

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07671

研究課題名(和文) 余剰家畜バイオマス資源の藻類および菌類による再資源化

研究課題名(英文) Resource recovery of animal waste by cultivation of algae and fungi in a liquid medium

研究代表者

皆川 秀夫 (MINAGAWA, Hideo)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：70146520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：家畜排泄物の余剰問題を解決するため牛糞・豚糞尿を液化し藻類・菌類の水耕栽培を試みた。藻類はクロレラ、菌類はヒラタケを選んだ。牛・豚の排泄物は水で10倍希釈し、微細気泡とオゾンの発生装置を用いて浄化処理した。植物の生長に關与する炭素/窒素(C/N)比は牛培地が6.2、豚培地は0.1となり、牛・豚の混合培地がクロレラの生長に有利であることがわかった。最適な混合割合を調べた結果、牛3：豚7の比率のときクロレラの生長量は標準培地に比し最大2.8倍を得た。ヒラタケは人工培地では菌糸の成長が認められたが、牛豚の両培地では菌糸の成長は僅少であった。マグネシウムやナトリウムなどのミネラル過剰が原因と推察した。

研究成果の概要(英文)：To find a practical way of alternative utilization of animal waste surplus, algae and fungi was examined to cultivate in the liquid mediums from cattle solid waste and swine solid and liquid mixed waste. *Chlorella* and oyster mushroom were selected as valuable species of algae and fungi, respectively. The waste was diluted with 10 times of water in volume and treated with the complex generators of fine bubble and ozone gas.

An index of Carbon and Nitrogen ratio (C/N) of the mediums showed 6.2 for cattle medium and 0.1 for swine. This means a mixture of cattle and swine mediums is needed for optimum *Chlorella* production. The most suitable ratio of cattle 30% and swine 70% mediums in volume was obtained, when *Chlorella* production was greatest in 2.8 times more than that of an artificial nutrient medium. Hyphae growth of oyster mushroom was observed for an artificial nutrient medium, but small for cattle and swine mediums due to excessive mineral nutrients such as magnesium or sodium.

研究分野：Biomass recovery

キーワード：家畜排泄物 藻類 菌類 水耕栽培 再資源化

1. 研究開始当初の背景

農林水産省の調査(2016年)によれば、家畜排物量は全国で年間約8,000万t(固体約5,000万t、液体約3,000万t)発生し、そのうち90%が堆肥化、液肥化、浄化、炭化、または焼却によって処理されている。そして河川放流のための「浄化」を除き、そのほとんどが農地還元されている。

しかし、農地還元をみると、家畜堆肥(牛・豚・鶏)では、未熟堆肥の流通による質的問題、耕種農家の高齢化や離農に伴う家畜堆肥利用の減少や敬遠の問題が指摘されている。

また、家畜液肥(豚・牛)については、飼料用農地(トウモロコシ畑・牧草地)への散布を除き、大半は自家農場内の敷地や農地への散布が多く、耕種農家による作物栽培への利用は少ない。

全体として、家畜堆肥、家畜液肥ともに農地還元の問題をかかえ、結果として「余剰問題」が顕在化している。

2. 研究の目的

本研究は、家畜排泄物の余剰問題を解決するため家畜糞尿汚水(牛・豚)を微細気泡とオゾンと併用した装置で浄化し、これを栄養源として付加価値の高い藻類および菌類の水耕栽培を試み、余剰家畜バイオマス資源の再資源化の可能性を探ることを目的とする。

中間成果として、炭素/窒素(C/N)比の向上とミネラルバランスの改善とを目指し、繊維質に富む牛糞を対象にその処理液を栄養源として藻類・菌類の水耕栽培を試みた。

その結果、

(1) 植物栽培の栄養指針となるC/N比は、豚糞尿浄化液(10倍希釈)が0.8であるのに対し、牛糞浄化液(10倍希釈)のそれは8.9となり、牛糞浄化液はC/N比の著しい向上が認められた。しかも、藻類(クロレラ)の生長量は牛糞浄化液が豚糞尿浄化液に比し2.5倍に増加した。

