

種々の堆肥中における大腸菌群等の生残

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者	越田, 淳一 森山, 典子 ごん春明, ほか4名,
巻/号	76巻6号
掲載ページ	p. 865-874
発行年月	2005年12月

種々の堆肥中における大腸菌群等の生残^{*1}

養 春明^{*2}・越田淳一^{*3}・森山典子^{*2}・王 曉丹^{*2}
有働武三^{*4}・井上興一^{*2}・染谷 孝^{*2}

キーワード 大腸菌群, 堆肥, 大腸菌, サルモネラ菌, 生残性

1. はじめに

日本では、有機系廃棄物の総量は廃棄物全体の約60%に当たる2億8千万トンという膨大な量に達すると推定され(1996年度)¹⁾、その内訳は、家畜糞尿9,400万トン、下水汚泥8,600万トン、生ゴミ2,000万トン、食品産業汚泥1,500万トン、その他6,600万トンである。近年、環境問題や安全な食品への国民の志向を背景として、このような有機廃棄物を資源化し、環境負荷を低減する持続的循環型社会への転換が求められている。おりしも、家畜排せつ物法(1999)や食品リサイクル法(2000)の制定により、家畜糞や食品廃棄物の適正な管理や排出抑制および資源化が推奨されている。とりわけ、バイオマス・ニッポン総合戦略の閣議決定(2002年12月)により、有機物資源としてのバイオマスの総合的利活用が省庁横断的に強力に推進されている。

このような法的整備を背景に、家畜糞や生ゴミ、汚泥などの有機廃棄物の資源化対策として堆肥化が目ざされ、同時に堆肥は、減農薬・減化学肥料による持続的農業を促進する有機質資材として再評価されつつある(本稿では、「堆肥」と「コンポスト」の語を区別せず、「堆肥」に統一して使用する)。堆肥の生産量はこの10年間で倍増し、1996年度には全国で総計300万トンと推計され¹⁾、今後とも増加すると予想される。そのため、堆肥の適正な生産および使用を図るために、社会学的および自然科学的研究および普及啓発の推進が強く求められている¹⁾。

先に筆者らは、堆肥の微生物的側面について再評価するために、蛍光染色法による細菌定量技術を堆肥の微生物分析に導入した。その結果、蛍光染色法による堆肥中の細菌数は、従来の培養法による測定値の数倍から10数倍も高く、堆肥中の細菌の平均約9割が、生きてはいるが培養できない(viable but nonculturable, VNC)状態にあるこ

となどを明らかにした²⁾。

一方、堆肥の急激な増産は、未熟堆肥の増加をも招くことが懸念され、施用後の土壤障害の発生などに加え、衛生的な問題が心配される。実際、未熟堆肥を使用して作られたと推定される果物や野菜の生食により、病原性の強い腸管出血性大腸菌O157:H7(大腸菌O157)による食中毒事件が諸外国で報告されている³⁻⁶⁾。日本や諸外国の野菜の微生物汚染状況に関する総説^{7,8)}によると、海外では野菜や果実による食中毒が増加傾向にあることから、日本でも潜在的な脅威として看過できず、農産物の生産・流通・消費の各段階における衛生管理の徹底が強調されている。

先に筆者らは、堆肥の病原菌汚染に関して内外の知見をとりまとめ⁹⁾、家畜糞や生ゴミなどの堆肥原料から多種類の病原菌や寄生虫が検出されていること、さらに、製品として流通している堆肥からも病原菌が検出される場合があることから、堆肥の発酵熟を十分に生かした堆肥温度管理を通して、微生物学的に安全な堆肥を製造することが重要であると指摘した。

しかしながら、堆肥中の病原菌の存在に関して、わが国での調査事例は依然少ない。牛糞堆肥の製造過程において、糞便汚染指標菌群である大腸菌群が発酵1~6週間で消失したという報告がある一方¹⁰⁻¹²⁾、1~3カ月の発酵終了後も生残していたという報告がある^{13,14)}。特に、製品として流通している堆肥中の病原菌の残留状況を把握することは、安全・安心な農産物を生産する上で欠かせない情報であるが、これに関する知見は限られている。

そこで本研究では、堆肥の微生物学的安全性(バイオセーフティ)を向上させるための基礎的情報を得ることを目的として、主に九州各地の堆肥製造施設で生産されている堆肥を入手し、糞便汚染指標菌(大腸菌群、大腸菌、およびサルモネラ菌)の残留について培養検査による実態調査を行った。あわせて、堆肥原料である牛糞や生ゴミなどにおける糞便汚染指標菌の存在と、堆肥化過程における消長についても調査検討した。

2. 材料および方法

1) 堆肥試料の採取

堆肥試料として、1997年9月~2004年12月に、九州各地および岡山県の堆肥施設23カ所から計29点を採取した(表1)。その内訳は、牛糞堆肥が13点(試料1~13)、牛

^{*1} 本研究の一部は日本土壤肥料学会九州支部会(2001年)において発表した。

^{*2} 佐賀大学農学部(840-8502 佐賀市本庄町1)

^{*3} 同上(現在、株式会社エルデック 998-0073 酒田市松美町1-55)

^{*4} 産業医科大学産業保健学部(807-8555 北九州市八幡西区医学生ヶ丘1-1)

2005年5月23日 受付・受理

日本土壤肥料学雑誌 第76巻 第6号 p.865~874 (2005)

表1 各種堆肥試料の製造場所, 原料, 副資材および発酵期間

堆肥試料 番号*1	製造場所	原料	副資材 (敷料)	発酵期間 (月)
1	宮崎県 N 牧場	牛糞	オガクズ	1
2	宮崎県 N 施設	牛糞	イナワラ	3
3	宮崎県 A 施設	牛糞	オガクズ	3
4	宮崎県 A 農協	牛糞	オガクズ	3
5	宮崎県 I 社	牛糞	オガクズ	3
6	鹿児島県 K 牧場	牛糞	廃材木材チップ	5
7	鹿児島県 I 施設	牛糞	オガクズ	3
8	福岡県 H 牧場	牛糞	オガクズ, パーク	2
9	熊本県 K 施設	牛糞	パーク	6
10	熊本県 Q 施設	牛糞	イナワラ	3
11	佐賀県 A 施設	牛糞	オガクズ, モミガラ	3
12	佐賀県 B 施設	牛糞	オガクズ, モミガラ	3
13	佐賀県 Q 施設	牛糞	オガクズ	6
14	熊本県 K 農協	牛糞, 鶏糞	オガクズ, モミガラ	4
15	熊本県 M 組合	牛糞, 鶏糞	オガクズ	3.5
16	鹿児島県 K 施設	鶏糞	—*2	2
17	熊本県 M 社 a*3	鶏糞	—	1
18	熊本県 M 社 b	鶏糞	—	1
19	佐賀県 Y 社	鶏糞	—	3
20	岡山県 N 社	下水汚泥, 鶏糞	—	1.5
21	佐賀県 D 社	下水汚泥, 生ゴミ	パーク	4
22	佐賀県 D 商会	生ゴミ	モミガラ	3
23	佐賀県 I 施設 c*4	生ゴミ	オガクズ	3.5
24	佐賀県 I 施設 d	生ゴミ	オガクズ	3.5
25	佐賀県 I 施設 e	生ゴミ	オガクズ	3.5
26	佐賀県 I 施設 f	生ゴミ	オガクズ	3.5
27	長崎県 N 施設 g	生ゴミ	オガクズ	3
28	長崎県 N 施設 h	生ゴミ	オガクズ	3
29	宮崎県 A 施設	生ゴミ	イナワラ	3

