

(52) コンポスト製造過程において発生する 亜酸化窒素の削減に関与する 脱窒細菌遺伝子の多様性と消長

進藤 絵里香¹・大坪 和香子²・上田 裕一³・上田 英代³・
宮内 啓介²・遠藤 銀朗^{2*}

¹ 東北学院大学大学院工学研究科 (〒985-8537 宮城県多賀城市中央1丁目13-1)

² 東北学院大学工学部環境建設工学科 (同上)

³ 有限会社日本ライフセンター (〒905-0426 沖縄県今帰仁村字諸志725)

* E-mail: gendo@tjcc.tohoku-gakuin.ac.jp

亜酸化窒素は温室効果ガスとしてだけでなく、成層圏オゾン層の破壊物質としても重要視されている。その発生源の一つに、有機性廃棄物のコンポスト製造プロセスがある。本研究では、 N_2O の発生抑制による環境保全型コンポスト製造技術を開発するために、 N_2O を還元し完全な脱窒産物として N_2 を放出する機能を持つ脱窒細菌に焦点を当ててその群集構造を解析した。豚糞尿を原料としたコンポストの解析を行った結果、野積み発酵法ではコンポスト化中期～後期にベータプロテオバクテリアに属する細菌の出現、および、高温前処理-野積み発酵法ではコンポスト化後期にアルファプロテオバクテリアに属する細菌の優勢的な出現に伴って N_2O の発生が減少したことから、それらに属する脱窒細菌が N_2O 除去に関与していると考えられた。

Key Words : *composting, nitrous oxide production, population dynamics of denitrifying bacteria, denitrification, nosZ genes*

1. はじめに

コンポスト(堆肥)化技術は、生ゴミや家畜糞尿等の窒素バイオマスを有機肥料として再生利用することを可能にし、化学肥料による土壌汚染拡大防止にも有効であることから、循環型および環境保全型の廃棄物処理技術として注目されている。しかし一方で、無機窒素化合物含量の高い廃棄物を原料としてコンポストを製造する過程では、温室効果ガスの一つである亜酸化窒素(N_2O)が発生することが報告されている¹⁾。

N_2O は、等量の二酸化炭素の310倍の地球温暖化効果があると考えられており²⁾現時点で地球全体の温室効果ガス排出量の約8%を占めているだけではなく、その割合は年々増加している³⁾。また、 N_2O は成層圏において一酸化窒素(NO)に酸化され、 NO によるオゾン分解反応サイクルを促進するため、フロン類と同等あるいはそれ以上のオゾン層破壊物質であることが懸

念されている⁴⁾。国際規制により排出量が減少傾向にあるフロン類とは対照的に、 N_2O の排出量は年々増加しており⁵⁾、 N_2O 放出の抑制は緊急かつ重要な国際的課題でもある。

農地土壌では主に脱窒過程で N_2O が発生していることが知られているが⁶⁾、コンポスト製造過程における N_2O の発生に対しても、前田らが最近行ったアイソトポマー比の解析により、脱窒反応が関与していることが示されている⁷⁾。畜産廃棄物など、アンモニウム態窒素を多く含む原料を使用したコンポスト製造過程では、酸素が豊富な堆積物表層付近で硝化が起り、硝酸態および亜硝酸態窒素が蓄積する。切り返し(天地返し)後にそれが無酸素状態になった段階で、コンポスト中に存在していた脱窒微生物が硝酸や亜硝酸を不完全に還元することにより、コンポスト堆積山から N_2O が発生すると考えられている⁸⁾。過去の報告によると、コンポスト製造過程において、 N_2O 発生の時期的や量的変

化は、コンポストの原料や発酵方法によっても大きく異なる^{7), 9), 10)}。筆者らは、コンポスト中には多数の脱窒細菌が存在しているにも拘わらず、 N_2O が発生する期間と全く発生しない期間が存在することに着目した。

