

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05880

研究課題名（和文）低温環境下における堆肥化のスタートアップに重要な基質および微生物の解析

研究課題名（英文）Analyses of significant substrates and microorganisms during startup stage of cow manure composting under low-temperature environment

研究代表者

花島 大（Hanajima, Dai）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・グループ長

研究者番号：20414708

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）：低温環境下で行う乳牛ふんの堆肥化処理においては、堆肥化反応が遅延する傾向にある。温度上昇が不十分な未熟堆肥では、雑草種子や病原性微生物などの残存リスクが高い。そこで本研究では、低温環境下における堆肥化処理の改善を目的とし、低温域での堆肥温度の立ち上がりに寄与している微生物の解明を試みた。その結果、低温域の堆肥においては細菌ではFirmicutes、Tenericutes、およびActinobacteria門に属する微生物種が、真菌では、MucoromycotaおよびAscomycota門に属する微生物種の活性が温度の立ち上がりに寄与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳牛の飼養には冷涼な環境が好まれるため、結果として乳牛ふんの堆肥化処理の多くは、北海道など冬期の寒さが厳しい地域において行われている。しかし極度の低温環境下では微生物活性が低下し、良質堆肥の生産は困難となる。これまで低温環境下における堆肥化処理、特に低温環境下で活躍する微生物の動態に関する研究はほとんど行われていない。本研究は堆肥品質が低下する冬期の堆肥化のスタートアップを改善し、堆肥品質の向上、および堆肥のリスクを低減させることを目的としている。

研究成果の概要（英文）：Generally, process of cow manure composting in winter season is hindered due to low ambient temperature. Immature compost that has not been exposed to heat poses high risks of survival of weed seeds and pathogenic microorganisms. With the aim of improving the composting process, we investigate microorganisms that play an important role in heat generation at startup stage of the composting process under low-temperature environment. The results indicated that metabolically active bacteria or fungi belonging to Firmicutes, Tenericutes, Actinobacteria, Mucoromycota or Ascomycota might contribute to heat generation of the composting process during startup stage.

研究分野：畜産環境保全学

キーワード：堆肥 低温環境 微生物 温度 基質

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

家畜排せつ物を有機質肥料として活用するため、固形分については主として堆肥化処理が行われている。しかし乳牛ふんの水分は約 85%と他の畜種よりも水分が高く、堆肥化における温度上昇が十分に得られない傾向にある。また一般的に乳牛の飼養には冷涼な環境が好まれるため、結果として乳牛ふんの堆肥化処理の多くは、北海道など冬期の寒さが厳しい地域において実施されている。しかし極度の低温環境下では、堆肥化反応が全く起きない、または起きたとしても有機物分解が大きく阻害される。温度上昇が不十分な未熟堆肥では、雑草種子、植物病害を引き起こす病原因子、食中毒原因菌である病原性大腸菌やサルモネラ菌などの残存リスクが高く、悪臭成分が多量に残存することから、運搬や堆肥散布時に地域住民から苦情が寄せられる可能性がある。しかし低温環境下においても一定レベルまで温度が上昇すればそれ以降は加速度的に温度が上昇する現象が認められている。すなわち、堆肥の中に最初に小さな火を灯すスターターの役割を果たす微生物の活性を増強することができれば、冬期においても高温堆肥化を実現し、雑草種子が少なく、悪臭成分の低下した堆肥を生産できる可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、堆肥原料中に存在する低温環境下で高い代謝活性を有する微生物、およびそれら微生物にとって利用性の高い基質を明らかにする。低温環境下において微生物活性を強化できる基質を人為的に堆肥に添加することにより、堆肥化プロセスの遅滞を解消し、堆肥品質が悪化することが多かった冬期の堆肥化プロセスを改善することで、堆肥品質の向上を図る手法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 低温環境下での堆肥化プロセスを再現する実験系の作出

堆肥は不均一性が高く、堆積物の部位によって温度や微生物叢が異なる。そこで本研究では、精密な温度データの取得および再現性の高い堆肥化試験を実施するため、小容量の原料で堆肥化過程を再現できる小型堆肥化装置を製作した。乳牛ふんと細断麦稈の混合物を 0.8 L 容器に充填し、中心部に熱電対を挿入した後に水槽に浸漬し、冷却水の制御により水温を 5 前後の低温で維持した。通気量は 50 mL/min とし、容器中の堆肥の温度上昇に合わせた小刻みなヒーターの制御により、水槽の水を堆肥温度よりも 0.5 だけ低い温度で追従させることで疑似的な断熱状態を作り出し、微生物の自己発熱のみで堆肥化反応を進行させる装置を製作した。

