

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1報)

南部奈津紀・村田文彦

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

(1)

Natsuki NANBU, Fumihiko MURATA

要 約

草地土壌や牛放飼場土等の臭気抑制能力を小型堆肥化装置を利用して調査したところ、草地土壌や牛放飼場土等の土壌量が増えるほど、アンモニア抑制効果が増加した。牛舎における土壌の臭気抑制能力を調査するため、二次破砕材と牛放飼場土壌や草地土壌を混合し敷料としたところ、ゼオライトと同等程度の臭気抑制効果がみられた。臭気抑制効果の優れた土壌内には、硝化の最終産物である硝酸態窒素の著しい増加があり、アンモニア酸化細菌と硝化能力の高い亜硝酸酸化細菌が確認された。亜硝酸酸化細菌の添加により、アンモニア酸化細菌の硝化能力が向上した。

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・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において林地廃材等の木質系資材には優れた臭気吸着能力があることを確認している²⁾。そこで畜糞堆肥を多く施用されている草地土壌や新鮮糞尿に常にさらされている牛放飼場土壌等の土壌は硝化能力に秀でた微生物が多いと仮定し、木質系資材と土壌を敷料等として供試し、土壌の臭気抑制能力を調査することで、臭気抑制能力の高い土壌の添加量と土壌の持つ臭気抑制能力を調査した。

II 材料及び方法

1. 臭気抑制試験 I

臭気抑制試験方法は、羽賀らの方法に準じて行った³⁾。

小型堆肥化実験装置を用いた発生アンモニア捕集装置(図1)に、剪定枝などの林地廃材を2回粉砕機にかけ15mm程度に破砕した資材(以下、二次破砕材)とアンモニア発生源としての尿素

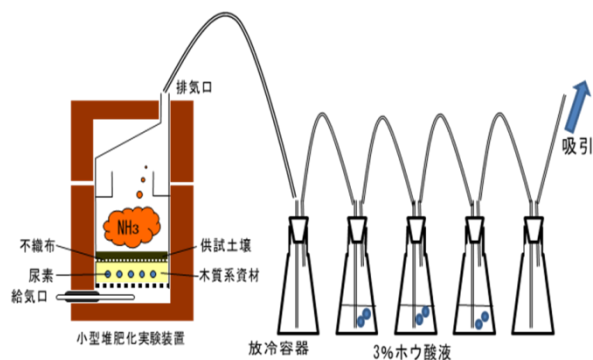


図1 発生アンモニア捕集装置

100g を混合して厚さ 20cm 量を充填した。その上部に、供試土壌として竹林土壌、畜産試験場内で常時乳牛を放牧しているパドックの土壌(以下、牛放飼場土壌)、および堆肥を毎年散布している草地の土壌(以下、草地土壌)をそれぞれ厚さ 10cm 重層した。二次破砕材と供試土壌は各々最大容水量(土壌が重力に反対して保持できる水の最大量のこと)の 60%水分に調整した。試験期間は一供試土壌につき約 50 日間で、装置内に発生するアンモニアを 0.15~0.2L/min で昼夜連続吸引し、3%ホウ酸液 100ml×3 本に捕集した。そして 1 本目のアンモニア捕集ホウ酸液(以下捕集液)より 5ml 採取し、ブロムクレゾールグリーン・メチルレッド液を指示薬として 1/50N 硫酸液で滴定し、捕集液 5ml 内に含まれるアンモニア態窒素(以下、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$)含有量を定量し比較した⁴⁾。

2. 臭気抑制試験 II

発生アンモニア捕集装置に、二次破砕材を厚さ 20 cm 量を敷き詰め、供試土壌として牛放飼場土壌、草地土壌を 8、5、3cm の厚さに重層した。二次破砕材にはアンモニア発生源としての尿素 100g を混合した。二次破砕材と供試土壌は各々最大容水量の 60%水分に調整した。臭気抑制試験 1 と同様に、試験期間 30 日間の捕集液内 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含有量を定量し比較した。

