

研究論文

## 豚糞尿スラリーを原料としたメタン発酵消化液の微生物群集構造

佐伯雄一・園田亮一・城 惣吉<sup>1)</sup>・矢野 翼<sup>1)</sup>・赤木 功<sup>2)</sup>・山本昭洋・杉本安寛<sup>3)</sup>

宮崎大学農学部応用生物科学科

<sup>1)</sup> 宮崎大学大学院農学工学総合研究科資源環境科学専攻

<sup>2)</sup> 鹿児島大学農学部生物資源化学科

<sup>3)</sup> 宮崎大学農学部植物生産環境科学科

(2012年12月26日 受理)

## Microbial community structure of methane-fermentation liquid of swine slurry

Yuichi SAEKI, Ryoichi SONODA, Sokichi SHIRO<sup>1)</sup>, Tsubasa YANO<sup>1)</sup>, Isao AKAGI<sup>2)</sup>,  
Akihiro YAMAMOTO, Yasuhiro SUGIMOTO<sup>3)</sup>

Department of Biochemistry and Applied Biosciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

<sup>1)</sup> Department of Environment and Resource Science, Interdisciplinary Graduate School of Agriculture and Engineering, University of Miyazaki

<sup>2)</sup> Department of Biochemical Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University

<sup>3)</sup> Department of Agricultural and Environmental Sciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

**Abstract :** Domestic animal excrement is known as biomass resources for soil improvement material and manure, and methane fermentation process is known as a remarkable method other than composting as the animal waste management. In our previous study, the existence of pathogenic microbes was not identified about methane-fermentation liquid from a methane fermentation biogas plant in University of Miyazaki. In this study, bacterial community structures of eubacteria and archaeobacteria were investigated for methane fermentation liquid and swine slurry by clone library analysis of environmental DNA targeting 16S rRNA genes. Phylogenetic tree by neighbor-joining method was constructed based on the ClustalW alignment result of the sequence data about 730 bases and the database sequences by BLAST search. In eubacteria, Family Clostridiaceae clones occupied majority in the slurry and the occupancy rate further increased in the fermentation liquid. Most eubacteria except for Family Clostridiaceae, decreased the occupancy rate, and the diversity index of the eubacteria also decreased. In archaeobacteria, the community structure of the detected methane fermentation archaeobacterium was changed. The dominance of *Methanocorpusculum* and *Methanoculleus* became large and the diversity index of a methane fermentation archaeobacteria increased. From these results, it was thought that the major bacteria in methane fermentation liquid and swine slurry could be clarified by differences of population of various microbes.

**Key words :** Archaeobacteria, Community structure, Clone library, Eubacteria, Methane-fermentation

## 緒言

日本国内の産業廃棄物は年間でおよそ4億tとされており、そのうちのおよそ22.5%が家畜排泄物であり、農業からの産業廃棄物が大きな割合を占めている(吉田 2004)。近年、日本国内において、農家一戸当たりの家畜飼育規模の拡大が見られ、それに伴い、固形状の家畜排泄物を積み上げて放置する「野積み」や、液体状の家畜排泄物を掘った穴に溜めておく「素掘り」といった家畜排泄物の不適切な処理を原因とした水質汚染や悪臭問題などの環境問題が顕在化した。この「野積み」や「素掘り」による家畜排泄物の処理は「家畜排泄物の管理の適正化及び利用の促進に関する法律(1999)」によって禁止され、法律で定められた家畜排泄物の処理法を遵守することが義務付けられた。また、家畜排泄物は土壌改良資材や肥料の原料といったバイオマス系資源として注目されていることもあり、その処理方法としてコンポスト化の他、メタン発酵処理などが利用されるようになった。特にメタン発酵処理に関して、生ゴミや家畜排泄物を原料としたメタン発酵で得られるバイオガスとしてのエネルギー回収率は90~100%と非常に高く、発生したバイオガスはガスエンジン発電機に送られ発電を行うための燃料として利用されている(木田 2004)。その反面、メタン発酵によって減少する家畜排泄物の重量は、メタンガスとして出ていくごくわずかであり、原料とほぼ同量の残渣がメタン発酵消化液として排出される。この消化液は原料の家畜排泄物と比較して悪臭が低減しており(Suzuki *et al.* 2009)、窒素、リン、カリウムなどの栄養成分を含んでいるため(西川他 2007)、従来の肥料に代わる液肥として農業へ利用することが、資源循環や環境負荷の改善にも結び付くと考えられている。

メタン発酵消化液を液肥として利用するためには、その安全性を確認する必要がある。家畜排泄物中にはサルモネラ、カンピロバクター、毒素原性大腸菌などといった病原性微生物が確認されており(柿市 2000)、その家畜排泄物を原料としている消化液にそれらの微生物が存在していた場合、液肥としての利用が難しくなる。農水省でリスク管理を行うべき有害微生物として、腸炎ピブリオ、サルモネラ、病原性大腸菌、カンピロバクター、ボツリヌス菌、ウェルシュ菌、リステリ

