

## 下水汚泥中のバチルス属細菌を利用した土壌改良資材の開発

長岡技術科学大学大学院 (学) ○品川 歩生, (学) 金子 知世  
 (正) 幡本 将史, (正) 牧 慎也, (正) 山口 隆司  
 群馬工業高等専門学校 (正) 青井 透

## 1. はじめに

下水汚泥は量・質共に安定して発生し、下水管で処理場に集められる集約型バイオマスである。しかし、下水汚泥の有効利用は建設資材としての利用が大部分を占めており、農業利用の割合は1割程度に止まっている<sup>1)</sup>。今後、更に下水汚泥の農業利用を拡大していくためには、従来の堆肥利用のみならず、付加価値をつけた製品の開発が重要であると考えられる。

バチルス属細菌は一部のし尿処理場の活性汚泥内で優占化が報告されている。また、バチルス属細菌は植物病害の原因の一つであるフザリウム属に対し生育抑制効果を持つことが知られている。以上のことから、バチルス属細菌が優占している汚泥を用いることで、植物病害に対し阻害効果を持つ土壌改良資材の製造が可能であると考えられる。本研究では、原料にバチルス属細菌が優占している下水汚泥を用いることで、バチルス属細菌を人為的に接種せずに植物病害を抑制する土壌改良資材の作成を目的とし、植物試験を行い作成した資材の植物病害抑制効果を確認した。

## 2. 実験方法

## 2.1. 下水汚泥の定量

## (1) 分析試料

分析試料は複数の農業集落排水処理施設・都市下水処理施設および養豚場の排水処理施設から採取し、解析に供した。

## (2) 平板培養法

分析試料を $10^3 \sim 10^5$ に段階希釈し、それぞれ無菌的にNA培地（ニュートリエントブロス8g/L, グルコース8g/L, 溶性デンプン10g/L, 食塩6g/L, 寒天17g/L）へ100μL滴下し、コンラージ棒で均一に塗

り広げ、恒温槽で32℃前後に保ち2日間培養を行なった後にコロニー形状を観察した。

## (3) リアルタイムPCR法

バチルス属に特異的なプライマーペア B360F-B513R<sup>2)</sup>を用いサイバーグリーンPCRアッセイ法によるリアルタイムPCRを行なった。始めに95℃で10分間酵素の活性化を行なった後、95℃で15秒、65℃で1分の2ステップ反応を40サイクル繰り返した。

## 2.2. 栽培実験による植物病害抑制効果の評価

## (1) 実験材料

病原菌には *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* Naka-1 の純粋菌株を用いた。植物はハウレンソウを使用し、室内温度20℃の環境下で、照度5000 Lxの照明付培養棚で3週間栽培を行った。また、コンポスの原料として下水余剰汚泥と副資材に杉バークを用い、生ごみ処理機へ投入し43日間に渡りコンポスト化を行ったものを土壌改良資材として用いた。

## (2) 栽培実験

土壌には黒ボク土を121℃、20分間高圧滅菌して用いた。堆肥は作成した土壌改良資材と市販のバーク堆肥を用いた。堆肥と土壌が体積比で1:10になるよう混合した。実験はバーク堆肥(BF)、土壌改良資材(CF)、滅菌土壌改良資材(SCF)の3系列で行い、栽培終了時のハウレンソウ病害発生と比較を行った。栽培終了後、葉の黄化および萎凋の程度から、病徴を0~3の階級に類別し病徴指数を次の式を使って算出した<sup>3)</sup>。0は健康体、1は葉がわずかに変色・変形、2は葉が明らかに変色・変形、3は枯死を示す。

$$\text{病徴指数} = \frac{\sum (\text{階級値} \times \text{該当階級葉数})}{3 \times \text{展開葉数}} \times 100$$

キーワード 下水汚泥, バチルス属細菌, コンポスト

連絡先 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1 長岡技術科学大学 水圏土壌環境研究室 Tel 0258-47-1611

### 3. 実験結果および考察

平板培養法により得られたバチルス属細菌数を図1に示す。全19試料中、林N1、林N2、西寧、北京におけるバチルス属細菌数は $10^5 \sim 10^7$  CFU/dry-gであった。それ以外の15試料ではバチルス属細菌数が $10^8$  CFU/dry-g以上であり、バチルス属細菌が優占化していることが示唆された。また、同様にリアルタイムPCR法によって得られたバチルス属細菌のコピー数を図2に示す。平板培養法と同様の傾向が見られ、リアルタイムPCR法がバチルス属細菌のモニタリングに有用であることが明らかになった。

