

## メタン発酵処理がバーティシリウム菌、 メロンつる割れ病菌の生存に及ぼす影響<sup>\*1</sup>

瀧本淳徳<sup>\*2</sup>・小池正徳<sup>\*2</sup>・高橋潤一<sup>\*2</sup>・梅津一孝<sup>\*2</sup>

<sup>\*1</sup>2004年度農業施設学会大会にて発表

<sup>\*2</sup>帯広畜産大学畜産科学科, 〒080-8555 帯広市

### 要 旨

本研究は作物病原菌であるバーティシリウム菌とメロンつる割れ病菌のメタン発酵による死滅効果を明らかにすることを目的に発酵温度 35℃ と 55℃ で回分試験を行った。その結果、微生物を 90% 死滅させるのに必要な時間  $T_{90}$  は、バーティシリウム菌は 35℃ で 7.7 日、55℃ で 0.6 日となった。メロンつる割れ病菌は 35℃ で 0.5 日、55℃ では 15 分で死滅し、共に 55℃ での死滅効果が高いことが明らかとなった。

キーワード：バーティシリウム菌、メロンつる割れ病菌、乳牛ふん尿、メタン発酵、 $T_{90}$

### はじめに

近年、有機性廃棄物を嫌気性発酵処理するバイオガスプラントが普及しつつある。嫌気性発酵により生成されたメタンガスは熱エネルギーや電気エネルギーに変換することができる。また、嫌気性発酵処理後に残る液肥は肥料成分を豊富に含んでいるため、良質な肥料として圃場に還元することができる (Umetsu *et al.*, 2002a)。

しかしながら、バイオガスプラントによる有機性廃棄物処理は、投入される家畜ふん尿や食品残渣などに含まれるバクテリア、ウイルス、寄生虫などの拡散といった危険がある。バイオガスシステムにおける家畜ふん尿中に含まれる大腸菌、サルモネラ菌などの病原体の死滅効果についてはいくつかの報告例がある (Olsen *et al.*, 1987, Kearney *et al.*, 1993; Umetsu *et al.*, 2002b)。しかし、混合発酵を行う場合、有機性廃棄物に含まれる可能性のある作物病原菌についての実験報告例は少ない。

本実験はメタン発酵処理における作物病原菌であるバーチシリウム菌 (*Verticillium dahliae*) とメロンつる割れ病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*)

の生存率について、35℃ の中温発酵と 55℃ の高温発酵で回分試験を行い、それぞれの温度別での死滅に必要な時間を求めることを目的とした。

### 材料及び方法

#### 1. 供試材料

本実験で使用した乳牛ふん尿スラリーおよび 55℃ 種汚泥は帯広畜産大学畜産フィールド科学センター内のバイオガスプラントより、また 35℃ 種汚泥は清水町大谷牧場のバイオガスプラントより採取し、バーチシリウム菌 (*Verticillium dahliae* トマト系 Vdt-3) およびメロンつる割れ病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* レース 0 Fom0-mk1) は帯広畜産大学植物微生物学研究室より入手した。

菌の培養は両菌共にローズベンガル培地を用いた。培地は、蒸留水 1L に、りん酸二水素カリウム ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1g、硫酸マグネシウム ( $\text{MgSO}_4$ ) 0.5g、ペプトン 5g、グルコース 10g を加え、pH を 6.8 に調整した。その後、ローズベンガル色素を 0.033g 加え、寒天粉末を 20g 入れた後、オートクレーブにより 120℃、20 分で滅菌した。

原稿受理 2006 年 3 月 6 日

照会先：梅津一孝 umetsu@obihiro.ac.jp

## 2. 実験方法

### 1) 実験Ⅰ パーティシリウム菌の殺菌試験

乳牛ふん尿スラリーをメタン発酵処理した場合のふん尿に含まれるパーティシリウム菌の生存率について、35℃の中温発酵と55℃の高温発酵で回分試験を行い、それぞれの発酵温度で殺菌に必要な最低時間を求めた。種汚泥300g、乳牛ふん尿400gにパーティシリウム菌の分生胞子を $1 \times 10^6$ CFU/mlを加えた菌区と種汚泥300g、乳牛ふん尿400gのコントロール区を35℃、55℃用にそれぞれ作成し、実験用発酵槽（PE製、容積1000ml）の中に入れ、これらを恒温槽（35℃、55℃）内に入れ回分試験を行った。実験期間は10日間とした。

