

天王寺動物園における飼育動物の糞を材料とした有用微生物探索の試み

江邊 正平¹, 芳野 美咲², 米田 奈央², 蘇 霆軒¹, 鷺尾 尚輝¹, 大池 達矢¹,
岡南 政宏², 阿野 貴司², 高見 一利³, 宮下 実⁴

要旨

本研究では有用微生物の探索を目的とし、様々な動物を飼育している動物園に着目した。天王寺動物園において生態や食性が異なる4種の飼育動物、アジアゾウ、キタジマキーウィ、コアラ、コウベモグラの糞を採取、スクリーニングを試みたところ、それぞれの動物の糞サンプルからマンガン還元する微生物、炭酸固定・窒素固定を行う微生物、植物生長促進を行う微生物、植物病原菌に対して抑制能を示す放線菌、難分解性の多糖を分解する微生物の存在が認められた。このことから飼育動物の糞は有用微生物の単離源として有効であることを示した。

キーワード：天王寺動物園、動物糞、有用微生物のスクリーニング

1. 緒論

動物の腸内には、多種多様な微生物が共生していることが知られている。例えば、ウシやヒツジなどの反芻動物が主食とする植物体にはセルロースやヘミセルロース、リグニンなどの繊維性物質が多く含まれるが、反芻動物自身はこれらを分解することは出来ず、それらの分解には腸内に生息する様々な微生物の助けを必要とする。このように動物の腸内には多様な微生物が生息しているため、腸を通して排出される動物の糞は有用微生物の宝庫であり、優れたスクリーニング源になり得るのではないかと考えた。そこで様々な動物を飼育する動物園において検体を採取した。これまでに飼育動物から有用微生物を幅広く探索する試みは行われておらず、新しい知見を得ることが期待できると考えた。そこで、天王寺動物園において飼育されている生活形態や食性が異なる4種類の動物（アジアゾウ、キタジマキーウィ、コアラ、コウベモグラ）の糞を採集し、有用微生物のスクリーニングを試みた。

本研究では、環境中や生態系において物質循環に関わる微生物に着目し（1）環境中におけるマンガン循環に関わる微生物、（2）炭酸固定、窒素固定を行う微生物、（3）抗真菌活性を有する放線菌、（4）植物生長促進に関わる微生物、（5）多糖分解酵素生産微生物の単離を目的とした。

2. 材料と方法

2.1 実験に使用した糞の採取

平成27年3月11日に天王寺動物園にて飼育されている4種の動物、アジアゾウ (*Elephas maximus* :

原稿受付 2016年1月12日

1. 近畿大学大学院生物理工学研究科 生物工学専攻, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
2. 近畿大学生物理工学部 生物工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
3. 大阪市天王寺動物公園事務所, 〒543-0063 大阪府大阪市 天王寺区茶白山町 1-108
4. 近畿大学先端技術総合研究所, 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

図 1A)、コアラ (*Phascolarctos cinereus*: 図 1B)、キタジマキーウイ (*Apteryx mantelli*: 図 1C)、コウベモグラ (*Mogera wogura*: 図 1D) の糞を採取した。

また今回糞を採取した天王寺動物園では、アジアゾウには乾草や青草、根菜類、果物などを、キタジマキーウイにはミミズや牛心臓肉、ミールワーム (ゴミムシダマシ科甲虫の幼虫) などを、コアラにはユーカリの枝葉を、コウベモグラにはミミズや牛肝臓肉、ミールワームなどを給餌している。

