

Studies on the control of the Escherichia coli population during animal waste treatment

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): Compost, E. coli, Regrowth, Liquid compost 作成者: 花島, 大 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00002179

家畜排泄物処理における大腸菌の制御に関する研究

花島 大

¹⁾ 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター

要 約

家畜排泄物は主として堆肥化、液肥化を経て循環利用されているが、食の安心・安全に対する消費者の関心は高く、有機肥料の生産段階においてもこれまで以上に衛生的な処理が望まれている。一般的に堆肥化過程で発生する高温は有害微生物の低減に効果があることが知られているが、牛糞のような高水分堆肥原料の堆肥化に際し、オガクズや稲ワラ等の水分調整材の使用が十分でない場合には、適正な堆肥化プロセスが進行しない事例も見受けられる。そこで本研究では、温度が上昇しにくい高水分の堆肥原料中での有害微生物の低減化を促進させる方法として、家畜糞と食品副産物等の有機廃棄物との混合堆肥化を検討した。また近年、堆肥化過程で一度は低減した有害微生物が、水分や温度など適当な生育条件が整うことで再増殖するという現象が問題となっている。堆肥の安全性を考える上でこのような堆肥の流通は好ましくないことから、再増殖を起こす可能性のある堆肥の類型化を行った。液肥化処理についてはそもそも研究蓄積が少なく、処理過程の有害微生物の動態や死滅機構は十分に明らかになっていない。そこで通気処理過程における糞便汚染指標微生物である大腸菌の消長についての知見を得るとともに、大腸菌数の推移に影響を与えると予測される物理化学的、生物的パラメータの推移を解析し、それらの関連性について検討を行った。

その結果、高水分牛糞に対する有機廃棄物の添加は、無添加の原料に比べ大幅に温度上昇を促進し、55℃を超える高温を維持することで、大腸菌数を激減させることが明らかとなった。この温度上昇は主として添加廃棄物中の易分解性有機物量に依存し、堆肥温度と易分解性有機物量の指標である BOD (Biochemical Oxygen Demand) 値の間には正の相関が認められた。また大腸菌の再増殖は、高温期の、または高温期が終了直後の堆肥サンプルにおいて顕著に認められることから、再増殖のリスクは有機物分解が十分に進行していない堆肥において特に高いことが明らかとなった。液肥化過程において大腸菌は、初期の段階で大幅に減少していた。堆肥化とは異なりこの低減機構は温度によるものではなく、大腸菌低減時に著しく優占する未培養の *Bacillus* 属細菌など共存する微生物群との競合、または有機成分の分解と代謝産物の生成に起因する液中の物理化学的変化が大腸菌の生存に影響を及ぼしているものと考えられた。以上から、堆肥については高温処理の徹底、および十分な腐熟期間の保持が、液肥については、温度以外の生物的、物理化学的要因による大腸菌低減のメカニズムの解明が衛生的な処理の確立に対して重要であると考えられた。

キーワード：堆肥、液肥、大腸菌、再増殖

第1章 序論

1. 研究の背景

(1) 家畜排泄物処理問題の現状

従来の「大量生産・大量消費・大量廃棄型社会」の反省から、我が国においては物質の効率的な利用やリサイクルの推進を通じ、より環境への負荷が少ない「循環型

社会」を構築することが急務となっている。このような状況の中、地球温暖化防止、循環型社会形成、戦略的産業育成、農山漁村活性化等の観点から、バイオマスの利活用推進に関する具体的取り組みや行動計画を取りまとめた「バイオマス・ニッポン総合戦略」が、平成14年12月に閣議決定された。このバイオマス・ニッポン総合戦略では、「再生可能な、生物由来の有機性資源で化

石資源を除いたもの」をバイオマスと定義しており、代表的なバイオマスとして家畜排泄物、下水汚泥、食品廃棄物、木質残材、そして農作物非食用部等が挙げられている。平成18年度の段階でそれらの総量は20,840万トンにも及び(図1)、このうち全体の42%(約8,700万トン)を占める家畜排泄物は、最も豊富なバイオマス資源となっている⁷⁾。またこの内訳を見ると乳牛、肉牛そして豚の順に排出量が多く、乳牛と肉牛で全体の60%を、また豚で25%を占めていることがわかる(図1)¹⁰⁾。

家畜排泄物は古くから肥料の原料として、また近年においてはバイオガスの原料として利用されてきたが、排泄物特有の強い臭気や汚物感などはしばしば周辺住民の苦情の原因となってきた。また図2に示すように乳牛、肉牛、養豚を営む農家戸数は、平成2年度以降減少傾向にある一方で(図2A)、一戸当たりの飼養頭数は増加傾向にある(図2B)。これは経営の大規模化と集約化が進行していることとともに、大量の排泄物が特定の地域に蓄積している状況を示している²⁵⁾。

このような状況を打開するため、家畜排せつ物の管理の適正化及び利用の促進に関する法律(家畜排せつ物法:平成11年施行)が制定され、家畜排せつ物の適正管理と循環利用が推進されてきた。しかし排泄物の局在化が進行している昨今では、生産された有機肥料等が地域内ですべて利用されるかという疑問が残る。特に九州南部の宮崎、鹿児島両県では、排出される家畜糞尿に含まれる窒素量を県内の耕地面積で除した場合、その値

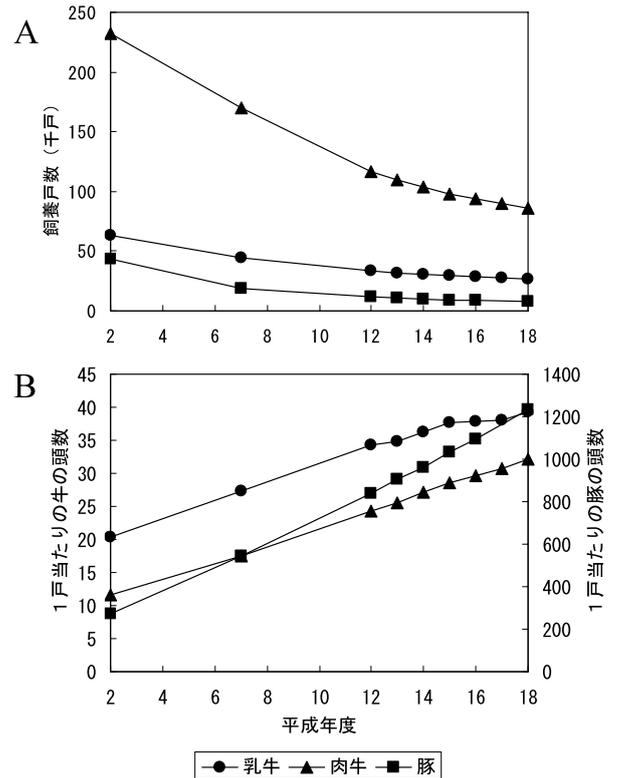


図2. 乳牛、肉牛および養豚経営における(A)畜産農家の年次推移および(B)1戸当たりの飼養頭数の推移
*畜産統計より作図

は250 kg/ha以上となり、全国平均の約2倍を超える集積が起きていることが報告されている¹⁰⁾。地域外を含めた有機肥料の円滑な流通を促進するためには、有機肥

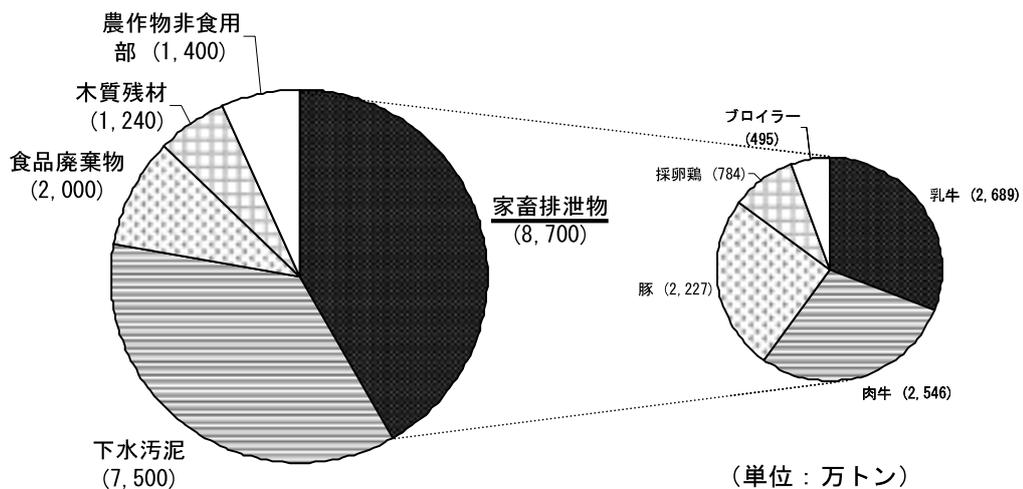


図1. 平成18年度におけるバイオマスの内訳と家畜排泄物の排出量
*農林水産省:食料・農業・農村白書および畜産統計より作図。

料品質の向上、肥効成分などの表示、流通システムの整備、そして有機肥料の安全性の確保が必要であることは言うまでもない。

(2) 衛生的な堆肥化処理、液肥化処理の必要性

有機肥料の利用を阻害する要因として、成分が安定していないこと、塩類の蓄積、重金属の蓄積、外来雑草の種子、有害微生物による汚染などが挙げられる。堆肥の臭いや色などとは異なり、いずれも利用者である耕種農家が感覚的に判断しにくい項目でもある。

食の安全性に対する消費者の意識は非常に高い。1996年に大阪の堺市で起きた病原性大腸菌 O157：H7 による集団感染では、3 名もの尊い命が奪われ、感染源とされたカイワレ大根の売上げが大幅に減少した。その他でも牛海綿状脳症（BSE）の発生に端を発した米国産牛肉離れ、ノロウイルスの流行による牡蠣の売上げの低迷、農薬や薬剤の残留による輸入農林水産物の買い控えなど、食の安心・安全を脅かす事件とその風評被害が関連業界に及ぼす打撃は無視できない状況にある。

それでは家畜排泄物を原料とした堆肥をはじめとした有機肥料には、潜在的にどのようなリスクがあるのだろうか。表 1 に平成 14 年から 18 年までの、細菌に由来する食中毒の年次別発生件数を示した。

これら食中毒菌のうち、群を抜いて発生件数の多いカ

ンピロバクター・ジェジュニ/コリ、サルモネラ属菌、そして病原大腸菌やウエルシュ菌については家畜消化管に由来することが知られており^{16, 24, 30)}、畜産物を介した食中毒が毎年発生している。家畜排泄物を原料とした有機肥料は、栽培時、そして収穫時に最終生産物である野菜や果実等と接触する可能性があり、可能な限りその製造過程でのリスクの低減が求められる。

それでは家畜排泄物処理過程で、これら有害微生物をどこまで低減させればよいのだろうか。畜産経営において家畜排泄物処理は非採算部門であり、可能な限り低コストでの処理を求められていること、また最終的に有機肥料としての利用を考えると、薬剤や抗生物質の使用による有害微生物の制御法を適用することは難しい。従って処理コストが許す範囲でリスクを低減させるスタンスが、最も現実的な選択肢であると考えられる。我が国においては肥料取締法において亜鉛、カドミウム等の重金属汚染に関する上限値は存在するが、有害微生物に関連した規制は現在のところ存在しない。よってここでは、諸外国におけるこれら有害微生物の堆肥品質基準値について紹介する。

アメリカ合衆国環境保護局（United States Environmental Protection Agency：USEPA）が 1994 年に策定した 40 CFR Part 503 Rule⁹⁴⁾ は、バイオマスの堆肥化、特に下水汚泥を対象とした堆肥の基準として、しばしば有機

表 1. 細菌性食中毒の発生件数の推移

	14 年度	15 年度	16 年度	17 年度	18 年度
細菌（総数）	1,377	1,110	1,152	1,065	774
サルモネラ属菌	465	350	225	144	124
ブドウ球菌	72	59	55	63	61
ボツリヌス菌	0	0	0	0	1
腸炎ビブリオ	229	108	205	113	71
病原大腸菌	97	47	45	49	43
ウエルシュ菌	37	34	28	27	35
セレウス菌	7	12	25	16	18
エルシニア・エンテロコリチカ	8	0	1	0	0
カンピロバクター・ジェジュニ/コリ	447	491	558	645	416
ナグビブリオ	2	2	0	0	0
コレラ菌	2	0	0	0	0
赤痢菌	2	1	1	0	1
チフス菌	0	0	0	0	0
パラチフス A 菌	0	0	0	0	0
その他細菌	9	6	9	8	4

* 厚生労働省統計より抜粋

肥料の安全性を議論する上で引用される。表2に示したように、Class Aの基準を満たす堆肥は、大腸菌群として1,000 MPN/g-dry weight以下であること、またはサルモネラ属菌として3 MPN/4g-dry weightであると記されている。また2005年にイギリスにおいて示された British Standards Institution's Publicly Available Specification for Composted Materials (BSI PAS 100) では、堆肥の満たすべき基準として、大腸菌として1,000 CFU/g-fresh mass以下であること、またはサルモネラ属菌として absent/25g-fresh massであることが定義されている⁸¹⁾。米国および英国のガイドラインには、ともにこの基準を達成するため、堆肥の製造過程における処理方法、到達温度、処理期間についての詳細な記載が盛り込まれている。堆肥の評価に特定の微生物(糞便汚染指標微生物やサルモネラ菌等)の菌数を用いている国は、他にはカナダ、イタリアおよびオーストリアなどがある¹⁸⁾。いずれの国においても、すべての有害微生物を検出、計数するのではなくサルモネラ菌または環境中における糞便汚染指標微生物(大腸菌や、大腸菌群、腸球菌)の菌数を有害微生物に関するリスクとして評価している。

液肥は堆肥と比較してハンドリングが悪いこと、また単位体積当たりの重量が重いことから運搬に適しておらず、有機肥料としての市場性は薄い。従って液肥の利用は自家消費または近隣農家に限られるため、品質に関する基準は特に存在しない。畜舎近くの貯留タンクに蓄積された糞尿が、直接農地に散布される事例も見受けられるが、糞尿中に含まれる有機酸、硫黄化合物および窒素化合物は強烈な臭気物質であるため、事前に通気処理やメタン発酵処理などを行い、十分に臭気を低減させてから散布を実施することが奨励されている。しかし液状糞

尿は比熱の高い水分を多く含むため、堆肥に比べて温度が上昇しにくい。よって一般的には、高温曝露による有害微生物の死滅は期待できず、堆肥とは異なる有害微生物の低減化手法が求められる。また液状である液肥は周辺の水路、河川への流入、降雨等により容易に圃場から流出する可能性もあることから、徹底した有害微生物の低減化が望まれる。

2. 既往の研究

(1) 堆肥化処理に関する研究

堆肥処理過程において発生する高温は、有害微生物の死滅に効果があることが知られている¹⁸⁾。Golueke et al.²²⁾が示した有害微生物、雑草種子それぞれの死滅温度を表3に示す。堆肥化に用いる原料や処理方式によって異なるが、通常温度は70℃近くまで上昇する。よって理論上、表3に示した有害微生物群は死滅すると考えられるが、堆積物全体に均一な高温を曝露することは難しい。また堆肥化の適切な進行の為に、水分調整、通気(酸素供給)等が必要とされるが、何らかの原因で堆肥化が適正に進行しなかった場合には、温度が十分に上昇しない可能性も考えられる。よって前述の40 CFR Part 503 Rule および BSI PAS 100 では、より確実な処理過程でのリスク低減を目指し、処理温度およびその持続時間等のプロセスについても詳細な規定を提示している^{81,94)}。また近年では、一度検出限界以下まで低下した有害微生物が堆肥中で再増殖(Regrowth)する現象が問題となっており、その要因の解析が進められている^{5,89,100)}。

(2) 液肥化処理に関する研究

一般的には、液状の化学肥料や肥効成分を豊富に含んだ液状肥料を液肥と称するが、本論では農地散布を目的

表2. 米国および英国における堆肥中の有害微生物の基準

Organization	Regulation	Requirements
USEPA ¹	40 CFR Part 503 Rule	Class A: < 1 × 10 ³ MPN/g-total solids (dry-weight basis) as coliform or < 3 MPN/4g- total solids as <i>Salmonella</i> sp.
		Class B: < 2 × 10 ⁶ CFU or MPN/g-total solid as coliform
BSI ²	BSI PAS 100	< 1 × 10 ³ CFU/g-fresh mass as <i>Escherichia coli</i> or Absent/25g-fresh mass as <i>Salmonella</i> sp.

¹ United States Environmental Protection Agency

² British Standards Institution

表 3. 各種病原性微生物の死滅温度

Organisms	Thermal deathpoint	
	Temperature (°C)	Exposure time in minutes
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	55 – 60	30
<i>Salmonella</i> spp.	56	60
	60	15
<i>Shigella</i> spp.	55	60
<i>Escherichia coli</i>	55	15 – 20
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	10
<i>Streptococcus pyogenes</i>	54	10
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> var. <i>hominis</i>	66	15 – 20
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	55	45
<i>Brucella abortus/suis</i>	61	3

*Golueke (1977) より抜粋

として家畜糞尿液状物を通気処理して得られた液状有機肥料を液肥と定義する。液肥化処理については、堆肥化処理と比較して単位体積当たりの基質となる有機物含量が低いこと、またその対象が液体であることから、比熱の高い水の温度を上昇させるために多大なる熱量を必要とする。よって堆肥化処理よりも温度が上昇しにくい傾向にある。一部の処理装置においては、通気システムを構築する通気ポンプや液分の攪拌装置の廃熱が伝導することにより液温が高温に達する場合もあるが、一般的な処理プロセスは中温域で推移する^{6,7)}。貯留状態にある糞尿中の指標微生物を含む有害微生物は、長期間にわたり生存することが知られている^{1,2,16,36,49)}。しかし55℃を超える高温域での液肥化処理過程では、堆肥化処理同様にその高温による有害微生物の低減作用が報告されている⁴⁴⁾。その一方で、中温域の処理過程におけるサルモネラ菌数の低減³⁴⁾や大腸菌群数の低減⁶⁴⁾等も報告されており、温度以外のファクターが有害微生物の消長に影響を及ぼす可能性も否定できない。

3. 研究の目的

本研究では、固形の家畜排泄物を扱う堆肥化処理、および液状物を扱う液肥化処理過程における有害微生物の低減化の促進を目的としている。適切に管理された堆肥化処理の温度は70℃近くまで上昇し、多くの有害微生物を死滅させるレベルまで達する。しかしながら日本国内においては、堆肥化進行の重要なファクターである水分を調整するのに必要なオガクズやワラなどの水分調整

材の安定した調達が困難、または購入は可能であっても価格が高いなどの問題があるため、適正な堆肥化処理が行われていない事例も見受けられる。特に比較的高水分である牛糞（約85%前後）の堆肥化において、水分調整材の必要性は高い。牛をはじめとする反芻動物は、病原性大腸菌（O157, O26, O111等）の主たる保菌動物と考えられており³⁰⁾、その排泄物処理過程でのリスク低減は重要な課題となっている。

よって本研究では、まず温度が上昇しにくい高水分の堆肥原料中での有害微生物の低減化を促進させる方法として、家畜糞と食品副産物等の有機廃棄物との混合堆肥化を検討した。平成15年に施行された食品循環資源の再生利用等の促進に関する法律（食品リサイクル法）では、食品廃棄物の飼料や肥料等の原材料としての再生利用が目標として掲げられており、従来、焼却または投棄されていた廃棄物の有効利用について様々な方法が模索されている。将来的な有機廃棄物の循環利用を促進する一形態として、また有害微生物を積極的に低減させる手法として両者の混合処理を試みた。

また近年、堆肥化過程で一度は低下した有害微生物が、水分や温度など適当な生育条件が揃うことで、再び堆肥中で増殖するという現象が問題となっている。堆肥化過程における有害微生物の低減に加え、堆肥中での再増殖の抑制も良質堆肥の持ちうる重要な要素と考えられたため、本件についても検討を行った。

液肥化処理については、堆肥化処理と比較してそもそも研究蓄積が少ない。一部、通気処理過程で有害微生物

数が低下した事例が報告されているが、その事象の再現性や死滅機構は明らかになっていない。そこで、通気処理過程における大腸菌の消長についての知見を得るとともに、大腸菌数の推移に影響を与えられ物理化学的パラメータや微生物群集の推移を解析し、それらの関連性について検討した。

全章を通じて、排泄物処理過程の衛生的な指標は大腸菌数が用いられている。これは、①糞便中にほぼ安定した個体数($10^6 \sim 10^7$ CFU/g-wet)で排出されていること、②サルモネラ菌等の有害微生物の動態を代表する菌であること^{55, 68, 73)}、③国内外での環境関連法規の規制対象となっていることによる。

4. 本研究の構成

本研究は堆肥化処理を論じた2～4章、および液肥化処理を論じた5章、全体を総括した第6章を含む全6章から構成されている。以下に第2章から第6章までの検討課題と方法を述べる。

第2章では、水分が高く適度な堆肥化が進行しにくい牛糞堆肥化過程の温度上昇、および大腸菌死滅を促進するため、小型堆肥化リアクターを用いた牛糞と各種有機廃棄物等との混合堆肥化を試み、その効果を明らかにする。

第3章では、第2章で検討した混合堆肥化処理において添加効果の認められた有機廃棄物である豆腐粕を用い、パイロット・スケールでの堆積型堆肥化処理における温度上昇効果の検証を行う。

第4章では、堆肥化ステージおよび牛糞堆肥に対する有機廃棄物の混合の有無が、堆肥中での大腸菌の増殖に与える影響を明らかにするため、堆肥に人為的に接種した大腸菌の増減を評価するアッセイを実施し、堆肥中での大腸菌の増殖(再増殖)に影響を与える要因について検討を行う。

第5章では、野菜や花卉など商品作物に利用されることが多い豚糞尿の液肥について、その処理過程における大腸菌の消長、臭気成分等の環境負荷物質の推移、pHや酸化還元電位等の物理化学的パラメータ、および非培養法による微生物群集の推移について解析を行い、相互の関連性について検討を行う。

第6章では、本研究での成果をまとめるとともに、より衛生的な家畜排泄物処理に関する今後の課題について述べる。

第2章 高水分堆肥原料に対する各種有機廃棄物の混合が大腸菌数低減に及ぼす影響

1. 緒言

家畜排泄物の処理は世界各国で問題となっており、我が国全体においても1年間に発生する推計8,700万トンの家畜排泄物の処理の為に様々な取り組みがなされている。

堆肥化処理は有機廃棄物を循環利用するために経験的に行われてきた方法であり、有機物の分解過程で悪臭は大幅に低減され、廃棄物自体の乾燥も進むことからハンドリング性の向上とともに運搬も容易となる利点がある。また適切な堆肥化処理は、微生物活性によって発生した高温により、病原微生物や雑草の種子を大幅に低減させる効果がある²²⁾。家畜排泄物はウイルス、細菌、または原虫等に由来する人畜共通の有害微生物に汚染されている例が報告されていることから、未処理の家畜排泄物を圃場等に散布することは人間に対する衛生的なりすくとなりうる。

特に搾乳牛は病原性大腸菌 O157:H7 の主要な保菌動物と目されていること³⁰⁾、また O157:H7 は動物の生体内よりも糞中で、また糞に汚染された物体中でより長く生存することが知られていることから、それらが家畜に対する O157:H7 の再感染源となっている可能性が指摘されている⁴⁹⁾。Wang et al.⁹⁶⁾ は牛糞中で O157:H7 が 5°C で 70 日、22°C で 56 日、37°C で 49 日間生存していたことを報告している。それ故、堆肥化過程での徹底した有害微生物の低減化が望まれている。しかしながら、牛糞は水分が 80 - 85% と比較的高く、また鶏や豚など穀物を給与されている家畜の糞に比べて繊維主体の飼料を給与されている為に、微生物群の基質となる易分解性有機物の含有量が少ない。よって有害微生物の死滅温度まで堆肥温度を上昇させるためには、適切な堆肥原料の水分調整が必要となる。我が国においてはオガクズ、稲ワラ、樹皮および籾殻などが水分調整材として一般的に用いられているが、すべての地域で年間を通じての安定的な供給が必ずしも保証されている訳ではない。十分量の水分調整材が確保できない場合には、堆肥原料が高水分のまま堆肥化処理を余儀なくされる事例も見受けられる。そこで本研究では高水分の堆肥化過程における大腸菌の低減化を促進するため、有機廃棄物の混合による堆肥化プロセスの改善を試みた。

本実験では、最初に水分の異なる堆肥材料に対して易分解性有機物の添加を行い、各水分レベルにおける易分

解性有機物の温度上昇，および大腸菌数の低減効果を検討した。その後，種々の有機廃棄物と牛糞の混合堆肥化試験を行い，その際の温度上昇と大腸菌数低減効果について検討を行った。

2. 実験方法

(1) 堆肥原料の性状

搾乳牛の糞は畜産草地研究所（つくば市）の搾乳牛舎から採取した。粗飼料と市販の濃厚飼料を給与している舎内の牛群より，ワラやオガクズなどの敷料が混入していない状態で糞を採取した。水分調整材として 8 mm 径のメッシュを通過した細断稲ワラを用い，目的の水分に調整するために適量を牛糞に添加後，混合した。

(2) 小型堆肥化リアクターおよび運転条件

堆肥化は，図 3 に示した有効容積 12 L の保温式の小型堆肥化リアクター^{26, 29, 52)}を用いて行った。温度測定のための熱電対を，容器の堆肥原料充填部の底から 7.5 cm の中心部に設置した。通気は，堆肥原料の底部から 0.4 L/min の割合で連続的に行った。一連の試験は，これらの堆肥化リアクター計 4 台を用い，25℃の恒温室内で実施した。

(3) 分析および大腸菌の計数

1) 水分

堆肥の水分は適量を 105℃で 24 時間乾燥させた後，デシケータ内で 30 分放冷後に測定した。

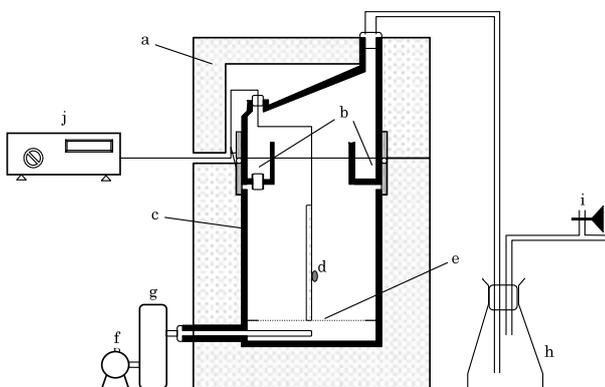


図 3. 堆肥化リアクターの概要

Schematic diagram of composting reactor.
a, insulation material (Styrofoam); b, trap for accumulated water; c, cylinder (PVC); d, thermocouple; e, stainless-steel mesh; f, aeration pump; g, flow meter; h, flask for cooling outlet gas; i, gas sampling port; j, recorder.

