

豚および家きんふん懸濁液の常温培養におけるアンモニア低減微生物の選抜

尾上 武*・下川智子¹⁾・山下聡子²⁾・日下芳友²⁾・前田 稔¹⁾・齋藤浩之²⁾・浅田研一

豚舎や鶏舎では悪臭の苦情や生産性の低下の原因となるアンモニア対策は重要である。そこで、常温で優れたアンモニア低減能力を有する微生物を選抜した。高濃度のアンモニア添加培地中での各菌株の増殖能および豚ふんまたは鶏ふん抽出液のアンモニア低減能により 11 株を初期選抜した。これらを豚ふん懸濁液に接種して培養し、アンモニア態窒素の低減能力を検証した。その結果、*Bacillus amyloliquefaciens* B1144 株を最終選抜した。B1144 株は豚ふん懸濁液中のアンモニアを 40~60%低減する能力を有する中温菌である。B1144 株を飼料に混合して子豚に給与しても健康状態に影響はなく、臓器への菌の浸潤は見られなかった。採食量や増体重に影響を及ぼすことはなかった。二次選抜株を鶏ふん懸濁液に接種して培養したが、アンモニアの低減能を有する株は選抜されなかった。今回選抜された B1144 株の養豚のアンモニア低減資材としての実用化が期待される。

[キーワード：豚，鶏，アンモニア，微生物，悪臭防止]

Selection of Ammonia Reduction Mesophile by Normal Temperature Culture of Pig and Poultry Feces Suspension. ONOUE Takeshi, Tomoko SHIMOKAWA, Satoko YAMASHITA, Yoshitomo KUSAKA, Minoru MAEDA, Hiroyuki SAITO and Kenichi ASADA (Fukuoka Agriculture and Forestry Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) Bull. Fukuoka Agric. For. Res. Cent. 3 :57 -64 (2017)

It is important to take measures to reduce ammonia emission from pig and poultry houses which causes complaints of bad odor and reduced productivity. In this study, microbe stocks that have superior ability to reduce ammonia emission under normal temperature conditions were selected. At first, 11 microbes were selected by their ability to increase in highly-concentrated ammonia nutrient medium and their ability to reduce ammonia in feces extract. These microbes were then injected into pig feces suspension, and their ability to reduce ammonia was tested. As a result, *Bacillus amyloliquefaciens* B1144 stock was selected. B1144 stock is a mesophile which can reduce ammonia emission from pig feces suspension by 40-60%. B1144 did not influence health and did not infiltrate internal organs even when given to piglets. However, no microbe stock was selected that has the ability to reduce ammonia emission from poultry feces. The practical use of B1144 stock for ammonia reduction in pig houses is expected.

[Keywords : Pig, Poultry, Ammonia, Microbe, Bad odor reduction]

緒 言

環境保全に関する法規制の強化や地域住民の関心の高まり等により、畜産経営では苦情対策が経営存続にかかわる重要な問題となっている。畜産経営に起因する苦情発生状況（農林水産省 2015a）における苦情発生件数を畜産農家戸数（農林水産省 2015b）で除した苦情発生率は 1.9%である。これを畜種別・原因別にみると、養豚に対する悪臭の苦情発生率が 6.0%と全畜種・全苦情要因の中で最も高く次いで養鶏に対する悪臭の苦情発生率が 3.7%となっている。畜産農家と一般住民が近接して生活する福岡県では悪臭の苦情発生率（福岡県 2015a, 2015b）は養豚で14.4%，養鶏で 4.6%と全国平均と比較してさらに深刻な問題となっていることから、福岡県の養豚・養鶏経営存続のためには悪臭問題の解決が不可欠である。

家畜ふん尿に由来する臭気は多種多様の臭気物質を含む複合臭であり、畜種別にもふん尿を堆積した牛舎ではインドールやスカトール、豚舎ではアンモニアや低級脂肪酸、鶏舎ではアンモニアが発生する等異なっている（代永 1995）ことから、畜種別、原因物質別に対策を講じる

必要がある。養豚や養鶏で問題となる悪臭原因物質としてあげられるアンモニアは尿がふんと混合することによって、ふん中に存在するウレアーゼの作用を受けて容易に発生する（代永 前出）ことから、飼養管理失宜のある豚舎ではアンモニアが高濃度で発生する。また、タンパク質の代謝物が尿素ではなく尿酸としてふんと一緒に排せつされる養鶏では養豚と比較してアンモニアが発生しやすく（Tanakaら 1991）、オールアウト後に敷料を山積みし、短い堆積期間で再び広げた鶏舎では入雛前にアンモニア濃度が70ppmに達した事例（小田原ら 2010）もある。さらに、アンモニア濃度の上昇によってブロイラーの生産性が影響を受ける（Homidanら 2011）うえ、採卵鶏舎内のアンモニアは作業者の衛生・労働環境にも影響を及ぼす（對馬ら 2013）ことから、悪臭対策だけでなく経営・衛生対策としてもアンモニアの低減は重要である。

