

2016 年度
修士論文

悪臭性低級脂肪酸を低減する
細菌群集構造の解析

21531018 三ッ橋 鈴菜

指導教員 病理・害虫学 准教授 岡本 英竜

酪農学園大学大学院酪農学研究科

目次

緒言	1
本論	
I 多様性を維持するための集積培養法の検討	6
1. 序文	6
2. 材料と方法	7
(1) 集積培養	7
1) 微生物源の調整	7
2) 牛ふん尿エキスの調整	7
3) 特定有機物分解菌用培地の調整	7
4) 培養法の検討	7
(2) 細菌群集構造解析	9
1) テンプレート DNA の作成	9
2) ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)	12
3) PCR 産物の精製	12
4) 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE)	12
5) 主成分分析による評価	16
6) 多様性指数の算出	16
3. 結果	18
4. 考察	27

5. 小括	28
II 牛ふん尿エキス高濃度環境における集積培養	29
1. 序文	29
2. 材料と方法	30
(1) 集積培養	30
1) 微生物源の調整	30
2) 牛ふん尿エキスの調整	30
3) 特定有機物分解菌用培地の調整	30
4) 培養法の検討	30
(2) 細菌群集構造解析	31
1) テンプレート DNA の作成	31
2) ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)	31
3) PCR 産物の精製	31
4) 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE)	31
5) 主成分分析による評価	32
6) 多様性指数の算出	32
(3) ガスクロマトグラフによる VFA の定量	32
3. 結果	33
4. 考察	42
5. 小括	44

III 総括	45
IV 謝辞	49
V 引用文献	50

緒言

畜産業に起因する苦情数は、平成27年度で1,604戸となっており、畜種別で見ると、乳牛505戸，豚451戸，肉牛304戸，鶏279戸，その他65戸と乳牛に対するものが最も多い^[23]。例年、全ての畜種において、悪臭に関する苦情が多く確認されており、現在も絶えることはない。この状況を受け、農林水産省では、畜産経営の大規模化・専門化に伴い、悪臭防止対策を適切におこなうことを重要視している^[22]。

早急に改善が求められたものの中に、家畜排せつ物の不適切な管理がある。固形状の家畜排せつ物を積み上げる「野積み」や液状の家畜排せつ物を穴に貯める「素掘り」といった、単に放置された状態は悪臭問題のみならず、河川や地下水の汚染の要因にもなり得る^[2、29、37]。このため、「家畜排せつ物の管理の適正化及び利用の促進に関する法律」が制定され、その後は、堆肥化や液肥化など、資源を有効活用する方法で処理が進められてきた^[13、20、35]。しかし、依然として悪臭関連の苦情が絶えないのは、家畜排せつ物を処理する上で、必然的に複合した臭気物質がある程度量発生し、拡散しやすいこと、有効な臭気対策が普及されていないことにあるといわれている^[2、9]。

畜産の施設で発生する臭気は様々な物質で構成された複合臭

である。悪臭防止法で特定悪臭物質として規制されているものは22物質あり、そのうち畜産現場で検出される物質は、メチルメルカプタン、硫化水素、硫化メチル、二硫化メチルといったイオウ系化合物とプロピオン酸、*n*-酪酸、*iso*-吉草酸、*n*-吉草酸の揮発性低級脂肪酸 (Volatile Fatty Acid: VFA)、そのほか、アンモニアやトリメチルアミンを含み、10物質ある^[39]。特に、VFAは閾値が低く、低濃度で臭気強度を示す特徴があり、畜産現場やその周囲において、より強烈な臭気を放っているとされる^[36]。これにより、VFAを低減させることができれば、悪臭苦情の緩和が期待できる。

スラリー状の家畜排せつ物を嫌氣的に発酵させるメタン発酵という処理法がある^[19]。悪臭が外部に漏れず、メタン生成菌の働きによって、発生したメタンガスをエネルギー活用できる一方で、施設整備費が高額且つ十分な農地を確保しなければいけないというデメリットも存在する^[6]。炭化や焼却といった処理法も、施設整備費が掛かることに加え、水分含量が高い家畜排せつ物の利用は困難であるとされており、応用が利かない^[26, 38]。このため、安価で効果があり、手間の掛からない簡便な方法が求められている。

以上のことから、微生物を用いた臭気対策が脚光を浴び、日々

研究が進められている^[28]。すでに100種類を超える微生物資材が市販されており、中には比較的安価な物も存在する^[4]。使用方法も簡易な物が多く、飼料に添加する、あるいはふん尿に直接散布するなど明確である。この特徴から、社会的ニーズも高まっており、多くの試験研究から、悪臭に有効とされる微生物(アンモニア酸化細菌, 亜硝酸酸化細菌, 脱窒菌, 硫黄酸化細菌など)が注目されている^[7-8, 11, 15, 21]。

微生物の資材化に伴い、留意しなければならないことは、保存性と安定性である。生きた微生物を使用する上で、活性の維持が不可欠であること、また、微生物資材の製造から流通に至るまで保存が利くこと、目的の場所で特性を発揮させることという条件を考慮すると、芽胞形成細菌がこれらの条件を満たしている^[31]。この細菌は、生育に不適な環境において、耐久性の高い芽胞を形成し、休眠状態となる。更に、至適環境では、芽胞から再び発芽し、増殖する特徴を持つ^[3]。このことから、長期保存や様々な環境への適応に優れた微生物資材の開発が期待できる。実際に悪臭低減の効果を謳う資材の研究例で、芽胞形成細菌による報告が多くある^[16-17]。中には、給与しても消化管内で死滅することなく排泄され、発芽・増殖し、悪臭物質を低減させるものも報告されており、資材化への期待が高まっている^[24]。また、低減させる対

象物質は、低級脂肪酸類やアンモニアなど多岐に渡っており、有用性が示され、今後も重要な細菌の一つと言える。

自然界は、高分子の栄養物を低分子の栄養物へと分解する微生物，その分解物を更に分解する微生物，更に炭酸ガスや水などに分解する微生物などが多様に混在している（微生物フローラ）。一般的に、微生物を使用して資材を開発する場合、微生物フローラから純粋分離した微生物を利用するケースが多い。これらが分解する物質は限定的なものであり、働きとしては狭いことが特徴である。しかし、環境浄化に微生物を利用することを考えた場合、栄養物の成分が複雑な下水や廃水，汚泥，有機性廃棄物，悪臭などに純粋分離した微生物を働かせることは非現実的とされる^[32]。そこで、様々な種で構成された微生物フローラを利用できれば、種と種の間で効果を補い合えることが期待される^[12]。実際に微生物フローラを使用した研究は多くの分野で報告されており、畜産現場の悪臭においても高い効果が得られると期待される^[32]。

高橋らによる先行研究では、乳牛における排せつ物中で、VFAを低減させる芽胞形成細菌の存在が示されている^[1, 25, 33-34]。しかしながら、単独基質のVFAで培養し、そこから純粋分離された株を使用していくことは未だ課題が多い。また、ふん尿の濃度が低い条件下での増殖しか認められていないことから、今後の実

用化に向けた上で、畜産現場の環境に合わせた試験研究が求められる。

本研究においては、畜産現場における排せつ物の状態に近い環境下で増殖し、VFAを低減させる芽胞形成細菌群集を検索した。

I. 多様性を維持するための集積培養の検討

1. 序文

先行研究において、ある畜産施設の曝気処理液からVFA（プロピオン酸，*n*-酪酸，*iso*-吉草酸，*n*-吉草酸）を低減させる芽胞形成細菌が分離されている^[1, 25, 33-34]。これらの分離株が増殖を示すデータは、吸光度によって測定された低濃度の牛ふん尿エキス添加条件によるものである。畜産現場での応用を考慮すると、牛ふん尿エキス高濃度の条件における増殖が望まれる。しかしながら、高濃度の牛ふん尿エキスでは光学的に細菌の増殖を確認することは不可能である。このことから、牛ふん尿エキス高濃度の条件下で増殖している結果を吸光度測定以外の方法で示すことが必要とされる。また、緒言でも述べたとおり、VFA単独基質における培養から得られた分離株を今後、悪臭問題に使用することは困難であるとされるため、細菌群集による検証も明らかにする必要がある。

本章では、吸光度測定による増殖の確認法から遠心分離による増殖の確認法に切り替え、多様な細菌群集を得ることができる培養法について検討した。更に、得られた細菌群集の構造について解析をおこなった。

2. 材料と方法

(1) 集積培養

1) 微生物源の調整

本学付属農場の堆肥場から堆肥を採取し、滅菌水に懸濁した。夾雑物を除去後、80℃-10分間で加熱処理を施し、芽胞形成細菌以外を殺菌したものを微生物源とした。

2) 牛ふん尿エキスの調整

乳牛由来のふんと尿を45:13の割合で混合した。これと等量の滅菌水を加えて2倍に希釈した。これを金属メッシュにて夾雑物を除去した。ふん尿由来の栄養基質を除去するため、38℃-5日間の振盪培養をおこなった。エアーポンプで通気し、様子を確認しながら水分調整もおこなった。その後、遠心分離(4℃-10,000r.p.m-15分間)し、上清をさらしで濾過し、オートクレーブにて滅菌処理したものを50%濃度の牛ふん尿エキスとした。

3) 特定有機物分解菌用培地の調整

特定有機物分解菌用培地(Table 1)に唯一の炭素源として、VFAの一つであるプロピオン酸を添加した。プロピオン酸単独基質は最終濃度が20mMとなるように調整した。

