

原 著

## 乳牛ふん尿の液状コンポスト化における微生物活性

岡本 英竜<sup>1</sup>・新堂 ゆい<sup>1</sup>・宮川 栄一<sup>1</sup>・松田 従三<sup>2</sup><sup>1</sup> 酪農学園大学 酪農学部 江別市, 069-8501<sup>2</sup> 北海道大学 大学院農学研究院 札幌市, 060-8589

## Microbial activity on liquid composting of dairy cattle manure

Eiryu OKAMOTO<sup>1</sup>, Yui SHINDO<sup>1</sup>, Eiichi MIYAGAWA<sup>1</sup> and Juzo MATSUDA<sup>2</sup><sup>1</sup> Faculty of Dairy Science, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, 069-8501<sup>2</sup> Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, 060-8589

キーワード：乳牛ふん尿, 液状コンポスト化, 微生物活性

Key words: dairy cattle manure, liquid composting, microbial activity,

## Summary

Liquid composting was examined which uses liquid that is separated from dairy cattle manure. In this case, the metabolic activity of microbes and the structure of bacterial community were investigated. Aeration was performed using the four following methods: continuous aeration, continuous-intermittent aeration (done 8 hours per day after continuous aeration), intermittent aeration done 8 hours per day and intermittent aeration done 12 hours per day. In each of the aeration methods, the metabolic activities of the microbes were not able to be recognized at a period from the onset to 12 hours. The increase in the metabolic activity of the microbes as a result of continuous aeration occurred earlier than that of intermittent aeration. In all aeration methods, the highest value of metabolic activity ranged from 25 to 30°C. In addition, a rapid increase in the temperature of the liquid manure was recognized around indicating the highest value. The bacterial communities formed immediately after aeration were similar in all the aeration methods. It was clarified that changes in the structure of bacterial community were not observed in spite of differences in the temperature transition.

## 要 約

乳牛ふん尿を固液分離した液分を試料として、液状コンポスト化、いわゆる曝気処理をおこない、微生物の代謝活性と細菌群集を分子生態でモニターした。曝気は、連続曝気、連続曝気後8時間/日の間欠曝気、8時間/日および12時間/日の間欠曝気の4つの運転条件でおこなった。すべての実験区において、運転開始後

12時間までは、微生物の代謝活性には変化が無く、微生物代謝が活性化する傾向は認められなかった。微生物代謝活性の上昇が早かったものは連続曝気であり、間欠曝気では、遅れて高まった。各処理区における微生物代謝活性のピークは、25～30°Cの範囲であり、どの処理区においても共通であった。微生物代謝活性の最高値となる時期付近で、液温の急激な上昇が、すべての実験区において認められた。分子生態でのモニターより、すべての実験区において、曝気開始数時間で、初発の細菌群集と異なる細菌群集を形成した。微

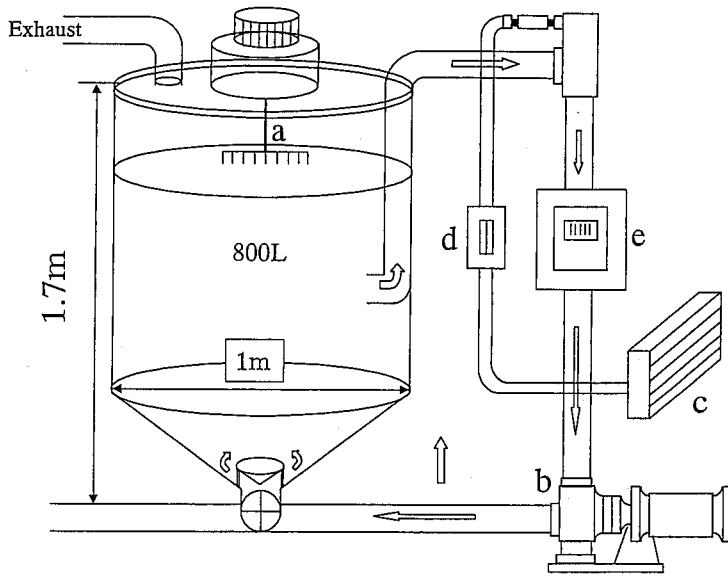


Fig. 1 The structure of aeration tank as experimental apparatus. The arrows show the flow of the liquid manure. a: foam breaker b: circulating pump c: blower d: flow meter of air e: flow meter of liquid manure

