

課題名 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

課題代表者名 寺田昭彦(東京農工大学 大学院工学研究院 応用化学部門  
細見・寺田研究室 准教授)

研究実施期間 平成22～24年度

累計予算額 累計予算額 13,127千円(うち24年度4,001千円)  
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード(5～10個以下程度) 畜産排水、飼料イネ、水田、窒素収支、硝化、脱窒、Anammox、脱窒性メタン酸化、メタン、亜酸化窒素

## 研究体制

- (1) 植栽の有無による水田土壌から採取した作土層および根圏の微生物活性に関する研究 (東京農工大学)
- (2) 窒素除去に關与する“活性のある”微生物群の同定と変遷に関する研究 (東京農工大学)
- (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 (東京農工大学)
- (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 (東京農工大学)

## 研究概要

### 1. はじめに(研究背景等)

水田はイネ生産ばかりでなく水質浄化など多面的機能を有しており、窒素を高濃度に含む畜産排水を水田に施用して、肥料としての利用と窒素除去の畜産排水処理が同時に達成できる可能性がある。このとき、液肥の過剰な散布は水質汚濁につながるため、水田内での水質管理、特に窒素収支の把握が必要である。本研究では、メタン(CH<sub>4</sub>)や亜酸化窒素(N<sub>2</sub>O)といった温室効果ガスを発生せず、窒素除去を行えるという新たな窒素代謝経路を持つ微生物群を同定し、その浄化能力を最大限に発揮できる条件を明らかにする(図1)。これより、水田施肥管理条件を決定でき、畜産排水の窒素を高効率に除去することに加え、温室効果ガス放出の抑制にもつながることが期待される。

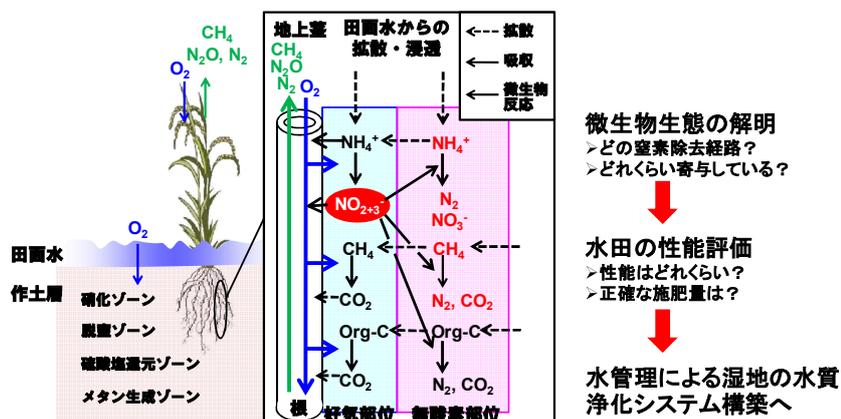


図1 本研究の概略図

### 2. 研究開発目的

本研究では、畜産排水由来の液肥を施肥している水田に着目し、イネの根圏に存在する窒素循環に関わる微生物群の同定・定量・空間分布の解明を目指し、水田における畜産排水からの窒素除去との関係を明らかにする。窒素はアンモニアを亜硝酸・硝酸に酸化する硝化反応と亜硝酸・硝酸を窒素ガスに還元する従属栄養性の脱窒反応の2つの異なる生物反応を経て無害化される。近年、硝化・脱窒以外の窒素除去経路が明らかになっている。一つは嫌気性アンモニア酸化(Anammox)であり、独立栄養性のAnammox細菌により嫌気条件下でアンモニアと亜硝酸を窒素ガスに変換する。もう一方は、メタン脱窒であり、亜硝酸・硝酸がメタンと反応して窒素ガスに変換される。これらの反応を担う細菌の特徴として、温室効果ガスである亜酸化窒素・メタンを放出しないため、水田からの温室効果ガスの放出を抑制するメリットを有する。したがって、畜産排水の処理システムとしての水田の管理上、これらの微生物群の動態の把握は極めて重要である。そこで、本研究で具体的に明らかにすべき課

題は次の3点である。1. イネの根圏にAnammox細菌および脱窒性メタン酸化細菌はどれくらいいるか？; 2. これらの微生物群は水田の窒素除去の寄与にどれだけ貢献しているのか？; 3. 水田への畜産排水の施肥量により、これらの微生物群を保持させることが可能か？これらの疑問点を明らかにすべく、以下の検討を行う。

(1) 植栽の有無による水田土壌から採取した作土層および根圏の微生物活性に関する研究  
作土層もしくは植栽したイネの根圏から得られた土壌による安定性同位体<sup>15</sup>Nを添加することで窒素収支および脱窒速度を明らかにする。

(2) 窒素除去に関与する“活性のある”微生物群の同定と変遷に関する研究

イネの根圏近傍の微生物群の多様性評価ならびに施肥量に対する微生物群の変遷を追跡し、実際に窒素除去に関与する微生物群の同定を行う。

(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

(2)で同定した微生物を検出できるPCRプライマーを用いて、窒素除去を担う微生物群の定量を行う。また、根圏の微生物の空間分布を確認する。

### 3. 研究開発の方法

#### (1) 植栽の有無による水田土壌から採取した作土層および根圏の微生物活性に関する研究

ポットを用いて人工液肥の窒素施肥量(100 kg-N/ha, 450 kg-N/ha, 900 kg-N/ha)、植栽(飼料イネ“タカナリ”)の有無や水の浸透速度(1.74 cm/day, 0.42 cm/day)を体系的に評価するために、飼料イネを植栽するポットを用いてそれぞれの窒素除去能力、窒素収支、温室効果ガス(CH<sub>4</sub>とN<sub>2</sub>O)放出量評価、さらには<sup>15</sup>Nトレーサーを用いた脱窒速度評価を行った。これにより、飼料イネの畜産排水の除去性能を窒素の収支から評価した。次に、飼料イネ水田土壌の嫌気性アンモニア酸化(Anammox)活性を評価するために各深さごとに区分けした水田土壌を<sup>15</sup>Nトレーサーを用いた。四重極型GC/MSを用いることにより、脱窒およびAnammox活性を分画することで、水田土壌のAnammox活性を評価した。

#### (2) 窒素除去に関与する“活性のある”微生物群の同定と変遷に関する研究

窒素除去のためには、窒素源であるアンモニア態窒素が亜硝酸・硝酸に酸化される必要がある。これまでの酸素に関する窒素収支では通常の硝化・脱窒反応だけではこれまでの結果で得られた窒素分を酸化するには酸素が足りないことが考えられ、近年発見された新しい窒素除去経路であるAnammox反応や脱窒性メタン酸化反応が起こっている可能性がある。これまでのところ、海底の堆積物、湖沼・河川の底泥等でAnammox反応を担う*Planctomycetes*門に属する細菌(Anammox細菌)や脱窒性メタン酸化を行う細菌の分子生物学的検出は行われているが、これを初めて飼料イネ水田土壌での検出に適用し、系統解析を行った。また、脱窒性メタン酸化細菌に関しては、定量が可能な新規PCRプライマーの開発を行った。

#### (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

イネ根圏は大気から吸収した酸素を根圏生物に供給する場であり、また、有機物を供給することが知られている。そこで、根圏に棲息している微生物群の系統を明らかにすることにより、根圏でどんな反応が起こっているかのヒントを得ることができ、水田および根圏での反応メカニズムの解明につながると考えられる。そこで、定量PCR法および蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション法を適用することにより、作土層およびイネ根圏の脱窒細菌およびAnammox細菌が帰属する*Planctomycetes*門の定量を行い、窒素除去性能との関連を評価した。また、(2)で開発した脱窒性メタン酸化を担う細菌群の定量に関しては、定量PCR法を用いることによって、

#### (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

これまでのポット試験の検討により、水田管理において水を引き抜いてイネの根ぐさを防ぐ中干しによる落水管理がおよぼす温室効果ガス放出の特性について評価した。特に、これまでの研究成果よりメタンの放出量に及ぼす影響とメタンをめぐる微生物群の量に関する評価を行うため、茨城県つくば市にある農業環境技術研究所にある実験圃場において常時湛水管理および中干し管理を実施し、その際の中干しによるメタン削減効果およびメタン生成・消費に関わる土壌微生物群への影響調査を目的とした。この研究成果により、中干しという水田の表面水管理にメタン抑制効果がある可能性が示唆された。また、水田からのメタン発生量のピークは畜産排水の液肥を投入する施肥後に観察されていることから、施肥前に落水を行うことがより効果的なメタン抑制に繋がると考えられる。そこで本実験では実験圃場において施肥前に約2週間程度の落水期間を設ける「施肥前落水」管理を実施し、その際のメタン削減効果およびメタン生成・消費に関わる土壌微生物群への影響とメタン排出量との関係調査を目的とした。

### 4. 結果及び考察

#### (1) 植栽の有無による水田土壌から採取した作土層および根圏の微生物活性に関する研究

畜産排水由来の液肥の窒素負荷が450、900 kg-N/haの系は、消失した窒素分が増大していることが確認で

きた。消失した窒素分を生物学的な脱窒とみなしたとすると、植栽ありの窒素負荷450、900 kg-N/haの系では脱窒による窒素除去の割合が高いことが示された(図2)。また、飼料イネの植栽により、高い窒素負荷対しても窒素化合物の地下への浸透を低減することができることが明らかになった。窒素負荷450 kg-N/ha、植栽有りの浸透速度の違いが脱窒速度に及ぼす影響を<sup>15</sup>Nトレーサー法を用いて評価した。最大脱窒速度は高浸透系で1.04 g-N/m<sup>2</sup>/day、低浸透系で0.31g-N/m<sup>2</sup>/dayと高浸透系の方が高く、植栽期間を通して高浸透系の方が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土壤中の酸化還元電位(Eh)が酸化状態と還元状態を繰り返しているために、酸化状態で起こる硝化反応が促進され、脱窒速度が高くなったと考えられる。一方で、低浸透系では植栽期間を通して土壌Ehは還元的であり、硝化反応が起こりにくかったため、脱窒に必要な硝酸・亜硝酸の生成が少なく、脱窒速度が低くなったと考えられる。脱窒速度の測定結果から、植栽期間を通しての積算脱窒量を求めたところ、高浸透系の脱窒量は17.16 g-N/m<sup>2</sup>、低浸透系の脱窒量は4.35 g-N/m<sup>2</sup>であり、高浸透系で低浸透系より約4倍高い値となった。以上より、畜産排水処理を飼料イネ水田で行う場合は、水の浸透速度を高くして酸化的環境を創製することにより、窒素除去能を向上させることが明らかになった。

次に、<sup>15</sup>Nトレーサー法を応用することにより、Anammoxの活性を評価した。2年間の水田サンプルを採取して評価を行ったところ、畜産排水の液肥を施肥した水田においては、Anammox活性が見られなかった。一方で、茨城県にある谷津田水田においては高いAnammox活性が検出された。畜産排水には高い窒素化合物が含まれており、窒素の量がAnammox反応を律速にさせる可能性は極めて低い。一方で、畜産排水には窒素化合物と同様に極めて高い有機物が含まれているため、この有機物により脱窒細菌の増殖が大幅に促進された可能性がある。これらの異なるサンプリングサイトから畜産排水を施肥した水田土壌でAnammox細菌を増やす条件を一般化することは困難であるが、畜産排水の有機物を減少させることにより、Anammox活性を高めることが可能になることが十分に考えられる。今回のプロジェクトで用いた畜産排水の液肥は牛舎からの排水に起因しており、養豚排水よりも有機物濃度が高いことが知られている。したがって、養豚排水のように有機物濃度が低い排水に適用すれば、Anammox活性を利用した窒素除去が十分に行える可能性が考えられる。一方、今回サンプリングサイトとして選択した谷津田水田では、既往の研究と比較しても遜色ない高い活性を示すことが確認できた。この結果より、水田土壌においてAnammox細菌による窒素除去の寄与は最大で30%を超え、これらの細菌を利用できる可能性も示した。

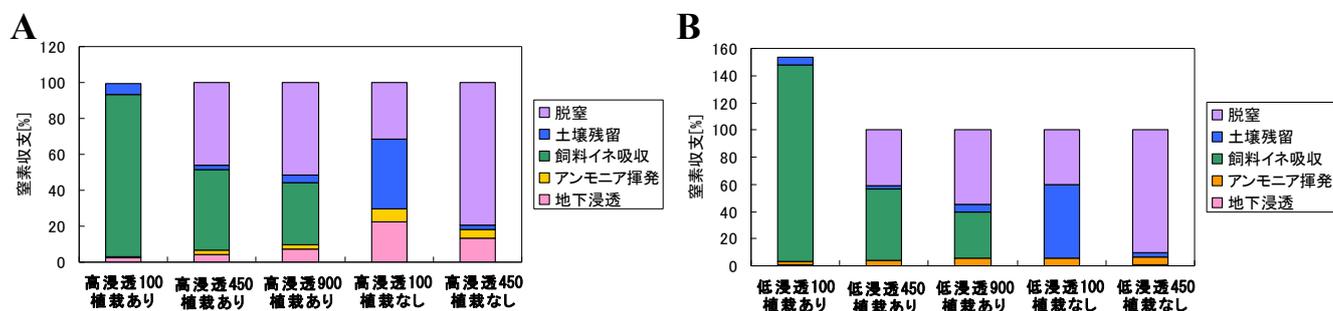


図2 各ポットにおける窒素収支のまとめ(A:高浸透(1.74 cm/day)系; B:低浸透(0.42 cm/day)系)

## (2) 窒素除去に関する“活性のある”微生物群の同定と変遷に関する研究

これまでのポット試験の結果を鑑み、嫌気性アンモニア酸化を担う微生物群の分子生物学的検出を試みた。これまで排水処理施設や自然界中に棲息しているAnammox細菌を検出するPCR用プライマー(合計5種類を精査)では全く検出されないことが明らかになった。このため、nested PCRを試みた(Dale et al. (2009) Environ. Microbiol. 11(5) 1194-1207)。Daleらの開発した手法を改良し、新たにアニーリング温度のタッチダウンを行うことを試みたところ正しい位置にPCRの増幅産物が得られた。得られたクローンは新規な分類(クラスター)を形成した。また、既存のAnammox細菌に近縁な種類は検出されなかった。この3つのクラスターは進化の系統的にこれまでのクローニングで得られた*Planctomycetes*とは全く異なるものであり、水田のイネ根圏に棲息する*Planctomycetes*門に属する窒素除去を担う細菌群はこれまで知られていた既知のAnammox細菌とは異なる種類である可能性が示唆された。

次に、近年発見された新規な脱窒性メタン酸化細菌(NC10門細菌)の検出を試みた。既知のPCRのプライマーを用い、検出を試みたところ、脱窒を行いながらメタン酸化が可能な細菌群が畜産排水を施肥する試験水田圃場に棲息することが確認された。しかしながら、このプライマーを用いた場合、NC10門細菌以外の細菌群の検出が非特異的に行われてしまい、NC10門の正確な定量が行えなことが明らかになった。そこで、この菌叢解析により得られた結果からNC10門のみを検出可能な新規プライマー(193f-616r)を設計し、この特異性を評価した。その結果、この193f-616rプライマーは特異性が保たれ、従来のプライマーのようなPCRによる非特異的増幅が抑

制できることが示された。NC10門細菌のみを定量可能であることが示された。このプライマーを以降の検討でNC10門細菌の水田でのダイナミクスを追跡するために利用した。

### (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

(1)における各ポットの2か所(田面水から2、10 cm以深)の土壌から得られた土壌を採取し、定量PCRにより *Planctomycetes*門の定量を行った。各ポットにおける *Planctomycetes*門の相対数を図3に示す。上部土壌の高浸透系植栽を有する系で、3回目追肥後に細菌数が増加し十倍以上になっていることが確認された。一方、土壌下部では高浸透450 kg-N/ha系を除く全ての系で土壌中の *Planctomycetes*門が減少傾向にあった。また、低浸透系は高浸透系と比較して細菌数の減少が大きく、特に植栽のある系においては顕著であった。微量酸素が存在する高浸透系では硝化が起こりやすく、Anammox細菌を含む *Planctomycetes*門が増加したということが考えられる。定量した *Planctomycetes*がAnammox反応を担う機能を有していると仮定すると、硝化反応で生成した亜硝酸を反応基質として利用し、菌体の増殖を行ったということの裏付けとなる。これらの定量結果から少なくとも高浸透系および田面水に近い作土層において酸素の供給が進み、窒素除去能の向上とAnammox細菌が属する *Planctomycetes*門の菌体数の増大の相関関係が見出すことができた。

次に、(3)(4)における各水田土壌における菌数の変化を評価した。対象としてメタン生成を担うメタン生成古細菌および生成したメタンを酸化するメタン酸化細菌、脱窒性メタン酸化細菌の定量を行い、各水田の水管理方法がこれらの微生物群の量に及ぼす影響を評価した。2011年に実施した実験圃場における水管理の結果より、中干しにより水を引き抜いた系においては、空気に触れることに水田土壌が好氣的になり、この酸素を利用してメタンを酸化するメタン酸化細菌が落水を行わない系と比較して有意に低い値になることが確認された。一方、メタン生成古細菌に関しては落水の有無に関わらず存在量に有意な差は見いだされなかった。したがって次に、2012年ではメタンおよび亜酸化窒素の生成を抑制するために、施肥前落水および後半低負荷施肥という新しい水管理および液肥の供給方法について検討を行った。この結果より、液肥を施肥する前に落水を行うことにより、メタン生成の量は大幅に削減することが可能であったが(詳細は4(4)を参照のこと)、このときにはメタンを酸化するメタン酸化細菌および脱窒性メタン酸化細菌の量に有意な差が見られなかった。一方で、メタン生成古細菌の量に着目すると、施肥前に落水をして液肥に含まれる有機物のメタン生成を抑制した施肥前落水には初期のメタン生成古細菌の量と比較してほとんど増大しなかったものの、通常の中干しを水管理として導入した系はメタン生成古細菌の相対的な増大が見られた(図4)。したがって、新たに導入した施肥前落水を用いることにより、メタン生成古細菌の増殖を抑制することが可能であった。以上より、畜産排水を施肥した水田において土壌を好氣的に保つ工程が温室効果ガスを抑えるうえで必須であることが示された。

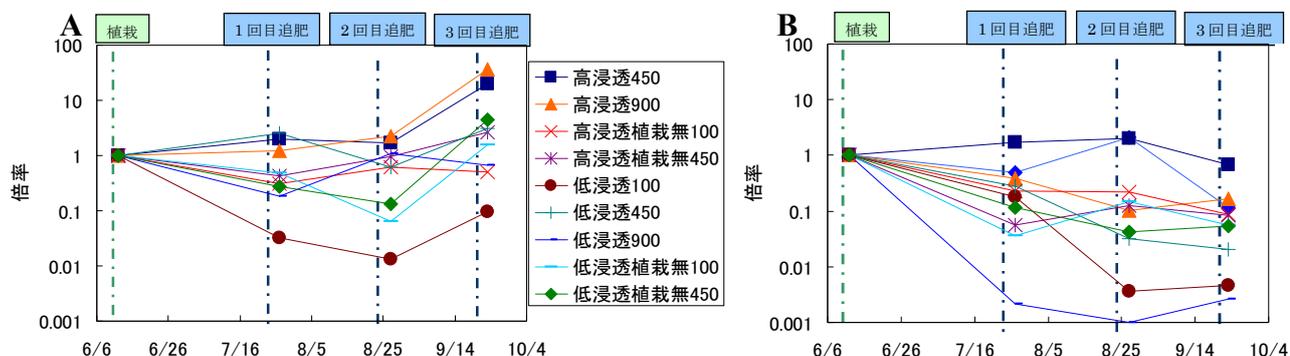


図3 (A) 土壌上部 (2cm) および (B) 深部 (10 cm以深) の *Planctomycetes*門の細菌数の相対変化

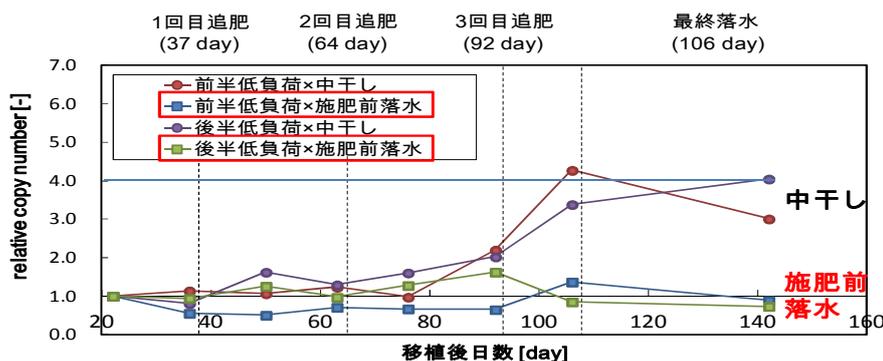


図4 各飼料イネ水田におけるメタン生成古細菌のダイナミクス

#### (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

中干し等の落水管理は土壌中微生物に対し様々な影響を及ぼすことが知られており、メタン生成古細菌の阻害効果やメタン酸化細菌を活性化する効果がこれまでに報告されている。しかし、その効果の程度は水田の管理方法や土壌性質などによって異なるとされている。特に畜産排水処理を目的とした飼料イネ水田管理は、栽培期間中に液肥を高負荷施肥するなど慣行の水田とは異なる土壌条件であると考えられる。そこで本実験では、実験圃場において常時湛水管理および中干し管理を実施し、その際の中干しによるメタン削減効果およびメタン生成・消費に関わる土壌微生物群への影響調査を目的とした。その結果、メタン生成のフラックスは中干しを導入することにより、大幅に削減可能であることが示された(図5)。

次に、前年度の中干しによる温室効果ガス削減効果の検討より明らかになった知見を利用して、畜産排水を施肥した飼料イネ水田における $\text{CH}_4$ および $\text{N}_2\text{O}$ の同時削減を目的とした。削減手法として、水管理では施肥前落水を、施肥方法では後半低負荷施肥を提案した。施肥前落水とは追肥前に落水を行う水管理であり、メタン排出抑制を狙った。落水により土壌中の酸化物を増加させた後に追肥を行うことで、酸化物を利用する微生物とメタン生成古細菌との間で畜産排水中の有機物を巡り競合が起きる。この競合によりメタン排出抑制が期待される。一方、後半低負荷施肥とは栽培の後半に低い窒素負荷での施肥を行う方法であり、 $\text{N}_2\text{O}$ 排出抑制を目指した(図6)。これらの仮説を検証するために、試験圃場にて実験を行ったところ、栽培期間中の $\text{CH}_4$ 排出量に関しては、施肥前落水系は慣行系に比べ前半低負荷系では15%、後半低負荷系では77%の削減ができた(図7)。 $\text{N}_2\text{O}$ 排出量に関しては、前半低負荷系からは $\text{N}_2\text{O}$ の排出が確認できたのに対し、後半低負荷系からは $\text{N}_2\text{O}$ の排出は確認できなかった。これらの温室効果ガスの排出総量を二酸化炭素等量で比較した場合、施肥前落水と後半低負荷を組み合わせた系は慣行系の水田と比べて84%の温室効果ガス削減率を示した(図8)。また、図6で示す水管理による運転(窒素負荷300 kg-N/ha)では、田面水・浸透水でアンモニア・亜硝酸は全く検出されなかった。以上より、ポット試験から得られた現象を把握し、それを水田管理にフィードバックすることにより、安定して畜産管理が可能であり、かつ温室効果ガスを大幅に削減可能であることが示された。

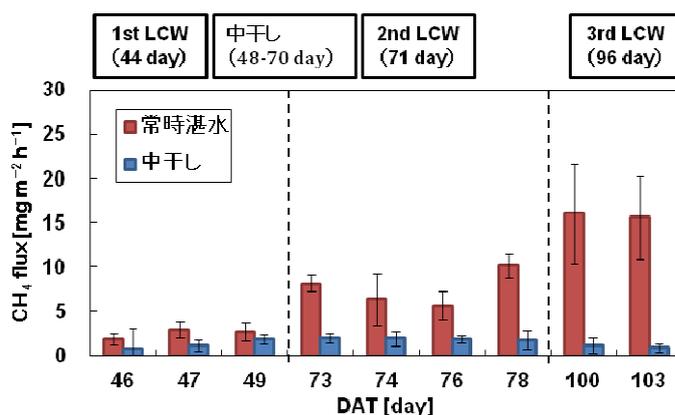


図5 中干しの有無によるメタン生成の推移

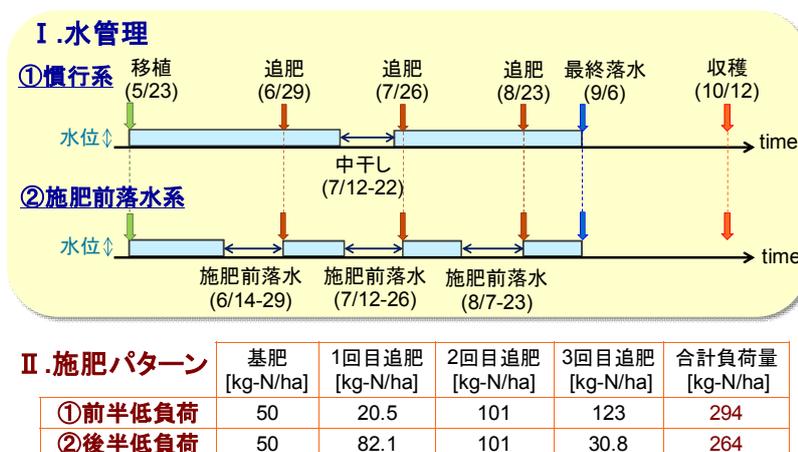


図6 新しい水管理法"施肥前落水"と"後半低負荷"を導入した水田管理方法

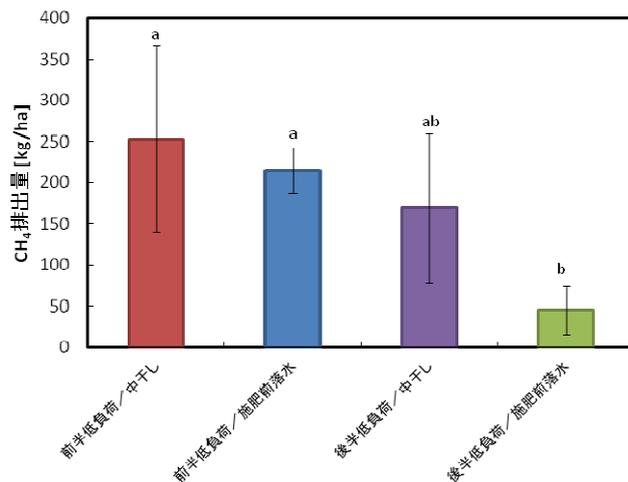


図7 施肥前落水および前半・後半低負荷による水田管理法がもたらすメタン排出量の評価

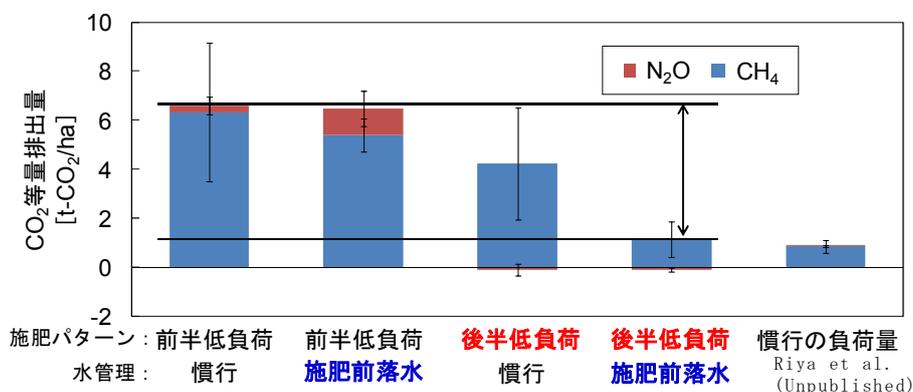


図8 施肥前落水および前半・後半低負荷の水田管理法がもたらす温室効果ガス削減効果 (CO<sub>2</sub>当量)

