

DNA直接抽出法による土壌細菌群集解析の県内土壌における適応条件

[要約] DNA 直接抽出法において、県内土壌からの DNA 抽出率を高めるためには、抽出バッファーに 5～25mg/ml のスキムミルクを添加することと、ビードビーター処理を 4800rpm で 30s × 3 回繰り返すことが効果的である。また、本条件で抽出した DNA は、PCR-DGGE 法による土壌細菌群集構造解析へ適応できる。

[キーワード] DNA 直接抽出法、PCR-DGGE 法、土壌細菌群集構造解析

[担当機関] 農業研究センター 土壌環境班

[背景・ねらい]

土壌診断において、土壌生物性は化学性、物理性と共に重要な指標であるが、これまでの分析手法は煩雑で多大な時間を要するため県内ではほとんど分析されていない。

近年、従来法に比べると短時間で分析できる DNA 直接抽出法及び PCR-DGGE 法による土壌細菌・糸状菌群集構造解析法が開発されたが、県内土壌では DNA 抽出効率が低く、本手法への適応が困難であった。そこで、DNA 直接抽出法 (図 1) において、県内土壌からの DNA 抽出効率を高める抽出条件を検討した。

[成果の内容・特徴]

1. 供試土壌 (国頭マージ: K1～3、島尻マージ: S1～3、ジャーガル: J1～3) によって傾向は異なったが、5～25mg/ml のスキムミルクの添加で DNA 抽出量は概ね増加した。一方、50～100mg/ml の添加では逆に DNA 抽出量が減少する場合が多かった (図 2)。また、スキムミルク添加による PCR の障害はおこらなかった (データ省略)。

2. 今回試験した 180s までの範囲では、ビードビーター処理の合計時間は同じでも、抽出バッファーを入れ替え 3 回繰り返すことによって、DNA 抽出量が増加した (データ省略)。土壌によっては、処理合計時間が 180s になると DNA 抽出量が減少するものもあったため、30s × 3 回の処理が適当であった。

3. 有機物連用試験圃場の作土について、上記の結果に基づき DNA 直接抽出法及び PCR-DGGE 法による土壌細菌群集構造解析をおこなったところ、多様性指数が化学肥料区では 1.06、牛ふん堆肥施用区では 1.29 であり、本手法の県内土壌への適応性が確認できた (図 3)。

[成果の活用面・留意点]

1. 研究機関において、土壌生物性診断に活用できる。

[残された問題点]

1. 土壌糸状菌群集構造解析への適応性は未確認であるため、今後検討する必要がある。

[具体的データ]