(2) 低温環境下においてスタートアップを促進する微生物の利用性の高い基質の特定

低温微生物が積極的に利用している可能性がある基質として炭水化物、タンパク質、脂質などが予想される。これら基質を堆肥原料の現物重量に対し 1.9%の割合で添加し、低温条件下で小型堆肥化装置を用いた試験を実施した。それぞれの温度データを取得し、低温環境下において温度の立ち上がりには効果の高い基質について比較を行った。

(3) 低温環境下においてスタートアップ時に活性を有する微生物種の特定

低温環境下における温度立ち上がり時に代謝活性を有する微生物を検出するため、低温、中温、高温時に小型堆肥化装置から採取した堆肥サンプルから RNA を抽出し、次世代シーケンサを用いた 16S rRNA をターゲットとしたアンプリコンシーケンスを実施した。堆肥温度の上昇過程で経時的に採取したサンプルにおける細菌群の変遷から、温度域毎に特徴的な細菌を検出し、低温域で代謝活性を有する細菌種の特定を試みた。

(4) 低温環境下における温度上昇促進効果をパイロットスケール規模で評価する実験系の作出

乳牛ふんは水分が高く、堆積した場合は底部から排汁が蓄積するとともに、通気性が悪化することで堆肥化プロセスが著しく阻害される。低温条件に加え、この乳牛ふんの高水分の問題は冬期に堆肥化処理を実施するうえで大きな障壁となっている。そこで低温環境下における温度上昇促進効果をパイロットスケール規模で評価できる実験系の作出を試みた。12t の高水分乳牛ふん原料を堆積し、その堆積物内部にスチール製角パイプ枠にエキスパンドメタルを溶接したスノコ状構造物および排汁を構造物の内部から排出する塩化ビニル管を設置し、冬期における堆肥化試験を実施した。

4. 研究成果

(1) 低温環境下においてスタートアップを促進する微生物の利用性の高い基質の特定

本研究において作出した微生物の自己発熱のみで堆肥化の温度上昇を再現できる小型堆肥化装置を用い、牛ふんと麦稈を原料とする対照区、原料の一部をデンブ、ポリペプトン、またはオレイン酸に置き替えた試験区の温度上昇を測定した。その結果、初発の 5 から 10 まで上昇するまでに要する時間が最も短いのは対照区であり、有機基質を添加した区はいずれも対照

区以上の時間を要した。一方で有機基質を添加した区では、中温域での温度上昇の勾配が対照区よりも大きいことが示された。すなわち、原料へ添加した基質はスタートアップの起爆剤として作用するのではなく、中温域以降の活発な温度上昇の際に利用されていると推測された。

(2) 低温環境下においてスタートアップ時に活性を有する微生物種の特定

温度上昇過程にある堆肥から経時的に採取した試料から RNA 抽出を行い、16S rRNA をターゲットとしたアンプリコンシーケンスを実施し、堆肥温度が 5 から 12 まで上昇する際に存在比が有意に増加する微生物種を検出した。最も増加割合が高い微生物種は未分類と判定され、更に詳細な遺伝子配列の相同性検索を実施した結果、真核生物のミトコンドリア SSU rRNA 遺伝子配列との相同性が高いという結果が得られた。今回使用したプライマーは、16S rRNA 以外にもミトコンドリアや葉緑体の SSU rRNA 遺伝子を増幅することが報告されている。本研究を開始した当初は堆肥中の低温細菌がスタートアップに貢献していると予想していたが、この結果を受けてモニタリング対象として真菌を加えることとした。細菌について 16S rRNA を、真菌については 18S rRNA をターゲットとしてアンプリコンシーケンスを実施した結果を図 1 に示す。堆肥温度が 5 から 12 に上昇する際に、細菌叢については門レベルでの大きな変化は認められないが、真菌叢については Mucoromycota の大幅な増加が認められた。細菌叢において温度の立ち上がり時にその相対的存在比が有意に増加したのは、Firmicutes、Tenericutes、Actinobacteria に属する 10 の微生物種であった。一方で相対的存在比が有意に増加した真菌種は、Mucoromycota および Ascomycota に属する 3 つの微生物種であった。低温環境下においては、これらの微生物種が温度の立ち上がりにも寄与していると考えられた。

