

畜産廃棄物のコンポスト製造過程に関与するアンモニア酸化細菌群の分子系統学的同定と動態解析

東北学院大学 工学部 学生会員 ○荒木伸也、東北学院大学 工学部 非会員 山田剛史、
(有) 日本ライフセンター 非会員 上田英代、上田裕一、東北学院大学 工学部 正会員 宮内啓介、
東北学院大学 工学部 フェロー会員 遠藤銀明

1. はじめに.

食糧やバイオエタノールなどの原料となる農産物を持続的に生産するためには、畜産廃棄物のような有機性廃棄物をコンポスト化し、肥料や土壌改良材として有効利用することが重要である。しかしながら、コンポスト製造過程において温室効果の大きい亜酸化窒素 (N_2O) の発生がしばしば観察されており、コンポスト技術は、有機資源の循環利用技術という負の側面だけでなく、温室効果ガスの発生源という負の側面を併せ持つ技術の可能性がある。地球環境に配慮する気運が高まる昨今において、 N_2O の発生抑制に配慮した環境保全型コンポスト製造法の開発が必要と思われる。これまでの研究により、農耕地土壌や廃水処理施設からの亜酸化窒素の発生には、アンモニア酸化反応や脱窒反応を担う微生物群が関与していることが知られている。しかしながら、コンポスト製造過程については、硝化反応や脱窒反応に関与する微生物情報が不足しており、亜酸化窒素の発生メカニズムはほとんど解明されていない。

そこで、本研究では、コンポスト化過程における亜酸化窒素の発生に関与すると思われる微生物群の基礎的情報を収集することを目的として、硝化反応および脱窒反応に関わる微生物群のうち、アンモニア酸化細菌群に着目して研究を行った。本報告では、まず、(1) コンポスト化過程における畜産廃棄物の物理化学的な変化を調査した。その後、(2) アンモニア酸化細菌のアンモニア酸化酵素をコードする遺伝子 (*amoA*) および β -proteobacteria 綱に属するアンモニア酸化細菌の 16S rRNA 遺伝子を分子マーカーとした定量的リアルタイム PCR 解析を行った。最後に、(3) 各遺伝子を標的としたクローンライブラリー解析を行い、各遺伝子の塩基配列に基づく系統解析から、コンポスト製造過程に関与するアンモニア酸化細菌の分子系統学的位置を特定したので報告する。

2. 実験方法

2.1 コンポスト過程における畜産廃棄物の物理化学的解析

本研究では、牛糞 (80%) およびおがくず (20%) を混合した畜産廃棄物を用いて、単純野積み法によりコンポスト化 (6 週間) を行った。コンポスト堆積山の深さ 20 cm よりコンポスト化過程のサンプルを週に一度の頻度で経時的に採取し、温度、pH、含水率、C/N 比、アンモニア性窒素、硝酸性窒素、亜硝酸性窒素および腐植化指標 (OMEI) を既報¹⁾に従って測定した。

2.2 16S rRNA 遺伝子および *amoA* 遺伝子を標的としたコンポスト過程におけるアンモニア酸化細菌の定量的リアルタイム PCR 解析

定量的リアルタイム PCR 解析を行うために、コンポストサンプルから DNA を抽出し、真正細菌の *amoA* 遺伝子、全真正細菌および β -proteobacteria 綱に属するアンモニア酸化細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的としたプライマーセットを用いて定量的リアルタイム PCR 解析を行った。

2.3 16S rRNA 遺伝子および *amoA* 遺伝子を標的としたコンポスト過程におけるアンモニア酸化細菌の多様性解析

上記の定量的リアルタイム PCR 解析により、各遺伝子が検出されたサンプル (4-6 週目のサンプル) を用いたクローンライブラリー (各 50 クローンずつ) を作製した。その後、作製したクローンライブラリー内の全ての塩基配列を決定した。決定した全ての *amoA* 遺伝子の塩基配列をアミノ酸 (151 a.a) に変換した後、MEGA4 ソフトウェア²⁾を用いて酵素タンパク質 AmoA の一部を基にした系統解析を行った。次に、 β -proteobacteria 綱に属するアンモニア酸化細菌由来の全ての 16S rRNA 遺伝子クローンの分子系統学的位置を明らかにするため、ARB ソフトウェア³⁾を用いた系統解析を行った。

3. 実験結果と考察

3.1 コンポスト過程における畜産廃棄物の物理化学的解析

本研究で作製したコンポスト堆積山では、発酵熱により堆積山の温度が 70 °C 付近まで上昇し、最終的 (6 週間後) には 55 °C まで徐々に低下した。その間、コンポスト堆積山の pH は、概ね 9.0 付近を推移した。はじめ、原材料中には、約 4000 mg-N/kg の高濃度のアンモニア性窒素が含まれていたが、コンポスト堆積山が高温および弱アルカリ条件であるために、発酵開始より徐々にアンモニアが揮散した (Fig. 1)。さらに、コンポスト化開始 4 週目から硝酸性窒素および亜硝酸性窒素が徐々にコンポスト堆積山に蓄積することも観察された (Fig. 1)。この観察結果は、比較的高温となる発酵時期においても、硝化細菌によるアンモニア酸化および亜硝酸酸化が起きていることを示していた。