サンプリングは35℃の中温発酵槽では、8時間後、1日後、3日後、5日後、7日後、9日後、10日後、55℃の高温発酵槽では、8時間後、1日後、3日後、5日後、7日後、9日後、10日後に行った。

サンプリングした試料は120℃、20分のオートクレーブ（島津MC-30L）で滅菌した蒸留水で $10^3$ まで段階希釈した後、各1mlを抗生物質（ストレプトマイシン）を含んだローズベンガル培地に混釈、25℃暗室で1週間培養後、出現したコロニー数を計測した。培地は1サンプルにつき5個作成し、その平均コロニー数を1実験のデータとした。実験は2反復行った。

今回の実験では嫌気発酵中のメロンつる割れ病菌数の変化は $T_{90}$ を用いて評価した。 $T_{90}$ とはある処理によって対象微生物の90%を死滅させるのに必要な時間と定義される（Shulundt, 1984）。ひとつの処理によって生き残る微生物は常用対数で表すと最初の数の大小にかかわらず同じ勾配をもって直線的に減少する。今回の実験では、 $T_{90}$ を生存している菌の減少率の対数と実験開始後日数とのグラフの近似直線の傾きから求めた。

$$T_{90} = -1/\alpha \quad \text{①}$$

$\alpha$ ：近似値直線の傾き

### 2) 実験Ⅱ メロンつる割れ病菌の殺菌実験

乳牛ふん尿スラリーをメタン発酵処理した場合のふん尿に含まれるメロンつる割れ病菌の生存率について、35℃の中温発酵と55℃の高温発酵で回分試験を行い、それぞれの発酵温度で殺菌に必要な最低時間を求めた。

種汚泥300g、乳牛ふん尿400gにメロンつる割れ病菌 $5 \times 10^6$ CFU/ml加えた菌区と種汚泥300g、乳牛ふん尿400gのコントロール区を35℃、55℃用にそれぞれ

3区画分計12基作成し、実験用発酵槽（PE製、容積1000ml）の中に入れ、これらを恒温槽（35℃、55℃）の中に入れて回分試験を行った。実験期間は5日間とした。

サンプリングは各温度で菌区、コントロール区共に2時間後、4時間後、6時間後、8時間後、1日後、3日後、5日後の計7回行った。

### 3) 実験Ⅲ メロンつる割れ病菌の殺菌試験（55℃再試行）

実験Ⅱの結果を踏まえ、55℃菌区のサンプリングを15分後、30分後、1時間後、1時間30分後、2時間後の計5回とした。投入割合は菌区で種汚泥300g、乳牛ふん尿400gにメロンつる割れ病菌 $1 \times 10^6$ CFU/ml、コントロール区で種汚泥300g、乳牛ふん尿400gとした。

### 4) 実験Ⅳ バイオガス生成確認試験

乳牛ふん尿のみとパーティシリウム菌およびメロンつる割れ病菌を接種した試料の35℃、55℃での発酵の確認として、回分試験を行った。実験期間は20日間とした。

バイオガスはテドラガスバッグに捕集し、毎日定時に測定した。pH、固形分濃度、有機物濃度、各有機酸量は実験開始前と終了後にサンプリングした試料を分析した。測定方法を以下に示す。

#### (1) バイオガス生成量 (L)

湿式ガスメーター（シナガワW-NK-1B）を用いて測定し、20℃、1atmで表した。

#### (2) バイオガス組成

ガスクロマトグラフ（島津GC-8A）を用いて分析した。カラムは70℃、熱伝導型検出器の温度は120℃とした。キャリアガスにはヘリウムガスを用い、流量は60ml/minとした。

