

氏 名(本籍)	幸 ^{こう} 田 ^だ 力 ^{ちから}
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 5 5 7 号
学位授与年月日	平 成 10 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科畜産学専攻 (博士課程)
学位論文題目	家畜排泄物の微生物的無臭化に関する研究：インドール系化合物無臭化偏性嫌気性菌の分離と特性解析
論文審査委員	(主 査) 教 授 勝 亦 瞭 一 教 授 秋 葉 征 夫 教 授 伊 藤 敏 敏 助教授 中 井 裕

論文内容要旨

第1章 序論

環境保全への認識が高まる中で、畜産学界として排泄物の処理は極めて大きな問題となっている。そのうち周辺社会から最も苦情件数の多いのは悪臭に関するものである。排泄物の悪臭は複数の物質に由来するが、その一構成成分であるスカトールとインドールは飼料中のトリプトファンが動物消化管で微生物分解を受けて生成する。スカトールが体内に吸収されるとブタの脂肪の不快化や反芻動物の呼吸器疾患を招くため、動物生産そのものにも悪影響を及ぼすことが知られている。インドールの消去能を有する細菌は種々知られているが、スカトールを無臭化する微生物は*Bacillus*種などわずかに報告があるにすぎず、難分解性物質とみなされている。

そこで本研究では家畜排泄物処理施設におけるスカトール・インドール消臭微生物の動態調査をおこない、分離株中これまで知られていない偏性嫌気性消臭菌の同定、消臭代謝経路の解析および経口接種時の糞便消臭作用について評価することにした。

第2章 家畜排泄物処理過程におけるインドールおよびスカトールの消長と消臭微生物の検索

各種の家畜排泄物処理過程における両インドール系化合物の量的変化および消臭に関わる微生物叢を調べ、そのうち従来知られていないインドール或いはスカトールを代謝する偏性嫌気性菌の分離・同定を試みた。

1. コンポスト化過程

コンポスト化は家畜排泄物と畜舎敷料や戻し堆肥などを混合し、定期的な切り返しをおこないながら微生物の発酵によって進行する。ブタ排泄物ではコンポスト化の進行とともに明らかにインドールおよびスカトールが減少したが、処理後も完全には消去されていなかった(図1)。コンポスト中のインドールおよびスカトール消去菌は、25℃或いは37℃いずれで培養しても総菌数と同様に発酵期に減少した(図2)。発酵期には温度が上昇するため、好熱性菌が増殖している可能性も考えられるが、好熱性の消去菌は検出されなかった。分離される消去菌の菌群構成は好気

或いは嫌気条件で異なり、処理段階でも変動していたが、いずれの場合もグラム陽性通性嫌気性菌が高率に分布していた（図3、4）。

2. 汚水処理過程

自然浄化方式のスラリー処理、ラグーン方式の尿汚水処理施設についても同様な調査をおこなった。コンポスト化過程に比べ、両施設ではインドール、スカトールの濃度は低かったが、最終処理水でも悪臭を放つ濃度で残存していた。

いずれの施設においても各処理段階での消去菌数の変動パターンは総菌数のそれと相関していた。なお、汚水処理過程ではコンポスト化過程よりも菌叢が複雑で放線菌や糸状菌も検出された。

3. インドールおよびスカトールの消去活性を有する偏性嫌気性菌の分離・同定

これまでスカトールを分解代謝する偏性嫌気性菌についての報告はない。そこで、前章で得たスカトール消去能を有する偏性嫌気性菌群に注目し、インドールを消去する偏性嫌気性菌とともに同定を試みた。分離された偏性嫌気性菌はすべてグラム陽性芽胞桿菌であることから *Clostridium* 属に分類された。インドールもしくはスカトールの代謝活性を有する15株を生化学性状試験およびDNA相同性試験によって解析した結果、6種（*C. aminovalericum*、*C. carnis*、*C. ghoni*、*C. histolyticum*、*C. malenominatum*、*C. propionicum*）の既知菌種と同定された。

同定された分離株に対応する標準株はインドールまたはスカトールの消去活性を有していなかったことから、本研究で取得した分離株は菌特異的に消去能を有していることが明らかとなった。

第3章 *Clostridium* 属分離株のスカトール代謝

スカトールは代謝の初期に無臭化されるが、無毒化されることも処理過程においては重要である。そこで本章では同定されたスカトールの代謝変換活性を有する4菌株を選び、それらの変換活性を詳細に評価し、代謝経路の解析をおこなった。

1. スカトールの消去活性試験

いずれの分離菌株においてもスカトールの消去は培地条件で影響されなかった。*C. malenominatum* A-3株の増殖において、スカトールを添加した場合に菌体増殖の誘導期に遅延が認められた(図5)。また、培地中に他の炭素源が豊富に存在しても、スカトールを増殖初期から消去した(図6)。インドールに対する消去活性もほぼ同様の傾向であった。

2. スカトール代謝経路の解析

スカトール代謝時の代謝産物を検索したところ数種の派生物が得られた。これらの派生物を分離同定し、さらにそれらを添加培養したときの代謝産物を調べることによって代謝経路を推定した。この時、添加物の消失量と代謝産物の蓄積量はほぼ等しかった(図10)。*C. aminovalericum* A-4株、*C. histolyticum* IAI-4株、*C. malenominatum* A-3株は3-メチルオキシインドールからオキシインドールを経てイサチンへ変換される経路(図7)で、*C. carnis* A1-6株はインドールからオキシインドールを経てイサチンへ変換される経路(図8)で代謝することが明らかとなった。両者の脱メチル化反応を経る経路は純粹分離された微生物によるスカトール代謝としては初めて明らかにされるものである。

5. 代謝変換酵素活性

C. malenominatum A-3株および*C. carnis* A1-6株由来スカトール代謝酵素は基質添加時に誘導された(表1、図9)。*C. malenominatum* A-3株において代謝酵素は生育初期の10時間以内に誘導され、比活性は対数増殖期である20~25時間で最大となった(図11)。*C. carnis* A1-6株でも同様の結果が得られた(図12)。また、最終代謝産物イサチンによる活性阻害は認められなかった(表2)。