図-1に示したように、脱窒反応において、 N_2O は亜硝酸の還元により一酸化窒素を経て生成する中間産物であるが、この N_2O が脱窒細菌の N_2O 還元酵素のはたらきにより N_2 まで還元されれば、 N_2O の排出量は減少する。したがって、コンポスト製造過程における N_2O 排出を抑制するための一つの方法として、コンポスト中に存在する脱窒細菌の N_2O 還元反応を促進することについて研究することが必要と考えられる。

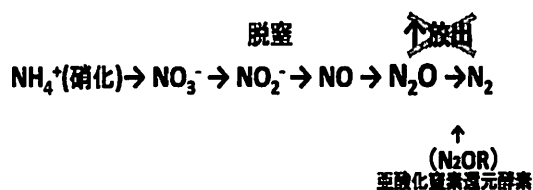


図-1 窒素化合物の変換過程

実際、コンポスト製造過程における脱窒反応に関与する微生物の生態や挙動についての知見は未だ少なく、上記の方法を開発するためには、コンポスト中に存在する N_2O 還元酵素を有する脱窒細菌についての知見が必要である。そこで、本研究では、 N_2O 還元酵素をコードする遺伝子 *nosZ* の定量およびクローン解析を行うことにより、 N_2O 還元酵素を保有する脱窒細菌のコンポスト中の存在量および多様性について明らかにすることを目的とし、実験を行った。

2. 実験方法

(1) コンポスト製造実験

本研究では、沖縄県の日本ライフセンターにおいて、養豚場からの糞尿処理施設から排出される廃棄物（豚糞搾汁残渣および脱水余剰活性汚泥）を原料として用い、2009年10月16日～12月21日の9週間にかけてコンポスト化実験を行った。原料100 kgに水分調節用のオガコを25 kgを混合したものを堆積し、1週間に1度の頻度で繰り返し（天地返し）を行う野積み発酵法（以下「A法」と記載する）と、上記の混合物を熱処理（100℃で約30分間加熱撹拌処理）した後堆積し、A法と同様に発酵を行う高温前処理-野積み発酵法（以下「B法」と記載する）の2つの方法でコンポストを作製した。分析試料として、切り返し直後の試料を採取した。採取した試料は、-20℃において冷

凍保存し分析に供した。

(2) コンポストの物理化学的性状の解析

A法およびB法により製造したコンポストの各週の試料について、含水率（%）、全揮発性固形物（TVS）（%）、pH、および無機窒素化合物量を測定した。含水率は湿重量3 gの試料を磁皿に入れ、105℃で24時間インキュベートし、水分蒸発前後の試料の重量差から算出した。この試料をさらに550℃で4時間加熱し、蒸発前後の試料の重量差からTVS（total volatile solid）を算出した。pHについては、1 gの試料に10 mL MQ水を加えて撹拌し、遠心分離後の上清のpHを測定した。

無機窒素化合物については、2 gの試料に20 mLの0.5 M 硫酸カリウム溶液を加え、1時間震盪した後、0.45および0.22 μmのポアサイズのフィルター濾過した抽出液を適宜希釈したものについて、アンモニウム態窒素（ NH_4^+-N ）、硝酸態窒素（ $NO_3^- -N$ ）、亜硝酸態窒素（ $NO_2^- -N$ ）を、Spectroquant® Tests（Merck社）を用いて測定した。

コンポスト製造過程における N_2O 発生量および温度変化は現地にてモニタリングを行った。コンポストの温度変化は、堆積山上部に土壤用デジタル温度計を挿入して測定した値を10分置きにコンピュータに信号を送信することにより自動記録した。 N_2O 発生量は、切り返し終了後に堆積山全体をビニール袋に移し密閉した後、0、2、5、8、24時間経過後に採取したガスサンプルをガスクロマトグラフィー（TCD検出器付き）により測定した（カラム：PorapakQ、カラム温度：50℃、TCD温度：120℃、Injector温度：120℃、電流：120 mA）。また、 N_2O の発生量は堆積山の体積、堆積山を密閉するのに使用したビニール袋の容積、およびコンポストの密度から、コンポスト乾重量1 kgあたりに発生する量（μg）として算出した。

