

牛糞堆肥を施用した畑地における
大腸菌の流出抑制に関する研究

2014 年

石川 裕太

博 士 論 文

牛糞堆肥を施用した畑地における
大腸菌の流出抑制に関する研究

石川 裕太

主	査	三原真智人
副	査	中村 好男
副	査	岡田 早苗
副	査	藤川 智紀

2014 年 3 月 20 日

論文要旨

第 I 章 研究の背景と目的

農林水産省の推計によると、日本では年間約 8400 万トンの家畜糞尿を排出していると見積もられている。これら家畜糞尿の処理方法として、堆肥化して農地に還元することが資源循環の視点から注目されている。しかし、堆肥の急激な増産は発酵不足に起因する *E. coli* (大腸菌) や大腸菌群などの健康被害をもたらす菌が多量に生残している未熟堆肥の増加を招く可能性がある。これら未熟堆肥を施用した畑地や野積み地からは、降雨などに伴って *E. coli*、大腸菌群が下流域に流出する危険性がある。これらのことから、*E. coli*、大腸菌群の流出に関する保全対策が求められてきた。

以上のことから、未熟堆肥を施用した畑地からの *E. coli*、大腸菌群の流出特性を解明すること、堆肥化過程および農地での施用後における保全対策を考案することを本研究の目的とした。

第 II 章 埼玉県 A 沼における大腸菌の流出特性に関する検討

埼玉県 A 沼付近の野積み現場周辺の水中及び底泥中における *E. coli*、大腸菌群数の観測を実施した。その結果、野積み現場周辺に多くの *E. coli*、大腸菌群が検出され、降雨に伴って野積み現場から *E. coli*、大腸菌群が流出していることが明らかとなった。また、水中よりも底泥に多くの *E. coli*、大腸菌群が生残しており、特に底泥が蓄積しやすい土砂溜において多くの *E. coli*、大腸菌群が生残していることが分かった。このことから、土砂溜に *E. coli*、大腸菌群を殺菌する仕組みを付与することで、*E. coli*、大腸菌群流出の抑制に寄与できると推察できた。

第 III 章 人工降雨を用いた大腸菌の流出特性に関する検討

人工降雨を用いた大腸菌群の流出特性の解明にあたっては、東京農業大学富士畜産農場から採取した牛糞、2週間発酵させた一次発酵堆肥を使用した。人工降雨装置下に牛糞堆肥を表面施肥、すき込みの2種類の方法で施用した模型斜面ライシメータを設置して、流出実験を行って流出水中の *E. coli*、大腸菌群数を分析した。その結果、全ての試験区において、2時間の降雨実験で施用した牛糞堆肥中の *E. coli*、大腸菌群と同程度の量が表面流、浸透流双方を通じて流出していることが明らかとなった。

あわせて、表面流出水中の懸濁物質と上澄み液を濾過したところ、80～90%の *E. coli*、大腸菌群が懸濁液中より検出され、糞便などの懸濁物質に伴って流出していることが分かった。このことから、畑地で適用されている土壌・肥料成分の流出抑制対策によって、ある程度 *E. coli*、大腸菌群の流出を抑制できると判断できた。

また、牛糞の発酵段階別に比較すると、施用方法に関わらず牛糞を施用した試験区からの *E. coli*、大腸菌群の流出が最も高くなることから、畑地での施用前に十分な発酵を経て、牛糞堆肥中の *E. coli*、大腸菌群数を減少させることが重要であると判断できた。

第 IV 章 緩衝帯を用いた大腸菌の流出抑制に関する検討

E. coli、大腸菌群は糞便などの懸濁物質に伴って流出するという第 II 章の結果を受け、土壌・肥料成分の流出抑制対策で用いられる緩衝帯を設置し、畑地からの *E. coli*、大腸菌群の流出に与える影響について模型斜面実験を実施した。人工降雨装置下に牛糞、一次発酵堆肥を施用した模型斜面ライシメータを設置し、下流部に緩衝帯として玉

