

原著

## 好気性超高温発酵堆肥の抗大腸菌群効果の検討

小堤悠平<sup>1</sup>、長峰孝文<sup>1</sup>、高橋友継<sup>2</sup>、畠中哲哉<sup>1</sup>、道宗直昭<sup>1</sup>、眞鍋 昇<sup>2</sup>

<sup>1)</sup> (一財) 畜産環境整備機構 畜産環境技術研究所、福島県西白河郡西郷村 961-8061

<sup>2)</sup> 東京大学大学院農学生命科学研究科 高等動物教育研究センター・附属牧場、茨城県西茨城郡岩間町

319-0206

**要約** 好気性超高温発酵堆肥による殺菌効果を検討した。東京大学附属牧場の圧送通気式堆肥化施設で発酵処理した好気性超高温発酵堆肥を実験に供試した。三つの試験からなり、①超高温発酵菌堆肥に乳牛ふんを混合し、ポット培養後、大腸菌群数による抗菌作用の試験、②超高温発酵菌堆肥を実際の牛舎敷料に利用し、大腸菌群数による抗菌作用の試験、③好気性超高温発酵堆肥の乳房炎原因菌(4菌株)に対する抗菌作用の試験を行った。供試した堆肥の発酵温度は、年間を通じて繰り返し時には100°C以上に達した。試験①の結果、50日目に堆肥の濃度依存的に大腸菌群の増殖が抑制される傾向が見られた。試験②の結果、堆肥の牛舎敷料利用は、オガクズのみでの敷料にくらべて大腸菌群数を抑制した。試験③の結果、供試4菌株に対しては明確な抗菌効果は認められなかった。これらの結果より、長期的な敷料利用で大腸菌群を制御できる可能性があるが、好気性超高温発酵堆肥の敷料利用時の抗菌性は限定的であることが示唆された。

キーワード: 超高温発酵菌堆肥、牛舎敷料、大腸菌群数、乳房炎

受領: 17.09.2014. 受理: 06.11.2014.

日本畜産環境学会 No14 (1) pp25-32. 2015

### 緒言

好気性超高温発酵堆肥とは、超高温発酵菌によって100°C近い発酵温度で有機性の廃棄物を分解させた堆肥である。堆肥製造において発酵が停滞して十分な発酵温度が得られない場合、未熟な堆肥が製造されることが問題である。また、堆肥の発酵温度の低下は、悪臭の発生、腸管出血性大腸菌O157やサルモネラなどの病原性細菌の検出や雑草種子の発芽を引き起こすことが報告されている[4]。好気性超高温発酵堆肥は、これらの問題点を解決できる可能性があり、超高温発酵菌を用いた下水汚泥の

堆肥化や、寒冷地での牛ふんと下水汚泥を組み合わせた堆肥化の例が報告されている[5,9]。

酪農において、乳房炎による経済的損失は大きな問題である。乳房炎を予防するために、敷料として堆肥を利用する例が知られている[1,2]。また、堆肥を敷料利用すると牛床中の大腸菌群の増殖が抑制されることが報告されている[6,7,10]。しかし、好気性超高温発酵堆肥の敷料利用に関する報告はまだない。そこで、好気性超高温発酵堆肥による乳房炎防除の可能性を探るため、実験室規模および実際の牛房における

