

養コオロギ廃棄物のフンと紙卵トレーで土壤改良材を開発

－ フン中のセルロース分解細菌等の有用細菌に着目して －



実施担当者 広島県立西条農業高等学校
教諭 大野 佑二郎

1 はじめに

内閣府が設定したムーンショット型研究開発制度では、持続的な食料供給産業を創出するために「昆虫、土壤微生物、人体内微生物等にあたっては、未利用な機能が多数存在しているものと推測され、これらの機能を活用した新たな社会経済活動のシステム化を図ることが必要である。」¹⁾と示されている。

本校ではコオロギを中心とした循環型バイオエコノミーの実現を目指した研究を行っており、実際に 2022 年からフタホシコオロギ(*Gryllus bimaculatus*)飼育を開始し、常時 2000 匹以上のコオロギを飼育している。これまでの研究で、未利用資源のみを餌や飼育資材に使用するコオロギ生産システムの構築に成功している。具体的には、お好み焼き屋から排出されるキャベツの芯を炭水化物源にし、ちりめん生産の際に排出されるちりめんモンスターを魚粉(たんぱく源)の代わりに使用して餌を作成し、ケーキ屋から排出されている紙卵トレーを共食い防止の資材として使用してコオロギ生産に成功した。

しかし、コオロギの飼育生産の際に生じるコオロギのフンと使用後の紙卵トレーをゴミとして捨ててしまっている。

そこで、コオロギのフンと紙卵トレーを混ぜたものの土壤改良効果を明らかにし、コオロギのフンに含まれる細菌の生物機能を確認することを本研究の目的とした。

2 土壤改良材の作成とコマツナの栽培

私たちは、捨てられているコオロギのフンと使用後の紙卵トレーも有効活用して完全資源循環型に近づけたいと考えた。そこで、コオロギのフンと紙卵トレーを混ぜて土壤改良材にすることを思いついた。

方法として、土壤改良材はコオロギのフンと紙卵トレーに赤玉土と米ぬかを加え、水を適量加えながら 2 週間毎日かき混ぜて作成した。

植物を育てるための土として赤玉土を利用し、土壤改良材として「紙卵トレー」と「腐葉土(対照区)」を加えて条件分けを行った。条件ごとに 1 プランターあたり 30 粒を播種したものを 6 プランター用意した。全プランターに同量の肥料(化成肥料 8-8-8 を 1 プランターあたり 30g)

を与えた。種まきから2週間経過後から1週間ごとに間引いた全個体の「葉の長さ」「茎の太さ」を測定した。

結果として、作成した「紙卵トレー」土壌改良材は、対照区の腐葉土と比べて、植物の成長を促進させる土壌改良効果と病害虫の被害を減少させる土壌改良効果（図1）を持っていることが確認できた。



図1. 病害虫の被害（左：腐葉土、右：フンと紙卵トレーで作成した土壌改良材）
 （対照区の腐葉土に対して作成した土壌改良材のほうが病害虫の被害が少ない。）

3 コオロギのフンに含まれる細菌の研究

3-1 セルロース分解細菌の発見とセルロース分解能力の測定

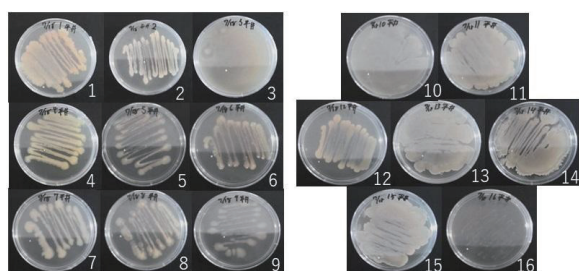


図2. セルロース分解菌のコロニー
 (1～9：CMC 培地、10～16：セルロース培地)

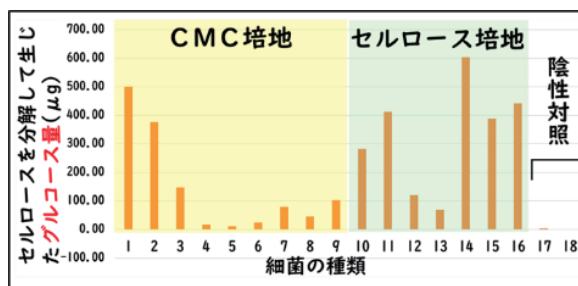


図3. セルロース分解能力

私たちは、コオロギは雑食であり、与えている餌の大部分が植物性であるため、体内にセルロース分解細菌が共生しており、フン中にもセルロース分解細菌が存在していると仮説を立てた。仮説を検証するため、フン中にセルロース分解細菌が存在しているか確認することとした。

