

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月12日現在

機関番号：31302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23780087

研究課題名（和文） 畜産廃棄物堆肥中の亜酸化窒素還元除去能を有する脱窒細菌の生態解明

研究課題名（英文） Microbial ecology of nitrous oxide-reducing denitrifying bacteria in the livestock waste composts

## 研究代表者

大坪和香子 (OHTSUBO WAKAKO)

東北学院大学・工学総合研究所・研究員

研究者番号：00598203

研究成果の概要（和文）：本研究では、養豚場の廃水処理プロセスで発生する固形廃棄物の堆肥化実験を行い、堆肥化プロセスにおける  $N_2O$  発生時期が硝酸や亜硝酸などの脱窒基質を生成するアンモニア酸化細菌の発生時期と連動することを明らかにした。また、堆積前の堆肥原料の高温前処理が、 $N_2O$  発生を低下させ、これが脱窒細菌の  $N_2O$  還元能によるものである可能性が示唆された。硝化、脱窒関連遺伝子の系統解析からは、アンモニア酸化細菌や脱窒細菌の群集構造が、堆肥化の進行に従って大きく変化していることが知られた。また、本研究において堆肥から単離された脱窒細菌株は、好気または微好気条件において脱窒を行う能力を有していた。これらの結果は、堆肥化プロセスにおける  $N_2O$  発生パターンに、堆肥中のアンモニア酸化細菌と脱窒細菌の群集構造や機能が大きく関与しており、これらを制御することが堆肥化プロセスにおける  $N_2O$  発生の削減に重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study we performed composting experiments using solid wastes from piggery wastewater treatment processes. Our results indicated that the timing of  $N_2O$  emission follows emergence of ammonia-oxidizing bacteria, which produce denitrification substrates such as nitrate and nitrite. We also found that hyperthermophilic pre-treatment reduces  $N_2O$  emission from composting, which is suggest to have been caused by denitrifying bacteria with  $N_2O$ -reducing activities. Phylogenetic analyses showed that community structures of ammonia-oxidizing bacteria and denitrifying bacteria dynamically changed as composting proceeded. Denitrifying bacterial strains isolated from our compost samples were able to perform denitrification under oxic or microoxic conditions. These findings collectively suggest that  $N_2O$  emission patterns during composting is strongly affected by community structures and functions of ammonia-oxidizing bacteria and denitrifying bacteria, which should be effectively controlled to reduce  $N_2O$  emission from composting processes.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：

キーワード：亜酸化窒素、堆肥化プロセス、脱窒、群集構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

亜酸化窒素 ( $N_2O$ ) は、温室効果ガスおよびオゾン層破壊物質として、その削減が求められている。 $N_2O$  の主な発生源は、化学肥料

を施用された土壌や家畜糞尿を主とする農畜産業由来であり、多様な微生物が行う無機窒素化合物の酸化還元反応である硝化および脱窒プロセスを起源とする。特に、硝酸および亜硝酸を還元する脱窒反応経路は、一般的に酸素への感受性が高く、特に亜酸化窒素を分子窒素へ還元する最終反応が最も影響を受けやすいと考えられている。畜産廃棄物の主な処理方法である堆肥化プロセスにおいても、多量の  $N_2O$  が発生することが知られているが、その発生時期や発生に關与する微生物の動態については未解明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究の開始当初までの堆肥化実験において、研究代表者らは、堆肥化プロセスは比較的好気的な条件であり、 $N_2O$  は堆肥化初期に発生する一方で、成熟した堆肥からは発生しないことを見いだした。そこで、本研究では、成熟堆肥中に存在する亜酸化窒素還元能を有する脱窒細菌の定量および多様性解析、単離・培養を行うことにより、その未知の生態、性質を明らかにし、新規の亜酸化窒素還元除去技術への応用に結びつけることを目的とした。具体的には、(1) 当該堆肥の成熟化に伴う微生物群集の変遷と脱窒活性の変動の明確化、(2) 当該活性を有する微生物の単離・培養および亜酸化窒素抑制型脱窒細菌としての提唱、(3) 新規の亜酸化窒素還元除去技術を確立するための基盤構築、の3点を行うことを目的とし、研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 堆肥化実験

