

乳牛排泄物の処理過程における
微生物遷移に関する生態学的研究

岡本英竜

乳牛排泄物の処理過程における
微生物遷移に関する生態学的研究

岡本英竜

獣医衛生学

指導教員 教授 永幡 肇

2017 年度

目 次

緒言	1
第Ⅰ章 乳牛糞の好氣的処理過程(堆肥化)における微生物群衆構造の解析	5
1. 序文	6
2. 材料および方法	7
3. 結果	11
4. 考察	24
5. 小括	26
第Ⅱ章 乳牛糞の嫌氣的処理過程(メタン発酵)における微生物群衆構造の解析	27
1. 序文	28
2. 材料および方法	29
3. 結果	33
4. 考察	44
5. 小括	46
第Ⅲ章 乳牛糞の嫌気および好氣的分解産物の敷料利用への衛生学的評価	48
1. 序文	49
2. 材料および方法	50
3. 結果	53
4. 考察	63
5. 小括	65
総括	67
謝辞	70
引用文献	71

緒 言

持続可能な産業社会において、エネルギーを含めて、効果的かつ経済的な生物資源の再利活用は、効率的で損失が小さい物質循環の上からも求められている活動である。バイオマス・ニッポン総合戦略が 2002 年に閣議決定され、地球温暖化防止、循環型社会の形成や農山漁村活性化などの観点からバイオマスの利活用推進に関する具体的取り組みや行動計画が策定され展開されてきている。バイオマス・ニッポン総合戦略では、バイオマスを「再生可能な、生物由来の有機性資源で化石資源を除いたもの」と定義され、代表的なバイオマスとして、家畜排泄物、下水汚泥、食品廃棄物や農作物非食用部等が含まれており、それらの総量は 2010 年度で 24,750 万トンと見積もられているが、わが国で 1 年間に発生する家畜排泄物の産出量は約 8,800 万トンと推計され、バイオマス資源の内訳として約 36%と最も大きく、その有効な生物資源としての処理並びに利活用が求められている。家畜排泄物の畜種別では乳用牛（28%）と肉用牛（29%）を合わせると全体の約 6 割にもなり、牛排泄物が大半を占めている [35]。家畜の排泄物に及ぼす飼養環境の構造において、その飼養頭数は漸減傾向が続いているが、飼養農家一戸当たりの飼養頭羽数は、漸次増加傾向が持続しており、大規模化が進行している。これに伴って、特定の地域での家畜排泄物の集積化ならびに局在化の進行が顕在傾向にあるものと推察される [21]。

資源循環の必要性から、堆肥化によって家畜排泄物を利用することの貢献度は高いと考えられるが、有機質肥料の利用は必ずしも計画どおりには促進されていない。その要因として、その肥料成分が不確定なことや雑草種子の混在、有害微生物の汚染などが考えられるが、それらは利用者が容易に判断出来ない内容である。一方、作物生産における有機質肥料の利用について、消費者からは有機質肥料を使用したものが好まれる傾向にあるが、堆肥は家畜排泄物由来として、人に対する食中毒細菌である *Campylobacter jejuni/ coli*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens* や *Escherichia coli* (*E. coli*) 等は、家畜消化管に由来していることが知られ有害微生物の存在も懸念されている [14, 20, 22, 39]。また、牛などの反芻家畜は病原性大腸菌（O157 や O26 等）の保菌動物であることが知られており、肉牛の約 8.9%で O157 の汚染が報告されている [43]。アメ

リカ合衆国環境保護局が1994年に策定した40 CFR Part 503 Rule [49]は、バイオマスの堆肥化、特に下水汚泥を対象とした堆肥の基準として、有機質肥料の安全性の評価の上から指標とされている。Class Aの基準をクリアするためには、*E. coli*として、1,000 MPN (Most Probable Number: 最確数) / g (乾物重) 以下の堆肥である必要があり、*Salmonella*としては、3 MPN / 4 g (乾物重) 以下とされている。イギリスでは、2005年の堆肥化産物の英国標準 (British Standards Institution's Publicly Available Specification for Composted Materials [BSI PAS 100])では、堆肥の安全性を満たす基準として、*E. coli*は、1,000 CFU / g (新鮮物) 以下、*Salmonella*は、未検出 / 25g (新鮮物) と定義されている [42]。他に、堆肥の評価に特定の微生物の菌数を指定している国には、イタリア、オーストリアやカナダなどがある [17]。しかし、我が国では、堆肥の品質基準における病原微生物に関する規制は現在のところ存在しない。家畜排泄物を原料とした堆肥等の有機質肥料を取り扱う場合、それらを施用する人および収穫された作物を利用する人に対して安全性の上から、リスクの回避が求められており、衛生的なものであることが家畜糞尿処理の目的の一つともなっている。

我が国では好氣的処理である堆肥化が主な処理法であり、堆肥として土壌還元が行われてきた。堆肥化のような好氣的処理では、有機物分解に伴う微生物のエネルギー生産から熱エネルギーが発生することで発熱が著しく、高温となることが順当な堆肥化の指標ともされている。また、嫌氣的処理として、特殊な発酵槽を利用したメタン発酵法がある。これは閉鎖系で加温されて発生するバイオガスを副次的に利用することが可能となり、処理された消化液は液状であり臭気強度が低下したものとなる。これらは主に液肥として土壌還元されている。大部分が水分であることから、遠隔地への移送にはメリットが期待できないため、家畜排泄物の有機質肥料の地域拡散としては大きくは期待されていない。これらの家畜排泄物処理は、好氣的あるいは嫌氣的であるとしても、残存する有機物を低分子化して無機化することでは共通している。好氣的処理では好氣性微生物群、嫌氣的処理では嫌氣性微生物群が糞尿処理の主役であり、堆肥化では易分解性有機物を細菌が代謝し、難分解性有機物を菌類が代謝を担う。メタン発酵では難分解性有機物も主として細菌が代謝し、有機物を無機化

する最終段階を Archaea に属するメタン生成菌群が担う。家畜排泄物処理が細菌のみならず他の微生物群が混在して進行することから、家畜糞尿処理は多種多様な微生物群によって成し遂げられるといわれる理由である [17]。

微生物生態学の分野では、難培養で未だ命名されていない微生物が 99% 以上存在すると考えられている [2]。環境中に存在する多様な微生物に対する培養技術がまだ追いついていないのが現状である。しかし、遺伝情報を持つ微生物に対し、分子生物学的手法が応用され、培養に頼らない分子生態によって、培養できない微生物の生態を把握できるようになってきた [1, 34, 38]。家畜糞尿処理の安定のために、有効な解析手法を活用して家畜排泄物処理に係る微生物群集を把握することが課題となっている。

本研究では、乳牛排泄物処理過程において、重要な役割を担っている微生物の生態について、好氣的処理である堆肥化過程では、水分含量が微生物群集構造に与える影響を明らかにする。また、嫌氣的処理であるバイオガスプラントの稼働における乳牛糞尿のメタン発酵においては、発酵温度変更に伴う嫌気消化の再安定化について、メタン発酵性状と微生物群集構造の遷移を明らかにすることを目的とした。さらに乳牛排泄物の嫌氣的処理と好氣的処理を組み合わせ乳牛糞の固形分の再生利用としての敷料利用の有効な事例から乳牛の乳房への安全性を検証する目的で、処理過程における細菌群集構造および乳牛の乳生産衛生上の上から、乳房炎の原因菌として関与する細菌群生態を明らかにし、敷料の安全性の評価を実施した。家畜排泄物処理において、好氣的および嫌氣的処理を組み合わせ、より効率的に堆肥あるいは敷料としての利活用を含めて有効かつ経済的な処理に資する解析とその有用な情報は生産農場の持続的再生産に資するものであり、本質的に重要な学術貢献と考えられる。

本研究は乳牛糞の好氣的、嫌氣的分解における微生物生態と酪農場への応用について、第 I 章では、乳牛糞の堆肥化において、適正水分と高水分材料の堆肥化について、堆肥の性状変化と細菌および菌類を主とした分子生態学的な微生物遷移を解析することを目的に実施した。第 II 章では、乳牛糞尿の嫌氣的処理におけるメタン発酵において、安定的な中温発酵と高温発酵での発酵温度変更による温度インパクトからの回復性について、嫌気消化におけるメタン発酵消化液の性状変化と細菌およびメタン生成菌を中心とした微生物群集構造の変

化を明らかにすることを目的に実施した。第Ⅲ章では、乳牛糞尿のメタン発酵後の消化液から固形分を分取して、乳牛にとって快適かつ衛生的な敷料化と敷料の調製過程における乳牛の乳房の健康に影響を及ぼす細菌群集構造の遷移と乳房炎原因微生物の動態を明らかにすることを目的に実施した。

第 I 章

乳牛糞の好氣的処理過程(堆肥化)における微生物群集構造の解析

1. 序文

家畜排泄物処理は各国で課題となっており、我が国においても1年間に発生する家畜排泄物は推計で8,800万トンと見積もられている[35]。我が国の畜産において環境保全型農業を実現するため、酪農場内の牧草地や耕作地への効果的な堆肥還元とともに、耕種農家への有効利用のためにも、良質で効果的な堆肥を調製し利活用に資する必要がある。

堆肥化は家畜糞などの有機性廃棄物を微生物の好氣的分解過程により低分子化することであり、経験的に実施されてきた方法である。有機物中の悪臭性有機物も分解されることから悪臭強度が低減され、発熱による水分蒸散によって乾燥が進むことから、取り扱い易い物性となり運搬性も容易になる。適切な堆肥化処理では、微生物による有機物代謝に起因する発熱によって高温になることで、雑草種子や主要な病原性微生物を不活化させる効果が期待されている。元肥などの施肥のみならず、耕種農家への提供によって、拡散・流通も期待され生産農場への未熟堆肥の負荷からの解放にも貢献しうると考えられ、その意義は大きい。

一方、堆肥の負の側面の一つとして、家畜排泄物由来の人獣共通感染症の報告[3, 23, 43]も多数あることから、処理が不十分な家畜排泄物を圃場に施用・散布することは人の健康へのリスクとしての懸念も存在しうる。耕種農家への提供においては、雑草の種子および植物病原菌の不活化も求められる。病原性ならびに病害微生物の不活化に至る死滅温度まで堆肥の温度を上昇させるには、原料となる堆肥の水分調整が重要な要因である。

堆肥化原料の水分含量は、堆肥化に影響を与える最も重要な制限因子の一つである。乳牛糞の水分含量はおよそ86%と見積もられており、適切な堆肥化処理を促すためには72%以下にする必要があると考えられている[18]。堆肥化の前提として、排泄物中の水分調整における材料には、稲ワラ、麦稈、オガクズやモミガラが我が国では一般的に利用されている。酪農現場において、堆肥化が良好に進行しない原因の一つに、水分調整材として利用される副資材の安定的な確保において、特に酪農専業地帯ではその取引の困難性もあり、価格も高騰する傾向にある。

高水分の堆肥化原料で堆肥化を進めても温度上昇は期待できない[17]。高水分環境下では、堆積物の通気性が悪くなり、好気性微生物の活動が停滞する[48]。一般的に好気性微生物と水分含量との関係において、水分含量 80%以上では堆肥化の進行が抑制される[18]。このように堆肥化の水分調節材や通気性に関する報告は多くあるが、微生物生態を含む解析は乏しく明らかにされていない。

本研究は、乳牛糞の好氣的処理過程（堆肥化）における微生物群集構造を明らかにすることを目的に、適切な水分含量および副資材を活用し調整した材料での堆肥化過程において、堆肥性状の相違および微生物による有機物利用を指標としてモニターするとともに、その堆肥化過程における主要な細菌および菌類の群集構造の変遷を検討した。

2. 材料および方法

(1) 堆肥原料

堆肥原料は酪農学園大学附属農場の乳牛の新鮮糞（糞尿溝および床に落下していない）と乾牧草(チモシー主体の混播)を混合し、水分含量を調整したものを堆肥化資材とした。試験 1 および試験 2 での標準区（適正水分含量）の水分含量は 65%であり、試験 2 での高水分区（水分含量過多）の水分含量は 80%に調整した。

(2) 小型堆肥化実験装置

堆肥化は、小型堆肥化実験装置かぐやひめ（農畜試式，富士平工業株式会社，東京）に堆肥化原料（約 12L）を投入し、実験を実施した。装置下部からの通気量は 0.5 L/min とした。1 週間に 1 度切り返しを行うと同時に、分析試料の採取を行った。

(3) 分析

1) 温度

小型堆肥化実験装置付属の温度計(「Thermo Recorder-おんどとり-TR-71S」, 株式会社ティアンドデイ, 松本)を用いて温度測定した。

2) pH

採取したコンポスト試料 5 g に 50 mL の 2 M KCl を加え、振盪抽出後、ガーゼでろ過し、ろ過液の pH を pH メーター (F-13, 堀場製作所, 京都) で測定した。

3) BOD₅ (Biochemical Oxygen Demand: 生物化学的酸素要求量)

BOD₅ の測定は、自動測定器 BOD Track (HACH company, USA) を使用した。

(3) 細菌群集構造

①試料からの DNA 抽出

分析試料を滅菌超純水に懸濁し、振盪器 (MMS-3000, 東京理化器械株式会社, 東京) にて 10 分間振盪した後、滅菌晒でろ過した。回収したろ液をマイクロチューブに採り、菌体洗浄のために 10 mM Phosphate buffer (pH7.2) で、懸濁と遠心分離 (12,000 rpm, 5 分間; 室温) を上清が透明になるまで繰り返した。洗浄菌体に Extraction buffer (10 mM Tris / HCl, pH7.5, 50 mM EDTA, 0.5 M NaCl) に溶解後、0.1 mm 径ガラスビーズ 0.5 g が充填された 2 mL 滅菌チューブに移し入れ、細胞破碎装置 (Beads Homogenizer Model BC-20, セントラル科学貿易, 東京) で細菌の細胞を破碎 (2,000 rpm-2 分間; 室温) した。その後、定法のフェノール-エタノール系で核酸を精製した。

②PCR 増幅

調整した鋳型 DNA に対し、細菌の 16S rDNA を対象とした Polymerase Chain Reaction (PCR) 増幅を行った。変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis : DGGE) に供するために、プライマーは GC クランプを付けた forward プライマー 357F-GC (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCG TCCCGCCGCCCCGCCCCGCCTACGGG AGGCAGCAG-3') と reverse プライマー 518R (5'-ATTACCGCGGCTGG-3') を用いた。増幅産物は、*Escherichia coli* 16S rDNA のポジションで 341 から 534 であり、およそ 200 bp のサイズであった。PCR 条件は、Takara EX Taq® ポリメラーゼ (タカラバイオ, 東京) を用い、93°C 1 分間; 1 cycle, 93°C 1 分, 59°C 30 秒間, 72°C 1 分間; 30 cycle, 72°C 7 分間; 1 cycle とした。PCR 後、アガロースゲル電気泳動で、PCR 産物の増幅確認と DNA の定量を行った。その後、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, USA) で精製した後、DNA の純度と濃度を NanoDrop 2000 (ND-100PR-1, サーマフィッシュヤ

ーサイエンティフィック，横浜) で測定した。

③DGGE

DGGE は DCode[™]ユニバーサルミュレーション検出システム (Bio-Rad, USA) を用いた。DNA 変性剤濃度を 25% から 55% (変性剤濃度 100% : 7 M 尿素および 40% 脱イオン化ホルムアミド) に濃度勾配をつけた 7.25% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。電気泳動は、1.0×TAE 緩衝液(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)にて、温度 60°C, 150 V(最初の 20 分間は 20 V)の条件下で、5 時間行った。電気泳動後、アクリルアミドゲルを SYBR® Green I (タカラバイオ, 東京) で 30 分間染色した後、UV 照射下で写真撮影を行った。

④DGGE の DNA バンドの切り出しとシーケンス解析

特徴的な DNA バンドの近縁種を推定するため、DGGE アクリルアミドゲルからのバンドは、メスを用いて切り出し、切り出したゲルは TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 中で DNA の溶出を行った。前述の GC クランプの付いていないプライマーペア (357F-518R) による PCR 増幅後、アガロースゲル電気泳動で、PCR 産物の増幅確認と DNA の定量を行った。精製した DNA を BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、蛍光色素反応を行った。その後、塩基配列の決定は、ABI PRISM® 310 ジェネティックアナライザーにて解析した。解析された塩基配列は、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の DNA データベースにて、相同性検索を行い、近縁種の決定を行った。

⑤群集構造解析

DGGE 写真におけるレーン毎の DNA バンド強度を数値化するために、画像解析ソフト (Gel-Pro Analyzer®, 株式会社プラネトロン, 東京) を使用した。数値化したデータでのクラスター分析は、R Project Contributors[41]が無償で提供している R 言語 (R i386 3.4.2) を利用して、群間平均法で作成した。

(4) 菌類群集構造

①試料からの DNA 抽出

分析試料からの菌類菌体の回収は、試料 5 g を滅菌生理食塩水 195 mL に懸濁し、ミキサーで粉砕した。その粉砕液 5 mL を、10×PBS で 90% 濃度に調整した Percoll 3 mL と、1×PBS 2 mL を遠心管内で混合したものに重層した。

その後、遠心分離(2,500 rpm, 25 分間; 室温)し、菌類画分と夾雑物に分離した。上層に分離した糸状菌画分を回収し Percoll を除去した。残った夾雑物に滅菌生理食塩水を加えて、攪拌し滅菌ガーゼでろ過し、酵母菌体を含むろ液を回収し、前述の糸状菌画分と混合して菌類菌体懸濁液とした。菌体洗浄は細菌と同様とした。洗浄菌体を Extraction buffer に溶解し、細胞破碎(2,000 rpm, 2 分間; 室温)を行った。細胞破碎処理を 3 回繰り返した。核酸の精製は細菌の核酸精製に準じて行った。

②PCR 増幅

菌類の 26S rDNA の可変領域である D1 領域を対象に PCR は、Nested PCR 法で行った。一次増幅で使用したプライマーは、forward プライマーとして NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')、reverse プライマーとして NL-4 (5'-GGTCCGTGTTCAAGACGG -3')を使用した。PCR 条件は、Takara EX Taq® ポリメラーゼ (タカラバイオ、東京) を用い、94°C 3 分間; 1 cycle, 94°C 1 分間, 65°C 1 分間, 72°C 1 分間; 30 cycle, 72°C 10 分間; 1 cycle とした。二次増幅では NL-1 に GC クランプを付けたプライマーを forward プライマー(5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCGG CATATCAATAAGCGGAGGAAAAG -3') と reverse プライマーとして LS-2 (5'-ATTCCCAAACAACACTCGACTC -3')を用いた。この後の調整は細菌で実施した方法に準じた。

③DGGE

前述の細菌群集構造解析に準ずるが、DNA 変性剤濃度を 25% から 45% の濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲル(ゲル濃度 7.25%)を用いた。電気泳動は、1.0×TAE 緩衝液(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)にて、温度 60°C, 150 V(最初の 20 分間は 20 V)の条件下で、7 時間行った。

④DGGE の DNA バンドの切り出しとシーケンス解析

細菌群集解析と同様の手順で行い、26S rDNA の塩基配列の相同性検索を行い、近縁種の決定を行った。

⑤群集構造解析

前述の細菌群集の群集構造解析と同様の手順でクラスター分析を行った。

3. 結果

(1) 堆肥化試験 1

堆肥化実験装置の安定性の確認および分析値の標準値を得る目的で、適正水分での稼働を実験した。乳牛糞堆肥化過程の温度の変化を図 1 に示した。試験開始 2 日後で品温が 60°C を超える現象を示したが、1 週間後には室温(約 25°C) まで低下した。最初の切り返し後、再び 58~59°C 付近まで温度の上昇を示したが、初発の温度上昇ほどの再現は認められなかった。

乳牛糞堆肥化過程における pH の推移を図 2 に示した。pH 6.2 の弱酸性であった原料が 1 週間後にはアルカリ性に変化し、2 週間後には pH 8.5 を超えた。それ以降は pH 8.7~9.0 付近で安定して推移した。

堆肥化実験の開始から 6 週間後までの細菌群集構造の推移を図 3 に示した。初発の 1 週間では中温期 (37°C) と最高温度 (68°C) 到達点の試料を採取し分析した。初発の 1 週間において、DNA バンドパターンが大きく変化していることが確認され、温度上昇過程の中温 (37°C) 時点の試料からは、主要な DNA バンドから、*Enterococcus faecalis* や *Streptococcus* sp. が検出された。

