

明 細 書

発明の名称：

汚泥分解用細菌、微生物分解細菌、微生物製剤、汚泥分解方法及び汚泥分解装置

技術分野

[0001] 本発明は、汚泥分解用細菌、微生物分解細菌、微生物製剤、汚泥分解方法及び汚泥分解装置に関する。

背景技術

[0002] 活性汚泥法により污水浄化を行うと、有機物を分解して増殖した微生物を含んだ余剰汚泥と呼ばれる汚泥を発生させる。廃水処理設備から排出される余剰汚泥は産業廃棄物の中で40%以上もの割合を占めるため、産業廃棄物を減容化するには、この余剰汚泥の減容化が効果的と考えられている。一般的に余剰汚泥は、脱水、乾燥後、焼却処理される（非特許文献1：「平成27年度事業、産業廃棄物排出・処理状況調査報告書、平成25年度実績（概要版）」[online]、平成28年3月、環境省大臣官房廃棄物・リサイクル対策部、[平成30年8月31日検索]、インターネット<URL: <https://www.e-stat.go.jp/stat-search/file-download?statInfId=000031403476&fileKind=2>>; 非特許文献2：山本昌幸、「下水の燃焼技術について」、日本燃料学会誌、一般社団法人日本燃焼学会、2011、第53巻、164号、p91-96）。

[0003] しかしながら、余剰汚泥を焼却処理すると温室効果ガスが発生するため、必ずしも環境に与える影響の少ない処理方法ではなかった。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：「平成27年度事業、産業廃棄物排出・処理状況調査報告書、平成25年度実績（概要版）」[online]、平成28年3月、環境省大臣官房廃棄物・リサイクル対策部、[平成30年8月31日検索]、インターネッ

ト<URL: <https://www.e-stat.go.jp/stat-search/file-download?statInfId=000031403476&fileKind=2>>

非特許文献2：山本昌幸、「下水の燃焼技術について」、日本燃料学会誌、一般社団法人日本燃焼学会、2011、第53巻、164号、p91-96

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 近年、地球環境に対する意識が社会全体で高まってきており、環境に与える影響がより少ない余剰汚泥の減容化方法、即ち、余剰汚泥を構成する微生物の分解方法が求められていた。

[0006] 本発明は、汚泥分解用細菌、微生物分解細菌、微生物製剤、汚泥分解方法及び汚泥分解装置を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] すなわち、本発明は、以下に例示される[1]～[18]に関する。

[1] 配列番号1に記載の塩基配列と97%以上の同一性を有する塩基配列を含む16S rRNA遺伝子を有する、汚泥分解用細菌（以下、「本発明に係る汚泥分解用細菌」と記すことがある。）。

[2] 配列番号1に記載の塩基配列に対して、塩基の変異数が2塩基以下である16S rRNA遺伝子を有し、且つ、標的微生物分解能を有する細菌（以下、「本発明に係る細菌」と記すことがある。）。

[3] 標的微生物が標的細菌である、[2]に記載の細菌。

[4] 標的微生物が標的死細菌である、[2]又は[3]に記載の細菌。

[5] 配列番号1に記載の塩基配列を含む16S rRNA遺伝子を有する、[1]～[4]のいずれかに記載の細菌。

[6] 受託番号NITE BP-03020として寄託された細菌。

[7] 細菌(a1)を含む、汚泥分解用微生物製剤（以下、「本発明に係る微生物製剤」と記すことがある。）。

細菌(a1)：配列番号1に記載の塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含む16S rRNA遺伝子を有する細菌。

〔８〕細菌（ａ１）は、配列番号１に記載の塩基配列と９５％以上の同一性を有する塩基配列を含む１６Ｓ ｒＲＮＡ遺伝子を有する、〔７〕に記載の汚泥分解用微生物製剤。

〔９〕細菌（ａ１）は、配列番号１に記載の塩基配列と９７％以上の同一性を有する塩基配列を含む１６Ｓ ｒＲＮＡ遺伝子を有する、〔７〕に記載の汚泥分解用微生物製剤。

〔１０〕細菌（ａ１）は、配列番号１に記載の塩基配列を含む１６Ｓ ｒＲＮＡ遺伝子を有する、〔７〕に記載の汚泥分解用微生物製剤。

〔１１〕細菌（ａ１）は、標的微生物分解能を有する、〔７〕～〔１０〕のいずれかに記載の汚泥分解用微生物製剤。

〔１２〕温度２０℃で汚泥を分解する、〔７〕～〔１１〕のいずれかに記載の汚泥分解用微生物製剤。

〔１３〕細菌（ａ１）は、受託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－０３０２０として寄託された細菌である、〔７〕に記載の汚泥分解用微生物製剤。

〔１４〕微生物（ａ２）をさらに含み、細菌（ａ１）及び微生物（ａ２）の総数に対する細菌（ａ１）数は０．１％以上１００％未満である、〔７〕～〔１３〕のいずれかに記載の汚泥分解用微生物製剤。

微生物（ａ２）：細菌（ａ１）と異なる微生物。

〔１５〕微生物（ａ２）は、配列番号７に記載の塩基配列と９０％以上の同一性を有する塩基配列を含む１６Ｓ ｒＲＮＡ遺伝子を有し、且つ標的微生物分解能を有する細菌、標的微生物分解能を有するバチルス属細菌、及び標的微生物分解能を有するパエニバシラス属細菌からなる群より選ばれる少なくとも１種を含む、〔１４〕に記載の汚泥分解用微生物製剤。

〔１６〕細菌（ａ１）の培養物を含む、汚泥分解用微生物製剤。

細菌（ａ１）：配列番号１に記載の塩基配列と９０％以上の同一性を有する塩基配列を含む１６Ｓ ｒＲＮＡ遺伝子を有し、且つ、標的微生物分解能を有する細菌。

〔１７〕〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の細菌又は〔７〕～〔１６〕のい

ずれかに記載の汚泥分解用微生物製剤を汚泥に作用させる工程を含む、汚泥分解方法（以下、「本発明に係る分解方法」と記すことがある。）。

[18] [1]～[6]のいずれかに記載の細菌又は[7]～[16]のいずれかに記載の汚泥分解用微生物製剤を用いた、汚泥分解装置（以下、「本発明に係る分解装置」と記すことがある。）。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、汚泥分解用細菌、微生物分解細菌、微生物製剤、微生物の分解方法及び分解装置を提供可能となる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]実験3において、*Brevibacillus parabrevis*（以下、「*Bb. parabrevis*」と記載することがある。） NITE BP-03020の形態を示す写真である。

[図2]実験3において、*Bb. parabrevis* NITE BP-03020のグラム染色の結果を示す写真である。

[図3]実験4において、*Bb. parabrevis* NITE BP-03020の標的微生物分解能を示すグラフである。

[図4]実験4において、*Paenibacillus glycanilyticus*の標的微生物分解能を示すグラフである。

[図5]実験5において、複数株の*Bb. parabrevis*の培養物を含む微生物製剤の標的微生物分解能を示すグラフである。

[図6]実験6において、*Bb. parabrevis* NITE BP-03020の培養物を含む微生物製剤の標的微生物（*Micrococcus lysodeikticus*）分解能を示すグラフである。

[図7]実験6において、*Bb. parabrevis* NITE BP-03020の培養物を含む微生物製剤の標的微生物（*Saccharomyces cerevisiae*）分解能を示すグラフである。

[図8]実験6において、*Bb. parabrevis* NITE BP-03020の培養物を含む微生物製剤の標的微生物（*Escherichia*

c o l i) 分解能を示すグラフである。

[図9]実験6において、B b . p a r a b r e v i s N I T E B P - 0 3 0 2 0 の培養物を含む微生物製剤の標的微生物 (B r e v i b a c i l l u s p a r a b r e v i s) 分解能を示すグラフである。

[図10]実験6において、B b . p a r a b r e v i s N I T E B P - 0 3 0 2 0 の培養物を含む微生物製剤の標的微生物 (G l u c o n o b a c t e r o x y d a n s) 分解能を示すグラフである。

[図11]実験7において、B b . p a r a b r e v i s N I T E B P - 0 3 0 2 0 の培養物を含む微生物製剤の汚泥分解能を示すグラフである。

[図12]実験8において、様々な温度条件下におけるB b . p a r a b r e v i s N I T E B P - 0 3 0 2 0 の培養物を含む微生物製剤の標的微生物分解能を示すグラフである。

[図13]実験9において、B b . p a r a b r e v i s N I T E B P - 0 3 0 2 0 の培養物と他の細菌の培養物との混合物を含む微生物製剤の汚泥分解能を示すグラフである。

[図14]参考実験7において、T u m e b a c i l l u s s p . (N I T E B P - 0 2 7 7 9) 添加後の余剰汚泥の乾燥重量を示した図である。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明する。なお、本発明は、以下の実施形態に限定されるものではない。

[0011] (共通する用語の説明)

本明細書において、「微生物」とは肉眼では構造が判別できないような微小な生物であり、大型多細胞生物を除く生物である。「標的微生物」とは、本発明に係る細菌又は微生物製剤により分解される微生物である。標的微生物としては細菌、真菌等が挙げられ、中でも細菌が好ましく、余剰汚泥を構成する細菌がより好ましい。標的微生物は、生菌であっても死菌であってもよい。

[0012] 「標的細菌」とは、標的微生物となる細菌を指す。標的細菌は、生菌であ

ってもよく、死菌であってもよく、生菌及び死菌を含んでもよい。生菌とは生きている細菌、例えば代謝が行われている細菌を指す。死菌とは死んでいる細菌、例えば代謝が行われていない細菌を指す。生菌と死菌とは、例えば propidium iodide (PI) 等の色素を用いて判別することができる。「標的死細菌」とは、標的細菌のうち死んでいる細菌をいう。標的細菌は、分解効率の観点からは標的死細菌であることが好ましい。余剰汚泥中の微生物の約50%は死菌である。標的死細菌は、例えば標的細菌に対して加熱、高圧蒸気滅菌、紫外線照射、ホルマリン処理、酸処理などを行うことにより得ることもできる。また、標的死細菌は粉碎されたものでもよい。

[0013] 標的微生物として、例えばマイクロコッカス (*Micrococcus*) 属細菌、バチルス (*Bacillus*) 属細菌、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属細菌、パエニバチルス (*Paenibacillus*) 属細菌、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属細菌などのグラム陽性菌、エスケリキア (*Escherichia*) 属細菌、アセトバクター (*Acetobacter*) 属細菌、グルコノバクター (*Glucanobacter*) 属細菌などのグラム陰性菌、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 等の真菌類が挙げられる。

[0014] 本明細書において、「標的微生物分解能」とは、標的微生物を代謝して、標的微生物を構成する生体分子の一部又は全部を、異なる分子に変換する能力を指す。生体分子としては、例えば糖、タンパク質、核酸、脂質等が挙げられる。