3. 牛床実証試験

(試験 1) 二次破砕材と牛放飼場土壌を 2(210L) : 1(105L) の割合で混合し、敷料として用い、黒毛和牛雌牛 1 頭を分娩房(110 m^2)で飼養して牛床における臭気抑制状況を調査した。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。約 50 日間の調査期間中、週 3 回、牛房内 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アンモニア濃度を測定した。試験終了時(約 50 日)にコンテナ内臭気をフレックサンプラーに捕集し、臭気官能試験法⁵⁾に基づいてパネラー 6 人により臭気の指数化を行った。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 70L を両区共に 3 回追加した

(試験 2) 同じ牛房と供試牛を用い、牛放飼場土壌を草地土壌に変更して同様にアンモニア濃度、臭気の指数を行った。なお調査期間中、二次破砕材 70L を両区共に 3 回追加した。

4. 土壌における臭気抑制能力の調査

臭気抑制試験 I で供試した竹林土壌、牛放飼場土壌、草地土壌の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。

また、土壌微生物実験法⁶⁾に基づき、MPN 法による硝化菌生菌数を調査し、硝化菌(アンモニア酸化細菌 Ammonia Oxidizing bacteria, 以下 AOB、亜硝酸酸化細菌 Nitrite Oxidizing bacteria, 以下 NOB)の集積培養と分離培養を行った。生菌が確認された分離培養液を AOB ゲルライト平板培地と NOB ゲルライト平板培地に 100 μl 塗布し、28 $^{\circ}\text{C}$ で 7 日間培養し出現コロニーを釣菌した。また、釣菌した菌株を計数液体培地または培養液体培地に接種後、28 $^{\circ}\text{C}$ で静置培養し、培地内 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ と $\text{NO}_2\text{-N}$ の濃度推移を RQ フレックスで測定した。

釣菌した NOB 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⁷⁾。

III 結果

1. 臭気抑制試験 I

二次破砕材のみ(覆土なし)で行った対照区の捕集 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 量は、試験開始後 1 週間から増加し、3 週間後から約 15mg 以上/day 捕集されるように

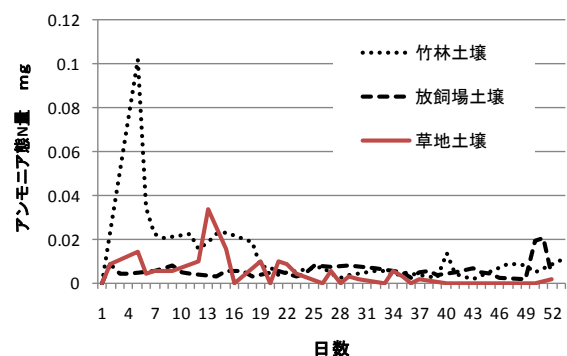


図 2 臭気抑制試験での最終排気捕集 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 量

なった。竹林土壌、牛放飼場土壌、草地土壌における試験期間中の捕集 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 量は極微量(開始3週間以降平均 0.01mg/day 以下)であった(図2)。試験終了時に小型堆肥化実験装置排気口で測定した発生アンモニア濃度は、対照区で 1000ppm 以上、竹林土壌は 2ppm 以下、畜試内牛放飼場土壌、草地土壌は $1\sim 0.5\text{ppm}$ 以下であり、すべての供試土壌でアンモニア発生量が減少した。

2. 臭気抑制試験Ⅱ

草地土壌、牛放飼場土壌とも、捕集総 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 量は 3cm 土 $>$ 5cm 土 $>$ 8cm 土と、土壌量が増えるほど、捕集される $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 量は減少した(図3、図4)。

