

JRA畜産振興事業に関する調査研究発表会

# 放牧地における家畜糞分解適正化

～微生物の多様性、機能、地域性の検討～

内田 義崇

北海道大学大学院農学研究院



HOKKAIDO  
UNIVERSITY

2023年11月16日





## 内田義崇(うちだよしたか)

北海道大学院農学研究院  
環境生命地球化学研究室

### バックグラウンド

- ニュージーランド・リンカーン大博士課程修了後、つくば市農業環境変動研究センター勤務
- 2013年1月より現職

### 最近の取り組み

- 家畜糞中の栄養素の動きの研究
- アフリカの土壌・水質劣化を改善し持続的に利用するための研究

# 事業を始めた経緯

- 放牧地での糞分解
  - なぜ分解がうまくいったりいかなかったりするのかな
- 糞分解と温室効果ガス
  - どの程度でているのか？
- 地域性、営農の影響
  - そもそもどんな微生物が酪農場のどういう場所に棲んでいるのか

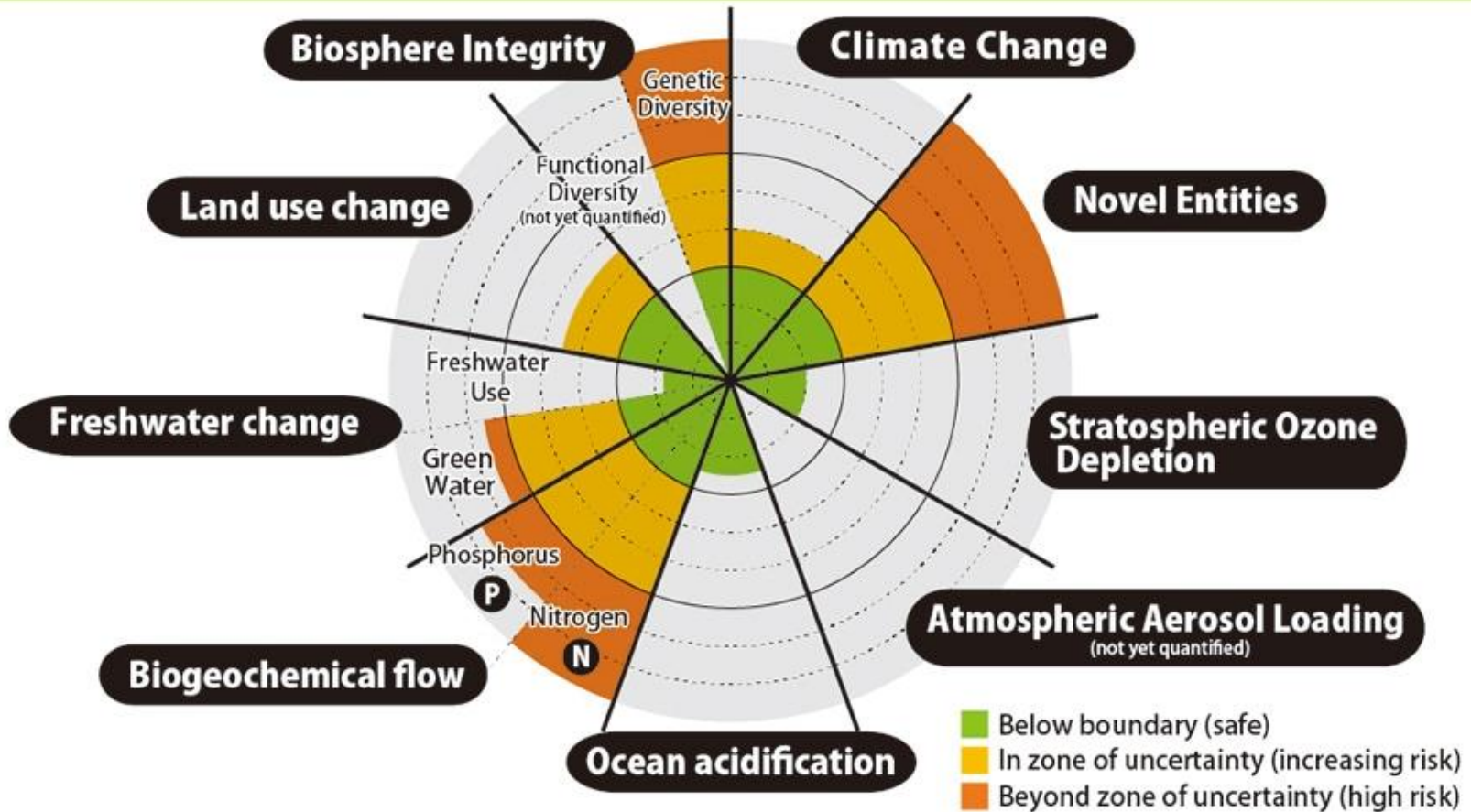


# 今日の話の流れ

- 微生物の多様性と機能とは？
  - なぜ多様性と機能を観る必要があるのか？
- 微生物の地域性を紐解く研究の紹介
  - 酪農場を循環する微生物の話
- 微生物の機能を考える実験の紹介
  - 微生物によるガス排出～理解が進んでいる部分
- まとめ

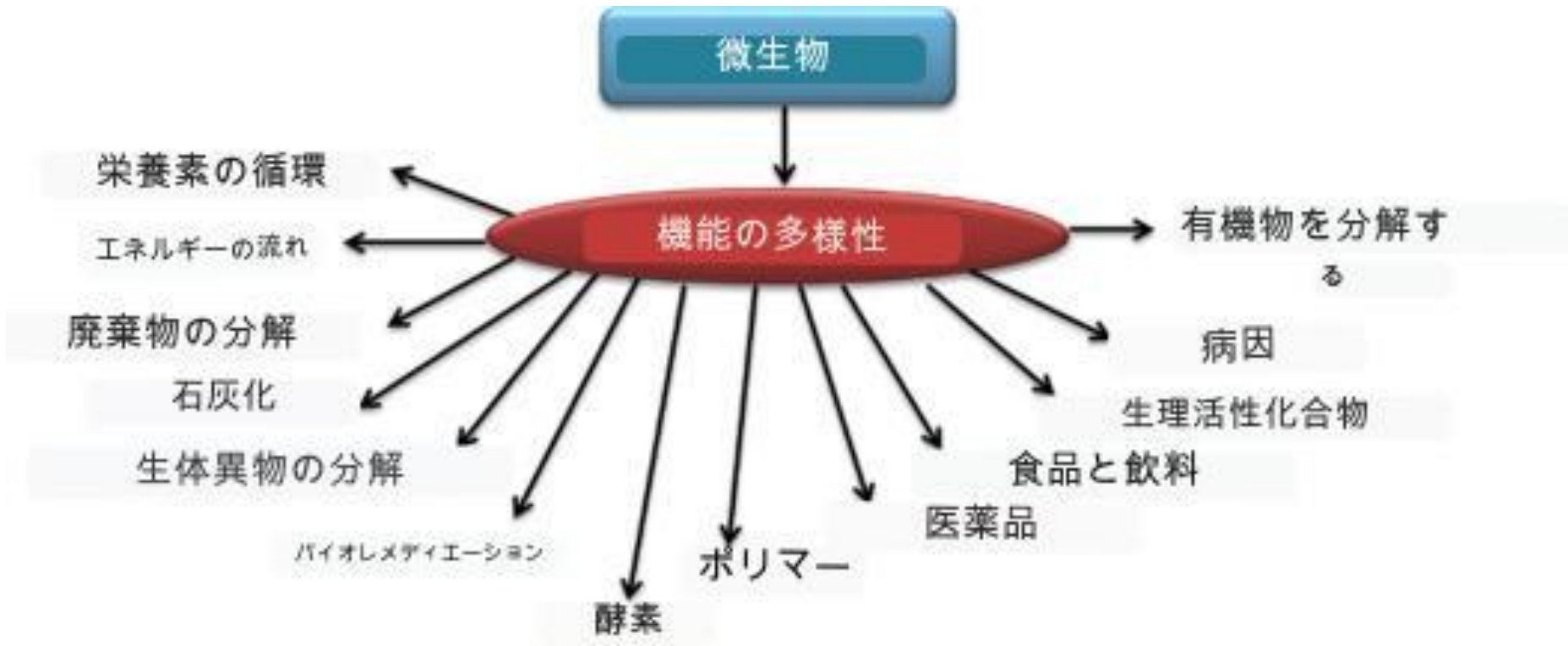
# プラネタリーバウンダリー

## Current status of planetary boundaries



地球のリミットを超えてしまった要素がオレンジ～赤で示されている。  
上の方のGenetic Diversity(生物多様性)、Functional Diversityに注目