## 好気性超高温発酵堆肥・大腸菌群防除

試験を行い、超高温発酵菌堆肥の殺菌効果を明らかにすることを目的とした。

### 材料と方法

#### 1) 超高温発酵菌堆肥

東京大学附属牧場（茨城県笠間市）において、場内の牛、山羊および馬が排泄するふん尿、飼料残渣、使用済み敷料などを混合した原料を床面圧送通気式堆肥化施設（堆積高 2.2m、幅 4m、奥行 7m×4 槽）で発酵処理をした堆肥を実験に供試した。発酵処理は、約 20t の発酵原料に、重量比で等量の戻し堆肥と 1/10 量の廃白土（食用油脂精製工程の活性白土ろ過から排出される 30～40%の油脂を含む残渣）を混合したものを 1 つの槽に堆積し、週に 1 回切り返しつつ 45 日間行った。戻し堆肥に超高温発酵菌が含まれている。堆肥発酵温度は、堆肥各深さ 1m の所で測定し、年間を通じて切り返し時には 100℃以上に達した。堆肥化処理の初期、中期、後期および発酵済みのそれぞれ 2 地点からサンプルを採取して成分を分析し、その結果を表 1 に示した。水分は、発酵初期の段階で 50%以下になっており、発酵終了時には 38%に低下した。pH は弱アルカリ性を保った状態を推移した。全窒素濃度と全炭素濃度は、全期間通して低い値であり、C/N 比は、堆肥化により低下する傾向が見られた。

#### 2) ポット培養における抗菌作用

超高温発酵菌堆肥に乳牛ふんを混合し、培養後、大腸菌群数を測定して抗菌作用を試験した。新鮮乳牛ふん、超高温発酵菌堆肥、滅菌オガクズを表 2 に示す割合で混合し、ガラス瓶（容積 250ml）に入れ、通気性のある Milli Wrap（FW00 100 RJ, Millipore）で封をし、30℃で培養した。培養 0、7、21、50 日後に大腸菌群数を測定した。培養中の水分蒸発を考慮し、重量減少分だけ適宜純水を添加した。

大腸菌群数の測定は、「JIS K 0102 工場排水試験方法 1993」の方法に準拠し、培養後の混合物を滅菌生理食塩水で段階希釈した後、DHL 寒天培地で 37℃24 時間培養後、コロニーを計測した。

#### 3) 牛房における抗菌作用

茨城県内の肉牛肥育農家の牛房（5.4 m×10.7 m）に、堆肥添加区としてオガクズ 2.5 m<sup>3</sup>と超高温発酵菌堆肥 2.5 m<sup>3</sup>を、もしくはオガクズのみ区としてオガクズ 5.0 m<sup>3</sup>を敷き、黒毛和種とホルスタインの F1、雄 7 頭（体重：500～600 kg）を 20 日間飼育した。1 つの牛房を使用して、堆肥添加区とオガクズのみ区をそれぞれ 3 回試験した（表 3）。試験開始 10 日目と 20 日目に牛房内の 5 地点から、敷料を採取し、大腸菌群数を測定した。いずれの試験区においても牛糞の除去はせず、10 日目にサンプル採取後に敷料を切り返した。各培地で得られた

表 1 堆肥化過程および出来上がり堆肥の各成分

分析項目	水分	灰分	pH	EC	全窒素濃度	全炭素濃度	C/N比	リン濃度	カリ濃度	石灰濃度	苦土濃度	銅濃度	亜鉛濃度	臭気指数*
単位	% (現物)	% (乾物)		mS/cm	% (乾物)	% (乾物)		% (乾物)	% (乾物)	% (乾物)	% (乾物)	mg/kg (乾物)	mg/kg (乾物)	
発酵初期	48	48	7.2	4.4	1.7	26.1	15.3	2.6	2.3	9.6	1.3	151	285	25.6
	47	52	7.3	4.2	1.6	23.2	14.5	2.7	2.2	10.3	1.3	161	295	
発酵中期	43	54	7.5	5.2	1.8	23.1	12.8	3.5	2.8	12.0	1.5	174	361	23.2
	40	54	7.4	5.4	1.8	22.6	12.6	3.5	3.1	11.7	1.6	192	365	
発酵後期	48	54	7.5	5.0	1.7	21.7	12.7	3.7	2.6	14.6	1.5	227	411	23.0
	46	57	7.5	5.0	1.8	20.5	11.4	3.8	2.5	15.8	1.5	248	438	
発酵済み	38	56	7.4	5.0	1.9	21.8	11.5	3.7	2.2	16.5	1.5	262	444	22.2
	38	52	7.4	5.2	1.8	22.7	12.6	3.6	2.3	15.3	1.4	232	413	

