

# ナシ剪定枝の堆肥化過程における糸状菌相の変化

鈴木達哉・横山とも子・鈴木 健・伊東靖之

キーワード：ナシ，剪定枝，堆肥化，糸状菌群集構造，アミスギタケCNCB-L1株

## I 結 言

千葉県は、農業粗生産額で全国第一位のナシ産地であり、県内のナシ園から排出される剪定枝は年間 11,000 t 以上と推定される (香取, 2010)。これらナシ剪定枝の処理策として、堆肥化とそのナシ園等への施用は、資源循環的な観点から望ましいといえる。しかし、ナシ剪定枝にはリグニンなど難分解性有機物が多く含まれ、堆肥化してナシ園等に施用するまでには長い時間がかかることから、千葉県内での取り組み事例は限られている (堀越, 2005)。

筆者らは、微生物を利用してナシ剪定枝を早期に分解・堆肥化すべく、アミスギタケ (*Polyporus arcularius*) 菌株 CNCB-L1 株を選抜した (横山・吉井, 2006)。本菌は, *in vitro* で高いナシ剪定枝分解能を有した。しかし、チップ化したナシ剪定枝の堆積時に試験接種したところ、定着及び増殖は困難であった。チップ化したナシ剪定枝には、多種多様な糸状菌が生息していたことから、定着及び増殖が困難だった要因として、他の糸状菌と生息場所や栄養の摂取で競合している、あるいは他の糸状菌から攻撃を受けている可能性が考えられたが詳細は不明である。よって、本菌の利用法を確立するには、まず堆肥化物の微生物相を詳細に調査することが有効であると考えられる。

近年、土壌や堆肥など多種類の微生物が存在する環境試料中の微生物群集構造の調査法として、生物工学的手法である末端制限断片長多型法 (以下、T-RFLP 法とする) が利用されている (渡邊・境, 2005)。本法では、環境試料より抽出した DNA から、対象の微生物群の調査指標となる DNA 断片を PCR で増幅し、制限酵素処理で得られた末端 DNA 断片を電気泳動で分離することで、試料の微生物群集構造の指標となるピークパターン図を得る (澤ら, 2006)。微生物を物理的に分離し、選択的あるいは非選択的な培地上で培養する従来の調査法 (以下、平板培養法とする) では、菌種間での培地上での増殖速度に差があるため微生物相全体を定量的に把握するのは困難である。一方、T-RFLP 法では、

微生物から抽出した DNA そのものを解析対象としているためこの問題は生じない。よって、ナシ剪定枝チップやその堆肥化物の微生物相の調査法として、本法は適していると考えられた。

そこで本研究では、野外でモデル的にナシ剪定枝を堆肥化し、T-RFLP 法を用いてナシ剪定枝チップ及びその堆肥化過程の糸状菌相を調査した。そして、調査結果から CNCB-L1 株の利用法について考察した。

本研究は、県単農林業バイオマス資源化技術開発研究事業「バイオマス資源の活用技術の開発」の一環として行った。本研究を実施するにあたり、当農林総合研究センター「バイオマス資源の活用技術の開発」研究プロジェクトのメンバーから貴重なご助言を頂いた。ここに記して感謝の意を表する。

## II 材料及び方法

### 1. 供試材料

2008 年 1 月 24 日に、ナシ剪定枝 (品種: あきづき, 主に一年生枝) を小型木材粉砕器で平均 1cm 角程度にチップ化した。2008 年 2 月 13 日に、野外に組んだ 90×90×90cm の木枠中にチップを積み込み、表面をシートで被覆した。なお、C/N 比を調整し、腐熟を促進するために、副資材として硫酸を添加した。積み込んだチップは、概ね 1 か月間隔で切り返し、適宜注水した。積み込み前のナシ剪定枝チップ及び、積み込み後 3 か月目 (5 月 14 日)、5 か月目 (7 月 17 日) 及び 7 か月目 (9 月 17 日) の切り返し前に木枠の上部から堆肥化物を採取し、以下の解析に用いた。

### 2. DNA 抽出

1. の採取試料は、よく混合した後に、おおむね 1cm 以上の粗大有機物を取り除き、500mg ずつチューブに小分けして -30°C で冷凍保存した。上記冷凍保存試料から、市販の DNA 抽出キット ISOIL for Beads Beating (ニッポンジーン) を用いて DNA を抽出した。DNA 抽出キットの使用にあたって、試料からの DNA 抽出効率を高めるために、添付マニュアルの手順であるビーズ破碎処理後に、65°C で 1 時間加温する操作を加えた。DNA 抽出は各堆肥化物につき独立して 3 回行い、混合して以下の解析に用いた。