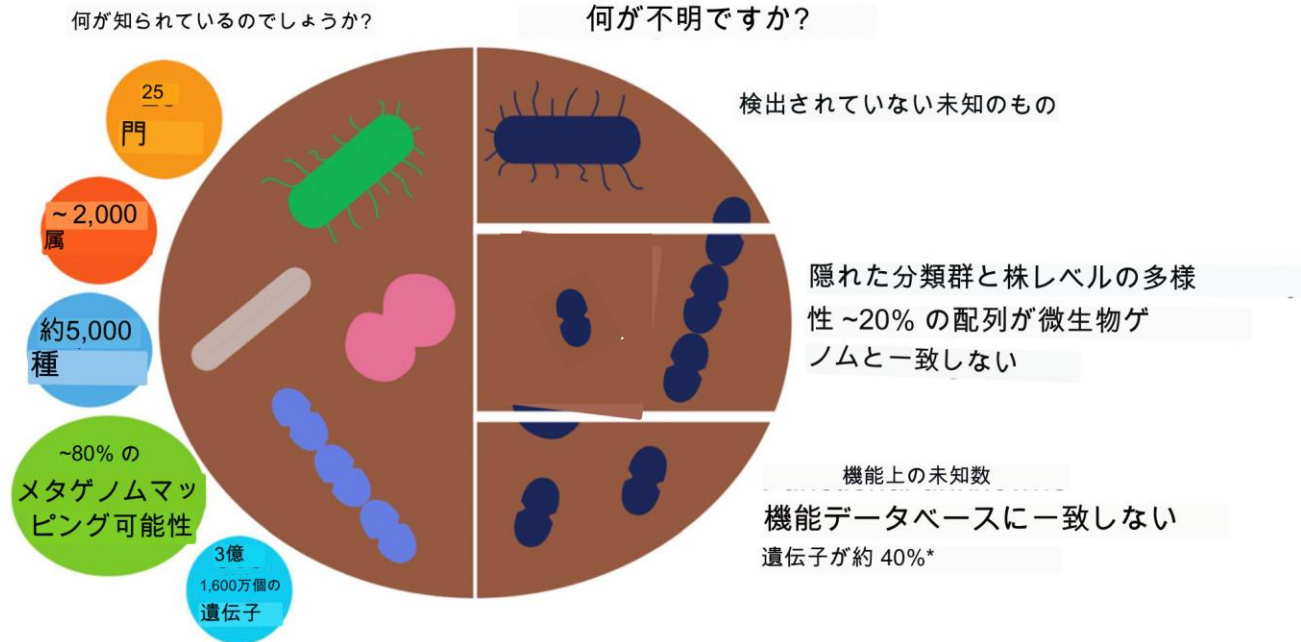
# 微生物多様性と機能



- 多様性を保全することはとても大切
- 微生物の場合はその理由が多岐に渡る
- 大切だが理解が進んでいない(どの微生物が大切か、などの問いに対する答え)

# 微生物多様性と機能

## ヒトのマイクロバイオーーム



- 腸内細菌ですらわかっていない部分が非常に多い
- 土壌や堆肥などはなおさらわかっていない(研究が進んでいない)

# 今日の話の流れ

- 微生物の多様性と機能とは？
  - なぜ多様性と機能を観る必要があるのか？
- 微生物の地域性を紐解く研究の紹介
  - 酪農場を循環する微生物の話
- 微生物の機能を考える実験の紹介
  - 微生物によるガス排出～理解が進んでいる部分
- まとめ

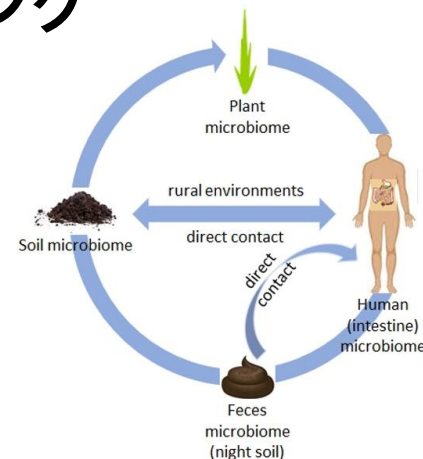


# 酪農場の微生物生態 と 微生物間ネットワーク

# 序論

## ▶ 過去の研究: マイクロバイオームサイクリング

- ✓ “土壌微生物コミュニティが腸内細菌と関係している?” (Blum et al., 2019)
- ✓ “腸内細菌が人が住む場所・地域と関連している?” (Tasnim et al., 2017)



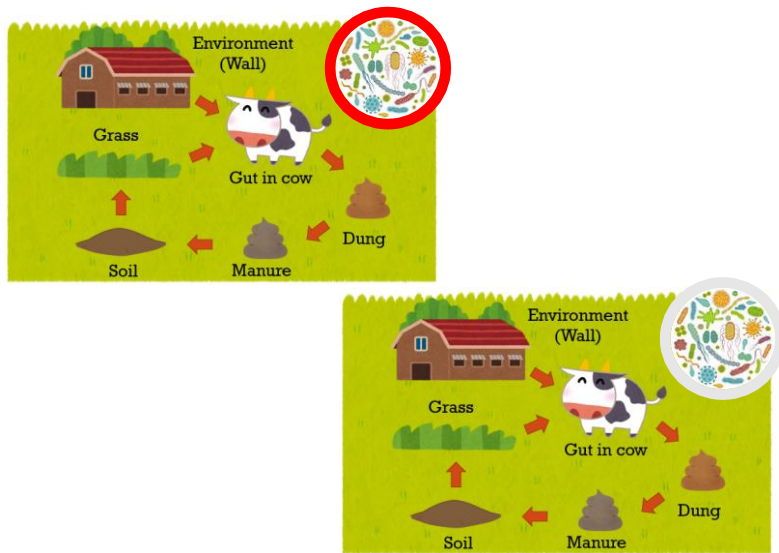
## ▶ 本研究

- 微生物のサイクリングは酪農生態系でも起こっているのか？

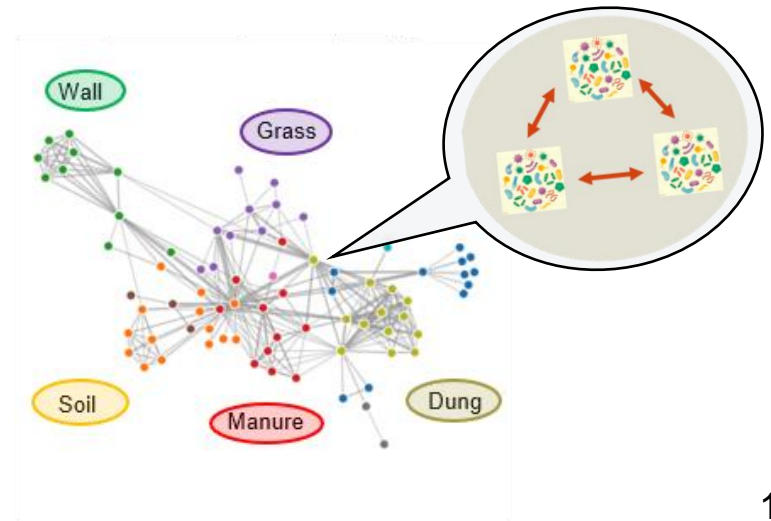


# 検証する仮定

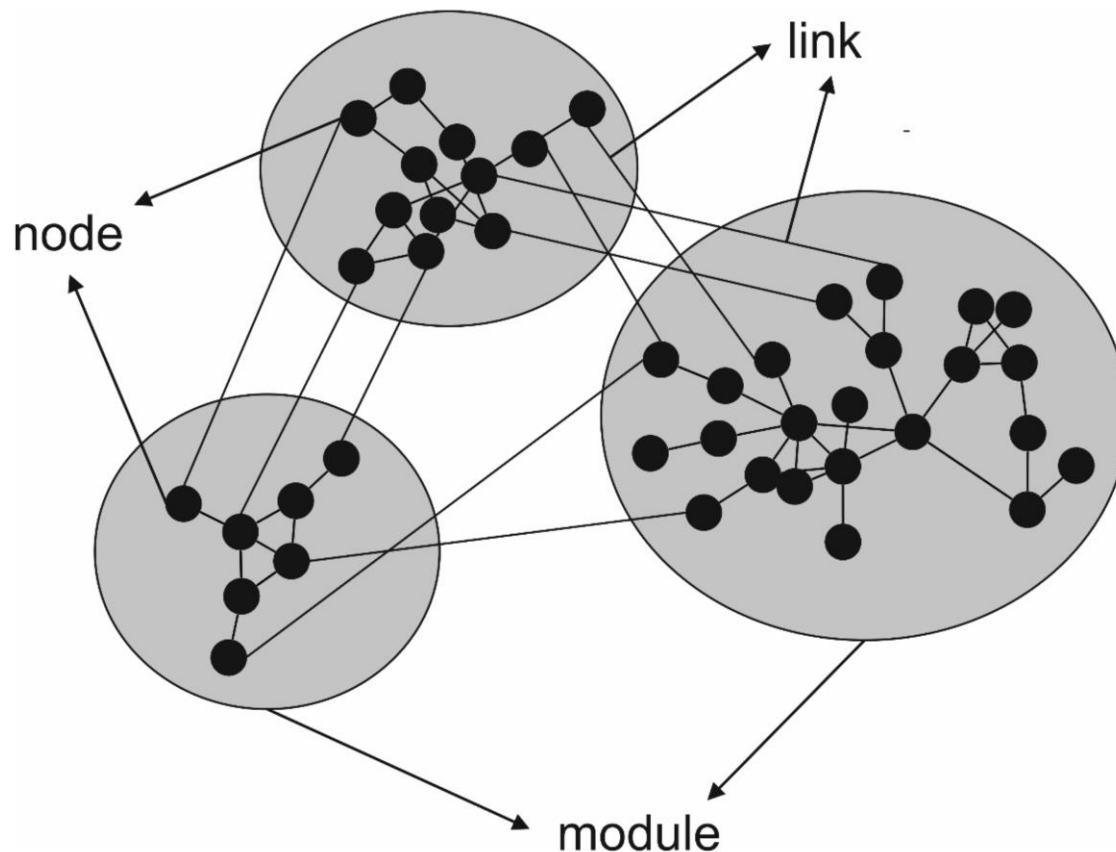
1. 微生物はさまざまな生息地内を移動し、独自のコミュニティのサイクルを形成する。



