

(8) 芝草病害防除コンポスト生産のためのコンポスト製品の
種菌としての繰り返し使用

Repeated use of compost product as seed of next composting for
production of suppressive compost preventing lawn grass disease

中崎清彦*, 永田貴寛*, 望月嘉乃*

Kiyohiko NAKASAKI*, Takahiro NAGATA*, Yoshino MOCHIDZUKI*

ABSTRACT ; In the production method of suppressive compost preventing lawn grass disease by inoculation of suppressive bacteria into lawn grass clippings as a raw material, we confirmed the possibility of repeated use of compost product as the seed of next composting. By making use of *Bacillus subtilis* N4-1, streptomycin resistant mutant, as a suppressive bacterium and seeding it in the raw material, we measured the change in concentration of the N4-1 in the raw material that contains many other microorganisms.

In composting with sterilized raw material, the ratio of the concentration of N4-1 in total bacteria fell rapidly with the increase in the number of repeating of use, but it was possible to produce compost with suppressive effect on lawn grass pathogen to the second repeated use. Further, in composting with disinfected raw material, possible number of repeating was limited to once. In composting with streptomycin-added raw material, the decrease in the ratio of N4-1 in the product with repeated use became slow and it was expected that possible repeating times of use were able to be increased, but it was found that there was a problem in growing of streptomycin resistant microorganisms other than the N4-1 in composting process.

KEY WORDS ; compost, biological pesticide, lawn grass disease, *Bacillus subtilis*, seeding

1. はじめに

植物の病気を引き起こす病原菌や病害虫を防除するために、化学農薬はこれまで多大な効果を挙げてきた。その反面、これらの化学農薬の長期間にわたる使用により、土壌微生物や環境への影響が問題となってきた。また、農薬に抵抗性を持つ耐性菌や難防除害虫の出現により、さらに大量の、あるいは強力な農薬散布が必要になるという悪循環をもたらしている。

こうした背景のもと、近年、コンポストに代表されるような有用微生物を含む微生物資材を植物病害の防除に用いようとする研究が急速な展開をみせている^{1~6)}。微生物資材を用いた病害防除は、微生物が持つ特定の病原菌や病害虫を抑制する作用を利用しているため、その作用には選択性があり、他の土壌微生物に対して影響が少ないことが知られている。しかしながら、これらの研究のほとんどは微生物資材の効果や使用法、防除

*静岡大学工学部物質工学科

(Department of Materials Science & Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Shizuoka University)

作用のメカニズムに焦点があてられており、微生物資材の作成方法についてはわずかな報告がみられるだけである^{7,8)}。

著者らはゴルフ場で問題となっている芝草葉腐病を防除できるコンポスト（機能性コンポスト）の作成方法について一連の研究を行ってきた^{7,8)}。現在、焼却や埋め立てによって処分されているゴルフ場の刈り芝をコンポスト原料として有効利用し、コンポスト化温度の制御と病原菌に対する抑制微生物の接種のタイミングを考慮した新しい方法で、機能性コンポストを高速に作成できることを明らかにしている⁷⁾。本研究では、純粋培養した抑制微生物を接種するのではなく、コンポスト製品を繰り返し次のコンポスト化の種菌として用いる方法で機能性コンポストを作成できるかについて検討することを目的とした。

2. 実験方法

2.1 芝草病原菌抑制細菌とコンポスト原料

抑制細菌は、芝草葉腐病の病原菌*Rhizoctonia solani* AG2-2 K1（以下、リゾクトニア）を抑制する微生物として当研究室で単離した、*Bacillus subtilis* N4のストレプトマイシン耐性自然突然変異株*Bacillus subtilis* N4-1を用いた。N4-1株は1000ppmのストレプトマイシンに対して耐性を持つため、コンポスト中にN4-1株以外の微生物が多数存在するときでもその濃度を選択的に測定することができる。抑制細菌であるN4-1株の接種試料は、N4-1株を30℃で20時間Trypticase-soy液体培地（Trypticase peptone 17g、Phyton peptone 3g、NaCl 5g、K₂HPO₄ 2.5g、Glucose 2.5g、Distilled water 1000ml）中で振とう培養し、これを、生理的食塩水で2回洗菌して調整した。接種試料中のN4-1株濃度は約 3.1×10^7 colony forming unit/mlとなった。

