

コンポスト製造過程における N₂O 発生機構の解明 その生物学的抑制技術の開発の研究

東北学院大学 工学部 学生会員 ○増子響 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 学生会員 進藤絵里香 日本ライフセンター 非会員 上田裕一
日本ライフセンター 非会員 上田英代 東北学院大学 工学部 フェロー会員 遠藤銀朗

1. 序論

コンポスト化技術は、生ごみや家畜糞尿を窒素バイオマス資源(有機肥料)として再利用することにより、化学肥料による土壌汚染の拡大を防ぎ、循環型および環境保全型社会に貢献する技術として注目されている。しかし、窒素成分を多く含む畜産廃棄物などを材料としたコンポスト化過程では、温室効果ガスである亜酸化窒素(N₂O)が発生することが問題視されている。今後、環境を保全しつつ農作物を持続的に生産するためには、N₂Oの発生抑制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。本研究は、この基盤形成として、コンポスト製造過程で起こるN₂O発生に関与する微生物の動態を明らかにすることを目的とし、脱窒細菌の保有するN₂O還元酵素遺伝子*nosZ*に着目し、解析を行った。本講演では、コンポスト中の無機窒素化合物変換とそれに伴う*nosZ*の存在量および多様性の変化について発表する。

2. 実験方法

2.1 コンポストの物理化学的性状の解析

本研究では、養豚場からの豚糞尿処理の際に発生する廃棄物を原料とし、単純野積みによるコンポスト製造(単純野積み法)と、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)した後に野積み法によりコンポスト製造(リボン処理法)を行い、コンポスト化週数0〜9週目に採取したサンプルについて、pH、含水率、無機窒素化合物(アンモニウム態窒素、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素)量を測定し、各コンポストの物理化学的性状の比較検討を行った。

2.2 定量的リアルタイムPCR法を用いたN₂O還元酵素遺伝子*nosZ*の定量解析

コンポスト化開始後0〜9週目の各サンプルからDNAを抽出し、このDNAを鋳型として脱窒細菌*nosZ*遺伝子を標的とした定量的リアルタイムPCR法を行った。DNA1 μgあたりの*nosZ*のコピー数を算出し、各試料中に存在したN₂O還元酵素を保有する脱窒細菌の存在量について比較考察した。

2.3 N₂O還元酵素遺伝子*nosZ*の塩基配列の決定および系統解析

コンポスト化開始後0週目(コンポスト化初期)、5週目(中期)、9週目(後期)のサンプルから抽出したDNAについて、*nosZ*遺伝子をPCR法にて増幅し、増幅したDNA断片をそれぞれクローニングした。各クローンライブラリーからランダムに選択した20クローンについて、塩基配列を解読(シーケンス)を行い、得られた塩基配列情報をデータベースと照合し、それぞれの*nosZ*塩基配列に最も相同性の高い*nosZ*既知配列を特定した。既知配列の由来する微生物種および本研究で得られた*nosZ*配列の系統学的な近縁関係を系統樹により確認し、クローンライブラリー中の各配列の存在比から、優勢的に存在する微生物種を推定した。

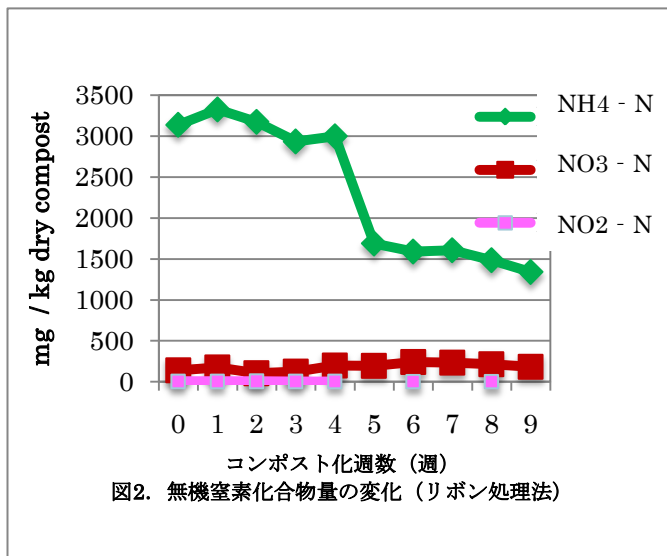
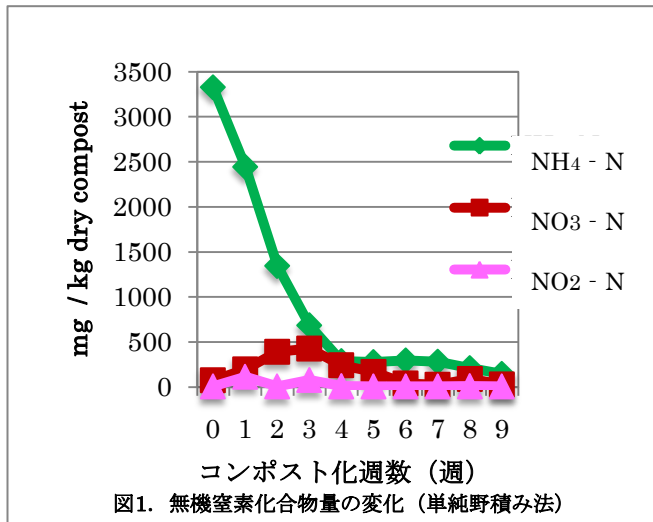
3. 実験結果

