

## 有機性廃棄物のコンポスト製造過程に關与する硝化細菌群の多様性と遷移に関する研究

東北学院大学 工学部 学生会員 ○荒木伸也、豊橋技術科学大学 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 遠藤銀朗

### 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正の側面だけでなく、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有る。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關与する微生物の情報不足しており、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關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關わる微生物群のうち、硝化細菌群に着目して研究を行った。本報告では、まず、(1) 3種の畜産廃棄物を主原料としたコンポスト製造過程における無機窒素化合物の変化やその他の物理化学的な性状を調査した。次に、(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 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。その後、(3) T-RFLP 法と多次元尺度法を組み合わせた手法とクローンライブラリー法を用いて、コンポスト製造過程に關与するアンモニア酸化細菌群の遷移の状況および多様性の調査を行った。さらに本研究では、(4) 亜硝酸酸化細菌、*Nitrobacter* 属の 16S rRNA 遺伝子をターゲットとしたリアルタイム PCR 解析を行ったので報告する。

### 2. 実験方法

#### 2.1 コンポスト過程における有機性廃棄物の物理化学的解析

本研究では、3種(牛糞2種、豚糞1種)の各畜産廃棄物(80%)とおがくず(20%)を混合した原材料を用いてコンポスト化を行った。各コンポスト化処理は、1.5-3ヶ月の期間で行った。コンポスト堆積山の深さ20cmよりコンポスト化過程のサンプルを経時的に(週に一度)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)を測定した。

#### 2.2 コンポスト製造過程におけるアンモニア酸化細菌の動態

定量的リアルタイム PCR 解析を行うために必要な標準 DNA 試料は、アンモニア酸化細菌である *Nitrosomonas europaea* の 16S rRNA 遺伝子および *amoA* 遺伝子を利用して調製した。その後、上記で経時的に採取したコンポストサンプルから DNA を抽出し、*amoA* 遺伝子および真正細菌、ベータプロテオバクテリア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 コンポスト製造過程におけるアンモニア酸化細菌の遷移と多様性

本研究では、上記の定量的リアルタイム PCR 解析において各遺伝子が検出されたサンプルを使用した。各コンポスト製造過程におけるアンモニア酸化細菌の遷移およびコンポスト材料間におけるアンモニア酸化細菌群集の違いを明らかにするために、*amoA* 遺伝子を基にした T-RFLP 法と多次元尺度法を組み合わせた方法を用いた。このアンモニア酸化細菌の多様性解析を行うために、16S rRNA 遺伝子および *amoA* 遺伝子を基にし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、クローンライブラリーのすべ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 aa)に変換した後、MEGA4ソフトウェアを用いて AmoA タンパク質に基づく系統解析を行った。また、ベータプロテオバクテリア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に、ARB ソフトウェアを用いて系統解析を行った。

#### 2.4 16S rRNA 遺伝子を標的としたコンポスト過程における亜硝酸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、全真正細菌、亜硝酸酸化細菌および *Nitrobacter* 属の 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。

### 3. 実験結果と考察

#### 3.1 コンポスト過程における有機性廃棄物の物理化学的解析

本研究で作製した3種の畜産廃棄物からなるコンポスト堆積山において、発酵熱によって堆積山の温度が70℃付近まで上昇し、コンポストが成熟化するにつれて徐々に低下した。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。コンポスト原材料は、高濃度のアンモニア性窒素を含んでおり、コンポスト堆積山が高温および弱アルカリ条件である

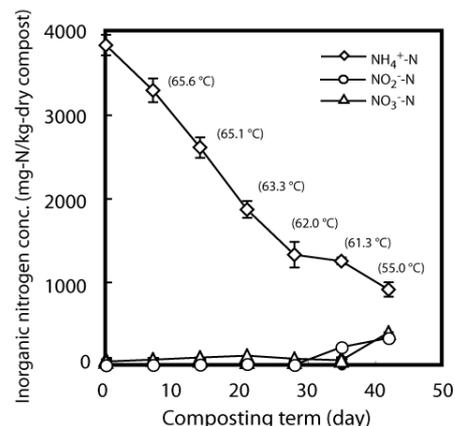


Fig. 1 コンポスト過程におけるアンモニア性窒素、亜硝酸性窒素および硝酸性窒素の変化 (括弧内は、堆肥山の温度を示す)

キーワード: アンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌、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朗研究室 TEL: 022-368-7493 FAX: 022-368-7070

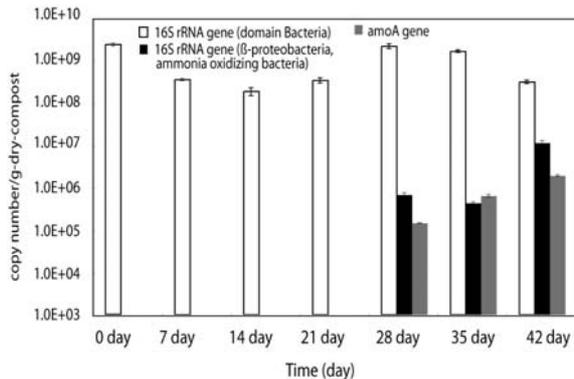


Fig. 2 牛糞を主原料としたコンポスト製造過程における真正細菌およびアンモニア酸化細菌の定量的リアルタイムPCR解析

ために、発酵開始より徐々にアンモニアの物理化学的揮散が観察された。その後、コンポスト化開始4-5週目から、徐々に硝酸性窒素および亜硝酸性窒素がコンポスト堆積山に蓄積することが観察された。この結果は、畜産廃棄物を原材料とした場合、コンポスト化中期から終期にかけてアンモニア酸化が起きていることを示していた (Fig. 1)。

