

2005 年度 博士論文

堆肥・土壌における細菌群集の解析および
大腸菌など糞便汚染指標菌の生残性に関する研究

Bacterial Community Analysis in Compost and Soil with
Special Reference to Survival of *Escherichia coli* and related fecal bacteria



鹿児島大学大学院連合農学研究科

生物環境保全科学専攻

龚 春 明

Science of Life Environment and Conservation
The United Graduate School of Agricultural Sciences Kagoshima University
Gong Chunming

目 次

英文要旨

和文要旨

第一章 緒論

1. 堆肥.....	1
2. 堆肥の衛生的現状.....	5
3. 微生物学の研究方法.....	12
4. 本研究の目的.....	17
5. 論文の構成.....	18

第二章 蛍光染色法および培養法による各種堆肥中の細菌の定量に関する研究

1. 緒言.....	19
2. 材料および方法.....	22
2.1 堆肥試料.....	22
2.2 理化学的性質の分析.....	24
2.2.1 含水率の測定.....	24
2.2.2 pH(H ₂ O)の測定.....	25
2.2.3 電気伝導率 EC の測定.....	25
2.2.4 陽イオン交換容量 CEC の測定.....	26
2.2.5 全炭素 (T-C) の測定.....	28
2.2.6 全窒素 (T-N) の測定.....	29
2.3 試料の懸濁液の調製.....	30
2.4 蛍光染色法.....	31
2.4.1 EB 蛍光染色法.....	31

2.4.2	CFDA 蛍光染色法.....	36
2.4.3	EB/CFDA 二重染色法.....	38
2.4.4	検鏡.....	38
2.5	培養法.....	40
3.	結果および考察.....	44
3.1	堆肥試料の理化学的性状.....	44
3.2	蛍光染色法による細菌数.....	45
3.3	希釈平板法による従属栄養性細菌数および放線菌数.....	49
3.4	希釈平板法による各種有機物分解菌数.....	52
4.	要約.....	57

第三章 堆肥における大腸菌群など糞便汚染指標菌の生残性に関する研究

1.	緒言.....	59
2.	材料および方法.....	62
2.1	供試堆肥の採取.....	62
2.2	試料の分散懸濁液の調製.....	64
2.3	理化学的性質の分析.....	64
2.4	糞便汚染指標菌の検出法.....	64
2.4.1	大腸菌群などの定義および相互の関係.....	65
2.4.2	各種糞便汚染指標菌の定量法.....	67
2.5	大腸菌群分離株の同定.....	69
2.6	病原大腸菌に対するスライド凝集反応.....	71
2.7	大腸菌の熱抵抗性.....	72
2.7.1	種々の温度における大腸菌の発育の検討.....	72
2.7.2	大腸菌の熱抵抗性の検討.....	74
2.7.3	D 値の算出法.....	77
3.	結果および考察.....	79

3.1	堆肥試料の理化学的性状.....	79
3.2	堆肥製品中の大腸菌群.....	81
3.3	大腸菌群分離株の同定および病原大腸菌に対するスライド凝集反応.....	83
3.4	堆肥製品中の大腸菌数およびサルモネラ菌数.....	85
3.5	堆肥原料中の糞便汚染指標菌数.....	86
3.6	堆肥発酵過程における糞便汚染指標菌の消長.....	88
3.7	種々の温度における大腸菌の発育.....	91
3.8	熱抵抗性試験条件の検討.....	94
3.8.1	加熱恒温器の選定.....	94
3.8.2	熱抵抗性試験用容器の選定.....	94
3.8.3	容器内に入れる試料量の選定.....	95
3.9	大腸菌の熱抵抗性.....	96
3.10	大腸菌のD値.....	98
4.	要約.....	100

第四章 加熱処理による堆肥原料の微生物的安全化に関する研究

1.	緒言.....	102
2.	材料および方法.....	104
2.1	無害化装置.....	104
2.2	牛糞試料.....	106
2.3	無害化処理方法.....	106
2.4	理化学性の測定.....	107
2.5	各種微生物の測定.....	108
2.6	糞便汚染指標菌の再増殖.....	108
2.7	糞便汚染指標菌の増菌培養.....	110
2.8	発酵能の測定.....	112
2.9	無害化牛糞の堆肥化過程における微生物の消長の検討.....	113

3.	結果および考察.....	114
3.1	加熱処理における牛糞試料の理化学性の経時的変化.....	114
3.2	加熱処理における牛糞中の各種微生物数の経時的変化.....	116
3.2.1	全細菌数及び全生細菌数の経時的変化.....	116
3.2.2	従属栄養性細菌数の経時的変化.....	117
3.2.3	糞便汚染指標菌の経時的変化.....	119
3.3	加熱処理による牛糞中の糞便汚染指標菌の再増殖の検討.....	121
3.4	加熱処理による牛糞中の糞便汚染指標菌の増菌培養試験.....	121
3.5	加熱処理による堆肥化微生物に及ぼす影響.....	122
3.5.1	全細菌数および全生細菌数.....	122
3.5.2	高温性, 中温性従属栄養性細菌.....	124
3.5.3	各種有機物分解菌.....	126
3.6	無害化牛糞の堆肥化過程における微生物の消長.....	128
3.6.1	非加熱処理における牛糞の理化学性および病原指標菌の経時的変化.....	128
3.6.2	加熱処理における牛糞の理化学性および各種微生物の経時的変化.....	129
3.6.3	無害化牛糞の堆肥化過程における品温の経時的変化.....	129
3.6.4	無害化牛糞の堆肥化過程における病原指標菌の経時的変化.....	130
4.	要約.....	132

第五章 FISHによる土壌中における大腸菌の特異的検出に関する研究

1.	緒言.....	133
2.	材料および方法.....	137
2.1	<i>E. coli</i> K12 純粋培養菌液の調製.....	139
2.2	<i>E. coli</i> K12 を添加した土壌の分散.....	139
2.3	細菌の物理的抽出.....	141
2.4	細菌の固定.....	142
2.5	細菌のフィルターへの捕集.....	144

2.6	プローブの設計および作成.....	146
2.6.1	大腸菌の特異的プローブの検索.....	149
2.6.2	大腸菌の特異的プローブの相同性検索.....	149
2.6.3	プローブの作成.....	151
2.6.4	至適プローブ濃度の検討.....	151
2.6.5	プローブの特異性の検討.....	152
2.7	ハイブリダイゼーションの手順.....	152
2.8	細菌の観察および画像解析.....	155
3.	結果および考察.....	157
3.1	FISHにおける大腸菌 K12 の反応.....	157
3.2	大腸菌プローブの検索および選定.....	159
3.3	大腸菌プローブの決定.....	160
3.4	大腸菌プローブの至適濃度.....	161
3.5	大腸菌プローブの種特異性の検証.....	161
3.6	超音波—遠心洗浄法による細菌の回収率.....	162
3.7	<i>E. coli</i> K12 の定量的検出.....	165
4.	要約.....	167

第六章 総括

1.	研究の背景.....	169
2.	蛍光染色法および培養法による各種堆肥中の細菌の定量に関する研究.....	169
3.	堆肥における大腸菌群等糞便汚染指標菌の生残性に関する研究.....	171
4.	加熱処理による堆肥原料牛糞の微生物的安全化に関する研究.....	172
5.	FISH による土壌中における大腸菌の特異的検出に関する研究.....	174
6.	研究結果の意義とその展望.....	175

謝辭.....	177
引用文獻.....	179

Summary

Increasing public interests have been concerned on safety foods and the environmental aspects recently, especially on the so-called organic foods, which are made from crops grown with organic fertilizers or compost but no pesticide nor chemical fertilizers. Application of compost in agricultural practice could potentially cause contamination of foodstuffs with pathogenic bacteria such as *Escherichia coli* O157:H7 (*E.coli* O157). The aim of this study is to investigate bacterial community structures and the occurrence of possible pathogenic bacteria in compost samples by conventional culture technique and fluorescence direct count methods, including fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Moreover, a pilot-scale apparatus was investigated for pasteurization of cow dung for compost production.

1. In 21 compost product samples collected from Kyusyu district, total direct count by the EB method was 3.7×10^{10} cells g^{-1} dry matter (mean), and total number of viable bacteria by the CFDA method was 1.2×10^{10} cells g^{-1} dry matter. The latter number was as large as ca. 12 times of those by conventional plate count on nutrient Agar, suggesting, ca. 90% of bacteria in compost were viable but nonculturable (VNC). It was also suggested that the fluorescence direct count method was more superior to plate count technique for observing and enumerating bacteria in compost.

2. Of 29 compost samples including cow dung manure, poultry manure, food waste compost and biosolid compost, coliform bacteria were detected in 10 samples (37.9%), with population of 1.8×10^2 to 2.5×10^6 CFU g^{-1} dry matter. Most of coliform bacteria, *E.coli* and salmonella were destructed during composting process, though some pathogenic bacteria survived in some of compost products. it was noticeable that some pathogens survived even in uncompleted compost of which temperature was 54-69°C.

3. To enhance microbial safety of compost material, 350 kg of cow dung was subject to pasteurization in a pilot-scale drum apparatus. Coliform bacteria, *E.coli* and salmonellas in cow dung at a level of 10^6 CFU g^{-1} dry matter have destructed and became undetectable (<20 CFU g^{-1} dry matter) after 6-hour heat treatment at 50 to 70°C. Moreover, the heat treatment was revealed to give almost no influence on various kinds of organic matter-decomposing bacteria that could contribute successive composting.

4. To evaluate biosafety of soil and compost, FISH was developed for detecting *E.coli* in soil and manure with high specificity and sensitivity. DNA data base analysis showed ES445 probe had high specificity and sensitivity for *E.coli*. By using FISH with ES445 probe, *E.coli* K12 added to soil samples was detected at a range of 3.9×10^8 to 3.9×10^9 cells g^{-1} soil with recovery of 51%.

These results suggest that *E.coli* in compost and soil would be detected quickly with high specificity. The study would construct the base of biosafety assessment of agricultural ecosystem for the safe products of organic farm.

要 旨

近年、環境問題や安全な食品への国民の志向を背景として、減農薬や有機農業、オーガニック食品への関心が高まっているなか、堆肥の施用量は急速に増えている。一方、堆肥を施用した農場で生産された農産物が原因で大腸菌 0157 による食中毒が発生した事例が外国で報告されており、堆肥や土壌の微生物的安全性の確保は日本でも重要となってきた。そこで本研究ではまず、蛍光染色法による細菌定量を堆肥の微生物分析に導入し、堆肥中の微生物群集に関する基礎的知見を集積した。次いで、堆肥や土壌における大腸菌群など糞便指標菌について、選択分離培地を用いて追跡するとともに、Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) による大腸菌の新規高感度迅速検出定量法を確立した。さらに、堆肥原料の迅速安全化処理法について検討した。

1. 九州等各地から採取した 21 点の堆肥製品試料中の全細菌数は (EB 蛍光染色法) 平均 3.7×10^{10} cells g^{-1} dry matter で、全生細菌数は (CFDA 蛍光染色法) 平均 1.2×10^{10} cells g^{-1} dry matter であった。この生菌数は従来広く使われている培養法による細菌数の平均約 12 倍であった。すなわち、堆肥中の細菌の約 9 割が、生きているが培養できない (viable but nonculturable, VNC) 状態にあることを示しており、このような状態にある堆肥中の細菌を観察・定量するには、蛍光染色法が培養法よりも卓越していることが示唆された。

2. 牛糞、鶏糞、生ゴミおよび下水汚泥を原料とした堆肥 29 点中 10 点 (38%) から、大腸菌群が検出された。その菌数は $1.8 \times 10^2 \sim 2.5 \times 10^6$ cfu g^{-1} dry matter の範囲であった。堆肥化の過程で大腸菌群や大腸菌、サルモネラ菌は、原料から発酵中間品、製品と移行するに従って菌数が低下した。しかし、発酵中間物で品温が $54 \sim 69^\circ\text{C}$ と高いにも関わらず、これら病原菌が多数生残している場合が認められた。

3. 加熱処理による堆肥原料牛糞の微生物的安全性に関する研究の結果、堆肥原料の牛糞を無害化処理機に投入し、 $50 \sim 70^\circ\text{C}$ で加熱処理すると、大腸菌群、大腸菌およびサルモネラ菌は、当初いずれも 10^6 cfu / g 乾物であったものが、6 時間後には不検出となった。このとき、堆肥化に関する各種有機物分解菌などには大きな影響を与えなかった。

4. 堆肥などの有機質資材を施用した土壌の生物的安全性（バイオセーフティー）を評価する手法として、土壌中の大腸菌をFISHにより高感度かつ迅速に検出する手法を開発した。大腸菌に対するES445プローブの種特異性は高く、土壌に添加した*E. coli* K12の回収率は $3.9 \times 10^8 \sim 3.9 \times 10^9$ cells/g soilの範囲でほぼ一定（51%）であり、土壌中の大腸菌を定量的に検出できることに世界で初めて成功した。

以上の結果から、通常の培養法では検出困難なVNC状態に陥った大腸菌の堆肥・土壌からの特異的迅速検出を行なう道を開くことができた。これにより、安全・安心な有機農産物生産に向けた農耕地土壌生態系の生物的安全性（バイオセーフティー）評価法の基礎を構築することができた。

第一章 緒 論

1. 堆肥

日本では、生物系廃棄物の発生量は年間約 2 億 8 千万トンであり、一般廃棄物と産業廃棄物を合わせた生物系廃棄物総量の約 6 割に当たる。このなかで、家畜糞尿の発生量は年間約 9,400 万トン、農作物残渣 1,400 万トン、生ゴミ 2,000 万トン、下水汚泥 8,600 万トンという膨大な量に達すると推定されている（図 1-1）。

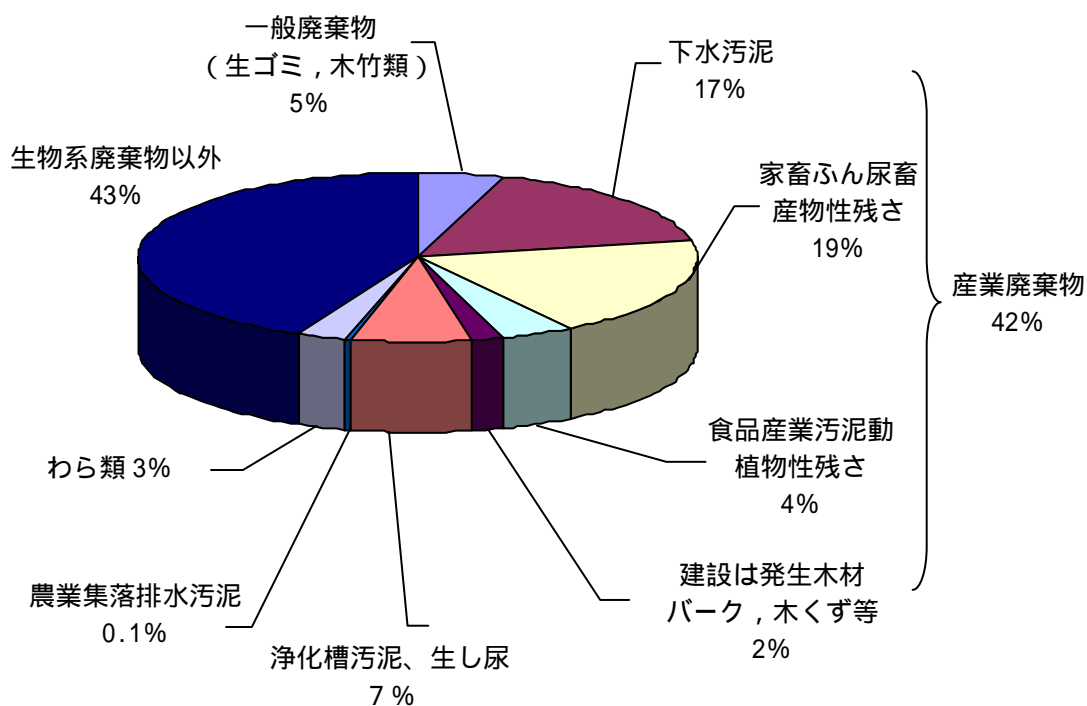


図 1-1 生物系廃棄物の発生量（茅野，2000）

一方、環境問題に対する国民の意識が高まる中で、廃棄物の減量化・リサイクルによる資源化の推進が社会的にも関心が高まり、農業の面では土づくりの観点から有機廃棄物の肥料化に大きな期待が寄せられている。こうしたことを踏まえ、最近、「家畜排せつ物の管理の適正化および利用の促進に関する法律(家畜排泄物管理法)」が施行され(1999年7月)、

家畜排泄物の管理について、畜産業を営む者が遵守すべき管理基準が定められた。また、「持続性の高い農業生産方式の導入の促進に関する法律」が施行され（1999年10月）、環境に調和した農業生産の確保を図るため、家畜糞等の堆肥化が奨励され、持続性の高い農業生産方式の導入の促進が図られている。さらに、「食品循環資源の再生利用等の促進に関する法律（食品リサイクル法）」が施行され（2000年6月）、食品廃棄物について発生抑制と減量化により最終的に処分される量を減少させるとともに、飼料や肥料等の原材料として再生利用するため、食品関連事業者（製造、流通、外食等）による食品循環資源の再生利用等の促進が図られている。

このように、家畜糞や、食品工場、大型店などから排出される食品廃棄物の適正な管理や堆肥化などの資源化が推進されている。すなわち堆肥化など資源化が奨励され、法的規制が強化されつつある。さらに、下水汚泥や、飲食店、家庭から排出される生ゴミの堆肥化なども自治体や市民団体により進められている。こうした状況を背景に、バイオマス・ニッポン総合戦略の閣議決定（2002年12月）がなされ、有機資源（バイオマス）の利活用が強力に推進されている。このようにして作られた堆肥など有機質資材の活用は、持続的農業を促進し、高品質で安全・安心な食料を国民に供給する上で、極めて望ましいことである。

このような背景から、近年、堆肥等の特殊肥料の生産・流通量は、大幅に増加している。1999年度の有機質肥料の生産量は580万トン、うち堆肥が約340万トンとなっており、今後とも増加すると予想される。

「堆肥」とは、肥料取締法で、「わら、もみがら、樹皮、家畜または家禽の糞その他動植物質の有機物質を堆積または攪拌し、腐熟させたものをいう」と定義されている。一般的に使われている「堆肥」という言葉は、家畜糞尿を含まない植物質だけの原料で作られたものをさす狭義の場合と、植物質と家畜糞を混合して発酵させてできた「厩肥」とを合わせて表現した「堆厩肥」と同義に使う場合がある。なお、堆肥とコンポストという語は、ほぼ同義語として使用されていることが多いが、歴史的には、家畜糞やイナワラなどの農産廃棄物を原料として製造されたものを堆肥と呼び慣わしており、その英語名（compost）のカタカナ表記としてコンポストとも呼ばれる。一方、近年製造されるようになった都市

ゴミコンポストや下水汚泥コンポストなどのように、農産廃棄物以外の原料から作られる場合には、主にコンポストと呼ばれることが多い。これらは微妙に使い分けられていることもあるが、本稿では全て「堆肥」の語に統一して使用した。

堆肥の熟成過程において、物理学的・化学的・生物学的にどのように反応が進行するのか。材料も環境も種々異なる堆肥を単純化することは難しいが、共通した概念を示すと図 1-2 のようになるだろう。

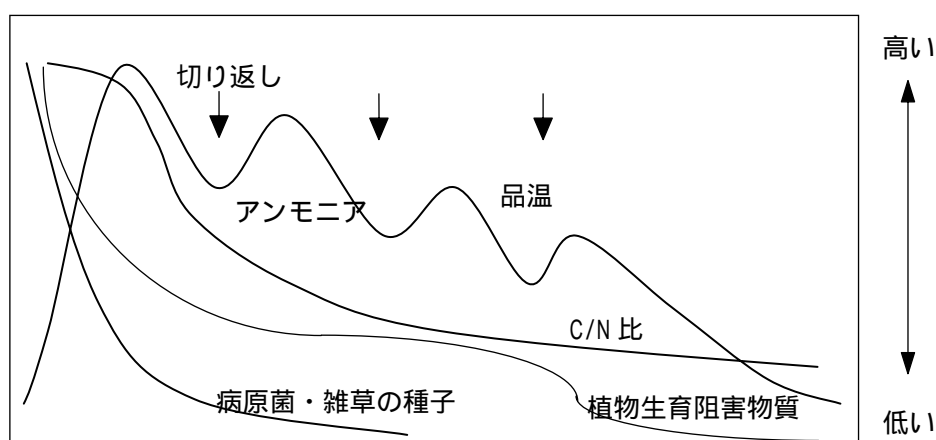


図 1-2 堆肥の完熟過程における質的变化（概念図）

すなわち、堆肥原料を堆積すると、微生物が徐々に活動を始め、発酵熱が生じる。堆肥の水分が 60%前後で、山（パイル）の高さが適当であれば、品温は 40 から 70 以上にまで上昇する（写真 1-1）。このとき、細菌、放線菌、糸状菌などの微生物は、まず、分解しやすい水溶性の有機物である糖類、アミノ酸、タンパク質などを利用して増殖する。その際、切り返しまたは強制通気によって十分な酸素が供給されている場合には、有機物に含まれる炭素分（C）が二酸化炭素にまで分解され、大気中に放出される（好氣的分解）。一方、有機物内の窒素成分（N）は、まずアミノ酸や尿素に分解され、次いでアンモニア化成作用や加水分解によりアンモニアとなって堆肥内に遊離してくる。このため、N 源の総量はあまり変わらないが C 源が減少するので、C/N 比が徐々に低下する。また、アンモニアの生成によって、堆肥の pH が中性からアルカリ性へと変化する。アルカリ性ではアンモニアは揮散するので

(アンモニアストリッピング),このような堆肥は,強烈なアンモニア臭がして,目も開けられないほどになる.



写真 1-1 堆肥の製造風景 (伊万里はちがめプラン)

やがて堆肥の品温はいったん低下してくる.これは,利用しやすい有機物が枯渇してきたことと,酸素濃度が低下したためで,ここで切り返しを行うと,物理的に隔離されていた水溶性有機物が微生物に利用可能な場所に出て来るとともに,酸素が供給されるため,再び微生物活動が活発になる.また次の段階として,やや分解しにくい有機物が微生物分解の対象となる.この有機物としては,ヘミセルロースやセルロース(繊維素),さらには木質成分であるリグニンなどがある.特にセルロースを分解できる微生物(セルロース分解菌)は菌種として限られているので,この微生物の出現は重要である.ある種の細菌や好熱性の放線菌などがこれに含まれる.セルロースは二糖類やグルコース,有機酸などに分解されるので,セルロース分解菌でない微生物も,そのおこぼれに預かれるため,微生物活動は再び活発になる.

このような状態の堆肥では,その表面に白い粉のようなものが発生している.これは放線菌(Actinomycetes, 多くはStreptomyces属)で,手に採ってみると,土のような臭いがす

るのですぐにわかる（完熟した堆肥の臭い，あるいは土壌の臭いとは，放線菌の出すある種のエステル化合物に他ならない）。

このような急激な微生物の増殖の結果，堆肥の温度が上昇するため，原料に含まれていた病原菌や寄生虫，雑草の種子などは死滅する．昨今問題となっている大腸菌 O157 も芽胞菌のような耐熱性は全くないので，60 で数十分間経過すると死滅すると考えられる（この反対に未熟堆肥では，病原菌による汚染の心配がつきまとう．また，堆肥の土壌施用後に，見知らぬ植物が発育してくることもある．これは家畜飼料用の穀類に混入していた雑草や牧草の種子が発芽したものである）。

さらに，リグニン関連成分であるタンニンや多環フェノール系の物質も分解を受けるようになる．これらの物質の中には，植物の発芽や生長を阻害する作用をもつものがあるため，未熟な堆肥ではしばしば発育障害をもたらす．

2. 堆肥の衛生的現状

安全かつ良質な食料の供給，ならびに環境に負荷をかけない持続的農業を行う上で，堆肥などの有機質資材を利用した有機農業が注目されている．しかし，有機質資材は化学肥料とは違い，成分が天然物由来の複雑なものであるため，その製造にあたっては，経験的な判断に依存するところが大きく，また，それらの品質を客観的に評価する基準も，必ずしも整備されてはいない．しかも，堆肥の原料となる有機質資材の種類は季節や地域によって異なるため，同じ施設で作られた製品であっても，それらの成分を一定に保つことは極めて難しい．

一方，堆肥の急激な増産は，未熟堆肥の増加を招くことが懸念され，施用後の土壌障害の発生などに加え，衛生的な問題が心配される．実際，堆肥中の病原菌により汚染された生の果物や野菜を消費して起こった食中毒事件が欧米でいくつか報告されている（Cieslak *et al.*, 1993; Chapman *et al.*, 1997; Itoh *et al.*, 1998; Little *et al.*, 1999）．堆肥に含まれるヒトの病原菌の中で，大腸菌，特に腸管出血性大腸菌 O157:H7（*E. coli* O157，写真 1-2）の感染は，最も重大な脅威である（Coia *et al.*, 1998; 小沼ら，2000）．ほとんどの大腸菌は病原性はなく，ヒトおよび温血動物の腸管において正常な微生物相の一部を構

成しているが、*E. coli* 0157 のようなベロ毒素 (Vero) を生産する大腸菌は、下痢、出血性腸炎あるいは溶血性尿毒症症候群の原因となる。腸管粘膜に定着した *E. coli* 0157 がその場で増殖し、産生されたベロ毒素によって下痢を起こす。1982 年アメリカで発生したハンバーガーによる食中毒事件で初めて、*E. coli* 0157 が原因菌であることが報告された。

E. coli 0157 による感染は経口感染で、飲食物からの感染やヒトからヒトへの感染、水を介しての感染で大規模な集団食中毒を起こす。感染が成立する菌量は約 100 個ともいわれ、従来報告されている食中毒菌のなかでは、最も少ない菌数で発症するのも特徴である。症状は、不顕性感染（まったく症状のないもの）から軽度の下痢、激しい腹痛、頻回の水様便、著しい血便とともに重篤な合併症を起こし死に至る場合まで様々である。また、これらの有症患者の 6~7% では、下痢などの初発症状の数日から 2 週間後に、あるいは激しい腹痛、血便の数日後に溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症などの重症合併症が生じることがあり、重症患者では死に至ることもある。

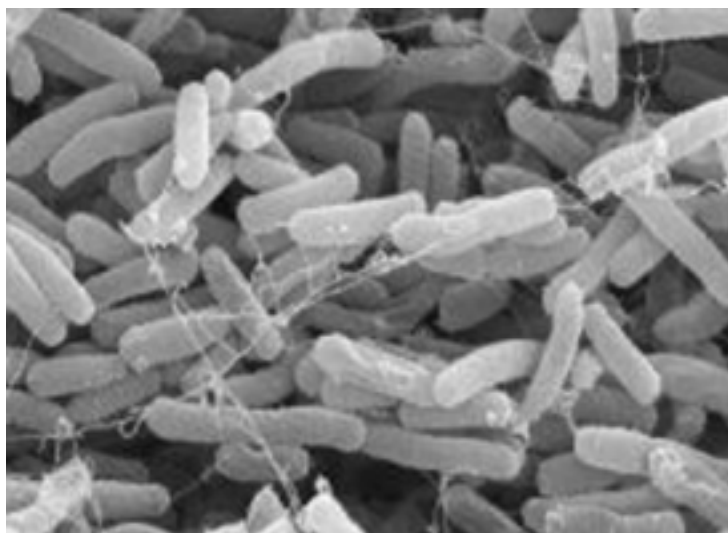


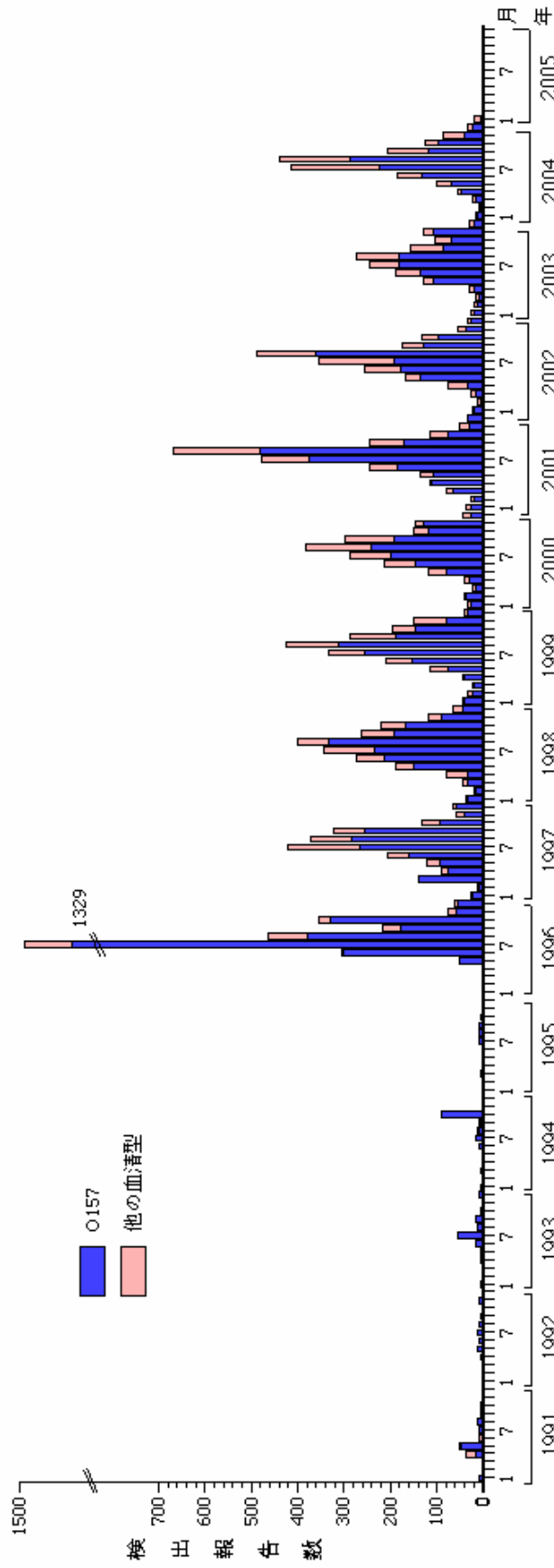
写真 1-2 大腸菌 0157 の走査型電顕像 (6000 倍)

(株式会社いかがくのホームページ <http://www.ikagaku.co.jp/kg/kg.html> より)

アメリカでは、本菌は毎年 20,000 件以上の食中毒の起因菌となり、250 人を死亡させていると推定されている (Finelli *et al.*, 1995; Kourkia *et al.*, 1997)。日本の *E. coli* 0157 による食中毒の発生は、1996 年 5~7 月にかけて岡山、広島、大阪(堺市)の小学校で最初に記録された。本菌により汚染された食品を使った給食によって引き起され、患者数はほぼ 10,000 人を超え、うち 8 人が死亡した(厚生労働省, 2005)。それ以来、本菌による食中毒は毎年 2,000 件以上報告されている(図 1-3)。

本菌による食中毒の原因食品として牛肉製品が指摘されている。その汚染源として、牛糞および牛腸管内容物が注目されはじめている。このような汚染牛糞由来の未熟堆肥を施用した家庭菜園の収穫物を介した大腸菌 0157 の感染事例が、アメリカで報告されている (Cieslak *et al.*, 1993)。日本における大腸菌 0157 による食中毒の大量発生に関連して、大腸菌 0157 感染の原因食品は確定できない場合も多いが、判明している範囲では、半数以上が牛肉であり、重要視されている(中澤, 2001)。このようなことから、牛糞など家畜糞を原料とした堆肥は大腸菌 0157 など病原菌の感染源となりうるため、その安全性を高めることは緊急の課題といえ、堆肥の衛生管理の重大性がますます増大している。

Verotoxin産生性大腸菌月別検出状況，1991年1月～2005年3月（病原微生物検出情報：2005年3月25日現在報告数）



各都道府県市の地方衛生研究所からの検出報告を区に示した。

図 1-3 大腸菌 O157 による食中毒事件月別状況

(国立感染症研究所ホームページ <http://idsc.nih.gov/iasr/prompt/graph/vt9j.gif> より)

本菌による牛肉の汚染源として、牛糞および牛の腸管内容物が欧米では注目されている。表 1-1 に示すのは、国外各種動物からの大腸菌 0157 の検出率を集計したものである。この表によると、牛、羊、ヤギ、鹿、ポニー、豚、ネズミ、鳩から検出されているが、中でも、牛、羊、鹿の保菌率が高く、特に英国とノルウェーの調査例では、牛から 13~20%の検出率が出ている。

表 1-1 各種動物からの大腸菌 0157 : H7 の検出率*

種類	検査頭数	検出率 (%)	地域	出典
牛	365	20.0	ノルウェー	Cizek ら, 1999
	4,800	15.7	イギリス	Chapman ら, 1997a
肉牛	1,800	13.4	イギリス	Chapman ら, 1997a
乳牛	1,661	16.1	イギリス	Chapman ら, 1997a
	2,103	4.0	イギリス	Chapman ら, 1993
	4,361	1.2	米国コロラド州	Garber ら, 1999
	197	1.0	ノルウェー	Vold ら, 1998
乳牛	3,570	0.28	米国ワシントン州	Hancock ら, 1994
肉牛 (放牧)	1,412	0.71	米国ワシントン州	Hancock ら, 1994
肉牛 (飼育場)	600	0.33	米国ワシントン州	Hancock ら, 1994
羊	*	+	米国アイダホ州	Kudva ら, 1997
	1,000	2.2	イギリス	Chapman ら, 1997a
ヤギ	*	+	イギリス	Chapman, 2000
鹿 飼育	*	9.0	米国ワシントン州	Keene ら, 1997
	*	+	イギリス	Chapman and Ackroyd, 1997
	212	2.4	米国カンザス州	Sargeant ら, 1999
ポニー	*	+	イギリス	Chapman, 2000
豚	1,000	0.4	イギリス	Chapman ら, 1997a
ネズミ	10	40	ノルウェー	Cizek ら, 1999
鳩	*	+	米国ウィスコンシン州	Shere ら, 1998
	*	+	イギリス	Dell ' Omo ら, 1998
鶏	1,000	0	イギリス	Chapman ら, 1997a

* 染谷・井上 (2003) より

+,陽性 (検出率不明) *, 頭数の記載なし

日本での牛の大腸菌 0157 保菌率は、1995 年以前は 0.1~0.3%であったのが、それ以降では 1.0~1.5%へとやや上昇している (表 1-2)。したがって大腸菌 0157 は、日本でも牛などの腸管常在菌となりつつあることが明らかである。これは汚染の先進地イギリスの十数%と

いう保菌率と比べれば、まだ低い。しかし、欧米で起きていることは、近い将来の日本の姿であるかもしれないと警戒すべきであろう。このようなことから、牛糞など家畜糞を原料とした堆肥の安全性を高めることは、日本においても緊急の課題と言える。

表 1-2 牛からの大腸菌 0157 : H7 の検出率

調査時期(年)	検査頭数	検出率(%)	出典
1987	300	0.33	静岡県東部食肉衛生研究所
1995	4,414	0.12	全国食肉衛生検査所協議会
1995	4,158	1.40	厚生省研究班
1997	670	1.04	秋庭・中澤, 1998
2000	605	1.50	島根県保健環境研究所

染谷・井上(2003)より

牛糞のみならず、下水汚泥や都市ゴミ(生ゴミ)にも多くの場合、病原菌が存在する。牛糞、下水汚泥や都市ゴミなど堆肥原料中の大腸菌群数に関する調査例を表 1-3 に示す。これらのいずれからでも、大腸菌群数が乾物 1 グラム当たり $10^5 \sim 10^7$ 個検出され、下水汚泥では 10^9 個という高い菌数も出ている。大腸菌群は糞便汚染の指標菌であり、牛糞から高い菌数が検出されるのは当然としても、いったん水処理を受けた下水汚泥や、直接の大きな汚染源が見あたらない都市ゴミからも多数検出されている点は、注目すべきである。

表 1-3 堆肥原料となる牛糞、下水汚泥および都市ゴミ中の大腸菌群

原料	大腸菌群(cfu g ⁻¹)	地域	出典
牛糞	3.0×10^6	日本	梅田ら, 1999
	$1.3 \times 10^6 \sim 3.0 \times 10^7$	日本	羽生ら, 1997
	$2.3 \times 10^5 \sim 3.3 \times 10^5$	日本	本多, 1999
	$3.0 \times 10^5 \sim 3.0 \times 10^7$	フィンランド	Vuorinen and Saharinen, 1997
下水汚泥	$2.0 \times 10^8 \sim 1.5 \times 10^9$	米国カリフォルニア	Greenberg ら, 1986
	$4.0 \times 10^5 \sim 4.0 \times 10^6$	米国カリフォルニア	Pereira-Neto ら, 1986
都市ゴミ	5.0×10^9	フランス	Deportes ら, 1998
	4.6×10^6	イタリア	Pera ら, 1991
	4.0×10^7	米国カリフォルニア	Pereira-Neto ら, 1986

染谷・井上(2003)より

上記のように、牛糞や活性汚泥、都市ゴミには大腸菌群が多数含まれる。これが堆肥化の過程でどのように減少するのか、また不検出となるまでにはどのくらいの期間を要するのか、この問題に関して調査した内外のデータのまとめを表 1-4 に示す。大腸菌群の消失には、おおむね 1~2 週間の処理ですむが、中には、6 週間以上を要する場合、さらには消失せずに製品中まで残留する場合も見られる。このように、大腸菌の生残性は報告によってまちまちである。これは、堆肥を製造する施設の構造や規模、製造方法などによる違いが反映されていると思われる。さらに、製品として流通している堆肥からも病原菌が検出される場合があることから、堆肥の発酵熱を十分に生かした堆肥温度管理を通して、微生物学的に安全な堆肥を製造することが重要であると考えられる。

表 1-4 堆肥化過程での大腸菌群の消失と製品中に生残する大腸菌群*

原料	消失までの期間	製品中の大腸菌群数	地域	出典
牛糞	1 週間	ND(<10 ²)	日本	伊吹ら, 1996
牛糞・麦わら	1 週間	ND(<10 ²)	フィンランド	Vuorinen and Saharinen, 1997
牛糞	2 週間	ND(<10 ²)	日本	渡辺ら, 1998
牛糞	2~6 週間	ND(<10 ²)	日本	本多, 1999
牛糞・オガクズ	9~12 日	ND(<10 ³) ~ 10 ⁴	日本	羽生ら, 1997
牛糞・オガクズ	消失せず	ND(<10 ³) ~ 10 ⁷	日本	梅田ら, 1999
オリーブ絞りかす	消失せず	7 × 10 ²	イタリア	Sciancalepore ら, 1996
活性汚泥	10 日	ND(<10 ²)	米国	Greenberg ら, 1986
活性汚泥	消失せず	10 ¹ ~ 10 ⁸	米国	Soares ら, 1995
都市ゴミ	1 週間	ND(<10 ²)	フランス	Deportes ら, 1998
都市ゴミ	1 週間	6.2 × 10 ³	イタリア	Pera ら, 1991

* 染谷・井上 (2003) より。

ND, 不検出。() 内に検出限界を示す。

牛糞や腸管内容物からの食肉への汚染ルートとしては、保菌牛の屠畜場での処理される過程が指摘されている。すなわち、不適切な屠畜により腸管内容物が食肉を汚染する可能性が考えられる。また、牛糞堆肥が未熟であると、大腸菌 0157 が十分に熱殺菌されず、生鮮野菜に対する汚染源となる可能性がある。さらに、牛糞や未熟堆肥は水系への汚染源ともなり、水泳場や簡易水道での感染の可能性もある。

このような国内外の現状から、堆肥の原料となる家畜糞尿は、その衛生管理の重大性がますます増大している。改正された肥料取締法の中でも堆肥についての衛生基準は定められておらず、そもそも堆肥中の病原微生物に関する研究報告例が少ないのが現状である。一般的に完熟堆肥では、その製造過程における発酵熱により、大腸菌 0157 のような病原菌は殺菌されると言われている。しかし、堆肥をどの程度の高温にどの位の期間保てば病原菌が死滅するのか、必ずしも明らかではない。したがって、大腸菌 0157 などによる重篤な食中毒を防止するうえからも、完熟堆肥にすることが重要であり、その条件の解明は緊急課題といえよう。特に、製品として流通している堆肥中の病原菌の残留状況を把握することは、安全・安心な農産物を生産する上で欠かせない情報であるが、これに関する知見は限られている。

現在、堆肥等の品質は、その原料、生産工程の多様化により様々なものが供給されている状況である。堆肥等の特殊肥料は肥料取締法の改正により、品質に関する表示が義務付けられた。しかし、表示内容について、衛生面に関して具体的な指針が提案されていない、また、堆肥中の病原微生物についての検査も義務付けられていない、そのため、検査がほとんど行われていない。

3. 微生物学の研究方法

微生物学の出発点は、17 世紀後半にオランダの Leeuwenhoek によってなされた一連の観察である。彼は自作の単眼の顕微鏡を使って自分の周囲の雨滴や土壌中小さな生物を観察し、その中には長さ 2 μm の微生物の存在を記述しているが、これが人類最初の細菌の形態的記述であろう。近代微生物学は、R.Koch (独) や L.Pasteur (仏) といった微生物学の父と呼ばれる先駆者により、その基礎が作られた。彼らが活躍していた 19 世紀後半は、細菌性伝染病がヒトの死因の高い割合を占めていた。そのため主にヒトや家畜の病原菌に重点を置いた研究がなされた。Koch は、肉エキスなどの栄養成分を寒天やゼラチンで固めたものを細菌用培地として用い、患者や患畜の検体を塗抹し、そこにコロニーを形成させて、病原菌の検出を計った。この技術を軸として、1880 年以降、様々な病原菌の存在が続々と突き止められ、微生物学が大きな脚光を浴びるとともに、確かな一学問分野が築き上げられ

た。

さて、Koch の微生物への大きな貢献は、微生物学の基本的な仮説となった Koch の四原則の提唱である、細菌がある特定の病気の原因菌であると認められるかどうかを判定する方法である。病気の動物には特定の病原菌が存在するが、健康な動物にはいない； その病原菌は純粋培養株として動物から分離できる； その培養株を健康な動物に接種すると、同じ病気を引き起こす； 接種によって病気になった動物から、再び同じ病原菌が分離・培養できる。この仮説は、今日でも微生物学の基礎を成す考え方となっている。そして、彼らにより確立された培養法による細菌の検出法は、その後の細菌学の発展において、多大なる貢献を果たしたことは言うまでもない。

20 世紀半ばから後半にかけて微生物学に新たな方法論が導入された。1970 年代後半に、蛍光顕微鏡を用いた直接検鏡法による細菌の検出・定量法が主に水圏微生物学において発達し、水環境試料中の全細菌数 (Total direct count, TDC) の計測が可能となった。これに用いられる蛍光色素は核酸親和性を有するもので、淡水細菌には Acridine orange (AO, Hobbie *et al.*, 1977) 海洋細菌には 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Porter and Feig, 1980) や Hoechst 33342 (Hoechst and Paul, 1982) などが用いられている。

このような直接検鏡法による全細菌数と培養法による生細菌数との比較が、海洋や湖沼に生息する細菌に関して行なわれた (Hobbie *et al.*, 1977)。その結果、全細菌数は生細菌数より数十倍から数百倍高いことが明らかとなり、培養法では、環境試料中の細菌数が過小評価されることが判明した。この事実は、海洋など水圏の細菌の多くは寒天培地上でコロニーを形成しないということも示している。

こうした現象を説明するものとして、当時二つの原因が考えられた。一つは、水圏の細菌のほとんどが死んでいるという可能性である。死菌であれば、当然のことながらコロニーが形成されることはない。もう一つは、生きていてもコロニーを作らない細菌が存在するという可能性である。しかしこの考えは、それまで 100 年以來信じられてきた Koch の考え方と相反しており、多くの微生物学者にとっておよそ受け入れがたいものであった。

このような問題を解決するために、1970 年代後半以降、生きた細菌と死んだ細菌を染め分けて、顕微鏡下でそれらを計数する活性染色法が開発された。例えば、呼吸活性を持つ

細菌を検出する 2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride (INT)法 (Zimmerman *et al.*, 1978) や 5-cyano-2,3-ditolyli tetrazolium chloride (CTC) 法 (Rodriguez *et al.*, 1992), 酵素活性を持つ細菌を検出する fluorescein diacetate (FDA) 法 (Lundgren *et al.*, 1981) などであった。

しかし、これらの方法は、細菌の代謝の一部を検出するものであって、必ずしも生細菌ばかりを検出しているとは言えない可能性がある。例えば、死んだ細菌の中に酵素活性が残っていれば、そのような細菌も FDA 法では生菌として検出するであろう。したがって、生細菌を検出するには、細菌の増殖能を識別する必要がある。

そこで、Kogure ら (1979) は、細菌の生死を増殖能の有無により判別する Direct viable count (DVC)法を開発した。この方法は、細胞分裂阻害剤を添加した酵母エキス培地に海水試料を接種し、30℃で6時間インキュベートして、細胞分裂阻害剤の効果により細胞分裂が抑制された状態で、伸長・肥大した細菌を生きた細菌として蛍光顕微鏡下で検出・定量する手法である。この DVC 法により、海洋には、培養法で得られる菌数の数百倍もの、培養できない生きた細菌が存在していることが明らかとなった。

一方、米国のメリーランド大学の R.Colwell らのグループは、大腸菌やコレラ菌などを滅菌天然水中に接種し、その生残を見る実験を行い、Kogure の DVC 法を適用した。その結果、希釈平板法による生細菌数が時間経過とともに急速に減少するのに対し、全細菌数はほとんど変化しなかったこと、さらに生細菌数の数倍から数百倍も多い細菌が生残していることを DVC 法によって見出した。彼女らは、このような飢餓条件下で生残している細菌を Viable but nonculturable (VNC), つまり生きてはいるが培養できない(コロニーを作らない)細菌と呼んだ (Xue *et al.*, 1982)。さらに、VNC 状態に陥った細菌は感染性も消失しているが、何らかのきっかけにより感染性が回復することを動物実験により示し、河川や海洋など低栄養環境下に生残する病原菌の公衆衛生上の潜在的な脅威を警告した (Colwell *et al.*, 1985)。彼女らの研究を契機として、自然環境中で生残している大腸菌やコレラ菌などの病原菌にとどまらず、広く海洋や河川、湖沼などの水圏環境に常在する細菌についても研究が進められた。

1950年代、Watson と Crick による DNA 分子の二重らせん構造モデル (Watson & Crick,

1953)の確立とともに分子生物学の研究が始まった。20世紀後半の分子生物学の飛躍的発展をもたらした、基礎生物学だけではなく、医学、農学をはじめとした応用生物学に大きな影響を与えたのは、1960年代の制限酵素の発見(Linn & Arber, 1968; Miselson & Yuan, 1968)に端を発した遺伝子工学における飛躍的な技術革新である。1970年代には遺伝子工学技術の柱となる遺伝子クローニング技術(Jackson *et al.*, 1972; Cohen *et al.*, 1973)、制限酵素や修飾酵素の発見と精製法(Smith & Welcox, 1970; Danna & Nathans, 1971)、塩基配列決定法の開発(Sanger *et al.*, 1975; Maxam & Gilbert, 1977)ならびに核酸分子間の固相化ハイブリダイゼーション法(Southern, 1975; Alwine *et al.*, 1977)などが相次いで開発され、遺伝子工学技術の基礎を築いた。また、1980年代には巨大DNA分子を分離することができるパルスフィールド電気泳動法(Schwartz & Cantor, 1984)や巨大分子をクローニングする技術(Burke *et al.*, 1987)が開発された。さらに、1985年にはSaikiらによって耐熱性DNAポリメラーゼを利用して *in vitro* でDNA分子を増幅できる画期的な polymerase chain reaction (PCR) 法が開発された(Saiki *et al.*, 1985; Mullis & Faloona, 1987)。

微生物分野には、1990年代になって分子生物的手法が導入され、培養に依存することなく微生物のゲノムや遺伝子などを直接解析して、高解像度レベル(属、種、株など)で微生物の多様性や群集構造を理解していく研究が行われ、急激な進歩を見せている。なかでも、菌体内の特定遺伝子を蛍光標識することにより個々の細胞レベルで行なう方法(FISH法)と、微生物細胞より抽出した遺伝子を増幅し電気泳動により行なう方法(DGGE法, TGGE法, T-RFLR法)は、環境中の微生物群集の構造解析において広く用いられている。

一方、土壌細菌を定量する方法は、水圏微生物学と比較して極めて遅れており、培養法が依然主流である。これには、Nutrient broth (NB)培地、Diluted nutrient broth (DNB)培地、アルブミン培地などの非選択性培地が一般的に用いられている。

土壌細菌の直接検鏡法としては、古くからジョーンズ・モリソン法(Jones & Molison, 1948)という古典的な方法がある。本手法では、血球計算板を用いて土壌プレパラートを作製し、光学顕微鏡下で土壌細菌の計数を行なうものである。しかしこの手法は、プレパラート作成に高度な技術を要する上に、土壌細菌と土壌粒子との識別が難しいという問題点

がある。そこで、水圏微生物学と同様に、蛍光顕微鏡を用いた直接検鏡法の導入が試みられた。ところが、水圏の細菌の染色に使用される AO や DAPI などの蛍光色素は、土壌粒子に対し非特異的に吸着する性質を有し、そのため、土壌粒子との識別が困難であった。また、土壌細菌用として Fluorescein isothiocyanate (FITC, Babulk & Paul, 1970), Europium chelate and Fluorescent brighter (ECFB, Anderson & Slinger, 1975), 5-(4,6-dichlorotriazin-2-yl) amimofluorescein (DTAF, Sherr *et al.*, 1987) など蛍光色素も適用が試みられたが、同様の理由によりその評価は低い。

そこで、Roser(1980)は、新たな蛍光色素として Ethidium bromide (EB)を土壌に導入したところ、細菌と土壌粒子との識別性が良く、細菌以外の糸状菌のような真核生物に対しても有効であることを見出した。さらに、当研究室の Someya (1995) は、Roser が検討していない EB の染色条件の詳細な検討を行い EB 染色法の最適条件を明らかにするとともに、FITC, ECFB, AO, DAPI, DTAF などの蛍光色素と比較し、EB が最も優れたものであることを明らかにした。こうした蛍光染色技術の進歩により、土壌中の全細菌数、つまり土壌 1 グラムにどのくらいの細菌が存在しているのかという、極めて基本的な問題を解決する手法が初めて確立された。

このようにして、土壌中の全細菌数の測定が可能となった。しかし、EB の染色原理は核酸親和性にあるため、EB では生死にかかわらず全ての細菌を検出している。したがって、土壌中の生きた細菌を検出するには、新たな手法が必要となる。そこで、当研究室では、生きた土壌細菌の検出を目的に、エステラーゼ活性を保持する細菌を特異的に検出する 6-carboxyfluorescein diacetate (CFDA)染色法を開発し、土壌細菌への導入に成功した(染谷, 1997)。本手法は、海洋細菌に用いられる FDA 法よりも染色性が良く、簡便な生細菌検出法である。

近年、環境試料中に含まれる細菌を培養せずに定量し、その群集構造を遺伝子レベルで解析する方法として、DeLong ら (1989) および Amann ら (1990) により開発された FISH 法が発達してきた。FISH は、細菌の 16S または 23S rRNA における分類群や種に特異的な塩基配列に対して相補的なオリゴヌクレオチドプローブを用い、環境試料中の目的細菌を蛍光顕微鏡下で検出する手法である (Amann *et al.*, 1995)。バイオフィルム、下水汚泥、植物

共生細菌などの解析によく使われている。これらの研究から、固体表面に付着している細菌群集が高度な構造をもつことやマイクロコロニー内では様々に異なった細胞が共存していることが明らかとなってきた。環境試料中の群集構造解析に用いられる FISH プロープには、全真正細菌に反応する EUB338 プロープをはじめとして、グラム陽性細菌やグラム陰性細菌の各種の細菌群を検出するための種々の群特異的プロープが提案されている (Manz *et al.*, 1992)。これらのプロープを用いて、生物膜 (Amann *et al.*, 1992; Okabe *et al.*, 1999) や活性汚泥 (Wagner *et al.*, 1993) のように、複雑な細菌フロラを構成する多くの環境試料の解析に成功している。特に、汚水処理微生物系では、処理システムの違いや季節の違いによる細菌群集構造の変化を解析するために (秋山ら, 2000)、また、バルキングや閉塞といった水処理技術上の問題と細菌フロラとの関連性の解明 (Roller *et al.*, 1994) などに広く用いられている。

このような FISH 用プロープの群特異性、つまり目的菌群のみを検出するという性質は、本手法を環境試料に適用する上で極めて重要なものと言える。しかし、土壌や堆積物においては感度が低いことが問題点である。また、細胞内の標的 rRNA の数が代謝活動に依存するため、細胞が活発に増殖していない場合はやはり感度が低下する。さらに、FISH プロープの特異性および感度には種々の問題点があり、必ずしも十分に検討されていない。これらの問題を解決するため、当研究室ではプロープの特異性や感度を向上させるために FISH の種々の条件について検討した (中村, 2002; 佐藤, 2003, 王, 2004)。

4. 本研究の目的

以上のことをふまえて、本研究では、培養法および非培養法 (蛍光染色法) を用い、堆肥および土壌の微生物学的安全性 (バイオセーフティー) を向上させるための基礎的情報を得ることを目的として、主に九州各地の堆肥製造施設で生産されている堆肥を入手し、まず、堆肥中に存在する全細菌数や有機物分解に関与する各種微生物を調べた。次いで糞便汚染指標菌 (大腸菌群, 大腸菌, およびサルモネラ菌) の堆肥製品中の残留について、培養検査により実態調査を行った。あわせて、堆肥原料である牛糞や生ゴミなどにおける糞便汚染指標菌の存在および堆肥化過程における消長についても調査した。また、より安全な堆肥の製

造・使用のための新規技術として、堆肥原料の迅速安全化処理法について検討した。さらに、FISHによる大腸菌の新規高感度迅速検出定量法の確立を行なった。

これらの研究成果より、堆肥中の大腸菌など有害微生物を迅速かつ高感度で検出する方法を開発し、堆肥化過程における有害微生物の動態とその変動要因を解明するとともに、堆肥の微生物安全性（バイオセーフティー）評価法の基礎を構築した。有機廃棄物無害化処理装置による堆肥原料（牛糞など）の微生物的安全化処理の最適条件を明らかにした。

FISHによる土壌および堆肥における大腸菌を対象として新規検出・定量法を確立し、有機性資源による農耕地生態系の微生物的安全性（バイオセーフティー）評価の基礎とした。

5. 論文の構成

本論文は六章で構成されている。第一章の緒論では、堆肥に関する定義や発酵（堆肥化）、衛生的現状ならび微生物研究史の概要および本研究の目的と意義の概略を述べた。第二章では、蛍光染色法と培養法を併用して、各種堆肥中における細菌群集を解析し、VNCについて論じた。第三章では、堆肥中の病原菌の生残性に関する実態調査を行なうとともに、堆肥における大腸菌 K12 および大腸菌 0157 の熱抵抗性を実験モデルで検討した。第四章では、牛糞など堆肥原料の迅速安全化法の検討について述べた。第五章では、分子生物学的蛍光染色法（FISH）により土壌中の大腸菌を迅速かつ特異的に検出する方法の開発について述べた。第六章では、各章の内容を総括して、研究の結論や未来の展望を述べた。

第二章 蛍光染色法および培養法による各種堆肥中の細菌の定量に関する研究

1. 緒言

堆肥の施用により、以下の効果が植生に対し一般的に得られる。1. 養分供給：堆肥には、窒素・リン酸・カリの三大栄養素及び石灰、苦土等の塩基成分が含まれている。また、材料の選択をうまく行くと、マンガン、ホウ酸、鉄、銅、モリブデン等の微量元素が含まれた総合的な養分供給資材となる。2. 土壌の化学性、物理性の改善：土壌中の腐植含量が増加する。さらに、腐植のキレート作用により、施肥リン酸の土壌への固定を抑えることができる。3. 生物性の改善：堆肥の施用により、土壌中の微生物や小動物の生活環境が改善され、その増殖、活動が盛んになる。このことにより、地力の促進や物質循環が向上する。また、微生物の活動が盛んな土壌では、一部の有害な細菌の活動が抑えられることも報告されている。未熟堆肥を使うと、易分解性有機物の急激な分解により、窒素飢餓や異常還元等が生じ、生育障害が起きる場合が多い。

現在、日本の畜産農家の専門化や大規模化を背景として、家畜排泄物の発生量は年間約9,400万tという膨大な量になっている（茅野，2000）。有機物資材の利活用は、畜産廃棄物の処理という面からもその推進が望まれているが、費用対効果の面で難しいこともある。そのため九州南部など各地で、畜産廃棄物の不法投棄（土壌浸透、野積み）による土壌、地下水汚染が進行している。これは、井戸水の硝酸態窒素汚染という形で顕在化している。このため、家畜排泄物による環境汚染の防止や適切な資源化は、ますます重要な課題となってきた。

一方、減農薬・減化学肥料農業や完全無農薬・無化学肥料による有機農業など、環境保全型農業や持続的農業への関心が高まっている。このような背景から、最近、堆肥に関連するいろいろな法律が施行された。すなわち、「家畜排せつ物の管理の適正化および利用の促進に関する法律」が1999年7月に制定され、家畜排泄物について、その適正な管理を確保し、堆肥化して農業の持続的な発展に資する土づくりに積極的に活用するなど、資源とし

での有効利用の促進が図られている。また「持続性の高い農業生産方式の導入の促進に関する法律」が1999年10月に施行され、持続性の高い農業生産方式の導入を促進するための措置を講ずることで、環境と調和のとれた農業生産の確保を図り、農業の健全な発展に寄与することが奨励されている。また、「食品循環資源の再生利用等の促進に関する法律」が施行され（2000年6月）、食品廃棄物について発生抑制と減量化により最終的に処分される量を減少させるとともに、飼料や肥料等の原材料として再生利用するため、食品関連事業者（製造、流通、外食等）による食品循環資源の再生利用等の促進が図られている。これにより、家畜糞や、食品工場、大型店などから排出される食品廃棄物の適正な管理や堆肥化などの資源化が推進されている。さらに、下水汚泥や、飲食店、家庭から排出される生ゴミの堆肥化なども自治体や市民団体により進められている。こうした状況を背景に、バイオマス・ニッポン総合戦略の閣議決定（2002年12月）がなされ、有機資源（バイオマス）の利活用が強力に推進されている。このようにして作られた堆肥など有機質資材の活用は、持続的農業を促進し、高品質で安全な食料を国民に供給する上で、極めて望ましいことである。

このような資源循環型社会の形成に向けた取り組みに伴い、堆肥という古くからの農業資材は、今日的な意義を帯びた有機質資材として見直されるべき時期に来ているといえよう。そのためすでに、学問的見地からも堆肥に関する再評価ともいべき諸研究がスタートしている。例えば、堆肥の肥料成分に関する研究（原田，1990；原ら，2003）、優良堆肥の製造方法（金澤，2002）や施用効果に関する研究（中津ら，2000；前原ら，2003；中野ら，2003）、重金属の蓄積による作物の生育阻害に関する研究（折原ら，2002；後藤ら，2002；磯部ら，2003）などがある。

堆肥の熟成過程や製品となった堆肥中における微生物の菌数やフロラに関しては、培養法による研究事例が数多く報告されている。堆肥の原料（牛糞，生ゴミ，下水汚泥，落葉，麦わらなど）にもよるが、細菌数は大略 $10^7 \sim 10^9$ cfu g⁻¹ dry matter の範囲にあり（Safwat, 1980; Nakai, 2001; Gray *et al.*, 1971; Diaz-Ravina *et al.*, 1989; De Bertoldi *et al.*, 1980; Epstein, 1997）、糸状菌数および放線菌数はいずれも $10^4 \sim 10^8$ cfu g⁻¹ dry matter の範囲にある（Safwat, 1980; Nakai, 2001; Gray *et al.*, 1971; Diaz-Ravina *et al.*,

1989; Epstein, 1997). フロラに関しては, 細菌では *Bacillus*, *Achromobacter*, *Pseudomonas* などが主要菌群として見出されており, 放線菌では *Streptomyces*, *Thermomonospora*, *Thermoactinomyces* が, 糸状菌としては *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Geotrichum* などが見出されている (Epstein, 1997; Finstein *et al.*, 1975). また, 堆肥中の病原菌に関しては, 染谷・井上 (2003) の総説に詳しくまとめられている.

一方, 培養によらない手法を用いて堆肥中の微生物フロラを解析する試みも始まっている. 大西ら (2003) は, Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)法を用いて生ゴミの堆肥化過程における好熱性細菌フロラを解析し, 培養法で得られた結果と大きな差異を見出し, 菌相の推定を培養法に頼ることの限界を指摘している.

近年, 水圏や土壌圏など自然環境中の従属栄養性細菌の大部分が, 生きているが培養できない (Viable but nonculturable, VNC) 状態にあるという現象が広く認識されつつある (McDougald *et al.*, 1998; 染谷ら, 1999; 木暮, 2003). これは, 蛍光顕微鏡技術の発達に負うところが大きい. すなわち, 環境試料中の生きた細菌細胞を蛍光顕微鏡下で直接定量できる種々の技法が開発されてきた結果 (Kogure *et al.*, 1984; Yamamoto *et al.*, 1996; 染谷ら, 2003), 培養法で得られる細菌数の数倍~数百倍の細菌数が環境試料中に見出されてきた.

蛍光色素を用いる直接検鏡法は近年めざましい進歩を遂げている. これは落射型蛍光顕微鏡の著しい発達とヌクレポアフィルターなど優れて平滑なフィルターの出現のおかげである. 蛍光色素としては, 菌体表層部のたんぱく質を染色する fluorescein isothiocyanate (FITC), 核酸および菌体表層部の酸性ポリ多糖に親和性がある acridine orange (AO), AO よりも核酸親和性の高い 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 及び ethidium bromide (EB), 代謝活性のある細胞を選択的に染色する fluorescein diacetate (FDA) および 6-carboxy fluorescein diacetate (CFDA) などが使われている. しかし堆肥中の細菌に関しては, 蛍光染色法などの直接計数法による定量を試みた例はほとんどない. 一方, Someya (1995) は, Ethidium bromide (EB) を用いた蛍光染色法が, 土壌中の細菌の定量に適していることを示した.