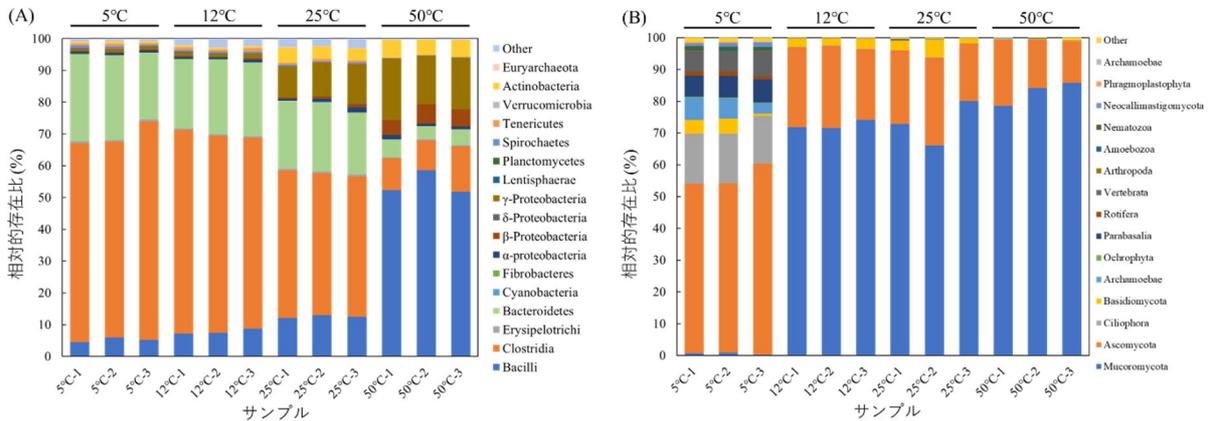


図 1 各温度域における細菌 (A) および真菌 (B) の相対的存在比の比較
*各温度域ともアンプリコンシーケンスは 3 連で実施した。

(3) 低温環境下における温度上昇促進効果をパイロットスケール規模で評価する実験系の作出

冬期に堆肥化試験を実施するうえで大きな障壁となっている高水分の問題を解消するため、図 2 に示したようなスノコ状構造物を作成し、堆積物の内部に設置した。スノコ状構造物を導入したスノコ区、およびスノコ状構造物の代わりにスチール製角パイプ枠に平板を溶接し、内部空間に発泡スチロールを充填した構造物を導入した対照区における冬期の温度推移を図 3 に示した。この期間の最低気温は -5.7、平均気温は 4.8 であった。期間を通じてスノコ区の堆肥温度が高い傾向にあり、特に外気温が低くなる 35 日後以降はその傾向が顕著であった。これはスノコ状構造物の導入による液分の分離および排出効果、加えて塩化ビニル管を介したガス交換により酸素供給量が増加し、温度上昇が促進されたと考えられた。今回は実験系の作出を目的に試験を実施したが、排汁の分離および嫌気部位におけるガス交換は実規模レベルの堆肥でも効果的に機能すると考えられた。

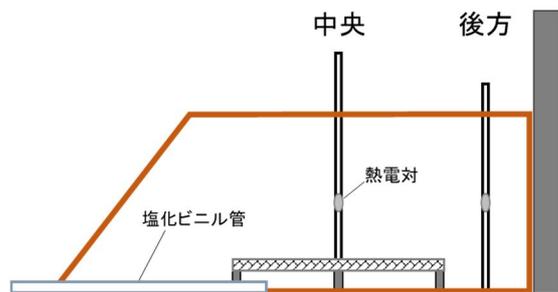


図 2 堆肥中に導入したスノコ状構造物の概略図

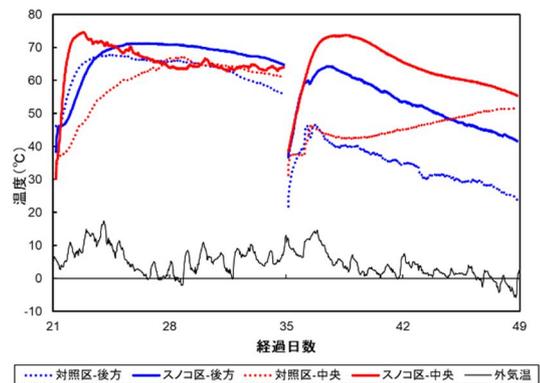


図 3 対照区およびスノコ区の温度推移

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hanajima Dai	4. 巻 95
2. 論文標題 Effects of slatted frame placed in compost pile on enhancing heat generation and organic matter degradation during high moisture cow manure composting	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13949
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13949	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 花島大、前田武己、青柳智、堀知行
2. 発表標題 低温環境下の乳牛ふん堆肥化過程における細菌叢および真菌叢の推移
3. 学会等名 日本微生物生態学会第36回大会
4. 発表年 2023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 分 担 者	前田 武己 (Maeda Takeki) (40333760)	岩手大学・農学部・准教授 (11201)	

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
---------	---------