

微生物を添加した家畜排泄物の堆肥化処理における
アンモニア発生低減に関する研究

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2018-06-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 黒田, 和孝 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10297/00025230

学位論文要約

Summary of Doctoral Thesis

専攻：自然科学教育部 環境・エネルギーシステム 氏名：黒田 和孝

論文題目：微生物を添加した家畜排泄物の堆肥化処理におけるアンモニア発生低減に関する研究

論文要約：

第1章 序論

堆肥化処理は、有機物を好气的条件に保持して微生物による分解を促し、作物肥料として利用できる堆肥を製造する処理であり、我が国では家畜排泄物の処理およびリサイクル利用のための方法として最も一般的に行われている処理である。

一般的な処理では、家畜排泄物にオガクズや麦稈等の水分調整材を混合し、堆積物内部に空気が通う条件（含水率 60～75%、かさ比重を 0.5～0.7 程度）に調整して堆積する。このような調整により、数日以内に微生物による活発な有機物分解が起こり、分解に伴う発熱で堆積物の温度が 60～80 °C に上昇し、排泄物中の病原微生物、作物病害菌、寄生虫卵等の死滅、作物生育阻害物質の分解、水分の蒸発による堆積物の乾燥が進む。処理期間中に堆積物は次第に自重で圧密化し、通気性が低下するため、時々堆積を切り崩し、均一に混合した後に再度堆積する作業（切返し）を行って通気性を回復し、好气的条件を保持する。ポンプを用いて堆積物下部から強制通気を行う場合もある。易分解性の有機物の分解が収束すると、堆積物の温度は徐々に低下する（1次発酵、1～2 か月）。この後、常温域で比較的難分解性の有機物の緩慢な分解が進む時期（2次発酵、2～3 か月）を経て、最終的には軽い土壌臭を残す乾燥した堆肥が製造される。このように家畜排泄物の堆肥化は、乾燥による減量化とハンドリングの改善、衛生面の向上、作物肥料としての品質の安定化等、利用に向けた条件調整として有効である。しかしながら、処理前半の1次発酵で堆積物が高温となる時期に、有機物の活発な分解に由来する極めて高濃度の臭気が発生し、畜産に起因する悪臭問題の主な発生源のひとつとなることから、この臭気が発生が堆肥化処理を行う上での大きな問題となっている。

家畜排泄物は元々強い臭気を有しており、その臭気は様々な悪臭物質が混合した複合臭であるが、発生する臭気の質や濃度は、排泄物の状態や時間の経過によって大きく変化する。新鮮排泄物の臭気はプロピオン酸やノルマル酪酸等の低級脂肪酸類を主体としているが、堆肥化処理した場合は、低級脂肪酸類は処理の初期に急激に低下し、それと前後して硫黄化合物類およびアンモニア（ NH_3 ）が高濃度で発生してくる。中でも NH_3 は極めて高濃度（～数千 ppm）で発生し、発生期間も長期にわたることから、堆肥化処理に由来する

臭気の主体となる。

我が国では悪臭防止法（1972～）により環境中の悪臭の規制が行われており、 NH_3 は悪臭防止法において規制の対象となる 22 種類の代表的な悪臭物質（特定悪臭物質）に含まれている。畜産は NH_3 の主要な発生源であり、特に家畜排泄物の堆肥化处理からの高濃度発生は、前記のように畜産経営や堆肥化施設の周辺で悪臭苦情の原因となるに止まらず、酸性雨や土壌酸性化、地下水や表層水の汚染、地球温暖化等、より広域の環境問題の原因ともなる。加えて、 NH_3 の形での窒素の損失は、堆肥の作物肥料としての価値の低下にも繋がる。これらのことから、堆肥化处理からの NH_3 の発生低減は、悪臭対策、環境への負荷の軽減化、堆肥の肥料価値の低下防止等、様々な面で重要な課題であり、有効な低減化技術が求められている。