アンモニアは人では 1ppm以上の濃度で刺激臭が感じられ、管理者が我慢できる最大濃度は50ppm、豚では25ppmで呼吸器その他の病気の原因となり、鶏の雛の場合50ppmで眼炎が発生する（代永 1998）。そこで著者らは豚のアンモニア低減対策としてはCPを11.5%に下げた低タンパク質飼料を肥育豚に給与すると、総窒素排せつ量が18.6~24.9%低減することを明らかにした（2010 a）。著者ら

*連絡責任者（生産環境部：onoue-t4410@pref.fukuoka.lg.jp）

受付 2016 年 8 月 1 日；受理 2016 年 11 月 10 日

1) 株式会社九州メディカル

2) 福岡県工業技術センター生物食品研究所

は総窒素排せつ量が低減した場合、堆肥化過程におけるアンモニアの濃度がピーク時には48.4%低減することを明らかにした(2010b)が、常温でのアンモニア濃度は測定しておらず、また、高濃度でアンモニアが発生している豚舎ではこの低減率では十分とは言えないため他の対策を講じる必要がある。その候補として微生物資材の利用がある。微生物はアンモニアに含まれる窒素を菌体タンパク質の材料として利用すると考えられるが、黒田(2006)は微生物資材の問題点として、含有されている微生物の正確な学名を確認できるものが少ないこと、微生物の臭気低減原理が不明確であるものが多いこと、臭気関連のデータが公表されているものが少ないことなどを挙げている。臭気低減原理の明確化には、標的とする悪臭原因物質を特定したうえで低減能力を有する微生物を選抜し、低減効果を検証することが必要である。微生物によるアンモニア低減策として、Kurodaら(2004)が堆肥化過程で発生するアンモニアを低減する高温耐性のバチルス属菌を単離しているが、常温である豚舎における効果は確認されていない。

著者らはこれまで保有バチルス属菌ライブラリーから豚舎で特異的に発生する悪臭の原因物質、低級脂肪酸を低減する微生物を選抜した(2015)。バチルス属菌は好気性または通性嫌気性の芽胞形成菌(根本と東1964)で、その芽胞は非常に強い耐久性があり、微生物が劣悪環境下におかれると形成されるが、環境が良化すると容易に通常の栄養型細胞になる(櫻井ら1993)。芽胞形成菌は取り扱いが容易で給与型の資材として活用できることから、既報では選抜の対象とした。そこで、今回も同様にバチルス属菌を用いた給与型資材の開発を目指した。また、給与型資材の開発においては、黒田(2006)が指摘するように、家畜に対する安全性の確認が必要である。そこで、著者らは選抜したバチルス属菌の安全性試験を試みた。そして、バチルス属菌の活用による養豚・養鶏でのアンモニア対策資材の開発を目的に本試験を実施した。

材料および方法

1 アンモニア低減微生物の初期選抜

選抜は福岡県工業技術センター生物食品研究所が保有する約5000株および株式会社九州メディカルが保有する約500株のバチルス属ライブラリーの微生物に対して行った。初期選抜はKurodaら(2004)を参考にしたアンモニア添加培地での微生物の増殖能による一次選抜と、豚ふん懸濁液および鶏ふん懸濁液中でのアンモニアの低減能による二次選抜の2段階で行った。

(1) 一次選抜

一次選抜の培地には0.2%Yeast Extract(Difco, 東京), 0.5%塩化ナトリウム(和光純薬工業, 京都)に塩化アンモニウム(和光純薬工業, 京都)を500mg/Lとな

るよう添加したものを使用した。生物食品研究所所有の株を約1000株ずつの5ユニット、九州メディカル所有の約500株を1ユニットの計6ユニットに分け、各ユニットの菌株混合培養液をアンモニア添加培地に接種して28℃および50℃で1日培養した。アンモニアは堆肥舎でも高濃度で発生(高原ら2001)するため、培養温度は畜舎で発生するアンモニア対策に加えて堆肥化過程で発生するアンモニア対策を想定し、2水準(常温=28℃, 高温=50℃)とした。1日後に増殖したコロニーを菌の種同定や株の識別を行わずにすべて採取して培養し、二次選抜に供試した。

(2) 二次選抜

二次選抜の培地には福岡県農林業総合試験場の母豚舎で採取した排せつ後24時間以内の豚ふんを用いた。豚ふんと4倍量の蒸留水を混合して30分間振とうし、3000rpmで5~10分間遠心分離した上澄みを、さらに15000rpmで遠心分離した。この上澄みを0.22μmフィルター(Millex-GV, ミリポア)によりろ過滅菌して豚ふん懸濁液を得た。豚ふん懸濁液を96ウェル平底マイクロプレートに100μL/well分注し、一次選抜菌株を1コロニーから個別に接種してそれぞれの選抜温度(28℃および50℃)で培養した。培養1日および2日後の豚ふん懸濁液のアンモニア濃度をアンモニアテストワコー(和光純薬工業, 京都)により測定し、最終選抜への供試数を考慮して、60%以上のアンモニア低減能を示した株を選抜した。また、50℃で選抜された株については、実際の堆肥化において達する70℃の高温条件下でも増殖可能を確認した。さらに、福岡県農林業総合試験場の採卵鶏舎で採取した排せつ後1日以内の鶏ふんを用いた懸濁液についても同様の操作を行い、アンモニア低減能により二次選抜を試みた。