2. 農場のさまざまな生息地で見られる微生物間には相互作用を見ることができ、それらは特定のネットワークを形成している。



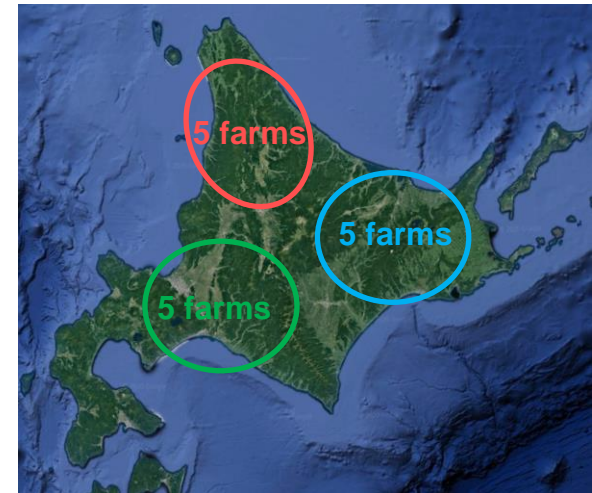
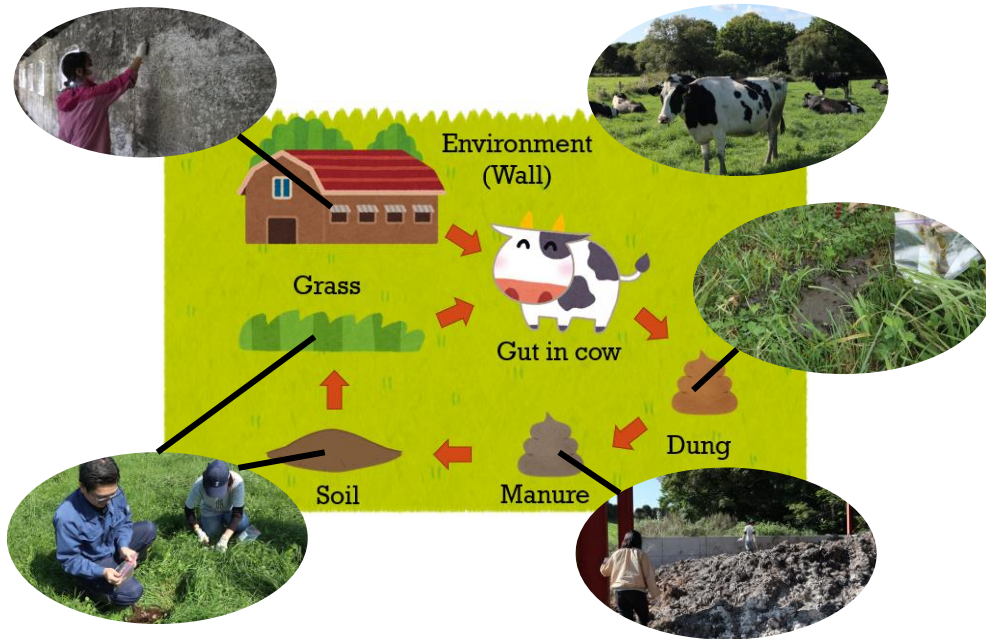
# 微生物間ネットワーク



- 単なる「種数」で多様性を評価するのではなく、その安定性や相互関係を評価する統計手法がある
- 微生物Aが居なければBは存在しない、というような相互関係
- Module(この場合は生息域や生態系)とModuleを繋ぐような関係は？



# 実験手法



• 15 grazing dairy farms

ラボ分析とバイオインフォマティクス

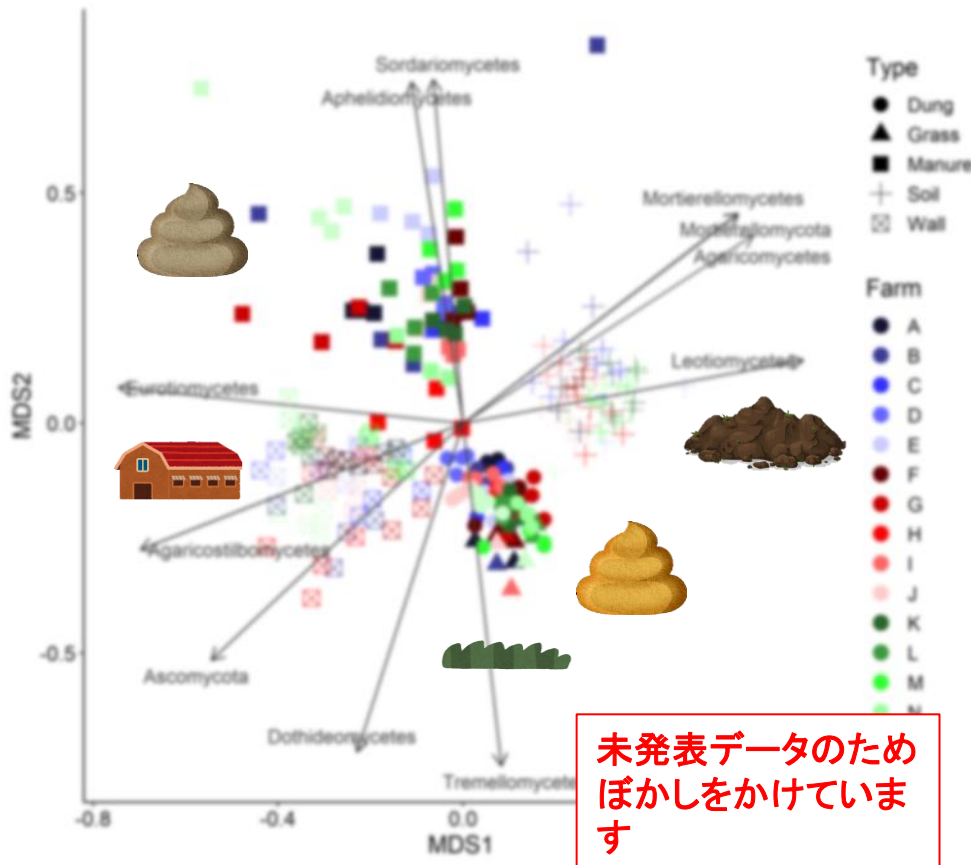
ITSのための定量的PCRおよびアンプリコンシーケンシング→DNA抽出

\*解析-

- マイクロバイームコミュニティ...非メトリック多次元尺度法
- マイクロバイームサイクリング...共有 ASV の数
- 特定のネットワーク...ネットワーク分析

# 結果①: 真菌のコミュニティ類似性

- NMDSプロットの見方→微生物コミュニティ構造が似ていれば近くにプロット
- 糞は糞の微生物で、堆肥は堆肥の微生物で固まっている
- 矢印の方向はその微生物種の多さを表している

