

研究論文

## 豚糞尿を原料としたメタン発酵消化液の液肥としての安全性に関する微生物的評価

園田亮一<sup>1)</sup>・赤木 功<sup>2)</sup>・浅野陽樹<sup>2)</sup>・山本昭洋<sup>1)</sup>・佐伯雄一<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 宮崎大学農学部応用生物科学科生物機能科学講座

<sup>2)</sup> 宮崎大学農学部地域農業システム学科

(2009年11月26日 受理)

### Estimation for bacterial safety of methane fermentation liquid from swine excrement slurry.

Ryoichi SONODA<sup>1)</sup>, Isao AKAGI<sup>2)</sup>, Yoki ASANO<sup>2)</sup>, Akihiro YAMAMOTO<sup>1)</sup>, Yuichi SAEKI<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Division of Biotechnology and Biochemistry, Department of Biochemistry and Applied Biosciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

<sup>2)</sup> Department of Regional Agricultural Systems, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

**Summary :** Recently, the domestic animal excrement causes serious water pollution and the problem of bad smell because of the inappropriate managements. The methane fermentation that is one of the methods of processing the animal excrement is expected as technology of a biomass recycling system, and the fermentation liquid is expected as liquid fertilizer. It is important to secure the safety for agricultural products when using it as liquid fertilizer. Therefore, in this study, we performed the evaluation about the microbiological safety of the fermentation liquid. The swine excrement slurry and the fermentation liquid processed by the biogas plant at University of Miyazaki were used as the samples. We researched about coliform bacteria, detection by PCR with specific primer sets for pathogenic bacteria, Biolog indices based on utilization of carbon sources and detection of protozoa by the nested-PCR specific for *Cryptosporidium*. The coliform bacteria was not observed in fermentation liquid but observed in the excrement slurry by the coliform selective medium. In the PCR for food pathogenic bacteria, though *E. coli* was detected in the excrement slurry, pathogenic bacteria were not detected in any samples. Furthermore, the existence of pathogenic bacteria was not detected in the fermentation liquid by Biolog indices. In addition, *Cryptosporidium* was not confirmed in the fermentation liquid. These results indicate that fermentation liquid will be safe in terms of pathogenic bacteria for use as liquid fertilizer.

**Key words :** Anaerobic bacterium, Gram negative bacterium, Gram positive bacterium, Liquid fertilizer, Methane fermentation liquid.

#### 緒言

日本国内の産業廃棄物は年間でおよそ4億tとされており、そのうちのおよそ22.5%が家畜排泄

物であり、農業からの産業廃棄物が大きな割合を占めている(吉田 2004)。近年、日本国内において、農家当たりの家畜飼育規模の拡大が見られ、

それに伴い、固形状の家畜排泄物を積み上げて放置する「野積み」や、液体状の家畜排泄物を掘った穴に溜めておく「素掘り」といった家畜排泄物の不適切な処理を原因とした深刻な水質汚染や悪臭問題といった環境問題が発生している。この「野積み」や「素掘り」といった処理は「家畜排泄物の管理の適正化及び利用の促進に関する法律」によって禁止され、法律で定められた家畜排泄物の処理法を遵守することが義務付けられるようになった。また、家畜排泄物は土壌改良資材や肥料といったバイオマス資源として注目されていることもあり、その処理方法としてメタン発酵処理やコンポスト化などが利用されるようになってきた。特にメタン発酵処理に関して、生ゴミや家畜排泄物を原料としたメタン発酵で得られるバイオガスとしてのエネルギー回収率は90%~100%と非常に高く、発生したバイオガスはガスエンジン発電機に送られ発電を行うための電気エネルギーとして利用されている(木田 2001)。その反面、メタン発酵によって減少する家畜排泄物の重量は、メタンガスとして出ていくごくわずかであり、原料とほぼ同量の残渣がメタン発酵消化液として産出される。この消化液は原料の家畜排泄物と比較した際に悪臭が低減していること(Suzuki *et al.* 2008)や、窒素、リン、カリウムなどの栄養成分を含んでいるといった報告があり(西川他 2007)、従来の肥料に代わって液肥として農業へ利用することが資源循環や環境負荷の改善にも結び付くと考えられる。

消化液を液肥として利用するためには、その安全性を確認する必要がある。家畜排泄物中にはサルモネラ、カンピロバクター、毒素原性大腸菌などといった病原性微生物が確認されており(柿市 2000)、その家畜排泄物を原料としている消化液にそれらの微生物が存在していた場合、液肥としての利用が難しくなる。農水省でリスク管理を行うべき有害微生物として、腸炎ビブリオ、サルモネラ、病原性大腸菌、カンピロバクター、ボツリヌス菌、ウェルシュ菌、リステリア菌、ブドウ球菌、セレウス菌などの微生物が危害要因として挙げられている。そこで、本研究では大腸菌群をはじめとした病原性を有する微生物のメタン発酵消化液における有無を確認するため、大腸菌群選択培地を用いた培養実験、特定遺伝子を増幅す