乳牛糞堆肥化過程における菌類群集構造の推移を図 4 に示した。細菌の DNA バンドパターンよりも群集構造の変化が明瞭で、特に初発から 1 週間後および 2 週間後にかけて著しい変化が認められた。堆肥化開始後 42 日後の試料には特徴的な DNA バンド A が検出され、その塩基配列から、*Kernia geniculotricha* と割り当てられた。

(2) 堆肥化試験 2

好氣的分解過程 (堆肥化) における堆肥の温度の推移において、標準区および高水分区の間に顕著な差が認められた (図 5)。標準区では、堆肥化開始直後から品温の上昇 (60°C) が認められ、初回の切り返し後にも、60°C を超える著しい温度の上昇が認められた。高水分区では、堆肥化実験期間を通して、僅かな温度上昇 (35°C) が確認されたが、温度上昇の大きな変化は認められなかった。

乳牛糞堆肥化過程の pH の推移では、堆肥化開始において、標準区および高水分区ともに、pH 6.7~6.8 の弱酸性であったが、実験開始 7 日後には、標準

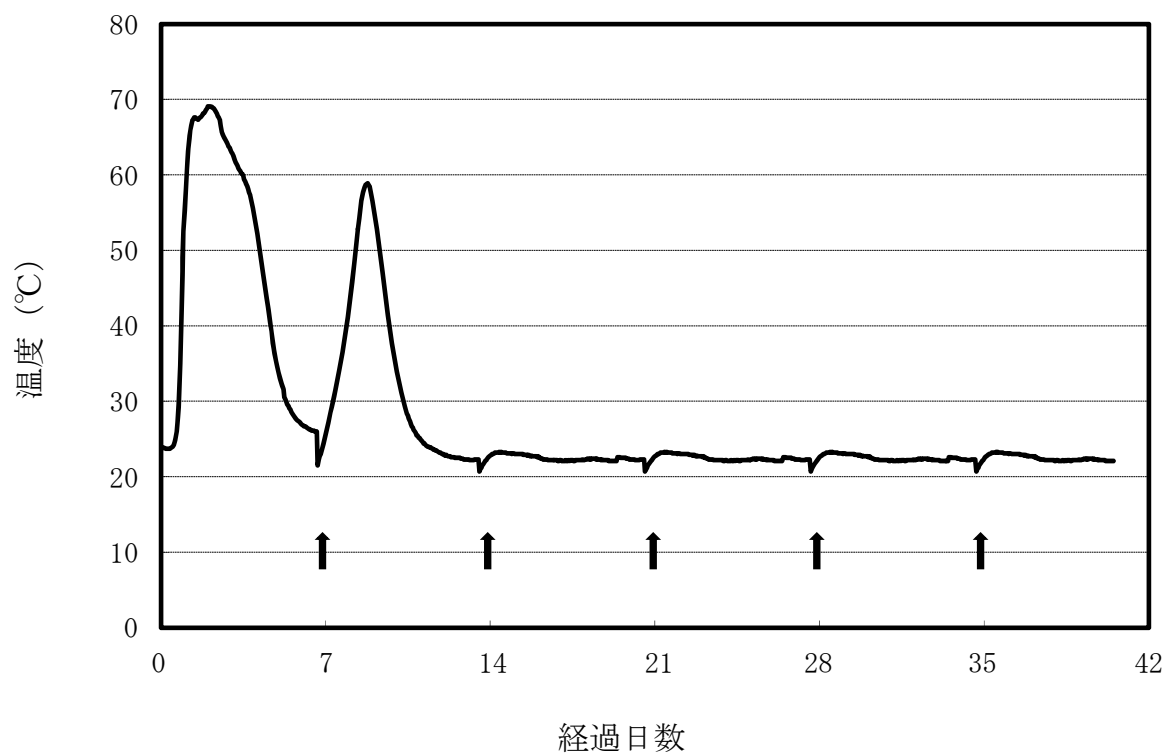


図1 乳牛糞の堆肥化過程における温度の推移（試験1）

図中の矢印は堆肥の切り返しのタイミングを示す

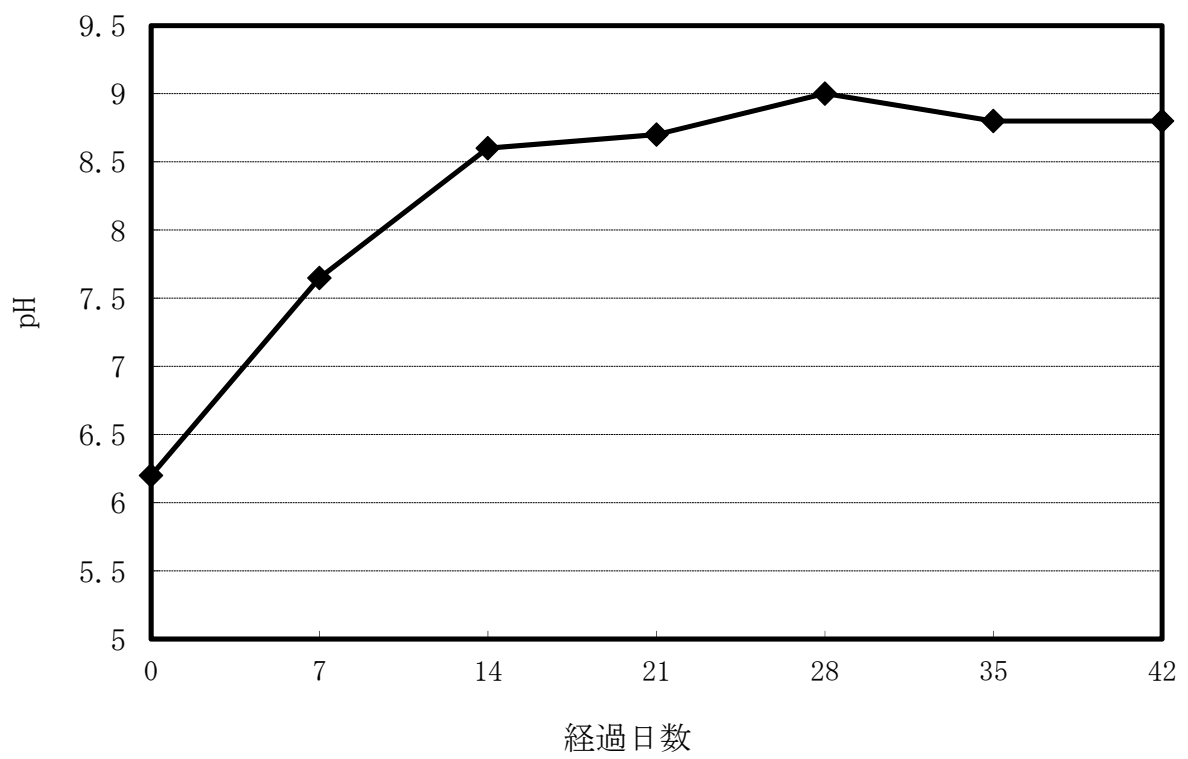


図2 乳牛糞の堆肥化過程におけるpHの推移（試験1）

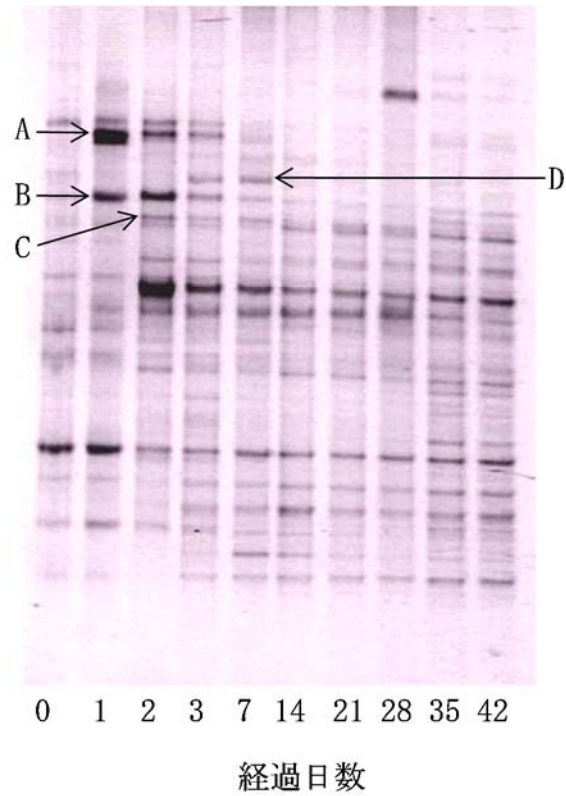


図3 乳牛糞の堆肥化過程における細菌群集構造の推移（試験1）

A : *Enterococcus faecalis* (95%)

B : *Streptococcus* sp. (99%)

C : *Bacillus* sp. (88%)

D : *Bacillus* sp. (98%)

記号:示したDNAバンドの細菌名および相同性割合

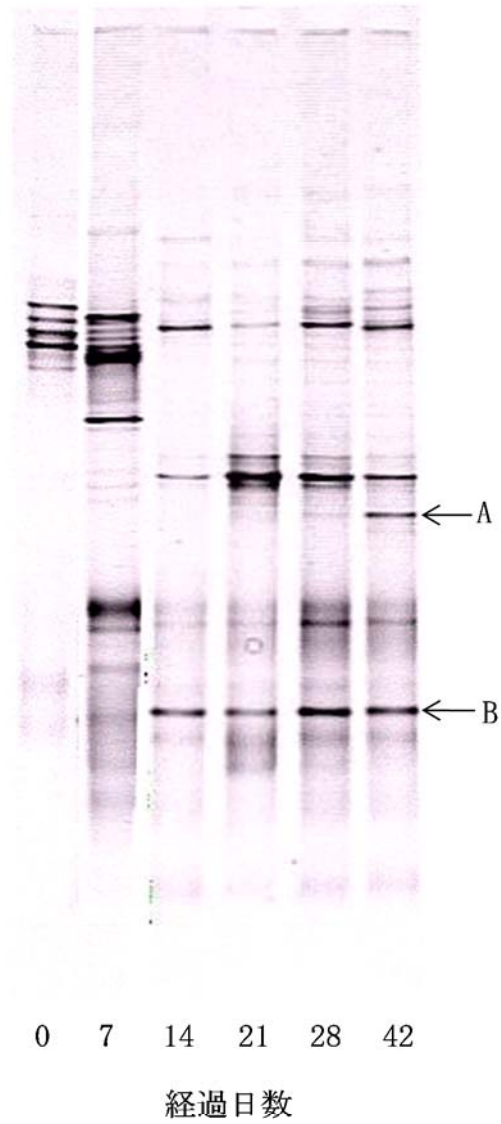


図4 乳牛糞の堆肥化過程における菌類群集構造の推移（試験1）

A : *Kernia geniculotricha* (92%)

B : *Emericella nidulans* (92%)

記号:示したDNAバンドの細菌名および相同性割合

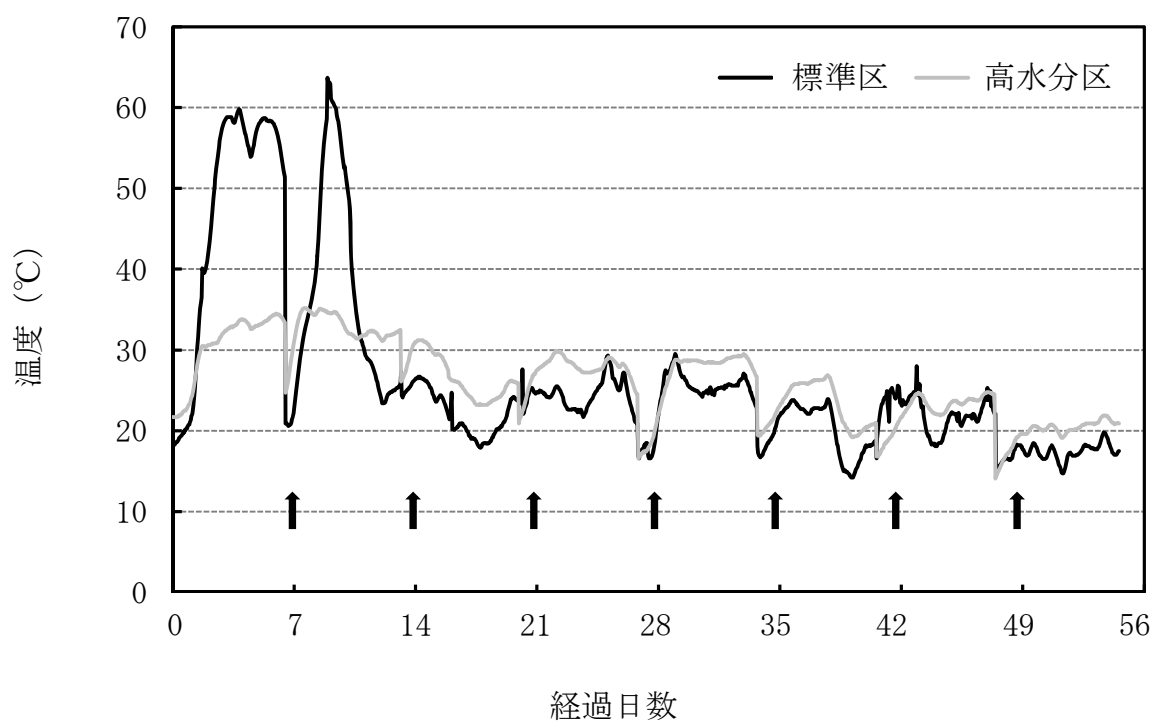


図5 乳牛糞の堆肥化過程における温度の推移（試験2）

図中の矢印は堆肥の切り返しのタイミングを示す

区では速やかに pH 9.0 となったが、高水分区は pH 7.2 であり、緩やかな変化であった(図 6)。実験開始後 14 日後には標準区および高水分区ともに、pH 8.5～8.7 付近のアルカリ性を示し、その後、同様に安定して推移した。

乳牛糞堆肥化過程における BOD₅ の推移において、標準区では、実験開始後 14 日後まで急激に減少して 15,000 mg/L を下回り、それ以降、緩やかに減少する推移を示した。高水分区では実験期間を通して著しい現象は認められず、緩やかに減少した(図 7)。

乳牛糞堆肥化過程の細菌群集構造の推移において、標準区および高水分区ともに、堆肥化開始時の細菌群集構造と比較して堆肥化進行した細菌群集構造とは異なる結果となった(図 8)。7 日後以降の堆肥化の進行とともに、主要な DNA バンドの数種が消失する変化が認められたが、相対的にまとまったクラスターを形成することが認められた(図 9)。高水分区でも、実験開始から 7 日後および 14 日後まで、主要な DNA バンド強度に変化が認められたが、21 日後以降、細菌群集は安定していた。しかし、標準区と高水分区の細菌群集構造の類似性は認められなかった。

乳牛糞堆肥化過程の菌類群集構造の推移において、図 10 に示すように標準区および高水分区ともに、堆肥化開始から 7 日後にかけて菌類群集構造に大きな変化が認められた。また、細菌群集構造と同様に標準区と高水分区とでは、異なるクラスターを形成したことから(図 11)、両区でそれぞれ構成される菌類群集に大きな違いがあることが認められた。

