

平成 24 年度
環境研究総合推進費補助金 研究事業
総合研究報告書

微生物酵素活性の利用による有機性廃棄物からの
リン再資源化に関する研究

(K112020)

平成 25 年 3 月

東京農工大学 橋本洋平

補助事業名	環境研究総合推進費補助金研究事業（平成 23 年度～平成 24 年度）
所轄	環境省
国庫補助金	13,583,000 円
研究課題名	微生物酵素活性の利用による有機性廃棄物からのリン再資源化に関する研究
研究期間	平成 23 年 6 月 1 日～平成 25 年 3 月 31 日
研究代表者名	橋本洋平（東京農工大学）
研究分担者名	苅田修一（三重大学）

目 次

総合研究報告書概要	1
本文	
1 . 緒論	8
1.1 研究の概要	8
1.2 研究の必要性	9
1.3 先行研究	10
1.4 研究の目的	12
2 . 日本の畑地土壌におけるリン可給性の現状～今後の土壌管理・堆肥施用に向けて	13
2.1 はじめに	13
2.2 材料および方法	13
2.3 結果および考察	16
2.4 まとめ（黒ボク土のリン施肥に関する考察）	17
3 . 堆肥化過程における鶏ふん中のリンの溶解性と化学形態の同定	18
3.1 はじめに	18
3.2 材料および方法	13
3.3 結果および考察	21
3.4 まとめ	26
4 . 鶏ふん堆肥からのフィチン酸分解菌の分離と堆肥化への利用	28
4.1 はじめに	28
4.2 材料および方法	29
4.3 結果および考察	35
4.4 まとめ	41
5 . 有用細菌の添加時期と回数の違いによる鶏ふん中のリン酸濃度への影響検討	44
5.1 はじめに（前章の実験条件の課題）	44
5.2 材料および方法	44
5.3 結果および考察	45
5.4 まとめ	46
6 . 総括	49
7 . 参考文献	52
8 . 研究発表	56
研究概要図	57
英文概要	58

環境研究総合推進費補助金 研究事業 総合研究報告書概要

研究課題名	微生物酵素活性の利用による有機性廃棄物からのリン再資源化に関する研究
研究番号	K112020
国庫補助金	13,583,000 円
研究期間	2011-2013 年
研究代表者名	橋本洋平 (東京農工大学)
研究分担者名	苅田修一 (三重大学)

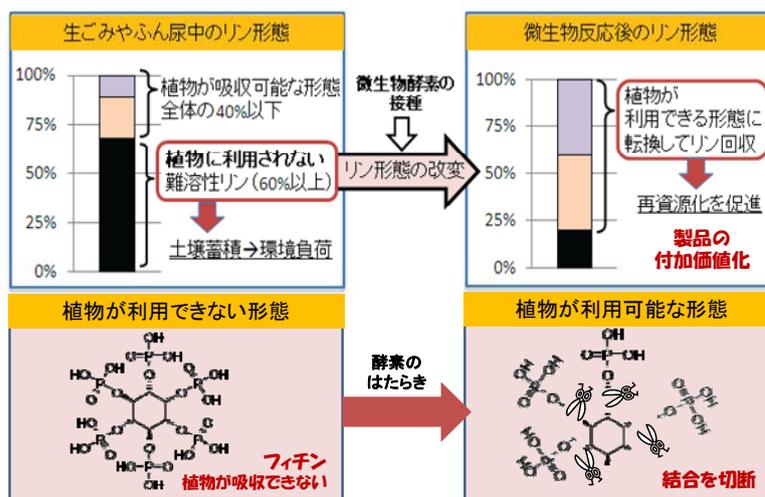
研究目的

本研究の目的は、有機性廃棄物中の難溶性リンを、微生物の作用によって改変し、植物の利用度を高めたリン酸肥料資源として回収することにある。生ごみやふん尿はリン濃度が高いが、全体の 50 %以上は植物が吸収できないフィチン酸やアパタイトの形態で存在する。これらのリン化合物形態ならびにリンの溶解性が、堆肥化過程でどのように変化するのが明らかになれば、現行の堆肥化システムの根本的な改良につながる。すなわち、有機性廃棄物のリン利用率を高めるためには、堆肥化の段階で難溶性リンを無機化および溶解させておき、植物が利用できる形態に転換する必要がある。難溶性リンは、有機酸による酸性溶解や、微生物のフィターゼ酵素によって分解できることに着目し、これらの有機酸生成能やフィチン分解酵素をもつ微生物の探査を行う。このような微生物の接種がリン形態の変換に及ぼす作用機構を明らかにし、有機性廃棄物のリン資源化における酵素活用の有効性を示す。将来的には、微生物酵素を援用した新しい堆肥化装置の構築を目標としており、本研究はそのために必要となるデータや知見を得るための基礎的研究として位置づけられる。

研究方法

本研究では、有機性廃棄物の中でもリンを多く含む鶏ふんを対象とし、堆肥化過程に

おける鶏ふん中のリンの形態を，微生物添加による作用によって改変し，植物に対するリンの利用度が高い（水溶態のリンが多い）堆肥を作成することを目的とした．鶏ふん中のリンの化学形態を，堆肥化の過程で微生物酵素を用いて，作物が吸収しやすいリン形態に改変するという着想である．その研究全体のイメージを図Aに示す．具体的には以下の項目について実験を行った．



図A 鶏ふん中のリンの化学形態の改変に着目した研究構想と方法

1) 堆肥化過程における鶏ふんに含まれるリンの化学形態の定性・定量

鶏ふんに含まれるリンは，難溶性のフィチン酸ならびにアパタイトとして存在していることが報告されている．しかし，堆肥化の過程でこれらのリン形態が，どのように変化するのかについては分かっていない．鶏ふん中の難溶性リンを植物が利用できるようにするためには，堆肥化の過程で生物可給性の形態に変化させる必要がある．このような手法を取り入れて，作物に対する肥料効果（肥効）の高い堆肥を製造するためには，堆肥化を迅速に進めることを一義的な目的とした現行の堆肥化システムを改良・再構築する必要性が課題として挙げられる．そのために必要となるのが，現在用いられている堆肥化システムから製造される堆肥中のリンの化学状態（リンがどのような形態で存在しているのか）を明らかにするという研究である．鶏ふんの堆肥化の過程において，リンがどのような形態で存在しているのか，ならびにこれまで推測されているリン形態である難溶態のフィチンや，水溶態のリンなどの各種形態が，確かに存在しているか，また堆肥化期間を通じての変化量を解明することに取り組んだ．

2) リン形態変化に関わる微生物酵素の探索と機能評価

(1)の研究の結果をふまえ、未熟なふん尿堆肥から、フィチン酸分解能(フィターゼ)ならびにアパタイト溶解能の高い有機酸を生産する菌株を探索する。フィターゼ生産菌はフィチンを含む寒天平板培地でのハロー形成によるコロニー選択法、有機酸生産菌については、pH 指示薬を混合した寒天培地、または炭酸カルシウムを含む寒天培地によるコロニー選択法で単離を行う。単離した菌株については、16S rRNA 遺伝子による種の同定を実施し、培養可能性やリン溶解機能を評価した。

3) 堆肥化プロセスにおける有用細菌の添加がリン形態変化に及ぼす効果の解明

(2)で同定した有用菌株を鶏ふんに添加し、実験室の堆肥化装置を用いて、鶏ふん中のリン形態の変化に及ぼす機能を評価する。また、添加菌株については DGGE 法によって菌の動向をモニターする。堆肥化過程で鶏ふんに含まれるリンの溶解性の変化を追跡し、菌株の添加による効果を明らかにする。また、堆肥化過程における菌株の添加回数や時期についても併せて検討する。

結果と考察

1) 堆肥化過程における鶏ふん中のリンの化学形態の定性・定量

三重県内の養鶏施設に隣接する堆肥化装置から、鶏ふん堆肥を堆肥化開始0日目から7日目まで毎日採取し、化学分析に供した。堆肥中におけるリンの化学形態を逐次抽出法によって分析し、それぞれ水抽出態、NaHCO₃抽出態、NaOH抽出態、HCl抽出態に4分画した。核磁気共鳴法、X線回折法等を用いて、堆肥中のリン化学形態を分析した。

堆肥化の進行に伴って、鶏ふん堆肥中の水溶性リンが全体の18%(0日目)から7%(7日目)に減少することが確認された。堆肥化が進むにつれて、水抽出されるような弱い結合状態のリンが、塩酸抽出態の難溶性リンに変化していくことが明らかとなった。鶏ふん堆肥中のリンは、カルシウムと結合した形態で存在していることが確認された。NMR法による分析の結果、堆肥化の進行に伴ってフィチン態のリンが増加することが明らかにされた。また、X線回折による分析結果では、水酸アパタイトとしてリンが存在していることも明らかにされた。これらの結果は、堆肥化の過程において鶏ふん中に生物可給性の低い難溶性のリン(フィチン、アパタイト)が増加することを示唆している。本成果を鑑みて、有用細菌の探索は、アパタイトやフィチン態のリンを溶解する酵素をもつ細菌に限定して実施された(結果2)。

2) 難溶性リンを溶解する機能をもつ有用細菌の探索

堆肥化過程にある鶏ふん堆肥中より、フィチン酸分解活性をもつ細菌のスクリーニングを行った。鶏ふん堆肥よりフィターゼ活性をもつ細菌を PSM 培地で分離した。培地に白いハローを形成し、生育の旺盛だった細菌を単離した。1 次および 2 次スクリーニングにより、7 細菌種を分離することができた。これらの細菌種について、16S rRNA 遺伝子配列による簡易同定を行ったところ、*Sphingomonas* 属、*Burkholderia* 属、*Bacillus* 属 3 種、*Microbacterium* 属、*Gordonia* 属に属することがわかった。これらのうち、*Sphingomonas* 属と *Burkholderia* 属の菌種は、不溶性フィチンに対し高い可溶化活性を示し、なおかつ 60 の高温でも、良好な生育を示した。単離したフィチン酸分解菌の DNA 塩基配列を同定し、BLAST 解析をした結果、*Burkholderia gladioli* BSR3 (99%) と相同性があった。

3) 有用細菌を添加した鶏ふん堆肥中のリン溶解性に関する研究

(2) で単離培養したフィターゼ生産細菌を添加した結果、添加後 2 日間の水溶性リン酸濃度が上昇することが確認された。そこで、当該細菌を堆肥化過程で 3 回添加したところ、当該細菌を添加しない場合、1 回添加の場合、ならびに試薬のフィターゼを添加した場合と比較して、堆肥化終了時の水溶性リン酸濃度は、堆肥化終了時に有意に増加した (1500mg/kg 増加)。

本研究で単離培養に成功した当該細菌は、おそらくほとんどの鶏ふん堆肥化装置で生育している普遍的な種であると考えられ、類似の菌種も存在していると推察される。本研究の菌株を利用、あるいはそれぞれの堆肥化装置の鶏ふんから単離された菌株を利用することによって、本研究で示された微生物酵素を利用した堆肥化の手法は、実用技術になりうると期待される。また、この手法は他の有機性廃棄物にも応用可能であると考えられる。そのためには、本研究で示されているように、堆肥化をする試料 (有機性廃棄物) 中のリンの化学状態を詳細に分析し、そのリン形態を分解することができる酵素を生産する細菌類 (特に高温耐性を有する) を単離・培養するという手順をとることが合理的である。

環境政策への貢献

(1) 有機性廃棄物のリン再資源化における微生物酵素利用の有効性について

肥料としての家畜ふん中のリンを作物に供給されやすくするために、鶏など単胃動物の飼料に試薬のフィターゼ(酵素)を添加し、飼料中に多く含まれる難溶態のフィチン態リンを溶解させてふん中に排出させる方法が開発されている。また、家畜ふんの堆肥化の過程で、フィターゼを添加することによって溶解性の高いリンを含む堆肥を作成するという方法も、実験的に行われている。しかし、いずれの方法も、試薬を用いるため費用が高く、元来廃棄物である家畜ふんの堆肥化技術として普及していない。

一方、本研究では鶏ふん堆肥の発酵時に生育している細菌のなかから、フィターゼを放出する種を単離・培養し、それを鶏ふんの堆肥化に添加するという方法を検討した。この方法は、目的の細菌が探査でき、それが培養できることが分かれば、その後の費用は細菌の維持・培養管理のみであることから、費用は初期投資(大学や研究所に委託する菌体探査と、その後の菌体維持のための培養装置の購入)のみで対応できると考えられる。

本研究で単離培養に成功した当該細菌に類似した種は、おそらくほとんどの鶏ふん堆肥化装置で普遍的に生育していると推察される。本研究では、まず鶏ふん中に含まれるリンの化学形態をフィチン酸と水酸アパタイトであることを同定し、その知見からフィチン酸を溶解するフィターゼ酵素をもつ細菌種をターゲットとして、発酵中の鶏ふんから探査した。この細菌種が堆肥化条件の高温環境下で培養可能であることが分かり、堆肥化過程に添加したところ、堆肥化完了後に鶏ふん中の水溶性のリンが有意に増加することが確認された。この結果は、本研究の最終目的である「有機性廃棄物のリン資源化における酵素活用の有効性」を示すものである。

本研究で単離された菌株、あるいは各地の堆肥化装置の鶏ふんから単離された菌株を堆肥化過程で添加することによって、本研究で提案した「微生物酵素を利用した堆肥化技術」は実用技術になりうると期待される。また、この手法は他の有機性廃棄物にも応用可能であると考えられる。そのためには、本研究で示されているように、堆肥化をする試料(有機性廃棄物)中のリンの化学状態を詳細に分析し、そのリン形態を分解することができる酵素を生産する細菌類(特に高温耐性を有する)を単離・培養するという手順をとることが合理的である。

(2) 日本の畑地土壌のリン可給性の評価方法の改良について

リンの土壌蓄積は黒ボク土と呼ばれる土壌において極めて多く、河川へのリン移行を考えるうえで潜在的なリン源となる。黒ボク土は、日本の畑地面積の47%を占めることから、近年の黒ボク土のリン可給性の調査は、今後のリン施肥に関する指針を決めるうえでの重要な情報を寄与できると考えられる。黒ボク土は、アロフェン鉱物の有無（アロフェン質・非アロフェン質）によって、リンの吸着特性が異なることが、本研究で全国1300地点の土壌データを解析することによって明らかにされた。

国内で広く用いられている土壌リンの診断法は、リン酸吸着能が同じ黒ボク土であっても、アロフェン質と非アロフェン質黒ボク土では、作物に対するリン酸供給量を等しく示さない。それは、両黒ボク土のリン酸吸着機構が異なるためである。リン吸着特性がアロフェン質と非アロフェン質黒ボク土で異なることを示した本研究の知見は、2つの黒ボク土に対してのリン施肥ならびに土壌管理の指針を別々に提示する必要があることを示唆している。このように同じ黒ボク土であってもリンの可給性を評価する土壌診断法や、土壌施肥管理法を区別して評価・設定することによって、より高度な環境保全型の農業が可能になり、農地から流出するリンを制限し、下流域の富栄養化を抑制することに貢献できると考えられる。特に、環境保全に配慮した堆肥の施用法を確立するうえで、本研究の成果は重要な知見を提案するものである。

研究成果の実現可能性

これまで報告されている試薬の酵素を添加した堆肥化の手法は、費用が高く、生ごみや家畜ふんなどの廃棄物の処理方法としては不向きである。一方、本研究の有用菌株を利用、あるいはそれぞれの堆肥化装置の鶏ふんから単離された菌株を利用することによって、本研究で示された微生物酵素を利用した堆肥化の手法は、実用技術になりうると期待される。また、本法は培養細菌を添加するという単純な作業であるため、現行の堆肥化設備を変更することなしに、適用することができる。費用は初期投資（大学や研究所に委託する菌体探査と、その後の菌体維持のための培養装置の購入）のみで対応できると考えられる。また、この手法は他の有機性廃棄物にも応用可能であると考えられる。本研究を基礎にしたフィチン酸分解菌を添加した堆肥化システムの構築には、実際の現場試験を行い、堆肥化時間、温度、通気など、堆肥化の環境条件を検討する必要がある。

結論

本研究の主な成果をまとめると、次の3点に集約される。

- (1) 堆肥化の進行に伴って、鶏ふん中に含まれる水溶性リン酸濃度が低下することが確認された。具体的なリン形態としては、堆肥化進行に伴って増加する難溶態のリンは、フィチン酸ならびに水酸アパタイトのようなカルシウム結合態の無機化合物である可能性が高いことが示唆された。
- (2) 堆肥化の過程でフィチン態リン酸を分解するフィターゼ生産細菌を、鶏ふん堆肥から分離し、その種は *Burkholderia* sp. と同定された。当該細菌は、堆肥化の高温条件下で培養可能であることを確認した。
- (3) 鶏ふんの堆肥化過程で単離培養したフィターゼ生産細菌を添加した結果、添加後2日間の水溶性リン酸濃度が上昇することが確認された。そこで、当該細菌を堆肥化過程で3回添加したところ、当該細菌を添加しない場合ならびに試薬のフィターゼを添加した場合よりも、堆肥化終了時の水溶性リン酸濃度は、堆肥化終了時に有意に増加した（1500mg/kg 増加）。

1. 緒論

1.1 研究の概要

有機性廃棄物に大量に含まれるリンの 3R 促進は，リン原料の国際価格が高騰している現状において，国内消費のリンの全量を輸入している日本の緊急課題である．輸入リン鉱石の 80%が肥料用途であることから，有機性廃棄物のリンを肥料として再資源化する意義は大きい．地球規模で起きている環境問題を炭素，窒素，リンの関係から見てみると，生ごみ，下水汚泥，家畜ふん尿などの有機性廃棄物を回収し，メタン発酵後，残渣に濃縮されるリンを肥料として循環させることが解決策として見えてくる．