*1 堆肥試料は1997年9月~2004年12月に採取した。

*2 副資材なし。

*3 a, ベレット状製品; b, 粉末状製品。

*4 c~f, g~h はそれぞれ同一施設で, 試料採取時期が異なる。

糞・鶏糞ブレンド堆肥が2点(試料14~15), 鶏糞堆肥が4点(試料16~19), 下水汚泥堆肥(鶏糞など他の原料も含まれる)が2点(試料20~21), 生ゴミ堆肥が8点(試料22~29)であった。これらはすべて発酵の終了した堆肥製品で, 畜舎の敷料や水分調整剤として使用されているオガクズやモミガラなどが副資材として混入していた。また, 堆肥の原料である牛糞や生ゴミ, 発酵途上の堆肥からも, 適宜試料を採取した。

堆肥試料等の採取には, 堆肥等の山の表面下30~50 cmの部位から約500 gずつを5カ所採取し, これらをよく混合縮分した後, その約500 gをビニール袋に密封した。これをクーラーボックスに入れて研究室まで運搬し, 冷蔵保存して3日以内に分析に供した。

2) 試料の分散処理

堆肥試料10.0 g(生重)に滅菌生理食塩水を加えて全量を100 mLとし, ステンレスブレードの付いたホモジナイザー(日本精機, エースホモジナイザー-AM-3)を用いて15,000 rpm, 15分間の分散処理を行った。この試料懸濁液を滅菌生理食塩水に加えて10倍希釈し, 10^{-2} 希釈懸

濁液を調製した。この希釈操作を順次繰り返し, 10^{-8} までの希釈懸濁液を調製した。

3) 理化学的性質の分析

堆肥試料等の理化学的分析は, 前報²⁾で採用した方法に従った。すなわち, 含水率は, 約10 gの試料を105°C, 24時間乾燥させて測定した。pH(H₂O)の測定にはガラス電極法(試料:水=1:2.5)を用いた。電気伝導率(EC)の測定にはEC計(堀場, Twin Cond B-173)を用いた(試料:水=1:5)。陽イオン交換容量(CEC)はセミマイクロ法により測定し, 全炭素(T-C)の測定にはチューリン法, 全窒素(T-N)の測定にはサリチル酸-硫酸分解法を用いた。

4) 糞便汚染指標菌検出法

大腸菌群数をデスオキシコーレイト寒天培地¹⁵⁾(栄研)で, 大腸菌数をクロモカルト・コリフォーム寒天培地¹⁶⁾(Merck)で, サルモネラ菌数をマンニトール・リチウム・クリスタルバイオレット・ブリアントアガー(MLCB)寒天培地¹⁷⁾(日水)で, いずれも希釈平板法により測定した。試料の 10^{-2} ~ 10^{-8} の希釈懸濁液のうち,

適切と予想された希釈液を3段階選び、各希釈段階5連の培地に各100 μLを塗抹接種し、いずれも37°Cで18~24時間培養した。大腸菌群では、培地上に出現した赤色コロニーを計数し¹⁵⁾、大腸菌では、培地上の濃青色コロニーを計数し¹⁶⁾、サルモネラ菌では、培地上の黒色コロニーを計数した¹⁷⁾。この場合、培地当たり5~10個の黒色コロニーから釣菌してTSI培地(栄研)に接種し、乳糖非分解性と硫化水素産生性およびサルモネラ菌免疫血清(デンカ生研)に対するスライド凝集反応を確認し、菌数を算定した。大腸菌群と大腸菌の陽性対照菌および陰性対照菌として*Escherichia coli* K 12および*Salmonella typhimurium* (*Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis*) IFO 14193をそれぞれ用い、サルモネラ菌にはそれらを逆に用いた。

5) 大腸菌群分離株の同定

デスオキシコーレイト寒天培地上の大腸菌群と推定される細菌コロニーから白金線で釣菌し、0.5 mLの滅菌生理食塩水に懸濁した(1試料当たり数個)。この懸濁液を肉汁寒天培地(5.0 g L⁻¹肉エキス, 10.0 g L⁻¹ペプトン, 5.0 g L⁻¹ NaCl, 15.0 g L⁻¹寒天, pH 7.0)¹⁸⁾上に画線塗

抹接種し、30°Cで5日間培養して純粋性を確認した。この分離株の新鮮培養菌液を、腸内細菌用簡易同定キットAPI 20 E(日本ビオメリュー)に接種し、37°Cで24時間好気培養した。培養ウエル中の自発的な反応および試薬添加による呈色反応を記録し、その結果を7桁のAPIプロファイルコードに変換し、これをAPI 20 Eプロファイルインデックスと照らし合わせて同定した。

6) 病原大腸菌に対するスライド凝集反応

*E. coli*と同定された菌株については、その新鮮培養液を病原大腸菌免疫血清(デンカ生研, 43種類のO抗原に対する免疫血清キット)に供試し、スライド凝集反応により病原大腸菌であるかを判定した。すなわち、肉汁寒天培地で前培養した被検菌株の1白金耳量を生理食塩水100 μLに加えて懸濁し、121°C, 15分間の熱処理を行うことで菌体表面の鞭毛抗原を除去した。これを15,000 rpmで5分間遠心分離し上清を捨て、沈さに生理食塩水100 μLを加えて得た菌体懸濁液を抗原液とした。スライドグラスに病原大腸菌混合血清または陰性対照として生理食塩水を1滴滴下し、これに抗原液を1白金耳ずつ加え、おのおのよく混合し、凝集の有無を判定した。病原大腸菌陽性対照

