

平成23年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「熱風利用による有機物高度堆肥化技術及び二次生産物の高度活用技術の開発」

研究開発等成果報告書

平成23年3月

委託者 東北経済産業局
委託先 公益財団法人福島県産業振興センター

第1章 研究開発の概要	
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	・・・ 1
1-2 研究体制	・・・ 2
1-2-1 研究組織及び管理体制	・・・ 2
1-2-2 研究員及び管理員	・・・ 4
1-3 成果概要	・・・ 6
1-4 当該プロジェクト連絡窓口	・・・ 6
第2章 本論	
2-1 堆肥化システムにおける処理条件の検討	・・・ 8
2-1-1 年間を通じた堆肥化最適条件の確立	・・・ 8
2-1-2 堆肥化最適条件における微生物叢分析とEC測定	・・・ 9
2-1-3 肥育牛糞への技術応用	・・・ 9
2-2 高機能性堆肥を利用した実証試験と評価	・・・ 9
2-2-1 高機能性堆肥の評価	・・・ 9
2-2-2 高機能性堆肥を用いたプランター栽培試験	・・・ 9
2-2-3 第三者機関による栽培試験	・・・ 10
2-2-4 高機能性堆肥による塩害土壌の回復試験	・・・ 10
2-2-5 副生産物の利用法開発	・・・ 12
2-3 微生物の解析による堆肥化のメカニズム解明	・・・ 12
2-3-1 含有菌のパラメーター変化による挙動確認	・・・ 12
2-3-2 有用酵素の探索	・・・ 14
(1) 希釈平板法および寒天培地法を使用した有用酵素の探索	
(2) 土壌メタゲノムを利用した有用酵素の探索	
2-4 周辺環境への影響調査	・・・ 15
2-4-1 発生する悪臭と分解される悪臭の挙動確認	・・・ 16
2-4-2 周辺環境への悪臭流出に関する挙動確認	・・・ 16
第3章 総論	・・・ 18

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

近年、我が国では、「家畜排せつ物の管理の適正化及び利用の促進に関する法律(家畜排せつ物法)」や「持続性の高い農業生産方式の導入の促進に関する法律(持続農業法)」、「肥料取締法」の改正などに代表されるように、畜産廃棄物の再資源化と農業の持続性が求められている。また「バイオマス・ニッポン総合戦略」が策定されるなど、バイオマスの総合的な利活用のための様々な取り組みも推進されている。しかし、経済的な問題、気候条件、技術的な問題等が壁となり、未だバイオマスの利活用が十分とはいえない状況にある。

例えば、バイオマスの一つとして畜糞を例にとると、一部でメタン発酵処理(バイオガスプラント)による再エネルギー化が行われているものの、技術面の問題やコストの問題などの解決すべき課題は多く、広く実用化には至っていない。そのため畜糞は、9割以上が堆肥として利活用されているのが実態である。

一方、これら家畜排せつ物資源の大きな排出先である畜産業に注目すると、近年になって低コスト化・高効率化のために集約的・工業的畜産業が主流となり、そのようなシステムが急激に数を増やしてきている。しかし、その飼育技術の急激な高度化に比べ、畜糞処理技術は未熟なままであり、畜糞由来の悪臭や汚水等が地域問題になるケースが増えてきているのが現状である。同様に、従来の堆肥化システムで畜糞を堆肥化する場合においても、水分調整・堆積・攪拌により微生物の活性条件を整える手法では気温のような周辺環境による影響を受けやすく、特に東北地方の冬季のような寒冷な条件下では80℃以上の高温発酵温度が維持できず、堆肥化が非常に困難であることに加え、水分調整に掛かる水分調整材費のコスト問題や開放型の堆肥施設による悪臭などの問題がある。更に家畜排せつ物法により整備を進めた従来型の堆肥化システムは設置開始から約10年が経過しており、設備の老朽化やメンテナンスに伴う費用なども問題として挙がってきている。

そこで、本研究ではこれら従来型堆肥化システムの抱える諸問題を解決し、家畜排せつ物を再資源化した上で高度利用すべく、次世代型堆肥化システムの開発と生産した高機能性堆肥の利用法開発を目指す。

まず、堆肥化において、再生油を燃料としたファイヤーサイクロンを利用して大量の熱風を生産し、その熱風を堆肥原料に通気させる。これにより短期間で強制的に好気性発酵条件を整え、迅速な堆肥化を行う。また、従来水分調整材として用いられてきたもみ殻やおがくず、戻し乾燥堆肥等の代わりに、通気材として大き目の木質系通気材を混合し、堆肥化後にふるいをかけて木質系通気材を回収・再利用することにより、従来型堆肥化システムで問題となっていた水分調整費用を大幅に削減した。また、悪臭問題については、半密封型ハウス「O.C.S.ハウス(Organic compost systemハウス)」(以下、O.C.S.ハウス)により周辺環境への放出を防ぎ、更にO.C.S.ハウスから悪臭を回収後簡易加温機「ファイヤーサイクロン」(以下、FC)の超高温燃焼熱により脱臭した。

