

高温処理コンポスト化プロセスにおける糸状菌の生態と遷移に関する研究

東北学院大学 工学部 学生会員 ○進藤絵里香、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. はじめに

生ゴミや家畜糞尿を窒素バイオマス資源として再利用するための技術の一つであるコンポスト化技術は、環境保全の観点から注目されている。しかし、その製造過程において温室効果ガスである亜酸化窒素 (N_2O) が発生することが問題視されている。

農耕地土壌や廃水処理プロセスからの N_2O の発生には、硝化・脱窒細菌が関与していることが知られているが、コンポスト製造過程における硝化・脱窒反応および N_2O 発生に関与する微生物の動態はほとんど解明されていない。 N_2O の排出抑制およびコンポスト化技術の有効利用のためには、これら微生物群の基礎的情報の収集が必要と考えられる。コンポストからの N_2O 発生に関与する可能性のある微生物群の一つとして、真核菌類 (主に糸状菌) が挙げられる。脱窒を行う糸状菌は一般的に N_2O 還元酵素をもたないため (祥雲、2006)、脱窒反応産物として N_2O を発生し、様々な環境中からの N_2O 発生の要因になっていると考えられている (Laughlin and Stevens 2002)。本研究では、コンポスト中に存在する糸状菌の動態を明らかにすることを目的とし、18S rRNA 遺伝子配列を基に、(1) 原材料の異なるコンポスト中に優勢的に存在する糸状菌を含む真核微生物の同定や (2) 数の変化、そしてコンポスト成熟に伴う (3) コンポスト中の真核微生物の多様性の解析を行った。

2. 実験方法

2.1 原料の異なるコンポストに優勢的に存在する糸状菌を含む真核微生物の同定

豚糞処理過程で発生する豚糞搾汁残渣および脱水余剰活性汚泥の混合物 (以下、豚糞処理廃棄物という) および生ゴミを材料としたコンポスト化では、高温期 (コンポスト化開始後 1, 2 週間) において真核微生物による層が形成される。これらの層の一部を各コンポストから採取し、FastDNA SPIN Kit for Soil (Qbiogene) を用いて DNA を抽出した。この DNA を鋳型として糸状菌の 18S rRNA 遺伝子配列に特異的なプライマーセット (un-ssu-0817(Fw), un-ssu-1196, 1536(Rv)) を用いて PCR を行い、増幅産物をク

ローニングし塩基配列の決定を行った。得られた配列について、NCBI の BLASTn 相同性検索を行い、最も近縁の糸状菌を含む真核微生物を明らかにした。

2.2 18S rRNA 遺伝子を標的とした定量的リアルタイム PCR 解析による糸状菌を含む真核微生物の存在量のモニタリング

豚糞処理廃棄物を原料とし、高温前処理を行った場合 (コンポスト R) と行わなかった場合 (コンポスト W) のコンポスト化過程 (コンポスト化開始後 1~13 週間) における糸状菌を含む真核微生物の存在量の変化を、18S rRNA 遺伝子を標的とした定量的リアルタイム PCR 解析によりモニタリングした。コンポスト化開始後 1 週間ごとに切り返しを行い、切り返し直後の堆積山から採取した各試料から FastDNA SPIN Kit for Soil (Qbiogene) を用いて DNA を抽出した。各コンポスト DNA を等量に希釈し、糸状菌の 18S rRNA 遺伝子配列に特異的なプライマーセット (un-ssu-0817, un-ssu-1196) を用いて、リアルタイム PCR 解析を行った。得られた増幅曲線および検量線から、1 μg のコンポスト DNA あたりの 18S rRNA 遺伝子のコピー数を算出した。

2.3 T-RFLP およびクローンライブラリー構築による糸状菌を含む真核微生物の多様性解析

2.2 で使用したコンポスト DNA およびプライマーセットを用い、蛍光色素 (FAM) で標識された 18S rRNA 遺伝子断片を PCR により増幅した。増幅産物を精製し、制限酵素 (AluI) で切断した生成物を Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて T-RFLP 解析を行った。得られたパターンから、各コンポスト試料中に存在する糸状菌の多様性を推定した。また、コンポスト化開始後 1, 7, 13 週目のコンポスト試料から抽出した DNA について、2.1 と同様に 18S rRNA 遺伝子のクローニングを行い、制限酵素 (AluI) の切断パターン (PCR-RFLP パターン) を基に分類し、分類ごとの代表クローンの塩基配列を決定した。

3. 実験結果と考察

3.1 原料の異なるコンポストに優勢的に存在する糸状菌を含む真核微生物の同定

塩基配列決定の結果、豚糞処理廃棄物を原料としたコンポストに出現する糸状菌を含む真核微生物は、Uncultured fungus に最も近縁 (61% identity) であることから、新規の系統群に属する糸状菌であることが示唆された。既知の真核微生物の中では *Chaetomium* sp. が最も近縁であるが、その identity は 44% と低いことが明らかになった。一方で、生ゴミを原料としたコンポストで層を形成した糸状菌を含む真核微生物は、*Rhizomucor pusillus* であった (92% identity)。また、初期の豚糞処理廃棄物由来のコンポスト DNA には *Cryptosporidium struthionis* 等の原生動物が存在したが、最終的には糸状菌の *Chaetomium* sp. が優勢になることや、コンポストの原料が異なる場合には異なる種の糸状菌が優勢的に増殖することが明らかになった。これらの糸状菌の脱窒能については、脱窒関連酵素遺伝子の解析を今後行う予定である。

