

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292131

研究課題名(和文) 家畜糞尿の循環利用のための動物用抗菌剤関連リスクの削減手法の確立

研究課題名(英文) Reduction of veterinary antibiotic-related risks for the reuse of dairy wastes

研究代表者

梅津 一孝 (Umetsu, Kazutaka)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：20203581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：畜産バイオマスの安全性確保のために、残留する抗生物質耐性菌の制御法と残留抗生物質の分解手法を確立することを目的として、メタン発酵法による抗生物質耐性菌の低減と、抗生物質の分解を試みた。家畜糞尿中のクロルテトラサイクリン、タイロシンはメタン発酵によって分解され、セファゾリン耐性菌は顕著に減少したが、中温メタン発酵処理ではバチルス、シュードモナス、アシネトバクターなどが残存する傾向にあり、消化液を液肥として利用する際には追加処理が必要であると考えられた。一方、難分解性抗菌剤は電解酸化処理によって効率的に分解され、テトラサイクリン系、セフェム系抗菌薬は優先的に分解されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To establish a treatment method of livestock wastes that promises the safe use of dairy biomass, lab-scale anaerobic digestion of livestock wastes were performed and the effectiveness of anaerobic digestion treatment on residual antimicrobials and antimicrobials-resistant bacteria was analyzed. Not only chlortetracycline and tylosin were decreased significantly by anaerobic digestion, but also cefazolin-resistant bacteria in cow manure, while Bacillus, Pseudomonas and Acinetobacter had tendencies to survive during mesophilic digestion. These results suggested that mesophilic digestate needs further sanitary treatment prior to use as liquid fertilizer. On the other hand, hardly-degradable antimicrobials could be degraded efficiently by electro-oxidation treatment, particularly tetracyclines and cefems.

研究分野：畜産衛生工学

キーワード：メタン発酵 抗生物質 薬剤耐性菌 畜産廃棄物

### 1. 研究開始当初の背景

畜産環境において家畜糞尿などのバイオマス資源の安全性確保は重要であり、また排出される廃棄物の安全も求められる。畜産において動物用抗菌剤は、感染症の予防・治療や成長促進を目的として広く用いられている。畜産における危害要因である家畜・家禽の疾病の予防・治療のためには、動物用抗菌剤の使用はやむを得ない面がある。しかし、我が国における抗菌剤(抗菌剤および合成抗菌薬)の年間使用量は2,200tを越え、ヒトよりも家畜や家禽に使用されている量の方が多い。投与された動物用抗菌剤の代謝分解は困難であることが一般的で、畜産施設から糞尿を通じて環境への拡散が懸念されている。近年、畜産由来と考えられる動物用抗菌剤が、我が国の河川等から検出されている。Matsuiら(Desalination, 2008)は、我が国の畜産地域域の河川において最大68 µg/Lのオキシテトラサイクリンが検出されたことを報告した。これは都市部河川の濃度と比較すると数オーダー高い値である。報告されている河川水のデータから、薬剤が使用される畜産施設から、数十mg/Lを超える濃度の畜産廃棄物が排出されている可能性がある。さらに、抗菌剤の使用によって耐性菌が出現し、耐性遺伝子が家畜糞尿を通じて伝播することが指摘されている(Witte, Science, 1998)。

また、感染症の予防・治療や成長促進を目的とする抗菌剤の不適切な使用は薬剤耐性菌の出現という由々しき事態を招き、一部はヒトへの影響が拡大している。2013年9月に米国疾病予防管理センター(CDC)から公表された薬剤耐性菌に関する文書(Antibiotic Resistance Threats in United States, 2013)において、抗菌剤耐性感染症によって米国内で年間23,000人が死に至り、もっとも重大な健康脅威のひとつであることが報告されている。この文書は、薬剤耐性の広がりについて詳述しており、家畜への抗菌剤投与が原因のひとつであることが図表を使って説明されている。畜産物環境中のこれらの残留医薬品や薬剤耐性菌のいずれも、主たる発生源は畜産業であると考えられている。米国疾病予防管理センター(CDC)は、薬剤耐性菌の伝播が食物連鎖だけではなく環境経路で拡大することを警鐘しており、ヒト・家畜・畜産物そして食料生産環境に関わる深刻な問題になりつつある。環境中のこのような因子を削減するためには、発生源におけるエミッション削減が一番効果的であり、畜産および環境工学分野の研究者としての義務でもある。しかしながら、畜産バイオマスの利用が着実に拡大しているにも関わらず、畜産業から排出される動物用抗菌剤のリスク削減技術は、大きく立ち遅れているのが現状である。

