326285.1
		nitrate reductase	Geobacter lovleyi	117	97%	3.00E-28	80%	WP_012468292.1
		nitrate reductase A subunit beta	Anaeromyxobacter dehalogenans	105	100%	5.00E-25	72%	WP_012633044.1
		nitrate reductase A subunit beta	Thermus thermophilus	123	98%	2.00E-31	77%	WP_014511194.1
		nitrate reductase	Geothrix fermentans	99.8	100%	3.00E-22	74%	WP_026852527.1
		nitrate reductase	Belnapia moabensis	109	96%	1.00E-25	81%	WP_043338728.1
		nitrate reductase	Methylocella silvestris	81.6	100%	3.00E-17	84%	WP_012590527.1
		nitrate reductase	Geothrix fermentans	88.6	100%	1.00E-18	84%	WP_026852527.1
		nitrate reductase A subunit alpha	Methylobacter tundripaludum	109	100%	1.00E-25	78%	WP_006893225.1
		Respiratory nitrate reductase 1 alpha chain	Hydrogenophaga sp. T4	169	94%	4.00E-47	97%	EWS65599.1
		respiratory nitrate reductase alpha chain	Comamonas denitrificans	106	98%	7.00E-27	98%	ABI96841.1
		nitrate reductase	Geobacter lovleyi	86.7	100%	7.00E-18	93%	WP_012468292.1
		nitrate reductase	Geobacter metallireducens	112	100%	1.00E-26	86%	WP_004512301.1
		nitrate reductase A subunit beta	Anaeromyxobacter dehalogenans	85.1	81%	1.00E-17	84%	WP_011421223.1
		nitrate reductase	Betaproteobacteria bacterium SG8_40	175	100%	6.00E-50	90%	KPK34518.1
		nitrate reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	111	100%	3.00E-26	85%	WP_012633045.1
		nitrate reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	111	98%	4.00E-26	78%	WP_012633045.1
		nitrate reductase A subunit alpha	Nocardioides sp. JS614	107	100%	7.00E-25	100%	WP_011754808.1
		nitrate reductase catalytic subunit	Methylomonas denitrificans	113	98%	3.00E-27	98%	WP_036274297.1
		Respiratory nitrate reductase 1 gamma chain	Hydrogenophaga sp. T4	85.9	100%	1.00E-18	67%	EWS63964.1
	3	nitrate reductase catalytic subunit	Campylobacter rectus	82.4	100%	2.00E-16	71%	WP_002944359.1
		nitrate reductase	Betaproteobacteria bacterium SG8_40	93.6	98%	8.00E-20	61%	KPK34517.1
		nitrate reductase subunit alpha, nitrate reductase 1, alpha subunit	Deltaproteobacteria bacterium CSP1-8	71.2	100%	2.00E-12	69%	KRT74986.1
		nitrate reductase	Xanthobacter sp. 91	109	100%	2.00E-26	92%	WP_029557183.1
		nitrate reductase	Kutzneria sp. 744	151	100%	2.00E-41	98%	WP_043726829.1
		nitrate reductase	Rhizobiales bacterium YIM 77505	110	100%	8.00E-27	93%	WP_037014844.1
		nitrate reductase						

**Table 3.5. Taxonomic assignments of *nir* transcripts.**

Sample	Replicate	NCBI-nr annotation	Organism	Bit score	Identity	E-value	Similarity	Accession No.
Jun X	2	nitrite reductase	Rhodocyclaceae bacterium Paddy-1	101	100%	3.00E-23	90%	WP_054621629.1
	3	NirK, nitrite reductase multicopper oxidase	Thaumarchaeota archaeon N4	96.7	100%	9.00E-22	86%	CDI05991.1
JunZ	1	nitrite reductase	Ralstonia sp. UNPF2a	130	100%	2.00E-36	64%	BAO96022.1
		nitrite reductase, copper-containing	Pelomonas sp. Root1217	178	100%	3.00E-51	95%	WP_057296411.1
		nitrite reductase, copper-containing	Pelomonas sp. Root1217	176	100%	2.00E-50	94%	WP_057296411.1
		nitrite reductase, copper-containing	Pelomonas sp. Root1217	178	100%	3.00E-51	95%	WP_057296411.1
		copper-containing nitrite reductase	Azoarcus sp. KH32C	93.2	100%	1.00E-20	79%	WP_015452284.1
		copper-containing nitrite reductase	Azoarcus sp. KH32C	78.6	77%	3.00E-15	83%	WP_015452284.1
		copper-containing nitrite reductase	Azoarcus sp. KH32C	78.6	77%	3.00E-15	83%	WP_015452284.1
		copper-containing nitrite reductase	Candidatus Brocadia fulgida	106	100%	1.00E-25	71%	KKO18415.1
		copper-containing nitrite reductase	Candidatus Brocadia fulgida	106	100%	1.00E-25	71%	KKO18415.1
		copper-containing nitrite reductase	Propionibacterium acnes JCM 18918	162	100%	1.00E-46	99%	GAE77676.1
	2	nitrite reductase	Limnochorda pilosa	87	100%	1.00E-18	60%	BAS29158.1
		Copper-containing nitrite reductase	Parcubacteria bacterium GW2011_GWF2_40_10	111	97%	1.00E-26	59%	KKR38789.1
		Copper-containing nitrite reductase	Parcubacteria bacterium GW2011_GWF2_40_10	111	97%	1.00E-26	59%	KKR38789.1
		Copper-containing nitrite reductase	Parcubacteria bacterium GW2011_GWE2_40_8	108	97%	5.00E-26	57%	KKR77692.1
		nitrite reductase	Salinisphaera shabanensis	82.4	100%	9.00E-17	74%	WP_021031782.1
		nitrite reductase	Ardenticatena maritima	97.1	100%	4.00E-22	76%	GAP62154.1
		nitrite reductase	Ardenticatena maritima	97.1	100%	4.00E-22	76%	GAP62154.1
		nitrite reductase	Rhodanobacter sp. Soil772	70.1	85%	6.00E-12	60%	WP_056388375.1
		nitrite reductase	Ardenticatena maritima	77.4	100%	4.00E-15	75%	GAP62154.1
		nitrite reductase	Pseudolabrys sp. Root1462	105	100%	3.00E-24	73%	WP_056909647.1
OctX	3	nitrite reductase	Nitrospira moscoviensis	131	100%	6.00E-35	89%	WP_053380582.1
		copper-containing nitrite reductase	Propionibacterium acnes JCM 18920	74.3	100%	1.00E-14	100%	GAE81415.1
		nitrite reductase	Rhodothermus marinus	69.3	95%	5.00E-12	70%	WP_012843162.1
		nitrite reductase	Pseudomonas fluorescens	60.1	59%	3.00E-08	58%	WP_057436864.1
		cytochrome C	Burkholderia thailandensis	117	100%	3.00E-29	83%	WP_011401081.1
		nitrite reductase	Bradyrhizobium sp. ORS 375	97.4	94%	2.00E-21	82%	WP_009028608.1
		cytochrome C	Dyadobacter alkalitolerans	86.3	100%	1.00E-17	61%	WP_026629980.1
	1	nitrite reductase	Wautersia sp. NH26B	134	100%	2.00E-37	88%	BAO96021.1
		nitrite reductase	Flavobacterium sp. B17	98.6	97%	1.00E-22	70%	WP_042721878.1
		nitrite reductase	Gammaproteobacteria bacterium SG8_30	75.1	100%	5.00E-14	80%	KPJ79435.1
		nitrite reductase, copper-containing	Rhodanobacter sp. Root561	91.7	74%	2.00E-19	71%	WP_056766691.1
		Copper-containing nitrite reductase (NO-forming),	Ralstonia solanacearum	91.7	71%	1.00E-19	66%	WP_013207410.1
		nitrite reductase	Gammaproteobacteria bacterium SG8_30	75.1	100%	5.00E-14	80%	KPJ79435.1
		nitrite reductase copper-containing	Burkholderia pseudomallei	96.3	98%	4.00E-22	71%	WP_009968864.1
		nitrite reductase	Ardenticatena maritima	83.2	51%	1.00E-16	82%	GAP62154.1
		nitrite reductase, copper-containing	Pelomonas sp. Root1217	117	100%	3.00E-29	88%	WP_057296411.1
		Nitrite reductase (NO-forming)	Herpetosiphon aurantiacus DSM 785	122	100%	5.00E-31	70%	ABX03943.1
OctZ	3	cbb3-type cytochrome C oxidase subunit III	Cupriavidus basilensis	98.2	100%	1.00E-23	83%	WP_006160802.1
		nitrite reductase	Sulfuritalea hydrogenivorans	70.1	100%	2.00E-12	94%	WP_041100219.1
		nitrite reductase	Sulfuritalea hydrogenivorans	70.9	100%	9.00E-13	97%	WP_041100219.1
		nitrite reductase	Sulfuritalea hydrogenivorans	70.9	100%	9.00E-13	97%	WP_041100219.1
		cytochrome C	Burkholderia pseudomallei	113	84%	1.00E-27	84%	WP_041191664.1
		nitrite reductase	Afipia sp. Root123D2	120	100%	1.00E-29	88%	WP_056296288.1
		nitrite reductase	Bradyrhizobium lablabi	114	100%	2.00E-28	93%	WP_057856414.1
		nitrite reductase	Ralstonia sp. UNPF2a	122	100%	3.00E-33	71%	BAO96022.1
		Copper-containing nitrite reductase (NO-forming), anaerobically induced outer membrane protein	Ralstonia solanacearum	105	86%	7.00E-25	78%	WP_014632033.1
		cytochrome C	Pedobacter sp. V48	72.8	62%	5.00E-14	73%	WP_048904641.1
	1	nitrite reductase, copper-containing	Flavobacterium sp. Root901	121	100%	7.00E-31	93%	WP_057122411.1
		nitrite reductase	Opitutus terrae	81.6	96%	2.00E-16	75%	WP_012373845.1
		nitrite reductase	Stenotrophomonas nitritireducens	115	100%	1.00E-30	74%	BAO96032.1
		nitrite reductase	Gammaproteobacteria bacterium SG8_30	115	100%	3.00E-28	89%	KPJ79435.1
		putative nitrite reductase	Gemmatimonas aurantiaca	99.4	97%	1.00E-22	54%	WP_015894577.1
		nitrite reductase	Alicyclophilus sp. CRZ1	64.3	85%	6.00E-14	88%	WP_019375085.1
		Nitrite reductase (NO-forming)	Herpetosiphon aurantiacus DSM 785	109	100%	2.00E-30	90%	ABX03943.1
		Nitrite reductase (NO-forming)	Herpetosiphon aurantiacus DSM 785	83.2	100%	9.00E-21	69%	ABX03943.1
		nitrite reductase	Pseudoalteromonas haloplanktis	89	100%	3.00E-24	65%	BAO96030.1
		nitrite reductase	Thermorudis peleeae	96.7	98%	5.00E-26	72%	WP_051914749.1
OctZ	2	nitrite reductase	Azohydromonas australica	155	98%	2.00E-46	65%	WP_029000517.1
		nitrite reductase	Betaproteobacteria bacterium SG8_39	122	100%	3.00E-37	73%	KPK05781.1
	3	nitrite reductase	Leptothrix cholodnii	149	100%	3.00E-44	77%	WP_012346472.1
		cytochrome c, mono- and diheme variants family	Burkholderiales bacterium JOSHI_001	102	100%	2.00E-27	86%	EHR69562.1
		Nitrite reductase (NO-forming)	Herpetosiphon aurantiacus DSM 785	69.3	90%	6.00E-16	92%	ABX03943.1

**Table 3.6A. Taxonomic assignments of *nor* transcripts in Jun.**

Sample	Replicate	NCBI-nr annotation	Organism	Bit score	Identity	E-value	Similarity	Accession No.
JunX	1	nitric-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	124	100%	3.00E-31	97%	WP_012097560.1
		nitric oxide reductase	Leptospira licerasiae	76.6	69%	1.00E-14	71%	WP_008597116.1
	2	nitric oxide reductase large subunit	Variovorax sp. Root434	115	100%	8.00E-28	89%	WP_056591375.1
	3	MULTISPECIES: cytochrome C	Geobacter	75.5	55%	8.00E-15	94%	WP_012529681.1
	1	nitric oxide reductase large subunit	Chryseobacterium sp. CF365	150	100%	7.00E-40	79%	WP_034698784.1
		nitric oxide reductase large subunit	Gemmata sp. IIL30	101	98%	7.00E-23	70%	WP_052552867.1
		nitric oxide reductase large subunit	Syntrophobacter fumaroxidans	85.1	100%	4.00E-17	56%	WP_011699771.1
		nitric oxide reductase large subunit	Syntrophobacter fumaroxidans	85.1	100%	4.00E-17	56%	WP_011699771.1
		nitric oxide reductase large subunit	Syntrophobacter fumaroxidans	85.1	100%	5.00E-17	56%	WP_011699771.1
		nitric oxide reductase (subunit B) protein	Rhodopirellula europaea	103	100%	9.00E-24	80%	WP_008670956.1
		nitric-oxide reductase	Desulfovibrio putealis	103	88%	5.00E-23	65%	WP_043646031.1
		nitric-oxide reductase	Desulfovibrio putealis	103	88%	5.00E-23	65%	WP_043646031.1
		nitric oxide reductase large subunit	Burkholderia oklahomensis	134	100%	1.00E-34	89%	WP_010116299.1
		nitric oxide reductase large subunit	Burkholderia oklahomensis	134	100%	1.00E-34	89%	WP_010116299.1
		nitric oxide reductase large subunit	Pelomonas sp. Root1237	102	100%	2.00E-23	76%	WP_056199587.1
		nitric oxide reductase	Thiobacillus thioparus	150	100%	6.00E-40	89%	WP_018506675.1
		nitric oxide reductase	Thiobacillus thioparus	151	100%	1.00E-40	90%	WP_018506675.1
		nitric oxide reductase	Acetobacter pomorum	125	100%	4.00E-31	79%	WP_006117536.1
		nitric oxide reductase large subunit	Gemmata sp. IIL30	108	96%	4.00E-25	68%	WP_052552867.1
		nitric-oxide reductase	Geobacter sp. M21	121	100%	9.00E-31	79%	WP_015838280.1
		nitric-oxide reductase	Geobacter bemidjensis	112	100%	3.00E-27	66%	WP_012529680.1
		nitric oxide reductase	Geobacter bemidjensis	90.5	100%	2.00E-19	67%	WP_012529680.1
		nitric oxide reductase	Geobacter bemidjensis	112	100%	3.00E-27	66%	WP_012529680.1
		nitric oxide reductase	Geobacter bemidjensis	112	100%	3.00E-27	66%	WP_012529680.1
		nitric oxide reductase	Desulfovibrio sp. X2	138	98%	1.00E-35	83%	WP_035040058.1
		nitric oxide reductase	Geothrix fermentans	90.9	100%	2.00E-19	88%	WP_026853729.1
		nitric oxide reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	95.1	100%	8.00E-21	87%	WP_011422768.1
		nitric oxide reductase	Geobacter daltonii	124	100%	1.00E-30	75%	WP_012645124.1
		nitric oxide reductase	Propionibacterium acnes JCM 18920	135	100%	1.00E-35	98%	GAE81392.1
		nitric-oxide reductase	Candidatus Solibacter usitatus	119	100%	8.00E-29	56%	WP_011684686.1
		nitric-oxide reductase	Candidatus Solibacter usitatus	119	100%	1.00E-28	56%	WP_011684686.1
		nitric oxide reductase	Archangium gephyra	97.8	98%	2.00E-21	76%	WP_047856059.1
		nitric oxide reductase	Desulfatitalea sp. BRH_c12	103	100%	1.00E-23	69%	KJS32560.1
JunZ	2	cytochrome C and Quinol oxidase polypeptide I family protein	Burkholderia pseudomallei ABCPW 91	85.5	97%	4.00E-18	74%	KGV64935.1
	1	nitric oxide reductase large subunit	Pelomonas sp. Root1444	67	81%	8.00E-11	73%	WP_056877232.1
		nitric oxide reductase large subunit	Propionispora sp. Iso2/2	87	98%	7.00E-18	66%	WP_054259836.1
		nitric oxide reductase large subunit	Gemmata sp. IIL30	108	100%	2.00E-25	68%	WP_052552867.1
		cytochrome c oxidase subunit I	Desulfovibrio sp. X2	125	100%	3.00E-31	84%	EPR44482.1
		nitric-oxide reductase	Geothrix fermentans	125	100%	4.00E-31	78%	WP_026853729.1
		nitric-oxide reductase	Geobacter metallireducens	132	100%	1.00E-33	77%	WP_004513650.1
		cytochrome C and Quinol oxidase polypeptide I family protein	Mycobacterium xenopi 3993	99.8	100%	3.00E-24	81%	EUA50285.1
		nitric-oxide reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	146	100%	1.00E-38	86%	WP_011422768.1
		nitric-oxide reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	146	100%	1.00E-38	86%	WP_011422768.1
		nitric oxide reductase	Burkholderia sp. H160	81.6	98%	9.00E-16	65%	WP_008917821.1
		nitric oxide reductase (subunit B) protein	Rhodopirellula europaea	82.8	90%	3.00E-16	68%	WP_008658338.1
		nitric oxide reductase (subunit B) protein	Rhodopirellula europaea	84.7	92%	5.00E-17	68%	WP_008658338.1
		nitric oxide reductase (subunit B) protein	Rhodopirellula europaea	82.8	90%	3.00E-16	68%	WP_008658338.1
		nitric-oxide reductase	Candidatus Solibacter usitatus	134	100%	3.00E-34	78%	WP_011684686.1
		nitric oxide reductase large subunit	Gemmata sp. IIL30	100	100%	1.00E-22	84%	WP_052552867.1
		nitric oxide reductase (subunit B) protein	Rhodopirellula europaea	82.8	90%	3.00E-16	68%	WP_008658338.1
		nitric oxide reductase (subunit B) protein	Rhodopirellula europaea	82.8	90%	3.00E-16	68%	WP_008658338.1
		nitric-oxide reductase	Geothrix fermentans	93.6	100%	2.00E-20	80%	WP_026853729.1
	3	nitric oxide reductase subunit B	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	94.4	100%	1.00E-20	92%	GAO01424.1
		nitric oxide reductase large subunit	Acidobacterium sp. PMMR2	84	100%	1.00E-16	83%	WP_026441534.1
		cytochrome B	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	82.8	100%	1.00E-16	82%	WP_012097216.1
		nitric oxide reductase large subunit	Archangium gephyra	109	100%	1.00E-25	83%	WP_047855682.1
		nitric oxide reductase large subunit	Pelomonas sp. Root1217	104	100%	5.00E-24	84%	WP_057297029.1
		nitric oxide reductase NorZ	Bacteriovorax sp. BAL6_X	97.8	100%	2.00E-21	52%	WP_021266481.1
		nitric-oxide reductase	Rhodanobacter sp. Soil772	109	100%	2.00E-25	65%	WP_056385337.1
		nitric-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	122	100%	2.00E-30	97%	WP_012098660.1
		nitric-oxide reductase	Thermoanaerobaculum aquaticum	95.9	100%	1.00E-21	85%	WP_038049554.1
		nitric oxide reductase large subunit	Anaeromyxobacter dehalogenans	77.8	99%	6.00E-15	95%	WP_011420460.1
		nitric oxide reductase subunit B	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	78.2	100%	1.00E-14	90%	GAO02475.1
		nitric oxide reductase	Desulfovibrio sp. X2	99.4	94%	3.00E-22	82%	WP_035040058.1
		nitric-oxide reductase	Geobacter pickeringii	109	100%	8.00E-26	81%	WP_039744910.1



**Table 3.6B. Taxonomic assignments of *nor* transcripts in Oct.**

Sample	Replicate	NCBI-nr annotation	Organism	Bit score	Identity	E-value	Similarity	Accession No.
OctX	1	nitric oxide reductase subunit B	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	92.4	96%	1.00E-19	67%	GAO04078.1
		nitric oxide reductase large subunit	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	78.6	93%	6.00E-15	68%	WP_012097216.1
	2	nitric oxide reductase	Candidatus Koribacter versatilis	122	95%	2.00E-30	82%	WP_011521171.1
		nitric oxide reductase	Candidatus Solibacter usitatus	102	100%	2.00E-23	84%	WP_011684686.1
		nitric oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	85.1	100%	2.00E-17	71%	WP_012098660.1
		nitric oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	73.2	100%	2.00E-13	59%	WP_012097560.1
		nitric oxide reductase	Flaviumibacter sp. ZG627	112	100%	5.00E-27	88%	WP_039126226.1
		nitric oxide reductase	Leptothrix cholodnii	114	100%	4.00E-28	98%	WP_012346498.1
		nitric oxide reductase large subunit	Pseudoxanthomonas suwonensis	108	98%	2.00E-25	77%	WP_024867540.1
		Nitric-oxide reductase, quinol-dependent	Fulvivirga imtechensis AK7	79.7	97%	2.00E-15	74%	ELR72472.1
		nitric oxide reductase large subunit	Desulfomonile tiedjei	89.4	100%	1.00E-18	69%	WP_014810344.1
		nitric-oxide reductase	Candidatus Solibacter usitatus	60.5	100%	1.00E-08	81%	WP_011684686.1
		nitric oxide reductase	Geobacter brementis	78.6	81%	1.00E-14	54%	WP_035496995.1
		nitric-oxide reductase	Geothrix fermentans	108	100%	2.00E-25	74%	WP_026853729.1
		nitric oxide reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	60.1	100%	2.00E-08	61%	WP_011422228.1
		nitric-oxide reductase	Geobacter metallireducens	94	100%	5.00E-20	67%	WP_004513650.1
		nitric oxide reductase large subunit	Rufibacter sp. DG31D	119	97%	1.00E-18	73%	WP_048921107.1
		nitric-oxide reductase	Candidatus Koribacter versatilis	83.6	100%	1.00E-16	85%	WP_011521171.1
		nitric-oxide reductase	Candidatus Koribacter versatilis	68.6	95%	1.00E-11	74%	WP_011521171.1
		nitric oxide reductase large subunit	Scytonema millei	88.2	100%	4.00E-18	67%	WP_05912455.1
		nitric oxide reductase large subunit	Scytonema millei	88.2	100%	4.00E-18	67%	WP_039712455.1
		nitric-oxide reductase	Geobacter metallireducens	94	100%	5.00E-20	67%	WP_004513650.1
		nitric oxide reductase	Leptonema illini	124	100%	2.00E-31	71%	WP_002773654.1
		nitric oxide reductase large subunit	Pelomonas sp. Root1237	82.8	100%	2.00E-16	85%	WP_056199587.1
		nitric oxide reductase large subunit	Rudanella lutea	75.9	92%	7.00E-14	57%	WP_027303359.1
		nitric oxide reductase large subunit	Methylosarcina lacus	127	91%	8.00E-32	62%	WP_024299925.1
		Nitric-oxide reductase subunit B	Geobacillus sp. WSUCF1	90.1	97%	8.00E-20	65%	EPR28836.1
		nitric oxide reductase large subunit	Caulobacter sp. Root1472	135	100%	9.00E-35	87%	WP_056751251.1
		nitric oxide reductase large subunit	Lysobacter daejeonensis	115	100%	7.00E-28	81%	WP_036134847.1
		nitric oxide reductase large subunit	Pelomonas sp. Root1237	82.8	100%	2.00E-16	85%	WP_056199587.1
		nitric oxide reductase	Bosea thiooxidans	65.9	100%	1.00E-10	56%	WP_055729784.1
		nitric oxide reductase	Desulfatitalea sp. BRH_c12	143	98%	2.00E-37	83%	KJS32560.1
		Nitric-oxide reductase	Enhygromyxa salina	100	100%	1.00E-22	76%	KIG14148.1
		nitric oxide reductase large subunit	Pseudoxanthomonas suwonensis	108	98%	2.00E-25	77%	WP_024867540.1
		nitric oxide reductase large subunit	Pelomonas sp. Root1444	98.2	98%	8.00E-22	73%	WP_056877232.1
		nitric oxide reductase large subunit	Burkholderia pseudomallei	82	100%	2.00E-17	86%	CFB52563.1
	3	nitric oxide reductase	Hyalangium minutum	109	100%	8.00E-26	92%	WP_044181196.1
		nitric oxide reductase	Hyalangium minutum	109	100%	8.00E-26	92%	WP_044181196.1
		nitric oxide reductase large subunit	Comamonas granuli	119	98%	1.00E-28	66%	WP_042421943.1
		nitric-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	119	100%	3.00E-29	79%	WP_012098660.1
		nitric-oxide reductase	Candidatus Koribacter versatilis	83.2	100%	2.00E-16	59%	WP_011521171.1
		nitric oxide reductase large subunit	Gemmata sp. IIL30	82	100%	2.00E-16	93%	WP_052552867.1
		Nitric-oxide reductase	Enhygromyxa salina	100	100%	1.00E-22	76%	KIG14148.1
		nitric oxide reductase large subunit	Bacillus rubiinfantis	101	98%	1.00E-22	66%	WP_042357039.1
		nitric oxide reductase large subunit	Gemmata sp. IIL30	79.3	75%	4.00E-15	70%	WP_052552867.1
		nitric oxide reductase	Elizabethkingia meningoseptica	93.2	98%	5.00E-20	74%	AKH93568.1
		nitric-oxide reductase	Geobacter sp. M18	75.1	100%	3.00E-14	67%	WP_041248390.1
		nitric-oxide reductase	Geobacter soli	105	100%	3.00E-25	75%	WP_039642718.1
		nitric-oxide reductase	Geobacter soli	102	100%	1.00E-23	89%	WP_039642718.1
		nitric oxide reductase large subunit-like protein	Pontibacter sp. BAB1700	105	98%	2.00E-24	81%	WP_007660492.1
		nitric-oxide reductase	Geobacter soli	95.9	89%	2.00E-21	76%	WP_039642718.1
		nitric-oxide reductase	Geobacter soli	105	100%	3.00E-25	75%	WP_039642718.1
		nitric-oxide reductase	Geobacter sp. M18	102	100%	3.00E-24	94%	WP_041248390.1
		nitric oxide reductase subunit B	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	108	100%	3.00E-25	87%	GAO02475.1
		nitric oxide reductase	Shimwellia blattae	101	93%	5.00E-23	78%	WP_002445511.1
		Nitric oxide reductase, subunit B	Waddlia chondrophila 2032/99	76.6	95%	3.00E-14	59%	CCB92015.1
		Nitric-oxide reductase, qNOR-like (norZ)	Candidatus Methyloirabialis oxyfera	97.1	85%	4.00E-21	70%	CBE68939.1
		nitric oxide reductase	Desulfovibrio sp. FW1012B	50.1	47%	4.00E-05	84%	WP_009182113.1
		nitric oxide reductase	Geothrix fermentans	87.8	90%	3.00E-18	85%	WP_026853729.1
		nitric oxide reductase	Geobacter metallireducens	84.7	93%	4.00E-17	70%	WP_004513650.1
		nitric-oxide reductase	Geothrix fermentans	108	98%	2.00E-25	83%	WP_026853729.1
		nitric-oxide reductase	Geothrix fermentans	80.9	95%	3.00E-15	75%	WP_026853729.1
		nitric-oxide reductase	Geobacter pickeringii	80.5	100%	1.00E-15	77%	WP_039744910.1
		nitric-oxide reductase	Desulfovibrio sp. TomC	92	98%	9.00E-20	78%	WP_043636560.1
		nitric oxide reductase	Edaphobacter aggregans	152	100%	5.00E-41	95%	WP_035353969.1
OctZ	1	nitric oxide reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	96.3	100%	2.00E-25	74%	WP_011422768.1
		nitric oxide reductase subunit B	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	101	100%	3.00E-27	83%	GAO02475.1
	3	nitric-oxide reductase qNorB	Bacillus azotoformans	110	100%	4.00E-30	68%	WP_003329195.1
		nitric oxide reductase large subunit	Bdellovibrio sp. ArHS	86.7	94%	4.00E-22	70%	KHD88082.1
		nitric oxide reductase large subunit	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	81.6	76%	3.00E-20	82%	WP_012097216.1
		nitric oxide reductase large subunit	Syntrophobacter fumaroxidans	88.6	100%	7.00E-23	70%	WP_011699771.1
		nitric oxide reductase large subunit	Alcanivorax pacificus	115	100%	3.00E-32	78%	WP_008736114.1
		nitric oxide reductase large subunit	Rudanella lutea	87.8	98%	1.00E-22	80%	WP_027303359.1

