

乾燥鶏ふんと街路樹剪定枝堆肥を原料とする発酵肥料の PCR-DGGE 法による微生物群集構造解析(短報)

竹下美保子*・福原絵里子¹⁾・荒木雅登・尾上 武・小山 太

[キーワード: PCR-DGGE 法, 発酵肥料, 街路樹剪定枝, 鶏ふん]

Changes in bacterial and fungal communities in fermentation fertilizer made from dried poultry manure and pruned twig by denaturing gradient gel electrophoresis. TAKESHITA Mihoko, Eriko FUKUHARA, Masato ARAKI, Takeshi ONOUE and Futoshi KOYAMA (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 32:48-51 (2013)

[Key words: denaturing gradient gel electrophoresis, fermentation fertilizer, poultry manure, pruned twig]

緒言

近年、消費者の食の安全・安心への関心が高まり、減化学肥料栽培による農産物が消費者に注目されている。著者らは、化学肥料の代替として県内で多量に発生する未利用の街路樹剪定枝をチップ化し堆肥化したもの（以下、剪定枝堆肥とする）を乾燥鶏ふんと混合し、再度発酵させて有機質肥料（以下発酵肥料とする）を生産する技術を開発している。このような発酵肥料を調製する際に多種多様な微生物の動態を明らかにすることは有機質肥料の発酵状態の把握や品質管理上重要である。しかし、環境中の全細菌細胞数に対して平板法によって検出できる細菌の割合は 1%にも満たないことが知られ (Amann *et al.* 1995)、従来の培養法では培養・単離されない微生物が多く存在するため、微生物の動態を解析することは困難であった。

その中で、環境中の微生物群集構造の実態を短時間で簡易に明らかにする手法として、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（以下、DGGE 法）が開発された (Muyzer *et al.* 1993)。この手法は微生物群集の解析に培養を要しない方法であり、培養不可能な微生物を含め、堆肥中の微生物群集を比較的短時間で視覚的に解析することが可能である (須賀・豊田 2005)。しかしながら、家畜ふんを混合した発酵肥料中の微生物群集構造の解析に関する研究事例は乏しい状況にある。

そこで、本研究では化学肥料の代替となり得る発酵肥料の安定的な生産に役立てるため、剪定枝堆肥と乾燥鶏ふんを混合後、発酵肥料となるまでの一連の過程について、DGGE 法を利用した微生物群集構造の変化を細菌叢と糸状菌叢の解析を中心に調査した。

材料および方法

1 発酵肥料の調製方法及び製品の理化学性分析

福岡県朝倉郡筑前町の採卵鶏飼養施設から搬出された乾燥鶏ふんと福岡市緑のリサイクルセンターにおいて 4 ヶ月屋外堆積した街路樹剪定枝堆肥を 200kg ずつ等量混合し、室内において高さ 30~50cm 程度の台形状に堆積して、2011 年 8 月 26 日から発酵を開始した。開始から 5 週間は 1 週間ごとに切り返しを行い、それ以降は 9 週後に切り返し、13 週後まで堆積した。発酵期間中の品温はバイメタル式温度計で表面から 30cm の深さを 1

回/日直読した。切り返し時に切り返し後の混合物から約 500 g 採材し、十分に均一化させた後、pH、水分含量および灰分分析に供した。pH は現物 5 g に蒸留水 45mL を加えて 30 分間振とうし、pH メーターで測定した。水分は 60°C で 48 時間通風乾燥後の重量減少量から算出し、灰分は 590°C で 2 時間強熱処理後の重量減少により算出した。開始時の灰分に対する有機物の減少率を有機物分解率として算出した。

2 DNA の抽出と PCR 増幅

切り返し時に採材した発酵肥料はすみやかに -40°C で凍結保存し、解凍後、PowerSoil[®] DNA Isolation Kit (MO BIO) を用いて DNA を抽出した。抽出 DNA は -20°C で保管し、下記の PCR 増幅に供試した。

