

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310050

研究課題名(和文)新規微生物反応の制御による環境低負荷型畜産排水処理技術

研究課題名(英文)Low environmental load technology for liquid livestock waste based on control of novel reactions mediated by microorganisms

研究代表者

細見 正明 (Hosomi, Masaaki)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90132860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円、(間接経費) 4,590,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では畜舎廃棄物を曝気した液肥を施肥した飼料イネ水田における脱窒性メタン酸化細菌の定量・活性と利用可能性を評価した。脱窒性メタン酸化細菌の検出プライマーを開発し、その量と存在部位を明らかにした。次に、水・施肥管理を制御する新しい栽培方法を提案し、温室効果ガスであるメタンおよび亜酸化窒素の大幅な削減を達成した。さらに、落水後に突発的に放出する亜酸化窒素の生成機構の解明を行った。

研究成果の概要(英文)：This study explored feasibility of harnessing denitrifying methane-oxidizing bacteria in a forage rice field as a site where aerated liquid livestock waste is supplied as a fertilizer. A PCR primer to detect and quantify these bacteria was designed, elucidating their abundances and locations in various rice paddy soils. A new strategy based on water control and the degree of liquid livestock waste dose allowed noticeable reductions of greenhouse gases, i.e. methane and nitrous oxide, from a forage rice paddy field. Furthermore, a plausible mechanism of abrupt nitrous oxide production from a rice paddy field after water drainage was elucidated.

研究分野：環境工学

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：水田 飼料イネ 畜産排水 メタン 亜酸化窒素 脱窒性メタン酸化細菌 メタン酸化細菌 プライマ

## 1. 研究開始当初の背景

平成 16 年に施行された「家畜排せつ物の管理と適正化及び利用の促進に関する法律」では、管理基準を満たすための家畜排せつ物処理施設の設置と、その処理における家畜排せつ物の適切な管理が義務付けられている。しかしながら、家畜排せつ物を適切に処理する施設を保有しない畜産農家が全体の 4 割となっているうえに、飼料の高騰などが相まって排水処理費用に回す余力が無くなってきているのが現状である。したがって、畜産排水が未処理のまま畑や牧草地へ施肥されることで、地下水の硝酸汚染や閉鎖性水域の富栄養化などの問題を引き起こしてしまう。

そこでこのような畜舎廃棄物処理に対し、水田と多収性の飼料イネに着目した。飼料イネは家畜の飼料に利用されるイネであり、食用のイネよりも高い窒素吸収性、バイオマス生産力、耐倒伏性、耐病虫害を有する特徴がある。そこで、この飼料イネ水田を利用した畜産排水処理システムの開発に取り組んできた。このシステムでは、畜産排せつ物を曝気処理した液肥 (Liquid cattle waste (LCW)) を飼料イネとして植栽した水田に高負荷に施肥することにより畜産排水の処理を行う。収穫された飼料イネは家畜飼料として利用することにより、循環的な畜産排水処理システムの構築が可能になる。

しかしながら、このシステムの課題として、高負荷施肥によるメタン ( $\text{CH}_4$ ) や亜酸化窒素 ( $\text{N}_2\text{O}$ ) といった温室効果の極めて高い 2 つのガスの放出量の増大が挙げられる。したがって、飼料イネを用いた畜産排水処理システムの構築のためには、飼料イネによる窒素吸収除去のみならず、水田土壤中に棲息する炭素・窒素循環を担う微生物群の生理生態の理解を深めることに加え、微生物の反応を考慮した温室効果ガス削減に向けた水田管理手法の構築が必要である。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、 $\text{CH}_4$  を酸化する微生物群の中でも、近年新たに代謝経路が発見された脱窒とメタン酸化を同時に行える脱窒性メタン酸化細菌の生理生態を明らかにすることを目的とした。次に、 $\text{CH}_4$  および  $\text{N}_2\text{O}$  の放出削減を行うことが可能な水田管理手法の提案と実証を行った。さらに、水田から突発的に放出される  $\text{N}_2\text{O}$  の放出メカニズムの解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 脱窒性メタン酸化細菌の検出