# Table 3.7. Taxonomic assignments of *nos* transcripts.

Sample	Replicate	NCBI-nr annotation	Organism	Bit score	Identity	E-value	Similarity
JunX	2	Nitrous-oxide reductase	Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1	118	100%	6.00E-29	81%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	146	100%	6.00E-39	86%
JunZ	1	nitrous-oxide reductase nosZ	Magnetospirillum gryphiswaldense	93.6	100%	3.00E-20	60%
		nitrous-oxide reductase	Candidatus Acetothermus autotrophicum	89.4	100%	5.00E-20	93%
		cytochrome C	Ferroglobus placidus	110	98%	9.00E-26	56%
		cytochrome C	Ferroglobus placidus	108	98%	5.00E-25	56%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	117	98%	1.00E-28	89%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	112	100%	5.00E-27	85%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	117	98%	1.00E-28	89%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	112	100%	5.00E-27	85%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	113	95%	3.00E-28	80%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	117	98%	1.00E-28	89%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	81.6	100%	2.00E-16	100%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	96.3	100%	2.00E-21	94%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	82.4	100%	2.00E-17	77%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	134	100%	9.00E-36	65%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	98.2	100%	4.00E-22	94%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	96.3	100%	2.00E-21	94%
		cytochrome C	Ardenticatena maritima	115	89%	8.00E-28	77%
		nitrous-oxide reductase	Ardenticatena maritima	122	98%	3.00E-30	73%
		nitrous-oxide reductase	Candidatus Acetothermus autotrophicum	78.2	63%	1.00E-15	79%
		nitrous-oxide reductase	Melioribacter roseus	85.5	100%	1.00E-17	80%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	130	100%	1.00E-33	91%
		nitrous-oxide reductase	Opitutaceae bacterium TAV5	115	100%	1.00E-27	60%
		nitrous-oxide reductase	Opitutaceae bacterium TAV5	115	100%	1.00E-27	60%
	2	nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	85.9	100%	1.00E-17	73%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	85.9	100%	1.00E-17	73%
		nitrous-oxide reductase	Flavobacterium sp. 316	132	100%	5.00E-34	77%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	85.9	100%	1.00E-17	73%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	167	100%	2.00E-46	91%
		nitrous-oxide reductase	Candidatus Acetothermus autotrophicum	101	100%	2.00E-24	77%
		cytochrome C	Myxococcales bacterium SG8_38	89.7	100%	6.00E-19	67%
		cytochrome C	Myxococcales bacterium SG8_38	89.7	100%	6.00E-19	67%
		cytochrome C	Myxococcales bacterium SG8_38	89.7	100%	6.00E-19	67%
		nitrous-oxide reductase	Anoxybacillus flavithermus	72.8	95%	3.00E-13	79%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	104	65%	4.00E-24	96%
		nitrous-oxide reductase	Capnocytophaga cynodermi	148	98%	1.00E-39	83%
	3	nitrous-oxide reductase	Owenweeksia hongkongensis	103	100%	1.00E-23	72%
		nitrous-oxide reductase	Desulfomonile tiedjei	157	100%	3.00E-43	84%
		nitrous-oxide reductase	Desulfomonile tiedjei	157	100%	3.00E-43	84%
		cytochrome C	Sphaerobacter thermophilus	101	98%	8.00E-23	62%
		cytochrome C	Sphaerobacter thermophilus	102	98%	4.00E-23	62%
		nitrous-oxide reductase	Opitutaceae bacterium TAV5	144	100%	3.00E-38	81%
		nitrous-oxide reductase	Desulfomonile tiedjei	157	100%	3.00E-43	84%
	1	nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	141	100%	2.00E-37	81%
		nitrous oxide reductase apoprotein	bacterium JGI-22	101	100%	4.00E-23	71%
		cytochrome C	Thioploca ingrica	100	86%	2.00E-22	69%
		nitrous-oxide reductase	Opitutus terrae	64.3	54%	4.00E-10	90%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	119	95%	2.00E-29	75%
		nitrous oxide reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	111	100%	6.00E-27	77%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	88.6	79%	1.00E-18	87%
		Nitrous-oxide reductase precursor	Candidatus Accumulibacter sp. SK-11	67.4	97%	3.00E-11	67%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	83.6	100%	6.00E-17	75%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	117	100%	1.00E-28	83%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	74.7	91%	7.00E-14	76%
		nitrous oxide reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	111	100%	6.00E-27	77%
OctX	3	nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	119	95%	2.00E-29	75%
		nitrous oxide reductase apoprotein	Cellulophaga algicola DSM 14237	107	100%	8.00E-25	68%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	139	100%	8.00E-38	88%
		nitrous oxide reductase apoprotein	Cellulophaga algicola DSM 14237	107	100%	8.00E-25	68%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	121	100%	3.00E-31	68%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	117	100%	1.00E-28	83%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	125	100%	9.00E-32	84%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	74.7	91%	7.00E-14	76%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	139	100%	2.00E-36	88%
		nitrous oxide reductase	Bacillus sp. ET	135	98%	2.00E-35	93%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	101	100%	2.00E-23	94%
		cytochrome C	Myxococcales bacterium SG8_38_1	62.4	45%	5.00E-09	75%
		cytochrome C	Myxococcales bacterium SG8_38	84	100%	7.00E-17	66%
		cytochrome C	Candidatus Thiomargarita nelsonii	67.8	100%	2.00E-11	60%
		nitrous-oxide reductase	Candidatus Acetothermus autotrophicum	91.3	97%	4.00E-20	55%
		nitrous-oxide reductase	Opitutaceae bacterium TAV5	71.6	100%	6.00E-13	84%
		nitrous-oxide reductase	Opitutus terrae	64.3	54%	4.00E-10	90%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	88.6	79%	1.00E-18	87%
	1	nitrous-oxide reductase	Candidatus Acetothermus autotrophicum	100	100%	8.00E-24	81%
		cytochrome C	Myxococcales bacterium SG8_38	67.8	100%	2.00E-11	66%
		nitrous oxide reductase	Rhodothermus marinus	121	100%	1.00E-31	66%
		cytochrome C	Myxococcales bacterium SG8_38_1	107	100%	7.00E-25	61%
		cytochrome C	Myxococcales bacterium SG8_38	68.9	68%	2.00E-11	58%
		cytochrome c	Magnetospira sp. QH-2	100	93%	1.00E-22	74%
		cytochrome c	Caldilinea aerophila	104	100%	4.00E-24	70%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	97.8	100%	1.00E-21	65%
		nitrous-oxide reductase	Hydrogenobacter thermophilus	130	98%	2.00E-33	76%
		nitrous-oxide reductase	bacterium JGI-5	85.5	100%	1.00E-17	75%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	97.4	100%	7.00E-22	94%
		nitrous-oxide reductase	Gillisia limnaea	80.5	91%	1.00E-15	67%
OctZ	2	nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	122	100%	1.00E-30	85%
		cytochrome c	Rhodothermus marinus	88.2	98%	4.00E-18	59%
		nitrous-oxide reductase	Candidatus Acetothermus autotrophicum	106	91%	7.00E-26	79%
		TAT-dependent nitrous-oxide reductase	Hyphomicrobium zavarzinii	115	100%	8.00E-28	72%
		nitrous-oxide reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	104	98%	5.00E-25	80%
	3	nitrous oxide reductase	Rhodothermus marinus	74.7	100%	1.00E-14	68%
		nitrous-oxide reductase	Ignavibacterium album	84.3	100%	2.00E-17	90%
		nitrous-oxide reductase	Niastella korensis	119	100%	2.00E-29	91%

# Table 3.8. Taxonomic assignments of *nrf* transcripts.

Sample	Replicate	NCBI-nr annotation	Organism	Bit score	Identity	E-value	Similarity	Accession No.
JunX	2	nitrite reductase	Cystobacter violaceus	75.1	100%	5.00E-14	71%	WP_043401184.1
		nitrite reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	97.1	100%	2.00E-21	71%	WP_012634152.1
	3	cytochrome c-552	Caldilinea aerophila	120	100%	3.00E-30	67%	WP_052317657.1
		cytochrome C	Geobacter soli	113	98%	1.00E-27	89%	WP_039647922.1
JunZ	1	Pentaheme cytochrome c nitrite reductase NrfA	Nitrospira sp. ENR4	103	100%	2.00E-24	76%	CUQ65653.1
		cytochrome C nitrite reductase	Desulfatitalea sp. BRH_c12	116	100%	7.00E-29	85%	KJ530416.1
		cytochrome C	Geobacter daltonii	69.3	98%	5.00E-16	61%	WP_012648182.1
		cytochrome c nitrite reductase catalytic subunit NrfA	Myxococcus stipitatus	60.8	97%	3.00E-13	71%	WP_015351334.1
		nitrite reductase	Myxococcus fulvus	102	100%	5.00E-28	82%	WP_046716096.1
		nitrite reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	150	100%	7.00E-45	81%	WP_011421954.1
		nitrite reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	149	98%	5.00E-44	81%	WP_011421954.1
		Nitrite reductase (cytochrome; ammonia-forming)	Chthoniobacter flavus Ellin428	124	95%	1.00E-35	80%	EDY20839.1
		cytochrome c-552	Anaeromyxobacter sp. PSR-1	108	98%	1.00E-29	71%	GAO01678.1
		nitrite reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	132	95%	2.00E-38	78%	WP_011421954.1
		nitrite reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	132	95%	2.00E-38	78%	WP_011421954.1
		cytochrome C	Desulfurimonas sp. TF	88.2	96%	1.00E-22	72%	WP_035055218.1
		cytochrome C	Desulfurimonas sp. TF	113	100%	2.00E-31	70%	WP_035055218.1
		nitrite reductase	Vulgatibacter incomptus	84.3	97%	2.00E-21	75%	WP_050726295.1
		nitrite reductase	Vulgatibacter incomptus	84.3	97%	2.00E-21	75%	WP_050726295.1
		nitrite reductase	Anaeromyxobacter sp. K	91.3	100%	9.00E-24	77%	WP_012525022.1
		nitrite reductase	Leptonema illini	92.8	98%	3.00E-24	64%	WP_002772611.1
		Cytochrome c552 precursor	Archangium gephyra	82.8	100%	1.00E-20	67%	AKI98892.1
		nitrite reductase	Anaeromyxobacter sp. K	91.3	100%	9.00E-24	77%	WP_012525022.1
		nitrite reductase	Opitutus terrae	73.2	100%	1.00E-17	72%	WP_012377393.1
	2	cytochrome C nitrite reductase	Geobacter metallireducens	84.7	79%	4.00E-21	69%	WP_004514005.1
		cytochrome c-552	Anaerolinea thermophila	79.3	100%	1.00E-19	58%	WP_013561276.1
		nitrite reductase	Anaeromyxobacter sp. K	91.3	100%	9.00E-24	77%	WP_012525022.1
		nitrite reductase	Anaeromyxobacter sp. K	91.3	100%	9.00E-24	77%	WP_012525022.1
		cytochrome C nitrite reductase	Geobacter pickeringii	85.1	94%	1.00E-21	73%	WP_039740049.1
		nitrite reductase	Opitutus terrae	73.2	100%	1.00E-17	72%	WP_012377393.1
		cytochrome C	Geobacter daltonii	97.1	97%	5.00E-26	96%	WP_012648182.1
		nitrite reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	70.5	100%	2.00E-16	71%	WP_011985270.1
		nitrite reductase	Coraliomargarita akajimensis	108	98%	1.00E-29	60%	WP_013044643.1
		nitrite reductase	Mobilicoccus pelagius	86.7	74%	8.00E-22	67%	WP_009482497.1
		nitrite reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	135	98%	8.00E-40	92%	WP_011421954.1
		cytochrome c-552	Caldilinea aerophila DSM 14535	80.1	100%	1.00E-19	63%	BAM00537.1
		nitrite reductase	Archangium gephyra	84.7	100%	2.00E-21	64%	WP_047854135.1
		nitrite reductase	Mobilicoccus pelagius	86.7	74%	8.00E-22	67%	WP_009482497.1
		cytochrome C nitrite reductase	Desulfovibrio africanus	105	100%	6.00E-29	76%	WP_014259205.1
		cytochrome C	Geobacter pickeringii	92.8	100%	5.00E-24	61%	WP_039739996.1
		Pentaheme cytochrome c nitrite reductase NrfA	Nitrospira sp. ENR4	62.4	67%	2.00E-13	58%	CUQ65653.1
		nitrite reductase	Pelobacter carbinolicus	105	100%	3.00E-29	72%	WP_011342651.1
		nitrite reductase	Pelobacter carbinolicus	105	100%	3.00E-29	72%	WP_011342651.1
		nitrite reductase	Coraliomargarita akajimensis	98.2	100%	2.00E-26	79%	WP_013044643.1
	3	nitrite reductase	Geothrix fermentans	140	100%	1.00E-41	82%	WP_052571042.1
		cytochrome C nitrite reductase	Deinococcus sp. 2009	101	94%	1.00E-27	76%	WP_022800307.1
		nitrite reductase	Geothrix fermentans	94.7	100%	3.00E-25	78%	WP_052571042.1
		cytochrome c-552	Candidatus Methanoperedens nitroreducens	88.6	100%	4.00E-23	65%	WP_048093932.1
		cytochrome C	Geobacter pickeringii	92.8	100%	5.00E-24	61%	WP_039739996.1
		nitrite reductase	Deltaproteobacteria bacterium CSP1-8	97.4	97%	1.00E-25	60%	KRT174970.1
		cytochrome c-552	Caldilinea aerophila	126	98%	2.00E-36	74%	WP_052317657.1
		nitrite reductase (cytochrome; ammonia-forming)	Rhodopirellula europaea	97.4	88%	8.00E-26	67%	WP_008664037.1
		nitrite reductase	Cystobacter violaceus	154	98%	2.00E-46	87%	WP_043401184.1
		Pentaheme cytochrome c nitrite reductase NrfA	Nitrospira sp. ENR4	73.9	77%	9.00E-18	86%	CUQ65653.1
		nitrite reductase	Cystobacter violaceus	154	98%	2.00E-46	87%	WP_043401184.1
		nitrite reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	81.6	100%	2.00E-20	79%	WP_011421954.1
		nitrite reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	74.7	100%	4.00E-18	89%	WP_011421954.1
		cytochrome C	Geobacter sp. M21	95.5	100%	2.00E-25	81%	WP_015836589.1
		cytochrome c-552	Caldilinea aerophila DSM 14535	108	98%	3.00E-30	76%	BAM00537.1
		nitrite reductase, formate-dependent, cytochrome	Candidatus Brocadia fulgida	92	82%	4.00E-24	65%	KKO19962.1
		nitrite reductase, formate-dependent, cytochrome	Candidatus Brocadia fulgida	92	82%	4.00E-24	65%	KKO19962.1
		nitrite reductase	Vulgatibacter incomptus	145	100%	4.00E-43	78%	WP_050726295.1
		cytochrome C nitrite reductase	Geobacter sp. M21	63.2	97%	4.00E-14	67%	WP_015837441.1
		cytochrome c-552	Caldilinea aerophila DSM 14535	81.6	100%	3.00E-20	67%	BAM00537.1
OctX	2	Pentaheme cytochrome c nitrite reductase NrfA	Nitrospira sp. ENR4	73.9	77%	9.00E-18	86%	CUQ65653.1
		nitrite reductase, formate-dependent, cytochrome	Candidatus Brocadia fulgida	92	82%	4.00E-24	65%	KKO19962.1
		nitrite reductase, formate-dependent, cytochrome	Candidatus Brocadia fulgida	92	82%	4.00E-24	65%	KKO19962.1
		cytochrome C nitrite reductase	Geobacter pickeringii	105	100%	3.00E-29	91%	WP_039740049.1
		cytochrome C nitrite reductase	Geobacter metallireducens	63.5	100%	3.00E-14	83%	WP_004514005.1
		cytochrome C nitrite reductase	Geobacter sp. M21	63.2	97%	4.00E-14	67%	WP_015837441.1
		cytochrome C nitrite reductase	Geobacter pickeringii	90.9	96%	1.00E-23	72%	WP_039740043.1
		Cytochrome c-552	Candidatus Methanoperedens sp. BLZ1	132	100%	8.00E-39	88%	KPQ44254.1
		nitrite reductase	Opitutus terrae	74.7	100%	3.00E-18	85%	WP_012377393.1
		nitrite reductase	Vulgatibacter incomptus	145	100%	4.00E-43	78%	WP_050726295.1
	3	nitrite reductase	Opitutus terrae	74.7	100%	3.00E-18	85%	WP_012377393.1
		cytochrome C	Geobacter sp. M21	95.5	100%	2.00E-25	81%	WP_015836589.1
		Nitrite reductase (cytochrome; ammonia-forming)	Chthoniobacter flavus Ellin428	121	100%	1.00E-30	81%	EDY20839.1
		nitrite reductase	Pelobacter carbinolicus	100	98%	7.00E-23	66%	WP_011342651.1
		nitrite reductase	Desulfovibrio gigas	70.9	49%	5.00E-12	69%	WP_021760178.1
		cytochrome C nitrite reductase	Geobacter metallireducens	119	100%	6.00E-30	79%	WP_004514005.1
		cytochrome C nitrite reductase subunit c552	Ignavibacterium album	116	100%	6.00E-29	86%	WP_014559729.1
		MULTISPECIES: nitrite reductase	Meiothermus	61.6	69%	3.00E-09	69%	WP_013158408.1
		nitrite reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	94	92%	2.00E-20	78%	WP_011421954.1
		nitrite reductase	Anaeromyxobacter sp. K	94.4	100%	7.00E-21	89%	WP_012526984.1
OctZ	1	nitrite reductase	Sorangium cellulosum So0157-2	135	100%	2.00E-35	87%	AGP34724.1
		nitrite reductase	Anaeromyxobacter sp. Fw109-5	103	100%	5.00E-24	69%	WP_011985270.1
		cytochrome c-552	Caldilinea aerophila DSM 14535	107	95%	2.00E-25	70%	BAM00537.1
		cytochrome C nitrite reductase	Geobacter lovleyi	71.6	88%	2.00E-12	51%	WP_012469115.1
		Nitrite reductase (cytochrome; ammonia-forming)	Desulfotomaculum kuznetsovii DSM 6115	113	100%	1.00E-27	62%	AEG16276.1
	3	Pentaheme cytochrome c nitrite reductase NrfA	Nitrospira sp. ENR4	85.5	100%	6.00E-18	82%	CUQ65653.1
		nitrite reductase	Vulgatibacter incomptus	125	100%	3.00E-32	80%	WP_050726295.1
		Cytochrome c552 precursor	Archangium gephyra	104	98%	1.00E-24	76%	AKI98892.1
		nitrite reductase	Vulgatibacter incomptus	138	97%	1.00E-36	75%	WP_050726295.1
		nitrite reductase	Geothrix fermentans	143	97%	3.00E-38	72%	WP_052571042.1
		nitrite reductase	Verrucomicrobiae bacterium DG1235	107	100%	2.00E-25	74%	WP_008100996.1
		nitrite reductase	Chthoniobacter flavus	96.3	98%	1.00E-21	69%	WP_042724568.1
		MULTISPECIES: nitrite reductase	Meiothermus	111	100%	5.00E-27	68%	WP_013158408.1
		cytochrome C	Geobacter sp. M18	120	100%	2.00E-30	87%	WP_015721120.1
		cytochrome C nitrite reductase	Syntrophobacter fumaroxidans	130	93%	2.00E-33	78%	WP_011699247.1
OctZ	1	nitrite reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	114	100%	5.00E-28	77%	WP_012634152.1
		nitrite reductase	Anaeromyxobacter sp. K	70.9	100%	3.00E-12	66%	WP_012526984.1
	2	nitrite reductase	Anaeromyxobacter dehalogenans	88.6	73%	2.00E-18	79%	WP_011421954.1
		cytochrome c-552	Caldilinea aerophila DSM 14535	80.9	97%	2.00E-16	74%	BAM00537.1
OctZ	1	cytochrome C	Geobacter pickeringii	108	98%	1.00E-25	75%	WP_039739996.1
		nitrite reductase	Myxococcus fulvus	59.3	98%	2.00E-08	71%	WP_046716096.1
	2	nitrite reductase	Myxococcus fulvus	102	96%	2.00E-23	57%	WP_046716096.1
		cytochrome C nitrite reductase	Desulfovibrio sp. U5L	146	100%	2.00E-39	82%	WP_009107352.1

**Table 3.9. Taxonomic assignments of *nif* transcripts.**

Sample	Replicate	NCBI-nr annotation	Organism	Bit score	Identity	E-value	Similarity	Accession No.
JunX	1	nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	<i>Geobacter lovleyi</i>	136	100%	5.00E-36	98%	WP_012468731.1
	2	nitrogen fixation protein D	cyanobacterium endosymbiont of <i>Rhopalodia gibba</i>	108	100%	2.00E-26	100%	AAW57050.1
JunZ	1	nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	<i>Desulfobacca acetoxidans</i> DSM 11109	111	100%	5.00E-27	93%	AEB08244.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Neosynechococcus sphagnicola</i>	79	98%	3.00E-15	59%	WP_036530761.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Calothrix</i> sp. 336/3	93.2	98%	3.00E-20	70%	WP_035157993.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	124	100%	8.00E-32	100%	WP_045667595.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	98.6	89%	4.00E-22	80%	WP_011697881.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	98.6	89%	4.00E-22	80%	WP_011697881.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	98.6	89%	4.00E-22	80%	WP_011697881.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	92	93%	7.00E-20	72%	WP_011697881.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	92	93%	7.00E-20	72%	WP_011697881.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	92	93%	7.00E-20	72%	WP_011697881.1
	2	nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Geobacter daltonii</i>	127	100%	6.00E-33	86%	WP_012647657.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Anaeromyxobacter</i> sp. Fw109-5	92.8	100%	1.00E-20	93%	WP_012097839.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Geobacter daltonii</i>	127	100%	6.00E-33	86%	WP_012647657.1
		Nitrogenase (molybdenum-iron) beta chain	<i>Arcticibacter svalbardensis</i> MN12-7	162	100%	9.00E-46	86%	EOR94278.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha	<i>Thioplaca ingrica</i>	112	78%	2.00E-27	96%	WP_045474800.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha	<i>Thioplaca ingrica</i>	112	78%	2.00E-27	96%	WP_045474800.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha	<i>Desulfobacca acetoxidans</i>	159	100%	5.00E-44	90%	WP_041284093.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Draconibacterium</i> sp. JN14CK-3	114	100%	5.00E-28	74%	WP_045033455.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Draconibacterium</i> sp. JN14CK-3	114	100%	5.00E-28	74%	WP_045033455.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	<i>Geobacter lovleyi</i>	182	100%	1.00E-52	98%	WP_012468731.1
	3	nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Desulfovibrio piezophilus</i>	82.4	90%	8.00E-17	95%	WP_015416176.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	<i>Anaeromyxobacter</i> sp. Fw109-5	127	100%	1.00E-32	82%	ABS27226.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha	<i>Geobacter</i> sp. OR-1	161	100%	4.00E-45	97%	WP_041972735.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha	<i>bacterium</i> UASB14	152	100%	2.00E-41	91%	WP_045510160.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha NifD	<i>Candidatus Magnetovum chiemensis</i>	99	100%	1.00E-22	83%	KJR40987.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha NifD	<i>Candidatus Magnetovum chiemensis</i>	99	100%	1.00E-22	83%	KJR40987.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain	<i>Pleurocapsa</i> sp. PCC 7327	126	100%	1.00E-32	87%	AFY79128.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	113	98%	2.00E-27	80%	WP_049770523.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	80.5	95%	5.00E-16	70%	WP_045667595.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Geobacter lovleyi</i>	122	88%	5.00E-31	81%	WP_012468730.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Geobacter lovleyi</i>	130	88%	1.00E-33	84%	WP_012468730.1
OctX	1	nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha	<i>Desulfobulbus elongatus</i>	129	100%	3.00E-33	88%	WP_028319057.1
		nitrogenase iron-iron protein beta chain	<i>Methanosarcina siciliae</i>	95.5	67%	4.00E-21	82%	WP_048173470.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha	<i>Anaeromyxobacter</i> sp. Fw109-5	125	100%	2.00E-32	92%	WP_049768734.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein, alpha chain	<i>Geobacter bemidjiensis</i> Bem	156	100%	3.00E-43	92%	ACH39088.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Beggiatoa alba</i>	122	100%	5.00E-31	96%	WP_040294916.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha	<i>Geobacter</i> sp. OR-1	106	98%	2.00E-25	90%	WP_041972735.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	<i>Geobacter uranireducens</i>	72.4	100%	2.00E-13	94%	WP_011938102.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha	<i>Geobacter bremensis</i>	115	91%	7.00E-29	94%	WP_026840236.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Cyanoshece</i> sp. CCY0110	113	100%	1.00E-27	82%	WP_008274045.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha	<i>Desulfobacca acetoxidans</i>	119	100%	6.00E-30	86%	WP_041284093.1
	2	nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Geobacter bemidjiensis</i>	97.1	100%	1.00E-21	77%	WP_012530510.1
		nitrogenase	<i>Rhopalodia gibba</i>	112	100%	1.00E-28	98%	CAE46754.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	<i>Desulfobacca acetoxidans</i> DSM 11109	95.5	100%	2.00E-21	92%	AEB08244.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	<i>Geobacter daltonii</i>	87.4	100%	1.00E-18	84%	WP_012647655.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Geobacter</i> sp. OR-1	146	100%	2.00E-39	87%	WP_041972734.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	<i>Anaeromyxobacter</i> sp. Fw109-5	86.7	97%	3.00E-18	81%	ABS27226.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha	<i>Anaeromyxobacter</i> sp. Fw109-5	144	100%	1.00E-38	98%	WP_049768734.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Geobacter uranireducens</i>	134	100%	3.00E-35	95%	WP_011938103.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Geobacter lovleyi</i>	92	100%	4.00E-20	88%	WP_012468730.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Zymomonas mobilis</i>	97.1	100%	6.00E-22	82%	WP_015740206.1
	3	nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha NifD	<i>Candidatus Magnetovum chiemensis</i>	100	100%	2.00E-23	94%	KJR40987.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	129	100%	2.00E-33	88%	WP_010943446.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Leptolyngbya</i> sp. JSC-1	124	100%	7.00E-32	86%	WP_036009874.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Kamptomena</i>	101	100%	4.00E-23	62%	WP_007356928.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit alpha	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	116	100%	6.00E-29	89%	WP_010943446.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	<i>Anaeromyxobacter</i> sp. PSR-1	98.6	100%	2.00E-22	88%	GAO02070.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain	<i>Ferriphaselus ammicola</i>	122	100%	4.00E-31	100%	GAO33782.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Geobacter uranireducens</i>	105	100%	7.00E-25	80%	WP_011938103.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Desulfobacca acetoxidans</i>	98.6	98%	1.00E-22	88%	WP_013705358.1
		nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Geobacter lovleyi</i>	98.2	100%	2.00E-22	94%	WP_012468730.1
OctZ	2	nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Geobacter uranireducens</i>	105	100%	7.00E-25	80%	WP_011938103.1
	3	nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	<i>Desulfobacca acetoxidans</i>	98.6	98%	1.00E-22	88%	WP_013705358.1

**Table 3.10.**  
**No. of bacterial phylum and proteobacterial class relevant to reductive nitrogen transformations.**

	metagenome				metatranscriptome			
	JunX	JunZ	Oct_X	Oct_Z	JunX	JunZ	Oct_X	Oct_Z
<i>nar</i>	22	20	21	19	7	17	20	13
<i>nir</i>	15	8	16	16	2	10	7	7
<i>nor</i>	14	14	13	13	3	8	12	3
<i>nos</i>	13	13	12	13	2	8	7	7
<i>nrf</i>	15	16	14	15	3	10	7	2
<i>nif</i>	12	15	11	12	2	6	6	1

**Table 3.11. Bacterial genera trascribing more than two genes involved in denitrification.**

	JunZ1				JunZ2				JunZ3				OctX1				OctX3				OctZ1				OctZ2				OctZ3			
Organisms	<i>nar</i>	<i>nir</i>	<i>nor</i>	<i>nos</i>	<i>nar</i>	<i>nir</i>	<i>nor</i>	<i>nos</i>	<i>nar</i>	<i>nir</i>	<i>nor</i>	<i>nos</i>	<i>nar</i>	<i>nir</i>	<i>nor</i>	<i>nos</i>	<i>nar</i>	<i>nir</i>	<i>nor</i>	<i>nos</i>	<i>nar</i>	<i>nir</i>	<i>nor</i>	<i>nos</i>	<i>nar</i>	<i>nir</i>	<i>nor</i>	<i>nos</i>	<i>nar</i>	<i>nir</i>	<i>nor</i>	<i>nos</i>
<i>Acidobacterium</i>									+		+																					
<i>Anaeromyxobacter</i>	+			+	+		+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+		+	
<i>Bacillus</i>																					+	+										
<i>Bradyrhizobium</i>									+		+																					
<i>Burkholderia</i>									+	+	+						+	+														
<i>Candidatus</i>																																
<i>Accumulibacter</i>																	+			+												
<i>Geobacter</i>					+		+		+		+						+		+													
<i>Geothrix</i>	+		+						+		+																					
<i>Optitus terrae</i>																			+		+											
<i>Propionibacterium</i>	+	+																														
<i>Desulfovibrio</i>					+		+																									

