

B-9 焼酎蒸留粕から作製した資材の肥料効果と発生した糸状菌の影響

宮崎大学 工学研究科 (学) ○安井 賢太郎, 工学部 (正) 増田 純雄, 農学部 佐伯 雄一
鹿児島工業高等専門学校 (正) 山内 正仁

1. はじめに

全国の本格焼酎(乙類焼酎)生産量の約95%を占める九州では、年間39.4万KLの焼酎生産量に対し廃液である焼酎蒸留粕(以下、焼酎粕)が50.9万ton発生している¹⁾。焼酎粕の主な処理法として、海洋投棄、肥料・飼料化、焼却処分が挙げられる。宮崎県では、平成14年より海洋投棄が、その翌年より農地還元が原則的に禁止となり、これら処理法に依存していた量を新たな処理法で適切に処理する必要がある。

焼酎粕は元来農産物からの副産物であるため、なるべく農耕地に還元することが物質循環の見地からも望ましい。そこで著者らは、焼酎粕と古紙・稲ワラを混合したものを育苗ポット²⁾などの農業用資材や法面・屋上の緑化資材に加工して利用する研究を行っている。焼酎粕製資材を土壌還元した際の肥料効果、資材に糸状菌の発生が認められたため、糸状菌を同定し植物体への影響を検討した結果について報告する。

2. 実験方法

2.1 資材作製; 焼酎粕はU酒造の甘藷・麦焼酎粕を用いた。甘藷焼酎粕と古紙(焼酎粕重量に対し3%)、甘藷焼酎粕と稲ワラ(同3%)、麦焼酎粕と稲ワラ(同5%)を混合粉碎し、加圧ろ過による固液分離を経て、固形物を板状に成型、乾燥(60℃, 24h)させたものを、資材として実験に用いた。

2.2 資材の土壌還元; 土壌還元実験は、平成15年10月7日から学内のビニルハウス内で行った。概略図を図-1に示す。図中の『①対照区』を試験区①、順に試験区②～⑤と称す。市販のプランターの中に、黒ボク土(表-1)を入れ、実験開始10日目に各条件で作製した資材を設置した。さらに同日、試験区①、⑤にはコマツナを播種、開始56日目に収穫し、その生育から資材による肥料効果の検討を行なった。灌水は、すべての試験区でpF2.0以下になるように行った。土壌中の水質測定^{3), 4)}は、表土から深さ5cmの位置に土壌溶液採水器(DAIKI-30113)を埋設し、シリンジで吸引採水した試料水を用い、黒ボク土の理化学性を土壌環境分析法⁵⁾、収穫したコマツナおよび資材の元素含有率を植物体分析法⁶⁾で測定した。

2.3 糸状菌の採取、培養および同定; 資材設置後に発生した糸状菌をエーゼで採取し、100mg/Lアンピシリンナトリウムを含むPDA培地で継代培養した。継代培養した糸状菌をスターチ培地⁷⁾を基に組成した液体培地にて培養した。培養した糸状菌を含む液体培地1.0mLをマイクロチューブに移し、遠心分離後上澄み液(液体培地)を捨てペレット状にした。ペレット状の糸状菌からDNA抽出キットISOPLANT II(ニッポンジーン)を用いてDNA溶液を得た。18S rRNAの増幅は18S rDNAのユニバーサルプライマー(EUK18S-F: 5'-CTGGTTGATCCTGCCAGT-3', EUK18S-R: 5'-GATCCTTCCGACAGGTTACAC-3')を用いて18S rDNAをPCR増幅(94℃5分, 94℃1分→55℃1分→72℃1分を30サイクル, 72℃10分)し、一次増幅産物を得た。得られたPCR産物をテンプレートとして、nested PCR(EUK18S-F: 5'-CTGGTTGATCCTGCCAGT-3', EUK570-R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3')を行った(94℃

