

平成24年度
環境研究総合推進費補助金 研究事業
総合研究報告書

コンポスト施用の安全性と有効性の微生物学的
評価法の確立に関する研究
(K2407,) K2330, K22021

平成25年3月

大阪府立公衆衛生研究所 足立伸一

補助事業名 環境研究総合推進費補助金研究事業 (平成22年度～平成24年度)

所 管 環境省

国庫補助金 47,605,000円

研究課題名 コンポスト施用の安全性と有効性の微生物学的評価法の確立に関する研究

研究期間 平成22年4月1日～平成25年3月31日

代表研究者名 足立 伸一 (大阪府立公衆衛生研究所)

研究分担者名 依田 知子 (大阪府立公衆衛生研究所)

中野 仁 (大阪府立公衆衛生研究所)

余野木 伸哉 (大阪府立公衆衛生研究所)

安達 史恵 (大阪府立公衆衛生研究所)

三輪 由佳 (地方独立行政法人 大阪府立環境農林水産総合研究所)

磯部 武志 (地方独立行政法人 大阪府立環境農林水産総合研究所)

細見 彰洋 (地方独立行政法人 大阪府立環境農林水産総合研究所)

辰巳 眞 (地方独立行政法人 大阪府立環境農林水産総合研究所)

中村 昇太 (大阪大学)

目 次

総合研究報告書概要	1
本文	
1. 研究背景と目的	15
1.1 コンポスト施用が植物に与える有効性について	15
1.2 コンポスト施用によるイチジク株枯病菌の抑止効果	24
2. 土壌微生物の解析	26
3. コンポストの減量となる余剰汚泥中の病原性微生物の熱不活化の検討	32
4. 引用文献	39
5. 全体の結論	41
6. 研究発表	41
7. 知的財産権の取得状況	43
8. ポンチ絵	44
9. 英文概要	45

環境研究総合推進費補助金 研究事業 総合研究報告書概要

研究課題名 コンポスト施用の安全性と有効性の微生物学的評価法の確立に関する 研究

研究番号 (K2407,) K2330, K22021

国庫補助金精算所要額 47,605,000 円

研究期間 2010年～2013年

代表研究者名 足立 伸一 (大阪府立公衆衛生研究所)

研究分担者名 依田 知子、中野 仁、余野木 伸哉、安達 史恵 (大阪府立公衆衛生研究所)、磯部 武志、辰巳 眞、三輪 由佳、細見 彰洋 (地方独立行政法人 大阪府立環境農林水産総合研究所)、中村 昇太 (大阪大学)

研究目的

有機性廃棄物のコンポスト化は、循環型社会構築の一つに位置づけられているが、コンポスト化率の高いヨーロッパ諸国に比べると、日本におけるその比率はかなり低い (文献 1, 2, 3)。高いコンポストの利用率*を目指すためには、コンポストの需要を高めることが必要であるが、そのためにはコンポストの有効性と安全性を客観的視点から明確に示すことが重要である。そこで本研究では、コンポストの安全性の科学的根拠を示すため、コンポスト原料中に含まれる病原微生物の検出、施用土壌の微生物群の変遷や植物の生育に与える影響 (土壌環境や土壌病防除など) を調査し、コンポスト施用における有効性及び安全性を微生物学的解析に基づき科学的に評価する。また、それぞれの農耕土壌に適したコンポスト施用 (種類・量) 方法を検討する。さらに病原微生物に対する安全性の確保についても検討する。

*コンポストの利用率：施肥量に占めるコンポストの割合

研究方法

1. コンポスト施用が植物に与える有効性について

1) 牛糞およびバーク堆肥によるイチジク株枯病菌による病徴の軽減効果

指標とする植物に生長の早いイチジク、病原菌には土壌病原真菌であるイチジク株枯病菌 *Ceratocystis fimbriata* を用いた。コンポストを施用し、土壌の微生物群を多様にするすることで株枯病防除効果を調査した。その際、コンポストとして次の3種類 (バーク堆肥施用土壌、牛糞堆肥連用果樹園土壌、およびバーク堆肥連用地植えイチジク園の土壌) とそれぞれの対照区を用いた。

2) 牛糞堆肥連用によるイチジク株枯病菌による病徴の軽減効果

指標とする植物、病原菌には1)と同じものを用いた。コンポスト施用用土には、株枯病菌の病徴発現を緩和した牛糞堆肥連用区の土壌を使用した。

(1) コンポスト施用による株枯病防除効果を調査する目的で、牛糞堆肥連用土壌と対照土壌（無施用土壌）で栽培したイチジクからそれぞれ葉と枝を準備した。新梢については、野外の同一条件で生育した健全なイチジクから準備した。

i) イチジクの葉および枝に株枯病菌を接種し、容器内で一定期間培養し、病斑の拡大を観察した。(図1および2を参照)

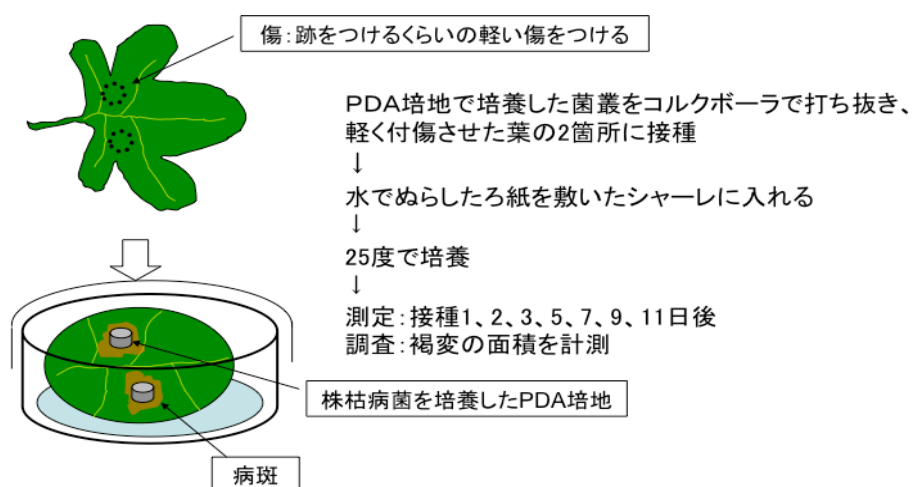


図1 葉への株枯病菌接種試験

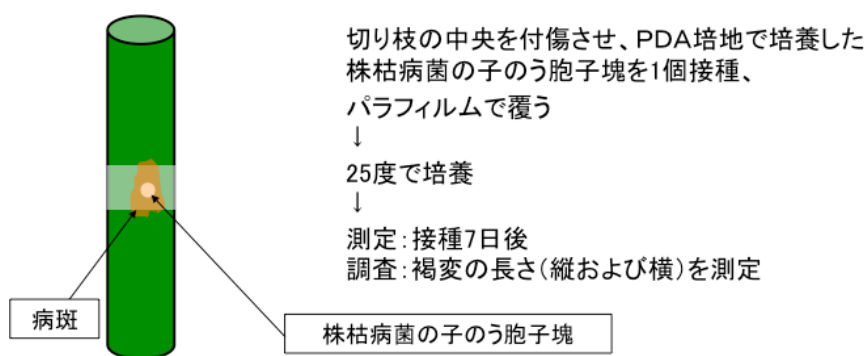


図2 枝への株枯病菌接種試験

ii) 牛糞堆肥連用土壌と対照土壌をガラス瓶に入れ、その土壌中に株枯病菌を接種し、5日間培養した。その培養土壌にイチジク新梢を挿し木し、10日間培養して病斑の拡大を観察調査した。(図3)

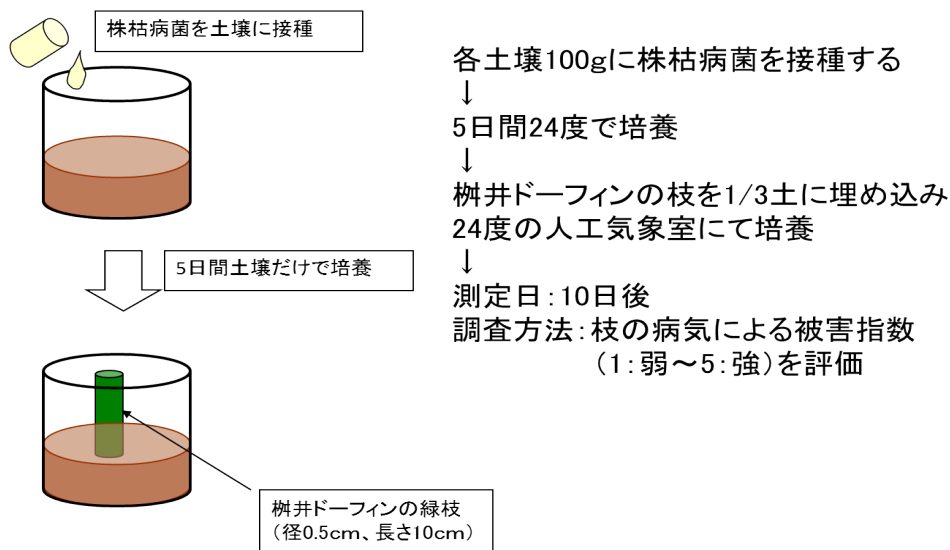


図3 土壤への株枯病菌接種および新梢の挿し木試験

3) バーク堆肥連用による病徴の軽減効果

2) -ii)に引き続き、その追加実験を行った。指標とする植物、病原菌は同様。コンポスト施用用土には、地植エイチジク園のバーク堆肥連用土壤およびその対照区の土壤を使用した。

(1) 地植エイチジク園のバーク堆肥土壤と対照土壤をガラス瓶に入れ、その土壤中に 株枯病菌を接種した。コンポスト施用による株枯病防除効果を調査する目的で、野外の一定条件で栽培した健全なイチジクから新梢を準備し、(1)で準備したイチジク新梢を挿し木し、容器内で一定期間培養して病斑の拡大を観察調査した。(上記図3を参照)

4) イチジクの生長に与えるコンポストの影響調査

(1) イチジクの生長に与える影響調査には、コンポストの有無、かん水量と施肥量(化学肥料)を変化させる処理区を設けて検討した。また、生長の計測に新梢の総延長や地下部乾物量だけでなく、果実重量や果実の糖度を使用した。

2. 土壤中の微生物の解析について

1) 土壤微生物群のDNA抽出およびそのメタゲノム解析

土壤微生物群を解析するため、以下の項目に取り組んだ。

(1) 土壤微生物群(細菌および真菌)のDNA抽出法について検討

ビーズによる細胞破壊法(文献4)を参考に改良を検討した。

(2) 土壌サンプル

土壌微生物群が多様だと考えられる森林土壌、植物系コンポストを連用している植物公園土壌および牛糞堆肥を連用している農耕地の土壌

(3) 細菌および真菌の PCR およびメタゲノム解析

細菌と古細菌については、種の同定に使用されている 16SrRNA 遺伝子をターゲットにした複数のプライマー（細菌については、5 種類、古細菌については 1 種類、文献 5-10）を使用し、PCR 法で増幅させた。また、真菌についても種の同定に使用されている 18SrRNA 遺伝子をターゲットに複数のプライマー（4 種類、文献 11-17）を選択した。PCR 産物について GS Junior plat form 454 (Life Science 社製) を使用し、メタゲノム解析を行った。プライマーの選択を検討するためにジェノミック DNA についてもメタゲノム解析を行った。

(4) イチジク株枯病菌による病徴の軽減効果を示した土壌微生物群の解析

イチジクを定植させた植木鉢の実験系において、土壌病害によるイチジクの病徴発現を緩和した実験系のコンポスト施用土壌について土壌微生物の解析を行った。

また、ガラス瓶に試験土壌と対照土壌を入れ、その土壌中に株枯病菌を接種し、そこにイチジク新梢を挿し木し、容器内で一定期間培養した実験 (p5 図 3 を参照) において、イチジク新梢に対して病徴抑制効果のあった牛糞堆肥連用土壌と対照土壌および、イチジク園のバーク堆肥連用土壌と対照土壌について、土壌微生物群の解析を細菌 (2 種類のプライマー) と真菌 (3 種類のプライマー) を対象として、メタゲノム解析を行った。

3. コンポスト原料となる余剰汚泥中の病原性微生物に対する熱不活性化の検討

し尿を含んだ汚水中には病原性微生物が含まれる危険性があり、それを濃縮した形態の余剰汚泥中においても同様に危険性がある。この余剰汚泥は濃縮処理や脱水処理後、コンポストとして有効利用される場合もある。近年、汚泥を再資源 (助燃材) として有効利用するため、含水率を低減化する目的で電気浸透式汚泥脱水機が開発されている。当装置は汚泥脱水時の生じる電気抵抗により汚泥が発熱する特徴を有していることから、今回、その熱を有害微生物の不活化に対し有効利用することに着目した。この電気浸透式汚泥脱水機をモデルに、下記に示したさまざまな指標微生物を利用して不活化に重要となる加熱温度と時間の関係を実験室内で検討し、熱不活性化条件を決定したい。

1) 指標微生物：大腸菌およびファージ

汚泥再生処理センター (し尿処理場) に設置された電気浸透式汚泥脱水機が脱水時に高い熱を出すため、この高熱により病原性微生物を不活性化できるのではないかと考えられている。そこで、電気浸透式汚泥脱水機の脱水時における汚泥の温度測定を実施し、その値を参考に指標微生物を用いて、コンポストの安全性を実証する事が可能となる実験系を組んだ。指標微生物として大腸菌 (*Escherichia coli* Castellani and Chaimers 1919) と大腸菌に感染するウイルスであるバクテリアファージ (*Escherichia coli* phage Q β) を用いた。

2) 指標微生物：腸球菌および枯草菌

1) の結果を踏まえ、病原性微生物に腸球菌を加えた。また、土壌改良効果が期待できると考えられる枯草菌（文献 21-22）については熱抵抗性があるので、熱処理後の残存を期待してこれを選び、実験に供した。

3) 実働施設による指標微生物の不活性化実験

平成 22 年度末に大阪府内で稼働し始めた電気浸透式脱水機を対象に脱水時に発熱する汚泥の温度測定をサーモラベル用いて行った。脱水前の汚泥で薄く挿み、これを脱水機の給泥部に挿入し、排泥部で回収した。また、脱水前後の汚泥中の大腸菌および大腸菌フェージの濃度変化を測定し、それらの微生物が不活性化されているかどうか検討を行った。

研究結果

1. コンポスト施用が植物に与える有効性について

コンポスト施用（バーク堆肥区および牛糞堆肥連用区）の有効性について植物の生育に及ぼす影響と病原菌に対する反応を調査した。

(1) 生育に及ぼす影響

バーク堆肥、牛糞堆肥を連用することで、土壌が改善されイチジクの生育促進効果がみられた。具体的に土壌の理化学性改善効果として、両コンポストとも腐植含量の増加、透水性および保水性の高まり、pH の中性化、肥料の 3 要素成分（リン、チッソ、カリウム）の増大が認められた。その結果、コンポストを施用することで、イチジクの生育促進効果が認められた。これは、コンポスト施用により、肥料成分の増加と保水性向上による水分供給量の増大によるイチジクの生育に対する影響の可能性を示唆している。今回設定した試験条件下では、かん水量が半分になることで生育不良となり、イチジクの収穫量や果実品質にも悪影響を及ぼした。しかし、少ないかん水量の条件においても、コンポストの施用により、その影響が軽減される事が示された。施肥量を 3 分の 1 にすることで、イチジクの生育に影響はなかったが、果実の収穫量は明らかに減少した。樹体に蓄えた栄養を利用し生育は維持されたが、樹体栄養分が減少した分、果実の収穫量は低下した。果樹栽培において、土壌は毎年耕すことができないため、なにも施さなければ土壌は劣化していくが、コンポストを連用することで、劣化を抑え安定した果実生産が可能になる。上述の纏めとして、コンポスト施用によりイチジクの品質が高くなった事を次の表に示す。