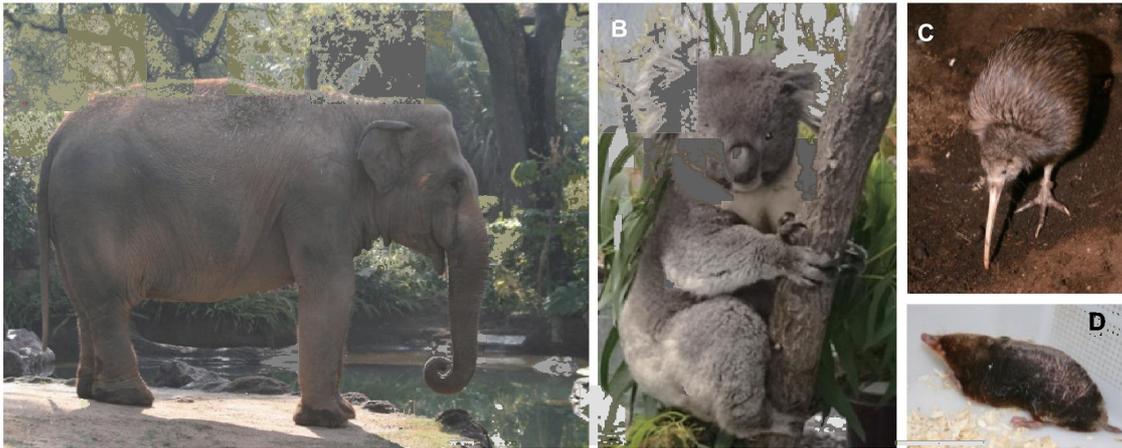


図 1 糞サンプルの採取源とした動物

アジアゾウ (A)、コアラ (B)、キタジマキーウイ (C)、コウベモグラ (D)

2. 2 糞サンプルからのスクリーニング、および活性評価

各動物の糞 1.0 g に対して 0.9%滅菌生理食塩水 10 mL を加え懸濁、希釈系列を作製し以下に示すそれぞれの寒天培地に塗布を行った。微生物の活性は各寒天培地における生育の有無、もしくは微生物の選抜後に行った試験の結果から評価した。

2. 2. 1 マンガン酸化微生物・マンガン還元微生物のスクリーニング

マンガン酸化菌、およびマンガン還元菌をスクリーニングするため、R2A 寒天培地⁽¹⁾に二酸化マンガン (IV) を 0.5% 加えた R2A+Mn 寒天培地にてコロニー周辺の培地の色の変化を指標に選抜を行った⁽²⁾。マンガン酸化微生物が生育した場合、コロニー周辺の培地の色が元の黒色より濃い黒色もしくは褐色となり、マンガン還元微生物では黒色から透明に変化する。このことから候補株のマンガン酸化能・還元能を評価した。

2. 2. 2 炭酸固定、もしくは窒素固定を行う微生物のスクリーニング

炭酸固定を行う微生物のスクリーニングには改変した Spizizen's minimal medium⁽³⁾ ((NH₄)₂SO₄ 0.02%、K₂HPO₄ 0.14%、KH₂PO₄ 0.06%、MgSO₄ · 7H₂O 0.002%、agar 1.5%) を NC (non-carbon source) 寒天培地として実験に使用した。また窒素固定を行う微生物のスクリーニングも同様に Spizizen's minimal medium を改変した NN (non-nitrogen source) 寒天培地 (sodium citrate 0.05%、K₂HPO₄ 0.14%、KH₂PO₄ 0.06%、MgSO₄ · 7H₂O 0.002%、agar 1.5%) を実験に使用した。NC 寒天培地、NN 寒天培地にて生育した微生物を炭酸固定候補微生物、もしくは窒素固定候補微生物とした。

2. 2. 3 抗真菌活性を有する放線菌のスクリーニング

放線菌のスクリーニングには4種類の培地、HV寒天培地、YMA培地、PDA培地、V8寒天培地を用いた。HV寒天培地はhumic acid-vitamin agar⁽⁴⁾を参考に、KCl 0.171%、Na₂HPO₄ 0.05%、MgSO₄·7H₂O 0.005%、CaCO₃ 0.002%、FeSO₄·7H₂O 0.01%、fulvic acid solution 1%(v/v)、アリナミンV(武田製薬工業株式会社) 0.5%(v/v)、agar 1.8%を含み、真菌の成長抑制のためにcycloheximideを50 mg/L添加することにより作製した。V8寒天培地は市販のトマトジュース20%(v/v)、CaCO₃ 0.3%、agar 2.0%にて作製した。以上の培地において生育してきた微生物のうち、コロニー形態から放線菌を選抜し、植物病原菌*Rhizoctonia solani*と対峙培養を行うことにより抗真菌活性能の有無を評価した。