(3) 選抜株の種同定

二次選抜された株については学名を明確にするため、ランダム増幅多型DNA(RAPD)法により株を識別するとともに16SrRNA遺伝子解析により種を同定した。QIAGEN DNA Genomic DNA Handbookのプロトコールに沿った操作方法に基づき、DNAの抽出および精製を行った。分光光度計(V-530, 日本分光, 東京)を用い、260nmおよび280nmの吸光度(O.D. 260およびO.D. 280)から抽出・精製したDNA試料原液の紫外外部吸収スペクトルを測定し、DNA濃度を算出した。DNA試料原液を滅菌純水で希釈し、10ng/μLの濃度に調製したものをDNA試料液とした。PCRチューブに滅菌超純水13.2μL, Ready-To-Go RAPD Analysis Kit(GEヘルスケア・ジャパン, 東京)付属のプライマー(5μM)5μL, PCRポリメラーゼ(タカラバイオ, 滋賀)付属のdNTP Mixture(各2.5mM)2μL, 10×Ex Taq Buffer 2.5μL, TaKaRa Ex Taq HS 0.3μLおよびDNA試料液(10ng/μL)2μLを加え、十分に攪拌した。キット付属のプライマーはPrimer-1~Primer-6の6種類である。RAPD-PCR反応は、95℃で5分加温後、45サイクル(95℃, 1分→36℃, 1分→72℃, 2分), その後72℃で5分間加温の条件で行った。泳動ゲルには2%アガロースゲル(ニッポンジーン, 東京)を用い、電

電気泳動 (100V, 25分) を行った。1×TAE 緩衝液 100mL あたり 10 μ L の SYBR Green (ロンザジャパン, 東京) を加えて調製した染色液に電気泳動後のゲルを浸し, 30分程度染色した後, ゲル撮影装置 (Digi-Gelshot, タカラバイオ, 滋賀) を用い, 電気泳動パターンの相動性を確認することにより株を識別した。InstaGene DNA 精製マトリックス (バイオ・ラッド, 東京) を用い, キットに添付された操作方法に基づき, DNA の抽出および精製を行った。PCR 反応は, 95°C で 3分加温した後, 30 サイクル (95°C, 30 秒→56°C, 1分30 秒→72°C, 1分30 秒), その後 72°C で 5分間の加温の条件で行った。プライマーは 6F (GRAGAGTTTGATCMTGGC) および 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) 各 5 μ L を用いた。PCR 反応液を QIAquick PCR Purification Kit (キアゲン, 東京) を用い, キットに添付された操作方法に基づき PCR 産物の精製を行った。純度の確認のために電気泳動を行った。泳動ゲルには 1.5% アガロースゲル (前出) を用い, 電気泳動 (100V, 25分) を行った。1×TAE 緩衝液 100mL あたり 10 μ L の SYBR Green (前出) を加えて調製した染色液に電気泳動後のゲルを浸し, 30分程度染色した後, ゲル撮影装置を用い, 純度を確認した。解析は PCR 産物を (株) マクロジェン・ジャパン (東京) に送付し, 委託解析にて実施した。塩基配列を得た後, BLAST にて相同性検索を行い, 種を同定した。

2 アンモニア低減微生物の最終選抜

試験には 1 で選抜された初期選抜株を供試した。最終選抜では悪臭だけでなく生産性に影響を及ぼす常温の畜舎で発生するアンモニアの対策を検討した。しかし, 堆肥化過程と畜舎の両方でアンモニアを低減できる菌株は単独で養豚のアンモニアを総合的に低減できることとなり, 経済的なメリットがあることから, 高温選抜株も常温での最終選抜に供試した。また, 実際の豚舎ではふんと尿が混合し, そこからアンモニアが発生する。そこで, 1 と同様に採取した豚ふんと, 同豚舎の母豚の排せつ時にポリ容器で直接採取した尿を用いた。豚ふんと 10 倍の蒸留水を混合して 30 分間振とうし, 2000rpm で 10 分間遠心分離した上澄みを No. 5A のろ紙 (東洋濾紙, 東京) を用いてろ過して豚ふん懸濁液を得た。豚ふん懸濁液に倍量の尿を混合した混合液を作成し, 混合液 150mL を 500mL 容の培養フラスコに注入して, 供試株を接種して約 10⁷CFU/g に調整した培養液を 1wt% 添加し, 28°C で 2 日間, 120rpm で振とうあるいは静置で培養した。振とう培養は好気状態となる排せつ物表層部, 静置培養は好気状態となる排せつ物内部を想定して設定した。対照区には供試株を接種していない培養液を同量添加して, 同様の操作を行った。2 日後, 懸濁液のアンモニア態窒素濃度の測定に供試した。アンモニア態窒素濃度の測定はブレンナー法によった。最も効果の高かった株について, 同様の方法により 3 反復で振とう培養し, 12 時間ごとにアンモニア態窒素濃度を測定して効果を確認した。

