

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510005

研究課題名（和文）イネ根圏における Anammox 細菌の定量及び水田窒素循環への寄与の解明

研究課題名（英文）Quantification of Anammox bacterial and its contribution to nitrogen circulation in rice rhizosphere

研究代表者

周 勝（SHENG ZHOU）

東京農工大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号：50451985

研究成果の概要（和文）：

本研究では窒素の安定同位体である ^{15}N を用いたトレーサー法により、水田土壌や河川底質における Anammox 及び脱窒反応活性を実測し調査を行った。さらに、水田や河川において Anammox 菌の定量及び窒素除去における Anammox 反応と脱窒反応の関係を明らかにした。

その結果、湛水および落水を繰り返す畜産廃水処理水田において Anammox 反応活性が検出されず、通年湛水している谷津田水田にて Anammox 反応活性が検出された。また、恋瀬川の河川底質にて Anammox 反応活性が検出された。窒素除去への寄与は谷津田水田では 8%未滿、恋瀬川では 3%未滿であり、淡水環境の窒素除去における Anammox の役割はわずかであることが示唆された。また、阻害試験から Anammox 反応は脱窒反応に依存していることが初めて実験データで直接証明した。

研究成果の概要（英文）：

The anaerobic ammonium oxidation (anammox) process in paddy field and river sediment was measured using ^{15}N stable isotope nitrogen. Furthermore, the quantification of Anammox bacterial and the relationship between anammox activity and denitrification activity were evaluated.

The anammox activities were not detected in paddy field that applied high livestock wastewater with flooding water and alternative flooding and drainage. Conversely, anammox activity was detected in Yasuda paddy field that flooded through the year with drained water from an upland vegetable field. On the other hand, the anammox activity measured in the sediment samples from Koiseigawa River was detected. However, the nitrogen removal by anammox process only accounted for less than 8% in Yasuda paddy field and less than 3% of the total amount of removed nitrogen, which suggested that anammox process has limited contribution to nitrogen removal in fresh water environment. However, it is the first time that the phenomena of anammox process depended on denitrification was proved by experimental data in this study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：物質循環、環境微生物

1. 研究開始当初の背景

水田はモンスーン地域において最も重要な農地で、世界の食料生産上きわめて重要であり、全収穫面積は1.5億haに達する。水田にはその他に洪水防止、水涵養、水質浄化など多面的な機能が知られている。しかし、年間投入肥料を窒素換算で2千万トンを超えるにかかわらず、水田における窒素循環、特に硝化・脱窒についていまだに不明な点が多い。水田を含む水環境における窒素の自然浄化はアンモニア(NH_4^+)の硝化により生じる亜硝酸(NO_2^-)あるいは硝酸(NO_3^-)の、窒素ガス(N_2)への脱窒が主と考えられてきた。一方、1995年に発見された新規微生物反応であるAnammox反応は、嫌気環境において、 NH_4^+ と部分的に硝化された NO_2^- を直接 N_2 まで変換する反応であり、硝化脱窒反応に比べ酸素を必要としない。既往の研究では、海域の NH_4^+ 、 NO_2^- 及び NO_3^- が共存する酸化層と還元層の界面付近におけるAnammox菌の棲息が明らかにされている。また、海域における窒素除去の20~70%はAnammox反応が担っていることが報告されており(Thamdrup and Dalsgaard, 2002)、水環境の窒素除去におけるAnammox反応の寄与は重要と考えられる。しかしながら、水田を含む淡水域におけるAnammox活性の実測例は極めて少なく、淡水域の窒素循環においてAnammox反応が果たす役割は不明である。本研究では、 NH_4^+ 、 NO_2^- 及び NO_3^- が共存し、かつ酸化層及び還元層が存在する淡水環境として、水田および河川の水-土壌界面に着目し、研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、水田を含む異なる淡水環境におけるAnammox菌の定量及び活性を評価することである。水田および河川の水-土