表1 各試験区におけるイチジク果実品質

試験区	収穫開始日 (月/日)	1樹当たり の収穫数 (個)	果実重量 (g)	1樹当たり の収穫量 (g)	糖度 (Brix°)
バーク堆肥区	7/31	20.0 a	51.2	1024.8 a	19.1 a
牛ふん堆肥区	8/3	23.0 a	53.5	1231.2 a	18.9 a
し尿汚泥区	8/3	13.3 b	65.5	867.5 b	15.7 b
対照区	7/31	19.0 a	52.9	1005.9 a	16.6 b

異なるアルファベット間で5%水準で有意差あり
標準的なかん水

(2) 病原菌に対する反応に及ぼす影響

- (i) イチジク苗定植後に株枯病菌を接種し、一定期間生育後に株枯病菌接種による地下部の外観的な病徴の発現を観察した。その結果、イチジクの地下部における外観的な病徴発現は、バーク堆肥区および牛糞堆肥連用区において対照区と比べ、軽減される傾向が観察された。図4にバーク堆肥コンポスト区の結果を示す。

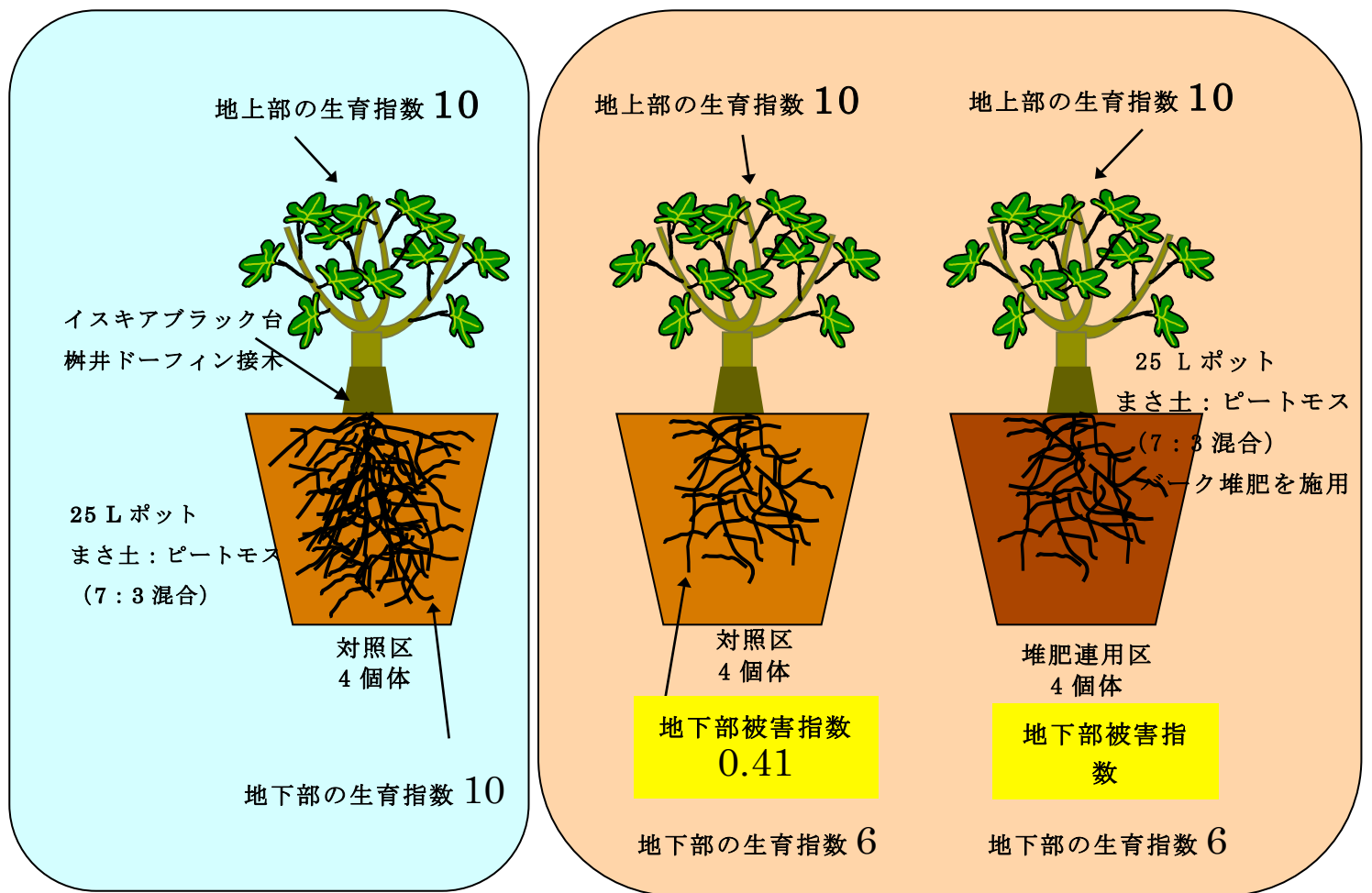


図 4. バーク堆肥施用が株枯病菌接種におけるイチジク生育に及ぼす影響
 ※地上部の生育指数は健全土壌の対照区の新梢長と新梢幅を 10 として求めた数値を表す。
 地下部の生育指数は健全土壌の対照区の根乾物重を 10 として求めた数値を表す。
 地下部の被害指数は地下部の外観、地際部断面および地際部 5 cm 下断面の被害指数：-1
 ~3 までの平均値を表す。

次にコンポスト施用によって、株枯病菌によるイチジクの地下部の外観的な病徴発現が軽減される効果について、その軽減がイチジク（宿主側）の要因によるのか土壌に依存しているのかを調査した。

(ii) 枝葉への株枯病菌を接種実験

コンポスト施用土壌（牛糞堆肥連用果樹園土壌）およびその対照区で栽培したイチジクの枝や葉に株枯病菌を接種した実験結果については、コンポスト施用したイチジクの枝葉で対照区に比べ、徴発現が拡大した。これは、窒素などの過栄養の影響を受けたのかもしれない(p4 実験方法の図 1、図 2 参照)。

(iii) 試験管内での新梢挿し木による株枯病菌接種実験

牛糞堆肥連用土壌と対照土壌を使用した試験管内での新梢挿し木による株枯病菌接種実験（p5 実験方法の図 3 参照）の結果においては、挿し木の地下部には、黒褐色の壊死が認められたが、その進行程度は、コンポスト区の方が統計的に有意に軽微であった。

この結果を踏まえて、バーク堆肥連用地植えイチジク園土壌と対照土壌を使用して追試実験を行った。その結果、挿し木の地下部には、黒褐色の壊死が認められたが、その進行程度は、コンポスト区の方が統計的に有意に軽微であった。（図 5 および 6 を参照）



図 5 接種 10 日後のイチジク枝
(左：現地対照区、右：現地コンポスト区)

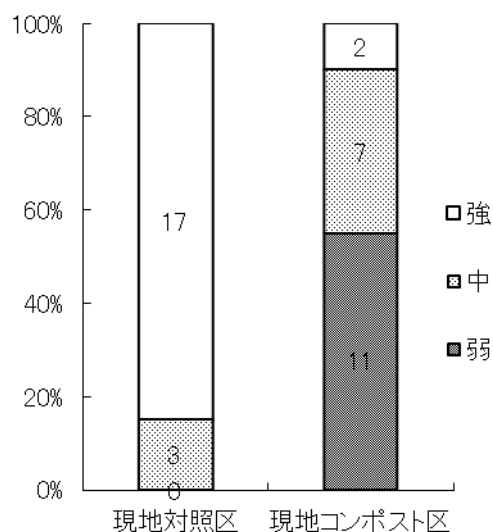


図 6 各被害指数の割合

2. 土壌中の微生物の解析について

ビーズによる細胞破壊法を用いた土壌からの DNA 抽出法を確立し、森林土壌について、細菌、古細菌および真菌について、種の同定に使用されているプライマーを複数使用し、PCR 産物を増幅させ、全ての PCR 産物について解析を行なった。また、プライマーの検討をするためにジェノミック DNA についてもメタゲノム解析したが、プライマーの選択はできなかった。

プライマーの選択をするため、森林土壌に加え、植物系コンポストを連用している植物公園土壌と、牛糞堆肥を連用している農耕地から、確立した方法で土壌微生物群の DNA を抽出し、同様に PCR 産物とジェノミック DNA についてメタゲノム解析検討を行った。その結果、細菌については、2 種類、真菌については、3 種類、古細菌については 1 種類のプライマー（表 2 参照でウグイス色のプライマー）を選択した。それらのプライマーを使用して、土壌病害によるイチジクの病徴発現を緩和したコンポスト施用の土壌微生物の解析を行った。その結果においては、細菌、真菌について門レベルでは顕著な差はなかった。

表2 プライマーの選択

プライマー	ターゲット	1年めの評価コメント	2年め以降のコメント
16S-1	細菌	特異性が高い	特異性が高い
16S-2	細菌	わずかに古細菌を検出	総合的に広範囲の細菌を検出
16S-3	放線菌	約25%は放線菌以外	評価できず
16S-4	細菌	わずかに古細菌を検出	特に問題はなし
16S-5	古細菌	特異性が高い	現時点では次世代シーケンサーの解析には適さない
16S-6	細菌	わずかに古細菌を検出	総合的に広範囲の細菌を検出
18S-1	真菌	特異性が非常に高い	特異性が高い
18S-2	真菌	特異性は、8割以上	特異性は良くない
18S-3	真菌	特異性は9割	特異性は比較的高い
18S-4	真菌	特異性は、8割以上	特異性は良くない
18S-5	菌根菌	真菌の特異性は高いが菌根菌以外の真菌も検出	特異性は高い、菌根菌以外の真菌は検出

土壌中に株枯病菌を接種し、そこにイチジク新梢を挿し木し、容器内で一定期間培養して病斑の拡大を観察調査した結果において、病徴発現が減少した土壌（牛糞堆肥連用土壌との地植えバーク堆肥連用イチジク園土壌とこの2つの対照区の土壌）について、土壌微生物の解析を行った。その結果、細菌および真菌について門レベルでの顕著な差はなかった。

3. コンポスト原料となる余剰汚泥中の病原性微生物の熱不活性化の検討

1) 指標微生物：大腸菌およびファージ

コンポストの安全性について、汚泥再生処理センター（し尿処理場）に設置された電気浸透式汚泥脱水機が脱水時に高い熱を出すため、高熱により病原性微生物を不活性化できると考えられている。指標微生物として大腸菌 (*Escherichia coli* *Castellani and Chaimers* 1919) と大腸菌に感染するウイルスであるバクテリアファージ (*Escherichia coli* phage Q β) を用いた。その結果、大腸菌を用いた実験結果では、65℃で急激に不活化が進み、この温度で10秒以上、および70～80℃、5秒以上で大腸菌が検出されないことが明らかになった。

大腸菌ファージを用いた試験結果では、大腸菌にくらべ熱耐性を有したが、75℃以上、5秒で生残率は急激に低くなり、短時間で不活化が進んだ。

2) 指標微生物：腸球菌および枯草菌

枯草菌と腸球菌の熱不活性化試験結果を行った。腸球菌は、大腸菌と比較し、熱耐性を有してお

り、65℃30 秒の加熱では不十分であったが、75℃では 5 秒で 10000 分の 1 以下の生残率になり、電気浸透式脱水機を用いることにより微生物学的な安全性が高まることが期待できた。(図 7 参照)

一方、環境中で有用と考えられる枯草菌については、80℃、5 分の加熱でも不活化されずに残存し、コンポストとして利用する場合において、その有用性が明確になった。(図 8 参照)

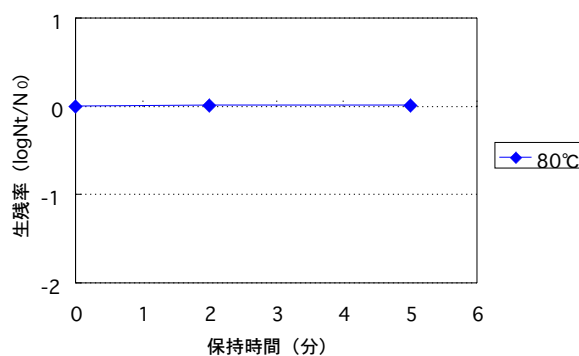


図 7 枯草菌の熱不活化試験結果

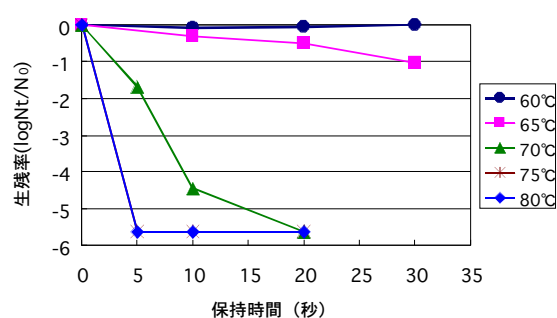


図 8 腸球菌の熱不活化試験結果

3) 実働施設による指標微生物の不活性化実験

汚泥再生処理センター（し尿処理場）に設置された電気浸透式汚泥脱水機の高熱による病原性微生物の不活性化を調べる目的で、今回は、大腸菌と大腸菌ファージに着目して、実験を行った。脱水前の大腸菌数は 1 g 当たり 1.3×10^5 個であったが、46V (印加電圧) 時では 7.1×10^3 個に減少し、50V (印加電圧) 時では検出されず、 $-5 \log$ 以上の不活化率を示した。

大腸菌ファージ数の変化については、数回、脱水前の汚泥に関して大腸菌ファージ数の測定を行ったが、いずれも誘出液 1 mL 中に 10PFU 未満しか測定されなかった。今回の実験時では、脱水前の汚泥と脱水後の汚泥ともにファージは測定されず、不活化効果を評価することはできなかった。参考までに他の 2 回の測定結果では誘出液 1 mL 中、脱水前が 6 PFU で脱水後が 0 PFU、脱水前が 9 PFU で脱水後が 0 PFU であった。

考察

コンポスト施用の連用により土壌は植物の生長に適した土壌へと改善されていた。コンポスト施用によるイチジクの生育や果実の収穫に及ぼす影響を調査したところ、対照区と比べ、生育においては顕著な差はないものの、果実の収穫量と品質が向上した。

イチジク苗を鉢に定植後、株枯病菌を接種し、一定期間生育後の株枯病菌による地下部の病徴発現を観察した実験において、病徴発現の軽減が観察できたコンポスト 2 種類（バーク堆肥、牛糞堆肥）とその対照区の土壌について、土壌微生物群のメタゲノム解析を行った。その結果、細菌については、門レベルでの大きな違いは見られなかった。真菌については、鉢植え用土ということで、プライマー検討に使用した土壌サンプルと違い、菌根菌と植物体が多く分布していたが、真菌の門レベルは、子囊菌門が多いという植物公園、農耕地に近いパターンを示した。しかし、株枯病菌を接種した土壌からは、接種後に増殖したと思われる株枯病菌を検出できた。

イチジクの枝葉に株枯病菌を接種し、その病徴発現を観察した実験においては、コンポスト施用で

育成したイチジクにおいて、病徴発現が拡大していた。これに対して、株枯病菌をコンポスト施用土壌中にかん注接種し、挿し木したイチジク新梢の病斑拡大を対照区と比較したところ、病斑の拡大が軽減されていた。コンポスト施用によるイチジクの土壌病害軽減効果は、実験結果より樹体の抵抗性ではなく株枯病菌の繁殖を妨げるなど、土壌の抑止効果に起因したと推察された。そのため、新梢への株枯病菌接種時に使用されたコンポスト連用区土壌である牛糞堆肥連用区と地植えのイチジク園（バーク堆肥連用区）とそれぞれの対照区、合計4区について、土壌微生物群の解析を行った。その結果、細菌および真菌について門レベルでの差はなかった。今回は詳細な解析を行う時間がなかったが、今後詳細な解析を行いたい。

