

## 堆肥の高窒素化のための微生物分離方法の開発

山本 忠\*

堆肥の有効利用を進めるためには、肥料に窒素成分を保持する技術を検討した。堆肥を分解する際に菌体内あるいは体外に窒素を保持する微生物を検索することとして、分別方法を検討した。たんぱく質染色方法とソフトアガー重層法を組み合わせることで、簡単な高窒素生産菌の分別方法開発の可能性が見出せた。

キーワード : 微生物、堆肥、たんぱく質

## Development of the Microorganism Separation Method for a Raise in the Nitrogen of Compost

YAMAMOTO Tadashi

In order to advance effective use of a compost, the technology of holding a nitrogen ingredient was examined. When disassembling a compost, the judgment method was examined as searching the microbe which holds nitrogen to the microorganism inside of the body or the outside of the body. By combining the protein dyeing method and a soft agar multistory method, the possibility of the judgment method development of an easy high nitrogen production microorganisms was able to be found out.

key words : microorganism, compost, protein

### 1 緒 言

岩手の農業の方向は、土づくりによる有機農産物・減農薬で差別化を図ろうとしている<sup>1)</sup>。そのために、牛糞の堆肥の高窒素化が出来れば有益である。有機農産物の有機表示には化学肥料ではなく、有機肥料の使用が前提である。また、減農薬農産物と表示するためには、慣行法の1/2の使用量という基準をクリアしなければならない。その減農薬には、耐病性を上げるための土づくりが重要である。現在の牛糞堆肥は、窒素が少ないためそのままでは特殊肥料の表示ができない。家畜排泄物を土づくりの役割から本格的な肥料への利用に転換を図ることが出来れば表示の問題を解決できる。岩手県では、土づくりのみでは、堆肥の充足率が197%となり、大幅な過剰となる。しかし、肥料としての活用まで利用範囲を広げると充足率90%とされている。

本研究では、農業サイドの要望に対応して堆肥の肥料化を目指した高窒素化となる微生物検索技術である。特に、牛糞堆肥の窒素濃度を上げて、鶏糞のような特殊肥料の認定を狙うこととした。それにより、特殊肥料の認定を受けることが出来れば、他の認定肥料との混合が可能となる。その結果、肥料製造現場で成分が補完できるので肥料として利用しやすいこととなる。

また、堆肥を減容化すると、その保管容積が削減できるの

で保管費用の点で有利となる。また、農地への散布作業の負荷が軽減されるため、農家での利用の促進につながる。

堆肥を高窒素化するために、たんぱく質を菌体内に多く保持するか培地に多量に分泌する菌の分離方法開発の視点で検討したのでその結果を報告する。

### 2 実験方法

#### 2 - 1 堆肥化微生物分離試験に用いた土壌

市販の堆肥と土壌改良材および発酵過程の堆肥を微生物の分離源として使用した。

#### 2 - 2 微生物試験法

衛生試験法・注解<sup>2)</sup>に基づいて試験を行った。微生物分離の基本は、ポテトデキストロース寒天培地(日水製薬製)あるいはトリプトソーヤ寒天菌培地を用いて25、3日間培養で測定した。

また、放線菌分離用には、Actinomycetes Isolation Agar (Difco 製)にシクロヘキシミドとグリセロールを添加して作成し、35、3日間培養して測定した。

#### 2 - 3 たんぱく質検出用培地

一次分離用としては、微生物を生育させた培地上に微生物がコロニーを形成したプレートへ、たんぱく質検出色素を含む寒天を重層した。重層用寒天としては、培地用寒天を0.3%でオートクレーブしたもの、あるいは電気泳動用

\* 食品技術部 (現在 企画情報部)

低融点寒天(TAKARA LO3)を0.3%として電子レンジ溶解したものを使用した。

重層培地に用いるたんぱく質検出色素は、BCA法の市販試薬であるプロテインアッセイ試薬BCA(PIERCE製)を10倍希釈して使用した。

表1 BCA試薬染色で重層に用いた寒天培地の相違による微生物生存率の比較

| 寒天の種類     | 植付け菌数 | 生育菌数 | 生育率(%) |
|-----------|-------|------|--------|
| 培地用の寒天重層法 | 50    | 16   | 32     |
| 低融点の寒天重層法 | 50    | 44   | 88     |

### 3 結 果

#### 3-1 培地用寒天による重層の検討

プロテインアッセイ試薬BCAを用いて試験とした。BCA溶液にnakaraiの寒天を0.3%加え、121、15分オートクレーブ後に寒天培地に重層を試みた。BCA溶液のpHが高いため、重層を試みた寒天はうまく固まらなかった。

次にBCA溶液の濃度や寒天濃度を変えて、混合しないでオートクレーブ後混ぜ合わせて重層するなどの方法を試みた。寒天濃度を2%程度にすれば固まるが、この濃度では培地の温度を低くすると培地に流す前に固まり、高い温度のままで流すと微生物の発現数に問題が生じ、有効な重層は出来なかった。

#### 3-2 電気泳動用寒天による重層の検討

高濃度の寒天では、使用できる温度に下がるまでに凝固するので、その問題を解決するため低融点の寒天を用いて重層法を試みることにした。低融点の寒天として、電気泳動用低融点寒天(TAKARA LO3)を用いた。寒天濃度を0.3%として電子レンジ溶解して、重層平板培地にして使用した。LO3は融点が37と低いので、温度が十分に下がってからコロニーにかぶせることが出来た。

また、コロニーの周辺が強く染まるものとコロニー自体が強く染まるもの両方染まるものなどの現象が見られた。

#### 3-3 重層染色コロニーの生存率

重層法により染色したコロニー50個をトリプトソーヤ寒天培地の平板培地に竹串で突いて生存率を比較し、表1に結果を示した。この結果は、1回の試験によるものであり、さらに検討を要するが、培地用の寒天を用いた重層法の移植先培地での生存率32%に比べ、低融点の電気泳動用の寒天を用いた重層法では、移植先の培地での生存率が88%と大幅に改善することができた。

### 4 考 察

本研究の目的は、堆肥製造時に高窒素化となる微生物検索技術の開発であり、たんぱく質を菌体内に保持するか培地に分泌する微生物分離操作の効率化とした。

微生物分離操作効率化の鍵となるたんぱく質の定量にBCA法を用いた理由は以下のとおりである。BCA法はアルカリ側では、BicinchoninateがCuとコンプレックスを形成して紫色を形成することを利用しており、実際の操作では、試薬のpHが強いアルカリ性のため堆肥製造時のアンモニア発生などの条件に耐える微生物選択に有効と考えている。

BCA法はいくつかのあるたんぱく質の定量法の中でも、溶液の場合はLowry法と比較して妨害物質の影響を受けにくく、感度は0.1~1mg/mlといわれており、感度が高い点が評価されている。しかし、高濃度のたんぱく質だけを染色していると言いたい点もある<sup>3)</sup>ので合わせて検討を進めたい。

今回の方法では、BCA試薬を10倍希釈していること及び寒天を加えたことでたんぱく質の定量性の範囲が変動していると考えられるので、定量性の確認が必要である。また、染色の範囲が、細胞外分泌物と表層だけに留まっているのかなどを含め微生物選択の手段として用いるにはさらに検討が必要である。

本研究は、平成15年度の基盤的先導的研究事業でおこなった。

### 文 献

- 1) 岩手県農業・農村基本計画：(1999)
- 2) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，金原出版(1990)
- 3) タンパク質実験法，p.27，祥土社(1996)