家畜糞尿における動物用抗菌剤関連リスクの低減のために、薬剤耐性菌の不活化技術と残留動物用抗菌剤の確実な分解技術を早

急に確立する必要がある。畜産バイオマスの更なる高度循環利用を目指す場合、エネルギー利用のみならず危害要因である残留医薬品と薬剤耐性菌の無害化が強く求められる。危害要因に対する的確なリスク低減技術の確立は、畜産資源の安全性確保と環境負荷の低減に大きく資すると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、家畜糞尿をはじめとする畜産バイオマスの安全性確保のために、残留する抗生物質耐性菌の制御法と残留抗生物質の分解手法を確立することを目的とした。具体的手段として、畜産バイオマスの利活用法として広く普及しているメタン発酵法を用いて、残留する抗生物質耐性菌の低減と、残留抗生物質の分解を試みた。残留抗生物質については、物理化学的手法についても検討を行った。

### 3. 研究の方法

我々は、抗菌剤の使用と耐性菌出現の関連を調べるため、帯広畜産大学内の乳牛畜舎で使用されている抗菌剤と未使用の抗菌剤を各5種類選択し、乳牛糞尿および高温(55℃)フルスケールバイオガスプラントで処理した乳牛糞尿(メタン発酵消化液)に含まれる耐性菌数の測定を行った。対象とした抗菌剤は、セファゾリン、セフトキシム、ストレプトマイシン、ネオマイシン、ペニシリン(以上使用)、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、バンコマイシン、チアムリン(以上未使用)で、微生物の薬剤感受性試験は臨床検査標準委員会(CLSI)の標準法(NCCLS 2002)に準拠した寒天平板塗抹培養法により実施した。

また、ラボスケールの発酵試験は回分式で行った。現有のラボ発酵試験器(10L)を用い、35℃(中温)、55℃(高温)、65℃(超高温)の温度で乳牛糞尿をメタン発酵処理し、それぞれのメタン発酵消化液に含まれる大腸菌、腸球菌、サルモネラ、キャンピロバクターの細菌数を測定した。細菌数の測定は、前述と同様に寒天平板塗抹培養法により行ったが、用いた寒天平板培地は大腸菌、腸球菌、サルモネラ、キャンピロバクターに特異的な選択分離培地(大腸菌:クロモアガーECC、腸球菌:ECS agar medium、サルモネラ:X-SAL寒天培地、キャンピロバクター:スキロー培地)である。さらに、乳牛糞尿に含まれるその他の細菌としてシュドモナス、パチルス、アシネトバクターについても同様に選択分離培地(シュドモナス:セトリミド寒天培地、パチルス:MYP寒天培地、アシネトバクター:クロモアガーアシネトバクター)を使用して細菌数の測定を行った。

さらに、簡易選択分離培地であるクロムアガーESBLを用いてセファゾリン耐性菌における拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)産生能を検討した。この培地には発色基質が含まれ

ており、発色や菌体コロニーの形状の違いから大腸菌、クレブシエラ、エンテロバクター、シトロバクター、プロテウス、シュドモナス、アシネトバクターに分類することができる。

