

## 牛糞スラリーから分離された放線菌

岡本 英竜・塚田 栄・宮川 栄一  
酪農学園大学, 江別市 069

## Actinomycetes isolated from dairy cattle slurry

Eiryu OKAMOTO, Sakae TSUKADA and Eiichi MIYAGAWA

Rakuno Gakuen University, Ebetsu-shi, 069

キーワード：放線菌, 同定, 生育性状, 牛糞スラリー, 液状コンポスト化

Key words : actinomycetes, identification, characterization, cattle slurry, liquid composting

## 要 約

前年の試験 (Okamoto *et al*; 1995) において, 乳牛糞スラリーの液状コンポスト化処理の進行にともなって増加した放線菌群を分離し, 同定をおこない, それらの生育性状を調べた. 分離した放線菌は, 1株は *Saccharomonospora*, 4株は *Micromonospora*, 10株は *Streptomyces* と同定した. *Micromonospora* は pH 7 から 8, *Saccharomonospora* は pH 8 から 9, *Streptomyces* は pH 8 から 10 を生育至適とし, *Streptomyces* の中には pH 11 でも盛んに生育する 2 株があった. また, すべての株がアンモニア利用性を示し, 難分解性炭水化物の利用性においては, セロビオースとキシロースを強く利用する傾向がみられた.

## 緒 論

近年, 社会的に環境汚染を懸念する傾向が強まってきたおり, 酪農にかぎらず畜産業全体に対し, 水質汚濁や悪臭の発生に関して厳しい目が向けられている. 実際には, 家畜糞は堆肥として, 尿は貯留し液肥として耕地に還元されている場合が多く, 良好に処理された堆肥からの悪臭の発生はわずかである. しかし, 尿は嫌気的な状態で貯留されるため, 主に偏性嫌気性細菌の代謝により低級脂肪酸等が蓄積され, それを農地還元した場合は大気中に揮散し悪臭の発生源となる. また, 畜舎の構造上, 糞尿が混合された状態の排泄物が畜舎外にそのまま放置されている様はまさしく還元状態を助長している. 現在, そのような液状の家畜排泄物を好氣的に処理することによって悪臭の発生を減少させ, しかも, 迅速に腐熟させる液状コンポスト化処理が注目されている. 堆肥におけるコンポスト化においては, 多くの研究が報告されているが, 液

状コンポスト化における微生物学的メカニズムについてはほとんどみられない.

我々は液状コンポスト化に關与する微生物を解析しているが, 昨年おこなった長期間曝気試験 (Okamoto *et al*; 1995) において, 好気性中温放線菌群が増加する傾向があることを示した. そこで著者らは, その放線菌群を分離して同定をおこない, それらの生育特性を調べた.

## 実験方法

1. 放線菌の分離 乳牛糞尿を固液分離した液分を 28 日間曝気したスラリーを試料として, HV 寒天平板培地 (Hayakawa, M. and H. Nonomura; 1987) (30℃ 培養) 上に生育した放線菌のコロニーを釣菌し, 同培地に移し培養した.

2. 分離放線菌の同定 分離放線菌の同定は主として清野ら (1985) の方法に準拠しておこなった.

菌体化学組成試験に用いるために ISP No.2 broth にて振盪培養し, 増菌をおこなった後, 菌体を凍結乾燥した. 菌体細胞壁ペプチドグリカンに存在するジアミノピメリン酸 (A<sub>2</sub>pm) の光学異性体の解析は, 凍結乾燥菌体を塩酸加水分解後, 薄層クロマトグラフィー (TLC) にておこなった. 全細胞糖組成 (WCSP) は凍結乾燥菌体を硫酸加水分解し, Gilbert *et al* (1987) の方法により, アルジトールアセテート体に誘導化しガスクロマトグラフィー (GLC) で分析した. メナキノン (MK) 組成の分析は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) でおこない, 既知 MK をもつリファレンス株をもちいて, MK 分子種を決定した.

形態学的特徴は HV 寒天培地上の生育を位相差顕微鏡および走査型電子顕微鏡 (日立 S-2460 N) を用いておこなった.