ア菌、ブドウ球菌、セレウス菌などの微生物が危害要因として挙げられている。これまで、我々の研究グループでは、宮崎大学に設置された中温性バイオガスプラントから採取したメタン発酵消化液に関して、大腸菌群選択培地を用いた培養実験と、病原性微生物特異的プライマーを用いたPCRによる検出を行った。その結果、スラリーにおいて大腸菌群と一般細菌が検出されたのに対し、消化液では大腸菌群は検出されず、一般細菌のみが検出された。さらに、大腸菌群、一般細菌以外では、腸炎ピブリオ菌、サルモネラ菌、リステリア菌、ブドウ球菌群、セレウス菌群、キャンピロバクター、ボツリヌス菌、ウェルシュ菌などの病原微生物の存在の有無を特異的プライマーによって確認したところ、それらの病原微生物の存在は確認されなかった(園田他 2010)。嫌気性発酵物における微生物の研究は病原微生物に関する研究だけでなく、群集構造の解析や発酵槽の効率化に関しても進められてきた。それらの研究では、環境DNA(environmental DNA : eDNA)の解析を基にしたシーケンスや、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis : DGGE)、温度勾配ゲル電気泳動法(Temperature Gradient Gel Electrophoresis : TGGE)、PCR産物の制限酵素断片長多型(PCR-Restriction Fragment length polymorphism : PCR-RFLP)といった培養に依存しない手法も取り入れられてきた。Connaughton *et al.* (2006)は、DGGEと16S rRNA遺伝子のシーケンス解析を用いて発酵槽中のバイオマス組成と発酵槽の活性を時間の経過とともに比較した。Sousa *et al.* (2007)は同様にDGGEと16S rRNA遺伝子のシーケンス解析を用いて、長鎖脂肪酸の存在と微生物の群集構造を時間の経過とともに比較した。また、Ye *et al.* (2007)はDGGEと一本鎖高次構造多型法(Single Strand Conformation Polymorphism : SSCP)を用いて、様々なpHで操作した発酵槽における微生物叢の変化を報告し、Mladenovska *et al.* (2003)はDGGEとTGGEを用いて、ラボスケールの嫌気発酵槽において優占しているメタン生成菌が*Methanosarcina siciliae*に近縁であるということ報告した。さらに、Liu *et al.* (2009)の研究では、DGGEと16S rRNA遺伝子のシーケンス解析によって嫌気性発酵槽におけるバクテリアと古細菌の群集構造が明らかにさ

れた。

微生物群集構造解析法としての16S rRNA遺伝子クローンライブラリー法は、数多くのクローンの配列を決定することにより、元の微生物群集の構成を推定することができる手法である。この手法は、16S rRNA遺伝子の塩基配列情報が得られるため、未知の菌種を含めてより詳細な、また正確な群集構造を解析する研究に適しており、培養困難な菌種が多く存在する微生物群集の詳細な解析に適用できる(藤本, 福井 2005)。Liu *et al.* (2009)の研究において、16S rRNA遺伝子のシーケンス解析とDGGE解析が比較された結果、微生物の多様性や構造を明らかにする場合、DGGEよりも16S rRNA遺伝子のシーケンス解析が適していると報告された。そこで本研究では、宮崎大学のバイオガスプラントから排出されるメタン発酵消化液とその原料中に存在する微生物の群集構造を明らかとするために、家畜糞尿原料としての豚糞尿スラリーと、宮崎大学構内に設置されている中温性バイオガスプラントから採取したメタン発酵消化液を試料として、16S rRNA遺伝子をターゲットとしたeDNAのクローンライブラリー解析によって、家畜糞尿スラリーとメタン発酵消化液に含まれる真正細菌と古細菌の群集構造を調査した。また、それぞれの微生物の相対的密度について、検討を加えた。

## 材料および方法

### 試料およびDNA抽出

試料には、家畜糞尿スラリー(以下、スラリー)として豚糞尿と、宮崎大学構内のバイオガスプラントから採取した、スラリーを原料としたメタン発酵消化液(以下、消化液)を用いた。試料からのeDNA抽出にはISOIL(ニッポンジーン)を用い、改変法で抽出を行った。試料300  $\mu\text{L}$ を0.5 gのガラスビーズを含む1.5 mL容マイクロチューブに採取し、570  $\mu\text{L}$ のLysis Solution HEと30  $\mu\text{L}$ のLysis Solution 20Sを加え、転倒混和した後、Bead Beater (DISRUPTOR GENIE, Scientific Industries)を用いて、30秒間破碎し、65  $^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベートした。マイクロチューブを、遠心分離(12,000  $\times g$ , 室温, 1分間)した後、上清360  $\mu\text{L}$ を回収し、後の処理は説明書に従った。試料から直接抽出したeDNA抽出液はさらに、Polyvinylpolypyrrolidone

(PVPP, Sigma)スピンカラムによる精製を行った(Cullen & Hirsch 1998)。抽出液全量を回収し、エタノール沈殿の後、DNAペレットを乾燥し、20  $\mu\text{L}$ のTE緩衝液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)に溶解してeDNA抽出液とした。

