

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658075

研究課題名(和文)高温性堆肥の微生物生態と遺伝子資源としての有用性

研究課題名(英文)Microbial ecology of high-temperature compost and its usefulness as genetic resource

研究代表者

粟冠 和郎 (Sakka, Kazuo)

三重大学・生物資源学研究科・教授

研究者番号：20154031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：高温性堆肥化過程において堆肥上層部で90℃以上に達した。培養法による生菌数は、顕微鏡法による生菌数の1/100～1/1000であり、難培養性細菌の重要性を示した。堆肥化開始後14日目の優占菌はBacillus属細菌であり36%を占めたが、81日目にはMelghirimyces thermohalophilusが63%を占め、菌叢は大きく変化した。堆肥中のDNAから直接好熱性酵素遺伝子が単離されたこと、好熱性細胞壁分解酵素生産菌が分離されたことから、高温性堆肥が遺伝子資源として有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Temperature reached over 90 degrees centigrade in the upper position of the compost of the high-temperature composting system. Viable cell numbers by surface plate method was about 1/100 to 1/1000 of those by microscopic observation method, suggesting that unculturable bacteria were important in the high-temperature composting process. Bacillus species dominated in the early stage of composting, accounting for 36% of the total cell numbers, but Melghirimyces thermohalophilus accounted for 63%, indicating that bacterial flora drastically changed in the process of the composting. Genes encoding thermophilic enzymes were directly cloned from DNA isolated from the compost and thermophilic bacteria producing bacterial cell wall-degrading enzymes were isolated from the compost, indicating that the high-temperature compost was quite useful as the genetic resource for isolating thermophilic enzymes and bacteria.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：堆肥 好熱性細菌 好熱性酵素 微生物生態学 菌叢 細胞壁分解酵素 遺伝子資源

1. 研究開始当初の背景

農産廃棄物などの堆肥化の過程で、微生物の発酵熱により高温になることは古くから知られていたが、その最高温度は80℃程度であった。最近、食品廃棄物や汚泥などの処理が大規模堆肥化施設で行われることが増えているが、そのような施設では、時には100℃を越えることが謳われている。しかし、そのような堆肥の精確な温度計測は行われておらずその実態は明らかでなかった。また、高温時にどのような微生物が生育しているのか、についても明らかでなかった。

2. 研究の目的

有機性廃棄物の堆肥化の過程の温度変化とそれに伴う細菌叢の変動の詳細な解析を行い、高温環境下に存在する細菌を明らかにすること、古細菌を含む超好熱性細菌を単離すること、さらに、高温性堆肥の好熱性酵素の分離源・遺伝子資源としての有用性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 高温堆肥化の方法と試料の採取 三重県内にある堆肥化施設で研究を行った。堆肥化は、汚泥(約54 t)と戻し堆肥(約155 t)をホイールローダーで混合し、縦14 m×横7 m×高さ2.5 mに積み、下部より強制通気することにより行われた。約一週間に一度切り返しを行った。堆肥化開始から52日までは強制通気を行い、それ以降は強制通気を停止した。最終的に堆肥化期間は80日であった。切り返しの度に、堆肥表面から等間隔(堆肥面から25、75、125、175、225 cm)の深さで試料を採取し、生菌数などの各種パラメーターを測定した。



図1 堆肥化過程の様子

(2) 堆肥の温度測定 ハンドオーガを用いて堆肥上面より穴をあけ、熱電対を25 cm間隔で設置した竹棒を挿入した。各熱電対をデータロガーに接続し、5分ごとに温度を測定・記録した。

(3) 細菌数の測定 培養法と顕微鏡法で細菌数を測定した。

①培養法 堆肥を生理食塩水に懸濁し、ホモ

ジナイザーを用いて、10,000 rpm、30分間ホモジナイズした後、段階的に希釈した。SCD培地またはNutrient培地を用い、平板とするための固化剤としてゲランガムを使用した。培養温度は37℃、60℃、70℃、80℃とした。培地の乾燥を防ぐため平板培地をフリーザーバッグ(ジップロック)に入れて培養した。