6. オキシインドールおよびイサチンの菌体増殖に及ぼす影響

インドールもしくはスカトール消去能を有する*Clostridium*分離株と同属非消去株のインドール系化合物に対する最大発育許容濃度(MAC)を調べた(表3)。オキシインドールおよびイサチンに対するMACの方がインドールやスカトールに対するMACよりも高い濃度を示し、これらの

化合物は代謝されると毒性が低くなると考えられた。

第4章 コンポスト化過程におけるスカトール代謝産物の測定

C. aminovalericum A-4株、*C. histolyticum* IAI-4株、*C. malenominatum* A-3株、*C. carnis* A1-6株はスカトールを代謝変換し、オキシインドールを経てイサチンを産生した。家畜排泄物コンポスト化過程におけるこれらの物質の存在とイサチンを代謝変換する微生物の存否を検索した。

インドール系化合物濃度はコンポスト化の進行に伴い減少傾向を示した。高濃度のオキシインドールが前処理過程で検出され（図13）、インドール或いはスカトール消去菌が前処理過程でインドール系化合物の消去に関与していることが示唆された。しかし、イサチンの蓄積は認められず、別の菌群がこの化合物の消去に関与していると示唆された。そこでイサチンを消去する微生物の検索をおこなったところ、嫌気条件下で $10^2 \sim 10^3$ のレベルで検出された（図14）。

イサチン消去能を有する微生物を分離し、インドール或いはスカトールの消去能を試験した結果、その一部はインドールを消失させたが、スカトールを消失させるものは存在しなかった。これはインドール代謝は環の開裂まで進むが、スカトール代謝は環を開裂できないことを示している。したがって、嫌気状態でベンゼン環およびピロール環を開裂する代謝には2種以上の菌の関与が必要であると推察される。

第5章 分離菌株の経口接種によるマウス排泄物中のスカトール消去効果

微生物を用いた糞便消臭剤は、現在まで好気性菌を中心に開発されており嫌気性菌を用いたものは少ない。*C. malenominatum* 種は偏性嫌気性菌でヒト消化管内やニワトリ盲腸内から分離されており、飼料添加消臭剤として利用できる可能性がある。そこで*C. malenominatum* A-3株をマウスに経口接種し、排泄物中のインドール系化合物の低減を観察した。

1. 排泄物中のインドール系化合物濃度

スカトールを経口接種したマウスと未接種マウスについて、同時にA-3株を経口投与したときの排泄物中のインドール系化合物の量を測定した。スカトール未接種区についてはA-3株を投与した場合としない場合で排泄物中のインドール系化合物の量に有意差は認められなかった（図15）。一方、スカトール接種区においては 1×10^5 の菌体投与時に、スカトールの有意な減少（ $P < 0.01$ ）が観察された（図16）。

2. 排泄物中のスカトール消去能を有する*Clostridium*の菌数

排泄物中のスカトール消去能を有する*Clostridium*の菌数は無接種対照区では検出限界値未満であったが、 1×10^4 接種区、 1×10^5 接種区で排泄物中からこの菌群が検出された（表4）。

第6章 総括

家畜排泄物処理施設におけるインドール系化合物無臭化微生物の動態を解析し、グラム陽性通性嫌気性菌が優勢群であることを明らかにした。その中から、これまでに報告のないインドールおよびスカトールの代謝変換活性を有する偏性嫌気性芽胞桿菌*Clostridium*属新菌株4種を分離・同定した。これら分離株によってスカトールは異なる2種の経路で代謝されたが、いずれもオキシインドールを経てイサチンへ変換されることを明らかにした。この経路で起こる脱メチル化は、純粹分離された微生物による代謝経路では初めてのものである。変換代謝は基質添加時に加速され、それは代謝酵素の誘導合成に基づくことを検証した。その酵素レベルは対数増殖期に最大となりその後減少した。この活性低下は蓄積物イサチンによる阻害によるものではなかった。スカトールの中間代謝産物が家畜排泄物処理過程においても検出されることから、分離株は野外で実際に悪臭の消去に関与している可能性が支持された。さらに*C. malenominatum* A-3株はマウスに対する経口接種試験において糞便中のスカトール濃度を下げる効果を有することから、消臭生菌剤として利用し得ることが示唆された。

