

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 1日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380134

研究課題名（和文） 乳牛糞尿資源の安全性確保のためのメタン発酵プロセスの機能拡張

研究課題名（英文） Functional enhancement of anaerobic digestion for ensuring the safety of dairy manure resource

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

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、乳牛糞尿資源の安全性確保のために、メタン発酵の機能強化により、薬剤耐性菌を含む乳牛糞尿資源の新規管理手法を確立することである。特に動物抗菌剤が投与された乳牛の糞尿を想定し、1. メタン発酵による抗生物質耐性菌の制御、2. メタン発酵消化液の後処理として電解酸化法による薬剤耐性菌の不活化について、重点的に検討を行った。メタン発酵は特定の抗生物質耐性菌の菌数を減少させる効果があることを明らかにした。また、メタン発酵消化液に対し電解酸化法を適用した結果、一部の抗生物質耐性菌については不活化効果が低く、リスクの高い抗生物質耐性菌が存在することが判明した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to establish a novel management of dairy manure by anaerobic digestion for ensuring the safety. We assumed the manure from dairy cows injected with veterinary antibiotics, and focused on the survival of antibiotic resistant bacteria during anaerobic digestion, and electrochemical inactivation of antibiotic resistant bacteria in anaerobically digested slurry. Results with manure samples from three different farms showed a similar trend that numbers of antibiotic-resistant bacteria decreased after the anaerobic digestion except for specific antibiotics. The electrochemical disinfection process decreased numbers of antibiotic-resistant bacteria in the anaerobically digested slurry. The result indicates that the batch mesophilic anaerobic digestion and electrochemical process can reduce relative risks of antibiotic-resistance bacteria in livestock manure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2011年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2012年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：畜産衛生工学

科研費の分科・細目：農業環境工学

キーワード：乳牛糞尿，メタン発酵，動物用抗菌剤，薬剤耐性菌

1. 研究開始当初の背景

家畜糞尿の資源化に対する社会的要請は極めて高い。畜産業において生産される畜産物以上に多量の糞尿の排出は避けられない。糞尿をはじめとする家畜廃棄物の管理は、生産環境を直接左右する重大な課題である。持続可能で健全な畜産環境は、畜産物の安全・安心を支える重要な基盤である。家畜糞尿の管理手法として、コンポストをはじめとする堆肥化そしてバイオマス利活用の視点からエネルギー化が推進されてきた。持続可能な畜産経営において、畜産廃棄物の再資源化は不可欠な要素である。

一方、家畜糞尿の資源化におけるリスクも指摘されている。糞尿に存在する病原性微生物や薬剤耐性菌の存在である。糞尿を肥料資源として圃場に還元することは循環型畜産業の基本であるが、糞尿の循環はそれらに付随する病原性微生物や耐性菌も拡散させる危険を含んでいる。サルモネラに汚染された牛糞スラリーを放牧地に散布したことによって、牛にサルモネラ症を引き起こした例や、リステリア菌に汚染された堆肥を使用したキャベツによって食中毒の例が報告されている。また、家畜疾病の予防や治療を目的として様々な動物用医薬品が活用されているが、抗生物質の使用に伴って発現した薬剤耐性菌が糞尿中に排出されていることも近年報告されている。我が国における抗菌剤の家畜への使用量は人用の使用量を超える 900 t と推計され(2002 年)、大量の抗菌剤の使用は薬剤耐性菌の出現リスクを高める。家畜糞尿における病原性微生物や薬剤耐性菌の残留は、糞尿の再資源化を妨げるだけでなく畜産環境に関わる深刻な問題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、メタン発酵の機能拡張によって、乳牛糞尿の資源化において危害要因である薬剤耐性菌に対するリスク管理手法を確立することである。薬剤耐性菌の低減とバイオガス生成の両立も目指した。メタン発酵だけでは十分に対応できないことも予想されたため、消化液（発酵残渣）に対して、物理化学的手法の1つである電解酸化法の適用についても検討を行った。

3. 研究の方法

(1)メタン発酵による家畜糞尿に残留する抗生物質耐性菌の消長とその制御
複数の農場から乳牛糞尿を入手し、メタン発酵試験に供試した。比較のために豚糞尿や牛糞尿も対象とした。すべての糞尿サンプルは、動物用抗菌剤の投薬履歴が判明している農場から入手し、薬剤耐性菌の発現との関連についても検討を行った。また、フルスケールバイオガスプラントから採取した消化液を