(2) しかし、C/N比の高い牛糞浄化液を使って4種の菌類(カワラタケ、ヒラタケ、サナギタケ、シイタケ)の水耕栽培を試みたが、いずれの菌類とも菌糸の生長は認められなかった。Na⁺などの塩類の過剰が原因と推定された。

そこで、中間成果の問題点を改善するため、最終目的として、次の3点を実施することとした。

- ① 窒素に富む豚糞尿浄化液と炭素に富む牛糞浄化液との補完効果をねらい、それらの「混合浄化液」を栄養源として藻類(クロレラ)の液体培養を試み最適な混合割合を調べた。
- ② 牛糞浄化液から塩類を除去して菌類(ヒラタケ)の水耕栽培を試みた。
- ③ これらより本研究の総括を行った。

3. 研究の方法

(1) 浄化液の調整

北里大学獣医学部附属FSC十和田農場の牛舎・豚舎から生牛糞と豚糞尿汚水とを各4L採取し、水道水で10倍希釈後、牛糞希釈液は繊維質をミキサーで長さ数ミリに裁断、それらを微細気泡発生装置(最大発生気泡径1μm)とオゾンガス発生装置(室内空気、100~1000mg/hr)とを併用した浄化・殺菌・脱臭・脱色が期待される「浄化装置」(ミクスター、FS302-SW1型、グリーンブルー(株))を用いて1~7日間、曝気処理した。この牛糞浄化液と豚糞尿浄化液とを藻類・菌類の培養に利用、浄化液の成分を調べた。

藻類の培養では、牛糞浄化液と豚糞尿浄化液との混合割合として(牛1:豚9)など計5種を設定した。菌類の培養では、牛糞浄化液から過剰な塩化ナトリウムを除去するためRO膜処理水装置((株)環境テクノス、RTA-200W)を使用した。

(2) 藻類の選定と培養

藻類・食用として用いられ過酷な環境下でも増殖が可能とされるクロレラを選定した。供試株は(独)国立環境研究所微生物系統保存施設(NIES)から入手したクロレラ(*Chlorella sorokiniana* Shihira and Krauss)を用いた。

クロレラを「クロレラ標準培地」を用いて復元培養し、増殖した供試株3mLずつを、200mL容三角フラスコに「浄化液」100mLとその比較対象として「標準液」100mLとを注入した2種類の培養ビン計8本にそれぞれ添加し、pH調整(6.5)後、恒温槽を用いて標準環境条件「25℃、明期/暗期10/14hr、照度6000lux」で3週間培養した。

藻類の増殖量の指標としてクロロフィルa濃度をアセトン抽出法により分析した。

(3) 菌類の培養とリグニン分解酵素の計測

供試菌は、液体培養が可能な白色腐朽菌の一種、ヒラタケ(*Pleurotus ostreatus*)の菌株を(独)製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター(NBRC)より入手した。

このヒラタケ菌株を「ヒラタケ標準培地」を用いて復元培養し、雑菌混入を避けるためクリーンベンチ内で200mL三角フラスコに「標準液」125mLと「浄化液」125mLとを注入した2種の培養ビン計6本にそれぞれ菌株を適量添加した。これらの培養ビンを「暗室、28℃」の環境条件に設定した恒温槽に入れシェイカーで1週間、振とう培養した。