表2 各種堆肥試料の理化学的性状

堆肥試料 番号	含水率 (%)	pH (H ₂ O)	EC (mS cm ⁻¹)	CEC (cmol _c kg ⁻¹)	T-C (%)	T-N (%)	C/N
1	45.4	8.2	3.3	61.8	36.3	2.6	14.0
2	60.1	8.6	5.0	NT*	63.3	3.7	17.1
3	77.0	6.5	0.4	NT	NT	NT	NT
4	38.6	9.1	7.3	NT	60.4	2.4	25.4
5	50.2	6.7	5.0	NT	20.4	0.8	24.8
6	47.9	8.8	5.1	60.5	30.1	2.2	13.6
7	45.8	9.0	4.2	43.9	33.2	2.1	15.8
8	40.4	6.8	3.0	51.2	19.7	1.1	17.9
9	58.3	8.2	4.4	55.2	35.1	1.8	19.5
10	51.3	9.0	7.7	NT	45.6	2.9	15.5
11	41.5	8.2	5.5	63.0	33.1	3.1	10.7
12	46.3	8.0	5.7	57.4	37.2	2.9	12.8
13	52.5	8.9	7.4	NT	NT	1.1	NT
14	29.2	9.4	6.1	31.4	29.0	1.7	17.1
15	45.1	9.3	5.9	60.1	34.2	2.0	17.1
16	23.2	7.9	6.9	48.4	30.6	3.7	8.3
17	16.1	8.0	7.1	61.4	36.3	3.7	9.8
18	15.7	6.7	8.5	56.2	37.3	4.9	7.6
19	52.5	8.4	7.4	NT	33.1	3.5	9.5
20	28.9	8.1	13.4	NT	31.7	2.1	15.1
21	44.3	6.6	5.7	61.3	27.2	1.3	20.9
22	20.9	6.6	4.2	41.2	46.3	2.6	17.8
23	54.0	6.7	7.9	79.0	17.5	1.2	14.6
24	50.9	8.2	6.5	33.5	35.2	2.1	16.8
25	53.6	8.0	3.1	31.0	16.1	1.0	16.1
26	57.6	7.4	6.4	47.5	23.9	1.7	14.1
27	13.0	6.3	3.5	71.5	28.9	1.5	19.3
28	15.0	7.1	3.8	68.3	27.1	1.4	19.4
29	31.4	8.9	11.5	NT	44.6	3.4	13.2
平均	41.7	7.9	5.9	55.4	35.1	2.4	15.3
範囲	13.0~77.0	6.3~9.4	0.4~13.4	31.4~79.0	17.5~63.3	1.1~4.9	7.6~25.4

* 未測定.

株として、産業医科大学産業保健学部微生物学教室にて保存の *E. coli* O157:H7 菌株を用い、陰性株に *E. coli* K12 を用いた。

3. 結果および考察

1) 堆肥試料の理化学的性状

九州各地などの堆肥製造施設 23 カ所から採取した堆肥試料 29 点の理化学的性状を表 2 に示す。これらの堆肥試料はいずれも、良質の完熟堆肥を作ると地域で評価の高い堆肥化施設から採取された。

含水率は 13.0~77.0% の範囲にあり、平均 41.7% であった。製品堆肥の含水率が高いと、微生物的な変質、特に病原菌の再増殖が起きやすいと指摘されている^{19,20)}。(社)日本施設園芸協会の生鮮野菜衛生管理ガイド²¹⁾では、堆肥製品の品質保持上、含水率は 30% 以下が好ましいとされている。この点、約 17% の堆肥試料のみが、この範囲にあった。なお、試料 3 は、製品が野外に放置されていたもので、雨水の影響を受けたため含水率が高く EC が低くなったものと推察された。

pH は 6.3~9.4 の範囲 (平均 7.9) で、アルカリ性の強い試料の中には、アンモニア臭の強いものがあった。

EC は 0.4~13.4 mS cm⁻¹ の範囲 (平均 5.9 mS cm⁻¹) であった。原料の違いによる一定の傾向は認められなかった。

CEC は 31.4~79.0 cmol_c kg⁻¹ の範囲 (平均 55.4 cmol_c kg⁻¹) であった。各種完熟堆肥の CEC はおおむね 40~120 cmol_c kg⁻¹ の範囲といわれ^{22,23)}、供試堆肥試料の CEC は、ほぼこの範囲に含まれていた。

全炭素 (T-C) は 17.5~63.3% の範囲 (平均 35.1%)、全窒素 (T-N) は 1.1~4.9% の範囲 (平均 2.4%) で、特に鶏糞堆肥 (試料 16~19) では高い傾向を示した。また、試料 2 および 4 は熟成前に製品化されたもので、全炭素が 60~63% と高かった。

炭素率 (C/N 比) は、7.6~25.4 の範囲 (平均 15.3) で、オガクズなど炭素率の高い副資材を原料に含まない鶏糞堆肥 4 点 (試料 16~19) は 7.6~9.8 と低かった。一般に、完熟堆肥のもつ C/N 比は 20 以下であり²³⁾、試料 29 点中 26 点 (90%) はこの範囲に入っていた。したがって CEC の値も勘案すると、供試試料の多くは完熟であったと判断された。

2) 堆肥製品中の大腸菌群数

堆肥試料 29 点中、大腸菌群が検出された試料は 11 点 (38%) あり、それらの菌数は 10²~10⁶ cfu g⁻¹ dry matter のレベルにあった (表 3)。原料別に見ると、牛糞堆肥、下水汚泥堆肥、生ゴミ堆肥から検出され、牛糞・鶏糞混合堆肥 2 点 (試料 14, 15) および鶏糞堆肥 4 点 (試料 16~19) からは検出されなかった。ただしこの傾向が有意のものかを判断するには、より多くの知見の集積が必要と考えられる。

大腸菌群数は公衆衛生学的な指標として、食品や飲料水

表 3 各種堆肥試料中の大腸菌群数

堆肥試料番号	大腸菌群数*1 (cfu g ⁻¹ dry matter)
1	ND*2
2	ND
3	(2.5±0.3)×10 ⁶
4	ND
5	(7.4±1.6)×10 ³
6	ND
7	(9.3±13.0)×10 ²
8	ND
9	ND
10	ND
11	(3.0±1.0)×10 ²
12	(6.4±1.1)×10 ²
13	(9.1±1.2)×10 ²
14	ND
15	ND
16	ND
17	ND
18	ND
19	ND
20	(1.8±0.4)×10 ²
21	(1.1±0.0)×10 ³
22	ND
23	(2.4±0.3)×10 ⁴
24	(4.7±1.2)×10 ³
25	ND
26	(3.2±0.5)×10 ³
27	ND
28	ND
29	ND
大腸菌群陽性率	37.9%

