

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19780205

研究課題名（和文）養鶏施設由来微生物を用いた脱臭廃水窒素除去方法の検討

研究課題名（英文）Survey of microbial organisms for nitrogen removal in poultry manure

研究代表者

和木 美代子（WAKI MIYOKO）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所浄化システム研究チーム・主任研究員

研究者番号：10355092

研究成果の概要（和文）：鶏糞処理施設におけるバイオマスサンプルについて窒素代謝に関わる微生物の存在について調査した。生鶏糞、貯留槽鶏糞、乾燥鶏糞において、アンモニア濃度は貯留槽鶏糞が最も高く含まれ、また硝酸、亜硝酸は検出されなかった。窒素代謝に関わる微生物の存在について各微生物に関わる特異的プライマーを用いた PCR 反応により推測した結果、アンモニア酸化細菌は生鶏糞にはわずかにしか含まれないが、貯留槽の段階で増加した後、乾燥処理後には減少していることが予測された。脱窒細菌はすべての段階において安定して存在し、一方でアナモックス細菌は何れの段階にも存在しないと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Microbial organisms for nitrogen removal were investigated in poultry manure; raw poultry manure in hencoop, raw manure in pit, and manure after drying. Ammonium concentration increased from the raw manure in hencoop to that in pit, and then decreased after drying. Nitrate and nitrite were not detected. By the PCR analysis using primers specific for nitrogen metabolizing microorganisms, it was shown that ammonium oxidizer increased in the pit, and then decreased after drying. Denitrifier existed commonly, and anammox was not detected.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 畜産学・草地学

キーワード：飼養、畜産環境

1. 研究開始当初の背景

(1) 畜産環境研究において悪臭問題は最も苦情割合が多く、現在においても取り組むことが求められているテーマである。中でも高窒素含量である鶏糞は、処理で発生する悪臭中アンモニア濃度も高いためその処理過程での悪臭の苦情が多い。現状での養鶏農家における悪臭処理は物理化学処理が主体であるが、危険な薬品や燃料を必要としない生物処理はその問題点を解決できれば真に環境に優しい技術になる可能性を秘めている。

(2) 生物脱臭技術の最大の問題点はその脱臭廃水の適切な処理方法が提案されていない事にある。これは現在までの脱臭の研究において第一反応であり最大目的でもあった悪臭成分の空気中からの除去のみが検討され続け、その後の脱臭廃水(悪臭成分および微生物を含んだ水)の処理が考慮されてこなかったことである。しかし環境意識の高まった現在では脱臭廃水の処理は重要な問題であり、現場においては污水处理施設を持つことの多い養豚農家等はそこに投入することで対応しているのが実際であるが、養鶏農家では一般的に污水处理施設を持たないため対応に苦慮し、この事が生物処理の普及を妨げているとも言える。すなわち生物脱臭廃水処理技術の研究が畜産環境問題の解決の為に必須である。

(3) 一般的な生物脱臭反応においては悪臭の主成分であるアンモニアの(微生物を含む)水への吸収がおこなわれ、同時に水中が好気状態に保たれアンモニアの酸化反応が硝化菌によって生起する。これはアンモニアの溶解による水中 pH の上昇を緩和する(硝化反応は pH を低下させるため)と同時にアンモニアの再揮散を押さえる意味を持ち、一般的な脱臭処理はここで反応が終了している。一方、污水处理方法における窒素除去としては有機物を電子供与体として用いる脱窒反応、無機物を用いる脱窒反応、および亜硝酸をアンモニアで還元するアナモックス反応があり、いずれも無酸素条件でおこるとされている。処理には反応を担う微生物(硝化菌、脱窒菌、アナモックス菌等)が必要であり、将来の農家への普及を考えればその微生物の供給源は畜産現場からが望ましく、鶏糞、鶏糞堆肥、養鶏場の土壌等が供給源として想定される。硝化菌および脱窒菌は比較的自然界に容易に存在するとされているが、その一方で鶏糞由来サンプルも状況によっては硝化菌が検出限界以下に低下しているという報告があり、自然界に比較的容易に存在すると考えられている硝化菌や脱窒菌においても種菌供給源は適切な選択をする必要があることを示している。

2. 研究の目的

本課題では高濃度の窒素を除去する脱臭反応装置に用いる種微生物源の候補として、養鶏施設由来の微生物源サンプル(例えば鶏糞、鶏糞堆肥、鶏舎施設の土壌等について)の硝化および窒素除去に關与する微生物存在傾向を調べる。脱臭の第一段階の反応を担うアンモニア酸化細菌、および窒素除去に關わる脱窒細菌とアナモックス細菌などの窒素代謝を行う微生物に特異的なプライマーを用いた PCR 反応によりそれらの存在傾向を明らかにする。畜産農家内の微生物供給源の情報とそれを用いた窒素除去反応の検討は、畜産農家に根付いた新しい生物脱臭処理方法の提案につながると期待される。