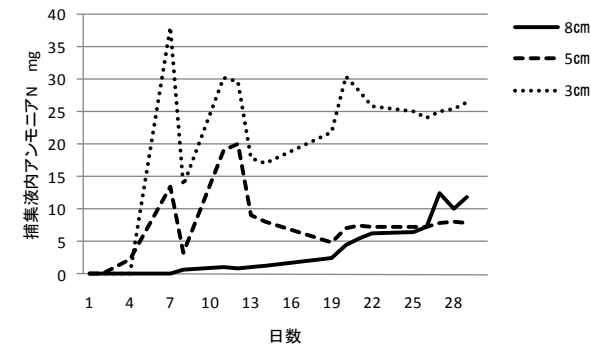


図3 草地土壌 捕集 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 量

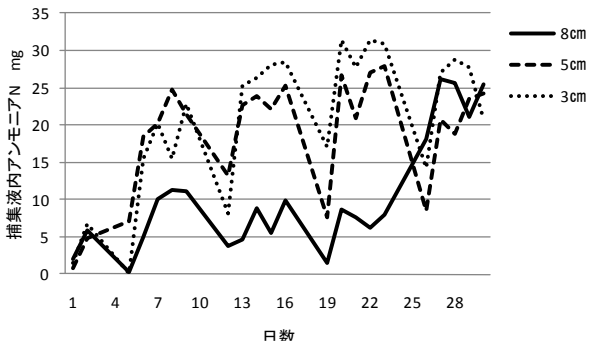


図4 牛放飼場土壌 捕集 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 量

3. 牛床実証試験

牛房内敷料からの発生アンモニア濃度は、3週間目以降からは牛放飼場土壌区がゼオライト区を下回った(図5)。草地土壌区は試験開始時より、期間中ほぼゼオライト区を下回った(図6)。

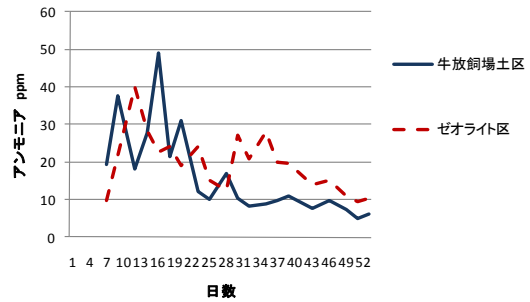


図5 牛房敷料からの発生アンモニア濃度 (牛放飼場土壌)

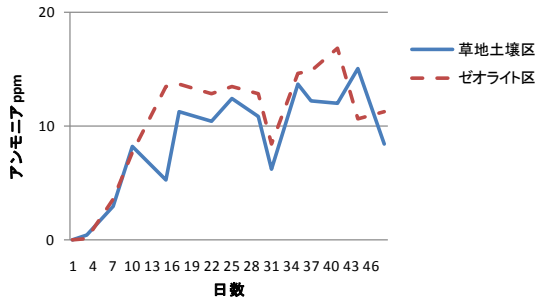


図6 牛房敷料からの発生アンモニア濃度
(草地土壤)

臭気の指数化は、試験1ではゼオライト区が14.8、牛放飼場土壤区が11.3であった。試験2ではゼオライト区が19.7、草地土壤区が17.6であった(表1)。また同試験による官能臭気強度は全区とも1(やっとかすかに感じる)程度であり、悪臭の発生は抑えられた。

表1 牛床実証試験の臭気官能調査結果

区分	閾値	臭気	臭気	
	平均値	濃度	指数	
	X	$Y=10^X$	$Z=10*X$	
試験1	ゼオライト	1.5	30.1	14.8
	牛放飼場土壤	1.1	13.4	11.3
試験2	ゼオライト	2.0	94.0	19.7
	草地土壤	1.8	57.6	17.6

4. 土壤における臭気抑制能力の調査

臭気抑制試験開始時と終了時の供試土壤の $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 量を測定し比較したところ、牛放飼場土壤と草地土壤で著しい増加がみられた(表2)。臭気抑制能力は草地土壤>牛放飼場土壤>竹林土壤の順で草地土壤が最も高く、臭気抑制能力の高い土壤中には、硝化菌の存在が示唆された。