飼料イネを植栽した実験圃場 (茨城県つくば市農業環境技術研究所) より抽出した DNA を用い、NC10 門に属する脱窒性メタン酸化

細菌の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセットである 8F-1043R を用いたクローンライブラリーを作成した。さらに、このクローンライブラリーから NC10 門の脱窒性メタン酸化細菌を定量可能な 16S rRNA 遺伝子の新規プライマーセットの設計を遺伝子解析ソフトである *Arb* を用いて行った。新たに作成したプライマーセット 193F-616R の汎用性評価のため、カンペンセイン (ナコーンパトム、タイ) およびつくば市の実験圃場の土壌 (表層 0~5 cm) を土壌サンプラーを用いて採取した。土壌から抽出した DNA サンプルを新規設計したプライマーセットを用いて PCR による NC10 門の DNA 遺伝子を増幅し、サブクローニングにより 16S rRNA 遺伝子解析によるプライマーの選択性を評価した。

### (2) 脱窒性メタン酸化細菌の水田土壌における分布

土壌サンプルはカンペンセイン (ナコーンパトム、タイ) つくば (茨城県つくば市) 谷津田 (茨城県牛久市) 行方 (茨城県行方市) の水田土壌を用いた。それぞれ表層 0~5、5~10、10~15 cm を土壌コアサンプラーにより採取した。土壌から DNA を抽出し、193F-616R のプライマーセットを用いて Real time 定量 PCR 法により NC10 門の脱窒性メタン酸化細菌、全細菌、好気性メタン酸化細菌の定量を行った。

### (3) 脱窒性メタン反応の活性評価

100 mL ガスクロバイアルに飼料イネ水田土壌 (農業環境技術研究所) を乾燥重量にして 10 g-dw、滅菌水 20 g を分注した。また、分注した土壌に対して 21 g/ml 塩化水銀 0.6 ml を添加し滅菌処理を行った系を失活系とした。バイアルを密封し、 $\text{CH}_4$  ガスをヘッドスペースに充填させ嫌氣的雰囲気を作成した。その後、亜硝酸ナトリウムを最終濃度 7 mM になるように基質として添加し、培養を開始した。ヘッドスペースを数日おきにサンプリングし、GC/TCD で  $\text{CH}_4$  と  $\text{N}_2$  を分析し、脱窒性メタン酸化活性を追跡した。

### (4) 新規水田管理法による温室効果ガス削減

これまでの検討により、飼料イネ栽培途中に中干しを行うことにより、水田土壌が酸素に接触して  $\text{CH}_4$  の生成が抑制されることが明らかになっている。そこで、新たに「施肥前落水」という水管理方法と「後半低負荷施肥」を提案した。施肥前落水とは LCW 追肥前に落水を行う水管理であり、 $\text{CH}_4$  排出抑制を目指した。落水により水田土壌を好氣的にして、土壌中の酸化物を増加させた後に追肥を行うことで、酸化物を利用する微生物とメタン生成古細菌との間で畜産排水中の有機物を

巡り競合が起きる。この競合により CH<sub>4</sub> 排出の抑制が期待される。一方、後半低負荷施肥とは、栽培の後半に LCW の施肥量を低下させ、低い窒素負荷で管理を行う方法のことで、N<sub>2</sub>O 排出抑制を目指した。水管理方法では施肥前落水と慣行系の 2 系列、施肥方法では後半低負荷施肥と前半低負荷施肥の 2 系列をそれぞれ掛け合わせた 4 系列の検討を実験圃場（農業環境技術研究所、各 10 × 4 m）にて行った。メタンガスサンプリングでは、クローズドチャンバー法を用いて行い、直径 30 cm、高さ 30 cm の円筒型アクリル製ベースを飼料イネが 1 株入るように土壌深さ 5 cm 程度差し込んで設置し上部に蓋をかぶせることにより密閉状態を保った。また、水田土壌中の CH<sub>4</sub> をめぐる微生物の定量として、各深さにある土壌から DNA を抽出し、定量 PCR による定量を行った。さらに、これらの DNA から 16S rRNA 遺伝子の V4 領域をターゲット通したプライマーセットを用いて PCR を行い、Pyrosequencer による古細菌および細菌の菌叢評価を行った。

