

RF-1002

水田のイネ根圏に棲息する脱窒を担う微生物群 の同定・定量と窒素除去への寄与の解明



東京農工大学大学院工学研究院 応用化学部門
寺田昭彦 (akte@cc.tuat.ac.jp)・周勝

実施期間： 平成22年度～平成24年度

累積予算額： 平成22年度 4,680千円
平成23年度 4,451千円
平成24年度 4,001千円
合計13,132千円(間接経費込)

本日の発表内容

- 研究背景
- 目的および研究体制
- 研究成果
- 本研究成果の学術的意義
- 本研究成果の行政的意義
- まとめ

研究背景1

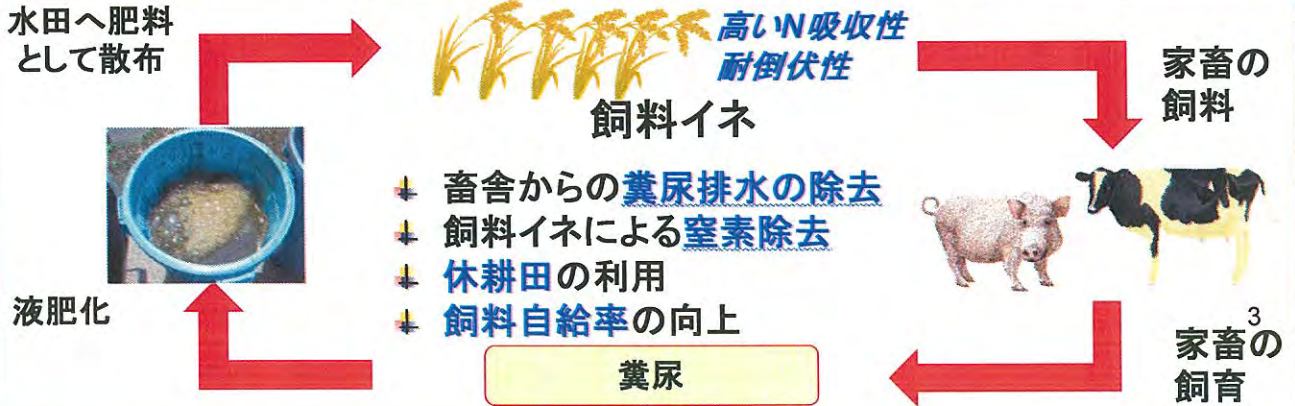
水田の自浄作用を用いて畜産排水(高窒素含有排水)を浄化

埼玉県妻沼にて：飼料イネを植栽した水田に液肥を撒く



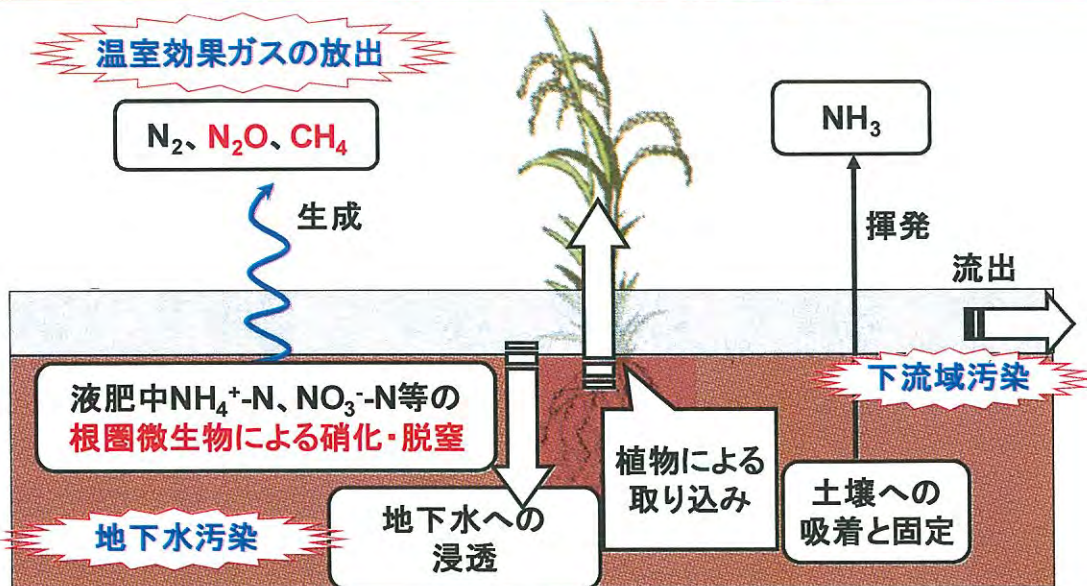
- 水田：モンスーン地域の湿地のひとつ
 - 世界に収穫面積1.5億ヘクタール
 - 食糧生産
 - 洪水の防止
 - 水涵養
 - 水質浄化(窒素除去)
- 多面的な機能を有する

