

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780263

研究課題名（和文）充填式生物脱臭担体上における脱窒菌群の存在様態の可視化

研究課題名（英文）Analysis of the denitrifying bacterial community in a biofilter packing media

研究代表者

安田 知子（YASUDA, Tomoko）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・畜産環境研究領域・主任研究員

研究者番号：50391371

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：生物脱臭担体の微生物特性に関する知見を得ることを目的として、走査型電子顕微鏡とin situ hybridizationを融合させたSEM-ISH法の脱臭担体への応用を試みた。また、水循環式生物脱臭装置のアンモニア分解を担う微生物群の解析を行った。SEM-ISH法を脱臭担体に適用するには、微生物識別のためのさらなる検討が必要である。微生物叢解析の結果では、軽石凝灰岩の一種である大谷石とロックウールについて比較したところ、窒素蓄積量の少ない大谷石で脱窒菌の割合が増えたことが示唆された。用いる担体によって生物脱臭装置内のアンモニアおよび窒素除去メカニズムが異なる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to understand microbial properties, especially regarding denitrification, of a biofilter packing media. An in situ hybridization followed by a scanning electron microscopic observation was attempted to apply to biofilter media in order to obtain both genetic and morphological information. However, it was not possible to distinguish target cells from nontarget ones and needed more challenging. Microbial community structures of the biofilter packing media were also investigated. The results revealed the differences in microbial community structures between pumice tuff and rockwool mixture. It could be hypothesized that the proportion of bacteria possessing denitrification activity increased in pumice tuff.

研究分野：農学

キーワード：畜産環境 生物脱臭

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 日本の畜産において、堆肥化は最も一般的な家畜ふんの処理方法であるが、有機物の分解に伴いアンモニアを主体とした臭気物質が発生し、畜産に起因する悪臭苦情の大きな原因となっている。「家畜排せつ物の管理の適正化及び利用の促進に関する法律」の施行を受け、堆肥化処理施設の整備が進んだことに伴い、これまで以上に脱臭装置への需要が高まっている。

(2) 生物脱臭装置によるアンモニアの除去は、水への吸収と、微生物による硝化を利用している。アンモニアの吸収で水中の水素イオンは消費されるが、硝化によって再び水素イオンが供給されるため、アンモニアの半分が亜硝酸・硝酸に、残り半分がアンモニウムイオンに変換されて pH は中性に保たれる。このように現状の装置ではアンモニアの除去は達成されるが、このままでは亜硝酸・硝酸とアンモニウムが装置内に蓄積することになる。そのため、窒素含有排水を別途処理するか、窒素蓄積による破過が起きないように脱臭担体を総交換するといった管理が必要となるため、運転コストを押し上げる要因となっている。

(3) これまでに我々は、水循環式のロックウール脱臭装置内の窒素収支を調査し、窒素の一部は脱窒により窒素ガスにまで変換され消失していることを示唆するデータを得ている。このメカニズムとして、脱臭担体上でバイオフィームが形成され、酸素濃度が不均一な環境となり、堆肥化ガスや死菌体などに由来する有機物を電子供与体として利用した脱窒が起きていることが予想される。生物脱臭装置内でさらに脱窒活性を高めることができれば、充填式生物脱臭装置での窒素の蓄積を回避し、また排水処理や脱臭担体の総交換にかかわるコストと労力を格段に減らすことが可能になると考えられる。

(4) 一般的に、汚水処理などの生物的窒素除去過程では、嫌気条件下で電子供与体を添加することで、脱窒活性を高めている。しかし、生物脱臭槽の内部では気相が 40～50%程度を占め、酸素分圧が高い部分が多いと考えられ (Zhu *et al.* 2001)、また、有機物を添加すると、菌体の増殖を促し、脱臭担体充填部の閉塞の原因となる。そのため、生物脱臭槽の内部で脱窒活性を高めるためには、既存の「脱窒技術」をそのまま適用することはできない。

(5) 充填式脱臭装置では、脱臭担体の重要性が広く認識されている (Andres *et al.* 2009, etc.)。生物脱臭装置内で脱窒活性を高める技術を開発する上では、現状の脱臭担体上の脱窒菌についての情報が不可欠であるが、これまで脱臭装置を対象にした研究はほとん

ど行われてきていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、生物脱臭装置内で脱窒反応を促進する条件を見いだすために、脱臭担体の微生物特性に関する知見を得ることを目的とした。担体上の脱窒菌の存在様態を解析する手法として、走査型電子顕微鏡 (SEM) と *in situ* hybridization を融合させた SEM-ISH 法 (Kenzaka *et al.* 2005) を脱臭担体に適用することが可能であるかを検討し、「対象とする微生物反応の場所を視覚的に捉える」という新たな視点を加えることで、畜産分野における生物処理技術開発のブレークスルーを目指した。また、水循環式生物脱臭装置での担体上の硝化および脱窒を初めとしたアンモニア分解を担う微生物群の遺伝情報を取得し、脱臭担体上で微生物叢が形成されるメカニズムを解明するための手がかりを得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) SEM-ISH 法の脱臭担体への適用可能性の検討

