

各種分子生物学的手法および統計学的手法を用いた真正細菌群の動態把握による 超高温無臭堆肥化法の評価

東北学院大学 工学部 学生会員 ○鈴木敦士、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

コンポスト化技術は、畜産廃棄物、厨芥廃棄物および下水汚泥のような有機固形性廃棄物を肥料や土壌改良材へと変換する微生物利用技術であり、環境的にやさしく、経済的にもフィジビリティの高い技術である。それらの有機固形性廃棄物の内、畜産廃棄物は、農作物生産に必要な必須元素をバランス良く含んでおり、良好な肥料や土壌改良材（コンポスト製品）として利用できる有機質資材の原料となることが知られている。しかしながら、高濃度のアンモニアを含む畜産廃棄物をコンポスト化する過程においては、アンモニアを主成分とする悪臭がしばしば問題となっている。また、ヨーロッパ諸国では、畜産廃棄物の処理を起源とするアンモニアガスが、大気中のアンモニアガスの主要な発生源となっており¹⁾、大気中に拡散したアンモニアガスが雨に含まれて降雨することにより土壌で酸化されて酸性雨と同様の影響をもたらしたり、富栄養化問題を引き起こす事も報告されている²⁾。従って、畜産廃棄物のコンポスト過程におけるアンモニアガスの発生防止は、地球環境保全の観点からも解決すべき大きな課題となっており、周辺地域環境および地球環境に配慮した環境保全型コンポスト製造技術の開発が必要となっている。そこで、我々は、畜産廃棄物からのコンポスト製造過程において最も懸念されるアンモニアの揮散防止を目的とした「超高温前処理無臭堆肥化法」を提案し、実用化へ向けた研究を行っている^{3),4)}。

超高温前処理無臭堆肥化法は、弱アルカリに調整した原材料に対して、超高温域（100℃）までの加温と機械的な攪拌により、原材料中の高濃度のアンモニアをあらかじめストリップングさせ、その後の原材料の熟成過程において生じる発酵熱に対して、アンモニアの揮散がおきない（化学的平衡が保たれる）程度まで畜産廃棄物中のアンモニア濃度を事前に調整する方法である。以前の報告において、前段のアンモニアストリップング処理が、後段の野積み法などを用いた原材料の熟成過程におけるアンモニアの揮散を抑止することが可能であることを報告した^{3),4)}。また、超高温前処理を適用すると、未処理の場合と比較して真菌の存在率が高くなり、腐植化が促進されることも判明した^{3),4)}。このような高い腐植効果を与えた要因の一つとして、超高温前処理が、コンポスト過程に関与する微生物種の構成に影響を及ぼした可能性が考えられる。

そこで、本研究では、超高温前処理無臭堆肥化法による高い腐植効果を示す要因を真正細菌の微生物群集の構造の変化から明らかにする事を目的として、牛糞を主原料とした同一原材料を用いて、超高温前処理無臭堆肥化法および単純野積み法を行った際の真正細菌群の変化を各種分子生物学的手法と統計学的手法を組み合わせた解析を行った。

本報告では、まず、(1) 各コンポスト化過程（42 日間）の真正細菌群集の遷移を T-RFLP 法で解析し、(2) その解析データを基に各サンプル間の真正細菌群集の構造の違いを多次元尺度法による非相似度解析によって推定した。その後、(3) 各コンポスト化過程（7, 21, 42 日間）のサンプルに対して 16S rRNA 遺伝子クローンライブラリー法を適用し、各コンポストサンプルを構成する主要な真正細菌の種を明らかにしたので報告する。