壌界面にてAnammox活性および脱窒活性を調査し、淡水環境の窒素除去におけるAnammox反応の役割を明らかとした。また、Anammoxと脱窒反応は同じ基質(NO_2^-)を利用するにも関わらず、両者の関係はまだ明らかにされていない。本研究ではそれらの関係も明らかにし、Anammox反応のメカニズムの解析も行った。

3. 研究の方法

室内実験として、室内実験において採取した水田土壌を実験ポットに入れ、高浸透系及び低浸透系を作成し、飼料イネを植栽した。窒素負荷100、450、900 kg-N/haで畜産排水を処理しながら、それぞれの脱窒速度及び硝化活性・Anammox活性 ^{15}N を用いて測定し、Anammox細菌の検出を試みた。

水田の評価対象として、高窒素負荷で畜産排水を施肥し、間断灌漑により水管理がなされている畜産排水処理水田と通年湛水条件が維持されている谷津田水田である。河川における調査は茨城県霞ヶ浦の流入河川である恋瀬川を評価対象とした。各調査地点において、表面水、河川底質あるいは水田土壌を採取した。採取した底質および土壌はそれぞれ深さ毎(0-2, 2-4, 4-6, 6-8および8-10 cm)に切り分け、サンプルとした。採取した底質および土壌のAnammoxおよび脱窒反応活性は窒素の安定同位体である ^{15}N を用いたトレーサ法により測定した。サンプルおよび純水からなる懸濁液に $^{15}\text{NH}_4^+$ および $^{14}\text{NO}_3^-$ 溶液あるいは $^{14}\text{NH}_4^+$ および $^{15}\text{NO}_3^-$ 溶液を添加して嫌気培養した。培養中、一定時間毎にヘッドスペースガスの $^{29}\text{N}_2$ および $^{30}\text{N}_2$ 濃度をGC-MSにより測定し、Anammoxや脱窒反応による N_2 生成速度を計算し、それぞれの活性を評価した。水試料および底質間隙水中の NH_4^+ 、 NO_3^- および

溶存有機炭素 (DOC) 濃度はイオンクロマトグラフィーおよび全有機炭素計 (TOC 計) よりそれぞれ分析した。Anammox および脱窒の関係性を明らかにするため、脱窒における NO_3^- 還元阻害剤である塩素酸ナトリウム (NaClO_3) を用いた阻害試験を実施した。また、Anammox 細菌の定量について、リアルタイム PCR を用いて、細菌の定量を行う。リアルタイム PCR 法はサーマルサイクラーと分光蛍光光度計を組み合わせた装置で、PCR の増幅産物をリアルタイムにモニターし定量解析を行う方法である。

4. 研究成果

(1) 室内実験

高浸透系は深さ 1 cm、5cm とともにほぼ酸化的であったことに対して、低浸透系では深さ 1 cm、5cm とともに還元性であった。アンモニア酸化細菌数は、高浸透系、低浸透系共に追肥後に増加し、硝化活性も追肥後に高くなることが確認できた。アンモニア酸化細菌数が高浸透系と低浸透系で同程度であっても、硝化活性は高浸透系の方が高く、高浸透系では低浸透系よりアンモニア酸化菌数当たりの活性が高いことが示唆された。これは高浸透系では落水時に十分な酸素供給がされるためと考えられる。また、最大脱窒速度が高浸透系で $1.0 \text{ g-N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ 、低浸透系で $0.3 \text{ g-N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ と、高浸透系で低浸透系より高い脱窒速度が得られた。これは、高浸透系では硝化反応が促進され、脱窒反応の基質である硝酸態窒素がより多く生成されたと考えられる。一方、Anammox 細菌が属している *Planctomycetes* 門の細菌群集構造は、窒素負荷量よりも浸透速度に影響を受けることが明らかになった。また、PCR 結果より、Anammox 細菌のポジティブコントロールと同じ位置にバンドを確認できたため、Anammox 菌が存在している可能性はあると考えられる。さらに、Nested PCR を改良することにより、Anammox 細菌に比較的近縁な未知の *Planctomycetes* を検出した。しかし、ポット実験の表層土壌を用いて