2) 堆肥温度

小型堆肥化リアクター内に設置した熱電対により，データロガー（サーモダック EF MODEL 5020A，江藤電気）を用いて 2 時間毎の連続測定を行った。

3) アンモニア態窒素

アンモニア態窒素は，堆肥サンプルと 2M KCl 溶液を 1 : 9 (w/v) で混合し，30 分の振盪後，得られた濾紙濾過液を Bremner 法⁴⁾によって分析した。

4) 生物化学的酸素要求量 (Biochemical oxygen demand : BOD)

堆肥の BOD は，堆肥適量（堆肥化ステージによって異なる）を 300ml の蒸留水に懸濁し，クーロメーター（大倉理研）により 5 日間の培養を行って測定した。

5) 大腸菌の計数

大腸菌数の測定は，堆肥と生理食塩水を 1 : 9 (w/v) で混合した後に，氷冷下で 10,000 rpm，5 分のホモゲナイズを行い，その希釈系列（1 : 9）についてクロモカルトコリフォーム寒天 (Merck) を用いた希釈平板法にて大腸菌数を計数した。培養は 37℃，24 時間で行い，特異酵素基質である salmon-galactoside が β -D-galactodidase によって分解される際に発する赤色と，X-glucuronide が β -D-glucuronidase によって分解される際に発する青色の両者が混合した際に呈する紫～濃青色のコロニーをもって大腸菌と判定した。

(4) 水分の異なる堆肥原料に対するポリペプトン混合試験

堆肥原料の様々な水分レベルを設定するため，採取した水分 84% の牛糞に対し，水分 12% の稲ワラの添加量を変えることで 71%，74% そして 78% の 3 段階の牛糞と稲ワラの混合物を作成した。それぞれの水分レベルの堆肥原料を無添加区（対照区）とした。これら無添加の堆肥原料に対し，易分解性有機物としてポリペプトン（ダイゴ）を乾物当たり 4% の割合で添加した区を設定した。それぞれ湿重で 4kg を堆肥化装置に充填し，連続通気を行った。堆肥は 7 日後に装置から取り出し，手で入念に混合を行った後に再び装置に充填した。その後，更に 5 日間通気を行い 12 日が経過した時点で堆肥化試験を終了した。初発，堆肥混合時，そして堆肥化終了時のサンプルを分析に供試した。

それぞれの水分レベルにおける添加区，無添加区の比較は，2 連の堆肥化試験によって行った。各水分レベルの実験は，異なる日に，異なるロットの牛糞を用いて行った。

(5) 高水分堆肥原料に対する各種有機廃棄物の混合試験

牛糞と細断稲ワラを6.5:3.5の割合で混合し、この有機物を添加していない牛糞・稲ワラ混合物を無添加区(対照区)とした。この牛糞・稲ワラ混合物の乾物量の17%を、豆腐粕、米ぬか、油かす、生鶏糞、乾燥鶏糞、および2種類の人工生ゴミなどの計7種類の有機廃棄物で置換した混合物を処理区として設定した。2種類の人工生ゴミ組成については、清掃局に持ち込まれる生ゴミの組成に関する報告書⁵³⁾をもとに作成した。供試した生ゴミの組成を表4に示す。混合物の水分は蒸留水を添加することにより78%に調整した。この一連の試験には4台の堆肥化装置を用い、無添加の対照区と各種有機廃棄物を混合した3種類の添加区を配置した(表5)。

3. 結果および考察

(1) 堆肥原料の水分と易分解性有機物の混合が堆肥化過程の温度上昇に及ぼす影響

通気開始後から堆肥温度は上昇を始め、いずれの堆肥においても2日目から4日目にかけて最高温度を記録した。その後、7日目に堆肥温度は30℃近くまで低下したため、装置から堆肥を取り出し、十分に攪拌した後にサンプルを採取し、再び装置内に充填した。しかし再充填後の堆肥においては、顕著な温度上昇が認められなかったため、温度上昇に対するポリペプトン添加効果の比較は、堆肥化開始から7日間のデータについて行うこととした。各水分レベルにおける無添加区、およびポリペプトン添加区の7日間の堆肥温度を図4に示した。温度推移は、2連で実施した繰り返し間で非常に近似していた。初発の堆肥原料の乾物量、平均最高温度、病原性微生物の低減に有効と言われる55℃以上の温度の持続時間⁹⁴⁾、堆肥化開始前および7日経過後の大腸菌数を表6に示した。

表4. 生ゴミAおよびBの組成(湿重%)

Constituents of garbage A and B (% of wet weight basis)

	Garbage A	Garbage B
Rice	20	20
Cabbage	30	30
Apple	15	15
Banana skin	15	15
Grilled fish	10	0
Tea leaves	5	0
Coffee grounds	5	0
Grilled beef	0	10
Salad oil	0	10

* 京都市清掃局「家庭ごみ細組成調査報告書」(1996年8月)を参考に組成を決定した。

表5. 3回の堆肥化試験の実験区分

Allocation of three runs of composting trials.

	Composter1	Composter 2	Composter 3	Composter 4
Run 1	Control 1	Tofu residue 1	Rice bran 1	Dried chicken feces
Run 2	Control 2	Tofu residue 2	Rice bran 2	Raw chicken feces
Run 3	Control 3	Rapeseed meal	Garbage A	Garbage B

いずれの水分レベルにおいても、ポリペプトン添加区の温度は無添加区と比較して高い値を示した。各水分レベルにおける無添加区とポリペプトン添加区との最高温度、および55℃以上の温度の持続時間を比較すると、71%水分で2.3℃、17時間、74%水分で7.0℃、30時間、そして78%で9.2℃、51時間となり、高水分レベルになるほどポリペプトン添加による温度上昇効果が高い傾向にあった。更に、この温度上昇は大腸菌数の低減と高い相関が認められた。United States Environmental Protection Agency (USEPA) は病原性微生物を除去する指標として55℃以上の温度への到達と、55℃以上の温

表6. ポリペプトンの添加が堆肥温度および大腸菌の低減に及ぼす影響

Effect of polypepton addition on the temperature and the elimination of *E. coli*.

Moisture content (%)	Maximum temperature (°C)		Duration55 ^a (h)		Number of <i>E. coli</i> (CFU/g-wet)			
	Control	Polypepton	Control	Polypepton	day 0		day 7	
71	68.4	70.7	52	69	1.6×10 ⁷	1.0×10 ⁷	<10 ³	<10 ³
74 ^b	60.0	67.0	38	68	1.1×10 ⁶	9.5×10 ⁵	<10 ³	<10 ³
78	53.5	62.7	0	51	1.6×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁵	<10 ³

^a Duration of the temperatures above 55°C.

^b Due to a trouble inside the composter, the data in one of the duplicates of a control (non-addition) treatment containing 74% moisture was omitted from Table 6.

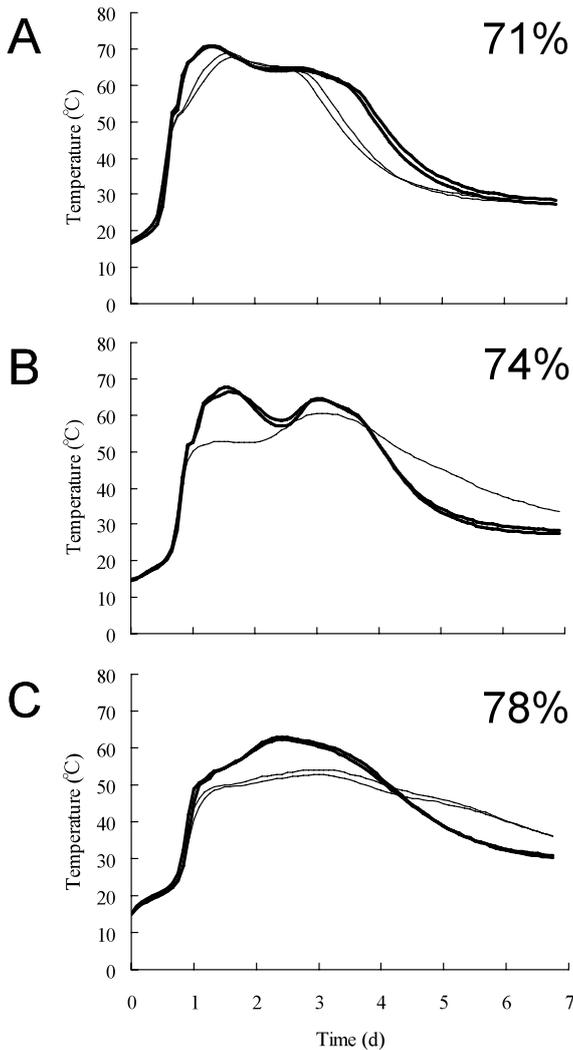


図 4. 71%(A)、74%(B)、および 78% 水分 (C) に調整した堆肥原料に、ポリペプトンを添加、または添加しない場合の堆肥温度の推移

Changes in temperature during composting process at (A) 71%, (B) 74% and (C) 78% moisture content level with or without polypepton addition.

Data of duplicate results are shown. Thin and thick line show a time course of control (non-addition) and treatment (polypepton-addition), respectively. Due to a trouble inside the reactor, the data in one of the duplicates of a control (non-addition) containing 74% moisture was omitted.

度を 3 日間以上継続させることを示している⁹⁴⁾。堆肥化 7 日後の大腸菌数は、78%水分における無添加区を除き、すべての区において 10^3 CFU/g まで低下していた。78%水分の無添加区では、最高温度は 55°C には到達せず (図 4)、大腸菌数も 1 オーダー減少したのみであった。このようにポリペプトン添加は、特に高水分条件において大腸菌数の低減を促進するレベルまで温度を上昇させる効果が顕著であった。ポリペプトンは栄養培地成分として汎用されており、微生物群がポリペプトンを基

質として利用することで代謝活性が高まり、堆肥の温度上昇に影響を及ぼしたと考えられた。

(2) 高水分堆肥原料に対する各種有機廃棄物の混合が温度上昇および大腸菌数の低減に及ぼす影響

前項で示されたように、温度上昇に対するポリペプトン添加の効果は、水分が 78% の時に最も顕著であった。そこで高水分条件 (78%) における種々の有機廃棄物の添加効果について検証を行った。

すべての堆肥化試験において通気直後から温度は上昇しはじめ、堆肥化開始後 1 - 4 日目の間に最高温度を記録した。開始後 7 日目に温度が 40°C 近くまで低下したため、堆肥化装置から堆肥を取り出し十分に攪拌した後、再び堆肥化装置内に充填した。攪拌後もすべての区で顕著な温度上昇が認められなかったため、堆肥化試験は 12 日間を終了した。温度上昇の一例として Run3 における温度推移を図 5 に示す。

有機廃棄物の添加による温度上昇効果は、生鶏糞および乾燥鶏糞添加区を除くすべての区において認められた。最高温度、55°C 以上の持続時間、0、7 および 12 日目における大腸菌数の推移を表 7 に示した。有機廃棄物を添加しない対照区の最高温度は、いずれも 55°C には到達せず、44.6 - 51.5°C の範囲であった。一般的に高水分の牛糞の堆肥化では、乾燥処理や適当な水分調整材との混合をしない限り高温処理は難しいことが指摘されている⁹¹⁾。そのため牛糞を原料として高温堆肥化処理

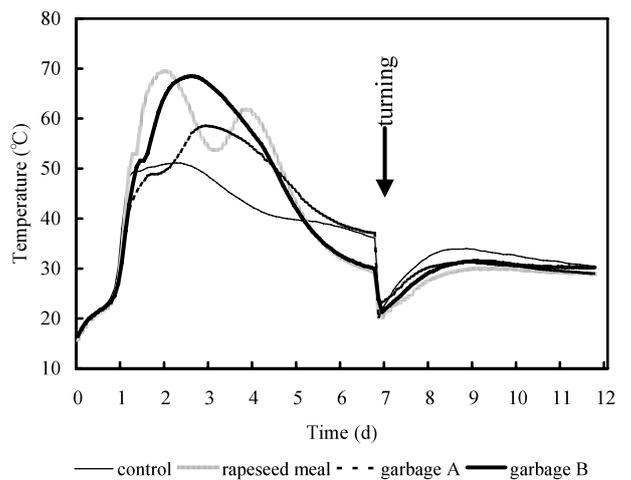


図 5. Run3 の堆肥温度の推移

Time courses of temperature of Run 3.

Arrow indicates turning of the composting materials. Thin, shaded, dotted and thick line show a time course of control (non-addition), rapeseed meal, garbage A and garbage B addition, respectively.

を実現させるためには、本試験で設定した78%という水分は高すぎると考えられた。しかしながら豆腐粕、米ぬか、油かす、生ゴミAおよび生ゴミBの混合は、温度上昇を促進し、それぞれ65.7 (n=2), 60.0 (n=2), 69.5, 58.6そして68.5℃の最高温度を記録した。また生ゴミAと生ゴミBの比較では、10%のサラダ油を含む生ゴミBの方がより高い最高温度を示すとともに、55℃以上の高温域の持続時間も長い傾向にあった(表7)。

USEPAが定めた堆肥の製造管理要件であるProcess to Further Reduce Pathogens (PFRP)によれば、堆肥の温度を少なくとも55℃以上に保ち、3日以上持続させる処理が求められている⁹⁴⁾。Run2における米ぬかの混合試験では、最高温度は55.4℃、55℃以上の高温持続時間は18時間であり、7日後の大腸菌数は 4.4×10^6 CFU/g-wetから検出限界以下($< 10^2$)まで減少していた。一方でRun1における乾燥鶏糞添加区では最高温度は52.5℃と55℃に満たず、大腸菌数の減少も認められなかった(表7)。最高温度が55℃に達しなかった対照区については7日目においても大腸菌数は減少せず、堆肥化開始前の大腸菌数とほぼ同様かそれ以上の値を示した。特にRun1とRun3の12日目の大腸菌数は 10^7 CFU/g-wet以上であり、堆肥化開始前の大腸菌数よりも明らかに増加していた。一方で生鶏糞および乾燥鶏糞添加区を除く有機廃棄物を添加した処理では、7日間の堆肥化処理期間で、初発の 10^6 から 10^2 CFU/g-wet程度

までの顕著な大腸菌数の低減が認められており、その後も12日目まで低い菌数で推移した。これらの結果から大腸菌数低減に対しては、堆肥化初期段階における高温曝露が非常に重要であることが明らかとなった。

生鶏糞添加区の最高温度は42.2℃であったが、大腸菌数は 4.7×10^6 から 2.0×10^3 CFU/g-wetにまで低下していた。Taylor et al.⁹³⁾は、石灰を添加した生の汚泥を土壤に施用し、その後の大腸菌群数をモニタリングしたところ、大腸菌群数はアンモニア態窒素濃度と負の相関があったことを報告している。0日目における生鶏糞添加区のアンモニア態窒素濃度は、他の処理区が0.79 - 1.50 mg-N/乾物gの範囲であったのに対し、2.57 mg-N/乾物gであり、7日目においても他の処理区が0.14 - 3.62 mg-N/乾物gの範囲であったのに対し、5.51 mg-N/乾物gと、いずれのサンプル採取日においても最も高い値を示していた。よって生鶏糞添加区において認められた大腸菌数の低下は、生鶏糞の分解過程で生成したアンモニアが、大腸菌の生存に影響を及ぼした可能性もあると考えられた。また生鶏糞を添加した堆肥には粘性があり、開始後7日目に行った堆肥の攪拌時には、硫化水素のような嫌気分解時に生成する臭気の発生が認められた。嫌気分解時に発生する低級脂肪酸等の有機酸は大腸菌の生存に阻害的に働くことが知られており³¹⁾、アンモニアもしくは嫌気的条件下で生成した分解産物が大腸菌の低減に寄与した可能性も考えられた。温度に依存しない大腸菌の死滅機構は未知の部分が多く、今後更なる

表7. 最高温度、55℃以上の持続時間、BODおよび大腸菌数の推移
Maximum temperature, duration of temperatures above 55°C, BOD, and changes in the number of *E. coli*.

No.	organic waste	TEMP _{max} ^a (°C)	Duration55 ^b (h)	BOD (O ₂ mg/g DM)	Number of <i>E. coli</i> (CFU/g-wet)			
					day 0	day 7	day 12	
Run 1	1	control 1	51.5	0	92.9	9.3×10^5	1.3×10^6	1.7×10^7
	2	tofu residue 1	67.9	70	206.0	2.6×10^6	$< 10^2$	2.1×10^3
	3	rice bran 1	64.6	60	223.6	8.3×10^5	$< 10^2$	$< 10^2$
	4	dried chicken feces	52.5	0	117.0	4.5×10^6	1.0×10^6	2.9×10^7
Run 2	5	control 2	44.6	0	81.1	9.4×10^6	2.4×10^6	1.3×10^6
	6	tofu residue 2	63.4	56	166.2	1.0×10^7	$< 10^2$	$< 10^2$
	7	rice bran 2	55.4	18	185.0	4.4×10^6	$< 10^2$	$< 10^3$
	8	raw chicken feces	42.2	0	124.3	4.7×10^6	2.0×10^3	1.2×10^3
Run 3	9	control 3	51.1	0	111.2	1.0×10^6	1.5×10^6	2.6×10^7
	10	rapeseed meal	69.5	58	174.0	1.0×10^6	$< 10^2$	$< 10^2$
	11	garbage A	58.6	32	179.8	1.1×10^6	$< 10^2$	$< 10^2$
	12	garbage B	68.5	58	219.7	1.2×10^6	$< 10^2$	$< 10^2$

^a Maximum temperature.

^b Duration of the temperatures above 55°C.

研究が期待される。

(3) 堆肥の温度と大腸菌数低減との相関

ポリペプトン添加試験, および有機廃棄物添加試験の計 23 回の堆肥化試験結果をもとに, 堆肥化開始後 7 日目の大腸菌数と堆肥の最高温度, および 55℃ 以上の持続時間との相関を図 6 に示した。PFRP に規定されている堆肥温度の下限値である 55℃ を境界として, 大腸菌数は 10^3 CFU/g-wet 以下にまで低下していた (図 6A)。また 55℃ 以上の高温曝露の経験がない堆肥については, 10^3 CFU/g-wet 以上の大腸菌の残存が認められたが, 最低 18 時間以上の曝露により, 大腸菌数は 10^3

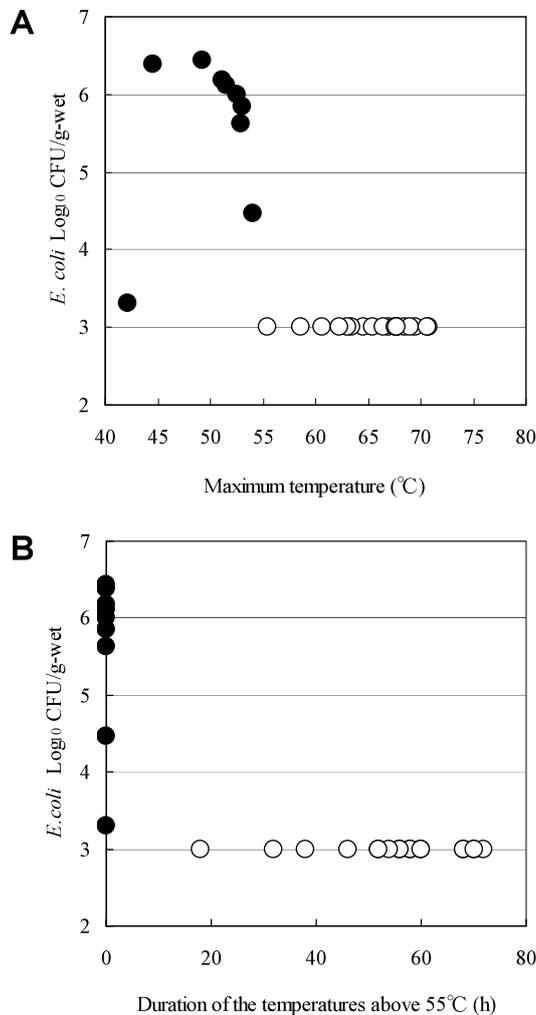


図 6. 堆肥化 7 日目の大腸菌数と最高温度 (A), および 55℃ 以上の持続時間 (B) との関係

Relationships between the numbers of *E. coli* on day 7 and (A) maximum temperatures or (B) duration of the temperatures above 55°C. Open circles show the numbers of *E. coli* below 10^3 CFU/g-wet.

