

## 微生物による悪臭防除試験

[平成 16~20 年度]

片岡辰一郎・森本直樹<sup>a</sup>  
(畜産技術科)<sup>a</sup> 現小笠原畜産指導所

---

【要 約】アンモニア酸化細菌 (*Bacillus subtilis*) を新規に分離した。本菌はアンモニア酸化遺伝子 (*amoA*) を有し、50℃でも増殖可能である特徴を有している。本菌を牛ふん尿中に  $10^9$  個/g 以上添加し堆肥化することで、堆肥化過程に発生するアンモニア量を 42% 削減することができる。

---

### 【目 的】

家畜ふん尿の堆肥化処理過程で発生するアンモニアは、濃度が極めて高く対応が求められている課題である。そこで、新規にアンモニア酸化細菌を分離し利用することで、堆肥化過程におけるアンモニアの発生抑制を試みた。

### 【方 法】

#### 1) アンモニア酸化細菌の分離

アンモニア酸化菌の分離源は、土壌 (10 種) および堆肥 (18 種) とした。検体を 10 倍量の生理食塩水で希釈し、高アンモニウム塩培地 (表 1) に塗抹した。培養温度は堆肥化過程でも増殖できることが必要であることから、50℃とした。

#### 2) アンモニア酸化遺伝子 (*amoA*) の確認

増殖したコロニーを単離・増菌後、プロティナーゼK法によりゲノム DNA を抽出した。抽出 DNA を精製し、一定濃度に調整した。調整した DNA を鋳型とし、設計した *amoA* プライマー (表 3) を用いて、PCR 増幅した。PCR 産物を電気泳動し、特定サイズの増幅断片を確認した。

#### 3) アンモニア酸化細菌の同定と特異プライマーの設計

アンモニア酸化細菌の形態的および生化学的性状を調べた。さらに、ゲノム DNA を抽出、16S rRNA の特定領域塩基配列をシーケンスした。

結果から FASTA を用いて塩基配列相同性の高い菌種を検索するとともに Primer3 を用いて特異プライマーを設計した。

#### 4) 家畜ふん混合試験

##### ①家畜ふんに対する菌添加効果

家畜ふん尿 (牛または鶏) とおが屑を混合し、水分を約 65% に調整した。培養したアンモニア酸化細菌を  $10^9$  個/g 濃度に混合し、小型堆肥化装置 (かぐやひめ: 容量 50) に充填した。1 週間に一度切り返しを行い、発生したアンモニアをガス検知管で測定した。切り返しごとに材料を採取し、添加した菌数を MPN-PCR 法によって定量した。

##### ②添加菌量の違いによる効果

牛ふん尿とおが屑を混合し、水分を約 65% に調整した。培養したアンモニア酸化細菌を滅菌生食で洗浄。調整牛ふん中に、一定濃度 ( $10^7$  個/g ・  $10^9$  個/g ・  $10^{11}$  個/g) となるように菌を混合し、小型堆肥化装置に充填した。1 週間に一度切り返しを行い、発生したアンモニアをガス検知管で測定した。

## 【成果の概要】

### 1) アンモニア酸化細菌の分離

土壌由来 14 種, 堆肥由来 27 種のコロニーを確認した。

### 2) アンモニア酸化遺伝子 (*amoA*) の確認

分離した 41 種のうち 2 種について PCR による目的遺伝子断片の増幅を確認し (図 1), アンモニア酸化遺伝子を持つことが判明した。

### 3) アンモニア酸化細菌の同定と特異プライマーの設計

分離した 2 種類の菌は形態学および生化学的な性状から同一のものと推測された。本菌は, グラム陽性, 芽胞形成菌であり, 50°C で増殖する高温菌であった。形態学および生化学的な性状を示す (表 2)。

