

高付加価値マッシュルーム栽培に向けた新規下水汚泥堆肥作製と微生物学的知見の収集

都城高専（学）○黒木和雄（非）高津佐愛実（正）黒田恭平 鹿児島高専（学）徳田裕二郎（正）山田真義（正）山内正仁
長岡技術科学大学（正）幡本将史（正）山口隆司 鹿児島大学名誉教授（非）八木史郎

1. はじめに

我々の研究グループでは、下水汚泥を活用した食用きのこ栽培の研究を行っており、これまでヒラタケ・マッシュルームの栽培に成功している。マッシュルーム栽培では下水汚泥堆肥を牛糞堆肥と併用し、密度が大きく吸水率が低いピートモスを覆土として利用することで、子実体の収量が従来法（牛糞堆肥 100%）と比較して 1.5–1.7 倍に増加することを確認すると共に¹⁾、マッシュルーム経営指標（150–250 kg/1000 kg 堆肥）²⁾と同等の収量を得ることに成功している。さらに、マッシュルーム栽培後の廃培地をチンゲンサイの栽培に利用することで、慣行の堆肥と同等の収量等を得ることが可能であった³⁾。一方で、流通している下水汚泥堆肥の C/N 比は 6–8 と低く、マッシュルーム栽培に求められる C/N 比の 17–20 に達していないこと、マッシュルーム菌糸が伸長期間において、栄養として利用されるリグニンやセルロースが牛糞堆肥に比べて少ないことが課題となっている。特にリグニンは牛糞堆肥と比較して 1/5 程度と非常に少ないことから、C/N 比が高く、リグニンやセルロースを多く含む広葉樹おが屑などを培地に利用することでマッシュルームを栽培する必要があるのが現状である。そのため、C/N 比が高く繊維量の多い下水汚泥堆肥を作製することができれば、マッシュルーム栽培培地中の下水汚泥堆肥の割合を高めることができ、下水汚泥の利用拡大に貢献できると考えた。また、マッシュルーム菌糸はリグニンなどの他に放線菌などを捕食することが報告されている。下水汚泥堆肥と牛糞堆肥では、好熱性細菌を含む *Bacillales* 目に属する微生物の存在割合に差異が確認されていることから、これら細菌の動態を知ることによって下水汚泥堆肥の最適化にも繋がると考えられる。本研究では、マッシュルーム菌糸の生態を考慮した新たな下水汚泥堆肥の作製とその化学・微生物学的特徴の評価を目的とした。

2. 実験方法

2.1 下水汚泥堆肥と混合堆肥の調製

表-1 に各試験区の堆肥組成を示す。試験区 1（下水汚泥堆肥）は、下水汚泥（脱水汚泥）、畑土、土壌改良資材（タテヤマユキ）を用いて調製した。試験区 2（混合堆肥）では、試験区 1 の資材に竹おが屑、米糠、甘藷焼酎粕原液を加えたものを混合堆肥とした。試験区 3（新規混合堆肥）は、試験区 2 の組成から畑土や土壌改良資材を除き、甘藷焼酎粕に乾燥固形物を用いて調製した。堆肥材料は混合後、堆積させて発酵を行った。発酵を均一化させるために堆積物の中心温度が約 80℃に到達後、切り返しを行い、合計 3 回の切り返しを行った。堆肥のサンプリングは、切り返しごとに表部（堆肥表面から 30cm）、中部（60cm）、中央部（90cm）の 3 カ所で採取した。

2.2 調製した堆肥の成分特性評価

調製した試験区 1, 2 の堆肥は水分率（常圧加熱水分法）、一般成分〔粗蛋白質：ケルダール法、粗脂肪：エーテル抽出法、粗灰分：直接灰化法、粗繊維：ろ過法、可溶無窒素物：100 – (水分 + 粗蛋白質 + 粗脂肪 + 粗灰分)〕、無機成分（P₂O₅：バナドモリブデン酸アンモニア法、K₂O、MgO、CaO：原子吸光法）および重金属成分（As, Cr, Cd, Pb, Al, : ICP 質量分析法、Hg：還元気化法、Cu, Zn, Ni：原子吸光法）の分析を行い、成分特性を評価した。C/N 比は堆肥中の全炭素量と全窒素量から算出し、リグニン、セルロース、ヘミセルロースは P. J. Van Soest らの方法で定量した⁴⁾。