コンポスト利用における病原微生物の危険性については、実際にし尿を濃縮するのに使用される電気浸透式脱水機の熱処理時に想定される温度領域で、大腸菌や腸球菌、大腸菌ファージを病原微生物の指標として利用し、不活化に重要となる加熱温度と時間の関係を実験室内で検討し、熱不活性化条件を決定した。さらに実際の電気浸透式脱水機の処理前後の汚泥を採取して、大腸菌と大腸菌ファージにおいて調査した。大腸菌については、脱水前後で50V時において、 $-5 \log$ 以上の不活性率を示し、良い結果を得る事ができた。また、土壌改良効果が期待できると考えられている枯草菌については、電気浸透式脱水機による高熱処理を行っても残存することが判明した。有用な微生物については、電気浸透式脱水機による処理後も余剰汚泥中の有害物などの分解に役立つと考えられる。今回の研究報告では、最終目標まではたどり着くことはできなかったが、3年間という短期間において良い結果を出せたと考えている。

環境政策への貢献

有機性廃棄物のコンポスト化は、循環型社会構築の一つに位置づけられているが、日本におけるコンポスト利用率は低い。高いコンポスト利用率を目指すには、その安全性と有効性を明確に示すことが重要である。この観点から、本研究では有機性廃棄物コンポストである牛糞堆肥、し尿、バーク堆肥について、科学的に植物に有効であることを示したいと考えた。コンポストについては経験的に使用することにより作物が健やかに生長することが一般的に知られているが、科学的に有効であることを示した報告書はお多くない（文献5、6）。そこで、大阪府の重要な農作物であるイチジクとイチジクの土壌病原真菌を指標に用いた。イチジクは、果樹としては非常に生長が早く、生育だけではなく果実の品質の向上も示せることを考慮して選んだ。結果的にコンポスト施用により、土壌の理化学性は向上した。特に腐植の割合が増加し、透水性、保水性ともに向上した。また、イチジクの生育はもとより果実の収穫量と品質（糖度が上昇）が向上した。コンポストを連用した土壌には、土壌病原真菌によるイチジクの地下部の病徴を軽減する能力があることも判明した。この病徴の軽減は、土壌微生物群が土壌病原真菌の増殖を抑制していると考えられるので、土壌微生物群の種類を膨大なデータを得られる次世代シーケンサーを用いた解析法（メタゲノム解析）を使用して行った。残念ながら、細菌と真菌については、門レベルでの顕著な差は認められなかったが、今後も詳細な解析を続けて行きたいと考えている。以上のことから、有機性廃棄物であるコンポスト施用により、土壌の理化学性が向上し、イチジクの生育とともに果実の収穫量と品質が向上し、土壌真菌によるイチジクの病徴発現を軽減することも科学的に示した。この事により、環境政策として、積極的にコンポストの利用を推奨できるため、貢献度が大きいと考えられる。

また、し尿を含んだ汚水中には病原性微生物が含まれる危険性があり、それを濃縮した余

剩汚泥もコンポストとして有効利用される時にも危険性が伴う。昨今、この汚泥を再資源（助燃材）として有効利用するため、含水率を低減化する目的で電気浸透式汚泥脱水機が開発されている。当該装置は脱水時の電気抵抗により高熱を発生することから、その熱を利用することにより余剰汚泥中の病原微生物による危険性を回避できる可能性がある。そこで、本研究では大腸菌とその大腸菌に感染するウイルスであるバクテリアファージ及び腸球菌を指標病原微生物として利用して不活化に重要となる加熱温度と時間の関係を実験室内で検討し、熱不活性化条件を決定した。また、実際に大阪府で稼働し始めた電気浸透式脱水機を前提に脱水前後の汚泥中の大腸菌および大腸菌ファージの濃度変化を測定し、これらの微生物が不活化されていることを示した。更に土壤改良効果が期待できると考えられる枯草菌については、電気浸透式脱水機による処理後においても不活化されずに残存し、コンポストとして利用する場合における有用性を明確にした。このことから、し尿を濃縮しコンポストとして安全に利用できることも示せたので、環境政策に貢献できたと考える。

研究成果の実現可能性

今回の研究成果として、有機性廃棄物コンポストを農業に使用することが推奨できる。ただし、安定的に品質の良い牛糞堆肥、バーク堆肥などを供給するシステムが必要となる。詳細な解析には至らなかった土壤微生物群のメタゲノム解析については、その解析方法を確立できたので、これから必要に応じて土壤微生物群の診断を可能にする道が開けたと考えている。費用については、高価で1検体あたり数十万円かかる。今後、安価になる可能性はあると考えられるが、そのデータ解析には専門家が必要となる。そのため、バイオインフォマティクスに精通した人材を育成していく必要もあるであろう。一方、し尿濃縮をおこない、安全にコンポスト利用できる候補としての電気浸透式脱水機については、予算や規模および用途に応じて、施設の建設を考慮する必要がある。その価格は流動的ではあるが、資源の乏しい我が国でコンポストとして安全に使用できる廃棄物を作製するのに重要となると思われる。

結論

コンポスト連用により土壤は改善され指標果樹としたイチジクにおいて、果実の収穫量・品質を向上させた。

コンポストを連用した土壤には、土壤病菌によるイチジク病徴発現を軽減させる効果があった。今回の実験結果より、この効果は樹体の抵抗性ではなく株枯病菌の繁殖を妨げるなど、土壤の抑止効果に起因していると推察された。この土壤の抑止要因として、土壤微生物群の関与が考えられたが、土壤中の細菌および真菌について、門レベルでの大きな違いは見つけられなかった。

コンポスト利用における病原微生物の危険性については、し尿を濃縮した形態の余剰汚泥にターゲットを絞り実験を行った。実際にし尿を濃縮するのに使用される電気浸透式脱水機の熱処理時に想定される温度領域で、大腸菌や腸球菌、大腸菌ファージを病原微生物の指標とし、熱不活性化条件を決定した。その後、実際の電気浸透式脱水機の処理前後の汚泥を採取し、大腸菌と大腸菌ファージに的をしぼり調査し、良い結果を得る事ができた。環境中で有害物などの分解に役立つと考えられている枯草菌については、電気浸透式脱水機による高熱処理によっても残存することがわかり、有用な微生物については、汚泥中の有害物の分解に役立っていることが分かった。総合的に考えて、今回の研究

報告では、最終目標まではたどり着くことはできなかったが、3年間という短期間に良い結果を出せたと考えている。

【研究目的】

有機性廃棄物のコンポスト化は、循環型社会構築の一つに位置づけられているが、その94%をコンポスト化しているオランダ（2005年）に比べると、日本におけるコンポスト利用率は低い。高いコンポストの利用率を目指すためには、コンポストの需要を高めることが必要であるが、そのためにはコンポストの有効性と安全性を客観的視点から明確に示すことが重要である。そこで本研究では、コンポストの安全性の科学的根拠を示すため、コンポスト原料中に含まれる病原微生物の検出、施用土壌の微生物叢の変遷や植物の生育に与える影響（土壌環境や土壌病防除など）を調査し、コンポスト施用における有効性及び安全性を微生物学的解析に基づき科学的に評価する。また、それぞれの農耕土壌に適したコンポスト施用（種類・量）方法を検討する。さらに病原微生物に対する安全性の確保についても検討する。

1. コンポスト施用が植物に与える有効性について

コンポスト施用の有効性について、植物の生育に及ぼす影響と病原菌に対する植物の応答に及ぼす影響の2点について実験を行った。植物の生育については、新梢の総延長や地下部の乾燥重量だけでなく、果実の総重量や果実の糖度についても計測し、コンポストの有効性を詳細に解析した。また、コンポスト施用による土壌の理化学的な改善についても調査した。

病原菌に対する植物の応答に及ぼす影響については、病原菌の植物体に対する病徴発現の軽減が観察されたが、このコンポストの影響が何に起因しているのかを追跡するため、宿主側（イチジク）の抵抗力と土壌の持つ病原真菌増殖抑制力について実験を行い、機序の解明に取り組んだ。

2. 土壌中の微生物の解析について

コンポスト施用が植物に与える有効性をコンポストが土壌中の微生物群の変遷に影響を及ぼしていると考えて、土壌中の微生物群の解析を行うことを最終目的とした。まず、土壌微生物群のDNA抽出法と土壌微生物群のメタゲノム遺伝子解析法の確立を行った。その後、病原菌に対する植物の応答に及ぼす影響の実験において、病害によるイチジクの病徴発現緩和を示した鉢植え土壌および、試験管内で株枯病菌接種によるイチジク新梢の病徴発現の軽減効果を示した土壌について、同様の手法を用いて土壌微生物群の解析を行った。

3. コンポストの原料となる余剰汚泥中の病原性微生物の熱不活性化の検討

し尿を含んだ汚水中には病原性微生物が含まれる危険性があり、それを濃縮した形態の余剰汚泥中においても同様に危険性がある。この余剰汚泥は濃縮処理や脱水処理後、コンポストとして有効利用される場合もある。近年、汚泥を再資源（助燃材）として有効利用するため、含水率を低減化する目的で電気浸透式汚泥脱水機が開発されている。当装置は汚泥脱水時の生じる電気抵抗により汚泥が発熱する特徴を有していることから、本研究では、その熱を有害微生物の不活化に対し有効利用することに着目し、この電気浸透式汚泥脱水機をモデルに、さまざまな指標微生物を利用して不活化に重要となる加熱温度と時間の関係を実験室内で検討し、熱不活性化条件を決定する。また、実働している電気浸透式汚泥脱水機による加熱前後に実際のサンプルを使用し、その有効性を調査する。

上記の各項目について研究目的、研究方法、および結果と考察をもうけ、最後に結論でまとめたい。

1-1. コンポスト施用が植物に与える有効性について

1) コンポストの施用による土壤理化学性改善効果とイチジク生育への影響調査

バーク堆肥、牛糞堆肥および汚泥の連用により、土壤の透水性、保水性、塩基置換容量 (CEC) 等土壤理化学性の違いを明らかにし、イチジクの栽培を通じて樹体生育、果実生産 (収量および品質) に及ぼす影響を調査する。

【材料および方法】

イチジク「榊井ドーフィン」2年生樹を供試した。基本用土としてマサ土 (花崗岩風化土) とピートモスを混合した土壤 (体積比でマサ土:ピートモス=4:1) を充填した25Lポットで、市販のバーク堆肥 (フジミバーク)、市販の牛糞堆肥 (発酵牛糞)、し尿汚泥 (トミヤマゆうき) を用い (対照区はコンポスト無施用)、2年間連用栽培した。基本的な栽培管理は前年に伸長した枝を3芽残し剪定を行った。発生する新梢は基本的に3本を残して芽欠きし、新梢の葉腋から発生する副梢もすべて除去した。また、伸長著しい新梢は先端を摘心した。

表3 供試したコンポスト

種類 (名称)	窒素 (N) (%)	リン酸 (P) (%)	カリウム (K) (%)
バーク堆肥 (フジミバーク)	0.7	0.4	0.3
牛ふん堆肥 (発酵牛ふん)	0.6	0.5	0.4
し尿汚泥 (トミヤマゆうき)	5.0	5.0	0.3

注) 事業者による表示値

バーク堆肥、牛糞堆肥では土壤表面に1鉢あたり800g (2L) 施与した。また、し尿汚泥は窒素濃度で施与量を調整し600g (Nで施肥量に合わせる) を土壤表面に施与した。対照区はコンポスト無施用とした。施肥はすべての区に対し、1鉢あたり窒素成分で30g (標準量) を緩効性被覆肥料 (ハイコントロール085 100日タイプ) で与えた。かん水は井水を使用し、タイマーによるチューブ灌水を朝夕2回1分間ずつ (100mL/回) 行った。

調査は樹体の生育と果実生産について行った。まず、初期生育として新梢の伸長を6月末まで測定した。収穫適期に達したイチジク果実は順次調査を行った。調査項目は果実重量および果実糖度 (Brix 値) とした。最終的に地上部を切除し、新梢の生長量 (全長、基部幅、乾物重) を計測するとともに、地下部は鉢土を丁寧に水洗いし、根部の乾物重を計測した。また、同時に土壤の理化学性調査を実施した。調査項目は透水性 (土壤カラム法)、保水性 (最大含水量)、pH (ガラス電極法)、EC (1:5 水抽出法)、窒素 (比色法)、リン酸 (比色法) カリウム (比色法)、塩基置換容量 (CEC) (セミマイクロ Schollenberger 法)、腐植含量 (乾式燃焼法) とした。

透水性は 200ml のカラムに供試土壌を充填し、上部から水道水を 100ml 注いで下部より 80ml 排出される時間を測定し、対照区を 100 としたときの時間比を求めた。保水性は濾紙で底をつけた 100ml の採土円筒に風乾した供試土壌を入れ、底部を水に浸し毛管飽和させ、円筒ごと炉乾させた時の含水量を 100g あたりに換算した値を求めた。pH、EC、塩基置換容量（CEC）、腐植含量は文献 7 に従い、窒素、リン酸、カリウムは文献 8 に従い値を求めた。

【結果】

(1) 土壌の理化学性への影響

栽培終了後の鉢土を用い、土壌の理化学性について調査した結果、バーク堆肥、牛糞堆肥を施用することで透水性（水はけ）が良くなるとともに保水性が増す結果を得た（図 9、図 10）。一方、し尿汚泥を施用すると保水性向上効果は確認できたが、透水性が若干不良となった（図 9、図 10）。し尿汚泥は細かな粒子から構成されているため、水分を吸収すると泥状になることで透水不良を起こすと考えられた。また、コンポストを施用することで土壌中の有機物含量が増え、腐植含量が高まると推察された（表 4）。栽培終了時の土壌を分析したが、pH、EC、窒素、リン酸、カリウムおよび塩基置換容量（CEC）についてはコンポスト施用の有無により大きな違いは見られなかった。

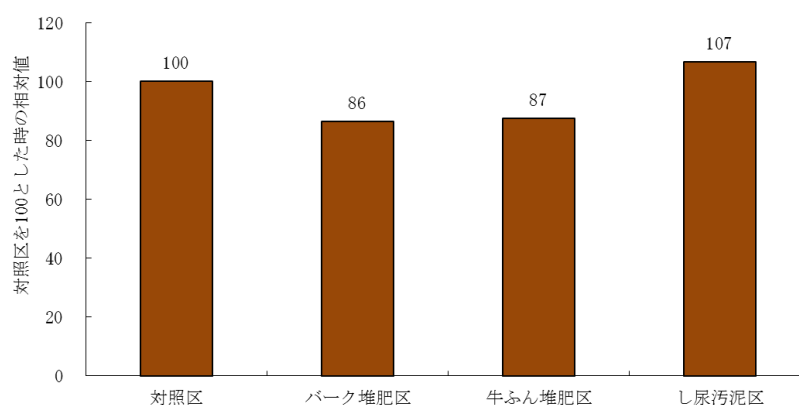


図 9 各用土の透水時間の比

透水比：標準用土を 100 とした場合の透水時間比

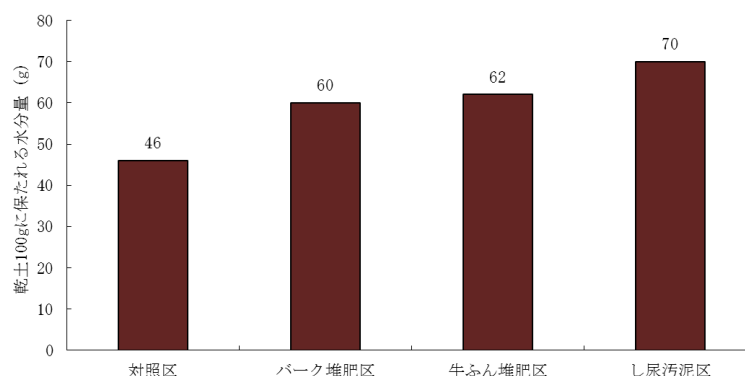


図 10 各用土の乾土 100g に保たれる水分量

表 4 各試験区における土壤理化学性

試験区	pH	EC (dS/m)	土壤 N mg/100g	土壤 P ₂ O ₅ mg/100g	土壤 K mg/100g	塩基置換容量 CEC (me/100g)	腐植(%)
バーク堆肥区	4.8	0.09	0.1	9.0	5.1	26.5	4.7
牛ふん堆肥区	5.2	0.08	0.1	6.0	4.5	20.2	3.9
し尿汚泥区	5.0	0.05	0.1	3.0	2.4	17.7	3.5
対照区	5.5	0.09	0.1	6.0	4.4	24.6	2.6

