

アンモニア酸化細菌による家畜ふん尿堆肥化過程におけるアンモニア発生低減効果

誌名	東京都農林総合研究センター研究報告
ISSN	18811744
著者	森本, 直樹
巻/号	6号
掲載ページ	p. 19-23
発行年月	2011年3月

原著論文

アンモニア酸化細菌による家畜ふん尿堆肥化過程における アンモニア発生低減効果

森本直樹*

東京都農林総合研究センター

摘 要

アンモニア酸化細菌を家畜ふん尿堆肥から分離した。この細菌は、アンモニア酸化遺伝子 (*amoA*) を有し、高温環境下で増殖可能な *Bacillus subtilis* であった。アンモニア酸化菌を 10^9 cfu/g 以上添加した乳牛ふん尿を堆肥化した場合、堆肥化初期に発生するアンモニアの総量が約 20% 減少した。

キーワード：家畜ふん尿，堆肥化，アンモニア酸化細菌，*Bacillus subtilis*

東京都農林総合研究センター研究報告 6: 19-23, 2011

緒 言

畜産環境問題の中で最も発生件数が多いのは悪臭関連問題である。悪臭自身が直接の原因となる、不快感、吐き気などの健康被害、目の前に畜舎があることで生じる心理的被害、嫌悪感、さらに病虫害の発生など、畜産に由来する悪臭は様々な問題の原因となりうる。さらに、家畜の生産性低下や飼育管理者の健康被害の原因となる物質や、地球温暖化に関与する物質もあり、畜産由来の悪臭による環境汚染は、広範囲に影響を及ぼす可能性をもつ。

畜産経営に由来する悪臭は、アンモニア、硫化水素、低級脂肪酸など悪臭防止法で規制される成分が主体とする約100種類以上の物質からなる高濃度複合臭気である。加えて、畜種や飼養環境によって発生する成分が大きく異なること、発生場所が、畜舎、堆肥舎、汚水浄化処理施設、還元農地、畜体自体など広範囲である特徴があり、低減対策を困難にしている。

一方、悪臭を処理するための様々な技術は実用化されているが、現状では一般の畜産農家が導入できる安価かつ効果的な技術はなく、新しい技術の開発が望まれる。

特に家畜ふん尿の堆肥化過程で発生するアンモニアは濃度が極めて高く、発生量も最大であり、畜産農家が最も適切な対応策を望んでいる問題である。

本研究では、新たに分離したアンモニア酸化細菌を用いることにより、家畜ふん尿堆肥化過程で発生するアンモニアの低減効果を検証した。

材料および方法

1. アンモニア酸化細菌(AOB:Ammonia Oxidizing Bacterium)の分離

細菌の分離源は、堆肥（家畜ふん尿由来堆肥18種）および土壌（腐葉土および畑由来土壌10種）を用いた。材料を10倍量の滅菌生理食塩水に懸濁し、高アンモニウム塩培地 (yeast extract 5g, Na₂HPO₄ 1g, CH₃COONa 1g, NH₄Cl 53.5g, agar 40g, D.W. 1000ml, pH7.5) に塗抹した。50°C・48時間培養後、出現したコロニーを釣菌し、ハートインヒュージョンブイヨン(HIB)で、30°C・48時間振盪培養した。増菌を確認できた培養液からゲノムDNAをCTAB法により抽出した。抽出DNAを精製(Takara SUPPEC-02)後、濃度調整したDNA溶液を鋳型とし、アンモニ

*連絡先: n-morimoto@tdfaff.com

ア酸化遺伝子 (*amoA*) のプライマーセット (f:5'-GGGG TTTCTACTGGTGGT-3' r:5'-CCCCTCKGSAAAGAATTC-3) を用い、PCR増幅 (94.5°C 6min-(94.5°C 30sec-55°C 30sec-72.5°C 45sec)35cycles-72.5°C 2min) を行った。PCR産物をアガロースゲル電気泳動 (1×TAE,1%アガロースゲル,100V20min) 後、特定サイズ(491bp)の増幅断片の確認を行った。

2. AOBの同定

分離したAOBの形態性状および生化学性状を調べた。さらに、培養菌液からCTAB法によりゲノムDNAを抽出、プライマー(f:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' r:5'-GGCTACCTTGTGTTACGACTT-3')を用いて、16S rRNA遺伝子の特定領域を増幅 (94°C 1min-(94°C 1min-63°C 1min-72°C 1.5min)30cycles-72°C 2min) した。さらに、増幅産物を精製・濃縮(Takara SUPPEC-02)した後のDNAを鋳型として、FITC蛍光標識を付したプライマー(f:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' r:5'-GGCTACCTTGTGTTACGACTT-3')を用いてPCR増幅 (98°C 5min-(99°C 1min-60°C 45sec-72°C 1.5min)25cycles-72°C 1min) した。PCR産物をシーケンサー (島津DSQ2000L) で解析した。