## 5. 本研究により得られた主な成果

### (1) 科学的意義

ポット試験により、通常の窒素負荷 80 kg-N/ha の 5 倍以上の 450 kg-N/ha で運転可能であることを示せた。<sup>15</sup>N トレーサーを用いて水の浸透速度の違いにより微生物による脱窒活性の違いを定量的に見出したこと、これらの細菌群の密度が脱窒活性試験と相関があることを示せたことは、学術的にも新規性が高い新たな知見であると考えられる。温室効果ガスの放出特性の評価より、亜酸化窒素よりもメタンの温室効果が圧倒的に多く、全体の 9 割以上を占めることが明らかになった。さらに、亜酸化窒素は好氣的条件下で放出量が増大すること、メタンは施肥後の嫌氣的条件下で顕著な放出が確認されたため、水管理や施肥条件の調整により温室効果ガスを削減できる可能性を示せたことは学術的にも意義がある。水田土壌は多様性が非常に高く、Anammox 細菌を検出可能なプライマーの利用では検出が困難であることが確認された。そこで、検出手法を改良することで、上記の問題を克服し、Anammox 細菌に近縁な新規な *Planctomycetes* を検出することに成功した。残念ながら Anammox 反応を見出すことが出来なかったが、Anammox 反応が検出された他のサイトのデータより、どのような条件で水田を管理すれば Anammox 反応を起こすことが可能かの知見を得ることができた。

温室効果ガスであるメタンを抑制可能なメタン酸化細菌の中でも、脱窒を行うことが可能な脱窒性メタン酸化細菌は畜産排水の液肥を施肥した水田土壌に棲息可能であることを明らかにした。また、それらの細菌を特異的に可能な定量プライマーを設計し、その特異性および定量性を明らかにした。これにより脱窒性メタン酸化細菌がメタン酸化細菌と同様に水田土壌に棲息することを定量的に示すことができたことの意義は大きいと考えている。

また、これらの成果から得られた知見より、畜産排水の浄化技術のみならず、水田からの温室効果ガス削減に向けた水管理方法を新たに提案し、温室効果ガスである亜酸化窒素ならびにメタンの大幅な削減が可能になった。この成果は生態工学的・分子生物学的手法を合わせた成果であり、産業排水でも処理が困難とされている

畜産排水を処理し、かつ温室効果ガスの排出も抑制可能な水田の管理方法を提案できた意義は大きいと考えている。

## (2) 環境政策への貢献

### <行政が既に活用した成果>

特に該当すべき事項はない

### <行政が活用することが見込まれる成果>

本申請課題を行うことにより、畜産排水処理のために約450 kg-N/haの施肥を行う必要があること、温室効果ガスが発生する時期・環境を特定できたことを明らかにした点は、今後の環境政策の一環として水田の適切な維持管理を行うためには大きな意義があると考えている。特に、畜産排水は産業排水の中でも高濃度に窒素を含み、水質汚濁防止法に基づく閉鎖性海域に係る窒素・リンの排水基準においてはいまだに暫定基準900 mg-N/Lが設けられており、処理技術の普及が難しい現状である。したがって、水田を核とする排水処理技術が確立できたことの意義は大きいと考えている。一方で、地球温暖化が叫ばれている中、亜酸化窒素やメタンなどの温室効果ガスが多量に水田から排出されていることを鑑みると、現在では排水処理のみならず、温室効果ガスの削減も同時に達成する必要が高まっている。本申請課題で得られた成果の1つである、新しい水管理手法を利用することでより、水田を用いて畜産排水に含まれる窒素化合物を放流基準値以下にまで低下させ、さらに水田からの温室効果ガス削減が可能なWin-Winなシステムを畜産農家に導入してもらえる可能性があると考えている。

## 6. 研究成果の主な発表状況(別添.作成要領参照)

### (1) 主な誌上発表

#### <査読付き論文>

- 1) A. TERADA, S. ZHOU and M. HOSOMI: Clean Technol. Environ. Policy 13, 6, 759-781  
 “Presence and Detection of Anaerobic Ammonium-Oxidizing (anammox) Bacteria and Appraisal of Anammox Process for High-Strength Nitrogenous Wastewater Treatment: A Review”
- 2) S. ZHOU, Y. SAKIYAMA, S. RIYA, X.F. SONG, A. TERADA and M. HOSOMI: Sci. Total Environ. 430, 93-100.  
 “Assessing Nitrification and Denitrification in a Paddy Soil with Different Water Dynamics and Applied Liquid Cattle Waste Using the N-15 Isotopic Technique”

#### <査読付論文に準ずる成果発表> (「持続可能な社会・政策研究分野」の課題のみ記載可)

特に記載すべき事項はない

### (2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 寺田昭彦、上村美羽、臼井陽菜子、崎山幸奈、西川恵美、大坂利文、常田聡、周勝、細見正明  
 “畜産排水除去を志向した飼料イネ水田におけるPlanctomycetes門の生態構造解析”  
 第45回日本水環境学会年会(2010年3月、北海道大学、札幌)
- 2) 利谷翔平、周勝、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回水環境学会シンポジウム(2011年9月、東北学院大学、宮城)
- 3) 上村美羽、利谷翔平、周勝、細見正明、寺田昭彦  
 “畜産排水を施肥した水田におけるメタン放出の挙動とメタン酸化細菌の関係解析”  
 第46回日本水環境学会年会(2012年3月、東洋大学、東京)
- 4) M. KAMIMURA, S. RIYA, S. ZHOU, Y. KOBARA, A. TERADA, M. HOSOMI  
 “Methane flux and abundance of microorganisms responsible for methane production and oxidation in rice paddies applying liquid manure from livestock wastewater with different irrigation strategies”  
 The 28th Annual Meeting of the Japanese Society of Microbial Ecology(2012年9月、豊橋科学技術大学、愛知)
- 5) 上村美羽、利谷翔平、周勝、小原裕三、寺田昭彦、細見正明  
 “畜産排水を施肥した飼料イネ水田のメタン放出挙動とメタンをめぐる微生物群のダイナミクス”  
 第64回日本生物工学会大会(2012年10月、神戸国際会議場、兵庫)

- 6) ソドビリゲ、利谷翔平、周勝、寺田昭彦、黒田久雄、細見正明  
“異なる水環境における Anammox反応活性の評価”  
第47回日本水環境学会年会（2013年3月、大阪工業大学、大阪）
- 6) 室井友里恵、上村美羽、利谷翔平、周勝、小原裕三、寺田昭彦、細見正明  
“畜産排水を施肥した飼料イネ水田におけるCH<sub>4</sub>およびN<sub>2</sub>Oの同時削減の試み”  
化学工学会第78年会（2013年3月、大阪大学、大阪）

## 7. 研究者略歴

課題代表者：寺田 昭彦

早稲田大学大学院理工学研究科博士後期課程修了、博士（工学）、

現在 東京農工大学大学院工学研究院 准教授

研究参画者

(1)：周勝

東京農工大学大学院工学府博士後期課程修了、博士（工学）、当時同大学助教、現在、上海市農業科学院 教授

(2)：寺田昭彦（同上）

(3)：寺田昭彦（同上）

(4)：寺田昭彦（同上）・周勝（同上）

## 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

## (1) 植栽の有無による水田土壌から採取した作土層および根圏の微生物活性に関する研究

東京農工大学 大学院工学研究院 応用化学部門 細見・寺田研究室  
寺田昭彦  
周勝

平成22～24年度累計予算額：2,376千円

(うち、平成24年度予算額：420千円)

予算額は、間接経費を含む。

**[要旨]** 水田はイネ生産ばかりでなく水質浄化など多面的機能を有しており、窒素を高濃度に含む畜産排水を水田に施用して、肥料としての利用と窒素除去の畜産排水処理が同時に達成できる可能性がある。このとき、畜産排水由来の液肥の過剰な散布は水質汚濁につながるため、水田内での水質管理、特に窒素に関する物質収支の把握が必要不可欠である。本研究では、亜酸化窒素 ( $N_2O$ ) やメタン ( $CH_4$ ) といった温室効果ガスを発生させない窒素代謝経路を持つ微生物群である嫌気性アンモニア酸化 (Anammox) 細菌およびメタン酸化細菌群を同定し、その浄化能力を最大限に発揮できる条件を明らかにする。ポット試験を通して様々な施肥量 (窒素負荷)、水の浸透速度、飼料イネを植栽し、畜産排水を液肥として用いた際の窒素除去性能、温室効果ガス量、窒素除去に関与する微生物群の同定・定量を行った。ポット試験により、水の浸透速度1.74 cm/dayにおいて通常の施肥量の約5倍の窒素負荷450 kg-N/haで運転しても、地下流出を抑え畜産排水が除去できること明らかになった。 $^{15}N$ トレーサー試験により、水田土壌に存在する微生物による脱窒反応を確認し、水の浸透速度が高いほど脱窒活性が高いことが明らかになった。また、温室効果ガスの放出特性の評価より、それぞれのガスが放出される条件を明らかにした。温室効果は $N_2O$ よりも $CH_4$ が圧倒的に多く、全体の9割以上を占めることが明らかになった。次に、 $^{15}N$ トレーサー法を応用することにより、Anammoxの活性を評価した。畜産排水の液肥を施肥した水田においては、Anammox活性が見られなかった。一方で、茨城県にある谷津田水田においては高いAnammox活性が検出された。これらの異なるサンプリングサイトから畜産排水を施肥した水田土壌でAnammox細菌を増やす条件を一般化することは困難であるが、畜産排水の有機物を減少させることにより、Anammox活性を高めることが可能になることが考えられる。

**[キーワード]** 畜産排水処理、飼料イネ、生物学的窒素除去、温室効果ガス

## 1. はじめに

水田はイネ生産ばかりでなく水質浄化など多面的機能を有しており、窒素を高濃度に含む畜産排水を水田に施用して、肥料としての利用と窒素除去の畜産排水処理が同時に達成できる可能性

がある。このとき、液肥の過剰な散布は水質汚濁につながるため、水田内での水質管理、特に窒素収支の把握が必要である。本研究では、 $\text{CH}_4$ や $\text{N}_2\text{O}$ といった温室効果ガスを発生せずに窒素除去を行えるという新たな窒素代謝経路を持つ微生物群同定し、その浄化能力を最大限に発揮できる条件を明らかにする（図1）。これより、水田施肥管理条件を決定でき、畜産排水の窒素を高効率に低減して、温室効果ガス放出の抑制にもつながることが期待される。

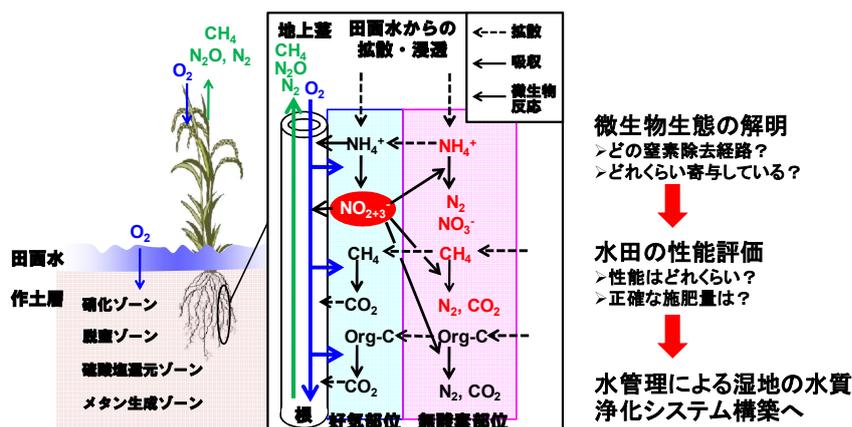


図1 本研究の概略図

## 2. 研究開発目的

本研究では、畜産排水由来の液肥を施肥している水田に着目し、イネの根圏に存在する窒素循環に関わる微生物群の同定・定量・空間分布の解明を目指し、水田における畜産排水からの窒素除去との関係を明らかにする。窒素はアンモニアを亜硝酸・硝酸に酸化する硝化反応と亜硝酸・硝酸を窒素ガスに還元する従属栄養性の脱窒反応の2つの異なる生物反応を経て無害化される。近年、硝化・脱窒以外の窒素除去経路が明らかになっている。一つは嫌気性アンモニア酸化

(Anammox) であり、独立栄養性のAnammox細菌により嫌気条件下でアンモニアと亜硝酸を窒素ガスに変換する。もう一方は、メタン脱窒であり、亜硝酸・硝酸がメタンと反応して窒素ガスに変換される。これらの反応を担う細菌の特徴として、温室効果ガスである $\text{N}_2\text{O}$ ・ $\text{CH}_4$ を放出しないため、水田からの温室効果ガスの放出を抑制するメリットを有する。したがって、畜産排水の処理システムとしての水田の管理上、これらの微生物群の動態の把握は極めて重要である。

サブテーマ1では、様々な窒素施肥量や水の浸透速度を体系的に評価するために、飼料イネを植栽するポットを用いてそれぞれの窒素除去能力、窒素収支、温室効果ガス ( $\text{CH}_4$ と $\text{N}_2\text{O}$ ) 放出量評価、さらには $^{15}\text{N}$ トレーサーを用いた脱窒速度評価を行った。これにより、飼料イネの畜産排水の除去性能を窒素の収支から評価した。また、新たにAnammox活性を明らかにするため $^{15}\text{N}$ トレーサー法を用いて水田土壌中のAnammox活性および脱窒活性を定量的に評価した。

## 3. 研究開発方法

(1) 植栽の有無による水田土壌から採取した作土層および根圏の微生物活性に関する研究

### 1) 植栽カラム

イネを植栽するカラムは高さ50 cm、直径22.6 cm (表面積 $400\text{ cm}^2$ ) の円筒状の塩化ビニル製容器とした。装置の断面図を図2に装置の写真を図3に、装置の寸法を表1に示した。

また、土壌間隙水を採取するために、土壌間隙水採水器（DIK.8393 大起理化社製）のポラスカップを土壌に深さ5 cmになるように差し込んだ。さらに、酸化還元電位（Eh）を測定するため、Eh計を土壌深さ1 cm、5 cmの位置に差し込んだ。

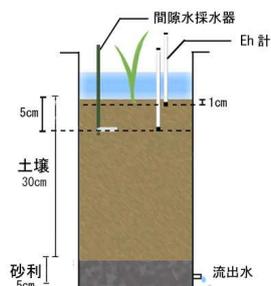


図2 ポット断面図



図3 植栽後の装置写真

表1 装置の寸法

形状	表面積 (cm <sup>2</sup> )	高さ (cm)
円筒型	$(22.6/2) \times 2 \times 3.14 = 400$	50

本研究では、基肥には化学肥料(ホームラン化成肥料888号,ミズホユーキ有限会社)を、追肥には埼玉県の妻沼有機センターにて生産された液肥を施肥した。液肥の組成を表2に示す。一般的なイネ栽培の窒素負荷量は89 kg-N/haであるが、今回の窒素負荷は平均値に近い値100 kg-N/haとそれよりも高い値450 kg-N/ha、900 kg-N/haの3つを設定した。また、追肥は植栽後、一月の間隔を空け、最高3回行った。追肥の設定は表3に記した。

表2 液肥組成

TOC [mg/l]	3300
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N [mg/l]	2300
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P [mg/l]	94.7
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N [mg/l]	0
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N [mg/l]	0

表3 施肥設定

全窒素負荷 [kg-N/ha]	基肥 [kg-N/ha]	追肥① [kg-N/ha]	追肥② [kg-N/ha]	追肥③ [kg-N/ha]
100	50	50	0	0
450	50	200	200	0
900	50	250	300	300

## 2) 飼料イネ

本研究では、短強稈で耐倒伏性が強いタカナリを飼料イネとして用いた。

## 3) 浸透速度の設定

浸透速度は全国の平均水田浸透速度である1.3 cm/dayより浸透速度が速い高浸透系と遅い低浸透系を模擬した。植栽期間中の平均浸透速度は高浸透系が1.74 cm/day、低浸透系が0.42 cm/dayに設定した。浸透速度は土の充填方法と植栽カラムの下に取り付けたコックによって調節した。高浸透系も低浸透系も5 cmの高さまで直径0.5 cm以下の大きさの砂利を入れ、その上に茨城県農業環境技術研究所の水田で採取した土壌を充填した。充填した土壌の重量は高浸透で平均20 kg、低浸透系で18kgであった。低浸透系では、20 cm水を含ませて適度にこねた土壌を隙間が少なくなるようにしてつめて、その上に乾燥した土壌を充填した。乾燥した土壌層は10cmになるよう、水を入

れた際に体積が小さくなることを考えて+3 cmの13 cmを入れた。高浸透系は、砂利の上に30cmの乾燥土壌層になるよう、体積変化を考慮して+6 cmの36 cmを充填した。浸透速度の測定は、カラム側面に定規を固定し、水面の変化から計算した。浸透のない系で植栽の有り、無しをそれぞれ作成し、その変化量を差し引くことで蒸発散分、イネによる吸収分を補正した。

#### 4) サンプルングおよび分析方法

##### ① 土壌サンプルング

土壌は、酸化層0-2 cmと2-20 cmに分けて採取した。数箇所土壌を採取し均一化した土壌を分析に用いた。土壌吸着態窒素分析および土壌中の全窒素分析に使用する土壌は、採取後に1週間風乾して乳鉢で粒径約1 mm以下に粉碎した。DNA抽出に使用する土壌はリン酸緩衝液に懸濁させ、10000 rpmで遠心分離を行った後、-20°Cで冷凍保存した。

##### ② 土壌分析

全窒素分析に用いる土壌は、植栽前と収穫後に採取し、1週間風乾した後乳鉢で粒径約1 mm以下に粉碎した。粉碎した土壌の窒素含有量を有機元素分析計（MICRO CORDER JM10、ジェイサイエンス製）により分析し、土壌中の全窒素量を求めた。土壌に吸着した窒素に関しては、植栽前と収穫後に採取し、1週間風乾した後乳鉢で粒径約1 mm以下に粉碎した。粉碎した土壌は土壌重量に対して10倍量の0.01M KClを加え1時間振とうした後、0.45 μmメンブレンフィルター

（ADVANTEC）でろ過し、アンモニア態窒素（ $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ）、亜硝酸態窒素（ $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ）および硝酸態窒素（ $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ）の濃度を分析した。アンモニア態窒素濃度は陽イオンカラム（IonPac<sup>®</sup> CS12A、日本ダイオネクス）、亜硝酸・硝酸態窒素濃度は陰イオンカラム（IonPac<sup>®</sup> AS12A、日本ダイオネクス）を装備したイオンクロマトグラフィー（ICS-90、日本ダイオネクス）により測定した。

##### ③ 水質分析試料サンプルングおよび分析方法

高浸透系、低浸透系共に、流入水と田面水、深さ5 cmの地点の土壌間隙水、浸透水（流出水）を採取した。土壌間隙水は田植え前に土壌間隙水採水器（DIK.8393 大起理化社製）のポーラスカップを土壌に深さ5 cmになるように鉛直方向に差し込むことで採取した。採取した試料は、0.45 μmメンブレンフィルター（ADVANTEC）でろ過し、各窒素濃度を測定した。測定法は土壌吸着態窒素の際の方法と同様にして行った。

##### ④ 植物体のサンプルングおよび分析方法

植栽前および収穫後の飼料イネを、茎、葉、穂、根の部位に分け、80°Cで24時間乾燥した。乾燥後、重量を測定し、飼料イネの収量を求めた。飼料イネ中の全窒素量の分析は、乾燥した飼料イネを茎、葉、穂、根の部位に分け、ワンダーブレンダー（大阪ケミカル）により粉碎して均一な状態とし、有機元素分析計（MICRO CORDER JM10、ジェイサイエンス製）により分析した。

##### ⑤ 土壌酸化還元電位 (Eh)測定

深さ1、5 cmの位置に差し込まれた土壌Eh測定用のガラス製白金電極（EP.201型、藤原製作所株式会社製）と、ポータブル酸化還元電位計（PRN.41型、藤原製作所株式会社製）により測定した。

#### 5) ポット試験の実験系

##### ① 実験系

本実験では、上記の窒素負荷、浸透速度の違いから条件の異なる計10系の実験系を設定した。系の条件の一覧は表4にまとめた。

表4 ポット試験に供試する実験系

窒素負荷 [kg-N/ha]	植栽あり 高浸透 (1.74 cm/day)	植栽あり 低浸透 (0.42cm/day)	植栽なし 高浸透 (1.74 cm/day)	植栽なし 低浸透 (0.42cm/day)
100	Run1	Run2	Run3	Run4
450	Run5 ( <sup>15</sup> Nトレーサー)	Run6 ( <sup>15</sup> Nトレーサー)	Run7	Run8
900	Run9	Run10	.	.

## ② 生育期間と流入期間

イネの栽培スケジュールを表5に示す。田植えをしてから収穫するまでの生育期間は143日であった。水管理は高浸透では間断灌漑、低浸透では常時湛水とし、週に2回、表面水水位が5 cmになるまで水を入れた。この水管理で高浸透系は約2日で表面水水位が0 cmになるが、低浸透系は湛水状態が維持されることになる。

表5 施肥スケジュール

基肥	6月11日
田植え	6月12日
追肥①	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-
稲刈り	11月2日

## 6) Anammox活性調査（平成23年度）

茨城県つくば市にある国立行政法人農業環境技術研究所の実験圃場より、水田土壌を採取した。イネを栽培していない期間である2011年2月および栽培期間中の2011年10月の水田土壌を0-5 cm, 5-10 cm, 10-15 cm, 15-20 cmに分けた。土壌サンプルを酸素に極力触れさせないようにして、バイアルに注入し、それぞれの窒素化合物に<sup>15</sup>Nをラベルさせた基質を投入することにより回分試験を行った。得られた各種窒素ガスの分子量の違いを四重極型GC/MSにて分画することにより、脱窒およびAnammox活性を測定した。バイアル試験の流れを図4に示す。

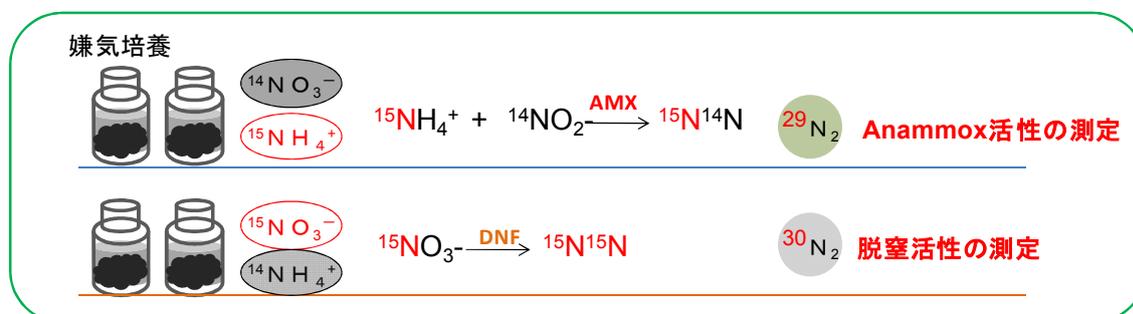


図4 四重極型ガスクロマトグラフィーによる脱窒およびAnammox活性の測定

## 7) Anammox活性調査（平成24年度）

平成23年度の検討により、 $^{15}\text{N}$ トレーサー法により国立行政法人農業環境技術研究所の実験圃場から採取した水田土壌からAnammox性能を確認することができなかった。そこで、同じ実験圃場による水田サンプルに加え、他の水田土壌および河川土壌を用いることによるAnammox活性の検出を行った。活性の検出には図4の方法を用いた。本研究で用いた環境サンプルを表6に示す。

表6 Anammox活性を測定したサンプル採取箇所

サンプル名	サンプル採取場所	サンプル採取日時
#1	国立行政法人農業環境技術研究所（本申請課題で試験しているサイト）	2012年8月
#2	茨城県北浦付近の水田土壌（谷津田水田）	2012年2月, 6月, 10月
#3	河川底質（茨城県恋瀬川）	2012年5月

## 4. 結果・考察

(1) 植栽の有無による水田土壌から採取した作土層および根圏の微生物活性に関する研究

## 1) 水田土壌の酸化還元電位Eh

Run 5-8のポット土壌における深さ1 cm, 5 cmの酸化還元電位Ehの比較を図5に示す。高浸透系では植栽の有無にかかわらず深さ1 cmの土壌は酸化しており、表層に酸化層が形成されていることがわかる。低浸透系は常時湛水状態であるため、植栽のある系無い系共に還元的で、時間が経つにつれEhがさらに低くなっていった。また、高浸透で追肥後は、急激にEhの低下が見られた。これは、土壌微生物による液肥中のアンモニア態窒素の酸化に、酸素が使われたためであると考えられる。図5(B)から、高浸透系植栽ありの系は中干以降酸化還元電位Ehが大きく上昇していた。これは、イネの成長によって根から酸素が供給されたためであると考えられる。植栽なし系では二回目追肥後にEh 0 mV付近に上昇した。これは、中干などの影響で土壌に変化があり5 cmまで土壌に酸素が供給されやすくなったためであると考えられた。低浸透系は植栽あり・なし共に常時還元雰囲気を保っていた。以上より、高浸透系は土壌が酸化的で、低浸透系は土壌が還元的で硝化の起こりやすさが異なることが分かった。低浸透系が常に湛水状態で土壌に酸素が供給されにくいのに対し、高浸透系は水位が0 cmの時に空気から土壌に直接空気が供給され、より多くの酸素が土壌に供給されることに起因する。