\*臭気指数は、におい識別装置（FF-2A、島津製作所）を使用し、測定方法は山本ら [11] の方法に準拠した。

表2 ポット培養試験における各材料の混合量 (g生重)

試験区	新鮮乳牛ふん	超高温発酵菌堆肥	滅菌オガクズ
牛ふんのみ区	50	0	0
堆肥0%区 (対照区)	25	0	25
堆肥50%区	25	12.5	12.5
堆肥90%区	25	22.5	2.5
堆肥100%区	25	25	0

表3 牛房における試験の試験期間

試験区	試験期間
堆肥添加区1回目	2009年10月2日～10月23日
オガクズのみ区1回目	2009年11月3日～11月24日
オガクズのみ区2回目	2010年1月13日～2月3日
堆肥添加区2回目	2010年2月13日～2月22日
オガクズのみ区3回目	2010年2月23日～3月15日
堆肥添加区3回目	2010年3月19日～4月9日

$p < 0.05$ の場合にその相関が有意であると

表4 乳房炎原因菌に対する抗菌作用 (試験1) の材料の混合量

	超高温発酵菌堆肥 (g)	オガクズ (g)	一般的な堆肥 (g)	生理食塩水 (g)	99.5%エタノール (mL)	ろ過滅菌の有無
抽出液1	25			225		有
抽出液2		12.5		237.5		有
抽出液3			25	225		有
抽出液4	25			25		なし
抽出液5	25			100		なし
抽出液6	25			100		有
抽出液7	25				25	なし
抽出液8	25				100	なし
抽出液9	25				100	有
抽出液10	99.5%エタノールのみをペーパーディスクに含ませた					

大腸菌群数から現物1gあたりの菌数を算出し、対数値に変換した。その対数値を用い、相関性の検定をt検定からp値を算出し

判断した。

#### 4) 乳房炎原因菌に対する抗菌作用

乳房炎原因菌は、独立行政法人農業・食

## 好気性超高温発酵堆肥・大腸菌群防除

品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所から供与された、下記の乳房炎の症状を示す乳牛の乳汁からの単離株を用いた。

*Staphylococcus aureus* (WATA#255-51d.)

*Staphylococcus simulans* (WATA#256-51d.)

*Streptococcus uberis* (HOKUNO#47D)

*Escherichia coli* (WATA#255-17d.)

超高温発酵菌堆肥の対照区として、栃木県酪農試験場にて調整された乳牛ふん堆肥(対照堆肥)を使用した。この堆肥は、敷料にオガクズを使用し、使用後に乳牛ふんとともに回収したものをスクリーンプレスで固液分離し、固形分をロータリーかく拌式の直線開放型堆肥舎にて20日間処理後、2カ月間堆積発酵したものである。小分けして $-20^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存し、適宜解凍して試験に供した。

### (試験1)

超高温発酵菌堆肥、オガクズまたは対照堆肥に滅菌生理食塩水もしくは99.5%エタノールを表4に示す割合で加え、30分間振盪(Silent Reciprocal Shaker, 池田理工, 動作速度4)し、この上澄液を抽出液とした。一部の抽出液については、ろ過滅菌( $0.2\ \mu\text{m}$ 、ミリポア)した(表4)。これらの抽出液を抗生物質検定用ペーパーディスク(薄手8 mm, ADVANTEC)に染み込ませ、エタノールで抽出したものについては、安全キャビネット内で放置し、エタノールを揮発させた。

非選択培地であるトリプトソイ寒天培地に乳房炎原因菌4株を、選択培地であるマンニト食塩培地(パールコア)に*Staphylococcus*属2株を、選択培地であるDHL培地(パールコア)に*E. coli*1株を塗抹し、この上に抽出液をしみ込ませたろ紙を静置した。好気条件下の $25^{\circ}\text{C}$ または $37^{\circ}\text{C}$ で1日培養し、阻止円の形成を観察した。