そこで本研究では, 九州各地から畜糞堆肥や生ゴミ堆肥などを採取し, それらの理化学

の性状を測定し、さらに、蛍光染色法および培養法を用いて、それらの微生物学的性質を分析した。すなわち、蛍光染色法として EB および CFDA 法を用い、培養法として種々の培地を用いて、各種細菌の測定を行なった。特に堆肥の製造過程において重要な役割を果たしていると考えられているセルロースや脂質などの有機物分解能を持つ微生物群を含む各種の微生物数を測定した。その分析の結果と、堆肥の理化学的性状や外観上にいかなる関係があるのかを検討した。

2. 材料および方法

2.1 堆肥試料

九州各地および岡山県の堆肥化施設 17 カ所から 1997 年 9 月～2004 年 12 月に計 21 点の堆肥試料を採取した。堆肥試料の採取に当たっては、堆肥の山の表面下 30～50cm の部位から約 500g ずつを 5 カ所で採取し、これらをよく混合縮分した後、その約 500 g をビニール袋に密封した（反復なし）。これをクーラーボックスに入れて研究室まで運搬し、4℃で冷蔵保存して 3 日以内に分析に供した。

堆肥試料は全て発酵の終了した堆肥製品である。表 2-1 に示すように、原料は牛糞、鶏糞、生ゴミ、下水汚泥、食品残渣などで、畜舎で敷料として使用されるオガクズなどが副資材として混入している。内訳は、牛糞堆肥が 9 点 (42.9%)、鶏糞堆肥が 4 点 (19.0%)、下水汚泥堆肥が 2 点 (9.5%)、および生ごみ堆肥が 6 点 (28.6%) であった。今回調査した堆肥の発酵期間は、1～6 ヶ月の範囲であった。そのうち、発酵期間 3～4 ヶ月の堆肥が 13 点あり、全体の 61.9%を占めた。

表 2-1 各種堆肥試料の製造場所，原料，副資材および発酵期間

堆肥試料 番号	製 造 場 所	原 料	副資材 (敷料)	発酵期間
1	宮崎県小林市 N 牧場	牛糞	オガクズ	1 ヶ月
2	鹿児島県指宿市 K 牧場	牛糞	廃材木材チップ	5 ヶ月
3	鹿児島県出水市 I 施設	牛糞	オガクズ	3 ヶ月
4	福岡県飯塚市 H 牧場	牛糞	オガクズ, バック	2 ヶ月
5	熊本県小川町 K 施設	牛糞	バーク	6 ヶ月
6	佐賀県唐津市 U 農協 A 施設	牛糞	オガクズ, モミガラ	3 ヶ月
7	佐賀県唐津市 U 農協 B 施設	牛糞	オガクズ, モミガラ	3 ヶ月
8	熊本県菊池市 K 農協	牛糞, 鶏糞	オガクズ, モミガラ	4 ヶ月
9	熊本県大牟田市 M 畜産組合	牛糞, 鶏糞	オガクズ	3.5 ヶ月
10	鹿児島県知覧町 K 施設	鶏糞	—	2 ヶ月
11	熊本県水俣市 M 社 ^{*1}	鶏糞	—	1 ヶ月
12	熊本県水俣市 M 社 ^{*2*}	鶏糞	—	1 ヶ月
13	佐賀県白石町 Y 社	鶏糞	—	3 ヶ月
14	岡山県 N 社	下水汚泥, 鶏糞	—	42 日
15	佐賀県富士町 D 社	食品残さ, 汚泥	バーク	4 ヶ月
16	佐賀県江北町 D 商会	生ゴミ	モミガラ	3 ヶ月
17	佐賀県伊万里市 I 施設 ^{*3}	生ゴミ	オガクズ	3.5 ヶ月
18	佐賀県伊万里市 I 施設 ^{*3}	生ゴミ	オガクズ	3.5 ヶ月
19	佐賀県伊万里市 I 施設 ^{*3}	生ゴミ	オガクズ	3.5 ヶ月
20	長崎県長崎市 N 施設 ^{*4}	生ゴミ	オガクズ	3 ヶ月
21	長崎県長崎市 N 施設 ^{*4}	生ゴミ	オガクズ	3 ヶ月

堆肥試料は 1997 年 9 月～2004 年 12 月に採取した。

*1 ペレット状製品。

*2 粉末状製品。

*3 試料採取時期：試料 17, 01 年 7 月；試料 18, 01 年 12 月；試料 19, 04 年 12 月。

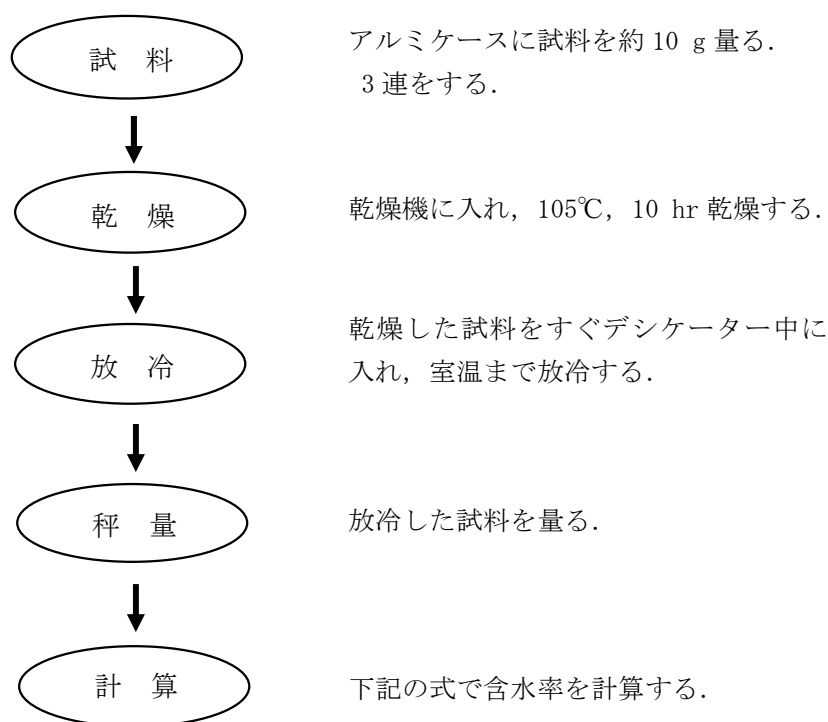
*4 試料採取時期：試料 20, 04 年 10 月；試料 21, 04 年 12 月。

2.2 理化学的性質の分析

堆肥試料の理化学的性質に関しては、含水率、pH(H₂O)、電気伝導率 (EC)、陽イオン交換容量 (CEC)、全炭素 (T-C)、全窒素 (T-N) など 6 項目を測定した。

2.2.1 含水率の測定

乾熱法 (土壤標準分析・測定法委員会, 1986) にしたがって、堆肥試料約 10 g を秤量瓶またはアルミケースに入れ秤量して、105 °C、18~24 時間乾燥処理してから、デシケーター中で室温までに放冷したのち秤量し、含水率を求めた (図 2-1)。通常は 3 連で測定し、その平均値を算出した。

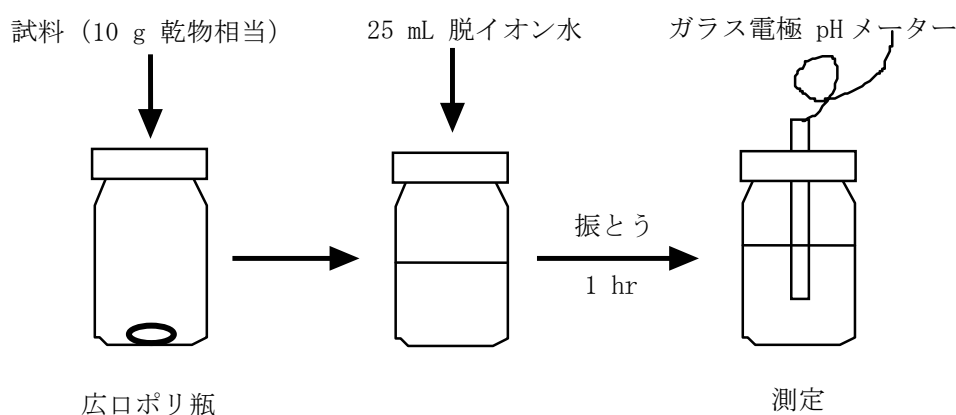


$$\text{水分含量 (含水率)} = \frac{(\text{風袋} + \text{湿潤試料}) \text{重} - (\text{風袋} + \text{乾燥試料}) \text{重}}{(\text{風袋} + \text{湿潤試料}) \text{重} - \text{風袋重}} \times 100 (\%)$$

図 2-1 試料含水率の測定

2.2.2 pH (H₂O)の測定

ガラス電極法（土壌環境分析法編集委員会，1997）で pH(H₂O)を測定した（図 2-2）．乾物 10 g 相当量の新鮮試料を 125 mL のポリエチレン振とう瓶に入れ，試料に含まれる水分を考慮して乾物量に対する水の比が 1：2.5 になるように脱イオン水を添加した．1 時間振とう後，ガラス電極計（HORIBA pH meter M-11）を試料に浸し，表示値を読み取った．

図 2-2 pH(H₂O)の測定

2.2.3 電気伝導率 EC の測定

EC は堆肥試料中の水溶性塩類総量の指標として有効である．1:5 水浸出法で EC を測定した（図 2-3）．乾物 10 g 相当量の新鮮試料を 100 mL 容のポリエチレン振とう瓶に入れ，試料に含まれる水分を考慮して乾物量に対する水の比が 1:5 になるように脱イオン水を添加した．一定時間よく振とうした後，EC メーター（HORIBA, Twin Cond B-173）を用いて測定した．

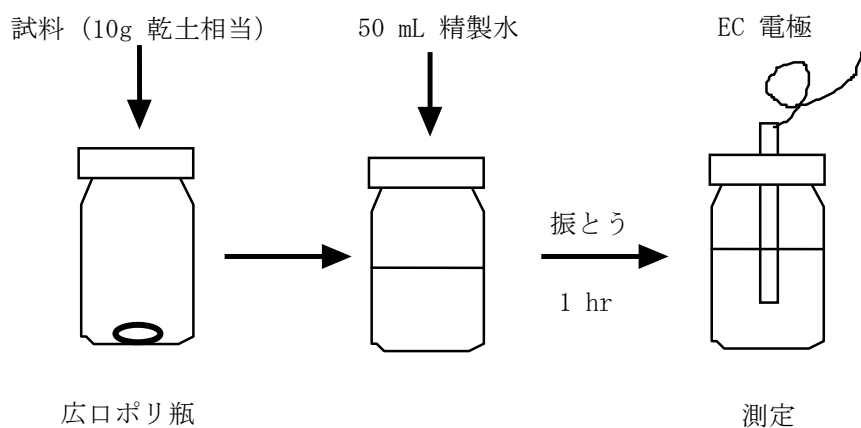


図 2-3 電気伝導率 (EC) の測定

2.2.4 陽イオン交換容量 CEC の測定

セミ・マイクロ法 (土壤環境分析法編集委員会, 1997) で陽イオン交換容量 (CEC) を測定した. 図 2-4 のように, ろ紙を底部に敷いたイオン浸出装置の浸透管に堆肥試料を 4.0 g 充填し, これに 1 N 酢酸アンモニウム溶液 100 mL を約 2 時間かけて通液し, 堆肥中の陽イオンを交換浸出させた. さらに, 80%エタノール 50 mL を通液して洗浄した. この時点で堆肥は NH_4^+ で飽和されているので, 10%塩化カリウム溶液 100 mL を通液して, NH_4^+ を交換溶出させた. 得られた溶出液を水蒸気蒸留法に供し, NH_4^+ を定量して CEC を求めた.

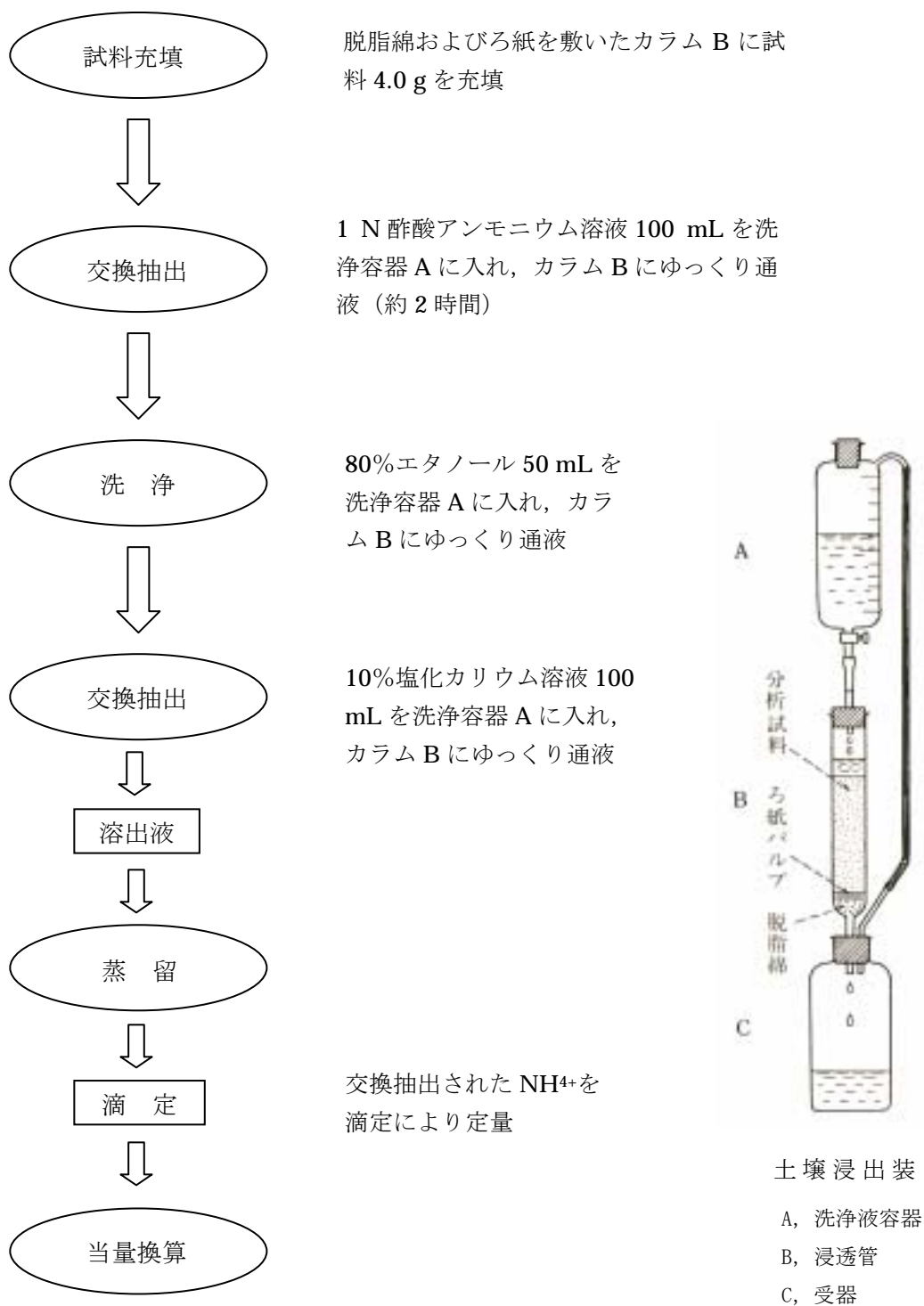


図 2-4 CEC の測定法 (セミ・マイクロ法)

2.2.5 全炭素(T-C)の測定

全炭素 (T-C) の測定にはチューリン法 (土壌標準分析・測定法委員会, 1986) を用いた (図 2-5). 堆肥中の有機炭素は, 重クロム酸カリウムの濃硫酸溶液 (クロム酸・硫酸混合液) と共に加熱すると, 次式のように酸化される.

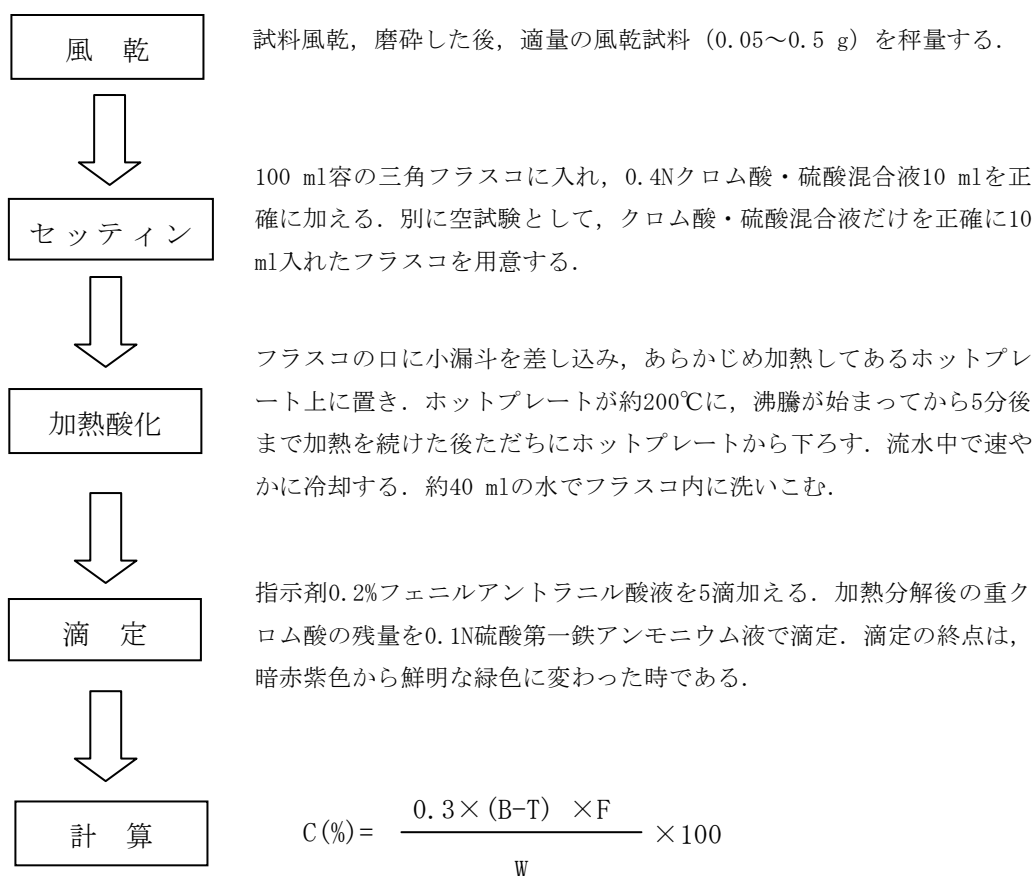
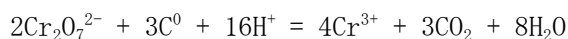


図2-5 全炭素分析法 (Tyurin法)

C: 分析試料の炭素含量 (%) ; B: 空試験滴定値 (ml) ; T: 分析試料滴定値 (ml) ;
 F: 0.1N硫酸第一鉄アンモニウム液の補正係数; W: 分析試料採集量 (g)

重クロム酸は, 反応した炭素量に応じて消費されるので, あらかじめ既知量の過剰の重クロム酸を加えておけば, 反応後残っている重クロム酸を標準鉄 (II) 溶液で滴定するこ

とによって、有機物の酸化に消費された重クロム酸の量が求められ、それから炭素量を算出することができる。

2.2.6 全窒素(T-N)の測定

全窒素 (T-N) の測定にはサリチル酸－硫酸分解法 (土壤環境分析法編集委員会, 1997) を用いた (図 2-6)。堆肥試料中に硝酸態窒素を含む場合には、硝酸を還元してアンモニア

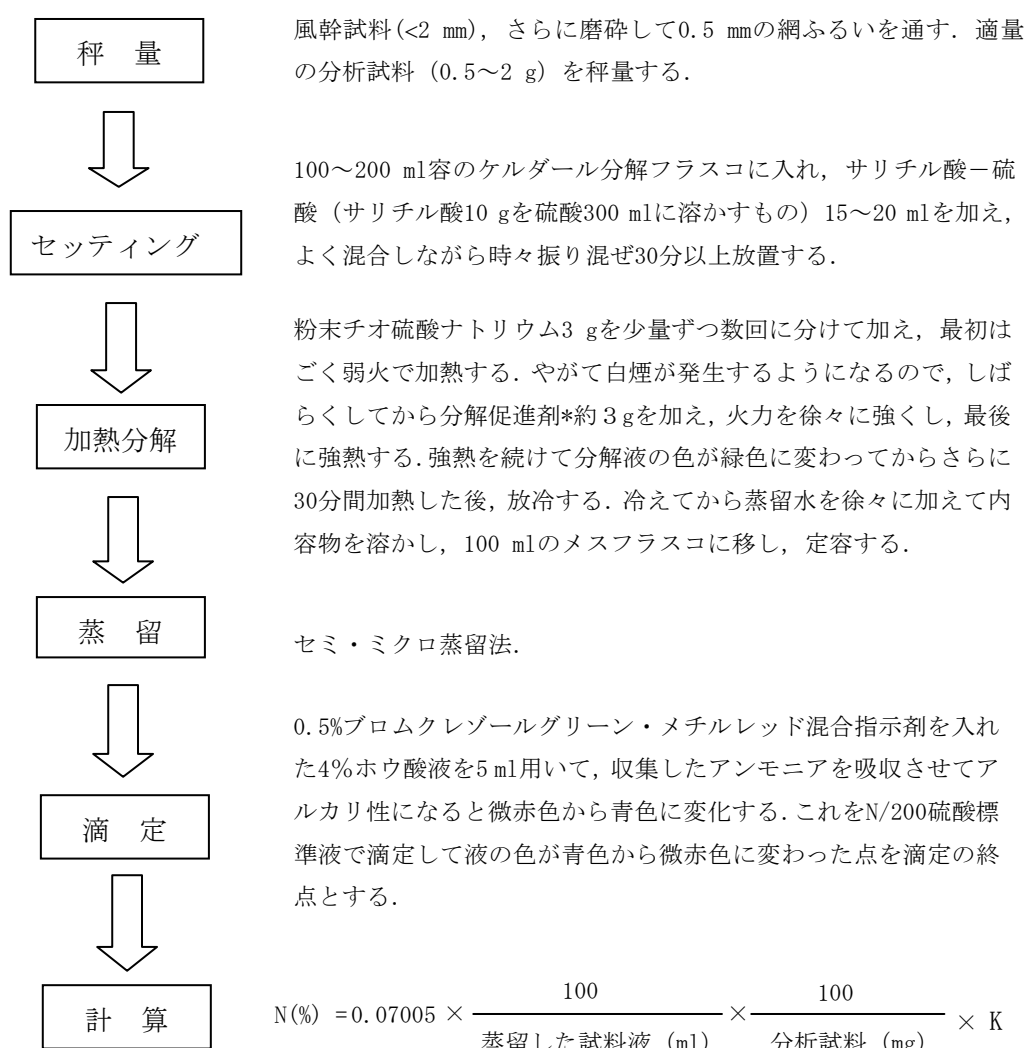


図2-6 全窒素分析法 (サリチル酸－硫酸分解法)

f: N/200硫酸標準液の補正係数; b: ブランク滴定値 (ml); t: 分析試料滴定値 (ml);
k: 風乾土/幹土重 (105℃乾燥); N/200硫酸標準液1ml=0.07005 mg(NH₄-N)

に変わる必要があるため、サリチル酸およびチオ硫酸ナトリウムを加えて硫酸分解を行う（サリチル硫酸分解法）。分解によって生成したアンモニウム態窒素を定量するため、硫酸分解液の一定量を強アルカリ性とした後、水蒸気蒸留によってアンモニアを蒸留し、これを滴定した。アンモニアを定量する方法としては、一定量の既知濃度のホウ酸液にアンモニアを吸収させ、それを既知濃度の硫酸で直接滴定してアンモニア量を求めた。

2.3 試料の懸濁液の調製

図 2-7 に示したように、堆肥試料 10.0 g(生重)を滅菌生理食塩水 (0.85% NaCl) に加えて全量を 100 mL とし、ステンレスブレードの付いたホモジナイザー（日本精機，エース

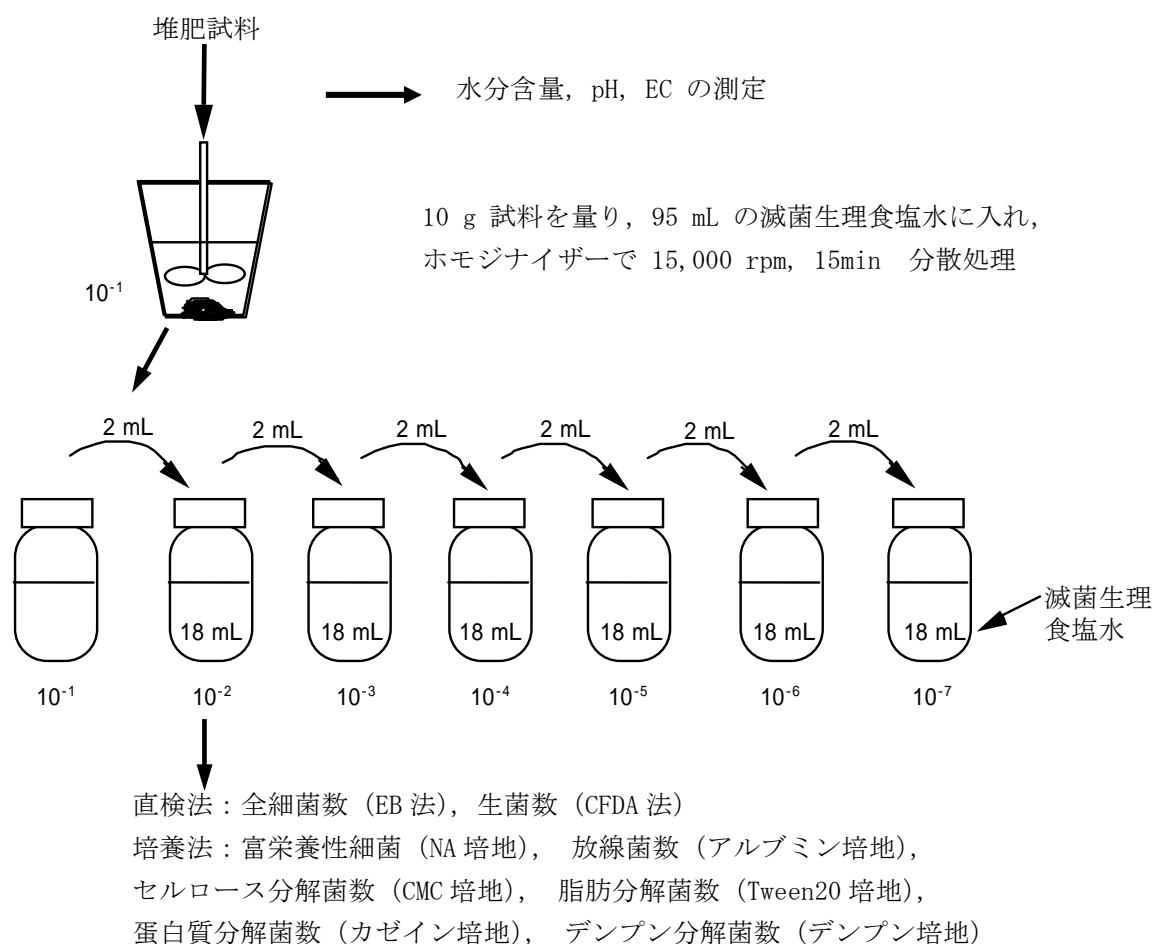


図 2-7 堆肥懸濁液の調製

ホモジナイザー AM-3) を用いて 15,000 rpm, 15 分間の分散処理を行った。この 10^{-1} 希釈懸濁液を 5 mL 取り, 45 mL の滅菌生理食塩水に加えて, 10^{-2} 希釈懸濁液とした。この希釈操作を順次繰り返して, 10^{-8} までの希釈懸濁液を調製して, 蛍光染色法または培養法による微生物定量に供した。

2.4 蛍光染色法

本研究では, EB 法を用いて全細菌数を求め, CFDA 法を用いて全生細菌数を求めた。

2.4.1 EB 蛍光染色法

試料中の全細菌数の定量は, Ethidium bromide (EB) 蛍光染色法 (Someya, 1995) を用いた。その原理は, 図 2-8 に示すように, 細菌の核酸に対する EB 親和性で, 核酸は 450 nm

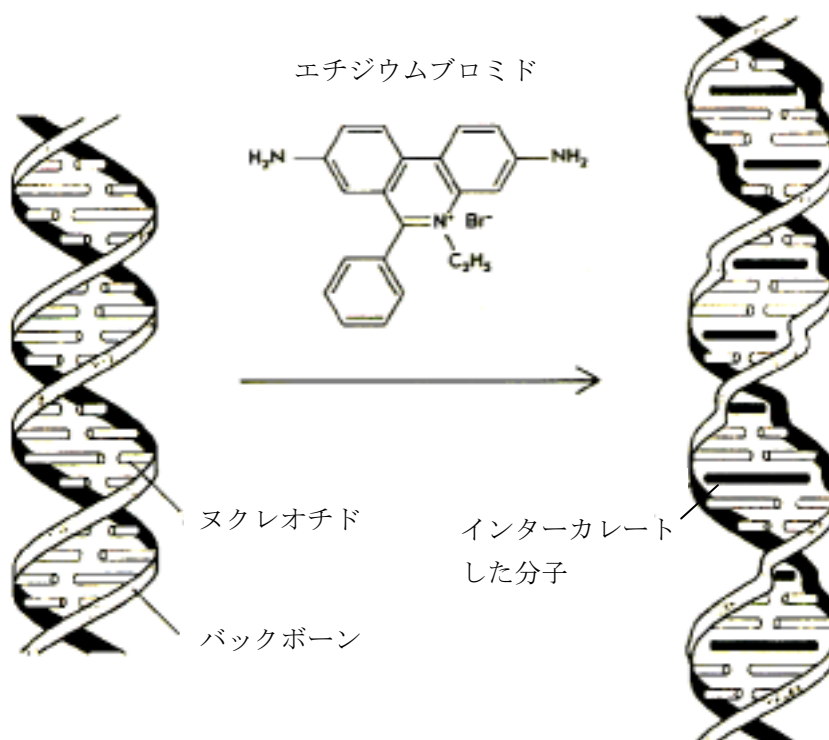


図 2-8 EB 染色の原理

エチジウムブロミドの DNA 分子中へのインターカレーション。エチジウムブロミドが入り込むために塩基対の間隔が広がり, 規則正しい糖-リン酸バックボーンはゆがめられ, 螺旋のピッチが増す。

付近の波長に吸収のピークがあり、この波長の青色光の吸収を利用する。EB分子はDNAの二本鎖の内部にインターカレートする性質を持ち、その際、DNA分子は、吸収した青色光のエネルギーを効率よくEB分子に渡す。これをエネルギー転移という。エネルギーを受けたEB分子は、励起されて590 nm（オレンジ色）の蛍光を発する。EB分子本来の吸収は300 nmなので、この300 nmの波長をあまり含まず450 nmの波長を豊富に含む青色光でEB染色した菌体を照射すると、遊離したEB分子は励起されず、インターカレートした分子のみがDNAからのエネルギー転移によって励起されて蛍光を発する。つまり、菌体の中で、DNA二本鎖のある部分のみが光るわけである。したがって、EBによってDNAを持つ菌体と他の物質とを染め分けることができる。細胞の生死にはかかわらず、生菌だけでなく死菌も染色される。EBは蛍光色素なので、試料を染色したのち落射型蛍光顕微鏡で観察すると、菌体のみが明るいオレンジ色の蛍光を発して見える。これを計数して、試料中の菌数を算出できる。

EB 蛍光染色法 (Someya, 1995) は、蛍光色素 (EB) が土壌有機物や粘土粒子に非特異的に吸着しにくい点で、アクリジンオレンジ (AO) 蛍光染色法 (Hobbie *et al.*, 1977) などよりも優れている。その手順は図 2-9 に示すように、有効直径 15.0 mm の吸引濾過器にメンブランフィルター (孔径 5.0 μm) とヌクレポアフィルター (ヌクレポア社または他社の同等品、孔径 0.2 μm) を順に載せ、その上にファンネルをセットした。試料粒子を均一に分散させるため、ヌクレポアフィルターをあらかじめ 100 $\mu\text{g/mL}$ の Poly-L-lysine 水溶液に 10 分間以上浸し、親水化処理したものを濾紙にはさんで乾燥させた後に使用した。ファンネルに除菌水を 1 mL 程度入れてから 10^{-2} の試料希釈懸濁液を 50 μL ~100 μL 加え、フィルターホルダー全体を軽く振ってよく混合させた後、吸引してフィルター上に試料を捕集した。EB 液 (100 mg L^{-1} , 0.1 mol L^{-1} リン酸緩衝液, pH7.2) 約 500 μL をフィルター上に載せて室温で 3 分間染色した。EB はシグマ社の製品 (純度約 95%) を用いた。吸引濾過してファンネル内の染色液を取り除き、スライドグラス上に IMMERSION OIL (オリンパス, 非蛍光, 屈折率 1.516) を一滴落とし、そこに染色したヌクレポアフィルターをのせた。その上に IMMERSION OIL を一滴のせてカバーグラスで封入し、最後に 100 g 程度のゴム栓をカバーグラスの上に約 1 分間置き、カバーグラスをスライドグラスに圧着さ

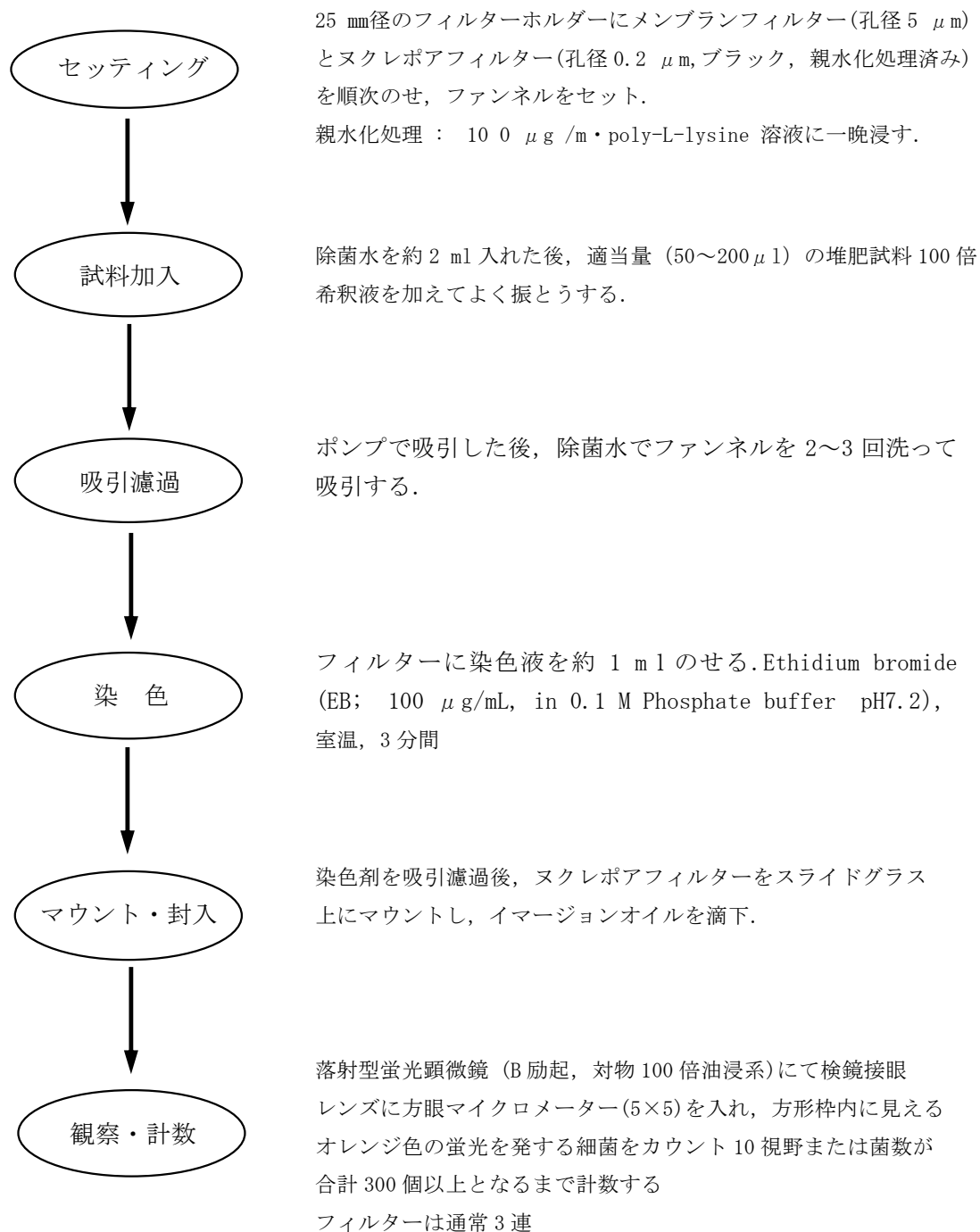


図 2-9 EB 法 (Someya, 1995) の手順

せた。このプレパラートを蛍光顕微鏡にセットし、B 励起下 (450~490 nm)、対物レンズ 40~100 倍で細菌の観察・計数を行った。1 試料あたり 3 枚のプレパラートを作製し、落射型蛍光顕微鏡 (オリンパス BH2-RFL) を用いて検鏡した。細菌数の計数には接眼レンズに 5×5 グリッド (40×40 μm) ないし 10×10 グリッド (80×80 μm) を用いてオレンジ色の蛍光を発する細菌を計数した。一視野当たり 30 個以上の細菌数となる条件下で、フィルター 1 枚につき 10 視野を計測し、1 試料当たり 3 枚のフィルターを作成し、平均値を求めた。顕微鏡視野当たりの菌数から試料中の菌数を計算する方法は表 2-2 にしたがった。

なお、使用した器具や Poly-L-lysine 水溶液および EB 溶液は、メンブレンフィルター (孔径 0.2 μm) で除菌したものを用いた。

表 2-2 直検法による菌数の計算

試料中の全細菌数 N (cells/g 乾土) は

$$N = \frac{\text{方形枠内の平均菌数 (cells)} \times \text{有効濾過面積 (mm}^2\text{)} \times \text{生土重}}{\text{方形枠内の面積 (mm}^2\text{)} \times \text{土壌希釈液の量 (mL)} \times \text{土壌希釈率} \times \text{乾土重}}$$

ここで、有効濾過面の直径 = 15.0 mm

方形枠の一辺の長さは

対物 レンズ (倍率)	×10	×20	×40	×100
一 辺 サ イ ズ (μm)	80	40	20	8

これから、換算係数*を得る

Grid	倍 率			
	×10	×20	×40	×100
5×5	1.10×10^3	4.42×10^3	1.77×10^4	1.10×10^5
10×10	2.76×10^2	1.10×10^3	4.42×10^3	2.76×10^4

* 換算係数 = 有効濾過面積 (mm²) / 方形枠内の面積 (mm²)

$$N = \text{換算係数} \times \frac{\text{方形枠内の平均菌数 (cells)} \times \text{生土重}}{\text{土壌希釈液の量 (mL)} \times \text{土壌希釈率} \times \text{乾土重}}$$

液体試料の場合、試料中の全細菌数 N (cells/mL) は

$$N = \text{換算係数} \times \frac{\text{方形枠内の平均菌数 (cells)}}{\text{試料希釈液の量 (mL)} \times \text{試料希釈率}}$$

2.4.2 CFDA 蛍光染色法

試料中の全生細菌数の定量には、6-carboxy fluorescein diacetate (CFDA) 蛍光染色法を用いた。CFDA 法は、細胞内酵素エステラーゼ活性および細胞膜の選択性を利用して生きて細菌を検出する手法である。CFDA は蛍光色素 6-carboxy fluorescein に酢酸基が二つエステル結合してできた化合物で、これは自身蛍光を持たない。CFDA は極性が低い（疎水性である）ため、細胞膜を容易に通過して細胞内に入る。細胞内で CFDA は、非特異的なエステラーゼ（リパーゼやフォスファターゼ）によって加水分解され、蛍光色素 carboxy fluorescein を遊離する。これは極性が高いので細胞膜を通過できず細胞内に滞留する（生物の細胞膜は選択透過性を持ち、特にイオンや糖、アミノ酸など極性の高い、すなわち親水性の物質はむやみに通さない性質を持っている）。したがって CFDA を用いると、酵素活性を持ち細胞膜に選択透過性を持つという意味で「生きている」細胞のみを蛍光顕微鏡下で検出することができる（染谷ら、2003、図 2-10）。

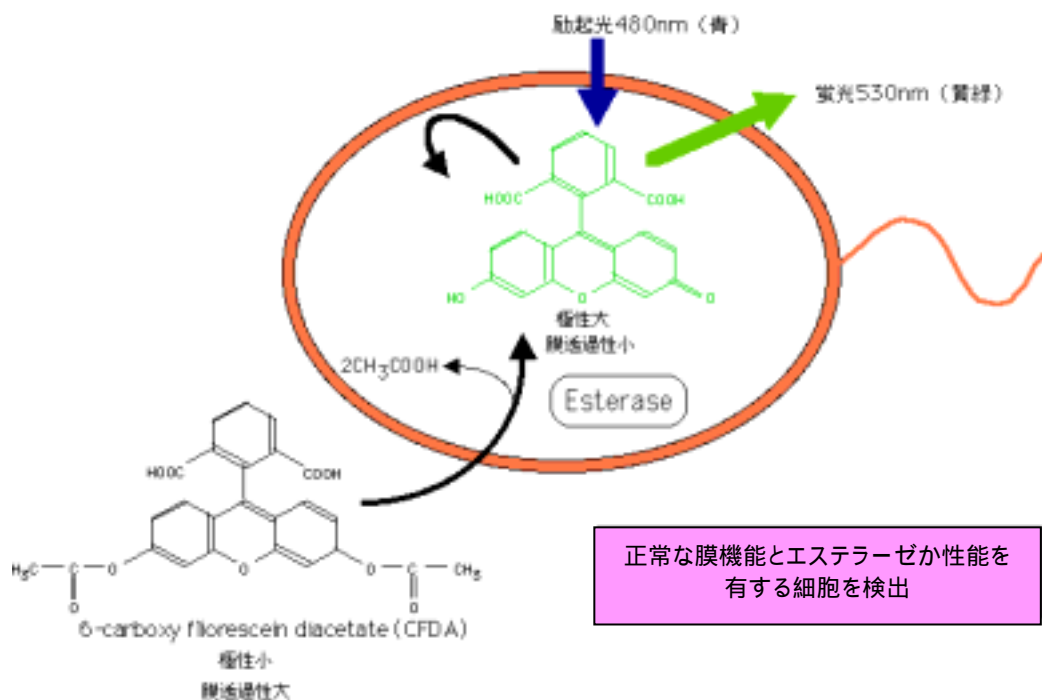


図2-10 CFDA染色の原理

全生細菌数の測定には、Yamamoto ら (1996) の CFDA 蛍光染色法を土壌・堆肥用に改変した方法を用いた (図 2-11)。

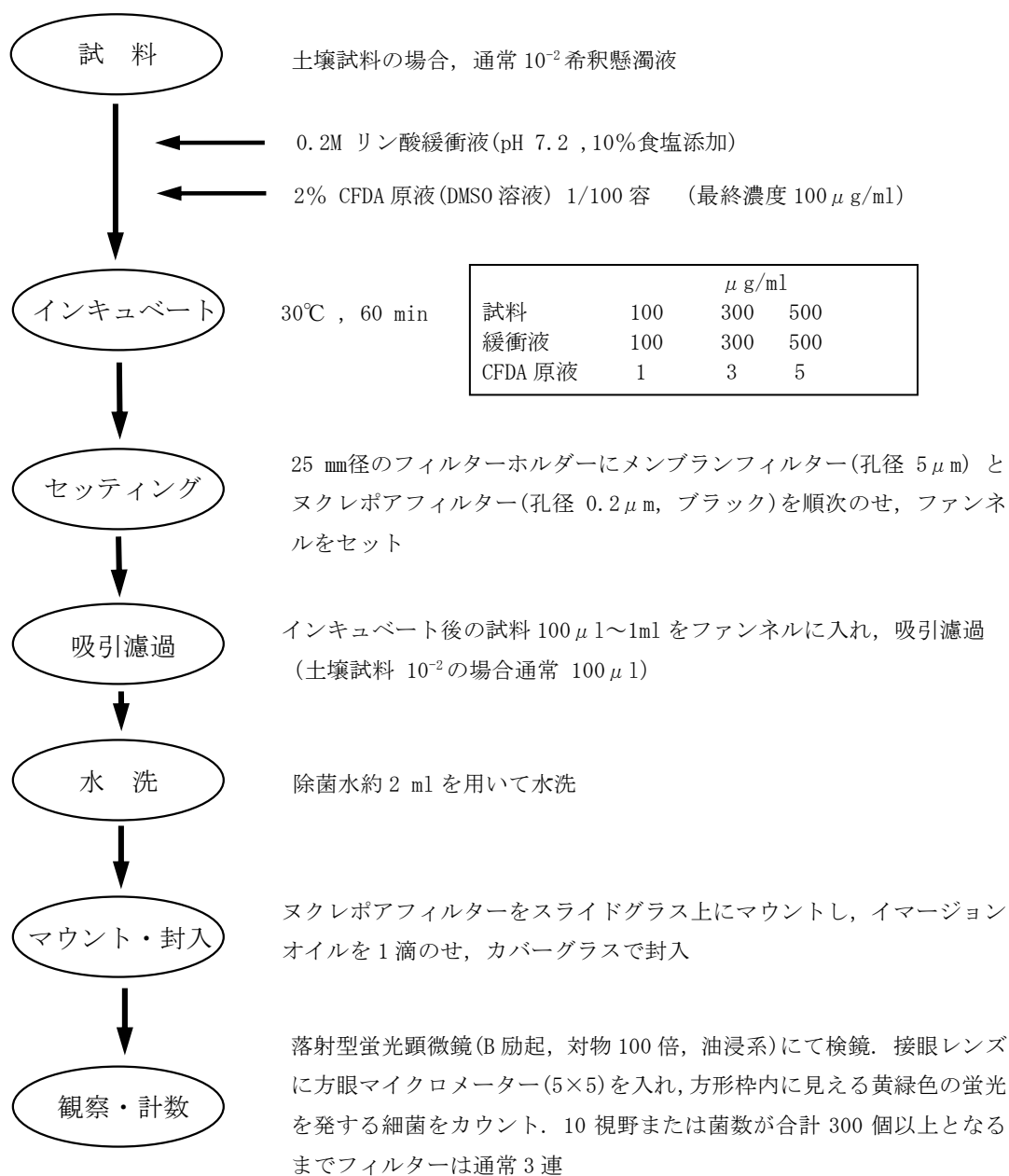


図 2-11 改良 CFDA 蛍光染色法の手順

マイクロチューブに 0.2 mol L^{-1} リン酸緩衝液食塩水 (10%NaCl 添加, pH7.2) を $500 \mu\text{L}$ 入れ, 試料の 10^{-2} 希釈懸濁液を $500 \mu\text{L}$ 加えた. これに 20 g L^{-1} CFDA 原液 (ジメチルスルホキシド溶液) を $5 \mu\text{L}$ 加えてよく混合し, アルミブロックヒーターで 30°C , 1 時間インキュベートした. CFDA は Molecular Probes 社より入手した. EB 蛍光染色法と同様にセットしたファンネル内に除菌水約 1 mL を入れ, これに, インキュベート後の反応液 $100 \sim 200 \mu\text{L}$ を加えて吸引濾過し, さらに除菌水約 1 mL を吸引濾過することで水洗した. プレパラートの作製および細菌数の計測は EB 蛍光染色法に準じた. B 励起下で黄緑色の蛍光を発する細菌を計数し, CFDA 生菌数とした.

2.4.3 EB/CFDA 二重染色法

EB/CFDA 二重蛍光染色法には, CFDA 蛍光染色法に従って試料を染色した後, EB 液をフィルター上に載せて室温で 1 分間染色した. プレパラートの作製および細菌数の計測は EB 蛍光染色法に準じた.

2.4.4 検鏡

蛍光観察は, 見たい細胞や分子だけを選択的に見ることができると, 近年の生命科学の研究に欠かせない手法になってきている (写真 2-1).

本研究では, 蛍光染色後のプレパラートを 40 倍あるいは 100 倍の対物レンズ (油浸系) を付けた落射型蛍光顕微鏡下で観察し, 堆肥試料中の細菌を計数した. Nikon Optiphot EFD-3 落射型蛍光顕微鏡を使った. 接眼レンズに 5×5 のグリッド型マイクロメーター, または 10×10 のグリッド型マイクロメーターを入れて, このグリッド内の染色された堆肥細菌の計数を行った. フィルター (プレパラート) 当たり 10 視野を検鏡した, 1 試料につき 3 連のフィルターを作成し, その平均値と標準偏差を求めた. 蛍光像の撮影には, ZEISS 社製高感度 3 CCD デジタルカメラ (AxioCam HRC) を蛍光顕微鏡に取り付けたシステムを用いた.

蛍光顕微鏡のフィルターの波長特性を表 2-3 に示した.

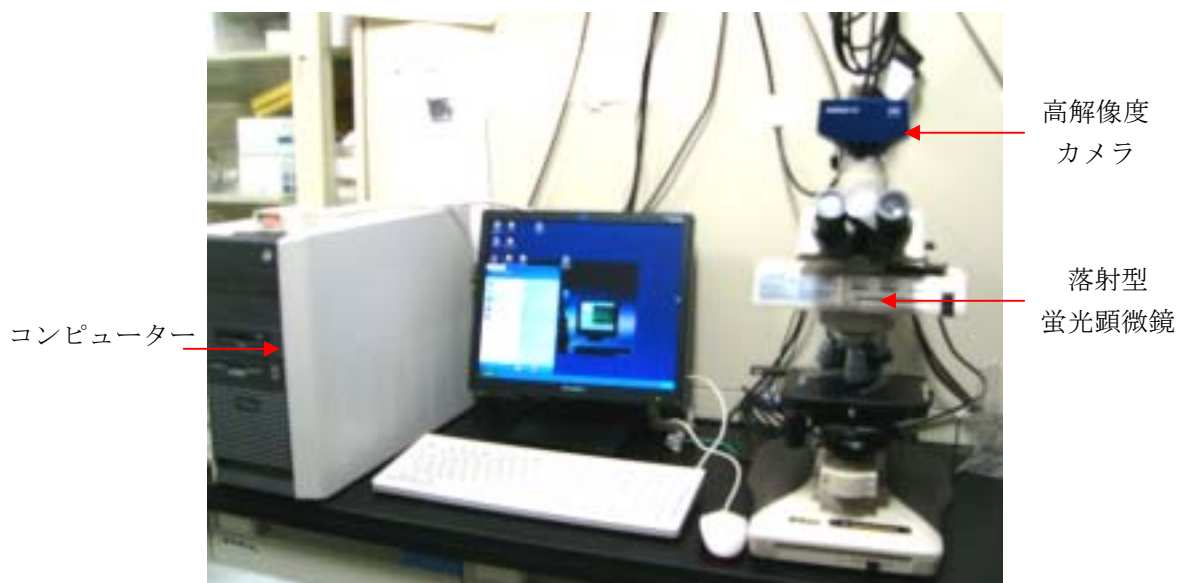


写真 2-1 蛍光顕微鏡システム

表 2-3 蛍光顕微鏡のフィルターの特性

フィルター		波 長 (nm)		
		Olympus BH2-RFK	Olympus BH2-RFL	Nikon Optipphoto EFD-3
UV	励起光	300-400	290-400	330-380
	観察光	≥410	≥410	≥420
V	励起光	385-420	380-420	380-420
	観察光	≥445	≥445	≥450
B	励起光	360-500	360-505	450-490
	観察光	≥505	≥505	≥520
G	励起光	450-560	525-575	510-560
	観察光	≥575	≥575	≥590

2.5 培養法

細菌を適切な培地の上に接種して適当な温度や、pH、酸素などの条件下で培養するという方法は、従来から細菌に対する重要な研究方法である。細菌を計数するため、培養法は大別的に平板法と most probable number (MPN) 法とに分けられる。本研究では、平板法を用いて細菌の菌数を求めた。その一般的な手順を図 2-12 に示した。堆肥中の微生物の分析項目には、従属栄養性細菌として NB 細菌および DNB 細菌を、また、放線菌、油脂分解菌、デンプン分解菌、蛋白質分解菌およびセルロース分解菌を選定した。

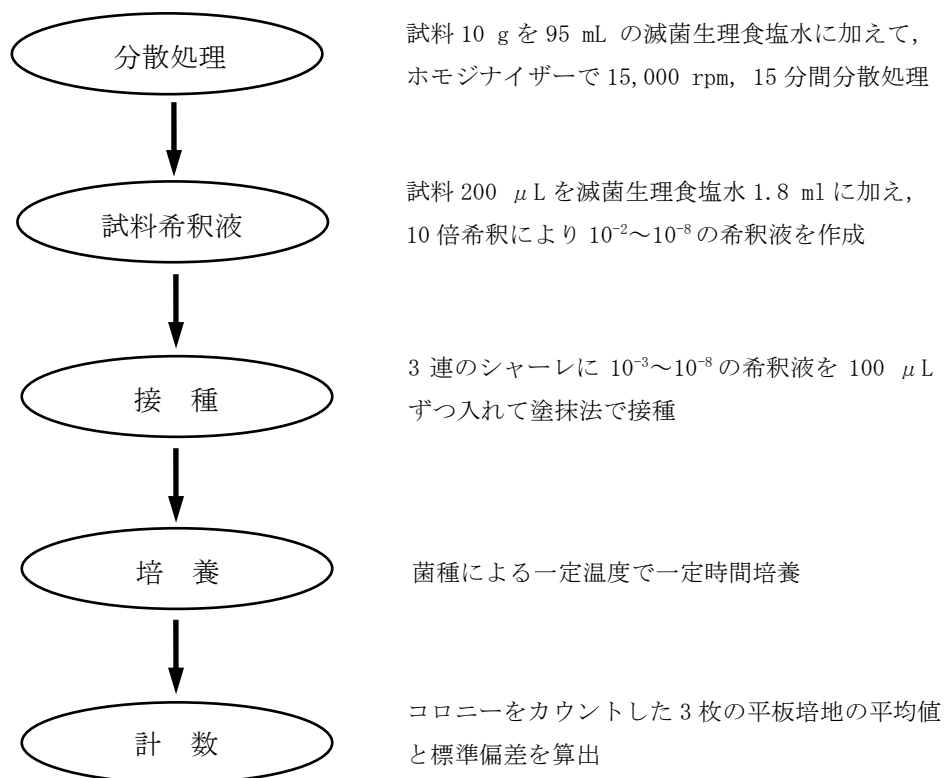


図 2-12 希釈平板法の手順

従属栄養性細菌のうち NB 細菌は, nutrient broth (NB) 寒天培地上で計測される細菌で, DNB 細菌は, 100 倍希釈 NB 寒天培地上で計測される細菌である (土壤微生物研究会, 1992). 放線菌はアルブミン培地上で計測し (土壤微生物研究会, 1992), 油脂分解菌は Tween20

培地(Sierra, 1956), デンプン分解菌はデンプン培地(コーワン, 1979), 蛋白質分解菌はカゼイン培地 (Martley *et al.*, 1970), またはゼラチン培地(Hankin *et al.*, 1974), セルロース分解菌は CMC 培地(Suyama *et al.*, 1993)を用いて希釈平板法により定量した. 表 2-4 に, これら微生物の培地, 培養条件および細菌の判定方法を示す.

表 2-5 に, 使用培地の組成を示す. 堆肥試料の 10^{-2} ~ 10^{-8} の希釈懸濁液のうち, 適切と予想された希釈液を 3 段階選び, 各希釈段階 5 連の培地に各 $100 \mu\text{L}$ を塗抹接種した. NB 細菌および DNB 細菌を計数する際は, 培地上に出現した細菌コロニーを全て計測し, 放線菌の計数には, 実体顕微鏡下で放線菌の菌糸が認められるコロニーのみを計数した.

油脂分解菌の計数には, コロニーの周囲に Tween 20 の分解によるカルシウム塩の白濁帯が出現しているものを計数した.

デンプン分解菌では, 培地にルゴール液 (6.7 g L^{-1} ヨウ化カリウム, 3.3 g L^{-1} ヨード) を注ぎ, デンプン・ヨード反応により濃紫色となった培地上で透明帯を持つコロニーを計数した.

セルロース分解菌の計数には, 染谷の carboxymethyl cellulose (CMC) 平板法を改良した Suyama ら (1993) のコンゴレッド法を用いた. 培養後, 培地表面に 0.1%コンゴレッド水溶液を約 10 mL 載せて 15 分ほど静置した後, これを捨て, 1 mol L^{-1} 食塩水約 10 mL を載せて 15 分間静置してから排液した. コンゴレッドによってオレンジ色に染まった培地上で周囲に透明帯が出現したコロニーを計数した.

蛋白質分解菌では, カゼインの分解による白濁帯が出ているコロニーを計測した. また, Hankin ら (1974) のゼラチン培地法も用いた. この場合, 培養後の平板培地に飽和硫酸アンモニウム溶液を約 10 mL 載せて 60 分間静置し, 塩析によりゼラチンを白濁沈澱させた後, 透明帯を持つコロニーを計数した.

表 2-4 培養法による細菌の定量法

目的微生物	培地	検出原理	試料希釈次数	培養条件	判定方法
従属栄養性細菌	NB 培地	富栄養性細菌の検出	$10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$	30°C, 5 日間	コロニーを全て計測する
従属栄養性細菌	DNB 培地	低栄養性細菌の検出	$10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$	30°C, 18 日間	コロニーを全て計測する.
放線菌	アルブミン培地	放線菌のみと検出する	$10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$	30°C, 1 ヶ月	放線菌コロニーのみを全て計測する.
油脂分解菌	Tween20 培地	Tween の分解	$10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$	30°C, 5 日間	コロニーの周りにカルシウム塩の白い沈殿が出ているものを計測する.
デンプン分解菌	デンプン培地	デンプンの分解	$10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$	30°C, 3 日間	ルゴール液を注ぎコロニーの周りに cclear zone が見られるものを計測する.
セルロース分解菌	CMC 培地	CMC の分解	$10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$	30°C, 3 日間	0.1% Congo Red 水溶液で培地表面を 15 分ほど満たした後, 流し, 1M 食塩水で 15 分間満たす. クリアゾーンができたものを計測する.
蛋白質分解菌	カゼイン培地	カゼインの分解	$10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$	30°C, 2 日間	コロニーの周りに白い沈殿が出ているものを計測する
蛋白質分解菌	ゼラチン培地	ゼラチンの分解	$10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$	30°C, 2 日間	硫酸アンモニウム液を注ぎ, 白濁沈殿させた後, cclear zone が見られるものを計測する.

NB, nutrient broth; CMC, carboxymethyl cellulose.

表 2-5 培地の組成一覧表

普通寒天培地		アルブミン培地	
成分	g/L	成分	g/L
肉エキス	5.0	エッグアルブミン	0.25
ペプトン	10.0	グルコース	1.0
塩化ナトリウム	5.0	K ₂ HPO ₄	0.5
寒天	15.0	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.2
	pH7.0	Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.01
		寒天	15.0
			pH6.9
Tween20 培地		CMC 培地	
成分	g/L	成分	g/L
ペプトン	10.0	リン酸水素二カリウム	1.0
塩化ナトリウム	5.0	硝酸アンモニウム	0.3
塩化カルシウム (2 水和物)	0.1	塩化カリウム	0.5
寒天	15.0	硫酸マグネシウム (7 水和物)	0.5
Tween20	10 mL	硫酸鉄	0.01
	pH7.4	CMC	5.0
		寒天	10.0
			pH6.8
デンプン培地		カゼイン培地	
成分	g/L	成分	g/L
酵母エキス	10.0	Sodium Caseinate	10.0
可溶性デンプン	5.0	N-Z Case Pulus	5.0
寒天	15.0	酵母エキス	2.5
	pH not adjusted	Glucose	1.0
		塩化カルシウム	0.88
		クエン酸 3 ナトリウム	4.4
		寒天	15.0
			pH6.6
ゼラチン培地			
成分	g/L		
肉エキス	5.0		
ペプトン	10.0		
塩化ナトリウム	5.0		
ゼラチン	4.0		
寒天	15.0		
	pH7.0		

3. 結果および考察

3.1 堆肥試料の理化学的性状

堆肥試料 21 点の理化学的性状を表 2-6 に示す。これらの堆肥試料はいずれも、地域で評判の高い堆肥化施設から採取された。

表 2-6 各種堆肥試料の理化学的性状

堆肥試料 番号	含水率 (%)	pH (H ₂ O)	EC (mS cm ⁻¹)	CEC (cmol _c kg ⁻¹)	T-C (%)	T-N (%)	C/N
1	45.4	8.2	3.3	61.8	36.3	2.6	14.0
2	47.9	8.8	5.1	60.5	30.1	2.2	13.6
3	45.8	9.0	4.2	43.9	33.2	2.1	15.8
4	40.4	6.8	3.0	51.2	19.7	1.1	17.9
5	58.3	8.2	4.4	55.2	35.1	1.8	19.5
6	41.5	8.2	5.5	63.0	33.1	3.1	10.7
7	46.3	8.0	5.7	57.4	37.2	2.9	12.8
8	29.2	9.4	6.1	31.4	29.0	1.7	17.1
9	45.1	9.3	5.9	60.1	34.2	2.0	17.1
10	23.2	7.9	6.9	48.4	30.6	3.7	8.3
11	16.1	8.0	7.1	61.4	36.3	3.7	9.8
12	15.7	6.7	8.5	56.2	37.3	4.9	7.6
13	52.5	8.4	7.4	NT*	33.1	3.5	9.5
14	28.9	8.1	13.4	NT	31.7	2.1	15.1
15	44.3	6.6	5.7	61.3	27.2	1.3	20.9
16	20.9	6.6	4.2	41.2	46.3	2.6	17.8
17	54.0	6.7	7.9	79.0	17.5	1.2	14.6
18	53.2	8.2	6.5	33.5	35.2	2.1	16.8
19	57.6	7.4	6.4	47.5	23.9	1.7	14.1
20	13.0	6.3	3.5	71.5	28.9	1.5	19.3
21	15.0	7.1	3.8	68.3	27.1	1.4	19.4
平均	37.8	7.8	5.9	55.4	31.6	2.3	14.8
範囲	13.0-58.3	6.3-9.4	3.0-13.4	31.4-79.0	17.5-46	1.1-4.9	7.6-20.9

* NT, 未測定.

含水率は 13.0~58.3% の範囲にあり、50% を越すものが 5 点あった。堆肥製品中の含水率が高いと、保管中に変質する可能性、特に病原菌の再増殖の可能性が指摘されている (Betoldi *et al.*, 1988)。 (社) 日本施設園芸協会の生鮮野菜衛生管理ガイドでも、堆肥の含水率は品質保持上、30% 以下が好ましいとされている (社団法人日本施設園芸協会, 2003)。この点、約 62% の堆肥試料で含水率が 30% 以上であった。

堆肥試料 21 点の pH は 6.3~9.4 の範囲で、中性からアルカリ性の範囲にあり、アルカリ性の強い試料の中には、アンモニア臭の強いものがあった。

EC は 3.0~13.4 mS cm⁻¹ の範囲にあった。土壌中の EC が 2.0 mS cm⁻¹ を越すと作物の生育に悪影響が生じ、除塩対策が必要となると言われている (松坂ら, 1994)。この点、供試堆肥はいずれも通常の使用では問題ないと思われた。

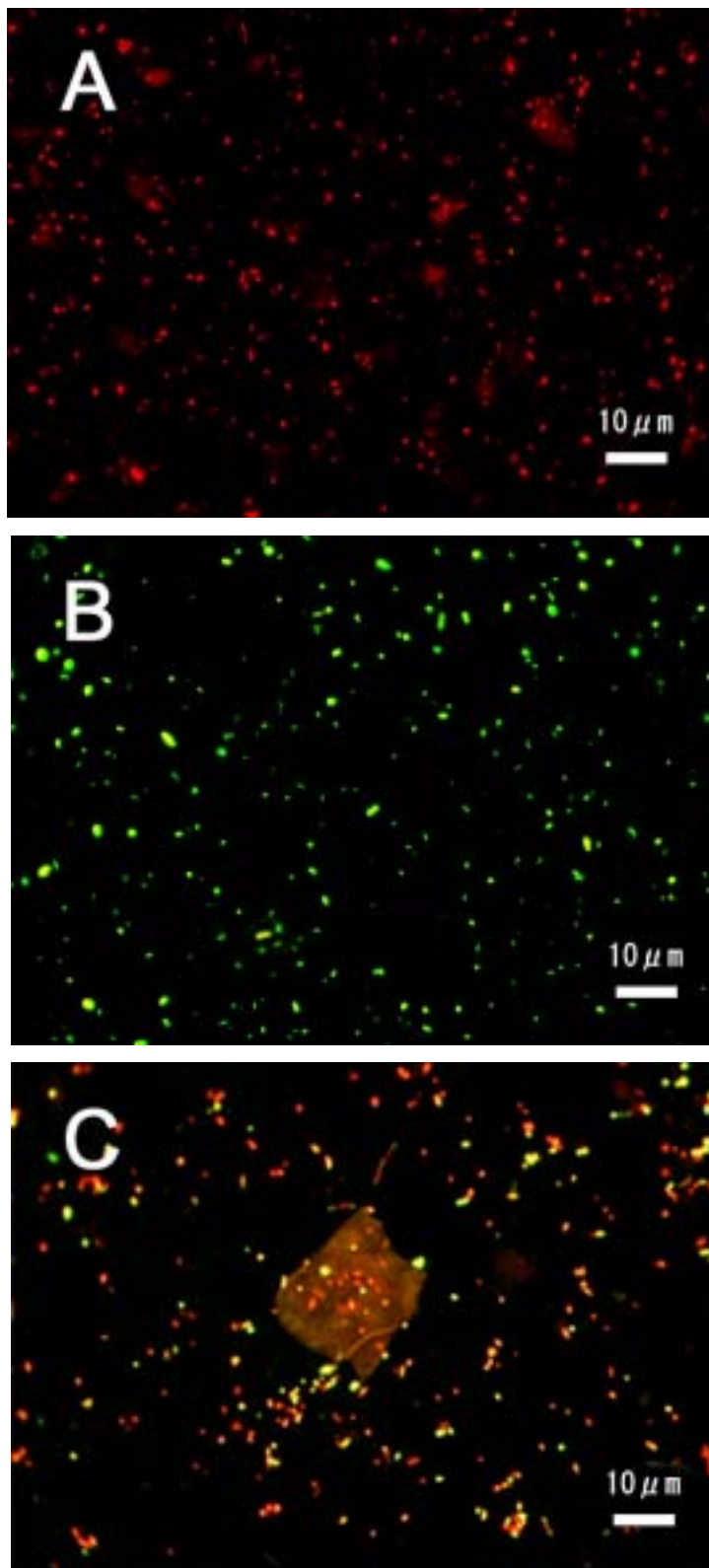
CEC は 31.4~79.0 cmol_ckg⁻¹ の範囲にあった。各種完熟堆肥の CEC はおおむね 40~120 cmol_ckg⁻¹ の範囲と言われ (Harada *et al.*, 1980; 藤原, 1997)、供試堆肥試料の CEC は、ほぼこの範囲に含まれていた。

全炭素 (T-C) は 17.5~46.3% の範囲、全窒素 (T-N) は 1.1~4.9% の範囲にあり、特に鶏糞堆肥 (試料 10~13) では T-N が高い傾向を示した。

堆肥試料の炭素率 (C/N 比) は、7.6~20.9 の範囲にあった。一般的に、完熟堆肥の持つ C/N 比は 15~20 であり (藤原, 1997)、オガクズなどの炭素率の高い副資材を原料に含まない鶏糞堆肥 4 点 (試料 10~13) を除き、ほぼこの範囲に入っていた。したがって CEC の値も勘案して、供試試料はいずれもほぼ完熟であったと判断された。

3.2 蛍光染色法による細菌数

EB 蛍光染色法、CFDA 蛍光染色法および EB/CFDA 二重蛍光染色法を用いて堆肥試料を染色した例を写真 2-2 に示す。EB 蛍光染色法では、全ての微生物 (主に細菌) 細胞がオレンジ色の蛍光を発する粒子として蛍光顕微鏡下で観察された。試料中に存在する有機物は、赤色の不定形物質として観察され、微生物との識別は比較的容易であった。一方、CFDA 蛍光染色法では、有機物はほとんど染色されず、暗色の背景の中で、生きた細菌が黄緑色の明るい蛍光を発した。また、EB/CFDA 二重蛍光染色法では、生細菌が CFDA により黄緑色に、



試料 17 (生ゴミ堆肥) を供試した. A, EB 蛍光染色法による画像 (B 励起). 全ての微生物 (主に細菌) の細胞がオレンジ色の蛍光を発する粒子として観察される. 有機物が薄い赤色に染まっている. B, CFDA 蛍光染色法による画像 (B 励起). 全ての生きている微生物 (主に細菌) の細胞が黄緑色蛍光を発する粒子として観察される. C, EB/CFDA 二重蛍光染色法による画像 (B 励起). 生きた細胞は黄緑色の粒子として, また死菌はオレンジ色の粒子として観察される. 生細胞は EB でも染色されているが, CFDA による黄緑色の蛍光が強いため, 黄緑色に見える. 画面中央に生ゴミ由来の四角形の有機物が見える.

