

土壌微生物活用による畜舎内アンモニア臭気の抑制効果(第2報)

南部奈津紀・笹木教隆

The effect to restrain the ammonia level in livestock building by the soil microorganism

(II)

Natsuki NANBU, Kiyotaka SASAKI

要 約

畜舎内のアンモニア濃度を低減させるため、二次破砕材と、室内試験で臭気抑制能力が確認された草地土壌や草地土壌からの土壌分離菌を混合して敷料として用い、豚床における臭気抑制能力を調査した。その結果、草地土壌や、草地土壌からの分離した土壌分離菌を二次破砕材と混合した敷料は、ゼオライトを二次破砕材に混合した敷料以上の臭気抑制効果を得た。草地土壌より分離培養し、単離した菌は *Bordetella petrii* と約 95% の相同性であり、豚舎汚水から発生するアンモニア濃度を軽減した。単離した菌を未滅菌豚舎汚水に添加したところ、硝酸態窒素の著しい増加が認められた。

I 緒 言

畜舎や堆肥舎の構造は多くが開放型であり、そこから発生する悪臭の捕集が困難な場合が多い。また臭気対策への投資は、直接に生産性向上に結び付かないこともあり、農家での対応が遅れがちになっている。このため、畜産農家で取り組みやすい簡易、省力かつ低コストな処理技術が必要である¹⁾。

これまでに当試験場では、林地廃材等の木質系資材(二次破砕材)や福井県畜試草地土壌(以下、草地土壌と言う)に優れた臭気吸着能力があることを示してきた^{2) 3)}。そこで、木質系資材と草地土壌からの分離菌を供試し、豚床における臭気抑制能力の調査と、土壌分離菌の持つ臭気抑制能力を検討した。

II 材料及び方法

1. 草地土壌を敷料に添加した実証試験

二次破砕材と草地土壌を 2(210L) : 1(105L) の割合で混合し敷料として用い、肥育豚 3 頭を独立房(10m²)で飼養して豚床における臭気抑制効果を調査した。対照区には二次破砕材とゼオライトを 2(210L) : 1(105L) の割合で混合し敷料として用いた。43 日間の調査期間中、週 3 回、豚房内 5 か所にコンテナ(75L)を 60 分間伏せ、北川式検知管でコンテナ内のアンモニア濃度を測定した。

2. 土壌からの分離菌を敷料に添加した実証試験

草地土壌より分離した土壌分離菌³⁾数株を硝化菌培養液体培地⁴⁾に混合接種し、27°C で 14 日間静置培養した培養液 500ml (生菌数 1.4 × 10² 個/ml) を二次破砕材 210L に混合し、試験区の敷料として用い、肥育豚 3 頭を独立房(10m²)で飼養し豚床における臭気抑制効果を調

査した。対照区には菌無添加の二次破砕材のみ 210L を用いた。発生アンモニア濃度の測定は、試験 1 と同じ方法により実施した。

3. 土壌の臭気抑制能力解明

豚床実証試験 1、2、で供試した土壌混合敷料における試験開始時と試験終了時の亜硝酸態 N 濃度 (以下、 $\text{NO}_2\text{-N}$)、硝酸態 N 濃度 (以下、 $\text{NO}_3\text{-N}$) を RQ フレックスを用いて測定した⁵⁾。

また、土壌微生物実験法³⁾に基づき、MPN 法による硝化菌(アンモニア酸化細菌 *Ammonia Oxidizing bacteria* : 以下、AOB とする、亜硝酸酸化細菌 *Nitrite Oxidizing bacteria* : 以下、NOB とする)の生菌数を測定した。