CFU/g-wet 以下にまで低下していた (図 6B)。

(4) 堆肥の温度上昇と原料の Biochemical Oxygen Demand (BOD) の相関

有機廃棄物添加区において認められた温度上昇は, 有機廃棄物に含まれる基質の添加によって増大した微生物活性に起因すると考えられた。そこで易分解性基質の指標として, 堆肥原料中の BOD 値を測定した。堆肥原料の BOD 値, 最高温度, 55℃ 以上の高温持続時間を表 7 に示した。対照区の平均 BOD は $95.1 \text{ O}_2 \text{ mg/g-dry matter}$ ($n=3$) であり, 有機廃棄物を添加した堆肥原料の値は, それよりも高い $117.0 - 223.6 \text{ O}_2 \text{ mg/g-dry matter}$ の範囲であった。また原料の BOD 値が $166.2 \text{ O}_2 \text{ mg/g-dry matter}$ 以上の場合には, 7 日目において顕著な大腸菌数の低下が認められた。BOD 値と堆肥の最高温度の間には, 図 7 に示したように正の相関が認められた ($r=0.832$)。特に豆腐粕, 米ぬか, および生ゴミ B を添加した堆肥原料の BOD 値は, $200 \text{ O}_2 \text{ mg/g-dry matter}$ 以上の高い値であった。家畜の飼料としても利用されるこれらの有機廃棄物については, 日本標準飼料成分表⁷⁾にその栄養的価値が記載されており, 乾燥豆腐粕および米ぬかはそれぞれ 13.1 および 18.5% の粗脂肪を含有しているとの報告がある。また生ゴミ B についても全重量の 10% のサラダ油が含まれている。油脂成分は BOD 値も高いことから, これらの成分が温度上

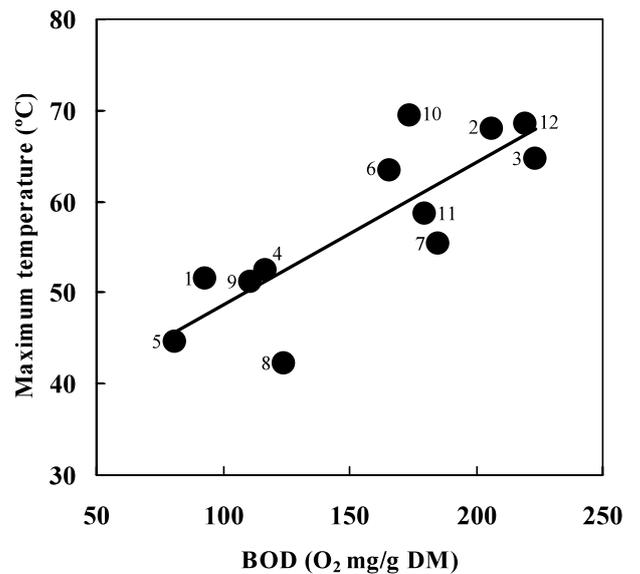


図 7. 最高温度と堆肥の BOD 値との相関

Relationships between maximum temperature and BOD value of compost mass. Numbers attached to circle correspond to those in Table 7.

昇に大きく影響を及ぼしているものと考えられた。油かすを添加した堆肥原料の BOD 値は、174.0 O₂ mg/g-dry matter に過ぎなかったが、添加処理区の中で最も高い 69.5°C の最高温度を記録した。Imbeah et al.⁴²⁾ は堆肥中の空隙の確保は、好気性菌の代謝による熱生産を行う上で必要な酸素を行き渡らせるのに効果があることを報告している。よってこの温度上昇は、BOD 源の供給に加え、粒状の油かすの混合により堆肥中に適当な空隙が形成された結果であると考えられた。

4. 要約

本試験では水分調整材が不足しがちな国内の状況を踏まえ、高水分の状態ながらも衛生的な条件を満たしうる堆肥化プロセスの確立を目的として、牛糞と有機廃棄物との混合堆肥化処理について検討を行った。水分が異なる堆肥原料に、培地成分として用いられる易分解性基質であるポリペプトンを添加し、堆肥の温度上昇に対する効果を測定した。その結果、水分が高くなるほど堆肥の温度上昇は抑制される一方で、ポリペプトンの添加は温度上昇を促進し、その効果は水分の高い堆肥原料において特に顕著であることが明らかとなった。高水分堆肥原料に対する易分解性有機物の添加効果が明らかになったところで、実際の有機廃棄物と牛糞の混合堆肥化試験を行った。高水分牛糞に対する豆腐粕、米ぬか、油かす、および生ゴミの混合は、無添加の原料に比べ大幅に温度上昇を促進し、55°C を超える高温を維持することで、大腸菌数を大幅に低減させることが明らかとなった。この温度上昇は主として添加物中の易分解性有機物量に依存し、堆肥温度と BOD 値の間には正の相関が認められた。また、有機廃棄物を添加した堆肥原料の BOD 値が 166.2 O₂ mg/g-dry matter 以上の時、顕著な大腸菌数の低減が認められた。家畜糞と有機廃棄物の混合堆肥化処理は、有機資源の循環の上でも、また堆肥化プロセスの改善の意味でも有効な手段と考えられる。

本試験は実験室レベルの小型リアクターを用いて行われたが、次章ではパイロット・スケールの堆積型堆肥化における有機廃棄物の添加効果を検証する。

第3章 豆腐粕の混合が牛糞の堆積型堆肥化過程の温度上昇に及ぼす影響

1. 緒言

我が国の集約的な畜産業の発展によってもたらされた局地的な排泄物の蓄積は、深刻な環境汚染問題を引き起

こしている²⁵⁾。このような環境問題に対応するため、家畜排泄物の管理の適正化および利用の促進を目的として、1999 年から新しい法律が施行された。また家畜排泄物に加え、各地域で発生する食品副産物等の有機廃棄物の循環利用も国策として推進されている。中でも水分が低く、臭いが少なく、スラリー状の糞尿に比べて市場価値が高い有機肥料を生産する堆肥化処理は、有機廃棄物の循環利用の最も現実的な手段となっている。

畜産業全体で排出される糞尿量に対する乳牛の割合は、2006 年において 31% を占めており畜種別で最も割合が高い。乳牛糞は水分が 80 - 85% と比較的高く、穀物を主として給与されている鶏や豚の糞に比較して易分解性有機物含量が少ない。それ故、高水分の乳牛糞を用いて堆肥化を行う場合には、適当な水分調整材（ワラやオガクズなど）の添加を行わない限り、高温域に達するまでの温度上昇は期待できない⁹¹⁾。

乳牛は病原性大腸菌 O157 : H7 の主要な保菌動物と考えられており³⁰⁾、乳牛糞の堆肥化過程で高温域の堆肥化を実践し、有害微生物を低減させることは以前にも増して重要になってきている。米国環境保護庁 (USEPA) の 40 CFR part 503 に記されている堆肥化プロセスの実施要項は、病原性微生物の低減や媒介物の制御の徹底を目的として定められた。このプロセス実施要項には様々な種類の堆肥化処理法に対し、堆肥化過程での温度とその持続時間についての基準が設けられている。これらの基準を満たす為には、高水分である乳牛糞の水分を調整し、堆積物中に空隙をもたらしような水分調整材の添加、もしくは第 2 章で議論された易分解性有機物の添加が有効な選択肢となりうる。

豆腐は我が国において人気のある食材であり、その副産物である豆腐粕は以前から家畜の飼料として用いられてきた。しかしながら、近年は安価な輸入飼料がそれにとって替わり、豆腐製造業界はその処理について対応を求められている。Nakasaki et al.⁶⁷⁾ は、この豆腐粕を堆肥原料として様々な菌の接種を行い、その温度上昇を観察した。その結果、豆腐粕は堆肥化することにより速やかに温度が高温域にまで達したことから、分解性の高い有機廃棄物であると考えられた。また第 2 章で示された BOD 値のように豆腐粕は相当量の易分解性有機物を含有していると考えられ、実規模の堆肥化においても豆腐粕を混合し堆肥化することで、良好な処理プロセスの進行が期待された。そこで本研究では乳牛糞に対する豆腐粕添加の効果、特に添加量と温度上昇の相関を明らかにするために、小型堆肥化リアクターを用いた試験を実施す

るとともに、堆積型堆肥における部位別温度上昇に対する添加効果を明らかにするために、パイロット・スケールでの静置堆積型堆肥化試験を行った。

2. 実験方法

(1) 豆腐粕の混合割合を変化させた場合の牛糞堆肥化試験（小型堆肥化リアクター試験）

搾乳牛の糞は、農林水産省畜産試験場（つくば市）の搾乳牛舎から採取した。粗飼料と市販の濃厚飼料を給与している舎内の牛群より、ワラやオガクズなどの敷料が混入していない状態で糞を採取した。新鮮牛糞と8mmの篩を通過した細断ワラを、71%の水分になるように湿重量比で8.3：1.7の割合で混合した。この乳牛糞と細断ワラの混合物に対し、乾燥豆腐粕（水分14%、ケルダール窒素分（Kj-N）5%）を全乾物当たり0%（対照区）、6%（6TR）そして11%（11TR）となるように混合した。それぞれの混合物の初発水分、およびKj-Nを表8に示す。小型堆肥化リアクターは、第2章で用いたものを使用した。それぞれ4kgの堆肥原料を、20cmの堆積高になるようにリアクターに充填した。温度測定のための熱電対はリアクター中心部の、堆肥原料充填物の底から7.5cmの位置に設置した。通気はそれぞれのリアクターに対し、0.4 L/minの割合で連続的に行った。小型リアクターを用いたすべての堆肥化試験は、25℃の恒温条件下で行った。堆肥化期間中のサンプリングは、堆肥温度が30℃近くまで低下した際にリアクターから堆肥を取り出し、手で十分に攪拌した後に行った。攪拌後は再び堆肥をリアクター内に充填し、通気を再開した。堆肥化処理は堆肥の攪拌処理後に、堆肥温度のピークが認められた後に終了した。初発、中間の堆肥攪拌時、堆肥化終了時のサンプルについて水分、および生物化学的酸素要求量（BOD）の測定を行った。この一連の試験は異なるロットの乳牛群の糞を用い、同一条件下で3回行った（Run 1 - 3）。この3回の試験期間中、牛糞を採取する個体、

表 8. 堆肥原料の水分とケルダール窒素量

Moiture content (%) and Kj-N (%) in the initial composting material mass.		
	Moisture (%) ±SD	Kj-N (%) ±SD
Control	71.7±0.9	1.4±0.1
6TR	70.3±0.8	1.6±0.1
11TR	69.4±0.1	1.9±0.1

*Control, 6TR, 11TR: 0, 6 and 11% tofu residue addition treatment, respectively.

およびその飼養管理は一定の条件下で行った。

(2) 静置堆積型堆肥化処理における豆腐粕の混合試験（パイロット・スケール試験）

乳牛糞とワラの混合物に対し、豆腐粕を添加、または添加しない原料を用いた堆積堆肥化試験を実施した。堆肥原料は、牛糞尿混合物のスクリュープレスによる固液分離処理によって得られた固形物を主とし、それに新鮮乳牛糞および細断ワラを湿重量比で7.2：3.5：1の割合で混合したものをを用いた。この混合物に対し、豆腐粕を乾物重当たり0%（対照区）および15%（添加区）混合し、水道水を添加することで水分78%の高水分原料を調製した。鉄製フレームと5cm厚の強化発泡スチロールで組み立てた枠に、1.0×0.8×0.75（縦×横×高さ）（単位：m）となるように上記堆肥原料を充填・堆積した。堆肥の底部には、ポリエステル製の不織布で表面をカバーした工業用排水シートを設置し、堆積物に対する底部からの受動通気が促進される設計とした⁹²⁾。堆肥原料は、それぞれ220kgをフレーム内に充填した。堆積物中の温度測定位置は計9箇所とし、堆積物の中心、および中心から左に40cm、右に40cmの位置に、堆肥底部から10cm、40cmおよび55cmの高さとなるように、ステンレス製の棒に熱電対を固定したものを挿入した。（図8）。

(3) 分析および統計解析

1) 水分、堆肥温度、生物化学的酸素要求量

第2章と同様の手法で測定した。

2) ケルダール窒素（Kjeldahl-nitrogen：Kj-N）

Kj-Nは、堆肥現物5g程度をBremner et al.の方法⁴⁾により測定した。

3) 統計解析

堆肥温度に対する豆腐粕添加の効果は、豆腐粕添加割合を処理、繰り返し試験をブロックとした乱塊法により分析した。平均値間の差は、Tukeyの多重検定により解析した。すべての統計解析は、SASのGLMプロシジャを用いて行った⁸²⁾。

3. 結果および考察

(1) 豆腐粕混合割合が堆肥の温度上昇および有機物分解に及ぼす影響（小型堆肥化リアクター試験）

いずれの添加割合の堆肥においても通気開始後から温度は上昇し、2日以内に最高温度を記録した。7日目にすべての堆肥において温度が30℃以下に低下したた

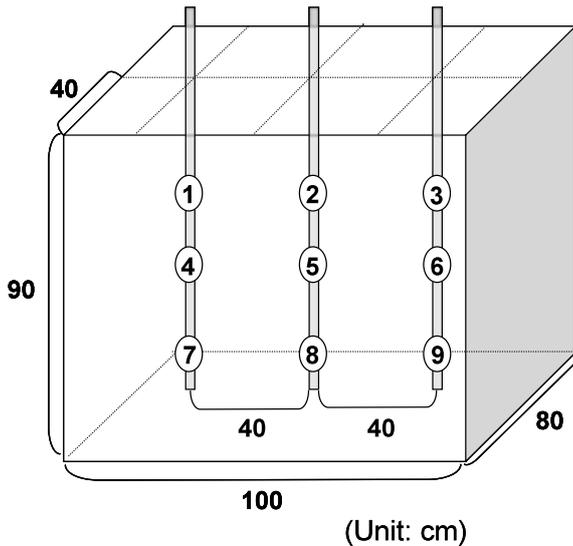


図8. 本研究で用いた静置型堆積堆肥の概要

A Schematic diagram of the static compost pile used in this study. The numbers of the thermocouples and their locations are corresponded to Fig. 10.

め、堆肥の攪拌を行った。いずれの堆肥も攪拌後に温度上昇のピークを示したが、11TR以外の堆肥の最高温度は50℃に達しなかった。その後の温度推移から、更なる温度上昇が期待できないと判断したため、豆腐粕混合割合が異なる堆肥における温度上昇効果の比較は、この温度上昇が最も顕著な12日間のデータを用いて行うこととした。

豆腐粕添加による温度上昇の評価は、(i) 最高温度 ($TEMP_{max}$)、(ii) 堆肥温度が55℃に達するまでに要する時間 ($TIME_{55℃}$)、(iii) 55℃以上の持続時間 ($Duration_{55℃}$) の3つのパラメータによって行った (表9)。

堆肥の最高温度は、豆腐粕添加割合が多いほど高い傾向にあったが、有意な差は認められなかった。 $TIME_{55℃}$ は豆腐粕添加割合が多くなるほど短縮される傾向にあり、対照区と11TRの間に有意差 ($p<0.05$) が認められた。USEPA は“A process to further reduce pathogens (PFRP)” に定められる堆肥製造管理要項の中で、堆肥中の病原微生物の死滅を徹底させるために、55℃以上の堆肥温度を少なくとも3日以上継続させて管理することを推奨している⁹⁴⁾。本堆肥化条件では、豆腐粕添加割合は堆肥の最高温度に対して有意な影響を与えなかったが、 $Duration_{55℃}$ は添加割合が高まるほど延長される傾向にあり、対照区と11TRの間に有意差が認められた ($p<0.05$)。

温度上昇に差異をもたらした要因として、豆腐粕中の

表9. 温度上昇に対する豆腐粕添加の効果
Effect of tofu residue addition on temperature rise.

	$TEMP_{max}^a$ (°C)	$TIME_{55℃}^b$ (h)	$Duration_{55℃}^c$ (h)
Control	65.9 ± 0.9 ^d	38.7 ± 7.6 ^d	55.3 ± 4.6 ^d
6TR	68.1 ± 1.7 ^d	32.0 ± 4.0 ^{de}	72.7 ± 8.3 ^{de}
11TR	68.6 ± 2.6 ^d	26.0 ± 2.0 ^e	89.3 ± 22.1 ^e

*Control, 6TR, 11TR: 0, 6 and 11% tofu residue addition treatment, respectively.

^aMaximum temperature.

^bTime required for temperature to reach 55℃.

^cDuration of the temperatures above 55℃.

^{d,e}Means in same row with different superscript letters are significantly different ($p<0.05$).

易分解性有機物が寄与した可能性が考えられた。豆腐粕添加割合の異なる混合物について、BOD値の経時変化を測定した結果を表10に示す。

混合物のBOD値は、対照区が $97.6 ± 16.6$ 、6TRが $126.6 ± 11.7$ 、11TRが $183.5 ± 18.9$ O₂ mg/g-dry matter と、添加割合が多くなるほど高くなる傾向にあった。しかしながら堆肥化の進行に伴ってBOD値は低下し、12日目にはいずれの区も $15.8 - 31.6$ O₂ mg/g-dry matter の範囲であった。Fernandes et al.²⁰⁾ は農業廃棄物と脂肪分を多く含んだ都市ゴミの混合堆肥化において、初発の脂肪含有量が堆肥の高温持続時間に影響を与えるが、その際の最高温度に大きな違いは認められないことを報告している。脂肪分、豆腐粕はともにBOD値が高い物質であり、豆腐粕によって持ち込まれた易分解性有機物は、堆肥化過程で分解され、その結果BOD量に比例した熱産生量をもたらされたと考えられた。

(2) 豆腐粕添加が静置堆積型堆肥の部位別温度上昇に及ぼす影響

パイロット・スケールの堆積型堆肥試験は、平均外気温が4.1℃であった冬期に行った。高水分にもかかわらず

表10. 堆肥化過程におけるBOD値 (O₂ mg/g-dry matter) の推移

Changes in BOD (O₂ mg/g-dry matter) during the composting process.

	Control	6TR	11TR
Day 0	97.6 ± 16.6	126.6 ± 11.7	183.5 ± 18.9
Day 7	49.1 ± 11.8	54.2 ± 14.3	70.4 ± 5.2
Day 12	15.8 ± 1.1	28.2 ± 4.7	31.6 ± 2.1

*Control, 6TR, 11TR: 0, 6 and 11% tofu residue addition treatment, respectively.

ず、対照区、豆腐粕添加区とも堆積直後から温度上昇が始まり、2-3日以内に最高温度に達した。堆肥化試験は、開始後21日目で堆積物の中心部（底部から40cmの部位）の温度がほぼ外気温と同程度に低下したため、その時点で終了した。図9に堆積型堆肥化試験の典型的な温度推移として対照区、および豆腐粕添加区の中心部の温度推移を示した。また図10に対照区、豆腐粕添加区の堆積物中それぞれ9箇所の最高温度、および55℃以上の高温持続時間を示した。堆積物中の部位によって温度推移が異なっており、中心部よりも周辺部の方が温度は低い傾向にあった。最高温度はいずれの部位においても豆腐粕添加区の方が対照区よりも高く、中心部から離れた部位においてその差は顕著であった。また堆積物中の最高温度は両区とも中心部で記録されていたが（それぞれ77.3、80.0℃）、それらの温度差は周辺部の同部位の温度差よりも小さかった。堆積物の9箇所（対照区については55℃に達しなかった箇所を除く8箇所）における $TIME_{55℃}$ の平均値を比較したところ、無添加区の37.9時間と比較して豆腐粕添加区では32.6時間と高温に達するまでの所要時間が短い傾向にあった。

高水分でかつ、厳寒期に行われたパイロット・スケール堆積型堆肥化試験では、小型堆肥化リアクター試験と比較して豆腐粕混合による温度上昇の効果が顕著に認められた。両区の $Duration_{55℃}$ の比較では、対照区では堆積物中9箇所の温度のうち4箇所がPFRPの基準を満

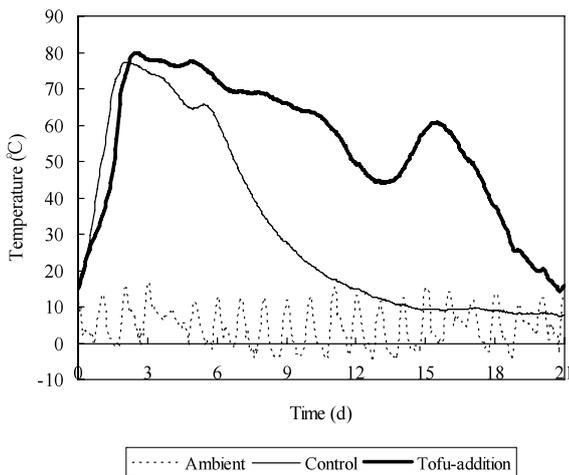


図9. 外気温および豆腐粕を添加した、または添加しない堆肥の中心温度の推移

Time courses of temperature of the center of the control pile, tofu residue addition pile and ambient during the composting process. Dotted, thin and thick line show a time course of ambient, control and tofu-addition treatment, respectively.

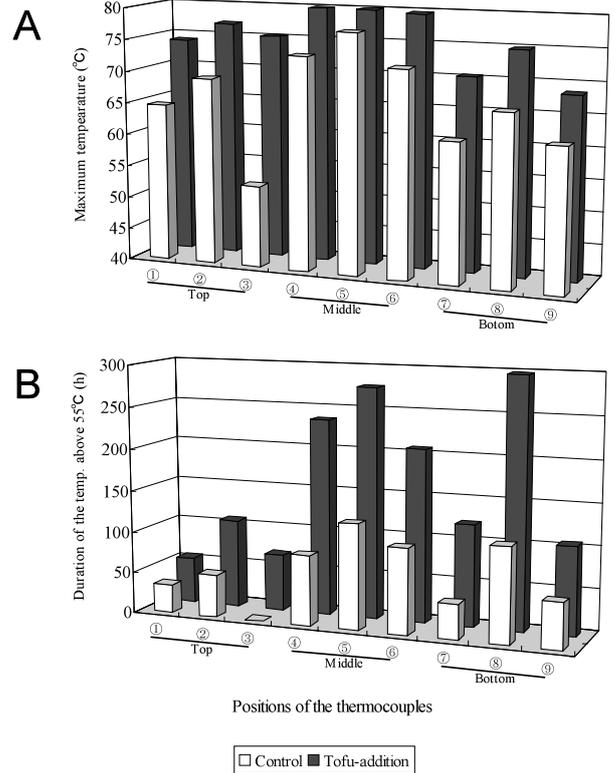


図10. 豆腐粕を添加した、または添加しない堆積堆肥の9箇所の最高温度 (A)、および55℃以上の持続時間 (B)の比較

Comparison of (A) the maximum temperature and (B) the duration of the temperature above 55°C ($Duration_{55℃}$) of 9 locations in control and tofu residue addition pile. The numbers of the positions are corresponded to Fig. 8. Open and shaded column show a value of control (non-addition) and tofu-addition treatment, respectively.

