

Environment Research and Technology Development Fund

環境省環境研究総合推進費終了研究等成果報告書

簡易型乾式メタン発酵による養豚排水処理と発酵残渣の有効利用
(1-1404)

平成26年度～平成28年度

Development of Simplified Dry Methane Fermentation Process for Livestock Wastewater Treatment and
Effective Utilization of Dry Methane Fermentation Residue

東京農工大学

平成29年5月

環境省
総合環境政策局総務課環境研究技術室
環境保健部環境安全課環境リスク評価室
地球環境局総務課研究調査室

簡易型乾式メタン発酵による養豚排水処理と発酵残渣の有効利用

(1-1404)

I. 成果の概要	i
1. はじめに (研究背景等)		
2. 研究開発目的		
3. 研究開発の方法		
4. 結果及び考察		
5. 本研究により得られた主な成果		
6. 研究成果の主な発表状況		
7. 研究者略歴		
II. 成果の詳細		
(1) 簡易型乾式メタン発酵の開発	1
(東京農工大学)		
要旨	1
1. はじめに	1
2. 研究開発目的	2
3. 研究開発方法	2
4. 結果及び考察	11
5. 本研究により得られた成果	25
6. 国際共同研究等の状況	26
7. 研究成果の発表状況	26
8. 引用文献	28
(2) 発酵残渣の有効利用法の確立	29
(東京農工大学)		
要旨	29
1. はじめに	29
2. 研究開発目的	30
3. 研究開発方法	30
4. 結果及び考察	40
5. 本研究により得られた成果	65
6. 国際共同研究等の状況	66
7. 研究成果の発表状況	66
8. 引用文献	68
III. 英文Abstract	71

課題名 1-1404 簡易型乾式メタン発酵による養豚排水処理と発酵残渣の有効利用

課題代表者名 細見 正明（東京農工大学 大学院工学研究院 応用化学部門 細見・寺田研究室 教授）

研究実施期間 平成26～28年度

累計予算額 55,355千円（うち平成28年度：16,905千円）
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード 高温乾式メタン発酵、豚尿、多収米、ハス、温室効果ガス、土壌病害

研究体制

- (1)簡易型乾式メタン発酵の開発（東京農工大学）
- (2)発酵残渣の有効利用法の確立（東京農工大学）

研究概要

1. はじめに（研究背景等）

現在、養豚排水中の窒素処理は、一律排水基準（100 mg/L）のみならず暫定排水基準でさえも、零細な養豚農家にとって達成が難しい。そこで、申請者らは、固形分が15～30%と多く粘土状で発酵が進行し、排水が発生しない乾式メタン発酵と多収米による飼料生産を組み合わせた養豚排水処理システムを提案する。本システムでは、多収米生産で発生する稲わらと養豚より発生する豚尿を混合し、高温乾式メタン発酵する。これにより、再生可能エネルギーであるメタンガスならびに肥料成分に富む固形の発酵残渣を得る。発酵残渣は多収米の肥料として利用することで、養豚経営における排水問題の解決と飼料の自給化を同時に達成できる。さらに、メタンガスをエネルギーとして使用することで、温室効果ガス放出の削減にもつながる。

しかし、乾式メタン発酵は粘土状で発酵するため、基質（豚ふん尿と稲ワラ）と嫌気性微生物からなる汚泥の混合攪拌が困難である。商業用の実規模乾式メタン発酵では機械攪拌のための特殊で高価なポンプや攪拌装置が必要となり、小規模養豚農家にとって導入は困難である。従って、基質と汚泥の接触を低コストかつ簡易にする乾式メタン発酵の開発が必要である。

さらに、物質循環の観点から発酵残渣を肥料等に再利用することが重要である。提案システムでは多収米への使用を想定しているが、水田作が盛んでない地域では多収米を栽培できないなどの問題もある。そこで、発酵残渣の利用方法に多様性を持たせることが必要となる。従って、乾式メタン発酵の低コスト・簡易化および発酵残渣の有効利用法の確立を行うことで、乾式メタン発酵を利用した養豚排水処理が達成される。

2. 研究開発目的

本研究の目的は、乾式メタン発酵の低コスト・簡易化および発酵残渣の有効利用法の確立である。より低コストな高温乾式メタン発酵による養豚廃棄物の処理を確立するために、稲ワラを含む汚泥を固定床として、豚し尿を含む浸出液を循環させる簡易型乾式メタン発酵処理システムを検討した。また、安定した運転のモニタリング指標として、汚泥中の各種有機酸濃度やアンモニア濃度、微生物叢の分子生物学的解析の結果から適切な指標を検討した。

発酵残渣の有効利用として、（1）水田における水管理による温室効果ガス削減効果の評価、（2）レンコン栽培への利用および温室効果ガス発生量評価、（3）土壌病害抑制効果の評価、（4）発酵残渣の炭化処理と土壌改良材としての利用可能性評価について行った。

3. 研究開発の方法

(1)簡易型乾式メタン発酵の開発

1)液循環方式が高温乾式メタン発酵に及ぼす影響

メタン発酵では、基質と種汚泥のリアクターへの仕込みを経て、発酵が行われる。そこで、簡易型乾式メタン発酵法として、液循環型乾式メタン発酵および非液循環型の乾式メタン発酵法を検討した。500 mL容のリアクターを作製し、液循環型乾式メタン発酵では、三種類の仕込み方法（混合、散布お

よび積層)と二種類の液循環方法(浸透および浸漬)を検討した。浸透方式は、定期的に上部から固定ろ床(基質および種汚泥の混合物)に浸出液(豚尿と発酵液の混合物)を散布して浸透させた。浸漬方式では、固定ろ床を一定時間豚尿で浸漬・放置し、固定ろ床下部から浸出液を引き抜く作業を繰り返した。さらに、トランスクリプトーム解析を実施し、豚尿を含む浸出液の使用がメタン発酵微生物の活性に及ぼす影響を調べた。

2) 種汚泥の接種量が高温乾式メタン発酵に及ぼす影響

非液循環型の乾式メタン発酵として、仕込み時の基質と種汚泥の混合比率(F/I比)を検討した。まず、F/I比がメタン生成に与える影響を明らかにするために、F/I比0.5, 1, 2および3で基質および種汚泥を混合した際のメタン生成量を500 mLリアクターを用いて評価した。ついで、F/I比を指標にした運転方式を検討するために、45 Lリアクターにスケールアップし、回分方式および徐々に基質を添加していく流加培養方式でのメタン発生量を比較した。

3) 運転環境と高温乾式メタン発酵の安定性

運転環境がメタン発酵に与える影響を明らかにするために、発酵中の攪拌頻度、温度変化および含水率をパラメータとして豚尿と稲わらの高温乾式メタン発酵を実施した。攪拌の影響を調べるために、無攪拌、1日1回攪拌(1 day)、3日に1回攪拌(3 day)および7日に1回攪拌(7 day)の4種類の攪拌頻度を比較した。温度条件は、(1) 55 °C一定(温度一定系)、(2) 55 °C一定で運転し、3週間後から20 °Cで1週間運転し、その後55 °Cで運転(温度再上昇系)および(3) 55 °C一定で運転し、3週間後から20 °Cで運転(温度低下系)、の3条件を評価した。含水率の影響については、異なる4種類の含水率(60、65、70、80%)となるように基質(稲わらおよび豚尿)と種汚泥および水を混合し、メタン発酵を行った。含水率の影響についてはさらに、含水率低下によるメタン生成の低下を抑制するために、低含水率での種汚泥馴養の効果を検証した。

4) 簡易型高温乾式メタン発酵の経済性

簡易型高温乾式メタン発酵システムの導入により、乾式メタン発酵に関わる経営体の経営が経済的に成り立つかどうかを評価した。本評価では、豚尿処理が問題となっている小規模養豚農家(ここでは肥育豚1000頭規模と仮定)に高温乾式メタン発酵あるいは、図1に示す自走式土質改良機とコンテナからなる簡易型高温乾式メタン発酵を導入した場合、養豚経営、豚尿処理、多収米飼料イネ栽培および資材輸送を含めた支出および収入を算出し、その差分である所得が、関与する経営体(養豚農家および水田農家)の必要所得を満たすかどうかを計算した。



図1 自走式土質改良機とコンテナを利用した簡易型乾式メタン発酵システム

(2) 発酵残渣の有効利用法の確立

1) 乾式残渣のイネおよびコムギへの肥料効果と環境負荷

東京農工大学FM本町(東京都府中市)に設置されているライシメーター(ステンレス製、縦100×横100×高さ50cm)12基を用いて、夏作に飼料イネ、冬作にコムギの栽培試験を行った。施肥は飼料イネのみに行き、コムギは無肥料で栽培した。2014年度の夏作では、化学肥料区、豚ふん尿由来の湿式メタン消化液(WetBD)区、豚ふん尿と稲ワラ由来のDryBD区(C/N20に調整し発酵させた残渣)、そしてWetBDに転炉スラグ(Slag)を混ぜたものの計4処理区を3反復設けた。転炉スラグを用いた理由は、転炉スラグによりCH₄放出を抑制することを期待したためである。転炉スラグに特段CH₄放出抑制効果は認められなかったため、2015、2016年度は転炉スラグ区の代わりに、豚ふん尿と稲ワラ由来のDryBD30区(C/N30に調整し発酵させた残渣)をもうけた。施肥は、2014年度は可給態窒素(有機態窒素の半分に

無機態窒素を加えた量)が基肥と追肥含めて30g-N/m²となるようにしたが、メタン発生量がかなり大きかったため、2015年度以降は可給態窒素で8~12g-N/m²に減らした。なお、施肥ごとの割合は「基肥：追肥1回目：追肥2回目=5：3：2」とした。ただし、DryBD20、DryBD30に関しては施用後すき込む必要があるため全量基肥で施肥した。イネ品種にはタカナリを用い、2014年度は常時湛水、2015、2016年度はメタン発生を減らすため中干し、間断灌漑を導入し、栽培を行った。コムギはイネの収穫後切り株間に深さ3cm程度の溝を4列作成し、その溝にコムギを播種し土を被せ、栽培した。コムギ栽培の際は基本的に浸透水を採取する下の排水口は常に開け、施肥は行わなかった。イネ、コムギともに、各ライシメーターの中心部5株を地表面から約2cmのところから刈り取り、穂部と茎葉部とにわけ、80℃で乾燥後、乾物重を測定した。

2) 発酵残渣のハスへの適用性と環境負荷の評価

発酵残渣によるハスの生育およびハス田の窒素挙動を明らかにするために、茨城県土浦市手野町にある実際のハス田に20 m²の試験区画を調整し、ハスの栽培試験を実施した。各区画にレンコン苗を4株移植し、現地の栽培法に則り、2014年5月から2017年1月まで栽培を行った。残渣は固形であり栽培期間中の施用が難しいので、ハスを移植する前に肥料を投入する基肥としての使用を検討した。さらに、栽培期間中に得られた水質データおよびハスによる窒素吸収量を用いて、乾式メタン発酵を養豚経営に導入した場合の環境中への窒素流出量を評価した。

さらに、発酵残渣(有機物)をハス田に施用した際のハス田からの温室効果ガス(メタン)放出を評価するために、上海市農業科学院(中国)に設置されたライシメーターを用いたハス栽培を実施した。メタン放出についてよく調査がなされている水稻に比べ、ハスに関してはメタン放出やメタン放出経路についての情報がほとんどない。そこで、ハスの葉の中央部(荷鼻)におけるメタン放出特性(日周変動)を調査した。次いで、ビニールチャンパーを用いてハス田からのメタン放出量と水稻からのメタン放出量を比較し、ハス栽培のメタン放出強度を評価した。さらに、乾式残渣の施用がハス田からのメタン放出に与える影響を評価するために、異なる3種の肥料(化学肥料、豚尿および堆肥)を施肥したハス田からのメタン放出の日周変動を調査した。

3) 発酵残渣による土壌病害抑制効果の評価

メタン発酵残渣がネコブセンチュウに及ぼす影響を評価するために、ネコブセンチュウ汚染土壌(静岡県より採取)と赤玉土をよく混ぜ、6処理区(無施用、化学肥料(N:P:K=14:14:14)、C/N比20の残渣(DBD20) 6.08 g(15kg無機態N/10a)、12.1g(30kg無機態N/10a)、C/N比30の残渣(DBD30) 7.7g(15kg無機態N/10a)、15.5g(30kg無機態N/10a)を設けた。14日後の土壌からDNAを抽出しリアルタイムPCRにて線虫密度を測定した。

トマト栽培において、萎凋病(病原菌:*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)ならびにネコブセンチュウの発生はわが国で頻りに認められる。両者はともに寄主作物の連作によって発生が増大する土壌病害であり、かつ混合発生することも稀ではない。そこで、乾式残渣がこれらの複合病に及ぼす影響を検証した。市販の赤玉土70gに炭酸カルシウムを150mg添加し、土壌のpHを約7に矯正した。処理区は無施用、化肥(15N)、BD20 15N、BD20 30N、BD30 15N、BD30 30Nの6つを設けた。化肥15N区(N:P:K=14:14:14)は15 kg無機態窒素/10 a(表層10 cm、土壌の仮比重1g/cm³)となるように0.16 g、BD20・30の15N、30N区にはそれぞれ15・30 kg可給態窒素/10a(無機態窒素に加えて有機態窒素の半分が無機化すると仮定、表層10cm、土壌の仮比重1g/cm³)となるようにBD20乾式残渣6.7g、13 gを、BD30乾式残渣を8.5g、17gを土壌180 g(鉢田土壌162 g、ネコブセンチュウ汚染土18g)に施用した。トマト萎凋病菌は*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Chz1-Aを用いた。1/10PDA寒天培地で5日間培養後、1/10PDB液体培地に植菌し5日間培養した。この培養液を、2重ガーゼで濾過し菌糸を取り除き、bud cell状の菌体を遠心分離により回収した(8000 rpm、5分、4℃)。滅菌水で2度洗浄後、ペレットを滅菌水に懸濁させ、血球計算盤を用い、bud cell数を計数した。Bud cellを乾土1 g当たり10⁵となるように接種した。この土壌に栽培2週間後のトマト芽生えを移植し、人工気象器内(明期:暗期=12時間:12時間、27℃)で栽培を行い、萎凋病症状の経時的変化を測定した。

4) 発酵残渣炭化物の作製

乾式メタン発酵残渣200 gをるつぼに入れ、500℃、1時間でマッフル炉内において炭化させた。その際、酸素との燃焼を抑制するために、るつぼにアルミホイルを被せ、炭化時の酸素の混入を防いだ。得られた炭化物は粉碎後、灰分、揮発性有機物、全炭素、全窒素およびリン酸含有量の測定に供した。リン酸含有量を計測する際は、1 Mの塩酸で抽出し、抽出液中のリン酸濃度から求めた。

4. 結果及び考察

(1) 簡易型乾式メタン発酵の開発

1) 液循環方式が高温乾式メタン発酵に及ぼす影響

各種仕込み方式に対して異なる液循環方式（浸漬および浸透）で50日間乾式メタン発酵した際の累積CH₄発生量は、浸漬系で124~152 mL/g-VS、浸透系で60~90 mL/g-VSであり、混合方式に関わらず浸漬系の方が浸透系よりも高いメタン生成を示した。汚泥を豚尿で浸漬することにより、汚泥中の微生物が基質全体に拡散しやすくなった事、および基質の分解生成物が微生物と接触しやすくなったと推察される。一方、浸透系では短絡流により豚尿が汚泥全体に均一に浸透しなかったものと考えられる。以上の結果から、浸漬が液循環手法として有用であることが分かった。しかし、トランスクリプトーム解析の結果、豚尿を含む滲出液で浸漬することにより、メタン生成を担う微生物であるメタン生成古細菌が阻害を受けることが示唆された。

2) 種汚泥の接種量が高温乾式メタン発酵に及ぼす影響

異なるF/I比における回分試験を行ったところ、F/I 0.5およびF/I 3ともにVS当たりの累積CH₄生成量は約350 mL/g-VSまで達した。この値は、稲わらの最大CH₄率である290 mL/g-VS²⁾よりも高かった。さらに、発酵後の発酵残渣の汚泥サンプルを分析したところ、有機酸の蓄積が見られなかった。従って、いずれの系においても基質の発酵はほぼ完了していたと考えられる。また、F/I比0.5ではおよそ12日目で、F/I比3ではおよそ80日間で約350 mL/g-VSに達した。つまり、F/I 0.5はF/I 3より6分の1の期間でメタン発酵が可能と考えられる。このことより、同じ量の基質に対して種汚泥の量が多くなると、より高効率、短期間でメタン発酵が可能であることが確認された。一方、流加培養方式でメタン生成阻害が確認された。

3) 運転環境と高温乾式メタン発酵の安定性

攪拌頻度を変え高温乾式メタン発酵した結果、攪拌頻度が多いほどメタン生成量が少なくなった（図2）。培養5日目まではいずれの攪拌頻度においても累積メタン生成量はほぼ同等だった。しかし、5日目以降累積量に差が生じ、最終的には無攪拌>7日1回>3日1回>1日1回の順に小さくなった。攪拌頻度が多いほどメタン生成量が小さくなる原因は、攪拌するためにリアクターを開放するため、大気中の酸素に汚泥が触れてしまい、メタン発酵を担う嫌気性微生物の活性が阻害されるためと考えられる。

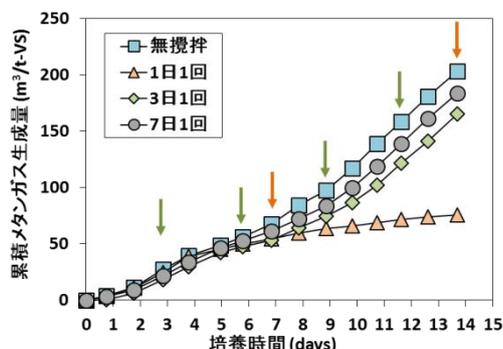


図2 異なる攪拌頻度における累積メタンガス生成量

（図中のオレンジおよび緑色の矢印はそれぞれ1日1回および3日1回攪拌系の攪拌日を示す。また、1日1回系は毎日攪拌した。）

55 °Cで反復回分発酵しているリアクターの温度を20 °Cに低下させると、メタン生成量の低下と酢酸濃度の上昇が観測された。しかし、一週間後再び55 °Cに戻して培養を行うと二週間後には55 °C一定で運転しているリアクターと同程度のメタン生成速度に達した。メタトランスクリプトーム解析の結果、セルロース分解とメタン生成に関わる酵素の遺伝子発現は、温度を55 °Cから20 °Cに変化させたところ大幅に減少した（図3）。しかし、再び55 °Cに戻したところ温度低下前の水準に戻った。以上の結果から、高温乾式メタン発酵において、1週間程度温度が低下しても活性はすぐに戻ることが示唆された。従って、豚尿と稲わらの高温乾式メタン発酵はある程度の温度変動に対しては耐性を有することが分かった。

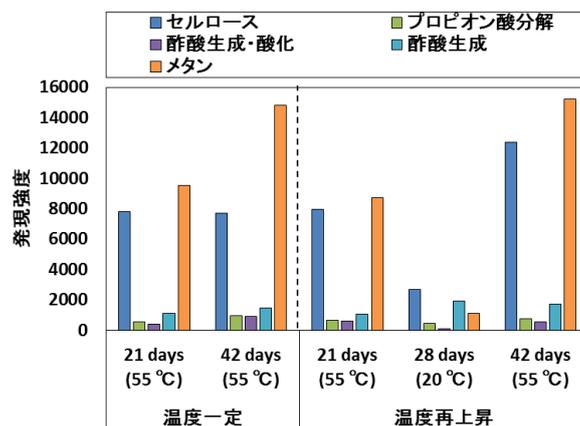


図3 異なる温度条件における遺伝子発現

異なる含水率で稲わらと豚尿を回分高温乾式メタン発酵したところ、累積メタンガス生成量は、発酵時の含水率が低いほど低下する傾向にあった。低含水率下で馴養を行った種汚泥を調製し、馴養前後の種汚泥を用いて乾式メタン発酵を実施し、馴養の効果の検証を行った。その結果、馴養前と馴養後で比較すると、馴養後種汚泥を用いた際の累積メタンガス生成量は含水率75%および70%でそれぞれ2割および5割増加した(図4)。また、馴養後70%の系は、馴養前75%の系と同等のメタンガス生成量を得た。これより、馴養後の種汚泥の方が、高活性に微生物がはたらいっていることが示唆された。したがって含水率をパラメータとする馴養の有効性が示唆された。

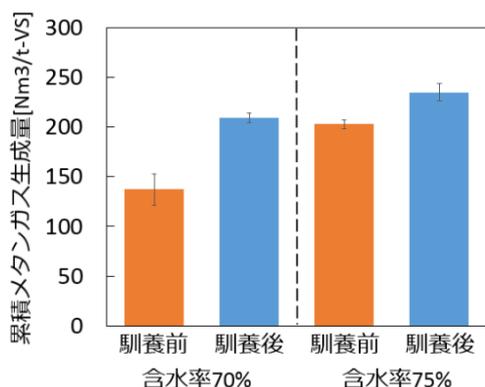


図4 含水率漸近馴養法で馴養した種汚泥の累積メタンガス生成量

4) 簡易型高温乾式メタン発酵の経済性

乾式メタン発酵および簡易乾式メタン発酵のコストはそれぞれ2042および1177万円/年であり、簡易化により約40%のコストカットができると試算された。各システムにおいて収入は、肥育豚の出荷、政府からの多収米栽培への補助金およびコジェネ発電による売電が共通していた。堆肥および炭化物の販売価格は炭化物の方が高いが、これは炭化物単価(6万円/t)が堆肥単価(4000円/t)より高いためである。最も高い支出を示したのは乾式メタン+堆肥化であり、簡易乾式+炭化および簡易乾式+堆肥化と続いた。支出のうち、豚舎、水田および輸送にかかるコストは全ての系で同じとしたため、支出の合計額は廃棄物処理費(乾式メタン発酵、堆肥化および炭化の導入および運営費)により異なった。最終的に、収入から支出を差し引いて得られる所得は乾式メタン+堆肥化、簡易乾式+堆肥化および簡易乾式+炭化でそれぞれ941、1956および2401万円/年となった。一方、各方式において養豚農家および水田農家に必要な所得合計は1847、1926および1926万円/年であり、簡易乾式+堆肥化あるいは簡易乾式+炭化で両者の所得をまかなうことが可能であることが分かった。以上より、簡易乾式メタン発酵の導入により豚尿処理が経済的に持続可能であることが示唆された。

(2) 発酵残渣の有効利用法の確立

1) 乾式残渣のイネおよびコムギへの肥料効果と環境負荷

飼料イネの乾物重の3年間の推移を見ると、乾式残渣区における茎葉部の収穫量は、2014年度は化肥区に比べ若干劣り、2015年度は化肥区を上回るなど一貫しなかったが、穂部の収穫量は3年間いずれの年度も化肥区と遜色ない結果が得られた。2015年度の施肥量は可給態窒素量で化肥区の8g/m²に対し、

乾式残渣区では11-12g/m²と5割程度高かったことが、乾式残渣区で化肥区に比べ茎葉部の収穫量が高くなった原因と考えられるが、2016年度の施肥量はいずれの処理区も8g/m²と統一した。従って、同一の可給態窒素施肥量の下では、乾式残渣の肥料効果は化学肥料に匹敵すると結論できる。

2014年秋から2015年春、2015年秋から2016年春にかけて行ったコムギ栽培では、穂部、茎葉部いずれも化学肥料区に比べて湿式消化液区で約2割、乾式残渣20区では約7割、乾式残渣30区では2倍以上高い値を示した（図5）。湿式消化液および乾式残渣のいずれの残渣処理区においても収穫量が増加しており、発酵残渣施肥により土壤肥沃度が向上することが結論された。特に、炭素投入量の最も多い乾式残渣処理区（DBD30区）では過去2年共に収量が2倍以上に増加しており、土壤肥沃度が顕著に増加したことが明らかとなった。

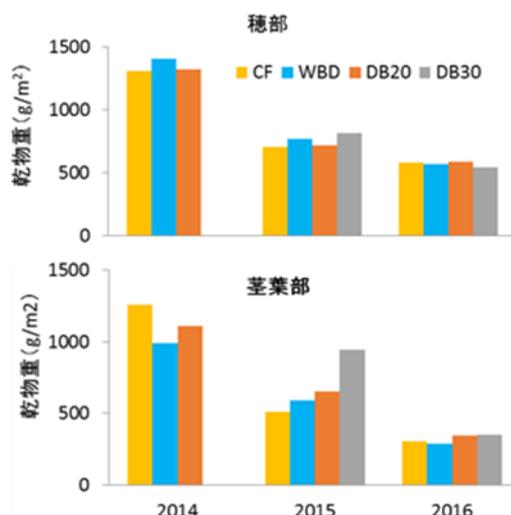


図5 イネ乾物収穫量 (g/m²) の年次推移 (CF: 化学肥料区、WBD: 湿式消化液区、DBD20, 30: C/N20, 30に調整し発酵させた乾式残渣区)

2014年度の累積メタン発生量は乾式残渣20区で170g/m²となり、化学肥料区の43や湿式消化液区の94と比べて顕著に高い値となった（図6）。これは、1作期間中のメタン発生量として堆肥施用土壌で20g/m²、稲ワラ施用土壌で72g/m²と報告されていることから考えるとあまりに高く、温室効果ガス発生観点からみた環境負荷がかなり大きくなることを意味する。そこで、2015年度以降は施肥量を30gN/m²から、8~12gN/m²と減らすとともに、メタン発生量の削減策として、中干しおよび間断灌漑を導入することとした。その結果、2015年度のメタン発生速度は、栽培前半は乾式残渣区で顕著に高いメタン発生が見られたが、中干し後の8月7日以降メタン発生速度はいずれの処理区も極めて低くなった。乾式残渣区のメタン発生速度は、2014年度において最大値が5000mg/m²/dを超えていたが、2015年度は4000mg/m²/d程度となり、残渣施用量を2014年度から減らした効果を見ることができた。また、間断灌水そして中干しを行うことで水田からのメタン発生を顕著に抑えることができると認識できた。一方、そうした水管理を導入しても、炭素投入量が多い乾式残渣区では、メタン発生リスクが高まることがわかった。

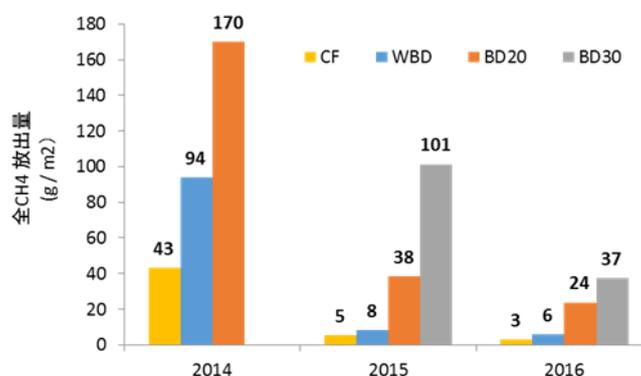


図6 栽培期間中の累積メタン発生量

(CF: 化学肥料区、WetBD: 湿式消化液区、BD20、DBD30: C/N20、30に調整し発酵させた乾式残渣区)

2) 発酵残渣のハスへの適用性と環境負荷の評価

慣行栽培（化学肥料）および発酵残渣栽培による収穫物（レンコン）の収量は、2015年度においてはそれぞれ26および23 t/ha、2016年度においては20および15 t/haだった。年次変動があるものの、いずれの年度においても発酵残渣を施用することでレンコン収量が低下する結果となった。2016年度は基肥のアンモニア態窒素に占める残渣施用割合を2015年度の半分にしたにもかかわらず、残渣系の方が慣行系よりも低収量となった。

化学肥料および発酵残渣を用いたハス栽培における水質データから、養豚排水を暫定排水基準値で処理し、化学肥料でハスを栽培するシナリオ（従来型システム）および高温乾式メタン発酵を養豚排水処理に導入し、発酵残渣をハス栽培に利用するシナリオ（提案型システム）における水環境中への窒素負荷量を算出した。その結果、従来型および提案型システムでそれぞれ5.7および1.3 tN/年だった。従って、豚尿を乾式メタン発酵で処理し、残渣をハス田に施用することにより、環境中へ流出する窒素を77%抑制しうることが示唆された。

ハスの葉の中央部（荷鼻）から放出されるガスの放出量は、日中に高い値を示した。また、葉によってガス放出量が異なっていた。一方、ガス中のメタン濃度はガス放出量とは逆に日中低く、夜間に高くなる傾向となった。調査した葉によっては全くガスを放出しない葉もあり、ハスの葉からのガス放出は葉により大きく異なることがわかった。ライシメーターで栽培したハス全体からのメタン放出速度（5~45 mgCH₄/m²/h）は水稲からのメタン放出速度（5~10 mgCH₄/m²/h）よりも常に高かった。ハスを無施肥、化学肥料、豚尿および堆肥で栽培した際のメタン放出速度（日周変動の平均）は、それぞれ2.2±0.1、2.1±1.4、4.5±1.0および9.0±2.2 mgCH₄/m²/hとなり、堆肥を施用した際のメタン放出速度が最も高くなった。本結果より、有機物を豊富に含む発酵残渣をハス田に施用した場合でもメタン放出量が高くなることが予想される。

以上の結果より、本研究のモデル地域である茨城県の養豚排水処理に乾式メタン発酵を導入し、発酵残渣を水稲だけでなくハス栽培に利用する場合、水環境への窒素負荷を抑制できるが、温室効果ガス放出の増大およびレンコン収量の低下に留意する必要があることが示唆された。

3) 発酵残渣による土壌病害抑制効果の評価

乾式残渣施用がネコブセンチュウに与える影響を見たところ、乾式残渣 20 の施肥量 15N、30N のいずれも、乾式残渣 30 の 30N 処理区で、初期密度に対してそれぞれ 43%、60%、79%の有意な減少がみられた（図 7）。したがって、メタン発酵残渣はネコブセンチュウ抑制効果を有し、その効果は施肥量が多いと高くなるといえる。

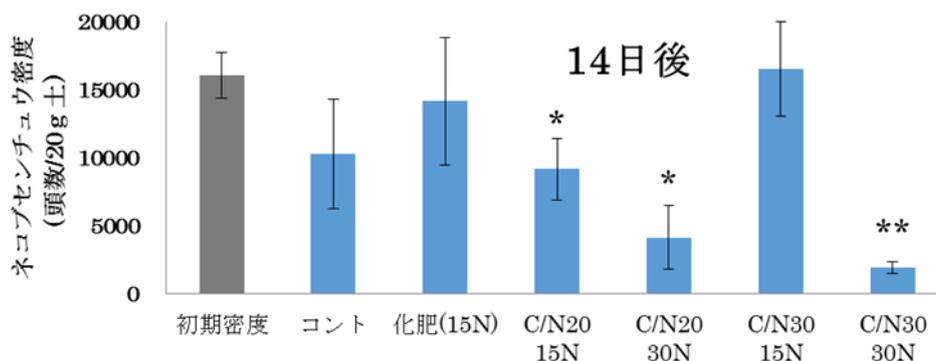


図 7 残渣施用のネコブセンチュウ密度に対する影響(t-test, * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$)

(コントロール: 無施肥、化肥: 化学肥料区、C/N20, 30: C/N20, 30 に調整して発酵させた乾式残渣、15N, 30N: 15, 30kg-N/10a の窒素施用量)

ついで、メタン発酵残渣の土壌施用がトマト萎凋病菌およびネコブセンチュウによる複合病に及ぼす影響をみたところ、病害程度は処理区間で有意な差はないものの30日後において残渣施用処理区すべてにおいて化学肥料処理区よりも低い値を示した（図8）。また、どの栽培日数においても化肥（15N）区が最も高い萎凋病の病害程度を示した。残渣がネコブセンチュウの抑制効果を有する結果が得られているので、ネコブセンチュウを抑制したことで、萎凋病の病害を抑えることにつながったと考えられた。なお、無施用区が化肥区よりも低い病害程度を示した原因は、無施用区には施肥していないためトマトの生育が悪く、本菌の感染割合も低下したのだと考えられた。栽培30日後のトマトの生育は、無施用区よりも化肥区・残渣区の方が良好であったことから、残渣には化肥と同程度の肥料効果があることが示された。

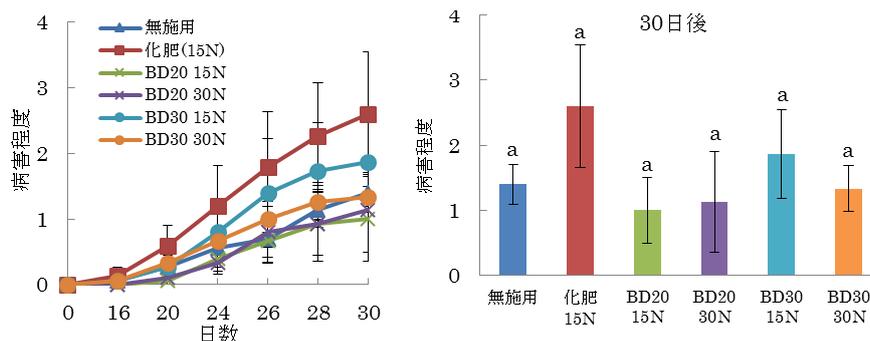


図8 トマト萎凋病の病害程度の経時変化（左）と栽培30日後の萎凋病の病害程度（右）
 （コント：無施肥、化肥：化学肥料区、BD20, 30：C/N20、30に調整して発酵させた乾式残渣、15N, 30N：15, 30kg-N/10aの窒素施用量）

土壌中のトマト萎凋病菌密度は栽培30日目において、有意な差はないもののBD20 15N・BD30 15N・BD30 30N区は、化肥(15N)よりも低い密度を示し、BD20 30N区では化肥(15N)と比べ有意に低いトマト萎凋病菌の密度を示した(図9)。したがって残渣の施用によって、土壌中のトマト萎凋病菌密度が低減されたことが示唆された。また、栽培30日目におけるトマト萎凋病菌の密度と病害程度の間には正の相関が得られた($p < 0.05$) (図9)。つまり本実験の結果は、トマト萎凋病菌の密度を低減させたことが病害の症状を抑えたためと考えられた。