(3) 定量的リアルタイムPCRによる N_2O 還元酵素遺伝子の定量

A法およびB法の各週の試料について、FastDNA SPIN Kit for Soil（Qbiogene）を用いてDNAを抽出した。各コンポストDNA溶液を滅菌水により等量（10 ng/μl）に希釈し、うち2 μl（20 ng）を定量的リアルタイムPCRの鋳型として用いた。スタンダードは、*Pseudomonas stutzeri* TR2株の*nosZ*断片をPCR増幅し、段階希釈したものを使用した。脱窒細菌の*nosZ*を特異的に検出するためのプライマーとしてHenryらによる*nosZ*1Fおよび*nosZ*1RM¹¹⁾を使用し、試薬はSYBR® Premix Ex Taq™（タカラバイオ）を使用した。

定量的リアルタイムPCR反応は、LightCycler (Roche 社) を用い、次の①から④までの反応プログラムを作成して行った。

- | | | | |
|---------|-------|------|-----------|
| ① 初期変成 | 94 °C | 2 分 | : 1 サイクル |
| ② 変性 | 94 °C | 2 分 | |
| アニーリング | 68 °C | 30 秒 | |
| 伸長 | 72 °C | 7 分 | |
| | | | : 40 サイクル |
| ③ 最終伸長 | 72 °C | 7 分 | : 1 サイクル |
| ④ 反応終了後 | 4 °C | 維持 | |

各試料から得られた増幅曲線および検量線から、1 µg のコンポストDNAあたりの *nosZ* 遺伝子のコピー数を算出した。

(4) N_2O 還元酵素遺伝子のシーケンス解析および系統解析による脱窒細菌の同定

上記 (3) の実験により A 法および B 法のコンポスト化週数が 0、5、9 週の試料から増幅した *nosZ* 断片を含んだ溶液を、Sephacryl™ S-300 (GE ヘルスケア・ジャパン) を用いて精製し、大腸菌 DH5α 株にクローニングした (DynaExpress TA PCR Cloning Kit、パイオダイナミクス研究所)。クローンライブラリーから、コロニーPCRによりインサートDNA (*nosZ*) を含むことが確認されたクローンをランダムに各 20 クローンずつ選択し、シーケンス解析を行った。得られた *nosZ* 塩基配列は、Codon Code Aligner (CodonCode 社, <http://www.codoncode.com/index.htm>) を用いて、*nosZ* のコンセンサス配列を得た。NCBI の BLASTn 相同性検索を行い、最も近縁の脱窒細菌を明らかにするとともに、決定した全ての *nosZ* 配列を fasta 形式のファイルとして分子系統解析ソフト ARB

(<http://www.arb-home.de/>) に取り込み、既知の *nosZ* 遺伝子配列と共にアライメントを行った。DNA 配列をアミノ酸配列へ変換して得られたアライメントを基に、PHYLIP distance matrix (Fitch) により *nosZ* の系統樹を作成した。

3. 実験結果と考察

(1) コンポスト製造実験におけるコンポスト中の温度、pH、含水率および N_2O 発生量の変化

A 法により製造したコンポストは、当初堆積山の温度が 59.3 °C に達したが、それ以降はこれを上回ることがなく、30~40 °C 付近に維持されていた (図-2)。これ

は、数日から数週間の好熱的な発酵状態が維持される一般的なコンポスト化過程とは異なっており、有機物が十分に分解されなかったことも考えられる。一方、B 法により製造したコンポストは、コンポスト化開始直後から 3 週目にかけて 60~70 °C の高温状態が維持されていたため (図-2)、好熱的な発酵状態にあったと考えられる。