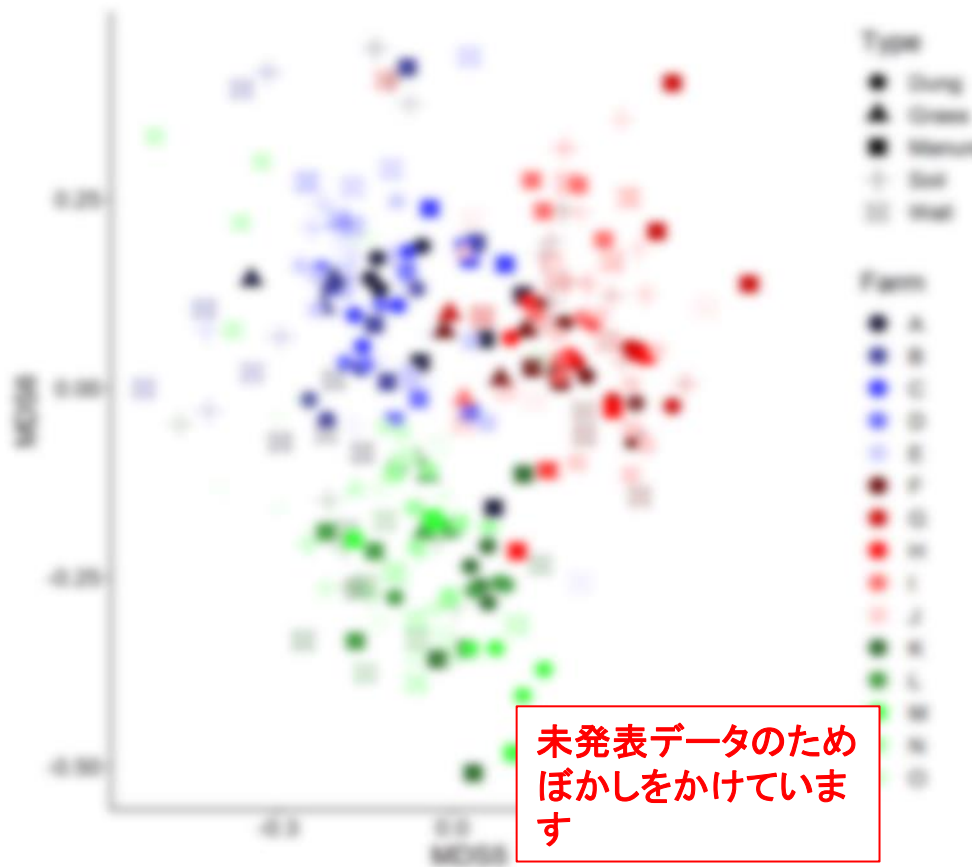
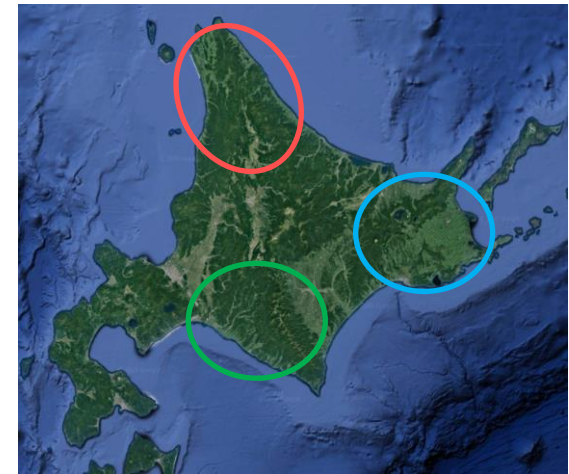


	F value	R <sup>2</sup> value	P value
Farm	2.3918	0.1038	< 0.001
Type	14.0055	0.1737	< 0.001

サンプルの「タイプ(糞、堆肥、土など)」は真菌群集構造に影響を与える

## 結果②: スケールを変えて同じデータを見てみると、、、。

- NMDSプロットのスケールを変更する
- コミュニティ構造の類似度を決定する様々な要因が見えてくる
- 生息地が一番大きな要因だが地域も大切

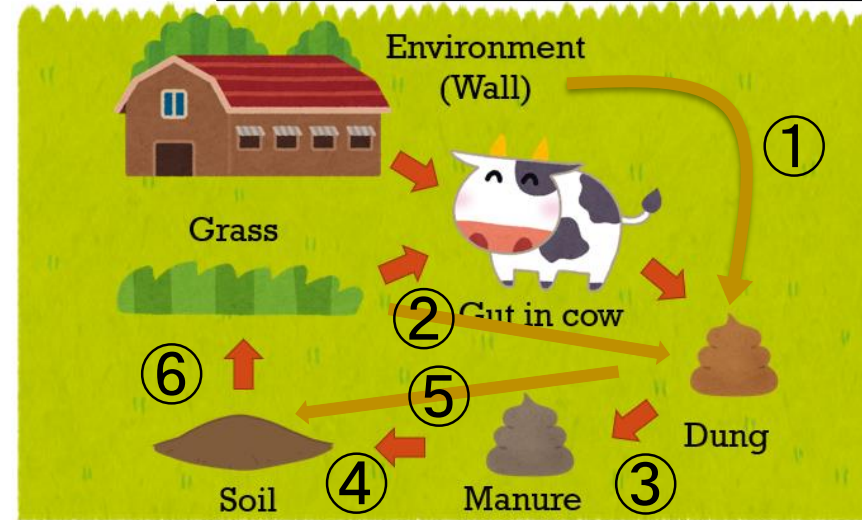
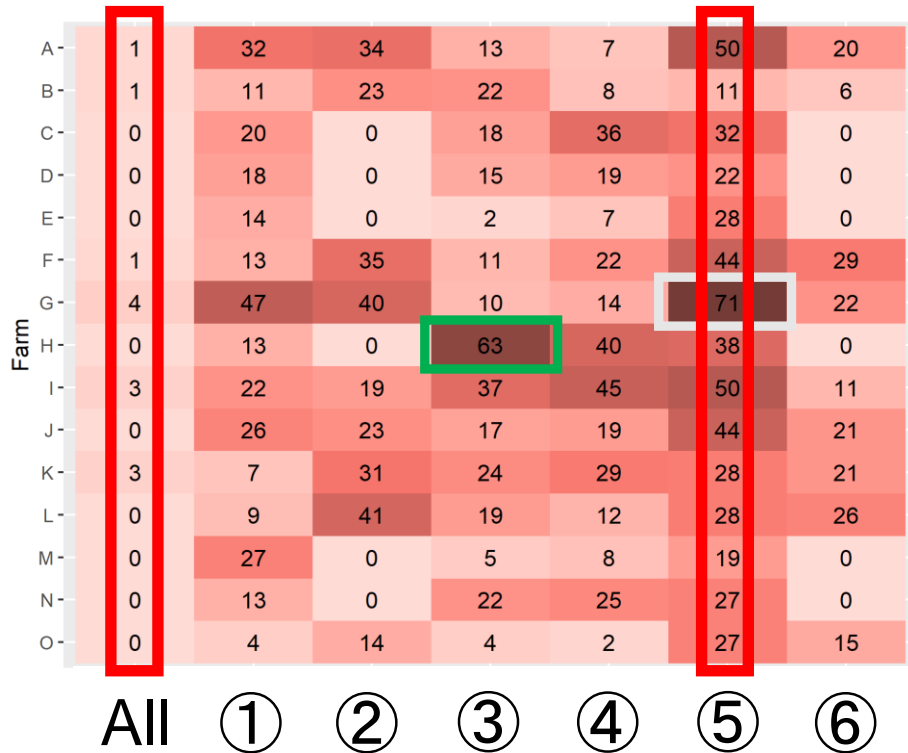


「地域」は、生息地の種類に関係なく、真菌群集の構造に影響を与える。

# 微生物はどのように生息域から生息域へと移動しているのか？

- 生息域と生息域をペアにして、何種類の微生物(ASV)が共通しているのかを数値化
- 場所によって共通種数が多いペアが変化する

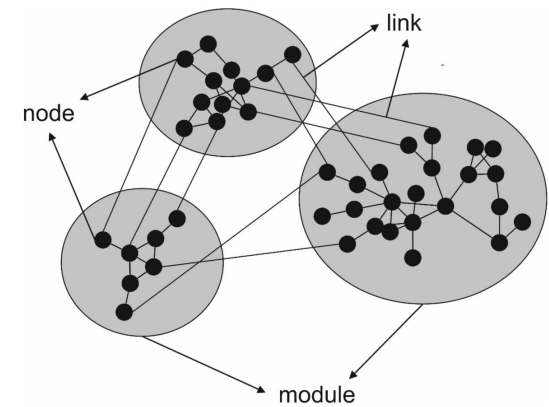
\* Amplicon Sequencing Variant  
→ virtual species assignment



- ✓ 農場Hの糞と肥料
  - ✓ 生堆肥メインの場合
- ✓ 農場Gの糞と土壌
  - ✓ 十分に発酵している場合

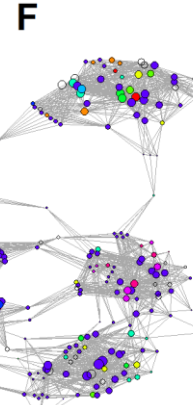
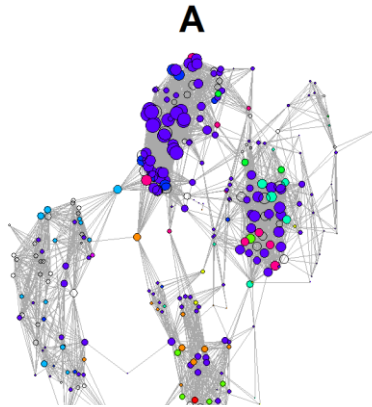


