

B-15 枯草菌優占化余剰汚泥とバーク等を原料とした 土壌改良資材中の枯草菌と線虫の挙動

○中里 恵理奈¹*・生方 明日香¹・青井 透¹

¹群馬工業高等専門学校・専攻科環境工学専攻（〒371-0845群馬県前橋市鳥羽町580）

*E-mail:aoi@cvt.gunma-ct.ac.jp

1. はじめに

群馬県の農作物として、高原キャベツ、コンニャク、ヤマト芋等が有名であるが、これらの農作物を栽培する際に農家は連作障害で悩まされている。その対処方法である農業散布は、土壌中の生態系を破壊し、残留農薬が地下水や川に流出するとさらにその被害は広範囲に及ぼされる。また、農作業者の健康にも悪影響を及ぼすと考えられている。さらに、連作障害を抑止するための農薬は、2年目以降は土壌中の生態系に偏りが生じ、効果が半減すると言われている。土壌にはこれらの物質を吸着し濃縮する性質があるため、長期の農業散布による土地の不毛化の可能性も挙げられる。

連作障害の別の対処方法として、バチルス属細菌の一種である枯草菌（*Bacillus subtilis*）を用いる方法が挙げられる。枯草菌は土壌中の代表的な細菌であり、生存環境悪化時に芽胞を形成して生き延びる性質をもつ。東京工業大学資源化学研究室の正田誠名誉教授は、土壌中に枯草菌が乾燥質量1gあたり 10^7 個存在すれば、連作障害を抑止できるとしている。*Bacillus thuringiensis*は害虫に殺菌効果のあるタンパク質が含まれており、微生物農薬として用いられている。

連作障害の原因の一つとして、線虫による害が挙げられる。土壌中の線虫は、植物寄生性線虫と自活性線虫の2つに分けられる。前者は生きた根菜類の根等に寄生して連作障害を引き起こすが、後者は土壌中の細菌またはカビを餌とし、中には植物寄生性線虫を捕食する種も存在する。そのため、この自活性線虫を増殖させることで、植物寄生性線虫による被害を抑制できると考えられる。

本研究室は、これまでに剪定枝や稲ワラ、廃菌床等の未利用バイオマスと枯草菌優占化活性汚泥の余剰汚泥を原料とし、これらを生ゴミ処理機で中低温発酵させてきた土壌改良資材（以下、堆肥と記す）を検討してきたが、いずれの場合でも枯草菌の優占化および自活性線虫の増殖が観察された。本研究では、実際の堆肥化セン

ターでの各堆肥の枯草菌および線虫の数を測定したので、それらの挙動について報告する。

2. 調査方法

(1) 調査対象

調査対象として、群馬県利根郡みなかみ町にある資源リサイクルセンターの堆肥を用いた。資源リサイクルセンターでは様々な原料を用いて堆肥化を行なっているが、本研究ではそのうち、*B. subtilis*が優占化している奥利根アメニティーセンターし尿処理施設脱水汚泥（以下、脱水汚泥と記す）とバークを原料とした堆肥（以下、バチルス堆肥と記す）、乳牛の糞、木質チップおよび給食残渣を原料とした堆肥（以下、牛糞堆肥と記す）の2種類の堆肥を選定し、2011年9月15日に採取した。そのうち、バチルス堆肥は7月15日と8月30日にも採取を行ない各畝の堆肥を採取した。

それぞれの堆肥は各畝で高さ約2.5m、幅約3m、奥行約5m、重量約40tの山積みになっており（図-1）、4時間に1度空気を供給し、週に1度パワーショベルで攪拌している。これらの山は無臭のため、虫を寄せ付けず、不快感を感じさせるものではなかった。そこから表面よりも10cmほど奥の堆肥を採取し、ふるいで大きな木片等を除去したものを試料としてバチルス数と線虫を調査した。また、それぞれの採取点の温度を測定し記録した（図-2）。



図-1 資源リサイクルセンターの写真



図-2 調査風景

(2) バチルス属細菌の培養手順

ニュートリエント培地 (Oxid-MF-1) 0.8%, グルコース0.8%, 塩化ナトリウム0.6%, 寒天1.7%, 水溶性デンプン1.0%を精製水投入して加熱溶解後、この液体培地をオートクレープで121℃, 20分間滅菌した。これをシャーレに20mlずつ注入して冷蔵庫に2日間保管し、寒天平板培地(以下、培地と記す)を作成した。次に、乾燥質量1.0gの試料を100mlの精製水で希釈し、ホモジナイザーで2分間搅拌した。この懸濁試料を滅菌した生理食塩水(0.85%塩化ナトリウム溶液)で希釈し、 10^4 , 10^5 , 10^6 倍の希釈試料水を作成し、各希釈試料水を培地に0.1ml滴下して表面に塗布した。これを1つの希釈試料水に対して2枚ずつ行ない、30℃, 暗所で48時間培養した。培養後、培地のコロニーを観察した。