### (試験2)

超高温発酵菌堆肥100gを非選択培地であるトリプトソイブイオン培地(300ml)もしくは滅菌水(300ml)に加え、 $37^{\circ}\text{C}$ で一週間振盪培養した。この培養液を、遠心分離( $10,000\times\text{g}$ 、15分)し、その上清を抽出液とした。その抽出液は、ろ過滅菌( $0.2\ \mu\text{m}$ 、ミリポア)した。この抽出液について、試験1と同様の方法にて、阻止円の形成を観察した。

### (試験3)

試験1の4菌株を塗布した非選択培地もしくは選択培地に、①超高温発酵菌堆肥、②これをオートクレーブ滅菌( $121^{\circ}\text{C}$ 、15分)したもの、③ $72^{\circ}\text{C}$ 、30秒で殺菌したもの、④ $100^{\circ}\text{C}$ 、30秒で殺菌したものを撒いた。これを $25^{\circ}\text{C}$ もしくは $37^{\circ}\text{C}$ で培養し、増殖を抑制するか観察した。

### (試験4)

堆肥由来の微生物が*E. coli*よりも増殖が遅い可能性が考えられるため、DHL培地に超高温発酵菌堆肥を埋包させ、 $25^{\circ}\text{C}$ で3日間培養した後、*E. coli*を塗布し、 $25^{\circ}\text{C}$ で培養して増殖を見た。堆肥の埋包方法は、加温溶解し約 $45^{\circ}\text{C}$ 以下に保持したDHL培地を約15mlシャーレに分注し、そこへ超高温発酵菌堆肥5gを加え静かに混和し冷却凝固させた。培地が凝固した後、DHL培地を5ml追加分注し重層した。

## 結 果

### 1) ポット培養における抗菌作用

混合前の大腸菌群数は、超高温発酵菌堆肥とオガクズからは未検出、牛ふんからは $5.1\times 10^6$  CFU/gであった。培養0~50日後の大腸菌群数を図1に示す。いずれの区も、大腸菌群数が7日目に上昇したが、その程度は、堆肥の添加割合が高くなるほど低かった。50日目には、大腸菌群数はいずれの区も減少したが、その減少傾向は堆肥の添

好気性超高温発酵堆肥・大腸菌群防除

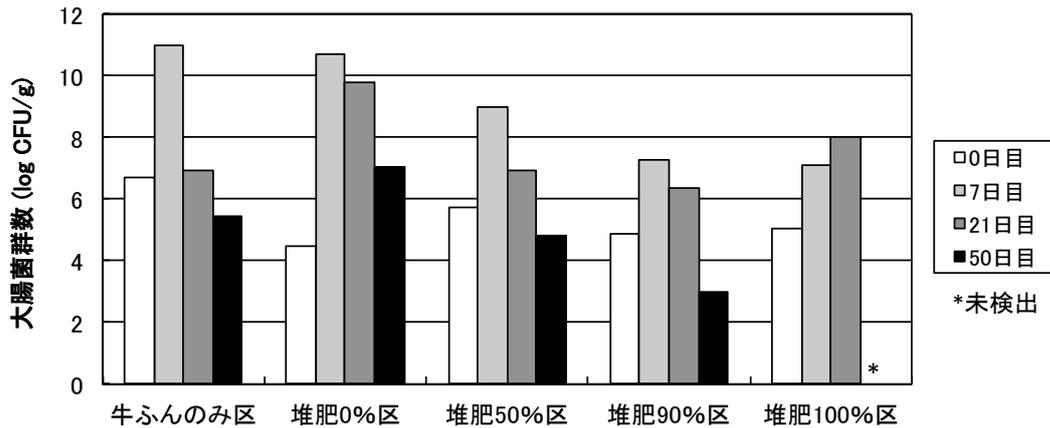


図1 ポット培養試験における大腸菌群数の推移

加割合が高くなるほど強くなり、堆肥100%区では検出されなかった。

2) 牛房における抗菌作用

試験に供試した資材の大腸菌群数は、超高温発酵菌堆肥が未検出、オガクズが $2.8 \times 10^4$  CFU/g、試験期間中に採取した牛ふんが $5.1 \times 10^6$  CFU/gであった。敷料の水分は、オガクズのみ区の方が高い傾向が見られたが、有意な差は見られなかった (図2)。大腸菌群数は、10日目でオガクズのみ区