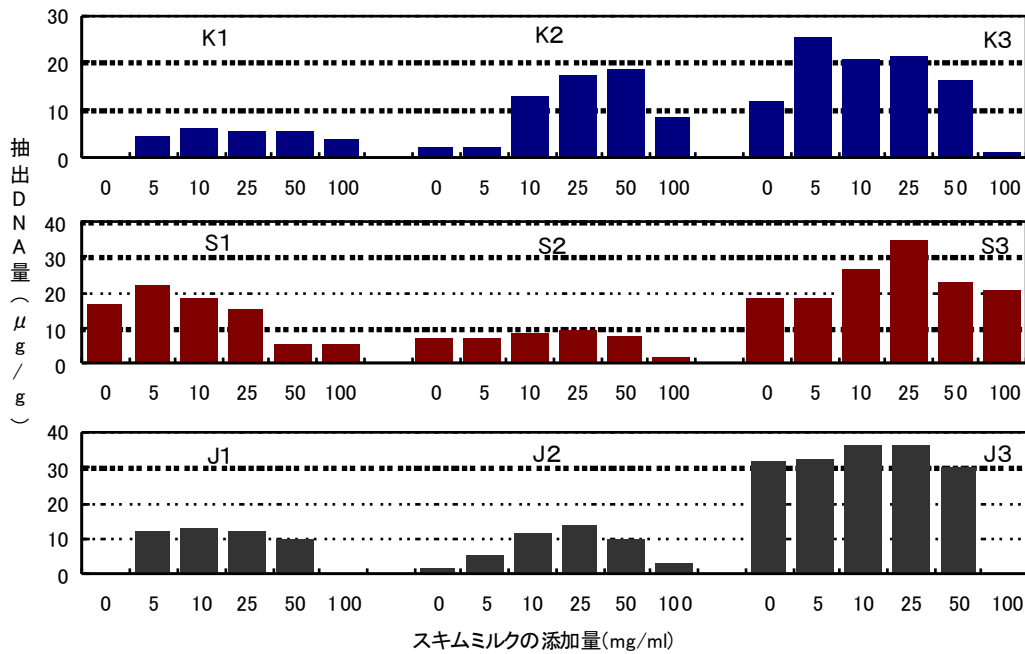


図2 スキムミルク添加量がDNA抽出量に及ぼす効果

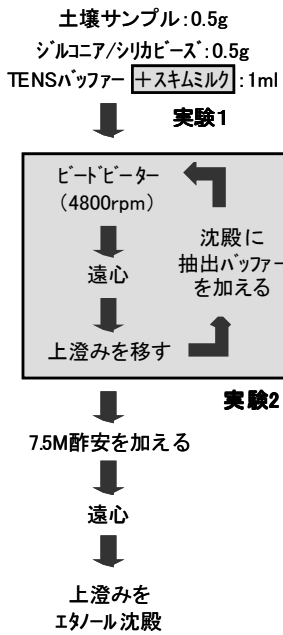


図1 DNA抽出法の概略

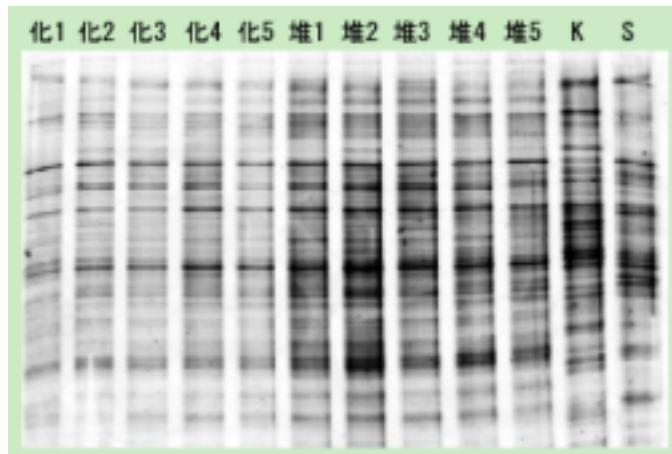


図3 DNA抽出法及びPCR-DGGE法による土壌細菌群集構造解析 (多様性指数: 化学肥料区1.06、牛ふん堆肥区1.29) (化1~5: 化学肥料単用区、堆1~5: 牛ふん堆肥連用区 K, S: 国頭マージと島尻マージの有機栽培圃場・参考)

[研究情報]

研究課題名: 土壌調査における生物性簡易診断法
 課題ID: 2004農30
 予算区分: 県単
 研究期間: 2004 ~ 2006年度
 研究担当者: 宮丸直子、儀間靖、與那嶺介功、亀谷茂
 発表論文等: H17年度土壌微生物学会にて発表
 特許取得予定の有無: 無

加味仏くん蒸一抽出法による土壤微生物バイオマス解析の県内土壤における適応条件

[要 約] ジャーガル等のアルカリ性土壤中には遊離の炭酸カルシウムが多く、抽出液中に土壤微生物由来の有機態炭素ばかりでなく無機態炭素が含まれてしまうため、クロロホルムくん蒸一抽出法で土壤微生物バイオマスを解析するためには、窒素ガスや純空気通気処理による無機態炭素の除去が必要である。

[キーワード] ジャーガル、クロロホルムくん蒸一抽出法、土壤微生物バイオマス

[担 当 機 関] 農業研究センター・土壤環境班

[背景・ねらい]

土壤診断において、土壤生物性は化学性、物理性と共に重要な指標であるが、これまでの分析手法は煩雑で多大な時間を要するため県内ではほとんど分析されていない。

クロロホルムくん蒸一抽出法（図 1）は、TOC 計による有機態炭素分析と組み合わせることにより、従来法に比べると短時間で土壤微生物バイオマス（炭素）を分析できる。しかし、ジャーガル等のアルカリ性土壤中には遊離の炭酸カルシウムが多く含まれ、抽出液中に有機態炭素ばかりでなく無機態炭素が多く含まれることが想定される。そのため、TOC 計で測定する場合に、無機態炭素除去の必要性とその除去法を検討した。

[成果の内容・特徴]

1. ジャーガルの 0.5M 硫酸カリウム抽出液中には無機態炭素が全炭素の 1/2 ～ 3/4 程度含まれており、有機態炭素測定のためには無機態炭素の除去が必要である（図 2）。

2. 無機態炭素の除去率は、窒素ガス通気処理（試料液を塩酸で pH3 に調整後、窒素ガスを 100ml/min 以上で 1 分間通気処理）や純空気通気処理（TOC 計で試料液に塩酸を 1.5% 加え、1 分 30 秒純空気を通気：スパージ処理）では約 98 % であり、充分に無機態炭素が除去されていた。振とう処理（試料液を pH3 に調整後、30 分振とう）は、作業は簡便であるが除去率が 89 % とやや低く、無機態炭素を充分に除去することはできなかった（表 1）。

3. 無機態炭素除去処理によって、有機物施用による土壤微生物バイオマス（炭素）の変化を測定し、本手法の県内土壤への適応性を検討した。その結果、堆肥区や緑肥区で微生物バイオマス炭素が増加していた。また、対象区（有機物施用なし、裸地）の微生物バイオマス炭素は低く推移しており、本手法の適応性が確認できた（図 3）。

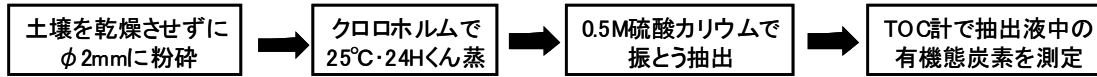
[成果の活用面・留意点]

1. 土壤微生物量の解析及び土壤中可給態養分の推定に活用できる。

[残された問題点]

1. 試料液の劣化を防ぐため、抽出後直ちに冷凍保存する。

[具体的データ]



