

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K13862

研究課題名(和文)菌類-バクテリアの共生系を活性化させた高付加価値きのこ栽培技術の創生

研究課題名(英文)Development of valuable mushroom cultivation method by activating fungal-bacterial symbiosis

研究代表者

黒田 恭平(Kuroda, Kyohei)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：50783213

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):国内の下水処理場からは年間227万トンの下水汚泥が排出されており、下水汚泥が有機分を多く含む特性を活かした利活用方法が求められている。これまで、下水汚泥堆肥を培地基材に利用することでマッシュルーム子実体の収量が従来法と比較して1.2-1.8倍に増加することを確認している。しかしながら、マッシュルーム子実体の収量が増加した詳細なメカニズムは不明である。本研究では、マッシュルーム(*Agaricus bisporus*)に着目し、下水汚泥を用いることによる培地中の微生物叢の変遷、子実体に生息する微生物叢の解明、これら微生物群が菌糸成長に与える影響について評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、全く手付かずの大衆食用きのこ(マッシュルーム)の食味・香り・収量を向上させる機構を菌類-細菌の共生系という観点から解明し、その共生系を活性化させることで新規高付加価値食用きのこ栽培技術を創生する学術的意義の高いものである。本研究を達成した暁には、日本国内だけでなく世界で発生する下水処理場由来バイオマスの新たな有効利用方法を確立可能であり、持続可能な社会形成に寄与する社会的意義の高い課題である。

研究成果の概要(英文):Previously, we succeeded to cultivate button mushroom (*Agaricus bisporus*) using sewage sludge compost, and we found that production rate of button mushroom became 1.2-1.8-fold higher than traditional way. Therefore, we hypothesized that utilization of sewage sludge compost can produce valuable mushrooms. While microorganisms in mushroom media are only known as substrates for growth of mushroom fungi, influence of difference of microbial communities in the media has not been investigated until now. In this study, to elucidate a mechanism of the valuable mushroom cultivation, we performed microbial community analysis based on 16S rRNA gene sequence, cultivation of predominant microorganisms in button mushroom prepared with sewage sludge compost, and co-cultivation of isolates and *A. bisporus*.

研究分野：環境微生物生態工学

キーワード：共生きのこ生産学 高付加価値きのこ 下水汚泥肥料 共生微生物 活性化

1. 研究開始当初の背景

国内の下水処理場からの下水汚泥の排出量は年間 224 万トン(乾物重量)であり、この内約 129 万トンが有効利用されているが、下水汚泥の特徴である 8 割が有機物である特性を活かした緑農地利用などは 20%未満にとどまっている。こうした中、全国各地で下水処理場由来バイオマスを農作物等の食料生産に利用した優れた取組みが産学官民の連携により盛んに行われている¹⁾。申請者らは下水汚泥と地域バイオマスや牛糞堆肥を用いてヒラタケ・マッシュルームの栽培に成功しており、下水汚泥を培地基材に利用すると、子実体中の遊離アミノ酸含量が通常のきのこの 3.4 倍(グルタミン酸、アラニンが主に増加)の高付加価値きのこの栽培できることを見出した²⁾。加えて、下水汚泥堆肥と牛糞堆肥を併用することで、マッシュルーム(*Agaricus bisporus*)子実体の収量が従来法(下水汚泥堆肥 0%、牛糞堆肥 85%利用区)と比較して 1.2-1.8 倍に増加することを確認している³⁾。近年、トリュフ(*Tuber spp.*)の栽培土壌及び子実体の微生物群集構造解析が行われ、約 20~85%が未知微生物であること、殻皮や基本体の部位に高い生理活性を保持する細菌(未知な *Proteobacteria*)が生息していることが明らかとなり、共生微生物群がきのこの成長過程において重要であることが示されている⁴⁾。つまり、きのこ菌類のエサとして考えられてきた細菌は、きのこの栽培過程に必要且つ、その食味や香りの形成に重要な役割を果たしていたと考えられる。学術的背景を踏まえ、申請者らが栽培に成功した高付加価値きのこ(高アミノ酸含有、香り等が向上)について、下水汚泥利用培地と通常の培地に存在する微生物群集構造の違いを調査し、きのこ子実体に共生する未知微生物群を明らかにすることで説明できる可能性がある。本研究を達成した暁には、共生微生物群を活性化させることで、新規高付加価値食用きのこ栽培技術の開発が可能となる。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、「何故、下水汚泥を培地基材に用いることにより高付加価値きのこができるのか?」という問い(仮説)についてその形成機序を学術的に解明することで、下水汚泥培地を用いた高付加価値(高アミノ酸含有、香り・食味を向上、収量増)きのこ栽培技術を開発することにある。本研究では、マッシュルームに着目し、下水汚泥を用いることによる培地中の微生物叢の変遷、子実体に生息する微生物叢の解明、これら微生物群が菌糸成長に与える影響について評価を行った。