東京農工大学工学部細見研究室でのDNA解析により、現在明らかになっているバチルスコロニーの形状および種名の一列を図-3に示す。この区分に基づき、バチルス属細菌のコロニー数とその他の菌のコロニー数を測定した。

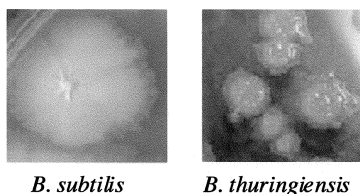


図-3 バチルスコロニーの形状と種名の一列

(3) ベルマン法による線虫の抽出手順

線虫の抽出にはベルマン法²⁾を用いた。試料を風乾質量で10g量り取り、キムワイプ1枚をはさんだふりいの中に移し、ガラス管をテフロンチューブで連結させた三角漏斗の中に設置した。水漏れ防止のため、連結部にはシールテープを巻いた。試料の厚みの半分よりも下に水面がくるように管内を精製水で満たし、試料の乾燥を防ぐため、パラフィルムで三角漏斗の上部に蓋をした。線虫抽出装置と自活性線虫の顕微鏡写真を図-4に示す。試料中の線虫は水中へ泳ぎ出し、重力によりガラス管底部に堆積する性質があるため、線虫の抽出試験開始から24時間後にテフロンチューブからガラス管を取り外し、ガラス管底部の2mlほどの線虫を含んだ試料水を得た。得られた試料水をガラス管ごと60℃の湯の中に50秒間入れ、線虫を熱殺した。熱殺後、試料水をパスツールピペットでスライドガラスに移し、顕微鏡で線虫の頭数を計測した。

線虫は、自活性線虫、ネコブ線虫、ネグサレ線虫の3種類で識別した。これらの線虫を見分ける大きな特徴は口針の有無であり、自活性線虫には口針がなく、植物寄生

性線虫であるネコブ線虫およびネグサレ線虫は口針を有している。これら植物寄生性線虫の特徴を図-5に示す。

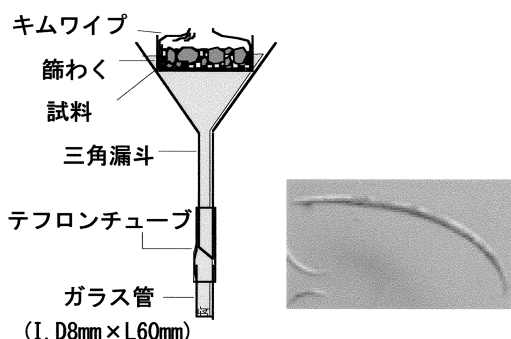


図-4 ベルマン法に基づく線虫抽出装置と抽出された自活性線虫の顕微鏡写真

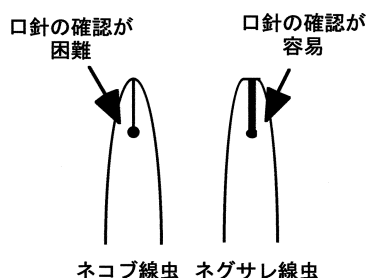


図-5 植物寄生性線虫の頭部の差異

3. 調査結果

(1) 調査結果概要

各試料中のバチルスコロニー数および線虫の頭数をまとめて表-1に示した。

(2) 土壌中の温度

温度は9月15日の試料採取時に測定した。バチルス堆肥の発酵1畝目の山(以下、1畝目と記す)の温度は、表面から7cmほどの表面付近で46℃、表面から1mlほどの中央部で42℃であり、表面付近と中央部で大きな差がないことが分かった。バチルス堆肥の発酵2畝目の山(以下、2畝目と記す)の温度は、表面付近で43℃、中央部で39℃と1畝目よりやや低温であったが、同様に表面付近と中央部で大きな差がなかった。1畝目と2畝目は共に60℃以下であったため、線虫が死滅しない温度であった。

一方、牛糞堆肥の二次発酵の途中である山(以下、牛二次中央と記す)の温度は、表面付近で61℃、牛糞堆肥の二次発酵開始60～65日である山(以下、牛60～65日)の温度は表面付近で41℃であった。牛二次中央は60℃以上で