#### 4. 研究成果

##### 4.1 家畜糞尿に残留する抗生物質耐性菌制御法の確立

帯広畜産大学で使用している抗菌剤と未使用の抗菌剤を比較した場合、使用している抗菌剤に対する耐性菌の中にはセファゾリン耐性菌 (0.49%) やストレプトマイシン耐性菌 (1.27%) のように数が多いものが含まれ、また逆に使用していない抗菌剤に対する耐性菌の中にはテトラサイクリン耐性菌 (0.003%) のように数が少ないものが含まれていた。また、ストレプトマイシンとカナマイシンは共にアミノグリコシド系の抗菌剤で、ともに細菌のリボソームに作用してタンパク合成阻害や、細胞質膜を障害する作用があるなどの作用機序が似ており、さらに広範囲のグラム陰性桿菌に効果があるなど抗菌スペクトルも似ているが、使用の有無によって耐性菌の陽性率に大きな違いが認められた (カナマイシン耐性菌は検出されなかった)。この結果は抗菌剤の使用と耐性菌の出現との関連を示唆するものであるが、使用している抗菌剤グループ全体 (0.01-1.27%) と使用していない抗菌剤グループ全体 (0-5.88%) の耐性菌数を比較すると有意な差は認められなかった ( $p=0.401194$ )。従って、帯広畜産大学の農場で採取した乳牛糞尿では、使用している抗菌剤に対する耐性菌が多く含まれるという結果は得られなかった。

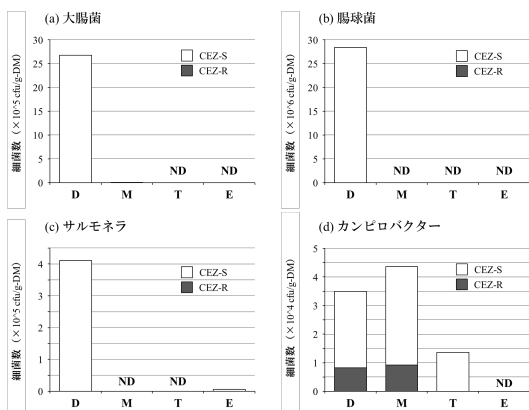


図 1 乳牛ふん尿と消化液中のセファゾリン耐性 (CEZ-R) および感受性 (CEZ-S) 細菌数

D: 乳牛糞尿, M: 中温発酵消化液, T: 高温発酵消化液, E: 超高温発酵消化液

ND: 検出限界以下

中温, 高温, 超高温のいずれの発酵処理においても消化液中に大腸菌, 腸球菌, サルモネラは検出されなかったが, 中温と高温の発酵処理ではカンピロバクターが検出された。

さらに, 乳牛糞尿に含まれる大腸菌, 腸球菌, サルモネラに関してセファゾリン耐性は認められなかったが, セファゾリン耐性カンピロバクターが検出され, 中温発酵処理では残存が認められた (図 1)。

また, シュドモナス, アシネトバクターはいずれの温度帯での発酵処理でも消失したが, バチルスは中温発酵で有意な増加が認められた。この増加が認められたバチルスはセファゾリン耐性ではなかった。一方, 乳牛糞尿中に存在が認められたシュドモナスはセファゾリン耐性であった (図 2)。

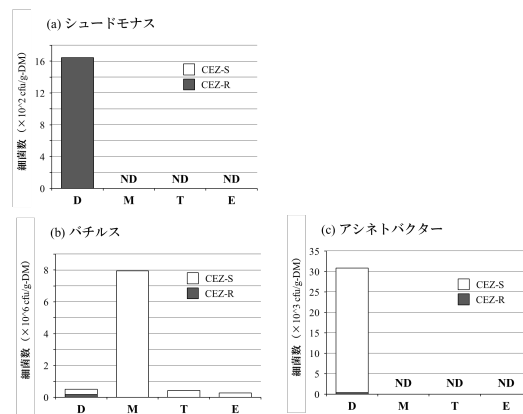


図 2 乳牛ふん尿と消化液中のセファゾリン耐性 (CEZ-R) および感受性 (CEZ-S) 細菌数

D: 乳牛糞尿, M: 中温発酵消化液, T: 高温発酵消化液, E: 超高温発酵消化液

ND: 検出限界以下

一般的に普及している中温メタン発酵処理ではカンピロバクター, バチルスなどの細菌が残存または増加する傾向にあるため, 消化液を液肥として利用する際には注意が必要であると考えられた。超高温域での嫌気性消化の先行研究例は少ないため, これらの知見はバイオガスシステムの工学的な展開の一助となると考えられる。