生物活性が低い低温ステージと連続曝気において最高温度となった約50℃のステージでの細菌群集構造は同じであり、一度形成された細菌群集は変動しないことが明らかとなった。

## 緒 言

北海道では酪農家戸数が減少しているにもかかわらず、乳牛の飼養頭数は減る傾向にはないことから、近年、一戸あたりの飼養頭数は増加の一途をたどっている。さらに最近では異業種参入もあり、メガファームといわれる数百頭規模の酪農会社が誕生している。多頭飼育の飼養形態は今やフリーストールが当然ようになってきている。

フリーストール牛舎から搬出される乳牛ふん尿に多量の敷料を加え、積極的に堆肥化する酪農家は少なく、敷料の入手困難な農家ではスラリーとして貯留している。このスラリーに対して強制的に空気を送り込む、いわゆる曝気処理があり、敷料なしで固形堆肥と同様の処理効果を期待するものが液状コンポスト化である。この技術は以前より研究がなされているが、物理的あるいは機械工学的な報告(美斎津, 1977; 柿市, 1983; 樋元ら, 1987)が多く、様々な曝気装置が考案された。効率のよい曝気装置としてエジェクター方式のポンプが提案されたが、耐久性と電気代コストから液状コンポスト処理を採択する酪農家が増える傾向にはない。この技術を効率よく低コストで行なうための情報の蓄積が必要であり、低コスト運転のためには、深夜電力の利用などが考えられ、効率的な処理を望む

には有機物分解を担う微生物を制御するための研究が必要とされている。

液状コンポスト処理など家畜ふん尿処理に関する情報は数多くあるが、この分野の微生物情報は、衛生指標の報告(TERNER, 2002)(湊, 2005)はあるが、処理を担う主役の微生物に関する情報を詳細に示したものは少ない(OKAMOTO *et al.*, 1995; OKAMOTO *et al.*, 1997)。近年、分子生物学な微生物解析技術が発達し、様々な環境において、寒天培地で検出される微生物よりもはるかに高い密度で多種多様な微生物集団の存在が確認されてきている(AMANN *et al.* 1995)。つまり、培養法で検出される微生物情報のみで、複雑かつ複合的な微生物集団を説明するには非常に危険である。その分子生物学手法により、培養困難な微生物を検出することができる技術があり、様々な環境での微生物生態の解明が集積しつつある(MUYZER *et al.*, 1993; HIRAISHI *et al.*, 2000; KOBAYASHI, 2006)。

以上のことから、乳牛ふん尿の液状コンポスト処理における効率的な曝気方法を検討するための情報を得るために、連続曝気と間欠曝気を組み合わせた試験をおこない、液状コンポスト化過程における微生物の代謝活性と分子生態をモニターした。

## 材料および方法

酪農学園大学附属農場の糞尿循環研究センター内の地下ピットに貯留されていた乳牛ふん尿を原材料とし、固液分離機(Reime社)にて固液分離した液分(TS 4.6%)を実験試料とした。

曝気装置は図1に示した。1000L容積のタンクに実験試料を800L投入した。曝気は、試料が側面から吸引され、曝気槽外の配管途中より空気が混入され、混和されたものが再び曝気槽底部より戻される方式であった。4機あるそれぞれの運転は、連続曝気処理(連続曝気区)、連続曝気し最高温度到達後に8時間/1日の曝気へと切り替える処理(連続曝気-8時間間欠曝気区)、8時間/1日の間欠曝気処理(8時間間欠曝気区)、12時間/1日の間欠曝気処理(12時間間欠曝気区)とした。いずれの運転も曝気運転時には2m<sup>3</sup>/hの空気が導入された。