**Table 3.S1. Taxonomic assignments of *nxr* transcripts.**

Sample	Replicate	NCBI-nr annotation	Organism	Bit score	Identity	E-value	Similarity	Accession No.
OctX	1	Nitrate oxidoreductase, beta subunit	Nitrospira sp. ENR4	122	95%	3.00E-31	95%	CUQ65853.1
		nitrate oxidoreductase subunit beta	Nitrospira moscoviensis	154	100%	8.00E-43	100%	WP_053381688.1
OctZ	2	Nitrate oxidoreductase, beta subunit	Nitrospira sp. ENR4	186	100%	7.00E-55	100%	CUQ65853.1

**Table 3.S2. Relative abundance of rRNA of Nitrospirae in metatranscriptome in the paddy soils from two depth in two different periods.**

(%)	JunX	JunZ	OctX	OctZ
<i>Nitrospirae</i>	0.33±0.05	0.66±0.09	0.46±0.15	1.17±0.09

**Table 3.S3. Taxonomic assignments of *pmo* transcripts.**

Sample	Replicate	NCBI-nr annotation	Organism	Bit score	Identity	E-value	Similarity	Accession No.
OctX	1	Methane monooxygenase	Sulfobacillus acidophilus TPY	149	84%	5.10E-40	91%	AEJ41334.1
		methane monooxygenase	Bradyrhizobium icense	152	100%	4.10E-41	100%	WP_065728928.1
	2	Methane monooxygenase	Sulfobacillus acidophilus TPY	152	84%	3.10E-41	93%	AEJ41334.1
		methane monooxygenase/ammonia monooxygenase subunit B	Methylocystis sp. ATCC 49242	112	100%	3.10E-27	100%	WP_036287217.1
		methane monooxygenase	Aminobacter aminovorans	145	100%	1.10E-38	100%	WP_067969131.1
	3	methane monooxygenase	Methylocystis parvus	122	98%	1.10E-32	100%	WP_016919336.1
		methane monooxygenase	Actinomyces sp. chiangmaiensis	120	98%	1.10E-29	98%	WP_026204220.1
		methane monooxygenase	Methylocystis sp. ATCC 49242	115	98%	1.10E-29	100%	WP_036281095.1
		methane monooxygenase	Methylococcaceae bacterium 73a	146	88%	9.10E-40	96%	WP_045226819.1
		methane monooxygenase/ammonia monooxygenase subunit C, partial	Methylogaea oryzae	95.5	98%	1.10E-22	100%	WP_054775121.1
OctZ	1	methane monooxygenase	Methylococcaceae bacterium 73a	102	86%	1.10E-23	91%	WP_045226819.1
		methane monooxygenase	Methylocystis rosea	112	88%	2.10E-28	97%	WP_051080338.1
		methane monooxygenase	Methylocystis sp. ATCC 49242	122	98%	2.10E-32	100%	WP_036281095.1
		methane monooxygenase	Methylocystis parvus	123	98%	6.10E-33	98%	WP_016919336.1
		Chain A, Crystal Structure Of Particulate Methane Monooxygenase (Pmmo)	Methylocystis Sp. Strain M	124	97%	3.10E-31	97%	3RFR_A
		methane monooxygenase	Methylocystis sp. ATCC 49242	132	100%	4.10E-36	100%	WP_036281095.1
		methane monooxygenase	Methylocystis parvus	139	99%	5.10E-39	100%	WP_016919336.1
		methane monooxygenase	Burkholderia sp. H160	141	93%	4.10E-37	97%	WP_008919789.1
		methane monooxygenase	Methylocystis sp. ATCC 49242	142	99%	5.10E-40	100%	WP_036281095.1
		MULTISPECIES: methane monooxygenase	Methylosinus	145	91%	5.10E-41	97%	WP_040566296.1
		methane monooxygenase/ammonia monooxygenase subunit B	Methylocystis sp. ATCC 49242	153	98%	4.10E-42	100%	WP_036287217.1
		methane monooxygenase	Saccharomonospora halophila	154	100%	6.10E-42	100%	WP_039739854.1
		methane monooxygenase, partial	Methylococcaceae bacterium 73a	154	97%	3.10E-45	100%	WP_045227076.1
		methane monooxygenase/ammonia monooxygenase subunit B, partial	Rathayibacter sp. Leaf294	79	94%	2.10E-14	100%	WP_056046020.1
	2	methane monooxygenase	Methylocystis sp. ATCC 49242	80.1	95%	6.10E-16	100%	WP_036279795.1
		methane monooxygenase	Methylocystis parvus	101	98%	3.10E-24	98%	WP_016919336.1
		methane monooxygenase	Methylococcaceae bacterium 73a	120	84%	8.10E-30	90%	WP_045226819.1
		methane monooxygenase	Methylocystis sp. ATCC 49242	121	100%	5.10E-32	100%	WP_036281095.1
		Chain K, Crystal Structure Of Particulate Methane Monooxygenase From Methylocystis Sp. Atcc 49242	Methylocystis Sp. Atcc 4924	122	100%	3.10E-32	100%	4PHZ_K
		Chain C, Crystal Structure Of Particulate Methane Monooxygenase (Pmmo) From Methylocystis Sp. Strain M	Methylocystis Sp. Strain M	124	98%	4.10E-33	98%	3RFR_C
		Chain K, Crystal Structure Of Particulate Methane Monooxygenase From Methylocystis Sp. Atcc 49242	Methylocystis Sp. Atcc 4924	124	98%	4.10E-33	100%	4PHZ_K
		methane monooxygenase	Methylocystis parvus	125	98%	1.10E-33	100%	WP_016919336.1
		Chain C, Crystal Structure Of Particulate Methane Monooxygenase (Pmmo) From Methylocystis Sp. Strain M	Methylocystis Sp. Strain M	139	99%	9.10E-39	99%	3RFR_C
		Chain K, Crystal Structure Of Particulate Methane Monooxygenase From Methylocystis Sp. Atcc 49242	Methylocystis Sp. Atcc 4924	139	100%	9.10E-39	100%	4PHZ_K
		methane monooxygenase	Methylococcaceae bacterium 73a	139	93%	3.10E-37	99%	WP_045226819.1
		methane monooxygenase/ammonia monooxygenase subunit C, partial	Frigoribacterium sp. Leaf44	140	99%	7.10E-40	100%	WP_056230117.1
		methane monooxygenase/ammonia monooxygenase subunit B, partial	Methylococcus capsulatus	141	96%	4.10E-38	97%	WP_026597566.1
		methane monooxygenase	Methylocaldum szegediense	144	90%	2.10E-40	99%	WP_026610999.1
		methane monooxygenase	Methylocystis sp. ATCC 49242	73.2	97%	9.10E-14	100%	WP_036281095.1
3	1	Chain A, Crystal Structure Of Particulate Methane Monooxygenase (Pmmo) From Methylocystis Sp. Strain M	Methylocystis Sp. Strain M	81.3	97%	7.10E-16	100%	3RFR_A
		methane monooxygenase	Methylocystis sp. ATCC 49242	89	100%	1.10E-19	100%	WP_036281095.1
		methane monooxygenase	Methylosinus sp. PW1	93.2	82%	3.10E-21	92%	WP_036294787.1
		methane monooxygenase	Methylocystis parvus	94.4	100%	8.10E-22	100%	WP_016922174.1
		methane monooxygenase	Methylococcaceae bacterium 73a	100	89%	2.10E-22	95%	WP_045226819.1
		methane monooxygenase	Methylococcaceae bacterium 73a	104	98%	2.10E-24	100%	WP_045226819.1
		methane monooxygenase	Methylocystis parvus	107	98%	1.10E-26	98%	WP_016922174.1
		methane monooxygenase	Methylocystis sp. ATCC 49242	112	100%	2.10E-28	100%	WP_036281095.1
		particulate methane monooxygenase subunit PmoC3	Methylococcus capsulatus str. Bath	115	91%	2.10E-29	95%	AAD43965.2
		MULTISPECIES: methane monooxygenase	Methylococcaceae bacterium 73a	117	100%	5.10E-29	100%	WP_005374465.1
	2	methane monooxygenase	Methylococcaceae bacterium 73a	122	93%	6.10E-31	95%	WP_045226819.1
		Chain C, Crystal Structure Of Particulate Methane Monooxygenase (Pmmo) From Methylocystis Sp. Strain M	Methylocystis Sp. Strain M	124	98%	4.10E-33	98%	3RFR_C
		methane monooxygenase	Methylocystis parvus	125	98%	2.10E-33	100%	WP_016919336.1
		methane monooxygenase	Methylocystis sp. ATCC 49242	125	98%	1.10E-33	100%	WP_036281095.1
		methane monooxygenase/ammonia monooxygenase subunit B	Methylovulum miyakonense	127	92%	1.10E-32	97%	WP_019865089.1
	3	methane monooxygenase	Methylococcaceae bacterium 73a	128	98%	4.10E-33	100%	WP_045226819.1
		methane monooxygenase	Methylocystis sp. ATCC 49242	133	98%	1.10E-36	100%	WP_036281095.1
	particulate methane monooxygenase subunit C		Methylocystis sp. JTC3	139	99%	9.10E-39	99%	AH195954.1

## 第 4 章

# 全国の水田土壌、畑・雑草地・森林土壌、底泥の メタゲノム解析

### 4.1 緒言

第 3 章までの解析から、新潟水田土壌において *Deltaproteobacteria* 綱細菌、中でも *Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌が優占しており、それらが還元的窒素変換反応を主導している可能性が示された。しかしながら、本知見は一つの水田土壌の解析から得られたものであり、他の水田土壌や他の土壌においても普遍性を持つかどうかは不明である。

そこで本章では、日本全国から採取された水田ならびに畑、雑草地、森林、底泥土壌を選出し、新潟水田において明らかになった第 3 章までの知見の普遍性を確認することとした。具体的には、まず、上記の土壌を対象として定量 PCR により *Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌の優占度を調べた。次に、メタゲノム解析を行い、還元的窒素変換反応に関わる機能遺伝子群の由来微生物を調べた。これらから、水田土壌において一般的に *Deltaproteobacteria* 綱細菌が還元的窒素変換反応を主導しているのか、その他の土壌においても同様のことが言えるのかを検証した。

## 4.2 実験手法

### 4.2.1 土壌サンプリング

水田土壌は、北海道大学構内の水田（北海道札幌市）、新潟県農業総合研究所内の連作水田（新潟県長岡市）、農業環境技術研究所のつくば FACE 水田（茨城県つくばみらい市）、名古屋大学構内の実習水田（愛知県名古屋市）より、深さ 0 - 10 cm の土壌を採取した。畑土壌、雑草地の土壌、森林土壌は、農業環境技術研究所（茨城県つくば市）のダイズ畑、東京大学構内（東京都文京区）および北海道内（北海道札幌市）雑草地、北海道札幌市藻岩山麓において、表層 1 cm の土壌を採取した。底泥は、山口県周南市、福岡県遠賀郡、熊本県玉名市の小川、大分県玖珠郡の溜池において、たも網で底泥層をすくい取り、表層 1 cm 土壌を採取した。各土壌サンプルの採取日、採取場所、採取者の詳細については **Table 4.1.**にまとめた。採取したサンプルは-30 °C で凍結保存し、適宜 DNA 抽出に用いた。

### 4.2.2 土壌 DNA の抽出

-30 °C で凍結保存した土壌試料 0.5g から、ISOIL for Beads Beating(Nippon Gene, Toyama, Japan)に 0.02 g skim milk を添加して各 3 連で DNA を抽出した (Takada-Hoshino *et al.*, 2004)。抽出した DNA は Nano Drop ND-1000(NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)を用いて品質を確認した。その後、dsDNA HS Assay Kit を用いて DNA 試料を調製し、Qubit 2.0 Fluorometer(Invitrogen, Carlsbad, Ca,USA)に供して定量した。

### 4.2.3 定量 PCR

4.2.2 において得られた DNA 各 3 連を鋳型として、SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)と Step One System (Applied Biosystems)を用いて、細菌の 16S rDNA 遺伝子を定量 PCR した。PCR 反応液は 20 µl 系で調製した。組成は、DNA ・



cDNA 溶液 1  $\mu$ l, SYBR Green PCR Master Mix 10  $\mu$ l, 10  $\mu$ M のプライマー（全細菌：338F, 518R(Klammer, *et al.*, 2008), *Geobacter* 属細菌: 494F, Geo825R(Holmes *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 1998), *Anaeromyxobacter* 属細菌: Ade399F, Ade466R(Thomas *et al.*, 2009)) 各 0.4  $\mu$ l, 5 mg/ml BSA 2.0 $\mu$ l, ROX reference dye(50 $\times$ ) 0.4  $\mu$ l, 滅菌水 5.8  $\mu$ l とした。PCR の条件は、95°C for 30 s に続いて、95°C for 5 s, 55°C for 30 s（細菌）もしくは 50°C for 20 s (*Geobacter* 属・*Anaeromyxobacter* 属細菌), 72°C for 30 s のステップを 40 回繰り返した。検量線は、pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA) に *Pseudomonas stutzeri* JCM 5965, *Geobacter sulfurreducens* JCM 18752, *Anaeromyxobacter dehalogenas* 2CP-C ATCC BAA-259 の 16S rRNA 遺伝子を挿入したプラスミド溶液の希釈シリーズを用いて作成した。

#### 4.2.4 シーケンシングライブラリ調製

定量した DNA は、Covaris M220(Covaris Inc., Woburn, MA, USA)を用いて~300bp のフラグメントになる様に切断した。断片化した DNA から、NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina®(New England Biolabs)を用いてシーケンシングライブラリを調製した。調製法は、付属のプロトコルに従った。

#### 4.2.5 シーケンシング

調製したライブラリは、MiSeq Reagent kit v2 (Illumina, San Diego, CA, USA) のプロトコルに従い、Illumina Miseq sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA)に供した。すべてのランにおいてレプリケートを 3 とし、Paired end シーケンシングを行った。

#### 4.2.6 インフォマティクス解析

得られた Paired end の塩基配列 (fastq ファイル) から、30bp 以上の重複・10%未満のミスマッチを含む配列同士を結合し、シングルリード配列とした。得られた fastq ファイ

ルから PRINSEQ(Schmieder *et al.*, 2011)を用いて Q-score 30 以上の配列を選出し、fasta 形式に変換した。rDNA 配列は MG-RAST 上で M5RNA データベースを用いて BLAT 検索を行った (e-value < 10<sup>-5</sup>, alignment length > 30bp)。non-rDNA 配列は MG-RAST 上で M5NR データベースを用いて BLAT 検索 (e-value < 10<sup>-5</sup>, alignment length > 30aa)を行い、機能遺伝子としてアノテーションされた配列は BLASTX 検索 (e-value < 10<sup>-5</sup>, alignment length > 30aa)を行った。

### 4.3 結果と考察

#### 4.3.1 細菌群集構造

##### 4.3.1.1 細菌の 16S rDNA の定量と *Anaeromyxobacter*, *Geobacter* 属細菌の分布

各土壌の細菌 16S rDNA の定量 PCR の結果を **Table 4.1**, **Figure 4.1**. に示した。土壌 1 g あたりの 16S rDNA 遺伝子のコピー数は水田土壌、畑・雑草地・森林土壌、底泥の順に高かった ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。

*Geobacter* 属細菌の 16S rDNA コピー数の全細菌 16S rDNA コピー数に対する割合は、水田土壌と底泥において畑・雑草地・森林土壌より有意に高く ( $P < 0.01$ )、水田土壌と底泥との間に有意差はなかった(**Figure 4.2A**.)。 *Anaeromyxobacter* 属細菌の 16S rDNA コピー数の全細菌 16S rDNA コピー数に対する割合は、水田土壌において畑・雑草地・森林土壌や底泥より有意に高かった ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。また、底泥土壌は畑・雑草地・森林土壌より有意に高かった ( $P < 0.05$ ) (**Figure 4.2B**.)。

これらの結果から、水田土壌において細菌は他の土壌より高密度で存在していることが示された。また、新潟以外の水田土壌や、嫌気的な環境である底泥においても *Anaeromyxobacter*, *Geobacter* 属細菌が優占していることが明らかとなった。一方で、水田土壌や底泥と比較して好気的な環境であると考えられる畑・雑草地・森林土壌においては、*Anaeromyxobacter*, *Geobacter* 属細菌の割合が低かった。 *Anaeromyxobacter*, *Geobacter*

属細菌は嫌気環境を好む細菌であるため(Sanford *et al.*, 2002; Prakash *et al.*, 2010)、本結果は妥当であると考えられる。

#### 4.3.1.2 rDNA 配列情報に基づく細菌群集構造

メタゲノム解析によって得られた rDNA 配列に基づいて解析した細菌群集構造を、**Figure 4.3., 4.4.** に示した。*Deltaproteobacteria* 綱細菌の全細菌に対する相対割合は、水田土壌、底泥、畑・雑草地・森林土壌の順に高かった ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) (**Figure 4.3.**)。 *Deltaproteobacteria* 綱細菌の中では、水田土壌と底泥においては畑・雑草地・森林土壌と比較して *Anaeromyxobacter*, *Geobacter* 属細菌が優占していた。*Geobacter* 属細菌の相対割合は、水田土壌、底泥、畑・雑草地・森林土壌の順に高かった ( $P<0.05$ ,  $P<0.1$ )。 *Anaeromyxobacter* 属細菌の相対割合は、水田土壌と底泥において畑・雑草地・森林土壌より有意に高かった ( $P<0.01$ )。一方、水田土壌と底泥土壌においては有意差が見られなかった (**Figure 4.4.**)。

これらの結果から、水田土壌は他の環境と比べて *Deltaproteobacteria* 綱細菌の割合が高いことが明らかとなった。また、**4.3.1.1** における定量 PCR の結果と同様に、*Anaeromyxobacter*, *Geobacter* 属細菌は嫌氣的な環境（水田土壌、底泥）において、好氣的な環境（畑・雑草地・森林土壌）より優占していることが示唆された。

## 4.3.2 様々な環境の土壌において還元的窒素循環を駆動する微生物

### 4.3.2.1 脱窒関連遺伝子 (*nar*, *nir*, *nor*, *nos*)

#### 4.3.2.1.1 硝酸還元 (*narG/napA*)

硝酸還元に関わる鍵酵素遺伝子 (*narG/napA*) は、全ての土壌サンプルにおいて検出され、その頻度に有意差は見られなかった(Figure 4.5A.)。

DNA 配列情報に基づく硝酸還元微生物の群集組成解析においては、*Deltaproteobacteria* 綱細菌の割合が水田土壌において他の土壌より高いことが明らかとなった ( $P<0.05$ )。畑・雑草地・森林土壌において、硝酸還元微生物として最も優占していたのは *Actinobacteria* 門細菌であり、他の土壌よりその割合が有意に高かった ( $P<0.01$ )。また、*Alphaproteobacteria* 綱細菌の割合は畑・雑草地・森林土壌において、*Beta*-, *Gammaproteobacteria* 綱細菌の割合は底泥において他の土壌より高い傾向が見られた (Figure 4.5B.)。

*Deltaproteobacteria* 綱細菌の中では、嫌気環境である水田土壌と底泥においては *Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌、好気環境である畑・雑草地・森林土壌においては *Sorangium* 属細菌の割合が高かった。先述した通り、*Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属は嫌気性細菌 (Sanford *et al.*, 2002; Prakash *et al.*, 2010)、*Sorangium* 属細菌は好気性細菌 (Schneiker *et al.*, 2007)であるため、本結果は妥当であると考えられる(Figure 4.5C.)。

これらの結果から、硝酸還元微生物として水田土壌においては *Deltaproteobacteria* 綱の *Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌、畑・雑草地・森林土壌においては *Actinobacteria* 門細菌、底泥においては *Betaproteobacteria* 綱細菌が優占していることが明らかとなった。底泥においては、*Deltaproteobacteria* 綱細菌は *Alpha*-, *Gammaproteobacteria* 綱細菌と同程度の割合であった。これにより、*Deltaproteobacteria* 綱細菌は新潟以外の水田土壌においても主に硝酸還元を駆動しており、底泥においてもある程度硝酸還元に参加している可能性が示された。

#### 4.3.2.1.2 亜硝酸還元 (*nir*)

亜硝酸還元に関わる鍵酵素遺伝子(*nir*)は、全ての土壌サンプルにおいて検出された。検出頻度は底泥において最も高く( $P<0.01$ )、水田と畑・雑草地・森林土壌との間に有意差はなかった(Figure 4.6A.)。

DNA 配列情報に基づく亜硝酸還元微生物の群集組成解析では、*Alpha*-, *Beta*-, *Gammaproteobacteria* 綱細菌の割合が全てのサンプルにおいて高いことが明らかとなった。一方で、*Deltaproteobacteria* 綱細菌の割合は全てのサンプルにおいて低く、P2, P3, U5, R1, R3 のサンプルでは0%であった(Figure 4.6B.)。

また、第3章の結果と同様に、*Deltaproteobacteria* 綱細菌の中では *Bdellovibrio* 属細菌のみが検出された(Figure 4.6C.)。 *Deltaproteobacteria* 綱(*Bdellovibrio* 属) 細菌は、水田土壌や底泥より好氣的な畑・雑草地・森林土壌において多く検出された。これは、同属細菌が好気性細菌であるためだと考えられた (Núñez *et al.*, 2003)。

これらの結果から、全ての土壌において *Deltaproteobacteria* 綱細菌の由来の *nir* はほとんど検出されず、同綱細菌が新潟水田以外の土壌においても亜硝酸還元にはほとんど寄与していないことが明らかとなった。一方、これまで脱窒菌として多く報告されてきた *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma-proteobacteria* 綱細菌(Ishii *et al.*, 2011)由来の *nir* が多く検出され、主にこれらの細菌が様々な土壌において亜硝酸還元を駆動している可能性が示された。

#### 4.3.2.1.3 一酸化窒素還元 (*nor*)

一酸化窒素還元に関わる鍵酵素遺伝子 (*nor*) は、全ての土壌サンプルにおいて検出された。検出頻度は水田土壌、底泥土壌、畑・雑草地・森林土壌の順に高かった ( $P<0.01$ ,  $P<0.01$ ) (Figure 4.7A.)。

DNA 配列情報に基づく一酸化窒素還元微生物の群集組成解析では、水田土壌、底泥において *Deltaproteobacteria* 綱細菌が優占していることが明らかになった。また、これま

で脱窒菌として多く報告されてきた *Alpha-, Beta-, Gammaproteobacteria* 綱細菌由来の *nor* もある程度検出された(Figure 4.7B.)。

*Deltaproteobacteria* 綱細菌の中では、*Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属の割合が最も高かった。一方で、畑・雑草地・森林土壌においては *Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属だけでなく *Sorangium* 属細菌由来の *nor* も多く検出された(Figure 4.7C.)。一酸化窒素還元微生物の群集組成は、*Desulfovibrio* 属細菌が多少検出されたことを除くと硝酸還元微生物の群集組成 (4.3.2.1.1) と似通っていた。

これらの結果から、一酸化二窒素還元微生物として、嫌気的な水田土壌、底泥においては *Deltaproteobacteria* 綱の *Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌、好気的な畑・雑草地・森林土壌においては *Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-proteobacteria* 綱細菌が優占していることが明らかになった。これにより、新潟以外の水田土壌や底泥においても *Deltaproteobacteria* 綱細菌が主に一酸化二窒素還元を駆動しており、畑・雑草地・森林土壌においても同綱細菌が一酸化二窒素還元にある程度寄与している可能性が示唆された。

#### 4.3.2.1.4 一酸化二窒素還元 (*nos*)

一酸化二窒素還元に関わる鍵酵素遺伝子 (*nos*) は、全ての土壌サンプルにおいて検出された。検出頻度は、水田土壌、底泥、畑・雑草地・森林土壌の順に高かった( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) (Figure 4.8A.)。

DNA 配列情報に基づく一酸化二窒素還元微生物の群集組成では、水田土壌において特に *Deltaproteobacteria* 綱細菌の優占が見られ、底泥においては *Deltaproteobacteria* 綱・*Betaproteobacteria* 綱細菌が同程度優占していた。一方、畑・雑草地・森林土壌においては U3 のサンプル以外 *Deltaproteobacteria* 綱細菌の顕著な優占は見られず、優占している細菌種にばらつきがあった(Figure 4.8B.)。

*Deltaproteobacteria* 綱細菌の中では、*Anaeromyxobacter* 属細菌の割合が最も高かった。

また、全てのサンプルにおいて unclassified *Myxococcales* 科細菌として同定された配列が複数存在した(Figure 4.8C.)。

これらの結果から、一酸化二窒素還元微生物として、嫌気的な水田土壌、底泥においては *Deltaproteobacteria* 綱の *Anaeromyxobacter* 属細菌が優占していることが明らかになった。また、好気的な土壌においては各サンプルによってばらつきがあり、水田土壌や底泥では検出が少なかった *Alphaproteobacteria* 綱、*Verrucomicrobia* 門、*Acidobacteria* 門細菌の優占も見られた。これにより、新潟以外の水田土壌や底泥においても *Deltaproteobacteria* 綱細菌が主に一酸化二窒素還元を駆動しており、畑・雑草地・森林土壌においてもサンプルによって同綱細菌が一酸化二窒素還元にある程度寄与している可能性が示唆された。

#### 4.3.2.1.5 脱窒反応のまとめと考察

第2章・第3章から、新潟水田土壌においては *Deltaproteobacteria* 綱細菌が主に硝酸還元、一酸化窒素還元、一酸化二窒素還元を駆動している可能性が示唆された。本章では、水田土壌、畑・雑草地・森林土壌、底泥といったサンプルを用いて新潟水田土壌以外にも上述した結果が得られるのかを検証した。嫌気環境である水田土壌と底泥においては第2章・第3章と類似した結果が得られ、好気環境である畑・雑草地・森林土壌においては水田土壌と底泥に比べて *Deltaproteobacteria* 綱細菌の優占は見られなかった。また、*Deltaproteobacteria* 綱細菌の中では、水田土壌と底泥においては嫌気的な *Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌、畑・雑草地・森林土壌においては好気的な *Sorangium* 属細菌が優占していた。

これらの結果から、新潟水田土壌以外の水田土壌においても、また、嫌気的な土壌である底泥においても、*Deltaproteobacteria* 綱細菌が硝酸還元、一酸化二窒素還元、一酸化二窒素還元に大きく寄与している可能性が示された。

#### 4.3.2.2 DNRA 関連遺伝子 (*nrf*)

DNRA に関わる鍵酵素遺伝子 (*nrf*) は、レプリケートを含む全ての土壌サンプルにおいて検出された。検出頻度は、水田土壌、底泥、畑・雑草地・森林土壌の順に高かった ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) (Figure 4.9A.)。

DNA 配列情報に基づく DNRA 微生物の群集組成では、全てのサンプルにおいて *Deltaproteobacteria* 綱細菌の優占が見られた。また、畑・雑草地・森林土壌においては *Verrucomicrobia* 門細菌由来の *nrf* も多く検出された (Figure 4.9B.)

