

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の配合条件の検討

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（学）池田匠児（学）平片悠河（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、下水汚泥と地域バイオマスや牛糞堆肥を活用した食用きのこ栽培の研究を行っており、ヒラタケ・マッシュルームの栽培に成功している。ヒラタケ栽培では培地（針葉樹おが屑）に下水汚泥（脱水汚泥）と甘藷焼酎粕乾燥固形物（甘藷焼酎粕）を栄養材として併用することで対象区（針葉樹おが屑＋米糠培地）に比べて菌糸の成長促進、栽培期間の最大10日間の短縮、培地10gあたりの収量を20%高めることが分かった¹⁾。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、1.2–1.8倍に増加することが確認されており、マッシュルーム栽培後の廃培地を葉菜類に栽培に利用できることがわかっている^{2,3)}。これらのことから、下水汚泥堆肥を培地材料に用いることにより高付加価値食用きのこの栽培が可能であることが明らかとなった。一方で、マッシュルーム栽培において下水汚泥堆肥の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や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にくらべて1/5程度しかない。そのため、これまではC/N比が大きく、リグニンやセルロースを多く含む広葉樹おが屑などを堆肥に利用することで栽培している。つまり、C/N比や繊維量の高いマッシュルーム栽培に最適化した下水汚泥堆肥を開発することができれば、培地中の下水汚泥堆肥の割合を増加させることができ、下水汚泥の利用拡大に貢献できると考えた。また、これまでの知見で、下水汚泥堆肥と牛糞堆肥において好熱性細菌である *Bacillales* 目に属する微生物の存在割合に差異が確認されており、これらの細菌の動態を知ることで堆肥の最適化にも繋がると思われる。

本研究では、下水汚泥を活用した高付加価値マッシュルーム栽培方法の確立に向けての堆肥の作製と堆肥中の好熱性細菌の動態の解析を目的とした。

2. 実験方法

2.1 下水汚泥堆肥と混合堆肥の調製

表-1に堆肥組成を示す。本試験では、下水汚泥堆肥を試験区1、混合堆肥を試験区2として下水汚泥（脱水汚泥）、竹おが屑、米糠、甘藷焼酎粕乾燥固形物、畑土、土壌改良資材（タテヤマユーキ）で調製した。新規混合堆肥には試験区3–6として混合堆肥にさらに甘藷焼酎粕原液、戻し堆肥を加え、配合割合を変化させたものを調製した。戻し堆肥には、堆肥化させた試験区2の混合堆肥を使用した。堆肥材料を混合後、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。試験区1、2、3は約90日間の発酵（切り返し3回目）でサンプリングを行い、残りの試験区は約60日間までの発酵（切り返し1回目）でサンプリングした。

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。また、C/N比を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⁾。

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 条件1	40	30	20	10	—	—	—
4	新規混合堆肥 条件2	40	30	20	—	10	—	—
5	新規混合堆肥 条件3	36	27	18	—	9	—	10
6	新規混合堆肥 条件4	36	27	18	9	—	—	10

* 畑土と土壌改良資材を合わせた数値

表-2 試験区 1,2 の一般成分, 無機成分の分析結果

試験区		C/N比	粗蛋白質	粗脂肪	粗灰分	可溶無窒素物	粗纖維	P ₂ O ₅	K ₂ O	MgO	CaO
		(g/100g-dry)						(%-wet)			
1	下水汚泥堆肥	6.0	22.2	2.4	54.1	6.6	14.7	1.8	0.088	0.26	2.0
2	混合堆肥	13	17.6	1.9	46.4	12.1	22.1	2.1	0.22	0.42	2.9

表-3 試験区 1,2 の繊維量, 重金属の分析結果

試験区		リグニン	セルロース	ヘミセルロース	As	Cd	Hg	Ni	Cr	Pb	Al	Cu	Zn
		(g/100g-dry)			(mg/kg-wet)								
1	下水汚泥堆肥	3.2	5.1	No data	4.1	0.2	0.23	7.7	15	13	18000	63	170
2	混合堆肥	4.4	10.4	No data	3.5	0.4	0.24	10	17	12	16000	64	210
					(50)	(5)	(2)	(300)	(500)	(100)	(－＊)	(－＊)	(－＊)