有機性廃棄物のし尿ならびに家畜ふん尿からのリン回収技術は，一般的に処理過程で固液分離される晶析法が適用されている（白毛 2005，鈴木 2002）．晶析法は，リン酸マグネシウムアンモニウム（MAP）によるリン回収と，カルシウムアパタイト（HAP）によるリン回収の 2 つの方式をとることが可能である．MAP による回収は，アンモニアの存在する生物処理の前段階で行われ，一方，HAP による回収は，アンモニアの存在しない生物処理後の段階でリン回収が実施される（Doyle and Parsons, 2002）．両方式の特徴を表 1-1 にまとめた．いずれの方法も，マグネシウム塩やカルシウム塩，ならびに pH 調整のための試薬を添加して，曝気処理を搭載したリアクターが必要となるが，純度の高い MAP および HAP としてリンを回収することが可能である．また，家畜ふん尿などに含まれる重金属類を，処理過程で除去できることから，回収されたリンを肥料として用いる場合には，有害金属が土壌へ蓄積することのリスクが軽減でき，工業用途への転用も容易になる．一方，これらの方法は，大規模なプラント建設が必要になり，目的の化学形態（MAP，HAP）としてリンを回収するためには，マグネシウムや pH 調整の薬剤を添加して反応を進行させる必要がある．また，回収される MAP および HAP の溶解性は低く（溶解度積 10^{-13} および 10^{-44} M），肥料として農地に施用した際に，作物に吸収される前に，土壌の腐植や粘土鉱物などの構成成分と吸着し，リンの利用度がさらに低下してしまう（Schoumans, 2000）．すでに日本の農地は，長年の施肥によりリンが過剰状態にあり，作物の根こぶ病などの病害発生の一因（村上ら 2004）となっていることを鑑みると，MAP および HAP 態として回収したリンを肥料用途として農地施用は適さない．したがって，肥料用途として有機性廃棄物を利用する際の条件としては，廃棄物中のリンが作物に吸収されやすい状態，すなわち水溶性リンの割合が多いことが重要であり，そのような堆肥を用いることによって，リン施用量や環境負荷の低減が可能になると考えられる．

既往の有機性廃棄物のリン再利用に関する研究は、廃棄物中からリンを化学的プロセスによって回収するという方法が採用されている。肥料として家畜ふん尿などの有機性廃棄物を利用する場合には、(1)堆肥そのものが安価であるため、必ずしも純度の高いリンを回収する必要はないこと、(2)作物に利用されやすい水溶性リンを多く含むこと、(3)既存の堆肥化装置に設置可能な技術手法が必要になることの3点が条件として挙げられる。特に有機性廃棄物の再利用を促進・普及するということの重要性を鑑みると、新たなプラントを製造することは現実的な方策ではなく、項目(3)で示したように、畜産農家が所有している既存の堆肥化装置に組み込むことができる技術を検討することが必要になってくる。

表 1-1 MAP 法と HAP 法による有機性廃棄物からのリン回収

回収法	MAPによる回収法	HAPによる回収法
概要	アンモニアとリン酸が共存する場合には、マグネシウムを添加して窒素とリンを同時にリン酸マグネシウムアンモニウムとして回収する。	リン酸が存在する場合には、カルシウム塩を添加してヒドロキシアパタイト(リン酸カルシウム)として回収する。
適応箇所	前凝集処理後、生物処理の前段階	生物処理後(膜分離後)、高度処理の前段階
反応式	$PO_4^{3-} + NH_4^+ + Mg^{2+} + 6H_2O \rightarrow MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$	$6PO_4^{3-} + 10Ca^{2+} + 2OH^- \rightarrow Ca_{10}(OH)_2(P_4O_{10})_6$
処理 pH	8.5	7.5

白毛(2005), Doyle and Parsons(2002)を参考

本研究では、微生物酵素の作用を利用し、有機性廃棄物中の難溶性リン形態を植物が容易に利用できる形態に転換し、肥料資源としてリンを再資源化する方法の確立を目指す。生ごみやふん尿から目的とする微生物を単離し、実際の堆肥化過程におけるリン形態の変化に及ぼす機能を評価し、回収したリンの肥料資源としての有効性を評価する。

1.2 研究の必要性

廃棄物の総排出量の60%を占める有機性廃棄物は、リンなどの養分に富むことから、肥料として再資源化し農地に還元する措置が、リンの3Rの観点から最も安価に大量に活用できる方法である。リン鉱石の枯渇と価格高騰が懸念される現状において、日本で

は輸入されるリン鉱石の80%が肥料用途であることや、リン酸肥料の施用量が世界1位であること、それによって長年の過剰施肥により水系の富栄養化が引き起こされている状況を鑑みても、肥料資源として有機性廃棄物のリン3Rを促進することは急務である。これまで報告されている廃棄物からのリン回収法(前述のHAP, MAP態)は、新たなプラント建設が必要となるため、既存の堆肥化装置を利用することが難しい。HAPやMAP態として回収されたリンの多くは肥料として用いられているが、すでにマグネシウムやカルシウムと結合しているため、土壤中で溶解しにくいという点、作物に吸収される前に土壌の構成成分と吸着することによって、最終的に土壌へのリン蓄積が促進される可能性が高い。これらの問題点を鑑みると、(1)コスト減を図るため、有機性廃棄物からリンを回収することなく、そのまま堆肥化させて利用することの必要性、(2)そのためには、廃棄物中のリンがHAPやMAP態ではなく、作物に吸収されやすい水溶性のリンを多く含む必要があること、(3)既存の堆肥化装置をそのまま用いて、微生物酵素を利用した(2)の成分改変を行うことができる方法を検討することが必要になる。将来的に、作物にとって有効なリンの多い(=水溶性リンを多く含む)有機性廃棄物の堆肥製造法を確立するためには、主としてこれまで明らかにされていない(1)堆肥化過程におけるリン化学状態(アパタイトフィチン態)と溶解性、(2)リン溶解酵素を放出する細菌の単離・培養、の2点についての基礎的研究が必要になる。

1.3. 先行研究

有機性廃棄物のし尿ならびに家畜ふん尿からのリン回収技術は、一般的に処理過程で固液分離される晶析法が適用されている(白毛2005, 鈴木2002)。晶析法は、リン酸マグネシウムアンモニウム(MAP)によるリン回収と、カルシウムアパタイト(HAP)によるリン回収の2つの方式をとることが可能である(表1-1)。MAPによる回収は、アンモニアの存在する生物処理の前段階で行われる。溶液中のリン酸とアンモニウムイオンおよびマグネシウムイオンの反応によって生成するリン酸マグネシウムアンモニウム $[MgNH_4PO_4]$ の晶析現象を利用したものである。本方式はリンとアンモニウムを含む液が対象となる。嫌気性消化槽の脱水分離液に Mg^{2+} を添加し弱アルカリ領域でMAPを生成させる(田中ら2005, 白毛2005)。一方、HAPによる回収は、アンモニアの存在しない生物処理後の段階でリン回収が実施される(Doyle and Parsons, 2002)。溶液中のリン酸とカルシウムイオンの反応によって生成するアパタイト $[Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6]$ の晶析現象を利用したものである。本方式では、リンを含む液にCaおよび水酸化物イオン

を含むアルカリ資材を添加し、過飽和状態（準安定領域）にした後、脱リン槽に導き、槽内の脱リン材と接触させることにより、ろ材表面にアパタイト結晶を析出させ液中のリンを回収する。HAP 法では処理水のリン濃度を 1 mg/L 以下にすることが可能である（田中ら 2005, 白毛 2005）。

これらの方法に対して、有機性廃棄物を堆肥化して、それに含まれるリンを肥料として利用する方法は、廃棄物をより大量に再資源化することが可能になると考えられる。そのためには、これまでの堆肥と同等の製品を製造するのではなく、土壌に添加した際に、作物に吸収されやすい水溶性のリンを多く含む堆肥を製造することによって、現在問題となっている土壌へのリン蓄積、流亡による湖沼の富栄養化、ならびにリン資源の再資源化の課題の解決につながる。有機性廃棄物である家畜ふん尿中に含まれているリンは、有機態のフィチン態で存在していることが報告されている。(Turner, 2004; Toor et al., 2005; Seiter et al., 2008)。フィチン態リンは溶解しにくく、分解されて無機化されなければ作物に利用されない。したがって、ふん尿を堆肥化する過程でフィチン態リンを分解させる必要があるが、そのためにフィチン分解酵素であるフィターゼを添加する方法が先行研究として報告されている(Maguire et al., 2004)。しかし、フィターゼ酵素は高額であり（例 40000 yen / 5g, Sigma-Aldrich）、大量のふん尿に添加して堆肥化を行うことは、費用面において現実的でない。そこで、対象とする有機性廃棄物から、フィターゼ放出細菌を単離・培養し、堆肥化過程で接種することができれば、難分解性のフィチン態リンを堆肥化過程で分解することが可能になると考えられる。この方法が確立できれば、既存の堆肥化装置に組み込むことによって、特別な施設が不要でコスト面で有利な有機性廃棄物の堆肥化によるリン再資源化につながる。しかし、堆肥化された有機性廃棄物中のリンの溶解性に関する報告は散見されるが(伊藤ら 2010)、堆肥化の過程においてフィチンやアパタイトなどのリンの化学形態がどのように変化するのかに関する基礎的な知見は見当たらない。また、堆肥化された有機性廃棄物から、フィターゼなどのリン溶解酵素を放出する有用細菌の単離に関する基礎的な研究も報告されていない。したがって、堆肥化による有機性廃棄物のリン再資源化を实用レベルにまで到達させるためには、これらの基礎的知見が不足しており、本研究はそのための研究として位置づける。

1.4 研究の目的

本研究の目的は、有機性廃棄物中の難溶性リンを、微生物の作用によって改変し、植物の利用度を高めたリン肥料として再資源化することにある。本研究では有機性廃棄物のなかでもリン含有量が多い鶏ふんを対象とした。はじめに、これまで明らかにされていない堆肥化過程の鶏ふんに含まれるリンの化学形態の定性・定量の変化について、実際の堆肥化装置の試料を分析し、明らかにすることを目指した。発酵過程にある鶏ふん堆肥から、フィチン酸分解能（フィターゼ）ならびにアパタイト溶解能の高い酵素を生産する菌株を探索し、種の同定をすることを目的とした。次に、この有用細菌を鶏ふんに添加し、実験室の堆肥化装置を用いて、鶏ふん中のリン形態の変化に及ぼす機能を評価した。ここで、堆肥化過程における菌叢の変化を追跡し、細菌添加の効果をリンの溶解性の挙動と併せて評価することを目指した。具体的には、堆肥化後の鶏ふんに含まれる水溶性リンの割合を増加させることによって、有用細菌の添加による効果を検証することにした。

加えて、現在起こっている日本の農地のリン過剰問題は、本研究で取り組む堆肥開発と併せて早急に対応すべき事項である。リンの土壌蓄積は、日本の黒ボク土において極めて多く、河川へのリン移行を考えるうえで潜在的なリン源となる。黒ボク土は、日本の畑地面積の47%を占めることから、近年の黒ボク土のリン可給性の調査は、今後のリン施肥に関する指針を決めるうえでの重要な情報を寄与できると考えられる。このような課題を鑑みて、土壌のリンの吸着特性を既存のデータから纏め上げ、現在広く用いられている土壌のリン可給性評価の手法についての提言を行った。

2. 日本の畑地土壌におけるリン可給性の現状～今後の土壌管理・堆肥施用に向けて

2.1 はじめに

日本の土壌は、リンを特異的に吸着する酸化アルミニウム・鉄鉱物を多く含むため、作物へのリン供給が制限されやすいという性質をもつ。肥料として施肥されたリンのほとんどは、これらの鉱物と吸着して不溶化される。土壌のリン制限の問題を回避し、作物に対するリンの要求量を満たすためには、リン肥料を土壌に大量に投入し、作物が吸収可能な土壌溶液中のリン濃度を増加させる必要がある。これまで長期間にわたって、土壌への大量のリン肥料の施用が、土壌管理法の指針のひとつとして奨励されてきた。その結果、農地のリンは過剰に蓄積されており、土壌流亡による湖沼の富栄養化や、作物への過剰障害を引き起こしている(村上ら, 2004)。全国の水田土壌の53%の可給態リン含量は、地力増進基本指針に基づく上限値を超えて蓄積しており、多くの圃場で施肥が過剰となっていることが報告されている(農林水産省, 2010)。

リンの土壌蓄積は黒ボク土において極めて多く、河川へのリン移行を考えるうえで潜在的なリン源となる。黒ボク土は、日本の畑地面積の47%を占めることから、近年の黒ボク土のリン可給性の調査は、今後のリン施肥に関する指針を決めるうえでの重要な情報を寄与できると考えられる。黒ボク土は、アロフェンの有無(アロフェン質・非アロフェン質)によって、リンの吸着特性が異なることが知られている(Wada and Higashi, 1976; Wada and Gunjigake, 1979; Wada and Wada, 1985)。しかし、日本全国の土壌を対象としたデータは多く存在するものの、それらを統合してアロフェン質と非アロフェン質黒ボク土におけるリン吸着挙動が明らかにされていない。そこで本研究では、既報のリン吸着量の土壌データを用いて、アロフェン質ならびに非アロフェン質黒ボク土のリン吸着特性について統計手法を用いて明らかにした。

2.2. 材料および方法

1) 土壌分析とパス解析

本研究では、日本全国のアロフェン質および非アロフェン質黒ボク土671地点のデータについて、リン吸着と最も関係している土壌特性をパス解析によって特定することを目的とした。土壌データは、松山(1994)から引用した。松山(1994)は、沖縄県を除くすべての都道府県に分布する黒ボク土の基本性質を網羅的にまとめており、データベースとして適していると判断した。

土壌はすべて2mm以下に篩別したものを分析した。土壌のリン酸吸着量は、2.5%のリン

ン酸二アンモニウム溶液(pH7)に、土壌・溶液の比が 1:2 になるように混合し、24 時間後に溶液中のリン酸濃度を測定することによって求めた(Blakemore et al., 1987)。溶液中のリン酸濃度は、モリブデンブルー法によって定量した。0.2M のシュウ酸溶液を用いて、土壌中の非晶質画分に属するアルミニウム、鉄、ケイ酸を抽出した(シュウ酸可溶画分)(Blakemore et al., 1987)。0.1M のピロリン酸ナトリウム溶液を用いて、腐植結合の画分に属しているアルミニウムと鉄を抽出した(ピロリン酸可溶画分)(Weaver et al., 1968)。抽出された溶液中の元素は、原子吸光光度計(Al, Fe)ならびに比色法(Si)で測定した。土壌の有機物含有量は 550 度の灰化後に減少した質量を測定して求めた(Hopkins, 1996)。その他の土壌分析法については、松山(1994)に記載されており、本報告では関連する土壌分析法について記述した。

土壌のリン酸吸着量は、非晶質および腐植結合態のアルミニウムと鉄、有機物および粘土含有量、土壌 pH などと相関があることが知られている(Wada and Higashi, 1976; Wada and Gunjigake, 1979; Wada and Wada, 1985; Saigusa et al., 1991; Hiradate and Uchida, 2004; Takahashi et al., 2007)。しかし、これらの土壌特性は、いずれもリン酸吸着量と強い相関を示すことが多く、どの特性がリン酸吸着量に対して本質的な因果関係となっているのかは、単相関係数を比較するだけでは分からない。このようなリン酸吸着に及ぼす土壌特性の複雑な因果関係の連鎖は、パス解析と呼ばれる統計手法(複数の重回帰分析の組合せ)によって、どの土壌特性が最も重要で、しかも直接的あるいは別の要因を介して間接的にリン酸吸着に関係しているのかをパス係数(Pc)を比較して明らかにすることができる(Williams et al., 1990; Kang et al., 2009)。パス解析の構成を図 2-1 に示す。大文字の P はパス係数、小文字の r が土壌特性間の単相関係数を示している。例えば、パス係数を加味した Alox (シュウ酸可溶性 Al) と PRC (リン酸吸着量) の相関係数 (r_{16}) は、 $r_{16} = P_{16} + r_{12}P_{26} + r_{13}P_{36} + r_{14}P_{46} + r_{15}P_{56}$ のように表現される。

パス解析を実行する前に、アロフェン質および非アロフェン質黒ボク土におけるリン酸吸着量に対して、いずれの土壌性質が強い相関をもつのかを解析した(単相関係解析)。その結果、シュウ酸可溶性 Al, Fe (=非晶質 Al, Fe)、ピロリン酸可溶性 Al, Fe (=腐植結合態 Al, Fe)、腐植含有量の 5 つの特性が、アロフェン質および非アロフェン質黒ボク土のリン酸吸着量と高い相関を示した(図 2-2, 表 2-1)。したがって、これらのパラメタ をパス解析に用いた。

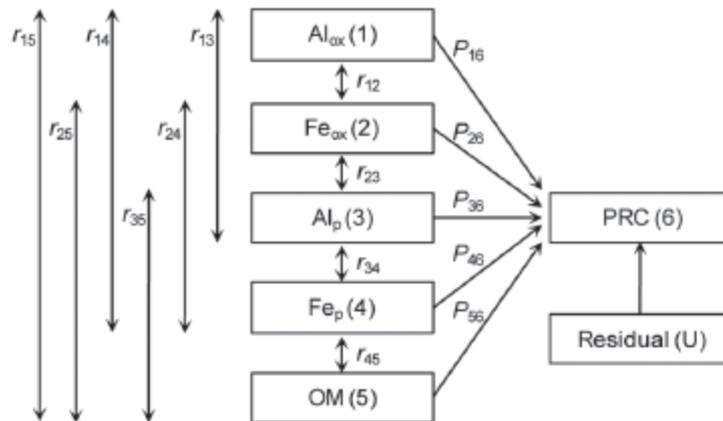


図 2-1 パス解析の構成 . Alox , Feox: シュウ酸可溶性 Al , Fe (=非晶質 Al , Fe) , Alp , Fep: ピロリン酸可溶性 Al , Fe (=腐植結合態 Al , Fe) , OM: 腐植 , PRC: リン酸吸着量 , U: 残さ

