

畜産廃棄物を用いた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 遠藤銀朗

1. はじめに.

コンポスト化過程では、温室効果の大きい(二酸化炭素の310倍)亜酸化窒素(N_2O)の発生がしばしば観察される¹⁾。農耕地土壌や廃水処理プロセスからの亜酸化窒素の発生には、生物学的なアンモニア酸化反応(特にヒドロキシルアミンから亜硝酸に酸化される過程)もしくは脱窒反応が関係している事が知られている。しかしながら、コンポスト製造過程では、アンモニア酸化反応や脱窒反応に関与する微生物情報の整備が不足しており、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。畜産廃棄物、下水汚泥や厨芥廃棄物などを利用した有機固形性廃棄物のコンポスト化技術は、持続的な農業生産活動やサトウキビやトウモロコシといったバイオエタノール原料などのエネルギー資源の確保に資する環境バイオテクノロジーとして、今後益々重要度が増すと考えられる。それと同時に、地球温暖化に配慮する気運が高まる昨今において、このようなコンポスト化技術の活用のためには、亜酸化窒素のような温暖化ガスの発生抑止能を付与した環境保全型コンポスト製造技術の開発が必要になると考えられる。

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、アンモニア酸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、(1)はじめに、コンポスト化過程における畜産廃棄物の物理化学的分析を行い、畜産廃棄物のコンポスト化過程でアンモニア酸化が起きているかを調査した。その後、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する(2)定量的リアルタイムPCR解析および(3)クローンライブラリー解析を行い、コンポスト製造過程に出現するアンモニア酸化細菌群の分子系統学的な同定と動態解析を行ったので報告する。

2. 実験方法

2.1 コンポスト化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、単純野積み化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20cm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²⁾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製造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解析を行うために必要な標準試料は、*Nitrosomonas europaea*の16S rRNA遺伝子および*amoA*遺伝子を利用して作製した。その後、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、 β -proteobacteria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。それぞれの遺伝子のコピー数は、乾燥コンポスト1gあたりに換算し、コンポスト化過程の各微生物群の動態解析を行った。

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化過程におけるアンモニア酸化細菌の多様性解析

*amoA*遺伝子および β -proteobacteria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(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(151aa)に変換した後、MEGA4ソフトウェア³⁾を用いてAmoAに基づく系統解析を行った。次に、 β -proteobacteria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⁴⁾を用いた系統解析を行った。

3. 実験結果と考察

3.1 コンポスト化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pH9.0付近を推移した。はじめ、原材料中には、約4000mg-N/kg-dry compostの高濃度アン

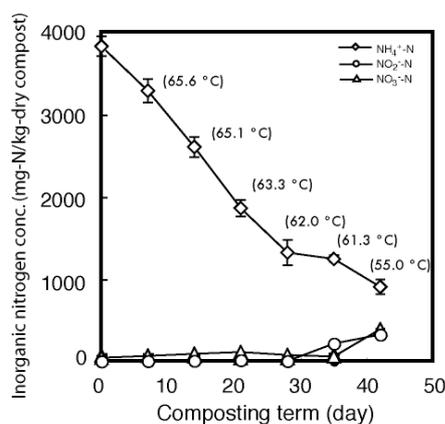


Fig. 1 コンポスト製造過程におけるアンモニア性窒素、亜硝酸性窒素および硝酸性窒素の変化(括弧内は、堆肥山の温度を示す)

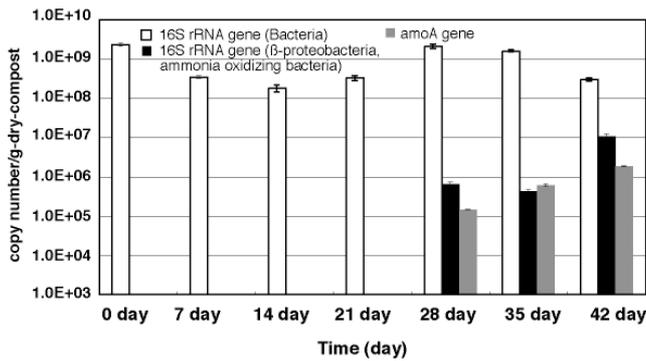


Fig. 2 コンポスト製造過程における真正細菌 (16S rRNA 遺伝子) およびアンモニア酸化細菌 (*amoA* 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子) の定量的リアルタイム PCR 解析結果