*1 菌数は、5 連の平板の平均値±標準偏差を示す。

*2 不検出 (検出限界: <20 cfu g⁻¹ dry matter)。

の衛生基準などで世界的に広く使われている。水や食品から本菌群が検出されることは、それらが糞便により直接または間接的に汚染されている可能性を意味する。本菌群に含まれる腸内細菌科の乳糖分解性細菌の多くは非病原性か、病原性の弱い日和見感染菌である。しかし、本菌群の存在は、出所を同じくする腸管系病原菌の存在リスクがあると考えられる。

一方、大腸菌群には人畜の糞便に由来するもの以外に、植物や土壤の常在菌として広く環境中に生存するものがあることが最近分かってきた。たとえば、国内の有機栽培野菜 153 点の 98% から、また市販野菜 (したがって堆肥使用との関係が明確でないもの) 44 点の 56% から大腸菌群が検出されたが、そのすべては大腸菌以外の菌種であり、病原性の可能性は低いと報告されている²⁴⁾。また、植物から窒素固定能をもつエンドファイトが多種類見出されているが、その中には、*Enterobacter* や *Klebsiella*, *Pantoea* など大腸菌群に属する腸内細菌科の細菌が含まれている²⁵⁾。したがって腸内細菌科の細菌が、植物のエンドファイトとして生鮮野菜や堆肥の副資材であるイナワラなどに存在する可能性も考えられる。このような植物内生菌のヒ

トや植物への病原性に関する知見は極めて限られており、今後の解明が待たれる。

以上のことから、堆肥からの大腸菌群の検出がただちに有害菌の存在を示すとはいえず、それがどのような菌種であり、どのような性質を有しているか詳細に検討する必要がある。

3) 大腸菌群分離株の同定および病原大腸菌に対するスライド凝集反応

大腸菌群が検出された堆肥試料のうち4点について、大腸菌群と推定される赤色コロニーから釣菌し、1試料当たり数株、計21株を分離純化した。これらを簡易同定キットAPI 20 Eに供試した結果(表4)、試料4点のうち3点からの分離株11株が、*E. coli*, *E. vulneris*, *Pantoea* sp., *Buttiauxella agrestis* と同定された。これらはいずれも大腸菌群に属する腸内細菌科の細菌である。しかし、*Serratia marcescens* のみが分離された試料が1点あり(試料23)、また *E. coli* が検出された試料1点(試料11)からも本菌が検出された。*S. marcescens* は大腸菌群には属さない腸内細菌科の細菌である。すなわち、デスオキシコーレイト寒天培地により大腸菌群陽性と判定された4点の堆肥試料のうち、1点からは大腸菌群が分離されず、代わりに大腸菌群ではない本菌が分離された。

S. marcescens は赤色色素プロジギオシン (prodigio-

sin) を生産するため、デスオキシコーレイト寒天培地上で大腸菌群の赤いコロニーと誤認されたものと推察された。本菌の発色と大腸菌の発色とは微妙に異なるので、大腸菌群を検出する際に、本菌の純粋培養を「誤認しやすい陰性対照」として用いることで、偽陽性の判定を避けることができると考えられる。

堆肥試料から分離された大腸菌群に属する細菌のうち、*E. coli* には非病原性の株と病原性の株とがあり、病原大腸菌の多くは菌体抗原により血清型別されている。そこで、*E. coli* と同定された分離株5株を、病原大腸菌免疫血清によるスライド凝集試験に供した。その結果(表4)、これらの分離株は、用いたいずれの抗血清とも反応しなかった。

一方、*E. vulneris*²⁶⁾, *Pantoea* sp.²⁷⁾, *B. agrestis*²⁸⁾, および非大腸菌群である *S. marcescens*²⁹⁾ は、いずれもヒトの日和見感染菌として知られている。これらの菌種の病原性は菌株により異なるが、これらの菌種が検出されたこと自体、注目すべきことであろう。

4) 堆肥製品中の大腸菌数およびサルモネラ菌数

堆肥試料12点について、クロモカルト・コリフォーム寒天培地を用いて、大腸菌の直接検出を試みた(表5)。その結果、いずれの試料からも大腸菌は不検出であった。これらの堆肥試料のうち、23および26については、デス

表4 堆肥から大腸菌群として分離した菌株のAPI 20 Eによる同定および病原大腸菌免疫血清反応

堆肥試料番号*1	菌株番号	API 20 E による同定結果			大腸菌群の合否	病原大腸菌スライド凝集反応
		コード	菌種	同定確率 (%)		
11	1	5307721	<i>Serratia marcescens</i>	97.5	-	NT*2
	2	5307721	<i>Serratia marcescens</i>	97.5	-	NT
	3	5044553	<i>Escherichia coli</i>	94.8	+	-
	4	5044553	<i>Escherichia coli</i>	94.8	+	-
	5	5144572	<i>Escherichia coli</i>	99.6	+	-
	6	5144572	<i>Escherichia coli</i>	99.6	+	-
12	7	5144556	<i>Escherichia coli</i>	97.6	+	-
	8	5344576	該当なし	-	-	NT
	9	5244576	該当なし	-	-	NT
23	10	5307761	<i>Serratia marcescens</i>	97.0	-	NT
	11	5307761	<i>Serratia marcescens</i>	97.0	-	NT
	12	5307761	<i>Serratia marcescens</i>	97.0	-	NT
	13	5306761	<i>Serratia marcescens</i>	95.3	-	NT
	14	5306761	<i>Serratia marcescens</i>	95.3	-	NT
	15	5306761	<i>Serratia marcescens</i>	95.3	-	NT
26	16	1005113	<i>Pantoea</i> sp.	97.9	+	NT
	17	1005113	<i>Pantoea</i> sp.	97.9	+	NT
	18	1005113	<i>Pantoea</i> sp.	97.9	+	NT
	19	1004113	<i>Escherichia vulneris</i>	41.4	+	NT
			<i>Buttiauxella agrestis</i>	24.6	+	NT
	20	1004113	<i>Escherichia vulneris</i>	41.4	+	NT
			<i>Buttiauxella agrestis</i>	24.6	+	NT
	21	1004113	<i>Escherichia vulneris</i>	41.4	+	NT
<i>Buttiauxella agrestis</i>			24.6	+	NT	

*1 詳細は表1参照。

*2 未測定。

表5 各種堆肥試料中の大腸菌数およびサルモネラ菌数

堆肥試料 番号	菌数 (cfu g ⁻¹ dry matter)	
	大腸菌	サルモネラ菌
2	ND*	ND
3	ND	ND
4	ND	ND
5	ND	ND
10	ND	ND
13	ND	(1.9±0.6)×10 ³
22	ND	ND
23	ND	(6.0±2.0)×10 ³
24	ND	ND
25	ND	ND
26	ND	ND
29	ND	ND
陽性率	0.0%	16.7%

* 不検出 (検出限界: <20 cfu g⁻¹ dry matter).