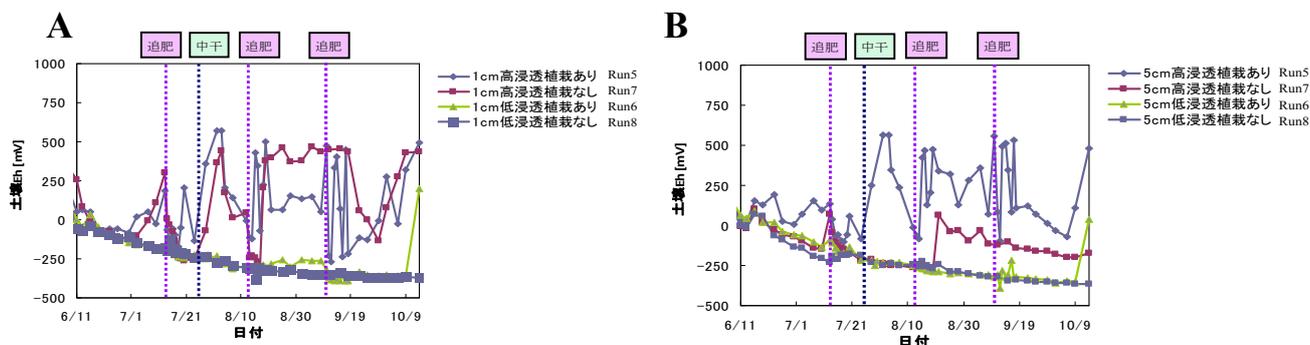


図5 土壌1 cm (A) および5 cm (B)における酸化還元電位の経日変化

## 2) 窒素化合物の挙動

植栽期間中の土壌表面水（田面水）、深さ5 cmの土壌間隙水、浸透水（流出水）の無機態窒素濃度変化を図6～11に示す。図6より、追肥後の田面水の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度の減少速度は低浸透系の方が遅く、より長い時間土壌表面に $\text{NH}_4^+\text{-N}$ が滞留していることが確認された。また、図7から追肥後に高浸透系および、1回目追肥後の低浸透田面水の $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 濃度が上昇していた。これは、硝化反応が起こったことに起因する。図8より、間隙水の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度は、追肥後に低浸透系のほうが高く検出された。さらに、植栽の無い系では植栽の有る系と比較して $\text{NH}_4^+\text{-N}$ が多く残存しており、その減少も遅かった。高浸透系では $\text{NH}_4^+\text{-N}$ が早く浸透し、酸化的雰囲気であることから、硝化反応が促進されたと考えられる。図9より高浸透、低浸透ともに大きな $\text{NO}_2^-$ および $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 濃度の上昇は見られなかった。図10より、浸透水の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度は高浸透900系（Run9）で3回目以降の施肥で多く検出された。また低浸透系植栽無450 kg-N/haでも $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の浸透が見られた。図11より、浸透水の $\text{NO}_x^-\text{-N}$ 濃度は2回目の追肥により植栽無し高浸透450系（Run7）、植栽有り高浸透900系（Run9）および植栽無し低浸透450系（Run8）に検出された。植栽無しの450 kg-N/haに硝酸態窒素の蓄積が見られたことから、イネによる $\text{NO}_x^-\text{-N}$ の吸収もしくはイネ根圏の微生物による窒素除去が考えられた。また、植栽有り900 kg-N/ha（Run9）は窒素負荷が高負荷すぎるため、窒素除去が間に合わない可能性が考えられた。

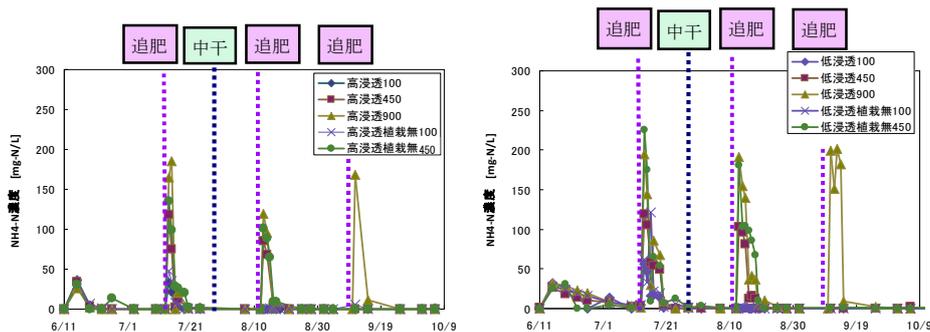


図6 田面水アンモニア態窒素変化 (左:高浸透系、右:低浸透系)

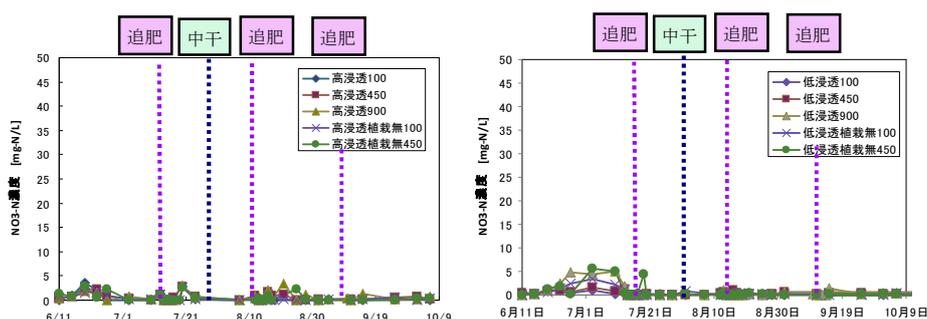


図7 田面水硝酸態窒素変化 (左:高浸透系、右:低浸透系)

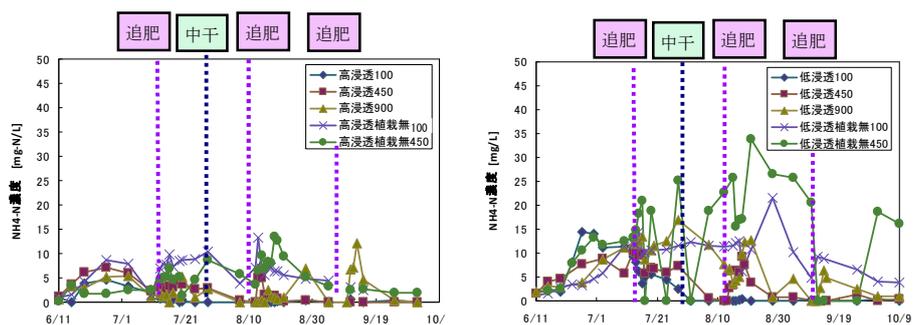


図8 5 cm間隙水アンモニア態窒素変化 (左:高浸透系、右:低浸透系)

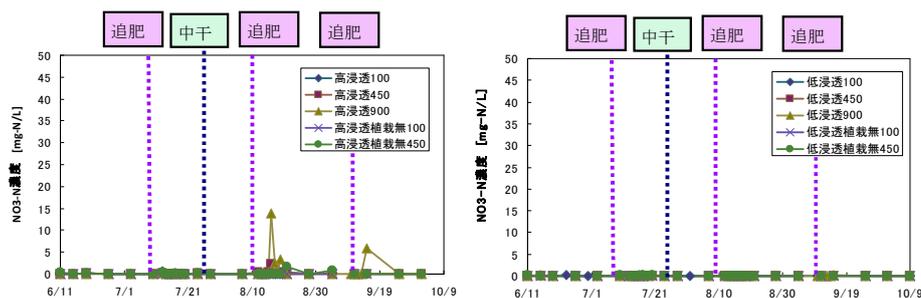


図9 5 cm間隙水硝酸態窒素変化 (左:高浸透系、右:低浸透系)

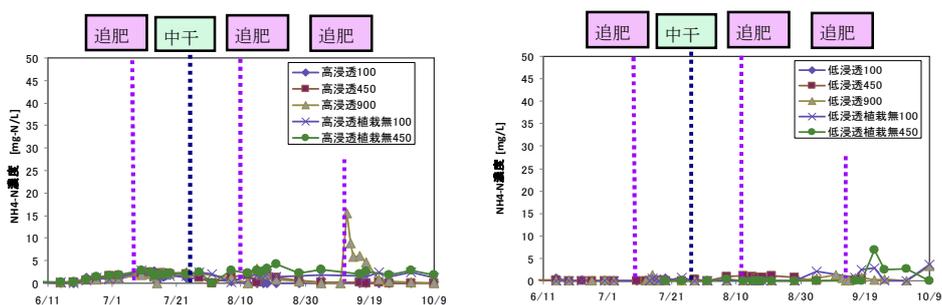


図10 浸透水中のアンモニア態窒素変化 (左:高浸透系、右:低浸透系)

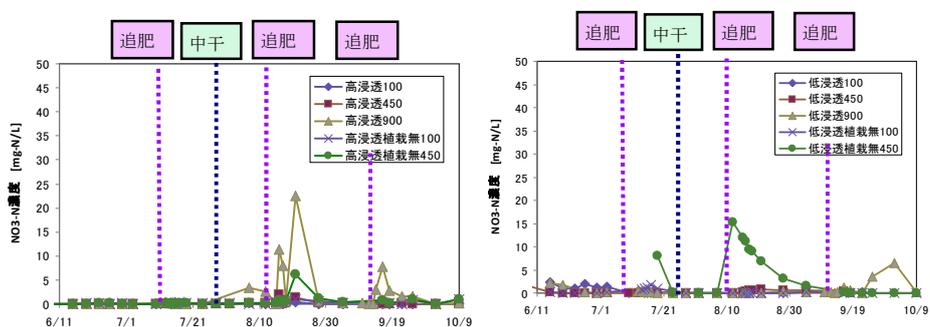


図11 浸透水中の硝酸態窒素変化 (左:高浸透系、右:低浸透系)

### 3) 各ポットにおける窒素収支地下への浸透量評価

植栽期間の実験結果から各ポットからの窒素収支を求めた。地下浸透量は高・低浸透系の平均浸透速度と流出水の無機態窒素濃度から地下へ浸透する窒素量を評価した。飼料イネによる窒素吸収量は、収穫した飼料イネより粉碎後、窒素含有量を分析した。土壌中の吸着態窒素は土壌から塩化カリウムにより窒素成分を溶出させることにより、評価した。表面水中の窒素濃度およびアンモニアガスの揮発量はヘンリーの式より算出した。残りの消失分を生物学的な脱窒による寄与として評価した。各ポットの窒素収支を図12に示す。

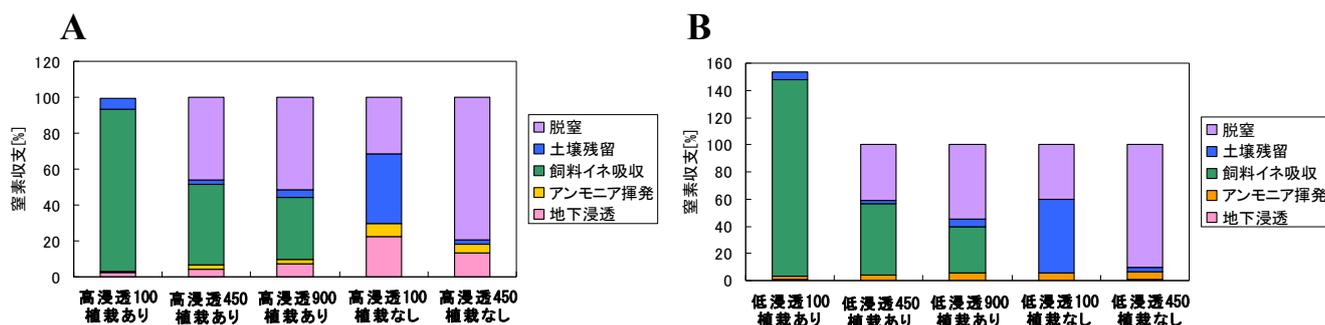


図12 各ポットにおける窒素収支のまとめ (A:高浸透 (1.74 cm/day) 系 ; B:低浸透 (0.42 cm/day)

窒素負荷100 kg-N/haでは飼料イネの吸収が非常に大きな割合を占め、特に低浸透系では収支が取れなくなりました。これは、CHN測定の際のばらつきに起因する。これ以降の議論は低浸透100 kg-N/haの系の考察は省くことにした。畜産排水由来の液肥の窒素負荷が増大すると、消失した窒素分が増大する傾向が確認できた。消失した窒素分を生物学的な脱窒とみなしたとすると、植栽ありの窒素負荷450 kg-N/ha、900 kg-N/haの系では脱窒による窒素除去の割合が高いことが示された。また、飼料イネの植栽により、高い窒素負荷対しても窒素化合物の地下への浸透を低減することができることが明らかになった。ただし、窒素化合物の地下への浸透は窒素負荷増大に伴い増加することが示されたため、900 kg-N/haといった高負荷での畜産排水由来の液肥供給は注意を要することが明らかになった。

#### 4) $^{15}\text{N}$ トレーサー法による脱窒速度の実測

脱窒反応の生成物は窒素ガスであり、もともと大気中存在する窒素ガスと区別することが難しい。そこで、自然界の窒素のうち0.366%しかない $^{15}\text{N}$ でマーキングした窒素化合物を利用し、脱窒速度、脱窒量の実測を行った。これまで行ってきたRun5 (植栽有り、高浸透、窒素負荷450 kg-N/ha) およびRun6 (植栽有り、低浸透、窒素負荷450 kg-N/ha) の系にて $^{15}\text{N}$ で標識した模擬液肥を作成し、追肥として施肥させた。模擬液肥に用いた試薬は $^{15}\text{N}$ 標識硫酸アンモニウム $^{15}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (>98 atom%  $^{15}\text{N}$ )、グルコース、リン酸水素二カリウムである。模擬液肥のpHは水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH 8になるように調節した。実験で用いたポットへ $^{15}\text{N}$ で標識した硫酸アンモニウムを含む模擬液肥 ( $\text{NH}_4^+\text{-N}=2000 \text{ mg/L}$ ,  $\text{TOC}=2500 \text{ mg/L}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}=120 \text{ mg/L}$ ) を施肥すると、脱窒反応によって放出される窒素ガスは $^{15}\text{N}$ を含んだ $^{29}\text{N}_2$ と $^{30}\text{N}_2$ が生成する。生成したガスをクロードチャンパー法により採取して同位体質量分析装置 (IRMS) で測定し、 $^{15}\text{N}$ 存在比 ( $^{29}\text{N}_2/^{28}\text{N}_2$ と $^{30}\text{N}_2/^{28}\text{N}_2$ ) の変化から脱窒速度を求めた。図12に $^{15}\text{N}$ トレーサー法により測定した植栽期間中の脱窒速度の推移を示す。最大脱窒速度は高浸透系で $1.04 \text{ g-N/m}^2/\text{day}$ 、低浸透系で $0.31 \text{ g-N/m}^2/\text{day}$ と高浸透系の方が3.4倍高く、植栽期間を通して高浸透系の方が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土壌Ehが酸化状態と還元状態を繰り返しているために、酸化状態で起こる硝化反応が促進され、脱窒速度が高くなったと考えられる。一方で、低浸透系では植栽期間を通して土壌Ehは還元状態であり、硝化反応が起こりにくかったため脱窒速度が低くなったと考えられる。

また、脱窒速度は高浸透系で基肥後3週間、低浸透系で基肥後4週間に最も高い値を示し、高浸透系、低浸透系ともに基肥の脱窒速度が最も高い結果となった。図13の脱窒速度の測定結果から、

植栽期間を通しての積算脱窒量を求めた。高浸透系の脱窒量は $17.16 \text{ g-N/m}^2$ 、低浸透系の脱窒量は $4.35 \text{ g-N/m}^2$ であり、高浸透系で低浸透系より約4倍高い値となった。

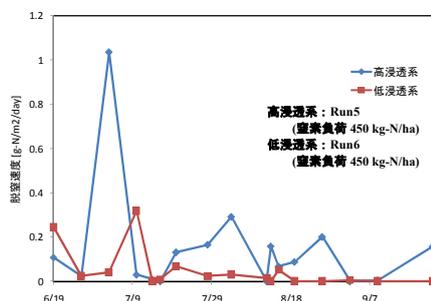


図13 高浸透系・低浸透系のポットにおける飼料イネ植栽期間中の脱窒速度の推移

### 5) 温室効果ガスの放出量評価

クローズドチャンバー法により気相中のガスをシリンジに採取し、温室効果ガス ( $\text{CH}_4$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ ) のフラックスを評価した。高浸透および低浸透系における $\text{CH}_4$ のフラックスの推移を図14に示す。植栽有り  $100 \text{ kg-N/ha}$  の負荷の系 (Run1およびRun2) では $\text{CH}_4$ 放出のピークはほぼ見られなかったが、植栽有  $450$ 、 $900 \text{ kg-N/ha}$  の系 (Run5, Run6, Run9, Run10) では追肥を行った7月13日、8月12日の後に $\text{CH}_4$ 生成フラックスのピークが見られた。これは、追肥の液肥に含まれる有機物により、土壌中の微生物の活性が上がり酸素を消費し、土壌が嫌気的になった際に $\text{CH}_4$ が生成される可能性を示唆している。各ポットから放出される $\text{N}_2\text{O}$ フラックスの推移を図15に示す。特徴とすべき点として、ポットから水を抜いて乾燥状態にする中干しの期間 (7月27日-8月3日) においてどのポットからも $\text{N}_2\text{O}$ のフラックスが大幅に増大する結果が得られた。これは、中干しすることによる土壌中への酸素供給が起り、硝化の過程により $\text{N}_2\text{O}$ が放出している可能性を示唆するものである。以上より、液肥の供給管理・水管理が $\text{CH}_4$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ の放出量に大きく寄与していることが明らかになった。

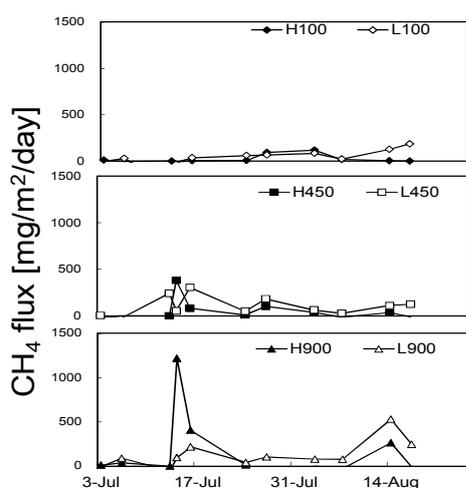


図14 植栽有りの高・低浸透系における $\text{CH}_4$ 放出 (H: 高浸透; L: 低浸透、数値は窒素負荷を示す。)

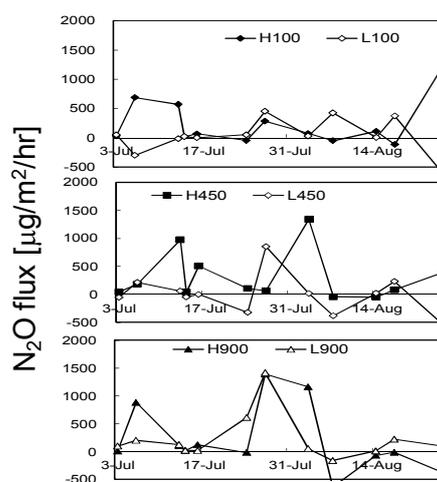


図15 植栽有りの高・低浸透系における $\text{N}_2\text{O}$ 放出 (H: 高浸透; L: 低浸透、数値は窒素負荷を示す。)

最後に温室効果ガスの放出量を二酸化炭素基準に変換した比較を図16に示す。温室効果係数はCH<sub>4</sub>がCO<sub>2</sub>の21倍、N<sub>2</sub>OがCO<sub>2</sub>の310倍としてそれぞれ計算した。高浸透および低浸透に関わらず窒素負荷の増大は温室効果ガスの放出量増大に正の相関がみられた。高浸透系の温室効果ガスの放出量は低浸透系に比べて約40-60%であり、温室効果ガスの削減が期待できることが示された。また、各ポットからの温室効果ガス全量の89-97%がCH<sub>4</sub>であり、CH<sub>4</sub>による温室効果が最も顕著であることが明らかになった。

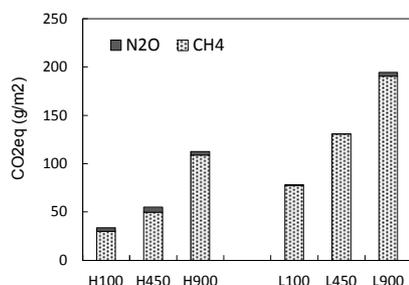


図16 高浸透系と低浸透系における温室効果ガス (CO<sub>2</sub>eq) の比較 (H：高浸透；L：低浸透、数値は窒素負荷 (kg-N/ha) を示す。)

#### 6) 脱窒およびAnammox活性評価 (平成23年度)

どちらの日付およびどの部位においてもAnammox活性は検出されない結果になった。この結果は、脱窒細菌による従属栄養脱窒、もしくは脱窒性メタン酸化細菌による脱窒が行われていることを示唆する結果である。また、各系は2検体実験を行っており、再現性はとれている。したがって、本水田土壌においてAnammox細菌によるAnammox活性は非常に低いということが示された。

脱窒活性を図17にまとめた。Aは2011年2月 (落水状態)、Bは2011年10月 (湛水状態)を示す。落水の場合は、土壌表面は酸素に触れるため、好氣的であり、脱窒活性が深層の方が高くなっていることを示唆している。一方で、湛水状態は土壌表面に水がはっているため、土壌表層も嫌気状態が保たれていると考えられる。土壌深部には窒素化合物が枯渇しているため、深層に行くにつれて低い脱窒活性であることが示唆された。

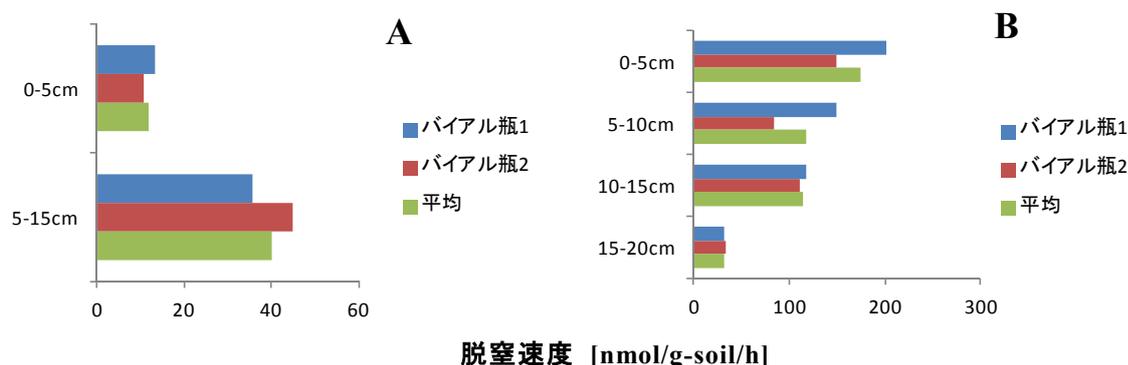


図17 四重極型ガスクロマトグラフィーによる脱窒活性 (A：2011年2月、B:2011年10月)

#### 7) 脱窒およびAnammox活性評価 (平成24年度)

平成24年度も昨年度同様に表7に示す#1の水田土壌を上述した活性試験に供したが、Anammox活性は検出されなかった (データ示さず)。この結果は昨年度と変わらず、脱窒細菌による従属

栄養的な脱窒、脱窒性メタン酸化細菌による脱窒が行われていることを示唆する結果である。また、各系は2検体実験を行っており、それぞれの測定結果の再現性はとれている。したがって、本申請課題で行っている水田圃場の土壌においてはAnammox細菌によるAnammox活性は非常に低いということが示された。

一方、水田土壌（#2）においては、高いAnammox活性が検出された。図18に各深さおよびAnammox・脱窒反応活性のプロファイルを示す。最も温度が低い2月において、Anammoxおよび脱窒活性が他のサンプリング時と比較して高くなっている点が不可解であるものの、どの底質深さおよび季節によってもAnammoxの活性が検出された。また、Anammox反応は特に田面水表層に近い環境において活性が高く、一方で、脱窒活性は、2月の場合は4-6 cm以降の深さにおいて活性が大きくなること、6月および10月においては水田土壌の深さ方向に対して大きな変化は見られないことが確認された。どの季節および水田深さにおいても、Anammox活性は脱窒活性を上回ることはなかったが、Anammoxの反応の寄与は#1の水田土壌と比較すると明らかに高いことが確認できた。Anammox反応が窒素除去に及ぼす寄与の割合を図19に示す。特に、Anammox反応による窒素除去への寄与は特に水田表層において5%~38%程度であった。このような高いAnammox活性は現場環境のアンモニア・硝酸濃度に依存する。実際に#2の水田は隣接する丘陵地に茶園があることにより、大量の肥料（アンモニア）が亜硝酸・硝酸により水田に流れ込む。これによりAnammox活性が高いことが考えられる。以上の結果より、水田のAnammox活性は水田の管理方法および場所によっても大きく異なることが明らかになった。

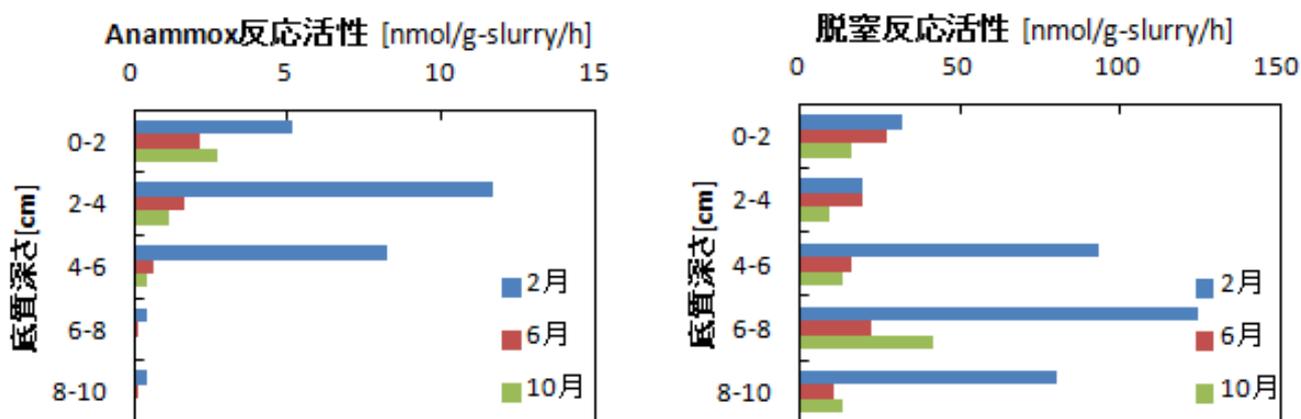


図18 谷津田水田土壌（#2）の底質深さ方向でのAnammoxおよび脱窒反応活性

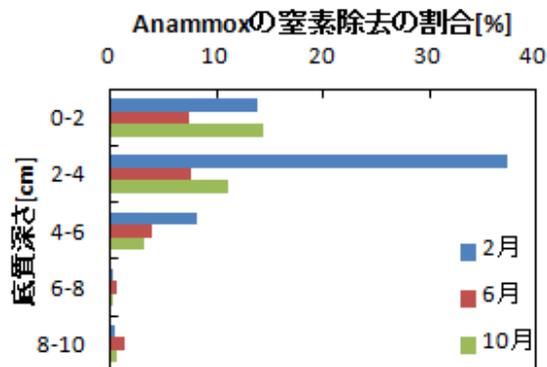


図19 谷津田水田土壌（#2）の底質深さ方向でのAnammox反応の窒素除去の割合(%)

最後に、参考として河川底質におけるAnammox活性についても合わせて評価した。#2の水田汚泥と同様にして、Anammox活性が検出され、同様にしてで河川水と底質の界面近傍でAnammox活性が最も高くなる傾向が得られた。Anammox活性に関しては#2の水田土壌よりも圧倒的に小さい結果になった（図20）。