その後①光学顕微鏡による菌糸観察、②「紫外線吸収法」によるリグニン分解酵素の濃度測定を行った。

4. 研究成果

(1) 浄化液の栄養成分

牛糞と豚糞尿とを「浄化装置」により処理したとき脱色変化を図1に示した。

豚糞尿の浄化液は1日で透明になったが、牛糞尿のそれは1週間たっても透明度は低く培養液として使用するため遠心分離しても脱色変化は僅少であった。

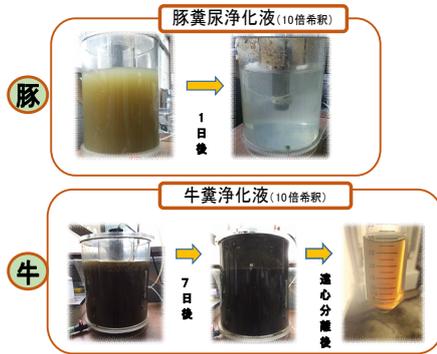


図1. 浄化装置による豚糞尿と牛糞の脱色変化

藻類（クロレラ）の培養液に用いた各種浄化液の栄養成分を、標準培地を基準（100%）として表1に示した。

表1. 藻類（クロレラ）培養水の栄養成分の比較

項目	標準培地 (クロレラ) (mg/L)	牛糞浄化液 (10倍希釈) (mg/L)	豚糞尿浄化水 (10倍希釈) (mg/L)
T-C	239 (100%)	740 (310%)	21 (9%)
T-N	127 (100%)	120 (94%)	180 (142%)
T-P	7 (100%)	78 (1,110%)	11 (157%)
K ⁺	40 (100%)	260 (650%)	230 (575%)
Na ⁺	134 (100%)	130 (97%)	53 (40%)
Mg ²⁺	4 (100%)	110 (2,750%)	10 (250%)
Ca ²⁺	26 (100%)	42 (162%)	22 (85%)
C/N比	1.9 (100%)	6.2 (326%)	0.1 (5%)

エネルギー成分に注目すると、T-C（全炭素）は、標準培地を基準にすると、豚糞尿浄化水では0.1倍に対して牛糞尿浄化水のそれは3.1倍になった。またT-N（全窒素）は、標準培地に比し、牛糞浄化液が0.9倍、豚糞尿浄化水が1.4倍となった。牛糞浄化液は炭素成分に富み、一方豚糞尿浄化液は窒素成分に富むことが分かった。

ミネラル成分に注目すると、牛糞浄化液ではT-P（全リン）が標準培地に比し11倍、Mg²⁺が27倍も多かった。

これらのことより藻類の培養には牛糞浄化液と豚糞尿浄化液との「混合液」が有利であることが示唆された。

表2. 菌類（ヒラタケ）培養水の栄養成分の比較

項目	標準培地 (ヒラタケ) (mg/L)	牛糞浄化水 (mg/L)	ろ過水 (mg/L)	ろ過水(A) (グルコース添加) (mg/L)	ろ過水(B) (沈殿物添加) (mg/L)
T-C	4300 (100%)	560 (13%)	60 (1%)	4300 (100%)	4300 (100%)
T-N	1400 (100%)	110 (8%)	13 (1%)	10 (1%)	250 (18%)
T-P	350 (100%)	75 (21%)	1 (0%)	0 (0%)	70 (20%)
K ⁺	2 (100%)	260 (13,000%)	72 (3,600%)	70 (3,500%)	71 (3,500%)
Na ⁺	18 (100%)	150 (830%)	49 (270%)	50 (280%)	51 (280%)
Mg ²⁺	82 (100%)	79 (96%)	44 (54%)	40 (49%)	780 (950%)
Ca ²⁺	0	41	3	0	30
C/N比	3.1 (100%)	5.1 (165%)	4.6 (148%)	430 (13,900%)	20 (645%)

菌類（ヒラタケ）の培養液に用いた各種浄化液の栄養成分を標準培地のそれを基準（100%）として表2に示した。

塩類過剰を軽減するため牛糞浄化液を対象にRO膜処理したろ過液はK⁺が1/4、Na⁺が1/3、Mg²⁺が1/2と軽減したものの、3大栄養素（T-C、T-N、T-P）もそれぞれ1/9、1/8、1/75と著しく低下した。

そこで、この問題を改善するため、ろ過液に標準培地の栄養成分を参考に、「グルコース」と牛糞浄化液を遠心分離した際得られた「沈殿有機物」との2種類をそれぞれ添加した成分も表2に併記し、これらの添加培養液も菌類（ヒラタケ）の水耕栽培に用いた。