オキシコーレイト寒天培地による大腸菌群の検出 (表3) と分離同定による確認もなされ、いずれも分離株は大腸菌以外の菌種であった (表4)。クロモカルト・コリフォーム寒天培地による結果は、これらの結果と一致する。

また、サルモネラ菌について MLCB 培地を用いて検査した (表5)。試料12点のうち2点から検出され (陽性率17%)、分離株はすべてサルモネラ菌であると確認された。その菌数はいずれも 10³ cfu g⁻¹ dry matter のレベルであった。

サルモネラ菌は、ヒトや動物の腸管内に生息し、主に食物や水を介して感染する代表的な腸管感染菌である。菌種や菌株により病原性の強弱はあるものの、基本的にすべて病原性を有するとみなされている。

5) 堆肥原料中の糞便汚染指標菌数

堆肥原料である牛糞試料5点および生ゴミ試料3点計8点について、糞便汚染指標菌の存在を検討した (表6)。これらの試料は、含水率が52.6~85.5%の範囲で、pHは5.3~8.7、ECは1.5~6.1 mS cm⁻¹であった。大腸菌群

は6点 (75%) から検出され、菌数は10⁶~10⁸ cfu g⁻¹ dry matter のレベルであった。また大腸菌は5点 (63%) から検出され、10²~10⁸ cfu g⁻¹ dry matter のレベルで、サルモネラ菌は6点 (75%) から検出され、10³~10⁸ cfu g⁻¹ dry matter のレベルであった。牛糞のみならず、生ゴミからもこれら糞便汚染指標菌が検出されていた。

堆肥の原料となる牛糞や生ゴミなどに関する内外の調査例によると、大腸菌群は、牛糞からは10⁵~10⁷ cfu g⁻¹ dry matter のレベルで、また生ゴミからは10⁶~10⁹ cfu g⁻¹ dry matter のレベルで検出されている⁹⁾。上記の結果は、これらの報告レベルとほぼ一致する。なお、大腸菌やサルモネラ菌の堆肥原料や堆肥中の陽性率や菌数に関しては、調査例が限られているが、本研究とほぼ同様の傾向が認められている³⁰⁾。

6) 堆肥発酵過程における糞便汚染指標菌の消長

表6に示す製造場所6施設における堆肥化過程での病原指標菌の消長を7例について追跡した (図1)。堆肥の温度 (図1、大腸菌群の図中) に関しては、7例のうち6例 (A~F) では、発酵中間品で60°C以上に上昇し、製品ではおおむね40°C以下に低下した。残りの1例 (G) では、原料、発酵中間品、製品を通して温度が約40~50°Cであった。図1の糞便汚染指標菌の消長パターンは、ほぼ4通りに分けられた。すなわち、(1) 糞便汚染指標菌は原料から検出されたが、発酵中間品で減少し、製品中では消失する場合 (Cの大腸菌群、A、D、Fの大腸菌、およびA、Bのサルモネラ菌)、(2) いったん消失するが、製品から再度検出される場合 (D~Fの大腸菌群、Eの大腸菌およびFのサルモネラ菌)、(3) 全く消失しない場合 (Gの大腸菌群とサルモネラ菌)、(4) 原料の段階から検出されない場合 (A、Bの大腸菌群、B、Cの大腸菌およびC、Dのサルモネラ菌) であった。

これらの結果は、大腸菌群¹⁰⁻¹⁴⁾ や大腸菌³⁰⁾、サルモネラ菌³⁰⁾ の堆肥化過程における消長に関する内外の既往の報告とほぼ一致した。

上記のような異なる消長を辿る原因に関して、(1) の

表6 堆肥原料の理化学性および各種病原指標菌数

製造場所*1	原料*2	含水率 (%)	pH (H ₂ O)	EC (mS cm ⁻¹)	菌数 (cfu g ⁻¹ dry matter)		
					大腸菌群	大腸菌	サルモネラ菌
佐賀県 A 施設 a*3	牛糞	75.5	7.7	5.9	(6.7±2.5)×10 ⁷	(7.6±0.5)×10 ⁷	(8.6±1.9)×10 ³
佐賀県 A 施設 b	牛糞	73.2	7.6	5.3	(1.4±0.1)×10 ⁸	(8.5±0.7)×10 ⁷	ND*4
佐賀県 B 施設	牛糞	84.1	8.6	6.1	(9.6±1.3)×10 ⁷	(1.0±0.2)×10 ⁸	(5.4±1.8)×10 ⁸
熊本県 Q 施設	牛糞	73.2	8.3	4.2	ND	(1.6±1.4)×10 ²	(5.3±1.0)×10 ³
佐賀県 Q 施設	牛糞	85.5	8.7	3.0	(1.5±0.2)×10 ⁶	(1.4±0.5)×10 ⁶	(5.7±1.3)×10 ⁵
佐賀県 I 施設 c	生ゴミ	53.5	5.5	5.4	>10 ⁶	NT*5	>10 ⁷
佐賀県 I 施設 e	生ゴミ	52.6	5.3	1.8	ND	ND	(5.6±1.9)×10 ⁶
佐賀県 D 商会	生ゴミ	67.6	6.0	1.5	(7.5±0.4)×10 ⁸	ND	ND