解析した遺伝子配列の相同性をFASTAによって検索し、菌種を推定した。

3. 特異プライマーの設計

解読した16S rRNA遺伝子塩基配列から、プライマー作成ソフト (Primer3) を用いて本菌の特異プライマーを設計した。設計したプライマーセットを用いて、AOB培養菌液からCTAB法によって抽出したDNAを鋳型としてPCR増幅 (95°C 1min-(95°C 1min-59°C 1min-72°C 1.5min)35cycles-72°C 15min) し、特定サイズの増幅産物の確認を行った。

4. 家畜ふん尿との混合によるアンモニア発生低減試験

(1)アンモニア発生低減試験

乳牛および採卵鶏由来の新鮮ふん尿をおが屑と混合し、水分を約65%に調整した。AOBを、HIBで30°C・48時間・振盪培養後、滅菌生理食塩水で洗浄・再浮遊し、 10^{13} cfu/mlに菌数を調整した。AOB浮遊液を家畜ふん尿おが屑混合物に混入 (10^7 cfu/g (10^7 区), 10^9 cfu/g (10^9 区), 10^{11} cfu/g (10^{11} 区)) し、各4kgを小型堆肥化装置に充填した(図1)。一定量通気(500ml/min)し、発生したアンモニア濃度を北川式ガス検知管で定時的に測定した。1週間に一度の切り返しを行い、切り返し毎に菌量測定用の材料を採取した。

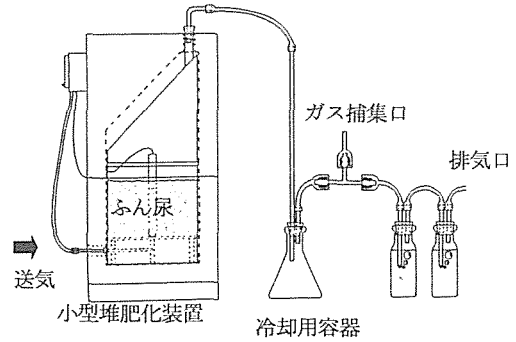


図1 堆肥化試験の概略図

(2)AOBの動態

菌数の測定はMPN-PCR法を用いた。すなわち、材料から全DNAをビーズビート法(ニッポンジーンISOFEAL for Beads Beating)により採取し、TE溶液で段階希釈した。各希釈段階のDNA溶液を鋳型として、菌特異プライマー(f:5'-AGCGTTGTCCGGAATTATTG-3' r:5' -TAAGGTTC TTCGCGTTGCTT-3')を用いPCR増幅 (95°C 1min-(95°C 1min-55°C 1min-72°C 1.5min)35cycles-72°C 15min) した。PCR産物をアガロースゲル電気泳動し、蛍光バンドの検出が可能な希釈濃度を求めることで目的DNA量を算出し、菌量を推定した。

結果および考察

1. AOBの分離

高アンモニウム塩培地には、堆肥由来材料からは27個、土壌由来材料から14個、のコロニーが出現した。コロニーの肉眼所見から、ほとんどが*Bacillus*属であった。この結果から、高温で増殖可能なアンモニア耐性細菌は環境中に比較的多数存在し、特殊な細菌ではないことがわかった。また、分離した41株は全てHIBで増殖可能であり、栄養要求性は厳しくないと考えられた。その中で、牛ふん尿堆肥由来の1株は、*amoA*特異プライマーによるPCR産物の増幅を確認し、*amoA*を持つことが判明した。

以上より本菌は、①アンモニアを酸化することができる(*amoA*を持つことはアンモニアを無臭化(酸化)できる遺伝的な裏付けがあることを意味する)、②高温でも増殖可能である(良好な堆肥化過程では微生物活動による温度上昇が起こるため、50°C以上で増殖できることが必要である)ことから、被検菌としてアンモニア発生抑制試験に供することとした。

