

栗山町製コンポストの機能性とキノンプロファイル分析

森本 正則*・桑原 直美*・田中 尚道**・駒井 功一郎*

(*近畿大学農学部農芸化学科・**近畿大学資源再生研究)

Property and quinone profile analysis of the compost made in Kuriyama town

Masanori MORIMOTO*, Naomi KUWAHARA*, Naomichi TANAKA**, Koichiro KOMAI*

**Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kinki University*

***Institute of Resource Recycling, Kinki University*

Synopsis

Application of compost made from garbage and bio-sludge show crop growth promoting effect in the field. We have evaluated to a property of the compost made in Kuriyama town (Hokkaido). Kuriyama town have a compost producing facility established in 2004. Mainly, we have evaluated suppression of the plant disease and plant growth promotion by using this compost.

Application of this compost had promoted the cucumber growth in dose dependent manner. Application of native compost was more better than autoclaved compost in root growth of cucumber seedlings. This fact suggest the promoting effect of root growth is attributed to some biological factors in this compost. Additionally, the compost suppressed to develop plant disease cause by *Pythium* sp. in inoculation test using cucumber seedlings.

For monitoring of microbial community of the compost, we have adopted microorganism respiratory quinone analysis by HPLC. As the result, we have detected large amount of ubiquinone 8 and menaquinone 6 by quinone profile analysis and have determined microbial community in the compost. In this compost, there were a lot of bacteria *Cytophaga* sp., *Bacillus* sp. and *Flavobacterium* sp. as acting fermentation process.

緒 言

生ゴミなどの家庭から出る有機性廃棄物を原料としたコンポストは、廃棄物処理やリサイクルといった環境問題だけでなく、農業や都市緑化の観点からの土壌環境改善や土質向上にも役立つ¹⁾。近年のこの様な背景から、家庭から排出される有機性廃棄物の回収・コンポスト化に取り組む自治体もある。今回供試したコンポストは、北海道夕張郡栗山町（人口：約15,000人、面積：203.84ha）エコソイルセンターでコンポスト化されたものである²⁾。これまでに我々は、有機性廃棄物である食品工場から排出される活性汚泥を原料としたコンポスト中に存在する植物生長促進作用を持つ微生物の存在を確認している³⁾。これらの微生物中には、抗菌物質を生産する種も認められたことから、コンポスト施用に伴い土壌伝染性植物病原菌に対する生物農薬的な効果も期待できると考えている^{4, 5)}。この様に、コンポスト中に存在している有用微生物を活用することで農業に有効に利用することが出来る。本研究では、コンポストの植物生長促進作用および植物病害を軽減する生物農薬としての機能性を評価するための試験を実施した。同時に、土壌微生物相の解析を目的として、広く環境中の微生物相のモニタリングが可能なキノンプロファイル法^{6, 7)}の適応を検討したので、ここにその詳細を報告する。

材料および方法

1. 栗山町製コンポストからの微生物数測定と細菌分離

簡易希釈平板法を行い、コンポスト内の微生物数を測定した。好気性細菌用およびカビ・酵母用ペトリフィルム（3M社製）を用いて出現コロニー数をカウントし、土壌健全性の指標となるB/F（Bacteria/Fungi）値を算出した。対照としてオートクレーブしたコンポストの微生物数を測定した。

微生物の分離は、汚泥コンポストを滅菌生理食塩水で懸濁後、10倍段階希釈したものを平板PDAまたはSCD培地上に均一に塗布した後、28℃で培

養を行い出現した細菌のコロニーを釣菌し、試験管中の斜面培地に保存した。

2. 栗山町製コンポスト施用による植物生長促進活性試験

コンポスト施用による実際の植物生長促進活性を確認するために、キュウリ（霜しらず地這：（株）サカタのタネ）を試験作物として育苗を行った。培養土には、真砂土にピートモスとバーミキュライト（体積比 6：2：2）を混合して使用した。コンポスト施用量、コンポスト中の微生物による植物の生長促進作用の差を確認するために、施用量ならびにオートクレーブ処理したコンポストを用いてビニルハウス内でそれぞれ25日間栽培し、生長度合を比較した。