龍 (*Ophiopogon japonicus* Ker Gawl.) を設置し、流出水中の *E. coli*、大腸菌群数を測定した。その結果、牛糞では緩衝帯による流出抑制効果が見られなかったが、一次発酵堆肥を施用した試験区においては緩衝帯の設置により92%の *E. coli* が捕獲され、緩衝帯による流出抑制効果が見られた。これは、緩衝帯を通過できる微小な粒子に生残していた *E. coli* は堆肥の一次発酵過程において死滅してしまい、発酵を経ても *E. coli* が生残している大きな粒子は緩衝帯で捕捉され易かったためと考察した。一方、糞便の有無に依存しない大腸菌群については、発酵段階に関わらず流出抑制効果は見られなかった。このことから一次発酵堆肥を施用した場合、畑地の緩衝帯による *E. coli* の流出抑制は効果的であると判断できた。

第 V 章 土砂溜を用いた大腸菌の流出抑制に関する検討

土壌・肥料成分流出対策の一つであり、第 II 章の調査においても多くの *E. coli*、大腸菌群が検出された土砂溜に着目し、フィルター層による *E. coli*、大腸菌群の捕捉能について検討した。玉砂利、活性炭、石灰窒素の三種類のフィルター層を設置して流出抑制効果を比較した結果、玉砂利や活性炭のような物理的な捕捉に関しては明確な効果が見られなかった。しかし、石灰窒素のフィルター層を有する土砂溜においては *E. coli*、大腸菌群の流出を完全に抑制することができた。これは、石灰窒素によって水中の pH が *E. coli*、大腸菌群の生育限界である 9.0 を上回ったためであると考察した。また、このときの石灰窒素との接触時間は 10 分程度であった。これらのことから、石灰窒素のような高アルカリ性のフィルター材を設置し、10 分以上接触させるよう設計することで、土砂溜や沈砂池に *E. coli*、大腸菌群の流出抑制効

果を付与できることが示された。

第 VI 章 風乾処理における微生物相の生残

第 II, III, IV 章の結果より、堆肥化過程において *E. coli*、大腸菌群を殺菌することを考えていく必要があると判断し、牛糞堆肥の発酵過程における風乾処理が堆肥中の微生物相に与える影響を調べた。牛糞、一次発酵堆肥を用いて風乾処理を 1 カ月間継続し、含水率を 10%まで低下させたものの、牛糞では完全に *E. coli*、大腸菌群を殺菌できず、さらに堆肥化に必要な一般細菌も減少してしまう結果となった。一方、一次発酵堆肥については、一般細菌の減少は生じたものの、完全に *E. coli*、大腸菌群が殺菌される結果となった。これらの結果から、発酵初期段階の堆肥に対する風乾処理は適切ではなく、少なくとも一次発酵の段階まで発酵させた後、風乾処理を行なうことが望ましいと考察できた。

第 VII 章 pH 調整における微生物相の生残

第 V 章の結果より、堆肥化に必要な一般細菌に影響の少ない抑制方法として、堆肥中の pH を 9.0 付近へ調整することが *E. coli*、大腸菌群および一般細菌に与える影響について評価した。pH 調整には石灰窒素または 1,000 °C で 1 時間加熱したホタテ貝殻の粉碎粉末のいずれかを添加することで、堆肥中の pH を pH 9.0 付近に調整した。調整後の試料を 37 °C に設定したインキュベータ内に静置し、微生物相の変化を追った。その結果、石灰窒素、ホタテ貝殻焼成粉末のいずれにおいても、発酵段階に関わらず添加直後に完全に *E. coli*、大腸菌群が殺菌された。また、堆肥化に寄与する一般細菌について見ると、全ての試料において有意な変化は生じなかった。これらの結果から、堆肥の pH を 9.0 付近に調整することで堆肥化に影響なく大腸菌群の殺菌を行うことが可能であ