16S rRNA 遺伝子塩基配列の全塩基配列を読解した結果, 最も相同性が高いもの (99.54%) は, *Bacillus subtilis* であった (図 2)。特異プライマーの塩基配列は, fwd: 5-AGCGTTGTCCGGAATTATTG-3 および rev: 5-TAAGGTTCTCGCGTTGCTT-3 とし, PCR により目的断片の増幅を確認することでプライマーの有用性を確認した。

### 4) 家畜ふん混合試験

#### ①家畜ふんに対する菌添加効果

牛ふん尿の堆肥化過程では, アンモニアの発生がピーク時で 42% 抑制された。しかし, 鶏ふんに対しては対照区と変わらず, アンモニアの抑制効果はなかった。添加菌は, 牛ふん堆肥化過程で一時的に増加し, その後減少した。鶏ふん中では一端減少し, その後増加した (図 3, 4)。

#### ②菌添加量の違いによる効果

菌添加量 ( $10^7$  個/g) の場合, 試験期間を通して菌無添加区とほぼ同様なアンモニアの発生量であり, アンモニア発生低減効果は認められなかった (図 5)。

菌添加量 ( $10^9$  個/g) の場合, アンモニアの発生パターンは, 対照区と同様であったが, アンモニアの発生がピーク時で 40% 抑制された (図 6)。

菌添加量 ( $10^{11}$  個/g) の場合, アンモニアの発生パターンは, 対照区と同様であったが, アンモニアの発生がピーク時で 45% 抑制された (図 7)。

### 5) まとめ

アンモニア酸化菌である *Bacillus subtilis* を新規に分離した。本菌はアンモニア酸化遺伝子 (*amoA*) を有し, 高温下でも増殖可能である特徴を有している。

本菌を牛ふん尿に添加し堆肥化することによって, 発生するアンモニアの抑制効果が認められた。菌の添加量は,  $10^9$  個/g 以上で効果があり,  $10^9$  個/g と  $10^{11}$  個/g では効果が同等だったことから, 高濃度添加でも高い効果は得られないことがわかった。

## 【成果の活用と留意点】

実用化の際は, 有効菌を含んだ堆肥を家畜ふんに混合する (戻し堆肥) ことで, 菌の添加を最小限に抑えることを検討する。

## 【発表資料】

- ・平成 18, 19 年度 研究速報

表1 アンモニア酸化菌分離培地組成

酵母エキス	5g
Na2HPO4	1g
CH3COONa	1g
NH4Cl	53.5g
寒天	40g
蒸留水	1000ml
PH	7.5

表2 アンモニア酸化細菌の性状

形態	桿菌
グラム染色	+
抗酸性	-
芽胞	+
鞭毛	-
運動性	-
カタラーゼ	+
オキシダーゼ	+
尿素分解性	+
ゼラチン分解性	+
硫化水素生成	-
インドール生成	-
硝酸塩還元	+
窒素ガス生成	-
クエン酸利用性	+
エスクリン分解性	+
VP反応	-
糖からの酸生成	
アラビノース	-
ダルシトール	-
果糖	-
ガラクトース	-
ブドウ糖	-
イノシトール	+
ラクトース	+
マルトース	-
マンニトール	-
ラフィノース	+
ソルビトール	-
シュクロース	-
キシロース	-
ラムノース	+
イノシトール	+