*Deltaproteobacteria* 綱細菌の中では、水田・底泥において *Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌の優占が見られた。一方、畑・雑草地・森林土壌においては *Anaeromyxobacter* 属・*Pelobacter* 属が優占しており、*Geobacter* 属細菌はあまり検出されなかった (Figure 4.9C.)。

これらの結果から、DNRA 微生物として、様々な環境において *Deltaproteobacteria* 綱の *Anaeromyxobacter* 属細菌が優占しており、嫌気的な環境である水田土壌、底泥において *Geobacter* 属細菌も優占していることが明らかになった。これにより、新潟以外の水田土壌や底泥においても *Deltaproteobacteria* 綱の *Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌が主に DNRA を駆動しており、畑・雑草地・森林土壌においても同綱の *Anaeromyxobacter*, *Pelobacter* 属細菌が DNRA にある程度寄与している可能性が示唆された。

#### 4.3.2.3 窒素固定関連遺伝子 (*nif*)

窒素固定に関わる鍵酵素遺伝子 (*nif*) は、全ての水田土壌、底泥において検出された。一方、畑・雑草地・森林土壌においては同遺伝子が検出されないサンプルが多く存在した。検出頻度は、水田土壌、底泥、畑・雑草地・森林土壌の順に高かった ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) (Figure 4.10A.)。

DNA 配列情報に基づく窒素固定微生物の群集組成では、水田・底泥において *Deltaproteobacteria* 綱細菌の優占が見られた。また、畑・雑草地・森林土壌においては



*Alphaproteobacteria* 綱細菌が優占しており、U3 の土壌を除いて *Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の *nif* はほとんど検出されなかった(**Figure 4.10B.**)。

*Deltaproteobacteria* 綱細菌の中では、同綱細菌が検出された全てのサンプルにおいて *Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌の優占が見られた(**Figure 4.10C.**)。

これらの結果から、窒素固定微生物として、嫌気的な環境である水田土壌、底泥において *Deltaproteobacteria* 綱の *Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌が優占していることが示唆された。これにより、新潟以外の水田土壌や底泥においても *Deltaproteobacteria* 綱の *Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌が主に窒素固定を駆動している可能性が示唆された。

#### 4.4 本章のまとめ

第 2 章・第 3 章において、新潟水田土壌では還元的窒素変換反応（脱窒、DNRA、窒素固定）のうち亜硝酸還元反応以外の全ての反応を主に *Deltaproteobacteria* 綱細菌が駆動している可能性が示された。本章では、新潟水田土壌以外の水田土壌や畑・雑草地・森林土壌、底泥においても同様のことが言えるか検証を行った。

ほとんど全ての還元的窒素変換反応関連遺伝子は、水田土壌、底泥、畑・雑草地・森林土壌の順に検出頻度が高かった。このことから、水田は他の環境と比較して還元的窒素変換反応が最も活発に起こっている可能性が示された。

還元的窒素変換反応に関わる細菌群集組成では、水田土壌、底泥における脱窒反応の硝酸還元以外の各ステップにおいて、*Deltaproteobacteria* 綱の *Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌の優占が見られた。一方、畑・森林土壌においてはこれまでに脱窒菌として知られてきた *Alpha-, Beta-, Gammaproteobacteria* 綱細菌が優占していた。また、硝酸還元反応では、全てのサンプルにおいて *Alpha-, Beta-, Gammaproteobacteria* 綱細菌が優占していた。第 2 章においても述べた通り、*nir* を保有する *Deltaproteobacteria* 綱細菌は

*Bdellovibrio* 属以外に報告されていない。そのため、本研究においても *Deltaproteobacteria* 綱の中では同属細菌由来の *nir* のみが検出された。これらの結果から、新潟水田土壌以外の水田土壌だけでなく底泥においても硝酸還元以外の脱窒反応の各ステップを主に *Deltaproteobacteria* 綱細菌が駆動していることが示唆された。

DNRA 反応については、全ての土壌において *Deltaproteobacteria* 綱細菌の優占が見られた。中でも、水田土壌、底泥では *Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌、畑・雑草地・森林土壌では *Anaeromyxobacter* 属・*Pelobacter* 属細菌が優占していた。この結果から、様々な環境の土壌において DNRA 反応を主に *Deltaproteobacteria* 綱細菌が駆動していることが示唆された。

窒素固定反応関連遺伝子は、畑・雑草地・森林土壌においてほとんど検出されなかった。一方で、水田土壌や底泥においては多数検出された。群集組成は、水田土壌、底泥、一部の畑土壌において *Deltaproteobacteria* 綱の *Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌の優占が見られた。ほとんどの畑・雑草地・森林土壌においては *Alphaproteobacteria* 綱細菌が優占していた。この結果から、新潟水田土壌以外の水田土壌だけでなく底泥においても窒素固定反応を主に *Deltaproteobacteria* 綱細菌が駆動していることが示唆された。

以上の結果から、これまで脱窒菌として考えられていた *Alpha-, Beta-, Gammaproteobacteria* 綱細菌由来の脱窒機能遺伝子、窒素固定細菌として考えられていた *Cyanobacteria* 門細菌、根圏細菌由来の *nif* は嫌気環境下の土壌（水田、底泥）において優占していないことが明らかになった。それらの土壌においては、これまで見落とされてきた *Deltaproteobacteria* 綱細菌、中でも *Anaeromyxobacter* 属ならびに *Geobacter* 属細菌が優占しており、これらが還元的窒素変換反応に重要な役割を果たしている可能性が強く示唆された。

## 参考文献

Anderson R, Rooney-Varga N, Gaw CV, Lovley DR. (1998) Anaerobic Benzene Oxidation in the Fe(III) Reduction Zone of Petroleum-Contaminated Aquifers. *Environ Sci Technol.* 32:1222-1229.

Holmes DE, Finneran KT, O'Neil RA, Lovley DR. (2002) Enrichment of members of the family *Geobacteraceae* associated with stimulation of dissimilatory metal reduction in uranium-contaminated aquifer sediments. *Appl Environ Microbiol.* 68:2300-2306.

Ishii S, Ikeda S, Minamisawa K, Senoo K. (2011) Nitrogen cycling in rice paddy environments: past achievements and future challenges. *Microbes Environ.* 26:282-292.

Klammer S, Knapp B, Insam H. (2008) Bacterial community patterns and thermal analyses of composts of various origins. *Waste Manag Res.* 26:173-187.

Núñez ME, Martin MO, Duong LK, Ly E, Spain EM. (2003) Investigations into the life cycle of the bacterial predator *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J at an interface by atomic force microscopy. *Biophys J.* 84:3379-3388.

Prakash O, Gihring TM, Dalton DD, Chin KJ, Green SJ, Akob DM, *et al.* (2010) *Geobacter daltonii* sp. nov., an Fe(III)- and uranium(VI)-reducing bacterium isolated from a shallow subsurface exposed to mixed heavy metal and hydrocarbon contamination. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60:546-553.

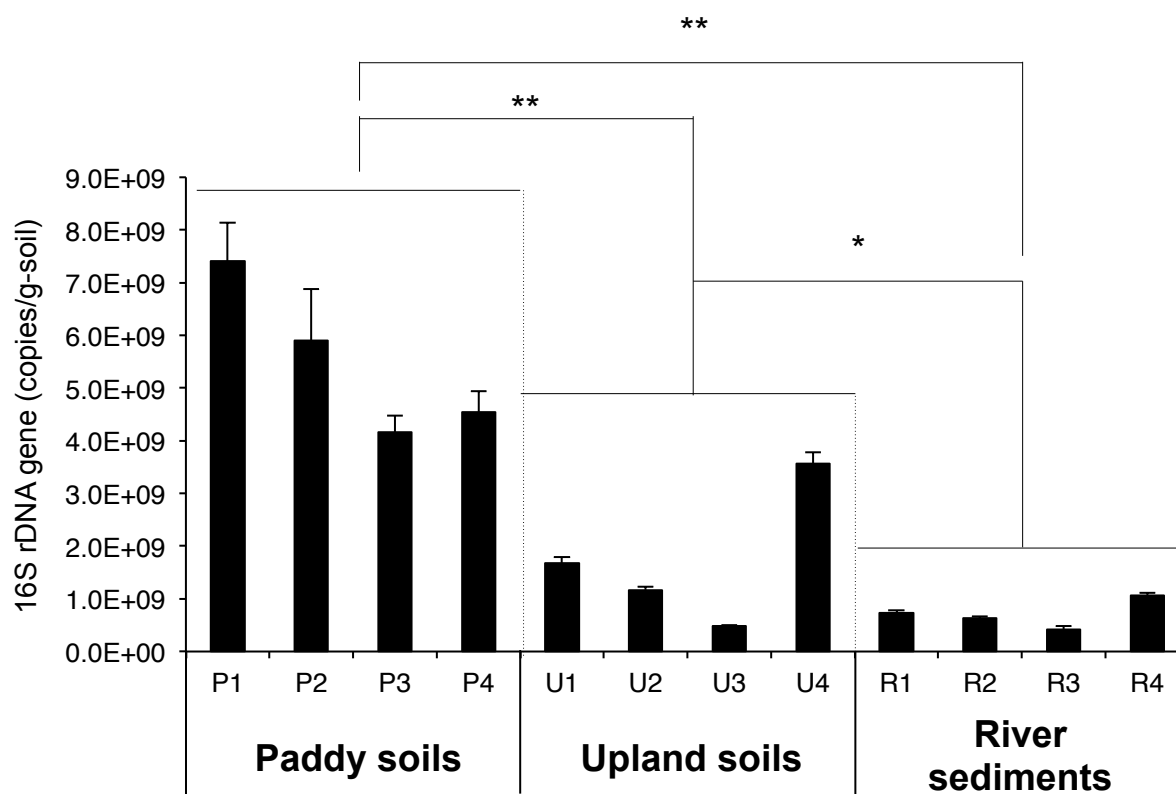
Sanford RA, Cole JR, Tiedje JM. (2002) Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halorespiring facultative anaerobic myxobacterium. Appl Environ Microbiol. 68:893-900.

Schmieder, R. and R. Edwards. (2011) Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. Bioinformatics. 27:863-864.

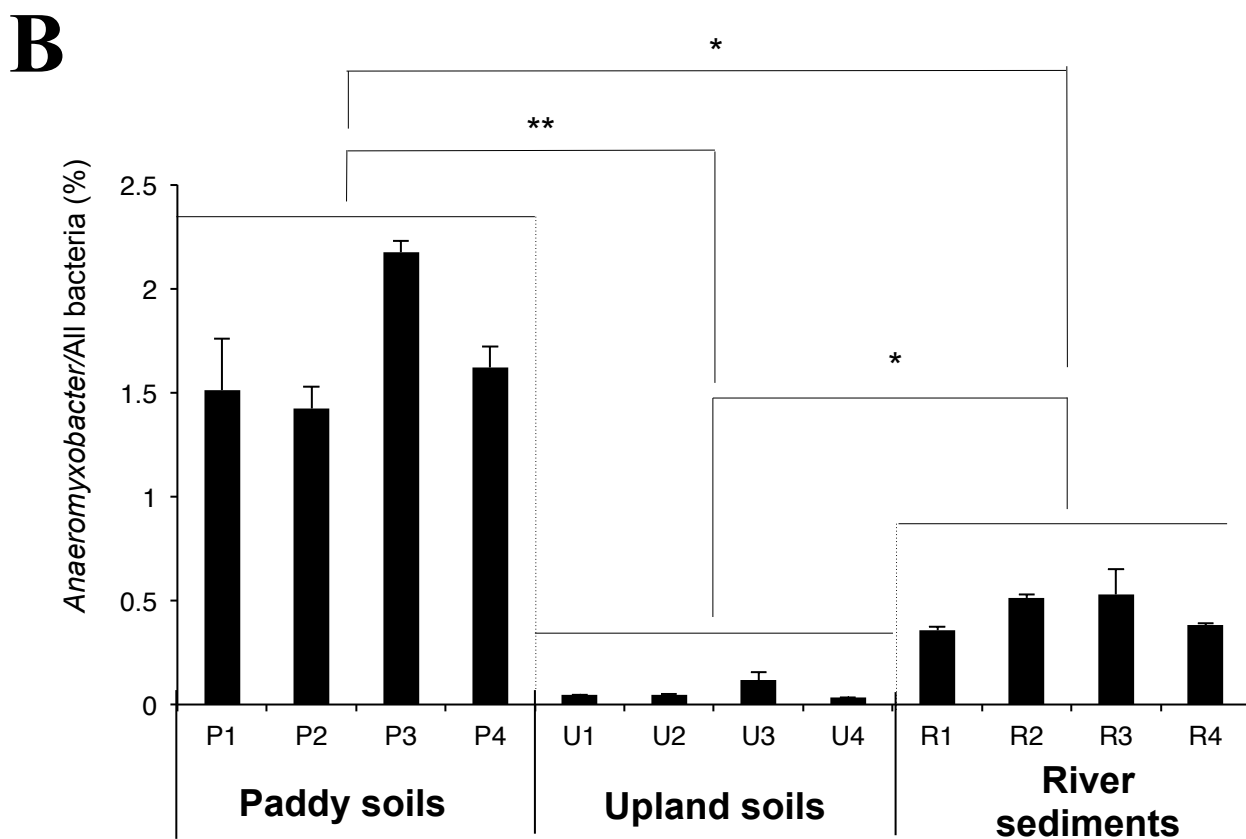
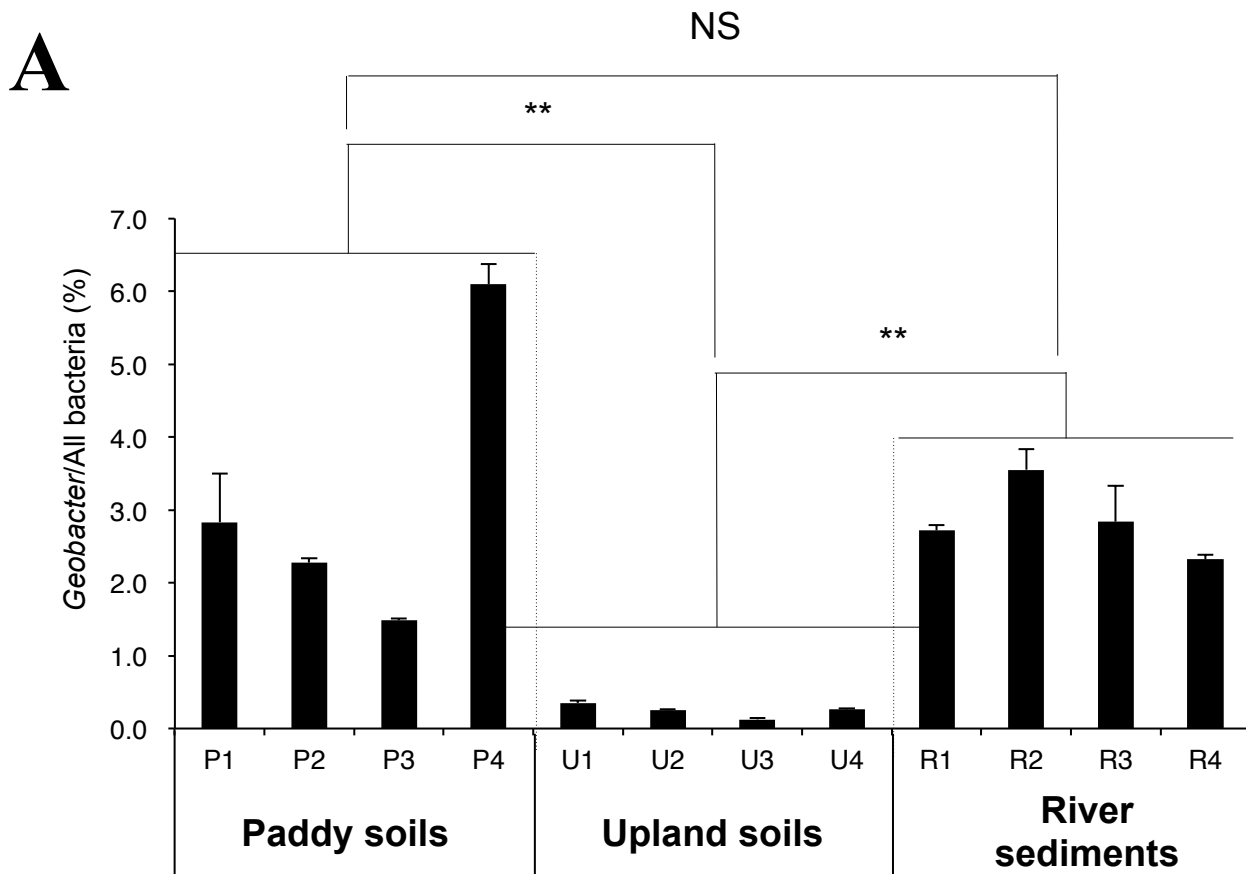
Schneiker S, Perlova O, Kaiser O, Gerth K, Alici A, Altmeyer MO, *et al.* (2007) Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. Nat Biotechnol. 25:1281-1289.

Takada-Hoshino Y, Matsumoto N. (2004) An improved DNA extraction method using skim milk from soils that strongly adsorb DNA. Microbes Environ. 19:13-19.

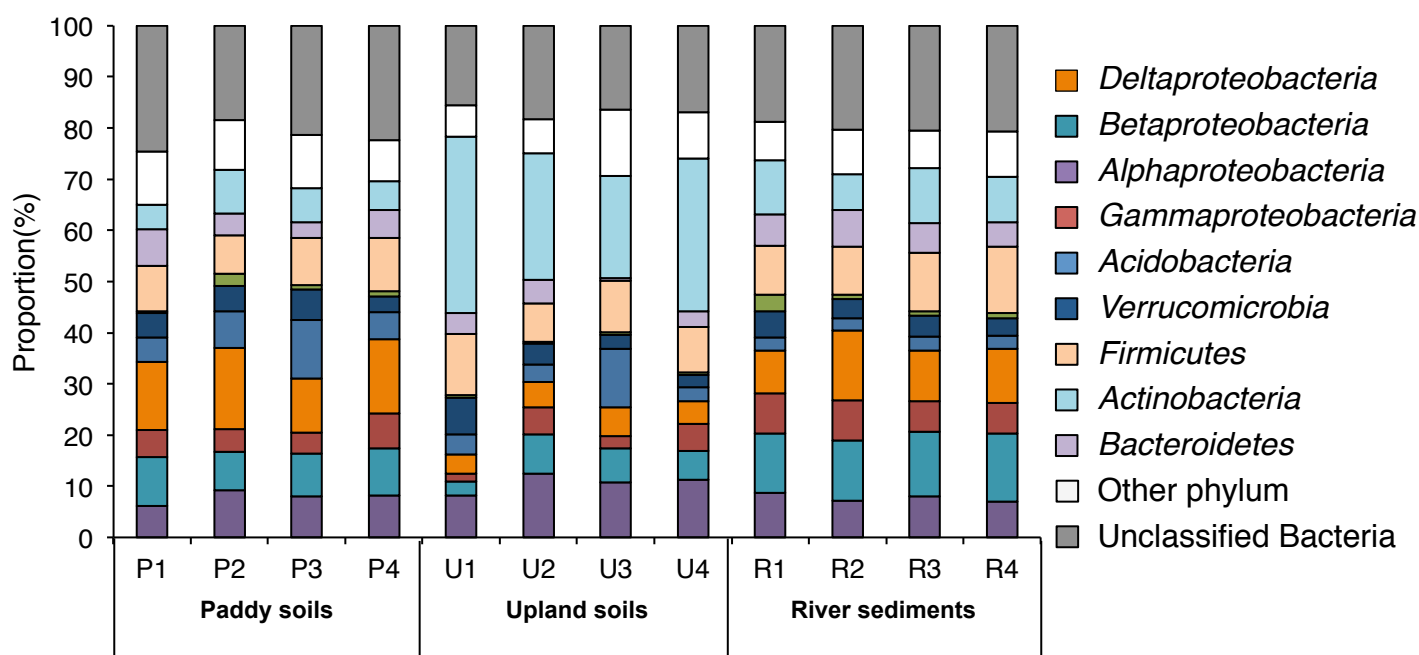
Thomas SH, Padilla-Crespo E, Jardine PM, Sanford RA, Löffler FE. (2009) Diversity and distribution of *Anaeromyxobacter* strains in a uranium-contaminated subsurface environment with a nonuniform groundwater flow. Appl Environ Microbiol. 75:3679-3687.



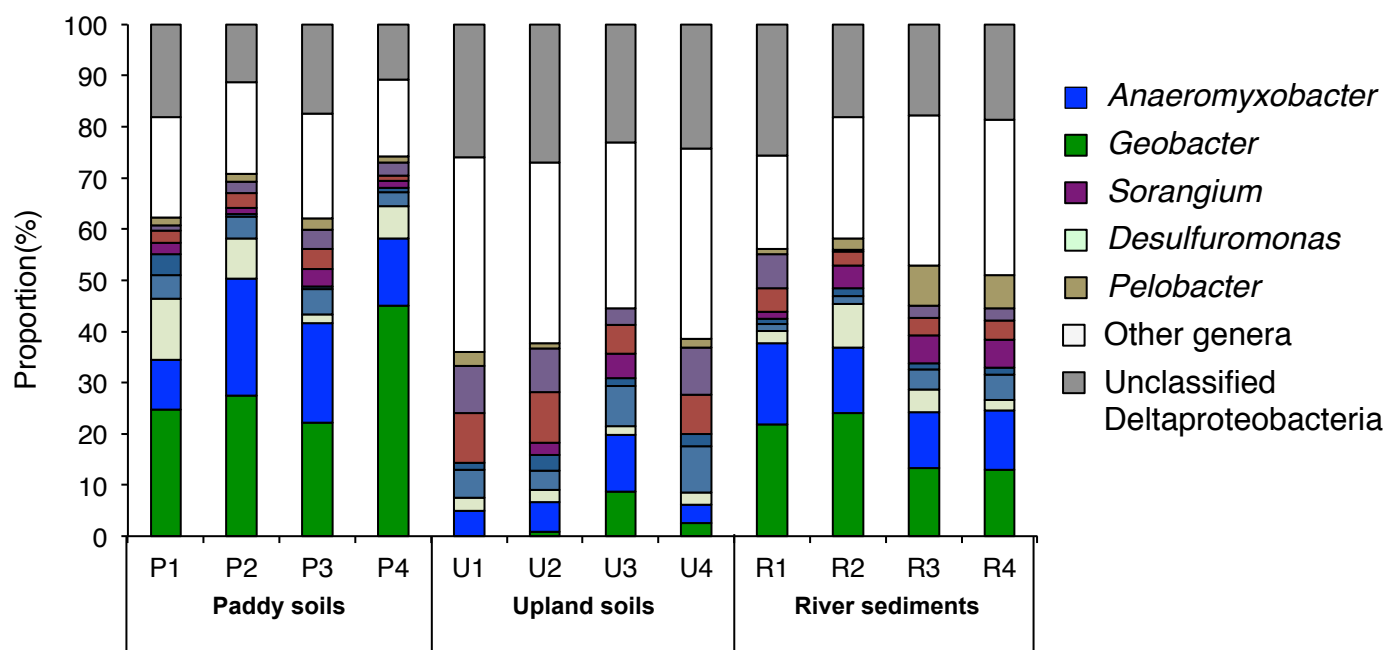
**Figure 4.1.** Copy number of bacterial 16S rDNA. Mean  $\pm$  SD is shown (n=3). Asterisks indicate statistically significant differences (Mann-Whitney *U* test; \*,  $P < 0.01$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ).



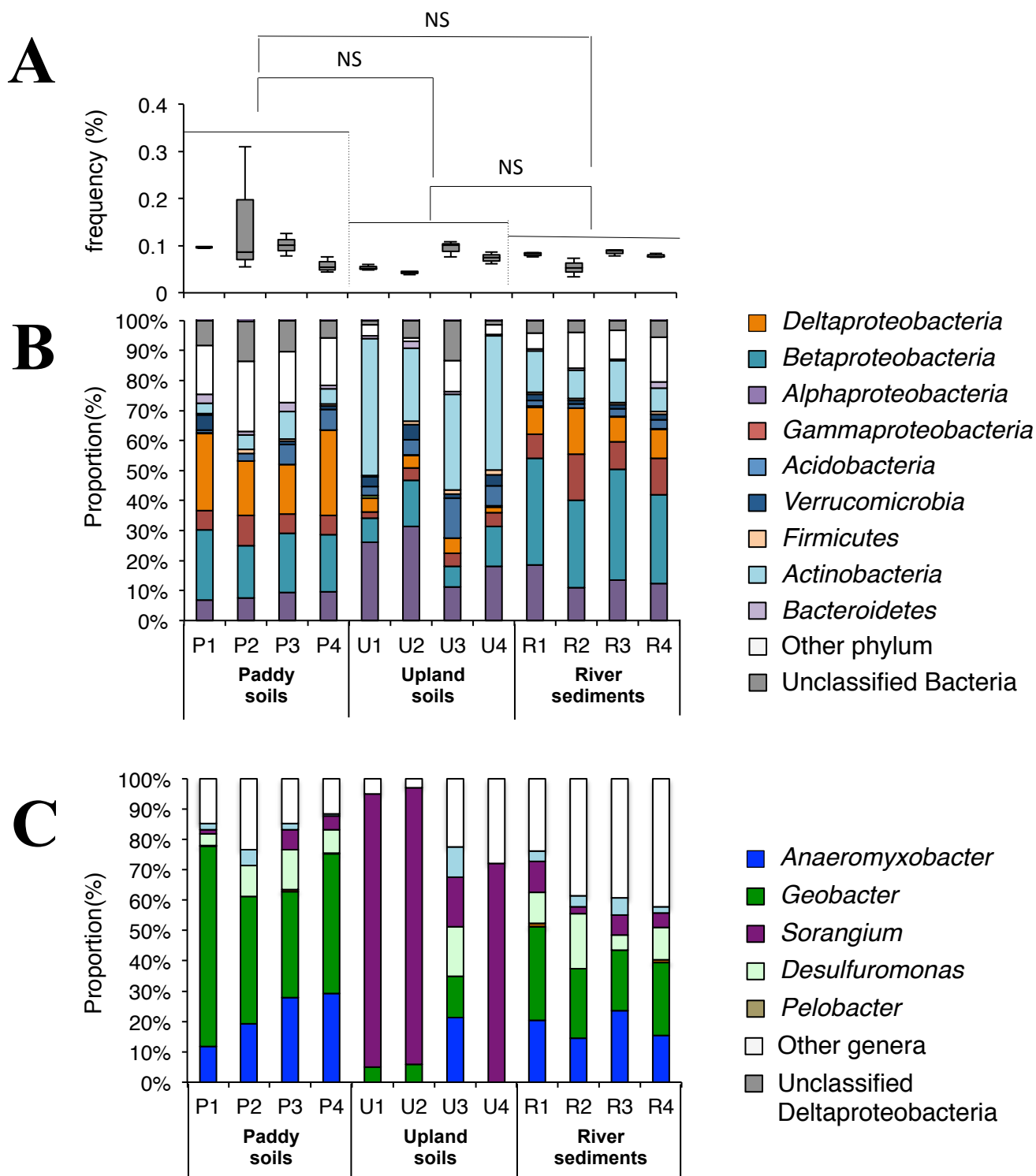
**Figure 4.2.** Proportion of *Anaeromyxobacter*(A) and *Geobacter*(B) against whole bacteria estimated by quantitative PCR method. Mean  $\pm$  SD is shown (n=3). Asterisks indicate statistically significant differences (Mann-Whitney *U* test; \*,  $P < 0.01$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ). NS, not significant difference.



**Figure 4.3.** Relative abundance of rDNA of bacterial phyla. Most dominant bacterial phylum, Proteobacteria, was classified and shown at the class level as *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, and *Delta*-proteobacteria. Data is shown as mean value of three replicates.

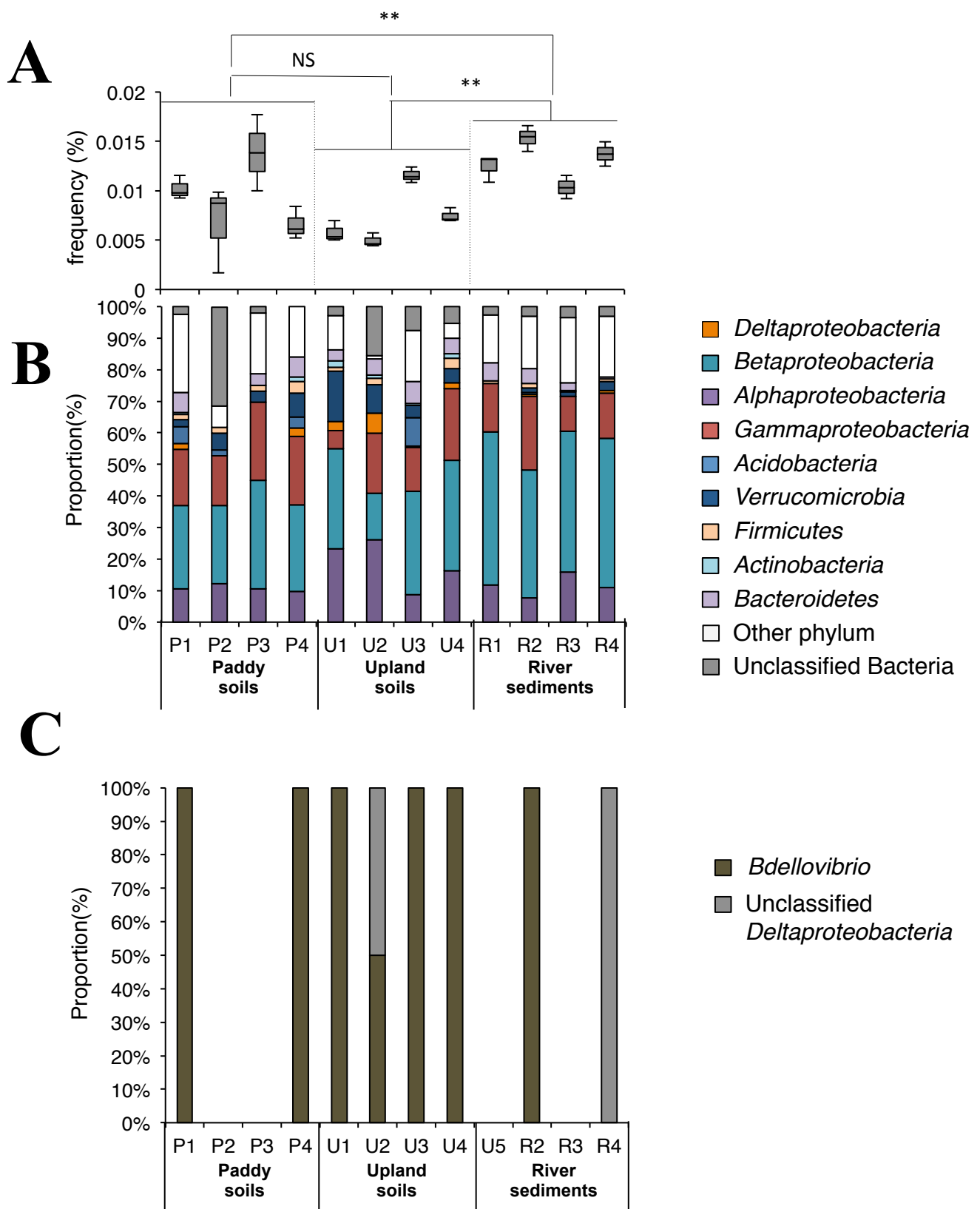


**Figure 4.4.** Relative abundance of rDNA of deltaproteobacterial genera. Data is shown as mean value of three replicates.

