

## 平成29年度 成績概要書

課題コード(研究区分) : 6102-624551(公募型研究)

### 1. 研究課題名と成果の要点

- 1) 研究成果名: バケツによる容積重設定と切返しによる牛ふん堆肥化過程における有害微生物リスクの低減(研究課題名: 堆肥化過程における食中毒菌の生残性に関する環境要因の解明と、これら環境ストレスによる損傷菌化メカニズムの解明)
- 2) キーワード: 乳牛ふん堆肥、容積重、大腸菌、サルモネラ、リステリア
- 3) 成果の要約: 乳牛ふんとオガクズの混合物を25Lバケツで計量し、温暖期では12.5kg(容積重0.50kg/L)、寒冷期は9.5kg(0.38kg/L)以下であれば、堆積物内の最高温度は55℃以上に上昇し、有害微生物は概ね不検出となる。表面と床面では生残するため3回以上切返し、堆積物全体を高温に曝す必要がある。

### 2. 研究機関名

- 1) 担当機関・部・グループ・担当者名: 畜試・基盤研究部・飼料環境G・湊 啓子・家畜衛生G
- 2) 共同研究機関(協力機関): (農研機構・野菜花き研究部門)
- 3) 研究期間: 平成25~29年度(2013~2017年度)

### 4. 研究概要

#### 1) 研究の背景

家畜ふん中には病原性大腸菌やサルモネラ(Sal)、リステリア(Lm)等の病原菌が含まれる場合があり、それらによる農作物の汚染を防ぐため堆肥化過程における有害微生物リスクの低減が求められている。リスク低減には堆肥温度を高めることが重要であり、その条件として副資材を混合し堆積物の容積重を500~700kg/m<sup>3</sup>に調整することが推奨されている。しかし、堆積時の容積重を生産現場で実測するのは難しく、バケツを用いた簡易な測定法が提案されているが、その値と実際の堆肥の品温上昇や病原菌の生残性との関係は未解明である。

#### 2) 研究の目的

堆積切返し方式(無通気)の乳牛ふんの堆肥化過程において大腸菌、SalおよびLmの低減条件とその条件を達成するために必要な容積重等、有害微生物リスクを低減するために必要な堆肥化条件を明らかにする。

### 5. 研究内容

#### 1) 乳牛ふんの堆肥化過程における大腸菌、サルモネラおよびリステリアの生残性

- ・ねらい: 堆積切返し方式(無通気)の乳牛ふんの堆肥化過程において、初期水分等の異なる種々の条件下で大腸菌、SalおよびLmの生残性を調べ、有害微生物リスクの低減に必要な堆肥化条件を解明する。
- ・方法: 乳牛ふんと副資材の混合物を屋内の区画に約7m<sup>3</sup>堆積(高さ1.6m)し、3週間隔で3回切返し計4回の堆積を行った。水分(70~78%)、副資材(オガクズ、モミガラ)、接種菌種(大腸菌、Sal、Lm)、実施時期(温暖期、寒冷期)を変えて合計8回(各2処理)の堆肥化試験を実施した。大腸菌は開始時に全体に接種、Sal(*Salmonella enterica* serovar *Infantis*)とLm(*Listeria monocytogenes*, 1/2c, リファンピシン耐性株)は、開始時と各切返し時の混合物50gに各々接種してPTFEバック(図1注\*1)に詰めて堆積物内の5箇所に埋設した。
- ・調査項目等: 温度、容積重(25Lバケツ, 図3注\*1)等。大腸菌はクロモカルトコリフォームアガーを用いた平板法、SalはTSAと混釈培養後にDHL培地(ノボビオシン20ppm添加)を重層する二重平板法、Lmはクロモアガーリステリア培地(リファンピシン50ppm添加)を用いた平板法により菌数を計測した。

#### 2) 容積重調整のためのオガクズ必要量の推定

- ・ねらい: 目標とする容積重に調整するために必要な乳牛ふんに対するオガクズの混合割合を明らかにする。
- ・調査項目等: 乳牛ふんに2種類のオガクズを割合を変えて混合して容積重(25Lバケツ)を測定した。