る特異的プライマーを用いたPCRによる特異的検出、そして、微生物による95種類の炭素源の酸化還元を発色によって検定することが出来るBiologプレート(BIOLOG, CA, USA)を用いた病原菌の存在の確認を行った。また、動物の小腸に寄生し、家畜排泄物中に存在するクリプトスポリジウム、特に*Cryptosporidium parvum*は、人に下痢を引き起こす人畜共通伝染病の腸管寄生原虫であるため、液肥として利用するためには、消化液中の存在を確認する必要がある。そこで、Nested-PCRを用いて試料中のクリプトスポリジウムの検出を行った。

## 材料および方法

### I. 大腸菌群選択培地を用いた大腸菌群の培養

試料には、家畜糞尿スラリー(以下、スラリー)として豚糞尿と、宮崎大学構内のバイオガス・プラントから採取したメタン発酵消化液(以下、消化液)を用いた。大腸菌群選択培地にはデゾキシコレート培地(日水製薬)を用い、蒸留水1Lに培地45.0gを溶解させ、121℃で20分間のオートクレーブ滅菌後、約20mLずつ滅菌シャーレに分注した。段階希釈によって作製したスラリーの100倍希釈溶液と1000倍希釈溶液、消化液の10倍希釈溶液と100倍希釈溶液を、それぞれ100 $\mu$ Lずつ培地に塗布し、37℃で24時間培養を行った。

### II. 食中毒性病原菌検出用プライマーを用いたPCRによる病原微生物の検出

#### 1) DNAの抽出

試料は大腸菌群の培養と同様、スラリーと消化液を用いた。DNA抽出にはISOIL(ニッポンジーン)を用い、改変法で抽出を行った。まず試料を300 $\mu$ Lずつ0.5gのガラスビーズを詰めた1.5mLマイクロチューブに採り、570 $\mu$ LのLysis Solution HEと30 $\mu$ LのLysis Solution 20Sを加え、転倒混和した後、Bead Beater(DISRUPTOR GENIE, Scientific Industries)を用いて、30秒間破砕し、65℃で1時間インキュベートした。冷却遠心機(3500-RA-2724, 久保田商事)にて、12,000 $\times g$ 、室温、1分間遠心し、上清360 $\mu$ Lを回収し、240 $\mu$ LのPurification Solutionを添加して十分に混合した。さらに360 $\mu$ Lのクロロホルムを添加し、15秒間ボルテックスで混和した後、遠

心分離 (12,000 × g, 室温, 15分間) を行った. 水層480 μLを回収し, 480 μLのPrecipitation Solutionを添加して十分に混和した後, 遠心分離 (15,000 × g, 4℃, 15分間) を行った. 上清を捨て, 600 μLのWash Solutionを加えて転倒混和し, 遠心分離 (15,000 × g, 4℃, 10分間) を行った. 上清を捨て, 600 μLの70% (v/v) エタノールと1.2 μLのEthachinmateを添加してボルテックスを行った後, 遠心分離 (15,000 × g, 4℃, 5分間) を行った. 上清を除去した後, 減圧乾燥を20分間行い, ペレットを60 μLのTE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)に溶解させ, DNA抽出液とした.

## 2) 特異的プライマーによるPCR増幅

本実験では, PCR反応に*Ex Taq* DNA polymeraseキット (タカラバイオ) を使用し, プライマーには病原体増幅用プライマーセットであるMORA-Primer (エーエムアール) のFood Pathogens (Table 1) とDiarrheal Pathogens (Table 2) を用いた. PCR反応液組成は10 × *Ex Taq* buffer 2.0 μL, dNTP mix(2.5 mM) 2.0 μL, *Ex Taq* DNA polymerase(5 U/μL) 0.1 μL, プライマー 5 μLをPCRチューブに加え, 鋳型DNA量が25 ng/チューブとなるように添加し, PCR反応液とした. PCR増幅はPCR thermalcycler (PTC-200 MJ Research) を用いて, 95℃で3分間の変性後, 95℃で30秒間, 55℃で30秒間, 72℃で30秒間の反応を35サイクル行った後, 72℃で7分間のインキュベーションを行った. PCRを行った後, TBE buffer (47.5 mM Tris-borate, 1 mM EDTA) とNuSieve 3:1 アガロース (Cambrex Bio Science Rockland, ME, USA) で調製した3% (w/v) アガロースゲルで電気泳動を行った. 電気泳動後, ゲルをエチジウム・プロマイド溶液 (ニッポンジーン) で染色を行った後, トランスイルミネーター (UVP High Performance UV Transilluminator, UVP) 上でPCR産物のバンドを検出した.

## III. Biologプレートを用いた培養による病原微生物の検出

本実験ではグラム陰性菌, グラム陽性菌, そして嫌気性菌用のBiologプレートを用いて, 病原微生物の存在の確認を行った. グラム陰性菌とグ

ラム陽性菌の検出はスラリーと消化液で行った. まず, 採取してきた試料を滅菌蒸留水で希釈し, 100倍希釈溶液を作製した. この100倍希釈溶液をBiologプレートにウェルあたり100 μLずつ接種し, 37℃で培養を行い, 24時間後, 48時間後, 72時間後, 96時間後の発色の様子を観察した.