### クローンライブラリーの構築

微生物群集構造解析のため、真正細菌と古細菌の16S rRNA遺伝子をターゲットとしたクローンライブラリーの構築を行った。16S rRNA遺伝子のPCR増幅には、Yamada *et al.* (2007)の報告に基づき、フォワードプライマーとして、真正細菌に特異的なBac16SrDNA-F(5'-GAGTTTGATCCTG GCTCAG-3')と古細菌に特異的なArc16SrDNA-F(5'-TTCYGGTTGATCCTGCC-3')を用い、5'末端にはベクターに相補的な配列(5'-ATCGATAAG CTTGATATCA-3')を付加したプライマー、およびリバースプライマーとして、真正細菌、古細菌ともに増幅可能なBacArc16SrDNA-R(5'-GGCTAC CTTGTTACGACTT-3')の配列を有し、5'末端にはベクターに相補的な配列(5'-CTGCAGGAATTC GATATCC-3')を付加したプライマーを用いた。PCR反応には、*Ex Taq* DNA polymeraseキット(タカラバイオ)を使用し、PCR反応溶液の組成は、5.0  $\mu\text{L}$  10  $\times$  *Ex Taq* buffer, 4.0  $\mu\text{L}$  dNTP mix (2.5 mM), 各1.0  $\mu\text{L}$  プライマー (10  $\mu\text{M}$ ), 0.2  $\mu\text{L}$  *Ex Taq* DNA polymerase (5 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ), 38.0  $\mu\text{L}$ 滅菌蒸留水, 1.0  $\mu\text{L}$  eDNA抽出液を混合したものとした。PCR増幅は94  $^{\circ}\text{C}$ で5分間の変性後、94  $^{\circ}\text{C}$ で30秒間、55  $^{\circ}\text{C}$ で30秒間、72  $^{\circ}\text{C}$ で1分間の反応を30サイクル行った後、72  $^{\circ}\text{C}$ で10分間インキュベートを行った。PCR終了後、アガロースゲル電気泳動によってPCR増幅の確認を行った。PCR産物のクローニングと形質転換には、In-Fusion Advantage PCR Cloning キット(タカラバイオ), pBluescript SK(+ )ベクター(Invitrogen) およびコンピテントセル(*Escherichia coli* JM109, ニッポンジーン)を使用した。クローニング反応および形質転換は説明書に従って行った。得られた形質転換体を、100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ アンピシリン(和光純薬), 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (ナカライテスク), 0.25 mM 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside (和光純薬)を含むLB寒天培地(10 g  $\text{L}^{-1}$  Bacto tryptone (Becton, Dickinson and Company), 5 g  $\text{L}^{-1}$  Yeast extract (ナカライテスク), 5 g  $\text{L}^{-1}$



NaCl, pH 6.8, 1.5% Agar powder (和光純薬)) に塗布し, 37 °C で12~16時間培養した. 得られたクローンは, コロニーPCRによって, インサートの確認を行ない, スラリーおよび消化液につき, 真正細菌と古細菌の16S rRNA遺伝子の形質転換体をそれぞれ96クローン, 計384クローンを獲得した. 得られたクローンは, 100 µg L<sup>-1</sup>アンピシリンを含むLB液体培地 1.5 mLに懸濁し, 37 °Cで一晩, 振とう培養した. 培養後, 10,000 × g, 室温で5分間遠心分離を行い, 菌体ペレットを回収した. プラスミド抽出には, Microprep DNA purificationキット (タカラバイオ) を用い, 説明書に従って抽出を行った.

#### シーケンス解析

プラスミドのシーケンス解析にはBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing キット (Applied Biosystems) を用いた. 反応液組成は説明書に従って調製し, 96 °C で10分間の変性後, 96 °C で30秒間, 52 °C で15秒間, 60 °C で4分間の反応を25サイクルのサイクルシーケンスを行った. 反応後, BigDye X Terminator Purification キット (Applied Biosystems) を用いて精製を行った. 解析は, 宮崎大学フロンティア科学実験総合センターに委託し, シーケンスアナライザー (Applied Biosystems 3500 xL genetic analyzer) で, 5'末端から約730塩基を解析した. 得られたシーケンスデータをRibosomal Database Project (RDP) のCHIMERA CHECKプログラム (MICHIGAN STATE UNIVERSITY Ribosomal Database Project : <http://rdp.cme.msu.edu/>) を用いてキメラ配列の除外を行った後, DNA Data Bank of Japan (DDBJ, 国立遺伝学研究所 生命情報・DDBJ研究センター : <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) の提供するBLAST version 2.2.18を用いて微生物データベースと相同性検索を行ない, 最も相同性の高いデータベースを抽出した. 次に得られた配列データとデータベースから抽出した配列データを基にGENETYX-Mac Ver.14.0 (GENETYX) を使用し, ClustalWによるアライメントを行い, 近隣結合法 (Neighbor-Joining method) によって, 系統樹の作製を行った. 得られた系統樹と相同性検索の結果から, 検出された微生物の16S rRNA遺伝子の分類を行った. Clostridiaceae科の分類に関してはJohnson & Francis (1975) とCollins *et al.* (1994)

の報告に基づき, Family番号による分類を行った. それぞれの検出された微生物の分類群の占有率をクローン数とその百分率で示し, さらに, 16S rRNA 遺伝子は微生物種によってゲノム中のコピー数が異なるため, rrnDB search (MICHIGAN STATE UNIVERSITY : <http://rrndb.mmg.msu.edu/search.php>) において, 目 (Order) レベルにおける16S rRNA遺伝子の平均コピー数を調査し, その値で占有率の補正を行った. なお, 検出された微生物の目レベルでのrRNA遺伝子のコピー数値が得られない場合, 上位の分類における値を使用した.

#### 多様性指数

スラリーと消化液における真正細菌と古細菌の多様性を解析するために, Shannon-Wienerの多様性指数 ( $H'$ ) およびSimpsonの多様性指数 ( $D$ ) を用いた (小林 1995; 大垣 2008).

$$H' = - \sum pi \ln pi \quad (1)$$

$$D = 1 / \sum pi^2 \quad (2)$$

クローンライブラリー解析によって得られたデータより, 微生物の目, 科, および属ごとの検出クローン数のクローン全数に対する割合で与えられる  $pi$  値を求めた. これを式 (1) および (2) に代入し, スラリーと消化液における真正細菌と古細菌の多様性指数を算出した.