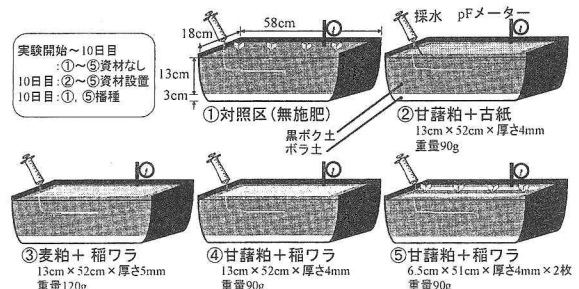


図-1 土壌還元実験

表-1 都城産黒ボク土の理化学性

pH	EC	C	N	C/N	NH ₄ ⁺ -N	NO ₃ ⁻ -N	トータルP ₂ O ₅	K ₂ O
(H ₂ O)	(dS/m)	(%)	(%)		(mg/乾土100g)	(mg/乾土100g)	(mg/乾土100g)	(mg/乾土100g)
(1.25)	(1.3)							
5.72	0.09	9.85	0.45	21.9	3.85	5.39	3.20	122.5

5 分, 94℃30 秒→55℃30 秒→72℃30 秒を 30 サイクル, 72℃10 分)。得られた PCR 産物の精製は, 1%アガロースゲル (1xTAE) 電気泳動後, ゲルの切り出しによって行った。精製した PCR 産物のダイレクトシーケンシングを行い, ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA) を用いて塩基配列を解読した。得られたシーケンシングデータはデータベースに対してホモロジーサーチを行い, 系統樹を作成して糸状菌の属レベルでの同定を行った。

3. 実験結果と考察

3.1 土壌溶出水 ; 図-2 に TOC の経日変化を示す。資材設置後 (実験開始 10 日目) の TOC は, 資材を設置した試験区②~⑤のすべてで上昇し, 試験区③は 377.2mg/L と最も高かった。資材から有機成分の溶出が認められ, これらの値は 10 日程度で減少し 2~3mg/L となった。25 日目に試験区③の TOC のみが再び上昇した。これは, 採水中に試験区③の土壌溶液採水器が外れて埋設し直したことで, 資材に接している表層付近の土壌が攪拌されたためだと考えられる。

図-3 に $\text{NH}_4^+\text{-N}$, 図-4 に $\text{NO}_3^-\text{-N}$ の経日変化を示す。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ は, どの試験区も資材による濃度変化は見られなかった。試験区③は, 25 日目に $\text{NH}_4^+\text{-N}$ が 53.1mg/L まで上昇した。これは, 先に述べた土壌の攪拌が原因であると考えられる。 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ も, 資材による濃度変化は見られず, 試験区②, ④の $\text{NO}_3^-\text{-N}$ は実験期間中 10~15mg/L で一定であり, 資材の窒素肥料効果が認められなかった。試験区③の $\text{NO}_3^-\text{-N}$ が 30 日目から上昇し, 55 日目に 35mg/L となった。これは, 図-3 の試験区③で上昇したアンモニアが硝化されたためだと考えられる。試験区①, ⑤の $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ が共に 30 日目から低下し始めたのは, コマツナによる吸収によるものだと考えられる。図-3 の試験区②, ④は, 30 日目から徐々にではあるが $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の上昇が見られる。これは, 窒素の無機化が始まったことが原因であり, この後さらなる $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の上昇, 硝化が起こり, 植物体がこれら無機態窒素を吸収することができるようになっていくと考えられる。

窒素と並び肥料の 3 要素であるリン酸, カリウムの経日変化も追った。リン酸は資材による濃度上昇は殆ど無い。よって, 資材とリン酸を併用することで均衡のとれた肥料として利用できると考えられる。またカリウムは資材による濃度上昇が試験区②~⑤で見られ, 試験区①, ⑤ではコマツナによる吸収が見られた。

図-5 に pH の経日変化を示す。焼酎粕は一般的に pH4.0 程度であるが, 焼酎粕製資材設置後の pH に変化は見られず, pH6.0 付近の値を示した。資材による土壌の酸性化は起きていないことがわかる。

