

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 岡本 英竜

学位の種類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第4項に該当

学位論文の題目 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

審査委員

主査 教授 永幡 肇（獣医衛生学）

副査 教授 樋口 豪紀（獣医衛生学）

副査 教授 森田 茂（家畜管理・行動学）

副査 教授 内田 郁夫（獣医細菌学）

## 学位論文要旨

# 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

申請者 岡本英竜

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 BOD<sub>5</sub> 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、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、繰り返し）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( $P<0.05$ )。調整後の 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( $1 \times 10^6$  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  $63^\circ\text{C}$ 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处理された固形物は、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。

# 論文審査の要旨および結果

## 1 論文審査の要旨および結果

本論文の審査は、学位論文として体裁を整え、研究の背景と意義が明確であり、得られた学術的な成果は新規性とともな十分な学術的根拠を有するものであり、その成果は科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかについて行われた。

### 研究の背景と目的

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て研究を遂行し下記の成績を得た。

### 成績

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、高温発酵を中温発酵に変更した条件よりも中温発酵を高温環境に変更した条件で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、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のが、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ヶ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( $P < 0.05$ )。調整後のCMS中の細菌数は夏季では10<sup>1</sup>から10<sup>2</sup> cfu/gの範囲であり、冬季では10<sup>4</sup> 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<sup>6</sup> cfu/g)と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℃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处理された固形物は、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になった。乳牛排泄物の嫌氣的処理に続く固形物の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是認されている基準を充たすことから乳房への感染リスク低減が明らかとなり、副産物資材の衛生学的根拠を明らかにしその有効性を示している。これらの成果は家畜排せつ物処理に関して新規の学術情報を提示し産業貢献に資する学術的価値は高く実用化に途を開くものと判断される。

以上のことから、岡本英竜氏は、博士(獣医学)の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査員一同は認めた。

## 2 最終試験の結果

審査委員4名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2018年2月8日

### 審査委員

主査 教授 永幡 肇

副査 教授 樋口 豪紀

副査 教授 森田 茂

副査 教授 内田 郁夫