3.1 コンポストの物理化学的性状の解析

単純野積み法およびリボン処理法の両サンプルにおいて、コンポスト化開始後に、アンモニウム態窒素の急速な増加が見られた(図1、2)。これは、物理化学的揮散の他に、微生物による硝化(アンモニア酸化)によるものと考えられる。単純野積み法に関しては、亜硝酸態窒素と硝酸態窒素の蓄積が見られたことから、亜硝酸や硝酸を還元する脱窒細菌の活動が遅れて起こっていたことが示唆された。

キーワード：コンポスト 微生物 N₂O

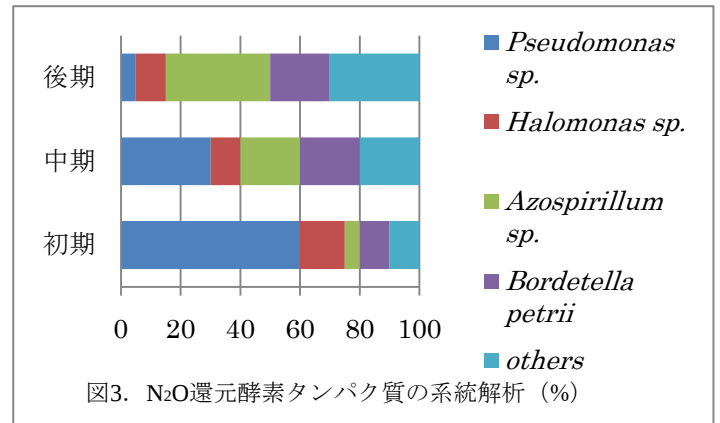
連絡先 東北学院大学工学部 宮城県多賀城市中央1-13-1 TEL：022-368-7445



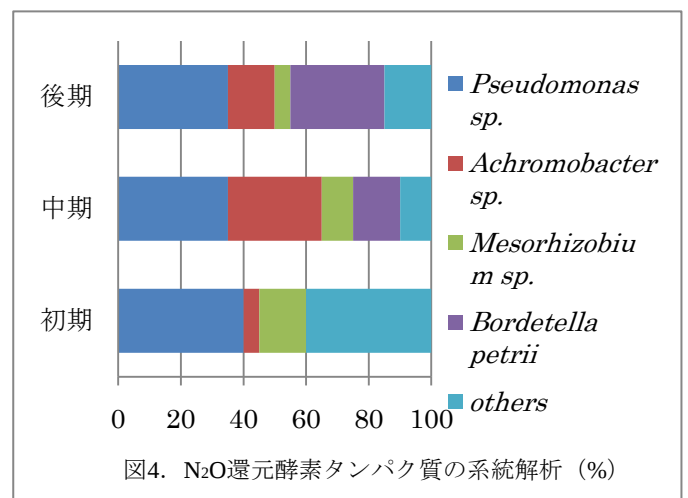
3. 2 N₂O還元酵素遺伝子 *nosZ* の塩基配列の決定および系統解析

コンポスト化開始後0週目（コンポスト化初期）、5週目（中期）、9週目（後期）の試料中に存在するN₂O還元酵素遺伝子 *nosZ* の存在比を図3および4に示す。単純野積み法およびリボン処理法の両サンプルにおいて、各細菌種の存在比がコンポスト化の進行に伴い大きく変化していた。また、両サンプルにおいて *Bordetella petrii* に近縁な脱窒細菌種が優勢的に存在していることが分かった。コンポスト化製造過程の後期において、N₂Oの還元除去が起こることが過去の実験データにより分かっているため、この細菌群がN₂Oの還元除去に関与している可能性があるとして唆された。

・単純野積み法



・リボン処理法



4. まとめ

本研究では、豚糞処理廃棄物を原料としたコンポスト製造過程において、主にN₂O還元除去に関与していると考えられるN₂O還元酵素遺伝子 *nosZ* を保有する脱窒細菌の存在量の変化および多様性の変化を明らかにした。特に、異なるコンポスト化手法やコンポスト化週数の違いが、*nosZ* の存在比や多様性に影響を与えることを明らかにした。

5. 謝辞

本研究では、「文部科学省、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」の助成を受けて行われたことを記し、感謝の意を表し、謝辞とする。