本研究では、養豚場の廃水処理プロセスにおいて生じる搾汁後の固体残渣および排水処理からの余剰汚泥約 100 kg の原料と、水分調節用のオガコを約 25 kg を混合したものを堆積することにより、堆肥化実験を行った。合計 5 回、各回 9~13 週間の独立した堆肥化実験を行い、毎週の切り返し後の堆肥山から試料をサンプリングした。温度および  $N_2O$  については、現地でモニタリング測定を行ったが、 $N_2O$  測定を行う手法が確立したのは、第 3 回目の堆肥化実験以降であった。また、各回の実験において、100°C の高温前処理 (HTPRT) を行った場合と行わなかった場合の 2 条件で平行して堆肥化を行い、各測定データを比較した。

### (2) 堆肥の物理化学的性状の解析

各実験、各集の堆肥試料について、含水率 (%)、全揮発性固形物 (TVS, total volatile solid) (%), pH、および無機窒素化合物を測定した。含水率は 105°C で 24 時間水分蒸発させた試料、TVS はこの試料をさらに 550°C で有機物蒸発させた試料の重量から算出した。pH 測定は、MQ 水に懸濁した堆肥試料

を用いた。無機窒素化合物については、各堆肥試料の 0.5M 硫酸カリウム溶液抽出液中のアンモニウム態窒素 ( $NH_4-N$ )、硝酸態窒素 ( $NO_3-N$ )、亜硝酸態窒素 ( $NO_2-N$ ) の各濃度を、Spectroquant® Tests (Merck 社) を用いて測定した。

### (3) 硝化および脱窒関連遺伝子の定量および系統学的解析

各実験、各週の試料から、FastDNA SPIN Kit for Soil (MP-Biomedicals 社製) を用いて抽出した DNA 20 ng を鋳型として用い、真正細菌の 16S rRNA 遺伝子、アンモニア酸化酵素遺伝子 (*amoA*)、亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirS*, *nirK*)、 $N_2O$  還元酵素遺伝子 (*nosZ*) の各遺伝子のリアルタイム PCR による定量を SYBR® Premix Ex Taq™ (タカラバイオ社) を用いて行った。また、定量的リアルタイム PCR の増幅産物を DynaExpress TA PCR Cloning システム (BioDynamics 研究所) を用いてクローン化し、クローンライブラリーの構築およびランダムに選択したクローンのシーケンス解析、さらに ARB (<http://www.arb-home.de/>) による系統解析を行った。

### (4) 脱窒細菌の単離培養

堆肥試料を生理食塩水に懸濁後、段階希釈したものをコハク酸およびクエン酸を炭素源、硝酸ナトリウムおよび亜硝酸ナトリウムを脱窒基質として加えたプロモチモールブルー (BTB) 培地プレートに塗布、培養し、脱窒源の利用により緑 (中性) から青 (アルカリ性) に変色したコロニーを選択し、脱窒細菌株の候補とした。各単離菌株の脱窒能力については、脱窒基質を添加した DM 培地 (Takaya et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003) を入れた密封試験管のヘッドスペースをアルゴンガス置換したもので培養し、生育曲線、培地中の硝酸のよび亜硝酸イオン濃度の減少、および  $N_2O$  の発生を調べることで評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 高熱前処理 (HTPRT) が堆肥化プロセスにおける無機窒素化合物に与える影響の解明

本研究では、従来の堆積法 (A 法) と、アンモニア臭気除去や高温発酵促進に有効とされる高温攪拌前処理法 (HYPRT, B 法) の 2 手法を用いて堆肥化実験を行った。B 法で堆肥化を行った場合、A 法と比較して明らかに堆肥化初期の高温状態がより長く維持され、有機物発酵が促進されていることが示唆された。一方で、B 法では明らかに A 法よりも  $N_2O$  発生時期が 3、4 週間遅延し、 $N_2O$  発生量の低下が認められた (図 1)。そこで、堆肥中の無機窒素化合物量の変化を比較したところ、両手法において、 $N_2O$  発生の直前