試料温度は、各曝気槽内に設置したT型熱電対線より1時間毎に自動測定した。生物化学的酸素要求量(BOD<sub>5</sub>)は試料を適宜希釈したものを20℃、5日間の条件で、BODTrak(HACH company製)にて測定した。揮発性低級脂肪酸(VFA)は、UEKI *et al.*, (1978)の示す試料調整に準じ、ガスクロマトグラフ(GC-

380, GLサイエンス社)を用い定量した。微生物の代謝活性として、微生物細胞内のアデノシン三リン酸(ATP)濃度を測定した。試薬および測定機器はすべてKIKKOMAN社の製品を使用した。試料をHEPES緩衝液(pH 7.75)で10倍段階希釈したものを分析試料とし、微生物細胞内ATPの抽出および発光試薬はルシフェール250プラスを、微生物細胞外ATPを除去するためにルシフェールATP消去試薬セットを用いた。測定にはルミノメーター(K-210)を使用した。ATP濃度を求めるために、ルシフェールATP標準試薬セットにて検量線を作成し、発光強度より算出した。細菌の群集構造は分子生物学的手法にて分子生態で調査した。試料の上清が透明になるまでリン酸緩衝液(pH 7.2)で洗浄と遠心分離を繰り返し、試料より細菌細胞を回収した。HIRAISHI *et al.* (2000)が示した方法を若干改変した方法でDNAの抽出をおこなった。回収した細菌細胞を一度凍結融解したのち、リゾチーム処理した。その懸濁液をビーズビーター(Beads Homogenize Model BC-20, セントラル科学貿易社)で2,000 r.p.m.で2分間細胞破碎をおこない、上清を回収した。この操作を3回繰り返し、得られた細胞破碎液を混合した後、プロテイナーゼK処理(55°C-30分間)、SDS処理(60°C-30分間)、CTAB処理(55°C-30分間)を経て、遠心分離をおこなった。上清を回収後、フェノール処理およびPCI処理によりタンパク除去をおこなった。水層に等量のイソプロパノールと1/10量の3M酢酸ナトリウム(pH 5.2)を加え、-20°Cに2時間静置して遠心分離後、DNAを回収した。最後に70%エタノールで精製し、TE bufferに溶解し、後の分析試料とした。DNAの増幅は、ポリメラーゼチェーン反応(PCR)で16SrDNAを標的とした。一次増幅では、27F(5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3')と907R(5'-CCCGTCAATTCC TTTRAGTTT-3'; R=A or G)のプライマーセットを使用した(PCR条件:93°C-60秒に続き、93°C-30秒, 53°C-30秒, 72°C-60秒を25サイクルの後、最後に72°C-7分間伸長反応)。二次増幅では、Muyzer *et al.* (1993)に示された341F-GC(5'-CGCCC GCCGCGCCCCCGG CCGTCCC GCCGCCCCCGCCCCCTACGGGAGGC-AGCAG-3')と517R(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')のプライマーセットを用いて、いわゆるV3領域と言われるところを標的としたnested-PCRをおこなった(PCR条件:93°C-60秒に続き、93°C-30秒, 59°C-30秒, 72°C-20秒を25サイクルの後、最後に72°C-7分間伸長反応)。変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)解析には、D Code System(Bio-Rad社)を用い、付属のマニュアルに従っておこなった。変性剤濃度勾配は25-65%(7M尿素, 40%脱イオンホルムアミド)で電気泳動は60°Cで65V-18時間おこなった。電気泳動後、ゲルはVistra Green(Amersham Biosciences KK)で染色し、UVイルミネレーター(254 nm)で撮影した。

DGGEで得られた単一バンドの塩基配列を決定する場合、対象のバンドをゲルごとパスツールピペットで切り出し、nested-PCRでのプライマーセットのGCクランプなしの341F(5'-CGGGAGGCAGCAG-3')と517Rのプライマーセットで再度増幅させた(PCR条件は同じ)。得られた増幅産物を分析試料として、Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystem社)と反応させた後、精製し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzerにて解読した。得られた塩基配列を日本DNAデータバンク(DDBJ)のBLASTにて相同性検索をおこない、細菌名の割り当てをおこなった。