現在堆肥化由来の臭気に用いられている代表的な対策としては、発生した悪臭空気を回収、処理して悪臭物質を除去し、無臭の空気を放出する脱臭処理と、堆肥化素材に添加することで処理過程での臭気発生を低減する臭気対策資材が挙げられる。脱臭処理は技術としての完成度が高く、悪臭対策効果は大きいですが、その一方で、装置或いは施設の形をとることから設置スペースを必要とすること、建設および運転のコストが高いことから、利用が限定される難点がある。一方、臭気の発生を低減する添加型資材は、微生物、化学物質、鉱物質等を素材とした様々な種類のものが市販されており、使用方法が簡易であることや脱臭処理に比べて低コストであることから農家の関心が高く、広く利用されているが、実際の効果については曖昧なものが多く、技術としての完成度は高いとはいえない。

本研究では、家畜排泄物の堆肥化处理において、微生物の添加により NH_3 発生を低減する方法の確立を目的として、有効な微生物のスクリーニングと同定および性状の調査、微生物添加による豚糞の堆肥化による効果の確認、微生物の製剤化とその有効利用条件の検討、実際の堆肥化处理に近い規模での堆肥化試験による微生物製剤の添加効果の検証を実施した。

第 2 章 アンモニア低減細菌の選抜および堆肥化处理での添加による効果の確認

微生物の添加による豚糞の堆肥化处理からの NH_3 発生低減を目的として、堆肥化处理の過程で増殖し、アンモニウム態窒素 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) 資化能の高い微生物の分離選抜を行なった。選抜した微生物については同定のための諸形質の調査、16S リボゾーム RNA 遺伝子の塩基配列解析、近縁菌とのゲノム DNA の相同性分析を行なった。この微生物を用いた堆肥化での NH_3 発生低減の可能性を探るため、実験室規模の堆肥化試験で微生物の培養液を豚糞に添加して堆肥化し、 NH_3 発生への影響を評価した。

（1）微生物の分離、選抜

微生物の選抜の基準として、①家畜排泄物を基質として増殖することができる、②高温条件下（60 °C 以上）で増殖することができる、③高濃度のアンモニウム態窒素 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) 存在下で生育することができる、④高い $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 資化能を有する、以上の 4 点を設定し、この基準に沿って微生物の分離・選抜を実施した。

農研機構畜産草地研究所（つくば市、以下畜草研）で牛糞と豚糞の混合物より調製された

堆肥を採取し、この堆肥の懸濁液を、S F 寒天培地(豚糞浸出液に塩化アンモニウム(NH₄Cl)を 500 mM 濃度に添加した寒天培地)に接種し、60 °C で 2 日間培養後、生じたコロニーを釣菌、純化した。分離した菌株は 7 mL の S F 液体培地(豚糞浸出液に NH₄Cl を 40 mM 濃度に添加した液体培地)に接種し、50 °C で 18 時間振盪培養した。培養前後で培地を遠心分離した上澄の NH₄⁺-N の変化を調べた。この方法により、分離した 124 菌株から、高い NH₄⁺-N 低減を示した 1 株 (TAT105) を選抜した。

TAT105 については、各種の基本的形質を調べると共に、16S リボゾーム RNA 遺伝子(16S rDNA) の塩基配列解析を行った。TAT105 はグラム陽性の桿菌であり、芽胞形成能を有することから、*Bacillus* 属細菌の類縁菌と考えられた。また、増殖可能温度および NH₄⁺-N 濃度の上限は、それぞれ 65 °C、1,200 mM であり、高温高アンモニウム環境に適応する特徴を示した。TAT105 は既存の菌種のうち、*Bacillus thermolactis* および *Bacillus kokeshiiformis* と 16S rDNA の配列が 99%以上の相同性を示したことから、これらの菌種の標準菌株 (*B. thermolactis* DSM23332^T, *B. kokeshiiformis* JCM19325^T) それぞれとの間で DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行い、厳密な同定を試みた。DNA-DNA ハイブリダイゼーションにおいて、TAT105-*B. thermolactis* 間では 70%以上の相同性が確認され、一方 TAT105-*Bacillus kokeshiiformis* 間では相同性が 70%未満であったことから、TAT105 は *B. thermolactis* に属する異株のひとつと考えられた。一方、*B. thermolactis* の標準菌株について報告されている諸形質と比較して、運動性、糖分解性等には若干の相違がみられた。