方法として、セルロースを炭素源に限定した培地を作成し、セルロースを糖として分解できる細菌のみが生き残れるようにした。生き残ったセルロース分解細菌を一種類ごとに分けて育てた。ジニトロサリチル酸がグルコース濃度によって色が変わることを利用してセルロース分解能力を測定した。

結果として、セルロース分解細菌を16種発見できた（図2）。また、それぞれのセルロース分解能力を明らかにした（図3）。

3-2 植物の成長を促進させる土壌改良効果はなぜ生じるのか

植物の成長を促進させる植物ホルモンとしてオーキシンが資料集に掲載されてある。私たちは、フン中の細菌がオーキシンを生成することで植物の成長を促進させたと仮説を立てた。仮説を検証するため、フン中の細菌がオーキシンを生成するのか確認することとした。

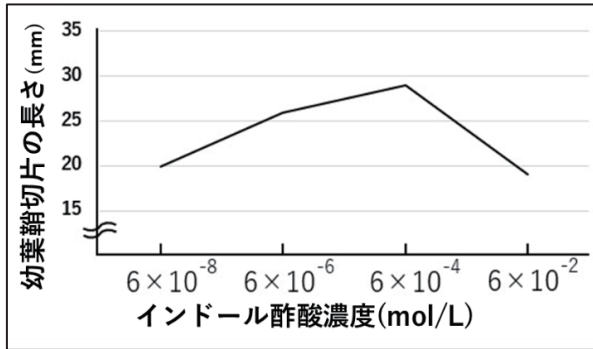


図4. 作成した検量線（オーキシシン濃度 (mol/L) と幼葉鞘切片の長さ)

方法として、マカラスムギの幼葉鞘の伸びる長さ（アベナテスト）でオーキシシンの生成を確認した。細菌はセルラーゼ活性が高いセルロース分解細菌2株（菌1、菌14）を用いた。まず、濃度が分かっているインドール酢酸で幼葉鞘の長さがどうなるか調べ、基準となる検量線（図4）を作成した。次に、セルロース分解細菌によって幼葉鞘の長さがどうなるか調べた。セルロース分解細菌の培養液をシリンジフィルターでろ過したものを原液とし、希釈液を用意した。それぞれの希釈液に幼葉鞘切片を7本入れ、1日経過後の長さをデジタルノギスで計測した。

測定結果をもとに検量線を用いてオーキシシンがどのくらい生成されているかを確認した。

結果として、フン中の菌1と菌14はオーキシシンを生成していることが明らかとなった。そのことが関係して植物の成長を促進させる土壤改良効果が生じたと考える。

3-3 病害虫の被害を減少させる土壤改良効果はなぜ生じるのか

私たちは、フン中の細菌が抗真菌作用や抗細菌作用を持っており、植物に被害をもたらす真菌や細菌の増殖を防ぎ、真菌や細菌からの直接的な被害を防ぐだけでなく、被害を受けないことによって植物の免疫力が高まることで昆虫からの食害被害を減少させたと仮説を立てた。仮説を検証するため、フン中の細菌の抗真菌作用や抗細菌作用を確認することとした。

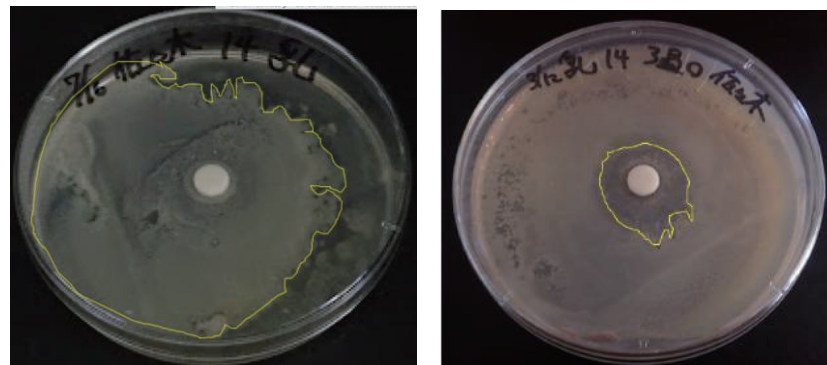


図5. 左：菌14の乳酸菌に対する菌の広がり
右：菌14の乳酸菌に対する阻止円

方法として、ろ紙拡散法を行い、セルロース分解細菌が持つ真菌や細菌への作用を確認した。セルロース分解細菌はセルラーゼ活性が高い4株（菌1、菌2、菌14、菌16）を用いた。セルロース分解細菌の培養液をそのまま使用する「ろ過なし」とシリンジフィルターを用いてろ過した「ろ過あり」を用意した。接種菌は身近な商店で手に入る真菌として酵母を、細菌として乳酸菌と納豆菌を用いた。