コンポスト原料として、刈り芝と研究室で厨芥から作成したコンポスト製品を乾燥重量比で10：1の割合になるように混合したものをを用いた。刈り芝は、初夏に芝刈り機で10mm程度の長さによりり取ったもので、含水率は63.9%、炭素および窒素の元素分析値はそれぞれ44.7%、2.18%でC/N比は20.5であった。厨芥から作成したコンポスト製品中の微生物相をTable 1に示す。研究室で厨芥を原料に作成したコンポスト製品は刈り芝中には低濃度にしか含まれない好熱性細菌と好熱性放線菌を含んでおり、リゾクトニアに対する抑制微生物は含まないことを確かめている。なお、原料は後述するように滅菌、殺菌、ストレプトマイシン添加の3通りの処理を行ってコンポスト化したが、いずれも蒸留水を加えて含水率を約60%とし、生石灰を加えてpHを8付近に調整した。

Table 1 Microorganisms in the seed used for composting

		Cell number (CFU/g-ds)
Thermophiles	Bacteria	1.4×10^6
	Actinomycetes	1.7×10^4
	Fungi	Not detected
Mesophiles	Bacteria	3.2×10^9
	Actinomycetes	8.5×10^5
	Fungi	1.7×10^4

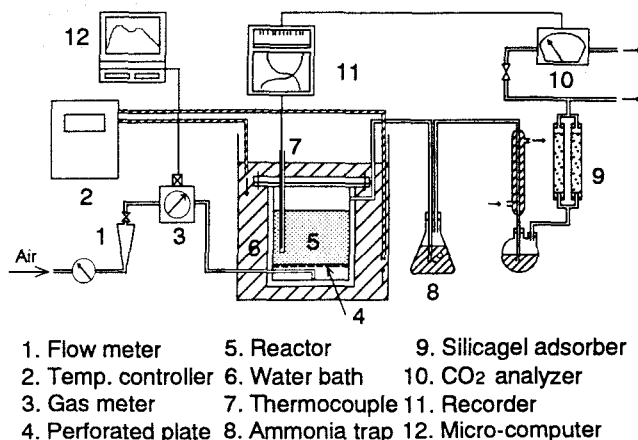


Fig. 1 Schematic diagram of composting system

2.2 コンポスト化システムとN4-1株の動態測定

コンポスト化システムの概略をFig. 1に示す。反応器5は容積3.6ℓの円筒型ステンレス製で6の水浴中に沈められており、水浴の温度をコントロールすることにより、反応器内の温度を任意に変えることができるようになっている。コンポスト原料は湿重量で約500gを反応器中に投入し底部より18ℓ/hの一定速度で通気した。反応器からの排気ガスは、まず、アンモニアトラップ11に導きアンモニアを取り除いた後に、炭酸ガスメータ14（理研計器製RJ-550A）で炭酸ガス濃度を連続的に測定した。排気ガス中の炭酸ガス濃度と、パルス発振器10を用いて実測される通気速度とからコンポスト化物単位乾燥重量あたり、単位時間あたりの炭酸ガス発生モル数と定義した炭酸ガス発生速度を計算し、これを有機物分解速度として定量した⁹⁾。また、有機物分解程度は元素分析で求めた刈り芝中の全炭素量に対して炭酸ガスとして揮散した炭素量の比と定義した炭素変化率で定量した。コンポスト化進行に伴い1日に1度反応器のふたを開け、均一な有機物分解を目的として固相を切り返し、サンプルを採取して、pH、含水率、およびN4-1株とN4-1株以外の細菌濃度を測定した。N4-1株についてはストレプトマイシン1000ppmを含むTrypticase-soy寒天培地を用い、全細菌はTrypticase-soy寒天培地を用いて測定し、両者の差からN4-1株以外の細菌濃度を計算した。培養温度は25℃とし、培養期間は7日間とした。なお、微生物濃度は単位乾燥重量あたりのコロニー形成数（colony forming unit/gram dry solid以下、CFU/g-ds）として整理した。また、サンプルを採取した後にコンポスト化物に適当量の蒸留水を加えて、含水率が低下しすぎないように留意した。