3. 研究の方法

(1) 下水汚泥堆肥を用いたマッシュルーム栽培培地中の微生物叢解析と培地内優占微生物の分離培養

① 下水汚泥堆肥を用いたマッシュルーム栽培試験

マッシュルーム栽培試験では、培地材料に市販の下水汚泥堆肥と市販の牛糞堆肥を用い、角形培養袋に 2.5 kg-wet になるように充填し、培地水分率を約 60%として調製した。培地に対する配合割合は、試験区 1-3 でそれぞれ下水汚泥堆肥 30%、17.5%、0%、牛糞堆肥 30%、52.5%、85%として調整した。16S rRNA 遺伝子解析及び生菌数測定のため、既報³⁾の下水汚泥堆肥の異なる 3 つの試験区から培地調製後(それぞれの培地材料を混ぜ合わせた直後)、二次発酵後(60°C で 4 時間殺菌処理後、5 日間 20°C、湿度 70%の条件下で静置し、培地の温度上昇が無いことを確認後)、子実体収穫後(マッシュルーム栽培後の廃培地)の培地を採取した。

② 生菌数測定

マッシュルーム培地基材への下水汚泥堆肥利用の有無における生菌数の比較を目的として、最も条件の異なる試験区 1 と試験区 3 の培地調製後、二次発酵後、子実体収穫後から採取した試料は生菌数測定まで 4°C、暗所で保管し、24 時間以内に培養試験に供試した。マッシュルーム栽培過程における培地中の生菌数測定は寒天平板培養法を用いて混釈法により実施した。培地は NB 寒天培地とこれを 100 倍希釈した DNB 寒天培地で生菌数測定を行った。培養は 30°C で行い、NB 培地は培養 5 日後、DNB 培地は 18 日後にコロニー数の計測を実施した。なお、生菌数測定は 1 平板につき 2 回ずつ計測し、その平均値を求めた。

③ マッシュルーム培地中の優占微生物の分離培養試料の採取および培養条件

下水汚泥堆肥を用いたマッシュルーム培地中に優占する微生物の分離培養を目的とし、試験区 1(下水汚泥堆肥 30%)、試験区 2(下水汚泥堆肥 17.5%)の子実体収穫後の廃培地を屋外のビニルハウス内で約 2 ヶ月間野積みしたものを混合し、チャック付きポリ袋一杯に採取し、培養実験まで 4°C で保存した。DNA 抽出には 0.5 g-wet の廃培地を用いた。基本培地は Widdel 培地を好気条件下で H₂S を添加せずに使用し、pH を 7.0 に調製した。基質は、採取した廃培地試料 5 g-wet を蒸留水 495 mL に懸濁し、121°C、20 分間処理を行った培地抽出液を Widdel 培地中に 1% 加えたものを基質とし、酵母抽出液 0.5%有無(分離株 1-10 は酵母抽出液有、分離株 11-16 は酵母抽出液無)の条件とした。酵母抽出液は市販の酵母エキスを蒸留水に 0.5% (w/w) になるように調製し、滅菌したものを用いた。試料の前処理は、試料 1 g-wet を 9 mL の滅菌済生理食塩水に懸濁し、固形物が無くなるまで電動のハンディホモジナイザーで分散した。分散した試料は、