水田を畜産排水処理の反応場とし、「飼料イネ」を核とする循環型社会構築へ



研究背景2

畜産糞尿液肥利用時の窒素挙動



■ 液肥：窒素を高濃度に含む ➡ 下流域・地下水汚染ならびに温室効果ガス放出の問題

土壤中微生物のポテンシャルを最大限に生かして畜産排水を処理



研究目的

- イネの根圏の窒素除去に関わる微生物群の同定・定量・分布の解明を目指す



多様な窒素除去経路の解明し、飼料イネを用いた水田による畜産排水の安定した処理と温室効果ガス放出の削減が達成できる維持管理法の指針を示す。

課題

【サブテーマ1】

植栽の有無による水田土壌の窒素収支・微生物活性に関する研究

【サブテーマ2】

窒素除去に関与する微生物群の同定と変遷に関する研究

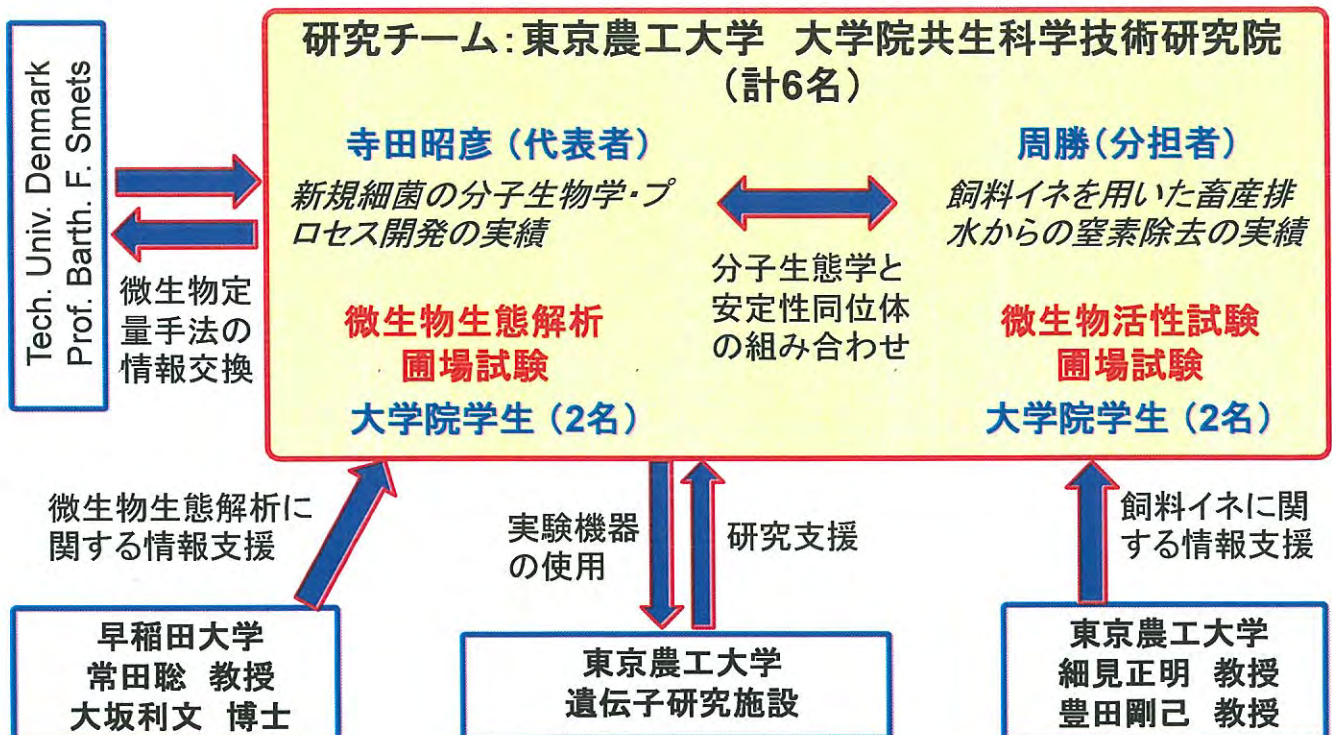
【サブテーマ3】

イネ根圏に棲息する微生物群の空間分布と存在量に関する研究

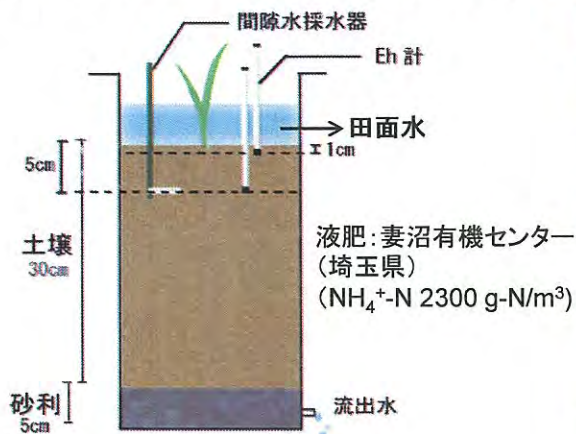
【サブテーマ4】

水田への施肥量と窒素除去能ならびに微生物の多様性、温室効果ガス放出の評価に関する研究

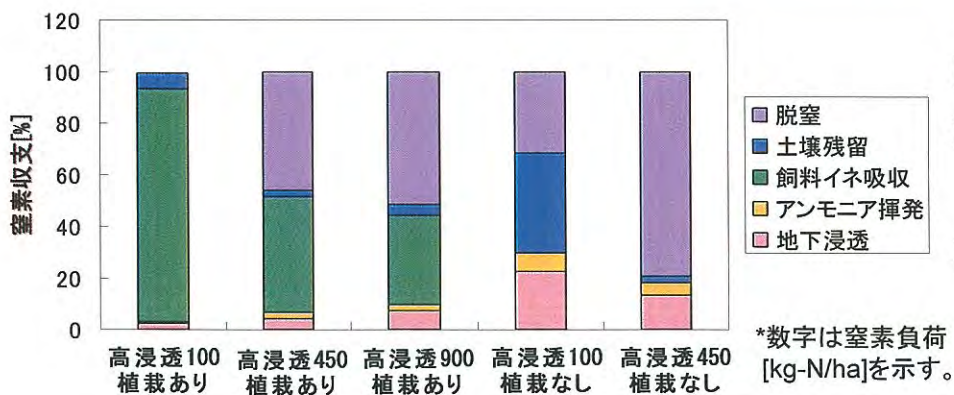
研究体制と支援



【サブテーマ1結果】 ポット試験による窒素収支の解明 7



施肥スケジュール	
基肥	6月11日
田植え	6月12日
追肥①(系ごとに異なる負荷)	7月13日
中干し	7月27日-8月3日
追肥②	8月12日
追肥③	9月10日
落水	10月16日-