#### (3) メタンガス量

以下の式により算出した。

$$\text{メタンガス量} = \text{バイオガス生成量} \times \text{メタンガス濃度} (\%)$$

#### (4) pH

デジタルpHメーター（東亜電波工業HM-30V）を用いて測定した。

#### (5) 固形分濃度 (TS) (%)

試料質量を測定して乾燥機で105℃、24時間で乾燥させた後、常温まで冷却、測定し、次式より求めた。

$$TS (\%) = D/W \times 100$$

TS：固形分濃度 (%)

D：乾物質量 (g)

W：試料質量 (g)

## (6) 有機物濃度 (VS) (%)

乾物質量を測定して灰化炉で 550℃、4 時間で灰化させた後、常温まで冷却、測定し、次式より求めた。

$$VS (\%) = (D-A) / W \times 100$$

VS：有機物濃度 (%)

A：灰化後質量 (g)

## (7) 揮発性有機酸量 (mg/l)

有機酸量の測定は高速クロマトグラフ有機分析システム (HPLC, 島津 LC-10AD) を用いた。

## 実験結果および考察

## 1. 実験 I パーティシリウム菌の殺菌試験

図 1 に 1 回目の実験結果を示す。35℃ 菌区の発酵槽は、8 時間後に急激に減少し、その後ゆるやかに減少した。55℃ 菌区の発酵槽では、8 時間後にはほとんどのパーティシリウム菌が死滅し、1 日目以降ではすべてのプレートからパーティシリウム菌の出現は見られなかった。

図 2 に 2 回目の実験結果を示す。35℃ 菌区の発酵槽では、1 回目の実験と同様に初めの 8 時間でコロニーは約 100 分の 1 に減少し、その後ゆるやかに減少した。55℃ 菌区の発酵槽では 1 日後にほとんどのパーティシリウム菌が死滅し、3 日目以降ではすべてのプレートからパーティシリウム菌の出現は見られなかった。1 回目と 2 回目の 55℃ 菌区での死滅速度の違いは、2 回目のほうが熱耐性を持っている微小菌核を形成したことが原因であると考えられる。

これらの結果から①式より  $T_{90}$  を求めた。35℃ 菌区の  $T_{90}$  は 7.7 日、55℃ 菌区の  $T_{90}$  は 0.2 ~ 0.6 日となった。中温発酵での家畜ふん尿中の病原菌の  $T_{90}$  は、大腸菌群は 0.8 ~ 2.7 日、サルモネラ菌は 0.9 ~ 2.4 日で

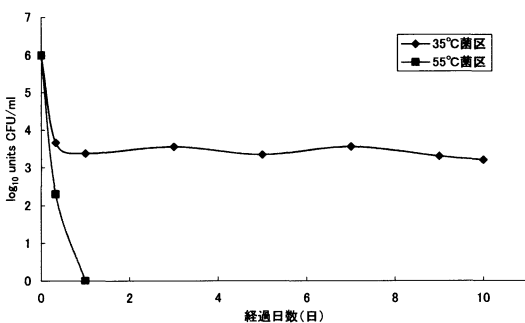


図 1 パーティシリウム菌数の経日変化 (1 回目)

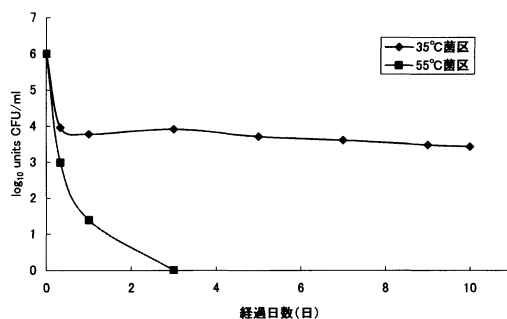


図 2 パーティシリウム菌数の経日変化 (2 回目)