同様に非くん蒸土壤抽出液の炭素含量測定し、くん蒸した場合の値と差し引きして、ファクター(2.15)をかけたものをバイオマス炭素とする。

図1 クロロホルムくん蒸一抽出法の概略

(本技術では、振とう抽出後に塩酸を添加し、通気処理によって無機態炭素を除去する)

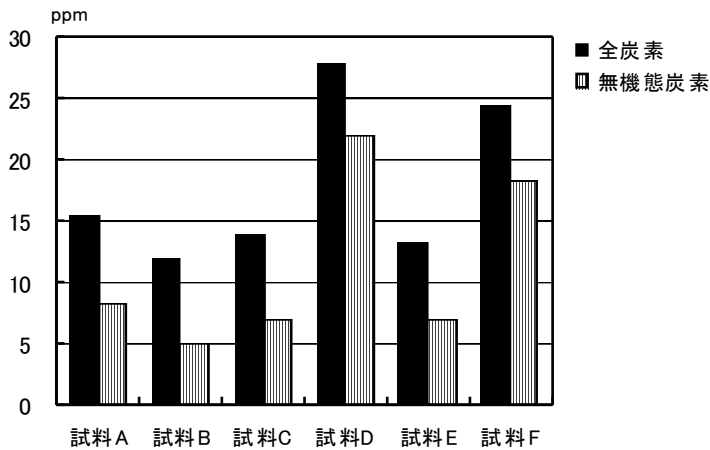


表1 各処理による無機態炭素除去率

	除去率 (%)
振とう区	88.9
窒素ガス区	98.7
スパージ区	97.9

*: 6試料の平均値

図2 ジャーガルの抽出液中に含まれる全炭素および無機態炭素 (試料A~Fはそれぞれ異なった圃場から採取)

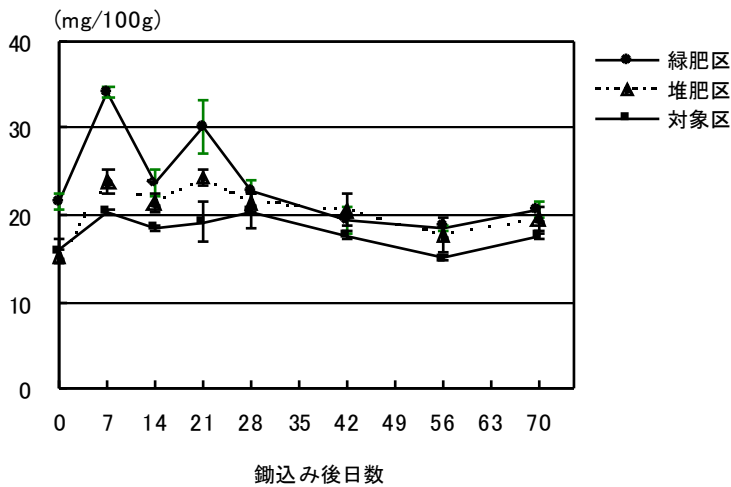


図3 有機物鋤込み後の土壤微生物バイオマス炭素の変動

[研究情報]

研究課題名：土壤調査における生物性簡易診断法

課題 I D：2004 農 30

予算区分：県単

研究期間：2004～2006 年度

研究担当者：宮丸直子、儀間靖、與那嶺介功、亀谷茂

発表論文等：無

特許取得予定の有無：無

セルフクリーニング式オガコ養豚における戻し堆肥の混合利用

【要約】セルフクリーニング式オガコ養豚において戻し堆肥とオガコを 1:1 で混合した敷料はオガコのみの場合と遜色なく悪臭の揮散を抑制することができ、オガコ敷料利用量を減らすことができる。また、1年以内の循環利用では、戻し堆肥中ミネラル濃度に大きな変化はない。

【キーワード】セルフクリーニング式オガコ養豚、戻し堆肥、悪臭対策

【担当機関】沖縄県畜産研究センター 飼養・環境班

【背景・ねらい】

県内の畜産環境問題発生件数は、悪臭が約8割を占め、畜種別では養豚への苦情が約6割を占める状況にある。また、市街化が農村地域に及びつつあることや周辺住民の環境保全意識の向上に伴い、畜産を起因とする悪臭問題は今後ますます増加することが懸念されている。しかし、悪臭対策は非採算部門であり、畜産経営を圧迫することが懸念されることから、低コストで効果的な悪臭対策技術の確立が求められている。そこで、悪臭対策用資材として、家畜排せつ物処理施設から産出される堆肥、浄化処理水および余剰汚泥等の処理物を利用することで低コスト化を図り、さらにその中に含まれる成分や微生物の作用による効率的な悪臭対策技術の確立を目的とする。本研究では、悪臭に効果のあるセルフクリーニング式オガコ養豚における戻し堆肥の混合利用について検討を行った。