また, 鶏ふんについても同様の試験を行い, 鶏におけるアンモニア低減微生物の選抜を試みた。鶏では肉用鶏

出荷後の敷料懸濁液および採卵鶏と同様のケージで飼養される種鶏の鶏ふん懸濁液の 2 種を供試した。鶏では液体の尿がふんと別個に排せつされるのではなく, 固体の尿酸がふんと一緒に排せつされるため, それを分別せずに混合した。培養は振とうのみとした。また, 供試菌株は初期選抜において豚ふんのみで効果が確認された 3 株を除く 8 株とした。

3 最終選抜株の安全性確認

著者らはこれまで低級脂肪酸低減能を有するバチルス属菌の研究を実施してきた (前出)。その経験から, 作業性や悪臭物質と微生物との接触効率等を考慮し, 飼料に混合して給与する微生物資材の開発を検討した。そこで, 最終選抜株を子豚に給与して安全性の確認試験を行った。

試験は平成 25 年 10 月 15 日~11 月 12 日に行った。試験には体重約 16 kg の「大ヨークシャー種」子豚を供試した。試験区分は対照区, 常用量区, 高用量区とし, 対照区には炭酸カルシウム, 常用量区には供試株 5.7×10⁷CFU/g, 高用量区には供試株 1.9×10⁹CFU/g を含む微生物資材をそれぞれ子豚後期用飼料 (TDN80%, CP16%) に 1% (W/V) ずつ混合し, 常用量区では 5.7×10⁵CFU/g, 高用量区では 1.9×10⁷CFU/g の供試株を含有する飼料を給与した。なお, 常用量区の菌数は経済性, 普及性を考慮して設定し, 高用量区はその 100 倍量で設定した。供試頭数は各区 6 頭 (対照区, 常用量区雄 3 頭, 雌 3 頭, 高用量区雄 2 頭, 雌 4 頭) とし, 試験期間は 28 日間とした。試験期間中の供試豚は子豚用の隔離施設における 6 頭群飼とし, 不断給餌, 自由飲水とした。調査項目は飼養中の健康観察 (外貌, 食欲, 排せつ物性状, 異常行動の有無) の他に, 28 日間の試験終了時に各区半数の 3 頭ずつをと畜して剖検するとともに, 臓器 (肺, 心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 膵臓, 腸間膜リンパ節) および消化管 (胃, 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸) 内容物を採取して給与した供試株の臓器への迷入および腸内分布の解析に供試した。と畜は腋下動脈を切断し, 放血することにより行った。残りの各区 3 頭は, 給与した供試株の腸内消長を確認するため, 28 日間の試験終了時に微生物資材を混合しない通常飼料に切替えて 7 日間飼養した後, 同様にと畜, 解剖, 試料採取を行い, 菌の推移を検証した。採取した試料を生理食塩水で 10 倍に希釈し, ボルテックスミキサーで攪拌後, 10 分静置し, 上清を回収した。得られた上清を 65°C, 30 分湯浴により加熱して低温殺菌を行った。段階希釈を行い標準寒天培地に播種し, 出現したコロニーのうち *Bacillus amyloliquefaciens* 様のものを計数した。陽性のコロニーはさらに顕微鏡観察を行い, 芽胞・結晶性タンパク質の比較から供試株であるかを判定した。

統計処理

1 のアンモニア態窒素濃度, 3 の 1 日あたり増体重は Mann-Whitney の U 検定を行った。

家畜福祉

試験に際しては、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号)に準拠した。

結 果

1 アンモニア低減微生物の初期選抜

豚ふん懸濁液での初期選抜の結果、常温菌 11 株、高温菌 23 株が選抜された。また、鶏ふん懸濁液での初期選抜では常温菌 3 株、高温菌 5 株が選抜された。高温菌(50℃で選抜された株)は 70℃では増殖できずアンモニア低減能を發揮しないが、その後 50℃にまで温度を下げると急速に増殖してアンモニア低減能を發揮した。また、50℃で選抜された株は、28℃でも増殖可能でアンモニア低減能を發揮することが示唆された。

これらの株について RAPD 法で多型分析を行ったところ、常温菌は 6 株、高温菌は 5 株に集約され(第 1 表)、管理番号の最も若番の数値を株番号とした。集約された計 11 株について 16SrRNA 遺伝子解析を行ったところ、常温菌は *Bacillus pumilus* が 2 株、*B. thuringiensis* が 2 株、*B. amyloliquefaciens* が 1 株、*Lysinibacillus xylanilyticus* が 1 株であった。また、高温菌は *B. licheniformis* が 4 株、*B. thuringiensis* が 1 株(常温の選抜株とは別株)であった。

2 アンモニア低減微生物の最終選抜

豚ふん懸濁液の培養後のアンモニア態窒素濃度を第 1 図に示す。対照区の培養後のアンモニア態窒素濃度は振とうの有無にかかわらず 4,300 mg/L 程度であった。11