Anammox 活性は確認できなかった。水田土壌における Anammox 細菌の存在場所について更なる検討が必要となる。

(2) 水田の Anammox 反応活性の評価

① 畜産排水処理水田の Anammox 反応活性

飼料イネを栽培している実際の水田において Anammox 活性を測定した。実験系として異なる畜産排水負荷 (100 および 600 kg-N ha^{-1}) および異なる水管理 (常時湛水及び低水位管理) を設定した。Anammox 活性測定用の水田土壌は異なる窒素負荷の畜産排水を施用した水田 (常時湛水) から 20 cm の土壌コアを採取した。採取した土壌コアを $0\sim 5 \text{ cm}$ 、 $5\sim 10 \text{ cm}$ 、 $10\sim 15 \text{ cm}$ と $15\sim 20 \text{ cm}$ に 4 層に分けて、バイアルビンに入れて嫌氣的に保ち、 ^{15}N 標識した NH_4 または NO_2/NO_3 を添加し、ヘッドスペースガス中に生成する $^{29}\text{N}_2$ 、 $^{30}\text{N}_2$ を測定してそれぞれ Anammox 活性、脱窒活性を測定した。その結果、いずれの水田系より Anammox 反応活性が検出されなかったが、脱窒反応活性が 600 kg-N/ha の系が $523 \mu\text{mol-N}_2/\text{vial/h}$ 、 100 kg-N/ha の系は $366 \mu\text{mol-N}_2/\text{vial/h}$ であり、追肥量の高い方の脱窒反応活性が高いことが分かった。また、脱窒活性は土壌表層から 20 cm の深さまで下がる傾向が見られた。これは施用した畜産排水に含まれるアンモニア態窒素が酸素のある土壌上層部における硝化細菌に硝化され硝酸塩まで変換され脱窒反応を促進されたと考えられる。Anammox 反応活性が検出されなかった原因として、畜産排水処理水田では湛水落水の条件を繰り返し、水位の変動により土壌の酸化還元条件も変わったと考えられる。以上の結果より、水田の状況によって Anammox 活性が大きく異なることがわかった。Anammox 細菌の増殖が遅く、棲息している環境に影響されやすい。畜産排水を施用した飼料イネ水田において、Anammox 細菌に比較的近縁な未知の *Planctomycetes* を検出したが、Anammox 活性がなかったことがわかった。

② 谷津田水田の Anammox 反応活性

一方、畑の浸透水より常時湛水した谷津田水田から 10 cm の土壌コアを採取して、2 cm ごとに 5 つの層を分けて、Anammox 活性及び脱窒活性を測定した。その結果、谷津田水田より Anammox 反応活性を検出し、活性は 0.15 ~ 2.15 nmol - N₂/g-slurry/h であり、窒素除去における Anammox 反応の寄与は 8% ぐらいであることが分かった。図 1 に谷津田水田土壌における Anammox および脱窒活性を示す。一方、水田土壌の脱窒反応活性は土壌の上層から下へ下がる傾向があり、Anammox 反応活性もそれに伴う傾向が観察された。また、その地点の水質を解析したが、Anammox 反応に使われる亜硝酸が全く存在せず、硝酸が僅かに検出された環境で Anammox 活性が検出された。畜産排水処理水田との比較から、Anammox 菌が存在する条件として、NH₄⁺および NO₂⁻および嫌気環境の存在に加えてその環境の永続的な安定性が必要と考えられた。また、Anammox 及び脱窒反応活性は深い位置程低くなる傾向にあり、NO₂⁻が検出されなかった。従って、谷津田水田土壌においても Anammox は脱窒反応より生じた亜硝酸を利用していると考えられた。