[0015] (本発明に係る汚泥分解用細菌)

本発明に係る汚泥分解用細菌は、配列番号1に記載の塩基配列と97%以上の同一性を有する塩基配列を含む16S rRNA遺伝子を有する。配列番号1に記載の塩基配列と97%以上の同一性を有する塩基配列を含む16S rRNA遺伝子を有する細菌としては、ブレビバチルス (*Brevibacillus*) 属細菌が挙げられる。ブレビバチルス属細菌としては、ブ

レビバチルス パラブレビス (*Brevibacillus parabrevis*)、ブレビバチルス チョウシネンシス (*Brevibacillus choshinensis*)、ブレビバチルス フォーモサス (*Brevibacillus formosus*)、ブレビバチルス アグリ (*Brevibacillus agri*)、ブレビバチルス ニトリフィカンス (*Brevibacillus nitrificans*)、ブレビバチルス ブレビス (*Brevibacillus brevis*)、ブレビバチルス レウスゼリ (*Brevibacillus reuszeri*)、ブレビバチルス リムノフィルス (*Brevibacillus limnophilus*)、ブレビバチルス パナチフミ (*Brevibacillus panacihumi*)、ブレビバチルス ゲラティニ (*Brevibacillus gelatini*) が挙げられる。

[0016] 本発明に係る汚泥分解用細菌は、配列番号 1 に記載の塩基配列と比較し、同一性又は相同性が 97.5%以上、98%以上、98.5%以上、98.8%以上、99.0%以上、99.3%以上、99.5%以上、99.8%以上又は 99.9%以上である塩基配列を含む 16S rRNA 遺伝子を有していてもよい。汚泥分解用細菌は、配列番号 1 に記載の塩基配列を含む 16S rRNA 遺伝子を有する細菌であってもよく、その代表的な菌株としては、後述する *Brevibacillus parabrevis* (受託番号 NITE BP-03020) が挙げられる。本発明に係る汚泥分解用細菌は、本発明に係る細菌を含んでもよい。

[0017] 本発明に係る汚泥分解用細菌は、配列番号 1 に記載の塩基配列と比較し、1 塩基又は数塩基の置換、欠失又は付加が起こった塩基配列を含む 16S rRNA 遺伝子を有していてもよい。1 塩基又は数塩基とは、例えば 1～25 塩基であってもよく、1～10 塩基であってもよく、1～5 塩基であってもよい。上記の変異は、16S rRNA の発現及び機能が失われない変異である。

[0018] 本発明に係る汚泥分解用細菌は、配列番号 1 に記載の塩基配列に含まれる

、約15塩基以上、好ましくは約18～約500塩基、より好ましくは約18～約200塩基、さらに好ましくは約18～約50塩基の連続した配列又はその相補配列にストリンジेंटな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含む16S rRNA遺伝子を有していてもよい。ストリンジेंटな条件とは、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいい、例えば60℃、1×SSC、0.1% SDS、好ましくは68℃、0.1×SSC、0.1% SDS中で1回以上洗浄する条件等が挙げられる。

[0019] 本発明に係る汚泥分解用細菌は、汚泥分解能を有する。汚泥は、好ましくは余剰汚泥である。汚泥分解能は、反応条件（汚泥及び汚泥に含まれる標的微生物の種類及び濃度、汚泥分解用細菌を含む溶液の組成、温度、pH、細菌数等）によって変化し得る。汚泥分解能を有するかどうかを調べる方法としては、例えば汚泥と汚泥分解能を調べたい細菌とを適切な培地又は緩衝液中で一定時間反応させた後、培地又は緩衝液中における汚泥の分解を調べる方法が挙げられる。分解を調べる方法としては、特に限定されないが、例えば汚泥の濁度を測定する方法、SLP試薬により汚泥に含まれる標的微生物を検出する方法、PCRにより汚泥に含まれる標的微生物のDNAを検出する方法、汚泥の乾燥重量を測定する方法、汚泥に含まれる標的微生物の乾燥重量を測定する方法、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）；質量分析法（MS）；薄層クロマトグラフィー（TLC）；核磁気共鳴（NMR）；ガスクロマトグラフィー（GC）等を用いて汚泥に含まれる標的微生物由来の分解物を検出する方法が挙げられる。

[0020] 濁度により汚泥分解能を調べる場合、汚泥分解能を有するとは、汚泥に汚泥分解用細菌を添加してから所定時間経過後の濁度が添加前の濁度よりも有意に低下していることをいう。添加後の濁度は、例えば添加前の濁度の80%以下であり、好ましくは50%以下であり、より好ましくは30%以下である。乾燥重量により汚泥分解能を調べる場合、汚泥分解能を有するとは、例えば添加後の乾燥汚泥重量が添加前の乾燥汚泥重量よりも有意に低下しており、例えば添加後の乾燥汚泥重量は、添加前の95%以下であり、好まし

くは90%以下である。一般に、細菌が標的微生物分解能を有するとき、汚泥分解能を有する。

[0021] (本発明に係る細菌)

本発明に係る細菌は、配列番号1に記載の塩基配列に対して、塩基の変異数が2塩基以下である16S rRNA遺伝子を有し、且つ、標的微生物分解能を有する。本明細書において、16S rRNA遺伝子は、細菌が本来有している内在性の16S rRNA遺伝子であることが好ましい。人工的に変異が誘発された16S rRNAであってもよい。配列番号1に記載の塩基配列に対して、塩基の変異数が2塩基以下である16S rRNA遺伝子を有する細菌として、ブレビバチルス (*Brevibacillus*) 属細菌が挙げられ、ブレビバチルス パラブレビス (*Brevibacillus parabrevis*) が挙げられる。本発明に係る細菌は、本発明に係る汚泥分解用細菌を含んでもよい。

[0022] 本発明に係る細菌の一実施形態としては、配列番号1に記載の塩基配列を含む16S rRNA遺伝子を有し、且つ、標的微生物分解能を有する細菌が挙げられる。

[0023] 配列番号1に記載の塩基配列を含む16S rRNA遺伝子を有する細菌の代表的な菌株としては、*Brevibacillus parabrevis* (受託番号NITE BP-03020、原寄託日:2019年9月17日)として、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター(NPMD、住所:〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室)にブダペスト条約に基づいて寄託されている菌株を挙げることができる。該菌株の菌学的性質については後述する。

[0024] 本発明に係る細菌は、配列番号1に記載の塩基配列と比較し、同一性又は相同性が98.5%以上、98.8%以上、99.0%以上、99.3%以上、99.5%以上、99.8%以上、99.9%以上である塩基配列を含む16S rRNA遺伝子を有していてもよく、配列番号1に記載の塩基配列を含む16S rRNA遺伝子を有していてもよい。

- [0025] 配列番号 1 に記載の塩基配列に対して、塩基の変異数が 2 塩基以下である細菌は、配列番号 1 に記載の塩基配列と比較し、1 塩基又は 2 塩基の置換、欠失又は付加が起こった塩基配列を含む 16S rRNA 遺伝子を有していてもよい。上記の変異は、16S rRNA の発現及び機能が失われない変異である。
- [0026] 本発明に係る細菌は、配列番号 1 に記載の塩基配列に含まれる、約 15 塩基以上、好ましくは約 18 ～約 500 塩基、より好ましくは約 18 ～約 200 塩基、さらに好ましくは約 18 ～約 50 塩基の連続した配列又はその相補配列にストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含む 16S rRNA 遺伝子を有していてもよい。ストリンジントな条件とは、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいい、例えば 60℃、1×SSC、0.1% SDS、好ましくは 68℃、0.1×SSC、0.1% SDS 中で 1 回以上洗浄する条件等が挙げられる。
- [0027] 本発明に係る細菌の標的微生物分解能は、反応条件（標的微生物の種類及び濃度、細菌を含む溶液の組成、温度、pH、細菌数等）によって変化し得る。標的微生物は、例えば標的細菌であり、好ましくは標的死細菌である。
- [0028] 例えば、本発明に係る細菌の代表的菌株 *B. parabrevis* NITE BP-03020 とマイクロコッカス属細菌死菌とをそれぞれ濁度（OD₆₆₀）0.2 に調製し、体積比 1：100 で混合後、20～35℃の温度条件下で 6.5～8.0 の pH 条件下で反応させることにより、1 週間後の濁度を 50% 程度低下させ、マイクロコッカス属細菌を分解することができる。
- [0029] 本発明に係る細菌は、対象微生物（本発明に係る細菌であるかを調べたい微生物）の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析、及び標的微生物の分解能の測定により、特定することができる。具体的には、対象微生物が、配列番号 1 に記載の塩基配列に対して、塩基の変異数が 2 塩基以下である 16S rRNA 遺伝子を有し、且つ、標的微生物分解能を有していれば、その微生物は本発明に係る細菌であると特定できる。

- [0030] 16S rRNA遺伝子の塩基配列の解析は、例えば以下の方法で行うことができる。まず、公知の方法を用いて、対象微生物からゲノムDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子を増幅させる。16S rRNA遺伝子を増幅させる方法としては、特に制限されるものではなく、当業者が通常用いるユニバーサルプライマーを用いたPCR法等が挙げられる。PCR法により得られた増幅産物を、必要に応じて精製し、DNAシーケンサー等に供して、塩基配列を決定することができる。得られた塩基配列と配列番号1に記載の配列との比較を行う。
- [0031] 標的微生物分解能を有するかどうかを調べる方法としては、例えば、対象微生物と標的微生物とを適切な培地又は緩衝液中で一定時間反応させた後、培地又は緩衝液中における標的微生物の分解を調べる方法が挙げられる。分解を調べる方法は、特に限定されないが、例えば標的微生物を含む溶液の濁度を測定する方法、SLP試薬により標的微生物を検出する方法、PCRにより標的微生物のDNAを検出する方法、標的微生物の乾燥菌体重量を測定する方法、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）；質量分析法（MS）；薄層クロマトグラフィー（TLC）；核磁気共鳴（NMR）；ガスクロマトグラフィー（GC）等を用いて標的微生物由来の分解物を検出する方法が挙げられる。
- [0032] 濁度により標的微生物の分解を調べる場合、標的微生物分解能を有するとは、標的微生物を含む溶液に本発明に係る細菌を添加してから所定時間経過後の濁度が添加前の濁度よりも有意に低下することをいう。添加後の濁度は、例えば添加前の濁度の80%以下であり、好ましくは50%以下であり、より好ましくは30%以下である。乾燥菌体重量により標的微生物の分解を調べる場合、標的微生物分解能を有するとは、例えば添加後の乾燥菌体重量が添加前の乾燥菌体重量よりも有意に低下しており、例えば添加後の乾燥菌体重量は、添加前の95%以下であり、好ましくは90%以下である。一般に、細菌が汚泥分解能を有するとき、標的微生物分解能を有する。
- [0033] これらの塩基配列解析及び標的微生物分解能の測定の結果に基づき、対象