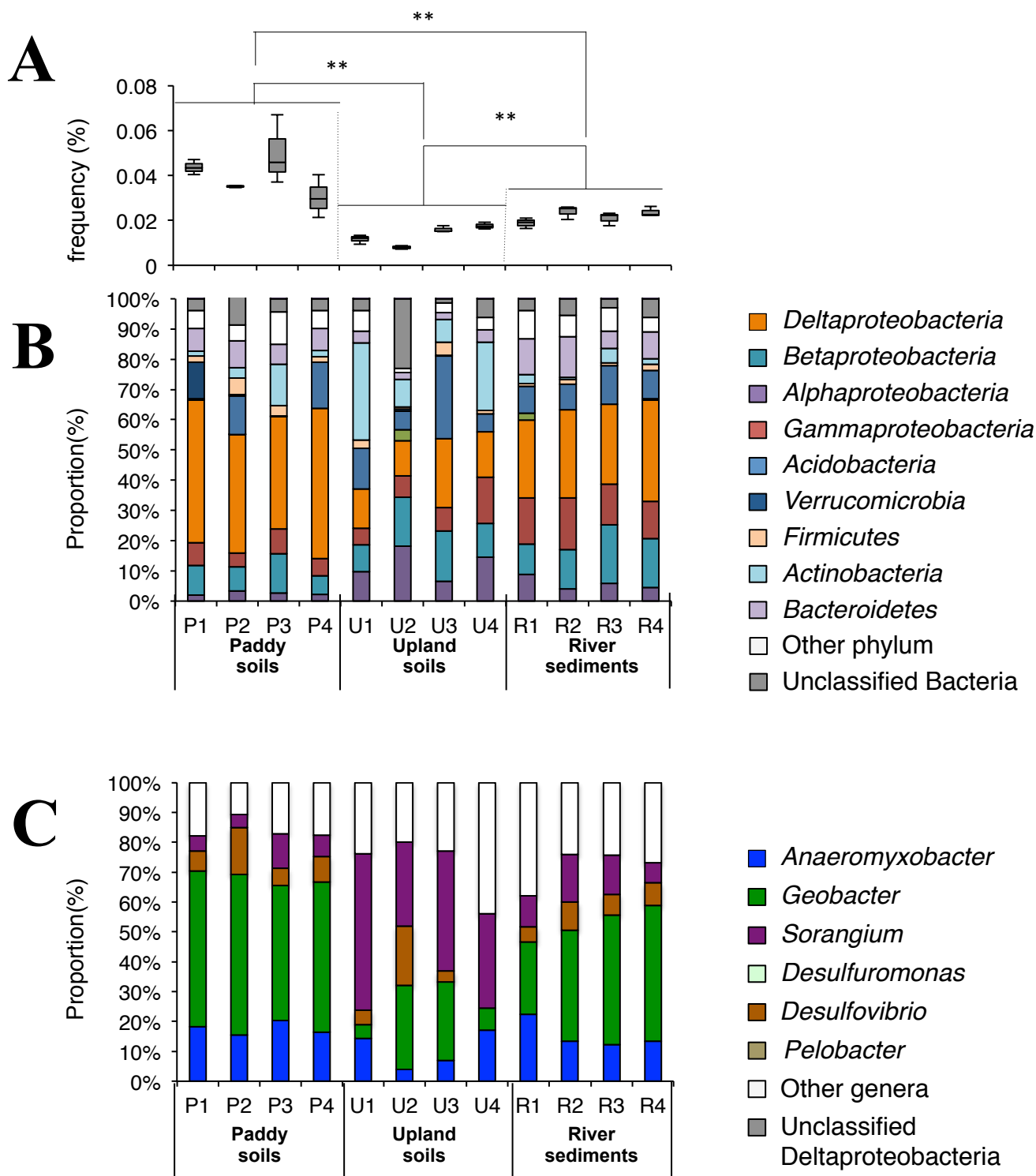


**Figure 4.5.** Relative abundance of genes in all protein-coding genes relevant to nitrate reduction (*nar*) and the composition of the assigned bacterial phyla (A) and deltaproteobacterial genera(B) in metagenome. Most dominant bacterial phylum, Proteobacteria, was classified and shown at the class level as *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, and *Delta*-proteobacteria. Data is shown as mean value of three replicates.

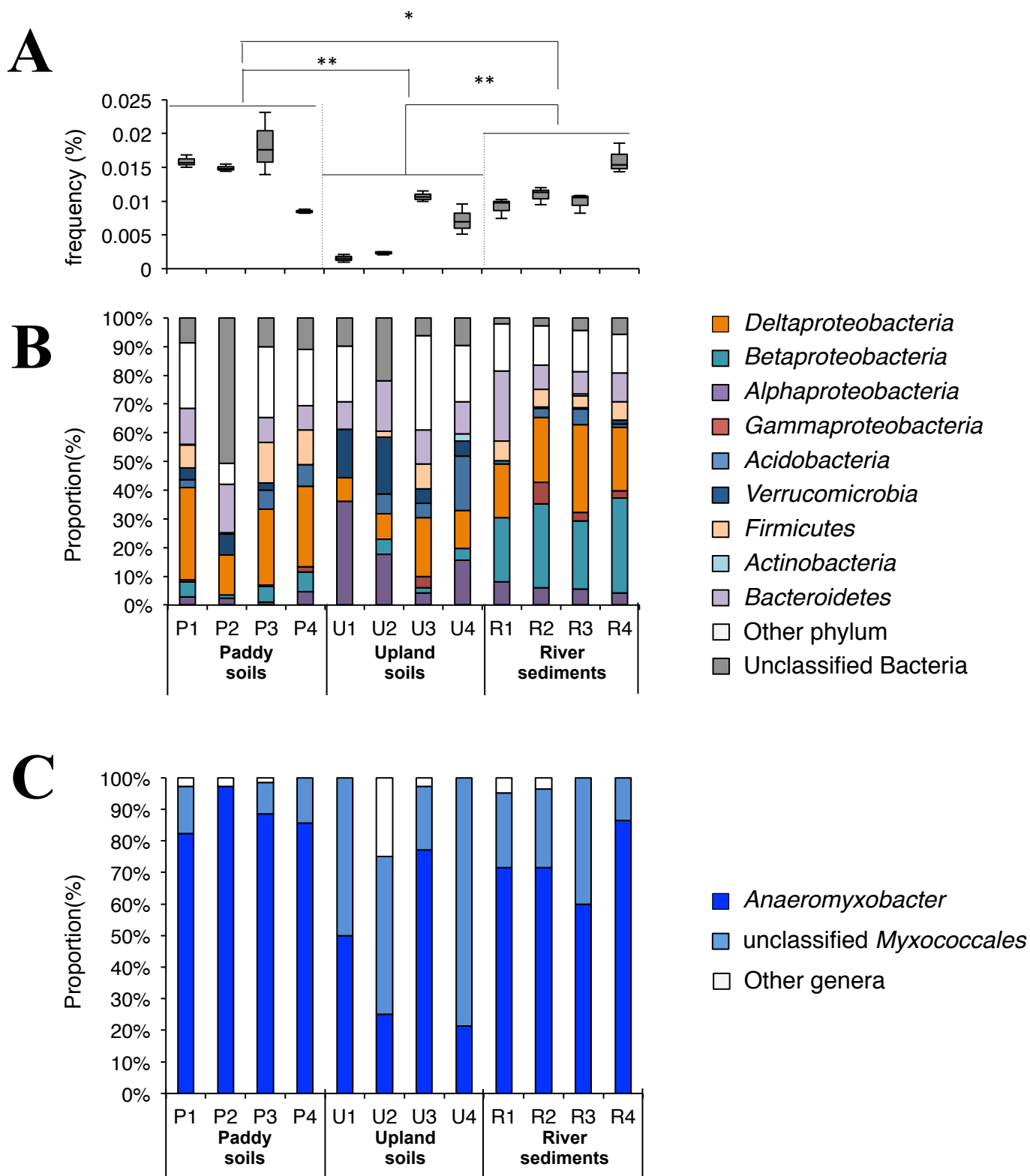




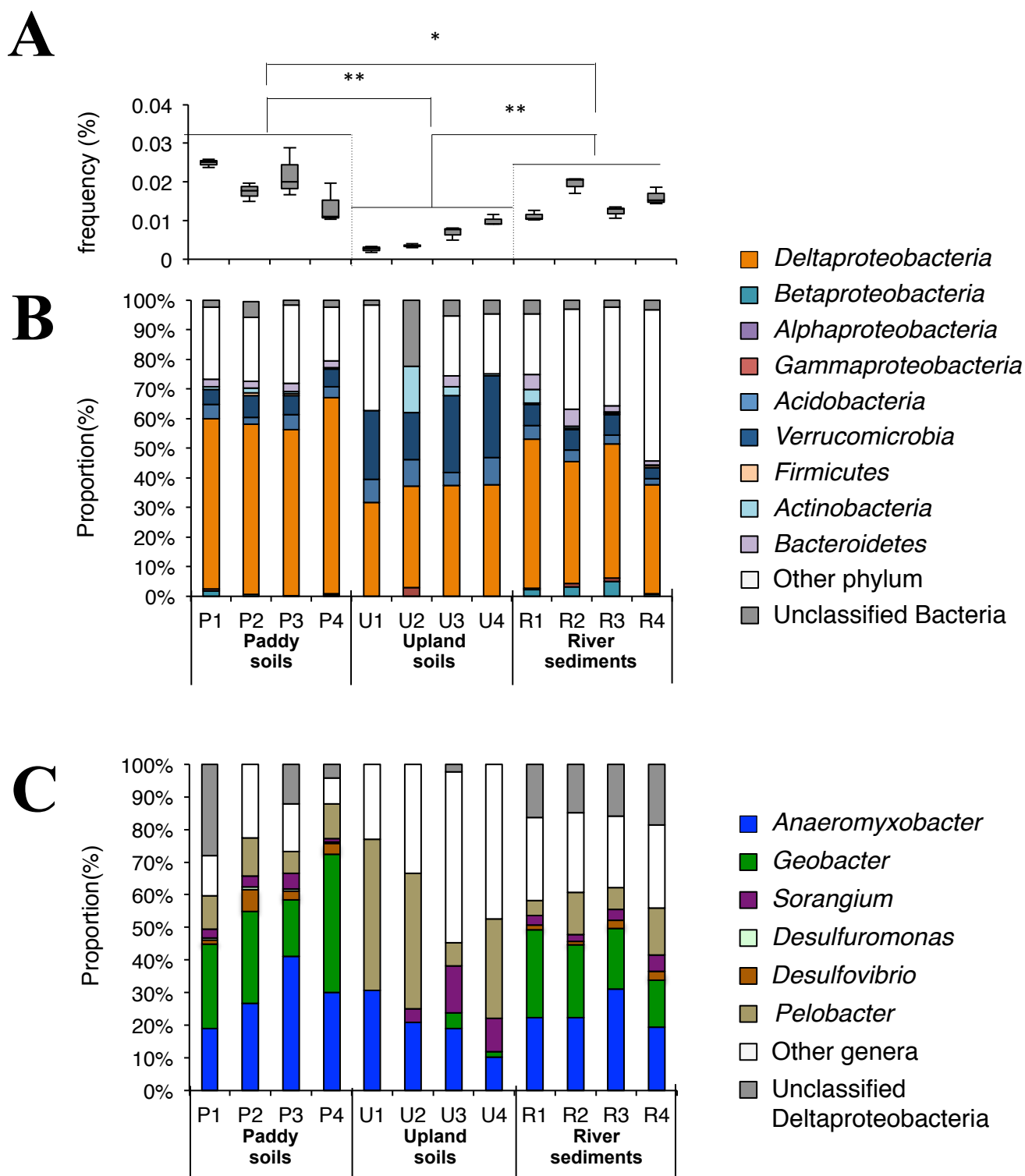
**Figure 4.6.** Relative abundance of genes in all protein-coding genes relevant to nitrite reduction (*nir*) and the composition of the assigned bacterial phyla (A) and deltaproteobacterial genera (B) in metagenome. Most dominant bacterial phylum, Proteobacteria, was classified and shown at the class level as *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, and *Delta*-proteobacteria. Data is shown as mean value of three replicates. Asterisks indicate statistically significant differences (Mann-Whitney *U* test; \*,  $P < 0.01$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ).



**Figure 4.7.** Relative abundance of genes in all protein-coding genes relevant to nitric oxide reduction (*nor*) and the composition of the assigned bacterial phyla (A) and deltaproteobacterial genera(B) in metagenome. Most dominant bacterial phylum, Proteobacteria, was classified and shown at the class level as *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, and *Delta*-proteobacteria. Data is shown as mean value of three replicates. Asterisks indicate statistically significant differences (Mann-Whitney *U* test; \*,  $P < 0.01$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ).



**Figure 4.8.** Relative abundance of genes in all protein-coding genes relevant to nitrous reduction (*nos*) and the composition of the assigned bacterial phyla (A) and deltaproteobacterial genera(B) in metagenome. Most dominant bacterial phylum, Proteobacteria, was classified and shown at the class level as *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, and *Delta*-proteobacteria. Data is shown as mean value of three replicates. Asterisks indicate statistically significant differences (Mann-Whitney *U* test; \*,  $P < 0.01$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ).

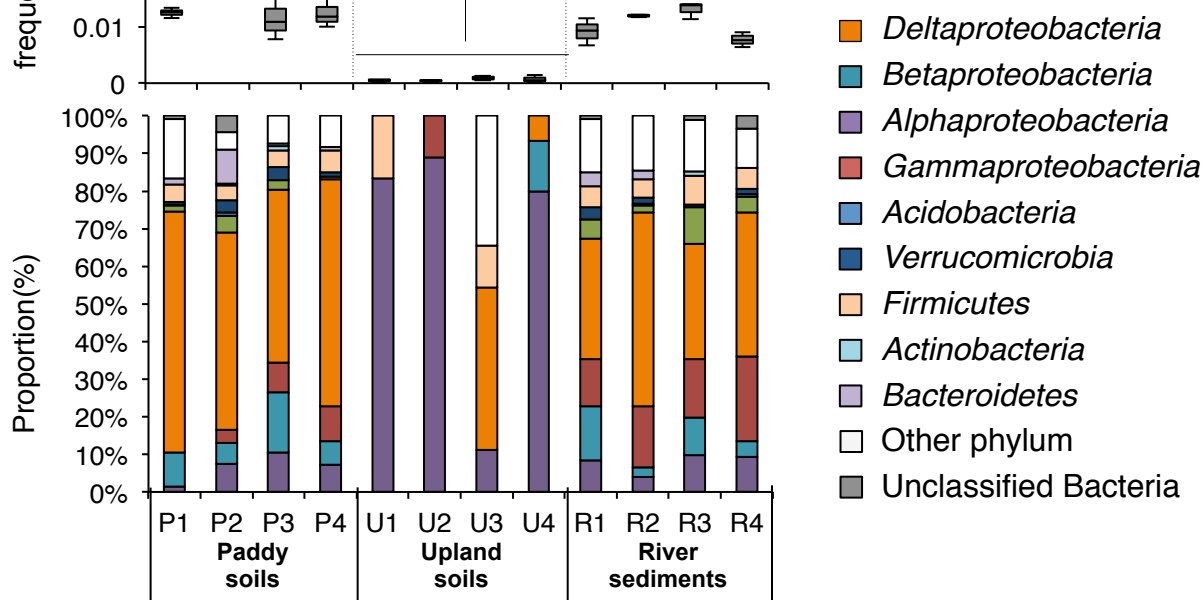


**Figure 4.9.** Relative abundance of genes in all protein-coding genes relevant to DNRA (*nrf*) and the composition of the assigned bacterial phyla (A) and deltaproteobacterial genera(B) in metagenome. Most dominant bacterial phylum, Proteobacteria, was classified and shown at the class level as *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, and *Delta*-proteobacteria. Data is shown as mean value of three replicates. Asterisks indicate statistically significant differences (Mann-Whitney *U* test; \*,  $P < 0.01$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ).

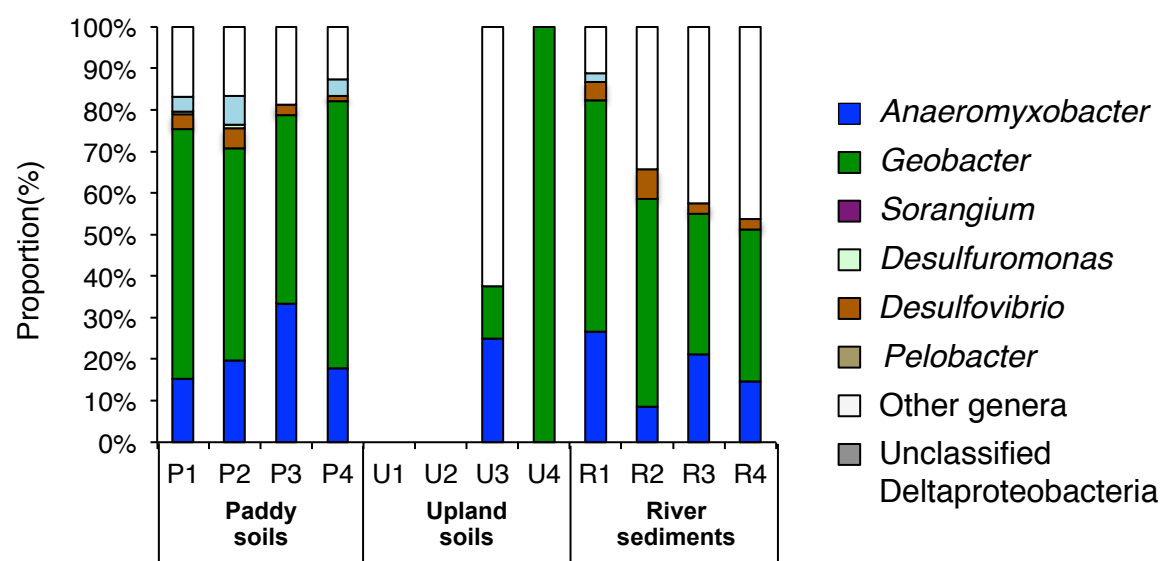
**A**



**B**



**C**



**Figure 4.10.** Relative abundance of genes in all protein-coding genes relevant to nitrogen fixation (*nif*) and the composition of the assigned bacterial phyla (A) and deltaproteobacterial genera(B) in metagenome. Most dominant bacterial phylum, Proteobacteria, was classified and shown at the class level as *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, and *Delta*-proteobacteria. Data is shown as mean value of three replicates. Asterisks indicate statistically significant differences (Mann-Whitney *U* test; \*,  $P < 0.01$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ).

**Table 4.1. Soil samples used in qPCR and Metagenome analysis.**

Sample ID	Environment	Collection site	Collection year	Collector	No. of copies		
					All bacteria	<i>Geobacter</i>	<i>Anaeromyxobacter</i>
P1	Paddy	Sapporo, Hokkaido pref.	2011	H.Itoh	$7.11 \pm 0.73 \times 10^9$	$2.02 \pm 0.47 \times 10^8$	$1.08 \pm 0.18 \times 10^8$
P2	Paddy	Nagaoka, Niigata pref.	2012/2009	Y.Masuda/H.Itoh	$5.99 \pm 0.98 \times 10^9$	$1.72 \pm 0.26 \times 10^7$	$1.32 \pm 0.10 \times 10^7$
P3	Paddy	Tsukuba, Ibaraki pref.	2011	T.Hasegawa	$3.82 \pm 0.32 \times 10^9$	$5.66 \pm 0.61 \times 10^7$	$8.30 \pm 1.00 \times 10^7$
P4	Paddy	Nagoya, Aichi pref.	2011	S.Asakawa	$4.31 \pm 0.39 \times 10^9$	$2.65 \pm 0.15 \times 10^8$	$7.03 \pm 0.31 \times 10^7$
U1	Upland (grass)	Sapporo, Hokkaido pref.	2016	H.Itoh	$1.61 \pm 0.11 \times 10^9$	$5.65 \pm 0.69 \times 10^6$	$7.15 \pm 0.29 \times 10^5$
U2	Upland (forest)	Sapporo, Hokkaido pref.	2016	H.Itoh	$1.16 \pm 0.06 \times 10^9$	$2.92 \pm 0.11 \times 10^6$	$5.36 \pm 0.53 \times 10^5$
U3	Upland (arable)	Tsukuba, Ibaraki pref.	2011	H.Akiyama	$4.70 \pm 0.30 \times 10^8$	$5.81 \pm 0.65 \times 10^5$	$5.47 \pm 0.15 \times 10^5$
U4	Upland (grass)	Bukyo-ku, Tokyo pref.	2016	Y.Masuda	$3.29 \pm 0.22 \times 10^9$	$8.55 \pm 0.42 \times 10^6$	$1.07 \pm 0.07 \times 10^6$
R1	River sediment	Shunan, Yamaguchi pref.	2015	H.Itoh	$6.85 \pm 0.46 \times 10^8$	$1.86 \pm 0.14 \times 10^7$	$2.44 \pm 0.13 \times 10^6$
R2	River sediment	Onga-gun, Fukuoka pref.	2015	H.Itoh	$6.23 \pm 0.26 \times 10^8$	$2.23 \pm 0.10 \times 10^7$	$3.21 \pm 0.19 \times 10^6$
R3	River sediment	Kusu-gun, Oita pref.	2015	H.Itoh	$4.52 \pm 0.56 \times 10^8$	$1.27 \pm 0.16 \times 10^7$	$2.36 \pm 0.37 \times 10^6$
R4	River sediment	Tamana, Kumamoto pref.	2015	H.Itoh	$1.06 \pm 0.05 \times 10^9$	$2.45 \pm 0.15 \times 10^7$	$4.05 \pm 0.29 \times 10^6$

**Table 4.2. Summary of sequencing and accession numbers.**

Sample	MG-RAST ID No.	bp	No. of seqs	Mean length	rRNA seq	non-rRNA seq
P1	4713869.3	331,847,542	1,532,919	216±59	1,020	605,017
	4713865.3	459,109,237	2,101,456	218±61	442	823,370
	4713866.3	389,804,807	1,715,893	227±59	211	692,971
	4670909.3	311,876,040	1,220,607	255±47	1,313	514,192
P2	4670907.3	503,771,192	2,016,340	249±49	2,048	829,603
	4670904.3	92,774,868	371,222	249±49	489	142,550
	4713867.3	238,253,265	991,071	240±70	448	406,272
P3	4713868.3	257,481,652	1,044,467	246±61	965	447,908
	4713864.3	361,085,274	1,647,468	219±61	741	660,635
	4713871.3	394,211,364	1,721,588	228±63	7	709,322
P4	4713872.3	355,334,351	1,607,812	221±64	960	651,277
	4713873.3	404,383,019	1,679,019	240±62	669	703,832
	4714249.3	219,924,047	769,866	285±56	676	393,829
U1	4714250.3	338,841,962	1,255,857	269±57	31	617,911
	4714248.3	261,618,200	993,460	263±63	764	385,414
	4713831.3	311,217,279	1,290,277	241±60	909	594,000
U2	4713830.3	337,481,693	1,372,292	245±62	475	632,125
	4713829.3	372,099,825	1,499,333	248±56	967	710,601
	4713862.3	322,578,274	1,435,317	224±56	905	572,579
U3	4713861.3	295,515,064	1,244,585	237±53	858	524,368
	4713863.3	277,186,593	1,110,081	249±58	94	480,449
	4714251.3	396,281,135	1,480,425	267±60	889	723,918
U4	4714271.3	275,829,669	1,028,422	268±58	687	504,023
	4714253.3	194,501,412	704,207	276±58	539	351,861
	4714255.3	347,365,512	1,210,180	287±51	312	606,141
R1	4714254.3	136,691,891	466,282	293±51	388	235,194
	4714269.3	233,757,178	819,751	285±53	185	405,331
	4713993.3	232,780,371	791,781	293±49	810	381,257
R2	4713992.3	282,083,343	991,087	284±51	966	477,095
	4713986.3	152,976,414	570,229	268±55	559	264,846
	4713984.3	330,075,302	1,261,281	261±55	192	610,517
R3	4713985.3	320,810,379	1,190,526	269±55	1,087	570,316
	4713991.3	441,738,480	1,730,555	255±55	1,203	828,576
	4713989.3	323,751,077	1,211,559	278±59	1,057	554,344
R4	4713988.3	286,948,930	1,096,904	261±62	1,045	488,623
	4713987.3	183,462,212	703,934	260±65	636	313,582

## 第 5 章

### 総合考察

#### 5.1 本研究の概要

本論文の目的は、「水田土壌において窒素循環反応(アンモニア酸化、脱窒、アンモニア生成型硝酸還元、窒素固定)に関わる微生物群集構造と機能遺伝子の検出量、およびその局在と変遷を包括的に明らかにし、土壌微生物が駆動する窒素循環の全体像を解明する」ことであった。

第 2 章では、まず新潟水田土壌の層別の理化学性プロファイルを示した。水田土壌は年間を通して 5 回サンプリングを行い、層別に分取した。酸化層・酸化層直下・還元層 (X 層・Y 層・Z 層) の分取は、最も還元層が発達する中干し直前の土壌を指標とした。分取した土壌の  $\text{NH}_4^+$ ・ $\text{Fe}^{2+}$  濃度、生物活性を測定し、理化学性の層別プロファイルを示した。還元度の指標となる  $\text{Fe}^{2+}$  濃度は湛水期の Z 層において最も高く、分取が適切であったことが示された。次に、それらの土壌から抽出した RNA を供試した簡易的メタトランスクリプトーム解析を行い、rRNA と mRNA 配列を取得した。rRNA 配列情報に基づく群集構造解析では、新潟水田土壌では嫌気性細菌の *Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属に代表される *Deltaproteobacteria* 綱細菌が優占しており、特にその傾向は Z 層において顕著であることが確認された。また、土壌が好氣的になる落水期には、*Chondromyces* 属・*Sorangium* 属といった好氣的な *Deltaproteobacteria* 綱細菌の割合が増加することがわかった。このように、rRNA の配列情報は充分得られたため層別の解析を行ったが、mRNA の配列数は少量であった。そのため、機能遺伝子は時期・層別ではなく全サンプルをまとめて群集組成解析を行った。アンモニア酸化反応に関わる微生物群の構造では、*Thaumarchaeota* 門古細菌、*Alpha-*, *Gamma-proteobacteria* 綱細菌由来の *amo* 転写産物が優



占していた。還元的窒素循環反応に関わる微生物群の構造では、脱窒・DNRA・窒素固定を対象として解析を行った。脱窒反応の中では、亜硝酸還元 (*nir*) 以外の全ての遺伝子において、*Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の転写産物が最も多く検出された。これまでに多く研究されてきた Typical な脱窒菌は、一連の脱窒反応を全て1つの菌が担うことができる。これとは対照的に、第2章の結果では、検出された脱窒関連遺伝子 (*nar*, *nor*, *nos*) 転写産物のほとんどが *nir* を保有していない *Deltaproteobacteria* 綱細菌由来のものであった。このことから、新潟水田土壌においては *Deltaproteobacteria* 綱細菌が主に亜硝酸還元以外の脱窒反応を担っている可能性が示唆された。水田で起こっているとされながら、その群集構造や転写の有無が明らかになっていなかった DNRA 微生物の群集構造においても、*Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の *nif* 転写産物の優占が見られた。また、これまで *Cyanobacteria* 門や根圏細菌が主に駆動していると考えられてきた窒素固定微生物の群集構造においても、*Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の *nif* 転写産物の優占が見られた。このように、アンモニア酸化反応は *Thaumarchaeota* 門古細菌、*Alpha*-, *Gamma*-*proteobacteria* 綱細菌が、亜硝酸から一酸化窒素への還元以外の還元的窒素循環反応は、*Deltaproteobacteria* 綱細菌が主に駆動している可能性が示された。しかしながら、上述したように第2章におけるメタトランスクリプトーム解析で得られた機能遺伝子配列はわずかであったため、それらの時期別・層別の変遷については見ることはできなかった。そこで第3章では、第2章より配列数が多く得られる様な解析を行い、それらの局在と変遷を追うこととした。