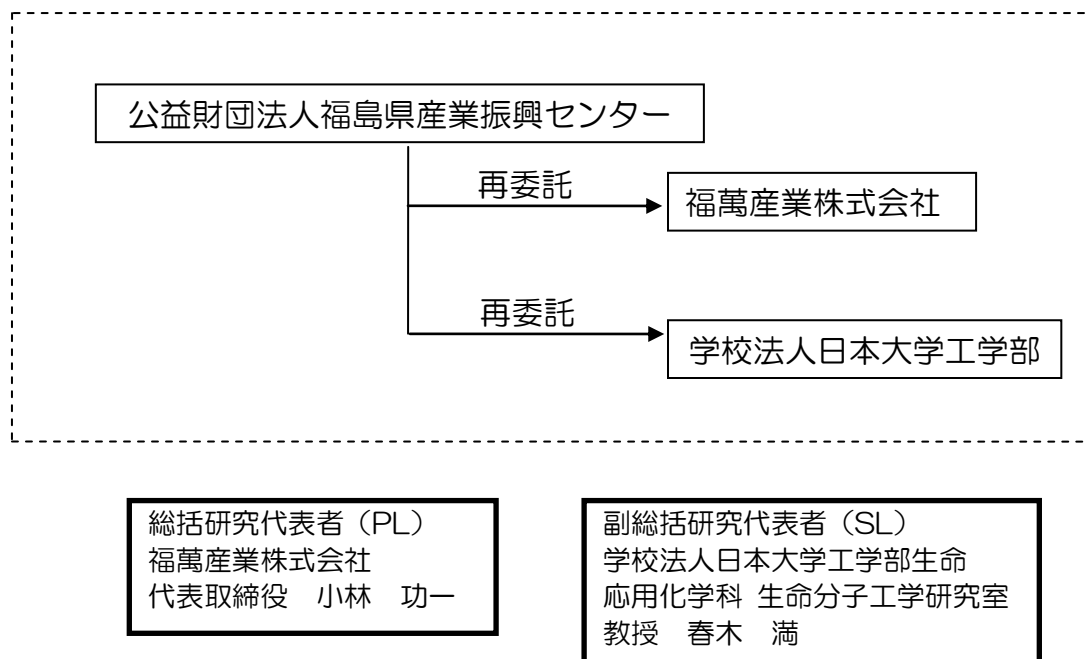
最終的に、生産された堆肥については、協力農家の農地で利用し、生産された作物の官能試験や土壌分析を行うことで、その効果や機能性を解明した。

このように、本研究では、従来型堆肥化システムの諸問題を包括的に解決し、生産される堆肥も高品質となるような、次世代型堆肥化システムの開発を行う。このシステムにより、日本の農業の発展に大きく貢献できることが期待できる。