株供試した微生物のうち、振とう培養においてアンモニア低減効果を示したのは B1144 株のみで、それ以外の微生物を添加した場合は対照区とほぼ同様の値であった。B1144 株を添加した場合のアンモニア態窒素低減効果は 66.1%であった。静置培養において最も低減効果が高かったのは B1144 株の 68.0%で、次いで Z 6 株の 65.6%、Z20 株の 60.0%、Z19 株の 28.0%の順であった。それ以外の微生物を添加した場合はアンモニア態窒素の低減効果はみられなかった。振とう培養、静置培養とも最も低減効果の高かった B1144 株のみを供試し、3 反復で同様の振とう培養試験を行った結果、対照区では時間の経過とともにアンモニア態窒素濃度が増加した。B1144 株を添加した場合も継時的に増加したが、その度合いは対照区と比較して緩やかであり、12 時間から 48 時間の間の測定したすべての時間において低減効果が持続される($p < 0.05$)ことが確認された(第 2 図)。

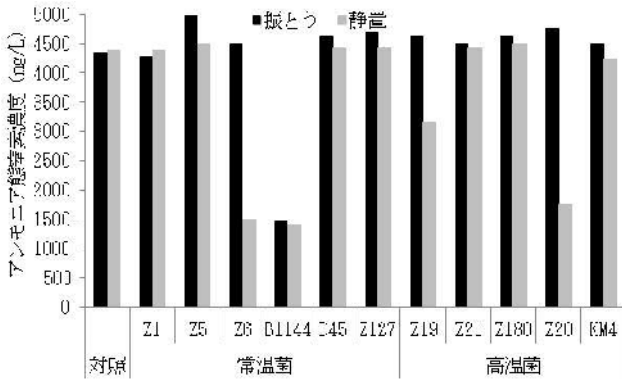
鶏ふん懸濁液の培養後のアンモニア態窒素濃度を第 3 図に示す。敷料懸濁液では 300 mg/L、鶏ふん懸濁液では 600 mg/L 前後と、豚ふん懸濁液と比較して低い値となった。鶏ふん懸濁液においては顕著なアンモニア低減効果を示す株は選抜されなかった。

3 最終選抜株の安全性確認

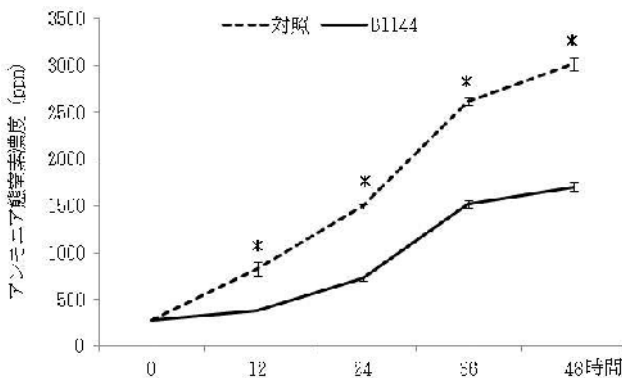
安全性試験の期間中における子豚の毛づや、目、鼻および肛門等の粘膜や肢蹄の状況など、外貌の観察から判断された健康状態は各区とも良好であった。下痢などの排せつ物の異常や、疾病感染の際にみられる巡回行動、発咳といった異常行動も見られなかった。B1144 株を給与した子豚の飼養成績を第 2 表に示す。対照区、常用量区、高用量区の順に、1 日あたり採食量は 1629.2 g、

第 1 表 選抜株の種名

選抜温度	仮番号	選抜畜ふん	管理番号	種名
常温	1	鶏	Z1	<i>B. pumilus</i>
	2	鶏	Z5	
	3	豚	Z144, Z149, Z150, Z151, Z152	<i>B. thuringiensis</i>
		鶏	Z6	
	4	豚	D45	<i>B. amyloliquefaciens</i>
	5	豚	B1144	
高温	6	豚	Z127, Z128, Z129, Z130	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>
	7	豚	Z154, Z155, Z156, Z157, Z190, Z195, Z196, Z197, Z199, Z200, Z201	
		鶏	Z19, Z22	
	8	豚	KM1, KM2, KM3, KM5, KM6, KM7, KM8, KM9	<i>B. licheniformis</i>
		鶏	Z21, Z23	
	9	豚	Z180, Z184, Z186	<i>B. thuringiensis</i>
	10	豚	KM4	
	11	鶏	Z20	

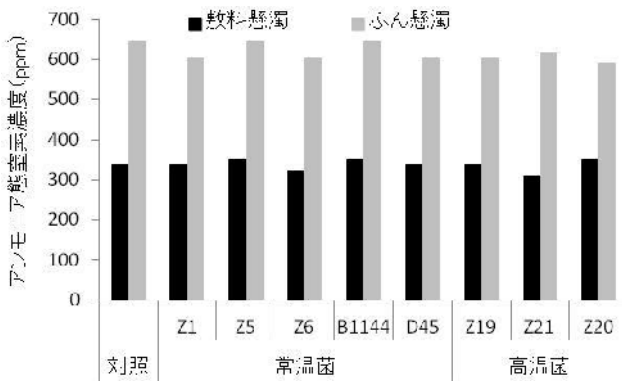


第1図 豚ふん懸濁液の常温培養後のアンモニア態窒素濃度



第2図 B1144株の添加による豚ふん懸濁液中のアンモニア濃度低減効果

- 1) 平均±標準偏差
- 2) * : 有意差あり (p<0.05)