標準的なかん水

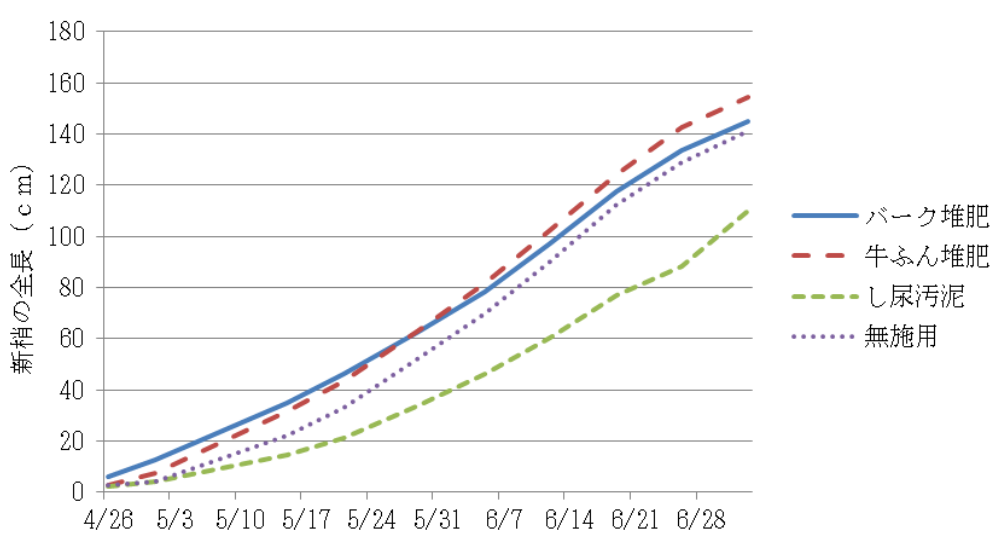


図 11 各コンポスト施用区におけるイチジク新梢伸長の推移

(2) 樹体生育への影響

初期生育については、バーク堆肥、牛糞堆肥を連用した場合で新梢の伸長促進が観察された。し尿汚泥区については新梢の伸長が抑えられた (図 11、表 5)。

イチジク樹を解体して生育量を調査した結果、対照区に比較して、牛糞堆肥を連用した区で地上部乾物重が有意に増加し、生育促進効果が観察された (表 5)。初期生育が劣っていたし尿汚泥区についても、解体による全乾物重は最終的に対照区と同程度の生育結果となった (表 3)。地下部乾物重については試験区ごとの有意な差は見られなかったが、牛糞堆肥区では全乾物重で有意な生育促進傾向が観察された。

表5 各試験区におけるイチジク生育量

試験区	地上部乾物重 (g)	新梢数	新梢の 乾物重 (g)	新梢の総延長 (cm)	新梢の基部径 (cm)	地下部乾物重 (g)	全乾物重 (g)
バーク堆肥区	335.0 b	3.0	111.7	473.5	17.8	169.3	504.3 b
牛ふん堆肥区	492.0 a	3.0	164.0	617.5	20.1	211.0	703.0 a
し尿汚泥区	243.0 b	2.2	110.5	412.4	17.3	174.2	417.2 b
対照区	187.8 b	3.0	62.6	429.6	15.0	149.3	337.0 b

異なるアルファベット間で5%水準で有意差あり (n=4)

平成25年1月8日調査 標準的な施肥

(3) 果実生産への影響

果実の収穫時期については、試験区間で差は認められなかった。果実収量はし尿汚泥区では収穫果数が少なく収量が低下したものの、バーク堆肥区、牛糞堆肥区とも対照区と同程度であった。果実の糖度についてはバーク堆肥区、牛糞堆肥区で高くなった (表6)。

表6 各試験区におけるイチジク果実品質

試験区	収穫開始日 (月/日)	1樹当たり の収穫数 (個)	果実重量 (g)	1樹当たり の収穫量 (g)	糖度 (Brix°)
バーク堆肥区	7/31	20.0 a	51.2	1024.8 a	19.1 a
牛ふん堆肥区	8/3	23.0 a	53.5	1231.2 a	18.9 a
し尿汚泥区	8/3	13.3 b	65.5	867.5 b	15.7 b
対照区	7/31	19.0 a	52.9	1005.9 a	16.6 b

異なるアルファベット間で5%水準で有意差あり

標準的なかん水

以上の結果、コンポストの連用により土壌の理化学性が向上し、イチジクの生育が促進される傾向があること、果実生産については、し尿汚泥を除き、収量が減少することなく高糖度になるなど高品質化が図れることが見いだされた。し尿汚泥については、土壌への施用により物理性が悪くなるため、生育の抑制にともなって収量が低下することが懸念され、施与量を減ずる必要があると考えられた。

2) コンポストの有無およびかん水量の違いによるイチジク生育への影響調査

コンポストの施用により土壌の理化学性が変化し、イチジクの生育に差が認められるが、かん水量の違いによってもイチジクの生育差が生じる可能性があるため、コンポストの施用およびかん水量の違いによる土壌の理化学性への影響を明らかにする。

【材料および方法】

試験材料、その他の条件は先の試験と同様である。バーク堆肥区および対照区に対し、かん水量

を変えて試験を実施した。

かん水はタイマーによるチューブ灌水を朝夕2回1分間ずつ(100mL/回)行う区(標準かん水区)および1/2に減じた区(朝1回1分間)(1/2かん水区)を設けた。なお、標準かん水量でも夏季高温時には鉢用土が乾燥し、生育への影響が考えられたため、平成24年8月1日～同年9月30日の間は、いずれの区もかん水回数を増やし、標準かん水区では朝夕4回1分間ずつ、1/2かん水区では朝夕2回1分間ずつとした。試験規模は1区4鉢とした。

調査項目は果実重量および果実糖度(Brix値)とした。イチジク樹の生育に関する最終調査は平成25年2月7日に地上部を切除し、地上部の生長量(新梢伸長量)を計測するとともに、地下部は鉢土を丁寧に水洗いし、根量(乾物重)を計測した。また、同時に土壌の理化学性調査を実施した。調査項目は透水性、保水性、pH、EC、窒素、リン酸、カリウム、塩基置換容量(CEC)、腐植含量とした。

【結果】

(1) 土壌の理化学性への影響

土壌の理化学性についてはコンポスト施用の有無による違いは認められたが、かん水量の違いによる大きな違いは認められなかった。かん水量が少ないと若干肥料成分が残存する傾向を示した。

なお、バーク堆肥施用区で腐植含量が高まり、塩基置換容量(CEC)が高まる傾向を示した(表7)。

表7 各試験区における土壌理化学性

試験区	pH	EC (dS/m)	土壌 N mg/100g	土壌 P ₂ O ₅ mg/100g	土壌 K mg/100g	塩基置換容量 CEC (me/100g)	腐植(%)
バーク堆肥+標準かん水区	4.8	0.09	0.1	9.0	5.1	26.5	4.7
+ 1/2かん水区	4.8	0.36	0.2	10.5	8.2	27.1	5.0
無施用 + 標準かん水区	5.5	0.09	0.1	6.0	4.4	24.6	2.6
+ 1/2かん水区	4.9	0.09	0.1	9.0	4.5	18.9	2.7

標準的な施肥

(2) 樹体生育への影響

初期生育についてはかん水量に影響し、1/2かん水区では新梢の伸長が押さえられた。また、バーク堆肥を施用した区で伸長が促進される傾向を示した(図12)。

イチジク樹を解体して生長量を調査した結果、かん水量による生育差が大きく、かん水量が制限されると生長が抑制される傾向を示した(表8)。しかし、1/2かん水条件下でもバーク堆肥を連用することで生長量の減少量を低減する効果が見いだされた(表8)。

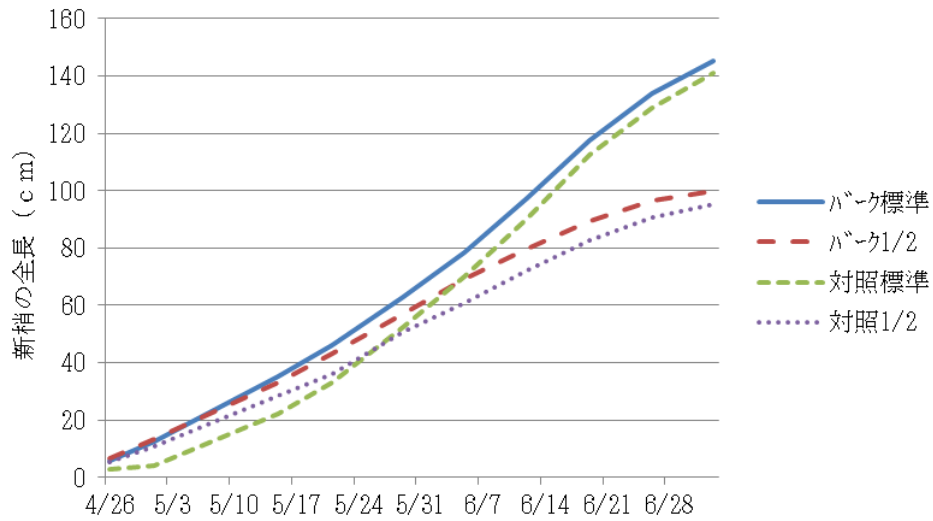


図 12 コンポスト（バーク堆肥）施用の有無およびかん水量の違いがイチジクの初期生育に及ぼす影響

表 8 各試験区におけるイチジク生育量

試験区	地上部乾物重 (g)	新梢数	新梢あたりの乾物重 (g)	新梢の総延長 (cm)	新梢の基部径 (cm)	地下部乾物重 (g)	全乾物重 (g)
バーク堆肥+標準かん水区	335.0 a	3.0	111.7	473.5	17.8	169.3 a	504.3 a
+ 1/2かん水区	234.6 b	3.0	78.2	364.6	15.4	148.6 a	383.1 ab
無施用 + 標準かん水区	187.8 b	3.0	62.6	429.6	15.0	149.3 a	337.0 ab
+ 1/2かん水区	130.7 b	2.7	48.4	337.6	13.7	96.1 b	226.9 b

異なるアルファベット間で5%水準で有意差あり (n=4)
平成25年1月8日調査 標準的な施肥

(3) 果実生産への影響

果実については、生長量と同様にかん水量による差が大きく、かん水量を制限することで収量が減少し、果実糖度も減少した（表 9）。

表9 各試験区におけるイチジク生育量

試験区	収穫開始日 (月/日)	1 樹当たり の収穫数 (個)	果実重量 (g)	1 樹当たり の収穫量 (g)	糖度 (Brix°)
バーク堆肥+標準かん水区	7/31	20.0 a	51.2 a	1024.8 a	19.1 a
+ 1/2かん水区	7/31	7.3 b	33.8 b	245.9 b	14.6 b
無施用 + 標準かん水区	7/31	19.0 a	52.9 a	1005.9 a	16.6 b
+ 1/2かん水区	7/31	6.6 b	32.2 b	211.6 b	15.9 b

異なるアルファベット間で5%水準で有意差あり
標準的な施肥

以上の結果、イチジクの生育および果実収量、品質にはかん水量が大きく影響することが明らかとなったが、コンポスト施用により、低かん水条件下でも生育、収量を維持する傾向が認められた。

3) コンポストの有無および施肥量の違いによるイチジク生育への影響調査

コンポストの施用により土壌の保肥力向上効果が期待され、慣行の肥料よりも少ない施用でも栽培が可能かどうか見極めるため、減肥によるイチジクの生育に及ぼす影響を調査する。

【材料および方法】

試験材料、その他の条件は先の試験と同様である。バーク堆肥区、牛ふん堆肥区および対照区に対し、施肥量を変えて試験を実施した。

施肥は慣行に従い、1鉢あたり窒素成分で30g（標準）または10g（1/3施肥）を緩効性被覆肥料（ハイコントロール085 100日タイプ）で与えた。また、かん水はタイマーによるチューブ灌水を朝夕2回1分間ずつ（100mL/回）行った。なお、標準かん水量でも夏季高温時においては鉢用土が乾燥し、生育への影響が考えられたため、平成24年8月1日～同年9月30の間は、いずれの区もかん水回数を増やし、標準かん水区では朝夕4回1分間ずつ、1/2かん水区では朝夕2回1分間ずつとした。

【結果】

(1) 土壌の理化学性への影響

土壌の理化学性についてはコンポスト施用の違いは認められたが、施肥量の違いによる差は認められなかった（表7）。施肥量が少ない区で残存肥料成分が少なかった。バーク堆肥、牛糞堆肥いずれも施用することで腐植含量が高まり、塩基置換容量（CEC）が高まる傾向を示した（表10）。

表 10 各試験区における土壌理化学性

試験区	pH	EC (dS/m)	土壌 N mg/100g	土壌 P ₂ O ₅ mg/100g	土壌 K mg/100g	塩基置換容量 CEC (me/100g)	腐植(%)
バーク堆肥区	4.8	0.09	0.1	9.0	5.1	26.5	4.7
+1/3施肥	5.4	0.05	0.1	2.6	0.9	16.4	3.7
牛ふん堆肥区	5.2	0.08	0.1	6.0	4.5	20.2	3.9
+1/3施肥	5.6	0.06	0.1	2.6	1.1	18.2	3.3
対照区	5.5	0.09	0.1	6.0	4.4	24.6	2.6
+1/3施肥	5.6	0.06	0.1	4.5	1.6	16.8	3.0

標準的なかん水

(2) 樹体生育への影響

初期生育について、施肥量の違い、コンポストの施用の有無による差は認められなかった(図 13)。イチジク樹を解体して生長量を調査した結果、施肥量の違いによる生育差が見られた。地上部乾物重については牛糞堆肥標準施肥区で最も重かった。地下部乾物重はコンポストの施用による一定の傾向が認められなかったが、バーク堆肥区と対照区では施肥量を削減した試験区において地下部乾物重が増大した(表 11)。

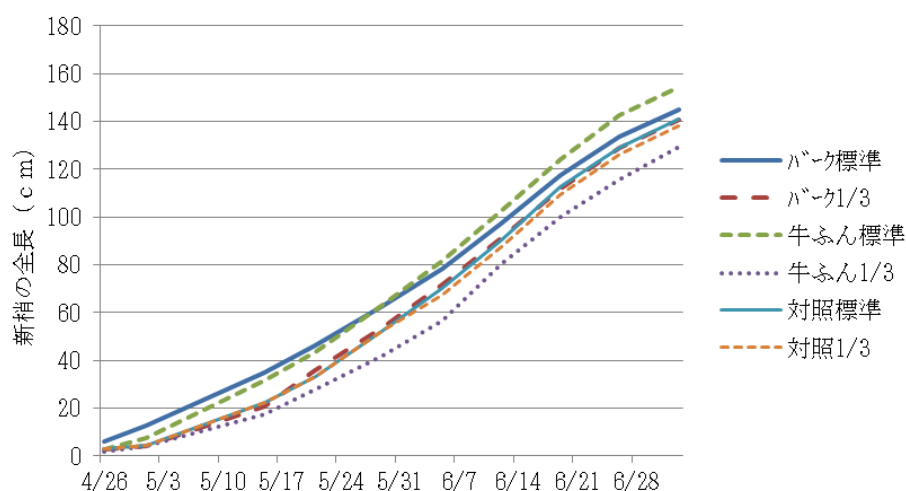


図 13 コンポスト(バーク堆肥)施用の有無および施肥量の違いがイチジクの初期生育に及ぼす影響

表 11 各試験区におけるイチジク生育量

試験区	地上部乾物重 (g)	新梢数	新梢あたりの 乾物重 (g)	新梢の総延長 (cm)	新梢の基部径 (cm)	地下部乾物重 (g)	全乾物重 (g)
バーク堆肥区	335.0 b	3.0	111.7	473.5	17.8	169.3 b	504.3 b
+1/3施肥	340.3 b	2.7	126.0	500.1	18.9	270.4 a	610.7 ab
牛ふん堆肥区	492.0 a	3.0	164.0	617.5	20.1	211.0 a	703.0 a
+1/3施肥	307.0 b	3.0	102.3	567.0	17.7	220.0 a	527.0 b
対照区	187.8 b	3.0	62.6	429.6	15.0	149.3 b	337.0 c
+1/3施肥	266.0 b	3.0	88.7	527.7	17.0	257.9 a	523.9 b