②顕微鏡法 全細菌数の測定には、Ethidium bromide (EB) 蛍光染色法を用いた。堆肥希釈液とEB溶液を混合し、黒色の親水性フィルター(0.2 μm、直径10 mm)で濾過した後、フィルターを、スライドガラス上に固定した。落射型蛍光顕微鏡を用いて、SWB励起下(420-480 nm)、対物レンズ40倍で細菌の観察・計数を行った。生細菌数の測定には、5-sulfofluorescein diacetate (sFDA) 蛍光染色法を用いた。堆肥希釈液にsFDA溶液を加え37℃で1時間静置した後、上記と同様にIB励起下(460-490 nm)で黄緑色の蛍光を発する細菌を計数した。

(4) 菌叢解析

① DGGE法 採取した堆肥試料より、ISOIL for Beads Beating(ニッポンジーン)を用いてゲノムDNAを調製した。これを鋳型にしてプライマー27Fと907Rを用いて、16S rRNA遺伝子のV1-V5領域をPCR法によって増幅した。さらに、増幅したV1-5領域を鋳型として、GCクランプ付き357Fと517Rのプライマーを用いて、16S rDNAのV3領域をPCR法によって増幅した。PCR産物をDGGE分析に供した。D-Codeシステム(Bio-Rad)を用い、アクリルアミド濃度勾配6-12%、尿素濃度勾配20-60%で作成した。ゲルをSYBR Goldで染色し、目的DNAを抽出した後、357Fと517Rのプライマーを用いて、V3領域をPCR法によって増幅した。このDNA断片をpT7BlueT-Vector(Novagen)にクローン化した後、塩基配列を決定した。

② クローン解析法 堆肥試料を滅菌水に懸濁し、1分間のボルテックス、超音波破砕機で15秒処理後、3%となるようにSDS溶液を加え攪拌し、ビーズ式細胞破砕装置で5分間処理した。上清にフェノール:クロロホルム:イソプロピルアルコール(25:24:1)を等量加えて転倒混和し、遠心上清をMontage-PCR Centrifugal Filter Device(MILLIPORE社)を用いて濃縮し、TE緩衝液で洗浄した後、TE緩衝液でDNAを回収した。DNAを鋳型にし、プライマーE341FとE907Rを用いて16S rDNAを増幅し、得られたPCR産物をTOPO TA クローニングキット(Invitrogen)を用いてクローニングし、塩基配列を決定した。GenBankのDNAデータベースに対する相同性検索(BLAST)を行った。

③培養法 上述したように、平板培養法により細菌を単離し、16S rDNAの塩基配列を決定した。

(5) 有用細菌の分離

① 油脂分解菌の単離 油脂（トリブチリンまたはオリーブ油）を含む液体培地を用いて集積培養を行った。油脂を含む寒天平板培地上のコロニーの周りに透明環を作る株、油脂とローダミンBを含む寒天平板培地上でオレンジ色の蛍光を発する株、Tween 20を含む寒天平板培地上のコロニーの周りに沈殿を生じる株を、油脂分解菌として単離した。

② 細菌細胞壁分解菌の単離 乳酸菌 (*Enterococcus faecalis*) 菌体を炭素源とした液体培地で集積培養した後、同じ組成の寒天平板培地に塗抹して、コロニー周辺に透明環を作る株を選択した。

4. 研究成果

(1) 堆肥化過程における温度変化 堆肥化開始 0 日目から 80 日目までの堆肥の温度変化を図 2 に示す。また、同じデータを切り返しから次の切り返しまでの約 1 週間の温度変化を 1 日毎にまとめたものを図 3 に示す。

