

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450415

研究課題名(和文)牛ふん堆肥における大腸菌の残存および再増殖機構の解明

研究課題名(英文)Studies on survival and regrowth of Escherichia coli in cow manure compost

研究代表者

花島 大(HANAJIMA, Dai)

国立研究開発法人農業・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・上級研究員

研究者番号：20414708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：牛糞堆積堆肥の各部位における大腸菌の残存性を調べるとともに、大腸菌の再増殖に影響を及ぼす栄養成分とその栄養成分の利用に競合的に働く細菌群を解析した。大腸菌は高温になる堆積物内部では死滅するが、堆肥頭頂部で長期間残存する傾向にあった。堆肥中で長期間残存していた大腸菌は、牛糞由来の大腸菌よりも熱に強い性質を示した。大腸菌は堆肥にグルコースを添加することで増加する傾向にあったが、トウモロコシ粉末や菌の遺体の添加では増加は認められなかった。堆肥中でグルコース、トウモロコシおよび菌の遺体を取り込んで増殖する細菌類をStable isotope probing法により特定した。

研究成果の概要(英文)：The present study assessed the survival of *E. coli* in various positions of piled cow manure compost. Key substrates which support *E. coli* regrowth in compost and the microbial competitors in terms of substrates assimilation were analyzed. *E. coli* survived longer time on top surface of pile, while *E. coli* in internal parts of pile eliminated. *E. coli* strains survived longer time in compost were capable of growing in higher temperature relative to *E. coli* isolated from raw cow manure. The addition of glucose resulted in higher growth of *E. coli* in compost. However, the addition of corn powder or dead bacterial biomass did not increase the number of *E. coli*. Bacterial species which incorporate glucose, corn powder or dead bacterial biomass in compost were identified by using Stable isotope probing method.

研究分野：畜産学・草地学、微生物生態学

キーワード：堆肥 大腸菌 安定同位体標識 炭素基質 SIP法

1. 研究開始当初の背景

肥料価格の高騰や有機農業の推進にともない、堆肥を有機肥料として利用する機運が高まっている。しかしながら牛は病原性大腸菌やサルモネラ菌の保菌動物と知られており、その糞便は病原菌に汚染されている可能性がある。堆肥は広域に流通すること、また野菜などの農産物と接触する可能性もあることから、牛糞の堆肥化過程では病原菌による汚染リスクを可能な限り低減させる必要がある。しかし酪農現場で生産される牛糞堆肥は、粗放な環境下で生産されている事例が少なくない。一般的に大腸菌は堆肥化過程で発生する高温により死滅するが、高水分の堆肥や、堆積物の表層や底部では温度上昇が十分でなく、大腸菌が残存する可能性がある。また堆肥中での大腸菌の残存以外にも、堆肥の攪拌に使用されるホイールローダー等の作業機械を介しての再汚染や、鳥や鹿など外部から侵入した野生動物の糞便による汚染リスクも考えられる。

堆肥に残存した大腸菌は、堆肥中に基質が豊富に存在し、かつ適当な水分が与えられた場合に再増殖することが報告されている。また滅菌堆肥に病原性大腸菌 0157 のみを接種した場合には 0157 は増殖するが、他の微生物群も共存する未滅菌堆肥に接種した場合には、0157 の増殖は抑制されるという報告もある。これらの現象は、堆肥中の基質の存在は大腸菌の増殖に寄与する一方で、堆肥中の微生物群と大腸菌の間には基質をめぐる競合関係が存在することを示している。

2. 研究の目的

本研究では堆肥の安全性を評価する上での指標微生物である大腸菌に着目し、その堆肥化過程での残存性と堆肥中での再増殖機構の解明を目的とする。堆肥中の大腸菌は、55 を超える高温に数日間曝露することで、また適切な頻度で攪拌することで死滅させることができるが、現実的には堆積物全体を均等に高温曝露することは難しい。そこで本研究では実規模の堆積型牛糞堆肥の各部位や周辺環境における大腸菌の消長を追跡することで大腸菌の残存しやすい部位の特定を行う。また牛糞、野生動物の糞、および堆肥に含まれる大腸菌を収集し、ゲノムの繰り返し配列の差異を検出する rep-PCR (repetitive-sequence-based PCR) 法による大腸菌の遺伝子型の判別により、牛糞堆肥中に残存する大腸菌の由来とその類型化を行い、特定の菌株が堆肥中に残存しやすいのか、それとも偶発的な汚染によって付着した大腸菌が残存しているのかを明らかにする。

これまでの研究から堆肥中での大腸菌の再増殖を促進する要因として、堆肥中に残存する大腸菌が利用可能な基質の存在が、また再増殖を抑制する要因として大腸菌の増殖に競合的に作用する堆肥中にもともと存在する“土着の微生物群”の影響が指摘されて