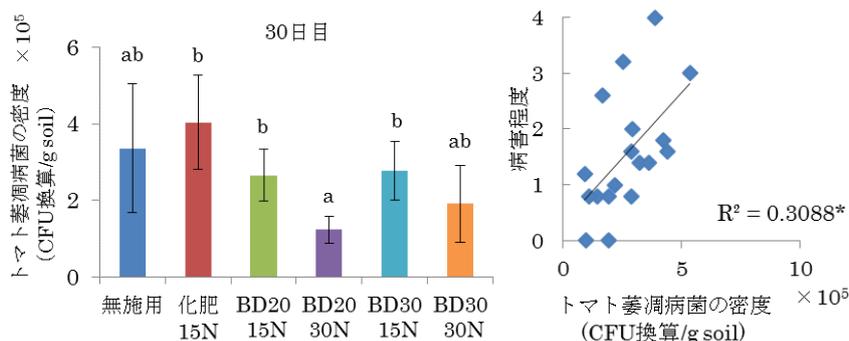


図9 培養30日目における土壌中のトマト萎凋病菌の密度（左）と栽培30日目のトマト萎凋病菌の密度と病害程度の関係（右）

（コント：無施肥、化肥：化学肥料区、BD20, 30：C/N20、30に調整して発酵させた乾式残渣、15N, 30N：15, 30kg-N/10aの窒素施用量）

4) 発酵残渣炭化物の作製

発酵残渣のリン含有率(1.3%)は豚ふん堆肥炭化物の炭化物のリン含有率(5.46%)の1/4程度だった。これは、発酵残渣は豚尿と稲わらを原料としており、豚ふん乾燥物に比べ原料中のリン含有率自体が少ないためと考えられる。一方、炭化物中に含まれるリンのうち、どれほどが実際に植物に利用可能かどうかを今後明らかにしていく必要がある。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

本研究では、簡易かつ低コストな乾式メタン発酵を開発するため、液循環型に加えて、液循環を全く行わない非液循環型のプロセスを研究した。液循環型では、菌体と基質の接触効率を向上させるために有効な攪拌方法と液循環手法を明らかにすることができた。液循環型の回分乾式メタン発酵では、基質と種汚泥の接触について、仕込み時の基質と種汚泥量の比(F/I比)を調整することで効率よくメタン発酵を行うことが可能であることが分かった。さらに、メタン発酵後の堆肥化や炭化に向けた乾燥工程を省略するために、従来の80%よりも低含水率での発酵を提案し、その影響だけでなく、低含水率化で発酵効率を向上させるための馴養法を明らかにできた。

さらに、本研究では、メタトランスクリプトーム解析を活用することで、F/I比や温度といった運転

パラメータは、メタン生成に關与する酵素の遺伝子発現に大きく關与し、メタン生成量に影響及ぼすことが明らかとなった。

乾式発酵残渣は化学肥料および湿式消化液と同程度の飼料イネへの肥料効果を有することを実証した。さらに、飼料イネの収穫後、土壤肥沃度評価のためにコムギを無肥料条件下で栽培したが、湿式消化液区、特に乾式残渣区では化学肥料区と比べて高いコムギ乾物重が得られ、乾式残渣は土壤肥沃度を高めることを実証できた。

本研究では始めてハスの荷鼻からのCH₄ガス放出を確認することができた。この結果はハス栽培も水稲やその他湿地植物と同様に温室効果ガスであるCH₄の放出源であることを示している。さらに、葉によってガス放出のパターンが異なることが分かり、複雑なガス輸送機構を有していることが示唆された。また、ビニールチャンバー法を用いることで、ハス栽培は水稲栽培よりもメタン放出量が高いことが示唆された。さらに、ハス栽培に有機物を施用することでメタン放出量の増加が確認されたことから、ハスへの乾式発酵残渣施用もメタン放出量を増大させることが予想される。

乾式発酵残渣が土壤中におけるネコブセンチュウ、トマト萎凋病菌の密度を低下させ、それにより病害発生程度も低減することを示した。

豚尿と稲わらの高温乾式メタン発酵残渣の炭化物にはリンが含まれていることが明らかとなった。ただし、その含有量は豚ふん堆肥炭化物と比べると低く、今後リン源としての評価やリン含有率を高める必要がある。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

- ・ 回分式高温乾式メタン発酵により豚尿および稲わらを処理することで、再生可能エネルギーを得つつ、排水の発生を抑制した豚尿処理
- ・ 発酵残渣を水田作物の肥料として利用し、豚尿に由来する窒素の環境中への流出を抑制
- ・ 発酵残渣は土壤肥沃度を高めること。
- ・ 発酵残渣は一部の病原菌、ネコブセンチュウ密度を下げる効果を有すること。
- ・ 発酵残渣DBD20は、化学肥料と同程度の硝酸塩溶脱リスクを有し、リスク削減のためには、DBD30を使用するか、あるいはDBD20と稲ワラを併用すること。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) S. Riya, S. Zhou, Y. Kobara, M. Sagehashi, A. Terada, M. Hosomi: Journal of Environmental Management, 161, 124-130 (2015) “Effects of N loading rate on CH₄ and N₂O emissions during cultivation and fallow periods from forage rice fields fertilized with liquid cattle waste”
- 2) S. Riya, K. Suzuki, S. Zhou, A. Terada, M. Hosomi: Journal of Medical and Bioengineering, 5(1), 11-14 (2016) “Influence of C/N ratio on performance and microbial community structure of dry-thermophilic anaerobic co-digestion of swine manure and rice straw”

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) 細見正明, 豊田剛己, 利谷翔平: 畜産環境情報, 53, 1-10 (2014) “乾式メタン発酵と飼料イネによる資源循環型養豚排水処理”

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 利谷翔平, 鈴木一弘, 周勝, 寺田昭彦, 細見正明: 化学工学会第46回秋季大会 (2014) “高温乾式メタン発酵および飼料イネ栽培を組み込んだ養豚システムのライフサイクルアセスメント”
- 2) S. Riya, K. Suzuki, S. Zhou, A. Terada, M. Hosomi: 9th IWA International Symposium on Waste Management Problems in Agro-Industries (2014) “Feasibility of pig manure treatment by dry-thermophilic anaerobic co-digestion with rice straw”

- 3) 利谷翔平, 丸尾光希, 孟令宇, 寺田昭彦, 細見正明: 第49回日本水環境学会年会 (2015)
“豚尿と稲わらの高温乾式メタン発酵における豚尿循環および基質混合方式の検討”
- 4) 利谷翔平, 丸尾光希, 孟令宇, 寺田昭彦, 細見正明: 化学工学会第80年会 (2015)
“豚尿と稲わらの高温乾式メタン発酵における豚尿循環および基質混合方式の検討”
- 5) 利谷翔平, 佐光俊樹, 孟令宇, 寺田昭彦, 細見正明: 化学工学会 第47回秋季大会 (2015)
“稲わらを基質とする豚尿浸漬型回分乾式メタン発酵における基質/種汚泥比の影響”
- 6) 古谷野康平, 豊田剛己, 沢田こずえ・Ghalia Missous: 日本土壌肥料学会2015年度京都大会 (2015)
“メタン発酵残渣を用いた土壌病害の抑制効果”
- 7) 利谷翔平, 片山美怜, 高橋恵理加, 島田幸治郎, 寺田昭彦, 細見正明: 日本土壌肥料学会2015年度京都大会 (2015) ” 乾式メタン発酵残渣を施肥した多収米水田におけるメタン放出の削減”
- 8) S. Riya, Y. Takeuchi, S. Zhou, A. Terada, M. Hosomi: The 12th International Conference of the East and Southeast Asia Federation of Soil Science Societies (2015) ” Linking Drainage-Induced Nitrous Oxide Production and Functional Gene Expression of Nitrifier and Denitrifier in Flooded Soil”
- 9) S. Riya, K. Suzuki, S. Zhou, A. Terada, M. Hosomi : 6th International Conference on Environmental Science and Development (2015) “Influence of C/N ratio on performance and microbial community structure of dry-thermophilic anaerobic co-digestion of swine manure and rice straw”
- 10) S. Riya, K. Suzuki, M. Katayama, E. Takahashi, S. Zhou, A. Terada, M. Hosomi: Japan-China Symposium on Chemical Engineering (2015) ” Development of novel pig farming system incorporating dry-thermophilic anaerobic digestion and forage rice cultivation”
- 11) S. Riya, K. Maruo, L. Meng, A. Terada, M. Hosomi: 14th World Congress on Anaerobic Digestion (2015) ” 14th World Congress on Anaerobic Digestion (2015) 「Effect of premixing and circulation of pig urine on dry-thermophilic anaerobic digestion”
- 12) 佐光俊樹, 孟令宇, 利谷翔平, 寺田昭彦, 細見正明: 化学工学会 第81年会 (2016)
“稲わらと豚尿を用いた簡易型高温乾式メタン発酵運転方法の検討”
- 13) 島村誠人, 利谷翔平, 寺田昭彦, 細見正明: 第50回日本水環境学会年会 (2016) ” 発酵残渣を施肥したハス田における窒素挙動の解明”
- 14) 古畑光, 島村誠人, 今野凌, 利谷翔平, 周勝, 寺田昭彦, 細見正明: 応用生態工学会 第20回大会 (2016) “ハス (*Nelumbo nucifera*) はどの葉からガスを放出しているのか”
- 15) Wang, Y., Koyano, K. and Toyota, K: 日本線虫学会 (2016) ” Effects of dry biogas digestate application on root knot nematodes and soybean cyst nematodes”
- 16) 上里亮世, 孟令宇, 利谷翔平, 寺田昭彦, 細見正明: 第19回化学工学会学生発表会小金井大会 (2017)
“稲わらと豚尿の高温乾式メタン発酵における含水率の影響”
- 17) 古畑光, 島村誠人, 今野凌, 利谷翔平, 周勝, 寺田昭彦, 細見正明: 第19回化学工学会学生発表会小金井大会 (2017) “ハスの温室効果ガス放出の評価および機構解明”
- 18) 那須啓亮, 利谷翔平, 寺田昭彦, 細見正明: 第51回日本水環境学会年会 (2017) “乾式メタン発酵残渣を施用したハス田のレンコン収量及び水質への影響”
- 19) 古畑光, 利谷翔平, 寺田昭彦, 細見正明: 第51回日本水環境学会年会 (2017) “ハス (*Nelumbo nucifera*) の温室効果ガス放出”

7. 研究者略歴

課題代表者: 細見 正明

大阪大学工学部卒業、博士 (工学)、
現在、東京農工大学大学院工学研究院 教授

研究分担者

1) 寺田 昭彦

早稲田大学大学院理工学研究科応用化学専攻 博士後期課程修了、博士 (工学)、
現在、東京農工大学大学院工学研究院 准教授

2) 豊田 剛己

名古屋大学農学研究科農芸化学専攻博士後期課程修了、博士 (農学)
現在、東京農工大学大学院農学研究員 教授

1-1404 簡易型乾式メタン発酵による養豚排水処理と発酵残渣の有効利用

(1) 簡易型乾式メタン発酵の開発

東京農工大学 大学院工学研究院

細見正明

平成26～28年度累計予算額：37702千円

(うち、平成28年度予算額：10463千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

現在、養豚排水中の窒素処理は、一律排水基準（100 mg/L）のみならず暫定排水基準でさえも、零細な養豚農家にとって達成が難しい。本研究では、含水率80%程度の粘土状で発酵が進行し、排水が発生しない乾式メタン発酵による養豚排水処理システムを提案する。特に、本研究では、零細農家でも使用可能な低コスト・簡易型乾式メタン発酵処理システムを検討した。また、安定した運転のモニタリング指標として、汚泥中の各種有機酸濃度やアンモニア濃度、微生物叢の分子生物学的解析の結果から適切な指標を検討した。

豚し尿を含む滲出液を循環させる方式（浸漬および浸透）を検討したところ、汚泥を浸漬させる方式がよりメタン生成が高くなる傾向を示した。しかし、トランスクリプトーム解析の結果、豚尿を含む滲出液で浸漬することにより、メタン生成を担う微生物であるメタン生成古細菌が阻害を受けることが示唆された。そこで、非液循環型の簡易型乾式メタン発酵として、基質（稲わらおよび豚尿混合物）と種汚泥の混合比（F/I比）を調製することで、効率よく高温乾式メタン発酵することができた。さらに、運転パラメータとして攪拌頻度、温度変動および含水率の影響を調査した。その結果、攪拌に関しては、仕込みの段階で基質と種汚泥をよく混合することで、発酵中は攪拌せずともメタン発酵が進行することが分かった。また、55℃で行う高温乾式メタン発酵は、1週間程度温度が20℃まで低下しても活性はすぐに戻ることがメタン発生速度およびメタトランスクリプトーム解析から示された。高温乾式メタン発酵は発酵中の含水率が低下すると活性が低下したが、低含水率で種汚泥を馴養することで、活性の低下を抑制できることが示唆された。以上より、重機やコンテナを活用した簡易型乾式メタン発酵を提案し、そのコスト試算を行った。

[キーワード]

高温乾式メタン発酵、稲わら、豚尿、低コスト、簡易化

1. はじめに

年間約9000万トンの家畜排せつ物の3割を占める養豚業は、農地を所有しないことが多く、農地還元が困難であった（乳用牛・肉用牛経営農家は自己保有地があり、農地還元が実施可能である）。そのため、従来型の養豚排水の活性汚泥法をはじめとした排水処理技術と豚糞のコンポスト化によるリサイクルでは、処理コストとともに温室効果ガスの排出量が増大することになる。また、輸入飼料の高騰化をはじめ、口蹄疫などの問題もあり、養豚業の置かれている状況は大変厳しい状況にある。特に、窒素の一律排水基準（100 mg/L）は、零細な養豚農家にとって達成が難しい。そのため、暫定排水基準が定められているものの、いずれは一律排水基準に対応する必要がある。

そこで、申請者らは、固形分が15～30%と多く粘土状で発酵が進行し、排水が発生しない乾式メタン発酵と多収米による飼料生産を組み合わせた養豚排水処理システムを提案する。本システムでは、多収米生産で発生する稲わらと養豚より発生する豚尿を混合し、高温乾式メタン発酵する。これにより、再生可能エネルギーであるメタンガスならびに肥料成分に富む固形の発酵残渣を得る。発酵残渣は多収米の肥料として利用することで、養豚経営における排水問題の解決と飼料の自給化を同時に達成できる。さらに、メタンガスをエネルギーとして使用することで、温室効果ガス放出の削減にもつながる。

しかし、乾式メタン発酵は粘土状で発酵するため、基質（豚ふん尿と稲ワラ）と嫌気性微生物からなる汚泥の混合攪拌が困難である。商業用の実規模乾式メタン発酵では機械攪拌のための特殊で高価なポンプや攪拌装置が必要となり、小規模養豚農家にとって導入は困難である。従って、基質と汚泥の接触を低コストかつ簡易にする乾式メタン発酵の開発が必要である。

2. 研究開発目的

本研究では、より低コストな高温乾式メタン発酵による養豚排水処理技術を確立するために、稲ワラを含む汚泥を固定ろ床として、豚し尿を含む浸出液を循環させる簡易型乾式メタン発酵処理システムを構築する。具体的には、定期的に上部から固定ろ床に浸出液を散布して浸透させる浸透方式と固定ろ床を一定時間浸漬・放置し、固定ろ床下部から浸出液を引き抜く浸漬方式について、バイオガス生成量及び生成速度の観点から浸出液の循環方法の最適化を図る。さらに、循環する浸出液に関しては、豚し尿のみの系を対照系として、メタン発酵汚泥と豚し尿の（比率を変えた）混合液を実験系とし、最適な混合比率を求める。また、安定した運転のモニタリング指標として、汚泥中の各種有機酸濃度やアンモニア濃度、微生物叢の分子生物学的解析の結果から適切な指標を確立する。

3. 研究開発方法

（1）液循環方式が高温乾式メタン発酵に及ぼす影響

1) リアクター、基質および種汚泥

異なる液循環方式がメタン発酵に与える影響を評価するために、小型の乾式メタン発酵装置を構築した（図(1)-1）。500 mlのアクリルカラムを利用し、両端をテドラーバッグおよびガス採取が可能なコックに接続したシリコン栓で密閉した。発酵槽内部の反応槽として水切り可能なフレコンバッグ（目開き0.4 mm）（200 mL）を用いることで液循環が実施できるようにした。



図(1)-1 実験装置概要図

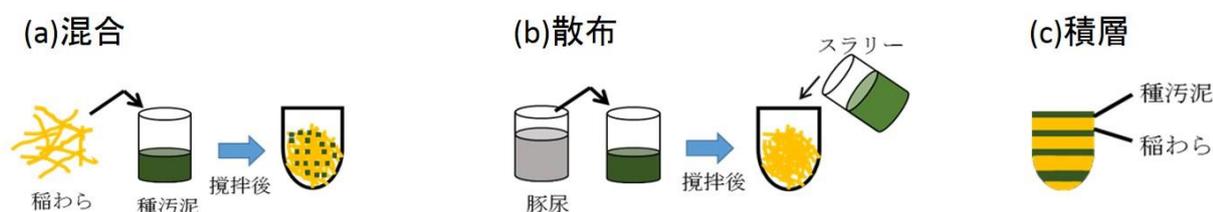
本研究で用いた種汚泥は、炭素/窒素比 (C/N比) =30、汚泥滞留時間 (SRT) =40 dayで豚尿と稲わらを高温乾式メタン発酵させた際の発酵残渣を用いた。実験開始前に、種汚泥に残存している有機物を取り除くため、窒素ガス (N₂) 雰囲気下、55°Cで前培養を行った。豚尿は、茨城県の養豚農家から提供されたものを用いた。また、多収米は茨城県行方市の水田において収穫されたタカナリを用いた。実験に用いる前に多収米を天日干で自然乾燥させ、穂部分を取り除いた葉と茎部分を2~3 cmに切断したものを用いた。各原料の性状を表(1)-1に示す。

表(1)-1 原料の性状

測定項目	種汚泥	豚尿	稲ワラ
TS [% , w. w]	21.35	4.59	92.29
VS [% , w. w]	11.64	2.37	69.79
TOC [mg/kg-w. w]	58100	10760	355800
TON [mg/kg-w. w]	3500	2336	4861
アンモニア態窒素 [mg/kg-w. w]	2098	3035	-
pH [-]	8.7	7.8	-
n-吉草酸 [mmol/kg-w. w]	0.00	0.00	-
iso-吉草酸 [mmol/kg-w. w]	0.00	8.13	-
n-酪酸 [mmol/kg-w. w]	0.00	20.80	-
iso-酪酸 [mmol/kg-w. w]	0.00	7.83	-
プロピオン酸 [mmol/kg-w. w]	0.00	49.03	-
酢酸 [mmol/kg-w. w]	0.00	167.57	-

2) リアクター運転方法

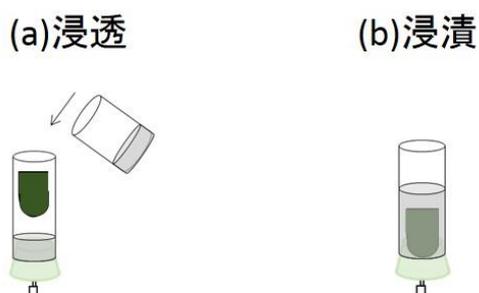
反応槽への種汚泥および基質の仕込み (混合) 方法および高温乾式メタン発酵中の液循環方法の検討を行った。図(1)-1に示したリアクターの反応槽内に種汚泥30 g、稲わら10 gを図(1)-2に示す3種類の混合方法によりセットした。混合は、基質と種汚泥が均一になるよう、完全に混合する方法である。散布は、種汚泥と豚尿 (150 g) を混合したスラリーを反応槽内の稲わらに散布する手法である。なお、スラリー調製に使用した豚尿は後述する液循環に使用する。積層は、フレコンバッグ中に種汚泥と稲わらを交互にセットする方法であり、本研究では種汚泥および稲わらが共に4層になるようにセットした。



図(1)-2 混合方法の概念図 (a: 混合、b: 散布、c: 積層)

各種混合方法により、反応槽に基質および種汚泥を充填した後、ヘッドスペースをN₂で置換し、55°Cで

培養を行った。培養中、定期的に豚尿150 gを2種類の液循環方式(図(1)-3)によって、反応槽内の汚泥に循環させた。浸透は、フレコンバッグ上からビーカーを用いて、豚尿を既定の回数かける手法である。浸漬は、フレコンバッグを既定の時間、豚尿に浸す方法である。浸透および浸漬はそれぞれ3日に1, 3, 5, 24, 48, 72時間の割合で実施した。培養は50日間実施し、定期的にテドラーバッグ中のバイオガス量の定量およびサンプリングを行った。サンプリングしたガス中のCH₄およびCO₂濃度は熱伝導度検出器を装備したガスクロマトグラフィ(GC-TCD)により定量した。



図(1)-3 液循環方法の概念図 (a: 浸透、b: 浸漬)

3) メタン発酵特性の評価

基質および種汚泥の混合方法および液循環方式がメタン発酵の特性に与える影響を評価するために、メタンガス発生量を回分式メタン発酵におけるモデル式であるGompertzの式¹⁾にフィッティングした。

$$M = P \times \exp \left[-\exp \left\{ \frac{R_m \times e}{P} (\lambda - t) + 1 \right\} \right]$$

ここで、M: 単位有機物 (VS) 当りの累積メタンガス生成量 (mL/g-VS)、λ: 遅延期 (day)、P: メタン生成ポテンシャル (mL/g-VS)、R_m: 最大メタン生成速度 (mL/(g-VS/day))、e: 自然対数の底である。Gompertzの式において、遅延期は、メタン発酵の立ち上がりに要する期間である。メタン生成ポテンシャルは、最大のメタン生成量、最大メタン生成速度は、メタン発酵立ち上がり後のメタン生成速度である。フィッティングはMicrosoft Excelのsolver関数を用いて、式からの計算値と実験値の平方誤差の和が最小となるP、R_m、λを求めた。

4) 微生物活性評価

乾式メタン発酵過程で、温度変化やメタン発酵阻害因子であるアンモニアが高濃度に蓄積した際、どのようにメタン生成が阻害されるかを明らかにするために、トランスクリプトーム解析を実施した。トランスクリプトーム解析では、微生物が有する各種遺伝子の発現量を定量し、微生物のどの機能が活発に働いているかを明らかにできる。本研究では、メタン生成古細菌の一種である*Methanosarcina barkeri*が有する遺伝子の発現解析を実施した。

本研究では、高温乾式メタン発酵を中温環境および低C/N比で行った際のトランスクリプトーム解析を実施した。実験系は、C/N比30の稲わらと豚尿の高温乾式メタン発酵 (C系)、35°Cで発酵を行う中温乾式メタン発酵 (M系) (温度低下を想定) および尿を過剰に添加し、低C/N比 (5.2) にした系 (U系) の3種類を設定した。各実験系を表(1)-2に示す。各実験系に対応した原料を500 mLデュラン瓶に仕込み、ヘッドスペースを窒素ガスで置換した後に、培養を行った。培養開始0、1

および7日後にデュラン瓶から汚泥を採取した。採取した汚泥から全RNAを採取し、逆転写反応によりcDNAに変換後、PCRによる増幅を行い、シーケンサ解析し、サンプルに含まれるmRNAの定性および定量を行った。

表(1)-2 トランスクリプトーム解析の実験系

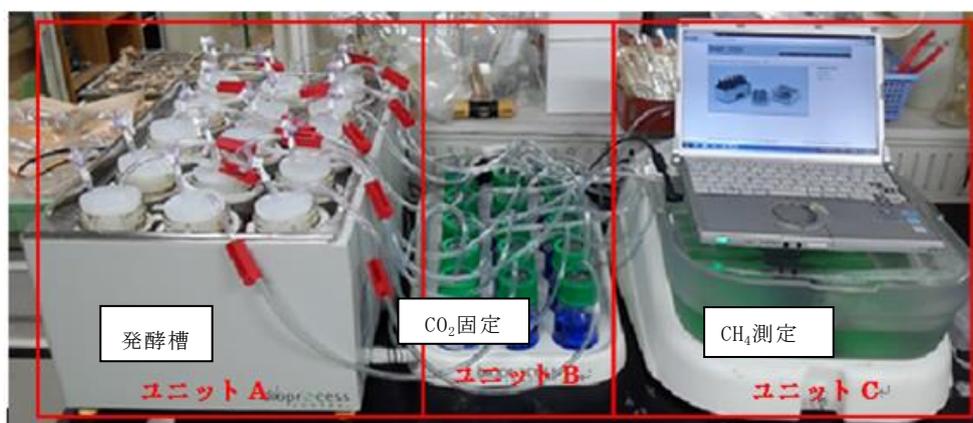
系	発酵温度 (°C)	種汚泥 (g)	稲わら (g)	尿 (g)	C/N比
C (高温)	55	30	10	12	30
M (中温)	35	30	10	12	30
U (尿過剰)	55	30	10	150	5.2

(2) 種汚泥の接種量が高温乾式メタン発酵に及ぼす影響

1) 接種量と乾式メタン発酵特性の関係

高濃度のアンモニウムを含む豚尿を循環する液循環方式では、発生する排水の窒素除去の必要性やアンモニウムによるメタン生成阻害が懸念される。そこで、液循環によらず基質と菌体の接触を向上し、メタン発酵を効率化する手法が必要と考えられた。本研究では、メタン発酵に不可欠なメタン生成古細菌などの微生物が含まれる種汚泥に着目し、その接種量を調整することにより、基質である稲ワラ周囲の微生物の量をコントロールし、メタン発酵効率の向上を図ることとした。まずは、自動メタンポテンシャルテストシステムを用い、異なる投入基質量 (Feedstock) と種汚泥接種量 (Inoculum) の比 (F/I比) を変化させてメタン発酵を行い、メタン生成ポテンシャルを調べ、種汚泥の接種量が乾式メタン発酵に与える影響を評価した (図(1)-4)。本装置は、発酵槽、CO₂固定ユニット、CH₄測定ユニットの3ユニットから構成されている。本装置の特徴は、15本のボトル (500 mL) CH₄発生量を同時にかつ自動的に評価できる点である。本装置を用いて、ブランクである種汚泥のみのCH₄発生量および、4種類の異なるF/I比の基質のCH₄発生量を評価した (表(1)-3)。なお、各系3連で調製した。ここで、F/I比は基質および種汚泥の強熱減量 (600 °Cで一時間強熱した際の重量減少割合であり、有機物量の指標) の比である。発酵は、55°Cで40日間行った。

AMPTSにより得られた累積CH₄生成量を、上述のGompertzの式にフィッティングすることにより、異なる系におけるメタン発酵特性をまとめ、比較を行った。



図(1)-4 AMPTS装置

表(1)-3 基質・種汚泥比 (F/I比)検討の実験系

F/I比[-]	豚尿[g]	稲ワラ[g]	種汚泥[g]	C/N比 [-]	TS [%]
3	34	10	24	30	21.38
2			36		
1			72		
0.5			144		

2) F/I比を指標とした運転方式の検討

接種量を制御した簡易型乾式メタン発酵の運転方式について検討を行った。具体的には、従来の連続式メタン発酵より簡単な回分式及び流加培養式の乾式メタン発酵について検討した。回分式においては、F/I比0.5および3の系を設け、それぞれのCH₄生成量及び滞留時間などパラメータについて検討した。流加培養式については、低F/I比から培養を開始し、定期的に基質を投入し、発酵を行った

等量の基質(稲ワラ及び豚尿)を異なる接種量(F/I比で0.5および3)で回分式高温乾式メタン発酵を行った際のCH₄発生量や反応時間を調査した(表(1)-4)。基質および種汚泥をよく混合して45 Lリアクターに投入し、窒素パージを行い嫌気条件下55℃で静置培養を行った。実験開始時の汚泥及び実験終了時の汚泥サンプルだけを採取し、分析した。リアクターには湿式ガスメーターを接続し、バイオガス生成量をモニターした。さらに、3日ごとにバイオガスをサンプリングし、バイオガス中のCH₄、CO₂およびH₂ガス濃度をGC-TCDにより測定した。

表(1)-4 各F/I比の実験条件

F/I比	種汚泥[kg-w.w]	尿[kg-w.w]	稲ワラ[kg-w.w]	TS[%]	C/N比
3	1.6	1.25	0.5	24	20.8
0.5	9.6			22.2	

回分式メタン発酵より多くの基質を処理するために、流加培養によるメタン発酵性能の評価を行った。流加培養とは、発酵汚泥を引き抜かず、基質のみを定期的に添加していく培養方法である。今回の実験では、F/I比0.43で嫌気培養(55℃)を開始し、7日に1回基質を投入した。最終的に総基質投入量と培養開始時の種汚泥とのVS比が3(つまりF/I比3)となるまで基質を投入し、培養を行った。後述するように、低F/I比の方が高F/I比よりもメタン生成量が高いので(後述)、このようにすることで反応槽内のF/I比を低く保つことができ、F/I比3で回分培養を行う場合よりもより早く基質を分解できるのではないかと考えられた。回分式の実験時と同様に、培養期間中3日に1回ガスサンプリングを行い、CH₄発生量を定量した。発酵終了時の汚泥サンプルを採取し、イオンクロマトグラフィおよびHPLCによりアンモニア(NH₄-N)濃度および有機酸濃度を定量した。実験開始時の実験条件および発酵中の基質投入量をそれぞれ表(1)-5および表(1)-6に示す。

表(1)-5 流加培養の仕込み条件

	仕込み量		混合汚泥	
	湿重 (kg w. w.)	有機物換算 (kg VS)	C/N比 (-)	含水率 (%)
種汚泥	3.2	0.30	36	78
豚尿	0.42	0.0036		
稲わら	0.17	0.13		

表(1)-6 流加培養中の基質投入量

	湿重 (kg w. w.)	有機物換算 (kg VS)
豚尿	0.26	0.0023
稲わら	0.10	0.080

3) F/I比が微生物菌叢に及ぼす影響

異なるF/I比が微生物菌叢に与える影響を明らかにするために、F/I比0.5および3で稲わらと豚尿の高温乾式メタン発酵を実施し、発酵中の汚泥菌叢を調査した。表(1)-4と同様の条件で回分発酵を実施した。発酵中、定期的に汚泥を採取し、有機酸を測定すると共に、次世代シーケンサにより汚泥中に存在する細菌および古細菌の組成を分析した。

さらに、汚泥からRNAを抽出し、メタトランスクリプトーム解析を実施した。これにより、どのような反応がF/I比によって影響を受けていたかを評価した。

(3) 運転環境と高温乾式メタン発酵の安定性

1) 回分高温乾式メタン発酵における攪拌の影響

乾式メタン発酵は粘土あるいは固形状で発酵が起こるため、液状で発酵する湿式メタン発酵に比べて攪拌により微生物と基質の接触を良くする必要がある。一方、攪拌を省略することができれば、発酵槽の構造もシンプルになり、より低コスト化を図ることができると考えられる。そこで、高温乾式メタン発酵における攪拌頻度の影響を評価した。

攪拌の影響を調べるために、無攪拌、1日1回攪拌(1 day)、3日に1回攪拌(3 day)および7日に1回攪拌(7 day)の4種類の攪拌頻度を比較した。2 Lの培養瓶に、種汚泥300 g、豚尿70 gおよび稲わら35 gを投入し、よく混合した。混合後、ガス採取用の3方コックとガスバッグが接続されたゴム栓で密栓した。密栓後、窒素ガスで5分間パージし、培養瓶内のヘッドスペースを嫌気状態とした後、55 °Cの恒温槽で培養開始した。

培養期間中、発生したガス量をガスバッグに蓄積したガス量から推定した。また、ガスバッグ中のガスの一部を真空瓶に採取し、ガス成分分析に供した。ガス採取後、攪拌を行う系についてはゴム栓を開け、大気雰囲気ですパチュラを用いて混合汚泥を5分間程度攪拌し、再度ゴム栓をして窒素パージした。また、培養期間中定期的に汚泥の酸化還元電位(ORP)を計測し、汚泥中の酸化還元状態を評価した。

採取したガス中の CH_4 、 CO_2 および H_2 濃度はGC-TCDを用いて測定し、そこで得られたガス組成およびガスバッグ中のガス発生量から、メタンガス生成量を求めた。

2) 高温乾式メタン発酵における温度の影響

高温乾式メタン発酵では種汚泥の再利用や発酵槽の開閉などにより種汚泥周囲の温度が変化した場合、活性への影響が危惧される。本研究では、高温乾式メタン発酵の温度を低下させた場合のメタン生成への影響を調べるとともに、低下した温度をもとに戻した際の活性の回復がどのようになるかを調査し、温度変化に対するメタン発酵の安定性を評価した。

20 Lリアクターを用いた反復回分実験を実施した。稲わらおよび豚尿の混合基質(C/N比33)を汚泥滞留時間(SRT)が40日、有機物負荷 $1.2 \text{ kgVS/m}^3 \text{ sludge/day}$ となるよう定期的に汚泥の抜き

出しと基質の投入を行った。温度条件は、(1) 55 ℃一定（温度一定系）、(2) 55 ℃一定で運転し、3週間後から20 ℃で1週間運転し、その後55 ℃で運転（温度再上昇系）および(3) 55 ℃一定で運転し、3週間後から20 ℃で運転（温度低下系）、の3条件を評価した。

3) 低含水率高温乾式メタン発酵の検討

a 高温乾式メタン発酵における含水率の影響

乾式メタン発酵後に排出される発酵残渣は、一部は種汚泥として乾式メタン発酵槽に返送され、残りは残渣処理工程（堆肥化あるいは炭化）で処理される。堆肥化や炭化では含水率60%以下が望ましいといわれている。乾式メタン発酵は含水率80%で実施されるため、発酵残渣にオガクズを添加したり、乾燥装置を用いて60%にまで低減する必要がある。そこで、発酵中の混合汚泥（基質である稲わら、豚尿および種汚泥の混合物）の含水率自体を低くできれば、後段の乾燥工程を省くあるいは簡略化し、低コスト化につながると考えられる。

そこで、稲わら及び豚尿の混合比率を変えることで、混合汚泥の含水率を調製し、低含水率での発酵が可能ではないかと考えられる。一方、乾式メタン発酵では発酵中の含水率が低くなるほどメタン収率が下がることが都市ごみやダンボールといったバイオマスで報告されている。特に、含水率が70%を下回ると急激にメタン収率が低下するといわれている。一方、豚尿と稲わらを基質とする高温乾式メタン発酵において含水率の影響を調査した例はない。そこで、本研究では含水率60～80%となるように稲わら、豚尿及び種汚泥混合物を調製し、含水率が回分高温乾式メタン発酵に与える影響を評価した。

実験系は、異なる4つの含水率として60、65、70、80%およびブランク（種汚泥のみの系）の5系とした。表(1)-7に示すとおり、基質および種汚泥の量は統一し、イオン交換水のみを変化させることによって含水率を調整した。培養は、自動メタンポテンシャルテストシステムを用いて行った。

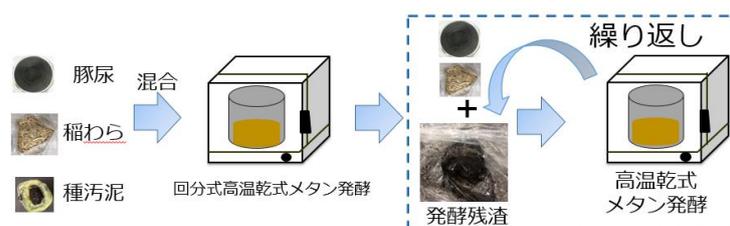
表(1)-7 各系の基質、種汚泥および水の混合割合

含水率[%]	60	65	70	80	blank
種汚泥[g]	33.5	33.5	33.5	33.5	33.5
稲わら[g]	20.0	20.0	20.0	20.0	-
豚尿[g]	5.0	5.0	5.0	5.0	-
イオン交換水	0	8.4	19.5	58.5	-

b 乾式メタン発酵における馴養の効果

i 含水率漸減馴養

低含水率の環境下において、高活性に働ける微生物を多く含んだ種汚泥を調製することができれば、高い含水率のときと同等、もしくはそれに近いメタン生成量を得ることができるのではないかと考えられる。メタン発酵の種汚泥（微生物）は、阻害が起こるような環境で培養すると、その阻害に耐性ができる。これは馴養と呼ばれるが、含水率をパラメータとする馴養は報告例がない。そこで本研究では、高含水率から低含水率まで徐々に含水率を下げた回分乾式メタン発酵を行い、低含水率環境に種汚泥を慣れさせる、含水率漸近馴養法(図(1)-5)を提案し、その効果を検証した。