3. 栗山町製コンポストの土壌病原菌生育抑制効果

供試コンポストが持つ植物病害抵抗性を評価する目的で、キュウリ根腐病菌 *Pythium aphanidermatum* (IFO 7030) に対する供試コンポスト内の微生物の拮抗作用を評価した。まず、PDA平板培地上に検定糸状菌を塗布し、そのシャーレの中心部に供試コンポストまたはオートクレーブしたコンポスト（0.5 g）を設置し、28℃で5日間培養した。また、土壌施用時の効果を確認するために麦粒に供試菌を保持させて、土壌と混和した。接種する麦粒の調製は、キュウリ根腐病菌 *P. aphanidermatum* (IFO 7030) をPDA平板培地上に植菌後、2日間28℃で培養した。菌の生育の盛んな部分をコルクボーラーで適量打ち抜き、オートクレーブした有殻大麦粒（のぞみ二条：カネコ種苗）へ投入した後、28℃で菌糸が麦粒全体に生育するまで約10日間培養を行った。その後、トレー上に菌糸の回った麦粒を移し、無風下で余分な水分を蒸発させた。この様にして得られた供試菌種を保持した乾燥麦粒を培養土の重量比2%の割合で混合し、キュウリの育苗を行った。育苗試験は25℃のインキュベーター内で21日間栽培した⁸⁾。

4. 栗山町製コンポストのキノプロファイル分析

供試コンポストの微生物相検出は、キノプロファイル法を実施した。供試コンポスト (20 g) にクロロホルム：メタノール (2：1, v/v, 80 ml) を加え、バスソニケーター中で超音波抽出を行った。抽出後は、遠心分離 (6000 rpm, 10 min.) を行い、上清を取る操作を3回繰り返した。すべての上清を合わせ、ろ紙を用いてろ過し、減圧濃縮後、適量のヘキサンと水 (2：1, v/v) で分配した。このヘキサン層を Sep-Pak Silica カートリッジに通し、2% ジエチルエーテル・ヘキサン混合溶液 (20 ml) でメナキノン (MK) を、10% ジエチルエーテル・ヘキサン混合溶媒 (20 ml) でユビキノン (Q) を、それぞれ溶出させた。各抽出液を減圧濃縮後、HPLC 分析用移動相 (200 μ l) に溶解し、HPLC 分析のサンプルとした。HPLC 分析は、逆相 ODS 系カラム (Imtakt Cadenza CD-C18 100 \times 4.6 mm) を用い、移動層にメタノール：イソプロピルエーテル (9：2, v/v)、流速 1.0 ml/min、検出波長：270 nm (MK), 275 nm (Q) に設定して実施した⁶⁾。

結果と考察

1. 栗山町製コンポストからの微生物数測定と分離

ペトリフィルムを用いた簡易測定法で、コンポスト内の微生物数は細菌数 68.6×10^6 cfu/g、糸状菌数 34.5×10^3 cfu/g となり、B/F 値は、供試コンポスト区では 1988 という値を示し、やや低値を示したものの健全な土壌の示す値、1000 を上回っていた。土壌微生物数は通常、細菌 $10^6 \sim 10^8$ cfu/g、糸状菌 $10^3 \sim 10^5$ cfu/g であることから考えると細菌数も多く土壌改良資材としては好ましい性質だといえる。一方、オートクレーブ処理したコンポストは細菌数 26.5×10^5 cfu/g で糸状菌は検出されなかった。供試コンポストは、オートクレーブ処理によって細菌群が完全に滅菌されるものではないことが判明した。



Plate 1. Plant growth promoting effect by compost application (0~10% contained)

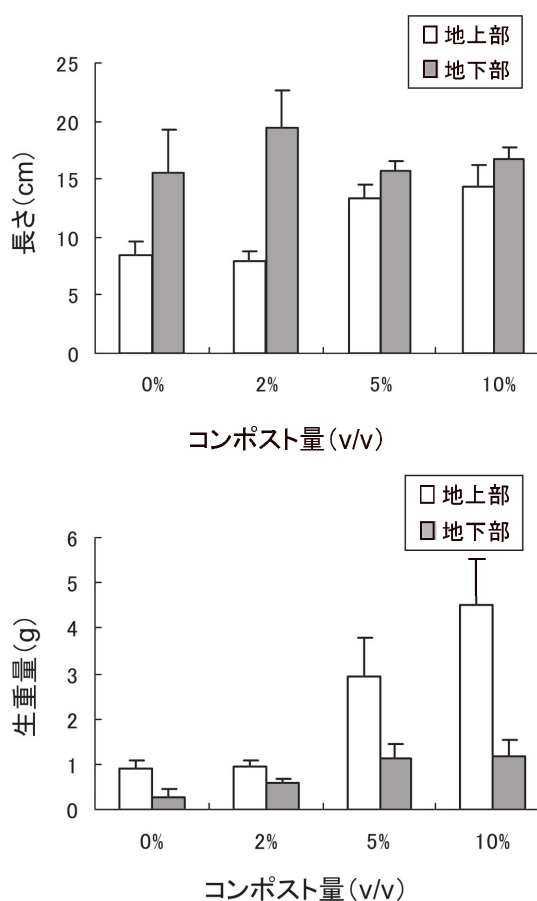


Fig. 1. Plant growth promoting effect by compost application (0~10% contained). Data shown as means and error bar (SD).