以上の形態学的特徴と菌体化学組成から, Bergey's manual of determinative bacteriology (Holt *et al* ;

1994) および Bergey's manual of systematic bacteriology (Williams et al; 1989) により同定をおこなった。

3. 分離放線菌の生育性状 生育至適 pH は pH 5~11 の範囲で HV 寒天培地上の生育を比較した。アンモニア利用性試験はグルコース・硝酸塩培地の生育を陽性対照、無窒素源培地の生育を陰性対照として、窒素源を硫酸アンモニウムに置き換えた培地における生育を比較した。難分解性炭水化物の利用性試験は、セルロース、セロビオース、CM-セルロース、キシラン、キチン、ペクチンを基質として 1% となるよう Pridham and Gottlieb (1948) の基礎培地に添加した。基礎培地上の生育を陰性対照、グルコースを添加した基礎培地での生育を陽性対照として比較した。

## 結 果

1. 分離放線菌の同定  $A_2pm$  の解析において、15 菌株中 10 菌株は  $LL-A_2pm$  を有しており、他の 5 菌株は  $meso-A_2pm$  が検出され、3-ヒドロキシ- $A_2pm$  は確認されなかった。 $meso-A_2pm$  が検出された 5 菌株について、WCSP を解析したところ、SA-04 株からはアラビノースとガラクトース、SA-08 からはキシロースとアラビノース、SA-09、-13 および -15 株からはラムノース、マンノース、ガラクトースがそれぞれ特徴的な糖として検出された。また、主なメナキノンとして、15 菌株をそれぞれ分析した結果、 $LL-A_2pm$  を有していた 10 菌株においては、MK-9 ( $H_6$ )、-9 ( $H_8$ ) をもつものと MK-9 ( $H_8$ ) のみをもつものが検出された。SA-04 株は MK-9 ( $H_4$ )、SA-08 株は MK-

-10 ( $H_4$ )、-10 ( $H_6$ )、SA-09、-13 および -15 株は MK-10 ( $H_4$ )、-10 ( $H_6$ )、-10 ( $H_8$ ) がそれぞれ、主要な MK として確認された。

SEM による生育形態について、SA-04 株は気中菌糸上に単一の胞子を形成した。SA-08、-09、-13、-15 株はともに基生菌糸が寒天培地上にわずかに出ている先端に単一の胞子を形成した。特に SA-08 については黒色で粘性のある色素を多く分泌することが認められた。 $LL-A_2pm$  を有していた 10 株は株により胞子形成形態や連鎖数、気中菌糸の分岐形態が異なっていたが、特殊な構造物の形成や基生菌糸の分断が認められなかった (Fig. 1)。

以上のことから、分離した放線菌 15 株は、1 株は *Saccharomonospora*、4 株は *Micromonospora*、他の 10 株は *Streptomyces* と同定した (Table 1)。

2. 分離放線菌の生育性状 pH 5~11 の範囲で HV 寒天培地での生育を比較したところ、*Saccharomonospora* SA-04 株は pH 8~9、*Micromonospora* SA-08、-09、-13 株は pH 7~8、SA-15 株は pH 7~10 に生育至適 pH を示した。*Streptomyces* は pH 8~10 に生育至適 pH を示したが、SA-07 株や SA-14 株は pH 11 でも旺盛な生育を示した (Table 2)。アンモニアの利用性は 15 菌株とも陽性を示した。難分解性炭水化物の利用性は、15 菌株中 14 菌株がキシランを、また、12 菌株がセロビオースを強く利用した。セルロース、CM-セルロースおよびキチンについては陰性対照と同等の生育を示しそれらの強い分解性は認められなかった。ペクチンについては 11 菌株が全く生育せず、SA-05 株のみに利用が認められた (Table 3)。

