

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510001

研究課題名(和文)堆肥化過程からのN₂O排出を支配する新規機構の解明とN₂O排出予測式の導出

研究課題名(英文)Elucidation of N₂O emission mechanism and estimation of N₂O discharge in composting process

研究代表者

宮竹 史仁(MIYATAKE, Fumihito)

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：70450319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：堆肥化では、強力な温室効果ガスであるN₂Oが発生する。本研究ではそのN₂O排出のメカニズム解明と排出量を予測することを目的とした。その結果、堆肥化過程におけるN₂O排出量は、堆肥原料中の亜硝酸態窒素または硝酸態窒素の量と高い相関性があることが示され、N₂O予測の可能性が示唆された。また高温(60℃)の堆肥化で生成されるN₂Oは、クローンライブラリ法により脱窒菌が関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the composting process, powerful greenhouse gas, N₂O, is produced. In order to clarify the N₂O emission mechanism and to estimation of N₂O discharge, N₂O emission and nitrifying-denitrifying gene abundance were investigated during composting process. N₂O discharge was depended on the nitrate nitrogen and nitrite nitrogen in composting material, showing a high correlation between nitrate nitrogen or nitrite and N₂O discharge during composting process. Clone library analysis showed that denitrifiers were responsible for N₂O emission during high temperature (about 60℃) stage of composting.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：地球温暖化 堆肥化 一酸化二窒素

1. 研究開始当初の背景

「堆肥化」は家畜排せつ物や生ゴミ等の生物系廃棄物を好気性微生物の活動により生分解させ、有機肥料を製造する伝統的なリサイクル技術である。しかし、その堆肥の製造過程では強力な温室効果ガスである一酸化二窒素 (N_2O : CO_2 と比較して 296 倍の温室効果も持つ) が排出される。しかも国内の家畜排せつ物処理過程から排出される N_2O は年間約 486 万トン CO_2eq に上り、国内総排出量の約 20%にも相当する。加えて N_2O はオゾン層を破壊する最も強力な物質と指摘されており (Wuebbles, D.J., *Science*, 2009)、堆肥製造時における N_2O 排出の削減は地球環境問題解決のための喫緊課題である。

堆肥化過程からの N_2O 排出に関しては、未知で不確実な点が極めて多い。これは、堆肥という雑多で不均一な原料でかつ多種多様な微生物群集を保有しており、しかも堆肥の発酵条件によりその N_2O の挙動が異なると考えられるためである。このため、堆肥化過程からの N_2O 排出の基本的な原理や堆肥化発酵条件による N_2O 排出との関連性も不明な点が多い。このような状況であり、堆肥化からの N_2O 排出量を概算するためのインベントリデータも不明瞭かつ不確実性が極めて高いのが現状である。

2. 研究の目的

堆肥化過程から発生する一酸化二窒素 (N_2O) は強力な温室効果ガスであり、その排出量は看過できない量である。加えて、堆肥化は雑多で不均一な原料でかつ多種多様な微生物群集が活動している複雑系であり、その N_2O 排出機構は不明瞭な点が極めて多い。とくに堆肥化の初期過程では、極めて特異的な高い温度 (約 $60^{\circ}C$) で多量の N_2O を排出する新たな微生物群集が存在し、それらは堆肥化条件と N_2O 排出量に強い相関性を持つことが、本研究代表者らのこれまでの研究成果から示唆されていたが、その詳細についてはほとんど分かっていないのが現状であった。そこで本研究では、以下 3 点について重点的に研究を行った。

- (1) 異なる堆肥化条件による N_2O 排出量を調査し、 N_2O 排出量の増加を促す主要因子を明らかにすること。
- (2) 堆肥化において観測される特異的な高温 (約 $60^{\circ}C$) で観測される微生物群集を調査すること。
- (3) N_2O 排出に関与する堆肥化の主要因子から N_2O 排出量の予測式を立てること。

以上、これらの研究を実施することで、堆肥化過程からの N_2O 排出メカニズムの解明ならびに N_2O 排出量の予測を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

