

〔醸酵工学 第56巻 第6号 788-793. 1978〕

放線菌による畜産排出物の処理*

田中 米実・田中 稔篤・南里 信也・林田 晋策

九州大学農学部農芸化学科

Treatments of domestic animal feces with actinomycetes. TANAKA, Y., T. TANAKA, N. NANRI, and S. HAYASHIDA (*Department of Agricultural Chemistry, Kyushu University, Fukuoka 812*) *Hakkokogaku* 56: 788-793. 1978.

Several strains of *Streptomyces* species were isolated from domestic animal feces and selected for microbiological treatments of domestic animal feces. These strains grew predominantly in fresh hen and pig feces, formed spores within 30 hr, and assimilated volatile fatty acids. Hen and pig feces were mixed with 30% bentonite or 10% saw-dust and 10% bentonite. The mixtures were inoculated with a selected strain of *Streptomyces* sp. and cultured at 30°C for 14 days. The feces turned white, deodorized within 4 days, and volatile fatty acids, hydrogen sulfide and gaseous ammonia almost disappeared. Some of the isolated strains of *Streptomyces* spp. showed antibiotic activity toward *Xanthomonas oryzae* in manure made of hen feces.

今日、産業廃棄物の処理は環境汚染の防止に加えて、廃棄物の再資源化をも目標としている。畜産排出物(畜ふん)の処理においては、小規模の場合には、肥料化を目的とした乾燥法¹⁾や堆積法²⁾が実施されているが、畜舎や畜ふん処理場におけるアンモニア、硫化水素、低級脂肪酸などの悪臭物質の発生³⁾や、処理ふんの土壌還元に伴う二次的環境汚染⁴⁾が新たな問題を提起しており大量の畜ふんは投棄や焼却によって処理されているのが現状である。

さきに、*Coprinus* 属などの糸状菌、並びに *Candida* 属、*Trichosporon* 属などの酵母の使用による畜ふんの脱臭処理を試み、畜ふんの窒素成分を揮散させることなく、これを菌体たんぱく質に変化させて、有機質に富む肥料を効率的に製造できることを報告した。^{5,6)} 本報では放線菌による畜ふんの脱臭処理を考察実施した。まず、新鮮畜ふん中で旺盛な増殖能と孢子形成能を示し、悪臭物質の1つである揮発性脂肪酸の資化能を併せもつ放線菌を分離選出し、これを畜ふんとベントナイトなどの混合物に接種、培養した結果、揮発性脂肪酸の急速な減少と、硫化水素およびアンモニアの揮散抑制を認め、放線菌が畜ふんの脱臭処理に有用であることを明らかにした。さらに、若干の菌株は畜ふん

で旺盛に増殖して、処理ふん中に、いね白葉枯病に対する抗菌性物質を生産した。

実験方法

試料 市販配合飼料で飼育された肉用豚および産卵鶏のふんを、排出後12時間以内に採取して直ちに実験に供した。

放線菌の分離 分離培地は、新鮮豚ふん 200 g に 800 ml の水を加えて10分間緩やかにかくはんした後、ガーゼで強く搾り、この搾汁に硫酸0.2%と硝酸ナトリウム0.2%を添加し、水酸化ナトリウムで pH 7.6 に調製し、寒天 15 g を溶解し、120°C, 30分間殺菌して調製した。この豚ふん寒天培地は放線菌の分離に特に有用であった。畜ふんや堆肥を主要分離源として、30°C または 50°C で培養を行うことにより、放線菌株を多数分離した。

菌株の選出 上記の分離培地から固形物と寒天を除き、グルコース1%を添加して選出培地とした。分離菌株について 30°C または 50°C で回転振とう培養を行い、その遠沈部を 105°C で乾燥後、無接種の培地を対象として菌体重量を算出して選出した。

培養および菌数 ベントナイト、おがくず、酢酸などの添加物を記載量宛加えた畜ふん(水分60%)約 500 g を、1 l 容三角フラスコへ入れ、無殺菌のまま直

* 廃棄物の微生物処理に関する研究(第6報)