たしていたのみであったが、豆腐粕添加区では7箇所が55℃以上の温度を3日以上持続していた。更に、豆腐粕添加区の $Duration_{55℃}$ はいずれの部位においても対照区の約2倍程度の値を示していた。今回の堆肥化試験は、高水分、低温環境という堆肥化に適さない条件であったが、豆腐粕添加は対照区に比較して大幅に温度上昇を促進するとともに、PFRPの要項を堆肥中の大部分の部位で満たしていた。今回の試験は堆肥の攪拌を行わない静置状態で行ったが、適切な間隔で攪拌を行うことで堆肥全体を高温に曝露できるような処理が期待できると考えられた。

4. 要約

本章では断熱型の小型堆肥化リアクター（有効容積12L）、および受動通気によるパイロット・スケールの堆積型堆肥化装置を用い、牛糞と細断ワラの混合物に豆

腐粕を混合した場合の温度上昇および有機物分解特性について検証を行った。小型堆肥化リアクターでの試験では、乾物当たり11%の豆腐粕の添加は、無添加の堆肥と比較して最高温度には差が認められなかったものの、高温域に達するまでに要する時間を短縮し、55℃以上の高温持続時間を有意に延長させることが明らかとなった。また堆肥中のBOD値の測定から、豆腐粕の添加により堆肥原料中の易分解性有機物量が大幅に増加する一方で、12日間の堆肥化期間中にそれらの大部分は分解されることが示された。この豆腐粕の温度上昇効果は、パイロット・スケールの堆積型堆肥化において更に顕著であり、堆積堆肥中のいずれの部位でも対照区よりも高い最高温度、および約2倍の55℃以上の高温持続時間が認められた。よって牛糞に対する豆腐粕の混合は、堆積物全体に高温状態を作り出すことが明らかとなった。

しかし現実には堆肥全体を完全に高温曝露し、大腸菌数をゼロにまで低減化させることは困難である。USEPAの40 CFR Part 503 Rule⁹⁴⁾においても、“Class A”堆肥の大腸菌群数を 10^3 CFU/g以下と定義しており、完全な死滅というよりは病原菌リスクの低下に主眼を置いていることが分かる。しかし近年、一度堆肥中で低減した有害微生物が、適当な水分と温度条件を付与されることで再増殖(Regrowth)する現象が問題となっている。本章で検証を行った豆腐粕添加は温度上昇という点では有用であるが、基質に富んだその性状は有害微生物の再増殖を促す可能性がある。よって次章では、牛糞と豆腐粕の混合堆肥化過程での様々な堆肥化ステージにおける大腸菌のRegrowthのリスク評価を行う。

第4章 堆肥化ステージの異なる堆肥中における接種大腸菌の増殖

1. 緒言

環境に優しい持続的農業の活性化の視点から、食品リサイクル法等の有機廃棄物の循環利用に関する法律が制定され、各地で有機資源循環利用の機運が高まっている。堆肥化処理は、家畜排泄物の循環利用の為に普遍的に行われている方法であり、臭気が軽減し乾燥が進んだ堆肥は、有機肥料として流通されている。また近年、牛舎で使用するオガクズやワラ等の敷料の不足から、堆肥をその代替として利用する事例も見受けられる。

乳牛は病原性大腸菌O157:H7の主たる保菌動物であると考えられている³⁰⁾。またO157:H7は牛糞中で長時間生存し続けることが知られており^{1,2,16,36,49)}、排泄物

処理過程での大幅な低減が望まれている。牛糞は比較的水分が高く、オガクズやワラなどの適切な水分調整材の混合を行わない限り、堆肥化過程で病原性微生物の死滅温度までの高温を実現することは難しい。しかし第2,3章で示されたように、易分解性有機物を多く含む有機廃棄物を混合することで、高水分条件でも温度が上昇し、大腸菌の死滅を促進できることが明らかとなった。しかし一方で易分解性有機物が未分解のまま残存した場合には、それらが有害微生物の基質となる可能性もある。たとえ見かけ上乾燥していたとしても、散布された圃場で降雨等の要因により適当な水分と温度条件が与えられた場合、残存した、または外部からの汚染により付着した有害微生物が、堆肥中で増殖する可能性がある。また敷料として利用された場合でも、尿や糞の汚染によりその中で有害微生物が増殖する状況は好ましくない。特に大腸菌は、乳牛における乳房炎の原因菌として頻繁に分離されており、疾病のリスクを増大させる可能性がある^{38,83)}。一方で堆肥には、外来の微生物に対する拮抗作用があるという報告もあり、Millner et al.⁶³⁾は堆肥中の拮抗微生物群の作用により、堆肥中のサルモネラ菌の増殖が抑制されることを報告している。

堆肥の利用に関してはいくつかの品質評価基準が設けられているが、実際の農業現場では、取り扱いや運搬の容易さを考えて堆肥の乾燥状態が目が向けられがちである。しかし本来は、適当な堆肥化期間を経て生産された腐熟の進行した堆肥の利用が望ましい。そこで本試験では、堆肥化期間の異なる堆肥に人為的に大腸菌を接種し、そこでの増殖を測定することで、堆肥中での大腸菌の動態を把握すると共に、拮抗作用の有無についても検証を行った。供試堆肥としては、第3章の実験で用いた堆肥を利用し、牛糞・ワラ堆肥とそれに豆腐粕を添加した堆肥中での大腸菌の増殖について比較を行った。

2. 実験方法

(1) 供試堆肥およびサンプリング

実験には、第3章で実施したパイロット・スケールの堆積型堆肥の対照区(牛糞・ワラ堆肥)、および豆腐粕添加区(牛糞・ワラ・豆腐粕混合堆肥)の2種類の堆肥を用いた。400gの堆肥原料を入れたナイロン・メッシュ袋に熱電対を括りつけ、それぞれ4つずつを対照区、または豆腐粕添加区の堆積堆肥の中心部近くの底部から40cmの高さのところに配置した。堆肥温度の推移は、1時間毎に連続的に記録した。ナイロン・メッシュ袋は、堆積堆肥から経時的に1つずつ取り出し、回

収した堆肥はすぐにアルミ製のトレイ上に広げ風乾させた。水分が20%以下になったところで、トレイから滅菌ビニール袋に移し、実験に供試するまで室温で保存した。また本試験とは別に、他の牛糞堆肥化試験で得た対照区と同一原料組成の堆肥を、開口したビニール袋に室温条件で190日間および360日間保存しておいた堆肥サンプル（それぞれA190およびA360）についても実験に供試した。

(2) 大腸菌の接種

接種には、家畜衛生試験場（現：動物衛生研究所）中澤宗生博士から供与いただいた大腸菌 O157:H37 CE273 株（子牛の糞便より分離。非病原性株）を用いた。本菌株を Nutrient Broth (Difco Laboratories) 100 ml に1白金耳接種し、37°Cで18時間、150 rpmの振盪培養を行った。菌体は遠心分離（7,000 × g, 10 min）にてペレットとし、0.1 M Phosphate-buffered saline (PBS) にて2度の洗浄、遠心分離を繰り返し、最終的に PBS に懸濁させた。菌体濃度は吸光度 (O.D.₆₀₀) の測定により、おおよそ 2.0×10^8 CFU/mL となるように PBS で適宜希釈し調製した。

(3) 大腸菌接種堆肥の培養

大腸菌接種培養試験に供試した風乾堆肥サンプルは、事前に0.5 cmの篩を通過したサイズのものをを用いた。接種前に風乾堆肥サンプルに存在する大腸菌、および大腸菌以外の大腸菌群の計数を行った。生牛糞とほぼ同様の大腸菌数である 10^7 CFU/g-dry weight の大腸菌 CE273 株を、乾物ベースで15 gの堆肥に接種し、水分約50%となるように滅菌蒸留水を添加した。大腸菌を接種した堆肥サンプルは、滅菌ビニール袋中で十分に攪拌後、100 ml容の滅菌三角フラスコに充填した。通気性のあるスポンジ製の栓をした接種堆肥を充填したフラスコとともに、水を入れたビーカーをプラスチック製の箱の中に収め、30°Cで5日間培養を行った。大腸菌および大腸菌以外の大腸菌群の測定は、培養前後に一度ずつ行った。すべての培養試験は1堆肥サンプルあたり3連で行った。

(4) 分析および大腸菌の計数

1) 水分、アンモニア態窒素

第2章と同様の手法で測定した。

2) 大腸菌の計数

測定は1希釈段階につき3枚のプレートを使用し

た。大腸菌に加え、 β -D-galactosidase の作用により salmon-galactoside が分解されて生じる赤色コロニーを、大腸菌以外の大腸菌群として計数した。本来、大腸菌は大腸菌群に分類されるが、ここでは大腸菌以外の大腸菌群の計数を大腸菌群数として表示した。

(5) 統計解析

初発の大腸菌数に対する大腸菌の増殖割合 (%) に対する堆肥化ステージの影響は、1元配置分散分析によって検定し、平均値の差を Tukey の多重検定によって解析した。すべての解析は SAS の GLM プロシジャを用いて行った⁸²⁾。

3. 結果

(1) 堆肥化過程の温度推移

堆肥化期間の平均外気温は4.1°Cであった。堆肥サンプルの温度履歴は図11に示した。対照区（無添加区）、および豆腐粕区の堆肥原料（0日目サンプル）、7、13、22および41日目の堆肥サンプルをそれぞれC0、C7、C13、C22、C41およびT0、T7、T13、T22、T41とした。それぞれの堆肥における最高温度は2日目に記録され、対照区で73.7°C、豆腐粕区で78.2°Cであった。対照区の温度は徐々に低下し、13日目に10°C以下になったのに対し、豆腐粕区では高温期間が持続し、22日目になって10°C以下にまで低下した。その後の温度は10°C以下で推移し、それ以上の温度上昇が期待できないと判断したため41日目に堆肥化処理を終了した。

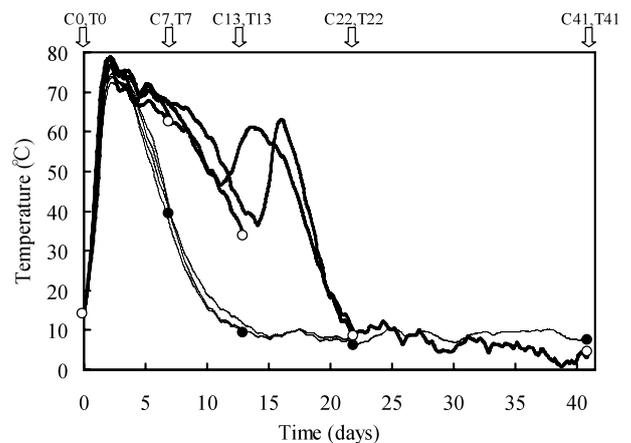


図11. 堆積堆肥の中心部付近の温度推移とサンプル採取時期

Temperature records at nearly mid-depth of the center in static piles and the time schedule for compost sample collection. Thin line: temperature in control pile; thick line: temperature in pile containing tofu residue. Circles show the temperatures at sample collection.

(2) 供試堆肥中の大腸菌および大腸菌群数

堆肥化開始前の堆肥原料中の大腸菌、および大腸菌群数は、ともに 10^7 CFU/g-dry matter のオーダーであった。堆肥化の進行に従って堆肥温度は上昇し、いずれの区においても大腸菌および大腸菌群数は $< 10^2$ CFU/g-dry matter まで低下した。しかしながら風乾処理により、いずれの堆肥サンプルにおいても再増殖が認められた。大腸菌接種試験に用いた接種前の堆肥サンプル中の大腸菌、および大腸菌群数を表 11 に示す。いずれのサンプルにおいても大腸菌数は 10^5 CFU/g-dry matter 以下であったが、大腸菌群数はそれよりも高い傾向にあった。堆肥化終了後から 190 日および 360 日経過した堆肥サンプル（それぞれ A190 および A360）については、大腸菌および大腸菌群とも検出限界 ($< 10^2$ CFU/g-dry matter) 以下であった。

(3) 異なる堆肥化ステージの堆肥中における大腸菌の増殖

大腸菌を接種した後の堆肥サンプル中の大腸菌数の平均は、 2.3×10^7 CFU/g-dry matter (範囲: $1.8 - 2.8 \times 10^7$ CFU/g-dry matter) であり、これは新鮮牛糞で検出される大腸菌数とほぼ等しかった。接種大腸菌の増殖割合は、培養前の大腸菌数に対する百分率として示した。

堆肥化ステージの異なる堆肥サンプルにおける大腸菌数の増殖割合を図 12 に示した。1000% を超える高い増殖は、対照区においては C7 および C13 で、豆腐粕区においては T0, T7, および T13 で認められた。特に堆肥化初期 (0 - 13 日目) の堆肥サンプルにおいて、豆腐粕区は対照区よりも増殖割合が高い傾向にあった。また最も高い増殖割合は対照区、豆腐粕区ともに 7 日目の堆肥サンプル (C7 および T7) において認められた。2 つの日数の経過した堆肥 A190 および A360 の増殖割合は、それぞれ 275% と 265% であり、これらと 13 日目以降の対照区および豆腐粕区における堆肥サンプルとの間に有意差は認められなかった。C22 は唯一、大腸菌数が低下した堆肥サンプルであった。

4. 考察

接種試験の結果、C22 の堆肥サンプルを除いたすべての堆肥サンプルにおいて大腸菌数は増加傾向にあり、接種菌に対する明確な堆肥の拮抗作用は認められなかった。大腸菌の増殖割合は、13 日目の堆肥サンプルを境にそれ以前の堆肥はそれ以後よりも高い傾向にあった。Russ and Yanko⁸⁰⁾ は、汚泥堆肥中のサルモネラ菌の増殖について、炭素窒素比 (C/N) がサルモネラ菌の増殖能に影響を与えていることを報告している。堆肥化プロセ

表 11. 風乾堆肥中、および培養前後の大腸菌および大腸菌群数の変化
Numbers of *E. coli* and coliforms in the air-dried compost and their populations before and after incubation.

Compost Samples ¹	After Air-Drying		Inoculation of <i>E. coli</i> ²	After Incubation	
	<i>E. coli</i> (CFU/g DM)	Coliforms ³ (CFU/g DM)	<i>E. coli</i> (CFU/g DM)	<i>E. coli</i> (CFU/g DM)	Coliforms (CFU/g DM)
C0	7.8×10^5	$< 10^4$	Average: 2.3×10^7	7.8×10^7	1.2×10^7
C7	$< 10^4$	1.7×10^5	Range: 1.8 to 2.8×10^7	3.7×10^8	2.9×10^8
C13	$< 10^4$	5.6×10^7	"	3.1×10^8	7.4×10^8
C22	$< 10^4$	2.3×10^8	"	8.3×10^6	1.1×10^9
C41	$< 10^4$	1.0×10^7	"	2.9×10^7	7.2×10^7
A190	$< 10^2$ *	$< 10^2$	"	5.7×10^7	$< 10^5$
A360	$< 10^2$	$< 10^2$	"	6.0×10^7	$< 10^5$
T0	7.6×10^5	1.3×10^4	"	4.1×10^8	1.2×10^8
T7	5.5×10^4	3.2×10^5	"	5.6×10^8	1.4×10^8
T13	$< 10^4$	1.3×10^7	"	2.5×10^8	9.3×10^7
T22	2.2×10^4	5.2×10^6	"	1.5×10^8	9.6×10^7
T41	$< 10^4$	2.9×10^6	"	3.7×10^7	4.0×10^7

¹ C = control; T = tofu residue; numbers = age (d) of sample collected; A190 and A360: compost samples derived from another composting run, which had been composted and kept in plastic bags for 190 or 360 d, respectively.

² Quantity of *E. coli* inoculated into each air-dried compost sample.

³ The numbers of coliforms except *E. coli* are shown.

* Below limit of detection.

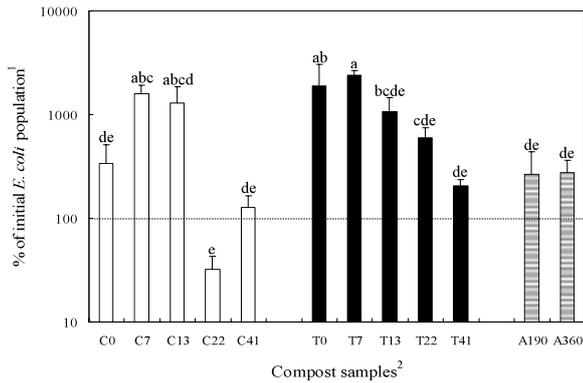


図 12. 古堆肥、および豆腐粕を添加した、または添加しない採取時期の異なる堆肥中における大腸菌の増殖の比較

Comparison of *E. coli* growth in compost samples of different stages with and without the addition of tofu residue, and aged compost samples.

¹ % of initial *E. coli* population calculated as [*E. coli* counts after 5 days incubation]/[*E. coli* counts before incubation] × 100.

² C = control; T = tofu residue; numbers = age (d) of sample collected; A190 and A360: compost samples derived from another composting run, which had been composted and kept in plastic bags for 190 or 360 d, respectively.

* abcde: Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$). Bars show standard deviation.

スに進行によって C/N が低下することは一般的に知られており¹⁸⁾、堆肥化日数とそれに伴う有機物分解の進行が、病原性微生物の増殖に与える一つの大きな要因として考えられた。

10 倍以上 (>1000%) の大腸菌の増殖を示した堆肥サンプルは、主として堆肥温度が高温期、または高温期を過ぎた直後に採取されたものであった。特に、いずれの区においても、7 日目に採取した堆肥サンプル (C7 および T7) で最も高い増殖が認められた。Mathur et al.⁵⁹⁾ は、堆肥化経過日数が異なる数種類の堆肥サンプルの湯抽出液について、生物化学的酸素要求量 (BOD)、および可溶性有機炭素 (DOC) を測定している。DOC については、堆肥化での分解が始まるとともに増加し、高温期が終了すると低下すること、また BOD 値については堆肥化後期の抽出液と比較して、初発、高温期および高温期が終了した直後の抽出物の値が高いことを報告している。また Soares et al.⁸⁹⁾ は、数種類の堆肥サンプル中における大腸菌群の増殖を測定し、非常に乾燥した堆肥において高い増殖が認められたことを報告している。彼等はこの現象を、堆肥化が低水分条件で進行したために分解が進む前に堆肥が乾燥し、有機物の多くが未分解のまま残存したことが大腸菌の増殖に寄与したのではないかと考察している。我々の堆肥化初期の堆肥サンプルに

おいて認められた大腸菌の増殖は、堆肥化過程で生成された大腸菌にとって利用性の高い低分子化した有機物、または堆肥サンプルの風乾過程で死滅した微生物群の遺体を利用することにより生じたものと考えられた。

豆腐粕混合は、高温堆肥化を促進し大腸菌数を大幅に低下させるが、一方で大腸菌の増殖を促進する傾向にあった。これは 0 日目において、C0 よりも有意に高い T0 の増殖割合によって裏付けられる。大豆ミールの酵素分解物は、しばしば大腸菌を含めた腸内細菌群の増菌培地 (Tryptic Soy Broth 等) の含有成分として用いられている。恐らく豆腐粕中に残存した利用可能な栄養成分が、大腸菌の増殖を促進したものと考えられた。

しかしながら堆肥化後日数が経過したサンプルにおいては、対照区、豆腐粕区の増殖割合の差は小さくなり、最終的に堆肥化終了から半年以上日数が経過した A190、A360 堆肥サンプルと同様の値となった。Hanajima et al.²⁹⁾ は、豆腐粕の添加により堆肥中の BOD 値は上昇する一方で、12 日間の堆肥化処理により、その値は無添加の堆肥と同様の値まで低下することを報告している。豆腐粕中の添加によって得られた易分解性有機物は、1, 2 週間の高温堆肥化過程においてその大部分が分解されると考えられた。

唯一、C22 の堆肥サンプルにおいて大腸菌数の減少が認められた。この理由は明らかでないが、生物的な拮抗が大腸菌の増殖に影響を与えた可能性がある。Millner et al.⁶³⁾ は大腸菌群の単独の存在、または代謝活性のある細菌群と放線菌の存在が、堆肥中でのサルモネラ菌の死滅を引き起こしたことを報告している。Golueke²³⁾ も接種した病原性微生物よりも堆肥中の土着の微生物群の方が、基質の競合において有利であることを指摘している。実際に C22 サンプル中の大腸菌群数は接種前 (2.3×10^8 CFU/g-dry matter)、接種後 (1.1×10^9 CFU/g-dry matter) とともに、すべての堆肥サンプル中で最も高い値を示していた。それ故、高い菌数で共存した大腸菌群が、接種大腸菌の増殖に影響を与えた可能性も考えられた。

本研究の結果は、堆肥化の高温期、または高温期が終わった直後の堆肥サンプルが仮に大腸菌に汚染され、適当な水分条件、温度条件が与えられた場合には、大腸菌の大幅な増殖が起きうることを示唆している。実際の現場では、高温多湿な夏季における汚染堆肥の施肥において注意が必要であると考えられた。また堆肥の敷料利用に関して Smith et al.⁸⁷⁾ は、大腸菌群に起因する牛の乳房炎の発生は夏に最大となり、それは敷料中に存在する

多数の大腸菌群への曝露が原因であると報告している。よって堆肥の敷料利用に際して環境性乳房炎の発生を抑制する為には、たとえ見かけ上堆肥が乾燥していたとしても、堆肥化初期、または分解が十分に進んでいない堆肥を、敷料として利用することは好ましくないと考えられる。

5. 要約

近年、堆肥における有害微生物の再増殖 (Regrowth) が問題となっている。また酪農経営においては、オガクズ等の敷料の高騰から堆肥をその代替として使用する事例も見受けられる。乳牛は病原性大腸菌 O157:H7 の主要な保菌動物とされており、非病原性大腸菌についても乳房炎の原因菌とされていることから、圃場に施用した、もしくは敷料として散布した堆肥中での大腸菌の増殖は好ましくない。堆肥化過程では堆肥の物理性、化学成分、そして微生物叢が大きく変化していく。有害微生物の堆肥中での増殖は、これら堆肥性状の変遷と関連が深いと予想される。そこで堆肥化開始後から 0, 7, 13, 22, 41, 190 および 360 日目に採取した堆肥に、人為的に大腸菌を接種することで、それぞれの堆肥における大腸菌の増殖リスクを検討した。堆肥サンプルは牛糞堆肥化過程、および牛糞と豆腐粕の混合堆肥化過程から経時的に採取し、直ちに風乾したものを供試した。堆肥を水分 50% に調整し、大腸菌を接種した後に 30°C の条件で 5 日間の培養を行った。培養前後のサンプルについて、希釈平板法により大腸菌の計数を行った。その結果、ほとんどの堆肥中で大腸菌は増殖し、特に高温期 (7 日目) の、または高温期が終了した直後の堆肥サンプルにおいて、最も高い増殖が認められることが明らかとなった。しかしながら堆肥化開始後 13 日以上経過した堆肥サンプルと、190 日以上経過した堆肥サンプルの間には、有意な差は認められなかった。豆腐粕混合堆肥の経過日数 13 日以前の堆肥では、同時期の無添加の牛糞堆肥と比較して高い大腸菌の増殖割合が認められた。よって豆腐粕の混合は、堆肥温度を大幅に上昇させ大腸菌の死滅を促進する一方で、分解が進行しなかった場合には、適当な水分や温度条件が与えられることで大腸菌の増殖を促進する可能性があることが示された。しかしながら十分な堆肥化期間を経ることで、その増殖は無添加の堆肥と同程度になることが明らかとなった。

第5章 豚糞尿通気処理過程における大腸菌の消長、物理化学的パラメータおよび微生物群集の推移

1. 緒言

家畜排泄物は、貴重な有機資源として古くから農業生産の肥料として用いられてきた。しかし糞尿液状物が直接農地に散布された場合には、悪臭は大気中に拡散し、しばしば近隣住民からの苦情を受けることになる。特に豚糞尿は低級脂肪酸 (VFAs)、インドール、フェノール、アンモニア、揮発性アミン、揮発性硫黄化合物等の様々な臭気物質を含む、臭気の強い有機廃棄物のうちの 1 つであることが知られている¹⁰³⁾。また豚糞尿は家畜および人間に危害を及ぼす *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia* 等の有害微生物に汚染されている可能性もある²⁴⁾。

酪農経営においては排出された糞尿は未処理のまま、もしくは堆肥化、液肥化等の処理がなされた後に自らが管理する農地に散布され、自給飼料を生産する為の肥料として用いられる。しかしながら養豚経営では、農地を持たない経営体が大部分を占めるため、糞尿は浄化処理後に河川へ放流、または野菜や花卉をはじめとした商品作物を栽培する農地に散布されることが多い。よって家畜糞尿を有機肥料として使用する場合には、事前に臭気や有害微生物等の環境リスクをできる限り低減させる処理を行うことが奨励されている。

我が国において、有機肥料生産を目的とした家畜排泄物の処理に対して最も汎用されている方法は好氣的処理である。豚糞尿の好氣処理の主眼は、臭気の高減、堆肥有機成分の安定化、そして有害微生物の高減に置かれている。これまで多くの手法やシステムが環境負荷低減を目的に開発されており^{19, 44, 101)}、様々な処理システムが豚糞尿の好氣的処理の実験に適用されてきた^{3, 44, 45, 68, 75)}。このような処理システムにおいて、通気手法の違いは処理温度に大きな影響を与える。一般的に豚糞尿の通気処理過程は中温域で進行するが、高温域での処理を可能とした装置では有害微生物の大幅な低減が実現できる⁴⁴⁾。一方で、アンモニア揮散量が増加することが知られている⁷⁵⁾。しかしながら、中温処理過程においてもサルモネラ菌の高減^{34, 84)}、および大腸菌群^{64, 84)}の高減も報告されており、熱以外の有害微生物高減機構の存在も示唆されている。また、Hissett et al.³⁷⁾ は 5°C から 50°C とした処理温度の中で、35°C から 40°C の中温域で微生物の呼吸活性が最も高くなると報告している。恐らく通気処理過程では、通気に

より生じた微生物群の活性が、糞尿中の環境に大きな変化をもたらしていることが考えられる。

これまでの家畜糞尿の通気処理における微生物学的な研究は、培養的手法によるものが中心であった^{9,41)}。また豚の消化管内容物サンプルからクローン化された 16S rRNA 遺伝子の 59%は、これまで培養法によって分離された菌の配列と 95%以下の相同性であったことが報告されている⁷⁷⁾。よって従来の培養法に依存したアプローチでは、豚糞尿中の微生物群集を十分に評価できない可能性がある。よって本研究では 16S rRNA 遺伝子を介した解析、ここでは PCR-DGGE 法およびクローンライブラリー法を用い、通気処理プロセスにおいて重要なパラメータである悪臭の推移、有機成分の分解、および糞便汚染指標微生物等の動態と、その時の微生物群集の特徴づけを行うことを目的とした。

2. 実験方法

(1) 供試豚糞尿試料

新鮮豚糞は、2002年11月から2003年8月にかけて畜産草地研究所内（つくば市）の肥育豚舎内で採取した。豚糞と蒸留水を1:14（豚糞については乾物重）の割合で混合し、0.5 mm のメッシュで濾過することで、処理過程では分解されない大きさの浮遊物質を除去した。この懸濁液に尿の代替として3L当たり6gの尿素を溶解し、豚糞尿を作成した。

(2) 小型液肥化リアクターおよび運転条件

回分式の液肥化処理は、泡切り羽を装備した5L容のジャーファーマンター（TJM-502WS, 高崎科学）に3Lの豚糞尿を充填して行った（図13）。液温は40℃に制御し、250 rpm の割合で連続攪拌した。通気はジャーファーマンターの底部からセラミック製散気管（1.2 cm i.d. × 5.5 cm）を通じて50 ml-air/min/L-slurry の割合で連続的に6日間行った。この通気量は日本国内で一般的に行われている通気量のほぼ平均値に相当する⁴³⁾。糞尿のORPとpHは、30分毎にデータロガー（サーモダック EF, Model 5020A, 江藤電気）により連続的に測定した。リアクター内のサンプルはシリンジを介して経時的に採取した。回分式通気処理試験は計3回実施した。

(3) 化学分析および大腸菌の計数

1) 化学的酸素要求量（Chemical oxygen demand : COD_{Cr}）

COD_{Cr} は Hach 社が供給する試薬および反応試験管を

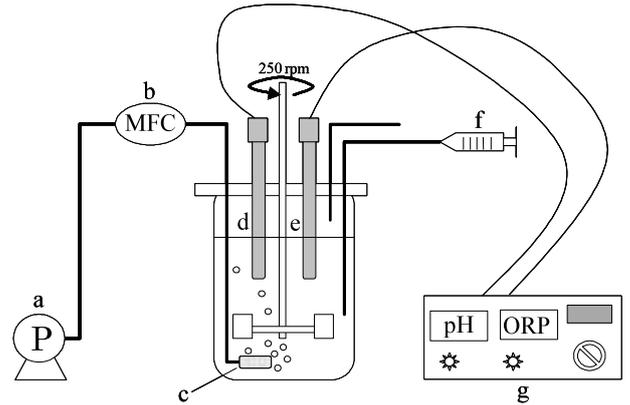


図 13. 液肥化リアクターの概要

Schematic diagram of liquid composting reactor.

a, aeration pump; b, mass flow meter; c, ceramic diffuser; d, pH sensor; e, ORP meter; f, sampling syringe; g, recorder.