4) 培養法の検討

プロピオン酸を炭素源とした特定有機物分解菌用培地に牛ふ

Table 1 Composition of the medium for bacteria in organic matter decomposition

NH_4NO_3	0.2 g
K_2HPO_4	0.3 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.002 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.002 g
Propionic acid	
Sterile water or Manure extract	To 200mL

ん尿エキスを加え、初発濃度が異なる6試験区(0%区, 10%区, 20%区, 30%区, 40%区, 50%区)を設定した。各試験区の増殖を遠心分離(4℃-10,000g-10分間)で確認後、各試験区の牛ふん尿エキス濃度+5%の新鮮な培地に継代した。これを、各試験区の牛ふん尿エキス濃度が最高濃度(50%)に至るまで段階的に継代した。その後も、最高濃度で継代培養を20回繰り返した(Fig. 1-2)。

(2) 細菌群集構造解析

1) テンプレートDNAの作成

各試験区から1mLとり、遠心分離(4℃-15,000r.p.m-10分間)をおこない、上清を除去後、滅菌超純水を添加して細胞を洗浄した。これを上清が透明になるまで繰り返した。その後、滅菌超純水400 μ L加え、0.1mmガラスビーズ0.5g入りマイクロチューブに移し、-20℃-15分間凍結させた。解凍後、リゾチーム溶液2 μ L加え、37℃-30分間インキュベートをおこない、滅菌超純水400 μ L加えた。それを、Beads Homogenizer(2,000r.p.m-2分間)で細胞破壊後、遠心分離(4℃-12,500r.p.m-5分間)をおこない、上清を回収した。上清400 μ LにプロテナーゼK 5 μ L, 10% SDS溶液20 μ Lを加え、55℃-30分間インキュベートした。その後、同量のPCI(Phenol Chloroform Isoamylalcohol=25:24:1)を加

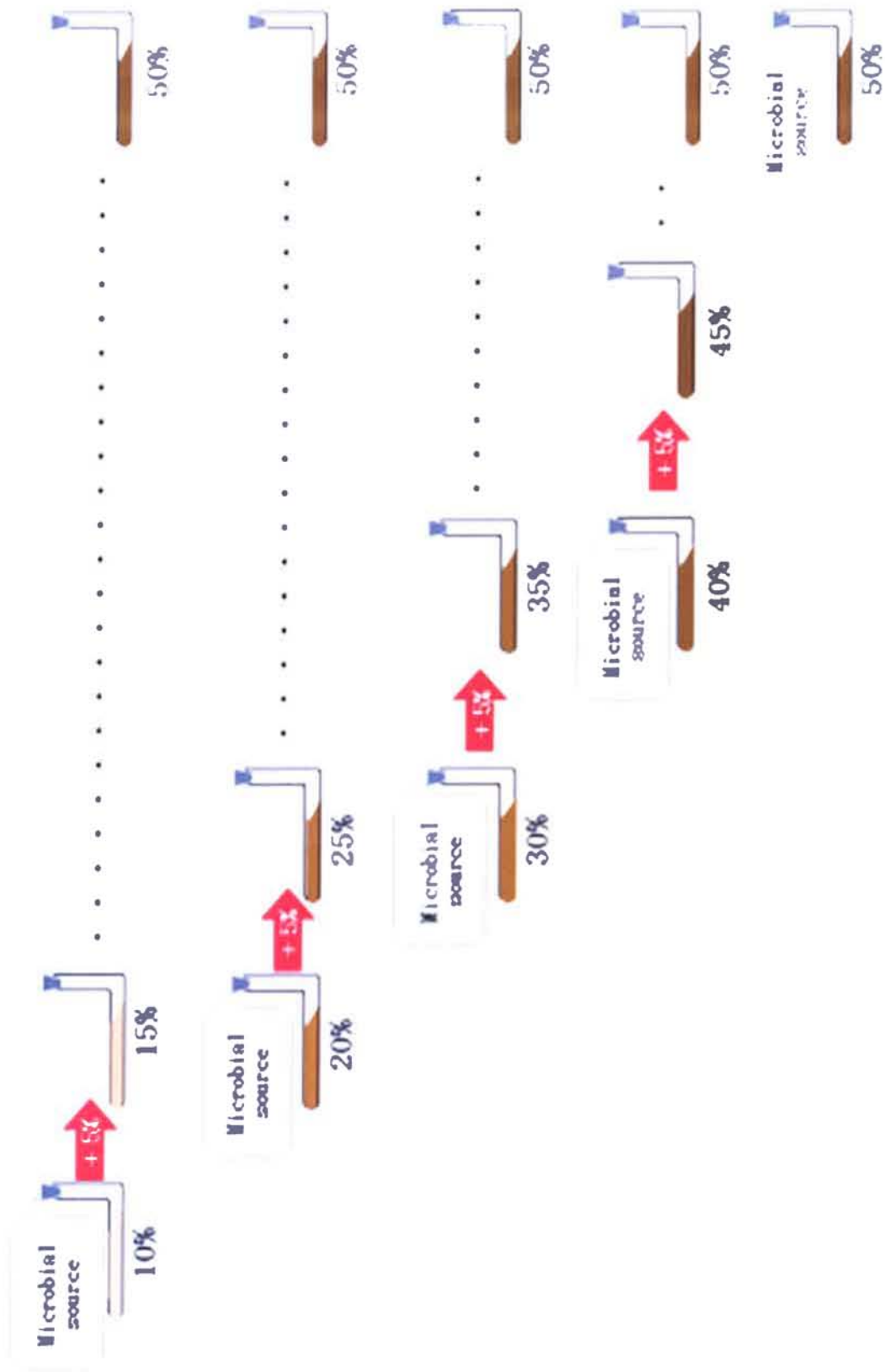


Fig. 1 Enrichment procedure of manure extract culture

え、ボルテックス後、遠心分離（20℃-12,500r.p.m-5分間）をおこなった。分離した液層から上層のみをとり、同量のイソプロパノールと、1/20量の5M NaClを加え、ボルテックスし、遠心分離（20℃-12,500r.p.m-5分間）後、上清を除去した。70%エタノール200 μ L加え、転倒混和後、遠心分離（20℃-12,500r.p.m-15分間）をおこない、上清を除去した。室温で風乾後、TE Buffer30 μ Lを加え溶解させたものをテンプレートDNAとした。

2) ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

0.2mLのPCRチューブにTable 2の反応液を分注した。分注した試薬は、KOD-Plus-Neo (TOYOBO社)を使用した。PCRに使用したプライマーはTable 3に示した。分注後、Table 4の設定でサーマルサイクラーをスタートさせ、16SrDNAを対象としたPCRをおこなった。その後、目的のサイズで増幅されているか確認するため、電気泳動（100V-30分間）をおこなった。

3) PCR産物の精製

PCR産物の精製はQIAquick Purification Kit (QIAGEN社)を使用し、おこなった。その後、ND-1000 (LMS社)にてDNA量を測定した。

4) 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE)

DGGE用のアクリルアミドゲル作成、電気泳動はD Code™System

Table 2 Reaction solution of PCR

Sterile ultrapure water	32 μ L
10 \times Buffer for KOD-Plus-Ver. 2	5.0 μ L
dNTP s (2 mM)	5.0 μ L
MgSO ₄ (25mM)	3.0 μ L
KOD-Plus	1.0 μ L
Primer-f (10mM)	1.5 μ L
Primer-r (10mM)	1.5 μ L
TemplatedNA	1.0 μ L
Total	50 μ L

Table 3 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5' -3')	Position ^{a)}
Bact-341-357F ^{b)}	CCTACGGGAGGCAGCAG	341-357
Bact-534-518R ^{c)}	ATTACCGGGCTGCTGG	518-534
GC-clamp	CGCCCGCCGGCCCCCGCCCGTCCGCGCCCGCCG	

a) Numbering of 16S oligonucleotide positions follows the *Escherichia coli* gene

b) Forward primer (GC clamped)

c) Reverse primer

Table 4 PCR amplification program

	Target(°C)	Hold(sec)	Cycles
Pre Denature	94	120	1
Denature	98	10	} 34
Annealing	62.3	30	
Extention	68	30	
Final	4	∞	1

(Bio Rad 社) を使用した。アクリルアミドゲル濃度は 6 % とし、変性剤の濃度は 50 % および 60 % を作成した (Table 5) 。変性剤アクリルアミド溶液を混合させ、変性剤濃度勾配ゲルを作成した。DNA 量が 250ng になるように PCR 産物を調整し、ウェルにアプライした。予備通電 (58℃ -20 V -15 分間) をおこない、その後、58℃ -50 V -18 時間で泳動をおこなった。泳動後、ゲルを TAE buffer 300mL 中に移し、SYBR Green I (Lonza 社) を 30 μ L 加え、30 分間振盪染色した。染色後、UV トランスイルミネーターでバンドを検出し、撮影した。

5) 主成分分析による評価

DGGE で得られた写真をゲルプロアナライザー (NIPPON ROPER 社) にて解析し、バンドの詳細な検出をおこなった。その後、R Project Contributors が提供している R ソフトにて、データを数値化し、主成分分析に使用した。

6) 多様性指数の算出

上記のゲルプロアナライザーにて解析されたバンドパターンを数値化し、シン普森多様性指数 ($D = 1 - \sum P_i^2$) , シャノン指数 ($H' = - \sum P_i \cdot \log P_i$) を算出した。

Table 5 Composition of denaturing gradient gel

Composition	50%	60%
40%Acrylamide/Bis Solution	30mL	30mL
50 × TAE buffer	4mL	4mL
Formamide (deionized)	40mL	48mL
Urea	42g	50.4g
Ultra pure water	To 200mL	To 200mL