表2 供試土壤内の亜硝酸態Nと硝酸態Nの推移 (ppm)

		二次	竹林	牛放飼場	草地
		破砕材	土壤	土壤	土壤
$\text{NO}_2\text{-N}$	試験前	0.76	0.91	0.00	0.76
	試験後	2.20	1.82	273.60	28.73
$\text{NO}_3\text{-N}$	試験前	5.65	16.95	2.26	1.13
	試験後	14.69	20.34	1,130.00	3,771.20

乾土1gに含まれるAOB生菌数は、試験開始時にはそれぞれ高い数値で存在していたものの、試験終了時には二次破砕材以外で減少した。NOB生菌数は、二次破砕材と草地土壤は増加した(表3)。牛放飼場土壤と草地土壤それぞれを接種源とした集積培養と分離培養、ゲルライト選択培地での釣菌により、AOB培地から29株とNOB培地から9株を得た。しかしこれらは完全な菌単離ではなく、釣菌した菌の培養液を接種した普通寒天培地では、他の有機栄養菌が混在していることが確認され、それらの有機栄養菌は硝化能力を有していなかった。

表3 供試土壤内の硝化菌生菌数の推移

		二次	竹林	牛放飼場	草地
		破砕材	土壤	土壤	土壤
AOB 生菌数	試験前	$3.6*10^0$	$3.3*10^0$	$9.0*10^4$	$1.1*10^5$
	試験後	$6.9*10^2$	$2.5*10^0$	$6.0*10^3$	$4.2*10^3$
NOB 生菌数	試験前	$2.8*10^0$	$4.8*10^5$	$1.7*10^4$	$3.8*10^4$
	試験後	$4.1*10^0$	$1.3*10^0$	$9.1*10^0$	$8.1*10^4$

AOBとした29株は、硝化能力を確認するための培養中、培地内 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 量は減少するものの株間の差は殆どみられなかった。NOBとした9株は、No.1、3、4の3株が、短期間で培養培地内の $\text{NO}_2\text{-N}$ 量が顕著に減少した(図7)。また、硝化速度に差の見られないAOBのうち10株を選び、NOB No.3を添加したところ、3株で培地内 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 量の減少が速くなった(図8)。

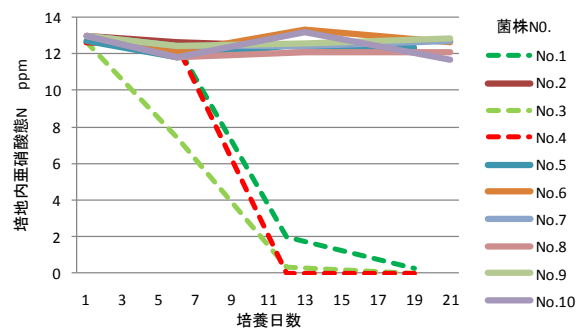


図7 NOB 硝化能力

IV 考察

今回の試験では、臭気発生源の上に覆土をすると長期間アンモニアを抑制できることが確認されたものの、少ない土壌ではアンモニアを抑制することは困難であった。アンモニア抑制に関わると考えられている硝化菌は増殖が遅いため⁶⁾、少量土壌では高濃度に発生するアンモニアを硝化するのに十分な菌量が不足したと思われる。

牛床における実証試験では、50日間敷料を交換せずにゼオライトと同等程度のアンモニア抑制効果がみられたものの、有意差はみられなかった。当試験の結果から50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、終了時の搬出敷料量は開始時の2倍以上となり、労力等の面からの考慮も必要である。