いる。そこで本研究では、堆肥中にいかなる炭素基質が存在する時に大腸菌は増殖が可能なのか、またその基質をめくり大腸菌がいかなる微生物群と競合しているのかを明らかにするため、SIP (Stable Isotope Probing) 法による解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 堆積型牛糞堆肥における大腸菌の消長と残存した大腸菌株の類型化

牛糞と低質牧草の混合物 26.8t を堆肥舎壁面に堆肥を押しつける形で 8.3×3.7×2.5m (W×D×H) のサイズに堆積した。堆積物の中央部および両端の底からの高さ 1m、表層から 50cm の部位に温度センサーを設置し、堆肥温度を連続測定した。堆肥化試験は、堆肥サンプルから大腸菌が検出されなくなる迄実施し、2 週間に一回の割合で堆肥の切り返しを行った。切り返し作業時には、堆積物の温度センサー付近の堆肥サンプル、および堆積物の頭頂部と底部のサンプルを採取した。ホイールローダーのバケット部の表面に存在する大腸菌を計数するため、切り返し作業前にラスパーチェック (日本 BD) を用いた拭き取りサンプルを採取した。また堆肥舎内に落下している野生動物の糞を採取した。

大腸菌の計数は、XM-G 寒天培地 (日水製薬) および Colisure 培地 (IDEXX Laboratories) を併用して測定した。堆肥サンプル、拭き取りサンプルおよび野生動物の糞から分離した大腸菌株について、BOX A1R プライマーを用いた rep-PCR を行い、得られたバンドパターンから遺伝子型の判別を行い、分離株の類型化を行った。

(2) 堆肥中における炭素源存在下の大腸菌の動態と SIP 法による炭素源の資化菌の検出

牛糞中に未消化物として排出される可能性があるデンプン、デンプンやセルロースの構成糖であるグルコース、および堆肥熱等で死滅した微生物遺体を想定した菌体バイオマス堆肥に添加した時の大腸菌の動態、およびそれぞれの基質を資化している細菌群について SIP 法による解析を行った。

麦稈と牛糞を混合して 2 ヶ月間堆積した牛糞堆肥を粉碎し、乾物 15g 相当の堆肥を 100mL 三角フラスコに充填した。前年度分離した堆肥化開始後 12 週目まで残存していた大腸菌 3 株を培養、それぞれが同じ菌数になるように混合した大腸菌懸濁液を 2.0×10^3 CFU/g となるように堆肥に添加した。この堆肥に ^{13}C 標識グルコースを堆肥乾物当り 0.5% 添加、非標識グルコースを堆肥乾物当り 0.5% 添加、炭素基質無添加 (対照) の 3 つの区を設定した。デンプンについては、 ^{13}C 標識および非標識 トウモロコシを堆肥乾物当り 1% 添加、トウモロコシ無添加 (対照) の 3 区を設定した。トウモロコシは、粒径 0.2mm 以下の ^{13}C 標識および非標識の粉末標品を購入した。菌体バイオマスは、 ^{13}C 標識および非標識菌体バイオ

マス堆肥乾物当り 0.375%添加、菌体バイオマス無添加（対照）の3区を設定した。菌体バイオマスは、¹³C 標識グルコースを唯一の炭素源とする無機塩培地で培養した大腸菌 NBRC3110 株を回収、熱失活させて調製した。

堆肥水分は 60%に調整し、30 の恒温器内でグルコースについては1日間、トウモロコシについては5日間、菌体バイオマスについては3日間の培養を行った。培養前後の大腸菌数を計数するとともに、堆肥から RNA を抽出し、トリフルオロ酢酸セシウムを用いた平衡密度勾配遠心処理を行い、炭素源の資化によって ¹³C 標識された RNA 画分を回収した。回収した RNA について、16S rRNA を標的とした RT-PCR を行い、T-RFLP 法およびクローンライブラリー法により各炭素源の資化菌の特定を行った。

4. 研究成果

(1) 堆積型牛糞堆肥における大腸菌の消長と残存した大腸菌株の類型化

堆積型牛糞堆肥における大腸菌の消長

堆積物内部の3箇所の温度測定部位は、いずれも 70 以上の高温となった。温度測定部位付近の堆肥の大腸菌数は、期間を通じて検出限界以下であったが、底部の堆肥では6週目まで、頭頂部では12週目まで大腸菌が検出された（図1）。切り返し直後の堆肥から大腸菌が検出されたケースもあり、切り返し作業によって大腸菌が残存した部位による再汚染が起こる可能性が示唆された。堆肥化開始後から14週目には、いずれのサンプリング部位からも大腸菌は検出されなくなった。