3. 結果

牛ふん尿エキス初発濃度で培養した細菌群集構造と段階的に最高濃度の50%まで高めた細菌群集構造を比較した (Fig. 3) 。各試験区の初発濃度を比較すると、50%区とは異なる細菌群集構造を形成していることが確認された。また、各試験区の初発濃度と最高濃度を比較すると、初発濃度では可視化されていたバンドが最高濃度では所々消失しており、細菌群集構造に若干の変化が認められた。0%区は、細菌の増殖が認められなかったため、結果から割愛した。Fig. 4では、牛ふん尿エキス初発濃度及び最高濃度における細菌群集構造の主成分分析を示した。この結果より、10%区及び20%区、30%区の細菌群集構造は初発濃度のものから大きく変化していることが認められた。また、20%区及び30%区、40%区の最高濃度における細菌群集構造は50%区のものに近い一方で、10%区の最高濃度における細菌群集構造は、他の試験区とは異なる構造であることが認められた。Table 6および7では、それぞれ牛ふん尿エキス初発濃度における細菌群集構造の多様性指数と牛ふん尿エキス最高濃度における細菌群集構造の多様性指数を示した。牛ふん尿エキスを最高濃度まで高めた10%区及び20%区、30%区の多様性指数は初発濃度よりも低く、40%区はシン普森多様性指数及びシャノン指数は共に高くなっ

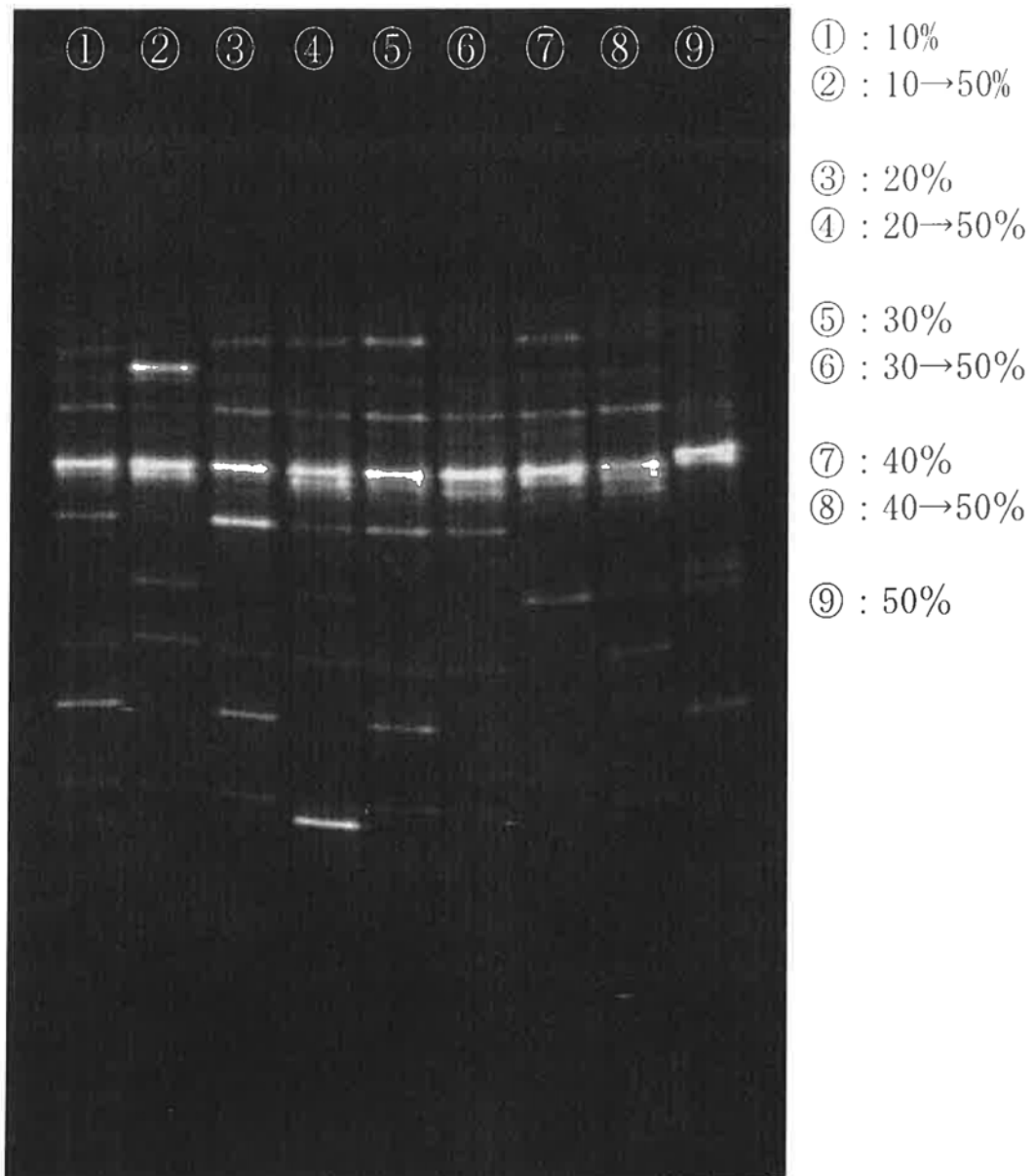


Fig. 3 DGGE profiles of total bacterial communities obtained from enrichment cultures

①, ③, ⑤, ⑦ : Initial concentration of manure extract.
 ②, ④, ⑥, ⑧ : Final concentration of manure extract.

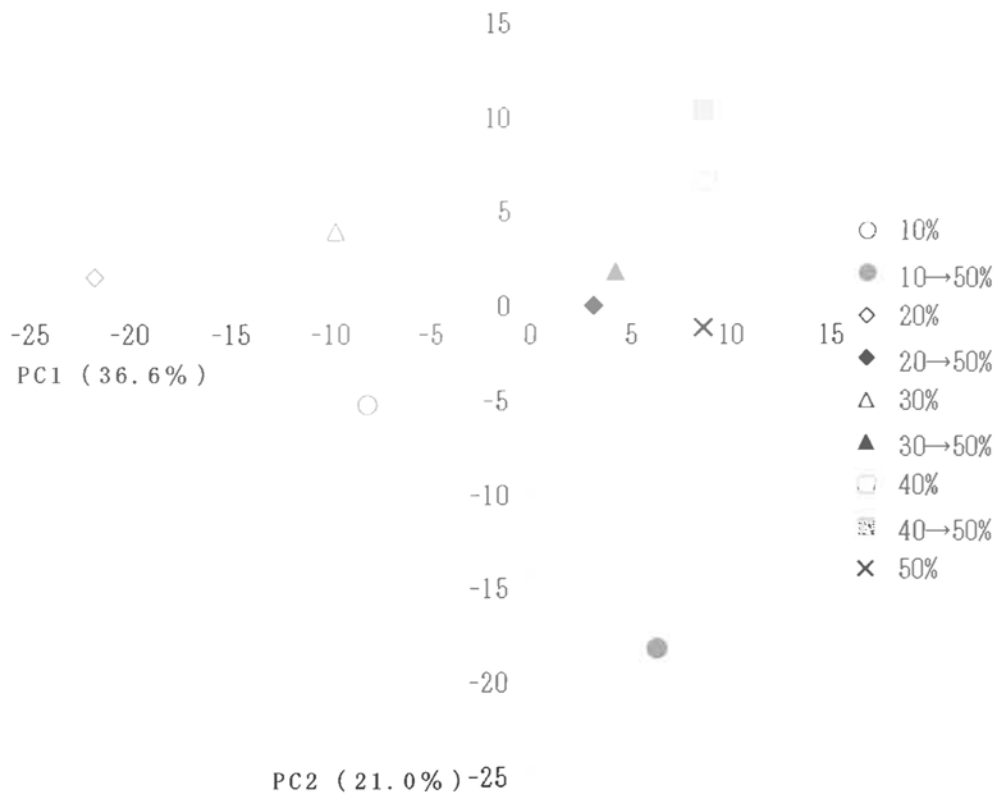


Fig. 4 Principal component analysis of DGGE profiles obtained from enrichment cultures

The band pattern obtained by DGGE was digitized, replaced it with a matrix, made it into coordinates, and plotted it on a plan. If a coordinate is close to other coordinates, the bacterial community structure is similar, and if it is distant, it has a different bacterial community structure. ○, ◇, △, □: Initial concentration of manure extract. ●, ◆, ▲, ■, ×: Final concentration of manure extract.