第3図 鶏ふん懸濁液の常温培養後のアンモニア態窒素濃度

1569.0 g, 1613.1 g であった。1日あたり増体重は708.3 g, 698.8 g, 709.5 g であった。飼料要求率は2.30, 2.25, 2.27 であった。1日あたり増体重には試験区間で有意差はなかった。

と畜時の剖検において、各臓器、消化管とも、いずれの区においても異常は見られず、7日後にと畜した子豚についても同様であった。臓器への給与菌株の動態について、いずれの試験区の子豚においても解析した肺、心

第2表 子豚の飼養成績

	飼料摂取量 g/day	日増体重 g/day	飼料要求率
対照区	1629.2	708.3 ±124.1	2.30
常用量区	1569.0	698.8 ±18.2	2.25
高用量区	1613.1	709.5 ±40.8	2.27

- 1) 試験期間：2013.10.15～2013.11.12, 供試頭数：6頭/区
- 2) 日増体重：平均±標準偏差

臓、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、および腸間膜リンパ節への給与菌株の移行は認められなかった。消化管内容物の給与菌数を第3表に示す。試験期間中は菌株給与の有無にかかわらず、胃、十二指腸および空腸の内容物から菌株は検出されなかった。常用量区の子豚では結腸および直腸、高用量区ではそれに加えて回腸および盲腸の内容物で、いずれも飼料中の菌数より少ない菌数が検出された。菌株を混合した試験飼料給与を停止し、菌株を混合しない通常飼料の給与に切り替えてから1週間経過した後にと畜した子豚の消化管内容物から菌株は検出されなかった。

常温培養での豚ふん懸濁液中のアンモニア低減効果と子豚への給与時の安全性が確認されたことから、*Bacillus amyloliquefaciens* B1144株(第4図)を豚舎で発生するアンモニアの低減微生物資材として選抜した。B1144株の性状を第4表に示す。

考 察

著者らは低級脂肪酸低減微生物の選抜に際し、ライブラリーの菌株を個別に培養して低減効果を確認した(前出)。しかし、この手法では多大な手間がかかるため、今回はある程度の数の微生物をまとめてアンモニア添加培地上で培養し、増殖したコロニーの株を採取する手法をとった。ただし、この手法では採取したコロニーの株の同一性は不明であり、複数採取したものが全て同一株ということもあり得る。ここでいう株は亜種の下分類単位で、作物でいうと系統に相当すると考えれば分かり易い。すなわち、同じ種でも株が違っていると性質、効果が異なる。今回は一次選抜株を簡単に有効なランダム増幅多型DNA(RAPD)法により株を識別し、16SrRNA遺伝子解析により種を同定した。こうして株の識別・種の同定を行ったところ、40株が11株に集約された。例えば、常温の豚ふんで選抜されたZ144株と鶏ふんで選抜されたZ6株は、もとは選抜にあたって同じライブラリーから播種された同一株であり、二次選抜の条件下では豚、鶏の双方に効果があるといえる。また、異なる温度帯で選抜された株は別の株と判断され、選抜株にはアンモニアの低減において至適温度帯があるといえる。二次選抜において50℃で選抜された株は28℃でも増殖可能であったことから、高温条件下で選抜された株は常温においてもア

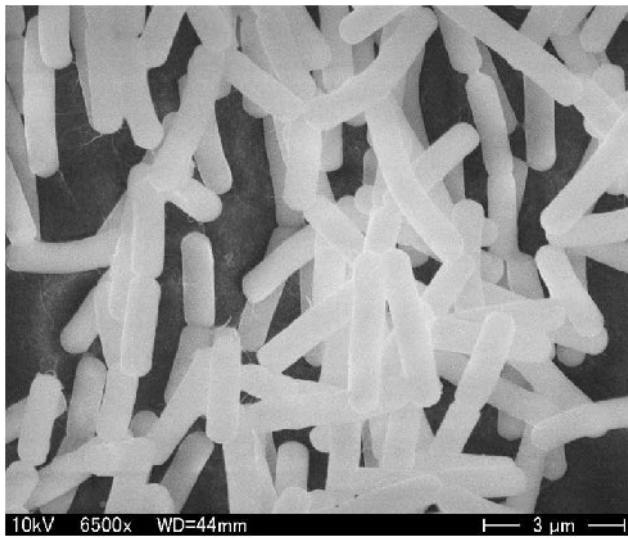
第3表 消化管内容物の B1144 株菌数

単位：CFU/g

		胃	十二指腸	空腸	回腸	盲腸	結腸	直腸
対照区	給与中	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	停止後	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
常用量区	給与中	ND	ND	ND	ND	ND	6.5×10^4	1.7×10^5
	停止後	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
高用量区	給与中	ND	ND	ND	2.5×10^6	4.3×10^5	2.6×10^6	5.1×10^6
	停止後	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

1) ND：検出限界以下

2) 停止後：B1144 株の給与停止 1 週間後

第4図 *Bacillus amyloliquefaciens* B1144 株

第4表 B1144 株の性状

試験	結果	VP テスト	結果
カタラーゼ	+	pH inVP broth < 6	+
オキシターゼ	-	pH inVP broth > 7	+
OF テスト	0	メチルレッド	+
ガス産生	-	インドール	-
Nitric reduction	+	硫化水素	-
カゼイン	+	クエン酸	-
ゼラチン	+	塩分	0-12%
デンプン	+	pH	5-9
		温度	20-50°C