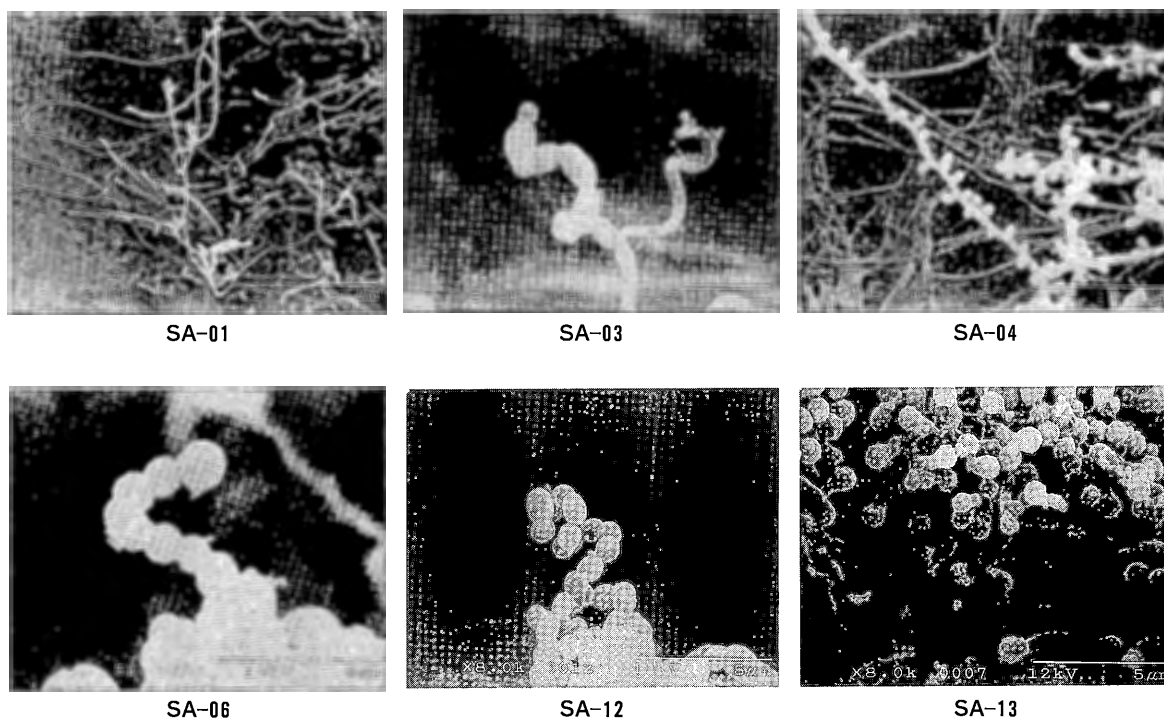


Fig. 1 Morphology of actinomycetes isolated (SEM)

Table 1 The chemical properties and the identification of actinomycetes isolated from slurry

strains	A <sub>2</sub> pm	Diagnostic Whole cell sugar	Predominant menaquinone (MK)	Identification (Genus)
SA-01	LL-	—	-9(H <sub>6</sub> ), -9(H <sub>8</sub> )	<i>Streptomyces</i>
SA-02	LL-	—	-9(H <sub>6</sub> ), -9(H <sub>8</sub> )	<i>Streptomyces</i>
SA-03	LL-	—	-9(H <sub>6</sub> ), -9(H <sub>8</sub> )	<i>Streptomyces</i>
SA-04	meso-	Ara, Gal	-9(H <sub>4</sub> )	<i>Saccharomonospora</i>
SA-05	LL-	—	-9(H <sub>6</sub> ), -9(H <sub>8</sub> )	<i>Streptomyces</i>
SA-06	LL-	—	-9(H <sub>8</sub> )	<i>Streptomyces</i>
SA-07	LL-	—	-9(H <sub>8</sub> )	<i>Streptomyces</i>
SA-08	meso-	Xyl, Ara	-10(H <sub>4</sub> ), -10(H <sub>6</sub> )	<i>Micromonospora</i>
SA-09	meso-	Rha, Man, Gal	-10(H <sub>4</sub> ), -10(H <sub>6</sub> ), -10(H <sub>8</sub> )	<i>Micromonospora</i>
SA-10	LL-	—	-9(H <sub>8</sub> )	<i>Streptomyces</i>
SA-11	LL-	—	-9(H <sub>6</sub> ), -9(H <sub>8</sub> )	<i>Streptomyces</i>
SA-12	LL-	—	-9(H <sub>8</sub> )	<i>Streptomyces</i>
SA-13	meso-	Rha, Man, Gal	-10(H <sub>4</sub> ), -10(H <sub>6</sub> ), -10(H <sub>8</sub> )	<i>Micromonospora</i>
SA-14	LL-	—	-9(H <sub>6</sub> ), -9(H <sub>8</sub> )	<i>Streptomyces</i>
SA-15	meso-	Rha, Man, Gal	-10(H <sub>4</sub> ), -10(H <sub>6</sub> )	<i>Micromonospora</i>

Table 2 The effect of pH on the growth of actinomycetes

strains	pH						
	5	6	7	8	9	10	11
SA-01	—	—	++	+++	+++	+++	+
SA-02	—	—	++	+++	+++	+++	+
SA-03	—	—	++	+++	+++	+++	+
SA-04	—	—	++	+++	+++	++	+
SA-05	—	—	++	+++	+++	+++	+
SA-06	—	—	++	+++	+++	+++	+
SA-07	—	—	++	++	+++	+++	+++
SA-08	—	—	++	++	+	+	—
SA-09	—	—	++	+++	+	+	+
SA-10	—	—	++	+++	+++	+++	++
SA-11	—	—	++	+++	+++	+++	++
SA-12	—	—	++	+++	+++	+++	+
SA-13	—	—	++	++	+	+	+
SA-14	—	—	++	+++	+++	+++	+++
SA-15	—	—	++	++	++	++	+