2. 2. 4 植物生長促進に関わる微生物のスクリーニング

植物生長促進に関わる微生物として、植物が吸収できない不溶性リン酸を可溶化する活性をもつ微生物のスクリーニングを試みた。選択培地にはリン酸三カルシウムを含むPikovskaya medium (PVK寒天培地)⁽⁵⁾、もしくはフィチン酸を含むphytase screening medium (PSM寒天培地)⁽⁶⁾を用い、コロニー周囲の色が透明に変化することから微生物のリン酸可溶化能を評価した。また植物体への鉄の取り込みを促進するシデロフォアを生産する微生物のスクリーニングにはCAS寒天培地⁽⁷⁾を使用した。微生物のシデロフォア産生能はコロニー周囲の色の青色から橙色への変化によりシデロフォア産生の有無を評価した。

2. 2. 5 セルロース、およびキチン分解微生物のスクリーニング

セルロースを分解する微生物のスクリーニングはCMC寒天培地⁽⁸⁾を用いた。CMC寒天培地の組成は論文の組成を改変し、カルボキシメチルセルロースナトリウム塩(carboxymethyl cellulose sodium salt : CMC-Na) 1%、yeast extract 0.05%、MgSO₄·7H₂O 0.05%、(NH₄)₂SO₄ 0.05%、KH₂PO₄ 0.1%、KCl 0.05%、agar 1.5%で作製した。セルラーゼ生産微生物の検出は、培養後のCMC寒天培地を1%コンゴレッド溶液で染色、洗浄後にコロニー周囲の脱色の有無により行った。また、キチンを分解する微生物のスクリーニングにはcolloidal chitin寒天培地(CC寒天培地)⁽⁹⁾を使用し、コロニー周囲のクリアゾーン形成の有無により評価した。

3 結果

マンガンの循環に関わる微生物を得るため、マンガン酸化能、マンガン還元能を有する微生物のスクリーニングを試みた。ところがマンガン酸化微生物を分離することはできなかった。一方、マンガン還元微生物はアジアゾウ、コアラ、コウベモグラの3種類の糞サンプルから得ることができた(表1)。R2A+Mn寒天培地において生育が認められたコロニー、アジアゾウ68個、コアラ290個、コウベモグラ112個、からそれぞれ2株、4株、2株のマンガン還元菌を分離することが出来た。

次に炭酸固定候補微生物、もしくは窒素固定候補微生物のスクリーニングを行った。スクリーニング培地としてR2A寒天培地を用いて菌数算定を行ったところ、R2A寒天培地ではキタジマキーウィとコウベモグラにおいては他の動物と比較すると高い菌数が示された(図2)。NC寒天培地を用いてスクリーニングを行ったところ、全ての動物の糞サンプルにおいて、炭酸固定微生物の存在が示唆された。また、NC寒天培地におけるアジアゾウ、コアラの菌数はR2A寒天培地とほとんど同等、キタジマキーウィ、コウベモグラにおいてはR2A寒天培地より低い菌数を示した(図2)。またNN寒天培地を用いてスクリーニングを行ったと

ころ、アジアゾウ、キタジマキーウィ、コアラの糞サンプルにおいて、窒素固定微生物の存在が示唆された（図 2）。しかしながらコウベモグラにおいては、NN 寒天培地では菌の生育は認められなかった。NC 寒天培地、NN 寒天培地ともにキタジマキーウィの糞サンプルにおいて最も高い菌数が示された。