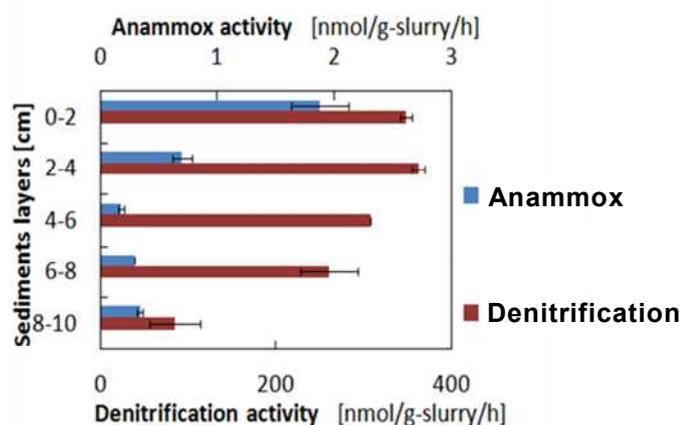


図20 恋瀬川低質サンプルのAnammoxおよび脱窒活性

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

通常の窒素負荷80 kg-N/haに対して、本研究で用いた飼料イネでは900 kg-N/haまで施肥しても畜産排水を処理可能であることを明らかにした。ただし、高浸透系の場合は地下への硝酸・亜硝酸の流出が懸念されるため、450 kg-N/haで運転することが望ましいことも示せた。窒素収支に基づいた畜産排水処理としての適正な施肥量を示せたことは、今後実フィールドに拡張する際の重要な知見になり得る。また、<sup>15</sup>Nトレーサーを用いて水の浸透速度の違いにより微生物による脱窒活性の違いを定量的に見出したことは学術的にも新規性が高い新たな知見であると考えられる。温室効果ガスの放出特性の評価より、N<sub>2</sub>OよりもCH<sub>4</sub>の温室効果が圧倒的に多く、全体の9割以上を占めることが明らかになった。さらに、N<sub>2</sub>Oは水を抜いた好氣的条件下で放出量が増大すること、CH<sub>4</sub>は施肥後の嫌氣的条件下で顕著な放出が確認されたため、水管理（浸透速度）や施肥条件の調整によりこれらの温室効果ガスを削減できる可能性を示せたことは学術的にも意義があると考えられる。さらに、これらの知見は人工湿地からの温室効果ガス放出の抑制に向けた運転管理の体系化に拡張できるのではないかと考えている。

また、<sup>15</sup>Nトレーサー試験によるAnammox活性検出試験において、畜産排水の液肥を施肥した水田ではAnammox活性が見られなかった一方で、茨城県にある谷津田水田においては高いAnammox活性が検出された。畜産排水には高い窒素化合物が含まれており、窒素の量がAnammox反応を律速にさせる可能性は極めて低い。一方で、畜産排水には窒素化合物と同様に極めて高い有機物が含まれているため、この有機物により脱窒細菌の増殖が大幅に促進された可能性がある。これらの異なるサンプリングサイトから畜産排水を施肥した水田土壌でAnammox細菌を増やす条件を一般化することは困難であるが、畜産排水の有機物を減少させることにより、Anammox活性を高めることが可能になることが十分に考えられる。今回のプロジェクトで用いた畜産排水の液肥は牛

舎からの排水に起因しており、養豚排水よりも有機物濃度が高いことが知られている。したがって、養豚排水のように有機物濃度が低い排水に適用すれば、Anammox活性を利用した窒素除去が十分に行える可能性が考えられる。一方、今回サンプリングサイトとして選択した谷津田水田では、既往の研究と比較しても遜色ない高い活性を示すことが確認できた。この結果より、水田土壌においてAnammox細菌による窒素除去の寄与は最大で30%を超え、これらの細菌を利用できる可能性も示せた。

表7 谷津田水田で検出されたAnammox活性の既往の研究との比較

場所	河口域 (大阪淀川汽水 域)	湖沼底質 (茨城県北浦)	水田 (中国)	水田底質 (茨城県谷津田)	河川底質 (茨城県恋瀬川)
Anammox活性 [nmol/ml-sediment/h]	0.29-0.69	2.4-10.4	0.81-3.78	1.42-8.15*	0.10-0.79*
Anammox反応による N除去の割合 [%]	0.86-1.58	3.5-30.0	4-37	7.8-37.3	0.22-1.95
サンプル箇所	表層0-1, 0-2 cm 底質 (2か所)	表層2 cm底質 底質11か所	1 m深さ (10 cm 毎)	表層0-4 cm土壌	表層0-4 cm底質
Reference	Amano <i>et al.</i> (2007) <i>Microbes</i> <i>Environ.</i> 22: 232-242	Yoshinaga <i>et al.</i> (2011) <i>Microbes</i> <i>Environ.</i> 26: 189-197	Zhu <i>et al.</i> (2011) <i>ISME J.</i> 5: 1905-1912	本研究	本研究

\*単位はnmol/g-slurry/h

## (2) 環境政策への貢献

### <行政が既に活用した成果>

該当する件は無し。

### <行政が活用することが見込まれる成果>

現在のところ、環境政策への貢献はなされていないが、平成22年度の検討により、畜産排水処理のために約450 kg-N/haの施肥を行う必要があること、温室効果ガスが発生する時期・環境を特定できたことを明らかにした点は、今後の環境政策の一環として水田の適切な維持管理を行うためには大きな意義があると考えている。平成23年度は水位管理による温室効果ガス削減の可能性と土壌細菌群との関わりを評価するため、これらのデータを集積させることで、最終的には環境負荷の低い畜産排水処理のための水田管理方法を提示できるものとする。

## 6. 国際共同研究等の状況

特になし。

## 7. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

#### <論文 (査読あり) >

A. TERADA, S. ZHOU and M. HOSOMI: *Clean Technol. Environ. Policy* 13, 6, 759-781

“Presence and Detection of Anaerobic Ammonium-Oxidizing (anammox) Bacteria and Appraisal of Anammox Process for High-Strength Nitrogenous Wastewater Treatment: A Review”

**<査読付論文に準ずる成果発表>**

特に記載すべき事項はない

**<その他誌上発表（査読なし）>**

特に記載すべき事項はない

**(2) 口頭発表（学会等）**

- 1) 周勝、崎山幸奈、菅原翔、利谷翔平、寺田昭彦、細見正明：第45回日本水環境学会年会（2011）  
「15Nを用いた畜産排水施用水田の窒素挙動の解明」
- 2) 利谷翔平、周勝、小原裕三、寺田昭彦、細見正明：第45回日本水環境学会年会（2011）  
「飼料イネ水田による畜産排水処理における温室効果ガス排出」
- 3) ソドビリゲ、利谷翔平、周勝、寺田昭彦、黒田久雄、細見正明：第47回日本水環境学会年会（2012）  
「異なる水環境における.. Anammox反応活性の評価」

**(3) 出願特許**

特に記載すべき事項はない

**(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）**

特に記載すべき事項はない

**(5) マスコミ等への公表・報道等**

特に記載すべき事項はない

**8. 引用文献**

- Amano et al. (2007) *Microbes Environ.* 22: 232-242  
Yoshinaga et al. (2011) *Microbes Environ.* 26: 189-197  
Zhu et al. (2011) *ISME J.* 5: 1905-1912

## (2) 窒素除去に関与する“活性のある”微生物群の同定と変遷に関する研究

東京農工大学 大学院工学研究院 応用化学部門 細見・寺田研究室

寺田昭彦

周勝

平成22～24年度累計予算額：3,215千円

(うち、平成24年度予算額：959千円)

予算額は、間接経費を含む。

**[要旨]** 水田はイネ生産ばかりでなく水質浄化など多面的機能を有しており、窒素を高濃度を含む畜産排水を水田に施用して、肥料としての利用と窒素除去の畜産排水処理が同時に達成できる可能性がある。このとき、サブテーマ1で示した水質管理や飼料イネ水田の環境と窒素収支に対応する窒素除去に関与する微生物群の相関を導き出すことができれば、窒素除去を促進可能な微生物を制御することで、窒素除去効率が高く、かつ温室効果ガスの放出が削減できる可能性がある。その中でも、Anammox反応を介する微生物群は温室効果ガスである亜酸化窒素( $N_2O$ )を生成しない窒素除去反応経路を有するため、水田土壌のAnammox細菌群の理解とその動態解析は上記の目標を達成するキーとなる微生物と考えられる。また、これに加えメタンを嫌氣的に酸化可能な脱窒性メタン酸化細菌はもう一つの温室効果ガスであるメタンを亜硝酸の原子状酸素を利用することに窒素除去とメタンの除去が同時可能になる。そこで、水田土壌に棲息するAnammoxを行うとされる細菌群、および脱窒をしながらメタン酸化が可能な細菌群の同定を、分子生物学的手法を用いて行った。これまでの手法ではAnammox細菌や脱窒性メタン酸化細菌群の検出が困難であるため、新たなPCR条件を開発した。新たなPCR条件を用いることにより、Anammox細菌に比較的近縁な新規の*Planctomycetes*群を検出することに成功した。新規の微生物群の発見により、それらの微生物群を特異的に検出できるオリゴヌクレオチドDNAの設計が可能になり、水田土壌中の正確な定量が可能になる。

**[キーワード]** 畜産排水処理、飼料イネ、生物学的窒素除去、嫌気性アンモニア酸化、脱窒性メタン酸化細菌

### 1. はじめに

飼料イネ水田に施肥する窒素はアンモニアを亜硝酸・硝酸に酸化する硝化反応と亜硝酸・硝酸を窒素ガスに還元する従属栄養性の脱窒反応の2つの異なる生物反応を経て無害化される。近年、硝化・脱窒以外の窒素除去経路が明らかになっている。一つは嫌気性アンモニア酸化(Anammox)であり、独立栄養性のAnammox細菌により嫌気条件下でアンモニアと亜硝酸を窒素ガスに変換する。もう一方は、メタン脱窒であり、亜硝酸・硝酸がメタンと反応して窒素ガスに変換される。これらの反応を担う細菌の特徴として、温室効果ガスである $N_2O$ 、 $CH_4$ を放出しないため、水田からの温室効果ガスの放出を抑制するメリットを有する。これらの細菌群を飼料イネ水田に保持することが重要であると考えられる。

## 2. 研究開発目的

サブテーマ1のポット試験により、高窒素負荷においても飼料イネ水田における窒素除去能の高さが証明された。窒素除去のためには、窒素源であるアンモニア態窒素が亜硝酸・硝酸に酸化される必要がある。これまでの酸素に関する窒素収支では通常の硝化・脱窒反応だけではこれまでの結果で得られた窒素分を酸化するには酸素が足りないことが考えられ、近年発見された新しい窒素除去経路であるAnammox反応が起こっている可能性がある。これまでのところ、海底の堆積物、湖沼・河川の底泥等でAnammox反応を担う*Planctomycetes*門に属するAnammox細菌の分子生物学的検出は行われているが、水田土壌での検出はこれまでのところ皆無である。そこで、新しい窒素除去経路を担うAnammox細菌の検出をまず試みた。次に、脱窒性メタン酸化を行うことが可能な脱窒性メタン酸化細菌の検出、および定量可能なPCRプライマーの開発を試みた。

## 3. 研究開発方法

### 1) DNA抽出

DNAの抽出は抽出キットFast DNA SPIN Kit for Soilを用いて行った。また抽出したDNAはPCR阻害を防ぐため、10倍に希釈して用いた。また、Anammox細菌の分子生物学的検出としてポット試験の土壌0-2 cmと2-20 cmの土壌を採取した。0-2 cm付近ではイネの根が行きとどいており、イネ根圏の土壌である。

### 2) ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

表6にAnammox細菌の検出に用いたプライマーの一覧を示す(表8)。PCRの反応液の組成は各試薬メーカーの推奨マニュアルに準拠して行った。

表8 使用したプライマー

プライマー名	配列(5'-3')	対象	Tm値
Pla46f	GGATTAGGCATGCAAGTC	<i>Planctomycetales</i>	58.0
Amx368f	TTCGCAATGCCCGAAAGG	Anammoxoglobus propionicus以外Anammox	56.0
Brod541f	GAGCACGTAGGTGGGTTTGT	<i>Scalindua</i>	57.0
1037r	CGACAAGGAATTTCGCTAC	universal bacteria(Nested)	59.8
Amx820r	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	anammoxidans, fulgida, stuttgartiensis	66.0
BS820r	TAATCCCTCTACTTAGTGCCC	wagneri, sorokinii	60.0
Brod1260r	GGATTCGCTTCACCTCTCGG	<i>Scalindua</i>	59.0
Amx1480r	TACGACTTAGTCCTCTCAC	All anammox	55.8

### 3) 使用したプライマーの組み合わせおよびPCRの温度条件

表9-14に使用したプライマーの組み合わせおよびPCRの温度条件を示す。PCRは通常のPCRと、nestedプライマーセットPla46fと1037rを用いてPCRを行い、増幅したPCR産物を用いてPCRを行うnested PCRの双方で行った。

表9 プライマーセットPla46f-1392rのPCR条件 (t-RFLP用)

		Temperature[°C]	time[min:sec]	
Step1	Pre-heating	94	05:00	
Step2	Denature	95	00:30	30 cycle
	Annealing	50	00:30	
	Elongation	72	01:30	
Step3	Final extension	72	10:00	
		4	∞	

表10 プライマーセットAmx368f-Amx820rのPCR条件（クローニング用）

		Temperature[°C]	time[min:sec]	
Step1	Pre-heating	94	04:00	
Step2	Denature	95	00:45	30
	Annealing	58	00:50	cycle
Step3	Elongation	72	01:00	
	Final extension	72	07:00	
		4	∞	

表11 プライマーセットAmx368f-Amx1480rのPCR条件（クローニング用）

		Temperature[°C]	time[min:sec]	
Step1	Pre-heating	94	04:00	
Step2	Denature	94	00:30	30
	Annealing	55	00:30	cycle
Step3	Elongation	72	01:30	
	Final extension	72	07:00	
		4	∞	

表12 プライマーセットBrod541f-Brod1260rのPCR条件（クローニング）

		Temperature[°C]	time[min:sec]	
Step1	Pre-heating	95	03:00	
Step2	Denaturation	95	00:45	10
	Annealing	65-60 (-0.5/cycle)	01:00	cycle
step3	Elongation	72	01:00	
	Denaturation	95	00:45	20
consistent cycles	Annealing	60	01:00	cycle
	Elongation	72	01:00	
Step4	Final elongation	72	07:00	
		4	∞	

表13 nested PCR第1段階（プライマーセットPla46f-1037r）のPCR条件（クローニング用）

		Temperature[°C]	time[min:sec]	
Step1	Pre-heating	94	04:00	
Step2	Denature	95	00:45	30
	Annealing	59	00:50	cycle
Step3	Elongation	72	03:00	
	Final extension	72	07:00	
		4	∞	

表14 nested PCR第2段階(プライマーセットAmx368f-Amx820r, -BS820r)のPCR条件

		Temperature[°C]	time[min:sec]	
Step1	Pre-heating	95	03:00	
Step2	Denaturation	95	00:45	10
	Annealing	65-60 (-0.5/cycle)	01:00	cycle
Step3	Elongation	72	01:00	
	Denaturation	95	00:45	20
consistent cycles	Annealing	60	01:00	cycle
	Elongation	72	01:00	
Step4	Final elongation	72	07:00	
		4	∞	

#### 4) t-RFLP（Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism）法による*Planctomycetes*門の変遷

Anammox細菌は*Planctomycetes*門に存在する微生物群であり、系統的に他の*Planctomycetes*門とは離れた位置に存在している。ただし、Anammox反応を担うAnammox細菌以外でもAnammox反応を

担う可能性が否定できないことも報告があり (Pynaert et al. (2003))、まずどの微生物群がそれぞれのポットに存在・出現・消失しているのかを確かめるために、*Planctomycetes*門全体をターゲットとしてt-RFLP法を試みた。表15、表16に使用したプライマーと制限酵素を示す。

表15 t-RFLP法に供試したプライマーセット

primer	specificity	sequence
[6FAM]*- Pla46f	<i>Planctomycetales</i>	[6FAM]GGATTAGGCATGCAAGTC
1392r	<i>Bacteria</i>	ACGGGCGGTGTGTAC

\*[6FAM]-はprimerの5'末端が6FAM蛍光修飾であることを示す

表16 t-RFLPで用いた制限酵素

制限酵素	切断部位
<i>Msp</i> I	C C G G G G C C
<i>Hha</i> I	G C G C C G C G

プライマーセット[6FAM]-Pla46f-1392rでサンプルのPCRを行い、PCR産物の精製を精製キット MicroconTM-100 (42413/MILLIPORE) を用いて行った。次に、アガロースゲル電気泳動によりPCR精製物が得られているかを確認した。さらに、PCR精製物の制限酵素処理を*Hha*Iと*Msp*Iを用いて制限酵素処理を行いT-RF (末端蛍光修飾制限酵素断片) を得た。その後、酵素反応時に混入した塩を除去する為、前段階で得たT-RFのエタノール沈殿を行い、エタノール沈殿後のT-RFとStandard size marker+Hi-Di Formamideの混合液を96wellプレートに15 µl/tubeずつ分注した後、95°C、5minでDNAを熱変性させた。最後に、ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzerでキャピラリー電気泳動を行い、蛍光標識された5'断片長と蛍光強度をGene Scan Softwareで解析した。

#### 5) 16S rRNAのクローンライブラリー解析

t-RFLPにより、これまで知られているAnammox細菌を検出できなかったことから、Anammox細菌を検出できる様々なプライマーセットを用いることにより、それぞれのサンプルの16S rRNA遺伝子に基づいたクローン解析を行い、Anammox細菌の存在を確認することとした。これに合わせ、Anammox反応の代謝経路であるヒドラジンから窒素ガスに変換する際のヒドラジン酸化酵素をコードするヒドラジン酸化遺伝子の検出も試みた。

#### 6) 脱窒性メタン酸化細菌の同定に向けた試み

2011年度の農業環境研究所 (つくば) の実験圃場の水田土壌からサンプルを採取した。実験系を表17に、2011年度の現場実験実施状況を表18に示す。土壌サンプリングは、コアサンプラーを用いてDNA抽出用土壌は深さ0~2 cm, 2~4 cm, 4~6 cm, 6~20 cmに分けて採取した。DNA抽出用土壌は、各系3地点から採取し均一化し、ふるいにかけて根などの夾雑物を除いた後、遠心分離で水分を取り除き-20°Cで冷凍保存した。

表17 2011年度 実験系

系	窒素負荷 [kg-N/ha]	中干し (2回目追肥後)	間断灌漑 (3回目追肥後)
S100	100	不十分 (嫌氣的)	落水日数3日
L100	100	十分 (好氣的)	落水日数6日
S600	600	不十分 (嫌氣的)	落水日数3日
L600	600	十分 (好氣的)	落水日数6日

表 18 2011年度 現場実験スケジュール

日付	水田管理
6/8	移植
7/22	1回目追肥
7月下旬	水管理開始
8/18	2回目追肥
9/12	3回目追肥
9月下旬	落水開始
11/2	収穫

## 7) 飼料イネ水田土壌中のNC10門細菌の同定（従来のプライマーセットによるPCR）

既往の脱窒性メタン酸化細菌であるNC10門細菌を対象としたプライマー(8F-1043R(Ettwig et al. (2009) 464, 543-548)を用いたPCRの後、PCR産物のクローニングを行い、PCR増幅産物の16S rRNA系統解析を行った。クローニングにはpGEM-T Easy Vector (Promega)を使用し、シークエンサー。シークエンスの結果から、今回獲得したクローンの16S rRNA遺伝子配列に基づく系統解析を行った。

## 8) 脱窒性メタン酸化細菌を検出する新しいPCRプライマーの設計

7) で得られたクローンライブラリーを抽出し、遺伝子解析ソフトであるARBを用いて、水田土壌中に棲息する脱窒性メタン酸化細菌を検出可能な16S rDNAプライマーの設計を行った。また、実際に設計したプライマーのNC10門への選択性を確認するために、設計したPCRプライマーにて水田土壌をPCRにかけ、増幅したPCRをサブクローニングにより、種類を同定した。サンプルのデータを表19に、PCR条件を表20に示す。

表 19 サンプルデータ

サンプリング日	深さ[cm]	窒素負荷[mg-N/ha]
2011/6/8 (植栽前)	0-2	50 (基肥)

表 20 PCR 条件

PCR反応条件				反応液組成	
	Temperature [°C]	Time [min:sec]		Master Mix	10 µl
Pre-heating	94	02:00		milliQ	4 µl
Denature	94	00:30	40 cycle	193F	0.5 µl
Annealing	64.5	00:30		616R	0.5 µl
Elongation	72	00:20		鋳型DNA	5.0 µl
	4	∞		全量	20 µl

## 9) 新規プライマーチェック

平成23年度の検討により、水田土壌から発生するメタンの削減が重要課題であることが明らかになった。メタンをめぐる微生物は図21、表21に示す微生物群を介して行われる。これらの微生物群を正確に定量するために、プライマーのチェックと定量PCR用のポジティブコントロール用の

DNAプラスミドの作成を行った。これにより、サブテーマ3、4の定量PCRの準備を行った。作製したDNAプラスミドはサブテーマ3、4の際に用いた。なお、脱窒性メタン酸化細菌に関しては、既存のプライマーセットでは他の細菌も検出してしまい過大評価につながるため、独自でプライマーを設計し、この特異性を評価した。

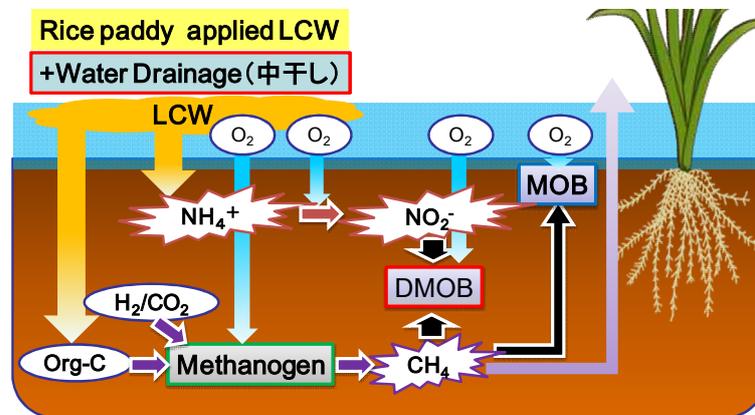


図21 水田土壌におけるメタンをめぐる微生物群の関係

表21 メタンに関与する微生物群

サンプル名	ターゲットとする遺伝子	プライマーセット
メタン生成古細菌 (Methanogen)	<i>mcrA</i> (機能遺伝子)	mlas-mcrA-rev*
メタン酸化細菌 (MOB)	<i>pmoA</i> (機能遺伝子)	A189F-Mb661R**
脱窒性メタン酸化細菌 (DMOB)	16S rRNA遺伝子	193F-661R***

\* Steinberg *et al.* (2008) *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 6663-6671

\*\* Ettwig *et al.* (2009) *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3656-3662

\*\*\* in this study

平成23年度は、NC10門細菌の16S rRNA系統解析結果およびgene bankのデータベースを基に遺伝子解析ソフト*ARB*を用いてNC10門細菌に特異的な遺伝子配列を抽出、NC10門細菌定量用の新規プライマーセット (表22) 作成した。このとき用いたPCRの条件を表24に示す。

表22 設計した NC10 門細菌定量用プライマー

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

R=A/G, Y=C/T

表23 PCR条件 (193F-616R)

反応条件		反応液組成	
Temperature [°C]	Time [min:sec]	SsoFast™ EvaGreen Supermix (Bio-Rad社)	10 µl
<b>Pre-heating</b>	94 02:00	milliQ water	4 µl
<b>Denature</b>	94 00:30	193F	0.5 µl
<b>Annealing</b>	64.5 00:30	616R	0.5 µl
<b>Elongation</b>	72 00:20	鋳型DNA	5.0 µl
<b>Melt curve step</b>	65-95 0.5°C/0:05	全量	20 µl
	4		∞

鋳型DNAには、検量線の精度確認のためにNC10門細菌より獲得したplasmid DNA、いくつかの異なる水田土壌サンプルから抽出したDNAへの適用性確認のために土壌抽出DNA、非特異的増幅の有無の確認のために*Chloroflexi*門細菌より獲得したplasmid DNAを用いた。反応装置にはCFX96リアルタイムPCRシステム（Bio-Rad 社）を使用した。

#### 4. 結果及び考察

##### 1) t-RFLPによる微生物生態構造の変遷

高浸透系・窒素負荷 450 kg-N/ha・植栽有りのポットにおけるプライマーPla46f-1392r, 制限酵素*HhaI*のt-RFLPの結果の一例(植栽有り、窒素負荷 450 kg-N/ha、高浸透 (Run5)・低浸透系 (Run6))を図22に示す。各サンプル間でピークパターンに違いがあり、異なる水田環境でイネを生育させた際に*Planctomycetes*門の細菌群集構造にも違いが出てくることが分かった。この結果から、窒素負荷量、植栽の有無が水田土壌細菌群に影響を及ぼすことが示唆された。また、それぞれのピークのT-RFの長さから、微生物群の種類を定量することが可能である。もし、既存のAnammox細菌がポットに存在している場合は、222 bpにクロマトグラム上のピークが検出されるはずであるが、今回のt-RFLPの結果からはAnammox細菌のピークが検出されなかった。Anammox細菌の存在割合が圧倒的に小さいか、Pla46f-1392rのプライマーセットでは増幅できない新種のAnammox細菌が存在しているかはこの結果からは判別できず、2)のクローニング解析により調査することにした。これらのクロマトグラムを基にして、多次元尺度法による群集構造の変遷を2次元プロットにした(図23)。この結果より、中干しや施肥により群集構造が大きく変わることが示唆された。最終的に到達した2次元プロットの位置は、高浸透・植栽有りの系は窒素負荷に関わらず近くに存在しており、一方で、低浸透および植栽の有無によりその収束する位置に大きな差がみられた。したがって、窒素負荷よりも水の浸透速度(酸素フラックスに影響)および植栽の有無により*Planctomycetes*門の細菌群集構造が大きく影響を受けることが明らかになった。

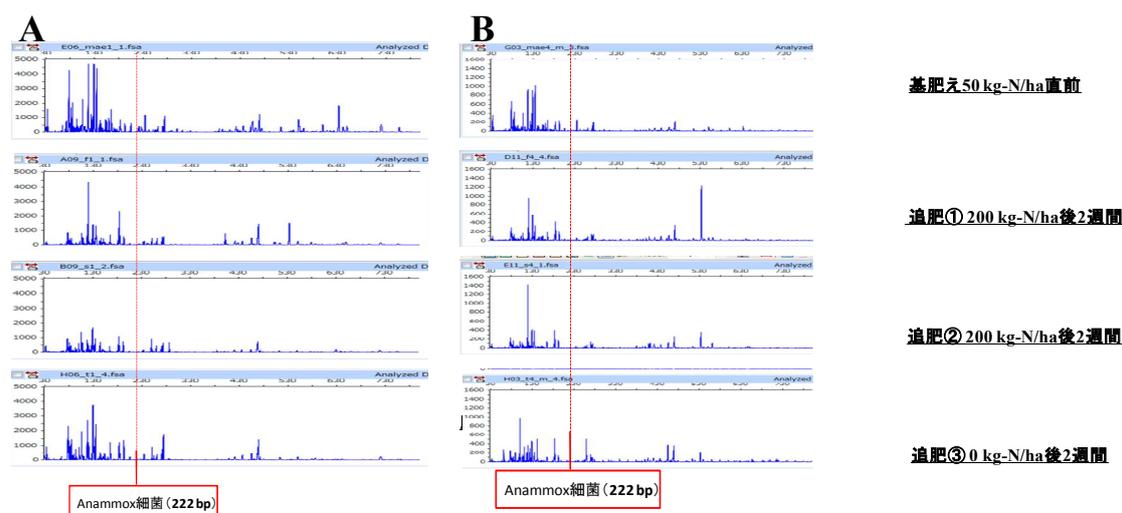


図22 高浸透系と低浸透系の*Planctomycetes*門のt-RFLP解析結果 (A: 高浸透系; B: 低浸透系)