微生物が本発明に係る細菌であるかを判断できる。

[0034] (本発明に係る微生物製剤)

本発明に係る微生物製剤の一実施形態は、以下の細菌 (a 1) を含む。

<細菌 (a 1)>

細菌 (a 1) は、配列番号 1 に記載の塩基配列と比較し、90%以上の同一性を有する塩基配列を含む 16S rRNA 遺伝子を有する。

[0035] 細菌 (a 1) は、配列番号 1 に記載の塩基配列と比較し、同一性又は相同性が 93%以上、95%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.5%以上、99.9%以上の塩基配列を含む 16S rRNA 遺伝子を有していてもよく、配列番号 1 に記載の塩基配列を含む 16S rRNA 遺伝子を有していてもよい。細菌 (a 1) として、ブレビバチルス (*Brevibacillus*) 属細菌が挙げられ、ブレビバチルス パラブレビス (*Brevibacillus parabrevis*) であってもよい。細菌 (a 1) は、受託番号 NITE BP-03020 として寄託された細菌であってもよい。

[0036] また、細菌 (a 1) は、配列番号 1 に記載の塩基配列と比較し、1 塩基又は数塩基の置換、欠失又は付加が起こった塩基配列を含む 16S rRNA 遺伝子を有していてもよい。1 塩基又は数塩基とは、例えば 1~135 塩基であってもよく、1~100 塩基であってもよく、1~50 塩基であってもよく、1~25 塩基であってもよく、1~5 塩基であってもよい。上記の変異は、16S rRNA の発現及び機能が失われない変異である。

[0037] 細菌 (a 1) は、配列番号 1 に記載の塩基配列に含まれる、約 15 塩基以上、好ましくは約 18~約 500 塩基、より好ましくは約 18~約 200 塩基、さらに好ましくは約 18~約 50 塩基の連続した配列又はその相補配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含む 16S rRNA 遺伝子を有していてもよい。

[0038] 細菌 (a 1) の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析は、上述の本発明に係る細菌と同様にして行うことができる。

[0039] 細菌（a1）は、標的微生物分解能を有することが好ましい。細菌（a1）の標的微生物分解能は、上述の本発明に係る細菌と同様にして評価することができる。

[0040] 標的微生物分解能が良好であることから、細菌（a1）としては、*Brevibacillus parabrevis*、本発明に係る汚泥分解用細菌、本発明に係る細菌、及び以下A群の細菌より選ばれる少なくとも1種の細菌を含むことが好ましい。細菌（a1）は、単一の細菌であってもよいし、複数種の細菌であってもよい。

A群：ブレビバチルス インボカツス（*Brevibacillus invocatus*）、ブレビバチルス セントロスポルス（*Brevibacillus centroporus*）、ブレビバチルス ボルステレンシス（*Brevibacillus borstelensis*）、ブレビバチルス レヴィクキ（*Brevibacillus levickii*）、ブレビバチルス マスシリエンシス（*Brevibacillus massiliensis*）、ブレビバチルス ジンセンジソリ（*Brevibacillus ginsengisoli*）、ブレビバチルス ラテロスポラス（*Brevibacillus laterosporus*）、ブレビバチルス フルバス（*Brevibacillus fulvus*）、ブレビバチルス フルミニス（*Brevibacillus fluminis*）、ブレビバチルス セディミニス（*Brevibacillus sediminis*）、ブレビバチルス サーモルバー（*Brevibacillus thermoruber*）、ブレビバチルス アイディノグルエンシス（*Brevibacillus aydinogluensis*）。

[0041] 本発明に係る微生物製剤は、汚泥分解能を有する。汚泥分解能は、上述の本発明に係る汚泥分解用細菌の欄に記載の方法で評価することができる。微生物製剤の汚泥分解能は、微生物製剤に含まれる細菌（a1）もしくは微生物（a2）又はこれらの培養物に由来することが好ましい。微生物製剤は、

温度 37℃以下、温度 30℃、温度 25℃又は温度 20℃で汚泥分解を分解することができ、温度 20℃～40℃の範囲で汚泥分解可能であってもよい。例えば、本発明に係る微生物製剤を標的微生物を含む溶液に添加してから 5 日目の溶液の濁度は、温度 25℃においては温度 30℃の溶液の濁度の 2 倍以下であり、温度 20℃においては温度 30℃の溶液の濁度の 3 倍以下であり、好ましくは 2.5 倍以下である。

[0042] 微生物製剤は、細菌 (a1) の他に、細菌 (a1) の培養物、微生物 (a2)、添加剤 (b)、担体 (c) 等を含むことができる。微生物製剤の具体例としては、細菌 (a1)、微生物 (a2)、添加剤 (b) 及び担体 (c) を含む微生物製剤を挙げることができる。

[0043] <細菌 (a1) の培養物>

本発明に係る微生物製剤の一実施形態は、細菌 (a1) の培養物を含む。細菌 (a1) の培養物は、例えば細菌 (a1) の分泌物、代謝物、細菌 (a1) から産生されるタンパク質、糖、酵素及びこれらが懸濁した液体培地が含まれる。具体的には、培養物は、制御された条件下で所定の液体培地中、又は炭素源及び窒素源を含む液体培地中で増殖させた細菌 (a1) の培養物が含まれる。細菌 (a1) の培養物を含む標的微生物分解用製剤には、細菌 (a1) の生菌が含まれていてもよい。細菌 (a1) の培養物は、細菌 (a1) を培養した上清であってもよい。培養上清は、例えば細菌 (a1) を培養した液体培地から遠心分離、濾過操作等で細菌 (a1) を除いて得ることができる。また、培養物は、細菌 (a1) の断片を含んでいてもよい。細菌 (a1) の断片は、例えば細菌 (a1) を超音波破碎、ビーズ摩擦、化学的溶解処理により得ることもできる。細菌 (a1) の培養物は、好ましくは標的微生物分解能を有する。

[0044] <微生物 (a2)>

微生物 (a2) は、細菌 (a1) と異なる微生物である。微生物 (a2) は、微生物製剤の汚泥分解能を失わせるような微生物でなければ特に制限されるものではない。微生物 (a2) は、単一の微生物であってもよいし、複

数種の微生物であってもよい。微生物（a 2）は、細菌（a 1）の増殖能又は安定性を向上させる細菌であってもよいし、細菌（a 1）の培養物の安定性を向上させる細菌であってもよい。

[0045] 微生物（a 2）は、微生物の16S rRNA遺伝子の塩基配列の解析、生理生化学性状試験等により、特定することができる。微生物（a 2）は、標的微生物分解能を有していてもよいし、有していなくてもよい。対象微生物の16S rRNA遺伝子の塩基配列の解析、及び標的微生物分解能の測定は、上述の本発明に係る細菌と同様にして行うことができる。

[0046] 微生物（a 2）としては、グラム陰性菌又はグラム陽性菌であってもよく、例えばチューメバチルス（*Tumebacillus*）属細菌、パエニバチルス属細菌、バチルス属細菌、アセトバクター属細菌、グルコノバクター属細菌、ラクトバチルス属細菌、ゴルドニア（*Gordonia*）属細菌、ミクロバクテリウム（*Microbacterium*）属細菌、ロドコッカス（*Rhodococcus*）属細菌、スフィンゴモナス（*Sphingomonas*）属細菌、エスケリキア属細菌、出芽酵母が挙げられる。

[0047] 微生物（a 2）は、標的微生物分解能を有する細菌を含むことが好ましく、例えば配列番号7に記載の塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含む16S rRNA遺伝子を有し、且つ標的微生物分解能を有する細菌（以下、「細菌（a 21）」と記載することがある。）、標的微生物分解能を有するバチルス属細菌、及び標的微生物分解能を有するパエニバチルス属細菌からなる群より選ばれる少なくとも1種を含むことが好ましい。

[0048] 配列番号7に記載の塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含む16S rRNA遺伝子を有し、且つ標的微生物分解能を有する細菌としては、チューメバチルス（*Tumebacillus*）属細菌が挙げられる。細菌（a 21）は、配列番号7に記載の塩基配列と比較し、同一性又は相同性が93%以上、95%以上、98%以上、99%以上、99.5%以上、99.9%以上の塩基配列を含む16S rRNA遺伝子を有していてもよく、配列番号7に記載の塩基配列を含む16S rRNA遺伝子を有してい

てもよい。細菌（a21）は、*Tumebacillus* sp.（受託番号NITE BP-02779、原寄託日：2018年9月11日）として、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（NPMD、住所：〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）にブダペスト条約に基づいて寄託されている菌であってもよい。該菌株の菌学的性質については、後述する表6～表9に示す。

[0049] 細菌（a21）は、例えばチューメバチルス アルギファエシス（*Tumebacillus algifaecis*）、チューメバチルス アビウム（*Tumebacillus avium*）、チューメバチルス フラゲラテス（*Tumebacillus flagellates*）、チューメバチルス ギンセンギソリ（*Tumebacillus ginsengisoli*）、チューメバチルス リポリティカス（*Tumebacillus lipolyticus*）、チューメバチルス ルテオラス（*Tumebacillus luteolus*）、チューメバチルス パーマメンティフリゴリス（*Tumebacillus permanentifrigoris*）、チューメバチルス ソリ（*Tumebacillus soli*）であってもよい。

[0050] 標的微生物分解能を有するバチルス属細菌としては、例えばバチルス サブチリス（*Bacillus subtilis*）、バチルス アミロリケファシエンス（*Bacillus amyloliquefaciens*）、バチルス スファエリカス（*Bacillus sphaericus*）、バチルス リケニフォルミス（*Bacillus licheniformis*）が挙げられる。

[0051] 標的微生物分解能を有するパエニバチルス属細菌としては、例えばパエニバチルス ポリミキサ（*Paenibacillus polymyxa*）が挙げられる。

[0052] 標的微生物分解能の観点から、細菌（a1）及び微生物（a2）の総数に対する細菌（a1）数は、0.1%以上であってもよく、1%以上であって

もよく、１０％以上であってもよく、５０％以上であってもよく、７５％以上であってもよく、９０％以上であってもよく、９５％以上であってもよく、１００％以下であってもよく、１００％未満であってもよい。

[0053] 細菌（a 1）及び微生物（a 2）の総数に対する細菌（a 1）数とは、微生物製剤に含まれる全細菌に対する細菌（a 1）の割合であることが好ましい。細菌（a 1）及び微生物（a 2）の総数に対する細菌（a 1）数を算出する方法としては、クローンライブラリー法、次世代シーケンサー解析、定量PCRにより算出する方法等が挙げられる。