以上の結果から、優れた臭気抑制能力を持つ土壌には高いアンモニア濃度に耐える硝化菌が存在していたことが明らかとなった。なかでも草地土壌より硝化能力の高いNOB 3株が分離されたことにより、牛舎試験での土混合敷料中のNO₃-N濃度上昇は、臭気としてのアンモニアが硝化菌の一連の働きによって硝化された生成物となり上昇したものと考えられる⁸⁾。

硝化菌のうち、NH₄⁺-NをNO₂-Nに酸化するAOBは5属7種、NO₂-NをNO₃-Nに酸化するNOBは4属5種が知られている⁹⁾。NOBの中ではニトロバクター属とニトロスピラ属が土壌や汚水環境等から検出されている¹⁰⁾が、同菌を測定する硝化細菌測定キットによる抗原抗体凝集反応では陰性反応であった。これは培養液中の菌体数がキットの力価に及んでいない可能性もあり、培養液を濃縮して再度試みる必要がある。

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

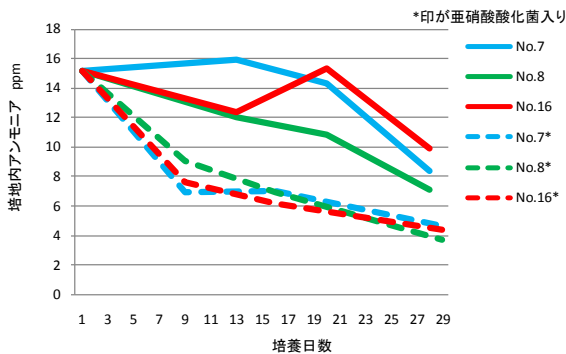


図8 NOB 添加による AOB 硝化能力の変化

硝化能力の高いNOB No.1、3、4は、ゼオライト平板培地での培養で明確なシングルコロニーを形成しなかった。同株はエーゼで塗布した軌跡に沿って、液体を流したような外観の連続した透明なコロニーとなることが共通しており、シングルコロニーを形成する他株と異なっていた。この3株のNOBは、NO₃-N蓄積が顕著であった草地土壌由来の菌であった。

NOB No.1、3、4の、硝化細菌測定キットによる亜硝酸酸化細菌検出は、3株とも陰性であった。

- 研究報告 第 19:30-34. 2006.
- 3) 羽賀清典・長田隆・田中康男・黒田和孝・花島大・柳井政史・北村耕作. 田中一人. 小型堆肥化実験装置の開発と利用方法. 平成 10 年度畜産成果情報 41-42. 1999.
 - 4) 嶋田典司. 土壤標準分析・測定法委員会編. 土壤標準分析・測定法. 博友社. 105-107. 1994.
 - 5) 岩崎好陽. 臭気官能試験法. 社団法人臭気対策研究協会. 50-66. 1990.
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) Watson, S. W., Bock, E., Harms, H., Koops, H. and Hooper, A. B. Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology, Vol.3, 1808-1834, 1989.
 - 10) Holger Daims, Jeppe L. Nielsen, Per H. Nielsen, Karl-Heinz Schleifer, and Michael Wagner. In Situ Characterization of Nitrospira-Like Nitrite-Oxidizing Bacteria Active in Wastewater Treatment Plants. Appl Environ Microbiol. November; 67(11): 5273-5284. 2001.

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

(I)

Natsuki NANBU, Fumihiko MURATA
Fukui Prefectural Livestock Experiment Station

The aim of this study was to decrease the ammonia level in the livestock building. It was used the litter mixed the crush wood and the soils(from pasture and grassland),it was almost same ammonia level when compared the soils and zeolite of the effect. The ammonia level was decreased by increasing of the amount of the soil. In the soil with excellent effect for controlling stench, nitrate-nitrogen was increased remarkably, ammonium oxidizing bacteria and nitrite-oxidizing bacterium with high nitrification ability were existed. The nitrification ability of ammonium oxidizing bacteria has improved by adding the nitrite-oxidizing bacterium.