にアンモニウム態窒素量の顕著な減少が見られた。また、同時期に、硝酸態窒素および亜硝酸態窒素が増加していることが明らかとなった。これらの結果から、畜産廃棄物の堆肥化において、アンモニア酸化の進行とそれに伴う脱窒基質の増加が起こる時期が、 $N_2O$  発生時期に連動していることが示唆された。

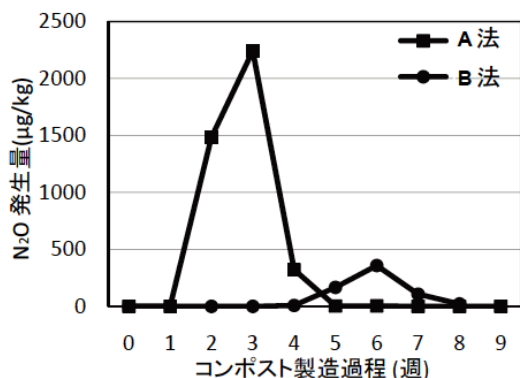


図1. 堆肥化プロセスにおける  $N_2O$  発生時期と発生量 (A 法: 従来の堆積法; B 法: 高温前処理法)

## (2) 堆肥化プロセスにおけるアンモニア酸化細菌および脱窒細菌の群集構造変化

上述したように、堆肥化プロセスにおける  $N_2O$  発生時期が、アンモニア酸化反応と連動している証拠を得るために、堆肥試料中のアンモニア酸化細菌の数を、同細菌が共通に保有するアンモニアモノオキシゲナーゼ遺伝子 (*amoA*) のリアルタイム PCR 解析により推定した。その結果、A 法では *amoA* が堆肥化初期から検出されたのに対し、B 法では堆肥化開始後 4 週目以降の堆肥にのみ検出された (図2)。このことから、堆肥中のアンモニア酸化細菌の出現時期が  $N_2O$  発生時期に影響を与えることが強く示唆された。また、脱窒関連遺伝子である亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirK/nirS*) および  $N_2O$  還元酵素遺伝子 (*nosZ*) の定量 PCR 解析をおこなったところ、*nirK* と *nirS* のコピー数に対する *nosZ* のコピー数の比は、 $N_2O$  発生量が少なかった B 法の堆肥中において高くなっていた。このことから、脱窒細菌群集における  $N_2O$  還元ポテンシャルを有する *nosZ* 保有細菌の割合が、堆肥山からの  $N_2O$  発生量に影響していることが考えられた。さらに、これらの遺伝子の系統解析を行ったところ、アンモニア酸化細菌と脱窒細菌の群集構造は堆肥化の進行に伴い大きく変化していることが知られた。また、B 法の堆肥で優勢化していたアンモニア酸化細菌は堆肥の材料となった汚泥等を由来としていたのに対し、脱窒細菌は堆肥化を行った現場由来の土着細菌である可能性が示唆された。

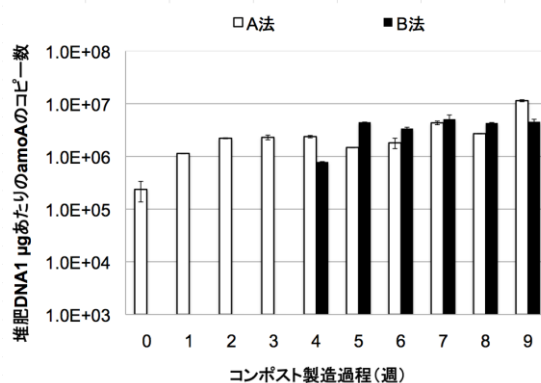


図2. *amoA* 遺伝子の定量的リアルタイム PCR 解析による堆肥化プロセスにおけるアンモニア酸化細菌の定量 (A 法: 従来の堆積法; B 法: 高温前処理法)