図1. 家畜排泄物コンポスト化過程におけるインドールおよびスカトール濃度

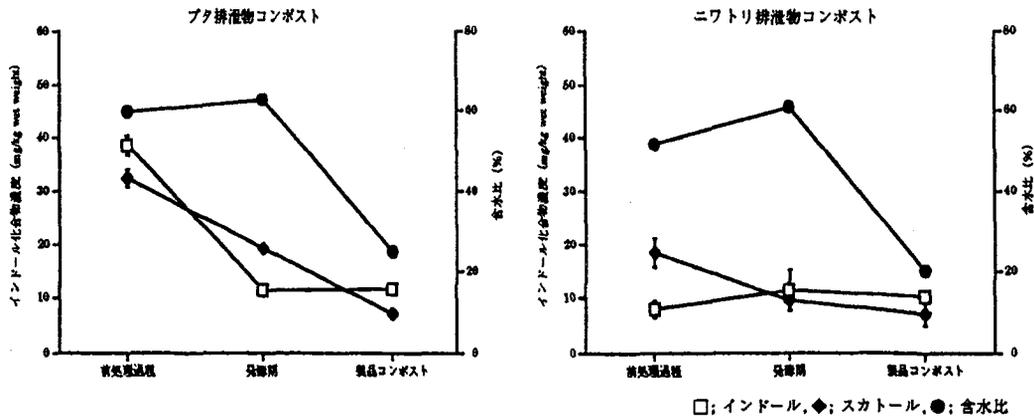


図2. ブタ排泄物コンポスト化過程におけるインドールまたはスカトール消去能を有する微生物の菌数

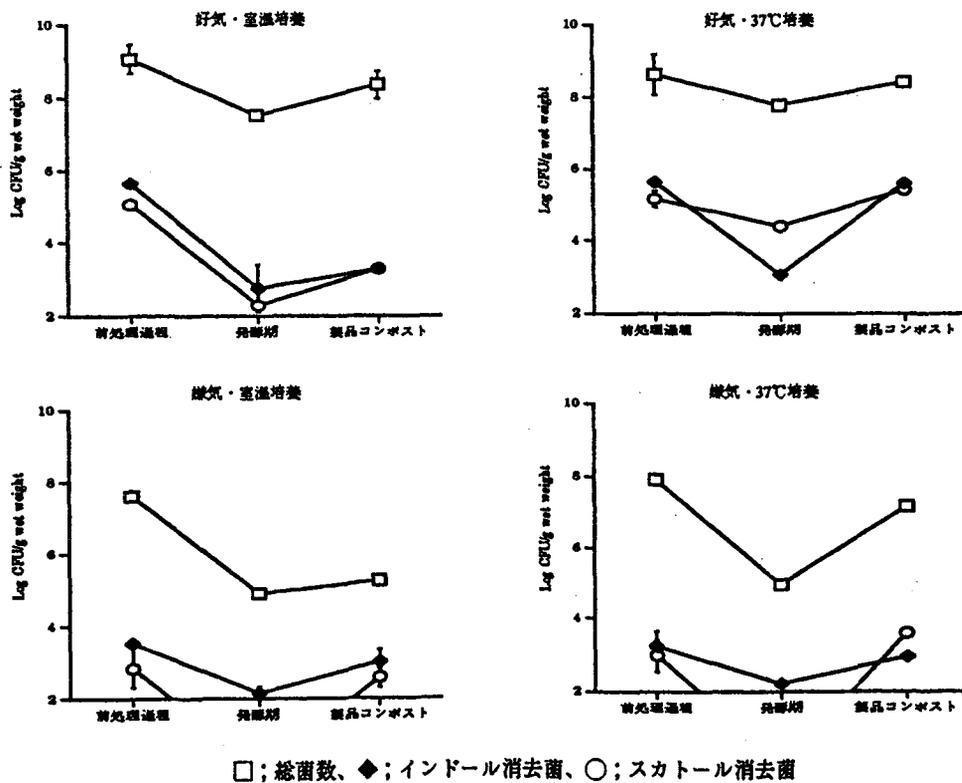


図3. プタ排泄物コンポスト化過程におけるインドール消去能を有する菌群の構成

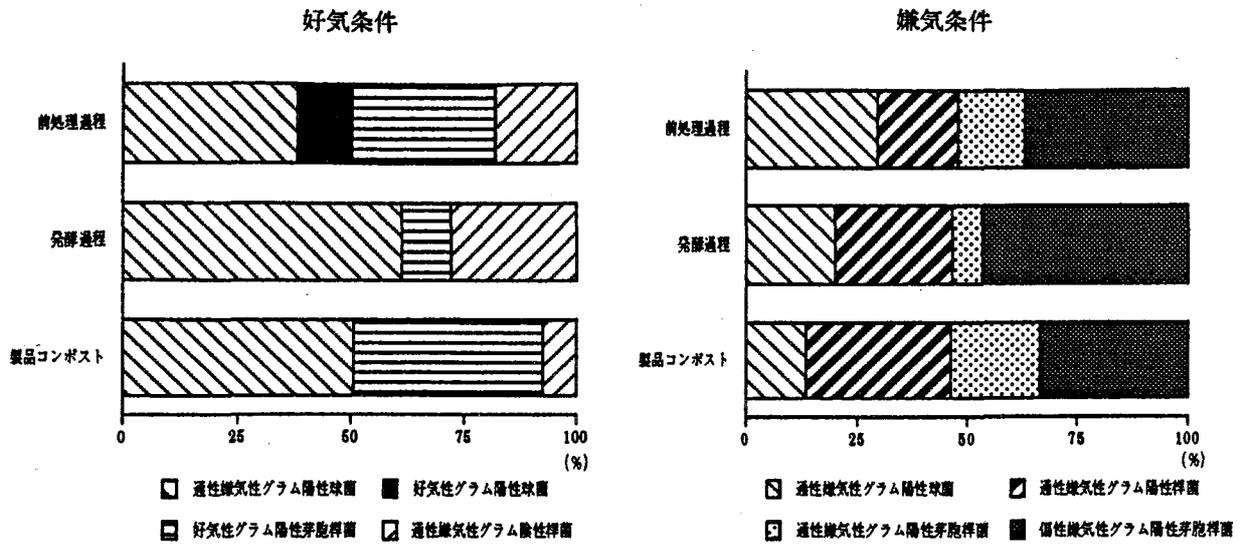


図4. プタ排泄物コンポスト化過程におけるスカトール消去能を有する菌群の構成

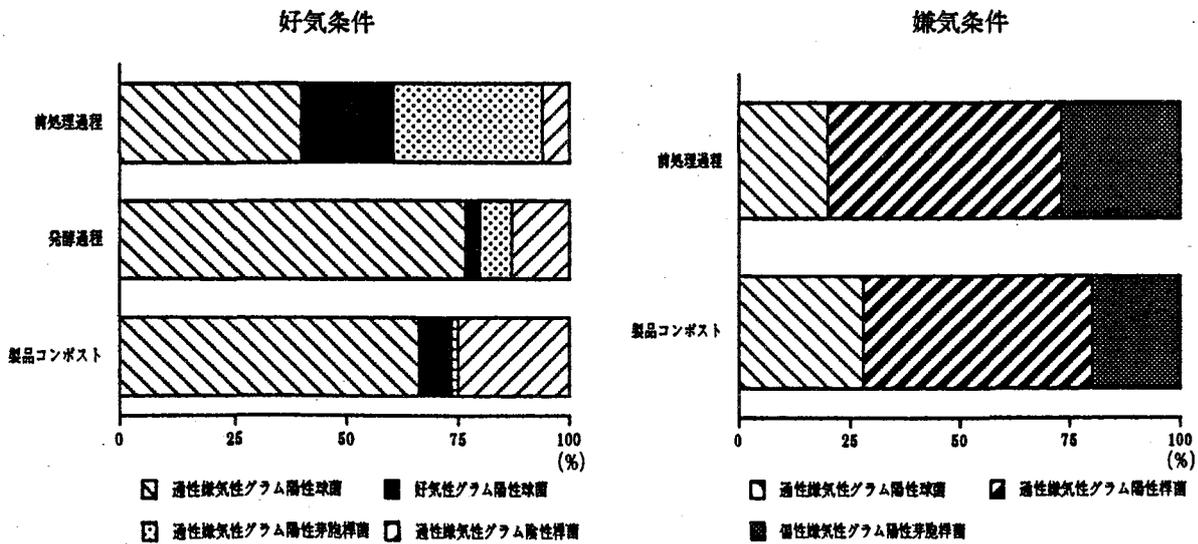


