

超高温コンポスト製造過程における窒素循環に関わる微生物の分子生物学的動態解析

東北学院大学 工学部 学生会員 ○中居行浩、菅原宏幸、東北学院大学 工学部 山田剛史

東北学院大学 工学部 正会員 宮内啓介、(有)日本ライフセンター 非会員 上田裕一

東北学院大学 工学部 フェロー 遠藤銀朗

1.はじめに。窒素は、植物の生育にとって最も重要な元素の一つであり、最近では、微生物工学的に製造されたコンポストなどを肥料として農地へ使用する例が増加してきている。良好なコンポストを製造する主たる目標は、作物にとって利用可能な窒素成分を成熟したコンポスト内に多く保持させる事にある。通常、家畜糞尿、生ゴミや下水汚泥などの廃棄物を原材料としてコンポスト化を行う場合、尿素の加水分解やペプチドからの脱アミノ化に伴ってアンモニアが生成されることが知られている¹⁾。近年の報告では、アンモニア酸化酵素遺伝子 (*amoA*) や既存のアンモニア酸化細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした分子生物学的手法により、アンモニア酸化細菌がコンポスト製造過程に存在し、アンモニアの酸化に寄与している事が明らかとなっている²⁾。アンモニア酸化細菌によって行われるアンモニアの酸化反応と脱窒細菌による脱窒反応がコンポスト製造過程において生じてしまうと、窒素もしくは亜酸化窒素が大気中に放出されてしまうことになる。

良好なコンポストを製造するためには、コンポスト製造過程においてこのような窒素循環を極力抑えたコンポスト製造法の確立が必須になると思われる。現在、我々は、家畜糞尿などを原材料とした際に問題となる病原性微生物の駆除とコンポスト製造過程における悪臭を抑える事などを目的として、超高温堆肥化法 (超高温攪拌反応槽による一次発酵と野積みによる二次発酵を組み合わせた手法) の開発を行っている。この試みでは、上記の目的を達成しつつ製品化されたコンポストと同程度のコンポストを短期間で製造することが可能であったが³⁾、コンポスト製造過程における窒素成分の挙動を把握するには至っていない。そこで本研究では、さらなる良好なコンポスト製造を可能にする超高温堆肥化法を構築するために、コンポスト製造過程における各窒素化合物の挙動と分子生物学的手法を用いた窒素循環に関わる微生物群の動態を解析する事を目的とした。

本報では、牛糞を主原料とした同一材料を用いて超高温堆肥化技術と単純野積み法を適用し、(1) 各コンポスト製造過程におけるそれぞれの窒素化合物の挙動を比較した。さらに本報では、(2) それらのコンポスト製造過程に存在するアンモニア酸化細菌および脱窒細菌の動態を窒素循環に関わる遺伝子を標的としたリアルタイム PCR 法により把握する事を試みた。(3) 最後に、コンポスト製造過程におけるアンモニア酸化古細菌の存在を確かめるため、本細菌群のアンモニア酸化酵素遺伝子を標的とした PCR 法を行ったので報告する。

2. 実験方法 牛糞 (80%) とおかご (20%) を混ぜた同一材料を超高温堆肥化法 (一次発酵: 超高温攪拌反応器, 二次発酵: 野積み) および単純野積み法のみでコンポスト化したサンプルを1週間毎に1.5ヶ月間採取した。超高温反応槽内で生成されたコンポストサンプルは、温度 25, 50, 75, 85 及び 100 °C に達した際のサンプルを採取し、後の実験に使用した。採取したサンプルの含水率および乾燥重量は、以前に報告された方法に基づき測定した⁴⁾。各コンポスト生成過程に生じた $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 及び $\text{NO}_2^-\text{-N}$ を測定は、以前に報告された方法に従って⁵⁾各コンポストサンプルから抽出産物を取得後、Ammonium-Test キット ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ の測定)、Nitrite-Test キット ($\text{NO}_2^-\text{-N}$ の測定) 及び各キット専用の測定器を用いて行った。各コンポスト製造過程に生じた $\text{NO}_3^-\text{-N}$ の測定は、以前に報告された方法に従って行った⁶⁾。