2.3 滅菌原料を用いたコンポスト化

2.1で調整したコンポスト原料にγ線を照射して滅菌し（以下、滅菌原料）、N4-1株を約10⁶CFU/g-dsの濃度になるように接種してコンポスト化した。なお、N4-1株は接種後40℃で72時間も経過すれば、高濃度に増殖し耐熱性の孢子となるため、72時間目以降に40℃から60℃に昇温することでN4-1株を高濃度に維持しながら高速で衛生的なコンポスト化が可能であることを確かめている⁷⁾。そこで、コンポスト化温度は72時間目まで40℃を維持し、それ以降コンポスト化終了の288時間目まで60℃一定に維持した（Run A-1）。引き続きRun A-1の製品を種菌とし、滅菌原料に加えたRun A-2を、以下、順次製品を繰り返し種菌として使用して

Run A-3、およびRun A-4を行った。製品を繰り返し種菌とした実験では好熱性微生物は種菌から供給されるので、研究室で厨芥から作成したコンポスト製品を用いる必要はなかったが、種菌および接種試料を加える前のコンポスト原料の質を同一にするために、コンポスト原料としては刈り芝に厨芥から作成したコンポスト製品を混合したものを用いた。このため、刈り芝:厨芥から作成したコンポスト製品:種菌の混合割合は乾燥重量比で10:1:1とした。

2.4 微生物の自己発熱を利用することを想定して殺菌した原料を用いたコンポスト化

大規模コンポスト化においては有機物分解に伴う微生物の自己発熱で80℃付近の高温を達成することが可能なので、コンポスト原料を別途に殺菌することなく、コンポスト化過程の自己発熱で殺菌することを想定したコンポスト化を行った。本実験では、用いた反応器が小さく自己発熱では80℃を達成できなかったため水浴中で温度を維持した。2.1で調整した原料をそのまま反応器中に投入し、温度は室温から80℃まで昇温し、24時間維持した。その後、室温まで冷却し、N4-1株を 10^5 CFU/g-ds付近の濃度になるように接種した。引き続いて40℃まで昇温し、72時間保った後、60℃まで昇温してその温度を288時間目まで維持した。この実験をRun B-1とした。次に、Run B-1の製品を種菌として、80℃の殺菌操作の後に加えるRun B-2を行った。刈り芝:厨芥から作成したコンポスト製品:種菌の混合割合は乾燥重量比で10:1:1とした。

2.5 ストレプトマイシンを添加した原料を用いたコンポスト化

N4-1株はストレプトマイシン耐性菌であるので、コンポスト原料にストレプトマイシンを添加することで、N4-1株以外の微生物の増殖を抑制し、N4-1株のみを選択的に増殖させることが可能かについて検討した。ストレプトマイシンはコンポスト原料に1000ppmの濃度になるように添加した。また、N4-1株の接種濃度は 10^5 CFU/g-ds程度とした。コンポスト化温度は初期72時間を40℃、それ以降を60℃に維持した (Run C-1)。引き続いて、Run C-1の製品を種菌としたRun C-2を行った。ストレプトマイシンを添加したコンポスト原料としては刈り芝に厨芥から作成したコンポスト製品を混合したものを用い、刈り芝:厨芥から作成したコンポスト製品:種菌の混合割合は乾燥重量比で10:1:1とした。

3. 実験結果と考察

3.1 滅菌原料を用いたコンポスト化

Run A-1におけるN4-1株およびN4-1株以外の細菌濃度、温度、炭酸ガス発生速度、炭素変化率の経時変化をFig. 2に示す。温度が40℃に維持されているコンポスト化72時間目までにN4-1株濃度は 10^{10} CFU/g-dsに達し、この時点でN4-1株は、そのほとんどが孢子になっているので60℃に昇温した後も濃度に変化はみられなかった。N4-1株以外の細菌は最終的に 3.2×10^8 CFU/g-ds付近の濃度となった。

