

コンポスト製造過程における窒素化合物の酸化とそれに関与する遺伝子群に関する研究

東北学院大学 工学部 学生会員 ○奥山徹、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 大坪和香子、(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. 序論

昨今の地球温暖化の進行により、海水の膨張や氷河などの融解による海面上昇、気候メカニズムの変化による異常気象の頻発、自然生態系や生活環境、農業への影響などが懸念されている。畜産廃棄物や都市廃棄物のコンポスト化技術は、資源循環による環境負荷を減らすだけでなく、食料やバイオエタノールなどの原料となる農作物の生産に利用することができる。コンポスト化技術は利点の多い技術である一方で、コンポスト化過程で窒素化合物の変換によって二酸化炭素の310倍の温室効果をもつ亜酸化窒素(N_2O)が発生することが問題となっている。有機性廃棄物のコンポスト化は今後益々重要度になると思われるが、本技術の持続的使用のためには、 N_2O の発生抑止機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。そのためには、コンポスト製造過程で起こる窒素化合物の硝化反応や脱窒反応に関与する微生物の動態や N_2O 発生のメカニズムを明らかにすることが重要である。

本研究では、 N_2O 発生にかかわるコンポスト製造過程における無機窒素化合物の変化を調査するとともに、アンモニア酸化酵素遺伝子 *amoA* を標的とした定量リアルタイムPCR法によりアンモニア酸化細菌群の同定と動態解析を行った。また、クローンライブラリー法による多様性解析を行った。

2. 実験方法

2.1 コンポスト化過程における物理化学的变化

本研究では、一次発酵として超高温型攪拌反応槽内で100℃の高温状態で攪拌処理(リボン処理)した後、野積み法により二次発酵したもの(コンポ

ストR)と、単純野積みにより発酵したもの(コンポストW)を継続的(週一度)に採取し、含水率、pH、無機窒素化合物(アンモニア態窒素、硝酸態窒素、亜硝酸態窒素)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

上記で使用したコンポストサンプルから、FastDNA Spin Kit for Soil (Q-Biogene)を用いてDNAを抽出した。対象としているアンモニア酸化細菌を解析するために、これらの細菌が有する *amoA* 遺伝子の特異的に検出することが可能なプライマー *amoA1F* および *amoA1R* を用いて定量リアルタイムPCR解析を行い、コンポスト中の *amoA* 遺伝子の存在量を測定した。

2.3 コンポスト製造過程におけるアンモニア酸化細菌群由来の *amoA* 遺伝子のクローニングと塩基配列決定

2.2の定量PCRによって増幅され *amoA* 遺伝子断片を用い、コンポストRおよびWのコンポスト化開始後1、7、13週目のサンプルについて1種類ずつクローニングした。各8個のクローンをランダムに選択し、DNA断片の塩基配列を決定した。得られた塩基配列を既知の *amoA* 遺伝子配列とアライメントし、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物理化学的变化

無機窒素化合物を調査した結果をFig. 1に示す。アンモニウム態窒素は、コンポスト化が進むにつれ物理的に揮散後、硝化反応により酸化されていることが推測された。一方で、硝酸態窒素がコンポスト

亜酸化窒素、畜産廃棄物

TEL:022-368-7493 FAX:022-368-7070

Rではコンポスト化過程中期から、コンポストWではコンポスト化初期から徐々に蓄積されていることが分かった。

このような物理化学的変化は、アンモニアを亜硝酸や硝酸に酸化する硝化細菌が増幅する過程存在することを示している。コンポストRにおいては、コンポスト化中期に亜硝酸の蓄積が見られ、これによる N_2O の発生が懸念された。

