

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月14日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580338

研究課題名（和文） 豚ふん尿を基質として優占化する新規微生物の機能解析と制御

研究課題名（英文） Analysis and control of novel microorganism which grows dominantly in pig manure as a substrate

研究代表者

花島 大（HANAJIMA DAI）

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・酪農研究領域・主任研究員

研究者番号：20414708

研究成果の概要（和文）：異なる農場の豚ふん尿を用いて液状コンポスト化過程を行った場合、ふんの性状により処理過程で優占する細菌群の構成割合は異なるが、出現する *Bacillus* 属細菌は系統的に近似していた。ふん中に豊富に存在する有機物（基質）の1つである死菌体は、*Bacillus* 属細菌をはじめとしたコンポスト化過程の優占細菌群によって一次的には利用されず、主として *Acholeplasma* 属に近縁な細菌に資化されていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The composition of predominant bacterial species in aerated pig manure slurry depends on the properties of pig manure. However, the predominant bacterial 16S rRNA genes among genus *Bacillus* recovered from different farm samples were phylogenetically close to each other. Decayed bacterial cell, one of the rich substrate in manure, was actively incorporated by genus *Acholeplasma*. Incorporation by predominant bacterial species including genus *Bacillus* were not observed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：畜産学、応用微生物学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、畜産学・草地学

キーワード：豚ふん尿、液状コンポスト、バチルス、優占種

1. 研究開始当初の背景

家畜ふん尿の年間排出量は約8,700万トンと推計されており、国内で最も豊富な有機廃棄物となっている。また近年では家畜生産の集約化が進行しており、特に養豚ではその傾向が顕著である。ふん尿を還元できる飼料畑をもつ酪農経営とは異なり、輸入濃厚飼料に大部分を依存する養豚では、狭いエリアにふ

ん尿が蓄積する傾向にあり、ふん尿の処理・利用が大きな問題となっている。近年の環境規制の強化や有機資源リサイクル機運の上昇を勘案すると、従来の尿汚水の放流や有機肥料生産以外の、付加価値の高い何らかの生産物の開発が期待されている。

汚物感と強い臭気を除けば、ふん尿は炭素・窒素分に豊富な有機資源でもある。有機肥料以外のふん尿の活用法として、これまで

も豚ふん尿を基質に納豆のネバネバの主成分であるポリグルタミン酸を微生物に生産させる試みがなされているが、実際のふん尿中では接種した菌の増殖が悪い、またはポリグルタミン酸の生産にはふん尿以外の基質の添加を必要とするなどの問題があった。

豚ふん尿液状コンポスト化過程における化学成分の変化と、分子生態学的手法による微生物群集の推移の研究から、ふん尿中の有機物が著しく減少し、溶存酸素の消費が高い時期に、これまで単離されたことのない新規の *Bacillus* 属に近縁な細菌が優占することを明らかにされた。通常、環境浄化に用いられる生物処理には多様な微生物群が存在し、それらの協同作業によってプロセスが進行するが、この液状コンポスト化プロセスでは、微生物群集の約 50% が本菌によって優占されていた。本菌の機能解析、およびその制御は、従来の環境浄化処理の高度化は勿論、ふん尿からのバイオマス生産をはじめとした新たな産業の創出に貢献する可能性がある。

2. 研究の目的

Bacillus 属細菌は、食品や生物農薬をはじめとして古くから産業利用されているとともに、ゲノム解析が進んでいる菌であり、将来的な産業利用の基盤的な生物資源としても利用価値が高い。豚ふん尿の液状コンポスト化過程において分子生態学的手法によって初めてその存在が確認された、有機物分解が旺盛で、短期間で優占化する *Bacillus* 属細菌の利用は、従来のふん尿処理の高度化は勿論のこと、有害微生物の生物的な制御、そして未利用資源を用いた有用物質の生産に寄与すると考えられる。

本菌の存在はこれまで特定の農場のふん尿を用いた液状コンポスト過程で確認されているが、由来の異なるふん尿サンプルの処理過程においても普遍的に優占化するのか、またなぜ本菌がふん尿中で優占的に増殖できるのかは明らかでない。また本菌は、液状コンポスト中での高い菌数が予想される一方で、市販寒天培地による培養では分離されないことから、特殊な生育環境、もしくは栄養成分を要求する細菌と考えられる。そこで本研究では、これまで得られている細菌の系統分類の情報、生存環境条件などの情報を基にふん尿中で優占する菌の単離を進め、その形質・機能を明らかにするとともに、これら菌の動態に影響を与える環境要因を解析した上で、効果的な制御方法について検討を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 異なる事業所から採取した豚ふん尿の