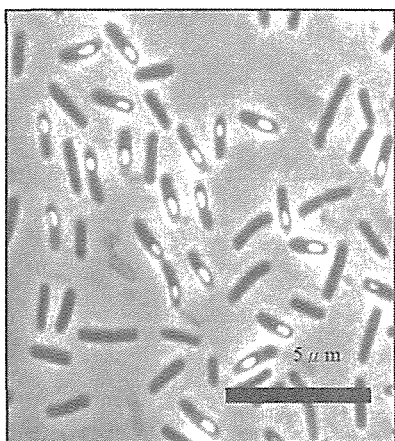


図2 アンモニア酸化細菌の光学顕微鏡像

2. AOBの同定

分離したAOBは、グラム陽性・芽胞形成細菌であり、50°Cで増殖可能な高温細菌であった(図2)。形態学的および生化学的な性状を示す(図3)。

16S rRNA遺伝子塩基配列を読解し、FASTAによる検索の結果、最も相同性が高いものは、*Bacillus subtilis* (NITE-P529)であり、99.54%の相同性があった(図4)。

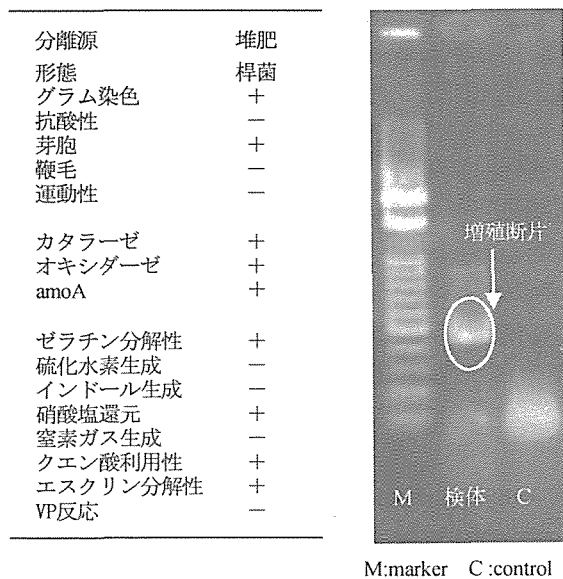


図3 アンモニア酸化細菌(AOB)の特徴

3. 菌特異プライマーの設計

特異プライマーの塩基配列は、f:5'-AGCGTTGTCCGG AATTATTG-3' r:5' -TAAGTTCTTCGCGTTGCTT-3' , とした。PCRにより目的断片の増幅が認められ、使用したプライマーセットとPCR条件とが有用であることを確認した(図4)。

```

1 gagtttgatc atggctccgg acgaacgctg cgggggtgccc taatacatgac aagtcgagcg
61 gacgggtggg agcttctctc cgaatgttag cgggggacgg gtagtaacca cgtgggtaac
121 ctgctggtaa gactcgggaa actcctgggata acccgggggcta ataccggatg cttgatgtaa
191 cgcctcgttc caattatata aggtgctctt tagctaccac ttacagatcg acccgggggg
241 ccttactcag ttggtgaggt aacggtcac caagtcagc atcgtatgac gacctgtag
301 ggtgactcgg cacactggga ctgagacacg gccctgactc ctacgggagc gacgactag
361 gaactctcag caatgggaga aagctcagcg gacgaacgcc gctgactgta tgaagttct
421 cggatcgtaa aactcgtttg ttagggaaga acaagtcctg ttgaaatgag cggtaacct
481 gacgttacct aacacaaag ccaaggtctaa ctactgcca gcagccggcg taatacgtag
541 gtcgaagcgg ttgtccgaaa ttattggggc taagtcgccc gcagcgggtc tcttaagttc
601 gatgtgaaag cccccgctc aaccggggag ggtcatgga aactcgggaa cttgagtgca
661 gaaggggaga gtggaatccc acgtgtagcg gtgaaatgcy tagagatctg gaggaaaccc
721 agtgggagag gggactctc ggtctgtaac cgaactgtag cgtgaaagc gtaggaggg
781 aacagatta gataccctgg tagtccacgc cgtataacgat gactgtaag tgtatgaggg
841 ttcctggcct ttatgtctgc agcaaaccca ctaagcactc cgcctgggga gtaagctgct
901 aagactgaaa ctcaaaagaa ttcaagaggt ctgacatcc tctgacaacc ctatagatag
961 ttcgaagcaa cgtgaaagaa cttaacaggt ctgacatcc tctgacaacc ctatagatag
1021 gacttccctc ttgagggcag agtgacaggt gctgacatcg tctcctcagc tctgtctcgg
1081 agatgttggg ttaagtcctg caagagagc aacctttagt ctatagatcg acactcagt
1141 tgggactcct aaggtgactg ccggtgacaa accggagaaa ggtggggatg acgtcaaatc
1201 atcatcctcc ttatgacctg ggtcaacac gttctacaat ggggagaaa aagggcagcg
1261 aagcccgag gctaacccaa tcccacaaat ctgttctcag tctggatcgc atctctcaac
1321 tgcactcgtt gaagctggaa tgcctagtaa tcccgatca gcatcgcggc gtaaatcgt
1381 tccggggcct tgtacacacc gccctgcaca ccacgagatc ttgtaaaccc cgaactcgt
1441 gaggtaacct ttggagcca cgcgcgcaag gttggacaga tgattgggtt gaagtcgtaa
1501 caaggtacac gtatcgggag gtcggctgg ataccctctc tggatcctc
    
```