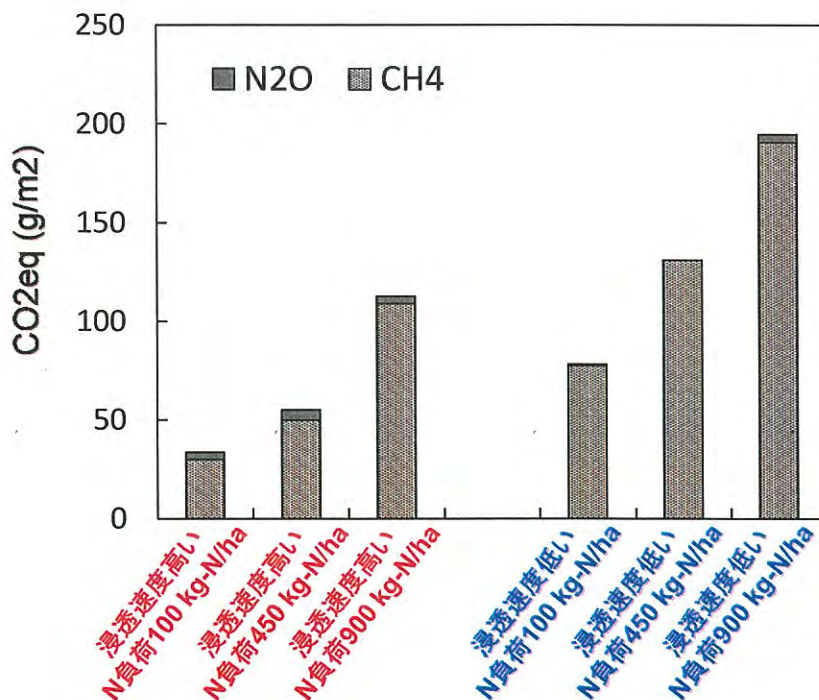


【結果まとめ】

- 窒素負荷の増大:
 - 脱窒の寄与増大
- 高浸透系の植栽なし:
 - 地下浸透の危険性の増大



【サブテーマ1結果】 ポット試験による窒素収支の解明 8



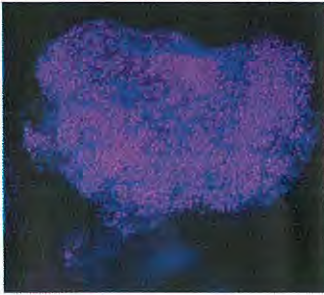
N₂O = 296 CO₂
 CH₄ = 23 CO₂

- 窒素負荷の増大 ∝ 温室効果ガス放出量
- 高浸透系からの温室効果ガス放出量 > 低浸透系からの温室効果ガス放出量
- CH₄による温室効果 >> N₂Oによる温室効果 (CH₄: 全量の89-97%)



【サブテーマ2】ターゲットとする細菌群

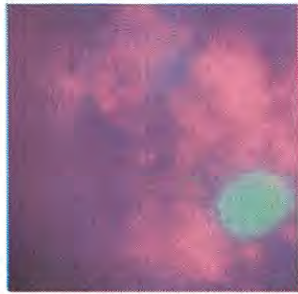
近年新たに発見された脱窒を担う細菌群 → 水田土壌でC, N循環に関与？



Terada et al. (2009)

嫌気性アンモニア酸化細菌 (アナモックス細菌; *Planctomyces*門に帰属)

- 脱窒用排水処理リアクターより発見 (1995)
- 独立栄養細菌
- 嫌氣的にアンモニア、亜硝酸を窒素ガスに変換
 - $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$
- **N_2O を生産しない**



Raghoebarsing et al. (2006)

脱窒性メタン酸化細菌 (NC10門に帰属; NC10)

- 運河の底泥より発見 (2006)
- 独立栄養細菌
- 嫌氣的に亜硝酸・硝酸を利用してメタンを酸化
 - $5\text{CH}_4 + 8\text{NO}_3^- + 8\text{H}^+ \rightarrow 5\text{CO}_2 + 4\text{N}_2 + 14\text{H}_2\text{O}$
 - $3\text{CH}_4 + 8\text{NO}_2^- + 8\text{H}^+ \rightarrow 3\text{CO}_2 + 4\text{N}_2 + 10\text{H}_2\text{O}$
- **CH_4 を消費する**