ちに接種した。種菌には殺菌ずみの畜ふん培地による7日間培養物を使用し、これを10% w/w 接種した。放線菌の生菌数は常法^{5,6)}に従い、処理物の希釈懸濁液を適宜作成し、平板法により測定した。培地には放線菌の分離に特に有用と認めた畜ふん寒天培地を使用し、28°C, 7日間、平板培養後、放線菌のコロニーから放線菌数(孢子を含む)を計数した。

孢子形成能 豚ふん寒天培地を使用して、接種時から孢子形成時までの所要時間を比較した。

揮発性脂肪酸資化能 ワックスマン培地(グルコース1.0%, ペプトン0.5%, 肉エキス0.5%, 食塩0.5%, pH 7.0)の炭素源を各種脂肪酸1%で代替し、pH 7.6に調製した培地50mlを500ml容肩付きフラスコへ分注、殺菌した。これに各菌株の一金耳を接種して5日間回転振とう培養の後、遠沈乾燥菌体の重量を比較した。

化学分析 前報同様^{7,8)}各試料を調製、分析した。揮発性脂肪酸は衛生試験法⁹⁾に従った。硫化水素は北川式真空法¹⁰⁾(No. 120B 型硫化水素検知管使用)に準拠し、1l容三角フラスコの試料中へ検知管の先端を挿入し、かくはん後、硫化水素を直接測定した。

抗菌力 鶏ふん400gにおがくず(または粉砕いなわら)100g, ベントナイト50gを添加して水分を60%とし、酢酸でpH 7.0に調製後、1l容三角フラスコに入れて1kg/cm², 30分間殺菌した。各菌株を接種し、30°C, 湿度80%の室で6日間培養後、培地に2倍量の水を添加し、4°Cで約5時間抽出後、遠心上澄液について、いね白葉枯病菌 *Xanthomonas oryzae* H-5809(九大植物病理学教室保存株)を試験菌として、カップ法により抗菌力を測定した。下層培地にはPSA培地¹¹⁾を使用し、試験菌はPSA培地から寒天を除いた培地で往復振とう培養を行った後、これをあらかじめ溶解

して47°Cに保持したPSA培地に接種し、下層培地上に流加して固化した。ステンレス製カップ(外径8mm, 内径6mm, 高さ10mm)を静かに載せ、培養抽出液0.1mlをそれぞれ注入し、4°C, 6時間拡散させた後、30°Cで培養し、阻止帯の直径(mm)を抗菌力とした。

実験結果

有用放線菌の選出 放線菌を30°Cで105株、50°Cで11株分離し、次の3点を検討して選出した。

1) 増殖能 選出培地で5日間培養後、菌体重量を測定して得られた畜ふんでの増殖能優良株をTable 1に示す。

2) 孢子形成能 分離菌株の大半は豚ふん寒天培地上で72時間以内に孢子を形成した。とくに菌株No. 4, No. 13 および No. 33 は30時間で顕著な形成能を示し、処理物の一部返送による半連続処理の場合の種菌としての優秀性を示唆した。

3) 低級脂肪酸資化能 新鮮ふんの揮発性脂肪酸を定量した結果、鶏ふんでは1,300mg/kg, 豚ふんでは2,200mg/kgであった。Table 2に示すように、菌株No. 4 および No. 33 は酢酸、プロピオン酸および酪酸を単一炭素源として速やかに増殖し、脱臭処理への有効性を示唆した。

ベントナイト添加の効果 糸状菌処理に準じて鶏ふんにおがくずを添加して水分を60%前後に調製後、pH 無調整のまま菌株No. 33を培養すると、相当量のアンモニア態窒素が揮散し、従って全窒素は減少した。おがくずの一部または全部をベントナイト(笠岡粘土工業製)で代替して処理を試みた結果、窒素成分の経時変化は、Fig. 1 および Fig. 2 の通り、鶏ふんにベントナイト30%添加、または酢酸1.0%とベントナ

Table 1. Actinomycetes selected for feces treatments.

