

B-11 ノニルフェノールを含む 下水汚泥コンポストにおける細菌群集構造の解析

○庄司 仁^{1*}・山下 洋正¹・尾崎 正明¹

¹独立行政法人土木研究所 材料地盤研究グループ (〒305-8516 茨城県つくば市南原 1-6)

*E-mail : shoji77@pwri.go.jp

1. はじめに

ノニルフェノール (NP) は、炭素数9のアルキル基側鎖を持つフェノール化合物の総称である。主にノニルフェノールポリエトキシレート (NPE) の原料として、幅広い用途に用いられてきた。最近では、生物毒性や内分泌攪乱作用の懸念される難分解性物質として、環境中での挙動に関心が高まっている。たとえば下水処理施設でのNPE について、汚泥に吸着されやすい、汚泥の嫌気性消化過程でNP まで分解される、などの知見がある。これらのことから、消化汚泥の再利用手法として重要な緑農地還元に際して、NP の残存が問題となる可能性もある。

そこで本研究では、NP を添加した消化汚泥のコンポスト化を行い、NP の消長について検討した。また、分解に関わる細菌の特定を目指して、16S rRNA 遺伝子および芳香族の分解に関わる機能遺伝子 (Catechol dioxygenase 遺伝子) の解析を行った。

2. 実験の方法

(1) 消化汚泥のコンポスト化

都市下水処理場から採取した消化汚泥、おがくず、種コンポストを、それぞれ 4:1:5 (質重比) の割合で混合して、円筒容器 (内径10cm, 高さ55cm) に詰めた。この装置を 35℃の恒温室に置き、活性炭を介した連続的な通気を行うことで、好気状態を保った。実験開始時および14日経過ごとに、分鎖NP 混合物 (SIGMA-ALDRICH)、直鎖NP (Wako) を表1のように添加するとともに、試料の採取およびコンポストの仕込み直しを行った。開始時

表-1 各条件のノニルフェノール添加量 [$\mu\text{g/gDS}$]

	無添加	低濃度	中濃度	高濃度
0日目 (分鎖NP)	0	100	500	1000
14日目 (直鎖NP)	0	75	375	750
28日目 (直鎖NP)	0	75	375	750

の種コンポストには、200 $\mu\text{g/gDS}$ の分鎖NP 混合物を加えて同様の条件で生産したコンポストを、14日目と28日目の種コンポストには、直鎖の生産物を用いた。

(2) ノニルフェノールの測定

日本下水道協会「下水道における内分泌攪乱物質調査マニュアル (案)」などを参照して、高速溶媒抽出とクリーンアップの後、高速液体クロマトグラフ Agilent 1100 (Agilent Technology) ータンデム型質量分析計 4000Q TRAP LC/MS/MS (Applied Biosystem) で測定した。

(3) 細菌群集構造の解析

分鎖NP (TMX と表記) の影響を見るために14日目の試料から、同じく直鎖NP (LNP と表記) の42日目、無添加 (NAD と表記) の42日目の試料から、Fast DNA Spin Kit for Soil (Qbiogene) でDNA を抽出した。MonoFas (GLサイエンス) で精製した後、Muyzer ら¹⁾に従って、16S rRNA 遺伝子のV3領域を標的とするPCR-DGGE法で解析した。また、Catechol 1,2-dioxygenase (C120) とCatechol 2,3-dioxygenase (C230) 遺伝子については、Sei ら²⁾に従ってPCR-Cloning法で解析した。

3. 結果

(1) ノニルフェノールの消長

図1に示した測定結果から、1000 $\mu\text{g/gDS}$ 程度までのNP ならば、分鎖型混合物・直鎖型ともに14日間ではほぼ分解されることが分かる。一般的な消化汚泥のNP 含有量は1000 $\mu\text{g/gDS}$ を大きく下回るので、コンポスト化によってNP を除去することは十分に実用的である。ただし、本研究では事前にNP で馴致した種コンポストを用いているので、突発的な混入や濃度上昇への対応能力は、別に検証する必要があるだろう。