第3章では、第2章において最も理化学性や群集構造に差異が見られた湛水期・落水期の X 層・Z 層を用いてメタゲノム解析と、第2章に比べてよりディープなメタトランスクリプトーム解析を行った。その結果、rRNA 配列に基づく群集構造は第2章と同様であり、シーケンシングバイアスは小さいことが示された。第3章では窒素循環反応に関わる機能遺伝子配列数も十分に得られ、層別・時期別に解析を行うことができた。そ

の結果、アンモニア酸化反応は主に *Thaumarchaeota* 門古細菌、*Alpha*-, *Gamma-proteobacteria* 綱細菌によって、湛水期の Z 層において最も活発に駆動されている可能性が示された。また、亜硝酸還元(*nir*)以外の脱窒反応関連遺伝子とその転写産物は、*Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属に代表される *Deltaproteobacteria* 綱細菌由来のものが優占していた。*nir* とその転写産物においては、上述した様な Typical な脱窒菌が優占していた。*nar*, *nir*, *nor*, *nos* 全ての遺伝子やその転写産物が同じサンプルにおいて同時に検出された属は極めて少なく、このことから様々な微生物により協奏的に脱窒反応が起きている可能性が示唆された。DNRA、窒素固定反応関連遺伝子においても、第 2 章と同様に *Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の遺伝子とその転写産物の優占が見られた。機能遺伝子の検出量は、時期・層別に有意差が見られたものが複数存在した。還元的窒素循環関連遺伝子とその転写産物の検出量は、X 層に比べて Z 層において多い傾向にあることが示された。還元的窒素循環反応に嫌気細菌である *Anaeromyxobacter* 属, *Geobacter* 属に代表される *Deltaproteobacteria* 綱細菌が大きく関与しているため、より嫌気的な環境である Z 層において機能遺伝子の検出量が多いのは妥当であると考えられた。

第 2 章・第 3 章の結果から、*Thaumarchaeota* 門古細菌、ならびに *Alpha*-, *Gammaproteobacteria* 綱細菌が主にアンモニア酸化反応を駆動しており、湛水期の X 層において活性が高まっている可能性が示された。また、特に水田土壌の Z 層において *Anaeromyxobacter* 属, *Geobacter* 属に代表される嫌気性の *Deltaproteobacteria* 綱細菌が優占しており、それらがこれまで見落とされてきた還元的窒素循環反応（亜硝酸から一酸化窒素への還元以外の脱窒・DNRA・窒素固定）に大きく関与していることが初めて示唆された。しかしながら、本結果は新潟県の水田土壌のみを用いて行ったものであり、他の水田土壌においても一般性を持ってその結果が得られるかどうかは定かではなかった。

そこで第 4 章では、北海道・愛知・新潟・茨城の水田土壌、北海道・茨城・東京・香川の森林、雑草地、畑土壌、山口・福岡・大分・熊本の底泥を用いて解析を行い、第 2

章・第 3 章で得られた知見の一般性を確認することとした。まず、全細菌・*Anaeromyxobacter* 属細菌・*Geobacter* 属細菌の rRNA を対象として定量 PCR を行った。全細菌の rRNA を対象とした定量 PCR からは、水田土壌は他の土壌より細菌密度が高いことが確認できた。また、*Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌は、水田土壌において森林・雑草地・畑土壌より有意にそれらの存在割合が高いことがわかった。底泥は、森林・雑草地・畑土壌よりそれらの存在割合が高かったが、これは底泥が森林・雑草地・畑土壌より嫌気的な環境であるためだと考えられた。次に、それらの土壌を用いてメタゲノム解析を行った。その結果、水田土壌においては第 2 章と同様に、*Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属に代表される *Deltaproteobacteria* 綱細菌が亜硝酸から一酸化窒素への還元以外の全ての還元的窒素循環反応に大きく関与していることが示唆された。一方、森林・雑草地・畑土壌においては、*Betaproteobacteria* 綱細菌に代表される Typical な脱窒菌が脱窒反応に大きく関与していることが示唆された。また、底泥では、森林、雑草地、畑土壌に比べて *Deltaproteobacteria* 綱細菌の割合は高かったが、水田土壌より低いという結果が得られた。

これらの結果から、「水田土壌における微生物群集構造や還元的窒素循環反応に関わる微生物群集構造と機能遺伝子の検出量、およびその局在と変遷を明らかにする」という目的は達成された。具体的には、アンモニア酸化は *Thaumarchaeota* 門古細菌、ならびに *Alpha-*, *Gamma-proteobacteria* 綱細菌が主に駆動しており、湛水期の X 層において活発であることが示された。また、一般的に水田土壌において優占している *Deltaproteobacteria* 綱細菌、中でも *Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌が還元的窒素循環に関わる諸反応を主導している可能性が初めて示された。*Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌は、水田土壌以外の嫌気環境において還元的窒素循環に寄与している可能性も示唆された。

## 5.2 水田土壌では *Deltaproteobacteria* 綱細菌が優占する

第2章・第3章において、新潟水田土壌では *Anaeromyxobacter* 属, *Geobacter* 属に代表される *Deltaproteobacteria* 綱細菌が優占しており、それらは嫌気的な環境において顕著であることが明らかになった。このことから、他の耕作地より嫌気的な環境を有する水田において、一般的に *Deltaproteobacteria* 綱細菌が優占している可能性が考えられた。そこで、第4章において、全国の水田・畑・森林・底泥土壌を対象とし、全細菌に対する *Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌の割合を確認するため、rRNA 配列の定量PCRを行った。その結果、*Anaeromyxobacter* 属細菌は水田土壌において他の土壌より有意に優占度が高く、*Geobacter* 属細菌は、水田と底泥土壌において、畑・森林土壌より優占度が有意に高いことがわかった。これらの結果から、*Anaeromyxobacter* 属, *Geobacter* 属細菌は、水田だけではなく嫌気的な環境下の土壌において優占している可能性が示された。また、水田土壌は、土壌 1g あたりの細菌の rRNA の検出量が他の環境の土壌より有意に多く、最も高密度に細菌が存在していることも明らかとなった。これらのことから、特に水田土壌において他の環境より *Anaeromyxobacter* 属, *Geobacter* 属細菌に代表される *Deltaproteobacteria* 綱細菌が密に存在している可能性が示された。

## 5.3 水田土壌における *Deltaproteobacteria* 綱細菌による還元的窒素循環反応

第2章・第3章において、新潟水田土壌では *Deltaproteobacteria* 綱細菌が亜硝酸還元以外の還元的窒素循環反応に大きく寄与していることが示唆された。また、第4章に示したように、新潟以外の水田土壌においても *Anaeromyxobacter* 属, *Geobacter* 属細菌が優占していた。このことから、第4章において水田土壌、畑・雑草地・森林土壌、底泥を対象としたメタゲノム解析を行い、水田土壌において還元的窒素循環反応に *Deltaproteobacteria* 綱細菌が寄与していることの普遍性を検証した。その結果、本研究において対象とした4カ所の水田全てにおいて、*Deltaproteobacteria* 綱細菌が還元的窒素循

環反応に大きく寄与している可能性が確認できた (Figure 5.1.)。また、第 2 章・第 3 章における新潟水田土壌のメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析と同様に、*Deltaproteobacteria* 綱の中では *Anaeromyxobacter* 属, *Geobacter* 属細菌が優占しており、ほとんどの遺伝子とほとんどの土壌サンプルにおいて、それらは凡そ 50%以上の割合を占めることも確認できた (Figure 5.2.)。

これらの結果から、一般的にどの水田土壌においても *Anaeromyxobacter* 属, *Geobacter* 属細菌に代表される *Deltaproteobacteria* 綱細菌が還元的窒素循環反応に大きく寄与している可能性が示された。

#### 5.4 *Anaeromyxobacter*, *Geobacter* 属細菌は窒素循環反応の活性を有するのか

本研究により、*Deltaproteobacteria* 綱細菌の中でも特に *Anaeromyxobacter* 属, *Geobacter* 属細菌が還元的窒素循環反応に大きく関与している可能性が明らかとなった。新潟水田土壌においてはメタゲノム・メタトランスクリプトーム双方を行ったため、遺伝子を保有しているだけでなく、それらが転写されていることまで明らかになった。そこで、実際にそれらの細菌は様々な窒素循環反応の活性を持っているのかについて文献的に調べた。ここでは、窒素循環反応に関わる遺伝子のうち、特にそれらの細菌の優占が見られた  $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 、 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$ 、 $\text{N}_2 \rightarrow \text{NH}_4^+$  の 4 経路の活性についての知見を Table 5.1. に示した。

$\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$  の反応を担う Nor の活性は、*Anaeromyxobacter* 属, *Geobacter* 属細菌において未だ報告されていなかった。これらの細菌は、脱窒菌において高頻度に保存されているアクセサリープロテインを含んだ *nor* オペロン(*norCBQD*)を有していない。しかしながら、アクセサリープロテインを持たない *norB* を保有していた(Zumft, 2005)。また、*Anaeromyxobacter* 属, *Geobacter* 属細菌由来の *nor* 転写産物も本研究において多数検出されている。これらのことから、*Anaeromyxobacter* 属, *Geobacter* 属細菌由来の *norB* は NO

$\rightarrow\text{N}_2\text{O}$  反応を触媒できる可能性が高いと考えられた。脱窒の最終ステップの反応 ( $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ) を担う Nos の活性は、*Anaeromyxobacter* 属細菌において報告されている(*Geobacter* 属細菌は *nos* を保有していない)。また、DNRA 反応 ( $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$ ) を担う Nrf の活性も、*Anaeromyxobacter* 属・*Geobacter* 属細菌双方において報告されている。しかしながら、窒素固定反応 ( $\text{N}_2 \rightarrow \text{NH}_4^+$ ) を担う Nif の活性は、*Geobacter* 属細菌のみで報告されており (Table 5.1., 5.2.)、*Anaeromyxobacter* 属細菌については不明である。そこで、活性が報告されている *Geobacter* 属細菌や既知の窒素固定菌と、*Anaeromyxobacter* 属細菌の Nif 遺伝子クラスタ構造の比較を行った。その結果、窒素固定活性が報告されている *Geobacter metallireducens*、*Geobacter sulfurreducens*、*Geobacter daltonii*、*Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5、*Anaeromyxobacter* sp.K は極めて相溶性の高いクラスタ構造を持っており、1.2. において示したニトロゲナーゼの機能単位全てをコードする遺伝子 (*nifD*, *nifK*, *nifH*) を保有していることがわかった (Figure 5.3.)。また、*Anaeromyxobacter* 属細菌の *nif* 転写産物も本研究において多数検出されている。これらのことから、*Anaeromyxobacter* 属細菌も窒素固定活性を持つ可能性が高いと考えられた。

以上のことから、本研究により様々な窒素循環反応への関与が示唆された *Anaeromyxobacter* 属、*Geobacter* 属細菌は、それらの反応について活性を持つ可能性が極めて高いことが示唆された。

## 5.5 *Anaeromyxobacter*, *Geobacter* 属細菌による還元的窒素変換経路

本研究では、*Anaeromyxobacter* 属細菌由来の脱窒に関わる機能遺伝子(*nar*, *nor*, *nos*)とその転写産物が検出された (第 3 章, 第 4 章)。しかしながら、*Anaeromyxobacter* 属細菌は亜硝酸還元酵素遺伝子(*nir*)を保有していないため、*nir* とその転写産物は全く検出されなかった。つまり、*Anaeromyxobacter* 属細菌は Typical な脱窒菌と異なり、 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$  の経路は駆動できるが  $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$  の経路は駆動できない (Figure 5.4.)。で

は、同属細菌は $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ の経路によって生成された $\text{NO}_2^-$ を放出してしまうのだろうか。そこで、アンモニア生成型亜硝酸還元酵素遺伝子である *nrf* の役割を考えたい。*nrf* は、 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_3$  の経路を駆動する鍵酵素遺伝子である。*Anaeromyxobacter* 属細菌はこの遺伝子を保有しており、多く転写していることが本研究により確認された。このことから、*Anaeromyxobacter* 属細菌は自ら硝酸還元によって生成した $\text{NO}_2^-$ を $\text{NH}_3$ に変換している可能性と、他の硝酸還元菌やアンモニア酸化菌が生成した $\text{NO}_2^-$ を $\text{NH}_3$ に変換している可能性が考えられた (Figure 5.5A.)。また、*Anaeromyxobacter* 属細菌由来の *nif* とその転写産物も本研究において高頻度に検出された (第 3 章, 第 4 章)。*nif* は、 $\text{N}_2 \rightarrow \text{NH}_3$  の経路を駆動する鍵酵素遺伝子である。このことから、*Anaeromyxobacter* 属細菌は、自ら生成した $\text{N}_2$ を $\text{NH}_3$ に変換しており、 $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2 \rightarrow \text{NH}_3$  という経路を駆動している可能性と、大気由来の $\text{N}_2$ や他の脱窒菌によって生成された $\text{N}_2$ を固定している可能性が考えられた (Figure 5.6A.)。

本研究では、*Anaeromyxobacter* 属細菌と同様に *Geobacter* 属細菌由来の脱窒に関わる機能遺伝子(*nar*, *nor*)とその転写産物が検出された (第 3 章, 第 4 章)。その一方で、*Geobacter* 属細菌は亜硝酸還元酵素遺伝子(*nir*)や一酸化二窒素還元酵素遺伝子(*nos*)を保有していないことを裏付けるように、*nir*, *nos* とその転写産物は全く検出されなかった。つまり、*Geobacter* 属細菌も Typical な脱窒菌と異なり、 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$  の経路を駆動できるが、 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$  の経路を駆動できないのである (Figure 5.4.)。しかしながら本研究では、*Geobacter* 属細菌も先述した *Anaeromyxobacter* 属細菌と同様に  $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_3$  の経路を駆動する鍵酵素遺伝子である *nrf* を多く転写していた。つまり、*Geobacter* 属細菌も自ら硝酸還元によって生成した $\text{NO}_2^-$ を $\text{NH}_3$ に変換している可能性と、他の硝酸還元菌やアンモニア酸化菌が生成した $\text{NO}_2^-$ を $\text{NH}_3$ に変換している可能性が考えられた (Figure 5.5B.)。また、*Geobacter* 属細菌由来の *nif* は多く発現されているため、*Geobacter* 属細菌は $\text{N}_2 \rightarrow \text{NH}_3$ の経路を駆動していると考えられた。しかしながら、上述したように

同属細菌は、 $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$  の経路を駆動できない。そのため、*Geobacter* 属細菌は *Anaeromyxobacter* 属細菌とは異なり、自ら生成した  $\text{N}_2$  ではなく大気由来の  $\text{N}_2$  や他の脱窒菌によって生成された  $\text{N}_2$  のみを固定していることが考えられた。また、*Geobacter* 属細菌のような *nor* を保有するが *nos* は保有しない細菌によって生成された  $\text{N}_2\text{O}$  を、*Anaeromyxobacter* 属細菌が  $\text{N}_2$  に還元している可能性も考えられた(**Figure 5.6B.**)。このように、*Anaeromyxobacter*, *Geobacter* 属細菌は Typical な脱窒菌とは異なるセットの脱窒遺伝子を保有しており、脱窒反応、アンモニア酸化反応、および大気から供給された  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$  を用いて **Figure 5.6** に示した経路を駆動している可能性が考えられた。

では、*nir* を保有しない *Anaeromyxobacter*, *Geobacter* 属細菌は、どこを発生源とする  $\text{NO}$  を用いて  $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$  という経路を駆動しているのだろうか。これまでの研究から、DNRA、硝化の過程、および L-arginine 等の含アミノ基化合物の脱アミノ反応において  $\text{NO}$  が生成されることが明らかとなっている(Smith and Zimmermann, 1981; Vermeiren *et al.*, 2009; Davidson *et al.*, 2000; Son and Rosazza, 2000)。微生物が関与する反応以外にも、水田土壤中に豊富に存在する二価鉄と亜硝酸によって三価鉄と  $\text{NO}$  が化学的に生成されることも報告されている (Brons *et al.*, 1991)。もちろん、脱窒反応における副産物としても  $\text{NO}$  は生成されるが、 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$  反応の鍵酵素遺伝子である *nir* のみを保有し  $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$  反応の鍵酵素遺伝子である *nor* を保有しない細菌は極めて少ないことが報告されている (Graf *et al.*, 2014)。そのため、脱窒経路において  $\text{NO}$  が放出される可能性は低いと考えられる。それにも拘らず、畑や森林など様々な土壌において  $\text{NO}$  フラックスは検出されている (Davidson *et al.*, 1997, Hou *et al.*, 2003)。これらのことから、 $\text{NO}$  は脱窒経路以外に上述した各種の反応から供給され、*Anaeromyxobacter*, *Geobacter* 属細菌はそれらを利用している可能性が考えられた(**Figure 5.7.**)。

このように、*Anaeromyxobacter*, *Geobacter* 属細菌は、これまで多く研究されてきた脱窒菌とは異なる経路(**Figure 5.7.**)を駆動するために脱窒関連遺伝子を保有、発現しているこ



とが考えられた。また、これまで水田において主に鉄還元を行っていると考えられてきた *Anaeromyxobacter*, *Geobacter* 属細菌は、還元的窒素循環反応によって  $\text{NH}_3$  を生成する経路(Figure 5.8.)を駆動している可能性が考えられた。これらの細菌は、世界的に水田において最も優占している種であり、これら由来の還元的窒素循環反応遺伝子とその転写産物が水田土壌から高頻度に検出されることは本研究において示した(第2章, 第3章, 第4章)。そのため、これらの細菌は水田土壌において  $\text{NH}_3$  生成に大きく寄与しており、水田の窒素肥沃度を維持するために極めて重要な役割を担っていることが考えられた。

## 5.6 *Deltaproteobacteria* 網細菌由来の還元的窒素循環関連遺伝子は

### なぜ今まで検出されてこなかったのか

これまで水田土壌における脱窒反応は、Typical な脱窒細菌である *Alpha*-, *Beta*-, *Gammaproteobacteria* 網細菌が主に担っており、窒素固定反応は *Cyanobacteria* 門の光合成細菌、*Alpha*-, *Beta*-, *Gammaproteobacteria* 網や *Actinobacteria* 門の根圏細菌および根粒菌が主に担っていると考えられてきた(Ishii *et al.*, 2011; Mårtensson *et al.*, 2009)。また、水田土壌における DNRA 反応は知見が乏しく、これまでに単離されてきた DNRA 細菌は多くが *Gammaproteobacteria* 網や *Firmicutes* 門細菌であった(Rütting *et al.*, 2011)。

しかしながら本研究から、水田土壌や他の嫌気環境において、脱窒反応の一部、DNRA 反応、窒素固定反応は主に *Deltaproteobacteria* 網細菌が担っている可能性が示唆された。そこで、これまで多く用いられてきた PCR ベースの手法では、何故 *Deltaproteobacteria* 網細菌が見落とされてきたのかを考えたい。

第2章において示した様に、脱窒反応の中で最終ステップである  $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$  の反応に関与する *nosZ*、窒素固定に関与する *nifH* とそれらの転写産物は、従来の PCR ベースの手法では *Deltaproteobacteria* 網細菌由来のものがほとんど検出されなかった。一方で、DNRA 反応に関与する *nrfA* は、水田以外の環境において従来の PCR ベースの手法を用

いて *Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の遺伝子が検出されている。

そこで本研究では、まず *nosZ*, *nrfA*, *nifH* をターゲットとした PCR プライマーと遺伝子配列との相同性を確認した (Table 5.3. -5.5.)。 *Deltaproteobacteria* 由来の *nosZ* 配列は、従来用いられていたプライマー (Throbäck *et al.*, 2004) とのミスマッチは多かったが、Jones らによって改良されたプライマー (Jones *et al.*, 2013) とのミスマッチは少なかった (Table 5.3.)。しかしながら、改良されたプライマーを用いても *Anaeromyxobacter* 属細菌由来の *nosZ* だけは増幅出来ないことが報告されている (Jones *et al.*, 2013)。 *Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の *nrfA* 配列と従来の reverse プライマーは相同性が高かったが、forward プライマーは相同性が低かった。特に、Welsh らによって改良されたプライマーにおいても *Geobacter* 属細菌由来の *nrfA* 配列との相同性は低いままであった。 *Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の *nifH* 配列は、従来用いられていたプライマー (Mohan *et al.*, 2004; Welsh *et al.*, 2014; Poly *et al.*, 2001) とのミスマッチが少なかった (Table 5.4.- 5.5.)。実際、クローンライブラリ解析から *Geobacter* 属細菌由来の *nifH* が検出された例もある (Mårtensson *et al.*, 2009)。これらのことから、 *Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の窒素循環関連遺伝子が検出されてこなかった理由の 1 つとしてプライマーのミスマッチが考えられるが、それだけではない可能性が考えられた。

高 GC 含量の塩基配列は PCR において増幅されにくいため、GC 含量は考慮すべき点であると考えられる。そこで、次に GC 含量について検証した。 *Deltaproteobacteria* 綱細菌、DNRA 駆動細菌、窒素固定細菌の *norB*, *nosZ*, *nrfA*, *nifH*, 16S rRNA, ゲノム全体のそれぞれの GC 含量について比較した (Table 5.6.)。これまで、水田土壌において 16S rRNA をターゲットとした PCR 解析が行われ、 *Anaeromyxobacter* 属、 *Geobacter* 属が多く検出されてきた。これらの属の 16S rRNA の GC 含量は、他の細菌と比較して大きな差が見られなかった。しかしながら、特に *Anaeromyxobacter* 属細菌は、16S rRNA 以外の全ての遺伝子において他の細菌より顕著に GC 含量が高いことがわかった。先述した様に、

ミスマッチの少ない Jones らのプライマーを用いても *Anaeromyxobacter* 属細菌由来の *nosZ* は増幅出来ないことが報告されている。これらのことから、高 GC 含量のため PCR 増幅しにくいというバイアスによって、本研究で多く検出された *Deltaproteobacteria* 綱細菌がこれまでの PCR ベースの解析手法では見落とされてきた可能性が考えられた。

## 5.7 今後の展望

本研究では、水田土壌における窒素循環反応に関わる微生物群集を解析するために、メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析法を用いた。その結果、これまでに見落とされてきた *Deltaproteobacteria* 綱細菌が還元的窒素循環を主導する可能性が示された。本研究では、*Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の還元的窒素循環関連遺伝子が多く検出され、それらが転写されていることまでは確認できた。また、**Figure 5.4., 5.8.**に示したような新たな窒素循環経路を同綱細菌が担っている可能性が示唆された。しかしながら、実際に環境中においてこれらの細菌はどの程度活性を持ち還元的窒素循環を担っているのかは不明である。そのため、**Figure 5.4., 5.8.**に示した様な反応を実際に *Anaeromyxobacter* 属、*Geobacter* 属細菌は行うのかを分離菌株を用いて検証する必要がある。

このように、メタゲノム・メタトランスクリプトーム解析法は、その解析によって明らかとなったことを検証する必要があるものの、新たな研究を展開するための基礎的知見を探索するツールとして強力である。そのため、これらの反応を活性レベルで証明し、水田土壌において *Anaeromyxobacter* 属、*Geobacter* 属細菌はその窒素肥沃度維持に大きく貢献していることを裏付けたいと考える。

## 参考文献

Bazylnski DA, Dean AJ, Schöler D, Phillips EJ, Lovley DR. (2000) N<sub>2</sub>-dependent growth and nitrogenase activity in the metal-metabolizing bacteria, *Geobacter* and *Magnetospirillum* species. Environ Microbiol. 2:266-273.

Brons HJ, Hagen WR, Zehnder AJB. (1991) Ferrous iron dependent nitric oxide production in nitrate reducing cultures of *Escherichia coli*. Arch Microbiol. 155:341-347.

Davidson EA, and Kinglerlee W. (1997) A global inventory of nitric oxide emissions from soils. Nutrient cycling in Agroecosystems. 48:37-50.

Davidson EA, Keller M, Erickson HE, Verchot LV, Veldkamp E. (2000) Testing a conceptual model of soil emissions of nitrous and nitric oxides. BioScience. 50:667-680.

Graf DR, Jones CM, Hallin S. (2014) Intergenomic Comparisons Highlight Modularity of the Denitrification Pathway and Underpin the Importance of Community Structure for N<sub>2</sub>O Emissions. PLoS One. 9:e114118.

Ishii S, Ikeda S, Minamisawa K, Senoo K. (2011) Nitrogen cycling in rice paddy environments: past achievements and future challenges. Microbes Environ. 26:282-292.

Jones CM, Graf DR, 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.

Mårtensson L, Diez B, Wartainen I, Zheng W, El-Shehawy R, Rasmussen U. (2009) Diazotrophic diversity, *nifH* gene expression and nitrogenase activity in a rice paddy field in Fujian, China. Plant Soil. 325:207-218.

Méthé BA, Webster J, Nevin K, Butler J, Lovley DR. (2005) DNA microarray analysis of nitrogen fixation and Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. Appl Environ Microbiol. 71:2530-2538.

Mohan SB, Schmid M, Jetten M, Cole J. (2004) Detection and widespread distribution of the *nrfA* gene encoding nitrite reduction to ammonia, a short circuit in the biological nitrogen cycle that competes with denitrification. FEMS Microbiol Ecol. 49:433-443.

Nevin KP, Holmes DE, Woodard TL, Covalla SF, Lovley DR. (2007) Reclassification of *Trichlorobacter thiogenes* as *Geobacter thiogenes* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 57:463-466.

Poly F, Monrozier LJ, Bally R. (2001) Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. Res Microbiol. 152:95-103.

Riederer-Henderson MA, Wilson PW. (1970) Nitrogen fixation by sulphate-reducing bacteria. J Gen Microbiol. 61:27-31.

Smith MS, and Zimmermann K. (1971) Nitrous oxide production by nondenitrifying soil nitrate reducers. Soil Sci Soc Am J. 45:865-871.

Steppe TF, Paerl HW. (2002) Potential N<sub>2</sub> fixation by sulfate-reducing bacteria in a marine intertidal microbial mat. *Aquat Microb Ecol.* 28:1-12.

Son JK, and Rosazza JP. (2000) Cyclic guanosine-3', 5'-monophosphate and biopteridine biosynthesis in *Nocardia* sp. *J Bacteriol.* 182:3644-3648.

Sung Y, Fletcher KE, Ritalahti KM, Apkarian RP, Ramos-Hernández N, Sanford RA, Mesbah NM, Löffler FE. (2006) *Geobacter lovleyi* sp. nov. strain SZ, a novel metal-reducing and tetrachloroethene-dechlorinating bacterium. *Appl Environ Microbiol.* 72: 2775-2782.

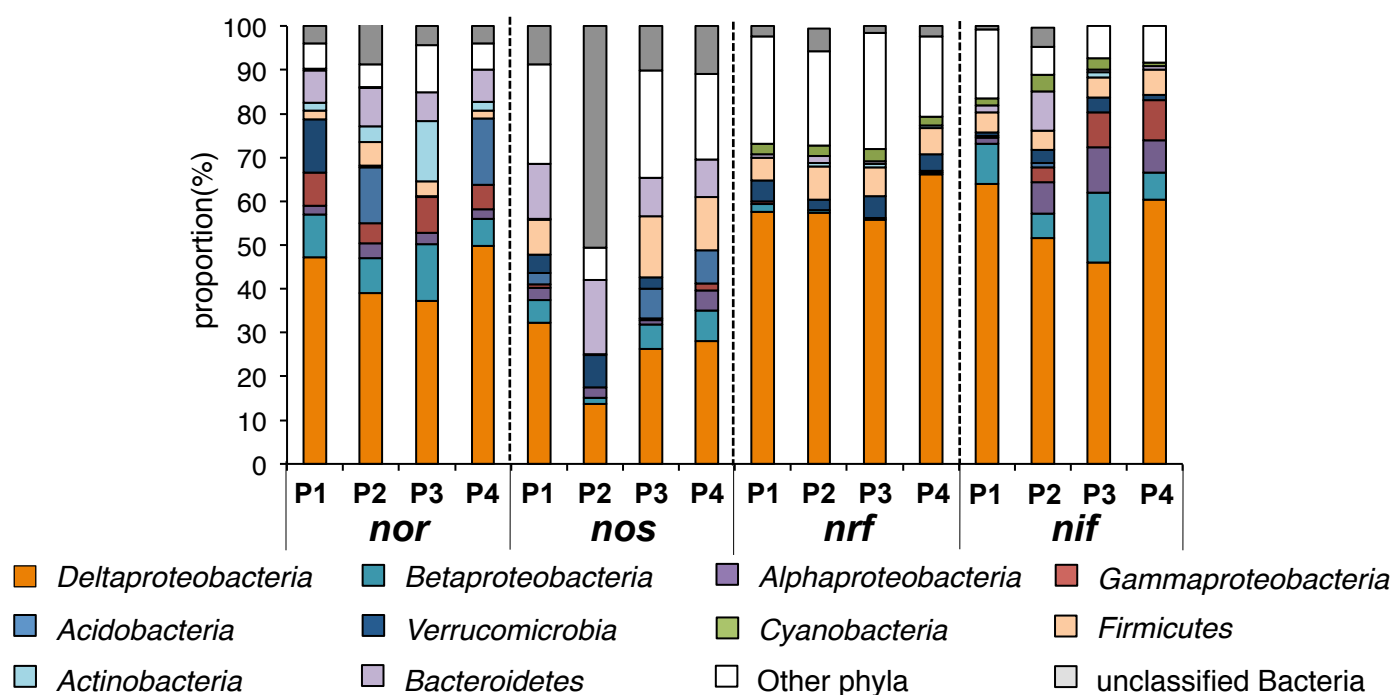
Tago K, Ishii S, Nishizawa T, Otsuka S, Senoo K. (2011) Phylogenetic and functional diversity of denitrifying bacteria isolated from various rice paddy and rice-soybean rotation fields. *Microbes Environ.* 26:30-35.