段階希釈を行った後、混釈法で 15°C、暗所・静置条件で培養した。培養後、位相差顕微鏡を用いて観察を行った。

④ 分離株の系統学的位置の推定

液体培地で増殖した培養液は、滅菌した 10 本の 1.5 mL チューブに 1 mL ずつ分注し、遠心分離 (14,000 rpm, 5 分, 4°C) を行い、上澄みを取り除き 1.5 mL チューブ 1 本に濃縮した。濃縮した培養液は滅菌した 1×PBS で 3 回洗浄し、DNase/RNase フリーの超純水 200 μL に懸濁し、凍結融解処理 (-80°C : 5 分, 60°C : 5 分) を 3 回行うことで DNA 抽出物を得た。DNA 抽出物は、全細菌特異的な Bac8f-Univ1492r のプライマーセットを用いて PCR 増幅を行った⁵⁾。PCR 増幅産物は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。DNA シークエンス解析は、シークエンスプライマーに Univ907r⁶⁾を用い、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific), Applied Biosystems 3730x/DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。

⑤ 16S rRNA 遺伝子解析

DNA 抽出には FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) を使用した。PCR 増幅に用いるプライマーセットは原核生物の 16S rRNA 遺伝子の V4 領域を含む Univ515F-Univ806R を使用し、PCR 条件は既報に従った⁷⁾。増幅産物は、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製後、MiSeq (Illumina) および MiSeq reagent kit v2 を用いた DNA シークエンス解析を行った。

(2) 下水汚泥堆肥を用いて栽培したマッシュルーム子実体に生息する微生物群の菌糸成長への影響評価

① 堆肥の作製とマッシュルーム栽培試験

表-1 に堆肥組成を示す。試験区 1 (下水汚泥堆肥) は、下水汚泥 (脱水汚泥)、畑土、土壤改良資材 (タテヤマユキ) を用いて作製した。試験区 2 (混合堆肥) は、試験区 1 の材料に竹おが屑、米糠、甘藷焼酎粕固形物を加えたものを混合堆肥とした。試験区 3 (新規混合堆肥) は、試験区 2 の組成から畑土や土壤改良資材を除いて作製した。堆肥材料は混合後、堆積させて発酵を行った。発酵を均一化させるために堆積物の中心温度が約 80°C に到達後、切り返しを行い、合計 3 回の切り返しを行った。マッシュルーム栽培試験は培地材料に試験区 3 の新規混合堆肥と馬糞堆肥、広葉樹おが屑を用い、角形培養袋に 2.5 kg-wet になるように充填し、培地水分率が 60% として調製した培地で行なった。培地に対する配合割合は、新規混合堆肥 0%, 25%, 50%, 75% としてそれぞれ調製した。収穫した子実体は、チャック付きポリ袋に入れ、分離培養実験まで 4°C で保存した。

② 子実体に優占する微生物群集構造解析

試料には新規混合堆肥の配合割合が異なる培地で栽培したマッシュルーム子実体を使用した。子実体は、洗浄を行わずピンセットを用いて細かく切り分け、試料として使用した。DNA 抽出には FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) を使用し、Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて DNA 濃度測定を行った。PCR 増幅に用いるプライマーセットには、原核生物を対象とする Univ515F-Univ909R を使用した。増幅産物は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製後、MiSeq (Illumina) および MiSeq Reagent Kits v3 (600 cycles, Illumina) を用いた DNA シークエンス解析を行った。得られたシークエンスデータは QIIME 2 を用いたデータ解析を実施した。

③ 子実体に優占する微生物の分離培養

マッシュルーム子実体に優占する微生物の分離培養を混釈法にて試みた。培地は、NB 寒天培地とこれを 100 倍希釈した DNB 寒天培地を使用した。試料の前処理は、子実体をピンセットにより刻んだもの 1 g を 9 mL の滅菌生理食塩水に懸濁し、電動のハンディホモジナイザーで固形物が分散するまで処理を施した。分散した試料は、段階希釈を行った後、混釈法で 30°C で培養した。コロニーの採取は、NB 培地では培養 5 日後、DNB 培地では培養 18 日後にコロニーの形態学的特徴が異なるものを選定し、白金耳を用いて同培地組成の液体培地 10 mL に植種し、震盪培養により分離培養を行なった。培養後、位相差顕微鏡 (OLYMPUS) を用いて観察を行った。分離株の系統学的同定は、Bac8F-Univ1500R のプライマーセットで PCR 増幅を行い、シークエンスプライマーに Univ907r を使用した 16S rRNA 遺伝子のシークエンス解析により行った。子実体中の微生物群集構造解析結果と分離株の相同性検索では、98% 以上となるものを同一系統として選定した。子実体中の優占微生物を存在割合の平均値を基に、高い順に順位付けした。