異なるアルファベット間で5%水準で有意差あり (n=4)

平成25年1月8日調査 標準的な施肥

(3) 果実生産への影響

果実については、生長量と同様に施肥量による差が大きく、施肥量を減らすことで収量が減少した (表 12)。糖度については一定の傾向が認められなかったが、標準的な施肥を行う条件下では、コンポスト施用により糖度が高まる傾向を示した。

表 12 各試験区におけるイチジク生育量

試験区	収穫開始日 (月/日)	1 樹当たり の収穫数 (個)	果実重量 (g)	1 樹当たり の収穫量 (g)	糖度 (Brix°)
バーク堆肥区	7/31	20.0 a	51.2 a	1024.8 a	19.1 a
+1/3施肥	7/31	18.4 ab	40.8 b	750.4 b	17.2 b
牛ふん堆肥区	8/3	23.0 a	53.5 a	1231.2 a	18.9 a
+1/3施肥	8/3	17.0 b	37.8 b	642.6 b	18.1 a
対照区	7/31	19.0 a	52.9 a	1005.9 a	16.6 b
+1/3施肥	7/31	16.1 b	39.5 b	636.3 b	17.4 b

異なるアルファベット間で5%水準で有意差あり
標準的なかん水

以上の結果、イチジクの生育および果実生産性は、施肥量の削減によって減退することが示された。コンポスト施用による増収効果は認められなかったが、標準的な施肥を行う条件下では果樹糖度が高まる効果が認められた。

【まとめ】

バーク堆肥、牛糞堆肥では連用することにより、土壌の理化学性（物理性、化学性）が改善される傾向を示し、イチジクの生育促進効果が見られた。このことは土壌の理化学性の改善によって生育が促進されることを示すものである。また、今回設定した試験条件下では、かん水量の差が生育差に大きく影響を及ぼし、かん水量が少ないと生育不良となり、イチジクの収穫量や果実品質にも悪い影響を及ぼした。しかし、低かん水条件においても、コンポストの施用によりその影響が軽減されることが示された。コンポスト施用は保水性向上効果にもつながるため、これらの要因によって生育が維持された可能性がある。また、施肥量を減じることでイチジクの生育には大きく影響を及ぼさないように見えたが、果実生産は明らかに低肥料区で劣る傾向を示した。このことは、樹体に蓄えた栄養を利用して成長は維持されたが、樹体栄養が消耗した分、果実の生産力低下につながったと考えられた。

耕作地とポット栽培では環境条件が異なるため、圃場レベルでの試験を実施する必要があるが、ポット栽培において、土壌表面にコンポストを施用することでも、耕耘をしなくても土壌改良効果が見られた。

果樹栽培において、土壌は毎年耕耘できないため、何も施さなければ経年劣化していくが、コンポストを連用することで劣化を抑え、安定した果実生産が可能になると考えられた。

1-2. コンポスト施用によるイチジク株枯病の抑止効果

【目的】

平成22年度および23年度の研究において、コンポスト施用による株枯病抑止効果が確認された。しかし、これらの研究はポット土壌を用いて行っていたもので、一般的な農耕地土壌での検討は行っていない。また、現地農家で使用されているコンポストは牛糞堆肥、バーク堆肥、剪定枝堆肥であるが、剪定枝堆肥の効果は検討していない。そこで平成24年度は、剪定枝堆肥を連年施用したイチジク園の土壌を用い、株枯病抑止効果について確認した。なお、本試験におけるイチジク品種は榊井ドーフィンである。

【材料および方法】

大阪府内の農家のイチジク園において、約 $0.4\text{m}^3/\text{m}^2$ のコンポスト（剪定枝堆肥）を平成17、18年の2回に分けて地表に施用された土壌（現地コンポスト区）と、無施用の土壌（現地対照区）を用いて試験に供した。供試土壌は平成24年11月19日にそれぞれ採取し、以下のようなポテトデキストロース寒天培地上で予め培養した株枯病菌 *Ceratocystis fimbriata* を混和した。この土壌に、野外の同一条件で生育した健全なイチジク新梢を挿し木し、バーク堆肥を施用しなかった土壌に挿し木した場合と病斑の拡大を比較した（図14）。

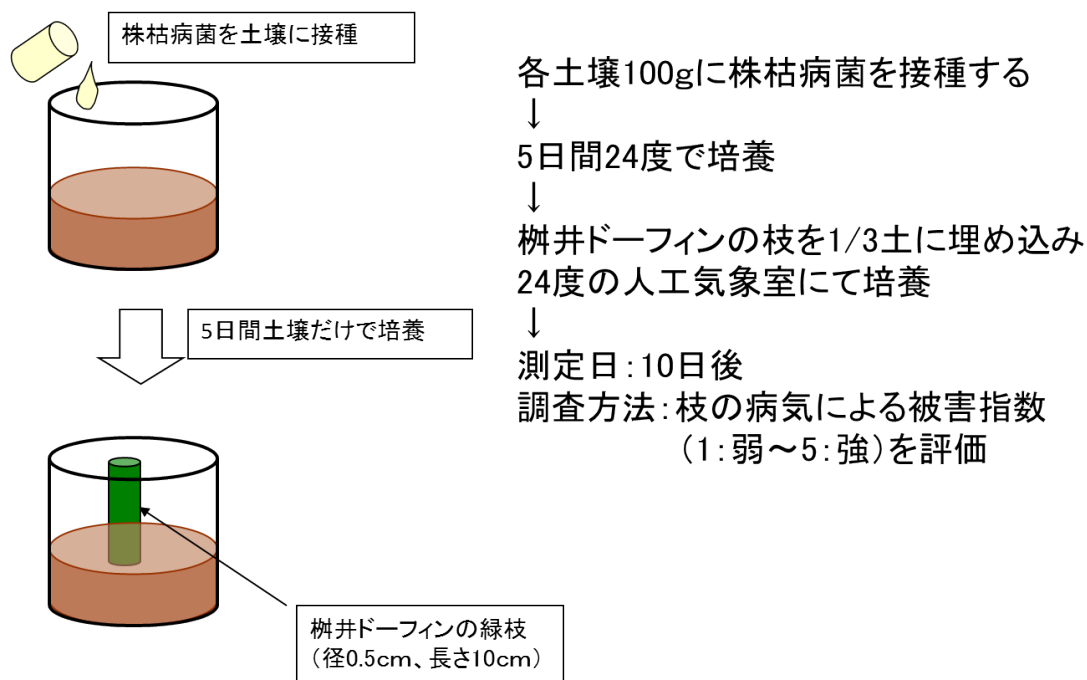


図 14 土壤への株枯病菌接種および新梢の挿し木試験

【結果および考察】

各土壤の土壤分析の結果を表 13 に示す。現地対照区では土壤 pH が 4.9 と低かったが、現地コンポスト区では堆肥の緩衝能の効果で土壤 pH は 6.7 と適正範囲になった。また肥料成分については両区とも大きな差はなかったと考えられる。

各区土壤の挿し穂の地下部には黒褐色の壊死が認められたが、その進行程度はコンポスト区の方がマン・ホイットニーの *U* 検定 ($P < 0.05$) によって有意に軽微であった (図 15、図 16)。現地イチジク園の土壤でもコンポスト施用することで株枯病を抑制する効果が認められた。

表 13 各土壤の理化学性

試験区	pH	EC (dS/m)	土壤 N mg/100g	土壤 P ₂ O ₅ mg/100g	土壤 K ⁺ mg/100g
現地コンポスト区	6.7	0.27	10.5	4.5	1.9
現地対照区	4.9	0.25	9.5	7.2	1.9



図 15 接種 10 日後のイチジク枝
(左：現地対照区、右：現地コンポスト区)

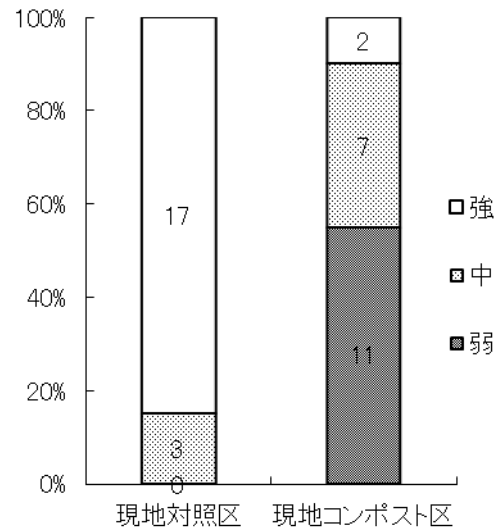


図 16 各被害指数の割合

2. 土壌中の微生物の解析について

【目的】

コンポスト施用が植物に与える有効性は、コンポストが土壌微生物群の変遷に影響を与えている可能性が高いと考え、土壌微生物群のメタゲノム解析を最終目標とした。そのため、土壌からの土壌微生物群の DNA 抽出法およびそのメタゲノム解析法の確立を行う。その後、コンポスト施用により、株枯病菌接種後にイチジク地下部の病徴発現軽減を示した土壌および試験管内で土壌中に接種した株枯病菌による新梢に対する病徴発現軽減を示した土壌について、土壌微生物群の解析を行った。

【材料および方法】

土壌からの土壌微生物群の DNA 抽出法
ビーズを使用した方法（文献 4）を改良して、下記に示した方法を確立した（図 17）。

DNA抽出の工程

1. 土壌サンプル0.25gを2mlの強化チューブ（タングステンビーズとジルコニアシリカビーズ入り）3本に入れる。
2. 土壌サンプルにライシスバッファー*0.7mlを加え、シェイクマスター（BMS）にて5分間振盪し、12000rpm, 4°Cにて5分間遠心し、上清を15mlのチューブに集める。この操作を3回繰り返す。

3. 上記で集めた上清に最終濃度が500mM となるように酢酸ナトリウム液を加え、氷上にて10分間置き、氷冷したイソプロピルアルコールを等量加えて攪拌し、3000rpm, 4° Cにて20分間遠心する。(イソプロピルアルコール沈殿) 遠心後、上清を捨て氷冷した70%エタノールで沈殿物を洗浄し、風乾してTEバッファー0.5mlを加えて4° Cに静置。
4. 抽出物が十分溶けた事を確認して、Montage-PCR Centrifugal Filter Deviceを使用してTEバッファーを加えながら、洗浄濃縮する。この過程が終了したら、アガロースゲルにて電気泳動を行ない、PCR時の希釈倍率の指標とする。

* ライシスバッファー:100mM Tris-HCl (pH8.0)/EDTA/NaCl, 3%SDS

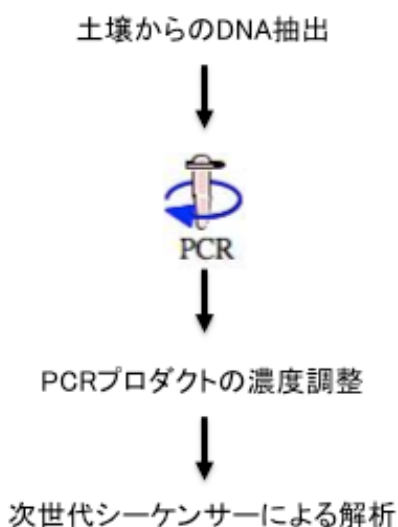


図 17 土壤米生物群の解析 (イメージ図)

プライマーについては、細菌、古細菌、真菌ともに種の同定、解析に使用されたものを選択した(下記に細菌と古細菌および真菌用のプライマーの一覧を表 14 および 15 に示した)。

表 14 細菌 (16S-1, 2, 3, 4, 6) と古細菌(16S-5)のプライマー

プライマー	名前	sequence (5'-3')	文献番号	PCR産物 [bp]	備考
16S-1	F984	AACGCGAAGAACCTTAC	9	395	V6-8
	R1378	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG			
16S-2	F967	CAACGCGAAGAACCTTACC	10, 11	272	V6-7
	R1238	GTAGCRCGTGTGTMGCCC			
16S-3	AcF243	GGATGAGCCCCGCGCCTA	12	271	V2-3 Actinomycetes specific
	AcR513	CGGCCGCGGCTGCTGGCACGTA			
16S-4	Com1	CAGCAGCCGCGGTAATAC	13	408	V4-5
	Com2	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT			
16S-5	Arch21F	TTCCGGTTGATCCYGCCGGA	14	938	V1-6 Archaea
	Arch958R	YCCGGCGTTGAMTCCAATT			
16S-6	784F	AGGATTAGATACCCTGGTA	15	278	V5-6
	1061R	CRRCACGAGCTGACGAC			

表 15 真菌のプライマー

プライマー	名前	sequence (5'-3')	文献番号	PCR産物 [bp]	備考
18S-1	NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	16, 17	390	
	Fung	ATTCCCCGTTACCCGTTG	18		
18S-2	NS7	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	17	342	V8-V9
	NS8	TCCGCAGGTTACCTACGGA	17		
18S-3	NS7	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	17	400	V8-V9
	F1Ra	CTTTTACTTCTCTAAATGACC	19		
18S-4	SR7R	AGTTAAAAAGCTCGTAGTTG	20	510	
	SR5	GTGCCCTTCCGTCAATT	20		
18S-5	NS31	TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC	17, 21, 22	600	V3-V4
	AM1	GTTTCCCGTAAGGCGCCGAA			
	AM2	GTTTCCCGTAAGGTGCCAAA			
	AM3	GTTTCCCGTAAGGTGCCGAA			

PCR の条件は、プライマーのアニーリング温度と PCR 産物の大きさを基にできるだけ同一条件で行えるように下記のように設定した。

Pre denature 94 ° C, 3 min, denature 94 ° C/annealing 55 ° C /extension 72 ° C (0.5//0.5/1 min)

35 cycles, final extension 72° C, 1 min. 16S-5 および 18S-5のみアニーリング温度を次の様に変更した。

16S-5: annealing temp. 62 ° C

18S-5: annealing temp. 60 ° C

試験土壌として、森林土壌、植物コンポストのみ連用の植物公園土壌、牛糞堆肥連用農耕地土壌を用いて、ジェノミック DNA と上記のプライマー11 種類で増幅させた PCR 産物について、GS Junior plat form 454 (Life Science 社製)を使用してメタゲノム解析を行った。その結果、細菌については、2 種類のプライマー (16S-2, 16S-6)、真菌については、3 種類のプライマー(18S-1, 18S-3, 18S-5)を選択した (研究概要の表 2 に選択理由記載、参照)。

試験管内で、株枯病菌を培養後にイチジク新梢を挿入し、一定期間培養後に株枯病菌によるイチジクの地下部の病徴発現判定で、病徴発現抑止効果が確認された土壌 2 種類、牛糞堆肥連用区とバーク堆肥連用イチジク園とそれぞれの対照区の土壌を材料として、同様に土壌微生物群のメタゲノム解析を行った (実験系については、図 14、実験結果については、図 15 および 16 を参照)。

【結果および考察】

それぞれの土壌微生物群を GS Junior plat form 454 (Life Science 社製)を使用して解析した結果の遺伝子配列が判明した数 (リード数) を表 16 に示した。

表 16 各土壌微生物の明らかになったリード数

プライマー	PCRプロダクト[bp]	牛糞堆肥区	牛糞堆肥無し	パーク堆肥区	パーク堆肥無し
16S-2	272	117576	34213	104906	110092
16S-6	278	261029	111312	285877	8046
18S-1	390	5181	5450	5072	5606
18S-3	400	15755	9004	5051	6568
18S-5	600	2603	9287	764	1212