採取した各コンポストサンプルからの DNA 抽出は、土壤サンプル用 DNA 抽出キットを用いて行った。その後、抽出した DNA から、DNA 精製キットを用いて不純物質を取り除いた。真正細菌および古細菌由来の 16S rRNA 遺伝子のコピー数をリアルタイム PCR 法で測定するために、*Escherichia coli* (真正細菌) および *Methanothermobacter thermautotrophicus* (古細菌) の全 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅した産物を標準試料として使用した。コンポストサンプル内の全真正細菌の乾燥コンポスト 1g あたりのコピー数の算出は、表 1 に示す真正細菌および古細菌を特異的に検出するプライマーセットと抽出した DNA (1 ng もしくは 10 ng/反応液) を用いたリアルタイム PCR 法を適用することで行った。

各コンポスト製造過程に存在する窒素循環に関わる各微生物群を評価するために、アンモニア酸化酵素遺伝子 (*amoA*)、亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirS* および *nirK*) および亜酸化窒素還元酵素遺伝子 (*nos Z*) などの機能遺伝子を標的とした定量的リアルタイム PCR 法を行った。表 1 に示すそれぞれの機能遺伝子を持つ微生物と標的としたプライマーセットを用いてリアルタイム PCR 法の標準試料を作成した。コンポストサンプル内の窒素循環に関わる微生物群の乾燥コンポスト重量 1g あたりのコピー数の算出は、各機能遺伝子を増幅可能なプライマーセット (表 1) と各遺伝子を有する微生物から抽出した DNA (10 ng/反応液) を用いたリアルタイム PCR 法を適用することで行った。各コンポストサンプル内のアンモニア酸化古細菌の存在は、本細菌群に特異的なプライマーセット (表 1) と抽出した DNA (10 ng/反応液) を用いた PCR 法で評価した。

表 1 本研究で使用した 16S rRNA 遺伝子および各機能遺伝子を標的としたプライマーセット

| Primer name | Target gene | Target group | Primer Sequence (5' to 3') | Primer length (mer) | Target site (<i>E. coli</i> position) | Reference |
|--------------|-------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------|--|------------|
| EUB338f | 16S rRNA | Domain <i>Bacteria</i> | GCTGCCTCCCGTAGGAGT | 18 | 338-355 | 7 |
| EUB338-If | 16S rRNA | Domain <i>Bacteria</i> | GCAGCCTCCCGTAGGAGT | 18 | 338-355 | 8 |
| EUB338-IIIf | 16S rRNA | Domain <i>Bacteria</i> | GCAGCCACCCGTAGGTGT | 18 | 338-355 | 8 |
| EUB338-IIIIf | 16S rRNA | Domain <i>Bacteria</i> | GCTGCCACCCGTAGGTGT | 18 | 338-355 | 8 |
| 907r | 16S rRNA | Domain <i>Bacteria</i> | CCGTCAATTCMTTTRAGTT | 19 | 907-926 | 9 |
| ARC109f | 16S rRNA | Domain <i>Archaea</i> | AMDGCTCAGTAACACGT | 17 | 109-126 | 10 |
| ARC912r | 16S rRNA | Domain <i>Archaea</i> | GTGCTCCCCGCCAATTCCT | 20 | 915-935 | 10 |
| amoA-1F | <i>amoA</i> | Anmmonia oxidizing bacteria | GGGGTTTCTACTGTTGGT | 19 | 332-349 | 11 |
| amoA-2R | <i>amoA</i> | Anmmonia oxidizing bacteria | CCCTCKGSAAGCCCTTCTTC | 21 | 802-820 | 11 |
| Arch-amoAF | <i>amoA</i> | Anmmonia oxidizing archaea | STAATGGTCTGGCTTAGACG | 20 | N.D | 12 |
| Arch-amoAR | <i>amoA</i> | Anmmonia oxidizing archaea | GCGGCCATCCATCTGTATGT | 20 | N.D | 12 |
| nosZ1f | <i>nosZ</i> | Denitrifying bacteria | WCSYTGTTTCMTGACAGCCAG | 21 | 1184-1203 | 13 |
| nosZ1Mr | <i>nosZ</i> | Denitrifying bacteria | ATRTCGATCARCTGVKCRTTYTC | 23 | 1421-1443 | this study |
| Cd3aF | <i>nirS</i> | Denitrifying bacteria | AACGYSAAGGARACSGG | 17 | 916-935 | 14 |
| R3cd | <i>nirS</i> | Denitrifying bacteria | GASTTCGGRTGSGTCTTSAYGAA | 23 | 1322-1341 | 14 |
| F1aCu | <i>nirK</i> | Denitrifying bacteria | ATCATGGTCTGCGCCGCG | 17 | 568-594 | 15 |
| R3Cu | <i>nirK</i> | Denitrifying bacteria | GCCTCGATCAGRTTGTGGTT | 20 | 1021-1040 | 15 |