④ 菌糸と分離株の共培養

菌糸の伸長を促す細菌を特定するために菌糸と分離株の共培養を行なった。菌糸は種菌 (日本

表-1 各試験区の堆肥材料組成

試験区		堆肥材料 (乾物重量 (%))					
		下水汚泥	竹おが屑	米糠	甘藷焼酎粕乾燥固形物	畑土	土壤改良資材
1	下水汚泥堆肥	44.1	—	—	—	—	55.9*
2	混合堆肥	11.1	8.3	5.6	2.8	47	25.1
3	新規混合堆肥	40	30	20	10	—	—

*畑土と土壤改良資材を合わせた数値

農林種菌, 日農 100, ブラウン種) を滅菌水で懸濁し, 懸濁液を培地に塗布し培養したものを使用した。培地には Potato Dextrose Broth (PD) 寒天培地を使用した。共培養には培養した菌糸と分離株を 96 穴のマルチウェルプレート用いて PD 液体培地で振盪培養を行った。さらに, 分離株の代謝産物が菌糸へ与える影響を調査のために分離株の培養液を使用した菌糸の培養を行なった。増殖速度を確認するために吸光マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher scientific) を使って濁度を測定した。測定波長は 595 nm を使用し, 2 反復で測定してその平均値を求めた。

4. 研究成果

(1) 下水汚泥堆肥を用いたマッシュルーム栽培培地中の微生物叢解析と培地内優占微生物の分離培養

① マッシュルーム培地中の微生物叢解析結果

本研究では, 試験区 1-3 の各マッシュルーム栽培過程の培地から 2,285-12,170 リードの 16S rRNA 遺伝子配列データと 274-760 の OTUs を得た。培地調製後では, *Actinomycetales* 目, *Saprospirales* 目, *Bacillales* 目に属する微生物群が優占して存在していた。二次発酵後の培地では, *Bacillales* 目細菌の割合が培地調製後の 19.5% (試験区 1), 15.2% (試験区 2), 10.3% (試験区 3) から, それぞれ 45.7%, 39.0%, 28.9% と大きく増加した。廃培地中でも優占する微生物群は *Actinomycetales* 目と *Bacillales* 目細菌であり, 特に廃培地中の *Bacillales* 目細菌は, 試験区 1, 2, 3 でそれぞれ 65.2%, 54.3%, 52.7% であった。栽培期間を通じてこれら微生物群がマッシュルーム培地内に存在していることが明らかとなった。

マッシュルーム培地中の属レベルにおける 16S rRNA 遺伝子解析結果について着目すると, 培地調製後では, 下水汚泥堆肥を 30% 使用した試験区 1 において, *Paenisporosarcina* 属 (9.1%), *Carnobacterium* 属 (10.3%) が特異的に優占していた一方で, *Actinomadura* 属が牛糞堆肥 85% の試験区 3 (6.3%) で下水汚泥堆肥利用区 (試験区 1 : 1.6%, 試験区 2 : 2.2%) よりも多く存在していた。一方, 60°C で 4 時間殺菌し, 5 日間熟成を行った二次発酵後の培地では, *Bacillales* 目に属する未培養グループ, *Bacillus* 属が牛糞堆肥 85% の試験区 3 と比較して優占していた。生菌数測定においては, NB 培地で生育可能な細菌数が培地調製後から子実体収穫後の廃培地まで減少傾向にあり, 10^9 cfu·g-wet⁻¹ から廃培地時に 10^6 cfu·g-wet⁻¹ まで生菌数が減少した。DNB 培地における生菌数は培地調製後から廃培地まで 10^4 - 10^5 cfu·g-wet⁻¹ 程度であり, NB 培地と比較して 10 倍から 10^4 倍低い値となった。このため, 栄養豊富な栽培初期の培地中では高栄養性細菌が優占化し, 栽培終了後には高栄養性細菌がマッシュルーム菌糸に捕食され, 低栄養性の細菌と同程度の生菌数となることが分かった。また, マッシュルームに病害 (褐変症, マミー病, 穿孔細菌病)⁸⁾ を引き起こす株を含む *Pseudomonas* 属は, 培地調製後 (試験区 1 : 0%, 試験区 2 : 0%, 試験区 3 : 0.04%), 二次発酵後 (0.02%, 0.11%, 0.12%), 廃培地 (0%, 0.01%, 0%) であり, 栽培過程を通してほとんど検出されなかった。