compost free non-autoclaved autoclaved

Plate 2. Effect of compost autoclaving on the cucumber root growth.

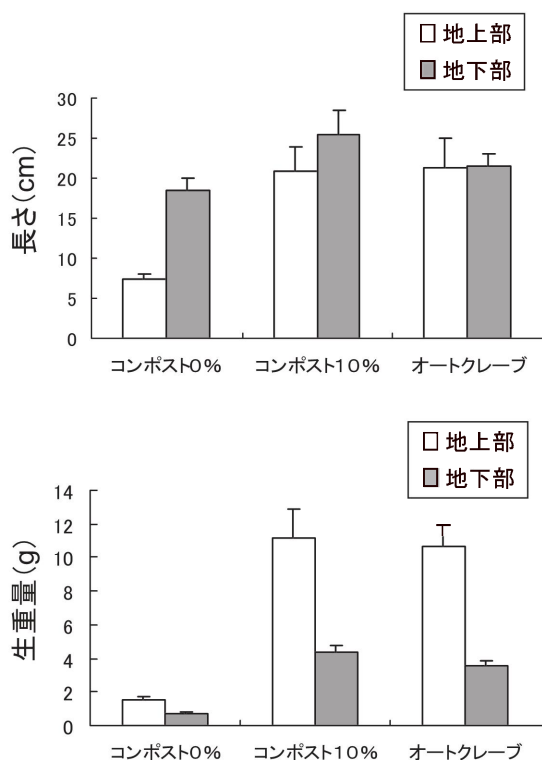


Fig. 2. Effect of compost autoclaving on the cucumber root growth. Data shown as means and error bar (SD).

2. 栗山町製コンポスト施用による植物生長促進活性試験

キュウリ幼苗に対するコンポスト施用による生長促進効果試験は、培養土重量比で混合率0～10%に設定して育苗した。その結果、コンポストを加えない培養土で育苗した植物と比較して、コンポスト処理量の増加に伴い地上部、地下部とも

にその生長促進効果を示した (Plate 1, Fig.1)。これは、コンポスト中の肥料成分によるところが大きいと考えた。

コンポスト中の微生物相は、オートクレーブ処理によって変動することが確認されているので、オートクレーブ処理による植物生長促進効果の変化を確認したところ、基本培養土に比べて両処理区とも生長促進作用が認められた。無処理コンポスト (10% w/w) とオートクレーブ処理コンポスト施用区 (10% w/w) でのキュウリの生長を比較すると、地上部には顕著な差は認められなかったが、地下部には無処理コンポスト処理区において若干の根部重量増加が認められ、コンポスト内の微生物相の変化が生長促進に何らかの影響を与えていると考えられた (Plate 2, Fig. 2)。

3. 栗山町製コンポストの土壌病原菌生育抑制効果

キュウリ根腐病菌 *P. aphanidermatum* (IFO 7030) に対するコンポストの持つ拮抗活性を評価した結果、オートクレーブ処理を施したコンポスト

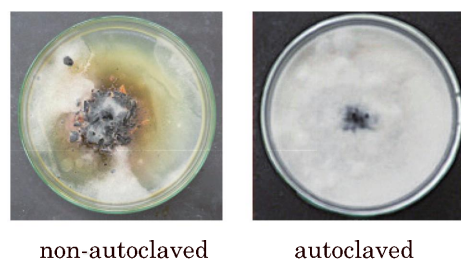
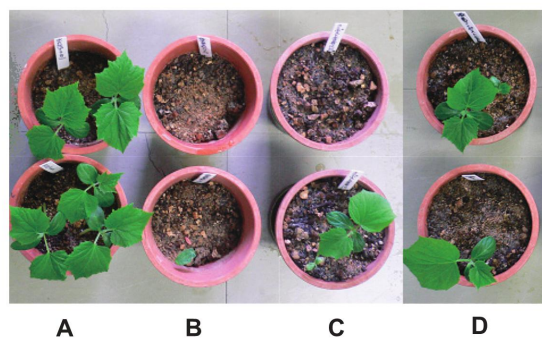


Plate 3. Suppression of *Pythium* sp. growth by microbial community in the compost.