コンポスト化における有機物分解速度に対応

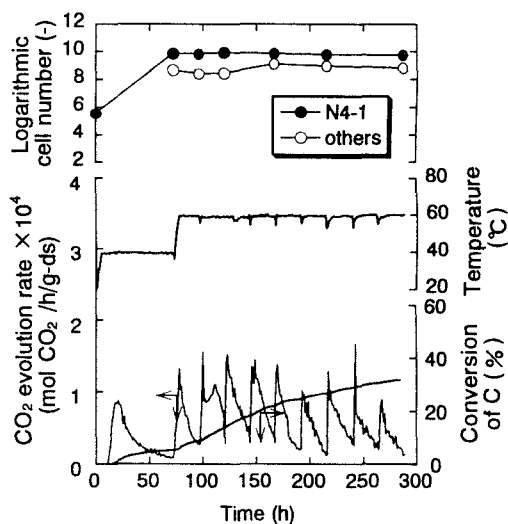


Fig. 2 The courses of CO₂ evolution rate, conversion of carbon, temperature, and concentrations of N4-1 and the other bacteria during composting of Run A-1

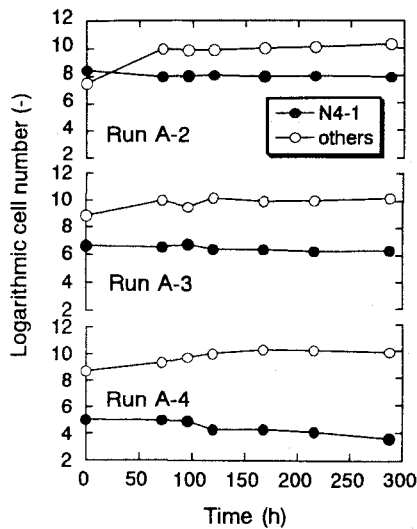


Fig. 3 The courses of concentrations of N4-1 and the other bacteria during composting of Run A-2 to A-4

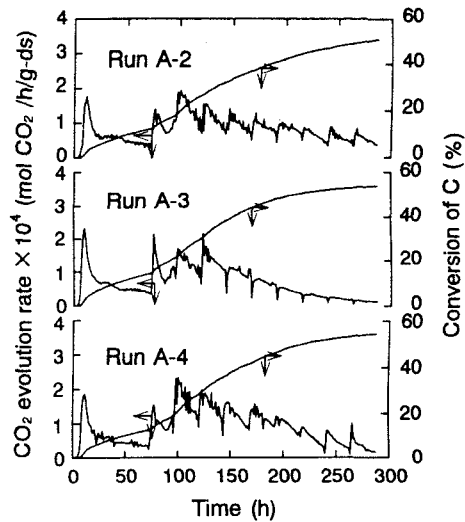


Fig. 4 The courses of CO₂ evolution rate and conversion of carbon during composting of Run A-2 to A-4

する炭酸ガス発生速度はコンポスト化温度が40℃に達した時に一旦ピークを持ち、その後次第に低下するが、温度を60℃に昇温させると一日に一度の切り返しに伴ってピークを持つ形で炭酸ガスの発生が持続した。炭素変化率は、コンポスト化終了時に約32.0%になった。

Run A-2～A-4のコンポスト化におけるN4-1株およびN4-1株以外の細菌濃度の経時変化をFig. 3に示す。Run A-2ではN4-1株は増殖せずほぼ一定濃度の 10^8 CFU/g-ds付近の値となった。Run A-3においてもN4-1株はほぼ一定の濃度であったが、Run A-4では明確な減少がみられた。一方、N4-1株以外の細菌はいずれの実験でも最終的に 10^{10} CFU/g-ds付近にまで増殖した。Run A-2～A-4でN4-1株が増殖できないことはRun A-1でN4-1株が増殖したと異なっている。Run A-2～A-4ではN4-1株以外の細菌がコンポスト化初期から高濃度に存在していたためにN4-1株は増殖できなかったものと考えられた。