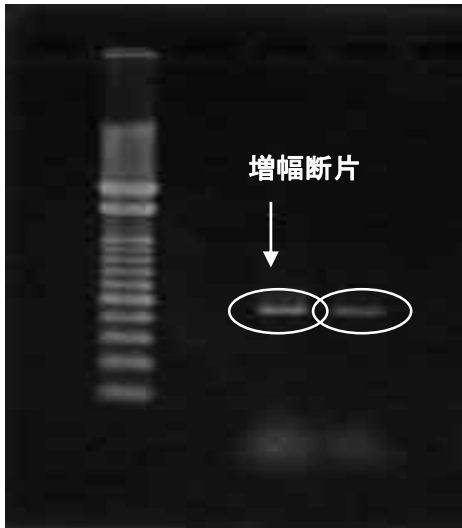


図1 amoA 増幅断片の泳動画像

表3 アンモニア酸化遺伝子 (amoA) のプライマー

遺伝子	プライマー配列 (5'-3')	PCR産物サイズ
amoA	F GGGGTTTCTACTGGTGGT	491
	R CCCCTCKGSAAGAATTCTTC	

```

1 gagtttgatc atggctcagg acgaacgctg cgggcggtgcc taatacatgc aagtcgagcg
61 gacagatggg agcttgctcc ctgatgttag cggcgggacgg gtgagtaaca cgtgggtaac
121 ctgcctgtaa gactgggata actccgggaa accggggcta ataccggatg cttgattgaa
181 ccgcatgggt caattataaa aggtggcttt tagctaccac ttacagatgg acccgcggcg
241 cattagctag ttggtgaggt aacggctcac caaggcgacg atgcgtagcc gacctgagag
301 ggtgatcgcc cacactggga ctgagacacg gccacagactc ctacgggagg cagcagtagg
361 gaatcttcg caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtagtga tgaaggtttt
421 cggatcgtaa aactctgttg ttagggaaga acaagtaccg ttcgaaatagg gcggtacctt
481 gacggtacct aaccagaaag ccacggctaa ctactgcca gcagcccggg taatacgtag
541 gtggcaagcg ttgtccgga ttattgggag taaagcgcg gcagcggtt tottaagtct
601 gatgtgaaa cccccggctc aaccggggag ggtcattgga aactggggaa cttgagtca
661 gaagaggaga gtggaattcc acgtgtagcg gtgaaatgag tagagatgtg gaggaacacc
721 agtggcgaag gcgactctct ggtctgtaac tgacgctgag gcgcgaaaagc gtggggagcgc
781 aacagattta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gagtgctaa gtgttagaggg
841 tttccgacct ttagtgtgc agcaaacgca ttaagcactc cgcctgggga gtacggtcgc
901 aagactgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cgggtgggca tgtggtttaa
961 ttcgaagcaa cggtaagaac cttaccaggt cttgacatcc tctgacaacc ctgagatag
1021 ggcttcccct tccggggcag agtgacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tctgtcgtg
1081 agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacctttgat cttagtgtgc agcattcagt
1141 tgggcaactc aaggtgactg ccggtgacaa accgggagaa ggtggggatg acgtcaaatc
1201 atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac gtgctacaa gggcagaaca aagggcagcg
1261 aagccgcgag gctaaagcaa tcccacaaat ctgttctcag ttcggatcgc agtctgcaac
1321 tcgactcgct gaagctggaa tcgctagtta tcgcggatca gcactgccgc gtgaaactgt
1381 tcccgggacct tgtacacacc gcccgtcaca ccacgagagt ttgtaacacc cgaagtcggt
1441 gaggtaacct tttggagcca gcccggaag gtgggacaga tggattgggt gaagtcgtaa
1501 caaggtagcc gtatcggaag gtgcggctgg atcacctct tggatcccg
    
```