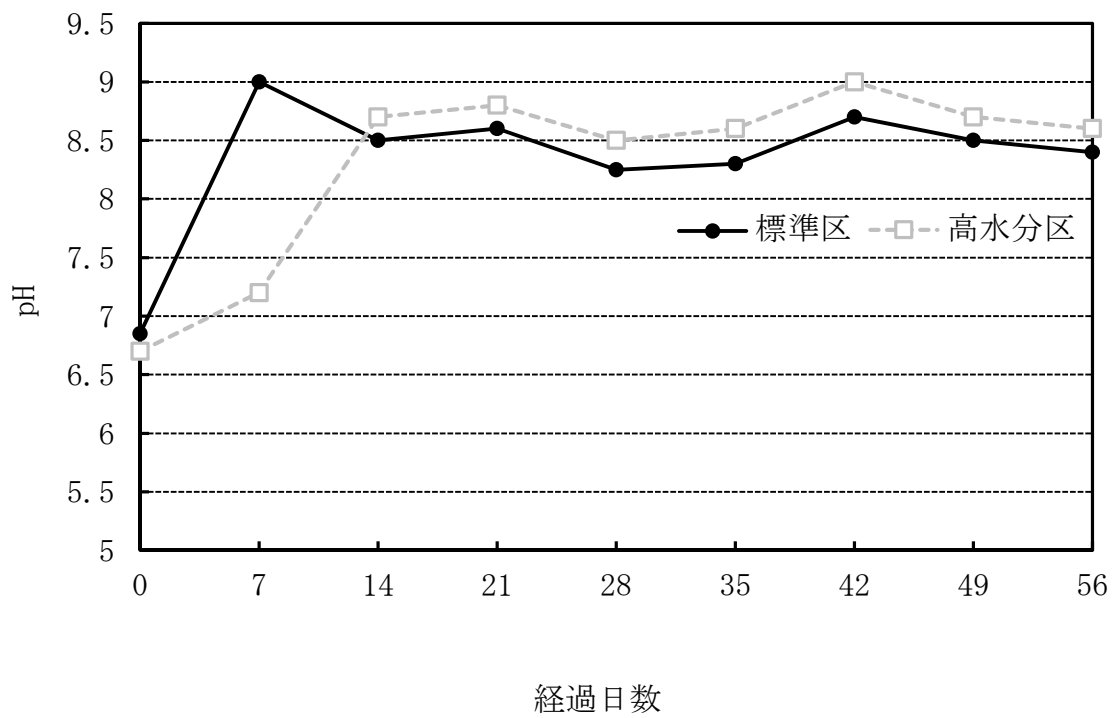


図6 乳牛糞の堆肥化過程におけるpHの推移（試験2）

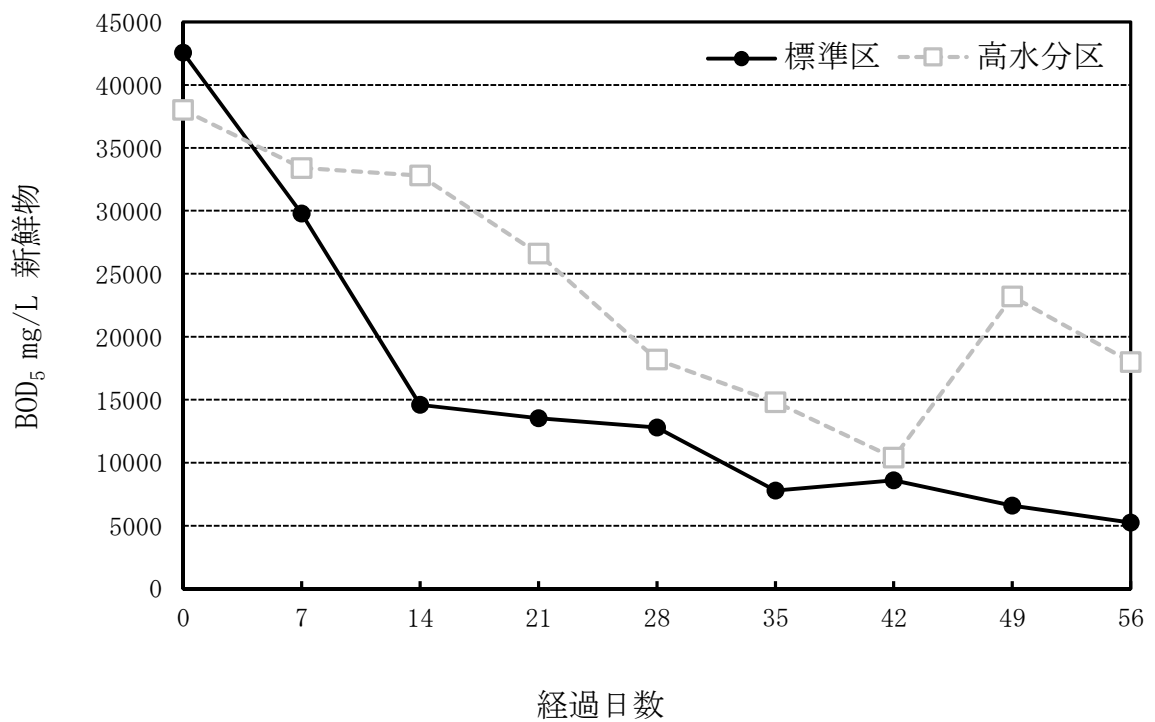


図7 乳牛糞の堆肥化過程におけるBOD₅の推移（試験2）

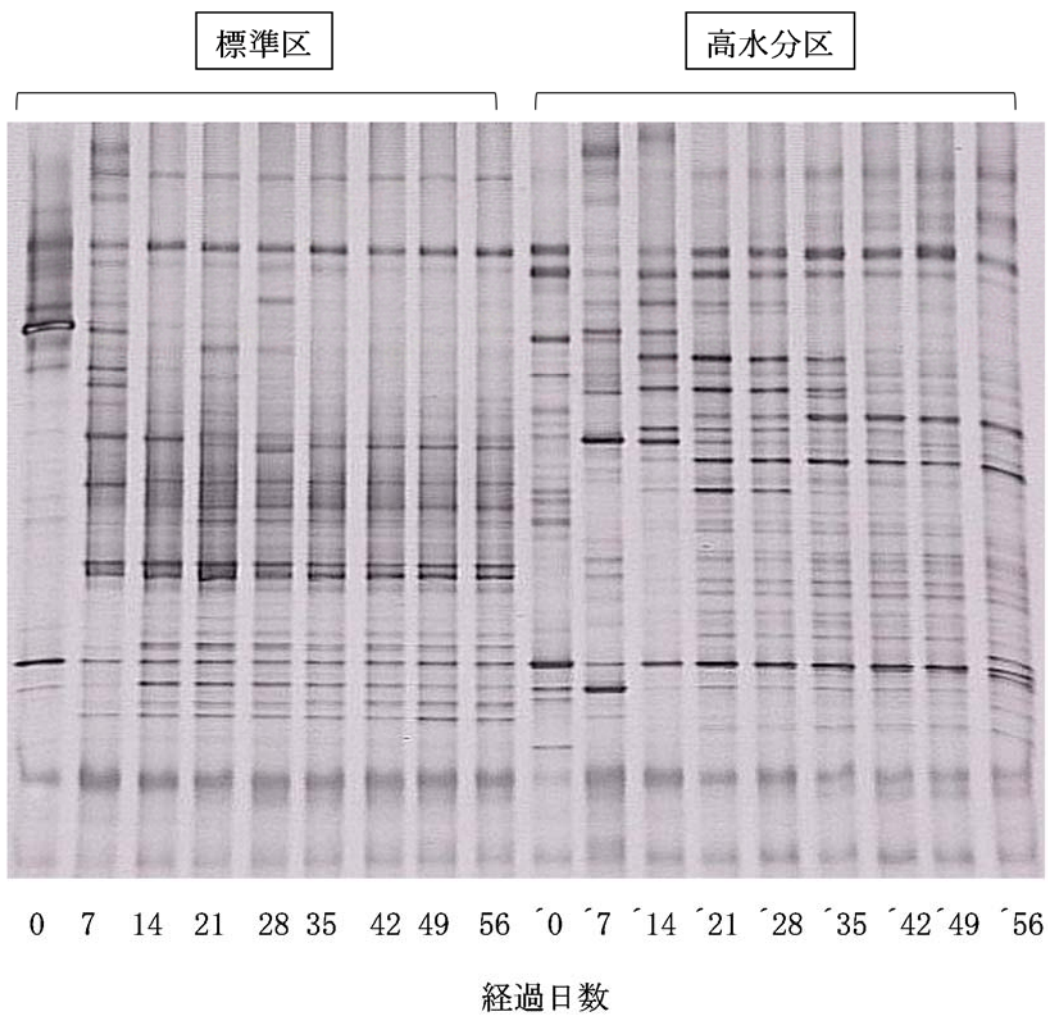


図8 乳牛糞の堆肥化過程における細菌群集構造の推移（試験2）

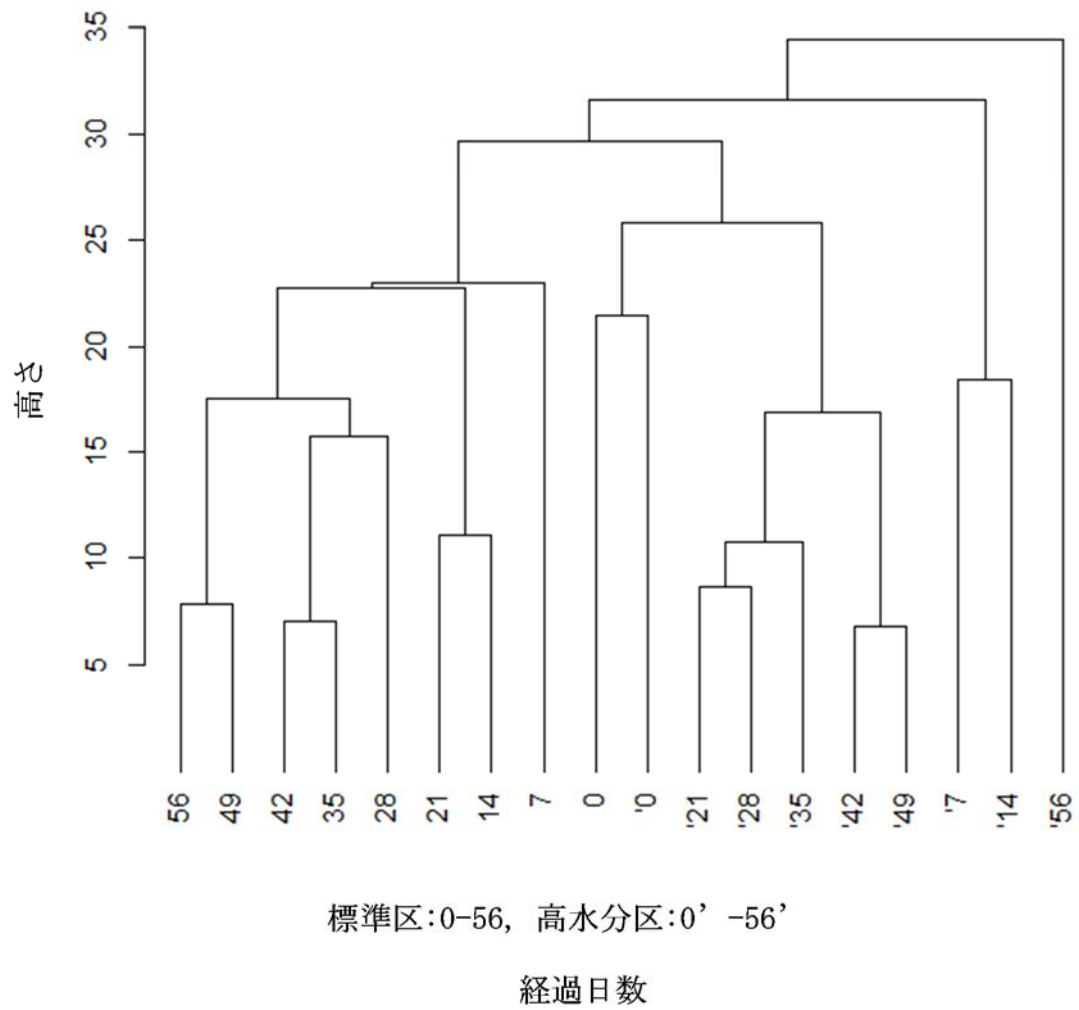


図9 乳牛の糞堆肥化過程における細菌群集構造のクラスター解析（試験2）

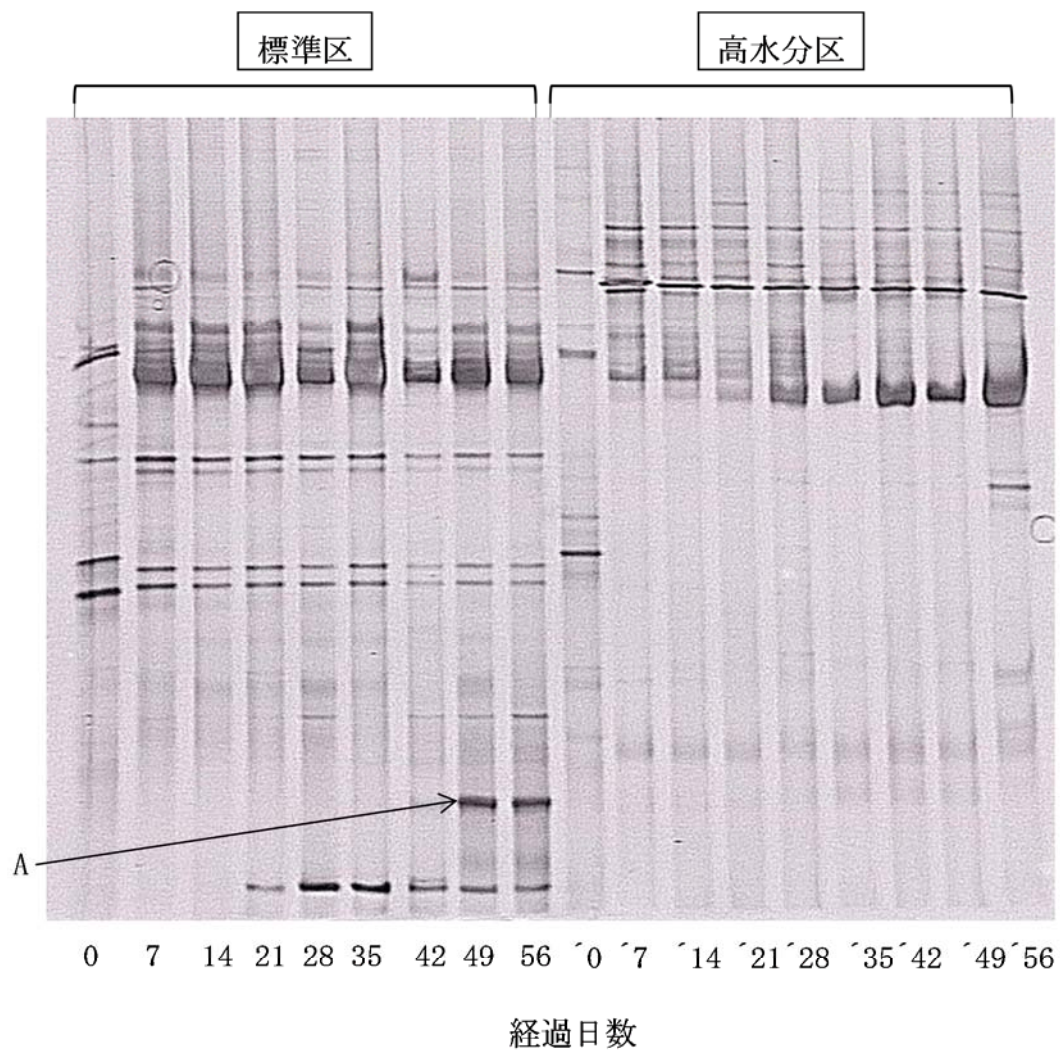


図10 乳牛糞の堆肥化過程における菌類群集構造の推移（試験2）

A: *Kernia Geniculotricha*(92%)

記号:示したDNAバンドの細菌名および相同性割合

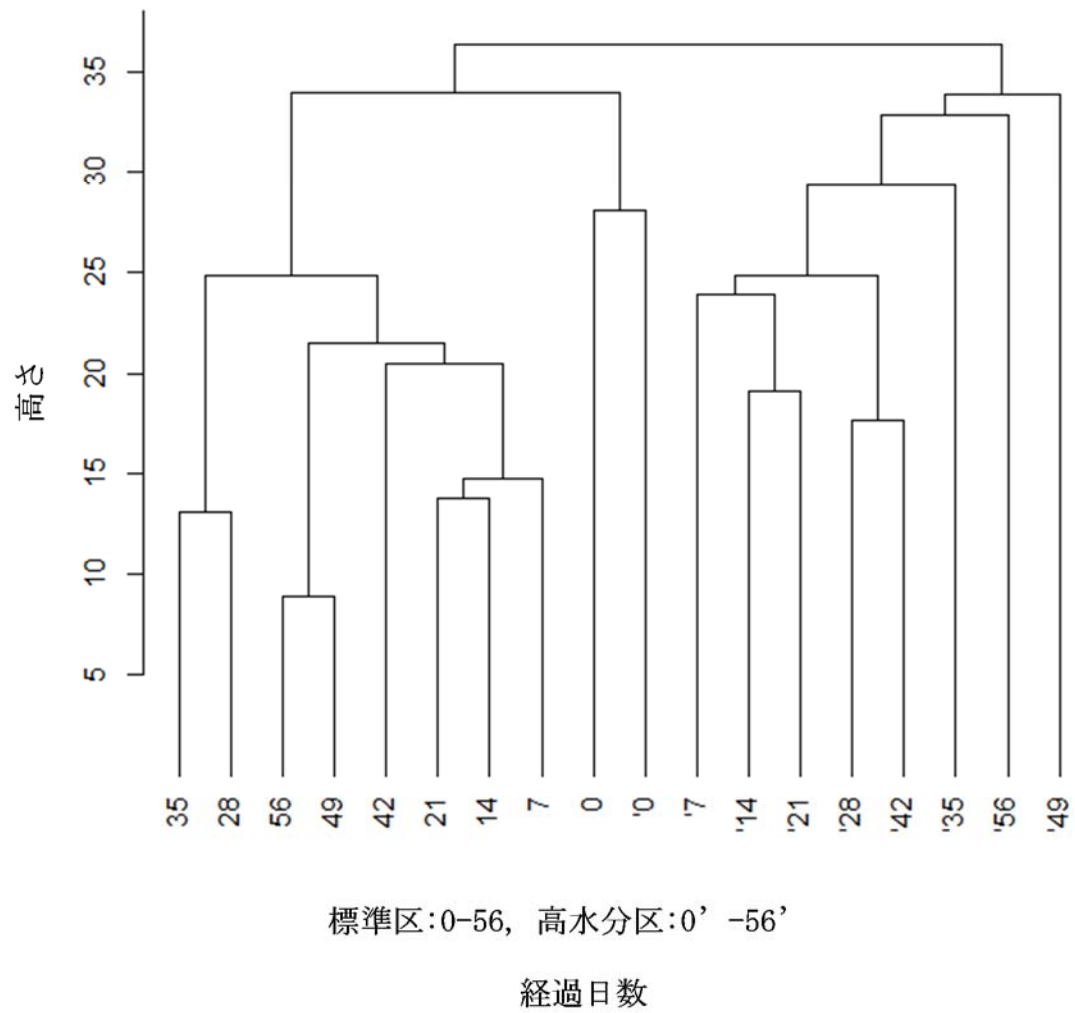


図11 乳牛の糞堆肥化過程における細菌群集構造のクラスター解析 (試験 2)

4. 考察

小型堆肥化実験装置を用いた乳牛糞の堆肥化試験において、堆肥化原料の水分含量の違いが、堆肥の温度、pH、BOD₅および微生物群集構造に与える影響を検討した。堆肥化の定義は、それを発信する国あるいは研究者によって様々であるが、有機物を生物的（微生物）に生分解させ、安定化させたものという点では共通している。微生物の活性化によって、副次的に堆肥原料が変化することも堆肥化と捉えることができる。

水分含量は、堆肥化、特にその温度上昇に影響をあたえる重要な制限因子の1つである。Tiquia ら[48] は、豚糞とオガクズで水分を調整した堆肥化実験で、水分 50%と 60%の試験区より、水分 70%の試験の方が堆肥温度の上昇のピークが低かったと報告している。本研究での適正水分含量での堆肥化試験は水分 65%で実施した。試験 1 では 70℃近くまで、試験 2 でも 60℃を超える温度上昇が認められた。切り返し後、再び温度上昇が起こるのは、有機物分解において均一性が得られないため、堆肥原料を均一に混合したとしても有機物を均質にすることは困難であり、さらに微生物が活性化している分布を平準化することは不可能である。そのため、堆肥化において切り返しは必要な工程であると考えられる。試験 2 における高水分区に温度上昇が認められなかったことは、Tiquia ら[48]の報告と一致した。高水分環境では微生物活性が活発ではないことが示唆された。

牛糞尿の生物分解では、有機物の無機化によって二酸化炭素、炭酸塩やアンモニアの蓄積によって、pH はアルカリ性に移行する[13]。本研究の試験 1 および試験 2 とも弱酸性からアルカリ性に变化した。試験 2 において、標準区はその移行が速やかであったが、高水分区ではその移行が緩慢であった。14 日以降は両区とも長期に渡って pH 8.5 前後で推移した。高水分の影響によって微生物による有機物分解活性が低いことが pH の推移からも推察された。

有機物分解を直接的に把握するものとしては BOD₅の推移は最適であるが、堆肥化研究における BOD₅の推移を示す報告は多くない[6]。易分解性有機物の存在を微生物の酸素消費量で見積もられているため、分析が煩雑であり、データの誤差が大きくなる可能性があるものと考えられる。本研究の試験 2 では、

pH 同様、適正水分含量の標準は初発から直線的に BOD₅ を減少させているのに対し、高水分区では、その低下が緩慢であった。試験後半では両区の値は低値となり近似する値となったことについて、高水分区は堆肥化に不利な条件であるが、通気や切り返しを行うことで徐々に堆肥化環境が改善されるものと考えられた。

家畜糞堆肥化過程において、Song ら[44]は、様々な資材の違いによる堆肥化の微生物群集構造を報告している。本研究の試験 1 では、乳牛糞堆肥化開始直後の主要な細菌を明らかにすることを目的の一つとした。堆肥化開始から温度上昇する過程で、37°C に達した時の細菌群集に特徴的な強大な 2 つの DNA バンドを解析したところ、*Enterococcus faecalis* と *Streptococcus* sp. であった。これらの細菌は乳牛糞便から頻繁に検出される細菌群であるが、堆肥化の温度上昇による 37°C 環境において主要な細菌と位置付けられた。これらの細菌の近縁種には、乳房炎の原因微生物として *Enterococcus faecium* , *E. faecalis* や *Streptococcus uberis* , *S. dysgalactiae* が知られている。これら 2 つの DNA バンドは堆肥化開始 2 日後の 68°C 環境でも DNA バンド強度は強く存在していたが、堆肥化開始 3 日後の 65°C 環境下では、DNA バンド強度は低下し、堆肥化試験後半の細菌群集構造ではそれらの位置に DNA バンドは検出されないため、良好に堆肥化が進んだものでは主要な細菌群から消失することが明らかとなった。

本研究では、細菌のみならず、菌類の群集構造も併せて情報を得た。Zhang ら[51] は作物資材を材料にした堆肥化の細菌と菌類の群集構造の変化を報告しているが、DNA シークエンスについては解析していない。本研究の試験 1 では、易分解性有機物が減少し、難分解性有機物を利用する菌類が繁茂することを前提に、堆肥化開始 42 日後の主要な DNA バンドを解析し、それぞれ *Kernia geniculotoricha*, *Emericella nidulans* と割り当てられた。試験 2 では、水分含量の影響について細菌および菌類の群集構造の遷移について解析した。細菌および菌類とも、水分含量によって、群集構造が大きく異なり、DNA バンドパターンより得られた情報からクラスター解析の結果、それぞれ異なるクラスターを形成し、堆肥化試験後半の群集構造では堆肥化開始時の群集構造からは解離した独特の群集構造を形成することが明らかとなった。また、試験 1 に

において検出された堆肥化後半に出現する *Kernia geniculotoricha* と相同性の高い DNA バンドが再び検出された。この菌類の検出が堆肥化の進行、いわゆる腐熟の指標菌になりうる可能性が示唆され、その微生物学的特性の解析は今後の検討に継続される。

5. 小括

乳牛糞の好氣的処理過程（堆肥化）における微生物群集構造を明らかにすることを目的として、水分含量の異なる堆肥化過程において、堆肥性状の相違およびその堆肥化過程における主要な細菌および菌類の群集構造の変遷を検討した。

適正水分含量である堆肥原料での堆肥化は、高水分である堆肥原料での堆肥化に比べて、著しい温度上昇および速やかな pH のアルカリへの推移と BOD₅ の減少が認められ、堆肥化の進行に明確な差が認められた。適正水分の堆肥と高水分堆肥とでは、全く異なる細菌および菌類群集構造が形成されることが明らかとなった。乳牛糞堆肥化開始直後に主要な細菌として検出された2つの DNA バンドは *Enterococcus faecalis* と *Streptococcus* sp. と割り当てられ、堆肥の温度上昇の役割を担っているものと推察されたが、堆肥化進行とともに主要な細菌群ではなくなり、堆肥化過程においてこれらの細菌の衰退が認められた。乳牛糞堆肥化実験の後半に出現する *Kernia geniculotoricha* と相同性の高い DNA バンドが検出された。再現性のあるこの菌類の検出が堆肥化の進行、いわゆる腐熟の指標菌になりうる可能性が示唆された。