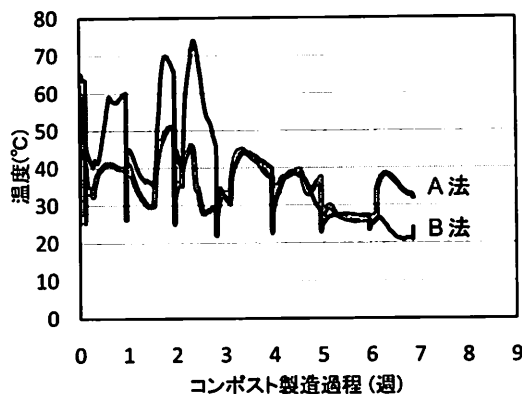


図-2 温度の変化

pH を比較すると、A 法ではコンポストの発酵が進行するのに伴って pH の低下が見られ、3 週目以降は中性に維持されていたのに対し、B 法ではむしろコンポスト化開始後に上昇し、5 週目に少し低下したものの、弱アルカリ性の状態が維持されていた (図-3)。一般的なコンポスト製造過程においては、pH はアンモニアの揮発や硝化反応によるアンモニウム態窒素の減少と共に減少することが知られているが、B 法でそれが見られなかった理由として、好熱微生物によるアンモニア化や高温による硝化細菌による酸化反応の阻害が起きていたと考えられる。

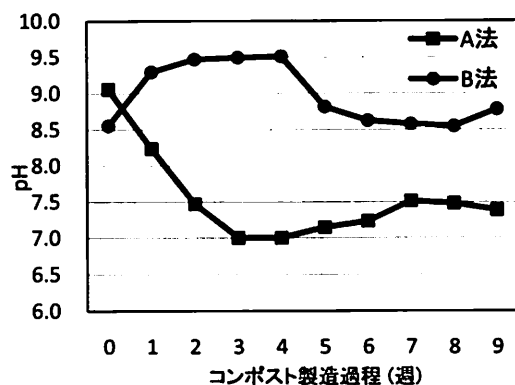


図-3 pH の変化

A 法・B 法ともに、コンポスト化の進行に伴う含水率の低下が見られたが (図-4)、全体を通して両製造方法の含水量が高くその差は 5~10 % であったことから、

B 法は高温状態の持続により水分が蒸発しやすい状態であったと考えられる。

以上の結果から、A 法および B 法により製造したコンポストは性質が大きく異なっていたことが分かる。これを踏まえ、 N_2O の発生パターンを比較すると、A 法では 3 週目をピークとして大量の N_2O が発生しているのに対し、B 法では、5 週目以降に僅かな N_2O 発生が見られた (図-5)。コンポスト化初期において中温状態が維持されていた A 法において pH の低下、 N_2O の発生、が観察された一方で、高温状態が維持された B 法では pH (アルカリ性) の変化および N_2O 発生が見られなかった、という結果は、コンポスト中で pH 変化や N_2O 発生に関与する微生物、つまり硝化細菌や脱窒細菌の熱への耐性が低い中温性 (mesophilic) の性質を有することを示唆している。

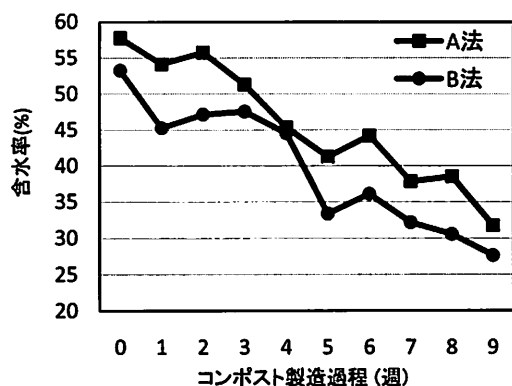


図4 含水率の変化

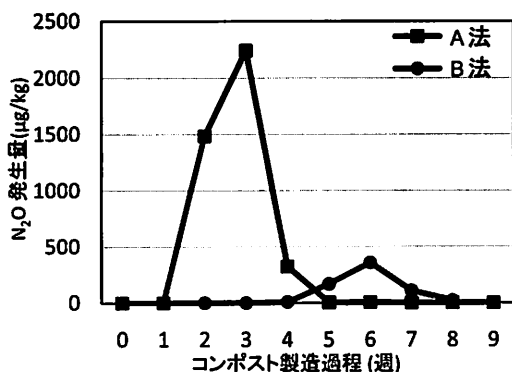


図5 N_2O 発生量の変化

(2) コンポスト中の無機窒素化合物量の変化

上述したように、pH の変化や N_2O 発生は、硝化細菌や脱窒細菌による無機窒素化合物変換の結果として生じるものであるため、A 法および B 法により製造したコンポストの抽出液中に含まれるアンモニウム態窒素 (NH_4-N)、硝酸態窒素 (NO_3-N)、亜硝酸態窒素