細菌の 16S rDNA の PCR 増幅には forward primer 357f-GC と reverse primer 518r を用いた (Muyzer *et al.* 1993)。PCR 条件は、92°C 2 分; 1cycle, 94°C 1 分, 55°C 1 分, 72°C 1 分; 30cycle, 72°C 10 分; 1cycle とした。糸状菌の 26S rDNA の増幅には、forward primer NL1-GC と reverse primer LS2R を用いた (Rantsiou *et al.* 2006)。PCR 条件は、95°C 5 分; 1cycle, 95°C 1 分, 52°C 45 秒, 72°C 1 分; 30cycle, 72°C 7 分; 1cycle とした (Abe *et al.* 2008)。

細菌および糸状菌の PCR 産物は 2% アガロースゲルを用いて電気泳動後、EtBr 溶液にて染色し、増幅の確認を行った。

3 DGGE 法

DGGE は DCode[™] ユニバーサルミュートーション検出システム (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて行った。

細菌の 16S rDNA の泳動については、Nakamura・Sakai (2011) の方法の変性剤濃度を改変して行った。PCR 反応液は、20~70% の DNA 変性剤濃度勾配 (7M 尿素および 40% ホルムアミド濃度を 100% 変性剤濃度とした) をつけた 8% アクリルアミドゲルで泳動した。電気泳動は 1.0×TAE 緩衝液 (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA) 中において 60°C, 200V の条件下で 5 時間行った。糸状菌の 26S rDNA の泳動については、Abe ら (2008) の方法に従った。

*連絡責任者 (畜産環境部: m-take@farc.pref.fukuoka.jp)

受付2012年 8月 1日; 受理2012年11月 9日

1) 現 飯塚農林事務所飯塚普及指導センター

細菌および糸状菌ともに泳動終了後、ゲルを EtBr 溶液で 30 分染色し、UV 照射下で写真撮影を行った。

4 DGGE バンドの切り出しとシーケンス解析

特徴的な消長を示すバンドの近縁種の菌を推定するため DGGE ゲルからのバンドの切り出しとシーケンス解析を行った。DGGE ゲルからのバンドは滅菌済み葉さじを用いて切り出し、切り出したゲルは TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) 中で DNA の溶出を行った (4°C, 18 時間)。GC クランプの付いていないプライマーセット (357f-518r) による再増幅後、TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) を用いてクローニングを行った。形質転換されていたサンプルを再度 PCR および DGGE 解析を行い、目的のバンドと同位置に泳動バンドが得られたサンプルについて、BigDye[®] Terminator CycleSequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてサイクル PCR を行った。その後、塩基配列の解析は秋田県立大学バイオテクノロジーセンターへ委託した。

解析された塩基配列は、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) DNA データベース上で相同性検索を行い、近縁種の決定を行った。

結果

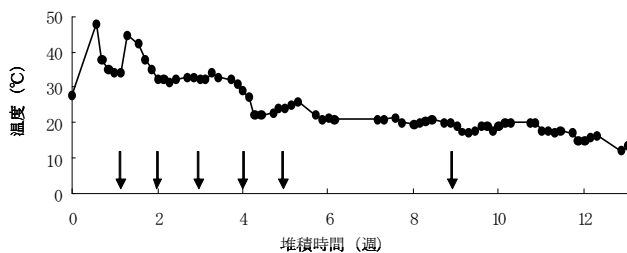
1 発酵肥料の品温推移と理化学性成分

温度は、剪定枝堆肥と乾燥鶏ふんを混合後、3 日目には 48°C まで上昇し、その後 34°C まで低下したが、1 週間後に切り返しを行うと再び 45°C まで上昇した。その後、同様に 32°C まで低下し、その後は切り返しを行っても品温の上昇はごくわずかか、上昇することはなかった (第 1 図)。