用い、糞尿サンプルと反応後に比色法によって測定した。

2) 全窒素

ケルダール窒素（Kj-N）は、ケルダール法によって測定した⁴⁾。全窒素（TN）は、Kj-Nと亜硝酸態および硝酸態窒素の合計値として算出した。

以下に挙げる化学分析は、糞尿サンプルを遠心し（20,000 × g, 10 min）、その遠心上清を分析サンプルとして用いた。

3) アンモニア態窒素（NH₄-N）および亜硝酸態、硝酸態窒素

NH₄-Nおよび亜硝酸態、硝酸態窒素は比色法（Aquatec 5400 analyzer, Tecator）を用いて測定した。糞尿サンプルの全窒素に対するアンモニア濃度の推移を把握するため、1日目から最終日のサンプルについてNH₄-N/TNの算出を行った。これら値の最小有意差検定は、SASのGLMプロシジャ⁸²⁾を用いて算出した。

4) 遠心上清の全炭素

豚糞尿の遠心上清の全炭素（Total organic carbon）（TOC_S）は、TOCアナライザー（TOC-500, 島津製作所）によって測定した。

5) 低級脂肪酸類（Volatile fatty acids : VFAs）

低級脂肪酸類（Volatile fatty acids : VFAs）（C₂ - C₄）は、キャピラリー電気泳動（HP3DCE system, Agilent Technologies）を用いて測定した。

6) 大腸菌の計数

大腸菌数の測定は滅菌生理食塩水により豚糞尿の希釈系列（1:9）を作成し、クロモカルトコロフォーム寒天

(Merck) 上に表面塗沫する希釈平板法により行った。

また大腸菌数が低い場合 ($<10^3$ CFU/mL) には、希釈平板法に加え、LMX broth (Merck) を用いた Most probable number method (MPN 法) を併用し計数を行った。

(4) 核酸抽出および PCR 条件

1) 核酸抽出

0.5ml の豚糞尿を遠心 (20,000 × g, 4℃, 5 min) して得られたペレットは、500 μl の extraction buffer (100 mM Tris-HCl at pH9.0 and 40 mM EDTA) に懸濁され、抽出に供するまで -20℃ の冷凍庫に保存された。ゲノム DNA はこの凍結サンプルよりベンジルクロライド法¹⁰²⁾により抽出し、PCR のテンプレートとした。

2) PCR 条件

PCR は、真正細菌 16S rRNA 遺伝子の可変領域 3 (*E. coli* 16S rDNA の 341 番目から 534 番目塩基対まで) を標的とした以下のプライマーを用いた⁶⁵⁾。

357f-GC : 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'

(下線部は GC クランプを示す)

517r : 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

PCR 増幅は AmpliTaq Gold (PE Applied Biosystems) により、サーマルサイクラー (TaKaRa Thermal Cycler MP; TaKaRa Biomedicals) を用いた。温度サイクルは、以下に示す条件で行った。

95℃, 10 分, 1 サイクル

93℃, 60 秒 → 48℃, 60 秒 → 72℃, 60 秒 25 サイクル

72℃, 5 分, 1 サイクル

PCR 産物を 2% アガロースゲル電気泳動で確認を行い、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて濃縮を行った。

(5) PCR-DGGE

DGGE は DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad) を用いて行った。使用したゲルにはポリアクリルアミド濃度勾配 (6 - 12%) と変性剤濃度勾配 (25 - 50%, ただし 7M 尿素 - 40% (v/v) ホルムアミドを 100% とする) の 2 つの濃度勾配が形成されており、PCR 産物をこのゲルに直接アプライした後に、0.5 ×

TAE buffer (20 mM Tris-acetate [pH 7.4], 10 mM acetate, 0.5 mM Na₂EDTA) 中で 200V の一定電圧で 61℃, 5 時間の電気泳動を行った。この二つの勾配を持つ Double gradient ゲルは、変性剤濃度勾配に加え、ポリアクリルアミド濃度の違いによる第 2 の勾配を導入することで個々のバンドの分離を改善する効果があることが報告されている^{13,32)}。

電気泳動後、ゲルを 1 万倍希釈した SYBR Green I (Molecular Probes) にて 30 分間染色し、トランスイルミネーター上にゲルを移し、UV 照射下で電気泳動像を撮影した (Gel Print 2000i, Genetics Solutions)。

電気泳動像から興味の対象となるバンドを選択し、トランスイルミネーター上にて切り出しを行った。切り出したバンドを含むゲルより、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて DNA を溶出させた。更に溶出 DNA を用いて再度 PCR-DGGE を行い、切り出したバンドが単一になるまで操作を繰り返した。尚、5 回の切り出しを経て単一にならなかったバンドについては、下記のシーケンスを行わなかった。

(6) Sequencing

単一になったバンド DNA を用いて、Sequence 反応を行った。反応は BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、反応条件は本キットのマニュアルに従った。Sequence 反応の際のプライマーは、前述の 357f-GC の GC クランプ部を除いた配列をもつ 357f および 517r を用いた。Sequence は、ABI Prism 377 DNA sequencer (Applied Biosystems) にて行った。得られた遺伝子配列と相同性をもつ配列について、WEB 上のデータベースより BLAST プログラムを用いて検索を行った。

(7) DGGE バンドパターンの統計解析

取り込まれた DGGE ゲルイメージを Luminous Imager (アイシン・コスモス研究所) で読み込み、バンド強度を数値化した。それぞれのバンドの強度は、 P_i に変換された。ここで P_i は以下のように定義される¹⁷⁾。

$$P_i = n_i/N$$

P_i : importance probability of the band in a gel lane

n_i : band intensity of individual bands

N : sum of the intensities of the bands in the lane

それぞれのレーンに対応するバンドが存在しない場合には、0の数値を入力した。これらの数値から、SASのPRINCOMPプロシジャ⁸²⁾を用いて主成分分析(Principal component analysis: PCA)を行い、DGGEバンドパターンの遷移について可視化を試みた。

(8) 16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリー解析

クローニングに供する真正細菌の16S rRNA遺伝子の増幅は、以下のプライマーセット⁵⁴⁾を用いて行った。

27f: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

1492r: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'

温度サイクルは以下に示す条件で行った。

95℃, 10分, 1サイクル

93℃, 60秒 → 48℃, 60秒 → 72℃, 60秒 15サイクル

72℃, 5分, 1サイクル

反応後にPCR産物を2%アガロースゲル電気泳動で確認を行い、適切に増幅されたバンド(～1.5kb)を切り出し精製した。精製されたPCR産物は、pGEM-T Easy vector (Promega)にライゲーション後、*E. coli* JM109株に形質転換を行い、IPTG (0.5 mM), X-gal (100 µg/mL) およびアンピシリン (100 µg/mL)を含むLB寒天培地に塗抹し、37℃で一晩培養した。寒天培地上に出現した白色コロニーを単離し、LB brothで培養後に菌体を得た。菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドの抽出を行った。Day 0, 2, 4, 6サンプルからランダムに取得されたクローン化されたDNA断片をSequenceのテンプレートとして使用した。Sequenceには、以下のプライマーセットを用いた。

27f: 前述

907r: 5' -CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'

それぞれ得られた配列については、Ribosomal Database Project II (RDP-II)¹¹⁾のRDP classifierを用いて系統学的な分類を行った。配列のキメラ構造は、5'末端側配列、3'末端側配列および全体配列の系統学的分類に斉一性が認められるか否かをチェックすることにより行った^{35, 58)}。99%以上の相同性を持つ配列同士は、同一の配列と定義し、以降の系統解析にはOperational taxonomic unit (OTU)として扱った。系統

樹は、MEGA version 3.1⁵⁰⁾を用いて作成した。1300塩基以上の16S rRNAのリファレンス配列を含む系統樹は、neighbor-joining法を用いて作成した。ブートストラップ値は1000回とした。

本研究で得られた塩基配列は以下のアクセッション・ナンバーでDDBJ/EMBL/GenBankデータベースに登録した。DGGEゲルから切り出されたDNA断片については、AB331442- AB331452を、微生物群集の16S rRNA遺伝子OTUsのPSM-1からPSM-62については、AB331453- AB331514を参照されたい。

3. 結果

(1) 液肥化過程における物理化学的パラメータの推移と大腸菌の消長

物理化学的パラメータの推移、および糞便汚染微生物の指標として測定した大腸菌数の推移は、3回の試験の平均値として示した。ORPについては、測定間隔が30分と短く、またその変化も急激であり、数値の平均化になじまないことから代表的な推移を示した。

1) pHの推移

pHは初発の7.1から実験開始1日目で8.3まで急上昇し、以後6日目に8.6に達するまで穏やかに上昇した(データ未掲載)。このpHの上昇は、アンモニア濃度の上昇と連続通気によるCO₂のストリップング^{28, 90, 95)}によるものと考えられた。開始1日後のアンモニア濃度の上昇は、添加した尿素的の分解に起因するものであり、1日目のアンモニア濃度である1,110 mg/Lは、最初に含まれていたアンモニア濃度と添加した尿素(2 g/L)のほぼ全量が、アンモニアに分解された濃度を合算した値に相当していた(図14C)。

2) COD_{Cr}およびTOC_sの推移

6日間の通気処理過程で初発COD_{Cr}の約60%が分解されていたことから、有機物の活発な分解が進行していたと考えられた(図14B)。TOC_sは開始後1日目に増加が認められたが、2日目以降から実験終了時まで一貫して減少傾向にあった(図14B)。

3) 大腸菌数の推移

大腸菌数は、初発の10⁷ CFU/mLから1日目には速やかに10² CFU/mLまで低下し、10³ CFU/mL以下の低い菌数で試験終了時まで推移した(図14D)。

4) ORPとアンモニア濃度およびVFA濃度の推移

ORPは、連続通気条件下ながら開始後12時間には-350 mVまで値が低下した(図14A)。この-350 mV程

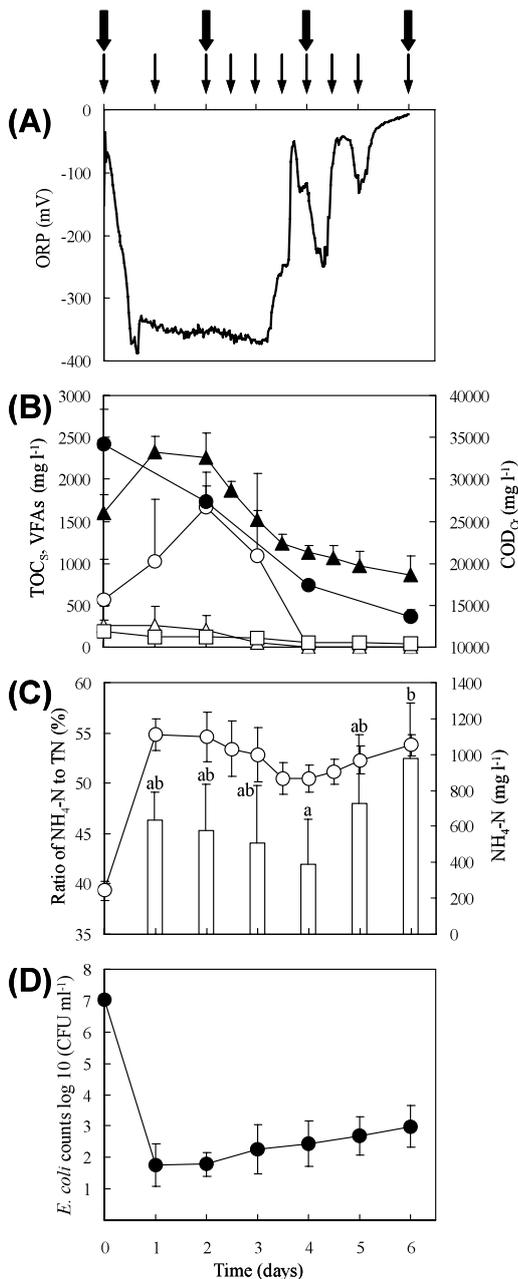


図 14. (A) 酸化還元電位, (B) 上清 TOC, VFA および COD_{Cr}, (C) アンモニア態窒素およびアンモニア/全窒素比, および (D) 大腸菌数の推移

Time courses of (A) oxidation-reduction potential (ORP) (B) supernatant TOC (TOC_s) and COD_{Cr}, and volatile fatty acids: closed triangles and circles represent the values of TOC_s and COD_{Cr}, respectively, while open circles, triangles and squares represent the values of acetic acid, propionic acid and butyric acid (C) NH₄-N in the pig slurry and the ratio of NH₄-N to total nitrogen. Ratio of NH₄-N to TN was statistically compared for the samples after day 1 when added urea was hydrolyzed: open circles and columns represent the values of ammonia concentrations and ratio of ammonia to total nitrogen, respectively, and (D) the number of *E. coli*. Thin arrows indicate the samples used for DGGE analysis (Fig. 15A). Bold arrows indicate the samples used for PCA (Fig. 15B) and clone library analysis. The error bars indicate standard deviations of the mean (n = 3). Only for ORP is a typical time course shown. ^{ab}: Means indicated with different letters are significantly different (p < 0.05).

度の低い ORP 値は 3 日目まで続き, この期間には豚糞尿中で主要な VFA である酢酸濃度, および TOC_s の増加が認められた (図 14B)。しかしながら 4 日目には, 酢酸を含む VFAs のほとんどが消失していた。

3 日目以降, ORP 値は -250 から -50 mV の間で変動しながら上昇し, 6 日目には -7 mV まで上昇した。この時期には TOC_s の分解速度は鈍化しており, アンモニア濃度の再上昇も認められた。Fig. 14C に 1 日目 (この時点でほとんどの添加尿素がアンモニアに分解されている) 以降の, 全窒素に対するアンモニア濃度の比率 (NH₄-N/TN: %) を示した。NH₄-N/TN は 4 日目に最も低く, 6 日目には有意に (p < 0.05) に増加していた。処理期間中, 亜硝酸態および硝酸態窒素は検出されなかった。

(2) PCR-DGGE 解析

3 回の液肥化試験のうち, 典型的な DGGE バンドパターンのプロファイルを図 14A に示した。物理化学的パラメータの推移と同様に, 微生物群集も開始 1 日後には顕著な変化が認められた。2 日目と 4 日目のバンドパターンにおいては, 顕著な変化は認められないが, その後 6 日目には再び大きなバンドパターンの変化が認められた。これらバンドパターンの経時的な推移は, 主成分分析の結果に明確に表れた (図 14B)。2 日目と 4 日目の座標は近接しているが, 0 日目および 6 日目の座標は大きく異なっていた。更に, 主成分分析の結果は, 3 回の繰り返し試験のバンドパターンの推移が互いに近似していることを示していた。

DGGE ゲルから重要と思われるバンドを切り出し, 精製した後に DNA 断片の塩基配列を調べた。BLAST 検索によるそれぞれの DNA 断片の Closest Relative の一覧を表 12 に示した。0 日目の微生物群集は, 消化管微生物の配列⁵⁶⁾ に高い相同性をもつ band 1, 2 のようなバンドの存在によって特徴づけられていた。液肥化開始後 1 日目には, Bacilli に分類される band 3, 4, 5 の配列が認められるとともに, 0 日目で認められた Clostridia に分類される band 1 の共存も認められた (図 15A)。2 日目には Bacteroidetes に分類される band 6 のようなバンドも認められた。DGGE ゲル上のバンドの中では, band 3 が処理期間を通じて特に強い強度で認められた。

4.5 日目には Bacteroidetes に分類される band 7, 8, Flavobacteria に分類される band 9, および Clostridia に分類される band 10 が明確なバンドとして認められた。これらのバンドは band 8 を除き, 微弱なバンド強度な

がらも 3.5 または 4 日目頃から認められていたバンドである。これらバンドパターンの変化は, band 1, 3, 4 および 6 のバンド強度の低下に付随して起こっていた。

(3) 16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリー解析

Day 0 (n=47 クローン), Day 2 (n=48 クローン),

Day 4 (n=50 クローン), Day 6 (n=48 クローン) のクローンライブラリーの比較を行った。Day 0 クローンライブラリーでは 22 の OTU が得られ, 豚糞尿中の微生物群集の高い多様性を示していた。クローンの大部分は, Clostridia (21/47) および Bacteroidetes (23/47) であった (図 16)。大部分の OTU は, PSM-28,

表 12. DGGE ゲルから得られた DNA 断片の配列に近縁な種とその相同性
Sequence similarities between DNA fragments recovered from DGGE gel and their closest relatives.

Band Number ^a	Closest relative			
	Organisms	Class ^b	Similarity ^c (%)	Accession No.
1	Uncultured bacterium clone p-956-s962-5	Clostridia	100	AF371797
2	Uncultured bacterium p-2513-18B5	Clostridia	100	AF371834
3	<i>Bacillus</i> sp. STB9	Bacilli	96	AY603079
4	Bacterium K2-24	Bacilli	96	AY345429
5	<i>Bacillus</i> sp. STB9	Bacilli	96	AY603079
6	<i>Petrimonas sulfuriphila</i> strain BN3	Bacteroidetes	93	AY570690
7	<i>Bacteroides</i> sp. 22C	Bacteroidetes	92	AY554420
8	<i>Chitinophaga</i> sp. Gsoil 052	Bacteroidetes	90	AB245374
9	<i>Flavobacterium terrae</i> strain R2A1-13	Flavobacteria	93	EF117329
10	Sulfate-reducing bacterium RA50E1	Clostridia	89	AY548776
11	<i>Aequorivita antarctica</i> isolate S4-8	Flavobacteria	96	AY771732

^a Band numbers refer to Fig. 15A.

^b The sequence of closest relatives were phylogenetically classified using the RDP classifier of the Ribosomal Database Project II

^c Percentage similarity to the closest relative according to the BLAST search.

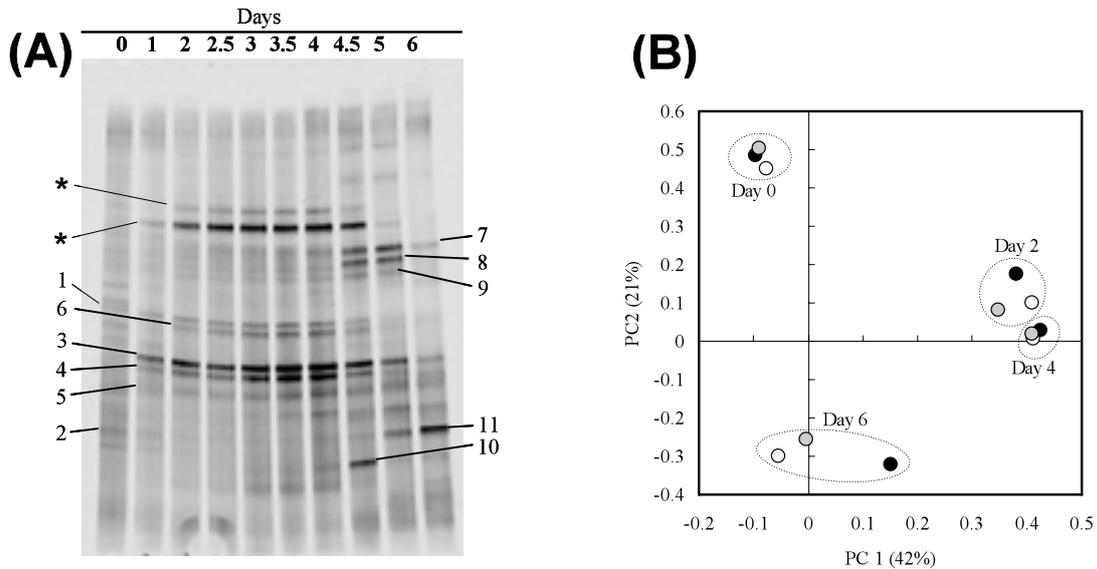


図 15. 豚ふん尿液肥化過程の微生物群集の DGGE プロファイル (A) と主成分分析による群集の推移の解析 (B)

(A) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiles of PCR-amplified 16S rRNA gene extracted from aerated pig manure slurry microflora. The numbered bands refer to those in Table 12. *: These bands are supposed to be a heteroduplex that was derived from the sequences represented by bands 3, 4 and 5, because the re-amplified fragments recovered from these bands showed bands 3, 4 and 5 on the DGGE gel. (B) Scatter plot of the results from the PCA of the DGGE profiles of three runs. Open, closed and shaded circles represent the plots of three independent runs. Open circles correspond to the run of the DGGE profile shown in (A).