Run A-2～A-4における炭酸ガス発生速度および炭素変化率の経時変化をFig. 4に示す。炭酸ガス発生速度はRun A-2～A-4のいずれもが40℃に達した時に一旦ピークをとり、その後60℃に昇温すると切り返し毎にピークをとるRun A-1の発生パターンと類似したが、全般にわたってRun A-1よりも大きくなっている。このため、炭素変化率はいずれの実験も50%付近の値となり、Run A-1に比べて大きくなった。これは、製品を繰り返し種菌として使用することで、その原料に適した微生物が優占種となるように変化し、しかも、その変化のためには一回の繰り返しで十分であることを示していると考えられることができる。実際、ドッグフードを原料としたコンポスト化で製品を繰り返し種菌として用いたときには、このことが確かめられている¹⁰⁾。

3.2 微生物の自己発熱を想定して殺菌したコンポスト化

Run B-1およびB-2におけるN4-1株およびN4-1株以外の細菌濃度と温度の経時変化をFig. 5に示す。Run B-1ではN4-1株以外の細菌濃度は80℃までの昇温期に一旦増殖するが、80℃に維持している間に3桁程度減少した。80℃の熱処理後に約 10^5 CFU/g-dsの濃度になるように接種されたN4-1株は温度を40℃に維持している間に増殖し、 10^8 CFU/g-ds付近の濃度で一定となった。一方、N4-1株以外の細菌は熱処理後 10^5 CFU/g-ds

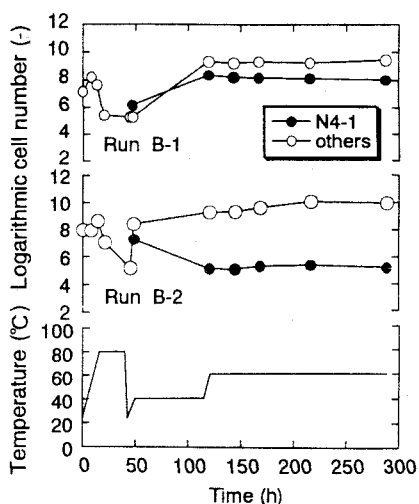


Fig. 5 The courses of temperature, and concentrations of N4-1 and the other bacteria during composting of Run B-1 and B-2

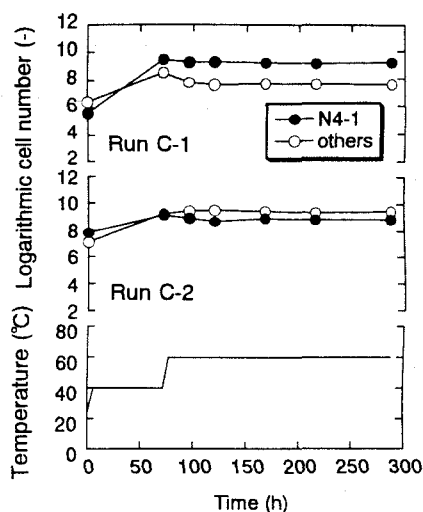


Fig. 6 The courses of temperature, and concentrations of N4-1 and the other bacteria during composting of Run C-1 and C-2

以上の濃度まで再増殖した。自己発熱を想定して80℃を24時間維持することでコンポスト原料の殺菌が可能となり、その後接種したN4-1株を増殖させることができることが確かめられた。なお、原料そのままN4-1株を接種したときには、原料中のN4-1株以外の細菌濃度が高いためにN4-1株は増殖できないことを確かめている⁷⁾。

Run B-2においてもコンポスト原料を80℃で殺菌し、N4-1株以外の細菌濃度を低下させたが、種菌として接種したRun B-1の製品中にはN4-1株以外の細菌が高濃度に存在しているため、種菌接種時のN4-1株以外の細菌濃度が 10^8 CFU/g-ds以上と高くなっており、N4-1株は増殖せず2桁程度減少した。