【成果の内容・特徴】

1. 豚ふんと敷料資材の混合による臭気成分の揮散抑制について、室内試験により検討したところ、戻し堆肥は豚ふんからのイオウ化合物4物質と低級脂肪酸4物質それぞれの揮散をオガコと遜色なく抑制した(図1)。
2. セルフクリーニング式オガコ養豚(図2)の実証豚舎内における臭気強度は、2.0~2.3の範囲内で推移し、年間平均2.1であり、適正な管理により豚房内気温に関係なく臭気強度は低水準であった(図3)。
3. 戻し堆肥の性状は、カリウム濃度がやや上昇傾向にあったが、他の肥料成分濃度、pH、EC、灰分等に大きな変化はみられなかった(図4)。
4. 1日1頭当たりオガコと戻し堆肥混合敷料の利用量は、年間平均7.0 lとなり、オガコのみの際の利用量と遜色なかった。

【成果の活用面・留意点】

1. 戻し堆肥は、きちんと堆肥化处理し、品温が外気温とほぼ変わらずアンモニア臭が感じられなくなった完熟堆肥を使用する。
2. 長期間にわたる戻し堆肥の循環利用は、堆肥成分の過度な蓄積が懸念される。

【残された問題点】

1. オガコ養豚の具体的な衛生対策方法が確立されていない。

[具体的データ]

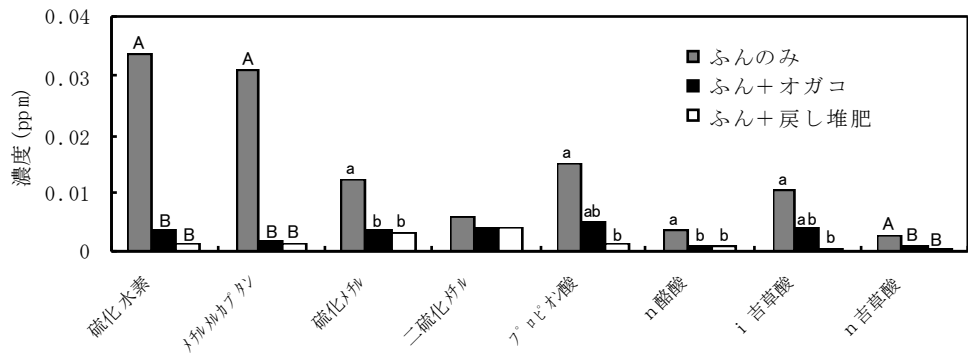


図1 豚ふんと敷料資材の混合による臭気成分揮散の抑制 (室内試験)

注) 大文字(P < 0.01)および小文字(P < 0.05)異符号間に有意差。

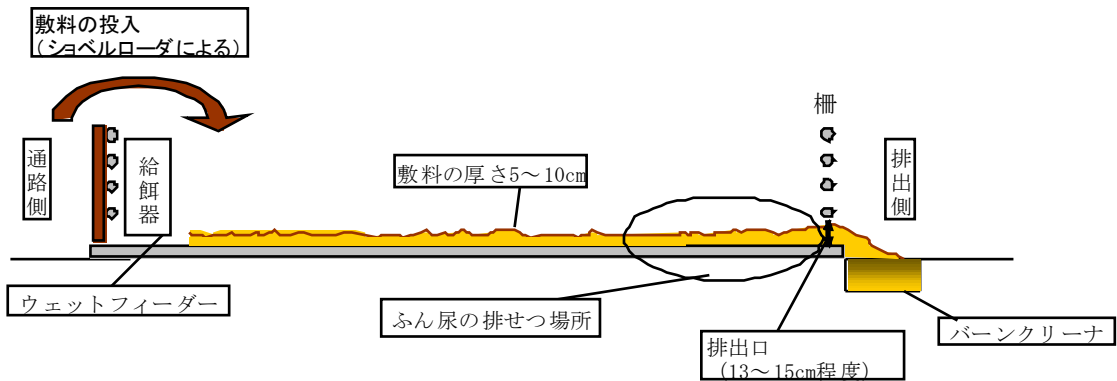


図2 セルフクリーニング式オガコ養豚の概図

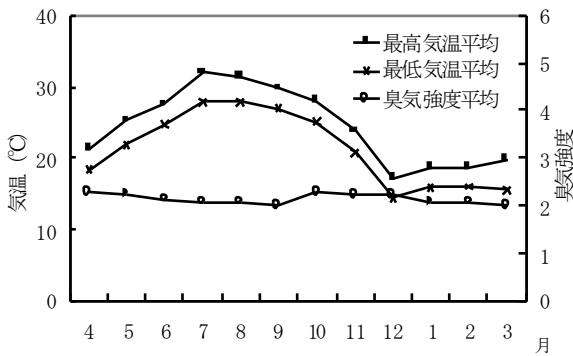


図3 豚房内気温と臭気強度

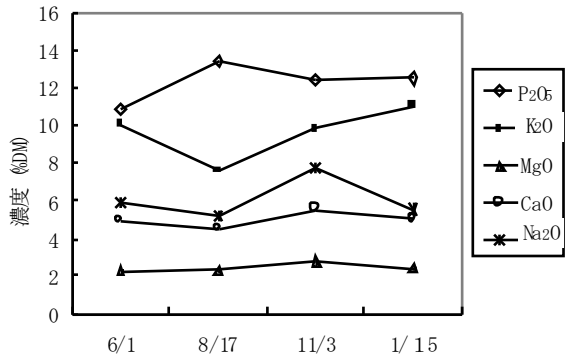


図4 戻し堆肥のミネラル成分

[研究情報]