嫌気性菌の検出は消化液に関して行った. 採取してきた試料を脱気した滅菌蒸留水で希釈し, 50倍希釈溶液を作製した. 嫌気性菌用のBiologプレートのプロトコールに従い, 20分間空気に晒した後, 50倍希釈溶液をウェルあたり100 μLずつ接種し, その10分後に角型ジャー (三菱ガス化学) にBiologプレートとアネロパック・ケンキ (三菱ガス化学) と嫌気指示薬 (三菱ガス化学) を入れ, 37℃で4日間, 発色の変化が見られなくなるまで培養を行った.

それぞれ3連で培養の後, それぞれのBiologプレートで発色したウェルと, Biologデータベースの病原微生物の発色パターンとを比較し, 発色割合を算出し, 病原微生物が試料中に存在する可能性を検討した.

## IV. Nested-PCRによるクリプトスポリジウムの検出

試料のDNAを2と同じ手法で抽出し, Nested-PCRにより得られたDNA抽出液中のクリプトスポリジウムの存在の有無を評価した. Primary-PCRおよびSecondary-PCRのプライマー配列はXiao *et al.* (1999) および, Irshad *et al.* (1999) の報告を参考に設計した2組のプライマーセット (Primary-PCR: 5'-TAATTCTAGAGCTAATACATGCG-3' と 5'-CATTCCTTCGAAACAGGA-3', Secondary-PCR: 5'-GGAAGGGTTGTTTATTAGATAAAG-3' と 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3') をそれぞれ用いた. PCR組成は, 10 × *Ex Taq* buffer 2.5 μL, dNTP mix (2.5 mM) 2.0 μL, 各10 μMプライマー0.5 μL, *Ex Taq* DNA polymerase (5 U/μL) 0.1 μL, 滅菌蒸留水19.0 μLと, 試料のDNA抽出液0.5 μLをPCRチューブに加え, 反応液とした. PCR増幅はPCR thermalcycler (PTC-200 MJ Research) を用いて, 94℃で3分間の変性後, 94℃で45秒間, 52℃で45秒間, 72℃で1分間の反応を35サイクル行った後, 72℃で7分間インキュベーター

を行った。得られたPCR産物をSecondary-PCRの鋳型DNAに使用した。Secondary-PCRにおけるPCR反応液組成、反応条件はPrimary-PCRと同様の手法で行った。PCR終了後、TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM 酢酸, 1 mM EDTA) で調製した1% (w/v) アガロースゲルで電気泳動を行った。電気泳動後、の2)と同じ方法で、染色を行い、PCR産物のバンドを検出した。

## 結果および考察

### I. 大腸菌群選択培地を用いた大腸菌群の培養

24時間培養後の培地の様子を観察したところ、スラリー区では大腸菌群のコロニーが出現していたのに対し、消化液区では大腸菌群のコロニーは出現しなかった (Fig. 1)。スラリーの大腸菌群濃

度を算出した結果、平均値  $\pm$  S.D. で  $(2.58 \pm 0.24) \times 10^5$  cells/mL となり、 $10^5$  cells/mL 以上の大腸菌群の存在が確認された。一方、消化液では10倍希釈溶液の培養においても大腸菌群のコロニーは出現しなかった。このことからメタン発酵の過程においてほとんどの大腸菌群が死滅するものと考えられる。

### II. 食中毒性病原菌検出用プライマーを用いたPCRによる病原微生物の検出

本実験では、*Clostridium perfringens* や *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli* のような食中毒性の菌を検出するためのプライマー (Table 1) と侵入性大腸菌や腸管毒素原性大腸菌のような下痢性の病原菌を検出するためのプライ



**Fig. 1.** The culture that used coliform bacteria selection nutrient medium. The Figure shows the nutrient medium after 24 hours. The left side shows culture of the swine excrement slurry, and the right side shows culture of the fermentation liquid.

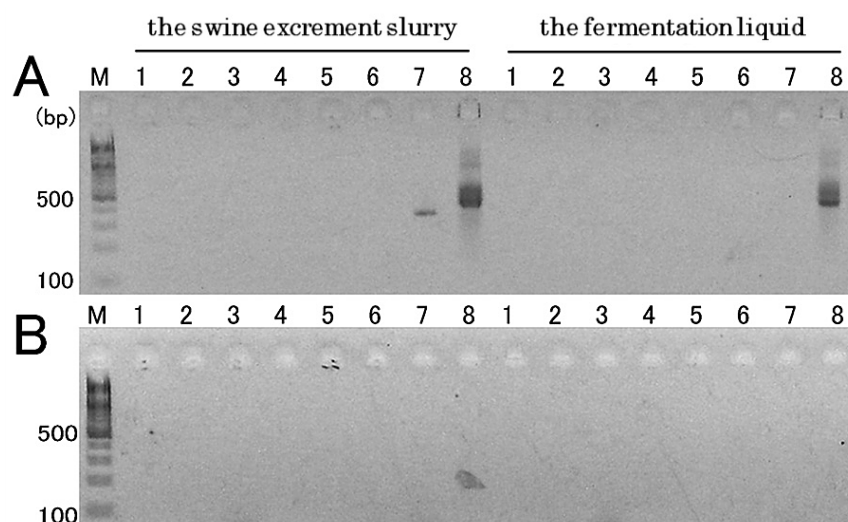
**Table 1.** List of food pathogens and the amplification sizes of the primers sets