1-2 研究体制

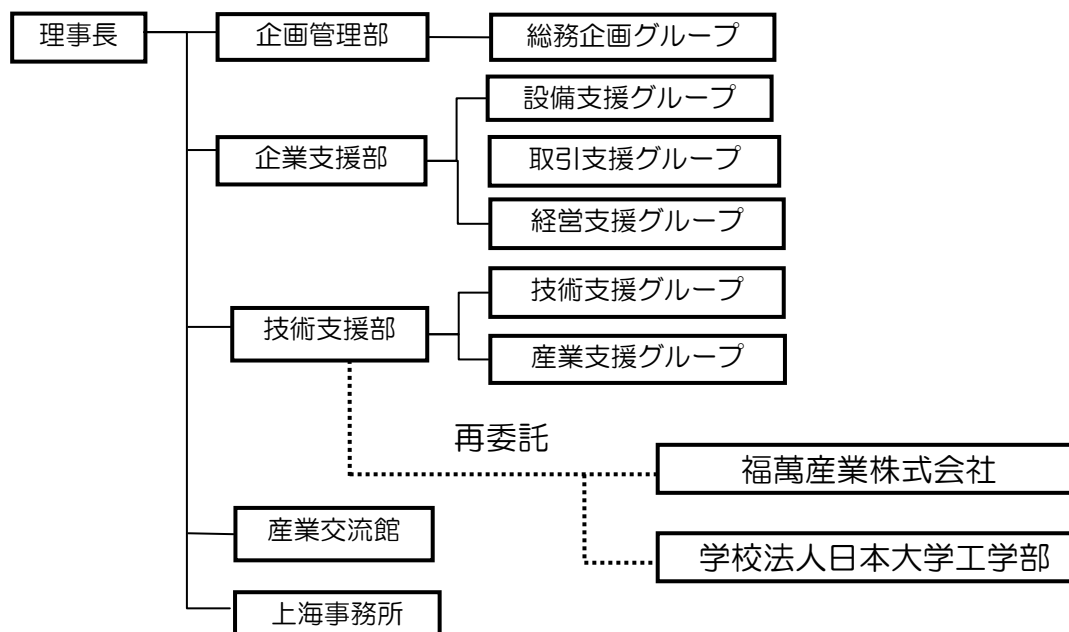
1-2-1 研究組織及び管理体制

1) 研究組織（全体）



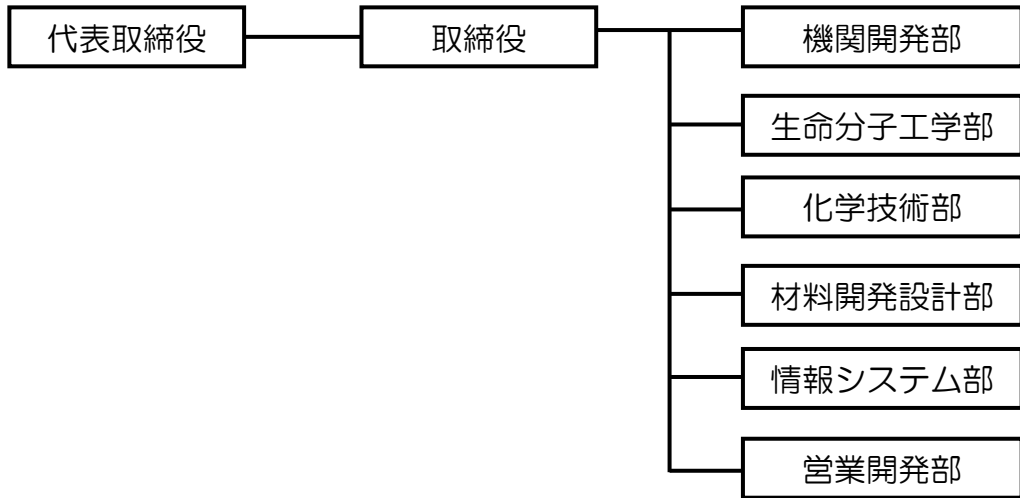
2) 管理体制

① 事業管理者【公益財団法人福島県産業振興センター技術支援部】

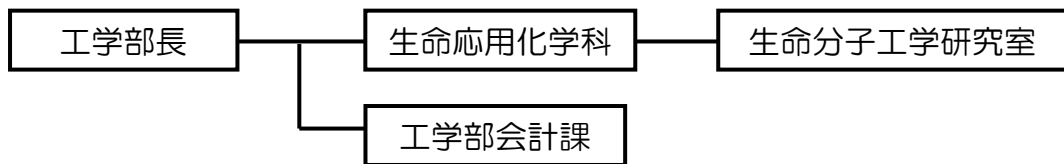


② (再委託先)

福萬産業株式会社



学校法人日本大学工学部



1-2-2 研究員及び管理員（役職・実施内容別担当）

【平成 23 年度事業内容について】

＜実施内容項目＞

- ① 堆肥化システムにおける処理条件の検討
 - ①-1 年間を通じた堆肥化最適条件の確立
 - ①-2 堆肥化最適条件における微生物叢分析とEC測定
 - ①-3 肉牛糞による堆肥化処理の実証試験
- ② 堆肥利用の実証試験
 - ②-1 堆肥を用いた栽培試験
 - ②-2 施肥による土壌改良の効果確認
 - ②-3 副生産物の利用法開発
- ③ 微生物の解析による堆肥化のメカニズム解明
 - ③-1 パラメーター変化による堆肥中の含有微生物の調査
 - ③-2 有用酵素および有用成分の特定
- ④ 悪臭が及ぼす周辺環境への影響調査
 - ④-1 FC システムでのアンモニアの分解挙動の調査
 - ④-2 夏季・春季（秋季）の周辺環境への悪臭物質流出に関する挙動確認
- ⑤ プロジェクト管理、総括
 - ⑤-1 進捗管理
 - ⑤-2 研究推進会議の開催
 - ⑤-3 事業化への検討
 - ⑤-4 報告書作成

【事業管理者】公益財団法人福島県産業振興センター技術支援部

①管理員

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
菅原 康則	技術支援部 部長	⑤-1、⑤-2、⑤-3、⑤-4
本田 和夫	技術支援部 産業支援グループ 課長代理	⑤-1、⑤-2、⑤-3、⑤-4
富田 大輔	技術支援部 産業支援グループ 主任	⑤-1、⑤-2、⑤-3、⑤-4

【再委託先（研究員）】

福萬産業株式会社

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
小林 功一	代表取締役	①-1、②-1、②-2、②-3、④-1、④-2、⑤-1、⑤-4
小林 聖	取締役	①-1、②-1、②-2、②-3、④-1、④-2、⑤-1、⑤-4
小林 隆一	取締役	①-1、③-1、③-2、⑤-4
佐藤 洋介	取締役	①-1、②-1、②-2、②-3、④-1、④-2
井上 大輔	取締役	①-1、②-1、②-2、②-3、④-1、④-2
渡邊 潤	取締役	①-1、②-1、②-2、②-3、④-1、④-2
鈴木 潤	情報システム開発部長	①-1、②-1、②-2、②-3、④-1、④-2

学校法人日本大学工学部

氏名	役職・所属	実施内容（番号）
春木 満	生命応用化学科生命分子工学研究室 教授	①-1、③-1、③-2

【事業管理者】

公益財団法人福島県産業振興センター技術支援部

（経理担当者）技術支援部 技術支援グループ 課長代理

鹿野 敦夫

（業務管理者）技術支援部 部長

菅原 康則

【再委託先】

福萬産業株式会社

（経理担当者）山形事業所 取締役

佐藤 洋介

（業務管理者）代表取締役

小林 功一

学校法人日本大学工学部

（経理担当者）工学部会計課 課長

佐藤 裕之

（業務管理者）生命応用化学科 生命分子工学研究室 教授

春木 満

研究推進会議 委員

研究推進会議 委員

氏名	所属・役職	備考
小林 功一	福萬産業株式会社 代表取締役	PL
春木 満	学校法人日本大学工学部生命応用化学科生命分子工学研究室 教授	SL
大越 正弘	福島県ハイテクプラザ 企画連携部 部長	アドバイザー
湯本 勲	独立行政法人産業技術総合研究所北海道センター 生物プロセス研究部門 副研究部門長	アドバイザー
原田 泰弘	独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター 畜産工学研究部 主任研究員	アドバイザー
道宗 直昭	財団法人 畜産環境整備機構 畜産環境技術研究所 研究開発部 部長	アドバイザー
武田 秀幸	財団法人 日本自動車研究所 エネルギー・環境研究部 パワートレイングループ	アドバイザー
林 拓道	独立行政法人産業技術総合研究所北海道センター 東北センターコンパクト化学システム研究センター 主任研究員	アドバイザー

アドバイザー氏名	主な指導・協力事項
大越 正弘	技術的裏づけや事業化へ向けた指導及び助言
湯本 勲	微生物に係る評価や利用法の確立協力
原田 泰弘	堆肥化の技術確立
道宗 直昭	堆肥化技術と生産された堆肥の評価
武田 秀幸	燃焼に関する総合的な技術
林 拓道	分析分野での助言