3.2 16S rRNA 遺伝子および *amoA* 遺伝子を標的としたコンポスト過程におけるアンモニア酸化細菌の定量的リアルタイム PCR 解析

上記で測定した全てのコンポストサンプルから DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子および *amoA* 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR 解析を行った。その結果、硝酸性窒素および亜硝酸性窒素の蓄積が観察されたコンポスト化開始後 4-6 週目

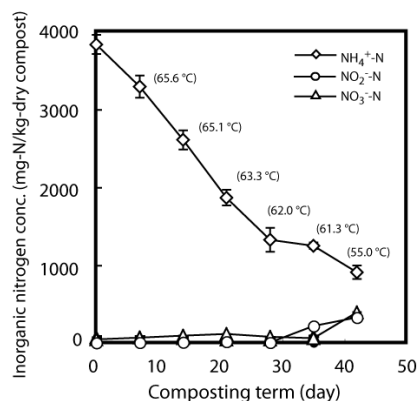


Fig. 1 コンポスト過程におけるアンモニア性窒素、亜硝酸性窒素および硝酸性窒素の変化 (括弧内は、堆肥山の温度を示す)

キーワード: アンモニア酸化細菌、コンポスト、亜酸化窒素、分子生物学的手法、畜産廃棄物

連絡先: 〒985-8537 宮城県多賀城市中央 1-13-1 東北学院大学工学部遠藤銀明研究室 TEL: 022-368-7493 FAX: 022-368-7070

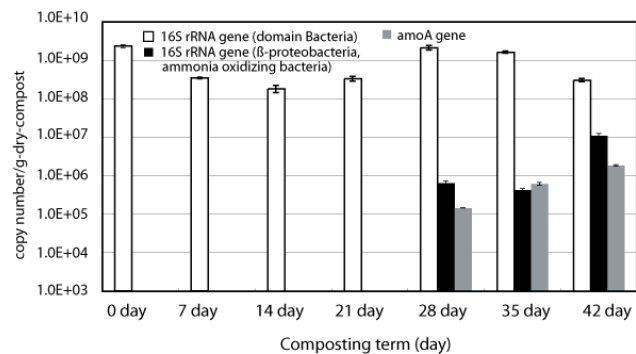


Fig. 2 コンポスト過程における全真正細菌 (16S rRNA 遺伝子) およびアンモニア酸化細菌 (*amoA* 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子) の定量的リアルタイム PCR 解析結果

において、*amoA* 遺伝子およびβ-proteobacteria 綱に属するアンモニア酸化細菌由来 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅産物が確認された。この間、真正細菌由来の 16S rRNA 遺伝子のコピー数に対する *amoA* 遺伝子のコピー数は、0.03-0.6 % を推移しており、β-proteobacteria 綱に属するアンモニア酸化細菌由来 16S rRNA 遺伝子とほぼ同程度のコピー数であった (Fig. 2)。

3.3 16S rRNA 遺伝子および *amoA* 遺伝子を標的としたコンポスト過程におけるアンモニア酸化細菌の多様性解析

さらに本研究では、定量的リアルタイム PCR 解析で得られた *amoA* 遺伝子の PCR 産物を用いて、クローンライブラリー (それぞれのサンプルで 50 クローン) を作製した。その結果、コンポスト化 4 週目のクローンライブラリーでは 1 種類 (SWC-1: 50/50 クローン)、コンポスト化 5 週目では 3 種類 (SWC-1: 48/50, SWC-2: 1/50, SWC-3: 1/50 クローン)、6 週目では 2 種類 (SWC-1: 49/50, SWC-4: 1/50 クローン) の *amoA* 遺伝子が検出された。検出された 4 種のクローンを *AmoA* のアミノ酸配列に変換し、既存のアンモニア酸化細菌と *AmoA* (151 aa) を基にした系統解析を行ったところ、β-proteobacteria 綱の *Nitrosomonas europaea* や *Nitrosomonas halophila* に近縁であることが (*N. europaea* 由来 *AmoA* のアミノ酸配列で 92% の相同性) 判明した (Fig. 3)。