4. 土壌分離菌の臭気抑制と硝化能力の解明

(1)土壌分離菌の単離と同定

草地土壌より分離した亜硝酸酸化能力の高い菌³⁾のうち N0.3 について、硝化菌培養培地とゲルライト平板培地で継代培養を繰り返しさらに単離を試みた。単分離できたコロニーを計数液体培地または培養液体培地に接種し、28°C で静置培養し、培地内アンモニア態 N 濃度(以下 $\text{NH}_4^+\text{-N}$)と $\text{NO}_2\text{-N}$ の濃度推移を測定した。単離菌を含む培養液を硝化菌検出キット「検出くん」 「スピラくん」(Yakult)により検出を行った⁶⁾。また、グラム染色により菌の性状を検査した。

(2)単離菌の臭気抑制と硝化能力の測定

新鮮豚舎汚水をオートクレーブを用い 120°C で 15 分滅菌し、50ml 滅菌遠沈管に 40ml ずつ分注して滅菌区と未滅菌区に分けた。次に、それぞれの区を、AOB ゲルライト平板培地で 7 日間培養した単離菌 1 株を添加した区 (菌添加区) と、添加しない区 (菌無添加区) に分けた後、28°C で 28 日間静置培養し、遠沈管内に発生するアンモニア濃度と、汚水内の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ の変化を RQ フレックスで測定した。

5. 有意差検定は t 検定により行い、 $P<0.05$ を有意差ありとした。

III 結果

1. 草地土壌を敷料に添加した豚床実証試験

試験期間中の平均発生アンモニア濃度は、草地土壌区 27.3ppm、ゼオライト区 49.0ppm であり、草地土壌区の発生アンモニア濃度がゼオライト区に比べて低下した ($P<0.05$)。試験中、糞尿により敷料の一部が水分過多になったため、二次破砕材 105L を両区共に 2 回追加した (図 1)。

2. 土壌分離菌を敷料に添加した豚床実証試験

試験期間中の平均発生アンモニア濃度は、菌添加区で 18.8ppm、菌無添加区で 36.8ppm であり、菌添加区の発生アンモニア濃度が菌無添加区に比べて低下した ($P<0.05$)。試験中、糞尿により敷料の一部が水分過多になったため、二次破砕材 105L を両区共に 2 回追加した (図 1)。

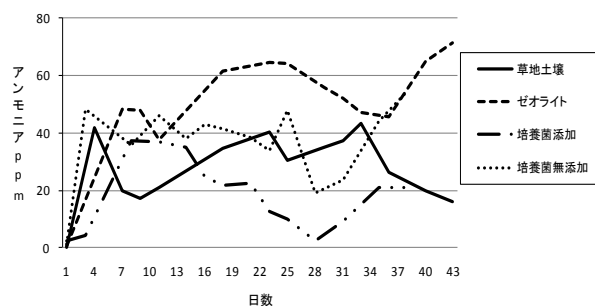


図1 豚厩内発生アンモニア濃度の推移

3. 土壌の臭気抑制能力の解明

草地土壌を敷料に添加した試験後の敷料内硝酸態 N 量は草地土壌区がゼオライト区の 11 倍となったものの、草地土壌区の敷料内硝化菌数は減少した。土壌分離菌を添加した敷料試験後の敷料内 $\text{NO}_3\text{-N}$ 量は菌添加区が菌無添加区の 4 倍となり、菌添加区の敷料内硝化菌生菌数は増加した (表 1)。

表1 敷料内硝酸態Nと硝化菌生菌数の変化

区分	草地土壌	ゼオライト	培養菌添加	培養菌無添加	
硝酸態N (mg/乾物g)	試験前	0.04	0.02	*0.03	*0.03
	試験後	1.1	0.1	0.8	0.2
アンモニア	試験前	1.2×10^5	2.6×10^3	$*1.1 \times 10^4$	$*1.1 \times 10^4$
	試験後	8.4×10^3	2.3×10^2	1.5×10^6	2.3×10^3
亜硝酸	試験前	2.9×10^4	4.0×10	$*2.9 \times 10$	$*2.9 \times 10$
	試験後	7.9×10^3	9.8×10	4.8×10	0.5×10