1-3 成果概要

本研究において、最終年度の各研究項目における成果を以下に示す。

堆肥化システムにおける処理条件の検討

本研究の根本である堆肥化システムの最適化については、各季節での微生物叢の内容が変化する時間（遷移点）を確認することで、画一的な熱風処理条件を確立することができた。この遷移点を経た堆肥は過乾燥状態（含水率 40%以下）にならないければ安定して高い有機物分解率（有機物分解率 50%以上）となることを確認した。初年度決定した冬季間の堆肥化暫定条件であるエアレーション期間 1 週間、堆積発酵（主発酵工程）期間 2 週間という条件を基本とし、春秋、夏の各季節における補正をすることで、通年で高機能性を有する堆肥を生産できる最適条件を確立した。これにより、目標である 20 日程度での堆肥化と高い有機物分解率目標を達成することができた。

高機能性堆肥の評価

各条件で生産される堆肥について含水率と有機物分解率を簡易測定し、その結果を条件設定にフィードバックさせる条件確立へ寄与した。最終的に、生産された高機能性堆肥の有機物分解率が 60%を超える条件も確認できた。EC（電気伝導度：Electrical Conductivity）に関しては目標値であった 2 mS/cm 以下を達成することは出来なかったが、生産した堆肥はすべて施肥可能な堆肥の目安である 4 mS/cm 以下であった。

微生物の解析による堆肥化のメカニズム解明

事前研究で生産した堆肥中の微生物を分析したところ、現在全国的に問題となっているナラ枯れの原因となる「ナラ菌」の活動抑制効果が期待できる結果が得られた。また、ブラックボックスであった次世代型堆肥化システム内の微生物挙動が明らかとなり、高い有機物分解率や迅速な堆肥化が可能であるメカニズムを解明した。

悪臭が及ぼす周辺環境への影響調査

悪臭の分解挙動に関して、熱による脱臭によりアンモニアを除く悪臭成分の低減に成功した。しかし当初想定していた O.C.S.ハウス内の圧力調整に問題が生じ悪臭が O.C.S.ハウス外に漏れてしまったことや、家畜排せつ物の含水率が非常に多かったことに起因し発生した水蒸気が非常に多かったことなどが原因で、アンモニアの脱臭が十分達成できなかった。しかし、臭気指数は 31 まで低下させることができ、目標値である 30 以下をおよそ達成することができた。

以上のように、各研究項目において目標を達成し、またそれらの研究管理についても定期的な検査を行うことで、全体として円滑な研究推進ができた。

1-4 当該プロジェクト連絡窓口

事業・研究総括関連

公益財団法人 福島県産業振興センター

技術支援部 産業支援グループ 本田 和夫

Tel : 024-959-1951 Fax : 024-949-1952

システム・技術関連問い合わせ先

福萬産業株式会社

代表取締役 小林 功一

TEL : 0238-37-5483

微生物関連

日本大学工学部生命応用化学科生命分子工学研究室

教授 春木 満

Tel : 024-956-8794 Fax : 024-956-8862

第2章 本論

2-1 堆肥化システムにおける処理条件の検討

FCを用いた堆肥化(図1)の有用な点の一つに、外気温の影響を受けない熱処理工程を行える点がある。初年度に検証した冬季の暫定条件を元に、熱風処理条件の絞り込みを行い、最適な熱風処理条件を確立することで次世代型堆肥化技術の最適条件確立を行った。具体的には、O.C.S.ハウス内(写真1)において行う熱処理工程の条件として、通気材の混合割合(体積比)、混合した処理物の堆積高さ、熱風処理時間、熱風温度を変化させ、O.C.S.ハウス内で熱処理中の堆肥含水率や堆肥温度、微生物叢の変化を随時確認しながら、最終的に完成する高機能性堆肥の有機物分解率、生じる過乾燥堆肥の割合等を調査し、高機能性堆肥製造の最適条件確立を行った。

更に生産した高機能性堆肥を用いた各種栽培試験による施肥効果確認や、その中で有用微生物や有用酵素を探索し微生物による堆肥化のメカニズム解明のためのデータ収集・分析を行った。以下に本研究で行う堆肥化のフロー図を示す。

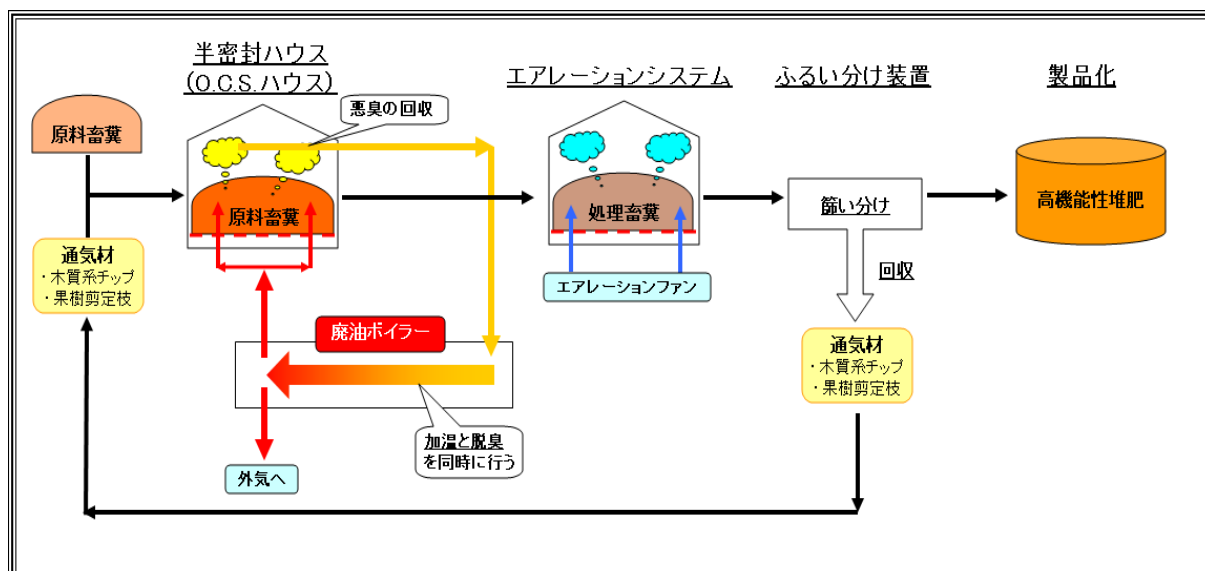


図1 本研究に用いるシステムのフロー図

2-1-1 年間を通じた堆肥化最適条件の確立

初年度に確立した暫定条件に加え、今年度は夏季並びに春秋期における最適条件を確立することにより、年間を通じた堆肥化最適条件を確立した。尚、検討する条件は熱風処理時間、熱風温度、エアレーション期間と一日当たりのエアレーション処理時間とし、設定した各条件下で生産された堆肥について、簡易分析法で有機物分解率と含水率を測定した。この時の含水率の目標値として、熱風処理直後に65%以下、エアレーション処理後に50%以下とする。