2.3 生菌数測定

各試験区において、マッシュルーム栽培過程における堆肥中の生菌数測定は切り返しごとに採取した試料を用いて混釈法で行った。培地は Nutrient Broth : Beef Extract 3 g · L⁻¹, Peptone 5 g · L⁻¹ (Difco) と Agar Noble : 1.5% (Difco) を使用した NB 寒天培地とこれを 100 倍希釈した DNB 寒天培地で生菌数測定を行った。採取した試料 1 g を 9 mL の滅菌生理食塩水に懸濁し、電動のハンディホモジナイザーで固形物が分散するまで処理を施した。培養は 30℃で行い、NB 培地は培養 5 日後、DNB 培地は 18 日後にコロニー数の測定を行った。

2.4 16S rRNA 遺伝子解析による微生物群集構造解析

試験区 1, 2, 3 において、堆肥調製後や切り返しごとに採取した試料を FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) を用いて DNA 抽出し、PCR 増幅を行った。プライマーセットには、原核生物を対象とした Univ515F–Univ909R を使用した。増幅産物は、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製後、MiSeq (Illumina) および MiSeq reagent kit v3 を用いた DNA シークエンス解析を行い、QIIME 2 を用いたデータ解析を実施した。

3. 結果及び考察

試験区 1, 2 の一般成分、無機成分の分析結果より、試験区 2 の C/N 比の値は 13 を示し、試験区 1 の 2.17 倍の数値となった。試験区 2 の無機成分は試験区 1 より 1.45–2.50 倍の値を示しており、マッシュルームの子実体形成に必要な

表-1 各試験区の堆肥組成

試験区		堆肥材料(乾物重量(%))						
		下水汚泥	竹おが屑	米糠	甘藷焼酎粕乾燥固形物	甘藷焼酎粕原液	畑土	土壌改良資材
1	下水汚泥堆肥	44.1	—	—	—	—	—	55.9 *
2	混合堆肥	11.1	8.3	5.6	—	2.8	47	25.1
3	新規混合堆肥	40	30	20	10	—	—	—

* 畑土と土壌改良資材を合わせた数値

カリウムが最も増加していた。また、繊維成分と重金属含有量の分析結果より、試験区2における繊維量はリグニンが4.4 g/100g-dry (試験区1の1.3倍)、セルロースが10.4 g/100g-dry (2.0倍)であった。ヘミセルロースは定量限界値以下であり、どちらの試験区でも検出されなかった。重金属は全て値において汚泥肥料公定規格の最大許容最大量以下であった。これらのことより、おが屑や米糠を用いることで、マッシュルーム栽培に適した高いC/N比やカリウムを多く含む堆肥の作成が可能であった。NB培地を用いた生菌数測定の結果、試験区1表部の平均菌数は 2.04×10^9 (cfu/g-wet)、試験区2表部の平均菌数は 1.34×10^{10} (cfu/g-wet)であった。これは、米糠や焼酎粕などの微生物の栄養分が豊富に含まれていることから混合堆肥の方で菌数が増えたと考えられる。全ての試験区においてNB培地での平均菌数は、DNB培地の平均菌数を上回ったことから、堆肥中では富栄養性の従属性栄養性細菌が多く生息していることがわかった。また、切り返しごとの生菌数は、切り返しごとに減少しているものや1回目から2回目では増加しているが、3回目には減少しているものが確認できた。これは堆肥化の過程において、発酵開始時は培地基材中の糖やアミノ酸などの易分解性物質を分解するため菌数が増加し、発酵終了時にはリグニンなどの繊維分である難分解性物質が残り、これを分解できる菌が限られているため減少したと考えられる。図-1は各試験区の堆肥化過程における目レベルの微生物群集構造解析結果を示す。試験区1では、Clostridiales目に属する微生物群が優占して存在していた(切り返し1回目: 20.2%, 2回目: 12.4%, 3回目: 21.6%)。Clostridiales目に属する嫌気性細菌やBacillales目に属する通性嫌気性であるMassilibacterium senegalenseの近縁種(相同性98%, 存在割合: 1.0-14.5%)などが存在していることから、試験区1は嫌気発酵が行われていたと考えられる。一方で、試験区2では放線菌を含むActinomycetales目に属する微生物群が優占して存在しており(1回目: 32.1%, 2回目: 33.5%, 3回目: 35.2%), 特にActinomadura属が存在していた。試験区3では、Bacillales目が優占して存在しており(1回目: 20.8%, 2回目: 62.5%, 3回目: 80.3%), Bacillales目の高温性細菌Cerasibacillus quisquiliarumの近縁種(相同性95%, 存在割合: 0.5-56.0%)やSinibacillus soliの近縁種(相同性98%, 存在割合: 0.2-26.8%)などが優占していることより、他の試験区と比較して発酵時の温度が高い状態であったと考えられる。また、おが屑を充填材とした小型コンポスト化装置内ではBacillales目細菌が優占化することが報告されており⁵⁾、堆肥材料である竹おが屑の割合も影響を与えたと考えられる。