これらの脱窒を担う独立栄養性の細菌群が水田に棲息している可能性



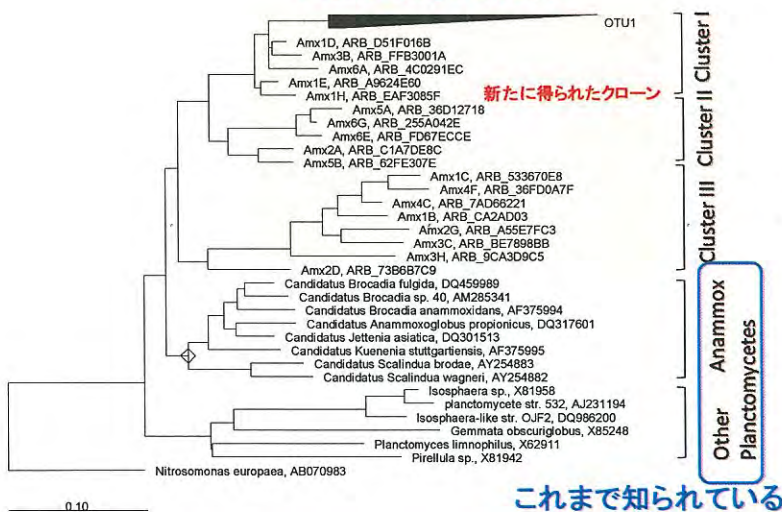
【サブテーマ2結果】 Anammox反応を担う

*Planctomyces*門群の解析

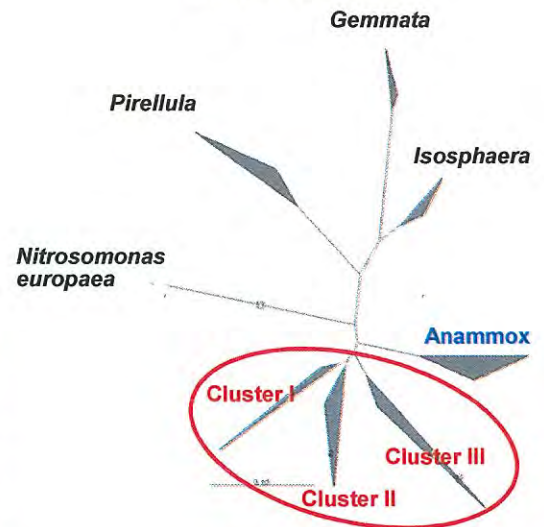
*Planctomyces*門: Anammox細菌を含む細菌門

無根系統樹

飼料水田に棲息する
*Planctomyces*門



有根系統樹



飼料イネ水田に棲息する
*Planctomyces*門

➤ 飼料イネポットに棲息するアナモックス反応を担う細菌はこれまで報告されていない全く新規な細菌群の可能性

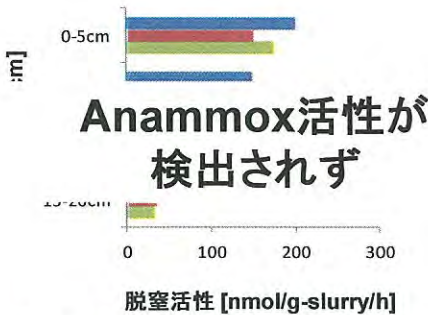


【サブテーマ2結果】 飼料イネ水田のAnammox活性は？ ¹¹

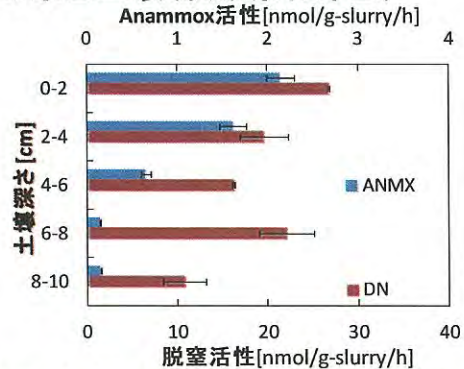


After Amano et al. (2007)

飼料イネ水田のAnammox活性



他の水田土壌(茨城県谷津田)



- 飼料イネ水田のAnammoxは他の水田と比較して活性が低い
- 畜産排水に含まれる有機物の影響が大きい可能性



【サブテーマ2結果】 NC10細菌を検出する新規プライマーの開発 ¹²

既知のPCRプライマー(8f-1043r)により、NC10門細菌を検出

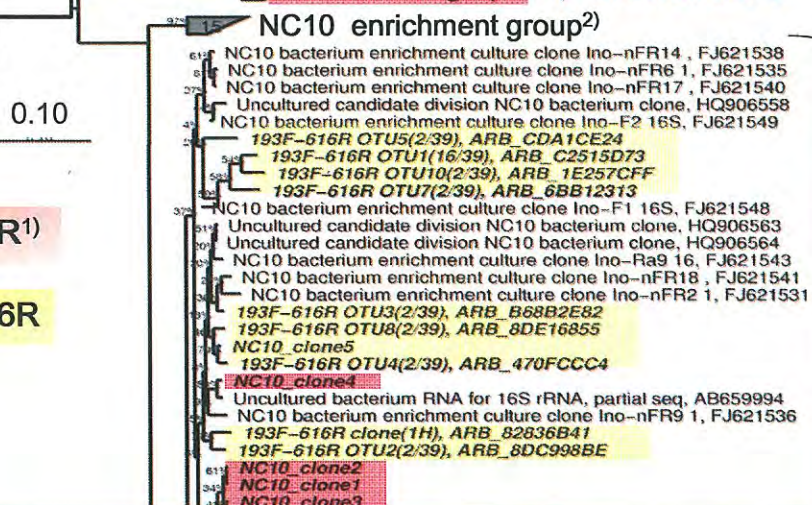
- しかし、多くのArtifactを含み定量用プライマーとしては利用できず
- **新規検出用DNAプライマーを設計(193f-616r)**

PCR産物の16S rRNA解析結果
39clone/39clone
→NC10門に帰属

Name	Sequence (5' to 3')
193F	GGRGGAYCAAAGGGGGCGAG
616R	ACGCGGRTCTCGGTTTRAGC

Nitrosomonas europaea, AB070983

8f-1043r clone group → Chloroflex門



8F-1043R¹⁾

193F-616R

1) Steinberg et al. 2008. AEM.
2) Ettwig et al. 2009. AEM.

未培養グループに近縁なNC10門細菌の存在を確認



1. 【落水(中干し)】によるメタン排出削減&微生物叢制御

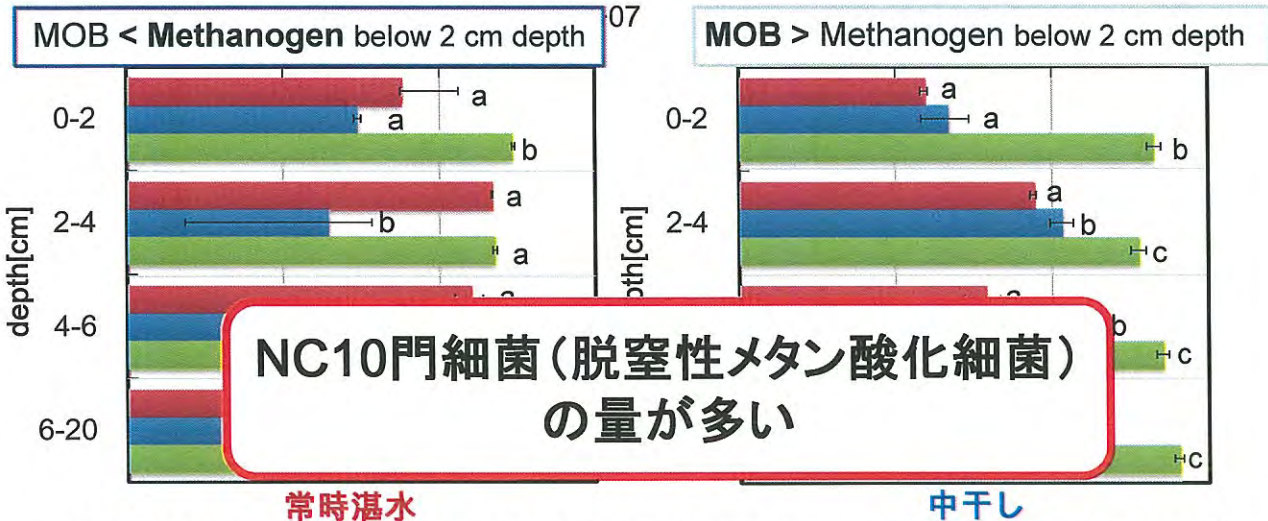
3回目追肥2週間後
(移植後日数111 day)

