

# 乳牛ふん堆肥化反応に寄与する微生物種の組み合わせによる スーパーオキシドジスムターゼ活性の変化\*

宮竹史仁\*<sup>1</sup>・岩瀬和則\*<sup>2</sup>

Change of superoxide dismutase activity due to combinations of microorganisms  
contributing to dairy cattle manure composting\*

Fumihito MIYATAKE\*<sup>1</sup>, Kazunori IWABUCHI\*<sup>2</sup>

[キーワード] 堆肥化, 乳牛ふん, 微生物, UPGMA 系統樹, スーパーオキシドジスムターゼ活性

[Keywords] composting, dairy cattle manure, microorganisms, UPGMA dendrogram, superoxide dismutase activity

## I 緒言

著者らは堆肥化反応において好気性高温菌の増殖速度, 代謝活性, 有機物分解率が 54°C で特異的に上昇することを見だし, 堆肥化反応の至適温度が 54°C であることを示唆した (Iwabuchi et al., 2001; Miyatake and Iwabuchi, 2001)。しかしながら, 54°C で観測される微生物の高活性が, ある種特定の微生物に依存するものなのか, 或いは複数種の微生物の相互作用に依るものなのか不明である。

そこで本研究では複数種の微生物を混合する組み合わせによって活性が変化するかどうかを確かめた。乳牛ふん堆肥から複数の微生物を 54°C で単離し, それらを分子生物学的手法で分類した。異なる分類区分に属する菌種を混合培養した後, この微生物活性を測定した。ここでは微生物活性の指標としてスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性を用いた。SOD は好気代謝過程で発生する有害な活性酸素種を除去するものであり, この活性が高い場合は活性酸素種を消去することにより微生物の正常な代謝活性を維持し, 逆に低い場合は微生物細胞に損傷を与え, 代謝活性を抑制させることを意味する。

## II 実験方法

### 1. 堆肥化

材料として乳牛ふん堆肥を使用し, 前報 (Iwabuchi and Kimura, 1994) と同様の装置で堆肥化を行った。堆肥化温度を 54°C に設定し, 試料水分が約 60% w.b. に維持するように定期的に水分調整を行いながら 15 日間反応を維持した。

### 2. 微生物の単離

堆肥中の微生物の単離は前報 (Iwabuchi and Miyatake, 2001) と同様の方法で行った。培養後, 60 菌株をランダムに採取し, それぞれ純粋培養を行った。

### 3. 分子生物学的手法と微生物の分類

純粋培養した微生物の DNA は Tanaka et al. (2000) の方法に基づいて抽出した。この DNA から微生物を分類するために分子生物学的手法の一つである RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法 (Williams et al., 1990) を適用した。RAPD-PCR の反応溶液組成は DNA ポリメラーゼ (AmpliTaq Gold; Applied Biosystems, USA) に付随する説明書に従った。プライマーには 10 mer のランダムプライマー (Operon 10-mer kit A, OPA-2, 3, 7, 10, 13; Operon Technologies, Inc., USA) 5 種類を独立に使用した。DNA 断片の増幅には 94°C 1 分間, 36°C 1 分間, 72°C 2 分間を 45 サイクル繰り返した。増幅産物は 1.5% アガロースゲルで電気泳動を行い, 複数の DNA 断片を持つ RAPD プロファイルを得た。この RAPD プロファイルを基に平均距離 (UPGMA) 法 (Sneath and Sokal, 1973) を使用して微生物の分子系統樹 (UPGMA 系統樹) を作成した。近縁度は Nei and Li

\* 2001 年 4 月 第 60 回農業機械学会 (鳥取大学) にて一部講演

\*1 会員、岩手大学大学院連合農学研究科 (配置大学: 山形大学 〒997-8555 鶴岡市若葉町 1-23) The United Graduate School of Agricultural Science, Iwate University (Research campus: Yamagata University, Tsuruoka, 997-8555, Japan)

\*2 会員、宇都宮大学農学部 (〒321-8505 宇都宮市峰町 350 TEL 028-649-5483) Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, Utsunomiya 321-8505, Japan