Table 6 Diversity index of DGGE profiles of the determined initial concentrations

Initial concentration (%)	Simpson's reciprocal index (D)	Shannon-Weiner index (H')
10	0.776	2.912
20	0.822	3.006
30	0.832	3.052
40	0.799	2.859
50	0.731	2.536

Table 7 Diversity index of DGGE profiles of cultured from determined concentrations to 50%

Initial concentration → Final concentration (%)	Simpson's reciprocal index (D)	Shannon-Weiner index (H')
10→50	0.760	2.765
20→50	0.758	2.601
30→50	0.754	2.756
40→50	0.838	3.093
50	0.731	2.536

た。中でも、50%区の多様性指数は、最も低い数値を示しており、牛ふん尿エキスの初発濃度を50%に設定した培養は多様な細菌を集積する上で適切ではないことが示唆された。Fig. 5で、牛ふん尿エキス最高濃度で継代培養した細菌群集構造を比較した。この結果から、継代を繰り返す程、可視化できるようになったバンドも認められたが、一方で消失したバンドもあり、牛ふん尿エキス最高濃度で継代培養することで細菌群集構造が変化したことが認められた。Fig. 6は牛ふん尿エキス最高濃度で継代培養した細菌群集構造の主成分分析を示した。10%区継代1回は、どの細菌群集構造とも離れた位置にあったが、継代10回、20回と繰り返していくことで20、30、40%区のものに近い細菌群集構造を形成するようになったことが認められた。また、50%区は、継代を繰り返しても細菌群集構造にあまり変化は無く、独自の構造を形成していることが認められた。Table 8では、牛ふん尿エキス最高濃度で継代培養し、得られた多様性指数を示した。10%区は継代するにつれ、シン普森多様性指数、シャノン指数共に数値が高くなり、最も多様性が高まった結果となった。一方、50%区は継代をしても、最も多様性指数が低い結果となった。

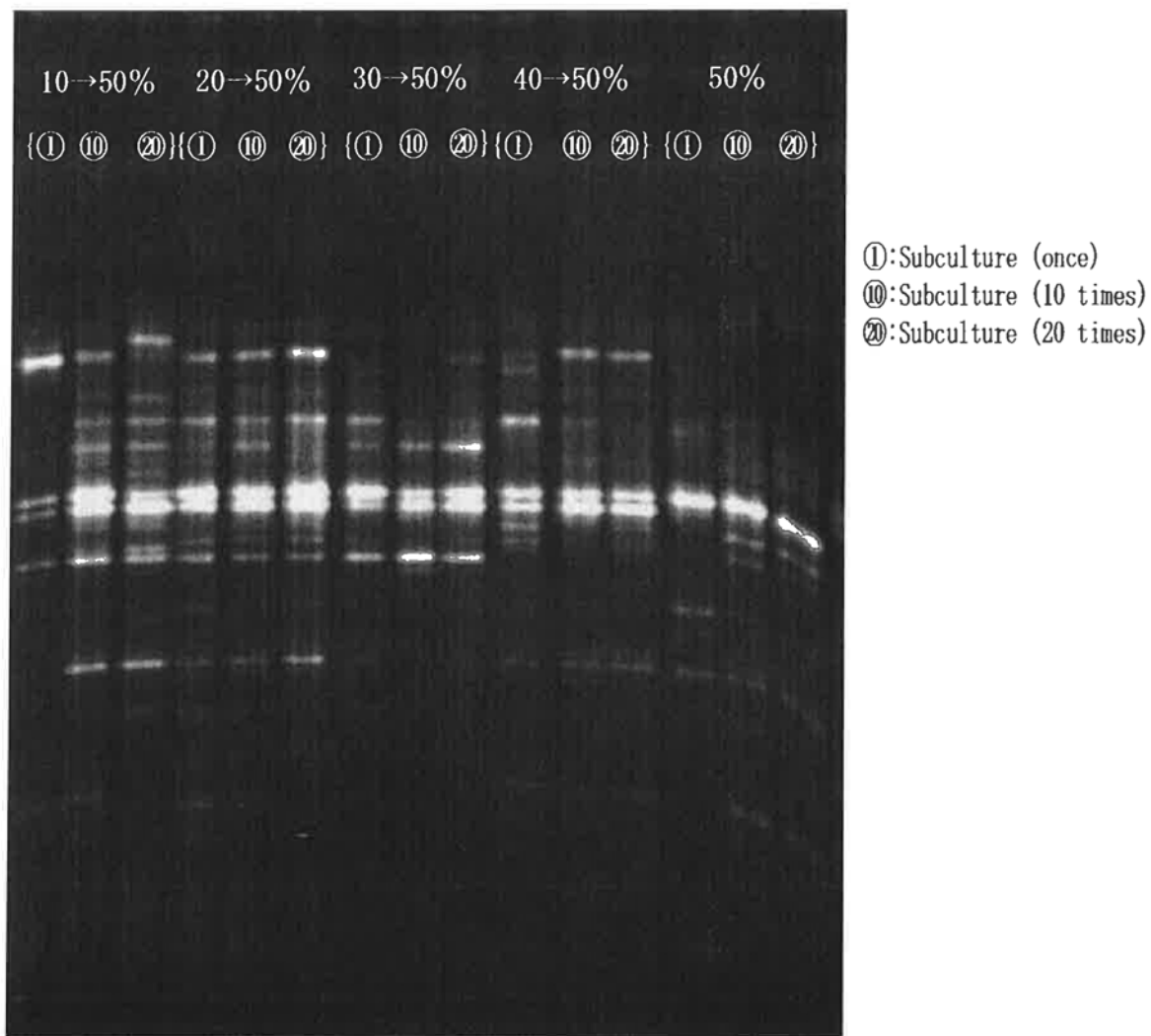


Fig. 5 DGGE profiles of total bacterial communities obtained from subcultures

The upper arrow shows that initial concentrations were gradually increased to 50% using manure extract. ①, ⑩ and ㉔ indicate that they were subcultured once, 10 times, and 20 times respectively after enrichment procedure of manure extract culture.

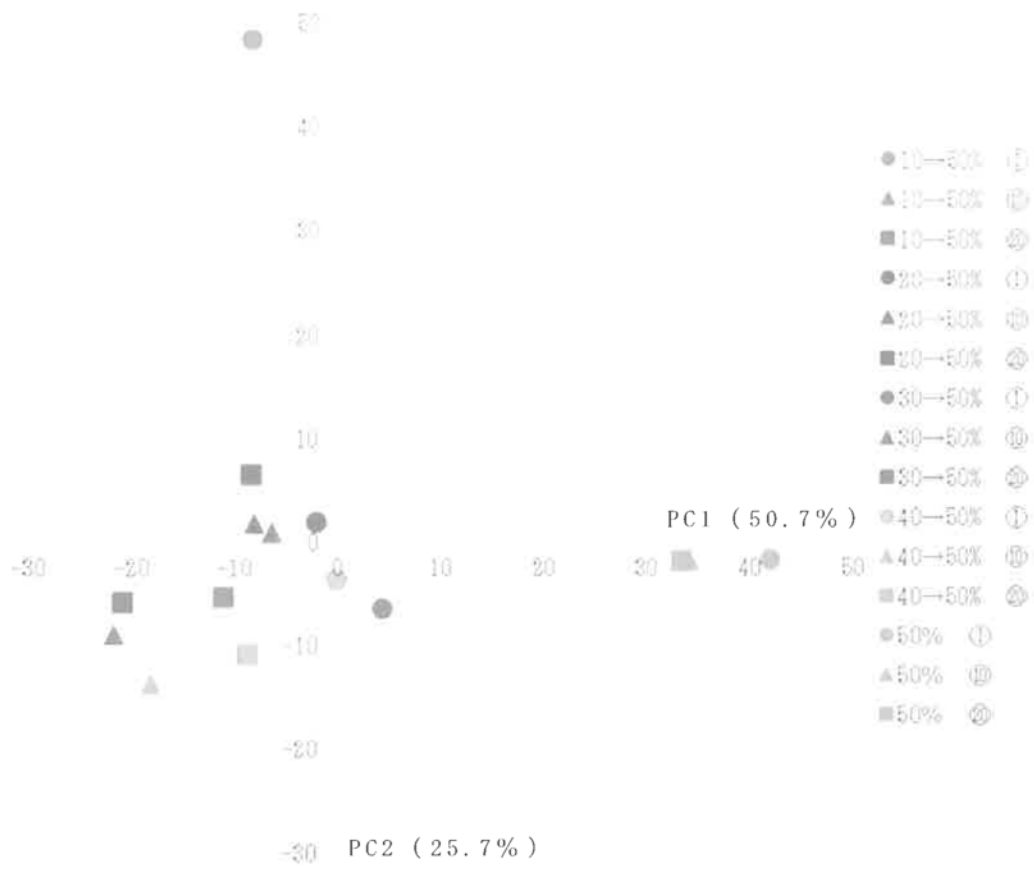


Fig. 6 Principal component analysis of DGGE profiles from subcultures

○ : subcultured once. ▲ : subcultured 10 times.
 ■ : subcultured 20 times.

Table 8 Diversity index of DGGE profiles from enrichment culture via
stepwise with using manure extract

Initial concentration→ Maximum concentration (50%)	Subculture	Simpson's reciprocal index (D)	Shannon-Weiner index (H')
10→50%	1	0.669	2.145
	10	0.839	2.931
	20	0.853	3.257
20→50%	1	0.832	3.062
	10	0.824	2.948
	20	0.838	2.989
30→50%	1	0.798	2.745
	10	0.736	2.052
	20	0.804	2.642
40→50%	1	0.846	3.103
	10	0.731	2.400
	20	0.793	2.705
50%	1	0.565	1.847
	10	0.702	2.606
	20	0.707	2.434

4. 考察

牛ふん尿エキス初発濃度と最高濃度の各試験区の細菌群集構造を比較したところ、10%区から30%区で構造が変化していたことから、牛ふん尿エキス段階的集積培養による細菌群集構造への影響は、低濃度区で顕著になると考えられた。また、その後の牛ふん尿エキス高濃度集積培養で、50%区の細菌群集構造はあまり変化していないのに対し、10%区の細菌群集構造は大きく変化していたこと、多様性指数も10%区が試験区の中で最も高かった結果は、牛ふん尿エキス高濃度集積培養によって、10%区の細菌群集構造がその影響を受け、より多種多様な細菌種で構成されるようになったことによると考えられた。