ハウレンソウ栽培前後でのバチルス属細菌濃度、フザリウム濃度を表1に示す。土壌改良資材(CF)のバチルス属細菌濃度は栽培前は $9.0 \times 10^6$  CFU/dry-g、栽培後は $7.8 \times 10^6$  CFU/dry-gであった。バーク堆肥および滅菌土壌改良資材(SCF)のバチルス属細菌濃度は検出限界以下であった。土壌中のバチルス属細菌濃度は $10^6$  CFU/dry-gで植物病害抑制効果が得られると推定されており<sup>4)</sup>、CFにおけるバチルス属細菌濃度はこの濃度以上であることがわかった。フザリウム濃度は栽培前ではBF、CF、SCFそれぞれ $1.5 \times 10^5$ 、 $1.4 \times 10^5$ 、 $5.7 \times 10^5$  CFU/dry-gであり、栽培後には $6.5 \times 10^4$ 、 $5.0 \times 10^4$ 、 $3.6 \times 10^5$  CFU/dry-gとなった。栽培後にBFとCFではフザリウム濃度が減少した。SCFのフザリウム菌濃度は栽培前後で大きな変化は見られなかった。栽培後の各系における発病度を図3に示す。SCFでは枯死しているハウレンソウが多く発病度も高い結果となった。栽培後にフザリウム濃度が減少したCFおよびBFの発病度は低い傾向が確認できた。BF中にはバチルス属細菌が少ないにもかかわらず発病度が低くなっていたことから、バチルス属細菌以外の菌が発病抑制に関与している可能性が示唆された。また、本研究ではバチルス属細菌全体量のみを調査しているため、バチルス属細菌の中でも特に拮抗作用を有する種類に着目することでより高い発病抑制効果が得られる可能性がある。

### 4. まとめ

- ・土壌改良資材は、植物病害抑制効果が期待できた。
- ・拮抗作用を有するバチルス属細菌を利用することで高い発病抑制効果が得られる可能性が示唆された。

### 参考文献

- 1) 環境省ホームページ,  
<http://www.env.go.jp/press/files/jp/104386.pdf>
- 2) 伊与ら, 用水と廃水 第52巻 第12号, 971-981, 2010
- 3) 雨宮ら, 土と微生物 第33巻, 27-34, 1989
- 4) 中崎ら, 廃棄物学会論文誌 第8巻 第4号, 166-174, 1997

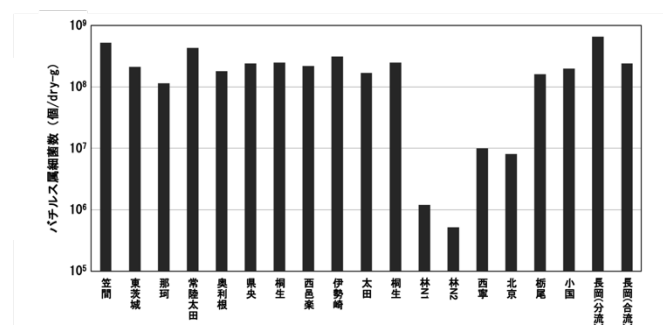


図1 各試料におけるバチルス属細菌数

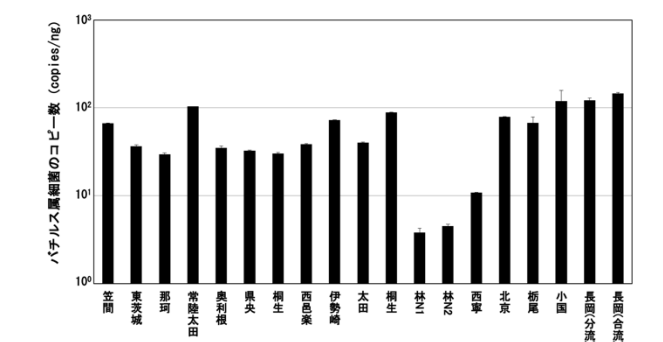


図2 各試料におけるバチルス属細菌のコピー数

表1 ホウレンソウ栽培試験における  
バチルス・フザリウム菌濃度

|                                  | BF                | CF                | SCF               |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 栽培前                              |                   |                   |                   |
| <i>Bacillus</i> 濃度 (CFU/dry-g)   | —                 | $9.0 \times 10^6$ | —                 |
| <i>Foxysporum</i> 濃度 (CFU/dry-g) | $1.5 \times 10^5$ | $1.4 \times 10^5$ | $5.7 \times 10^5$ |
| 栽培後                              |                   |                   |                   |
| <i>Bacillus</i> 濃度 (CFU/dry-g)   | —                 | $7.8 \times 10^6$ | —                 |
| <i>Foxysporum</i> 濃度 (CFU/dry-g) | $6.5 \times 10^4$ | $5.0 \times 10^4$ | $3.6 \times 10^5$ |

— : 検出限界以下

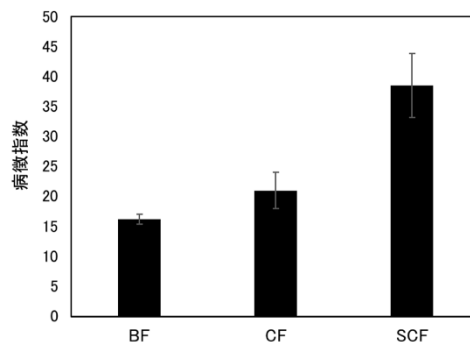


図3 栽培後のフザリウム病害発病度