### 3.2 コンポスト製造過程におけるアンモニア酸化細菌の動態

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製造過程において、amoA遺伝子およびベータプロテオバクテリア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、0.03-4.9%を推移しており、ベータプロテオバクテリア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 コンポスト製造過程におけるアンモニア酸化細菌の遷移と多様性

各コンポスト製造過程におけるアンモニア酸化細菌群集の遷移を明らかにするために、amoA遺伝子を標的としたTRFLP法を適用した。その結果、各コンポスト製造過程において、コンポスト製造が進むにつれてTRFパターンが変動し、ア

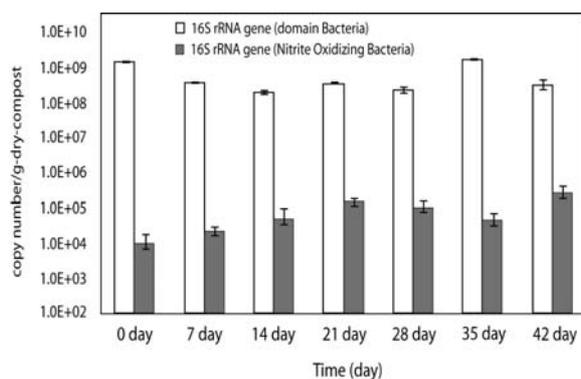


Fig.4 牛糞を主原料としたコンポスト製造過程における真正細菌および亜硝酸酸化細菌の定量的リアルタイムPCR解析

ンモニア細菌の種も変化することが明らかとなった。コンポスト製造過程におけるアンモニア酸化細菌群集の違いや、コンポスト間におけるアンモニア酸化細菌群集の違いを明らかにするために、現在、本解析によって得られたTRFのピーク値を基に多次元尺度法を用いて解析を行っている。次に、牛糞を主原料としたコンポスト製造過程において、どの種のアンモニア細菌が関与しているかを明らかにすることを試みた。上述した定量的リアルタイムPCR解析において、4-6週目においてamoA遺伝子のPCR増幅が確認されており、そのamoA遺伝子のPCR産物を用いてクローンライブラリーを作製した。その50クローンをそれぞれ解析した結果、コンポスト開始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。検出されたクローンをAmoAアミノ酸配列に変換し、既存のアンモニア酸化細菌との系統解析を行ったところ、高頻度に検出されたSWC-1は、ベータプロテオバクテリア綱のNitrosomonas europaeaのamoA遺伝子に比較的近縁であった。また、その他は、Nitrosomonas属のamoA遺伝子に属するものの、既知の細菌とは異なる新規な細菌由来の塩基配列である事が明らかとなった (Fig. 3)。

### 3.4 16S rRNA遺伝子を標的としたコンポスト過程における亜硝酸酸化細菌の定量的リアルタイムPCR解析

3種のコンポストサンプルからDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子標的としたリアルタイムPCR解析を行った結果、コンポスト製造過程の全期間において、亜硝酸酸化細菌由来の16S rRNA遺伝子のPCR増幅産物が確認された (Fig. 4)。この結果は、硝酸性窒素および亜硝酸性窒素の蓄積が確認されたコンポスト製造過程においてのみPCR増幅が確認されたアンモニア酸化細菌の結果とは異なるものであった。

### 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る、アンモニア酸化がなされている可能性が知られた。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および亜硝酸酸化細菌がどのように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ことにしている。

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。

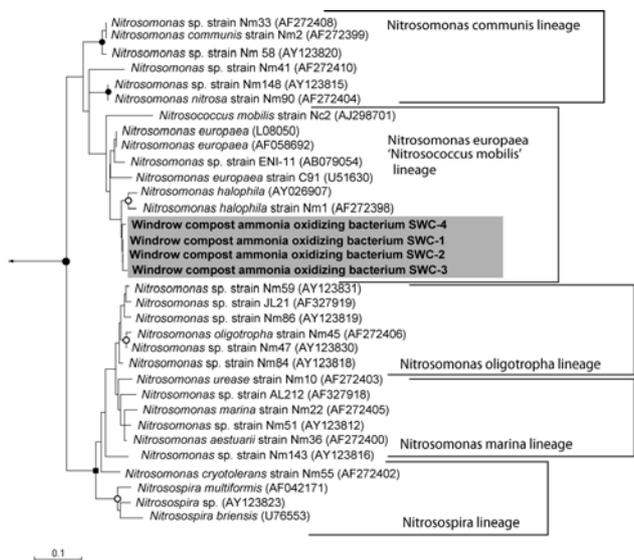


Fig. 3 AmoA (151 a.a) の部分的アミノ酸配列を基にしたコンポスト過程に出現する4種のアンモニア酸化細菌の分子系統学的位置