

低臭気堆肥微生物の DNA 解析

Biochemical Analysis of the Bacteria in a Compost

松本幸次^{1*}、朝井 計²
Kouji Matsumoto^{1*}, Kei Asai²

^{1,2} 埼玉大学 理学部分子生物学科

Department of Molecular Biology, Saitama University

Abstract

As composting organisms are believed to be facultative, we examined whether or not they show anaerobic nitrate respiration. Both RT PCR and FISH examination of the *narG* expression gave no strong signal of the *narG* expression in the bacteria of a compost, which seemed to show denitrification.

Key Words: Compost, Bacteria, Gene expression

1. 目的

本研究は畜糞堆肥の臭気を低減する研究プロジェクト「無臭堆肥製造と販売のエコシステムの開発」（関東経済産業局・平成21年度戦略的基盤技術高度化支援事業）研究代表者・定家義人（埼玉大学名誉教授）のうち、堆肥微生物の DNA 解析を行い臭気低減化のプロセスを解析することを目的とした。

2. 背景

家畜糞を曝気処理すると無臭の上澄液が得られる。この液を畜糞堆肥化工程に散布すると、臭気の削減が図れる。堆肥微生物の呼吸は酸素

呼吸が主体と考えられているが、硝酸呼吸が誘導されることが臭気削減につながると想定して研究が進められている。

堆肥材に、NO₃ が生成した上澄液を散布すると、対照に比べ、わずかながら NO₂, NO が多く検出され、NO₃ がより減少するので脱窒過程（NO₃ ⇒ NO₂ ⇒ NO ⇒ N₂O ⇒ N₂）が促進されていると考えられたので、このサンプルに関して解析を行った。

3. 結果

サンプルから DNA, RNA を抽出し、脱窒の第一反応を触媒する硝酸還元酵素遺伝子の転写量を *narG* のプライマー[1]を用いた RT PCR で、16S rDNA を対照に測定した。上澄液を散布したサンプルでは転写量が増大していたが、全ての mRNA を cDNA に変換した、精度の高い RT

* 〒338-8570 さいたま市桜区下大久保255
電話：048-858-3406 FAX：048-858-3384
Email：koumatsu@molbiol.saitama-u.ac.jp

PCR ではその差がなくなったので、あったとしても差は小さいものと思われる。

narG mRNA に相補的な蛍光プローブ RNA [2] を使った FISH 実験では優位な差は無かった。今回用いた堆肥サンプルでは、活発に遺伝子発現を示す活性のある汚泥バクテリアが得られなかったためかもしれない。

上澄液には硝酸イオン値が蓄積する。このプロセスは、硝化菌（アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌）によるアンモニアの酸化が必要であるが、硝化菌の多寡を硝化菌表面抗原に対する抗体による凝集反応で判定し、硝酸イオンの蓄積するサンプルでは硝酸菌が出現することを確認した。また、硝酸値は硝酸テストの呈色反応を併用した。

牛糞と鶏糞の曝気処理によって菌相の変化 [3] をリボソーム遺伝子（16S-23S 境界領域）のクローニング・塩基配列比較で行った。クローニングが思いのほか困難であったが、乳牛糞では曝気に伴ってアルファ・プロテオバクテリアが増加した。本プロジェクト以前に行われた乳牛糞処理では主力菌の Firmicutes 門 クロストリデュウムがベータ・プロテオバクテリアに変化した、そのようなことは起きなかった。一方鶏糞の場合は出発の主力菌は Firmicutes 門 ラクトバシラスであったが、曝気に伴って消失し、目立った主力菌の出現は無かった。

4. 結論と展望

脱窒反応を起こしていると思われる堆肥化中のバクテリア集団から核酸を抽出して、脱窒反応の第一過程を触媒する酵素 NarG 遺伝子の転写量を測定した。RT PCR と FISH 法による測定では強いシグナルが検出できなかった。京都大学の KEGG に収録されている、ゲノムの分かっていた 900 程度のバクテリアのうち narG を持っているものが 50% あるが、病原微生物が主なので、環境微生物全体ではこの割合が分からない。より活性のある堆肥バクテリアからの核酸の抽出と統計処理の必要な多数のデータの蓄積が必要かもしれ

ない。

参考文献

- [1] L. Philippot, S. Piutti, F. Martin-Laurent, S. Hallet, and J. C. Germon: Molecular Analysis of the Nitrate-Reducing Community from Unplanted and Maize-Planted Soils, *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, pp. 6121-6128 (2002).
- [2] A. Pernthaler, and R. Amann: Simultaneous Fluorescence in situ Hybridization of mRNA and rRNA in Environmental Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, pp. 5426-5433 (2004).
- [3] T. Sadaie, A. Sadaie, M. Takada, K. Hamano, J. Ohnishi, N. Ohta, K. Matsumoto, and Y. Sadaie: Reduction of Sludge Production and Domination of Family *Comamonadaceae* by Reducing Oxygen Supply in the Wastewater Treatment Procedure of a Food-Processing Factory. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, pp. 791-799 (2007).