### 3. T-RFLP 法

2. の抽出 DNA 溶液を鋳型として、糸状菌相調査用のプ

受理日 2013 年 8 月 9 日

本報の一部は、日本微生物生態学会 (2009 年 11 月, 東広島市) において発表した。

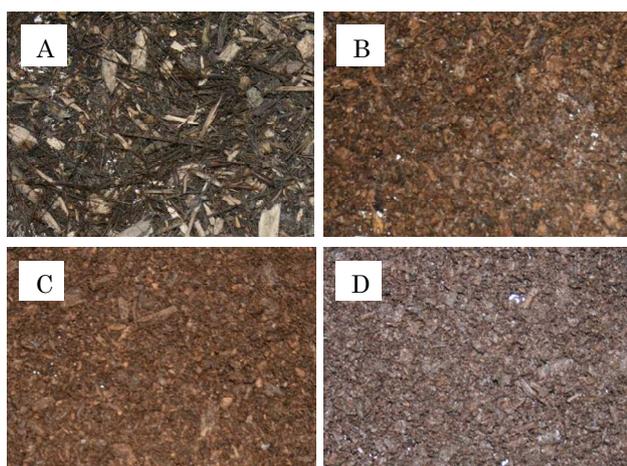


写真1 ナシ剪定枝チップ及びその堆肥化物の様子  
注) (A) 積み込み前のナシ剪定枝チップ, (B) 積み込み後3か月目, (C) 同5か月目, (D) 同7か月目の堆肥化物 (いずれも風乾物)。

プライマーセット (ITS1F (5' -CTTGGTCATTTAGAGGAA GTAA-3' ) (Gardes and Bruns 1993) と ITS4 (5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' ) (Innis et al. 1990) ) を用いて, PCR によりリボソーム DNA の内部転写スペーサー (ITS) 領域の DNA 断片を増幅した。ITS4 の 5' 末端は, 予め FAM 蛍光色素 (Applied Biosystems) で標識した。耐熱性 DNA 合成酵素として GoTaq (プロメガ) を用いた。2. の抽出 DNA 溶液中に含まれる腐植成分による反応阻害を軽減するため, 反応液中に牛血清アルブミン (以下, BSA とする) (タカラバイオ) を終濃度 0.4mg/mL になるように添加した。反応条件は, 95°C2 分の後, 95°C30 秒, 52°C 30 秒, 72°C1 分のサイクルを 30 回繰り返す, 終了時に 72°C 10 分処理とした。増幅した DNA 断片は, Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (プロメガ) を用いて精製した後, その一部を制限酵素 *Msp* I で切断した。切断産物はエタノール沈殿により精製し, 滅菌水に溶解した後, その一部を i-Di ホルムアミド, DNA 断片長スタンダード GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems) と混合した。調製した試料から, 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により, 蛍光標識末端制限断片 (以下, T-RF (複数の場合は T-RFs) とする) を長さに応じて分離しつつ, その蛍光を検出した。さらに, DNA 断片解析ソフトウェア GeneMapper (Applied Biosystems) により, 分離した T-RFs の長さ (bases) 及び検出した蛍光強度を数値化した蛍光ピーク高さを解析し, ピークパターン (横軸に分離・検出された T-RFs の長さを, 縦軸に分離・検出された T-RF の蛍光ピーク高さを示した二次元図) を得た。

#### 4. クローンライブラリ解析

本解析は, 3. で得られた T-RFs の由来となった糸状菌種を推定するために行った。2. の抽出 DNA 溶液を鋳型と

第1表 各試料におけるT-RFsの検出数

試料 (ナシ剪定枝チップ)	T-RFsの検出数 (個)
積み込み前	40
積み込み後	
3か月目	4
5か月目	12
7か月目	16

注) 蛍光ピーク高さ30以上の個数をカウントし, 検出数とした。

して, 3. と同様のプライマーセットを用いて, PCR により DNA 断片を増幅した。DNA ポリメラーゼ, 反応液中への BSA 添加濃度及び PCR の反応条件は, 3. と同様とした。増幅した DNA 断片は, pT7Blue ベクター (Novagen), 大腸菌 DH5 $\alpha$  (タカラバイオ) を用いて, 定法により TA-クローニングを行った。1. の採取試料それぞれにつき, 96 クローンの塩基配列を解読した。塩基配列解読には, BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) 及び 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いた。得られた塩基配列は, 塩基配列解析ソフトウェア GENETYX Ver.8 (ゼネティックス) を用いてアセンブルした後, DDBJ (日本 DNA データバンク) の BLAST プログラムを用いて類似性の高い塩基配列を決定した (Altschul et al., 1990) 。