図5. 異なるインドールおよびスカトール濃度による *C. malenominatum* A-3 株の生育阻害

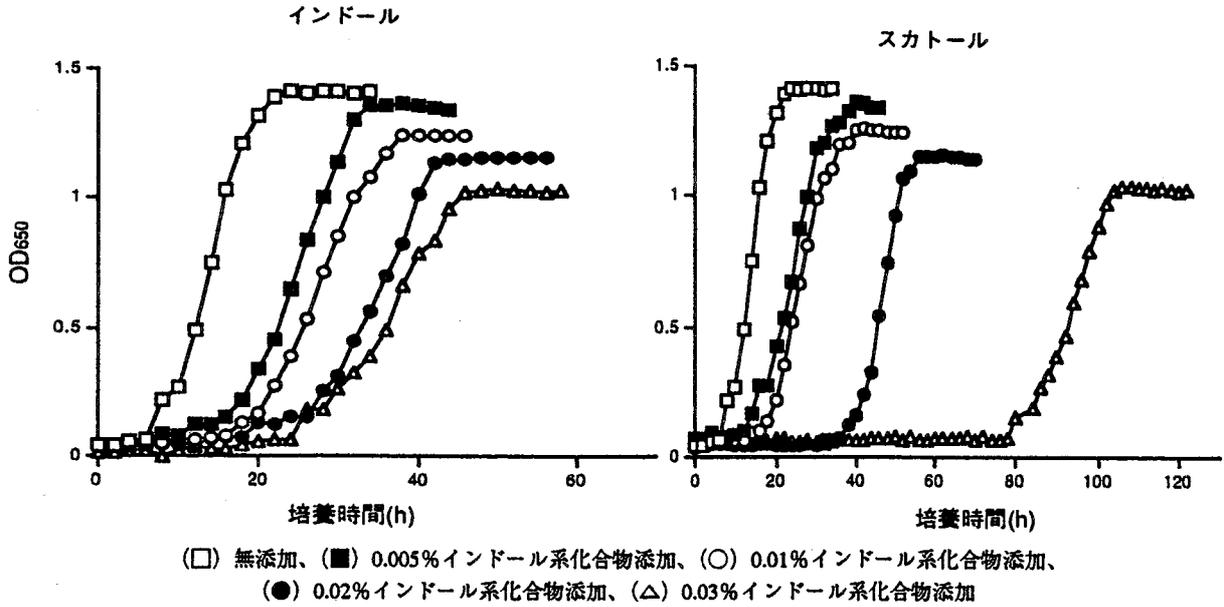


図6. *C. malenominatum* A-3 株の培養中におけるグルコースおよびインドールまたはスカトールの消失

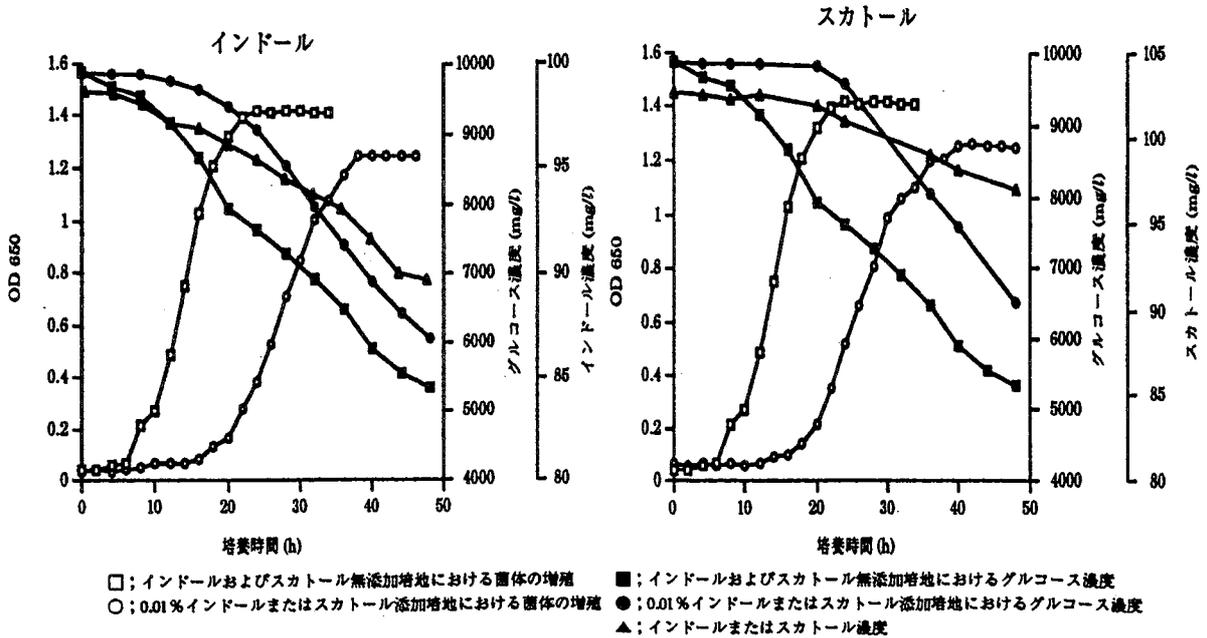


図7. *C. aminovalericum* A-4株, *C. histolyticum* IAI-4株, *C. malenominatum* A-3株の
 スカトールおよびインドールの代謝経路