脱窒菌群の SEM-ISH 法の検討に先立ち、*nirK* 遺伝子をターゲットとした脱窒菌群の FISH を行った。方法は Kenzaka ら (2007) と Kawakami ら (2012) の高感度 FISH 法を参考にした。*Alcaligenes faecalis* NBRC13111 と *Pseudomonas aureofaciens* NBRC3521 の *nirK* 遺伝子をターゲットにし、それぞれプライマー FlaCu/R3Cu と nirK1F/nirK5R を用いて PCR 産物を得た後、ランダムプライム法で DIG 標識プローブを作成した。作成したプローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、HRP 標識した抗 DIG 抗体を反応させた後、ビオチン化チラミドを添加しシグナルの増幅を試みた。さらに Cy3 標識したストレプトアビジンと反応させ、蛍光顕微鏡によりシグナルを検出した。*nirK* 遺伝子検出の特異性の確認には、*nirK* 遺伝子の PCR 産物をクローニングした大腸菌 JM109 株と非保有株を用いた。

SEM-ISH 法は Kenzaka ら (2005) の方法を参考にして行った。ビオチン標識したプローブ (真正細菌の 16S rRNA 遺伝子をターゲットにした EUB338 とネガティブコントロールとして相補配列である NON338) を用い、ハイブリダイゼーションを行った後、ストレプトアビジン-金コロイドと反応させ、菌体に金コロイドを取り込ませた。さらに金の増感反応を行った後、t-ブタノールで置換し凍結乾燥させて試料を得た。電子顕微鏡の高真空モードで二次電子像と反射電子像を取得した。

#### (2) 脱臭担体サンプルの微生物群の解析

畜産分野で脱臭技術がほぼ確立しており、良好な処理性能を示しているロックウール脱臭担体について、水循環条件下での脱窒菌群集の変化を PCR-DGGE 法を用いて解析し

た。

脱臭担体の違いが微生物群集に与える影響を調べるために、未利用資源で軽石凝灰岩の一種である大谷石と、ロックウールについて、アンモニア処理が良好に行われている担体を用いて、16S rRNA 遺伝子をターゲットにした次世代シーケンス法により微生物叢を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) SEM-ISH 法の脱臭担体への適用可能性の検討

*nirK* 遺伝子をターゲットにした高感度 FISH 法により、*nirK* 遺伝子を検出することができた。しかし、*nirK* 非保有株との比較では、プローブの非特異的な吸着によると考えられるシグナルとの差が少なく、環境サンプルへの適用には、尚検討が必要であった。ターゲット遺伝子配列の量が少ないため、シグナル増強反応が必要となるが、その場合に非特異シグナルが増えることが問題となるのでその改善と、また、今回はランダムプライム法で作成したプローブのみの検討であったので、PCR 法で作成したプローブを検討する必要があると考えられた。

*nirK* 遺伝子をターゲットにすることは現段階で困難であったので、SEM-ISH 法については 16S rRNA 遺伝子のプローブを用いて検討した。図 1 に大腸菌に金を取り込ませ、SEM の反射電子像を取得した結果の例を示す。EUB338 プローブで NON338 プローブを用いた場合より比較的明るく見えた。反射電子像では重い元素が明るく見えるため、金を取り込まれたためと考えられた。

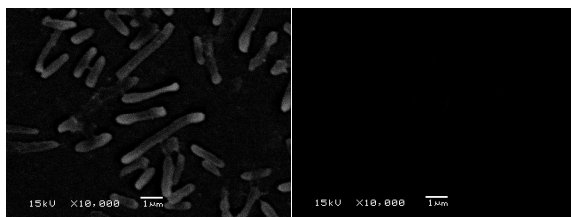


図 1. ビオチン標識した EUB338 プローブ（左）および NON338 プローブ（右）を用いてハイブリダイゼーションを行った後、ストレプトアビジン-金コロイドと反応させた大腸菌の反射電子像（10,000 倍）

続いて、脱臭担体の例として大谷石サンプルに SEM-ISH 法を適用した結果を示す（図 2）。

凝灰岩は、火山灰が固結した岩石であり、非晶質固結物を含む。図 2 では非晶質の部分が見えていと考えられるが、反射電子像においてもこれらの非晶質部分が、明るく見えていた。このように、脱臭担体サンプルでは、微生物以外のものでも反射電子像で明るく見えることがあるため、微生物の識別には工夫が必要である。