## (3) 堆肥試料から単離した脱窒細菌株の脱窒特性の評価

段階希釈した堆肥懸濁液から、コハク酸およびクエン酸を炭素源として加えたプロモチモールブルー (BTB) 培地プレート上に青いコロニーを形成する脱窒細菌を 50 株単離した。これらの脱窒細菌は、好気・微好気条件においても、亜硝酸および硝酸を還元し、生育することが可能であった。16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定により細菌種を同定したところ、各グループ間および堆肥化過程の前半と後半において優勢種は大きく異なっていた。例えば、堆肥化初期 (高温期) ではアルファプロテオバクテリアおよびガンマプロテオバクテリアに属する生育の早い脱窒細菌が優勢的であったのに対し、低温条件の堆肥化過程後期では、ベータプロテオバクテリアに属する生育の遅い脱窒細菌が優勢的であった。この結果は、16S rRNA 遺伝子を用いた群集解析結果とも一致していた。

## 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2件)

(1) 進藤絵里香、大坪和香子、上田英代、上田裕一、宮内啓介、遠藤銀朗、コンポスト製造過程において発生する亜酸化窒素の削減に参与する脱窒細菌遺伝子の多様性と消長、土木学会論文集 G (環境)、査読有り、Vol. 67、No. 7、2011、441-448

(2) Takeshi Yamada、Shinya Araki、Wakako Ikeda-Ohtsubo、Keiko Okamura、Akira Hiraiishi、Hideyo Ueda、Yasuichi Ueda、Keisuke Miyauchi、Ginro Endo、Community structure and population dynamics of ammonia oxidizers in composting processes of ammonia-rich

livestock waste, Systematic and Applied Microbiology, 査読有り、2013、DOI: 10.1016/j.syapm.2013.02.001.

〔学会発表〕(計9件)

①2011年7月、Bad Nauheim, ドイツ、Enzymes in the Environment、査読有り、Wakako Ikeda-Ohtsubo, Erika Shindo, Hideyo Ueda, Yasuichi Ueda, Keisuke Miyauchi, Ginro Endo、Quantification and diversity analysis of denitrifying enzyme genes in livestock waste compost.

②2011年9月、札幌、XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (IUMS 2011)、査読有り、Wakako Ikeda-Ohtsubo, Erika Shindo, Keisuke Miyauchi, Ginro Endo、Isolation of aerobic denitrifying bacteria from livestock waste compost.

③2011年10月、京都、第27回日本微生物生態学会大会、査読有り、大坪和香子、進藤絵里香、上田裕一、上田英代、宮内啓介、遠藤銀朗、養豚場排水処理残渣の堆肥化プロセスに存在する脱窒細菌群集の定量および系統解析

④2012年3月、京都、日本農芸化学会2012年度大会、査読無し、大坪和香子、尾形裕明、宮内啓介、遠藤銀朗、好氣的条件下で脱窒を行う能力を有する堆肥由来細菌の単離と同定

⑤2012年6月、仙台、Japan-Finland Biotechnology Symposium 2012、査読無し、大坪和香子、Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emission during composting: when and how?

⑥2012年8月、コペンハーゲン、デンマーク、14th International Symposium on Microbial Ecology (ISME-14)、査読有り、Wakako Ikeda-Ohtsubo, Erika Shindo, Keisuke Miyauchi, Ginro Endo、Effect of a hyperthermophilic pretreatment on nitrous oxide emission-pattern and population dynamics of nitrifying and denitrifying bacteria during composting of swine waste.

⑦2012年8月、豊橋、第28回日本微生物生態学会大会、査読有り、Wakako Ikeda-Ohtsubo, Erika Shindo, Keisuke Miyauchi, Ginro Endo、Effect of mismatches in primers for amplifying nitrous oxide reductase (*nosZ*) genes on community

structure analysis of denitrifying bacteria

⑧2013年3月、仙台、平成24年度土木学会東北支部 技術研究発表会、査読無し、東海林晃、大坪和香子、宮内啓介、遠藤銀朗、コンポスト製造過程で出現する脱窒細菌が保有する N<sub>2</sub>O 還元酵素の多様性に関する研究

⑨2013年3月、仙台、日本農芸化学会2013年度大会、査読無し、大坪和香子、進藤絵里香、宮内啓介、遠藤銀朗、堆肥化プロセスにおける亜酸化窒素(N<sub>2</sub>O) 発生に硝化・脱窒細菌が与える影響

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大坪 和香子 (OHTSUBO WAKAKO)

東北学院大学・工学総合研究所・研究員

研究者番号：00598203