5. 小括

Iの結果から、牛ふん尿エキス初発濃度を10%に設定し、段階的に濃度を上げていくことで最高濃度まで高め、更に牛ふん尿エキス濃度が最高濃度の状態で、複数回継代したものが最も多様性が高くなることが示された。これは、プロピオン酸を唯一の炭素源とした条件下で、多様性が高い細菌群集構造の形成をねらいとした集積培養法を検討したものである。よって、ほかの対象基質である *n*-酪酸, *iso*-吉草酸, *n*-吉草酸についても、同様の条件で検討する必要がある。

II. 牛ふん尿エキス高濃度環境における集積培養

1. 序文

Iより、最も多様性が高い培養法は、牛ふん尿エキス初発濃度を10%に設定し、牛ふん尿エキス段階的集積培養と高濃度集積培養を組み合わせであった。この方法に準じて、プロピオン酸以外の*n*-酪酸、*iso*-吉草酸、*n*-吉草酸についても同様の傾向が確認されるか調査した。また、牛ふん尿エキス高濃度集積培養のみおこなうことで得られた細菌群集構造についても比較し、上記の細菌群集とVFA低減に差があるかも検証した。

2. 材料と方法

(1) 集積培養

1) 微生物源の調整

Iと同様に、本学付属農場の堆肥場から採取した堆肥を処理後、微生物源とした。

2) 牛ふん尿エキスの調整

Iと同様に、乳牛由来のふんと尿を45:13の割合で混合し、調整したものを牛ふん尿エキスとし、使用した。

3) 特定有機物分解菌用培地の調整

特定有機物分解菌用培地 (Table 9) に唯一の炭素源として、プロピオン酸, *n*-酪酸, *iso*-吉草酸, *n*-吉草酸をそれぞれ単独基質で添加した。各基質は、最終濃度が20mMになるように調整した。

4) 培養法の検討

VFA各基質を炭素源とした特定有機物分解菌用培地に牛ふん尿エキスを加え、初発濃度を10%に設定した。増殖確認後、牛ふん尿エキス濃度+5%の新鮮な培地に継代した。これを、牛ふん尿エキス濃度が最高濃度に至るまで段階的に継代した。その後も、最高濃度で継代培養を20回繰り返した(牛ふん尿エキス段階的集積培養+高濃度集積培養)。また、比較対象として、牛ふん尿

エキス高濃度集積培養のみのものもおこなった。

(2) 細菌群集構造解析

1) テンプレート DNA の作成

I と同様に、各試験区から 1 mL とり、PCR 用に処理したものをテンプレート DNA とした。

2) ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

I と同様に、0.2 mL の PCR チューブに Table 2 の反応液を分注し、Table 3 のプライマー、Table 4 の条件で PCR をおこなった。その後、目的のサイズで増幅されているか確認するため、電気泳動 (100 V - 30 分間) をおこなった。

3) PCR 産物の精製

I と同様に、PCR 産物の精製は、QIAquick Purification Kit を使用し、おこなった。その後、ND-1000 にて DNA 量を測定した。

4) 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE)

DGGE 用のアクリルアミドゲル作成および電気泳動は D Code™ System を使用した。アクリルアミドゲル濃度は 6 % とし、Table 5 に従って変性剤を作成した。I と同様に PCR 産物を調整後、ウェルにアプライし、予備通電 (58°C - 20V - 15 分間) 後、58°C - 50V - 18 時間で泳動した。泳動後、ゲルを染色し、UV トランスイルミネーターで撮影した。

5) 主成分分析による評価

Iと同様に、DGGEで得られた写真を解析後、Rソフトでデータを数値化し、主成分分析に使用した。

6) 多様性指数の算出

Iと同様に、DGGE写真のバンドパターンを数値化し、シンプソン多様性指数、シャノン指数を算出した。

(3) ガスクロマトグラフによるVFAの定量

L字試験管に特定有機物分解菌用培地 2.5mL、牛ふん尿エキス 7.5mL分注したものに、集積培養をおこなった細菌群集 100 μ Lを接種し、30 $^{\circ}$ C-24時間培養した。VFAは全て、最終濃度が5mMとなるように調整した。3時間ごとに培養物を1mL採取し、小試験管に分注した。24%メタリン酸-5N硫酸を0.2mL加え、ブチルゴムを閉め攪拌した。これを遠心分離(3,500r.p.m-4 $^{\circ}$ C-15分間)し、得られた上清 0.35mLを分析試料とした。これに内部標準物質として80mMの2-メチル吉草酸を0.05mL加えた。攪拌後、1 μ Lをガスクロマトグラフ(GC-380:GL Science)に注入し、内部標準法にてVFAを定量した。カラム(充填剤Unisole-F 200, 30/60メッシュ, 3.2mm \times 2.0mm:GL Science)温度を140 $^{\circ}$ C、INJ/DET温度を170 $^{\circ}$ C、窒素をキャリアーガスとして、検出器はFIDを用いた。

3. 結果

牛ふん尿エキス段階的集積培養および高濃度集積培養から得られた細菌群集構造を比較した (Fig. 7)。牛ふん尿エキス段階的集積培養における細菌群集構造を比較すると、10%、50%、継代 20 回と集積培養をおこなって行く中で、バンドの可視化や消失が 4 基質すべてにおいて現れていた。また、両培養法ともに、形成された細菌群集構造は基質によって若干異なっていることが認められた。牛ふん尿エキス段階的集積培養および高濃度集積培養から得られた細菌群集構造の主成分分析をおこなった (Fig. 8, 9)。Fig. 8 から、牛ふん尿エキス濃度を 10% から 50% まで段階的に高めると、プロピオン酸と *n*-吉草酸の各細菌群集構造は初発濃度と最高濃度のものが類似しており、一方で、*n*-酪酸と *iso*-吉草酸の各細菌群集構造は初発濃度と最高濃度では異なるものを形成していることが確認された。Fig. 9 において、二つの異なる培養法から得られた座標を比較すると、*n*-吉草酸以外の 3 基質は類似した細菌群集構造を形成していることが認められた。牛ふん尿エキス段階的集積培養および高濃度集積培養から得られた細菌群集構造の多様性指数を算出した (Table 9, 10)。Table 9 によると、牛ふん尿エキス濃度を 10% から 50% に段階的に上げたとき、シンプソン多様性指数は *n*-吉草酸以外の 3 基

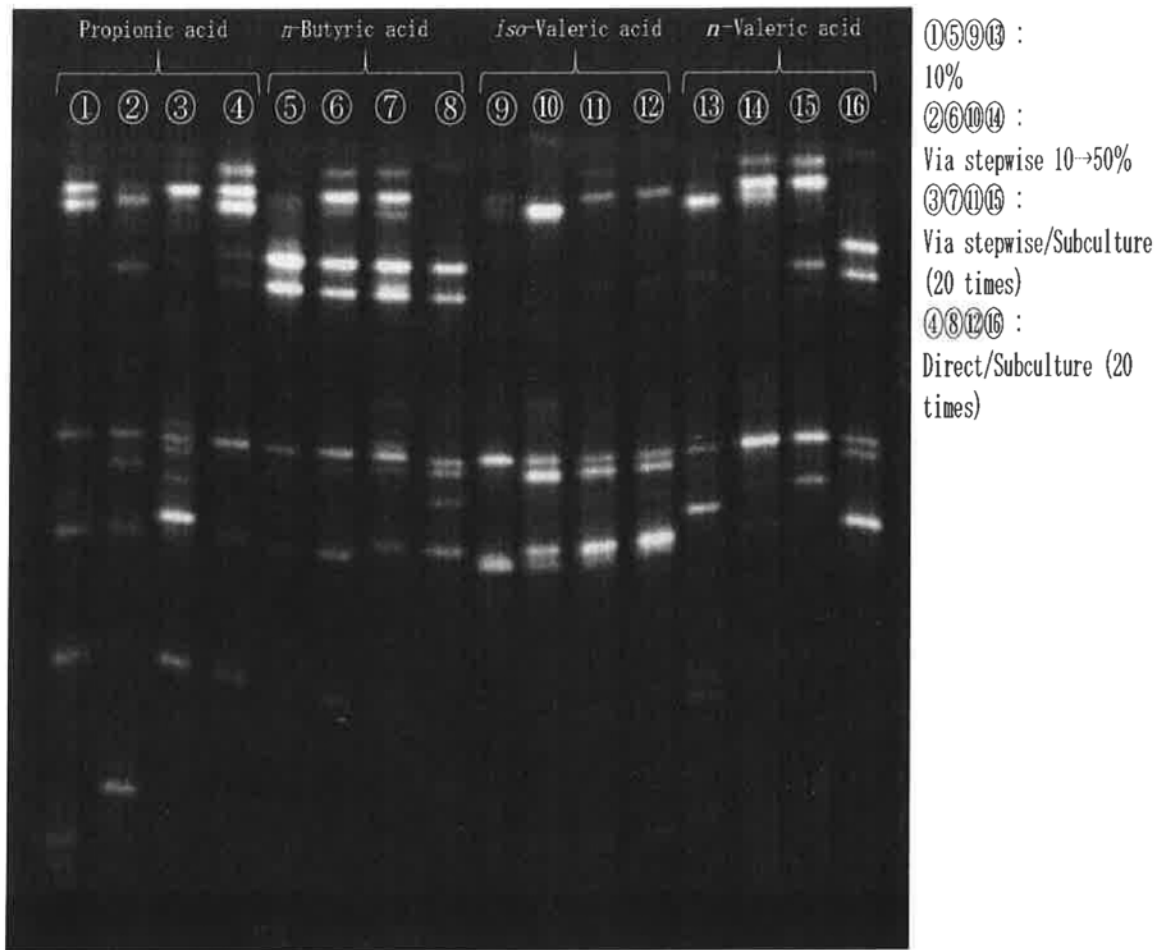


Fig. 7 DGGE profiles of total bacterial communities obtained from enrichment cultures of different substrates

① , ⑤ , ⑨ , ⑬ : Initial concentration of manure extracts. ② , ⑥ , ⑩ , ⑭ : Final concentration of manure extracts. ③ , ⑦ , ⑪ , ⑮ : Subcultured 20 times respectively after enrichment procedure of manure extract (via stepwise). ④ , ⑧ , ⑫ , ⑯ : Subcultured 20 times respectively after enrichment procedure of manure extract (direct).