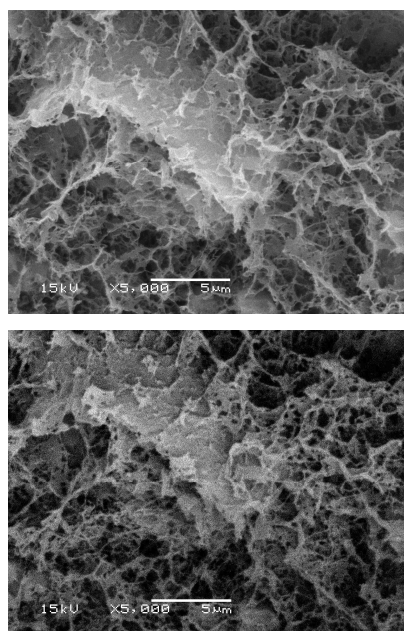


図 2. 大谷石サンプルの電子顕微鏡像。上、2 次電子像；下、反射電子像（5,000 倍）

脱臭担体の構造と微生物の形態を知るには SEM による観察が有効である。SEM とハイブリダイゼーションや元素分析などを組み合わせ、微生物の特徴を活かして SEM 像上で識別をすることができれば、脱臭担体の評価手法として活用できるので、今後も手法の検討を続けたい。

##### (2) 脱臭担体サンプルの微生物群の解析

水循環式ロックウール生物脱臭装置内での脱臭菌群集の変化を解析した。既存の *nosZ* 遺伝子をターゲットにしたプライマーを用いた解析結果では、サブディヴィジョンのプロテオバクテリアに近縁な脱窒菌の存在が示された。水循環のない実装置の運転から、水循環条件に移行した過程で、これらの脱窒菌はサブディヴィジョン内でも種類が変化していた。また、遺伝子数の増加も認められた。水循環過程は窒素濃度が上昇していく過程であり、微生物の代謝産物・バイオマスが蓄積していくので、脱窒にとっての基質と有機物量の変化が菌叢に影響を与えていた可能性が考えられた。

大谷石とロックウールを比較した結果では、両者で異なる微生物叢が形成されていることが明らかとなった。即ち、大谷石サンプルでは *Proteobacteria* 門の割合が増えて、*Chloroflexi* 門の割合が減っていた。*Proteobacteria* の中では、サブディヴィジョンの割合が増えており、さらに大谷石で増えていた属が明らかとなった。その中には脱窒菌の存在が知られている *Rhodanobacter* 属を含んでいた。大谷石とロックウールでは、今回用いたサンプルを得た試験においてアンモニア除去性能は同等であったが、担体へ

の窒素蓄積量が異なっていた。

本研究により、窒素蓄積量が異なる担体で微生物叢も異なっていたという非常に興味深い結果が得られた。大谷石とロックウールは形状、物理化学性（陽イオン交換容量、保水性）のみならず微生物性も異なり、同等のアンモニア除去性能を示していても、異なるメカニズムでアンモニアおよび窒素除去が行われていることが示唆された。大谷石で脱窒菌の割合が増えることが示唆されたが、その理由は既存の知見からは説明できない。今後は、脱臭担体の違いと微生物群集の関係、特に大谷石のような軽石凝灰岩と脱窒との関連に焦点を当てて、微生物群集形成のメカニズム解明を進めていきたい。

#### <引用文献>

- Andres *et al.* (2009) *Can. J. Civ. Eng.* 36:1895-1902.  
Kawakami *et al.* (2012) *J. Microbiol. Methods* 218-223.  
Kenzaka *et al.* (2005) *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5523-5531.  
Kenzaka *et al.* (2007) *Lett. Appl. Microbiol.* 49:796-799.  
Zhu *et al.* (2001) *Water Sci. Technol.* 43:285-293.

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔学会発表〕(計 3件)

Tomoko Yasuda, Miyoko Waki, Yasuyuki Fukumoto, Ayako Maeta, Mamoru Shimono, Toshimi Matsumonoto, Hirohide Uenishi, Comparison of oyaishi (pumice tuff) and rockwool as a packing media for ammonia gas removal, The 6th international conference on Biotechniques for air pollution control, 2015年9月2～4日, Ghent (Belgium)

安田知子、和木美代子、福本泰之、鈴木一好、花島大、ロックウール生物脱臭装置内の脱窒菌群集の解析、日本土壌肥料学会 2013年度名古屋大会、2013年9月11～13日、名古屋大学（名古屋市）

Tomoko Yasuda, Miyoko Waki, Kazuyoshi Suzuki, Community structural changes of amoA-encoding archaea and ammonia-oxidizing bacteria in a rockwool biofilter with water circulation system, 3rd International conference on nitrification. 2013年9月2～5日、中央大学（東京都）

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

安田 知子 (YASUDA, Tomoko)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・畜産環境研究領

域・主任研究員

研究者番号：50391371