| No. | 病原菌名                                     | 和名               | 増幅サイズ  |
|-----|--|------------------|--------|
| 1   | <i>Staphylococcus</i> spp.               | ブドウ球菌群           | 414 bp |
|     | <i>Clostridium perfringens</i>           | ウェルシュ菌           | 257 bp |
| 2   | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> group     | 腸炎ビブリオ菌 (溶血毒)    | 368 bp |
|     | <i>Clostridium perfringens</i>           | ウェルシュ菌           | 230 bp |
| 3   | <i>Campylobacter jejuni</i>              | キャンピロバクター        | 107 bp |
| 4   | <i>Vibrio cholerae</i>                   | コレラ菌 (下痢毒素)      | 494 bp |
|     | <i>Clostridium botulinum</i> AB(F) group | ボツリヌス菌群 AB(F)型   | 390 bp |
| 5   | <i>Listeria monocytogenes</i> group      | リステリア菌           | 411 bp |
|     | <i>Bacillus cereus</i> group             | セレウス菌群 (非溶血性腸管毒) | 152 bp |
| 6   | <i>Salmonella</i> spp.                   | サルモネラ菌 (侵入因子)    | 422 bp |
|     | <i>Bacillus cereus</i> group             | セレウス菌群           | 143 bp |
| 7   | <i>E. coli/Shigella</i> group            | 大腸菌/赤痢菌          | 413 bp |
| 8   | Bacterial universal                      | 細菌一般             | 510 bp |
|     | Fungal universal                         | カビ一般             | 380 bp |



**Table 2.** List of diarrheal pathogens and the amplification sizes of the primer sets

| No. | 病原菌名                                 | 和名               | 増幅サイズ  |
|-----|--------------------------------------|------------------|--------|
| 1   | Invasive <i>E. coli/Shigella</i>     | 赤痢菌/侵入性大腸菌群      | 127 bp |
| 2   | Enterotoxigenic <i>E. coli</i>       | 腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) | 297 bp |
|     | Enterohemorrhagic <i>E. coli</i>     | 腸管出血性大腸菌群 (EHEC) | 376 bp |
| 3   | Invasive <i>E. coli/Shigella</i>     | 赤痢菌/侵入性大腸菌群      | 137 bp |
|     | Enterohemorrhagic <i>E. coli</i>     | 腸管出血性大腸菌群 (EHEC) | 272 bp |
| 4   | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> group | 腸炎ビブリオ           | 368 bp |
|     | Enterotoxigenic <i>E. coli</i>       | 腸管毒素性大腸菌 (ETEC)  | 171 bp |
| 5   | <i>Vibrio cholerae</i>               | コレラ菌 (下痢毒素)      | 494 bp |
| 6   | <i>Yersinia</i> group                | エルシニア属菌群         | 316 bp |
|     | <i>Campylobacter jejuni</i>          | キャンピロバクター        | 107 bp |
| 7   | Invasive <i>E. coli/Shigella</i>     | 赤痢菌/侵入性大腸菌群      | 117 bp |
| 8   | <i>Salmonella</i> spp.               | サルモネラ菌 (侵入因子)    | 422 bp |
|     | Enterotoxigenic <i>E. coli</i>       | 腸管凝集性大腸菌         | 173 bp |

**Fig. 2.** The result of PCR amplification for detection of food pathogens and diarrheal pathogens.

- A : Detection of food pathogens, M : Size marker (100 bp ladder), 1 : *Staphylococcus* spp./*Clostridium perfringens*, 2 : *Vibrio parahaemolyticus* group/*Clostridium perfringens*, 3 : *Campylobacter jejuni*, 4 : *Vibrio cholerae*/*Clostridium botulinum* AB(F) group, 5 : *Listeria monocytogenes* group/*Bacillus cereus* group, 6 : *Salmonella* spp./*Bacillus cereus* group, 7 : *E. coli/Shigella* group, 8 : Bacterial universal/Fungal universal.
- B : Detection of diarrheal pathogens, M : Size marker (100 bp ladder), 1 : Invasive *E. coli/Shigella*, 2 : Enterotoxigenic *E. coli*/Enterohemorrhagic *E. coli*, 3 : Invasive *E. coli/Shigella*/Enterohemorrhagic *E. coli*, 4 : *Vibrio parahaemolyticus* group/Enterotoxigenic *E. coli*, 5 : *Vibrio cholerae*, 6 : *Yersinia* group/*Campylobacter jejuni*, 7 : Invasive *E. coli/Shigella*, 8 : *Salmonella* spp./Enterotoxigenic *E. coli*