(NO_2-N) の濃度を測定し、その変化を図-6 に示した。

A 法では、コンポスト化開始直後からアンモニウム態窒素量が急速に減少しており、図-3 に見られた pH の低下と一致している。コンポスト中の NH_4-N の減少は、アンモニアの物理学的揮散の他にアンモニア酸化細菌による硝化作用によるものが考えられるが、コンポスト化開始後 1 週目以降に亜硝酸態窒素の減少と硝酸態窒素量の増加が見られることから、硝化細菌による反応が起こっていたことは明らかである。3 週目では、 NH_4-N の減少と同時に N_2O 発生と NO_3-N の減少も起こっており、硝化反応と脱窒反応が平行して行われていたことが考えられる。このように硝化と脱窒が同時に起こる際に N_2O が発生する、という現象は、牛糞を原料としたコンポストの研究においても報告されている。

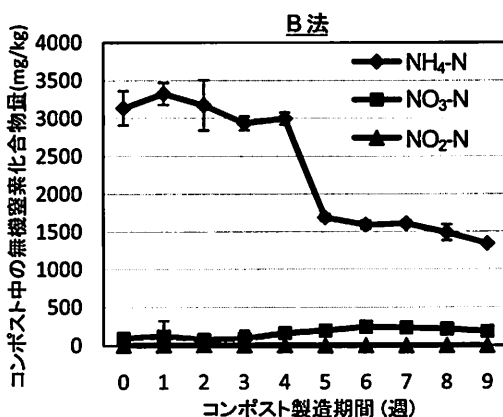
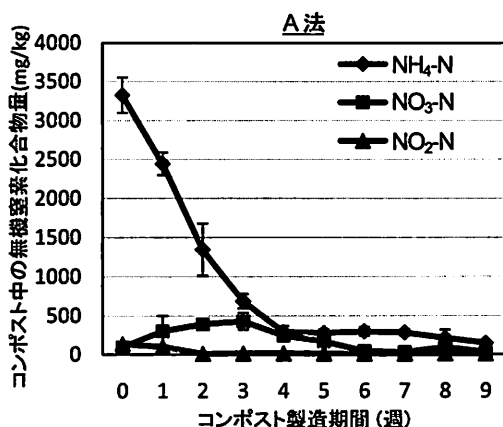


図6 無機窒素化合物量の変化

一方、B 法では、pH と同様、コンポスト化開始後 4 週目までは、無機窒素化合物量の変化がほとんど見られなかった。 NH_4-N は 5 週目において急激に減少し、これに伴う硝酸態窒素の僅かな増加が見られた。これは、B 法のコンポスト中の温度が 40 °C 以上に上がらな

くなった時期(図-2)と一致しており、熱への耐性の弱い硝化細菌群が活動を開始したことによると考えられる。そして、この5週目以降に N_2O 発生が始まっていることから、ここでも上述した硝化と脱窒が同時に起こる際の N_2O 発生が起こっていることが考えられる。

(3) *nosZ*を保有する脱窒細菌の存在量変化

N_2O 還元酵素は一部の脱窒細菌に存在し、一連の脱窒反応だけではなく、空気中の N_2O 還元除去に関与している可能性がある。我々は、コンポスト中にこのような脱窒細菌がどの程度存在し、コンポスト製造過程においてどのように群集としての構造を変化させているのかを明らかにするために、 N_2O 還元酵素遺伝子*nosZ*を標的とした定量的リアルタイムPCRを行った。1gのコンポストから抽出できるDNAの回収率はサンプルによる差が大きかったため、ここではコンポストDNA1μgあたりの*nosZ*のコピー数により、遺伝子の量的変化を示した(図-7)。