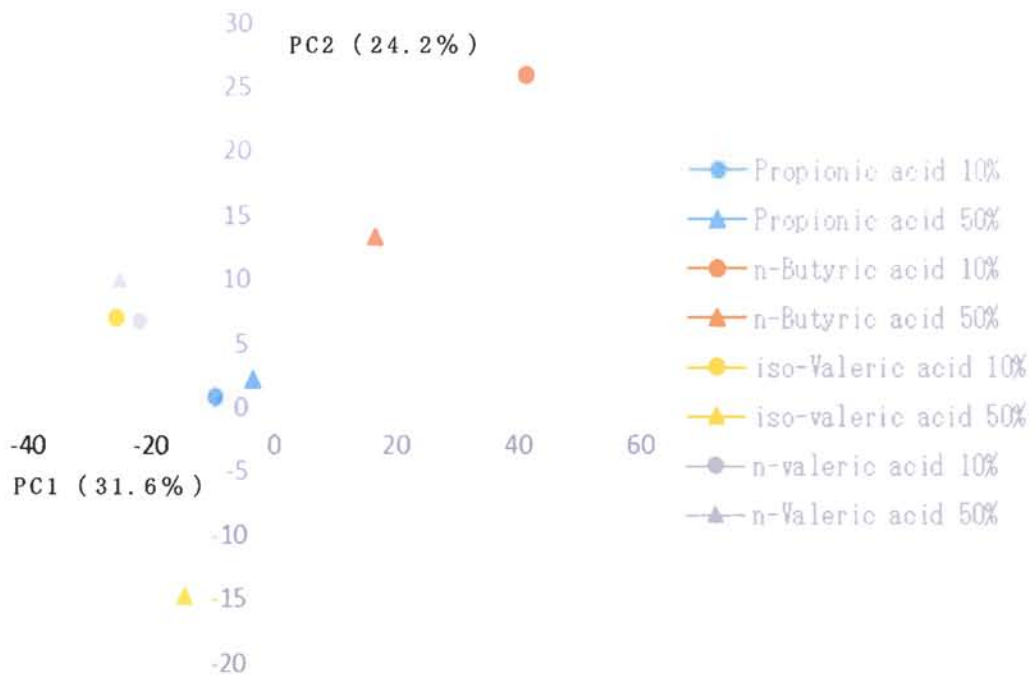


Fig. 8 Principal component analysis of DGGE profiles from enrichment culture via stepwise by different substrates using manure extract.

● : Initial concentration of manure extract. ▲ : Final concentration of manure extract.

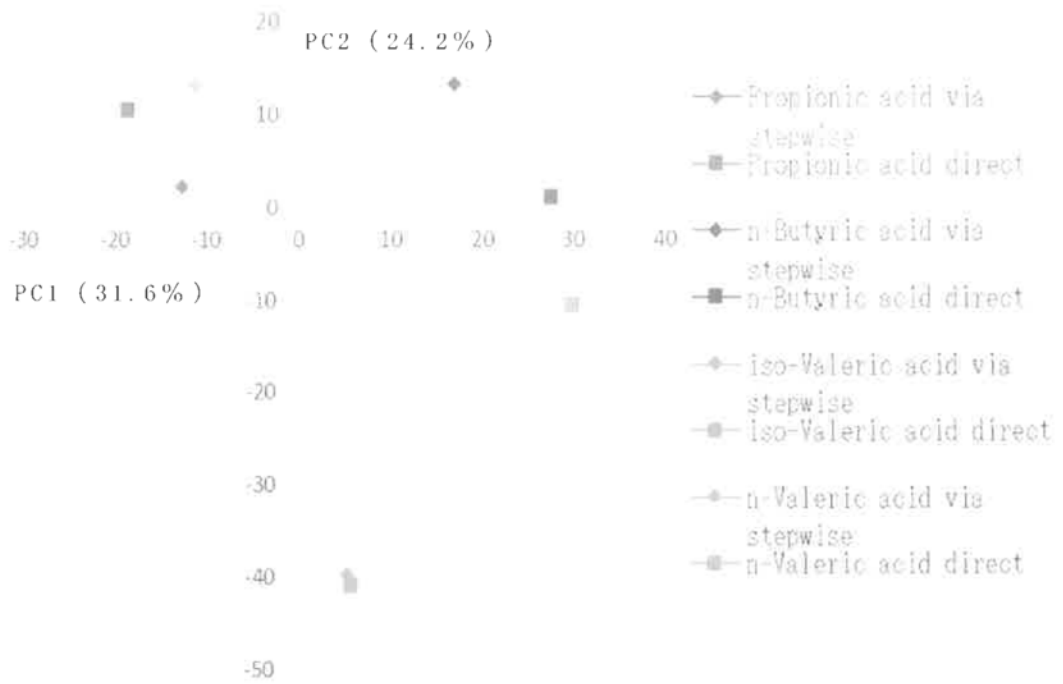


Fig. 9 Principal component analysis of DGGE profiles obtained subculture (via stepwise or direct) using manure extract

◇ : via stepwise □ : direct

Table 9 Diversity index of DGGE profiles obtained from stepwise enrichment cultures of different substrates

VFA substrate	Concentration of manure extract (%)	Simpson's reciprocal index (D)	Shannon-Weiner index (H')
Propionic acid	10	0.846	2.980
	50	0.851	2.928
<i>n</i> -Butyric acid	10	0.640	1.707
	50	0.817	2.686
<i>iso</i> -Valeric acid	10	0.598	1.501
	50	0.809	2.612
<i>n</i> -Valeric acid	10	0.770	2.533
	50	0.733	2.079

Table 10 Diversity index of DGGE profiles obtained from subculture using manure extract

VFA substrate	Culture method	Simpson's reciprocal index (D)	Shannon-Weiner index (H')
Propionic acid	via stepwise	0.831	3.081
	direct	0.802	2.624
<i>n</i> -Butyric acid	via stepwise	0.841	2.963
	direct	0.812	2.611
<i>iso</i> -Valeric acid	via stepwise	0.728	2.336
	direct	0.695	2.144
<i>n</i> -Valeric acid	via stepwise	0.798	2.536
	direct	0.774	2.282

via stepwise:Enrichment culture using high concentration manure extract via stepwise.

direct:Direct enrichment culture using high concentration manure extract.

質において高まっており、シャノン指数においては *n*-酪酸と *iso*-吉草酸が高まったことが認められた。Table 10 によって、二つの培養法における多様性指数を比較すると、牛ふん尿エキス段階的集積培養後に続けて高濃度集積培養をおこなった方が、4 基質すべてのシンプソン多様性指数、シャノン指数共に数値が高かった。牛ふん尿エキス段階的集積培養・高濃度集積培養から得られた細菌群集の VFA 低減能をモニタリングするため、ガスクロマトグラフにて VFA の定量をおこなった (Fig. 10)。 *n*-酪酸と *n*-吉草酸が培養 6 時間、プロピオン酸が培養 9 時間で、それぞれ検出限界下に達した。一方で、*iso*-吉草酸は培養 12 時間まで減少が確認できたものの、培養 24 時間までに検出限界下に達することとはなかった。同様に、牛ふん尿エキス高濃度集積培養から得られた細菌群集の VFA 低減能も確認したところ、*n*-吉草酸が培養 6 時間、プロピオン酸と *n*-酪酸が培養 9 時間で検出限界下となった (Fig. 11)。また、*iso*-吉草酸は培養してから 24 時間以内では検出限界下には至らなかった。

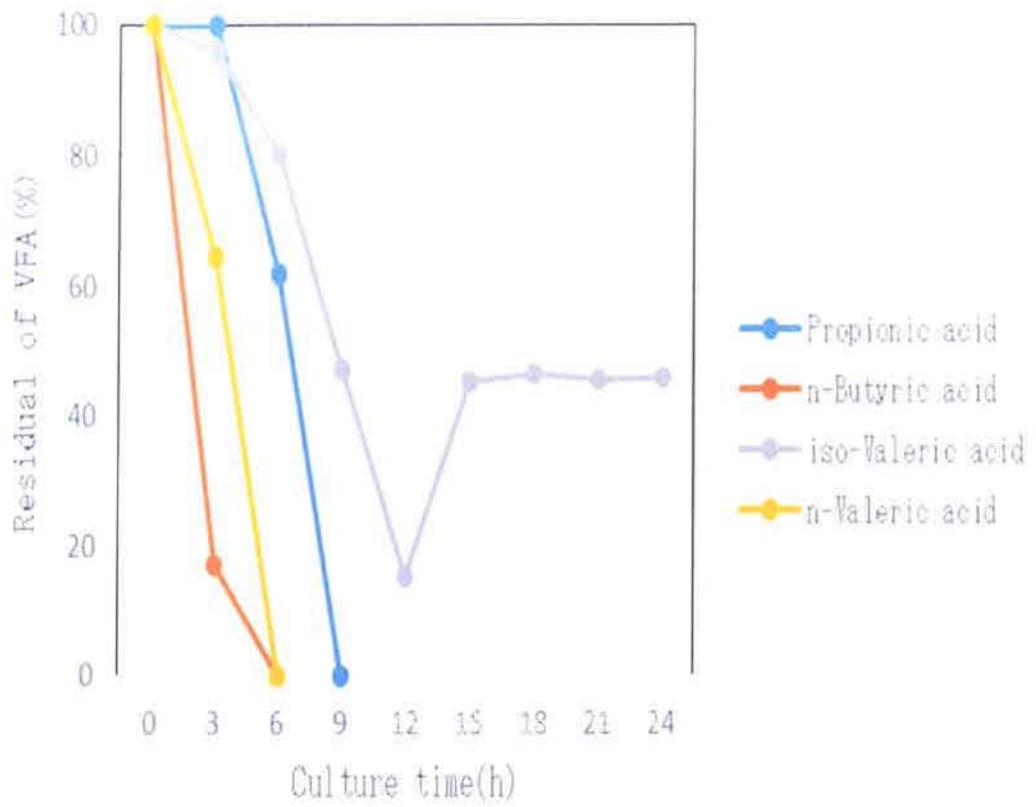


Fig.10 Reduction of VFA on subculture inoculated bacterial community using manure extract via stepwise