[0054] クローンライブラリー法及び次世代シーケンサー解析により細菌の存在割合を算出する方法として、具体的には、微生物製剤に含まれる細菌（a 1）及び微生物（a 2）からゲノムDNAを抽出して16S rRNA遺伝子の塩基配列を複数取得し（以下、取得した複数の塩基配列数をリード数と記す。）、取得した塩基配列が細菌（a 1）又は微生物（a 2）のいずれに由来する塩基配列であるかをそれぞれ決定する。次に、リード数に対する細菌（a 1）に由来する塩基配列数を算出し、細菌（a 1）及び微生物（a 2）の総数に対する細菌（a 1）数とすることができる。

[0055] 次世代シーケンサー解析で用いる次世代シーケンサーとしては、DNA断片をテンプレートとし、1塩基ずつ再合成する時の蛍光強度を検出し、塩基配列を決定できれば特に制限されるものではない。次世代シーケンサーとしては、例えば、MiSeq、HiSeq 2500（イルミナ社製）、5500xI SOLiDTM、Ion ProtonTM、Ion PGMTM（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）、GS FLX+（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社製）等が挙げられる。

[0056] 定量PCRにより細菌の存在割合を算出する方法として、具体的には、微生物製剤に含まれる細菌（a 1）の16S rRNA遺伝子コピー数と、細菌（a 1）及び微生物（a 2）の16S rRNA遺伝子コピー数をそれぞれ算出する。次に細菌（a 1）及び微生物（a 2）の16S rRNA遺伝子コピー数に対する細菌（a 1）の16S rRNA遺伝子コピー数を算出

し、細菌（a1）及び微生物（a2）の総数に対する細菌（a1）数とすることができる。

[0057] 定量PCRで用いるリアルタイムPCR装置としては、DNAをPCRにより増幅することができるサーマルサイクラーと、増幅産物を検出するための分光蛍光光度計と、を備えていれば、特に制限されるものではない。リアルタイムPCR装置としては、例えば、StepOnePlus（Applied Biosystems社製）、Thermal Cycler Dice Real Time System（タカラバイオ株式会社製）、LightCycler 96 System（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社製）等が挙げられる。

[0058] 定量PCRに用いるマスターミックスとしてはFast SYBR Green Master Mix、Power SYBR Green Master Mix、SYBR Select Master Mix、PowerUp SYBR Green Master Mix（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）等が挙げられる。

[0059] <添加剤（b）>

添加剤（b）としては、例えば、界面活性剤、分散剤、補助剤、保護剤等が挙げられる。添加剤（b）の種類及び濃度は、細菌（a1）が死滅しない、又は当該細菌が有する標的微生物分解能が失われない条件で適宜決定することができる。

[0060] <担体（c）>

担体（c）としては、例えば、無機微粒子担体が挙げられる。無機微粒子担体としては、金属及びその無機塩類又は酸化物であってもよく、炭素を含有するものであっても化学的に無機物に分類されるものであってもよい。また、有機態炭素の含有量が1%程度未満の純物質又は混合物であってもよい。

[0061] 無機微粒子担体の中心粒子径は、好ましくは $1\mu\text{m}\sim 100\mu\text{m}$ であり、より好ましくは $4\mu\text{m}\sim 75\mu\text{m}$ であり、さらに好ましくは $13\mu\text{m}\sim 25$

μm である。中心粒子径がこのような範囲にある場合、細菌（a 1）が無機微粒子担体に担持されやすくなる傾向にある。ここで、中心粒子径とは、レーザー回折・光散乱法に基づく体積基準の粒度分布におけるメジアン径（D50）を指す。無機微粒子担体の比重は、特に制限されないが、1.2～3.5であることが好ましい。

[0062] 無機微粒子担体は、培養初期の歩留まりを向上させることを目的として、必要に応じて、各種凝集剤を用いて凝集させてもよい。凝集剤としては、例えば、ノニオン性、カチオン性、アニオン性の高分子凝集剤等が挙げられる。

[0063] 微生物製剤の製造方法としては、例えば、細菌（a 1）と無機微粒子担体とを混合し、無機微粒子担体上に細菌（a 1）を担持させ、これを培養して得られる微生物製剤を回収する方法が挙げられる。

[0064] 培養方法としては、回分、半回分、流加、連続のいずれの方式を用いてもよい。培養方法としては、例えば、増殖が遅く菌体収率の低い微生物を効率的に調製するという観点から、特開平9-187272号公報に記載されるように、微生物を培養する容器（以下、反応槽という）へ供給する対象化合物の濃度を培養時間の経過に伴い、対数増加させる連続培養方式を用いてもよい。

[0065] 本発明において、微生物の製剤化手段は、細菌（a 1）の標的微生物分解能が失われない限り特に限定されず、公知の製剤化手段を利用することができる。微生物製剤の形態としては、液体又は固体（カプセル封入体、寒天状、粉末状等を含む）であってもよく、それらの凍結体、凍結乾燥体等であってもよい。微生物製剤が液体である場合は、培地、緩衝液、生理的食塩水等に懸濁された菌懸濁液としてもよい。液体は、酸性又は中性であってもよい。微生物製剤が固体又は凍結乾燥体である場合は、例えば培養された細菌を濃縮した後、適当な乾燥又は凍結乾燥を行い、固体又は凍結乾燥体としてもよい。その際、賦形剤などを添加してもよい。

[0066] （汚泥分解方法）

本発明に係る分解方法は、本発明に係る汚泥分解用細菌、本発明に係る細菌又は本発明に係る微生物製剤を汚泥に作用させる工程を含む。本発明に係る汚泥分解用細菌、本発明に係る細菌及び本発明に係る微生物製剤が有する標的微生物分解能は、標的微生物を含む余剰汚泥の処理に有用であり、本発明に係る分解方法により、余剰汚泥を減容化することができる。

[0067] 本発明に係る汚泥分解用細菌、本発明に係る細菌又は本発明に係る微生物製剤を汚泥に作用させるとは、例えば本発明に係る汚泥分解用細菌、本発明に係る細菌もしくは本発明に係る微生物製剤又はこれらを懸濁した溶液と、汚泥とを接触させることをいう。本発明に係る汚泥分解用細菌、本発明に係る細菌又は本発明に係る微生物製剤が汚泥に含まれる標的微生物を分解することで、汚泥が分解される。

[0068] 本発明に係る汚泥分解用細菌、本発明に係る細菌又は本発明に係る微生物製剤を汚泥に作用させる工程は、本発明に係る汚泥分解用細菌、本発明に係る細菌又は細菌（a 1）が死滅しない、又は当該細菌が有する標的微生物分解能が失われない条件であれば、特に制限されるものではない。当該工程は、例えば、温度が20～40℃の条件下であってもよく、25～30℃の条件下であってもよい。また、pHは6.5～8.0の条件下であってもよく、7.0～7.5の条件下であってもよい。

[0069] 汚泥に対する本発明に係る汚泥分解用細菌、本発明に係る細菌又は本発明に係る微生物製剤の添加量は、標的微生物の種類及び濃度、反応系の容積等を考慮し、適宜設定することができる。

[0070] 本発明に係る分解方法において、汚泥が分解されていることの確認方法は、特に制限されるものではなく、当業者が通常用いることができる方法により行われる。このような確認方法としては、例えば、上述の汚泥分解能の評価方法又は標的微生物分解能の評価方法が挙げられる。

[0071] （汚泥分解装置）

汚泥分解装置としては、本発明に係る汚泥分解用細菌、本発明に係る細菌又は本発明に係る微生物製剤を用いて余剰汚泥を削減できる装置であれば特

に限定されないが、例えば余剰汚泥が発生する汚泥処理装置、排水処理装置等が挙げられる。また、例えば余剰汚泥が存在する既存の汚泥処理装置、排水処理装置等に本発明に係る汚泥分解用細菌、本発明に係る細菌又は本発明に係る微生物製剤を添加して、汚泥分解装置とすることもできる。

- [0072] 従来、余剰汚泥を分解するために、オゾン、アルカリ、次亜塩素酸等の化学的処理、ビーズミル、超音波破碎等の物理的処理、高温条件下又はアルカリ条件下で働く微生物を用いた生物学的処理等が行われていたが、これらの処理を行うためには、余剰汚泥を別のタンクに移す必要があり、設備コスト及びランニングコストが多くかかっていた。本発明に係る汚泥分解用細菌、本発明に係る細菌及び本発明に係る微生物製剤は、余剰汚泥中に直接投入することができるため、新たな設備を整えるコストを抑えることができるとともに、従来行われている汚泥分解方法を変更する必要もない。

実施例

- [0073] [実験 1. 標的微生物分解能を有する微生物の探索]

(方法)

環境（水）中に存在する微生物群から数菌株を単離した。

- [0074] (結果)

単離した菌株ごとにミクロコッカス属細菌分解能を調べたところ、1つの菌株にミクロコッカス属細菌分解能が認められた。以下、ミクロコッカス属細菌分解能が認められた菌株を「菌株 A」と記す。

- [0075] [実験 2. ミクロコッカス属細菌分解能を有する菌株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析]

(材料)

・ 802 培地：10g ポリペプトン、2g 酵母エキス、1g 硫酸マグネシウム七水和物を超純水に溶解し、pH を 7.0 に調節した後、1000 mL に調製し、高圧蒸気滅菌した培地

・ クローニング用フォワードプライマー（27f：配列番号 2）

・ クローニング用リバースプライマー（1492r：配列番号 3）

・シーケンス解析用プライマー（339F：配列番号4、536R：配列番号5、907F：配列番号6）

[0076] （方法）

菌株Aからイージー・エクストラクト for DNA（エーエムアール株式会社製）を用いてDNAを抽出し、PCRにより16S rRNA遺伝子を増幅させるための鋳型DNAとして用いた。

[0077] PCRは以下の条件で行った。25.0 μ Lの2×PCR buffer for KOD FX（東洋紡株式会社製）、10.0 μ LのdNTP mix（2 mM）、1.5 μ Lのクローニング用フォワードプライマー及びクローニング用リバースプライマー（それぞれ10 pmol/ μ L）、0.58 μ Lの鋳型DNA、10.4 μ Lの滅菌水、1.0 μ LのDNAポリメラーゼ（KOD FX、1 U/ μ L、東洋紡株式会社製）を、マイクロチューブに加え、混合した。マイクロチューブをPCR装置に供し、鋳型DNAの増幅反応を行った。反応は、（1）94℃、2分間、（2）98℃、10秒間、（3）50℃、30秒間、（4）68℃、1.5分間で行い、（2）～（4）の工程は35サイクル繰り返し行った。PCR後の増幅産物を精製した。