Target gene

- メタン菌 ■ *mcrA*
- メタン酸化細菌 ■ *pmoA*
- NC10門細菌 ■ 16S rRNA

Copy number [copies/g-dry soil]

Copy number [copies/g-dry soil]



Different letters at the same depth indicate significant difference ($P < 0.05$, $n=3$)

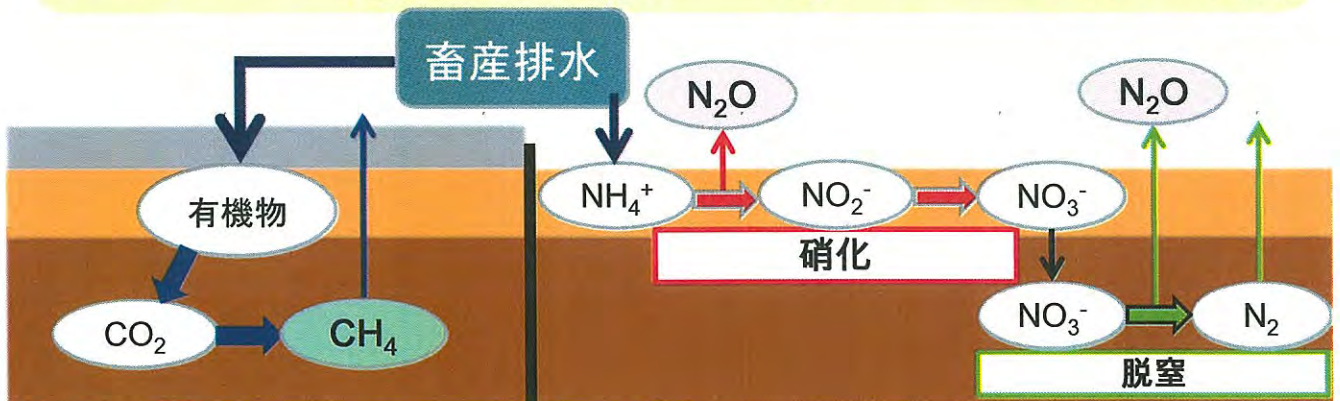
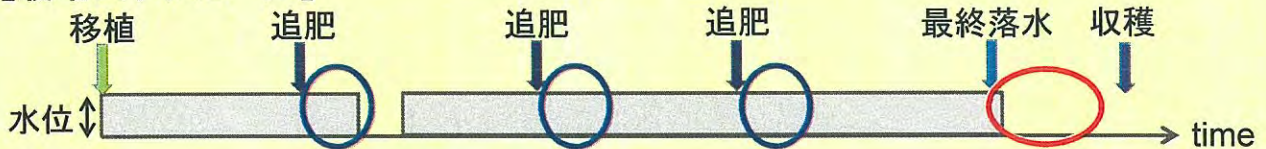


サブテーマ4 温室効果ガス低減に向けた戦術1

CH₄とN₂Oの排出特性の違い

追肥後と最終落水後に排出量増大

【栽培スケジュール】



湛水(還元状態)+有機物
→CH₄生成促進

落水(酸化状態)+NH₄⁺残存
→N₂O生成促進



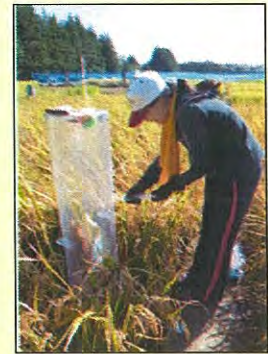
サブテーマ4 温室効果ガス低減に向けた戦術2

【圃場実験】栽培管理

水管理2種類と施肥パターン2種類を組み合わせた4系で実施



茨城県つくば市にある
試験水田(40 m²)を4
枚使用
(国立農業環境技術研究所)