表-1 各試料のパチルスコロニー数および線虫の頭数

試料名	採取日	畝の温度(℃)	パチルスコロニー数 (個/g)	自活性線虫数 (頭/10g)	ネコブ線虫数 (頭/10g)	ネグサレ線虫数 (頭/10g)	備考
脱水汚泥	2011.7.15		3.4×10^8	1	0	0	
1畝目			2.4×10^8	0	0	0	通路手前側, 表面から10cm
2畝目			3.2×10^7	0	0	0	通路手前側, 表面から10cm
1畝目	2011.8.30		5.6×10^7	626	0	0	通路手前側, 表面から10cm
2畝目			1.2×10^8	328	0	0	通路手前側, 表面から10cm
3畝目-1			7.7×10^7	705	0	0	通路手前側, 表面から10cm
3畝目-2			2.6×10^7	79	0	0	通路奥側, 表面から10cm
脱水汚泥	2011.9.15		6.4×10^8	839	0	0	
1畝目-1		46	1.4×10^8	6910	0	0	通路手前側, 表面から10cm
1畝目-2		46	1.8×10^7	0	0	0	通路奥側, 表面から10cm
2畝目-1		43	1.8×10^7	334	0	0	通路手前側, 表面から10cm
2畝目-2		43	2.6×10^7	1438	0	0	通路奥側, 表面から10cm
2畝目-3		43	1.7×10^7	361	0	0	通路手前側, 表面から10cm
2畝目-4		43	4.1×10^7	174	0	0	通路奥側, 表面から10cm
牛二次中央		61	8.0×10^5	2082	0	0	通路手前側, 表面から10cm
牛60～65日		41	1.1×10^7	7715	0	0	通路手前側, 表面から10cm

あったため、線虫が生息しにくい環境だといえる。

(3) 堆肥のパチルスコロニー数

パチルス堆肥において通路の手前側と奥側を比較した場合、1畝目とパチルス堆肥の発酵3畝目の山（以下、3畝目と記す）では手前側のパチルスコロニー数のほうが多かったが、2畝目は手前側と奥側で同等のコロニーが測定された。パチルス堆肥のコロニー数を畝で比較した場合は、どの畝でも大きな差が観察されなかったため、発酵の途中で枯草菌の急激な増殖または死滅は起こらないことがいえる。

脱水汚泥、牛二次中央および牛60～65日のパチルスコロニー数については、脱水汚泥からはパチルス堆肥よりも多くのコロニーが測定され、牛二次中央と牛60～65日からは少ないコロニーが測定された。

(4) 堆肥の線虫の頭数

すべての試料において、ネコブ線虫およびネグサレ線虫を確認することはなかった。7月15日に採取した堆肥は線虫をほとんど確認することができなかったが、8月30日と9月15日に採取した堆肥は9月15日の1畝目-1を除き全ての堆肥で線虫の存在が確認された。

通路の手前側と奥側の線虫の頭数を比較すると、2畝目は明確な差は見られなかったが、1畝目と3畝目は手前側のほうがより多くの線虫が測定された。このことから、通路の手前側のパチルス堆肥は通路の奥側よりも線虫が生息しやすい環境であると思われる。各畝においては、1畝目よりも2畝目、2畝目よりも3畝目のほうが線虫が比較的少ないため、発酵が進むにつれて線虫はやや減少していくと考えられる。

牛糞堆肥の線虫の頭数は、パチルス堆肥の場合よりも

多く測定され、牛60～65日後は牛二次中央よりも多くの線虫が測定された。牛二次中央は高温の状態であったにもかかわらず、比較的多くの線虫が測定されたため、牛糞堆肥には線虫が高温でも生息できる何らかの要因があると思われる。

4. まとめ

資源リサイクルセンターのパチルス堆肥は、自活性線虫の減少がやや見られるものの、枯草菌の優占化が観察された。一方、牛糞堆肥については、パチルス堆肥よりもパチルスコロニー数は少なかったが、高温状態のもとで自活性線虫の増殖が観察された。今後も両堆肥の枯草菌および線虫の数を測定し、それらの挙動について調査を続ける予定である。

謝辞

本研究を行なうにあたり、資源リサイクルセンター本多正義殿に多大なご協力をいただきました。また、パチルスコロニー数の測定は岸分析主任にご指導と協力をいただきました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Orié Asaka, Takashi Ano and Makoto Shoda: Persistence of *Bacillus subtilis* RB14 and Its Derivative Strains in Soil with Respect to *lpa-14* Gene, J. Ferment. Bioeng., 81 [1], 1-6 (1996)
- 2) 線虫学実験法編集委員会 (2004) 線虫学実験法, 日本線虫学会, pp. 87-88
- 3) 林恵里香, 小林彩乃, 青井透 (2008) : 各土壌中の線虫分布調査とネコブ線虫被害との関係調査, 第45回環境工学研究フォーラム講演集, pp. 106-108
- 4) 生方明日香 (2010) : 稲ワラ・刈草等未利用バイオマスを原料とした土壌改良資材の試作, 平成21年度群馬高専環境都市工学科卒業研究発表会予稿集