(2) 堆肥化試験

家畜排泄物の堆肥化処理での TAT105 の添加による堆肥化期間中の NH₃ 発生低減の可能性を探るため、実験室規模の小型堆肥化試験装置(有効容積 12 L、下部からの連続通気式)を用いて豚糞の堆肥化試験を行い、TAT105 添加の NH₃ 発生への影響を調べた。TAT105 は YA 液体培地(酵母エキス、無機塩類に NH₄Cl を 100 mM 濃度に添加した培地)に接種し、50 °C で 20 時間振とう培養したものを添加した。豚糞は畜草研内の豚舎で採取したものをを用いた。堆肥化期間は 18 日間とし、期間中ガス検知管を用いて装置からの排気中の NH₃ 濃度を経時的に測定した。また、堆肥化混合物中に熱電対を装着した棒を挿入し、期間中の混合物の品温の推移を調べた。開始後 7 日目および 13 日目に装置に充填した堆肥化混合物を一旦取り出し、均一に混合した後改めて装置に充填する操作(切返し)を行ない、その際に混合物の一部を採取し、分析に供した。採取した混合物試料は各形態の窒素を分析し、全窒素含量を求めた。再現性の確認のため、試験は同じ設定条件で 3 回反復実施した。以下、次章以降も含めて堆肥化試験期間の管理、各種測定、分析は同様に実施した。また、文中に示した測定値は反復実施した試験の平均値である。

混合物の品温は試験開始後 3 日目前後に 65~70 °C まで上昇し、一旦低下した後、7 日目の 1 回目の切返し後に再び 70 °C 前後まで上昇した。13 日目の 2 回目の切返し以降は温度の再上昇が 50 °C 以下に留まった。堆肥化装置からの排気中の NH₃ 濃度は混合物の品温上昇に伴って上昇し、開始後 3~4 日目および 1 回目の切返しから 2 日目前後にピークに達した。堆肥化期間中、TAT105 添加区では、排気中の NH₃ 発生濃度が無添加対照区に比べて

低い値で推移し、ピーク値は対照区が 1190 ppm、TAT 添加区が 620 ppm であった。堆肥化開始時の混合物中の全窒素は無添加対照区が 36.99 g、TAT105 添加区が 36.88 g で、両者の間に統計的な有意差は無かったが、終了時までの途中採取分に含まれる窒素を除く窒素損失は無添加対照区で 5.13 g、TAT105 添加区で 3.12 g であり、統計的な有意差 ($P < 0.05$) が確認された。これらの値は開始時全窒素のそれぞれ 14.0% および 8.5% であり、対照区の損失を 100% とすると、TAT105 添加区の損失は 60.4% であり、損失の低減は 39.6% と見積もられた。また、終了時の堆肥中の窒素残存分は無添加対照区で 28.27 g、TAT105 添加区で 30.33 g であり、これらの間にも統計的な有意差 ($P < 0.01$) が確認された。一方、採取した堆肥化混合物の懸濁液を YA0.5 寒天培地 (上記 YA 液体培地の NH_4Cl 濃度を 500 mM とし、寒天 3% を添加した培地) に接種し、55 °C で 2 日間培養して生じたコロニーの計数により、堆肥化混合物中の高温性アンモニウム耐性細菌 (TAT) の菌濃度の変化を調べた。試験開始時の混合物中の TAT 濃度は対照区で 8.0×10^4 CFU/gDM、TAT105 添加区で 2.3×10^7 CFU/gDM であったが、両区とも堆肥化初期に顕著に上昇し、7 日目の 1 回目の切返しまでに対照区で 7.0×10^8 CFU/gDM、TAT105 添加区で 1.2×10^{10} CFU/gDM となり、TAT105 添加区では対照区の約 16 倍に達した。この濃度差は堆肥化期間を通して観察され、終了時には対照区で 1.2×10^9 CFU/gDM、TAT105 添加区で 7.7×10^9 CFU/gDM となった。堆肥化混合物中の TAT 濃度の対数値については、7 日目の 1 回目の切返し、13 日目の 2 回目の切返し、および終了時で、両区間に有意差 ($P < 0.01, 0.05$) が確認された。以上の結果から、TAT105 添加区では、堆肥化の過程で生成した $\text{NH}_4^+\text{-N}$ を TAT105 が資化しながら増殖した結果、 NH_3 発生が低減し、これによって窒素損失が抑えられたものと考えられた。