この結果、細菌についてのリード数については、特に問題なかったが、PCR産物が得られにくかったプライマー18S-5のリード数が少なかった。

次に細菌の門レベルでの解析グラフを図18に示す。

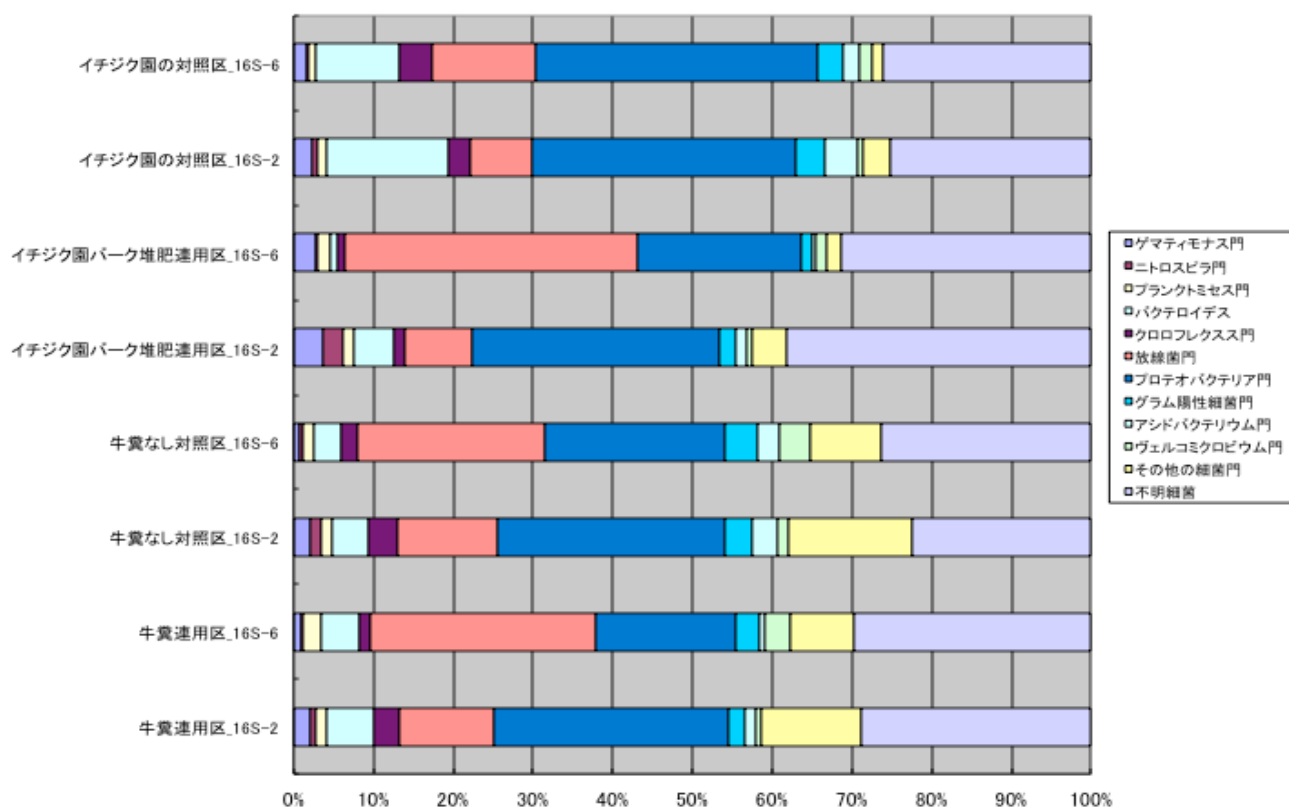


図 18 各土壌における細菌の門レベルの解析図

本事業のプロジェクトでさまざまな土壌における（森林土壌、植物コンポスト連用植物公園土壌、牛糞連用農耕地土壌、イチジク定植鉢土壌）土壌微生物群を解析してきたが、プライマーの種類により、最も頻度が高く検出された細菌の門が異なる事はなかった。今回の結果では、プライマー16S-2と16S-6による解析でパーク堆肥連用区と牛糞連用区でプロテオバクテリアと放線菌の占有率が異

なっていた。すなわち、バーク堆肥連用区と牛糞連用区の両方において、16S-2のプライマーを使用した解析では、プロテオバクテリア門が最も多く検出されたが、16S-6のプライマーを使用した解析では、プロテオバクテリア門よりも、放線菌門が多く検出された。データベース上に分類の不明な細菌の遺伝子が多く登録されており、今回の解析で不明細菌の割合が多くなったことも影響しているのかもしれない。今後、より詳細な検討を行って解析を続けて行きたいと思う。上記の事実にこだわらず、広い視野で見ると、すべての土壌について最も頻度が高く検出されたのは、プロテオバクテリアと放線菌であり、今まで得たデータと一致した。コンポスト連用区（牛糞堆肥とバーク堆肥）に比べて対照区においては、グラム陽性菌の頻度が高く検出された。（図18）コンポスト連用区と対照区に共通した特徴は、細菌の門レベルでの解析では見いだせなかった。

次に真菌について門レベルの解析グラフを図19に示した。若干プライマーによる違いはあるが、すべての区において子囊菌門の分布が多かった。バーク堆肥とその対照区においては、担子菌門の割合が対照区で多かった。またプライマー18S-5について、リード数は少ないものの（表16）特異性は高いことが明確になった。真菌の門レベルの解析からは、コンポスト連用区と対照区に共通の特徴は、見いだせなかった。

細菌についても真菌についても門レベルの解析では顕著な差が得られなかったが、今後、より詳細に解析を進めていきたい。

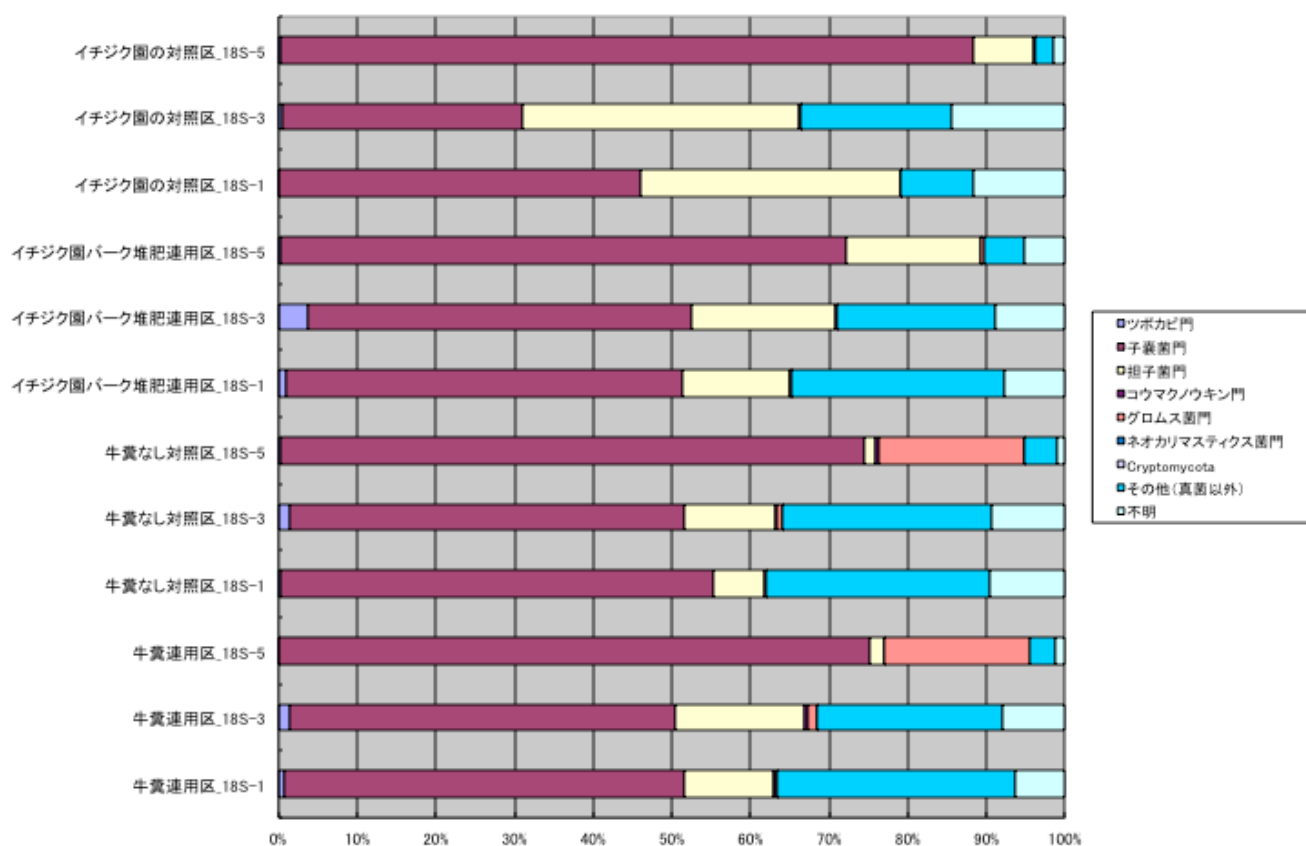


図19 各土壌についての真菌の門レベルでの解析図

メタゲノム解析についてであるが、土壌微生物群を構成する細菌については、α-プロテオバク

テリア (アグロバクテリウムなど)、b-プロテオバクテリア (ラルストニアなど)、g-プロテオバクテリア (シュードモナスなど)、G+C%の低いグラム陽性菌 (バチルスなどの)、G+C%の高いグラム陽性菌 (ロドコッカスなど)の多様な細菌を検出できることがその信頼性の指標となるのであるが(文献 31-32)、今回の解析では、これらの細菌をすべて検出した。また、大きな分類の門から、綱、目、科、詳細な分類の属までの各分類項目においてグループ数が多いことも解析の信頼性の指標となる(文献 31-32)。表 17 に細菌および表 18 に真菌について、その分類項目ごとに検出されたグループ数を示した。論文報告されているデータと比べても遜色ないものと考えられた(文献 31-32)。細菌のプライマーとしてグループ数を多く検出できる 16S-2 と 16S-6 を選択した。また、真菌については、特異性の高い 18S-1、18S-3 および 18S-5 を選択した。この表 17 において、ジェノミック DNA の解析でのグループ数が少ないのは、分類に使用されている細菌の 16S rRNA 遺伝子や真菌の 18S rRNA 遺伝子のような特定の遺伝子に特化せず、ランダムな遺伝子の塩基配列を解析する手法であるため、解析遺伝子のリード数に対して同定された遺伝子数が少ないため、必然的に検出されたグループ数も少なくなっていると考えられる。しかし、土壤微生物群の中では、際立って多い細菌の分布状況を知るために必要であった。(遺伝子増幅による偏りのない方法であるため、プライマーの選択時に役立った。)

今回のコンポスト施用 (牛糞堆肥連用区とバーク堆肥連用区) 土壤の土壤微生物群については、詳細な解析には至らなかった。今後、指標とできるような微生物に着目できれば、この事業で確立した解析方法と合わせて詳細な解析を行っていきたいと考えている。

表 17 細菌の分類項目ごとに同定されたグループ数を各プライマーごとに表示

土壌サンプル	プライマー	門	綱	目	科	属
森林	16S-1	22	37	83	179	607
	16S-2	24	39	80	176	542
	16S-4	20	35	75	166	511
	16S-6	20	34	78	181	558
	ジェノミックDNA	21	37	78	152	302
植物公園	16S-1	23	38	84	190	595
	16S-2	25	40	87	195	643
	16S-4	22	37	84	189	616
	16S-6	24	40	86	192	634
	ジェノミックDNA	18	33	70	133	271
農耕地	16S-1	23	36	81	179	583
	16S-2	26	41	88	212	757
	16S-4	23	40	85	193	654
	16S-6	25	42	90	206	647
	ジェノミックDNA	16	31	66	128	235

表 18 真菌の分類項目ごとに同定されたグループ数を各プライマーごとに表示

土壌サンプル	プライマー	門	綱	目	科	属
森林	18S-1	6	19	66	166	349
	18S-2	7	25	75	170	334
	18S-3	7	25	76	201	450
	18S-4	9	24	73	154	293
	18S-5	2	6	12	21	48
植物公園	18S-1	7	26	67	132	232
	18S-2	実施せず	実施せず	実施せず	実施せず	実施せず
	18S-3	7	19	53	108	184
	18S-4	8	21	52	103	189
	18S-5	実施せず	実施せず	実施せず	実施せず	実施せず
農耕地	18S-1	6	21	62	127	216
	18S-2	8	24	60	122	215
	18S-3	7	23	80	179	382
	18S-4	8	23	65	136	251
	18S-5	5	9	17	26	47

3. コンポストの原料となる余剰汚泥中の病原性微生物の熱不活化の検討

【はじめに】

し尿を含んだ汚水中には多くの微生物が含まれているが、時として病原性を有する細菌や、感染症を引き起こすウイルスなどが含まれる。下水処理場での病原性微生物の挙動に関しては多くの報告があり（文献 23-25）、これらのほとんどが生物反応槽（活性汚泥槽）で除去されていることが示されている。しかし、この除去は生物反応槽内で病原性微生物が不活化されたことよりも、活性汚泥に吸着されることにより低減しているとされている。すなわち、余剰汚泥として処分される汚泥中には病原性微生物が濃縮されている危険性がある。

余剰汚泥は濃縮処理や脱水処理を受けたあと、再利用の一つとして堆肥（コンポスト）として有効利用される。堆肥は肥料や土壌改良材の他に、土壌の病害予防にも効果があるとされている（文献 26-27）。堆肥化過程で汚泥中の有機物が分解されるとともに、その際の発酵熱（60～65℃）と時間（2日程度）により有害な微生物の死滅が期待されるが、発酵が不十分で温度が上昇しなかったり、不均一な発酵であった場合には残存する危険性がある。

これまで脱水処理技術としては真空脱水、ベルトプレス脱水、遠心脱水、多重円盤型脱水などがあったが、近年、新たに電気浸透式汚泥脱水機が開発された。この脱水機は処理過程でジュール熱が発生し汚泥が高温になることから、含まれている病原性微生物に対する不活化効果が期待できるのではないかと考えられた。

そこで、これまでに大腸菌、腸球菌、枯草菌、大腸菌に感染するウイルスであるバクテリアファ

ージを指標微生物として用い、実験室内で不活化に与える加熱温度と時間の関係を明らかにした。

これを踏まえ、フィールドテストとして大阪府内のし尿処理場で稼働している電気浸透式脱水機の汚泥を採取し、微生物の不活化状況を検討した。

1) 電気浸透式汚泥脱水機について

電気浸透式汚泥脱水機の基本構造は、金属製の回転ドラム（陽極）と金属ベルト（陰極）、ろ布から構成されており、2つの電極間に40～45Vの電圧が印加される。

原理図を図20に示した。前濃縮された汚泥がろ布を介して2つの電極に挟まれ圧搾される間に、負の電荷を持っている汚泥粒子は陽極付近に移動し、正の電荷を帯びた水分子はろ布を通して陰極側に移動し脱水される。この時、2つの電極の間には電流が流れ、汚泥が抵抗体となり、その結果ジュール熱が発生する。

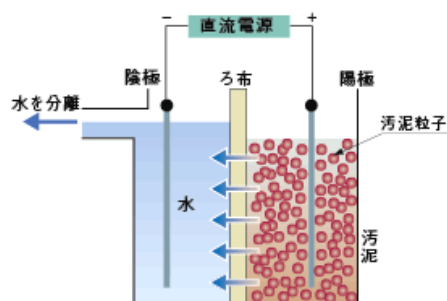


図20 電気振盪式汚泥脱水の原理

【実験方法】

(1) 脱水汚泥の温度測定

脱水時に発熱する汚泥の温度測定は、(株)日油技研工業製の以下の不可逆性示温材を用いた。これを5cm四方のガーゼに張り付け、脱水前の汚泥で薄く挟み込んだ。これを脱水機の給泥部に挿入し、排泥部で回収した。

サーモラベル 5S-65 : 65～85℃の5℃刻みで示温

サーモラベル 4E-50 : 50～65℃の5℃刻みで示温

サーモラベル 4E-70 : 70～85℃の5℃刻みで示温

(2) 汚泥からの微生物誘出方法

i) 細菌の誘出（□らの方法に準拠、文献28）

50mL遠沈管に脱水汚泥1.0g（湿重量）とリン酸緩衝液20mLを加え、ステンレスブレードの付いたホモジナイザーを用いて9,500rpm、30秒間の分散処理を行う