最終的には、最適条件下で生産された堆肥について、一般成分とされる「水分・灰分・pH・EC・窒素全量・リン酸全量・カリウム全量・石灰全量・苦土全量・炭素率」と、微量成分・特定項目とされる「銅全量・亜鉛全量・発芽率・酸素消費量・臭気(臭気指数)」の全15項目の分析を公的機関財団法人畜産環境

整備機構に外注し、事業化に向けた施肥設計のための基礎データとした。この時、堆肥化条件と EC 値の関係についても検討し、低 EC 堆肥の作製条件を確立した。目標値は EC が 3.0 以下とする。

また、通気材として家畜排せつ物に混合して使用（再利用）する木質チップについては再使用可能回数を設定し、コスト面での有効性を検討した。

2-1-2 堆肥化最適条件における微生物叢分析と EC 測定

各処理条件や O.C.S.ハウス内で熱風処理している過程等様々な工程ごとに堆肥のサンプリングを行い、微生物叢分析を行った。分析結果は次世代型堆肥化システムのメカニズム解明や、最適条件確立のため熱風処理条件へフィードバックした。

2-1-3 肥育牛糞への技術応用

本研究の最適条件確立する際に使用した家畜排せつ物は搾乳牛の糞であった。しかし、家畜排せつ物は搾乳牛以外にも肥育牛、豚、鶏などからも排出され、それらの含水率、成分、物性などは様々である。

そこで、試験地周辺地域で盛んに取り組まれて全国的にも有名な肥育牛に注目し、肥育牛の糞を対象とした堆肥化技術の応用を検討した。

具体的には、O.C.S.ハウスの小型モデル「簡易 O.C.S システム」を製作し、2-1-1 で確立した最適条件を工業用ドライヤーを用いて再現し、生産された堆肥の含水率や有機物分解率を簡易測定することで、肥育牛糞への技術応用を検討した。

2-2 高機能性堆肥を利用した実証試験と評価

本研究によって生産される高機能性堆肥を用いて様々な試験を行い堆肥の生産販売の事業化へつながるデータとする。

尚、今回行った実証試験地は、東日本大震災による津波被害を受けた水田や、山形県天童市のさくらんぼ農家、山形県白鷹町篤農家である。

2-2-1 高機能性堆肥の評価

生産した高機能性堆肥について、実際に農地に使用し作物の生産を行うことで高機能性堆肥の評価を行った。

これは、一般に堆肥の評価基準は数値化されておらず、農地での利用とそれにより生産される作物の品質で感覚的に評価されているためである。そこで、本試験ではすでに述べた有機物分解率の数値化に加え、実農地での利用・生産物の品質確認を併せることで、従来では行われていなかった数値化による明確な堆肥の評価と、実際の効果を確認した。具体的な品質確認には、高機能性堆肥を用いて生産した作物を食味する官能試験を行い、アンケートによる様々な項目について評価を行った。

2-2-2 高機能性堆肥を用いたプランター栽培試験

高機能性堆肥を用いて、一般に試験栽培で用いられる小松菜を対象とした栽

培試験を行い、一般的な堆肥との比較試験を行った。

まず、対称区として無肥料栽培（試験区①）と、一般堆肥を用いた栽培を二つ用意した。この時、一般堆肥を用いて栽培したポットについては、一般堆肥に記載してある最適な施肥方法を参考に、表面に50g程度散布した試験区②と、高機能性堆肥の最適割合（後述）と同程度の混合割合である土：一般堆肥＝1：1で混合した試験区③を用意した。

一方、高機能性堆肥を用いた試験区については、事前研究で判明した最適割合である土：高機能性堆肥＝1：1（試験区④）と、大量に施肥可能であることを確認するため1：2（試験区⑤）の2種類の割合を用意した。

以上の栽培試験条件について、表3に述べる。

表 1 栽培試験の各条件

	使用資材	混合割合（混合量）
試験区①	無肥料	—
試験区②	一般堆肥	50g程度（表面に散布）
試験区③		土：一般堆肥＝1：1（体積比）
試験区④	高機能性堆肥	土：高機能性堆肥＝1：1（体積比）
試験区⑤		土：高機能性堆肥＝1：2（体積比）

栽培作物：小松菜 設定温度：20℃

2-2-3 第三者機関による栽培試験

2-2-2で行う一般堆肥との比較栽培試験と並行して、第三者機関である(財)日本肥料検定協会に栽培試験を外注し、堆肥の成分を加味した栽培試験を行い、堆肥評価を行った。

2-2-4 高機能性堆肥による塩害土壌の回復試験

平成23年3月に発生した東日本大震災とそれに伴う津波により、東北地方太平洋側は甚大な被害を受け、田畑は海水による塩分や汚泥・ヘドロなどで数年は耕作が困難といわれる状況になっていた。