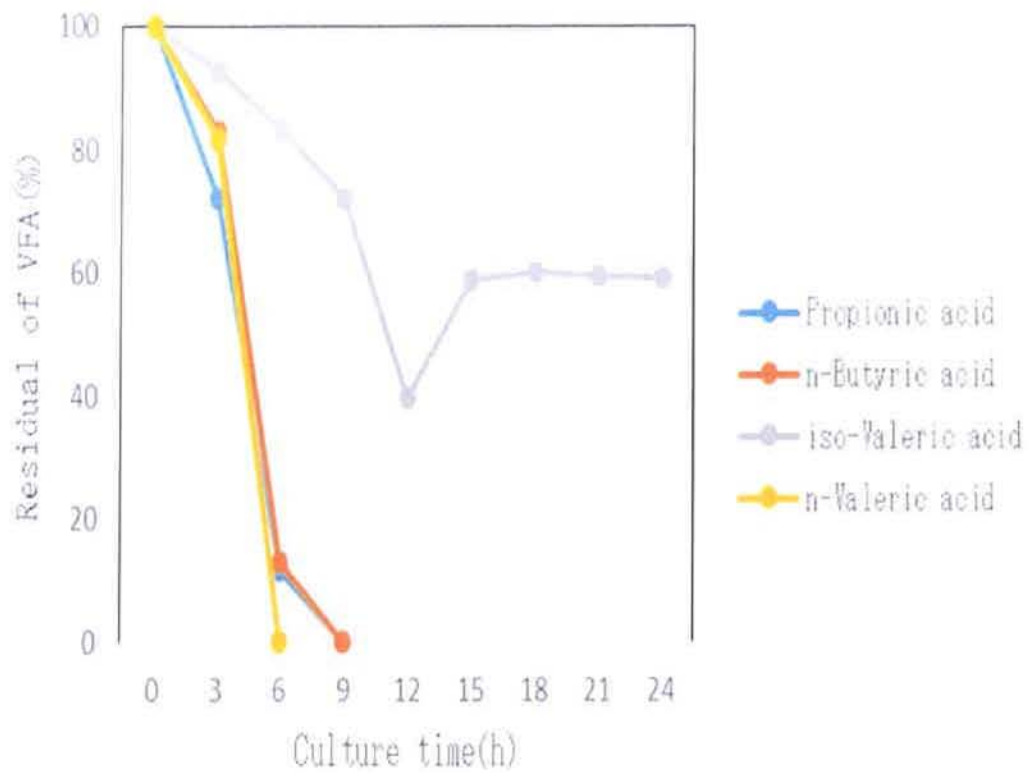


Fig.11 Reduction of VFA on direct enrichment culture inoculated bacterial community using manure extract

4. 考察

各培養の DGGE 写真より、基質ごとに異なるバンドパターンが確認され、各基質に特化した細菌群集が得られたと考えられた。また、バンドの消失や可視化が認められたことから、培養をしていく中で細菌群集構造に変化があったと考えられる。牛ふん尿エキス段階的集積培養において、主成分分析の結果から 4 基質の中で特に大きな変化があったのは、*n*-酪酸と *iso*-吉草酸であることがわかった。それに伴い、シンプソン多様性指数、シャノン指数も共に大きく変化し、多様性指数が高まっていたのは、*n*-酪酸と *iso*-吉草酸であった。よって、段階的に牛ふん尿エキスの濃度を上げるという条件が、この 2 基質の細菌群集構造の多様性を高める因子であると考えられた。牛ふん尿エキス段階的・高濃度集積培養と牛ふん尿エキス高濃度集積培養、各継代 20 回の細菌群集構造を比較すると、DGGE 写真上では、異なっている様に見えるが、中でも特に大きく異なっているのは、*n*-吉草酸であることがわかった。このことから、*n*-吉草酸における細菌群集は、ほかの 3 基質に比べ、培養法の違いによる影響を受けやすいと考えられた。牛ふん尿エキス段階的・高濃度集積培養と牛ふん尿エキス高濃度集積培養の多様性指数を比較すると、若干ではあるが、前者の方がシンプソン多様性指数、シャノン指数共に高くなって

いる。このことから、VFA 4 基質において、細菌群集の多様性を少しでも高めたいのであれば、牛ふん尿エキスの濃度を段階的に上げる培養法は効果的であると考えられる。ガスクロマトグラフの結果から、牛ふん尿エキス段階的・高濃度集積培養で得られた細菌群集を使用したものの方が、*n*-酪酸の低減が速かった。また、*iso*-吉草酸は、検出限界下には至っていないものの、残存率は牛ふん尿エキス段階的・高濃度集積培養の方が低かった。したがって、細菌群集の多様性が少しでも高いことが、VFA 低減に影響していると考えられる。

5. 小括

Ⅱの結果から、VFA基質によって細菌群集構造の形成が異なること、多様性を高めるには、牛ふん尿エキス濃度を段階的に上げるのが効果的であることが認められた。また、多様性が高いことが、VFAの低減の速さや残存率に影響するものと考えられた。

Ⅲ．総括

VFA を対象とした悪臭低減の研究は、本研究室で継続的におこなわれている。微生物源をある曝気処理液とし、安達は、VFA 基質培地から細菌の培養をおこない、細菌群集構造を明らかにしている^[1]。また、更科らは曝気処理液から 31 菌株の芽胞形成細菌を分離した^[25, 33]。更に、高橋は本研究室の保存株を組み合わせ、その相乗効果を評価している^[34]。これらの研究は共通して、乳牛ふん尿由来の牛ふん尿エキスなるものを使用して培養をおこなっている。しかしながら、これまでで分離されてきた細菌は、牛ふん尿エキス低濃度で培養されたものであり、現在のままでは、畜産現場での活用は困難であると考えられる。また、もう一つ懸念しなくてはいけないことは、様々な微生物が混在し、栄養源も豊富であろう畜産現場にて、分離株の特性が発揮されるか否かである。高橋の研究によると、多種類の細菌が混在する中でも、選抜株の増殖および VFA 低減能が確認されているが、選抜株にとって至適な環境に限定しているため、どの様な環境下においても、同様の結果が得られるかは検証されるべき課題である^[34]。

悪臭は、様々な物質から構成される複合臭である。同様に多種多様な物質で構成された例は下水や汚泥などがあり、この様な条件では、環境浄化のために微生物フローラを用いている場合が多

い^[10, 30]。水質浄化などで使われる活性汚泥は、凝集性細菌，非凝集性細菌，糸状性細菌からなり、pHや汚泥濃度，溶存酸素濃度の影響により、独特の細菌群集を形成することが知られている^[27]。悪臭分野の研究で、福山らは、硫化水素と硫化メチルの除去を活性汚泥によっておこなっている^[10]。そこでは、2日間以上、活性汚泥液中に被処理悪臭ガスを送り続け馴致させ、未馴致汚泥と比較させている。その結果、未馴致汚泥に比べ、馴致汚泥の方が両成分とも除去率 99%以上となり、高度の脱臭が認められていた。この結果から、牛ふん尿エキスを使用した培養においても長期間の馴致が必要ではないかと考え、I章では、多種多様な細菌群集を形成させ高い効果を得るために長期に渡る集積培養を試みた。Kedar C. Ahireらは、TBP濃度を段階的に上げた集積培養をおこない、高いTBP分解能を示す分離株を得た^[14]。同様に、本研究においても、牛ふん尿エキスを低濃度から高濃度まで段階的に上げる集積培養をおこない、DGGEにて細菌群集構造を確認した。また、得られた細菌群集は主成分分析および多様性指数を使用して評価した。その結果、牛ふん尿エキス段階的集積培養による細菌群集構造への影響は、低濃度区で顕著になると考えられ、その後の牛ふん尿エキス高濃度集積培養では、10%区の細菌群集構造が大きく変化していたこと、多様性指数も10%区が最も高まったこと

から、多種多様な細菌群集を形成させるには、牛ふん尿エキス濃度を低濃度から高濃度へと段階的に高めることで馴致させ、その後も高濃度の牛ふん尿エキスで培養する必要があるとした。