#### (5) N<sub>2</sub>O の放出機構の解明

N<sub>2</sub>O は好気状態で突発的に水田土壌から放出されることが観察されてきたため、水を抜く工程である落水の後の土壌表層における N<sub>2</sub>O 濃度と N<sub>2</sub>O の生成・消費に關与する酵素をコードした機能遺伝子（mRNA）の発現量を評価した。水田土壌を充填したカラムを湛水にし、模擬的な水田を調製した。NH<sub>4</sub><sup>+</sup>を 100 kg-N/ha 添加した後、落水 1 日前（-1 day）、落水直後（0 day）、6 h、12 h、1 day、2 day、3 day において、N<sub>2</sub>O および O<sub>2</sub> 濃度鉛直分布を微小電極により測定し、さらに、表層から 0~5 mm、5~10 mm の各層における mRNA（アンモニア酸化(*amoA*)、亜硝酸還元(*nirK*)、N<sub>2</sub>O 還元(*nosZ*)) の発現量を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 脱窒性メタン酸化細菌の検出

NC10 門の脱窒性メタン酸化細菌をターゲットとした既往のプライマー 8F-1043R を用いた際、*Chloroflexi* 門を主とする NC10 門以外の細菌が 80% 以上検出されることが明らかになった。したがって、既往のプライマー 8F-1043R は水田土壌に棲息する NC10 門細菌の定量には適用できないことが示唆された。設計した 193F-616R のプライマーセットを用い、クローンライブラリーを作成した結果、図 1 に示すように全てのサンプルにおいて、NC10 門に属する脱窒性メタン酸化細菌のみが検出され、偽陽性として *Chloroflexi* 門は全く検出されなかった（図 1）。このため、193F-616R は水田土壌中の NC10 門細菌の定量評価に利用できることが明らかになった。

#### (2) 脱窒性メタン酸化細菌の水田土壌における分布

水田土壌の深さごとに、NC10 門の脱窒性メタン酸化細菌、全細菌、好気性メタン酸化細菌の定量を行った結果、水田深さの違いによるそれぞれの細菌の遺伝子コピー数に大きな違いは見られなかった。また、カンペンセイン（タイ）の水田土壌において、イネ根圏土壌から採取した DNA サンプル中の NC10 門細菌および好気性メタン酸化細菌のコピー数は、同水田での他の深さ土壌と比較して、最大 0.03 倍と少ない値となった。

全細菌数に対する NC10 門細菌のコピー数は 0.001~0.8% であることが示された。更に、4 つの水田土壌全てにおいて 0~2 cm 及び 0~5 cm の表層土壌よりも、2~10、5~10 cm の方が全細菌に対する NC10 門の脱窒性メタン酸化細菌の存在割合が高くなった。イネ根圏土壌での NC10 門細菌のコピー数が少なくなった理由として、根からの滲出液の影響が考えられる。