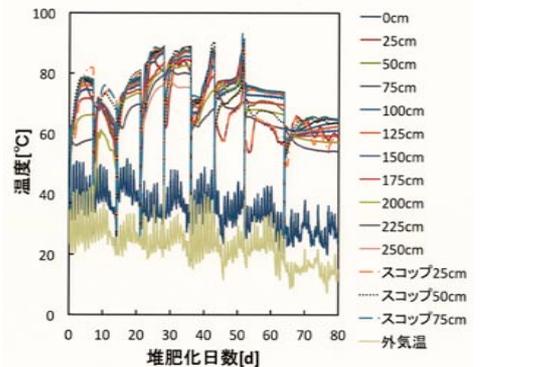


図 2 堆肥化過程の温度変化

この間、52 日目までは約 1 週間ごとに切り返しを行ったが、それ以降は 64 日目一度行ったのみである。また、52 日目までは堆肥下部から強制通気を行ったが、それ以降は通気を停止した。図 2 に見られるように、不規則な変化はあるものの、切り返し後に温度は低下するが、徐々に上昇し数日後にはピークに達した。堆肥化開始当初の最高温度は 80°C 程度であったが、この値も徐々に徐々に上昇し、約 90°C に達した。今回得られた最高値は 93.1°C であった。仕込み直後から切り返しまで (図 3 A) と 36 日目の切り返しから次の切り返しまでの約 1 週間の温度変化 (図 3 B) を見ると、堆肥上部から下部まで全体的に、日が経つにつれて上昇したが、上部での温度上昇が大きいものに対して、下部では温度変化はほとんどなく、温度分布は均一ではないことが明らかとなった。43 日目の切り返し以降の数日間、温度上昇が緩慢であったが、この期間は通気が停止していた。また、52 日以降は、通気は行われなかったが、この期間の温度上昇は観察されなかった。このことから、堆肥が高温となるためには通気が必須であることが確認された。

今回、堆肥の深度別の温度変化を熱電対で精確に測定したが、高温性堆肥で謳われているような 100°C を超える高温は観察されなかった。今回の場合でも、棒状有機液体温度計またはバイメタル式堆肥温度計を用いて堆肥の温度を測定した時、100°C を超えることが観察されたが、堆肥内部が大気圧以上の高圧になることは考えにくく、温度測定の精度の問題であると考えられた。以上のように、100°C を超える高温は観察されなかったが、今回の測定の最高温の 93.1 ははじめとして、90°C を超えることは常に観察されており、これまでに報告されている堆肥に比べると高温になることは間違いない。

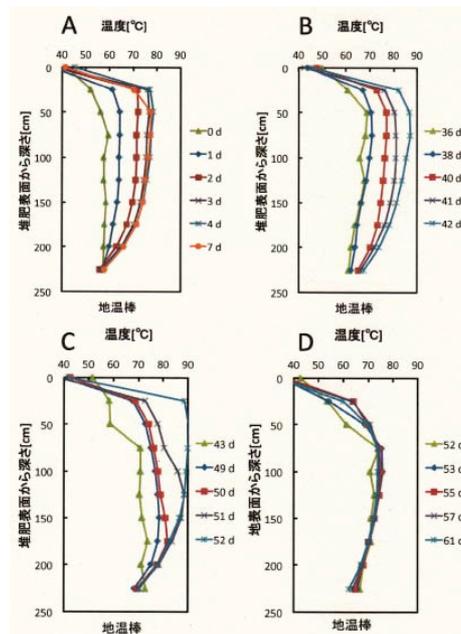


図 3 堆肥化過程の温度変化

(2) 堆肥化過程の細菌数と菌叢の変化

上述のように、今回研究対象とした高温性堆肥が、従来報告されている通常の堆肥よりも高温となることが確認された。このような環境下に、どのような細菌が生息するかは、学術的にも興味深く、堆肥化過程における細菌数と菌叢の変化について検討した。

① 細菌数の変動 堆肥化直後および切り直し直後の堆肥の表面付近から採取した試料中の生菌数と全菌数を顕微鏡法で計数した結果を図 4 に示す。全菌数については、全期間中概ね一定であった。一方、生菌数は、開始直後が最も多く、一時的な回復を見られたものの、概して徐々に減少する傾向が見られた。また、堆肥の切り直し直前に深度別に採取した試料中の細菌数を測定した結果を図 5 に示す。図 3 に見られるように、温度に関しては、上部で高く、下部で低い傾向が見られたが、細菌数については、全菌数および生菌数とも部位による大きな違いは見られなかった。顕微鏡法では、難培養性細菌の数も含めて計数することが出来ると考えられ