*1 製造場所の詳細は表1参照。

*2 副資材を含む (表1参照)。

*3 a と b, c と e はそれぞれ同一施設で、試料採取時期が異なる。

*4 不検出 (検出限界: <20 cfu g⁻¹ dry matter)。

*5 未測定。

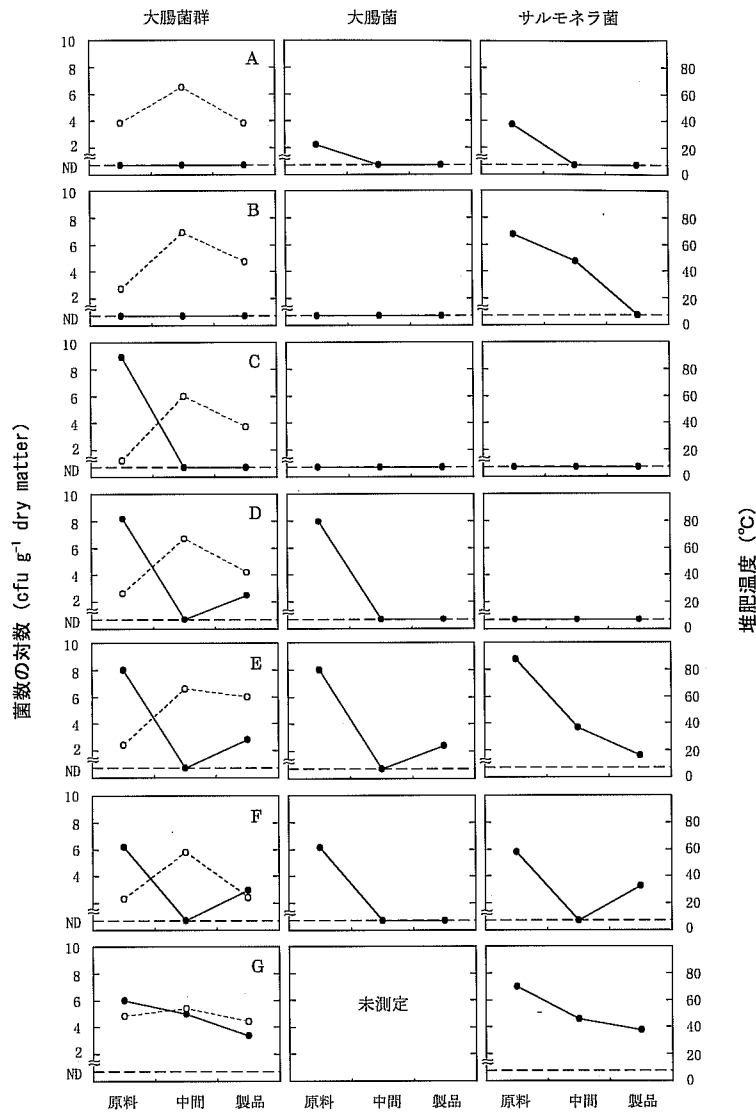


図1 堆肥化過程における大腸菌群，大腸菌およびサルモネラ菌の消長と堆肥温度

A, 熊本県Q施設(牛糞堆肥)；B, 佐賀県I施設c(生ゴミ堆肥)；C, 佐賀県D商会(生ゴミ堆肥)；D, 佐賀県A施設b(牛糞堆肥)；E, 佐賀県B施設(牛糞堆肥)；F, 佐賀県Q施設(牛糞堆肥)；G, 佐賀県I施設e(生ゴミ堆肥)。

ND, 不検出(検出限界： $<20 \text{ cfu g}^{-1} \text{ dry matter}$)。製造場所の詳細は表1および6を参照。●—● 菌数，○---○ 温度。

場合では、温度制御が適切で発酵熱による糞便汚染指標菌の殺菌が完全で、製品中での再増殖もなかったと判断される。(2)の場合では、発酵温度不足による糞便汚染指標菌の生残や保管中の高水分下での再増殖²⁰⁾などが考えられるが、結論を得るには、堆肥化過程での詳細な温度や菌数の追跡が必要がある。(3)の場合には、発酵温度がやや低いことや、交叉汚染(堆肥の表層部の温度が低い箇所が生残していた菌や堆肥製造後の不適切な取り扱いによる原料からの汚染)の可能性が考えられる。

ここで特に注目すべきことは、発酵中間物で品温が60~70°Cと高いにもかかわらず、糞便汚染指標菌が多数検出されている場合があることである(BとEのサルモネ

ラ菌)。サルモネラ菌を含め非芽胞菌の多くでは、D値(細胞の90%が死滅するのに要する時間)が50°C前後のときでも数10秒から数分間であり³¹⁾、約60°Cの発酵中の堆肥から生きたサルモネラ菌が検出されることは説明が付きにくい。水分活性が低いと熱の殺菌作用を受けにくいことが食品中の病原菌の生存に関して報告されており³¹⁾、堆肥中でも同様の現象がある可能性が考えられる。また、上記の交叉汚染の可能性も考えられる。54°Cで増殖できる大腸菌やサルモネラ菌の変異株も報告されており³²⁾、堆肥中にそのような細菌が存在するか、今後の課題である。

通説では、堆肥の製造過程の発酵熱によって病原菌や寄生虫卵、雑草の種子などが死滅するといわれているが、本

研究では、完熟堆肥と見なされる堆肥製品中から大腸菌群が高頻度 (38%) で検出され、さらに、大腸菌やサルモネラ菌およびその他の日和見感染菌として知られる腸内細菌科の細菌が検出された。特に、60°C以上の発酵中の堆肥からもサルモネラ菌が検出されたことから、堆肥の製造過程における温度管理や交叉汚染の防止など、適切な衛生管理が重要であることが強調される。

堆肥原料中に存在し、堆肥製品に残留する可能性のある病原菌のうち、最も警戒すべきなのは、大腸菌 O 157 であろう。しかし、本菌の牛糞等からの検出率は、イギリスやノルウェーなどを除けば日本も含め数%以下であり、堆肥からの分離例はほとんどない⁸⁾。その他の病原菌としては、大腸菌 O 157 以外の病原大腸菌やサルモネラ菌が重要と考えられる。本研究では、堆肥製品から分離された大腸菌は病原大腸菌ではなかったが、まだ少数例なので、より多くの知見の集積が望まれる。また、サルモネラ菌が堆肥製品の 17% から検出されたことは注目すべきである。

以上のことから、堆肥には潜在的に感染リスクがあると考えて対処することが適切と考えられる。すなわち、堆肥は完熟した製品でも病原菌による汚染の可能性のあるものとして考え、原則として作付け数カ月前に元肥としてのみ使用し、追肥として使用しないこと、施用後すぐに土壌と混合して飛散を防止すること、生食用野菜と接触しないような配慮をすることなどの対策²¹⁾が必要と考えられる。

本研究も含めて、堆肥中の大腸菌等の検出には、培養法が使用されている。しかし、環境中に出た大腸菌が VNC 状態になることは広く知られており³³⁾、低栄養環境、温度ストレス、塩ストレスなどが VNC 化を促進すると指摘されている。堆肥中でも熱ストレスにより大腸菌等が VNC となる可能性が考えられ、このような場合、培養法では菌数を過小評価する恐れがある。しかし、この点について実証的に研究した報告は見あたらない。これは、堆肥中の大腸菌を培養に依存しないで定量的に検出した成功例がないためである。堆肥中の大腸菌やサルモネラ菌の DNA プローブによる検出が試みられているが³⁰⁾、原理的に定量的がないという限界がある。この点に関して、筆者らは、Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) による大腸菌の特異的かつ定量的な検出法の開発に成功しており、別の論文で報告する。