( $3.4 \times 10^6$  CFU/g) が堆肥添加区 ( $2.9 \times 10^5$  CFU/g) の12.1倍となり、危険率5%で有意差が見られた (図3)。一方、20日目では、オガクズのみ区の大腸菌群数が低下して堆肥添加区とほぼ同等のレベルとなった。

3) 乳房炎原因菌に対する抗菌作用

(試験1)

どの抽出液においても阻止円は認められなかった。ろ過滅菌していない抽出液では、堆肥由来の微生物の増殖が認められた。DHL培地では堆肥由来の腸内細菌群の増殖は認められなかったが、放線菌と思われる微生物の増殖が見られた。以上の結果から、超高温発酵菌堆肥からの水またはエタノールによる抽出物には、試験に供した4株の乳房炎原因菌を抑制する効果はないと考えられた。

(試験2)

どの試験区においても阻止円は認められなかった。抽出時間を長くしても、水による抽出物には、試験に供した4株の乳房炎原因菌を抑制する効果はないと考えられた。また、トリプトソイブイオン培地に

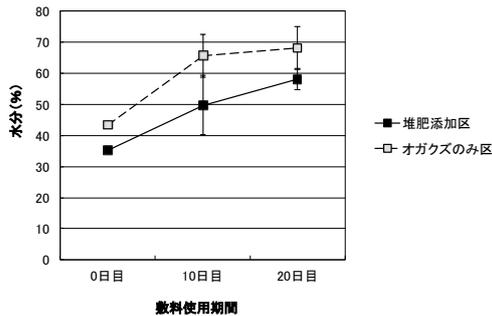


図2 牛房における敷料の水分の推移

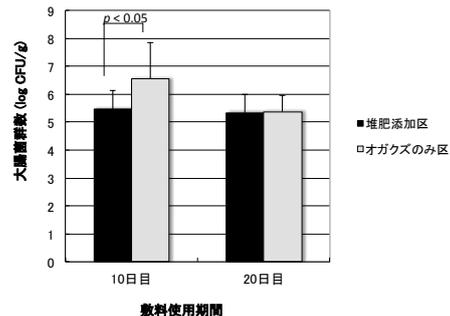


図3 牛房における敷料の大腸菌群の推移

## 好気性超高温発酵堆肥・大腸菌群防除

より、堆肥中の微生物を増殖させても、抽出物に4株の乳房炎原因菌を抑制する効果はないと考えられた。

### (試験3)

どの試験区においても塗布した菌株の抑制は認められなかった。オートクレーブ滅菌した堆肥以外は、堆肥由来の微生物の増殖が見られた。トリプトソイ寒天培地とマンニト食塩培地では、コロニーの形態が異なる多くの種類の微生物が見られたが、DHL培地では、試験1と同様に放線菌と思われる微生物のみが見られた。

### (試験4)

超高温発酵菌堆肥を埋包して培養した培地で、*E. coli*の増殖の抑制は見られなかった。

## 考 察

ポット培養における抗菌作用を見る試験では、堆肥を添加した7日目および21日目では効果が見られず、0日目よりも高い値を示していることから短期的には抗菌作用はないが、50日目では堆肥の濃度依存的に大腸菌群の増殖が抑制される傾向が見られた。超高温発酵菌堆肥を敷料とし短期的に大腸菌群を抑制することは難しいが、長期的な敷料利用で大腸菌群を制御できる可能性が示唆された。

牛房における抗菌作用の試験では、気温、湿度、牛房内における牛ふん尿混入量のかたよりなど、多くの変動要因がかかわる実証的試験であったが、超高温発酵菌堆肥の混合が大腸菌群数を10日後に抑制する結果であった。しかし、大腸菌群数を予防できるほどの効果があったとは言えないが、オガクズを単独で敷料利用した時よりは、抗菌作用があることが認められた。細田ら[1]は、堆肥とオガクズの混合物に大腸菌を添加して一定時間培養後に大腸菌数を

