

石灰窒素の活用による 畜産動物の糞尿由来堆肥に含まれる 薬剤耐性菌制御の可能性

酪農学園大学 獣医学群 獣医学類 食品衛生学ユニット 教授 臼井 優

背景

獣医療およびヒト医療の現場における薬剤耐性菌/薬剤耐性遺伝子の出現・拡散は、国際的な公衆衛生上の課題となっている。抗菌薬は、畜産動物に対しても主に細菌感染症の治療を目的として使用されているが、その多くは生体内ではほとんど代謝されず、糞尿中に排出されることが知られている。そのため、畜産動物での抗菌薬の使用は、畜産動物の腸管内において薬剤耐性菌を選択するだけでなく、糞尿に含まれる残留抗菌薬としても薬剤耐性菌を選択することが示唆されている。

畜産動物からヒトへの薬剤耐性菌の伝播経路として、食肉の喫食や畜産動物との接触、環境を介した経路が提唱されている。環境を介した伝播経路のひとつとして、畜産動物の糞尿を由来とする堆肥がある。堆肥は、畑などの土壌環境に散布されるため、畜産動物の腸管内や糞尿中で選択された薬剤耐性菌が土壌環境中に拡散され、野菜などに付着し、ヒトが喫食することで、畜産動物からヒトへと薬剤耐性菌が伝播する可能性がある。そのため、畜産動物からヒトへ伝播する薬剤耐性菌/薬剤耐性遺伝子の伝播リスクを減少させる畜産動物の糞尿（畜産廃棄物）処理法が必要とされている。

畜産動物の糞尿処理法のひとつとして、好気性堆肥化が挙げられる。アメリカ環境保護庁（United States Environmental Protection Agency）は、55°C以上の堆肥温度を3日間以上持続させることを適切な堆肥化条件としており、この条件によって病原微生物は死滅するとしている。好気性堆肥化では、好気性微生物による発酵熱で堆肥の温度が上昇する。しかし、十分な副資材が使用できないことによる水分調整不足、畜産動物の糞尿の状態、気候因子、堆肥化設備の状態などのさまざまな要因から、堆肥の温度が十分に上昇せず、病原微生物や薬剤耐性遺伝子が残留することが危惧されている。

また、適切な条件で堆肥化を行っても、*Clostridioides*

difficile のような芽胞形成菌が芽胞を形成することで、堆肥化の温度に耐え、堆肥中に残留する可能性が報告されている。そのため、適切な堆肥化条件とならない場合の耐性菌対策となる畜産廃棄物処理方法、芽胞形成菌にも有効な堆肥処理方法が求められている。

そこで、適切な堆肥化条件とならないことを想定し（堆肥温度が十分に上昇しないことも想定し）、堆肥の温度に依存せず、堆肥中の薬剤耐性菌を除去する方法として、堆肥原料そのものを殺菌する処理法が考えられた。

石灰窒素は、殺菌効果を持つ塩基性の窒素肥料であり、主成分のカルシウムシアナミド（ CaCN_2 ）が殺菌作用を持ち、農薬効果のある肥料としても利用されている。殺菌成分であるシアナミドは、尿素に分解されて肥料養分として利用されるため、殺菌成分として残留する危険性はない。また、石灰窒素は、水と反応することにより、強アルカリ性を示す水酸化カルシウム [$\text{Ca}(\text{OH})_2$] となる。そのため、石灰窒素は、水に溶解することで強アルカリ性を呈し、殺菌効果を示すため、堆肥化処理に用いれば薬剤耐性菌/薬剤耐性遺伝子を減少させることができる可能性がある。

そこで今回、畜産動物の糞尿に含まれる薬剤耐性菌を含む細菌に対する石灰窒素の殺菌効果を明らかにし、新たな耐性菌対策のオプションとして提案することを目的として、畜産動物の糞尿上清にスパイクされた細菌と芽胞の生菌数に石灰窒素の添加がおよぼす影響を調べた。その後、野外農場において、石灰窒素を添加した堆肥化が、薬剤耐性菌/薬剤耐性遺伝子を減少させるのに有効であるかを調べた。