セファゾリンを添加したクロモアガー-ECC 寒天培地で乳牛糞尿およびメタン発酵消化液を培養し, セファゾリン耐性の大腸菌, 大腸菌以外の大腸菌群, その他のグラム陰性菌の選別を行った。比較対象として帯広畜産大学農場から採取した乳牛糞尿を同様に培養した。今回の検討ではいずれの試料からも大腸菌は検出されなかった。他の大腸菌群はメタン発酵消化液では検出されず, その他のグラム陰性菌は, 乳牛糞尿に比べメタン発酵消化液では減少しており, 高温ほど減少していることが確認された。

次に, 大腸菌群と他のグラム陰性菌からそれぞれ 300 株を選択し, クロモアガー-ESBL 寒天培地に移植して分類するとともに ESBL 産生能を確認した。大腸菌群の中では, ESBL を産生するクレブシエラ, プロテウス等の割合は少ないが, メタン発酵処理により ESBL を産生するシュドモナスとアシネトバク

ターが増加することが示唆される結果となった(図3)。

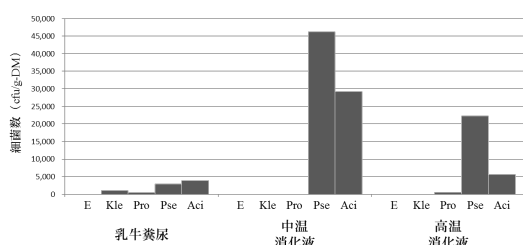


図3 β-ラクタマーゼ産生菌の検出

E: 大腸菌, Kle: クレブシエラ/エンテロバクター/シトロバクター, Pro: プロテウス, Pse: シュードモナス, Aci: アシネトバクター

メタン発酵消化液ではESBLを産生する細菌のうち比較的熱に耐性を持つ細菌が残存もしくは増加する傾向がみられた。特に中温メタン発酵消化液ではセファゾリン耐性のシュードモナス, パチルス, アシネトバクターが増加する懸念が示された。これまでの知見を合わせると, 中温メタン発酵処理ではカンピロバクター, パチルスに加え, シュードモナス, アシネトバクターなどの細菌が残存または増加する傾向にあると考えられるため, 消化液を液肥として利用する際には高温で殺菌するなどの追加的な処理が必要であると考えられるが, これらの細菌が圃場に散布した後にどのような動態を示すかについて調査する必要がある。

#### 4.2 畜産バイオマスに含有する抗生物質の分解

酪農の場合, 抗菌剤の排出先として生乳と乳牛糞尿が挙げられる。そこで本研究では, 廃棄乳と糞尿両方の処理技術を確認することによって, 畜産施設からの抗菌剤排出量の削減を試みた。処理法として, 廃棄乳に対しては, 生乳が生物難分解性物質を含有し, 生物学的処理が困難であることから物理化学的な手法である電解酸化法を, 乳牛糞尿に対しては家畜糞尿処理法として用いられるメタン発酵の適用を試みた。具体的には, 乳牛糞尿の中温メタン発酵プロセスにおける含有抗菌剤の分解特性と発酵に及ぼす影響を調べた。また, 生物学的処理であるメタン発酵のみでは抗菌剤濃度の低減が不十分である場合を想定し, メタン発酵後消化液に添加した抗菌剤に対して電解酸化処理を試みた。乳牛糞尿のメタン発酵において, 含有するクロルテトラサイクリンおよびタイロシンは分解された。嫌気性水溶液での結果と比較すると, メタン発酵では抗菌剤の濃度低減速度が大きく, メタン発酵の有効性が示された。また, 電解酸化処理によって, メタン発酵後消化液に含有する抗菌剤は効率的に分解された。電解酸化法は, 乳牛糞尿に残留する抗菌剤の確実な分解を実現する手法であると考えられる。

生乳に含有する抗菌剤の分解については, 電解酸化処理によって生乳に含有するテトラサイクリン系抗菌薬およびセフェム系抗菌薬は部分的かつ優先的に分解されることを明らかにした。生乳中の抗菌剤の分解特性を水溶液と比較すると, 生乳中では抗菌剤濃度および瞬間電流効率の挙動が異なり, 有機性濃厚溶液としての特徴が明らかになった。抗菌剤の優先的な分解には, 実験条件の影響が大きく, 優先性が向上すると, 抗菌剤の分解に要する電気量は減少した。優先的な分解はエネルギー消費量を抑制すると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 7件)

Beneragama, N., Masahiro Iwasaki, Kazutaka Umetsu, Methane production from thermophilic co-digestion of dairy manure and waste milk obtained from therapeutically treated cows, *Animal Science Journal*, 査読有, 88, 2017, 401-409.