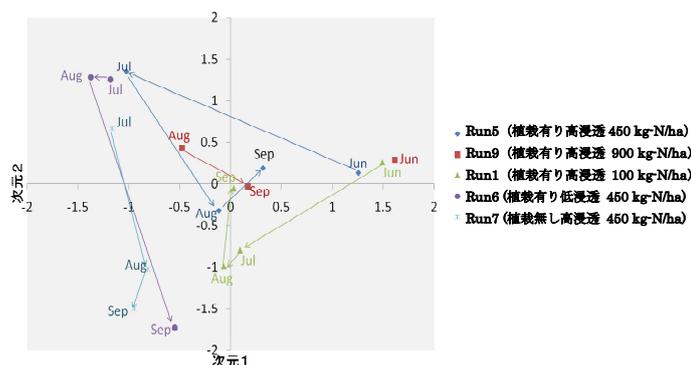


図23 多次元尺度法によるPlanctomycetes門に帰属する細菌群集構造の変遷

## 2) t-RFLPによる微生物生態構造の変遷

Anammox細菌に特異的なプライマーを用いたPCRを行い、Anammox細菌が存在するかの確認を行った。サンプルは高浸透・植栽有り・窒素負荷450 kg-N/haのものとした。使用したプライマーのPCR結果およびシーケンシングの結果を表24に示す。

表24 PCRおよびクローニングによるAnammox細菌の存在確認

プライマーセット	対象	Reference	PCR	sequencing
Pla46f 1392r	Planctomycetales universal bacteria	Neef <i>et al.</i> (1998) Freitag and Prosser (2003)	○	0/22
Amx368f Amx1480r	Anammoxoglobus propionicus 以外のAnammox All anammox	Schmid <i>et al.</i> (2003) Amano <i>et al.</i> (2007)	○	0/49
Brod541f Brod1260r	Scalindua Scalindua	Penton <i>et al.</i> (2006) Penton <i>et al.</i> (2007)	○	0/15
Ana-hzo1f Ana-hzo2r	hzo gene hzo gene	Quan <i>et al.</i> (2008) Quan <i>et al.</i> (2008)	×	—
hzo1f hzo1r	hzo gene hzo gene	Li <i>et al.</i> (2010) Li <i>et al.</i> (2010)	×	—

\*PCR：増幅を確認(○)，増幅せず(×)

\*sequencing：anammox細菌と同定されたクローン数[コロニー]/シーケンシングを行ったクローン数[コロニー]

## 3) Anammox細菌の検出に向けた試み

### ① Pla46f-1392r

Pla46f-1392r PCR産物のシーケンシング結果からPCR産物から得たクローンが系統的にどのようなグループに属するのか調べた。各細菌の門への帰属結果を表25に示す。Pla46f-1392rはPlanctomycetes門を対象としたプライマーであるが他の門に属する細菌DNAも増幅していることが明らかになった。検出されたPlanctomycetes門に属さない微生物群のプライマーとの塩基の相補性にミスマッチはなく、水田に存在するPlanctomycetes門およびAnammox細菌を正しく理解するためには、これまで汎用的に利用されているこのプライマーセットでは不適であることが明らかになった。また、Anammox細菌に近縁なクローンを得ることは出来なかった。

表25 Pla46f-1392rのシーケンス結果

phylum	獲得クローン数
Lentisphaerae	1
uncultured OP3	2
Planctomycetes	10
uncultured WS3	6
uncultured	1
Chloroflexi	2
Total	22

## ② AMX368f-AMX1480r

AMX368f-AMX1480r PCR産物のシーケンシング結果から、PCR産物から得たクローンが系統的にどのようなグループに属するのか調べた。解析した49のクローン全てがOP3という分類群に属することがわかった。この結果から使用したAMX368f-AMX1480rはこれまでの報告ではanammox細菌に特異的であると報告されていたが、水田に棲息する多種多様な微生物群のため、OP3のようなanammox、*Planctomycetes*門以外の細菌DNAを増幅する可能性があることが明らかになった。OP3は*Planctomycetes* / *Verrucomicrobia* / *Chlamydiae*のsuperphylum（門と綱や亜綱以下のグループの間に位置する分類群）にあたり、海底底泥、高塩環境の深海、淡水湖、帯水層、メタン生成バイオリクター、水田土壌などの嫌気的環境で見ついているとの報告があるが、機能等について不明な部分が多い。得られたクローン（OP3）とプライマーの間に配列違いは無く、クローン同士の相溶性が高いことから、PCRで増幅されたのは殆どがOP3であったのではないかと考えられる。

## ③ Brod541f-Brod1260rによる結果

クローン解析の結果、PCR増幅産物は*Mycobacterium*, *Actinobacterium*（ $\alpha$ プロテオバクテリア）等であることがわかった。これらの細菌種はBrod541f-Brod1260rRと2塩基程度の塩基配列の違いがあるが、PCRの条件設定が緩かったことによる非特異的な増幅が起きたものと考えられる。PCR条件の変更を行い、様々な条件で調査したが、クリアな増幅産物を得ることができなかった。

## ④ nested PCRを用いたAnammox細菌検出の試み

これまでの試みでは、1段階のPCRを行ってきたが、これまで既存の報告で他の自然環境で成功例があるプライマーセットが使えなかったため、nested PCRを試みた（Daleら(2009)）。Daleらの条件に加え、新たにアニーリング温度のタッチダウンを行うことを導入し表13、14に示してあるような条件でPCRを行い、ゲル電気泳動を行ったところ、ゲル状の正しい位置に増幅産物が得られた。この増幅産物を切り出し、クローニングを再度行った。クローニングで得られた系統樹を図24に示す。

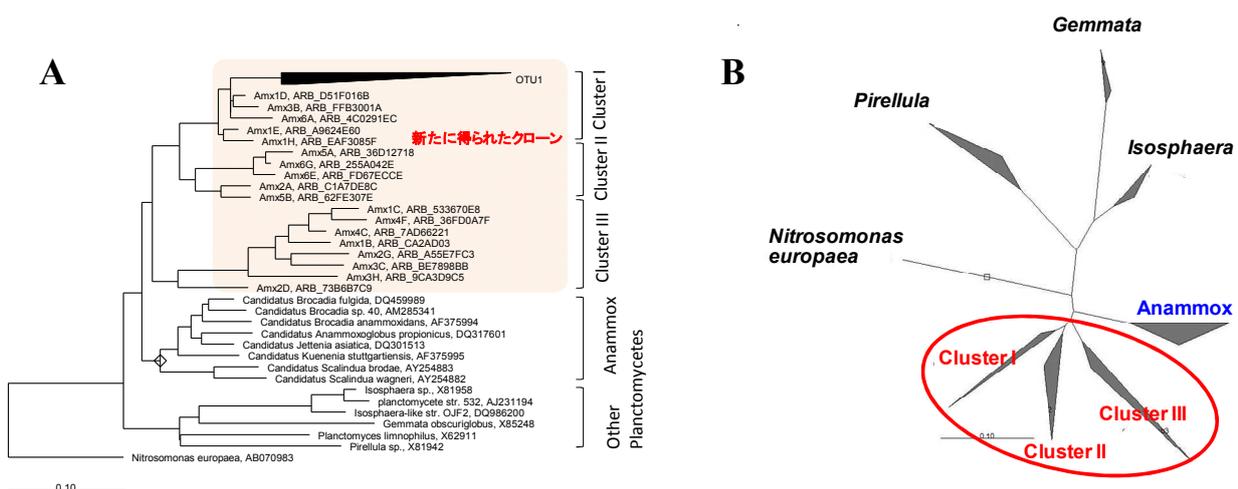


図24 nested PCRで増幅された16S rRNA遺伝子の系統樹 (A) 無根系統樹; (B) 有根系統樹  
(1st round: Pla46f-1037r; 2nd round: amx368f-amx820r)

得られたクローンは新規な分類（クラスター）を形成した。また、既存のAnammox細菌に近縁な種類は検出されなかった。この3つのクラスターは進化の系統的にこれまでのクローニングで得ら

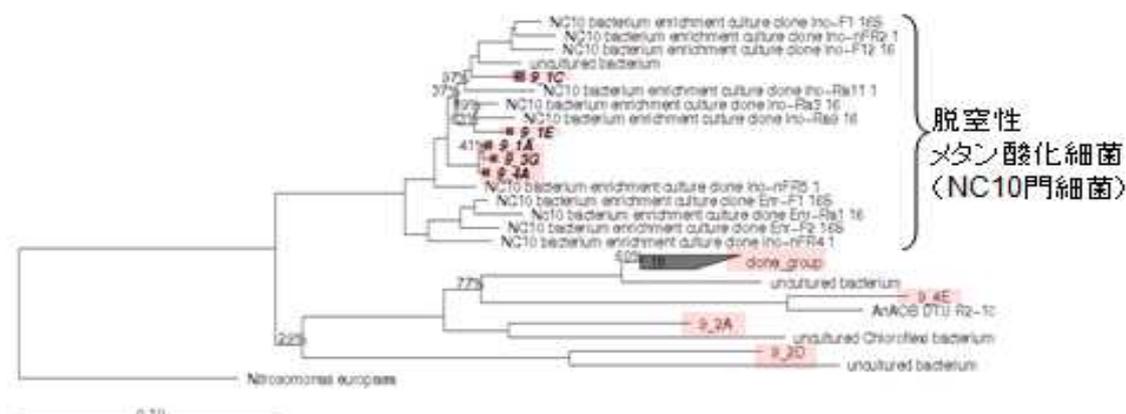
れた*Planctomycetes*とは全く異なるものであり、これまで発見されているAnammoxのクラスターに近い(図24(B))。未知の種類のアナモックス反応を持った細菌と100%断定することはできないが、Anammox反応を担う新規の細菌群である可能性が考えられる。水田のイネ根圏に棲息する*Planctomycetes*門に属する窒素除去を担う細菌群はこれまで知られていた既知のAnammox細菌とは異なる種類である可能性が示唆された。

#### 4) 脱窒性メタン酸化細菌の検出に向けた試み

##### ① 系統解析

作成した系統樹を図25に示す。図25では今回獲得したクローンでNC10門細菌に分類されたものを太字で示してある。

系統解析により、解析済み全27クローン中5クローンがNC10門細菌に分類されることが確認できた。したがって、定量はこの時点では行っていないものの、脱窒性メタン酸化細菌の検出に成功した。これらのクローンはこれまでオランダや日本で報告されている脱窒性メタン酸化細菌(NC10門)と97%以上の塩基配列の相同性を示し、同じ種であることが示された。しかし、今回使用したプライマーセット8F-1043Rでは、NC10門細菌に分類されない種類も多く検出されており、残り22クローンは*Chloroflexi*門細菌に属する未培養の細菌などとの相同性が高いという結果であった。*in silico*の解析では、これらのクローンのDNA塩基配列は、プライマーと相補性が完全に保たれており、本研究で対象とする水田土壌では従来のプライマーでは不適であることが示唆された。



赤：既存のプライマー(8F-1043R)で拾ったクローン

図 25 NC10 門細菌の系統樹

##### ② 新規16S rDNAプライマーの設計

以上の結果から、既往のプライマーでは、飼料イネ水田土壌に棲息するNC10門細菌の定量PCRを行う際に、非特異的増幅による定量の過大評価に繋がる恐れがある。さらに、8F-1043Rでは、塩基長が1000 bpになり、定量PCRに適用するには非常に困難である。そこで、NC10門細菌の16S rRNA系統解析結果およびgene bankのデータベースを基に遺伝子解析ソフトARBを用いてNC10門細菌に特異的な遺伝子配列を抽出、NC10門細菌定量用の新規プライマーセット(表26)作成した。

表 26 設計した NC10 門細菌定量用プライマー

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

R=A/G, Y=C/T

この2つのプライマーセットでの塩基の相補性を確認したところ、現在登録されているNC10門細菌の9割以上を検出可能であり、8F-1043RのプライマーセットでサブクローニングしたNC10門に属さない細菌群は*in silico*でForwardおよびReverseプライマーにおいて塩基の相補性は3ミスマッチ以上であることから、プライマーとして適している可能性が示唆された。

### ③ 新規16S rDNAプライマーのNC10門への特異性評価

実際に新たに設計したプライマーの特異性を調査するために、193F-616RのプライマーによりPCRを行い、増幅したDNAの電気泳動を行った。このときに、ポジティブコントロールとして、8F-1043Rにより増幅させたクローン (*in silico*で新規プライマーとの相補性のミスマッチは0)、ネガティブコントロールとして8F-1043Rにより獲得したNC10門に帰属しないクローン (*in silico*で新規プライマーとの相補性のミスマッチは4ミスマッチ) を水田土壌からDNA抽出したサンプルおよび水により評価した。得られた電気泳動の結果を図26に示す。図26に示すように、標準DNAおよび土壌サンプルについては特異的な増幅を確認、またネガティブについては増幅がないことを確認した。また、増幅されたDNAの塩基長は理論値である443 bpでほぼ一致しており、正しい位置にDNAバンドが検出されたといえる。

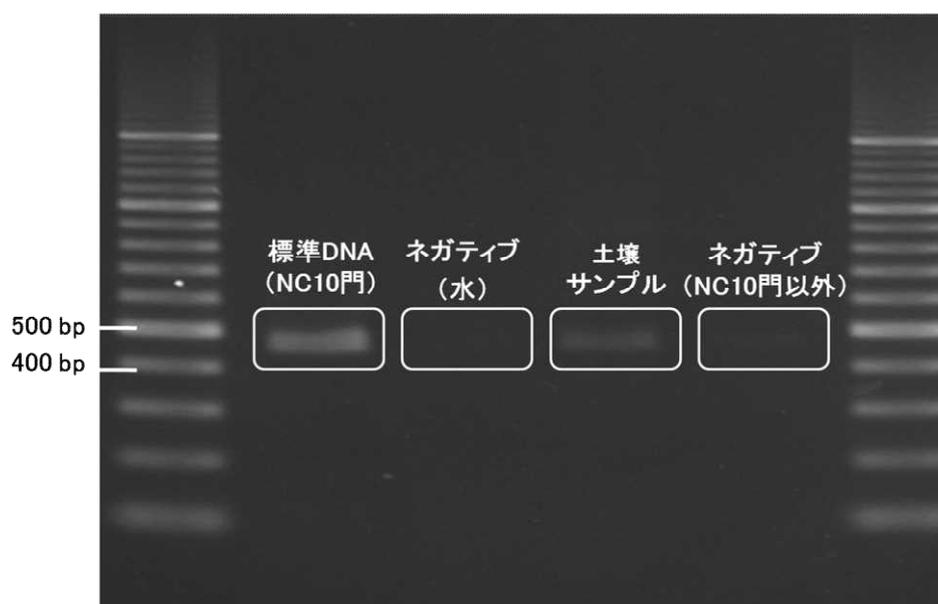


図 26 PCR 産物 (193F-616R) の電気泳動

次に、図26において水田土壌からのDNAサンプルのバンドを切り出し、このDNAをサブクローニングして、塩基配列を同定後、16S rRNA系統解析を行い、系統樹を作製した。サブクローニングで合計40のクローンを獲得して、塩基配列の同定を行った。クローニングにはpGEM-T Easy Vector (Promega)を使用し、Macrogen Japanに解析を委託した。シーケンスの結果から、獲得したクローンの16S rRNA遺伝子配列に基づく系統解析を行った。作成した系統樹を図27に示す。

表 27 サンプルデータ

サンプリング日	深さ[cm]	窒素負荷[mg-N/ha]
2011/9/27 (3回目追肥後)	0-2	600 (3回分)

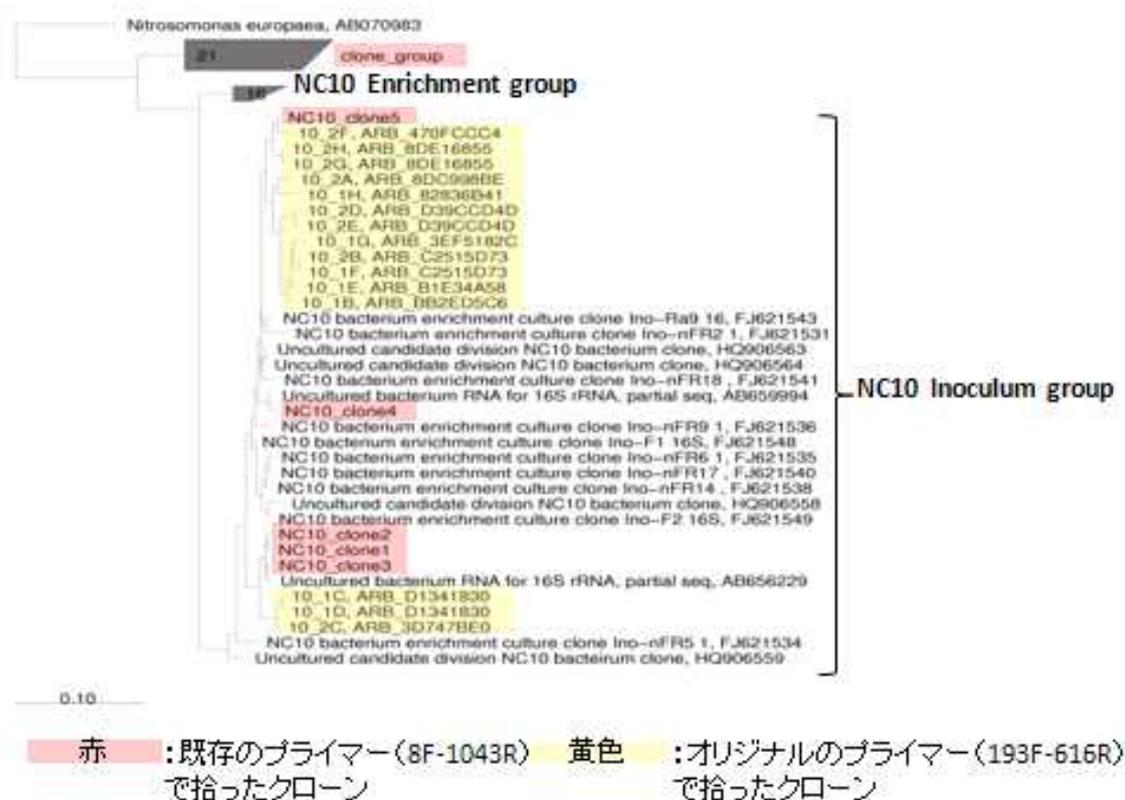


図 27 8F-1043R と 193F-616R PCR 産物の系統樹

解析を行った全40 cloneがNC10門に帰属し(図28)、従来のプライマーセットのような非特異的増幅は見られなかった。また、今回新たに設計したプライマーセットで検出されたNC10門に属する脱窒性メタン酸化細菌は8F-1043Rと近縁であり、プライマーの違いによる種レベルでの帰属の相違は見られなかった。以上の結果より、設計したプライマーを用いることにより、特異的に水田土壌に棲息するNC10門細菌を検出することが可能になった。



図 28 解析した全 40clone を含む系統樹

また、得られたクローンをポジティブコントロールとして、定量PCRにより検量線を作成した。得られた結果を図29に示す。

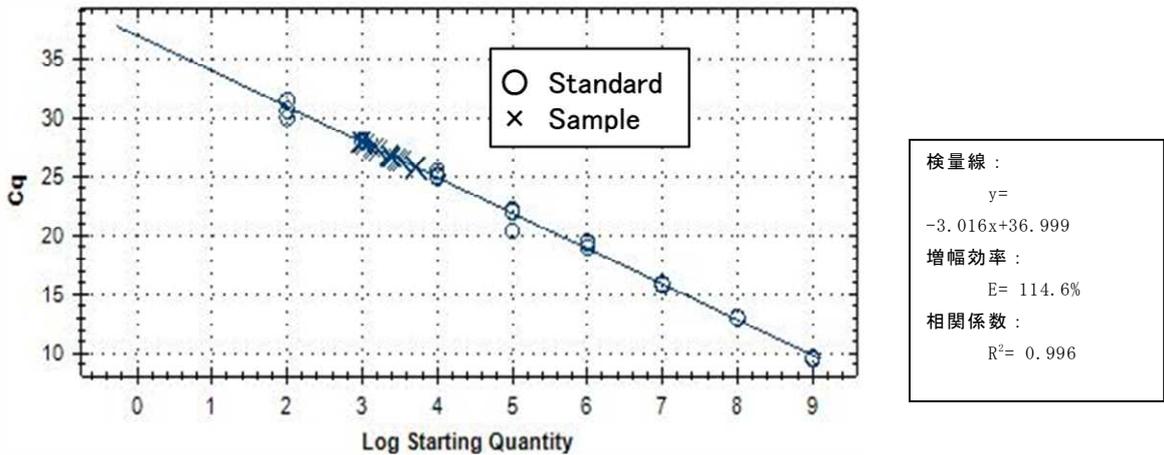


図 29 検量線 (193F-616R)

以上の結果から、新規プライマーセット193F-616Rが定量PCRに実用可能であることが示された。今後の定量PCRのツールとして、適用していくことが可能で、メタンフラックスとの相関を定量的に議論できる。

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

水田土壌においてAnammox反応を担うとされる細菌群は水の浸透速度および植栽の有無に対して微生物生態が大きく変動することが明らかになった。一方で、畜産排水の液肥である施肥の負荷の違いは*Planctomycetes*門の微生物生態構造に大きな違いを及ぼさなかった。このような操作因子に対する微生物生態構造の変遷を追跡できたことは学術的に大きな成果と考える。

水田土壌は多様性が非常に高く、これまでAnammox細菌を検出可能なプライマーの単純な利用ではAnammox細菌の検出は困難であることが確認された。これは、水田におけるAnammox細菌の同定に関する研究報告が皆無であることに関連している。そこで、Nested PCRを用いて検出手法を改良することにより、上記の問題を克服し、Anammox細菌に近縁なこれまでに知られていない*Planctomycetes*を検出することに成功した。これまで検出されていない未知な分類を見出したことは微生物生態学にも新規性を有する成果であると考えている。

さらには、脱窒とメタン酸化を同時に行う脱窒性メタン酸化細菌の検出および定量用のプライマーを設計およびその特異性の評価を行った。これにより、

### (2) 環境政策への貢献

#### <行政が既に活用した成果>

該当なし。

#### <行政が活用することが見込まれる成果>

現在のところ、環境政策への貢献はなされていないが、新規*Planctomycetes*の種類を同定したこと、また畜産排水を施肥する水田内の脱窒性メタン酸化細菌を定量可能なプライマーを開発できた。これにより、水田土壌中のAnammox反応やメタン酸化を担っていると考えられる細菌群の定量が容易になり、この細菌群の密度に基づいた温室効果ガス放出を削減しつつ畜産排水除去を行える水田管理の方針を見いだせると考えている。

## 6. 国際共同研究等の状況

国際共同研究計画・協力案件： 窒素除去に関与する新規微生物群の同定・定量

カウンターパート氏名： Barth F. Smets

所属： Department of Environmental Engineering, Technical University of Denmark

参加・連携状況： 現在は微生物定量用のサンプルの提供および意見交換を行っている。今後、新規微生物群の定量等に関するディスカッションを行う予定である。

国際的位置づけ： カウンターパートの所属する大学はヨーロッパ有数の環境工学科を有し、自然環境および排水処理における新規微生物群の利用を行っており、今後の意見交換により、研究の進展が加速することを期待している。

## 7. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

#### <論文（査読あり）>

- 1) A. TERADA, S. ZHOU and M. HOSOMI: Clean Technol. Environ. Policy 13, 6, 759-781

“Presence and detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria and appraisal of anammox process for high-strength nitrogenous wastewater treatment: A review”

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 寺田昭彦、上村美羽、臼井陽菜子、崎山幸奈、西川恵美、大坂利文、常田聡、周勝、細見正明：第45回日本水環境学会年会（2011）  
「畜産排水除去を志向した飼料イネ水田における *Planctomycetes* 門の生態構造解析」
- 2) 利谷翔平、周勝、小原裕三、寺田昭彦、細見正明：第45回日本水環境学会年会（2011）

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- Amano et al. (2007): *Microbes Environ.* 22: 232-242.  
 Dale et al. (2009): *Environ. Microbiol.* 11: 1194-1207.  
 Freitag and Prosser (2003): *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1359-1371.  
 Li et al. (2010): *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86: 781-790.  
 Neef et al. (1998): *Microbiology-UK* 144: 3257-3266.  
 Penton et al. (2006): *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6829-6832.  
 Pynaert et al. (2003) : *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3626-3635.  
 Quan et al. (2008): *Environ. Microbiol.* 10: 3130-3139.  
 Schmid et al. (2003): *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 529-538.