試験方法

① 畜産動物糞尿中細菌への

石灰窒素の殺菌効果確認試験

豚の糞尿上清に細菌および芽胞をスパイクし、そこへさまざまな濃度の石灰窒素を添加する試験を行った。

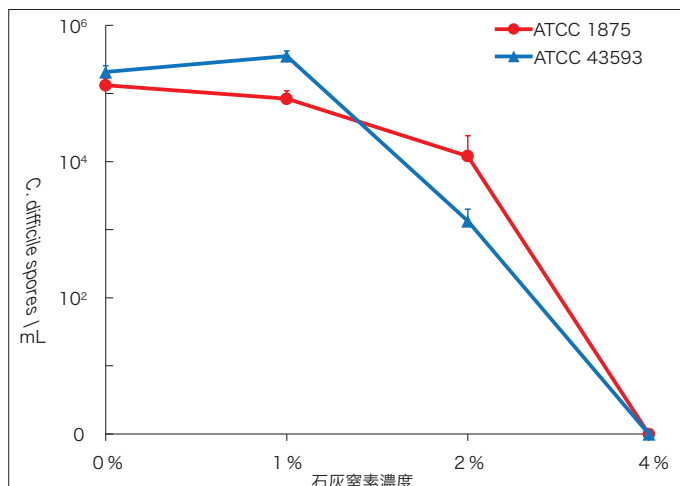
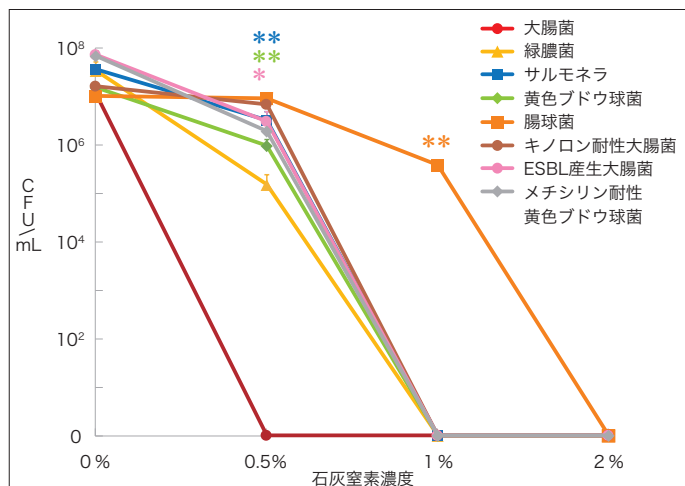


図1 豚の糞尿上清に石灰窒素を添加した際の生菌量

左：大腸菌、緑膿菌、サルモネラ、黄色ブドウ球菌、腸球菌の菌濃度

右：C. difficile の芽胞の濃度

*は有意差があることを示す

スパイク用の細菌として、マーカーをつけた大腸菌3種類、緑膿菌、サルモネラ、黄色ブドウ球菌2種類、腸球菌、芽胞形成菌としてC. difficile 2種類を用いた。豚の糞尿上清に、一晚培養した菌液または芽胞精製液をスパイクし、さまざまな濃度の石灰窒素〔最終濃度：0、0.5、1、2、4% (w/w)〕を混合し、攪拌した後、25℃・24時間静置した。24時間後、畜産動物の糞尿に含まれるスパイクした細菌および芽胞の生菌量を、培養法によって推定した。