あることから (Olsen *et al*, 1987; Kearney *et al*, 1993), パーティシリウム菌は家畜ふん尿中の病原菌に比べ熱に対する耐性があると考えられる。

## 2. 実験 II メロンつる割れ病菌の殺菌試験

メロンつる割れ病菌の生存数を図 3 に示す。は 35℃ 菌区の場合、実験開始から 2 時間後のコロニーの減少が著しく、3 日目にはコロニーの出現は認められなかった。55℃ 菌区の場合は 2 時間後ですでにコロニーの発現は見られなかった。メロンつる割れ病菌と同種のきゅうりつる割れ病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) には豚ふんを、トマト萎ちょう病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) には鶏ふんを土壌に施用することによりこれらの防除に効果があるという研究報告 (松田明ら, 1975; 本間善久ら, 1976) があることから、ふん尿中の細菌や有機物がメロンフザリウム萎ちょう菌の生存に影響を与えたということが考えられる。

35℃ 菌区の場合、メロンフザリウム萎ちょう菌の  $T_{90}$  は 0.5 日であった。

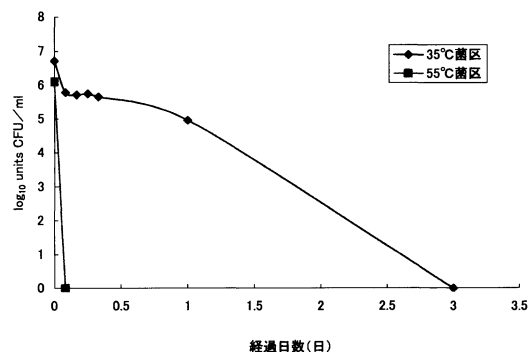


図 3 メロンつる割れ病菌数の経日変化

3. 実験Ⅲ メロンつる割れ病菌の殺菌試験 (55℃ 再試行)

実験Ⅲにおいても55℃菌区のすべてのシャーレにコロニーの発現は見られなかった。このことから、今回使用したメロンつる割れ病菌は55℃では生存出来ないと考えられる。このことは同種のきゅうりつる割れ病菌、トマト萎ちょう病菌、イチゴ萎黄病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *fragariae*) が60℃、10分間の加熱で死滅するという研究報告 (吉野正義ら, 1972) と同様の結果となった。

以上の結果より、パーティシリウム菌、メロンつる割れ病菌は共に55℃の高温発酵の方が35℃の中温発酵に比べ、殺菌効果が高いことが明らかとなった。これは、家畜ふん尿中の大腸菌群、腸球菌、サルモネラ、ヨーネ菌を使った嫌気発酵実験の結果と同様であった (Olsen *et al*, 1985; Forshell, 1995; Watanabe *et al*, 1997)。

4. 実験Ⅳ バイオガス生成確認試験

図4にパーティシリウム菌区およびコントロール区

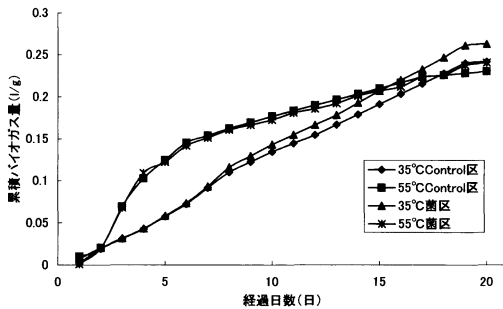


図4 パーティシリウム菌区とコントロール区の投入有機物当たり累積バイオガス生成量

の投入有機物当たりの累積バイオガス生成量を、また図5にメロンつる割れ病菌区およびコントロール区の投入有機物当たりの累積バイオガス生成量を示す。両菌区共にコントロール区とほぼ同様なガス生成傾向を示した。55℃は、35℃に比べガス生成速度が速く、発酵初期のガス生成量が多かったが、20日目にはほぼ同様の累積ガス生成量となった。