乳牛糞堆肥化の実験において、細菌および菌類の双方を堆肥材料の水分含量の影響を検討した微生物群集構造解析で得られた情報は本研究において初めて明らかにされた。

第Ⅱ章

乳牛糞尿の嫌気的処理過程（メタン発酵）における微生物群集構造の解析

1. 序文

我が国では家畜排泄物の処理として堆肥化が一般的に行われてきた。しかし、堆肥化過程では作物の養分となるべき窒素（アンモニア）が大気中に飛散する[40]。この飛散したアンモニアが大気中の水蒸気に溶け込み降雨となることが間接的な酸性雨の原因となっている[30]。また、メタンや亜酸化窒素の温室効果ガスも放散していることから、堆肥化は養分損失とともに有害性という問題も考慮する必要がある[15,18]。

1997年の気候変動に関する国際連合枠組み条約の京都議定書の採択以降、家畜糞尿の嫌気消化（メタン発酵）処理施設が全国的に普及し始めた[32]。メタン発酵は堆肥化と全く異なり、欧州では広く普及している技術である[4]。メタン発酵は嫌気性を保つため閉鎖系環境において、嫌気性微生物による有機物の分解作用を進行させるものであり、養分や有害ガスの飛散が起こらない。また、有機物の分解により生成されるバイオガスはエネルギーとして利用可能である。これらの点が評価され、メタン発酵技術を利用した糞尿処理施設（バイオガスプラント）が日本各地に建設されてきた[32]。

メタン発酵における有機物の分解は段階的に進行する。初めに嫌気性細菌群による加水分解により高分子有機物が低分子有機物へ分解され、低分子有機物が酸発酵で揮発性脂肪酸（VFA）、アルコール、アルデヒド等へ分解され、さらに酢酸、水素、二酸化炭素が生成する。最終的にこれらの基質から、Archaeaに属するメタン生成菌群によってメタンが生成される[24]。

メタン発酵の発酵温度域は中温発酵（30～40℃）、高温発酵（50～60℃）に分別されており、中温発酵では中温性微生物、また、高温発酵では高温性微生物により微生物群集構造が構成されている。これは発酵の最終段階を担うメタン生成菌群に 38℃環境を至適生育温度とするものと、55℃環境を生育至適とする二群が存在するためである[16]。メタン発酵の安定性では、高温発酵よりも中温発酵の方が安定して発酵する温度範囲が広いとされており、家畜糞の処理では中温発酵が推奨されている[31]。しかし、有機物の分解速度において、高温発酵は中温発酵の約2倍ともいわれており、また病原菌に対する高い殺菌性も報告されている[33]。我が国のバイオガスプラントは温度管理の容易さか

ら中温発酵が普及している[32]。

中温発酵のバイオガスプラントにおいて、農場で病原性微生物が蔓延し、衛生的な処理が必要となり高温処理の必要性に迫られる可能性が生じたり、あるいは、高温発酵のバイオガスプラントにおいて保温機器の故障が発生して温度が保持できず、中温発酵で維持せざるを得ない状況が生じることも想定される。そのような事態に備えて、発酵温度の変更の影響を把握しておくべき課題がある。しかし、これまでの報告は中温域以下での異なる発酵温度の報告[10]や高温域内で発酵温度を上昇させた報告[16]はあるが、中温域と高温域の広範囲で発酵温度を変えた報告はない。また、それらの報告では微生物生態に関する情報は詳細には明らかにされていない。これはメタン発酵に関与する嫌気性微生物群の多くが難培養性であることに起因しているものと考えられる。さらに、メタン生成菌の培養は数か月を要するものもあり研究の進展にも影響が及んでいる。

本研究では、乳牛排泄物の嫌气的処理（メタン発酵）の過程において、その嫌気消化に及ぼす発酵温度の変更の点から、発生バイオガスおよびメタン発酵消化液の性状に加え、メタン発酵消化液中の細菌群集およびメタン生成菌群集の構造の遷移をモニタリングし、発酵温度変更からの安定的回復に至る過程での微生物生態学的群集構造を解析した。

2. 材料および方法

(1) 材料

乳牛糞尿メタン発酵液は、酪農学園大学附属農場の糞尿循環研究センターのメタン発酵消化液（中温発酵：38℃）と帯広畜産大学のメタン発酵消化液（高温発酵：55℃）をそれぞれのバイオガスプラント発酵槽より採取したものをを用いた。中温消化液は38℃、高温消化液は55℃にて恒温水槽で保温し、約90日間の馴養の後に実験に供した。

(2) 実験の概要

実験の概略を図1に示した。実験用発酵槽にはテドラーバッグ®（ジーエル

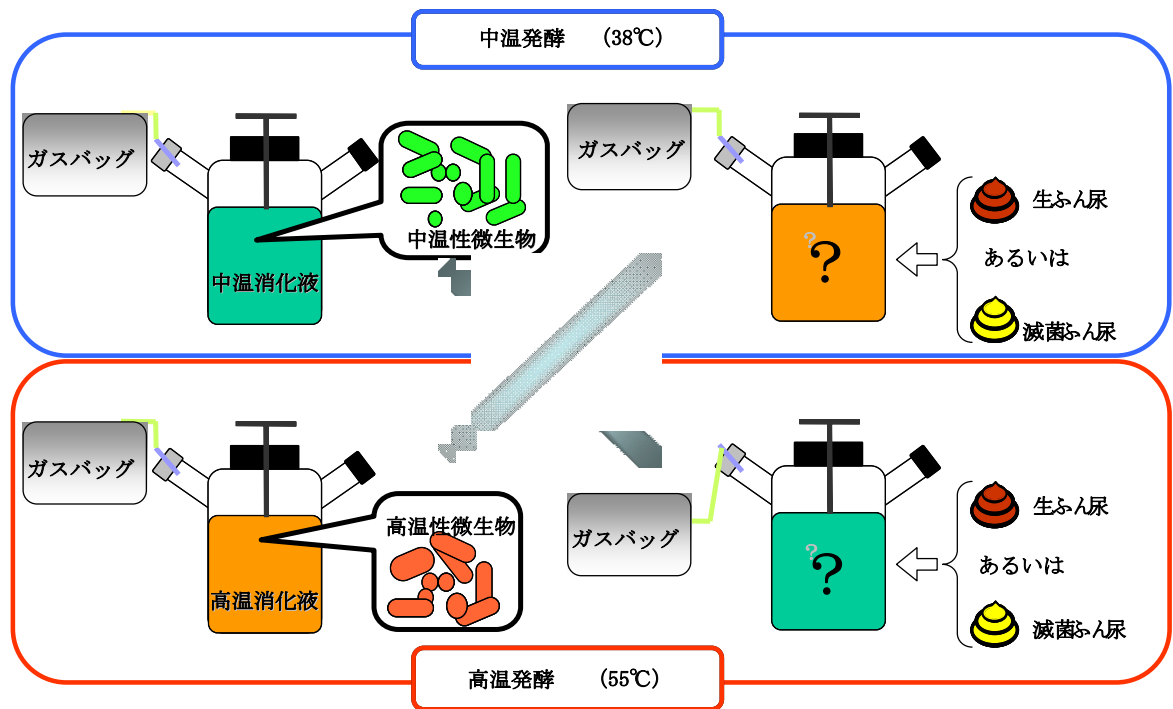


図12 発酵温度変更メタン発酵実験の概要

サイエンス，東京）を取り付けた容積 3 L のスピナーフラスコを使用した。馴養後の消化液を発酵槽に 1.5 L ずつ分注して 3 日間温度を保った後、中温発酵消化液は 55°C のウォーターバスへ、高温発酵消化液は 38°C のウォーターバスへ、それぞれ、発酵温度を変更した。

基質である糞尿の投入前に、発酵槽中の消化液を攪拌し 60 mL 採取した。糞尿の投入は、毎日一度 60 mL とし、未滅菌糞尿（生糞尿）あるいはオートクレーブ処理した糞尿（滅菌糞尿）を使用し、それぞれ 2 つの系を設定した。これらの操作は発酵槽内の嫌氣的環境を維持するため窒素ガスを流入しながら行った。試験区は、中温消化液を高温発酵に変更し、生糞尿を投入した処理区（中→高温（生）区）と、滅菌糞尿を投入した処理区（中→高温（滅）区）を設置した。また、高温消化液を中温発酵に変更し、糞尿を投入した処理区（高→中温（生）区）と滅菌糞尿を投入した処理区（高→中温（滅）区）も同様に設置した。

（3）分析

1）消化液の pH

分析試料の消化液を希釈せず、pH メーター（M-11，堀場製作所，東京）を用いて測定した。

2）揮発性低級脂肪酸（Volatile fatty acid : VFA）の定量

VFA は、水素炎検出器（Frame ionized detector : FID）を備えたガスクロマトグラム（GC - 8 A，島津製作所，京都）を使用して定量を行った。カラム充填剤は Unisole-F200 を使用し、分析条件として、キャリアーガスは窒素ガスを使用し、カラム温度は 140°C、気化室および検出器温度は 170°C で分析を行った。

3）バイオガス発生量の測定および組成分析

バイオガスの発生量は 200 mL ガラスシリンジで測定した。バイオガスの組成は、熱伝導型検出器（Thermal conductivity detector : TCD）を備えたガスクロマトグラフ（GC - 380，GLサイエンス社，東京）を用いた。カラムはステンレスカラムで、充填剤は Unibeads C 60/80 を使用した。分析条件として、キャリアーガスはヘリウムガスを使用し、カラム温度は 130°C，検出器温度は 160°C で分析を行った。

4) 細菌群集構造

①試料からの DNA 抽出

第 1 章の細菌群集構造の①に準じて行った。

②PCR 増幅

PCR 反応は、抽出した DNA を鋳型とし、細菌の 16SrDNA の V3 領域を含む範囲を標的とし、Nested PCR を行った。一次増幅では Bact-8-27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') と Univ-926-907R (5'-CCTACGGGAGG CAGCAG-3') を使用した。反応条件は 94°C 2 分間 ; 1 cycle, 94°C 30 秒間, 59°C 30 秒間, 72°C 40 秒間 ; 30 cycle, 72°C 7 分間 ; 1 cycle とした。PCR 後の反応液は 2 %アガロースゲル電気泳動で増幅を確認した。その後、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, USA) を用いて精製を行い、二次増幅の鋳型 DNA とした。二次増幅では、Bact-341-357F+GC Clamp プライマー (5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCATTACCG CGGCTGCTGG -3') と Bact-534-518R プライマー (5'-AAACTYAAAGGA ATTGACGG-3') のペアを使用した。二次増幅では 94°C 2 分間 ; 1 cycle, 94°C 30 秒間, 58°C 30 秒間, 72°C 20 秒間 ; 30 cycle, 72°C 5 分間 ; 1 cycle とした。その後、同様に精製した後、DNA の純度と濃度を NanoDrop 2000 (ND-100PR-1, サーモフィッシャーサイエンティフィック, 横浜) で測定した。

③DGGE

DGGE は第 1 章の細菌群集構造の③に準じて行い、変性剤濃度を 25% から 65% と改変し、120V, 6 時間の電気泳動条件で行った。

④DGGE の DNA バンドの切り出しとシーケンス解析

第 1 章の細菌群集構造の④に準じた。

⑤群集構造解析

DGGE 写真をレーン毎に DNA バンド強度を数値化するために、画像解析ソフト (Gel-Pro Analyzer®, 株式会社プラネトロン, 東京) を使用した。数値化したデータでの主成分分析は、R Project Contributors [41] の R 言語 (R i386 3.4.2) を利用して解析した。

5) メタン生成菌群集構造

①試料からの DNA 抽出

第 2 章の細菌群集構造の①に準じて行った。

②PCR 増幅

PCR 反応は、抽出した DNA を鋳型とし、Archaea の 16SrDNA を標的とし、Nested PCR を行った。一次増幅では Arch-344-363F (5'-ACGGGGCGCAGCAGGCGCGA-3') と Arch-934-915R (5'-GTGCTCCCCCGCCAATTCCT-3') を使用した。反応条件は 94°C 2 分間 ; 1 cycle, 94°C 30 秒間, 61°C 30 秒間, 72°C 40 秒間 ; 30 cycle, 72°C 5 分間 ; 1 cycle とした。PCR 後の反応液は 2 % アガロースゲル電気泳動で増幅を確認した。その後、QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, USA) を用いて精製を行い、二次増幅の鋳型 DNA とした。二次増幅では、Arch-344-363+GC Clamp プライマー(5'-CGCCCCGCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCACGGGGCGCAGCAGGCGCGA-3') と Bact-534-518R プライマー(5'-AAACTYAAAGGAATTGACGG-3') のペアを使用した。二次増幅では 94°C 2 分間 ; 1 cycle, 94°C 30 秒間, 58°C 30 秒間, 72°C 20 秒間 ; 30 cycle, 72°C 5 分間 ; 1 cycle とした。その後の精製と定量は第 2 章の細菌群集構造の②に準じた。

③DGGE

DGGE は第 2 章の細菌群集構造の③に準じて行い、DNA 変性剤濃度を 25% から 65% と改変したアクリルアミドゲルを用いた。電気泳動は、120V, 6 時間の条件下で行った。

④DGGE の DNA バンドの切り出しとシーケンス解析

第 2 章の細菌群集構造の④に準じた。

⑤群集構造解析

第 2 章の細菌群集構造の⑤に準じた。

3. 結果

メタン発酵消化液の pH の推移を図 13 に示した。コントロールである対照中温区は pH 8.2~8.3、対照高温区は pH 8.8~8.9 であった。発酵温度を 37°C

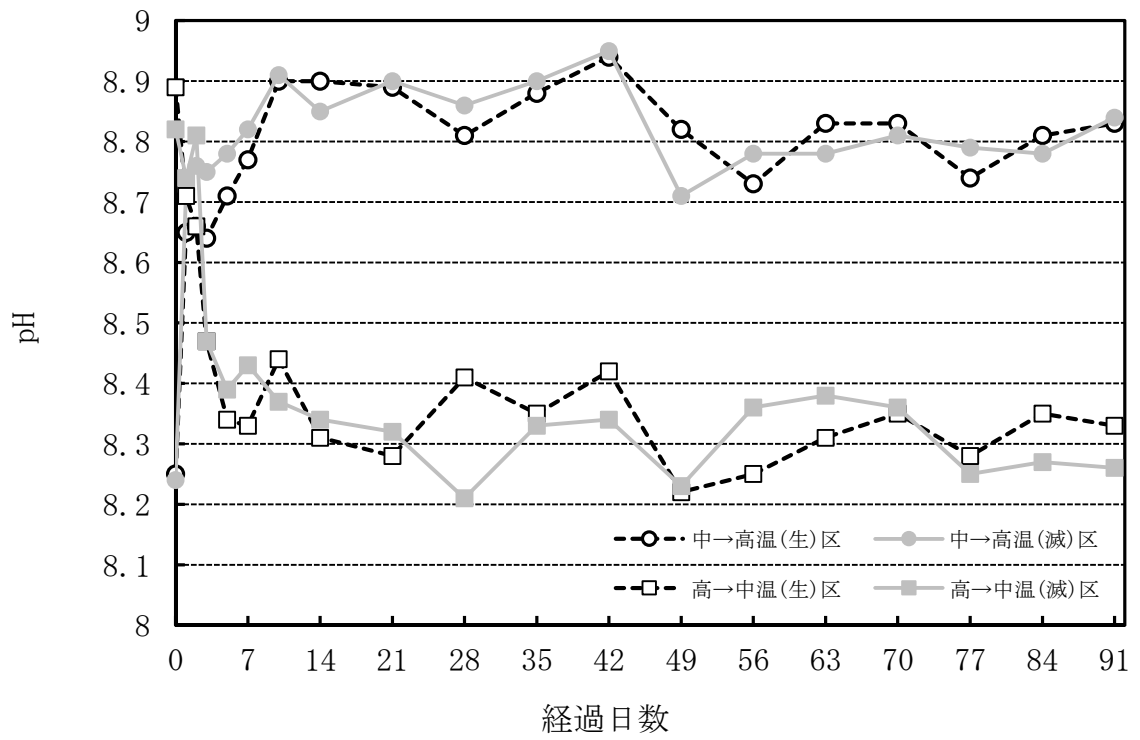


図13 乳牛糞のメタン発酵における消化液のpHの推移

から 55℃に変更した消化液の pH の値は、中→高温（生）区および中→高温（滅）区ともに、1 日後に pH 8.6 に上昇し、10 日後には pH 8.9 となった。発酵温度を 55℃から 37℃に変更した消化液の pH の値は、高→中温区（生）区および高→中温区（滅）区とも、pH は徐々に低下し、14 日後に pH 8.3 となった。投入原料中の微生物の生菌および滅菌の違いに大きな差は認められなかった。

メタン発酵消化液の VFA の推移を図 14 に示した。中→高温（生）区および中→高温（滅）区の両区では、当初、酢酸が 60~80 mM であったが、発酵温度変更後、徐々に増加した。その後、7 日および 14 日後では、プロピオン酸濃度が酢酸濃度を上回った。21 日以後、プロピオン酸は低下し、低濃度で推移した。高→中温（生）区では、発酵温度変更 7 日後から 28 日後にかけて酢酸濃度を上回るプロピオン酸濃度の上昇が認められたが、35 日以降、プロピオン酸は検出限界以下となった。高→中温（滅）区では、発酵温度変更後 14 日後から 42 日後まで、酢酸濃度を上回るプロピオン酸濃度の上昇が認められた。63 日後、以降、プロピオン酸は検出限界以下となった。

4 つの試験区で発生したバイオガス発生量の推移を図 15 に示した。発酵温度変更前は、中温発酵および高温発酵でのバイオガス発生量はともに原料 60 mL あたりおよそ 2,000 mL であった。中→高温（生）区は、発酵温度変更直後に発生バイオガス量が 2,400 mL まで一時的に増加し、その後 1,500 mL まで低下した後、徐々に回復する推移を示した。中→高温（滅）区は、発酵温度変更直後に僅かに発生バイオガスが増加したが、2 日後に 1,200 mL まで低下し、その後、徐々に回復した。高→中温区（生）区および高→中温区（滅）区の両区は発酵温度変更直後に発生バイオガスが 500 mL にまで低下した。その後、徐々に回復したが、発生バイオガス量が不安定なステージがあり、56 日後以降、安定する傾向であった。

各試験区の発生バイオガス中のメタンガス濃度の推移を図 16 に示した。各試験区ともメタンガス濃度は 60%前後安定していた。発酵温度変更後、中→高温区（生）区および中→高温区（滅）区では、メタン濃度が 50%を下回り数日間続いた。7 日後には 55%以上となり回復した。高→中温区（生）区も発酵温度変更直後、メタンガス濃度は 53%まで一時的に低下したが、その後、不安定