# ネットワーク解析

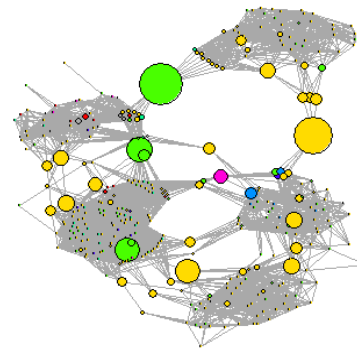
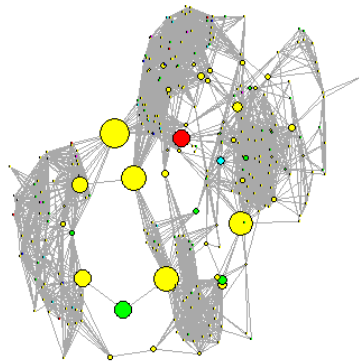


**Psathyrellaceae** (ナヨタケ科)  
窒素の多い環境に生育しがち。  
それぞれの生息域でのNodeとなる率が高そう。

- Agaricostilbaceae
- Aspergillaceae
- Bulleribasidiaceae
- Cladosporiaceae
- Cucurbitariaceae
- Didymellaceae
- Microascaceae
- Mortierellaceae
- Psathyrellaceae
- Sporormiaceae
- Others



- Aphelidiomycota
- Ascomycota
- Basidiomycota
- Mortierellomycota
- Mucoromycota
- Rozellomycota
- Others



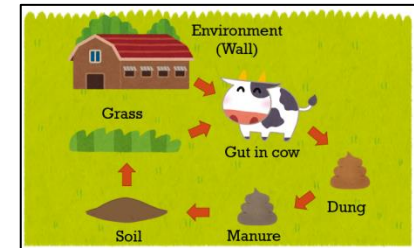
**Ascomycota** (子囊菌門)  
生息域と生息域を繋ぐ役割を担っている可能性が高そう。

- これらが何を意味するのはまだまだ研究が必要
- いい堆肥を作れば土の微生物が良くなる、といった「概念」を学術的に実証するのにこのような解析は必須

# ここまでの結論

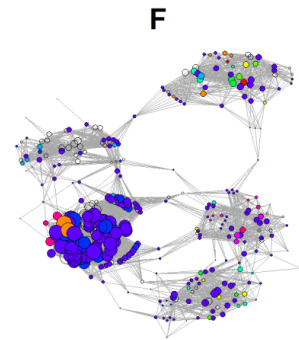
1.微生物は異なる生息地内を移動していて、そのメカニズムは農場によって大きく異なる可能性がある

- 共通の微生物種を沢山持っている生息域のペアとそうでないペアがある
- このような種の共通性などは農場毎に大きく異なる
- 一方で、地域差もある程度あるため、地域毎に異なるメカニズムを有している可能性が高い



2.異なる生息地で見られる微生物間の相互作用も農場毎に異なっている

- 微生物の生息域同士を繋げる微生物が居る
- 生息域の中でもネットワークに貢献しているタイプとそうでないタイプがいる



将来的には、、、これらネットワークをどのように制御できるか？ そもそもこういうことやって何か役に立つのか？

# 今日の話の流れ

- 微生物の多様性と機能とは？
  - なぜ多様性と機能を観る必要があるのか？
- 微生物の地域性を紐解く研究の紹介
  - 酪農場を循環する微生物の話
- 微生物の機能を考える実験の紹介
  - 微生物によるガス排出～理解が進んでいる部分
- まとめ

## 話題提供②

土壌中や糞中の微生物コミュニティは  
糞分解時に発生する温室効果ガス量  
と関連するか？



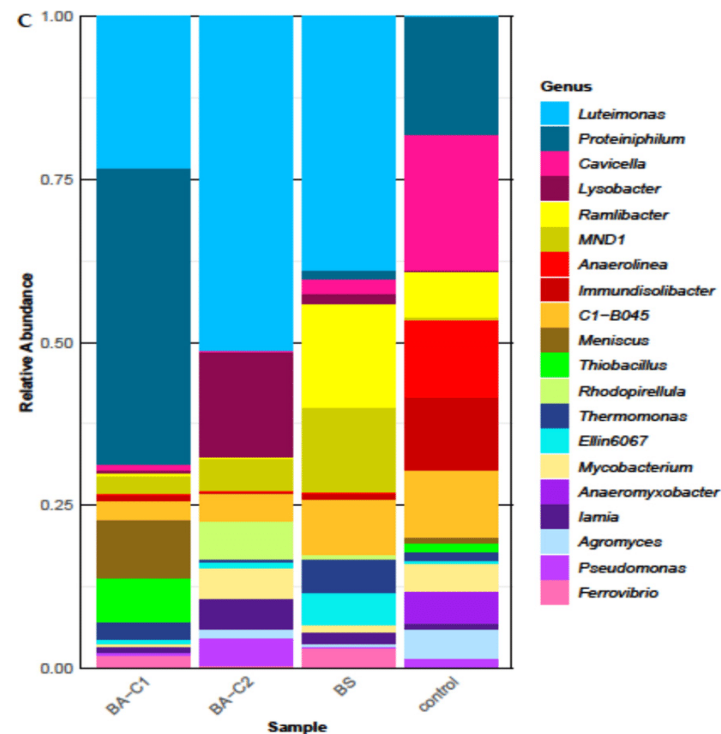
# 背景

酪農産業は温室効果ガス排出の重要な原因となっている。



- 糞の分解とガス排出に影響を与える微生物群集を考察することは極めて重要

# 研究の目的等



- 微生物の種と存在割合(右)は、酪農牛糞が土壤に排せつされた後の分解やそれに伴うガス排出量とどのように関連しているのか？

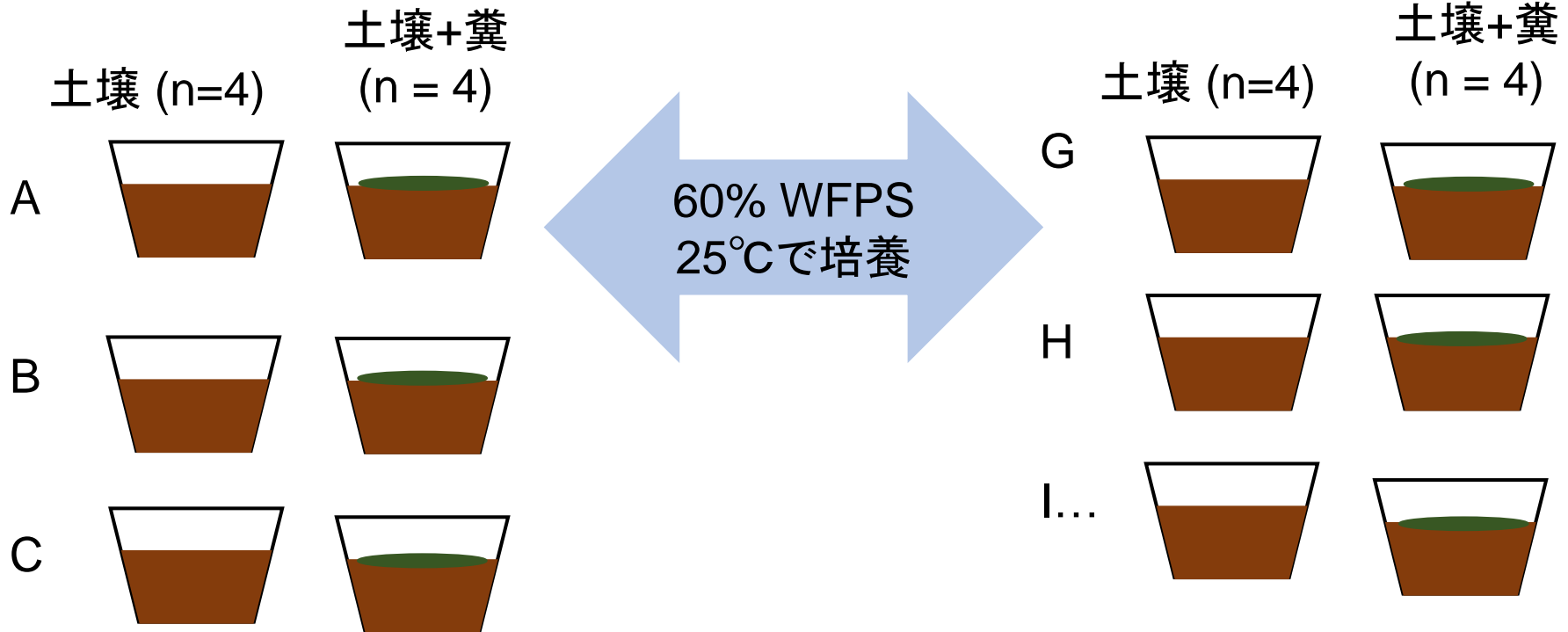
※先ほどの研究と同様



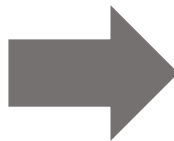
- 15カ所の放牧酪農場から土壌を採取
- 道央、道北、道東からまんべんなく採取