写真 2-2 堆肥の蛍光染色像

また死菌が EB によりオレンジ色に染色され、両者の区別は明瞭であった。

ただし、EB/CFDA 二重蛍光染色法で得られた生細菌数は、CFDA による単染色で得た生細菌数よりも少ない傾向が認められた（データ略）。これは、CFDA では EB と比べて、染色直後では蛍光強度がより強いが、蛍光の退色がより早いことが主な原因と考えられた。すなわち、生菌は CFDA のみならず EB でも染色されているが、染色直後では EB の蛍光は CFDA の蛍光にマスクされ、肉眼的には認められない。しかし、CFDA の蛍光の退色につれて EB の蛍光が現れ、死菌と誤認しやすくなると考えられた。したがって、EB/CFDA 二重蛍光染色法は、デモンストレーションには適しているが、生細菌数の計測には不適で、その目的には CFDA 単染色（CFDA 蛍光染色法）が適していると判断された。

CFDA 蛍光染色法は、微生物の持つエステラーゼ活性に基づいて生細胞を検出している。エステラーゼは全ての生物細胞が有する酵素であるから、原理的には全ての生細胞を検出することができる。この意味で、CFDA 蛍光染色法で得られる細菌数を「全生細菌数」と呼ぶことができると考えられる。

EB 蛍光染色法および CFDA 蛍光染色法を用いて、21 点の堆肥試料中の細菌数を測定した。その結果(表 2-7), EB 法によって得られる全細菌数は $7.8 \times 10^9 \sim 9.3 \times 10^{10}$ (平均 3.7×10^{10}) cells g⁻¹ dry matter という値であった。これは、肥沃な水田土壌（染谷ら, 2003）の 2～9 倍も高い菌数であった。

一方、CFDA 蛍光染色法による全生細菌数は $1.4 \times 10^9 \sim 8.2 \times 10^{10}$ (平均 1.2×10^{10}) cells g⁻¹ dry matter であった。生菌率（全細菌数に対する全生細菌数の比）は 5.4%～169%（平均 41.8%）であった。ここで、生菌率が 100%を超える試料（試料 1, 2, 4, および 9）があった理由は、両染色法の検出感度の差にあると考えられた。すなわち、EB は A0 などと比べると有機物への非特異的吸着が少ないが、セルロースなどの粗大有機物が多い試料では、多少は非特異的に吸着され、背景と細菌粒子とのコントラストがやや低下する。一方、CFDA 蛍光染色法では、蛍光物質 CF は細胞内に貯留するため、背景はほとんど染色されず極めて暗い（写真 1, B）。このため、EB 蛍光染色法では、粗大有機物が多い試料で、コントラストの低下による細胞の見落としがあり得ると考えられた。この推論は、生菌率が 100%を超える試料（1, 2, 4, および 9）が、イナワラ含量の高い牛糞堆肥に限られていることから

も指示された。したがって、生菌率が100%以上の場合、生菌率はほぼ100%と見なしてよいと判断した。

表 2-7 各種堆肥試料中の全細菌数，全生細菌数，及びその生菌率

堆肥試料番号	全細菌数* ¹	全生細菌数* ¹	生菌率* ² (%)
	(EB 蛍光染色法)	(CFDA 蛍光染色法)	
	(cells g ⁻¹ dry matter)		
1	$(5.0 \pm 0.5) \times 10^{10}$	$(8.0 \pm 1.8) \times 10^{10}$	160.0
2	$(6.8 \pm 1.3) \times 10^{10}$	$(8.2 \pm 1.2) \times 10^{10}$	120.6
3	$(9.3 \pm 2.5) \times 10^{10}$	$(4.8 \pm 1.2) \times 10^{10}$	51.6
4	$(4.1 \pm 2.0) \times 10^{10}$	$(4.8 \pm 0.9) \times 10^{10}$	117.1
5	$(2.3 \pm 0.4) \times 10^{10}$	$(5.4 \pm 4.6) \times 10^9$	23.5
6	$(8.6 \pm 2.1) \times 10^{10}$	$(3.8 \pm 1.9) \times 10^{10}$	44.2
7	$(6.2 \pm 0.3) \times 10^{10}$	$(9.6 \pm 0.4) \times 10^9$	15.6
8	$(2.2 \pm 0.5) \times 10^{10}$	$(1.4 \pm 5.1) \times 10^9$	6.4
9	$(3.9 \pm 0.9) \times 10^{10}$	$(6.6 \pm 1.4) \times 10^{10}$	169.2
10	$(2.3 \pm 0.5) \times 10^{10}$	$(2.0 \pm 1.0) \times 10^9$	8.7
11	$(6.7 \pm 3.0) \times 10^{10}$	$(3.6 \pm 2.0) \times 10^9$	5.4
12	$(3.5 \pm 0.7) \times 10^{10}$	$(6.0 \pm 6.4) \times 10^9$	17.1
13	$(1.5 \pm 0.3) \times 10^{10}$	$(2.5 \pm 0.2) \times 10^9$	16.7
14	$(2.3 \pm 0.2) \times 10^{10}$	$(1.8 \pm 0.1) \times 10^{10}$	78.3
15	$(3.2 \pm 0.9) \times 10^{10}$	$(1.1 \pm 0.4) \times 10^{10}$	34.4
16	$(7.8 \pm 0.8) \times 10^9$	$(1.7 \pm 0.2) \times 10^9$	21.8
17	$(6.3 \pm 1.5) \times 10^{10}$	$(2.6 \pm 0.2) \times 10^{10}$	41.3
18	$(5.9 \pm 0.2) \times 10^{10}$	$(1.8 \pm 0.3) \times 10^{10}$	30.5
19	$(7.1 \pm 0.2) \times 10^{10}$	$(2.8 \pm 0.5) \times 10^{10}$	39.4
20	$(2.7 \pm 0.2) \times 10^{10}$	$(4.6 \pm 0.3) \times 10^9$	17.0
21	$(2.2 \pm 0.2) \times 10^{10}$	$(5.9 \pm 0.3) \times 10^9$	26.8
平均* ³	3.7×10^{10}	1.2×10^{10}	41.8

*1 菌数値は，3連のフィルターの平均値±標準偏差を示す。

*2 (全生細菌数 / 全細菌数) × 100。

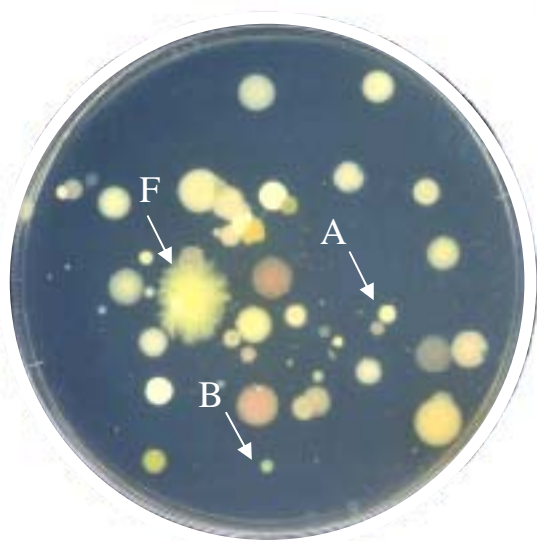
*3 菌数には相乗平均を，比率には相加平均を用いた。なお，生菌率が100%を超える場合，100%として平均を求めた。

一部の牛糞堆肥(試料7)と鶏糞堆肥の多く(試料8, 10~13)では、生菌率が5.4~17.1%と低い傾向が認められた。生菌率の高低は、微生物の代謝活性や菌体のターンオーバー速度を反映するものと考えられるが、これらの点については、より多くの知見の集積が必要である。

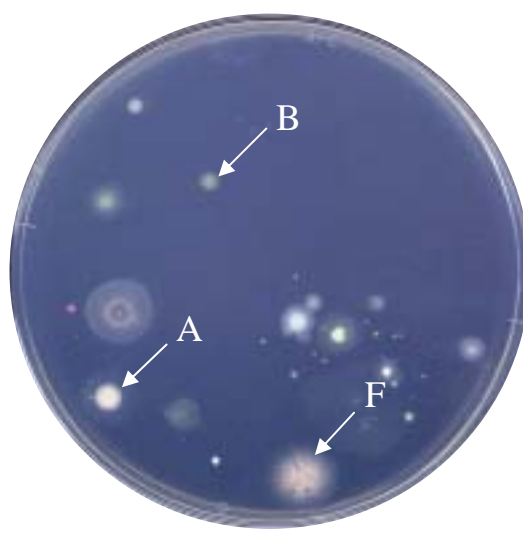
3.3 希釈平板法による従属栄養性細菌数および放線菌数

堆肥試料21点を希釈平板法に供し、NB細菌、DNB細菌及び放線菌の菌数を測定した。各種培地上のコロニーの様子を写真2-3に示した。従属栄養性細菌のうち、NB培地によって計測されるNB細菌は(表2-8)、 $4.6 \times 10^6 \sim 5.2 \times 10^9$ (相乗平均 4.6×10^8) cfu g⁻¹ dry matter で、DNB培地によって計測されるDNB細菌は $4.2 \times 10^5 \sim 1.1 \times 10^9$ (相乗平均 3.8×10^7) cfu g⁻¹ dry matter であった。NB細菌数とDNB細菌数の比は、0.7~381 (平均48.1)で、NB細菌数はDNB細菌数より数倍~数百倍多かった。NB細菌には、高濃度の有機物を利用して増殖できる富栄養性細菌が多く含まれる。一方、DNB細菌の多くには、低栄養性細菌(有機物濃度1 mg L⁻¹で増殖する細菌)が含まれることが土壌などで知られている(Ohta *et al.*, 1983)。したがってこの結果から、完熟堆肥中では、培養可能な従属栄養性細菌のうちの多くを富栄養性細菌が占め、低栄養性細菌は少数者である可能性が示唆された。このように、富栄養性細菌が優占することは、堆肥が富栄養環境にあることの反映と考えられる。

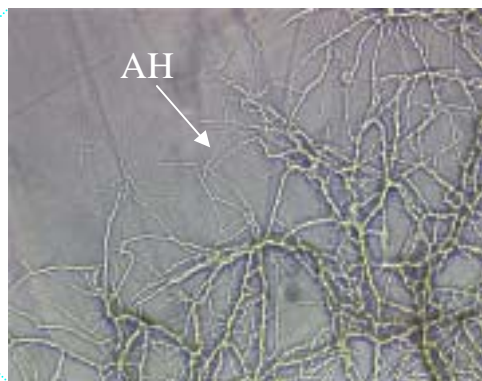
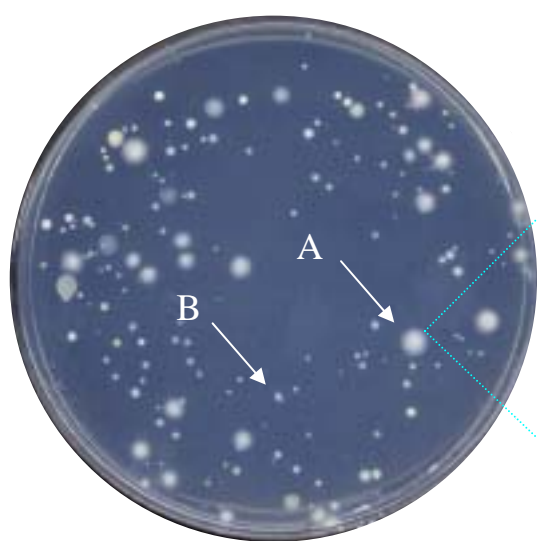
コロニー形成率(全生細菌数に対するNB細菌数またはDNB細菌数のうちの高い方の菌数の比)は0.1%~46.9% (平均8.5%)であった。この結果は、CFDA蛍光染色法で検出される生きた細菌のうち、平均約9割が培地上でコロニーを形成しないことを意味しており、堆肥中の細菌の多くがVNC状態にあることを示唆する。湖沼・海洋・土壌など環境中の細菌の多くがVNC状態にあることはよく知られている(McDougald *et al.*, 1998; 染谷ら, 1999; 木暮, 2003)。一方、ヒトの糞便では約50%が培養可能であることが、全真正細菌をターゲットとするFISHにより明らかにされている(Franks *et al.*, 1998)。土壌や淡水などと比べれば、堆肥中の有機物濃度や組成は糞便に近く、その点では、堆肥中で生存している細菌の多くが培養されてもいいと予想されたが、それを覆す結果であった。環境



A. NB 培地上の富栄養性細菌のコロニー



B. DNB 培地上の低栄養性細菌のコロニー



C. アルブミン培地上の放線菌のコロニーおよびその菌糸

写真 2-3 富栄養性細菌，低栄養性細菌および放線菌

A, 放線菌； AH, 放線菌菌糸； B, 細菌； F, 糸状菌.

中の細菌が VNC 状態に陥る原因には、塩分、乾燥、高温、低温などのストレスが知られている (McDougald *et al.*, 1998; 染谷ら, 1999; 木暮, 2003). 堆肥中の細菌が VNC になる原因としては、発酵熱による温度ストレスの可能性が考えられる。

表 2-8 各種堆肥試料中の従属栄養性細菌数及び放線菌数

堆肥試料 番号	従属栄養性細菌*1 (cfu g ⁻¹ dry matter)		A/B	コロニー 形成率*2 (%)	放線菌 (cfu g ⁻¹ dry matter)
	NB 細菌 (A)	DNB 細菌 (B)			
1	$(3.7 \pm 0.0) \times 10^9$	$(4.4 \pm 0.6) \times 10^8$	8.4	4.6	$(4.6 \pm 1.0) \times 10^8$
2	$(7.1 \pm 0.0) \times 10^7$	$(1.5 \pm 0.3) \times 10^6$	47.3	0.1	$(4.4 \pm 0.3) \times 10^6$
3	$(4.9 \pm 0.0) \times 10^9$	$(5.2 \pm 0.1) \times 10^8$	9.4	10.2	$(1.9 \pm 0.0) \times 10^6$
4	$(2.5 \pm 0.0) \times 10^9$	$(8.0 \pm 7.7) \times 10^8$	3.1	5.2	$(3.5 \pm 0.0) \times 10^8$
5	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^9$	$(2.2 \pm 0.6) \times 10^8$	5.0	20.4	$(2.6 \pm 3.4) \times 10^7$
6	$(2.5 \pm 0.2) \times 10^9$	NT*3	-	6.5	$(2.4 \pm 0.6) \times 10^8$
7	$(4.5 \pm 1.3) \times 10^9$	NT	-	46.9	$(4.5 \pm 0.5) \times 10^6$
8	$(2.3 \pm 0.1) \times 10^8$	$(4.0 \pm 2.1) \times 10^6$	57.5	16.4	$(9.2 \pm 4.9) \times 10^5$
9	$(6.7 \pm 0.2) \times 10^8$	$(3.2 \pm 1.2) \times 10^7$	20.9	1.0	$(1.3 \pm 0.5) \times 10^6$
10	$(3.5 \pm 0.1) \times 10^7$	$(4.6 \pm 0.9) \times 10^5$	76.1	1.8	$(6.5 \pm 9.1) \times 10^4$
11	$(4.6 \pm 1.1) \times 10^6$	$<10^5$	-	0.1	$<10^5$
12	$(1.6 \pm 0.0) \times 10^8$	$(4.2 \pm 2.5) \times 10^5$	381	2.7	$<10^5$
13	$(1.7 \pm 0.1) \times 10^7$	NT	-	2.4	NT
14	$(6.1 \pm 0.2) \times 10^8$	$(3.4 \pm 0.8) \times 10^8$	1.8	3.4	$(1.5 \pm 0.7) \times 10^6$
15	$(8.0 \pm 0.1) \times 10^8$	$(1.1 \pm 0.6) \times 10^9$	0.7	10.0	$(5.7 \pm 5.0) \times 10^6$
16	$(3.0 \pm 0.5) \times 10^8$	NT	-	3.8	$(2.5 \pm 0.5) \times 10^7$
17	$(4.7 \pm 1.2) \times 10^8$	NT	-	1.8	$(1.3 \pm 0.1) \times 10^8$
18	$(2.2 \pm 0.1) \times 10^9$	$(3.8 \pm 0.5) \times 10^8$	5.8	12.0	$(2.3 \pm 0.5) \times 10^8$
19	$(5.2 \pm 0.2) \times 10^9$	$(6.4 \pm 1.1) \times 10^8$	8.1	18.6	$(1.1 \pm 0.4) \times 10^8$
20	$(5.3 \pm 1.1) \times 10^7$	NT	-	1.2	$(1.0 \pm 0.5) \times 10^7$
21	$(5.9 \pm 0.7) \times 10^8$	NT	-	10.0	$(1.8 \pm 0.1) \times 10^8$
平均*4	4.6×10^8	3.8×10^7	48.1	8.5	9.6×10^6

*1 菌数は、5連の平板の平均値±標準偏差を示す。

*2 (NB 細菌数または DNB 細菌数のうちの高い方の菌数 / CFDA による全生細菌数) × 100

*3 NT, 未測定。

*4 菌数には相乗平均を、比率には相加平均を用いた。

上記の結果から、堆肥中の細菌の定量には、培養法では不十分であり、培養によらない微生物定量法である蛍光染色法が有効であることが示唆された。

アルブミン培地で計測した放線菌数は $6.5 \times 10^4 \sim 4.6 \times 10^8$ (相乗平均 9.6×10^6) cfu g⁻¹ dry matter であった。牛糞堆肥および生ゴミ堆肥では $10^6 \sim 10^8$ cfu g⁻¹ dry matter と比較的多く、一方、鶏糞堆肥ないし牛糞・鶏糞混合堆肥(試料 8~13)では 10^6 cfu g⁻¹ dry matter 以下で少ない傾向が認められた。放線菌は、一般的にセルロースなど難分解性有機物を分解するため、牛糞堆肥や生ゴミ堆肥では多いが、鶏糞堆肥では少ないものと推察された。また、放線菌の多くは抗生物質生産能を持ち、土壌病害菌に対して拮抗作用を持つ種類も含まれる(日本放線菌学会, 2001)。したがって、高い放線菌数は、堆肥の付加価値を高めるとも考えられるが、その実証的検討は今後の課題である。

培養法による既往の諸研究によると、堆肥中の細菌数は麦わら堆肥や落葉堆肥では $10^8 \sim 10^9$ cfu g⁻¹ dry matter と多い(Safwat, 1980; Webley, 1947; Hankin *et al.*, 1976)。一方、家畜糞(牛糞, 豚糞や鶏糞)堆肥や生ゴミ堆肥, 下水汚泥堆肥では $10^7 \sim 10^9$ cfu g⁻¹ dry matter と(Nakai, 2001; Gray *et al.*, 1971; Diaz-Ravina *et al.*, 1989; De Bertoldi *et al.*, 1980; Nakasaki *et al.*, 1992) やや少ない傾向が認められる。逆に放線菌数は、麦わら堆肥や落葉堆肥では $10^5 \sim 10^6$ cfu g⁻¹ dry matter とやや少なく(Safwat, 1980; Hankin *et al.*, 1976), 家畜糞堆肥で $10^5 \sim 10^7$ cfu g⁻¹ dry matter とやや多く(Nakai, 2001; Epstein *et al.*, 1997), さらに生ゴミ堆肥や下水汚泥堆肥では $10^6 \sim 10^8$ cfu g⁻¹ dry matter と多い傾向が見られる(Safwat, 1980; Gray *et al.*, 1971; Diaz-Ravina *et al.*, 1989; De Bertoldi *et al.*, 1980; Epstein, 1997)。本研究で得られた家畜糞堆肥や生ゴミ堆肥中の培養法による細菌数や放線菌数は、これらの傾向とほぼ一致していた。

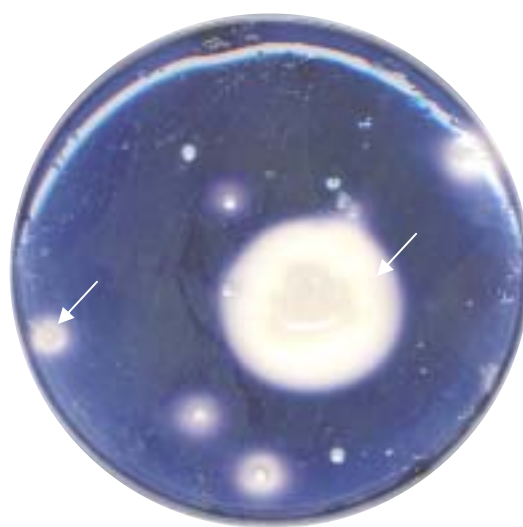
3.4 希釈平板法による各種有機物分解菌数

堆肥試料 10 点中の各種有機物分解菌数を測定した。そのコロニーの代表例を写真 2-4 に示す。これらの選択培地上の目的菌は、目的有機物の分解による透明帯または白濁帯を形成し、他の菌との識別は多くの場合、容易であった。各種有機物分解菌数を表 2-9 に示す。鶏糞堆肥(試料 13)や下水汚泥・鶏糞混合堆肥(試料 14)では、牛糞堆肥(試料 6, 7)



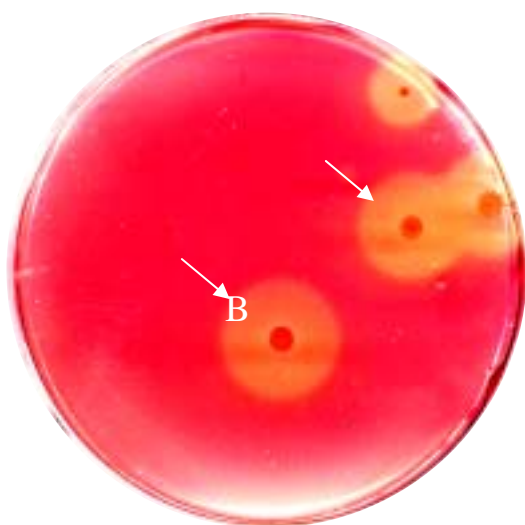
A, Tween 20 培地上の油脂分解菌

* コロニーの周りに Tween 20 の分解によるカルシウム塩の白濁帯を形成.



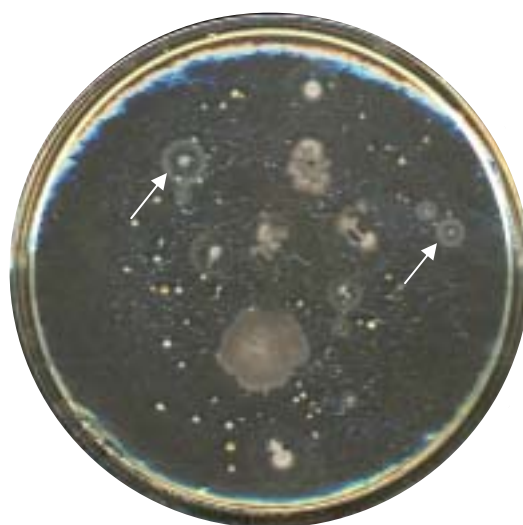
B, デンプン培地上のデンプン分解菌

* ルゴール液により濃紫色となった培地上でコロニーの周囲に透明帯を形成.



C, CMC 培地上のセルロース分解菌

* コンゴレッドによってオレンジ色に染まった培地上でコロニーの周囲に透明帯を形成.



D, カゼイン培地上の蛋白質分解菌

* コロニーの周りにカゼインの分解による白濁帯を形成.

写真 2-4 生ゴミにおける各種有機物分解菌

表 2-9 堆肥試料中の各種有機物分解菌群数

堆肥試料 番号	原料	油脂分解菌		デンプン分解菌		セルロース分解菌	
		菌数*1 (cfu g ⁻¹ dry matter)	存在比*2 (%)	菌数 (cfu g ⁻¹ dry matter)	存在比 (%)	菌数 (cfu g ⁻¹ dry matter)	存在比 (%)
6	牛糞	(3.0±0.1)×10 ⁸	12.0	(5.1±1.1)×10 ⁸	20.4	(4.1±0.3)×10 ⁸	16.4
7	牛糞	(2.2±0.5)×10 ⁸	4.8	(1.6±0.4)×10 ⁸	3.6	(2.8±0.1)×10 ⁸	6.2
13	鶏糞	(2.0±0.2)×10 ⁵	1.2	(1.7±0.2)×10 ⁶	10.0	(4.7±2.9)×10 ⁴	0.3
14	下水汚泥・鶏糞	(8.0±6.8)×10 ⁷	13.1	(1.8±0.0)×10 ⁷	2.9	(1.3±0.4)×10 ⁶	0.3
16	生ゴミ	(2.1±0.5)×10 ⁸	44.7	(1.1±0.4)×10 ⁸	23.4	(1.7±0.6)×10 ⁸	36.2
17	生ゴミ	(1.8±1.6)×10 ⁸	38.3	(5.7±1.2)×10 ⁷	12.1	(8.3±2.3)×10 ⁷	17.7
18	生ゴミ	(5.0±0.4)×10 ⁸	22.7	(2.9±0.5)×10 ⁸	5.6	(1.9±0.3)×10 ⁸	8.6
19	生ゴミ	(2.2±1.2)×10 ⁸	4.2	(3.1±0.5)×10 ⁸	14.1	(1.1±0.1)×10 ⁸	2.1
20	生ゴミ	(4.5±1.3)×10 ⁷	84.5	(1.1±0.1)×10 ⁷	20.8	(4.1±1.7)×10 ⁶	7.7
21	生ゴミ	(1.3±0.1)×10 ⁸	22.0	(2.1±0.2)×10 ⁸	35.6	(7.4±0.7)×10 ⁷	12.5

*1 菌数は、5連の平板の平均値±標準偏差を示す。

*2 NB 細菌数またはDNB 細菌数のうちの高い方の菌数に対する比率

や生ゴミ堆肥（試料 16～21）と比べて、油脂分解菌数、デンプン分解菌数、セルロース分解菌数がいずれも少ない傾向が認められた。すなわち、牛糞堆肥や生ゴミ堆肥では、これら有機物分解菌数がほぼ $10^7 \sim 10^8$ cfu g⁻¹ dry matter のオーダーにあり、鶏糞堆肥や下水汚泥堆肥よりも多い傾向が認められた。これは、発酵原料である牛糞や生ゴミが有機物に富むことを反映していると推察された。また試料 17～19 および 20～21 は、それぞれ同一施設から時期を変えて採取したものであるが、同一施設の生ごみ堆肥でも、各種の有機物分解菌数に変動があることが見てとれる。これは、季節による原料組成の変動や発酵温度の違いなどを示す可能性が考えられるが、今後の知見の集積が必要である。

試料 8 点について、蛋白質分解菌数を測定した（表 2-10）。当初、カゼイン法を主として用いたが、極めて低い菌数しか得られない場合があり（試料 13～18）、ゼラチン法も併用した。その結果、カゼイン法では検出できない場合でもゼラチン法で検出でき、その菌数は $10^7 \sim 10^8$ cfu g⁻¹ dry matter のオーダーにあった。蛋白質分解菌の産生するプロテアーゼは多様であり、基質としてカゼインを用いた場合、検出されにくいタイプの蛋白質分解菌が存在する可能性が考えられ、詳しくは今後の課題である。

表 2-10 堆肥試料中の蛋白質分解菌群数

堆肥試料 番号	原 料	カゼイン培地		ゼラチン培地	
		菌数* ¹ (cfu g ⁻¹ dry matter)	存在比* ² (%)	菌数 (cfu g ⁻¹ dry matter)	存在比 (%)
6	牛糞	$(4.1 \pm 0.2) \times 10^8$	16.4	NT* ³	-
7	牛糞	$(3.1 \pm 0.2) \times 10^8$	6.8	NT	-
13	鶏糞	$<10^2$	$<10^{-3}$	NT	-
14	下水汚泥・鶏糞	$<10^4$	$<10^{-2}$	NT	-
18	生ゴミ	$<10^4$	$<10^{-3}$	NT	-
19	生ゴミ	$<10^4$	$<10^{-3}$	$(1.2 \pm 0.8) \times 10^7$	0.2
20	生ゴミ	$<10^4$	$<10^{-1}$	$(1.7 \pm 1.0) \times 10^7$	32.1
21	生ゴミ	$<10^4$	$<10^{-2}$	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^8$	20.3

*1 菌数は、5 連の平板の平均値±標準偏差を示す。

*2 NB 細菌数または DNB 細菌数のうちの高い方の菌数に対する比率。

*3 NT, 未測定。

以上の諸結果から、供試した堆肥中の細菌は、その多くが培養困難な VNC 状態にあることが判明した。同時に、培養できない細菌を観察・定量するには、蛍光染色法が有効であることが実証された。蛍光染色法に要する時間は、EB 蛍光染色法でわずか約 10 分間、CFDA 蛍光染色法でも 1 時間余りであり、培養法と比べて極めて短時間で測定ができる点でも優れている。しかし一方で、有機物分解菌など機能性の面から堆肥中の細菌を解析するには、依然、培養法に頼らざるを得ない面が残されている。本研究で対象としたセルロース分解菌やデンプン分解菌などの有機物分解菌は、系統発生的に多様な菌群に分散しており、そのうえ分解酵素系の遺伝子も多岐にわたっており、特異塩基配列を用いる FISH などによる定量が現状では困難である。従って、全細菌数などの計測における蛍光染色法の優位性は揺るがないとしても、機能群の解析には、蛍光染色法と培養法とを補完的に使用するべきものと結論される。

現在、堆肥中の微生物フロアの研究に関しては、培養法によらない方法である PCR-DGGE 法などが導入されつつある。今後、堆肥に関するよりいっそうの知見が、このような培養に依存しないフロア解析法や蛍光染色法などによって集積されるならば、堆肥中の微生物の動態がより明らかになるとともに、堆肥の微生物的品質評価法の確立などを通して、良質な堆肥の製造・利用技術の確立などに寄与できるものと期待される。

4. 要約

九州等各地の堆肥化施設 17 ヶ所から採取した 21 点の堆肥製品試料中の各種の微生物数を蛍光染色法および培養法により測定し、堆肥中の細菌の測定に蛍光染色法が有効であるか検証するとともに、各種有機物分解菌数を平板培養法で測定し比較検討した。得られた結果は以下のとおりである。

1) これら堆肥の含水率は 13.0~58.3%で、pH は 6.3~9.4, EC は 3.0~13.4 mS cm⁻¹ の範囲にあり、CEC は 31.4~79.0 cmol_ckg⁻¹の範囲にあった。炭素率は 7.6~20.9 の範囲にあり、完熟堆肥の持つべき C/N 比の範囲にほぼ入っていた。

2) Ethidium bromide (EB) 蛍光染色法により、堆肥中の細菌が明瞭に観察でき、有機物との識別は容易であった。これを用いて定量した結果、全細菌数は $7.8 \times 10^9 \sim 9.3 \times 10^{10}$ (相乗平均 3.7×10^{10}) cells g⁻¹ dry matter の範囲にあった。一方、6-carboxyfluorescein diacetate (CFDA) 蛍光染色法では、有機物はほとんど染色されず、暗色の背景に生きた細菌が黄緑色の蛍光を発して明瞭に観察された。CFDA 蛍光染色法による全生細菌数は $1.4 \times 10^9 \sim 8.2 \times 10^{10}$ (相乗平均 1.2×10^{10}) cells g⁻¹ dry matter で、生菌率 (全細菌数に対する全生細菌数の比) は 5.4~169% (平均 41.8%) であった。生菌率が 100%を越えることがある理由として、EB 蛍光染色法よりも CFDA 蛍光染色法の方が、有機物とのコントラストが大きく、過小評価が少ないことが推察された。

3) 希釈平板法による測定の結果、Nutrient broth (NB) 寒天培地による NB 細菌数は $4.6 \times 10^6 \sim 5.2 \times 10^9$ (相乗平均 4.6×10^8) cfu g⁻¹ dry matter であった。これらの値は、百倍希釈 NB 寒天培地による DNB 細菌数より数倍~数百倍高く、堆肥の富栄養的環境を反映していると考えられた。コロニー形成率 (CFDA 蛍光染色法による全生細菌数に対する培養可能な細菌数の比) は 0.1~46.9% (平均 8.5%) と低かった。このことは、堆肥中の細菌の約 9 割が、生きているが培養できない (Viable but nonculturable, VNC) 状態にあることを示しているとともに、堆肥中の培養できない細菌を観察・定量する目的に、蛍光染色法が有効であることを示唆していた。

4) 牛糞堆肥および生ゴミ堆肥には放線菌が $10^6 \sim 10^8$ cfu g⁻¹ dry matter 存在し、一方、鶏糞堆肥では 10^6 cfu g⁻¹ dry matter 以下で少ない傾向が認められた。

5) 牛糞堆肥や生ゴミ堆肥には、セルロース分解菌やデンプン分解菌、油脂分解菌が $10^7 \sim 10^8$ cfu g⁻¹ dry matter 存在し、鶏糞堆肥や汚泥堆肥と比べて多い傾向が認められた。

6) 蛋白質分解菌数の測定には、カゼイン法では堆肥試料の測定に適さない場合があり、ゼラチン法により、 $10^7 \sim 10^8$ cfu g⁻¹ dry matter の菌数が得られた。

以上の結果から、堆肥中の細菌の多くは VNC であり、全細菌数などの定量には蛍光染色法が培養法よりも卓越していることが検証された。同時に、有機物分解菌など、現在では蛍光染色法で定量できない微生物もあり、蛍光染色法と培養法とを補完的に使用することが必要と判断された。

第三章 堆肥における大腸菌群など糞便汚染指標菌の 生残性に関する研究

1. 緒言

日本では、生物系廃棄物の総量は廃棄物全体の約 60%に当たる 2 億 8 千万トンという膨大な量に達すると推定され、その内訳は、家畜糞尿 9,400 万トン、下水汚泥 8,600 万トン、生ゴミ 2,000 万トン、食品産業汚泥 1,500 万トン、その他 6,600 万トンである（生物系廃棄物リサイクル研究会, 1999; 茅野, 2000）。廃棄物による環境汚染のおそれが重大な問題となってきた。一方、環境問題への国民の関心が高まる中で、廃棄物を資源化、環境負荷を低減していく循環型の経済社会への転換が求められている。最近、家畜排せつ物法(1999)や食品リサイクル法(2000)が制定され、家畜糞や、食品工場、大型店などから排出される食品廃棄物の適正な管理や堆肥化などの資源化が推進されている。すなわち堆肥化など資源化が奨励され、法的規制が強化されつつある。さらに、下水汚泥や、飲食店、家庭から排出される生ゴミの堆肥化なども自治体や市民団体により進められている。こうした状況を背景に、バイオマス・ニッポン総合戦略の閣議決定(2002年12月)がなされ、有機資源(バイオマス)の利活用が強力に推進されている。このようにして作られた堆肥など有機質資材の活用は、持続的農業を促進し、高品質で安全な食料を国民に供給する上で、極めて望ましいことである。このような中で有機廃棄物である生ごみ、食品産業汚泥、畜産副産物、生活排水汚泥等は、元来資源化・リサイクルが可能であり、既に堆肥等として利用が図られているものもある。

このような法的整備を背景に、家畜糞や生ゴミ、汚泥などの有機廃棄物の資源化対策として堆肥化が注目され、同時に堆肥は、減農薬・減化学肥料による持続的農業を促進する有機質資材として再評価されつつある。堆肥の生産量はこの十年間で倍増し、1996年度には全国で総計 300 万トンと推計され(茅野, 2000)、今後も増加すると予想される。そこで、堆肥の適正な生産および使用を図るために、社会学的、自然科学的研究および普及啓発の推進が強く求められている(茅野, 2000)。

第二章で述べたように、堆肥の微生物学的側面について再評価するために、蛍光染色法による細菌定量技術を堆肥の微生物分析に導入した。その結果、蛍光染色法による堆肥中の細菌数は、従来の培養法による測定値の数倍から十数倍も高く、堆肥中の細菌の平均約9割が、生きてはいるが培養できない (viable but nonculturable, VNC) 状態にあることなどを明らかにした (糞ら, 2005)。

一方、堆肥の急激な増産は、未熟堆肥の増加をも招くことが懸念され、施用後の土壤障害の発生などに加え、衛生的な問題が心配される。実際、未熟堆肥を使用して作られたと推定される果物や野菜の生食により、病原性の強い腸管出血性大腸菌 0157:H7 (大腸菌 0157) による食中毒事件が諸外国で報告されている (Morgan *et al.*, 1988; Besser *et al.*, 1993; Cieslak, *et al.*, 1993; Chapman, *et al.*)。日本や諸外国の野菜の微生物汚染状況に関する総説 (小沼ら, 1999; 金子, 1999) によると、海外では野菜や果実による食中毒が増加傾向にあることから、日本でも潜在的な脅威として看過できず、農産物の生産・流通・消費の各段階における衛生管理の徹底が強調されている。

本菌による食品の汚染源として、牛糞および牛の腸管内容物が欧米では注目されている。すなわち、牛糞からの 0157 の検出率は実に数%—数十%にも昇る。本菌によって汚染された牛糞や腸管内容物を介して牛挽肉、生乳、水、非加熱リンゴジュース、果物および野菜が汚染され、経口感染によって集団発生が起きている。牛、羊および鹿はこの病原菌の主な保菌動物であると考えられている (染谷, 2000)。

通常、堆肥の製造過程では、発酵熱による発熱のため堆肥は 60°C 以上の高温となり、この熱によって病原菌や寄生虫卵、雑草の種子などが死滅する。したがって、一般的に良質の完熟堆肥には病原菌が存在しないと言われるが、実際には、そう単純ではない。堆肥製造過程の高温で、大腸菌群が何日くらいで消滅するか、また製品堆肥中に残存していないかを調査した内外の報告では、大腸菌群の堆肥からの消失には、どの調査例でも 1 週間以上の発酵期間が必要で、製品堆肥中に残留する場合も少なくない (染谷・井上, 2003)。

本菌によって汚染された牛糞や腸管内容物を介して、牛挽肉、生乳、水、非加熱リンゴジュース、果物および野菜が汚染され、経口感染によって集団発生が起きている (Pell, 1997)。牛、羊および鹿はこの病原菌の主な保菌動物であると考えられている (Keene *et al.*,

1997; Tauxe *et al.*, 1997). Wang らは、牛糞において *E. coli* 0157 が一定の温度下で 70 日間もに生残できることを報告した (Wang *et al.*, 1996).

染谷らは、堆肥の病原菌汚染に関して内外の知見をとりまとめ (染谷・井上, 2003), 家畜糞や生ゴミなどの堆肥原料から多種類の病原菌や寄生虫が検出されていること、さらに、製品として流通している堆肥からも病原菌が検出される場合があることから、堆肥の発酵熱を十分に生かした堆肥温度管理を通して、微生物学的に安全な堆肥を製造することが重要であると指摘した。

しかしながら、堆肥中の病原菌の存在に関して、我が国での調査事例は依然少ない。牛糞堆肥の製造過程において、糞便指標菌群である大腸菌群が発酵 1～6 週間で消失したという報告がある一方 (伊吹ら, 1996; 渡辺ら, 1997; 梅田ら, 1999), 1～3 ヶ月の発酵終了後も生残していたという報告がある (羽生ら, 1999; 金子, 1999)。特に、製品として流通している堆肥中の病原菌の残留状況を把握することは、安全・安心な農産物を生産する上で欠かせない情報であるが、これに関する知見は限られている。

家畜糞の堆肥化過程では、原料の畜糞に病原菌が含まれていても、通常は発酵熱により殺菌消毒される。しかし、未熟堆肥では病原菌が残留する可能性がある。したがって、畜糞を原料とした堆肥の衛生管理は、堆肥の取り扱い者の健康や農産物の安全性の確保において極めて重要である。日本では、堆肥の衛生基準について定めはなく、堆肥中の病原微生物の検査法も定められていない。また、畜糞堆肥の衛生学的な研究も少ない。さらに、堆肥中の微生物全般に関しても微生物学的研究は少ない。

今まで、環境中における大腸菌の生残について多くの研究があるが、それらのほとんどは、土壌、水環境および廃棄物に絞られたものである (Shere *et al.*, 1998; Kudva *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Gafliardi *et al.*, 2000; Maule, 2000)。堆肥中における病原菌の生残についての研究は極めて少ない (Lung *et al.*, 2001)。そこで本研究では、堆肥の微生物学的安全性 (バイオセーフティー) を向上させるための基礎的情報を得ることを目的として、主に九州各地の堆肥製造施設で生産されている堆肥を入手し、糞便汚染指標菌 (大腸菌群, 大腸菌, およびサルモネラ菌) の残留について培養検査による実態調査を行った。あわせて、堆肥原料である牛糞や生ゴミなどにおける糞便汚染指標菌の存在と、

堆肥化過程における消長についても調査検討した。さらに、大腸菌 K12 および大腸菌 0157 に対して種々の温度下での発育およびその熱抵抗性について室内モデルを用いて検証した。

2. 材料および方法

2.1 供試堆肥の採取

堆肥試料として、1997年9月～2004年12月に、九州各地および岡山県の堆肥施設計23ヵ所から計29点を採取した(表3-1)。その内訳は、牛糞堆肥が13点(試料1～13)、牛糞・鶏糞ブレンド堆肥が2点(試料14～15)、鶏糞堆肥が4点(試料16～19)、下水汚泥堆肥(鶏糞など他の原料も含まれる)が2点(試料20～21)、生ゴミ堆肥が8点(試料22～29)であった。これらは全て発酵の終了した堆肥製品で、畜舎の敷料や水分調整剤として使用されているオガクズやモミガラなどが副資材として混入していた。また、堆肥の原料である牛糞や生ゴミ、発酵途上の堆肥からも、適宜試料を採取した。

堆肥試料等の採取には、堆肥等の山の表面下30～50cmの部位から約500gずつを5ヵ所採取し、これらをよく混合縮分した後、その約500gをビニール袋に密封した。これをクーラーボックスに入れて研究室まで運搬し、冷蔵保存して3日以内に分析に供した。

表 3-1 各種堆肥試料の製造場所，原料，副資材および発酵期間

堆肥試料* 番号	製造場所	原料	副資材（敷料）	発酵期間 （月）
1	宮崎県 N 牧場	牛糞	オガクズ	1
2	宮崎県 N 施設	牛糞	イナワラ	3
3	宮崎県 A 施設	牛糞	オガクズ	3
4	宮崎県 A 農協	牛糞	オガクズ	3
5	宮崎県 I 社	牛糞	オガクズ	3
6	鹿児島県 K 牧場	牛糞	廃材木材チップ	5
7	鹿児島県 I 施設	牛糞	オガクズ	3
8	福岡県 H 牧場	牛糞	オガクズ，バーク	2
9	熊本県 K 施設	牛糞	バーク	6
10	熊本県 Q 施設	牛糞	イナワラ	3
11	佐賀県 A 施設	牛糞	オガクズ，モミガラ	3
12	佐賀県 B 施設	牛糞	オガクズ，モミガラ	3
13	佐賀県 Q 施設	牛糞	オガクズ	6
14	熊本県 K 農協	牛糞，鶏糞	オガクズ，モミガラ	4
15	熊本県 M 組合	牛糞，鶏糞	オガクズ	3.5
16	鹿児島県 K 施設	鶏糞	-*2	2
17	熊本県 M 社 a*3	鶏糞	-	1
18	熊本県 M 社 b	鶏糞	-	1
19	佐賀県 Y 社	鶏糞	-	3
20	岡山県 N 社	下水汚泥，鶏糞	-	1.5
21	佐賀県 D 社	食品残さ，汚泥	バーク	4
22	佐賀県 D 商会	生ゴミ	モミガラ	3
23	佐賀県 I 施設 c*4	生ゴミ	オガクズ	3.5
24	佐賀県 I 施設 d	生ゴミ	オガクズ	3.5
25	佐賀県 I 施設 e	生ゴミ	オガクズ	3.5
26	佐賀県 I 施設 f	生ゴミ	オガクズ	3.5
27	長崎県 N 施設 g	生ゴミ	オガクズ	3
28	長崎県 N 施設 h	生ゴミ	オガクズ	3
29	宮崎県 A 施設	生ゴミ	イナワラ	3

*1 堆肥試料は 1997 年 9 月～2004 年 12 月に採取した。

*2 副資材なし。

*3 a, ペレット状製品; b, 粉末状製品。

*4 c～f, g～h はそれぞれ同一施設で，試料採取時期が異なる。

2. 2 試料の分散懸濁液の調製

堆肥試料 10.0 g(生重)を滅菌生理食塩水に加えて全量を 100 mLとし、ステンレスブレードの付いたホモジナイザー(日本精機, エースホモジナイザー AM-3)を用いて 15,000 rpm, 15 分間の分散処理を行った。この試料懸濁液を滅菌生理食塩水に加えて、 10^{-2} 希釈懸濁液を調製した。この希釈操作を順次繰り返して、 10^{-8} までの希釈懸濁液を調製して、培養法による微生物定量に供した(図 2-7 を参照)。

2. 3 理化学的性質の分析

含水率は、乾熱法(土壤標準分析・測定法委員会, 1986)にしたがって、約 10 gの堆肥試料を 105°C, 24 時間乾燥させ、測定した。pH(H₂O)は、ガラス電極法(試料:水=1:2.5)(土壤環境分析法編集委員会, 1997)を用いて測定した。電気伝導率(EC)の測定には、EC計(堀場, Twin Cond B-173)を用いた(試料:水=1:5, 土壤環境分析法編集委員会, 1997)。陽イオン交換容量(CEC)はセミ・マイクロ法(土壤環境分析法編集委員会, 1997)で測定し、全炭素(T-C)の測定にはチューリン法(土壤標準分析・測定法委員会, 1986)を用い、全窒素(T-N)の測定にはサリチル酸-硫酸分解法(土壤環境分析法編集委員会, 1997)を用いた(第二章を参照)。

2. 4 糞便汚染指標菌の検出法

水や牛乳、食品の衛生検査において、いわゆる衛生細菌学でいう大腸菌は、医学細菌学とはやや意味を異にし、大腸菌(*Escherichia coli*)以外に *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* のほかに、*Aeromonas* のような腸内細菌以外の細菌を含めたもので、大腸菌群と総称されている。本菌群は好気性または通性嫌気性の無芽胞桿菌で、乳糖を分解してガスを形成するグラム陰性菌と定義され、糞便汚染の指標菌として広く使われている。本菌群が水、食品から検出されることは、それらが大便により直接または間接的に汚染されていることを意味し、本菌群と出所を同じくする腸管系病原菌の存在の可能性があると見なされる。

2. 4. 1 大腸菌群などの定義および相互の関係

大腸菌群や糞便性大腸菌などは、糞便汚染指標菌として食品や環境など公衆衛生上よく使用されている。図 3-1 は大腸菌群などの定義およびその関係を示す。

大腸菌群 (coliform bacteria) は、乳糖を分解しガスを産生する好気性ないし通性嫌気性のグラム陰性無芽胞桿菌の総称で、糞便汚染の指標として扱われる。大腸菌群には、大腸菌以外にも、クレブシエラやシトロバクター、エンテロバクターなど腸内細菌科の細菌やアエロモナスなど近縁の細菌種が含まれる。それらの中には、糞便汚染と関係のない自然界の常在菌も存在することがあるため、測定値の評価には注意を要する。

清涼飲料水や生食用かきの大腸菌群検査には乳糖ブイヨン培地が、また食肉、魚肉練り製品等には BGLB 培地が使われ、いずれも MPN 法 (液体培地による検査法) によって測定される。また、乳製品や冷凍魚介類には、デスオキシコーレイト培地による希釈平板法が使われる (衛生試験法・注解, 2000)。

糞便性大腸菌 (Fecal coliform) は、大腸菌群に属する細菌のうち、大腸菌のみを検出する簡便法によって計測されるものを言う。大腸菌群の中で、大腸菌が最も耐熱性が高いことを利用した検査方法で、EC 培地などを用いて 44.5°C で 24 時間培養し、ガス産生が認められたものを陽性として MPN 法で計測する。

大腸菌 (*Escherichia coli*) は、生物学的に大腸菌と同定される細菌を言い、人や温血動物の腸管の常在菌で、自然界では比較的生存期間が短いので適切な汚染指標となる。大腸菌群として検出された細菌をさらに IMVIC 試験や API 同定キットなどを用いて性状試験を行い判定する。

大腸菌 0157 (*Escherichia coli* 0157:H7) は、大腸菌のうち、その菌体表層成分である O 抗原 (菌体抗原で、現在 1-173 の番号が付けられている) として 157 番目の抗原を持ち、H 抗原 (鞭毛抗原、現在 1-60 の番号が付けられている) として 7 番目の抗原を持つ菌株 (血清型) である。Vero 毒素を産生し、腸管出血性腸炎を起こす病原大腸菌の代表的な菌株である。大腸菌 0157 は、飲食物を介する経口感染により伝播し、水平感染 (人から人への感染) や、水を介する大規模な集団食中毒を引き起こすなど、軽視できない病原菌である。

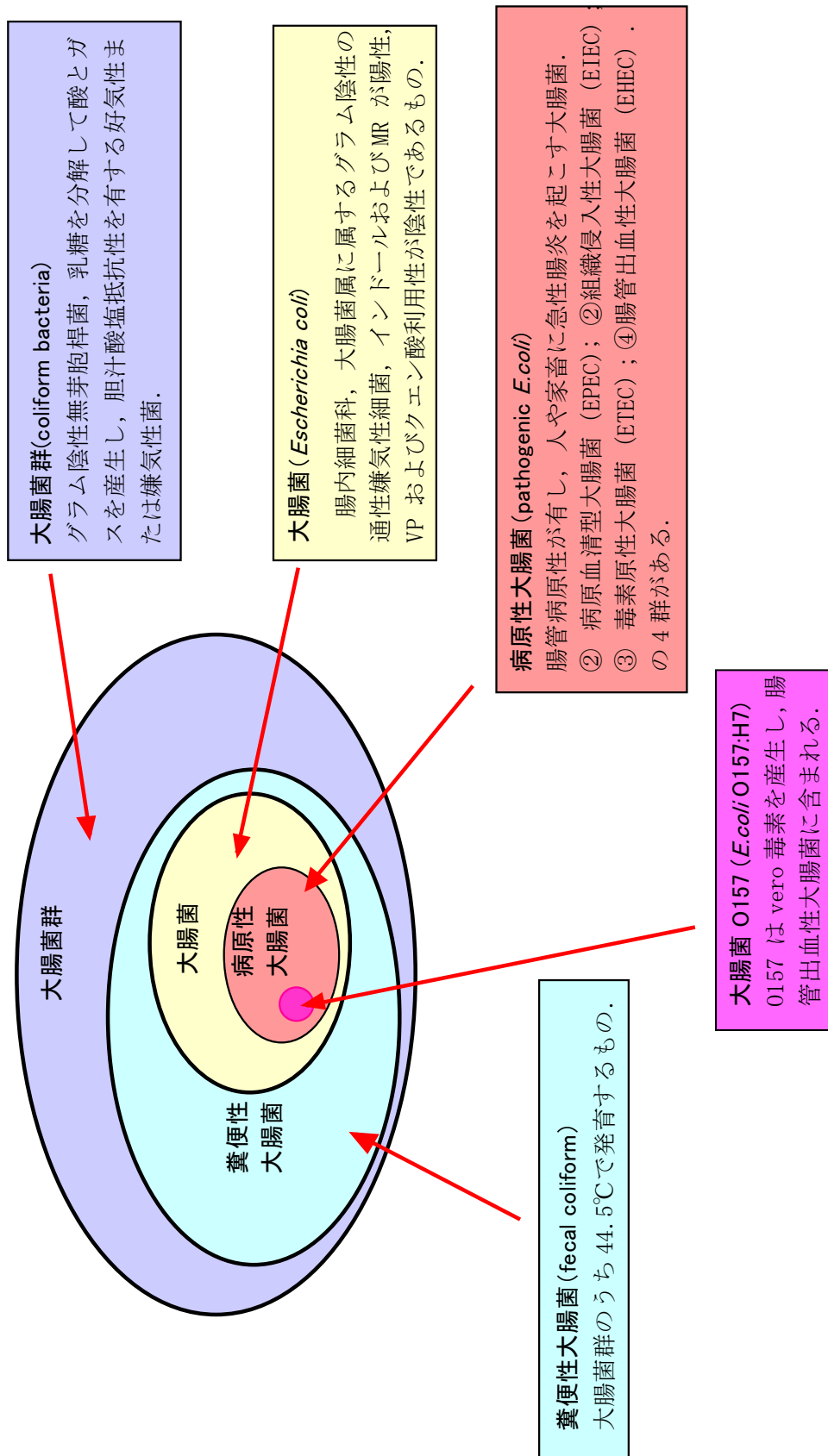


図 3-1 大腸菌とその公衆衛生的指標菌の関

2. 4. 2 各種糞便汚染指標菌の定量法

大腸菌群はDesoxycholate agar (デスオキシコーレイト) 寒天培地 (栄研) で, 大腸菌は Chromocult coliform agar (クロモカルト) 寒天培地 (Merck) 上で, サルモネラ菌は Mannitol lysine crystalviolet brilliantgreen agar (MLCB) 寒天培地 (日水) 上で希釈平板法により定量した. 表 3-2 に, これら微生物の培地, 培養条件および細菌の判定方法を示す.

表 3-2 培養法による細菌の定量法

微生物	培地	検出原理	希釈次数	培養条件	判定方法
従属栄養性細菌	NA 培地	富栄養性細菌の検出	$10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$	30°C, 5 日間	コロニーを全て計測する
大腸菌群	デスオキシコーレイト培地	胆汁酸抵抗性乳糖の分解	$10^{-1}, 10^{-3}, 10^{-5}$	37°C, 1 日間	赤色コロニーを計測する
大腸菌	クロモカルト培地	β -D-グルクロニダーゼの検出	$10^{-1}, 10^{-3}, 10^{-5}$	37°C, 1 日間	濃青色コロニーを大腸菌として計測し, ピンク色のコロニーを大腸菌群とする
サルモネラ菌	MLCB 培地	ブリリアントグリーン抵抗性硫化水素の発生	$10^{-1}, 10^{-3}, 10^{-5}$	37°C, 1 日間	黒色のコロニーを計測する

NA, nutrient Agar ; MLCB, Mannitol lysine crystalviolet brilliantgreen agar.

堆肥試料の $10^{-1} \sim 10^{-7}$ の希釈懸濁液のうち, 適切と予想された希釈液を 3 段階選び, 各希釈段階 5 連の培地に各 100 μ L を塗抹接種し, いずれも 37°C で 18~24 時間培養した. 大腸菌群では, デスオキシコーレイト寒天培地上に出現した真っ赤なコロニーを計数した (日本薬学会, 2000). 大腸菌では, クロモカルト寒天培地上の濃青色コロニーを計数した (Frampton et al, 1988). サルモネラ菌では, MLCB 寒天培地上の黒色コロニーを計測した (日本薬学会, 2000). このとき, 大腸菌群と大腸菌の陽性対照菌および陰性対照菌として *Escherichia coli* K12 および *Salmonella typhimurium* (*Salmonella choleraesuis* subsp.

choleraesuis) IF014193 をそれぞれ用い，サルモネラ菌にはそれらを逆に用いた．これらの培地の組成を表 3-3 に示した．

表 3-3 培地の組成一覧表

デスオキシコーレイト培地		MLCB 培地	
成分	g/L	成分	g/L
ペプトン	10.0	酵母エキス	5.0
乳糖	10.0	ペプトン	10.0
デスオキシコール酸ナトリウム	1.0	ハートエキス	2.0
塩化ナトリウム	5.0	塩化ナトリウム	4.0
リン酸 2 カリウム	2.0	マンニット	3.0
クエン酸鉄アンモニウム	2.0	L-リジン塩酸塩	5.0
中性紅	0.033	チオ硫酸ナトリウム	4.0
寒天	15.0	クエン酸鉄アンモニウム	1.0
	pH7.3	ブリリアントグリーン	0.0125
		クリスタルバイオレット	0.01
		寒天	15.0
			pH6.8
クロモカルト培地		BHI 培地	
成分	g/L	成分	g/L
ペプトン	3.0	牛脳エキス末	7.5
塩化ナトリウム	5.0	ハートエキス末	8.0
リン酸 2 水素ナトリウム	2.2	ペプトン	10.0
リン酸 1 水素ナトリウム	2.7	ブドウ糖	2.0
ピルビン酸ナトリウム	1.0	塩化ナトリウム	5.0
トリプトファン	1.0	リン酸 1 水素カリウム	2.5
ソルビトール	1.0		
タージトール 7	0.15		
発色基質	0.4		
寒天	10.0		
	pH6.8		pH7.2

2.5 大腸菌群分離株の同定

デスオキシコーレイト寒天培地上の大腸菌群と推定される細菌コロニーから白金線で釣菌し、0.5 mLの滅菌生理食塩水に懸濁した（1試料当たり数個）。この懸濁液を肉汁寒天培地（5.0 g L⁻¹ 肉エキス，10.0 g L⁻¹ ペプトン，5.0 g L⁻¹ NaCl，15.0 g L⁻¹ 寒天，pH7.0）（土壤微生物研究会，1992）上に画線塗抹接種し、30°Cで5日間培養して純粋性を確認した。この分離株の新鮮培養菌液を、腸内細菌用簡易同定キットAPI 20E（日本ビオメリュー）に接種し、37°Cで24時間好気培養した。培養ウエル中の自発的な反応および試薬添加による呈色反応を記録し、その結果を7桁のAPIプロファイルコードに変換し、これをAPI 20Eプロファイルインデックスと照らし合わせて同定した（図3-2）。

API 20Eは、1枚のプレート上に20個のマイクロチューブを有し、腸内細菌科の細菌および他のグラム陰性桿菌の同定のための生化学的性状テストに必要な20の基質が乾燥状態でセットされたシステムである。API 20Eプレートの基質の成分は以下の通りである。

① o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド (ONPG)； ② L-アルギニン塩酸塩 (ADH)； ③ 塩酸リジン (LDC)； ④ L-オルニチン塩酸塩 (ODC)； ⑤ クエン酸ナトリウム (CIT)； ⑥ チオ硫酸ナトリウム (H₂S)； ⑦ 尿素 (URE)； ⑧ L-トリプトファン (TDA)； ⑨ L-トリプトファン (IND)； ⑩ ピルビン酸ナトリウム (VP)； ⑪ ゼラチン (GEL)； ⑫ ブドウ糖 (GLU)； ⑬ D-マンニトール (MAN)； ⑭ イノシット (INO)； ⑮ D-ソルビトール (SOR)； ⑯ L-ラムノース (RHA)； ⑰ 白糖 (SAC)； ⑱ D-メリビオース (MEL)； ⑲ D-アミグダリン (AMY)； ⑳ L-アラビノース (ARA)。これらの反応の試験結果をデータベースまたはプロファイルインデックスブックと照合させることで、腸内細菌科の細菌および類縁菌を同定することができる（写真3-1）。



写真3-1 API 20Eの供試例 (*E. coli* K12)

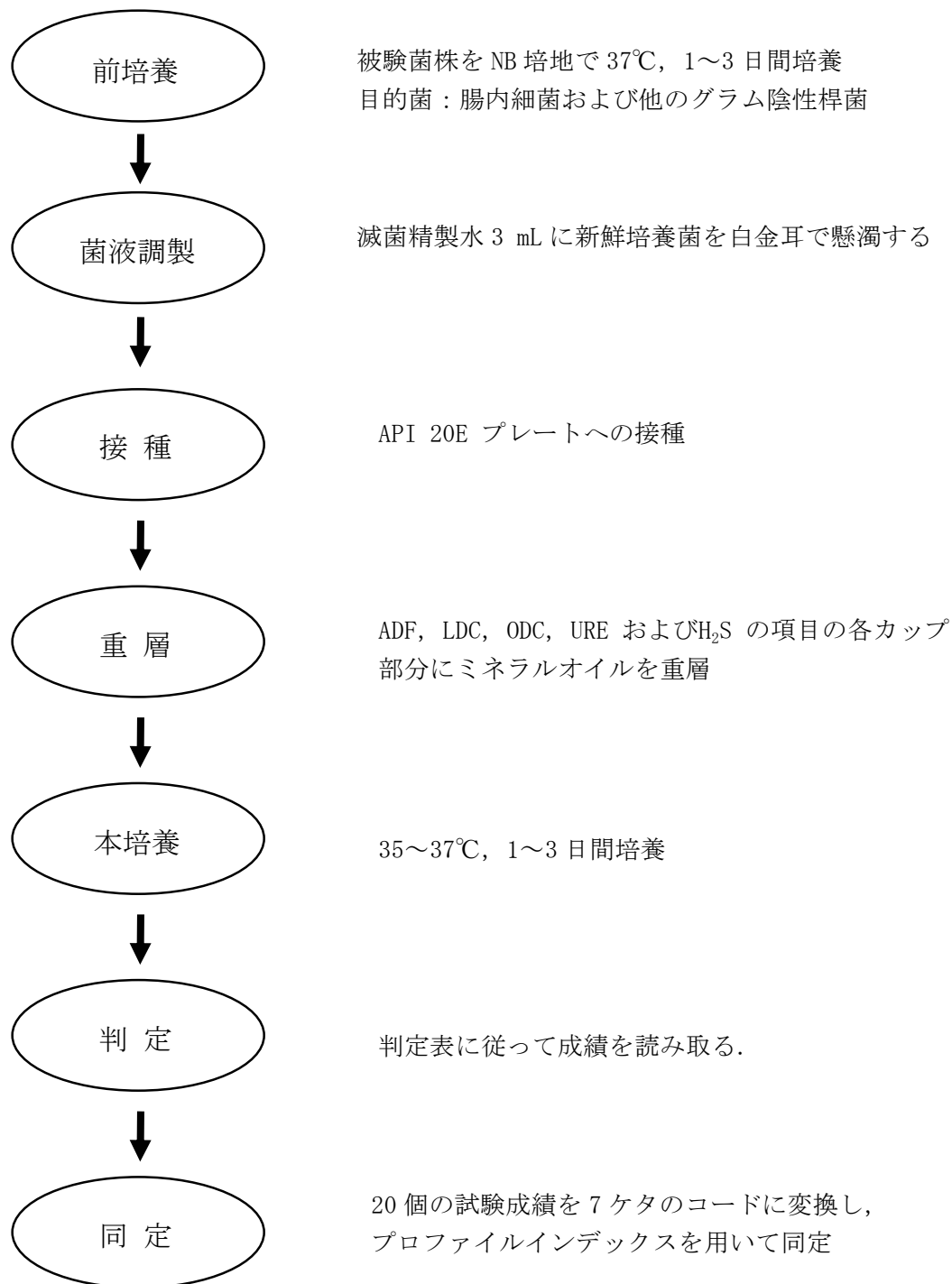


図 3-2 API 20E による性状試験および同定

2.6 病原大腸菌に対するスライド凝集反応

細菌や赤血球などの粒子性の抗原に対して、適切な抗体を反応させると、抗原表面に結合した抗体によって、抗原は肉眼的に認められる凝集塊を作る。この血清学的反応は凝集反応 (agglutination) という。この反応に与かる抗原を凝集原 (agglutigen), 抗体を凝集素 (agglutinin) と呼ぶ。細菌には鞭毛抗原 (H 抗原), 莢膜由来の K 抗原またチフス菌の Vi 抗原, 細胞壁多糖体由来の菌体抗原 (O 抗原) など多くの抗原が表面に存在する。H 抗原に基づく H 凝集は線状のやわらかい凝集塊を作り, O 抗原に基づく O 凝集は小さく硬い凝集塊を作る。また類縁菌種間で菌種に特異な種特異抗原のほか共通の抗原 (群特異抗原) をもつ場合には, 相互に類属凝集反応 (group agglutination) を起こす。