第 3 章 アンモニア低減微生物の製剤化および有効利用条件の検討

TAT105 の添加による堆肥化処理からの NH_3 発生低減の実用化に向けて、TAT105 を含む製剤を調製し、長期的な保存での安定性を調べるとともに、実験室規模の豚糞の堆肥化試験で NH_3 発生低減のための利用条件を検討した。また、堆肥化混合物中の TAT105 の検出法として使用した高アンモニウム寒天培地の選択性を調査した。

(1) TAT105 製剤の調製と保存性の調査

フスマ、炭化パルプスラッジ、酵母エキスに無機塩類と可溶性デンプンを添加した液体培地を混合した固体培地を調製し、これに TAT105 を接種して 55 °C で 4 日間培養した後、風乾したものを製剤とした。調製した製剤は調製時点から常温でプラスチック容器に 1 年間保存し、保存期間中の製剤中の TAT 菌濃度を YA1 寒天培地 (前記の YA0.5 寒天培地の NH_4Cl 濃度を 1 M とした寒天培地) への接種、60 °C で 2 日間の培養で生じたコロニーを計数することで確認した。この製剤は調製時点での平均菌濃度が 5.3×10^9 CFU/gDM であったが、室温で 1 年間保存した後でも菌濃度は 4.1×10^9 CFU/gDM を示し、調製時の 77% の濃度を維持していた。また、保存期間中、製剤中の菌の 72~91% が芽胞の状態が存在することが確認された。この結果から、TAT105 は菌を高濃度に保持した乾燥状態の製剤として常温で長期保存が可能であり、製剤化に適した菌株と考えられた。

(2) TAT105 製剤の有効添加量の検討 (堆肥化試験 1)

調製した TAT105 製剤について、前章に記した小型堆肥化試験装置を用いた実験室規模の豚糞の堆肥化試験で、NH₃ 発生低減のための有効添加量を検討した。試験区として製剤無添加の対照区、及び製剤の添加量を段階的に変えた 3 つの区 (開始時の混合物中の TAT105 濃度が $\approx 10^5$ CFU/gDM (添加区 1-1)、 $\approx 10^6$ CFU/gDM (添加区 1-2)、 $\approx 10^7$ CFU/gDM (添加区 1-2) となるように製剤を添加) を設定し、7 日間の堆肥化を行なった。なお、製剤は使用前日に等量の水を混合したものを使用した。堆肥化混合物中の TAT 濃度の確認には、上記の YA1 寒天培地を用いた (以下、下記の本章の堆肥化試験 2、3、および次章の堆肥化試験の TAT 濃度確認も同様)。試験は同じ設定で 3 回反復実施した。試験期間中、添加区 1-3 では、他の試験区に比べて NH₃ 発生濃度が低めとなった。また、期間中の窒素損失の平均は対照区で 6.9 g、添加区 1-1 で 6.4 g、添加区 1-2 で 6.1 g、添加区 1-3 で 5.7 g であり、添加区 1-3 では他の試験区との間に有意差 ($P < 0.05$) が確認された。また、堆肥化開始時の混合物中の TAT 濃度は、対照区、添加区 1-1、添加区 1-2、添加区 1-3 で、それぞれ 1.6×10^4 、 1.0×10^7 、 1.2×10^7 、 1.1×10^7 CFU/gDM であったが、終了時にはそれぞれ 1.2×10^8 、 4.9×10^8 、 1.2×10^9 、 2.3×10^9 CFU/gDM まで上昇し、濃度の対数値について対照区と添加区 1-2、1-3 の間に有意差 ($P < 0.05$) が確認された。この結果から、製剤の有効添加量としては、堆肥化開始時点の混合物中で TAT105 濃度が 10^7 CFU/gDM 以上となる量が目安と考えられた。

(3) TAT105 製剤の前処理の検討 (堆肥化試験 2)