計測した室内実験と、実際の酪農場で堆肥とオガクズの混合物を敷料に使用したのち、大腸菌数を計測した現地試験の結果、ともに7日後に大腸菌数が低下したことを報告している（使用したオガクズの大腸菌数は $6.0 \times 10^7$  CFU/g）。

一方、乳房炎原因菌に対する抗菌作用の試験では、供試した4菌株のいずれに対しても、抗菌効果を見いだすことはできなかった。試験1と試験2から、抗菌作用は水やエタノールで抽出できるものではないことが明確になった。また、試験3、4から、堆肥そのものでも*E. coli*の増殖を抑制するものではないことが明確になった。分離培養株による試験で抗菌作用が見られなかった原因として、今回供試した4菌株に対して効果がなかった可能性を完全に排除しうるものではないが、乳房炎原因菌に対する抗菌作用の試験で用いた培養環境が、ポット培養や牛房での環境と違う点に起因することが考えられる。

環境要因として考えられることの1つは、培地が細菌の増殖に最適な富栄養状態にあるのに対し、ポット培養や牛房では、ふんの部分は栄養に富むが、これ以外の部分はオガクズの偏った栄養状態であったり、超高温発酵菌堆肥の貧栄養状態であったりすることである。もし、超高温発酵菌堆肥の抗菌作用が弱いものであるならば、培地上の富栄養状態での活発な細菌の増殖を抑えられるものではないことが考えられる。ポットや牛房の試験では、堆肥添加分だけオガクズが少なくなっており、オガクズ由来の栄養が減ることで大腸菌群の増殖が低下している可能性も考えられる。もう1つは、寒天培地上では、コロニー毎に分かれて増殖しており、お互いが干渉しないのに対し、ポット培養や牛房では、様々な微生物が競合しながら増殖してい

ることである。もし、超高熱発酵菌堆肥の抗菌作用が、抗生物質的なものでなく、微生物間の競合作用によるものであった場合、寒天培地上では、その作用を評価することはできない。

大腸菌群数は、大腸菌 (*E. coli*) だけでなく *Citrobacter* 属、*Klebsiella* 属、*Enterobacter* 属、*Aeromonas* 属等、幅広い細菌種を含んでいる[3]。したがって、超高熱発酵菌堆肥が50日目に大腸菌群数を抑制する結果は、抗菌作用が幅広い細菌に及ぶことを意味している。しかし、乳房炎は、*Staphylococcus* 属、*Streptococcus* 属、*Mycoplasma* 属、*Corynebacterium* 属、*Enterococcus* 属、*Pseudomonas* 属、*Candida* 属等、非常に幅広い微生物によって引き起こされるため[8]、超高熱発酵菌堆肥の敷料として利用しただけでは乳房炎の防除が難しいことが考えられる。

本研究により、好気性超高温発酵堆肥の長期的な敷料利用で大腸菌群を制御できる可能性があるが、その堆肥の敷料利用時の抗菌性は限定的であることが示唆された。今後、超高熱発酵菌堆肥の抗菌作用を及ぼす微生物の範囲を明らかにすることにより、効果的な乳房炎防除技術を開発できるものとする。

### 謝 辞

本研究は、平成 20～22 年度新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業における「糞尿媒介感染症統御のための処理技術の実用化と先進的衛生管理法」によって行われたものであり、ここに謝意を表します。また、本研究に菌株を提供いただいた(独)農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 細菌・寄生虫病研究チーム 秦英司様に謝意を表します。さらに、調査に協力いただいた東京大学附属