### III 結 果

#### 1. 供試したナシ剪定枝チップの堆肥化の様子

積み込み前のナシ剪定枝チップ及び, 積み込み後3か月目, 5か月目及び7か月目の堆肥化物の風乾物の様子を写真1に示した。積み込み後3か月目, 5か月目の堆肥は, 全体に茶褐色に変化した。積み込み後7か月目の堆肥は, 全体に黒褐色に変化し, 残存するナシ枝片は容易に指で折れる程度まで腐熟が進んでいた。また, 見かけ上の体積は, 積み込み後7か月目までに, 積み込み時の 2/3 程度に減少した。

#### 2. T-RFLP法による糸状菌相の把握

T-RFLP 法にて検出された T-RFs のうち, 蛍光ピーク高さ 30 以上の T-RFs の検出数を第1表に示した。蛍光ピーク高さ 30 未満のピークは, ノイズの可能性が高いと判断した。積み込み前のナシ剪定枝チップからは 40 個, 積み込み後3か月目, 5か月目及び7か月目の堆肥化物からは, それぞれ 4 個, 12 個, 16 個の T-RFs が検出された。

T-RFLP 法にて得られたピークパターンを第1図に示した。積み込み期間の異なる試料ごとに, 検出された全 T-RFs の蛍光ピーク高さを合計し, その 1/20 以上の蛍光ピーク高さを持つ T-RFs (以下, 主要 T-RFs とする) を

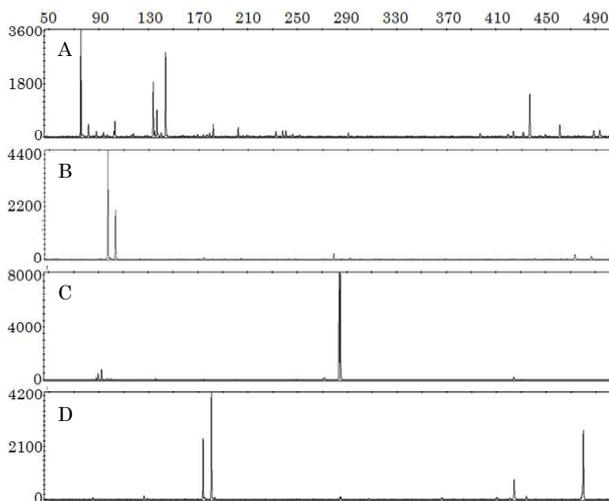
第2表 クローンライブラリ解析によって得られた塩基配列の由来となった糸状菌種の推定

試料 (ナシ剪定枝チップ)	クローン名	割合 <sup>1)</sup> (%)	推定された塩基配列の由来糸状菌種 (アクセッションNo.)	スコア <sup>2)</sup> (bits)	セルロース 分解能 <sup>3)</sup>	リグニン 分解能 <sup>3)</sup>
積み込み前	A	21	Mycorrhizal fungal sp. shyhlc (EU880596)	1049		
	B	19	Aureobasidium pullulans strac (DQ680687)	1140		
	C	14	Alternaria alternata strainc (FJ904919)	1053		
	D	11	Bulleromyces sp. PYCC 5739 1c (AF444670)	1037		
	E	7	Uncultured fungus 18S rRNA gc (AM260879)	1013		
積み込み後 3か月目	F	42	Scedosporium apiospermum gc (AB489076)	1229		
	G	31	Zopfiella karachiensis straic (AY999128)	553	○	
	H	16	Trichoderma longibrachiatum c (EU280095)	1296		
	I	8	Coprinopsis cinerea genes foc (AB097563)	1340		○
	J	7	Cephalotheca foveolata gene c (AB278171)	1090		
積み込み後 5か月目	K	81	Phanerochaete chrysosporiumc (AF475147)	1241		○
	L	4	Uncultured Cercophora clonec (DQ900985)	404		
	M	3	Foliar endophyte of Picea glc (AY561209)	632		
	N	3	Uncultured soil fungus clonec (EU826900)	289		
	O	3	Aspergillus fumigatus isolatc (GQ337429)	533		
積み込み後 7か月目	P	33	Uncultured fungus 18S rRNA gc (AM260852)	220		
	Q	29	Uncultured soil fungus clonec (DQ980587)	486		
	R	18	Uncultured soil fungus clonec (EU826909)	480		
	K	5	Phanerochaete chrysosporiumc (AF475147)	1233		○
	S	4	Cordyceps sinensis strain A1c (EF488439)	775		