-12, -13, -16, -17, -26 (EF529620, AY028442, AB064923, AY239461, AB238927, X94967) のように動物の糞便, またはルーメンに由来する配列と相同性が高かったが, 口腔 (PSM-11) (AY005061), または水田 (PSM-34) (Y15986) に由来する配列も認められた (表 13)。

Day 2 クローンライブラリーは 9 つの OTU から構成されており, Day 0 と比較して特定の細菌が集積したことを示していた (図 16)。Day 2 ライブラリーでは, *Bacillus* に分類されるクローンの顕著な増加が認められた (図 16, 表 13)。この優占の OTU である PSM-1 (21/48), および PSM-2 (9/48) は, DGGE ゲルでの band 3, 5 (PSM-1), および band 4 (PSM-2) に対応していた。PSM-1 と -2 は *Bacillus* に属し, 系統的に近似していた (similarity 98.3-98.7%)。またこれらと 97% 以上の相同性をもつ Closest relative は, データベース上に認められなかった。Day 2 ライブラリーで Clostridia は Bacilli に次いで 2 番目に多いクローンであったが, Day 0 ライブラリーと同一の OTU は認められなかった (図 17)。

Day 2 と同様の構成は, Day 4 ライブラリーにおいても認められた。Day 4 ライブラリーにおいてはより多くの *Bacillus* に属する OTU の集積が認められ, Day 2 と同様に多数の PSM-1 (28/50) および -2 (12/50) が認められた (図 16, 表 13)。また Day 4 ライブラリーは,

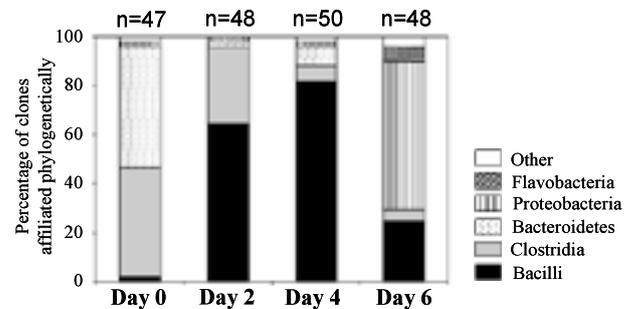


図 16. 0, 2, 4, 6 日サンプルから得られた 16S rRNA 遺伝子の系統的分類

Relative proportions of 16S rRNA gene sequences recovered from day 0, 2, 4 and 6 samples. "Other" represents Sphingobacteria, Mollicutes or unclassified bacteria combined. The number above the bar indicates the total number of clones obtained in this study.

表 13. 0, 2, 4, 6 日目のクローンライブラリーのうち全クローンの 5% 以上の割合を占めた OTU とその近縁種

The commonly isolated OTUs (>5% in total clones) from day 0, 2, 4 and 6 clone libraries.

Clone library	OTUs	% of Total	Class ^a	Corresponded DGGE band ^b	Best match in GeneBank	% similarity ^c
Day 0	PSM-28	10.6	Clostridia		EF529620	93
	PSM-16	8.5	Bacteroidetes		AY239461	87
	PSM-17	8.5	Bacteroidetes		AY862593	90
	PSM-11	6.4	Bacteroidetes		AY005061	90
	PSM-12	6.4	Bacteroidetes		AY028442	93
	PSM-13	6.4	Bacteroidetes		<i>Prevotella copri</i>	93
	PSM-37	6.4	Clostridia		Y15986	89
Day 2	PSM-1	43.8	Bacilli	Band 3, 5	AM690038	95
	PSM-2	18.8	Bacilli	Band 4	DQ448750	94
	PSM-34	14.6	Clostridia		AF443595	98
	PSM-36	8.3	Clostridia		<i>Oscillibacter valericigenes</i>	93
Day 4	PSM-1	56.0	Bacilli	Band 3, 5	AM690038	95
	PSM-2	24.0	Bacilli	Band 4	DQ448750	94
Day 6	PSM-1	10.4	Bacilli	Band 3, 5	AM690038	95
	PSM-56	10.4	β -proteobacteria		EF095770	96
	PSM-49	8.3	α -proteobacteria		AJ565420	91
	PSM-50	8.3	α -proteobacteria		AJ565420	91
	PSM-62	8.3	γ -proteobacteria		AM400231	96
	PSM-48	6.3	Flavobacteria		<i>Aequorivita antarctica</i>	93

^a The sequences of OTUs were phylogenetically classified using the RDP classifier of the Ribosomal Database Project II.

^b Band numbers refer to Fig. 15A and Table 12.

^c Percentage similarity to the closest relative according to the BLAST search.

Bacteroidetes のクローンの増加によっても特徴づけられた。しかし Day 4 ライブラリーの Bacteroidetes に分類された4つの OTU のうち3つは、Day 0 ライブラリーの Bacteroidetes と異なるクラスターを形成していた(図

17)。

Day 6 では、Proteobacteria に属するクローンが最も多くなり、以下 Bacilli, Flavobacteria がこれに次いだ(図 16)。しかしながら、DGGE プロファイルにお

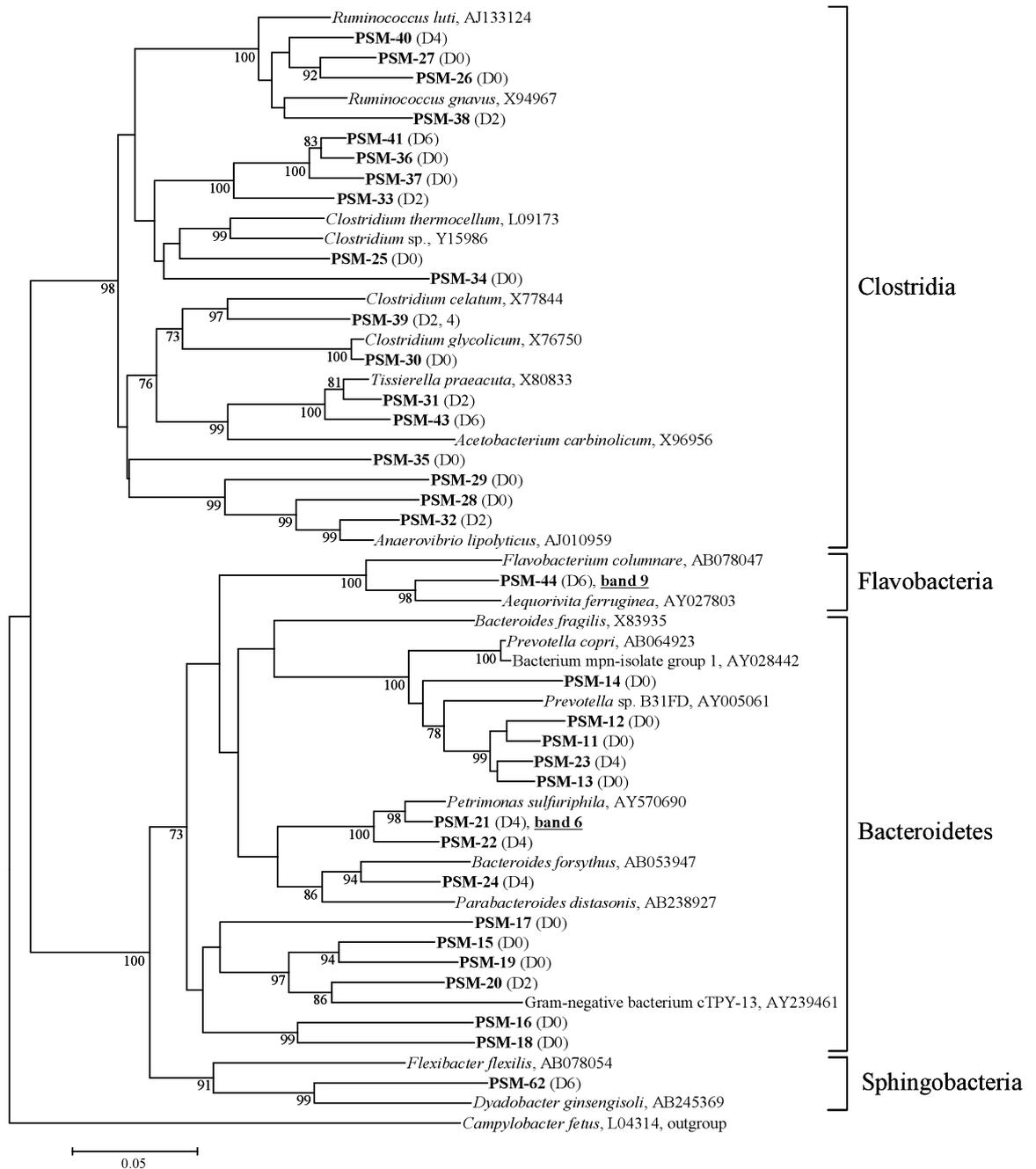


図 17. 0, 2, 4, 6 日目のクローンライブラリーから得られた Clostridia, Bacteroidetes, Flavobacteria および Sphingobacteria に属するクローンの系統樹

Phylogenetic tree generated by the neighbor-joining method showing the phylogenetic relationships among the clones from the aerated pig slurry samples on day 0, 2, 4 and 6 within the classes Clostridia, Bacteroidetes, Flavobacteria and Sphingobacteria. Bootstrap values are shown for each node that had >70% support in a bootstrap analysis of 1000 replicates. Sequences obtained in the present study are in boldface, followed by the clone library from which the individual 16S rRNA clone sequences came. *Campylobacter fetus* in the ϵ -proteobacteria served as the outgroup organism. The scale bar represents 5% sequence divergence. DDBJ/EMBL/GenBank accession numbers of reference sequences are given.

いても認められたように、band 3 および 5 に対応する PSM-1 (5/48) は依然として検出された (図 18, 表 13)。Proteobacteria に属するクローンのいくつかは、水圏に由来する微生物群の配列と高い相同性を示した。例えば canal water (PSM-45, -46) (AJ565420), および lake water (PSM-57) (AM400231) (図 18) がそれに該当する。また DGGE ゲルでの band 9 に対応する PSM-44 は Flavobacteria に属し、その配列は seawater (AY027803) に由来する微生物の配列と高い相同性を示した。

4. 考察

本研究で実施した液肥化処理過程では COD_{Cr} の減少に示されるように、豚糞尿の有機成分は効果的に安定化されていた。また臭気成分である VFAs 濃度は、4 日の処理期間で嗅覚的に受容できる濃度 0.23 kg/m^3 ⁹⁷⁾ にまで低下していた。もう一つの臭気物質であるアンモニアは、4 日目までは低下していたが、通気処理を継続することで再上昇することが明らかになった。また糞便汚染の指標微生物である大腸菌は、処理終了時に 10^3 CFU/mL 以下まで低減化されていた。この菌数は、40 CFR part 503 regulation⁹⁴⁾ の “Class A” の基準に相当する値である。

連続通気運転にも拘わらず処理の初日から ORP は、 -350 mV 近くまで急速に低下した。この低い ORP 値は、溶存酸素を消費する好気性菌の旺盛な呼吸によるものと考えられた。実際に PCR-DGGE およびクローンライブラリー解析では、この ORP が低い時期に *Bacillus* に属する細菌の優占が認められた。またこの時期には、有機物の可溶化と無機化が同時に進行しており、特に酢酸濃度は 2 日目に最高値となり 4 日目に消失していた。

Bacillus 属の細菌は様々な環境に遍在し、酢酸やプロピオン酸などの低分子の有機酸を含む種々の基質を好氣的に資化できることが知られている⁸⁸⁾。これまでに中温域の豚糞尿の液肥化処理サンプルからは *B. thuringiensis*⁵⁷⁾ が、高温域のサンプルから *B. licheniformis*³⁾, および *B. thermocloacae*⁴⁵⁾ が単離またはその近縁種のクローンとして得られているが、本実験で得られた OTU PSM-1, -2 の配列との相同性はいずれも 96% 以下であった。Nakamura et al.⁶⁶⁾ は、生ゴミ処理過程で優占となる新規に単離された Bacillaceae に属する株について生理・生化学性状の解析を行い、それらが有機廃棄物の分解を担っている可能性があることを報告している。堆肥化と同様に液状物の通気処理も世界で広く行われている手法であるが、これらのプロセスは未だに有機廃棄物

分解の重要な役割を果たしている未培養の菌種³³⁾ を多く含んでいる可能性があると考えられる。低 ORP の時期には Bacilli に加え、有機酸産生菌として知られている Clostridia および Bacteroidetes^{12, 85)} も検出された。Leung と Topp⁵⁷⁾ は、*Clostridium* sp. が豚糞尿の凝集物中で生存することを報告している。また好気性菌の呼吸によって造りだされた低 ORP 状態は、好気性菌とともに嫌気性菌の増殖をも可能にしたと考えられた。豚糞尿の有機成分の可溶化および無機化は、好気性菌と嫌気性菌が優占種として共存した状態で進行したのと考えられた。

ORP 値は 3 日目から上昇し始め、4 日目には VFAs の消失と TOC_s 分解速度の鈍化が認められた。この ORP の上昇は、基質を酸化するために必要な酸素要求量が減少したことによると考えられた。大部分の分解可能な炭素源が消失した後、Bacilli のバンド強度が低下していく一方で、Bacteroidetes のバンド (band 7, 8, 9 および 11) が認められた。Bacteroidetes に属する菌のいくつかは、下水処理プラントの好気プロセスに常在し、有機物分解を担っている。それらの多くはタンパク質、キチン質、デンプン、またはセルロースなど多様な高分子化合物を分解できることが知られている⁷⁸⁾。band 10 の DNA 断片は、4.5 日目に一時的に検出されたが、5 日目には認められなかった。この菌種は微生物群集の新しいメンバーとして増殖したが、直ちに死滅したのと考えられた。4 から 6 日目に認められた ORP の変動は、アンモニア濃度の上昇を伴っていることから、新たに生じた微生物群集が死菌を分解する際に要した酸素消費の変化に起因するものと考えられた。

Day 6 のクローンライブラリーにおいては、Proteobacteria が最も優占であり、次いで Bacilli, Flavobacteria の順であった。ライブラリーで優占であった Proteobacteria, および Flavobacteria の配列は、豚糞尿と比較して相対的に汚染度の低い水圏の細菌群の配列との相同性が高かった。それ故、6 日目に認められた微生物群集の明確な変化は、糞尿の有機成分の安定化と大いに関連があるものと考えられた。

窒素成分の変遷に目を向けると、アンモニア濃度は 1 日目で降徐々に低下し、4 日目に最も低い濃度を示した (図 14C)。このアンモニア濃度の低下は、 $NH_4\text{-N}/\text{TN}$ の比率としても 4 日目に最小となり、以後増加していくことから、アンモニアの揮散によるものではなく一時的な有機化によるものと考えられた。

豚糞尿におけるアンモニアの貯蔵形態として、*Bacillus* 株を用いる研究が試みられている^{39, 51, 76}。これらの報告のうち、Hoppensack et al.³⁹⁾ は液状糞尿の TN のうちの 28% が菌体バイオマスとして、また 0.1% がポ

リグルタミン酸 (PGA) の産生に用いられたことを示している。本研究で検出された *Bacillus* が PGA を産生するかどうかは明らかでないが、炭素源の好氣的な分解と NH₄-N/TN の低下、および炭素源の枯渇と NH₄-N/TN

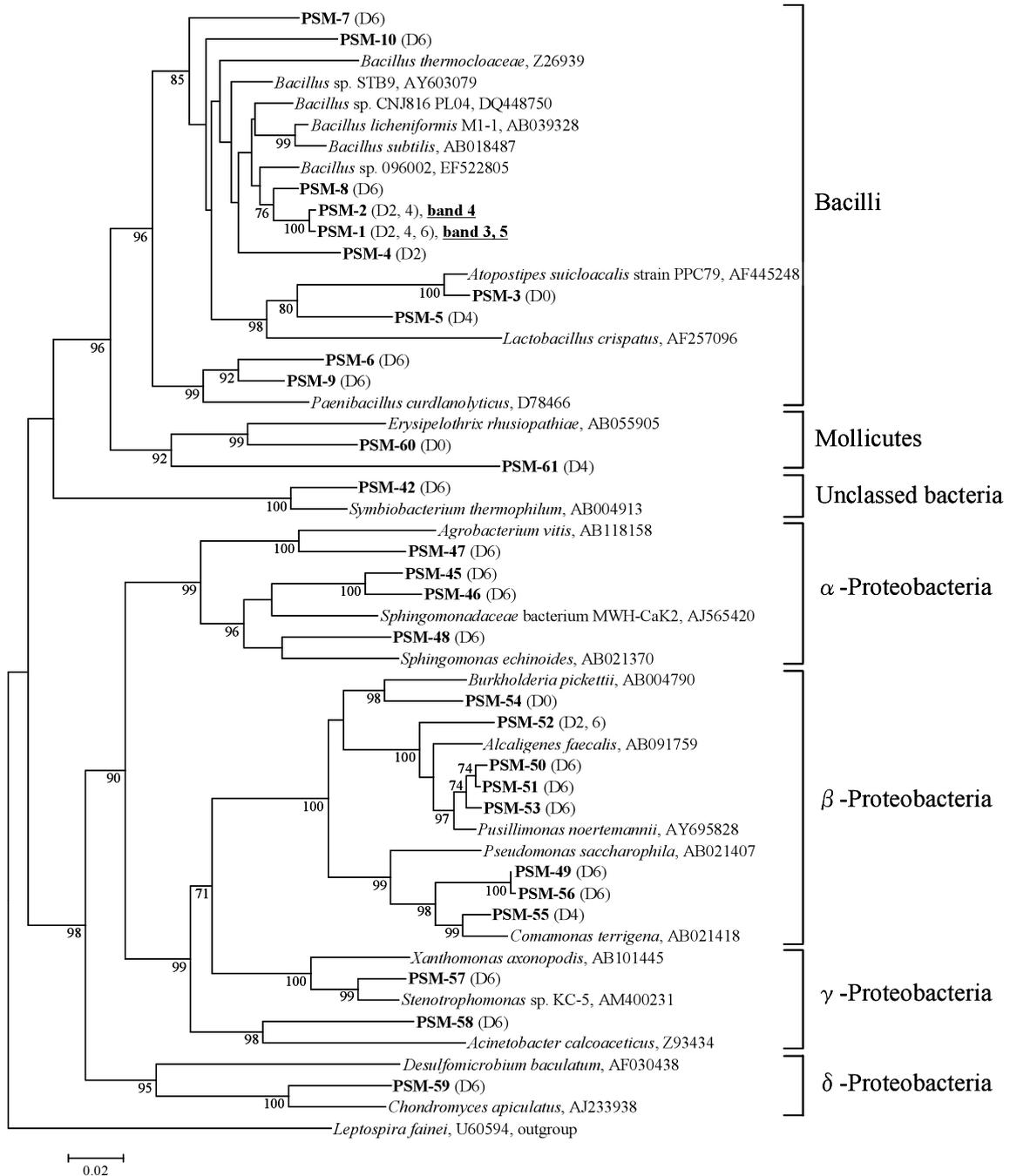


図 18. 0, 2, 4, 6 日目のクローンライブラリーから得られた Bacilli, α-proteobacteria, β-proteobacteria, γ-proteobacteria, δ-proteobacteria, Mollicutes および Unclassed に属するクローンの系統樹

Phylogenetic tree generated by the neighbor-joining method showing the phylogenetic relationships among the clones from the aerated pig slurry samples on day 0, 2, 4 and 6 within the classes Bacilli, α-proteobacteria, β-proteobacteria, γ-proteobacteria, δ-proteobacteria, Mollicutes and Unclassed. Bootstrap values are shown for each node that had >70% support in a bootstrap analysis of 1000 replicates. Sequences obtained in the present study are in boldface, followed by the clone library from which the individual 16S rRNA clone sequences came. *Leptospira fainei* in the *Spirochaetes* served as the outgroup organism. The scale bar represents 2% sequence divergence. DDBJ/EMBL/GenBank accession numbers of reference sequences are given.

の上昇は、*Bacillus* を優占した群集の推移と関連が深いと推察されることから、この時期の群集が糞尿中の適当な炭素源を用いて、アンモニアをバイオマスに変換していたものと考えられた。VFA の消失と TOC_s の分解速度の鈍化の後に、 $\text{NH}_4\text{-N}/\text{TN}$ は有意に増加した (図 14) が、この比率の増加は炭素源の欠乏によって死滅した菌体の分解に起因するアンモニア生成によるものと考えられた。

糞便汚染の衛生的な指標として培養法による大腸菌のモニタリングを行った。大腸菌数は至適生育温度に近く (40°C)、低 ORP 値 ($\sim -350\text{ mV}$) 条件であったのにも拘わらず、通気開始後直ちに 10^3 CFU/mL 以下にまで低下した。

Diez-Gonzalez et al.¹⁵⁾ は、静置した牛糞尿中で認められる大腸菌の死滅は、炭酸塩とアルカリ条件の協同効果による非生物的な要因に起因するものだとしている。本実験では、添加した尿素が 1 日以内に分解されることから、 CO_2 とアンモニアが生成されることで pH および炭酸塩濃度の上昇が起きると考えられた。しかしながら本実験は連続通気を行っており、産生された CO_2 は随時ストリップングされる状況にあった。また Harris et al.³¹⁾ は、VFAs が豚糞尿中の大腸菌を失活させることを報告しているが、その効果が認められる pH は 4.3 であり、その pH が 6.8 にまで上昇した場合には、低減効果は認められないとしている。本試験では、通気処理の初期に大幅な VFAs 濃度の上昇が認められたものの、期間を通じて pH はアルカリ側で推移していた。

Munch et al.⁶⁴⁾ は、豚糞尿および牛糞尿に対する通気処理は、大腸菌群数を大幅に低減させることを報告している。本研究の微生物群集の推移のデータは、通気処理によりたった 1 日で群集が大きく変化すること、また豚糞尿に由来する消化管微生物が大幅に減少することなどが認められている。共存微生物群による生物的な有害微生物の抑制は、これまでにいくつか報告されており^{40, 86)}、通気処理によって優占となった *Bacilli-Clostridia-Bacteroidetes* を主体とする菌叢が、大腸菌を含む消化管由来の微生物群の排除に作用した可能性も考えられる。

本研究では、消化管由来微生物群集が通気処理により急激に *Bacillus* 属優占の群集に変化すると共に、その過程で VFA やアンモニア濃度の減少、および大腸菌数の大幅な低下が起こることが示された。通気条件下における ORP 値は、*Bacillus* をはじめとした好気性菌の呼吸の影響を受けるとともに、アンモニアの同化を伴う易分解性炭素源の分解とも関連が深かった。よって ORP 値

を読み取ることで処理過程の進行をモニタリングすることが可能であり、低級脂肪酸やアンモニアのような臭気物質が低下する時期を検出することで、プロセス管理上、有用な情報を得ることができると考えられた。

本研究で検出された *Bacillus* のうち、PSM-1 および -2 の *Bacillus* 株は、通気処理プロセスにおいて重要な役割を担っている可能性がある。新種の可能性もあるこの 2 つの *Bacillus* 株については、処理過程におけるそれらの代謝活性および他の菌群に対する影響 (大腸菌の抑制に働く作用など) などに注目しつつ、更なる研究が必要である。

5. 要約

豚糞尿には低級脂肪酸をはじめとした強烈な臭気物質が含まれており、有機肥料として圃場に散布する際には、通気処理により臭気を大幅に低減させるとともに有機成分を安定化させることが奨励されている。この液肥化プロセスは、通気処理によって新たに生じた微生物群の活性によって進行すると考えられる。そこで本研究では環境負荷物質として重要な臭気物質、および糞便汚染指標微生物である大腸菌の消長を測定するとともに、処理過程における微生物群集の変遷を非培養的手法により解析した。豚糞尿の ORP は連続通気であるのにも拘わらず 1 日目に -350 mV 近くまで低下したことから、好気性菌群による活発な溶存酸素の消費が起こっていたと考えられた。この ORP が低い環境では *Bacilli*, *Clostridia*, および *Bacteroidetes* が優占となっており、特に *Bacillus* は 2 日目のクローンライブラリーで全クローンの 65% を占めていた。この ORP が低く、*Bacillus* が優占していた環境下では、臭気物質である低級脂肪酸およびアンモニア濃度が低下するとともに、大腸菌数が大幅に低下していた。低級脂肪酸が消失し、糞尿中の可溶性炭素成分の分解が鈍化した 4 日目前後を境に、ORP 値は上昇し、 -250 から -50 mV の値を上下しつつ 6 日目に -7 mV まで上昇した。この ORP 値の変動は可溶性炭素成分の消失に伴う好氣的代謝活性の減退と、飢餓により生じた死菌を新たに基質として分解する際に要した酸素消費によるものと考えられた。糞尿中の有機成分の安定化と ORP 値の上昇に伴い、微生物群集は *Bacillus* から *Proteobacteria* を優占とする菌叢へと遷移した。通気処理によって生じた 2 つの未培養の菌種を含む *Bacillus* が優占する過程で、豚糞尿の主要な臭気成分である低級脂肪酸の分解とアンモニアの有機化が進行するとともに、大腸菌数も大幅に低下し、豚糞尿の有機