② 野外農場の堆肥への石灰窒素添加試験

酪農学園大学附属農場において収集された豚糞便と稲わらを使用して、野外農場での好気性堆肥化試験を行った。

この混合物は2つのグループ（コントロールと石灰窒素添加；各5kg）に分けられた。石灰窒素の最終濃度は、

①の試験より4%とした。これらについて、13日間にわたって好気性堆肥化が行われた。サンプリングは、4回（石灰窒素添加前、添加直後、2日後、13日後）実施された。サンプルについて、大腸菌数（オキシテトラサイクリン耐性大腸菌、アンピシリン耐性大腸菌を含む）、大腸菌群数、グラム陰性菌数が培養法によって推定され、そして薬剤耐性遺伝子（*tetA*, *tetB*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*）および16S rRNAのコピー数がqPCRによって定量され、さらに16Sアンプリコンメタゲノム解析による細菌叢解析が実施された。

試験結果

① 畜産動物糞尿中細菌への

石灰窒素の殺菌効果確認試験

豚の糞尿上清に石灰窒素を添加した際の、スパイクし

た細菌および芽胞の生菌数を図1に示した。豚の糞尿上清中に0.5%石灰窒素を添加することで、大腸菌1種類を定量限界以下まで減少させ、緑膿菌、サルモネラ、黄色ブドウ球菌種類、大腸菌1種類を有意に減少させた。1%石灰窒素の添加によって、腸球菌を有意に減少させ、腸球菌以外の試験したすべての細菌を定量限界以下まで減少させた。また、2%石灰窒素の添加によって、試験したすべての細菌を定量限界以下まで減少させた。

豚の糞尿上清中のC. difficile 芽胞2種類の量は、2%石灰窒素の添加によって減少した。また、4%石灰窒素の添加によって、C. difficile 芽胞は定量限界以下まで減少した。

② 野外農場の堆肥への石灰窒素添加試験

野外試験における、堆肥中の大腸菌数（オキシテトラサイクリン耐性大腸菌またはアンピシリン耐性大腸菌を含む）、大腸菌群数およびグラム陰性菌数を図2に示した。これらの細菌は、コントロールでは、13日間検出され続けた。一方、4%石灰窒素の添加直後、これらの細菌は直ちに検出限界以下まで減少した。

野外農場の堆肥に含まれる16S rRNAおよび薬剤耐性遺伝子のコピー数を図3に示した。試験開始時、すべての試験された薬剤耐性遺伝子は、 10^3 から 10^7 コピー/gの範囲で検出され、16S rRNA 遺伝子のコピー数は約 10^{12} コピー/gだった。試験期間中、すべての試験された遺伝子のコピー数は、試験開始時に比べて有意な変化はなかった。

堆肥中の細菌叢の門レベルでの変化を図4に示した。0日目は、Bacteroides 門、Proteobacteria 門、Actinobacteria 門、Firmicutes 門、Chloroflexi 門が、全細菌群集の92%を占めていた。コントロールでは、試