るが、生育可能な温度についての情報は得られない。そこで培養法による生菌数の測定を行った。

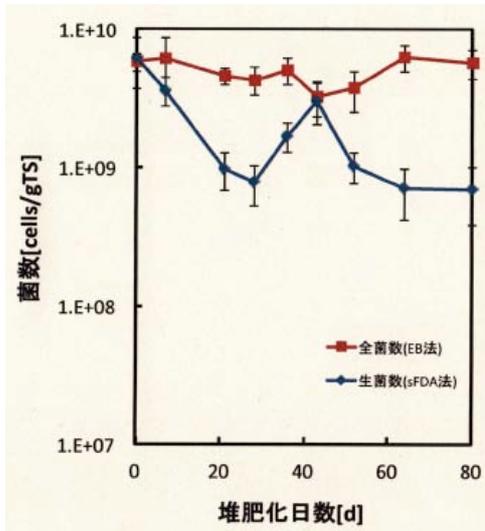


図4 堆肥化過程の菌数変化

切り返し後の堆肥表面付近から試料を採取し、顕微鏡法で全菌数と生菌数を計数した。

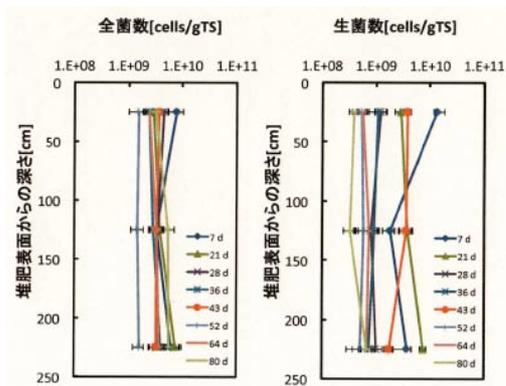


図5 堆肥化過程の堆肥中の深さ別の菌数変化

切り返し前の堆肥から深さ別に試料を採取し、顕微鏡法で全菌数と生菌数を計数した。

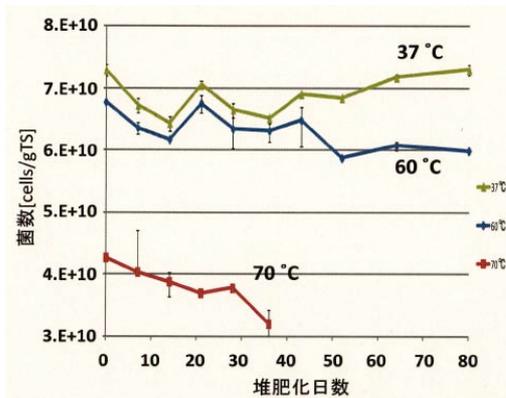


図6 堆肥化過程の堆肥中の深さ別の菌数変化

Nutrient 寒天培地を用いて、37°C、60°Cお

よび 70°Cで培養したときの生菌数を図6に示す。37°Cと60°Cでは、堆肥化開始当初はほぼ同様の生菌数が得られたが、堆肥化が進むにつれて、60°Cに於ける生菌数はやや減少した。培養温度70°Cとしたとき、開始時において生菌数は37°Cと60°Cの場合に比べて3桁低く、堆肥化の進行とともにさらに低下し、堆肥化36日以降はコロニーの形成を確認できなかった。また、培養温度80°Cにしたとき、生菌数を算出できるほどのコロニーの出現は認められなかった。

実験前の予想では、堆肥温度の上昇とともに、好熱性菌が増加するものと考えたが、90°Cに達する堆肥中において、70°C以上で生育する菌が極めて少数であり、その数も堆肥化とともに減少するという結果は予想外であった。微生物の発生する熱で堆肥の温度が上昇するのは間違いないので、コロニーを形成しない難培養性細菌が発熱に貢献していると考えるのが妥当と考えられる。その場合でも、堆肥化とともに生菌数は減少することから、90°Cのような超高温を好む細菌が多数存在するとは考えにくいと検証が必要である。

37°Cで生育する菌が最も多く計数されたが、これらの菌が堆肥中で栄養細胞として存在しているとは考えられず胞子を形成していると考えられた。

② 堆肥化過程における菌叢変化 熱水中の溶存酸素濃度は低いため、超好熱菌のほとんどは偏性嫌気性であり、古細菌に属する。細菌では、*Aquifex pyrophilus* (至適生育温度 85°C) と *Thermotoga maritima* (至適生育温度 80°C) が有名であるが、微好気性または偏性嫌気性である。高温性堆肥化施設では、下部から強制通気をしているため、部分的に嫌气的になるとしても、全体的には好氣的に保たれ、好気性細菌が優占していると考えられた。そこで、堆肥化に伴う菌叢の変化をDGGE法とクローン解析法で調べた。堆肥化開始後7日から80日の試料(堆肥表面から25、125および225 cm)をDGGEで分析した結果を図7に示す。