図(1)-5 含水率漸近馴養法の概念図

乾式メタン発酵では含水率75%より低くなると急激なメタン生成の低下が報告されている。そこで、含水率75%で培養を行い、その発酵残渣を種汚泥として含水率70%でメタン発酵を行った。含水率75および70%の培養時における基質および種汚泥の混合割合は表(1)-8のようにした。基質および種汚泥の量は統一し、イオン交換水のみを変化させることによって、含水率を調整した。なお、含水率75%の培養で使用した種汚泥の含水率は83%だった。

表(1)-8 各含水率における混合割合

混合含水率[%]	種汚泥[g]	尿[g]	稲わら[g]	イオン交換水[g]
75	2550	383	1469	2570
70	2550	383	1469	1436

ステンレス製の45 Lリアクターに、種汚泥、混合基質(豚ふん尿、稲わら)およびイオン交換水を表(1)-3のような混合割合となるよう、投入し、よく攪拌した。その後、フタで密閉後ヘッドスペースを N_2 ガスで置換し、55℃一定で恒温槽内で回分式高温乾式メタン発酵を行い、メタンガス発生量が収束するまで培養した。フタにはサンプリング用の二方コックおよび積算ガス流量計が接続されており、発生したガス(バイオガス)の累積発生量が自動的に記録された。含水率75%の培養終了後、発酵残渣を種汚泥として含水率70%で培養を行った。

リアクターのフタに取り付けた積算ガス流量計の目盛りからバイオガス発生量を読み取り、同時にリアクターに取り付けた二方コックから60 mlのガスを捕集し、あらかじめ脱気されている50 mlのバイアルに封入して保存した。このバイアルから0.5 mL採取し、GC-TCDを用いて CH_4 、 CO_2 および H_2 濃度を測定し、そこで得られたガス組成から、メタンガス生成量および生成速度を求めた。培養途中の汚泥の性状を分析するために、ガスサンプリングと同時に汚泥50 gの引き抜きを行った。汚泥を引き抜く際、手動による攪拌を行った。また引き抜き後にはヘッドスペースの N_2 置換を行った。

ii 馴養効果の検証

培養終了後、培養前の汚泥および培養後の汚泥(馴養前後の種汚泥)を用いて乾式メタン発酵を実施し、馴養の効果の検証を行った。含水率75%で培養した発酵残渣と馴養前の種汚泥(含水率83%の種汚泥)を用いて、含水率70および75%で回分高温乾式メタン発酵を行った。5 L培養瓶に、種汚泥、混合基質(豚ふん尿、稲わら)およびイオン交換水を表(1)-9のように、投入、混合した。ゴム栓で密閉し、 N_2 ガスでヘッドスペースをパージし、55℃一定で恒温槽内で、回分高温乾式メタン発酵を行い、メタンガス発生量が収束するまで培養した。ゴム栓には2 Lテドラーバッグおよび二方コックが接続されており、それぞれ バイオガス

発生量の定量およびガスサンプリングに供した。

表(1)-9 馴養前および馴養後の種汚泥を用いた混合割合

種汚泥	平均混合含水率[%]	種汚泥[g]	尿[g]	稲わら[g]	イオン交換水[g]
馴養前	70	83	10	22	23
	75	83	10	22	0
馴養後	70	80	5	20	21
	75	80	5	20	0

(4) 簡易型高温乾式メタン発酵の経済性

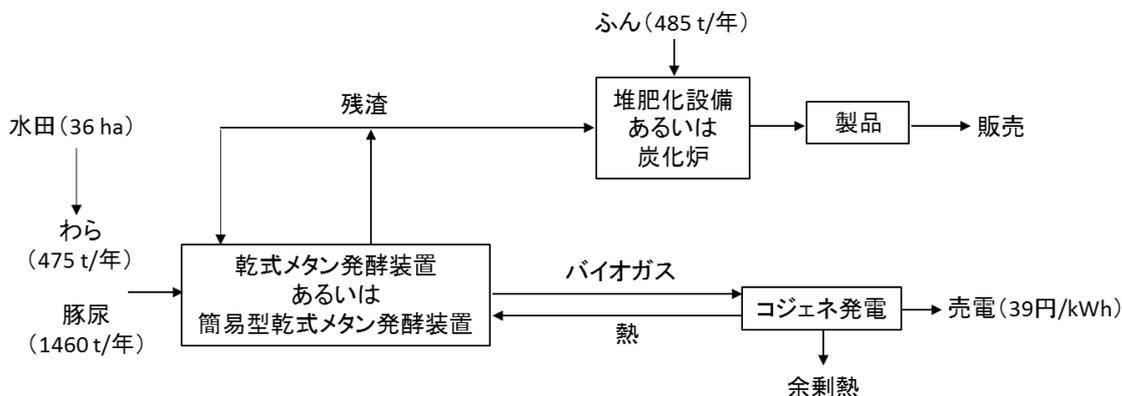
簡易型高温乾式メタン発酵システムの導入により、乾式メタン発酵に関わる経営体の経営が経済的に成り立つかどうかを評価した。本評価では、豚尿処理が問題となっている小規模養豚農家（ここでは肥育豚1000頭規模と仮定）に高温乾式メタン発酵あるいは、簡易型高温乾式メタン発酵を導入した場合、養豚経営、豚尿処理、多収米飼料イネ栽培および資材輸送を含めた支出および収入を算出し、その差分である所得が、関与する経営体（養豚農家および水田農家）の必要所得を満たすかどうかを計算した。

図(1)-6に本試算で想定するプロセスを示す。1000頭規模の養豚場から発生する豚ふん尿は尿とふんに分離される。尿と稲わらは乾式メタン発酵あるいは簡易型乾式メタン発酵で処理される。発生する残渣の一部は種汚泥としてメタン発酵装置にリサイクルし、残りはふんと混合して堆肥化あるいは炭化される。発生する堆肥化物あるいは炭化物は農業資材として販売されるが、堆肥化物の一部は多収米飼料イネ栽培に利用されるものとする。一方、メタン発酵で発生したバイオガス中のメタンはコジェネ発電により電気エネルギーと熱に変換される。電気は全て固定価格買取制度を利用し、1 kWh当り39円で売電する。発生した熱の一部はメタン発酵槽の加温に利用し、余剰熱は廃熱する。

経済性試算では養豚経営、豚尿処理、多収米飼料イネ栽培および資材輸送の各種工程における設備などの導入に伴う費用（導入費）と維持管理に伴う費用（運営費）を文献値等から算出した。養豚経営、乾式メタン発酵装置、多収米飼料イネ栽培および資材輸送の導入費および運営費は細見ら（H23-H25年度環境省総合推進費 1B-1103）を元に算出した。堆肥化設備および炭化炉の導入費・運営費および製品の販売価格は家畜糞尿処理施設・機械選定ハンドブック（畜産環境整備機構，2005）を参考にした。なお、輸送は豚舎から乾式メタン発酵施設への豚ふん尿の輸送、水田から乾式メタン発酵施設への稲わらの輸送、水田から豚舎への玄米（飼料）の輸送および乾式メタン発酵施設から水田への堆肥の輸送（必要分のみ、堆肥化シナリオのみ）を考慮し、輸送距離はそれぞれ10 kmとした。

簡易型乾式メタン発酵装置は、図(1)-7に示すように自走式土質改良機とコンテナからなるシステムを想定した。本システムでは、土質改良機に基質（豚尿およびわら）と種汚泥を入れ、混合する。混合された汚泥はコンテナからなる発酵槽に投入され、回分高温乾式メタン発酵を実施する。発酵槽内の温度は熱交換器により55℃に保たれ、放熱は発酵槽周囲を断熱材で覆うことで抑制する。なお、熱交換器にはコジェネ発電で発生した熱を利用する。簡易型乾式メタン発酵装置の低コスト化を図るため、自走式土質改良機とコンテナは中古品を購入することとした。コンテナの内寸は長さ、高さおよび幅が3.6、2.3および2.3 mであり、コンテナ1基で1日分の豚尿および

稲わらを処理することとした。発酵時間は30日のため、30基のコンテナを使用することとした。



図(1)-6 経済性試算で想定するプロセス



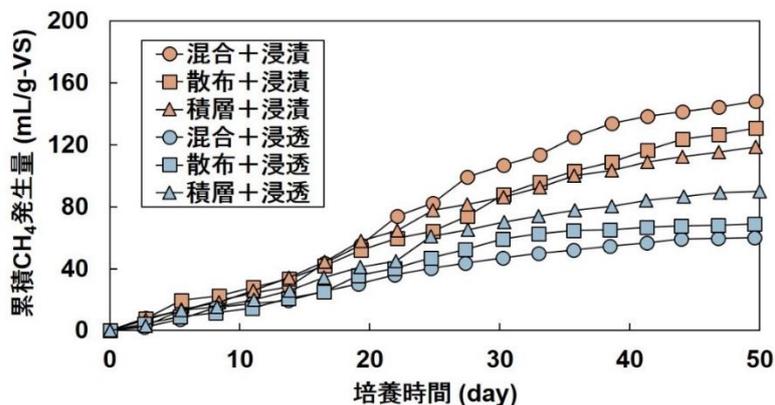
図(1)-7 自走式土質改良機とコンテナを利用した簡易型乾式メタン発酵システム

4. 結果及び考察

(1) 液循環方式が高温乾式メタン発酵に及ぼす影響

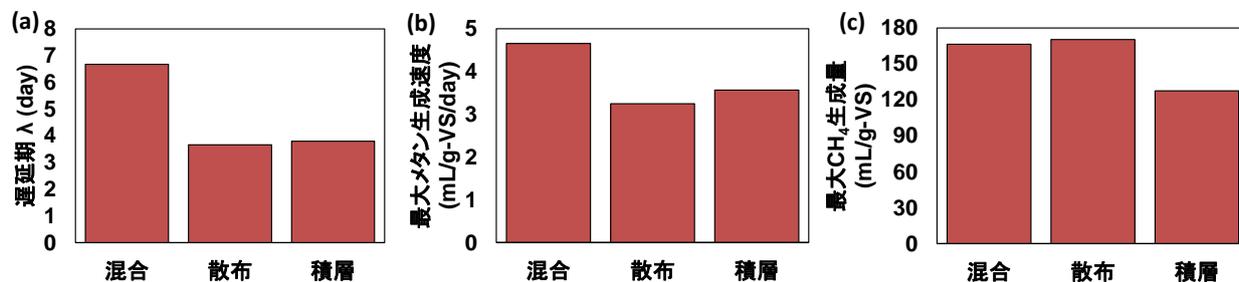
1) 液循環方式および混合方式がメタン発酵効率に及ぼす影響の評価

各系における投入有機物 (VS) あたりの累積メタンガス生成量の経日変化を図(1)-8に示す。50日間の累積CH₄発生量は、浸漬系で124~152 mL/g-VS、浸透系で60~90 mL/g-VSであり、混合方式に関わらず浸漬系の方が浸透系よりも高いメタン生成を示した。汚泥を豚尿で浸漬することにより、汚泥中の微生物が基質全体に拡散しやすくなった事、および基質の分解生成物が微生物と接触しやすくなったと推察される。一方、浸透系では短絡流により豚尿が汚泥全体に均一に浸透しなかったものと考えられる。以上の結果から、浸漬が液循環手法として有用であることが分かった。



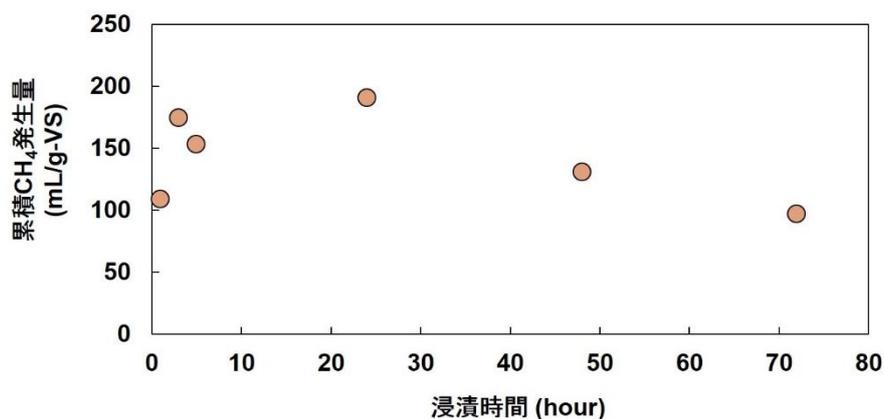
図(1)-8 投入VSあたりの累積メタンガス発生量の経日変化
(浸漬および浸透頻度はそれぞれ3日に1時間)

浸漬方式で運転する乾式メタン発酵において基質・種汚泥混合方式が及ぼす影響を明らかにするために、図(1)-8の結果を、Gompertzの式にフィッティングすることで各パラメータを算出した。算出したメタン生成ポテンシャル (P)、最大メタン生成速度 (R_m)および遅延期 (λ)をそれぞれ図(1)-9a、9bおよび9cに示す。メタン発酵の立ち上がり要する期間である遅延期 λ は、混合系で6.7 days、散布および積層ではそれぞれ3.2および3.6 daysであり、散布および積層系の方が混合系よりも早く立ち上がることが分かった。これは、基質中に菌体が均一に分散している混合系に比べ、散布および積層系では菌体濃度が局所的に高くなるため、基質が分解されやすくなるためと考えられる。メタン発酵立ち上がり後の最大メタン生成速度は混合系が最大を示した。メタン発酵立ち上がり後のメタン生成は菌体と稲わらの接触だけでなく、菌体と接触している稲わらの量も関係すると考えられる。散布系や積層系では反応槽内で局所的に菌体が存在しているため、菌体が接触していない稲わらが混合系よりも多くなるため、最大メタン生成速度が混合系に比べて小さくなったと考えられる。最大メタン生成量は混合系と散布系で同等の値となった。これは、浸漬系の発酵時間50 daysにおける累積メタン発生量は混合系の方が散布系よりも高かったが(図(1)-8)、より長い時間発酵を行うと最大で混合系に匹敵するメタンを生成できることを意味している。さらに、散布方式は混合方式に比べてより簡便に基質と菌体を仕込むことができることを考慮すると、散布方式が基質の仕込み方法として有用と考えられる。



図(1)-9 浸漬系の各混合方式における遅延期 λ (a)、
最大メタン生成速度 R_m (b)および最大メタン生成量P (c)

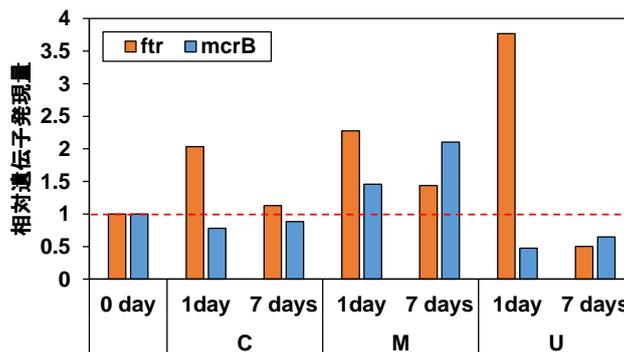
以上の検討から、混合方式は散布、液循環方式は浸漬が簡易型乾式メタンに適していると考えられた。そこで、次は浸漬時間について検討を実施した。浸漬時間は基質と菌体の接触時間に影響すると考えられるため、浸漬時間を長く取るとメタン発生量が増加すると予想される。図(1)-10に、1, 3, 5, 24, 48および72時間浸漬させた場合の累積CH₄発生量を示す。浸漬時間の増加とともに累積CH₄発生量は増加する傾向を示し、浸漬24時間で最大値を示した。しかし、浸漬時間が24時間を越えると、予想に反してCH₄発生量の低下が確認された。浸漬期間中は混合汚泥のアンモニア濃度が、メタン発酵を阻害する濃度である3000 mgN/Lを超えるため、より長期間の浸漬ほどメタン発酵阻害の効果が基質・菌体接触の効果よりも高くなったと考えられる。



図(1)-10 浸漬系の各混合方式における浸漬時間と累積CH₄発生量の関係（発酵時間40日）

図(1)-11にトランスクリプトーム解析により得られた各種メタン発酵条件における相対遺伝子発現量を示す。メタン生成過程で機能する酵素である、ホルミルメタノフラン-テトラヒドロメタノプテリンホルミルトランスフェラーゼ（formylmethanofuran-tetrahydromethanopterin formyltransferase）およびメチル-コエンザイム M 還元酵素のベータサブユニット

（methyl-coenzyme M reductase, beta subunit）の情報を有する遺伝子、*ftr*および*mcrB*の遺伝子発現量を計測することができた。培養初日（0 day）における発現量を基準にすると、*ftr*はいずれの系においても1 day後に増加し、7 day後に低下する傾向を示した。その度合いは、U系において顕著だった。*mcrB*は、0 dayと比較すると、M系で増加し、C系では若干の低下が見られた。一方、U系ではおよそ*mcrB*の発現量がおよぼ半分になっていた。*mcrB*遺伝子が有する情報（メチル-コエンザイム M 還元酵素）は、メタン生成の最終ステップに当るため、この遺伝子の発現が少ないと、メタン生成が起こらなくなる可能性がある。24時間以上豚尿に浸漬させるとメタン発生量が低下（図(1)-10）した原因は、メタン生成段階が阻害されたためと推察される。

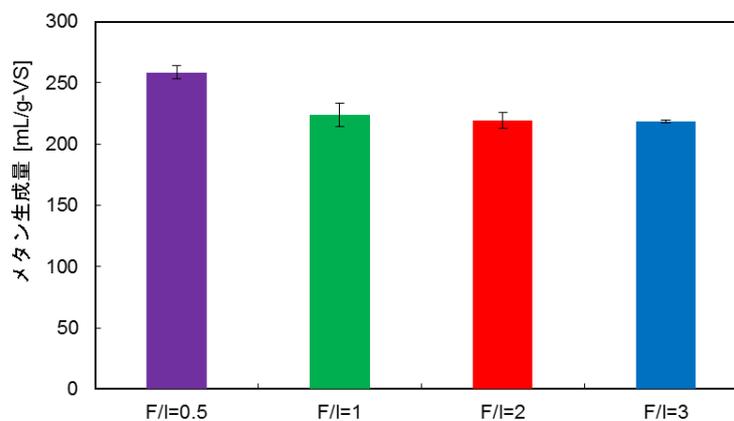


図(1)-11 メタン生成に関わる機能遺伝子の発現量。C: 高温 (55 °C) ・C/N比 = 30; M: 中温 (35 °C) ・C/N = 30) ; U: 高温 (55 °C) ・C/N比 = 5.2。赤い点線は相対遺伝子発現量が1 (0 dayを基準とする) を示す。

(2) 種汚泥の接種量が高温乾式メタン発酵に及ぼす影響

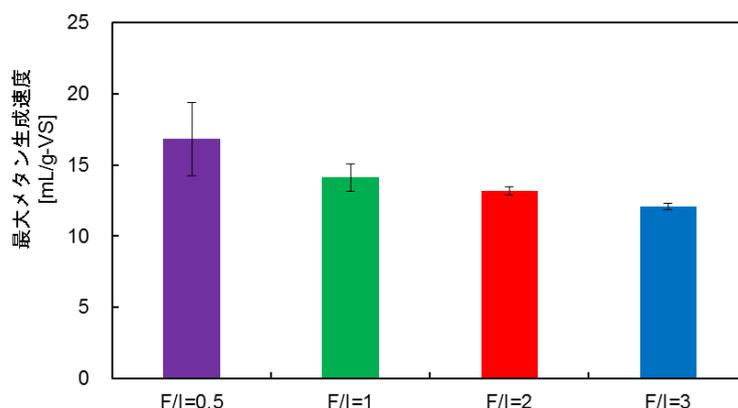
1) 接種量と乾式メタン発酵特性の関係

培養40日目の、異なるF/I比における有機物 (VS) 重量当りの累積CH₄生成量を図(1)-12に示す。40日間の累積CH₄発生量は、F/I比0.5、1、2、3系において、それぞれ259、224、220および219 mL/g-VSであり、F/I比が低くなるほどCH₄生成量が高くなる傾向が見られた。つまり、稲ワラの周囲に種菌である種汚泥の割合が多くなると、CH₄生成量も高くなることが分かった。



図(1)-12 異なるF/I比における累積CH₄生成量

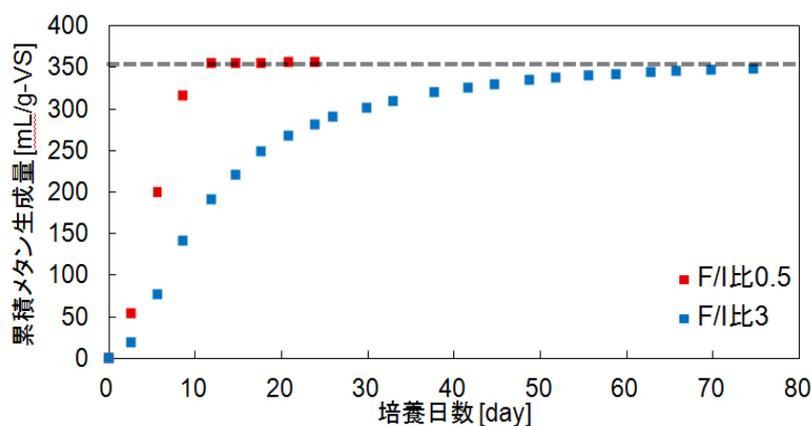
また、Gompertzの式から推定した最大CH₄生成速度は、F/I比が低くなるほど有意に上昇した ($p < 0.05$) (図(1)-13)。F/I比が低い、つまり種汚泥の割合が増えることで、稲ワラ周囲の菌体量が多くなり、基質に接触する菌体割合が増え、メタン発酵がより活発に起こり、CH₄生成量が増加したと推察された。以上より、種汚泥接種量の増加は基質と菌体との接触効率を向上させる手法として有効であることが示された。



図(1)-13 異なるF/I比における最大CH₄生成速度

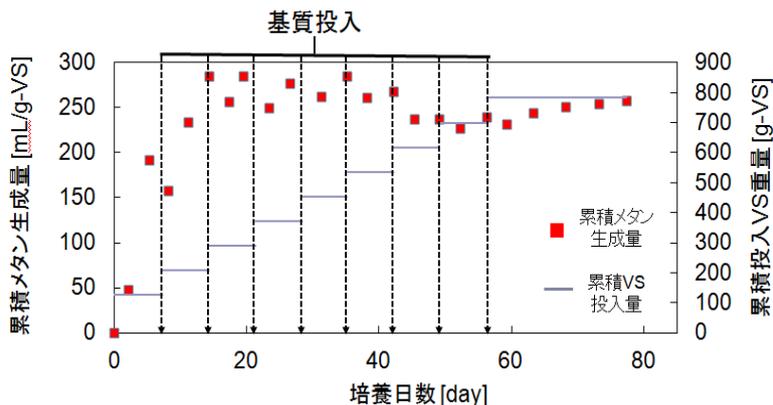
2) F/I比を指標とした運転方式の検討

異なるF/I比における回分試験の結果を示す。図(1)-14より、F/I 0.5およびF/I 3ともにVS当たりの累積CH₄生成量は約350 mL/g-VSまで達した。この値は、稲わらの最大CH₄率である290 mL/g-VS²⁾よりも高かった。さらに、発酵後の発酵残渣の汚泥サンプルを分析したところ、有機酸の蓄積が見られなかった。従って、いずれの系においても基質の発酵はほぼ完了していたと考えられる。また、F/I比0.5ではおよそ12日目で、F/I比3ではおよそ80日間で約350 mL/g-VSに達した。つまり、F/I0.5はF/I 3より6分の1の期間でメタン発酵が可能と考えられる。このことより、同じ量の基質に対して種汚泥の量が多くなると、より高効率、短時間でメタン発酵が可能であることが確認された。



図(1)-14 各F/I比における累積CH₄生成量の経日変化(回分発酵)

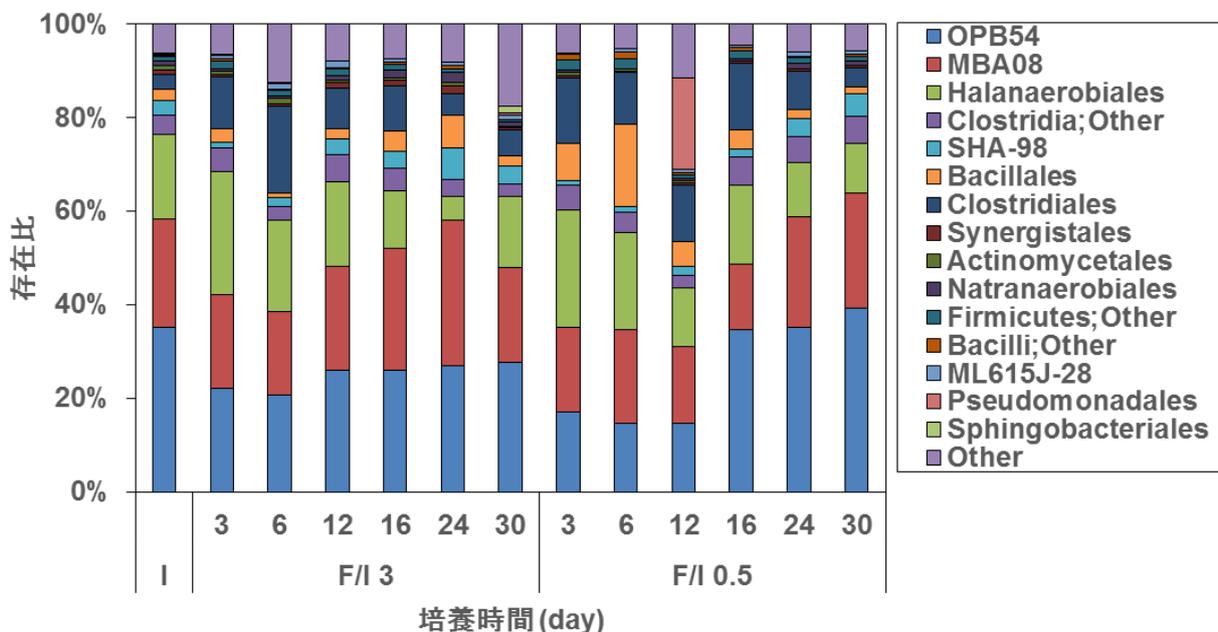
図(1)-15に流加培養方式による累積CH₄生成量を示す。総基質投入量と培養開始時の種汚泥とのF/Iが3となるまで基質を投入し、発酵(メタン生成)が安定するまでに80日間を要した。発酵安定後のCH₄生成量は約250 mL/g-VSだった。発酵後の汚泥にはメタン発酵の中間生成物である有機酸(VFA)の一つの蟻酸の蓄積が確認されたため、有機酸の蓄積による発酵阻害が起こったことが示唆された。よって、この実験条件の場合、F/I比を上げていくことでメタン発酵阻害が起こることが示唆された。



図(1)-15 流加培養の累積CH₄生成量及び累積基質VS投入量の経日変化

3) F/I比が微生物菌叢に及ぼす影響

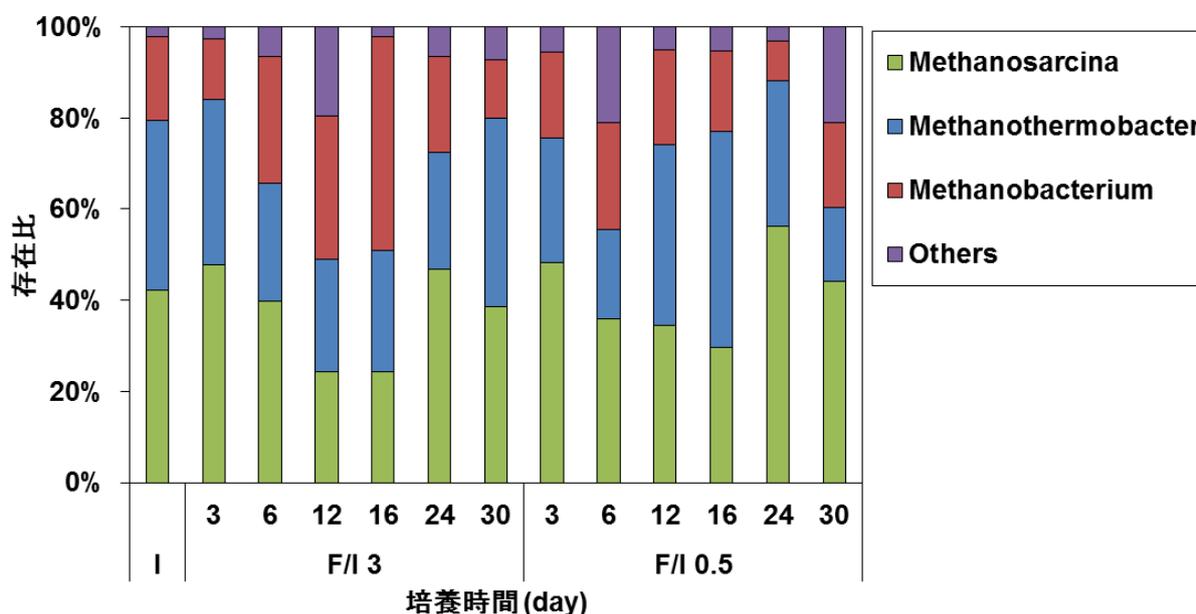
図(1)-16および図(1)-17に、F/I比0.5および3で高温乾式メタン発酵した場合の細菌組成および古細菌組成の変化を示す。細菌組成では、種汚泥およびいずれのF/I比においても、おおよそ50%以上をOPB54、MBA08およびHalanaerobiales目の細菌群が占めていた。OPB54やHalanaerobiales目は発酵を行う菌が属しており、MBA08目は嫌気汚泥やメタン発酵リアクターにおいて見出されている。従って、これらはセルロースなど高分子物質の代謝物の分解に寄与していると考えられる。発酵初期(3日~12日)に、F/I比0.5においてOPB54およびHalanaerobiales目の減少が確認された。これら以外の細菌の中では、同様の期間にBacillales目の存在比がF/I 0.5においてより高くなる傾向が見受けられた。



図(1)-16 種汚泥 (I) および異なるF/I比における発酵汚泥中の細菌組成変化

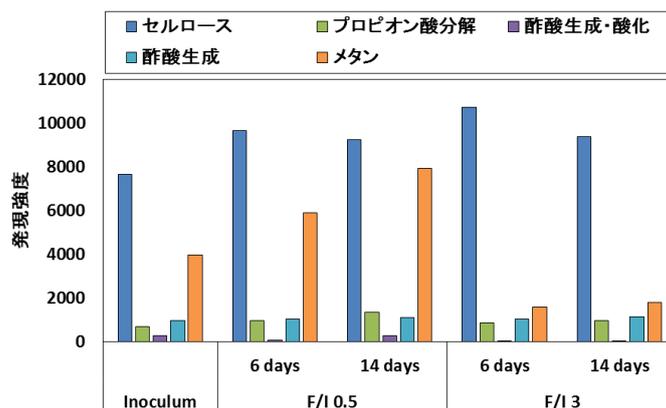
一方、古細菌のほとんどは、メタン生成古細菌である *Methanosarcina*、*Methanothermobacter* および *Methanobacterium* 属が占めていた。これらの菌は、稲わらと豚糞尿の高温乾式メタン発酵リアクターにおいても見出されている³⁾。F/I 0.5において、培養6日から16日にかけて *Methanothermobacter* 属の増加が見られた。*Methanothermobacter* 属は、高温メタン発酵において有機酸が蓄積した際に増加することが確認されている⁴⁾。F/I比0.5の発酵がより早く進むため、有機酸の蓄積はないと考えられ、Horiら⁴⁾の結果とは逆の傾向を示した。一方、培養3日から12日かけて、F/I比3の *Methanosarcina* 属の減少が見られた。*Methanosarcina* 属は酢酸からCH₄を生成する菌であるため、有機物の分解による酢酸の供給が減少したことが示唆される。

以上のように、メタン発酵の運転パラメータ（F/I比）により菌の組成がある程度変化することがわかった。



図(1)-17 種汚泥 (I) および異なるF/I比における発酵汚泥中の古細菌組成変化

さらに、種汚泥およびそれぞれのF/I比で運転しているリアクター中汚泥に関してメタトランスクリプトームを実施し、各種物質の代謝に関わる遺伝子発現を解析した(図(1)-18)。その結果、稲わらに含まれる高分子であるセルロース分解に関わる酵素、プロピオン酸分解に関わる酵素および酢酸生成に関わる酵素をコードした遺伝子の発現に関しては種汚泥と各種F/I比において大きな差は見られなかった。すなわち、これらの反応はF/I比に影響を受けなかったと考えられる。一方、酢酸生成・酸化およびメタン生成に関わる酵素をコードした遺伝子発現の強度はF/I比0.5の方がF/I比3よりも数倍高かった。このことは、F/I比0.5においてはセルロースからメタンまでの代謝がスムーズに進んでいることを示唆している。一方、F/I3においては酢酸生成やメタン生成がF/I比0.5より活発でないため、メタン生成速度も遅くなったと推察される。

