

# 畜産廃棄物のコンポスト製造過程に関与する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 ○岡大地、東北学院大学大学院 工学研究科 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、東北学院大学 工学部 非会員 大坪 和香子  
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<sup>1)</sup>。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、生物学的な硝化反応(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、硝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性固形廃棄物のコンポスト化技術は、持続的な農業生産活動やバイオエタノール原料などのエネルギー資源の生産活動に資する環境バイオテクノロジーとして、今後重要度が増すと考えられる。それと同時に、地球温暖化の防止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室効果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、硝化反応および脱窒反応に関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、(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硝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  $\beta$ -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) 亜硝酸酸化細菌の 16S rRNA 遺伝子をターゲットとした PCR による同細菌群の同定をおこない、コンポスト製造過程に出現する硝化細菌群の分子系統学的な同定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、豚糞 (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 (9 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、CN 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<sup>2)</sup> 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、 $\beta$ -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 亜硝酸酸化細菌の検出

亜硝酸酸化細菌の検出のために、亜硝酸酸化酵素遺伝子 *nirB*、*Nitrobacter* 属および *Nitrospira* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的としたプライマーセットを用いた PCR 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、pH は概ね pH 9.0 付近を推移した。はじめ、原材料中には約 4500 mg-N/kg-dry compost の高濃度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)。

コンポスト 微生物 硝化反応

連絡先 遠藤銀朗 (宮城県多賀城市中央 1-13-1) 022(368)7493

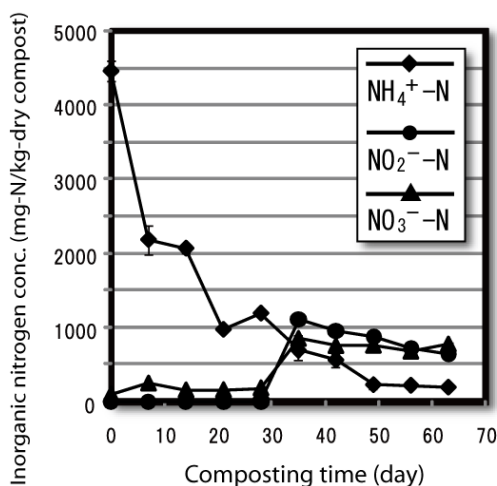


Fig. 1 コンポスト製造過程におけるアンモニア性窒素、亜硝酸性窒素および硝酸性窒素の変化

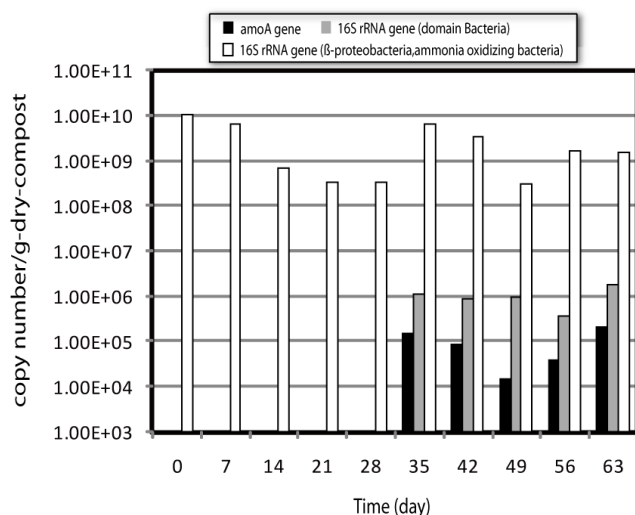


Fig. 2 コンポスト製造過程における真正細菌 (16S rRNA 遺伝子) およびアンモニア酸化細菌 (*amoA* 遺伝子) および  $\beta$ -proteobacteria 16S rRNA 遺伝子の定量的リアルタイムPCR解析結果

この観察結果は、本コンポストの製造過程において硝化細菌によるアンモニア酸化(亜硝酸生成)および亜硝酸酸化(硝酸生成)が起きていることを示していると考えられる。

### 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 5 週目以降において、*amoA* 遺伝子および  $\beta$ -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  $2.21 \times 10^{-5} \sim 1.38 \times 10^{-4} \%$  を推移しており、 $\beta$ -proteobacteria に属するアンモニア酸化細菌由来 16S rRNA 遺伝子の約 1/10 のコピー数であった (Fig. 2)。

### 3.3 亜硝酸酸化細菌の同定

上記のコンポストサンプルから抽出した DNA を用いて亜硝酸酸化酵素遺伝子 *nrxB* を標的とした PCR を行った。しかし目的とする DNA 産物の増幅は確認されなかった。そこで亜硝酸酸化細菌の 16S rRNA を標的とした PCR を行うことにした。亜硝酸酸化細菌として知られている *Nitrobacter* 属および *Nitrospira* 属の各 16S rRNA 遺伝子を標的としたプライマーセットを用いて PCR を行った。その結果、*Nitrobacter* 属を標的とした場合にのみ目的のサイズのバンドが得られた。また、このバンドは硝酸、亜硝酸が観察されたサンプルからのみ観察された。このことから本コンポスト化過程において亜硝酸酸化反応を担っているのは、*Nitrobacter* 属細菌であることが強く示唆された。

### 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、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ことにした。また、亜硝酸酸化細菌(*Nitrobacter* 属)の動態をリアルタイムPCRを用いて解析するとともに、クローン解析によって亜硝酸酸化細菌の同定を進めていく予定である。

### 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