② 培地中に優占する微生物群の分離培養法の検討

本研究では, マッシュルーム栽培に関与する優占微生物群の分離培養法を確立することを目的とし, 培地抽出液を基本の炭素源とした分離培養を行った。分離培養の対象とした試験区 1, 2 の試験区において, *Enterobacteriaceae* 科, *Ochrobactrum* 属が全体の 9.8%-17.6% と優占して存在していた。また, 下水汚泥堆肥 30% の試験区 1 では *Sphingobacterium* 属が 11.1%, *Sphingobacteriaceae* 科に属する未培養グループが 5.3% と *Bacteroidetes* 門に属する微生物群が優占化していた一方で, 下水汚泥堆肥 17.5% の試験区 2 では, *Bacillales* 目, *Pseudomonas* 属に属する微生物群がそれぞれ 9.6%, 9.9% と優占していた。マッシュルーム廃培地中の微生物叢解析結果と比較し, 分離試料中の微生物叢が異なった理由として, 分離培養に用いた試料は野積みされたものであることから, 廃培地中の基質の有機物分解が進み, 微生物叢が変化したことが理由として考えられた。分離株の細胞形態やコロニーの形態学的特徴が異なると考えられる 8 株を選定し, ダイレクト 16S rRNA 遺伝子シーケンス解析を行った。結果, *Ochromactrum* 属, *Enterobacteriaceae* 科, *Cellulosimicrobium* 属, *Microbacterium* 属に属する微生物群の分離培養に成功した。これら分離株は廃培地中で平均して最も優占して存在する微生物群を含んでおり, 培地抽出液と酵母抽出液を組み合わせた段階希釈による寒天平板培養を行うことでマッシュルーム培地中の優占種の分離培養が可能であることが示された。

(2) 下水汚泥堆肥を用いて栽培したマッシュルーム子実体に生息する微生物群の菌糸成長への影響評価

① 子実体中の微生物叢解析結果

培地に新規混合堆肥 50% を含む子実体では, *Pseudomonadales* 目の優占 (存在割合 : 59%) が確認できた。一方, 新規混合堆肥 0%, 75% では, *Burkholderiales* 目の優占 (存在割合 : 20-35%) が確認された。これより, 培地材料に使用する新規混合堆肥の割合によって子実体に生息する微生物群にも影響を与えることがわかった。また, 下水汚泥堆肥を使用したマッシュルーム栽培の培地中には, *Bacillales* 目や *Actinomycetales* 目に属する微生物群の優占が確認されている⁹⁾。つまり, 子実体と培地中では異なる微生物叢を示しており, 培地中とは異なる働きをしていると考えられる。

② 分離培養の結果

混釈法によりマッシュルーム子実体に生息する微生物群の分離培養を行った。NB 培地および

表-2 BLAST による分離株の相同性検索結果

分離株	Taxonomy (Accession No.)	相同性	株数
NB_1	<i>Sphingobacterium cladoniae</i> strain DSS_G4 (MG322228.1)	633/635(99%)	1
NB_2	<i>Microbacterium hominis</i> strain CT55 (MK854980.1)	476/476(100%)	24
NB_3	<i>Chryseobacterium indologenes</i> strain MB30 (MH798803.1)	555/555(100%)	5
NB_5	<i>Pantoea</i> sp. DmB 17 (KF720929.1)	566/566(100%)	1
NB_9	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain P8-7 (MN181183.1)	554/554(100%)	3
NB_13	<i>Sphingobacterium multivorum</i> strain MadaFrogSkinBac.DB-.1865 (MF525235.1)	550/551(99%)	1
NB_17	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain KP7 (MN715320.1)	351/351(100%)	9
NB_19	<i>Chryseobacterium daecheongense</i> (LC036624.1)	610/610(100%)	1
NB_20	<i>Streptomyces lonarensis</i> strain IIPR:BP05:02 (MK158076.2)	265/277(96%)	1
NB_21	<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain PB41 (MN744554.1)	543/543(100%)	1
NB_23	<i>Rhodococcus qingshengii</i> strain SC1 (MN727110.1)	472/472(100%)	9
NB_26	<i>Streptomyces xiangtanensis</i> strain LUSFXJ (NR_164877.1)	473/473(100%)	1
NB_27	<i>Rhodococcus</i> sp. strain SER17 (MK660305.1)	526/526(100%)	1
NB_30	<i>Caulobacter vibrioides</i> strain P6-H3 (MK318611.1)	490/490(100%)	2
DNB_19	<i>Pseudomonas veronii</i> strain MT5 (MN449463.1)	559/559(100%)	1