↓

20℃の恒温槽で20分間振盪し細菌を誘出する

↓

この懸濁液を目開き0.3mm（60メッシュ）の金属円筒でろ過し、夾雑物を除去する

↓

ろ液を細菌測定試料とする

ii) 大腸菌ファージの誘出 (金らの方法に準拠、文献 29)

【誘出液】

1 モル NaNO_3 溶液にビーフェキストラクトを 3%濃度になるよう調製
上記混合液を pH 7 に調整

【誘出操作】

50m L 遠沈管に脱水汚泥 1.0g (湿重量) と誘出液 20m L を加え、ステンレスブレードの付いたホモジナイザーを用いて 9,500rpm、30 秒間の分散処理を行う

↓

20°Cの恒温槽で 20 分間振盪しファージを誘出する

↓

これを 6,000rpm で 10 分間の遠心分離を行う

↓

デカンテーションする

沈殿物

上澄液

↓

再度これに誘出液 20m L を添加する

↓

ホモジナイザー (9,500rpm) で 30 秒間の分散処理を行う

↓

20°Cで 20 分間振盪しファージを誘出させる

↓

6,000rpm で 10 分間の遠心分離を行う

↓

注射筒にセットした $0.45\mu\text{m}$ のディスクフィルターでろ過する

↓

ろ液をファージ測定試料とする

(3) 細菌の測定

一般細菌の測定は標準寒天培地を用いて行った。大腸菌群及び大腸菌の測定は特定酵素基質培地による測定とし、IDEX 社製のコリラート MPN テストキット (以後コリラート法と記載) を用いた方法と、Merck 社製のクロモカルトコリフォーム寒天培地 (以後クロモカルト法と記載) を用いた方法で測定した。前者は損傷菌の検出率も高いとして販売されており、最確数で菌数を求める。一方、クロモカルト法はろ紙上に増殖したコロニー数をカウントする。

(4) 大腸菌ファージの測定

(独) 製品評価技術基盤機構から譲渡を受けた *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani and Chaimers 1919 (NBRC 番号 3301) を宿主菌として、RNA ファージを測定した。測定は神子らの方法 (文献 30) に準拠して行った。

【結果】

(1) 脱水時の汚泥温度

脱水機の通常運転時の印加電圧 46V 時と、50V に上昇させた時のサーモラベル写真を図 21、22 に示した。



図 21 46V 印加時のサーモラベルの示温

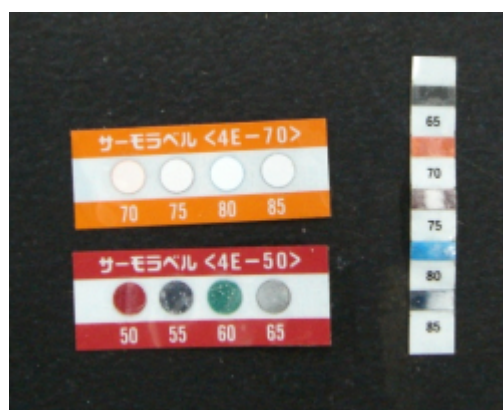


図 22 50V 印加時のサーモラベルの示温

46V 時では 55~60°C を示しており、50V 時では 1 種類のラベルは 60~65°C を、他方は 80~85°C を示していた。これは脱水時に板状に排出される汚泥中に温度むらがあるのか、サーモラベルの熱応答速度の違いかは不明である。

(2) 汚泥の含水率

脱水前の汚泥の含水率は 85.9% であり、46V 脱水時で 71.8%、50V 脱水時で 69.2% であった。

(3) 細菌数の変化

脱水前汚泥と通常運転時 (46V)、および印加電圧を 50V に上昇させたときの汚泥誘出液中の菌数と、汚泥の含水率から換算した乾重量 1g 当たりに残存していた菌数を求め、表 19 に示した。

表 19 汚泥の乾重量 1 g 当たりの細菌数

試料	含水率	一般細菌数	コリラート法		クロモカルト法	
			大腸菌群数	大腸菌数	大腸菌群数	大腸菌数
脱水前	0.859	2.7E+08	4.7E+05	1.1E+05	2.7E+05	1.3E+05
46 V	0.718	2.9E+08	1.2E+03	偽発色	4.3E+03	7.1E+03
50 V	0.692	1.4E+08	0	偽発色	6.5E+02	0

一般細菌数は脱水前汚泥 1g に 2.7×10^8 個存在していた。印加電圧 50V 時では、汚泥温度が 80°C 前後に上昇したにもかかわらず、菌数は 1.4×10^8 個と、ほとんど不活化されていなかった。

そこで、50V 脱水時汚泥の誘出液で、菌数測定時の希釈倍率が最も高いシャーレに形成したコロニーを 5 個釣菌し、これを試験管に入った滅菌リン酸緩衝液に懸濁させた。これをブロックヒーターに差し込み、 80°C 20 分の加熱処理を行った。この処理液を再度標準寒天培地に塗抹したところ、20 時間培養後に、加熱処理前と同様の形状で、粘性のあるコロニーを形成した (図 23)。

このことから、残存した細菌の多くは熱耐性がある枯草菌と考えられた。



図 23 80°C 20 分加熱処理液の標準寒天培地に生育したコロニー

コリラート MPN 法は 36°C で 20 時間培養後、図 24 のように試料水が入った溶液が黄色に発色した場合を大腸菌群陽性として、最確数を求める。同じ溶液にブラックライトを照射し、蛍光を発したものを大腸菌陽性として、最確数を求める。

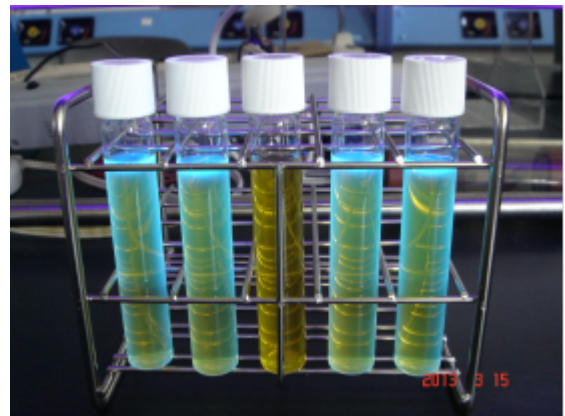
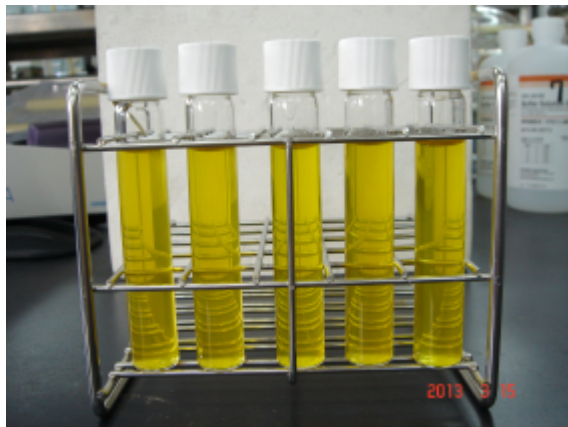


図 24 コリラート MPN 法（左：大腸菌群陽性 右：蛍光を発するのは大腸菌陽性）

大腸菌群数は脱水前が 1 g 当たり 4.7×10^5 個で 46V 脱水後で 1.2×10^3 個と、 $-21\log$ の不活化率を示していた。50V 脱水時では、誘出液中で検出されず、 $-51\log$ 以上の不活化率を示した。

一方、大腸菌数は脱水前で 1 g 当たり 1.1×10^5 個を示したものの（表 19）、脱水後の汚泥は図 25 に示したように、大腸菌群陰性（黄色に発色せず）にもかかわらず、蛍光のみを発する（大腸菌陽性）という現象が、希釈率の低い上位 3 段階の各 5 本すべてで生じた。そのため、コリラート法で大腸菌の不活化を評価することはできなかった。

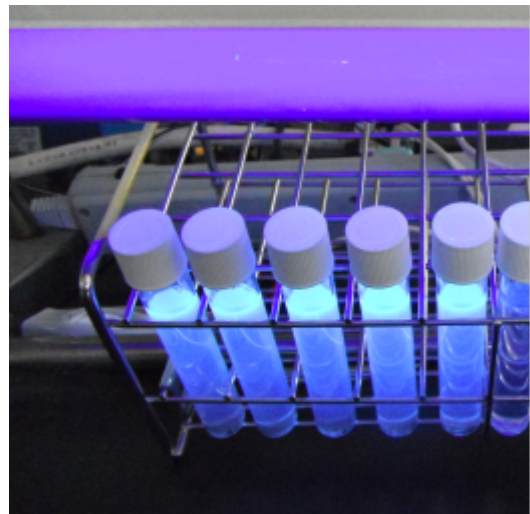
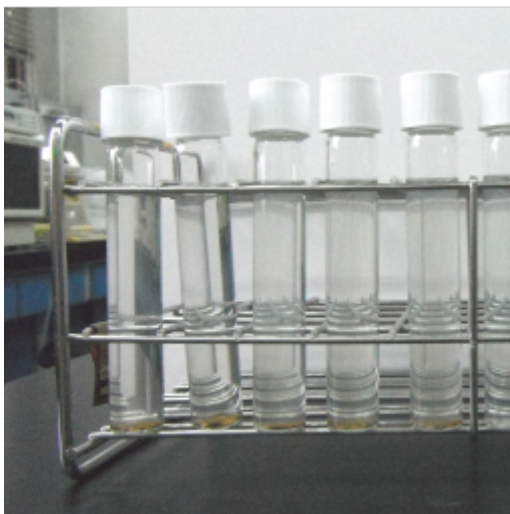


図 25 脱水後の汚泥誘出液のコリラート写真（左：20 時間培養後、右：左にブラックライト照射）

この黄色に発色せず、蛍光のみを発した培養管液を標準寒天培地に塗抹し、1 晩培養した。翌日粘りのあるコロニーが形成されたため、これを釣菌して同じコリラート法で測定したが、黄色の発色も蛍光も発しなかった。すなわち、枯草菌と考えられる菌が発色に関与したとは考えられなかった。

脱水後の汚泥誘出液をオートクレーブで滅菌処理したのち測定したところ、滅菌前では蛍光を発したが、滅菌処理後では発色しなかった。すなわち、誘出液に含まれている無機物や金属塩の影響でもないと考えられた。

クロモカルト法では脱水前の大腸菌群数は1 g 当たり 2.7×10^5 個であったが、46 V 時では 4.3×10^3 個と、 $-2 \log$ の不活化率を示した。50 V 時でも 6.5×10^2 個残存し、不活化率は約 $-3 \log$ であった。この結果はコリラート MPN 法と異なるところがあり、測定方法による差がどのような菌種によってもたらされるか、今後の検討課題である。

脱水前の大腸菌数は1 g 当たり 1.3×10^5 個であったが、46 V 時では 7.1×10^3 個に減少し、50 V 時では検出されず、 $-5 \log$ 以上の不活化率を示した。

(4) 大腸菌ファージ数の変化

これまで数回、脱水前の汚泥に関して大腸菌ファージ数の測定を行ったが、いずれも誘出液 1 mL 中に 10 PFU 未満しか測定されなかった。今回の実験時では、脱水前の汚泥と脱水後の汚泥ともにファージは測定されず、不活化効果を評価することはできなかった。参考までに他の 2 回の測定結果では誘出液 1 mL 中、脱水前が 6 PFU で脱水後が 0 PFU、脱水前が 9 PFU で脱水後が 0 PFU であった。

【まとめ】

脱水時に汚泥が発熱する電気浸透式汚泥脱水機を対象に、脱水前後での微生物の不活化状況を検討した。

通常、脱水機の運転は脱水後の汚泥の含水率が 70% になるよう、印加電圧を 40~45 V に調整している。施設によってはこの状態で汚泥の温度が 75°C まで上昇したことを確認しているが、今回対象とした施設では 55~60°C 程度にしか上昇しなかったため、一時的に 50 V 前後まで上昇させ、併せて測定を行った。

標準寒天培地を用いた一般細菌の測定では、脱水前と脱水後とも乾重量 1 g 当たり 10^8 個オーダー存在し、菌数の大きな変化は認められなかった。その原因の一つとして、耐熱性の枯草菌がほとんどを占めていたからと考えられた。

大腸菌群と大腸菌は、特定酵素基質培地を用いたコリラート MPN キットと、クロモカルトコリフォーム寒天培地の 2 つを用いて測定した。

脱水前の大腸菌群数はいずれの測定方法とも 1 g 当たり 10^5 個存在しており、60°C 程度の発熱で 10^3 個まで減少し、 $-2 \log$ 程度の不活化率を示した。しかし、80°C 程度の発熱では、コリラート法では検出されなかったが ($-5 \log$ 以上の不活化率)、クロモカルト法では 10^2 個残存 ($-3 \log$ の不活化率) した結果となった。

脱水前の大腸菌数は、いずれの測定方法とも 1 g 当たり 10^5 個存在した。脱水後試料のコリラート法では、大腸菌群の存在を示す黄色の発色を呈しないにもかかわらず、大腸菌の存在を示す蛍光を発した。この発色が何に起因するかは不明であったが、残存している主な菌は耐熱性の枯草菌であった。クロモカルト法でも、80°C 程度の発熱では検出されなかった ($-5 \log$ 以上の不活化率)。

大腸菌ファージは脱水前汚泥でも誘出液 1 mL 中に 10 PFU 未満しか測定されず、不活化効果を評価することはできなかった。この原因の一つに、汚泥からの誘出率が低かったのかも知れないが、それを評価することはできなかった。

【考察】

電気浸透式汚泥脱水機では、余剰汚泥の脱水時に発生する熱によって、大腸菌群や大腸菌が不活化されることが明らかとなった。感染症の流行等により、余剰汚泥中に病原性を有する微生物が高濃度に含有する恐れがある場合には、脱水機への印加電圧を調整し発熱温度をあげることにより、さらなる不活化効果を得ることができ、脱水汚泥を再利用する際の安全性が高まることが期待される。

【全体の結論】

コンポスト連用により土壌の理化学性（透水性、保水性および腐植含有量の増加など）が、改善された。そのため、指標果樹としたイチジクにおいて、果実の収穫量・品質は、向上した。

コンポストを連用した土壌には、土壌病菌による地下部のイチジク病徴発現を軽減させる効果があった。実験結果より、この効果は樹体の抵抗性ではなく株枯病菌の繁殖を妨げるなど、土壌の株枯病菌増殖抑制効果に起因していると推察された。この土壌の抑制要因として、土壌微生物群の関与が考えられたため、イチジク病徴発現を軽減させる効果のあったコンポスト施用土壌とその対照区の土壌微生物群のメタゲノム解析を行った。しかし、土壌中の細菌および真菌について、門レベルでの大きな違いは明らかにできなかった。

コンポスト利用における病原微生物の危険性については、し尿を濃縮した形態の余剰汚泥にターゲットを絞り実験を行った。実際にし尿を濃縮するのに使用される電気浸透式脱水機の熱処理時に想定される温度領域で、大腸菌や腸球菌、大腸菌ファージを病原微生物の指標とし、熱不活性化条件を決定した。また、実際の電気浸透式脱水機の処理前後の汚泥を採取し、大腸菌と大腸菌ファージに的を絞り調査した。その結果、電気浸透式脱水機の熱処理後には、これらの有害微生物は検出せずにより良い結果を得る事ができた。環境中で有害物などの分解に役立つと考えられている枯草菌については、電気浸透式脱水機による高熱処理によっても残存することが明らかになり、有用な微生物については、汚泥中の有害物の分解に役立っていることが分かった。今回の研究報告では、最終目標まではたどり着くことはできなかったが、3年間という短期間に良好な結果を出せたと考えている。