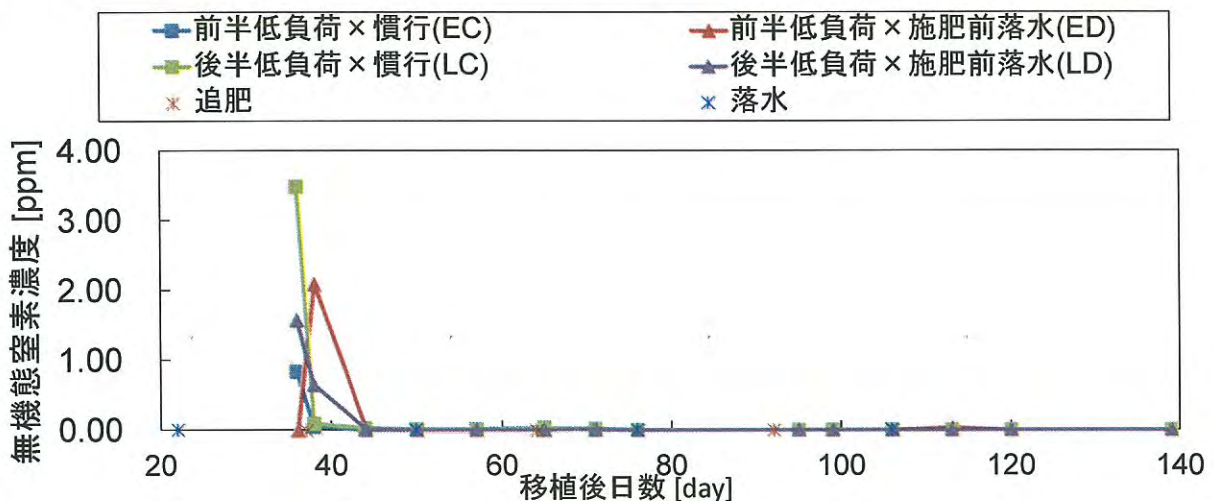
II. 施肥パターン

	基肥 [kg-N/ha]	1回目追肥 [kg-N/ha]	2回目追肥 [kg-N/ha]	3回目追肥 [kg-N/ha]	合計負荷量 [kg-N/ha]
①前半低負荷	50	20.5	101	123	294
②後半低負荷	50	82.1	101	30.8	264



【サブテーマ4結果】窒素の流出量評価

◆間隙水(深さ20 cm)中の無機態窒素濃度

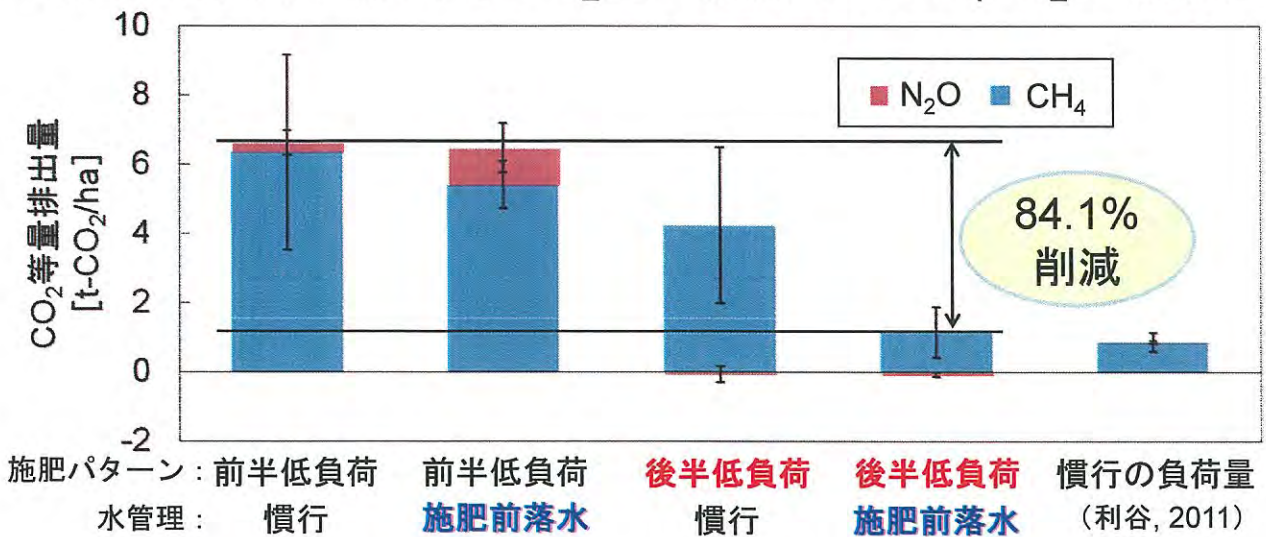


➡ 間隙水の窒素濃度10 ppm以下(地下水の環境基準 : 10 ppm以下)

流出水による汚染はなく、水田内で窒素除去が可能(<300 kg-N/ha)