研究課題名：効率的臭気対策技術の確立

課題ID：2004 畜 022

予算区分：県単

研究区分：実用化研究

研究期間：2004～2006年度

研究担当者：鈴木直人

発表論文等：沖縄畜研セ研報第44号

特許取得予定の有無：無

既存貯留槽を利用した豚舎污水处理技術

[要約] 既存の貯留槽にばっ気装置等を付設し、前処理ばっ気槽として活用することにより、豚汚水中の BOD、窒素、リンそれぞれの浄化槽への負荷軽減を行うことができる。

[キーワード] 豚舎排水浄化処理、貯留槽、前処理

[担当機関] 沖縄県畜産研究センター 飼養・環境班

[背景・ねらい]

豚舎排水を浄化処理し河川や海に放流する技術として、浄化槽内で活性汚泥を培養し、排水を処理する活性汚泥法が一般的に行われている。沖縄県内の養豚農家はふん尿を混合して貯留する形態を取っている農家が多く、高濃度の排水を浄化処理することとなるため、容積の大きな浄化槽および経費を必要とし、さらに豚増頭の際には、さらに新たな浄化槽が必要となる可能性があり、経営拡大の妨げとなることが予想される。そこで、本研究では各養豚農家に既存する污水貯留槽にばっ気処理機器等を付設し、前処理槽として活用することにより浄化槽へ送られる污水の負荷を下げ、浄化槽容積の縮小化および豚増頭時において新たな浄化槽設置の必要がない污水浄化処理対策技術の確立を図る。

[成果の内容・特徴]

1. 豚舎排水中の生物化学的酸素要求量(BOD)濃度はばっ気強度(污水 1m³1 時間当の空気送風量 m³) が強まる毎、日数を経過する毎に顕著に低下し、ばっ気強度 9、12 日間処理で約 90 %の低下を示した(図 1)。

2. 7 槽からなる越流移送式の貯留槽(有効容積約 11m³)にばっ気装置を付設した実証試験(図 2)において、11 日間滞留の設定で第一槽に排水を投入し、ばっ気強度 2 でばっ気処理を行なったところ、排水の pH は上昇し、浄化処理に必要な各成分濃度の低下が見られ、

BOD で約 6 割、全窒素(T-N)で約 3 割、全リン(T-P)で約 4 割低下した。その成分バランスは、

BOD:T-N:T-P = 100 : 24:5 であり、原水の 100:14:3 と比較して、特に窒素比の高い処理水となった(表 1)。

3. 1 t タンクを浄化槽とした回分式浄化処理において、原水を 40L(対照区)および BOD50 %低減を設定して前処理ばっ気した処理水を 80L(前処理区)それぞれ毎日タンクに投入し、さらに、前処理区では、窒素除去技術のばっ気、停止を繰り返す間欠ばっ気を行った。その結果、浄化処理水の BOD、SS 値は、対照区および前処理区それぞれ基準値を下回り、前処理ばっ気を行い污水投入量を 2 倍に増やした前処理区は、対照区と遜色なく浄化された(表 2)。

[成果の活用面・留意点]

1. 豚汚水の過度の前処理は、BOD に対する窒素、リン比率が高くなりすぎるものが懸念されるため、BOD 除去で 50 %程度までの設定に抑える。

[残された問題点]

1. 連続式浄化処理における浄化処理水中の窒素除去

[具体的データ]

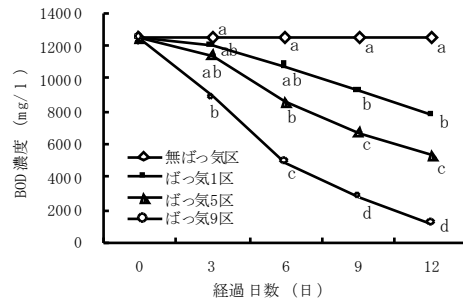


図1 ばっ気強度の違いによるBOD濃度推移(室内試験)