Throbäck IN, Enwall K, Jarvis A, Hallin S. (2004) Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol Ecol.* 49:401-417.

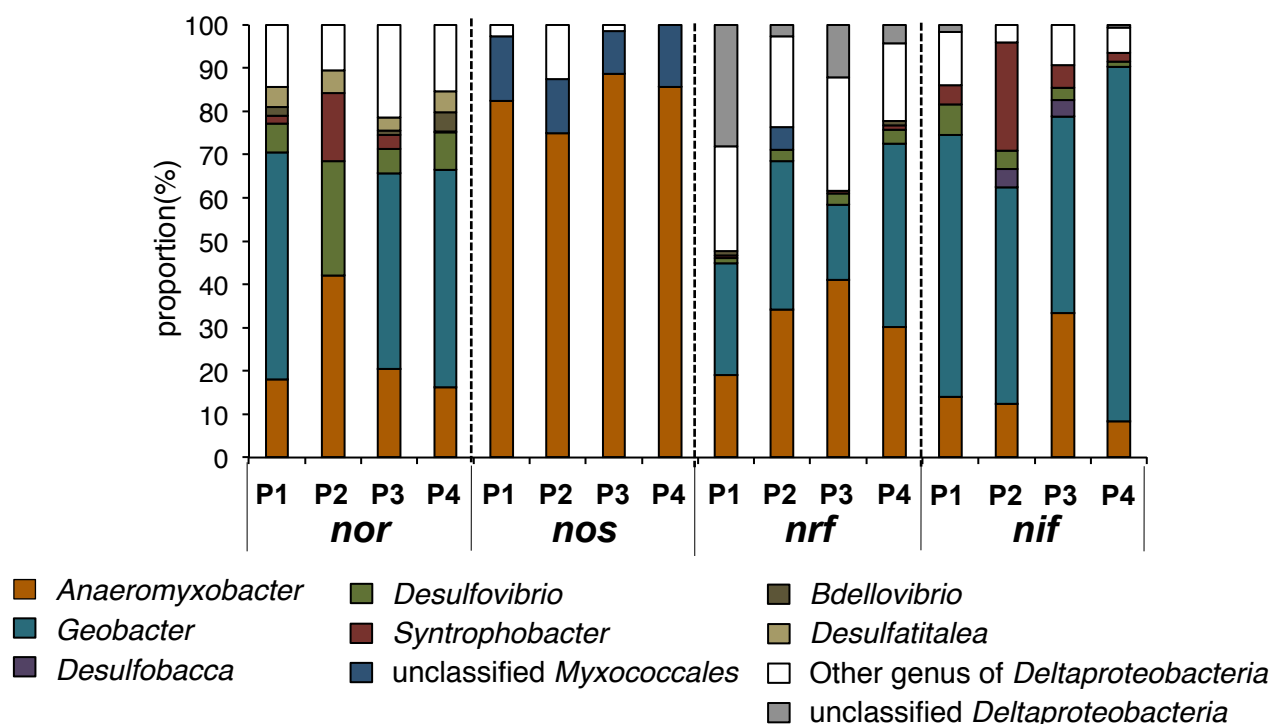
Vermeiren J, Wiele TV, Verstaete W, Boeckx P, Boon N. (2009) Nitric oxide production by the human intestinal microbiota by dissimilatory nitrate reduction to ammonium. *J Biomed Biotechnol.* 2009:284718.

Welsh A, Chee-Sanford JC, Connor LM, Löffler FE, Sanford RA. (2014) Refined NrfA phylogeny improves PCR-based *nrfA* gene detection. *Appl Environ Microbiol.* 80:2110-2119.

Yamazaki T, Yoshida N, Wada E, Matsuo S. (1987) N<sub>2</sub>O reduction by *Azotobacter vinelandii* with emphasis on kinetic nitrogen isotope effects. Plant Cell Physiol. 28:263-271.



**Figure 5.1.** The composition of genes relevant to denitrification (*nor*; *nos*), nitrite reduction to ammonium(*nrf*) and nitrogen fixation(*nif*) assigned bacterial phyla in metagenome in paddy soils of Hokkaido(P1), Niigata(P2), Ibaraki(P3) and Aichi(P4). Most dominant bacterial phylum, Proteobacteria, was classified and shown at the class level as *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, and *Delta*-proteobacteria. Data is shown as mean value of three replicates. Data is shown as mean value of three replicates.



**Figure 5.2.** The composition of genes relevant to denitrification (*nor*; *nos*), nitrite reduction to ammonium(*nrf*) and nitrogen fixation(*nif*) assigned Deltaproteobacterial genera in metagenome in paddy soils of Hokkaido(P1), Niigata(P2), Ibaraki(P3) and Aichi(P4). Data is shown as mean value of three replicates.



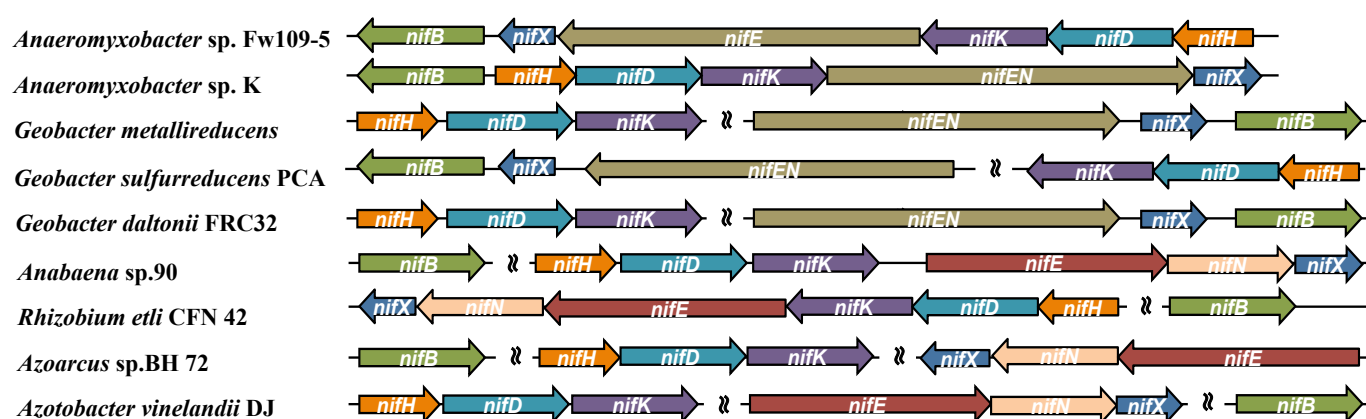
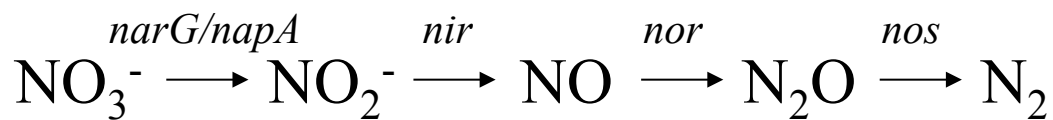
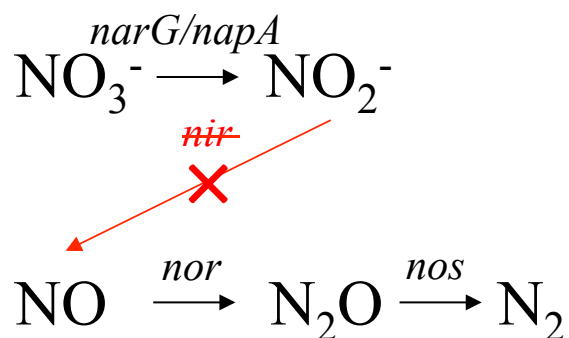


Figure 5.3. Nif gene clusters conserved in genome of *Anaeromyxobacter* spp. and diazotrophs.

### Typical denitrifier



### RNT player (*Anaeromyxobacter*)



### RNT player (*Geobacter*)

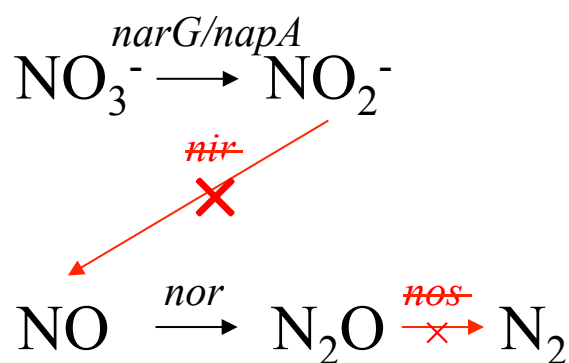
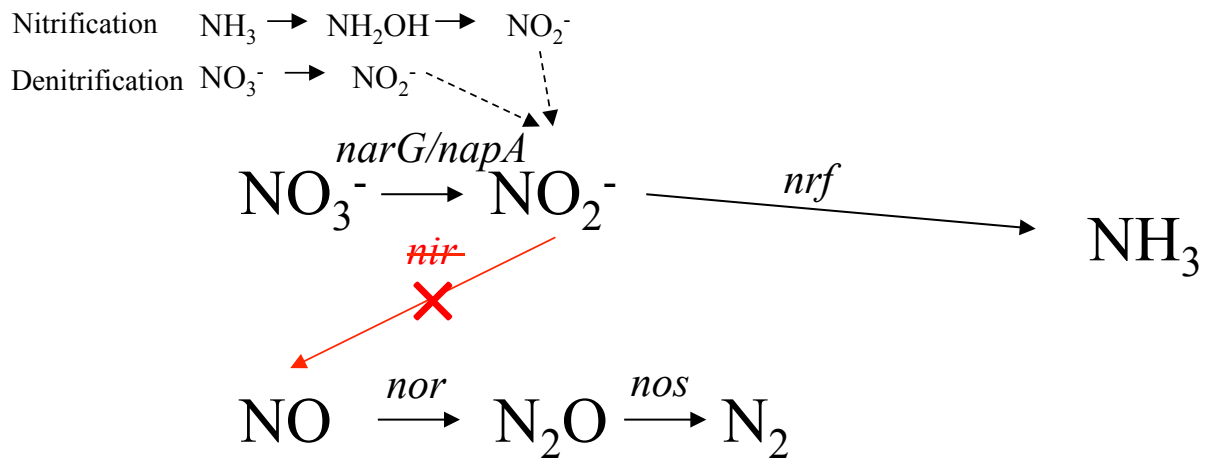


Figure 5.4. Pathways involving denitrification.

(A)

**RNT player (*Anaeromyxobacter*)**



(B)

**RNT player (*Geobacter*)**

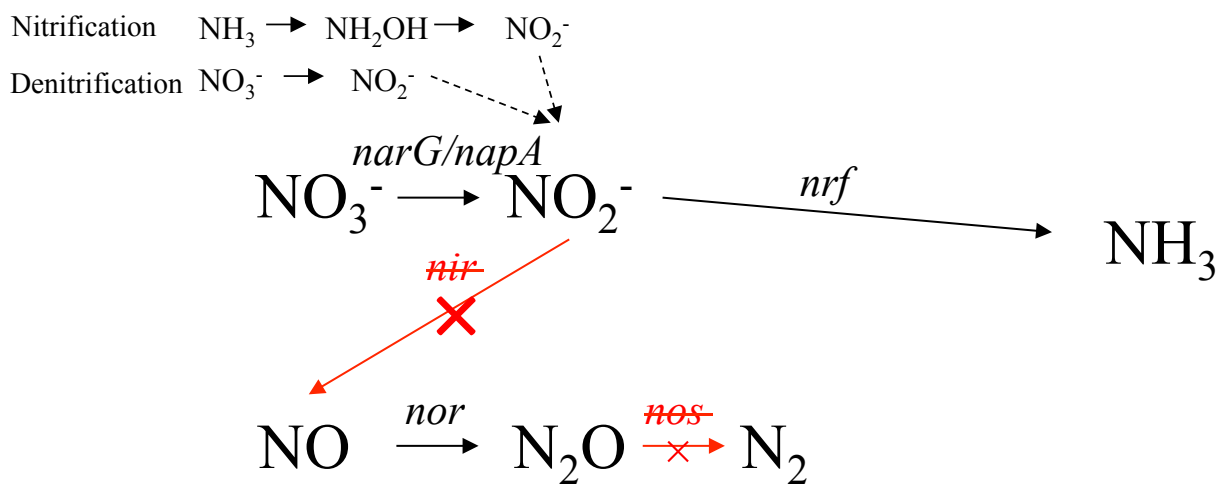
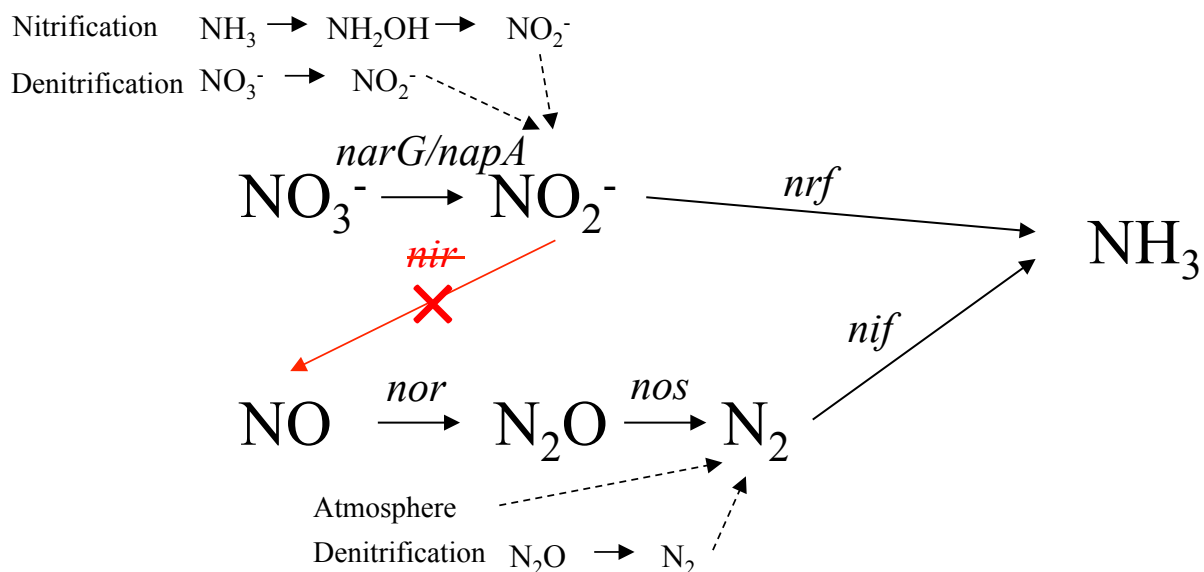


Figure 5.5. Pathways involving denitrification and DNRA(A, *Anaeromyxobacter*; B, *Geobacter*).

(A)

**RNT player (*Anaeromyxobacter*)**



(B)

**RNT player (*Geobacter*)**

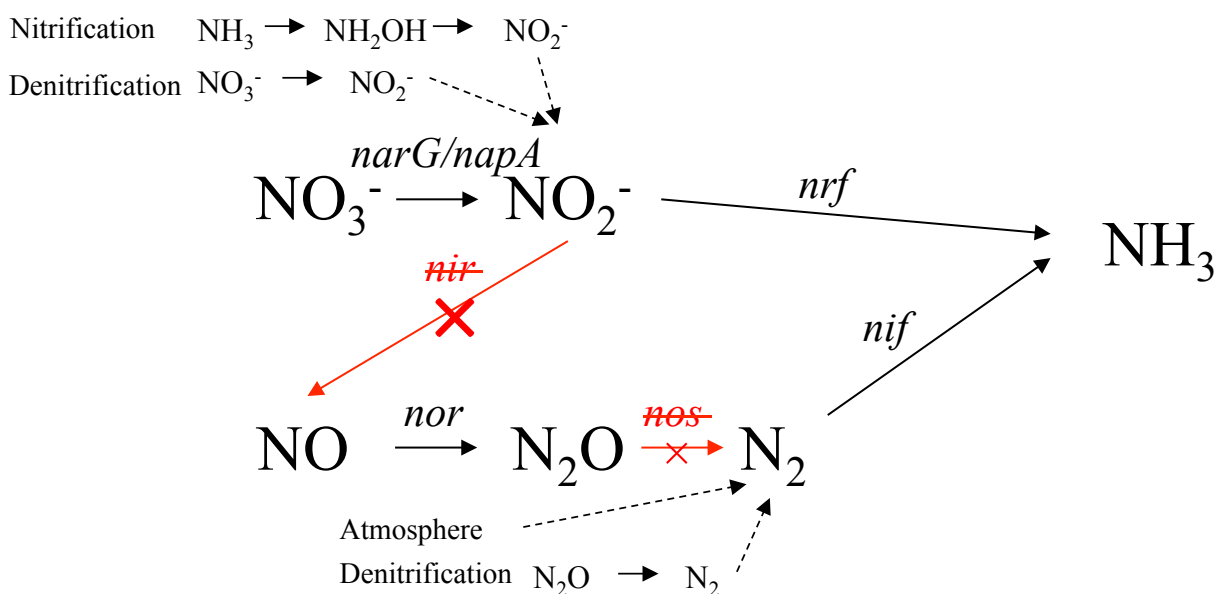
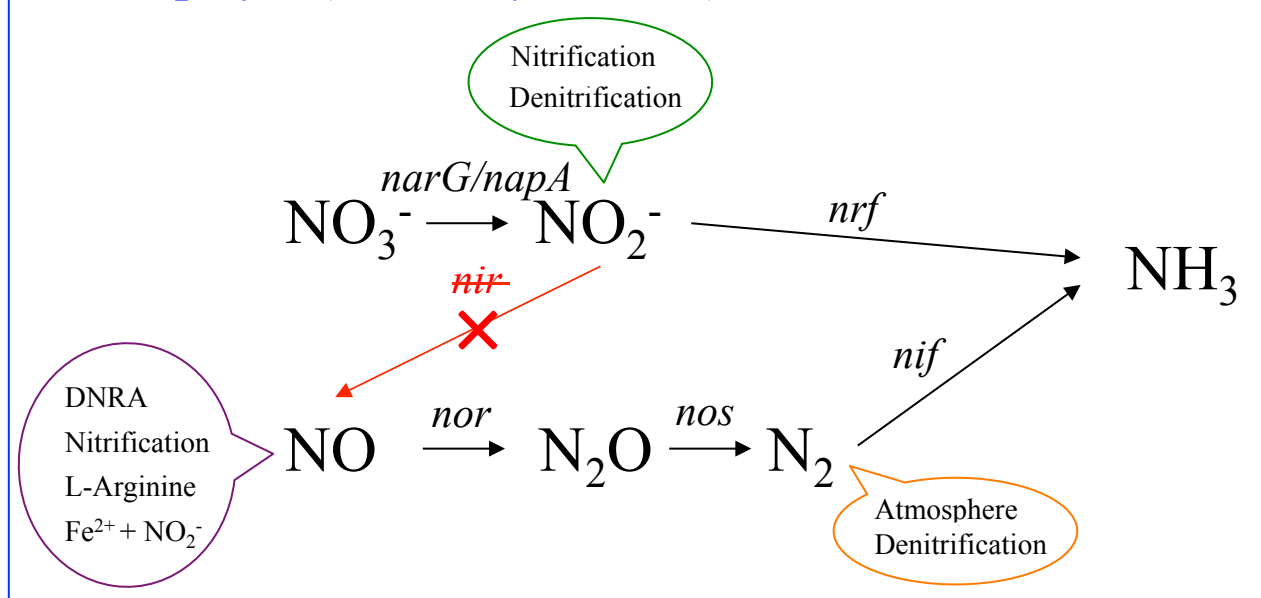


Figure 5.6. Pathways involving reductive nitrogen transformations (A, *Anaeromyxobacter*; B, *Geobacter*).

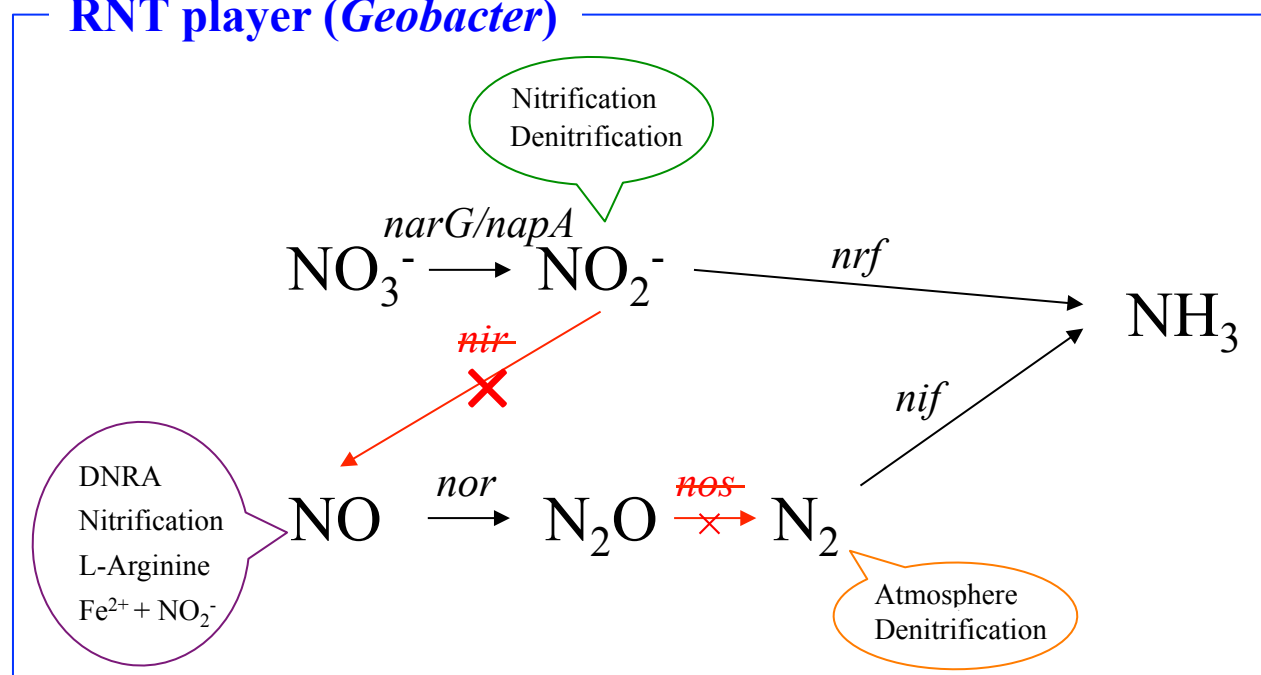
(A)

**RNT player (*Anaeromyxobacter*)**



(B)

**RNT player (*Geobacter*)**



**Figure 5.7.** Pathways involving reductive nitrogen transformations (A, *Anaeromyxobacter*; B, *Geobacter*).

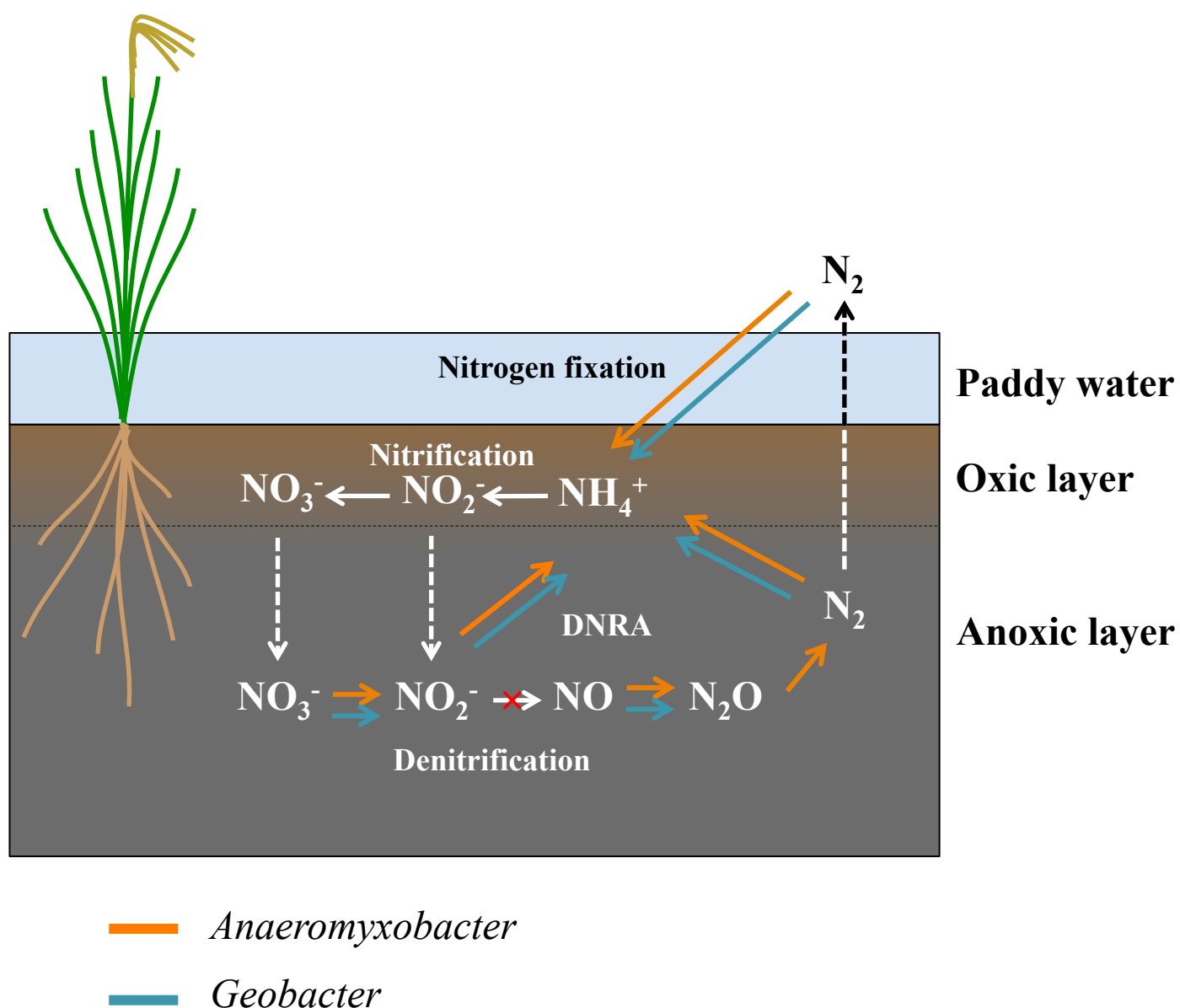


Figure 5.8. Overview of nitrogen transformations in rice paddy soils.

**Table 5.1. Reductive nitrogen transformation activities of *Geobacter* sp. and *Anaeromyxobacter* sp. reported in previous studies.**

Organisms	References reporting reductive nitrogen transformation activities			
	Nor NO → N <sub>2</sub> O	Nos N <sub>2</sub> O → N <sub>2</sub>	DNRA NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> → NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Nitrogen fixation N <sub>2</sub> → NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
<i>Geobacter</i>	ND <sup>a</sup>	— <sup>b</sup>	Sung <i>et al.</i> , 2006; Nevin <i>et al.</i> , 2007	Bazylnski <i>et al.</i> , 2000; Methe <i>et al.</i> , 2005; in this study
<i>Anaeromyxobacter</i>	ND <sup>a</sup>	Sanford <i>et al.</i> , 2012	Sanford <i>et al.</i> , 2002	ND <sup>a</sup> ,

<sup>a</sup> ND, no data.

<sup>b</sup> None of *Geobacter* spp. harbor *nos* in their genome.