曝気処理過程における優占細菌群の比較

①スラリーの調製

国内の地理的に離れた 4 箇所（北海道、茨城、岡山、熊本）の養豚事業所（それぞれ R, N, O および K 農場）から採取した豚ふんの乾物 1 に対して 14 の割合で滅菌蒸留水を添加し、0.5mm のメッシュで未消化の飼料片や家畜の体毛を除去後、尿の代替として尿素を 2g/L の割合で添加したものを供試スラリーとした。さらに 4 箇所の農場の豚ふんを乾物量として等量ずつ混合して基質および微生物群を均一化して同様の方法で調製したスラリーを作成した。

②曝気処理条件と分析項目

5L 容のジャーファーメンターにそれぞれ 3L のスラリーを充填し、40°C の温度条件下で 150 ml/min/3L の連続通気を 6 日間行った。経時的に採取したサンプルについて有機物分解の指標として、スラリーの COD および BOD を測定した。細菌群集の解析は、16S rRNA 遺伝子をターゲットとしたクローンライブラリー法によって実施した。

(2) 優占菌の単離

①寒天培地による分離

(1) の試験で実施した 4 箇所の養豚事業所から採取した豚ふんのうち、*Bacillus* 属細菌の優占化が最も顕著であった N 農場の豚ふんを再度試料として通気処理を行った。酸化還元電位をモニタリングし、酸素消費が著しい時期のサンプルから優占菌の単離を試みた。培地は 1) Nutrient Agar、2) 100mM 酢酸ナトリウム添加 Nutrient Agar、3) 豚ふん尿遠心上清スラリー培地の 3 種類を用いた。通気条件下のスラリーでは、連続通気ながらも溶存酸素の消費が早く、酸化還元電位の値は -300mV の還元的な値を示している。よって寒天培地の培養は好気培養以外にも、密閉容器に脱酸素剤を封入したアネロパック・微好気を用いた好気、微好気条件下での培養を行った。培養温度はコンポスト処理と同様の 40°C とし 24 時間、コロニーが認められない場合にはさらに 48 時間まで培養を行った。寒天培地については、上記培地の他に培地成分の貧栄養化を目的とした、有機物分解が進んだ通気処理終了時のスラリー上清を用いた低栄養遠心上清スラリー培地、および培地成分のオートクレーブを行わない濾過滅菌豚ふん尿スラリー培地も用いて単離を試みた。

②限外希釈法による分離

96 穴マイクロプレートのウェルに 200μL ずつ濾過滅菌豚ふん尿を分注し、スラリーをリン酸バッファにより $10^7 \sim 10^{12}$ 倍希釈した溶液を 20μL ずつ接種した。40°C で振盪培養を行い 24 時間後にスラリーを接種しなかったブランクに対して吸光度 (OD_{600}) が上昇したウェルから培養液を取り出して遠心、菌体ペレ

ットを作成してDNAの抽出を行った。抽出DNAについて16S rRNA 遺伝子をターゲットとした塩基配列の解析を行った。

(3) Stable Isotope Probing (SIP) 法による優占菌の基質利用に関する解析

優占菌がふん尿中のいかなる基質を利用して増殖しているかを明らかにするため、ふん中の主要な有機物(基質)である菌体に着目し、菌体を構成する炭素をすべて¹³Cとした大腸菌を作成、通気条件下にあるスラリーに添加しSIP法による菌体由来炭素の取り込みを行っている微生物群の探索を行った。

①¹³C 標識大腸菌の作成

¹²C-、または¹³C-グルコースを唯一の炭素源として培養した大腸菌を集菌し、リン酸バッファに懸濁した。この懸濁液を90℃・30分で熱処理し、大腸菌を失活させた。

②スラリーへの¹²C-または¹³C-ラベル大腸菌の添加

N農場の豚ふんを再度試料として用い、2台の5L容のジャーフェーマンターにそれぞれ3Lのスラリーを充填して連続通気を行い、有機物量が低下してくる通気開始後3日目に、¹²C-、または¹³C-標識された大腸菌死菌懸濁液を添加し、経時的にサンプルを採取した。

③RNA 抽出および超遠心分離

標識大腸菌添加6時間後のそれぞれのサンプルからRNAを抽出し、密度勾配遠心法によって¹³C-また¹²C-大腸菌体を取り込んだ微生物のRNAの分画を行った。各分画のRNAをテンプレートとして16S rRNA 遺伝子をターゲットとしたRT-PCRを行い、分画ごとの細菌群集のプロファイルをT-RFLP法により解析した。