N.D: not determined

3. 実験結果と考察 超高温堆肥化技術および単純野積み法を適用し製造過程のコンポストサンプルから $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ および $\text{NO}_2\text{-N}$ を抽出した後、それぞれのコンポスト製造過程における各項目の変動を調査した。その結果、同一原材料を用いてコンポストを製造したにも関わらず、超高温堆肥化技術および単純野積み法ではコンポスト製造過程における窒素の形態において顕著な相違が確認された (図1)。超高温攪拌反応槽内における $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ および $\text{NO}_2\text{-N}$ は、大きな変化は示しておらず、ほぼ一定の割合で推移する事が判明した。しかしながら、超高温堆肥化技術を適用した際の二次発酵過程では、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ および $\text{NO}_2\text{-N}$ は概ね低濃度で推移したが、単純野積み法を適用すると、5,6 週目にかけて $\text{NO}_3\text{-N}$ および $\text{NO}_2\text{-N}$ の割合が非常に高くなる傾向を示した (図1)。

窒素循環に関与する微生物群の機能遺伝子を標的としたリアルタイム PCR 法を適用したところ、超高温堆肥化技術を適用したコンポスト製造過程では、ほぼ一定の割合で *amoA* および *nirS* と思われる遺伝子の増幅が確認された。測定した窒素化合物の挙動とこれらの機能遺伝子の動態を考慮すると、超高温堆肥化技術を適用したコンポスト製造過程では、硝化脱窒反応が引き起こされている可能性が示唆された。一方、

単純野積み法を適用したコンポスト製造過程では、5-6 週目にはじめて *amoA* と思われる遺伝子の増幅が確認されており、コンポスト化過程後期において亜硝酸が非常に蓄積するが、硝化反応と脱窒反応が起こりにくい環境を比較的保持しつつコンポスト化が進行しされていることが判明した。また、本解析を通じてアンモニア酸化古細菌由来の *amoA* 遺伝子の PCR 産物を得られることはなかった。今後、このような遺伝子レベルの動態解析と各窒素化合物の挙動を把握しつつ、超高温堆肥化技術による最適なコンポスト化方法を模索していく予定である。

4. 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 (異分野融合研究開発型) の助成を受けて行われた事を記し感謝の意を表します。

5. 参考文献

- 1) Inbar et al. (1993) *J. Environ. Qual.* **22**: 857-863
- 2) Kowalchuk et al. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 396-403
- 3) 山田ら (2007) 第41 回日本水環境学会講演論文集
- 4) Wu et al. (2000) *J. Environ. Qual.* **29**: 424-429
- 5) Okano et al. (2004) *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1008-1016
- 6) Cataldo et al. (1975) *Com. Soi. Sci. Plant Anal.* **6**: 71-80
- 7) Amann et al. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1919-1925
- 8) Daims et al. (1999) *Syst. Appl. Microbiol.* **22**: 434-444
- 9) Stubner (2002) *FEMS Microbiol. Ecol.* **50**: 155-164
- 10) Groβkopf (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 960-969
- 11) Rothauwe et al. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5261-5266
- 12) Christopher et al. (2005) *PNAS* **102**: 6478-6483
- 13) Henry et al. (2006) *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 5181-5189
- 14) Michotey et al. (2000) *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1564-1571
- 15) Hallin et al. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1652-1657

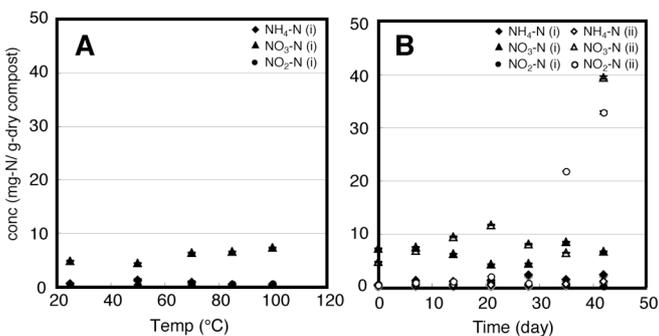


図 1 超高温堆肥化法 (i) および単純野積み法 (ii) によるコンポスト製造過程における $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ および $\text{NO}_2\text{-N}$ の挙動。A: 超高温攪拌反応槽、B: 各野積み過程