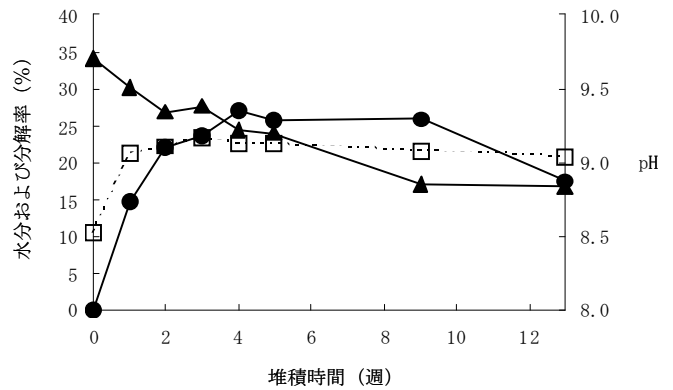
pH は、混合 1 週間後には 8.5 から 9.1 に上昇し、その後も緩やかに上昇を続け、3 週間には最高値の約 9.2 になった (第 2 図)。発酵開始時の水分は約 35% であったが、品温の上昇ともなって低下し、13 週後の終了時には 17% となった (第 2 図)。また、有機物の分解率については、混合後 1 週間後に 15%、2 週間後には 22% となり、2 週間後までに大きく上昇したが、その後は 25% 前後を推移した (第 2 図)。

2 発酵肥料中の細菌 16S rDNA および糸状菌 26S rDNA の DGGE プロファイル

剪定枝堆肥と乾燥鶏ふんを混合堆積した発酵肥料の発酵過程における細菌群集構造を第 3 図に示した。DGGE ゲルのバンドは発酵開始時 (lane 1) は明瞭な 9 本、



第 1 図 乾燥鶏ふんと剪定枝堆肥混合物の発酵期間における品温の推移 (図中の矢印は切り返しを示す)

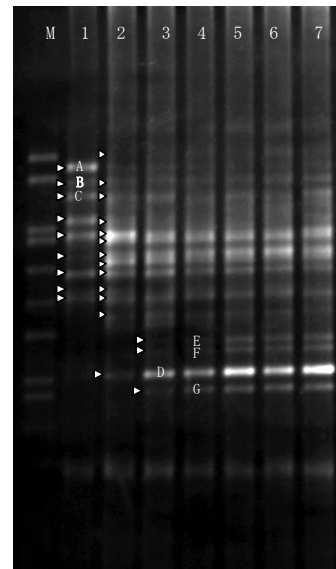


第 2 図 乾燥鶏ふんと剪定枝堆肥混合物の発酵期間における理化学性の変化

▲: 水分 ●: 有機物分解率 □: pH

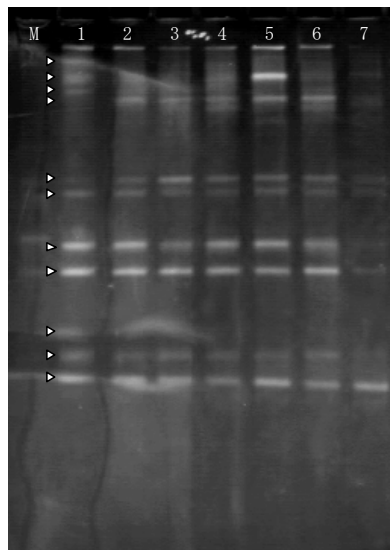
発酵 1 週間後 (lane 2) は主要な 13 本が確認された。この中でバンド A は発酵開始時には検出されたが、発酵が進むにつれて消失し、バンド B および C のように発酵期間を通して検出されるバンドも認められた。一方、バンド D~G は、発酵過程 2 週および 3 週目から顕著に検出され、特に D は、発酵が進むとともに明瞭となる傾向を認めた。以上のように、細菌 16S rDNA の DGGE 解析の結果得られるバンドは、発酵ステージにより異なっており、DGGE により細菌叢の変遷が確認できることが明らかとなった。

細菌叢と同様に、糸状菌叢についても DGGE 法による菌叢解析を行った結果、11 本の明瞭なバンドが認められたが、細菌叢と比較すると相対的にバンドパターンに大きな差異は認められず、バンドの濃淡に差はあるが、発酵期間 9 週間までの各ステージでは、DGGE による明確な変遷は認めることはできなかった (第 4 図)。