## 結果および考察

この実験において、連続曝気-8時間間欠曝気区の運転は、運転開始58時間後に49.7°Cの最高温度となった後、間欠8時間運転に切り替えた。また、12時間間欠曝気区は、運転開始92時間でポンプトラブルのため、データはそれまでのものしか示せないことを予め述べる。

図2に液状ふん尿のBOD<sub>5</sub>の推移を示した。BOD<sub>5</sub>は、易分解性有機物量を示し、その減少は微生物による有機物分解、すなわち液状コンポスト化の進行を示す。連続曝気区および連続曝気-8時間間欠曝気区では72時間後にかけて、速やかにBOD<sub>5</sub>は減少した。8時間間欠曝気区および12時間間欠曝気区の2つの実験区では、24時間後のBOD<sub>5</sub>値は一時上昇し、その後減少に転ずるという推移を示した。総体的に曝気空気量が多いほど、BOD<sub>5</sub>値の減少が顕著であった。

図3には、わが国の悪臭防止法に指定されている低級脂肪酸の4物質について、液状コンポスト化過程の推移を示した。液状コンポスト化の目的の一つに悪臭の低減があることから、これら低級脂肪酸の減少は、液状コンポスト化の効果として、その進行を示す。当初、乳牛ふん尿の固液分離した液分には、プロピオン酸23.9 mM、*n*-酪酸11.05 mM、*iso*-吉草酸2.47 mMおよび*n*-吉草酸2.81 mMがそれぞれ検出された。連続曝気区および連続曝気-8時間間欠曝気区は、暫時減少し、48時間後にはおよそ10%にまで減少した。一方、間欠曝気区は、運転開始後、24時間後に一旦上昇し、その後、減少するという推移を示した。濃度上昇した低級脂肪酸はプロピオン酸のみならず、他の脂肪酸の濃度も僅かではあるが上昇した。このことはBOD<sub>5</sub>の推移と一致することから、両間欠曝気区においては、低温ではあるが、初発の24時間の間に有機物の低分子化が起こっていることが示唆された。両間欠曝気区において、曝気空気量に比例して時間の長い12時間曝気区の方が、より早い低級脂肪酸の減少を示した。低級脂肪酸はすべて検出限界以下になることはなく、*n*-酪酸のみがわずかに残存した。

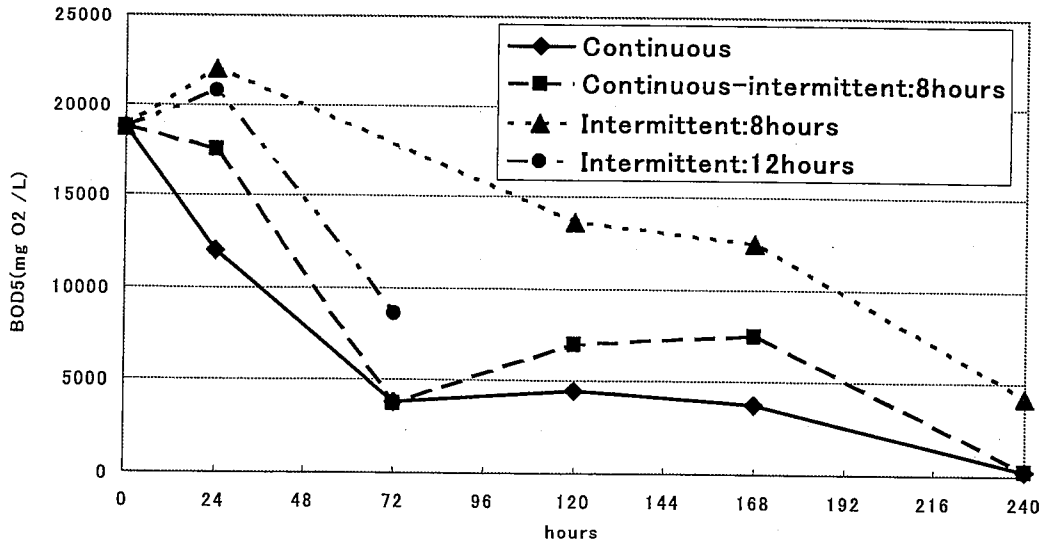


Fig. 2 Changes in the biological oxygen demand of liquid manure.