米国 EPA では下水汚泥堆肥の販売基準に関して、施設ごとのランクを定めており²⁰⁾、堆肥製品中の糞便性大腸菌群数が 10^3 MPN g^{-1} dry matter 未満であれば A クラスの施設としてランク付けされ、製造された堆肥は広く販売できるが、 $10^3 \sim 10^6$ MPN g^{-1} dry matter では B クラスとされ、市販の禁止など販売が著しく限定される (「糞便性大腸菌群数」は、大腸菌群数よりは真の大腸菌数に近いと見なされている衛生学的指標である³⁴⁾)。ただしこの基準は経験則的なものと推察される。

日本では、堆肥の微生物学的安全性 (バイオセーフティー) に関して法的な基準はないが、今後、堆肥中の有

害菌に関する知見が多数集積するならば、堆肥の衛生基準を設定することも可能になると期待される。

4. 要 約

九州各地の堆肥化施設 23 カ所から、牛糞、鶏糞、生ゴミおよび下水汚泥を原料とした堆肥計 29 点を採取し、糞便汚染指標菌 (大腸菌群、大腸菌およびサルモネラ菌) について培養検査した。

1) これら堆肥試料の CEC は $31.4 \sim 79.0$ $cmol_c kg^{-1}$ の範囲 (平均 55.4 $cmol_c kg^{-1}$) で、炭素率 (C/N 比) は $7.6 \sim 25.4$ の範囲 (平均 15.3) にあり、他の性状と合わせ、多くが完熟堆肥であると判断された。

2) デスオキシコーレイト寒天培地により大腸菌群が 29 点中 11 点 (38%) から検出され、 $10^2 \sim 10^6$ $cfu g^{-1}$ dry matter の菌数レベルであった。大腸菌群陽性堆肥試料 4 点のうち 3 点からの分離株は、大腸菌群に属する *E. coli*, *E. vulneris*, *Pantoea* sp., *Buttiauxella agrestis* と同定された。しかし、*Serratia marcescens* のみが分離された試料が 1 点、本菌と *E. coli* が分離された試料が 1 点あった。大腸菌群には属さない腸内細菌科の細菌である *S. marcescens* は赤色色素を生産するため、分離培地上で大腸菌群の赤いコロニーと誤認されたものと推察された。一方、得られた *E. coli* 5 株は、病原大腸菌免疫血清試験ですべて陰性であった。

3) 堆肥試料 12 点についてクロモカルト・コリフォーム培地による大腸菌の直接培養検査および MLCB 寒天培地によるサルモネラ菌の検出を試みた結果、大腸菌はいずれの試料からも検出されず、サルモネラ菌は 2 点 (17%) から検出され、その菌数は 10^3 $cfu g^{-1}$ dry matter のレベルにあった。

4) 堆肥原料 (牛糞、鶏糞、生ゴミ等) 8 点のうち大腸菌群およびサルモネラ菌がいずれも 6 点 (75%) から、大腸菌が 5 点 (63%) から検出され、菌数はいずれも $10^2 \sim 10^8$ $cfu g^{-1}$ dry matter であった。

5) 堆肥製造施設 6 カ所における堆肥化過程での糞便汚染指標菌の消長を 7 例について追跡した結果、糞便汚染指標菌が減少して製品中で消失する場合、いったん消失するが製品で再度検出される場合、全く消失しない場合、原料から製品まで検出されない場合の 4 通りが観察された。発酵温度が高くてもサルモネラ菌などが生残する場合があります。その原因について、再増殖や交叉汚染の可能性を考察した。