# 温室効果ガス排出量の評価

土壌- 70g、糞- 1g (乾燥重量ベース)



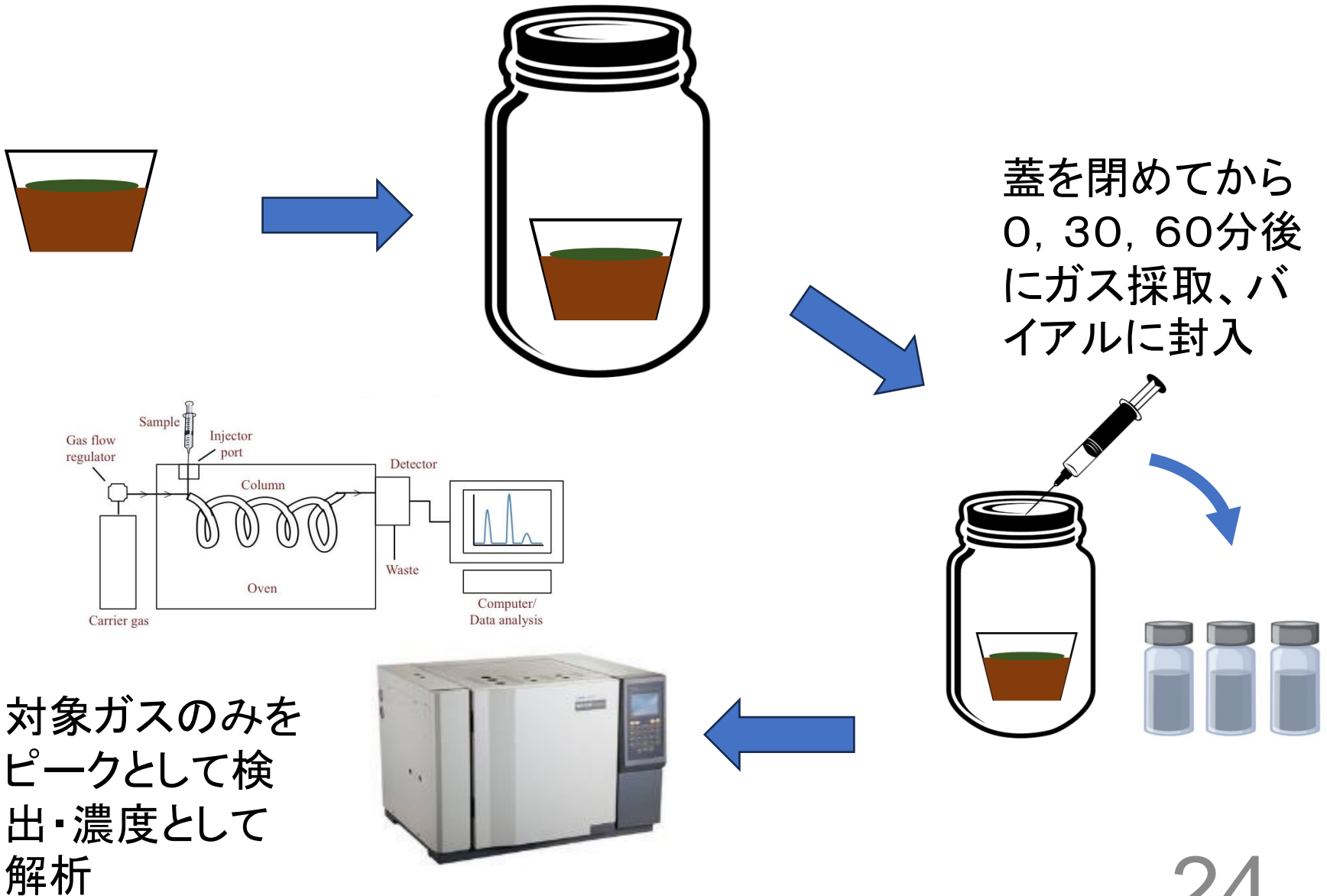
200日間  
程度培養



測定ガス  
ガスクロマトグラフを用  
い、二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)  
および亜酸化窒素  
(N<sub>2</sub>O)



# 温室効果ガス排出量の評価



# ガス排出に関連した理化学性や微生物の評価

## 土壌と糞の測定

- 土壌のpH
- 全炭素(糞と土壌)
- 全窒素(糞と土壌)
- qPCRによる細菌の存在量

## DNAサンプリングと分析

0 days ~

初期

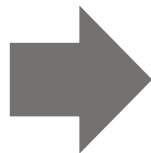
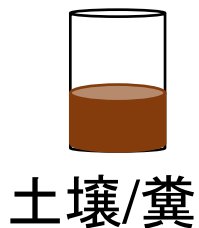
100 days ~

中期

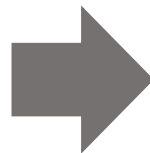
200 days

後期

DNA抽出  
(Power soil kit)



PCRによる  
増幅



次世代  
シーケンシング

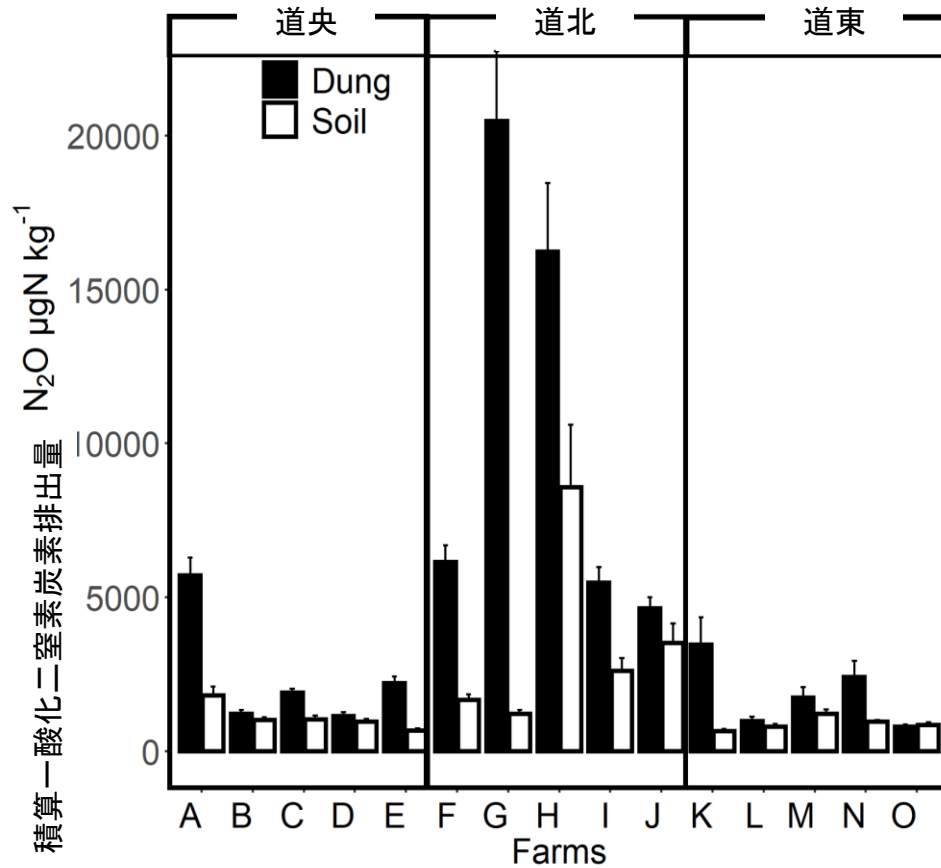
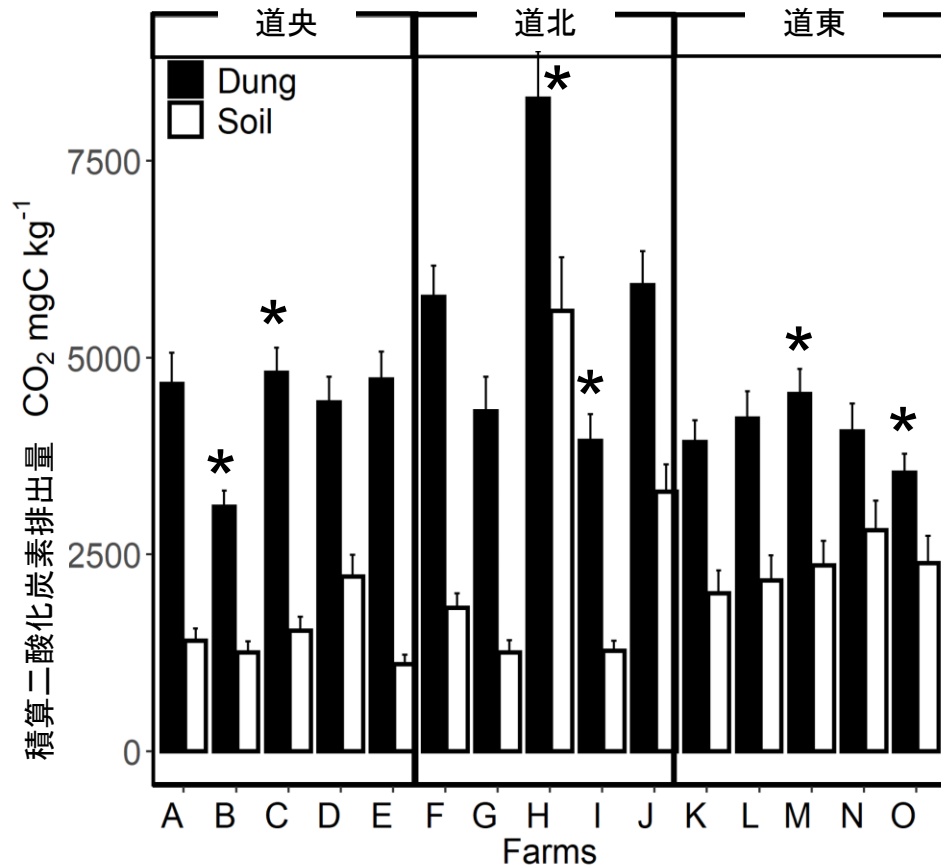