◆栽培期間中におけるCO₂量に換算したCH₄・N₂O 排出量

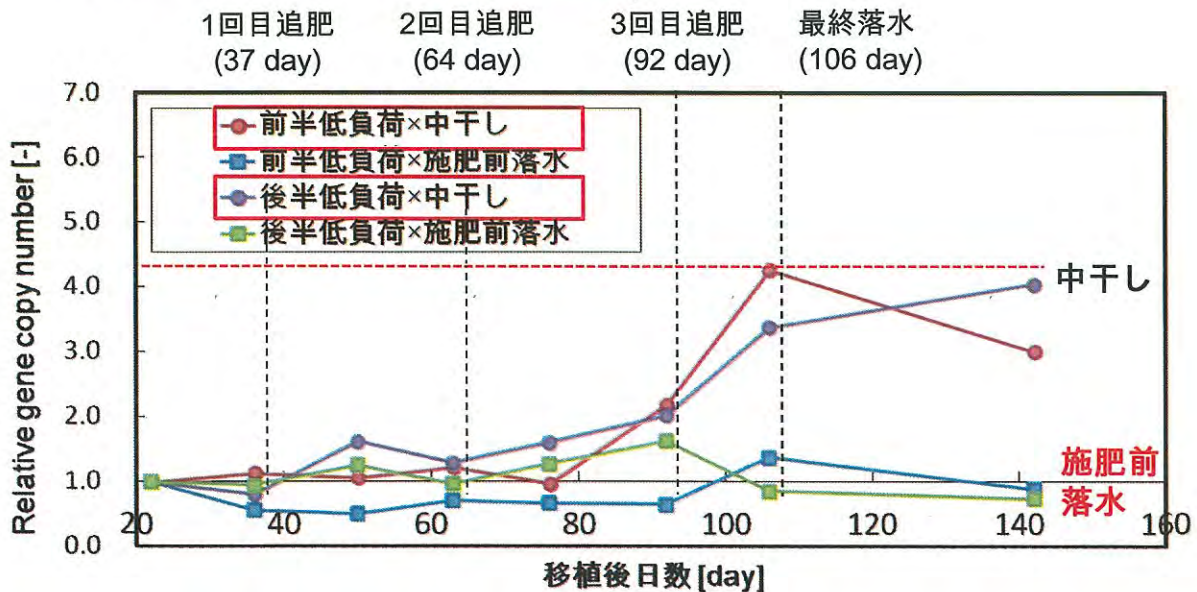


後半低負荷および追肥前落水により食用水田(100 kg N ha⁻¹)並みの温室効果ガス排出で畜産排水(ca. 300 kg N ha⁻¹)処理可能

施肥前落水・後半低負荷によるCH₄およびN₂Oの同時削減成功

【サブテーマ4結果】 栽培期間中のメタン菌のダイナミクス

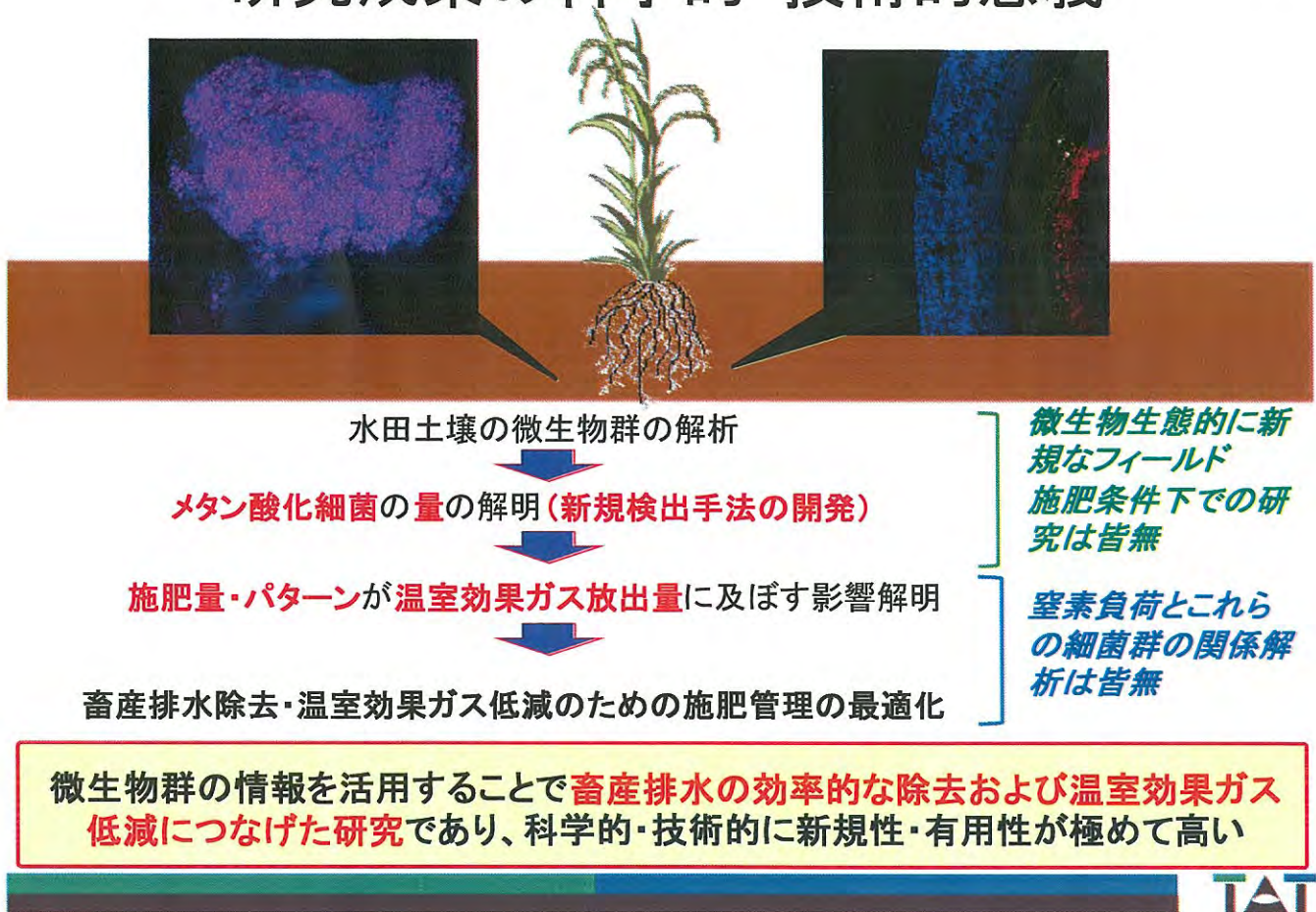
窒素除去に関する微生物量: 大きな変化なし
 メタン酸化(メタン消費)に関する微生物量: 大きな変化なし
 メタン生成菌の微生物量: **大きな違いあり**