注) 同経過日数の小文字異符号間に有意差 (P < 0.05)。

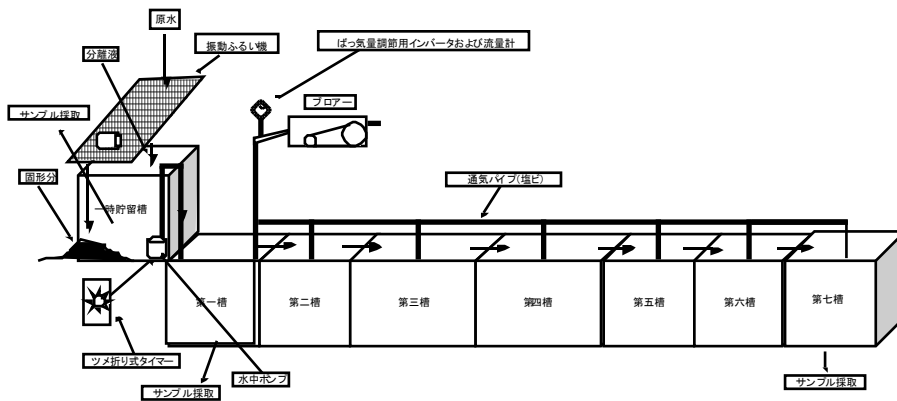


図2 実証試験装置概図

表1 実証試験における成分濃度変化

	BOD mg/l	SS mg/l	pH	EC mS/cm	T-N mg/l	T-P mg/l	T-K mg/l	T-Mg mg/l	BOD:N:P比
原水	8234 A	6353	7.1 A	8.9 A	1183.4 A	261.8 A	1047.6	141.1 a	100:14:3
第一槽	5780 AB	4831	8.2 B	7.5 A	1059.9 AB	168.4 B	1007.8	107.2 b	100:18:3
第七槽	3308 B	4852	8.4 B	5.0 B	790.7 B	153.0 B	1026.7	93.4 b	100:24:5
低下率	59.8	—	—	—	33.2	41.6	—	33.8	

注1) 低下率は原水に対する第七槽の低下率

2) 浄化処理に適したBOD:N:P比は100:5:1

3) 大文字異符号間 (P < 0.01) および小文字異符号間 (P < 0.05) に有意差。

表2 回分式浄化処理における処理水水質

区分	日汚水投入量		pH	BOD mg/l	SS mg/l	NH ₃ -N mg/l	NO ₂ -N mg/l	NO ₃ -N mg/l	T-P mg/l
	L								
対照区	40		8.0	30.1	64.8	22.7	4.6	62.9	30.9
前処理区	80		8.1	44.9	23.2	15.3	3.9	77.5	27.9

注) n=12

[研究情報]

研究課題名：既存貯留槽利用型污水处理技術の確立

課題ID：2004 畜 021

予算区分：県単

研究区分：実用化研究

研究期間：2004～2006年度

研究担当者：鈴木直人

発表論文等：沖縄畜試研報第42号、沖縄畜研セ研報第44号

特許取得予定の有無：無

豚舎排水浄化処理水散布による豚房の臭気低減効果

〔要約〕豚舎臭気低減を目的とした浄化処理水の豚房への散布は、水散布以上の臭気低減が期待できない。また、浄化処理水散布による臭気低減は、豚特有の臭気が、水による影響によりやわらげられることによるところが大きい。

〔キーワード〕豚舎排水、浄化処理水、臭気低減

〔担当機関〕沖縄県畜産研究センター 飼養・環境班

〔背景・ねらい〕

市街化が農村地域に及びつつあることや周辺住民の環境保全意識の向上に伴い、畜産を起因とする悪臭問題は今後ますます増加することが懸念されている。しかし、悪臭対策は非採算部門であり、低コストで効果的な悪臭対策技術の確立が求められている。近年、豚舎排水を浄化処理している養豚農家で、豚舎内の臭気低減を目的に、浄化処理水を循環再利用し、豚房へ散布する農家が散見される。そこで、本研究では、豚舎排水浄化処理水(処理水)の豚房への散布が、豚舎内臭気低減に与える効果について検討した。

〔成果の内容・特徴〕

コンクリート壁で2部屋に仕切られた閉鎖型豚房(2.7m×2.7m、3豚房×2)内に各豚房6頭ずつ収容し、各豚房の上方から散水器(口径0.3mm)により1時間おきに30秒間(日量約100L 夜間散布なし)処理水および水を散布し、豚舎内の揮散した臭気成分濃度等について比較検討した。

1. 処理水と水の散布について比較検討したところ、処理水を散布した豚房の各臭気成分濃度は、それぞれ水散布と比べ高い傾向にあった。すなわち、処理水は、水以上の臭気低減効果が期待できないと考えられた。(表1、図2、3)。

2. 水散布なしと水散布について比較検討したところ、気温に大きな差はなかったが、水散布なしでは粉塵数が多くなる傾向にあった。また、水散布で湿度が高い傾向にあった。さらに、水散布した豚房の各臭気成分は水散布なしと比べ、イオウ化合物類濃度が高く、低級脂肪酸類濃度で低い値を示す傾向にあった。処理水散布による豚舎臭気低減は、低級脂肪酸類を主体とする豚特有の臭気が、水による影響によりやわらげられることによるところが大きいと考えられた。(表2、図3、図4)。

〔成果の活用面・留意点〕

1. 豚舎臭気低減を目的とした豚舎排水浄化処理水の循環再利用における参考資料となる。

〔残された問題点〕

1. 開放型豚舎における効果的な臭気対策技術の確立

[具体的データ]

表1 試料採取時の豚房内環境(処理水と水散布)

区分	粉塵数 cpm	臭気強度	気温 ℃	湿度 %
水散布	37.3	2.9	30.3	97.1
処理水散布	30.5	3.7	29.9	94.8

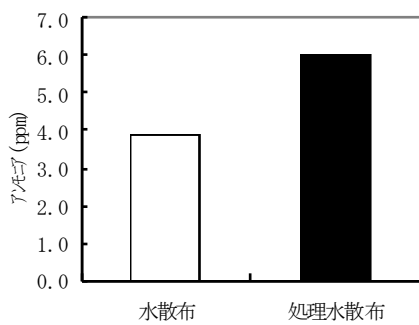


図2 アモニア濃度 (処理水と水散布)