注1) 各試料から得られた全塩基配列数に占める当該塩基配列数の割合 (%) を示す。

2) データベース検索をかけた塩基配列と推定された塩基配列との類似性程度を数値化して示す。

3) セルロース分解能及びリグニン分解能の当否は、データベースで確認して示す。



第1図 T-RFLP法によって得られたピークパターン

注1) (A) 積み込み前のナシ剪定枝チップ, (B) 積み込み後3か月目, (C) 同5か月目, (D) 同7か月目の堆肥化物。

2) 縦軸は蛍光ピーク高さを示す。

3) 横軸はT-RFsの長さを50~490basesで示す。

選び、試料間で比較したところ、試料ごとに主要 T-RFs は特異的だった。

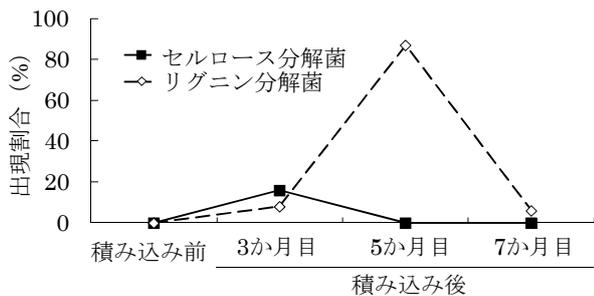
### 3. クローンライブラリ解析による主要糸状菌種の推定

クローンライブラリ解析によって得られたクローンの塩基配列について類似性の高い塩基配列を検索し、その由来となった糸状菌種を推定した結果を第2表に示した。例

えば、積み込み前のナシ剪定枝チップから得られたクローン A は菌根菌由来と推定され、同試料から得られたクローンのうち 21% がクローン A と同様の塩基配列であった。同様に、積み込み前のナシ剪定枝チップから得られたクローン B 及び D は酵母類、クローン C は葉上生息菌にそれぞれ由来したと推定された。積み込み後 3 か月目、5 か月目の堆肥化物から得られたクローン F, G 及び K は、*Scedosporium* 属菌、*Zopfiella* 属菌及びマクワタケ属菌にそれぞれ由来したと推定された。積み込み後 7 か月目の堆肥化物から得られたクローン P, Q 及び R は、土壤等に生息する糸状菌群に由来したと推定された。

### 4. クローンライブラリ解析によって得られた塩基配列と T-RFLP法によって得られたT-RFsとの比較

3. の解析で得られた主要クローンの塩基配列から、当該塩基配列を制限酵素 *Msp* I で切断した際に出現が予想される末端制限断片の長さを計算し、2. で検出された主要 T-RFs へクローンを割り当てた。例えば、積み込み前のナシ剪定枝チップから検出された T-RFs のうち、最も高い蛍光ピークである長さ 74bases の T-RF には、クローンライブラリ解析で最も割合の高かったクローン D を割り当てた。この場合、検出された T-RFs の長さ、クローン D の塩基配列から出現が予想される末端制限断片の長さとの差は、+3 bases だった。同様に、他の主要 T-RFs についても、クローンライブラリ解析によって得られたクローンを割り当てた。これらの長さの差は+1~+4 bases



第2図 セルロース分解菌及びリグニン分解菌の出現割合の推移

注) 各菌の出現割合は、クローンライブラリ解析で得られたクローン数に占める、セルロース分解能あるいはリグニン分解能を有する糸状菌種に由来することが推定されたクローン数の割合とした。

だった(データ未掲載)。

#### 5. セルロース分解能又はリグニン分解能を有する糸状菌群の発生程度の推定

各クローンの推定された由来糸状菌について、セルロース分解能又はリグニン分解能の有無をデータベースで確認し、その結果を第2表に示した。また、各試料から得られた全クローン数に占めるセルロース分解能又はリグニン分解能を有する糸状菌種が由来となったクローン数の割合(以下、セルロース分解菌又はリグニン分解菌の出現割合とする)を第2図に示した。セルロース分解菌の出現割合は、積み込み前のナシ剪定枝チップでは0%、積み込み後3か月目、5か月目及び7か月目の堆肥化物では、それぞれ16.2%、0%、0%だった。一方、リグニン分解菌の出現割合は、積み込み前のナシ剪定枝チップでは0%、積み込み後3か月目、5か月目及び7か月目の堆肥化物では、それぞれ8.1%、81.6%、5.9%だった。