統計解析



# 結果と考察

- インキュベーション100日におけるCO<sub>2</sub>およびN<sub>2</sub>O排出量
- ほとんどのガス排出は最初の100日に起きた



ガス排出にも地域差の傾向が見られた。

それぞれの地域でガス排出が最も高いものと低いもので微生物を解析

# 土壌、糞の理化学性とガス排出量

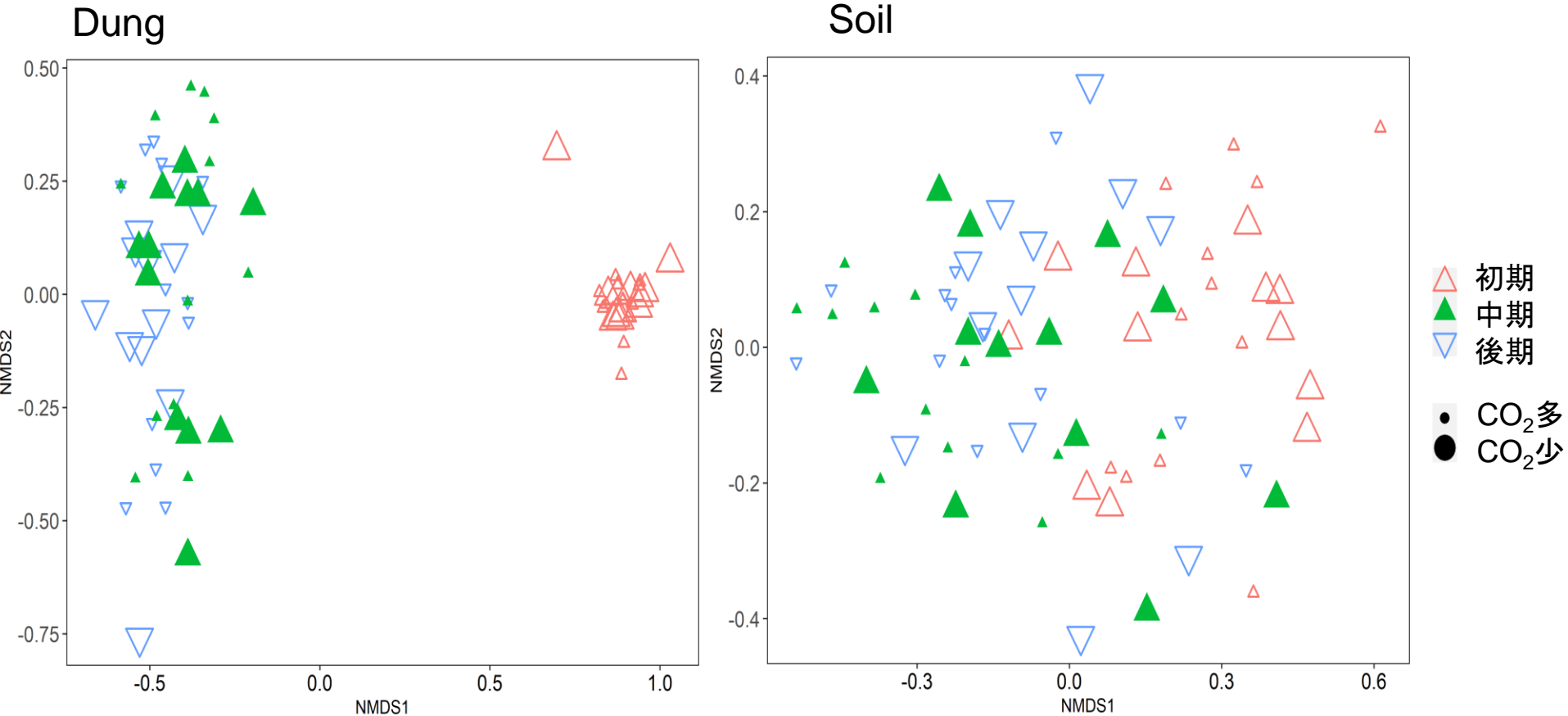
- 土壌と糞の性質とCO<sub>2</sub>排出パターンとのピアソン相関

	土壌 炭素	土壌 窒素	糞 炭素	糞 窒素	土壌 pH	土壌 密度	CEC
High CO <sub>2</sub>	0.93***	0.94***	-0.68*	-0.65*	-0.66*	-0.74**	0.93***
Low CO <sub>2</sub>	-0.35	-0.30	0.05	0.14	0.24	0.65*	-0.11

\*, \*\*, \*\*\* は  $P < 0.05$ ,  $0.01$  and  $0.001$

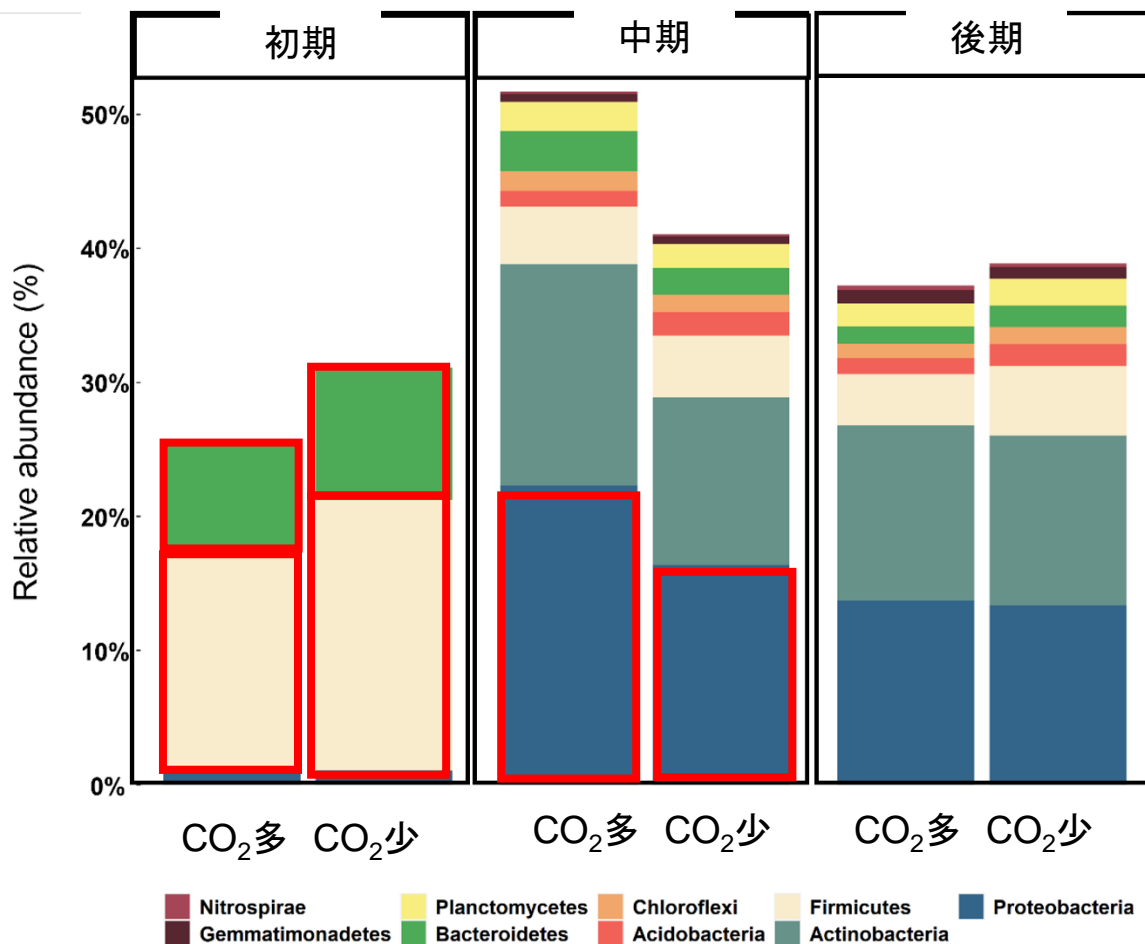
- 土壌炭素や窒素は糞由来CO<sub>2</sub>と強い正の相関がある(糞由来CO<sub>2</sub>排出量が多い場合)
- 糞由来CO<sub>2</sub>排出量が元々低いサンプル中では、土壌や糞の理化学性はガス排出量を説明しにくい