モニア性窒素を含んでいたが、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の物理化学的揮散が観察された (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製造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 週目において、*amoA* 遺伝子および β-proteobacteria 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 に属するアンモニア酸化細菌由来 16S rRNA 遺伝子とは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群の多様性解析

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 (clone 1: 50/50 クローン)、コンポスト化 5、6 週目では 2 種類 (clone 1: 44/50、clone 2: 6/50 クローン)、(clone 1: 45/50、clone 2: 5/50 クローン) の *amoA* 遺伝子が検出された。検出された 2 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 a.a) を基にした系統解析を行ったところ、最も高頻度に検出された clone 1 は、β-proteobacteria の *Nitrosomonas europaea* に比較的近縁であることが判明した (Fig. 3)。また、clone 2 は、*Nitrosomonas* 属に属するものの、既存の細菌とは

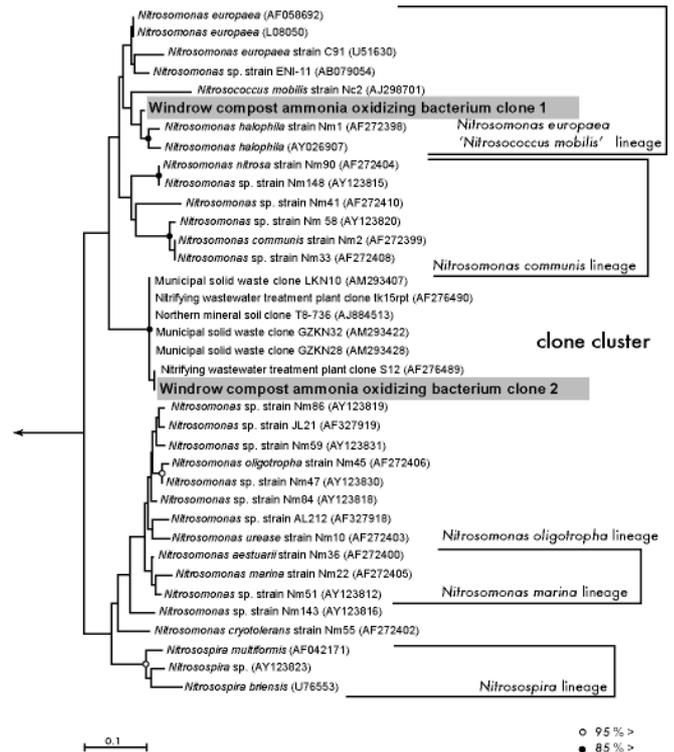


Fig. 3 *AmoA* (151 a.a) を基にしたコンポスト製造過程に出現する 2 種のアンモニア酸化細菌の分子系統学的位置

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)。次に、β-proteobacteria 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製し系統解析を行ったところ、回収されたクローン数に違いはあるものの、*amoA* 遺伝子を標的とした解析と比較的類似した多様性を示し、検出されたクローン配列は、*Nitrosomonas* 属内の異なる分子系統学的位置に属した。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可能性を示唆している。

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、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本研究で同定されたアンモニア酸化細菌群が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) Fukumoto et. al. (2003) Bioresour. Technol. **89**, p.109-114
- 2) Yamada et. al. (2007) J. Biosci. Bioeng. **104**, p.408-415.
- 3) Ludwig et. al. (2004) Nucleic Acids Res. **32**, p.1363-1371
- 4) Tamura et. al. (2007) Mol. Bio. Evol. **24**, p.1596-1599