### (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

東京農工大学 大学院工学研究院 応用化学部門 細見・寺田研究室

寺田昭彦

周勝

平成22～24年度累計予算額：7,005千円

(うち、平成24年度予算額：2,403千円)

予算額は、間接経費を含む。

**[要旨]** 新規*Planctomycetes*門に属する細菌群および脱窒細菌の定量を定量PCR法にて行った。上部土壌の高浸透系植栽を有する系で、3回目追肥後に*Planctomycete*門の細菌数が増加し十倍以上になっていることが確認された。一方、土壌下部では高浸透450 kg-N/ha系を除く全ての系で土壌中の*Planctomycetes*門が減少傾向にあった。また、低浸透系は高浸透系と比較して細菌数の減少が大きく、特に植栽のある系においては顕著であった。これらの定量結果から少なくとも高浸透系および田面水に近い作土層において酸素の供給が進み、窒素除去能の向上とAnammox細菌が属する*Planctomycetes*門の細菌数の増大の相関関係が見出すことができた。さらに、イネ根圏に付着している微生物群の空間分布を蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて解析したところ、イネ根圏にアンモニアを好気的および嫌氣的に酸化するアンモニア酸化細菌およびAnammox細菌が共存していることが明らかになった。

次に、脱窒性メタン細菌、メタン酸化細菌とメタン生成古細菌のダイナミクスを実験圃場を用いて検討した。飼料イネの栽培途中における水の引き抜き期間（中干し）を行うことにより、温室効果ガスであるメタンを酸化する細菌群が中干しを行わない実験圃場の系と比較して有意に高い値が得られた。また、新しい水田管理方法である水を引き抜く（落水）を畜産排水の液肥を施肥する前に行い、液肥に含まれる有機物を好氣的に分解させて、有機物がメタンに変換されることを抑制させる管理方法を用いると、メタンを生成するメタン生成古細菌の成長を大幅に抑制できることが明らかになった。以上より、水田の水管理は土壌中の微生物群の存在量に大きな影響を及ぼすことを明らかにした。

**[キーワード]** 畜産排水処理、蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション法、生物学的窒素除去、嫌気性アンモニア酸化、定量PCR

#### 1. はじめに

イネ根圏は大気からの吸収した酸素を根圏生物に供給する場であり、また、有機物を供給することが知られている。そこで、根圏に棲息している微生物群の定量を行うことにより、ポット試験で得られた窒素除去性能、脱窒速度との関連を明らかにする。サブテーマ1で植栽した飼料イネポットのイネ根圏に棲息している微生物群、特に*Planctomycetes*門の細菌群の定量を行うことによ

り、根圏でどんな反応が起こっているかのヒントを得ることができ、水田および根圏での反応メカニズムの解明につながると考えられる。これにより、Anammox反応を担う*Planctomycetes*門と窒素除去の関係性の理解から、これらの細菌群の制御を行うための水田の管理指針を提示できることが期待される。

また、メタン酸化をめぐる微生物群の関係により、水田土壌中のメタン生成量を抑制できる可能性がある。図21に示したようにメタンをめぐる消費者・生産者のポピュレーションを追跡することは水田からのメタン発生を大幅に削減できる可能性がある。

## 2. 研究開発目的

定量PCR法および蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション法を適用することにより、作土層およびイネ根圏の脱窒細菌およびAnammox細菌が帰属する*Planctomycetes*門および脱窒細菌の定量を行い、窒素除去性能との関連を評価した。さらに、イネ根圏の切片を作成し、イネに付着し棲息する微生物群の可視化と空間分布の観察を目指した。また、メタンをめぐる微生物（メタン酸化細菌、脱窒性メタン酸化細菌、メタン生成古細菌）の定量を行い、各水田の管理方法の違いがこれらの微生物群のポピュレーションに及ぼす影響を評価した。

## 3. 研究開発方法

### 1) リアルタイム定量PCRによる土壌に棲息する微生物群の定量

表4に示すポットの土壌上部2 cmおよび下部2 cm以下から土壌を採取し、それをリアルタイム定量PCRに供試することにより、Anammox細菌が帰属する*Planctomycetes*門の細菌群および脱窒細菌群の定量を行った。これまで報告されているAnammox細菌のプライマーセットによるPCRおよびクローニングによる細菌の同定において正確なAnammox細菌の定量ができなかったため、Anammox細菌を含む*Planctomycetes*門を検出することが可能なPla46f-518rのプライマーセットを用いてリアルタイム定量PCRを行い、Anammox細菌を含めた*Planctomycetes*門全体の挙動を追跡することとした（表28）。一方、脱窒細菌は系統学的に多様であることから、機能遺伝子（亜硝酸還元遺伝子（*nirS*および*nirK*））の定量を行った。リアルタイム定量PCRで用いた反応条件を表29に示す。検量線はバイオリアクターおよび環境サンプルから採取したAnammoxおよび脱窒細菌由来のDNAを用いて行った。

表28 リアルタイム定量PCRに用いたプライマー

プライマー	プライマー標的細菌	プライマーの塩基配列(5'-3')	Reference
Pla46f	<i>Planctomycetes</i>	GGATTAGGCATGCAAGTC	Neef et al. 1998
518r	<i>Bacteria</i>	ATTACCGCGGCTGCTGG	Neef et al. 1998
<i>nirS</i> 4Qf	<i>nirS</i>	GT(C/G)AACG(C/T)(C/G)AAGGA(A/G)AC(C/G)GC	Henry et al. 2004
<i>nirS</i> 6Qr	<i>nirS</i>	GA(C/G)TTCGG(A/G)TG(C/G)GTCTT(C/G)A(C/T)GAA	Henry et al. 2004
<i>nirK</i> 876f	<i>nirK</i>	AT(C/T)GGCGG(A/C/G)CA(C/T)GGCGA	Henry et al. 2004
<i>nirK</i> 1040r	<i>nirK</i>	GCCTCGATCAG(A/G)TT(A/G)TGGTT	Henry et al. 2004

表29 *Planctomycetales*プライマーPla46f-518rおよび脱窒遺伝子プライマーのPCR条件

		Temperature[°C]	time [min:sec]	
Step1	Pre-heating		94	5:00
	Denaturation		94	0:30
Step2	Annealing ( <i>Planctomycetes</i> )		56	0:30
	Annealing ( <i>nirS</i> and <i>nirK</i> )	63 (-1°C/cycle) to 58		
	Elongation		72	
Step3	Final extension		72	5:00
	Melting curve		94	

2) 蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション (FISH) 法によるイネ根圏の微生物の可視化  
 実水田（茨城県つくば市の農業環境技術研究所）より得られた根圏をパラホルムアルデヒドにて固定化した。次に、明らかに大きな土の塊を剥がし、イネ根圏をポリビニルアルコールで包埋し、クライオミクロトームにて氷結させた。その後、ミクロトームにより、30  $\mu\text{m}$ の厚みを有する切片を作製した。その後、切片をAmannらの標準プロトコール (Amann *et al.* (1995)) に従ってハイブリダイゼーションを行い、蛍光顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡を用いてイネ根圏の微生物群の可視化を行った。FISH法で標的とした細菌はアンモニアを好氣的に酸化する $\beta$ -Proteobacteriaに属するAOBの*Nitrosomonas*属と*Nitrospira*属、また嫌氣的に酸化する嫌氣性アンモニア酸化細菌である。

### 3) メタンをめぐる微生物群の定量（平成23年度）

#### ① 実験系とサンプル

2011年度の農業環境研究所（つくば）の実験圃場の水田土壌からサンプルを採取した。実験系を表30に、2011年度の現場実験実施状況を表31に示す。また、採取したサンプルに関する情報を表32に、水田の水質管理に関する時系列的な情報を図30に示す。

#### ② 定量PCR

各微生物の遺伝子コピー数定量はCFX96 リアルタイムPCRシステム（Bio-Rad 社）によるreal time PCRによって行った。用いたプライマーセットを表33に示す。

表30 2011年度 実験系

系	窒素負荷 [kg-N/ha]	中干し (2回目追肥後)	間断灌漑 (3回目追肥後)
S600	600	不十分 (嫌氣的)	落水日数3日
L600	600	十分 (好氣的)	落水日数6日



図30 各処理区における追肥後の灌漑管理とサンプリング（追肥の間隔期間）

表 31 2011年度 現場実験スケジュール

日付	水田管理
6/8	移植
7/22	1回目追肥
7月下旬	水管理開始
8/18	2回目追肥
9/12	3回目追肥
9月下旬	落水開始
11/2	収穫

表 32 サンプルデータ

サンプリング日	深さ[cm]	累積窒素負荷[kg-N/ha]
2011/6/8 (植栽前)	0-2、6-20	50
2011/7/21 (1回目追肥前)	0-2、6-20	50
2011/8/4 (2回目追肥前)	0-2、6-20	150
2011/9/12 (3回目追肥前)	0-2、6-20	350
2011/9/27 (3回目追肥後)	0-2、6-20	600 (3回分)

表 33 PCR 条件

PCR反応条件				反応液組成	
	Temperature [°C]	Time [min:sec]		Master Mix	10 µl
Pre-heating	94	02:00		milliQ	4 µl
Denature	94	00:30	40 cycle	193F	0.5 µl
Annealing	64.5	00:30		616R	0.5 µl
Elongation	72	00:20		鋳型DNA	5.0 µl
	4	∞		全量	20 µl

## 4) 圃場実験による畜産排水処理とメタンをめぐる微生物群の定量

## ① 実験系とサンプル

平成23年度に実施した実験圃場における畜産排水処理試験において、常時湛水管理および中干し管理を実施し、その際のメタン削減性能の検討を行ってきた。窒素除去に関してどちらの条件においても大きな差は見られなかったものの、温室効果ガス、特にメタンガスの発生量に大きな違いがみられた。そこで、メタン発生量の違いの影響因子として各水田土壌における微生物群の定量評価を行い、中干しによるメタン生成・消費に関わる土壌微生物群への影響を評価した。

## ② 実験圃場の管理方法

茨城県つくば市にある農業環境技術研究所の圃場にてフィールド実験を実施した。試験圃場は、40 m<sup>2</sup>を1つの区画とした。温室効果ガス排出における中干しの影響を調査するために、「常時湛水」「中干し」の2つの実験系を設定した。施肥管理および水管理を含む水田管理スケジュールを表34に示す。全ての試験圃場で追肥は計3回実施した。3回の追肥による窒素負荷を表35に示す。

中干し期間は畜産排水を1回目追肥と2回目追肥の間の7月26日から7月22日の8月17日に設定した。実験期間は飼料イネの栽培期間である6月8日（移植後日数（Days After Transplanting (DAT) 0日目）から11月2日までの147日間であった。

表34 飼料イネ水田管理スケジュール

Field management	Date	DAT (days)
基肥	5月26日	
代かき	5月26日、6月3日	
移植	6月8日	0
1回目追肥（1st LCW）	7月22日	44
中干し開始	7月26日	48
中干し終了	8月17日	70
2回目追肥（2nd LCW）	8月18日	71
3回目追肥（3rd LCW）	9月12日	96
最終落水開始 <sup>*1</sup>	8月初旬	
収穫	11月2日	147

\*1 最終落水期間中、灌漑は行わなかったが、降雨の関係により水位が上昇した。

表35 3回の追肥による窒素負荷（NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N）量

	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N loading [kg-N ha <sup>-1</sup> ]				
	Basal	1回目追肥	2回目追肥	3回目追肥	合計
常時湛水	50	53	114	168	385
中干し	50	53	114	168	385

### ③ 測定方法

中干しによるメタン削減効果およびメタン生成・消費に関わる土壌微生物群への影響調査するための調査項目を表36に示す。

表36 測定項目一覧

サンプル	分析項目	分析方法
ガス	メタンガスフラックス	GC/FID
土壌	土壌吸着体窒素濃度	イオンクロマトグラフィー
	有機炭素濃度	TOC
	土壌溶存メタン濃度	GC/FID
	土壌中微生物遺伝子コピー数	Real time PCR
水	酸化還元電位	酸化還元電位計
	表面水水位	自動水位計

### ④ ガスサンプリング

ガス採取は、クローズドチャンバー法により行われた。直径30 cm、高さ30 cmの円筒型アクリル製ベースを飼料イネが1株入るよう、土壌に深さ5 cm程度差し込み、安定のために1時間放置した。その後直径30 cm、高さ100 cmのアクリル製チャンバーをベースにかぶせ、密閉状態とした。

ベースとチャンバーの接続部分にシリコンゴムを敷き、クリップで挟むことで密閉状態を保つようにした。チャンバーにはガス採取のための三方コック、気圧調節用の1 Lテドラーバッグ（東京硝子）、温度計およびチャンバー内部を完全混合にするためのファンが付いている。チャンバーをベースにかぶせて密閉直後（0 min）、10 minおよび20 min後に50 mlシリンジによって内部の気体を採取し、予め真空にしておいた30 mLガスクロバイアル（SVG-30, 日電理化硝子製）に注入保存した。ガス採取時、同時に深さ5 cmの土壤に設置した白金電極と。酸化還元電位計（PRN-41型、藤原製作所製）により土壤中の酸化還元電位（Eh）を測定した。

#### ⑤ メタンガスフラックス測定

採取したガスサンプルはCH<sub>4</sub>濃度の測定に供した。CH<sub>4</sub>濃度は水素炎イオン化型検出器付きガスクロマトグラフィー（GC-14B, Shimadzu）、N<sub>2</sub>O濃度は電子捕捉型検出器付きガスクロマトグラフィー（GC-14A, Shimadzu）により測定した。

CH<sub>4</sub>フラックスは、チャンバーの密閉時間における、内部の濃度変化速度から以下の式により計算した。

$$F = \frac{\Delta C}{\Delta t} \times \frac{V}{V_0} \times \frac{T_0}{T} \times M \times \frac{1}{A}$$

ここで、 $F$ : フラックス [ $\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ]、 $\Delta C/\Delta t$ : チャンバー内濃度変化速度 [ $\text{ppmv} \cdot \text{h}^{-1}$ ]、 $V$ : 密閉体積 [ $\text{m}^3$ ]、 $V_0$ : 標準状態で理想気体1 molが占める体積 $0.0224 \text{ m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ 、 $T_0$ : 273 [K]、 $T$ : チャンバー内温度 [K]、 $M$ : モル質量 [ $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]、 $A$ : チャンバー断面積 [ $\text{m}^2$ ]である。

#### ⑥ 土壤サンプリング

土壤サンプリングには2種類の土壤コアサンプラーを土壤の状態によって使い分けた。ライナー採土器（大起理化工業）は直径5.5 cm、深さ20 cmのコアサンプルを採取可能であり、より少量でよい場合は直径2 cm、深さ10 cmのコアサンプラーを用いた。土壤サンプリングは採取位置による偏りを防ぐため、流入水側よりおおよそ2.5、5.0、7.5 cmに位置する3点から毎回ランダムに採取した。

#### ⑦ 土壤吸着態窒素（NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N）濃度、有機炭素濃度（DOC）測定

土壤コアサンプルに含まれる吸着態窒素は、風乾後2.0 mmのふるいにかけて植物残渣等を除いたあとに、KCl溶液により抽出した。抽出液を濾過した後にイオンクロマトグラフィーにて無機態窒素濃度を測定し、単位乾燥土壤あたりに含まれる吸着態窒素量を求めた。また有機炭素濃度は、濾過後KCl抽出液をTOC計（TOC 5000A, Shimadzu）により分析した。

#### ⑧ 土壤溶存メタン濃度測定

土壤に溶存しているメタンの抽出操作の一連の流れを図31に示す。50 mlガスクロバイアルにサンプル土壤、N<sub>2</sub>曝気水20 mlおよび塩化水銀溶液0.3 mlを入れた後、スラリー状になるまで良く振とうした。振とう後は1時間静置し、ヘッドスペースのガスを三方コック付きシリンジで10 ml採取し、真空3 mlバイアルに保存した。保存したガスはGC/FIDでメタン濃度を分析した。

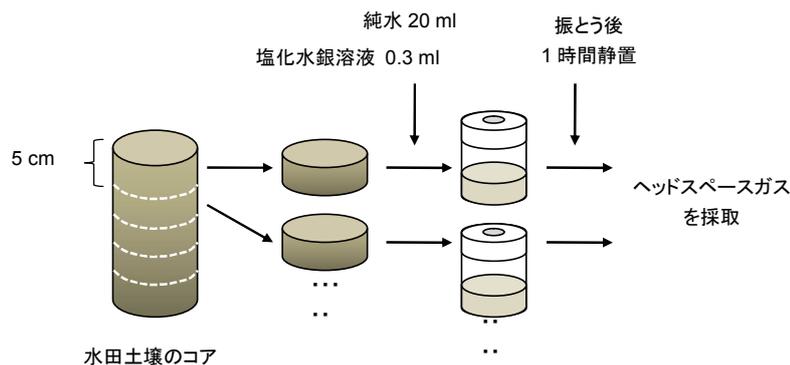


図 31 水田土壌中の温室効果ガス抽出方法

## ⑨ DNA抽出

各実験圃場の2.5、5.0、7.5 cm地点から土壌コアをサンプリングし、0-2、2-4、4-6 cm深さに切断した後、3地点のコアサンプルを完全に混合した状態でDNA抽出まで-20°Cにて冷凍保存した。抽出には市販の環境試料用DNA抽出キットExtrap Soil DNA Kit Plus ver.2（日鉄環境エンジニアリング株式会社）を使用した。DNAは滅菌水にて抽出し、使用まで-20°Cにて冷凍保存した。

## ⑩ 定量PCR

各微生物の遺伝子コピー数定量はCFX96リアルタイムPCRシステム（Bio-Rad 社）によるreal time PCRによって行った。用いたプライマーセットを表37に示す。また各プライマーセットに対する定量PCR反応条件を表38に示す。

表 37 使用したプライマーセット

	Target gene	Primer set	Primer sequence (5'-3')
メタン菌	<i>mcrA</i>	mlas mcrA-rev	GGGTGGGTMGGDTTCACMCARTA CGTTCABGCGTAGTTVGGRTAGT
メタン酸化細菌	<i>pmoA</i>	A189F Mb661R	GGNGACTGGGACTTCTGG CCGGMGCAACGTCYTTACC
NC10門細菌	16S rRNA	193F 616R	GGRGGAYCAAAGGGGGCGAG ACGCGGRTCTCGGTTRAGC

\* M = A/C, D = A/G/T, R = A/G, B = G/C/T, V = A/G/C, N = A/T/G/C, Y = T/C

表 38 PCR 条件

反応条件		反応液組成	
Temperature [°C]	Time [min:sec]	SsoFast™ EvaGreen Supermix (Bio-Rad社)	
<b>Pre-heating</b>	94	05:00	milliQ water 4 μl
<b>Denature</b>	94	00:25	193F 0.5 μl
<b>Annealing</b>	65 (mlas-mcrA-rev) 65 (A189F-MB661R) 64.5 (193F-616R)	00:30	616R 0.5 μl
<b>Elongation</b>	72	00:45	鋳型DNA 5.0 μl
<b>Melt curve step</b>	65-95 0.5°C/0:05		全量 20 μl
	4	∞	

#### ⑪ 土壌酸化還元電位 (Eh)

予め深さ1 cm, 5 cmの位置に挿入した土壌Eh測定用の白金電極 (EP.201型, 藤原製作所株式会社製) およびポータブル酸化還元電位計 (PRN.41型、藤原製作所株式会社製) に接続された比較電極を土壌に挿入することにより定期的に測定した。

#### ⑫ 表面水水位

水田表面水の浸透および蒸発散による水位低下を把握するため、飼料イネ移植時に水位計 (HIOKI 3635, 日置電機) を小区画内のほぼ中央に設置した。また、蒸発散量を把握するために、小区画外に現場土壌を充填し、飼料イネを植栽した箱を設置し、水位計をその中央に設置した。

### 4. 結果及び考察

#### 1) リアルタイム定量PCRによる土壌に棲息する微生物群の定量

リアルタイム定量PCRによる各飼料イネ植栽ポットにおける*Planctomycetes*門細菌の相対値を図32に示す。増減の傾向を正確に把握するために、植栽開始の際の*Planctomycetes*門の細菌数を1とした。上部土壌の高浸透系植栽を有する系で、3回目追肥後に細菌数が増加し十倍以上になっていることが確認された。一方、土壌下部では高浸透450 kg-N/ha系を除く全ての系で土壌中の*Planctomycetes*門が減少傾向にあった。また、低浸透系は高浸透系と比較して細菌数の減少が大きく、特に植栽のある系においては顕著であった。微量酸素が存在する高浸透系では硝化が起りやすく、*nammox*細菌を含む*Planctomycetes*門が増加したということが考えられる。定量した*Planctomycetes*がAnammox反応を担う機能を有していると仮定すると、硝化反応で生成した亜硝酸を反応基質として利用し、菌体の増殖を行ったということの裏付けとなる。これらの定量結果から少なくとも高浸透系および田面水に近い作土層において酸素の供給が進み、窒素除去能の向上とAnammox細菌が属する*Planctomycetes*門の菌体数の増大の相関関係が見出すことができた。追肥3回目後 (9月23日) の土壌上部 (2 cm) における脱窒に参与する遺伝子を有する細菌 (脱窒細菌) と*Planctomycetes*門の細菌群の定量結果を図33に示す。高浸透・植栽無しの系は同じ浸透速度で植栽有りの系と比べてどちらの細菌数が少ないことが確認された。これにより、飼料イネを植栽することで、土壌に存在できる脱窒を担う微生物群を高密度に保持できることが明らかになった。具体的には、同じ水の浸透速度、窒素負荷において植栽の有無を比較すると、植栽有りの系では*Planctomycetes*門の細菌数は4.5倍、脱窒細菌数は24倍も存在量が多いことが明らかになった。次に、水の浸透速度の違いにより、高浸透の系が*Planctomycetes*門の細菌数は3.3倍、脱窒細菌数は2.1倍多いことが確認された (窒素負荷450 kg-N/haの系)。この結果は図12の<sup>15</sup>Nトレーサー試験で得られた高浸透系の方が最大脱窒速度で3.4倍高い結果 (1.04 g-N/m<sup>2</sup>/day vs. 0.31 g-N/m<sup>2</sup>/day) に概ね一致する。また、脱窒細菌に対する*Planctomycetes*門に属する細菌の割合は5-25%程度であることが明らかになった。植栽の有無、浸透速度、窒素負荷に関してこの割合の傾向は得られなかった。

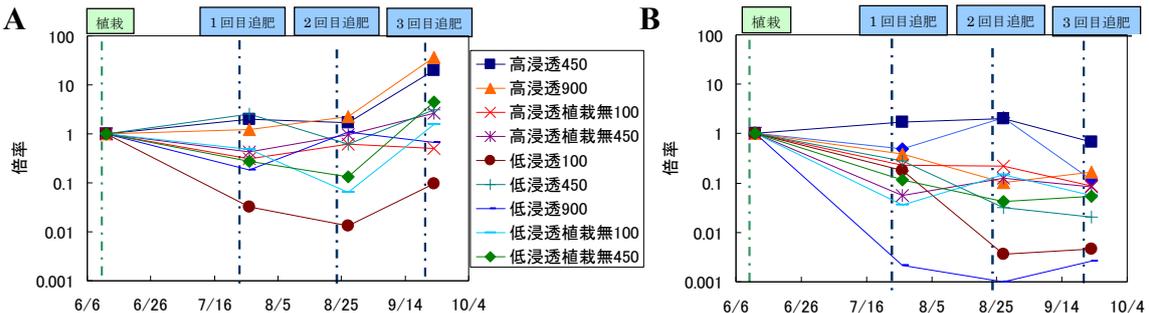


図32 (A) 土壌上部 (2cm) および (B) 深部 (10 cm以深) のPlanctomycetes門の細菌数の相対変化

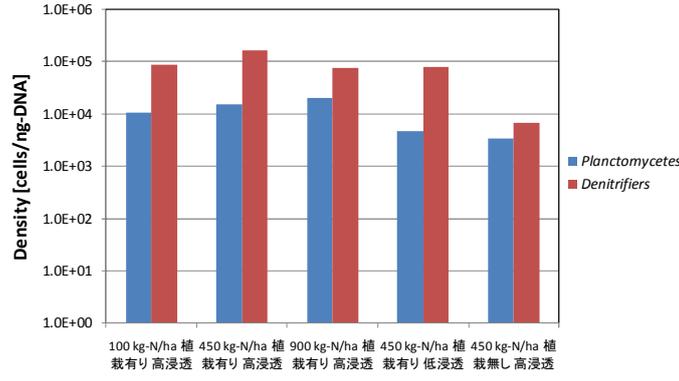


図33 脱窒細菌およびPlanctomycetes門に属する細菌群の存在量の比較

2) 蛍光in situハイブリダイゼーション (FISH) 法によるイネ根圏の微生物の可視化

クライオミクロトームにより作製したイネの切片の光学顕微鏡による断面図を図34に示す。土壌粒子が含まれたサンプルにおいては切片の作製が困難であると考えられてきたが、今回のイネ根圏ではイネ組織の大きな破壊もなく断片の作製ができた。FISH法によるイネ根圏における微生物細胞の検出結果を図35に示す。イネ根圏において微生物群が棲息することが確認された。また、青-紫色で示す好気性アンモニア酸化細菌が比較的イネの根近傍に検出された。イネは大気中から酸素を取り込み、根圏へ供給することが示唆されているため、これらの細菌はイネの根から酸素を獲得し、アンモニアを亜硝酸に変換している可能性が考えられる。Anammox細菌はわずかであるがピンクに検出している部分があり (図35の白丸の部分)、これらの細菌がアンモニア酸化細菌により酸化された亜硝酸を用いて窒素ガスに変換する可能性が考えられる。

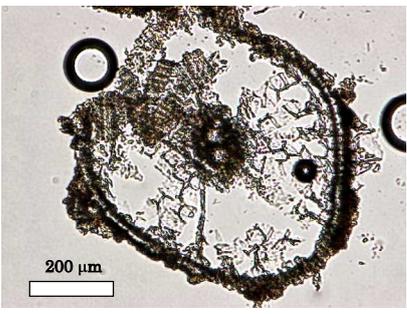


図34 実水田のイネ根圏の断面図 (左上および右端の大きな○は混入した泡を表す)

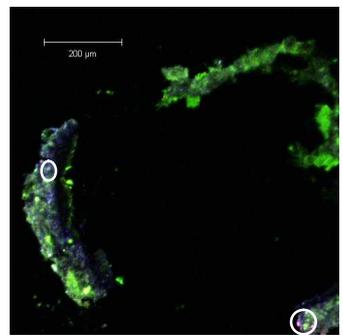


図35 FISH法による実水田のイネ根圏に棲息する微生物群の可視化 (青-紫:β-プロテオバクテリアに属するアンモニア酸化細菌、ピンク:Anammox細菌、緑:その他の細菌)

## 3) 実験圃場における脱窒性メタン酸化細菌の定量（平成23年度）

サブテーマ2で開発した新規PCRプライマー193f-616rの検量線およびサンプルの融解曲線の結果を図36に示す。

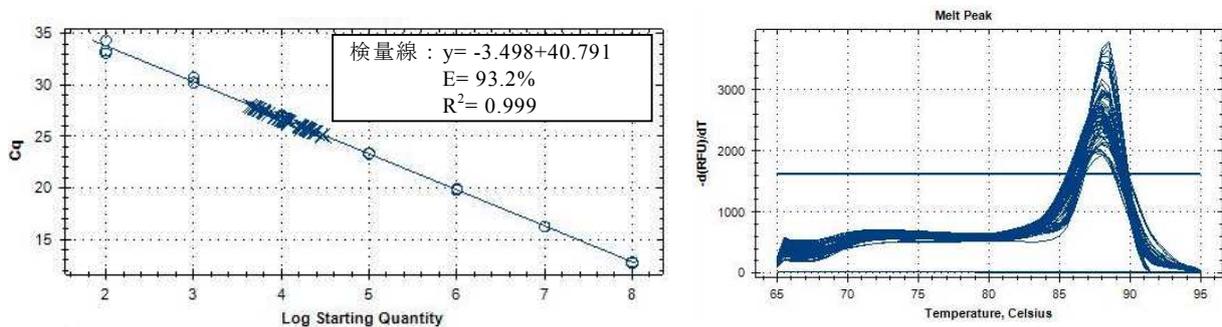


図 36 検量線の結果および融解度曲線

融解度曲線は同一融解温度において単一のピークとなり、PCR産物が特異的である、すなわち脱窒性メタン酸化細菌由来のDNAが増幅されていることを示した。この定量結果を図37-38に示す。