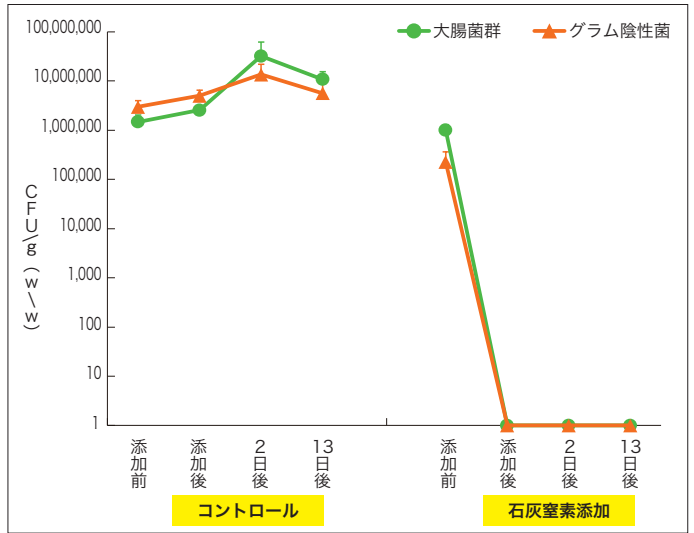
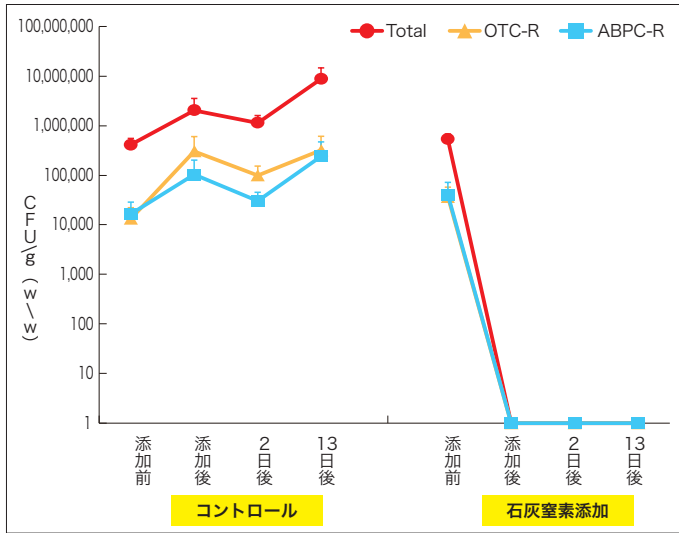


図2 野外堆肥に石灰窒素を添加した際の生菌量

左：大腸菌(total)、オキシテトラサイクリン耐性大腸菌(OTC-R)、アンピシリン耐性大腸菌(ABPC-R)の菌数
 右：大腸菌群、グラム陰性菌の菌数

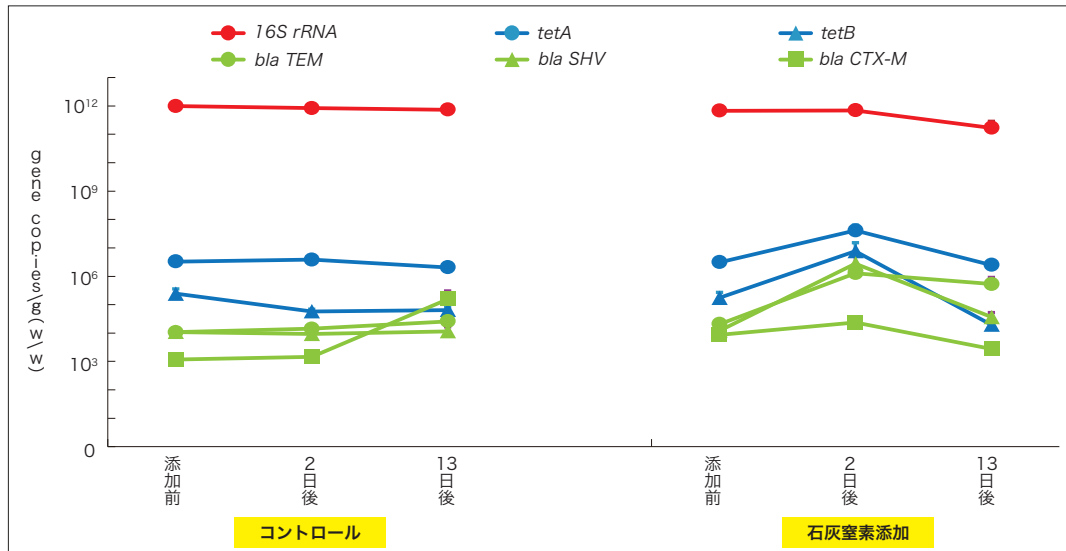


図3 野外堆肥に石灰窒素を添加した際の16S rRNA コピー数および薬剤耐性遺伝子コピー数

験期間（13日間）を通じて、細菌叢に有意な変化は認められなかった。一方、石灰窒素を添加した場合、Bacteroides 門の割合が約35%（0日目）から25%（13日目）に有意に減少した。また、Actinobacteria 門が約17%（0日目）から29%（13日目）に大幅に増加し、最も主要となった。さらに、Chloroflexi 門の割合も約3.0%（0日目）から5.1%（2日目）に有意に増加した。