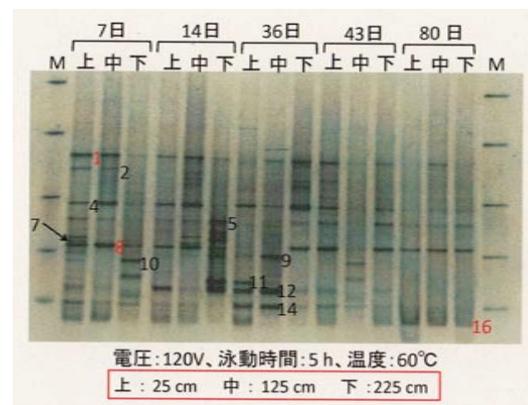


図7 堆肥化過程における菌叢変化

堆肥化開始後7日から80日の試料(堆肥表面から25、125および225 cm)をDGGEに供した。

約一週間ごとに切り返しを行っており、菌叢の均一化を行っていることになるが、14日目下、36日目上・下に見られるように、他のバンドパターンと大きく異なっている例が見られた。一方、バンド1、4、8など共通に見られるものも多く、全体としては大きな変化は見られなかった。ここで見られたバンド1、8、16は16S rDNAの配列より、それぞれ *Bacillus seohaeanensis*、*Bacillus iranensis*、*Melghirimyces thermohalophilus* に近縁の菌であると同定された。

堆肥化開始後14日目と80日目の堆肥表面から125 cmの部分の試料のクローン解析の結果を図8と図9に示す。14日後の主な優占菌は *B. iranensis* や *B. thermoamylovorans* などの *Bacillus* 属、*Cerasibacillus* 属、*Melghirimyces* 属、*Mechercharimyces* 属であり、優占度はそれぞれ37、9、9、6%であった。一方、80日後の主な優占菌は *Melghirimyces* 属 (*M. thermohalophilus*)、*Bacillus* 属であり、優占度は63、18%であった。この結果より、堆肥化の過程で *Melghirimyces* 属が増大し、*Bacillus* 属が減少し、菌叢に偏りが生じたことが明らかとなった。この菌叢は、これまで報告された堆肥のそれとはかなり異なっており、高温であることなどの環境を反映していると思われる。今回のクローン解析の結果からは古細菌の存在は確認されなかった。また、古細菌16S rDNAに特異的なプライマーを使用してPCRを行ったとき、明確なバンドが得られなかったことから、古細菌が優占していることはないことが示された。

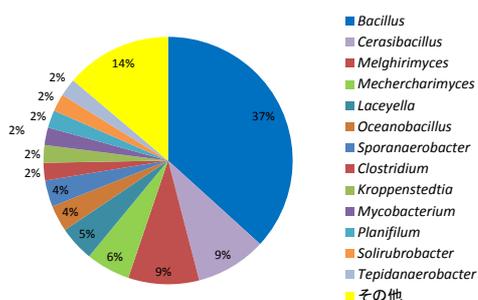


図8 堆肥化14日目の試料のクローン解析

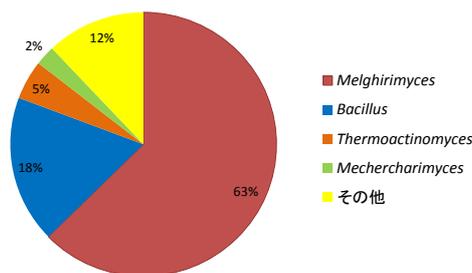


図9 堆肥化80日目の試料のクローン解析

堆肥化開始後14日目と80日目の深さ125 cmの試料を培養温度60℃と70℃で培養した時に出現したコロニー(菌株)の16S rDNAの配列を決定した。14日目の試料を60℃で培養したときに出現した全49株の中の48株が、1株が *Thermaerobacter marianensis* であった。培養温度70℃においては全49株中、*Geobacillus* 属と *Thermaerobacter* 属の細菌がそれぞれ20株ずつあり、*Bacillus* 属の細菌が6株であり、その他 *Mechercharimyces* 属、*Caldalkalibacillus* 属および *Prevotella* 属が1株ずつであった。80日目の試料を60℃で培養したときに得られた全45株の中の44株は *B. thermoamylovorans* と同定された。予想されたことではあるが、非培養法と培養法での結果の違いは大きく、難培養性細菌の重要性が予想された。