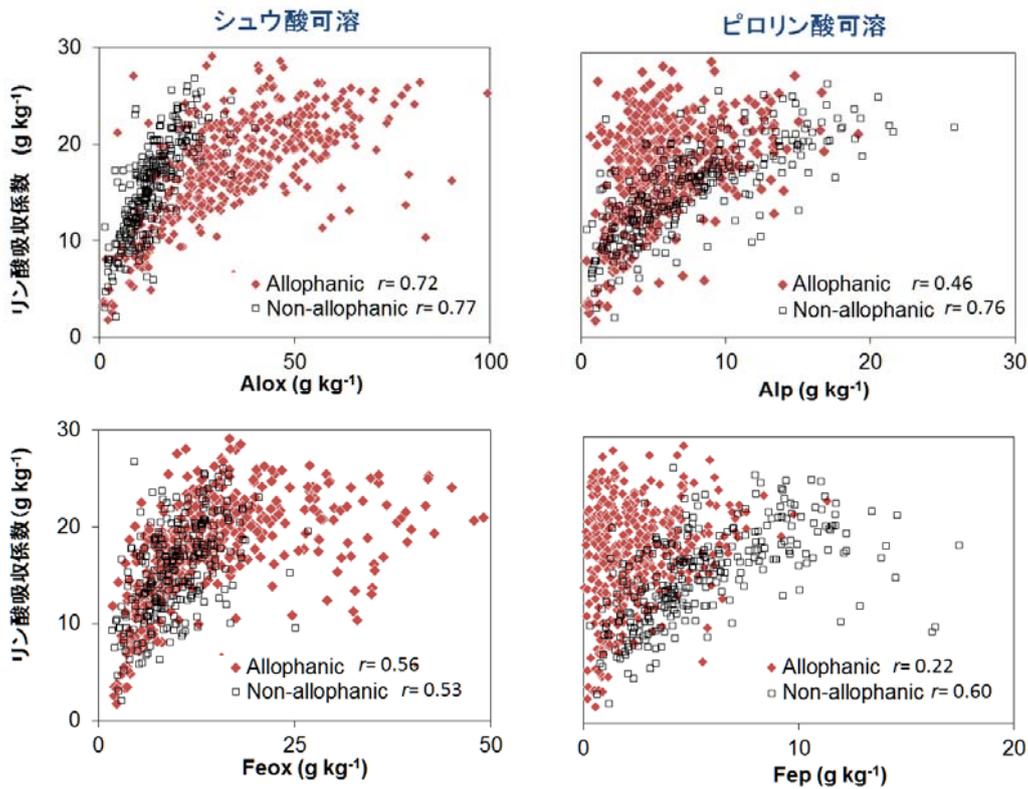


図 2-2 アロフェン質（赤）および非アロフェン質（白）黒ボク土のリン吸着（リン酸吸収係数）に対するシュウ酸可溶性 Al・Fe (Alox, Feox), ピロリン酸可溶 Al・Fe (Alp, Fep) の関係

2.3 結果および考察

アロフェン質黒ぼく土のリン酸吸着量は、酸性シュウ酸溶液で抽出された非晶質アルミニウム (Al_{ox} , $r = 0.72$) および鉄 (Fe_{ox} , $r = 0.56$) の濃度と相関が見られた (図 2-2, 表 2-1)。しかし、パス解析の結果は、 Al_{ox} がリン酸吸着量の増加に最も直接的に関わっている土壌特性であり ($Pc = 0.71$)、 Fe_{ox} ($Pc = 0.01$) との直接的な効果は認められなかった。非アロフェン質黒ぼく土についての単相関解析では、 Al_{ox} ($r = 0.77$)、 Fe_{ox} ($r = 0.60$) ならびにピロリン酸で抽出された腐植結合態のアルミニウム (Al_p , $r = 0.76$) と有機物含有量 ($r = 0.55$) が、それぞれリン酸吸着と高い相関を示すことが確認された。一方、パス解析では、 Al_p の増加がリン酸吸着量の増加に対して最も直接的に関係している土壌特性であり ($Pc = 0.60$)、有意な単相関を示した Al_{ox} が、リン酸吸着量に対して直接的に作用している要因であるとは認められなかった ($Pc = 0.24$)。非アロフェン質黒ぼく土の有機物含有量は、リン酸吸着量の増加に対しての直接的な効果が見られなかったが、 Al_p の増加を伴って間接的にリンの吸着量を増加させていることが分かった。このような有機物含有量の間接効果によるリン吸着量の増加は、アロフェン質黒ぼく土では見られなかった。

表 2-1 パス解析によるアロフェン質と非アロフェン質黒ボク土のリン吸着に及ぼす土壌特性の直接・間接効果。下線の数値がリン吸着量に及ぼす各土壌特性の直接効果 (相関係数)、それ以外は間接効果。各行の数値の総和が単相関係数 (r) となる。

Variable†	Al_{ox}	Fe_{ox}	Al_p	Fe_p	OM	r	R^2	$U‡$
Allophanic soils (n = 394)								
Al_{ox}	<u>0.71*</u>	0.01	-0.04	0.00	0.04	0.72*	0.57	0.66
Fe_{ox}	0.54	<u>0.01</u>	-0.02	0.00	0.03	0.56*		
Al_p	0.28	0.00	<u>-0.10</u>	0.18	0.10	0.46*		
Fe_p	-0.01	0.00	-0.08	<u>0.23*</u>	0.08	0.22*		
OM	0.24	0.00	-0.09	0.16	<u>0.12</u>	0.43*		
Non-allophanic soils (n = 277)								
Al_{ox}	<u>0.24*</u>	0.13	0.52	-0.08	-0.05	0.77*	0.65	0.59
Fe_{ox}	0.13	<u>0.25*</u>	0.28	-0.10	-0.02	0.53*		
Al_p	0.21	0.12	<u>0.60*</u>	-0.10	-0.07	0.76*		
Fe_p	0.14	0.18	0.45	<u>-0.14</u>	-0.05	0.60*		
OM	0.16	0.07	0.48	-0.08	<u>-0.08</u>	0.55*		

* Significant at $p < 0.05$.

† Al_{ox} and Fe_{ox} , oxalate-extractable Al and Fe, respectively; Al_p and Fe_p , pyrophosphate-extractable Al and Fe, respectively; OM, organic matter.

‡ Uncorrelated residue.

2.4 まとめ（黒ボク土のリン施肥に関する考察）

本研究では、同じ黒ボク土であってもアロフェン質と非アロフェン質ではリンの吸着に関係している土壌コロイドが異なることが、650地点の日本の黒ボク土データの統計解析によって網羅的に明らかにされた。本研究の結果は、リンの吸着メカニズムを明らかにするために、限定された数種類の黒ボク土試料を用いて実施された研究結果と一致した(伊藤ら, 2011)。このことは、日本各地に分布している畑地の黒ボク土について、それらの作物へのリン可給性が異なることを意味している。

リンの吸着挙動は、アロフェン質黒ボク土ではシュウ酸抽出のAI（非晶質AI）、非アロフェン質黒ボク土ではピロリン酸抽出のAI（腐植結合AI）と密接に関係していたことから、これらの抽出法を使い分けることによって、それぞれの黒ボク土のリン吸着がより適切に評価できると考えられる。リン吸着に関係している土壌コロイドが、アロフェン質と非アロフェン質黒ボク土で異なることは、それぞれの土壌に対してのリン施肥ならびに土壌管理の指針を提示する必要があることを示唆している。このように同じ黒ボク土であってもリンの可給性を評価する土壌診断法や、土壌施肥管理法を区別して評価・設定することによって、農地から流出するリンを制限し、下流域の富栄養化を抑制することに貢献できると考えられる。特に、環境保全に配慮した堆肥の施用法を確立するうえで、本研究の成果は重要な知見を提案するものである。本研究の成果は以下の論文等で発表されている。

- Hashimoto, Y., Kang, J., Matsuyama, N., and Saigusa, M. 2012. Path analysis of phosphorus retention capacity in allophanic and non-allophanic Andisols. *Soil Science Society of America Journal*. 76:441-448
- 橋本洋平, Jihoon Kang, 松山信彦, 三枝正彦. 2012. アロフェン質と非アロフェン質黒ボク土のリン酸吸着機構に直接的に関係している土壌化学性の特定: 全国 671 地点データのパス解析. *日本ペドロジー学会(首都大学 3/6)*

3 堆肥化過程における鶏ふん中のリンの溶解性と化学形態の同定

3.1. はじめに

現在リン酸の年間生産量は P_2O_5 換算で約 4000 万トンである。これは、約 1 億 4000 万トンのリン鉱石に相当する。しかし、過去のリン消費量の増加率に従って、リン肥料の消費が年間 3 % ずつ増加すると仮定すると、2060 年代には現在の約 5 倍に当たる年間消費量 2 億トンを超えることとなり、経済的に採掘できるリン鉱石はすべて枯渇すると考えられている (Matsubae-Yokoyama et al., 2009; Doolette and Smernik, 2011)。また、日本がリン資源の 100% を海外から輸入していることから、国内の農作物の価格は、海外の需給状況に左右されやすいことがいえる。前述したように、日本の土壌が高い吸着特性を有するため、作物へのリン供給を満たすために、長期的にリン肥料を大量に投入することが行われてきた。それに伴って、過剰なリンが農地に蓄積され、土壌流亡による湖沼の富栄養化や、作物への過剰障害を引き起こしている (村上ら, 2004)。リン資源の欠乏と農地のリン過剰の問題は、肥料の製造ならびに施用と密接に関係している。営農の経営費における肥料費の割合は、水田経営で 8%、畑作経営で 16% であり (農林水産省 2009)、リン酸の施用量と肥料単価を鑑みると、今後のリン原料の価格上昇によって、経営費に占める肥料費の割合はさらに増加することが予想される。

世界的なリン資源枯渇の問題を解決するための対策の一つとしては、家畜ふん堆肥等の国内の有機資源に豊富に含まれるリンを有効に利用し、肥料自給率を向上させ、海外資源の需給状況などによる影響を低減させることが挙げられる。堆肥の平均的なリン酸含有量は、牛ふん堆肥が 20600 mg kg^{-1} 、豚ふん堆肥が 41100 mg kg^{-1} 、鶏ふん堆肥が 51300 mg kg^{-1} であることが報告されている (塩崎, 2008)。本研究では、最もリン酸含有量の高く、潜在的なリン利用の可能性を有している鶏ふんに着目した。

これまで様々な家畜の堆肥製品に含まれるリンの可溶性や、逐次抽出法による溶出分画についての知見は報告されている。例えば、伊藤ら (2010) は様々な家畜に含まれているリンを逐次抽出法 (Frossard et al., 1994) で分画した結果をまとめている。この報告によると、採卵鶏ふん堆肥に含まれる易溶性リン酸 (作物に吸収されやすいリン) の割合は、全リン酸含有量の 30.7% であることが分かった。また、牛ふん堆肥の易溶性リン酸は約 70%、豚ふん堆肥の易溶性リン酸は約 50% であった。つまり、鶏ふん中のリン酸含有量は牛ふんや豚ふんと比較して高いにも関わらず、生物に利用されやすい形態のリンの割合が少ないことが明らかにされた。この理由の一つとしては、飼料中の植物由来のリンがフィチン酸の形態で存在しているため、フィターゼ等の消化酵素を持たない鶏などの単胃動物のふん中にはフィチン酸のような難溶態リンが多く含まれること

が挙げられる。したがって、鶏ふん中の難溶性リンを植物が利用できるようにするためには、堆肥化の過程で生物可給性の形態に変化させる必要があり、将来的なリンの有効活用のための方向性としては、既往の堆肥化プロセスの改良、ならびに新しい堆肥化システムを構築することが課題として挙げられる。そのためには、鶏ふん中や、堆肥化の過程におけるリンの化学形態の変化の時期や変化量を解明することが重要であると考えられる。

研究の最終目標は、有機性廃棄物中の難溶性リンを、微生物の作用によって改変し、植物の利用度を高めたリン肥料として再資源化することである。この目標を達成するために、リンの含有量が多い有機性廃棄物（鶏ふん）を対象として、堆肥化過程のリンの化学形態を詳細に定性・定量して、リンの存在形態を明らかにすることを目的とした。

3.2 材料および方法

(1) 鶏ふん堆肥の採取

鶏ふん堆肥は、三重県の有限会社鈴鹿ポーターが所有しているウインドウレス（窓なし）鶏舎に隣接する密閉式縦型堆肥化装置内から、堆肥化過程 0 日目から 7 日目まで毎日採取した。これらの試料を - 80 で凍結したのち、凍結乾燥機で乾燥させ、めのう乳鉢を用いて微粉碎し分析に供した。

(2) 堆肥中に含まれる元素の分析

グラファイトブロックを用いた分解法(Kovar and Pierzynski, 2009)により、堆肥中の元素を定量した。乾燥させた試料 $0.100 \pm 0.005\text{g}$ ($n=3$) をテフロン容器に秤量した。ドラフト内でテフロン容器に過酸化水素(12%)を 10mL 添加した後、静かに濃硫酸を 1mL 加えてよく混合した。10 分後、グラファイトブロックを 200 に加熱して溶液を蒸発させた。次に、濃硝酸を 10mL 加えて再び 200 で加熱して溶液を蒸発させた。蒸発後に 5mL の蒸留水と濃硝酸、1mL 濃塩酸を加えた。また上蓋を取り付けた後、捕集溶液として希硝酸(2%)を 5mL 加えて、グラファイトブロックで加熱分解(180 ,2 時間)を行った。分解後、一晩放冷させた。テフロン容器中の溶液をろ紙(5B,ADVANTEC)でろ過した。ろ液は 50mL メスフラスコで希釈し、ICP-OES によってリン、カルシウム、マグネシウム濃度を測定した。

(3) 逐次抽出法による無機態リンの分画

堆肥には、工業的に生産されたリン肥料と異なり、様々な形態のリン酸塩が含まれている。逐次抽出法(Frossard et al., 1994)では、有機物を各種抽出液で順次抽出することによって、有機物中のリンを、水溶性リン、易溶性リン(有機態)、酸化アルミニウム・酸化鉄に吸着したリン、難溶性リンの4種類に分画することが可能である。乾燥させた鶏ふん堆肥 $0.20 \pm 0.01\text{g}$ ($n=3$)を 50 mL 容ファルコンチューブに秤量し、純水 40 mL をチューブに注ぎ、ボルテックスで数分攪拌した後に恒温室(20)で 18 時間振とうを行った。振とう後、遠心分離(8,000 rpm, 5min)を行い、上澄み液をろ紙(5B, ADVANTEC)でろ過した。ろ液は分析まで低温室(4)で保存した。同様にして、易溶性リンは 0.5M 炭酸水素ナトリウム溶液、酸化アルミニウム・酸化鉄に吸着態のリンは 0.1M 水酸化ナトリウム溶液、アパタイト態リンは 1.0M 塩酸によって抽出した。いずれの段階についても、振とう後に遠心分離(8,000 rpm, 5min)を行い、採取したろ液を分析まで低温室で保存した。リン酸の定量にはモリブデンブルー法を用いた。

(4) 核磁気共鳴分光法による堆肥中のリンの化学形態の同定

核磁気共鳴分光法(^{31}P -NMR 法)は、スペクトルから得られる分子構造に関する情報量の多さから、有機・無機化合物の構造解析・同定に広く用いられている。今回は堆肥中のリンの化学形態を、 ^{31}P -NMR 法を用いて明らかにすることを目的とした。このための準備として、堆肥中に含まれるリンを抽出し、さらに堆肥中に含まれる常磁性のイオンなどを除外する必要がある。そこで Turner et al. (2004) の論文を参考にして、Ca ならびに Al の除去に有効である NaOH-EDTA 抽出液を用いて、鶏ふん堆肥中のリンの抽出を行った。

堆肥化 0, 1, 2, 4, 7 日目の鶏ふん堆肥 $1.00 \pm 0.005\text{g}$ ($n=2$)を 50mL 容ファルコンチューブに量りとり、NaOH-EDTA(0.50M NaOH+50mM EDTA)溶液を 20mL 加えた。ボルテックスでよく攪拌した後、恒温室(20)で 4 時間振とうを行った。振とう終了後、遠心分離(9,000rpm, 30min)を行い、上澄み液を $0.45 \mu\text{m}$ 孔のメンブレンフィルターでろ過し、50mL ファルコンチューブに保存した。全リン濃度に対する NaOH-EDTA 溶液によるリンの抽出率を求めるため、ろ液を 1mL 採取し、ICP-OES 用の 15mL 容ファルコンチューブに入れて、分析まで低温室で保存した。残りの溶液はチューブに薬包紙を被せて、12 時間以上凍結させ、その後凍結乾燥機を用いて乾燥させた。乾燥試料はめのう乳鉢を用いて粉碎し、50mL 容ファルコンチューブに常温保存した。

³¹P-NMR 分析は、三重大学機器分析センターのフーリエ変換核磁気共鳴分析装置(日本電子(株), EX-270 型, FT-NMR)を用いて行った。凍結乾燥後、めのう乳鉢で微粉碎した堆肥を 2.0mL 容エッペンチューブに 0.100 ± 0.005 g 秤量した。1.0M NaOH を 1.0mL 添加し、試料が完全に溶解するまでボルテックスを用いて攪拌した。試料が溶解したら、D₂O を 100 μL 採取し、エッペンチューブに加え、再びボルテックスで数分攪拌した。この溶液を NMR 試料管の底から 4cm の高さまで入れて分析に供した。長時間 1.0M NaOH に溶解させておくと、試料の分解が進行すると考えられたので、これらの作業を 1 サンプル測定する毎に行った。scan 回数は 500 に設定した。

(5) 粉末 X 線回折による堆肥中のリンの化学形態の同定

粉末 X 線回折は、粉末 X 線回折装置(リガク (株), 試料水平型多目的 X 線回折装置 Ultima IV)を用いて行った。堆肥化 0, 7 日目の試料を 550 °C で 18 時間灰化させ、めのう乳鉢で微粉碎した。試料をガラス試料板のくりぬき部分に載せ、ガラス試料板を利用し、試料を充填部にほぼ均等に分布させた。装置の測定条件は 40V, 40mA, scan 回数 1, scan スピード 0.500 s, 測定角度範囲は 2θ = 10 ~ 60 とした。比較試料として水酸アパタイトを測定した。