実験前、実験後の固形分濃度、有機物濃度、固形分に占める有機物割合、pH、有機酸量の値を表1、2に示す。有機物分解率は全区で25%前後であった。pHは、55℃の方が35℃に比べ高い値を示した。また両区ともに実験前と比べ、実験後にpH値は上昇した。有機酸分解率は全区で97.5%前後となり、ほとんどの有機酸は発酵により分解された。

以上の結果から今回実験で用いた供試材料は正常にメタン発酵が行われていたものと考えられる。

今回の実験結果は回分式発酵でのものであり、ふん尿中の病原菌は回分式より連続投入式の方が長く生存

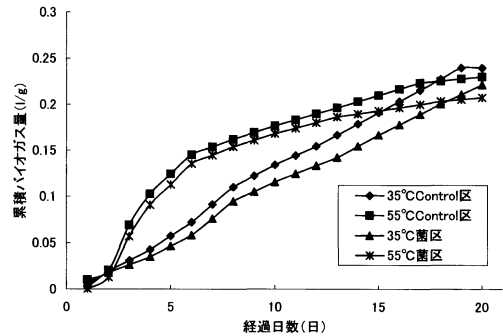


図5 メロンつる割れ病菌区とコントロール区の投入有機物当たり累積バイオガス生成量

表1 実験前供試原料の性状

	Control		パーティシリウム菌区		メロンつる割れ病菌区	
	35℃	55℃	35℃	55℃	35℃	55℃
固形分濃度 (%)	7.27	7.79	6.89	7.74	7.92	7.68
有機物濃度 (%)	5.88	6.18	5.49	6.13	5.96	6.00
固形分に占める有機物割合 (%)	80.88	79.33	79.68	79.20	75.25	78.13
pH	7.37	7.79	7.27	7.74	7.28	7.68
有機酸量 (mg/l)						
蟻酸	0.73	0.66	0.72	0.74	1.42	1.47
プロピオン酸	180.04	154.49	384.03	378.43	418.76	368.06
酢酸	434.00	359.65	155.69	161.02	164.64	148.96
酪酸	103.39	98.45	92.94	101.19	102.21	99.41
総有機酸量	718.17	613.25	633.38	641.39	687.04	617.80

表2 実験後供試原料の性状

	Control		パーティシリウム菌区		メロンつる割れ病菌区		
	35°C	55°C	35°C	55°C	35°C	55°C	
固形分濃度 (%)	5.88	6.20	5.31	6.00	5.89	6.02	
有機物濃度 (%)	4.42	4.57	4.01	4.38	4.43	4.43	
固形分に占める有機物割合 (%)	75.17	74.71	75.52	73.00	75.21	73.59	
pH	7.63	7.92	7.67	7.90	7.63	7.94	
有機酸量 (mg/l)	蟻酸	0.29	0.35	0.27	0.30	0.31	0.35
	プロピオン酸	1.25	1.05	1.64	1.00	1.90	1.45
	酢酸	14.62	12.85	11.78	12.00	12.30	14.45
	酪酸	0.40	0.67	0.35	0.49	0.36	0.25
	総有機酸量	16.56	14.92	14.04	13.79	14.87	16.5

したという報告 (Kearney *et al*, 1993) があることから、今後連続投入式での実験も必要であると考え。また、 $T_{90}$  は菌の種類によっても変わる (Leena, 2003) ため、今後他の作物病原菌についての検討も必要であると考え。

### 総括

本実験は、乳牛ふん尿スラリーをメタン発酵処理した場合の作物病原菌の一種であるパーティシリウム菌およびメロンつる割れ病菌の生存率について、35°Cの中温発酵と55°Cの高温発酵で回分試験を行い、それぞれの温度で殺菌に必要な最低時間を求めることを目的とした。結果を要約すると以下のとおりである。

- 1) パーティシリウム菌は35°C 菌区の中温発酵では10日以内に全ての菌は死滅せず、 $T_{90}$  は7.7日となった。55°C 菌区の高温発酵では3日後には死滅し、 $T_{90}$  は0.2～0.6日となった。
- 2) メロンつる割れ病菌は、35°Cの菌区の中温発酵では3日後には死滅し、 $T_{90}$  は0.5日となった。55°C菌区の高温発酵では15分で死滅した。