3.2 資材の肥料効果 ; 表-2 に収穫時のコマツナの生育および元素含有率を示す。葉数, 葉重, 根重の値

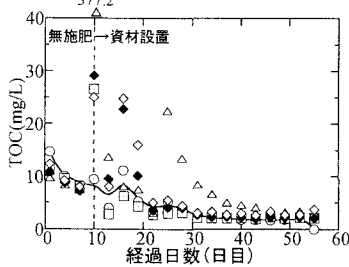


図-2 土壌中の TOC の経日変化

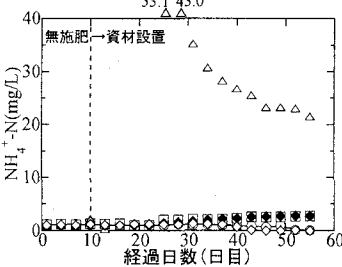


図-3 土壌中の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の経日変化

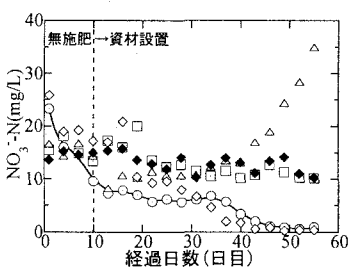


図-4 土壌中の $\text{NO}_3^-\text{-N}$ の経日変化

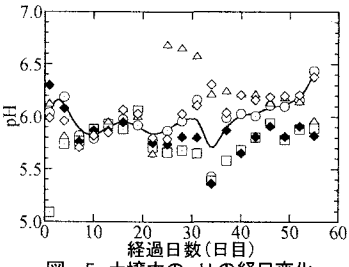


図-5 土壌中の pH の経日変化

○: ①対照区(生育) □: ②甘藷粕+古紙
△: ③麦粕+稲ワラ ◆: ④甘藷粕+稲ワラ
◇: ⑤甘藷粕+稲ワラ(生育)

表-2 コマツナの生育および元素含有率

試験区	葉数		根重	C(%)		N(%)		P(%)		K(%)	
	(枚)	(g-乾)		葉	根	葉	根	葉	根	葉	根
①対照区	AVE. 8.0	1.52	0.31	36.5	39.1	2.5	2.2	0.23	0.27	5.8	3.3
	STD. 0.8	0.40	0.05	1.2	0.9	0.3	0.1	0.02	0.02	0.6	0.7
⑤甘藷粕+稲ワラ	AVE. 8.5	2.45	0.54	37.7	37.2	2.1	1.9	0.25	0.33	5.8	2.8
	STD. 1.3	0.50	0.12	0.5	0.6	0.0	0.4	0.01	0.03	0.8	0.4

から試験区①に比べ試験区⑤の生育が良く、若干の肥料効果が認められた。図-3、図-4の結果から、資材に即効性の肥料効果が無かったため、コマツナの播種を資材設置から1ヶ月後に行なえば、かなりの肥料効果が認められ、生育に顕著な差が見られると考えられる。

3.3 糸状菌の影響；資材設置から2日後に糸状菌の発生が認められた。糸状菌は「甘藷粕+古紙」製資材で3種類(S1~S3-fungi)、「麦粕+稲ワラ」製資材で5種類(M1~M5-fungi)、「甘藷粕+稲ワラ」製資材で5種類(K1~K5-fungi)の発生が確認できた(図-6)。発生した糸状菌は不完全菌の *Hypocrea* 属, *Trichoderma* 属, *Penicillium* 属, *Aspergillus* 属の糸状菌, 接合菌類の *Mucor* 属であった。また, K4-fungi は *Choanephora* 属に近い糸状菌であるが属レベルでの同定ができなかった。K2, M3-fungi は同定ができていないが, 培養した糸状菌の集落性状を見ると, K2-fungi は *Penicillium* 属, M3-fungi は K4-fungi に近い糸状菌であると考えられる。

焼酎粕製資材に糸状菌の発生が認められる事は、見た目に不快感を与えかねないのだが、同定された糸状菌はすべて元来土壤に生息し、糖やセルロースを分解する糸状菌である。佐伯ら⁸⁾が行った焼酎粕を特殊肥料として利用している農家へのアンケート結果では、焼酎粕を利用すると「作物の生育が良い」という回答が最も多く、焼酎粕に発生した糸状菌による病害の報告はない。また今回の生育試験においても植物体に病害は見られなかった。これらのことから、資材に発生した糸状菌が、病原性糸状菌である可能性は低いと考えられる。