液状ふん尿の温度と液状ふん尿中に存在する微生物細胞内ATP濃度の推移を図4に示した。微生物細胞内ATPとは有機物代謝の結果得られる生物エネルギーであり、微生物の有機物分解のインジケータとなり、この値が高いほど、微生物の代謝が活発であることを示す。すべての実験区において、運転開始12時間後までは微生物細胞内ATP濃度に変化がないが、温度が上昇している。これは、実験に用いた曝気装置の構造から判るように、循環ポンプによる物理的な熱によるものと思われる(図1)。その後、微生物細胞内ATP濃度の上昇とともに液温の上昇は顕著となっている。連続曝気運転の実験区では微生物細胞内ATP濃度の上昇は

速やかであり、間欠曝気運転の二つの実験区では緩慢であった。しかし、すべての実験区において、微生物細胞内ATP濃度が最高値となる時期付近で、急激な液温の上昇が認められた。このことから液状コンポスト化における液温の上昇は微生物が生産する生物エネルギーが影響を及ぼしていることが理解できる。また、微生物細胞内ATP濃度が最高値を示した時の温度は、どの実験区においても、25~30℃の範囲であった。このことは、液状コンポスト化における微生物の有機物代謝はこの温度範囲が最も高く、この温度帯での著しい微生物増殖が推察され、効率のよい液状コンポスト化をおこなうための一つの指標になると考えられ