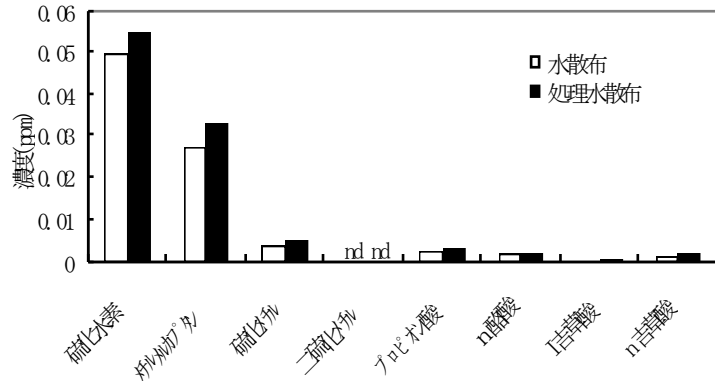


図3 臭気成分濃度 (処理水と水散布)

表2 試料採取時の豚房内環境(散布なしと水散布)

区分	粉塵数 cpm	臭気強度	気温 ℃	湿度 %
水散布なし	75.4	3.4	28.1	88.7
水散布	39.1	2.9	27.9	99.0

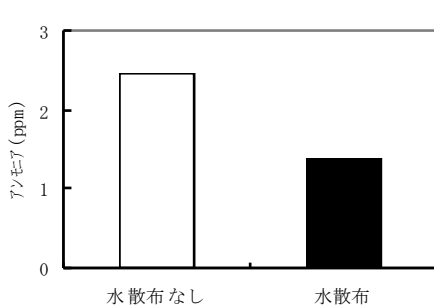


図4 アモニア濃度 (水散布と散布なし)

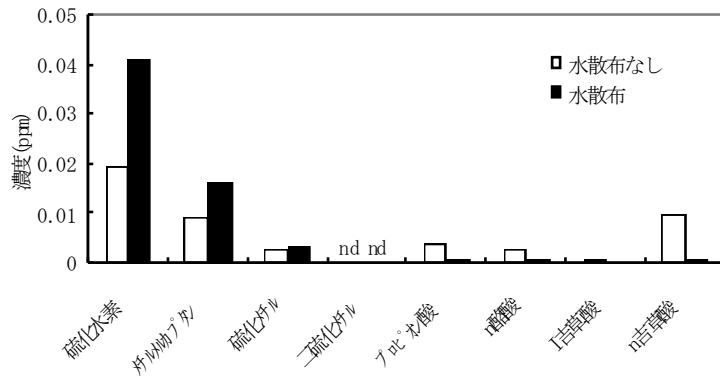


図5 臭気成分濃度 (水散布と散布なし)

[研究情報]

研究課題名：効率的臭気対策技術の確立

課題ID：2004 畜 022

予算区分：県単

研究区分：実用化研究

研究期間：2004～2006年度

研究担当者：鈴木直人

発表論文等：沖縄畜研セ研報第45号掲載予定

特許取得予定の有無：無

黒色色素の膜分離等に関する研究開発

[要 約] バイオエタノール製造の際発生する難分解性黒色色素を含む蒸留廃液について、成分分析を行い性状を把握すると共に、限外ろ過膜を用いた分離法を中心とした色素成分の除去（分離）技術について検討を行った。

その結果、分画分子量 1,000 の膜で色度の約 80%が分離可能であり、残存する色素については、オゾン処理との組み合わせにより、色度 500 以下とすることができた。

一方、蒸留廃液の持つ有用性について検討したところ、蒸留廃液は抗酸化力を有し、ポリフェノールが含まれており、それらは色素分と関連していることが判明した。

[キーワード] バイオエタノール蒸留廃液 膜分離 色素除去

[担当機関] 工業技術センター 食品・化学研究班

[背景・ねらい]

本研究の委託元である株式会社りゅうせきでは、環境省地球温暖化対策技術開発事業において「沖縄産糖蜜からの燃料用エタノール生産プロセス開発およびE3等実証試験」を実施し、バイオエタノールガソリン（E3）への添加用エタノールの原料として甘蔗廃糖蜜の利用技術の確立を目指している。しかし、糖蜜を原料として、アルコール発酵を行う際、発生するアルコール蒸留廃液は有機汚濁度が極めて高く、糖蜜由来の難生分解性な黒色色素が含まれており、その効率的な除去技術は、まだ十分に確立されていない。その一方で、色素成分は抗酸化作用や各種生理活性効果を持つことが知られており、それを分離精製することによって有価物として利用できる可能性がある。

そこで、平成17年度より本事業を受託し、沖縄産糖蜜を原料とした新規アルコール製造試験で発生する蒸留廃液について、成分分析等を行ってその性状を把握すると共に、限外ろ過膜を用いた分離法を中心とした色素成分の除去（分離）技術について検討を行った。

[成果の内容・特徴]