I 章では、プロピオン酸を用いた培養であったため、II 章では、今回の対象であるプロピオン酸以外の基質である *n*-酪酸，*iso*-吉草酸，*n*-吉草酸各単独基質で牛ふん尿エキス段階的・高濃度集積培養をおこない、同様の傾向になる確認した。その結果、VFA 基質ごとに細菌群集構造は異なっていることが確認され、牛ふん尿エキス濃度を段階的に高めていく培養法は多種多様な細菌を集積する上で効果的であるとされた。また、多様性指数が高かった細菌群集は、VFA 低減においても高い効果を示した。今回の結果では、24 時間以内に *iso*-吉草酸を検出限界下に至らせることはできなかったが、ほかの 3 基質に至っては、培養 9 時間以内に検出限界下としている。細菌群集を使用しても、プロピオン酸，*n*-酪酸，*n*-吉草酸においては、競合することは無く、迅速に低減できたことから、種の間でうまく効果を補い合えたと考えられる。一方で、*iso*-吉草酸については、残存率は一時大きく下がったものの、再び上昇している。これは、高橋の結果でも確認されており、細菌群の一部が代謝産物として VFA を産生した影響によるものと考えられている^[34]。*iso*-吉草酸の低減については、未だ

課題が残るため、微生物源を変更してみるか、ほかの方法を模索していく必要がある。

微生物資材を開発していく上で、考慮しなければいけないことがある。その一つとして、黒田は、市販臭気対策資材の問題点である臭気低減作用についての情報の曖昧さを挙げている^[18]。培養された細菌群集を使用して今後、実用化に向けた研究をしていくのであれば、どのような原理で臭気を低減するのか、代謝経路を明確にしたいところである。その指標となりそうなものの中に、SIP (Stable Isotope Probing) 法がある。花島は、¹³Cで標識されたグルコースを使用し、グルコース資化に関わる細菌群の解析をおこなっている^[5]。今後、VFAでも同様の試験をおこない、VFA資化に携わっている細菌を解明できれば、代謝経路解明の一助となる可能性がある。

本研究では、多種多様な細菌群集の形成ならびに牛ふん尿エキスへの馴致をねらいとした集積培養について検討し、得られた細菌群集構造の解析をおこなった。また、ガスクロマトグラフによって、迅速なVFA低減が3基質で認められたため、今後も細菌群集による悪臭低減の研究は重要であると示唆され、また、VFA資化細菌の解明や細菌群集の効果について徹底的に追及していく必要性があると考えられる。

IV. 謝辞

本論文執筆にあたり、終始御指導，御鞭撻頂きました、本研究室の岡本英竜准教授に深く感謝致します。また、御校閲賜りました応用昆虫学研究室の佐々木均教授，畜産衛生学研究室の高橋俊彦教授，獣医衛生学ユニットの永幡肇教授，度々、御指導頂きました北海道農業研究センターの花島大博士に謹んで御礼申し上げます。最後に、様々な面で支えてくださった本研究室の皆様，家族に心から感謝致します。

V. 引用文献

- [1] 安達由貴. 2012. 悪臭性低級脂肪酸を低減する細菌の検索. 卒業論文、1-36.
- [2] 道宗直昭. 2009. 『最近の研究動向』悪臭対策技術. 畜産環境情報、43 : 3-8.
- [3] FRANCIS C A、TEBO B M. 2002. Enzymatic Manganese(II) Oxidation by Metabolically Dormant Spores of Diverse *Bacillus* Species. *Appl Environ Microbiol.*, 68 : 874-880.
- [4] 羽賀清典. 2000. 家畜排泄物処理, 汚染対策における微生物利用と資材化. 微生物の資材化 : 研究の最前線、336-341.
- [5] 花島大. 2015. 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. 日本畜産学会第120回大会 講演要旨、97.
- [6] 本多淳裕. 2000. メタン発酵処理の今後の課題. 廃棄物のメタン発酵—理論と実用化技術—、225-228.
- [7] 福本泰之. 2009. 家畜ふん堆肥化における窒素保持. 農業および園芸 = *Agriculture and horticulture*、84 : 164-169.
- [8] 福本泰之. 2013. [酪農における窒素循環効率化のための技術シーズ] 家畜排せつ物の堆肥化で生ずる一酸化二窒素ガスの発生と微生物制御法. *JATAFF ジャーナル*、1 : 12-15.
- [9] 福本泰之. 2015. 畜産悪臭問題への研究サイドからの取り組み

について. 畜産環境情報、61:1-10.

- [10] 福山丈二、伊藤尚夫、本田淳裕、小瀬洋喜. 1979. 活性汚泥による悪臭除去に関する研究 (第1報) イオウ系臭気の活性汚泥による除去. 大気汚染学会誌、14:422-429.
- [11] JOVER Josefina、RAMIREZ Martin、RODRIGUEZ Ivan、CANTERO Domingo、GOMEZ Jose M. 2012. Strategies for pH control in a biofilter packed with sugarcane bagasse for hydrogen sulfide removal. J Environ Sci Health Part A., 47:990-996.
- [12] 金川貴博. 2002. 生物脱臭法の概要, 基本原理および特性. 普及版 防脱臭 技術集成、349-369.
- [13] 環境省. 2015. 家畜排せつ物の管理と利用の現状と対策について
<https://www.env.go.jp/council/09water/y0917-03/mat03.pdf>.
- [14] Kedar C. Ahire、Balu P. Kapadnis、Girish J. Kulkarni、Yogesh S. Shouche、Rajendra L. Deopurkar. 2012. Biodegradation of tributyl phosphate by novel bacteria isolated from enrichment cultures. Biodegradation., 23:165-176.
- [15] 近藤徹弥、森川豊. 2008. 悪臭物質の微生物的分解技術の開発.

愛知県産業技術研究所研究報告、7：94-97.

- [16] 小山太、黒田和孝、浅田研一、尾上武、近藤隆一郎. 2011.
Bacillus sp. TAT105 株添加による豚糞堆肥化過程のアンモニア揮散低減効果. 日本畜産学会報、82：163-169.
- [17] 黒田和孝. 2002. 家畜排せつ物の堆肥化における微生物を用いた臭気低減. 土と微生物、56：69-74.
- [18] 黒田和孝. 2006. 養豚で利用される臭気対策資材. 日豚会誌、43：143-167.
- [19] 李玉友、小林拓朗. 2015. メタン発酵と消化液農地還元利用を核としたバイオマス循環システム. コンポスト科学 環境の時代の研究最前線、195-214.
- [20] 松崎敏英. 1979. 家畜ふん尿の利用と処理、第2版. 117-122.
社団法人 農山漁村文化協会. 東京.
- [21] 森本直樹. 2011. アンモニア酸化細菌による家畜ふん尿堆肥化過程におけるアンモニア発生低減効果. 東京農総研研報、6：19-23.
- [22] 農林水産省. 2015. 畜産環境をめぐる情勢、1-16.
- [23] 農林水産省. 2015. 畜産経営に起因する苦情発生状況.
www.maff.go.jp/j/chikusan/kankyo/taisaku/pdf/kujou2.pdf.

- [24]尾上武．2002．豚への給与試験による低級脂肪酸類低減のためのD45株の最適菌数の検証．豚ふん中の低級脂肪酸類を分解し、豚舎で発生する臭気を低減する微生物資材の開発、4-10．
- [25]更科響．2013．悪臭性低級脂肪酸を低減する芽胞形成細菌の検索～*iso*-吉草酸・*n*-吉草酸～．卒業論文、72-108．
- [26]関口昇．2007．炭化处理技術の具体的取り組み．畜産環境情報、38：7-12．
- [27]柴田浩彦．2016．農業集落排水処理施設の維持管理基礎講座（第4回汚泥管理と微生物（その1））．JARUS、116：35-38．
- [28]重田芳廣．1976．悪臭公害と処理技術 下巻 対策技術編、第1版．251-271．株式会社アイピーシー．東京．
- [29]塩谷哲夫．1994．酪農事情 家畜ふん尿のハンドリングと活用 <土・草・家畜>の資源循環の再生をめざして、第1版．38-39．株式会社 酪農事情社．東京．
- [30]惣田訓、橋本くるみ、高田一輝．2016．酸素活性汚泥法の微生物群集構造の解析—標準活性汚泥法と膜分離活性汚泥法との比較—．下水道協会誌、53：138-144．
- [31]鈴木孝仁．2000．微生物の多様性とその利用．微生物の資材化：研究の最前線、13-14．
- [32]臭気対策研究会．1994．生物脱臭の基礎と応用—改訂版—、第

- 1 版. 1-11. 社団法人 臭気対策研究協会. 東京.
- [33]高橋みると. 2013. 悪臭性低級脂肪酸を低減する芽胞形成細菌の検索～プロピオン酸・*n*-酪酸～. 卒業論文、38-71.
- [34] 高橋みると. 2015. 悪臭性低級脂肪酸を低減する芽胞形成細菌の動態. 修士論文、1-57.
- [35]中央畜産会. 1988. 農林水産省畜産局家畜ふん尿処理利用手引制作事業 共同利用堆肥化施設の手引と優良事例、第1版、3-23. 社団法人 中央畜産会. 東京.
- [36]中央畜産会. 1990. 家畜ふん尿処理利用手引制作事業報告書 畜産における臭気とその防止対策、第1版. 13-16. 社団法人中央畜産会. 東京.
- [37]鵜飼信義、依田 亮. 1994. 自然浄化処理技術の実際―地域環境の保全―、第1版. 140-141. 株式会社 地人書館. 東京.
- [38]薬師堂謙一. 2011. 家畜排せつ物の炭化処理技術の現状と課題. 養豚の友、505 : 25-28.
- [39]吉川和身. 1996. 第1講 悪臭防止法の改正―経緯と動向―. 悪臭防止法の改正と対策動向、11-19.