Microbe	Strain	Source	Cultivation temperature (°C)	Spore color	Growth in screening medium (mg)*	Spore formation time (hr)
<i>Streptomyces</i>	No. 4	Pig feces	50	Light yellow	18	30
<i>Streptomyces</i>	No. 12	Hen feces	30	White	24	42
<i>Streptomyces</i>	No. 13	Cow feces	30	Light grey	22	32
<i>Streptomyces</i>	No. 33	Pig feces	30	Light yellow	28	30

* Growth is indicated as the dry weight of mycelia (mg), after 120 hr shaking in the screening medium (100ml) containing hen feces ca. 20%, (NH₄)₂SO₄ 0.2%, NaNO₃ 0.2%, adjusted to pH 7.6.

Table 2. Assimilations of fatty acids by selected *Streptomyces*.

Microbe		A sole carbon source in medium*			
		Glucose	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid
<i>Streptomyces</i> No. 4	pH**	5.8	8.4	8.5	8.2
	Growth (mg)**	16.0	8.5	10.2	10.4
<i>Streptomyces</i> No. 12	pH	5.8	8.0	8.2	8.1
	Growth (mg)	15.0	6.6	10.5	6.5
<i>Streptomyces</i> No. 13	pH	7.6	8.2	8.0	8.2
	Growth (mg)	11.0	10.0	6.0	10.2
<i>Streptomyces</i> No. 33	pH	6.0	7.8	8.0	8.2
	Growth (mg)	16.0	19.0	16.8	12.4

* A modified Waksman's medium containing glucose or fatty acid as a sole carbon source.

** Mycelial dry weight and pH of the culture after 5 days at an appropriate temperature on a rotary shaker.

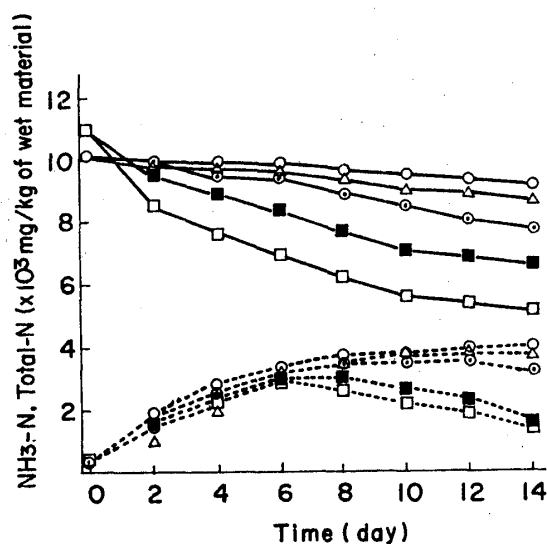


Fig. 1. Change in nitrogen contents in hen feces during the treatment with *Streptomyces*. *Streptomyces* sp. No. 33 was precultured at 30°C for 5 days in medium consisting of hen feces 100 g, acetic acid 1 g, bentonite 5 g and moisture 60%. This seed was inoculated into fresh feces in the inoculum size of 10%. The feces was supplemented with: ■, 20% saw-dust; ○, 20% bentonite; ○, 30% bentonite; △, 20% bentonite and 1% acetic acid; and □, 20% saw-dust without inoculating seed. Contents are expressed as mg/kg of wet material. —, total-N; ·····, NH₃-N.

イト20%の併用添加の場合、さらに豚ふんにおがくず10%とベントナイト10%の併用添加の場合には、アンモニア態窒素の増加にもかかわらず、全窒素はほとんど減少しなかった。生成アンモニアは塩基置換容量の大きいベントナイトに吸着保持され、揮散による悪臭