マー (Table 2) を用いた。まず、食中毒性病原菌検出用プライマーを用いた場合、スラリーでは一般細菌と大腸菌群において増幅サイズと一致するPCR産物が確認された。一方、消化液では一般細菌以外のPCR産物のバンドは検出されなかった (Fig. 2A)。スラリーからは大腸菌が検出されたが、消化液からは検出されなかったことからメ

タン発酵の過程において大腸菌群のほとんどは死滅してしまうものと考えられる。しかし、一般細菌に関してはスラリーと消化液の両方から検出されたことから、発酵過程においてすべての菌が死滅するのではないものと考えられる。PCRによる検出では、さらに大腸菌の中でも侵入性大腸菌群や腸管出血性大腸菌群など、下痢性の大腸菌を

検出するプライマーを用いたところ、スラリー、消化液のいずれのサンプルからも病原微生物は検出されなかった (Fig. 2B). これらの結果は、宮崎大学のメタン発酵消化液には食中毒性および下痢性病原菌の存在する可能性は低いことを示唆するものである.

### III. Biologプレートを用いた培養による病原微生物の検出

グラム陰性菌のプレートにおけるスラリーと消化液の発色パターンを比較してみると、スラリーでは全炭素源のうち $88.6 \pm 2.9\%$ の炭素源において、発色を示したのに対し、消化液ではその発色パターンが大きく変化し、発色の見られた炭素源は全炭素源の $39.1 \pm 2.2\%$ と減少していた (Fig. 3). また、グラム陽性菌のプレートにおける発色パターンに関しても、グラム陰性菌の場合と同様にスラリーでは $59.4 \pm 3.0\%$ の炭素源が発色を示したのに対し、消化液では発色の見られた炭素源は $6.2 \pm 3.0\%$ と減少していた (Fig. 4). これはグラム陰性菌、グラム陽性菌に関して、メタン発酵過程で単純な菌相へと変化しているためと考えられる. 次に消化液に関して、グラム陰性菌、グラム陽性菌、そして嫌気性菌のBiologプレートの発色パターンをデー

タベース上にある病原微生物の発色パターンと比較してみた. 比較した病原微生物はグラム陰性菌では *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella bongori*, *E. coli*, グラム陽性菌では, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, そして嫌気性菌では *Campylobacter*, *C. botulinum*, *C. perfringens*と、それぞれリスク管理を行う必要のある病原微生物に関して調査した. これまでの実験結果よりスラリーでは大腸菌群が存在していると考えられるので、データベースと一致した発色の割合を平均値 $\pm$ S.D.で示した結果、スラリーの発色パターンと大腸菌の発色パターンとで一致した $89.8 \pm 2.4\%$  (Fig. 3) を同定の基準値と定め、Biologプレートにおける同定には、この値以上の発色的一致が必要と考えた. グラム陰性菌のBiologプレートにおいて、スラリーでは*S. bongori*, *V. parahaemolyticus*に一致した発色は共に90%以上と高い割合を示した (Fig. 3). 一方、消化液では、*E. coli*が $39.0 \pm 0.0\%$ , *S. bongori*が $41.5 \pm 1.6\%$ , *V. parahaemolyticus*が $50.0 \pm 0.0\%$ といずれも基準値より低い値であった (Fig. 3). グラム陽性菌のBiologプレートではスラリーと病原微生物で一致した発色の割合はそれぞれ、*L. monocytogenes*が $53.5 \pm 9.9\%$ , *S. aureus*が $65.5$