牧場のスタッフの皆様と試験にご協力いただいた農家の皆様に謝意を表します。

### 文 献

- [1] 細田紀子、吉川清人、渡辺工一、岡本達也 (1996)、環境性乳房炎の防除法の検討、獣医畜産新報 49(2): 101-104.
- [2] 細田紀子、渡辺工一 (1997)、環境性乳房炎の予防—一時発酵堆肥の敷料利用—、畜産の研究 51 (2) :60-63.
- [3] 川田十三夫 (1985)、糞便による環境汚染、天児和暢・南嶋洋一 (編)、戸田新細菌学: 167、南山堂、東京
- [4] 金澤 晋二郎、山村 友王、柳田 裕紹、蔵本 寛基 (2003)、超高温・好気発酵法によるバイオハザード・フリーコンポストの製造新技術、土と微生物 57(2): 105-114.
- [5] 金澤晋二郎、山村友王 (2002)、超高温・好気発酵法による有機性廃棄物の新堆肥化技術: 下水汚泥堆肥の理化学性及び耐熱性フォスファターゼ活性、日本土壤肥料学会講演要旨集 (48):24
- [6] 松元良祐、橋本和博 (2006)、堆肥の敷き料利用による牛床の大腸菌抑制効果の検討、香川県西部家畜保健衛生所報告.
- [7] 三好里美、中嶋哲治、光野貴文 (2008)、安全で効率的な戻し堆肥作りの検討、香川県西部家畜保健衛生所報告.
- [8] 笹原二郎 (1988)、乳房炎、中村良一・酒井保・吐山豊秋・笹原二郎・村上大蔵(編)、新編 獣医ハンドブック:279、養賢堂、東京
- [9] 筒木 潔、金澤 晋二郎、近藤 康彦、笠原 敬介 (2004)、超高温菌による厳寒地堆肥化システムの創生、日本土壤肥

- 料学会講演要旨集 (50):18 .
- [10] 脇屋裕一郎、坂井隆宏 (2002)、戻し堆肥の敷料利用技術の確立 戻し堆肥利用農家の実態調査、佐賀県畜産試験場試験研究成績書 38 号:69-72.
- [11] 山本朱美、喜多純一、小川雄比古、小堤恭平、古谷修(2006)、におい識別装置による畜舎および堆肥臭気の強度評価、におい・かおり環境学会誌 37 (1) :33-37.

Original Article

**Coliform group control by using aerobic high-temperature fermentation compost from a cowshed**

Yuhei Ozutsumi<sup>1</sup>, Takafumi Nagamine<sup>1</sup>, Tomotsugu Takahashi<sup>2</sup>, Tetsuya Hatanaka<sup>1</sup>, Naoaki Doshu<sup>1</sup>, Noboru Manabe<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of livestock industry's environmental technology, Fukushima-Nishi-sirakawa-gun 961-8061, Japan

<sup>2</sup>Animal Resource Science Center, The University of Tokyo, Ibaraki-Iwama 319-0206, Japan

In order to explore the possibility of coliform group control by aerobic high-temperature fermentation compost, its bactericidal effect was examined. The compost used for the experiment was produced in the Animal Resource Science Center, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo by the composting facility using the positive pressure aeration. The study was consisted of three experiments; exp. 1: cultivation after mixture of milk cow feces with compost, and measurement of the number of coliform group, exp. 2: use of the compost as bedding material in a cowshed, and then measurement of the number of coliform group, and exp. 3: cultivation after mixture of mastitis pathogens (four strains) with the compost, and measurement of the number of strains. After the turn-over of the compost, the temperature of the compost reached to 100°C or more throughout the year. Exp. 1 showed that the number of coliform group suppressed depending on compost concentration on 50 days of composting. Exp. 2 showed that the coliform group count when the compost was used as the bedding material in a cowshed decreased compared with when only sawdust was used. In the exp. 3, antimicrobial efficacy of the compost to any of the 4 strains were not unambiguously related. Although the antibacterial properties of the compost were limited, there is a possibility that the coliform group is controlled when the compost is used for a long period of time as bedding material in a cowshed.

**Corresponding: Yuhei Ozutsumi** (e-mail: ozutsumi@chikusan-kankyo.jp)