— no growth  
+ weak growth  
++ moderate growth  
+++ strong growth

Table 3 Utilization of carbohydrate and  $\text{NH}_4^+$  of actinomycetes

strains	carbon source						nitrogen source
	cellobiose	cellulose	CM-cellulose	xylan	chitin	pectin	$\text{NH}_4^+$
SA-01	++	±	±	++	±	±	+
SA-02	++	±	±	++	±	±	+
SA-03	+	±	±	++	±	-	+
SA-04	++	±	±	++	±	-	+
SA-05	++	±	±	±	±	+	+
SA-06	++	±	±	++	±	-	+
SA-07	+	±	±	++	±	-	+
SA-08	++	±	±	++	±	±	+
SA-09	++	±	±	++	±	-	+
SA-10	+	±	±	++	±	-	+
SA-11	++	±	±	++	±	-	+
SA-12	++	±	±	++	±	-	+
SA-13	++	±	±	++	±	-	+
SA-14	++	±	±	++	±	-	+
SA-15	++	±	±	++	±	-	+

++ : utilized strongly  
 + : utilized  
 ± : utilized or not  
 - : not utilized

## 考 察

Poincelot (1975) は堆厩肥における微生物叢の変化について、初期に易分解性有機物を中温性細菌が優勢に分解し、温度の上昇とともに、高温性の放線菌や糸状菌が優勢になりヘミセルロースやセルロースの分解を担っているとまとめている。放線菌はセルロースを分解しないと考えられてきた (Waksman and Cordon; 1939) が, Stutzenberger (1971) はセルロースを分解する高温性放線菌を都市ごみコンポストから分離している。液状コンポスト化においては、液温の上昇があまり認められておらず、温度変化は顕著ではないことから、微生物叢の変化は堆厩肥に比べて多様ではなかったが、放線菌は増加する傾向が認められた (Okamoto *et al*; 1995)。今回の試験において、分離した放線菌群はキシランを分解するが、セルロースを分解するものは認められなかった。

太田ら (1978, 1985, 1988) によって悪臭を分解する微生物に関しての一連の研究がなされており、*Streptomyces* や *Thermoactinomyces* などの放線菌が硫化水素や低級脂肪酸の分解に関与しているとしている。今回臭い成分の分解性は検討していないが、分離株すべてがアンモニウムイオンを窒素源として利用していることから、窒素代謝に関与していることが示唆される。

今回、分離同定された放線菌は堆厩肥にも存在するものと同様と思われ、堆厩肥と同様に、液状コンポスト化においても重要な役割を担っていると考えられる。今後、これらの放線菌の種レベルまでの解析をおこなうとともに、液状コンポスト化における放線菌の生理・生態を詳細に検討していく必要があると思われる。

## 文 献

- Gilbart, J., A. Fox and S. L. Morgan, (1987), Carbohydrate profiling of bacteria by gas chromatography-mass spectrometry: chemical derivatization and analytical pyrolysis. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **6**(6), 715-723.
- Hawakawa, M. and H. Nonomura, (1987), Efficacy of artificial humic acid as a selective nutrient in HV agar used for the isolation of actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* **65**, 609-616.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams, eds. (1994), *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. 605-703.
- Ohta, Y. and M. Ikeda, (1978), Deodorization of pig feces by actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 487-491.
- Ohta, Y. and H. Sato, (1985), An artificial medium

- for deodorant microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 1195-1196.
- Ohta, Y. and Y. Kuwada, (1988), Rapid deodorization of cattle feces by microorganisms. *Biol. Wastes.* **24**, 227-240.
- Okamoto, E., E. Miyagawa, Y. Matsui and J. Matsuda (1995), Changes of microbial population on liquid composting of dairy cattle slurry. *J. Rakuno Gakuen Univ.*, **20**, 81-91.
- Poincelot, R. P., (1975), The biochemistry and methodology of composting. *Conn. Agric. Exp. Sta. (New Haven) Bulletin*, **754**: 1-18.
- Pridham, T. G. and D. Gottlieb, (1948), The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as an aid for species determination. *J. Bacteriol.* **56**, 107-114.
- 清野昭雄, 川本勲, 鈴木健一朗, (1985), 放線菌の同定実験法, "形態, 細胞壁 (菌体成分), イソプレノイド・キノンの項執筆" 5-139. 日本放線菌学会. 東京.
- Stutzenberger, F. J., (1971), Cellulase production by *Thermomonospora curvata* isolated from municipal solid waste compost. *Appl. Microbiol.* **22**(2), 147-152.
- Waksman, S. A. and T. C. Cordon, (1939), Thermophilic decomposition of plant residues in composts by pure and mixed cultures of microorganisms. *SoilSci.* **47**(3), 217-225.
- Williams, S. T., M. E. Sharpe and J. G. Holt, (1989), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. vol. 4.