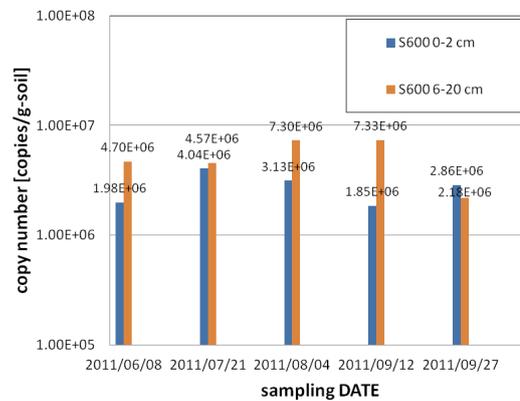


図 37 NC10 門に帰属する脱窒性メタン酸化細菌の定量結果（灌漑間隔 3 日に 1 回）

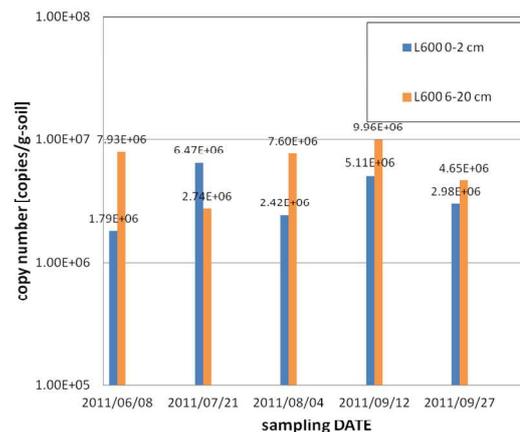


図 38 NC10 門に帰属する脱窒性メタン酸化細菌の定量結果（灌漑間隔 6 日に 1 回）

## ① 各土壌深さのNC10門細菌数：

図37-38から、灌漑の頻度を変えた実験系の間で脱窒性メタン酸化細菌の大きな違いは見られなかった。また、1回目追肥以降において6-20 cmの土壌深さが深い方で脱窒性メタン酸化細菌に帰属するNC10門細菌数が高い結果がみられた。これは、脱窒性メタン酸化細菌がメタンを資化するた

め、メタン発生がより顕著に起こると考えられる深層部にアバンダンスが高くなるという可能性が考えられる。各水田土壌深さ方向のメタンフラックスを示したものを図39に示す。CH<sub>4</sub>濃度分布は深い方でより高い濃度を示しており、また好気/嫌気的環境であることから、より下層でNC10門細菌の活性があることが予想される。

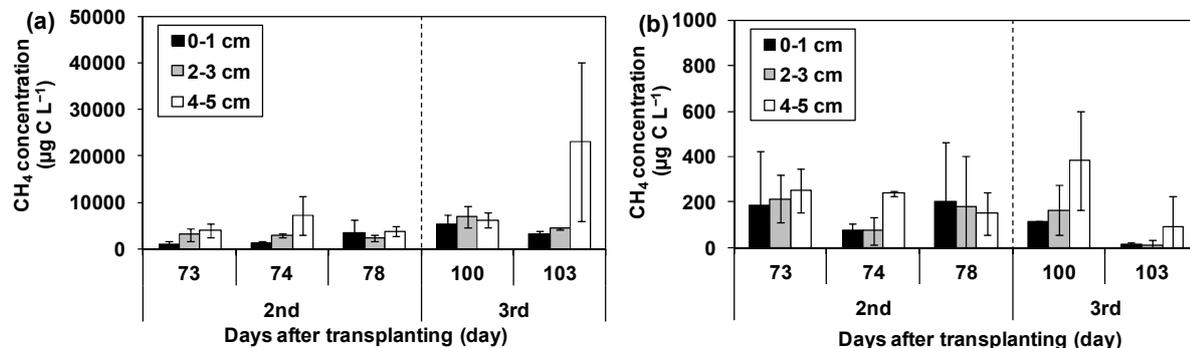


図 39 2回目および3回目追肥後における土壌中 CH<sub>4</sub> 濃度分布 (a: S600; b:L600)

② 水田管理方法による違い：

図40に示すように、土壌中CH<sub>4</sub>濃度はS系とL系で大きな差が見られたが、NC10門細菌数の違いは1~2倍程度の範囲に収まり、特に大きな違いは見られなかった。

③ NC10門細菌数変動について：

植栽期間を通じ、植栽前からの菌数は最大で約4倍と大きな変動は見られなかった(図40)。水田からのCH<sub>4</sub>排出挙動に関しては、S600系の方が高い放出速度、また計3回の追肥後では3回目の追肥後の放出速度が最大、などといった違いが見られた(図41)。しかし、今回の結果では、メタン放出速度に見られるような変化・違いは細菌数に関しては確認できなかった。

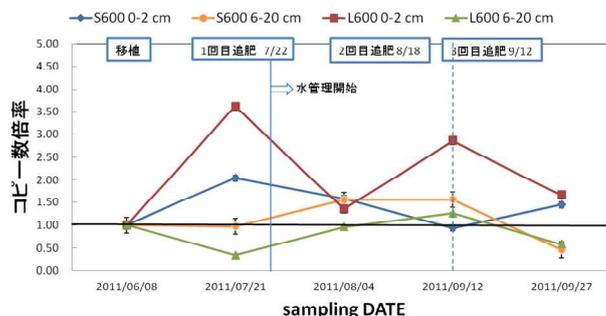


図40 NC10門に帰属する脱窒性メタン酸化細菌の相対値

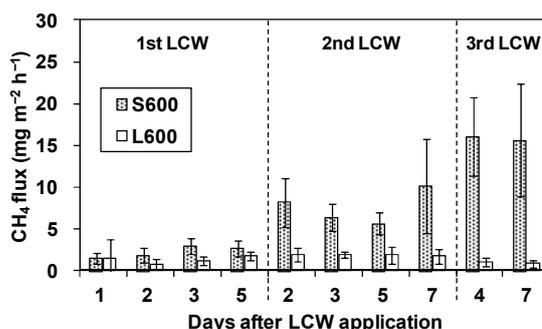


図41 水田からのメタンフラックスの経日変化 (LCWは畜産排水由来の液肥を意味している)

## 4) 実験圃場におけるメタンをめぐる微生物群のポピュレーションダイナミクス (平成23年度)

常時湛水と中干し系で2回目追肥、3回目追肥をはさんだDAT 70 dayと111 dayの機能遺伝子*mcrA*、*pmoA*、NC10 (16S rRNA遺伝子) のコピー数を、0-2 cm、2-4 cm、4-6 cm土壌深さごとに比較した結果を図42-44に示す。これらの結果をまとめると、以下のようなになる。

- ・*mcrA*は水管理に関わらずLCW後に10倍程度減少した。*mcrA* (メタン生成菌の有する機能遺伝子) は3回の畜産排水 (LCW) 施肥により、10倍程度減少した。これは畜産排水に含まれるアンモニアが高濃度に入ることにより起る。アンモニアは土壌表層において亜硝酸・硝酸に酸化される。この窒素酸化物を電子受容体として土壌中の脱窒細菌が利用することで、脱窒が行われる。このときの電子供与体はLCWに含まれる有機物および土壌に存在する有機物であるため、メタン生成古細菌が有機物獲得競争に敗れた結果である可能性が考えられる。

- ・常時湛水系で*pmoA* (メタン酸化細菌の有する機能遺伝子) はLCW後に減少する傾向が見られた。対して中干し系では、LCW後でも維持あるいは増加する傾向にあった。この様子は0~2 cmよりも2~6 cmでより顕著に見られた。中干しは、水を水田から引き抜くことにより、水田土壌を好氣的にする。これにより、水田土壌中の酸素濃度が高くなることにより、メタンを酸化可能なメタン酸化細菌が増殖したことが考えられる。水田土壌深さ2-6 cmにおいてその傾向が顕著に示された一方で、0-2 cmにおいてその傾向はあまり得られていない。これは畜産排水に含まれる有機物を酸化分解に利用する従属栄養性細菌の増殖が関与しているものと考えられる。

- ・NC10門の16S rRNA遺伝子は*mcrA*、*pmoA*といった機能遺伝子の量と比較して同程度、あるいはそれ以上のcopy数で存在した。NC10門に属する脱窒性メタン酸化細菌の量は他のメタンに関与する細菌群と同じオーダーで存在することが初めて明らかになった。これらの細菌群は増殖速度が2週間程度と非常に遅いことが報告されているが、予想を上回る量の脱窒性メタン酸化細菌が棲息することが明らかになった。したがって、水田の環境状況を制御することにより、脱窒とメタン酸化を同時に達成するこのNC10門細菌のポテンシャルを活かすことが可能になると推察される。

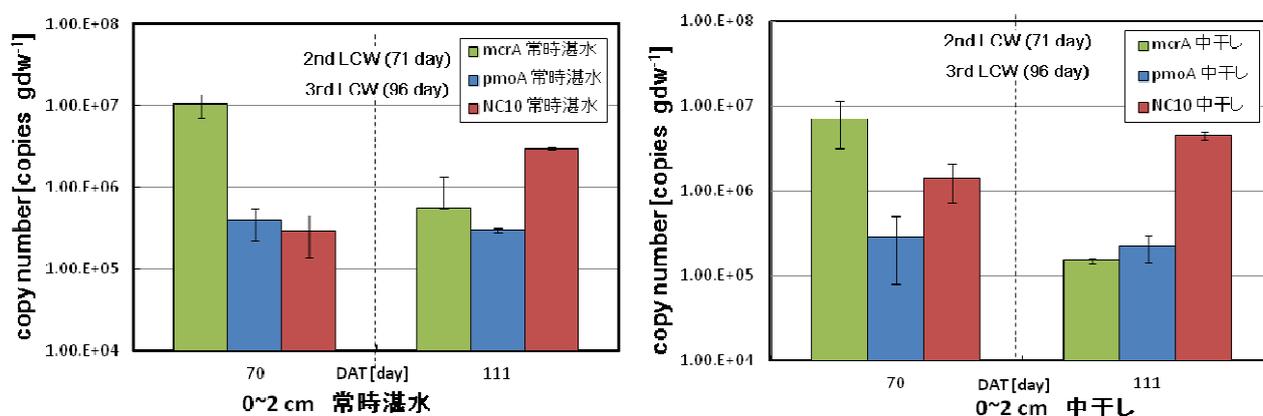


図42 0-2 cm土壌中の2nd, 3rd LCW前後のコピー数変化

(中干し系は48-70日目に水を引き抜いている)

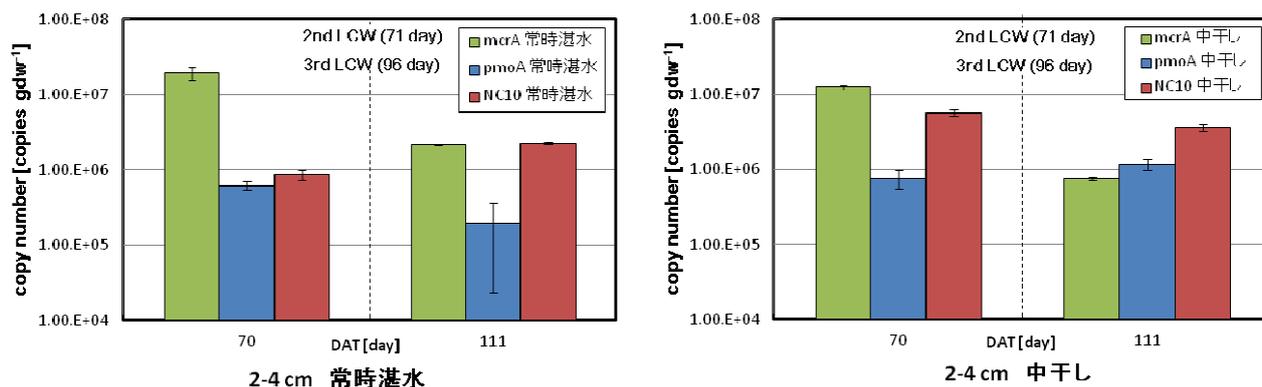


図43 2-4 cm 土壌中の2nd, 3rd LCW前後のコピー数変化  
(中干し系は48-70日目に水を引き抜いている)

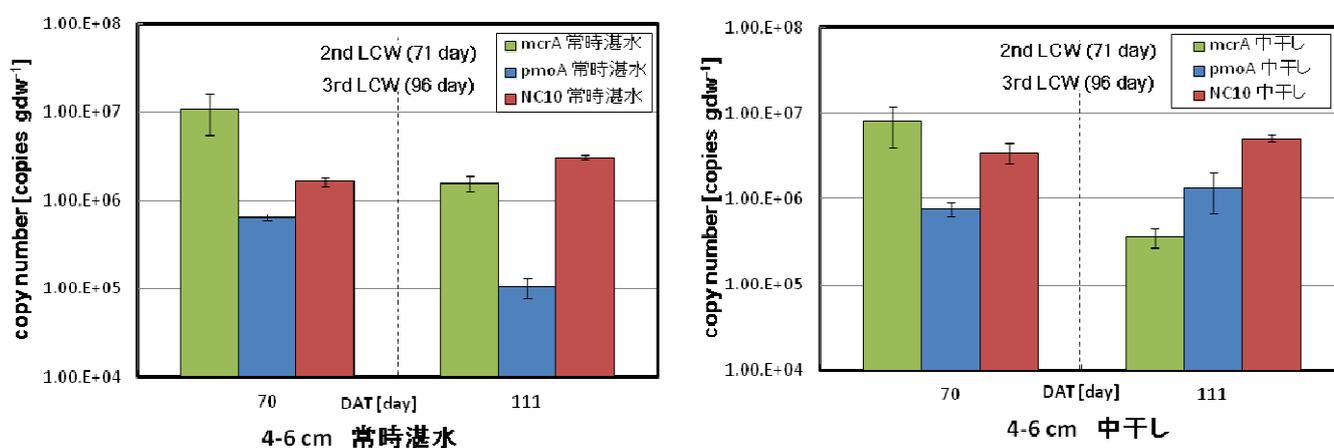


図44 4-6 cm 土壌中の2nd, 3rd LCW前後のコピー数変化  
(中干し系は48-70日目に水を引き抜いている)

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

イネ植栽ポットの土壌中のAnammox反応を担う *Planctomycetes* 門に属する細菌は窒素負荷が高い方がより多く棲息可能であること、さらに土壌上部2 cm付近において密度が高いことを示唆した。土壌中のAnammox反応が起こり得る箇所を絞り込むことが出来たことは学術的に意義がある成果である。また、水の浸透速度もこれらの細菌群の増減に大きな影響を及ぼしており、水の浸透速度の増大が土壌中への酸素の供給を促進しており、土壌中の酸化・還元状態が脱窒を行う微生物群の密度の増大に大きく貢献することを示していることも学術的に価値のある成果と言える。

DAT 111 [day]の中干し系では、メタン消費に寄与するメタン酸化細菌 (*pmoA*) や脱窒性メタン酸化細菌がメタン生成古細菌よりも有意に多く存在し、常時湛水系に比べメタン削減に有利な微生物叢を形成していたと推察される。すなわち、中干しという操作が、メタンを消費する微生物群の数を増やし、水田の温室効果ガス (メタン) の削減に寄与できる可能性を示唆した。

## (2) 環境政策への貢献

### <行政が既に活用した成果>

該当項目はなし。

### <行政が活用することが見込まれる成果>

サブテーマ3のみの結果では環境政策に対する提言を行うことは困難であるが、今回の特定微生物群の定量手法を平成23年度から実施する圃場における水田土壌サンプルに適用することにより、 $N_2O$ および $CH_4$ 放出量、畜産排水除去特性とリンクさせる。さらに、運転管理条件と窒素除去に関する微生物群の定量結果より、脱窒に関連する微生物群の制御が低温温室効果ガス放出型畜産排水除去システムの構築のカギとなることを示し、一つの有用な畜産排水処理法として普及出来る段階まで研究を進めることができれば、行政に対しての一つのアピールになると考えている。

## 6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

## 7. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

#### <論文(査読あり)>

A. TERADA, S. ZHOU and M. HOSOMI: Clean Technol. Environ. Policy 13, 6, 759-781

“Presence and detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria and appraisal of anammox process for high-strength nitrogenous wastewater treatment: A review”

S. ZHOU, Y. SAKIYAMA, S. RIYA, X.F. SONG, A. TERADA and M. HOSOMI: Sci. Total Environ. 430, 93-100.

“Assessing nitrification and denitrification in a paddy soil with different water dynamics and applied liquid cattle waste using the N-15 isotopic technique”

#### <査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

#### <その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない

### (2) 口頭発表(学会等)

特に記載すべき事項はない

### (3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

Amann (1995): In Akkermans ADC, van Elsas JD, de Bruijn FJ (editors) *Molecular Microbial Ecology Manual*. Dordrecht (1995):pp 1-15.

Henry et al. (2004): *J. Microbiol. Meth.* 59: 327-335.

Neef et al. (1998): *Microbiology-UK* 144: 3257-3266.

#### (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

東京農工大学 大学院工学研究院 応用化学部門 細見・寺田研究室  
寺田昭彦  
周勝

平成22～24年度累計予算額：531千円

(うち、平成24年度予算額：219千円)

予算額は、間接経費を含む。

**[要旨]** 飼料イネ水田において、前半低負荷、後半低負荷、中干しと施肥前落水という異なる施肥管理、水管理を組み合わせた圃場実験を行った結果、中干しよりも施肥前落水の方でメタン抑制効果が高くなる傾向が得られた。またメタン削減が最大となったのは後半低負荷／施肥前落水系で削減率は77%であった。また圃場実験および培養実験から、メタン酸化古細菌 (*mcrA*) は施肥前落水によっては阻害されることが示された。また、メタン酸化古細菌*mcrA*コピー数はメタンフラックスとの相関性があることから、施肥前落水でメタン生成を担う微生物群の活性を抑制することで、メタンフラックスの削減が期待できる。以上の結果をまとめると、中干しや施肥前落水といった水管理は土壤に酸素を供給することで、メタン生成、消費に関わる微生物群の存在数、比を変化させ、メタン、排出量が削減する効果があることが示された。また、水管理は特にメタン生成古細菌の働きを抑制する効果が高いと考えられる。

**[キーワード]** 飼料イネ水田、水管理、施肥、閉鎖性水域、底質、DO、貧酸素水塊、貧栄養化

### 1. はじめに

これまでのサブテーマにより、特に畜産排水の処理とともに温室効果ガスの削減も重要であることが検討されてきた。特に、水田土壤の酸化・還元の度合により、畜産排水の液肥に含まれる窒素の除去効率や、亜酸化窒素やメタンなどの温室効果ガスの削減に影響を及ぼすことが明らかになってきている。そこで、これまでの知見を集約することで、畜産排水処理の場である水田の酸化・還元の状況をダイナミックに変化させることにより、窒素除去性能を維持するとともに、温室効果ガスの削減に貢献できるのではないかと考え、茨城県つくば市にある実験圃場を用いることにより、検討を行った。

### 2. 研究開発目的

平成23年度の調査により、中干しによるメタン削減効果の評価および土壤微生物群への影響の結果から、中干しという水田の表面水管理にメタン抑制効果がある可能性が示唆された。水田からのメタン発生ピークは施肥後に観察されており、施肥前に落水を行うことがより効果的なメタン抑制につながると考え、実験圃場において施肥前に約2週間程度の落水期間を設ける「施肥前落

水」管理を実施、その際のメタン削減効果およびメタン生成・消費に関わる土壌微生物群への影響調査を目的とした。

### 3. 研究開発方法

#### 1) 新しい水田管理法を考慮した実験系

2012年茨城県の独立行政法人農業環境技術研究所の圃場にてフィールド実験を実施した。これまでの畜産排水処理のための水田管理において、以下の項目が確認されている。

- 畜産排水の液肥を施肥した水田により窒素除去を 500 kg-N/ha 程度まで行うことが可能
- ただし、500 kg-N/ha 以上の負荷で窒素化合物（アンモニア+硝酸）の水圏環境への流出が顕在化
- 温室効果ガスとして水田から排出される温室効果への寄与は窒素負荷 600 kg-N/ha 以下の場合、9割以上がメタンガス（亜酸化窒素は10%以下）
- 中干しによりメタンガスの放出を抑制可能である。これは土壌が好気性になることにより、嫌氣的に形成されるメタンの放出が抑制できるから。
- 施肥によりメタンガスの放出
- 飼料イネの成長が進まなくなる中干し以降は、窒素の取り込み量が少なくなる。

以上の観点から、追肥を行う前に、土壌を好氣的にする「施肥前落水」およびイネ栽培の後半部分において畜産排水の施肥量を減少させる「後半低負荷」の2つの検討を行い、温室効果ガスの削減を目指した（図45）。

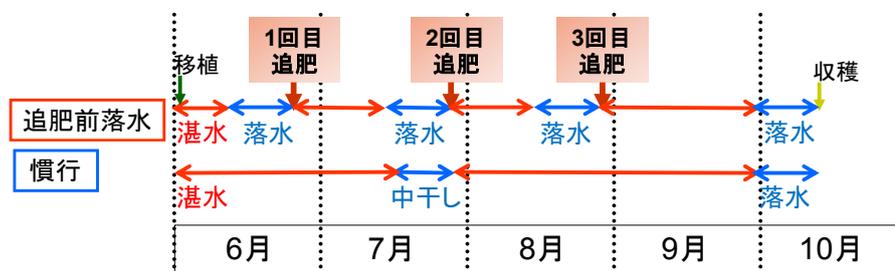


図45 新しい水田管理方法「施肥前落水」の概要

#### 2) 実験系の設計

試験圃場は、40 m<sup>2</sup>を1つの区画とした。温室効果ガス排出における施肥管理および水管理の影響を見るため、「前半低負荷・中干し（慣行の落水）」「前半低負荷・施肥前落水」「後半低負荷・中干し（慣行の落水）」「後半低負荷・施肥前落水」の4つの実験系を設定した。施肥管理および水管理を含む水田管理スケジュールを表39に示す。全ての試験圃場で追肥は計3回実施し、3回の追肥による窒素負荷および溶存有機炭素（DOC）濃度を表40、表41に示す。施肥方法の前半低負荷施肥は、1回目追肥の負荷量を最も低く設定し、2回目追肥、3回目追肥で段階的に負荷を高くして行った。一方で、後半低負荷施肥はその逆の負荷量設定で実施した。水管理である施肥前落水は、1回目追肥前の6月14日から6月28日までの14日間を1回目施肥前落水、2回目追肥前の7月12日から7月25日までの13日間を2回目施肥前落水、3回目追肥前の8月7日から8月22日までの15日間を3

回目施肥前落水として実施された。中干し期間は1回目追肥と2回目追肥の間の7月12日から7月22日の10日間に設定した。実験期間は飼料イネの栽培期間である5月23日（移植後日数（Days After Transplanting（DAT））0日目）から10月12日までの142日間であった。

表 39 飼料イネ水田管理スケジュール

環境	DATE	DAT [day]
移植	5月23日	0
1st施肥前落水開始（A5,A7）	6月14日	22
1回目追肥	6月29日	37
中干し(A6,A8)、 2nd施肥前落水（A5,A7）開始	7月12日	50
中干し終了（A6,A8）	7月22日	60
2回目追肥	7月26日	64
3rd施肥前落水開始（A5, A7）	8月7日	76
3回目追肥	8月23日	92
最終落水開始	9月6日	106
稲刈り	10月12日	142

表 40 3回の追肥による窒素負荷量（NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N ベース）

	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N loading [kg-N ha <sup>-1</sup> ]			
	1回目追肥	2回目追肥	3回目追肥	合計
前半低負荷系	20.5	101	123	244
後半低負荷系	82.1	101	30.8	214

表 41 3回の追肥により施肥された溶存有機炭素（DOC）負荷

	DOC-C loading [kg-C ha <sup>-1</sup> ]			
	1回目追肥	2回目追肥	3回目追肥	合計
前半低負荷系	54.2	170	176	400
後半低負荷系	217	170	44.1	430

### 3) 測定方法

測定項目および測定方法に関してはサブテーマ3の4)の項目と同じ方法で行った。亜酸化窒素のフラックスおよび溶存濃度においてはメタンと同じ方法・解析を用いて評価した。

## 4. 結果及び考察

### 1) 土壌Eh

栽培期間中（DAT 0~142 [day]）の深さ1 cm、5 cm、8 cmの土壌Ehの変動を図46に示す。施肥前落水を行った系（A、C）に関しては、落水敢行後に土壌環境が好氣的になるため、土壌Ehの上昇が確認された。

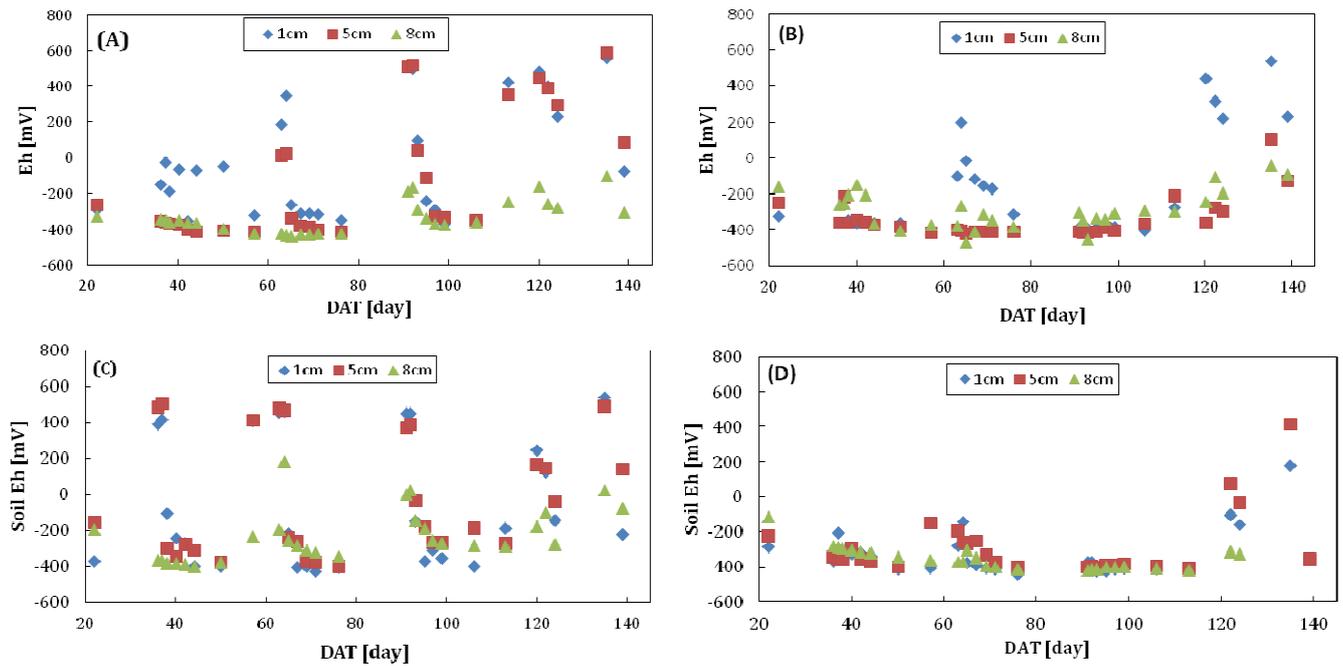


図46 栽培期間の深さごとの土壌Eh

- (A) 前半低負荷・施肥前落水 (B) 前半低負荷・中干し  
 (C) 後半低負荷・施肥前落水 (D) 後半低負荷・中干し

## 2) 飼料イネ水田における窒素化合物の除去性能

栽培期間中 (DAT 0~142 [day]) の間隙水 (深さ20 cm) における窒素化合物の濃度を図47に示す。どの系においても水田土壌深層部の間隙水の窒素濃度は40日目後における上昇を除けば未検出レベルであり、現状の畜産排水の施肥の負荷 (300 kg-N/ha) であれば、地下水への窒素化合物の浸透による地下水汚染は問題ないことが示唆された。