*豚床の敷料である木質資材の値

4. 土壌分離菌の硝化能力と同定

(1)分離菌の単離と同定

NOB と仮定して釣菌した N0.3 菌³⁾は NOB 用培地を用いた継代培養中に NOB としての高い硝化能力を失った。硝化菌検出キット「検出く

ん」(Yakult)での判定で AOB 抗体に陽性反応があり、また、AOB 培養培地に接種し、培養液内の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度推移を測定することにより AOB としての硝化能力が確認された。以降、AOB ゲルライト平板培地で継代培養を行った。

単離できたコロニーは AOB 抗体に陽性反応があり、AOB ゲルライト平板培地に生育するものの、普通寒天培地(ニッスイ)にも生育した。グラム染色は陰性であった。コロニーPCRによる 16SrRNA500bp の相同性解析では、AOB ゲルライト培地生育株、普通寒天培地生育株ともに *Bordetella petrii* と約 95%の相同性であった。

(2)単離できたコロニーの臭気抑制と硝化能力の測定

豚舎減菌汚水と未減菌汚水における容器内発生アンモニア濃度は、菌添加により半減する傾向にあった(図2)。汚水中の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ は土壌より単離できたコロニーの添加により減少する傾向にあった。豚汚水内の $\text{NO}_3\text{-N}$ は減菌汚水において菌添加区と無添加区による差はなかったが、未減菌汚水の菌添加区では著しい増加がみられた(表2)。

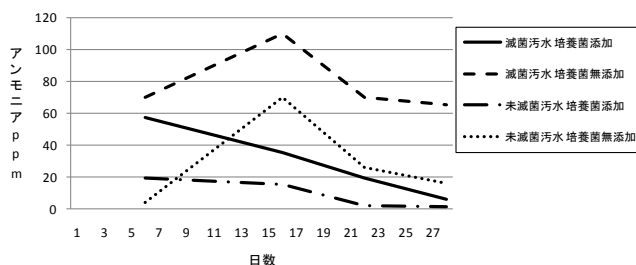


図2 培養菌添加の有無による発生アンモニア濃度の推移

表2 培養菌添加の有無における汚水内窒素量の変化 (mg/L)

区分	アンモニア態N		硝酸態N	
	開始前	28日目	開始前	28日目
減菌汚水	培養菌無添加	522.1	407.1	0.7
	培養菌添加	522.1	136.0	0.6
未減菌汚水	培養菌無添加	460.0	423.5	19.4
	培養菌添加	460.0	113.4	170.6

IV 考察

豚床における実証試験では、草地土壌を混合した敷料、草地土壌から分離した菌を混合した敷料において、約 40 日の間、敷料を交換せず、ゼオライトを混合した敷料と同等以上のアンモ

ニア抑制効果がみられた。このアンモニア抑制効果については、試験後の草地土壌を混合した敷料や草地土壌から分離した菌を混合した敷料中の $\text{NO}_3\text{-N}$ が高くなったことより、豚糞内の窒素がアンモニアとして飛散せず、土壌内硝化菌の硝化作用によって $\text{NO}_3\text{-N}$ への硝化が進んだと思われる⁷⁾。これらの敷料を堆肥化した場合には肥料効果の高い堆肥となることが期待できる。

当試験の結果から約 40 日間敷料を交換せず飼養することは可能と思われるが、試験期間中水分調整のための二次破砕材の追加と糞尿量により、調査終了時の搬出敷料量は開始時の概ね 2 から 3 倍となった。土壌を混合した敷料は土壌重量が多いため作業労力が大きくなるが、土壌から分離した菌を培養した液料は軽量であり作業効率が上がると思われる。

豚床試験 1、2、終了後に供試豚を解剖したところ、土壌を用いていた試験区の 2 頭に寄生虫が見られたことから、今後土壌を敷料に用いる際には寄生虫の発生に注意する必要がある。