# 微生物群集構造の変化



- ガス排出が最も大きかった初期は糞の微生物は他の時期と全く違うコミュニティ構造を有していた
- 土壌も同じ傾向はあったが弱かった
- ガス排出量が多いグループと少ないグループの違いははっきりとはわからない(次のスライドでより細かく検証)

# 糞中微生物群集構造の違い(CO<sub>2</sub>多サンプルとCO<sub>2</sub>少サンプル)



初期では、*Bacteroidetes* や *Firmicutes* の少なさが CO<sub>2</sub>排出の多さと関連 (Bello et al. 2020; Sun et al. 2019).

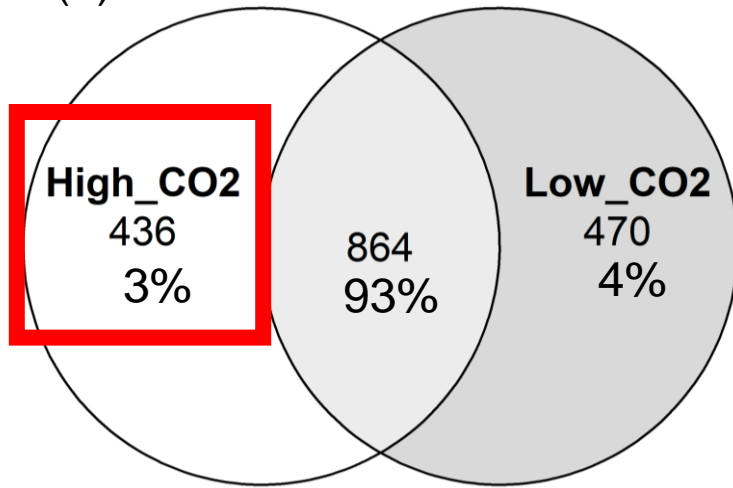
中期においては、*Proteobacteria* の増加が CO<sub>2</sub>排出の多さと関連している可能性がある (Ma et al. 2017).

- 分解のステージにも影響を受けるが、糞中の微生物組成が糞分解中の CO<sub>2</sub>排出量と関連があることが示唆された
- しかし、その変化量はそれほど大きくはなかった。

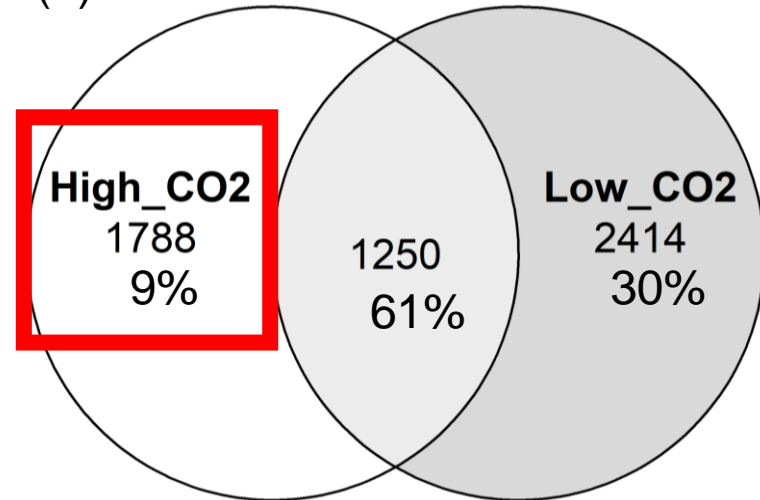


# ベン図: CO<sub>2</sub>排出量が多いサンプルにしか居ない糞中微生物?

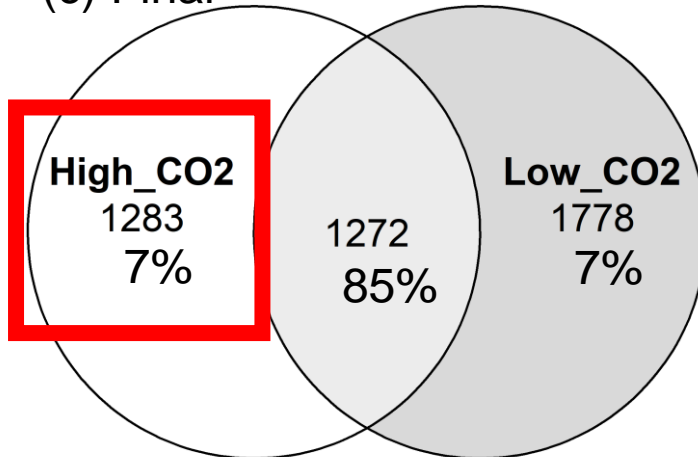
(a) Initial



(b) Middle



(c) Final



- *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Firmicutes* などがCO<sub>2</sub>排出量が多いサンプルにしか居ない微生物としてカウントされた。
- その割合は非常に少なかった。

## 結論とまとめ

- 糞分解時のCO<sub>2</sub>排出量は地域差もあるが、農場毎に極めて大きくばらついている。
- *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes* の糞中の存在比が糞が土壌上で分解する際のCO<sub>2</sub>排出量と関係がある
  - 存在比だけではなく、CO<sub>2</sub>排出が多いサンプルにしかいないものも(割合は少ないが)存在している。
- 土壌の炭素量や窒素量も糞分解時のCO<sub>2</sub>排出量と関連している
  - 土壌は微生物だけではなく理化学性も大切？

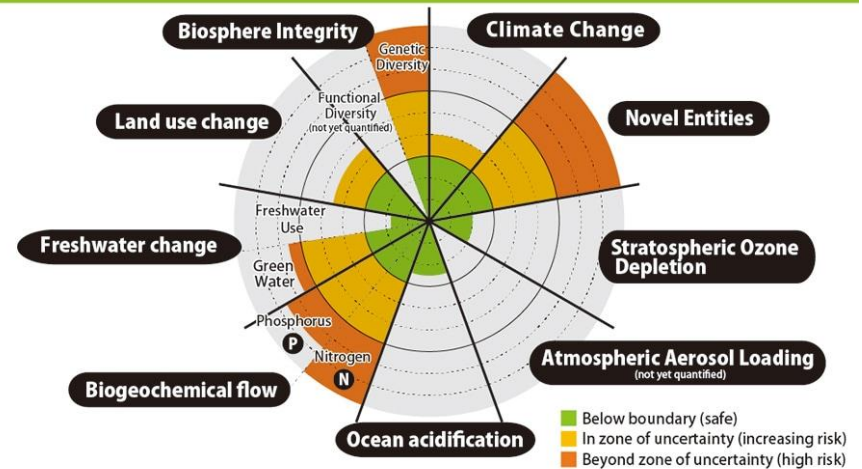
# 今日の話の流れ

- 微生物の多様性と機能とは？
  - なぜ多様性と機能を観る必要があるのか？
- 微生物の地域性を紐解く研究の紹介
  - 酪農場を循環する微生物の話
- 微生物の機能を考える実験の紹介
  - 微生物によるガス排出～理解が進んでいる部分

## まとめ

- 家畜糞分解は、環境面、栄養素循環の視点から重要
- 微生物の多様性、地域性、機能を観ていくことが大切
- 経営面とのつながりについてはさらなるサンプリングが必須

Current status of planetary boundaries



- JRA畜産振興事業

まだわかっていないことの多い研究にもかかわらず、採択していただいたことに深く御礼申し上げます。

- 協力農家さん

センシティブな課題（温室効果ガスなど）と関連していたが快く協力していただいたことに感謝します。