

## 牛ふんの堆肥化過程における大腸菌の消長と分離菌の性状

誌名	滋賀県畜産技術振興センター研究報告
著者	渡辺, 千春 布藤, 雅之 内藤, 慎吾 谷, 庸子 藤田, 耕
巻/号	5号
掲載ページ	p. 27-30
発行年月	1998年12月

# 牛ふんの堆肥化過程における大腸菌の消長と分離菌の性状

渡辺千春<sup>1)</sup> 布藤雅之<sup>2)</sup> 内藤慎吾<sup>2)</sup> 谷 庸子<sup>2)</sup> 藤田 耕<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>滋賀県畜産技術振興センター <sup>2)</sup>滋賀県家畜保健衛生所

## 要 約

実際に堆肥を生産している堆肥舎3戸と強制攪拌発酵施設3戸において、堆肥化過程での大腸菌数の推移を追跡した。いずれの施設も適正な管理がなされており、生ふん投入後およそ1週間で60°C前後まで温度が上昇した。その過程において大腸菌数は、50°Cくらいまではあまり減少せず、60°C前後に達した時点で急激に減少し、直接培養では検出されなくなった。

次に、発酵温度が60°C以上に達し、直接培養で大腸菌が検出されなかった4施設22サンプルについて増菌培養したところ、ほとんどのサンプルから大腸菌が分離された。このことから、大腸菌は堆肥化処理により検出限界以下まで減少するものの、完全には消失せずわずかながら堆肥中に存在する可能性が示唆された。そこで、この堆肥中に存在する大腸菌(堆肥由来株)と、生ふんから直接培養により分離された大腸菌(生ふん由来株)とが、同じものなのかを調べるため各分離菌の性状を検討した。

生ふん由来株は多様な性状を示したのに対し、堆肥由来株は異なる施設から分離されたにもかかわらず、生化学的性状が同一で薬剤感受性とプラスミドプロファイルのパターンが特定の3種類に限定された。このことから、堆肥由来株は高温環境下でも生息可能な堆肥固有の特定株ではないかと仮定し、温度抵抗性について検討した。しかし、実験的には60°Cで死滅し野外事象を再現することはできず、検討課題として残された。

ふん尿処理を大腸菌の検出という観点から見た場合、発酵熱による温度上昇が必要であるとわかった。また、大腸菌が検出されなくなる温度の目安は60°Cと考えられた。

(キーワード: 牛ふん, 堆肥化, 大腸菌)

## 緒 言

家畜ふんの堆肥化は、有機質肥料の生産として古くから取り組まれてきた<sup>1)</sup>。また、堆肥化技術の研究も、水分調整材や通気技術等、発酵促進に関する報告は多い<sup>3,6,11)</sup>。しかし、堆肥化過程における微生物叢の動態や堆肥固有菌種等に関する微生物学的な研究報告は少ない。

近年、病原性大腸菌による集団食中毒が発生し、食品生産分野ばかりでなく一般家庭においても、衛生管理に対する意識改革が飛躍的に進んだ。そのような状況下で、大腸菌は人間も含めた動物の腸内常在細菌であることから、家畜ふん堆肥、特に牛ふんの安全性について懸念が持たれている。一般的に病原菌は熱に弱く、堆肥化処理過程での発酵熱により死滅するとされている<sup>2)</sup>。しかし、実際の生産現場では処理方法や条件等の違いからその様相は多種多様であり、家畜ふん堆肥の微生物学的研究は、未だ検討課題が多い。

そこで本研究では、微生物学的な観点から見た取り組みのひとつとして、牛ふんの堆肥化過程における大腸菌の消長と分離菌の性状について検討した。

## 材料と方法

### (1) 材料

6戸の発酵処理施設において、生ふんから堆肥になるまでの過程で、処理日数(1~35日後)に応じたそれぞれの時点で該当する個所で採取した。採材時のばらつきを少なくするため、各個所では少なくとも5ポイント以上から無作為に採取し、1つのサンプルとしてプールした。発酵方法は堆積方式と攪拌方式に分け、堆積方式の堆肥舎3戸(H,T,N農家)と、攪拌方式の強制攪拌発酵施設3戸(S,Y,F農家)から合計33サンプルを供試した。