(1979) の遺伝距離により算出した。

#### 4. 酵素活性の測定

純粋培養した微生物を Trypto-soya (日水製薬, 日本) 培地で 24 時間 54°C で培養を行った。この培養物に 0.2% triton X-100 を含む PBS (phosphate-buffer saline) を混合し, 超音波処理を施した。この混合液を 10,000×g で 30 分間遠心分離し, その上清を酵素活性の測定に用いた。

微生物の SOD 活性は上記の上清を用い NBT(xanthine-xanthine oxidase-nitroblue tetrazolium systems) 法 (Beauchamp and Fridovich, 1977) により測定を行い, その測定値は常法によりタンパク質量で補正した。なお, タンパク質量は Lowry et al. (1951) の方法で測定した。また, SOD 活性の測定値における統計的比較は Bonferroni-Dunn 検定 ( $P < 0.05$ ) で行った。

### III 結果および考察

図 1 に単離した微生物の RAPD プロファイルに基づく UPGMA 系統樹を示した。単離した 60 菌株は, 最終的に A から S までの 19 菌種に枝分かれした。さらに系統樹を巨視的に (近縁度約 50% を基準として) 判断すると I から VII のグループに分類される。菌株数は H, I, J 菌種で多くいずれも近縁状態にあった。それらの菌種が所属するグループ IV は全菌株数の 55% を占めており, 数的には堆肥化における優占微生物であると理解される。

次に, A から S までの菌種のうち複数個の菌株が検出された菌種を対象として SOD 活性を検討した。まず, 個々の菌種の活性を評価するために 1 菌種のみで培養後 SOD 活性を測定した (図 2)。個々の菌種の活性には差があり, S 菌種のように活性が検出されないものも存在した。菌株数で優位的状態であった H, I, J 菌種においては格段高い活性は観察されず, 微生物の活性は数的優占とは無関係である。

一方, 現実的には堆肥化反応中は複数の微生物種が存在し反応を進行させるため, 複数の菌種が活性に及ぼす影響を考慮することが重要である。それゆえ, 複数菌種

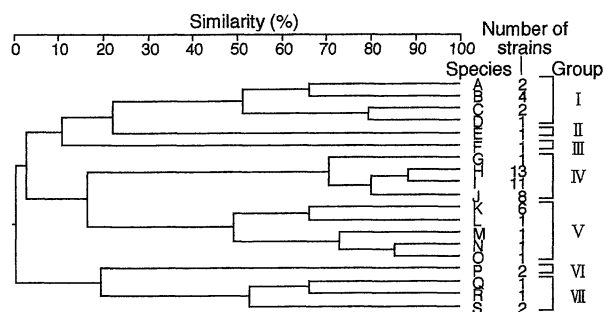


図 1 54°C で単離した微生物の RAPD プロファイルに基づく UPGMA 系統樹  
Fig. 1 UPGMA dendrogram based on RAPD profiles of microorganisms isolated at 54°C

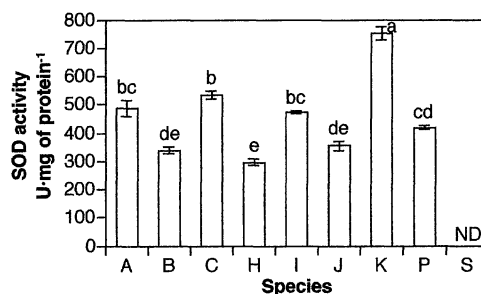


図 2 単菌種の SOD 活性 (n=3)  
データは平均値±標準誤差。同一文字 (a, b, c, d, e) を持つ値は有意差なし ( $p < 0.05$ )。ND; 検出されず。

Fig. 2 SOD activity (n=3) of one species  
The data are expressed as means±standard errors. Values with the same letter (a, b, c, d, e) are not significantly different at a  $p$  value of 0.05. ND; not detected.