研究の方法は、研究目的の 3 点に応じて計画し、具体的には以下の通り実施した。

- (1) 異なる堆肥化発酵条件が N_2O 排出量に及ぼす影響

精密小型堆肥化試験装置 (図 1) を用いて、各種の堆肥発酵条件 (含水率条件、通気量条件、堆肥原料中の窒素成分量や炭素/窒素 (C/N) 比の条件、戻し堆肥混合などの材料条件) を変えて堆肥化を行った。発酵槽に堆肥材料を充填し、精密小型堆肥化試験装置に設置した後、自己発熱による堆肥化試験を行った。堆肥化過程では、発酵槽から排出される N_2O 濃度と堆肥温度を連続的に測定した。測定された N_2O 濃度から堆肥化過程における N_2O 排出速度および積算 N_2O 排出量が計算された。なお、 N_2O 濃度の測定には光音響マルチガスモニタ (INNOVA 1412-5, INNOVA) で、堆肥温度はプログラマブルコントローラ (21X, Campbell Scientific) を用いて、10 分毎に自動測定された。

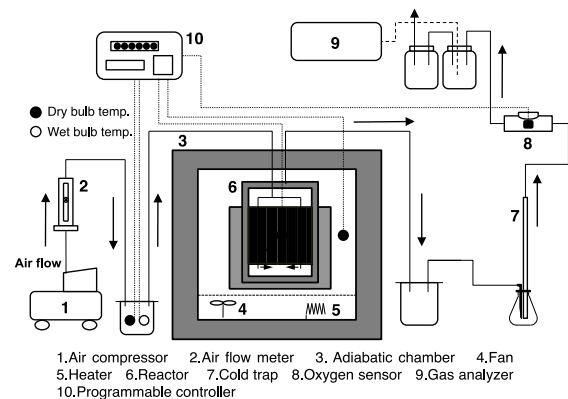


図 1 精密小型堆肥化試験装置

- (2) 特異的な高温で N_2O 生成に関与する微生物の解析

精密小型堆肥化試験装置 (図 1) で堆肥化試験を行い、自己発熱によって堆肥の材料温度が $30, 40, 50, 60, 70^{\circ}C$ に到達した時点で堆肥のサンプルを採取した。この採取した堆肥サンプルを用いて微生物叢解析 (PCR-DGGE 法) や硝化・脱窒遺伝子を用いたクローンライブラリ法といった分子生物学的手法による微生物分析を行い、堆肥化の N_2O 生成に関与している微生物系統樹を作成した。同時にアンモニア態窒素や硝酸態窒素といった無機態窒素の変遷や N_2O や CO_2 排出速度の変化を調査し、微生物分析との関連性を調査した。なお、本研究課題(2)は研究分担者である(独)農研機構 北海道農業研究センター 前田高輝 研究員によって実施された。

- (3) 主要な堆肥化発酵条件による N_2O 排出予測式の導出

研究方法(1)では、堆肥化過程で発生する N_2O の排出量を支配する主要因子 (堆肥材料中の硝酸態窒素および亜硝酸態窒素の量) が

明らかにされたことを受けて、堆肥化過程から発生する N_2O 排出の見積もりを試みた。本研究課題(3)では、精密小型堆肥化試験装置(図1)を用いて、異なる主要因子の量(硝酸態窒素および亜硝酸態窒素の量)が堆肥化過程における N_2O 排出量に及ぼす影響を検討した。それらの結果から、堆肥化過程で発生する N_2O 排出の予測式を導出した。

4. 研究成果

(1) 異なる堆肥化発酵条件が N_2O 排出量に及ぼす影響-堆肥化過程からの N_2O 排出量を支配する決定的堆肥化要因の検討-

本研究では、①含水率条件、②温度条件、③通気量条件、④堆肥原料中窒素量やC/N(窒素/炭素)比の条件、および⑤戻し堆肥の混合などによる材料条件といった堆肥発酵条件が、堆肥化過程で発生する N_2O 排出量との間に関連性を見いだせるか検討した。その結果、発酵条件と N_2O は排出量の関係は、以下の通りである。