6) 上記の諸結果に基づき、堆肥の製造過程における温度管理や交叉汚染防止などの適切な衛生管理の重要性を指摘した。

文 献

- 1) 茅野充男：生物系廃棄物リサイクルの現状と課題、畜産環境情報, 9, 2~8 (2000)
- 2) 糞 春明・越田淳一・井上興一・染谷 孝：蛍光染色法

- および培養法による各種堆肥中の細菌の定量, 土肥誌, 76, 401~410 (2005)
- 3) Morgan, G. M., Newman, C., Palmer, S. R., Allen, J. B., Shepherd, W., Rampling, A. M., Warren, R. E., Gross, R. J., Scotland, S. M. and Smith, H. R.: First recognized community outbreak of haemorrhagic hemorrhagic colitis due to verotoxin producing *Escherichia coli* O157:H7 in the UK. *Epidemiol. Infect.*, **101**, 83~91 (1988)
 - 4) Besser, R. E., Lett, S. M., Weber, J. T., Doyle, T. J., Wells, J. G. and Griffin, P. M.: An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *JAMA*, **269**, 2217~2220 (1993)
 - 5) Cieslak, P. R., Barrett, T. J., Griffin, P. M., Gensheimer, K. F., Beckett, G., Buffington, J. and Smith, M. G.: *Escherichia coli* O157:H7 infection from a manured garden. *Lancet*, **342**, 367 (1993)
 - 6) Chapman, P. A., Siddons, C. A., Manning, J. and Cheetham, C.: An outbreak of infection due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in four families: the influence of laboratory methods on the outcome of the investigation. *Epidemiol. Infect.*, **119**, 113~119 (1997)
 - 7) 小沼博隆: 野菜における微生物汚染状況とその対策, 日本食品微生物学会雑誌, 17, 37~41 (2000)
 - 8) 金子賢一: 生食用野菜および果実が媒介食品となる感染症, 食衛誌, 40, 417~425 (1999)
 - 9) 染谷 孝・井上興一: 堆肥施用と病原菌汚染, 農業技術体系 土壌肥料編, 追録第14号, 第7-①巻, 資材64の84, 農文協, 東京 (2003)
 - 10) 伊吹俊彦・畠中哲也・斉藤雅典・佐々木泰弘・蔡 義民: 天井クレーン型堆肥自動切り返し装置および戻し堆肥利用を特徴とする堆肥化施設の性能, 農林水産省草地試験場草地飼料研究成果最新情報, 11, 105~106 (1996)
 - 11) 渡辺千春・布藤正之・内藤慎吾・谷 庸子・藤田 耕: 牛糞の堆肥化過程における大腸菌の消長と分離菌の性状, 滋賀県畜産技術振興センター研究報告, 5, 27~30 (1998)
 - 12) 本多勝男: 家畜糞の堆肥化処理ハウス, 畜産の研究, 53, 193~198 (1999)
 - 13) 羽生宜弘・芳川恵一・伊東 光・吉沢直樹: 石灰窒素添加による牛糞堆肥中の大腸菌群の抑制 (予報), 長野県畜産技術研究発表集, 47, 7~13 (1997)
 - 14) 梅田 勲・大野 寛・渡辺康司・田口勝士・小塩静夫・中西寿男・伊東 元・高原康光・安形憲一・浅井英樹・若園鎮康・水野 拓: 開発した堆肥発酵槽の断熱効果と油脂添加の効果, 岐阜県畜産試験研究報告, 25, 25~32 (1999)
 - 15) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, p. 69~72, 金原出版, 東京 (2000)
 - 16) Frampton, E. W., Restaino, L. and Blaszkowski, L.: Evaluation of β -glucuronidase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-GLUC) in a 24 hour direct plating method for *Escherichia coli*. *J. Food Protect.*, **51**, 402~404 (1988)
 - 17) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, p. 88~89, 金原出版, 東京 (2000)
 - 18) 土壌微生物研究会編: 新編土壌微生物実験法, p. 15~23, 養賢堂, 東京 (1992)
 - 19) Betoldi, M., Zucchini, F. and Civilini, M.: Temperature, pathogen control and product quality. *Biocycle*, **29**, 43~50 (1988)
 - 20) Soares, H. M., Cardenas, B., Weir, D. and Switzenbaum, M. S.: Evaluating pathogen regrowth in biosolids compost. *ibid.*, **36**, 70~74 (1995)
 - 21) 社団法人日本施設園芸協会編: 生鮮野菜衛生管理ガイド—生産から消費まで—, p. 1~99, 社団法人日本施設園芸協会, 東京 (2003)
 - 22) Harada, Y. and Inoko, A.: The measurement of the cation-exchange capacity of composts for the estimation of the degree of maturity. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **26**, 127~134 (1980)
 - 23) 藤原俊六郎: 有機物の腐熟度判定法, 有機廃棄物資源化大事典, 有機質資源化推進会議編, p. 41~50, 農文協, 東京 (1997)
 - 24) 上田成子・桑原祥浩: 有機栽培圃場の野菜および有機肥料の衛生細菌学的研究, 防菌防黴, **30**, 145~152 (2002)
 - 25) Dong, Y., Iniguez, A. L., Ahmer, B. M. and Triplett, E. W.: Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 1783~1790 (2003)
 - 26) Lebine, W. N. and Goldberg, M. J.: *Escherichia vulneris* osteomyelitis of the tibia caused by a wooden foreign body. *Orthop. Rev.*, **23**, 262~265 (1994)
 - 27) De Baere, T., Verhelst, R., Labit, C., Verschraegen, G., Wauters, G. and Vanechoutte, M.: Bacteremic infection with *Pantoea ananatis*. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 4393~4395 (2004)
 - 28) Dionisio, D., Belli, A., Dionisio, A., Poggiali, G., Corradini, S., Pierotti, P., Menci, R. and Mecocci, L.: Appendicitis: microbial interactions and new pathogens. *Recent. Prog. Med.*, **83**, 330~336 (1992)
 - 29) 平瀧洋一: セラチア, 日本臨牀, **60**, 2156~2160 (2002)
 - 30) Droffner, M. L. and Brinton, W. F.: Survival of *E. coli* and *Salmonella* populations in aerobic thermophilic composts as measured with DNA gene probes. *Zbl. Hyg.*, **197**, 387~397 (1995)
 - 31) 芝崎 勲: 微生物制御に関連する資料 (その1), 防菌防黴, **24**, 477~488 (1996)
 - 32) Dioffner, M. L. and Yamamoto, N.: Procedure for isolation of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas* mutants capable of growth at the refractory temperature of 54°C. *J. Microbiol. Methods*, **14**, 201~206 (1991)
 - 33) 染谷 孝・犬伏和之・山本啓之・加藤憲二: 土壌水圏における Viable but nonculturable (VBNC) 微生物の解析手法の進歩と課題, 土と微生物, **53**, 45~51 (1999)
 - 34) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, p. 72~73, 金原出版, 東京 (2000)

Occurrence and Survival of Coliform Bacteria, *Escherichia coli* and *Salmonella* in Various Manure and Compost

Chun-Ming Gong, Junichi Koshida¹, Noriko Moriyama, Xiaodan Wang,
Takezo Udou*, Koichi Inoue and Takashi Someya
(*Fac. Agric., Saga Univ., *School Health Sci., Univ. Occup. Environ. Health ;*
¹*present address : Erdec, Co. Ltd.*)

Occurrence and survival of fecal-contamination indicator bacteria (coliform bacteria, *Escherichia coli* and *Salmonella*) in various manure and compost samples collected from 23 composting facilities mostly in Kyushu were investigated by using selective media. Coliform bacteria were detected on desoxycholate agar from 11 (38%) of 29 product samples (15 cow dung manure, 4 poultry manure, 2 biosolid compost and 8 food waste compost) at a range of 10^2 to 10^6 cfu g⁻¹ dry matter. From positive samples, 21 isolates of possible coliform bacteria were purified. Among them, species of coliform bacteria (*E. coli*, *E. vulneria*, *Pantoea* sp. and *Buttiauxella agrestis*) were identified whereas isolates of *Serratia marcescens*, not coliform bacteria, were also obtained, suggesting that careful observation was necessary to avoid false positive counting due to the presence of a red colony of *S. marcescens* that resembled coliform bacteria. Isolates of *E. coli* were tested for slide aggregation with a set of antiserum against pathogenic *E. coli* serotypes and negative reaction was obtained for all the isolates tested. Direct detection of *E. coli* on Chromocult coliform agar and *Salmonella* on MLCB agar resulted in none and 2 (17%) of 12 samples tested, respectively. The fate of fecal-contamination indicator bacteria as above was followed during compost production on 7 cases at 6 compost facilities and 4 patterns were observed: fecal-contamination indicator bacteria 1) decreased and finally disappeared, 2) decreased once but re-growth was occurred on products, 3) decreased to some extent but remained in products, 4) was not detected throughout production. These results suggest that some fecal-contamination indicator bacteria may survive compost production and appropriate temperature control would be significant for hygiene control of manure and compost.

Key words coliform bacteria, compost, *Escherichia coli*, *Salmonella*, survival

(Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr., 76, 865-874, 2005)