アンモニア低減能を発揮することが示唆されたため、28°Cでの豚ふん懸濁液での最終選抜に供試したが、低減能を示したのは Z20 株の静置培養における試験のみであった。この Z20 株は *Bacillus thuringiensis* であり、もともと常温で増殖する種である。50°Cで選抜された他の株はす

べて高温下で増殖できることが知られている *Bacillus licheniformis* であった。この種は常温では増殖能力が劣ることから、28°Cでの最終選抜では効果がみられなかったものと思われる。

今回、常温でのアンモニア低減菌として最終選抜されたのはすでに資材化済みの B1144 株であった。他の株も豚ふん懸濁液での二次選抜では低減効果を発揮しているが、最終選抜で効果がなかったことを検討したとき、両選抜での違いは①初期選抜では尿の混合はないが、最終選抜ではある、②初期選抜では培地を滅菌したが、最終選抜ではしていない、の 2 点で、最終選抜の方がより現場に近い条件となっている。尿の混合に関しては、混合により pH が上昇することが考えられたが、排せつ直後の尿を供試したこともあり、ふん懸濁液、尿および培養開始時の混合物とも pH は概ね 6~7 であった。培養終了の 48 時間後には概ね 9 まで上昇したが、各株の至適 pH の範囲であることから、影響は及ぼしていないと推察される。滅菌の有無に関しては、豚の腸内細菌叢は乳酸菌群、嫌気性群、好気性群に大別され、そのうち乳酸菌群の *Lactobacillus* が最優勢フローラを構成するが、嫌気性群は偏性嫌気性のものが優勢である (光岡 1987)。本研究では偏性好気性菌と通性嫌気性菌を含む 11 株を二次選抜した。今回、微生物の菌数の動態は解析していないが、好気状態の振とう培養ではふん中の偏性好気性菌が優先的に増殖したことにより B1144 株以外の菌株の生育を阻害し、微好気状態の静置培養では B1144 株を含む微好気下でも生存できる通性嫌気性菌が生存しアンモニア低減効果を示したと考えられた。

鶏ふん懸濁液では明確なアンモニア低減効果を示す微生物が選抜できなかったのも同様に他の微生物の影響によるものである可能性がある。また、鳥類に独特な尿酸というアミノ酸の代謝物の形態が影響した可能性もあるが、今回は検証していない。微生物を用いた鶏のアンモニア抑制は報告が少なく、一色ら (1975) は鶏に乳酸菌を添加した飼料を給与するとアンモニアの排せつ量が低下したとしている一方、篠原ら (2002) はブロイラー鶏ふんの脱臭微生物資材についてアンモニア発生の抑制効果が認められなかったとしている程度である。今回も選

抜微生物による効果が認められず、微生物によるアンモニアの抑制は困難である可能性もあるが、養鶏におけるアンモニアの低減は重要な課題であり、小山ら (2011) はスギ樹皮の被覆により鶏ふん堆肥化過程のアンモニア吸着効果はオガクズの 3 倍であると報告していること等から、今後別の方法で対策を講じていく必要がある。

給与型資材の開発において、安全性の確認が必要である (黒田 2006) が、B1144 株が属する *Bacillus amyloliquefaciens* については農業関係で活用されている報告はほとんどなく、当然豚に対する安全性を検討した報告もない。そこで本報では、豚に給与した際の安全性を確認するため、「飼料添加物の評価基準及びその試験方法 (2007)」を参考に、発育や臓器等への菌株の移行の有無を調査した。B1144 株給与豚の外貌や剖検所見に問題はなく、採食量や増体重は給与しなかったものと遜色なく順調に発育した。菌株の給与を停止して 1 週間後にはいずれの消化管内容物からも B1144 株は検出されなかったことから、消化管に定着し、増殖することはないと推察された。臓器への浸潤もみられず、B1144 株の給与は豚の安全な資材になりうると判断された。また、消化管への定着がないことは、低減効果の維持には肥育期間中の連続給与が必要であることを示唆している。

初期選抜された株のうち、豚ふん懸濁液を用いて検証した最終選抜でも低減効果を示したのは B1144 株のみであった。本試験で豚舎におけるアンモニア対策資材として選抜された B1144 株はすでに水産用に資材化されており、生産性に関する課題は解決されている。B1144 株はタケノコ工場の排水中から採取された微生物であるが、タケノコ工場ではタケノコの皮を処理する際、低級脂肪酸が発生する。ここで、同株を散布すると悪臭が低減することが判明したことから、低級脂肪酸が最も問題となる養豚において低減能を検証したところ、効果が確認された (未発表)。今回、豚ふん懸濁液中のアンモニアを低減する効果が確認されたことから、養豚における複合臭対策としての活用が期待され、そのためには、豚への給与試験により、豚房で発生するアンモニアの低減効果の検証が求められる。