水管理【施肥前落水】によって栽培後期のメタン菌増加を抑制

研究成果の科学的・技術的意義

19

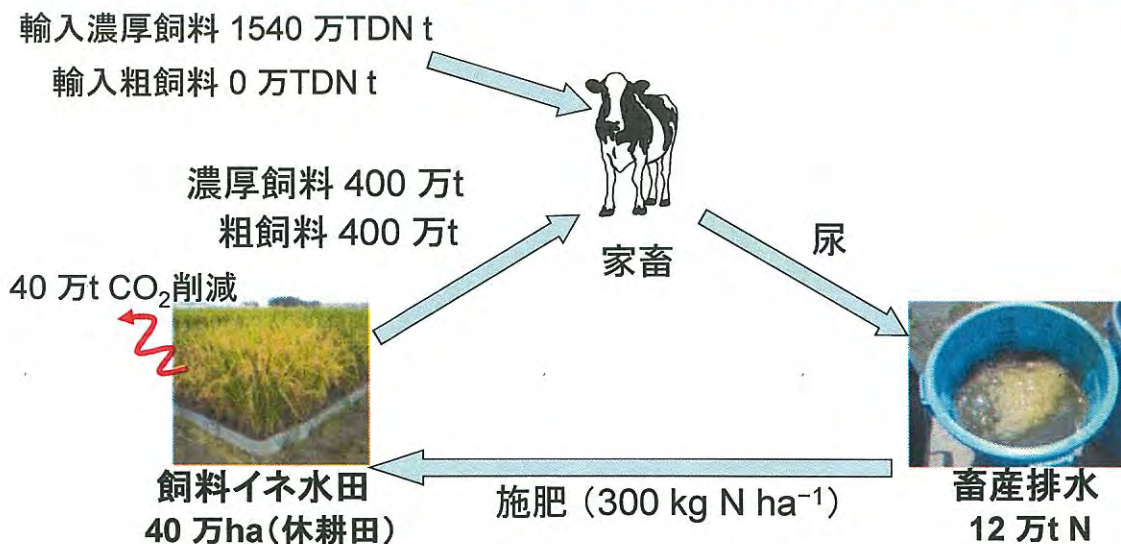


TAT

研究成果の社会的・経済的・行政的意義

20

飼料イネ水田による低環境負荷型畜産排水処理システム



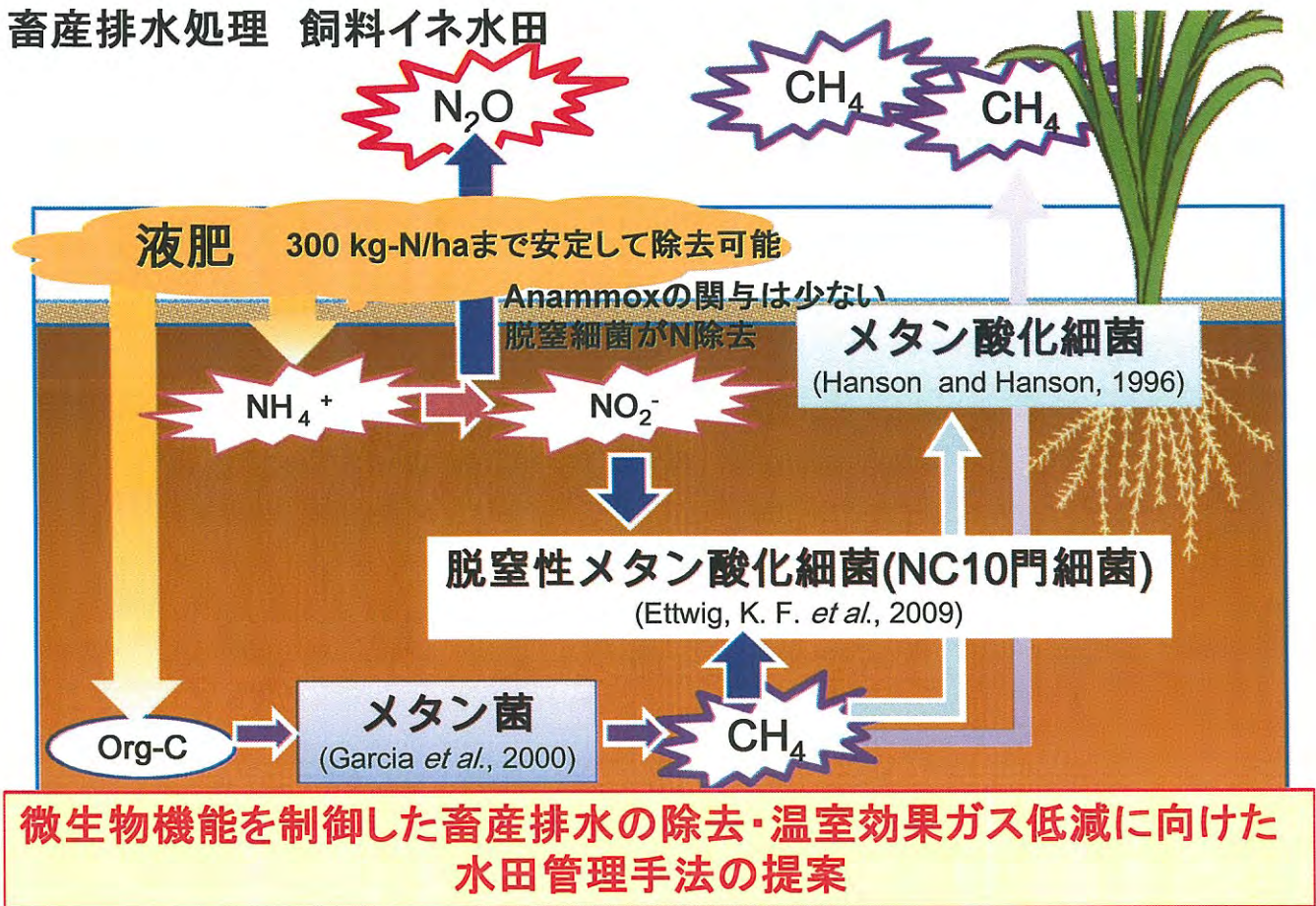
- 畜産排水の50%を水環境汚染のリスクなく処理可能
- 飼料自給率を25%(現状)から41%まで向上可能
- 飼料輸入に伴うCO₂を40万トン削減(飼料イネからの排出を考慮)

畜産排水処理法としての飼料イネの導入によりCO₂削減、飼料自給率の向上が期待される

TAT

本研究のまとめ

畜産排水処理 飼料イネ水田



ご清聴ありがとうございました。

謝辞

本研究は環境省環境研究総合推進費(RF-1002)の補助を受けて行われた。ここに記して謝意を表す。

共同研究者(敬称略)

細見正明(東京農工大学)
豊田剛己(東京農工大学)
常田聡(早稲田大学)
大坂利文(早稲田大学)
Barth F. Smets(Tech. Univ. Denmark)
小原裕三(農環研)

利谷翔平(東京農工大学、JSPS)
上村美羽(東京農工大学)
ソドリゲ(東京農工大学)
室井友里恵(東京農工大学)
臼井陽菜子(東京農工大学)

他、ご援助・ご尽力いただいた全ての皆様