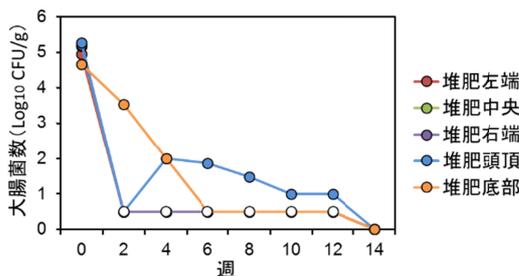


図1 牛糞堆肥の各部位における大腸菌数の推移 *白丸は検出限界以下 (<10 CFU/g) を示す。

外的要因による大腸菌の汚染リスクを評価するために堆肥舎内および周辺部の鳥獣の糞、およびホイールローダーのバケット部の拭き取りによる大腸菌の検出を試みた。目視による観察と堆肥舎内に残された足跡から、堆肥舎内にはスズメ、カラス、タヌキ、アライグマなどの鳥獣が侵入していると推察されたが、堆肥舎内では鳥類以外の糞は確認することができなかった。堆肥の切り返しに用いられるホイールローダーのバケット部には、多い時で 100 CFU/100cm² 程度の大腸菌が検出されており、汚染されたバケットも再汚染リスクの1つと考えられた。

堆肥中で長期残存した大腸菌株の類型化

堆肥化開始後から12週間後のサンプルに残存していた大腸菌株について、BOX A1R プライマーを用いた REP-PCR を行い、大腸菌の遺伝子型の判別を行った。異なる遺伝子型をもつ堆肥残存株4株、および堆肥化前の牛糞から分離した大腸菌株4株について、LB培地中での37、44.5、47、49 培養における濁度 (OD₆₀₀) の推移を比較した（図2）。濁度の推移は、37 および 44.5 培養では両者とも同様であったが、47 培養では堆肥残存株の濁度の方が高い傾向にあった。

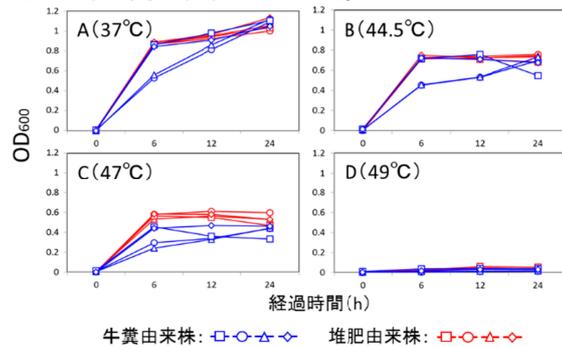


図2 牛糞由来株および堆肥由来株の各培養温度における濁度 (OD₆₀₀) の比較 (n=3) (A、B、C、Dはそれぞれ37、44.5、47、49 培養での測定結果を表す)

この結果から、堆肥中で長期間残存できる大腸菌株は、牛糞由来株よりも高温域における増殖能が高い傾向にあると考えられた。

12週目まで堆肥に残存していた大腸菌の多くは、牛糞由来株と近似したバンドパターンを示していたが、一部は鳥由来株に近似したバンドパターンを示す株も存在した。堆肥頭頂部では期間を通じて鳥の糞が多数確認されており、鳥由来の大腸菌による堆肥の再汚染の可能性も示唆された。

(2) 堆肥中における炭素源存在下の大腸菌の動態と SIP 法による炭素源の資化菌の検出

堆肥中における炭素源存在下の大腸菌の動態

グルコース添加区において 2.0×10^3 CFU/g 程度の割合で堆肥に接種した大腸菌数は、1日後に ¹³C 標識グルコースおよび非標識グルコース添加区で2倍以上に増加した（図3）。

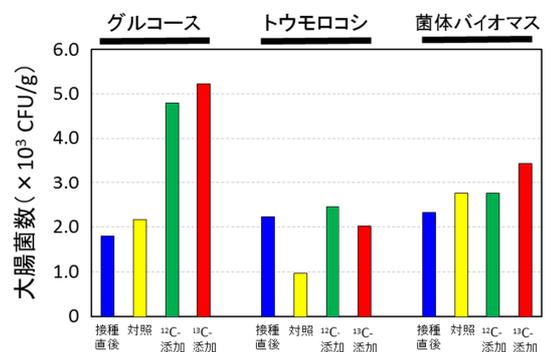


図3 炭素源添加試験における接種直後および培養後の大腸菌数の比較 (n=2)

無添加区における菌数は接種時と同程度であったことから、グルコース添加により大腸菌は増加することが明らかとなった。一方で、¹³C 標識および非標識トウモロコシ添加区の大腸菌数は、無添加区よりは高い値であったが、接種時の菌数と同程度の値であった。菌体バイオマス添加においては、無添加区と¹³C 標識および非標識菌体バイオマス添加区の間に大きな差は認められなかった。グルコースの添加により大腸菌数の増加が認められたことから、大腸菌の利用しやすい基質が堆肥中に存在することで再増殖が起きやすいことが追認できた。