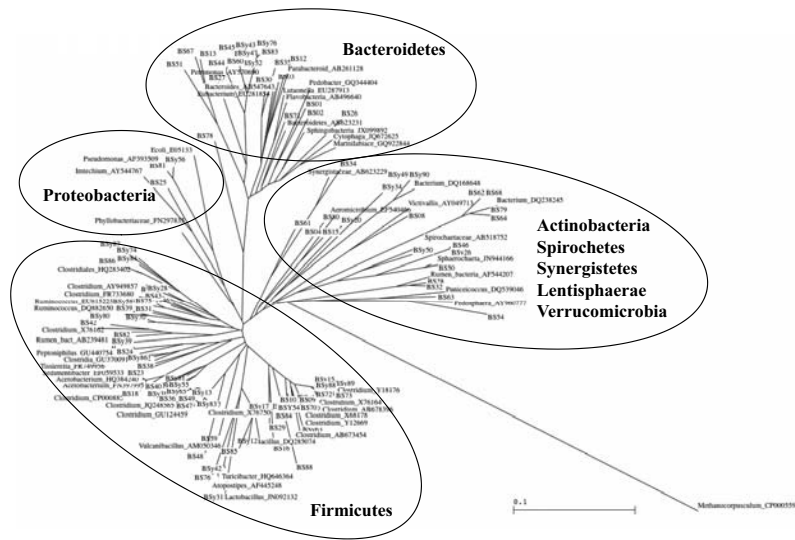
#### 微生物相対量の比較

スラリー及び消化液中に存在する真正細菌およびメタン発酵古細菌の菌密度を評価するために, リアルタイムPCRを用いて真正細菌とメタン発酵古細菌の相対的密度の検討を行った. リアルタイムPCRにはSYBR® Premix *Ex Taq* II (Perfect Real Time) (タカラバイオ) を使用し, リアルタイムPCR用プライマーとして, 真正細菌用 (338f: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' および 518r: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') と古細菌用 (931f: 5'-AGGAATTGGCGGGGAGCA-3' および m1100r: 5'-BGGGTCTCGCTCGTTRCC-3') を用いた (Einen *et al.* 2008). リアルタイムPCR反応液の組成は, 説明書に従い, 温度条件を, 95 °C で30秒間の変性後, 95 °C で5秒間, 60 °C で30秒間の2ステップ反応を40サイクル行った. 増幅は Ct法で評価し, 消化液のメタン発酵古細菌を1とした時の他の細菌の遺伝子量の相対量として評価した. また, 上記と同様に, 16S rRNA 遺伝子は

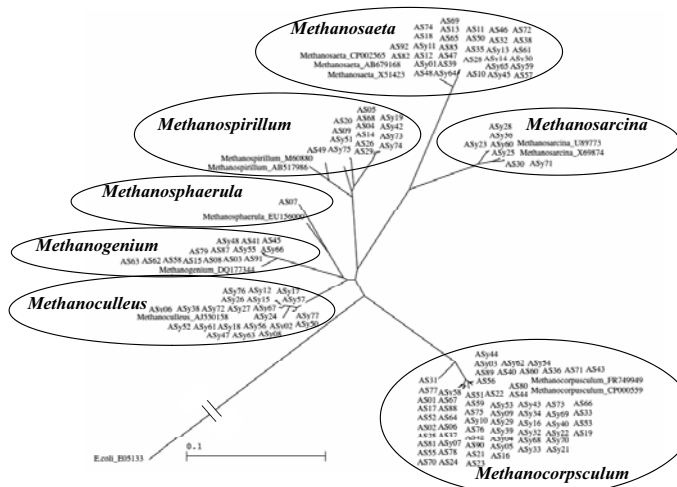
微生物種によってゲノム中のコピー数が異なるため、rrnDB searchで目(Order)レベルの16S rRNA遺伝子の平均コピー数を調査し、検出されたrRNA遺伝子の比率と目(Order)のコピー数から、加重平均値を算出した。すなわち、真正細菌においては、スラリー：5.10，消化液：6.53の値を，メタン発酵古細菌においては，スラリー：2.68，消化液：2.68の値を用いて細菌細胞数の補正を行い，細菌数の相対量を算出した。なお，検出された微生物の目レベルでのrRNA遺伝子のコピー数値が得られない場合，上位の分類における値を使用した。

**結果および考察**

本研究において，真正細菌のプライマーでPCR増幅を行ったスラリーと消化液を，それぞれBac-スラリー，Bac-消化液，同様に古細菌のプライマーでPCR増幅を行ったスラリーと消化液を，それぞれArc-スラリー，Arc-消化液と表記した。クローンライブラリーのシーケンス解析を行ったところ，Bac-スラリーで87，Bac-消化液で80，Arc-スラリーで87，Arc-消化液で70の配列データを得た。DDBJのBLASTによる相同性検索の結果得られた個々のクローンに近縁な微生物の配列データと共



**Fig. 1.** Dendrogram of bacterial clones contained in swine slurry and methane fermentation liquid. Circles indicate clusters of Phylum. Bar (0.1) indicates the rate of base substitution. BS represents bacteria clone from swine slurry and BSy represents bacteria clone from methane fermentation liquid.