第 3 図 発酵肥料中の細菌群集構造 DGGE プロファイル

M: マーカー, 1: 発酵開始時, 2: 1 週間後, 3: 2 週間後, 4: 3 週間後, 5: 4 週間後, 6: 5 週間後, 7: 9 週間後
▷: 検出されたバンド A~G: シーケンス解析に供されたバンド



第4図 発酵肥料中の糸状菌群集構造 DGGE プロファイル
M: マーカー, 1: 発酵開始時, 2: 1 週間後, 3: 2 週間後, 4: 3 週間後, 5: 4 週間後, 6: 5 週間後, 7: 9 週間後
▷: 検出されたバンド

3 DGGE バンドシーケンシングにより検出された近縁種

DGGE ゲルから 4 本のバンド (第 3 図: A~D) を切り出し、シーケンス解析を行い、塩基配列を決定し、相同性検索を行った結果、バンド A は *Atopostipos suicloacalis* と 99% の相同性を確認し、D は *Nocardiopsis nikkonensis* と 98% の相同性を認めた。発酵期間を通して見られる B のバンドは *Staphylococcus nepalensis* と 99% の相同性を確認し、C のバンドは *Bacillus* 属の一種であることを確認した。

考 察

コンポスト化装置内および家畜ふん堆肥化施設における微生物叢の研究は多数報告されており (Ishii *et al.* 2000, Ishii・Takii 2003, 春田・五十嵐 2004, Nakasaki *et al.* 2009, Watanabe *et al.* 2009), Maeda ら (2009) は、牛ふんの堆肥化においては 4~6 週間の間で細菌叢が変化すると報告している。これに対して、発酵肥料を用いた今回の細菌の 16S rDNA をターゲットとした DGGE 解析では、発酵開始直後と 1 週間後では細菌叢が大きく異なり、それ以降、細菌叢としては比較的安定した状態を示した。一般に発酵肥料は発酵温度を 50°C 程度までしか上げずに調製することで、通常の堆肥化過程とは異なる微生物の作用で有機物を分解し、肥料成分が緩やかに溶出する効果があり、また、発酵肥料中の微生物が土壌の微生物に有用な働きをするともいわれる。今回、細菌叢の変化が 1 週間と早かったのは、乾燥鶏ふんと剪定枝堆肥を混合し、蓄熱しないよう 30~50cm 程度に堆積したため、発酵温度が低く、高温耐性菌の適温まで品温が達していなかったことが原因と考えられる。

一方、糸状菌の 26S rDNA をターゲットにした DGGE 解

析では、バンドの濃淡は出るものの細菌叢と比較すると糸状菌叢の大きな遷移は認められておらず、糸状菌種の変化が小さかったことを示している。家畜ふんの堆肥化過程では、品温が高い発酵過程で細菌が増殖して有機物の分解が終了し、その後品温が低下し始めた後に、真菌類が増殖するとされている (Insam・Bertoldi 2007)。今回の試験で発酵 9 週目まで糸状菌の種類が大きく変わらなかったのは堆肥化と同様に、細菌による有機物の分解が進行しているためと推察される。