グルコースは多くの微生物にとって利用しやすい炭素基質である。しかし実際の堆肥中でグルコースが遊離した形で存在することは考えにくい。トウモロコシや菌体バイオマスの添加では、顕著な増殖が認められなかったことから、大腸菌の再増殖には、今回供試した基質以外の成分や環境条件が影響している可能性もある。

SIP 法による炭素源の資化菌の検出

¹³C 標識グルコース、非標識 (¹²C) グルコースおよび無添加区の堆肥から RNA を回収し、平衡密度勾配遠心分離処理後に 16S rRNA をターゲットとした T-RFLP 法による解析を行った結果を図 4 に示す。

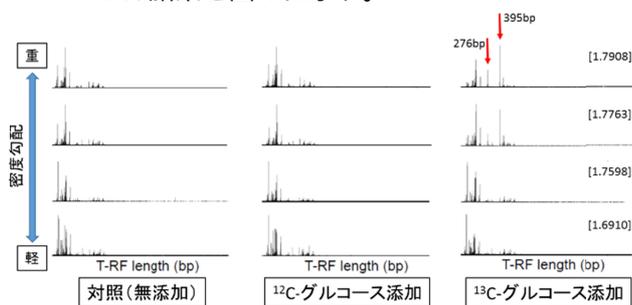


図 4 SIP 法を用いた ¹³C 標識グルコース、非標識グルコースおよび無添加区における T-RFLP プロファイルの比較 (括弧内は Buoyant Density 値を示す。各区とも “重い” 分画の T-RFLP プロファイルを上から順に配置している)

T-RFLP プロファイルおよびクローンライブラリーの結果では、無添加区と非標識グルコース添加区の間には細菌群集の構成に大きな違いは認められなかった。このことはグルコースを添加することにより、新たにグルコース資化能を持つ細菌が優占化することはなかったことを示している。しかし ¹³C 標識グルコース添加区においては、Buoyant Density (BD) 値が 1.7763 g/mL 以上となった “重い” 分画から回収した RNA において、T-RFLP プロファイル上の 276bp および 395bp の周辺に特徴的なピークが認められた。これらピークは、無添加区や非標識グルコース添加区、および ¹³C 標識グルコース添加区の “軽い” 分画に微小なピークとして存在するが、

¹³C 標識グルコース添加区の “重い” 分画でのみ大きなピークとして検出されていることから、これらピークはグルコース資化能を持つ細菌に由来するものと考えられた。シーケンス解析の結果から、これら細菌は *Phyllobacteriaceae* 科および *Mycobacterium* 属細菌であることが明らかとなった。

トウモロコシ添加試験においても、同様の解析を行い、*Streptomyces* 属細菌による資化が顕著であることを明らかにした。*Streptomyces* 属細菌の一部は、アミラーゼ活性を有しており、生デンプン分解酵素を持つ本菌がトウモロコシの資化性に優れていたものと推察された。

菌体バイオマス添加試験では、*Sphingobium* 属および *Simplicispira* 属細菌による菌体バイオマスの取り込みが顕著であった。グルコースやトウモロコシの資化菌とは異なり、両者の配列は無添加区および非標識菌体バイオマス添加区のクローンライブラリーから検出されていないことから、堆肥中の比較的少数派の菌が菌体バイオマスの資化に関わっていると考えられた。*Simplicispira* 属細菌は、活性汚泥からの分離例があり、菌体バイオマスが豊富な環境中に生息する細菌が堆肥中においても積極的にそれらを利用していると推察された。

これら細菌群は、大腸菌の炭素基質利用に競合的に働くと考えられ、病原菌の生物的な増殖制御に利用できる可能性がある。

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 3 件)

1) Hanajima Dai, Presence and survival of *Escherichia coli* during cow manure composting at different sampling locations in a compost barn, Proceedings of VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2015, 2015 年 10 月 30 日、バルセロナ大学 (スペイン)

2) 花島 大, SIP 法による堆肥中のグルコース資化に関わる細菌群の解析、第 120 回日本畜産学会、2015 年 9 月 11 日、酪農学園大学 (北海道江別市)

3) 花島 大, 堆肥から分離した特定酵素基質培地を用いた大腸菌検出において偽陽性を示す細菌、第 121 回日本畜産学会、2016 年 3 月 28 日、日本獣医生命科学大学 (東京都武蔵野市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花島 大 (HANAJIMA, Dai)

国立研究開発法人 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 上級研究員

研究者番号: 20414708