3.3 結果と考察

(1) 堆肥中に含まれる元素の分析

堆肥化 0 および 7 日目の鶏ふん堆肥に含まれるリン酸(P₀₄), カルシウム(Ca), マグネシウム(Mg), カリウム(K)の濃度を表 3-1 に示した。これらの平均値は、リン酸が 40600 mg kg⁻¹, カルシウムが 79700 mg kg⁻¹, マグネシウムが 5680 mg kg⁻¹, カリウムが 15950 mg kg⁻¹であった。平均的な採卵鶏乾燥ふんのリン酸含有量は 51900 mg kg⁻¹, カルシウムが 78400 mg kg⁻¹, マグネシウムが 8640 mg kg⁻¹, カリウムが 31000 mg kg⁻¹であった(塩崎, 2008)。これらの値と本研究で供試した鶏ふん堆肥の値はほぼ一致した。牛ふん堆肥と比較して豚および鶏ふん堆肥の全リン含有量が高い理由として、豚および鶏植物が牛に比べて、植物の主要なリン酸形態であるフィチン酸の利用効率が低いことや、リン酸カルシウムなどのリン酸化合物が飼料に添加されていることなどが挙げられる。また、リン酸カルシウムの添加に付随して、カルシウム含有量も多くなると考えられる。

表 3-1 堆肥化開始 0 および 7 日目の鶏ふん中の主要元素濃度

day	各元素濃度(mg kg ⁻¹)			
	PO ₄	Ca	Mg	K
0	41900 (±4230)	75300 (±6160)	5600 (±280)	15300 (±650)
7	39300 (±940)	84100 (±1670)	5760 (±100)	16600 (±200)
Average	40600 (±1840)	79700 (±3110)	5680 (±110)	15950 (±920)

()は標準偏差を表す。

(2) 形態別リン濃度の変化

図 3-1 は、水抽出態・炭酸水素ナトリウム抽出態・水酸化ナトリウム抽出態・塩酸抽出態の無機リン酸濃度を示している。堆肥化 0 日目の鶏ふん堆肥に含まれる無機リン酸の形態別割合は、水抽出態が 18.4%、炭酸水素ナトリウム抽出態が 8.9%、水酸化ナトリウム抽出態が 1.1%、塩酸抽出態が 13.8%であり、これらの割合が堆肥化の進行に伴って変化した。最も顕著な変化は、堆肥化 0 日目から 7 日目において、水抽出態リンの割合が 18.4%から 6.9%まで減少した点である。一方、塩酸抽出態リンは 13.8%から 18.7%に増加していた。また塩酸抽出態は 2 日目でリン酸濃度が最大値に達するが、3, 4 日目に減少し、日数が経過するにつれて再び 18.7%まで増加した。以上より、堆肥化進行において、水抽出されるような弱い結合状態のリンが、塩酸抽出態の難溶性リンに変化していくことが明らかとなった。

Kleinman et al.(2005) は採卵鶏ふん(生ふん)の全リン酸に占める水抽出態リン(振とう時の水：堆肥の混合比 1:200, 振とう時間 1 時間)の割合が 20%であることを報告した。これは、本研究の堆肥化 0 日目の全リン酸に占める水抽出態リンの値とほぼ一致している。一方、伊藤ら (2010)は密閉型発酵方式の採卵鶏ふん堆肥の全リン酸に占める水抽出態(振とう時の水：堆肥の混合比, 1:200, 振とう時間:16 時間)を 15.7%と報告しており、本研究の堆肥化 7 日目の全リン酸に占める水抽出態リンよりも高い数値を示していた。これらの結果は、堆肥化に用いた鶏ふんや堆肥化システムによって、最終的に生産される堆肥中のリン濃度や化学形態が変わることを示唆している。

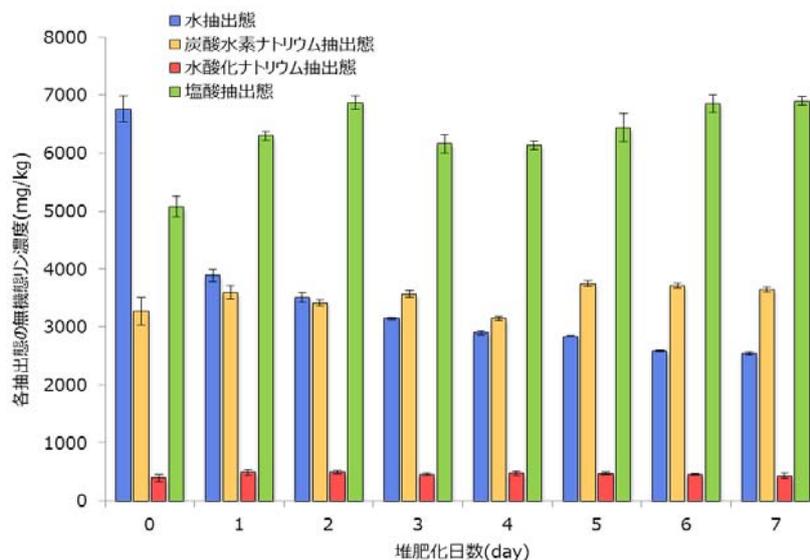


図 3-1 堆肥化過程におけるリン分画の変化

(3) ^{31}P -NMR 法による堆肥化過程のリン化学形態の分析

図 3-2 は、堆肥化 0, 1, 2, 4, 7 日目鶏ふん堆肥の ^{31}P -NMR スペクトルの一部を拡大し、オルトリン酸に相当するピーク (5.84 ppm) を示している。オルトリン酸の化学シフトの値は Turner et al. (2003) の論文を参考にした。0 日目のピークの高さを 100% とすると、1 日目は 90%、2 日目は 81%、4 日目は 65%、7 日目は 73% と減少する傾向が見られた。このことは、鶏ふん堆肥中のオルトリン酸が堆肥化の進行に伴って減少することを示しており、逐次抽出法の水抽出態の減少 (図 3-2) と同様の傾向がみられた。水酸アパタイトはアルカリ溶液に不溶であるため、NaOH-EDTA 溶液では抽出することが不可能であると考えられる。 ^{31}P -NMR 法による測定では、堆肥化の進行に伴って塩酸抽出態で増加したオルトリン酸は加味されず、水抽出態の減少を主に捉えていると考えられる。

図 3-3 は、堆肥化 0 日目の P-NMR スペクトルのうち、フィチンに相当するピークを抽出したものである。矢印で示したピークの面積の総和が、フィチンの濃度に相当することが知られている (Turner et al., 2003b)。分析の結果、堆肥化 0 日目ですでに堆肥中にフィチンが存在していることが確認された。フィチンはリン全体の 16-20% に相当するとみられる。このピーク強度は堆肥化の進行に伴って増加し、7 日目に堆肥中のリンの 25-28% を占めていることが分かった。

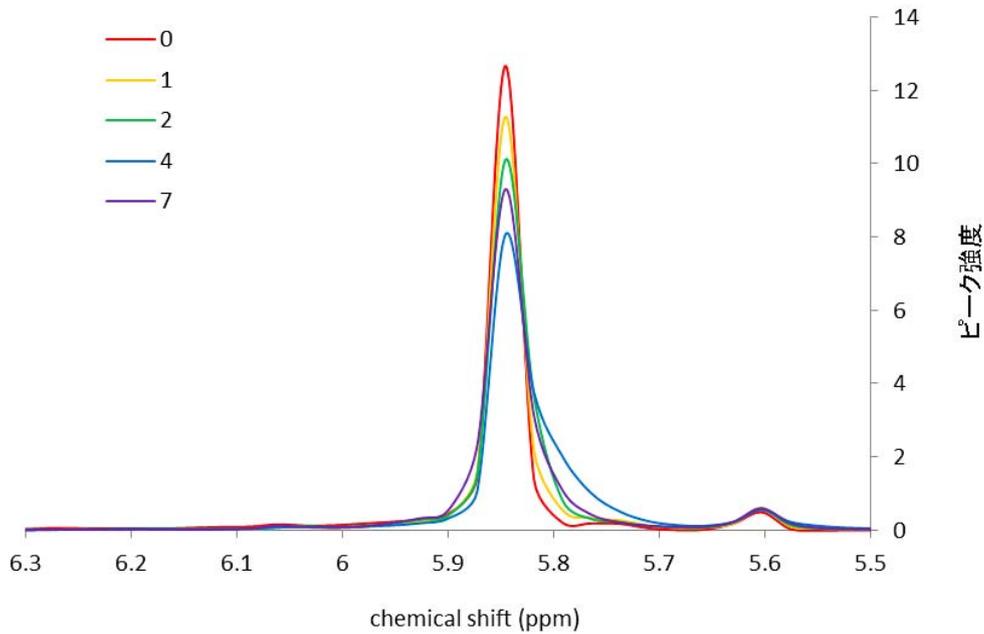


図 3-2 P-NMR 法による堆肥化過程のオルトリン酸ピークの変化（0日から7日目）

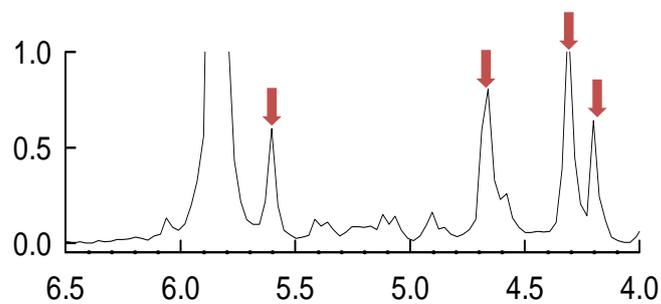


図 3-3 堆肥の P-NMR スペクトルにおけるフィチン酸に相当するピーク

(4) 粉末 X 線回折法と走査型電子顕微鏡による堆肥中のリンの化学形態の同定

標準物質である水酸アパタイトと、堆肥化 0,7 日目の堆肥を粉末 X 線回折によって分析した（図 3-4）。堆肥試料のスペクトルのピークが現れた回折角は、全体的に水酸アパタイトのピークと一致していたことから、水酸アパタイトが堆肥中の主要なリン形態

の一つであることが明らかになった。水酸アパタイトの XRD スペクトルに着目すると、 $2\theta = 30 \sim 35$ の間のピークに特徴づけられる。XRD による分析では、堆肥化 0, 7 日目のスペクトルの形状はほぼ同一であり、堆肥化の進行によって堆肥中の水酸アパタイトは変化しなかったことが示唆された。また、水酸アパタイトは堆肥化 0 日目(生ふん)の時点で存在することが明らかとなった。他のリン化合物のピークは、堆肥試料中に同定されなかった。堆肥試料には、水酸アパタイトの他にカルサイト(CaCO_3) の存在が確認された。

図 3-5 は走査型電子顕微鏡による、堆肥表面の元素分析結果を示している。このイメージでは、堆肥中のカルシウム、リンが同位置に分布していることが確認できることから、堆肥中のリンはカルシウムと結合した形態で存在していることがいえる。すなわち、前述の X 線回折ならびに NMR 分析の結果と併せて解釈すると、堆肥中のリンはアパタイト態ならびにフィチン酸カルシウムの形態で存在していることが特定された。一方、堆肥中のリンはアンモニウム(イオン)とマグネシウムと結合した MAP 態で存在するという報告もなされているが(Hunger et al., 2008; Baugé et al., 2013)、本研究では X 線回折ならびに走査型電子顕微鏡の結果から、MAP 態の存在は認められなかった。

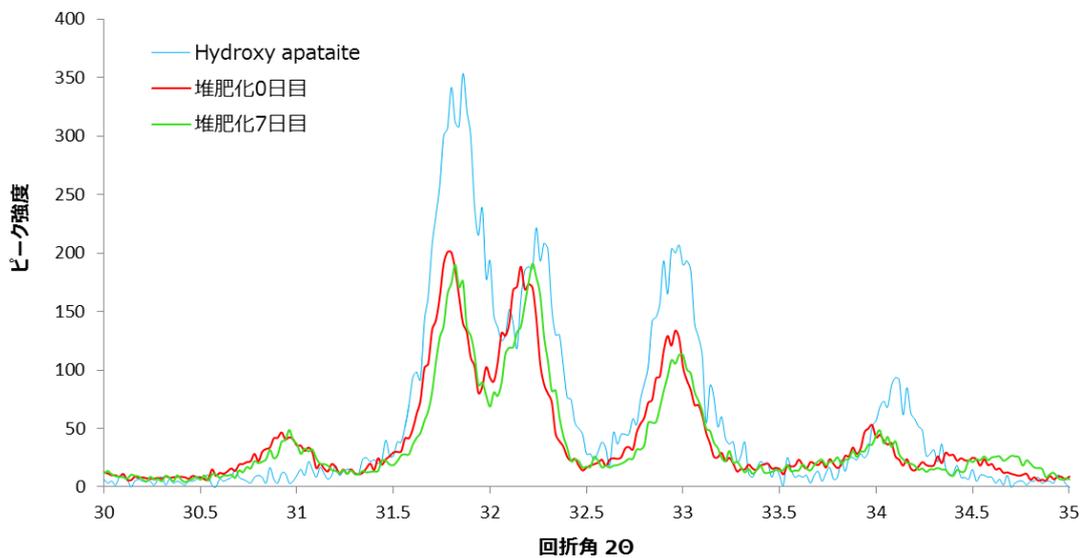


図 3-4 堆肥化 0 および 7 日目の堆肥の XRD スペクトル

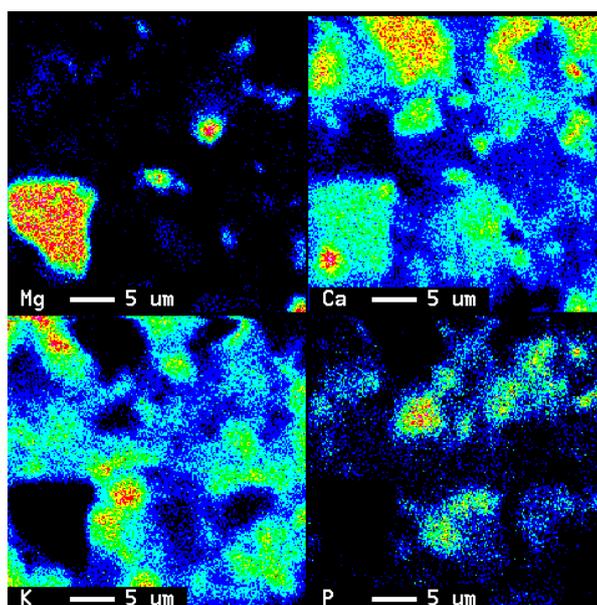


図 3-5 SEM-EDX (走査型電子顕微鏡) による堆肥表面の元素分布 (Mg, Ca, P)

3.4 まとめ

逐次抽出法と核磁気共鳴分光法の結果,堆肥化の進行に伴って堆肥中に含まれる水溶性リン酸濃度が低下することが確認された.逐次抽出法の炭酸水素ナトリウム抽出(2段階目,易溶性・有機態リン)の割合が,堆肥化の後期で増加していることから,有機態リンの割合は,堆肥化進行に従って増加することが示唆された.このような水抽出可能な形態のような弱い結合状態のリンが,堆肥化の進行に伴って塩酸で抽出されるような難溶態のリンに形態変化していくことが示された.具体的なリン形態としては,フィチン酸などのリン酸モノエステルは堆肥化の過程でほとんど変化しないことが示された.これらの結果から,堆肥化進行に伴って増加する難溶態のリンは,フィチン酸ならびに水酸アパタイトのようなカルシウム結合態の無機化合物である可能性が高いことが示唆された.粉末X線回折による分析では,堆肥化0,7日目のスペクトルの形状はほぼ同一であり,堆肥化の進行によって堆肥中の水酸アパタイトは変化しなかったことが示唆された.また水酸アパタイトの前駆体であるリン酸オクタカルシウム(OCP)は存在しないことも示唆された.鶏ふんを堆肥化することによって,生物可給性の低いリン化学形態の割合が増加することが明らかになったことから,堆肥化過程において難溶態のリンの生成量を少なくするようなプロセスの構築,すなわちフィチン態ならびに水酸アパタイトを可溶化する酵素を放出する微生物を担持したプロセスの構築が有効であると示唆された.この知見に基づき,次章の研究を計画した.なお本研究結果は,以下

の学会で報告された。

- 吉川廉, 橋本洋平, 堂本晶子, 村上圭一, 苅田修一. 2011. 鶏ふん堆肥に含まれるリンの化学形態の解明. 日本土壤肥料学会中部支部例会(金沢市 11/10)
- 橋本洋平, 吉川廉, 山口紀子, 北島義典, 村上圭一. 2011. XANES 法による堆肥発酵過程におけるリン化学形態の解明. 第 28 回 PF シンポジウム(つくば市, 7/14-15)

4 鶏ふん堆肥からのフィチン酸分解菌の分離と堆肥化への利用

4.1 はじめに

肥料としての家畜ふん中のリンを作物に供給されやすくするために、鶏など単胃動物の飼料にフィターゼを添加し、飼料中に多く含まれるフィチン態リンを無機化(全リンの50%~80%)させる技術が開発されている。これによって、無機リン酸塩を飼料に添加しなくても、豚や家畜の成長生産を確保し、リン排泄量も30%~50%削減されることが報告されている(Maguire et al., 2004; Toor et al., 2005)。日本でも、家畜や豚の飼料にフィターゼを添加することで家畜や豚のリン栄養が改善されると同時に、リンの排出量を削減されることが確認されている(武政ら 1994, 斎藤ら 1998)。

日本においては、微生物由来のフィターゼが、1996年に試料添加物として許可されており、飼料へのフィターゼ添加技術は今後さらに普及すると予想される。しかし、フィチン酸のリン酸基にはCa Mg ZnやCuなどのミネラルが結合しやすく(斎藤ら 1998)、飼料中に添加されるミネラルの量が多ければ、高レベルのフィターゼを添加したとしてもフィチン態リン酸の分解が不十分になると考えられる(Maenz et al., 1999)。それゆえフィターゼを添加すれば、飼料中のフィチン態リンの一部が分解されるものの、なお多くのフィチン態リンがふん中にそのまま排泄され結果的にその無機リン酸の含量が著しく低下するため、作物の養分源としての価値が大きく低下すると考えられる。そこで、ふん尿堆肥の肥料価値を確保するために排泄されたフィチン態リンの無機化を堆肥化過程で促進させることが重要になると考えられる。