[0078] 精製したPCR後の増幅産物150 ng相当量と、シーケンス解析用プライマー（10 μ M）0.32 μ Lと、BigDye Terminator v3.1（Applied Biosystems社製）8.0 μ Lとを混合し、これに滅菌超純水を加えて液量を20.0 μ Lとした反応液を調製した。この反応液をPCR装置に供し、増幅反応を行った。反応は、（1）96℃、1分間、（2）96℃、10秒間、（3）50℃、5秒間、（4）60℃、4分間で行い、（2）～（4）の工程は25サイクル繰り返し行った。得られた反応液を精製し、精製液をDNAシーケンス解析（3730 xl DNA Analyzer）に供して、菌株Aから抽出した鋳型DNAの16S rRNA遺伝子の塩基配列を決定した。

[0079] （結果）

得られた塩基配列を国際塩基配列データベース（DDBJ／ENA（EMBL）／GenBank）に対してホモロジー解析を行った。基準株の中では、*Brevibacillus parabrevis* IFO12334の16S rRNA遺伝子の塩基配列に対し、99.8%の同一性を示した。しかし、得られた塩基配列と完全に一致する16S rRNA遺伝子を有する微生物は存在しなかった。

[0080] このときの16S rRNA遺伝子の塩基配列を配列番号1に示す。以上より、配列番号1に記載の塩基配列を有する16S rRNA遺伝子を有する細菌は、標的微生物分解能を有することが示唆された。

[0081] [実験3. 配列番号1に記載の塩基配列を含む16S rRNA遺伝子を有する*Bb. parabrevis*の形態観察及び生理・生化学的性状試験]

（方法）

菌株Aについて、形態観察及び生理・生化学的性状試験を行った。これらの試験は、光学顕微鏡による形態観察、BARROWらの方法（Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria 3rd Edition 1993、Cambridge University Press.）及びAPI50CHB（bioMérieux社製、Lyon、France）によって行った。試験結果を表1～表3に示す。

[0082] （結果）

図1に示すように、菌株Aのコロニーは、円形でクリーム状の形態を有していた。また、図2に示すように、菌株Aは桿菌であり、グラム染色に陰性であった。菌株Aは、表4に示す点で、16S rRNA遺伝子の相同性が最も高い*Bb. parabrevis* IFO12334と異なる特徴を有していた。そのため、菌株Aは、従来の*Bb. parabrevis*とは異なる、新種の株であることが示唆された。菌株Aを*Brevibacillus parabrevis* NITE BP-03020として寄託した

。

[0083] [表1]

培養温度(° C)	30	
細胞形態	桿菌 ($1.0 \times 2.0\text{--}3.0 \mu\text{m}$)	
グラム染色性	－	
芽胞の有無	＋(膨張あり)	
運動性	＋	
コロニー形態	培地: Nutrient Ager	
	培養時間: 24 hr	
	直径: 1 mm	
	色調: クリーム色	
	形: 円形	
	隆起状態: レンズ状	
	周縁: 全縁	
	表面の形状など: スムーズ	
生育温度試験 (° C)	37	＋
	45	＋
カタラーゼ反応	＋	
オキシダーゼ反応	＋	
グルコースからの酸/ガス産生 (酸産生/ガス産生)	－/－	
O/Fテスト(酸化/発酵)	－/－	

＋: 陽性、－: 陰性

[0084]

[表2]

基質成分	試験結果	基質成分	試験結果	基質成分	試験結果
コントロール	-	α-メチル-D-グルコシド*	-	D-タトース*	-
グリセロール*	-	N-アセチルグルコサミン*	-	D-フコース*	-
エリスリトール*	-	アミグダリン*	-	L-フコース*	-
D-アラビノース*	-	アルブチン*	-	D-アラビトール*	-
L-アラビノース*	-	エスクリン*	+	L-アラビトール*	-
リボース*	-	サリシン*	-	グルコネート*	-
D-キシロース*	-	セロビオース*	-	2-ケトグルコネート*	-
L-キシロース*	-	マルトース*	-	5-ケトグルコネート*	-
アドニトール*	-	ラクトース*	-	b-ガラクトシダーゼ**	-
b-メチル-D-キシロース*	-	メリビオース*	-	アルギニンジヒドロラーゼ**	-
ガラクトース*	-	サッカロース*	-	リシンデカルボキシラーゼ**	-
グルコース*	-	トレハロース*	-	オルニチンデカルボキシラーゼ**	-
フラクトース*	-	イヌリン*	-	クエン酸の利用性**	+
マンノース*	-	メレチトース*	-	H ₂ S 産生**	-
ソルボース*	-	ラフィノース*	-	ウレアーゼ**	-
ラムノース*	-	でんぶん*	-	トリプトファンデアミナーゼ**	-
ズルシトール*	-	グリコーゲン*	-	インドール産生**	-
イノシトール*	-	キシリトール*	-	アセトイン産生(VP) **	-
マンニトール*	-	ゲンチオビオース*	-	ゼラチナーゼ**	+
ソルビトール*	-	D-ツラノース*	-	硝酸塩還元**	-
α-メチル-D-マンノシド*	-	D-リキソース*	-		

*発酵性試験, **生化学試験

+:陽性、-:陰性

[0085] [表3]

試験項目	試験結果
生育	
50 °C	+
55 °C	-
20 °C	+
嫌気	-
加水分解	
カゼイン	+
Tween80(リパーゼ活性)	+
でんぶん	-
資化	
グルコース	+
トレハロース	+
グリセロール	+
マンニトール	+
マルトース	+

[0086]

[表4]

基質成分	ブレビバチルス パラブレビス I F O 1 2 3 3 4	菌株 A
グルコース	酸化	酸化しない
マンニトール	酸化	酸化しない
エスクリン	陰性	陽性
クエン酸利用	陰性	陽性
ゼラチナーゼ	陰性	陽性
硝酸塩還元	還元	還元しない

[0087] [実験4. *B. parabrevis* NITE BP-03020の
標的微生物分解能評価]

[0088] (材料)

・ 802培地：10g ポリペプトン、2g 酵母エキス、1g 硫酸マグネシウム七水和物を超純水に溶解し、pHを7.0に調節した後、1000mLに調製し、高圧蒸気滅菌した培地

・ A液：4.35g リン酸水素二カリウム、1.70g リン酸二水素一カリウム、8.92g リン酸水素二ナトリウム12水和物、0.34g 塩化アンモニウムを超純水に溶解後、200mLに調製し、高圧蒸気滅菌を行った溶液

・ B液：4.50g 硫酸マグネシウム7水和物を超純水に溶解後、200mLに調製し、高圧蒸気滅菌を行った溶液

・ C液：5.50g 塩化カルシウム無水物を超純水に溶解後、200mLに調製し、高圧蒸気滅菌を行った溶液

・ D液：0.05g 塩化鉄6水和物を超純水に溶解後、200mLに調製し、0.2μmのシリンジフィルターで濾過滅菌を行った溶液

[0089] (方法)

マイクロコッカス（標的微生物）を802培地で温度25℃で培養し、集菌及び洗浄後、超純水986mLに対し、濁度（OD660）0.2となるように混合し、高圧蒸気滅菌を行い、基質溶液を得た。986mLの基質溶液に3.0mL A液、3.0mL B液、3.0mL C液、3.0mL

D液、及び1.8 mL 1%リン酸溶液を混合し、無機培地を溶媒とする標的微生物含有溶液を得た。標的微生物含有溶液に含まれる標的微生物は標的死細菌である。

[0090] *Bb. parabrevi* NITE BP-03020を802培地に播種し、30℃で24～48時間培養した。培養後、標的微生物含有溶液5.0 mLに対して*Bb. parabrevi* NITE BP-03020の培養液50 µLを添加し、25℃、200 rpmで振とうし、経時的に試験管の濁度(OD660)を簡易濁度計(簡易ODモニター、mini photo 518R、TAITEC社製)で測定した。結果を図3に示す。また、同じ方法で培養したパエニバチルス グリカニリティカス(*Paenibacillus glycanilyticus*)の培養液50 µLを標的微生物含有溶液50 mLに添加して、濁度を測定した結果を図4に示す。陰性対照は、*Bb. parabrevi* NITE BP-03020の培養液を添加していない標的微生物含有溶液の濁度(OD660)である。

[0091] 図3に示すように、陰性対照では、標的微生物含有溶液の濁度がほとんど変化しないのに対して、*Bb. parabrevi* NITE BP-03020の培養液を添加した標的微生物含有溶液では、添加前の50%以下にまで濁度が低下した。また、図4に示すように、*Paenibacillus* sp. の培養液を添加した標的微生物含有溶液では、濁度の低下は見られなかった。以上の結果より、*Bb. parabrevi*は標的微生物分解能を有することがわかった。

[0092] [実験5. *Bb. parabrevi* NITE BP-03020の培養物を含む微生物製剤の標的微生物分解能評価]

(方法)

Bb. parabrevi NITE BP-03020、*Bb. parabrevi* NBRC3331、*Bb. parabrevi* NBRC12333、*Bb. parabrevi* NBRC12334、*Bb.*

. *parabrevis* NBRC12374をそれぞれ802培地に播種し、30℃で24～48時間培養した。培養後、培養液を0.2 μ mのシリジフィルターで濾過し、培養上清（培養物）を得た。標的微生物含有溶液5.0mLに対して培養上清50 μ Lを添加し、25℃、200rpmで振とうし、経時的に試験管の濁度（OD660）を簡易濁度計（簡易ODモニター、miniphoto 518R、TAITEC社製）で測定した。結果を図5に示す。陰性対照は*Bb. Parabrevis*の培養上清を添加していない標的微生物含有溶液の濁度（OD660）である。標的微生物含有溶液は、実験4と同じ溶液を用いた。*Bb. parabrevis* NBRC3331、*Bb. parabrevis* NBRC12333、*Bb. parabrevis* NBRC12334、及び*Bb. parabrevis* NBRC12374は独立行政法人製品評価技術基盤機構から取得した。

[0093] （結果）

Bb. parabrevis NITE BP-03020以外の各*Bb. parabrevis*株についても、培養上清を添加することで、標的微生物含有溶液の濁度が低下していた。よって、*Bb. parabrevis* NITE BP-03020以外の*Bb. parabrevis*も、標的微生物分解能を有していることがわかった。また、*Bb. parabrevis*の培養物も、標的微生物分解能を有していることがわかった。

[0094] さらに、*Bb. parabrevis* NITE BP-03020の培養上清を添加した標的微生物含有溶液は、他の*Bb. parabrevis*株の培養上清を添加した標的微生物含有溶液よりも濁度が低下していた。*Bb. parabrevis* NITE BP-03020は、他の*Bb. parabrevis*株よりも標的微生物分解能に優れていることがわかった。

[0095] [実験6. *Bb. parabrevis* NITE BP-03020の培養物を含む微生物製剤の複数の標的微生物に対する分解能評価]

(材料)