### 6. 成果概要

- 1)-(1)大腸菌とSalおよびLm(大腸菌とLmはデータ略)は活発な温度上昇が認められた堆積内部(B, C, D)では概ね不検出となったが、温度上昇が緩慢な床面(A)や表面(E)では生残した(図1)。3菌種ともに埋設部位の温度が高いほど生残菌数は少なく、50℃以上の部位では概ね不検出となった(図2)。複数回の切返しにより堆積堆肥の全体を50℃以上の高温に曝す必要があると考えられた。
- 1)-(2)堆肥混合物中の大腸菌(開始時6~7 log CFU/現物g)は、4回の堆積が終了した12週間後には2 log CFU/現物g以下となった(データ略)。SalとLmは各埋設部位で大腸菌と同等以上に減少したため、堆肥全体に存在した場合でも大腸菌と同様の低減が期待できる。以上より、大腸菌、SalおよびLmは50℃以上の温度上昇と3回の切返しで微生物リスクは十分に低減することが明らかとなった。なお、リスク低減の安全率と雑草種子の不活化条件(55℃・2~3日, 西田ら1999)を考慮して「切返しを3回以上実施して4回の堆積でいずれも最高温度が55℃・3日以上となるようにすること」を、有害微生物リスクの低減に必要な堆肥化条件とした。
- 1)-(3)水分が同等の場合、容積重が低い方が堆積物の品温は高くなる傾向が見られた(データ略)。4回の堆積の最高温度は初期容積重が高い堆肥ほど低く、初期容積重は品温上昇の目安となると考えられた(図3)。また、寒冷期では温度上昇が抑制される傾向が見られた。1)-(2)の堆肥化条件を達成した25Lバケツで測定した初期容積重は、オガクズを副資材とした場合、温暖期(環境温度; 10~30℃)では0.50 kg/L以下、寒冷期(-3~10℃)では0.38 kg/L以下であった。なお、8L程度の小容量のバケツで測定する場合は、温暖期では0.48 kg/L以下、寒冷期では0.37 kg/L以下を目安とする。
- 2)-(1)乳牛ふんを容積重0.50および0.38 kg/Lに調整するために必要なオガクズの混合割合(容積比)は種類により大きく異なり、乳牛ふん1に対して生木を削ったオガクズaでは各々1.5, 2.5、製材工場由来のオガクズbでは0.8, 1.4と推定された(図4)。なお、乳牛ふん尿に対して容積比で1.5倍を上回る量のオガクズを混合した堆肥では、1~2回の切返しを追加して通算5~8ヶ月の堆肥化期間を経てもC/N比は40前後と高かった。

<具体的データ>

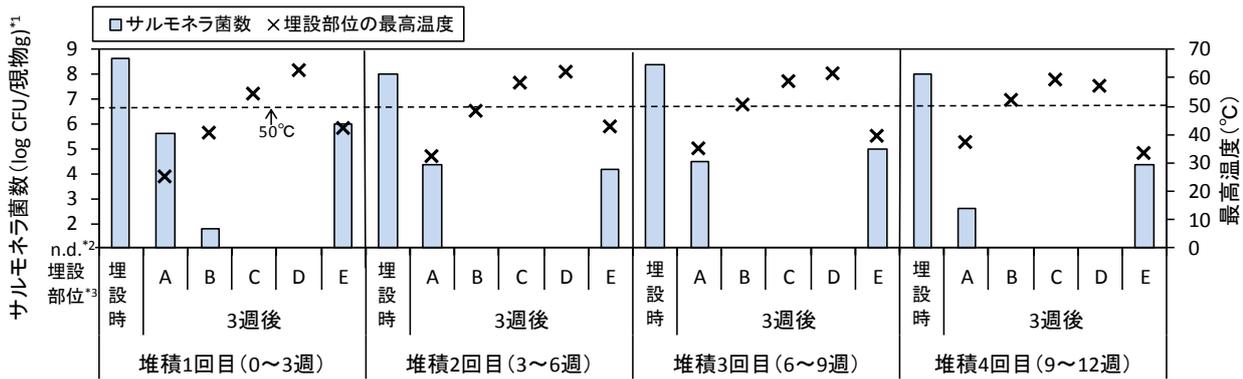


図1 乳牛ふんオガクズ堆肥<sup>74</sup>に埋設した PTFE バック内堆肥中のサルモネラ菌数の変化

\*1:開始時および3,6,9週後の切返し時の混合物にサルモネラ培養菌液を接種し、PTFE バック(15×16cm, PTFE 濾紙を二重に貼り合わせて作成、菌の流亡が生じず、通気性があり外部と同様に堆肥化が進行することが確認されたもの)に詰めて堆肥に埋設した。各3週後の切返し時に PTFE バックを回収し生残菌数を調査した。\*2:不検出(検出限界 0.7 log CFU/現物 g) \*3:埋設部位;A(床面), B(下層:床上40cm), C(中央:床上80cm), D(上層:40cm 深), E(表面:2~3cm 深) \*4:水分 70%, 初期容積重 0.40kg/L

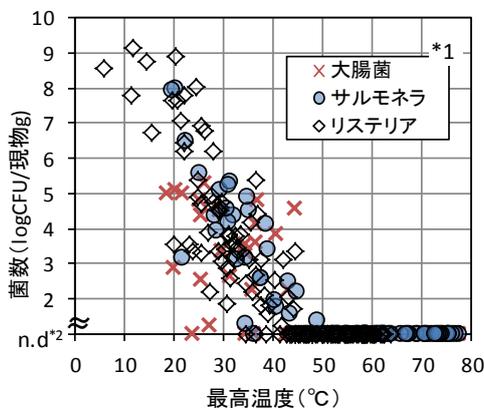


図2 PTFE バック埋設部位の最高温度と大腸菌、サルモネラおよびリステリアの生残菌数の関係

\*1:初期菌数;大腸菌 6.5, サルモネラ 8.4, リステリア 9.5 log CFU/g \*2:不検出(検出限界:大腸菌とリステリアは 1.2 log CFU/現物 g, サルモネラは図1と同じ)