過去の研究では、家畜(牛、豚、鶏)ふん堆肥にフィターゼを添加することによって、無機態リンを10%程度増加できることが明らかになっている(那桂玲, 2004)。しかし、現状ではフィターゼのコストが高く、排泄されたふんへのフィターゼの添加は現実的でない判断される。薬品のフィターゼを使用する際に生じる費用の問題を回避するために、代替策として、フィターゼを放出する微生物を利用するという方法が有効であると考えられる。先行研究としては、*Aspergillus*由来のフィターゼを添加した飼料で飼養した豚の排泄直後のふんを室温で40日間放置したところ、排泄されたフィターゼの活性は、0日目の1070U/kgから40日目には45U/kgと直線的に減衰し、この間に排泄されたフィチン態リンの約半分が分解されることが確認されている(那桂玲, 2004)。このように、強力なフィチン酸分解菌が分離できれば、堆肥に直接接種して、堆肥中に残っているフィチン態リンを分解させることが可能である。この考え方に基づいて、分離したフィターゼ生成微生物を濃厚飼料に接種して、フィチン態リンを分解される研究が

実施されている(Hirabayashi et al., 1998)。一方、堆肥化過程においてフィターゼ生成微生物を利用する研究はほとんど報告されていない。堆肥中のフィチン堆肥リンが更に分解できれば、作物に利用可能な無機リン含量が増加し、堆肥の肥料価値を確保できると考えられる。

フィチン酸($C_6H_{18}O_{24}P_6$)は、myo - イノシトール六リン酸エステル(myo-insitol hexaphosphate)とも呼ばれている。この物質はカルシウム - マグネシウム混合塩として広く植物体に存在し、特に穀物類や豆類ではフィチン態リンは全リンの50%~80%を占めている(van Hartingsveldt et al., 1993)。また、イノシトール六リン酸以外の一リン酸(IP1)、二リン酸(IP2)、三リン酸(IP3)、五リン酸(IP5)等のエステル型も土壌や動物に存在している。フィターゼ(Phytase, myo-inositol-hexakisphosphatase など)は、フィチン酸を加水分解する酵素である。フィターゼは小麦や米ぬかなどの高等植物に存在し、種子中の糊粉粒に結合している。発芽についてフィターゼ活性が上昇し、フィチン酸からリン酸が遊離して生長に利用される。また、多くの微生物もフィターゼを持つが、その中でも最もフィターゼ活性が強いものが分離株 *Aspergillus ficuum* NRRL3135 と報告されている(van Hartingsveldt et al., 1993)。

前章の研究結果によって、堆肥化過程で水溶性のリンが減少し、難溶性のアパタイト態ならびにフィチン態のリンに変化することが確認されている。本章では、フィターゼ生成細菌を鶏ふん堆肥から単離し、鶏ふん発酵過程において菌株を添加することによって、鶏ふん中のリンの溶解性と細菌叢がどのように変化するかを堆肥化過程で追跡した結果を報告する。

4.2 材料および方法

(1) 鶏ふん堆肥中からのフィターゼ生産細菌の単離

(a) 鶏ふん堆肥の採取方法

三重県の有限会社鈴鹿ポーターが所有しているウィンドウレス(窓なし)鶏舎に隣接する密閉式縦型堆肥化装置内から、発酵中の鶏ふん堆肥を採取した。採取した鶏ふん堆肥は保冷剤入りのクーラーボックス内に保存し、低温状態で実験室に運搬した。この鶏ふん堆肥をフィターゼ生産細菌の単離に用いた。

(b) 鶏ふん堆肥中のフィターゼ分泌細菌の単離

フィチンを唯一の栄養源とする一般細菌培地を用いて、以下の方法により鶏ふん堆肥中からフィターゼ生産菌を単離した。まず、鶏ふん堆肥 $10\text{g} \pm 0.2\text{g}$ ($n=1$) を 90mL の生理食塩水で希釈し 10 分間振とうした。振とう後、上澄み液 $100\ \mu\text{L}$ を $900\ \mu\text{L}$ 生理食塩水で希釈し、 10^{-6} 倍に希釈したものと 10^{-9} 倍に希釈したものを寒天培地にスクリーニングした。寒天培地として、フィチン酸カルシウムを含む寒天培地を調製し使用した (Gulati et al., 2007)。植菌した培地を 37 のインキュベーター内で 2 日間培養し、フィチン酸カルシウムを溶解したコロニーの周りに白いハローを形成した細菌を選択した。

(c) PCR 法による目的遺伝子の増幅

PCR 法は PCR Thermal Cycler PERSONAL (TAKARA) と PCR キット KODFX(東洋紡)を使用した。PCR チューブに $2 \times$ PCR 緩衝液(東洋紡)、2mM dNTP 混合物(東洋紡)、フォワードプライマー、リバースプライマー、鋳型 DNA、KODFX(東洋紡)を適量ずつ加え、全量 $50\ \mu\text{L}$ となるように超純水を入れ混合した。PCR の反応は 94 で 2 分間反応後、98 で 10 秒間、54 で 30 秒間、68 で 1 分 30 秒間を 1 サイクルとして 30 サイクル反応させ、目的の DNA 断片を増幅させた。

(d) アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動に DNA 電気泳動装置 Mupid ミニゲル電気泳動槽(アドバンス)を使用した。アガロース S(ニッポンジーン)とトリス酢酸 EDTA 緩衝液(TAE 緩衝液)を用いて、臭化エチジウム($1\ \mu\text{g}/\text{mL}$)を含む 0.8%アガロースゲルを作成した。TAE 緩衝液を満たした電気泳動装置に作成したアガロースゲルをセットした後、試料 DNA と $6 \times$ ローディング緩衝液を混合したものをアガロースゲルにセットし、100V で電気泳動を行った(Sambrook and Russell, 2001)。DNA サイズマーカーとして OneSTEP Marker 6 (/ Sty digest)(ニッポンジーン)を使用した。電気泳動後、紫外線照射により DNA バンドの確認と、BIOINS 鶏ふん堆肥は、TRUMENT Print Graph (アトー株式会社)によるゲルの写真撮影を行った。

(e) DNA 塩基配列の決定

0.2mL 容チューブに 1 μ M フォワードプライマー(27F)または 1 μ M リバースプライマー(1492R) ,5 \times シークエンス反応緩衝液 ,シークエンスプレミックス(Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits)(アプライド バイオシステムズ)を適量ずつ加え , 全量 10 μ L となるように超純水を入れ混合した . シークエンスの反応はサーマルサイクラーを用いて , 95 で 1 分間反応後 , 95 で 10 秒間 , 50 で 5 秒間 , 60 で 4 分間を 1 サイクルとして 30 サイクル反応させた . 反応後 , 反応液に 3M 酢酸ナトリウム(pH4.6) 3 μ L を加え , 99.5%エタノール 62.5 μ L と超純水 14.5 μ L と混合し , 15 分間室温で静置した . その後 , 15,000rpm で 15 分間遠心分離して上清を取り除いた . 沈殿に 70%冷エタノールを加え洗浄し , 上清を確実に取り除き , 沈殿を減圧乾燥させた . 塩基配列の決定には , DNA シークエンサー(ABI PRISM3100 Genetic Analyzer)を用いた .

(2) 鶏ふん堆肥の実験装置および発酵方法

(a) 鶏ふん堆肥発酵実験装置

堆肥の発酵槽として縦 16cm 横 24cm 高さ 12cm (内寸) の発砲スチロールを用いた . 発砲スチロールの底に通気口を作り外部から空気を送るシステムの発酵装置を作成した . 実験装置の写真を図 4-1 示した . 以下の装置ならびに堆肥化条件は , 繰り返し予備実験の結果決定された . 鶏ふんが反応槽に占める体積割合が 90% (4150cm³) になるように充填した . また , 予備実験では毎分 2L の通気を行ったが , 鶏ふんの乾燥が過剰に進むことや , 堆肥温度が低下することによって堆肥化が進行しないという問題が確認された . したがって , 本実験では通気を行わず , 毎日堆肥を十分に攪拌することによって , この問題に対応することにした . 堆肥温度の計測は , 発酵装置のほぼ中央 (縦 10cm , 横 12cm , 高さ 8cm) の位置で行った .

(b) フィターゼ生産細菌の培養方法ならびに添加方法

単離したフィターゼ生産菌を 0.5 \times LB 培地で 1L 培養した . 0.5 \times LB 培地組成は , 1% のポリペプトンを 0.5g (w/v) , 0.5%乾燥酵母エキス 0.25g (w/v) , 1%塩化ナトリウム 0.5g (w/v) , pH7.0 である . 培養する際 , 37 , 180rpm の条件下で 18 時間培養した . 培養後 , 遠心分離機を用いて集菌し , 50mL の蒸留水で希釈してスプレーで堆肥に接種し (細菌数 6.4 \times 10⁸cfu/g) , その後均一になるようによく混合した .

(c) 鶏ふんの堆肥化条件

三重県の有限会社鈴鹿ポーターが所有しているウィンドウレス(窓なし)鶏舎より採取した鶏ふんを発酵に用いた。堆肥発酵の区分として、細菌添加区と対照区を設けた。鶏ふん重量(kg)は対照区 2kg, 細菌添加区 1.5kg とし、鶏ふん堆肥発酵装置の中で発酵させた。細菌添加区について、発酵開始 1 日前に鶏ふん 500g を高温加圧処理(オートクレーブ処理, 温度 121 15min)で滅菌し, 0.5×LB 液体培地で 1L 培養した細菌を混合した。常温で 1 日放置し, 発酵装置内の細菌添加区に添加した。堆肥化は 30 日間で行い, 55 のインキュベーター内で保温した。堆肥の温度は Thermo Recorder TR-71U (T & D 社製)で測定し, 鶏ふんを発酵過程の温度をデータロガーでモニターした。好気条件で発酵を進行させるために 1 日 1 回鶏ふん堆肥を攪拌し酸素供給を行った。また, 堆肥の水分含有を保つため, 鶏ふん堆肥の重量の減少によって水分を補充した。

実験開始前に鶏ふん堆肥をオートクレーブすることの目的は, 鶏ふん中の菌相を均一にし, フィターゼ放出菌がリン溶解に及ぼす効果を確認するためである。予備実験の段階で, オートクレーブ処理の有無によって, 鶏ふんの水抽出態リン酸濃度を測定した(図 4-2)。オートクレーブ処理をしなかった鶏糞の水溶性リン濃度は 4625 mg kg^{-1} であった。一方オートクレーブ処理をした鶏ふんのリン酸濃度は, 4440 mg kg^{-1} であった。その差は約 185 mg kg^{-1} であり優位差はなかった。したがって, オートクレーブによる菌相の均一化の処理は, 水溶性リン濃度に影響しないことが判明したことから, フィターゼ放出菌の効果を適正に評価するための本処理が適切であるといえる。



図 4-1 堆肥化装置の写真

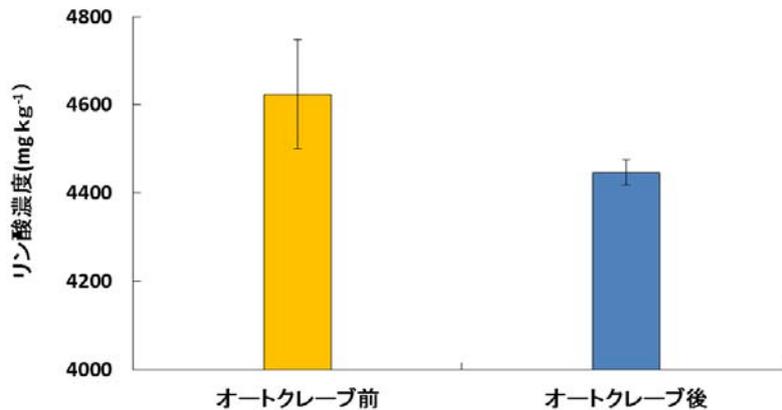


図 4-2 オートクレーブ処理の前後の鶏ふん中の水溶性リン濃度

(3) 鶏ふん堆肥の分析

(a) 水抽出態リン酸の分画

サンプリングの精度を高め均一な試料を得るため、試験区からランダムに 10 か所サンプリングをし、縮分した 20g の試料について各種計測を行った。試料の採取は、堆肥化日数 0 日目～7 日目、11 日目、17 日目、20 日目、30 日目に実施した（各 12 時ころ）。採取した 10g については含水率を測定した（105℃、24 時間）。一部の試料は -80 の冷凍庫 (SANYO) で保存し、その後菌相変化を最小限にするため、試料を凍結乾燥した。凍結乾燥後に粉碎された鶏ふん堆肥 $0.20 \pm 0.01\text{g}$ ($n=3$) を 50mL 容ファルコンチューブに秤量し、純粋 40mL をチューブに注ぎ、ボルテックスで数分攪拌したのちに恒温室 (20) で 18 時間振とうを行った。振とう後、遠心分離機 (8,000rpm, 5min) を行い、上澄み液をろ紙 (5B, ADVANTEC) で濾過した。濾液は分析を行うまで - 低温室 (4) で保存した。

溶媒抽出した溶液中のリンは、モリブデンブルー法により無機態リン酸の定量を行った。調製した 2.5M 硫酸 100mL にモリブデン酸アンモニウム液 (40g/L) 30mL を加えて混合した後、アスコルビン酸液 60mL と酒石酸アンチモニルカリウム液 10mL を加えて混合発色溶液を作成した。50mL のファルコンチューブに抽出液 1mL 混合発色溶液 1mL を加えて 1 時間放置し、発色させた。蒸留水 8mL を発色させた抽出液に供し希釈した。分光光度計を用いて波長 710nm の吸光度を測定した。検量線をリン酸濃度 0ppm、1ppm、2ppm、4ppm、5ppm から作成し、抽出液に含まれるリン酸の濃度を求めた。

(b) 鶏ふん堆肥の細菌分析実験

堆肥中の微生物 DNA の精製には QIAampDNAstool (QIAGEN) を使用して溶菌した。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法による目的遺伝子の増幅は次の条件で実施した。10×PCR 緩衝液(TAKARA), dNTP 混合物(TAKARA), GC357F, 517R, rTaq を加え PCR の反応は, 95 で 30 秒間, 65 で 30 秒間, 72 で 2 分間を 10 サイクル, 95 で 30 秒間, 60 で 30 秒間, 72 で 2 分間を 10 サイクル, 95 で 30 秒間, 55 で 30 秒間, 72 で 2 分間を 10 サイクル最後に 72 で 5 秒間 1 サイクル反応させ目的の DNA 断片を増幅させた。(図 4-1)

堆肥化過程における細菌叢の変化を追跡することを目的として, DGGE 法(denaturing gel gradient electrophoresis, 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法)を実施した。表 4-1 に従い, 変性剤 20%のゲル溶液を作成した。尿素 4.2g をビーカーに測りとり, ホルムアミド 4mL を入れて尿素が溶解するまで混合した。40%アクリルアミドを 7.5mL と 50×TAE 1mL を加えてさらによく混ぜた。それぞれのゲル溶液に TEMED を 50 μL 加えた。濃度 80%のゲル溶液には, D - CODE DYE 50 μL を加えて染色した。

表 4-1 変性剤溶液の調製

ゲル溶液	50mL	
変性剤 (%)	20%	80%
ホルムアミド	4mL	16mL
尿素	4.2g	16.8g
ゲル濃度 (%)	6%	16%
40%アクリルアミド	7.5mL	20mL
50×TAE	1mL	1mL

電気泳動層に 7L の蒸留水と 50×TAE 140mL を加え, 温度コントロールモジュールを利用して 60 まで温め, 保温した。ゲル板を組み立てた。90 μL の 10%APS をそれぞれのゲル溶液に加え攪拌した後, 15mL をシリンジで吸い上げた。ゲルの入ったシリンジをモデル 475 デリバリーシステムに装着し, 均一な速度でゲル溶液が落下するようにカムをゆっくり回した。予めセットしたガラスにゲルを注入し, ガラスサンドイッチの段差上端まで溶液を入れた。コームガスケットをゆっくりと差し込み, ガラスサンドイッチのガラスの段差とコームガスケットが密着するように取り付け, ゲルが固まるまで 1 時

間放置した。ガラスサンドイッチをコアの両側に取り付け、60 で保温した電気泳動層に入れた。コームガスをゆっくりと抜いた。DNA サンプル 10 μ L、6 \times Loading Buffer 10 μ L を 1.5mL チューブに入れてピペティングにより混合し、作成したゲルのウェルに DNA サンプルを入れた。電圧 200V で 6 時間電気泳動をした。この間電気泳動層の温度を 60 に保った。

4.3 結果および考察

(1) フィターゼ活性を有する細菌の単離と塩基配列の同定

堆肥化過程にある鶏ふん堆肥中より、フィチン酸分解活性をもつ細菌のスクリーニングを行った。鶏ふん堆肥よりフィターゼ活性をもつ細菌を PSM 培地で分離した。培地に白いハローを形成し、生育の旺盛だった細菌を単離した(図 4-3)。1 次および 2 次スクリーニングにより、7 細菌種を分離することができた。これらの細菌種について、16S rRNA 遺伝子配列による簡易同定を行ったところ、*Sphingomonas* 属、*Burkholderia* 属、*Bacillus* 属 3 種、*Microbacterium* 属、*Gordonia* 属に属することがわかった。これらのうち、*Sphingomonas* 属と *Burkholderia* 属の菌種は、不溶性フィチンに対し高い可溶化活性を示し、なおかつ 60 の高温でも、良好な生育を示した。単離したフィチン酸分解菌の DNA 塩基配列を同定し、BLAST 解析をした結果、*Burkholderia gladioli* BSR3 (99%) と相同性があった。以後、堆肥に添加するフィチン酸分解菌を *Burkholderia* sp.0M114 とした(図 4-5)。また、決定した 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を図 4-4 に示した。*Burkholderia* は、 β -プロテオバクター科に属する好気性細菌である。この細菌による培地上のフィチンの溶解は、フィターゼ酵素の放出による作用機構が考えられる。同様に、乳酸などの有機酸放出によってフィチン酸が溶解された可能性も考えられる。どちらの作用機構が卓越して起こっているのかは確認できていないが、*Burkholderia* はフィチンを溶解する機能を有する細菌であることが確認された。

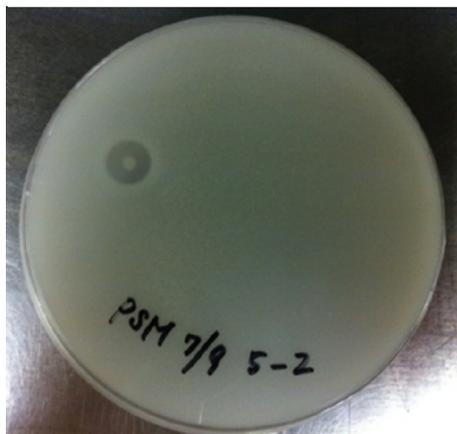


図 4-3 鶏ふん堆肥からフィターゼ活性をもつ細菌を培地で分離した際の写真

CTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACAGCAGCACGGGTGCT
 TGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGG
 GGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATACGATCCACGGATGAAAGCGGGGA
 CCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAG
 GCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGA
 GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAG
 CCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCC
 GGAAAGAAATCCTGAGGGCTAATATCCTTCGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACC
 GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTAC
 TGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTAAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACC
 TGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCACGT
 GTAGCAGTAAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATAACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGG
 CCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
 TCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATTCCTTAGTAACGTAGCTAA
 CGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACG
 GGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACC
 TACCCTTGACATGGTCGGAATCCTAGAGAGATCTGGGAGTGCTCGAAAAGAGAACCGATAC
 ACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGCTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC
 GAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACA
 AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACA
 CGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTCGCCAACCCGCGAGGGGGGAGCTAATCCCAGA
 AAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAG
 TAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCGTC
 ACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGACGGTCACC
 ACGGTAGGATTCATGACTGGGGTGAAGT

図 4-4 単離したフィチン酸分解菌の DNA 塩基配列

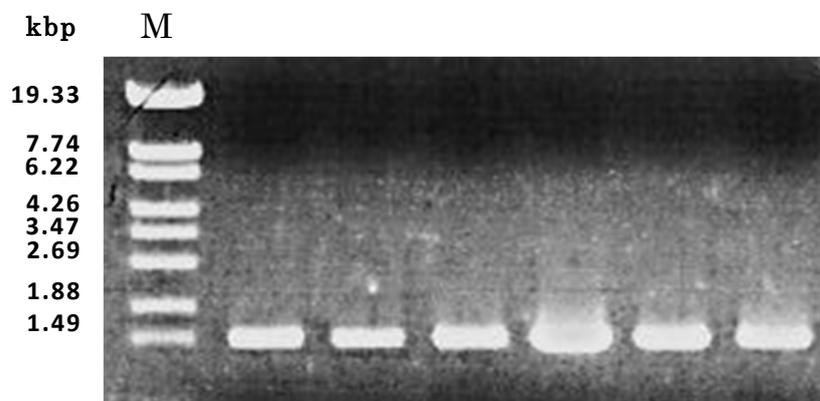


図 4-5 16S rRNA の増幅 . M : マーカー , : 増幅した遺伝子 sp.0M114 , ~ については と同じ塩基配列をもつ細菌であることが判明した .