- ① 堆肥材料の含水率が 55~74%w.b.程度の範囲であれば、堆肥化過程で発生する N_2O 排出は比較的抑制させることが可能であった。また、含水率が低下するほど N_2O 排出量は増加する傾向が観測された。この堆肥材料の含水率の範囲は堆肥化発酵の最適条件ともほぼ一致した。これは、適切な水分条件下で堆肥化を行うことで N_2O 排出量は比較的減少することが明らかとなった。
- ② 堆肥の温度に関しては、堆肥化初期過程における温度上昇時の 43~50°C(中温域)および 56~68°C(高温域)で N_2O 排出速度は明らかに上昇し、しかも高温域の 56-68°C間でよりピーク値が上昇し、これまでの研究成果を裏付ける結果となった。
- ③ 堆肥化の通気量に関しては、一般的な最適通気量(0.72 L/min/kg-dm)の場合と、その最適通気量よりも抑えた(少ない)条件(0.30 L/min/kg-dm)で4週間の堆肥化試験を実施した。その結果、通気量の少ない 0.30 L/min/kg-dm に抑えることで N_2O 排出量は約30%減少した(図2)。通気量に関しては、現在、研究者によって主張が異なっている。通気量の増加が N_2O 排出量を抑制させるという報告がある一方で、通気量の増加は N_2O 排出量を増加させる報告もなされている。本研究の結果においては、上記2種類の通気量による堆肥化試験の他にも幾通りかの再現実験を行っており、その結果は全て、通気量を抑制させることで N_2O 排出量を低減させるというものであった。

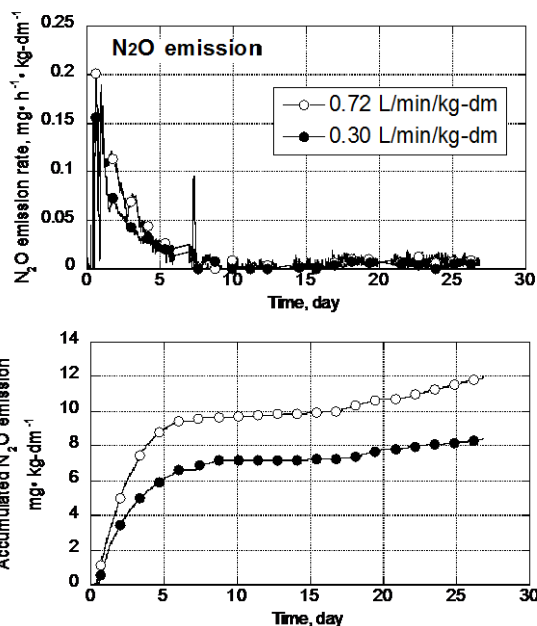


図2 堆肥化過程における N_2O 排出速度(上図)と積算 N_2O 排出量(下図)の変化

- ④ 堆肥原料中に含まれる全窒素量に関しては、その量が増加するほど N_2O 排出量も増加する傾向($y=0.099-0.828$, $R=0.905$)が観測された。しかしながら、その窒素成分の1つであるアンモニア態窒素と N_2O 排出量には相関性は全く認められず、堆肥窒素中の亜硝酸態窒素や硝酸態窒素の量が N_2O 排出量と関係していると考えられた。また、C/N比に関しては明確な相関性は認められなかったものの、C/N比が22以下で N_2O 排出量が増加する傾向が観測された。
- ⑤ 堆肥材料が N_2O 排出量に及ぼす影響として、様々な原料で堆肥化試験を行った結果、戻し堆肥を混合して堆肥化を行うことで、 N_2O 排出量は極めて著しく増加することが明らかとなった。戻し堆肥とは、堆肥化終了時の製品堆肥(完熟堆肥)を水分調整材として水分の高い堆肥原料に混ぜて使用するものである。堆肥の製造現場では、副資材としての戻し堆肥の利用が多く、堆肥を生産する一般的な方法の一つでもある。この戻し堆肥を混合した原料を堆肥化することで、 N_2O 排出量は増大した。これは、これまで検討してきた含水率条件や通気量条件といった物理的な堆肥化発酵条件が誤差範囲と思えるほどの N_2O 排出量の増加であった。この原因は、戻し堆肥は完熟堆肥であり硝化が進んでいる堆肥である。そのため無機態窒素(亜硝酸態窒素および硝