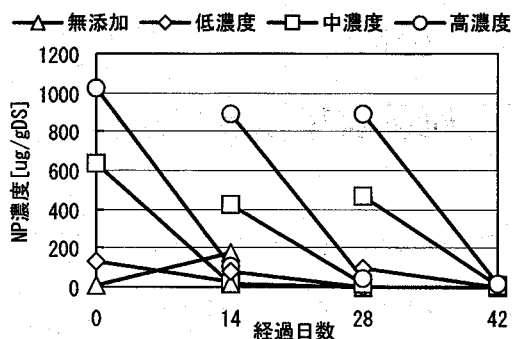


図-1 ノニルフェノール濃度の推移

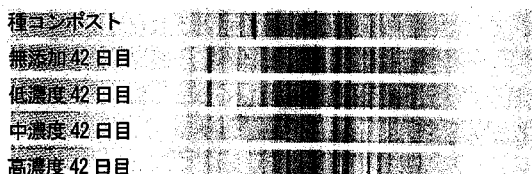


図-2 16S rRNA 遺伝子を標的とする PCR-DGGE 結果

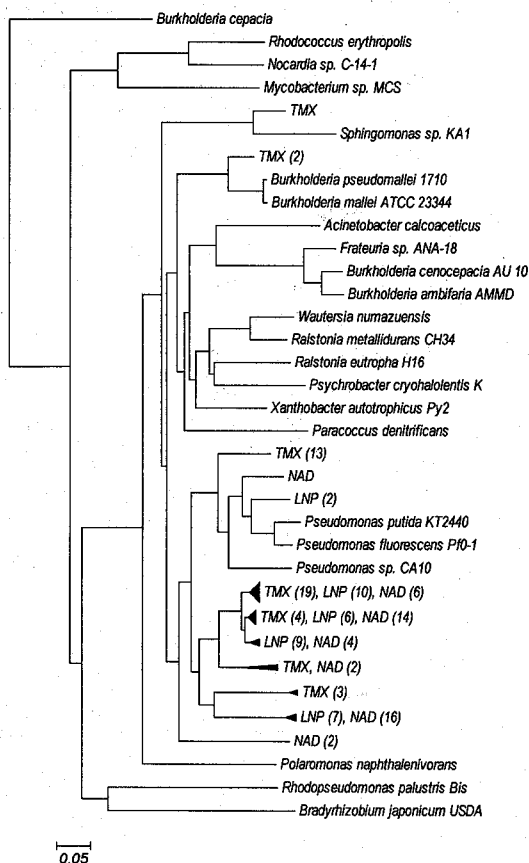


図-3 検出された C120 遺伝子の分類

Burkholderia cepacia の Chlorocatechol 1, 2-dioxygenase 遺伝子をアウトグループに使用。また、括弧内は検出数。

(2) 16S rRNA 遺伝子を標的とする解析結果

図 2 の DGGE プロファイルでは、NP 添加の履歴が異なる 42 日間の馴致を経ても、種コンポストからの変化、条件ごとの違いとも小さい。これは、NP の分解能力を持つ細菌が少ないために、細菌全体を対象とする 16S rRNA 遺伝子の解析が適さない可能性を示している。

(3) C120 および C230 遺伝子を標的とする解析結果

得られた C120 と C230 遺伝子の塩基配列は、アミノ酸配列に翻訳してから、EMBL の提供する Clustal W を用いて図 3 および図 4 の系統樹に整理した。なお、C120 のアミノ酸配列長は 94、同じく C230 は 125 程度である。

まず C120 遺伝子は、大部分が *Pseudomonas* 属の持つ遺伝子と近縁なクラスターに分類された。つまり、本実験で生産した下水汚泥コンポストにおいては、C120 遺伝子の多様性が高くなかった。NP の影響は、分鎖 NP を添加した TMX のみから 13 クローン (38%) 検出されたものが目立つ。逆に直鎖 NP と無添加からは、LNP の 7 クローン (15%) = NAD の 16 クローン (36%) のように、共通して検出されるものが多かった。特に前者のような挙動を示す遺伝子は、分鎖 NP を特異的に分解する細菌に由来する可能性が高く、注目に値する。

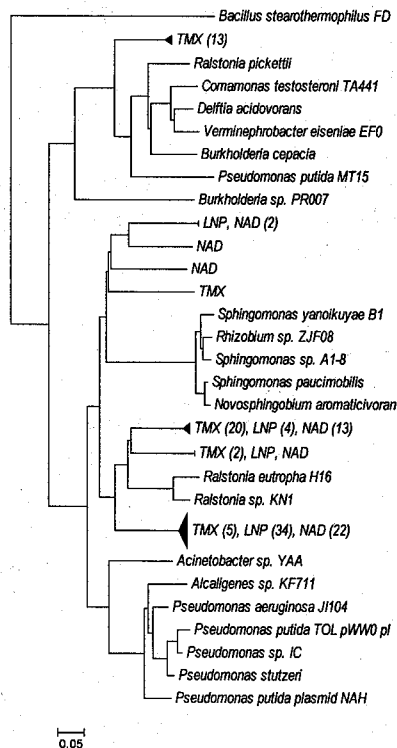


図-4 検出された C230 遺伝子の分類

Bacillus stearothermophilus の C230 遺伝子 (Subfamily I.2.E) をアウトグループに使用。また、括弧内は検出数。

次に C230 遺伝子は、大きく分けて 3 種類のクラスターに分類された。主に *Burkholderiales* の持つ Subfamily I.2.C に近縁なものが TMX から 13 クローン (32%)、同じく *Sphingomonas* 属の持つ Subfamily I.2.B にやや近縁なものが全条件から少しずつ検出されて、残りは一部の *Ralstonia* 属と近縁な位置にあった。NP の影響については、TMX に特異的な I.2.C 近縁配列の存在に加えて、*Ralstonia* 属に近縁な部分でも見られた。たとえば、TMX では 20 クローン (49%) ながら LNP では 4 クローン (10%) にすぎないもの、逆に LNP では 34 クローン (85%) ながら TMX では 5 クローン (12%) にすぎないものが存在するように、異なる内訳を示した。一方、無添加の NAD は LNP と近いクローンの構成となった。