(3) 高温性堆肥からの有用細菌の分離

Tween 20を含む寒天平板培地を用いて60℃で培養したとき、油脂分解性を示すコロニーの前コロニーに占める割合は約10%であった。これらの菌を単離し同定したところ、*Bacillus* 属、*Geobacillus* 属に位置づけられるものが多かった。また、*Ureibacillus thermosphericus* に近縁株も見いだされた。

また、乳酸菌 (*Enterococcus faecalis*) 菌体を炭素源として細菌細胞壁分解酵素生産菌のスクリーニングを行ったところ、*E. faecalis* 菌体を溶解する株を見いだした。これらのなかから3株を単離し、同定したところ1株は *Thermoactinomyces vulgaris* であり、他の2株は *Bacillus methanolicus* と同定された。これらの細菌はいずれも細菌細胞壁を分解する能力については報告されておらず、高温性堆肥が有用酵素を生産する好熱性細菌の分離源として優れていることが示された。

(4) 堆肥DNAからのキシラナーゼ遺伝子のクローニング

高温性堆肥の遺伝子資源としての有用性を確認するため、糖質分解酵素ファミリー10のキシラナーゼをコードする遺伝子の単離を試みた。

バーチウッドキシランを含む培地に堆肥を接種し集積培養を行った後、DNAを抽出した。糖質分解酵素ファミリー10のキシラナーゼに高く保存されている領域の配列をもとにプライマーを設計し、上記DNAを鋳型にしてPCRを行ったところ、遺伝子の増幅が認められた。このDNA断片をクローン化し塩基配列を決定したところ、*Thermobacillus composti* で報告されているキシラナーゼと類似した酵素をコードしていることが明らかとなった。以上の結果より、高温性堆肥が、好熱性酵素遺伝子を単離するための遺伝子資源として優れていることが示された。

(5) まとめと考察

高温性堆肥の温度変化を正確に測定した。最高で 93.1℃を計測し、間違いなく普通の堆肥より高温になることが確かめられた。菌叢は、これまでに報告された堆肥のものとは大きく異なっており、高温等の特異的な環境を反映していると考えられた。堆肥化の過程で生菌数の減少が観察されたことから、堆肥の高温化により好熱菌が活発に活動しているとは必ずしも言えないように思われる。発熱に関与しているのは、堆肥中で圧倒的な多数を占める難培養性細菌であろう。高温になる機構は不明であるが、堆肥上部で高温になることから、下層部で発生した熱が上部へ移動することも考えられる。好熱性酵素生産菌が単離出来ること、堆肥由来 DNA から直接好熱性酵素遺伝子が単離されることから高温性堆肥が優れた遺伝子資源であることが示された。

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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 栗冠真紀子、福丸琢人、東俊之、千葉悠佳、木村哲哉、栗冠和郎、高温性堆肥の経時的・空間的温度変化に伴う菌叢変化、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 29 日、明治大学生田キャンパス (川崎市多摩区)
- ② 福丸琢人、栗冠真紀子、坂井勝、木村哲哉、栗冠和郎、超高温性堆肥の温度と微生物群の経時的・空間的变化の解析、第 65 回日本生物工学会大会、2013 年 9 月 20 日、広島国際会議場 (広島市中区)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗冠 和郎 (SAKKA, Kazuo)

三重大学・大学院生物資源学研究科・教授
研究者番号：20154031

(2) 研究分担者

栗冠 真紀子 (SAKKA, Makiko)

三重大学・大学院生物資源学研究科・学術
研究員

研究者番号：00422882

(3) 連携研究者

()

研究者番号：