(2) 鶏ふん堆肥の堆肥化

単離・培養に成功した *Burkholderia* sp.0M114 の細菌を添加して、堆肥化実験を実施した。コントロール区（細菌添加なし）ならびに細菌添加区の鶏ふん堆肥の発酵過程の様子を図 4-6 および 7 に示した。鶏ふん発酵 0 日目は羽毛や鶏ふんの団粒が多く存在していた。発酵経過 17 日目は羽毛が分解されているのが写真から読み取れた。発酵経過 30 日目は鶏の羽毛や鶏ふんの団粒が見られず、完全に分解されていた。堆肥の発酵は色や臭いに加えて、30 日目の堆肥を用いたコマツナ発芽試験（藤原ら 1996）により、発芽障害が見られなかったことから腐熟度を判断し、発酵経過 30 日目で堆肥が完成したと判断した。

鶏ふん堆肥の含水率は、採取試料を 105°C で 24 時間乾燥させた後の質量を計測することで測定した。試験区からランダムに 10 か所サンプリングをし、縮分した 10g の試料について、含水率を求めた。コントロールにおける含水率は 50% ~ 60% であったため、鶏ふん堆肥発酵期間中の水分の供給は十分であったと判断した。一方、細菌添加区においては、17 日目の含水率(図 4-8)が 42% と低く、この間の水分供給が十分でなかった。原因としては、細菌添加区の実験装置がインキュベーターの発熱装置に近かったため水分の蒸発が促進されたものと考えられた。また、水分の供給不足によって細菌の生育が良好でなかった可能性がある。細菌の生育状況については後の DGGE 法で確認した。



図 4-6 堆肥化直前の鶏ふんの状況（左：コントロール区，右：細菌添加区）



図 4-7 堆肥化完了直後（30 日目）の鶏ふんの状況（左：コントロール区，右：細菌添加区）

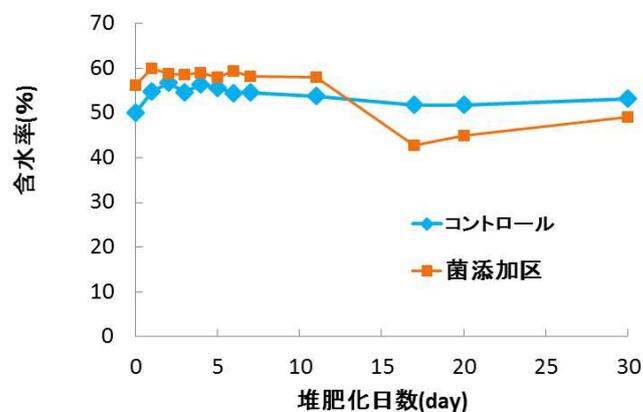


図 4-8 堆肥化過程の鶏ふん中の含水率

(3)堆肥中の水溶性リン酸濃度の推移

図 4-9 に無機態リンの中でも最も生物可給性の高い水溶性(水抽出態)のリン酸濃度を示す。堆肥化の進行に伴い、コントロール区(細菌添加なし)では、鶏ふん中の水溶性リンが微増し、堆肥化終了の 30 日目には、約 3600 mg kg^{-1} に変化した。細菌添加区における水抽出態リン酸濃度は、堆肥化開始の時点で 3640 mg kg^{-1} であり、ここから堆肥化 2 日目にかけて 4210 mg kg^{-1} まで増加した。しかし、堆肥化 2 日目から 3 日目にかけて 3690 mg kg^{-1} にまで減少し、その差は約 525 mg kg^{-1} であった。その後、堆肥化経過日数によるリン酸濃度に大きな変化は見られず、堆肥が完成した堆肥化 30 日目のリン酸濃度は 3390 mg kg^{-1} であり、堆肥化 0 日目の 3640 mg kg^{-1} とほとんど変わらなかった。

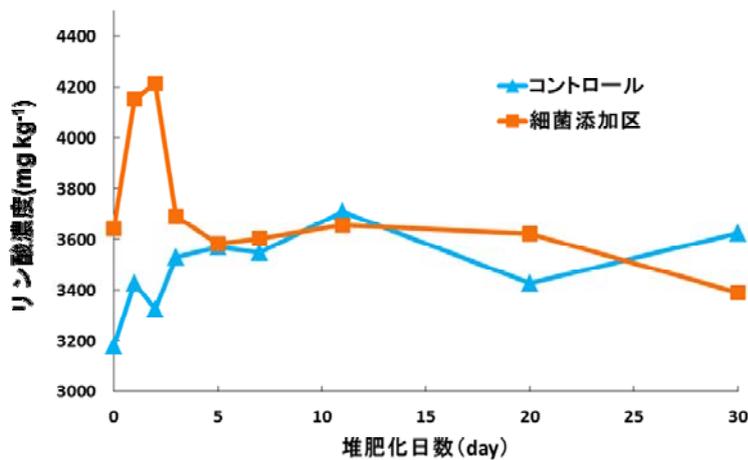


図 4-9 堆肥化過程における鶏ふんの水溶性リン酸濃度

(4) PCR - DGGE 法を用いた堆肥化過程における細菌群の遷移

堆肥化過程における細菌叢の変化を追跡することを目的として PCR - DGGE 法を、それぞれの堆肥化期間から採取した鶏ふんに適用した。堆肥化過程の鶏ふん中の細菌の遷移をバンドに示した。図 4-10 は、堆肥化 0 日目～7 日目、11 日目、17 日目、20 日目、30 日目の鶏ふん堆肥中に存在する細菌を溶菌して、その DNA を鋳型として PCR 法によって増幅させたバンドである。図 4-10 におけるコントロール区鶏ふん（細菌添加なし）～と細菌添加鶏ふん～の増幅させた 16S rRNA を用いて DGGE 法を行った。

図 4-11 (左) は、DGGE 法によって得られた堆肥化過程のコントロール区（細菌添加なし）の鶏ふん中の細菌の遷移を示したものである。DGGE 法によって、堆肥中に棲息していた細菌の遺伝子が個別のバンドとして検出されており、バンドの強度の増減は、それぞれのバンドに対応する細菌の消長を端的に表している。その中でも棲息期間が長い、または濃いバンドが出ている 4 つの細菌群に着目した(図 4-11)。コントロール区の鶏ふんの DGGE 画像について、特に棲息期間が長かったのは a の細菌群であった。細菌群 a のバンドを堆肥化 0 日目から堆肥化 11 日目まで検出した。堆肥化 3 日目に出現した細菌群 b の濃いバンドは、堆肥化 3 日目から堆肥化 11 日目まで検出された。細菌群 c については、堆肥化 0 日目から出現し、濃いバンドが堆肥化 8 日目まで検出できていたが、堆肥化 11 日目にはその存在を確認できなかったことから、この細菌群は堆肥化 8 日目と堆肥化 11 日目の間で消滅したと考えられた。細菌群 c についても、堆肥化 4 日目に出現し、濃いバンドが堆肥化 8 日まで検出できたが、堆肥化 11 日以降は確認することができなかった。

図 4-11 (右) に、細菌添加処理した堆肥化過程の鶏ふんの DGGE のバンドを示した。無処理鶏ふんの DGGE バンドと比較して細菌群の種類は多く、特にバンドが濃く棲息期間が長かった a' ~ h' の細菌群に着目した(図 4-11 右)。細菌添加した鶏ふんの DGGE において、最も棲息期間が長かったのは b' の細菌群であった。この細菌群 b' は、無処理鶏ふんの細菌群 a と同じ細菌群であると考えられた。また、細菌群 d', f', g' についても、それぞれ無処理鶏ふんの DGGE に出現していた細菌群 b, c, d と同じ細菌群であると考えられた。細菌添加区に限定的に見られたのは、a', c' および e' の細菌群であった。細菌群 a' は堆肥化 0 日目から薄いバンドが検出でき、堆肥化 0 日目から堆肥化 8 日目にかけて徐々に濃いバンドが検出できた。細菌群 c' のバンドは、堆肥化 0 日目から堆肥化 3 日目まで検出できたことから、添加したフィターゼ生産細菌が検知された可能性が高いことが示唆された。しかし、仮に細菌群 c' が添加細菌である sp.0M114 である場合、細菌群の棲息期間の短さ、またバンドの薄さから細菌の定着、ならびに生育条件の最適化が十分でなかったことを意味する。細菌群 e' は、堆肥化 0 日目から堆肥化 8 日目まで比較的長い期間棲息し、堆肥化 3 日目から堆肥化 5 日目にかけて最も濃いバンドを示した。この細菌群 e' もまた、堆肥化 0 日目から棲息し、コントロール区の鶏ふんのバンドに見られなかったことから、添加したフィターゼ生産細菌である可能性が高い。これらのバンドの消長から判断し、堆肥化過程で添加したフィターゼ生産細菌の増殖と定着が適切に行われたことが推察された。

4.4 まとめ

本研究では、堆肥化過程の鶏ふんから、フィチン酸分解菌「*Burkholderia* sp.0M114」を単離し培養することに成功した。DGGE 法による菌相解析の結果から、この細菌は、一部が堆肥化過程で消滅せずに堆肥化に寄与していることが確認された。これらの結果は、本研究で同定されたフィチン酸分解菌が、堆肥化の過程で増殖可能であり、実際の堆肥化システムにおいて適用可能であることを示唆している。この細菌を鶏ふんに添加し堆肥化実験を実施し、細菌添加なし(コントロール区)の場合と水溶性リンの違いを比較した。細菌添加処理した鶏ふんについて、堆肥化 0 日目から 2 日目にかけての水溶性リンは 4210 mg kg^{-1} に増加した。しかし、堆肥化 30 日目のリン酸濃度 (3390 mg kg^{-1}) は、堆肥化 0 日目 (約 3640 mg kg^{-1}) とほぼ変わらないリン酸濃度であった。また、コントロール区では、堆肥化終了の 30 日目の鶏ふん中の水溶性リンが約 3600 mg kg^{-1} であり、この値は細菌添加区よりもやや高い。鶏ふんへのフィターゼ分解細菌の添加は、

水溶性リンの濃度を堆肥化の初期過程で増加させるが、堆肥化終了時までその効果が持続しないことが示唆された。しかし、当該細菌は鶏ふん中のリンを溶解する機能を有していることが確認されているため、堆肥化過程における細菌の添加時期を検討することによって、この問題は解決できる可能性があると考えられた（次章）。

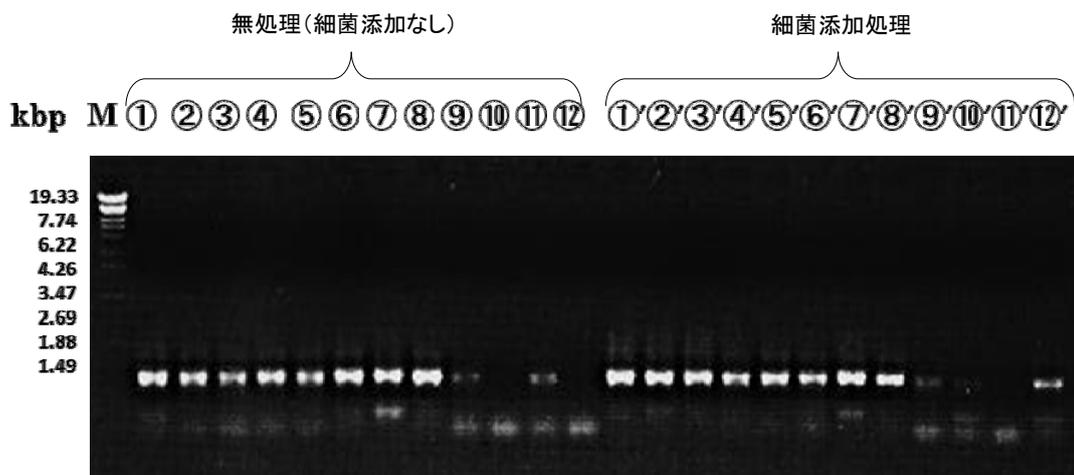


図 4-10 rTaq による目的遺伝子の増幅

M: マーカー, ~ コントロール区 (細菌添加なし) 堆肥化 0 日~8 日目, コントロール区 堆肥化 11 日目, コントロール区 堆肥化 17 日目, コントロール区 堆肥化 20 日目, コントロール区堆肥化 30 日目.

' ~ ' は, 細菌添加処理区の菌相で, 堆肥化日数の番号は, コントロール区と同様

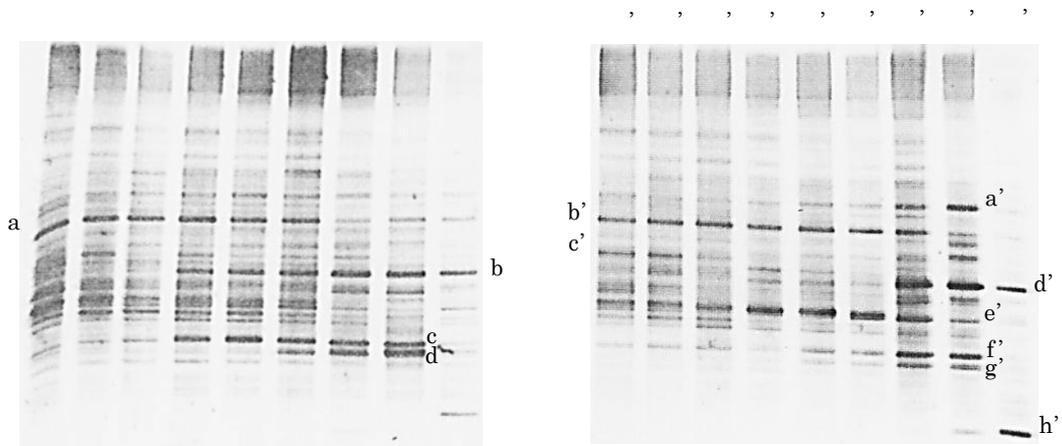


図 4-11 DGGE 法による堆肥化期間中の菌相変化

左図： 「コントロール区（細菌添加なし）」 ～ コントロール 堆肥化 0 日～8 日目， コントロール堆肥化 11 日目， コントロール堆肥化 17 日目， コントロール 堆肥化 20 日目， コントロール 堆肥化 30 日目

右図： 「細菌添加処理」 ～ の期間は無処理区と同じ

5 有用細菌の添加時期と回数の違いによる鶏ふん中のリン酸濃度への影響検討

5.1 はじめに（前章の実験条件の課題）

前章では、堆肥化 0 日目にフィターゼ生産細菌を添加して、堆肥化終了時点において鶏ふん中の水溶性リン酸濃度が高い堆肥の完成を目指した。しかし、堆肥化 0 日目から堆肥化 2 日目にかけてリン酸濃度が増加したものの、堆肥化 30 日目のリン酸濃度(3390 mg kg⁻¹)は堆肥化 0 日目(約 3640 mg kg⁻¹) とほぼ変わらない結果となった。そこで、堆肥化過程でフィターゼ生産細菌の添加時期を検討することによって、堆肥化完了時点の鶏ふん中の水溶性リン酸濃度を増加できるという着想に至った。

本研究では、前回の堆肥化の結果を受けて、添加するフィターゼ生産細菌の添加時期、添加回数に着目した。前回の堆肥化では、堆肥化 0 日目にフィターゼ生産細菌を添加したところ、堆肥化 3 日目にかけて鶏ふん中の水溶性リン酸濃度が上昇するという結果が得られた(図 4-1)。そこで、今回はフィターゼ生産細菌の添加を堆肥化 16 日目に行い、フィチン態リン酸の分解と水溶性リン酸の増加を試みた。また、前回の鶏ふん堆肥化では、堆肥化 0 日目から堆肥化 3 日目にかけてリン酸濃度が上昇したものの、堆肥化 4 日目以降リン酸濃度は低下した。この結果から、鶏ふんの堆肥化過程でフィターゼ生産細菌を断続的に添加することで、増加した分の水溶性リン酸濃度を保持することができるかを試みた。