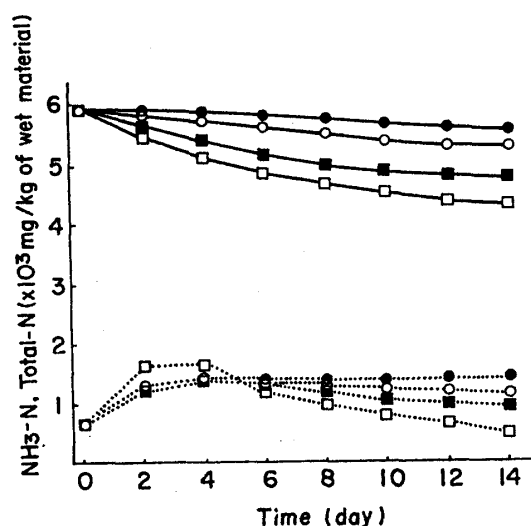


Fig. 2. Change in nitrogen contents of pig feces during the treatment with *Streptomyces*. Fresh pig feces were supplemented with: ■, 20% saw-dust; ○, 10% saw-dust and 10% bentonite; ●, 20% bentonite; □, 20% saw-dust without inoculating seed. —, total-N; ·····, NH₃-N.

発生が防止されるものと考察した。

放線菌による畜ふんの処理 上述の結果に基づき、鶏ふんにはベントナイト30%を添加し、豚ふんにはおがくず10%とベントナイト10%を添加して、直ちに菌株 No. 33 を接種し、30°C、湿度80%の室で培養した。BOD と硝酸・亜硝酸態窒素の経時変化を Fig. 3 に、増殖と揮発性脂肪酸を Fig. 4 に、硫化水素揮散量を Fig. 5 にそれぞれ示した。放線菌は畜ふん中で速やかに増殖して4日目には最高の 5×10^9 /g に達し、品温は2～3日目に最高の 43°C に達して4日目には再び

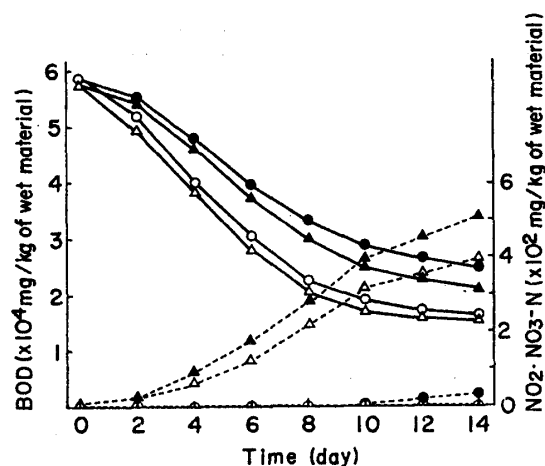


Fig. 3. Changes in BOD and NO_2 , $\text{NO}_3\text{-N}$ during the treatment of feces with *Streptomyces* sp. No. 33.

Fresh hen and pig feces were supplemented with 30% bentonite and 10% saw-dust plus 10% bentonite, respectively.

●, hen feces as control (no inoculation of microorganism); ○, hen feces inoculated with microorganism; ▲, pig feces as control; △, pig feces inoculated with microorganism.

....., NO_2 , $\text{NO}_3\text{-N}$; —, BOD.

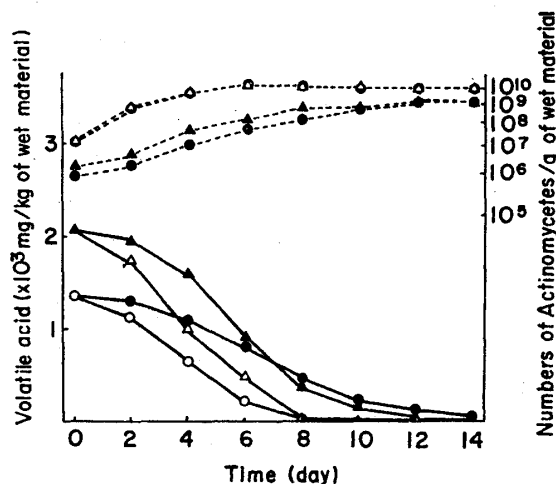


Fig. 4. Changes in numbers of Actinomycetes and volatile acids during the treatment of feces with *Streptomyces* sp. No. 33.

Fresh hen and pig feces were supplemented with 30% bentonite and 10% saw-dust plus 10% bentonite, respectively.

●, hen feces as control (no inoculation of microorganism); ○, hen feces inoculated with microorganism; ▲, pig feces as control; △, pig feces inoculated with microorganism.