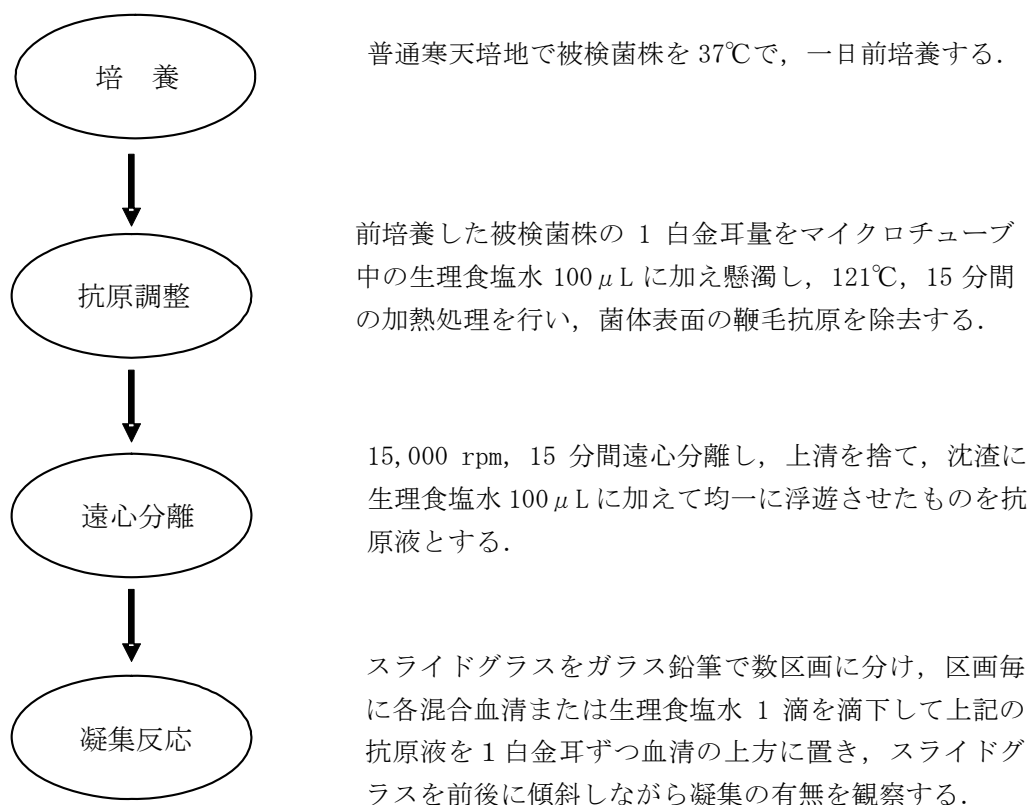


図 3-3 病原大腸菌のスライド凝集反応手順

スライドグラスの上で抗原と抗体（抗血清や被検血清）を混合して定性的に判定する方法を，スライド凝集反応という．本研究では，*E. coli* と同定された菌株について，その新鮮培養液を病原大腸菌免疫血清（デンカ生研，43 種類の O 抗原に対する免疫血清キット）に供試した．図 3-3 に示した手順にしたがって，スライド凝集反応により病原大腸菌であるかを判定した．

病原大腸菌陽性対照株として，産業医科大学産業保健学部微生物学教室にて保存の *E. coli* 0157 臨床分離菌株を D8 株用い，陰性株に *E. coli* K12 を用いた．

2.7 大腸菌の熱抵抗性

滅菌生理食塩水または滅菌堆肥中における熱抵抗性の試験には，*E. coli* K12 および，産業医科大学産業保健学部微生物学教室有働武三教授より分与いただいた腸管出血性 *E. coli* 0157 の臨床分離株 15 株（菌株番号 G1～G15）を用いた．K12 は遺伝的および生理学的性状が良く知られている，毒性がなく自然環境下での生存能力も低い大腸菌の実験室株である．

2.7.1 種々の温度における大腸菌の発育の検討

固体静置培養：*E. coli* 0157（G1～G15，共 15 株）および *E. coli* K12（1 株）計 16 株をそれぞれ NA（Nutrient Agar）培地上に接種し，37℃，24 時間，前培養した．この菌体を滅菌生理食塩水に懸濁して，懸濁液を白金耳で取り，BHI（Brain Heart Infusion Broth）培地にそれぞれ 2 連で接種した．37℃，45℃，50℃，55℃および 60℃で 1～2 日間培養した後，菌株の発育状況を観察記録した（図 3-4）．

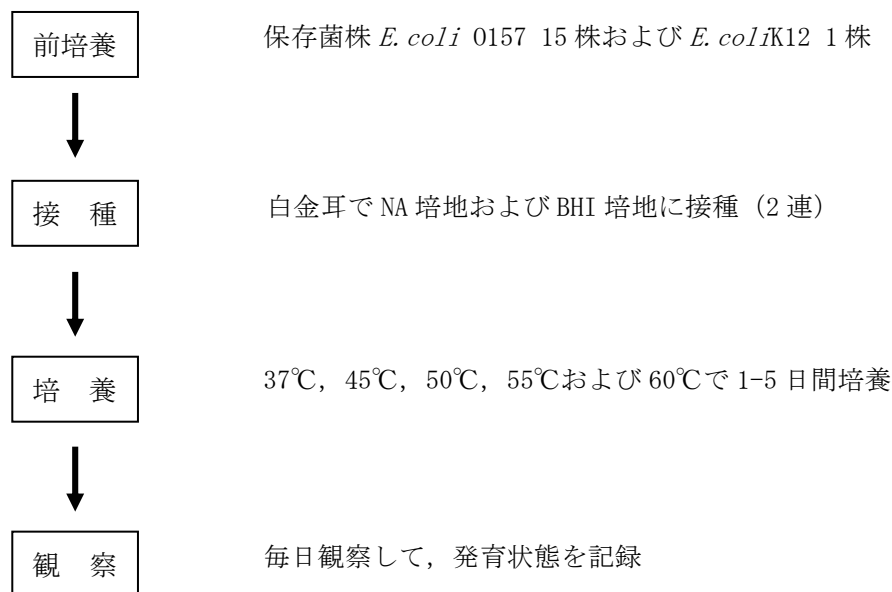


図 3-4 種々の温度における大腸菌 0157 などの発育試験 (固体培地)

液体静置培養：保存菌株を BHI 液体培地 2 mL に接種し, 37°C, 24 時間, 前培養した。これを 20 μ L 取って, BHI 液体培地 2 mL に接種し, 37°C, 45°C, 50°C, 55°C および 60°C で 2 日間培養し, 菌株の発育状況を観察記録した (図 3-5)。

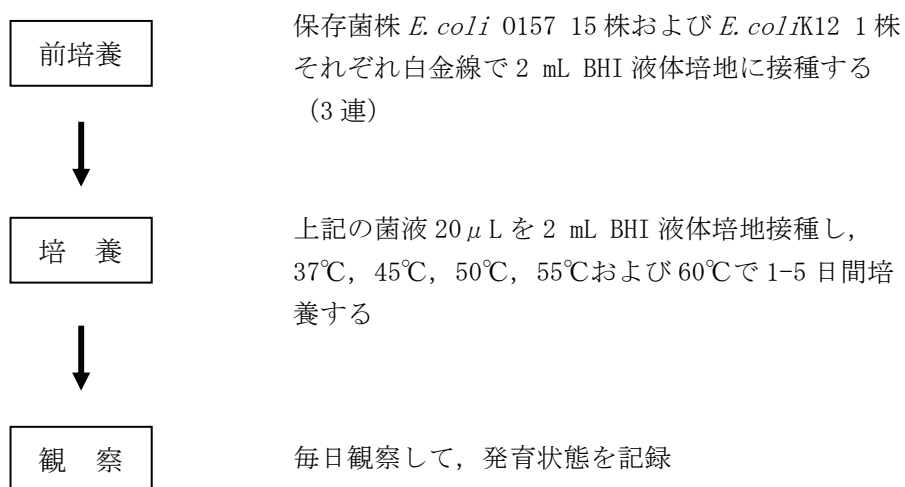


図 3-5 種々の温度における大腸菌 0157 などの発育試験 (液体静置培養)

液体振とう培養： *E. coli* 0157 G7 株の菌液 200 μ L を BHI 培地 18 mL にそれぞれ 3 連で接種し，37°C，45°C，50°C および 55°C で 12 時間振とう培養後，菌数を経時的に希釈平板法で計測した．すなわち，希釈菌液を NA 培地に接種して 37°C，24 時間培養した後コロニーを計数した．

2.7.2 大腸菌の熱抵抗性の検討

採取した堆肥製品を乾燥機で 105°C，10 時間乾燥し，デシケーター内に置いて冷却した．この乾燥堆肥を 1 mm メッシュの篩にかけたのち，メディウム瓶に入れ，乾燥機で 180°C，5 時間滅菌し，室温で保存した．使用時，この滅菌乾燥堆肥に滅菌水を加えて，40% または 70% 含水率の滅菌堆肥試料を調製した（図 3-6）．

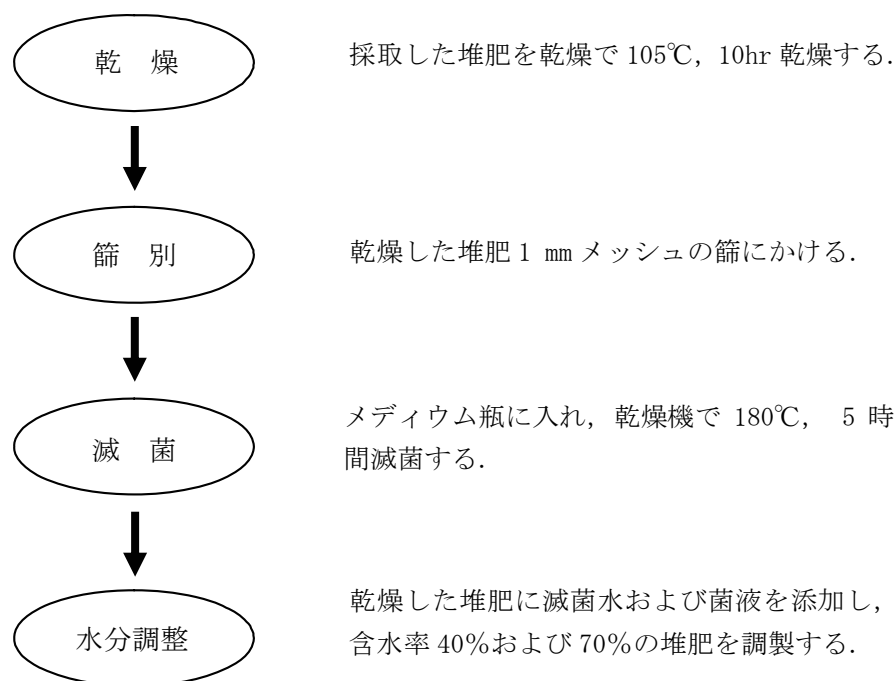


図 3-6 熱抵抗性試験用の堆肥試料調製

熱処理する場合、大腸菌 K12 および大腸菌 0157 を L 字管に入った 18 mL の Nutrient Broth (NB) 培地にそれぞれ 200 μ L 接種し、37°C、8~40 時間振とう培養し、対数増殖期の後期および定常期に、培養液 100 μ L を 0.9 mL の滅菌生理食塩水または 0.9 g の滅菌堆肥（含水率 40%または 70%）に接種し、それぞれ 60°Cのウォーターバスに水没させ、0, 1, 2, 3, 5 および 10 分間の熱処理を行った。生理食塩水の場合はそのまま、また堆肥試料の場合は 9 mL の滅菌生理食塩水を加えてからホモジナイザーで 15,000 rpm, 15 分間分散処理し、これを段階希釈し、NA 培地に接種して、37°C、18~24 時間培養した後、コロニーを計数し、その値から生残した菌数を計算した（図 3-7）。熱処理に用いた容器は、熱伝導性の高いアルミキャップ（M1 型、4 mL 容）にシリコンゴム栓を付けたものを使用した。温度計には三商 D・H 形 DIGITAL 温度計を用いた。

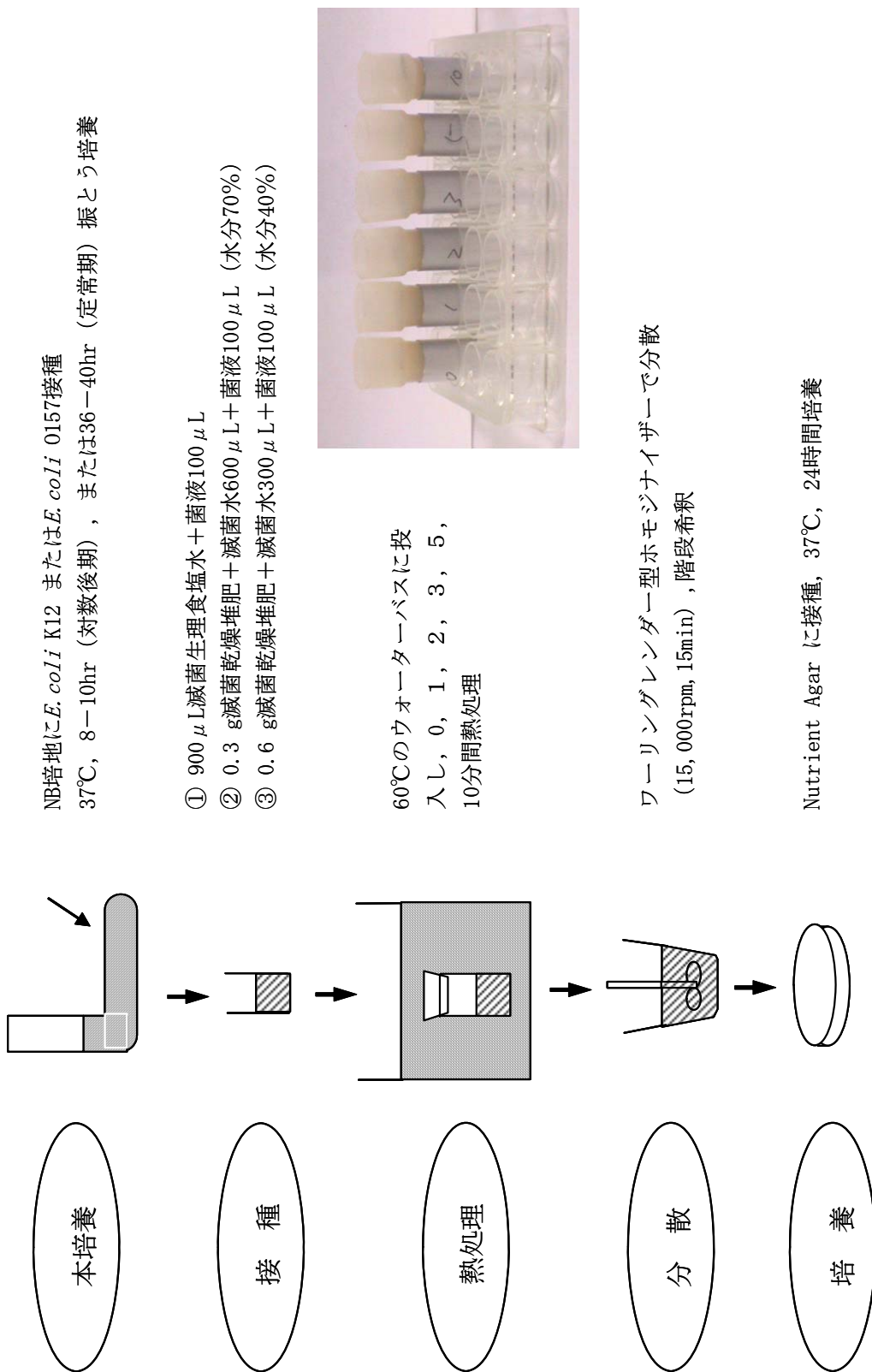


図3-7 大腸菌の熱抵抗性試験の手順

2.7.3 D値の算出法

D値は、一定温度下で菌数が1/10に減少するのに要する時間で、decimal reduction time (DRT)とも呼ばれる(柳田, 1981)。

図3-8 Aからも分かるように、一般に微生物の細胞の死滅経過は、原則として化学反応における1次反応のような経過を取る。すなわち、任意の時刻における死滅速度は、その時の生細胞数に比例するという関係が成立する。今、はじめの細胞数を N_0 、これにあるストレスをかけた場合、 t 時間後に細胞数が N になったとすれば、

$$- (dN/dt) = kN$$

すなわち

$$- \ln N = kt + C$$

となる。 $t = 0$ においては $N = N_0$ であるから、 $C = - \ln N_0$ となり

$$- \ln N = kt - \ln N_0$$

$$k = 1/t \ln N_0 / N$$

あるいは

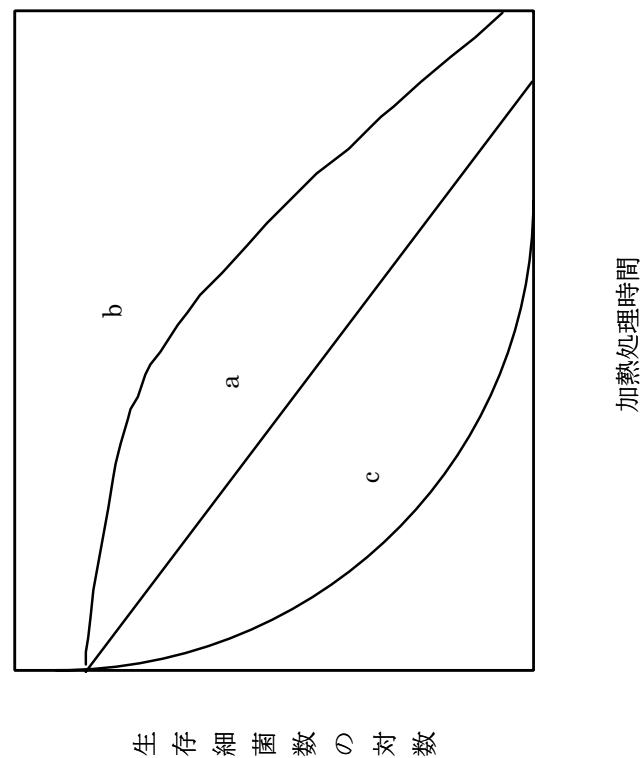
$$k = 1/t (\log N_0 - \log N) / 0.434 \quad (1) \text{式}$$

$t = D$ においては $(\log N_0 - \log N) = 1$ となり

$$D = 2.303/k \quad (2) \text{式}$$

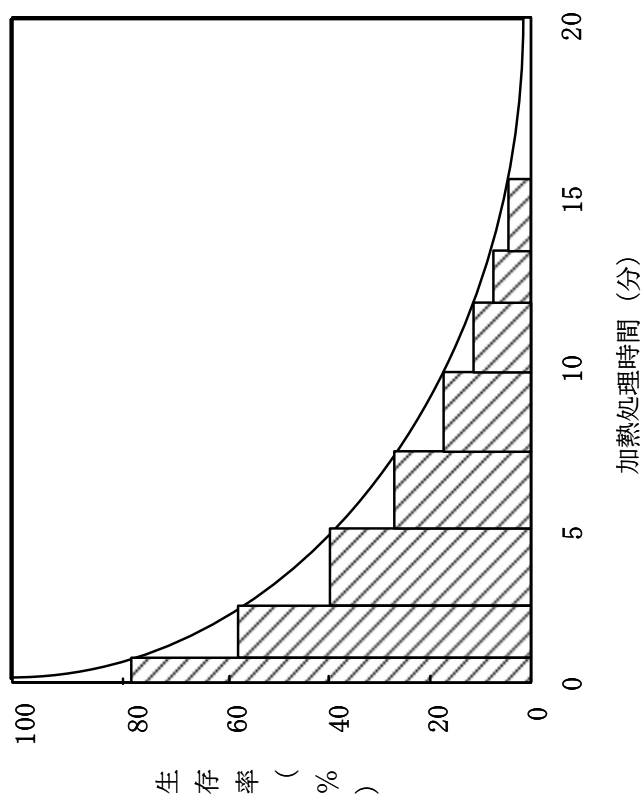
と表される。ここに、 k は死滅速度を示す恒数である。この関係からも分かるように、一般に生細胞数の対数と時間との間には、図3-8 Bの直線aに示すような直線関係が成立する。これは死滅の対数法則 (law of logarithmic order of death) と呼ばれている。

そこで、図3-8 Bのように、実験的に求めた生細胞数の減少直線を最小二重法で直線回歸し、(1)式から k を求め、さらに(2)式からD値を求めた。



B 微生物の死滅経過の種類の様式

a: 死滅の対数法則に準じた経過。
 b: 死滅速度が次第に増大するような経過。
 c: 死滅速度が次第に減少するような経過。
 (柳田, 1981)



A 微生物の死滅経過

曲線は、生存細胞数の時間的变化を示す。
 斜線棒グラフは、単位時間の死滅率を示す
 (Rahn, 1932)

図3-8 加熱処理における微生物の死滅経過

3. 結果および考察

3.1 堆肥試料の理化学的性状

主に九州各地の堆肥製造施設 23 箇所から採取した堆肥試料 29 点の理化学的性状を表 3-4 に示す。これらの堆肥試料はいずれも、良質の完熟堆肥を作ると地域で評価の高い堆肥化施設から採取された。

含水率は 13.0~77.0%の範囲にあり、平均 41.7%であった。製品堆肥の含水率が高いと、微生物的な変質、特に病原菌の再増殖が起きやすいと指摘されている (Betoldi *et al*, 1988; Soares *et al*, 1995)。 (社) 日本施設園芸協会の生鮮野菜衛生管理ガイド (社団法人日本施設園芸協会, 2003) では、堆肥製品の品質保持上、含水率は 30%以下が好ましいとされている。この点、約 17%の堆肥試料のみが、この範囲にあった。

pH は 6.3~9.4 の範囲 (平均 7.9%) で、アルカリ性の強い試料の中には、アンモニア臭の強いものがあつた。

EC は 0.4~13.4 mS cm⁻¹ の範囲 (平均 5.9 mS cm⁻¹) であつた。原料の違いによる一定の傾向は認められなかつた。

CEC は 31.4~79.0 c mol_e kg⁻¹ の範囲 (平均 55.4 c mol_e kg⁻¹) であつた。各種完熟堆肥の CEC はおおむね 40~120 c mol_e kg⁻¹ の範囲と言われ (Harada *et al*, 1980; 藤原俊六郎, 1997), 供試堆肥試料の CEC は、ほぼこの範囲に含まれていた。

全炭素 (T-C) は 17.5~63.3% の範囲 (平均 35.1%) で、試料 2, 4 の炭素率が高かつた。全窒素 (T-N) は 1.1~4.9% の範囲 (平均 2.4%) で、特に鶏糞堆肥 (試料 16~19) では高い傾向を示した。

炭素率 (C/N 比) は、7.6~25.4 の範囲 (平均 15.3%) で、オガクズなど炭素率の高い副資材を原料に含まない鶏糞堆肥 4 点 (試料 16~19) は 7.6~9.8 と低かつた。一般に、完熟堆肥の持つ C/N 比は 20 以下であり (藤原俊六郎, 1997), 試料 29 点中 26 点 (90%) はこの範囲に入っていた。したがって CEC の値も勘案すると、供試試料はほとんど完熟であつたと判断された。

表 3-4 各種堆肥試料の理化学的性状

堆肥試料 番号	含水率 (%)	pH (H ₂ O)	EC (mS cm ⁻¹)	CEC (cmol _c kg ⁻¹)	T-C (%)	T-N (%)	C/N
1	45.4	8.2	3.3	61.8	36.3	2.6	14.0
2	60.1	8.6	5.0	NT*	63.3	3.7	17.1
3	77.0	6.5	0.4	NT	NT	NT	NT
4	38.6	9.1	7.3	NT	60.4	2.4	25.4
5	45.5	6.7	5.0	NT	20.4	0.8	24.8
6	47.9	8.8	5.1	60.5	30.1	2.2	13.6
7	45.8	9.0	4.2	43.9	33.2	2.1	15.8
8	40.4	6.8	3.0	51.2	19.7	1.1	17.9
9	58.3	8.2	4.4	55.2	35.1	1.8	19.5
10	51.3	9.0	7.7	NT	45.6	2.9	15.5
11	41.5	8.2	5.5	63.0	33.1	3.1	10.7
12	46.3	8.0	5.7	57.4	37.2	2.9	12.8
13	52.5	8.9	7.4	NT	NT	1.1	NT
14	29.2	9.4	6.1	31.4	29.0	1.7	17.1
15	45.1	9.3	5.9	60.1	34.2	2.0	17.1
16	23.2	7.9	6.9	48.4	30.6	3.7	8.3
17	16.1	8.0	7.1	61.4	36.3	3.7	9.8
18	15.7	6.7	8.5	56.2	37.3	4.9	7.6
19	52.5	8.4	7.4	NT	33.1	3.5	9.5
20	28.9	8.1	13.4	NT	31.7	2.1	15.1
21	44.3	6.6	5.7	61.3	27.2	1.3	20.9
22	20.9	6.6	4.2	41.2	46.3	2.6	17.8
23	54.0	6.7	7.9	79.0	17.5	1.2	14.6
24	50.9	8.2	6.5	33.5	35.2	2.1	16.8
25	53.6	8.0	3.1	31.0	16.1	1.0	16.1
26	57.6	7.4	6.4	47.5	23.9	1.7	14.1
27	13.0	6.3	3.5	71.5	28.9	1.5	19.3
28	15.0	7.1	3.8	68.3	27.1	1.4	19.4
29	31.4	8.9	11.5	NT	44.6	3.4	13.2
平均	41.7	7.9	5.9	55.4	35.1	2.4	15.3
範囲	13.0-77.0	6.3-9.4	0.4-13.4	31.4-79.0	17.5-63.3	1.1-4.9	7.6-25.4

* 未測定.

3.2 堆肥製品中の大腸菌群数

堆肥試料 29 点中、大腸菌群が検出された試料は 11 点 (38%) あり、それらの菌数は 10^2 ~ 10^6 cfu g⁻¹ dry matter のレベルにあった (表 3-5)。原料別に見ると、牛糞堆肥、下水汚泥堆肥、生ゴミ堆肥から検出され、牛糞・鶏糞混合堆肥 2 点 (試料 14, 15) および鶏糞堆肥 4 点 (試料 16~19) からは検出されなかった。ただし、この傾向が有意なものかを判断するには、より多くの知見の集積が必要と考えられる。

表 3-5 各種堆肥試料中の大腸菌群数

堆肥試料 番号	大腸菌群数 (cfu g ⁻¹ dry matter)	堆肥試料 番号	大腸菌群数 (cfu g ⁻¹ dry matter)
1	ND*	16	ND
2	ND	17	ND
3	$(2.5 \pm 0.3) \times 10^6$	18	ND
4	ND	19	ND
5	$(7.4 \pm 1.6) \times 10^3$	20	1.8×10^2
6	ND	21	$(1.1 \pm 0.0) \times 10^3$
7	$(9.3 \pm 13.0) \times 10^2$	22	ND
8	ND	23	2.4×10^4
9	ND	24	4.7×10^3
10	ND	25	ND
11	$(3.0 \pm 1.0) \times 10^2$	26	$(3.2 \pm 0.5) \times 10^3$
12	$(6.4 \pm 1.1) \times 10^2$	27	ND
13	$(9.1 \pm 1.2) \times 10^2$	28	ND
14	ND	29	ND
15	ND		
大腸菌群陽性率		37.9%	

* 不検出 (検出限界 : < 20 cfu g⁻¹ dry matter).

大腸菌群数は公衆衛生学的な指標として、食品や飲料水の衛生基準などで世界的に広く使われている。水や食品から本菌群が検出されることは、それらが糞便により直接または間接的に汚染されている可能性を意味する。本菌群に含まれる腸内細菌科の乳糖分解性細

菌の多くは非病原性か、病原性の弱い日和見感染菌である。しかし、本菌群の存在は、出所を同じくする腸管系病原菌の存在リスクがあると考えられる。

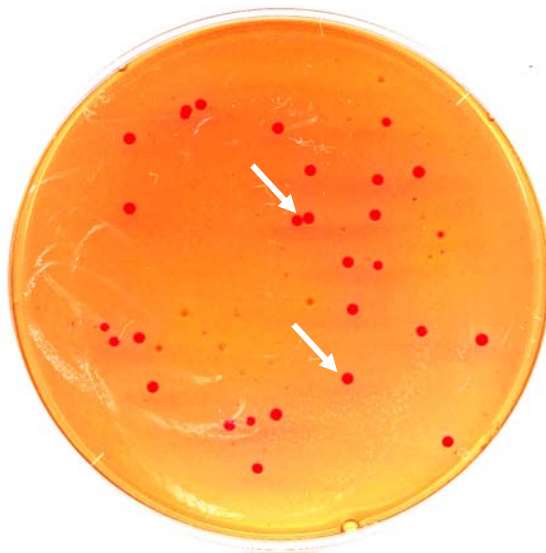


写真 3-2 デスオキシコーレイト培地上の大腸菌群コロニー

写真 3-2 はデスオキシコーレイト培地上に形成された大腸菌群コロニーを示す。大腸菌群には人畜の糞便に由来するものと、土壌等に由来するものがある。従って、大腸菌群の存在自体が直ちに糞便性汚染を意味するものではないが、病原微生物により汚染されている疑いを示している。病原菌による汚染の疑いのない飲料水とするために、「大腸菌については検出されないこと」(厚生労働省, 2005) と水道法第 4 条に基づき厚生労働省により定められている。「食品衛生規範等の指導基準値」(神奈川県, 2005) によると、食品中の大腸菌群や大腸菌は全て陰性であることが要求される。

一方、大腸菌群には人畜の糞便に由来するもの以外に、植物や土壌の常在菌として広く環境中に生存するものがあることが最近分かってきた。たとえば、国内の有機栽培野菜 153 点の 98%から、また市販野菜(従って堆肥使用との関係が明確でないもの) 44 点の 56%から大腸菌群が検出されたが、その全ては大腸菌以外の菌種であり、病原性の可能性は低いと多種類見いだされているが、その中には、*Enterobacter* や *Klebsiella*, *Pantoea* など大

腸菌群に属する腸内細菌科の細菌が含まれている (Dong *et al.*, 2003). したがって腸内細菌科の細菌が、植物のエンドファイトとして生鮮野菜や堆肥の副資材であるイナワラなどに存在する可能性も考えられる. このような植物内生菌のヒトや植物への病原性に関する知見は極めて限られており、今後の解明が待たれる.

以上のことから、堆肥からの大腸菌群の報告されている (上田・桑原, 2002). また、植物から窒素固定能を持つエンドファイトの検出が直ちに有害菌の存在を示すとは言えず、それがどのような菌種であり、どのような性質を有しているか詳細に検討する必要がある.

3.3 大腸菌群分離株の同定および病原大腸菌に対するスライム凝集反応

本研究でデスオキシコーレイト培地から検出された大腸菌群は確かに大腸菌群に属するか、もし大腸菌と同定された場合、その大腸菌は病原性を持っているかということを確認するため、牛糞堆肥試料 5 点から得られた大腸菌群分離株について、API 20E により同定した.

試料 5 点のうち 4 点からの分離株 11 株が、*E. coli*, *E. vulneris*, *Pantoea* sp または *Buttiauxella agrestis* と同定された. これらはいずれも大腸菌群に属する腸内細菌科の細菌である. しかし、*Serratia marcescens* のみが分離された試料が 1 点あり (試料 23), また *E. coli* が検出された試料 1 点 (試料 11) から本菌が検出された. *S. marcescens* は大腸菌群には属さない腸内細菌科の細菌である. すなわち、デスオキシコーレイト寒天培地により大腸菌群陽性と判定された 5 点の堆肥試料のうち、1 点からは大腸菌群が分離されず、代わりに大腸菌群ではない本菌が分離された.

S. marcescens は赤色色素プロジギオシン (prodigiosin) を生産するため、デスオキシコーレイト寒天培地上で大腸菌群の赤いコロニーと誤認されたものと推察された. 本菌の発色と大腸菌の発色とは微妙に異なるので、大腸菌群を検出する際に、本菌の純粋培養を「誤認しやすい陰性対照」として用いることで、偽陽性の判定を避けることができると考えられる.

堆肥試料から分離された大腸菌群に属する細菌のうち、*E. coli* には非病原性の株と病原性の株とがあり、病原大腸菌の多くは菌体抗原により血清型別されている. そこで、*E. coli*

と同定された分離株 5 株を，病原大腸菌免疫血清によるスライド凝集試験に供した．その結果（表 3-6），これらの分離株は，いかなる病原大腸菌の血清型にも反応しなかった．

表 3-6 堆肥から大腸菌群として分離した菌株の API 20E による同定および病原大腸菌免疫血清反応

堆肥試料 番号*1	菌株 番号	API 20E による同定結果			大腸菌群 の合否	病原大腸菌 スライド 凝集反応
		コード	菌種	同定確率 (%)		
11a*2	1	5307721	<i>Serratia marcescens</i>	97.5	-	NT*3
	2	5307721	<i>Serratia marcescens</i>	97.5	-	NT
	3	5044553	<i>Escherichia coli</i>	94.8	+	-
11b	4	5044553	<i>Escherichia coli</i>	94.8	+	-
	5	5144572	<i>Escherichia coli</i>	99.6	+	-
	6	5144572	<i>Escherichia coli</i>	99.6	+	-
12	7	5144556	<i>Escherichia coli</i>	97.6	+	-
	8	5344576	該当なし	-	-	NT
	9	5244576	該当なし	-	-	NT
23	10	5307761	<i>Serratia marcescens</i>	97.0	-	NT
	11	5307761	<i>Serratia marcescens</i>	97.0	-	NT
	12	5307761	<i>Serratia marcescens</i>	97.0	-	NT
	13	5306761	<i>Serratia marcescens</i>	95.3	-	NT
	14	5306761	<i>Serratia marcescens</i>	95.3	-	NT
	15	5306761	<i>Serratia marcescens</i>	95.3	-	NT
26	16	1005113	<i>Pantoea sp.</i>	97.9	-	NT
	17	1005113	<i>Pantoea sp.</i>	97.9	-	NT
	18	1005113	<i>Pantoea sp.</i>	97.9	-	NT
	19	1004113	<i>Escherichia vulneris</i>	41.4	+	NT
			<i>Buttiaux agrestis</i>	24.6	-	NT
	20	1004113	<i>Escherichia vulneris</i>	41.4	+	NT
			<i>Buttiaux agrestis</i>	24.6	-	NT
21	1004113	<i>Escherichia vulneris</i>	41.4	+	NT	
		<i>Buttiaux agrestis</i>	24.6	-	NT	

*1 詳細は表 1 参照．

*2 a と b はそれぞれ同一施設で，試料採取時期が異なる．

*3 未測定．

一方, *E. vulneris*, *Pantoea* sp., *B. agrestis*, および非大腸菌群である *S. marcescens* は, いずれもヒトの日和見感染菌として知られている (Lebine *et al.*, 1994; De Baere *et al.*, 2004; Dionisio *et al.*, 1992; 平潟, 2002). これらの菌種の病原性は菌株により異なるが, これらの菌種が検出されたこと自体, 注目すべきことであろう.

3.4 堆肥製品中の大腸菌数およびサルモネラ菌数

堆肥試料 12 点について, クロモカルト・コリフォーム寒天培地を用いて, 大腸菌の検出を試みた (表 3-7). その結果, いずれの試料からも大腸菌は不検出であった. これらの堆肥試料のうち, 23 および 26 については, デスオキシコーレイト寒天培地による大腸菌群の検出 (表 3-5) と分離同定による確認もなされ, いずれも分離株は大腸菌以外の菌種であった (表 3-6). クロモカルト・コリフォーム寒天培地による結果は, これらの結果と一致した.

表 3-7 各種堆肥試料中の大腸菌数およびサルモネラ菌数

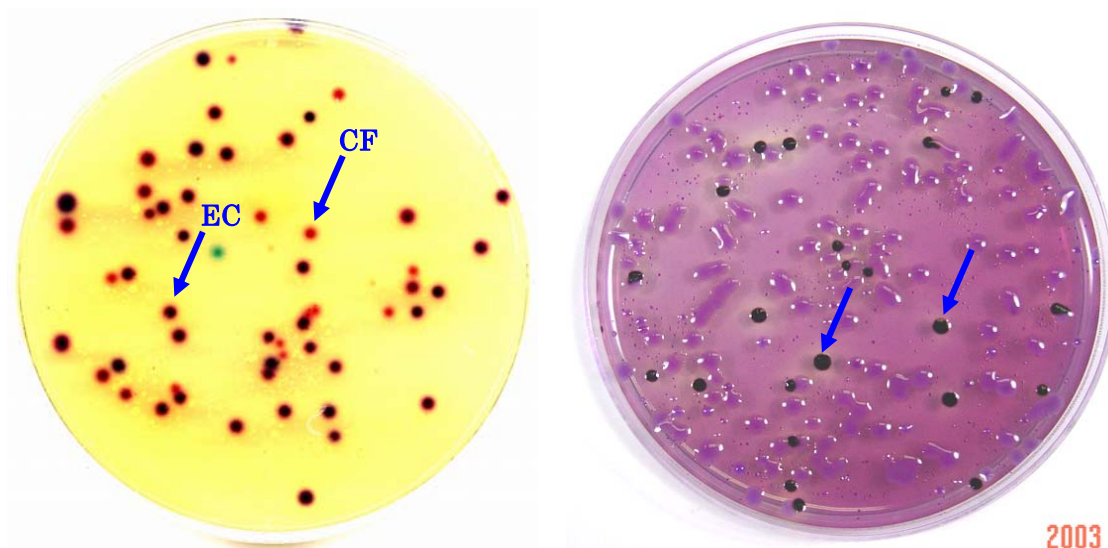
堆肥試料 番号	菌数 (cfu g ⁻¹ dry matter)	
	大腸菌	サルモネラ菌
2	ND*	ND
3	ND	ND
4	ND	ND
5	ND	ND
10	ND	ND
13	ND	(1.9 ± 0.6) × 10 ³
22	ND	ND
23	ND	(6.0 ± 2.0) × 10 ³
24	ND	ND
25	ND	ND
26	ND	ND
29	ND	ND
陽性率	0.0%	16.7%

* 不検出 (検出限界 : < 20 cfu g⁻¹ dry matter)

また、サルモネラ菌についてMLCB培地を用いて検査した（表 3-7）。試料 12 点のうち 2 点から検出され（陽性率 17%），その菌数はいずれも 10^3 cfu g⁻¹ dry matter のレベルであった。

サルモネラ菌は，ヒトや動物の腸管内に生息し，食物や水を介して，またヒトからヒトに感染する代表的な細菌群である。本菌群による感染症は，昔は腸チフスが有名であったが，近頃は食中毒が最も多い。特に近年は，サルモネラ・エンテリティディス (*Salmonella enteritidis*) を原因とする卵および卵加工品による食中毒が急増している。

クロモカルト培地上に形成された濃青色の大腸菌コロニーおよび MLCB 培地上に形成された黒色のサルモネラ菌コロニーを写真 3-3 に示す。



A, クロモカルト培地上のコロニー

B, MLCB 培地上のサルモネラ菌コロニー

CF, 大腸菌群のコロニー

EC, 大腸菌のコロニー

写真 3-3 大腸菌およびサルモネラ菌のコロニー

3.5 堆肥原料中の糞便汚染指標菌数

堆肥原料である牛糞試料 5 点および生ゴミ試料 3 点計 8 点について，糞便汚染指標菌の

存在を検討した(表 3-8). これらの試料は, 含水率が 52.6~85.5 の範囲で, pHは 5.3~8.7, ECは 1.5~6.1mS cm⁻¹であった. 大腸菌群は 6 点 (75%) から検出され, 菌数は 10⁶ ~10⁸ cfu g⁻¹ dry matterのレベルであった. また大腸菌は 5 点 (63%) から検出され, 10² ~10⁸ cfu g⁻¹ dry matterのレベルで, サルモネラ菌は 6 点 (75%) から検出され, 10³ ~10⁸ cfu g⁻¹ dry matterのレベルであった. 牛糞のみならず, 生ごみからもこれら糞便汚染指標菌が検出されていた.

堆肥の原料となる牛糞や生ゴミなどに関する内外の調査例によると, 大腸菌群は, 牛糞から 10⁵~10⁷ cfu g⁻¹ dry matterのレベルで, また生ゴミからは 10⁶~10⁹ cfu g⁻¹ dry matterのレベルで検出されている(染谷・井上, 2003). 上記の結果は, これらの報告レベルとほぼ一致する. なお, 大腸菌やサルモネラ菌の堆肥原料や堆肥中の陽性率や菌数に関しては, 調査例が限られているが, 本研究とほぼ同様の傾向が認められている(Droffner *et al.*, 1995).

表 3-8 堆肥原料の理化学性および各種病原指標菌数

製造場所 ^{*1}	原料 ^{*2}	含水率 (%)	pH (H ₂ O)	EC (mS cm ⁻¹)	菌数 (cfu g ⁻¹ dry matter)		
					大腸菌群	大腸菌	サルモネラ菌
佐賀県A施設 ^{a*}	牛糞	75.5	7.7	5.9	(6.7±2.5)×10 ⁷	(7.6±0.5)×10 ⁷	(8.6±1.9)×10 ³
佐賀県A施設 ^b	牛糞	73.2	7.6	5.3	(1.4±0.1)×10 ⁸	(8.5±0.7)×10 ⁷	ND ^{*4}
佐賀県B施設	牛糞	84.1	8.6	6.1	(9.6±1.3)×10 ⁷	(1.0±0.2)×10 ⁸	(5.4±1.8)×10 ⁸
熊本県Q施設	牛糞	73.2	8.3	4.2	ND	(1.6±1.4)×10 ²	(5.3±1.0)×10 ³
佐賀県Q施設	牛糞	85.5	8.7	3.0	(1.5±0.2)×10 ⁶	(1.4±0.5)×10 ⁶	(5.7±1.3)×10 ⁵
佐賀県I施設 ^c	生ゴミ	53.5	5.5	5.4	>10 ⁶	NT ^{*5}	>10 ⁷
佐賀県I施設 ^e	生ゴミ	52.6	5.3	1.8	ND	ND	(5.6±1.9)×10 ⁶
佐賀県D商会	生ゴミ	67.6	6.0	1.5	(7.5±0.4)×10 ⁸	ND	ND

*1 製造場所の詳細は表 1 参照.

*2 副資材を含む(表 1 参照).

*3 a と b, c と e はそれぞれ同一施設で, 試料採取時期が異なる.

*4 不検出(検出限界: <20 cfu g⁻¹ dry matter).

*5 未測定.

3.6 堆肥発酵過程における糞便汚染指標菌の消長

表 3-8 に示す製造場所 6 施設における堆肥化過程での病原指標菌の消長を 7 例について追跡した (図 3-9). 堆肥の温度 (図 3-10, 大腸菌群の図中) に関しては, 7 例のうち 6 例 (A~F) では, 発酵中間品で 60°C 以上に上昇し, 製品ではおおむね 40°C 以下に低下した. 残りの 1 例 (G) では, 原料, 発酵中間品, 製品を通して温度が約 40~50°C であった. 図 3-10 の糞便汚染指標菌の消長パターンは, ほぼ 4 通りに分けられた. すなわち, (1) 糞便汚染指標菌は原料から検出されたが, 発酵中間品で減少し, 製品中では消失する場合 (C の大腸菌群, A, D, F の大腸菌, および A, B のサルモネラ菌), (2) いったん消失するが, 製品から再度検出される場合 (D~F の大腸菌群, E の大腸菌および F のサルモネラ菌), (3) 全く消失しない場合 (G の大腸菌群とサルモネラ菌), (4) 原料の段階から検出されない場合 (A, B の大腸菌群, B, C の大腸菌および C, D のサルモネラ菌) であった.

これらの結果は, 大腸菌群 (伊吹ら, 1996; 渡辺ら, 1998; 本多ら, 1999; 羽生ら, 1997; 梅田ら, 1999;) や大腸菌 (Droffner *et al.*, 1995), サルモネラ菌 (Droffner *et al.*, 1995) の堆肥化過程における消長に関する内外の既往の報告とほぼ一致した.

上記のように異なる消長を辿る原因に関して, (1) の場合では, 温度制御が適切で発酵熱による糞便汚染指標菌の殺菌が完全で, 製品中での再増殖もなかったと判断される.

(2) の場合では, 発酵温度不足による糞便汚染指標菌の生残や保管中の高水分下での再増殖 (Soares *et al.*, 1995) などが考えられるが, 結論を得るには, 堆肥化過程での詳細な温度や菌数の追跡の必要がある. 温度, 水分, 炭素, pH, NaCl および微生物の多様性などは堆肥中での病原菌の再増殖の主な影響因子であると報告されている (Deportes *et al.*, 1995; Blackburn *et al.*, 1997). (3) の場合には, 発酵温度がやや低いことや, 交叉汚染 (堆肥の表層部の温度が低い箇所が生残していた菌や堆肥製造後の不適切な取り扱いによる原料からの汚染) の可能性が考えられる.

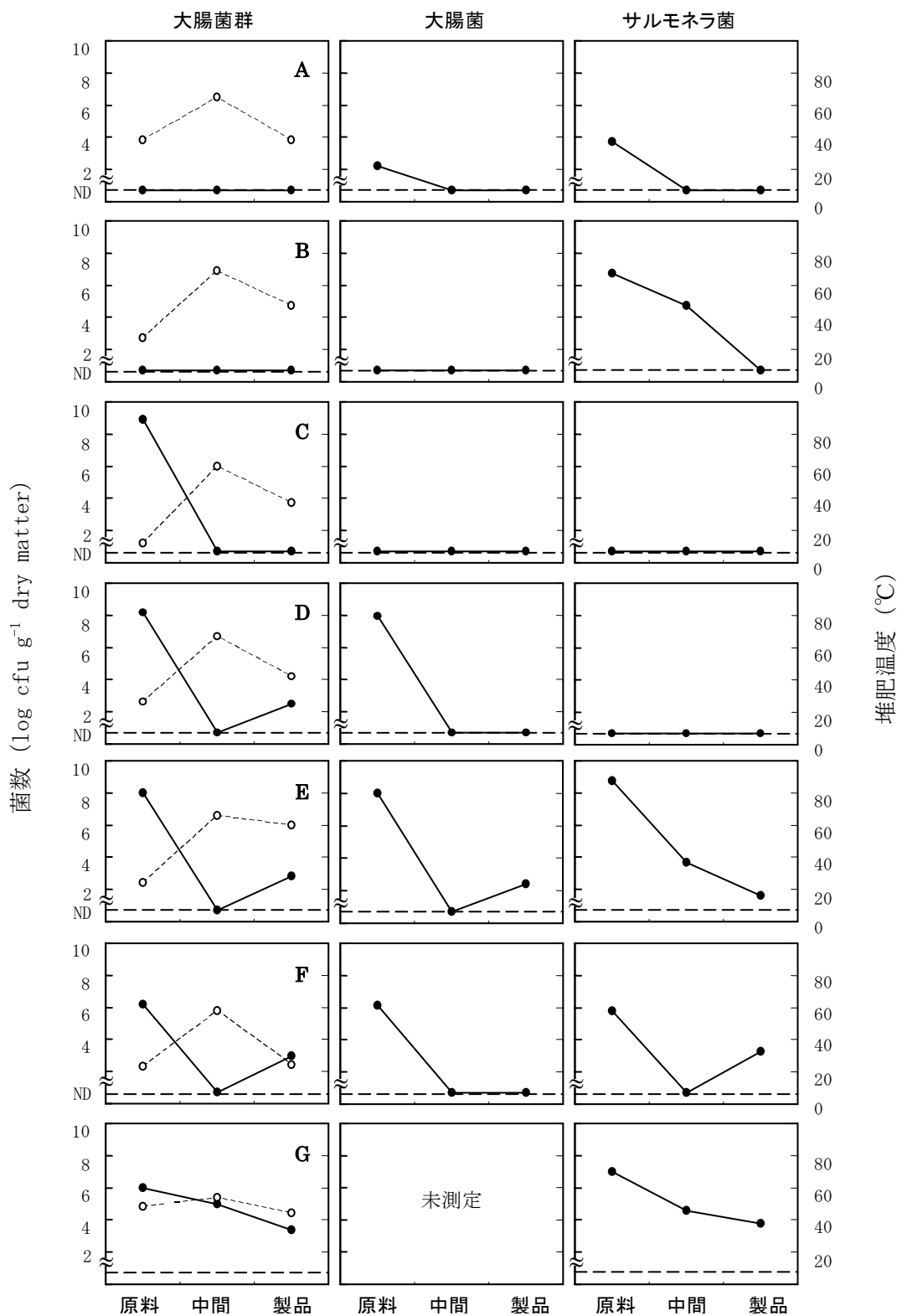


図 3-9 堆肥化過程における大腸菌群，大腸菌およびサルモネラ菌の消長と堆肥温度

A, 熊本市Q施設(牛糞堆肥); B, 佐賀県I施設(生ごみ堆肥c); C, 佐賀県D商会(生ごみ堆肥); D, 佐賀県A施設(牛糞堆肥b); E, 佐賀県B施設(牛糞堆肥); F, 佐賀県Q施設(牛糞堆肥); G, 佐賀県I施設(生ごみ堆肥e).

ND, 不検出(検出限界 <20 cfu g^{-1} dry matter)

●—● 菌数 ○.....○ 温度

ここで特に注目すべきことは、発酵中間物で品温が 60~70℃と高いにも関わらず、糞便汚染指標菌が多数検出されている場合があることである (B と E のサルモネラ菌)。サルモネラ菌を含め非芽胞菌の多くでは、D 値 (細胞の 90%が死滅するのに要する時間) が 50℃前後のときでも数十秒から数分間であり (芝崎, 1996), 約 60℃の発酵中の堆肥から生きたサルモネラ菌が検出されることは説明がつきにくい。水分活性が低いと熱の殺菌作用を受けにくいことが食品中の病原菌の生存に関して報告されており (芝崎, 1996), 堆肥中でも同様の現象がある可能性が考えられる。また, 上記の交叉汚染の可能性も考えられる。54℃で増殖できる大腸菌やサルモネラ菌の変異株も報告されており (Droffner, 1991), 堆肥中にそのような細菌が存在するか, 今後の課題である。

通説では, 堆肥の製造過程の発酵熱によって病原菌や寄生虫卵, 雑草の種子などが死滅するといわれているが, 本研究では, 完熟堆肥と見なされる堆肥製品中から大腸菌群が高頻度 (38%) で検出され, さらに, 大腸菌やサルモネラ菌およびその他の日和見感染菌として知られる腸内細菌科の細菌が検出された。特に, 60℃以上の発酵中の堆肥からもサルモネラ菌が検出されたことから, 堆肥の製造過程における温度管理や交叉汚染の防止など, 適切な衛生管理が堆肥の取り扱い者の健康や農産物の安全性の確保において重要であることが強調される。

堆肥原料中に存在し, 堆肥製品に残留する可能性のある病原菌のうち, 最も警戒すべきなのは, 大腸菌 0157 であろう。しかし, 本菌の牛糞等からの検出率は, イギリスやノルウェーなどを除けば日本も含め数%以下であり, 堆肥からの分離例はほとんどない (金子, 1999)。その他の病原菌としては, 大腸菌 0157 以外の病原大腸菌やサルモネラ菌が重要と考えられる。本研究では, 堆肥製品から分離された大腸菌は病原大腸菌ではなかったが, まだ少数例なので, より多くの知見の集積が望まれる。また, サルモネラ菌が堆肥製品の 17%から検出されたことは注目すべきである。

以上のことから, 堆肥には潜在的に感染リスクがあると考えて対処することが適切と考えられる。すなわち, 堆肥は完熟した製品でも病原菌による汚染の可能性があるものとし

て考え、原則として作付け数ヵ月前に元肥としてのみ使用し、追肥として使用しないこと、施用後すぐに土壌と混合して飛散を防止すること、生食用野菜と接触しないような配慮をすることなどの対策（社団法人日本施設園芸協会，2003）が必要と考えられる。

本研究も含めて、堆肥中の大腸菌等の検出には、培養法が使用されている。しかし、環境中に出た大腸菌が VNC 状態になることは広く知られており（染谷ら，1999）、低栄養環境、温度ストレス、塩ストレスなどが VNC 化を促進すると指摘されている。堆肥中でも熱ストレスにより大腸菌等が VNC となる可能性が考えられ、このような場合、培養法では菌数を過小評価する恐れがある。この点について実証的に研究した報告は見あたらない。これは、堆肥中の大腸菌を培養に依存しないで定量的に検出した成功例がないためである。堆肥中の大腸菌やサルモネラ菌の DNA プローブによる検出が試みられているが（Droffner *et al.*，1995）、原理的に定量性がないという限界がある。この点に関して、筆者らは、Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) による大腸菌の特異的かつ定量的な検出法の開発に成功しており、第五章で報告する。

米国EPAでは下水汚泥堆肥の販売基準に関して、施設ごとのランクを定めており（Soares *et al.*，1995）、堆肥製品中の糞便性大腸菌群数が 10^3 MPN g^{-1} dry matter未満であればAクラスの施設としてランク付けされ、製造された堆肥は広く販売できるが、 $10^3 \sim 10^6$ MPN g^{-1} dry matterではBクラスとされ、市販の禁止など販売が著しく限定される。ただしこの基準は経験則的なものと推察される。

日本では、堆肥の微生物学的安全性（バイオセーフティー）に関して法的な基準はないが、今後、堆肥中の有害菌に関する知見が多数集積するならば、堆肥の衛生基準を設定することも可能になると期待される。

3.7 種々の温度における大腸菌の発育

大腸菌 0157 の臨床分離株 15 株および K12 株の種々の温度における培養結果を表 3-9 に示す。BHI 培地を用いた場合、平板培地上では大腸菌 0157 は 50°C までは旺盛に発育し、 55°C

でも発育が見られ、60℃でも15株中13株でわずかな発育が見られた。しかし液体培地による静置培養では45℃までは発育したが、50℃以上では発育しなかった。一方、K12株では平板培地上でも発育は55℃までで、液体培地では45℃が発育の上限であった。

平板培地の方が液体培地よりも高温で発育可能であるという上記の結果から、酸素濃度が高温での発育に影響している可能性が考えられる。そこで、L字管に入った液体培地に *E. coli* 0157 G7 株を接種し、振とう培養した結果、45℃で旺盛な増殖が認められ、50℃では発育しなかった。しかし、その菌液をNA培地に接種したところ、多数のコロニーが出現した。55℃の場合では生残細胞はほとんど認められなかった。

以上の結果から、供試した大腸菌 0157 株または K12 株は高い温度（50～60℃）で発育でき、この時、酸素濃度が影響していることが示唆された。大腸菌 0157 は K12 株と比べて熱抵抗性が高く、55℃までは平板培地上で良く発育し、60℃の温度でもわずかながらであるが、平板上で発育することが見出された。大腸菌 0157 の熱抵抗性がこれほど高いことを報じた論文は、今までに見あたらない。

表 3-9 種々の温度における大腸菌 0157:H7 および K12 の発育試験

培養温度 (°C)	培養法	菌 株															
		0157:H7															
		G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	
37	固体静置	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	液体静置	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
45	固体静置	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	液体静置	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
50	固体静置	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	液体静置	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	固体静置	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	液体静置	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	固体静置	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	液体静置	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

培養 2 日間後のデータを採用した。
 ++, よく発育, +, 一般発育, ±, やや発育, -, 発育しない。

3. 8 熱抵抗性試験条件の検討

3. 8. 1 加熱恒温器の選定

加熱恒温器にはドライバスとウォーターバスを用いた。いずれの方が伝熱がよいか、その検討の結果を図 3-10 に示す。温度計センサーを 60℃のドライバスに投入した場合、温度計の読みが 60℃になる時間は約 240 秒で、一方、60℃のウォーターバスでは、温度計の読みが 60℃に達する時間はわずか 20 秒であった。

この結果から、ドライバスよりウォーターバスの方が温度上昇速く、熱伝導性がよいことが分かった。したがって、本試験には恒温器にはウォーターバスを選んだ。

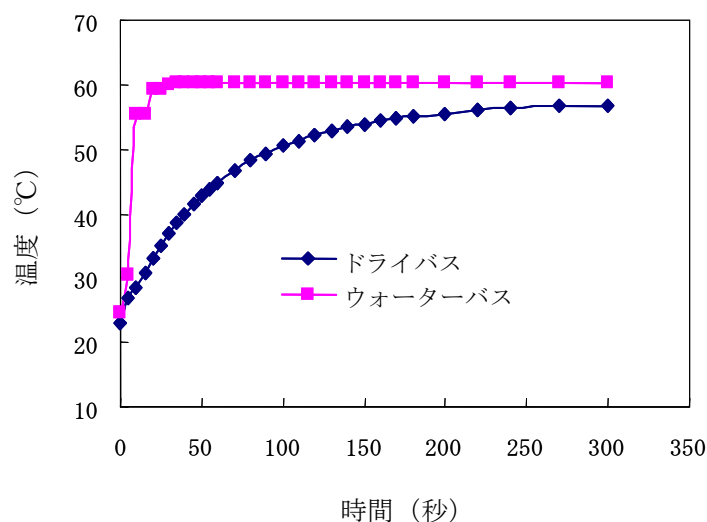


図 3-10 ウォーターバスまたはドライバスに温度計のセンサーを入れた際の温度上昇曲線

3. 8. 2 熱抵抗性試験用容器の選定

ウォーターバスに種々の容器を投入した際の容器内の温度変化を測定した (図 3-11)。アルミキャップ (M1 型, 4 mL 容) にシリコン栓をしたもの、キャップ付小試験管 (10 mL 容)、マイクロチューブ (1.5 mL 容) およびバイアル瓶 (S-1 型, 4 mL 容) の計 4 つ容器の中では、アルミキャップや小試験管、バイアル瓶の熱伝導がほぼ同じで、120 秒で 60℃に達した。マイクロチューブの熱伝導はやや遅れ、約 180 秒であった。

アルミキャップや小試験管、バイアル瓶の熱伝導性がほぼ同じで最も良好であったが、取り扱いの便利さのため、アルミキャップにシリコン栓を付したものを熱抵抗性試験用容器として選んだ。

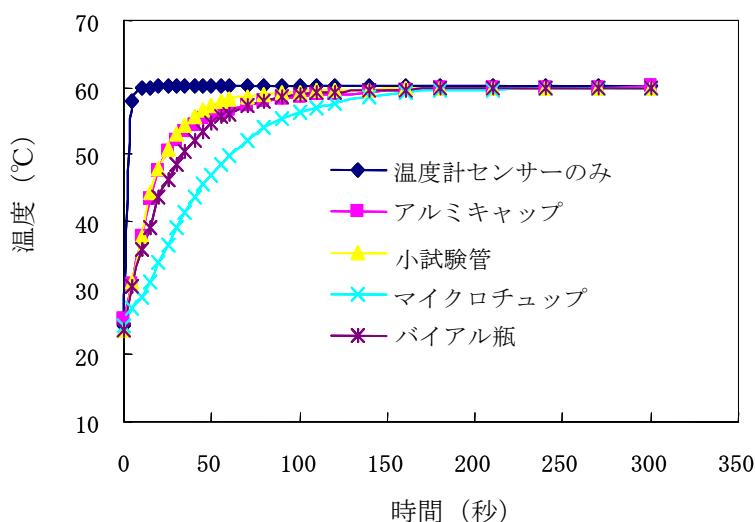


図 3-11 種々の容器における温度上昇曲線

*容器内に水 1 ml と温度計センサーを入れ、密栓して 60°C のウォーターバスに、水没させる

3. 8. 3 容器内に入れる試料量の選定

蒸留水をアルミキャップに 0～3 mL 入れ、伝熱性を検討した (図 3-12). 0.5～3 mL の

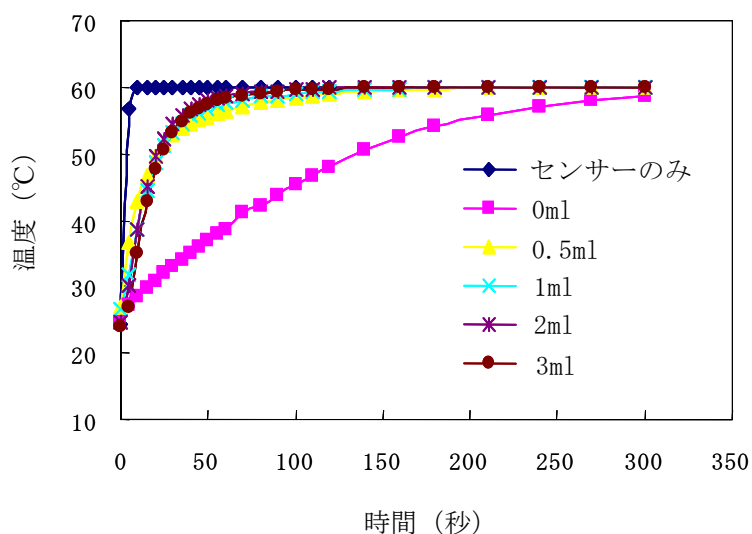


図 3-12 アルミ容器内の水量が温度上昇曲線に及ぼす影響

範囲で温度上昇がほぼ同じで、60°Cになるまでの時間は約120秒であった。一方、0 mLでは300秒以上を要した。この結果から、試料量として1 mLを熱抵抗性試験に採用した。

3.9 大腸菌の熱抵抗性

生理食塩水中または堆肥中における大腸菌の熱抵抗性試験の結果を図3-13示す。

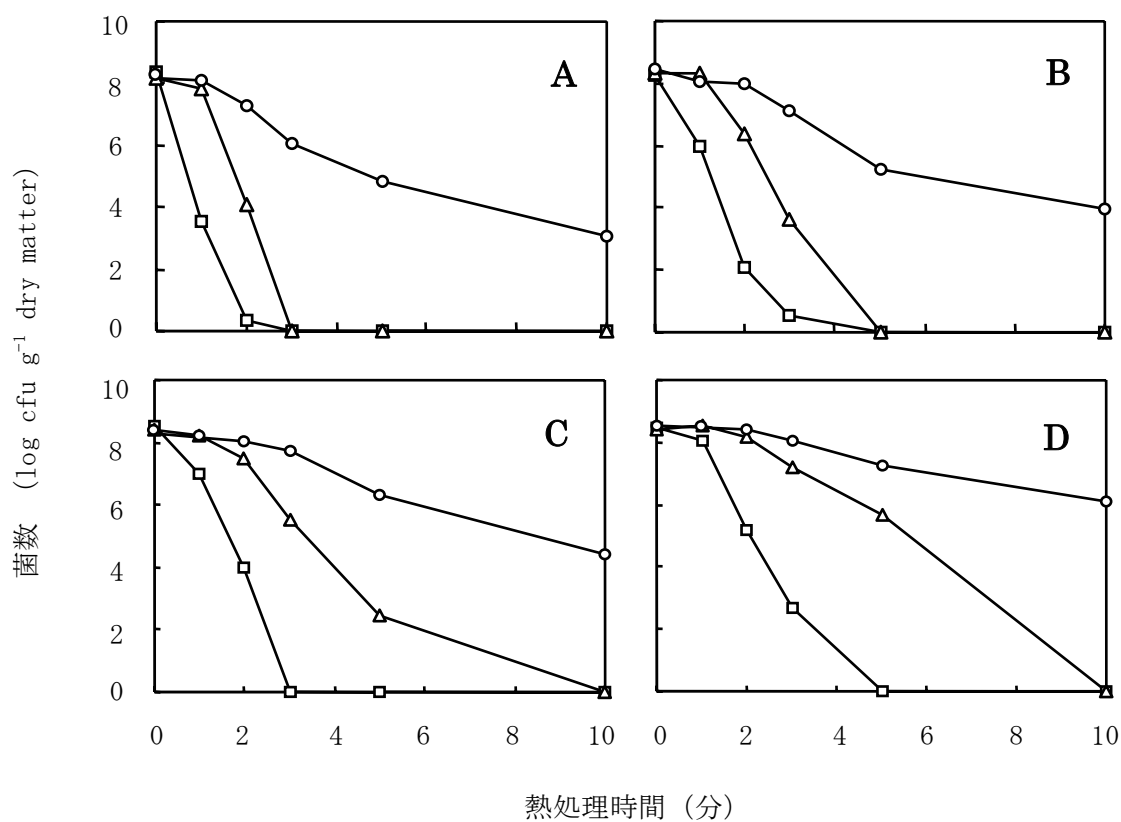


図 3-13 60°Cにける大腸菌の死滅曲線

A 対数期後期 K12 B 定常期 K12 C 対数期後期 O157 D 定常期 O157
 —□— 堆肥 (40%水分) —△— 堆肥 (70%水分) —○— 生理食塩水

最初の約1分間ではいずれの場合も菌数があまり低下しなかった。これは、熱処理の際に処理容器内の温度が高温になるまでの熱伝導の時間が必要であるためと推察される。

大腸菌K12の場合では、対数期後期の菌体では、当初 1.6×10^8 cfu/mLあった菌数が、食

塩水中では1分間で 3.5×10^3 cfu/mLに減り、約2分間で 10^1 cfu/mL以下に著しく低下した。しかし、含水率70%の堆肥中では、死滅がやや遅く、さらに含水率40%の堆肥中では、加熱10分後でも 1.1×10^3 cfu/mLの細胞が生残していた(図3-13 A)。一方、定常期の菌体で同様の実験をすると、当初 2.1×10^8 cfu/mLあった菌数が、食塩水中では1分間で 9.6×10^5 cfu/mLに減り、約2分間で 1.2×10^2 cfu/mLに著しく低下した。含水率70%の堆肥中では、死滅がやや遅く、含水率40%の堆肥中では、加熱10分後でも 8.9×10^3 cfu/mLの細胞が生残していた(図3-13 B)。対数期後期の菌体と比べて、いずれの場合でも熱抵抗性がさらに強まる傾向が認められた。

このように、生理食塩水よりも堆肥中の方が大腸菌は死滅しにくく、しかも堆肥の含水率が低いと熱抵抗性が高くなることが明らかであった。さらに、定常期の菌体の方が対数期後期の菌体よりも熱抵抗性が強い傾向が認められた。