硝化能力の高い草地土壌より単離された単離菌株は、16SrRNA の約 95% 相同性では *Bordetella petrii* であるとの確定はできない。しかし豚舎減菌汚水に単離した菌を添加した試験において、汚水内 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ が減少したにも関わらず $\text{NO}_3\text{-N}$ が増加しなかったことは、静置培養中に脱窒が行われた可能性も考えられ、*Bordetella petrii* は嫌気的環境でも生育し硝酸塩を脱窒する能力があるという報告⁸⁾と一致する。

Bordetella petrii は、*Bordetella* 属では最初の発見が病患からでなく環境から選出された唯一の菌で⁹⁾、家畜病原性があるとの報告はまだない。しかし、*Bordetella* 属の他種には鼻曲がり病等の家畜病原性がある¹⁰⁾ことから、注意が必要と思われる。

以上のことから、単離された菌についてはさらなる解析が必要と思われる。

参考文献

- 1) 代永道裕. 畜産環境アドバイザー養成研修会資料 臭気対策技術および新規処理技術研修. 1-4. 1999.

- 2) 南部奈津紀・斉藤正志. 福井県畜産試験場研究報告. 19:30-34. 2006.
- 3) 南部奈津紀・村田文彦. 福井県畜産試験場研究報告. 未投稿. 2011.
- 4) 木村隆介. 土壤微生物研究会編. 土壤微生物実験法. 養賢堂. 207-214. 2004.
- 5) 棚橋寿彦. 堆肥等有機物分析法. 日本土壤協会. 94-101. 2010.
- 6) 奥村剛一・長井富美子・山本修太・大村浩・澤田治司・橋本敏一・三品文雄. 高比重ラテックス凝集法(RPLA法)およびFISH法を用いた実下水処理施設の硝化細菌数の解析. 第38回日本水環境学会大会講演要旨集. p111. 2004.
- 7) 福本泰之・鈴木一好・黒田和孝・花島 大・安田知子・長田 隆. 亜硝酸酸化細菌の添加による家畜排泄物堆肥化過程での N_2O 発生制御. 平成 18 年度畜産草地成果情報. 26. 2007.
- 8) Gross, Roy Guzman, Carlos A. Sebahia, Mohammed Martins dos Santos, Vítor A. P. Pieper, Dietmar H. Koebnik, Ralf Lechner, Melanie Bartels, Daniela Buhrmester, Jens Choudhuri, Jomuna V. Ebensen, Thomas Gaigalat, Lars Herrmann, Stefanie Khachane, Amit N. Larisch, Christof Link, Stefanie Linke, Burkhard Meyer, Folker Mormann, Sascha Nakunst, Diana Rückert, Christian Schneiker-Bekel, Susanne Schulze, Kai Vorhölder, Frank-Jörg Yevsa, Tetyana Engle, Jacquelyn T. Goldman, William E. Pühler, Alfred Göbel, Ulf B. Goesmann, Alexander Blöcker, Helmut Kaiser, Olaf Martinez-Arias, Rosa. The missing link : *Bordetella petrii* is endowed with both the metabolic versatility of environmental bacteria and virulence traits of pathogenic *Bordetellae*. *BMC Genomics*, 9:449. 2008.
- 9) von Wintzingerode F, Schattke A, Siddiqui RA, Rösick U, Göbel UB, Gross R. *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. *Int J Syst Evol Microbiol*. Jul;51(Pt 4):1257-65. 2001.
- 10) 田先威和夫監修. おもな実験動物. 新編畜産大辞典, 1407, 養賢堂. 東京. 1996.

The effect to restrain the ammonia level in livestock building by the soil microorganism (II)

Natsuki NANBU, Kiyotaka SASAKI
Fukui Prefectural Livestock Experiment Station

The aim of this study was to decrease the ammonia level in the livestock building. When I mixed the crush wood and the grassland soil, the bacteria (from the grassland soil) in the piggery, the ammonia level was restraint effect of them were better than zeolite. The isolated bacteria which was divided from the grassland soil was *Bordetella petrii* and about 95% homogeny, The bacteria reduced the ammonia level which occurred from the sludge of piggery. By the addition of it, it was increased nitrate nitrogen remarkably in the non-sterilization sludge.