・LB液体培地：500mLの超純水に対し、LB Broth, 1.1 G PER TABLET (SIGMA社製)を10個の割合で溶解し、高圧蒸気滅菌をした培地

・802培地：実験4と同じ

・細菌用培地：20g グルコース、5g ポリペプトン、3g 酵母エキス、3g 肉エキス、2g 硫酸アンモニウム、1g リン酸二水素一カリウム、0.5g 硫酸マグネシウム七水和物を超純水に溶解し、pHを7.0に調節した後、1000mLに調製し、高圧蒸気滅菌した培地

・YM培地：20g グルコース、5g ペプトン、3g 酵母エキス、3g モルトエキスを超純水に溶解し、高圧蒸気滅菌した培地

[0096] 表5に記載の標的微生物を同表に記載の培地及び培養温度で培養し、集菌及び洗浄後、超純水986mLに対し、濁度(OD660)0.2~0.3となるように混合し、高圧蒸気滅菌を行い、基質溶液を得た。基質溶液に実験4と同じA液~D液及びリン酸溶液を混合し、様々な種類の細菌(死菌)を標的微生物とする標的微生物含有溶液を得た。

[0097] [表5]

標的微生物	培地	培養温度(°C)
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	802培地	25
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YM培地	37
<i>Escherichia coli</i>	LB培地	37
<i>Brevibacillus parabrevis</i>	802培地	30
<i>Gluconobacter oxydans</i>	細菌用培地	30

[0098] 標的微生物含有溶の種類以外は実験5と同じ方法で、各標的微生物含有溶液に*Bb. parabrevis* NITE BP-03020の培養上清を添加し、濁度を経時的に測定した。結果を図6~図10に示す。

[0099] (結果)

Bb. parabrevis NITE BP-03020の培養上清を添加した標的微生物含有溶液は、いずれも陰性対照に比べて濁度が低下して

おり、*Bb. parabrevi*s 及びその培養物は、様々な種の標的微生物を分解できることがわかった。

[0100] [実験7. *Bb. parabrevi*s NITE BP-03020の培養物を含む微生物製剤の汚泥分解能評価]

(材料)

余剰汚泥を洗浄後、超純水986mLに対し、濁度(OD660)0.2となるように混合し、高圧蒸気滅菌を行い、余剰汚泥基質溶液を得た。余剰汚泥基質溶液中の標的微生物は、死菌である。986mL 余剰汚泥基質溶液に、3.0mL A液、3.0mL B液、3.0mL C液、3.0mL D液、及び1.8mL 1%リン酸を混合した余剰汚泥含有溶液を準備した。

[0101] (方法)

標的微生物を含む溶液として余剰汚泥含有溶液を用いたこと以外は実験5と同じ方法で、*Bb. parabrevi*s NITE BP-03020の培養上清を余剰汚泥含有溶液に添加し、余剰汚泥含有溶液の濁度を経時的に測定した。

[0102] (結果)

図11に示すように、*Bb. parabrevi*s NITE BP-03020の培養上清を添加することにより、余剰汚泥含有溶液の濁度の低下が認められた。従って、*Bb. parabrevi*s NITE BP-03020の培養物は汚泥分解能を有することがわかった。

[0103] [実験8. *Bb. parabrevi*s NITE BP-03020の培養物を含む微生物製剤の標的微生物分解能の温度感受性評価]

(方法)

*Bb. parabrevi*s NITE BP-03020の培養上清を標的微生物含有溶液に添加した後の振とう温度を変化させた以外は実験5と同じ方法で、標的微生物含有溶液の濁度を経時的に測定した。振とう温度は、20℃、25℃、30℃又は37℃であった。

[0104] (結果)

図12に示すように、*Bb. parabrevi*s NITE BP-03020の培養上清を添加した標的微生物含有溶液は、振とう温度20℃～37℃において、濁度が低下していた。*Bb. parabrevi*s NITE BP-03020の培養物を含む微生物製剤は、温度20℃でも標的微生物分解能を有していることがわかった。

[0105] [実験9. *Bb. parabrevi*s NITE BP-03020、*B. subtilis* subsp. *inaquosorum* DSM022148、及び*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779の各培養物上清を含む複合微生物製剤の汚泥分解能評価]

(材料)

余剰汚泥を洗浄後、超純水986mLに対し、濁度(OD660)0.15となるように混合し、高圧蒸気滅菌を行い、余剰汚泥基質溶液を得た。余剰汚泥基質溶液中の標的微生物は、死菌である。986mL 余剰汚泥基質溶液に、3.0mL A液、3.0mL B液、3.0mL C液、3.0mL D液、及び1.8mL 1%リン酸を混合した余剰汚泥含有溶液を準備した。

[0106] *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* DSM022148は、環境中から単離された細菌を用いた。*B. subtilis* subsp. *inaquosorum* DSM022148の16S rRNA遺伝子の塩基配列を配列番号8に示す。*Bb. parabrevi*s NITE BP-03020と*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779との16S rRNA遺伝子配列の同一性は87%、*Bb. parabrevi*s NITE BP-03020と*B. subtilis* subsp. *inaquosorum* DSM022148との16S rRNA遺伝子配列の同一性は89%であった。

[0107] (方法)

*Bb. parabrevi*s NITE BP-03020を802培地

に播種し、30℃で24～48時間培養した。*B. subtilis* subsp. *inaquosorum* DSM022148を802培地に播種し、37℃で24～48時間培養した。*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779をR2A培地に播種し、25℃で24～48時間培養した。培養終了後、培養液を0.2 μ mのシリンジフィルターで濾過し、培養上清（培養物）を得た。余剰汚泥含有溶液5.0 mLに対して各培養上清50 μ Lを添加し、25℃、200 rpmで振とうし、経時的に試験管の濁度（OD660）を簡易濁度計（簡易ODモニター、miniphoto 518R、TAITEC社製）で測定した。3種混合上清添加区では、各培養上清を16.7 μ Lずつ添加した。結果を図13に示す。陰性対照は培養上清を添加していない標的微生物含有溶液の濁度（OD660）である。

[0108] （結果）

図13に示すように、*Bb. parabrevis* NITE BP-03020、*B. subtilis* subsp. *inaquosorum* DSM022148、及び*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779の培養上清を単独で添加するよりも、それぞれを混合して添加することにより余剰汚泥含有溶液の大きな濁度の低下が認められた。従って、*Bb. parabrevis* NITE BP-03020の培養物及び他2菌を含む複合微生物製剤も汚泥分解能を有することがわかった。

[0109] [参考実験1. 標的微生物分解能を有する微生物の探索]

（方法）

ミクロコッカス（*Micrococcus*）属細菌を炭素源とした培地を用いて、環境（水）中に存在する微生物群を培養することにより、ミクロコッカス（*Micrococcus*）属細菌を分解する微生物を集積培養した。次に、集積培養された微生物群から、増殖が良好であった数菌株を単離した。

[0110] （結果）

単離した菌株ごとにミクロコッカス属細菌分解能を調べたところ、1つの菌株にミクロコッカス属細菌分解能が認められた。以下、ミクロコッカス属細菌分解能が認められた菌株を「菌株B」と記すことがある。

[0111] [参考実験2. ミクロコッカス属細菌分解能を有する菌株の16S rRNA遺伝子の塩基配列解析]

(材料)

・R2A培地：1000mLの超純水に対し、R2A Broth, DAGO(日本製薬株式会社製)を3.2gの割合で溶解し、高圧蒸気滅菌をした培地

- ・クローニング用フォワードプライマー(27f：配列番号2)
- ・クローニング用リバースプライマー(1492r：配列番号3)
- ・シーケンス解析用プライマー(339F：配列番号4、536R：配列番号5、907F：配列番号6)

[0112] (方法)

菌株Bからイージー・エクストラクト for DNA(イーエムアール株式会社製)を用いてDNAを抽出し、PCRにより16S rRNA遺伝子を増幅させるための鋳型DNAとして用いた。

[0113] PCRは以下の条件で行った。25.0μLの2×PCR buffer for KOD FX(東洋紡株式会社製)、10.0μLのdNTP mix(2mM)、1.5μLのクローニング用フォワードプライマー及びクローニング用リバースプライマー(それぞれ10pmol/μL)、0.58μLの鋳型DNA、10.4μLの滅菌水、1.0μLのDNAポリメラーゼ(KOD FX、1U/μL、東洋紡株式会社製)を、マイクロチューブに加え、混合した。マイクロチューブをPCR装置に供し、鋳型DNAの増幅反応を行った。反応は、(1)94℃、2分間、(2)98℃、10秒間、(3)50℃、30秒間、(4)68℃、1.5分間で行い、(2)～(4)の工程は35サイクル繰り返し行った。PCR後の増幅産物を精製した。

[0114] 精製したPCR後の増幅産物150ng相当量と、シーケンス解析用プライマー(10 μ M) 0.32 μ Lと、BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems社製) 8.0 μ Lとを混合し、これに滅菌超純水を加えて液量を20.0 μ Lとした反応液を調製した。この反応液をPCR装置に供し、増幅反応を行った。反応は、(1) 96 $^{\circ}$ C、1分間、(2) 96 $^{\circ}$ C、10秒間、(3) 50 $^{\circ}$ C、5秒間、(4) 60 $^{\circ}$ C、4分間で行い、(2)～(4)の工程は25サイクル繰り返した。得られた反応液を精製し、精製液をDNAシーケンス解析(3730x1 DNA Analyzer)に供して、菌株Bから抽出した鋳型DNAの16S rRNA遺伝子の塩基配列を決定した。

[0115] (結果)

得られた塩基配列を国際塩基配列データベース(DDBJ/ENA(EMBL)/GenBank)に対してホモロジー解析を行った。基準株の中では、*Tumebacillus permanentifrigoris* Eur1_9.5の16S rRNA遺伝子の塩基配列に対し、同一性98.1%を示した。しかし、得られた塩基配列と完全に一致する16S rRNA遺伝子を持つ微生物は存在しなかった。

[0116] 得られた16S rRNA遺伝子の塩基配列を配列番号7に示す。このことから、配列番号7に記載の塩基配列を有する16S rRNA遺伝子を有する細菌は、微生物分解能を持つことが示唆された。

[0117] [参考実験3. 配列番号7に記載の塩基配列を有する16S rRNA遺伝子を有するチューメバチルス(*Tumebacillus*)属細菌の形態観察及び生理・生化学的性状試験]

(方法)

菌株Bについて、形態観察及び生理・生化学的性状試験を行った。これらの試験は、光学顕微鏡による形態観察、BARROWらの方法(Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria 3rd E

dition 1993、Cambridge University Press.) 及びAPI 50 CHB (bioMérieux社製、Lyon、France) によって行った。試験結果を表6～表9に示す。

[0118] (結果)