3. 研究の方法

養鶏施設内の微生物供給源となることが期待されるサンプル(鶏糞、鶏糞堆肥、土壌等)について硝化および窒素除去を担う微生物の存在可能性を PCR 法等によって調査し、そのサンプルの特徴と存在可能性の関係を明らかにする。

(1) 生鶏糞(9 サンプル; 2 シーズン 春・夏 鶏舎内において 9 羽から直接排泄された糞)、貯留槽鶏糞(3 サンプル; 3 シーズン 春・夏・秋)、乾燥鶏糞(5 サンプル; 3 シーズン 春・夏・秋)、養鶏場の土壌サンプル(4 サンプル; 2 シーズン 春・夏 2 箇所)を採取し、窒素組成等の化学的組成を測定した。

(2) 上記サンプルから total DNA を抽出し、PCR 反応を行いそのシグナルの有無で判定することにより窒素代謝に關わる細菌の存在を予測した。各試験において反応あたりサンプル由来 10ng の tDNA を用い、また positive control として *Nitrosomonas europaea* (アンモニア酸化細菌、全細菌)、*Nitrosomonas multiformis* (アンモニア酸化細菌)、*Paracoccus denitrificans* (脱窒細菌、全細菌)から抽出した total DNA を用いた。

またアナモックス菌には *Candidatus Brocadia fulgida* に 95% の相同性を持つ養豚廃水処理リアクター由来クローンをを用いた。Positive control と同サイズのバンドの有無によって反応結果を判断した。

全細菌の存在についてバクテリアの 16S rDNA に特異的な 27f-907r primer セットを用い調べた。

アンモニア酸化細菌の存在についてはその機能遺伝子に特異的な amoA1F-2R primer セット、および 16S rDNA に特異的な CT0189f-CT0654r primer セットを用い調べた。

脱窒細菌についてその機能遺伝子に特異的な nirS cd3af- R3cd primer セットを用い

調べた。

アナモックス細菌については、汚水浄化施設に存在する割合の高いアナモックス菌を想定し、これらの 16S rDNA に特異的な primer セット Pla46f-Amx368r および Amx368f-Amx820r を用いて、アナモックス活性を持つ豚舎污水处理施設由来の汚泥でその検出能を確認した後に鶏糞処理施設サンプルについて調べた。

4. 研究成果

(1) 養鶏施設における微生物供給源として、排泄後 1 日以内の鶏舎内の生鶏糞、鶏糞貯留槽内の生鶏糞、乾燥処理後の鶏糞、および比較用サンプルとして土壌を採取した。生鶏糞と貯留槽鶏糞の間では pH, DM, BOD の物性は大きく変わらないが、乾燥鶏糞では DM と pH が大きく上がり、BOD は低下していた。生鶏糞、貯留槽鶏糞、乾燥鶏糞からはアンモニアが検出され、中でも貯留槽鶏糞が特に高い濃度であった。硝酸および亜硝酸は検出されなかった(表 1)。また土壌については、アンモニア、硝酸、亜硝酸のいずれも検出限界以下であった。

表 1 サンプルの物性

	生鶏糞	貯留槽 鶏糞	乾燥鶏 糞	土壌
n	9	3	5	4
pH	7.3±0.3	7.5±0.2	8.7±0.3	6.1±1.0
DM (%)	28±7	30±7	80±2	62±7
灰分 (%)	7±2	10±4	35±3	49±8
BOD/DM (%)	23±4	30±9	7±3	0.4±0.1
N-NH ₄ ⁺ /DM (%)	0.7±0.2	1.7±0.3	0.3±0.2	nd
N-NO ₃ ⁻ /DM (%)	nd	nd	nd	nd
N-NO ₂ ⁻ /DM (%)	nd	nd	nd	nd

(2) total DNA の抽出を行い、全バクテリアに共通の配列を用いた primer による PCR 反応を行った結果、すべてのサンプルから目的の長さの断片の増幅が見られ、DNA の抽出が PCR 反応の阻害物質を含まず行われたことが確認された(表 2)。

アンモニア酸化細菌に特異的な配列を用いた primer による PCR を行った結果、貯留槽鶏糞および土壌ではすべてのサンプルで断片の増幅が見られたが、生鶏糞および乾燥鶏糞では一部のサンプルしか増幅が見られなかった。次いで脱窒細菌に特異的な配列を用いた primer による PCR を行った結果、いずれのサンプルでも高い確率で増幅が見られた。