調製した TAT105 製剤中の大部分の菌は芽胞として休眠状態にあることから、使用にあたっての休眠打破のための前処理を、有効添加量の検討と同様の 7 日間の実験室規模堆肥化試験で検討した。試験区としては、製剤無添加の対照区及び製剤の取り扱いを変えた 3 つの製剤添加区 (製剤を試験開始時にそのまま堆肥化素材と混合する区 (添加区 2-1)、試験開始 1 日前に製剤に等量の水を添加混合し、開始時に堆肥化素材と混合する区 (添加区 2-2)、試験開始 1 日前に製剤に等量の水及び豚糞を添加混合し、開始時に堆肥化素材と混合する区 (添加区 2-3)) を設定した。製剤の添加量は試験開始時の堆肥化混合物中で TAT105 の菌数が $\approx 10^7$ CFU/gDM となる量とした。試験期間中、添加区 2-2 及び 2-3 では、他の試験区に比べて NH₃ 発生濃度が低めとなった。また、期間中の窒素損失の平均は対照区で 5.8 g、添加区 2-1 で 5.9 g、添加区 2-2 で 4.8 g、添加区 2-3 で 4.9 g であり、添加区 2-2 及び 2-3 では他の試験区に比べて有意に少なかった ($P < 0.05$)。また、堆肥化開始時の混合物中の TAT 濃度は、対照区、添加区 2-1、添加区 2-2、添加区 2-3 で、それぞれ 1.6×10^4 、 1.0×10^7 、 1.2×10^7 、 1.1×10^7 CFU/gDM であったが、終了時にはそれぞれ 1.3×10^8 、 1.3×10^9 、 3.0×10^9 、 2.3×10^9 CFU/gDM となり、濃度の対数値について対照区と 3 つの添加区の間には有意差 ($P < 0.05$) が確認された。以上の結果から、前処理としては、使用前日に製剤に水を添加混合しておくことが有効と考えられた。

(4) TAT105 製剤の有効利用条件での堆肥化 (堆肥化試験 3)

TAT105 製剤の利用方法についての以上の検討結果を踏まえて、実験室規模の豚糞の堆肥化試験で有効利用条件を適用した場合の NH₃ 発生低減効果を評価した。試験区としては製

剤無添加の対照区と製剤添加区の2区を設定し、製剤添加区では、開始前日に等量の水を添加混合した製剤を、試験開始時の堆肥化混合物中で TAT105 の菌数が $\approx 10^7$ CFU/gDM となる量を添加した。試験期間は 18 日間とし、7 日目と 13 日目に切返しを行なった。TAT105 製剤添加区では、無添加対照区に比べて堆肥化期間中の NH_3 発生濃度が低く推移した。試験開始時の混合物中の全窒素は、対照区が 31.81 g、TAT105 添加区が 31.77 g であり、両者に有意差は無かった。一方、試験終了時の混合物中の全窒素は、対照区が 25.52 g、TAT105 添加区が 26.90 g であり、堆肥化期間中の窒素損失分は、対照区が 6.29 g、TAT105 添加区が 4.87 g であり、堆肥化期間中の窒素の減少は約 23% 少なく、窒素の減少分および堆肥中残存分については両区間に有意差 ($P < 0.05$) が確認された。また、堆肥化混合物中の TAT 濃度は堆肥化期間中に両区で上昇したが、終了時には対照区 3.5×10^8 CFU/gDM に対して TAT105 添加区は 3.4×10^9 CFU/gDM で、対照区の 9.6 倍に達し、菌濃度の対数値について両区間に有意差 ($P < 0.05$) が確認された。

(5) TAT 検出法の選択性の調査

堆肥化試験で使用した TAT 検出法 (YA1 寒天培地への接種後、60 °C で 2 日間の培養によるコロニー形成) について選択性を調べるため、TAT105 の近縁種 10 種の標準菌株 (*Aerobacillus pallidus* ATCC 51176, *Bacillus aestuari* NBRC 103107, *Bacillus alveayuensis* JCM 12523, *Bacillus fumarioli* NBRC 102428, *Bacillus smithii* JCM 9076, *Bacillus thermoamylovorans* DSMZ 13307, *Bacillus stearothermophilus* JCM 2501, *Geobacillus thermodenitrificans* NCIMB 11730, *Geobacillus thermoglucosidasius* NCIMB 11955, *Ureibacillus thermosphaericus* NCIMB 13819) を各菌株保存機関から入手し、*B. thermolactis* DSM23332^T, *B. kokeshiiformis* JCM19325^T (第2章参照) と共に YA1 寒天培地に接種して 60 °C で 2 日間培養し、増殖の有無を調べた。これらのうち、*B. thermolactis* および *B. kokeshiiformis* は培養 24 時間以内に増殖が観察され、培地上のコロニーの色調、形状も TAT105 と同様であった。一方、他の 10 菌株はいずれも 2 日目までの培養で増殖が確認されず、第2章で堆肥化混合物中の TAT の検出に用いた YA0.5 寒天培地をもちいた 55 °C での培養でも増殖は観察されなかった。