菌株Bは、10℃で生育しなかったが、16S rRNA遺伝子の相同性が最も高い*Tumebacillus permanentifrigoris* Eurl__9.5にはこのような特徴がみられなかった。そのため、菌株Bは、従来の*Tumebacillus*とは異なる、新種であることが示唆された。菌株Bを*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779として寄託した。

[0119]

[表6]

試験項目		結果
培養温度 (°C)		25
細胞形態		桿菌 (0.8-0.9 × 3.0-5.0 μm)
グラム染色性		+
胞子の有無		+
運動性		-
コロニー形態		培地: R2A寒天
		培養時間: 48hr
		直径: 1-2mm
		色調: 黄色
		形: 円形
		隆起状態: レンズ上 (中央隆起)
		周縁: 波状
		表面の形状など: スムーズ
		透明度: 不透明
		粘稠度: バター様
生育温度試験 (°C)	37	+
	45	-
カタラーゼ反応		+w
オキシダーゼ反応		-
グルコースからの酸/ガス産生 (酸産生/ガス産生)		-/-
O/fテスト (酸化/発酵)		-/-

+: 陽性, -: 陰性, +w: 反応弱い

[0120]

[表7]

試験項目 (発酵性試験)	試験 結果	試験項目 (発酵性試験)	試験 結果	基質成分 (発酵性試験)	試験 結果
コントロール	—	α -メチル-D-グルコシド	—	D-タガトース	—
グリセロール	—	N-アセチルグルコサミン	—	D-フコース	—
エリスリトール	—	アミグダリン	—	L-フコース	—
D-アラビノース	—	アルブチン	—	D-アラビトール	—
L-アラビノース	—	エスクリン	—	L-アラビトール	—
リボース	—	サリシン	—	グルコネート	—
D-キシロース	—	セロビオース	—	2-ケトグルコネート	—
L-キシロース	—	マルトース	—	5-ケトグルコネート	—
アドニトール	—	ラクトース	—		
β -メチル-D-キシロース	—	メリビオース	—		
ガラクトース	—	サッカロース	—		
グルコース	—	トレハロース	—		
フラクトース	—	イヌリン	—		
マンノース	—	メレチトース	—		
ソルボース	—	ラフィノース	—		
ラムノース	—	でんぶん	—		
ズルシトール	—	グリコーゲン	—		
イノシトール	—	キシリトール	—		
マンニトール	—	ゲンチオビオース	—		
ソルビトール	—	D-ツラノース	—		
α -メチル-D-マンノシド	—	D-リキソース	—		

+ : 陽性、— : 陰性

[0121]

[表8]

基質成分 (生化学試験)	試験結果
β -ガラクトシダーゼ	—
アルギニンジヒドロラーゼ	—
リシンデカルボキシラーゼ	—
オルニチンデカルボキシラーゼ	—
クエン酸の利用性	—
H ₂ S 産生	—
ウレアーゼ	—
トリプトファンデアミナーゼ	—
インドール産生	—
アセトイン産生 (VP)	—
ゼラチナーゼ	—
硝酸塩還元	—

＋：陽性、－：陰性

[0122] [表9]

試験項目	試験結果
10℃での生育	—
pH 9.0での生育	＋
でんぷんの加水分解	＋

＋：陽性、－：陰性

[0123] [参考実験4. *Tumebacillus* sp. NITE BP-02779の標的細菌（死菌）に対する分解能評価]

(材料)

・R2A培地：1000mLの超純水に対し、R2A Broth, DAIKO（日本製薬株式会社製）を3.2gの割合で溶解し、高圧蒸気滅菌をした培地

・LB液体培地：500mLの超純水に対し、LB Broth, 1.1 GPER TABLET (SIGMA社製) を10個の割合で溶解し、高圧蒸気滅菌をした培地

・ 802 培地：10 g ポリペプトン、2 g 酵母エキス、1 g 硫酸マグネシウム七水和物を超純水に溶解し、pHを7.0に調節した後、1000 mLに調製し、高圧蒸気滅菌した培地

・ 細菌用培地：20 g グルコース、5 g ポリペプトン、3 g 酵母エキス、3 g 肉エキス、2 g 硫酸アンモニウム、1 g リン酸二水素一カリウム、0.5 g 硫酸マグネシウム七水和物を超純水に溶解し、pHを7.0に調節した後、1000 mLに調製し、高圧蒸気滅菌した培地

[0124] ・ 標的細菌（死菌）含有無機培地：986 mL 基質溶液、3.0 mL A液、3.0 mL B液、3.0 mL C液、3.0 mL D液、及び1.8 mL 1%リン酸を混合した培地

なお、上記の基質溶液及びA液～D液としては、以下のものを用いた。

基質溶液：表10記載の標的細菌を同表記載の条件で培養し、集菌及び洗浄後、超純水986 mLに対し、濁度（OD₆₆₀）0.2となるように混合し、高圧蒸気滅菌を行った溶液

A液：4.35 g リン酸水素二カリウム、1.70 g リン酸二水素一カリウム、8.92 g リン酸水素二ナトリウム12水和物、0.34 g 塩化アンモニウムを超純水に溶解後、200 mLに調製し、高圧蒸気滅菌を行った溶液

B液：4.50 g 硫酸マグネシウム7水和物を超純水に溶解後、200 mLに調製し、高圧蒸気滅菌を行った溶液

C液：5.50 g 塩化カルシウム無水物を超純水に溶解後、200 mLに調製し、高圧蒸気滅菌を行った溶液

D液：0.05 g 塩化鉄6水和物を超純水に溶解後、200 mLに調製し、0.2 μmのシリンジフィルターで濾過滅菌を行った溶液

[0125]

[表10]

標的細菌	培地	培養温度 (°C)
<i>Micrococcus</i>	802培地	25
<i>Bacillus</i>	細菌用培地	25
<i>Staphylococcus</i>	R2A培地	30
<i>Lactobacillus</i>	802培地	25
<i>Paenibacillus</i>	細菌用培地	25
<i>Escherichia</i>	LB培地	37
<i>Acetobacter</i>	802培地	25

[0126] (方法)

Tumebacillus sp. NITE BP-02779をR2A培地に播種し、25℃で24時間～48時間培養した。

[0127] 培養終了後、*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779培養液50μLと標的細菌（死菌）含有無機培地5.0mLとを試験管に添加して、25℃、200rpmにて反応させ、経時的に試験管の濁度（OD660）を簡易濁度計（簡易ODモニター miniphoto 518R、TAITEC社製）で測定した。標的細菌（死菌）含有無機培地の濁度（OD660）が、陰性対照の濁度（OD660）の50%を示す経過日数を算出し、以下の基準で分解能の有無を判定した。

A：0日以上2.0日未満

B：2.0日以上5.0日未満

C：5.0日以上

なお、陰性対照は*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779無添加の標的細菌（死菌）含有無機培地の濁度（OD660）を用いた。

[0128] (結果)

結果を表11に示す。*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779を添加することにより、標的細菌（死菌）含有無機培地の濁度の低下が認められた。従って、*Tumebacillus* sp. NITE

B P - 0 2 7 7 9 は標的微生物（標的死細菌）を分解可能であった。

[0129] [表11]

標的細菌（死菌）	結果	細胞形態	グラム染色
<i>Micrococcus</i>	A（0. 7日）	球菌	陽性
<i>Bacillus</i>	A（0. 8日）	桿菌	陽性
<i>Staphylococcus</i>	A（1. 9日）	球菌	陽性
<i>Lactobacillus</i>	A（1. 9日）	桿菌	陽性
<i>Paenibacillus</i>	A（1. 1日）	桿菌	陽性
<i>Escherichia</i>	A（0. 6日）	桿菌	陰性
<i>Acetobacter</i>	A（0. 7日）	桿菌	陰性

[0130] [参考実験5. *Tumebacillus* sp. N I T E B P - 0 2 7 7 9 の標的細菌（生菌）に対する分解能評価]

（材料）

・ 標的細菌（生菌）含有無機培地：986mL 滅菌水、3. 0mL A液、3. 0mL B液、3. 0mL C液、3. 0mL D液、1. 8mL 1%リン酸、及び標的細菌（生菌）を混合した溶液

なお、A液～D液としては参考実験4と同じものを用いた。また、標的細菌（生菌）含有無機培地の濁度（OD660）は0. 2となるように標的細菌（生菌）を混合した。

[0131] （方法）

標的細菌（生菌）含有無機培地を用いたこと以外は、参考実験4と同じ方法で*Tumebacillus* sp. N I T E B P - 0 2 7 7 9 の標的細菌（生菌）に対する分解能を評価した。

[0132] （結果）

結果を表12に示す。*Tumebacillus* sp. N I T E B P - 0 2 7 7 9 を添加することにより、標的細菌（生菌）含有無機培地の濁度の低下が認められた。従って、*Tumebacillus* sp. N I T E B P - 0 2 7 7 9 は標的細菌（生菌）を分解可能であった。

[0133]

[表12]

標的細菌（生菌）	結果	細胞形態	グラム染色
<i>Micrococcus</i>	B（2. 0日）	球菌	陽性
<i>Staphylococcus</i>	A（1. 5日）	球菌	陽性

[0134] [参考実験6. *Tumebacillus* sp. NITE BP-02779の余剰汚泥（死菌）に対する分解能評価（1）]

・余剰汚泥（死菌）含有無機培地：986mL 基質溶液、3. 0mL A液、3. 0mL B液、3. 0mL C液、3. 0mL D液、及び1. 8mL 1%リン酸を混合した培地

基質溶液:余剰汚泥を洗浄後、超純水986mLに対し、濁度（OD660）0. 2となるように混合し、高圧蒸気滅菌を行った溶液

基質溶液として上記のものを用いたこと以外は、参考実験4と同じものを用いた。

[0135] （方法）

余剰汚泥（死菌）含有無機培地を用いたこと以外は、参考実験4と同じ方法で*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779の余剰汚泥（死菌）に対する分解能を評価した。

[0136] （結果）

結果を表13に示す。*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779を添加することにより、余剰汚泥（死菌）の濁度の低下が認められた。従って、*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779は余剰汚泥（死菌）を分解可能であった。

[0137] [表13]

標的細菌（死菌）	結果	細胞形態	グラム染色
余剰汚泥	B（3. 2日）	—	—

[0138] [参考実験7. *Tumebacillus* sp. NITE BP-02779の余剰汚泥（死菌）に対する分解能評価（2）]

（材料）

参考実験6と同じものを用いた。

[0139] (方法)

参考実験4と同じ方法で反応を行った。反応は5連で行い、反応開始後4日目に試験管中に残存する余剰汚泥を全量回収した。回収した余剰汚泥を乾燥後、余剰汚泥の乾燥重量を測定し、陰性対照群と *Tumebacillus* sp. NITE BP-02779 添加群とで有意差検定 (t 検定、片側) を行った。

[0140] (結果)