また、今回高温で選抜した微生物の堆肥化試験により、堆肥化過程で発生するアンモニアの低減微生物を最終選抜し、アンモニアを総合的に低減できる資材の開発も重要である。堆肥化過程ではアンモニアの他に悪臭物質として硫黄化合物が発生することが報告されている (高原ら 2001) ことから、その対策も必要となる。こうして開発された複数の悪臭低減微生物を組み合わせた複合臭対策資材を実用化することにより養豚農家の悪臭対策の一助となることが期待される。

謝 辞

本研究は、財団法人福岡県産業・科学技術振興財団「I S T 研究開発 F S 事業」により行われました。深く御礼申し上げます。

引用文献

- 福岡県農林水産部畜産課 (2015a) 畜産経営環境保全の現状と対策 (No. 45). 4.
- 福岡県農林水産部畜産課 (2015b) 家畜飼養頭羽数 (平成 27 年 2 月 1 日現在). 2-3.
- Homidan A. AL., J. F. Robertson, A. M. Petche, 土屋正彦・片山詔司・斎藤忠次・信沢敏一・戸塚耕二 (2011) ブロイラーの生産性に及ぼすアンモニアと粉塵濃度の影響. 畜産の研究 65 : 349-454
- 一色 泰・田先威和夫・中広 義雄 (1975), 鶏に対する乳酸菌の給与がアンモニア産生に及ぼす影響. 日本家禽学会誌 12 : 93-95.
- 小山 太・清水邦義・松原恵理・吉田絵美・近藤隆一郎 (2011), スギ樹皮被覆による鶏ふん堆肥化過程のアンモニア抑制. 木材学会誌 57 : 370-376.
- Kuroda K., D. Hanajima, Y. Fukumoto, K. Suzuki, S. Kawamoto, J. Shima and K. Haga (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.
- 黒田和孝 (2006) 養豚で利用される臭気対策資材. 日豚会誌 43 : 143-167.
- 光岡知足 (1964) 「豚の腸内フローラと消化器系疾患」. 豚病学—生理・疾病・飼養— <第三版>. 近代出版, 東京, p. 107-119.
- 根本 久・東 量三 (1964) 「バチルス属 Genus Bacillus」. 獣医微生物学. 養賢堂, 東京, p. 369-381.
- 農林水産省 (2015a) 畜産経営に起因する苦情発生状況. 農林水産省生産局, 東京, http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kankyo/taisaku/pdf/kujou_2014.pdf (2015 年 9 月 8 日閲覧)
- 農林水産省 (2015b) 平成 27 年 畜産統計. 156-170.
- 農林水産省消費・安全局畜産安全管理課 (2007) 飼料添加物の評価基準及びその試験方法. 社団法人日本科学飼料協会, 東京, p. 43-47.
- 小田原産子・川邊久浩 (2010) 一ブロイラー農場における堆積飼青の現状と課題. 鶏病研報 46 : 13-17.
- 尾上 武・立花文夫・鮫ヶ井靖雄・小山 太・手島信貴・山口昇一郎・浅田研一 (2010 a) アミノ酸添加低タンパク質飼料の肥育豚への給与が季節別の尿量および窒素排せつ量に与える低減効果. 日豚会誌 47 : 1-7.
- 尾上 武・立花文夫・鮫ヶ井靖雄・小山 太・手島信貴・山口昇一郎・浅田研一 (2010 b) 低タンパク質飼料を給与した肥育豚のふん尿の堆肥化過程における窒素動態とアンモニアの発生状況. 日豚会誌 47 : 8-15.
- 尾上 武・下川智子・日下芳友・前田 稔・齋藤浩之・浅田研一 (2015) 低級脂肪酸低減微生物 *Bacillus thuringiensis* D45 株の選抜. 日豚会誌 52 : 143-152.
- 櫻井 純・長濱政博・小林敬子 (1993) 「チューリンゲンシス菌」. イラストレイテッド微生物学. 南山堂,

- 東京, p. 122-123.
- 篠原啓子・福井弘之・沢則之・近藤正治 (2002) ブロイラー鶏ふんへの微生物資材(K3 菌)利用による脱臭効果及び堆肥化への効果. 徳島県立農林水産総合技術センター畜産研究所研究報告 2 : 95-100.
- 高原康光・森千江子・井奈波良一(2001)臭気排出強度による養豚農家の悪臭発生量評価. 臭気の研究 32 : 150-157.
- Tanaka H., K. Kuroda, T. Osada, M. Yonaga, M. Suzuki and M. Inaba(1991)Aerial VFA in animal waste treatment facilities, Anim. Sci. Technol. 62 : 955-962.
- 對馬宣道・向後克哉・太田能之・吉田達行・中尾暢宏・田中 実(2013)冬季における二酸化炭素とアンモニアガス濃度にもとづいた労働環境としての採卵鶏舎の衛生評価について. 畜産の研究 67 : 234-242.
- 代永道裕(1995)悪臭と有害ガス. 畜産環境大事典. 農山漁村文化協会, 東京, p. 25-39.
- 代永道裕(1998)悪臭の防止. 畜産環境アドバイザー養成研修会資料. 畜産環境整備機構, 東京, p. 75-114.