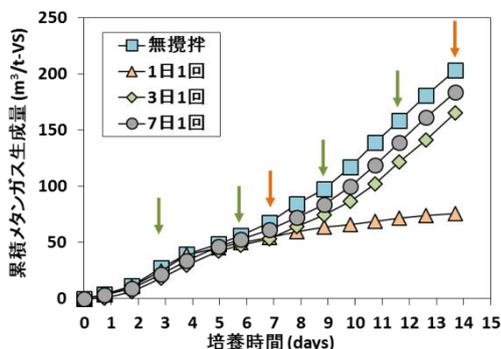


図(1)-18 種汚泥 (Inoculum) および異なるF/I比における遺伝子発現

(3) 運転環境と高温乾式メタン発酵の安定性

1) 回分高温乾式メタン発酵における攪拌の影響

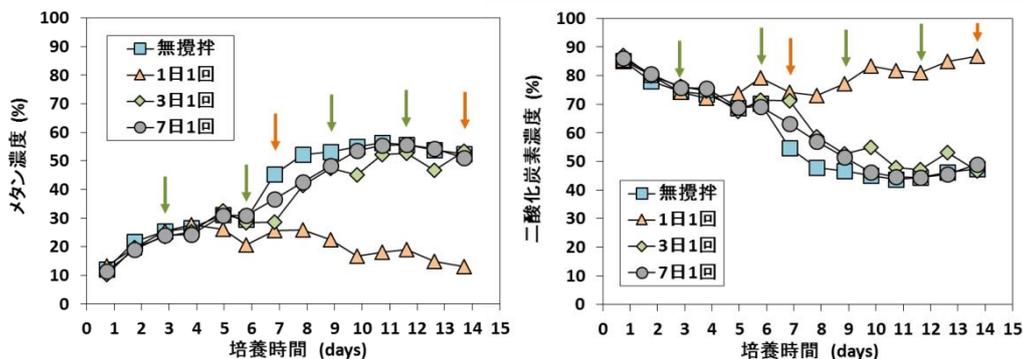
攪拌頻度を変え高温乾式メタン発酵した結果、攪拌頻度が多いほどメタン生成量が少なくなった (図(1)-19)。培養5日目まではいずれの攪拌頻度においても累積メタン生成量はほぼ同等だった。しかし、5日目以降累積量に差が生じ、最終的には無攪拌>7日1回>3日1回>1日1回の順に小さくなった。攪拌頻度を多くすると菌体と基質の接触が良くなりメタン生成量が高くなると想定していたため、予想とは反対の結果となった。



図(1)-19 異なる攪拌頻度における累積メタンガス生成量

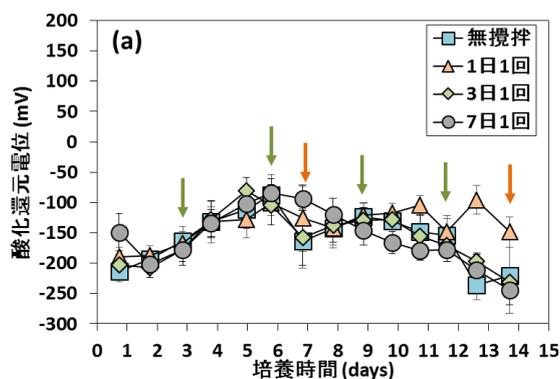
(図中のオレンジおよび緑色の矢印はそれぞれ1日1回および3日1回攪拌系の攪拌日を示す。また、1日1回系は毎日攪拌した。)

生成したバイオガス中のメタン濃度と二酸化炭素濃度 (図(1)-20) に着目すると、特に1日1回の攪拌頻度においてメタン濃度の低下および二酸化炭素濃度の上昇が見られた。通常、メタン発酵が順調に進行した場合、メタンおよび二酸化炭素濃度はおおよそ60および40%になる。無攪拌、7日1回および3日1回の攪拌頻度は概ねこの傾向と一致しており、メタン発酵が順調に進行していたと考えられる。一方、1日1回の攪拌頻度においてはメタンおよび二酸化炭素濃度は最終的には10および90%と生成したガスのほとんどが二酸化炭素となっていた。このことは、1日1回の攪拌頻度の場合、有機物の分解がメタン生成よりも酸化的に行われていることを示唆する。



図(1)-20 異なる攪拌頻度におけるバイオガス中のメタン（左）および二酸化炭素濃度（右）
 (図中のオレンジおよび緑色の矢印はそれぞれ1日1回および3日1回攪拌系の攪拌日を示す。また、
 1日1回系は毎日攪拌した。)

メタン発酵は酸化還元環境に大きく左右されることから、培養中に培養瓶中汚泥の酸化還元電位の変化を調査した。サンプリング時の汚泥攪拌前に汚泥中の酸化還元電位を測定した結果（図(1)-21）、培養期間を通して -50 mV以下を示しており、汚泥が還元的な状態にあることが分かった。一方、培養6日目以降、酸化還元電位は減少し、最終的には -250 mVと強還元状態になったが、1日1回攪拌の系のみ -100 ~ -150 mVの間を推移した。二酸化炭素からのメタン生成は酸化還元状態が -300 mV以下において活発におこることが知られている。従って、1日1回攪拌では酸化還元電位がメタン生成に適しておらず、有機物の最終産物が二酸化炭素でストップしている可能性が高い。



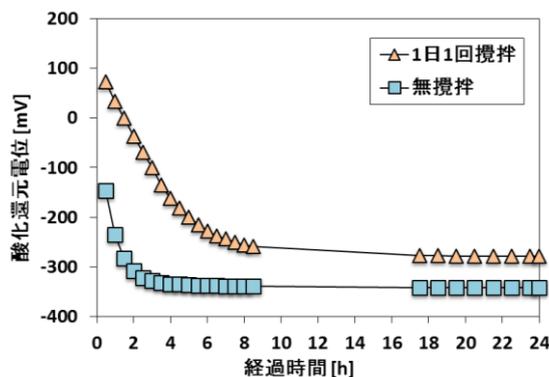
図(1)-21 汚泥中の酸化還元電位

(図中のオレンジおよび緑色の矢印はそれぞれ1日1回および3日1回攪拌系の攪拌日を示す。また、
 1日1回系は毎日攪拌した。)

攪拌後の汚泥中酸化還元電位がどのように変化するのかを明らかにするために、攪拌後した汚泥およびしない汚泥に酸化還元電位計を挿入し、窒素パーズをして密閉し、汚泥中酸化還元電位の変化を計測した。その結果、攪拌の有無に関わらず24時間以内にある一定の酸化還元電位に収束したが、攪拌した系はより高い酸化還元電位に収束した（図(1)-22）。つまり、攪拌により汚

泥内部にまで酸素が混合され、汚泥内部が無攪拌よりも酸化になったと推察される。

以上より、大気に開放した状態で攪拌を行う場合、攪拌は汚泥中に酸素を混合することになり、メタン生成を阻害する要因となることが明らかとなった。従って、培養開始時のみ種汚泥と基質をよく混合して発酵槽に仕込んだ後は、攪拌せずに培養する方法が望ましい。

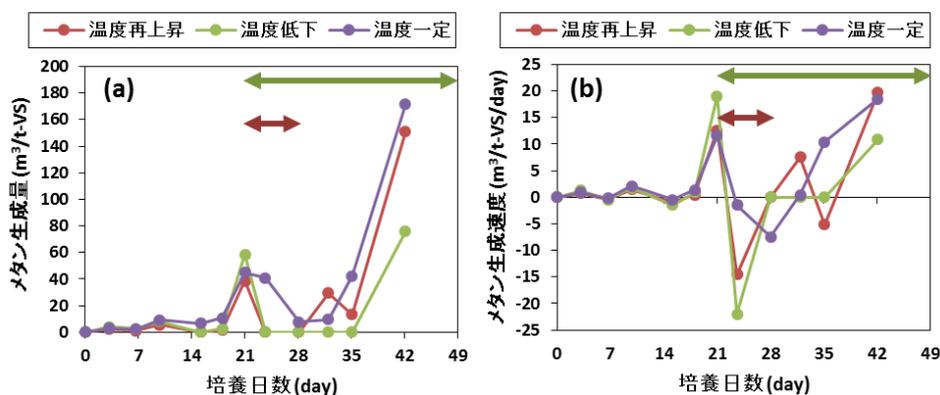


図(1)-22 攪拌後の培養瓶中酸化還元電位の変化

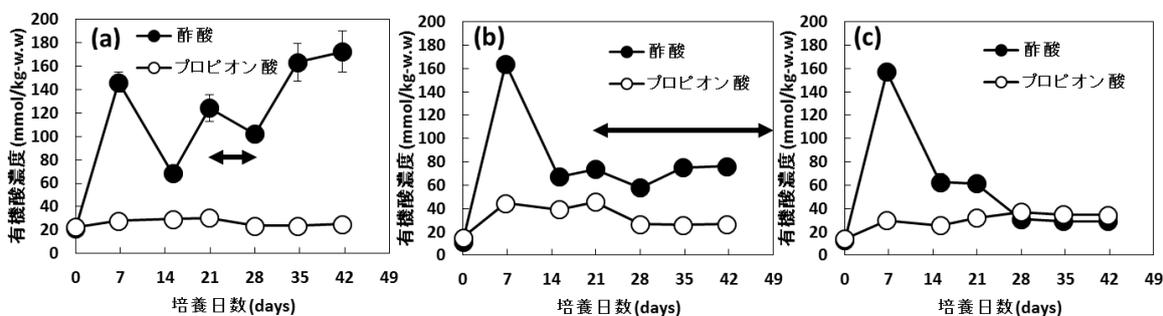
2) 高温乾式メタン発酵における温度の影響

図(1)-23に異なる温度条件で高温乾式メタン発酵を実施した際のメタン生成量およびメタン生成速度を示す。いずれの系も培養21日目までは55℃で培養を行った。この間、全ての系でメタン生成は見られなかった。これは、比較的低負荷で基質を投入したことに加え、種汚泥が馴致されていないためと考えられる。この期間、全系の汚泥中にはメタン前駆体である酢酸が蓄積しており（図(1)-24）、酢酸からメタン生成の過程が律速だったと考えられる。

培養18日目からメタン生成量の増加が見られた。21日目から、温度再上昇系および温度低下系の培養温度を20℃に低下させたところ、両系のメタン生成量の低下が見られた。培養28日目において温度再上昇系の温度を55℃に戻したところ、酢酸濃度の上昇とともにメタン生成量およびメタン生成速度は上昇し、温度一定系と同等に達した（図(1)-23aおよび24a, c）。一方、21日目以降20℃で培養を続けた温度低下系は35日までメタン生成が全く見られなかったが、42日目には温度再上昇系と温度一定系の半分程度までメタン生成量および生成速度が回復した。この時、温度低下系の酢酸濃度は温度一定系のそれよりも高い値で推移しており（図(1)-23aおよび24b, c）、酢酸からのメタン生成活性の低下が示唆される。



図(1)-23 異なる温度条件で高温乾式メタン発酵（反復回分）した際の（a）メタン生成量および（b）メタン生成速度（赤および緑色の矢印はそれぞれ温度再上昇系および温度低下系を温度20℃で培養した期間を示す。矢印のない期間は温度55℃で培養した期間を示す）



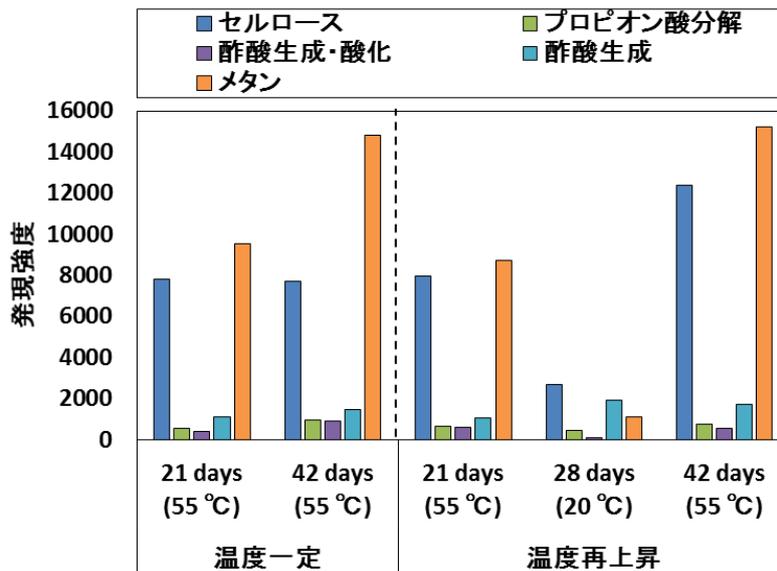
図(1)-24 異なる温度条件（a:温度再上昇; b:温度低下; c:温度一定）で高温乾式メタン発酵（反復回分）した際の汚泥中有機酸濃度（黒矢印はそれぞれ温度再上昇系および温度低下系を温度20℃で培養した期間を示す。矢印のない期間は温度55℃で培養した期間を示す）

温度変化により乾式メタン発酵汚泥中の微生物の活性がどのように変化したかを調べるために、温度一定の系および温度再上昇の系から定期的に汚泥を採取し、抽出したRNAを用いてメタトランスクリプトーム解析を実施した（図(1)-25）。いずれの系、培養日数においても、プロピオン酸分解、酢酸生成・酸化および酢酸生成に関する遺伝子発現に大きな差は見られなかった。一方、セルロース分解とメタン生成に関わる酵素の遺伝子発現は温度一定では8000～14000の強度を保っていたのに対し、温度再上昇の系では温度を55℃から20℃に低下させると両遺伝子の発現が大幅に低下した（図(1)-25）。

以上の結果から、高温乾式メタン発酵において、1週間程度温度が低下しても活性は二週間程度で戻る、あるいは20日程度の長期間室温程度の状態が続いても活性はある程度回復することが示唆された。これは、高温乾式メタン発酵には高温に耐性を持つ微生物だけでなく、中温程度の温度でも活動できる微生物が存在するためと考えられる³⁾。このような特性は、簡易型乾式メタン発酵を行う上で重要な性質と考えられる。

また、図(1)-18および図(1)-25で示されたように、メタン生成量の低下および増加にもっともよく対応するのはメタン生成に関する酵素の遺伝子であることが分かった。メタン発酵でしばしば蓄積が見られる有機酸であるプロピオン酸の分解に関与する遺伝子発現はメタン生成に比べ環

境変動に対する変動が小さかった。

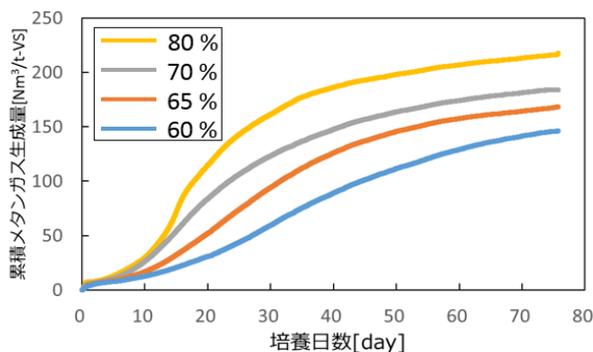


図(1)-25 異なる温度条件における遺伝子発現

3) 低含水率高温乾式メタン発酵の検討

a 高温乾式メタン発酵における含水率の影響

図(1)-26に異なる含水率で稲わらと豚尿を回分高温乾式メタン発酵した際の累積メタン生成量の経時変化を示す。最終的な累積メタンガス生成量は、発酵時の含水率が低いほど低下する傾向にあった。また、ダンボールや下水汚泥など本研究と異なる基質を用いた研究でも同様の傾向が見られるが^{5, 6)}、高含水率(80%)からより低い含水率で発酵した際のメタンガス生成量の低下の程度が異なった。既往の報告では、含水率70%での累積メタンガス生成量は、高含水率時の3~6割程度だった^{5, 6)}。これに対し、本研究では含水率が80%時と比べ、60%で7割程度となり、基質が豚尿と稲わらの場合におけるメタン発酵可能な最低含水率が、ラボスケールにおいては、他の基質に比べて低くなる可能性が示唆された。



図(1)-26 各含水率における累積メタンガス生成量の経日変化

発酵終了時の汚泥を採取し、汚泥の物理化学性評価を実施した（表(1)-10）。メタン発酵は高濃度（3000 mg-N/kg-w.w）のアンモニアで阻害されることが知られている。しかし、発酵後の汚泥中のアンモニア性窒素濃度は阻害濃度よりも低く、アンモニア阻害が低含水率下でのメタン生成阻害要因ではないと考えられた。また全ての含水率において、有機酸の蓄積が確認され、含水率が低くなるほどより多くの種類の蓄積が確認された。有機酸はメタン生成の中間体であるため、含水率が低くなるほど微生物の活性が低くなることが示唆された。Abbassi-Guendouzらは、含水率が低くなると物質拡散に制限がかかってしまうと述べている⁵⁾。また、微生物の酵素反応には水分が必要であること、微生物の周りの水分が低いと、微生物菌体が脱水し、活性が低下した可能性が考えられた。

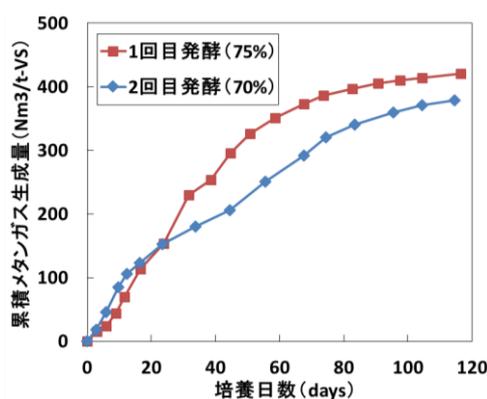
表(1)-10 各含水率の発酵残渣の性状分析結果

含水率[%]	60	65	70	80
TS [%w.w]	67.47	73.06	77.40	86.85
VS [%w.w]	21.55	17.72	14.72	8.41
pH [-]	9.40	9.36	9.36	8.67
NH ₄ -N [mg/kg-w.w]	661	550	498	109
グルコース[mmol/kg-w.w]	0.80	0.77	1.13	0.80
iso-酪酸[mmol/kg-w.w]	0	0	0	0
蟻酸[mmol/kg-w.w]	18.07	15.67	18.07	10.07
プロピオン酸[mmol/kg-w.w]	0.90	0	0	0
酢酸[mmol/kg-w.w]	4.67	29.07	0	0

b 乾式メタン発酵における馴養の効果

i 含水率漸減馴養

図(1)-27に含水率漸近馴養法による発酵時の累積メタン生成量の経時変化を示す。1回目の発酵（含水率83%の種汚泥を用いて含水率75%で培養）のメタンガス生成量に比べて、2回目の発酵（1回目の発酵終了時の汚泥を種汚泥として含水率70%で培養）におけるメタンガス生成量は低かった。

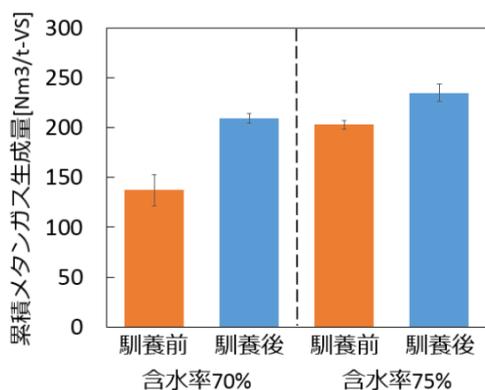


図(1)-27 含水率漸近馴養法における累積メタンガス生成量の経日変化

ii 馴養効果の検証

馴養前後の種汚泥を用いて乾式メタン発酵を実施し、馴養の効果の検証を行った。各系の培養45日目までの累積メタンガス生成量を図(1)-28に示す。各含水率での発酵結果について、馴養前

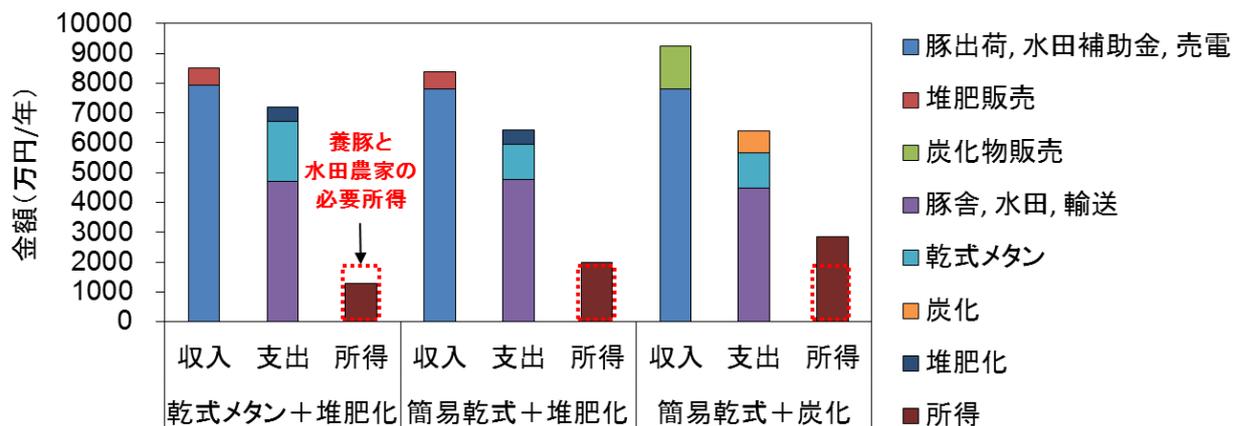
と馴養後で比較すると、馴養後種汚泥を用いた際の累積メタンガス生成量は含水率75%および70%でそれぞれ2割および5割増加した。また、馴養後70%の系は、馴養前75%の系と同等のメタンガス生成量を得ている。これより、馴養後の種汚泥の方が、高活性に微生物がはたらいしていることが示唆された。したがって含水率をパラメータとする馴養の有効性が示唆された。



図(1)-28 含水率漸近馴養法で馴養した種汚泥の累積メタンガス生成量

(4) 簡易型高温乾式メタン発酵の提案

図(1)-29に各種メタン発酵および残渣処理を導入した養豚経営（肥育豚1000頭規模）における経済性を示す。各システムにおいて収入は、肥育豚の出荷、政府からの多収米栽培への補助金およびコジェネ発電による売電が共通していた。堆肥および炭化物の販売価格は炭化物の方が高いが、これは炭化物単価（6万円/t）が堆肥単価（4000円/t）より高いためである。最も高い支出を示したのは乾式メタン+堆肥化であり、簡易乾式+炭化および簡易乾式+堆肥化と続いた。支出のうち、豚舎、水田および輸送にかかるコストは全ての系で同じであったため、支出の合計額は乾式メタン発酵、堆肥化および炭化の導入および運営費により異なった。乾式メタン発酵および簡易乾式メタン発酵のコストはそれぞれ2042および1177万円/年であり、簡易化により約40%のコストカットとなった。最終的に、収入から支出を差し引いて得られる所得は乾式メタン+堆肥化、簡易乾式+堆肥化および簡易乾式+炭化でそれぞれ1292、1970および2847万円/年となった。一方、各方式において養豚農家および水田農家に必要な所得合計は1926万円/年であるため、簡易乾式+堆肥化および簡易乾式+炭化で所得をまかなうことが可能であることが分かった。以上より、簡易乾式メタン発酵の導入により豚尿処理が経済的に持続可能であることが分かった。



図(1)-29 各種メタン発酵方式における経済性

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

乾式メタン発酵の運転方式には大きく分けて連続型と回分型の二種類がある。連続型では基質と種菌の混合効率を上げるために特殊なポンプや攪拌機を使用する必要がある。一方、回分型では基質を堆積し、そこにメタン発酵に関わる微生物を含む液を循環させることで、有機酸など発酵の中間生成物と微生物との接触を図る。本研究では、簡易かつ低コストな乾式メタン発酵を開発するため、上記液循環型に加えて、液循環を全く行わない非液循環型のプロセスを研究した。液循環型では、菌体と基質の接触効率を向上させるために有効な攪拌方法と液循環手法を明らかにすることができた。さらに、トランスクリプトーム解析により、発酵条件が微生物の活性に大きく関わることを示すことができた。

非液循環型の回分乾式メタン発酵では、基質と種汚泥の接触について、仕込み時の基質と種汚泥量の比 (F/I比) を調製することで効率よくメタン発酵を行うことが可能であることが分かった。乾式メタン発酵の種汚泥は、主に湿式メタン発酵の消化液 (液状の残渣) が用いられてきた⁷⁾。本研究から、乾式残渣 (粘土状の残渣) も種汚泥として有効にはたらくことが分かった。さらに、発酵中の攪拌は大気に開放して行うことで、汚泥中に酸素が混入し、メタン発酵効率に影響を及ぼすことが分かった。以上のことから、仕込み時に一定の比率の基質と種汚泥を良く混合した上で発酵槽に投入すれば、その後は攪拌せずともメタン発酵を行うことができる。さらに、F/I比は細菌および古細菌といった微生物の組成にも大きく影響することがわかった。以上の結果は、運転パラメータの変化 (微生物の生育環境の操作) が汚泥に存在する微生物の種類に影響することを意味している。

メタン発酵の運転の安定性については古くから研究がなされており、温度変動や有機物負荷、酸素の影響などが報告されている。しかしながら、メタン発酵のどの段階が阻害を受けているかについては中間性生物の蓄積などのデータから判断するしかなかった。本研究では、これに対してメタトランスクリプトーム解析により、具体的にどの反応 (を行う酵素の合成) が影響を受けたかを調査できた。

乾式メタン発酵において、含水率が低下するとメタン生成量が大幅に低下することは都市ごみやダンボールの乾式メタン発酵において観測されている^{5, 6)}。本研究においても含水率の低下とともに

にメタン生成量の減少が確認できた。従って、含水率の影響は豚尿と稲わらの高温乾式メタン発酵においても起こることが示された。メタン発酵においては、しばしば阻害が起こるような環境で培養するとその環境に適応する現象が報告されている⁸⁾。本研究では、低含水率でも活性の低下を抑制できるような手法として低含水率による馴養を試み、低含水率による活性低下を抑制することができた。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

・ 回分式高温乾式メタン発酵で豚尿および稲わらを処理することで、再生可能エネルギーを得つつ、排水の発生を抑制した豚尿処理

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文 (査読あり) >

- 1) S. Riya, K. Suzuki, S. Zhou, A. Terada, M. Hosomi: Journal of Medical and Bioengineering, 5(1), 11-14 (2016) “Influence of C/N ratio on performance and microbial community structure of dry-thermophilic anaerobic co-digestion of swine manure and rice straw”

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) 細見正明, 豊田剛己, 利谷翔平: 畜産環境情報, 53, 1-10 (2014) “乾式メタン発酵と飼料イネによる資源循環型養豚排水処理”

<その他誌上発表 (査読なし) >

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表 (学会等)

- 1) 利谷翔平, 鈴木一弘, 周勝, 寺田昭彦, 細見正明: 化学工学会第46回秋季大会 (2014) “高温乾式メタン発酵および飼料イネ栽培を組み込んだ養豚システムのライフサイクルアセスメント”
- 2) S. Riya, K. Suzuki, S. Zhou, A. Terada, M. Hosomi: 9th IWA International Symposium on Waste Management Problems in Agro-Industries (2014) “Feasibility of pig manure treatment by dry-thermophilic anaerobic co-digestion with rice straw”
- 3) 利谷翔平, 丸尾光希, 孟令宇, 寺田昭彦, 細見正明: 第49回日本水環境学会年会 (2015)

- “豚尿と稲わらの高温乾式メタン発酵における豚尿循環および基質混合方式の検討”
- 4) 利谷翔平, 丸尾光希, 孟令宇, 寺田昭彦, 細見正明: 化学工学会第80年会 (2015)
“豚尿と稲わらの高温乾式メタン発酵における豚尿循環および基質混合方式の検討”
 - 5) S. Riya, K. Suzuki, S. Zhou, A. Terada, M. Hosomi: 6th International Conference on Environmental Science and Development (2015) “Influence of C/N ratio on performance and microbial community structure of dry-thermophilic anaerobic co-digestion of swine manure and rice straw”
 - 6) 利谷翔平, 佐光俊樹, 孟令宇, 寺田昭彦, 細見正明: 化学工学会 第47回秋季大会 (2015)
“稲わらを基質とする豚尿浸漬型回分乾式メタン発酵における基質/種汚泥比の影響”
 - 7) S. Riya, K. Suzuki, M. Katayama, E. Takahashi, S. Zhou, A. Terada, M. Hosomi: Japan-China Symposium on Chemical Engineering (2015) “Development of novel pig farming system incorporating dry-thermophilic anaerobic digestion and forage rice cultivation”
 - 8) S. Riya, K. Maruo, L. Meng, A. Terada, M. Hosomi: 14th World Congress on Anaerobic Digestion (2015) “14th World Congress on Anaerobic Digestion (2015) 「Effect of premixing and circulation of pig urine on dry-thermophilic anaerobic digestion”
 - 9) 佐光俊樹, 孟令宇, 利谷翔平, 寺田昭彦, 細見正明: 化学工学会 第81年会 (2016)
“稲わらと豚尿を用いた簡易型高温乾式メタン発酵運転方法の検討”
 - 10) 上里亮世, 孟令宇, 利谷翔平, 寺田昭彦, 細見正明: 第19回化学工学会学生発表会小金井大会 (2017) “稲わらと豚尿の高温乾式メタン発酵における含水率の影響”

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 長岡工業高等専門学校において研究紹介「メタン発酵による豚尿と稲わらのリサイクル」
(2017年1月26日、長岡高等専門学校にて)

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

- 1) アイルランドの技術情報サイト「Engineers Journal」において本研究「Towards sustainable agricultural waste management using dry anaerobic digestion」が紹介された
(<http://www.engineersjournal.ie/2016/07/26/towards-sustainable-agricultural-waste-management-using-dry-anaerobic-digestion-and-rice-cultivation/>)

8. 引用文献

- 1) J.J. Lay, Y.Y. Li, T. Noike: Mathematical model for methane production from landfill

- bioreactor, *Journal of Environmental Engineering-Asce* 124 (1998) 730-736.
- 2) H. Iino, S. Zhou, M. Sagehashi, Y. Nakashimada, T. Ookawa, A. Terada, M. Hosomi, Thermophilic Anaerobic Digestion Characteristics of Forage Rice, *Environmental Science* 24 (2011) 462-471.
 - 3) S. Riya, K. Suzuki, S. Zhou, A. Terada, M. Hosomi: Influence of C/N ratio on Performance and microbial community structure of dry-thermophilic anaerobic co-digestion of swine manure and rice straw, *Journal of Medical and Bioengineering* 11-14 (2016).
 - 4) T. Hori, S. Haruta, Y. Ueno, M. Ishii, Y. Igarashi: Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester, *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006) 1623-1630.
 - 5) A. Abbassi-Guendouz, D. Brockmann, E. Trably, C. Dumas, J.P. Delgenes, J.P. Steyer, R. Escudie: Total solids content drives high solid anaerobic digestion via mass transfer limitation, *Bioresour. Technol.* 111 (2012) 55-61.
 - 6) H. Benbelkacem, J. Bollon, R. Bayard, R. Escudie, P. Buffiere: Towards optimization of the total solid content in high-solid (dry) municipal solid waste digestion, *Chemical Engineering Journal* 273 (2015) 261-267.
 - 7) Y. Li, J. Zhu, C. Wan, S.Y. Park, Solid-state anaerobic digestion of corn stover for biogas production, *Transactions of the Asabe* 54 (2011) 1415-1421.
 - 8) Y. Chen, J.J. Cheng, Effect of potassium inhibition on the thermophilic anaerobic digestion of swine waste, *Water Environment Research* 79 (2007) 667-674.