③ 谷津田水田における Anammox と脱窒反応の関係

我々は水田土壌における Anammox 反応は硝酸の脱窒で生じた亜硝酸を利用していると考え、脱窒反応の硝酸塩から亜硝酸塩までの還元経路を阻害させ、水田土壌に阻害剤の添加有無の Anammox 及び脱窒反応活性を評価した。谷津田水田土壌においても NaClO₃-の添加により、脱窒活性の阻害が確認された(図 2a)。また、Anammox 活性は、NO₂⁻を基質とした場合 NaClO₃⁻の影響を受けないが(図 2b)、NO₃⁻を基質とした場合は NaClO₃⁻の影響を受け、低下した(図 2c)。以上の結果より、谷津田水田土壌において、Anammox 反応は脱窒反応の硝酸の脱窒で生じた亜硝酸塩を利用していることを初めて実験データで直接証明

した。

(3) 河川の Anammox 反応活性の評価

① 河川底質の Anammox 反応活性

恋瀬川底質において Anammox 反応活性が検出された。また、脱窒反応活性も測定した結果、河川底質における Anammox 反応の窒素除去への寄与は 3%未満だった。また、Anammox 及び脱窒反応活性は、深い位置程低くなる傾向にあった。また、河川水や底質の水質と活性を比較したところ、いずれの深さの底質においても Anammox 反応の基質である NO₂⁻が検出されなかった。一方、NO₃⁻がごく僅かに検出されており、Anammox 菌は NO₃⁻の脱窒の結果生じた NO₂⁻を利用している、すなわち、Anammox 菌の脱窒菌への依存が示唆された。

② 河川底質における Anammox と脱窒反応の関係

河川底質における Anammox と脱窒反応の関係を明らかにするため、河川底質を異なる濃度の硝酸塩基質において培養し、Anammox 及び脱窒反応活性を評価した。その結果を図 3 及び図 4 に示した。図より、異なる濃度の硝酸塩において脱窒反応活性が Michaelis-Menten 式に従うと伴に Anammox 反応活性も Michaelis-Menten に従った。それは Anammox 反応は脱窒反応に依存していることを示唆された。

また、Anammox および脱窒の関係のメカニズムを明らかにするため、脱窒における NO₃⁻還元阻害剤である NaClO₃を用いた阻害試験を実施した。結果は谷津田水田と同様である。脱窒反応の阻害剤である NaClO₃の添加により、脱窒活性の阻害が確認された。一方、Anammox 活性は NO₂⁻を基質とした場合 NaClO₃⁻の影響を受けないが、NO₃⁻を基質とした場合は低下した。以上の結果は、Anammox 反応は NO₃⁻の脱窒より生じる NO₂⁻を利用していることを示唆しており、Anammox 反応の脱窒反応への依存が実験的に明らかとされた。

(4) 総括

畜産排水を施用した水田において Anammox 反応活性が検出されなかった原因として、畜産排水処理水田では湛水落水の条件を繰り返す、水位の変動により土壌の酸化還元条件も変わったと考えられる。一方、谷津田水田及び恋瀬川の底質において Anammox 反応活性が検出された。窒素除去への寄与は谷津田水田では 8%未満、恋瀬川では 3%未満であり、淡水環境の窒素除去における Anammox の役割はわずかであることが示唆された。また、阻害試験から Anammox 反応は脱窒反応に依存していることが初めて実験データで直接証明した。