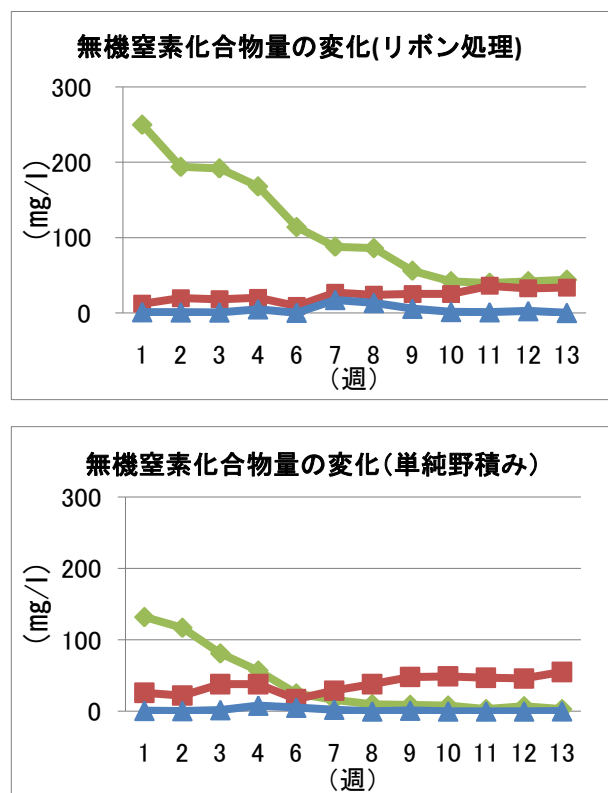


Fig.1 コンポスト化過程における無機窒素化合物量の変化

- 硝酸態窒素
- ◆ アンモニア態窒素
- ▲ 亜硝酸態窒素

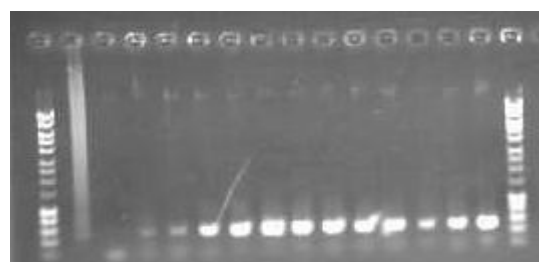
3.2 コンポスト製造過程におけるアンモニア酸化細菌の動態

amoA 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR 解析を行った結果、上記で測定した全てのコンポストサンプルにおいて *amoA* 遺伝子の PCR 増幅が確認され、その存在量はコンポスト化後期にかけて増加していた (Fig. 2, 2-a, 2-b)。これは、コンポスト化初期から存在しているアンモニア酸化細菌がコンポストの成熟に伴って増加していたことを示している。

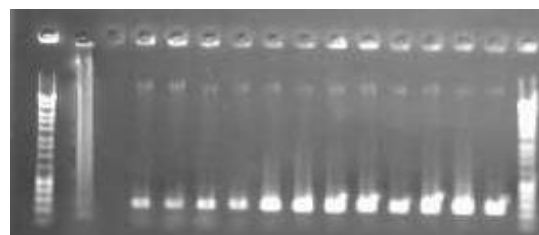
菌がコンポストの成熟に伴って増加していたことを示している。

3.4 コンポスト製造過程におけるアンモニア酸化細菌群由来の *amoA* 遺伝子のクローニングと塩基配列決定

クローニングおよび塩基配列決定を行った *amoA* 遺伝子系統解析を行った結果、単純野積み法サンプル1週目と13週目の *amoA* は β -プロテオバクテリアの *Nitrosomonas* 群に近縁な3つの単純系統群に分布していることが明らかになった。



2-a リボン処理サンプル



2-b 単純野積み法サンプル

Fig. 2 PCRによって増幅した *amoA* 遺伝子の電気泳動結果(右より 1kb Ladder, Positive control, Negative control, 1週目から13週目まで週一度採取したコンポスト(5週目除く), 1kb Ladderの順)

4.まとめ 本研究では、異なる製造法で作製した2種のコンポストサンプルについて、その物理化学的特徴を明らかにすると共に、無機窒素化合物量変化に伴うアンモニア酸化細菌の動態変化を明らかにした。また、得られた *amoA* 遺伝子配列の全てが3つの単純系統群に収束したという結果は、コンポスト中のアンモニア酸化細菌の多様性は比較的低いことを示唆している。

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。