次に、β-proteobacteria 綱に属するアンモニア酸化細菌由来 16S rRNA 遺伝子を標的としたクローンライブラリーを作

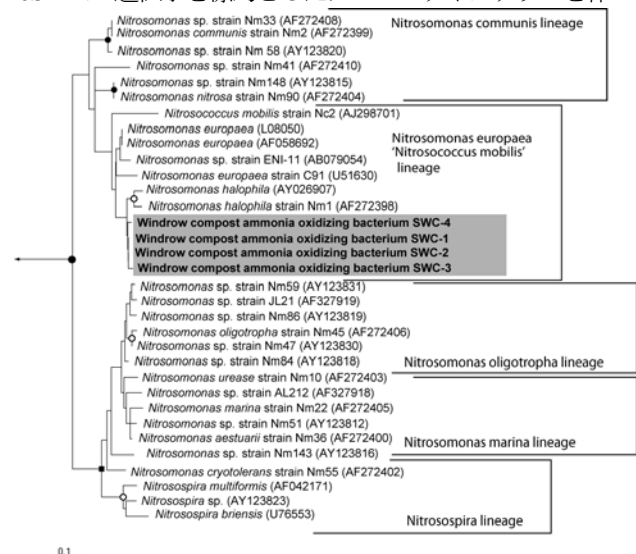


Fig. 3 *AmoA* (151 aa) の部分的アミノ酸配列を基にしたコンポスト過程に出現する 4 種のアンモニア酸化細菌の分子系統学的位置

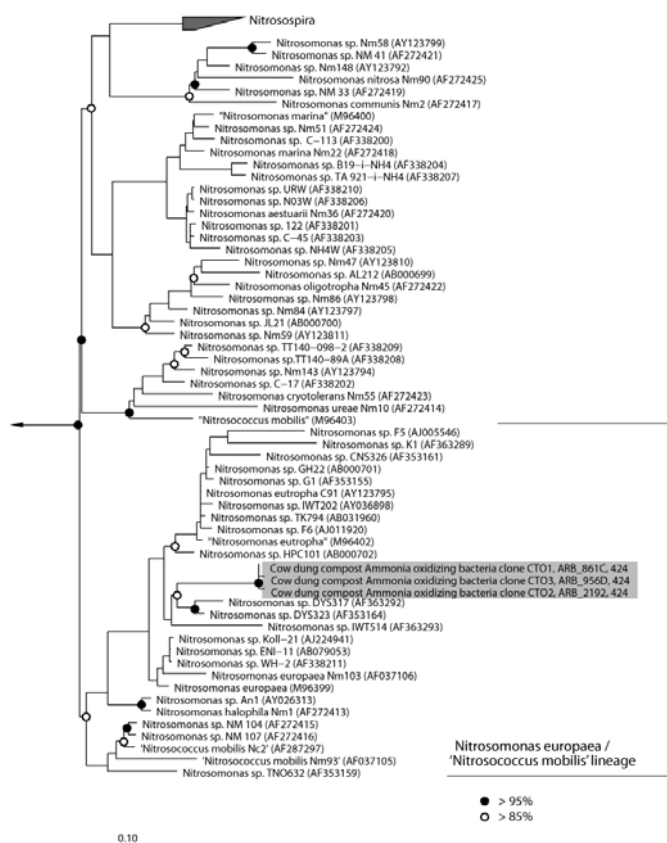


Fig. 4 16S rRNA 遺伝子を基にしたコンポスト過程に出現する 3 種のアンモニア酸化細菌の分子系統学的位置

製し系統解析を行ったところ、4 週目のクローンライブラリーでは 3 種類 (CTO-1: 48/50, CTO-2: 1/50, CTO-3: 1/50 クローン)、5 週目では 2 種類 (CTO-1: 49/50, CTO-2: 1/50 クローン)、6 週目では 2 種類 (CTO-1: 48/50, CTO-3: 2/50 クローン) の 16S rRNA 遺伝子が検出された。16S rRNA 遺伝子を標的とした分子系統解析結果は、*amoA* 遺伝子を標的とした解析と比較的類似した結果を示し、*Nitrosomonas europaea* / *Nitrosococcus mobilis* グループの異なる分子系統学的位置 (*N. europaea* 由来 16S rRNA 配列で 94% の相同性) に属した (Fig. 4)。この結果は、コンポスト製造過程の高温発酵期において観察されたアンモニア酸化は、新規の *Nitrosomonas* 属細菌によりなされていることを示唆していた。

4. おわりに

本研究では、コンポスト化過程の高温発酵期 (4-6 週目) においても、*Nitrosomonas* 属に属する新規のアンモニア酸化細菌により、アンモニア酸化がなされている可能性を示した。今後の予定として、本研究で同定されたアンモニア酸化細菌群がコンポスト製造過程において観察された亜酸化窒素の発生に関与しているかを調査する予定である。

5. 謝辞 本研究は、生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業「温室ガス抑止のための窒素バイオマス再生・浄化システムの構築」の助成を受けて行われたことを記し、感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Yamada et. al. (2007) J. Biosci. Bioeng. **104**, p.408-415.
- 2) Tamura et. al. (2007) Mol. Bio. Evol. **24**, p.1596-1599
- 3) Ludwig et. al. (2004) Nucleic Acids Res. **32**, p.1363-1371