3.2 18S rRNA 遺伝子を標的とした定量的リアルタイム PCR 解析による糸状菌を含む真核微生物の存在量のモニタリング

Fig. 1, 2 にコンポスト R およびコンポスト W 中に存在する糸状菌を含む真核微生物の 18S rRNA 遺伝子のコピー数の変化を示した。両コンポストにおいて、コンポスト化開始後から安定して糸状菌が存在すること、その存在量はコンポスト化過程において常に変動していることから、糸状菌の群集構造が大きく変化していることが示唆された。

3.3 T-RFLP およびクローンライブラリー構築による糸状菌を含む真核微生物の多様性解析

各コンポストの T-RFLP ピークとして、豚糞処理廃棄物を原料としたコンポスト R の 1 週目では 4 本、7 週目では 8 本、13 週目では 16 本が、コンポスト W の 1 週目では 5 本、7 週目では 9 本、13 週目では 10 本が確認できたため、このピーク数に相当する種類の糸状菌を含む真核微生物が存在すると考えられ、コンポスト化が進むにつれて糸状菌を含む真核微生物の種類が増加することが示唆された。

コンポスト化開始後 1, 7, 13 週目のコンポスト R およびコンポスト W から抽出した DNA から構築した 18S rRNA 遺伝子のクローンライブラリーからランダムに選んだ 23 個のクローンについて、PCR-RFLP 解析を行った結果、2~4 種の切断パターンが確認された。各切断パターンを代表するクローンについて、18S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定したところ、Table 1 に示す糸状菌を含む真核微生物が存在することが知られた。

4. おわりに

本研究では、豚糞処理廃棄物や生ゴミを原料としたコンポスト化過程において糸状菌を含む真核微生物が多く出現すること、およびその多様性や遷移を明らかにすることがで

きた。今後の研究では、これらの糸状菌が実際に脱窒および N_2O 発生に関与しているかを明らかにしていく予定である。

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

祥雲弘文: 蛋白質 核酸 酵素, Vol.51, No.5, 419-429 (2006)
R. J. Laughlin and R. J. Stevens, Soil Science Society of America Journal, 66:1540-1548 (2002)

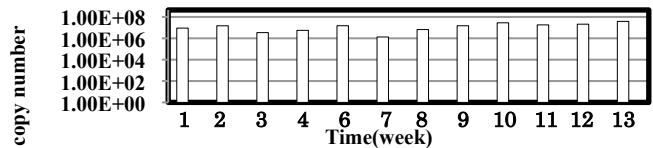


Fig. 1 コンポスト R 中に存在する 18S rRNA 遺伝子のコピー数の変化

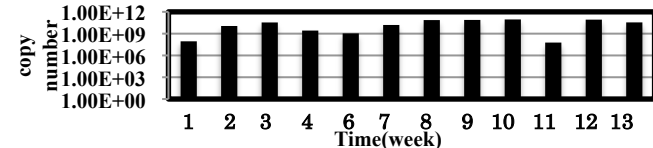


Fig. 2 コンポスト W 中に存在する 18S rRNA 遺伝子のコピー数の変化

Table 1 コンポスト内の糸状菌の同定結果

生ゴミ由来のコンポストDNA			
Clone No.	最も相同性が高い生物名 (blastn)	Query coverage(%)	Max ident(%)
1(clone 5)	<i>Aspergillus terreus</i>	100	98
2(clone 2)	<i>Rhizomucor pusillus</i>	100	97
3(clone 2)	<i>Rhizomucor pusillus</i>	100	98
5(clone 3)	<i>Rhizomucor pusillus</i>	100	98
6(clone 3)	<i>Rhizomucor pusillus</i>	100	98
7(clone 6)	<i>Rhizomucor pusillus</i>	100	100
14(clone 7)	<i>Rhizomucor pusillus</i>	100	99
29(clone 1)	<i>Rhizomucor pusillus</i>	100	97
30(clone 1)	<i>Rhizomucor pusillus</i>	100	99
31(clone 4)	<i>Rhizomucor pusillus</i>	97	99
32(clone 1)	<i>Rhizomucor pusillus</i>	90	99
33(clone 4)	<i>Rhizomucor pusillus</i>	96	99
豚糞処理廃棄物由来コンポストDNA(R)			
1週目-8(clone2)	<i>Cryptosporidium struthionis</i>	62	96
1週目-9(clone5)	<i>Cryptosporidium struthionis</i>	71	96
1週目-10(clone3)	<i>Saccobolus dilutellus</i>	62	98
1週目-12(clone3)	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	63	98
1週目-13(clone2)	<i>Penicillium roqueforti</i>	63	96
1週目-14(clone1)	<i>Cryptosporidium struthionis</i>	62	96
1週目-15(clone1)	<i>Ascomycota</i> sp.	65	100
7週目-4(clone3)	<i>Chaetomium</i> sp.	63	100
7週目-5(clone3)	<i>Chaetomium</i> sp.	63	100
13週目-2(clone5)	<i>Chaetomium</i> sp.	72	99
13週目-12(clone2)	<i>Chaetomium</i> sp.	71	100
13週目-14(clone2)	<i>Chaetomium</i> sp.	72	100
豚糞処理廃棄物由来コンポストDNA(W)			
1週目-9(clone 1)	<i>Cryptosporidium struthionis</i>	63	96
1週目-20(clone 3)	<i>Colpodella tetrahymenae</i>	63	94
7週目-18(clone 4)	<i>Colpodella tetrahymenae</i>	38	91
13週目-8(clone 3)	<i>Chaetomium</i> sp.	63	99
13週目-13(clone 2)	<i>Chaetomium</i> sp.	64	97
13週目-23(clone 1)	<i>Chaetomium</i> sp.	63	93