酸態窒素)が多く含まれており、これが堆肥原料中に混合されることで、堆肥化過程において N_2O 排出量を著しく増加させたと考えられる。よって、堆肥化発酵において N_2O の排出量を支配する決定的な主要因子は堆肥原料中の亜硝酸態窒素または硝酸態窒素の量であると考えられた。

そこで、堆肥原料にそれぞれ亜硝酸ナトリウム、硝酸ナトリウム、硫酸アンモニウムといった純粋試薬を混合し、人為的に通常の10倍程度の亜硝酸態窒素、硝酸態窒素およびアンモニア態窒素濃度を高めて、堆肥化試験を行った結果、硝酸態窒素を高めた試験区で、 N_2O 排出量は著しく上昇した(図3)。

また、堆肥の温度上昇ごとにサンプリングを行い、その中の硝化菌および脱窒菌をMPN法でその遷移を調査した結果、堆肥化過程では脱窒過程において N_2O が生成される可能性が示された。また、高温域(55~70°C)で N_2O は増加したが、一般的な脱窒菌の最適温度(30°C)を超えており、このような高温において高い N_2O 生成能力を有する微生物叢の存在の可能性が示された。

以上、これらの結果から、堆肥化過程からの N_2O 排出量を決定づける主要因は無機態窒素である硝酸態窒素の量であり、堆肥化過程で発生する N_2O 排出を支配するものと考えられた。

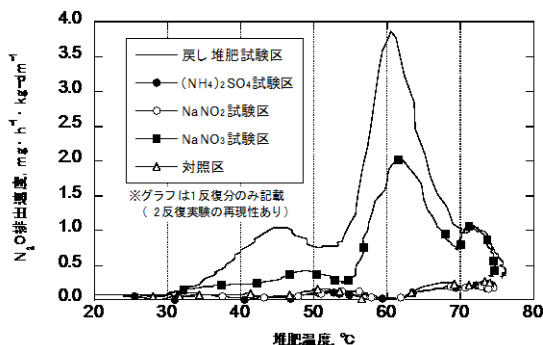


図3 各試験区の N_2O 排出速度の温度依存性

(2) 特異的な高温で N_2O 生成に関与する微生物の解析

堆肥化過程では、約43~50°Cの中温域と約56~68°Cの高温域において N_2O 排出速度が上昇し、 N_2O 排出量も増加することが本研究結果(1)等から明らかとなっている。しかしながら、一般的に土壌や水処理における N_2O 生成は、約28~30°C程度の常温で活動する硝化菌や脱窒菌が関与していると考えられており、堆肥化の様な高温での N_2O 生成微生物は良く分かっていない。そこで、堆肥化過程で

温度が変化するにつれサンプリングを行い(30, 40, 50, 60, 70°C)、その温度における硝酸態窒素量や微生物叢を解析した。その結果、バクテリアコミュニティの有意な変化は観測されなかった。しかしながら、堆肥温度の上昇に伴い硝酸態窒素の量が減少し、且つ2つの脱窒遺伝子(*nirS*と*nosZ*)は有意に上昇する結果を示した(図4)。これらの結果は、高温、とくに40, 50, 60, 70°Cで硝酸態窒素を窒化する脱窒菌の存在を明らかにするものである。また、これらの遺伝子をクローンライブラリ法で解析した結果、2つの遺伝子(*nirS*と*nosZ*)の多くは、*Pseudomonas-like*で構成されるクラスターで増加することが明らかとなった(図5)。

以上の結果から、堆肥化過程における N_2O 排出のメカニズムは、これらの脱窒菌の活動が極めて深く関与しており、従来の土壌や水処理で見受けられる N_2O 生成メカニズムとは異なるものであることを示す。