考察

豚の糞尿上清にスパイクした細菌は、2%石灰窒素の添加により定量限界以下まで減少した。石灰窒素の主要成分であるCaOは、水分と反応してCa(OH)₂を形成し、pHを上昇させる。多くの細菌は、中性pH条件で増殖し、

アルカリ性環境（pH > 9）では増殖しない。

以上のことから、石灰窒素の豚の糞尿上清への添加は、アルカリ環境をつくり、複数の細菌種に対して殺菌効果が示すことが明らかとなった。また、4%石灰窒素の添加は、豚の糞尿上清に含まれる*C. difficile*の芽胞を検出限界以下まで減少させた。芽胞は、高温、凍結、乾燥、酸、アルカリなどのさまざまなストレスに対して高い耐性を示すが、4%石灰窒素の添加によるアルカリ環境は、芽胞に対しても殺菌効果を発揮することが示唆された。

今回の野外試験では、好気性堆肥化を実施したにもかかわらず、堆肥の温度が十分に上昇しなかった。好気性堆肥化における発酵による温度上昇は、さまざまな要因に影響される複雑なプロセスである。本研究では、コン

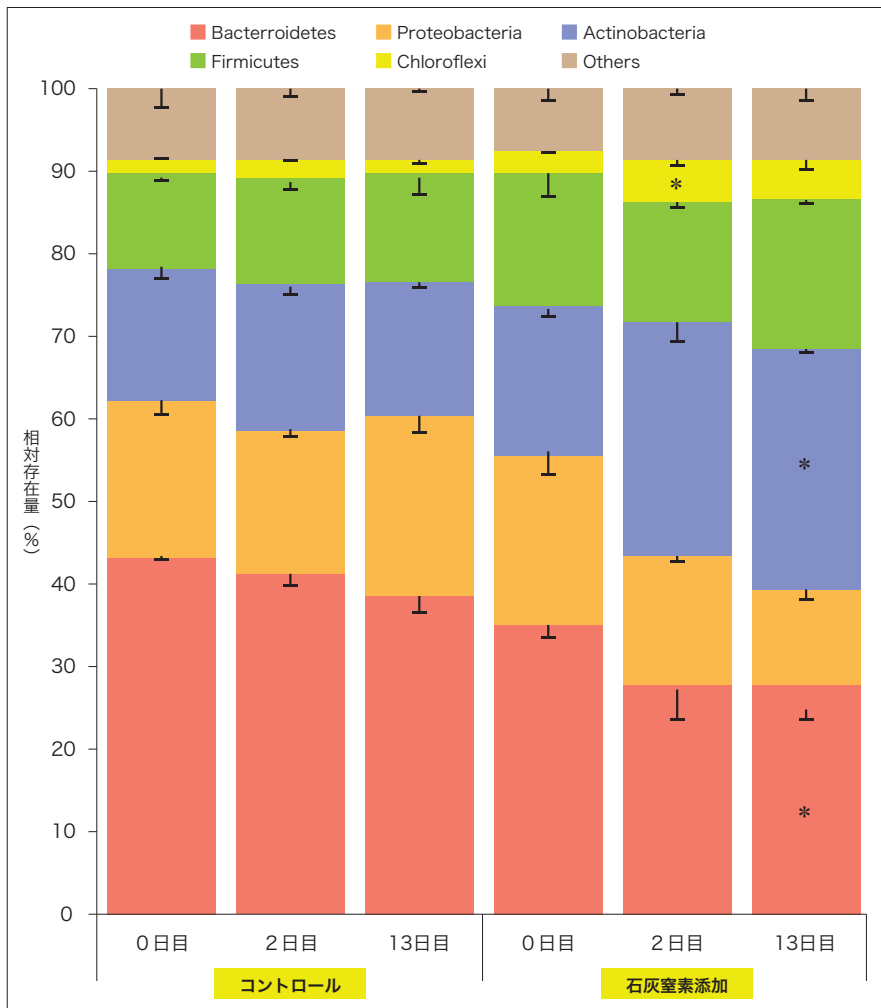


図4 野外堆肥に石灰窒素を添加した際の細菌叢の変化(門レベル)
*は有意差があることを示す

コントロールを含む堆肥の不十分な発酵の原因は明らかではないが、不適切な水分含有量、C/N比、低い周囲温度(冬季)、小さな堆肥サイズ(5kg)、不適切な通気などの要因が発酵プロセスに影響をあたえた結果、温度が十分に上昇しなかった可能性がある。実際の野外の条件においても、複雑な発酵プロセスゆえに適切な条件での好気性堆肥化が達成されないことも多い。したがって、今回の野外試験は、結果的にみると、不適切な堆肥化条件となってしまった場合の石灰窒素添加の有効性を検証することとなった。

4%石灰窒素を堆肥に添加した直後、薬剤耐性大腸菌を含む大腸菌、大腸菌群、およびグラム陰性細菌数は検出限界以下にまで減少した。コントロールでは、これらの細菌は試験期間を通して検出され、ほとんど減少しなかった。

以上の結果から、石灰窒素を堆肥に添加すると、不適切な堆肥化条件であっても、畜産動物の糞尿由来細菌を直ちに減少できることが示唆された。一方、堆肥中の16S rRNAおよび薬剤耐性遺伝子のコピー数は、石灰窒素を添加しても有意に変化しなかった。これは、堆肥サンプル