A法のコンポストにおける*nosZ*存在量の変化において特徴的なのは、3週目の急激な減少と、4週目の増加である。この時期には無機窒素化合物量に大きな変化は見られず(図-6)、 N_2O 発生量は3週目に増加、4週目に減少している(図-2)ことから、 N_2O 還元能を有する脱窒細菌は、 N_2O 発生に関与していなかったことが示唆される。むしろ、これらの細菌の増加と N_2O 発生量の減少が一致していることは、 N_2O 還元能を有する脱窒細菌群が N_2O の還元除去に有効にはたっていた可能性も考えられる。

B法では、0~1週目に比べて急激にコピー数が増加していたが、これは脱窒細菌を含む細菌全体に見られる傾向であることを、細菌16S rRNA遺伝子の定量的リアルタイムPCR解析結果(データ非表示)により確認した。おそらく、高温前処理により死滅した一部の細菌が、1週間の堆積期間中に回復したためだと考えられる。1週目以降は、B法における*nosZ*のコピー数に大きな変化は見られないが、 N_2O 発生が見られた5、6週目に*nosZ*のコピー数が最も少なくなっている点は、A法と共通している。

機能遺伝子のコピー数と実際の微生物活性が必ずしも一致しないことは過去の研究で指摘されているが^{10,15)}、コンポスト製造過程の一部の時期において、これらの脱窒細菌群が N_2O の還元除去に関与している可能性を示す結果が、A法B法共に得られたということは重要な知見である。

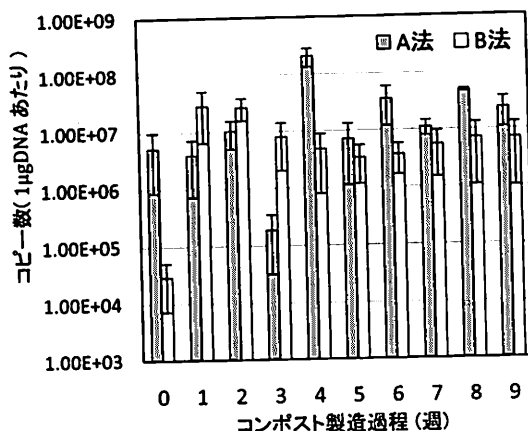


図-7 *nosZ* 遺伝子のコピー数の変化

(4) コンポスト中に存在する N_2O 還元酵素を有する脱窒細菌の同定

コンポスト化開始後0、5、9週目のコンポストから増幅した*nosZ*について、塩基配列を決定した。

BLASTnによる検索結果では、A法では60個の総クローン中56個の配列が、B法では60個中50個の配列が、既知の細菌由来の*nosZ*配列との相同性が95%を下回る、新規の*nosZ*遺伝子であることが知られた。本研究で取得した配列を、既知の*nosZ*の配列とアライメントし、系統樹として示したのが図-8である。本研究で得られた*nosZ*は、本研究で用いたプライマーによって増幅可能な全ての細菌グループ(アルファプロテオバクテリア、ベータプロテオバクテリア、ガンマプロテオバクテリア)に分布しており、極めて多様性が高いことが明らかになった。95%の相同性を採用すると、A法では少なくとも12の系統型、B法では9の系統型の*nosZ*が存在していると考えられる。この中でも、単系統群としてのクラスターを形成していると考えられるものについて、AからFまでのクラスターに分類すると、コンポスト化開始後A法およびB法における0週目、5週目、9週目の各時期において、*nosZ*クラスターから見た群集の構成が大きく異なっていたことが分かる(図-9)。

例えば、A法において0週目のクローン全体の50%(10/20)を占めた*Pseudomonas*属(ガンマプロテオバクテリア綱)に近縁のGroup Aは、5週目、9週目とコンポスト化の進行に伴って減少していたが、それに対し*Bordetella petrii*(ベータプロテオバクテリア綱)に近縁のGroup Bや*Acidovorax*属(ベータプロテオバクテリア綱)に近縁のGroup Fは増加していた(図-9)。