成分も安定化していった。

第6章 総括

本研究において、堆肥化および液肥化処理過程における糞便汚染の衛生的指標である大腸菌数の消長、および死滅を促進する諸条件に関する様々な知見が得られた。

第2章においては、水分調整材の不足に起因する不適切な堆肥化処理と、それに付随した大腸菌の残存に対し、食品廃棄物等の各種有機廃棄物の混合による処理プロセスの改善を試みた。実際の有機廃棄物の利用に先立ち、培地成分として用いられるポリペプトンを水分の異なる堆肥原料に添加して、その温度上昇効果を検討した。通常、適正な堆肥化のためには70%以下の水分が推奨されている⁹⁾が、本試験ではこの適正水分よりも高い水分で堆肥化を実施した。その結果、原料水分が高ければ高いほど堆肥の温度上昇は抑制され、最も水分が多い78%の堆肥化条件では、最高温度は53.5℃までにしか達せず、更に大腸菌数もほとんど低下しないことを明らかにした。一方でポリペプトンを添加した堆肥は、いずれの水分においても無添加の堆肥よりも高い温度で推移し、78%の水分において最高温度は62.7℃に達し、大腸菌数も大幅に低下することが明らかとなった。適正水分の上限近い71%の水分条件では、ポリペプトンの添加の有無に関わらず最高温度や大腸菌の低減効果もほぼ同程度であったことから、添加効果は特に高水分原料に対して有効であることが示された。この結果を受け、単独では温度上昇が期待できない高水分(78%)の牛糞-細断稲ワラ混合物を対照として、各種有機廃棄物との混合堆肥化試験を行った。その結果、ポリペプトン添加試験同様に、無添加では大腸菌数を低下させる程の温度上昇は認められなかったが、食品副産物や食品残渣である豆腐粕、米ぬか、油かす、および生ゴミとの混合により堆肥温度は上昇し、大腸菌数も大幅に低下することが明らかとなった。堆肥化過程における温度上昇は酸素消費量と相関が認められることから^{18,21)}、有機廃棄物の混合に伴う微生物活性の増大が温度上昇に寄与していると考えられた。有機廃棄物の混合により、微生物群が利用可能な基質量が増加したと考えられたため、それぞれの混合物の生物化学的酸素要求量(BOD)と、堆肥の最高温度との相関を検討した。その結果、両者の間には正の相関が認められ、BOD値が166.2 O₂ mg/g-dry matter以上の時に、大幅な温度上昇と顕著な大腸菌数の低下が認められることが明らかとなった。

それでは本実験よりも更に高い水分の原料においても、BOD値を高めること(基質量を増やすこと)で、高温堆肥化が実現できるのであろうか。有機廃棄物の好氣的分解では、微生物群に対する酸素供給が不可欠である。本試験では細断ワラという堆積物中に空隙を維持するのに適した水分調整材を利用したため、比較的酸素(空気)の浸透は確保されていたと考えられる。しかし今回の試験よりも更に材料の水分が高い状態では、材料の泥濘化を招き、好氣的な分解が阻害される恐れがある。更に嫌気部分で生成する有機酸等によるpHの低下は、堆肥化過程の遅延を起こすことが知られている²¹⁾。また本試験における米ぬかと油かすの混合堆肥化試験の比較においても、BOD値の比較では、油かすよりも米ぬかの値の方が高い一方で、温度上昇効果は米ぬかの方が低いという結果が得られている。この差異は、顆粒状の油かすと泥濘化を起こしやすい米ぬかの物理性の違いが影響していたものと考えられた。よって高水分材料に対する有機廃棄物の混合は、温度上昇およびそれに付随した大腸菌の低減化に効果的に働くが、堆積物中の通気性の確保も重要な条件であると考えられた。

小型堆肥化リアクターを用いた第2章での結果から、堆肥化処理における有機廃棄物の混合効果が明らかとなった。しかし有機廃棄物の混合は、堆肥化過程で分解されるべき有機物負荷量を高めることであり、成分の安定化、すなわち堆肥の腐熟に要する時間が延長される可能性があった。また最も現場で一般的な堆肥化手法である堆積型堆肥化処理を考えた場合には、強制通気でないことによる通気性の悪化、自重による堆積物底部の圧密化、堆積物の各部位の温度差等が生じる可能性があったため、小型堆肥化リアクターで得られた結果がそのまま反映されるか否かは明らかでなかった。そこで第3章では第2章の試験で混合効果が認められた豆腐粕について、小型堆肥化リアクターを用いて豆腐粕混合堆肥の分解特性を測定するとともに、パイロット・スケールでの堆積型堆肥化処理を実施し、堆積物の各部位の温度上昇効果について検討した。

豆腐粕の混合割合を変えた堆肥化試験において、混合割合の増加は最高温度に対してではなく、高温(>55℃)持続時間の延長に効果的に働くことが明らかとなった。またこの際、堆肥有機成分の安定化の指標であるBOD値は、豆腐粕の混合により著しく増加するものの、12日間の堆肥化で無添加と同程度まで低下していた。パイロット・スケールでの静置堆積型堆肥化では、混合の有無に関わらずいずれの堆積物においても中心部と周辺

部では温度推移は異なり、周辺部の方が低い傾向にあった。また両者の最高温度を比較すると、すべての部位において添加区の方が高い傾向にあった。堆肥化過程での大腸菌群の死滅を徹底する為に定められた USEPA の“A process to further reduce pathogens (PFRP)”の基準によれば、55℃以上の堆肥温度を少なくとも3日以上継続させるとある。この基準を満たす部位は、無添加で9つの温度測定部位のうち4箇所ではなかったが、豆腐粕添加においては7箇所であった。このように豆腐粕添加は最高温度を上昇させるだけでなく、大腸菌の死滅に必要な高温持続時間を堆積物中の広範囲な部位で実現することが明らかとなった。今回は静置状態での堆積堆肥化を行ったが、適度な切り返し(攪拌)を行うことで、より多くの部分が高温に曝露され、徹底した大腸菌の死滅が期待できると考えられる。

堆肥化過程での有害微生物の低減以外にも、完成した堆肥中での有害微生物の再増殖が近年問題となっている。処理プロセスの厳密な管理が難しい堆肥化処理では、有害微生物を完全に排除することは難しい。有害微生物が残存する堆肥に、または外的要因で堆肥が汚染された時に、適当な温度と水分条件が与えられることで大幅に有害微生物が増殖することが報告されており^{27,40,80,100}、Soares et al.⁸⁹⁾は堆肥中の未分解の物質が大腸菌群の再増殖に影響を与えると推察している。一方で、Sidhu et al.⁸⁶⁾は、堆肥化過程で出現する微生物群集が有害微生物の増殖を抑制することを報告している。一般に堆肥化の進行に伴い、有機物の減少、物理性の変化、温度の変化が起こり、それに従って微生物群集も遷移していく。これら物理的、化学的および生物学的な変化は複雑に絡み合い、有害微生物の再増殖に影響を及ぼしているものと考えられた。

近年、牛舎の床に散布するオガクズ等の敷料は不足する傾向にあり、その代替物として乾燥した堆肥を用いる事例が見受けられる。有機肥料として施用した堆肥中での有害微生物の増殖は勿論のこと、敷料として利用した牛床での有害微生物の再増殖も乳牛の疾病防止の観点から好ましいものではない。有機廃棄物の添加によって増加した易分解性有機物は、堆肥中での有害微生物の増殖を促進する可能性がある。そこで第3章で作成した堆積型堆肥の様々な堆肥化ステージにおいて採取した堆肥サンプルを用い、人為的に接種した大腸菌の増減を測定することで、堆肥における増殖リスクの評価を行った。その結果、ほとんどの堆肥で大腸菌は増殖し、無添加および豆腐粕添加ともに堆肥温度が高温期にあった堆肥にお

いて最も増殖割合が高いことが明らかとなった。当初は易分解性有機物量が多く残存している0日目の堆肥が、最も増殖割合が高いと予想していたが、有機物の低分子化が進行した高温期(7日目)の堆肥の方が、大腸菌にとって利用しやすい形態の基質を豊富に含んでいたものと考えられた。堆肥化開始後13日を経過した堆肥では、190日以上堆肥化を行った堆肥の増殖割合と有意差は認められなかった。また無添加および豆腐粕添加の0日目の堆肥サンプル間の比較からも分かるように、豆腐粕を添加した堆肥では、大腸菌の増殖は有意に高かった。これは豆腐粕に含まれる基質により、大腸菌の増殖が促進されたものと考えられた。しかしながら日数を経る毎にその増殖割合も低下することから、分解が十分に進んだ豆腐粕混合堆肥の再増殖リスクは、190日以上堆肥化を行った堆肥と同程度になると考えられる。以上から有機廃棄物を混合した堆肥、または高温期にある堆肥は、大腸菌の増殖ポテンシャルを有するが、処理期間に十分な攪拌と有機物の分解を進行させることで、再増殖リスクの少ない堆肥を生産することが可能となると考えられた。

第2章から4章までは堆肥化処理を対象とし、2,3章の結果から、堆肥化過程の大腸菌の死滅は堆肥温度に依存していること、その境界温度は55℃前後であること、有機廃棄物の混合によってもたらされる易分解性有機物の増加は、微生物群を活性化し、温度上昇を促進することが明らかとなった。この温度上昇効果は水分が高い時に特に顕著であり、高水分原料の温度上昇を補完する有機廃棄物の混合処理は、衛生的な面からも、また有機資源循環の視点からも有効な処理と考えられた。また第4章では堆肥中での有害微生物の再増殖リスクの評価を行い、増殖リスクが高い堆肥化ステージの特定と、十分な堆肥化期間を確保し有機物の分解を徹底することで、増殖リスクを低減させることが可能であることを数値的に示すことができた。有機質堆肥の腐熟の観点から、十分な堆肥化期間の確保の必要性はこれまでも言われていたが、有害微生物の増殖リスクについても同様のことが確認されたことは、堆肥の製造管理上意義がある。

家畜糞尿の液状物に対して通気を行う液肥化処理は、一般的に堆肥化過程ほどの温度上昇が期待できない。というのも液状糞尿は、糞と比較して単位体積当たりの有機物量(基質量)が少ない一方で、比熱の高い水分を多く含んでいるからである。一部、通気装置や循環装置からの機械廃熱の伝導により、55℃以上の温度を実現する

装置の報告も見受けられるが^{44,75)}、大部分の通気処理過程は中温域で推移する⁷⁾。よって高温処理が可能な堆肥化処理と比較して、液肥化処理における大腸菌の低減は困難であると予想された。しかし中温域の液肥化過程における有害微生物³⁴⁾、または大腸菌群⁶⁴⁾の低減は以前から報告されており、その低減化機構についても非生物学的な^{15,31,74)}、または生物学的な要因^{40,86)}の諸説が混在している。そこで本研究では、通気処理過程における大腸菌の消長とともに、その生存に影響を与えると予想された物理化学的パラメータ、有機物量（基質量）そして生物学的な要因として微生物群集の測定を行った。通気処理過程では、未培養の微生物を含む群集が急激に遷移していくことが予想されたため、微生物群集の解析は、細菌の16S rRNA 遺伝子を標的とした非培養的手法によって行った。

豚糞尿への通気処理は、物理化学的パラメータおよび微生物群集の構成に大きな変化をもたらしていた。通気処理開始前には、消化管に由来すると考えられる微生物群が大部分を占めたが、2日目には *Bacilli-Clostridia-Bacteroidetes* が優占となり、特に *Bacillus* は2日目のクローンライブラリーにおいて全クローンの65%を占める程の優占状態であった。またORP値は1日目には-350 mV 近くまで低下し、連続通気条件にも拘わらず液中が還元的状態になっていることを示していた。このORPの低下は、*Bacillus* をはじめとする好気性菌が、急激に酸素を消費していることに起因するものと考えられた。この *Bacillus* の優占は、有機物分解の進行、悪臭であるVFAおよびアンモニアの低下、そして大腸菌数の顕著な低下等と同時期に起こっていた。通気条件下において *Bacillus* を含む好気性菌群は、VFAを含めた有機物を基質として利用する際に酸素を消費し、同時にアンモニアを同化したものと考えられた。またこの急激な物理的、化学的な性状の変化、および微生物群集の変遷の中で、大腸菌数は初発の 10^7 CFU/mL から1日後には 10^2 CFU/mL まで減少し、処理最終日の6日目まで 10^3 CFU/mL 以下の低い菌数で推移した。この大腸菌数は、水質汚濁防止法の河川への放流基準値である3,000個/cm³を下回る値であった。これまでに大腸菌数の死滅機構については、大きく分けて非生物学的、および生物学的要因の2つの説が報告されている。Diez-Gonzalez et al.¹⁵⁾ は、静置牛糞尿中の大腸菌の死滅は、尿中の尿素の分解によって生成したアンモニアによるアルカリ(pH: 8.5)と、CO₂の生成による炭酸塩の蓄積(100 mM)の協同効果によって起こると報告している。本研究

においても大腸菌数が大幅に低減する1日目には、アンモニア濃度の上昇、およびpHの上昇(～8.3)が認められた。本研究では液中の炭酸塩濃度は測定していないが、Diez-Gonzalez et al.の実験条件と異なり我々の実験では連続通気と攪拌を行っているため、CO₂のストリッピングが生じやすい状況にあった。また液肥化後期にpHは約8.6程度まで上昇したが、逆に大腸菌数は微増傾向にあり、高pHと大腸菌低減効果との相関は明確ではなかった。生物学的な要因としては、Sidhu et al.⁸⁶⁾が滅菌、および非滅菌堆肥に接種したサルモネラ菌の消長の比較から、堆肥中の土着の微生物群によるサルモネラ菌の拮抗作用の存在を報告している。Millner et al.⁶³⁾は、堆肥中の大腸菌群、または代謝活性がある微生物群や放線菌が、サルモネラの死滅を促進したと報告している。この現象については第4章の堆肥への大腸菌接種試験において、有意差は認められないものの、大腸菌群数が最も多い堆肥においてのみ(図12: C22-compost) 接種大腸菌の減少が認められたという結果が得られている。クローンライブラリー解析では、0日目と2日目のライブラリーに同一のクローンが認められなかったことから、通気処理により0日目の消化管由来の微生物群集が積極的に排除されたと考えられた。

活性汚泥処理を行っている汚水中での原虫による細菌の捕食は一般的な事象であるが、検鏡観察では原生動物の存在は認められなかった。本実験は6日間のバッチ式処理であり、大腸菌の減少に影響を与えるほどの原生動物の増殖は起こらなかったものと思われた。

液肥化過程の初期には、通気条件下ながら旺盛な酸素消費が起こることで還元的な状態になり、嫌気性菌と考えられる *Clostridia* や *Bacteroidetes* と *Bacillus* の共存が認められた。しかし有機物の分解が進行するとORPは上昇し、微生物群集も *Bacillus* の優占の群集から *Proteobacteria* を中心とした、比較的有機物負荷が少なく、溶存酸素の高い環境に適した水圏微生物群と高い相同性がある群集へと遷移していった。このように通気処理過程にある微生物群集は、基質の減少やそれに伴うORPの変化などの液中環境の変化と相互に作用を及ぼしつつ遷移していったものと考えられ、微生物生態学的にも非常に興味深い現象であると思われた。またORPの推移をモニタリングすることで、VFAおよびアンモニアなどの悪臭物質の減少、および易分解性有機物の量を検知できる可能性が示され、技術的にも応用可能な現象を明らかにしたことは非常に意義がある。

本研究では大腸菌死滅機構の解明までは至らなかった

が、物理化学的パラメータ、および微生物群集の同時測定を実施したことで、大腸菌低減に影響を及ぼす可能性のある各種パラメータの変動を把握するとともに、通気処理で優占となる主として2種類の未培養の *Bacillus* 属の細菌の存在を明らかにすることができた。これら細菌は、処理プロセスの優占菌というだけでなく、大腸菌を含む有害微生物の低減等にも作用している可能性もあり、これらの機能解析や通気処理過程での役割を解明することで、より安全で効率的なプロセスの構築に資する技術が開発される可能性がある。

本研究では、堆肥化および液肥化処理過程において、糞便汚染の衛生的指標である大腸菌の消長、および死滅を促進する諸条件について検討を行った。本来、大腸菌は糞便汚染の指標微生物の位置付けだが、近年では O157, O111, O26 をはじめとした病原性株による疾病も発生していることから、処理過程での低減化の重要性は増してきている。また病原性微生物とは別に、近年、家畜に投与した抗生物質や合成抗菌剤に耐性を持つ薬剤耐性菌の存在が問題となっている。牛群における多剤耐性大腸菌の存在も報告されており⁴⁶⁻⁴⁸⁾、耐性遺伝子をもった菌が排泄物等を介して土壌や河川などの環境中に放出された場合、それら耐性遺伝子が他の菌に伝達されることが指摘されている^{8, 62, 70)}。これら耐性菌の存在は人間や家畜の投薬治療に対する脅威となるため、排泄物処理過程における腸内細菌群の低減は、これまで以上に重要性を増すと考えられる。

畜体に由来する大腸菌以外の有害微生物では、同じ腸内細菌科に属し、温血動物の消化管内で増殖するサルモネラ菌の環境中での動態が注目されている⁹⁸⁾。環境中での大腸菌とサルモネラ菌の動態の比較から、大腸菌数の測定はサルモネラ菌のリスクを評価する上での指標になりうるという報告^{55, 68, 73)}がある一方で、10℃以下の河口水中⁷⁹⁾、または塩分の高い水中(brackish water)⁶⁰⁾では、サルモネラ菌の生存性の方が高いことが報告されている。またサルモネラ菌はハエの体内で4週間程度生存することが知られており⁶¹⁾、鳥やハエはサルモネラ菌が環境中に拡散する際にベクターとして機能すると考えられている¹⁴⁾。生体外に糞とともに排出された大腸菌は、温度や豊富な栄養分等の条件が揃いやすい熱帯地域を除き、環境中では一時的な再増殖はあるものの最終的には減少の一途をたどる一方で、サルモネラ菌は環境中に放出された後も少ない菌数ながらも生存を続け、ホストとなる動物体内で再び増殖すると考えられている⁹⁸⁾。しかし、堆肥化過程における高温曝露のように物理的に菌を

死滅させるプロセスは、菌種に関わらず画一的に作用すると考えられる。表3に示したように大腸菌とサルモネラ菌の死滅温度は、55～60℃とほぼ同程度であることから、堆肥化過程の大腸菌数の減少は、サルモネラ菌の動態をも含めた指標になると考えられる。また USEPA の調査において、365 サンプルの堆肥中のサルモネラ菌を測定した結果、165 サンプルが汚染されていたが、サルモネラ菌が検出されなかった86 サンプルは、すべて大腸菌群数が1,000 MPN/g 以下であったことが報告されている⁹⁹⁾。これは大腸菌群数が1,000 MPN/g 以下に低下した堆肥では、サルモネラ菌が検出される確率が極めて低いことを示している。一方で液肥中のサルモネラ菌の残存については、液中環境において大腸菌より高い生存性のデータが示されていることから^{60, 79)}、更なる検証が必要であると考えられる。

堆肥化過程における有害微生物の制御については、堆肥全体の高湿曝露を基本とし、堆肥原料単体での温度上昇が期待できない場合には、本研究で効果の認められた易分解性有機物を豊富に含む有機廃棄物の添加や、通気性を改善する副資材の添加により温度上昇を促進することが現実的であると考えられる。また堆肥中での有害微生物の再増殖については、本研究で明らかとなった基質の残存がその一因と考えられる。現在の堆肥の評価方法は、コマツナ種子の発芽試験による植物への生育障害に対する評価が一般的であるが、今後は有害微生物の再増殖リスクの評価についても、堆肥の品質の新たな評価軸として開発する必要があると考えられる。

糞尿液状物の液肥化過程では、通気開始から1日の処理で4オーダー程度の大腸菌の減少が認められた。この大腸菌数の減少は、通気による急速な有機物分解の進行とそれを担う微生物群集の増殖時期と時を同じくすることから、共存微生物群による拮抗作用がその一因と考えられた。そこで基質の競合による影響を明らかにするため、同一の処理条件にある2つの液状糞尿のうち1つにグルコースを添加したところ、大腸菌は 10^{10} CFU/mL 程度まで増加することを確認した(データ未掲載)。次に通気処理過程で優占となる *Bacillus* の増殖を抑制するため、グラム陽性菌に抗菌スペクトルをもつバンコマイシンを添加したところ、大腸菌は 10^8 CFU/mL 近くまで増加するとともに通気処理期間中も 10^4 CFU/mL を超える菌数で推移した。この時、DGGE プロファイルには *Bacillus* (OTU PSM-1 および -2) に由来するバンドは確認されず、優占種である *Bacillus* を含むグラム陽性菌を抑制することで、大腸菌の生存性が高まることが示さ

れた（データ未掲載）。大腸菌数は基質の添加により、また共存するグラム陽性菌を抑制することにより増加することから、基質の競合を介した共存微生物群との競合が大腸菌の消長に影響を及ぼしている可能性も考えられた。いずれにせよ1日で大腸菌数を4オーダー低減化させる現象は、有用な有害微生物の制御法になりうると考えられた。微生物間の拮抗作用を利用した有害微生物の制御は、薬剤の使用と異なり、環境に優しく、コストの安い手法であると考えられる。この機構解明によって得られる低減効果の増強、または既報の生物的・非生物的な低減効果との組合せ等により、これまで以上に有効な有害微生物の制御手法の確立が期待される。

本研究では有機肥料の循環利用の障壁となりうる有害微生物の低減について、他産業に由来する有機廃棄物の統合処理を行うことでその達成を試みた。有機廃棄物との混合処理の主眼は有害微生物の低減化にあったが、温度上昇が見込める有機廃棄物を無差別に利用すればいいというものでもない。堆肥利用に関する問題点として「堆肥成分の不安定」が挙げられており、堆肥の温度上昇を期待して様々な有機廃棄物を無秩序に混合した場合、大腸菌数の低減は達成できても肥料成分の変動が起きることにより、耕種農家での利用性が低下することが危惧される。せっかく作られた有機質肥料も利用されなければリサイクルの意味を持たない。有機廃棄物のリサイクルが浸透するためには、安定した量と質で供給される有機廃棄物同士の適切な組合せと、安定した品質を産出できる堆肥化システムが必要となる。処理のための処理ではなく、確固としたリサイクルのシナリオに立った視点が必要である。そのためには処理の連携、肥料の運搬、利用先の確保など循環型社会を構築する上で必要な社会的なインフラの整備も必要と考えられる。こと環境問題に関しては、テクノロジーと社会システムが両輪となって取り組むべき事柄であると考えられる。

謝 辞

本論文は、著者が農林水産省畜産試験場（現独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所）に赴任後、行った研究の成果を学位論文として取り纏めたものである。本研究を遂行するにあたり、多くの方々からの御指導、御助言、御支援、激励のお言葉を頂き、ここにその感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、東京大学の五十嵐泰夫教授には本論文の取り纏めの機会と適切な指導を賜りまし

た。研究のみならず農業、食品産業そしてエネルギー問題までを大局的に見据えるその視点は大いに勉強になりました。石井正治准教授には、微生物学の面からの数々のご助言を、そして情熱的な激励を頂きました。石井正治准教授との交流の中で、教科書には載っていない大切な事柄を勉強させて頂きました。春田 伸助教（現首都大学東京准教授）には、微生物群集の解析の詳細なご指導、ご教示を賜るとともに、長時間におよぶディスカッションにもお付き合い頂きました。

畜産草地研究所の羽賀清典研究管理監には、研究全般にわたり物心両面のご指導と便宜を賜りました。このような形で研究を継続し取り纏めることが出来たのは、羽賀清典研究管理監の日々のご理解とご鞭撻がなければ到底なし得なかったものであります。黒田和孝主任研究員には、研究室の同僚として数多くの示唆に富んだご助言を頂きました。