図2 アンモニア酸化細菌 16S rRNA 遺伝子領域塩基配列と特異プライマーの位置

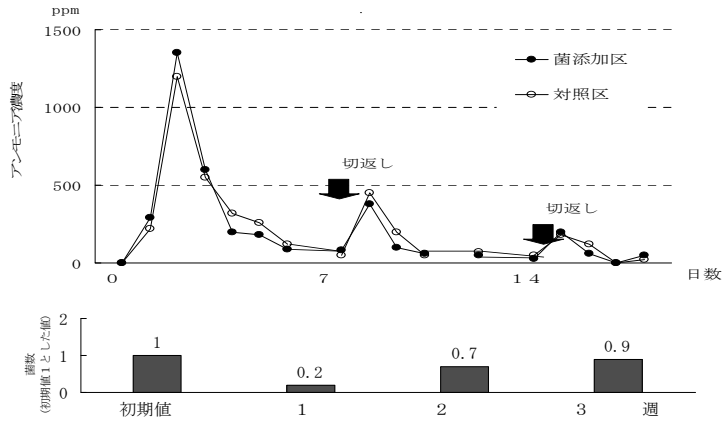


図3 鶏ふん堆肥化過程でのアンモニア発生量と添加菌の推移

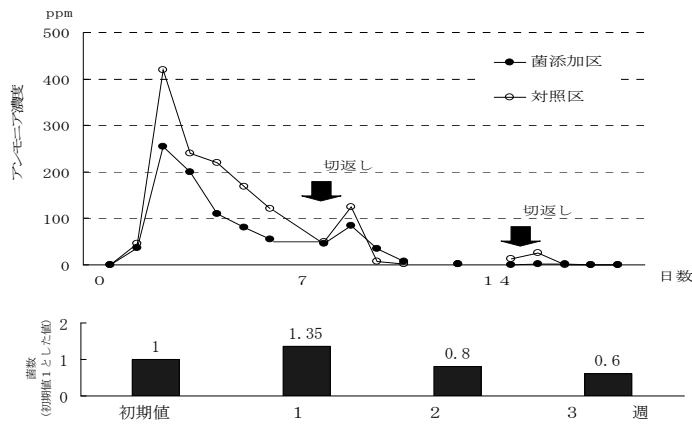


図4 牛ふん堆肥化過程でのアンモニア発生量と添加菌の推移

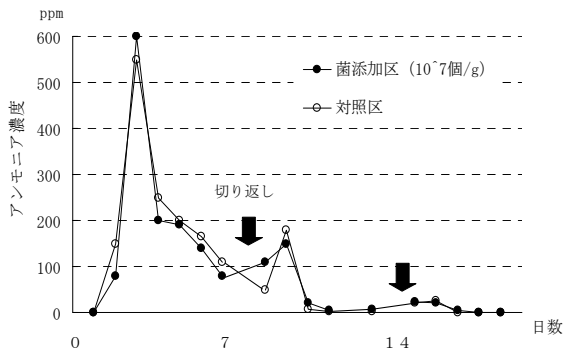


図5 牛ふん堆肥化過程でのNH<sub>3</sub>発生量 (菌濃度 10<sup>7</sup>個/g)

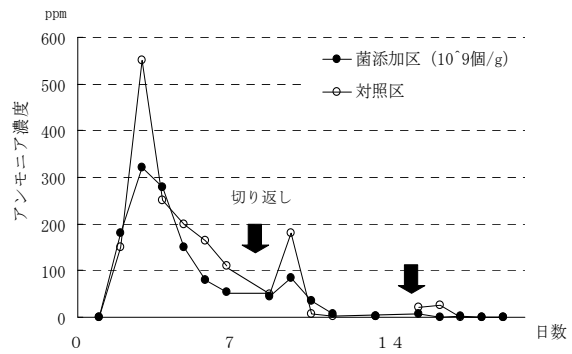


図6 牛ふん堆肥化過程でのNH<sub>3</sub>発生量 (菌濃度 10<sup>9</sup>個/g)

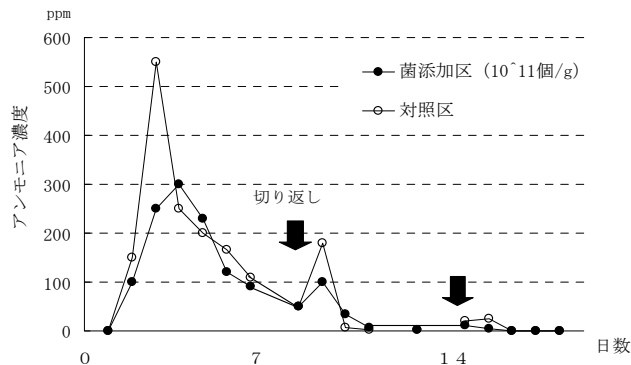


図7 牛ふん堆肥化過程でのNH<sub>3</sub>発生量 (菌濃度 10<sup>11</sup>個/g)