従来の除塩は代掻きや灌水を繰り返す方法であったが、それでは除塩完了まで2～3年もの時間が必要とされており、迅速な復興のためにはより短期間で高効率な技術が必要である。また、厚く堆積したヘドロ、海砂などの影響、肥沃な表土の流出等、農地回復のためには様々な課題を解決する必要がある。

そこで今回、効果的な解決策の1つとして、高機能性堆肥を用いた塩害農地の早期回復試験を行う。これにより、排水性の向上や土中における微生物環境の改善を狙い、塩害対策と併せてヘドロ対策や土壌改良、地力回復による農地回復を目指す。これによる具体的な効果として

- 1) 田植えまでの約3週間という短期間で除塩、土壌改良、地力回復が可能
- 2) 確実な効果が望める（事前研究などの成果がある）
- 3) 重金属、悪性有機物(未分解有機物など)、病原性菌等にも対応
- 4) 植物（稲）の生育を阻害せず健康な成長が望めること
- 5) 来年以降も継続して農業が行えること

等が期待できる。

以上のような効果で、津波被害を受けた農地の塩害・ヘドロ・重金属・病気予防など総合的に対策できる回復試験を行った。尚、高機能性堆肥の施肥量などの条件は次項で述べる。

試験内容

① 面積 12a

12 高機能性堆肥 24m³ 施肥 (10a 当たり 20m³) +ゼオライト (粒径 1~4mm) 240k g

② 面積 8a

高機能性堆肥 8m³ 施肥 (10a 当たり 10m³) +ゼオライト (粒径 1~4mm) 100k g



写真3 水田に堆積したヘドロの様子。

試験開始当初、流入していたヘドロ自体の EC は 7.83mS/cm、それを混ぜ込んだ水田土壌の EC は 1.88mS/cm であった (表 4)。塩害の目安 EC は様々な指導があるが一般に 1mS/cm とされており、このままでは作付が困難であった。

表 2 流入した汚泥とそれを混ぜ込んだ水田土壌中の分析

	pH	EC[mS/cm]
汚泥※1	4.8	7.83
水田土壌※2	4.7	1.88
一般的な水田の例 (付近の津波被害を受けてない水田)	5.5	0.12
最適値	5.0~6.5	1 ≧

※ 1 堆積した汚泥のみを測定

※ 2 汚泥を土壌に混ぜ込み測定

2-2-5 副生産物の利用法開発

本研究において、O.C.S.ハウスから悪臭を回収する段階で 1%程度のアンモニア水が副産物として回収される。この回収したアンモニア水を微生物資材による処理をすることで、農業用資材としての有効利用を検討した。

そこで、微生物によるアンモニア分解試験を以下のような手順で行った。

- 1) 28%アンモニア水を蒸留水で希釈し、1%のアンモニア水を作成する。
- 2) 1%アンモニア水 100mL に微生物資材 FC-51 を 1mL、ショ糖 1g、BTB 溶液 1mL を加え攪拌する。
- 3) 27°Cに設定した恒温槽中で 24 時間静置する。
- 4) パック式簡易測定法により、水溶液中のアンモニア濃度を測定する。
- 5) アンモニア濃度がどの程度減少しているか確認し、安全な液肥としての利用可能性を検討する。

2-3 微生物の解析による堆肥化のメカニズム解明

FC を用いた O.C.S.ハウスによる堆肥化は、その発酵前段階として熱風による加熱（原料の水分によるスチーム、蒸すという概念を含む）を行うという、従来の堆肥化では考えられなかった非常にユニークな技術である。このプレ発酵処理工程の存在により、生物学的観点から従来の堆肥とは異なる微生物群集構造を有している可能性があるとして興味もたれる。

本試験は有機物高度堆肥化技術の開発が目的のひとつであり、堆肥を用いる現代の農業においてはこれまでに重要視されてきた物理的な要素に加え、有機物やその他の物質の分解に大きく貢献している微生物についての知見を蓄積することも重要な要素であると考えられる。

本項では、この堆肥化において重要な役割を果たすと考えられる、微生物の群集構造の移り変わりや、分解に大きく寄与していると考えられる分解酵素を持つ微生物の解析について報告する。

2-3-1 含有菌のパラメーター変化による挙動確認

パラメーター変化による微生物群集構造の挙動確認のため、まずは堆肥中に存在する微生物群の構造の解析を行った。微生物群集構造の解析には、前項で説明した 16SrRNA 系統解析法、および変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis : DGGE) を用いた。本項における微生物群集構造解析では、前項で述べた『培養可能』微生物に加え、微生物全体の 99%を占めるとも言われる『難培養』及び『培養不可』微生物もその探索対象とすることが可能であるため、より詳細かつ正確な群集構造の解析が可能となると考えられる。

本項の実験では、この 16SrRNA 系統解析法と DGGE を組み合わせた『PCR - DGGE 法』による微生物群集構造解析を行った。なお DGGE の解析能を考慮し、16SrRNA は V3 可変領域と呼ばれる部位のみを増幅している。

今回の微生物解析には堆肥化の最適条件検討のため用いられた冬季製造堆肥を使用した。各試料の該当工程は次表のようになっている。

上記試料からのメタゲノムの抽出には ISOIL for Beads Beating(ニッポンジーン)を用いた。抽出したメタゲノムを鋳型として PCR を行った。

反応溶液組成	サイクル	
1 × Ex Taq Buffer	95°C 10分	
0.4 μM GC Clamp-357F	↓	} ×20cycle
0.4 μM 519R	95°C 30秒	
0.2mM dNTP	65°C* 30秒	
0.01 μg テンプレート DNA	72°C 1分	
2.5U Ex Taq HS Polymerase	↓	} ×10cycle
全量 100 μℓ	95°C 30秒	
	55°C 30秒	
	72°C 1分	
	↓	
	72°C 5分	

※1 サイクルごとに-0.5°C

使用プライマー

GC-Clamp 357F : 5' -CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGC
GGGGGCACGGGGGGCTCCTACGGGAG
 CAGCAG-3'