以上の結果より、バイオガスシステムはパーティシリウム菌、メロンつる割れ病菌といった作物病原菌に対して十分な殺菌能力をもち、更に55°Cの高温発酵の方がより有効であることが明らかとなった。

### 参考文献

- Forshell, L. (1995): Survival of *Salmonellas* and *Ascaris suum* eggs in a thermophilic BGP, *Acta, Vet, Scand*, 36(1), 79-85.
- 本間善久・久保千冬・大畑貫一 (1976) : 土壌への有機物施用によるトマト萎ちょう病の抑制効果, 日本植物病理学会報, 42, 339.
- Kearney, T. E., Larkin, M. J. and Levett, P. N. (1993): The effect of slurry storage and anaerobic digestion on survival of pathogenic bacteria, *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 86-93.
- Leena Sahlstrom (2003): A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants, *Bioresource Technology*, 87, 161-166.
- 松田明・尾崎克巳・下長根鴻 (1975) : 各種有機物の土壌施用による土壌病害の発病抑制効果について, 日本植物病理学会報, 41, 273.
- Olsen, J. E., Jorgensen, J. B. and Nansen, P. (1985): On the reduction of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine slurry subjected to batch mesophilic or thermophilic anaerobic digestion, *Agric. Wastes* 13, 273-280.
- Olsen, J. E. and Larsen, H. E. (1987): Bacterial decimation times in anaerobic digestions of animal slurries, *Biological Wastes*, 21, 153-168.
- Shulundt, J. (1984): Survival of pathogenic enteric bacteria in anaerobic digestion on slurry-treated land, *Dissertation Abstracts International*, C45(4), 1025.
- Umetsu, K., Kondo, R., Tani, M. and Hayashi, T. (2002a): Fertilizer value of anaerobically co-digested dairy manure and food processing wastes, *Greenhouse Gases and Animal Agriculture*, 331-342.
- Umetsu, K., Kishimoto, T. and Takahashi, J. (2002b): Survival of coliform bacteria during mesophilic

anaerobic digestion of dairy manure slurry, Proceedings of 4th International Livestock Waste Management Symposium  
Watanabe, H., Kitamura, T., Ochi, S. and Ozaki, M. (1997): Inactivation of pathogenic bacteria under

mesophilic and thermophilic conditions, Wat, Sci, Tech, Vol. 36, No.6-7, 25-32.  
吉野正義・嶋崎豊 (1972) : キュウリつる割病に対する熱風利用の土壤消毒効果, 関東東山病害虫研究会年報, 19, 32.

## The Effect of Inactivation of *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* under Anaerobic Digestion<sup>\*1</sup>

Atsunori TAKIMOTO<sup>\*2</sup>, Masanori KOIKE<sup>\*2</sup>, Jun-ichi TAKAHASHI<sup>\*2</sup> and Kazutaka UMETSU<sup>\*2</sup>

<sup>\*1</sup> Presented at the SASJ Annual Meeting in 2004

<sup>\*2</sup> Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, 080-8555.

### Abstract

The aim of the study was to clear the effect of inactivation of *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* of crops pathogenic fungi under methophilic (35°C) and thermophilic (55°C) temperatures using batchwise anaerobic digesters. The time required for a 90% reduction of viable counts of a population of microorganisms or a decrease by log<sub>10</sub> ( $T_{90}$ ) of *Verticillium dahliae* was 7.7 days at 35°C and 0.6 days at 55°C, respectively. The  $T_{90}$  value of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* was 0.5 days at 35°C. However, *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* could not be detected after 15 minutes at 55°C. As a result, it was clear that thermophilic digestion was more effective in inactivating *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* than methophilic digestion.

**Keywords:** *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, dairy slurry, anaerobic digestion,  $T_{90}$