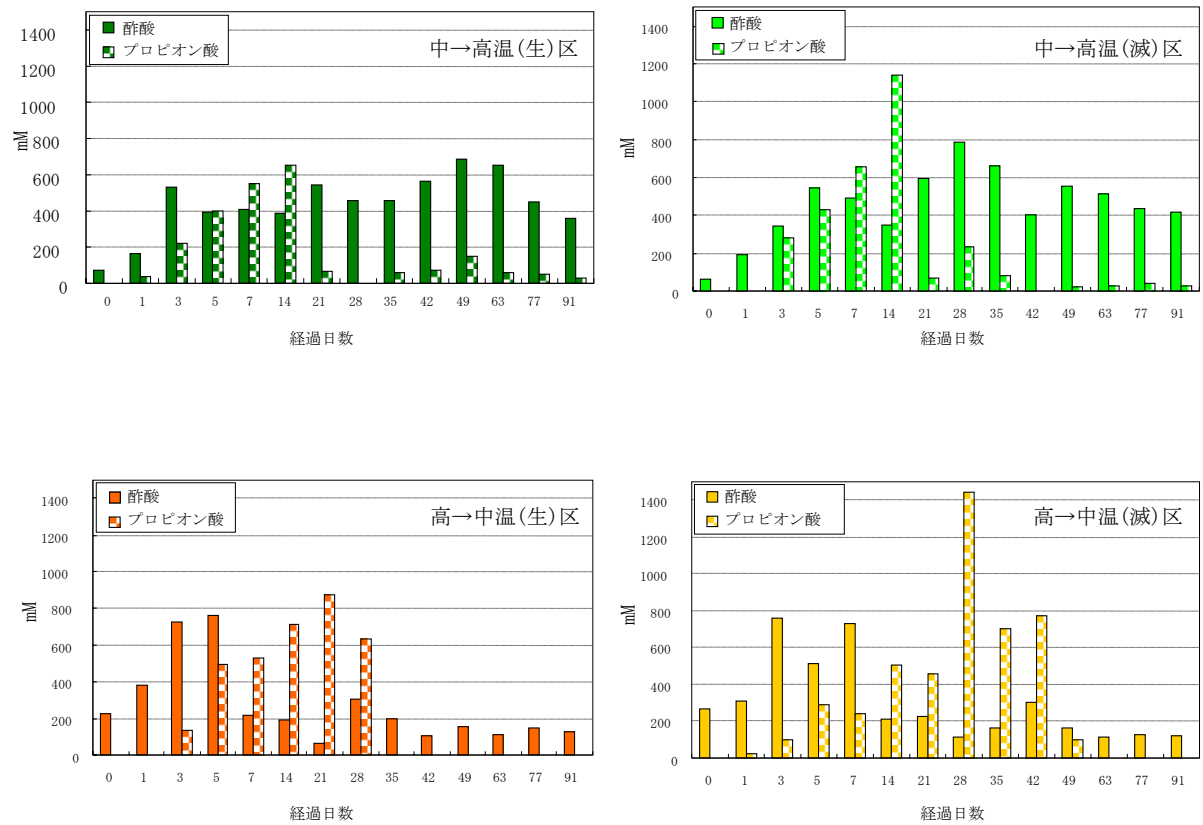


図14 乳牛糞のメタン発酵における消化液中のVFA（酢酸・プロピオン酸）の推移

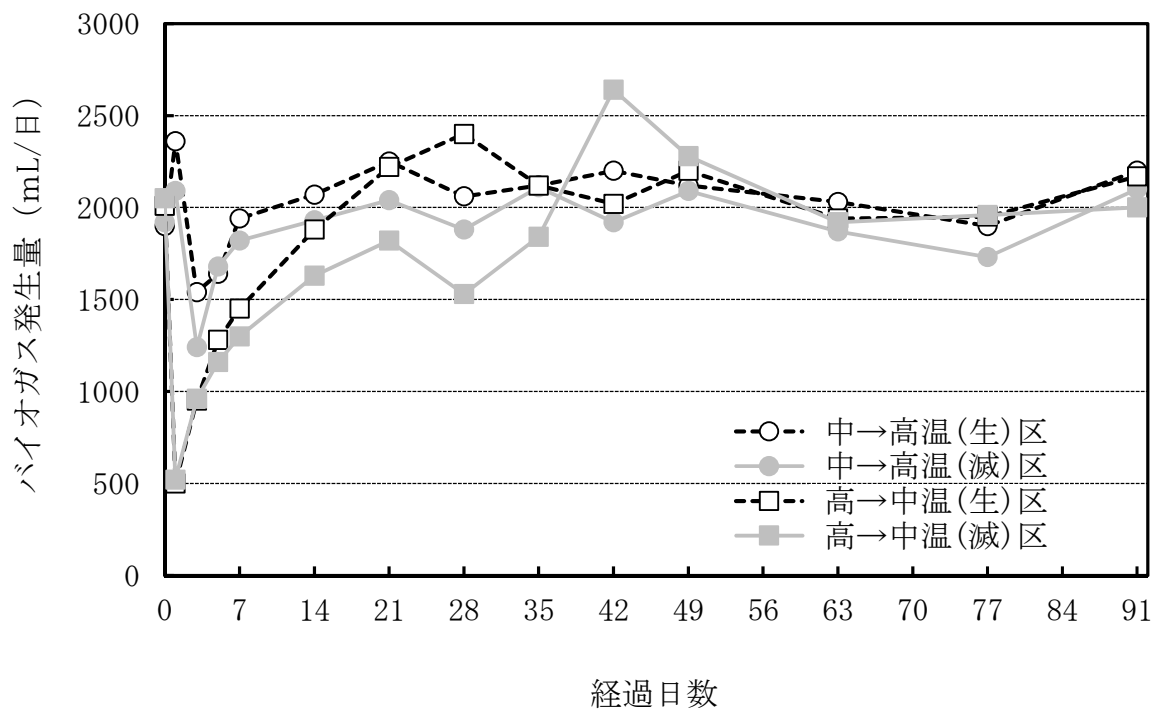


図15 乳牛糞のメタン発酵におけるバイオガス発生量の推移

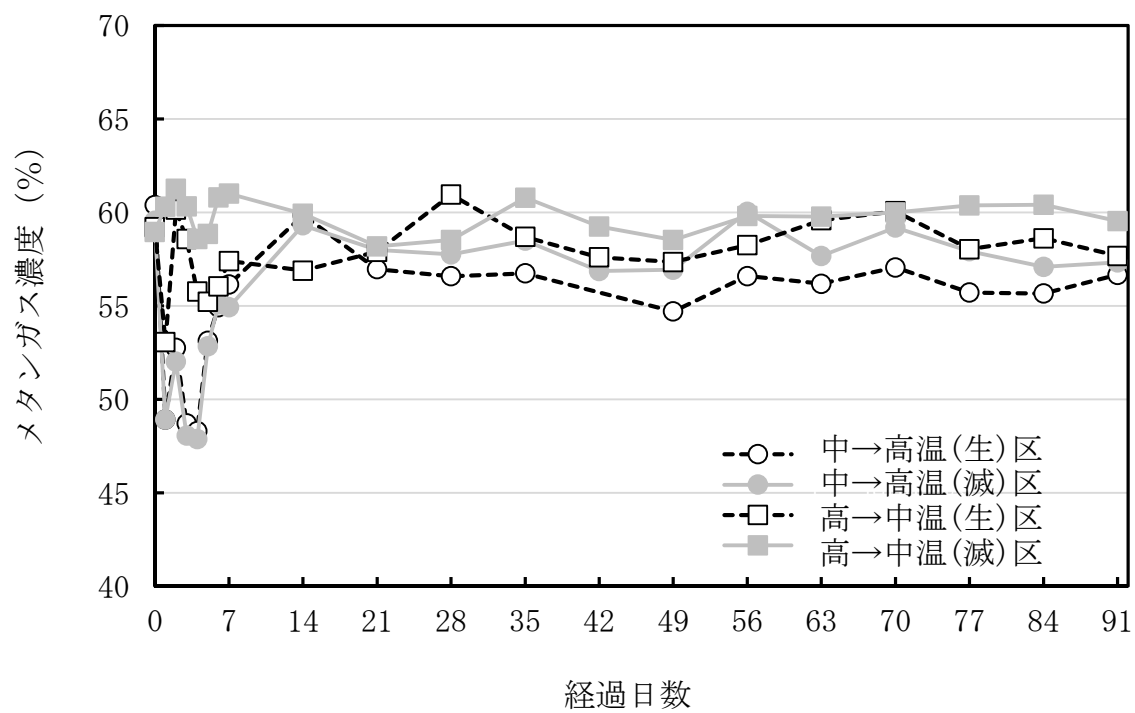


図16 乳牛糞のメタン発酵におけるバイオガス中メタンガス濃度の推移

な推移をするものの回復した。高→中温区（滅）区では、発酵温度変更直後にメタンガス濃度の急激な低下は認められなかった。

PCR-DGGE解析による乳牛糞尿メタン発酵の細菌群集構造の推移を図17に示した。また、そのDGGEのDNAバンドパターンから主成分分析し作図した成績を図18に示した。主成分分析では、プロットされた位置および距離が近いほど、DNAバンドパターンから群集構造が類似していることが示された。中→高温（生）区の細菌群集の推移では、発酵温度変更28日後までは同じクラスターを形成していたが、35日後から遷移が認められ、42日後および49日後には別のクラスターが形成された。63日後から91日後では、さらに別のクラスターが形成された。そのクラスターは対照高温に近づく傾向が認められた。中→高温（滅）区の細菌群集の推移では、発酵温度変更直後に著しく遷移し大きなクラスターを形成した。そのクラスター内で変遷が進み、91日後の群集構造は対照高温に近づく傾向が認められた。高→中温（生）区の細菌群集の推移では、発酵温度変更時と1日後の群集構造には大きな変化が認められなかったが、3日後から7日後の群集構造は遷移し、さらに14日以降の群集構造は変遷して大きなクラスターを形成した。91日後の群集構造は対照中温の群集構造と非常に類似する結果となった。高→中温（滅）区の細菌群集の推移では、発酵温度変更後の変遷は緩慢であったが、28日後に大きく遷移し、35日後から49日後の群集構造で一つのクラスターが形成された。63日後および77日後の群集構造は別のクラスターを形成したが、91日後の群集構造は、対照中温に近づく遷移を示した。

PCR-DGGEによる、乳牛糞尿メタン発酵のメタン生成菌群集構造の推移を図19に示した。また、そのDGGEのDNAバンドパターンから主成分分析し作図した成績を図20に示した。中→高温（生）区のメタン生成菌群集の推移では、発酵温度変更直後から大きく遷移したが、クラスターを形成するほどの定性が認められなかった。63日後および77日後の両群集構造には類似性が認められたが、対照高温のそれとはかけ離れていた。91日後の群集構造は対照の高温に近似する結果となった。中→高温（滅）区のメタン生成菌群集の推移では、発酵温度変更後、徐々に大きなクラスターを形成したが、対照の高温に近づく傾向は認められなかった。91日後の群集構造のみ対照の高温に近づく傾向が認

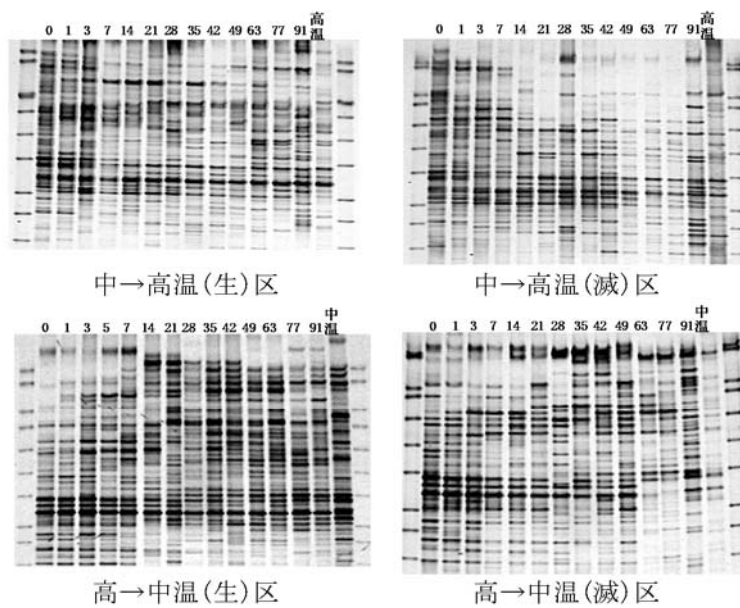


図17 乳牛糞のメタン発酵における細菌群集構造の推移
 数字 (0-91) は、発酵温度変更後の経過日数を示す
 中温, 高温は、それぞれ対照区を示す

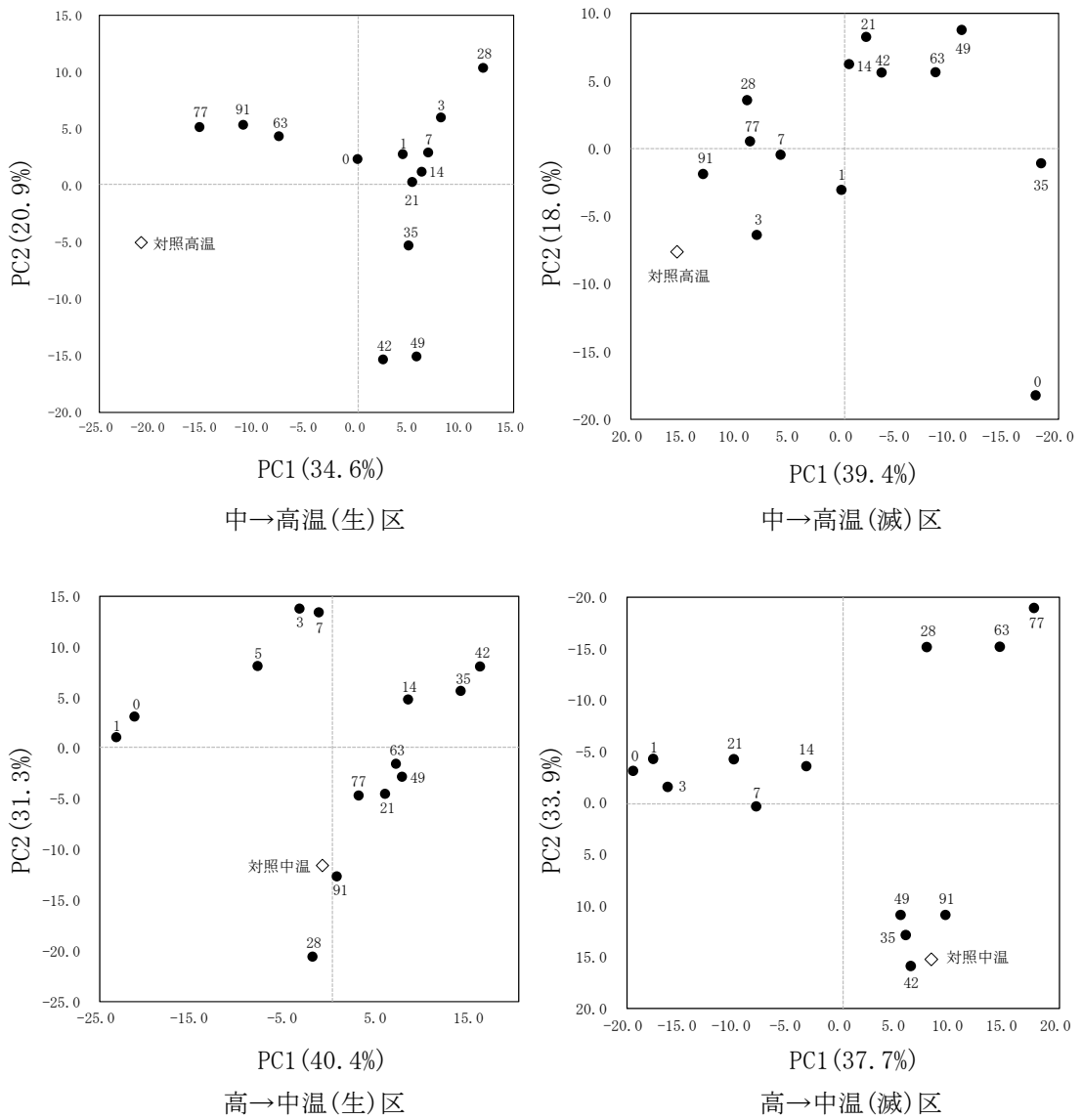


図18 乳牛糞のメタン発酵における細菌群集構造(主成分分析)

PC1およびPC2はそれぞれ第1主成分および第2主成分を示す
 PC1, PC2の括弧内数値は寄与率を示す
 図中の数値は発酵温度変更後の日数を示す

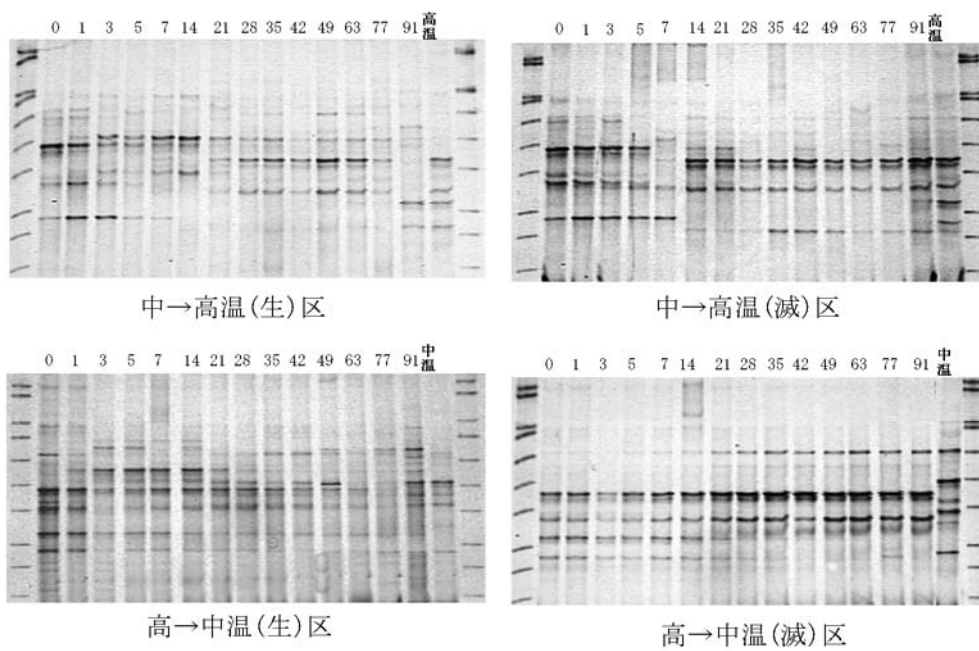


図19 乳牛糞のメタン発酵におけるメタン生成菌群集構造の推移
 数字(0-91)は、発酵温度変更後の経過日数を示す
 中温、高温は、それぞれ対照区を示す

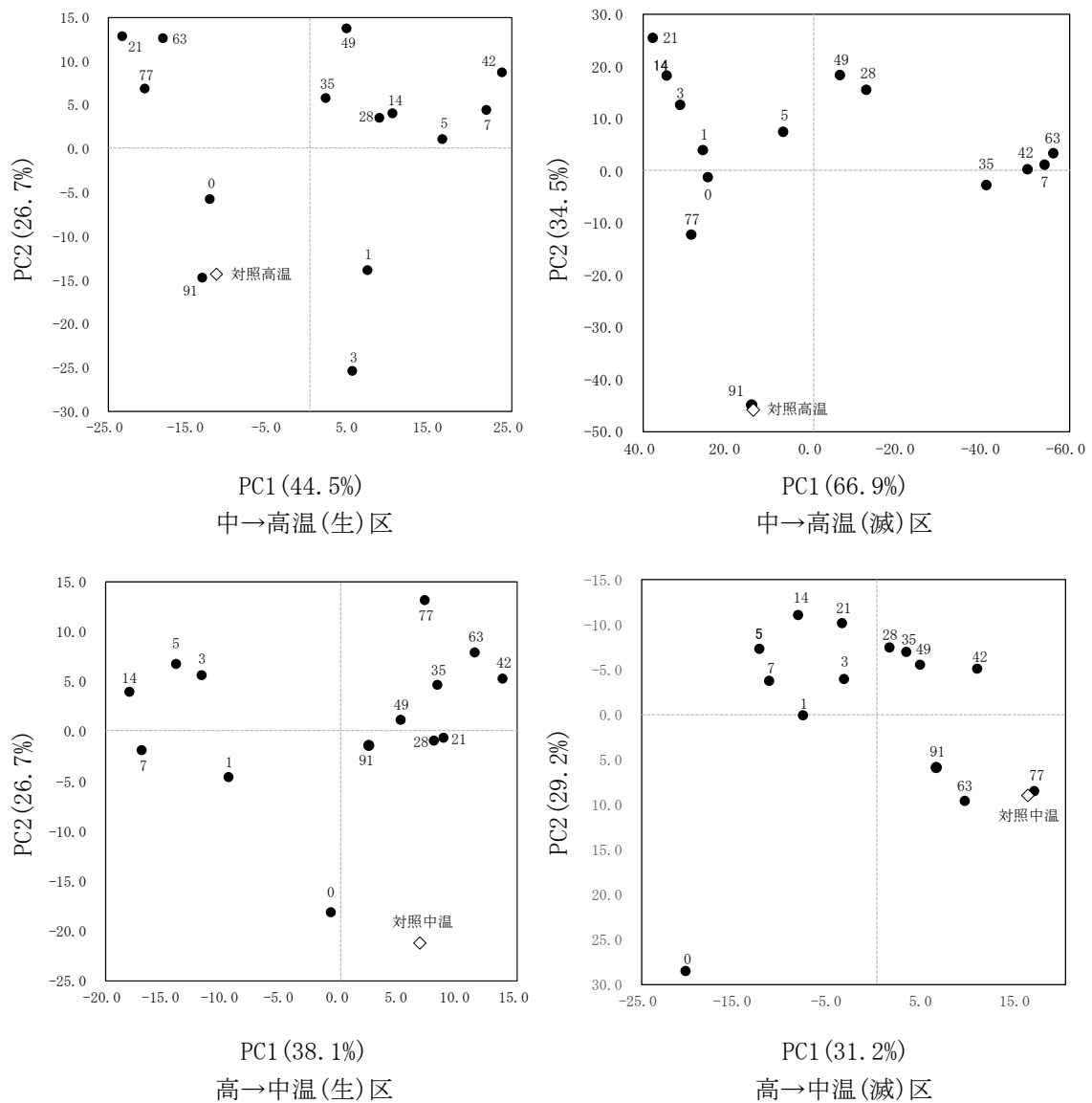


図20 乳牛糞のメタン発酵におけるメタン生成菌群集構造(主成分分析)