### (2) 大腸菌の培養

直接培養は、材料5gを滅菌生理食塩水により段階希釈後、DHL寒天培地で37°C 24時間好気培養し、赤色コロニーをカウントした。直接培養では検出限界以下であった材料について、さらに、材料5gをノボビオシン加mECブイヨン45mlで42°C 24時間増菌培養した。それをDHL寒天培地に画線塗抹し37°C 24時間好気培養後、赤色コロニーを単分離した。

### (3) 分離菌の性状

発酵温度が60°C以上に達していた4施設において、直接培養で分離された生ふん由来大腸菌38株と、増菌培養でのみ分離された堆肥由来大腸菌19株を供試し、生化学的性状(api20E:日本ビオメリュー・バイテック)、薬剤感受性(日本化学療法学会標準法)およびプラスミドプロファイ

ル(プラスミド簡易微量分離法関崎の変法<sup>5)</sup>)について検討した。さらに、温度抵抗性について、滅菌生理食塩水に菌を浮遊させた湿熱条件下と、滅菌堆肥に菌液を接種した乾熱条件下で検査した。

結 果

1 発酵温度と大腸菌数

堆肥化過程における発酵温度の推移は、いずれの施設も、生ふん投入後およそ1週間で60℃前後まで上昇しその後徐々に低下するというパターンを示した(図1)。

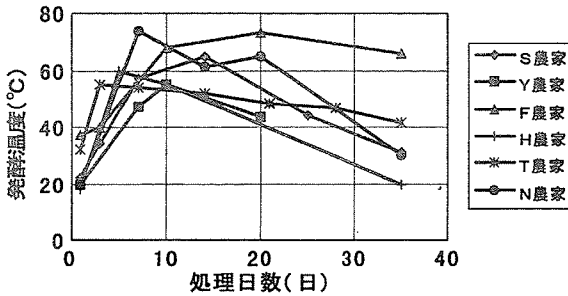


図1 堆肥化過程における発酵温度の変化

大腸菌数は、発酵温度が上昇していく過程において、50℃くらいまではあまり減少せず10<sup>6</sup>CFU/g程度で推移した。しかし、60℃前後に達した時点で急激に減少し、いずれの施設においても直接培養で大腸菌は検出されなくなった(図2)。

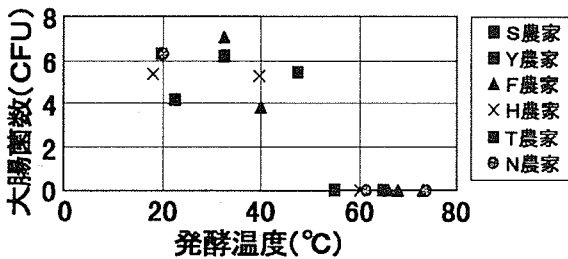


図2 発酵温度と大腸菌数の関係

2 増菌培養

直接培養で大腸菌が検出されなかったサンプルを増菌培養したところ、堆積方式では8サンプルすべてから、攪拌方式では14サンプル中10サンプルから大腸菌が分離された。

3 分離菌の性状

(1) 生化学的性状

生ふん由来株はインドール産生の有無や糖分解性の違いから、apiコードで5144572, 5044552, 5104572, 5144552, 5544572, 5044542, 5104532の7種類の異なる性状を示した。それらの株数を表1に示した。

表1 分離菌の生化学的性状

	農家	検査株数	apiコード (株数)							
			A	B	C	D	E	F	G	
生ふん由来株	Y	10	7	3						
	F	9	5	1	1	1	2			
	T	9	7	2			1			
	N	10	4			4			1	1
堆肥由来株	Y	5	5							
	F	5	5							
	T	4	4							
	N	5	5							

一方、堆肥由来株は異なる施設から分離されたにもかかわらず、すべて同一のapiコード5144572であった。これらはインドール陽性で、アセトイン、ゼラチナーゼおよび硫化水素が陰性、また、糖の分解はぶどう糖、マンニトール、ソルビット、ラムノース、白糖、メリビオースおよびアラビノースが陽性で、イノシットおよびアミグダリンが陰性という性状を示した。

(2) 薬剤感受性

生ふん由来株では施設により差が見られ、Y農家は10株中8株が感受性株であったのに対し、他の3農家は逆に大部分が耐性株であった。また、T農家は多剤耐性株が9株中4株あった。これに対し堆肥由来株は、感受性株かペニシリン耐性株の2種類のみであった(表2)。