TAT105 およびこれらの菌株について DNA を抽出し、PCR で 16S rDNA を増幅した後、2 種類の制限酵素 (HinfI および HaeIII) それぞれで処理し、ゲル電気泳動でプロファイルを確認する制限断片長多形分析 (restriction fragments length polymorphism analysis, PCR-RFLP) を行なった。TAT105、*B. thermolactis*、*B. kokeshiiformis* は、HinfI および HaeIII での処理物について 3 菌株で同じ泳動プロファイルを示したが、他の 10 菌株は HinfI および HaeIII の分解物のいずれも前記の 3 菌株とは異なる泳動プロファイルを示した。また、上記の堆肥化試験 3 で開始時、各切返し時、終了時に採取した堆肥化混合物について、TAT 菌濃度の調査のために YA1 寒天培地に形成させたコロニーの一部をランダムに釣菌し、純化した TAT 菌株から DNA を抽出し、16S rDNA の HinfI および HaeIII の PCR-RFLP を行なった。分析した TAT 菌株の全てで HinfI および HaeIII の泳動プロファイルは TAT105、*B. thermolactis*、*B. kokeshiiformis* と同一であった。以上の結果から、TAT105 およびその最近縁の *B. thermolactis*、*B. kokeshiiformis* に高い選択性を示すこと

が確認された。この検出法を用いた堆肥化試験において、堆肥化過程で TAT105 添加区の TAT 濃度が対照区に比べて顕著に高濃度となることが高い再現性で観察されたことから、本検出法は、TAT105 添加区と無添加対照区を設定した比較試験において、TAT105 の増殖を確認する方法として利用しうるものと考えられた。

第4章 パイロットスケール堆肥化試験でのアンモニア発生低減の検証

実際に行われている堆肥化に近い素材と管理による TAT105 添加による NH₃ 発生低減効果の確認、評価を目的として、パイロットスケールの堆肥化試験装置（発酵槽：縦横 1 m × 高さ 1.8 m, 有効容積 1.8 m³）を用いて実際の堆肥化処理に近い条件での堆肥化試験を実施した。

素材は養豚農家から採取した豚舎の床面堆積物を用い、おがくずを混合して水分調整した混合物を堆肥化試料とした（重量 ≈1 t）。TAT105 製剤の添加量および前処理は、前章の有効利用条件の検討結果に準じて、使用前日に等量の水を添加混合し、開始時に添加後の混合物中で $\geq 10^7$ CFU/gDM となる量を添加した。試験期間は 28 日間とし、開始後 7、14、21 日目に切返しを行なった。開始時、各切返し時、終了時に堆肥化混合物の一部を採取し、分析に供した。期間中の堆肥化混合物の品温、排気中 NH₃ 濃度の測定、採取した試料の分析は実験室規模堆肥化試験と同様に実施した。また、試験は同じ設定で 3 回反復実施した。

TAT105 添加区では、無添加対照区に比べて、堆肥化期間中の NH₃ 発生濃度は低めの傾向を示し、堆肥化期間中の窒素損失は 14.4% 少なかった。一方、重量および VS の減少分、残存分については両区で同様であり、製剤の添加は有機物分解の進行に影響を与えなかったものと考えられた。開始時の堆肥化混合物中の TAT 濃度は、対照区、TAT105 添加区でそれぞれ 1.73×10^5 CFU/gDM、 2.2×10^7 CFU/gDM であったが、開始より 7 日目の切返し時までには両区とも顕著に上昇し、対照区で 1.2×10^8 CFU/gDM、TAT105 添加区で 9.5×10^8 CFU/gDM となり、TAT105 添加区では対照区の約 8 倍に達した。これ以降は両区とも濃度に大きな変化は見られず、終了時でも TAT105 添加区で 1.1×10^9 CFU/gDM、対照区で 2.1×10^8 CFU/gDM であり、TAT105 添加区では対照区の 5.4 倍の値を保持していた。開始後 7 日目、14 日目、21 日目の各切返し時点および終了時の混合物中 TAT 濃度の対数値については、対照区と TAT105 添加区の間有意差 ($P < 0.001 \sim 0.05$) が確認された。これらの結果は基本的に実験室規模の堆肥化試験と同様であり、パイロットスケールの堆肥化においても TAT105 が同様の作用を示すことが示唆された。TAT105 添加区では製剤の添加により堆肥化開始時の試料中の TAT105 が試料中の高温性微生物の中で優占種となり、これによって堆肥化初期の高温高アンモニウム環境下での優先的な増殖が起こり、TAT が対照区を顕著に上回る濃度に達すること、これ以降終了時まで高濃度が維持されることが、TAT105 添加による NH₃ 発生低減の作用機序と考えられた。