4. 研究成果

(1) 異なる事業所から採取した豚ふん尿の曝気処理過程における優占細菌群の比較

①スラリーの性状とサンプルリング時期

4つの農場のうちO農場はすのこ豚舎、残りの3つは平床豚舎であり、R農場のみ敷料が使用されていた。細菌群集の比較は、最も有機物分解が活発な液状コンポスト化開始後3日目のサンプルを用いたが、BOD/COD比の高いO農場のふん尿のみ有機物分解の進行が著しく速かったため、開始後0.5日目のサンプルを用いた。

②各ふん尿サンプルにおける優占細菌群集の比較

有機物分解が活発な時期に得られた各サンプルの全クローンに対して40%以上の構成比を示した菌種は、*Bacillales* 目(主として*Bacillus* 属)、*Xanthomonadales* 目(主として*Ignatzschineria* 属)、または*Burkholderiales* 目(主として*Comamonas* 属)

であった(図1)。4種のふん尿を等量ずつ混合し、基質量と種菌量を平準化した豚ふん尿については*Bacillus* 属を中心とした群集が構成されたことから、本菌はコンポスト化過程での競合に強い生理学的特性を備えているものと考えられた(図1)。

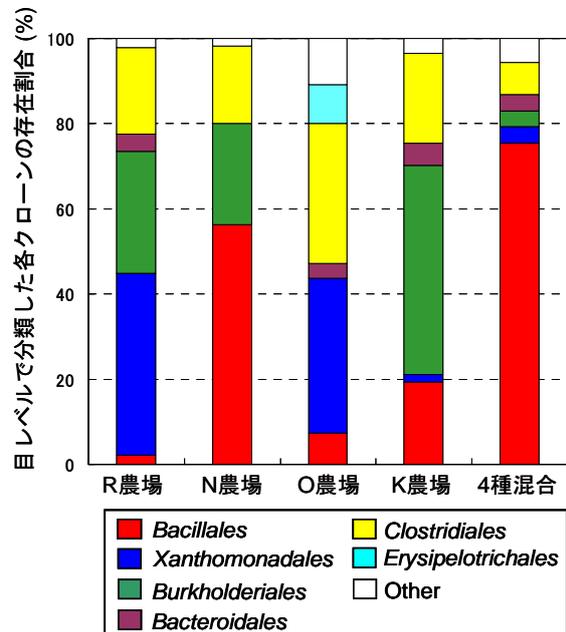


図1 有機物分解が活発な時期に採取した各ふん尿サンプルのクローンの存在割合

③優占的に認められたクローンの系統的分類

図2に各ふん尿サンプルの液状コンポスト化過程において優占的に認められたクローンの系統樹を示す。O-47(O農場)を除き、*Bacillales* 目、*Burkholderiales* 目、*Xanthomonadales* 目のいずれにおいても、農場の違いにかかわらず得られたクローン配列の相同性は高かった。*Ignatzschineria* 属、*Comamonas* 属のクローン配列はいずれもデータベース上の既存の単離株と相同性は高かったが(>99%)、*Bacillus* 属のクローン配列と既存の単離株との相同性は96%以下であったことから新規の細菌である可能性が高い。

(2) 優占菌の単離

①寒天培地による分離

豚ふん尿寒天培地は、Nutrient Agar 培地と比較してコロニー数も多く、コロニー形状からみた多様性も高い傾向にあった。コロニーが出現した最大希釈倍率のプレートから98コロニーを単離し、16S rRNA 遺伝子の配列に基づく分類を行ったが、微生物群集解析で優占が認められた*Bacillus* 属細菌と同一の配列を持つ単離菌は得られなかった。単離菌の大部分は*Burkholderiales* 目、

*Pseudomonadales*目および*Bacillales*目に属しており、うち*Bacillales*目細菌の配列は*Solibacillus silvestris*に相同性が高いものが多かった。

ふん尿成分を含む培地において高いコロニー数を得られたことから、再度N農場のサンプルを用いて低栄養遠心上清スラリー培地、および濾過滅菌豚ふん尿スラリー培地による分離を試みたが、単離菌の多くは*Burkholderiales*目、*Bacillales*目であり、うち*Bacillales*目では*Solibacillus*属、*Kurthia*属、*Caryophanon*属の細菌が大部分を占めたが、細菌群集解析で優占が認められた*Bacillus*属細菌と同一の配列を持つ単離菌は得られなかった。