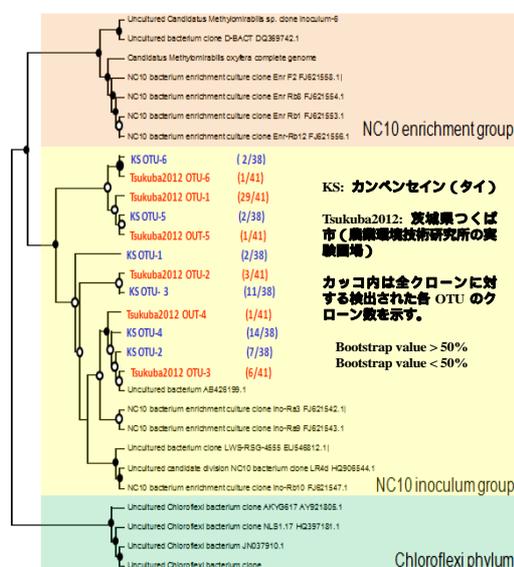


図 1 193F-616R を用いた NC10 門細菌の系統樹

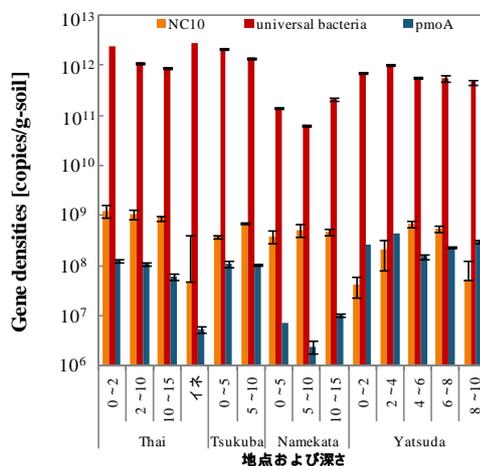


図 2 新規プライマーセット 193F-616R を用いた土壌深さにおける NC10 門の定量結果

### (3) 脱窒性メタン反応の活性の評価

脱窒性メタン酸化反応の化学量論比 ( $3\text{CH}_4 + 8\text{NO}_2^- + 8\text{H}^+ \rightarrow 3\text{CO}_2 + 4\text{N}_2 + 10\text{H}_2\text{O}$ ) を鑑みると、 $\text{CH}_4$ 消費量と窒素の比が3:4であれば、本反応の活性が検出されたと言える。しかしながら、培養30日目においてもこの比に達しておらず脱窒性メタン酸化活性の検出には至らなかった。回分試験準備途中で酸素に触れて活性を失った可能性と土壤中に棲息するこれらの細菌の活性が低いのかは、今後の調査を必要とする。

### (4) 新規水田管理法による温室効果ガス削減

栽培期間中の $\text{CH}_4$ 排出量に関しては、施肥前落水系は慣行系に比べ前半低負荷系では15%、後半低負荷系では77%の放出削減が確認された。施肥前落水という水管理に加え、後半に施肥量を少なくすることにより、大幅に $\text{CH}_4$ を削減できることが示された。 $\text{N}_2\text{O}$ 排出量は、前半低負荷を行った2系の水田からは $\text{N}_2\text{O}$ の排出を検出できたが、後半低負荷を行った2系の水田からは $\text{N}_2\text{O}$ の排出は検出されなかった。 $\text{CH}_4$ および $\text{N}_2\text{O}$ の排出総量を二酸化炭素等量で比較した場合、施肥前落水と後半低負荷施肥を組み合わせた系は、慣行の水管理と前半低負荷施肥を行った水田系と比較して84%の温室効果ガス削減率を達成した。また、この水および施肥管理の組み合わせで栽培したそれぞれの飼料イネの収量は統計的な有意差が無く、温室効果ガスを削減しつつ飼料イネの収量を維持できることが示された。このような大幅な温室効果ガス削減の理由を考察するために、土壤中のメタン酸化細菌、脱窒性メタン酸化細菌およびメタン生成古細菌の存在量を定量PCRにより評価したところ、メタン酸化を行う細菌群量は水田圃場の間で差異は確認されなかった。一方、メタン生成古細菌の量は慣行系では約3倍増加したのに対し、 $\text{CH}_4$ が大幅に削減された施肥前落水と後半低負荷を組み合わせた系ではメタン生成古細菌量が実験期間中に増加しないことが示され、 $\text{CH}_4$ 生成量とメタン生成古細菌の菌数に相関が見られた。