バイオエタノール蒸留廃液について成分分析及び膜分離試験、分離液の機能性評価等を行った。これにより以下の結果が得られた。

- 1.プラント試験毎の蒸留廃液は化学性状がほぼ一定していることが判明した。
- 2.煮沸により色度は増大することや遠心分離により若干色素が分離されることが分かった。
- 3.膜分離試験の結果、ベンチ試験廃液及びプラント試験蒸留廃液は同様の傾向を示し、分画分子量 1,000 の膜で色度の約 80%が分離可能であった。
- 4.残存する色素除去法として、オゾン処理との組み合わせにより、色度 500 以下に脱色が可能であった。この結果からプラント内の雑排水で希釈し、色度を 100 以下とできる見通しが得られた。
- 5.蒸留廃液の有用性に着目し試験を行った結果、蒸留廃液は抗酸化力を有し、ポリフェノールが含まれており、それらは色素分と関連していることが判明した。

[成果の活用面・留意点]

- 1.現在宮古島や伊江島で実施されているバイオエタノール生産プロセス開発事業や県内のいくつかの事業所で製造されているラム酒の製造工程を稼働するために不可欠な廃水の脱色

処理及び有効利用法の一つとして応用が図れる。

成果の活用については本研究の委託者であり、現在バイオエタノール関連事業を実施している(株)りゅうせきへ移転する。本研究の結果については、既に(株)りゅうせきに報告済みである。

2.本事業結果を活用してエタノール蒸留廃水から機能性のある色素分を分離することにより、機能性食品や化粧品などの素材としての応用が図れる。

[残された問題点]

大型膜処理装置へのスケールアップ化、膜の耐久性評価、コストダウン化

[具体的データ]

表1 ベンチ試験及びプラント試験蒸留廃液の化学性状

採取年月日	05. (熊本大学)	06.06	06.11.26	06.11.27		
採取位置	混合	混合	混合	常圧蒸留	減圧蒸留	混合
pH	4.6	4.9	4.5	4.6	4.6	4.6
色度	62000	31700	55700	60900	60400	64300
TOC (mg/l)	49000	36400	57400	62400	72600	68700
COD _{Cr} (mgO ₂ /l)	98000	79200	135000	135000	187000	153000
SS (g/l)	2.6	1.5	3.0	3.5	3.6	4.5
Na (mg/l)	530	400	480	520	540	550
K (mg/l)	18300	15800	18000	18300	18800	19000
Ca (mg/l)	1460	1100	1390	1020	990	1050
Mg (mg/l)	2180	1680	1820	2080	2100	2100
SO ₄ ²⁻ (mg/l)	8710	6460	7190	5360	5140	5380
Cl (mg/l)	12700	11000	9800	11200	11700	11800

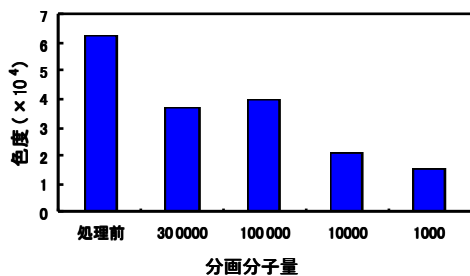


図1 膜処理による色度の変化

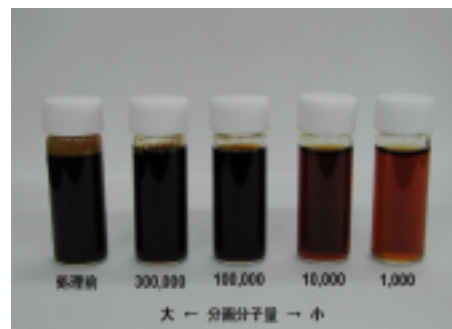


図2 各種分画分子量の膜透過液の色調
透過圧力: 0.05MPa

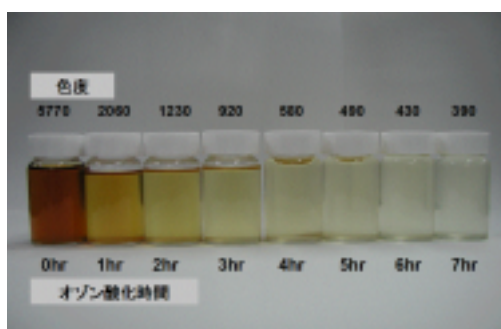


図3 オゾン処理液の色調

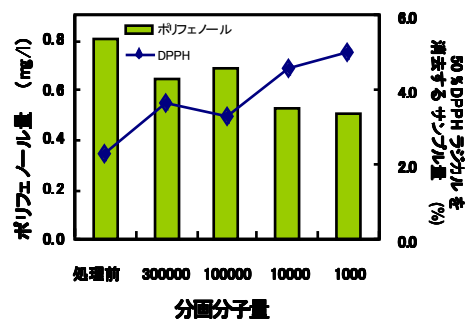


図4 膜透過液画分のポリフェノール量とDPPH消去能

[研究情報]

研究課題名：沖縄産糖蜜からの燃料用エタノール生産プロセス開発およびE3等実証試験
－黒色色素の膜分離等に関する研究開発－

課題ID：2005技013 予算区分：受託 研究期間：平成17～18年度

研究担当者：平良直秀、渡部翔之、仲地健次、市場俊雄、湧田裕子、比嘉真嗣

発表論文等：なし 特許取得予定の有無：なし