

# 未利用資源を用いた自活性線虫優占化堆肥における線虫群集構造解析

長岡技術科学大学 学生会員 ○蔵下はづき 学生会員 池田匠児 正会員 幡本将史 正会員 山口隆司  
群馬工業高等専門学校 正会員 青井透

## 1. はじめに

下水処理施設から発生する下水汚泥の排出量は年々増加しており、2018年度では年間約2,418千トンが排出された<sup>1)</sup>。排出された下水汚泥のうち約50%が建設資材として有効利用されているが、下水汚泥が有機物を豊富に含む特徴を活かした再利用方法である緑農地利用、燃料化等への利用は約20%程度であり未だ低い状況にある。我々の研究グループでは、し尿処理施設から発生する汚泥を用いた有用微生物優占化堆肥による植物寄生性線虫害（世界で年間約15兆円の被害額）防除技術の開発を行っており、本堆肥を3t/10aの施用でコンニャクおよびヤマトイモの植物寄生性線虫害を防除可能なことを報告している<sup>2)</sup>。本技術は*Bacillus*属細菌や自活性線虫をそれぞれ $10^7$ cfu/g-dry以上、1万頭/10g以上優占化させた堆肥を施用することで植物寄生性線虫の増殖を抑え、作物への加害を抑制するものである。我々は更なる本技術の水平展開のためにも、し尿処理汚泥の3倍以上の発生量がある下水汚泥を用いて本堆肥を作製できれば、農地利用への新たな高付加価値資源循環技術の開発に繋がると考えた。これまでの研究において、籾殻、バーク、牛糞堆肥等を配合した下水汚泥の堆肥化により、線虫頭数を15万頭/10g-dryまで増加させることに成功した。一方で、増殖した自活性線虫の系統、原材料の配合割合やその種類が増殖に与える影響については未だ不明である。

本研究では、原材料の配合割合の違いが自活性線虫優占化に与える影響および作製した下水汚泥堆肥と既存の堆肥との線虫群集構造の違いを評価することを目的とし、異なる配合の下水汚泥堆肥の作製、線虫頭数の測定、18S rRNA 遺伝子に基づいた線虫群集構造解析を行った。

## 2. 実験方法

本研究では、3つの異なる配合割合の下水汚泥堆肥（試験区1-3）を作製した（表1）。また、線虫群集構造比較のために5種の既存の堆肥（し尿汚泥堆肥、杉バーク資材、松バーク資材、杉バーク堆肥、松バーク堆肥）から試料の採取を行った。採取した試料はベルマン法による線虫の抽出および光学顕微鏡を用いた線虫頭数測定に供試した。得られた堆肥およびベルマン法で抽出した線虫はFast DNA SPIN kit for soil (MP Biomedicals) を用いてDNA抽出を行い、抽出したDNA濃度はQubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。抽出したDNAを鋳型として18S rRNA 遺伝子を対象としたプライマーセット18S965-18S1573R<sup>4)</sup>を用いて1st PCRを行った。PCR条件は95°C:6分、(95°C:30秒, 55°C:30秒, 72°C:1分)×35サイクル、72°C:10分とし、PCR増幅産物はQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いて精製を行った。2nd PCRは試料を識別するインデックスを含んだ2nd PCRプライマーセットを用いて行った。得られた2nd PCR増幅産物はQIAquick PCR Purification Kitを用いて精製を行い、MiSeq (Illumina)によるDNAシーケンス解析(2×300 bp)に供試した。得られたDNAシーケンスデータはQIIME2を用いてForward側(F)、Reverse側(R)をそれぞれシングルエンドで解析を行った。系統解析のリファレンスにはSILVA 132を用い、各operational taxonomic units (OTUs, 相同性97%以上)の相同性検索にはlocal blastnを用いた。各試料の多様性評価にはそれぞれ9,000リードを再抽出し、α多様性解析としてFaith's phylogenetic diversity (PD)を、β多様性解析としてunweighted及びweighted UniFracに基づいたPrincipal coordinate Analysis (PCoA)を用いた。

## 3. 実験結果および考察

本研究では下水汚泥を用いた異なる条件での堆肥作製および既存堆肥との線虫群集構造比較解析を行った。各試料からベルマン法で線虫頭数を計測した結果、試験区1で $8.0 \times 10^4$ 、試験区2で $8.3 \times 10^4$ 、試

表1 下水汚泥堆肥組成および線虫頭数

試験区	乾燥重量 (%)				線虫頭数 (頭/10g)
	牛糞堆肥	脱水汚泥	乾燥汚泥	バーク堆肥	
1	20	5	35	30	$8.0 \times 10^4$
2	30	5	35	30	$8.3 \times 10^4$
3	50	5	35	10	$1.1 \times 10^5$