結果を図14に示す。陰性対照群と比較して *Tumebacillus* sp. NITE BP-02779 添加群では余剰汚泥の乾燥重量の有意な低下 ($p < 0.01$) が認められた。従って、*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779 を添加することにより余剰汚泥を削減可能であった。

[0141] [参考実験8. 様々な細菌の *Micrococcus* 属細菌に対する分解能評価]

(材料)

標的細菌含有無機培地として、参考実験4で用いた *Micrococcus* 属細菌を標的細菌として含む標的細菌 (死菌) 含有無機培地を準備した。微生物分解能の有無を評価する細菌として表14に示す細菌を準備した。

[0142]

[表14]

<i>Tumebacillus</i> sp.NITE BP-02779
<i>Tumebacillus algifaecis</i> NBRC108765t
<i>Bacillus alvei</i> IFO 3343t
<i>Bacillus badius</i> ATCC 14574t
<i>Bacillus brevis</i> IFO 3331
<i>Bacillus brevis</i> JCM 2503t
<i>Bacillus cereus</i> JCM 2152t
<i>Bacillus cereus</i> var.juroi ATCC 21281
<i>Bacillus circulans</i> ATCC 13403
<i>Bacillus circulans</i> IFO 3329
<i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257t
<i>Bacillus firmus</i> JCM 2512t
<i>Bacillus lentus</i> JCM 2511t
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14594
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 27811
<i>Bacillus licheniformis</i> IFO 12195
<i>Bacillus licheniformis</i> IFO 12197
<i>Bacillus licheniformis</i> IFO 12200t
<i>Bacillus macerans</i> JCM 2500t
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 13639
<i>Bacillus megaterium</i> IFO 12108
<i>Bacillus megaterium</i> JCM 2506t
<i>Bacillus moritai</i> ATCC 21282
<i>Bacillus pabuli</i> IFO 13638t
<i>Paenibacillus polymyxa</i> IFO 3020
<i>Paenibacillus polymyxa</i> JCM 2507t
<i>Bacillus pumilus</i> IFO 12092t
<i>Bacillus sphaericus</i> SC1713
<i>Bacillus sphaericus</i> ATCC 14577
<i>Bacillus sphaericus</i> IFO 3341
<i>Bacillus sphaericus</i> IFO 3525
<i>Bacillus sphaericus</i> IFO 3526
<i>Bacillus sphaericus</i> IFO 3527
<i>Bacillus sphaericus</i> IFO 3528
<i>Bacillus subtilis</i> JCM 1465t
<i>Bacillus subtilis</i> 168 NBRC111470
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 14593
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 03108
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 03134
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 13169
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3026
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NBRC3037
<i>Bacillus thuringensis</i> ATCC 13366
<i>Bacillus validus</i> IFO 13635

[0143] (方法)

参考実験4と同じ方法で、標的細菌含有無機培地と評価対象となる細菌を

含む培養液とを混ぜ、評価対象となる細菌の微生物分解能を評価した。標的細菌含有無機培地の濁度（OD 660）が、陰性対照の濁度（OD 660）の50%を示す経過日数を算出し、以下の基準で微生物分解能の有無を判定した。

A：0日以上1.0日未満

B：1.0日以上4.0日未満

C：4.0日以上

なお、陰性対照は評価対象となる細菌を含む培養液を添加しなかった標的細菌含有無機培地の濁度（OD 660）を用いた。

[0144] （結果）

結果を表15に示す。また、表14に記載の評価対象の細菌の16S rRNA遺伝子の塩基配列と*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779の16S rRNA遺伝子の塩基配列（配列番号7）との相溶性検索を行い、算出された同一性割合を表15に示す。表15に記載の細菌の16S rRNA遺伝子の塩基配列を、配列番号9～18として示す。これらは独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター（NBRC）オンラインカタログ<<https://www.nite.go.jp/nbrc/catalogue/NBRCDispSearchServlet?lang=jp>>又は国立生物工学情報センター（NCBI）データベースカタログ<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>に収載されている配列である。

[0145] *Tumebacillus* sp. NITE BP-02779及び*Tumebacillus algifaecis* NBRC108765tはA判定であったが、*Bacillus*属細菌及び*Paenibacillus*属細菌はB判定又はC判定であった。従って、*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779及び*Tumebacillus algifaecis* NBRC108765tは*Bacillus*属細菌及び*Paenibacillus*属細菌よりも標的微生物（標的死細菌）分解能が優れていた。

[0146] *Tumebacillus* sp. NITE BP-02779の16S rRNA遺伝子の塩基配列と*Tumebacillus algifaecis* NBRC108765tの16S rRNA遺伝子の塩基配列との同一性は、92.8%であった。一方、*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779の16S rRNA遺伝子の塩基配列と*Bacillus*属細菌又は*Paenibacillus*属細菌の16S rRNA遺伝子の塩基配列との同一性は、90%未満であった。このことから、16S rRNA遺伝子の塩基配列の同一性が、*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779と90%以上である細菌は、標的微生物分解能が優れていると考えられた。*Tumebacillus algifaecis* NBRC108765tはNBRCから入手可能であり、その16S rRNA遺伝子の塩基配列はGenBank/EMBL/DDBJデータベースにAccession No. JX110710として収載されている。

[0147]

[表15]

評価対象の細菌	結果	配列同一性
<i>Tumebacillus</i> sp. NITE BP-02779	A (0. 3日)	—
<i>Tumebacillus algifaecis</i> NBRC108765t	A (0. 8日)	>90% (92. 8)
<i>Paenibacillus polymyxa</i> JCM 2507t	B (1. 1日)	<90% (85. 3)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NBRC3037	B (1. 2日)	<90% (86. 7)
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3134	B (2. 2日)	<90% (86. 7)
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3026	B (2. 9日)	<90% (86. 7)
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 13169	B (2. 9日)	<90% (86. 7)
<i>Bacillus sphaericus</i> IFO 3341	B (3. 3日)	<90% (86. 8)
<i>Bacillus sphaericus</i> IFO 3528	B (3. 6日)	<90% (86. 8)
<i>Bacillus licheniformis</i> IFO 12197	B (3. 6日)	<90% (87. 0)
<i>Bacillus subtilis</i> 168 NBRC111470	C (4. 2日)	<90% (86. 7)
その他(33株)	C (>4. 2日)	<90%

[0148] [参考実験9. *Tumebacillus* sp. NITE BP-02779と*Escherichia coli*とを含む混合溶液の標的微生物分解能評価]

(材料)

標的細菌含有無機培地として、参考実験4で用いた*Micrococcus* 属細菌を標的細菌として含む標的細菌（死菌）含有無機培地を準備した。また、*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779と*Escherichia coli* DH5 α とを含む溶液を準備した。

[0149] (方法)

まず、*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779を25℃で24時間、*Escherichia coli* DH5 α を37℃

で24時間培養した。

[0150] 培養後、*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779 培養液 (OD₆₆₀=0.2に調製) と *Escherichia coli* DH5 α 培養液 (OD₆₆₀=0.2に調製) とを表16に示す比率で混合した混合溶液を準備した。調製した微生物製剤50 μ Lと標的細菌含有無機培地5.0mLとを試験管に添加して、25℃、200rpmにて反応させ、2日後に混合液の濁度 (OD₆₆₀) を簡易濁度計 (簡易ODモニター、miniphoto 518R、TAITEC社製) で測定した。陰性対照の濁度 (OD₆₆₀) に対する、微生物製剤を添加した標的細菌含有無機培地の濁度 (OD₆₆₀) の割合を標的微生物の残存率として算出し、以下の基準で標的微生物分解能を評価した。

A : 0%以上50%未満

B : 50%以上70%未満

C : 70%以上

なお、陰性対照は混合溶液無添加の標的細菌含有無機培地の濁度 (OD₆₆₀) を用いた。

[0151] (結果)

結果を表16に示す。*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779と*Escherichia coli*とを含む溶液は、良好な標的微生物分解能を示した。

[0152]

[表16]

微生物製剤		標的微生物の残存率 (%)
微生物製剤に含まれる 細菌(a1)と細菌(a2)の総和に対する 細菌(a1)の割合 $T / (T + E) \times 100$	100%	A(5%)
	50%	A(22%)
	25%	A(28%)
	13%	A(35%)
	6.3%	A(39%)
	3.1%	A(36%)
	1.6%	A(43%)
	0.78%	A(42%)
	0.39%	A(45%)
	0.20%	A(48%)
	0%	C(124%)
陰性対照		C(100%)

T: *Tumebacillus* sp. NITE BP-02779の菌数

E: *Escherichia coli* DH5 α の菌数

標的微生物の残存率(%) = OD660(微生物製剤添加) / OD660(陰性対照) $\times$ 100

[0153] [参考実験10. *Tumebacillus* sp. NITE BP-02779培養物の標的微生物分解能評価]

(材料)

標的細菌(生菌)含有リン酸緩衝液として66mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.24)10mL、及び*Micrococcus*属細菌乾燥菌体(SIGMA-ALDRICH社製)10mgを混合した溶液を用いた。

[0154] (方法)

まず、*Tumebacillus* sp. NITE BP-02779をR2A培地で一定時間、培養した。

[0155] 培養後、培養液を遠心分離して、菌体を除いた培養上清を回収した。96穴プレートに回収した培養上清100 μ Lと標的細菌含有リン酸緩衝液100 μ Lとを添加して、マイクロプレートリーダー(Molecular Device社製)を用いてABS450nmを経時的に測定した。*Micrococcus*属細菌分解能(UNITS/mL)を算出し、以下の基準で標的微生物分解能を評価した。

S: 200 (UNITS/mL) 以上

A: 100 (UNITS/mL) 以上200 (UNITS/mL) 未満

B : 20 (UNITS/mL) 以上 100 (UNITS/mL) 未満

C : 20 (UNITS/mL) 未満

なお、Micrococcus 属細菌分解能 (UNITS/mL) は以下の式を用いて算出した。

Micrococcus 属細菌分解能 (UNITS/mL)

$$= \{ \Delta \text{ABS} 450 \text{ nm} / \text{分} (\text{培養上清を添加した標的細菌含有リン酸緩衝液}) - \Delta \text{ABS} 450 \text{ nm} / \text{分} (\text{培養上清無添加の標的細菌含有リン酸緩衝液}) \} / (0.001 \times 0.1)$$

[0156] (結果)

結果を表 17 に示す。Tumebacillus sp. NITE BP-02779 を一定時間培養した培養上清は、標的微生物分解能を有していることがわかった。

[0157] [表17]

培養時間(時間)	Micrococcus 属細菌分解能
0	C (13UNITS/mL)
21	A (121UNITS/mL)
28	S (249UNITS/mL)
46	S (250UNITS/mL)
53	S (252UNITS/mL)
68	A (153 UNITS/mL)