一方、B法ではGroup Aが0、5、9週目に同じ割合35% (7/20) で存在していたが、0週目に20%の割合で存在していた根粒菌に近縁なGroup D (ベータプロテオバクテリア綱) はコンポスト化の進行に伴って減少し、系統学的な位置 (図-8) から新規の系統グループだと考えられるGroup Cが増加していた (図-9)。

*nosZ*遺伝子の系統学的な分布および構成は、 N_2O 還元酵素を保有する脱窒細菌の群集構造を大きく反映しており、これがコンポストの製造方法やコンポスト発酵の進行に伴って大きく変化しているという結果は、

(3) でも示唆された N_2O の還元除去への関与を示唆する重要な知見である。

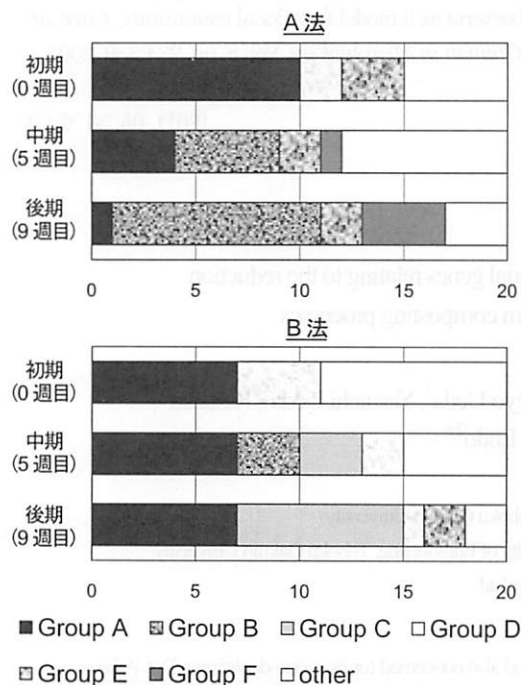


図-9 コンポスト中の $nosZ$ 遺伝子の系統変化

4. まとめ

本研究では、養豚場由来廃棄物のコンポスト製造過程において、無機窒素化合物量や N_2O 発生量等の物理化学的因子および N_2O 還元酵素を保有する脱窒細菌の群集構造がどのように変化するかを明らかにした。

一般的なコンポスト製造法であるA法と高温前処理を行ったB法を比較すると、 N_2O の発生時期 (図-5) や無機窒素化合物量の変化のパターン (図-6)、 $nosZ$ の存在量 (図-7) や各系統型の存在比 (図-9) が大きく異なっていた。コンポスト化初期 (1~3週目) では、温度の上昇が起こらなかったA法において観察された

N_2O 発生が、高温状態が維持されていたB法 (図-2) においては見られなかったこと、また中温および低温状態が維持されているコンポスト化後期 (7~9週目) において、AB両手法において N_2O 発生が起こらなかった、という結果は、コンポスト中の温度変化が N_2O 発生および還元除去に大きな影響を与えていることを示唆している。本研究で観察された N_2O 発生パターンの変化と、脱窒細菌群集構造の変遷がどのように関連しているのかを知るためには、各時期に優勢的に存在する系統型の脱窒細菌の生残能や N_2O の発生および還元除去能が温度により受ける影響を明らかにしていく必要がある。このため、現在はコンポストから脱窒細菌株を単離し、培養実験や脱窒関連遺伝子の発現解析を行うことにより、生理学的諸性質の解明を目指している。

謝辞：本研究は文部省科学研究費基盤研究B (課題番号 21360258) および同省私立大学研究基盤形成支援事業からの研究助成によって行われたことを付記し、謝辞とします。