5.2 実験方法および材料

(1) 鶏ふんの堆肥化条件

堆肥化条件は、コントロール区(細菌添加なし)、試薬のフィターゼ添加区、細菌 1 回添加区、細菌 3 回添加区の 4 つを設けた。試験区の数はいずれも各 1 である。堆肥化システムの温度、通気条件ならびに用いた鶏ふん重量は前章と同じに設定した。堆肥化開始から 16 日目に、細菌 1 回添加区と細菌 3 回添加区にそれぞれ培養した細菌を添加して、鶏ふんと混合した。フィターゼ添加区には、堆肥化開始から 16 日目に鶏ふん重量の 0.1% に相当する 2.0g のフィターゼ試薬を少量ずつ均一に添加して、十分に混合した。細菌 3 回添加区については、鶏ふん発酵経過 19 日目と 21 日目にも細菌を添加した。細菌の添加方法(調製等)は前章と同様である。

(2)堆肥化期間中の鶏ふん試料の採取

サンプリングの精度を高めて均一な試料を得るため、試験区からランダムに10か所サンプリングをし、縮分した20gの試料について各種計測を行った。試料の採取は、堆肥化日数1, 10, 15~23, 27, 30日目に実施した(各12時ころ)。採取した10gについては含水率を測定した(105°C, 24時間)。一部の試料は-80の冷凍庫(SANYO)で保存し、その後菌相変化を最小限にするため、試料を凍結乾燥した(前章と同様)。

(3)鶏ふん堆肥の水溶性リンの分析

前章と同様に採取した鶏ふんに蒸留水を添加し、溶出したリンをモリブデンブルー法により定量することによって、水溶性リンとして定めた(前章と同様)。

5.3 結果および考察

(1)鶏ふん堆肥の含水率と温度

堆肥化期間中の鶏ふん堆肥の含水率を図5-1に示す。堆肥化開始直後の含水率が、43-55%と処理区によってばらつきがみられた。この要因としては、鶏ふんが団粒を形成しており、サンプリングが適切にできなかった可能性が挙げられる。堆肥化12日目の細菌添加区の含水率が38.2%と低かった。堆肥化開始後15日目に、すべての区の含水率が45%付近まで低下したため、灌水したことにより、それ以降の鶏ふんの含水率が上昇した。いずれの試験区の含水率も、堆肥化17日目以降は概ね50%を維持しており、前章の堆肥化実験と一致していることから、堆肥の水分条件に関しては、前章の実験を再現できているといえる。堆肥化期間中の鶏ふんの発酵温度は、含水率と同様に堆肥化開始直後ではばらつきが見られたのは、鶏ふんの初期水分状態と関係があると考えられた。堆肥温度が16日の灌水後に上昇がみられ、堆肥化20日から終了時にかけて60°Cを維持していた(図5-2)。

(2)堆肥化に伴って変化する水抽出態リンの挙動

図5-3は「コントロール区」(無処理)と、試薬のフィターゼを堆肥化16日目に添加した「フィターゼ添加区」の水抽出態リン酸濃度を示している。フィターゼ添加区における堆肥化16日目のリン酸濃度は 3729 mg kg^{-1} であり、堆肥化17日目にかけて 4772 mg kg^{-1} まで 1043 mg kg^{-1} 増加した。また、堆肥化17日目のリン酸濃度が 3748 mg kg^{-1} であったコントロール区と比較しても、その差は 1023 mg kg^{-1} で、添加した試薬のフィタ

ーゼは、鶏ふん中の水抽出態のリン酸を大きく増加したことが確認された。しかし、堆肥化 17 日目の最大ピークを計測した後は、リン酸濃度を保つことができずに減少の一途をたどった。

同じく図 5-3 に、堆肥化 16 日目にフィターゼ生産細菌を添加した「細菌 1 回添加区」の水抽出態リン酸の濃度を示している。堆肥化 16 日目の細菌添加後リン酸濃度は徐々に増加し、堆肥化 20 日目のリン酸濃度が、 4953 mg kg^{-1} で最大であった。細菌添加前の堆肥化 15 日目との差は 683 mg kg^{-1} 、コントロール区の堆肥化 21 日目との差は 1290 mg kg^{-1} であり、大幅にリン酸濃度を高めることができた。また、フィターゼ添加区の最大リン酸濃度が、堆肥化 17 日目に 4772 mg kg^{-1} であったのに対して、細菌 1 回添加区の堆肥化 20 日目の最大リン酸濃度は 4953 mg kg^{-1} であったことから、堆肥中にフィターゼ生産細菌を添加することで、フィターゼ添加よりも効果があることがわかった。しかし、フィターゼ添加区と同様に最大リン酸濃度のピークを迎えた後、リン酸濃度は減少し、堆肥化 12 日目のリン酸濃度は 4218 mg kg^{-1} まで減少した。堆肥化 21 日目以降は、平均 4355 mg kg^{-1} のリン酸濃度を保持し続けた。

堆肥化 16 日目、19 日目、21 日目に細菌を添加した「細菌 3 回添加区」の水溶性リン酸濃度を図 5-3 に示した。堆肥化 16 日目に細菌を添加した後、徐々に水溶性リン酸の濃度は高くなり、堆肥化 19 日目でリン酸濃度 4847 mg kg^{-1} のピークを迎えた。その後、堆肥化 20 日目に一度濃度が 4442 mg kg^{-1} と減少したが、堆肥化 21 日目に 2 回目のピークを迎え、リン酸濃度が 5156 mg kg^{-1} まで上昇した。堆肥化 23 日以降は、平均約 4814 mg kg^{-1} で水溶性リン酸濃度が推移し、他の処理区よりも堆肥化完了時点での水溶性リン酸濃度が高い結果となった。

5.4 まとめ

各処理区の 30 日目の水溶性リン酸濃度を比較すると(図 5-3 拡大)、コントロール区 < フィターゼ区 = 細菌 1 回添加区 < 細菌 3 回添加区の順に、値が有意に増加していることが確認された。前章(4 章)の堆肥化実験と今回のデータを比較してみると、細菌添加後の水溶性リン酸の挙動が似ている傾向が見られた。特に細菌を添加した後、約 2 日間かけてリン酸が上昇し、一旦水溶性リン酸の濃度が最大に達すると、その後は減少するという傾向が顕著に類似していた。細菌一回添加区ならびにフィターゼ添加区では、それぞれ添加後一定期間が経過すると、水溶性リン酸濃度が低下するという共通の現象が観察された。この傾向は、細菌が放出するフィターゼ、ならびに試薬のフィターゼによっ

て、鶏ふん中のフィチン態リン酸から遊離したオルトリン酸が、カルシウム・アルミニウムなど別の元素と結合して不溶化した可能性が高いと考えられた。逐次抽出法の結果、細菌3回添加区における塩抽出態のリン酸濃度を見てみると、確かに堆肥化0日目(35 mg kg⁻¹)と比較して堆肥化30日目(270 mg kg⁻¹)の塩抽出態リン酸に増加が見られた。堆肥化終了時に塩酸抽出分のリンが5%程度増加していることが分かり、フィターゼによって溶解したリンの一部は、水溶態以外の形態に変化したと推察された。鶏ふんの堆肥化によって、水抽出されるような弱い結合状態のリンが、塩酸抽出態の難溶態リンに形態変化する現象は、現場の堆肥化システムから採取された試料の分析結果でも確認されている(3章)。生物可給性の高い水溶性リン酸をより多く含む堆肥を創造するには、フィターゼによって加水分解されたリン酸を堆肥化の進行中で他のリン酸に形態変化をさせずに保持することが、今後の研究課題となる。

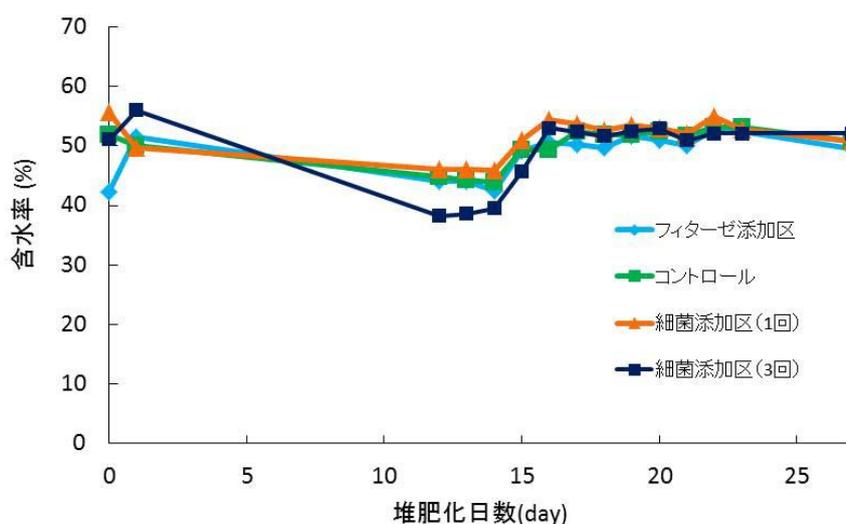


図 5-1 堆肥化過程の鶏ふん中の含水率

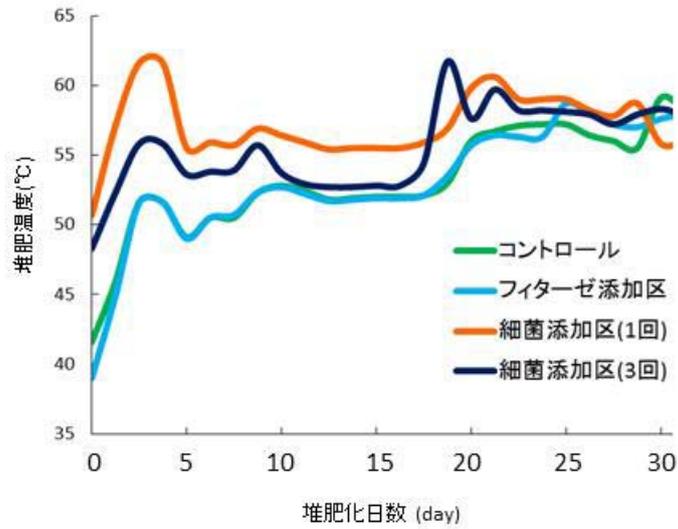


図 5-2 堆肥化過程の鶏ふんの温度

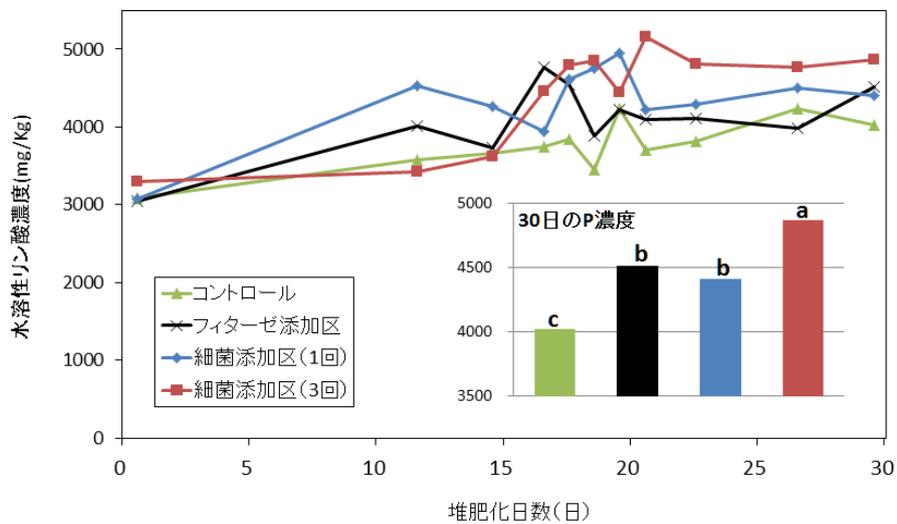


図 5-3 堆肥化過程の鶏ふん中の水溶性リン濃度．図中の棒グラフは 30 日目の水溶性リン濃度を示している．異なるアルファベットは有意水準 $p=0.05$ で各平均値に差があることを示す (Tukey HSD 法, $n=3$) .

6. 総括

有機性廃棄物に含まれるリンの有効利用の開発において、省資源化や低コスト化などが重要な課題となっている。本研究では、家畜ふん堆肥中に高濃度に含まれるリンに着目し、堆肥資源としてリンを有効利用する着想に基づいて実験を実施した。具体的には、鶏ふんならびにその堆肥中に含まれるリンの化学状態を明らかにし、堆肥化過程で微生物酵素の作用を援用し、作物に吸収されやすいリン形態に改変するという手法を用いた。先行研究によって、鶏ふん中に含まれるリンは、その多くがフィチン酸として存在していることが指摘されている(Toor et al., 2005)。その理由は、鶏に給餌する植物性飼料に含まれるリンの50%~70%は、フィチン態リンとして存在しているためである(例、ダイズ粕)。鶏などの単胃家畜は、フィターゼ分解酵素を持たないため、飼料中のフィチン酸は消化されずにふんとして排泄される。鶏ふん堆肥中のフィチン態リンを堆肥化過程で分解し、水溶性のリンの割合を多く含む堆肥が創出できれば、有機性廃棄物の有効利用を促進するための一助となるだけでなく、土壌のリン過剰による水系などの環境汚染の解決にもつながる。リン肥料は土壌に施用しても、植物にリン源として吸収利用されずに、土壌中のアルミニウムや鉄鉱物に吸着されて蓄積される。土壌中の有機態リンの50%を占めていることが報告されている(Turner et al., 2003a)。特に日本の畑地の約50%の面積を占める黒ボク土では、リンの吸着作用が著しく、リンが過剰に蓄積されている。黒ボク土の中でも、アロフェンと含むものと含まないものでは、リンの吸着特性が異なるため、それぞれについてリンの施肥管理を設定する必要があるにも関わらず、これまで取り組まれていない。

研究の最終目標は、有機性廃棄物中の難溶性リンを、微生物の作用によって改変し、植物の利用度を高めたリン肥料として再資源化することである。この目標を達成するために、現行の鶏ふん堆肥化装置から採取した鶏ふん中のリンの溶解性や化学状態を明らかにし、その知見に基づき、単離・培養した有用細菌を添加した堆肥化実験を実施した。これに並行して、全国650か所の黒ボク土のデータを用いて、アロフェン質および非アロフェン質黒ボク土のリン吸着特性を明らかにし、リン肥料施用に関する土壌管理・評価について検討した。研究結果として得られた知見は、次のとおりである。

- (1) 全国650地点の土壌データの統計解析によって、リンの吸着挙動は、アロフェン質黒ボク土ではシュウ酸抽出のAI(非晶質AI)、非アロフェン質黒ボク土ではピロリン酸抽出のAI(腐植結合AI)と密接に関係していたことが分かった。したがって、

これらの土壌リン酸抽出法を，双方の黒ボク土で使い分けることによって，それぞれの黒ボク土のリン吸着がより適切に評価できると考えられる．このように同じ黒ボク土であってもリンの可給性を評価する土壌診断法や，土壌施肥管理法を区別して評価・設定することの必要性が示唆された．

- (2) 堆肥化の進行に伴って，鶏ふん中に含まれる水溶性リン酸濃度が低下することが確認された．水抽出可能な形態のような弱い結合状態のリンが，堆肥化の進行に伴って塩酸で抽出される難溶態のリンに形態変化していくことが示された．具体的なリン形態としては，堆肥化進行に伴って増加する難溶態のリンは，フィチン酸ならびに水酸アパタイトのようなカルシウム結合態の無機化合物である可能性が高いことが示唆された．これらの結果は，堆肥化過程において難溶態のリンの生成量を少なくするようなプロセスの構築，すなわちフィチン態ならびに水酸アパタイトを可溶化する酵素を放出する微生物を担持したプロセスの構築が有効であると示唆された．
- (3) 堆肥化の過程でフィチン態リン酸を分解するフィターゼ生産細菌を，鶏ふん堆肥から分離し，その種は *Burkholderia* sp. であることを同定した．当該細菌は，堆肥化の高温条件で培養可能であることを確認した．
- (4) 鶏ふんの堆肥化過程で単離培養したフィターゼ生産細菌を添加した結果，添加後2日間の水溶性リン酸濃度が上昇することが確認された．そこで，当該細菌を堆肥化過程で3回添加したところ，当該細菌を添加しないコントロール区（4020 mg/kg）ならびに試薬のフィターゼ添加区（4515mg/kg）よりも，堆肥化終了時の水溶性リン酸濃度は，堆肥化終了時に 4870mg/kg まで有意に増加した．

本研究では，堆肥化の過程で鶏ふん中のリンの溶解性と化学状態がどのように変化するのかについて解明した点は，これまでにない新規な点である．この成果によって，フィチン態リンが堆肥化過程で増加している可能性が示唆され，堆肥化の高温環境でフィチンおよび有機酸を放出する有用細菌を単離・培養する必要性を見出すことができた．フィチン態リンを無機化する作用を有する細菌を単離し，簡易的な堆肥化装置を用いて鶏ふんの堆肥化過程で接種した．鶏ふん堆肥中に作物可給性の高い水溶性リン酸を増加させるためには，堆肥化の過程で当該菌種を複数回に分けて接種することが有効であることが確認された．

本研究によって，フィチン分解機能を有する細菌を利用した鶏ふんの堆肥化は，堆肥中のリン溶解性を増加させるうえで有効であることが，実験室レベルで明らかになった．

本研究は、堆肥化過程の鶏ふん中のリンの化学形態・溶解性の解明、ならびに有用細菌による鶏ふん中のリン溶解作用を検討し、基礎的な知見を得ることに重点を置き研究を進めた。そのため、今後現場レベルで本研究の有用細菌を添加した堆肥化システムの構築には、堆肥化時間、温度、通気など、堆肥化における各種環境条件も検討する必要がある。現場の堆肥化機構を再現できる実験系を用いた実験が今後の課題として挙げられる。加えて、堆肥化の期間中、有用細菌のフィターゼ活性をコントロールすることも重要であると考えられる。細菌が放出するフィターゼによって、一旦加水分解されたオルトリン酸を、堆肥化過程でそのまま維持し、できるだけ他の難溶態（フィチンやアパタイト態）に変化させないという工夫も、今後の課題として重要な検討事項である。今後同様の実験を実施し、有用細菌による鶏ふん中のリンの溶解効果について再現性の確認を行う。