**Fig. 2.** Dendrogram of archaeal clones contained in swine slurry and methane fermentation liquid. Circles indicate clusters of Genus. Bar (0.1) indicates the rate of base substitution. AS represents archaea clone from swine slurry and ASy represents archaea clone from methane fermentation liquid.

に、ClustalWによるアライメント解析を行ない、作成した系統樹をFig. 1 およびFig. 2 に示した。得られた系統樹と相同性検索の結果からクローンの分類を行った結果をTable 1 およびTable 2 に示した。

真正細菌において、スラリーでは非常に多様な微生物が存在していることが示唆された。Table 1

より、Bac-スラリーにおいてFirmicutes門が49.4% (30.1% : 括弧内に補正占有率を示す) を占め、特にClostridiaceae科は47.1% (28.6%) を占めていた。Bac-消化液ではその占有率は飛躍的に上がり、Firmicutes門として83.8% (67.4%) を占めており、Clostridiaceae科として80.0% (64.2%) の占有率を示した。これは、メタン発酵過程において、スラ

**Table 1.** Deduced taxonomical order, family, and genus of bacterial clones detected in swine slurry and methane fermentation liquid, and number and ratio of isolates.

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Swine slurry			Methane fermentation liquid					
					No. clone	Clone occupancy (%)	Adjusted occupancy (%)	No. clone	Clone occupancy (%)	Adjusted occupancy (%)			
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridiales Family I. <i>Clostridium</i>	18	20.7	12.5	36	45.0	36.1			
				Clostridiales Family II. <i>Desulfotomaculum</i>				1	1.3	1.0			
				Clostridiales Family IV. <i>Clostridium</i>	6	6.9	4.2	5	6.3	5.0			
				Clostridiales Family VIII. <i>Ruminococcus</i>	1	1.1	0.7	1	1.3	1.0			
				Clostridiales Family X. <i>Clostridium</i>	1	1.1	0.7	3	3.8	3.0			
				Clostridiales Family XI. <i>Tissierella</i>				2	2.5	2.0			
				<i>Peptoniphilus</i>	2	2.3	1.4	1	1.3	1.0			
				<i>Sedimentibacter</i>	1	1.1	0.7						
				<i>Acetobacterium</i>	2	2.3	1.4						
				Clostridiales Family XIII. <i>Clostridium</i>	7	8.0	4.9	14	17.5	14.0			
				Rumen bacterium (AB239481) unknown	3	3.4	2.1	1	1.3	1.0			
				Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>				1	1.3	0.8
							<i>Vulcanibacillus</i>	1	1.1	0.5			
							Lactobacillales	Carnobacteriaceae	<i>Atopostipes</i>	1	1.1	1.0	
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>							1	1.3	1.4			
Erysipelotrichi	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	<i>Turcibacter</i>							1	1.3	1.1	
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	<i>Parabacteroides</i>	2	2.3	2.2						
				<i>Petrimonas</i>	1	1.1	1.1						
				unknown	2	2.3	2.2						
			Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>	1	1.1	1.1						
			Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	unknown	1	1.1	1.6				
			Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	unknown	2	2.3	3.8				
			Devision Bacteroidetes	-	-	unknown	6	6.9	9.6				
Devision Bacteroidetes	-	-	unknown	8	9.2	12.8	6	7.5	13.8				
Actinobacteria	Actinobacteridae	Actinomycetales	Nocardioideaceae	<i>Aeromicrobium</i>	2	2.3	2.9						
			Microbacteriaceae	<i>Leucobacter</i>	1	1.1	1.5						
			Rumen bacterium (AF544207) unknown	2	2.3	2.9							
Proteobacteria	Betaproteobacteria			<i>Imtechium</i>	1	1.1	1.2						
	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	1	1.1	1.2	1	1.3	1.8			
Spirochetes	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	<i>Sphaerochaeta</i>	2	2.3	6.4	2	2.5	9.2			
Synergistetes	Synergistia	Synergistales	Synergistaceae	unknown	2	2.3	3.4	1	1.3	2.5			
Lentisphaerae	Lentisphaeria	Victivallales	Victivallaceae	<i>Victivallis</i>	1	1.1	2.9						
Verrucomicrobia	Opitutae	Puniceococcales	Puniceococaceae	<i>Puniceicoccus</i>	1	1.1	2.6						
	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobia	<i>Pedosphaera</i>	1	1.1	1.7						
	Bacterium (DQ168648)			unknown				3	3.8	5.3			
	Bacterium (DQ238245)			unknown	7	8	8.6						

リーよりもさらに嫌気的条件となるため、嫌気性微生物であるClostridiaceae科細菌の占有率が上がったためと考えられる。Clostridiaceae科を除く微生物に関しては、多くがその占有率を下げている。Bacteroidetes門はBac-スラリーで26.4% (34.4%) を占めていたが、Bac-消化液でその占有率は減少し、単独のBacteroidetes細菌の検出に留まり、Bacteroidetes門として7.5% (13.8%) まで減少した。Bacteroidetes門の中でもBacteroidia綱に属する微生物は嫌気性で、多くの動物の消化器官の腸内細菌の大きなグループを占めることが知られている。本研究結果から、Bacteroidia綱に属する微生物は、メタン発酵槽の、より嫌気的な条件下では優占化できないことが示唆された。また、消化液よりもスラリーにおいて多くの種類の微生物が存在していることが明らかとなった。これは、豚の腸内細菌由来の多様な微生物がスラリー中に存在することを示唆している。Liu *et al.* (2009)は、中国の崇明地方にあるバイオガス発酵槽中のバクテリアと古細菌の群集構造を解析し、バクテリアに関してはFirmicutes門、Bacteroides門、Spirochetes門が優占することを確認した。その中でもFirmicutes門の*Clostridium*属が優占していると報告しており、今回の研究結果はその報告と一致した。