表2 分離菌の薬剤感受性

	農家	検査株数	薬剤耐性 (株数)		
			感受性	PCG耐性	多剤耐性
生ふん由来株	Y	10	8	2	
	F	9	2	7	
	T	9	3	2	4
	N	10	2	7	1
堆肥由来株	Y	5	2	3	
	F	5	5		
	T	4		4	
	N	5	3	2	

(3) プラスミドプロファイル

生ふん由来株がおおよそ20種類のパターンに分類されたのに対し、堆肥由来株は4施設から分離した19株すべてが3種類の特定パターンに該当した(図3)。

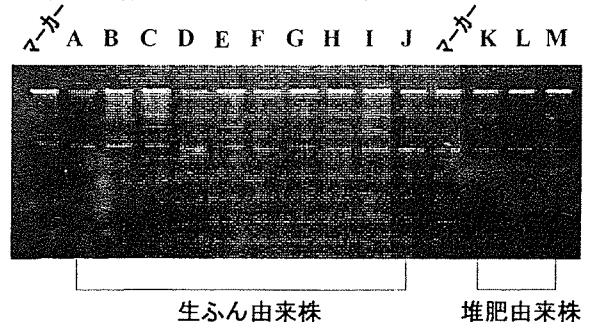


図3 分離菌のプラスミドプロファイル

(4) 温度抵抗性

湿熱条件下における50℃感作では生ふん由来株および堆肥由来株とも、1時間経過後も菌数はわずかに1オーダー程度しか減少しなかった。しかし、60℃感作では生ふん由来株は5分後、堆肥由来株は10分後にすべて死滅した(図4)。

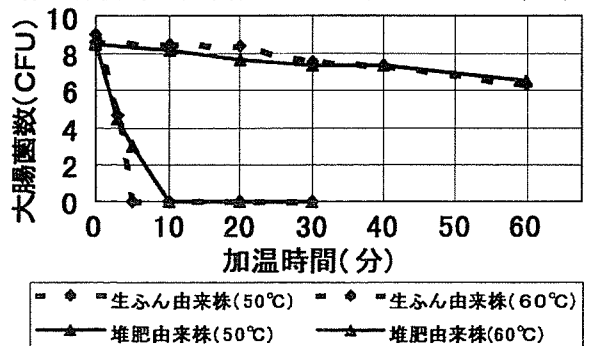


図4 湿熱条件下における分離菌の温度抵抗性

乾燥条件下ではいずれの由来株も、60°C 24時間ですべて死滅した。

### 考 察

堆肥化過程における発酵温度は、酸素、水分および炭素源と窒素源の比率等が一定の条件を満たしていれば、生ふんに含まれる易分解性有機物が微生物により分解され熱エネルギーが発生し、その結果発酵熱が蓄積されて70°Cくらいまで上昇することが報告されている<sup>8,9)</sup>。今回、堆積方式および攪拌方式のいずれの発酵方法でも、生ふん投入後およそ1週間で発酵温度は60°C前後まで上昇し、適切な管理による良好な堆肥化がなされていたものと推察された。この発酵温度の上昇は、生ふん中の病原菌や寄生虫、あるいは雑草の種子等を死滅させると言われており、家畜ふんの堆肥化により腸内細菌群が検出されなくなるという報告は数多い<sup>10,12)</sup>。今回の結果も同様で、大腸菌は発酵温度が60°C前後に達した時点で、直接培養では検出されなくなった。これらのことから、牛ふんの堆肥化において、発酵熱により大腸菌を検出限界以下まで減少させるためには、処理方法や条件等の違いにかかわらず、処理施設の適切な管理が重要であるということが明らかとなった。

一方、Mote et al<sup>7)</sup>は乳牛の排泄物を堆肥化する過程で、大腸菌群が初期に減少あるいは検出されなくなるものの、後期になるとその数はまた増加し、堆肥化により大腸菌群を排除することは困難であると示唆している。そこで、直接培養で大腸菌が検出されなくなったサンプルから、大腸菌が完全に死滅したのかどうかを確認するため増菌培養を実施したところ、堆肥舎からのすべてのサンプルが、また強制攪拌発酵施設からの約7割のサンプルが大腸菌陽性となった。このことから、大腸菌は堆肥化処理過程において検出限界以下まで減少するものの、完全には消失せず、わずかながら堆肥中に存在する可能性が示唆された。