ると考察できた。

第 VIII 章 総括

これらの一連の研究結果より、未熟堆肥を施用した畑地においては、*E. coli*、大腸菌群が表面流、浸透流によって流出し、表面流出では懸濁物質に伴って多く流出していることが明らかとなった。*E. coli*、大腸菌群の流出を効果的に抑制するには、高アルカリ性のフィルター材を持つ土砂溜を設置することが最も効果的であることが分かった。また、堆肥化過程においては風乾処理よりも添加材による pH 9.0 付近への調整が発酵に影響なく、*E. coli*、大腸菌群を殺菌できることが明らかとなった。

以上のことから、*E. coli*、大腸菌群が懸濁物質に伴って表面流出することが明らかとなった。あわせて、既存の土壌・肥料成分の流出抑制対策を改良することで *E. coli*、大腸菌群流出を抑えることができることが分かった。また、堆肥化過程において *E. coli*、大腸菌群の抑制とともに一般細菌数に大きな影響を与えない最適な pH が明らかとなった。このことから、今後の *E. coli*、大腸菌の流出抑制対策を確立する上で、重要な指標となると考えられる。特にアジアやアフリカ等の発展途上国などでも、アルカリ材があれば *E. coli*、大腸菌群の流出や拡大を抑制できると判断でき、その応用性は高いと考えられる。

目次

論文要旨	i
第 I 章 研究の背景と目的	1
第 1 節 研究の目的と意義	2
第 2 節 従来の研究と課題	8
第 3 節 本研究の構成	10
参考・引用文献（第 I 章）	12
第 II 章 埼玉県 A 沼における大腸菌流出の現状	16
第 1 節 本章の目的	17
第 2 節 実験方法	18
1. 調査対象地	18
2. 調査方法	20
3. 分析項目	21
第 3 節 結果及び考察	22
1. 水中・底泥中における <i>E. coli</i> 、大腸菌群の分布	22
2. 土砂溜と水路の底泥中における <i>E. coli</i> 、大腸菌 群数の違い	25
第 4 節 本章のまとめ	27
参考・引用文献（第 II 章）	28
第 III 章 人工降雨を用いた大腸菌の流出特性の解明	29
第 1 節 本章の目的	30
第 2 節 実験方法	31
1. 実験方法	31

1)異なる施用方法による <i>E. coli</i> 、大腸菌群の流出特性の比較	31
2)懸濁液と上澄み液の違いによる <i>E. coli</i> 、大腸菌群流出量の比較	35
2.分析項目	37
第3節 結果および考察	38
1.施用方法の違いによる <i>E. coli</i> 、大腸菌群の収支	38
2. <i>E. coli</i> 、大腸菌群の表面流出、浸透流出	41
3.懸濁液成分、上澄み液成分中の <i>E. coli</i> 、大腸菌群数	43
第4節 本章のまとめ	47
参考・引用文献（第III章）	48
第IV章 緩衝帯を用いた大腸菌の流出抑制	49
第1節 本章の目的	50
第2節 実験方法	51
1.実験方法	51
2.分析項目	54
第3節 結果および考察	
1.緩衝帯の有無による <i>E. coli</i> 、大腸菌群の流出量の違い	55
第4節 本章のまとめ	59
参考・引用文献（第IV章）	60

第 V 章	土砂溜を用いた大腸菌の流出抑制	61
第 1 節	本章の目的	62
第 2 節	実験方法	63
1.	実験方法	63
2.	分析項目	67
第 3 節	結果および考察	68
1.	フィルター材の違いによる <i>E. coli</i> 、大腸菌群の抑制効果	68
2.	フィルター層通過による pH の変化	72
第 4 節	本章のまとめ	73
	参考・引用文献（第 V 章）	74
第 VI 章	風乾処理における微生物の生残	75
第 1 節	本章の目的	76
第 2 節	実験方法	77
1.	実験方法	77
2.	分析項目	79
第 3 節	結果および考察	81
1.	風乾処理が <i>E. coli</i> の生残に与える影響	81
2.	風乾処理が大腸菌群の生残に与える影響	84
3.	風乾処理が一般細菌の生残に与える影響	86
第 4 節	本章のまとめ	88
	参考・引用文献（第 VI 章）	89