図4 アンモニア酸化細菌16SrRNA塩基配列と菌特異プライマーの位置

4. 家畜ふん尿との混合によるアンモニア発生低減試験

(1)アンモニア発生低減試験

乳牛ふん尿を用いた試験では、アンモニア濃度は試験開始1日後に最大となり急速に減少した。その後、アンモニアは1回目の切り返し時には一時的に上昇したが、2回目の切り返し以降ほとんど発生しなかった(図5)。鶏糞を用いた試験の場合、乳牛ふん尿と比較するとアンモニアの濃度レベルが高いが、発生パターンは類似していた。

堆肥化過程で発生したアンモニア濃度は、いずれの条件でも試験開始1~2日後に最大となった。乳牛ふん尿の場合、10⁹区は340ppm、10¹¹区は360ppmであり、対照区の580ppmと比べ38~42%低く、AOB添加による低減効果が認められた。しかし、10⁷区は550ppmであり、アンモニア濃度の低下は認められなかった。鶏糞の場合、菌添加によるアンモニア濃度の低下は認められなかった(図6)。

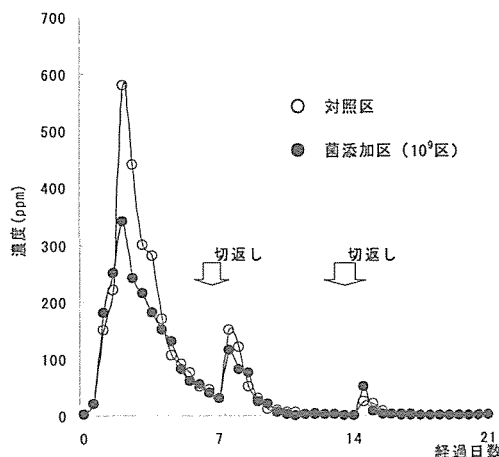


図5 乳牛ふん尿堆肥化過程で発生したアンモニア濃度の推移

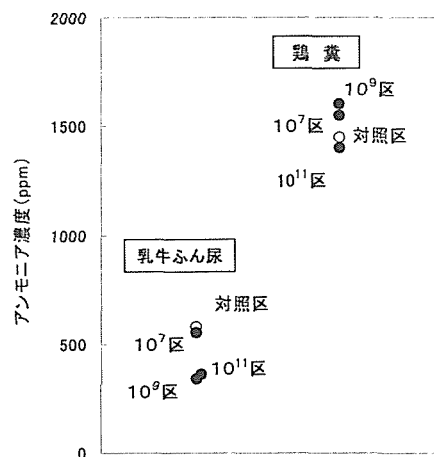


図6 家畜ふん尿堆肥化過程で発生したアンモニア濃度の最大値

試験期間中に発生したアンモニア総量は、乳牛ふん尿の場合、 10^9 区および 10^{11} 区は、対照区と比較すると約20%少なく、アンモニア発生の低減化効果が認められた。 10^7 区は対照区とほぼ同量であり、アンモニア発生総量の低減効果は認められなかった(図7)。

以上から、新規に分離したAOBを添加することにより、牛ふん尿の堆肥化初期におけるアンモニアの発生濃度の低下と発生総量の低減化が可能であることが判明した。また、効果の発現には 10^9 cfu/g以上の菌を添加する必要があるが、 10^9 cfu/g以上添加した場合でも、より高い効果が認められることはなかった。しかし、効果の発現には 10^9 cfu/g以上の菌を添加する必要があり、 10^9 cfu/g以上添加した場合でも、高い効果は得られないことがわかった。また、鶏糞を対象とした試験では、アンモニア発生の抑制効果は認められなかった。これは、鶏糞の場合、堆肥化過程で発生したアンモニアの発生総量は牛ふん尿の約3倍あり、添加したAOBによるアンモニア酸化能力を超えていた可能性や、使用したAOBは牛ふん尿堆肥由来であり、牛ふん尿と異なる環境下の鶏糞中では機能を十分発現できなかった可能性が考えられる。