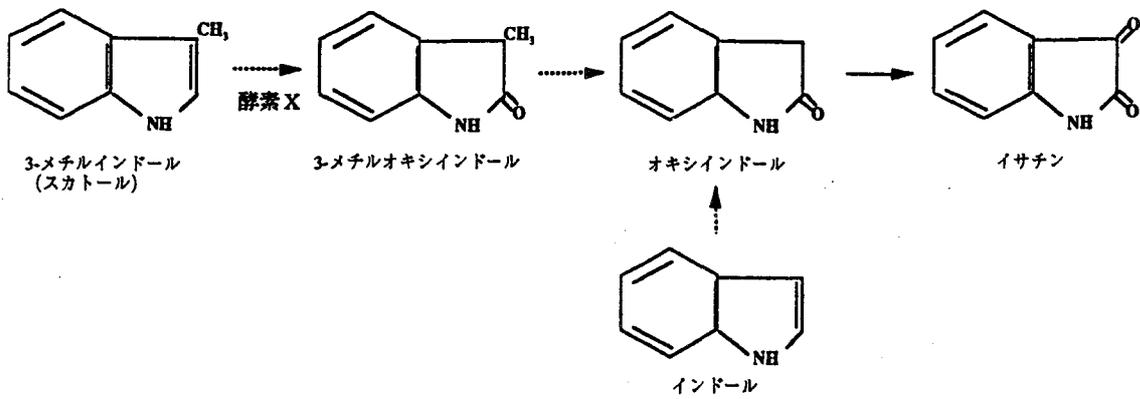


図8. *C. carnis* A-1-6株のスカトールおよびインドールの代謝経路

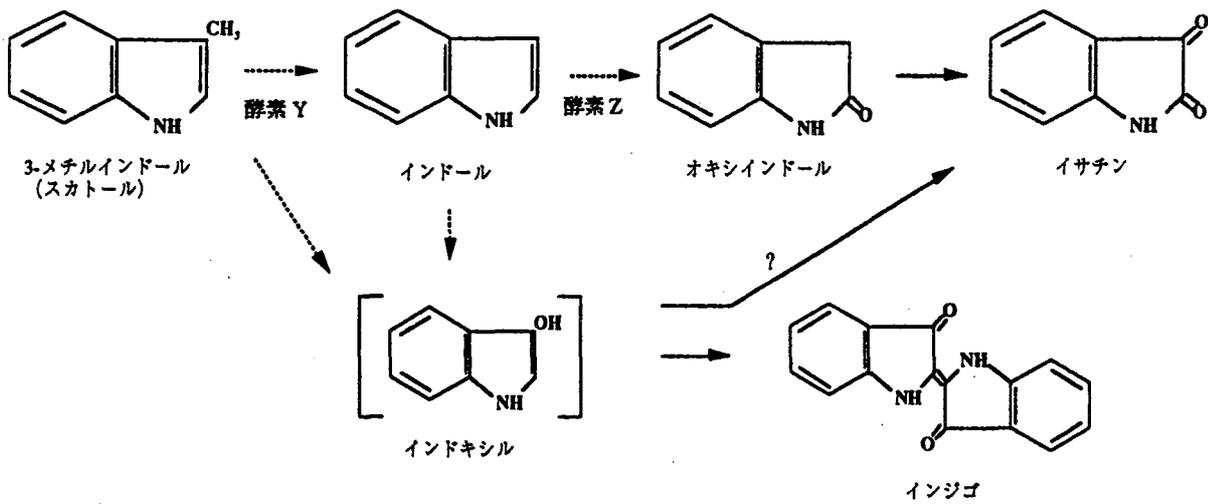


表 1. スカトール分解 *Clostridium* 分離株の菌体抽出物中における酵素の比活性

酵素	比活性 (mU) ^{a)}		
	無添加	インドール添加	スカトール添加
<i>C. malenominatum</i> A-3			
酵素X ^{b)}	0.08	13.56	18.66
オキシインドールヒドロキシラーゼ	0.73	3.90	4.87
<i>C. carnis</i> A1-6			
酵素Y	0.04	6.29	9.21
酵素Z	0.43	10.20	11.18
オキシインドールヒドロキシラーゼ	0.15	2.80	3.42

- a) 1分あたりに1 μ molの基質の消失もしくは産生するものを1 unit と定義した
 活性は1mgのタンパク質当たりのmUで表示した
 b) 酵素の名称は代謝経路図に表示

図 9. 異なるスカトール濃度で前培養した菌体接種時における *C. malenominatum* A-3 株の
 0.02%インドールまたはスカトール添加培地中での増殖