第 VII 章	pH 調整における微生物相の生残	90
第 1 節	本章の目的	91
第 2 節	実験方法	92
1.	実験方法	92
1)	石灰窒素添加実験	92
2)	HSSP 添加実験	95
2.	分析項目	97
第 3 節	結果および考察	99
1.	石灰窒素、HSSP 添加による pH の変化	99
2.	石灰窒素、HSSP 添加が <i>E. coli</i> の生残に与える 影響	101
3.	石灰窒素、HSSP 添加が大腸菌群の生残に与える 影響	104
4.	石灰窒素、HSSP 添加が一般細菌の生残に与える 影響	107
第 4 節	本章のまとめ	110
	参考・引用文献（第 VII 章）	111
第 VIII 章	総括	113
	謝辞	117
	Summary	118
	Appendix	124

圖表一覽表

Fig. 1-1 Detail of dung emission	4
Fig. 1-2 Research structure of this dissertation	11
Fig. 2-1 Dilution plate technique	21
Fig. 2-1 Dilution plate technique	21
Fig. 2-2 Number of <i>E. coli</i> in water	23
Fig. 2-3 Number of coliform bacteria in water	23
Fig. 2-4 Number of <i>E. coli</i> in sludge	24
Fig. 2-5 Number of coliform bacteria in sludge	24
Fig. 2-6 Number of <i>E. coli</i> in channel and sedimentation tank	26
Fig. 2-7 Number of coliform bacteria in channel and sedimentation tank	26
Fig. 3-1 Outline of runoff experiment	34
Fig. 3-2 Filtration of sample	36
Fig. 3-3 Dilution plate technique	37
Fig. 3-4 Number of <i>E. coli</i> input in fresh cow dung and <i>E.</i> <i>coli</i> efflux through surface runoff and percolation	39
Fig. 3-5 Number of <i>E. coli</i> input in 2 weeks fermented manure and <i>E. coli</i> efflux through surface runoff and percolation	39
Fig. 3-6 Number of coliform bacteria input in fresh cow dung and coliform bacteria efflux through surface runoff and percolation	40

Fig. 3-7	Number of coliform bacteria input in fresh cow dung and coliform bacteria efflux through surface runoff and percolation	40
Fig. 3-8	Total efflux of <i>E. coli</i> from plots applied fresh cow dung or 2 weeks fermented manure by broadcasting or incorporating	42
Fig. 3-9	Total efflux of coliform bacteria from plots applied fresh cow dung or 2 weeks fermented manure by broadcasting or incorporating	42
Fig. 3-10	Rate of <i>E. coli</i> efflux in suspended water or filtered water	44
Fig. 3-11	Total efflux of coliform bacteria in suspended water or filtered water	44
Fig. 3-12	Changes in total efflux of <i>E. coli</i> in suspended water or filtered water (cow dung)	45
Fig. 3-13	Changes in total efflux of <i>E. coli</i> in suspended water or filtered water (2 weeks fermented manure)	45
Fig. 3-14	Total efflux of coliform bacteria in suspended water or filtered water (cow dung)	46
Fig. 3-15	Total efflux of coliform bacteria in suspended water or filtered water (2 weeks fermented manure)	46
Fig. 4-1	Outline of runoff experiment	53
Fig. 4-2	Dilution plate technique	54