表 1 各動物の糞に含まれる微生物が有する活性の評価

Exp.	Plate	Activity	Animal feces			
			<i>E. maximus</i>	<i>A. mantelli</i>	<i>P. cinereus</i>	<i>M. wogura</i>
1	R2A+Mn agar	manganese oxidation	-	-	-	-
	R2A+Mn agar	manganese reduction	+	-	+	+
2	NC agar	carbon fixation	+	+	+	+
	NN agar	nitrogen fixation	+	+	+	-
3	HV agar	antifungal activity of actinomycetes	+	-	-	-
	YMA agar	antifungal activity of actinomycetes	-	-	-	-
	PDA agar	antifungal activity of actinomycetes	-	-	-	-
	V8 agar	antifungal activity of actinomycetes	-	-	-	-
4	PVK agar	phytase production	+	+	+	+
	PSM agar	insoluble phosphate solubilization	+	+	+	+
	CAS agar	siderophore production	-	-	+	+
5	CMC agar	cellulase production	+	+	-	-
	CC agar	chitinase production	+	+	-	-

それぞれの寒天培地において活性を示したものを +、活性を示さなかったものを - とした。

続いて抗真菌活性を示す放線菌のスクリーニングを行ったところ、アジアゾウの糞サンプルにおける HV 寒天培地と V8 寒天培地のみで放線菌の存在が認められた。それら放線菌を HV 寒天培地から 5 株、V8 寒天培地から 1 株分離し、*R. solani* に対する抑制能の有無を調べた。結果、HV 寒天培地を用いて分離した放線菌 4 株のうち 1 株が弱いながらも抑制能を示した（表 1）。

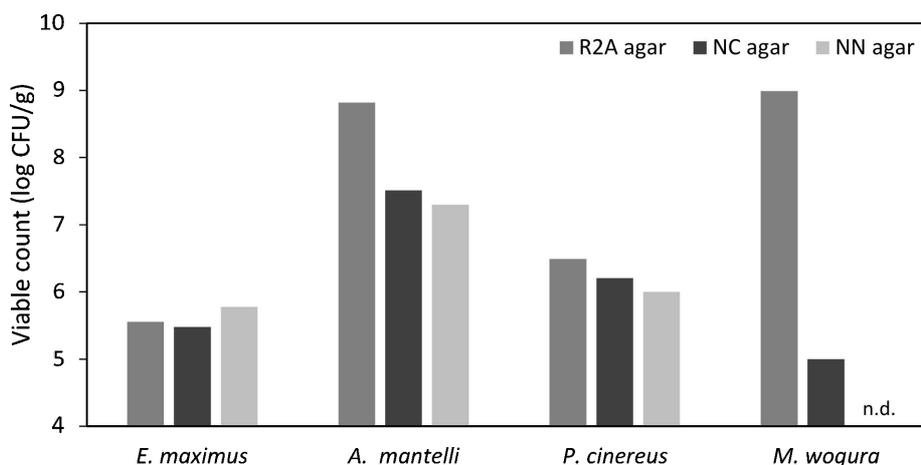


図 2 NC 寒天培地、NN 寒天培地における動物糞 1 g 当たりの菌数

コントロールとして R2A 寒天培地を使用した。n.d. は微生物の生育が認められなかったことを示す。

次にリン酸可溶化活性を示す微生物のスクリーニングを試みた。PVK 寒天培地ではアジアゾウ、キタジマキーウイの糞サンプルは弱かったものの、全てのサンプルにおいて活性を示した（表 1）。PSM 寒天培地においても全ての糞サンプルにおいて活性を示し、コアラの糞サンプルにおいて強い活性が認められた（表 1）。続いて鉄の取り込みを促進するシデロフォア生産微生物を CAS 寒天培地を用いてスクリーニングを行った。結果、コアラとコウベモグラの糞サンプルにおいてのみ弱い活性を示した（表 1）。