ルのDNA抽出物に含まれるDNAが、生菌と死菌の区別ができていないことが原因と考えられた。

コントロールの細菌叢は、試験期間中に顕著な変化が認められなかった。一方、石灰窒素を処理した堆肥では、不適切な堆肥化条件にもかかわらず、細菌叢の構成に顕著な変動が認められた。石灰窒素を処理した堆肥では、Actinobacteria門とFirmicutes門の増加が観察され、Bacteroidetes門の割合が減少した。Bacteroidetes門は、薬剤耐性遺伝子の貯蔵庫として知られており、石灰窒素の添加により、生菌が保有する薬剤耐性遺伝子を減少させる可能性がある。

今回、野外農場での石灰窒素添加試験では、芽胞形成菌を除去するため、4%の濃度を選択した。4%石灰窒素の添加は、堆肥化の初期段階における微生物に対しても殺菌作用を示し、堆肥化を抑制する可能性がある。好気性発酵を起こす有用な微生物を保持しつつ、芽胞形成菌を除去することは困難である。今後、好

気性発酵を引き起こす微生物を保持するための適切な添加濃度を決定するための試験が必要である。また、場合によっては、通常の好気性堆肥化の後に石灰窒素を加えることも検討する必要がある。

結論

畜産動物の糞尿を由来とする薬剤耐性菌を含む細菌は、不適切な堆肥化が実施された場合、堆肥中に残ってしまう。野外での好気性堆肥化は、常に適切な条件下で行われるわけではなく、必ずしも温度が十分に上がらない。

今回の試験結果から、石灰窒素を堆肥に添加すると、堆肥のpHを上げ、芽胞形成細菌や薬剤耐性菌を含む細菌を減少できることが明らかとなった。以上のことから、石灰窒素の堆肥への添加は、薬剤耐性菌を制御する有効なオプションとなる可能性がある。

元論文は、以下のとおり。Enami M, Fukuda A, Yamada M, Kobae Y, Nakajima C, Suzuki Y, Usui M*. Heated scallop-shell powder and lime nitrogen effectively decrease the abundance of antimicrobial-resistant bacteria in aerobic composting. Environ Technol Innov. 34.103590. 2024.