表 2 PCR 反応結果

	primer set / n	9	3	5	4
全バクテリア	(27f-907R)	9/9	3/3	5/5	4/4
アンモニア酸化細菌	(AmoA 1F-2R)	2/9	3/3	3/5	4/4
アンモニア酸化細菌	(CTO 189f-654r)	2/9	3/3	1/5	4/4
脱窒細菌	(nirS cd3af-R3cd)	7/9	2/3	4/5	4/4
アナモックス細菌	(Amx368f-820r)	0/9	0/3	0/5	0/4

排泄直後の鶏糞には脱窒細菌は存在するがアンモニア酸化細菌の存在頻度は低いと考えられた。アンモニア酸化細菌は貯留中に増殖がおり、さらに乾燥処理を経ると減少する変動がおこると推測された。また脱窒細菌については普遍的に存在していると考えられた。

アナモックス菌については、自然界において脱窒細菌、アンモニア酸化細菌よりも偏在する傾向が示されていることから、PCR の条件から検討を行った。豚舎污水处理施設汚泥は高い確率でごく僅かなアナモックス活性を持つことから、まずこれらを用いてアナモックス細菌を検出する PCR 反応条件の検討を行った。微量アナモックス活性を保持する豚舎污水处理施設汚泥サンプルおよび活性の検出できないサンプルを用いて、アナモックス菌の属する *Planctomycetales* に特異的な primer (Pla46f) およびアナモックス細菌に特異的な primer (Amx820, Amx368) を用いて組み合わせを検討した。その結果、*Planctomycetales* に特異的な primer とアナモックス細菌に特異的な primer の組み合わせた場合は非特異的な増幅が見られたが、アナモックス細菌に特異的な primer のみの組み合わせを用いた場合は、活性と PCR 増幅の完全な一致が見られ、後者の組み合わせはアナモックス細菌の検出に利用できると考えられた(図 1)。

生鶏糞、貯留槽鶏糞、乾燥鶏糞、養鶏場土壌のサンプルについて、この組み合わせを用いて PCR 反応を行った。その結果、いずれのサンプルについても PCR 産物の増幅は見られず、アナモックス菌は存在しない可能性が高いと考えられた(表 2, 図 2)。

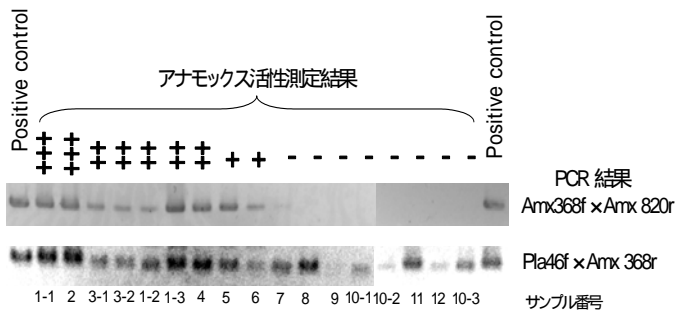


図1 豚舎汚水処理施設汚泥を用いたアナムモックス primer の検討結果

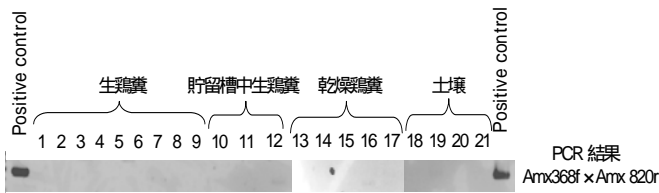


図2 養鶏施設サンプルについて アナムモックス primer を用いた PCR 結果

鶏糞中の微生物および物性は、鶏舎内から貯留過程、乾燥過程で大きく変化することが示され、特にアンモニア酸化細菌については貯留槽中で存在確率が高まると予測された。アナムモックス細菌については鶏糞中では検出されなかったが、豚舎汚水処理施設汚泥を用いた PCR 条件の検討では活性と一致する primer セットの条件が明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Miyoko Waki, Tomoko Yasuda, Kazuyoshi Suzuki, Takahiro Sakai, Naoto Suzuki, Ryoji Suzuki, Kenji Matsuba, Hiroshi Yokoyama, Akifumi Ogino, Yasuo Tanaka, Shingo Ueda, Mio Takeuchi, Takao Yamagishi, Yuichi Suwa, Rate determination and distribution of anammox activity in activated sludge treating swine wastewater, 査読有, Bioresource Technology (101), 2010 ,p2685-2690

〔学会発表〕(計1件)

和木美代子, 安田知子, 福本泰之, 黒田和孝, 鈴木一好 家畜排泄物処理施設におけるアナムモックス菌の探索 活性とPCR反応の比較 第8回畜産環境学会講演要旨 8(1) p25 2009年8月5日、東京都

6 . 研究組織

(1)研究代表者

和木 美代子 (WAKI MIYOKO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所浄化システム研究チーム・主任研究員

研究者番号：10355092