## IV 考 察

本研究では、ナシ剪定枝分解菌 CNCB-L1 株の利用法について知見を得るために、T-RFLP法を用いてナシ剪定枝チップ及びその堆肥化過程の糸状菌相を調査した。

試料中の糸状菌相の調査には、従来、平板培養法を用いるのが一般的だった(加藤・小木曾, 1998)。しかし、平板培養法では、培地上での菌種間での増殖速度の差によって微生物相全体を定量的に把握するのは困難である。一方、糸状菌相をDNAレベルで調査するT-RFLP法では、この問題が生じず、試料に含まれる微生物相の種類とその変遷を把握するのに適している(渡邊・境, 2005)。本研究では、堆肥の糸状菌相変化の把握を目的にしていたため、T-RFLP法を適用した。

今回供試したナシ剪定枝チップの堆肥化物は、堆肥化程

度の目安となるC/N比の変化等の測定は行っていないが、観察から積み込み期間に応じて木質成分の分解が進んだことが確認された(写真1)。また、積み込み後7か月目の堆肥は、藤原(2003)の指標に従い、指での剪断性を調査したところ、熟成状態に達したと推察された。よって、今回供試した試料は、堆肥化過程の初期から後期に亘っての糸状菌相を調査するのに適していたと考えられる。

T-RFLP法によって検出された各試料のT-RFsの検出個数から、積み込み前のナシ剪定枝チップでは、多種の糸状菌が存在し、特定の糸状菌による優占度合いは比較的低いと推察された。これに対し、堆肥化過程のそれでは、特定の糸状菌による優占度合いが高まったと推察された(第1表)。さらに、T-RFLP法で得られたピークパターン図の試料間での比較から、ナシ剪定枝チップの堆肥化過程を通じて常時出現する糸状菌はほとんどなく、堆肥化の進展に伴って糸状菌相全体に大きな変化が起きたと考えられる。これらと同様の傾向は、2009年の冬に積み上げたナシ剪定枝堆肥のT-RFLP解析でも確認された(データ省略)。これら傾向が一般的なものかどうかについては、今後さらに調査点数を増し、検討する必要がある。

T-RFLP法によって検出された各試料の主要T-RFsについて、クローンライブラリ解析によって得られたクローンを割り当てたところ、両者の長さには+1~+4basesの差が認められた。Pandeyら(2007)は、T-RFLP法において検出されたT-RFsは、そのDNA断片に蛍光色素が付着しているため、電気泳動度が若干異なる、すなわち検出される長さが実際の長さから若干ずれることを示している。今回の割り当てで確認され、T-RFLP法で検出されたT-RFの長さと、割り当てられた塩基配列から予想された末端制限断片の長さとの差も、上記と同様の理由により生じたと推察される。

T-RFLP法及びクローンライブラリ解析によって推定された各試料の主要糸状菌種のうち、セルロース分解能又はリグニン分解能を有する糸状菌種の出現割合から、ナシ剪定枝の堆肥化の初期には、セルロース分解菌が優占種となり、中後期には、リグニン分解菌が優占種となったと考えられる(第2図)。一般に、木質物の堆肥化過程では、セルロースの分解に比べてリグニンの分解は遅れるとされている(藤原, 2003)。今回得られた、セルロース分解能又はリグニン分解能を有する糸状菌種の出現割合から予想される優占種の推移は、この知見と合致するものだった。

T-RFLP法及びクローンライブラリ解析によって推定された、各試料の主要糸状菌種の中で、マクカワタケ属菌は、CNCB-L1株と分類上の位置づけ及び栄養特性が近い菌であり、その発生活長はCNCB-L1株を接種して、ナシ

剪定枝チップに定着させる際の参考になると考えられる。両菌はともに、リグニン分解能が非常に高い白色腐朽菌である（横山・吉井，2006；杉浦ら，2010）。マクカワタケ属菌は、積み込み後のナシ剪定枝チップでは発生が認められず、積み込み後5か月目に高い優占度を示した。このことから、CNCB-L1株を接種しても、積み込み時あるいは積み込み後間のないナシ剪定枝チップでは定着させることは困難であるものの、積み込み後数か月目の時期、例えば、本研究に用いた堆肥では、3～5か月の間であれば、定着させられる可能性があることが示された。今後は、本研究で得られた示唆を参考に、積み込み期間の異なる堆肥化物に対して、さまざまな量のCNCB-L1株接種を行い、最適な接種時期や接種量についてさらに検討していく必要がある。