DGGE ゲルからバンドを切り出してシーケンス解析を行った結果、発酵開始時には存在しないが、発酵 2 週目から出現してくるバンド 4 本のうちの 1 本 (第 2 図の D) は、*N. nikkonensis* と 98% の高い相同性が認められる。*N. nikkonensis* は放線菌の一種であり、コンポストから分離され、10~37°C で生育 (適温 30°C) するとされている (Yamamura *et al.* 2010)。本試験で調製した発酵肥料の品温は、混合直後は 50°C 近くまで上昇し、1 週間後も 45°C まで再び上昇するが、発酵 2 週間後から発酵 4 週間までは最適生育温度の 30°C 前後で推移し、増殖に適していたと考えられ、その後も 15°C 以上の品温が保持されたため生育が可能であったと思われる。一方、発酵開始時に見られたがその後消失したバンド A は、*A. suicloacalis* と 99% の高い相同性が認められる。*A. suicloacalis* は、豚ふん堆肥保管場所、メタン発酵槽やコンポスト化装置から検出されている (Cotta *et al.* 2004, 小林ら 2008, Watanabe *et al.* 2008)。Watanabe ら (2008) は、コンポスト化装置内で凝集化が生じると *A. suicloacalis* をはじめとする嫌気性菌が出現することを報告している。本研究では、乾燥鶏ふんと剪定枝堆肥を混合することで、好気的な発酵が進み、混合直後に存在した *A. suicloacalis* のような嫌気性菌の生存が認められなくなったものと思われる。また、生育期間を通して存在が確認された B のバンドは *S. nepalensis* と 99% の相同性が認められる。*S. nepalensis* はブドウ球菌として知られる *Staphylococcus* 属であるが、発酵食品から分離された報告があり (船津ら 2005)、分布が確認されても衛生的に問題はないと考えられ、今回の発酵肥料においても同様に発酵の一過程を担うものと示唆される。

Maeda ら (2009) は、牛ふんの堆肥化において初期の段階は、*Bacillus* 属のような高温菌、その後セルロースを分解する細菌が優占となることを報告している。しかし、本研究における DGGE 解析の結果では、主要な全てのバンドに対して相同性の高い菌種を明らかにすることはできておらず、発酵開始から終了までの各細菌の役割を明確にするまでには至っていない。さらに、発酵肥料は、原料や調製条件によって群集構造が様々であるといわれるが、その発酵過程における微生物の関与や微生物の変遷は未確認な部分が多く残されている。今回の DGGE 法を中心とした研究では発酵の各ステージを比較し、その消長から特徴的な細菌 4 種を同定することができた。この方法は経時的な変化を網羅的に把握する際に有効であり、塩基配列情報に基づく解析法と組み合わせることで、効率的に細菌種の動態を明らかにできる。今後は、今回は同定できなかった品質管理の面で重要と

思われる細菌種について特徴的な変化を明らかにしていく必要がある。

謝 辞

本研究を行うにあたり、貴重なご意見・ご指導を賜りました九州大学大学院農学研究院酒井謙二教授ならびに東京工業大学大学院理工学研究科中崎清彦教授に深謝します。また、実験装置をお借りした福岡県工業技術センター生物食品研究所の皆様に感謝いたします。

引用文献

Abe M. *et al.* (2008) *Int J Food Microbiol.* 124 : 199- 203.
Amann R. I. *et al.* (1995) *Microbiol Reviews.* 59 : 143- 169.
Cotta M. *et al.* (2004) *Anaerobe* 10 : 191- 195.
船津保浩ら (2005) *日水誌*71 : 611- 617.
春田 伸ら (2004) *環境バイオテクノロジー学会誌* 4 : 29-39.

Insam H. *et al.* (2007) *Compost Science and Technology.*
Ishii K. *et al.* (2000) *J. Appl. Microbiol.* 89 : 768- 777.
Ishii K. *et al.* (2003) *J. Appl. Microbiol.* 95 : 109- 119.
小林拓朗ら (2008) 土木学会第63回年次学術講演会.
Maeda K. *et al.* (2009) *J. Environ. Qual.* 38 : 598- 606.
Muyzer G. *et al.* (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 695- 700.
Nakamura K. *et al.* (2011) *Soil Sci. Plant Nutr.* 57 : 519- 528.
Nakasaki K. *et al.* (2009) *Bioresour Technol.* 100 : 676- 682.
Rantsiou K. *et al.* (2005) *Appl. Environ. Microbiol.* 71 : 1977-1986.
須賀有子ら (2005) *土肥誌* 76 : 649- 655.
Yamamura H. *et al.* (2010) *Int J Syst Evol Microbiol.* 60 : 2967-2971.
Watanabe K. *et al.* (2008) *Curr Microbiol.* 56 : 458- 467.
Watanabe K. *et al.* (2009) *World J Microbiol Biotechnol.* 25 : 803- 811.