2. 実験方法

2.1 各コンポスト製造過程における T-RFLP 法を用いた真正細菌群集構造の動態解析

牛糞（80%）およびおがくず（20%）を原材料として用いて、超高温前処理無臭堆肥化法および単純野積み法によりコンポスト化する過程（42 日間）のサンプルを 1 週間毎に採取した。コンポスト堆積山の切り返しは、週に一度のみ行った。得られたコンポストサンプルから DNA を抽出し、真正細菌の 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を標的としたプライマーセットを用いて PCR 増幅を行った。その際、forward プライマーの 5'端には、6-FAM 蛍光物質を付加して PCR 反応に供した。PCR 反応条件等は、既報に従って行い³⁾、PCR サイクルは 30 回で行った。その後、mung bean nuclease による偽 T-RF ピークの検出防止処理⁵⁾ および BstUI による制限酵素処理を行い、DNA シーケンサーによって末端蛍光標識された T-RF 断片長を解析した。

2.2 多次元尺度法による真正細菌群集構造の非相似度解析

次に、得られた真正細菌由来のそれぞれの T-RF 断片を 1bp 刻みで整理し、全 T-RF 断片の高さの合計に対する各 T-RF 断片の高さから、各 T-RF 断片の検出された全真正細菌群の T-RF 断片に対する割合を算出した。その後、算出した各 T-RF 断片の割合を用いて、42 日間にわたる各コンポスト過程および二つのコンポスト製造過程における真正細菌群集の非相似度解析に必要な Bray-Curtis 距離を算出した。最後に、算出した距離行列マトリックスを基にして多次元尺度法による二次元プロット図を得た。

2.3 各コンポスト製造過程における 16S rRNA 遺伝子クローンライブラリー法を用いた優占真正細菌種の特定

各コンポスト化過程（7, 21, 42 日間）のサンプルから DNA を抽出し、真正細菌の 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を標的としたプライマーセットを用いて PCR 増幅を行った。PCR 反応条件は、既報に従って行い³⁾、PCR サイクルは 30 回で行った。その後、各 PCR 産物をクローン化し、それぞれのコンポスト製造過程の真正細菌群のクローンライブラリーとして、ランダムに 100 クローンを選択した。次に、BstUI および HhaI によって制限酵素処理を行い、両方の制限酵素処理において同一の電気泳動パターンを示す 16S rRNA 遺伝子クローンを同一の phylotype として解

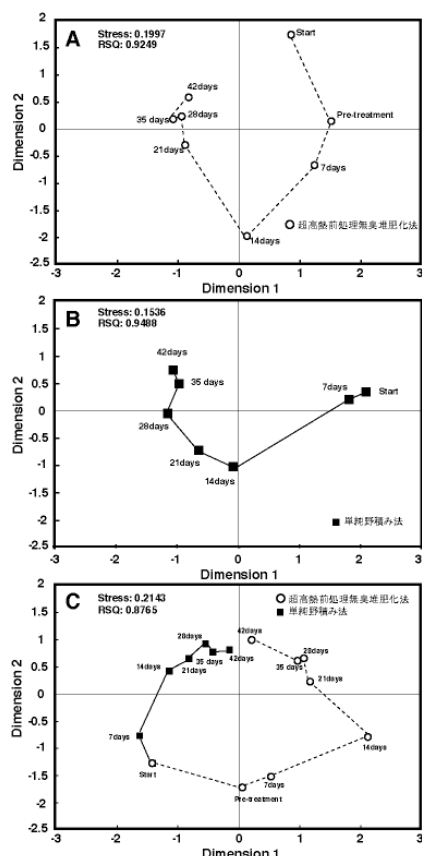


Fig. 1 各コンポスト製造過程における真正細菌群集の多次元尺度法による非相類似度解析。A: 超高温前処理無臭堆肥化過程、B: 単純野積み過程、C: 超高温前処理無臭堆肥化および単純野積み過程の比較解析

析した。得られた 16S rRNA 遺伝子クローンの塩基配列は、DNA シーケンサーによって決定し、その配列を用いて ARB プログラム⁶⁾による系統解析を行った。

3. 実験結果と考察

3.1 各コンポスト製造過程における T-RFLP 法を用いた真正細菌群集構造の動態解析

各コンポスト製造過程におけるコンポストサンプルを 7 日毎に採取し、T-RFLP 法によって各サンプル中に存在する真正細菌群の網羅的解析を試みた。その結果、同一の原材料を用いたにも拘わらず、超高温前処理を行うことで、コンポスト開始から得られる T-RF 断片のパターンが全く違って来る事が観察された。