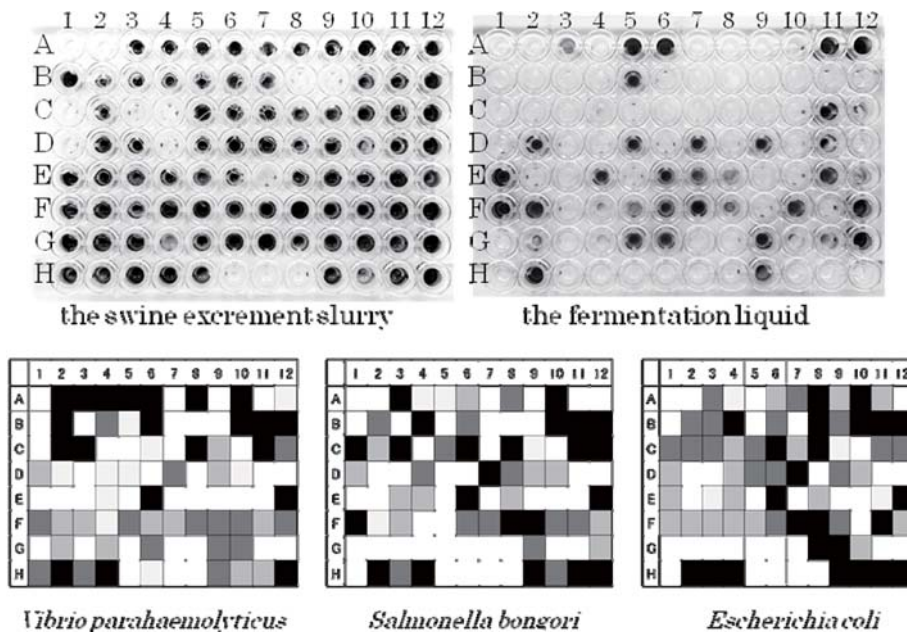


Fig. 3. The utilization patterns of Biolog plate for the Gram-negative bacterium in the slurry and the fermentation liquid.

The left side of the upper section shows the utilization pattern of the excrement slurry, and the right side of upper section shows the utilization pattern of the fermentation liquid. The lower section quoted utilization patterns of *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella bongori* and *Escherichia coli* from the Biolog database.

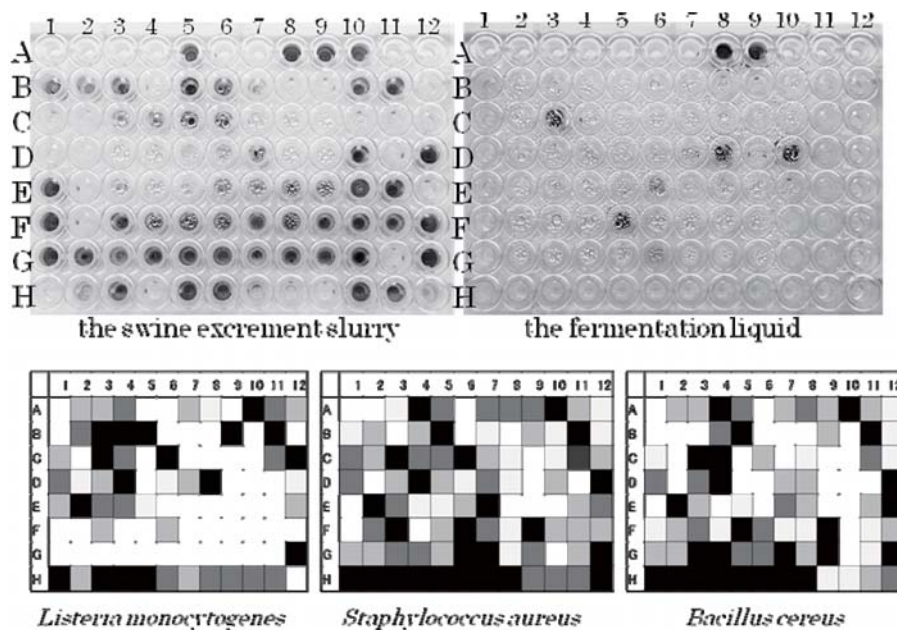


Fig. 4. The utilization patterns of Biolog plate for the Gram-positive bacterium in the slurry and the fermentation liquid.

The left side of the upper section shows the utilization pattern of the excrement slurry, and the right side of upper section shows the utilization pattern of the fermentation liquid. The lower section quoted utilization pattern of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* from the Biolog database.