参考文献

- 1) Hellmann, B., L. Zelles, A. Palojarvi, and Q. Bai: Emission of climate-relevant trace gases and succession of microbial communities during open-windrow composting, *Appl Environ Microbiol.*, Vol. 63, pp. 1011-1018, 1997.
- 2) 環境省: IPCC 第2次評価報告書, 1995.
- 3) 環境省: IPCC 第4次評価報告書, 2007.
- 4) Ravishankara, A. R., J. S. Daniel, R. W. Portmann: Nitrous oxide (N_2O): The dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century, *Science*, Vol. 326, pp. 123-125, 2009.
- 5) Davidson, E. A.: The contribution of manure and fertilizer nitrogen to atmospheric nitrous oxide since 1860, *Nat. Geosci.*, Vol. 2, pp. 659-662, 2009.
- 6) Opdyke, M. R., N. E. Ostrom, and P. H. Ostrom: Evidence for the predominance of denitrification as a source of N_2O in temperate agricultural soils based on isotopologue measurements, *Global Biogeochem Cycles*, Vol. 23, pp. 10, 2009.
- 7) Maeda, K., S. Toyoda, R. Shimojima, T. Osada, D. Hanajima, R. Morioka, and N. Yoshida: Source of Nitrous Oxide Emissions during the Cow Manure Composting Process as Revealed by Isotopomer Analysis of and *amoA* Abundance in Betaproteobacterial Ammonia-Oxidizing Bacteria, *Appl Environ Microbiol.*, Vol. 76, pp. 1555-1562,

- 2010.
- 8) Fukumoto, Y., K. Inubushi: Effect of nitrite accumulation on nitrous oxide emission and total nitrogen loss during swine manure composting, *Soil Science & Plant Nutrition*, Vol. 55, pp. 428–434, 2009.
 - 9) Hellebrand, H. J.: Emission of nitrous oxide and other trace gases during composting of grass and green waste, *J. Agric. Eng. Res.*, Vol. 69, pp. 365–375, 1998.
 - 10) Friis, B. B., M. Pell, U. Sonesson, H. Jonsson, H. Kirchmann: Formation and emission of N₂O and CH₄ from compost heaps of organic household waster, *Environ Monit Assess.*, Vol. 62, pp. 317–331, 2000.
 - 11) Henry, S., D. Bru, B. Stres, S. Hallet, and L. Philippot: Quantitative detection of the *nosZ* gene encoding the nitrous oxide reductase and comparison of the abundance of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils, *Appl Environ Microbiol*, Vol. 72, pp. 5181–5189, 2006.
 - 12) Jia, Z., and R. Conrad: Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil, *Environmental Microbiology*, Vol. 11, pp. 1658–1671, 2009.
 - 13) Philippot, L., S. Hallin: Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community, *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 8, pp. 234–239, 2005.

(2011. 05. 30 受付)

Diversity and succession dynamics of bacterial genes relating to the reduction of nitrous oxide (N₂O) emitted from composting processes

Erika Shindo¹, Wakako Ikeda-Ohtsubo², Hideyo Ueda³, Yasuichi Ueda³, Keisuke Miyauchi², Ginro Endo^{2*}

¹Graduate School of Engineering, Tohoku Gakuin University

²Department of Civil and Environment Engineering, Faculty of Engineering, Tohoku Gakuin University

³Japan Life Center Ltd

Nitrous oxide (N₂O) is one of the most potent greenhouse gases and also concerned for its ozone-depleting effect. A large amount of N₂O is emitted from waste treatment processes such as composting. To obtain insights into denitrifying bacteria with N₂O-reducing potential, we analyzed diversity and succession of the denitrifying bacteria in composting processes by analyzing N₂O reductase gene, *nosZ*, as a molecular marker. The composting experiments were performed by traditional windrow method (method A) and a pre-treatment method at 100°C for 30 minutes prior to windrow composting (method B). Composting with method A proceeded mesophilically and shifted pH from alkaline to neutral, while composting with method B proceeded mostly thermophilically and under stable alkaline condition. In both methods, N₂O was emitted at the stage when nitrification and denitrification simultaneously proceeded. Results of quantitative real-time PCR analysis showed that the copy numbers of *nosZ* gene changed significantly during each composting process. The results of cloning analysis of *nosZ* genes amplified from the compost of each method composting showed that almost all nucleotide sequences were affiliated with novel *nosZ* phylotypes. The results indicate that denitrifying bacteria with N₂O-reducing potential are highly diverse and that their succession patterns of dominance are largely affected by physicochemical properties of the composting.