元東京農工大学の野附 巖教授、東京農工大学の鎌田寿彦教授には著者が畜産環境問題に関わるきっかけと親身なご指導を賜りました。

動物衛生研究所の中澤宗生疫学研究チーム長には、菌株を譲渡して頂くとともに病原性微生物についてのご教示を賜りました。林 孝室長（現中央農業研究センター 上席研究員）には統計学についてご指導を頂きました。桃木徳博室長（現台湾国食糧肥料技術センター 副所長）には研究が育つのをあたたかく見守って頂きました。三上栄一博士には環境微生物について示唆に富んだご意見を頂きました。

畜産草地研究所の代永道裕上席研究員、田中康男チーム長、鈴木一好上席研究員、長田 隆上席研究員、和木美代子主任研究員、福本泰之主任研究員、荻野暁史研究員、横山 浩研究員、安田知子研究員には日常の研究活動において多くの協力と便宜を図って頂きました。

東京大学応用微生物学研究室では新井博之助教、青島美穂博士の研究に真摯に取り組む姿勢に刺激を受けました。応用微生物学研究室における複雑微生物群グループゼミで席を同じくした中村浩平氏、加藤創一郎氏、佐々木建吾氏、堀知行氏には、数々の批判とご助言を頂きました。

ここに記して深く感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Avery, L. M., Killham, K. and Jones, D. L. (2005). Survival of *E. coli* O157 : H7 in organic wastes

- destined for land application, J. Appl. Microbiol., 98, 814-822.
- 2) Bach, S. J., Stanford, K. and McAllister, T. A. (2005). Survival of *Escherichia coli* O157 : H7 in feces from corn- and barley-fed steers, FEMS Microbiol. Lett., 252, 25-33.
 - 3) Beaudet, R., Gagnon, C., Bisailon, J. G. and Ishaque, M. (1990). Microbiological aspects of aerobic thermophilic treatment of swine waste, Appl. Environ. Microbiol., 56, 971-976.
 - 4) Bremner, J. M. (1965). Total nitrogen. In : Methods of Soil Analysis, 1149-1178. American Society Agron. Inc.
 - 5) Burge, W. D., Enkiri, N. K. and Hussong, D. (1987). *Salmonella* regrowth in compost as influenced by substrate (*Salmonella* regrowth in compost). Microbial Ecology, 14, 243-253.
 - 6) Burton, C. H. and Sneath, R. W. (1995). Continuous Farm Scale Aeration Plant for Reducing Offensive Odors from Piggery Slurry - Control and Optimization of the Process, Journal of Agricultural Engineering Research, 60, 271-279.
 - 7) Burton, C. H. and Turner, C. (2003). Manure management treatment strategies for sustainable agriculture. Editions Quae.
 - 8) Chee-Sanford, J. C., Aminov, R. I., Krapac, I. J., Garrigues-Jeanjean, N. and Mackie, R. I. (2001). Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities, Appl. Environ. Microbiol., 67, 1494-1502.
 - 9) Chikh, G., Pourquie, J., Kaiser, P. and Davila, A. M. (1997). Characterization of the bacterial flora isolated from a pilot-scale lagoon processing swine manure. Can. J. Microbiol., 43, 1079-1083.
 - 10) 畜産企画課畜産環境・経営安定対策室 農林水産省生産局畜産部 (2007). 畜産環境をめぐる情勢, 2007年8月.
 - 11) Cole, J. R., Chai, B., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., McGarrell, D. M., Garrity, G. M. and Tiedje, J. M. (2005). The Ribosomal Database Project (RDP-II) : sequences and tools for high-throughput rRNA analysis, Nucleic Acids Res., 33, D294-296.
 - 12) Cotta, M. A., Whitehead, T. R. and Zeltwanger, R. L. (2003). Isolation, characterization and comparison of bacteria from swine faeces and manure storage pits, Environmental Microbiology, 5, 737-745.
 - 13) Cremonesi, L., Firpo, S., Ferrari, M., Righetti, P. G. and Gelfi, C. (1997). Double-gradient DGGE for optimized detection of DNA point mutations, Biotechniques, 22, 326-330.
 - 14) Davies, R. H. and Wray, C. (1995). Observations on disinfection regimens used on *Salmonella enteritidis* infected poultry units, Poult Sci., 74, 638-647.
 - 15) Diez-Gonzalez, F., Jarvis, G. N., Adamovich, D. A. and Russell, J. B. (2000). Use of carbonate and alkali to eliminate *Escherichia coli* from dairy cattle manure, Environmental Science & Technology, 34, 1275-1279.
 - 16) Duffy, G. (2003). Verocytotoxic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries, J. Appl. Microbiol., 94, Supplement 1, 94-103.
 - 17) Eichner, C. A., Erb, R. W., Timmis, K. N. and Wagner-Dobler, I. (1999). Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community, Appl. Environ. Microbiol., 65, 102-109.
 - 18) Epstein, E. (1997). The Science of Composting, CRC Press.
 - 19) Evans, M. R., Deans, E. A., Hissett, R., Smith, M. P. W., Svoboda, I. F. and Thacker, F. E. (1983). The Effect of Temperature and Residence Time on Aerobic Treatment of Piggery Slurry - Degradation of Carbonaceous Compounds, Agricultural Wastes, 5, 25-36.
 - 20) Fernandes, F., Viel, M., Sayag, D. and Andre, L. (1988). Microbial breakdown of fats through in-vessel co-composting of agricultural and urban wastes, Biological Wastes, 26, 33-48.
 - 21) 藤田賢二 (1993). コンポスト化技術, 技報堂出版, 東京.
 - 22) Golueke, C. G. (1977). Biological reclamation of solid wastes.
 - 23) Golueke, C. G. (1983). Epidemiological aspects of sludge handling and management, BioCycle, 24, 50-58.
 - 24) Guan, T. Y. and Holley, R. A. (2003). Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness—a review, J. Environ. Qual., 32,

- 383-392.
- 25) Haga, K. (1998). Animal waste problems and their solution from the technological point of view in Japan, *JARQ*, 32, 203-210.
- 26) Hanajima, D., Kuroda, K., Fukumoto, Y. and Haga, K. (2006). Effect of addition of organic waste on reduction of *Escherichia coli* during cattle feces composting under high-moisture condition, *Bioresource Technology*, 97, 1626-1630.
- 27) Hanajima, D., Kuroda, K., Fukumoto, Y. and Haga, K. (2004). Growth of seeded *Escherichia coli* in rewetted cattle waste compost of different stages, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 17, 278-282.
- 28) Hanajima, D., Kuroda, Y., Fukumoto, T., Yasuda, K., Suzuki, and Haga, K. (2007). Effect of aeration on phytotoxicity reduction in anaerobic digestion liquor of swine manure. *Animal Science Journal*, 78, 433-439.
- 29) Hanajima, D., Kuroda, K. and Haga, K. (2001). Enhancement of the thermophilic stage in cattle waste composting by addition of tofu residue, *Bioresource Technology*, 78, 213-216.
- 30) Hancock, D. D., Besser, T. E., Kinsel, M. L., Tarr, P. I., Rice, D. H. and Paros, M. G. (1994). The prevalence of *Escherichia coli* O157: H7 in dairy and beef cattle in Washington State, *Epidemiol. Infect.*, 113, 199-207.
- 31) Harris, I., Henry, D. P. and Frost, A. (2001). The effect of volatile fatty acids in acidified fermented piggery effluent on shiga-toxigenic and non-toxic resident strains of *Escherichia coli*, *Lett. Appl. Microbiol.*, 33, 415-419.
- 32) Haruta, S., Kondo, M., Nakamura, K., Aiba, H., Ueno, S., Ishii, M. and Igarashi, Y. (2002). Microbial community changes during organic solid waste treatment analyzed by double gradient-denaturing gradient gel electrophoresis and fluorescence in situ hybridization, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 224-231.
- 33) Haruta, S., Nakayama, T., Nakamura, K., Hemmi, H., Ishii, M., Igarashi, Y. and Nishino, T. (2005). Microbial diversity in biodegradation and reutilization processes of garbage, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99, 1-11.
- 34) Heinonen-Tanski, H., Niskanen, E. M., Salmela, P. and Lanki, E. (1998). *Salmonella* in animal slurry can be destroyed by aeration at low temperatures, *J. Appl. Microbiol.*, 85, 277-281.
- 35) Hengstmann, U., Chin, K. J., Janssen, P. H. and Liesack, W. (1999). Comparative phylogenetic assignment of environmental sequences of genes encoding 16S rRNA and numerically abundant culturable bacteria from an anoxic rice paddy soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 5050-5058.
- 36) Himathongkham, S., Bahari, S., Riemann, H. and Cliver, D. (1999). Survival of *Escherichia coli* O157 : H7 and *Salmonella typhimurium* in cow manure and cow manure slurry, *FEMS Microbiol. Lett.*, 178, 251-257.
- 37) Hissett, R., Deans, E. A. and Evans, M. R. (1982). Oxygen consumption during batch aeration of piggery slurry at temperatures between 5 and 50 deg C, *Agricultural Wastes*, 4, 477-487.
- 38) Hogan, J. S., Smith, K. L., Hoblet, K. H., Schoenberger, P. S., Todhunter, D. A., Hueston, W. D., Pritchard, D. E., Bowman, G. L., Heider, L. E., Brockett, B. L. and et al. (1989). Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds, *J. Dairy Sci.*, 72, 1547-1556.
- 39) Hoppensack, A., Oppermann-Sanio, F. B. and Steinbuchel, A. (2003). Conversion of the nitrogen content in liquid manure into biomass and polyglutamic acid by a newly isolated strain of *Bacillus licheniformis*, *FEMS Microbiology Letters*, 218, 39-45.
- 40) Hussong, D., Burge, W. D. and Enkiri, N. K. (1985). Occurrence, Growth, and Suppression of *Salmonellae* in Composted Sewage-Sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 887-893.
- 41) Iannotti, E. L., Fischer, J. R. and Sievers, D. M. (1982). Characterization of Bacteria from a Swine Manure Digester, *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 136-143.
- 42) Imbeah, M. (1998). Composting piggery waste : a review, *Bioresource Technology*, 63, 197-203.
- 43) Japan Livestock Industry Association (JLIA). (1989). Facility of liquid composting, Report of animal waste treatment technology (In Japanese).
- 44) Juteau, P., Tremblay, D., Ould-Moulaye, C. B., Bisailon, J. G. and Beaudet, R. (2004). Swine waste treatment by self-heating aerobic thermophilic bioreactors, *Water*

- Research, 38, 539-546.
- 45) Juteau, P., Tremblay, D., Villemur, R., Bisaillon, J. G. and Beaudet, R. (2004). Analysis of the bacterial community inhabiting an aerobic thermophilic sequencing batch reactor (AT-SBR) treating swine waste, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66, 115-122.
- 46) Khachatryan, A. R., Besser, T. E., Hancock, D. D. and Call, D. R. (2006). Use of a nonmedicated dietary supplement correlates with increased prevalence of streptomycin-sulfa-tetracycline-resistant *Escherichia coli* on a dairy farm, *Appl. Environ Microbiol.*, 72, 4583-4588.
- 47) Khachatryan, A. R., Hancock, D. D., Besser, T. E. and Call, D. R. (2006). Antimicrobial drug resistance genes do not convey a secondary fitness advantage to calf-adapted *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 443-448.
- 48) Khachatryan, A. R., Hancock, D. D., Besser, T. E. and Call, D. R. (2004). Role of calf-adapted *Escherichia coli* in maintenance of antimicrobial drug resistance in dairy calves, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 752-757.
- 49) Kudva, I. T., Blanch, K. and Hovde, C. J. (1998). Analysis of *Escherichia coli* O157 : H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3166-3174.
- 50) Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (2004). MEGA3 : Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment, *Brief Bioinform.*, 5, 150-63.
- 51) Kuroda, K., Hanajima, D., Fukumoto, Y., Suzuki, K., Kawamoto, S., Shima, J. and Haga, K. (2004). Isolation of thermophilic ammonium-tolerant bacterium and its application to reduce ammonia emission during composting of animal wastes, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 68, 286-292.
- 52) Kuroda, K., Osada, T., Yonaga, M., Kanematu, A., Nitta, T., Mouri, S. and Kojima, T. (1996). Emissions of malodorous compounds and greenhouse gases from composting swine feces, *Bioresource Technology*, 56, 265-271.
- 53) 京都市清掃局 (1996). 家庭ごみ細組成調査報告書, 1996年8月.
- 54) Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing, In : *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, 115-175. Chichester.
- 55) Lau, M. M. and Ingham, S. C. (2001). Survival of faecal indicator bacteria in bovine manure incorporated into soil, *Lett. Appl. Microbiol.*, 33, 131-136.
- 56) Leser, T. D., Amenuvor, J. Z., Jensen, T. K., Lindecrona, R. H., Boye, M. and Moller, K. (2002). Culture-independent analysis of gut bacteria : the pig gastrointestinal tract microbiota revisited, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 673-690.
- 57) Leung, K. and Topp, E. (2001). Bacterial community dynamics in liquid swine manure during storage : molecular analysis using DGGE/PCR of 16 S rDNA, *FEMS Microbiology Ecology*, 38, 169-177.
- 58) Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. and Schleifer, K. H. (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis, *Electrophoresis*, 19, 554-568.
- 59) Mathur, S. P., Dinell, H., Owen, G., Schnitzer, M. and Dugan, J. (1993). Determination of compost biomaturity. II. Optical density of water extracts of composts as a reflection of their maturity, *Biological Agriculture and Horticulture*, 10, 87-108.
- 60) Mezrioui, N., Baleux, B. and Troussellier, M. (1995). A Microcosm Study of the Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* in Brackish-Water, *Water Research*, 29, 459-465.
- 61) Mian, L. S., Maag, H. and Tacal, J. V. (2002). Isolation of *Salmonella* from muscoid flies at commercial animal establishments in San Bernardino County, California, *J. Vector. Ecol.*, 27, 82-85.
- 62) Miller, R. V. (1998). Bacterial gene swapping in nature, *Sci. American magazine*, 278, 66-71.
- 63) Millner, P. D., Powers, K. E., Enkiri, N. K. and Burge, W. D. (1987). Microbially mediated growth suppression and death of *Salmonella* in composted sewage sludge, *Microbial Ecology*, 14, 255-265.
- 64) Munch, B., Larsen, H. E. and Aalbaek, B. (1987). Experimental Studies on the Survival of Pathogenic and Indicator Bacteria in Aerated and Non-Aerated Cattle and Pig Slurry, *Biological Wastes*, 22, 49-65.
- 65) Muyzer, G., Dewaal, E. C. and Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of Complex Microbial-Populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis Analysis

- of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S ribosomal RNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 695-700.
- 66) Nakamura, K., Haruta, S., Nguyen, H. L., Ishii, M. and Igarashi, Y. (2004). Enzyme production-based approach for determining the functions of microorganisms within a community, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 3329-3337.
- 67) Nakasaki, K., Watanabe, A., Kitano, M. and Kobuta, H. (1992). Effect of seeding on thermophilic composting of tofu refuse, *Journal of Environmental Quality*, 21, 715-719.
- 68) Natvig, E. E., Ingham, S. C., Ingham, B. H., Cooperband, L. R. and Roper, T. R. (2002). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 2737-2744.
- 69) Ndegwa, P. M., Zhu, J. and Luo, A. (2003). Effects of bioreactor temperature and time on odor-related parameters in aerated swine manure slurries, *Environmental Technology*, 24, 1007-1016.
- 70) Nikolich, M. P., Hong, G., Shoemaker, N. B. and Salyers, A. A. (1994). Evidence for natural horizontal transfer of tetQ between bacteria that normally colonize humans and bacteria that normally colonize livestock, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3255-3260.
- 71) 農林水産技術会議事務局編 (1995) . 日本標準飼料成分表, 74-90.
- 72) 農林水産省 (2007) . 食料・農業・農村白書, 平成18年度版 .
- 73) Ogden, L. D., Fenlon, D. R., Vinten, A. J. A. and Lewis, D. (2001). The fate of *Escherichia coli* O157 in soil and its potential to contaminate drinking water, *Int J. Food Microbiol.*, 66, 111-117.
- 74) Park, G. W. and Diez-Gonzalez, F. (2003). Utilization of carbonate and ammonia-based treatments to eliminate *Escherichia coli* O157 : H7 and *Salmonella Typhimurium* DT104 from cattle manure, *J. Appl. Microbiol.*, 94, 675-685.
- 75) Park, K. J., Zhu, J. and Zhang, Z. (2005). Influence of aeration rate and liquid temperature on ammonia emission rate and manure degradation in batch aerobic treatment, *Transactions of the ASAE*, 48, 321-330.
- 76) Potter, M., Oppermann-Sanio, F. B. and Steinbuchel, A. (2001). Cultivation of bacteria producing polyamino acids with liquid manure as carbon and nitrogen source, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 617-622.
- 77) Pryde, S. E., Richardson, A. J., Stewart, C. S. and Flint, H. J. (1999). Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen, and cecal lumen of a pig, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 5372-5377.
- 78) Reichenbach, H. (1981). *The Order Cytophagales*, Springer, Berlin.
- 79) Rhodes, M. W. and Kator, H. (1988). Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in estuarine environments, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2902-2907.
- 80) Russ, C. F. and Yanko, W. A. (1981). Factors affecting *Salmonellae* repopulation in composted sludges, *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 597-602.
- 81) Russell, S., and Best, L. (Jun 2006). *Setting The Standards For Compost*, BioCycle, 47, 4 pgs.
- 82) SAS Institute Inc. (1988). *SAS/STAT User's Guides Release 6.03 Edition*, Cary, NC.
- 83) Schukken, Y. H., Grommers, F. J., Van de Geer, D., Erb, H. N. and Brand, A. (1990). Risk factors for clinical mastitis in herds with a low bulk milk somatic cell count. 1. Data and risk factors for all cases, *J. Dairy. Sci.*, 73, 3463-3471.
- 84) Semenov, A. V., van Bruggen, A. H., van Overbeek, L., Termorshuizen, A. J. and M. Semenov, A. M. (2007). Influence of temperature fluctuations on *Escherichia coli* O157 : H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in cow manure, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 60, 419-28.
- 85) Shah, H. N. (1992). *The Genus Bacteroides and Related Taxa*, Springer, Berlin.
- 86) Sidhu, J., Gibbs, R. A., Ho, G. E. and Unkovich, I. (2001). The role of indigenous microorganisms in suppression of *Salmonella* regrowth in composted biosolids, *Water Research*, 35, 913-920.
- 87) Smith, K. L., Todhunter, D. A. and Schoenberger, P. S. (1985). Environmental mastitis : cause, prevalence, prevention, *J. Dairy. Sci.*, 68, 1531-53.
- 88) Sneath, P. H. A. (1986). *Endospore-forming Gram-*

- positive rods and cocci. In : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2, 1104-1139, Williams & Wilkins.
- 89) Soares, H., Cárdenas, B., Weir, D. and Switzenbaun, M. (1995). Evaluating pathogen regrowth in biosolids compost, *BioCycle*, 36, 70-72.
- 90) Suzuki, K., Tanaka, Y., Osada, T. and Waki, M. (2002). Removal of phosphate, magnesium and calcium from swine wastewater through crystallization enhanced by aeration, *Water Res.*, 36, 2991-2998.
- 91) Taiganides, E. P. (1977). *Animal waste*, Applied Science Publishers, London.
- 92) Tanaka, Y. (1998). Possibility of Passive Aeration Composting Using Soil Draining Material, *Anim. Sci. Technol.*, 69, 1106-1110.
- 93) Taylor, J. M., Epstein, E., Burge, W. D., Chaney, R. L., Menzies, J. D. and Sikora, L. J. (1978). Chemical and biological phenomena observed with sewage sludges in simulated soil trenches, *Journal of Environmental Quality*, 7, 477-482.
- 94) USEPA. (1994). A Plain English Guide to the EPA Part 503 Biosolids Rule, EPA/832/R-93/003. Washington, DC.
- 95) van Rensburg, P., Musvoto, E. V., Wentzel, M. C. and Ekama, G. A. (2003). Modelling multiple mineral precipitation in anaerobic digester liquor, *Water Res.*, 37, 3087-3097.
- 96) Wang, G., Zhao, T. and Doyle, M. P. (1996). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 in bovine feces, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2567-2570.
- 97) Williams, A. G., Shaw, M., Selviah, C. M. and Cumby, R. J. (1989). The Oxygen Requirements for Deodorizing and Stabilizing Pig Slurry by Aerobic Treatment, *Journal of Agricultural Engineering Research*, 43, 291-311.
- 98) Winfield, M. D. and Groisman, E. A. (2003). Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 3687-3694.
- 99) Yanko, W. A. (1988). Occurrence of pathogens in distribution and marketing municipal sludges. Prepared for U. S. Environmental Protection Agency Health Effects Research Laboratory, Research Triangle Park, by Los Angeles County Sanitation Districts, San Jose Creek Water Quality Laboratory, Whittier, CA. Rept. No. EPA/600/1-87/014. (NTIS PB88-154273/AS).
- 100) Zaleski, K. J., Josephson, K. L., Gerba, C. P. and Pepper, I. L. (2005). Potential regrowth and recolonization of Salmonellae and indicators in biosolids and biosolid-amended soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 3701-3708.
- 101) Zhang, Z. J. and Zhu, J. (2006). Characteristics of solids, BOD₅ and VFAs in liquid swine manure treated by short-term low-intensity aeration for long-term storage, *Bioresource Technology*, 97, 140-149.
- 102) Zhu, H., Qu, F. and Zhu, L. H. (1993). Isolation of Genomic DNAs from Plants, Fungi and Bacteria Using Benzyl-Chloride, *Nucleic Acids Research*, 21, 5279-5280.
- 103) Zhu, J. (2000). A review of microbiology in swine manure odor control, *Agriculture Ecosystems & Environment*, 78, 93-106.

Studies on the control of the *Escherichia coli* population during animal waste treatment

Dai Hanajima

¹⁾ National Agricultural Research Center for Hokkaido Region

Summary

Animal waste is utilized as an organic fertilizer after it is subjected to composting or the liquid composting process. Food security and safety are a great concern for consumers; therefore, effective treatments are required to ensure organic fertilizer hygiene. It is well known that proper composting effectively destroys pathogens in animal waste through the high temperature achieved by the process. In Japan, sawdust or rice straw is normally used as a bulking agent for moisture adjustment, though a constant supply of these bulking agents cannot be expected. In case of a shortage of bulking agents, composting with high moisture content materials such as cattle feces is inevitably carried out under inappropriate conditions. In this study, to ensure pathogen reduction during composting of cattle feces, I investigated co-composting with a variety of organic wastes. In addition, recently, the regrowth of pathogens in finished compost when appropriate temperature and moisture conditions are provided is becoming an issue, even though the pathogen population decreases to a low level during the composting process. Since the use of such compost which allows the pathogen regrowth is unfavorable, I evaluated the *E. coli* regrowth potential in various types of compost. There are few reports on the dynamics of pathogens and the mechanisms of their reduction during the liquid composting of animal waste. In this study, the relationship between the dynamics of the *E. coli* population and the biological and physicochemical factors that may affect *E. coli* survival was investigated.

The results showed that the addition of organic wastes to high moisture content cattle feces significantly increased heat generation compared to the treatment wherein organic wastes were not added, and the maximum temperatures of more than 55°C remarkably reduced the *E. coli* population. This temperature increase depends on the amount of easily digestible organic carbon present in organic wastes, and we observed a positive correlation between the maximum temperatures and the values of biochemical oxygen demand (BOD), an indicator of easily digestible organic carbon. Significant *E. coli* regrowth was observed in the compost samples collected during or immediately after the thermophilic phase. Therefore, the risk of regrowth is considered to be the highest in immature compost. During the liquid composting process, the *E. coli* population significantly decreased during the initial phase of the process. However, the *E. coli* reduction was not due to high temperatures; therefore, the mechanism for *E. coli* reduction is different between the solid and liquid composting processes. It is speculated that the reduction of the *E. coli* population may be due to the competition with *Bacillus*, which was found to be predominant during the *E. coli* decreasing phase, and/or the changes in physicochemical factors induced by the degradation of organic substances and the production of metabolites during the process. These results indicate that thermophilic and curing stages are important for *E. coli* elimination during solid composting. Further investigation is required for the elucidation of the mechanism for *E. coli* reduction during liquid composting process.

Key words: Compost, *E. coli*, Regrowth, Liquid compost