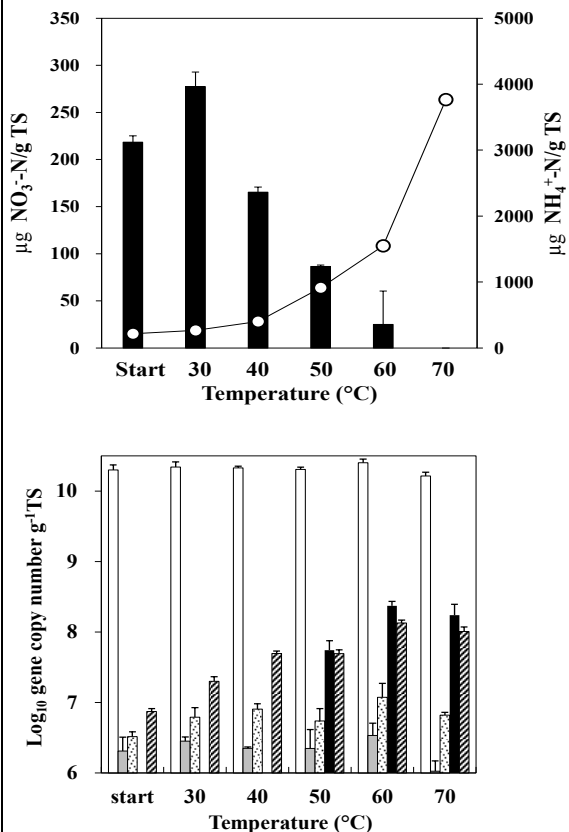


図4 堆肥温度の上昇に伴う硝酸態窒素量の変化(上図: black bar)と遺伝子コピー数の変化(下図: 16S rRNA gene (white), *amoA* (grey), *nirK* (dot), *nirS* (black) and *nosZ* (slash))

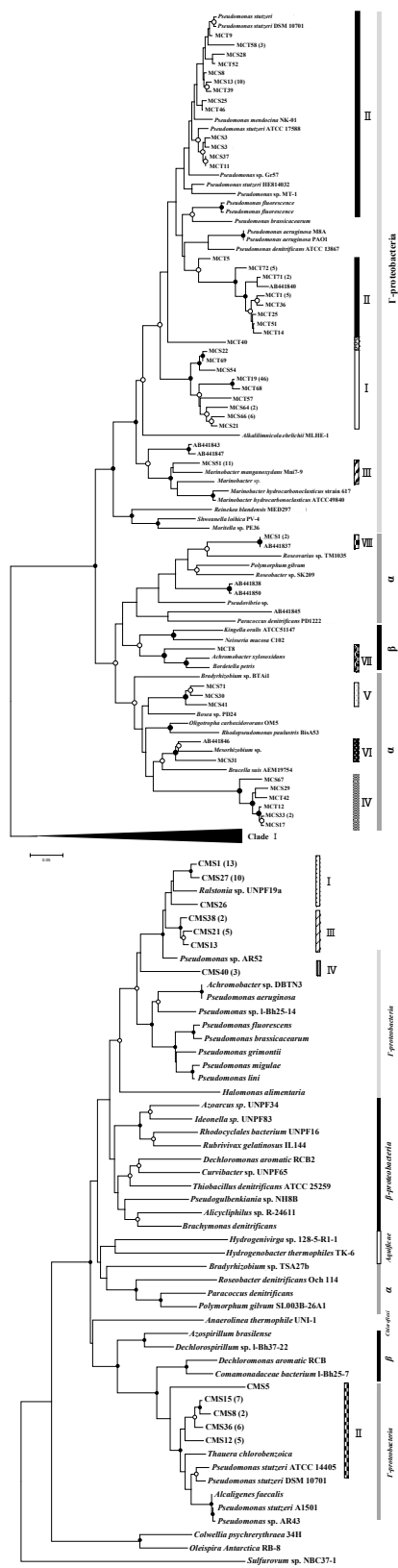


図4 *nosZ* (前図:) および *nirS* (後図) における系統樹 (I ~ IV区が堆肥から分離されたもの; *nosZ* に関しては II、IIIが有意に増加、*nirS* は I、II、III、IVが有意に増加)