(-)は汚泥肥料公定規格の許容最大量, *No standard value

2.3 生菌数測定

試験区 1, 2, 3 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繰り返しごとに採取した試料を平板培養法における混釈法で行った。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、NB 寒天培地と 100 倍希釈した NB (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。その後、段階希釈を行った試料溶液を混釈法で寒天培地に混合した。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 において、堆肥調製後に採取した試料を 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った。

3. 結果及び考察

表-2 に試験区 1, 2 の一般成分, 無機成分の分析結果を示す。試験区 2 は試験区 1 に比べて, C/N 比は約 2 倍, 無機成分は 1.45-2.5 倍に増加した。特にマッシュルーム子実体を形成するのに必要なカリウムは最も増加している。また、表-3 に繊維成分と重金属含有量を示す。試験区 2 におけるリグニンなどの繊維量が試験区 1 と比較して 1.3-2.0 倍に増加していた。これより、リグニンなどの繊維成分は、おが屑を用いることで補うことが可能であった。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算出されなかった。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。これらのことから、おが屑を用いた混合堆肥にすることで、C/N 比やカリウム量の高いマッシュルーム栽培に適した堆肥に近づけると考える。表-4 に試験区 1, 2, 3 における堆肥の繰り返しごとの生菌数測定結果を示す。全ての試験区において NB 培地での菌数は、DNB 培地の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、繰り返しごとの生菌数は、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ことがわかった。

4. 終わりに

本研究では、C/N 比やカリウム量の高い下水汚泥を活用した堆肥を作製することができた。今後、下水汚泥量を増やした 3-6 の試験区の生菌数測定や 16S rRNA 遺伝子解析を進め、好熱性細菌などの動態を分析することで、さらなる最適なマッシュルーム堆肥の製作を目指す。

参考文献

- 1) 山内正仁ら, 土木学会論文集 G, (環境), 2016
- 2) 山内正仁ら, 土木学会論文集 G, (環境), 2017
- 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, p123, 1973

表-4 堆肥中の繰り返しごとの生菌数

試験区			繰り返し 1 回目	繰り返し 2 回目	繰り返し 3 回目
1	下水汚泥堆肥 (cfu/g-wet)	表部 NB	3.39×10 ⁸	2.68×10 ⁹	3.09×10 ⁹
		表部 DNB	7.22×10 ⁷	2.44×10 ⁷	1.13×10 ⁸
		中部 NB	1.67×10 ⁸	6.39×10 ⁹	6.02×10 ⁷
		中部 DNB	1.94×10 ⁷	1.65×10 ⁸	3.63×10 ⁷
		中央部 NB	9.92×10 ⁷	2.28×10 ⁹	6.95×10 ⁷
		中央部 DNB	1.38×10 ⁷	2.59×10 ⁸	1.26×10 ⁷
2	混合堆肥 (cfu/g-wet)	表部 NB	3.29×10 ¹⁰	4.12×10 ⁹	3.09×10 ⁹
		表部 DNB	4.93×10 ⁸	5.61×10 ⁸	6.55×10 ⁷
		中部 NB	3.31×10 ⁹	1.33×10 ⁸	6.02×10 ⁷
		中部 DNB	3.25×10 ⁸	4.14×10 ⁸	1.20×10 ⁷
		中央部 NB	8.98×10 ⁹	5.53×10 ⁸	6.95×10 ⁷
		中央部 DNB	9.92×10 ⁸	1.08×10 ⁸	1.64×10 ⁷
3	新規混合堆肥 条件 1 (cfu/g-dry)	表部 NB		2.67×10 ⁹	7.56×10 ⁷
		表部 DNB	1.15×10 ⁹ *1	2.76×10 ⁹	<10 ⁷ *2
		中部 NB		2.19×10 ⁹	1.80×10 ⁸
		中部 DNB		2.29×10 ⁸	<10 ⁷ *2
		中央部 NB	4.79×10 ⁸ *1	8.12×10 ⁷	5.74×10 ⁷
		中央部 DNB		3.05×10 ⁸	<10 ⁷ *2

*1 繰り返し後のサンプルのため n=1 で行った
*2 1.00×10⁷ では観測することができなかった