PC1およびPC2はそれぞれ第1主成分および第2主成分を示す
 PC1, PC2の括弧内数値は寄与率を示す
 図中の数値は発酵温度変更後の日数を示す

められた。高→中温（生）区の細菌群集の推移では、発酵温度変更後には大きな遷移が認められ、1日後から14日後の群集構造でクラスターを形成した。その後、21日後から91日後までさらに別のクラスターを形成したが、これらは対照の中温に近似することはなかった。高→中温（滅）区の細菌群集の推移では、発酵温度変更直後から大きく遷移し、1日後から49日後の群集構造で大きなクラスターを形成した。63日後から91日後の群集構造は遷移して別のクラスターを形成し、そのクラスターは対照の中温を含むものであった。

4. 考察

家畜排泄物由来の各種病原微生物の死滅について、Golueke[19]は効果のある温度とその時間について報告している。*Escherichia coli*では55°Cで15～20分、*Staphylococcus aureus*では50°Cで10分としている。家畜糞尿や排水処理のためのメタン発酵は、38°C付近の発酵温度中温発酵と50～55°Cで嫌気消化を行う高温メタン発酵があり、高温発酵では有害微生物の低減あるいは殺滅が期待されるが、多くのメタン発酵設備は中温発酵が選択されている。高温発酵の温度環境は*E. coli*などの病原微生物は死滅に至るレベルであり、発酵温度に変更が加えられることで問題が発生しないか検討した。

本研究において、乳牛糞での高温メタン発酵でpH 8.8前後、また中温発酵ではpH 8.3前後で推移しており、発酵温度変更後に速やかに変更された発酵温度の定常のpHを示した。多くのメタン生成菌の生育至適pHは中性域であることから、極端にアルカリ性に傾くこと避けたいところであるが、乳牛糞尿のメタン発酵では窒素成分濃度が高く、アンモニウムや重炭酸塩の影響でアルカリ性を示す傾向にある。さらに高温発酵条件では、中温発酵よりも代謝が速いため、ややアルカリ性が強くなる傾向がある。Liら[33]は、メタン発酵における安全性について、中温メタン発酵では、アンモニウム濃度4,500～5,000 mg/L以下、高温発酵では2,500 mg/L以下と報告している。本研究ではアンモニウム濃度は計測していないが、高温発酵が選択されない理由の一つと考えられる。

メタン生成菌は水素利用性メタン生成菌と酢酸利用性メタン生成菌が存在す

る。本研究では VFA 濃度の推移を追跡したが、酢酸利用性メタン生成菌の基質を追跡するのではなく、発酵の異常をモニターするためである。Hill and Cobb [24]は、安定的なメタン発酵条件を見出すために VFA について調べており、酢酸に対するプロピオン酸の濃度の比 (A/P 比) が 1.4 以上ではメタン発酵が抑制されると報告している。本研究において、中温から高温に発酵温度を変更した試験区では温度変更 14 日後に A/P 比が 1.4 を超えたが一時的であったものと推察される。しかし、高温から中温に発酵温度を変更した試験区において、高→中温 (生) 区では発酵温度変更 7 日後から 28 日後、高→中温 (滅) 区では発酵温度変更 14 日後から 42 日後までと長期間に渡って A/P 比が 1.4 を超えていた。VFA のモニタリングにおいて、酢酸およびプロピオン酸の濃度の変動から発酵温度変更によるインパクトが顕著に現れたことが明らかとなった。

メタン発酵では中温発酵と高温発酵の消化液中に存在する微生物群集構造は異なる。つまり発酵温度を変更すれば変更後の温度が最適温度である微生物を優占種とする微生物群集構造が形成されると推察された。しかし、本研究でのメタン生成菌群集構造を解析した結果では、高→中温区において試験期間を通じて優占種として検出される高温性メタン生成菌のバンドが存在していた。91 日間も優先種として群集構造を形成したことは興味ある新たな知見であった。この高温性メタン生成菌が中温発酵に変更された消化液中で如何なる役割を担っているのは今後の研究に残された課題である。主成分分析の結果からメタン生成菌と細菌の群集構造の遷移速度を比較するとメタン生成菌の方が遅いという結果となった。一般に、メタン生成菌の増殖速度は細菌よりも遅いとされていることから、今回の実験において Archaea 群集構造の遷移が遅くなった要因はメタン生成菌の増殖速度の差に起因しているものと考えられた。

中温発酵から高温発酵へ変更した場合は高温発酵から中温発酵に変更する場合よりも速く異常発酵から回復した。このことは、高→中温区で高温性メタン生成菌が優占種として存在したことも一要因と考えられる。メタン生成菌の基質は中温性および高温性に共通している。このため中→高温区では、中温性メタン生成菌が淘汰されて高温性メタン生成菌が速やか増殖したのに対して、高→中温区では残存していた高温性メタン生成菌と中温性メタン生成菌の間で基質の競合が起こり、中温性メタン生成菌の増殖が遅れたことが高→中温区の回

復を遅れさせた原因と推察される。VFA 濃度，バイオガス発生量の結果からも発酵温度を上昇させるより下降させる場合の方がより悪影響を及ぼすことが示唆された。

本研究により、メタン発酵において異常発酵から回復するのが最も速いのは pH であり、次にバイオガス組成、続いて VFA 濃度およびバイオガス発生量が回復し、最後に微生物群集構造が安定することが明らかとなった。稼働されているバイオガスプラントでは観測が容易なバイオガスや VFA を状態評価の指標としている用いることが多い。しかし、バイオガスや VFA が安定した状態であっても微生物が不安定な状態であれば、わずかな負荷の増加によって異常発酵に陥ることが予想されるため、それらのみでメタン発酵の発酵状態の評価を実施することは不十分であることが本研究から明らかとなった。

5. 小括

乳牛排泄物の嫌氣的処理（メタン発酵）の過程において、発酵温度変更の影響を明らかにするために、発生バイオガスおよびメタン発酵消化液の性状に加え、メタン発酵消化液中の細菌群集およびメタン生成菌群集構造の遷移をモニタリングし、発酵温度変更からの安定的回復に至る過程での微生物生態学的群集構造を解析した。中温（38℃）で安定的なメタン発酵が行われていた発酵槽を高温（55℃）環境に、高温（55℃）で安定的なメタン発酵が行われていた発酵槽を中温（38℃）環境に急変させた。

発酵温度の変更後、全てのメタン発酵消化液の pH はおよそ 1 週間で変更後の対照温度と同値の pH に変化し、その後安定して推移した。メタン発酵消化液の VFA の推移において、発酵温度変更 1 週間後で、酢酸濃度よりもプロピオン酸濃度が高まる現象、いわゆる異常発酵が認められた。その異常発酵からの回復は、早い順に、中→高温（生）区と中→高温（滅）区が 21 日後に、高→中温（生）区が 35 日後に、高→中温（滅）区が 49 日後に回復した。発生バイオガスの推移において、発酵温度の変更後は全ての実験区でバイオガス発生量は激減した。発生バイオガス量が安定したのは、中→高温（生）区と中→高温（滅）区が発酵温度変更 14 日後であり、高→中温（生）区が 35 日後に、高→中温（滅）

区が 63 日後に回復した。バイオガス中のメタン濃度において、発酵温度変更直後に濃度低下および上昇が認められ、メタン濃度 55~60%程度に安定したのは、中→高温（生）区と中→高温（滅）区が発酵温度変更 7 日後であり、高→中温（生）区および高→中温（滅）区は比較的安定していた。

細菌群集構造において、中温発酵を高温環境に変更した条件で、対照とする高温維持した細菌群集構造と近似するには、中→高温（生）区および中→高温（滅）区では 77 日の時間が必要であった。しかし、高温発酵を中温発酵に変更した条件では、比較的早期（高→中温（生）区では 28 日、高→中温（滅）区では 35 日）に対照とする中温維持した細菌群集構造と一時的に近似するが、安定性は認められなかった。メタン生成菌群集構造において、中温発酵を高温環境に設定した条件で、対照とする高温維持環境のそれと近似するには、中→高温（生）区および中→高温（滅）区ともに、91 日に時間を要した。高温発酵を中温発酵に変更した条件では、高→中温（滅）区が 77 日後に近似したが、高→中温（生）区においては、91 日後でも近似する傾向が認められなかった。

メタン発酵の発酵温度の中温と高温を変更した場合、pH や発生バイオガス量およびメタン濃度の安定回復は比較的早いですが、VFA である酢酸およびプロピオン酸濃度からみた異常発酵では安定回復に 3 週間から 7 週間を要した。さらに、微生物群集の回復には最も時間が必要であり、細菌よりもメタン生成菌の安定回復には 3 ヶ月以上を必要とすることが明らかとなり、メタン生成菌の増速速度に起因するものと考えられた。

第Ⅲ章

乳牛糞の嫌気および好氣的分解産物の敷料利用への衛生学的評価

1. 序文

乳牛糞尿処理の一つに嫌氣的分解、いわゆるメタン発酵がある。閉鎖系の発酵槽（バイオガスプラント）で分解を促進するため、糞尿の悪臭が低減し、副次的に発生するメタンガスをエネルギーとして利用できる利点があるが、初期投資のコストが高額であり、広く生産農場への導入には解決されるべき課題がある[32]。乳牛糞尿の嫌気消化では、各種有機物が低分子化され無機化される。糞と尿が混合したものはスラリー状であるが、十分な発酵後には、消化液と呼ばれる流動性のある液肥となる。しかし、リグニンなど木質系有機物は消化されず、消化液の固形分として残存している[37]。

家畜糞の堆肥化では、水分調節のための副資材（オガクズ・稲わらや麦稈）が必要不可欠であるが、堆肥化にのみ使用されるものではなく、最初に牛床の敷料として利用した後で、堆肥化に応用されるのが一般的である[17]。このような副資材は安定的な供給が見込まれず、入手し得たとしても高価格で取引されており、畜産農家、特に酪農家や肉牛農家では経済的な負担となっているのが現状である[26]。

ある酪農場は、乳牛糞尿をメタン発酵させるバイオガスプラントを導入し、メタン発酵消化液を固液分離し、未消化有機物の固形分を好氣的処理することにより、牛床の敷料に応用している。多頭化飼育に伴い、敷料確保が難しく、その購入にもおいても経費を含めて解決すべき課題があるが、この再生敷料に期待が寄せられている。乳牛糞由来であることから、衛生面が懸念され、特に環境性乳房炎原因微生物によるウシ乳房炎への影響が危惧されている。この再生敷料の製造工程には、メタン発酵の嫌気消化液固形分を好氣的に処理する過程が組み込まれている。この意味するところは、いわゆる堆肥化処理と同義であり、高温化することで刺激臭であるアンモニアや水分を除去するとともに環境性乳房炎原因微生物の制御を意図するものである。

他に類を見ないこのような再生敷料の衛生学的評価のために、メタン発酵消化液の固液分離直後から好氣的処理が完了した敷料（Composted Manure Solids：CMS）となるまでの細菌群集構造の遷移の解析意義は大きい。本章では CMS 調製工程中の主要な細菌のモニタリングを行うとともに、環境性乳房

炎原因微生物の動態を検討した。

2. 材料および方法

(1) 材料

北海道江別市内のある牧場のフリーストール牛舎からの乳牛糞尿をメタン発酵させた消化液の固形物が再生敷料として完成するまでの工程から採取したものを材料とした。なお、この調査は、夏季（8月）および冬季（2月）の二季に分けて行った。

(2) CMS 調製工程の概要

CMS 調製工程の概略を図 21 に示した。固液分離した直後の固形物と再生敷料調製終了まで、2日毎に採取をおこなった。分離直後の固形物をC0とし、その後、二日毎の切り返しの度に、経過2, 4, 6, 8日後までをそれぞれC1~C4とした。またC0~C4までの分析試料は、堆肥から5点を採取した。

(3) 分析

1) 温度

CMS の温度は、サーモレコーダーを用いて10分間隔で8日間記録した。堆積物の山のほぼ中央にセンサーを刺入して、中心部の温度を測定した。

2) pH

CMS の pH は第1章2.(3)2) に準じて行った。

3) 水分含量

CMS の水分含量は、定法である105°Cで48時間乾燥させた蒸散水分量で換算した。

(4) 細菌群集構造

①試料からの RNA 抽出

第1章の細菌群集の①に準じて行った。

②RT-PCR

この実験では CMS 調製工程が短期となるため、活性化している主要な細菌群を対象とするために RNA を鋳型とし、RT-PCR を行った。細菌の 16S r RNA を対象に、QIAGEN One Step RT-PCR Kit (QIAGEN, USA) を使用した。プ

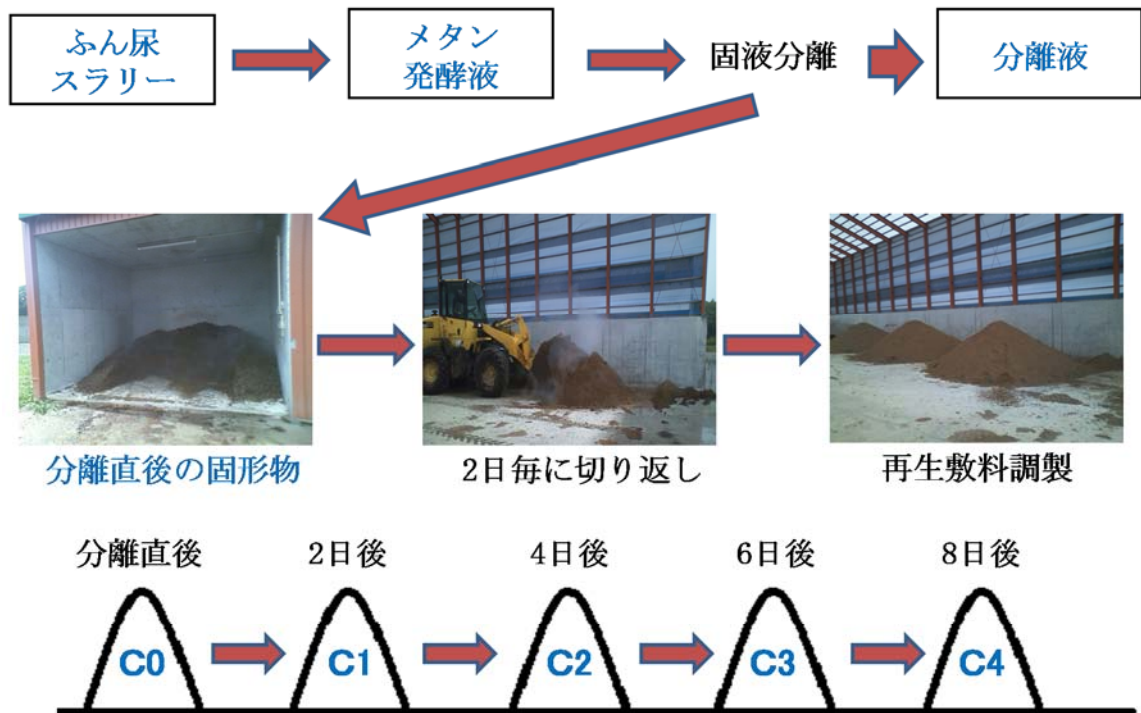


図21 乳牛糞のメタン発酵消化液固形分からの再生敷料の調製工程

ライマーは Bact-968-984F+GC Clamp プライマー(5'- CGCCCGGGGCGCGC
CCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC -3') と
Bact-1401-1378R プライマー (5' - CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG -3')
のペアを使用した。逆転写反応は 50°C 30 分間とし、95°C 15 分間; 1 cycle,
94°C 30 秒間, 55°C 30 秒間, 72°C 1 分間 ; 30 cycle, 72°C 10 分間 ; 1
cycle とした。PCR 後の反応液は 2 %アガロースゲル電気泳動で増幅を確認し
た。QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, USA) を用いて精製を行い、
DNA の純度と濃度を NanoDrop 2000 (サーモフィッシャーサイエンティフィ
ック, 横浜) で測定した。

③DGGE

DGGE は第 1 章の細菌群集構造の③に準じて行い、アクリルアミド濃度を
6%、DNA 変性剤の濃度勾配は 50%から 70%と改変し、50V, 18 時間の電気
泳動条件で行った。

④DGGE の DNA バンドの切り出しとシーケンス解析

第 1 章の細菌群集構造の④に準じた。

⑤群集構造解析

DGGE 写真をレーン毎に DNA バンド強度を数値化するために、画像解析ソ
フト (Gel-Pro Analyzer ®, 株式会社プラネトロン, 東京) を使用した。数値
化したデータでの主成分分析は、R Project Contributors の R 言語 (R i386
3.4.2) を利用して解析した。

(5) 乳房炎原因微生物

1) CMS 調製過程の乳房炎原因微生物

①対象細菌

調査対象とする細菌は、ウシ乳房炎原因微生物の主なものとして、伝染性乳
房炎原因微生物の *Staphylococcus aureus* (SA)、環境性乳房炎原因微生物のコ
アグララーゼ陰性 Staphylococci (coagulase negative Staphylococci : CNS) ,
Escherichia coli (*E. coli*) , 大腸菌群 (Coliforms) , Streptococci ,
Enterococci & *Streptococcus uberis* (*S. uberis*) を対象とした。

②培地

SA, CNS は卵黄加マンニット食塩培地(日水製薬株式会社、東京)、*E. coli*お

よび Coliforms はクロモカルトコリフォーム寒天培地(メルク・ジャパン株式会社、東京)、Streptococci はクロモアガーオリエンタシオン寒天培地(関東化学株式会社、東京)、Enterococci & *S. uberis* は改良型エドワード寒天培地(関東化学株式会社、東京)をそれぞれ用いた。

③培養

SA および CNS は 37°C・2 日間培養、*E. coli* および Coliforms, Streptococci、Enterococci & *S. uberis* は 37°C・1 日間培養とした。

④生菌数の算出

生菌数の算出は定法の希釈平板にて行った。コロニーの識別は製造者の指示書に準じて実施した。卵黄加マンニット食塩培地上に卵黄反応陽性コロニーを SA と判断し、卵黄反応陰性のコロニーを CNS とした。クロモカルトコリフォーム寒天培地では、濃い紫色のコロニーを *E. coli* と判定し、サーモン色から赤色のコロニーを Coliforms としてカウントした。クロモアガーオリエンタシオン寒天培地上に検出された青緑色および白色の小コロニーを Streptococci と判定しカウントした。また、改良型エドワード寒天培地では、エスクリン陽性反応のコロニーを Enterococci & *S. uberis* として計測した。

⑤統計解析

統計解析は、R(ver.3.0.2)の l m 関数を用いた。得られたコロニー数を対数化し、経過日数の違いを要因とする一元配置分散分析と Tukey の方法による多重比較をおこない、有意差検定を行った。

3. 結果

1) RT-PCR-DGGE による細菌群集構造解析

夏季試料での RT-PCR-DGGE により検出されたバンドパターンは、固液分離直後の CMS (C0) から第一切り返し後の CMS (C1) および第二切り返し後の CMS (C2) にかけて大きく変化した。CMS (C3) から CMS (C4) にかけては類似したバンドパターンであった (図 22)。夏季試料での RT-PCR-DGGE DGGE より、特徴的な DNA バンドを切り出し、塩基配列を決定した。得られた塩基配列を DDBJ の BLAST にて細菌名を検索した結果、A は 99%の相同性