大腸菌0157の場合では、対数期後期の菌体では、当初 2.5×10^8 cfu/mLあった菌数が、食塩水中では1分間で 9.8×10^6 cfu/mLに減り、約2分間で 1.0×10^4 cfu/mL以下に低下した。しかし、含水率70%の堆肥中では、死滅がやや遅く、さらに含水率40%の堆肥中では、加熱10分後でも 2.7×10^4 cfu/mLの細胞が生残していた(図3-13 C)。一方、定常期の菌体で同様の実験をすると、当初 2.7×10^8 cfu/mLあった菌数が、食塩水中では1分間で 1.1×10^8 cfu/mLに減り、約2分間で 1.5×10^5 cfu/mLに低下した。含水率70%の堆肥中では、死滅がやや遅く、含水率40%の堆肥中では、加熱10分後でも 1.3×10^6 cfu/mLの細胞が生残していた(図3-13 D)。

大腸菌0157の熱抵抗性試験の結果は大腸菌K12株と同様、食塩水中よりも堆肥中、それも水分が低い方が、また対数期の菌体よりも定常期の菌体の方が熱抵抗性高いという結果が得られた。しかも、K12株よりも全般的に死滅が遅い傾向が見られた。

微生物の加熱殺菌においては、微生物固有の熱抵抗性はもちろんであるが、加熱前、加熱時、加熱後の諸条件の影響を無視することができない。このうち加熱前歴については、内部要因としての細胞の遺伝性、細胞成分組成、培養齢など微生物細胞自体の問題と、外部環境因子としての温度、水分活性(a_w)、培地成分、pH、酸素などが微生物の熱死滅に対して影響することが明らかにされている(芝崎, 1996)。これに関して、上記の結果から、

内部要因の培養齢について、対数期後期の菌体より定常期の菌体の方が熱抵抗性は高いこと、また、外部環境因子の水分ポテンシャルについて、堆肥の含水率が低いと熱抵抗性が強くなるという2点の結論が明らかであった。

3.10 大腸菌のD値

図3-14の死滅曲線から求めたD値を表3-10に示す。生理食塩水中で対数期後期の大腸菌K12のD値は15.0秒であったが、含水率40%の堆肥中における定常期の菌体では122.4秒となり、熱抵抗性が約8倍も高かった。

表3-10 *E. coli* K12 and 0157 のD値

処 理	D 値 (秒)			
	対数後期		定常期	
	K12	0157	K12	0157
生理食塩水	15.0	17.2	22.1	30.4
堆肥(含水率70%)	15.4	40.0	29.0	61.6
堆肥(含水率40%)	109.9	136.4	122.4	215.9

E. coli 0157 は臨床株を使った。

D値：一定温度下で菌体が90%死滅するのに要する時間

算定された大腸菌0157のD値は、生理食塩水中で約17.2秒と、K12株よりもやや大きく、水分40%の堆肥中では定常期菌体で215.9秒という大きな値であり、K12株の約2倍の値であった。このように大腸菌0157は大腸菌K12株より熱抵抗性が強いことが明らかとなった。

以上の結果から、堆肥の中では、大腸菌の熱抵抗性は堆肥中の水分含量が低いほど高く、定常期の菌体は対数後期の菌体より、熱抵抗性が高い傾向があった。水分含量（水ポテンシャル）が低いほど熱抵抗性が高まるという現象は、食品微生物学で知られていることである。また定常期菌体の方が種々のストレスに対して抵抗性が高いことも最近指摘されている（染谷，1999；柳田，1981）。

Tsuchidoら（1982）は加熱プロセス中での*E. coli*細胞の熱抵抗性の変化を種々の加熱条

件で検討した。温度上昇速度が遅いほど細胞の熱抵抗性が増し、急速加熱により著しく生菌数が低下することが認められた。50°Cで急速加熱した場合、*E. coli*細胞のD値は3.7分で、50°Cで緩速加熱（0.6°C min⁻¹）した場合、D値は17.0分であった。Katsuiら（1982）は加熱殺菌前の予備保温（熱ショック）効果について*E. coli*細胞の生残率を求めた。37°Cで30分間保温した*E. coli*細胞は50°Cで殺菌加熱した場合、D値が45分で、対照として0°C、30分保温した*E. coli*細胞では50°Cで殺菌加熱したとき、D値が30分と低くなった。しかし、このような予備保温（熱ショック）効果による熱抵抗性獲得の機序はまだ明らかにされていない。

熱抵抗性の上昇と熱ショック蛋白の合成とが併行していること、熱ショック細胞の熱死滅経過より加熱損傷の修復システムが効率よく対応していること、細胞膜機構が関連することなどの指摘がなされている（芝崎，1996）。Tsuchidoら（1992）は*E. coli*細胞の加熱損傷の回復過程において熱ショック蛋白質やその他の蛋白質の合成が認められるが、熱ショック蛋白質の生成によって熱抵抗性が誘導されるとし、さらに回復過程中にリポ多糖の合成が行なわれることも確かめている。

得られたD値から計算して、堆肥中で10⁸ cfu/g から10⁰ cfu/g に減少する時間は、定常期菌体で大腸菌K12が16.3分、大腸菌0157が28.8分である。したがって高温の堆肥中では、数時間で大腸菌は全て死滅してしまうはずである。しかし実際には、本研究における調査では、発酵中の堆肥から大腸菌が検出された。このことから、堆肥中の大腸菌の生残には、熱ショックあるいは他にまだ知られていない重要な因子があるという可能性が考えられる。この点に関連して、堆肥の山の内外で温度が異なるという、温度分布の不均一性も重要な因子と考えられる。

4. 要約

九州各地の堆肥化施設 23 ヲ所から、牛糞、鶏糞、生ゴミおよび下水汚泥を原料とした堆肥計 29 点を採取し、理化学的性質または糞便汚染指標菌（大腸菌群、大腸菌およびサルモネラ菌）について培養検査した。

1) これらの堆肥のCECは $31.4 \sim 79.0 \text{ c mol}_e \text{ kg}^{-1}$ の範囲（平均 $55.4 \text{ c mol}_e \text{ kg}^{-1}$ ）で、炭素率（C/N比）は $7.6 \sim 25.4$ の範囲（平均 15.3%）にあり、ほぼ完熟堆肥であると判断された。

2) デスオキシコーレイト寒天培地により大腸菌群が 29 点中 11 点（38%）から検出され、 $10^2 \sim 10^6 \text{ cfu g}^{-1} \text{ dry matter}$ の菌数レベルであった。大腸菌群陽性堆肥試料 4 点のうち 3 点からの分離株は、大腸菌群に属する *E. coli*, *E. vulneris*, *Pantoea* sp., *Buttiauxella agrestis* と同定された。しかし、*Serratia marcescens* のみが分離された試料が 1 点、本菌と *E. coli* が分離された試料が 1 点あった。大腸菌群には属さない腸内細菌科の細菌である *S. marcescens* は赤色色素を生産するため、分離培地上で大腸菌群の赤いコロニーと誤認されたものと推察された。一方、得られた *E. coli* 5 株は、病原大腸菌免疫血清試験で全て陰性であった。

3) 堆肥試料 12 点についてクロモカルト・コリフォーム培地による大腸菌の直接培養検査およびMLCB寒天培地によるサルモネラ菌の検出を試みた結果、大腸菌はいずれの試料からも検出されず、サルモネラ菌は 2 点（17%）から検出され、その菌数は $10^3 \text{ cfu g}^{-1} \text{ dry matter}$ のレベルにあった。

4) 堆肥原料（牛糞、鶏糞、生ゴミ等）8 点のうち大腸菌群およびサルモネラ菌がいずれも 6 点（75%）から、*E. coli* が 5 点（63%）から検出され、菌数はいずれも $10^2 \sim 10^8 \text{ cfu g}^{-1} \text{ dry matter}$ であった。

5) 堆肥製造施設 6 ヲ所における堆肥化過程での糞便汚染指標菌の消長を 7 例について追跡した結果、糞便汚染指標菌が減少して製品中で消失する場合、いったん消失するが製品で再度検出される場合、全く消失しない場合、原料から製品まで検出されない場合の 4

通りが観察された。発酵温度が高くてもサルモネラ菌などが生残する場合があります、その原因について、再増殖や交叉汚染の可能性を考察した。

6) 堆肥中では大腸菌の熱抵抗性が水溶液中よりも高まる現象が実験的に確認された。さらに、定常期の菌体は対数期後期の菌体より熱抵抗性が高く、また、*E. coli* 0157 の熱抵抗性は大腸菌 K12 よりも高いことが明らかになった。

7) 60°Cの加熱処理における *E. coli* K12 (対数期後期) の D 値 (菌数が 90%減少するのに要する時間) は、生理食塩水中では 15 秒であったが、水分 40%の堆肥中では 110 秒と大きかった。一方、*E. coli* 0157 の D 値は、生理食塩水中では 17 秒で、水分 40%の堆肥中では 136 秒であった。さらに、定常期の菌体では D 値が大きくなり、水分 40%の堆肥中で 216 秒であった。

以上の結果から、牛糞や生ゴミなど堆肥原料中には大腸菌群やサルモネラ菌が高濃度で存在するが、堆肥発酵過程でその大部分は死滅することが示唆された。しかし、これら病原指標菌が死滅していない堆肥製品も認められた。上記の諸結果に基づき、堆肥の製造過程における温度管理や交叉汚染防止などの適切な衛生管理の重要性を指摘した。

得られたD値に基づくと、60°Cの堆肥中で 10^8 cfu/g から 10^0 cfu/g に菌数が減少する時間は、*E. coli* K12 で 16.2 分、*E. coli* 0157 で 28.8 分と算定される。これらの値では、高温の堆肥から大腸菌群などが検出される理由が説明できない。したがって堆肥中の大腸菌の生残には、熱ショックなど重要な因子があるという可能性が考えられる。

第四章 加熱による堆肥原料の微生物的安全性に関する研究

1. 緒言

環境問題や食品の安全への志向を背景として、有機農業やオーガニック食品への関心が高まっている。その中で、堆肥は「土づくり」の基本となる有機物を提供し、重要な有機質農業資材としてよく使用されている。さらに、家畜排泄物法（1999）や食品リサイクル法（2000）の制定に伴い、家畜糞や食品廃棄物などの適正な処理の方法として堆肥化が見直され、堆肥の施用量が近年、増加している。しかし、堆肥の原料となる牛糞、下水汚泥および都市ごみなどには、大腸菌、サルモネラ菌等の多種多様な病原菌が存在し（Deportes *et al.*, 1995）、乾物 1 g 当たり $10^5 \sim 10^9$ 個という高い大腸菌群数も検出されている（梅田ら, 1999; 羽生ら, 1997; 本多ら, 1999; Vuorinen *et al.*, 1997; Greenberg *et al.*, 1986; Pereira-Neto *et al.*, 1986; Deportes *et al.*, 1998; Pera *et al.*, 1991）。一方、上田ら（2002）の調査では、有機栽培野菜は市販野菜に比較して大腸菌群の検出率が高かった。その上、有機栽培圃場の土壌 101 点からは大腸菌群が 100% 検出され、糞便性大腸菌群も 7% から検出されており、堆肥施用の影響がうかがえる。特に、腸管出血性大腸菌 O 157 : H7 は日本の牛に 0.1 ~ 1.5% 保菌されており（染谷・井上, 2003）、牛糞に汚染された食品を介して、少量の菌数でも食中毒が引き起こされたことが報告されている（染谷・井上, 2003; Coia *et al.*, 1998; Michino *et al.*, 1999）。このように、大腸菌 O157 に関連して堆肥を介した野菜の汚染リスクが指摘されている。

堆肥化の際、堆肥原料中の病原菌は発酵熱により大部分死滅すると言われる。しかし、発酵中の堆肥の内外の温度は均一ではない。従って内部は 60 以上に達していても、外部は 30 ~ 40 という場合もある。そのため、堆肥には有害微生物の生残の可能性があると考えられる。しかも、堆肥製品中からも病原菌が検出されており（Gong *et al.*, 2005; 梅田ら, 1999; 羽生ら, 1997; Pera *et al.*, 1991; Sciancalepore *et al.*, 1996; Soares *et al.*, 1995）、本研究（第三章）でも同様の結果を得た。このため、病原リスクのある堆肥（未熟

堆肥)は、有機農業に不安をもたらすことになる。

安全で安心な堆肥を製造するためのガイドラインとして、堆肥製造の衛生管理の要点として、60 以上の堆肥温度を3週間以上維持すること、製品堆肥の水分は30%以下が好ましいこと、作業機械・道具類を堆肥原料用と製品堆肥用とで明確に区別すること、製造施設の整理整頓を励行し、原料が製品に混入しないようにすること、などが挙げられている(日本施設園芸協会, 2003)。温度管理の要点は、堆肥製造技術者が経験的に会得しているほか、いくつかの研究者が検討している。発酵中の堆肥の水分調節は、温度管理上重要である。また、廃食用油や石灰窒素を添加すると堆肥温度が上昇するので、温度管理上有益である(梅田ら, 1999; 羽生ら, 1997; Greenberg *et al.*, 森, 2003)。最近、超高温菌を利用した高温堆肥化の研究が進んでいる(金澤, 2002)。通常の堆肥では、発酵温度が上がると微生物の活性が低下するため、80 以上にはなかなか上昇しない。しかし超高温菌を利用すると、90 前後でも発酵温度を維持できるため、発酵期間を短縮できるとともに、病原菌の完全殺菌が容易に達成できる。しかし、超高温堆肥化は研究段階にあり、実用化と普及が待たれる。

堆肥の微生物的安全性を達成する方策としては、堆肥化中の病原菌を完全に死滅するように発酵温度を高く維持することが重要であり、これは様々な手法を用いて工夫されている。特に、高温になる堆肥中でも病原菌が死滅しにくい理由の一つに、堆肥の山の表面では温度が低く、そこで病原菌が生き残る素地が出てくることが考えられる。これは、パイル方式(堆肥を山積みにして発酵させる最も一般的な方法)の堆肥法ではどうしても避けられない現象である。

そこで、本研究では、堆肥原料の微生物的安全性を24時間で達成する堆肥化前処理技術を開発するために、密閉式の大型容器に堆肥原料である牛糞を入れ、50~70 で加熱処理して短時間で無害化してしまう方法を検討した。加熱処理した堆肥原料中の大腸菌群などの指標性病原菌は培養法により検査する。その際、病原菌の一部が損傷菌の状態となり、通常よく使われる選択圧の高い選択分離培地では検出できない可能性(日本施設園芸協会, 2003)も考えられたため、増菌培養による高感度培養検査を行なった。

また、製造後期に品温が低下した際、または製品の保存の際、わずかに生残している病

原菌が再び出現し再増殖することがある (Deportes *et al.*, 1998; Someya *et al.*, 2003; Mote *et al.*, 1988) ことも考えられたので, この再増殖が起きないかについても検討した。さらに, 加熱処理によって牛糞中の病原菌が死滅したと同時に, 堆肥の発酵に役立つ有機物分解菌が死滅することも考えられ, 加熱処理した牛糞が十分な発酵能を有しているか検討した。最後に, 加熱処理した牛糞と非加熱処理の牛糞をそれぞれ堆肥化し, その中の病原菌の動態を調べ, 微生物的安全性を確認した。

2. 材料および方法

2.1 無害化装置

ドラム回転式堆肥原料無害化処理機 4 号機 (写真 4-1, 図 4-1) を佐賀県白石町の有限会社玄甫興業と共同開発した。この微生物的無害化処理機は, 直径 136 cm, 長径 217 cm, 容積 2.2 m³ で, 1 回に約 1 トンの堆肥原料を処理できる。加温用ヒーター (1 kw × 5 個) が装置の二重壁内に設置され, 温水を作ることにより加温する仕組みになっている。また, 温風送風機 (竹網製作所, TSK-15, 1.5 kw) により補助加熱した。



写真 4-1 ドラム回転式無害化处理機

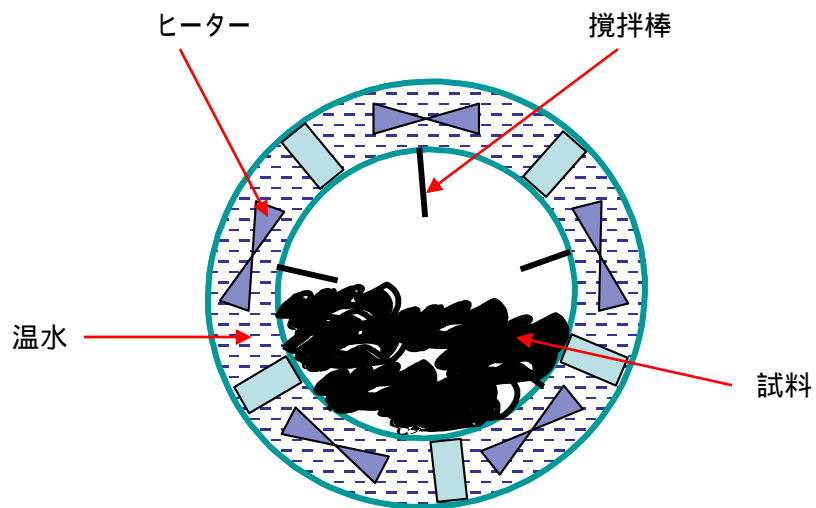


図 4-1 ドラム回転式無害化处理機断面図

2.2 牛糞試料

牛糞試料として、県内から3点を採取した(表4-1)。試料2は400kgをシート上に広げ、扇風機を使って乾燥処理し、含水率を51%に調節した。

表4-1 各種牛糞試料

試料番号	試料	採取場所	採取日	含水率(%)
1	肉用牛糞	白石町畜産農家	2003年6月11日	82
2	肉用牛糞	白石町畜産農家	2003年6月30日	51(調整)
3	搾乳牛糞	佐賀県畜産試験場	2004年5月31日	73

2.3 無害化処理方法

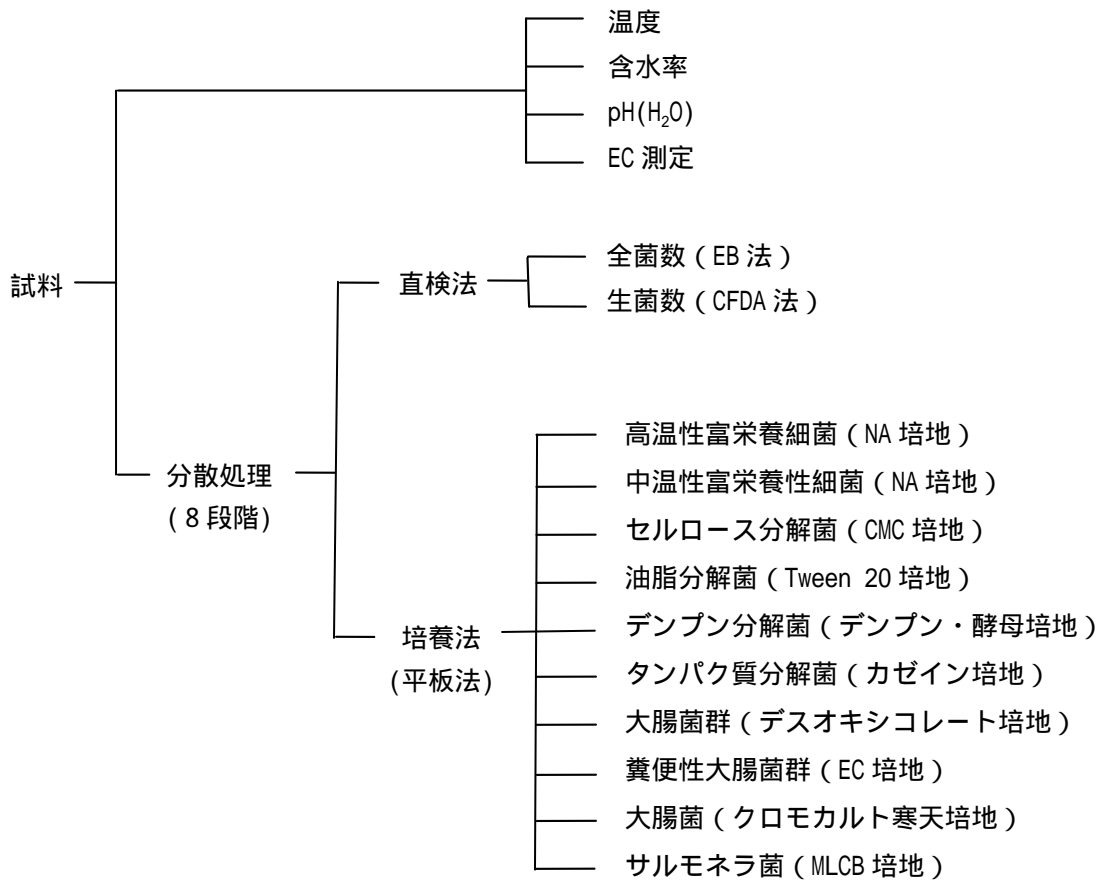
あらかじめ無害化処理機を予熱して、60～65とし、生牛糞300kgを無害化処理機に投入し、投入口を閉めて、24時間の加熱攪拌処理をおこなった。装置回転速度は1rpmとした(写真4-2)。



写真4-2 無害化処理機内部の様子

運転開始 0, 1, 3, 6, 24 時間後に装置内部から牛糞試料をそれぞれ 1 kg 採取し(任意に 5 力所から採取し, それらを混合した), 表 4-2 に示す項目について測定した.

表 4-2 堆肥試料の分析項目とその方法



2.4 理化学性の測定

温度は, 試料採取の際に, 5 力所を任意に選んで温度計(三商,D.H 型)で測定し, 平均値を求めた. 含水率は, 採取した試料を混合縮合して, その約 1 g を取り, ハロゲン水分計(メトラー, HG53)で測定した(3連). pH(H₂O) および EC の測定では, 乾物 10 g 相当量の試料を 100 mL のポリエチレン振とう瓶に入れ, 試料に含まれる水分を考慮して乾物量に対

する水の比が 1 : 5 になるように脱イオン水を添加した。1 時間振とう後、パスツールピペットで浸出液を取り、ポケット pH 計 (HORIBA, twin pH B-212) およびポケット EC 計 (HORIBA, Twin cond RB-173) で pH および EC をそれぞれ測定した。(第二章参照)

2.5 各種微生物の測定

試料中の全細菌数、全生細菌数の定量は、それぞれ Ethidium bromide (EB) 蛍光染色法 (Someya, 1995), 6-carboxy fluorescein diacetate (CFDA) 蛍光染色法 (染谷, 1997) を用いて行った。高温性および中温性従属栄養性細菌、有機物分解菌群、大腸菌群、糞便性大腸菌群、大腸菌、サルモネラ菌は第二章および第三章の方法に従って、希釈平板法を用いて測定した。すなわち、 $10^{-1} \sim 10^{-8}$ の希釈段階希釈懸濁液から適当と思われる希釈懸濁液を 3 段階選択し、各種の培地に接種し、一定の培養条件で培養後、菌数を計測した。

中温性従属栄養性細菌は NB 細菌 (第二章) と同じもので、NA 培地で 30℃、5 日間培養しコロニーを計数した (土壤微生物研究会, 1992)。高温性従属栄養性細菌の測定には、NA 培地で 60℃、3 日間培養しコロニーを計数した。また、糞便性大腸菌群は Most Probable Number (MPN) 法を用いて測定した。堆肥試料の希釈懸濁液 ($10^{-1} \sim 10^{-5}$ 希釈) を EC 培地 (20.0 g L⁻¹ ペプトン, 5.0 g L⁻¹ 乳糖, 1.5 g L⁻¹ 胆汁酸塩 No.2, 4.0 g L⁻¹ リン酸 2 カリウム, 1.5 g L⁻¹ リン酸 1 カリウム, 5.0 g L⁻¹ 塩化ナトリウム, pH6.9) 各 5 連に 1 mL ずつ接種し、恒温水槽を用いて 44.5℃ で 24 時間培養した。EC 培地には、培地 9 mL を中型試験管 (長さ 160 mm, 外径 18 mm) に分注し、ダーラム管 (長さ 30 mm, 内径 5 mm, 外径 6 mm 程度の一端を封じたガラス管) を逆さにして投入したものをを用いた。培養後、EC 培地のいずれもダーラム管内にガスの蓄積が見られ、かつ、培地が黄変した試験管を陽性とし、陽性管数から試料中の細菌数を最確数 (MPN) として算出した (図 4-2, 写真 4-3)。

2.6 糞便汚染指標菌の再増殖

無害化処理した牛糞中の病原菌が死滅したのかを確認するため、再増殖実験を行った。その手順を図 4-3 に示す、安全化処理機で加熱処理した牛糞を 150 g 計り、滅菌した広口瓶に入れ、蓋をして、30℃ で 7, 14, 21 日間インキュベートした。それぞれ 10 g の試料を

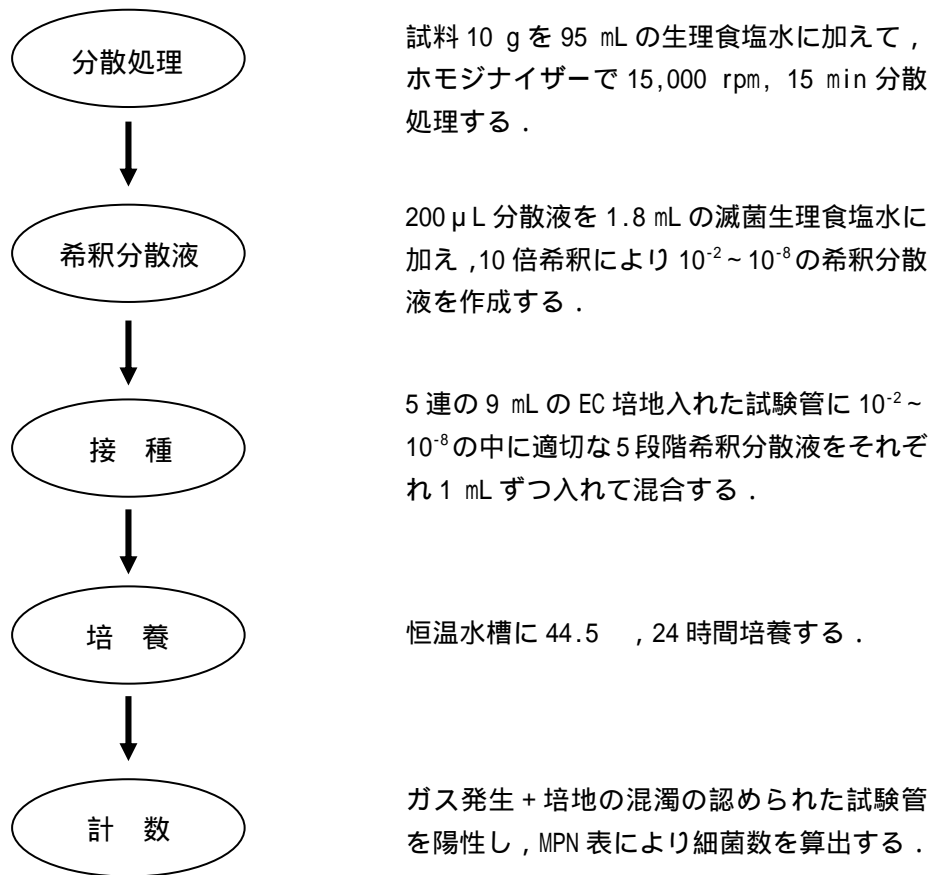


図 4-2 糞便性大腸菌群の MPN 測定法

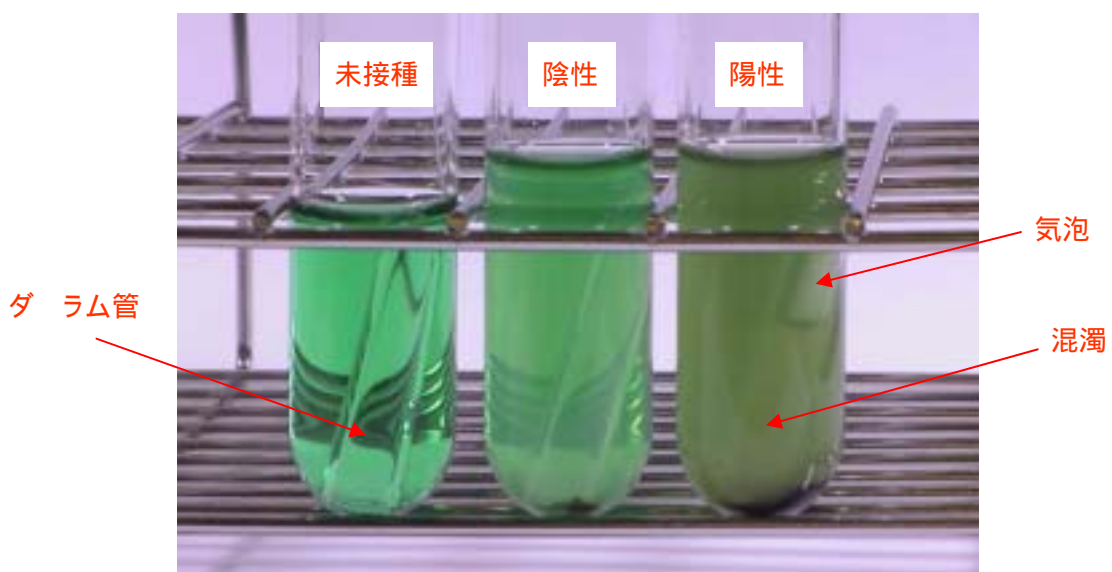


写真 4-3 MPN 法による糞便性大腸菌群の検出 (EC 培地)

採取して、デスオキシコーレイト培地およびクロモカルト培地により、大腸菌群およびサルモネラ菌を測定した。

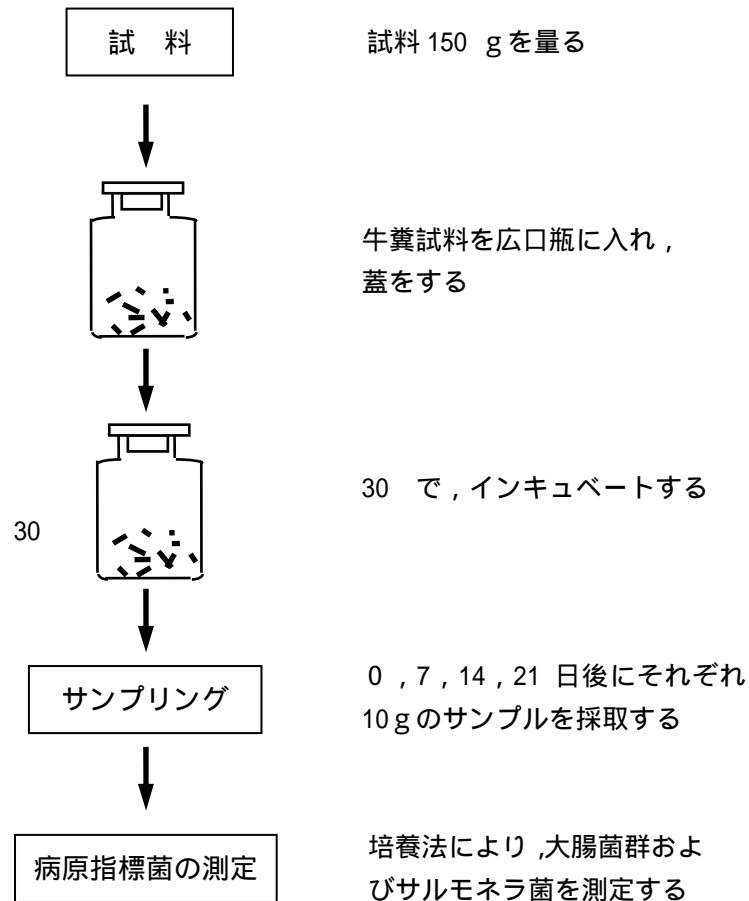


図 4-3 再増殖試験

2.7 糞便汚染指標菌の増菌培養

加熱、乾燥、放射線照射および凍結された堆肥原料中の大腸菌群およびサルモネラ菌は、損傷されているか休眠状態にあるため増殖力が弱いので、選択性の強い増菌培地に検査材料を直接接種すると死滅したり増殖できないことがある。そのため、あらかじめ選択性の弱い本培地で前増菌培養した後に増菌培養すると、大腸菌群およびサルモネラ菌の検出率が高まる。

増菌培養手順を図 4-4 に示す。加熱処理後の牛糞を 25 g 秤量して、乳糖ブイヨン培地 225 mL および EEM ブイヨン培地 225 mL に添加後、混合し、36℃ で 24 時間の大腸菌群の増菌培養を行なった。培養後、それぞれ培養液 100 μL をデスオキシコーレイト培地および MLCB 培地に塗抹接種し、37℃ で 24 時間培養して、大腸菌群およびサルモネラ菌の発育を判定した。

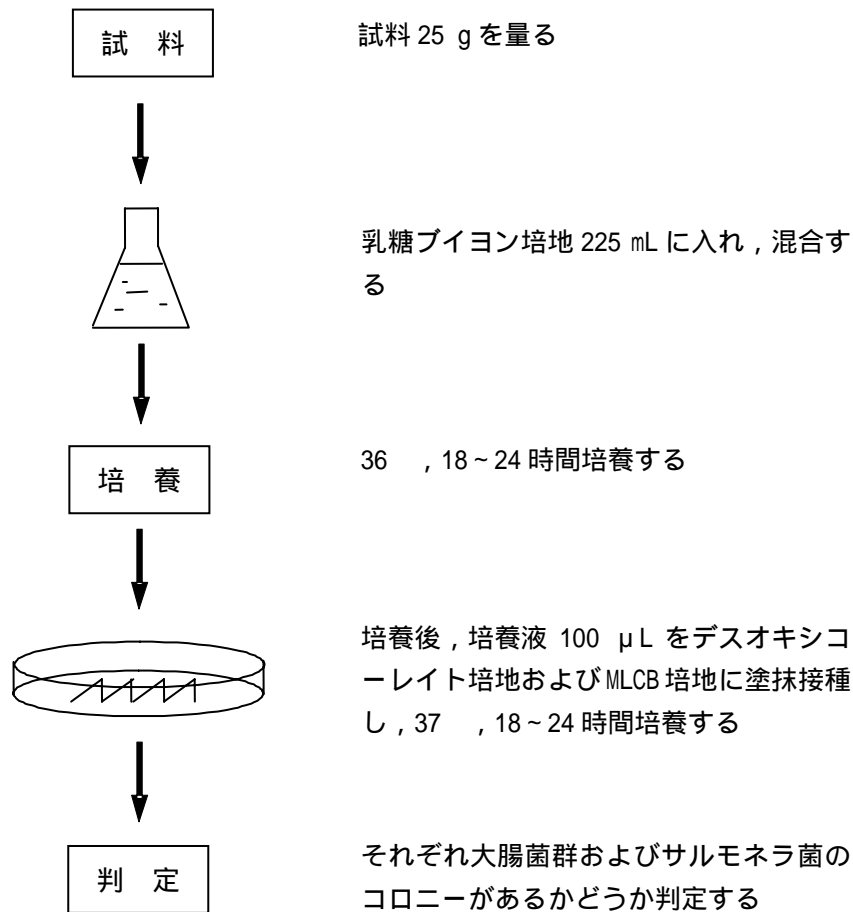


図 4-4 大腸菌群増菌培養の試験方法

培地組成は、乳糖ブイヨン培地 (3.0 g L⁻¹ 肉エキス, 5.0 g L⁻¹ ペプトン, 5.0 g L⁻¹ 乳糖, pH6.9), EEM ブイヨン培地 (10.0 g L⁻¹ トリプトン, 5.0 g L⁻¹ マンニット, 6.5 g L⁻¹ リン酸二ナトリウム, 2.0 g L⁻¹ リン酸一カリウム, 20.0 g L⁻¹ ウシ胆汁末, 0.0135 g L⁻¹ プリリアントグリーン, pH7.2) とした。

2.8 発酵能の測定

未加熱処理牛糞および24時間加熱処理後の牛糞を各100g量り、それぞれ滅菌ビーカーに入れて、滅菌脱イオン水で含水率を60%に調整後、アルミホイルでビーカーを覆った。このビーカーを30℃で7日間インキュベートした。その後、さらに60℃で7日間インキュベートした。インキュベート中の牛糞の含水率を60%に維持するよう滅菌脱イオン水で水分補給を毎日行なった。インキュベート前、30℃で7日間インキュベート後、さらに60℃で7日間インキュベート後にそれぞれ10gの試料をサンプリングし、全細菌数、全生細菌数、従属栄養性細菌、大腸菌群、サルモネラ菌、デンプン分解菌、セルロース分解菌、油脂分解菌、タンパク質分解菌の分析をおこなった。実験手順を図4-5に示した。

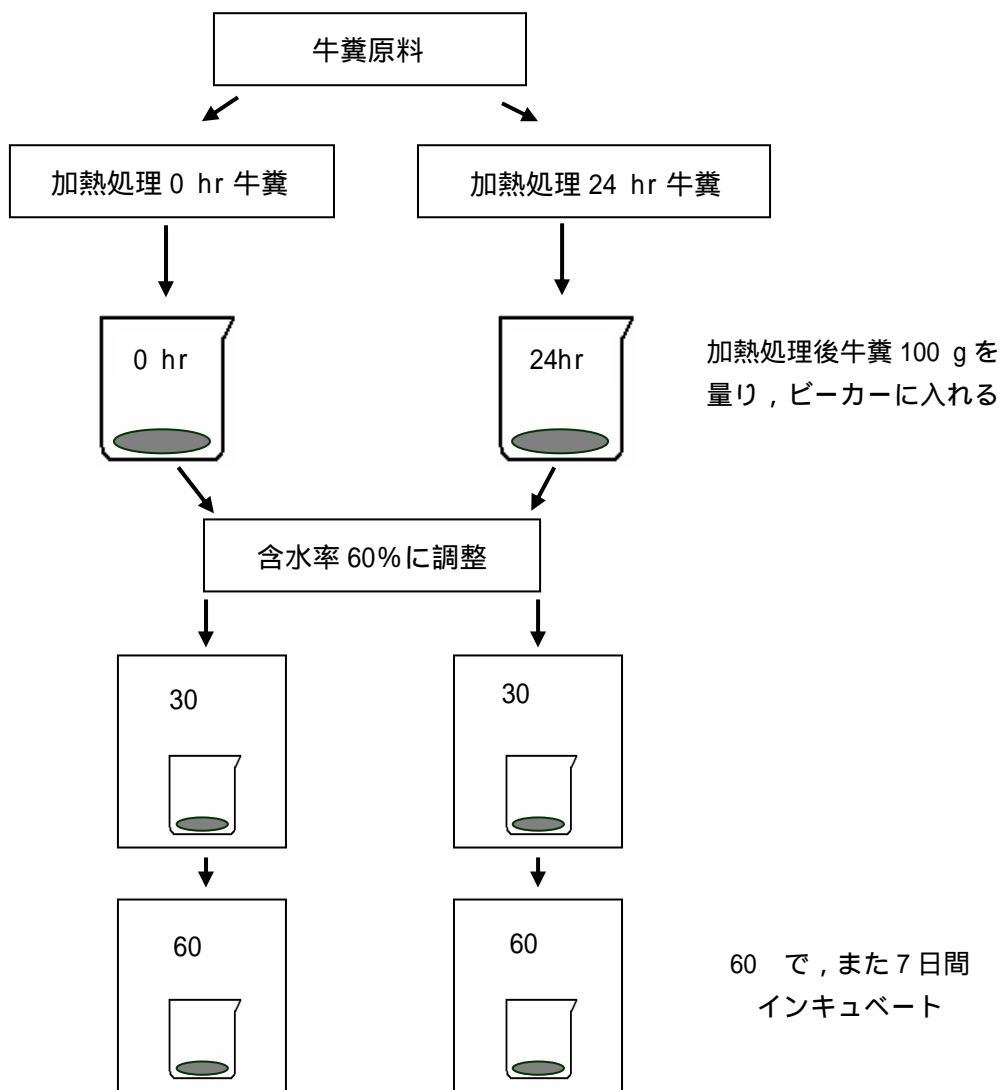


図 4-5 加熱処理牛糞の発酵能にする実験手順

2.9 無害化牛糞の堆肥化過程における微生物の消長の検討

無害化処理機で加熱処理した牛糞を、独立行政法人九州沖縄農業研究センター（九農研）および宮崎総合農業試験場（宮農試）に運んで堆肥化した。

1) 牛糞の加熱処理

非加熱処理：牛糞（試料 3） 2 m^3 （ 1.6 t ）を無害化処理機に数回に分けて投入し、加熱せず、24 時間送風回転のみとした。

加熱処理：牛糞（試料 3） 4 m^3 （ 3.2 t ）を予熱容器に予熱してから無害化処理機に数回分けて投入し、本体ヒーターによる加熱および温風送風攪拌を行なった。

2) 加熱処理した牛糞を堆肥化した。

九農研では強制通気式閉鎖型堆肥化装置（容量 2.0 m^3 ，切り返し週一回）を用い、宮農試ではパイル方式にて堆肥化した（容量 2.0 m^3 ，切り返しは週一回）。

3) 無害化牛糞の堆肥化過程における各種微生物の消長を検討した。

測定項目は a, 理化学性：温度，含水率，pH，EC； b, 微生物：全細菌数（EB 法），全生細菌数（CFDA 法），大腸菌群（Desoxycholate Agar 培地），大腸菌（Coliform Agar 培地），サルモネラ菌（MLCB 培地）。

3. 結果および考察

3.1 加熱処理における牛糞試料の理化学性の経時的変化

図 4-6 に加熱処理における処理機加温壁温度および牛糞温度の推移を示した。試料 1 (含水率 82%) の場合、処理機の温度はスタート時に 62 で、これに投入した牛糞温度は 34 で、3 時間後には 50 に達し、6 時間後には 54、24 時間後には 66 であった。試料 2 (含水率 51%) の場合、処理機の温度はスタート時に 63 で、これに投入した牛糞の温度は 32 で、3 時間後に 52、6 時間後に 62 に達し、24 時間後には 60 であった。

この結果から、本研究で用いた有機廃棄物無害化処理機は含水率 50% 以上の生牛糞を 6 時間以内に、60 という低温滅菌温度にできることが明らかになった。

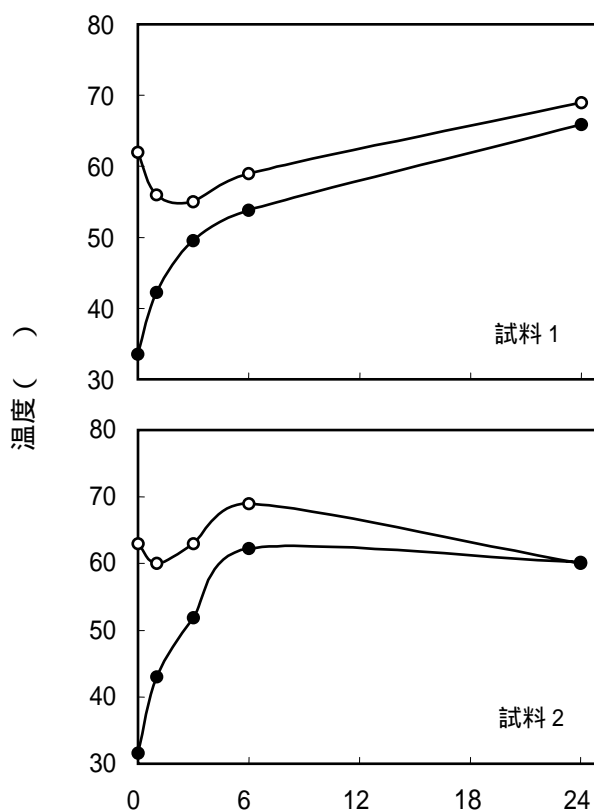


図 4-6 加熱処理における処理機加温壁温度および牛糞温度の推移

○— 処理機加温壁温度 ●— 牛糞温度

加熱処理における牛糞の含水率，pH および EC を図 4-7 に示した．試料 1 の場合，牛糞含水率は最初の 82% から，3 時間後に 80%，24 時間後に 77% とやや低下した．pH はスタート時の 8.4 から，加熱処理 6 時間後には 8.0 とやや下がり，24 時間後には 6.8 に下がった．EC 値は処理期間中，5.2～6.1 の範囲で変動していた．試料 2 の場合，牛糞の含水率は当初の 51% から，加熱処理 3 時間後に 47%，24 時間後には 40% に低下した．pH は加熱処理期間中，8.9～9.2 の狭い範囲で変動していた．EC 値も同様に 3.4～3.9 の狭い範囲で変動していた．このように，加熱処理により牛糞の含水率はわずかに低下したが，pH や EC には大きな変動は認められなかった．

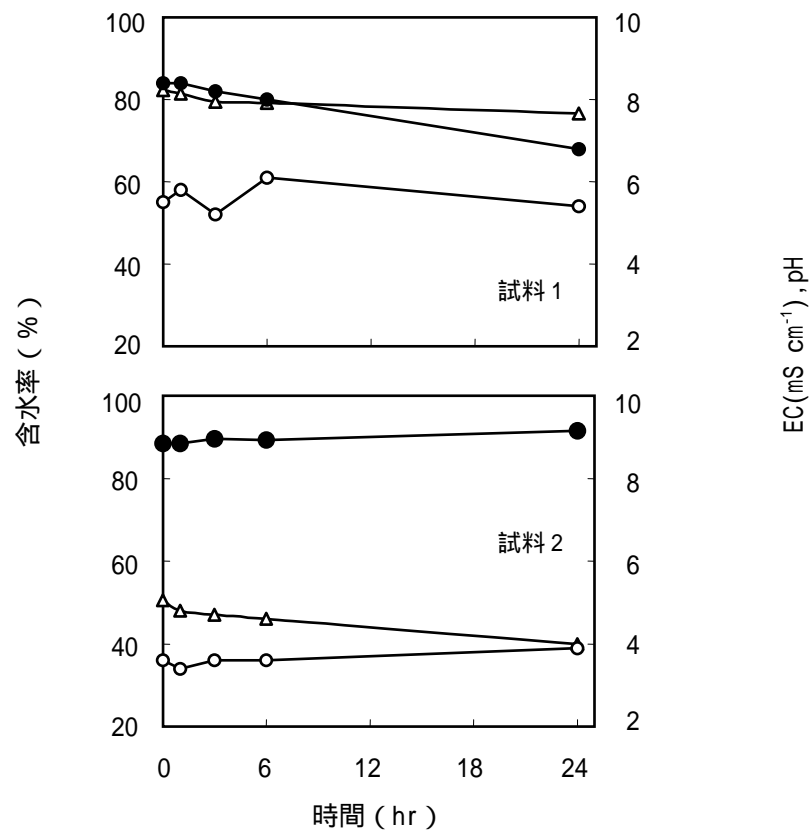


図 4-7 加熱処理における牛糞含水率，pH および EC の経時的変化

—▲— 含水率 —●— pH —○— EC

3.2 加熱処理における牛糞中の各種微生物数の経時的変化

3.2.1 全細菌数および全生細菌数の経時的変化

全細菌数（EB法）および全生細菌数（CFDA法）を図4-8に示す。試料1（含水率82%）の場合、6時間の加熱処理で全細菌数は 2.07×10^{11} cells g⁻¹ dry matter から 9.3×10^{10} に半減し、24時間後に 7.7×10^{10} cells g⁻¹ dry matter と約3分の1に減少した。全生細菌数は、当初の 4.5×10^{10} cells g⁻¹ dry matter から6時間後に 9.0×10^9 cells g⁻¹ dry matter と5分の1に減少し、24時間後に 1.3×10^9 cells g⁻¹ dry matter と35分の1に減少した。生菌率は当初21.6%であったが、6時間の加熱処理後9.6%に急激に低下し、24時間の加熱処理後1.6%になった。

試料2（含水率51%）の場合、加熱処理によって牛糞中の全細菌数は当初の 3.4×10^{11} cells g⁻¹ dry matter から6時間後には 1.4×10^{11} cells g⁻¹ dry matter に半減し、24時間後に 7.3×10^{10} cells g⁻¹ dry matter と約5分の1に減少した。また全生細菌数は、 8.5×10^{10} cells g⁻¹ dry matter から6時間後に 5.9×10^9 cells g⁻¹ dry matter と約14分の1に減少し、24時間後に 3.3×10^9 cells g⁻¹ dry matter と26分の1に減少した。生菌率では当初25.2%であったが、6時間の加熱処理後、4.1%に急激に低下し、24時間の加熱処理後4.5%になった。

これらの結果から、50～66の加熱処理によって、牛糞中の全細菌数は1～2桁減少するが、 10^9 cells g⁻¹ dry matter の生細菌が残存することが明らかとなった。

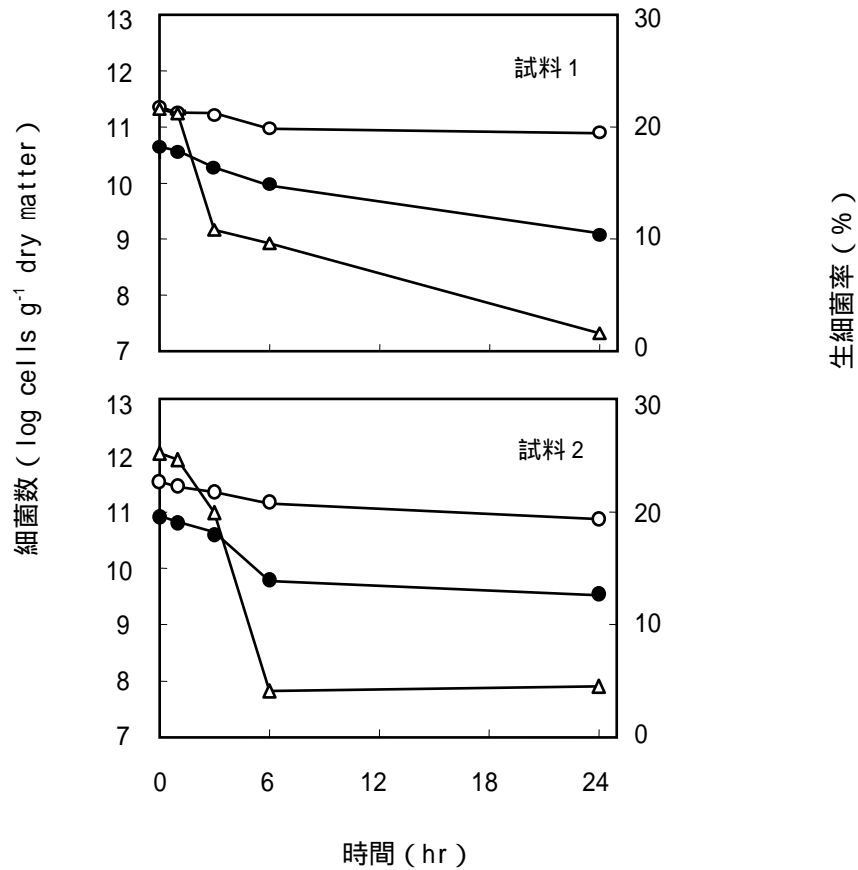


図 4-8 加熱処理による牛糞中の直接計数法による細菌数の経時的変化

○— 全細菌数 ●— 全生細菌数 ▲— 生細菌率

3.2.2 従属栄養性細菌数の経時的変化

中温性および高温性従属栄養性細菌数の経時的変化を図 4-9 に示す。

試料 1 (含水率 82%) の場合、加熱処理期間中、中温性従属栄養性細菌数は当初の 1.8×10^{10} cfu g⁻¹ dry matter から、6 時間後には 1.8×10^7 cfu g⁻¹ dry matter に急激に減少し、24 時間後には 1.3×10^6 cfu g⁻¹ dry matter と約万分の一に減少した。このとき、コロニー形成率(全生細菌数との比)は最初の 40.8% から 6 時間後には 1.0% 以下に急激に減少した。一方、高温性従属栄養性細菌数は $1.0 \times 10^6 \sim 6.6 \times 10^6$ cfu g⁻¹ dry matter の範囲で、大きな変動は認められなかった。

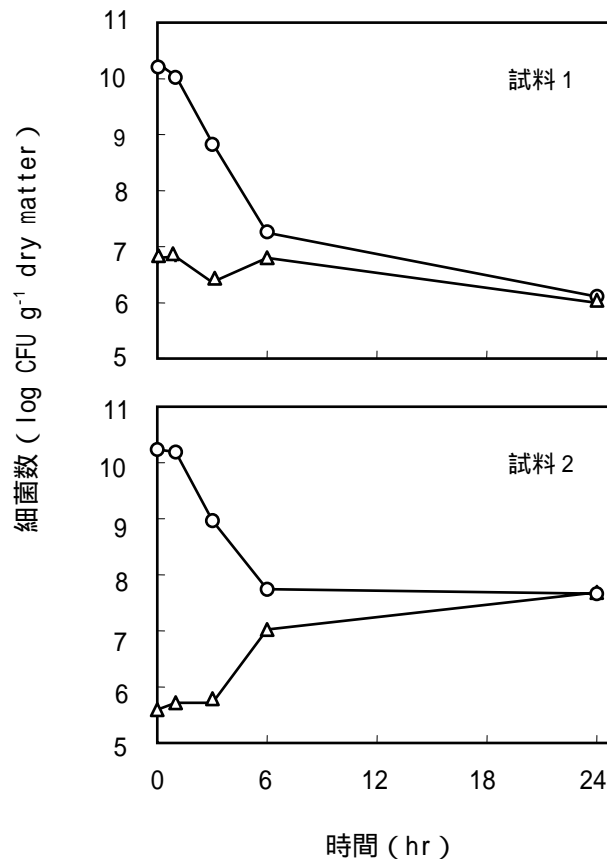


図 4-9 加熱処理による牛糞中の従属栄養性細菌の経時的変化

○— 中温性従属栄養性細菌 ▲— 高温性従属栄養性細菌

試料 2(含水率 51%)の場合,加熱処理によって中温性従属栄養性細菌は 1.8×10^{10} cfu g⁻¹ dry matter から,3 時間後に 9.3×10^8 cfu g⁻¹ dry matter,さらに 6 時間後に 5.5×10^7 cfu g⁻¹ dry matter,24 時間後に 4.6×10^7 cfu g⁻¹ dry matter と約 400 分の 1 に減少した。コロニー形成率は最初の 21.5%から,6 時間後には 1.5%以下に急激に減少した。一方,高温性従属栄養性細菌は当初の 3.9×10^5 cfu g⁻¹ dry matter から 6 時間後に 1.0×10^7 cfu g⁻¹ dry matter と約 25 倍に増加した。

これらの結果から,加熱処理によって牛糞中の中温性従属栄養性細菌は減少したが,高温性従属栄養性細菌数は一定または増加したことが明らかになった。

ここで注目されるのは、コロニー形成率が著しく低下したことであった。この原因として、熱ストレスにより細菌が VNC 状態になったと考えられる。さらに、半致死の損傷 (sublethal injury) 状態になって、コロニー形成ができないことも考えられる。加熱処理による損傷菌の発生は、Ordal らのによって概念的に示され (Iandolo and Ordal, 1966), *Staphylococcus aureus* 細胞をリン酸緩衝液中で加熱処理し、通常のトリプトソイ寒天培地およびこの細菌の選択培地として利用される 7.5% 食塩を含む同培地を用いてそれぞれの生菌数を測定した。その結果の差に基づいて、前者の培地 (非選択培地) ではコロニーを形成するが、後者では (選択培地) できない細菌集団を、この濃度の食塩に対する耐性を失った加熱損傷菌として定義した。土戸 (2002) や森地 (2003) も、食品や諸環境において微生物細胞に冷却、凍結、加熱、濃縮、乾燥、加塩、加糖、放射線および酸性化など様々な理化学的ストレスをかけて、その細菌の一部が半致死の損傷菌になる現象を見出している。これらの損傷菌は、加熱処理後適当な条件におかれると、少なくとも一部の集団は回復することが指摘されている。

本実験では、非選択培地 (NA 培地) を用いているため、コロニー形成率の低下は VNC 状態への移行と考えられる。

3.2.3 糞便汚染指標菌の経時的変化

糞便汚染指標菌の消長を図 4-10 に示す。試料 1 (含水率 82%) の場合、大腸菌群、糞便性大腸菌、大腸菌およびサルモネラ菌は、当初 10^6 cfu or MPN g^{-1} dry matter 前後あったが、3 時間後から急激に減少し、6 時間後にはいずれも不検出となった。試料 2 (含水率 51%) の場合、糞便汚染指標菌はいずれも、当初 10^6 cfu g^{-1} dry matter 前後あったが、3 時間後にはサルモネラ菌が不検出、6 時間後にはいずれも不検出となった。これは Greenberg ら (1986) の堆肥温度が 50 を超えると大腸菌群が急激に減少したという試験結果と同様であった。

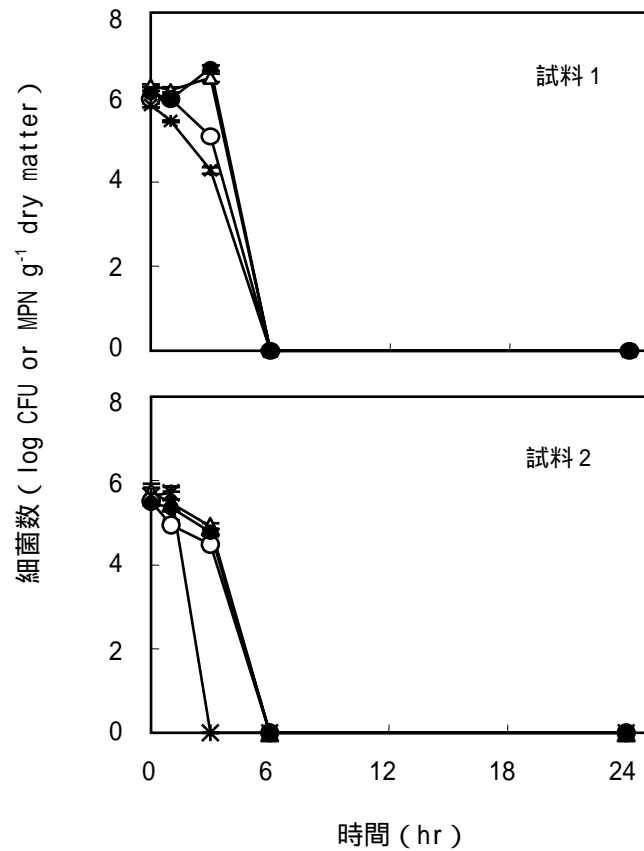


図 4-10 加熱による牛糞中の病原性指標菌の消長

- △— 大腸菌群
- 糞便性大腸菌群
- 大腸菌
- ✱— サルモネラ菌

堆肥の製造過程において病原菌を死滅させる温度と期間に関しては、「55 以上で3日間以上」(Greenberg et al, 1986), 「55~60 で3日間以上」(Deportes et al, 1998), 「65 以上で2~3日間以上」(Betoldi et al, 1988) などの報告がある。本研究では、牛糞中の病原指標菌が検出限界以下となるまでに50 以上で6時間という短時間であった。上記の諸報告よりも病原菌を死滅させる期間が短いのは、装置が密閉式で内部の温度が均一のため、滅菌が徹底されたためと推察される。

3.3 加熱処理による牛糞中の糞便汚染指標菌の再増殖の検討

培養法による糞便汚染指標菌の計測には検出限界があり (10^2 cfu g^{-1} dry matter), わずかな菌が残留している可能性が考えられる. そこで, 3.2.3 の結果を確かめるため, 加熱処理 6 時間および 24 時間の牛糞を用いて再増殖試験を行った. すなわち, 加熱処理した牛糞を 30 で, 3 週間インキュベートした. その結果 (表 4-3), 大腸菌群もサルモネラ菌も検出されなかった.

表 4-3 加熱処理した牛糞中の糞便汚染指標菌の再増殖試験*による検出*

試料	加熱処理時間 (hr)	再増殖日数	大腸菌群	サルモネラ菌
試料 1	6	7	ND**	ND
		14	ND	ND
		21	ND	ND
	24	7	ND	ND
		14	ND	ND
		21	ND	ND
試料 2	6	7	ND	ND
		14	ND	ND
		21	ND	ND
	24	7	ND	ND
		14	ND	ND
		21	ND	ND

* 30 でインキュベート

** 不検出 (検出限界: 10^2 cfu g^{-1} dry matter)

3.4 加熱処理による牛糞中の糞便汚染指標菌の増菌培養試験

さらに, 病原菌の損傷菌などが存在するかどうかを確認するために, 加熱処理 6 時間および 24 時間後の牛糞を, それぞれ乳糖ブイヨン培地および EEM ブイヨン培地に接種して, 36 で 24 時間増菌培養した後, 大腸菌群およびサルモネラ菌の有無を試験した (表 4-4). 試料 1 (含水率 82%) の場合, 6 時間および 24 時間加熱処理後の牛糞試料からはいずれも,

大腸菌群もサルモネラ菌も検出されなかった。一方、試料2（含水率 51%）の場合、大腸菌群はいずれも不検出であったが、6 時間加熱処理後の牛糞試料からは、サルモネラ菌が増菌培養で検出された。

表 4-4 加熱処理した牛糞中の糞便汚染指標菌の増菌培養による検出

試料	加熱処理時間(hr)	大腸菌群	サルモネラ菌
試料 1	6	ND*	ND
	24	ND	ND
試料 2	6	ND	検出
	24	ND	ND

* 不検出（検出限界： 10^2 CFU/g dry matter）

このように、含水率が低い場合は、殺菌効果が低いことが明らかになった。これは含水率が低いほうが堆肥中の大腸菌が生残しやすいという実験結果（第二章）と一致する。

以上の結果から、本無害化装置により短時間で堆肥原料（牛糞）の病原菌を死滅させることができることが明らかになった。すなわち、牛糞を 24 時間の無害化処理することにより、牛糞中の病原性指標菌を完全に殺菌できることが確認された。この方法は、牛糞の Pasteurization（パステライズ、低温殺菌）と言うべきものである。

3.5 加熱処理による堆肥化微生物に及ぼす影響

加熱処理した牛糞の発酵能が喪失するかを調べるために、加熱処理した試料を 30℃、7 日間インキュベートし（処理後、室温に放置した状態を想定）、さらに 60℃、7 日間インキュベートした（堆肥化を想定）。牛糞中の全細菌、全生細菌、従属栄養性細菌および各種有機物分解菌の回復状況を検討した。

3.5.1 全細菌数および全生細菌数

未処理（非加熱処理）の試料 2 の全細菌数は当初 3.4×10^{11} cells g^{-1} dry matter であっ

たが、これを 30 で7日間インキュベートした後 (B) には 2.8×10^{11} cells g^{-1} dry matter にやや減少し、さらに 60 で7日間インキュベートした後 (C) には 1.3×10^{11} cells g^{-1} dry matter と当初の約 3 分の 1 に減少した (図 4-11)。一方、24 時間加熱処理した試料 2 の全細菌数は未処理の約 5 分の 1 の 7.3×10^{10} cells g^{-1} dry matter であったが、30 で7日間インキュベートした後 (B) には 1.8×10^{11} cells g^{-1} dry matter と約倍増し、さらに 60 で7日間インキュベートした後 (C) には 1.2×10^{11} cells g^{-1} dry matter と再びやや減少した。

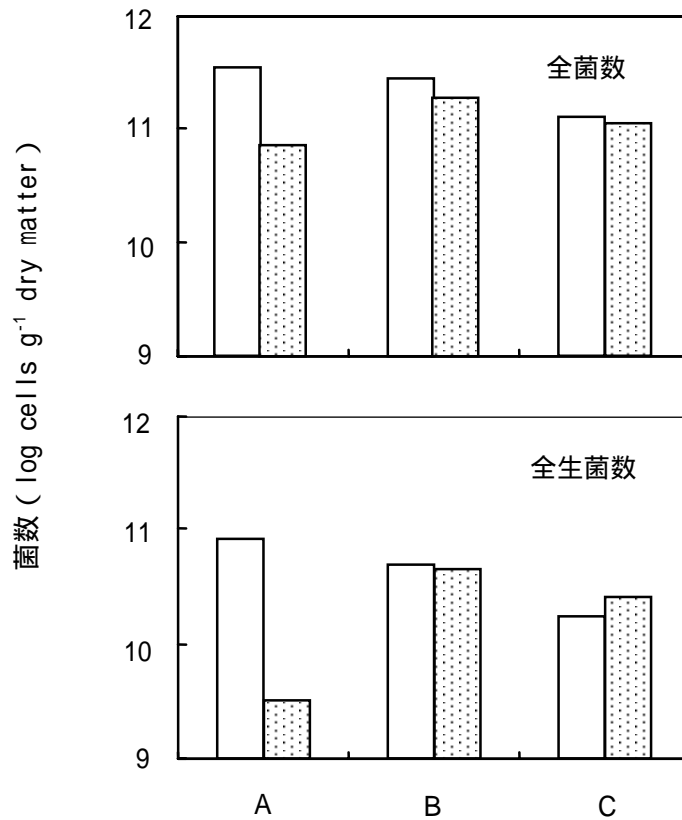


図 4-11 未処理または高温処理した牛糞のインキュベート前後の全細菌数および全生細菌数

A, インキュベート前; B, 30 で, 7日間インキュベート;

C, さらに 60 で, 7日間インキュベート.