Takemura, T., Ikko Ihara, Yumika Kitazono, Kiyohiko Toyoda, Masahiro Iwasaki, Kazutaka Umetsu, Effect of seed sludge on survival of antibiotic-resistant bacteria and fate of bacteria resistant to different classes of antibiotics during anaerobic digestion of dairy manure, *Journal of Water and Environment Technology*, 査読有, 14, 2016, 282-288.

Kitazono, Y., Ikko Ihara, Kiyohiko Toyoda, Kazutaka Umetsu, Antibiotic removal from waste milk by electrochemical process: degradation characteristics in concentrated organic solution, *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 査読有, 2016, 1-9.

Kitazono, Y., Ikko Ihara, Kiyohiko Toyoda, Kazutaka Umetsu, Anaerobic biodegradation of veterinary antibiotics in dairy manure and its physico-chemical post-treatment, *Proceedings of the 8th International Symposium on Machinery and Mechatronics for Agricultural and Biosystems Engineering (ISMAB)*, 査読有, 2016, 1205-1210.

Kitazono, Y., Ikko Ihara, Kiyohiko Toyoda, Kazutaka Umetsu, Degradation of veterinary antibiotics during anaerobic digestion of dairy manure, *Water Practice and Technology*, 査読有, 10, 2015, 532-537.

井原一高, 菅祐子, 豊田浄彦, 岩崎匡洋,

梅津一孝, 乳牛糞尿資源の循環利用のための中温メタン発酵による動物用抗菌剤耐性菌の低減, 農業農村工学会資源循環研究部会論文集, 査読有, 10, 2014, 37-41.

竹村俊希, 井原一高, 豊田浄彦, 岩崎匡洋, 梅津一孝, メタン発酵における乳牛糞尿に残留する抗生物質耐性菌の消長, 農業食料工学会関西支部報, 査読有, 116, 2014, 56.

[学会発表](計 16 件)

瀬古真理, 井原一高, 豊田浄彦, 清水和哉, 間世田英明, 岩崎匡洋, 梅津一孝, 乳牛糞尿の嫌気性消化におけるセファゾリンが薬剤耐性菌の消長に及ぼす影響, 第 51 回日本水環境学会年会, 2017 年 3 月 16 日, 熊本大学(熊本・熊本)

辻陽平, 井原一高, 間世田英明, 清水和哉, 豊田浄彦, 岩崎匡洋, 梅津一孝, 乳牛糞尿の嫌気性消化における薬剤耐性菌の消長 テトラサイクリン系抗生物質の影響, 農業食料工学会関西支部第 137 回例会, 2017 年 3 月 15 日, 大阪府立大学(大阪・堺)

井原一高, メタン発酵による家畜糞尿における薬剤耐性菌のリスク低減, 第 27 回廃棄物資源循環学会研究発表会, 2016 年 9 月 27 日, 和歌山大学(和歌山・和歌山)

瀬古真理, 井原一高, 豊田浄彦, 清水和哉, 間世田英明, 岩崎匡洋, 梅津一孝, 乳牛糞尿の嫌気性消化における薬剤耐性菌の消長 残留セフェム系抗生物質の影響, 2016 年度農業施設学会大会, 2016 年 8 月 30 日, 高知大学(高知・高知)

瀬古真理, 井原一高, 豊田浄彦, 岩崎匡洋, 梅津一孝, 乳牛糞尿の嫌気性消化における薬剤耐性菌の消長 - 残留抗生物質の影響 -, 農業食料工学会関西支部第 135 回例会, 2016 年 3 月 2 日, 神戸大学(兵庫・神戸)

井原一高, 竹村俊希, 豊田浄彦, 岩崎匡洋, 梅津一孝, 嫌気性消化における乳牛糞尿に残留する抗生物質耐性菌の消長に与える影響因子の検討, 農業環境工学関連 5 学会 2015 年合同大会, 2015 年 9 月 17 日, 岩手大学(岩手・盛岡)