(2) 藻類（クロレラ）の培養と最適混合割合
クロレラを21日間培養し、各混合培養液のクロロフィルa量（平均値）の変化を「標準培地」と比較して図2に示した。

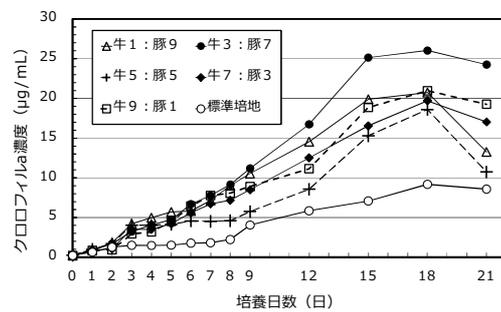


図2. 牛糞・豚糞尿の混合割合がクロレラのクロロフィルa濃度(平均値)の変化に及ぼす影響

「牛5:豚5」の培養液を除き、他の4種の培養液は9日目まで緩やかに増殖、その後急激に上昇、18日に5種の培養液はいずれも最大に達した。最大値に注目すると、「牛3:豚7」の培養液が最大を示し、「標準培地」に比し2.8倍も増加した。他の4種の培養液間では最大値に有意差はなかった。この理由として「牛1豚9」では炭素源の栄養不足、他の3種培養液では、培地の透明度が低くクロレラの生長を阻害したためと、それぞれ考察した。

(3) 菌類（ヒラタケ）の培養と菌糸の生長
4種の培養液でヒラタケを培養したときの菌糸の生長を図3に示した。

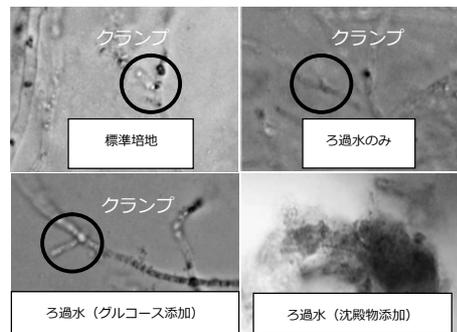


図3. 光学顕微鏡による菌糸の生長観察

菌糸の生長指標となる隔壁側面に生じる小さなこぶ状突起の「クランプ」は「沈殿物

添加」を除く 3 種の培養液で認められた。しかし紫外線吸収計測では「標準培地」を除きリグニン分解酵素の生成は僅少であった。これはろ過水のミネラルバランス (T-P の不足、K⁺の過剰、Mg²⁺の不足) が原因と推定した。

過去 3 年間の総括として、次の成果を得た。

- ① 藻類 (クロレラ) の培養では、「牛 3 : 豚 7」の「混合浄化液」(水 10 倍希釈) が最もクロレラの生長を促進させ、「標準培地」に比し 2.8 倍にもなった。
- ② 炭素に富む「牛糞浄化液」と窒素に富む「豚糞尿浄化液」との補完効果を見出し、家畜排泄物の再資源化に新たな道筋をつけた。
- ③ 牛糞・豚糞尿 (水 10 倍希釈) の前処理に用いた、微細気泡とオゾンガスを併用した「浄化装置」は、浄化・殺菌・脱臭・脱色が認められ、藻類の培養に有効であった。
- ④ 菌類 (ヒラタケ) の培養では、牛糞浄化水を RO 膜で塩類調整した「ろ過水」に菌糸の生長を確認できた。
- ⑤ しかし「ろ過水」のリグニン分解酵素の生成は僅少であった。依然、ミネラルバランスに問題があると推定され、残された課題となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 皆川秀夫 他、家畜排泄物の藻類および菌類による再資源化、2017 生態工学会年次大会発表論文集、家畜排泄物の藻類および菌類による再資源化、2017、51-52
- ② 皆川秀夫 他、家畜排泄物の藻類および菌類による再資源化、2016 生態工学会年次大会発表論文集、2016、31-32
- ③ 皆川秀夫 他、液体培地による白色腐朽菌の菌糸培養とそのリグニン分解酵素の抽出、2015 生態工学会年次大会発表論文集、2015、21-22

[図書] (計 1 件)

- ① 皆川秀夫 他、丸善出版、閉鎖生態系・生態工学ハンドブック、2015、215-217

[その他]

ホームページ等

https://www.kitasato-u.ac.jp/vmas/faculty/re/re_study08.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

皆川 秀夫 (MINAGAWA、Hideo)
北里大学・獣医学部・准教授