(2) 発酵残渣の有効利用法の確立

東京農工大学 大学院農学研究院
豊田 剛己

平成26～28年度累計予算額：17653千円

(うち、平成28年度予算額：6442千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

乾式メタン発酵の普及にはその発酵残渣の有効活用が欠かせない。メタン発酵の原料は稲ワラ、豚し尿といった地域資源であり、特に豚し尿は植物養分を豊富に含むことから、発酵残渣の農業利用が望ましい。本研究では、(1) 発酵残渣による多収米栽培における収量および環境負荷、(2) 発酵残渣によるレンコン栽培(ハス)における環境負荷、(3) 野菜畑や温室栽培における土壌病害抑制効果の評価および(4) 発酵残渣の炭化処理と土壌改良材としての利用可能性評価を行った。

発酵残渣を用いて3ヵ年連続で多収米を栽培したところ、いずれの年度においても、化学肥料区と劣らない収量を得ることができた。従って、発酵残渣の肥料効果は化学肥料に匹敵すると考えられる。一方、発酵残渣を施用した多収米水田からのメタン放出量は化学肥料区よりも高かった。

発酵残渣を用いて2ヵ年連続でハスを栽培した結果、多収米とは逆に化学肥料区よりも収量の低下が見られた。栽培期間中に得られた水質データおよびハスによる窒素吸収量を用いて、乾式メタン発酵を養豚経営に導入した場合の環境中への窒素流出量を評価したところ、豚尿を乾式メタン発酵で処理し、残渣をハス田に施用することにより、環境中へ流出する窒素を77%抑制しうることが示唆された。また、ハス栽培におけるメタン放出量は水稻栽培の数倍であることが明らかとなった。

乾式発酵残渣が土壌中におけるネコブセンチュウ、トマト萎凋病菌の密度を低下させ、それにより病害発生程度も低減することを示した。

発酵残渣炭化物のリン含有率(1.3%)は豚ふん乾燥物の炭化物のリン含有率(3.8%)の1/3だった。これは、豚ふん乾燥物に比べて発酵残渣中のリン含有率が少ないためである。

以上より、発酵残渣の有効利用については環境負荷など検討の余地があると考えられる。

[キーワード]

発酵残渣、多収米、ハス、温室効果ガス、土壌病害

1. はじめに

乾式メタン発酵の普及にはその発酵残渣の有効活用が欠かせない。メタン発酵の原料は稲ワラ、豚し尿といった地域資源であり、特に豚し尿は植物養分を豊富に含むことから、発酵残渣の農業利用が望ましい。メタン発酵残渣の作物への肥料効果ならびに土壌への影響について、これまで様々な研究がなされてきているが、大半が湿式タイプのメタン発酵残渣を用いたものであり、乾

式タイプの発酵残渣を対象にした研究例は乏しい¹⁾。

2. 研究開発目的

以上より、乾式メタン発酵残渣の水田および畑における多様な有効利用を検討することが本研究開発の目的である。発酵残渣の有効利用として、化学肥料に代わる飼料イネ水田やハス田への散布、土壌病害の抑制法として野菜畑への散布、発酵残渣の炭化による土壌改良材を研究対象とする。具体的には、(1) 水田における水管理(追肥前の落水や間断灌漑)による温室効果ガス削減効果の評価、(2) ハス田における温室効果ガス発生量評価、(3) 野菜畑や温室栽培における温室効果ガス発生量並びに土壌病害抑制効果の評価、(4) 発酵残渣の炭化处理と土壌改良材としての利用可能性評価について行う。

3. 研究開発方法

(1) 乾式残渣のイネおよびコムギへの肥料効果と環境負荷

東京農工大学FM本町(東京都府中市)に設置されているライシメーター(ステンレス製、縦100×横100×高さ50cm)12基を用いて、夏作に飼料イネ、冬作にコムギの栽培試験を行った。施肥は飼料イネのみに行き、コムギは無肥料で栽培した。2014年度の夏作では、化学肥料区、豚ふん尿由来の湿式メタン消化液(WetBD)区、豚ふん尿と稲ワラ由来のDryBD区(C/N20に調整し発酵させた残渣)、そしてWetBDに転炉スラグ(Slag)を混ぜたものの計4処理区を3反復設けた。転炉スラグを用いた理由は、転炉スラグによりメタン放出を抑制することを期待したためである。転炉スラグに特段メタン放出抑制効果は認められなかったため、2015、2016年度は転炉スラグ区の代わりに、豚ふん尿と稲ワラ由来のDryBD30区(C/N30に調整し発酵させた残渣)をもうけた。各処理区の施肥量は表(2)-1で示した。施肥は可給態窒素(有機態窒素の半分に無機態窒素を加えた量)が基肥と追肥含めて8~30gN/m²となるようにし、施肥ごとの割合は「基肥:追肥1回目:追肥2回目=5:3:2」とした。ただし、DryBD20、DryBD30に関してはすき込む必要があるため全量基肥で施肥した。イネ品種にはタカナリを用い、イネ栽培時の主な栽培管理を表(2)-2に示す。また、コムギはイネの収穫後切り株間に深さ3cm程度の溝を4列作成し、その溝にコムギを播種し土を被せた。コムギ栽培の際は基本的に浸透水を採取する下の排水口は常に開け、施肥は行わなかった。イネ、コムギともに、各ライシメーターの中心部5株を地表面から約2cmのところから刈り取り、穂部と茎葉部とにわけ、80°Cで乾燥後、乾物重を測定した。

表(2)-1 供試した発酵残渣の可給態窒素量および施用量

		施肥量 (全量, /m ²)	施用した可給態 窒素量 (g-N/m ²)	施肥した 窒素総量 (gN/m ²)	施肥した 炭素総量 (gC/m ²)
2016 年度	CF	57.1 (g)		8.0	0
	WetBD	2.1 (L)	8.0	10.2	25
	DBD20	3.1 (kg)		13.3	164
	DBD30	4.3 (kg)		14.6	241
CF	57.1 (g)	8.0		8.0	0
2015 年度	WetBD	2.4 (L)	12	11.5	34
	DBD20	2.9 (kg)	11	15.5	196
	DBD30	7.9 (kg)	12	30.4	494
2014 年度	CF	171 (g)		30	0
	WetBD	6.7 (L)	30	27	93
	WetBD+スラグ	6.7 (L)		27	93
	DBD20	5.2 (kg)		50	504

CF：化学肥料、WetBD (wet biogas digestate)：湿式メタン消化液、DBD (dry biogas digestate)：豚尿と稲ワラ由来の乾式発酵残渣、20と30は発酵開始時の設定C/N比を示す

表(2)-2 飼料イネ (品種：Takanari) の栽培スケジュール

	2014年度	2015年度	2016年度
・ 田おこし	5月12日	5月25日	5月27日
・ 代掻き；	5月24日	6月14日	7月2日
・ 基肥；	6月15日	6月23日	7月6日
・ 田植え；	6月19日	6月29日	7月12日
・ 浮草の除草剤添加；		7月11日	7月26日
・ 中干し；	常時湛水	7月27日～8月7日	8月9日～8月21日
・ 間断灌水；	常時湛水	8月7～10日	8月21-24日 (1回目) 8月24-26日 (2回目)
・ 追肥1回目	8月8日	8月17日	9月2日
・ 追肥2回目；	9月12日	9月20日	9月16日
・ ネット張り (雀除け) ；		9月26日	10月24日
・ 落水；	10月30日	10月29日	10月28日
・ 収穫；	11月7日	11月9日	11月16日

ライシメーターの土壌表面から発生するメタンはクローズドチャンバー法で1週間に1度サンプリングした。チャンバーを土壌表面に差し込み10分間放置後、密閉させ、0、10、20分後にシリンジを用い10mL容のバイアルにそれぞれ30mLずつチャンバー内の気体を採取した。メタン濃度はガスクロマトグラフィー水素炎イオン化検出器 (FID) を用いて計測した。

2015、2016年度はライシメーター下部から生育期間中1～2週間に1度浸透水を採取し分析した。浸透水の採取時以外は排水溝を常に閉じていた。ただし、雨が降りライシメーターが溢れてしまいそうな場合は、3～4cmまで水位を下げた。浸透水中の硝酸態窒素濃度 (ppm) は採取したサンプルを20倍濃縮後、カタルド法を用いて測定した。

(2) 発酵残渣のハスへの適用性と環境負荷の評価

1) 発酵残渣によるハスの生育および水環境への影響

a 発酵残渣によるハスの生育およびハス田の窒素挙動

本実験は、茨城県土浦市手野町にある実際のハス田にて実施した。波板を土壌深さ30 cmまで挿入し、1区画約20 m²の系を2区画建設し、実験を行った（図(2)-1）。



図(2)-1 波板で建設した実験区画（1区画20 m²）（左）および実験風景（右）

各区画にレンコン苗を4株移植し、現地の栽培法に則り、2014年5月から2017年1月まで栽培を行った。残渣は固形であり栽培期間中の施用が難しいので、ハスを移植する前に肥料を投入する基肥としての使用を検討した。発酵残渣によるハスの生育および水環境への影響を明らかにするために、現地の施肥方法（化学肥料と有機肥料の利用）に則った慣行系と発酵残渣を使用する残渣系の2系をそれぞれ1反復ずつ設けた（表(2)-3）。残渣系では、基肥における残渣と化学肥料の投入比率が与える影響も調べるため、1年目（2015年度）は基肥の窒素成分（NH₄⁺態窒素）を全て残渣でまかない、2年目は約半分を残渣でまかなった。なお、1年目と2年目で基肥の施肥量が異なるのは、1年目において残渣の調整量が不足したためである。移植、追肥、収穫その他の圃場管理は現地の方法に則った。

表(2)-3 各系の施肥計画

	系	基肥		追肥		合計
		kg N/ha	内訳	kg N/ha	内訳	kg N/ha
2015年	残渣系	80	残渣：100%	100	化肥：100%	180
	慣行系	80	化肥：100%	100	化肥：100%	180
2016年	残渣系	140	残渣：52% 化肥：48%	100	化肥：100%	240
	慣行系	140	化肥：57% 有機肥：43%	100	化肥：100%	240

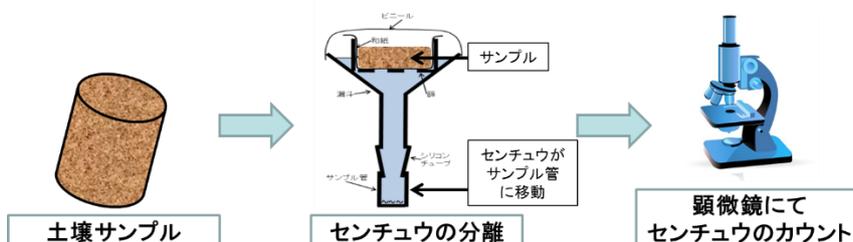
※但し発酵残渣中のアンモニア態窒素のみ考慮

栽培期間中、各系の表面水を直接、土壌間隙水は、土壌深さ10, 30および70 cmに挿入したポラスカップからシリンジにより真空吸引することで採取した。採取した水サンプルの $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度および有機体窒素濃度をそれぞれイオンクロマトグラフィおよび全有機炭素計 (TOC計) で測定した。

採取した葉、茎およびレンコンは、重量、個数を計測し、一部は恒温槽において80 °C、二週間乾燥させ、含水率を求めた。また、乾燥させたものの一部を、C/Nコーダにて窒素含有量を計測した。

土壌サンプルは、植栽前後に土壌サンプラーを用いて採取した。1サンプルそれぞれ、深さ30 cmまでの土壌を採取した。採取した土壌は一部を恒温槽において105 °C、1日間乾燥させ、C/Nコーダにて窒素含有量を計測した。

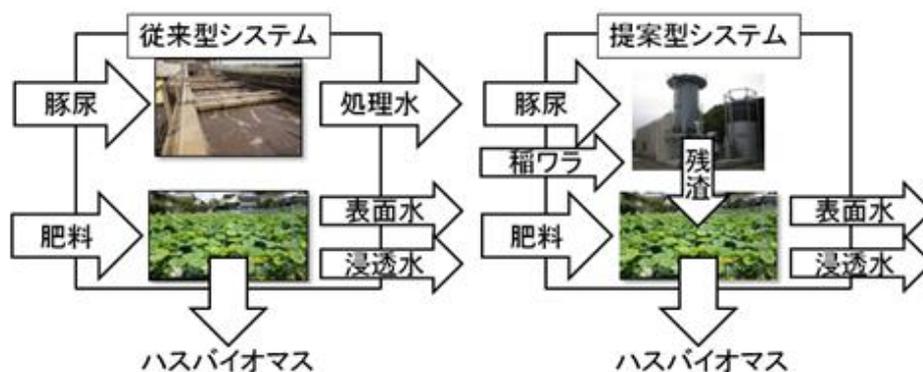
また、ハス栽培において収穫物のレンコンのセンチウ被害はレンコンの商品価値を落とすため、深刻な問題となっている。そこで、発酵残渣の施用が土壌中のセンチウ濃度に影響するかを明らかにするために、ハスバイオマス収穫時に採取した各系の土壌に含まれるセンチウの濃度を、ベルマン法により測定した。ベルマン法の概略図を以下に示す。



図(2)-2 ベルマン法によるセンチウ数測定方法の概略図

b 乾式メタン発酵導入による環境中への窒素流出量の評価

乾式メタン発酵で豚尿を処理し、その発酵残渣をハス田へ施肥するというアプローチが、豚尿を排水処理して放流する現行の管理法に比べて環境に対して低窒素負荷かどうか明らかにするために、ハス栽培で得られたハスバイオマスの窒素量および表面水と間隙水窒素濃度のデータを用いて、乾式メタンを導入した場合の環境中への窒素流出量の評価を行った。仮定として、1000頭規模の養豚経営における豚尿処理とハス栽培を包括したシステムにおける窒素収支を算出した。現行の養豚排水処理法と慣行栽培のハス田を包括したシステムを「従来型システム」、乾式メタン発酵による養豚排水処理と発酵残渣を施用するハス田を包括したシステムを「提案型システム」とした(図(2)-3)。豚尿処理に係る窒素の流入・流出量については文献値を参考にした。また、ハス田からの表面水流出による窒素流亡は折本らによる一作あたりの表面水排出量に、本実験で測定した表面水中全窒素濃度の一作を通した平均値を乗じることで推定した。さらに、浸透流出した窒素については、測定した浸透水量に地下深さ70 cmでの全窒素濃度を乗じることで推定した。

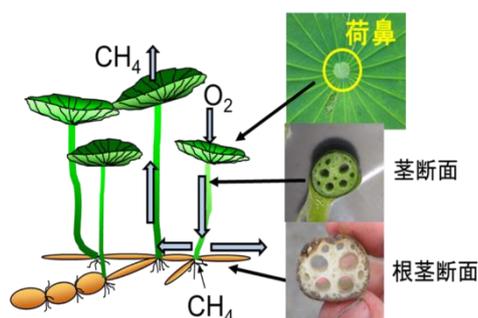


図(2)-3 従来型の窒素

3) ハス栽培の温室効果ガス発生の評価

a ハスの葉からの温室効果ガス放出

ハスの茎および根茎は中空構造になっており、葉の中心部(以下荷鼻)を通じて、ハスは大気-土壌間でガス交換を行うといわれている(図(2)-4)。ハスは水稻と同様湛水環境で生長するため、根圏に酸素を輸送するガス輸送システムが発達している。従って、水稻と同様温室効果ガスであるメタンを根圏から大気に輸送・放出していると考えられる。一方、水稻のガス輸送原理は分子の濃度差を推進力とする拡散であるのに対し²⁾、ハスは圧力差により生じる空気の流れ(マスフロー)によりガス輸送を行うことが知られている³⁾。ガス輸送の観点から見ると、マスフローは拡散の数倍以上の効率を有しているため、ハスは水稻に比べメタンを効率よく大気中に放出していると考えられる。そのため、発酵残渣を施用した場合水稻よりも多量のメタンを放出する恐れがある。しかし、ハスからのメタン放出量自体を測定した研究はこれまでになく、そもそもどれほどメタンを放出するかさえ分かっていない。さらに、ハスは葉の中心部にある気孔の密集部(荷鼻、いわゆるへソ)からガスを放出することが古くから知られているが、葉からのガス放出がどれほどハス田からのメタン放出に寄与しているかは明らかではない。そこで、本研究ではハス田のメタン放出量を明らかにすることを目的とし、ハス田および水稻とのメタン放出量の比較を行った。



図(2)-4 ハスのガス輸送機構模式図

上海市農業科学院(中国)に設置されたライシメーター3基でハスを栽培し、3基のライシメーターのうち中間的なハスの生育を示した1基について、スライム(ゲル状玩具)をハスの葉の荷鼻に取り付けてガス放出する葉を特定した。その葉の中から葉が開ききっていない若い葉1枚(葉1)

および葉がすでに開ききっている葉2枚（葉2、葉3）を選出した。この3枚の葉についてガス放出速度の測定と、ガスのサンプリングを行った。ガス放出速度測定には石鹼膜流量計を用いた。ハスの葉からのメタン放出速度はガス放出速度および採取したガスのメタン濃度から算出した。

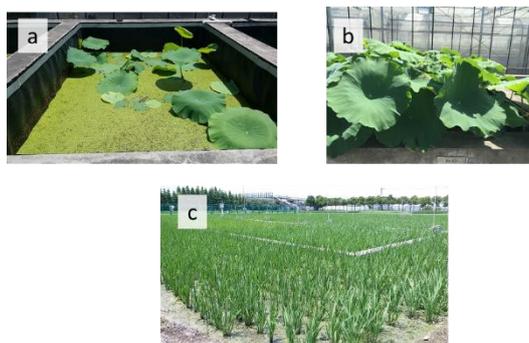
どのような葉からガスが放出されるのかを明らかにするために、室内で専用容器を用いてハスを栽培した。食用のハスは大きくなりすぎ、室内での栽培が困難になるため、より小型の観賞用のハス（品種：金合歡）を栽培した。図(2)-5に示すアクリル製容器に、東京農工大学府中本町水田の土壌（2 mmふるい済み）を充填した。水を加えよく混合した後、ハス一株を植栽した。栽培したハスの、ガス放出をする葉の特定は、スライムを荷鼻に直接取り付け、膨張を確認することで行った。



図(2)-5 室内におけるハス栽培の様子（左：栽培中、右：ガス放出する葉の特定）

b ハスと水稲栽培の温室効果ガス放出量の比較

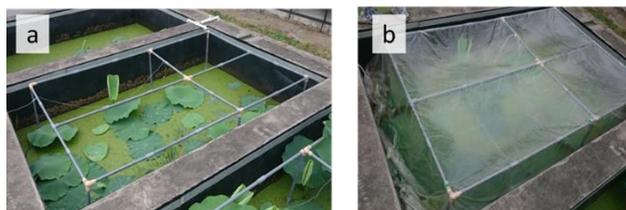
上記、上海市農業科学院のライシメーター3基と60 m²の水田でそれぞれハス栽培と水稲栽培を実施した（図(2)-6）。ハスも水稲も現地の栽培方法に則って栽培した。ハスおよび水稲栽培におけるメタン放出量比較試験は、生長が旺盛な7月および8月に実施した。



図(2)-6 (a)ライシメーター内のハス（7月）、(b)ライシメーター内のハス（8月）および(c)水稲を栽培した水田

ハス田からのメタン放出速度（フラックス）はビニールチャンバー法により測定した。ハス田に塩ビパイプのフレームを設置し（図(2)-7a）、塩化ビニール製の透明シートで覆った（図(2)-8b）。なお、この際密閉を確実にするために、ビニールの端は全て水中に入るように覆った。密閉後6 min、12 minおよび18 minにチャンバー内大気20 mLをあらかじめ真空にしたガスクロバイアル（容量10 mL）に採取した。サンプリングは7/17～7/18にかけては日中9:00から2時間毎、日中9:00まで行っ

た。また8/22～8/23にかけては8:00、11:00、14:00、17:00、18:00、20:00、23:00、2:00、5:00、6:00、7:00、8:00に基本3時間毎、日の入と日の出に関しては測定時間間隔を短くして集中的に測定を行った。



図(2)-7 ビニールチャンバー法によるガス採取 ((a) ビニール密閉前および(b) ビニール密閉後)

保管したガスは帰国後GC-FIDにてメタン濃度を測定し、メタン濃度の変化速度からメタンフラックスを算出した。

水稻栽培時のメタンフラックス測定は、クローズドチャンバー法を用いた(図(2)-8)。測定開始前、アクリル製チャンバーの土台部分を4株のハスが入るように設置した。上部のチャンバーを土台に設置した。チャンバーにはタイマー付きオートサンプラーが接続されており、設置後起動させた。チャンバーで密閉した時間を0 minとして、タイマー付きオートサンプラーにより自動的に6 min、12 minおよび18 min後にテドラーバッグにガスが採取された。採取したガスはGC-FIDにて、メタン濃度を測定し、メタン濃度の変化速度からメタンフラックスを算出した。この実験は7/17～7/18にかけては日中9:00から2時間毎、日中9:00まで行った。また8/22～8/23にかけては日中8:00から3時間毎、日中8:00まで行った。



図(2)-8 クローズドチャンバー法で使用した器具 ((a) 土壌に挿入する土台および(b) 土台に載せるチャンナー)

c ハス田への施肥が温室効果ガス放出に与える影響

ハスや水稻のように土壌が湛水し、酸素が消失するような環境ではメタンが生成・放出される。さらに、水稻栽培における稲わらや堆肥など有機物の施用はメタン放出を増大させることが良く知られている⁴⁾。Riyaらは、豚ふん尿と稲わらの高温乾式メタン発酵残渣を施用した多収米水田においてもメタン放出量が増大することを報告している⁵⁾。そのため、発酵残渣を用いてハスを栽培した場合も、メタン放出量の増大が懸念される。そこで、本実験では上海市農業科学院の4基のライシメーターそれぞれに異なる肥料(対照系(無施肥)、化学肥料系、豚尿系、堆肥系)でハスを栽培し、メタン放出を比較した。

(3) 発酵残渣による土壌病害抑制効果の評価

1) 乾式残渣が植物寄生性線虫に及ぼす影響

我が国の作物栽培において脅威となっている主要な植物寄生性線虫はネグサレセンチュウ (*Pratylenchus* spp.)、ネコブセンチュウ (*Meloidogyne* spp.)、シストセンチュウ (*Heterodera* spp.) である。そこで、メタン発酵残渣の施用が、これら植物寄生性線虫に及ぼす影響を評価した。

ネグサレセンチュウ汚染土壌 (千葉県から採取) とネコブセンチュウ汚染土壌 (静岡県から採取) をそれぞれ50 gずつ用意し、4処理区 (i) 無施用、ii) 化学肥料 (N:P:K = 8:8:8、20kgN/10a、表層10 cm)、iii) C/N比20のメタン発酵残渣 (DBD20、残渣) 2.2 g (20kg 無機態N/10a)、iv) C/N比30の残渣 2.8 g (20kg 無機態N/10a) ・3連を設けた。面積当たりから体積当たりへの換算は、表層0-10 cm、土壌の仮比重1 g/cm³とし、乾式残渣の窒素添加量は無機態窒素に加えて有機態窒素の半分が無機化すると仮定した。培養4週間後に土10gを採取し、即座に60℃で乾燥した。Sato et al. (2011)に従い、乾燥土壌をボールミル (ヴァーダー・サイエンティフィック社製ミキサーミルMM400) で粉砕し、粉砕土壌0.5gからDNA抽出後、リアルタイムPCRにて線虫密度の評価を行った⁶⁾。ネグサレセンチュウおよびネコブセンチュウ密度推定のためのプライマー、検量線はそれぞれSato et al. (2011)、Watanabe et al. (2013)を用いた^{6,7)}。

メタン発酵残渣がネコブセンチュウに及ぼす影響をさらに評価するために、1:3の割合になるようにネコブセンチュウ汚染土壌47.5 gと市販の赤玉土142.5g計190gをよく混ぜ、6処理区 (無施用、化学肥料 (N:P:K = 14:14:14)、C/N比20の残渣 (DBD20) 6.08 g (15kg 無機態N/10a)、12.1g (30kg 無機態N/10a)、C/N比30の残渣 (DBD30) 7.7g (15kg 無機態N/10a)、15.5g (30kg 無機態N/10a) ・3連を設け、14日後に土を10 gずつとり、土壌DNA抽出後、リアルタイムPCRにて線虫密度を測定した。さらに、発酵残渣が発病した野菜の生育にどのように影響するかを調べるため、発芽処理したトマトの種を赤玉土70 gに播種し28℃に設定した人工気象器 (明期:暗期=12h:12h) で栽培した。2週間後に赤玉土170gをポットに用意し、4処理区 (無施用・化学肥料 (N:P:K = 14:14:14))、C/N比20の残渣7.28g (20kg 無機態N/10a)、C/N比30の残渣 10.0g (20kg 無機態N/10a) ・3連を設けた。全ての処理区に対して2%麦芽エキス培地で5日間培養したトマト萎凋病菌を1g土壌当たり10⁶となるように接種し、2週間栽培したトマト苗を移植した。これを人工気象器28℃ (明期:暗期=12h:12h) で30日間栽培し、経時的に病害程度 (0:0% 枯れる、1:1~24% 枯れる、2:25~49% 枯れる、3:50~74% 枯れる、4:75~100% 枯れる) を求めた。

関東近郊、東北、北海道のダイズおよびエダマメ圃場において、ダイズシストセンチュウ (soybean cyst nematode: *Heterodera glycines*) による線虫害が広がっている。そこで、乾式残渣の本線虫に対する密度低減効果を評価した。供試土壌には、埼玉県草加市のエダマメ圃場より採取した自然汚染土壌を用いた。無肥料区、化学肥料 (NPK) 区、DBD20 区、DBD30 区、湿式消化液区の5処理区を各3反復設けた。無肥料区を除き、添加窒素量を10a当たり30kgNに揃えた。具体的には、生土70gに化学肥料0.26g、乾式残渣 (DBD20) 6.9g、乾式残渣 (DBD30) 13.5g、豚糞尿由来の湿式消化液 3.4mL を添加し、よく混合した。湿式消化液はアンモニア態窒素を基に施用量を算出した。添加後30℃の恒温器内で培養し、直後、7日、15日後にポット内の土壌20gを取り出し、60℃で乾燥させ、ボールミルで粉砕した。土壌からDNAを抽出後、リアルタイムPCR⁸⁾

により定量した。なお、添加 5 日、10 日後にはベルマン法を用いて土壤中に生育する二期幼虫数を数えた。

青森県のニンニク栽培ではイモグサレセンチュウ (*Ditylenchus destructor*) 被害が最重要病害虫となっている。そこで、前述の 5 処理区をもうけ、乾式残渣の本線虫に対する密度低減効果を評価した。本線虫の定量には、Cheng et al. (2015) の開発したイモグサレセンチュウ特異プライマーおよび検量線を用いた⁹⁾。

2) 乾式残渣が複合病 (トマト萎凋病とネコブセンチュウ) に及ぼす影響

トマト栽培において、萎凋病 (病原菌: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) ならびにネコブセンチュウの発生はわが国で頻繁に認められる。両者はともに寄主作物の連作によって発生が増大する土壌病害であり、かつ混合発生することも稀ではない。そこで、乾式残渣がこれらの複合病に及ぼす影響を検証する実験を2014年と2015年に解析した。

市販の赤玉土70gに炭酸カルシウムを150mg 添加し、土壌のpHを約7に矯正した。この土壌をアグリポット (直径: 6.2 cm、高さ: 5.6 cm) に充填後、発芽処理を行ったトマトを4粒播種し、人工気象器内 (明期: 暗期=12時間: 12時間、27℃) で2週間栽培を行った。栽培期間中は定期的にポット毎の重量を測定し、減少した分だけ水を添加した。処理区は無施用、化肥 (15N)、BD20 15N、BD20 30N、BD30 15N、BD30 30Nの6つを設け、各試験区は3反復で行った。化肥15N区

(N:P:K=14:14:14) は15 kg無機態窒素/10a (表層10cm、土壌の仮比重1g/cm³) となるように0.16 g、BD20・30の15N、30N区にはそれぞれ15・30 kg可給態窒素/10a (無機態窒素に加えて有機態窒素の半分が無機化すると仮定、表層10cm、土壌の仮比重1g/cm³) となるようにBD20乾式残渣6.7 g、13 gを、BD30乾式残渣を8.5g、17gを土壌180g (銚田土壌162g、ネコブセンチュウ汚染土 (静岡県で採取) 18g) に施用した。トマト萎凋病菌は*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Chz1-Aを用いた。1/10PDA寒天培地で5日間培養後、1/10PDB液体培地に植菌し5日間培養した。この培養液を、2重ガーゼで濾過し菌糸を取り除き、bud cell状の菌体を遠心分離により回収した (8000 rpm、5分、4℃)。滅菌水で2度洗浄後、ペレットを滅菌水に懸濁させ、血球計算盤を用い、bud cell数を計数した。Bud cellを乾土1 g当たり10⁵となるように接種した。この土壌に栽培2週間後のトマト芽生えを移植し、人工気象器内 (明期: 暗期=12時間: 12時間、27℃) で栽培を行い、萎凋病症状の経時的変化を測定した。栽培期間中は定期的にポット毎重量を測定し、減少分だけ水を添加した。萎凋病の病害程度は、0: 被害なし、1: 僅かな萎れ、2: 萎れ、3: 重度の萎れ・褐変、4: 枯死とした。また、栽培30日目の土壌からDNA抽出を行い、萎凋病菌の密度、一般細菌の密度、一般糸状菌の密度を測定した。萎凋病菌には、フザリウム菌 (ITS1f, *F. oxysporum*) のプライマー¹⁰⁾、一般細菌にはEUB338f, 518fのプライマー、一般糸状菌にはITS1f, 5.8sを用いた。各菌の密度はCt値から1g土壌中のCFUまたはコピー数に変換する検量線 (萎凋病: $y=-3.3715x+49.554$ (2014年度作成)、一般細菌: $y=-3.7126x+37.861$ (2015年度作成)、一般糸状菌: $y=-3.454x+40.143$ (2015年度作成)) を用い密度の定量を行った。

3) 乾式残渣が複合病 (トマト青枯病とネコブセンチュウ) に及ぼす影響

青枯病はネコブセンチュウにより被害が助長される。ネコブセンチュウによる直接的な根の被害は、病原性細菌・糸状菌の影響を受けやすくし、作物の収量低下につながる事が知られてい

る。そこで、乾式残渣の施用が青枯病とネコブセンチュウによる複合病に及ぼす影響を検証した。病原菌と施肥量を除いて3-2-2と同様の手順を踏み、本実験の施肥量は20 kg可給態窒素/10aとした。トマト青枯病菌は*Ralstonia solanacearum* YU1Rif43を用い、1/10普通ブイヨン寒天培地で4日間培養後、同液体培地に植菌し1日間振とう培養した(120rpm)。この培養液を遠心分離し、滅菌水で2度洗浄した。ペレットを0.85%生理食塩水に懸濁させ、OD_{660nm}の吸光度を測定し、0.268(5.0×10⁸ CFU/ml)となるように希釈を行った。この菌懸濁液を乾土1 g当たり5×10⁵となるようにすべての処理区に接種した。この土壤に栽培3週間後のトマト芽生えを移植し、人工気象器内(明期:暗期=12時間:12時間、27°C)で栽培を行い、青枯病症状の経時的変化を測定した。栽培期間中は定期的にポット毎重量を測定し、減少分だけ水を添加した。青枯病の病害程度は、0:被害なし、1:僅かな萎れ、2:萎れ、3:重度の萎れ・枯れ、4:枯死とした。

4) 乾式残渣が褐色根腐病菌の密度に及ぼす影響

未分解性有機物や乾燥豚糞の多量施用(5 t/10a)は、褐色根腐病菌による発病を1/2に軽減し、糸状菌の増殖が本菌の活性を相対的に低下させ発病が軽減したとの報告がある¹¹⁾。そこで未分解性有機物を含む豚尿と稲ワラ由来の乾式残渣の施用が土壤微生物を活性化させ、微生物による競合によって本菌を抑制できると考え、以下の実験を行った。植物体を栽培・移植する作業を除き、(2)-3と同様の手順を踏み6処理区を設けた。土壤はネコブセンチュウ汚染土を、トマト褐色根腐病菌は*Pyrenochaeta lycopersici* type1 906を用いた。1/10 PDA寒天培地で10日間培養後、1/10 PDB液体培地に植菌し30日間静置培養した(20°C)。この培養液を、ブレンダーによる破碎後遠心分離した。これを滅菌水で2度洗浄後、50 gとなるように滅菌水を加え菌懸濁液を調整した。この菌懸濁液を1.25g/10g 生土となるようにすべての処理区に接種した。すべての処理区には最大容水量の60%(0.84g/g)となるように滅菌水を加え、25°Cで培養を行った。培養期間中は土壤が乾いたら適宜水分を添加した。培養0、7、21日目に5gを採取し、土壤DNAの抽出を行った。このDNA溶液を用いリアルタイムPCRを行い、Ct値と菌密度の検量線から褐色根腐病菌の密度を評価した。プライマーはPyFおよびPyR¹²⁾を用いた。検量線($y=-2.3508x+34.595$)は、濃度既知(3×10⁷ CFU/ml)の褐色根腐病菌の培養液(原液)と10、100、1000倍希釈したものをネコブ汚染土壤に添加し、土壤DNA抽出後、real-time PCRで分析を行いCt値と菌密度の関係を表したものである(2014年度作成)。

5) 乾式残渣に稲ワラを混ぜた施用物が土壤の硝化に及ぼす影響

施用有機物が易分解性炭素を多分に含む場合、土壤中の硝酸態窒素濃度を減少することが知られる¹³⁾。そこで、BD20の乾式残渣に稲ワラを混ぜることで土壤の硝酸汚染リスクを減らせられないか検証した。無肥料、硫安(化肥)、BD20、BD20+RS少、BD20+RS多、BD30の6処理区を設けた。無肥料区を除く、5処理区に200mg NH₄-N/kg 乾土(土壤の比重1g/cm³、深度15cmと仮定すると、300kg NH₄-N/haと等しい施用量になる)となるように、硫安区には蒸留水で溶かした硫酸アンモニウムを、BD20、BD20+RS少、BD20+RS多区には乾式残渣BD20を19g、BD30区には乾式残渣BD30 25gを291g(200g 乾土)畑地土壤(府中本町)に施用した(表(2)-4)。さらにBD20+RS少区は、C/N比16となるように、BD20+RS多区にはC/N比30となるように、粉碎した稲ワラをそれぞれ1.3g、8.1g添加した。つまり、BD20+RS少区とBD30区は添加物のC/N比(16)が等しくなるように設計した。各処理区を作

成後、50mlガラス容器に乾土5g分を入れた。この土壌を含んだガラス容器は、アルミホイルで蓋をし、0, 3, 7, 14, 35日間25℃で培養を行った。水分含量は最大容水量の50%となるように水分調整を行い、培養期間中は一週間ごとに元の重量となるよう蒸留水を加え、初期の水分含量を維持した。培養後のサンプルは1処理区3連分を破壊的に採取し、0.5M硫酸カリウムを用いて抽出を行った。この抽出液から、アンモニア態窒素、硝酸態窒素、全窒素、全炭素の測定を行った。また、土壌DNA抽出用も先ほどと同様に1処理区3連分を破壊的に採取した。この抽出した土壌DNAから、Qbitを用いてDNA量の測定を行った。

表(2)-4 残渣・稲ワラを添加した時の各成分量の推定値

	全炭素 (mg/kg)	全窒素 (mg/kg)	C/N	水溶性炭素 (mg/kg)	水溶性全窒素 (mg/kg)	NH ₄ -N (mg/kg)
無施用	0	0	0	0	0	0
硫安	-	-	-	-	200	200
BD20	6100	520	12	430	260	200
BD20+RS少	9000	560	16	830	270	200
BD20+RS多	24000	780	30	2900	290	200
BD30	7000	430	16	660	220	200

(4) 発酵残渣炭化物の作製

乾式メタン発酵残渣の有効利用法として、炭化に着目した。炭化は有機物を熱分解することで安定化および減量化を図ることができるため、残渣の長期保管がしやすくなる。基本的に、炭化過程で窒素分の大部分はアンモニアや窒素ガスとして揮散する。一方、リンやカリウムのような元素は揮発しないため炭化物に残存する。従って、炭化物をリンやカリウム源となる壤改良材として利用することができると考えられる。そこで、本研究では乾式メタン発酵残渣の炭化物を作成し、そのリン肥料としての利用可能性を評価した。

乾式メタン発酵残渣200gをるつぼに入れ、500℃、1時間でマッフル炉内において炭化させた。その際、酸素との燃焼を抑制するために、るつぼにアルミホイルを被せ、炭化時の酸素の混入を防いだ。得られた炭化物は粉碎後、灰分、揮発性有機物、全炭素、全窒素およびリン酸含有量の測定に供した。リン酸含有量を計測する際は、1Mの塩酸で抽出し、抽出液中のリン酸濃度から求めた。

4. 結果及び考察

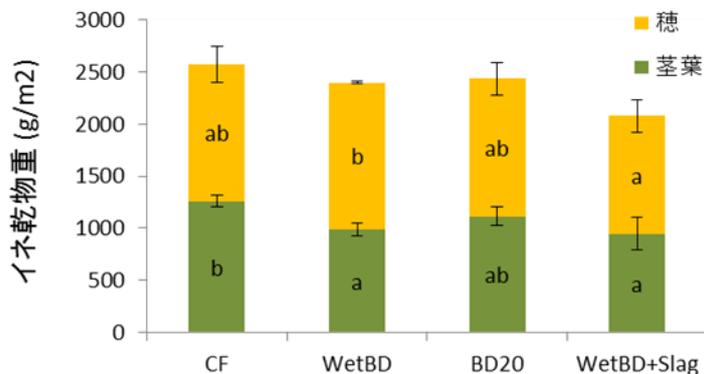
(1) 乾式残渣のイネおよびコムギへの肥料効果と環境負荷

1) イネおよびコムギの乾物重への影響

2014年度に栽培したイネの乾物重は、茎葉部ではWetBD区はCF区より有意に低かったが、BD20区はCF区と差はなく、穂部ではWetBD区、BD20区のいずれもCF区と有意な差はなかった(図(2)-9)。一方、スラグ添加区は穂部で他の処理区と比べて約2割低く、生育阻害が認められた。

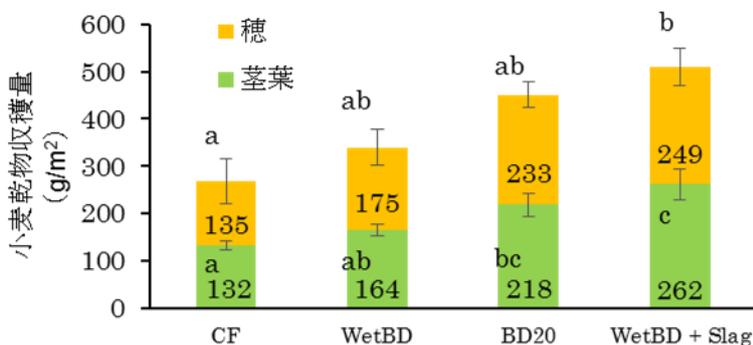
コムギ栽培では、穂部、茎葉部いずれもCF区に比べてWetBD区で約2割、BD20区では約7割、WetBD+スラグ区では2倍ほど高い値を示した(図(2)-10)。これらの結果より、湿式および乾式のいずれの発酵残渣も化学肥料と同程度の肥料効果を有すること、また、発酵残渣の施肥によって土壌肥