Fig. 4-3 Total efflux of <i>E. coli</i> from controlled plot and grass buffer strips plot (cow dung)	56
Fig. 4-4 Total efflux of <i>E. coli</i> from controlled plot and grass buffer strips plot (2 weeks fermented manure)	56
Fig. 4-5 Total efflux of <i>E. coli</i> from controlled plot and grass buffer strips plot (2 weeks fermented manure)	57
Fig. 4-6 <i>E. coli</i> efflux around grass buffer strips	57
Fig. 4-7 Total efflux of coliform bacteria from controlled plot and grass buffer strips plot (cow dung)	58
Fig. 4-8 Total efflux of coliform bacteria from controlled plot and grass buffer strips plot (2 weeks fermented manure)	58
Fig. 5-1 Outline of sedimentation tank	64
Fig. 5-2 Outline of Filter layer	66
Fig. 5-3 Outline of runoff experiment	66
Fig. 5-4 Dilution plate technique	67
Fig. 5-5 Number of <i>E. coli</i> input and <i>E. coli</i> efflux (gravel)	69
Fig. 5-6 Number of coliform bacteria input and coliform bacteria efflux (gravel)	69
Fig. 5-7 Number of <i>E. coli</i> input and <i>E. coli</i> efflux (carbon)	70

Fig. 5-8 Number of coliform bacteria input and coliform bacteria efflux (carbon)	70
Fig. 5-9 Number of <i>E. coli</i> input and <i>E. coli</i> efflux (lime nitrogen)	71
Fig. 5-10 Number of coliform bacteria input and coliform bacteria efflux (lime nitrogen)	71
Fig. 5-11 Changes in pH of water	72
Fig. 6-1 Changes in Temperature	78
Fig. 6-2 Dilution plate technique	79
Fig. 6-3 Changes in <i>E. coli</i> and water content in cow dung	82
Fig. 6-4 Changes in <i>E. coli</i> and water content in 2 weeks fermented manure	82
Fig. 6-5 Outline of <i>E. coli</i> surviving in cow dung	83
Fig. 6-6 Changes in coliform bacteria and water content in cow dung	85
Fig. 6-7 Changes in coliform bacteria and water content in 2 weeks fermented manure	85
Fig. 6-8 Changes in general bacteria and water content in cow dung	87
Fig. 6-9 Changes in general bacteria and water content in 2 weeks fermented manure	87
Fig. 7-1 Process of making Heated Scallop-Shell Powder	96
Fig. 7-2 Dilution plate technique	97
Fig. 7-3 Changes in pH (lime nitrogen)	100

Fig. 7-4 Changes in pH (HSSP)	100
Fig. 7-5 Changes in <i>E. coli</i> in cow dung (lime nitrogen)	102
Fig. 7-6 Changes in <i>E. coli</i> in 2 weeks fermented manure (lime nitrogen)	102
Fig. 7-7 Changes in <i>E. coli</i> in cow dung (HSSP)	103
Fig. 7-8 Changes in <i>E. coli</i> in 2 weeks fermented manure (HSSP)	103
Fig. 7-9 Changes in coliform bacteria in cow dung (lime nitrogen)	105
Fig. 7-10 Changes in coliform bacteria in 2 weeks fermented manure (lime nitrogen)	105
Fig. 7-11 Changes in coliform bacteria in cow dung (HSSP)	106
Fig. 7-12 Changes in coliform bacteria in 2 weeks fermented manure (HSSP)	106
Fig. 7-13 Changes in general bacteria in cow dung (lime nitrogen)	108
Fig. 7-14 Changes in general bacteria in 2 weeks fermented manure (lime nitrogen)	108
Fig. 7-15 Changes in general bacteria in cow dung (HSSP)	110
Fig. 7-16 Changes in general bacteria in 2 weeks fermented manure (HSSP)	110
Fig. 8-1 Proposal plan in A swamp	116