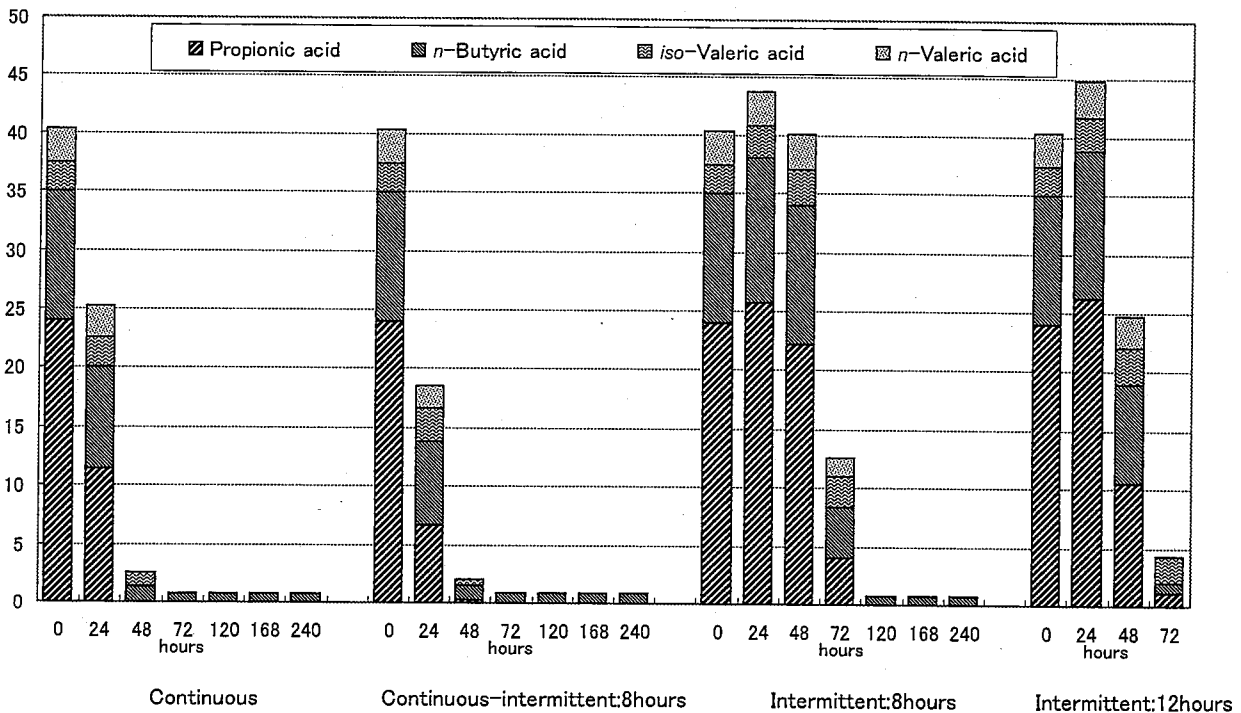


Fig. 3 Changes in the concentration of volatile fatty acid in liquid manure.

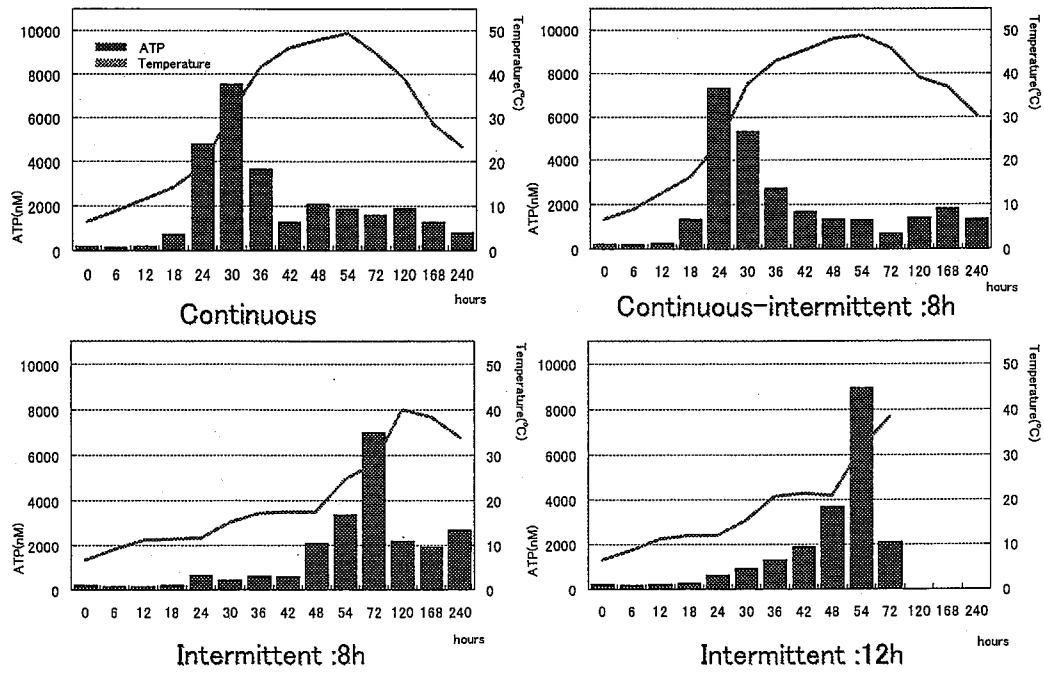


Fig. 4 Changes in the metabolic activity of microbes and temperature of liquid manure.

る。つまり、この温度を保つことで、高い微生物活性を維持し、速やかな液状コンポスト化を進行させることが期待できる。しかし、有機物負荷などの影響も考えられるため、今後の検討が必要である。

以上の液状ふん尿性状の結果より、間欠曝気運転でも連続曝気運転同様、 $BOD_5$ の減少、悪臭であるVFAの低減があり、微生物代謝活性も共通した温度域にあることが明らかとなった。このことより、液状コンポスト化技術については、間欠曝気は有効であり、バッチ式ではなく連続式の処理フローで、液温を25~30°C