(3) 主要な堆肥化条件による N₂O 排出予測式の導出

本研究成果(1)において、堆肥化過程での N₂O 排出を支配する主要因子が無機態窒素である硝酸態窒素であると示唆された。そこで、この窒素量と N₂O 排出量との関連性を調査し、より詳細な N₂O 生成メカニズムとその堆肥原料中に含まれる窒素量から堆肥化過程で排出される N₂O 排出予測式を導出することを試みた。なお、本研究成果(1)において亜硝酸態窒素の添加による試験では、N₂O 排出量の増加は観測されなかったが、その添加量を増やして実験を行った。この理由は、堆肥化過程での N₂O 生成が脱窒過程に由来していると考えられることから、硝酸態窒素と同様に亜硝酸態窒素も N₂O 排出の要因であると推測されたことによる (本研究成果(1)では亜硝酸態窒素の添加量が少なすぎた可能性があるため)。

その結果、堆肥材料中の亜硝酸態窒素および硝酸態窒素濃度が増加するほど N₂O 排出量も著しく増加した (図 5)。N₂O 排出量は 35~45°C の中温域と 55~60°C の高温域で排出のピーク値が観測されたが、濃度の上昇につれて、高温域でのみ、N₂O 排出量が増加した。高温域の N₂O 上昇は、堆肥化初期の N₂O 生成が中温域よりも高温域が主体であることを意味する。これは、高温域で活性化する微生物叢が亜硝酸態窒素と硝酸態窒素を高温で硝化脱窒させ、多量の N₂O を生成させるメカニズムが存在することを明確に示した。

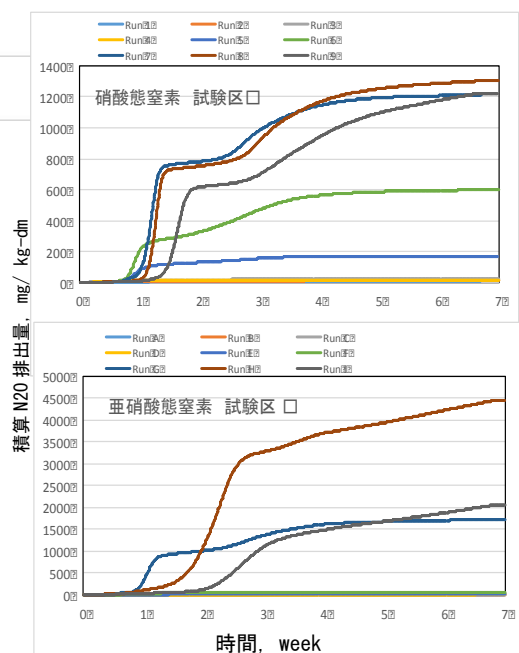


図5 積算 N₂O 排出量の変化 (Run の数字およびアルファベットが進むほど、硝酸態窒素および亜硝酸態窒素の量は増加)

また、亜硝酸態窒素および硝酸態窒素濃度と N₂O 排出量の関係を調査した結果、双方の無機態窒素ともに積算 N₂O 排出量と極めて高い正の相関性 (硝酸態窒素 $y=667.04x-38.929$, $r^2=0.9284$; 亜硝酸態窒素 $y=5369x-163.97$, $r^2=0.9479$) が観測された (図

6). 堆肥材料中の亜硝酸態窒素量と硝酸態窒素量の増加が、堆肥化過程で生成される N_2O 量の増加を誘発することを明確に示した。しかしながら、亜硝酸態窒素量は現実的には堆肥に含まれる量とは考え難い量である。学術的には亜硝酸態窒素量の増加は N_2O 排出を誘発するが、実際の生産現場では、そこまでの亜硝酸態窒素は含まれていない。そのため、現実的には硝酸態窒素の量が重要な要因であり、その量が N_2O 排出量を決定づけると推測される。しかしながら、本研究で得られた予測式を実証の堆肥化試験による N_2O 排出量と比較したところ、適用はされなかった。予測式の確立には、よりデータの蓄積が必要かも知れない。