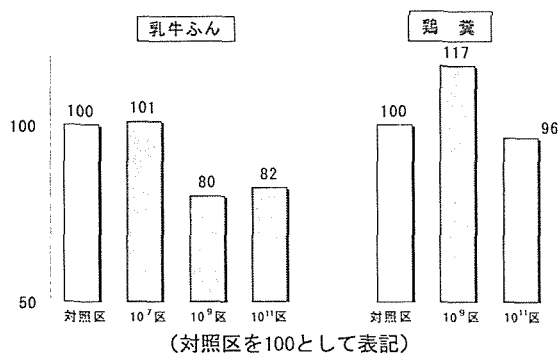


図7 家畜ふん尿堆肥化過程で発生したアンモニアの総排出量

(2)堆肥化過程におけるAOBの動態

畜産から発生する臭気は、大部分が家畜ふんに由来する微生物活動に伴う栄養物の分解によって生じる。例えばアンモニアは、ふん中に存在する腸内細菌が生産するウレアーゼと尿中に含まれる尿素が反応することによって発生する。臭気は微生物活動の産物であり、微生物の種類、栄養条件、温度、pH、酸素条件などによって発生する臭気の成分や量が大きく異なる。従って、微生物活動を制御できるならば、臭気の発生量や組成を制御することが可能である。しかし、家畜ふん1g中には100種100億の細菌が存在し、堆肥化に関与しているすべての細菌の働きや、細菌同士の相互関係の全貌を解析することは難しく、課題が多い。

家畜ふんに添加したAOBの量は、ふん尿の種類および菌の添加濃度に関わらず、試験期間中変動しなかった。この結果から、添加したAOBは家畜ふんに存在し続けていたことが推測できる。AOB添加によるアンモニアの発生抑制の原理は、発生したアンモニアを亜硝酸に変換(無臭化)し、アンモニアの発生量を低減化するのであり、アンモニア低減効果を確認するにはAOB (*amoA*) の活性状態を知ることが重要となる。しかし、MPN-PCR法による菌量の測定では、生菌と死菌との区別、菌の活動状態と静止状態との区別ができず、添加したAOBの活性状態を把握することはできなかった。家畜ふんにおけるAOBの活性状態とアンモニア発生抑制効果との関係を検証するには、AOB由来*amoA*の発現状況を明らかにしていく必要がある。

引用文献

- Kuroda, K., Hanajima, D., Fukumoto, Y., Suzuki, K., Kawamoto, S., Shima, J., and Haga, K. (2004) Isolation of thermophilic ammonium-tolerant bacterium and its application to reduce ammonia emission during composting of animal wastes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68:286-292.
- Morimoto, N. (2000) Removal of bad odor of animals with odor decomposing microorganisms. *Farming Japan*, 34:42-44.
- 中村明靖 (2002) 16srDNAと遺伝子*amoA*に基づいたAOBの定量 第36回日本水環境学会 pp.296
- 長田 隆 (2002) 豚のふん尿処理に伴う環境負荷ガスの発生. 畜産草地研究所研究報告, 2:15-62.
- 篠田吉史 (2000) 16sRNA遺伝子による細菌の系統分類法. 島津評論, 57:121-132.
- Wilson, K. (1991) Preparation of genomic DNA from bacteria in *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., NEW YORK: pp.241-245.

Effect of adding ammonia-oxidizing bacteria to ammonia emission
during the composting process of animal wastes.

Naoki Morimoto*

Tokyo Metropolitan Agriculture and Forestry Research Center

Abstract

Ammonia-oxidizing bacteria was isolated from compost made of animal wastes. The strain (*Bacillus subtilis*) had ammonia-monooxygenase gene (*amoA*). To evaluate the effect of adding the strain to ammonia emission during the composting process of animal wastes was done. Ammonia emission tended to be lower about 20% in the strain-added material than in the control material to which the strain was not added.

Keywords: animal waste composting, *Bacillus subtilis*, ammonia-monooxygenase gene

Bulletin of Tokyo Metropolitan Agriculture and Forestry Research Center, 6: 19-23, 2011

*Corresponding author: n-morimoto@tdfaff.com