第5章 終論

本研究は、微生物の添加により家畜排泄物の堆肥化処理からの NH₃ 発生を低減する技術の開発を目的として実施した。微生物の機能として増殖に伴う窒素の資化を利用すること

を想定し、堆肥化過程の高温高アンモニウム環境に適応し、アンモニウム態窒素を資化しながら増殖する細菌 *Bacillus* sp. TAT105 株を分離選抜した。16S rDNA の塩基配列に基づく解析の結果、TAT105 は *Bacillus thermolactis* の異株と考えられた。TAT105 は高温性で高いアンモニウム耐性を有していることから、堆肥化試料からの検出および計数の方法として、アンモニウム塩を高濃度に含む寒天培地 (YA1 寒天培地) に接種し、高温 (60 °C) で培養することでコロニー形成させる方法を作成し、この方法が TAT105 およびその分子系統上の近縁菌種に高い選択性を有することを見出した。また、実際の家畜排泄物の堆肥化処理での利用を想定して TAT105 の製剤化を検討し、TAT105 を固体培養したものを乾燥することで、粉末または顆粒状の担体に菌体を高密度に保持した状態で長期保存が可能であることを確認した。この TAT105 製剤を用いて実験室規模およびパイロットスケールで豚糞の堆肥化試験を行い、TAT105 添加区および無添加対照区の間で NH₃ 発生の推移、窒素や有機物の損失、微生物の増殖等を比較することで、TAT105 添加による NH₃ 発生低減の確認を確認した。

本研究では、堆肥化試験を反復実施し、NH₃ 発生の推移を調べると共に、堆肥化期間中の素材中の窒素や有機物の減少、微生物の増殖等について定量評価し、統計処理によって TAT105 添加区と無添加対照区との間の有意差の有無を確認することで、TAT105 添加による NH₃ 発生低減効果について、効果の程度および再現性を合わせて検証した。本研究で用いた実験系・実験方法は、堆肥化処理で添加利用する資材の効果の評価に利用しうるものとする。

堆肥化処理からの NH₃ 発生を低減する方法としては、微生物機能の利用の他に、化学物質の添加による低減、家畜飼料の成分調整による窒素排泄量自体の低減化等、様々な方法の検討、開発が行われている。TAT105 添加の効果には限界があることから、他の手法との併用による効果の向上は今後の課題のひとつである。

家畜排泄物の堆肥化処理を含め、有機性廃棄物の処理での微生物製剤の添加利用は数十年前から行われており、臭気の低減化、処理の促進等の効果を謳った数多くの製剤が市販されている。しかしながらその一方で、製剤に含まれる微生物とその機能についての情報は殆ど提供されておらず、実際の効果も曖昧なものが多い。このように有機性廃棄物の処理で利用される微生物製剤については、微生物の添加利用の理念のみが先行し、科学的背景が欠落または不足した状態が続いている。この問題を解消し、微生物の添加利用を普遍的な技術とするためには、使用する微生物の選抜、同定、および機能の解明、微生物製剤の効果の定量評価、処理の過程での微生物の作用と動態の確認等、科学的背景を明らかにする必要がある。そのためには、有効な微生物の探索と利用方法の確立を中心として、効果の評価のための実験系の作出、微生物の特異的検出方法の開発等を含めて、多面的な研究および知見の蓄積が必要である。今後この方面の研究が進み、堆肥化処理での微生物製剤の添加利用が完成度の高い技術となることを期待したい。