□ 未処理 ▨ 24時間高温処理後

試料 2 の全生細菌数も、全細菌数とほぼ同様の傾向を示し、非加熱処理では 8.5×10^{10} cells g⁻¹ dry matter であったが、30 で7日間インキュベートした後 (B) には 5.0×10^{10} cells g⁻¹ dry matter にやや減少し、さらに 60 で7日間インキュベートした後 (C) には 1.8×10^{10} cells g⁻¹ dry matter と当初の約5分の1に減少した。生菌率としては当初 25.2% であったが、それから、17.9%、13.5%に低下した。一方、24 時間加熱処理した試料 2 の全生細菌数は 3.3×10^9 cells g⁻¹ dry matter となったが、30 で7日間インキュベートした後 (B) には 4.7×10^{10} cells g⁻¹ dry matter と約 14 倍増加し、さらに 60 で7日間インキュベートした後 (C) にも 2.6×10^{10} cells g⁻¹ dry matter とわずかに減少したのみであった。生菌率としては、当初 4.5% であったが、それから、25.3%、22.3%に上昇した。

以上の結果から、牛糞中の細菌は、24 時間の加熱処理により減少するが、30 で7日間のインキュベートによりかなり回復することが明らかとなった。すなわち、加熱無害化処理によって全細菌数や全生細菌数はいったん減少するが、常温で 1 週間放置すると、かなり回復するという現象を見出した。

3.5.2 高温性、中温性従属栄養性細菌

図 4-12 に示したように、未処理 (非加熱処理) の牛糞 (試料 2) の中温性富栄養細菌数は当初 1.7×10^{10} cfu g⁻¹ dry matter であったが、30 で7日間インキュベートした後 (B) には 1.6×10^{10} cfu g⁻¹ dry matter と変化なく、さらに 60 で7日間インキュベートした後 (C) には 3.1×10^5 cfu g⁻¹ dry matter と激しく減少した。一方、24 時間加熱処理した試料 2 の中温性富栄養細菌数は加熱前と比べて約 400 分の 1 に減少し 4.6×10^7 cfu g⁻¹ dry matter となったが、30 で7日間インキュベートした後 (B) には 1.9×10^{10} cfu g⁻¹ dry matter と大幅に増加し加熱前の菌数にほぼ復帰した。さらに 60 で7日間インキュベートした後 (C) には 5.0×10^5 cfu g⁻¹ dry matter と再び激しく減少した。

高温性富栄養細菌に関しては、非処理の牛糞 (試料 2) では当初 3.9×10^5 cfu g⁻¹ dry matter の菌数であったが、30 で7日間インキュベートした後 (B) には 3.8×10^5 cfu g⁻¹ dry matter と変わらず、さらに 60 で7日間インキュベートした後 (C) には 3.9×10^8 cfu g⁻¹ dry matter と千倍に増加した。一方、24 時間加熱処理した場合、高温性富栄養細菌数は未処理

と比べて約 120 倍の 4.8×10^7 cfu g⁻¹ dry matter と増加し, 30 で 7 日間インキュベートした後 (B) には 3.1×10^7 cfu g⁻¹ dry matter にやや減少し, さらに 60 で 7 日間インキュベートした後 (C) には 1.7×10^9 cfu g⁻¹ dry matter と再び大幅に増加した。

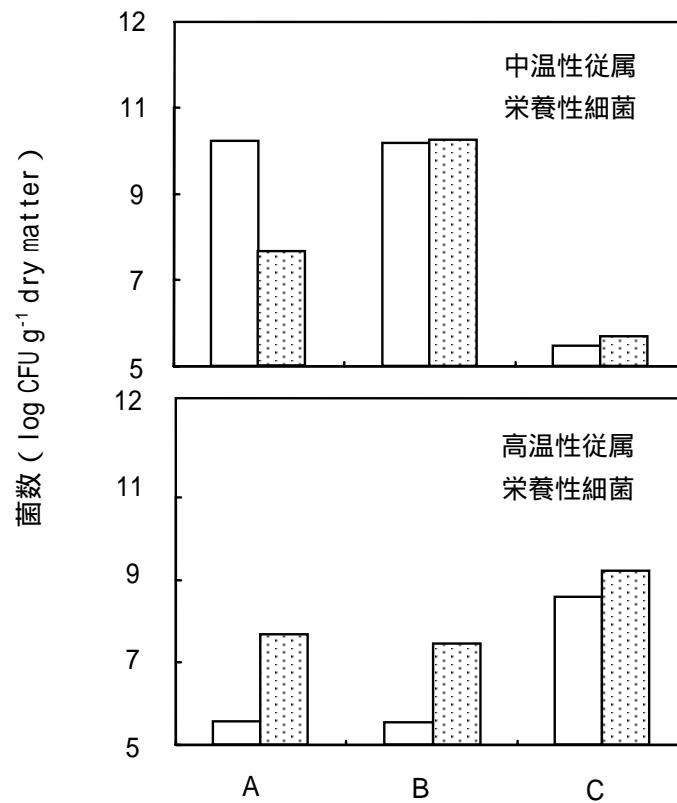


図 4-12 未処理または高温処理した牛糞のインキュベート後の高, 中温性従属栄養性細菌

A, インキュベート前; B, 30 で, 7 日間インキュベート;
C, さらに 60 で, 7 日間インキュベート。

□ 未処理 ■ 24 時間高温処理後

以上の結果から, 牛糞中の中温性富栄養細菌は, 24 時間の加熱処理により菌数が激しく減少するが, 30 で 7 日間インキュベートすることでほぼ元の菌数に回復することが明らかになった。一方, 高温性富栄養細菌は当初, 中温性富栄養細菌の約 5 万分の 1 と少なかったが, 24 時間の加熱処理により菌数は逆に増加し, さらに 60 で 7 日間インキュベートすると, 10^9 cfu g⁻¹ dry matter のレベルまで増加した。このように, 本研究で用いた無害

化処理機で加熱処理することによって、牛糞中の中温性富栄養細菌には一時的な影響しか与えないことが判明した。しかも、牛糞中の高温性富栄養細菌は加熱処理によってむしろ多くなり、堆肥化過程で品温が上昇した際にはさらに増殖し、非加熱処理の場合よりも高い菌数レベルに達した。このことは、堆肥化過程で主役となると考えられる高温性富栄養細菌が、無害化処理により増殖が促進され、そのため堆肥化もさらに促進される可能性を示している。

3.5.3 各種有機物分解菌

前記と同様の処理をした牛糞中の各種有機物分解菌数の推移を図 4-13 に示す。セルロース分解菌、油脂分解菌、蛋白質分解菌、デンプン分解菌のいずれも、多少の差はあるがほぼ同様の推移を示した。すなわち、供試生牛糞中にはこれら有機物分解菌は $6.7 \times 10^7 \sim 1.2 \times 10^9$ cfu g⁻¹ dry matter 存在し、これを 30℃ で 7 日間インキュベートすると、これらの菌数はほぼ変わらないが、多少減少した。さらに 60℃ で 7 日間インキュベートすると、 $1.3 \times 10^6 \sim 2.1 \times 10^8$ cfu g⁻¹ dry matter と大幅に減少した。一方、この牛糞を無害化処理（24 時間加熱処理）すると、これら有機物分解菌は 500 分の 1~4 分の 1 に減少したが、30℃ で 7 日間インキュベートにより、元の菌数前後にまでほぼ回復した。特に油脂分解菌と蛋白質分解菌では、生牛糞よりも 4.7 倍高い菌数となった。続く 60℃ で 7 日間インキュベートにより、これらの菌数は 137 分の 1~3 分の 1 へ激減した。

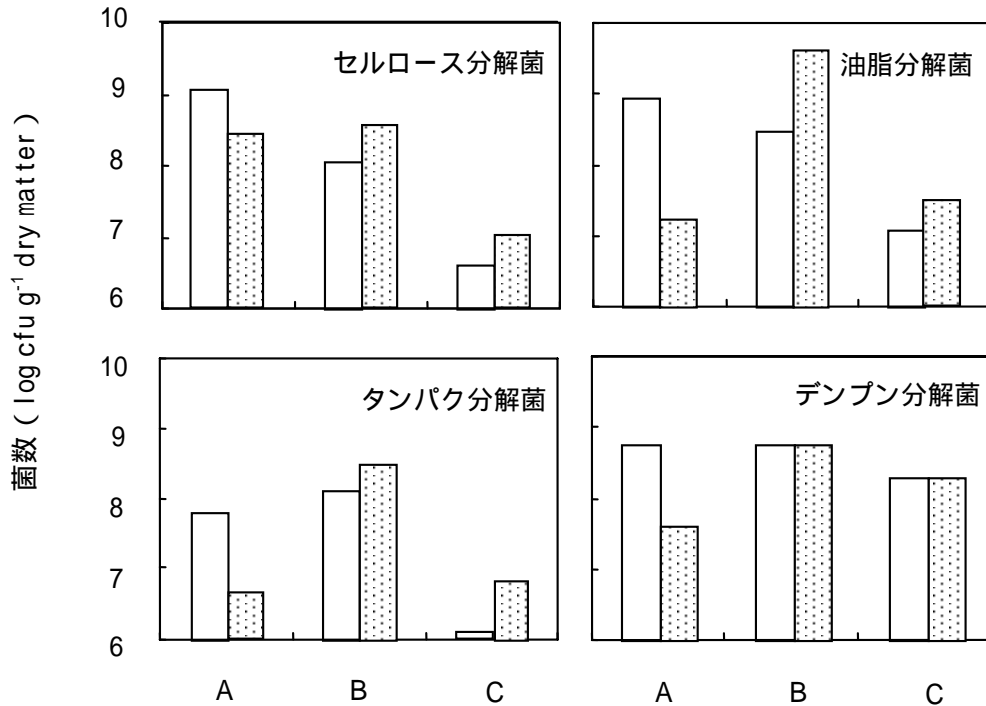


図 4-13 未処理または高温処理した牛糞のインキュベート後の有機物分解菌数

A, インキュベート前; B, 30 で, 7日間インキュベート;
 C, さらに 60 で, 7日間インキュベート.
 □ 未処理 ■ 24時間高温処理後

これらの結果から, 牛糞の無害化処理により, 各種有機物分解菌は 4~500 分の 1 に減少するが, その後, 単に放置することによって, いずれも元の菌数前後にまで回復することが示された.

全細菌や各種の有機物分解菌の推移を見ると, 無害化処理によっていったん減少した菌数は, 単に放置 (30 で 7 日間の静置) することによって, 元の菌数以上に増加する場合も認められた. この原因としては, 高温処理により牛糞中の微生物が死滅したのち, 生残していた微生物が死菌体を栄養源として速やかに増殖した可能性が考えられる.

このように, 無害化処理機による加熱処理は, 堆肥化に関する微生物に対して大きなマイナスの影響はほとんどないと考えられる.

3.6 無害化牛糞の堆肥化過程における微生物の消長

無害化処理が堆肥化過程に対して悪影響を及ぼさないかどうかを確認するため、無害化処理した牛糞を実際に数 m³ 規模で堆肥化して、発酵温度の推移および病原性指標菌などの消長を追った。このとき、無害化処理の対照として、無害化処理機に牛糞を入れて非加熱で攪拌処理のみを施した。

3.6.1 非加熱処理における牛糞の理化学性および病原指標菌の経時的変化

牛糞試料 3 を無害化処理機に 400 kg 投入して、加熱せず、24 時間送風回転のみの処理を行ない、対照区とした。この処理を 4 回繰り返す、合わせて約 1.6 t の対照区牛糞を得た。その理化学性および病原指標菌の経時的変化を表 4-5 に示す。処理前には牛糞の温度は 28.8℃、含水率 74.6%、pH 8.1、EC 4.0 で、24 時間の非加熱処理後も、これらの理化学性はほとんど変わらなかった。全細菌数および全生細菌数は処理前後で 10¹⁰ cells g⁻¹ dry matter のレベルで他の 3 回の処理においても、ほぼ同様の結果を得た。大腸菌群数、大腸菌数およびサルモネラ菌数は処理前に 10⁴ ~ 10⁵ cfu g⁻¹ dry matter あり、処理後もほぼ変化がなかった、微増した。

表 4-5 非加熱処理牛糞の理化学性および病原指標菌の経時的変化*

測定項目	処 理	
	0 hr	24 hr
温度 (℃)	28.8	28.2
含水率 (%)	74.6	73.2
pH	8.1	8.3
EC (mS/cm)	4.0	4.2
全細菌数 (cells g ⁻¹ dry matter)	(4.79 ± 0.80) × 10 ¹⁰	(5.09 ± 0.80) × 10 ¹⁰
全生細菌数 (cells g ⁻¹ dry matter)	(3.34 ± 2.64) × 10 ¹⁰	(3.63 ± 0.38) × 10 ¹⁰
大腸菌群数 (cfu g ⁻¹ dry matter)	(9.33 ± 2.64) × 10 ⁵	(1.17 ± 0.17) × 10 ⁶
大腸菌数 (cfu g ⁻¹ dry matter)	(6.81 ± 0.83) × 10 ⁵	(9.96 ± 1.83) × 10 ⁵
サルモネラ菌数 (cfu g ⁻¹ dry matter)	(3.35 ± 0.12) × 10 ⁴	(3.88 ± 0.37) × 10 ⁴

* 4 回の処理のうちの第一回目のデータを示す。

3.6.2 加熱処理における牛糞の理化学性および各種微生物の経時的変化

牛糞試料 3 を無害化处理機に 400 kg 入れて加熱処理した。この処理を 8 回繰り返して、合わせて約 3.2 t の処理牛糞を得た。第一回の処理の結果を表 4-6 に示す。牛糞の温度は、スタート時には 42.3 で、24 時間後には 60.5 に上昇した。この間、牛糞の含水率は 73.3 ~ 73.1 で安定し、pH は 8.0 ~ 8.1、EC は 3.5 ~ 4.0 の範囲にあり、ほとんど変化しなかった。

表 4-6 加熱処理牛糞の理化学性および病原指標菌の経時的変化

測定項目	処 理	
	0 hr	24 hr
温度 ()	42.3	60.5
含水率 (%)	73.3	73.1
pH	8.0	8.1
EC (mS/cm)	3.5	4.0
全細菌数 (cells g ⁻¹ dry matter)	(1.58 ± 0.35) × 10 ¹¹	(4.94 ± 0.41) × 10 ¹⁰
全生細菌数 (cells g ⁻¹ dry matter)	(3.02 ± 0.48) × 10 ¹⁰	(3.09 ± 0.70) × 10 ¹⁰
大腸菌群数 (cfu g ⁻¹ dry matter)	(2.51 ± 2.17) × 10 ⁴	ND*
大腸菌数 (cfu g ⁻¹ dry matter)	(1.12 ± 0.75) × 10 ⁵	ND
サルモネラ菌数 (cfu g ⁻¹ dry matter)	(3.35 ± 0.12) × 10 ⁴	ND

* 不検出(検出限界: <10² cfu g⁻¹ dry matter)

この無害化处理において、全細菌数は、24 時間の加熱処理で約 3 分の 1 に減少した。全生細菌数はほとんど変化しなかった。大腸菌群、大腸菌およびサルモネラ菌は、当初 10⁴ ~ 10⁵ cfu g⁻¹ dry matter 前後であったが、加熱処理 24 時間後にはいずれも不検出となった。このように、24 時間加熱処理により牛糞中の大腸菌群など測定した病原性指標菌が全て死滅した。

3.6.3 無害化牛糞の堆肥化過程における品温の経時的変化

加熱処理および非加熱処理した上記牛糞を九沖農研に運搬し、それぞれを堆肥化した。堆肥化は閉鎖式強制通気堆肥化装置内で 40 日間行なった。堆肥品温の経時的変化を図 4-14 に示す。

堆肥化スタート翌日には、加熱処理牛糞堆肥および非加熱処理牛糞堆肥とも 74.0 に上昇し、その後、60 以上の品温を 4 週間維持した。週間ごとの切り返しの際に、品温が外気温近くまで一時的に低下したが、すぐに上昇した。このとき、加熱処理牛糞堆肥の品温は非加熱処理牛糞堆肥よりも 1~5 高く推移し、この傾向は約 30 日間継続した。この結果は、牛糞無害化处理により堆肥化が促進される効果があることを示している。これは、無害化处理に伴う熱処理によって牛糞中の細菌が死滅し、生残した常在菌によって栄養源として死菌体の再利用が起き、常在菌数が無処理牛糞よりも増加したものと考えられる（表 4-6）。

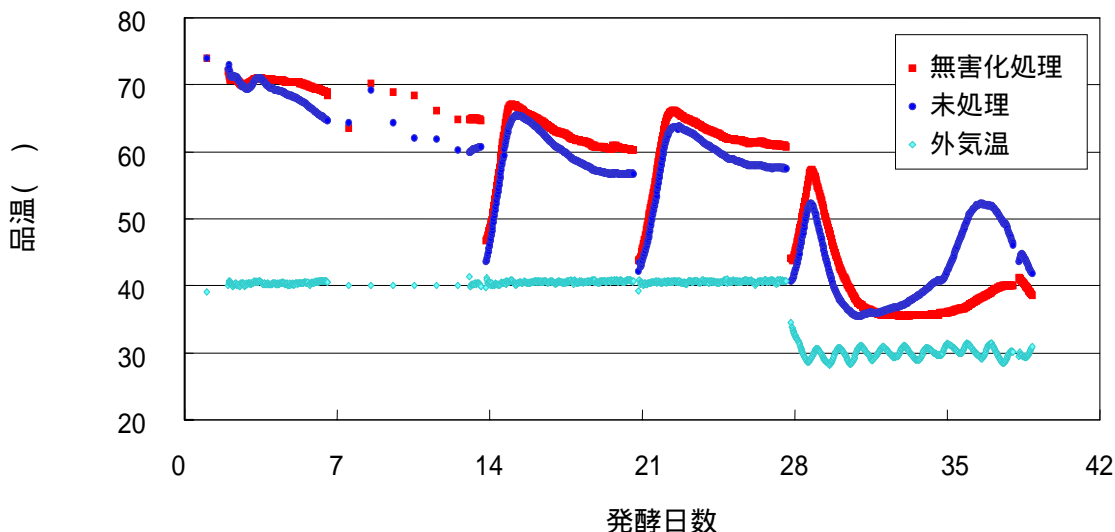


図 4-14 堆肥化過程の堆肥温度の経時的変化

3.6.4 無害化牛糞の堆肥化過程における病原指標菌の経時的変化

加熱処理牛糞および非加熱処理牛糞の堆肥化過程における病原性指標菌の消長を追跡した（表 4-7）。未処理牛糞では当初、大腸菌群、大腸菌およびサルモネラ菌が $10^4 \sim 10^6$ cfu g⁻¹ dry matter 存在したが、堆肥化 14 日後にはいずれも不検出となった。一方、無害化牛糞では堆肥化の全期間を通じて、上記病原性指標菌は全く検出されなかった。これらの結果から、24 時間無害化处理した牛糞は堆肥化過程でも確実に有害菌の存在しない状態を保つこ

とができ、微生物的安全化を確保できることが明らかになった。同時に、閉鎖型強制通気式堆肥化装置のような高価だが優れた発酵装置を使用すれば、有害菌の存在する牛糞も堆肥化過程で微生物的安全化ができることが示された。ただし、実際の多くの堆肥センターでは閉鎖型堆肥化装置はなく、パイル方式や開放型攪拌発酵方式が主流であるため、堆肥化の品温管理が難しい状態なので、堆肥原料の無害化処理は十分意義があると考えられる。

表 4-7 無害化処理牛糞の堆肥化過程における病原指標菌数の変化

試料	堆肥化日数	大腸菌群	大腸菌	サルモネラ菌
未処理牛糞	0	$(1.17 \pm 0.17) \times 10^6$	$(9.96 \pm 1.83) \times 10^5$	$(3.88 \pm 0.37) \times 10^4$
	14	ND*	ND	ND
	42	ND	ND	ND
無害化処理牛糞	0	ND	ND	ND
	14	ND	ND	ND
	42	ND	ND	ND

* 不検出(検出限界： $<10^2$ cfu g⁻¹ dry matter)

単位: cfu g⁻¹ dry matter

以上の諸結果から、本無害化処理機で牛糞を 24 時間処理することで、微生物的安全化が達成でき、しかも無害化処理による堆肥化への悪影響はなく、むしろ堆肥化促進効果があることが明らかとなった。

なお、本無害化処理機とその方法は、特許申請された(特願 2004-076750 堆肥原料処理方法および装置, 発明人: 染谷孝, 出願人: 染谷孝, 有限会社玄甫工業)。

4. 要約

牛糞などの堆肥原料中には、動物の腸管に由来する多種多様な病原菌が存在している。病原菌を完全に死滅させ、安全な堆肥を製造するために、堆肥原料である牛糞を無害化処理機に投入し、50～70℃で加熱処理して短時間で安全化するための条件検討を行った。また、加熱処理後の牛糞中の病原性指標菌の再増殖試験および増菌培養を行い、殺菌を確認した。さらに、加熱処理後の牛糞が十分な発酵能を有しているか検討し、加熱処理した牛糞を実地に堆肥化し、その中の病原菌の動態を調べ、微生物的安全性を確認した。

1) 無害化処理機に投入した牛糞の温度は当初の34℃から、6時間後には55℃、24時間後には66℃に到達した。この条件下で、試料1(含水率82%)および試料2(含水率51%)いずれも、大腸菌群や糞便性大腸菌群、大腸菌およびサルモネラ菌などは当初 $10^5 \sim 10^6$ cfu g⁻¹ dry matterであったが、加熱処理6時間以降には不検出となった。ただし含水率51%の牛糞で、サルモネラ菌が6時間処理後に増菌培養で検出されたが、24時間加熱処理後には増菌培養でも検出されなかった。これらの結果から、本無害化処理機により短時間で堆肥原料(牛糞)の病原菌を完全に死滅させることができることを明らかにした。

2) セルロース分解菌、油脂分解菌、デンプン分解菌および蛋白質分解菌は、当初 $10^7 \sim 10^9$ CFU/g dry matterであったが、無害化処理によりこれら有機物分解菌は500分の1～4分の1に大幅に減少したが、これを30℃で7日間インキュベートすると、元の菌数前後にまでほぼ回復した。特に油脂分解菌および蛋白質分解菌では、生牛糞よりも約5倍の菌数となった。これらの結果により、牛糞原料の加熱処理により各種有機物分解菌はいったん減少するが、その後室温で放置することにより、速やかに菌数は回復するため、無害化処理が堆肥化に与える微生物に与える影響はほとんどないことを明らかにした。

3) 圃場試験に使用するため、無害化牛糞および未処理牛糞を調製し、堆肥原料とした。未処理牛糞からは大腸菌群等がいずれも多数検出されたが、処理牛糞からは、いずれからも検出されなかった。さらに、堆肥化過程の品温は、未処理牛糞堆肥より無害化処理牛糞堆肥の方でむしろ高い傾向が認められた。これは、無害化処理に伴う熱処理で死滅した細菌菌体を常在菌が再利用し、著しい増殖が起きたことによるプライミング効果と考えられ、無害化処理により堆肥化がむしろ促進される効果があることを示している。

第五章 FISH による土壌中における大腸菌の特異的検出に関する研究

1. 緒言

従来、環境試料中の細菌フロラを解析する方法としては、培養してコロニーを形成させ、そこから多数の菌株を単離し同定する方法が一般的であった。しかし、自然界においては、生きているが培養できない (Viable but nonculturable, VNC) 状態にある細菌が大部分を占めていることが分かってきた (McDougald *et al*, 1998; 染谷ら, 1999; 森地, 2003)。また、コレラ菌や大腸菌など本来培養できる病原菌も、環境中においては VNC になることが知られている (Xue *et al*, 1982)。したがって、環境試料中の病原菌を検出・定量するには、培養法では不十分である可能性が出てきた。一方、近年、環境試料中に含まれる細菌を培養せずに定量し、その群集構造を遺伝子レベルで解析する方法として、蛍光染色法と微生物学的手法を合わせた Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) が発達してきた。FISH では rRNA をターゲットとするプローブがよく用いられる。リボソーム RNA (rRNA) は、細胞内で蛋白質を合成するリボソーム (ribosome) を構成する RNA である。rRNA には全ての生物に共通な配列が保存されている領域と、微生物の科、属、種のレベルで特異的な配列が存在するため、系統分類および進化系統の指標分子として用いられている (Woese, 1987)。したがって、目的に応じた rRNA 配列を標的とすることにより、科や属レベルでの特定微生物の検出が可能となる。この原理に基づいて FISH が 1990 年代はじめに開発された (DeLong *et al*, 1989; Amann *et al*, 1990)。

FISH は検出対象とする微生物が持つ特異的な rRNA 配列に相補的な配列 (プローブ) を合成し、これを蛍光標識し、微生物細胞内の rRNA を標的としてハイブリダイゼーションを行うことにより特定の微生物をシングルセルレベルで検出する方法である (図 5-1)。すなわち、細菌の 16S または 23S rRNA における特異的な塩基配列に対して相補的なオリゴヌクレオチドプローブを作成し、このプローブを蛍光色素 Cy3 などによって標識し、環境試料中の目的細菌とハイブリダイゼーションを行い、プローブと結合した目的細菌を蛍光顕微鏡下で検

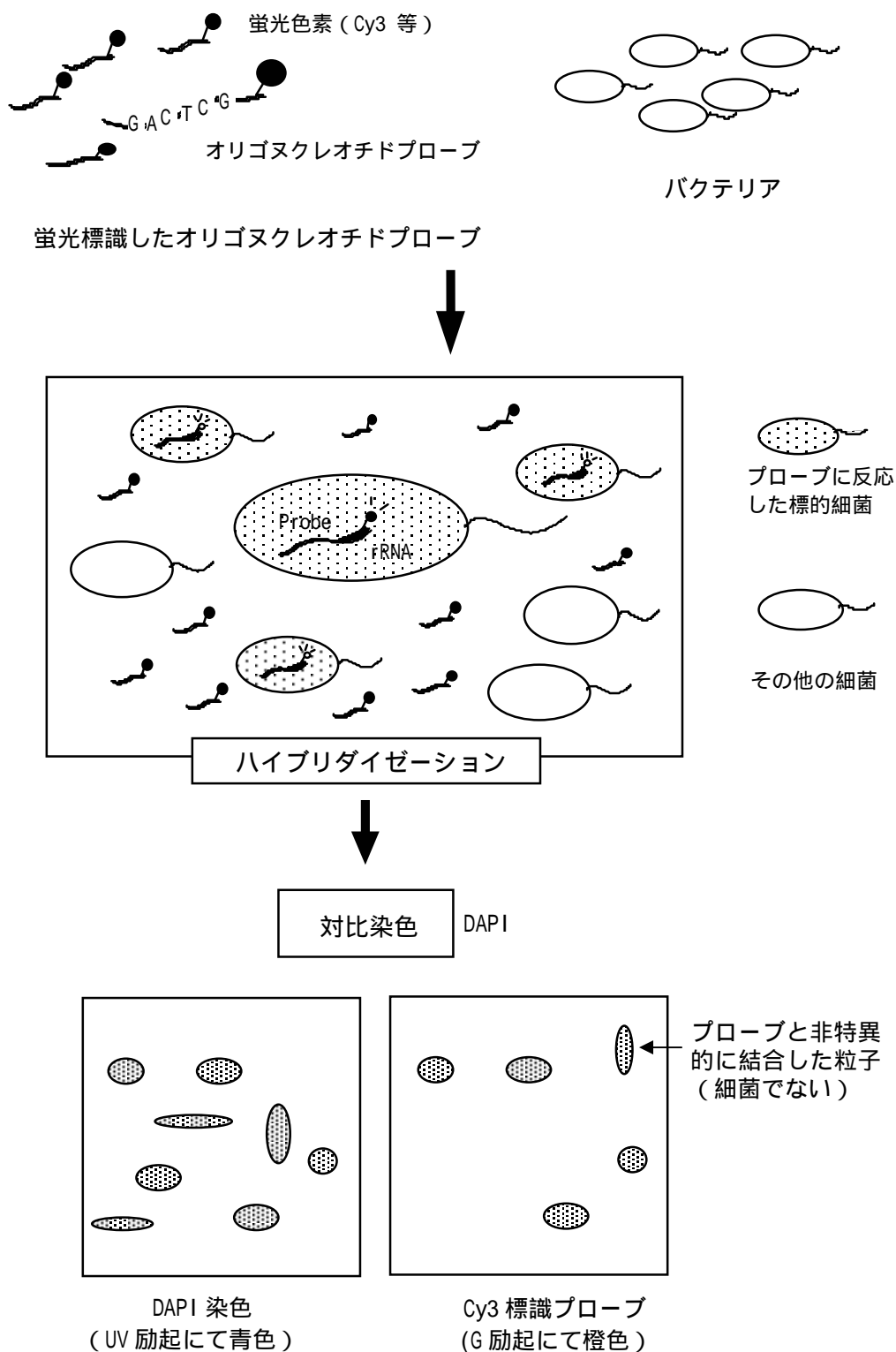


図 5-1 Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) の原理

出する。プローブの設定により、サブクラス、属ないし種や菌株レベルの特異性をもたせることができる (Amann *et al.*, 1995)。近年、FISH は水試料中の細菌を特異的に検出する手法として広く利用されるようになってきた。

FISH では微生物細胞由来の蛍光強度が細胞内の rRNA 量に依存する。対数増殖期などの生理活性の高い状態にある細菌では rRNA は数千コピー存在するため、FISH により容易に検出できる。しかしながら、環境中の微生物の多くは生理活性の低い状態にあることから rRNA 含量が低く、また微小であることから通常の FISH 法では蛍光の認識が困難である場合が多い。これを解決する方法として山口ら (2003) は、微弱な蛍光を検出できる高感度冷却 CCD カメラの利用、Cy3 などの蛍光強度のより高い色素をプローブの標識に用いること、得られる蛍光シグナルを増幅させること、などの方法を指摘した。

群集構造解析に用いられる FISH プローブには、全真正細菌に反応する EUB338 プローブをはじめとして、グラム陽性細菌やグラム陰性細菌の各種の細菌群を検出するための種々の群特異的プローブが提案されている (Manz *et al.*, 1992)。これらのプローブを用いて、生物膜 (Amann *et al.*, 1992; Okabe *et al.*, 1999) や活性汚泥 (Wagner *et al.*, 1993) のように、複雑な細菌フロラを構成する多くの環境試料の解析に成功している。特に、汚水処理微生物系では、処理システムの違いや季節の違いによる細菌群集構造の変化の解析 (秋山ら, 2000)、また、バルキングや閉塞といった水処理技術上の問題と細菌フロラとの関連性の解明 (Roller *et al.*, 1994) などに広く用いられている。

このような FISH 用プローブの群特異性、つまり、目的菌群のみを検出するという性質は、本手法を環境試料に適用する上で極めて重要なものと言える。しかし、この特異性については Amann らの初期の研究 (Manz *et al.*, 1992; Roller *et al.*, 1994) を除いては、必ずしも十分には検証されていない。すなわち彼らは、FISH プローブの特異性を実際 FISH に実施することなく、Dot blotting 法などを用いて、間接的に検討している。すなわち、細菌の細胞をそのまま (*in situ*) ハイブリダイゼーションして検討していないため、いろいろ問題点を残している。

これに対して、当研究室では、純粋培養菌に対して FISH を実施することで各種の FISH プローブの特異性を検定した。境 (2001) は、オリゴヌクレオチドプローブとして EUB338、

ALF1b, BET42a, GAM42a および CF319a の 5 種類を用いて, ヤクルト方式浄化槽内における真正細菌, プロテオバクテリアの -, -, - の各サブクラス, Cytophaga/Flavobacteria (CF) のフロラを解析した. このように FISH を用いることで, 浄化槽の細菌フロラを解明し, タイプの異なる浄化槽の比較ができるなど, 環境中の細菌フロラの解明に有効であった. しかし, 中村 (2002) が, 食品工場排水処理や池の水質浄化に使われている種々のヤクルト浄化システムを対象として, ヤクルト濾材表面に発達したバイオフィーム (菌膜) の微生物群集を解析したところ, 真正細菌に属するプロテオバクテリア -, -, - の各サブクラスおよび Cytophaga/Flavobacteria (CF) を合わせた全細胞数が, 真正細菌を検出する EUB338 プローブに反応した細胞よりも多くなるという問題が発生した. このことは, 使用した各種プローブの特異性および感度に問題があると考えられる. それを解決するために, 佐藤 (2003) および王 (2005) は, FISH に用いられる種々のオリゴヌクレオチドプローブについて純粋培養細菌を用いて検出特異性および感度 (目的の菌種に対する反応率) を検討した. さらに, 反応感度を向上させるために FISH の種々の反応条件を改善したことにより, その改良法を確立した.

このように, FISH は微生物生態学的研究に欠かせない先端技術となってきた. しかしながら, 以上の諸研究の対象は主に水環境試料であり, 土壌や堆肥を対象とした研究はほとんどない. 第三章で, 堆肥における大腸菌群等の生残性に関する研究の結果, 培養法により堆肥製品中から大腸菌群など糞便汚染指標菌を検出した. しかし, 環境中に出た病原菌の一部が VNC 状態となることを考えると, 培養法では堆肥中の大腸菌群を過小化評価している可能性がある. しかし, 大腸菌などが淡水や海水中で VNC になることは証明されているが, 土壌や堆肥中でも果たして VNC になるかどうかについては知られていない. それは, 多数の常在菌が共存する中で, 培養せずに土壌や堆肥中の大腸菌を定量する手法が確立されていないためである. そこで, 本研究では, 土壌中における大腸菌を特異的かつ迅速に検出する FISH について検討し開発した.

2. 材料および方法

FISH の基本的な手法は Amann ら (1995) の方法に従い, Alfreider ら (1996) のポリカーボネートフィルターを使用する変法を取り入れた中村 (2002) の手法に従った。以下に FISH の研究開発の手順を示す (図 5-2)。まず大腸菌の純粋培養液を土壌に添加してホモジナイズで分散処理 (15,000 rpm, 15 min) した。その分散液を 100 倍希釈した。超音波遠心洗浄法によりその分散希釈液を 3~5 回処理して上清を収集し, それにパラホルムアルデヒド固定液を加えて固定し, 細胞壁・細胞膜を処理することにより, プローブの細胞内への透過性を高めた。その後, 固定した細胞をフィルターに捕集し, ゼラチンでコーティングしたスライドガラス上へのせ, 大腸菌に対して特異的な蛍光標識プローブを含むバッファーにより, 固定した細胞に対してハイブリダイゼーションを行った。その後, 洗浄操作により非特異的に吸着・結合したプローブを除去した。最後に対比染色を行い, 蛍光顕微鏡下で観察した。

なお, FISH に使用した全ての器具および溶液は 0.2 μm のメンブランフィルターで除菌したものをを用いた。

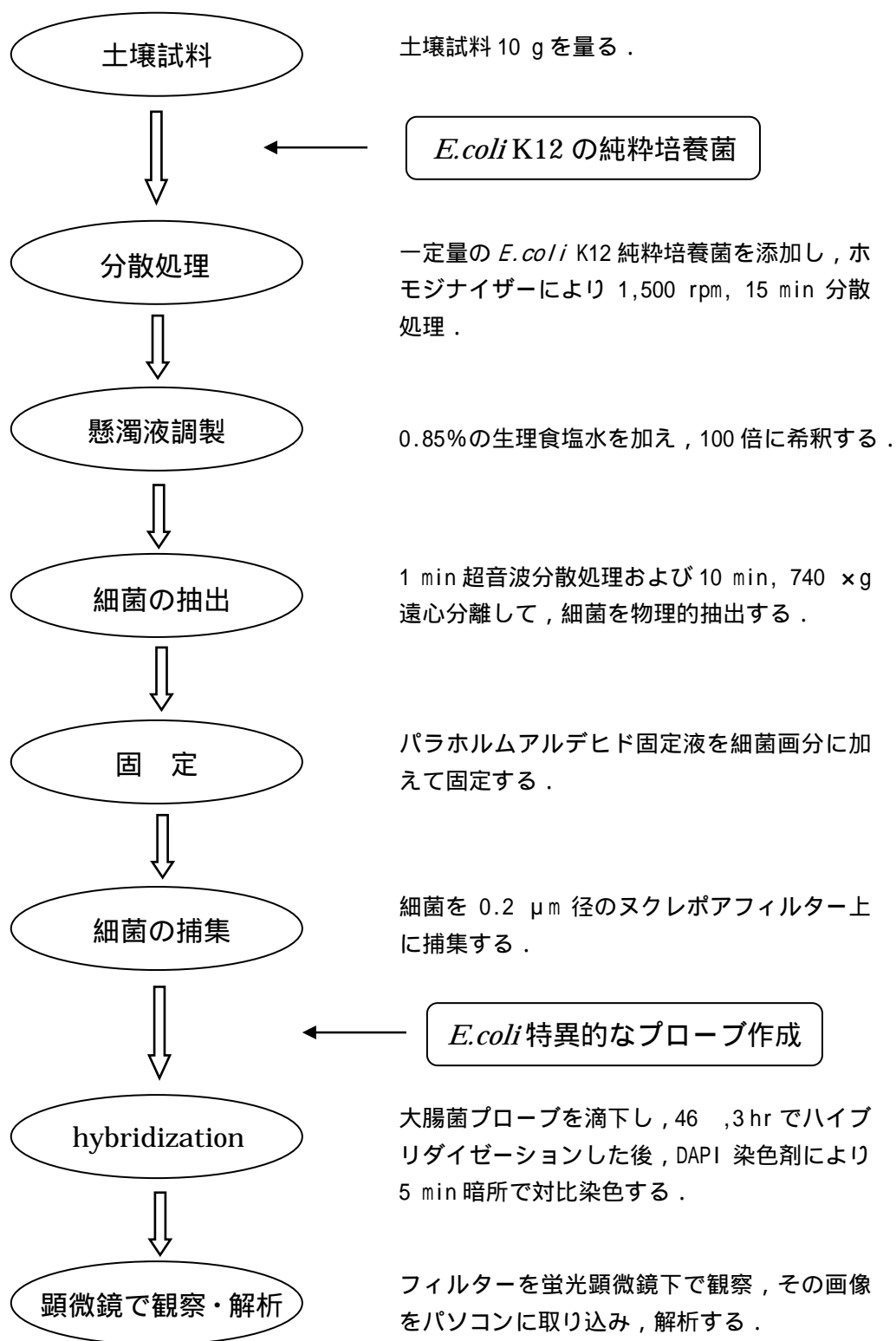


図 5-2 土壌中の大腸菌検出の試験手順

2.1 *E.coli* K12 純粋培養菌液の調製

クックドミート培地(室温)または50%グリセリン(-80)で保存されている *E.coli* K12 菌株を白金耳で Nutrient Agar (NA) に画線接種し, 37 , 18~24 時間で培養した. NA 培地に発育した菌株を, L 字試験管に入った Nutrient broth (NB) 5 mL に白金耳で接種し, バイオフィトレコーダー (ADVANTEC, TVS062CA) を用いて対数増殖後期に達するまで 37 で振とう培養し (45 stroke/min), 前培養液を得た. この 100 μ L を, 新しい NB 培地 5 mL (L 字管) に接種し, 同様に対数増殖後期に達するまで本培養を行った (図 5-3). この時の菌液の最終濃度は約 2×10^9 CFU/mL であった.

2.2 *E.coli* K12 を添加した土壌の分散

上記の菌液から培地成分を除去するために, 1.5 mL 容のマイクロチューブに上記の菌液を 1.0 mL 程度移し, 遠心機 (マイクロ遠心器, TAITEC, Micro Clever CR-12) を用いて 9,000 \times g, 12,000 rpm で 10 分間遠心したのち, マイクロピペットで上清 800 μ L を静かに取り除き, 除菌滅菌生理食塩水 800 μ L を加えて懸濁した. この遠心洗浄操作を 3 回繰り返した.

洗浄後, 適当な濃度に調整した *E.coli* K12 を畑土壌 (佐賀大学ダイズ畑) 10 g に添加して, よく混合した. これに生理食塩水 (0.85% NaCl) を加えて全量を 100 mL とし, ステップレスブレードの付いたホモジナイザー (日本精機, エースホモジナイザー AM-3) を用いて 15,000 rpm, 15 分間の分散処理を行った. この 10^{-1} 希釈懸濁液を 5 mL 取り, 45 mL 滅菌生理食塩水に加えて, 10^{-2} 希釈懸濁液とした (図 2-7 参照).

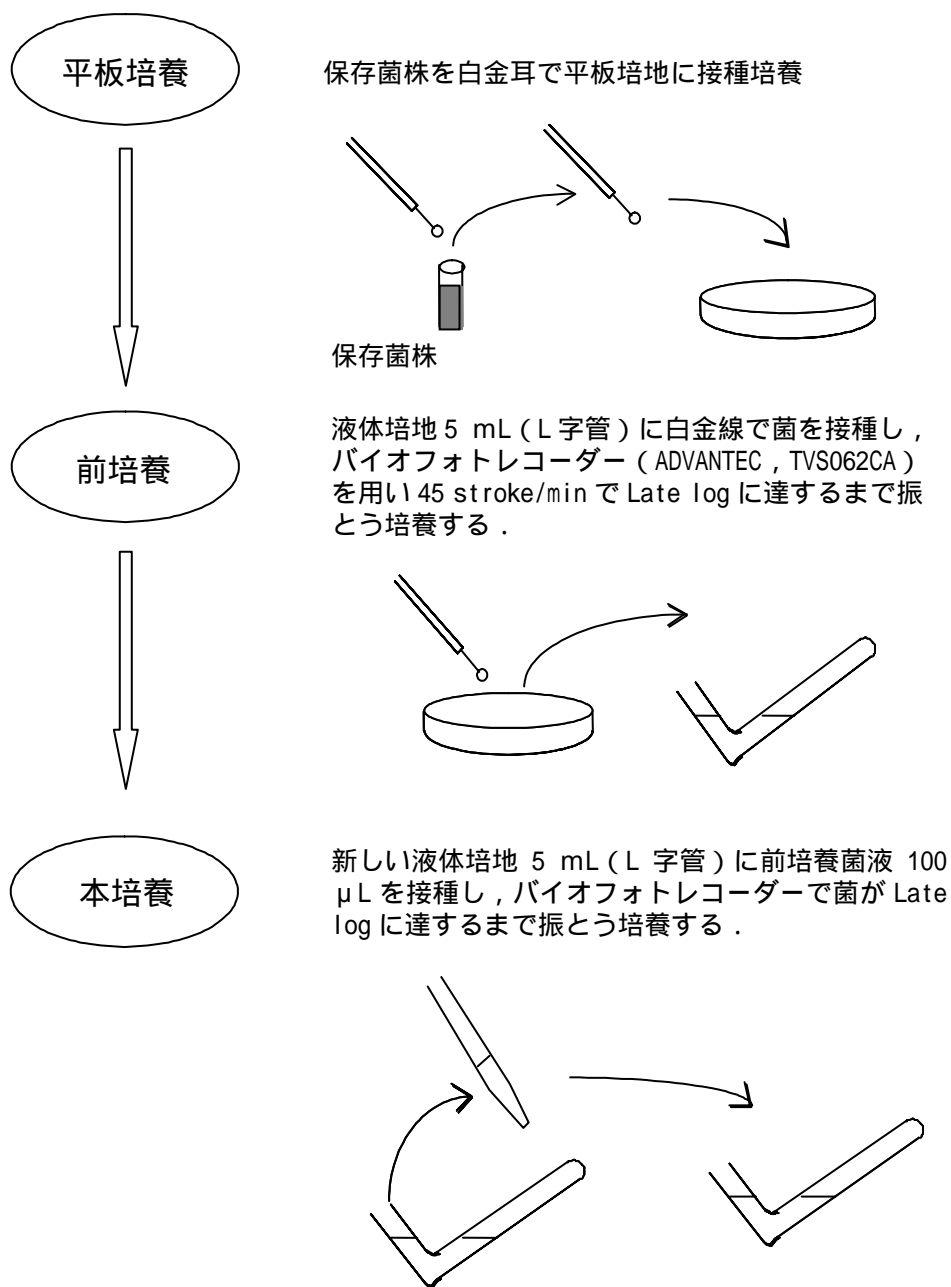


図 5-3 菌供試株の培養法

2.3 細菌の物理的抽出

土壌有機物や粘土粒子による FISH 反応への妨害を防ぐために、本研究では、当研究室の池田（2004）の超音波・遠心洗浄法（図 5-4）を用いて、土壌から細菌細胞を物理的に抽出し、これを FISH に供するという方法をとった。

上記の 100 倍希釈分散懸濁液を 13 mL 容の遠心管に 10 mL ずつ分注し、超音波破碎機(TOMY 超音波発生機 UD-201,出力：6)を用いて 1 分間分散処理してから遠心分離機（KUBOTA KS-5200C）に移し、低速遠心分離（ $190 \times g \sim 720 \times g$, 10 分間）して、マイクロピペットで上清 9 mL を静かに取った。その沈さに除菌水または生理食塩水 9 mL を加え再懸濁し、これに上記と同様の超音波処理と低速遠心分離を 3~5 回繰り返す、上清を合併して土壌から細菌画分を抽出し、その細菌画分を FISH に供した。

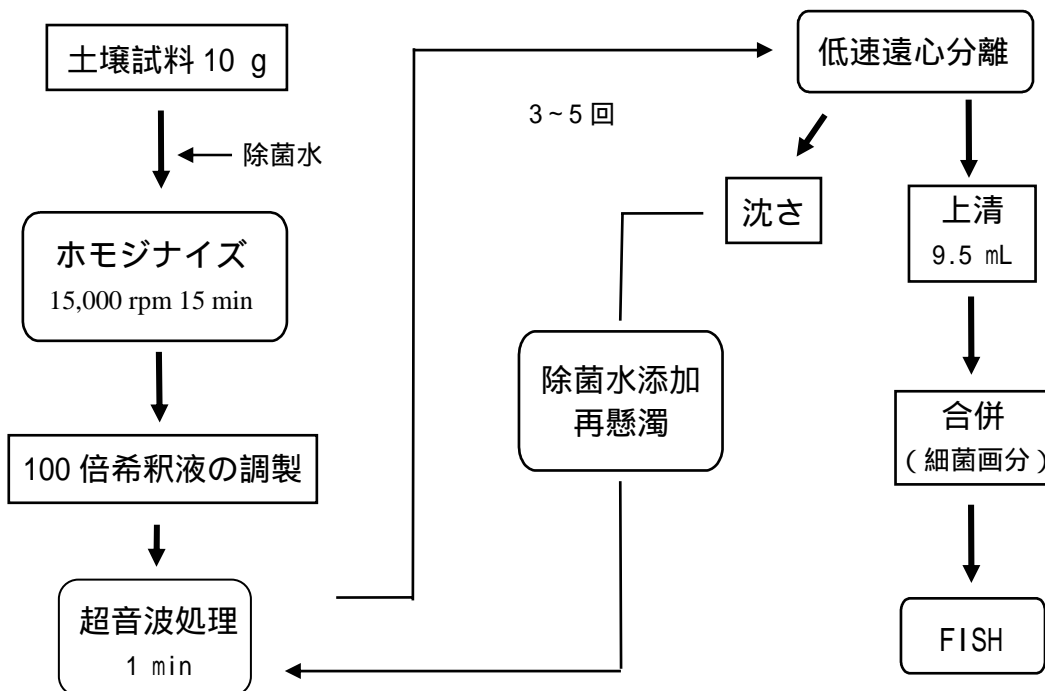


図 5-4 遠心洗浄法による土壌細菌画分の抽出（池田，2004）

2.4 細菌の固定

100 mL の固定液を作る場合，三角フラスコに 4 g のパラホルムアルデヒド (paraformaldehyde, SIGMA USA) を量って入れ，蒸留水を 66 mL 加えた後湯煎で溶かした．次に，3 倍濃度のリン酸緩衝食塩水 (Phosphate buffered saline, 3×PBS, pH7.4) を 33 mL 加えてよく混合し，すぐ 4 の冷蔵庫に入れて放冷した．冷却後の溶液を 2N NaOH あるいは 2N HCl で pH7.4 に調整し，4%パラホルムアルデヒド固定液 (pH 7.4) を得た．これを 0.2 μm のメンブランフィルターで除菌して使用した．なお，3×PBS の組成を表 5-1 に示す．

表 5-1 3×PBS 溶液の組成

試薬	グレード	最終濃度 (mM)	使用量 (g/L)
NaCl	試薬特級	410.7	24.0
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	試薬特級	24.3	8.7
KCl	試薬特級	8.1	0.6
KH ₂ PO ₄	試薬特級	4.4	0.6
蒸留水	滅菌不要		1.0 L

pH7.4, 一般的な使用目的であれば, pH7.2~7.6 なら十分なので, 調整不要.
0.2 μm のフィルターで濾過して冷凍保存.

2.3 で得られた細菌画分液に，除菌した 4%パラホルムアルデヒド固定液 (分画液の 3 倍量) を加え，4 で 1~24 時間固定した (図 5-5). パラホルムアルデヒドは変性が早く，古いパラホルムアルデヒドを使用すると非特異性蛍光が増大することがあるため (Amann *et al.*, 1992), 使用の都度作成した.

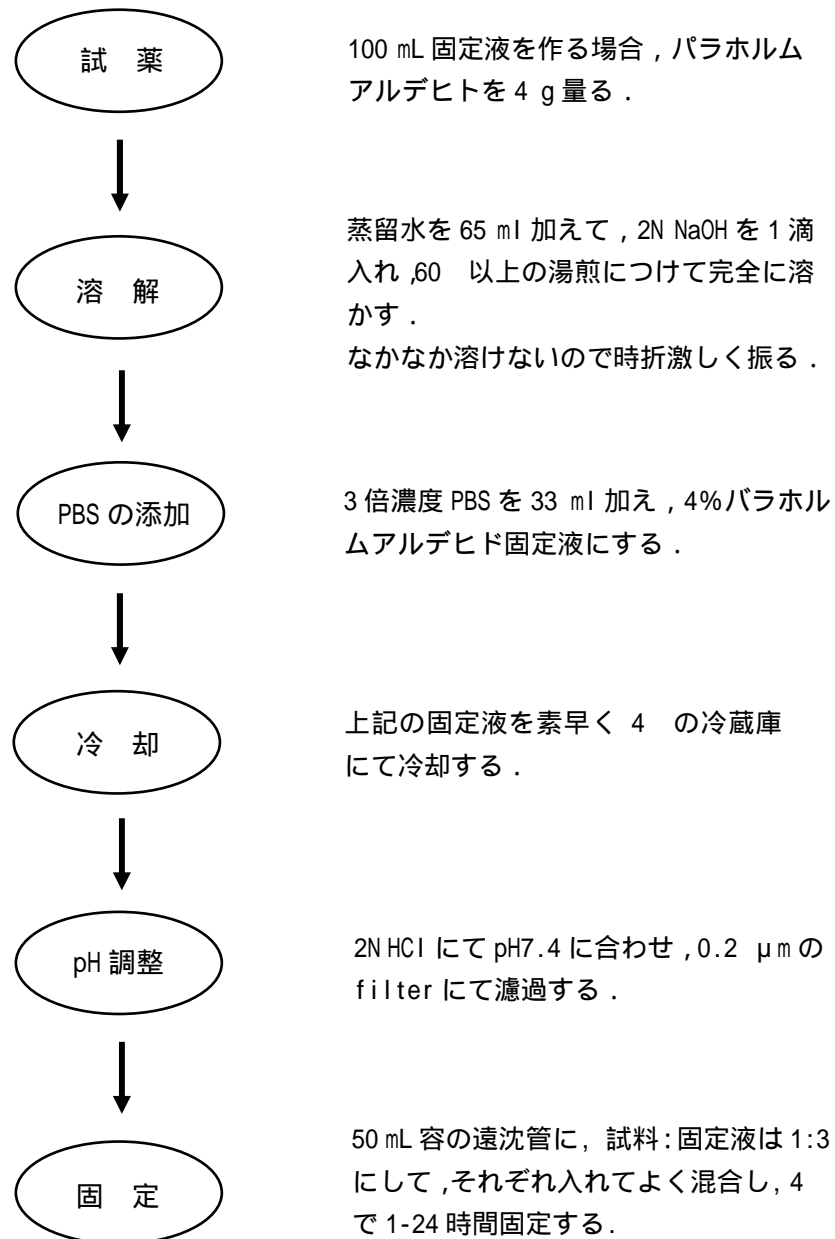


図 5-5 FISH 法における固定液の調製および試料の固定法

*1 パラホルムアルデヒド溶液は変性が早いため、使用時にその都度作成する。

*2 固定試料を液体の状態では長時間保存する場合は、パラホルムアルデヒド溶液で 1 時間以上固定した後に取り除き、PBS で数回菌体を洗浄した後にエタノール (50%v/v, in PBS, pH7.2) を加え、-20 °C で冷凍保存する。

2.5 細菌のフィルターへの捕集

まず、視野当たりの全細胞数を EB 染色にて求めた。この値に基づいて、FISH 用のフィルターに捕集する適切な試料量を求め、FISH 用のフィルターに試料を載せ、濾過・捕集した。図 5-6 にその手順を示す 25 mm 径のフィルターホルダーに GF/C ガラスフィルター(Whatman 社)とヌクレポアフィルター (Toyo Roshi 社, 孔径 0.2 μm) を順次のせ、ファンネルをセットした。これに PBS 1 mL および EB 染色から判断した適切菌液量の 4 倍量 (パラホルムアルデヒドで 4 倍に希釈されているため) の固定菌液を添加し、吸引濾過して細菌をフィルターに捕集した。適切な菌 (試料) 液量については、FISH 画像の観察視野面積内に 60 cells 程度の菌が存在するよう調節するために、以下の式から求めた。

適切菌液量 (μL)

$$= \text{EB 染色した菌液量} (\mu\text{L}) \div \text{EB 染色された細胞数} (\text{cells} / \text{EB 法測定用視野}) \\ \times 60 (\text{cells} / \text{FISH 用視野})$$

上式で、FISH の画像解析で用いる観察視野面積 (3,000 μm^2) は、EB 用測定視野面積 (1,600 μm^2) のほぼ 2 倍である。

捕集した細菌の洗浄および脱水を行なった。PBS 1 mL をフィルター上に添加して 3 分静置したのち吸引濾過した。この洗浄処理をさらに 2 回繰り返した。また、50%のエタノールを 1 mL 入れて 10 分間脱水処理した後、80%、99.5%のエタノール各 1 mL をフィルターに同様に順次入れ、それぞれ 3 分後に吸引除去することで脱水処理した。エタノールによる脱水は、非特異的蛍光の減少に貢献するため (Amann *et al*, 1992)、丁寧に実施する必要がある。

脱水後、細菌を捕集したフィルター周囲の余白をハサミで切り放し、6 等分して、エタノール消毒済フィルターケース (直径 30 mm) に入れ、 -20°C で冷凍保存した。

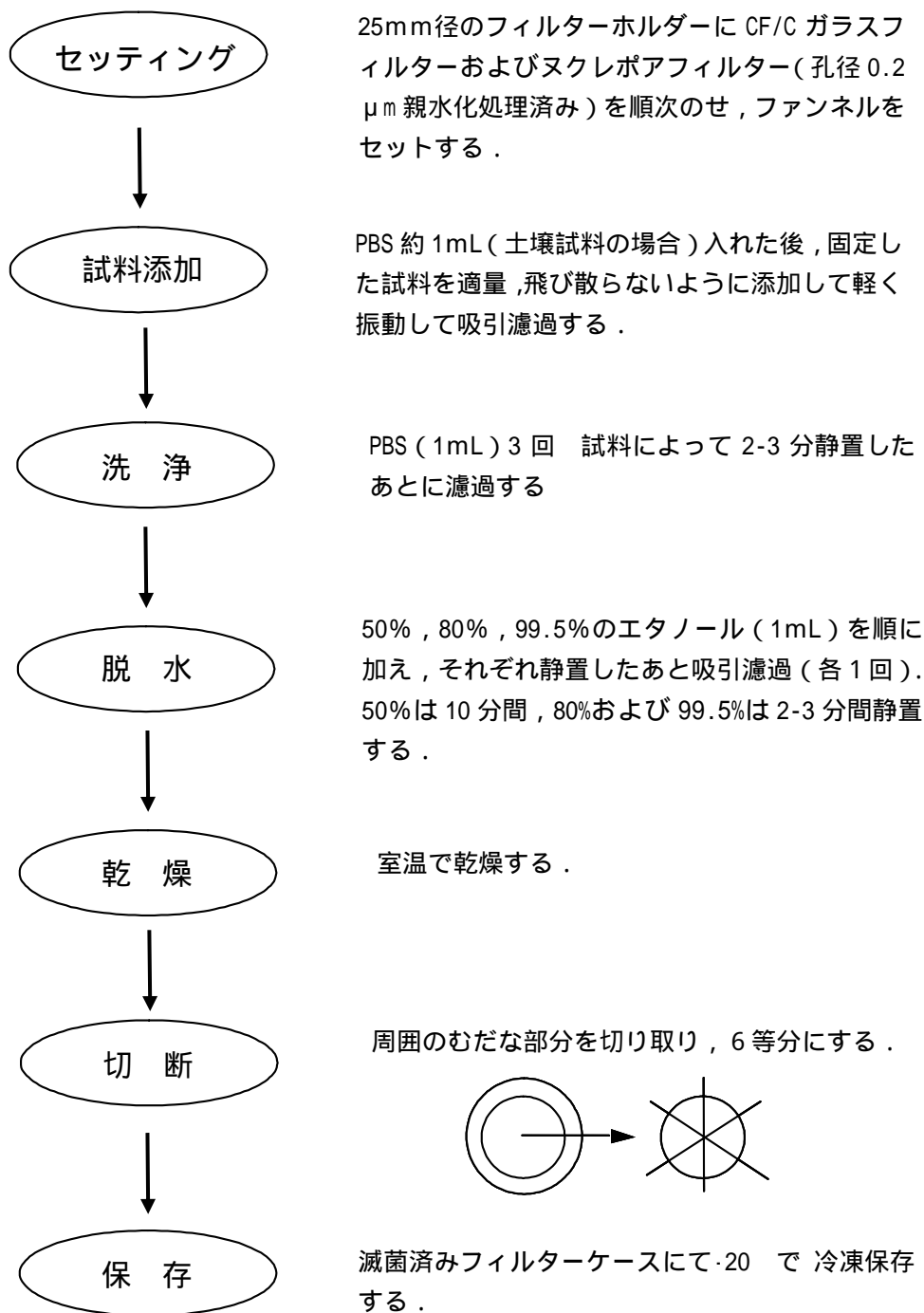


図 5-6 細菌の捕集 (フィルターの作成)

2.6 プロープの設計および作成

細菌類の系統樹は、16S rRNA の塩基配列に基づいた分子進化に即して作られている (図 5-7)。このうち、水圏や土壌で出現すると予想される細菌群を系統樹の中から選定し、各細菌群の 16S または 23S rRNA に存在する特異的な塩基配列に対して相補的な 17~18 塩基のオリゴヌクレオチドを作成し、5' 末端を蛍光色素 Cy3 で標識することで FISH 用プロープを作成した。本研究室で使用したプロープを表 5-2 に示した。これらのうち、EUB338 は真正細菌 (Domain Bacteria) を検出するためのプロープであり、ALF1b (-1b)、BET42a (-42a) および GAM42a (-42a) の各プロープは、グラム陰性細菌を代表するプロテオバクテリアという大きな菌群の各グループを特異的に検出するために作成された。ただし BET42a および GAM42a は 17 塩基中 1 塩基しか違いがないので、このままでは交叉反応による誤反応が起きやすい。これを防ぐため、BET42a プロープには非標識 GAM42a プロープを同濃度加え、また、GAM42a プロープには非標識 BET42a プロープを同濃度加えた (Manz *et al.*, 1992)。

また、これらのプロープに加えて、今回新しく HGCGP および LGC354B プロープを作成した。HGCGP プロープは High G+C グラム陽性細菌を検出するためのプロープである。このグループのグラム陽性細菌には放線菌をはじめとする多種多様な代謝能力を有する細菌種が多いため、自然界における有機物の分解に大きく寄与していると考えられている。また、秋山ら (2000) によって、活性汚泥では High G+C グラム陽性細菌が 1~2 割存在すると報告されている。また、Low G+C グラム陽性細菌は、土壌ないし土壌・水系から多く分離されており、活性汚泥中にも多く存在する。Meier *et al.* (1999) によると、Low G+C グラム陽性細菌を検出するプロープには LGC354A~C の 3 種類があり、そのうち *Bacillus* や *Staphylococcus* を検出する LGC354B プロープを選定した。

さらに、本研究では大腸菌の種特異的プロープの設計を行った。まず、文献またはプロープベースから大腸菌の特異的なプロープを検索した。次いで、得られたプロープの塩基配列を DNA Data Bank of Japan, DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) により相同性検索した。最後に、プロープの特異性を確認し、大腸菌のプロープを決定した。

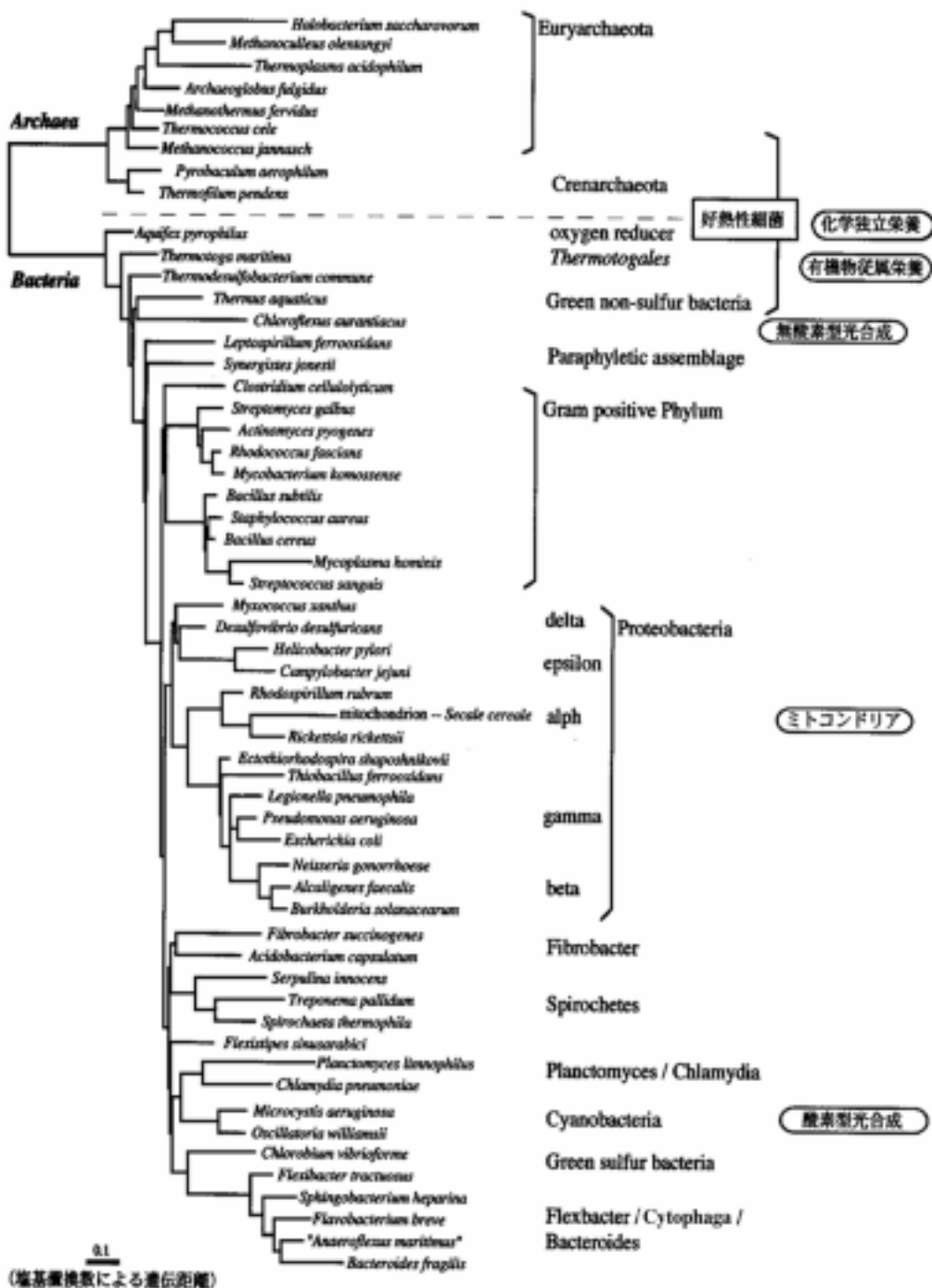


図 5-7 原核生物の 16S rRNA による分子進化の系統樹 (山本・平石, 1997)

表 5-2 検討した FISHI プロープの特性

プロープ名	対象微生物	シーケンス	プロープ結合部位	文献
EUB338	domain Bacteria	5'-GCT CCC TCC CGT AGG AGT-3'	16S, 338-355	Amann <i>et al.</i> (1990)
ALF1b	α -subclass Proteobacteria	5'-CGT TCG(C/T)TC TGA GCC AG-3'	16S, 19-35	Manz <i>et al.</i> (1992)
BET42a ^{*1}	β -subclass Proteobacteria	5'-GCC TCC CCA CTT CGT TT-3'	23S, 1027-1043	Manz <i>et al.</i> (1992)
GAM42a ^{*2}	γ -subclass Proteobacteria	5'GCC TCC CCA CAT CGT TT-3'	23S, 1027-1043	Manz <i>et al.</i> (1992)
CF319a	Cytophaga/Flavobacterium group	5'-TGG TCC GTG TCT CAG TAC-3'	16S, 319-336	Manz <i>et al.</i> (1996)
HGCCP	GPBHG ^{*3}	5'-TAT AGT TAC CAC CGC CGT-3'	23S, 1901-1918	Roller <i>et al.</i> (1994)
LGC354B	GPBLGC ^{*4} の一部	5'-GCA GUA GGA AUC UUC CG-3'	16S, 354-371	Herald <i>et al.</i> (1999)
ES445	<i>Escherichia coli</i>	5'-CTT TAC TCC CTT CCT CCC-3'	16S, 445-462	Kenzaka <i>et al.</i> (2001)