【引用文献】

1. 尾崎 正明：下水汚泥の効率的有効利用に関する研究（博士論文：京都大学），2011
2. 国土交通省 国土技術政策総合研究所：ディスプレイ導入による影響評価に関する研究報告ーディスプレイ導入時の影響判定の考え方ー，No222，2005.
3. 竺 文彦：生ごみ堆肥化の現状，環境技術，40，(12)，714-717，2011
4. Martin-Laurent F, L. Philippot, S. Hallet, R. Chaussod, JC. Germon, G. Soulas, and G. Catroux. 2001. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2354-2359.
5. 中崎清彦，鈴木伸章，王岩鵬、植物病害の防除効果を持つ機能性コンポストの製造ー廃棄物学会第18回、研究発表会講演論文集 p348-350，2007
6. 玉野武行、豊田 能史ら、汚泥コンポスト施用による植物生長促進と土壌再生化への効果(3)各種汚泥堆肥の肥効比較試験、*Waste & resource* (42)，9-22，2001-08-00

7. 土壤環境分析法 (1997) 日本土壤肥料学会監修、土壤環境分析法編集委員会編 (博友社 東京)
8. 小型反射式光度計(RQ フレックス)による有機質資材中のカリウム, リン, 窒素の簡易測定法 (2004) 安藤義昭・小柳渉・森山則男 日本土壤肥料學雜誌 75(5), 605-608,
9. Heuer H, M. Krsek, P. Baker, K. Smalla, and EMH. Wellington. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3233-3241.
10. Heuer H, K. Hartung, G. Wieland, I. Kramer, and K. Smalla. 1999. Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S rRNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1045-1049.
11. Youssef N, CS. Sheik, LR. Krumholz, FZ. Najar, BA. Roe, and MS. Elshahed. 2009. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:5227-5236.
12. Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EMH. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3233-3241.
13. Schwieger F, and CC. Tebbe. 1998. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4870-4876.
14. Edward F. DeLong. 1992. Archea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 5695-5689.
15. Nakamura S, T. Nakaya, and T. Iida. 2011. Metagenomic analysis of bacterial infections by means of high-throughput DNA sequencing. *Exp. Biol. Med.* 236:968-971.
16. May LA, B. Smiley, and MG. Schmidt. 2001. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Can. J. Microbiol.* 47:829-841.
17. Vainio EJ, and J. Hantula. 2000. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol. Res.* 104:927-936.
18. White TJ, TD. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes for phylogenetics. p. 315-322. In Innis MA, Gelfand DH, Sninsk JJ, White TJ (ed), *PCR protocols; a guide to methods and applications.* Academic Press, Inc., New York, NY.
19. de Souza FA, GA. Kowalchuk, P. Leeflang, JA. van Veen, and E. Smit. 2004. PCR-denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter- and intraspecies 18S rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1413-1424.
20. Vilgalys lab, Duke University, August 2012
<http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>
21. Santos-Gonzalez JC, RD. Finlay, and A. Tehler. 2007. Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities in roots in a seminatural grassland. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5613-5623.
22. Simon L, M. Lalonde, and TD. Bruns. 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from

- vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 291-295.
23. 金 台東、本田裕之、白神直弘、矢野一好、海野 肇(1993)活性汚泥混合液中でのウイルス感染価の低減について、水環境学会誌、16(5)、47-53
 24. 原本英司、片山浩之、大垣眞一郎(2009)下水処理場における病原ウイルスの低減効果の解明、水環境学会誌、32(6)、33-38
 25. 下水道におけるウイルス対策に関する調査委員会報告書(平成22年3月)、国土交通省
 26. 青井 透、宮里直樹(2007)バチルス菌優占連作障害抑止型土壌改良材の試作と実農地への適用、第62回土木学会学術講演会講演集
 27. 林恵里香、青井 透(2009)バチルス優先化下水汚泥を種菌に用いて製造した自活性線虫増殖型土壌改良材、第46回下水道研究発表会講演集、16-18
 28. 口春明(2005)堆肥・土壌における細菌群集の解析および大腸菌など糞便汚染指標菌の生存性に関する研究、鹿児島大学大学院連合農学研究科博士論文
 29. 金 台東、本多浩之、白神直弘、矢野一好、海野 肇(1994)活性汚泥に移行したポリオウイルスの誘出条件について、水環境学会誌、17(8)、31-38
 30. 神子直之、大垣眞一郎(1993)ウイルス不活化手法の大腸菌ファージによる評価、環境微生物工学研究法、技法堂出版、233-236
 31. Terrat S, R. Christen, A. Dequiedt, et al.. 2012. Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. *Microb. Biotechnol.* 5:135-141.
 32. Delmont TO, P. Robe, S. Cecillon, IM. Clark, F. Constancias, P. Simonet, PR. Hirsch, and TM. Vogel. 2011. Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:1315-1324.

< 研究発表 >

1) 論文発表

1. Fumie Adachi, Atsushi Yamamoto, Koh-Ichi Takakura, Ryuji Kawahara, Occurrence of fluoroquinolones and fluoroquinolone-resistance genes in the aquatic environment. *Science Of The Total Environment*, **444**, 508-514 (2013)
2. 細見彰洋(2011)イチジク株枯病対策の現状と課題. 果実日本 66(11):44-48
3. 中村昇太(2011)第二世代アセンブラの選び方と使い方. 実験医学増刊: Vol. 29 No. 15
4. 中村昇太・中屋隆明・飯田達也(2011)感染症のメタゲノミック診断. 化学療法の領域: Vol. 27 No. 9
5. Nakaya T, Nakamura S, Iida T, Horii T. 2011. Direct metagenomic detection of viral pathogens in human specimens using an unbiased high-throughput sequencing approach. *Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats*
6. Nakamura S, Nakaya T, Iida T. 2011. Metagenomic analysis of bacterial infections by means of high-throughput DNA sequencing. *Exp. Biol. Med.*
7. Shirajum Monira, Shota Nakamura, Kazuyoshi Gotoh, Kaori Izutsu, Haruo Watanabe, Nur H. Alam,

Hubert P. Endtz, Alejandro Cravioto, Sk. I. Ali, Takaaki Nakaya, Toshihiro Horii, Tetsuya Iida, Munirul Alam. 2011. Gut Microbiota of Healthy and Malnourished Children in Bangladesh. *Front. Microbiol.*

8. 三輪由佳、細見彰洋、石井孝昭. 異なる土壌条件がイチジク株枯病によるイチジクさし木苗枯死率に及ぼす影響. *土と微生物*. 2010. 64 (2) : 89-94
9. 三輪由佳、細見彰洋、石井孝昭. 異なる土壌条件がイチジク株枯病によるイチジクさし木苗枯死率に及ぼす影響. *園芸学研究*. 2010. 9 (別 2): 406
11. 飯田哲也: 次世代シーケンサーを用いた細菌感染症のメタゲノミック診断. *Medical Technology* (2010) 38: 227-229
12. 中村昇太、中屋隆明、飯田哲也: 次世代シーケンサーを用いた感染症の診断と解析 メタゲノム解析技術の最前線 シーエムシー出版 p. 160-168, 2010
13. Nakaya, T., Nakamura, S., Okamoto, Y., Nagai, Y., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Iida, T., and Horii, T.: Direct Metagenomic Detection of Viral Pathogens in Human Specimens using an Unbiased High-throughput Sequencing Approach. In: *Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats*, Ed. Frans J. deBruijn. Wiley-Blackwell (an imprint of John Wiley & Sons Ltd), Hoboken, NJ, USA. 2011

2) 学会発表

1. 三輪由佳・磯部武志・細見彰洋: コンポスト施用土壌におけるイチジク株枯病抑制要因の究明、園芸学会平成 24 年度秋季大会、福井 2012 年 9 月
1. 中村昇太: 感染症メタゲノミクス、NGS現場の会 第二回研究会、2012年5月
2. 中村昇太: 次世代シーケンサーを用いたメタゲノミクスによる病原微生物探索、第15回日本水環境学会シンポジウム、2012年9月
3. 中村昇太: メタゲノミック診断法のハイスループット化、生命情報科学若手の会 第4回研究会、2013年3月
4. 中村昇太: 感染症のメタゲノミック解析、次世代シーケンサー現場の会 第1回研究会、静岡 2011 年 5 月
6. 中村昇太: 次世代シーケンサーを用いた臨床検体からの病原体探索、Roche ゲノムコンファレンス、東京 2011 年 6 月
7. 中村昇太: 次世代シーケンサーを用いた臨床検体からの病原体探索、Roche DNA シーケンサー最先端セミナー、大阪 2011 年 7 月
8. 三輪由佳: コンポスト施用がイチジク株枯病防除に及ぼす影響、第30回研究会 近畿土壌肥料研究協議会、2011年7月
9. 依田知子、山崎謙治、青山幾子: Analysis of amino acid sequence of HBGA-binding sites in Norovirus GII.4 ORF2 from six patients including a weak-secretor in the same region within the period of one month (International Union of Microbiological Societies 2011 Congress) 札幌 2011 年 9 月
10. 中村昇太: メタゲノミクスを応用した病原体検出システムの開発、生命情報科学若手の会 2011 沖縄セミナー、沖縄 2011 年 9 月
11. 三輪由佳・細見彰洋 (2011) コンポスト施用がイチジク株枯病に及ぼす影響. *園芸学研究* 10 別 2:395

12. 中村昇太: Metagenomic Analysis of Bacterial Infections、IUMS 2011 Sapporo、札幌 2011年9月
13. 中村昇太: 次世代シーケンシングを活用した感染症診断:メタゲノミック診断法、Genaris 次世代ゲノム解析セミナー、大阪 2011年10月
14. 中村昇太: 感染症におけるメタゲノミック診断法の研究開発、生命情報科学若手の会 第3回研究会、愛知 2011年10月
15. 中村昇太: Databases for metagenomics of unexplored fields、第34回日本分子生物学会年会、横浜 2011年12月
16. 中野 仁、足立 伸一: 汚泥脱水工程での発熱による病原性微生物の不活化の検討、第46回日本水環境学会年会、東京 2012年3月
17. 依田知子、左近直美、中田恵子、加瀬哲男: RT-LAMP 法を用いたノロウイルス検出キットの再評価、第51回日本臨床ウイルス学会、高松 2010年6月
18. 安達史恵、高木総吉、吉田仁、上堀美知子、清水武憲、園井一行: 大阪府内に勤務する人の血清中有機フッ素化合物について、第19回環境科学討論会、名古屋 2010年
19. 飯田哲也: 次世代シーケンサーを用いた微生物・感染症解析、メインシンポジウム 4「口腔と関連器官の感染症 5W1H なぜ私はこの研究をしているのか」、第52回歯科基礎医学会学術大会 2010年9月
20. 飯田哲也: 次世代シーケンサーの細菌感染症への応用、日本細菌学会中国四国支部総会(特別講演) 2010年10月
21. 中屋隆明、中村昇太、飯田哲也、堀井俊宏: 次世代シーケンサーを用いた臨床検体からの病原体探索、Roche Genomics conference (招待講演)2010年9月
22. 奥崎大介、中村昇太: 細胞生物学者の視点でみるマイクロアレイと次世代シーケンス、第62回日本細胞生物学会(招待講演) 2010年5月
23. 中村昇太、中屋隆明、飯田哲也、安永照雄、堀井俊宏: 感染症メタゲノミクスの現状と挑戦、第4回ゲノム微生物学会若手の会、2010年10月
24. 中村昇太、中屋隆明、飯田哲也、堀井俊宏、安永照雄: メタゲノミクスを応用した病原体検出システムの開発、第2会生命情報若手の会、2010年10月
25. 中村昇太: GS Junior とはじめるバイオインフォマティクス、BMB2010 (Roche バイオテクノロジーセミナー)2010年12月
26. Shota Nakamura, Naohisa Goto, Takaaki Nakaya, Tetsuya Iida, Toshihiro Horii, Teruo Yasunaga: Development of metagenomic diagnosis system for infectious disease、日本バイオインフォマティクス学会年会(ポスター) 2010年12月

・知的財産権の取得および特許の実用新案登録
なし

・ポンチ絵



土壌診断法、ただいま確立中！
♪ 乞うご期待・・・♪

・英文概要

- ・研究課題名 : Establishment of microbiological assessment for safe and available compost application
- ・代表研究者名及び所属 : Shinichi Adachi (Osaka Prefectural Institute of Public Health)
- ・共同研究者名 : Tomoko Yoda ・ Hitoshi Nakano ・ Shinya Yonogi ・ Fumie Adachi (Osaka Prefectural Institute of Public Health) , Yuka Miwa ・ Takeshi Isobe ・ Makoto Tatsumi ・ Akihiro Hosomi (Research Institute of Environment, Agriculture and Fisheries) , Shota Nakamura (Osaka University)

要旨 : Use of compost is still very low in Japan. In order to increase its use it is necessary to show both the safety and availability of compost.

In this study we focused in the following categories:

1. Effect of compost application on the growth of *Ficus* and its response to pathogenic organisms.
2. Analysis of soil microbial communities in the composted soil compared to the control soil (bacteria and fungi)
3. Assessment of heat inactivation for pathogenic microorganisms and heat survival for effective microorganisms in excess sludge (one of the materials of compost).

Soil microbial community increases its diversity as well as quantity by the application of compost. In this study, we showed the application of compost improved soil conditions, such as water permeability, water retentiveness, and increased total nitrogen content, phosphorus compound and humus. This improvement of the soil condition increased the growth of the *Ficus* tree as well as the quality and quantity of the fruit.

We also showed the application of compost provided a palliative effect on the symptoms of the *Ficus* disease *Ceratocystis fimbriata* (*C. fimbriata*) that occurs when ficus is grown in a flowerpot. *C. fimbriata* was inoculated into the leaves or branches of the *Ficus* in non-composted soil or composted soil. After inoculation of *C. fimbriata* in vitro and incubated for several days, the size and severity of the lesions was the same. When *C. fimbriata* was inoculated into the branches that were put into the composted soil, the necrotic lesion of the branches after incubation became smaller than that of the branches in control soils. This suppression of the lesions was considered to be due to inhibition of *C. fimbriata* growth in the soil and not to resistance of the *Ficus* trees. The same suppression of underground lesion areas in the *Ficus* branches was observed using different type of compost soils including cattle manure or bark compost. One of the composted soils was obtained from the farm where the farmer has cultivated *Ficus* trees with bark compost application for more than seven years.

The soil microbial communities that showed the suppression of the lesion in the *Ficus* branches were analyzed by the high-throughput sequencer using 16S rRNA genes as well as 18S rRNA genes.

Regarding bacteria, there was not clear difference in levels between the two different composted

soils and the compared control soils. For fungi analysis, the most abundant phylum was Ascomycota in all of the soils and there was no difference between the composted soils and control soils. We have not finished our detailed analysis, however, we have established the confidential analysis of the soil microorganism communities using the high-throughput sequencer from this project. For example *C. fimbriata* was found in the inoculated soils, and when the species level analysis was conducted, the microorganisms that were reported to be suppressive for the plant pathogens, such as *Pseudomanadaceae*, *Burkholderiaceae*, and *Trichoderma* were detected. We need to improve the method for future research.

An electro-osmotic sludge extractor of excess sludge in the resource-recycling center (night soil treatment plant) produces high temperature during the dehydration process. It was considered that inactivation of the pathogenic microorganisms might be possible using this high temperature. Investigation of the temperature and the heating time effectiveness for inactivation using the indicator microorganisms was carried out. Results showed thermal inactivation treatment for pathogenic microorganisms such as *Escherichia coli* (*E. coli*), *E. coli* phage, and *Enterococcus* using this equipment appeared to be sufficient enough while *Bacillus subtilis* (considered to be one of the effective bacteria for compost) survived after thermal inactivation treatment of the under same conditions.

Further study was conducted using the electro-osmotic sludge extractor in Osaka prefecture. *E. coli* and *E. coli* phage inside the sludge was focused and the sludge was sampled before and after treatment by the electro-osmotic sludge extractor. Neither of the pathogens was detected after heat-treating the sludge. The results indicated the electro-osmotic sludge extractor increased the safety of the treated sludge. The temperature during the electro-osmotic sludge extractor operation was measured. It was between 60-85°C. a temperature at which the useful bacteria, *Bacillus subtilis* in the environment can survive.

• キーワード : compost, *Ficus carica*, *Ceratocystis fimbriata*, soil microbial communities, heat inactivation of pathogenic microorganisms