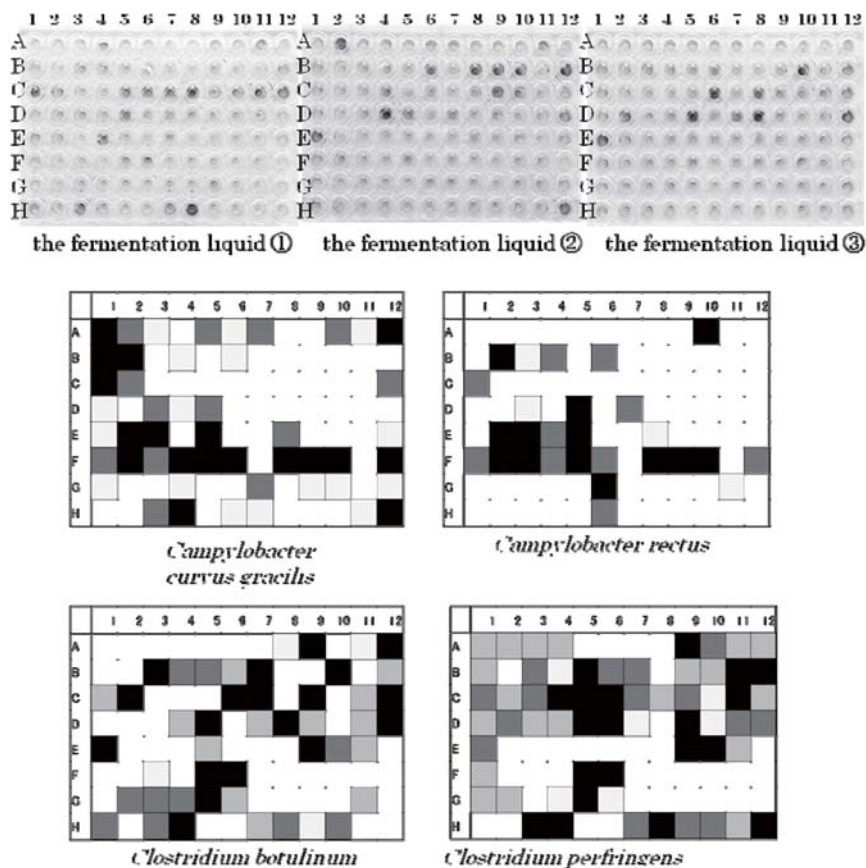


Fig. 5. The utilization pattern of Biolog plate for the Anaerobic bacterium in the fermentation liquid. The upper section shows the utilization patterns of the fermentation liquid. The middle section quoted the utilization pattern of *Campylobacter*, and the lower section quoted utilization pattern of *Clostridium botulinum* and *Clostridium perfringens* from the Biolog database.



± 3.4%, *B. cereus*が67.3 ± 5.2%であり, 消化液と病原微生物の比較では, *L. monocytogenes*が5.9 ± 1.6%, *S. aureus*が8.5 ± 3.3%, *B. cereus*が8.2 ± 1.3%と, いずれも基準値を大きく下回った (Fig. 4). また, 嫌気性菌の発色パターンと消化液の発色パターンを比較した結果, それぞれ*Campylobacter curvus*で12.9 ± 8.5%, *Campylobacter rectus*で14.5 ± 6.6%, *C. botulinum*で21.4 ± 2.4%, *C. perfringens*で22.5 ± 5.3%となった (Fig. 5).

以上のことから, スラリーにおける複雑な菌相が発酵過程に単純化し, メタン生成菌などのメタン発酵に関係する菌が増加したと考えられる. また, Biologプレートを用いた手法では, 消化液ではグラム陰性, グラム陽性, 嫌気性菌に属する各種病原微生物の存在は認められなかった. スラリーではグラム陽性菌に属する病原微生物に関しては基準値を下回っており, 存在は認められなかったが, グラム陰性菌に関して, Biologプレートによる実験では3種類とも発色の一致した割合が基準値である88%を超えていた. しかしながら, PCRで検出されたのは*E. coli*だけであった. これは, スラリー中には多種多様な微生物が存在しており, Biologプレートでの実験ではスラリーの希釈液をそのまま接種したため, 多種多様な微生物が炭素源の発色に関与したと考えられる. 従って, Biologプレートの実験とPCRによる実験の両方で検出された*E. coli*は存在していると考えられるが, PCRによる実験で検出されなかった*V. parahaemolyticus*と*S. bongori*の2種類に関して, スラリー中に存在している可能性は低いと考えられる.

#### IV. Nested-PCRによるクリプトスポリジウムの検出

クリプトスポリジウムは, 動物の小腸に寄生し, 家畜排泄物中に存在しており, 下痢を引き起こす腸管寄生原虫であることが知られている. 従って, 消化液中にクリプトスポリジウムが存在している場合は, 液肥としての利用が困難になる. そこで, Nested-PCRを用いて試料中に存在する*Cryptosporidium*属原虫の確認を行なった. Nested-PCRの結果, *Cryptosporidium*属原虫がスラリーから検出された (Fig. 6). 今回用いた

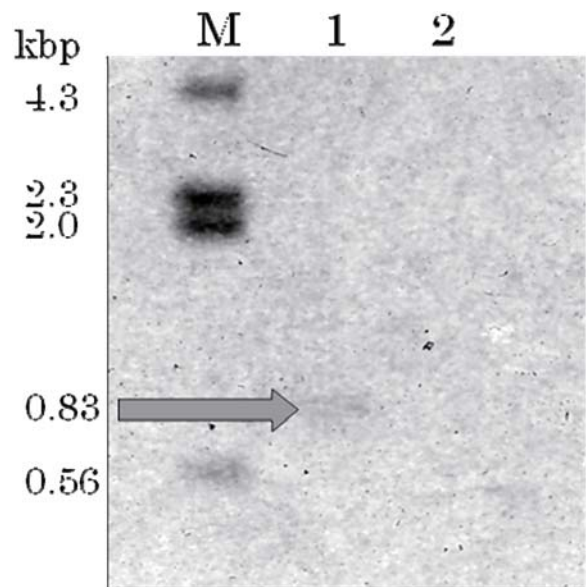


Fig. 6. The result of nested-PCR amplification for detection of *Cryptosporidium*. Lane M shows  $\lambda$ Hind III marker. Lane number 1 shows the excrement slurry, and lane number 2 shows the fermentation liquid, respectively.

プライマーにおけるPCR産物の推定増幅サイズは825 bpであり (Xiao *et al.* 1999), 電気泳動によって検出されたPCR産物のサイズもおおよそ825 bpであることからスラリーにおいては*Cryptosporidium*属原虫が存在していると考えられる. 消化液のレーンでは, *Cryptosporidium*属原虫と思われるPCR産物は検出されなかった.