最後に、多糖類を分解する微生物のスクリーニングを行った。CMC 寒天培地によるスクリーニングの結果、アジアゾウ、およびキタジマキーウイの糞サンプルにおいてセルラーゼ生産微生物が得られた（表 1）。続いて CC 寒天培地を用いてスクリーニングを行った結果、アジアゾウ、およびキタジマキーウイの糞サンプルにおいてキチナーゼ生産微生物の存在が認められた（表 1）。またアジアゾウの糞サンプルから単離した微生物が強い活性を示した。

4. 考察

各飼育動物の糞から様々な活性を有する微生物が得られた。これまでに野生動物の糞を単離源とした有用微生物探索の試みは世界的に行われている。Murty と Chandra は野生のゾウの糞やコンポストを含む様々なサンプルからキシロースやキシランを利用可能な微生物の単離を報告している⁽¹⁰⁾。また Singh らは野生のサイの糞からセルラーゼを産生する微生物の単離⁽¹¹⁾、Farouq らは野生のアジアゾウの糞からセルラーゼを産生する真菌の単離に成功している⁽¹²⁾。さらに Peterson らはコアラの糞から様々な難分解性の基質を分解できる酵素を産生する真菌を単離している⁽¹³⁾。本研究では飼育下のアジアゾウとキタジマキーウイの糞にセルラーゼやキチナーゼといった多糖分解酵素を産生する微生物が存在することを明らかにした。今回のスクリーニングにより飼育下のアジアゾウから野生動物で既に報告されていたセルラーゼ生産菌が得られた。つまり動物は種において特定の機能を有する微生物を腸内に有していることが考えられ、またそれは餌とする食物に影響されないことが示唆された。さらに今回、単離源とした全ての動物の糞から不溶性リン酸を可溶化する微生物の存在が示され、コアラとコウベモグラの糞からはシデロフォアを産生する微生物が得られた。このことから野生下・飼育環境下に関わらず動物の糞には多糖分解する酵素を産生する微生物を初めとして、様々な活性を有する微生物の存在が示唆された。

また今後の展望として同一種の動物間における腸内微生物叢が生息環境（気候や餌、ストレス等）で変わるという仮説を立て、野外や複数の異なる動物園から同一種の動物の糞を採取して微生物のスクリーニング、微生物の活性の比較を行うことで、既知の微生物よりも強い活性を有する新規微生物の単離が可能となることが期待される。

微生物のスクリーニングを行う際、我々が単離・培養できる微生物はほんの一握りに過ぎないとされ、99% にもおよぶ微生物は“未知微生物”として培養出来ていないか、もしくはそれらの微生物を含むサンプルに出会っていないことが分かっている^(14,15)。世界中の動物園で飼育されるその土地固有の動物の糞をスクリーニング源とすることは未知微生物のスクリーニングを可能とする微生物学の新たな試みとなるのではないだろうか。

5. 結論

アジアゾウ、キタジマキーウイ、コアラ、コウベモグラの糞サンプルから様々な活性を有する有用微生物が得られた。また、抗真菌活性を有する放線菌はアジアゾウのみ、シデロフォア産生微生物はコアラとコウ

ベモグラにおいて、難分解性多糖を分解する微生物はアジアゾウとキタジマキーウィにおいて存在が示された。全ての動物で多様な活性を有する微生物が腸内に存在していることが明らかとなり、動物園において飼育されている動物の糞が有用微生物の単離源となり得ることを示した。

また、これまでにキタジマキーウィとコウベモグラの糞を単離源とした有用微生物の探索に関する知見は飼育動物のみならず野生動物においても報告されていない。このことから、本研究はそれらの動物の糞に有用微生物が存在することを初めて報告するものである。