沃度が向上することが示唆された。



図(2)-9 2014年度栽培におけるイネ乾物収量

(CF:化学肥料区、WetBD:湿式消化液区、BD20:C/N20に調整し発酵させた乾式残渣区)

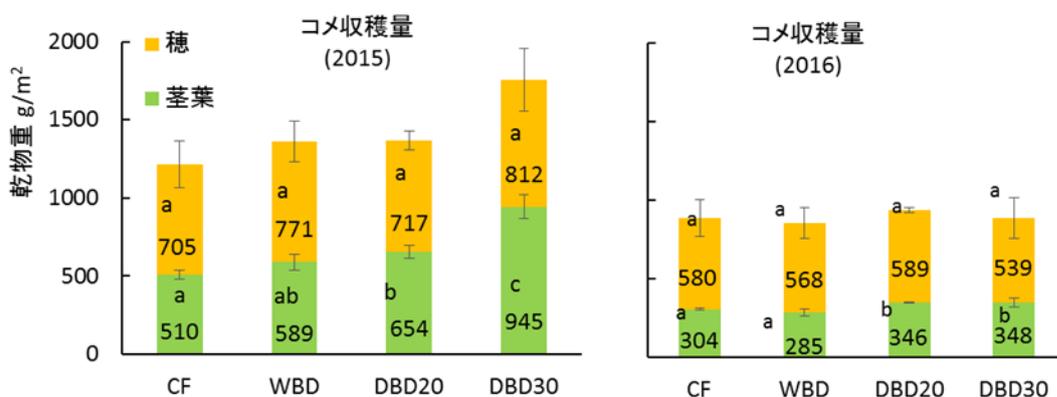


図(2)-10 2014～2015にかけて栽培したコムギ乾物収量

(CF:化学肥料区、WetBD:湿式消化液区、BD20:C/N20に調整し発酵させた乾式残渣区)

2015年度はスラグ区をとりやめ、代わりにC/N比30の原材料で乾式発酵を行ったDBD30区とした。また、施肥量は可給態窒素で8～12g/m²とした。その結果、イネの乾物重は、穂部では処理区間で有意な差は見られなかったが、茎葉部では施肥窒素量が8gともっとも少ないCF区でもっとも少なく、施肥窒素量が12kgともっとも多いWBD区とDBD30区で高くなった(図(2)-11)。DBD30で茎葉の収量がもっとも高くなったが、これは可給態窒素に加えて、有機態窒素の形で投入された窒素量もDBD30区で最大であったため、これらの有機態窒素が栽培期間中に順次無機化されイネの施肥源となったためと考えられた。

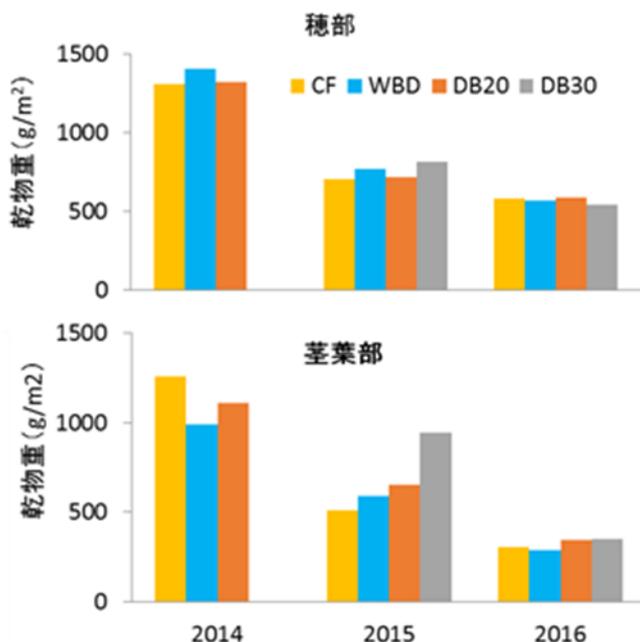
2016年度は2015年度と同様に処理区、施用する肥料の量を可給態窒素で8g/m²にそろえてイネの栽培試験を行った。その結果、穂部では処理区間に有意な差は認められなかったが、茎葉部では、施肥された全窒素量が8kgのCF区に対し、13～15kgと5割以上多かったDBD20、DBD30区で有意に高くなった(図(2)-11)。



図(2)-11 2015、2016年栽培時のイネ乾物収穫量 (g/m²)

(CF: 化学肥料区、WBD: 湿式消化液区、DBD20, 30: C/N20, 30に調整し発酵させた乾式残渣区)

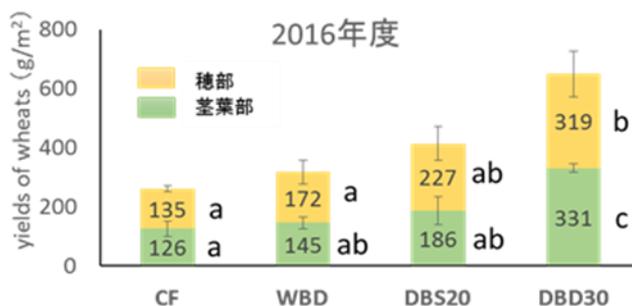
イネの乾物重の3年間の推移を見ると、乾式残渣区における茎葉部の収穫量は、2014年度は化肥区に比べ若干劣り、2015年度は化肥区を上回るなど一貫しなかったが、穂部の収穫量は3年間いずれの年度も化肥区と遜色ない結果が得られた (図(2)-12)。2015年度の施肥量は可給態窒素量で化肥区の8g/m²に対し、乾式残渣区では11~12g/m²と5割程度高かったことが、乾式残渣区で化肥区に比べ茎葉部の収穫量が高くなった原因と考えられるが、2016年度の施肥量はいずれの処理区も8g/m²と統一した。従って、同一の可給態窒素施肥量の下では、乾式残渣の肥料効果は化学肥料に匹敵すると結論できる。



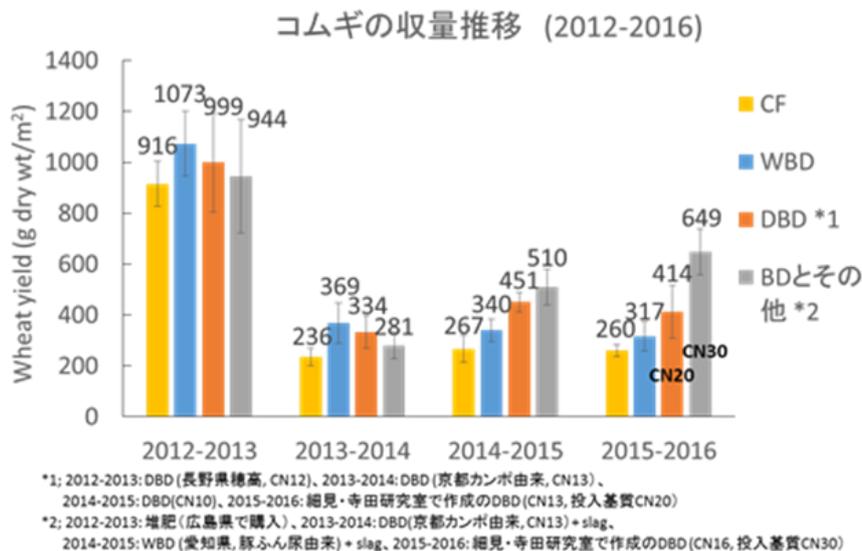
図(2)-12 イネ乾物収穫量 (g/m²) の年次推移

(CF: 化学肥料区、WBD: 湿式消化液区、DBD20, 30: C/N20, 30に調整し発酵させた乾式残渣区)

2015年秋から2016年春にかけて行ったコムギ栽培では、穂部において、化学肥料のみの連用区に比べ、湿式消化液連用区では約2割、C/N20の乾式残渣では約6割、C/N30の乾式残渣では2倍以上高い収量を示した（図(2)-13）。茎葉においても同様の傾向が認められた。過去4年間のコムギ収量の推移を見たところ（図(2)-14）、2012-2013年度は明確ではなかったが、それ以降、湿式消化液および乾式残渣のいずれの残渣処理区においても収量が2割以上増加しており、発酵残渣施肥により土壌肥沃度が向上することが結論された。特に、炭素投入量の最も多い乾式残渣処理区（DBD30区）では過去2年共に収量が2倍以上に増加しており、土壌肥沃度が顕著に増加したことが明らかとなった。



図(2)-13 2015～2016にかけて栽培したコムギの乾物収量
 (CF: 化学肥料区、WBD: 湿式消化液区、DBD20, 30: C/N20, 30に調整し発酵させた乾式残渣区)



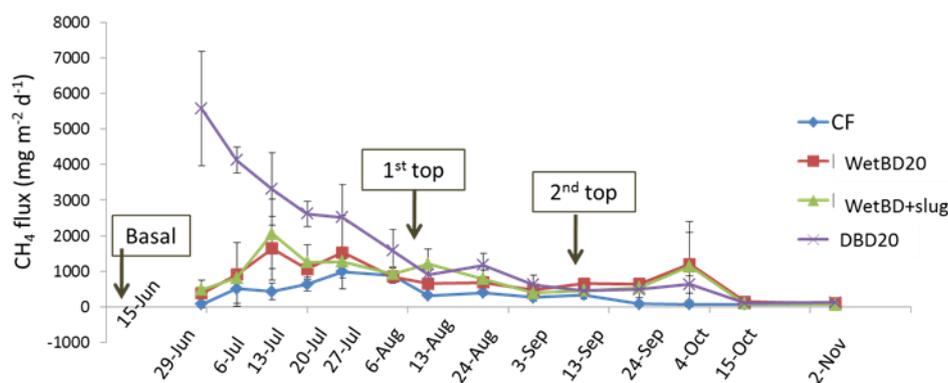
図(2)-14 コムギ収量（穂部＋茎葉部）の年次推移

2) イネ栽培中のメタン発生量に及ぼす影響

2014年度の飼料イネ栽培に伴うメタン発生速度の推移を図(2)-15に示す。炭素投入量はCF区のゼロに対し、WetBS区では93gC/m²、DBD20区では504gC/m²となった。水田への有機物施用はメタン発生量を促進することは周知であるが、本研究でも湿式消化液、特に炭素投入量の多い乾式残渣

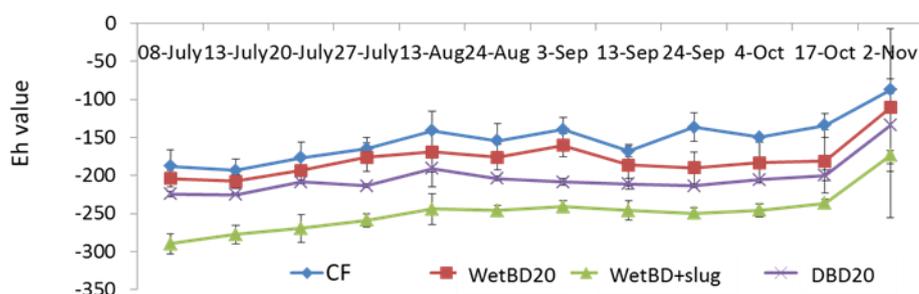
区で、顕著にメタン発生量が高くなった。メタン発生量は栽培前半で特に高かったことから、乾式残渣として投入された炭素が水田土壤中中で嫌氣的に分解され、分解産物としてメタンとなったことが推察される。また、スラグ添加によりメタン発生量を抑制できることが報告されているが¹⁴⁾、本研究では再現されなかった。スラグによるメタン発生量の抑制メカニズムとして、スラグ中の鉄酸化物土壤中での還元化の進行を抑制させることが考えられているが、本研究では、スラグ添加によりむしろEh値が低下しており、還元化がより進行していた（図(2)-16）。

2014年度の累積メタン発生量はDBD20区で170g/m²となり、CF区の43やWetBD区の94と比べて顕著に高い値となった（図(2)-17）。これは1作期間中のメタン発生量として堆肥施用土壤で20g/m²、稲ワラ施用土壤で72g/m²と報告されている¹⁵⁾ことから考えるとあまりに高く、温室効果ガス発生点からみた環境負荷がかなり大きくなることを意味する。そこで、2015年度以降は施肥量を30gN/m²から、8~12gN/m²に減らすとともに、メタン発生量の削減策として、中干しおよび間断灌漑を導入することとした。

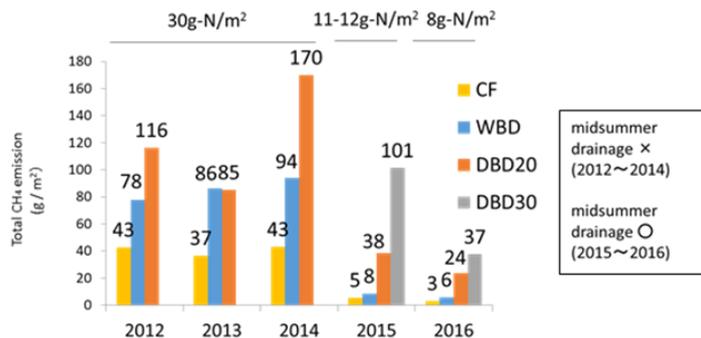


図(2)-15 2014年度の飼料イネ栽培時のメタンフラックスの推移

(CF:化学肥料区、WetBD:湿式消化液区、BD20:C/N20に調整し発酵させた乾式残渣区)

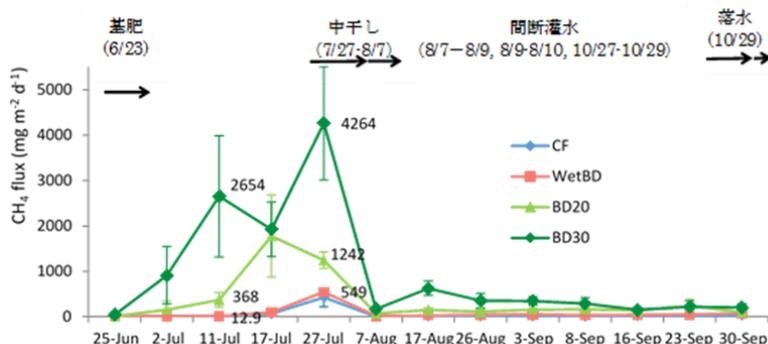


図(2)-16 2014年度の飼料イネ栽培時の土壌中の酸化還元電位 (Eh) の推移



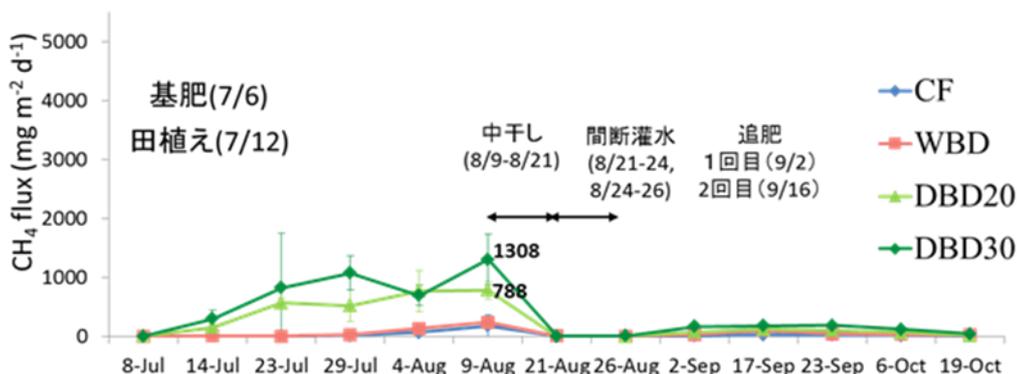
図(2)-17 栽培期間中の累積メタン発生量

2015年度のメタン発生速度は、栽培前半は乾式残渣区で顕著に高いメタン発生が見られたが、中干し後の8月7日以降メタン発生速度はいずれの処理区も極めて低くなった(図(2)-18)。乾式残渣区のメタン発生速度は、2014年度において最大値が5000mg/m²/dを超えていたが、2015年度は4000mg/m²/d程度となり、残渣施用量を2014年度から減らした効果を見ることができた。また、間断灌水そして中干しを行うことで水田からのメタン発生を顕著に抑えることができると再認識できた。



図(2)-18 2015年度の飼料イネ栽培時のメタンフラックスの推移

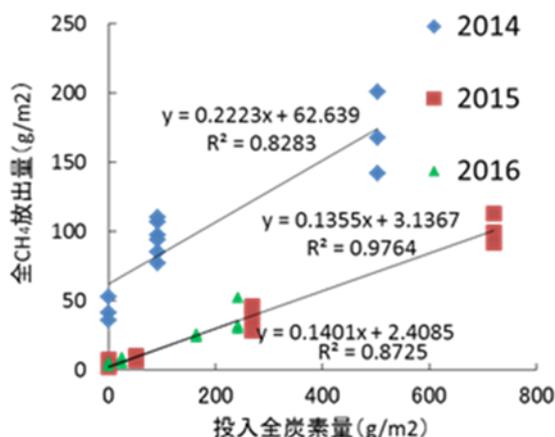
2016年度のメタン発生速度は、2015年度と同様の傾向が見られ、乾式残渣区(DBD20、DBD30)で顕著に高く、中干しおよび間断灌溉終了後はいずれの処理区も顕著に低くなった(図(2)-19)。処理区別で2015年度における累積メタン放出量を比較したところ、CFとWetBDは非常に低い累積メタン放出量を示した一方、BD20では高い累積メタン放出量を示し、更にBD30においてより高い値を示した(図(2)-17)。これは投入した全炭素量(BD30 722g/m²)が多いために起こったと考えられる。



図(2)-19 2016年度の飼料イネ栽培時のメタンフラックスの推移

2014～2016年度において、投入した全炭素量と全メタン放出量の相関をみたところ、高い相関が得られ、傾きはほぼ同じであった（図(2)-20）。つまり水田に施用された発酵残渣由来の炭素の一定割合がメタンとして放出されることがわかる。水田に発酵残渣のような有機物を施肥する際、投入炭素量に応じてメタン発生量が促進されることがわかった。また、2014年は栽培期間中つねに湛水状態を維持したのに対し、2015、2016年は中干し、間断灌水を行った。兩年のy切片の値の差より、中干し、間断灌水の実施により累積メタン発生量を60g/m²削減できる推定された。中干し、間断灌水の効果は顕著であり、常時湛水条件下であった2012から2014年は、化学肥料区で37～43g/m²であったメタン発生量が、3～5g/m²まで減少した。また、湿式消化液施用は、常時湛水条件下では化学肥料と比べメタン発生量を45～51g/m²も増加させたが、中干し・間断灌水の導入により増加分はわずか3g/m²となった。

したがって、窒素量で施肥量を併せる場合、湿式消化液は乾式残渣と比べ、単位面積あたりに投入される炭素量が少なくなり、その結果、中干し・間断灌水を導入することで、メタン発生リスクは最小化できると考えられた。一方、そうした水管理を導入しても、炭素投入量が多い乾式残渣区では、メタン発生リスクが高まることがわかった。



図(2)-20 投入炭素量と全メタン放出量の相関図

3) イネ栽培中の浸透水中の硝酸態窒素濃度に及ぼす影響

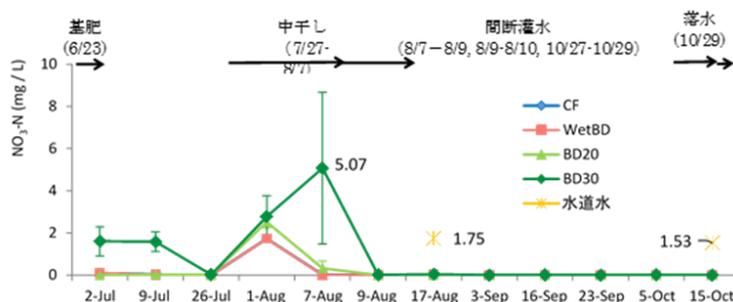
2015年の飼料イネ栽培時にライシメーター下部から採取した浸透水において、CF、WetBDおよび

BD20区では、施肥後から収穫までの間を通してほとんど硝酸態窒素は検出されなかった（図(2)-21）。それに対し、BD30では施肥9日後に2mg/Lの硝酸態窒素が検出された。施肥した乾式残渣中のアンモニア態窒素が速やかに硝化され硝酸塩となり溶脱してきた可能性があるが、図(2)-16で見られるようにDBD30区では速やかに還元化が進行したため、硝化が抑制されていた可能性が高い。7/26（施肥後33日目）の段階で溶脱が見られなくなっていたことから、BD30区には前年度まで堆肥や乾式残渣が施肥されており、他の処理区に比べ有機態窒素が多く施用され、それらに含まれていた有機態窒素が冬作期間の間に無機化、硝化され、それが浸透水中に放出されてきたことに起因すると考えられた。

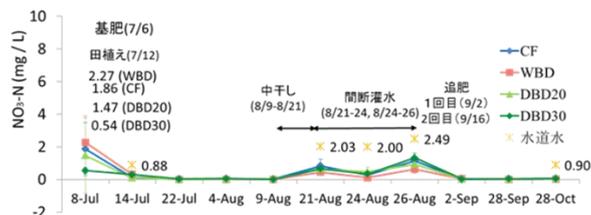
中干し後の8月1日にどの処理区でも高い硝酸塩を示した。これは土壌が酸化状態になり硝化が起りやすくなっていたために起こったと考えられる。加えて、8月7日にBD30で最大値となる5.07 mg/Lを示したのは、施用した投入全窒素量がCFの約3.8倍、WetBDの約2.6倍、BD20の約2倍と他の処理区よりもかなり多かったことが原因であると考えられた。間断灌水後はどの処理区でも硝酸塩は検出されなかった。本結果から、BD30を水田に施肥した際に中干しと間断灌水を行うことはメタンの放出は抑えられる一方、硝酸溶脱リスクは高まるということが示された。

2016年度も同様に浸透水中の硝酸塩窒素濃度の推移を評価した（図(2)-21）。施肥直後および間断灌水中に、若干の硝酸塩溶脱が確認されたが、処理区間の顕著な違いは見られなかった。それ以外の収穫までの期間では浸透水中にほとんど硝酸塩は検出されなかった。2015年度の結果では、中干し後の浸透水において乾式残渣区で他の処理区より高い硝酸塩濃度が確認され、乾式残渣処理に伴う硝酸塩汚染リスクの増大の可能性が示唆されたが、2016年度は再現されなかった。従って、DBD30を水田に施肥した際に中干しと間断灌水を行うことによりメタン放出は抑えられる一方、硝酸塩溶脱リスクは必ずしも高まらないと結論できる。

2015年栽培



2016年栽培



図(2)-21 2015年、2016年の飼料イネ栽培時の浸透水中の硝酸態窒素濃度の推移

4) 乾式残渣のイネ栽培における環境負荷

乾式残渣の環境負荷は、メタン発酵過程で得られるバイオガスを発電することで得られる環境負荷の低減効果と、水田に施用後温室効果ガスであるメタン発生を促進することによる環境負荷の増大の2つに大別される。C/N20に調整した豚ふん尿および稲ワラを原料とした乾式発酵過程におけるバイオガス生成量は、実験値で535Nm³/t-VS、VSは22%であったことから、乾式残渣の新鮮重当たりのバイオガス発生量は117.7Nm³/t-FMとなる。2016年度の1m²当たりの施用量は3.1kg-FMのため、1m²に施用する量の乾式残渣を作る際、0.365 Nm³のバイオガスが得られる計算になる。バイオガスの発電量は1.9 kWh/Nm³、それに伴うCO₂排出量は0.505 kg-CO₂/kWh（廃棄物系バイオマス利用導入マニュアル(案) バイオガス化施設導入に向けた検討簡易マニュアル)のため、1m²当たりに施用する乾式残渣を生産する過程で得られるバイオガスを発電利用することで、

$(0.365(\text{Nm}^3) \times 1.9(\text{kWh}/\text{Nm}^3)) = 0.693 \text{ kWh} \rightarrow 0.693 \times 0.505 (\text{kg-CO}_2/\text{kWh}) = 350\text{g-CO}_2$ 相当を削減できることになる。また、化学肥料製造には0.503t-CO₂/t（味の素 食品関連材料CO₂排出係数データベース）の二酸化炭素排出が伴うため、化肥区における肥料施用量57.1g/m²に基づく29gCO₂/m²と計算される。乾式残渣を用いることで1 m²当たり350gCO₂が削減でき、化学肥料を使用すると29gCO₂が発生するので、2016年度の乾式残渣DBD20区では、両者を併せて379 gCO₂の削減できたことになる。一方、乾式残渣区におけるメタン発生量の増加量は、24 g-メタン/m²であり、排出係数28をかけると672gCO₂/m²となる。これらの試算から、2016年度は中干し、間断灌漑を導入し、メタン発生量を削減した結果であるにもかかわらず、乾式発酵残渣製造時に得られるCO₂削減効果以上に、乾式発酵残渣を水田に施用すると温室効果ガスであるメタンを発生させてしまう、つまり、乾式残渣を化学肥料代替として用いると、温室効果ガス発生という観点での環境負荷は大きくなってしまったという結果になった。中干し・間断灌漑を導入することで、湿式消化液の施用によるメタン発生量の増大はわずか3g/m²であったが、これをCO₂換算すると84gCO₂/m²となり、化学肥料製造に由来する環境負荷29gCO₂/m²を超える結果となった。

化学肥料と湿式消化液は、イネの収穫量を最大限とするために、基肥に加えて追肥2回と、基準となる肥料の量を3回にわけて施用されている。一方、乾式残渣は、イネの生育中は土壤に混和できないという理由から追肥は行わず、基肥の1回で基準量全てを施用した。それにもかかわらず、イネの収穫量は乾式残渣区と化肥区で遜色なかったことから、乾式残渣は収量減をもたらさずに追肥の手間を省ける有効な肥料源であると言える。また、その肥料効果は施用直後に栽培されるイネにとどまらず、施肥の約5ヶ月後から栽培を開始したコムギ栽培においても確認された。乾式残渣施用で土壤微生物バイオマスが増加することが確認されているため、この増加した微生物バイオマスがイネおよびコムギに対する養分供給源となり、イネ、ムギの生育を高めたと考えられる。二酸化炭素排出量から見積もった乾式残渣の環境負荷は化学肥料と比べて大きくなってしまいが、二酸化炭素排出量では見積もれないプラスの効果があることがわかった。

(2) 発酵残渣のハスへの適用性と環境負荷の評価

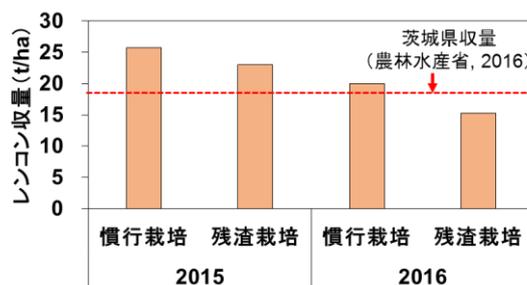
1) 発酵残渣によるハスの生育および水環境への影響

a 発酵残渣によるハスの生育およびハス田の窒素挙動

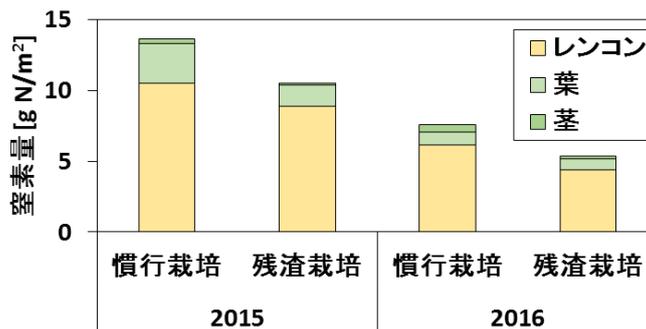
発酵残渣栽培による収穫物（レンコン）の収量は、慣行栽培よりも低かった（図(2)-22）。2015年度の収量と比較すると、2016年度は慣行栽培および残渣栽培いずれの系の収量も低かった。こ

これは、2016年度は台風により生長に影響が出たためと考えられる。しかし、いずれの年度においても残渣栽培の収量が低くなった。2016年度は基肥のアンモニア態窒素に占める残渣施用割合を2015年度の半分にしたにもかかわらず、残渣系の方が慣行系よりも低収量となった。

収穫物の部位別窒素吸収量の合計（図(2)-23）は、2015年度において慣行系および残渣系でそれぞれ13.6および10.6 g N/m²、2016年度では慣行系および残渣系でそれぞれ7.6および5.4 g N/m²だった。収量と同様に窒素吸収量においても残渣系の方が慣行系より小さくなった。



図(2)-22 レンコン収量



図(2)-23 ハスバイオオマスの部位別窒素吸収量

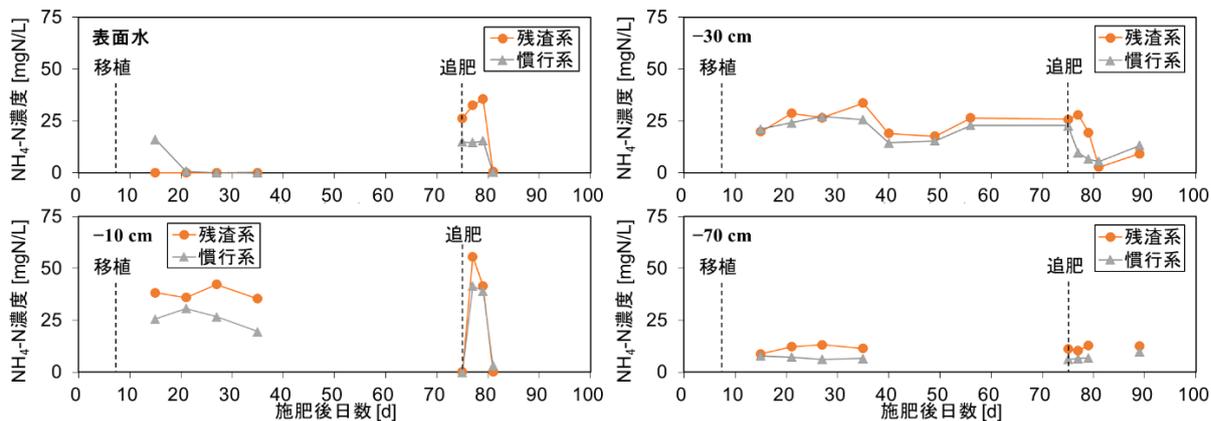
基肥施肥後、同じアンモニア態窒素量で施肥したにもかかわらず、表面水と間隙水におけるアンモニア態窒素濃度の変動は慣行系と残渣系で異なった。表面水では、基肥後に慣行系のアンモニア態窒素濃度が残渣系より高濃度となった（図(2)-24および25）。残渣系では基肥で施用するアンモニア態窒素の全量（2015年度）あるいは半分（2016年度）を残渣として土壤に埋め込んだ。一方、慣行系では全てのアンモニア態窒素を化学肥料として表面水に散布したため、残渣系よりも表面水の濃度が高くなったと推察された。基肥後上昇したアンモニア態窒素濃度は徐々に減少した。これは、土壤への拡散・浸透や硝化・脱窒など微生物反応によると考えられる。本実験では、区画を波板で囲っているため、表面水の流出はなかった。しかし実際の栽培では、基肥や追肥後の降雨などによる表面流出による窒素流出に留意する必要がある。

一方、基肥施肥後の間隙水（10 cmおよび30 cm）のアンモニア態窒素濃度は残渣系の方が高くなった（図(2)-24および25）。これは、残渣を土壤に埋め込んだので、残渣中のアンモニア態窒素が土壤に溶解したことに加え、残渣中有機態窒素の無機化によるアンモニア態窒素の放出が一因と考えられる。また、後述するように残渣によるハスの生育阻害によりアンモニア態窒素の吸

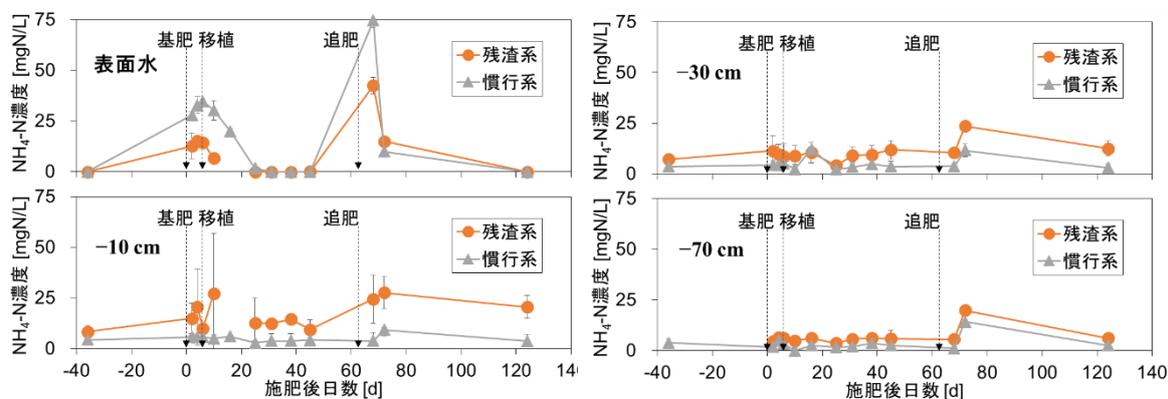
収が抑制されたためとも考えられる。

アンモニア態窒素はハスの養分として吸収されるはずなので、慣行系よりも高濃度ということは残渣系の収量は慣行系より高いはずである。しかし、実際は図(2)-22および23 に示されるように残渣系の収量と作物の窒素吸収量は慣行系よりも低かった。これは、残渣を施肥することで何らかの生長阻害が起こり、窒素の吸収が抑制されたためと考えられる。植物の生育阻害の一因として、土壌中における有機酸の蓄積が報告されている¹⁶⁾。従って、土壌中に施肥された発酵残渣が土壌微生物の働きで分解し、有機酸に変化し、窒素の吸収を抑制したのではないかと考えられる。

深さ70 cmにおけるアンモニア態窒素濃度は、他の深さに比べ観測期間中の変動が小さかった。一方、発酵残渣を施用した系のアンモニア態窒素濃度はいずれの年度も慣行系よりも高く、追肥後や追肥以外においても10 mgN/Lを超える場合が観測された(図(2)-24および25)。これは、土壌に基肥として混合した発酵残渣の有機体窒素が無機化した結果と考えられる。アンモニア態窒素は土壌粒子に吸着するため、土壌中を移動しにくい。従って、深部の窒素挙動を把握するためにはより長期の調査が必要になると考えられる。



図(2)-24 2015年度の基肥日(0 day)から栽培期間中の表面水、深さ10 cm、30 cmおよび深さ70 cmの $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度



図(2)-25 2016年度の基肥前(-36 day)から栽培期間中の表面水、深さ10 cm、30 cmおよび深さ70 cmの $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度