種汚泥として用いた。薬剤耐性菌の検出については、土壤細菌用とされる PTYG 培地を用いた。動物用抗菌剤として、畜産業における使用状況を考慮し、テトラサイクリン系オキシテトラサイクリン(OTC)、セファロsporin系セファゾリン(CEZ)、グリコペプチド系バンコマイシン(VCM)、アミノグリコシド系ストレプトマイシン(SM)、β-ラクタム系アンピシリン(AMP)を選択し、上述の培地に対し個別に添加することにより薬剤耐性菌の検出を行った。

(2)電解酸化法によるメタン発酵消化液に残留する薬剤耐性菌の不活化
乳牛糞尿を投入したメタン発酵リアクタから一定期間後に消化液を対象として、電解酸化試験を行った。薬剤耐性菌の不活化のために、電気化学反応による高効率の塩素生成を狙い、陽極に DSA (Dimensionally stable anode) を用いた。また、反応効率の向上のために、消化液に対し遠心分離を行い、上澄み液を実験に用いた。

4. 研究成果

研究当初は、病原性微生物と薬剤耐性菌を区分して検討することを計画していた。初年度における検討の結果、予想以上に薬剤耐性菌の低減効果の可能性が見出されたため、社会的な要請も踏まえ薬剤耐性菌のリスク低減技術の確立に注力した。

(1)家畜糞尿からの薬剤耐性菌の検出とメタン発酵による薬剤耐性菌の消長
メタン発酵試験の前に、複数の農場から採取した家畜糞尿に残留する薬剤耐性菌の検出を行った。対象とした家畜糞尿サンプルに全てから薬剤耐性菌が検出された。対象とした乳牛糞尿においては CEZ 耐性菌が最も多く存在した。全ての抗生物質耐性菌数は $10^3 \sim 10^4$ CFU/g DM であった。これは、文献に報告されている土壤における通常の抗生物質耐性菌数と同水準であった。他の薬剤耐性菌と比較すると、CEZ 耐性菌数は有意に多く、当該農場における乳房炎治療を目的とした抗生物質使用と耐性菌数との関連性が示唆された。また、豚糞尿中の抗生物質耐性菌は乳牛糞尿中の耐性菌よりも多い傾向にあり、抗生物質の使用頻度と抗生物質耐性菌数には関連性があると考えられた。一方、過去一年間に投薬履歴がない家畜から排出された糞尿からも一定数の抗生物質耐性菌が検出された。

薬剤耐性菌数を低減するため、3つの農場で採取した家畜糞尿を対象に、中温メタン発酵を行った。発酵が進行すると共に耐性菌は減少した。耐性菌の低減効果は抗生物質により差がみられたが、糞尿採取場所による違いはほとんど見られなかった。そこで、採取場所に関わらず、全サンプルの耐性菌数を平均

し、抗生物質ごとの耐性菌数変化を比較したOTC, VCM 耐性菌は低減効果が高く, SM, AMP 耐性菌減少割合は低く, これらの間に有意差がみられた。したがって, メタン発酵による耐性菌低減効果は抗生物質の種類により差が生じることが示された。

中温メタン発酵と高温メタン発酵における耐性菌低減効果を比較したところ, 発酵開始後 10 日目までは中温発酵の方が高い低減効果が得られた。一方, 10 日目以降は高温発酵による高い低減効果がみられたことから, メタン発酵の安定性が耐性菌減少に影響することが示唆された。また, 高温発酵開始後 20 日目でも SM 耐性菌が検出された。一般的に, 中温発酵より効果が高いとされている高温発酵による病原性微生物処理においても効果の低い菌の存在が報告されていることから, メタン発酵により完全に処理できない菌が存在する可能性が高い。家畜糞尿におけるリスク低減手法は, メタン発酵だけでは不十分な場合があり, より確実な低減手法を加える必要があることが示された。

(3) メタン発酵-電気化学反応の 2 段階処理

A 牧場, B, C 農場の家畜糞尿を対象としたメタン発酵消化液に対し, 電気化学処理を行った。全耐性菌が電気化学処理時間とともに減少した。特に OTC, AMP, VCM 耐性菌は効果が高く, 50 分間の反応で検出限界以下まで減少した。電気化学反応によって, 糞尿中に残留する塩化物イオンから次亜塩素酸等の殺菌力のある物質が生成し, 死活化に寄与したと考えられる。一方で, SM, CEZ 耐性菌の低減効果は低かった。さらに, 電気化学処理のみおよび 2 段階処理による耐性菌低減効果を比較したところ, 多くの耐性菌が 2 段階処理により, 短時間で処理可能となったが, SM 耐性菌は 2 段階処理において効果が低下した。2 段階処理は耐性菌処理に有効であるが, 一部効果が低く, リスクの高い耐性菌の存在が確認された。