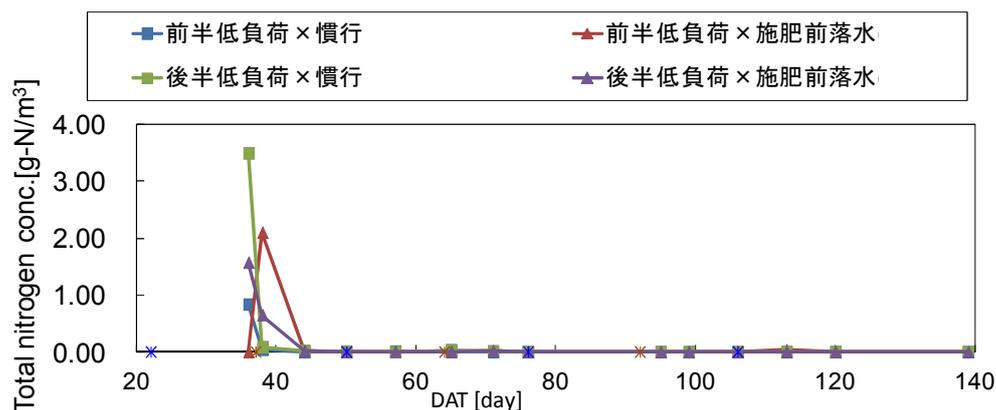


図47 各実験圃場系における窒素化合物の水質変化

## 3) メタン削減効果

前半高負荷施肥の初回施肥後のメタンフラックスを図48、後半低負荷施肥の施肥後のメタンフラックスを図49に示す。また LCW1週間後の土壌溶存メタン濃度の前半低負荷系の結果を図50、後半低負荷系の結果を図51に示す。

これらの結果をまとめると、以下のことが示された。

- メタンフラックスの結果（図 48、図 49）から、後半低負荷系では施肥前落水によるメタン削減効果が認められた。しかし、前半低負荷系では施肥前落水の方がメタンフラックスが高い。しかし総排出量では、施肥負荷量によらずメタン削減効果があった。この点に関しては原因の解明が今後必要である。
- 土壌溶存メタン濃度では、施肥方法に関わらず施肥前落水によるメタン発生抑制効果がみられた。
- 総排出量では、「後半低負荷系・施肥前落水」が最もメタン排出量削減に有効であることが示された。その排出量は水管理の違いにより（施肥前落水と中干し系）、総量として 84%のメタン削減効果が表れた（データ示さず）。これに亜酸化窒素を加え、排出係数（メタンは  $\text{CO}_2$  の 25 倍、亜酸化窒素は  $\text{CO}_2$  の 296 倍）を考慮した二酸化炭素等量の排出量を図 52 に示す。この結果、後半低負荷の施肥管理と施肥前落水の水管理を組み合わせた水田管理方法では、前半低負荷+慣行系（中干しのみ）の系と比較して 84%の温室効果ガス削減効果が確認された。この量は、100 kg-N/ha の窒素負荷で化学肥料により施肥を行っている一般の水田と同じ温室効果ガス排出量であり、本技術の適用により 3 倍の窒素負荷で温室効果ガス排出量を 1/3 に抑えられることを意味している。

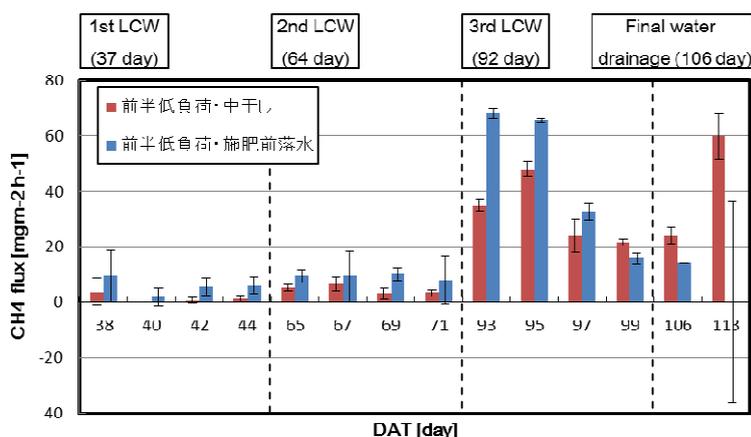


図48 施肥後のメタンフラックス（前半低負荷系）

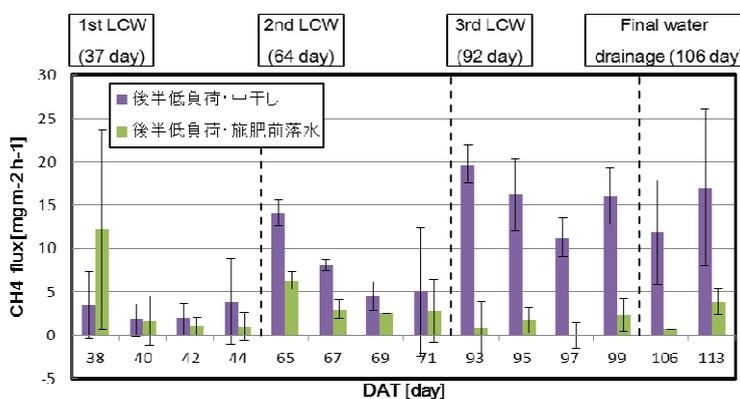


図49 施肥後のメタンフラックス（後半低負荷系）

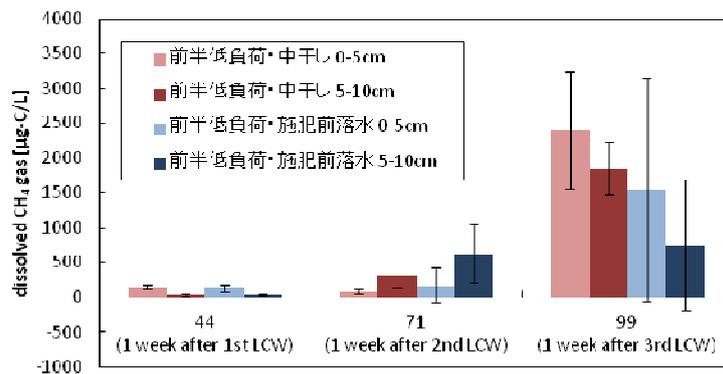


図50 施肥前落水系と中干し系の土壤溶存メタン濃度の比較（前半低負荷系）

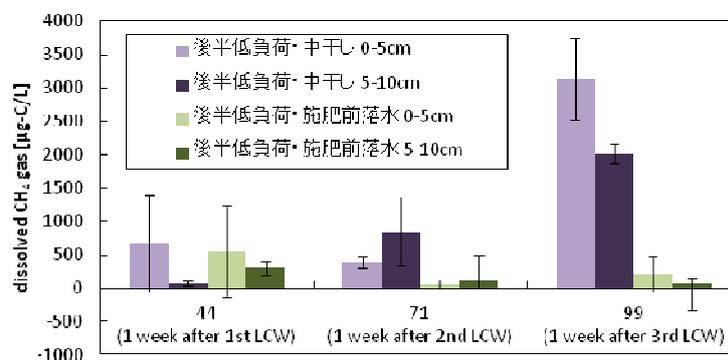


図51 施肥前落水系と中干し系の土壤溶存メタン濃度の比較（後半低負荷系）

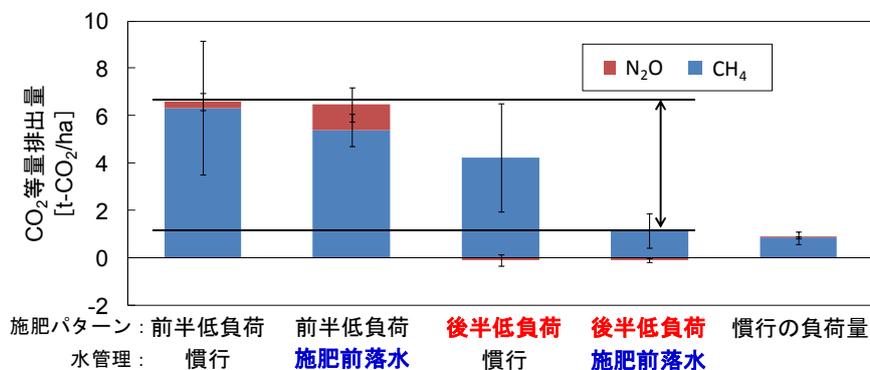


図52 5/23(移植)～10/12(稲刈り)までの二酸化炭素換算の温室効果ガス放出量比較

### 3) 水田土壤微生物の定量

温室効果ガスの大幅削減が見られた後半低負荷系における水田土壤中の微生物定量結果を、図53から図56に示した。各微生物の定量は定量PCRによって行った。

- 水田土壤表面 5 cm において施肥前落水系では、*pmoA* 遺伝子と NC10 門の 16S rRNA 遺伝子のコピー数が最大 10 倍程度になった（図 53）。全体を通して、中干しのみを行った慣行系と比較して 2-3 倍程度の違いがあり、施肥前落水系はこれら 2 つの遺伝子に関して有意に高い値を示した。*mcrA* 遺伝子のコピー数に大きな違い無いことから、メタン酸化に参与する遺伝子、すなわちメタン酸化細菌数が施肥前落水系において多いことが明らかになった。また、この傾向は脱窒性メタン酸化細菌（NC10 コピー数（図 53、図 54）にも有意な差として現れた。

すなわち、水田土壌において、落水を増やすことによりメタンを酸素を使って、もしくは窒素化合物（硝酸・亜硝酸）を利用して酸化を行う細菌群がより多く棲息していること、さらにメタン放出量の総量に相関性があることが示唆された。

- 土壌 5-10 cm のコピー数に施肥前落水系および中干し系に大きな違いは見られなかった。すなわち、水管理がメタンをめぐる微生物の量に影響を及ぼす範囲は 0-5 cm に限られていることが確認された。

次に、前半低負荷系も含めた各土壌深さにおける *mcrA* 遺伝子の平均値としてとり、植栽開始時の *mcrA* 遺伝子の相対値を 1 とした際の相対 *mcrA* 遺伝子の経日変化を図 57 に示す。*mcrA* 遺伝子に関しては、施肥前落水を導入することにより、土壌が好氣的になる可能性を鑑みると、好氣的な環境が *mcrA* 遺伝子を有するメタン生成古細菌の増殖を抑制した可能性が高い。したがって、施肥前落水という工程を導入することによりメタン生成古細菌の増殖を抑制し、最終的に温室効果ガスであるメタンを抑制することが可能になったと言える。

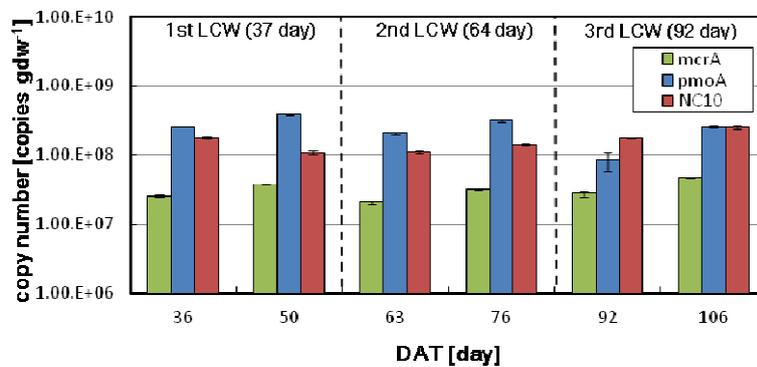


図53 0～5 cm土壌中の追肥前後copy数変化（後半低負荷・施肥前落水）

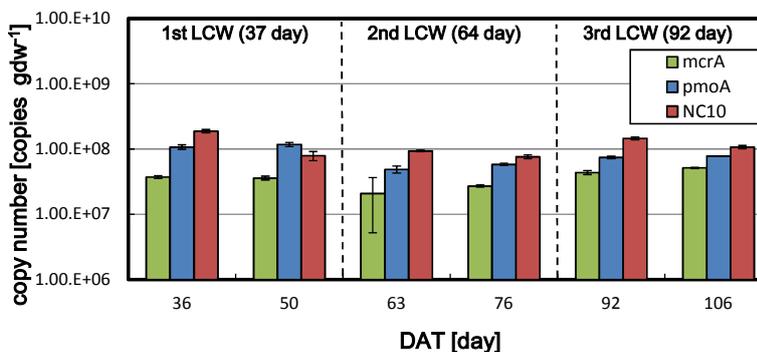


図54 0～5 cm土壌中の追肥前後copy数変化（後半低負荷・中干し）

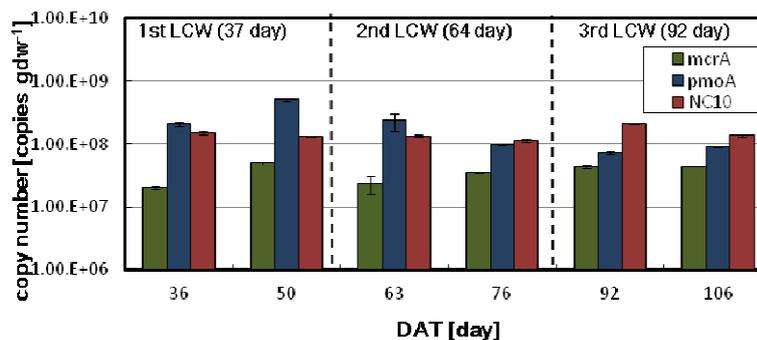


図55 5～10 cm土壌中の追肥前後copy数変化（後半低負荷・施肥前落水）

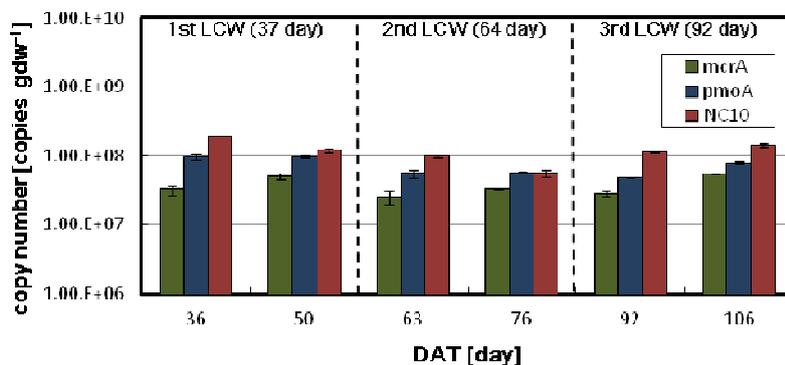


図56 5～10 cm土壌中の追肥前後copy数変化（後半低負荷・中干し）

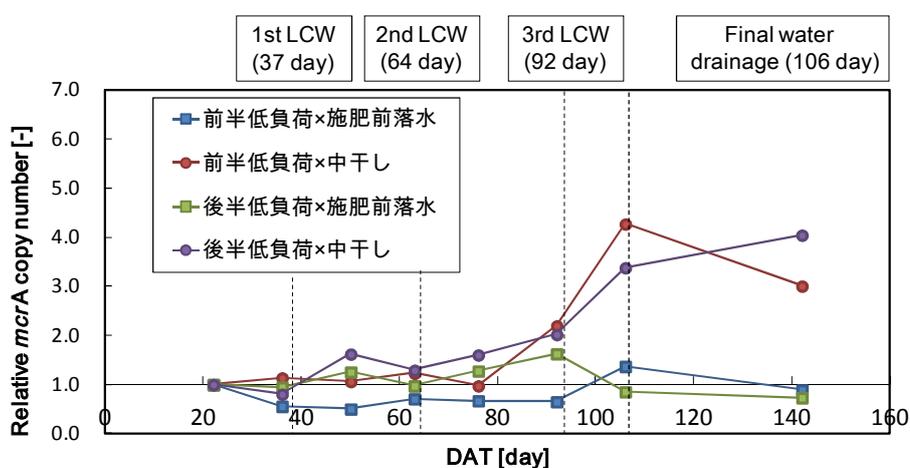


図57 栽培期間中のメタン生成古細菌の相対数変化

#### 4) まとめ

これまでの水田管理方法の検討から、新たに「施肥前落水」および「後半低負荷施肥」を実施し、イネ栽培期間において、水管理の変更により温室効果ガス排出量を二酸化炭素当量でを最大84%の削減に成功した。また、窒素負荷300 kg-N/haの畜産排水の液肥の施肥により窒素汚染の懸念が無いことが示された。また、このような水・施肥管理を行った水田土壌には、メタンを酸化する細菌群が有意に多く棲息していること、およびメタンを生成する古細菌の増殖が抑制されていることが確認された。

### 5. 本研究により得られた成果

#### (1) 科学的意義

水管理として「施肥前落水」を行い、水田土壌を好氣的にし、施肥条件として「後半低負荷」の施肥を行うことにより、温室効果ガスを最大で84%削減できることを明らかにした。またこのとき、メタンをめぐる微生物群の量に有意差が生じ、特に水管理として施肥前落水を行うことにより、メタンを生成するメタン生成古細菌の増殖を抑制し、メタン生成量の削減に寄与していることを明らかにした。このように、水管理および施肥条件を組み合わせることにより、有

用微生物を制御して飼料イネ水田による畜産排水処理を実施しつつも、温室効果ガス排出の削減に寄与できる可能性を技術的な観点から示したのは初めてのケースである。

## (2) 環境政策への貢献

### <行政が既に活用した成果>

該当なし。

### <行政が活用することが見込まれる成果>

上述した成果として、畜産排水の液肥を我が国の休耕田を含む耕作放棄地40万haに、300 kg-N/haの負荷で施肥し、排水処理を行った際の環境負荷を計算すると、飼料イネ水田においては畜産農家から排出される畜産排水の約50%を水圏環境の水環境汚染のリスクなく処理することが可能になる。また、飼料イネ水田で得られた飼料の総量は濃厚飼料および粗飼料がそれぞれ400万トン生産されると試算され、100%輸入に依存している濃厚飼料の量を1540万TDNトンまで減少することになる。一方、粗飼料はこれにより全く輸入に依存する必要がなくなり、我が国で自給可能になる試算である。その結果、我が国の現在の飼料自給率25%は40%まで上昇することが期待される。また、海外から輸入される際に運搬される船舶の燃料の削減に伴う温室効果ガスの排出も削減可能である。したがって、本技術の適用により、休耕田の有効利用による飼料生産量の増大、畜産排水の浄化を温室効果ガス排出を低減しながら行うことが究極的には可能になると考える。さらには、この技術をアジアモンスーン地域全体に拡張することにより、土地有効利用による食料生産量増大につなげていくことが可能になる。

もちろん、これらの試算は非常にラフな想定に基づくものであり、様々なシナリオを考慮した試算が必要になる。したがって、今後詳細な経済的インパクトを組み合わせることにより、飼料自給率増大につながるような飼料イネ水田をコアとする飼料生産・畜産排水処理システムの実現可能性を評価していきたいと考えている。一方で、研究の面においても複数年の飼料イネ栽培による効果の実証やリンの物質収支なども今後検討していく必要があると言える。

## 6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

## 7. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

#### <論文(査読あり)>

特に記載すべき事項はない

#### <査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

#### <その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない

## (2) 口頭発表 (学会等)

- 1) M. Kamimura, S. Riya, S. Zhou, M. Hosomi, A. Terada : The 28th Annual Meeting of the Japanese「Society of Microbial Ecology (September 2012)  
Methane flux and abundance of microorganisms responsible for methane production and oxidation in rice paddies applying liquid manure from livestock wastewater with different irrigation strategies」
- 2) 上村美羽、利谷翔平、周勝、寺田昭彦、細見正明 : 第64回日本生物工学会大会 (2012)  
「畜産排水を施肥した飼料イネ水田のメタン放出挙動とメタンをめぐる微生物群のダイナミクス」
- 3) 利谷翔平、周勝、小原裕三、寺田昭彦、細見正明 : 第47回日本水環境学会年会 (2013)  
「空間分布解析による落水後の水田における突発的な亜酸化窒素排出挙動の解明」
- 4) 室井友里恵、上村美羽、利谷翔平、周勝、寺田昭彦、細見正明 : 化学工学会第78年会 (2013)  
「畜産排水を施肥した飼料イネ水田におけるCH<sub>4</sub>およびN<sub>2</sub>Oの同時削減の試み」

## (3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

## (4) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)

特に記載すべき事項はない

## (5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

## (6) その他

特に記載すべき事項はない

## 8. 引用文献

特に記載すべき事項はない

## Identification and Quantification of Bacterial Groups and their Contribution to Nitrogen Removal at Rice Paddy Field

Principal Investigator: Akihiko TERADA

Institution: Division of Applied Chemistry, Institute of Engineering, Tokyo  
University of Agriculture and Technology  
2-24-16 Naka, Koganei-shi, Tokyo 184-8588  
Tel.& Fax: +81-42-388-7069  
E-mail: akte@cc.tuat.ac.jp

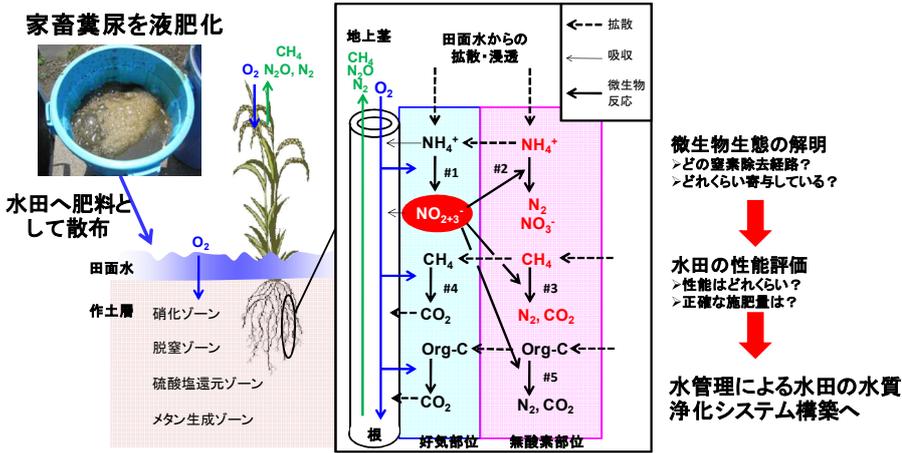
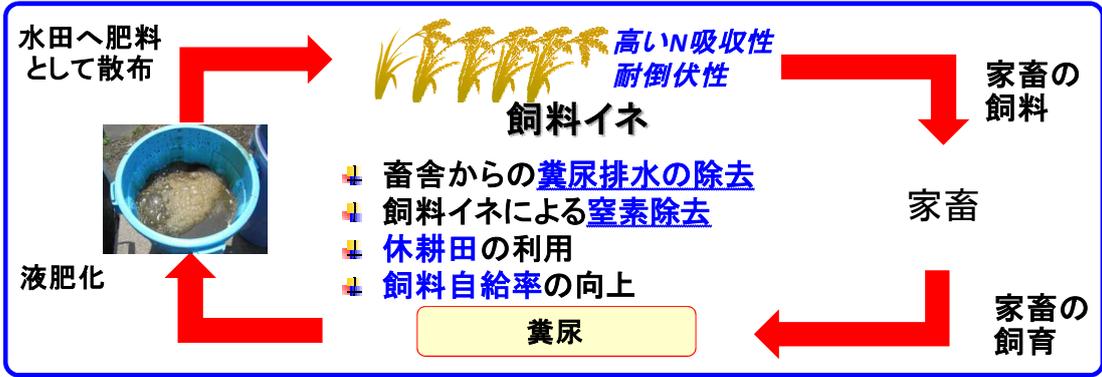
[Abstract]

Key Words: Livestock Wastewater, Forage Rice Paddy, Biological Nitrogen Removal, Greenhouse Gas Effect, Anaerobic Ammonia Oxidation

A rice paddy field holds multiple functions: not only a site as rice plant production but also as remediation of contaminants, e.g. livestock wastewater. In order to harness a forage rice paddy field for removal of livestock wastewater, the main challenges are twofold. The one is to understand nitrogen mass balance since excessive application of livestock wastewater potentially results in nitrogen-based pollution of the adjacent water bodies. The other is to conduct water management in a rice paddy field by utilizing inhabited bacteria for nitrogen removal, which preferably do not emit greenhouse gases. Hence, the objectives of this study are twofold: first, identification and quantification of anaerobic ammonia oxidizing (anammox) bacteria and denitrifying methane-oxidizing bacteria (DMOB) responsible for nitrogen removal without producing nitrous oxide and methane; second, elucidation of an optimal management condition of a forage rice paddy field by harnessing these bacterial activities. The effects of nitrogen loading based on the amount of livestock wastewater, water infiltration rate and presence/absence of rice paddy plants on nitrogen removal performance, the amount of greenhouse gas emission and microbial community were investigated through pot experiments.  $^{15}\text{N}$  tracer experiment confirmed that dissipated nitrogen was derived from denitrification and that high denitrification activity correlated with high water infiltration rate. Real time quantitative PCR for denitrifying bacteria and *Planctomycetes* bacteria (the phylum to which anammox bacteria are affiliated) demonstrated positive correlation between the densities of these bacteria in soil and the denitrifying activity by the  $^{15}\text{N}$  tracer experiment. Test field experiment with a surface area of 40 m<sup>2</sup> found DMOB affiliated to the NC10 phylum capable of methane oxidation coupling with nitrite reduction to N<sub>2</sub> gas. Aerobic condition proliferated methane oxidizing bacteria (MOB) and DMOB, resulting in reduction of methane production. Given this trend, a new water management strategy, termed pre-topdressing water drainage, where water is discharged from a forage rice paddy before addition of liquid manure of livestock wastewater, was proposed. Providing

intentional aerobic condition accelerated heterotrophic bacterial activity, resulting in less chance for methanogens to produce methane. The introduction of the pre-topdressing water drainage dramatically reduced methane emission by 77% compared with the control run applying a conventional water drainage management. Such reduction has correlation with suppression of methanogen. No contamination with nitrogen was observed with this drainage procedure at 300 kg-N/ha. Hence, the proposed control methanogen growth, leading to reduction of greenhouse gas emission with high nitrogen removal from livestock wastewater.

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



#	微生物反応	電子供与体	電子受容体	反応に微生物群
1	硝化	アンモニア	酸素	アンモニア酸化細菌・古細菌 亜硝酸酸化細菌
2	嫌気性アンモニア酸化(アナモックス)	アンモニア	亜硝酸	嫌気性アンモニア(アナモックス)細菌
3	嫌気性メタン脱窒	メタン	硝酸・亜硝酸	嫌気性メタン酸化細菌
4	メタン酸化	メタン	酸素	メタン酸化細菌
5	脱窒	有機炭素	硝酸・亜硝酸	従属性脱窒細菌

窒素除去に寄与  
温室効果ガス(メタン・亜酸化窒素)を放出しない