②限外希釈法による分離

寒天培地による分離が困難であることから、液体培地を用いた限外希釈法による分離を試みた。ブランクに比べて濁度が上昇したウェルのうち、単一のシーケンスデータが得られたものについて16S rRNA遺伝子配列を解析したが、すべて*Burkholderiales*目*Comamonas*属に近縁な細菌であった。

目的とする*Bacillus*属細菌の単離には、今回試みた手法とは別のアプローチ、例えば芽胞形成能を利用した熱処理による細菌群の絞り込みが有効かもしれない。

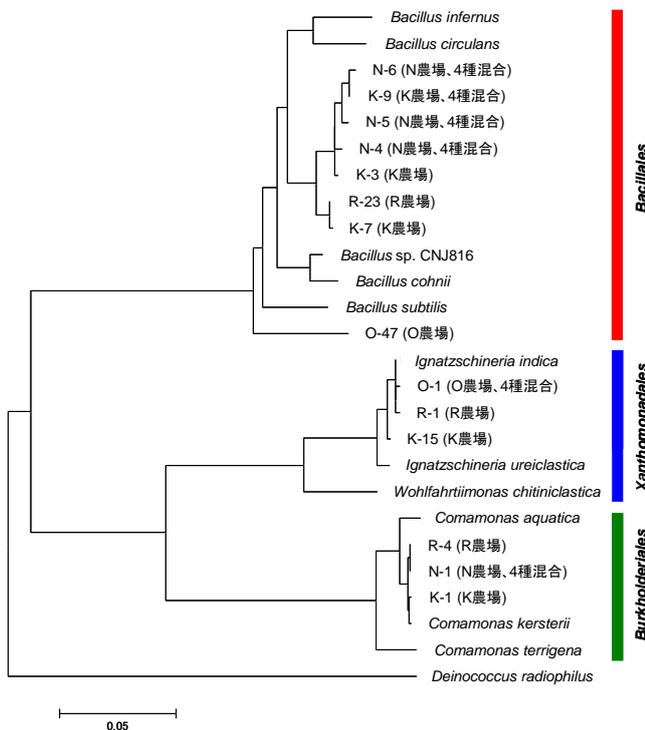


図2 優占的に認められたクローンの系統樹 (括弧内はクローンが得られたふん尿サンプルを示す)

(3) Stable Isotope Probing (SIP) 法による優占菌の基質利用に関する解析

液状コンポスト化過程における優占菌の基質を明らかにするため、ふん中の代表的な炭素源の1つである菌体に着目し、 ^{13}C 標識-グルコースを唯一の炭素源として増殖した大腸菌を熱処理して得られた死菌体を基質としたSIP法を実施した。本法は ^{13}C 標識された炭素基質を自身の体内に取り込み核酸を合成した菌を特異的に検出する方法である。 ^{13}C 標識した大腸菌死菌体を液状コンポストに投入後6h経過したサンプルについて解析を行った結果、唯一*Acholeplasma*属に近縁な細菌のピークのみが認められ(図3)、本菌が死菌体の資化に関与していることが明らかとなった。*Bacillus*属は多様な有機物を利用可能であることが報告されており、ふん中に存在する腸内細菌をはじめとした死菌体もその一部と予想していたが、それ以外の基質を利用していると考えられた。

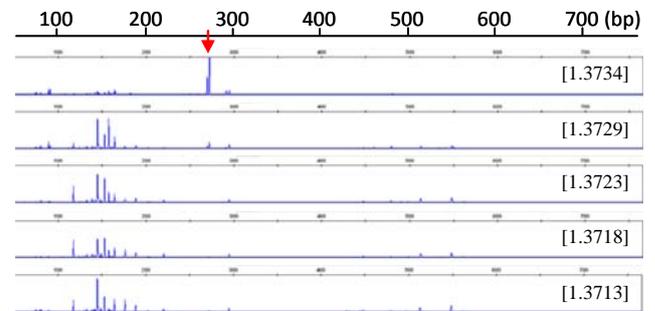


図3 SIP法で得られた各分画のT-RFLPプロファイル (図中の[]の値は浮遊密度。図中の赤い矢印は*Acholeplasma*属に近縁な細菌のピークを示す)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

花島 大、前田高輝、森岡理紀、異なる事業所から採取した豚ふん尿の曝気処理過程における優占細菌群の比較、2011年度日本畜産学会 (2011年8月27日 北里大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花島 大 (HANAJIMA DAI)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター 酪農研究領域 主任研究員

研究者番号：20414708