これらの水田においてメタン生成古細菌の量が増減したことから、群集構造に変遷があったかを評価するため、16S rRNA 遺伝子に基づく菌叢解析を行った。メタン生成古細菌の群集構造解析より、どの水田土壌においても *Methanosarcina* が最も優占した属であり、*Methanothermobacter* と *Methanocella* が次に多い属として検出された。細菌の群集構造も水田間で大きな変化は見られなかった。以上より、メタン生成古細菌や細菌の群集に大きな変化は無く、むしろ水や施肥の管理による土壌環境の変化による $\text{CH}_4$ をめぐる微生物の量や生理活性に影響を及ぼした可能性が示さ

れた。

### (5) $\text{N}_2\text{O}$ の放出機構の解明

水田土壌の落水前後の $\text{N}_2\text{O}$ 濃度の鉛直分布を図3に示す。土壌深さ5~10mmにおいて、落水から12h以降に $\text{N}_2\text{O}$ 濃度が上昇した。なお、 $\text{O}_2$ 濃度を測定した結果、5~10mmは $\text{O}_2$ の存在しない還元層であった。そこで、還元環境での $\text{N}_2\text{O}$ 生成に関する脱窒の機能遺伝子である *nirK* の mRNA 発現量の測定を実施したところ、落水から6h後にのみ高い転写量の上昇が確認された。従って、mRNAの合成と $\text{N}_2\text{O}$ 濃度増加の関連が示唆された。

次に、酸化層および還元層におけるN挙動とmRNA合成の関連を明らかにするために、それぞれの状態を模擬した培養を実施したところ、酸化系では $\text{NO}_3^-$ の生成、還元系においては $\text{N}_2\text{O}$ の生成がそれぞれ確認された。還元系における $\text{N}_2\text{O}$ 濃度の上昇は $\text{NO}_3^-$ 添加から24h後に観察された。一方、脱窒に関する各機能遺伝子の活発な転写は $\text{NO}_3^-$ 添加直後に確認された。したがって、脱窒に関する機能遺伝子の転写は、 $\text{NO}_3^-$ の存在にตอบสนองして行われることが示唆された。

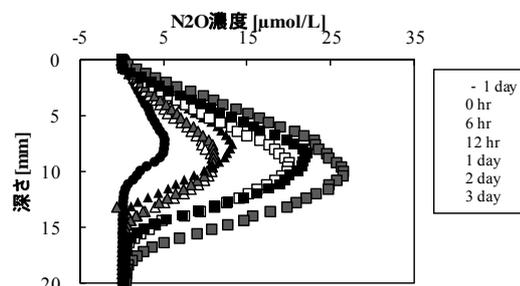


図3 落水後(0h)における水田土壌中の $\text{N}_2\text{O}$ の濃度プロファイル

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

- S. Riya, Y. Muroi, M. Kamimura, S. Zhou, A. Terada, Y. Kobara, M. Hosomi: Simultaneous reduction of  $\text{CH}_4$  and  $\text{N}_2\text{O}$  emissions from a forage rice field fertilized with high-load of livestock wastewater by water management and fertilization pattern. *Proc. Recent Advances in Pollution Control & Resource Recovery for the Livestock Farm Industry* (2013) 242-247 (査読有)
- 利谷翔平、周勝、寺田昭彦、小原裕三、細見正明: 畜産排水を多量施肥した飼料イネ水田より発生する温室効果ガスの抑制に関する研究(2012) 第15回水環境シンポジウム講演集 293-298(査読有)
- 利谷翔平、周勝、寺田昭彦、小原裕三、

細見正明：飼料イネ水田を利用した温室効果ガス低排出型畜産排水処理の開発 (2011) 第14回水環境シンポジウム講演集 253-258 (査読有)

[学会発表](計14件)

竹内裕貴、利谷翔平、寺田昭彦、細見正明：落水後の水田土壌から排出される亜酸化窒素放出機構の解明 化学工学会第79年会(2013年3月20日、岐阜大学、岐阜)

公文陽子、上村美羽、利谷翔平、細見正明、寺田昭彦：水田中に棲息する脱窒性メタン細菌の空間分布と系統学的評価 第29回日本微生物生態学会大会(2013年11月23日、鹿児島大学、鹿児島)