519R : 5' -GWATTACCGCGGCKGCTG-3'

※下線部は GC-Clamp 部を示す

DGGE に供するため、プライマー除去を行い精製した。その後、DGGE を行うため、変性剤濃度勾配ゲルを作成した。変性剤濃度勾配ゲルは、以下のよ
 うな組成のゲル組成溶液をグラジエントすることで作成した。

	30%溶液	60%溶液
40%アクリルアミド	8%	
100%変性剤※	30%	60%
50×TAE	×1	
10% APS	0.06%	
Dye Solution	なし	有
TEMED	0.06%	

※100%変性剤溶液
 40%ホルムアミド濃度
 7M尿素

精製した DNA をロードし、100V/3 時間/60°Cの条件で電気泳動を行い、終了後にゲルをエチジウムブロマイド溶液で染色した。その後ゲルを撮影し、見られたバンドについては切り出し、シーケンスによる塩基配列の解析を行い、ホモロジー検索により微生物の特定を行った。

2-3-2 有用酵素の探索

(1) 希釈平板法および寒天培地法を使用した有用酵素の探索

当試験で製造された堆肥には、有機物分解に大きく寄与している微生物、ひいては酵素が多数含まれている可能性が考えられる。そこでこれらの酵素のうち前年度に引き続き、特に工業利用に有用であると考えられる酵素類について、その探索を行った。本試験では堆肥を水で希釈し、寒天培地にまくことで堆肥に含まれる微生物を培養・検出する『希釈平板法』を用いて探索を行った。

1) 堆肥試料(完成試料)を 1g 粗秤する

2) 10mL の超純滅菌水を加える

3) 転倒混合を行う

上記操作を行った溶液を『等倍試料溶液』とする。

4) 等倍試料溶液をもとに 10 倍～1,000 倍希釈溶液を作成

5) 寒天培地^{*1}へ 200 μ l 散布

6) 滅菌ガラスビーズにより均一に塗布

7) 37°C で一晩培養

8) ハロー形成が見られたコロニーを採取し、LB 培地で 37°C/overnight 振とう培養

9) 細菌ゲノムの抽出方法²⁾に従い、ゲノム DNA を抽出

10) 以下に示すプライマー³⁾を用いて PCR により 16S rRNA の増幅及びシーケンサーによる塩基配列の解析を行った

27F 5' -AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

1492R 5' -TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

反応溶液組成

1 ×	Ex Taq Buffer
0.4 μ M	27F
0.4 μ M	1492R
0.2mM	dNTP
0.01 μ g	テンプレート DNA
2.5U	Ex Taq Polymerase
<hr/>	
全量	100 μ l

サイクル

95°C 5分

↓

94°C 30秒

55°C 30秒

72°C 1分

} ×25cycle

11) Ez Taxon⁴⁾データベースを利用した BLAST 検索を行い、相同性の高い菌種を検索

(2) 土壌メタゲノムを利用した有用酵素の探索

上記探索法では、分解酵素を持つ微生物が『培養可能』である場合しかその存在を確認できない。一方、自然界に存在する微生物はその大半が培養不可能な微生物であると考えられ、上記のような培地を用いた実験のみではそれら『培養不可微生物』もしくは『難培養微生物』の持つ有用酵素を探索できない。

そこで、そのような微生物の持つ DNA を堆肥から直接抽出し、大腸菌へ組みこみ、分解活性を持つ酵素を発現するか観察することで、これらの微生物の持つ有用酵素の探索を行った。

- 1) ISOIL (ニッポンジーン) を用いて、土壌よりメタゲノムを抽出
- 2) Copycontrol Fosmid Library Production Kit (Epicentre) を用いて、Fosmid ライブラリを構築
- 3) 上記試験と同様、基質を含む寒天培地上で培養
- 4) 形成されたコロニーより、ハロー^{※2} 形成を行っているものを調べる

※1 セルラーゼ検出培地

以下に示す組成の培地を使用した。

Avicel 活性検出培地

蒸留水	100mL
0.5% AVICEL	0.5g
0.5% polypepton	0.5g
0.1% KH ₂ PO ₄	0.1g
0.05% MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05g
0.05% Yeast extract	0.05g
1.5% Agar	1.5g

単一炭素源 Avicel 活性検出培地

蒸留水	100mL
0.5% AVICEL	0.5g
0.1% KH ₂ PO ₄	0.1g
0.05% MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05g
0.05% Yeast extract	0.05g
1.5% Agar	1.5g

CMCase 検出培地

蒸留水	98mL
azo-CMC	0.5g
0.5% polypepton	0.5g
0.05% MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05g
0.05% Yeast extract	0.05g
1.5% Agar	1.5g

2-4 周辺環境への影響調査

従来の堆肥化技術の大きな問題として悪臭や汚水などによる周辺環境への影響が挙げられる。これは、開放型堆肥舎のような構造的な問題や十分な脱臭が行われ

ていないシステムが原因として挙げられ、悪臭を周辺環境・地域へ拡散している手法が用いられている為である。また、冬季は不十分な発酵のため悪臭が発生しやすく、逆に夏季は高温多湿な気候のため悪臭が周辺に拡散しやすいという、十分な堆肥化が行われないことで、通年で悪臭が発生し周辺へ悪影響を及ぼすサイクルとなってしまう。

よって、これらの問題点を解決する高度堆肥化技術や脱臭システムが求められている。

2-4-1 発生する悪臭と分解される悪臭の挙動確認

本研究において、発生する悪臭は O.C.S.ハウス内に留まり、回収され FC により熱処理脱臭される。

そこで、O.C.S.ハウス内の悪臭成分と FC により熱処理脱臭された空気中の悪臭成分を外注分析することで、悪臭の挙動を明らかにした。

2-4-2 周辺環境への悪臭流出に関する挙動確認

2-4-1 により脱臭され排気された空気や、エアレーション、堆積発酵時に発生する悪臭について検知管式気体測定器を用いて測定し、その挙動を確認した。これにより、周辺環境への影響を把握し、従来の堆肥化システムで問題となっていた悪臭について、本研究の優位性を確認した。