4. まとめ

本研究では、おが屑や焼酎粕を用いることでC/N比やカリウム量の高い新規下水汚泥堆肥を作製することができた。微生物群集構造解析の結果、堆肥中に放線菌やBacillales目が優占して存在することを確認した。マッシュルーム菌糸が放線菌を捕食することは報告されているが、これらの菌の存在割合の差がマッシュルーム栽培にどのような影響を与えるか不明であるため、今後、作製した堆肥を用いたマッシュルーム栽培試験を行うことでその影響を明らかにしていく予定である。

参考文献

1) 山内正仁ら, 土木学会論文集G, (環境), 2017, 2) 岡野寛浩ら, 日本きのこ学会誌, 2004, 3) 山田真義ら, 土木学会論文集G, (環境), 2018, 4) P. J. Van Soest etc.: Proc. Nutr. Soc., 32, p.123, 1973, 5) 渡邊啓子, 創価大学博士論文, 2008

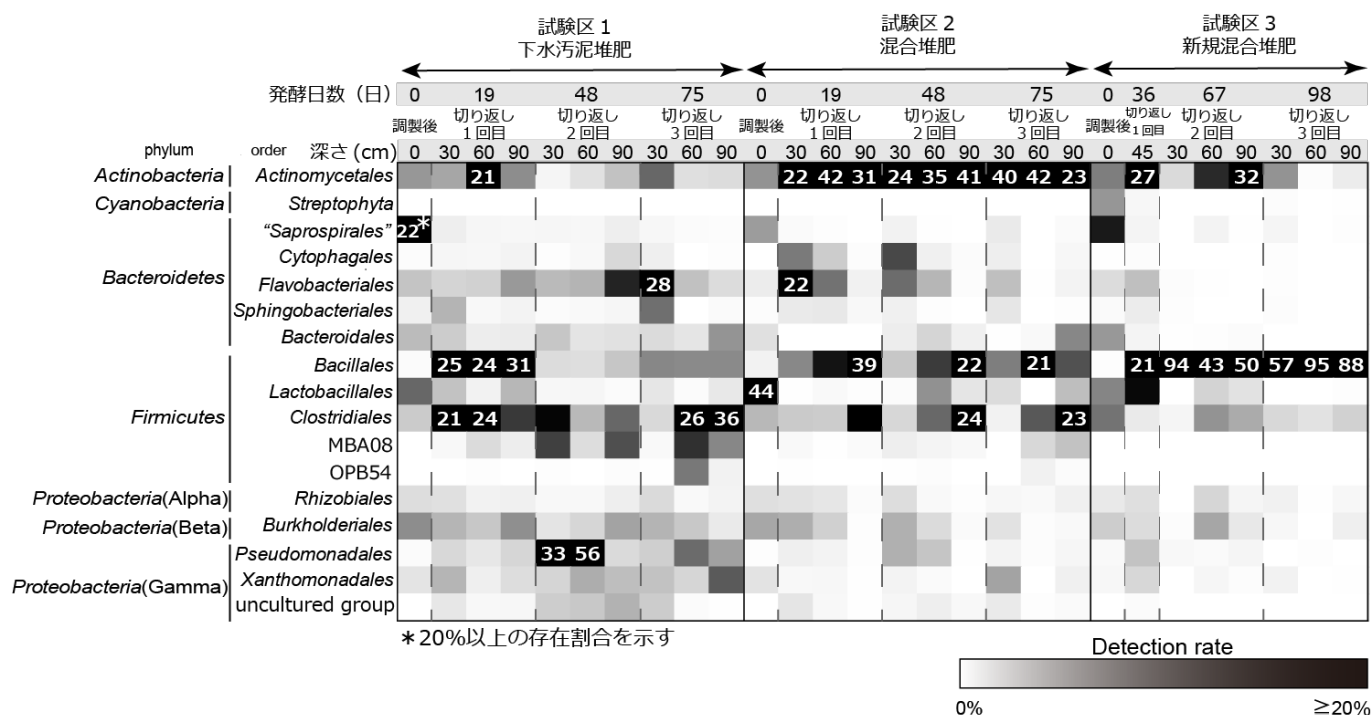


図-1 目レベルにおける堆肥発酵過程の微生物群集構造変化

キーワード: 下水汚泥堆肥 (Sewage sludge compost), マッシュルーム (Button mushroom), 微生物群集構造解析 (Microbial community analysis), 地域未利用バイオマス (Unused biomass)

連絡先: (住所) 宮崎県都城市吉尾町 473 番地 1, (電話) 0986-47-1227, (FAX) 0986-47-1231