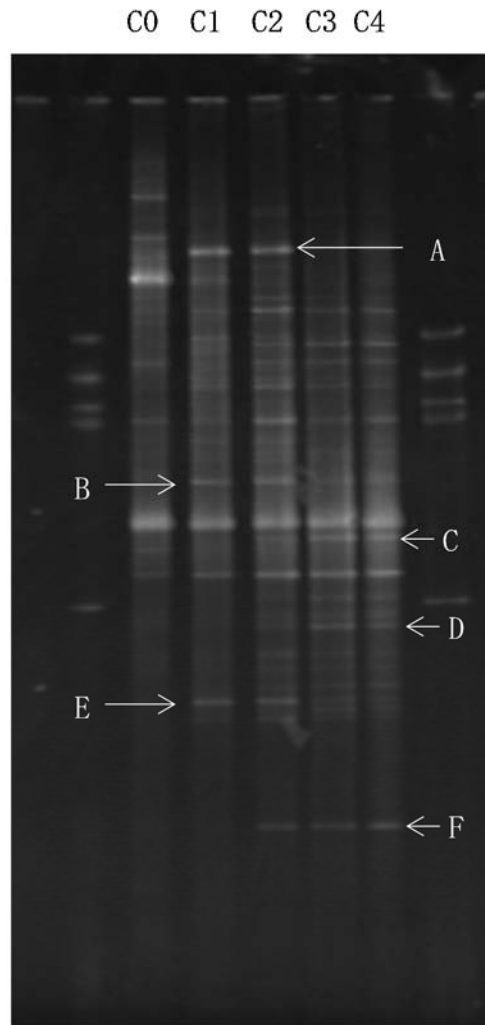


図22 乳牛糞尿のメタン発酵消化液固形分からの敷料調製工程の細菌群集構造の遷移 (夏季)

- A : *Pseudomonas* sp. (99%)
- B : *Thioalkalivibrio sulfidophilus* (96%)
- C : *Thioalkalivibrio sulfidophilus* (90%)
- D : *Thermacetogenium phaeum* (93%)
- E : *Pseudomonas bauzanensis* (99%)
- F : *Deferrisoma palaeochoriense* (92%)

記号:示したDNAバンドの細菌名および相同性割合

で *Pseudomonas* sp. と割り当てられ、B および C はそれぞれ 96% および 90% の相同性で *Thioalkalivibrio sulfidophilus* と割り当てられた。D は 93% の相同性で *Thermacetogenium phaeum*, E は 99% の相同性で *Pseudomonas bauzanensis*, F は 92% の相同性で *Deferrisoma palaeochoriense* と割り当てられた。検出された細菌名からも、嫌気環境から好気環境への推移およびアルカリ・高温環境への移行を示していることが明らかとなった。また、冬季試料での RT-PCR-DGGE により検出されたバンドパターンは、夏季試料の最近群集構造の推移と酷似していた (図 23)。

DGGE を元に核酸バンドの存在を行列とし数値化し、主成分分析で解析した結果、両季節の RNA-DGGE のバンドパターンは固液分離直後から調製工程後期にかけて著しく変化した (図 24)。CMS (C0) から CMS (C1) の変化が最も大きく、それは夏季および冬季とも同様であった。さらに調製工程進行に伴って、変化は減少し、CMS (C3) から CMS (C4) の類似性は酷似していた。

2) CMS 調製過程の乳房炎原因微生物

(1) CMS の温度, pH および水分含量

夏季および冬季における、CMS 調製過程における CMS の水分含量, pH および試料採取時の温度の値を表 1 に示した。開始時の CMS (C0) の温度はメタン発酵の発酵温度に近い 40°C であった。夏季における CMS 調製過程の品温は 63°C から 74°C という非常に高い温度が維持された。冬季においても、氷点下の外気温にも拘わらず、夏季同様に高い品温を維持した (67°C ~ 71°C)。pH においては、夏季および冬季とも、弱アルカリで推移していた。CMS (C0-C4) の水分含量は、夏季では 69.6% から 61.7%、冬季では 73.2% から 66.2% へとそれぞれ減少した。

(2) 夏季および冬季における、スラリー, 消化液および CMS 中の環境性乳房炎原因微生物の変化

夏季および冬季における糞尿スラリー, 消化液および CMS (C0-C4) 中の *E. coli*, Enterococci & *S. uberis*, Coliforms, CNS および Streptococci を含む主な乳房炎原因微生物の生菌数を計測した。Streptococci (2.6×10^8 cfu/g) は、CNS (1.7×10^8 cfu/g) に次いで、糞尿スラリーと消化液中に最も頻繁に検出された (表 2)。夏季における、糞尿スラリー中の Enterococci & *S. uberis*,

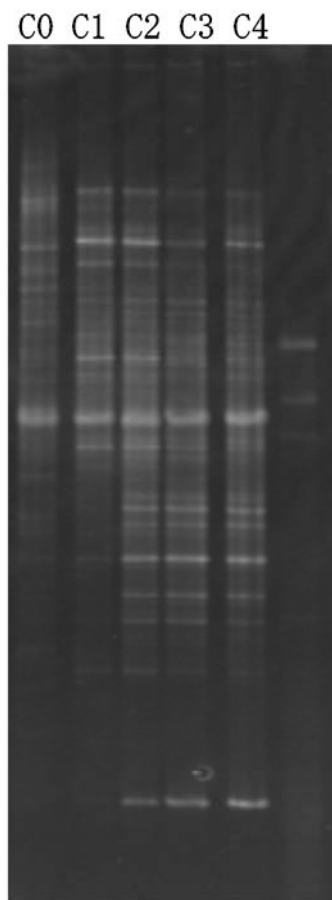


図23 乳牛糞尿のメタン発酵消化液固形分からの敷料調製工程の細菌群集構造の遷移（冬季）

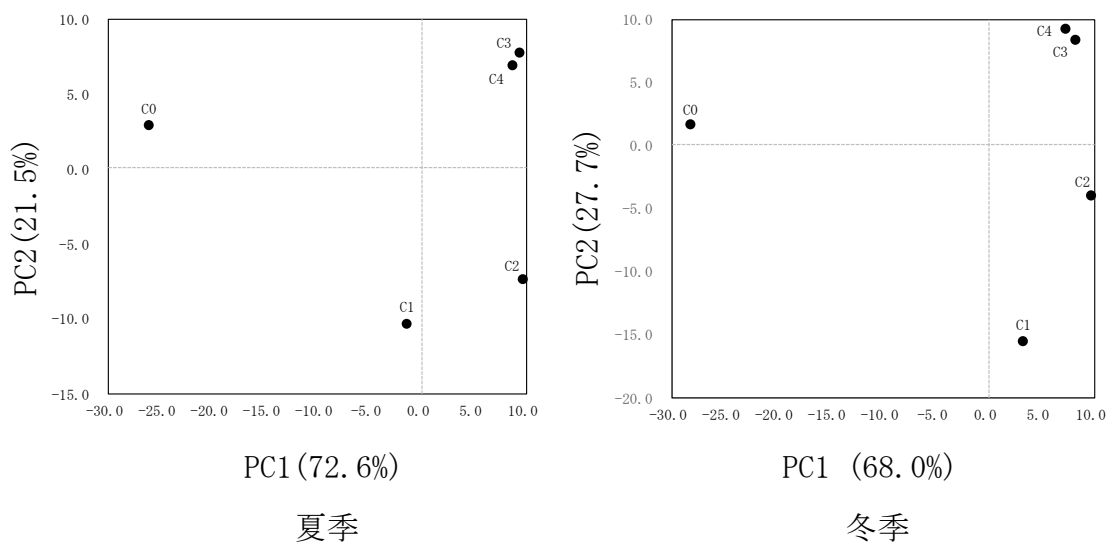


図24 乳牛糞尿のメタン発酵消化液固形分からの
敷料調製工程における細菌群集構造の主成分分析

PC1およびPC2はそれぞれ第1主成分および第2主成分を示す
 PC1, PC2の軸の数値は寄与率を示す
 C0-C4はCMSの調整ステージを示す

表 1 8日間、2日毎の切り返しによって、堆肥化处理された消化液固形物の温度、pHと水分含量の変化

	夏季			冬季		
	温度 (°C)	pH	水分含量 (%)	温度 (°C)	pH	水分含量 (%)
C0	40	9.1	69.6	40	8.5	73.2
C1	63	9.2	67.5	71	8.7	73.0
C2	74	9.2	67.1	70	8.7	70.7
C3	63	9.3	65.2	69	8.9	67.5
C4	67	9.4	61.7	67	9.0	66.2

C0: バイオガスシステムの嫌気的な消化液を固液分離した固形分

C1-C4: 8日間、2日毎に切り返しされ、堆肥化された糞固形物

表2 乳牛糞尿スラリー，メタン発酵消化液，固液分離した液分と固分中の主要な乳房炎起因病原の細菌数

(n=3)

季節	試料	SA	CNS	<i>E. coli</i>	Coliforms	Streptococci	Enterococci & <i>S. uberis</i>
夏季	糞尿スラリー	ND	8.15±0.15	5.61±0.31	6.48±0.19	8.37±0.16	6.80±0.07
	メタン発酵消化液	ND	6.08±0.09	4.38±0.04	4.85±0.15	6.68±0.37	5.72±0.05
	固液分離液分	ND	6.22±0.09	4.57±0.05	5.19±0.08	6.50±0.32	6.45±0.15
	固液分離固分	ND	5.30±0.06	3.42±0.18	4.15±0.25	6.25±0.23	5.67±0.05
冬季	糞尿スラリー	ND	9.00±0.38	7.19±0.61	7.19±0.61	9.81±0.02	6.64±0.26
	メタン発酵消化液	ND	8.95±0.28	6.64±0.29	6.64±0.29	8.80±0.28	6.02±0.31
	固液分離液分	ND	8.99±0.15	6.31±0.04	6.31±0.04	7.60±0.89	7.12±0.27
	固液分離固分	ND	5.88±0.03	3.95±0.11	3.95±0.11	6.38±.004	5.98±0.02

単位：log CFU / g - 乾物(DM) ± 標準誤差(S.E.)

SA: *Staphylococcus aureus*, CNS: coagulase negative staphylococci, *E. coli*: *Escherichia coli*, *S. uberis*: *Streptococcus uberis*.

ND (not detected) : 検出限界以下

Coliforms および *E. coli* の数は、それぞれ 6.5×10^6 cfu/g, 3.7×10^6 cfu/g, および 6.5×10^5 cfu/g であった。夏季において、CMS (C4) 中の CNS, *E. coli*, Coliforms, Enterococci & *S. uberis* と Streptococci の細菌数は、CMS (C0) や CMS (C1) 中のそれらよりも有意に ($P < 0.05$) 減少した (図 25)。夏季において、これらの細菌は 8 日間で CMS (C4) 中で著しく減少した。夏季および冬季において、糞尿スラリー、消化液あるいは CMS 中に、SA は検出されなかった (図 26)。冬季において、CMS (C4) 中の Streptococci, CNS, *E. coli*, Coliforms と Enterococci & *S. uberis* の細菌数は、CMS (C0) 中のそれらよりも有意に ($P < 0.05$) 減少し、冬季では、CMS (C4) 中の Coliforms の細菌数は、CMS (C0) と近似していた。CMS (C4) 中の Streptococci, CNS, Enterococci & *S. uberis* と Coliforms の細菌数は、それぞれ、 2.7×10^4 , 2.0×10^4 , 6.8×10^3 , 1.1×10^4 cfu/g であり、*E. coli* は検出されなかった。

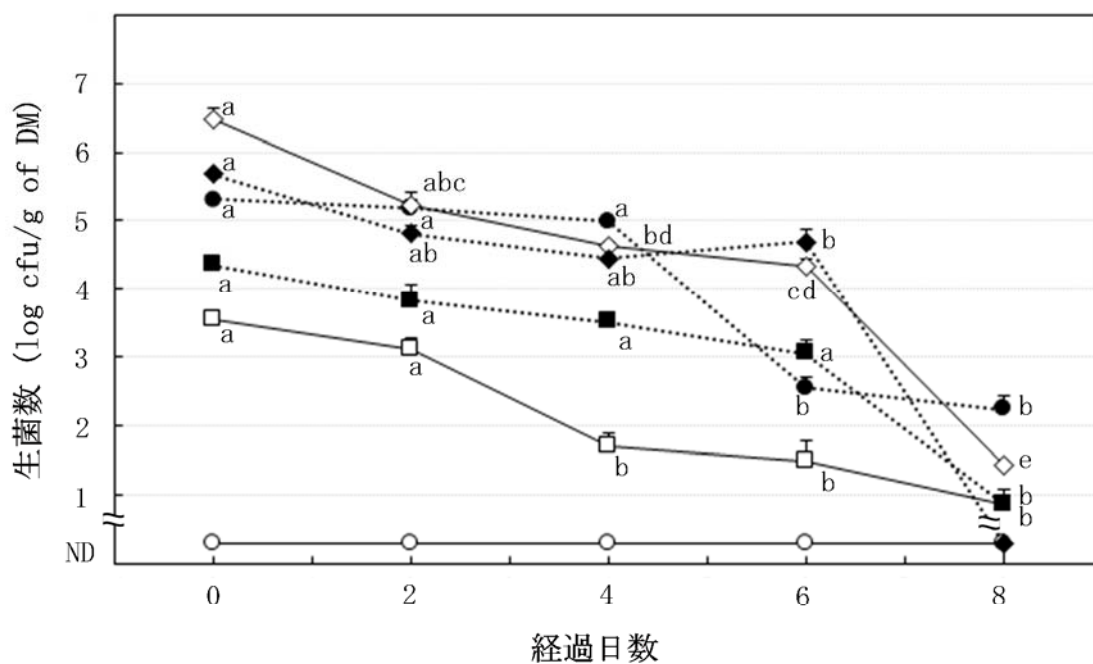


図25 夏季の再生敷料の調製工程における堆肥化処理された糞固形分中の乳房炎原因細菌数の推移

- : *Staphylococcus aureus* (SA),
- : coagulase negative staphylococci (CNS),
- : *Escherichia coli*,
- : Coliforms (CO),
- ◇: Streptococci,
- ◆: Enterococci & *S. uberis*

ND (not detected): 検出限界以下
 成績: 平均±標準誤差
 異なる符号間で有意差 ($P > 0.05$)

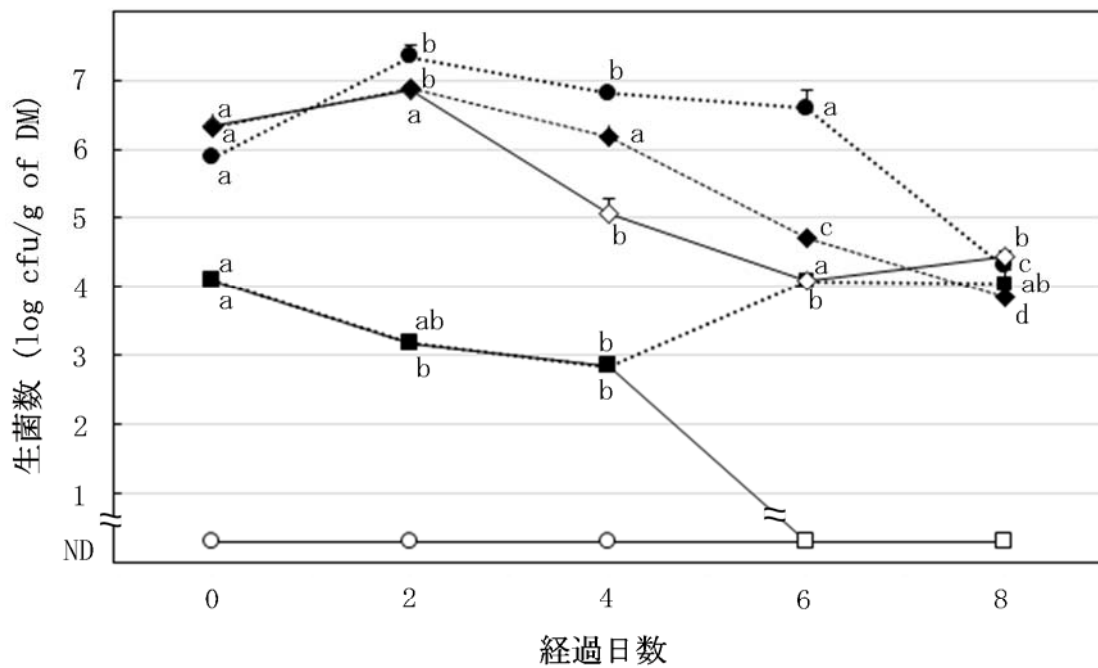


図26 冬季の再生敷料の調製工程における堆肥化处理された糞固形分中の乳房炎原因細菌数の推移

- : *Staphylococcus aureus* (SA),
- : coagulase negative staphylococci (CNS),
- : *Escherichia coli*,
- : Coliforms (CO),
- ◇: Streptococci,
- ◆: Enterococci & *S. uberis*

ND (not detected): 検出限界以下
 成績: 平均±標準誤差
 異なる符号間で有意差 ($P > 0.05$)

4. 考察

欧州では持続可能な酪農のために、環境に配慮した負荷の少ない処理方法として、バイオガスプラントによって発生するメタン発酵消化液は適切に取り扱われていると評価されている[4]。乳牛に対する再生敷料の有効な利活用は、酪農場における乳牛の福祉（快適性）と収益性および持続可能性において重要な内容を有しているものと考えられる。本研究では、乳牛における乳房の健康問題のリスクにおいて、バイオガスシステムによって生産されるメタン発酵消化液からの CMS の効果を評価した。

CMS 調製過程における細菌群集構造の遷移において、2日毎の切り返しを含む8日間を対象にモニタリングを行った。比較的短い期間の細菌群集構造を評価するには、細菌の DNA ではなく RNA を対象に RT-PCR-DGGE による解析が有効であることが報告されている[36]。本研究において RT-PCR-DGGE により、夏季および冬季の群集構造およびその変遷に大きな相違がないことが明らかとなったことから、厳冬期でも積極的な堆肥化進行が成し遂げられ、通年、安定した CMS 生産が可能であることを確認し得た。

本研究においては、伝染性乳房炎の原因病原体である SA は、乳牛糞尿スラリー、メタン発酵消化液あるいは CMS では検出されなかった。CNS と環境性連鎖球菌(other Streptococci ; OS)は、乳牛の環境性乳房炎の共通の原因微生物である。CNS、Coliforms に代表される主要な乳房炎原因微生物は一般に酪農場の環境に広く認められる[45]。本研究の知見は、これを確認するものであり、CNS、OS や Coliforms は糞尿スラリー、消化液および CMS 中に共通して存在していることを明らかにした。CNS、OS や Coliforms 数は、糞尿スラリーやメタン発酵消化液よりも CMS 中では有意に低かった。糞尿スラリーとメタン発酵消化液中の細菌数に違いはなかったが、好気状態で CMS (C1) よりも好気分解の進んだ CMS (C4) 中で細菌が有意に少ないことが認められた。

Cole, K.J. and Hogan, J.S. [11] は新鮮糞を固形分とそれを4週間堆肥化した CMS との乳房炎関連細菌の細菌数の比較を行い、*Klebsiella* spp.は有意な減少が認められなかったが、Coliforms と Streptococci は、有意に減少し 10^3 レベルとなったと報告している。乳房炎原因微生物は嫌気消化後のメタン発酵消

化液中に明確に確認される。本研究で用いられたバイオガスシステムは約 42°C で運転している中温メタン発酵システムであり、嫌気性の環境は、CNS、Streptococci や Coliforms を含む中温性細菌の生残においては大きなインパクトとは考え難い。本研究では 8 日間の堆肥化過程で、CNS、OS と Coliforms の細菌数では、CMS (C1) よりも CMS(C4)中の方が有意に低く、夏季では 10^1 レベル、冬季では 10^4 レベルであった。Barberg ら[5], Klaas ら[29] および Black ら [7]の報告によると、敷料堆肥、いわゆる単なる戻し堆肥の温度は、材料消毒のために必要な 55~65°Cに達していないとしている。また、45°Cから 55°Cの温度は、材料の劣化を最大にし、55°C以上 では浄化を促進するという報告もある[46]。本研究における、C1 から C4 の CMS で観測された 63~74°C という温度は、一般的な病原微生物の消毒殺滅に要求される 55-65°Cの閾値[46]を明らかに超えていることが明らかになった。

乳房炎原因微生物にとって最適な状態は 15°Cと 45°Cの範囲にあり、これらの細菌は 45°C以上で死滅するとしている[50]。Imbeah[27]は堆肥敷料の高温が堆肥化効率にとって、鍵となる管理戦略と報告している。55°Cから 65°C以上の温度は病原殺滅を促進する[46]。他方、Black ら[8]は、堆肥の衛生化のための条件を満たさない牛舎敷料は、 $36.1 \pm 11^\circ\text{C}$ の温度にあると報告した。本研究において、乳房炎原因微生物は、CMS 調製過程において繰り返される繰り返しとともに顕著に減少することが本研究で確認され、CMS の温度は、環境性乳房炎原因微生物の殺滅を満たすものであり、夏季で 63-74°C、冬季で 67-71°Cであった。