*1 非標識 GAM42a プロープを含む

*2 非標識 BET42a プロープを含む

*3 Gram-positive bacteria with high G+C content of DNA

*4 Gram-positive bacteria with low G+C content DNA

2.6.1 大腸菌の特異的プローブの検索

まず、文献により大腸菌に特異的なプローブを検索した。FISH のプローブについては、環境微生物生態に関する雑誌から検索した。主な雑誌には、アメリカ微生物学会 (ASM) の会誌である「Applied and Environmental Microbiology」(<http://journals.asm.org>)、ヨーロッパ微生物学連合会 (FEMS) の会誌「FEMS Ecology」や「FEMS Letters」、「FEMS Reviews」(<http://www.fems-microbiology.org>) およびイギリスのオックスフォード大学の「Nucleic Acids Research」(<http://nar.oupjournals.org>) などがある。

次に、プローブデータベースから目的細菌のプローブを検索した。主なプローブデータベースは、アメリカのミシガン大学の「Ribosomal Database Project- , RDP」(<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>)、日本国立遺伝学研究所の「DNA Data Bank of Japan, DDBJ」(<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) およびオーストリアのウィーン大学の「probeBase」(<http://www.microbial-ecology.de/probebase>) などである。また、日本理化学研究所微生物材料開発室の「Japan Collection of Microorganisms, JCM」(<http://www.jcm.riken.jp>) やアメリカの世界生物資源センターの「American Type Culture Collection, ATCC」(<http://atcc.org/Home.cfm>) から検索できる。そのほか、日本語 MEDLINE (<http://www.healthy.pair.com>) や佐賀大学附属図書館の電子ジャーナル (<http://yoka.dl.saga-u.ac.jp/univ/saga>) から調べた。

2.6.2 大腸菌の特異的プローブの相同性検索

ここでは、DDBJ で公開されている相同性検索システムを例に、具体的な使い方を示す。DDBJ のホームページ(<http://www.ddbj.nig.ac.jp>)から Homology Search を選択して、配列相同性のページに移る。このページを見るとわかるように、DDBJ では、検索のアルゴリズムとして、BLAST、FASTA、SSEARCH および PSI-BLAST を提供しており、それぞれについて、さまざまな検索対象用のデータベースを構築している。

1) 検索条件の設定と検索の実行

BLAST アルゴリズムを使って相同性検索をする場合を例にして、使用法を説明する。相同性検索のページから BLAST をクリックして、検索条件を指定するページに移る。

まず、データベースとして default(DNA)、DDBJ 全データあるいは DDBJ 新着データを選択した場合に限り、検索対象を DDBJ の division によってさらに絞り込むことができる。

次に、検索用キーとなる配列を指定する。配列の指定は、コピー & ペースト機能を利用してウィンドウに直接貼りつけるか、File Upload の「参照」ボタンをクリックして、ユーザーのコンピュータ内のテキストファイルを直接指定して行なう。テキストファイルを指定する場合、ファイルには検索に使う配列のみを書いておく。最後に、検索結果の受け取り方法を指定する。オンラインのまま検索結果を見たい場合は WWW のボックスを、E-mail で受け取りたい場合には E-mail のボックスをチェックする。

これで検索条件の設定は終わる。検索を実行するには、1 検索内容の送信ボタンをクリックする。正常に受けつけられると、レシートが得られる。

2) 結果の見方

検索が終了すると、結果が HTML 形式の添付ファイルとして届く。このファイルをダブルクリックすると結果を見ることができる。結果リストは、検索結果の局所配列を含む配列のアクセッション番号、バージョン番号、Definition 行の一部のあとに、Score 列と E-value 列が続く。

E-value は BLAST が相同性の度合いを測る量の 1 つで、検索に使ったデータベースの中で、この局所配列と検索配列の組合せが偶然に見つかる個数を示している。簡単にいえば、この数が小さいということは、この局所配列の検索配列への一致度が高いということになる。一概にはいえないが、この値が $1e-10$ (1×10^{-10}) 以下であると、かなり高い確率で機能的にも類似の配列である可能性が示唆される。Score 列の数字はクリックできるようになっているが、これをクリックすると局所配列の詳細をみることができる。

条件設定の画面で Gap を非計算にし、結果の受け取りを WWW にして検索を実行すると、結果リストの上方に [Select Sequences] という項目が現われる。このボタンをクリックすると、多重配列化および進化系統樹作成プログラム (CLUSTALW) への連携インタフェース画面を表示することができる。このページで解析のための配列を絞り込み、CLUSTALWSETUP ボタンをクリックすると、進化系統解析をオンラインで実行することができる。

2.6.3 プロープの作成

FISH 用プロープの製作はつくばオリゴサービス (株) に依頼した。その方法を大腸菌に特異的なプロープ ES445 を例にして説明する。まず、つくばオリゴサービス (株) のホームページ (<http://www.tos-bio.com>) を開く、製品発注をクリック後、製品発注ページの DNA オーダーフォームをクリックする。発注の申し込みページに ES445 プロープの塩基配列 CTT TAC TCC CTT CCT CCC を入力し、5' 末端を蛍光色素 Cy3 で標識、HPLC 精製および収量 OD などの情報を全て入力して依頼した。プロープの標識に一般的に用いられる蛍光色素を表 5-3 に示した。

表 5-3 FISH 用プロープの標識に用いられる蛍光色素

Fluorochrome	Excitation (nm)	Emission (nm)
Fluoresein-isothiocyanate (FITC)	494 (Blue)	518 (green)
5(6)-carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimide-ester (FLUOS)	494 (Blue)	518 (green)
Tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)	554 (Green)	576 (Orange)
Texas Red	596 (Red)	615 (Red)
Cy2	489 (Blue)	506 (Green)
Cy3	550 (Green)	570 (Orange)
Cy5	649 (FarRed)	670 (FarRed)

2.6.4 至適プロープ濃度の検討

注文して得られたプロープ粉末にハイブリダイゼーション緩衝液 (HB, 表 5-4) を加えて溶液とし、さらに、2.5, 5.0, 7.5, 10, 15 ng/μL の 5 段階の濃度に調製した。これらプロープ希釈液について、大腸菌の代表的な菌株である *E. coli* K12 に対する検出率 (全細胞数に対するプロープで検出された細胞の比率) を測定した。このとき、大腸菌は -プロテオバクテリアに属するため、-プロテオバクテリアに対する特異的な GAM42a プロープ (2.5 ng/μL) をコントロールとして用いた。調製したプロープは -20 で凍結保存した。

表 5-4 ハイブリダイゼーション緩衝液 (HB) の組成

組成	最終濃度
NaCl	0.9 M
Tris-HCl (pH7.4)	20 mM
SDS	0.01%
Formamide	20%: EUB38, ALF1b, CF, HGCGP 30%: BET42a, GAM42a, DEL, LGC354B

2.6.5 プローブの特異性の検討

大腸菌プローブの特異性の検定には, *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* O157:H7 G7 株, *shigella dysenteriae*, *shigella boydii*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter diversus*, *Staphylococcus aureus* 209P JC-1, *Bacillus cereus* の計 11 株の既知の細菌の菌株を用いた。クックドミート培地 (室温) または 50%グリセリン (-80) で保存されている各種菌株を白金耳でそれぞれ Nutrient Agar (NA) 培地に画線塗抹し, 37 , 18~24 時間で培養した。NA 培地に発育した菌株を, Nutrient broth (NB) 液体培地 5 mL (L 字試験管) に白金耳で接種した。バイオフィトレコーダー (東洋科学, TC-106) を用い, 対数増殖後期に達するまで 37 で振とう培養し (45 stroke/min), 新鮮培養菌を得た。この前培養液 100 μ L を, 新しい NB 液体培地 5 mL (L 字管) に接種し, 対数増殖後期に達するまで同様に本培養を行った (図 5-3 に参照)。

これらの純粋培養菌を, 選定した大腸菌プローブとそれぞれ FISH を行い, 検出率を測定した。

2.7 ハイブリダイゼーションの手順

FISH の手順を図 5-8 に示す。ポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) に, 折り畳んだキムワイプ 1 枚を入れ, これにハイブリダイゼーション緩衝液 (HB) を 2 mL 加えて湿らせ, キャップを閉めてインキュベータに入れ, 46 で 20 分間保温した。これはハイブリダイゼーション中にフィルターが乾燥するのを防ぐためである。ゼラチンコーティングしたスラ

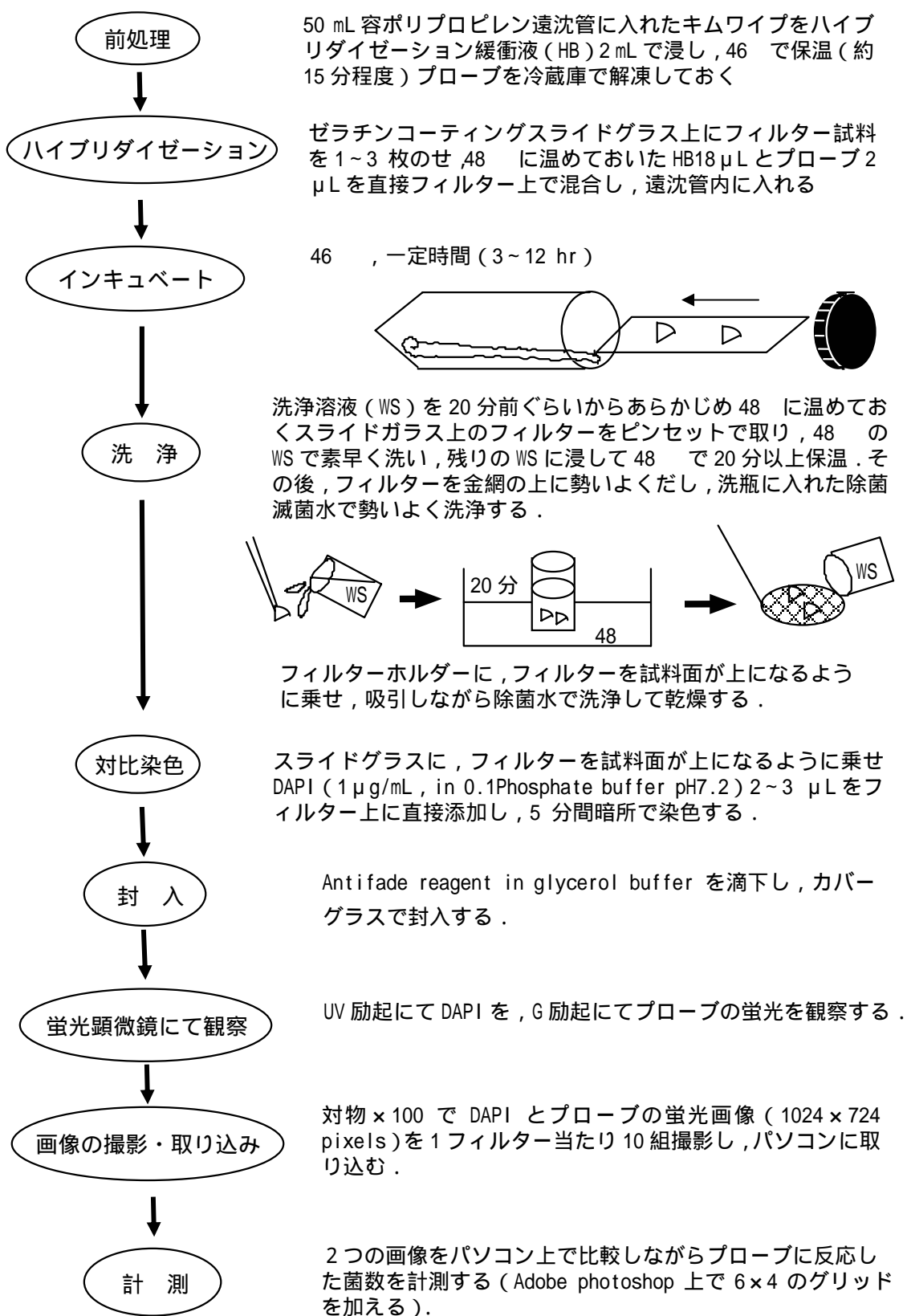


図 5-8 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)法の手順

イドグラスに，図 5-6 の方法で作成したフィルターを試料面が上になるようにしてのせ，48 に暖めておいた HB 18 μ L および解凍して室温に戻しておいたプローブ 2 μ L をフィルター上で混合した．このスライドグラスを，上記のポリプロピレン製遠沈管に素早く入れ，46 で 3~12 時間インキュベートし，ハイブリダイゼーションさせた．図 5-9 は，スライドグラスのゼラチンコーティングの手順を示した．

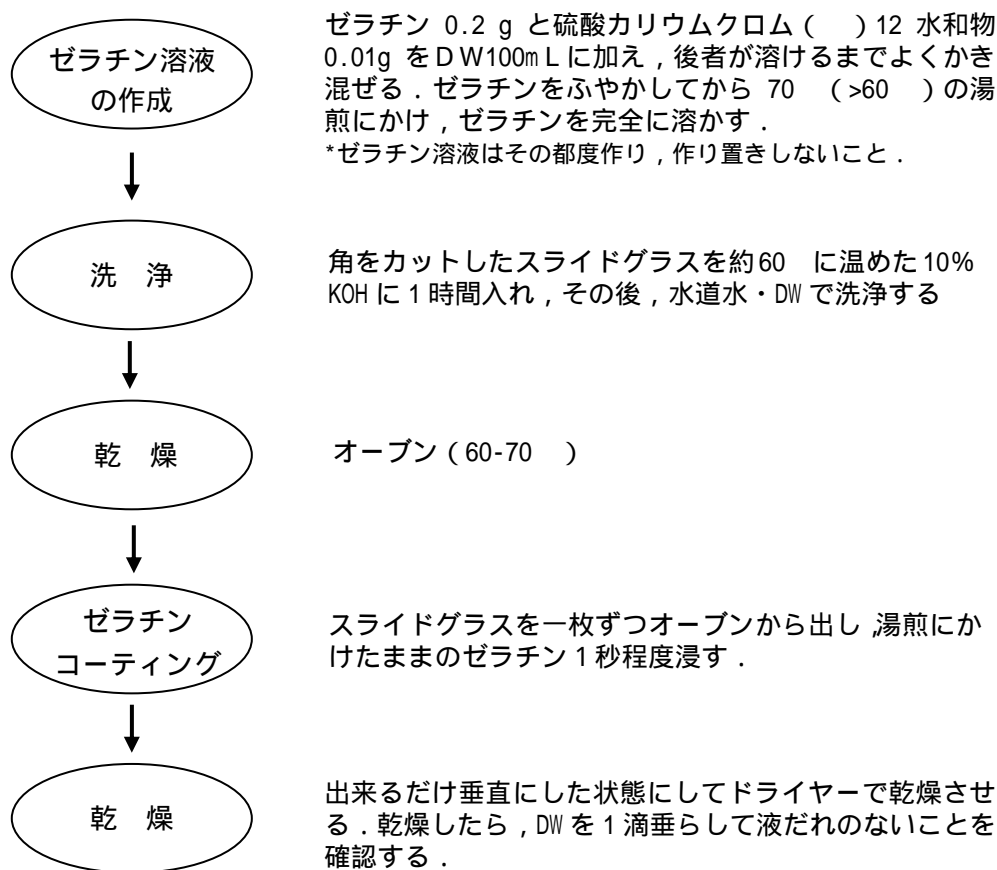


図 5-9 スライドグラスのゼラチンコーティング

純粋培養菌を用いた実験では，試料当たり各プローブ 1 連で行い，環境試料を用いた実験では 3 連で行った．ハイブリダイゼーション後，ピンセットでフィルターの端をはさみ，スクリー管瓶 (20 mL 容) に入った 10 mL 以上の洗浄溶液 (WS, 48 に暖めておく，表 5-5) のうち約 5 mL をこの表裏にかけ流し，残りの WS にフィルターを浸して，48 で 20

分間以上保温した。その後、スクリー管瓶の中身を金網の上に流し、さらに除菌滅菌水約 15 mL で勢い良くフィルターの表裏を洗浄し、吸引して乾燥させ、フィルターの試料面が上になるように再びスライドグラス上に置いた。4, 6 diamino-2-phenylindole (DAPI, $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) をフィルター上に直接 $2 \text{ } \mu\text{L}$ 添加し、暗所で 5 分間染色した。染色後、フィルターが乾いていなければ吸引して乾燥させ、再度スライドグラス上に戻し、グリセリン入り Anti Fade (Molecular Probes, SlowFades Antifade Kits) を 1 滴添加して、 $18 \times 18 \text{ cm}$ のカバーグラスで封入した。

表 5-5 洗浄溶液 (WS) の組成

組成	最終濃度
4N EDTA	5 mM
Tris-HCl (pH7.4)	20 mM
SDS	0.01%
NaCl	0.225M: EUB38, ALF1b, HGCGP 80mM: BET42a, GAM42a, DEL, CF, LGC354B

2.8 細菌の観察および画像解析

FISH のプレパラートを蛍光顕微鏡下で観察し、Adobe Photoshop 上で画像解析した。図 5-10 に示すように、作成したプレパラートを蛍光顕微鏡 (Nikon, EFD-3) にセットし、まず DAPI 染色された細胞を UV 励起下 ($330 \sim 380 \text{ nm}$)、対物レンズ 100 倍で観察し、適切な視野を選択した。この蛍光顕微鏡画像をデジタルカメラ (ZEISS, AxioCam HRc) で撮影し (メモリ画素数: 高解像度モード = $1400(\text{H})\text{pixel} \times 1040(\text{D})\text{pixel}$)、Microsoft Photo Editor を用いて JPEG で保存した。次いで、上記と同一視野において、プローブに特異的に反応した細菌の蛍光像を G 励起下 ($510 \sim 560 \text{ nm}$) で同様の操作にて、保存した。DAPI 画像およびプローブ反応画像を 1 フィルターにつき、それぞれ 10 視野ずつパソコンに取り込んだ。

これら同一視野の蛍光画像の各組を Adobe Photoshop 上で合成して解析した。まず両画像のコントラストと明るさを調節し、DAPI 画像全体を選択したのちコピーしてプローブ反

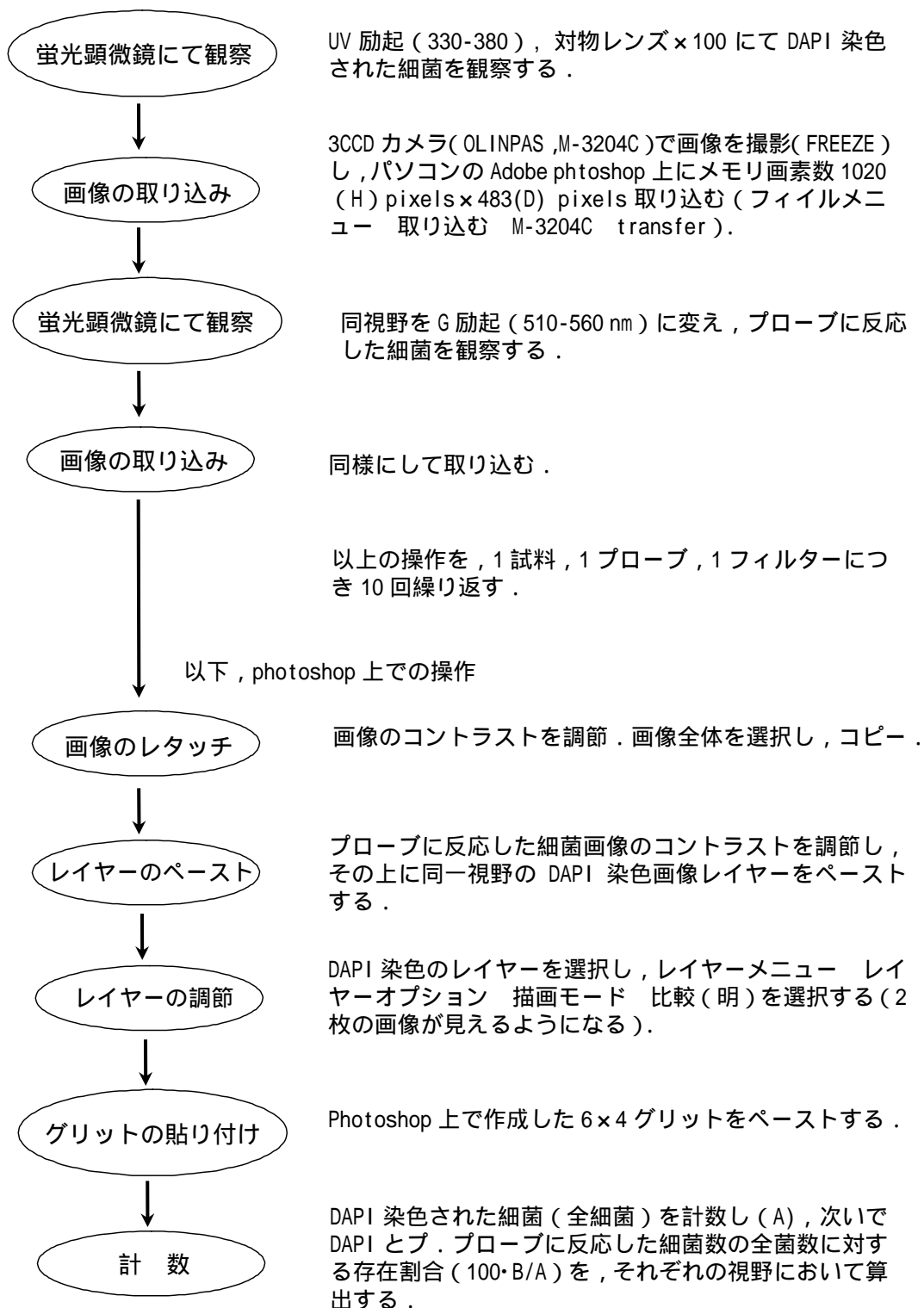


図 5-10 画像の取り込みと細菌の計数法

応画像に張り付けた。次いで、DAPI 画像のレイヤーを選択し、レイヤーメニューからレイヤーオプションを選択して、描画モードを“比較(明)”に設定したのち 2 つの画像の位置を調節して重ね合わせた。さらに、計数範囲を定めるため、Adobe Photoshop 上で作成した 6×5 のグリッド(縦 50 μm, 横 60 μm, 面積 3,000 μm² に相当)を二重画像に重ねた。次いで、細菌計数を行った。まず DAPI 染色された細胞を計数し、次いで DAPI とプローブの両方の蛍光を発している細胞を計数した。DAPI で蛍光を発せず、プローブでのみ蛍光を発しているものは、試料中に含まれる有機物や細胞の 2 次生成物とみなし、計数から除外した。プローブに反応した細胞数(A)の、DAPI で染色された全細胞数(B)に対する割合(A/B×100)を算出し、各細菌に対する蛍光プローブの反応率とした。蛍光プローブ反応率は視野ごとに算出し、平均値(mean)と標準偏差(standard deviation)を求めた。

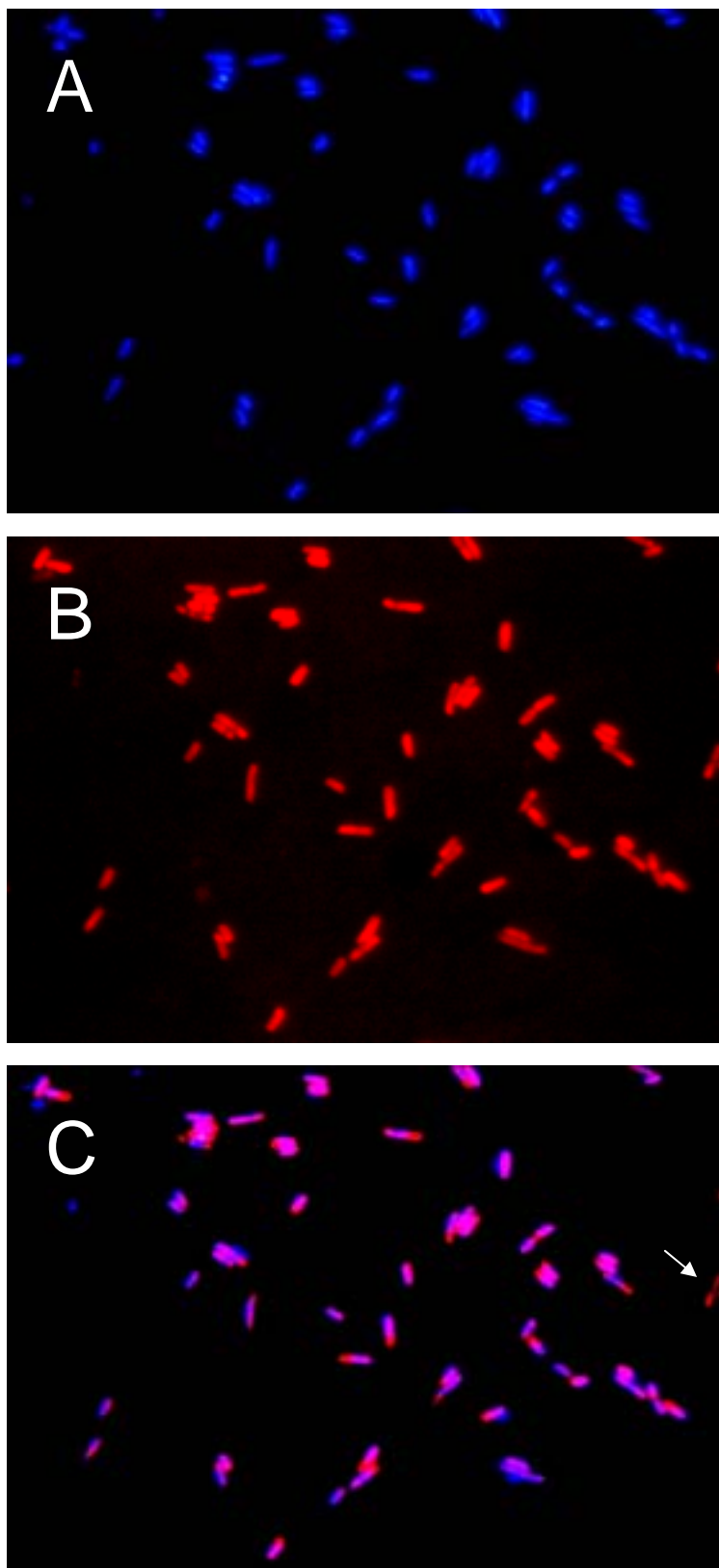
3. 結果および考察

3.1 FISH における大腸菌 K12 の反応

本研究では、まず当研究室で改良した FISH 法の有効性を検証するために、微生物研究で最も多く使っている *E. coli* K12 の純粋培養菌を用いて、真正細菌を標的とした FISH プローブの EUB338 とハイブリダイゼーションし、その検出感度を検討した。

写真 5-1 に示すように、DAPI 蛍光染色法では、全ての *E. coli* K12 細胞が青色の蛍光を発する粒子として蛍光顕微鏡下で観察された(写真 5-1A)。一方、EUB338 プローブを用いた FISH 法では、暗色の背景の中で *E. coli* K12 細胞がオレンジ色の蛍光を発した(写真 5-1B)。また、同じ視野の画像写真 5-1A と写真 5-1B とを重ねると、*E. coli* K12 細胞がほぼ重ねあわさり、*E. coli* K12 細胞の検出率は 98.6%であった。

このように、本 FISH 法は、*E. coli* K12 の検出に対して適用であると確認された。土壌や堆肥から大腸菌を特異的かつ迅速に検出する手法を確立するために、この方法は、基本的な手法として適用性が高いと考えられる。



E. coli K12 を用いて FISH による検出有効性を検討した。A, DAPI 蛍光染色法による画像 (UV 励起)。全ての *E. coli* K12 の細胞が青色の蛍光を発する粒子として観察される。B, 真正細菌に対する EUB338 プローブとハイブリダイゼーションによる蛍光画像 (B 励起)。全ての *E. coli* K12 の細胞がオレンジ色蛍光を発する粒子として観察される。C, 同じ視野の DAPI 蛍光画像 (A) と EUB338 の蛍光画像 (B) と重ねた画像。EUB338 プローブで FISH による細胞は DAPI 蛍光染色による細胞とほぼ重なっている。矢印の示す粒子はプローブと非特異的に結合した粒子で、細菌ではない。

写真 5-1 EUB338 プローブを用いた FISH による *E. coli* K12 の蛍光画像

3.2 大腸菌プローブの検索および選定

文献または Probase から検索した結果，表 5-6 に示すように，10 種類のプローブが，大腸菌プローブの候補として得られた．このうち，ES445 プローブは大阪大学の Kenzaka ら（2001）の提案するもので，DDBJ により相同性検索した結果，その塩基配列を持っている細菌のうち，理論上大腸菌は約 70% を占め，他にシゲラなど数種の類縁菌種も認められた．Neef らの Eco1167 プローブは *E. coli* が 62.2%，シゲラが 32.4% であった．Eco440 プローブにおいては *E. coli* の占める割合が 50.0%，Eco541 プローブは 60.0% があった．Eco-1 プローブは E-value が $2e-12$ (2×10^{-12}) であり，*E. coli* ATCC25922 に対して，この局所配列の検索配列への一致度がかなり高い．しかし，塩基配列が 37 mer と長すぎ，この配列を持つ細菌のうち大腸菌に対して占める割合が 37.5% と低い，そのほかの 5 種類のプローブについては相同性が低かった．これらの結果から，本研究では，ES445 プローブおよび Eco1167 を，理論的な特異性の高さから選定した．これらのプローブを合成して 5' 末端を蛍光色素 Cy3 で標識し FISH に供した．

表 5-6 大腸菌特異的プローブの選定

プローブ	塩基配列	E-value*	<i>E. coli</i> の比率	出典
1.ES445	5'-CTT TAC TCC CTT CCT CCC-3'	0.019	約 70.0%	Kezaka <i>et al</i> , 2001
2.Eco1167	5'-GCA TAA GCG TCG CTG CCG-3'	0.028	62.2%	Neef <i>et al</i> , 1995
3.Eco-1	5'-ACA GGA AGA AGC TTG CT- CTT TGC TGA CGA GTG GCG GA-3'	2e-12	37.5%	Wang <i>et al</i> , 2002
4.Eco440	5'-TCC CTT CCT CCC CGC TG-3'	0.075	約 50.0%	Fuchs <i>et al</i> , 1998
5.Eco0541	5'-CCG ATT AAC GCT TGC ACC-3'	0.019	約 60.0%	Fuchs <i>et al</i> , 1998
6.Eco871	5'-CCC CAG GCG GTC GAC TTA-3'	2e+02		Fuchs <i>et al</i> , 1998
7.Eco889	5'-TAA CCT TGC GGC CGT ACT-3'	9e+02		Fuchs <i>et al</i> , 1998
8.Eco1410	5'-GCA ACC CAC TCC CAT GGT-3'	29.2		Fuchs <i>et al</i> , 1998
9.Eco1482	5'-TAC GAC TTC ACC CCA GTC-3'	1.2e+02		Fuchs <i>et al</i> , 1998
10.Eco1500	5'-CCC CTA CGG TTA CCT TGT-3'	31.0		Fuchs <i>et al</i> , 1998

* E-value は BLAST において相同性の度合いを測るパラメーターの 1 つで，検索に使ったデータベースの中で，この局所配列と検索配列の組合せが偶然に見つかる個数を示している．

3.3 大腸菌プローブの決定

選定した ES445 プローブおよび Eco1167 プローブの大腸菌に対する検出感度について、大腸菌 K12 の純粋培養菌を用いて検証した。写真 5-2 に示すように、大腸菌の全ての細胞は DAPI により UV 励起下で青い蛍光を発し、一方、FISH プローブに結合した細胞は G 励起下で赤色の蛍光を発した。左右の写真は同じ視野で、それぞれ DAPI 染色された全細胞（左）およびプローブとハイブリダイゼーションした細胞（右）である。その結果、ほぼ 100% の大腸菌 K12 細胞が ES445 プローブと反応した。一方、Eco1167 プローブはほとんど大腸菌 K12 と反応しなかった（原因不明）。この結果から、本研究では ES445 プローブを有望な大腸菌プローブとして最終決定した。

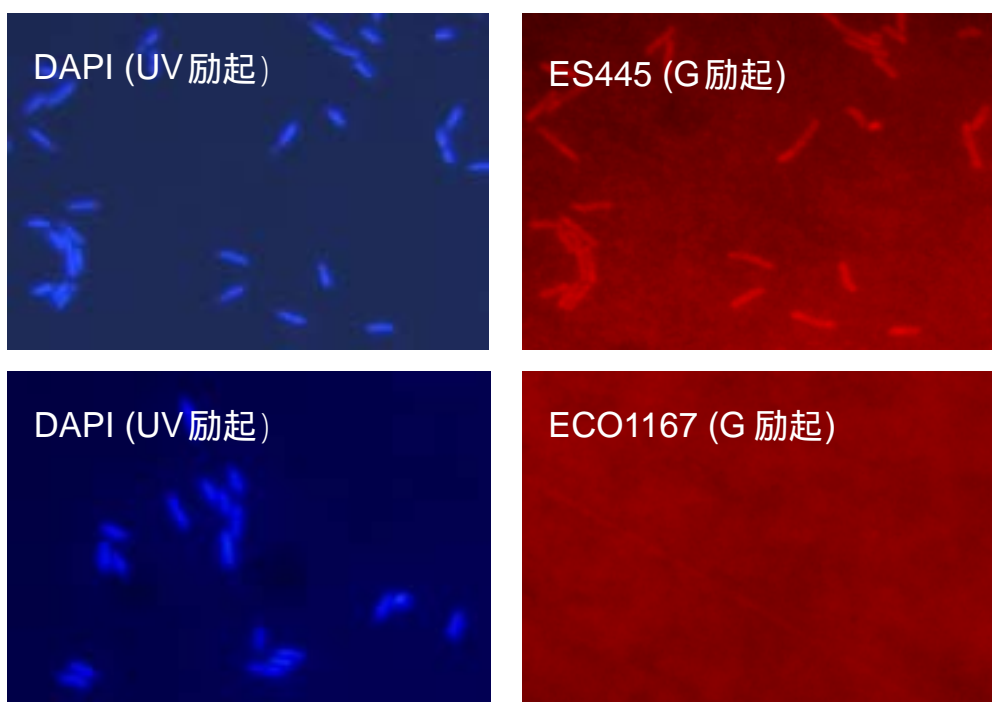


写真 5-2 *E. coli* K12 に対するプローブの検出感度

ES445 プローブおよび Eco1167 プローブによるハイブリダイゼーション後に、DAPI により対比染色を行なった。すべての *E. coli* K12 が UV（紫外線）励起下で DAPI に由来する青い蛍光を発している。G（緑色）励起光下ではプローブとハイブリダイゼーションした *E. coli* K12 のみが赤い蛍光を発している。左右の写真は同一視野で励起光を変えて撮影した。

3.4 大腸菌プローブの至適濃度

ES445 プローブの至適な濃度を決めた。2.5, 5.0, 7.5, 10, 15 ng μL^{-1} の 5 段階濃度の ES445 プローブおよび 2.5 ng μL^{-1} の GAM42a プローブを用いて, *E. coli* K12 に対して検出率を測定した(図 5-11)。コントロールとして用いた GAM42a プローブでは, 92.5%と高い検出率であった。一方, ES445 プローブでは 7.5 ng μL^{-1} の濃度で, 検出率が最も高く, 95.5%に達した。したがって, この濃度が最適濃度であることが明らかになった。

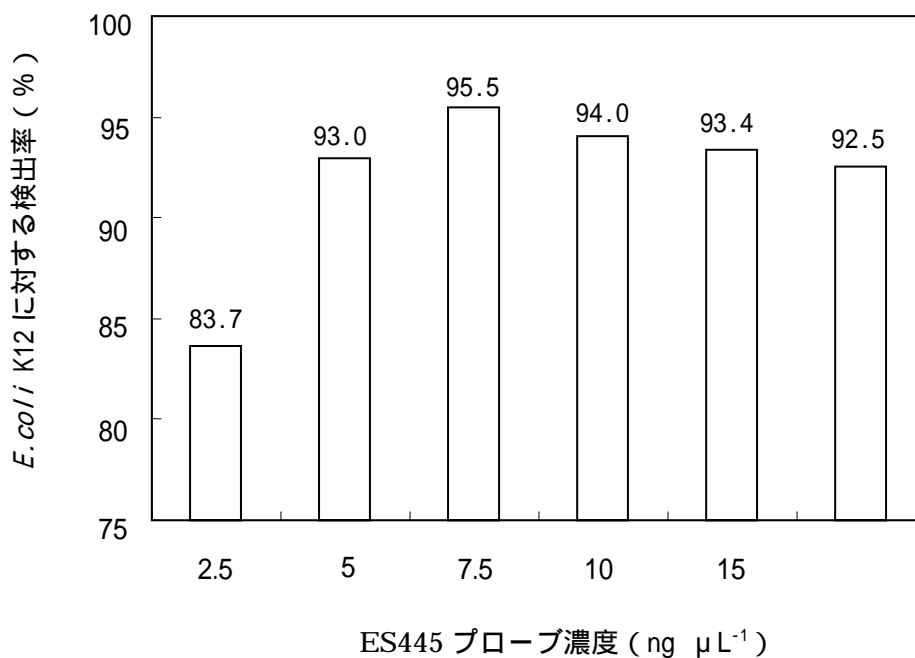


図 5-11 *E. coli* K12 に対する ES445 プローブ濃度により検出率

3.5 大腸菌プローブの種特異性の検証

ES445 プローブの種特異性について 本研究では *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* O157, *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydii*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter diversus*, *Staphylococcus aureus* および *Bacillus cereus* など大腸菌ないし大腸菌の近縁菌である 11 種類の菌株を用いて検証した。その結果, 図 5-12 に示したように, *Escherichia coli* K12

の検出率は 101% , *Escherichia coli* O157 は 85%と高い検出率であった . また , *Shigella* (赤痢菌) に対しても 50~80%の検出率があった . 一方 , *Salmonella typhimurium* では 9%で , *Serratia marcescens* で 5% , 他の腸内細菌 5 種とグラム陽性菌 2 種に対しては不検出であった . このように , ES445 プローブは大腸菌と , ごく近い類縁菌である赤痢菌に対して特異性が高いことが実証された .

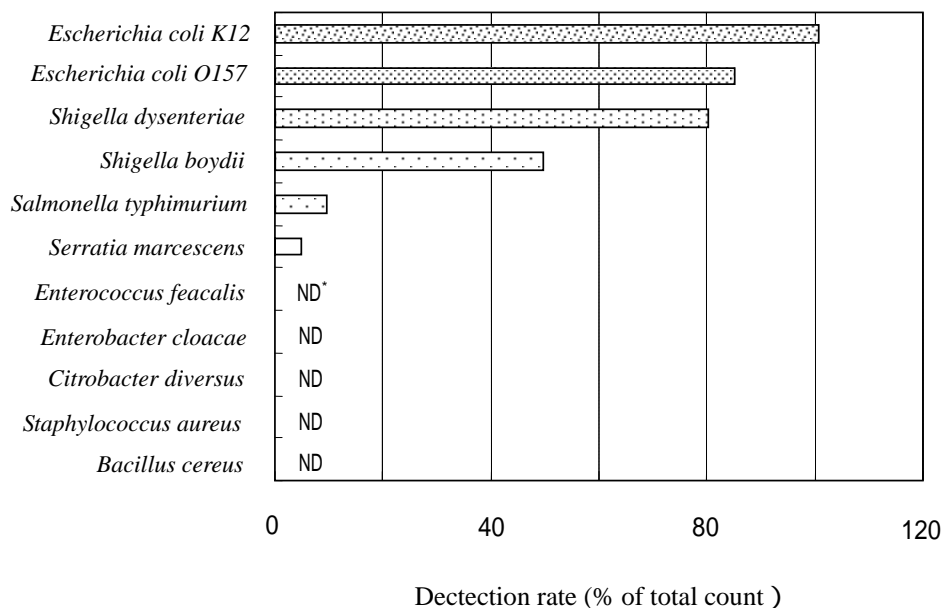


図 5-12 ES445 プローブの特異性検証

* ND, 未検出 .

3.6 超音波 遠心洗浄法による細菌の回収率

FISH は近年水試料中の細菌を特異的に検出する手法として広く利用されるようになってきた . しかし , 土壌での成功例はほとんどない . これは , 土壌有機物や粘土粒子による FISH 反応への妨害があるためと考えられる . この問題を解決するために , 本研究では , 当研究室の池田が改良した超音波 遠心洗浄法 (池田ら , 2004)を用いて , 土壌から添加した *E. coli* K12 細胞を物理的に抽出し , その細菌画分を FISH に供した .

まず、ES445 プローブを用い、対数期後期の *E. coli* K12 の純粋培養細胞とハイブリダイゼーションした。その結果、*E. coli* K12 の検出率は 98.6%であった。このとき、*E. coli* K12 の細胞は DAPI 蛍光染色でも ES445 プローブとハイブリダイゼーションでも明瞭に観察され、DAPI の蛍光染色された細胞数に対照すると、ほぼ全ての細胞が ES445 プローブと反応したことが明らかになった（写真 5-3A）。

次いで、*E. coli* K12 を佐賀大学水田土壌に添加してホモジナイザーで分散処理し、それを FISH に供した。その結果、*E. coli* K12 細胞の検出率は 23.2%と低かった。DAPI による全細菌の蛍光画像では、土着菌と大腸菌がともに観察できたが、土壌有機物の自家蛍光も多数観察された。同一視野において、G 励起下では ES445 プローブと反応した大腸菌の細胞は非常に観察しづらかった（写真 5-3B）。このように、ES445 プローブと反応した *E. coli* K12 の細胞を検出するのに、土壌有機物や粘土粒子が何らかの妨害を与えたことが示唆された。

そこで、*E. coli* K12 を水田土壌に添加した分散懸濁液から超音波 遠心洗浄法により細菌画分を抽出し、ES445 プローブによる FISH に供した（写真 5-3C）。その結果、細菌画分には *E. coli* K12 の検出率は 91.1%という高い検出率であった。土壌有機物の自家蛍光が少なく、ES445 プローブと反応した *E. coli* K12 の細胞を明瞭に観察することができた（写真 5-3C）。このように、超音波 遠心洗浄 法により土壌有機物や粘土粒子を除去することで、検出感度が高まることが明らかとなった。土壌中の大腸菌が FISH で検出されたことは、細胞添加実験ではあるが、世界初であると思われる。

このとき、細菌画分の回収率は 70.1%であった。ここで回収率とは、画分前の懸濁液の全菌数に対する、細菌画分液中の全菌数と定義した。したがって、ES445 プローブを用いた FISH において、土壌に添加した *E. coli* K12 の検出率が $70.1\% \times 91.1\% = 63.9\%$ と算定された（表 5-7）。土壌における大腸菌の検出率としては、まずまず満足すべきものであると考えられる。

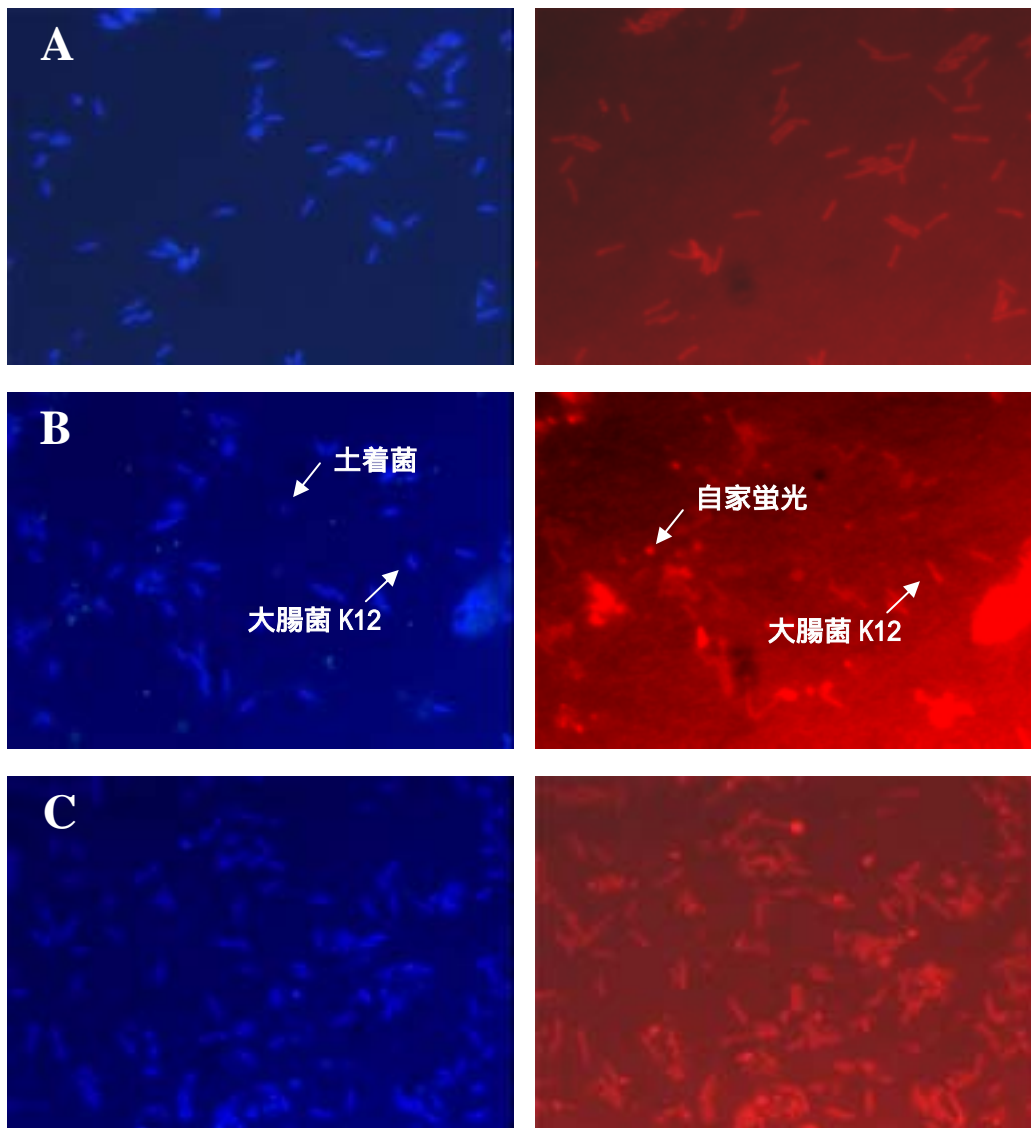


写真 5-3 *E. coli* K12 純粋培養, *E. coli* K12 を添加した土壌およびその細菌画分に対する ES445 プローブによる FISH 画像

左側は DAPI による細胞の対比染色画像で, 右側は ES445 プローブとハイブリダイゼーションした細胞の画像. 左右の写真は同一視野で励起光を変えて撮影した. A, *E. coli* K12 純粋培養細胞; B, *E. coli* K12 を添加した佐大水田土壌; C, *E. coli* K12 を佐大水田土壌に添加した後, 超音波遠心洗浄法により得られた細菌画分.

これらの結果から，超音波 遠心洗 浄法によって土壌から細菌を抽出する方法が有効であることが明らかになった．この方法を用いて，FISH による土壌や堆肥中の大腸菌など目的病原菌を特異的に検出することが可能となった．

表5-7 超音波 遠心洗浄による土壌細菌の回収率およびFISHによる大腸菌の検出率 *1

目的細菌	蛍光色素 or プローブ	細菌回収率 ^{*2} (%)	大腸菌検出率 ^{*3} (%)
全細菌	Ethidium bromide	70.1	
<i>E. coli</i> K12	ES445	63.9	91.1

*1 土壌懸濁液に*E. coli* K12を添加し（最終濃度： 10^7 cells mL⁻¹），超音波 遠心洗浄法により細菌画分を得た．

*2 回収率 (%) = (画分液中の全菌数 / 画分前の懸濁液の全菌数) × 100

*3 検出率 (%) = (ES445プローブによる*E. coli* 菌数 / DAPI による全菌数) × 100

3.7 *E. coli* K12 の定量的検出

超音波 遠心洗浄法によって，水田土壌に添加した *E. coli* K12 の回収率が 63.9%であるという結果が得られた．この方法を用いて，土壌に添加した大腸菌が定量的に検出されるのかを検討するために，本研究では，佐賀大学畑土壌試料に大腸菌 K12 を添加し，遠心洗浄法により得られた細菌画分に対して ES445 プローブを用いて FISH を行い，その回収率を検討した．その結果（図 5-13）， $3.9 \times 10^8 \sim 3.9 \times 10^9$ cells g⁻¹ soil の範囲で添加した大腸菌に対して，ほぼ直線的な値が得られ，直線回帰式 $Y = 0.511X$ ($r = 0.998$) が得られた．このことから，ES445 プローブによる大腸菌の回収率は平均 51.1%で，極めて高い相関 ($r = 0.998$) で，土壌中における大腸菌数を定量できることが実証された．

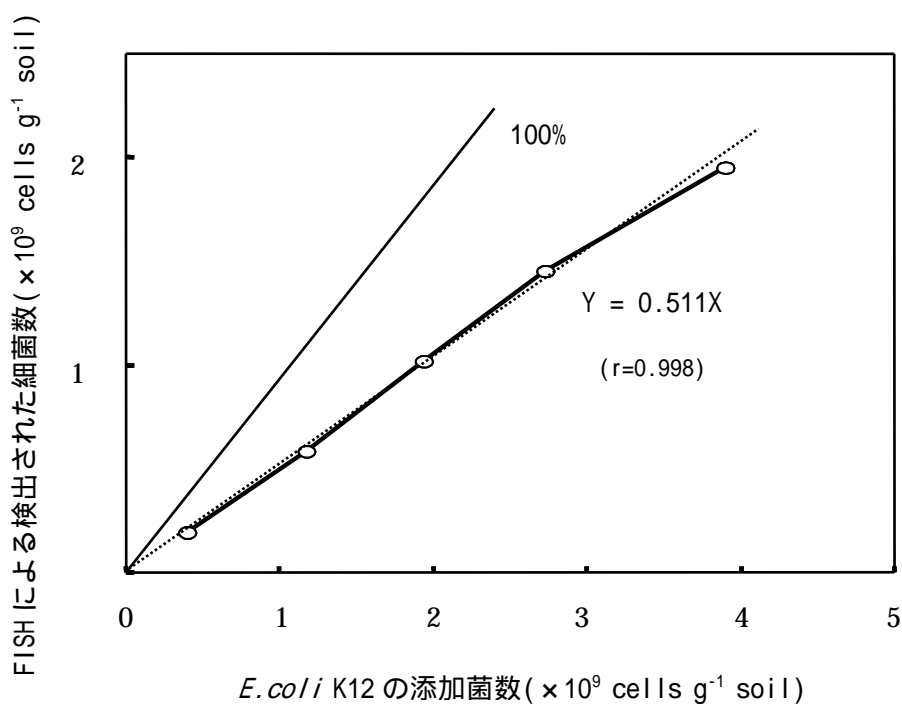


図 5-13 畑土壌に添加した *E. coli* K12 の回収率

以上の結果から、ES445プローブは大腸菌の特異的プローブとして信頼性が高く、土壌中の大腸菌をFISHにより特異的かつ定量的に検出できることが示された。この方法を活用して、土壌や堆肥における大腸菌を迅速かつ特異的に検出することができると期待される。特にこのFISHは全工程5時間で実施できるため、迅速性にも優れている。本研究は、土壌中の大腸菌に対してFISHを用いて検出した初めての成功例である。

4. 要約

自然界においては、生きているが培養できない (Viable but nonculturable, VNC) 状態にある細菌が大部分を占めている。したがって、環境試料中の病原菌を検出・定量するには、培養法では不十分である可能性が出てきた。一方、堆肥などの有機質資材を施用した土壌の生物的安全性 (バイオセーフティー) を高めるためには、大腸菌など外来性有害菌の土壌中における動態の解明が重要である。そこで本研究では、農業生態系におけるバイオセーフティーを評価する手法として、土壌中の大腸菌を FISH により高感度かつ迅速に検出する手法を検討し、以下の結果が得られた。

1) 文献またはインターネットから特異的な大腸菌プローブを検索した結果、10 種類の大腸菌プローブ候補が抽出され、それらを DDBJ による相同性検索および RDP による特異性確認について検討した結果から、ES445 プローブ (5'-CTT TAC TCC CTT CCT CCC-3') の特異性および感度は良く、これを用いた FISH により、信頼性が高いことが実証された。ES445 プローブは 7.5 ng/mL の濃度が至適濃度で、検出率が最も高く、95.5% に達した。

2) 11 種類の既知の細菌種を用いて、ES445 プローブの特異性を検討した結果、大腸菌株の検出率 85~100%、*Shigella* は 50~80%、*Salmonella* や *Serratia* など他の菌種では 0~10% であった。このように、ES445 プローブは大腸菌とその類縁菌である赤痢菌に対して特異性が高いことが実証された。

3) FISH は、土壌での成功例はほとんどない。これは、土壌有機物や粘土粒子による FISH 反応への妨害があるためと考えられる。この問題を解決するために、当研究室の超音波遠心洗浄法を導入して、土壌有機物や粘土粒子を除去することで、*E. coli* K12 の細胞は明瞭に観察され、ほぼ全ての細胞が ES445 プローブと反応し、検出感度が高まった。その結果、全菌数の回収率は 70.1% で、土壌に添加した大腸菌の回収率 63.9% を得た。

4) 畑土壌に添加した *E. coli* K12 の回収率は $3.9 \times 10^8 \sim 3.9 \times 10^9$ cells/g soil の範囲でほぼ一定 (51%) であり、直線回帰式 $Y = 0.511X$ が得られた。この結果から、土壌中の大腸菌を FISH により定量的に検出できることが実証された。

以上の結果から、ES445 プローブは大腸菌の特異的プローブとして信頼性が高く、土壌中の大腸菌を FISH により特異的かつ定量的に検出できることが示された。この方法を活用して、

土壌や堆肥における病原菌の迅速かつ特異的検出が可能となると考えられる。

第六章 総括

1. 研究の背景

化学肥料や農薬を利用する現代農業技術は、著しい生産性の向上をもたらした反面、資材の過剰投入による環境負荷を招いている。高品質で、しかも安全・安心な農作物を供給する有機農業への期待が消費者の間に高まっているなかで、堆肥の施用量が急速に増えている。一方、堆肥は、家畜糞や下水汚泥など、本来腸管系の病原菌が内在し得るものを原料としているので、衛生的管理が重要であると考えられる。近年の食生活スタイルの変化、健康・グルメ志向による野菜類の生食の増加が、新しい形の衛生リスクを増大させている。農産物の生産や流通、消費までの過程のどこかで、農産物がひとたび病原菌に汚染された場合、大きな食中毒事件に拡大するおそれがある。堆肥を施用した農場で生産された農産物が原因で、病原性の強い大腸菌 O157 による食中毒が発生したことが外国で報告されている。日本においては、1996 年に大阪堺市などで、患者数 10,000 人を超え、うち 8 人の死亡者を出した大腸菌 O157 による食中毒事件は、まだ記憶に新しいところである。このような背景から、堆肥や土壌の微生物的安全性の確保は、今後一層重要となるものと思われる。

そこで本研究ではまず、Ethidium bromide(EB)および 6-carboxymethylfluorescein diacetate (CFDA)蛍光染色法による細菌定量を行うことで、堆肥中の細菌群集の全体像を明らかにした。次いで、堆肥や土壌における大腸菌群など糞便指標菌について、選択分離培地を用いて追跡するとともに、堆肥の迅速安全化技術を開発した。さらに、Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) による大腸菌の新規検出・定量法を確立した、

2. 蛍光染色法及び培養法による各種堆肥中の細菌の定量に関する研究

九州等各地の堆肥化施設 17 ヶ所から採取した 21 点の堆肥製品試料中の各種の微生物数を蛍光染色法および培養法により測定し、堆肥中の細菌の測定に蛍光染色法が有効であるか検証するとともに、各種有機物分解菌数を平板培養法で測定し比較検討した。

1) これら堆肥の含水率は 13.0~58.3%で、pH は 6.3~9.4、EC は 3.0~13.4 mS cm⁻¹

の範囲にあり，CEC は $31.4 \sim 79.0 \text{ cmol}_c\text{kg}^{-1}$ の範囲にあった．炭素率は $7.6 \sim 20.9$ の範囲にあり，完熟堆肥の持つべき C/N 比の範囲にほぼ入っていた．

2) EB 蛍光染色法により，堆肥中の細菌が明瞭に観察でき，有機物との識別は容易であった．これを用いて定量した結果，全細菌数は $7.8 \times 10^9 \sim 9.3 \times 10^{10}$ (相乗平均 3.7×10^{10}) $\text{cells g}^{-1} \text{ dry matter}$ の範囲にあった．一方，CFDA 蛍光染色法では，有機物はほとんど染色されず，暗色の背景に生きた細菌が黄緑色の蛍光を発して明瞭に観察された．CFDA 蛍光染色法による全生細菌数は $1.4 \times 10^9 \sim 8.2 \times 10^{10}$ (相乗平均 1.2×10^{10}) $\text{cells g}^{-1} \text{ dry matter}$ で，生菌率 (全細菌数に対する全生細菌数の比) は平均 41.8% であった．

3) 希釈平板法による測定の結果，Nutrient broth (NB) 寒天培地による NB 細菌数は $4.6 \times 10^6 \sim 5.2 \times 10^9$ (相乗平均 4.6×10^8) $\text{cfu g}^{-1} \text{ dry matter}$ であった．これらの値は，百倍希釈 NB 寒天培地である DNB 細菌数より数倍～数百倍高く，堆肥の富栄養的環境を反映していると考えられた．コロニー形成率 (CFDA 蛍光染色法による全生細菌数に対する培養可能な細菌数の比) は平均 8.5% と低かった．このことは，堆肥中の細菌の約 9 割が，生きているが培養できない状態 (Viable but nonculturable, VNC) にあることを示しているとともに，堆肥中の培養できない細菌を観察・定量する目的に，蛍光染色法が有効であることを示唆していた．

4) 牛糞堆肥および生ゴミ堆肥には放線菌が $10^6 \sim 10^8 \text{ cfu g}^{-1} \text{ dry matter}$ 存在し，一方，鶏糞堆肥では $10^6 \text{ cfu g}^{-1} \text{ dry matter}$ 以下と少ない傾向が認められた．

5) 牛糞堆肥や生ゴミ堆肥には，セルロース分解菌やデンプン分解菌，油脂分解菌が $10^7 \sim 10^8 \text{ cfu g}^{-1} \text{ dry matter}$ 存在し，鶏糞堆肥や汚泥堆肥と比べて多い傾向が認められた．

6) 蛋白質分解菌数の測定には，カゼイン法では堆肥試料の測定に適さない場合があり，ゼラチン法により， $10^7 \sim 10^8 \text{ cfu g}^{-1} \text{ dry matter}$ の菌数が得られた．

以上の結果から，堆肥中の細菌の約 9 割が，生きているが培養できない (VNC) 状態にあることを示しているとともに，堆肥中の培養できない細菌を観察・定量する目的に，蛍光染色法が培養法よりも卓越していることを示唆した．同時に，放線菌およびセルロース分解菌，デンプン分解菌，油脂分解菌および蛋白質分解菌など有機物分解菌など，現在では蛍光染色法で定量できない微生物もあり，蛍光染色法と培養法とを補完的に使用すること

が必要と判断された。

3. 堆肥における大腸菌群等糞便汚染指標菌の生残性に関する研究

近年，*E. coli* 0157 など病原菌により汚染された生の果物や野菜を消費して起きた食中毒事件が内外で報告された。これまで，大腸菌について多くの研究があるが，それらのほとんどは土壌，水環境および廃棄物に絞られたもので，堆肥に関するものは少ないであった。本研究では，九州各地の堆肥化施設 23 ヶ所から，牛糞，鶏糞，生ゴミおよび下水汚泥を原料とした堆肥計 29 点を採取し，糞便汚染指標菌（大腸菌群，大腸菌及びサルモネラ菌）について培養検査した。

1) これらの堆肥の CEC は $31.4 \sim 79.0 \text{ c mol}_c \text{ kg}^{-1}$ の範囲（平均 $55.4 \text{ c mol}_c \text{ kg}^{-1}$ ）で，炭素率（C/N 比）は $7.6 \sim 25.4$ の範囲（平均 15.3%）にあり，ほぼ全て完熟堆肥であると判断された。

2) デスオキシコーレイト寒天培地により大腸菌群が 29 点中 11 点（37.9%）から検出され， $10^2 \sim 10^6 \text{ cfu g}^{-1} \text{ dry matter}$ の菌数レベルであった。大腸菌群陽性堆肥試料 4 点のうち 3 点からの分離株は，大腸菌群に属する *E. coli*，*E. vulneris*，*Pantoea* sp.，*Buttiauxella agrestis* と同定された。しかし，*Serratia marcescens* のみが分離された試料が 1 点，本菌と *E. coli* が分離された試料が 1 点あった。大腸菌群には属さない腸内細菌科の細菌である *S. marcescens* は赤色色素を生産するため，分離培地上で大腸菌群の赤いコロニーと誤認されたものと推察された。一方，得られた *E. coli* 5 株は，病原性大腸菌免疫血清試験で全て陰性であった。

3) 堆肥試料 12 点について，クロモカルト・コリフォーム培地による大腸菌の直接培養検査および MLCB 寒天培地によるサルモネラ菌の検出を試みた結果，大腸菌はいずれの試料からも検出されず，サルモネラ菌は 2 点（16.7%）から検出され，その菌数は $10^3 \text{ cfu g}^{-1} \text{ dry matter}$ のレベルにあった。

4) 堆肥原料（牛糞，鶏糞，生ゴミ等）8 点のうち大腸菌群およびサルモネラ菌がいずれも 6 点（75%）から，大腸菌が 5 点（63%）から検出され，菌数はいずれも $10^2 \sim 10^8 \text{ CFU g}^{-1} \text{ dry matter}$ であった。

5) 堆肥製造施設 6ヶ所における堆肥化過程での糞便汚染指標菌の消長を 7例について追跡した結果、糞便汚染指標菌が減少して製品中で消失する場合、いったん消失するが製品で再度検出される場合、全く消失しない場合、原料から製品まで検出されない場合の 4通りが観察された。発酵温度が高くてもサルモネラ菌などが生残する場合があります、その原因について、再増殖や交叉汚染の可能性を考察した。

6) *Escherichia coli* K12 および *Escherichia coli* 0157:H7 の臨床分離株を用いて、滅菌生理食塩水または滅菌堆肥中における熱抵抗性を実験的に検討した結果、60 の加熱処理における *E. coli* K12 (対数期後期) の D 値 (菌数が 90%減少するのに要する時間) は、生理食塩水中では 15 秒であったが、水分 40%の堆肥中では 110 秒と大きかった。一方、*E. coli* 0157 の D 値は、生理食塩水中では 17 秒で、水分 40%の堆肥中では 136 秒であった。さらに、定常期の菌体では D 値が大きくなり、水分 40%の堆肥中で 216 秒であった。

7) 得られた D 値に基づくと、60 の堆肥中で 10^8 CFU/g から 10^0 CFU/g に菌数が減少する時間は、*E. coli* K12 で 16.2 分、*E. coli* 0157 で 28.8 分と算定される。これらの値では、高温の堆肥から大腸菌群などが検出される理由が説明できない。したがって堆肥中の大腸菌の生残には、他にまだ重要な因子があるという可能性が考えられる。

以上の結果から、牛糞や生ゴミなど堆肥原料中には大腸菌群やサルモネラ菌が高濃度で存在するが、堆肥発酵過程でその大部分は死滅することが示唆された。しかし、これら病原指標菌が死滅していない堆肥製品も認められた。すなわち、病原菌は高温の堆肥化過程において、ある程度長時間生残できることが明らかになった。堆肥中での大腸菌の生残時間は、60 の高温下で 1 時間以内と実験的に確認された。これでは実際に高温の堆肥から大腸菌群などが検出される理由が説明できないため、堆肥の製造過程における温度管理や交叉汚染防止などの適切な衛生管理の重要性が指摘された。

4. 加熱処理による堆肥原料牛糞の微生物的安全化に関する研究

牛糞などの堆肥原料の中には、動物の腸管に由来する多種多様な病原菌が存在している。病原菌を完全に死滅させて、安全な堆肥を製造するために、容量 1 トンの無害化処理機に堆肥原料とする牛糞 300 kg を入れ、50~70 で加熱処理して短時間で微生物的安全化する

ための条件検討を行った。さらに、加熱処理後の牛糞中の病原性指標菌の再増殖試験，増菌培養による殺菌の確認を行った。また，加熱処理後の牛糞が十分な発酵能を有しているか検討した。

1) 含水率 82%および含水率 51%の牛糞試料いずれも，牛糞温度は当初の 34 から，6 時間後には 55 ，24 時間後には 66 に到達した。この条件で，大腸菌群や糞便性大腸菌群，大腸菌，サルモネラ菌など病原指標菌は当初 $10^5 \sim 10^6$ CFU/g dry matter であったものが，加熱処理 6 時間以降には不検出となった。含水率 82%の生牛糞の場合，大腸菌群およびサルモネラ菌は，6 時間処理後の増菌培養および再増殖試験でも不検出となった。しかし，含水率 51%の生牛糞の場合，サルモネラ菌が 6 時間処理後の増菌培養で検出された。さらに，24 時間加熱処理後の牛糞試料を増菌培養して，サルモネラ菌の測定を行ったが，この場合は検出されなかった。これらの結果から，本無害化装置により短時間で堆肥原料（牛糞）の病原菌を死滅させることができることが明らかになった。