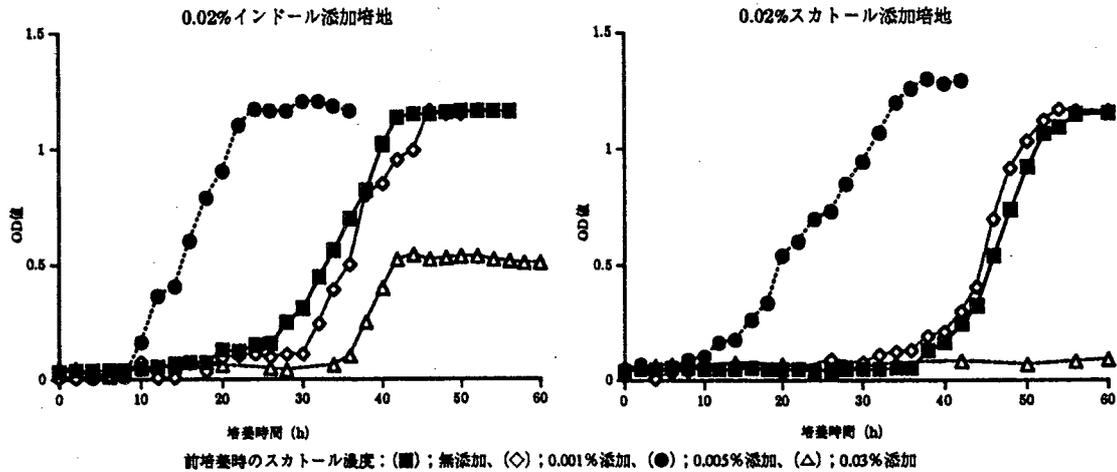


図10. *C. malenominatum* A-3株の培養中における
スカトールの消失および中間代謝産物の蓄積

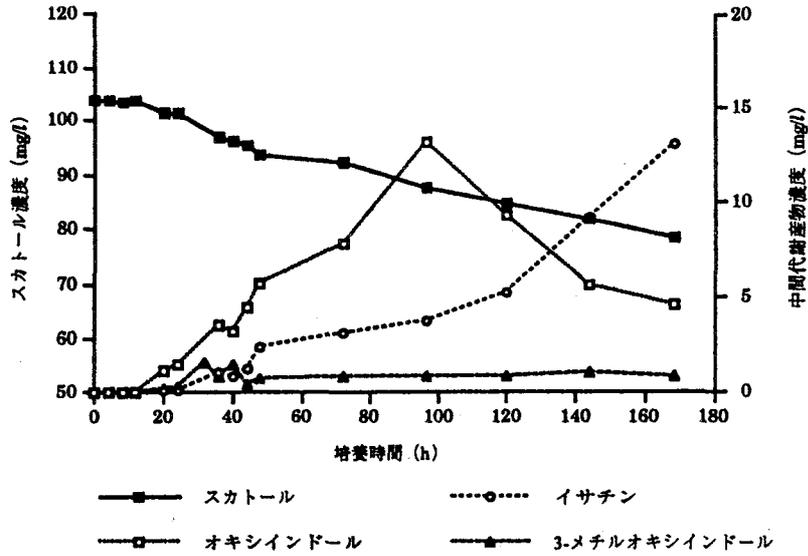


図11. *C. malenominatum* A-3株の培養中におけるスカトール
により誘導された酵素の比活性の経時変化

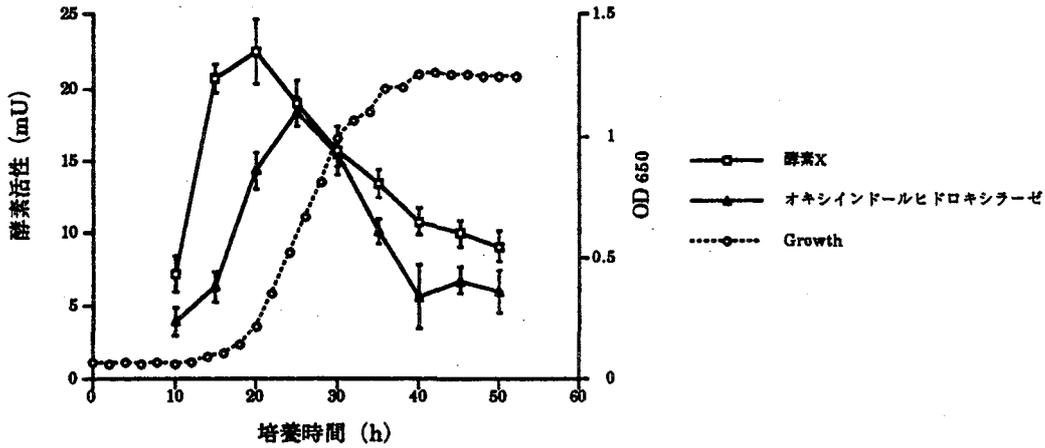


図12. *C. carnis* A1-6株の培養中におけるスカトール
により誘導された酵素の比活性の経時変化

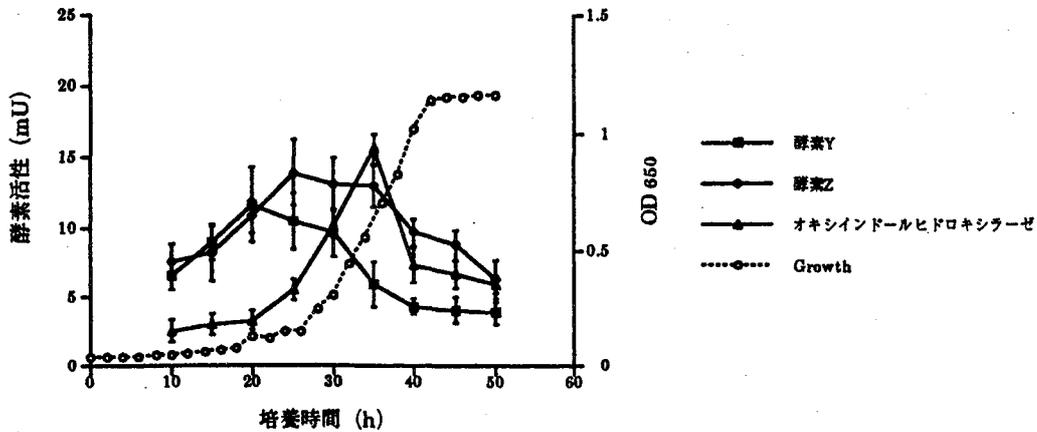


表2. *C. malenominatum* A-3株の対数増殖期終了時の酵素の比活性

酵素	比活性 (mU) ^{a)}	
	イサチン添加	無添加
酵素X	17.54 ± 3.04	16.02 ± 3.89
オキシインドールヒドロキシラーゼ	10.67 ± 4.10	11.29 ± 3.72