環境に保持できるシステムで、なおかつ、夜間運転することで低コスト化が期待できるものと思われる。ただし、この場合の連続式の処理フローでは、昼間の運転停止時の滞留時間中にふん尿が投入されることとなるため、VFAや $BOD_5$ の変動など、その影響を調査する必要がある。

図5には液状コンポスト化過程の細菌群集構造の推移を示した。運転開始前の細菌群集構造とは全く異なる細菌群集を形成したことが明瞭に見てとれる。曝気運転開始直後の低温環境に形成されたその群集構造

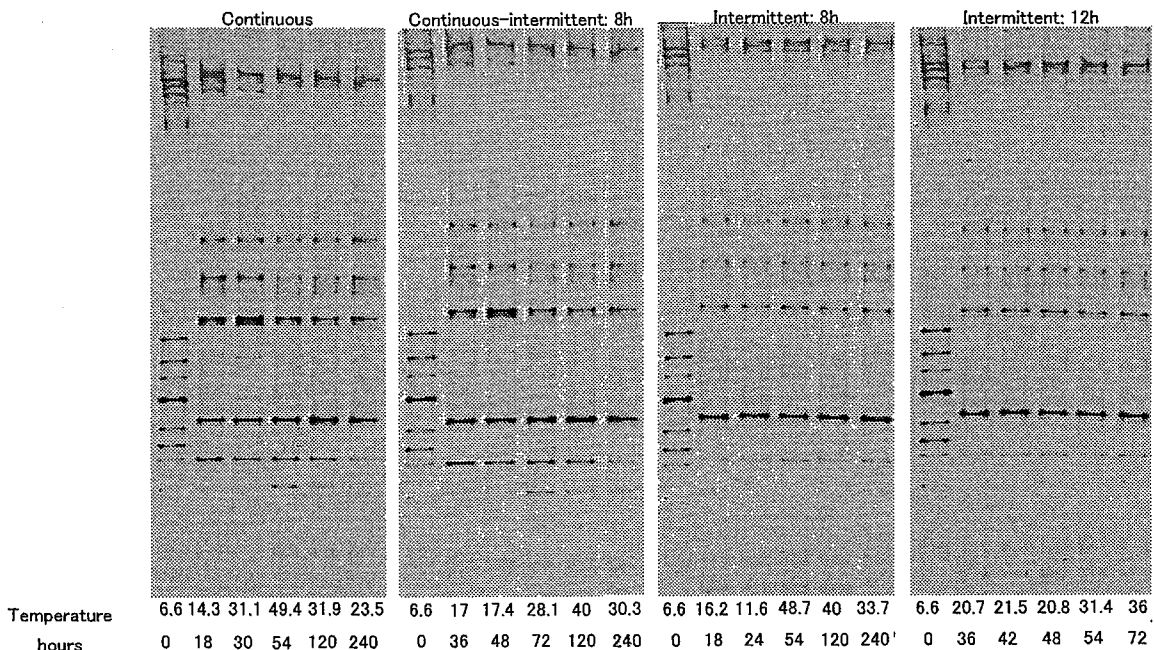


Fig. 5 Succession of the bacterial communities during liquid composting.

は、微生物代謝活性の高い時や50°C 近い温度環境に関わらず、安定しており変動していないことが明らかとなった。PCR-DGGEでの解析は、培養不可能な細菌を検出でき、細菌集団の中で最も密度の高いものから優先的に検出される。逆に言うと、検出されない密度の細菌の変遷は割愛されることになる。事実、本実験において、大腸菌数を培養法にてモニターしており、それらは初発時には約 $10^8$ CFU/mlのレベルで存在していたが、連続曝気の二つの区では運転開始54時間で検出限界以下になり、8時間間欠曝気区においても168時間後に検出限界以下となった。このことは、低密度の細菌群集では大きな変遷が起こっていることを示しており、PCR-DGGEが網羅的な解析方法ではないことに留意が必要である。しかしながら、存在する微生物の密度から考えても、高密度で存在する微生物の代謝活性は、絶大であることは十分と考えられる。DGGEで検出された主要なバンドの塩基配列決定によって、液状コンポスト試料では、*Acinetobacter* spp. (*A. lwoffii*, *A. haemolyticus*, *A. calcoaceticus*, *A. junii*), *Ralstonia* sp., *Rhizobium* sp. や *Ochrobactrum* sp. などの細菌名が割り当てられ、その存在が確認された。曝気していない試料において検出された主要なバンドは、すべて Uncultured bacterium と割り当てられた。