**Table 5.2. Acetylene reduction activity of *Geobacter* species reported in previous studies and this study.**

<i>Geobacter</i> species	Reference
<i>Geobacter metallireducens</i>	Bazylnski <i>et al.</i> , 2000
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Methe <i>et al.</i> , 2005
<i>Geobacter daltonii</i>	in this study

**Table 5.3. The core position of the forward and reverse primers of *nosZ* from *Deltaproteobacteria* and other denitrifier.**

Phylum/Proteobacterial class	Organisms	nosZ661b <sup>a</sup>	nosZ1622R <sup>a</sup>	nosZ-II-F <sup>b</sup>	nosZ-II-R <sup>b</sup>
		CGGYTGGGGSMMWKACCAA	CGCRASGGGAASAAGGTSCG	CTIGGICCIYTKCAYAC	GYACVGAITTYTGYTCIGC
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-C	GGGCTACGGCTACGACGA	CGCAAGGGGACCAGGTGCT	CTGGGCCGCTCCACAC	GCACGAACCTTCTGCTCCGC
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-1	GGGCTACGGCTACGACGA	CGCAAGGGGAACAGGTGCT	CTGGGCCCTCTCCACAC	GCACGAACCTTCTGCTCCGC
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Anaeromyxobacter</i> sp.Fw109-5	GGGCTACGGCTACGACGA	CGCAAGGGAAACAGGTGCT	CTGGGCCCTTCCACAC	GCACGAACCTTCTGCTCCGC
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Anaeromyxobacter</i> sp.K	GGGCTACGGCTACGACGA	CGCAAGGGCAACAGGTGCT	CTGGGCCGCTGCACAC	GCACGAACCTTCTGCTCCGC
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Thioalkalivibrio nitratireducens</i> DSM 14787	CGGCTGGGGCAAGACCAA	CGCGACGGCAACAAGGTCCG	CTGGGCCGCTACACAC	GCAGCTGGTTCTGCCACGC
<i>Epsilonproteobacteria</i>	<i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740	GGGCTATGGGTTTGATGA	TGCAACGGGTGTACGTGAT	CTGGGTCCACTGCATAC	GCACCGAGTTCTGCTCAGC
<i>Firmicutes</i>	<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> ATCC 51507	TGGGTATGGCTGACGGC	CGGATGGCAATAATGTCA	TAGGGCCACTGCATAC	GCACCAACTTCTGCTCCGC
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	CGGCTGGGGCCAGACCAA	CGCGACGGCAACAAGGTGCG	CTGGGCCGCTGCATAC	GCTACTGGTTCTGCCACGC
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	CGGCTGGGGCCAGACCAA	CGTGACGGCAACAAGGTCCG	CTGGGCCATTGCACAC	GCACCTGGTTCTGCCATGC
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17025	CGGCTGGGGAAGACCAA	CGCGACGGCAACAAGGTCCG	CTGGGCCGCTGCACAC	GCACGTTCTTCTGCCATGC
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Azoarcus</i> sp.BH 72	GGGCTGGGGCATCACCAA	CGCGACGGCAAGAAGGTCA	CTGGGCCGCTGCACAC	GCACCCACTTCTGCCACGC

<sup>a</sup> Throback *et al.*, 2004

<sup>b</sup> Jones *et al.*, 2013



**Table 5.4. The core position of the forward and reverse primers of *nrfA* from *Deltaproteobacteria* and other DNRA microbes.**

		nrfA-F1 <sup>a</sup>	nrfA-R1 <sup>a</sup>	nrfAF2aw <sup>b</sup>
Phylum/Proteobacterial class	Organisms	GCNTGYTGGWSNTGYAA	GAYTGycAYATGCCNSA	CARTGYCAYGTBGARTA
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-1	ACCTGCGGCAAGTGCCA	GACTGCCACATGCCGTA	CAGTGCCACGTGAGTA
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-C	ACCTGCGGCAAGTGCCA	GACTGCCACATGCCGTA	CAGTGCCACGTGAGTA
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Anaeromyxobacter</i> sp.Fw109-5	ACCTGCGGCAAGTGCCA	GACTGCCACATGCCCTA	CAGTGCCACGTGAGTA
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Anaeromyxobacter</i> sp.K	ACCTGCGGCAAGTGCCA	GACTGCCACATGCCGTA	CAGTGCCACGTGAGTA
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Geobacter pickeringii</i> G13	TCCTGCTCACCTGCAA	GACTGCCACATGCCGTA	CAGTGCCACGTACCTA
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Geobacter sulfurreducens</i> KN400	TCCTGCTCACCTGCAA	GACTGCCACATGCCCTA	CAGTGCCACGTACCTA
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Geobacter</i> sp.M21	GCCTGCTCACCTGCAA	GACTGCCACATGCCCTC	CAATGCCACGTACCTA
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Geobacter bemidjensis</i> Bem	GCCTGCTCACCTGCAA	GACTGCCATATGCCGAT	CAGTGCCACGTACCTA
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Geobacter metallireducens</i> GS-15	GTCTGCTCACCTGCAA	GACTGTCTATGCCCTA	CAGTGCCACGTACCTA
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Geobacter lovleyi</i> SZ	GCCTGTCTGACCTGCAA	GACTGCCATATGCCGTA	CAGTGCCATGTACCTA
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Geobacter daltonii</i> FRC-32	ATATGCCGGTGATGAAA	GACTGCCATATGCCGGT	CAGTGTCATGTGGAATA
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Miyazaki F	ACCTGTGGAACTGCAA	GACTGCCACATGTCGTA	CAGTGCCACGTGGAATA
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> MPOB	GTGTGCCCTGCTCTGCAA	GACTGTACATGCCCTA	CAGTGCCACGTACCTA
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides cellulosilyticus</i> ASM 131834v1	ACCTGTGGACATGTAA	GATTGCCACATGCCTTA	CAGTGCCACGTGGAATA
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	GCTTGCTGGAGCTGTAA	GACTGTCTATATGCCCTA	CAGTGTCACGTTGGAATA
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Escherichia coli</i> K-12 MG 1655	GCATGCTGGAGTTGTAA	GACTGCCATATGCCAAA	CAGTGCCATGTGGAGTA
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Thioalkalivibrio nitratreducens</i> DSM 14787	ATGGGGGGGTTTCGGG	GACTGCCACATGCCCAA	CAGTGCCACGTGGAGTA
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Salmonella enterica</i> , serovar Typhimurium SL 1344	GCCTGCTGGAGTTGTAA	GACTGCCACATGCCGAA	CAGTGCCACGTGGAGTA
<i>Epsilonproteobacteria</i>	<i>Sulfurospirillum deleyianum</i> DSM 6946	GGGTGTTGGACATGTAA	GATTGTCTATATGCCCTA	CAGTGTCACGTTGAGTA
<i>Epsilonproteobacteria</i>	<i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740	GCCTGCTGGACTTGCAA	GATTGCCATATGCCCTA	CAGTGCCATGTGGAGTA
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium acetivum</i> ASM 104271v1	TCTTGTTAGCTTGTA	GATTGCCATATGCCAGA	CAATGCCACGTTGAGTA
<i>Firmicutes</i>	<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> ATCC 51507	TCTTGTGGACCTGTAA	GATTGCCATATGCCTTA	CAATGTCTACGTTGGAATA

<sup>a</sup> Mohan *et al.*, 2004

<sup>b</sup> Welsh *et al.*, 2014

**Table 5.5. The core position of the forward and reverse primers of *nifH* from *Deltaproteobacteria* and diazotrophs.**

Phylum/Proteobacterial class	Organisms	polF <sup>a</sup>	polR <sup>a</sup>	AQER <sup>a</sup>
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Anaeromyxobacter</i> sp.Fw109-5	TGCGAYCCSAARGCBGACTC	TCCGGYGARATGATGGCSAT	CAGGARATCTACATCGTC
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Anaeromyxobacter</i> sp.K	TGCGATCCCAAGGCCGACTC	TCCGGCGAGATGATGGCCAT	GAGGAGATCTACATCGTG
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Geobacter pickeringii</i> G13	TGCGACCCCAAGGCCGACTC	TCCGGCGAGATGATGGCCAT	GAGGAGATCTACATCGTC
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Geobacter sulfurreducens</i> KN400	TGCGATCCCAAGGCCGATTCT	TCCGGCGAGATGATGGCCAT	GAGGAGATCTACATCGTC
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Geobacter</i> sp.M21	TGCGACCCCAAGGCCGACTC	TCCGGCGAGATGATGGCGAT	GAGGAGATCTACATCGTC
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Geobacter bemidjensis</i> Bem	TGCGACCCCTAAGGCCGACTC	TCCGGCGAGATGATGGCCAT	GAGGAGATCTACATCGTC
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Geobacter metallireducens</i> GS-15	TGCGACCCCAAGGCCGACTC	TCCGGCGAGATGATGGCCAT	GAGGAGATCTACATCGTC
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Geobacter lovleyi</i> SZ	TGCGACCCCAAGGCCAGACTC	TCCGGCGAAATGATGGCCAT	GAGGAGATCTACATCGTC
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Geobacter daltonii</i> FRC-32	TGCGACCCCAAGAGCGATTCT	TCCGGCGAGATGATGGCCAT	GATCATGTCTTTACCGTT
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Miyazaki F	TGCGACCCCAAGGCCGACTC	TCCGGCGAGATGATGGCCAT	GAGGAGATCTACATCGTG
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i> HRM2	TGTGATCCCAAGCAGGATTCT	TCCGGAAGAGTTTATGTCCAT	GACAGGGTCTATGTGGTG
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfobacca acetoxidans</i> DSM 11109	TGTGATCCCAAGGCCGACTC	TCCGGTGAGATGATGGCCAT	AAGGAGATCTACATCGTC
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> MPOB	TGCGATCCCAAGCGGATTCT	TCCGGCGAGATGATGGCCAT	CGCGAGATCTACATCGTG
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfomonile tiedjei</i> DSM 6799	TGCGATCCCAAGCAGATTCT	TCCGGCGAAATGATGGCCAT	CAAGAGATCTTACATGTCT
<i>Epsilonproteobacteria</i>	<i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740	TGCGATCCCTAAGCGGATTCT	TCTGGAGAGATGATGGCGAT	CAAGAGATCTATCGTT
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium acetivum</i> ASM 104271v1	TGTGACCCAAAGGCCGATTCT	AGTGGTGAGCTAATGGCTTT	CAAGAAATCTACATGTT
<i>Firmicutes</i>	<i>Desulfotobacterium dehalogenans</i> ATCC 51507	TGCGATCCCAAGCGGATTCT	TCCGGAGAGATGATGTCCAT	GATGTGGTTTTATAATT
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122	TGTGACCCCTAAGCTGACTC	TCAGGTGAAATGATGGCGAT	CAAGAAATCTACATCGTG
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Anabaena</i> sp. 90	TGCGATCCCTAAGCTGACTC	TCAGGTGAAATGATGGCGAT	CAAGAAATCTACATCGTT
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	TGCGACCCCTAAGCTGACTC	TCTGGTGAAATGATGGCGAT	CAAGAAATCTACATCGTT
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	TGTGACCCCTAAGCTGATTCT	TCCGGGGAATGATGGCGAT	CAAGAAATCTACATCGTA
<i>Actinobacteria</i>	<i>Frankia</i> sp. CeI 3	TGCGACCCCAAGCCGACTC	TCCGGCGAGATGATGGCGAT	CAGGAGATCTACATCGTC
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	TGCGATCCGAAAGCCGACTC	TCTGGTGAAATGATGGCAAT	CAGGAGATCTACATCGTG
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	TGCGATCCGAAAGCCGACTC	TCCGGTGAGATGATGGCGCT	CAGGAAATCTACATCGTC
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	TGCGACCCGAAAGCCGACTC	TCCGGCGAGATGATGGCGCT	CAGGAGATCTACATCGTG
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF 303099	TGCGACCCGAAAGCCGACTC	TCCGGCGAGATGATGGCGCT	CAGGAAATCTACATCGTC
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Azospirillum thioophilum</i> ASM 130559v1	TGCGACCCGAAAGCCGACTC	TCCGGCGAGATGATGGCGCT	CAGGAAATCTACATCGTC
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17025	TGCGACCCCAAGGCCGACTC	TCCGGCGAGATGATGGCGCT	CAGGAAATCTACATCGTC
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Azoarcus</i> sp.BH 72	TGCGACCCGAAAGCTGACTC	TCCGGCGAAATGATGGCCAT	CAGGAAATCTACATCGTC
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> ASM 104094v1	TGCGATCCCAAGCTGACTC	TCCGGCGAGATGATGGCCAT	CAGGAAATCTACATCGTG
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Methylobacterium denitrificans</i> FJG 1	TGCGACCCCTAAGCCGATTCT	TCCAGCGAGATGATGGCTAT	CAAGAAATTTATCGTT
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ	TGTGACCCGAAAGCTGACTC	TCCGGTGAGATGATGGCCAT	CAGGAAATCTACATCGTC
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342	TGCGATCCGAAAGCCGACTC	TCCGGCGAGATGATGGCGAT	CAGGAGATCTACATCGTC

<sup>a</sup> Poly *et al.*, 2001

**Tabel 5.6. GC content of *nosZ*, *nrfA*, *nifH*, 16S rRNA gene, and genome of *Deltaproteobacteria*, other DNRA microbes, and diazotrophs.**

Phylum/Proteobacterial class	Organisms	GC content %						Accession No.
		<i>norB</i>	<i>nosZ</i>	<i>nrfA</i>	<i>nifH</i>	16S rRNA	genome	
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-1	71.2	67.4	70.1	-	58.6	74.8	CP001359
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-C	71.2	67.4	69.6	-	58.6	74.9	NC007760
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Anaeromyxobacter</i> sp.Fw109-5	70.6	67.2	68.6	67.4	58.6	73.5	CP000769
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Anaeromyxobacter</i> sp.K	71.1	67.2	70.1	67.8	58.5	74.4	CP001131
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Geobacter pickeringii</i> G13	66.0	-	65.6	61.6	56.4	62.3	CP009788
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Geobacter sulfurreducens</i> KN400	-	-	62.1	60.8	55.9	61.0	CP002031
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Geobacter</i> sp.M21	60.6	-	61.8	61.8	55.0	60.5	CP001661
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Geobacter bemidjiensis</i> Bem	59.6	-	61.0	61.7	55.1	60.3	CP001124
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Geobacter metallireducens</i> GS-15	65.1	-	61.9	58.1	56.4	59.6	CP000148
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Geobacter lovleyi</i> SZ	-	-	49.8	54.4	54.2	54.8	CP001089
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Geobacter daltonii</i> FRC-32	55.5	-	54.5	59.5	54.7	53.5	CP001390
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Miyazaki F	-	-	61.3	62.2	57.4	67.1	CP001197
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i> HRM2	-	-	-	53.5	52.2	48.8	CP001087
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfobacca acetoxidans</i> DSM 11109	-	-	-	53.7	55.7	52.9	CP002629
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> MPOB	56.6	-	59.1	58.9	57.0	59.9	CP000478
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfomonile tiedjei</i> DSM 6799	50.0	53.7	-	50.8	55.9	50.1	CP003360
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides cellulosilyticus</i> ASM 131834v1	-	-	47.6	-	50.5	42.7	CP012801
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	-	-	44.9	-	54.8	45.9	NC004347
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Escherichia coli</i> K-12 MG 1655	-	-	52.3	-	54.4	50.8	NC000913
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Thioalkalivibrio nitratireducens</i> DSM 14787	61.0	64.7	62.6	-	56.3	66.5	CP003989
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Salmonella enterica</i> , serovar Typhimurium SL 1344	-	-	54.0	-	54.4	52.2	NC016810
<i>Epsilonproteobacteria</i>	<i>Sulfospirillum deleyianum</i> DSM 6946	-	-	40.7	-	49.2	39.0	CP001816
<i>Epsilonproteobacteria</i>	<i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740	-	48.3	49.0	49.0	51.7	48.5	BX571656
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium acetivum</i> ASM 104271v1	-	-	40.3	37.5	54.5	35.3	CP009687
<i>Firmicutes</i>	<i>Desulfotobacterium dehalogenans</i> ATCC 51507	45.9	47.4	50.2	53.6	53.9	45.0	CP003348
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122	-	-	-	42.3	53.7	38.8	CP003659
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Anabaena</i> sp. 90	-	-	-	44.1	53.3	38.1	CP003284
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	-	-	-	47.4	53.9	41.3	BA000019
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	-	-	-	45.1	54.5	38.0	CP000806
<i>Actinobacteria</i>	<i>Frankia</i> sp. CcI 3	-	-	-	64.1	60.4	70.1	CP000249
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	59.8	60.9	-	55.0	55.6	63.7	AP012206
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	60.6	60.4	-	58.2	55.4	62.0	NC003047
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	58.9	-	-	59.8	55.7	61.3	CP000133
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF 303099	-	-	-	60.5	56.1	62.5	BA000012
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Azospirillum thiophilum</i> ASM 130559v1	62.7	-	-	64.3	57.8	68.2	CP012401
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17025	62.9	65.0	-	63.8	56.0	68.5	CP000661
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Azoarcus</i> sp.BH 72	63.8	64.7	-	62.6	55.5	67.9	AM406670
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> ASM 104094v1	-	-	-	61.7	53.5	63.4	CP011930
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Methylomonas denitrificans</i> FJG 1	55.1	-	-	49.3	53.3	51.7	CP011476
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ	-	-	-	59.0	55.8	65.7	CP001157
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342	61.1	-	-	58.2	54.7	57.3	CP003200

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成26年度博士課程進学  
氏 名 増田 曜子  
指導教員名 妹尾 啓史

論文題目 水田土壌の窒素循環を担う微生物群集の  
オミクス法を用いた網羅的解析

### 第1章 序論

湛水下の水田土壌においては、田面水によって大気中の酸素が供給されにくくなり、鉛直方向に酸素濃度の勾配が生じる。田面水に接する表層土壌は比較的高い酸素濃度が保たれ酸化的な環境（酸化層）が維持される一方、表層土よりも下層では酸素濃度が著しく低い嫌氣的な環境（還元層）が発達する。嫌氣的環境下では、土壌中の窒素循環に関わる各還元反応、すなわち、硝酸や亜硝酸が一酸化二窒素や窒素ガスに還元される脱窒、硝酸がアンモニアに還元されるアンモニア生成型硝酸還元(Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium, DNRA)、窒素ガスがアンモニアに変換される窒素固定が活発に進行する。この水田土壌で特徴的に見られる活発な還元的窒素循環反応が、畑土壌では見られない「硝酸の低溶脱」「窒素肥沃度の維持」といった水田土壌の環境保全性ならびに持続的生産性の基柱と考えられている。したがって、これらの反応を駆動する微生物群を明らかにすることは、学術的に重要であるのみならず、環境負荷が少なく持続的な農業生産につながる知見が得られると期待される。

水田土壌の還元的窒素循環に関わる微生物群を明らかにするために、土壌 DNA を用い各反応の機能遺伝子を PCR 増幅して微生物の多様性を推定する手法がこれまでに多く用いられてきた。しかしながら、近年急速に拡充されつつある微生物ゲノム解読により、還元的窒素循環関連遺伝子はこれまでよりもはるかに広範な分類群の微生物に保存されていることが明らかとなっている。このことから、従来の PCR ベースの解析手法では、プライマーのミスマッチにより多様性を著しく過少評価してしまう可能性が指摘されている。こうした問題を回避し網羅的な解析を行うため、PCR を介さないメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析法（オミクス法）が用いられるようになってきた。水田土壌においてもオミクス解析が導入されるようになってきたものの、データ量が小

規模である上、還元的窒素循環反応にフォーカスしその詳細を議論した研究例は無く、これらの反応を担う微生物に関する包括的な理解は未だ達成されていない。

そこで本研究では、水稻栽培期間の水田土壌の酸化層や還元層について大規模なオミクス解析を行い、水田土壌において特徴的な還元的窒素循環反応（脱窒、DNRA、窒素固定）に焦点をあて、それら機能遺伝子量・転写量ならびに多様性・局在を解析し、水田土壌の活発な還元的窒素循環反応の駆動力となる微生物群の全貌解明を試みた。

## 第 2 章 新潟水田土壌における還元的窒素循環反応に関わる微生物群集の概観

新潟県農業総合研究所内の水田において、2012 年の湛水直後から収穫後にかけての 5 つの時期（湛水直後・2 週間後・中干し前・間断灌漑期・落水期）に土壌コアを採取した。還元層が最も発達する中干し前の土壌の酸化層・酸化層直下・還元層（X 層・Y 層・Z 層）の位置を土色に基づいて決定し、他の時期の土壌についても同位置を分取した。土壌の還元の進行の指標となる  $\text{Fe}^{2+}$  濃度は湛水期の Z 層において最も高く、分取が適切であったことが示された。分取した全ての土壌から RNA を抽出し、次世代シーケンサーに供して塩基配列を取得し、各データベースに対して相同性検索を行った。

rRNA 配列情報に基づく土壌の細菌群集構造解析の結果、全ての時期において *Deltaproteobacteria* 綱細菌が優占していた。中でも、最も還元状態が発達する湛水期の Z 層土壌においては嫌気性細菌の *Anaeromyxobacter* 属、*Geobacter* 属細菌、好気的環境となる落水期においては好気性細菌の *Chondromyces* 属、*Sorangium* 属細菌が優占していることが明らかになった。

一方、本解析で得られた mRNA の配列数が少数であったことから、窒素循環反応に関わる微生物群集構造の解析は全てのサンプルから得られた配列をまとめて行った。硝酸還元は *Alpha-*、*Beta-*、*Deltaproteobacteria* 綱細菌、亜硝酸還元は *Thaumarchaeota* 門古細菌・*Betaproteobacteria* 綱細菌、一酸化窒素還元と一酸化二窒素還元は *Deltaproteobacteria* 綱細菌由来の mRNA が高頻度に検出された。また、DNRA 遺伝子の mRNA については、古くから DNRA 細菌として見出されてきた *Firmicutes* 門や *Gammaproteobacteria* 綱細菌由来のものではなく、*Deltaproteobacteria* 綱細菌由来のものが高頻度に検出された。さらに、窒素固定遺伝子の mRNA については、従来法でもよく検出されてきた光合成細菌や根圏細菌由来もののだけでなく、*Deltaproteobacteria* 綱細菌由来のものも高頻度に検出された。これらの結果から、水田土壌では *Deltaproteobacteria* 綱細菌が脱窒、DNRA、窒素固定に関与している可能性が示された。

### 第 3 章 新潟水田土壌のメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析

第 2 章において見出された *Deltaproteobacteria* 綱細菌の還元的窒素循環反応への関与をより詳細に解析・検証するために、湛水期ならびに落水期の X 層、Z 層土壌を解析対象とし、メタゲノム解析とともに土壌サンプルあたりのシーケンス量を増やしたメタトランスクリプトーム解析を行った。

脱窒反応（亜硝酸→一酸化窒素→一酸化二窒素→窒素ガス）の各ステップを触媒する亜硝酸還元酵素、一酸化窒素還元酵素、一酸化二窒素還元酵素の各遺伝子（*nir*, *nor*, *nos*）とその転写産物を調べたところ、*nir* は脱窒菌としてよく知られた *Alpha*-, *Beta*-, *Gammaproteobacteria* 綱細菌由来のものが検出された一方、*nor* や *nos* はこれまでの研究ではほとんど検出例がない *Deltaproteobacteria* 綱の *Anaeromyxobacter* 属と *Geobacter* 属細菌由来のものが脱窒菌由来のものよりも極めて高頻度に検出された。これらのことから水田土壌における脱窒反応は、亜硝酸還元を行う細菌群（従来の脱窒菌）だけで完結するのではなく、一酸化窒素還元、一酸化二窒素還元を行う *Anaeromyxobacter* 属や *Geobacter* 属細菌が部分的に関与することによって「協奏的に」進行していることがはじめて示唆された。

DNRA の鍵酵素遺伝子とその転写産物についても、*Anaeromyxobacter* 属と *Geobacter* 属細菌由来のものが高頻度に検出された。さらに驚くべきことに、古くから水田の主要な窒素固定細菌として考えられてきた光合成細菌の窒素固定遺伝子よりも、これまではほとんど検出例のない *Anaeromyxobacter* 属と *Geobacter* 属細菌の窒素固定遺伝子の方がはるかに高頻度に転写されていることが明らかとなった。これらのことから *Anaeromyxobacter* 属と *Geobacter* 属細菌が DNRA や窒素固定によってアンモニアを生成している可能性が高く、*Anaeromyxobacter* 属と *Geobacter* 属細菌が水田土壌の窒素肥沃性の維持に寄与していることがはじめて示唆された。

### 第 4 章 全国の水田土壌、畑・雑草地・森林土壌、底泥のメタゲノム解析

第 2 章・第 3 章では、新潟水田土壌において *Anaeromyxobacter* 属と *Geobacter* 属細菌が還元的窒素循環反応を主導している可能性を示した。第 4 章では、水田を含む様々な環境の土壌を解析対象とし、新潟水田において示された知見の一般性を確認した。

土壌サンプルとして、日本全国の 4 カ所の水田土壌、4 カ所の畑・雑草地・森林土壌、4 カ所の底泥を用いた。これら土壌中の *Anaeromyxobacter* 属と *Geobacter* 属細菌の 16 rRNA 遺伝子量を定量 PCR 法により調べた。また各土壌から DNA を抽出しメタゲノム解析を行った。

定量 PCR の結果から、*Anaeromyxobacter* 属と *Geobacter* 属細菌は畑・雑草地・森林土壌

よりも水田土壌や底泥において優占度が高いことが明らかになった。メタゲノム解析の結果から、脱窒、DNRA、窒素固定に関わる遺伝子の検出頻度は、水田が最も高く、続いて底泥、畑・雑草地・森林土壌であった。また、一酸化窒素還元、一酸化二窒素還元、DNRA、窒素固定に関わる遺伝子の群集構造については、畑・雑草地・森林土壌と比較して水田土壌や底泥において *Anaeromyxobacter* 属、*Geobacter* 属細菌の優占度が高かった。これらのことから、還元的窒素循環反応は水田土壌においてポテンシャルが高く、新潟水田以外の水田土壌や底泥においても、*Anaeromyxobacter* 属や *Geobacter* 属細菌がこれらの反応のキープレイヤーである可能性が示された。

## 第5章 総合考察

本研究により、*Anaeromyxobacter* 属や *Geobacter* 属細菌が水田土壌の脱窒、DNRA、窒素固定反応を主導している可能性が示された。*Anaeromyxobacter* 属と *Geobacter* 属細菌はこれまで水田土壌に普遍的に優占する鉄還元菌であることが知られているが、従来の PCR ベースの解析において、環境中からこれら鉄還元菌の還元的窒素循環関連遺伝子が検出された例はほとんどない。これら鉄還元菌の還元的窒素循環関連遺伝子について、従来 PCR ベースの解析で用いられてきたプライマーのミスマッチを調べたところ、顕著なミスマッチがないものも見つかった。そこで GC 含量を調べたところ、これら鉄還元菌の窒素固定遺伝子は他の細菌由来の遺伝子に比べて GC 含量が高く、PCR 増幅されにくいことが考えられた。ミスマッチのないプライマーを用いても *Anaeromyxobacter* 属細菌の一酸化二窒素還元酵素遺伝子は増幅されないことも報告されている。このことから、水田土壌中に優占しているにも関わらず *Anaeromyxobacter* 属と *Geobacter* 属細菌の還元的窒素循環関連遺伝子が検出されてこなかった理由として、プライマーのミスマッチだけでなく、GC 含量の高さが考えられた。なお、これまでに *Anaeromyxobacter* 属や *Geobacter* 属細菌はほとんどの還元的窒素循環反応において活性を保有することが報告されている。したがって、*Anaeromyxobacter* 属や *Geobacter* 属細菌が実際に土壌中の還元的窒素循環反応において活性を発揮している可能性は高い。

本研究は、水田土壌の窒素循環を駆動する微生物群集構造に関する知見を大きく刷新し、生態系における *Anaeromyxobacter* 属や *Geobacter* 属細菌の新たな機能を提唱するものである。これまで水田土壌の優占種でありながら還元的窒素循環反応への関与がほとんど議論されてこなかった鉄還元菌こそが、脱窒反応の一部を担って亜硝酸や窒素ガスを生成し、DNRA や窒素固定によってアンモニアを生成している可能性が高く、それらが水田土壌の硝酸溶脱の低減や窒素肥沃度の維持に大きく寄与していることが示唆された。

## 謝辞

本論文は、筆者が東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻博士課程における研究成果をまとめたものである。同専攻 妹尾啓史教授には、本研究を進めるにあたり、終始にわたり多大なるご助言、ご指導をいただいた。ここに深謝の意を表する。また、研究全般を通じて貴重なご助言をいただいた、伊藤英臣博士（産業総合研究所北海道センター）、大塚重人准教授、磯部一夫助教に感謝の意を表する。

新潟県農業総合研究所ならびに、白鳥豊博士（新潟県農業総合研究所主任研究員）には、年間を通した土壌サンプリングにおいてご協力をいただき、浅川晋教授（名古屋大学大学院生命農学研究科）、秋山博子博士（農業環境技術研究所）、長谷川利弘博士（農業環境技術研究所）には土壌サンプルをご提供いただいた。また、嫌気培養のプロトコルは山田千早博士（京都大学大学院生命化学研究科）に、アセチレン還元活性の測定は青野俊裕助教（東京大学生物生産工学研究センター）にご教授いただいた。ここに感謝の意を表する。最後に、東京大学農学部土壌圏科学研究室の各位に多くの協力をいただいた。ここに感謝の意を表する。