3.2 多次元尺度法による真正細菌群集構造の非相類似度解析

上記で明らかになった T-RF 断片パターンの違いを統計学的に評価するために、42 日間にわたる各コンポスト過程および相互のコンポスト製造過程間における真正細菌群の違いを統計学的に解析した。その結果、各コンポスト製造法ともコンポスト化が進むにつれて、真正細菌群集が遷移していくことが統計学的に評価された。(Fig. 1-A および B) 次に、超高温前処理無臭堆肥化法および単純野積み法によるコンポスト化過程に関わる真正細菌群集の違いを同様に評価したところ、各コンポスト製造法において関与する真正細菌群集が全く異なっていることが示唆された。(Fig. 1-C) しかしながら、コンポスト過程の終期 (42 日目)

には、それぞれの方法でコンポスト化処理を行っても最終的には類似した真正細菌群集に近づく事が評価された。

(Fig. 1-C)

3.3 各コンポスト製造過程における 16S rRNA 遺伝子クローンライブラリー法を用いた優占真正細菌種の特定

さらに本研究では、各コンポスト化過程 (7, 21, 42 日間) から得たサンプル内の主要な真正細菌群集の構造を明らかにするために、16S rRNA 遺伝子を標的としたクローンライブラリー法を適用した。その結果、超高温前処理無臭堆肥化法を適用した場合、超高温前処理直後の 7 日目において、真正細菌全体に占める *Bacillus* 属細菌の割合が高くなるのに対し、単純野積み法では *Clostridium* 属細菌に比較的近縁な未培養系統群に属する細菌種が多数を占める事が明らかになった。以前の研究において、*Bacillus* 属細菌とリグノセルロースを分解する *Trichoderma* や白色腐朽菌などの真菌を混合し、堆肥化前の下水汚泥由来の有機固形性廃棄物に直接添加したところ、コンポストの腐植化が促進されたという報告がなされている⁷⁾。我々の以前の研究では、超高温前処理を行ったコンポスト化過程における真菌由来の存在率が高くなる事が明らかになっており^{3), 4)}、この事実と本研究で明らかとなった *Bacillus* 属細菌の優占化とは、超高温前処理無臭堆肥化法による腐植化の促進と密接な関係があることが示唆された。また、単純野積み法を適用したコンポスト製造過程では、週に一度の切り返しのみでは、堆積山に好気的環境を構築する事ができず、偏性嫌気性細菌である *Clostridium* 属細菌に近縁な細菌種が繁殖することになったものと考えられる。一方、超高温前処理を行うと原材料中の水分を調節する (減らす) 事もできるため、週に一度程度の切り返しであっても堆積山の環境が比較的好気的に保たれ、超高温処理で生き延びた芽胞形成能を持つ *Bacillus* 属細菌などの好気性細菌が優占的に繁殖したものと考えられる。超高温前処理無臭堆肥化法による畜産廃棄物のコンポスト化は、コンポスト化過程におけるアンモニアの揮散を抑止するだけでなく、少ない切り返し作業で堆積山に好気的な環境を容易に構築し、超高温処理によって選別された真正細菌群の種や真菌との相互作用によって、コンポストの腐植化を促進できる方法である事が、本研究における分子生物学的手法および統計学的手法を用いた解析から明らかになった。

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「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) Buijsman et. al. (1987) *Atmos Environ.* **21**, p1009-1022
- 2) Schulze et. al. (1989) *J. Agromed.* **7**, p7-81.
- 3) Yamada et. al. (2007) *J. Biosci. Bioeng.* **104**, p.408-415.
- 4) Yamada et. al. (2007) *J. Environ. Biotech.* **7**, p.111-117
- 5) Egert et. al. (2003) *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, p.2555-2562
- 6) Ludwig et. al. (2004) *Nucleic Acids Res.* **32**, p.1363-1371
- 7) Wei et. al. (2007) *Chemosphere* **68**, p.368-374