北園弓佳, 井原一高, 豊田浄彦, 梅津一孝, メタン発酵による乳牛糞尿に残留した動物用抗菌剤の分解に関する検討, 農業環境工学関連 5 学会 2015 年合同大会, 2015 年 9 月 15 日, 岩手大学(岩手・盛岡)

Qi, G., Masahiro Iwasaki, Zhifei Pan, Yumiko Endo, Fetra Jules Andriamanohiarisoamanana, Ikko Ihara, Kazutaka Umetsu, Investigation of pseudomonas spp. in dairy manure during anaerobic digestion, 農業環境工学関連 5 学会 2015 年合同大会, 2015 年 9 月 15 日, 岩手大学(岩手・盛岡)

Iwasaki, M., Yumiko Endo, Zhifei Pan, Guangdou Qi, Fetra Jules Andriamanohiarisoamanana, Ikko Ihara, Kazutaka Umetsu, Investigation of cefazolin-resistant bacterial communities in mesophilic and thermophilic anaerobically digested cow manure, 農業環境工学関連 5 学会 2015 年合同大会, 2015 年 9 月 15 日, 岩手大学(岩手・盛岡)

Takemura, T., Ikko Ihara, Yumika Kitazono, Kiyohiko Toyoda, Masahiro Iwasaki, Kazutaka Umetsu, Effect of seed sludge and antibiotic class on survival of antibiotic-resistant bacteria during anaerobic digestion of dairy manure, Water and Environment Technology Conference, 2015 年 8 月 6 日, 日本大学(東京)

井原一高, 菅祐子, 豊田浄彦, 岩崎匡洋, 梅津一孝, 乳牛糞尿資源の循環利用のための中温メタン発酵による動物用抗菌剤耐性菌の低減, 農業農村工学会資源循環研究部会研究発表会, 2015 年 6 月 18 日, 東京ビックサイト(東京)

北園弓佳, 井原一高, 豊田浄彦, 梅津一孝, メタン発酵による乳牛糞尿に残留する動物用抗菌剤の分解に関する基礎的検討, 第 49 回日本水環境学会年会, 2015 年 3 月 18 日, 金沢大学(石川・金沢)

Takemura, T., Ikko Ihara, Kiyohiko Toyoda, Masahiro Iwasaki, Kazutaka Umetsu, Effect of seed sludge on the survival of antibiotic-resistant bacteria in dairy cattle manure during batch anaerobic digestion, 9th IWA International Symposium on Waste Management Problems in Agro-Industries, 2014 年 11 月, 高知大学(高知・高知)

Kitazono, Y., Ikko Ihara, Kiyohiko Toyoda, Kazutaka Umetsu, Degradation of veterinary antibiotics during antibiotic digestion of dairy manure, 9th IWA International Symposium on Waste Management Problems in Agro-Industries, 2014 年 11 月, 高知大学(高知・高知)

Iwasaki, M., Masazumi Miyake, Ikko Ihara, Fetra Andriamanohiarisoamanana, Guangdou Qi, Zhifei Pan, Kazutaka Umetsu,

Investigation of cefazolin-resistant bacterial communities in dairy cow manure during mesophilic anaerobic digestion, 2014 年度農業施設学会大会, 2014 年 8 月 29 日, 神戸大学 (兵庫・神戸)

竹村俊希, 井原一高, 豊田浄彦, 岩崎匡洋, 梅津一孝, メタン発酵による乳牛糞尿に残留する抗生物質耐性菌の低減と影響因子の検討, 2014 年度農業施設学会大会, 2014 年 8 月 28 日, 神戸大学 (兵庫・神戸)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梅津一孝 (UMETSU, Kazutaka)  
帯広畜産大学・畜産学部・教授  
研究者番号: 20203581

### (2) 研究分担者

井原一高 (IHARA, Ikko)  
神戸大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号: 50396256

西田 武弘 (NISHIDA, Takehiro)  
帯広畜産大学・畜産学部・准教授  
研究者番号: 70343986

### (3) 連携研究者

岩崎 匡洋 (IWASAKI, Masahiro)  
帯広畜産大学・畜産学部・特任研究員  
研究者番号: 50591195