A: Blank B: Inoculation of phytopathogen C: Phytopathogen + non-autoclaved compost D: Phytopathogen + autoclaved compost

Plate 4. Test compost having recovery effect of growth inhibition by inoculation of *Pythium* sp..

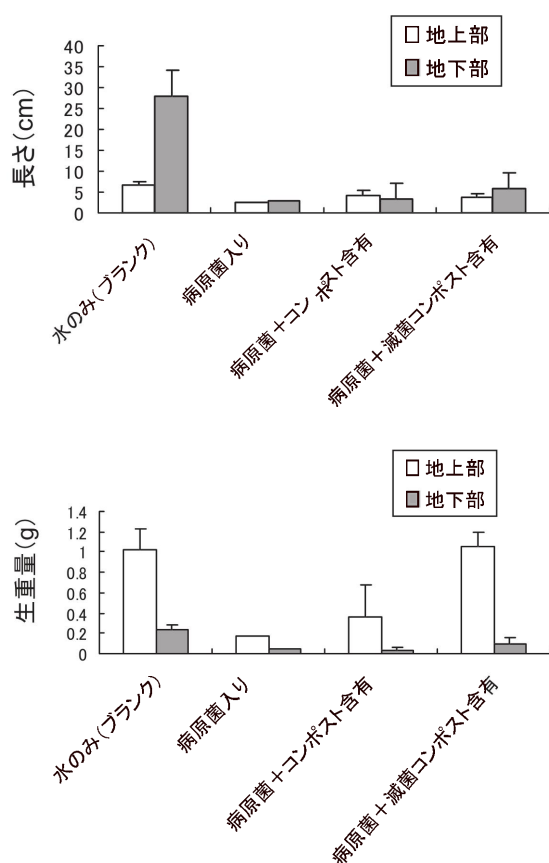


Fig. 3. Test compost having recovery effect of inhibitory effect by inoculation of *Pythium* sp.. Data shown as means and error bar (SD).

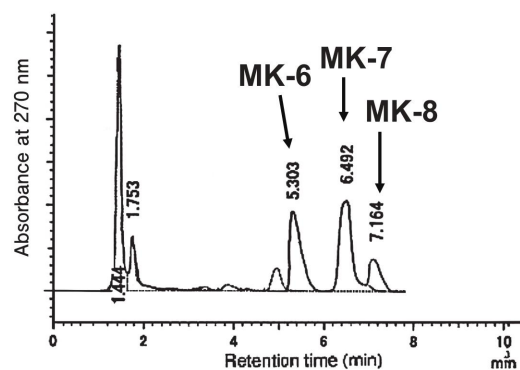
トと比較して明らかに高い供試菌種に対する生育抑制効果を示した (Plate 3)。これは、コンポスの病原菌生育抑制効果に微生物的要因が関与していることを強く示唆する結果である。より栽培条件に近い形でキュウリを土壌を用いた育苗試験に供したところ、コンポスト施用による発病抑止効果が明らかに確認できた (Plate 4, Fig. 4)。

4. 栗山町製コンポスのキノプロファイル分析

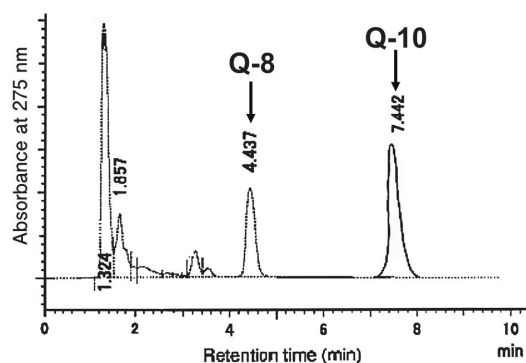
文献情報を参考に標準菌体 (Table 1) を用いてキノ溶出時間を特定した⁶⁾ (Fig. 4)。MK-6、MK-7、MK-8、Q-8のHPLC分析条件でのキノ溶出時間を基に供試コンポスト中の微生物相を推定した (Fig. 5, Table 2)。供試コンポストから抽出されたキノ種の分析結果からコンポスト1kg中に含まれるキノ量は $0.0693\mu\text{mol}$ であり、文献値と比較して若干小さな値となった。今回のキノプロファイルでは全体的にグラム陰性菌が多い結