3.3 原料にストレプトマイシンを添加したコンポスト化

Run C-1およびC-2におけるN4-1株およびN4-1株以外の細菌濃度と温度の経時変化をFig. 6に示す。Run C-1では、原料にストレプトマイシンを添加したため、40℃に維持しているコンポスト化開始72時間目までにN4-1株以外の細菌は2桁程度しか増殖しなかったのに対し、N4-1株は4桁程度増殖して $10^8 \sim 10^9$ CFU/g-ds付近の一定濃度となった。ストレプトマイシンを添加することによって、N4-1株を高濃度に増殖させることができることが分かった。なお、コンポスト製品中に残存するストレプトマイシン濃度をバイオアッセイ法で測定したところ5.6ppmまで減少していたことが確かめられた。ストレプトマイシンがコンポスト化過程のどの時期に失活するか確かめていないので、コンポスト化72時間目にN4-1株以外の細菌の増殖がみられたとしてもその細菌が、ストレプトマイシン耐性菌か否かを判定することはできなかった。製品中に残存するストレプトマイシンの濃度は低く、コンポスト過程でストレプトマイシン耐性菌が増殖していなければ、製品を実際のゴルフ場で使用できる可能性もあると期待された。

引き続いて行ったRun C-2では、N4-1株以外の細菌はコンポスト化72時間目までに2桁以上の 10^8 CFU/g-と同数計数されたことから、Run C-2のコンポスト化初期に増殖したN4-1株以外の細菌はストレプトマイシ

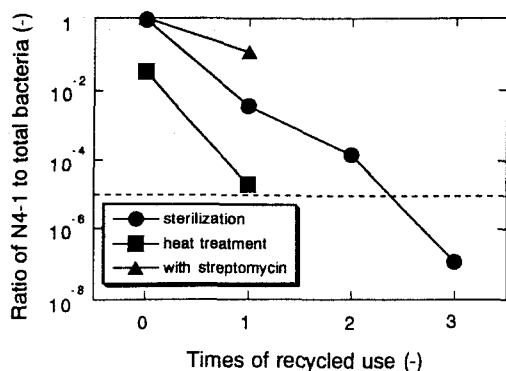


Fig. 7 The ratio of N4-1 to total bacteria in the compost products

ン耐性菌であることが分かった。また、Run C-1 では製品中にストレプトマイシン耐性菌が増殖していたのではないかと考えられた。原料にストレプトマイシンを添加する方法では、製品を種菌として繰り返し使用することでN4-1株以外のストレプトマイシン耐性菌がN4-1株より高濃度に増殖してしまうことが分かった。

滅菌、殺菌、ストレプトマイシン添加のすべてのコンポスト化における製品中の全細菌濃度に対するN4-1株濃度の割合をFig. 7に比較する。滅菌原料を用いた場合、繰り返し回数が増えるほど製品中のN4-1株の割合が減少し、N4-1株が駆逐されることが分かる。なお、リゾクトニアに対する抑制試験の結果から、病原菌の抑制のためには全細菌に対するN4-1株濃度の割合が 10^{-5} 以上でなければならないことを確かめており⁸⁾、繰り返し回数が0～2回(Run A-1～A-3)の製品はリゾクトニアに対する抑制効果を持つが、繰り返し3回目(Run A-4)の製品は抑制効果を失ったことが分かる。滅菌原料を用いた場合、繰り返し2回目まで芝草病原菌に対して抑制効果を持つコンポストを作成できることが分かった。なお、容積0.08 lのミニリアクタを用いて、40℃で48時間コンポスト化したものを繰り返し使用したときにも、繰り返しに伴ってN4-1株の割合が低下するという同様の傾向がみられている⁸⁾が、低下度合は本実験の方が大きくなった。これは、本実験ではコンポスト化時間が長く温度も高いので製品中のN4-1株は孢子になっており、種菌として用いたときのN4-1株の再増殖が遅れるためと考えられた。