表(2)-5に収穫時土壌のセンチウ濃度を示す。慣行系ではセンチウの存在が確認されたが、残渣系では確認されなかった。本結果より、残渣施用によりセンチウ被害できることが示唆された。一方、収穫したレンコン表面のセンチウ被害を示す黒い斑点は、慣行系と残渣系で大きな変化は観察されなかった（図(2)-26）。

表(2)-5 収穫時土壌のセンチウ濃度

系	センチウ数 (体/m ²)
慣行系	147440
残渣系	0

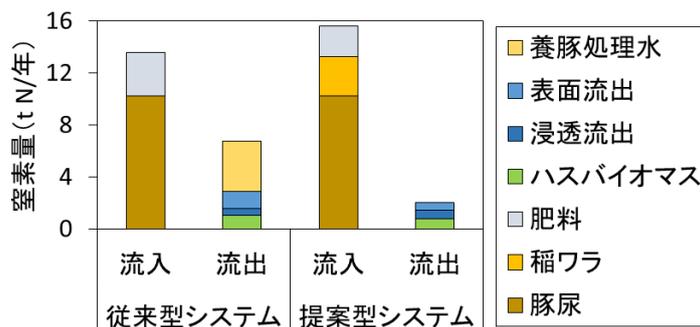


図(2)-26 収穫レンコン（残渣系および慣行系）の様子

b 乾式メタン発酵導入による環境中への窒素流出量の評価

ハス栽培で得られたハスバイオマスの窒素量および表面水と間隙水窒素濃度のデータ（2016年度）を用いて、乾式メタンを導入した場合の環境中への窒素流出量の評価を行った（図(2)-27）。養豚排水を排水処理施設で処理し、環境中へ放流し、ハス田は化学肥料で栽培される従来型システムでは、システムへ流入する窒素は豚尿と化学肥料合わせて13.3 tN/年だった。システムから流出する窒素は、排水処理施設からの処理水、ハスバイオマスによる窒素吸収およびハス田表面水と地下浸透流出である。これらの合計は6.7 tN/年であり、57%が養豚処理水だった。乾式メタン発酵と残渣をハス田で利用する提案型システムにおいて、システムに流入する窒素は豚尿および肥料に加えて乾式メタン発酵に利用する稲わらが加わるため15.6 tN/年であり、従来型システムより高かった。一方、提案型システムからの流出はハスバイオマスによる窒素吸収およびハス田表面水と地下浸透流出の系2.0 tN/年だった。いずれのシステムにおいても流入の方が流出より高いが、これは流出において、排水処理や土壌中における脱窒および土壌への窒素蓄積を考慮していないためである。

系から流出する窒素のうち、水環境の窒素負荷となる養豚処理水、表面流出および浸透流出の合計を比較すると、従来型および提案型システムでそれぞれ5.7および1.3 tN/年だった。従って、豚尿を乾式メタン発酵で処理し、残渣をハス田に施用することにより、環境中へ流出する窒素を77%抑制しうることが示唆された。

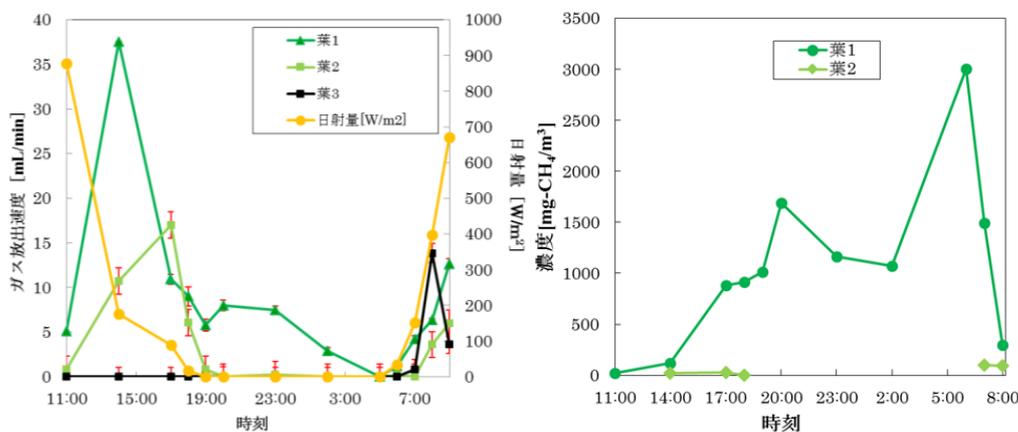


図(2)-27 従来型及び提案型システムの窒素収支 (養豚1000頭規模)

2) ハス栽培の温室効果ガス発生の評価

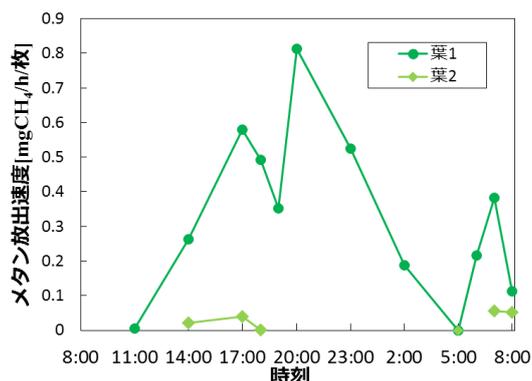
a ハスの葉からの温室効果ガス放出

石鹼膜流量計によって得られた荷鼻からのガス放出量およびガス中のメタン濃度の日周変動を図(2)-28に示した。ガス放出量は日射量の高い日中に高い値を示した。また、葉によってガス放出量が異なっていた。一方、ガス中のメタン濃度はガス放出量とは逆に日中低く、夜間に高くなる傾向となった(図(2)-28)。なお、葉3に関してはガスサンプリングに十分なガス放出が得られなかったためデータが得られなかった。葉1のメタン濃度は夜間に高い値を示していた。また、同じ時間帯で葉1と葉2の値を見るとメタン濃度が大きく異なっていた。従って、時間帯および葉によってガス放出速度とメタン濃度は大きく異なることが分かった。



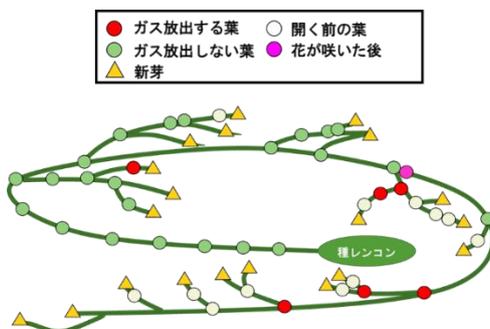
図(2)-28 荷鼻からのガス放出量(左)およびガス中のメタン濃度(右)の日周変動

ガス放出速度にメタン濃度を乗じることにより荷鼻からのメタン放出速度を算出した(図(2)-29)。葉1の荷鼻からのメタン放出速度は17時から20時にかけて高くなった。一方、葉2に関してはガス放出量が少ないためメタン濃度を測定できなかった点が多かったため、一部しかメタン放出速度を算出できなかった。しかし、葉1および葉2でメタン放出速度は大きく異なり、昨年度と同様の結果となった。



図(2)-29 ハスの荷鼻からのメタン放出速度

上記のように葉によってガス放出速度が異なる理由を明らかにするために、温室で栽培した観賞用ハスを根茎ごと掘り出し、ガス放出する葉の位置関係を調べた(図(2)-30)。図(2)-30において、ガス放出する葉は赤い丸で記されている。ガス放出する葉の共通する特徴として、新芽に近いところに位置していた。しかし、新芽に近い葉の全てがガスを放出していたわけではなかったことから、新芽に近い葉の一部の葉がガス放出していることが示唆された。ハスのガス輸送の駆動力としては、光合成による酸素の生成、根からの水吸収時の溶存メタンの流入、荷鼻が開くことによるガス放出が挙げられる。新芽から遠い、つまり古い葉は、新芽に近い若い葉と比べ、葉が大きく葉の位置も高いことから、光合成を行うのに効率が良い。また、新芽に近い葉は生長途中であり、植物としての働き、つまり荷鼻の開閉が活発的に行われると考えられる。また新芽に近い葉の方が成長するため、根からの水分の吸収が多く、メタンを多く吸収すると考えられる。過去の研究ではハスの葉はリーフブレード(ハスの葉の側面の小さな穴)よりガスを吸収しているという研究報告がある。従って、これらをまとめると、まずハスは古い葉からより酸素を生成し地下茎に送る。この流れと同時にリーフブレードにおけるガス吸収によって大気も地下へと送られる。新芽に近い葉が日中、荷鼻を開きここからガスを放出する。放出されるまでの経路で輸送されるガスは、根からの吸収により流入したメタンと混合され輸送される。従って、より長い経路で輸送されたガスはより多くの根を通るため、ガス内のメタン濃度は高くなっていく。実際、高いメタン放出速度を示した葉1は葉が丸まっており、若い葉であることが考えられる。以上より、ハスの荷鼻からのメタン放出速度は葉の新しさに依存すると考えられる。

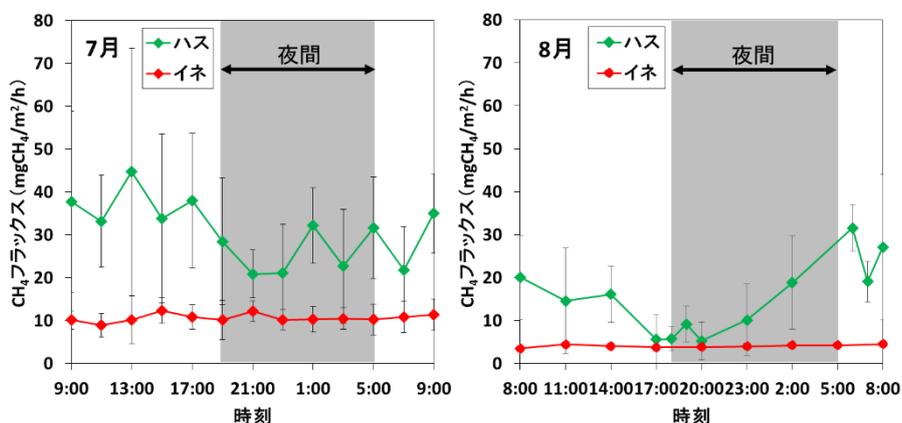


図(2)-30 各葉の地下茎における位置関係

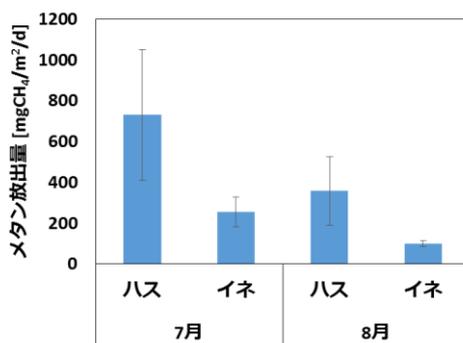
b ハスと水稲栽培の温室効果ガス放出量の比較

図(2)-31に7月および8月のハス田およびイネの水田からのメタンフラックスの日周変動を示す。ハス田からのメタンフラックスはライシメーターごとに異なっており、大きなばらつきを示した。日中と夜間での推移に特に規則性は見られなかった。一方、イネは1日を通して比較的一定の値を示しているといえる。また、ハス田に比べばらつきも小さかった。

7月と8月を比較すると、ハス田とイネいずれにおいても8月のメタンフラックスが小さかった。これは、植物の根圏から放出される有機物（メタン生成の基質）の量や植物体内の通気組織（土壌から大気へのメタンの通り道）の発達程度が時間とともに変化したためと考えられる。ハスとイネを比較するとメタンフラックスは全体を通して、ハスの方が高い値となった。1日当りのハス田およびイネ水田のメタン放出量を（図(1)-32）を比較すると、7月はハスの放出量がイネの2.9倍、8月は3.6倍だった。従って、夏季においてハス田から放出されるメタンの量はイネよりも高くなることが示唆された。



図(2)-31 7月（左）および8月（右）のハス栽培と水稲栽培のメタンフラックスの日周変動（日射量がゼロの期間を夜間として示す）

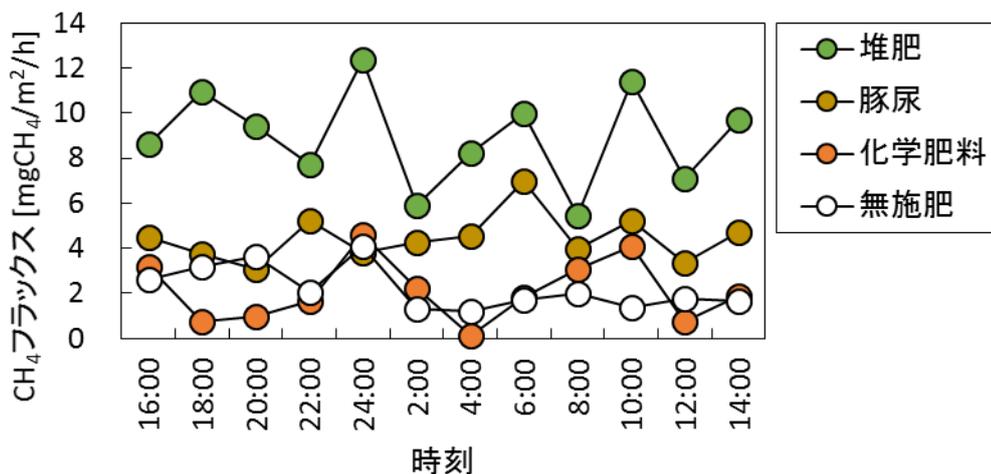


図(2)-32 7月および8月のハスとイネのメタン放出量

c ハス田への施肥が温室効果ガス放出に与える影響

図(2)-33に異なる肥料を施用したハス田におけるメタンフラックスの日周変動を示す。肥料により CH_4 フラックスは大きく異なっており、無施肥、化学肥料、豚尿および堆肥で栽培した際のメタン放出速度（日周変動の平均）は、それぞれ 2.2 ± 0.1 、 2.1 ± 1.4 、 4.5 ± 1.0 および $9.0 \pm 2.2 \text{ mgCH}_4/\text{m}^2/\text{h}$

となり、堆肥を施用した際のメタン放出速度が最も高くなった。このような傾向は水稻においても報告されている⁴⁾。本実験では発酵残渣が不足していたため同じ有機物として堆肥をやむなく使用した。しかし、図(2)-17に示されているように、多収米栽培において発酵残渣の施用はメタン放出を増大させる。従って、発酵残渣をハスに施用した場合でもメタン放出量の増加が予想される。

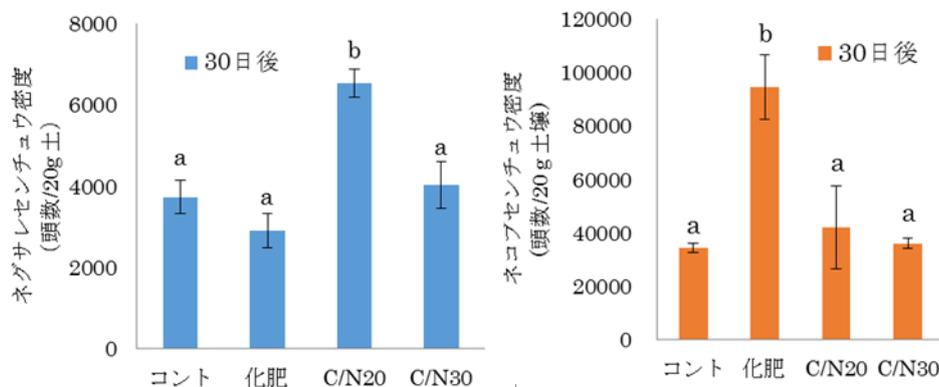


図(2)-33 ビニールチャンバー法によるCH₄フラックスの日内変動

(3) 発酵残渣による土壌病害抑制効果の評価

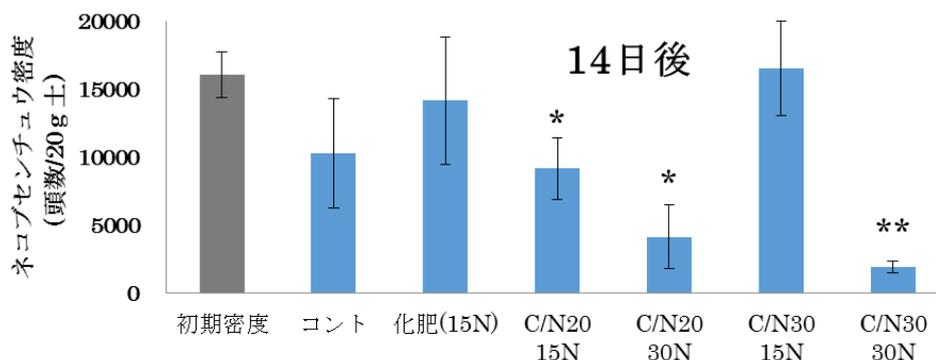
1) 乾式残渣が植物寄生性線虫に及ぼす影響

ネグサレセンチュウおよびネコブセンチュウに汚染された土壌に化学肥料あるいはメタン発酵残渣を施肥した結果、ネグサレセンチュウに関しては、化肥処理区よりも発酵残渣 C/N20 と C/N30 処理区で高い密度を示した(図(2)-34)。一方でネコブセンチュウに関しては、化肥処理区よりも C/N20 と C/N30 処理区で低い密度を示した(図(2)-34)。従って、発酵残渣はネグサレセンチュウに対する抑制効果はないが、ネコブセンチュウへの抑制効果が示唆された。



図(2)-34 残渣施用によるネグサレセンチュウ(左)・ネコブセンチュウ(右)密度への影響 (コント: 無施肥、CF: 化学肥料区、C/N20,30: C/N20、30に調整して発酵させた乾式残渣)

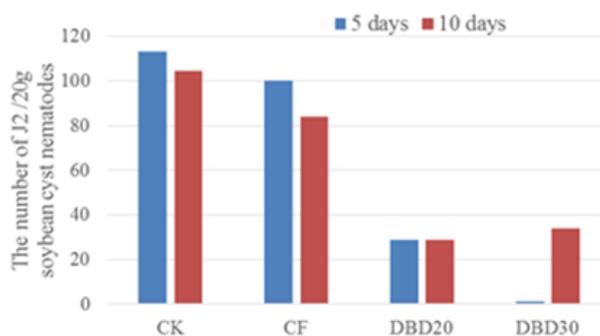
乾式残渣施用がネコブセンチュウに与える影響をさらに確認するため、再現実験を行った。その結果、C/N20 15N・30NとC/N30 30N 処理区で、初期密度に対してそれぞれ43%、60%、79%有意な減少がみられた(図(2)-35)。このことから、再現性が得られたので、メタン発酵残渣はネコブセンチュウ抑制効果を有することがわかった。



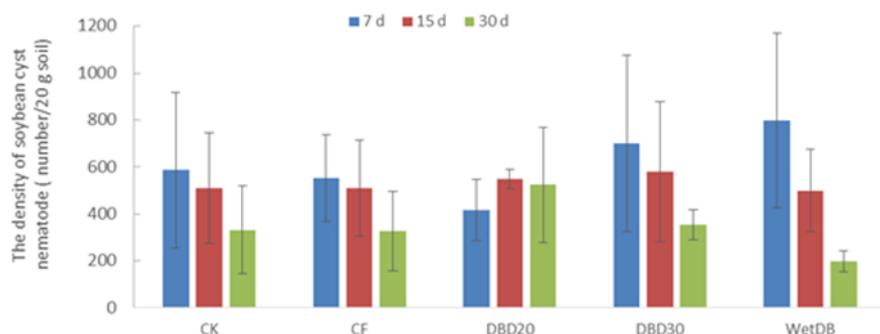
図(2)-35 残渣施用のネコブセンチュウ密度に対する影響(t-test, * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$)

(コント：無施肥、化肥：化学肥料区、C/N20,30：C/N20、30に調整して発酵させた乾式残渣、15N,30N：15,30kg-N/10aの窒素施用量)

乾式残渣のダイズシストセンチュウへの影響を、二期幼虫数と卵密度の両面から評価した。乾式残渣施用後の土壤中の二期幼虫数は、無肥料区(CK)および化肥区(CF)と比べ、乾式残渣添加区で顕著に低かった(図(2)-36)。これは、無肥料区と化肥区ではシスト内の卵が一定の比率で孵化したのに対し、乾式残渣区では線虫卵の孵化が抑制されたためと考えられる。線虫密度への影響は、添加7、15、30日後のいずれにおいても処理区間で有意な差は認められなかった(図(2)-37)。ダイズシストセンチュウに関しては、土壤中の一部のカビが線虫卵に寄生し、線虫卵を死滅させるという報告例が知られるため¹⁷⁾、本研究でも卵寄生菌が乾式残渣の施用で増殖し、線虫卵の死滅が加速される可能性を検証したが、線虫卵密度は乾式残渣施用で減少しなかった。従って、乾式残渣および湿式消化液には顕著なダイズシストセンチュウ密度低減効果はないと考えられた。一方、湿式消化液施用区では、培養30日目の線虫密度がもっとも低下しており、生物的要因が関与している可能性がある。

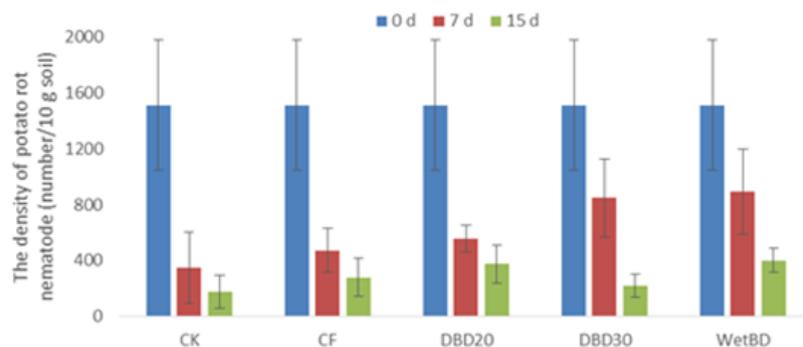


図(2)-36 ベルマン法によるダイズシストセンチュウ (*Heterodera glycines*) の幼虫数評価 (CK：無施肥、CF：化学肥料区、DBD20,30：C/N20、30に調整して発酵させた乾式残渣)



図(2)-37 乾式残渣が土壤中のダイズシストセンチュウ (*Heterodera glycines*) 密度に及ぼす影響 (CK：無施肥、CF：化学肥料区、DBD20,30：C/N20、30 に調整して発酵させた乾式残渣)

ついで、ニンニクのイモグサレセンチュウに対する影響を評価した。接種直後 1500 頭/10g であったイモグサレセンチュウ密度は、培養 7 日、15 日にかけて、無施肥区で急激に低下し、化肥区も同様であった (図(2)-38)。一方、この密度低減傾向は、乾式残渣あるいは湿式消化液の添加で緩やかになり、発酵残渣添加でイモグサレセンチュウが生存しやすくなる結果となった。

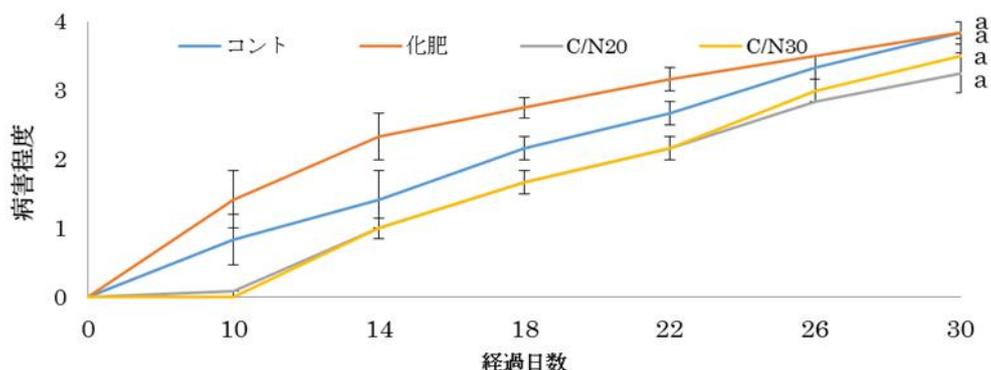


図(2)-38 乾式残渣が土壤中のイモグサレセンチュウ (*Ditylenchus destructor*) 密度に及ぼす影響 (CK：無施肥、CF：化学肥料区、DBD20,30：C/N20、30 に調整して発酵させた乾式残渣、WetBD：湿式メタン消化液)

以上、乾式残渣の植物寄生性線虫への影響は、ネコブセンチュウに対しては密度低減効果が確認できたが、ネグサレセンチュウ、ダイズシストセンチュウ、イモグサレセンチュウに対して抑制効果は認められないという結果になった。

2) 乾式残渣が複合病 (トマト萎凋病とネコブセンチュウ) に及ぼす影響

メタン発酵残渣の土壌施用がトマト萎凋病に及ぼす影響を調べたところ、30 日後の処理区間で有意な差は得られなかった (図(2)-39)。しかしコントロールや化学肥料と比べると、C/N20・C/N30 施用処理区ではそれぞれの経過日数において病害程度を低く示していることから、病害遅延効果を有する可能性が示唆された。



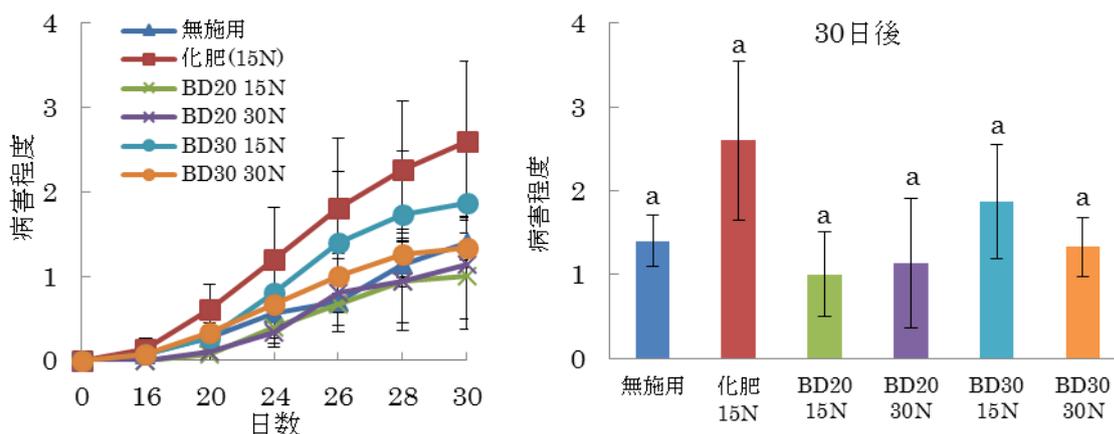
図(2)-39 残渣施用がトマト萎凋病の発病程度に及ぼす影響

(コント：無施肥、化肥：化学肥料区、C/N20,30：C/N20、30に調整して発酵させた乾式残渣)

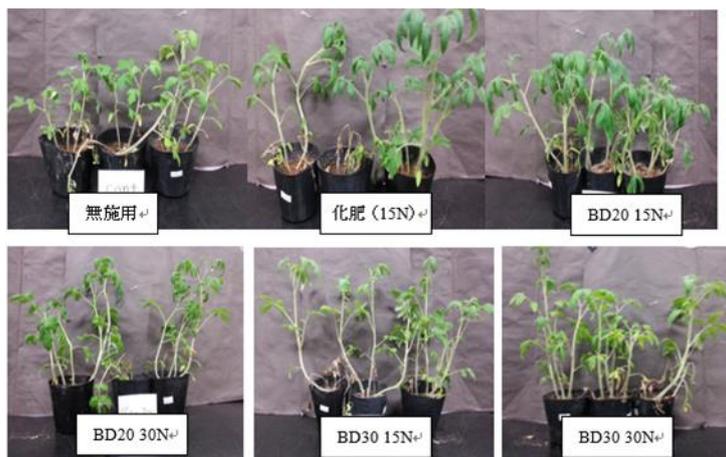
メタン発酵残渣の土壌施用がトマト萎凋病菌およびネコブセンチュウに及ぼす影響は、有意な差はないものの30日後において残渣施用処理区すべてにおいて化学肥料処理区よりも低い値を示した(図(2)-40)。残渣がネコブセンチュウの抑制効果を有する結果が得られているので、今回ネコブセンチュウを抑制したことで、萎凋病の病害を抑えることにつながったと考えられた。

栽培30日後のトマトの生育は、無施用区よりも化肥区・残渣区の方が良好であった(図(2)-41)。また、BD20 15N区・BD30 15N区は、それぞれ二倍量多く残渣を添加したBD20 30N区・BD30 30N区との間に大きな生育の違いはみられなかった。

どの栽培日数においても化肥(15N)区が最も高い萎凋病の病害程度を示した。また栽培30日目において、残渣施用した4処理区は化肥区よりも低い病害程度を示し、残渣の施用が発病を軽減したと考えられた(図(2)-40)。無施用区が化肥区よりも低い病害程度を示した原因は、無施用区は施肥していないためトマトの生育が悪く、本菌の感染度合も低下したのだと考えられた。

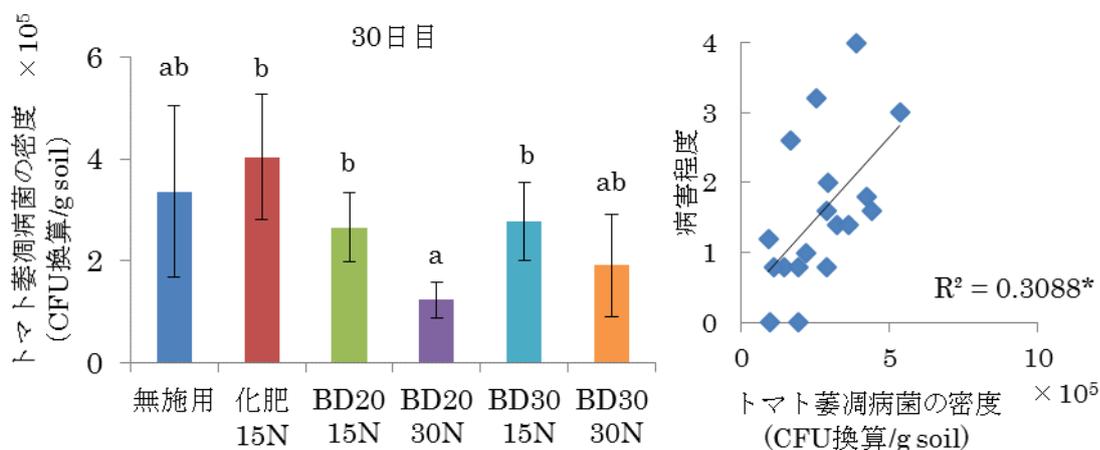


図(2)-40 トマト萎凋病の病害程度の経時変化(左)と栽培30日後の萎凋病の病害程度(右)
(コント：無施肥、化肥：化学肥料区、BD20,30：C/N20、30に調整して発酵させた乾式残渣、
15N,30N：15,30kg-N/10aの窒素施用量)



図(2)-41 栽培30日後の各処理区の生育状況

土壌中のトマト萎凋病菌密度は栽培30日目において、有意な差はないもののBD20 15N・BD30 15N・BD30 30N区は、化肥(15N)よりも低い密度を示し、BD20 30N区では化肥(15N)と比べ有意に低いトマト萎凋病菌の密度を示した(図(2)-42)。したがって残渣の施用によって、土壌中のトマト萎凋病菌密度が低減されたことが示唆された。また、栽培30日目におけるトマト萎凋病菌の密度と病害程度の間には正の相関が得られた($p < 0.05$) (図(2)-42)。つまり本実験の結果は、トマト萎凋病菌の密度を低減させたことが病害の症状を抑えたためと考えられた。

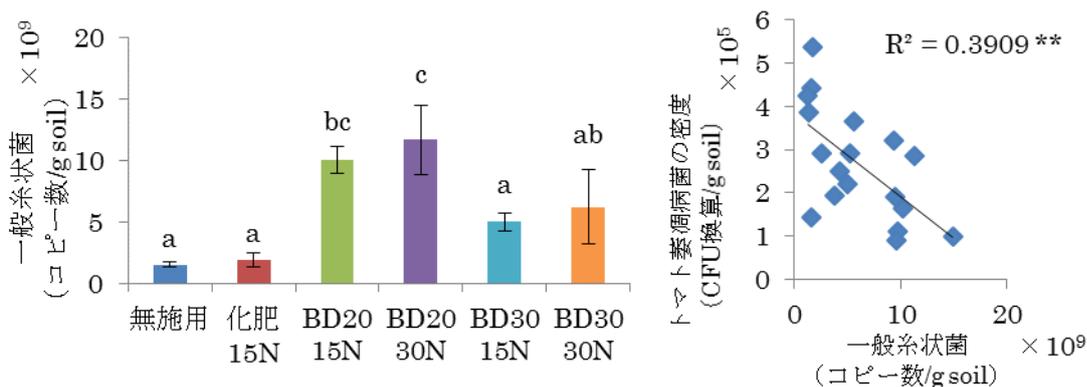


図(2)-42 培養30日目における土壌中のトマト萎凋病菌の密度(左)と栽培30日目のトマト萎凋病菌の密度と病害程度の関係(右)

(コント:無施肥、化肥:化学肥料区、BD20,30:C/N20,30に調整して発酵させた乾式残渣、15N,30N:15,30kg-N/10aの窒素施用量)

一般廃棄物由来の堆肥施用が、微生物相の養分競争によって、土壌中のフザリウム菌密度を低下させるということが報告されている。そこでトマト萎凋病の密度を低減させた要因が、土壌微生物による競争だと推測し、一般細菌と一般糸状菌密度の測定を行った。一般細菌密度とトマト萎凋病菌密度との相関は得られなかったが、一般糸状菌とトマト萎凋病菌密度との間に負の相関が得られた($p < 0.01$) (図(2)-43)。したがって、本実験では残渣施用による土壌中の一般糸状菌の