a) 1分あたりに1 μmolの基質の消失もしくは産生するものを1 unit と定義した。
活性は1mgのタンパク質当たりのmUを平均値±標準偏差で表示した。

表3. 嫌気条件におけるインドール系化合物に対する最大発育許容濃度

菌株	スカトール	インドール	オキシインドール	イサチン
インドール消去菌				
<i>C. aminovalericum</i> IEI-2	300	700	2800	>1000
<i>C. ghoni</i> A1-4	300	800	>3000	>1000
<i>C. malenominatum</i> A-13	300	500	>3000	>1000
<i>C. propionicum</i> AI-2	300	400	>3000	>1000
スカトール消去菌				
<i>C. aminovalericum</i> A-4	300	300	2200	800
<i>C. carnis</i> A1-6	300	800	>3000	>1000
<i>C. histolyticum</i> IAI-4	300	700	>3000	>1000
<i>C. malenominatum</i> A-3	300	600	>3000	>1000
インドールおよびスカトール非消去菌				
<i>C. aminovalericum</i> ATCC 13725 ^T	300	500	1800	800
<i>C. carnis</i> ATCC 25777 ^T	300	500	2200	>1000
<i>C. ghoni</i> ATCC 25757 ^T	300	600	1800	800
<i>C. histolyticum</i> ATCC 19401 ^T	300	500	1800	>1000
<i>C. malenominatum</i> ATCC 25776 ^T	300	400	1900	700
<i>C. propionicum</i> ATCC 25522 ^T	300	400	2300	>1000