第3章 総論

従来の堆肥化は水分調整の後に堆積・攪拌を行うことで太陽熱や微生物による発酵熱を用いて有機物の分解を促し堆肥化の促進を行ってきた。しかしこの手法は水分調整に掛かる費用が膨大であることや気温低下などの周辺環境の影響を受けやすく非常に不安定な技術であったと言える。それに対し、本研究では外気温に影響を受けない画一的な熱処理を行うことができるようになったことで、通年で周辺環境に影響されず迅速に好気性発酵を促すことが可能となった。また、水分調整材を必要としないシステムであるため篩い分けによる回収を行うことで、水分調整に掛かる費用が大幅に削減できた。

また、堆肥が製造される過程において、微生物がどのように関わっているか、どの様に遷移していくかを調査したことで FC を用いた堆肥化におけるメカニズムが解明できた。

本研究の具体的な成果として、熱処理条件の確立や二次生産物中に含まれる微生物の植物病原菌に対する生育阻害効果、生産される堆肥による塩害地の復旧効果、臭気などの環境負荷が低いシステムとしての証明などが挙げられる。

本事業の成果を以下に示す。

成果概要

① 堆肥化システムにおける処理条件の検討

前年度の成果を受けて、熱処理工程の条件を様々な試験を行うことで遷移点という FC を用いた堆肥化における最も重要な要因を理解することが出来、それらを通年得られる熱処理条件を見出すことが出来た。

①-1 年間を通じた堆肥化最適条件の確立

①によって得られた条件を元に各季節毎に複数回熱処理の工程を行い、熱処理後のエアレーション工程の補正を行うことで、通年で高機能性堆肥を生産することが可能になった。

①-2 堆肥化最適条件における微生物叢分析とEC測定

FCを用いた堆肥化の過程において、微生物叢の遷移を調査することで、有機物分解の根幹である微生物種の特定が成された。最適条件から生産される堆肥は、EC数値の目標である数値3.0m/sを標準的にクリアすることがわかった。

①-3 肉牛糞による堆肥化処理の実証試験

簡易的な装置を用いて実証試験を行ったところ、十分に肥育牛糞にも本システムが適用できることが明らかとなった。特に、通気材の量が搾乳牛糞の半分で十分な堆肥化が可能であることがわかり、経済的な堆肥化が期待できる。

② 堆肥利用の実証試験

本試験において生産された高機能性堆肥を用いて、様々な試験を行い、高機能性堆肥が持つ可能性を確認し、事業化へのアドバンテージとした。

②-1 堆肥を用いた栽培試験

小松菜のプランター栽培において市販の完熟堆肥との差を栽培試験によって明らかにした。協力農家による試験栽培品も官能試験による成果として好評価を得た。

②-2 施肥による土壌改良の効果確認

東日本大震災の影響で津波被害を受けた石巻の農地の回復試験を行い、例年以上の収穫量を得ることが出来塩害土壌の回復は大成功を収めた。塩害対策のノウハウとして確立できた。

②-3 副生産物の利用法開発

窒素分液肥としての利用法について、一定の可能性を見出した。また、今後コスト面を精査していくことで、より安価な利用法（圃場への散布）などが期待できる。

③ 微生物の解析による堆肥化のメカニズム解明

③-1 熱風処理条件の違いによる堆肥中の含有微生物の調査

完成した高機能性対比の微生物群集構造解析により、各製造段階における特定の層の微生物を同定した。現状ではまだ未解析の部分もあるが、これらの微生物を指標とすることで堆肥化の完成度の把握およびメカニズムの解明が期待できる。

③-2 有用酵素および有用成分の特定

初年度に、現在大きな問題となっているナラ枯れ病の原因である「*Raffaelea quercivora*(ラファエリア クエルシボウ)」の生育を阻害する効果を持つ菌が取得できた。これにより、高機能堆肥とそれに付随する生産物について、植物病原菌を対象とした新たな利用法が期待できる。

④ 悪臭が及ぼす周辺環境への影響調査（福萬産業株式会社）

従来の堆肥化システムで問題とされている悪臭の拡散とそれに伴う周辺環境への影響について、本システムにより悪臭の低濃度化が可能であった。また、密封ハウスによる迅速な堆肥化技術により、堆肥化工程中での悪臭発生と周辺環境への拡散を抑制することが出来た。

④-1 FCシステムでのアンモニアの分解挙動の調査

FCを用いることで、臭気指数を低減することが出来た。ただ、含水率が高い堆肥化原料を取扱う場合、アンモニアに対して十分な脱臭機構を構築するなど、今後改良する余地がある。

④-2 夏季・春季（秋季）の周辺環境への悪臭物質流出に関する挙動確認

堆肥化最適条件を確立することが出来たこともあり、エアレーションや堆積発酵の堆肥化工程における悪臭発生量が殆ど無いことがわかった。従って、本システムは周辺環境への悪臭拡散も抑制できるため、環境へやさしいシステムと言える。

最後に・・・本研究は、研究期間内に千年に一度とも言われる大きな自然災害が起り、それに負けることなくたくさんの成果を生み出すことが出来ました。それらの成果の中には今まさにタイムリーな農地復旧の技術を伴うノウハウも含まれております。それらの成果が国を挙げて取り組むべき課題に活かされるということになれば正に誉れであります。たくさんのアドバイザーの方々に導いていただき、社会貢献につながる知見を得ることが出来たことに、深甚の謝意を表し結びの言葉とさせていただきます。