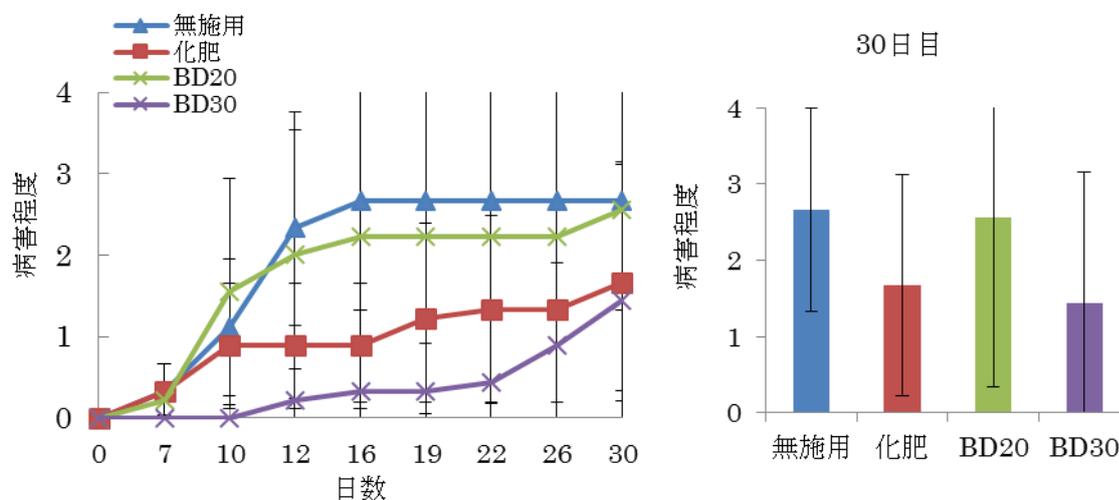
増加が、トマト萎凋病菌を抑制したと示された。下水汚泥と豚糞尿由来、アミノ酸肥料と豚糞尿由来の堆肥の施用によりフザリウム病を抑制した例では、非病原性フザリウムの増加といった土壌微生物相の変化が養分や場所の競争を引き起こし、病原菌の増加を抑制したためという報告がある¹⁸⁾。一方、メタン発酵残渣の施用はフザリウム病を抑制するが、病害抑制は土壌微生物群集とは関係せず、土壌中の水溶性炭素・窒素や微生物活性の増加が関係したとする方向もある¹⁹⁾。したがって本実験においても残渣の施用が、非病原性フザリウムの増加や土壌微生物活性を向上させ、本病原菌を抑制したのではないかと考えられた。



図(2)-43 培養30日目における土壌中の一般糸状菌の密度 (左) と栽培30日目における土壌中のトマト萎凋病菌の密度と一般糸状菌密度の関係 (右) (コント:無施肥、化肥:化学肥料区、BD20,30:C/N20,30 に調整して発酵させた乾式残渣、15N,30N:15,30kg-N/10a の窒素施用量)

3) 乾式残渣が複合病 (トマト青枯病とネコブセンチュウ) に及ぼす影響

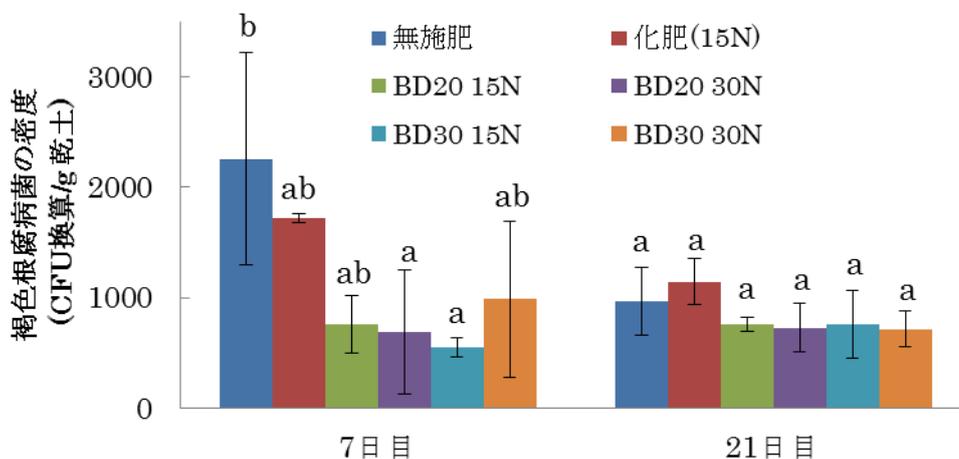
栽培30日目において、処理区間に有意な差はみられなかった (図(2)-44)。しかし、栽培10日目において無施用・化学肥料・BD20区では発病を示していたが、BD30区ではそのような症状はみられず、BD30は遅延効果を示した。BD20区とBD30区は、易分解性炭素をはじめとした炭素量などが異なり、BD30区の方がBD20区よりも多く易分解性炭素を施用している。このことから土壌中の微生物活性がBD30の方がより高まり、微生物競合により青枯病に対する遅延効果を示したと推測された。



図(2)-44 トマト青枯病の病害程度の経時変化(左)と栽培30日後の青枯病の病害程度(右)
(化肥:化学肥料区、BD20,30:C/N20、30に調整して発酵させた乾式残渣)

4) 乾式残渣が褐色根腐病菌の密度に及ぼす影響

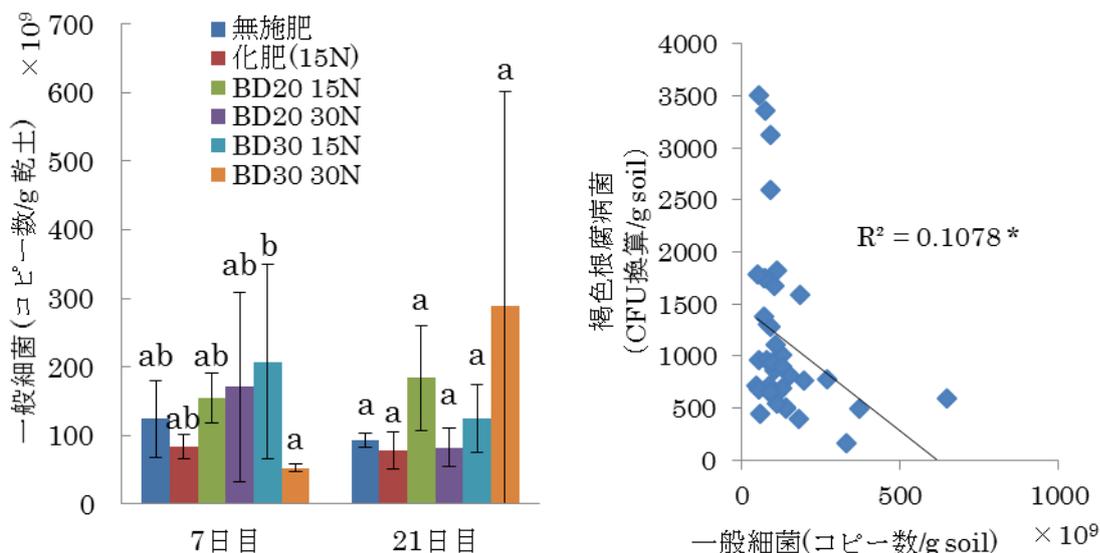
培養7日目において、無施用・化肥区と比べ残渣区(BD30 30Nを除く)は密度低下がみられ、無施用区とBD20 30N・BD30 15Nの間には有意な差がみられた(図(2)-45)。この菌は、生活廃棄物由来の堆肥、牛糞尿由来の堆肥、そして堆肥茶の施用によって発病を軽減したとあり²⁰⁾、メタン発酵残渣の場合でも同様に、抑制効果を有する可能性が示唆された。



図(2)-45 培養7, 21日目における褐色根腐病菌の菌密度
(コント:無施肥、化肥:化学肥料区、BD20,30:C/N20、30に調整して発酵させた乾式残渣、15N,30N:15,30kg-N/10aの窒素施用量)

また森田・堀(1981)によると糸状菌密度の増加により、本菌の発病を抑制したと記される¹¹⁾。そこで土壌微生物の増加量の確認を目的とし、一般細菌と一般糸状菌の密度を測定した。培養7日目において、化学肥料<無施用<残渣区(BD30 30Nを除く)の順に一般細菌密度が高かった(図

(2)-46)。これは残渣由来の易分解性炭素の投入によって一般細菌が活性化したからだと考えられる。また、培養0, 7, 21日目における土壌中の一般細菌と褐色根腐病菌の密度の間に負の相関が得られた。したがって、一般細菌の増加は褐色根腐病菌の密度を低減した一因だと示唆された。一方、一般糸状菌の密度を測定したが、相関は得られなかった。したがって本実験では、残渣の施用が一般細菌の密度を増加させ、土壌中の褐色根腐病菌密度を低減したと示された。



図(2)-46 培養7, 21日目における一般細菌の密度(左)と
培養0, 7, 21日目の一般細菌と褐色根腐病菌の菌密度の関係(右)

(コント: 無施肥、化肥: 化学肥料区、BD20,30: C/N20、30に調整して発酵させた乾式残渣、
15N,30N: 15,30kg-N/10aの窒素施用量)

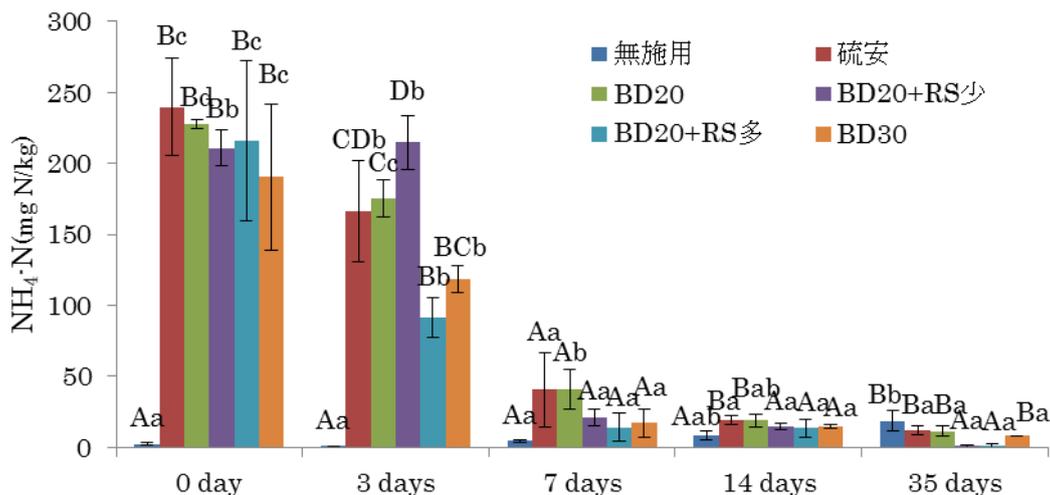
5) 乾式残渣に稲ワラを混ぜた施用物が土壌の硝化に及ぼす影響

培養0日目において、無施用区を除いたすべての処理区は約200mgのアンモニア態窒素を示し、その後速やかに減少した(図(2)-47)。培養7, 14, 35日目において、BD20区>硫安区>BD30区>BD20+RS少区>無施用区>BD20+RS多区の順に高い硝酸態窒素濃度を示した(図(2)-48)。BD20区、BD20+RS少区、そしてBD30区は培養7日目~35日目において硝酸態窒素の大きな増加はみられず、施用7日後にはほとんど硝化が終了し、添加したアンモニウム塩はすべて硝酸塩に硝化されてしまうことが明らかになった。これは、残渣の施用が土壌のpHを高め硝化が促進されるため、残渣区は硝化速度が化肥区よりも速いのだと考えられる²¹⁾。BD20+RS多区では硝酸態窒素の増加はみられなかった。これは多量の易分解性炭素の投入が、土壌微生物を活性化させ、多くの窒素が不動態化したためだと考えられる。

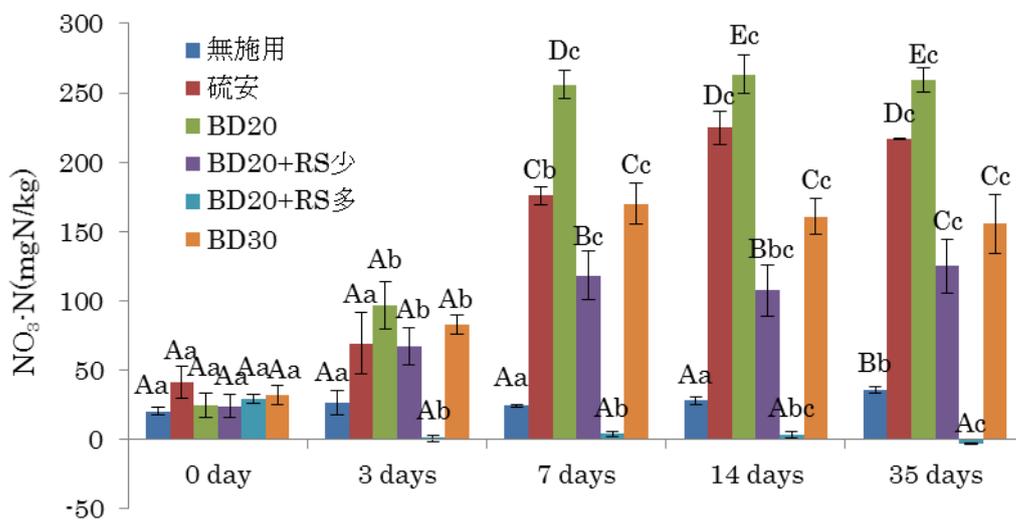
14~35日目において、BD30区は硫安区よりも低い硝酸態窒素濃度を示した。これは、一般的に施用した有機物のC/N比が20より高い場合、窒素の不動態化が起こるとされるが、はC/N比15以上の有機物でも不動態化が起きることが知られる。本実験ではC/N比16のBD30乾式残渣の施用が、微生物による窒素の不動態化を促進させたため、硫安区よりも低い硝酸態窒素濃度を示したと考えられた。したがって、BD30の乾式残渣の硝酸溶脱リスクは低いと示された。一方7~35日目に

において、BD20区は他処理区よりも有意に高い硝酸態窒素濃度を示し、添加したアンモニア態窒素200 mg以上の硝酸態窒素濃度が検出された。これは、BD20由来の有機態窒素が無機化したからと考えられ、BD20の乾式残渣は硝酸溶脱リスクが最も高いことが示唆された。

乾式残渣と稲ワラを少量混ぜたBD20+RS少区とBD30区は、施用物のC/N比が16と等しいが、易分解性炭素量はBD20+RS少区の方が170 mg多く含まれている。つまり易分解性炭素の投入が多かった前者の方が、微生物による窒素の不動化量が多かったため、BD30区よりも硝酸態窒素濃度が低くなったと考えられた。



図(2)-47 土壌中のNH₄-N濃度の経時変化



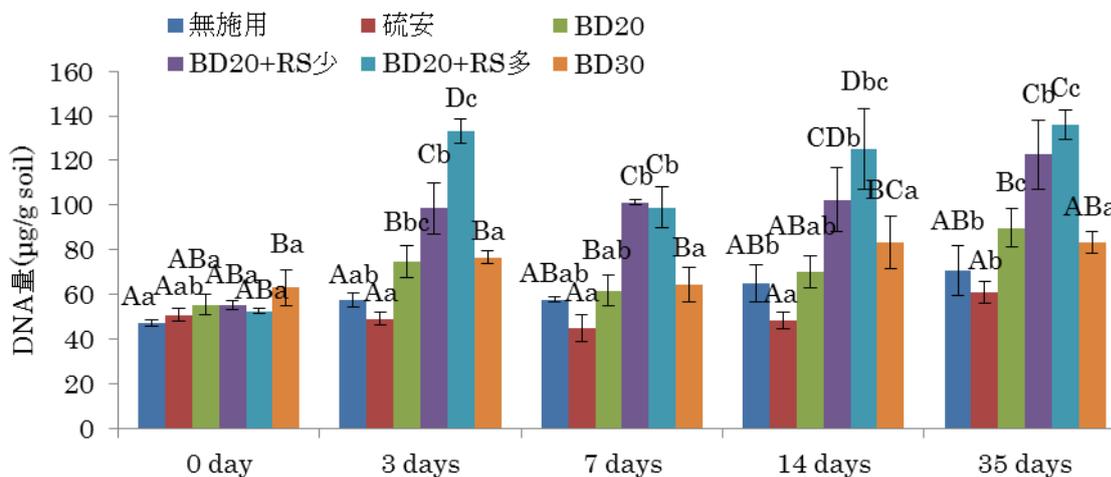
図(2)-48 土壌中の硝酸態窒素濃度の経時変化

(大文字のアルファベットは処理区間、小文字は日数間の有意差を意味する)

(硫安：硫酸アンモニウム、BD20,30：C/N20、30に調整して発酵させた乾式残渣、RS：稲ワラ)

培養14日目において、BD20+RS多区>BD20+RS少区>BD20区>BD30区>無施用区>硫安区の順に高いDNA量を示した(図(2)-49)。易分解性炭素の投入が多かったBD20+RS少の方が、微生物に

よる窒素の不動化量が多かったため、BD30区よりも硝酸態窒素濃度が低くなった。前述したこの結論を支持するDNA量の増加がBD20+RS少区ではみられた。したがって、BD20の乾式残渣のみの施用は硝酸溶脱リスクが高いものの、稲ワラと残渣を混ぜた混合物の施用は、微生物による窒素の不動化をもたらし、硝酸溶脱リスクの低減につながると示唆された。



図(2)-49 土壌中のDNA量の変化

(大文字のアルファベットは処理区間、小文字は日数間の有意差を意味する)

(硫安：硫酸アンモニウム、BD20,30：C/N20、30に調整して発酵させた乾式残渣、RS：稲ワラ)

(4) 発酵残渣炭化物の作製

表(2)-6に炭化前後の発酵残渣の性状を示す。発酵残渣の炭化により、重量はおおよそ1割に減少した。また、揮発性有機物含有率および全炭素含有率の減少も見られ、炭化により発酵残渣の有機物の減少が確認できた。一方、灰分の含有率と P_2O_5 （五酸化二リン）含有率は炭化により増加した。灰分は金属など熱でも安定な物質であり、リンも加熱では揮散しないため、これらは炭化により炭化物内に濃縮したものと考えられる。

発酵残渣のリン含有率は450℃で炭化した豚ふん堆肥炭化物のリン含有率(5.46%)²²⁾の1/4程度だった。これは、発酵残渣は豚尿と稲わらを原料としており、豚ふん乾燥物に比べ原料中のリン含有率自体が少ないためと考えられる。一方、炭化物中に含まれるリンのうち、どれほどが実際に植物に利用可能かどうかを今後明らかにしていく必要がある。発酵残渣のリン肥料としての価値が明らかになれば、ハス田へのリン肥料としての残渣の還元が可能となる。

上述の通り、水稻やハス田はメタン放出源として重要である。一方、炭化物の施用により水田からのメタン放出が抑制できたという報告例もある²³⁾。従って、炭化物の施用により多収米飼料イネ水田やハス田からのメタン放出を抑制しながら栽培が出来ると考えられる。

表(2)-6 炭化前後の発酵残渣の性状

	原料	炭化物
重量 [g]	200	15.8
含水率 [wet-%]	82.4	
Ash [%]	34.9	66.7
VS [%]	65.1	33.3
TC [%]	35.3	27.1
TN [%]	1.75	0.7
P ₂ O ₅ [%]	0.59	1.3

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

強力な温室効果ガスであるCH₄は、湛水した水田のように土壌が無酸素な環境で盛んに生成されるため、特に水稻栽培におけるメタン放出が盛んに研究されてきた^{4, 24)}。一方、根茎を食用として利用されるハスも水稻と同様に水田で栽培されるにもかかわらず、そのメタン放出量は調査がなされてこなかった。一方、水稻やハスのように無酸素土壌に根を張る植物は根圏への酸素輸送のために通気組織を発達させてきた。従って、大気と植物体とのガス交換研究が盛んになされている。しかし、ハスのメタン輸送に着目した研究はこれまでに報告例がない。本研究では始めてハスの荷鼻からのCH₄ガス放出を確認することができた。この結果はハス栽培も水稻やその他湿地植物と同様に温室効果ガスであるCH₄の放出源であることを示している。さらに、葉によってガス放出のパターンが異なることが分かり、複雑なガス輸送機構を有していることが示唆された。また、ビニールチャンパー法を用いることで、ハス栽培は水稻栽培よりもメタン放出量が高いことが示唆された。さらに、ハス栽培に有機物を施用することでメタン放出量の増加が確認されたことから、ハスへの乾式発酵残渣施用もメタン放出量を増大させることが予想される。

メタン発酵およびその発酵残渣の農業利用に関する研究例は数多くなされており、肥料としての価値がすでに確立されている。ところが、発酵残渣の農業利用に関する研究の大半は湿式タイプの発酵残渣 (= 湿式消化液) を用いたものであり、本研究で対象とした乾式発酵残渣に関する研究例はきわめて限られている¹⁾。本研究により3年間、乾式発酵残渣の飼料イネへの肥料効果を化学肥料および湿式消化液と比較したところ、同等の乾物重を得ることができた。化学肥料や湿式消化液では慣行に従い、苗移植前の基肥1回と生育期間中2回の、合計3回の施肥を行ったのに対し、乾式残渣では基肥1回の施肥で同等の乾物重を得ることができたことは、今後、施肥労力の削減につながる成果である。本研究では、施肥量を単位面積当たりの窒素量で揃えたため、残渣に含まれる窒素以外の各種成分も土壌に施用され、湿式消化液区には25~93g/m²の炭素が、乾式残渣区には164~504g/m²の炭素が投入されたことになる。炭素の投入は微生物バイオマスを増加させるため土壌肥沃度が高まる。本研究でも、飼料イネの収穫後、土壌肥沃度評価のためにコムギを無肥料条件下で栽培したが、湿式消化液区、特に乾式残渣区では化学肥料区と比べて高いコムギ乾物重が得られ、乾式残渣は土壌肥沃度を高めることを実証できた。一方、乾式残渣の水田への施用は、メタン発酵過程で得られるバイオガスによる再生可能エネルギー生産に伴う二酸化炭素発生量の削減量以上に、水田から温室効果ガスであるメタン発生を促進するため、環境負荷を増大さ

せてしまうリスクも明らかにすることができた。

堆肥の施用による土壌伝染性病原菌や植物寄生性線虫の抑制に関して、数多くの研究例がある。一方、湿式消化液では、キタネグサレセンチュウ²⁵⁾、ネコブセンチュウ、フザリウム菌^{19, 26)}を抑制した例など、きわめて限られた研究例しか報告されていない。乾式残渣の研究例は著者らの知る限り報告されていない。本研究において、乾式残渣が土壌中におけるネコブセンチュウ、トマト萎凋病菌、トマト褐色根腐病菌の密度を低下させることを示すことができた。ネコブセンチュウ以外の植物寄生性線虫や青枯病菌などでは密度低減効果を確認することはできなかったため、すべての土壌伝染性病原菌や線虫に効果がある訳ではなかったが、一部の病原菌、線虫に対して抑制効果を見出した貴重な研究例となった。

発酵残渣の施用量は可給態窒素量で化学肥料区と揃えている。そのため、発酵残渣区では化学肥料区以上に全窒素投入量が高くなる。また、発酵残渣はアルカリ性のため土壌に施用すると土壌酸性を中和する効果があり硝化が促進されるため、発酵残渣は硝酸汚染リスクを高めかねない²¹⁾。本研究においても、C/N30に調整して発酵させた乾式残渣（DBD30）区の硝酸汚染リスクは化学肥料区と同程度もしくはそれ以下であったが、DBD20区では化学肥料区以上に硝酸溶脱が起きる可能性が示された。そこで、DBD20区における硝酸汚染リスクを低減するために稲ワラを6.5g/kg土壌施用すると土壌中の硝酸態窒素含量が半減し、40.5g/kg土壌施用すると硝酸態窒素含量をほぼゼロまで低下させることができた。稲ワラ施用による堆肥由来の硝酸塩溶脱リスクの削減はよく知られているが¹³⁾、本研究でもそれが乾式発酵残渣に当てはまること、溶脱リスクの低下は微生物バイオマスによる窒素の不動化が原因であることを明らかにできた。

豚尿と稲わらの高温乾式メタン発酵残渣の炭化物にはリンが含まれていることが明らかとなった。ただし、その含有量は豚ふん堆肥炭化物と比べると低く、今後リン源としての評価やリン含有率を高める必要がある。

（２）環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

- ・発酵残渣を水田作物の肥料として利用し、豚尿に由来する窒素の環境中への流出を抑制
- ・発酵残渣は土壌肥沃度を高めること。
- ・発酵残渣は一部の病原菌、ネコブセンチュウ密度を下げる効果を有すること。
- ・発酵残渣DBD20は、化学肥料と同程度の硝酸塩溶脱リスクを有し、リスク削減のためには、DBD30を使用するあるいはDBD20と稲ワラを併用すること。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

（１）誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) S. Riya, S. Zhou, Y. Kobara, M. Sagehashi, A. Terada, M. Hosomi: Journal of Environmental Management, 161, 124-130 (2015) "Effects of N loading rate on CH₄ and N₂O emissions during cultivation and fallow periods from forage rice fields fertilized with liquid cattle waste"

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 利谷翔平, 片山美怜, 高橋恵理加, 島田幸治郎, 寺田昭彦, 細見正明: 日本土壤肥料学会 2015年度京都大会 (2015) "乾式メタン発酵残渣を施肥した多収米水田におけるメタン放出の削減"
- 2) 古谷野康平, 豊田剛己, 沢田こずえ・Ghalia Missous: 日本土壤肥料学会2015年度京都大会 (2015) "メタン発酵残渣を用いた土壤病害の抑制効果"
- 3) S. Riya, Y. Takeuchi, S. Zhou, A. Terada, M. Hosomi: The 12th International Conference of the East and Southeast Asia Federation of Soil Science Societies (2015) "Linking Drainage-Induced Nitrous Oxide Production and Functional Gene Expression of Nitrifier and Denitrifier in Flooded Soil"
- 4) 島村誠人, 利谷翔平, 寺田昭彦, 細見正明: 第50回日本水環境学会年会 (2016) "発酵残渣を施肥したハス田における窒素挙動の解明"
- 5) 古畑光, 島村誠人, 今野凌, 利谷翔平, 周勝, 寺田昭彦, 細見正明: 応用生態工学会 第20回大会 (2016) "ハス (*Nelumbo nucifera*) はどの葉からガスを放出しているのか"
- 6) Wang, Y., Koyano, K. and Toyota, K: 日本線虫学会 (2016) "Effects of dry biogas digestate application on root knot nematodes and soybean cyst nematodes"
- 7) 古畑光, 島村誠人, 今野凌, 利谷翔平, 周勝, 寺田昭彦, 細見正明: 第19回化学工学会学生発表会小金井大会 (2017) "ハスの温室効果ガス放出の評価および機構解明"
- 8) 那須啓亮, 利谷翔平, 寺田昭彦, 細見正明: 第51回日本水環境学会年会 (2017) "乾式メタン発酵残渣を施用したハス田のレンコン収量及び水質への影響"
- 9) 古畑光, 利谷翔平, 寺田昭彦, 細見正明: 第51回日本水環境学会年会 (2017) "ハス (*Nelumbo nucifera*) の温室効果ガス放出"

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) Nkoa R: Agricultural benefits and environmental risks of soil fertilization with anaerobic digestates: a review, *Agron. Sustain. Dev.* 34, 473-492 (2014)
- 2) Nouchi I, Mariko S, Aoki K: Mechanism of methane transport from the rhizosphere to the atmosphere through rice plants, *Plant Physiol.* 94, 59-66 (1990)
- 3) Grosse W, Armstrong J, Armstrong W: A history of pressurised gas-flow studies in plants, *Aquatic Botany* 54, 87-100 (1996)
- 4) Yagi K, Minami K: Effect of organic-matter application on methane emission from some Japanese paddy fields, *Soil Sci. Plant Nutr.* 36, 599-610 (1990)
- 5) Riya S, Katayama K, Takahashi E, Zhou S, Terada A, Hosomi M: Mitigation of Greenhouse Gas Emissions by Water Management in a Forage Rice Paddy Field Supplemented with Dry-Thermophilic Anaerobic Digestion Residue, *Water Air and Soil Pollution* 225, 2118 (2014)
- 6) Sato E, Suga Y, Kisaki C, Toyota K, Miyake K, Takada A, Takeuchi K, Matsuura R: Quantification of *Pratylenchus penetrans* in radish fields using a combination method of soil compaction and real-time PCR to determine the economic threshold, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 57, 213-220 (2011)
- 7) Watanabe T, Masumura H, Kioka Y, Noguchi K, Min YY, Murakami R, Toyota K: Development of a direct quantitative detection method for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in andosol and analysis of relationship between the initial population of *Meloidogyne* spp. and yield of eggplant. *Nematol. Res.*, 43, 21-30 (2013)
- 8) Ito D, Toyota K, Sedrati GM: Suppression of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, using water extract of bean sprout residue, *Nematology*, 17, 523-530 (2015)
- 9) Cheng Z, Toyota K, Yamashita K: Development of real-time PCR primers specific to the potato rot nematode *Ditylenchus destructor* causing damage to garlic to quantify its density in soil. *Nematol. Res.*, 45, 93-100 (2015)
- 10) Lievens B, Brouwer M, Vanachter A, Levesque CA, Cammue BPA, Thomma B.: Quantitative assessment of phytopathogenic fungi in various substrates using a DNA macroarray. *Environ. Microbiol.*, 7, 1698-1710 (2005)
- 11) 森田儒, 堀兼明: トマト褐色根腐病の防除。土と微生物, 23, 19-21 (1981)

- 12) Hilton S, Bennett AJ, Keane G, Bending GD, Chandler D, Stobart R, Mills P: Impact of shortened crop rotation of oilseed rape on soil and rhizosphere microbial diversity in relation to yield decline. *Plos One*, 8, e59859 (2013)
- 13) Herai Y, Kouno K, Hashimoto M, Nagaoka T: Relationships between microbial biomass nitrogen, nitrate leaching and nitrogen uptake by corn in a compost and chemical fertilizer-amended regosol. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 52, 186-194 (2006)
- 14) Ali MA, Oh JJ, Kim PJ: Evaluation of silicate iron slag amendment on reducing methane emission from flood water rice farming. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 128, 21-26 (2008)
- 15) Kanno T, Miura Y, Tsuruta H, Minami K: Methane emission from rice paddy fields in all of Japanese prefecture: relationship between emission rates and soil characteristics, water treatment and organic matter application. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.*, 49, 147-151 (1997)
- 16) Armstrong J, Armstrong W: An overview of the effects of phytotoxins on *Phragmites australis* in relation to die-back, *Aquatic Botany* 69, 251-268 (2001)
- 17) Bao Y, Neher DA, Chen, S: Effect of soil disturbance and biocides on nematode communities and extracellular enzyme activity in soybean cyst nematode suppressive soil. *Nematology*, 13, 687-699 (2011)
- 18) Huang X, Shi DZ, Sun FQ, Lu HH, Liu JJ, Wu WX: Efficacy of sludge and manure compost amendments against *Fusarium* wilt of cucumber. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 9, 3895-3905 (2012)
- 19) Cao Y, Wang JD, Wu HS, Yan SH, Guo DJ, Wang GF, Ma Y: Soil chemical and microbial responses to biogas slurry amendment and its effect on *Fusarium* wilt suppression. *Appl. Soil Ecol.*, 107, 116-123 (2016)
- 20) Giotis C, Markelou E, Theodoropoulou A, Toufexi E, Hodson R, Shotton P, Shiel R, Cooper J, Leifert C: Effect of soil amendments and biological control agents (BCAs) on soil-borne root diseases caused by *Pyrenochaeta lycopersici* and *Verticillium albo-atrum* in organic greenhouse tomato production systems. *Eur. J. Plant Pathol.*, 123, 387-400 (2009)
- 21) Sawada K, Toyota K: Effects of the application of digestates from wet and dry anaerobic fermentation to Japanese paddy and upland soils on short-term nitrification. *Microbes Environ.*, 30, 37-43 (2015)
- 22) 土手裕, 関戸知雄, 上田浩三, 阪本亮一: 豚ふん堆肥炭化物からのカリウム回収方法の検討, 廃棄物資源循環学会研究発表会講演集, B6-4 (2011)
- 23) Han X, Sun X, Wang C, Wu M, Dong D, Zhong T, Thies JE, Wu W: Mitigating methane emission from paddy soil with rice-straw biochar amendment under projected climate change, *Sci. Rep.*, 6, 24731 (2016)
- 24) Yagi K, Tsuruta H, Kanda K, Minami K: Effect of water management on methane emission from a Japanese rice paddy field: Automated methane monitoring, *Glob. Biogeochem. Cycle* 10, 255-267 (1996)
- 25) Min YY, Sato E, Shirakashi T, Wada S, Toyota K, Watanabe A: Suppressive effect of

anaerobically digested slurry on the root lesion nematode *Pratylenchus penetrans* and its potential mechanisms. Jpn. J. Nematol., 37, 93-100 (2007)

- 26) 甘利誠, 豊田剛己, Tajul MD Islam, 増田和成, 黒田哲生, 渡辺昭: 土壌および養液栽培へのメタン消化液施用が数種土壌病害発生に及ぼす影響。土と微生物, 62, 106-113 (2008)

Development of Simplified Dry Methane Fermentation Process for Livestock Wastewater Treatment and Effective Utilization of Dry Methane Fermentation Residue

Principal Investigator: Masaaki HOSOMI

Institution: Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology

2-24-16 Naka, Koganei-shi, Tokyo 184-8588

Tel.: +81-42-388-7070

Fax: +81-42-388-7693

E-mail: hosomi@cc.tuat.ac.jp

[Abstract]

Key Words: Dry-thermophilic anaerobic digestion, Pig urine, High-yielding rice, Lotus, Greenhouse gas, Soil-borne diseases

In Japan, piggery wastewater treatment in small-hold farmers has been insufficient to meet effluent standards due to large economic burden. In this study, we studied dry-thermophilic anaerobic digestion to treat piggery wastewater with rice straw as well as recycling digestate for agricultural use.

Regarding anaerobic digestion, we developed a simple and cost-effective digestion system especially applicable to small-hold farmers. Dry-thermophilic anaerobic digestion at 55°C was successfully conducted by mixing substrate, i.e. rice straw and piggery wastewater, and inoculum at a certain ratio at the start of digestion. No mixing was required during the digestion experiment. Furthermore, analyses based on methane production rates and meta-transcriptome revealed that dry-thermophilic anaerobic digestion can recover the activity within two weeks after temporal imposition at 20°C.

To reduce drying energy for pretreatment of composting or carbonization, dry-thermophilic anaerobic digestion at a water content lower than 80% was also evaluated. Results showed that methane production was dramatically reduced after decrease in water content from 80% to 60%. Therefore, we aimed at acclimatizing inoculum resistant against low water content. The inoculum acclimated under low water conditions yielded higher methane production than that without acclimation.

Cultivation of high-yielding rice by digestate from dry thermophilic methane fermentation resulted in comparable yields of grain and stover to chemical fertilizer, suggesting that digestate can be used as a fertilizer in the rice cultivation. However, application of digestate increased methane emission from a rice field.

Digestate from anaerobic methane fermentation was also applied for lotus cultivation. Different from the case of rice cultivation, the application of digestate reduced yield of lotus biomass. According to nitrogen flow analysis during cultivation of

lotus biomass, the amount of nitrogen discharged to water bodies was reduced by 77% by replacing conventional management with the one using dry-thermophilic anaerobic digestion for piggery wastewater treatment and digestate for lotus cultivation. We also found that methane emission from the lotus fields was higher than rice fields, and organic matter application increased its emission.

We also found digestate can decrease soil diseases caused by nematode or bacterial wilt. Therefore, digestate can be used for soil disinfection.

Biochar prepared from digestate contained 1.3% as phosphorus, one fourth of the phosphorus amount in the biochar of pig dung compost.

These results suggested that dry-thermophilic anaerobic digestion would be useful for piggery wastewater treatment while digestate usage should be taken into consideration from the standpoint of environmental impact and fertilizer value.