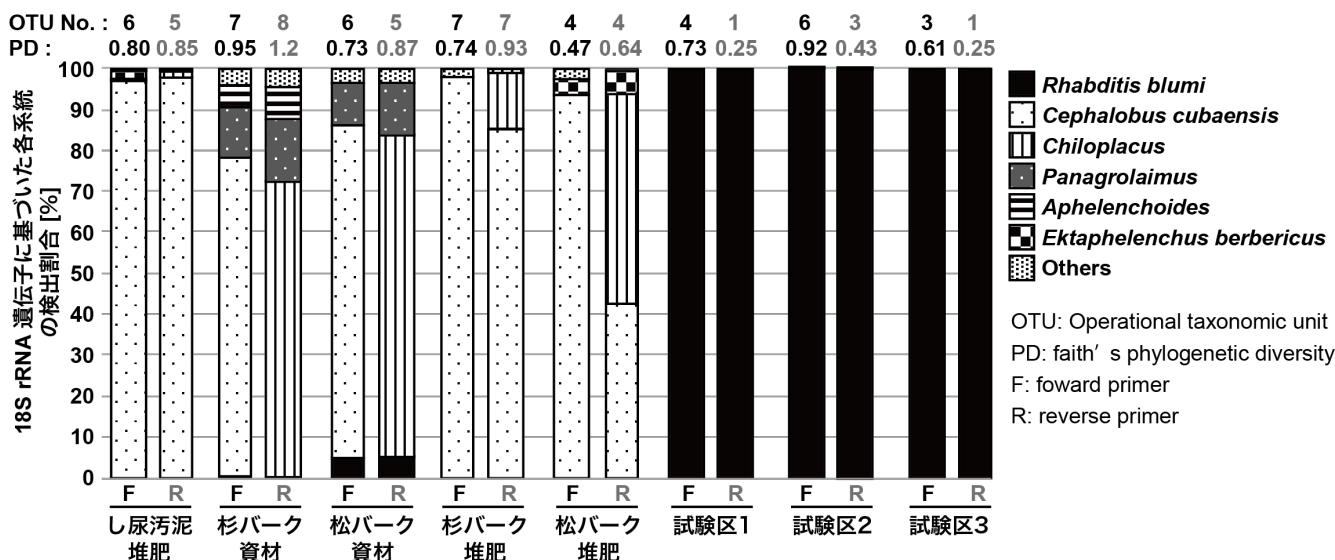


図1 18S rRNA 遺伝子に基づいた各系統の検出割合および多様性解析

試験区3で $1.1 \times 10^5$ 頭/10gを示し、全ての試験区で線虫を優占化させることに成功した(表1)。ベルマン法で抽出した線虫からの18S rRNA 遺伝子解析の結果、得られたOTU数(種の数)はそれぞれF側で3-7, R側で1-8であった。また各試料の $\alpha$ 多様性解析の結果、PDではF側が0.47-0.95の範囲、R側が0.25-1.2の範囲であった。また、既存堆肥におけるPDの値は、下水汚泥堆肥と比較してF側で0.50-1.6倍、R側で1.5-4.9倍とR側のリードで高い多様性を示した(図1)。各試料のunweighted UniFracに基づいたPCoAの結果では、バークを原料とする既存の堆肥と、作製した下水汚泥堆肥で線虫群集が大きく異なることが示され(図2)、weighted UniFracの結果も同様の結果を示した。

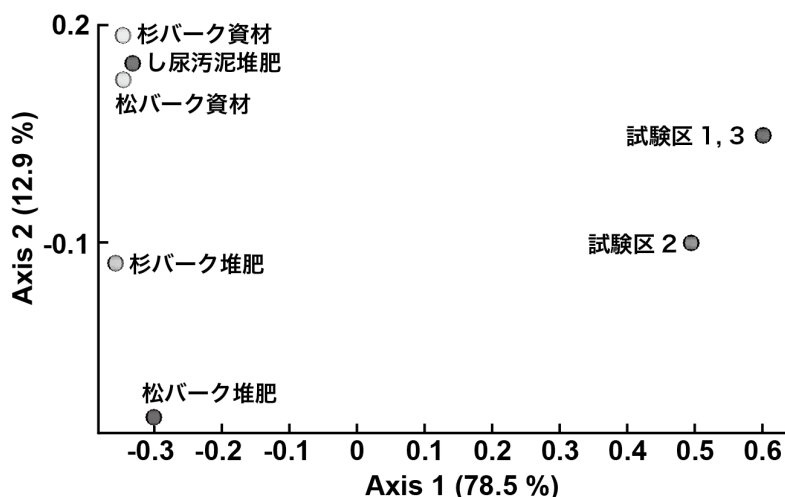


図2 各堆肥試料のunweighted UniFracに基づいたPCoA

これらの結果を基に、OTUレベルで試料間の線虫群集構造比較解析を行った結果、既存堆肥中ではそれぞれCephalobusやChiloplacus等の自活性線虫が70%以上の存在割合で優占していることが確認された。一方で、下水汚泥堆肥では、全ての試験区のF側とR側の両方でRhabditisのみの優占(99%以上)が確認された。下水汚泥堆肥の線虫群集構造比較解析の結果、試料間で同一の線虫(Rhabditis)が優占していることから配合割合が優占する線虫の系統に与える影響は無いと考えられた。また、下水汚泥堆肥とバーク堆肥の線虫群集構造比較解析では、異なる線虫の系統が優占していることから、原材料の組成の違いが増殖する線虫の系統に影響を与えることが示唆された。

#### 4. まとめと今後の予定

18S rRNA 遺伝子に基づいた堆肥の線虫群集構造解析の結果、堆肥には特定の種類の線虫が優占する事が明らかになった。これら優占した線虫種の機能は不明であることから、これら線虫種が植物寄生性線虫の生育などに与える影響を評価する必要があると考えられた。今後は作製した有用微生物優占化堆肥の寄生性線虫害防除効果の比較検討を行う予定である。

#### 引用文献

- 1) 国土交通省ホームページ: [http://www.mlit.go.jp/mizukokudo/sewerage/crd\\_sewerage\\_tk\\_000124.html](http://www.mlit.go.jp/mizukokudo/sewerage/crd_sewerage_tk_000124.html), (2020.10.15 日閲覧)
- 2) 蔵下はづぎら, 土木学会論文集G(環境), Vol.74, No.7, pp.III\_255-III\_264, 2018.
- 3) 池田匠児ら, 令和元年度土木学会全国大会第74回年次学術講演会講演集, VII-56, 2019.
- 4) Lynn et al., J. Nematol., Vol.50, No.4, pp.533-542, 2018.