....., numbers of Actinomycetes; —, volatile acids.

35°C まで低下した。従って、放線菌の増殖は4日目には定常期となり、畜ふんは灰白色の菌叢に包まれ、硫化水素の揮散は認められず、官能的にも脱臭が認めら

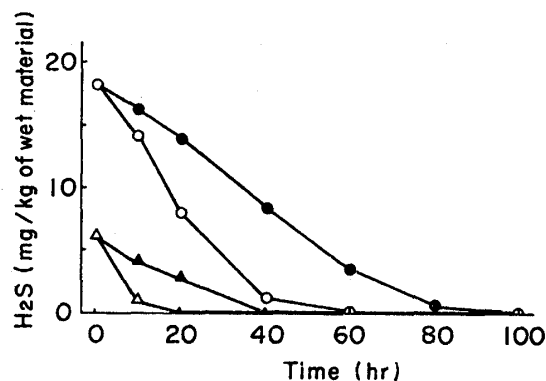


Fig. 5. Change in hydrogen sulfide volatilized during the treatment of feces by *Streptomyces* sp. No. 33. Fresh hen and pig feces were supplemented with 30% bentonite and 10% saw-dust plus 10% bentonite, respectively.

●, hen feces as control (no inoculation of microorganism); ○, hen feces inoculated with microorganism; ▲, pig feces as control; △, pig feces inoculated with microorganism.

れた。しかし、 BOD_{10} は4日目では30%の低下に過ぎず、10日目に漸く 15,000 mg/kg まで低下し、以後はほぼ一定値を示し、長期にわたり極めて徐々に低下した。BOD の変化は処理の進度を示しており、その定常化は処理の終点の指標と考えられる。従って、処理期間を10~14日と定めた。前報⁸⁾ 同様、鶏ふん処理における硝酸態窒素の生成は僅少であった。豚、鶏ふんとも、窒素成分の損失はほとんど認められず、揮発性脂肪酸は速やかに消失し、硫化水素の揮散も対照に比して少なく、菌株 No. 33 は脱臭処理に優れた性能を示した。大腸菌数は処理前の $2 \times 10^7/\text{g}$ から処理後の $1 \times 10^3/\text{g}$ まで減少し、衛生面からも本処理法の安全性が認められた。

処理畜ふんの抗菌力 分離菌株81株を用いて鶏ふんを処理し、その水抽出液を用いて、いね白葉枯病菌に対する抗菌力を調べ、Table 3 に示す通り、若干の菌株使用の場合に明確な抗菌力を認めた。

考 察

畜ふんは速効性および緩効性の窒素成分を含有し、りん酸成分も多く、肥料として優れており、今後も施用が期待されている。しかし、一方では畜ふんの多量土壌還元によって土壌や水系の汚染問題が惹起⁴⁾ され、畜ふんを環境汚染や汚物感のない、しかも取り扱いやすい形態に加工するための技術が要望されている。著者らは再資源化の観点から、生畜ふん中で旺盛に増殖し、有機態窒素を増加させる微生物の分離選択に努め、

Table 3. Antibiotic activities of manures made of hen feces by *Streptomyces*.

Microbe	Strain	Source	Cultivation condition	Spore color	Antibiotic activity on <i>Xanthomonas oryzae</i>
<i>Streptomyces</i>	No. 143	Hen feces	30°C, 7 days	White	13 mm
<i>Streptomyces</i>	No. 145	Hen feces	30°C, 7 days	Light grey	12 mm
<i>Streptomyces</i>	No. 147	Hen feces	30°C, 7 days	Light yellow	15 mm

* Activity is indicated by the diameter of the inhibition zone formed by the cup method with 0.1 ml of the supernatant of manures diluted twofold with water. No clear inhibition zone was detected in the control (uninoculated) manure.