参考文献

- (1) Reasoner, D. J., Geldreich, E. E. (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 1-7.
- (2) Wade, H. E. (2009) Influence of earthworm activity on soil microbes and soilborne diseases of vegetables. *Plant Disease* 93, 175-179.
- (3) Spizizen, J. (1958) Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 44, 1072-1078.
- (4) 乙黒美彩、中島琢自、宮道慎二 (2012) 放線菌の分離と抗生物質の探索、*生物工学会誌* 90, 493-498.
- (5) Gulati, H. K., Chadha, B. S., Saini, H. S. (2007) Production and characterization of thermostable alkaline phytase from *Bacillus laevolacticus* isolated from rhizosphere soil. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34, 91-98.
- (6) Sharma, S., Kumar, V., Tripathi, R. B. (2011) Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 1, 90-95.
- (7) Payne, S. M. (1994) Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods in Enzymology* 235, 329-44.
- (8) Miller, M., Palojarvi, A., Rangger, A., Reeslev, M., Kjoller, A. (1998) The use of fluorogenic substrates to measure fungal presence and activity in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 613-617.
- (9) Velusamy, P., Kim, K. Y. (2011) Chitinolytic activity of *Enterobacter* sp. KB3 antagonistic to *Rhizoctonia solani* and its role in the degradation of living fungal hyphae. *International Research Journal of Microbiology* 2, 206-214.
- (10) Murty, M. V. S., Chandra, T. S. (1989) Isolation and characterization of xylose- and xylan-utilizing anaerobic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 55, 153-163.
- (11) Singh, S., Moholkar, V. S., Goyal, A. (2013) Isolation, identification, and characterization of a cellulolytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain SS35 from rhinoceros dung. *International Scholarly Research Notices Microbiology* 2013, 1-7.

- (12) Farouq, A. A., Abdullah, D. K., Hooi-Ling, F., Abdullah, N. (2012) Isolation and characterization of coprophilous cellulolytic fungi from Asian elephant (*Elephas maximus*) dung. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* 2, 44-51
- (13) Peterson, R. A., Bradner, J. R., Roberts, T. H., Nevalainen, K. M. H. (2009) Fungi from koala (*Phascolarctos cinereus*) faeces exhibit a broad range of enzyme activities against recalcitrant substrates. *Letters in Applied Microbiology* 48, 218-25.
- (14) Keller, M., Zengler, K. (2004) Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews. Microbiology* 2, 141-50.
- (15) Rappé, M. S., Connon, S. A., Vergin, K. L., Giovannoni, S. J. (2002) Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* 418, 630-3.

英文抄録

Screening of beneficial microorganisms from feces of captive animals in Osaka Tennoji Zoo

Shohei Ebe¹, Misaki Yoshino², Nao Yoneda², Tingxun Su¹, Naoki Washio¹, Tatsuya Ohike¹,
Masahiro Okanami², Takashi Ano², Kazutoshi Takami³ and Minoru Miyashita⁴

The aim of this study is the isolation of beneficial microorganisms from the animal feces. Since the zoo is keeping a variety of animal species, the fecal samples were collected at the zoo from the following four animals which have different ecological features: Asian elephant (*Elephas maximus*), North Island brown kiwi (*Apteryx mantelli*), koala (*Phascolarctos cinereus*) and Japanese western mole (*Mogera wogura*).

Isolation of beneficial microorganisms from the animal feces and activity tests have been performed by using agar media. As a result, all animal feces have shown the presence of beneficial microorganisms such as manganese reducing microorganisms, carbon-fixing microorganisms, nitrogen-fixing microorganisms, plant growth promoting microorganisms, actinomycetes that have antifungal activity against plant pathogenic fungi, and persistent polysaccharide degrading microorganisms. This study revealed that feces of captive animals have usefulness for screening of beneficial microorganisms.

Key word: Osaka Tennoji Zoo, animal feces, screening of beneficial microorganisms.

-
1. Division of Biotechnological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan.
 2. Department of Biotechnological Science, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan.
 3. Osaka Municipal Tennoji Zoological Gardens, Osaka 543-0063, Japan.
 4. Institute of Advanced Technology, Kindai University, Wakayama 642-0017, Japan.