メタン発酵古細菌の結果をTable 2 に示した。メタン発酵古細菌において、Arc-スラリーで特に優占している*Methanocorpusculum*属はArc-消化液においても優占していたが、Arc-スラリーにおいて12.6% (12.7%) の占有率であった*Methanogenium*属はArc-消化液では4.3% (4.3%) の低い値となった。また、Arc-スラリーでは1%程度の*Methanoculleus*属がArc-消化液において31.4

% (31.5%) の高い占有率を示した。Arc-スラリーに比べ、Arc-消化液では*Methanosaeta*属の占有率が下がっている一方で、*Methanosarcina*属の占有率は高くなっており、すべてのメタン発酵古細菌で占有率の増減が検出された。本研究において、消化液で確認された*Methanoculleus*, *Methanospirillum*, *Methanogenium*, *Methanosaeta*, *Methanosarcina*は、Liu *et al.* (2009)の研究で、消化液において高い割合で存在しているという報告と一致した。また、スラリーと消化液における*Methanosaeta*と*Methanosarcina*の占有率の変化については、Hwang *et al.* (2008)の研究において、スラリーと消化液を比較した際の酢酸濃度は、スラリーで高いことから、*Methanosaeta*は高濃度の酢酸が存在するときに優占し、*Methanosarcina*は酢酸の濃度が低い時に優占すると報告された。本研究結果でも同様の現象が起こり、スラリーでは*Methanosaeta*が優占しているが、酢酸濃度の低くなった消化液では*Methanosarcina*の占有率が高くなったと考えられた。豚糞尿を原料とした発酵物の微生物叢の研究で、*Clostridium*が優占していることは、Snell-Castro *et al.* (2005)やPeu *et al.* (2006)によって報告されており、また、古細菌に関してはWhitehead & Cotta (1999)やTang *et al.* (2004)、そしてHori *et al.* (2006)により*Methanoculleus*, *Methanogenium*が優占していると報告されており、これも今回の研究結果とほぼ一致していた。以上の研究ではいずれも原料として豚糞尿を使用しており、Liu *et al.* (2009)の研究においても未消化のバイオマスと酢酸やプロピオン酸などの脂肪酸から構成される豚糞を唯一の原料としており、発酵槽における多くの古細菌が

**Table 2.** Deduced taxonomical order, family, and genus of archaeal clones detected in swine slurry and methane fermentation liquid, and number and ratio of isolates.

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Swine slurry			Methane fermentation liquid		
					No. clone	Clone occupancy (%)	Adjusted occupancy (%)	No. clone	Clone occupancy (%)	Adjusted occupancy (%)
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanocorpusculaceae	<i>Methanocorpusculum</i>	41	47.1	47.3	24	34.3	34.4
			Methanomicrobiaceae	<i>Methanoculleus</i>	1	1.1	1.2	22	31.4	31.5
				<i>Methanogenium</i>	11	12.6	12.7	3	4.3	4.3
				<i>Methanosphaerula</i>	1	1.1	1.2			
				<i>Methanospirillum</i>	9	10.3	10.4	6	8.6	8.6
				<i>Methanosaeta</i>	23	26.4	26.2	9	12.9	12.7
		Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	<i>Methanosarcina</i>	1	1.1	1.1	6	8.6	8.5



豚糞に由来していると考察した。本研究の結果から、メタン発酵古細菌の群集構造においては、スラリーと消化液の古細菌を比較した際に、消化液ではスラリーで極低密度であった *Methanoculleus* が 31.4% (31.5%) の高い占有率を持っており、検出されたメタン発酵古細菌すべてが、その占有率を変化させていたため、発酵過程において、*Methanocorpusculum*, *Methanoculleus*, *Methanogenium*, *Methanospirillum*, *Methanosaeta*, *Methanosarcina* がメタン発酵、若しくは何らかの役割を果たしつつ一定の占有率を獲得し、メタン発酵槽における独自のメタン発酵古細菌の菌叢が確立したものと考えられた。

検出された微生物の分類データとその占有率から算出された多様性指数を Table 3 に示した。多様性指数の評価の結果、クローンの占有率および補正占有率の両値を用いた多様性指数は同様の結果を示した。検出微生物の科・属レベル共に真正細菌の多様性指数はスラリーにおいて、消化液の 2 倍ほど高い多様性を検出した。一方、メタン発酵古細菌に関しては、メタン発酵過程を経た消化液において、高い多様性を示した。これらの結果は、豚糞尿スラリーにおいて、消化管由来の多様な微生物叢が検出されたため、真正細菌において高い多様性を示したものと考えられた。また、スラリーから消化液への発酵過程における微生物叢に関して、真正細菌は嫌気的条件下に晒されるにつれ、*Clostridium* 属などの嫌気性菌の占有率が上がることで真正細菌の多様性が低くなり、一方で、メタン発酵に関与する古細菌の多様性が高くなったと考えられた。当研究室の先行研究で、95 種類の異なる炭素源を含む 96 穴マイクロプレート