平板培地全体に接種菌をコンラージ棒で塗抹し、その中心にセルロース分解細菌の培養液をしみ込ませたろ紙を置き、30℃で1日培養した。セルロース分解細菌の培養液をそのまま使用する「ろ過なし」は、接種菌に対するセルロース分解細菌の広がりを確認した。シリンジフィルターを用いてろ過した「ろ過あり」は、セルロース分解細菌が分泌する物質によって、接種菌に対して形成する阻止円を確認した。細菌の広がり、阻止円ともに撮影した画像を ImageJ に取り込んで面積を測定した。

結果として、接種菌に対するセルロース分解細菌の広がり、セルロース分解細菌が接種菌に対して形成する阻止円が確認できた（図5）。図は ImageJ で加工しており、黄色い線の内側が接種菌に対するセルロース分解細菌の広がり、セルロース分解細菌が接種菌に対して形成した阻止円である。これらのことから、使用したセルロース分解細菌には抗真菌作用と抗細菌作用があることが明らかとなった。そのことが関係して病害虫の被害を減少させる土壤改良効果が生じたと考える。

3-4 セルロース分解細菌の同定

実験で使用した細菌のオーキシシン生成能力や抗真菌、抗細菌作用が確認できたことから、バイオセーフティレベルが1であれば農業資材として活用できる可能性が広がる。そこで、種を同定することにした。セルラーゼ活性が高い2株(菌1と菌14)を16SrRNAのV1-V9領域で同定を行った。同定は株式会社生物技研に依頼した。

結果として、菌1が *Bacillus velezensis*、菌14が *Bacillus amyloliquefaciens* であり、どちらの細菌もバイオセーフティレベルが1で安全であることが明らかとなった。さらに、菌1と菌14は植物成長促進根圏細菌であり、有用性が明らかになった⁽²⁾⁽³⁾。

4 まとめ

土壌改良材の中では、コオロギのフン中のセルロース分解細菌が紙卵トレーのセルロースをグルコースに分解し、そのグルコースを栄養にしてフンや土壌中に含まれる細菌が活性化する。活性化された細菌には *Bacillus velezensis* や *Bacillus amyloliquefaciens* のような植物成長促進根圏細菌(PGPR)が含まれており、それらの細菌が「植物の成長を促進させる土壌改良効果」や「病害虫の被害を減少させる土壌改良効果」を生じさせたと考える。

5 展望

循環型バイオエコノミーを目指したコオロギ生産で生じたゴミを土壌改良材として再利用することで完全資源循環に近づいた。また、作成した土壌改良材の効果が生じる原因を明らかにすることができた。今後はコオロギのフンから発見した *Bacillus velezensis* と *Bacillus amyloliquefaciens* を用いた実験をして、他の有用な能力や作用について明らかにしていきたい。そして、添加する細菌などの条件を変えた土壌改良材の試作を繰り返し行うことで実用化を目指す。また、発見した *Bacillus velezensis* と *Bacillus amyloliquefaciens* が持つセルロースを分解し、オーキシシンを生成する能力と、抗真菌・抗細菌作用を活用した農業資材を開発したい。具体的には、シュレッダーダストに培養した *Bacillus velezensis* と *Bacillus amyloliquefaciens* を噴霧したものを乾燥させ、植物の根元にふりかける農業資材を考えている。バチルス属は芽胞の状態では高温や乾燥等に強いため、長期保存ができる。また、直接細菌を土壌に噴霧するよりも細菌が定着すると考える。ふりかけた後は細菌が発芽してシュレッダーダストのセルロースを分解し、それを栄養として活性化する。そして「植物の成長を促進させる土壌改良効果」と「病害虫の被害を減少させる土壌改良効果」を発揮する。これが実現すれば、化学肥料と化学農薬の使用量を抑えることができると考える。

謝辞

本研究は公益財団法人中谷財団様の科学教育振興助成、公益財団法人マツダ財団様の研究費の支援を受けております。この場を借りてお礼申し上げます。本研究の遂行にあたり、国立研究開発法人産業技術総合研究所バイオ変換研究グループの皆様、香川大学農学部准教授松本由樹様には研究のご指導ご助言いただき厚く御礼申し上げます。さらに、株式会社ACORN 徳の風プロジェクト様にはコオロギの飼育に関するご助言をいただきました。菓子工房 mike 様からは紙卵トレーを、清原水産様からは煮干し残渣を提供していただきました。ご協力いただき深く感謝を申し上げます。

参考文献

- 1) 内閣府(2022): ムーンショット型研究開発制度が目指すべき「ムーンショット目標」について
- 2) Gautam, S., Chauhan, A., Sharma, R., Sehgal, R., and Shirkot, C.K. (2021): Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of bacterial canker of tomato incited by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Biological Control*, 157, 104567.
- 3) Wu, Y., Zhou, J., Li, C. and Ma, Y. (2019): Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *MicrobiologyOpen*, 8(11), e927.hoka 他