## V 摘 要

野外でモデル的に堆肥化したナシ剪定枝を材料に、T-RFLP法を用いてナシ剪定枝チップ及びその堆肥化過程の糸状菌相を調査した。さらに、上記のデータから、ナシ剪定枝分解菌CNCB-L1株の利用法について考察した。

1. 積み込み前のナシ剪定枝チップでは、多種の糸状菌が存在し、特定の糸状菌による優占度合いは比較的低かったのに対し、堆肥化過程のそれでは、特定の糸状菌による優占度合いが高まったと考えられた。
2. 積み込み後3か月目のナシ剪定枝チップではセルロース分解菌の出現が、積み込み後5か月目のナシ剪定枝チップでは、リグニン分解菌が出現したと考えられた。
3. CNCB-L1株と栄養特性の近い白色腐朽菌のナシ剪定枝チップの堆肥化過程における発生消長から、CNCB-L1株をナシ剪定枝チップ又はその堆肥化物に接種し、定着させるには、積み込み後数か月目の時期に接種する必要があることが示唆された。

## VI 引用文献

Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 : 403–410.

藤原俊六郎 (2003) 堆肥のつくり方・使い方. 152pp. 農文協.

Gardes, M. and T.D. Bruns (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2 : 113–118.

堀越明 (2005) 県内ナシ剪定枝処理の現状と資源循環的な活用法. <<http://www.pref.chiba.lg.jp/ninaite/fukyushidou/kenkyuu-h17/documents/h17nasisennteisi.pdf>>

Innis, M.A., D.H. Gelfand, J. J. Sninsky and T.J. White (1990) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. pp 315–322. Academic Press.

加藤博美・小木曾正敏 (1998) 豚ふん堆肥の一次発酵における微生物相の特性. 土肥講演要旨集. 44 : 311.

香取茂夫 (2010) なし剪定枝処理に関する対策の現状. <<http://www.pref.chiba.lg.jp/ninaite/network/h20-fukyuu/nashisentei.html>>

Pandey, J., K. Ganesan, and R.K. Jain (2007) Variations in T-RFLP profiles with differing chemistries of fluorescent dyes used for labeling the PCR primers. *J. Microbiol. Methods.* 68 : 633–638.

澤島弘・柴田均・増永二之・松本真悟・山本達之・稲田郷・田中利幸 (2006) T-RFLP をもちいた微生物群集構造の解析方法. 特許情報. 特開 2006–94803 (P2006–94803A).

杉浦立樹・山岸賢治・平井浩文・河岸洋和 (2010) 高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株における新規リグニンペルオキシダーゼ高発現株のリグニン分解特性. 木材学会誌. 56 : 382–387.

横山とも子・吉井幸子 (2006) ナシ樹木廃材分解剤及びナシ樹木廃材分解方法. 特許情報. 特開 2006–272114 (P2006–272114A).

渡邊克二・境雅夫 (2005) 7. 土壌微生物の群集構造解析(その3) MERFLP法とT-RFLP法, 原理と適用(土壌中の遺伝子・遺伝子情報…何ができるのか, 何がわかるのか). 土肥誌. 76 : 925–927.

## Changes in Fungal Community Structure during Composting of Pear Branch Prunings

Tatsuya SUZUKI, Tomoko YOKOYAMA, Takeshi SUZUKI and Yasuyuki ITO

Key words : composting, fungal community structure, pear, *Polyporus arcularius* strain CNCB-L1, branch prunings

### Summary

To find an efficient method for inoculating waste wood from pear trees with *Polyporus arcularius* strain CNCB-L1, which is capable of efficiently decomposing this wood, we investigated the changes in fungal community structure during composting of pear branch prunings. Fungal community structure was assessed by using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP).

1. Fewer peaks were detected by T-RFLP profiling of pear branch prunings after the start of composting than before. This suggested that specific fungi became predominant during composting.
2. Cellulolytic fungi predominated on pear branch prunings 3 months after the start of composting, whereas lignin decomposing fungi predominated 5 months after composting began.
3. These results imply that if inoculation with *Polyporus arcularius* strain CNCB-L1 were performed not before composting but some months after the start, it may be possible to grow this strain on pear branch prunings.