2) 水分ポテンシャルが低い場合，同じ温度でも殺菌効果が低いことが知られている。加熱処理により牛糞中の指標性病原菌は 6 時間後にはいずれも希釈平板法での検出限界以下になったものの，試料 2（含水率 51%）の場合，6 時間加熱処理後の牛糞の試料から増菌培養でサルモネラ菌が検出され，試料 1（含水率 82%）の場合，6 時間加熱処理後の試料から増菌培養および再増殖試験により病原性指標菌がいずれも不検出になった。この結果により，牛糞含水率の低い場合は含水率の高い場合より殺菌効果が低いことが明らかになった。

3) 24 時間の加熱処理により全細菌数は 1/3 に低下し，生菌率（全細菌数に対する全生細菌数の比）は 21.6%から 1.6%に低下した。セルロース分解菌，油脂分解菌，デンプン分解菌および蛋白質分解菌は，当初 $10^7 \sim 10^9$ CFU/g dry matter であったが，処理後は 500 分の 1~4 分の 1 に大幅に減少した。しかし無害化牛糞を 30 で 1 週間静置することで，いずれの菌数もほぼ回復した。特に油脂分解菌および蛋白質分解菌では，生牛糞よりも 4.7 倍高い菌数となった。これらの結果により，牛糞原料の加熱処理により各種有機物分解菌は一旦減少するが，その後インキュベートすることにより，速やかに菌数は回復できるため，加熱処理が堆肥化微生物に与える影響はほとんどないことを明らかにした。

4) 無害化牛糞を九冲農研および宮農試にて堆肥化した。その全過程において大腸菌群等は全く検出されなかった。さらに、全細菌数や各種の有機物分解菌数は、無処理牛糞よりもむしろ高い傾向を示した。これは、無害化処理に伴う熱処理で死滅した細菌菌体が常在菌により再利用されたことによるプライミング効果と考えられ、初期発酵温度が無処理牛糞よりも高く推移する結果と合わせると、無害化処理により堆肥化が促進される効果があることを示している。

これらの結果から、55～65℃の加熱条件で6時間以上処理することで、牛糞を完全に無害化できることが明らかとなった。報告した結果より、病原菌を死滅させる期間が短くなるのは、加熱処理過程で投入した牛糞を攪拌棒で連続攪拌運転することで、温度が均一になり、滅菌が徹底されたためと推察される。牛糞の含水率が低い場合は、高い場合より殺菌効果が低いことが明らかになった。牛糞原料を加熱処理することで、各種有機物分解菌はいったん減少するが、その後のインキュベートにより菌数は回復できることが明らかとなり、加熱処理が堆肥化微生物に与える影響がほとんどないことを明かし、また、無害化処理により堆肥化が促進される効果があることを示唆した。

5. FISHによる土壌中における大腸菌の特異的検出に関する研究

従来、環境試料中の細菌フロアを解析する方法としては、培養法を用いてコロニーを形成させ、そこから多数の菌株を単離し同定する方法が一般的であった。しかし、自然界においては、大腸菌やコレラ菌などの病原菌が、生きているが培養できない(Viable but nonculturable, VNC)状態に陥ることが分かってきた(Xue et al, 1982)。近年、環境試料中に含まれる細菌を培養せずに定量し、その群集構造を遺伝子レベルで解析する方法として、蛍光染色法と微生物学的手法を合わせたFluorescence *in situ* Hybridization(FISH)が発達してきた。堆肥などの有機質資材を施用した土壌の生物的安全性(バイオセーフティー)を高めるためには、大腸菌など外来性有害菌の土壌中における動態の解明が重要である。そこで本研究では、農業生態系におけるバイオセーフティーを評価する手法として、土壌中の大腸菌をFISHにより高感度かつ迅速に検出する手法を検討した。

1) 大腸菌に特異的なプローブを文献またはインターネットから検索した結果、10種類

の大腸菌プローブ候補を得た。それらを DDBJ による相同性検索および RDP による特異性確認について検討した結果，ES445 プローブの特異性と感度は良く，信頼性が高いことが予想された。ES445 プローブの至適濃度は 7.5 ng/mL で，95.5%の検出率が得られることが明らかになった。

2) 11 種類の既知の細菌種を用いて，ES445 プローブの特異性を検討した結果，大腸菌株の検出率は 85～100%，*Shigella* は 50～80%，*Salmonella* や *Serratia* など他の菌種では 0～20%であった。このように ES445 プローブは，大腸菌とその類縁菌である赤痢菌に対して特異性が高いことが実証された。

3) FISH は土壌での成功例がほとんどない。これは，土壌有機物や粘土粒子による FISH 反応への妨害があるためと考えられる。この問題を解決するために，当研究室で開発した超音波遠心洗浄法を導入した。その結果，この手法により土壌有機物や粘土粒子を除去することで，土壌に添加した *E. coli* K12 の細胞は明瞭に観察され，ほぼ全ての細胞が ES445 プローブと反応した。このとき，全菌数の回収率は 70.1%で，添加した大腸菌の回収率は 63.9%であった。

4) 畑土壌に添加した *E. coli* K12 の回収率は， $3.9 \times 10^8 \sim 3.9 \times 10^9$ cells/g soil の範囲でほぼ一定 (51%) であり，直線回帰式 $Y = 0.511X$ が得られた。この結果から，土壌中の大腸菌を FISH により定量的に検出することが実証された。

以上の結果から，ES445プローブは大腸菌の特異的プローブとして信頼性が高く，土壌中の大腸菌を FISH により特異的かつ定量的に検出できることが示された。この方法を活用して，土壌や堆肥における病原菌の迅速かつ特異的検出が可能となると考えられる。特にプローブ ES445 による FISH は全工程 5 時間という短時間で実施できた。これは土壌中の大腸菌に対して FISH を用いて検出した初めての成功例である。

6. 研究結果の意義とその展望

本研究で，以下の成果が得られ，将来の研究の展望が開けた。

1) EB および CFDA 蛍光染色法により，堆肥中の細菌の大部分が「生きているが培養でき

ない（VNC）」状態にあることも明らかにした。これは、従来の培養法では堆肥中の微生物数を大幅に過小評価していたことを意味する。

2) FISHによる大腸菌の特異的かつ迅速な検出について検討し、土壌中の大腸菌を高感度かつ迅速に検出するFISHを確立した。

3) 有機廃棄物無害化処理堆肥原料である牛糞などの微生物的安全化処理の最適条件を明らかにした。本技術は特許申請され、堆肥製造においてバイオセーフティーを確保する新規技術として発展することが期待される。

4) 今後、本研究室で開発したFISHを用いることで、土壌モデル実験や農耕地現場において、培養法では検出困難なVNC状態に陥った大腸菌の検出について検討し、その適用性を評価することで、有機農業の普及に向けた農耕地土壌生態系での生物的安全性(バイオセーフティー) 評価法の基礎を構築できると期待される。

謝 辞

知らず知らずに 5 年の留学生活はまもなく終わります。本研究の遂行ならびに本論文の執筆にあたり、熱心なご指導、ご鞭撻を賜り、多大なご助言くださり、大変お世話になりました。主指導教官の佐賀大学農学部土壌環境学研究室の井上興一教授に心から厚く御礼申し上げます。また、貴重なコメント、ご配慮を賜りました佐賀大学農学部教授近藤栄造先生に深く御礼申し上げます。

ここで、衷心感激にあふれていることは、佐賀大学農学部土壌環境学研究室の助教授染谷 孝先生が私を引き受け、この良好な勉強の機会を賜ったことでもあります。加えて、指導教官として、学術的で広い視野から、博士論文のテーマの選定、研究計画、同行調査から学位論文をまとめるまでの全プロセスにおいて、始終一貫暖かいご指導、激励を賜りました。特に、修士論文や博士論文、学会発表、学会誌発表論文の作成にあたっては、お忙しいところ、先生は貴重な時間と精力を割いて私の原稿を一字一句直していただきました。私は常日頃先生のこのような熱心さと真面目さに感動させられています。先生への深い感謝の気持ちを表す言葉がうまく見つかりませんが、先生から教えていただいた学問に対する厳しい姿勢を持って、今後の研究に取り組んでいかなければならないと思っています。さらに、微生物学に関する基礎から応用に至るまで、幅広く懇篤なるご教示をいただくとともに、研究者としての鋭い研究力、考察力、真理を探求する姿勢の重要性を教示いただき、日常生活に関しても大変お世話していただきました。先生にご指導いただける機会を持ち得たのは、生涯の幸運であると思います。これら的大変貴重な経験を積んで視野を広めて思惟啓発することが今後の仕事に極めて大きな良い影響を与えてくれるに違いないと思います。心から深謝申し上げますとともに、これからも変わらずご指導とご鞭撻をお願いする次第であります。

本論文の審査に当たり、ご専門の立場からご丁寧にご校閲いただき、貴重なご意見を賜りました鹿児島大学農学部教授稲永醇二先生、宮崎大学農学部教授赤尾勝一郎先生および琉球大学農学部教授渡嘉敷義浩先生に心より厚く御礼申し上げます。

また、堆肥の安全化研究・実験の遂行上、多大なご協力と激励いただきました九州沖縄農業研究センター土壌微生物研究室の橋本知義室長、NPO 法人伊万里はちがめプランの福田俊明理事長、(有)玄甫興業の石橋洋佑取締役社長に感謝の意を表します。

さらに、本研究の遂行にあたっては、ご協力や暖かい励ましをいただきました森山典子氏を始め、王 暁丹氏、池田英彰氏、谷 梓氏など土壌環境学研究室の皆様にご心より感謝申し上げます。

そして、修士課程および博士課程の期間、様々な形で支えてくださった佐賀大学農学部のご先生方ならび鹿児島大学連合農学研究科の皆様にご感謝します。またご援助をいただきました文部科学省、財団法人飯島記念食品科学振興財団、佐賀県庁および佐賀県日中友好協会の皆様にご深く感謝の意を申し上げます。さらに、日本に滞在中、いろいろ便宜を図ってくださった全ての方々にご心から感謝の意を表します。

最後に、佐賀での 5 年間の留学生生活に対して、惜しみない援助と激励および心の支えを与えてくれました母親、兄弟たちに深く感謝申し上げます。特に愛している妻と子供にご感謝したいと思います。

引用文献

- 1) 秋庭正人・中澤宗生：牛における大腸菌 0157:H7 の保菌状況，感染症学誌，**72**，167-168 (1998)
- 2) Alwine, J. C., Kemp, D. J. and Stark, G. R.: Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **74**, 5350-5354 (1977)
- 3) Alwine, J. C., Reed, S. I. and Stark, G. R.: Characterization of the Autoregulation of Simian Virus 40 Gene A, *J Virol.*, **24**, 22-27 (1977)
- 4) Anderson, J. R. and Slinger, J. M.: Europium chelate and fluorescent brightener staining of soil propagules and their photomicrographic counting-1. methods. *Soil Biol.Biochem.*, **7**, 205-209 (1975)
- 5) 秋山隆史・佐藤弘泰・味埜 俊・松尾友矩：FISH 法を用いた下水処理場活性汚泥中の細菌群集構造解析，水環境学会誌，**23**，271-278 (2000)
- 6) Allerberger, F., Rossboth, D., Dierich, M. P., Aleksic, S., Schmidt, H. and Karch, H.: Prevalence and clinical manifestations of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Austrian children, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **15**, 545-550 (1996)
- 7) Amann, R. I., Krumholz, L. and Stahl, D. A.: Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology, *J. Bacteriol.*, **172**, 762-770 (1990)
- 8) Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K-H.: Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews.*, **59**, 143-169 (1995)
- 9) Amann, R., Stromley, J., Devereux, R., Key, R. and Stahl, D. A. : Molecular and Microscopic Identification of Sulfate-Reducing Bacteria in Multispecies Biofilms.

- Applied and Environmental Microbiology.*, **58**, 614-623 (1992)
- 10) Anon.: The Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food, *Report on verocytotoxin-producing Escherichia coli*, HMSO., London (1995)
- 11) Artolozaga, I., Ayo, B., Latatu, A., Azua, I., Unanue, M. and Iriberry, J.: Spatial distribution of protests in the presence of macroaggregates in a marine system, *FEMS Microbiology Ecology*, **33**, 191-196 (2000)
- 12) Babiuk L. A. and Paul E. A.: The use of fluorescein isothiocyanate in the determination of the bacterial glassland soil. *Can. J. Microbiol.*, **16**, 57-62 (1970)
- 13) Barker, J., Humphrey, T. J. and Brown, M. W. R.: Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in a soil protozoan: Implications for disease. *FEMS Microbiology Letter*, **173**, 291-295 (1999)
- 14) Bertoldi, M. D., Citerinesi, U. and Griselli, M.: Bulking agents in sludge composting, *Compost Science/Land Utilization*, **41**,32-35 (1980)
- 15) Besser, R. E., Lett, S. M., Weber, J. T., Doyle, T. J., Wells, J. G. and Griffin, P. M.: An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *JAMA.*, **269**, 2217-2220 (1993)
- 16) Betoldi, M., Zucconi, F. and Civilini, M.: Temperature, pathogen control and product quality. *Biocycle*, **29**, 43-50 (1988)
- 17) Beuchat, L. R. and Ryu, J-H.: Produce handling and processing practices. *Emerging Infection Diseases*, **3**, 459-465 (1997)
- 18) Blackburn, C. W., Curtis, L. M., Humpheson, L., Billon, C. and McClure, P. J.: Development of thermal inactivation models for *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors. *Internation Journal of Folly Microbiology*, **38**, 31-44 (1997)
- 19) Bouvier, T. and Del Giorgio, P. A.: Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): a quantitative review of published reports, *FEMS Microbiology Ecology*, **44**, 3-15 (2003)

- 20) Braun-Howland, E. B., Danielsen, S. A. and Nierzwichi-Bauer, S. A.: Development of a rapid method for detecting bacterial cells in *situ* using 16S rRNA-Targeted probes, *BioTechniques*, **13** (6), 928-932 (1992)
- 21) Braun-Howland, E. B., Vescio, P. A. and Nierzwichi-Bauer, S. A.: Use of a simplified cell blot technique and 16S rRNA-directed probes for identification of common environmental isolates, *Applied and Environmental Microbiology*, **59** (10), 3219-3224 (1993)
- 22) Brenner, D. J., McWhorter, A. C., Knutson, J. K. L. and Steigerwalt, A. G.: *Escherichia vulneris*: a new species of enterobacteriaceae associated with human wounds, *Journal of Clinical Microbiology*, **15** (6), 1133-1140 (1982)
- 23) Bruns, A. and Berthe-Corti, L.: In situ detection of bacteria in continuous-flow cultures of seawater sediment suspensions with fluorescently labeled rRNA-directed oligonucleotide probes, *Microbiology*, **144**, 2783-2790 (1988)
- 24) Burke, K. T., Carle, G. F. and Olson, M. V.: Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors, *Science*, **236**, 806-812 (1987)
- 25) CFR-Title 40 Code of Federal Regulation: Standards for the use or disposal of sewage sludge., Washington D. C (1998)
- 26) Chang, Y.: The fungi of wheat straw II. Biochemical and physiological studies, *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **50** (4), 667-677 (1967)
- 27) Chang, Y. and Hudson, H. J.: The fungi of wheat straw compost. I. Ecological studies, *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **50** (4), 649-666 (1967)
- 28) Chapman, P. A., Siddons, C. A., Wright, D. J., Norman, P., Fox, J. and Crick, E.: Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection in man. *Epidemiol Infect.*, **111**, 439-447 (1993)
- 29) Chapman, P. A. and Ackroyd, H. J.: Farmed deer as a potential source of verocytotoxigenic-producing *Escherichia coli* O157. *The Veterinary Record*, **20**,

引用文献

- 314-315 (1997)
- 30) Chapman, P. A., Siddons, C. A., Gardan, A. T. and Harkin, M. A.: A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiol Infect.*, **119**, 245-250 (1997a)
- 31) Chapman, P. A., Siddons, C. A., Manning, J. and Cheetham, C.: An outbreak of infection due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in four families: the influence of laboratory methods on the outcome of the investigation. *Epidemiol Infect.*, **119**, 113-119 (1997b)
- 32) Chapman, P. A.: Sources of *Escherichia coli* O157 and experiences over the past 15 years in Sheffield. *UK. J Appl Microbiol.*, **88**, 51S-60S (2000)
- 33) Chino, M., Kanazawa, S., Mori, T., Araragi, M. and Kanke, B.: Biochemical studies on composting of municipal sewage sludge mixed with rice hull, *Soil Sci. Plant Nutr.*, **29** (2), 159-173 (1983)
- 34) 茅野充男: 生物系廃棄物リサイクルの現状と課題, 畜産環境情報, **9**, 2-8 (2000)
- 35) Christensen, H., Hansen, M. and Sorensen, J.: Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence *in situ* hybridization with a rRNA oligonucleotide probe, *Applied and Environmental Microbiology*, **65**(4), 1753-1761 (1999)
- 36) Cieslak, P. R., Barrett, T. J., Griffin, P. M., Gensheimer, K. F., Beckett, G., Buffington, J. and Smith, M. G.: *Escherichia coli* O157:H7 infection from a manured garden. *The Lancet*, **342**, 367 (1993)
- 37) Cizek, A., Alexa, P., Literak, I., Hamirik, J., Novak, P. and Smola, J.: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle and Norwegian rats from a large-scale farm. *Lett Appl Microbiol.*, **28**, 435-439 (1999)
- 38) Clowell, R. R., Brayton, P. R., Grimes, D. J., Roszak, D. B., Huq, A. and Palmer, L. M.: Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: Implications for release of genetically engineered microorganisms,

- Bio/Technology*, **3**, 817-820 (1985)
- 39) Coia, J. E.: Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **20**, 1-9 (1998)
- 40) Cohen, S., Chang, A., Boyer, H. and Helling, R.: Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*, *Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America*, **70**, 3240-3244 (1973)
- 41) Crawford, D. L.: Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains, *Applied Environ. Microbiol.*, **35** (6), 1041-1045 (1978)
- 42) Danna, K. and Nathans, D.: Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Haemophilus influenzae*, *Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America*, **68**, 2913-2917 (1971)
- 43) De Bertoldi, M., Citernes, U. and Griselli, M.: Bulking agents in sludge composting. *BioCycle*, **21**, 32-41 (1980)
- 44) Dell' Omo, G., Marabito, S. and Quondam, R.: Feral pigeons as a source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *The Veterinary Record*, **21**, 309-310 (1998)
- 45) DeLong, E. F., Taylor, L. T., Marsh, T. L. and Preston, C. M.: Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent *in situ* hybridization, *Applied and Environmental Microbiology*, **65** (12), 5554-5563 (1999)
- 46) Deportes, I., Benoit-Guyod, J-L. and Zmirou, D.: Hazard to man and the environment posed by the use of urban waste compost: a review. *The Science of the Total Environment*, **172**, 197-222 (1995)
- 47) Deportes, I., Benoit-Guyod, J-L. Zmirou and M. C. Bouvier.: Microbial disinfection capacity of municipal solid waste (MSW) composting, *J. Applied Microbiology.*, **85**, 238-246 (1998)
- 48) Devereux, R., Kane, M. D., Winfrey, J. and Stahl, D. A.: Genus- and group-specific

引用文献

- hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria, *System. Appl. Microbiol.*, **15**, 601-609 (1992)
- 49) Diaz-Ravina, M., Acea, M. J. and Carballas, T.: Microbiological characterization of four composted urban refuses. *Biological Wastes*, **30**, 89-100 (1989)
- 50) 土壤微生物研究会：新編土壤微生物実験法，養賢堂，東京（1992）
- 51) 土壤標準分析・測定法委員会編：土壤標準分析・測定法，博友社，東京（1986）
- 52) 土戸哲明：加熱殺菌において発生する損傷菌とその生理学，*防菌防黴*，**30**，105-110（2002）
- 53) Droffner, M. L. and Brinton, W. F.: Survival of *E. coli* and *salmonella* populations in aerobic thermophilic composts as measured with DNA gene probes. *Zbl. Hyg.*, **197**, 387-397 (1995)
- 54) Droffner, M. L. and Yamamoto, N.: Prolonged environmental stress via a two step process selects mutants of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas* that grow at 54°C. *Arch. Microbiol.*, **156**, 307-311 (1991a)
- 55) Droffner, M. L. and Yamamoto, N.: Procedure for isolation of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas* mutants capable of growth at the refractory temperature of 54°C. *J. Microbiol. Methods.*, **14**, 201-206 (1991b)
- 56) Egan, S., James, S., Holmstrom, C. and Kjelleberg, S.: Inhibition of algal spore germination by the marine bacterium *pseudoalteromonas tunicata*, *FEMS Microbiology Ecology*, **35**, 67-73 (2001)
- 57) Epstein, E.: Pathogens. In: *The Science of Composting.*, pp.53-76, Technomic Pub., Pennsylvania, U.S.A. (1997)
- 58) Fabien, J. and Ebaron, L. P.: Ecological implications of an improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3643-3647 (1997)
- 59) Finelli, L., Crayne, E., Pilot, K. and Spitalny, K. C.: Enhanced detection of sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infections-New Jersey 1994. *MMWR.*, **44**, 417-418 (1995)

- 60) Finney, M., Smullen, J., Foster, H. A., Brokx, S. and Storey, D. M.: Evaluation of chromocult coliform agar for the detection and enumeration of enterobacteriaceae for faecal samples from healthy subjects, *Journal of Microbiological Methods*, **54**, 353-358 (2003)
- 61) Finstein, M. S. and Morris, M. L.: Microbiology of municipal solid waste composting; In *Advances in Applied Microbiology.*, ed. D.Perlman, Academic Press, New York, 113-151 (1975)
- 62) Forsyth, W. G. C. and Webley, D. M.: The microbiology of composting II-A study of the aerobic thermophilic bacterial flora developing in grass composts, *Proc. Soc. Appl. Bact.* 34-39 (1948)
- 63) Frampton, E. W., Restaino, L. and Blaszkowski, L.: Evaluation of β -glucuronidase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indol- β -D-glucuronide (X-GLUC) in a 24 hour direct plating method for *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, **51**, 402-404 (1988)
- 64) Franks, A. H., Harmsen, H. J., Raangs, G. C., Jansen, G. J., Schut, F. and Welling, G.W.: Variation of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3336-3345 (1998)
- 65) Friedrich, U., Maismith, M. M., Altendorf, K. and Lipski, A.: Community analysis of biofilters using fluorescence *in situ* hybridization including a new probe for the xanthomonas branch of the class proteobacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, **65**(8), 3547-3554 (1999)
- 66) Fuchs, B. M., Glockner, F. O., Wulf, J. and Amann, R.: Unlabeled helper oligonucleotides increase the *in situ* accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes, *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (8), 3603-3607 (2000)
- 67) Fuchs, B. M., Wallner, G., Beisker, W., Schwippl, I., Ludwig, W. and Amann, R.: Flow cytometric analysis of the *in situ* accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA

引用文献

- for fluorescently labeled oligonucleotide probes, *Applied and Environmental Microbiology*, **64** (12), 4973-4982 (1998)
- 68) Fujio, Y. and Kume, S.: Isolation and identification of thermophilic bacteria from sewage sludge compost, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **72** (5), 334-337 (1991)
- 69) Gagliardi, J. V. and Karns, J. S.: Leaching of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse soils under various agricultural management practices. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 877-883 (2000)
- 70) Gagliardi, J. V. and Karns, J. S.: Leaching of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse soils under various agricultural management practices, *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (3), 877-883 (2000)
- 71) Garber, L., Wells, S., Schroeder-Tucker, L. and Ferris, K.: Factors associated *Escherichia coli* O157 on dairy farms. *J. Food Prot.*, **62**, 307-312 (1999)
- 72) Geissier, K., Manafi, M., Amoros, I. and Alonso, J. L.: Quantitative determination of total coliforms and *Escherichia coli* in marine waters with chromogenic and fluorogenic media, *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 280-285 (2000)
- 73) Glazer, A. N., Peck, K. and Mathies, R. A.: A stable double-stranded DNA-ethidium homodimer complex: Application to pictogram fluorescence detection of DNA in agarose gels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 3851-3855 (1990)
- 74) Glockner, F. O., Fuchs, B. M. and Amann, R.: Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization, *Applied and Environmental Microbiology*, **65** (8), 3721-3726 (1999)
- 75) Gong, C. M., Inoue, K., Inanaga, S. and Someya, T.: Survival of pathogenic bacteria in compost with special reference to *Escherichia coli*. *Journal of Environmental Sciences.*, **17**, (2005) (in Press)
- 76) Gong, C. M., Wang, X., Ikeda, H., Inoue, K. and Someya, T.: Rapid and specific

- detection of *Escherichia coli* in soil by fluorescence *in situ* hybridization, *Proceedings of International Symposium on Identification and Use of Microbial Resources for Sustainable Agriculture*, Kumamoto, 64-65 (2004)
- 77) 糞 春明：堆肥中の大腸菌など病原微生物の動態に関する研究．修士論文，2002
- 78) 糞 春明・池田英彰・王 曉丹・井上興一・染谷 孝：FISH による土壌中における大腸菌の特異的検出，2004 年度日本土壌肥料学会大会，福岡(2004)
- 79) 糞 春明・井上興一・染谷 孝：FISH による土壌の大腸菌の高感度特異的検出，2005 年度日本土壌肥料学会九州支部会，佐賀(2005)
- 80) 糞 春明・顧 衛兵・伊地知武郎・井上興一・染谷 孝：高温処理による堆肥原料の微生物的無害化処理，2003 年度日本微生物生態学会，大阪(2003)
- 81) 糞 春明・越田淳一・井上興一・染谷 孝：蛍光染色法及び培養法による各種堆肥中の細菌の定量．土肥誌，**76**(4)，401-410(2005)
- 82) 糞 春明・越田淳一・森山典子・王 曉丹・井上興一・染谷 孝・有働武三：各種堆肥中における大腸菌群等の生残．土肥誌，**76**(6)，(2005) 印刷中
- 83) 糞 春明・染谷 孝：堆肥中における大腸菌の熱抵抗性，2002 年度日本土壌微生物学会大会，塩原(2002)
- 84) 糞 春明・野下美由紀・染谷 孝：西日本から採取した各種コンポスト中の病原性指標菌について，2001 年度日本土壌肥料学会九州支部会，佐賀(2001)
- 85) 後藤茂子・林 浩昭・山岸順子・米山忠克・茅野充男：下水汚泥コンポストの長期連用に伴う重金属の土壌への蓄積と水平方向の移行，土肥誌，**73**，391-396(2002)
- 86) Gray, K. R., Sherman, K. and Biddlestone, A. J.: A review of composting-part 1. *Process Biochemistry*, **6**, 32-36 (1971)
- 87) Greenberg, A. E., T. B. Shastid and W. M. Ellgas.: Quantity control monitoring, *Biocycle*, **27**, 36-38 (1986)
- 88) Grimes, D. J. and Colwell, R. R.: Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semitropical ocean water, *FEMS Microbiology Letters*, **34** (2), 161-165 (1986)

- 89) 羽生宜弘・芳川恵一・伊東光・吉沢直樹：石灰窒素添加による牛糞堆肥中の大腸菌群の抑制（予報），長野県畜産技術研究発表集，**47**，7-13（1997）
- 90) 羽賀清典：畜産廃棄物，有機廃棄物資源化大事典，有機質資源化推進会議編，p.335-337，農文協，東京（1997）
- 91) Hahn, D., Amann, R. I., Ludwig, W., Akkermans, A. D. L. and Schleifer K-H.: Detection of micro-organisms in soil after *in situ* hybridization with rRNA-targeted, fluorescently labeled oligonucleotides, *Journal of General Microbiology*, **138**, 879-887 (1992)
- 92) Hancock, D. D., Besser, T. E., Kinsel, M. L. Tarr, P. I., Rice, D. H. and Paros, M. G.: The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. *Epidemiol Infect.*, **113**, 199-207 (1994)
- 93) Hankin, L., Poincelot, R. P. and Anagnostakis, S. L.: Microorganisms from composting leaves: ability to produce extracellular degradative enzymes. *Microbial Ecol.*, **2**, 296-308 (1976)
- 94) Hankin, L., Sands, D. C. and Hill, D. E.: Relation of land use to some degradative enzymatic activities of soil bacteria. *Soil Science*, **118**, 38-44 (1974)
- 95) 原 正之・石川裕一・小畑 仁：豚ふんペレット堆肥の畑土壌における肥料成分の溶出特性，土肥誌，**74**，453-458(2003)
- 96) Harada, Y. and Inoko, A.: The measurement of the cation-exchange capacity of composts for the estimation of the degree of maturity. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **26**, 127-134 (1980)
- 97) 原田靖生：家畜排泄物及び処理物の特性，畜産の研究，**44**，128-134（1990）
- 98) 春田 伸：生ゴミ分解過程の微生物群集の解析，環境技術，**31**，698-700（2002）
- 99) Hasebe, A., Kanazawa, S. and Takai, Y.: Microbial biomass in paddy soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **30** (2), 175-187 (1984)
- 100) Hassen, A., Belguith, K., Jedidi, N., Cherif, A., Cherif, M. and Boudabous, A.: Microbial characterization during composting of municipal solid waste,

- Bioresource Technology*, **80**, 217-225 (2001)
- 101) 早津雅仁: 土壤微生物と物質循環 2. 硝酸性窒素の動態・処理と土壤微生物, 日本土壤肥料学雑誌, **73**, 323-329 (2002)
- 102) Himathongkham, S., Bahari, S., Riemann, H. and Cliver, D.: Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in cow manure and cow manure slurry, *FEMS Microbiology Letters*, **178**, 251-257 (1999)
- 103) 平石 明: しまみづ *Eisenia fetida* を利用した家庭生ゴミ処理 減量能力の評価および微生物群集の解析, 生物工学会誌, **80**, 283-290(2002)
- 104) 藤原俊六郎: 有機物の腐熟度判定法, 有機廃棄物資源化大事典, 有機質資源化推進会議編, 41-50, 農文協, 東京 (1997)
- 105) Hobbie, J. E., Daley, R. J. and Jasper, S.: Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 1225-1228 (1977)
- 106) 本多勝男: 家畜糞の堆肥化処理ハウス, 畜産の研究, **53**, 193-198 (1999)
- 107) Iandolo, J. J. and Ordal, Z. J.: Repair of thermal injury of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, **91**, 134-142 (1966)
- 108) 伊吹俊彦・畠中哲也・斉藤雅典・佐々木泰弘・蔡 義民: 天井クレーン型堆肥自動切り返し装置及び戻し堆肥利用を特徴とする堆肥化施設の性能, 農林水産省草地試験場草地試料研究成果最新情報, **11**, 105-106 (1996)
- 109) 池田英彰・井上興一・染谷 孝: FISH、DGGE 法のため土壌からの細菌細胞の物理的分画法の検討, 2004 年度日本土壤肥料学会大会, 福岡(2004)
- 110) 今西 規・宮崎 智: 既知の配列と比較する: 相同性検索, あなたにも役立つバイオインフォマティクス, 共立出版, 13-21(2002)
- 111) 井上雄三: 有機性廃棄物のコンポストの現状と課題, 環境技術, **29**, 2-13 (2000)
- 112) 磯部 等・関本 均: 堆肥化に伴う豚ふん中の銅及び亜鉛の化学形態変化と植物吸収移行性, 土肥誌, **70**, 45~50 (2003)
- 113) 一色賢司: 生食される野菜・果物の衛生管理の考え方, 防菌防黴, **31**, 13-18 (2003)

引用文献

- 114) Itoh, Y., Sugita-Konishi, Y., Kasuga, F., Iwaki, M., Hara-Kudo, Y., Saito, N., Noguchi, Y., Konuma, H. and Kumagai, S.: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 1532-1535 (1998)
- 115) Jackson, D., Symons, R. and Berg, P.: Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: Circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*, *Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America*, **69**, 2904-2909 (1972)
- 116) Janshekar, H. and Fiechter, A.: On bacterial degradation of lignin, *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 47-50 (1982)
- 117) Jarnagin, J. L. and Luchsinger, D. W.: The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of mycobacterial. *Stain Technology.*, **55** (4), 253-258 (1980)
- 118) Jefferies, T. W.: Physical, chemical and biochemical considerations in the biological degradation of wood, In J. F. Kennedy Et al. (ed). *Wood and Cellulosic: Industrial Utilization, Biotechnology, Structure and Properties*, Ellis Horwood Led., West Sussex, England, 213-230 (1987)
- 119) Johnen, B. G.: Rhizosphere microorganisms and roots stained with europium chelate and fluorescent brightener. *Soil Biol. Biochem.*, **10**, 495-502 (1978)
- 120) Jones, P. C. T. and Mollison, J. E.: A technique for the quantitative estimation of soil microorganisms. *J. Gen. Microbiol.*, **2**, 54-69 (1948)
- 121) Jurtshuk, R. J., Blick, M., Bresser, J., Fox, G. E. and Jurtshuk J. R. P.: Rapid *in situ* hybridization technique using 16S rRNA segments for detecting and differentiating the closely related gram-positive organisms *Bacillus polymyxa* and *Bacillus macerans*, *Applied and Environmental Microbiology*, **58**(8), 2571-2578 (1992)

- 122) 神奈川県：食品衛生規範等の指導基準値，
<http://www1.ocn.ne.jp/~egg-true/topic12.htm> (2005)
- 123) 金澤晋二郎：肥効の高い堆厩肥の製造と新しい腐熟検定法，土と微生物，**56**，45-54
(2002)
- 124) 金子賢一：生食用野菜及び果物が媒介食品となる感染症，食衛誌，**40**，417-425
(1999)
- 125) Katayama, A., Kai, K. and Fukie, K.: Extraction efficiency, size distribution, colony formation and [³H]-Thymidine incorporation of bacteria directly extracted from soil, *Soil Sci. Plant Nutr.*, **44** (2), 245-252 (1998)
- 126) Keene, W. E., Sazie, E., Kok, J., Rice, D. H., Hancock, D. D., Balan, V. K., Zhao, T. and Doyle, M. P.: An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. *JAMA.*, **277**, 1229-1231 (1997)
- 127) Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Prapagdee, B. and Nikami, E.: Bacterial community composition and activity in urban rivers in Thailand and Malaysia, *Journal of Health Science*, **47** (4), 353-361 (2001)
- 128) Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Tani, K. and Nasu, M.: rRNA-targeted fluorescent *in situ* hybridization analysis of bacterial community structure in river water, *Microbiology*, **144**, 2085-2093 (1998)
- 129) 顧 衛兵・糞 春明・伊地知武郎・井上興一・染谷 孝：高温処理機による堆肥原料牛糞の微生物的安全化，2003 年度日本土壤肥料学会九州支部会，宮崎 (2003)
- 130) Kogure, K., Shimidu, U. and Taga, N.: An improved direct count method for aquatic bacteria. *Archiv. Hydrobiol.*, **102**, 117-122 (1984)
- 131) Kogure, K., Simidu, U. and Taga, N.: A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **25**, 415-420 (1979)
- 132) 厚生労働省：腸管出血性大腸菌 O157 による食中毒の発生状況，食中毒・食品監視関連情報，<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/jokyo/O157.html> (2005)
- 133) 厚生労働省：水質基準に関する省令，水道法関連法規等，

- <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/hourei/suidouhou/> (2005)
- 134) 国立感染症研究所感染症情報センター：腸管出血性大腸菌 (EHEC/VTEC/STEC), 病原微生物検出情報, <http://idsc.nih.go.jp/iasr/prompt/graph/vt9j.gif> (2005)
- 135) 木暮一啓：培養不能細菌 VNC 研究の現状と課題, 月刊海洋, 号外, **33**, 187 (2003)
- 136) 木暮一啓・池本栄子：腸管出血性大腸菌 0157 の天然河川中の常在性, 日本細菌学雑誌, **52**, 601-607 (1997)
- 137) 木嶋伸行・木村 武・山崎浩道・菊池 直：土壌における *E. coli* 0157 の挙動, 日本土壌微生物学会講演要旨集, 26 (2000)
- 138) Kolattulady, P. E.: Biosynthesis of surface lipids, *Science*, **159**, 498-505 (1968)
- 139) 小沼博隆：野菜における微生物汚染状況とその対策, 日本食品微生物学会雑誌, **17**, 37-41 (2000)
- 140) Kourkia, P. E., Mylonakis, T. and Flanigan.: Enterohemorrhagic *E. coli* 0157:H7 an emerging pathogen, *Family Physician.*, **56**, 853-856 (1997)
- 141) コーワン, S.T.: 医学細菌同定の手引き, 坂崎利一 訳, 近代出版, 東京, 335 (1979)
- 142) Krueger, R. G., Gillham, N. W. and Coggin, J. H.: *Introduction to Microbiology*, The Macmillan Co., New York, 1973
- 143) Kudva, I. T., Blanch, K. and Hovde, C. J.: Analysis of *Escherichia coli* 0157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 3166-3174 (1998)
- 144) Kudva, I. T., Hatfield, P. G. and Hovde, C. J.: Characterization of *Escherichia coli* 0157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* serotypes isolated from sheep. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 892-899 (1997)
- 145) 草野：呼吸活性を持つ環境細菌の CTC 法による検出・定量法の開発, 佐賀大学農学部 1999 年度卒業論文 (2000)
- 146) Li, S., Spear, R. N. and Andrews, J. H.: Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of *aureobasidium pullulans* on microscope slides and leaf surfaces, *Applied and Environmental Microbiology*, **63** (8), 3261-3267 (1997)

- 147) Linn, S. and Arber, W.: Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*, X. *In vitro* restriction of phage fd replicative form, *Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America*, **59**, 1300-1306 (1968)
- 148) Little, C., Roberts, D., Youngs, E. and Louvois, J. D.: Microbiological quality of retail imported unprepared whole lettuces: a PHLS food working group study. *Journal of Food Protection*, **62**, 325-328 (1999)
- 149) Liu, W. T., Mirzabekov, A. D. and Stahl, D. A.: Optimization of an oligonucleotide microchip for microbial identification studies: a non-equilibrium dissociation approach, *Environmental Microbiology*, **3** (10), 619-629 (2001)
- 150) Loy, A., Horn, M. and Wagner, M.: Probebase: an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes, *Nucleic Acids Research*, **31**(1), 514-516 (2003)
- 151) Lundgren, B.: Fluorescein diacetate as a stain of metabolically active bacteria in soil. *Oikos.*, **36**, 17-22 (1981)
- 152) Lung, A. J., Lin, C. M., Kim, J. M., Marshall, M. R., Nordstedt, R., Thompson, N. P. and Wei, C. I.: Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Enteritidis in cow manure composting. *Journal of Food Protection*, **64**, 1309-1314 (2001)
- 153) 前原隆史・長友 誠・清本なぎさ・別府誠二：家畜ふん堆肥を用いた促成インゲンマメのリン，カリ無化学肥料栽培，土肥誌，**74**，515-518 (2003)
- 154) Manaz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. and Schleifer, K-H.: Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.*, **15**, 593-600 (1992)
- 155) Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. and Schleifer, K-H: Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions, *System. Appl. Microbiol.*, **15**, 593-600 (1992)
- 156) Marsh, P. B. and Simpson, M. E.: The Limiting Effects of Temperature and Moisture on the Growth of Fungi and Bacteria, Unpublished report, *USDA. Agr. Res. Serv.*,

引用文献

- Beltsville*, MD (1976)
- 157) Martley, F. G., Jayashankar, S. R. and Lawrence, R. C.: An improved agar medium for the detection of proteolytic organisms in total bacterial counts. *J. appl. bact.*, **33**, 363-370 (1970)
- 158) 松坂泰明・栗原 淳：土壤・植物栄養・環境事典，78-79，博友社，東京（1994）
- 159) Maule, A.: Survival of the verotoxingenic strain *E.coli* 0157:H7 in laboratory-scale microcosms, *Coliforms and Escherichia coli-problems or Solutions?* (Ed. Kay, D. and Frickler, C), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 61-65
- 160) Maule, A.: Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* 0157 in soil, water and on surfaces. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, **88**, 71S-78S (2000)
- 161) Maxam, A. M. and Gilbert, W.: A new method of sequencing DNA, *Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**, 560-564 (1977)
- 162) McDougald, D., Rice, S. A., Weichart, D. and Kjelleberg, S.: Nonculturability.: adaptation or debilitation?, *FEMS Microbiology Ecology*, **25**,1-9 (1998)
- 163) McKinley, V. L., Vestal J. R. and Eralp, A. E.: Research shows effects of physical and chemical factors on microbial communities and active during the composting of municipal sewage sludge, *BioCycle*, 39-43 (1985)
- 164) Meier, H., Amann, R., Ludwig, W., and Schleifer, K-H.: Specific oligonucleotide probes for *in situ* detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G+C content, *Systematic and Applied Microbiology*, **22**, 186-196 (1999)
- 165) Meselson, M. and Yuan, R.: DNA restriction enzyme from *E.coli*, *Nature*, **217**, 1110-1114 (1968)
- 166) Michino, H., Ariki, K., Minami, S., Takaya, S., Sakai, N., Miyazaki, M., Ono, A. and Yanagawa, H.: Massive outbreak of *Escherichia coli* 0157:H7 infection in schoolchildren in Sakai city, Japan, associated with consumption of white radish

- sprouts. *Am. J. Epidemiol.*, **150**, 787-796 (1999)
- 167) Mochizuki, M. and Hattori, T.: Kinetics of microcolony formation of a soil oligotrophic bacterium, *Agromonas* sp. *FEMS Microbiology Ecology*, **38**, 51-55 (1986)
- 168) Morgan, G. M., Newman, C. and Palmer, S. R.: First recognized community outbreak of haemorrhagic colitis due to verotoxin producing *Escherichia coli* O157:H7 in the UK. *Epidemiol Infect.*, **101**, 83-91 (1988)
- 169) 森地敏樹：食品中の損傷菌の特徴と検出，*海洋*，**33**，56-64 (2003)
- 170) 森 達摩：高温発酵処理による家畜糞中の大腸菌の消長，*防菌防黴*，**31**，85-89 (2003)
- 171) 森山典子・糞 春明・井上興一・橋本知義・染谷 孝：Direct *in situ* PCR 法による土壌における脱窒菌の高感度迅速検出法の開発，2005 年度日本土壌肥料学会九州支部会，佐賀 (2005)
- 172) Mote, C. R., Emerton, B. L., Sallison, J., Dowlen, H. H. and Oliver, S. P.: Survival of coliform bacteria in static compost piles of dairy waste solids intended for free stall bedding, *J. Dairy Sci.*, **71**, 1676-1681 (1988).
- 173) Mudaly, D. D., Atkinson, B. W. and Bux, F.: 16s rRNA *in situ* probing for the determination of the family level community structure implicated in enhanced biological nutrient removal, *Water Science and Technology*, **43** (1), 91-98 (2001)
- 174) Mullis, K. and Faloona, F.: Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction, *Methods in Enzymology*, **55**, 335-350 (1987)
- 175) Nakai, Y.: Animal waste management and microorganisms. *Anim. Sci. J.*, **72**, 1-13 (2001)
- 176) 中川英明：土壌中の生きた細菌を検出する CFDA 蛍光染色法の改良，佐賀大学大学院 1995 年度修士論文 (1996)
- 177) 中村寛治・渋谷勝利・岡村和夫：バイオレメディエーションにおける微生物の利用およびその検出 我が国における実証試験を例に，*土と微生物*，**56**，37-44(2002)
- 178) 中村洋子：浄化槽微生物群集の呼吸活性および群集構造解析に関する研究，佐賀大学農学部 2001 年度卒業論文 (2002)

- 179) 中野明正・上原洋一・山内 章：堆肥施用がトマトの収量，糖度，無機成分及び ^{15}N 値に与える影響，土肥誌，**74**，737-742(2003)
- 180) Nakasaki, K., Watanabe, A., Kitano, M. and Kubota, H.: Effect of seeding on thermophilic composting of tofu refuse. *J. Environ. Qual.*, **21**, 715-719 (1992)
- 181) 中澤宗生：牛の腸管出血性大腸菌 0157 に関する細菌の研究動向，防菌防黴，**29**，697-705 (2001)
- 182) 中津智史・東田修司・山神正弘：淡色黒ボク土壌における堆きゅう肥の連用が畑作物の収量・品質および土壌環境に及ぼす影響，土肥誌，**71**，97-100 (2000)
- 183) Natvig, E. E., Ingham, S. C., Ingham, B. H., Cooperhand, L. R. and Roper, T. R.: Salmonella enterica serovar typhimurium and Escherichia coli contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure, *Applied and Environmental Microbiology*, **68** (6), 2737-2744 (2002)
- 184) Neef, A., Amann, R. and Schleifer, K-H.: Detection of microbial cells in aerosols using nucleic acid probes, *System, Appl. Microbiol.*, **18**, 113-122 (1995)
- 185) 日本放線菌学会編：放線菌の分類と同定，日本学会事務センター，東京 (2001)
- 186) 日本施設園芸協会，生鮮野菜衛生管理ガイド，35-39 (2003)
- 187) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，金原出版株式会社，東京 (2000)
- 188) Nuovo, G. J., Gallery, F., MacConnell, P. Becher, J. and Bloch, W.: An improved technique for the *in situ* detection of DNA after polymerase chain reaction amplification, *American Journal of Pathology*, **139** (6), 1239-1244 (1991)
- 189) 王 曉丹・森山典子・龚 春明・井上興一・染谷 孝：CTC-SYBR Green 二重蛍光染色法による土壌及び堆肥中における呼吸活性を持つ細菌の検出定量，2004 年度日本土壌肥料学会大会，福岡(2004)
- 190) Ohta, H. and Hattori, T.: Oligotrophic bacteria on organic debris and plant roots in a paddy field soil. *Soil Biol. Biochem.*, **15**, 1-8 (1983)
- 191) Ohtomo, R., Minato, K. and Saito, M.: Survival of *Escherichia coli* in a field amended with cow feces slurry, *Soil Sci. Plant Nutr.*, **50** (4), 575-581 (2004)

- 192) Ohtomo, R., Minato, K. and Saito, M.: Soil particles inhibit colony formation of *Escherichia coli* on the surface of agar media, *Soil Sci. Plant Nutr.*, **49** (6), 867-872 (2003)
- 193) Okabe, S., Satoh, H. and Watanabe, Y.: *In situ* analysis of nitrifying biofilms as determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 182-3191 (1999)
- 194) 大西章博・長野晃弘・藤本尚志・高橋力也・牛久保明邦・鈴木昌治: FISH(fluorescence *in situ* hybridization) 法を適用したコンポスト好熱性細菌の検出技術の開発, 環境技術, **32**, 52-61 (2003)
- 195) Ootsubo, M., Shimizu, T., Tanaka, R., Sawabe, T., Tajima, K., Yoshimizu, M., Ezura, Y., Ezaki, T. and Oyaizu, H.: Oligonucleotide probe for detecting enterobacteriaceae by *in situ* hybridization, *Journal of Applied Microbiology*, **93**, 60-68 (2002)
- 196) 折原健太郎・上山紀代美・藤原俊六郎: 家畜糞堆肥の重金属含有量の特性, 土肥誌, **73**, 403-409 (2002)
- 197) 大澤 朗: 食水系検体からの腸管出血性大腸菌 0157 の検出はなぜ難しいのか? 特集・微生物制御における VNC (培養不能生存) 菌と損傷菌の問題, 防菌防黴, **30**, 91-94 (2002)
- 198) Paul, J. H.: Use of hoeschst dyes 33258 and 3324 for enumeration of attached and planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43** (4), 939-944 (1982)
- 199) Pell, A. N.: Manure and microbes: public and animal health problem?, *J Dairy Sci.*, **80**, 2673-2681 (1997)
- 200) Pera, A., G. Vallini, S. Frassinetti and F. Cecchi.: Cocomposting for managing effluent from thermophilic anaerobic digestion of municipal solid waste. *Environmental Technology*, **12**, 1137-1145 (199)
- 201) Pereira-Neto, J. T., Stentiford, E. I. and Smith, D. V.: Survival of fecal indicator micro-organisms in refuse/sludge composting using the aerated static

引用文献

- pile system, *Waste Management & Research*, **4**, 397-406 (1986)
- 202) Pernthaler, A., Preston, C. M., Pernthaler, J., DeLong, E. F. and Amann, R.: Comparison of fluorescently labeled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine bacteria and archaea, *Applied and Environmental Microbiology*, **68** (2), 661-667 (2002)
- 203) Pien, F. D., Shrum, S., Swenson, J. M., Hill, B. C., Thornsberry, C. and Farmer III, J. J.: Colonization of human wounds by *Escherichia vulneris* and *Escherichia hermannii*, *Journal of Clinical Microbiology*, **22** (2), 283-285 (1985)
- 204) Poincelot, R. P.: *The Biochemistry and Methodology of Composting*, The Connecticut Agr. Expt. Sta., New Haven, CT (1975)
- 205) Porter, J., Mobbs, K., Hart, C. A., Saunders, J. R., Pickup R. W. and Edwards, C.: Detection, distribution and probable fate of *Escherichia coli* O157 from asymptomatic cattle on a dairy farm. *Journal of Applied Microbiology.*, **83**, 297-306(1997)
- 206) Porter, K. G. and Feig. Y. S.: The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora, *Limnol. Oceanogr.*, **25**, 943-948 (1980)
- 207) Ramsay, A. J. and Bawden, A.D.: Effects of sterilization and storage on respiration, nitrogen status and direct counts of soil bacteria using acridine orange, *Soil Biol. Biochem.*, **15**, 263-268 (1983)
- 208) Ranalli, G., Bottura, G., Taddei, P., Garavani, M., Marchetti, R. and Sorlini, C.: Composting of solid and sludge residues from agricultural and food industries, bioindicators of monitoring and compost maturity, *J. Environ. Sci. Health.*, **36** (4), 415-436 (2001)
- 209) Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G. and Davis, R.J.: Hemorrhagic colitis associated with rare serotype. *N. Engl. J. Med.*, **308**, 681-685 (1983)
- 210) Rimhanen-Finne, R., Vuorinen, A., Marmo, S., Malmberg, S. and Hanninen, M. L.:

- Comparative analysis of *Cryptosporidium*, *Giardia* and indicator bacteria during sewage sludge hygienization in various composting processes, *Letters in Applied Microbiology*, **38**, 301-305 (2004)
- 211) Ritz, K.: Molecular approaches to the analysis of soil microbial community structure and function, *Soil Microorganisms*, **52**, 7-21 (1998)
- 212) Rodriguez, G. G., Phipps, D., Ishiguro, K., and Ridgway, H. F.: Use of a fluorescent rodox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(6), 1801-1808 (1992)
- 213) Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K-H.: *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology*, **140**, 2849-2858 (1994)
- 214) Roser, D. J.: Ethidium bromide: A general purpose fluorescent stain for nucleic acid in bacteria and eucaryotes and its use in microbial ecology studies, *Soil Bio. Biochem.*, **15**, 263-268 (1980)
- 215) Rude, R. A., Jacson, G. J., Bier, J. W., Sawyer, T. K. and Risty, N. G.: Survey of fresh vegetables for nematodes, amoebae, and *Salmonella*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**, 613-615 (1984)
- 216) Rye, H. S., Yue, S., Wemmer, D. E., Quesada, M. A., Haugland, R. P., Mathies, R. A. and Glazer, A. N.: Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes: properties and applications, *Nucleic Acids Research*, **20**(11), 2803-2812 (1992)
- 217) Safwat, M. S. A.: Composting cottonseed wastes. *BioCycle*, **21**, 27-29 (1980)
- 218) Saiki, K., Scharf, S. J., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N.: Enzymatic amplification of beta-globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, **230**, 1350-1354 (1985)
- 219) Sanger, F. and Coulson, A. R.: A rapid method for determining sequences in DNA

引用文献

- by primed synthesis with DNA polymerase, *Journal of Molecular Biology*, **94**, 444-448 (1975)
- 220) Sargeant, J. M., Hafter, D. J., Gillespie, J. R., Oberst, R. D. and Flood, S. J.: Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer sharing rangeland with cattle. *J. Am. Ve. tMed. Assoc.*, **215**, 792-794 (1999)
- 221) 佐藤朋子: Fluorecence *in situ* Hybridizaition における細菌検出感度の向上に関する研究. 佐賀大学農学部 2001 年度卒業論文(2002)
- 222) Schuppler, M., Wagner, M., Schon, G. and Gobel, U. B.: *In situ* identification of nocardioform actinomycetes in activated sludge using fluorescent rRNA-targeted oligonucleotide probes, *Microbiology*, **144**, 249-259 (1998)
- 223) Schwartz, P. C. and Cantor, C. R.: Separation of yeast Chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis, *Cell*, **37**, 67-75 (1984)
- 224) Sciancalepore, V., Colangelo, M., Sorlini, C. and Ranalli, G.: Composting of effluent from a new two-phases centrifuge olive mill microbial characterization of the compost. *Toxicol. Environ. Chem.*, **55**, 145-158 (1996)
- 225) 生物系廃棄物リサイクル研究会編:生物系廃棄物リサイクル研究会報告の概要, 生物系廃棄物リサイクル研究会 (1999)
- 226) Shere, J. A., Bartlett, K. J. and Kaspar, C. W.: Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 1390-1399 (1998)
- 227) Sherr, B. F., Sherr, E. B. and Fallon, R. D.: Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate *in situ* protozoan bacterivory. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 958-965 (1987)
- 228) 白川 隆: 野菜栽培環境における大腸菌の生態と大腸菌用選択培地の開発, 防菌防黴, **30**, 21-28(2002)
- 229) Sidhu, J., Gibbs, R. A., Ho, G. E. and Unkovich, I.: Selection of *Salmonella* Typhimurium as a indicator for pathogen regrowth potential in composted biosolids,

- Letters in Applied Microbiology*, **29**, 303-307 (1999)
- 230) Sierra, G.: A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*, **23**, 15-22 (1956)
- 231) Simon, H. M., Smith, K. P., Dodsworth, J. A., Guenther, B., Handelsman, J. and Goodman, R. M.: Influence of tomato genotype on growth of inoculated and indigenous bacteria in the rhizosphere, *Applied and Environmental Microbiology*, **67** (2), 514-520 (2001)
- 232) Smith, H. O. and Wilcox, K. W.: A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*, . Purification and general properties, *Journal of Molecular Biology*, **51**, 379-391 (1970)
- 233) Soares, H. M., Cardenas, B., Weir, D. and Switzenbaum, M. S.: Evaluating pathogen regrowth in biosolids compost. *BioCycle*, **36**, 70-74 (1995)
- 234) Someya, T.: Three-dimensional observation of bacteria in organic debris with a confocal laser scanning microscope. *Soil Microorganisms*, **46**, 61-69 (1995)
- 235) Someya, T., Gong, C. M. and Inoue, K.: Biosafety assessment of manure and agricultural field by fluorescence *in situ* hybridization (FISH), *Proceedings of International Symposium on Identification and Use of Microbial Resources for Sustainable Agriculture*, Kumamoto, 42-49 (2004)
- 236) Someya, T., Gong, C. M. and K. Inoue,: Recent topics on the biosafety control of composting, *Proceedings of the Japan /Taiwan Symposium on Molecular Biology of Functional Regulation in Plant and Microbe*, 2003
- 237) 染谷 孝: 蛍光染色法による土壌微生物の検出法, 月刊海洋, 号外 No. **33**, 4-22 (2003)
- 238) 染谷 孝: 野菜衛生管理システム構築指導事業, 施設生産衛生管理検討会報告書, 日本施設園芸協会, 1-44 (2000)
- 239) 染谷 孝: 土壌微生物の生態とその新しい研究手法, 日本生態学会誌 **47**, 59-62 (1997)
- 240) 土壌微生物研究会: 新編土壌微生物実験法, p.15-23, 養賢堂, 東京 (1992)
- 241) 染谷 孝: 蛍光染色法. 新編土壌微生物試験法 (土壌微生物学会編), p.147-154, 養

- 賢堂, 東京 (1992)
- 242) 染谷 孝・王 晓丹・龚 春明・越田淳一・中川秀明・田中智佳子・石橋正文・横堀加奈里・井上興一: 蛍光染色による土壌・堆肥中の特異的微生物, *土と微生物*, **57**, 115-123(2003)
- 243) 染谷 孝・犬伏和之・山本啓之・加藤憲二: 土壌水圏における Viable but nonculturable (VBNC) 微生物の解析手法の進歩と課題, *土と微生物*, **53**, 45-51(1999)
- 244) 染谷 孝・井上興一: 堆肥施用と病原菌汚染, 農業技術体系 土壌肥料編, 追録第 14 号, 第 7- 巻, 資材 64 の 84-99, 農文協, 東京(2003)
- 245) 染谷孝・横堀加奈里・樋口国義: グリストラップバクテリアの開発. 日本水環境学会九州支部研究発表会要旨集, 37 (2000)
- 246) Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *Journal of Molecular Biology*, **98**, 503-517 (1975)
- 247) Steffan, R. J., Goksoyr, J., Bej, A. K., and Atlas, R. M.: Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54** (12), 2908-2915 (1988)
- 248) Stranch, D.: Microbiological specification of disinfected compost, Compost: Production, Quality and Use, *Elsevier Applied Science*, Barking, UK, 210-229
- 249) Strom, P. F.: Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting, *Applied and Environ. Microbiol.*, **50**, 889-905 (1985)
- 250) Strom, P. F.: Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting, *Applied and Environ. Microbiol.*, **50**, 906-913 (1985)
- 251) 諏訪裕一: 廃水処理硝化プロセスのアンモニア酸化細菌とその分子生物学的解析, *土と微生物*, **52**, 41-52 (1998)
- 252) Suyama, K., Yamamoto, H., Naganawa, T., Iwata, T. and Komada, H.: A plate count method for aerobic cellulose decomposers in soil by congo red staining. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **39**, 361-365 (1993)
- 253) Swannell, R. P. J. and Williamson, F. A.: An investigation of staining methods to determine total cell number of respiring micro-organisms in samples obtained from the field and the laboratory. *FEMS Microbiology Ecology*, **53**, 315-324 (1988)

- 254) 社団法人日本施設園芸協会：生鮮野菜衛生管理ガイド 生産から消費まで，39，社団法人日本施設園芸協会，東京(2003)
- 255) Syutsubo, K., Kishira, H. and Harayama, S.: Development of specific oligonucleotide probes for the identification and *in situ* detection of hydrocarbon-degrading alcanivorax strains, *Environmental Microbiology*, **3** (6), 371-379 (2001)
- 256) 田川毅明・糞 春明・森山典子・井上興一・染谷 孝：生ごみ堆肥の有用放線菌の分離およびその有機物分解能に関する研究，2005 年度日本土壌肥料学会九州支部会，佐賀(2005)
- 257) 田中智佳子：EB 蛍光染色法による土壌細菌定量法の確立とその応用，佐賀大学大学院農学研究科 1996 年度修士論文(1997)
- 258) Tanaka, Y., Yamaguti, N. and Nasu, M.: Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in natural river water determined by the use of flow cytometry, *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 228-236 (2000)
- 259) Tani, K., Kurokawa, K. and Nasu, M.: Development of a direct *in situ* PCR method for detection of specific bacteria in natural environments, *Applied and Environmental Microbiology*, **64** (4), 1536-1540 (1998)
- 260) Tansey, M. R. and Brock, T. D.: Microbial life at high temperatures: Ecological aspects, In F. J. Kushner (ed). *Microbial Life in Extreme Environments*, Academic Press, New York, 160-216 (1979)
- 261) Tauxe, R. V.: Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerging Infect Dis*, **3**(4) October-December. [Internet, WWW], ADDRESS: <http://www.cdc.gov/ncidod/vol3no4/tauxe.htm>, (1997)
- 262) Torsvik, V. L. and Goksoyr, J.: Determination of bacterial DNA in soil. *Soil Bio. Biochem.*, **10**, 7-12 (1978)
- 263) Tsuchido, T., Cho, H., Matsuyama, S. and Takano, M.: Protein synthesis and thermotolerance in *Escherichia coli* cells recovering from heat injury. *J. Antibact.*

引用文献

- Antifungal Ag.*, Jpn., **20**, 131-137 (1992)
- 264) Turley, C.: Bacteria in the cold deep-sea benthic boundary layer and sediment-water interface of the NE Atlantic, *FEMS Microbiology Ecology*, **33**, 89-99 (2000)
- 265) Turpin, P. E., Maycroft, K. A., Rowlands, C. L. and Wellington, E. M.: Viable but nonculturable salmonellas in soil. *J. Appl. Bacteriol.*, **74**, 421-427 (1993)
- 266) 上田成子・桑原祥浩：有機栽培圃場の野菜および有機肥料の衛生細菌学的研究，防菌防黴，**30**，145-152 (2002)
- 267) 梅田 勲・大野 寛・渡辺康司・田口勝士・小塩静夫・中西寿男・伊東 元・高原康光・安形憲一・浅井英樹・若園鎮康・水野 拓：開発した堆肥発酵槽の断熱効果と油脂添加の効果，岐阜県畜産試験研究報告，**25**，25-32 (1999)
- 268) 浦田直美：生きているが培養できない土壌細菌の Direct viable count 法による検出と定量，佐賀大学 1995 年度卒業論文 (1996)
- 269) Ursua, P. R., Unzaga, M. J., Melero, P. Iturburu, I., Ezpeleta, C. and Cisterna, R.: *Serratia rubidaea* as an invasive pathogen, *Journal of Clinical Microbiology*, **34** (1), 216-217 (1996)
- 270) Vance, E. D. and Brookes, P. C.: Measurement of microbial biomass in soil. Chemical analysis in Environmental Research, *Institute of Terrestrial Ecology*, Grange Over Sands, 68-78 (1987)
- 271) Vold, L., Klungseth, Johansen, B., Kruse, H., Skjerve, E. and Wasteson, Y.: Occurrence of shigatoxiogenic *Escherichia coli* O157 in Norwegian cattle herds. *Epidemiol Infect.*, **120**, 21-28 (1998)
- 272) Vuorinen, A. H. and Saharinen, M. H.: Evolution of microbiological and chemical parameters during manure and co-composting drum composting system. *Agriculture Ecosystems and Environment.*, **66**, 19-29 (1997)
- 273) Wai, S. N., Moriya, T., Kondo, K., Misumi, H. and Amako, K.: Resuscitation of *Vibrio cholerae* O1 strain TS-4 from a viable but nonculturable state by heat

- shock. *FEMS Microbiol. Lett.*, **136**, 187-191 (1996)
- 274) Walke, R.: The preparation, characterization and agricultural use of bark-sludge compost, Ph. D. Dissertation, U. of New Hampshire, Durham, NH, (1975)
- 275) Wang, G., Zhao, T. and Doyle, M. P.: Fate of Enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 in bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 2567-2570 (1996)
- 276) Wang, G. and Doyle, M. P.: Survival of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *Journal of Food Protection*, **61**, 662-667 (1998)
- 277) Wang, R. F., Beggs, M. L., Robertson, L. and Cerniglia, C. E.: Design and evaluation of oligonucleotide-microarray method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples, *FEMS Microbiology Letters*, **213**, 175-182 (2002)
- 278) Wanger, M., Amman, R., Lemmer, H. and Schleifer, K. H.: Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria, Inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 1520-1525 (1993)
- 279) 渡辺千春・布藤正之・内藤慎吾・谷 庸子・藤田 耕：牛ふんの堆肥化過程における大腸菌の消長と分離菌の性状，滋賀県畜産技術振興センター研究報告，**5**，27-30（1998）
- 280) Watson, J. D. and Crick, F. H.: Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature*, **171**, 737-738 (1953)
- 281) Webley, D. M.: The microbiology of composting, 1. the behavior of the aerobic mesophilic bacterial flora of composts and its relation to other changes taking place during composting. *Proc. Soc. Appl. Bact.*, **2**, 83-89 (1947)
- 282) Weinbauer, M. G., Beckmann, C. and Hofle, M. G.: Utility of green fluorescent nucleic acid dyes and aluminum oxide membrane filters for rapid epifluorescence enumeration of soil and sediment bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64** (12), 5000-5003 (1998)
- 283) Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J.: 16S ribosomal

引用文献

- DNA amplification for phylogenetic study, *Journal of Bacteriology*, **173** (2), 697-703 (1991)
- 284) Whang, K. and Hattori, T.: Oligotrophic bacteria from rendzina forest soil. *Annonie van Leeuwenhoek*, **54**, 19-36 (1988)
- 285) Willians, M. M. and Braun-Howland, E.: Growth of *Escherichia coli* in model distribution system biofilms exposed to hypochlorous acid or monochloramine, *Applied and Environmental Microbiology*, **69** (9), 5463-5271 (2003)
- 286) Wullings, B. A., Beuningen, A. R. V., Janse, J. D. and Akkermans, A. D. L.: Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23 S rRNA-targeted probes, *Applied and Environmental Microbiology*, **64** (11), 4546-4554 (1998)
- 287) Xu, H-S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J. and Collwell, R. R.: Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environments. *Micro. Ecol.*, **8**, 313-323 (1982)
- 288) 山口進康・那須正夫:培養操作に依存しない微生物群集構造解析,月刊海洋 号外 **33**, 29-40 (2003)
- 289) Yamamoto, H., Hashimoto, Y. and Ezaki, T.: Study of nonculturable *Legionella pneumophilla* cells during multiple-nutrient starvation. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **20**, 149-154 (1996)
- 290) 柳田友道:微生物集団の増殖阻害と死滅,微生物科学, p.405~518 (1981)
- 291) Zimmermann, R., Iturriaga, R. and Brick, J.: Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 926-935 (1978)