最大発育許容濃度はmg/l で表示した。

図 13. コンポスト化過程におけるオキシインドール
およびイサチン濃度の推移

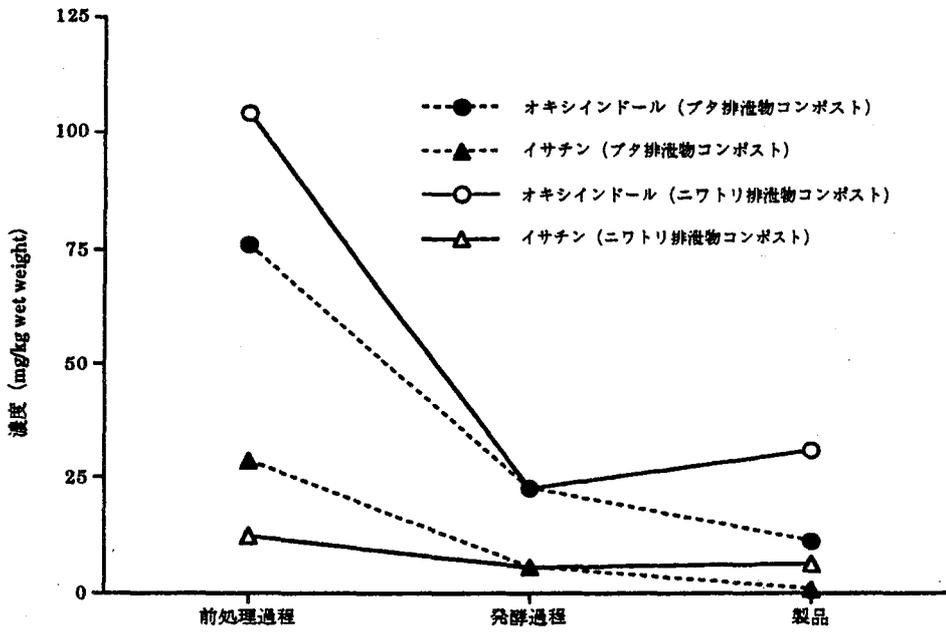


図 14. コンポスト化過程におけるイサチン消去能を
有する微生物の菌数の推移

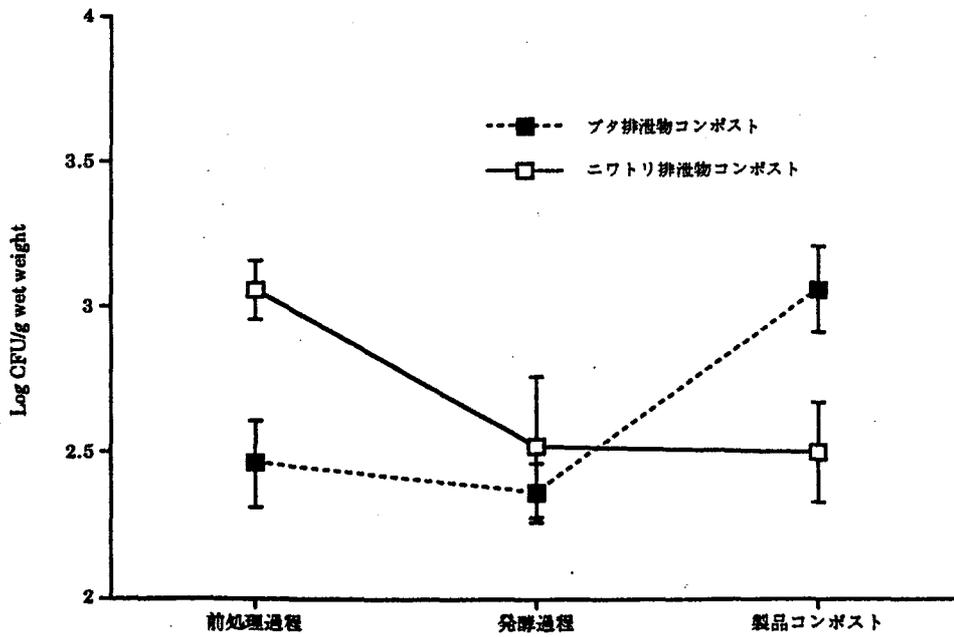


図15. スカトール未接種試験におけるマウス排泄物中のインドール系化合物の含量

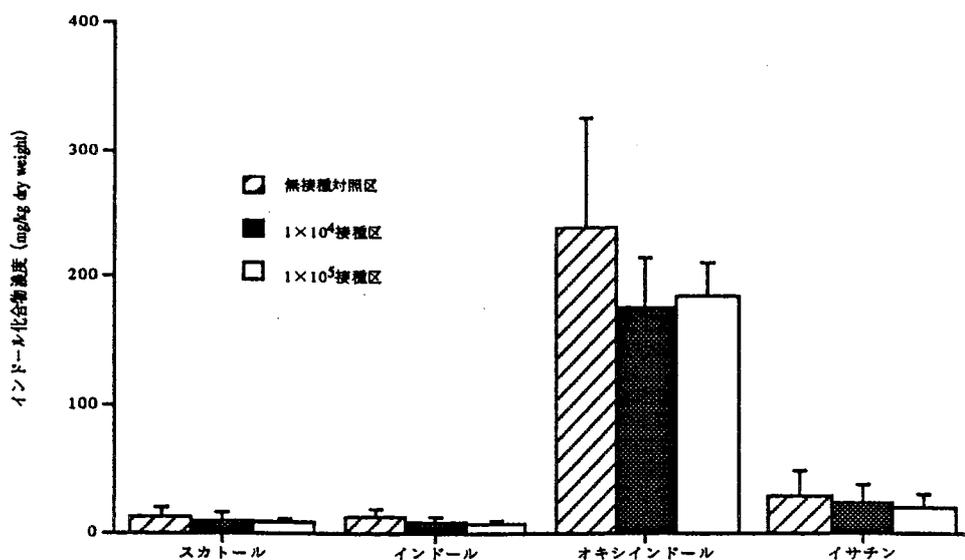
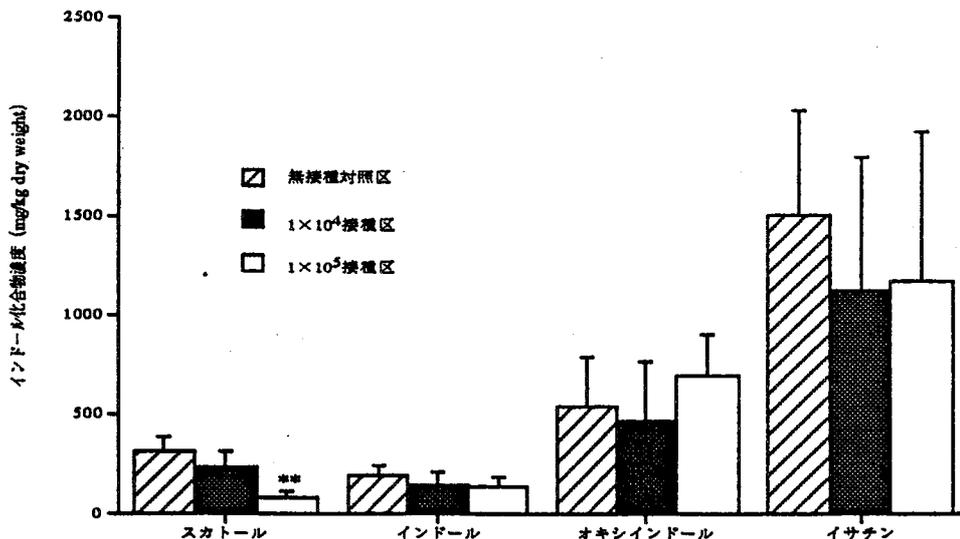


図16. スカトール接種試験におけるマウス排泄物中のインドール系化合物の含量



Significant differences from control are indicated by asterisks (** P < 0.01).

表4. マウス排泄物中のスカトール代謝変換活性を有する *Clostridium* の菌数

試験区	菌数
スカトール未接種試験	
1-1. 無接種対照区	<2.36
1-2. 1.0×10 ⁴ 接種区	4.08 ± 0.30
1-3. 1.0×10 ⁵ 接種区	4.75 ± 0.53
スカトール接種試験	
2-1. 無接種対照区	<2.44
2-2. 1.0×10 ⁴ 接種区	4.42 ± 0.51
2-3. 1.0×10 ⁵ 接種区	5.06 ± 0.30

a) 糞便1g (乾燥重量) 当たりの菌数の対数値の
平均値 ± 標準偏差

論文審査結果要旨

畜産事業に伴う環境汚染の中で排泄物に由来する悪臭は大きな問題となっている。家畜排泄物処理は微生物作用を利用した開放系施設で行われているが、緩慢ながら臭気も減少していくことが知られる。この事実は消臭微生物の存在を示唆しており、その検証は処理システムの改善に向けて有益な知見を与えるものと考えられる。本研究は悪臭成分のうちインドールとスカトールを対象を絞り、排泄物処理における消臭微生物の動態解析、分離微生物の同定と機能解析を目的に行ったものである。

処理方式の異なる家畜排泄物処理施設について調査したところ、いずれも処理過程で両インドール系化合物は減少することが認められた。処理中の排泄物からインドールまたはスカトール含有寒天培地を用いた好気或いは嫌気培養条件下で各化合物に対する非感受性菌が分離され、その殆どが各インドール系化合物の消去能を有していた。嫌気性菌のうち常に高頻度で分離される偏性嫌気性グラム陽性芽胞桿菌15株について調べた結果、*Clostridium*属の6菌種と同定された。両物質の消去能は対応する標準株にはなく、分離株の固有形質であり、特にスカトール消去能は偏性嫌気性菌では初めて検出されたものである。

スカトール消去菌は、代謝産物の同定、それら中間体の添加培養時の蓄積産物の解析から、いずれもスカトールをオキシインドール経由でイサチンへ変換することがわかり、好気性菌で知られているスカトール代謝経路とは異なっていた。その代謝系の酵素群はスカトール或いはインドールで誘導された。分離源の処理中排泄物にはオキシインドールやイサチンの蓄積は認められず、またイサチン分解菌が分離されたことから、処理過程でインドールおよびスカトールは複数の菌種の共同作用によって完全に分解されているものと考えられる。

分離株の一つ*C. malenominatum*株をマウスに経口接種したところ、スカトール投与マウスの死亡率は低下し、糞中のインドールおよびスカトール量は減少したことから、動物消化管内でも消去作用を示すことが確認された。

以上のように本研究により今まで研究されていなかった家畜排泄物処理過程における悪臭成分インドールとスカトールの消長、無臭化に関与する微生物の動態、そのうちの偏性嫌気性菌の特性が明らかにされ、さらにこれら微生物の応用の可能性も示された。このような新たな知見を得たことに対し、審査員一同は本研究者に博士（農学）の学位を授与するに値するものと認定した。