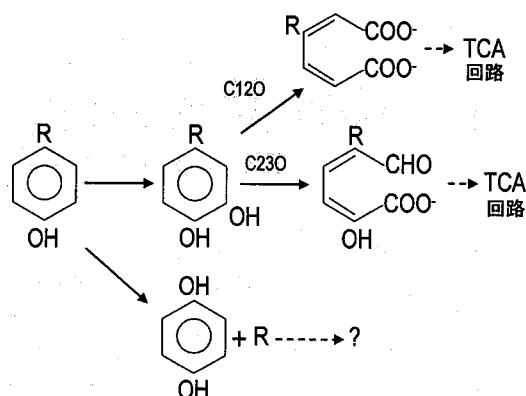


図-5 提唱されているノニルフェノールの分解経路

4. 考察と今後の課題

(1) ノニルフェノール分解能力をもつ細菌の推定

これまでに、アルキルフェノール類の分解能力を持つ細菌として *Pseudomonas* 属^{3,4)}や *Sphingomonas* 属⁵⁾が単離されている。特に NP に関しては後者の報告例が多いものの、本研究ではほとんど検出されなかった。そのかわり、分鎖の混合 NP が分解されたときに、*Pseudomonas* 属に近縁な C120、そして Subfamily I.2.C に近縁な C230、*Ralstonia* 属に近縁な C230 が高頻度で検出された。極めて特異的に検出されたことから、これらの機能遺伝子を持つ細菌は、分鎖型 NP の分解能力を持つ可能性が高い。その一方、16S rRNA 遺伝子に比べてデータベースが貧弱であること、プラスミドによる水平伝播があり得ることから、これらの細菌の系統分類に関しては課題もある。

直鎖 NP については、無添加条件との相違があいまいだったので、分解能力を持つ細菌の候補を挙げることは難しい。逆に言えば、分鎖 NP とは異なり、コンポストに常在する細菌が容易に分解できる可能性も考えられる。

(2) ノニルフェノールの分解経路と機能遺伝子

細菌による NP の好気的な分解は、アルキル鎖の酸化ではなく、ベンゼン環への水酸基付加から始まることが知られている (図 5 参照)^{4,5)}。しかし、水酸基の付く位置やその後の分解経路については、まだ未解明な点も多い。中間代謝物の存在時間が短いので、それらの測定から分解経路を推定することが難しいという問題もある。したがって、各反応に関わる機能遺伝子から、経路を推定する手法もあり得るだろう。たとえば C120 と C230 の量を比べることで、オルト開裂とメタ開裂のどちらが主要な経路であるのか、判別できるかもしれない。このような観点から、より定量的な機能遺伝子の評価を行っていくことが今後の課題である。

5. まとめ

- ・下水 (消化) 汚泥のコンポスト化に際して NP を添加したところ、1000 μ g/gDS 程度ならば、直鎖型・分鎖型とも 14 日間で大部分が分解された。
- ・16S rRNA 遺伝子を標的とする PCR-DGGE 法では、NP 分解と対応する群集構造の変化は検出されなかった。
- ・C120 遺伝子を標的とする PCR-Cloning 法では、分鎖 NP を添加したものから、*Pseudomonas* 属に近縁な特定のアミノ酸配列が高い比率で検出された。
- ・C230 遺伝子を標的とする PCR-Cloning 法では、分鎖 NP を添加したものから、Subfamily I.2.C と *Ralstonia* 属に近縁なアミノ酸配列が高い比率で検出された。これらの遺伝子は、前述の C120 遺伝子とともに、分鎖 NP の分解能力を持つ細菌に由来する可能性が高い。
- ・直鎖 NP を添加したものと無添加のものでは、類似した機能遺伝子が検出されたことから、直鎖 NP は、コンポストに常在する細菌が分解できる可能性もある。

参考文献

- 1) Muyzer G, Waal E.C. and Uitterlinden A.G., *Appl Environ Microbiol*, Vol.59, pp.695-700, 1993.
- 2) Sei K., Asano K., Tateishi N., Mori K., Ike M. and Fujita M., *J Biosci Bioeng*, Vol.88, pp542-550, 1999.
- 3) Soares A., Guieysse B., Delgado O. and Mattiasson B., *Biotechnol Let*, Vol.25, pp731-738, 2003.
- 4) Jeong J.J., Kim J.H., Kim C.K., Hwang I. and Lee K., *Micobiol*, Vol.149, pp3265-3277, 2003.
- 5) Corvini P.F.X., Hollender J., Ji R., Schumacher S., Prell J., Hommes G., Priefer U., Vinken R. and Schaffer A., *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol.70, pp114-122, 2006.