#### V. まとめ

大腸菌群の選択培地を用いた実験, 特異的プライマーを用いたPCR法による食中毒病原菌の検出, Biologプレートを利用した病原微生物の検出を通じて, グラム陰性菌である*V. parahaemolyticus*, *S. bongori*, *E. coli*, グラム陽性菌である, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, 嫌気性菌である*Campylobacter*, *C. botulinum*, *C. perfringens*といった病原微生物についてメタン発酵消化液の微生物的安全性の評価を行った. その結果, 消化液においては, いずれの実験においても病原微生物は検出されなかった. さらにNested-PCRによるクリプトスポリジウムの検出の結果, スラリーにおいては*Cryptosporidium*属原虫と思われるPCR産物が検出されたのに対し, 消化液では確認されなかった. Côté *et al.*



(2006)の報告によると、多くのスラリーで検出された大腸菌は消化液では99-100%の減少が認められ、さらにサルモネラやクリプトスポリジウムは全く検出されず、本研究の結果と一致する。以上のことから、スラリーと比較して消化液では大腸菌を始め、食中毒性細菌が検出限界以下であり、食中毒性細菌が生残している可能性は低いと考えられる。今回の研究において、消化液中に含まれる病原微生物は検出されなかったことから液肥として利用する際の安全性に問題は無いと考えられる。しかし、消化液にどのような微生物が存在しているのかは未解明であるため、今後は消化液中における微生物相のさらなる解析や、実際に消化液を土壌に施用した際に、土壌の微生物相に与える影響を調査していく必要がある。

## 要約

近年、家畜排泄物は、その不適切な処理のため深刻な水質汚染や悪臭問題の原因となっている。家畜糞尿の処理方法の一つであるメタン発酵は資源循環型の技術として注目されており、その際に産出される消化液は液肥としての利用が期待されている。液肥として利用する際に重要なこととして農作物への安全性を確保する必要がある。そこで、本研究では液肥利用の基礎データとして、消化液中の微生物的安全性に関する評価を行った。試料には、原料である家畜糞尿スラリーと、宮崎大学構内に設置されてあるバイオガス・プラントから採取したメタン発酵消化液を用いた。実験内容として、大腸菌群選択培地を用いた大腸菌群の検出、食中毒性病原菌検出用プライマーを用いたPCRによる病原微生物の検出、Biologプレートの発色を利用した病原微生物の検定、そしてNested-PCRを用いたクリプトスポリジウムの検出を行った。大腸菌群選択培地ではスラリーでコロニーが観察されたのに対し、消化液では観察されなかった。病原菌検出用プライマーを用いたPCRでも、スラリーにおいて大腸菌が検出されたが、それ以外の病原微生物は検出限界以下であった。消化液では、すべての病原微生物が検出限界以下という結果になった。また、Biologプレートを用いた検定においても、消化液に病原微生物は検出されず、クリプトスポリジウムに関して

消化液では検出されなかったことから病原微生物に関して、液肥としての安全性に問題は無いことが示唆された。

キーワード：メタン発酵消化液、液肥、グラム陰性菌、グラム陽性菌、嫌気性菌

## 謝辞

本研究は、「文部科学省特別研究経費・連携融合事業・農林畜産物利用による地域資源システムの構築」による運営交付金を用いて実施された。研究の実施にあたり、「農林畜産物利用による地域資源システムの構築」に関係する宮崎大学の教職員の方々に深く感謝申し上げます。

## 引用文献

- Côté C., D. I. Massé, S. Quessy (2006) Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries. *Biore. Technol.*, **97**, 686-691.
- 柿市徳英 (2000) 環境衛生(第3章)家畜衛生学。文永堂出版。東京。pp. 128-129.
- 木田建次 (2001) 生産的変換技術(第2章)。バイオマスエネルギー利用の最新技術。シーエムシー出版。東京。pp. 88-110.
- 西川知宏・井上博茂・梅田幹雄・山本祐二・稲村達也 (2007) メタン発酵消化液の連用水田における水稻の生育及び窒素吸収動態。日本作物学会記事別号 223, pp. 40.
- Sulaiman I. M., L. Xiao, A. A. Lal (1999) Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4431-4435.
- Suzuki Y., A. Kubota, T. Furukawa, Y. Asano, H. Takahashi, T. Sekito, Y. Dote, Y. Sugimoto (2009) Residual of  $17\beta$ -estradiol in digestion liquid generated from a biogas plant using livestock waste. *J. Hazard. Mater.* **165**, 677-682.
- Xiao L., L. Escalante, C. Yang, I. M. Sulaiman, A. A. Escalante, R. J. Montari, R. Fayer, A. A. Lal (1999) Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1578-1583.
- 吉田弘之 (2004) 亜臨界水処理による未利用有機物の高速高度資源化と農林水産・畜産分野への応用の可能性。畜産の情報(国内編) 9, 21-26.