既報^{5,6)}の通り、糸状菌および酵母による畜ふんの脱臭処理法を確立し、現在、中間規模の装置を試作して処理試験を実施中である。本報では、生畜ふん中で顕著な増殖能、孢子形成能および揮発性脂肪酸資化能を示す放線菌を分離し、これを使用する新脱臭処理法について述べた。従来、植物の生育阻害が認められているおがくずの一部をベントナイトに代替して添加剤とした結果、処理困難とされている鶏ふんの場合でもアンモニアの揮散が抑制された。ベントナイトは水分調整のほかに、悪臭物質の吸着による即効的脱臭効果を示し、生成アンモニアを吸着して揮散を防ぎ、次いで放線菌によって悪臭物質が資化されて、脱臭処理が進行するものと考察された。従って、畜舎にあらかじめいなわらやおがくずとともにベントナイトを散布して、ふんとともに回収、処理すれば、汚物感と悪臭揮散の軽減や水分調整に有効で、土壌改良効果も期待される。鶏ふんに酢酸を1%添加してpH7に調製すると、ベントナイト添加量は水分調整に必要な20%にまで減少させることができた。また、処理ふんの一部を半連続的に返送することにより、前報⁷⁾同様、添加物量を一層減少させることができよう。一方、豚ふんでは、アンモニアの揮散は僅少であったが、ベントナイトの10%添加によってアンモニアの揮散はほとんど認められない程度にまで防止された。

以上の通り、畜産排出物にベントナイトなどの適当な添加剤を混入することによって水分を調整し、必要に応じて工業用酢酸でpHを調整して無殺菌のまま真菌類⁸⁾や放線菌の選出菌株を接種すれば、2週間以内に処理物のBODは定常化して、窒素成分に富み、しかも悪臭および汚物感のない灰白色の有機肥料が製造される。さらに、特定の放線菌株の使用によって、処理ふんに、いね白葉枯病菌などの植物病原菌に対する抗菌力を賦与することが可能となった。つまり、処理

物を単に有機肥料の目的だけでなく、各種病虫害の防除にも利用できることが示唆された。

要 約

畜ふん寒天培地を設定して、畜ふんおよびその堆積物から多数の放線菌株を分離し、豚および鶏ふんの処理に有用な菌株を選出した。一優良株 *Streptomyces* sp. No. 33 は無殺菌の畜ふんに速やかに増殖して、30時間以内に孢子を形成し、悪臭物質である揮発性脂肪酸を資化した。本菌を、1%酢酸と20%ベントナイトまたは10%ベントナイトと10%おがくずをそれぞれ添加した鶏ふんまたは豚ふんに接種し、30°Cで培養した結果、畜ふんは速やかに白色菌叢に被われ、4日以内に脱臭された。すなわち、畜ふん中の揮発性脂肪酸、アンモニア、硫化水素などの悪臭物質は、この処理によって速やかに消失した。しかし、BODの定常化を指標として、処理期間は10~14日とした。分離放線菌の数株は、鶏ふんに増殖していね白葉枯病菌に対する抗菌性物質を生産した。

文 献

- 1) 吉田, 鈴木, 原田, 大西: 畜産の研究, **24**, 1117 (1970).
- 2) 伊藤: 同上, **30**, 132 (1976).
- 3) 坂本: 公衆衛生誌, **19**, 315 (1972).
- 4) 遠崎: 公害と対策, **9**, 117 (1974).
- 5) Waksman, S. A.: *Principles of Soil Microbiology*, 15, Williams and Wilkins Co., Baltimor (1932).
- 6) 土壌微生物研究会: 土壌微生物実験法, p. 77, 養賢堂, 東京 (1975).
- 7) 田中, 林田, 本江: 醸工, **54**, 333 (1976).
- 8) 田中, 林田, 本江: 醸酵工学, **55**, 134 (1977).
- 9) 日本衛生学会: 衛生試験法注解, p. 745, 金原出

- 版, 東京 (1965).
- 10) 日本分析化学会: 最新の分析化学, p. 67, 丸善出版, 東京 (1960).
- 11) 根井外喜男: 微生物の保存法, p. 153, 東大出版会, 東京 (1973).
- 12) Taras, M. J., Greenberg, A. E., Hoak, R. D.,
- Rand, M. C.: *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 11th Ed., 527, American Public Health Association Inc., New York (1960).
- (昭52. 9. 3受付)