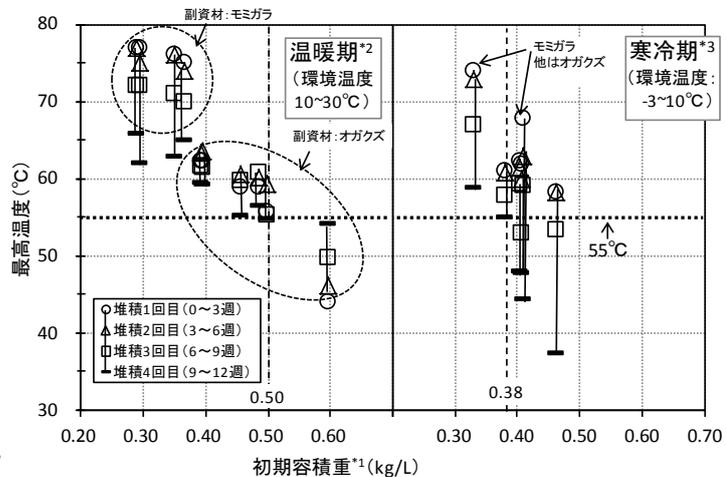


図3 堆肥化開始時原料の容積重と堆肥化過程での4回の堆積での最高温度(72時間維持\*4)

\*1:測定手順;①25L バケツの空重量を計量。②バケツにすりきり一杯水を入れて計量、バケツの空重量を引いた値をこのバケツの容積とする。③堆肥原料をバケツに山盛り入れ、はみ出た分をすりきり除去して計量し、バケツの空重量を引き②で求めたバケツ容積で割る。  
\*2:温暖期:オガクズ(H26:5~7月, H27:6~8月, H28:5~8月)とモミガラ(H26:8~10月, H27:9~11月)を副資材として水分条件を変えて実施。  
\*3:寒冷期:オガクズ(H26:11下~2月中旬(1.8°C), H27:12中~3月下旬(1.1°C), H29:9下~12月中旬(8.7°C))とモミガラ(H26とH27;オガクズと同時期)で各々水分条件を変えて実施。  
\*4:3日間以上維持された温度のうちの最高温度

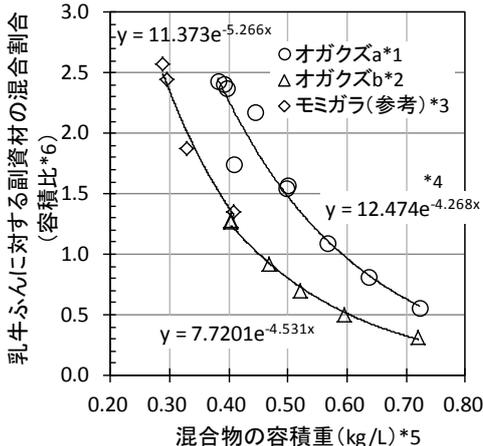


図4 乳牛ふんに対するオガクズの混合割合と混合物の容積重の関係

乳牛ふん(水分 88%, 容積重<sup>77</sup> 0.98kg/L)に以下の副資材を割合を変えて混合。  
\*1:生木を削ったオガクズ(原料;カラマツ, 水分 45%, 容積重<sup>77</sup>0.27kg/L, 保水率 320%(w/w DM)) \*2:製材工場由来のオガクズ(原料;エゾマツ等, 水分 15%, 容積重<sup>77</sup>0.16kg/L, 保水率 529%) \*3:モミガラ(水分 14%, 容積重<sup>77</sup>0.11kg/L, 保水率 181%) \*4:オガクズ a の副資材必要量=12.474×EXP(-4.268×目標容積重 kg/L) \*5:図3の\*1の手順で測定。  
\*6:現物重量あたりの混合量を、各原料をホイールローダーのバケツで扱う場面を想定して求めた容積重<sup>77</sup>により容積換算して求めた。\*7:25L バケツですり切り後に約10cmの高さから5回落とし、沈降分を山盛り追加して再度5回落としてすり切り計量。

7. 成果の活用策

1) 成果の活用面と留意点

- (1) 有害微生物リスクの低減が求められる農場での堆肥生産に活用する。
- (2) 適切な切返し回数は堆積規模により異なるため、急激な品温上昇が認められなくなるまで継続する。
- (3) オガクズを副資材とした堆肥では木質の分解に時間を要するため、通算7ヶ月程度の堆肥化期間を設ける。  
また、乳牛ふんに対して容積比で1.5倍を超えるオガクズを混合すると十分な C/N 比の低下が見込めないため、施用時に窒素飢餓の発生に対する注意が必要となる。

2) 残された問題とその対応 なし

8. 研究成果の発表等 ・湊啓子ら(2017) 損傷菌セミナー2017(日本損傷菌研究会主催) 講演要旨集 p10