本研究で用いた生物学的手法であるメタン発酵と, 物理化学的手法である電気化学処理の 2 手法は, どちらも耐性菌低減効果を示した。しかし, SM 耐性菌および CEZ 耐性菌はどちらの処理法においても低減されにくい傾向が見られた。特に, 一部の農場の乳牛糞尿を対象としたメタン発酵-電解酸化 2 段階処理では減少率が 17.9 % と非常に低かった。これは生物学的手法および物理化学的手法では完全に減少させることができない可能性が高く, リスクの高い菌であることが示唆された。

これらの知見は, メタン発酵(嫌気性消化)による家畜糞尿処理が動物用抗菌剤耐性菌に関連するリスク低減に貢献できることを示すものである。

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 3 件)

- ① 井原一高, 吉田弦, 豊田浄彦, 岩崎匡洋, 梅津一孝 (2012): 動物用抗菌剤の環境影響と嫌気性消化によるリスク低減, 土と微生物, 66 (2), 47-50, <http://ci.nii.ac.jp/naid/110009544391>. (査読無)
- ② Beneragama N, Yusuke M, Yamashiro T, Iwasaki M, Adekunle LS and Umetsu K (2011): The survival of cefazolin resistant bacteria in thermophilic co-digestion of dairy manure and waste milk, Journal of Agricultural Science and Technology A1, 1181-1186, <http://davidpublishing.org/show.html?3864>. (査読有)
- ③ 井原一高, 菅祐子, 豊田浄彦, 岩崎匡洋, 梅津一孝, (2010): 中温メタン発酵による家畜糞尿に残留する抗生物質耐性菌の不活化, 農業農村工学科委資源循環研究部会論文集, 6, 45-53. (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

- ① Ikko Ihara, Megumi Yoshitake, Kiyohiko Toyoda, Masahiro Iwasaki, Kazutaka Umetsu (2013): Risk Reduction of Antibiotic-Resistant Bacteria by Anaerobic Digestion and Electrochemical Oxidation for Manure Application, Preprints of the 2013 IFAC Bio-Robotics Conference, Sakai, Japan, March 27-29, 2013.
- ② 吉竹恵, 井原一高, 吉田弦, 豊田浄彦, 岩崎匡洋, 梅津一孝, メタン発酵および電気化学反応による家畜糞尿における抗生物質耐性菌リスクの低減, 農業環境工学関連学会 2012 年合同大会, 栃木県宇都宮市, 2012. 9. 12.
- ③ Y. Suga, I. Ihara, K. Toyoda, M. Iwasaki and K. Umetsu (2011): Survival of Antibiotic Resistant Bacteria in Batch Anaerobic Digestion of Dairy Manure, Proceedings of the 4th IWA-Aspire Conference & Exhibition, Tokyo, Japan, Oct. 2-4, 2013.
- ④ 菅祐子, 井原一高, 豊田浄彦, 吉竹恵, 岩崎匡洋, 梅津一孝, 中温メタン発酵による乳牛糞尿中に残留する抗生物質耐性菌の不活化, 2011 年度農業施設学会大会, 香川県高松市, 2011. 8. 24-26.

- ⑤ 吉竹恵, 井原一高, 豊田浄彦, 菅祐子, 岩崎匡洋, 梅津一孝 (2011): メタン発酵消化液に残存する抗生物質耐性菌の電気化学反応による不活化, 2011年度農業施設学会大会, 香川県高松市, 2011.8.24-26.
- ⑥ 井原一高, 豊田浄彦, 吉竹恵, 菅祐子, 梅津一孝 (2011): メタン発酵消化液の利活用のための電気化学反応による抗生物質耐性菌の不活化, 農業機械学会関西支部大会第125回例会, 大阪府堺市, 2011.3.2.
- ⑦ Nilmini Beneragama, Takaaki Yamashiro, Masahiro Iwasaki, Ikko Ihara, Kazutaka Umetsu (2010): Determination and separation of residues in bovine milk following antibiotic therapy for mastitis, 2010年度農業施設学会年次大会, 新潟市, 2010.8.31.
- ⑧ 菅祐子, 井原一高, 豊田浄彦, 梅津一孝 (2010): メタン発酵による乳牛糞尿中の抗生物質耐性菌死活化に関する基礎的検討, 2010年度農業施設学会大会, 新潟市, 2010.8.31.

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

小池 正徳 (KOIKE MASANORI)
帯広畜産大学・畜産学部・教授
研究者番号: 00205303

井原 一高 (IHARA IKKO)
神戸大学・農学研究科・准教授
研究者番号: 50396256