Table 1 Origin of each standard quinone for HPLC quinone profile analysis.

| Origin | Quinone |
|----------------------------------|----------|
| <i>Eschericia coli</i> | MK-8,Q-8 |
| <i>Sphingomonas paucimobilis</i> | Q-10 |
| <i>Exiguobacterium acetilium</i> | MK-7 |
| <i>Flavobacterium hydatis</i> | MK-6 |



メナキノン (MK)



ユビキノ (Q)

Fig. 4. Calibration of standard quinones for HPLC quinone profile analysis.

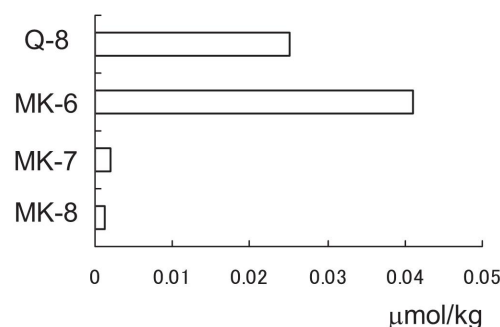


Fig. 5. Quantitative analysis of respiratory quinone in the compost by quinone profile analysis.

Table 2 Microorganism community of the compost by quinone profile analysis

| | |
|---------------------------|--|
| Q-8 | N: <i>Burkholderia</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Thiobacillus</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Proteus</i> , <i>Enterobacter</i> |
| MK-6 | N: <i>Cytophaga</i> |
| MK-7 | N: <i>Cytophaga</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Flexibacter</i> P: <i>Bacillus</i> , <i>Thermoactinomyces</i> |
| MK-8 | N: <i>Aeromonas</i> , <i>Proteus</i> , <i>Enterobacter</i> P: <i>Lactobacillus</i> , <i>Micrococcus</i> |
| N: Gram negative bacteria | |
| P: Gram positive bacteria | |

果となり、その中での占有種である *Cytophaga* や *Flavobacterium* は土壌中のセルロース分解菌として知られる (Table 2)。グラム陽性菌である *Bacillus* 属細菌も有機質分解促進、植物病原菌生育抑制作用を持つことが知られている。今回、キノンプロファイルで同定した菌群はコンポスト作製の発酵段階で活動していた菌であると考えられた。

今後、コンポスト施用土壌や病害抑止土壌などのキノンプファイルにより、コンポスト施用による微生物相が明確になり、より効率的な病害防除への情報が得られるものと思われる。

引用文献

- 1) 山内文男：生ゴミ処理とコンポスト化，食の科学，**212**, 46–56, (1995).
- 2) 坂口昇一，田中尚道：栗山町における家庭ごみのリサイクルと「有料化」に関する事例—有料化ならびに堆肥化施行後のごみ最終処分量とリサイクル率について—，近畿大学資源再生研究所報告，**3**, 23–26, (2005).
- 3) 森本正則，金森忍，折居千賀，駒井功一郎：汚泥コンポスト由来糸状菌の植物生長促進活性，近畿大学資源再生研究所報告，**1**, 45–50, (2003).
- 4) 森本正則，松本朋子，駒井功一郎：汚泥コンポストの植物生長促進活性に関わる微生物と，

それらの代謝産物，近畿大学資源再生研究所報告，**2**, 49–55, (2004).

- 5) 森本正則，若山晃子，駒井功一郎：古紙混合汚泥コンポスト中の植物生長促進作用に関わる糸状菌とそれらの代謝産物，近畿大学資源再生研究所報告，**3**, 63–68, (2005).
- 6) Fujie, K., Hu, H.-Y., Tanaka, H., Urano, K., Saitou, K. and Katayama, A.: Analysis of respiratory quinones in soil for characterization of microbiota. *Soil Sci. Plant Nutr.* **44**(3), 393–404, (1998).
- 7) Katayama, A., Hu, H.-Y., Nozawa, M., Yamakawa, H. and Fujie, K.: Long-term changes in microbial community structure in soils subjected to different fertilizing practices revealed by quinone profile analysis. *Soil Sci. Plant Nutr.* **44**(4), 559–569, (1998).
- 8) 百町満朗：植物生育促進菌類について，植物防疫，**46**(6), 252–257, (1994).