(Biologプレート, BiOLOG, Hayward, CA, USA) を用いた炭素源の資化性パターンの比較実験を行った (園田他 2010)。その結果、スラリーでは、グラム陰性菌用プレートで発色した炭素源が 88.6% であったのに対し、消化液では 39.1% の低い値となり、グラム陽性菌用プレートでも、スラリーでは 59.4% の炭素源の発色に対し、消化液では 6.2% の低い値であった。本研究におけるバクテリアの多様性指数の低下は、スラリーにおける複雑な菌相が発酵過程に単純化したと考察された先行研究の結果とよく一致していた。

クローンライブラリー法は細菌の群集構造を推定するのに適しているが、細菌の密度を推定することは出来ない。本研究では、細菌の遺伝子コピー数の相対値を求め、データベース上のコピー数による、リアルタイムPCRの結果の補正によって細菌・古細菌の相対値を算出した。その結果、消化液の古細菌の密度が最も低いと考えられたため、消化液における古細菌密度を 1 とした時の他の菌の相対値で示した。また、遺伝子のコピー数は実際の菌数を反映しないため、相対遺伝子量 (Relative gene amount) と、相対細胞密度 (Relative cell density) で示した (Table 4)。菌数は真正細菌、古細菌ともにスラリーで高い値を示した。スラリー、消化液における真正細菌と古細菌の比は 3.16 と 13.0 であり、スラリーにおける真正細菌の菌密度はメタン発酵古細菌の 3 倍程度であるのに対し、消化液中の真正細菌がメタン発酵古細菌よりも 10 倍以上の高い菌密度を有していることが示唆された。以上の結果から、微生物密度は真正細菌、メタン発酵古細菌共にスラリーで高いものの、真正細菌とメタン発酵古細菌の密度の差はスラリー

Table 3. Diversity index of deduced taxonomical order, family and genus level.

Sample	Domain	Shannon-Wiener $H'$			Simpson $D$		
		Order	Family	Genus	Order	Family	Genus
Swine slurry	Bacteria	1.981	2.814	2.935	0.748	0.914	0.918
		2.361	2.918	3.013	0.866	0.931	0.934
	Archaea	0.589	1.276	1.356	0.400	0.675	0.681
		0.586	1.276	1.356	0.397	0.675	0.681
Methane fermentation liquid	Bacteria	0.862	1.932	1.956	0.352	0.751	0.752
		1.244	2.102	2.121	0.557	0.814	0.814
	Archaea	0.520	1.420	1.551	0.337	0.724	0.751
		0.516	1.417	1.549	0.334	0.724	0.751

Upper values were calculated from clone number.

Lower values were calculated from occupancy rate adjusted by copy numbers.



**Table 4.** Relative amount of 16S rRNA genes and the relative cell density.

Domain	Sample	Relative gene amount	Relative cell density
Bacteria	Swine slurry	128.0	67.3
	Methane fermentation liquid	52.0	21.3
Archaea	Swine slurry	13.0	13.0
	Methane fermentation liquid	1.0	1.0

Each values were calculated as relative value against archaea in methane fermentation liquid.

で小さく、消化液で大きいことが示唆された。

本研究では、スラリーと消化液における微生物群集構造を明らかにすることを目的に、クローンライブラリーの解析を行い、さらに真正細菌と古細菌それぞれの微生物相を調査し、相対的密度の検討を加えた。その結果、スラリーと消化液における主要な微生物を検出することができた。より詳細な細菌叢を明らかにするためにはさらに多くのクローンの配列を解析することが求められるが、本研究における結果から、占有率の明らかな差異により、主要な細菌叢は明らかに出来たと考えられた。さらなる課題として、液肥としての利用において、土壤に施与した場合の土壤における細菌群集構造の解析が望まれる。

## 要 約

家畜排泄物は土壤改良資材や肥料製造のためのバイオマス系資源として注目されており、その処理方法としてコンポスト化の他、メタン発酵処理が注目されている。宮崎大学に設置された中温性バイオガスプラントから採取したメタン発酵消化液に関するこれまでの研究で、病原微生物の存在は確認されなかった。本研究では、メタン発酵消化液とその原料中の微生物群集構造を明らかにするために、16S rRNA遺伝子をターゲットとしたeDNAのクローンライブラリー解析によって、真正細菌と古細菌の群集構造を調査した。得られた16S rRNA遺伝子配列の5'末端から約730塩基の相同性検索をBLASTによって行った。さらに得られた配列データとデータベースから抽出した配列データを基にClustalWによるアライメントの後、近隣結合法による系統樹の構築を行ない、検出された微生物の16S rRNA遺伝子の分類を行った。その結果、真正細菌群集において、Clostridiaceae科がスラリーで優占しており、消化液でその優占性はさらに上がり、高い占有率を示した。Clostridiaceae科を除く微生物に関しては、多くが

その占有率を下げている。真正細菌群集の多様性指数は大きく低下していた。一方、古細菌群集においては、検出されたメタン発酵古細菌すべて、その占有率を変化させており、発酵過程において、*Methanocorpusculum*, *Methanoculleus*が優占化し、*Methanogenium*, *Methanospirillum*, *Methanosarcina*も一定の占有率を獲得し、メタン発酵古細菌群集の多様性指数が高まったと考えられた。以上、豚糞尿スラリーおよびメタン発酵消化液における各種微生物の占有率の変化を検出することにより、メタン発酵消化液の主要な微生物群集構造を明らかに出来たと考えられた。