【附図】

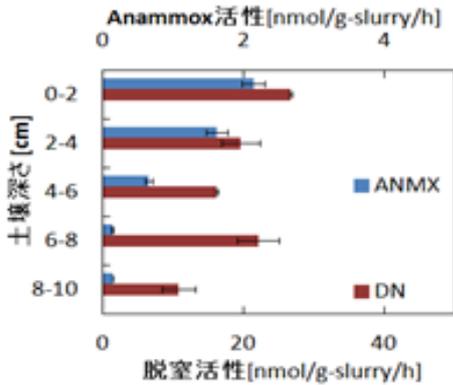


図 1. 谷津田水田土壌の Anammox 及び脱窒反応活性

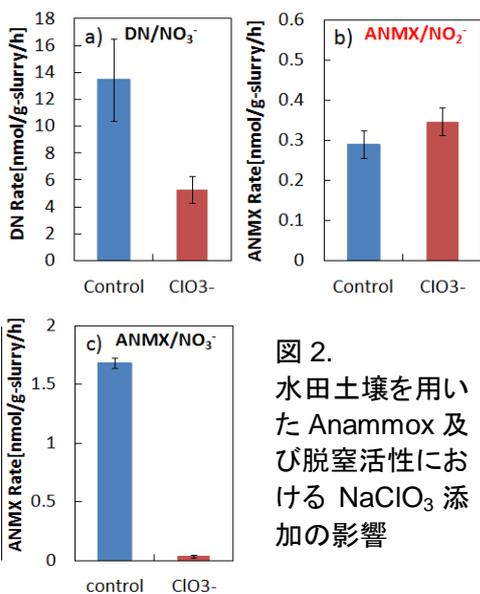


図 2. 水田土壌を用いた Anammox 及び脱窒活性における NaClO₃ 添加の影響

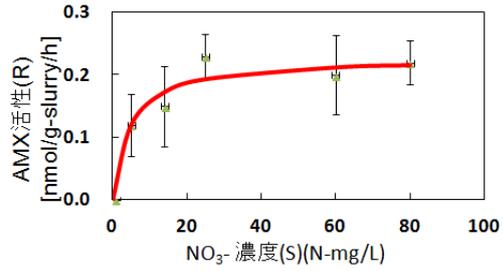


図 3. 異なる硝酸塩基質における Anammox 反応活性

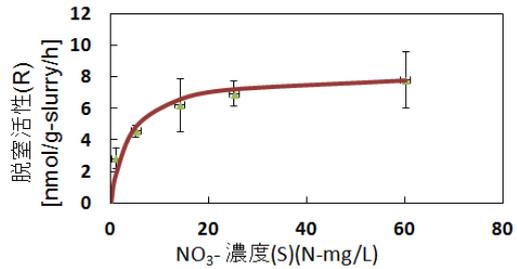


図 4. 異なる硝酸塩基質における脱窒反応活性

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 Sheng Zhou, Yukina Sakiyama, Shohei Riya, Xiangfu Song, Akihiko Terada, Masaaki Hosomi, Assessing nitrification and denitrification in a paddy soil with different water dynamics and applied liquid cattle waste using the ¹⁵N isotopic technique, Science of the Total Environment (査読有), 430(15), 93-100, 2012.
- ② Akihiko Terada, Sheng Zhou, Masaaki Hosomi, Anammox ubiquity in natural environment and recent advances of anammox process: A review, Clean Technologies and Environmental Policy (査読有), 13(6), 759-781, 2011.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 利谷翔平、周勝、小原裕三、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. 9. 10-11、東北工業大学(仙台)
- ② S. Zhou, R. Higuchi, A. Terada, M. Nishikawa, M. Hosomi, Detection of anammox bacteria and activity in sediments from different riverine environments, Joint conference of SWS, WETPOL and Wetland Biogeochemistry Symposium, Prague, Czech Republic, 3-8 July 2011.
- ③ 周勝、崎山幸奈、菅原翔、利谷翔平、寺田昭彦、細見正明、 ^{15}N を用いた畜産排水施用水田の窒素挙動の解明、日本水環境学会第 45 回年会、2011. 3. 19、北海道大学(札幌)。
- ④ 周勝、 ^{15}N トレーサーを用いた水田窒素挙動の測定、日本水環境学会東北支部第 5 回人工湿地ワークショップ、2010. 8. 27、東北大学農学部川渡フィールドセンター(仙台)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

周 勝 (SHENG ZHOU)

東京農工大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号 : 50451985

(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