本研究で単離培養に成功した当該細菌は、おそらくほとんどの鶏ふん堆肥化装置で生育している普遍的な種であると考えられ、類似の菌種も存在していると推察される。本研究の菌株を利用、あるいはそれぞれの堆肥化装置の鶏ふんから単離された菌株を利用することによって、本研究で示された微生物酵素を利用した堆肥化の手法は、実用技術になりうると期待される。また、この手法は他の有機性廃棄物にも応用可能であると考えられる。そのためには、本研究で示されているように、堆肥化をする試料（有機性廃棄物）中のリンの化学状態を詳細に分析し、そのリン形態を分解することができる酵素を生産する細菌類（特に高温耐性を有する）を単離・培養するという手順をとることが合理的である。

謝辞

本研究全般のご指導を頂きました村上圭一博士（三重県）に深謝いたします。鶏ふん試料の提供は、近藤博信氏ならびに近藤拓弥氏（有限会社鈴鹿ポーター）のご協力を頂きました。本研究成果の一部は、吉川廉氏ならびに大場マリア氏の貢献によりなされた。ここに記して感謝申し上げます。

7 参考文献

- Baugé, S.M.Y., Lavkulich, L.M., Schreier, H.E., 2013. Serpentine affected soils and the formation of magnesium phosphates (struvite). *Canadian Journal of Soil Science* 93, 161-172.
- Blakemore, L.C., Searle, P.L., Daly, B.K., 1987. *Methods for Chemical Analysis of Soils*. New Zealand Soil Bureau Scientific Report 80.
- Doolette, A.L., Smernik, R.J., 2011. Soil Organic Phosphorus Speciation Using Spectroscopic Techniques. In: Bünemann, E.K., Oberson, A., Frossard, E. (Eds.). *Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling*. Springer, pp. 3-36.
- Doyle, D.J., Parsons, A.S., 2002. Struvite formation, control and recovery. *Water Res.* 36, 3925-3940.
- Frossard, E., Tekely, P., Grimal, J.Y., 1994. Characterization of phosphate species in urban sewage sludges by high-resolution solid-state ^{31}P NMR. *European Journal of Soil Science* 45, 403-408.
- Gulati, H., Chadha, B., Saini, H., 2007. Production of feed enzymes (phytase and plant cell wall hydrolyzing enzymes) by *Mucor indicus* MTCC 6333: purification and characterization of phytase. *Folia Microbiol* 52, 491-497.
- Hirabayashi, M., Matsui, T., Yano, H., Nakajima, T., 1998. Fermentation of soybean meal with *Aspergillus usarii* reduces phosphorus excretion in chicks. *Poultry Science* 77, 552-556.
- Hiradate, S., Uchida, N., 2004. Effects of soil organic matter on pH-dependent phosphate sorption by soils. *Soil Science and Plant Nutrition* 50, 665-675.
- Hopkins, B.G., 1996. Estimation of soil organic matter by weight Loss-On-Ignition. In: Magdoff, F.R., Tabatabai, M.A., Hanlon, J., E.A. (Eds.). *Soil organic matter: Analysis and interpretation*. Special publication, No. 46. Soil Sci. Soc. Am. Madison, WI., pp. 21-32.
- Hunger, S., Sims, J.T., Sparks, D.L., 2008. Evidence for Struvite in Poultry Litter: Effect of Storage and Drying. *J. Environ. Qual.* 37, 1617-1625.
- Kang, J., Hesterberg, D., Osmond, D.L., 2009. Soil Organic Matter Effects on Phosphorus Sorption: A Path Analysis. *Soil Sci Soc Am J* 73, 360-366.
- Kovar, J.L., Pierzynski, G.M., 2009. *Methods of Phosphorus Analysis for Soils, Sediments, Residuals, and Waters*.
- Maenz, D.D., Engele-Schaan, C.M., Newkirk, R.W., Classen, H.L., 1999. The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase-susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola

- meal. *Animal Feed Science and Technology* 81, 177-192.
- Maguire, R.O., Sims, J.T., Saylor, W.W., Turner, B.L., Angel, R., Applegate, T.J., 2004. Influence of Phytase Addition to Poultry Diets on Phosphorus Forms and Solubility in Litters and Amended Soils. *J. Environ. Qual.* 33, 2306-2316.
- Matsubae-Yokoyama, K., Kubo, H., Nakajima, K., Nagasaka, T., 2009. A Material Flow Analysis of Phosphorus in Japan. *Journal of Industrial Ecology* 13, 687-705.
- Saigusa, M., Matsuyama, N., Honna, T., Abe, T., 1991. Chemistry and fertility of acid Andisols with special reference to subsoil acidity. In: Wright, R.J., Baligar, V.C. (Eds.). *Plant-Soil Interactions at Low pH*. Kluwer Academic Publisher, pp. 73-80.
- Schoumans, O.F., 2000. Determination of the degree of phosphate saturation in non-calcareous soils. In: Pierzynski, G.M. (Ed.). *Methods of phosphorus analysis for soils, sediments, residuals, and waters*. Bull. No. 369. Southern Extension Research Activity-Information Exchange Group (SERA-IEG-17), Kansas State University, Manhattan, KS., pp. 31-34.
- Seiter, J.M., Staats-Borda, K.E., Ginder-Vogel, M., Sparks, D.L., 2008. XANES spectroscopic analysis of phosphorus speciation in alum-amended poultry litter. *J Environ Qual* 37, 477-485.
- Takahashi, T., Nanzyo, M., Hiradate, S., 2007. Aluminum status of synthetic Al-humic substance complexes and their influence on plant root growth. *Soil Science & Plant Nutrition* 53, 115-124.
- Toor, G.S., Peak, J.D., Sims, J.T., 2005. Phosphorus Speciation in Broiler Litter and Turkey Manure Produced from Modified Diets. *J Environ Qual* 34, 687-697.
- Turner, B.L., 2004. Optimizing Phosphorus Characterization in Animal Manures by Solution Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Current address: Soil and Water Science Department, University of Florida, 106 Newell Hall, P.O. Box 110510, Gainesville, FL 32611. *J. Environ. Qual.* 33, 757-766.
- Turner, B.L., Cade-Menun, B.J., Westermann, D.T., 2003a. Organic Phosphorus Composition and Potential Bioavailability in Semi-Arid Arable Soils of the Western United States. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 67, 1168-1179.
- Turner, B.L., Mahieu, N., Condron, L.M., 2003b. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectral assignments of phosphorus compounds in soil NaOH-EDTA extracts. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 67, 497-510.
- van Hartingsveldt, W., van Zeijl, C.M.J., Harteveld, G.M., Gouka, R.J., Suykerbuyk, M.E.G., Luiten, R.G.M., van Paridon, P.A., Selden, G.C.M., Veenstra, A.E., van

- Gorcom, R.F.M., van den Hondel, C.A.M.J.J., 1993. Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (phyA) of *Aspergillus niger*. *Gene* 127, 87-94.
- Wada, K., Gunjigake, N., 1979. Active Aluminum and Iron and Phosphate Adsorption in Ando Soils. *Soil Science* 128, 331-336.
- Wada, K., Higashi, T., 1976. The categories of aluminum- and iron-humus complexes in Ando soils determined by selective dissolution. *J. Soil Sci.* 27, 357-368.
- Wada, S., Wada, K., 1985. Charge characteristics and exchangeable cations status of Korean Ultisols and Alfisols and Thai Ultisols and Oxisols. *J. Soil Sci.* 36, 21-29.
- Weaver, R., Syers, J., Jackson, M., 1968. Determination of silica in citrate-bicarbonate-dithionite extracts of soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 32, 497-501.
- Williams, W.A., Jones, M.B., Demment, M.W., 1990. A concise table for path analysis. *Agron. J.* 82, 1022-1024.
- 伊藤豊彰, 木川直人, 三枝正彦, 2011, 黒ボク土におけるリン酸収着と土壌リン酸の可給性: アロフェン質黒ボク土と非アロフェン質黒ボク土の違いに注目して. *ペドロジスト*, 55, 84-88.
- 伊藤豊彰, 小宮山鉄兵, 三枝正彦, 森岡幹夫, 2010, 豚ふんおよび鶏ふん堆肥のリン酸組成 *日本土壌肥料学雑誌* 81, 215-223.
- 斉藤守, 増田達明, 生雲晴久, 小出和之, 伊奈孝二三, 1996, 肥育豚に対するフィターゼ添加低リン飼料給与によるリン排泄量低減効果, *日本養豚学会誌*, 33, 155-160
- 塩崎尚郎, 2008, *肥料便覧* 第6版, 農文協
- 白毛宏和, 2005, MAP 法によるリン回収資源化システム, *環境バイオテクノロジー学会誌*, 4, 109-115
- 鈴木一好, 2002, 豚舎汚水中リンの結晶化法による除去および回収. *畜産技術*, 571, 34-39
- 武政正明, 村上斉, 石渡健一, 1994, フィターゼの利用によるリン排泄量低減の可能性, *日本家禽学会誌*, 31, 227-230.
- 田中俊博, 島村和彰, 2005, リン回収工程を有する下・廃水処理技術環境バイオテクノロジー学会誌, 4, 101-108
- 土壌環境分析法編集委員会, 1997, *土壌環境分析法*, 博友社
- 郝桂玲, 2004, フィターゼによる家畜飼料中のフィチン態リンの分解に及ぼす亜鉛及

び鋼の影響.

郝桂玲, 西尾道德, 前川考昭. 2005. 家畜ふん堆肥からフィチン酸分解菌の分離と利用, 農業施設, 25, 197-204

西尾道德, 木村龍介, 1989, リン溶解菌とその農業利用の可能性, 土と微生物, 28, 31-40

西尾道德, 2002, 農業生産環境調査に基づく我が国のリン酸施用実態の解析日本土壤肥料学雑誌, 74, 435-443

農林水産省. 2010. http://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/hozen_type/h_sehi_kizyun/

農林水産省生産局, 2009, 肥料価格の現状等について, 農水省資料.

松山信彦, 1994. 我国黒ボク土の非晶質成分による類型区分とその土壤管理に関する研究. 東北大学博士論文

村上圭一, 中村文子, 後藤逸男, 2000, 土壤のリン酸過剰とアブラナ科野菜根こぶ病発病の因果関係, 土壤肥料学会誌, 75, 453-457

村上圭一, 中村文子, 後藤逸男, 2004, 土壤のリン酸過剰とアブラナ科野菜根こぶ病発病の因果関係, 土壤肥料学雑誌 75, 453-457

藤原俊六郎, 安西徹郎, 加藤哲郎, 1996, 土壤診断の方法と活用, 農村漁村文化協会

8 研究発表

本研究に関連する論文発表

1. Hashimoto, Y., Kang, J., Matsuyama, N., and Saigusa, M. 2012. Path analysis of phosphorus retention capacity in allophanic and non-allophanic Andisols. *Soil Science Society of America Journal*. 76:441-448.
2. Hashimoto, Y. and Karita, S. 2013. Enhanced phosphorus availability in poultry manure by inoculation of phytase-secreting bacteria in the composting process. (in preparation for *Poultry Science*).

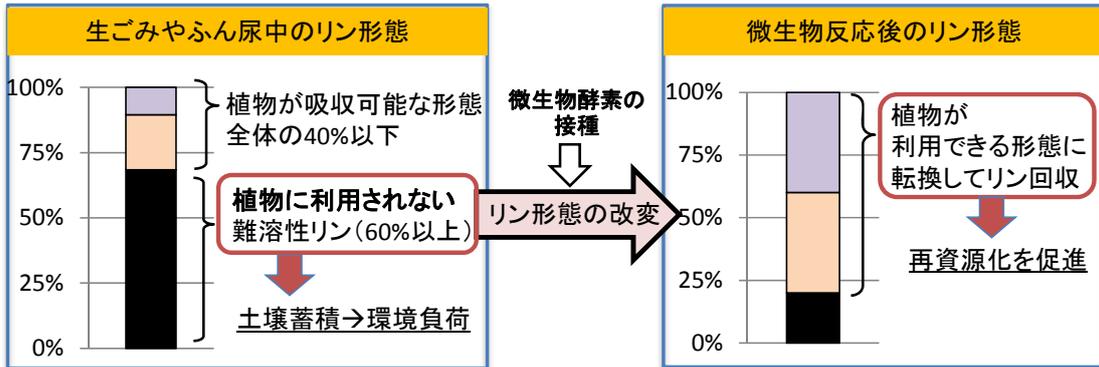
本研究に関連する学会発表

1. 吉川廉, 橋本洋平, 堂本晶子, 村上圭一, 荻田修一. 2011. 鶏ふん堆肥に含まれるリンの化学形態の解明. 日本土壌肥料学会中部支部例会 (金沢市 11/10)
2. 橋本洋平, 吉川廉, 山口紀子, 北島義典, 村上圭一. 2011. XANES 法による堆肥発酵過程におけるリン化学形態の解明. 第 28 回 PF シンポジウム (つくば市, 7/14-15)
3. 橋本洋平, Jihoon Kang, 松山信彦, 三枝正彦. 2012. アロフェン質と非アロフェン質黒ぼく土のリン酸吸着機構に直接的に関係している土壌化学性の特定: 全国 671 地点データのパス解析. 日本ペドロロジー学会 (首都大学 3/6)
4. 吉川廉, 橋本洋平, 堂本晶子, 村上圭一. 2012. 堆肥化過程における鶏ふん堆肥のリン化学形態の解明. 日本土壌肥料学会全国大会 (鳥取大学, 9/4-6)

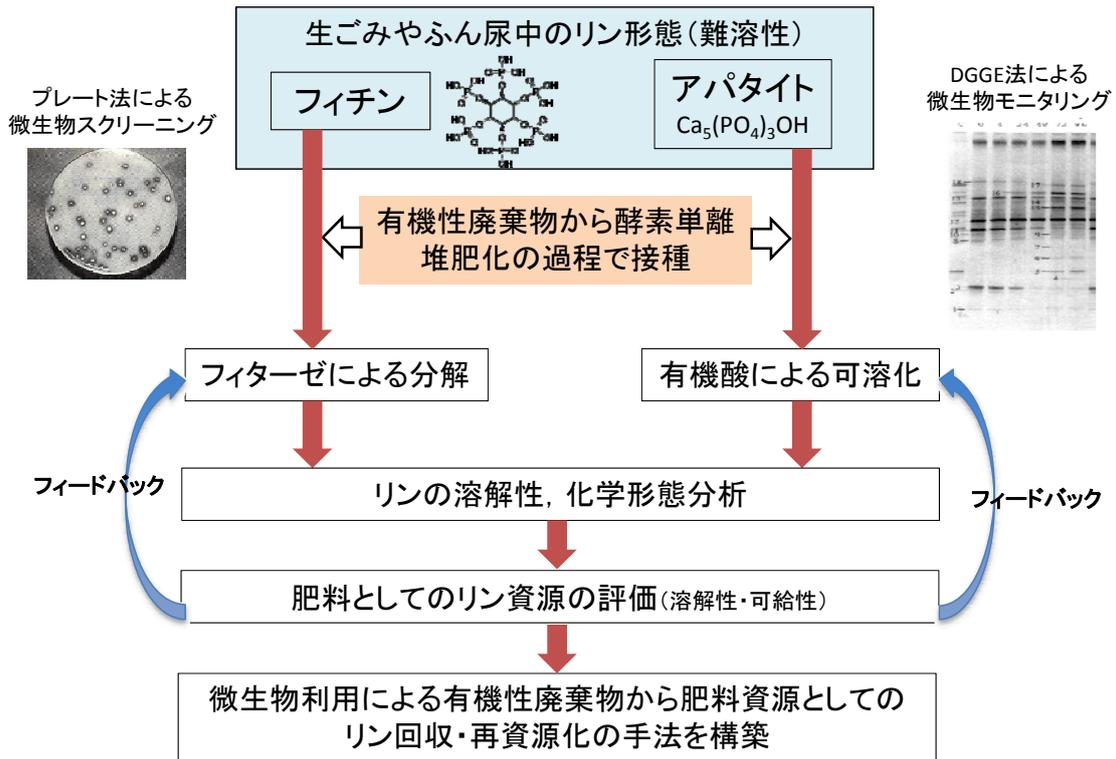
微生物酵素活性の利用による有機性廃棄物からのリン再資源化

日本のリン状況：リン原料の100%を輸入・そのうち80%が肥料用途・リン施肥量が世界第一位
 有機性廃棄物：廃棄物全体の60%を占める・リン含有量が多い

有機性廃棄物から肥料資源としてリン回収する意義は大きい



微生物酵素を利用して有機性廃棄物中のリンの形態に変化を与えて有効化



英文概要

Increase of phosphorus solubility in organic residues using phosphatase-secreting bacteria in composting processes

Yohey Hashimoto (Tokyo University of Agriculture and Technology)

Shuichi Karita (Mie University)

Key words

composting, phosphorus, poultry manure, phosphatases

The aim of this study was to increase phosphorus availability to plants in organic residue (poultry waste) using phosphatase-secreting bacteria during the composting process. Phosphorus solubility and chemical speciation were rapidly altered during the composting process. The fraction of water soluble phosphorus decreased with increasing the composting time, and the decreased fraction was transformed into HCl-extractable fraction (i.e., apatite-like phosphorus). Phytic acid and hydroxyapatite were two major phosphorus species occurring during the composting period. We found a bacterium species that solubilize phytic acid in the composted poultry manure and was identified as *Burkholderia species*. This species was added to poultry litter in a laboratory composting system and measured phosphorus solubility and alternation of bacterial species during the composting period. The amount of water-extractable phosphorus was greater in the poultry litter amended with *Burkholderia* species than in control (without any treatment) and in phytase treatment. The amount of water-extractable phosphorus was further increased when *Burkholderia* species was added in three times during composting period of poultry litter. Our study indicates that the use of phosphatase-secreting bacteria for composting processes can be an alternative method to a phytase-assisted composting process for increasing phosphorus solubility in poultry waste composts.