そこで、直接培養で分離された生ふんに含まれる大腸菌と、増菌培養でのみ分離された発酵処理後の堆肥に含まれる大腸菌とが同じ由来なのかどうかを見るため、分離菌の性状について検討した。生ふん由来株はそれぞれの施設によりいく種類かの異なる性状を示した。しかし、堆肥由来株は異なる4施設から分離されたにもかかわらず、生化学性状が同一で薬剤感受性とプラスミドプロファイルのパターンが特定の3種類に整理された。このことから堆肥中に存在する大腸菌は、高温環境下でも生息可能な堆肥固有の特定株ではないかと仮定し、それらの温度抵抗性を調べた。しかし、実験的な温度感作では、物理的条件がより野外に近い乾条件下でも菌は60°Cですべて死滅し、野外事象を再現することはできず、今後の検討課題

として残された。

大腸菌は、現在、家畜衛生において大きな課題のひとつとなっている<sup>4)</sup>。ふん尿処理を大腸菌の検出という観点から見た場合、発酵熱による温度上昇が必要であるとわかった。また、大腸菌が検出されなくなる温度の目安は60°Cと考えられる。今回、生ふん由来株と堆肥由来株の違いを明らかにすることはできなかったが、今後さらに要因を検討し、堆肥の安全性について確認していく必要がある。

### 引用文献

- 1) 中央畜産会, 堆肥化施設設計マニュアル, 1987.
- 2) Golueke, C. G. Biological reclamation of solid wastes. Rodale press, 1977.
- 3) 本多勝男. 家畜ふんの堆肥化処理能力向上に関する試験(1)物理的発酵要因の検討. 神奈川県畜試験報 70: 123-130, 1980.
- 4) 伊藤武. ペロ毒素産生性大腸菌と食品衛生. モダンメディア39(7): 307-322, 1993
- 5) Kado, C. I. and Liu, S. T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bacteriol. 145: 1365-1375, 1981.
- 6) 加藤博美・早川岩男・井戸豊・沢田守男・山川芳男・森健治郎. 家畜ふん尿のコンポストに関する研究(10)畜ふん堆肥化に対する強制通気の効果. 愛知農総試研報16: 376-382, 1984.
- 7) C. R. Mote, B. L. Emerton and J. S. Allison. Survival of Coliform Bacteria in Static Compost Piles of Dairy Waste Solids Intended for Freestall Bedding. J. Dairy Sci. 77: 1676-1681, 1988.
- 8) 扇元敬司. コンポストの微生物学. 畜産の研究51(1): 9-18, 1997.
- 9) 扇元敬司. コンポストの微生物学. 畜産の研究51(2): 14-20, 1997.
- 10) 斎木隆. 高温菌利用による簡易浄化装置の開発改良. 農林水産技術会議事務局別枠研究試験成績書6: 90-94, 1979.
- 11) 柴田るり子・岡田光弘・曾根一幸・高山文雄. 有機質資材が家畜ふんの物性改良に及ぼす効果. 千葉畜セ研報10: 71-76, 1986.
- 12) 上田邦夫. たて型微生物発酵槽による牛ふんの急速堆肥化における腐朽効果について. 日土肥誌56: 398-403, 1985

Fate of Esherichia coli in Composting Process of Bovine Feces and Characteristics of isolated strains

SUMMARY

Fate of Esherichia coli (E. coli) of bovine feces were observed in composting process at three houses of static compost piles and three systems of fermentation by forced turning. All systems were operated properly and temperature of piles rised to 60°C during the first one week. In the process, the numbers of E. coli were not drastically changed within about 50°C, but they were rapidly decreased and not detected by the direct plating at about 60°C. Most of the samples which were undetectable E. coli by direct plating, were detectable E. coli by the enrichment culture. It is suggested that E. coli is not disappeared completely in composting process, and E. coli exist a little in compost.

The characteristics of strains which were isolated by direct plating (raw feces source) and enrichment culture (compost source), were examined. The strains of raw feces source showed various characteristics. On the otherhand, the atrains of compost source showed the same biochemical characteristics, specific 3patterns of drug sensitivity and plasmid profile. The strains of compost source were supposed origin from compost that have an ability to survive under the thermophilic enviroment. But, experimentally, they disappeared at 60°C.