の存在が活性に与える影響を検討するために, 複数の菌種を混合培養し SOD 活性を測定した (図 3)。検討された全菌種を混合培養した際の SOD 活性は 469 U/mg of protein であり, 全菌種から B, C, I, K, S 菌種をそれぞれ 1 菌種のみ排除し混合培養した場合でさえも同程度の活性を示した。しかしながら, H, J 菌種をそれぞれ排除した場合 SOD 活性は有意に減少した。さらに, A, P 菌種をそれぞれ排除した場合に至っては, SOD 活性は検出すらされなかった。したがって, 堆肥中の微生物はたとえ 1 菌種の欠落であっても, それらの微生物の相互関係は敏感に活性に反映することを意味する。

以上により, 微生物を混合培養する組み合わせによって SOD 活性が変化することが示された。乳牛ふん堆肥化反応において A と P 菌種は微生物種間の活性維持の

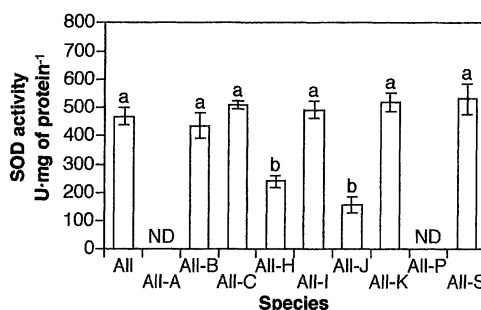


図 3 複数菌種の SOD 活性 (n=3)  
データは平均値±標準誤差。同一文字 (a, b) を持つ値は有意差なし ( $P < 0.05$ )。ND; 検出されず。

Fig. 3 SOD activity (n=3) of complex species  
All is A+B+C+H+I+J+K+P+S, All-x; x means A, B, C, H, I, J, K, P or S. The data are expressed as means ± standard errors. Values with the same letter (a, b) are not significantly different at a  $P$  value of 0.05. ND; not detected.

ためには必要不可欠であり、HとJ菌種が補完的に必要な菌種と考えられる。

### References

- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44, 276-287.
- Iwabuchi, K., Kimura, T., 1994. Aerobic biodegradation of dairy cattle feces (Part 1). *Journal of JSAM*, 56(2), 67-74.
- Iwabuchi, K., Ikeda, Y., Miyatake, F., 2001. Activated temperature of microorganisms contributing to cattle manure composting (In Japanese). 60th proceeding of Japanese Society of Agricultural Machinery, 173-174.
- Iwabuchi, K., Miyatake, F., 2001. Culture conditions for determining microbial population size contributing to high rate composting of dairy manure by using the dilution agar-plate method. *Journal of JSAM*, 63(6), 85-89.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Miyatake, F., Iwabuchi, K., 2001. Search and enzyme activity of microorganisms contributing to composting (In Japanese). 60th proceeding of Japanese Society of Agricultural Machinery, 175-176.
- Nei, M., Li, W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 5269-5273.
- Sneath, P.H. A., Sokal, R.R., 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman & Co., San Francisco, Calif.
- Tanaka, H., Hashiba, H., Kok, J., Mierau, I., 2000. Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum* - biochemical and genetic characterization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2502-2512.
- Williams, J.G.K., Kubelin, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531-6535.
- (原稿受理：2002年10月31日・質問期限：2003年7月31日)

### コメント

#### [読者のコメント]

乳牛ふん堆肥化反応では特定の菌種が発酵に影響を及ぼしていることがわかったが、これは別な材料の堆肥化反応でもそのようなことは言えるのか？

#### [コメントに対する著者の見解]

本研究は乳牛ふん堆肥化反応で見られる現象であり、別な材料の堆肥化においては現時点では不明です。ただし、別な材料、例えば他の家畜ふんや下水汚泥でも同様の結果が得られると考えられ、それには2つの理由があ

ります。1つ目は材料が異なっても堆肥化過程における温度履歴や酸素消費速度などの反応速度は同様の傾向を示すことが知られており、堆肥化に関与する菌相にはそれほど大差がないと思われること。2つ目はどの堆肥化でも高温性バチルスが多く検出されることが知られており、乳牛ふん堆肥化からも同様に検出されることから (Iwabuchi and Miyatake, 2001), 材料の違いは菌種には大きく影響しないと思われること。以上、本研究は乳牛ふん堆肥化反応を対象としていますが、一般的には別な材料においても十分あり得ると考えられます。