微生物の自己発熱を想定して殺菌した原料に純粋培養したN4-1株を接種したコンポスト化では、滅菌原料を用いたコンポスト化に比べて製品中のN4-1株の割合は小さくなり、これを種菌として繰り返した時、N4-1株の割合の低下度合も大きくなった。これは、殺菌原料中のN4-1株以外の細菌濃度が滅菌原料に比べて高いためと考えられた。殺菌原料を用いたとき、機能性コンポストを作成するのに製品の繰り返し使用可能な回数は1回に限られることが分かった。一方、ストレプトマイシンを添加した原料を用いたときには、他の2つの原料を用いた場合に比べてN4-1株濃度の割合の低下度合は小さくなったが、低下を抑止することはできなかった。これは、N4-1株よりも増殖速度が速いN4-1株以外のストレプトマイシン耐性菌が増殖するためと考えられた。

4. まとめ

本研究では、コンポスト製品を種菌としてコンポスト原料に接種し、繰り返し芝草病害を防除する機能性コンポストを作成するための方法を検討し、以下に示す結論を得た。

滅菌、殺菌、ストレプトマイシン添加のいずれの原料を用いた場合でも繰り返し回数の増加に伴い、N4-1株

濃度も全細菌中に占めるN4-1株の割合も低下した。滅菌原料を用いたときは繰り返し2回まで、自己発熱を想定して原料を殺菌する方法では繰り返し1回だけ機能性コンポストを作成できることが分かった。原料にストレプトマイシンを添加する方法ではN4-1株以外の微生物の増殖を抑制し、N4-1株が全細菌濃度に占める割合の低下度を小さくすることができたので、製品を種菌として繰り返し使用できる回数は増加すると期待されたが、コンポスト化過程でストレプトマイシン耐性菌が増殖するために、この方法の適用は実際には難しいと考えられた。

<謝辞>

本研究の一部は文部省科学研究費補助金重点領域『人間地球系』の助成のもとに行われた。記して謝意を表する。

<引用文献>

- 1) D.R. Fravel: Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease, Ann. Rev. Phytopathol., Vol.26, pp.75-91, 1988.
- 2) D.M. Goodman and L.L. Burpee: Biological control of dollar spot disease of creeping bentgrass, Phytopathology, Vol.81, pp.1438-1443, 1991.
- 3) 藤原俊六郎, 折原紀子: 数種の微生物資材の特性とトマト根腐萎ちょう病抑止効果の検討, 神奈川県園芸試験場研究報告, Vol.26, pp.25-29, 1993.
- 4) R.P. Volland and A.H. Epstein: Development of suppressiveness to disease caused by *Rhizoctonia solani* in soils amended with composted and noncomposted manure, Plant Dis., Vol.5, pp.461-466, 1994.
- 5) H.A.J. Hoitink and M.E. Grebus: Status of biological control of plant disease with composts, Compost Science & Utilization, Vol.2, pp.6-12, 1994.
- 6) H.M.T. Hokkanen and J.M. Lynch: Biological control-Benefits and risks-, Cambridge University Press, 1995.
- 7) K. Nakasaki, S. Hiraoka and T. Nagata: A new composting operation for production of biological pesticide from mowed lawn grass, submitted to Appl. Environ. Microbiol.
- 8) 中崎清彦, 木代芳幸, 平岡幸子: *Bacillus subtilis*を接種した芝草病害防除コンポストの作成, 廃棄物学会論文誌, Vol.8, pp.166-174, 1997.
- 9) K. Nakasaki, M. Sasaki, M. Shoda and H. Kubota: Change in microbial numbers during thermophilic composting of sewage sludge with reference to CO₂ evolution rate, Appl. Environ. Microbiol., Vol.49, pp.37-41, 1985.
- 10) 中崎清彦, 渡辺淳, 片岡稔, 久保田宏: コンポスト化における種菌の繰り返し使用の効果, 用水と廃水, Vol.35, pp.32-37, 1993.