3.4 資材の元素含有率；表-3に資材設置時およびコマツナ収穫時(設置後46日目)の元素含有率の変化を示す。資材設置時のC/N比を見ると、「麦粕+稲ワラ」製資材が9.5と最も低い。試験区③は土壤溶液採水器が外れたため、窒素の無機化に要する時間が判断できなかったが、C/N比から、他の資材に比べ分解され易いことを示唆している。また、資材の設置から1ヶ月半経過した後も、すべての資材の窒素含有率が高いことから、肥料効果が長期的に続くことが言える。

4. おわりに

焼酎粕と古紙・稲ワラを混合して作製した資材を土壤に還元する実験を行い、以下のような知見が得られた。

- 1) 資材に即効性の窒素肥料効果はなく、窒素の無機化に1ヶ月程要する。
- 2) 資材のリン酸含有率が低いため、資材とリン酸を併用することで均衡のとれた肥料として利用できる。
- 3) 資材による土壤の酸性化は起こらなかった。
- 4) 資材に発生した糸状菌は、*Hypocrea* 属, *Trichoderma* 属, *Penicillium* 属, *Aspergillus* 属, *Mucor* 属の糸状菌であり、資材の分解に寄与している。

【参考文献】

- 1) 九州本格焼酎協議会；平成14酒造年度 本格焼酎原料別製成数量と焼酎粕の処理別・月別数量 (2003)
- 2) 山内 正仁 他；甘藷および麦焼酎蒸留粕で作製した蘇生紙の化学的特性とチンゲンサイの生育試験に関する研究、廃棄物学会論文誌, Vol.11, No.5, pp.231~240 (2000)
- 3) 日本水道協会；上水試験方法 (1985)
- 4) 日本分析化学会北海道支部；水の分析 第4版, 化学同人 (1994)
- 5) 日本土壤肥料学会；土壤環境分析法, 博友社 (1997)
- 6) 日本土壤協会；土壤、水質及び植物体分析法 (2001)
- 7) 土壤微生物研究会；土壤微生物実験法, pp.385, 養賢堂 (1992)
- 8) 佐伯 雄一 他；芋製焼酎粕施用農耕地における硝酸性窒素濃度の経時的変化-第1報, 現地調査-, 宮崎大学農学部研究報告, 第50巻, pp.31-39 (2004)

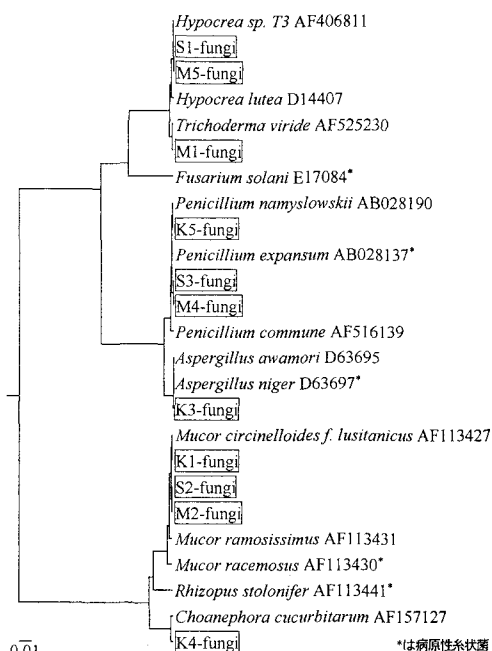


図-6 資材に発生した糸状菌およびデータベースから抽出した糸状菌の18S rDNA 部分塩基配列の系統樹 (UPGMA)

学名の後にデータベースの Accession No.を示す

表-3 資材の元素含有率の変化

資材(試験区)		C(%)	N(%)	C/N	P(%)	K(%)
甘藷粕+古紙(②)	設置時	44.2	2.34	18.9	0.17	0.39
	収穫時	44.0	1.93	22.8	0.10	0.31
麦粕+稲ワラ(③)	設置時	44.0	4.66	9.5	0.31	0.69
	収穫時	40.5	2.98	13.6	0.25	0.46
甘藷粕+稲ワラ	設置時	41.2	2.99	13.8	0.32	0.95
	(④)生育無し	41.0	2.90	14.2	0.28	0.89
	(⑤)生育有り	38.8	2.70	14.4	0.25	0.82