利谷翔平、室井友里恵、上村美羽、寺田昭彦、周勝、小原裕三、細見正明：追肥前落水が畜産排水を施肥した飼料イネ水田のCH<sub>4</sub>排出並びにCH<sub>4</sub>生成古細菌に及ぼす影響 第29回日本微生物生態学会大会(2013年11月23日、鹿児島大学、鹿児島)

S. Riya, Y. Muroi, M. Kamimura, S. Zhou, A. Terada, Y. Kobara, M. Hosomi: Simultaneous reduction of CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions from a forage rice field fertilized with high-load of livestock wastewater by water management and fertilization pattern. International Conference on Recent Advances in Pollution Control and Resource Recovery for the Livestock Farming Industry (2013年10月、Jiaxing, China)

利谷翔平、室井友里恵、上村美羽、周勝、小原裕三、寺田昭彦、細見正明：畜産排水を施肥した飼料イネ水田におけるCH<sub>4</sub>およびN<sub>2</sub>Oの同時削減-水管理と施肥方法の検討- 日本土壌肥料学会 2013年度名古屋大会(2013年9月12日、名古屋大学、愛知)

S. Riya, S. Zhou, A. Terada, Y. Kobara, M. Hosomi: Spatio-temporal analysis of nitrous oxide production and emission after drainage of flooded soil. 3rd International Conference on Nitrification (2013年9月5日、中央大学、東京)

室井友里恵、上村美羽、利谷翔平、周勝、小原裕三、寺田昭彦、細見正明：畜産排水を施肥した飼料イネ水田におけるCH<sub>4</sub>およびN<sub>2</sub>Oの同時削減の試み 化学工学会第78年会(2013年3月17日、大阪大学、大阪)

草都毕力格、周勝、利谷翔平、寺田昭彦、黒田久雄、細見正明：異なる水環境におけるAnammox反応活性の評価 第47回

日本水環境学会年会(2013年3月13日、大阪工業大学、大阪)

利谷翔平、上村美羽、周勝、寺田昭彦、小原裕三、細見正明：空間分布解析による落水後の水田における突発的な亜酸化窒素排出挙動の解明 第47回日本水環境学会年会(2013年3月13日、大阪工業大学、大阪)

上村美羽、利谷翔平、周勝、細見正明、寺田昭彦：畜産排水を施肥した飼料イネ水田のメタン放出挙動とメタンをめぐる微生物群のダイナミクス 第64回日本生物工学会大会(2012年10月26日、神戸国際会議場、兵庫)

利谷翔平、周勝、寺田昭彦、小原裕三、細見正明：畜産排水を多量施肥した飼料イネ水田より発生する温室効果ガスの抑制に関する研究 第15回日本水環境学会シンポジウム(2012年9月10日、佐賀大学、佐賀)

上村美羽、利谷翔平、周勝、細見正明、寺田昭彦：畜産排水を施肥した水田におけるメタン放出の挙動とメタン酸化細菌の関係解析 第46回日本水環境学会年会(2012年3月16日、東洋大学、東京)

利谷翔平、上村美羽、周勝、寺田昭彦、小原裕三、細見正明：畜産排水を施肥した水田における亜酸化窒素の動態とアンモニア酸化に与える遺伝子発現解析 第46回日本水環境学会年会(2012年3月16日、東洋大学、東京)

利谷翔平、周勝、寺田昭彦、細見正明：飼料イネ水田を利用した温室効果ガス低排出型畜産排水処理の開発 第14回日本水環境学会シンポジウム(2011年9月10日、東北工業大学、宮城)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

細見 正明 (HOSOMI MASA AKI)  
東京農工大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号：90132860

### (2)研究分担者

寺田 昭彦 (TERADA AKIHIKO)  
東京農工大学・大学院工学研究院・准教授  
研究者番号：30434327

### (3)研究分担者

周 勝 (ZHOU SHENG)  
東京農工大学・大学院工学研究院・助教  
研究者番号：50451985