DNB 培地の両方でコロニーの形成が確認でき、コロニーの色、形状より系統が異なると考えられる株を選定し、61株の分離株を得た(表-2)。選定した61株にダイレクト 16S rRNA 遺伝子シーケンス解析を行った。結果、*Sphingobacterium* 属、*Microbacterium* 属、*Pseudomonas* 属、*Rhodococcus* 属、*Agrobacterium* 属などに属する15種類の微生物に分類できた。分離株のうち、子実体に平均して最も優占する *Pseudomonadales* 目の近縁種は分離できたが、他の優占していた *Burkholderia* 属や *Sphingomonas* 属の近縁種の分離培養はできなかった。これらの微生物群を分離培養するためには、培養条件や培地成分の検討を行う必要がある。今回、分離培養実験では *Microbacterium hominis* に近縁の種が最も多く確認された。

③ 菌糸と分離株の共培養結果

菌糸の培養の結果、PD 寒天培地で5日間培養後、綿状の白いコロニーが発生した。また、顕微鏡観察の結果、管状の細胞を持つ菌糸の培養ができた。PD 液体培地を使用した分離株の培養は、15株のうちNB_20以外の14株で増殖が確認できた。吸光マイクロプレートリーダーの測定結果から増殖曲線を求め、対数増殖期の傾きより比増殖速度を推定した(表-3)。結果、菌糸と分離株を使用した共培養より7株、分離株の培養液を使用した菌糸の培養より9株で菌糸のみの培養と比較して比増殖速度の増加を確認でき、最大約2倍になることがわかった。つまり、これらの分離株や培養液中の代謝産物が菌糸の伸長を促進する働きを持つ可能性が考えられる。今後、分離株の代謝産物の特定を行うことで菌糸の伸長促進作用のメカニズム解明にも繋がると考えられた。

<引用文献>

- 1) 国土交通省, 食と下水道の連携について~BISTRO 下水道~, 2015, 2) 山内正仁ら, 土木学会論文集 G (環境) (環境工学研究論文集第 53 巻), 72(7), 515-522, 2016, 3) 山内正仁ら, 土木学会論文集 G (環境) (環境工学研究論文集第 54 巻), 73(7), 397-405, 2017, 4) Splivallo, R. et al., Environ. Microbiol., 17(8), 2647-2460, 2015, 5) Weisburg, W.G. et al., J. Bacteriol., 173(2), 697-703, 1991, 6) Lane, D.J., JohnWiley & Sons, Chichester, UK., 1991, 7) Kuroda, K. et al., PLoS One, 11(12), e0167788, 2016, 8) 宮崎和弘, 改訂版 最新きのこ栽培技術, 株式会社プランツワールド, 59-69, 2014, 9) 黒田恭平ら, 土と微生物, Vol. 73, No. 2, pp. 62-70, 2019.

表-3 菌糸と分離株の共培養における比増殖速度

	比増殖速度 (μ^{-1})		
	分離株のみ	菌糸と分離株	菌糸と培養液
菌糸	0.0108		
NB_1	0.0104	0.0190	0.0208
NB_2	0.0086	0.0031	0.0293
NB_3	0.0203	0.0061	0.0111
NB_5	0.0048	0.0245	0.0083
NB_9	0.0086	0.0089	0.0180
NB_13	0.0114	0.0277	0.0082
NB_17	0.0168	0.0092	0.0277
NB_19	0.0090	0.0170	0.0122
NB_21	0.0071	0.0176	0.0094
NB_23	0.0186	0.0051	0.0074
NB_26	0.0086	0.0091	0.0174
NB_27	0.0194	0.0168	0.0139
NB_30	0.0178	0.0138	0.0122
DNB_19	0.0071	0.0054	0.0076