SASAKI *et al.* (2004) は乳牛のパドックから流れ出る汚水を貯めたラグーンにおいて、PCR-DGGEにて、ラグーンの垂直分布の細菌構造の差異を調べている。ラグーン表面と中間部および深部では細菌群集構造に違いがあり、バンドの菌名の割り当てでも未培養なものや未同定のもので相同性の低いものが検出されている。ラグーンの垂直分布は調査されているが、野外フィールド環境において経時変化をモニターするにはかなり多くの試料分析する必要があり、困難を要すると考えられる。家畜ふん尿処理過程の微生物情報は網羅的に調査する必要がある。その点、今回の実験では均質な試料が得られることで、サンプリングの差異が無い。今回得られた微生物情報は、効率のよい液状コンポスト化処理の貴重な情報となりうるとともに、適切な微生物叢を検討する指標となる可能性がある。

## 引用文献

- AMANN, R. I., LUDWIG, W., and K. H. SCHLEIFER (1995) *Microbiology*, Rev. 59, 143-169.
- HIRAISHI, A., IWASAKI, M., and H. SHINJO (2000) Terminal restriction pattern analysis of 16S rRNA genes for the characterization of bacterial communities of activated sludge. *J. Biosci. Bioeng.*, 90: 148-156.
- 樋元淳一・岩淵和則・松田従三(1987)液状家畜ふん尿の好気性発酵による堆肥化II. 最適曝気量と発熱, 北海道大学農学部邦文紀要. 15(3), 266-271.
- 柿市徳英(1980)曝気式ラグーンによる家畜ふん尿処理に関する研究, 日本獣医畜産大学研究報告 29, 117-122.
- KOBAYASHI Y. (2006) Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology: Need for basic and applied science. *Anim. Sci. J.*, 77: 357-385.
- 美斎津康民(1977)液状家畜ふん尿の急速腐熟化技術, 農林水産省畜産試験場年報 17, 135-148.
- 湊啓子(2005)乳牛ふん尿の処理・利用過程における大腸菌の動態と流出防止対策, 畜産技術 604, 6-10.
- MUYZER, G., WAAL, E., and A. UITTERLINDEN (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified gene coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 695-700.
- OKAMOTO, E., MIYAGAWA, E., MATSUI, Y., and J. MATSUDA (1995) Changes of microbial population on liquid composting of dairy cattle slurry. *J. Rakuno Gakuen Univ.*, 20(1): 81-90.
- OKAMOTO, E., MINATO, K., UEMATSU, M., AOYAMA, J., MIYAGAWA, E., and Y. MATSUI (1997) Effects of temperature and aeration on microflora during liquid composting of dairy cattle slurry. *J. Rakuno Gakuen Univ.*, 21(2): 185-191.
- PEDRO, M. S., HARUTA, S., HAZAKA, M., SHIMADA, R., YOSHIDA, C., HIURA, K., ISHI, M., and Y. IGARASHI (2001) Denature gradient gel electrophoresis analysis of microbial community from field-scale composter. *J. Biosci. Bioeng.*, 91: 159-165.
- SASAKI, H., KITAZUME, O., SASAKI, T., and Y. NAKAI (2004) Ammonia-assimilating microbes in microbial community in lagoon for wastewater from paddock of dairy cattle. *Anim. Sci. J.*, 75: 79-84.
- TURNER, C. (2002) The thermal inactivation of *E. coli* in straw and pig manure. *Technol.*, 84: 57-61.
- UEKI, A., MIYAGAWA, E., MINATO, H., AZUMA, R., and T. SUTO (1978) Enumeration and isolation of anaerobic bacteria in sewage digester fluids. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 24: 317-332.