以上の結果から、堆肥中の硝酸態窒素および亜硝酸態窒素量と N_2O 排出量には高い相関性があり、これらから予測式に導出が可能であると考えられるが、その精度を向上させるためには、よりデータの蓄積が必要であると思われる。

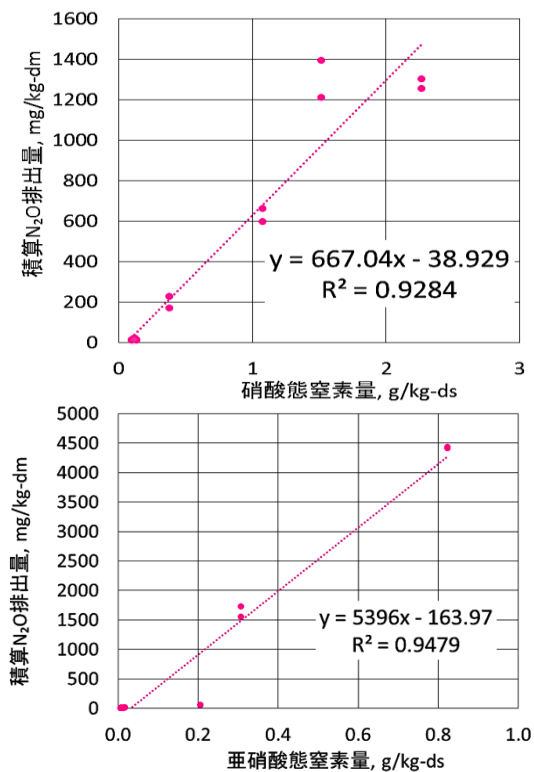


図 6 硝酸態窒素および亜硝酸態窒素の量と積算 N_2O 排出量の関係

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 1 件)

- ① 宮竹史仁、家畜排せつ物の堆肥化技術の向上ならびに温室効果ガス排出に関する研究、農業施設、査読無、44(3)、2013、96-97

[学会発表] (計 4 件)

- ① 宮竹史仁、谷昌幸、前田武己、岩渕和則、異なる堆肥材料による堆肥化初期過程の温室効果ガス排出特性、2013 年度農業施

設学会年次会、2013 年 8 月 30 日、岐阜大学 (岐阜県岐阜市)

- ② 宮竹史仁、寺井咲百合、谷昌幸、加藤拓、前田高輝、前田武己、岩渕和則、堆肥化の初期過程で発生する一酸化二窒素 (N_2O) の排出挙動、第 23 回廃棄物資源循環学会研究発表会、2012 年 10 月 23 日、仙台国際センター (宮城県仙台市)
- ③ 宮竹史仁、張元明、鈴木祐宇利、谷昌幸、加藤拓、前田高輝、前田武己、岩渕和則、堆肥化の通気条件が温室効果ガスの排出量に及ぼす影響、農業環境工学関連学会 2012 年合同大会、2012 年 9 月 14 日、宇都宮大学 (栃木県宇都宮市)
- ④ 宮竹史仁、鈴木康浩、谷昌幸、加藤拓、前田高輝、前田武己、岩渕和則、堆肥化初期過程における一酸化二窒素 (N_2O) の排出特性 — 戻し堆肥の混合が N_2O 排出速度に及ぼす影響 —、第 22 回廃棄物資源循環学会研究発表会、2011 年 11 月 4 日、東洋大学 (東京都文京区)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：
○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：
〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮竹 史仁 (MIYATAKE, Fumihito)
帯広畜産大学・畜産学部・准教授
研究者番号：70450319

(2)研究分担者

前田 高輝 (MAEDA, Koki)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・その他部局等・研究員
研究者番号：90435941

(3)連携研究者

なし ()
研究者番号：