*NB_20は増殖が確認できなかった

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kuroda Kyohei, Kurashita Hazuki, Arata Tomoka, Miyata Ayaka, Kawazoe Miyu, Nobu Masaru K., Narihiro Takashi, Ohike Tatsuya, Hatamoto Masashi, Maki Shinya, Yamaguchi Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Influence of Green Tuff Fertilizer Application on Soil Microorganisms, Plant Growth, and Soil Chemical Parameters in Green Onion (<i>Allium fistulosum</i> L.) Cultivation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Agronomy	6. 最初と最後の頁 929 ~ 929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/agronomy10070929	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 黒田 恭平, 高津佐 愛実, 徳田 裕二郎, 池田 匠児, 平片 悠河, 幡本 将史, 山田 真義, 山口 隆司, 八木 史郎, 山内 正仁	4. 巻 73
2. 論文標題 下水汚泥堆肥を用いたマッシュルーム栽培培地中の微生物叢解析と培地内優占微生物の分離培養	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 土と微生物	6. 最初と最後の頁 62 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18946/jssm.73.2_62	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kazuo Kuroki, Yujiro Tokuda, Shoji Ikeda, Yuga Hirakata, Masashi Hatamoto, Masayoshi Yamada, Takashi Yamaguchi, Fumio Yagi, Masahito Yamauchi, Kyohei Kuroda
2. 発表標題 Microbial community analysis of newly prepared sewage sludge compost for button mushroom cultivation
3. 学会等名 International Conference of "Science of Technology Innovation" in Nagaoka (4th STI-Gigaku 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒木和雄, 高津佐愛実, 徳田裕二郎, 池田匠児, 山田真義, 山内正仁, 幡本将史, 山口隆司, 八木史郎, 黒田恭平
2. 発表標題 高付加価値マッシュルーム栽培に向けた新規下水汚泥堆肥作製と微生物学的知見の収集
3. 学会等名 土木学会第73回年次学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒木和雄, 片平智仁, 山田真義, 幡本将史, 山口隆司, 八木史郎, 山内正仁, 黒田恭平
2. 発表標題 下水汚泥堆肥を用いて栽培したマッシュルーム子実体に存在する微生物群の同定および菌系成長への影響評価
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒田恭平, 高津佐愛実, 徳田裕二郎, 池田匠児, 平片悠河, 幡本将史, 山田真義, 山口隆司, 八木史郎, 山内正仁
2. 発表標題 下水汚泥堆肥を用いた高付加価値マッシュルーム栽培培地中の複合微生物群の分子生物学的解析および培養
3. 学会等名 第55回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kyohai Kuroda, Manami Kotsusa, Yujiro Tokuda, Shoji Ikeda, Yuga Hirakata, Masashi Hatamoto, Masayoshi Yamada, Takashi Yamaguchi, Fumio Yagi, Masahito Yamauchi
2. 発表標題 Microbial community analysis and cultivation of predominant microorganisms in button mushroom media utilizing sewage sludge
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第32回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒木和雄, 高津佐愛実, 徳田裕二郎, 池田匠児, 平片悠河, 幡本将史, 山口隆司, 八木史郎, 山田真義, 山内正仁, 黒田恭平
2. 発表標題 高付加価値マッシュルーム栽培に向けた新規下水汚泥堆肥の配合条件の検討
3. 学会等名 土木学会西部支部研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuo Kuroki, Manami Kotsusa, Yujiro Tokuda, Shoji Ikeda, Yuga Hirakata, Masashi Hatamoto, Masayoshi Yamada, Takashi Yamaguchi, Fumio Yagi, Masahito Yamauchi, Kyohei Kuroda
2. 発表標題 Attempt at a development of optimized sewage sludge compost for button mushroom cultivation
3. 学会等名 International Conference of " Science of Technology Innovation " in Nagaoka (2018 3rd STI-Gigaku) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山内 正仁 (Yamauchi Masahito) (40239843)	鹿児島工業高等専門学校・都市環境デザイン工学科・教授 (57701)	
研究協力者	野口 太郎 (Noguchi Taro) (90615866)	都城工業高等専門学校・物質工学科・准教授 (57601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------