本研究で見いだされた CMS の効率的な堆肥化は、開始温度が 40°C付近であることと CMS の調製工程中の低い水分含量（およそ 70%）とが付随しているものと考えられる。また、二日毎の頻繁な繰り返しも好氣的分解が加速したとも考えられる。加えて、pH の上昇は夏季で pH 8.5 から pH 9.4、冬季で pH 8.5 から pH 9.0 の範囲であった。これらの CMS の pH は、固形分の堆肥化において CMS 中でアンモニアと炭酸水素の生成に起因すると考えられる。Diez-Gonzalez F. ら[13] は静置した牛糞尿中で認められる *E. coli* の死滅は、炭酸塩とアルカリ条件の相乗効果によるものと報告している。pH 8 から pH 9 は細菌の生残や生育を抑制することが報告されている[47]。病原細菌はアルカリ条

件で、そして低い水分含量の CMS 中で 63°C以上の温度で不活化される傾向にある。

CMS (C4) 中の細菌数が 10^3 から 10^4 レベルに減少したことは、65°Cを超える高い温度、pH 8~9 のアルカリ性や CMS 自体がスラリーのメタン発酵下での嫌気消化による栄養減少など様々な要因により影響を受けていることが示唆される。また CMS 調製過程における、積極的な切り返しが水分蒸散を促し、水分含量の変化に加えて二次的な要因が相乗効果として微生物学的性状に影響を与えているものと推察される。

材料中 10^6 /g を超える乳房炎起因病原を含む敷料は乳房内感染のリスクを増加させることが報告されている[8, 12, 28]。本研究での CMS (C4) 中の乳房炎起因病原菌の数は、乳房感染の最小リスクに対して容認されるレベル内であった。敷料が乳房の健康と細菌負荷に影響を与えており[25]、敷料の細菌数の最小化は、ウシ乳房炎の制御のために管理戦略の上から重要である[7]。

結論として、CMS の病原の減少は、8日間 63°Cを超える温度と pH8.7 から pH 9.2、および水分含量 62~73%と密接に関係しているように考えられる。これらの結果は乳牛の乳房健康への最小のリスクと想定される再生敷料として用いるためのメタン発酵消化液からの CMS の調製のための有機物分解の促進に関与する好氣的条件の重要性を裏付けるものである。

5. 小括

メタン発酵消化液固形分を堆肥化处理された（2日間隔で8日間、切り返された）固形物（CMS : C1-C4）中の主要な乳房炎原因微生物、pH および水分含量について評価した。Streptococci、CNS および Coliforms の細菌数は、4回切り返された8日後の CMS (C4)中には、夏季では、それぞれ 2.6×10^1 , 1.7×10^2 および 1.0×10^1 cfu/g 検出され、これらの細菌数は固液分離直後および一度切り返された CMS (C1)と比較して著しく減少した($p < 0.05$)。最終段階の CMS (C4)中の細菌数は 10^1 から 1.7×10^2 cfu/g の範囲にあり、それらは乳房炎に対するリスクとして是認されているレベル(1×10^6 cfu/g)に比較して低値であることから、乳房炎に対するリスクはより小さいものであると

評価された。CMS (C1- C4)の温度は、夏季において 63-74°C、冬季においては 70-67°Cであった。CMS(C0- C4) の pH は夏季では pH 9.2(±0.1)、冬季では pH 8.7(±0.2)であった。CMS (C0-C4) の水分含量は、夏季で 69.6 から 61.7%、冬季では 73.2 から 66.2%の範囲にあった。CMS 中の乳房炎原因微生物の有意な減少は、8 日間 63°C以上の温度域、pH 8.7 から 9.2 のアルカリ域、そして水分含量 62%から 73%の物理的環境と密接に関連しているものと考えられる。本研究において、メタン発酵消化液固形分の堆肥化処理された固形物は、乳牛の乳房の健康上の問題を軽減させた再生敷料として価値を有する敷料であることを示している。

総 括

有機性廃棄物としての乳牛排泄物の効果的処理は、乳牛の飼養衛生および動物福祉、酪農経営の持続的展開ならびに環境保全など持続可能性を意図した展開において、その課題の意義は大きい。飼養構造の変遷に伴った乳牛排泄物の効果的な好氣的ならびに嫌氣的処理とその利活用は試行的な状況にあり、その処理と実用化に資する学術情報の集積と評価およびその利用が求められている。

本論文は乳牛糞の好氣的ならびに嫌氣的処理過程における物理的諸要因の影響と微生物群集の遷移の一端を明らかにするとともに有用事例から副産物資材としての敷料化における微生物特性と乳牛の生乳生産衛生に関する衛生学的評価を実施することを目的とした。

第 I 章では、乳牛糞の好氣的処理過程（堆肥化）における微生物群集構造を明らかにすることを目的とし、水分含量の異なる堆肥化過程における堆肥性状の相違および主要な細菌と菌類の群集構造の変遷を検討した。適正水分含量の堆肥化は、温度上昇、pH の速やかなアルカリ化および BOD₅ の減少が認められ、高水分の堆肥化に比べてその相違が明らかになった。堆肥化開始直後に主要な細菌として、*Enterococcus faecalis* と *Streptococcus* sp. が検出され、堆肥の温度上昇の役割を担っているものと推察された。堆肥化の後半に出現する *Kernia geniculotoricha* と相同性の高い DNA が検出され、この糞生菌は堆肥化における腐熟の指標菌になりうる可能性が示唆された。水分含量の違いにより、異なる細菌および菌類群集構造が形成されることが明らかとなり、微生物群集構造解析で得られた情報から堆肥化の進行が把握できるものとなった。

第 II 章では、乳牛糞の嫌氣的処理（メタン発酵）の発酵温度の影響について、中温(38℃)メタン発酵を高温(55℃)環境下に、また、高温(55℃)メタン発酵を中温(38℃)環境に急変させ、バイオガスおよびメタン発酵消化液の性状に加え、細菌およびメタン生成菌の遷移から微生物生態学的群集構造を解析した。消化液の pH は、発酵温度の変更後 1 週間では不安定であったが、その後安定した。メタン発酵消化液の VFA の推移は、発酵温度の変更 1 週間後に、酢酸濃度よりもプロピオン酸濃度が増加する現象、いわゆる異常発酵が認められ

た。この異常発酵において、高温メタン発酵を中温環境下にした試験区よりも中温メタン発酵を高温環境下にした試験区の方が早期に回復することを認めた。バイオガス発生量の安定性では、中温メタン発酵を高温環境下にした試験区は14日後であり、高温メタン発酵を中温環境下にした試験区は35日後となり回復が遅延した。メタン濃度55~60%を安定域とした場合、中温メタン発酵を高温環境下にした試験区は7日後に安定し、高温メタン発酵を中温環境下にした試験区は当初から比較的安定していた。細菌群集構造において、高温発酵を中温環境下に変更した試験区よりも中温発酵を高温環境下に変更した試験区の方が、細菌群集構造の安定性が高い傾向が認められた。さらにメタン生成菌群集構造において、中温発酵を高温環境下に設定した試験区で、対照とする高温維持環境のそれと近似するには、メタン生成菌群集構造の安定には91日以上を要することが明らかとなった。メタン発酵の温度を変更したことで、pHやバイオガス発生量およびメタン濃度の安定回復は比較的早いですが、VFAである酢酸およびプロピオン酸濃度からみた異常発酵からの安定回復には3週間から7週間と長時間を要することが明らかとなった。さらに微生物群集の回復は最も時間が必要であり、細菌よりもメタン生成菌の安定回復には3ヵ月以上の時間を必要とすることが明らかとなり、この理由としてメタン生成菌の増殖速度に起因しているものと推察された。

第III章では、メタン発酵消化液固形分を堆肥化处理した(2日間隔で8日間、切り返し)固形物(Composted Manure Solids: CMS)の性状と主要な細菌の変遷および乳房炎原因菌を検索した。RT-PCR-DGGEによる細菌群集構造の変遷では、夏季および冬季とも酷似しており、このことより外気温の影響を受けないことが明らかとなった。乳房炎原因菌の検証において、Streptococci、CNSおよびColiformsの細菌数は、最終段階のCMS中には、固液分離直後と比較して、夏季では著しく減少した($P < 0.05$)。調製後のCMS中の細菌数は夏季では 10^1 から 10^2 cfu/g の範囲であり、冬季では 10^4 cfu/g レベルであった。それらは乳房炎に対するリスクとして是認されているレベル(1×10^6 cfu/g)に比較して低値であることから、乳房炎に対する危険度はより小さいものと評価された。CMS中の病原細菌の有意な減少は、8日間63°C以上の温度域、アルカリ域のpH および水分含量62%から73%の物理化学的環境と密接に関連し

ていることが推察された。メタン発酵消化液固形分の堆肥化処理された固形物は、乳牛の乳房の健康に対するリスクを軽減させた良好な再生敷料としての価値を有することを示している。

本研究から、酪農場の糞尿資源の好氣的ならびに嫌氣的分解における物理的要因と分解に関わる微生物群集の動態から排泄物処理過程における微生物群集の遷移の一端が明らかとなった。乳牛排泄物の嫌氣的処理に続く好氣的処理の有機物分解過程における堆肥資材の安全性について、乳房炎原因微生物の動態から乳房への感染リスク低減が確認され、副産物資材の衛生学的根拠を提示しその有効性を明らかにした。

謝 辞

本論文は著者が酪農学園大学に赴任後行った研究の成果を学位論文として取り纏めたものである。本研究を遂行するにあたり、多くの方々からの御指導、御助言、御支援、激励のお言葉をいただき、ここにその感謝の意を表します。

稿を終えるにあたり、本論文の取り纏めの機会と適切な御指導、御助言を賜りました酪農学園大学大学院獣医学研究科 獣医衛生学 永幡 肇 教授に深く感謝申し上げます。

本論文の副査として査読いただき、御指導、御助言を賜りました酪農学園大学大学院獣医学研究科 獣医衛生学 樋口豪紀教授、同 獣医細菌学 内田郁夫 教授、ならびに同大学院酪農学研究科 動物資源生産学 森田 茂 教授に感謝申し上げます。

また、本論文をご審査いただいた酪農学園大学大学院獣医学研究科の諸先生に感謝申し上げます。

本研究の端緒より貴重な御助言を賜りました酪農学園大学名誉教授 宮川 栄一 先生に感謝申し上げます。また、本学赴任より叱咤激励を賜りました酪農学園大学名誉教授 故 松井幸夫先生に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行において、支えてくれた妻 岡本由美に感謝申し上げます。

ここに記して感謝の意を表します。

引用文献

1. Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R. and Stahl D.A. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1919-1925.
2. Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
3. Asai, T., Usui, M., Hiki, M., Kawanishi, M., Nagai, H. and Sasaki, Y. 2013. Clostridium difficile isolated from the fecal contents of swine in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **75**: 539-541.
4. Bacenetti, J., Sala, C., Fusi, A. and Fiala, M. 2016. Agricultural anaerobic digestion plants: What LCA studies pointed out and what can be done to make them more environmentally sustainable. *Appl. Energy* **179**: 669-686.
5. Barberg, A.E., Endres, M.I. and Janni, A.K. 2007. Compost dairy barns in Minnesota: A descriptive study. *Appl. Eng. in Agric.* **23**: 231-238.
6. Barrington, S., Choinière, D., Trigui, M. and Knight, W. 2002. Effect of carbon source on compost nitrogen and carbon losses. *Bioresour. Technol.* **83**: 189-194.
7. Black, R.A., Taraba, J.L., Day, G.B., Damasceno, F.A. and Bewley, J.M. 2013. Compost bedded pack dairy barn management, performance, and producer satisfaction. *J. Dairy Sci.* **96**: 8060-8074.

8. Black, R.A., Taraba, J.L., Day, G.B., Damasceno, F.A., Newman, M.C., Akers, K.A., Wood, C.L., McQuerry, K.J. and Bewley, J.M. 2014. The relationship between compost bedded pack performance, management, and bacterial counts. *J. Dairy Sci.* **97**: 2669-2679.
9. Bouskova, A., Dohanyos, M., Schmidt, J.E., Angelidaki, I., 2005. Strategies for changing temperature from mesophilic to thermophilic conditions in anaerobic CSTR reactors treating sewage sludge. *Water Res.* **39**: 1481-1488.
10. Chae, K.J., Jang, A., YimbIn, S.K. and Kima, S. 2008. The effects of digestion temperature and temperature shock on the biogas yields from the mesophilic anaerobic digestion of swine manure. *Bioresour. Technol.* **99**: 1-6.
11. Cole, K.J. and Hogan, J.S. 2016. Environmental mastitis pathogen counts in freestalls bedded with composted and fresh recycled manure solids. *J. Dairy Sci.* **99**: 1501-1505.
12. Cornell Waste Management Institute (CWMI). 2010. Cornell Waste Management Institute. Cornell University, Ithaca, NY; [cited 18 August 2017]. Available from URL: <http://cwmi.css.cornell.edu/useofDMS.pdf>
13. Diez-Gonzalez F., Jarvis, G.N., Adamovich, D.A. and Russell, J.B. 2000. Use of carbonate and alkali to eliminate *Escherichia coli* from dairy cattle manure. *Environ. Sci. Technol.* **34**: 1275-1279.
14. Duffy, G. 2003. Verocytotoxigenic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries. *J. Appl. Microbiol.* **94**: 94-103.

15. El Kader, N.A., Robin, P., Paillat, J.M. and Leterme, P. 2007. Turning, compacting and the addition of water as factors affecting gaseous emissions in farm manure composting. *Bioresour. Technol.* 98: 2619-2628.
16. El-Mashad, H.M., Zeeman, G., van Loon, W.K.P., Bot, G.P.A. and Lettinga, G. 2004. Effect of temperature and temperature fluctuation thermophilic anaerobic digestion of cattle manure. *Bioresour. Technol.* 95: 191-201.
17. Estein, E. 1996. The science of composting. CRC Press. Boca Raton Florida.
18. Fukumoto, Y., Osada, T., Hanajima, D. and Haga, K. 2003. Patterns and quantities of NH₃, N₂O and CH₄ emissions during swine manure composting without forced aeration—effect of compost pile scale. *Bioresour. Technol.* 89: 109-114.
19. Golueke, C.G. 1977. Biological reclamation of solid wastes. Rodale Press, Emmaus Paris.
20. Guan, T.Y. and Holley, R.A. 2003. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness—a review. *J. Environ. Qual.* 32: 388-392.
21. Haga, K. 1998. Animal waste problems and their solution from the technological point of view in Japan. *JARQ.* 32: 203-210.
22. Hancock, D.D., Besser, T.E., Kinsel, M.L., Tarr. P.I., Rice, D.H. and

- Paros, M.G. 1994. The prevalence of *Escherichia coli* O157.H7 in dairy and beef cattle in Washington State. *Epidemiol. Infect.* **113**: 199-207.
23. Haruna, M., Sasaki, Y., Murakami, M., Mori, T., Asai, T., Ito, K. and Yamada, Y. 2013. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates from beef cattle and pigs in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **75**: 625-628.
24. Hill, D.T. and Cobb, S.A. 1993. Modeling predictive indicators in animal waste methanogenesis. *Trans. Am. Soc. Agric. Eng.* **36**: 879-885.
25. Hogan, J.S. and Smith, K.L. 1997. Bacteria counts in sawdust bedding. *J. Dairy Sci.* **80**: 1600-1605.
26. Husfeldt, A.W. and Endres, M.I. 2012. Association between stall surface and some animal welfare measurements in freestall dairy herds using recycled manure solids for bedding. *J. Dairy Sci.* **95**: 5626-5634.
27. Imbeah M. 1998. Composting piggery waste: A review. *Bioresour. Technol.* **63**: 197-203.
28. Jasper, D.E. 1980. The coliform mastitis enigma: Cow sawdust, softwood shavings, bedding. pp.23-34. *In*: Proceeding of International Congress on Diseases of Cattle (Mayer E.), Bregman Press, Haifa, Israel.
29. Klaas, I.C., Bjerg, B.S., Friedmann, S. and Bar, D. 2010. Cultivated barns for dairy cows *In*: An option to promote cattle welfare and environmental protection in Denmark? *Dansk veterinærtidsskrift* **93**: 20-29.

30. Krupa, S.V. 2003. Effects of atmospheric ammonia (NH₃) on terrestrial vegetation: a review. *Environ. Pollut.* **124**: 179-221.
31. Labatut, R.A., Angenent, L.T. and Scott, N.R. 2014. Conventional mesophilic vs. thermophilic anaerobic digestion: a trade-off between performance and stability?. *Water Res.* **53**: 249-258.
32. Li, Y., and Kobayashi, T. 2010. Application and new developments of biogas technology in Japan. pp.35-58 *In*: Environmental anaerobic technology. (Herbert H.P. Fang) Imperial College Press, Covent Garden London.
33. Li, Y., Park, S. Y., and Zhu, J. 2011. Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **15**: 821-826.
34. Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H. and Forney, L.J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4516-4522.
35. MAFF, 農林水産省第4回バイオマス活用推進会議. 2012. <http://www.maff.go.jp/j/biomass/suisinkaigi/04/pdf/all.pdf>
36. Maukonen, J., Mättö, J., Satokari, R., Soderlund, H., Mattila-Sandholm, T. and Saarela, M. 2006. PCR DGGE and RT-PCR DGGE show diversity and short-term temporal stability in the *Clostridium coccooides-Eubacterium rectale* group in the human intestinal microbiota. *FEMS Microbiol. Ecol.* **58**: 517-528.

37. Möller, K. and Müller, T. 2012. Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: a review. *Eng. Life Sci.* **12**: 242-257.
38. Muyzer, G., de Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16SrRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.
39. Natvig, E.E., Ingham, S.C., Ingham, B.H., Cooperband, L.R. and Roper, T.R. 2002. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2727-2744.
40. Osada, T., Kuroda, K. and Yonaga, M. 2000. Determination of nitrous oxide, methane, and ammonia emissions from a swine waste composting process. *J. Mater. Cycles Waste*, **2**: 51-56.
41. R Core Team. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [cited 12 April 2017]. Available from URL: <http://www.R-project.org/>.
42. Russel, S. and Best, L. 2006. Setting the standards for compost. *BioCycle*. **47**: 53-58.
43. Sasaki, Y., Tsujiyama, Y., Kusukawa, M., Murakami, M., Katayama, S. and Yamada, Y. 2011. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and O26 in beef farms. *Vet. Microbiol.* **12**: 140-145.

44. Song, C., Li, M., Jia, X., Wei, Z., Zhao, Y., Xi, B., Zhu, C. and Liu, D. 2014. Comparison of bacterial community structure and dynamics during the thermophilic composting of different types of solid wastes: anaerobic digestion residue, pig manure and chicken manure. *Microb. Biotechnol.* **7**: 424-433.
45. Sorter, D.E., Kester, H.J. and Hogan, J.S. 2014. Bacterial counts in recycled manure solids bedding replaced daily or deep packed in freestalls. *J. Dairy Sci.* **97**: 2965-2968.
46. Stentiford, E.I. 1996. Composting control: Principles and practice. pp.49-59. *In*: The Science of Composting. Part1. (de Bertoldi M., Sequi P., Lemmes B., Papi T. eds.) Blackie Academic and Professional, Boundary Row London.
47. Sutherland, J.P. 1999. Appendix A. *In*: Bedding in Loose Housing. Report 97/R2/28 to Milk Development Council. (Hughes J.W., Faull W.B., Cripps P.J., Sutherst J.E., Ward, W.R. eds.), University of Liverpool, Liverpool.
48. Tiquia, S.M. Tam, N.F.Y. and Hodgkiss, I.J. 1996. Microbial activities during composting of spent pig-manure sawdust litter at different moisture contents. *Bioresour. Technol.* **55**: 201-206.
49. USEPA. 1994. A Plain English Guide to the EPA Part 503 Biosolids Rule. EPA/832R-93/003. Washington, DC.
50. Ward, W.R., Hughes, J.W., Faull, W.B., Cripps, P.J., Sutherland, J.P. and Sutherst, J.E. 2002. Observational study of temperature, moisture,

pH and bacteria in straw bedding, and faecal consistency, cleanliness and mastitis in cows in four dairy herds. *Vet. Rec.* **151**: 199-206.

51. Zhang, J., Zeng, G., Chen, Y., Yu, M., Yu, Z., Li, H., Yu, Y. and Huang, H. 2011. Effects of physico-chemical parameters on the bacterial and fungal communities during agricultural waste composting. *Bioresour. Technol.* **102**: 2950-2956.