キーワード：クローンライブラリー、群集構造、古細菌、真正細菌、メタン発酵消化液

## 謝 辞

本研究は、「文部科学省特別研究経費・連携融合事業・農林畜産物利用による地域資源システムの構築」による運営交付金を用いて実施された。研究の実施にあたり、「農林畜産物利用による地域資源システムの構築」に関係する宮崎大学の皆様に深く感謝申し上げます。

## 参考文献

- Collins, M.D., P.A. Lawson, A. Willems, J.J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal, P. Garcia, J. Cai, H. Hippe, J.A.E. Farrow (1994) The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 812-826.
- Connaughton, S., G. Collins, V. O'Flaherty (2006) Development of microbial community structure and activity in a high-rate anaerobic bioreactor at 18 °C. *Water Res.* **40**, 1009-1017.
- Cullen, D.W. & P.R. Hirsch (1998) Simple and rapid method for direct extraction of microbial

- DNA from soil for PCR. *Soil Biol. Biochem.* **30**, 983-993.
- Einen, J., I.H. Thorseth, L. Øvreås, (2008) Enumeration of Archaea and Bacteria in seafloor basalt using real-time quantitative PCR and fluorescence microscopy. *FEMS Microbiol. Lett.* **282**, 182-187.
- 藤本淳治・福井 学 (2005) 腸内フローラの構造解析: 16S rDNA-クローンライブラリー法. 腸内細菌学雑誌. **19**, 47-52.
- Hori, T., S. Haruta, Y. Ueno, M. Ishii, Y. Igarashi (2006) Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1623-1630.
- Hwang, K., S.G. Shin, J. Kim, S. Hwang (2008) Methanogenic profiles by denaturing gradient gel electrophoresis using order-specific primers in anaerobic sludge digestion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80**, 269-276.
- Johnson, J.L. & B.S. Francis (1975) Taxonomy of the Clostridia: ribosomal ribonucleic acid homologies among the species. *J. Gen. Microbiol.* **88**, 229-244.
- 柿市徳英 (2000) 環境衛生. 家畜衛生学. 文永堂出版. 東京. pp. 128-129.
- 木田建次 (2001) 生産的変換技術. バイオマスエネルギー利用の最新技術. シーエムシー出版. 東京. pp. 88-110.
- 小林四朗 (1995) 生物群集の構造と調査データ. 生物群集の多変量解析. 蒼樹書房. 東京. pp. 9-21.
- Liu, F.H., S.B. Wang, J.S. Zhang, J. Zhang, X. Yan, H.K. Zhou, G.P. Zhao, Z.H. Zhou (2009) The structure of the bacterial and archaeal community in a biogas digester as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequencing analysis. *J. Appl. Microbiol.* **106**, 952-966.
- Mladenovska, Z., S. Dabrowski, B.K. Ahring (2003) Anaerobic digestion of manure and mixture of manure with lipids: biogas reactor performance and microbial community analysis. *Water Sci. Technol.* **48**, 271-278.
- 西川知宏・井上博茂・梅田幹雄・山本祐二・稲村達也 (2007) メタン発酵消化液の連用水田における水稻の生育及び窒素吸収動態. 日本作物学会紀事別号. **223**, 40.
- 大垣俊一 (2008) 多様度と類似度, 分類学の新指標. *Argonauta*, **15**, 10-22.
- Peu, P., H. Brugere, A-M. Pourcher, M. Kerouredan, J-J. Godon, J-P. Delgenes, P. Dabert (2006) Dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3578-3585.
- Snell-Castro, R., J-J. Godon, J-P. Delgenes, P. Dabert (2005) Characterization of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **52**, 229-242.
- 園田亮一・赤木 功・浅野陽樹・山本昭洋・佐伯雄一 (2010) 豚糞尿を原料としたメタン発酵消化液の液肥としての安全性に関する微生物的評価. 宮崎大学農学部研究報告. **56**, 93-101.
- Sousa, D.Z., M.A. Pereira, H. Smidt, A.J.M. Stams, M.M. Alves (2007) Molecular assessment of complex microbial communities degrading long chain fatty acids in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**, 252-265.
- Suzuki, Y., A. Kubota, T. Furukawa, K. Sugamoto, Y. Asano, H. Takahashi, T. Sekito, Y. Dote, Y. Sugimoto, (2009) Residual of 17 $\beta$ -estradiol in digestion liquid generated from a biogas plant using livestock waste. *J. Hazard. Mater.* **165**, 677-682.
- Tang, Y., T. Shigematsu, Ikbal, S. Morimura, K. Kida, (2004) The effects of micro-aeration on the phylogenetic diversity of microorganisms in a thermophilic anaerobic municipal solid-waste digester. *Water Res.* **38**, 2537-2550.
- Whitehead, T.R. & M.A. Cotta, (1999) Phylogenetic diversity of methanogenic archaea in swine waste storage pits. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**, 223-226.
- Yamada, T., K. Miyauchi, H. Ueda, Y. Ueda, H. Sugawara, Y. Nakai, G. Endo (2007) Composting cattle dung wastes by using a hyperthermophilic pre-treatment process: characterization by physicochemical and molecular biological analysis. *J. Biosci. Bioeng.* **104**, 408-415.
- Ye, N-F., F. Lu, L-M. Shao, J-J. Godon, P-J. He (2007) Bacterial community dynamics and product distribution during pH-adjusted fermentation of vegetable wastes. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 1055-1065.
- 吉田弘之 (2004) 亜臨界水処理による未利用有機物の高速高度資源化と農林水産・畜産分野への応用の可能性. 畜産の情報(国内編). **9**, 21-26.