Table 3-1 Properties of manures	32
Table 3-2 Number of microorganisms in manures	32
Table 3-3 Properties of soil	33
Table 3-4 Chemical and biological properties of soil	33
Table 3-5 Properties of manures	35
Table 3-6 Number of microorganisms in manures	36
Table 3-7 Properties of soil	36
Table 3-8 Chemical and biological properties of soil	36
Table 4-1 Properties of cow dung and manures	52
Table 4-2 Number of microorganisms in manures	52
Table 4-3 Properties of soil	52
Table 4-4 Chemical and biological properties of soil	53
Table 5-1 Properties of cow dung	66
Table 5-2 Number of microorganisms in manures	66
Table 6-1 Properties of manures	77
Table 6-2 Number of microorganisms in manures	78
Table 7-1 Properties of manures (lime nitrogen)	93
Table 7-2 Number of microorganisms in manures (lime nitrogen)	93
Table 7-3 Properties of manures (HSSP)	95
Table 7-4 Number of microorganisms in manures (HSSP)	96

Photo. 1-1 Situation of making manure	5
Photo. 1-2 <i>Escherichia coli</i>	5
Photo. 1-3 Maintenance facilities of cow dung	6
Photo. 1-4 Situation of field heaping	6
Photo. 1-5 Situation of manure applying in developing country	7
Photo. 1-6 Situation of barn in developing country	7
Photo. 2-1 Location of A swamp	18
Photo. 2-2 Situation of A swamp	19
Photo. 2-3 Situation of field heaping in A swamp	19
Photo. 2-4 Location of sampling point	20
Photo. 2-5 Sedimentation tank	20
Photo. 2-6 Colonies of <i>E. coli</i> and coliform bacteria	21
Photo. 3-1 Situation of manures	32
Photo. 3-2 Situation of artificial rainfall simulator	33
Photo. 3-3 Situation of incorporating	34
Photo. 3-4 Colonies of <i>E. coli</i> and coliform bacteria	37
Photo. 4-1 Buffer strips in field around A swamp	50
Photo. 4-2 <i>Ophiopogon japonicus</i> Ker Gawl.	52
Photo. 4-3 Situation of slope model	53
Photo. 4-4 Colonies of <i>E. coli</i> and coliform bacteria	54
Photo. 5-1 Sedimentation tank around A swamp	62
Photo. 5-2 Sedimentatation tank	64
Photo. 5-3 Gravel	65
Photo. 5-4 Carbon	65

Photo. 5-5 Lime nitrogen	65
Photo. 5-6 Colonies of <i>E. coli</i> and coliform bacteria	67
Photo. 6-1 Situation of air drying experiment	78
Photo. 6-2 Colonies of <i>E. coli</i> and coliform bacteria	80
Photo. 6-3 Colonies of general bacteria	80
Photo. 6-4 Situation of dried cow dung	83
Photo. 7-1 Situation of cow dung and manure	93
Photo. 7-2 Lime nitrogen	94
Photo. 7-3 Situation of incubator	94
Photo. 7-4 Scallop-Shell	96
Photo. 7-5 Colonies of <i>E. coli</i> and coliform bacteria	98
Photo. 7-6 Colonies of general bacteria	98
Photo. 8-1 Shell in developing country	116

第 I 章

研究の背景と目的

第 1 節 研究の目的と意義

農林水産省の 2012 年に実施した推計によると、日本では約 8400 万トンもの家畜糞尿を排出していると見積もられ、その約 6 割である約 4900 万トンは牛糞とされている (Fig. 1-1)。これは、日本におけるバイオマス資源の 4 分の 1 を占める割合である。これら有機資源の活用方法として、堆肥化、液肥化して農地に還元することが資源循環の視点から注目されており (Photo 1-1)、多くの農家、自治体で実施されている。

しかし、堆肥の急激な増産は切り返しや水分管理の不足に起因する、発酵不足の未熟堆肥の増加を招く可能性がある。これら未熟堆肥中には *E. coli* (Photo 1-2) 等の病原性を持つ菌の生存が報告されている (糞ら 2005)。*E. coli* とは、学名 *Escherichia coli* (エシェリキア・コライ) で日本語では大腸菌の名で広く認知されており、生食用牡蠣などの食品における成分規格となっている。*E. coli* は大腸菌群の一種である。大腸菌群とは、グラム陰性の無芽胞桿菌で、乳糖を分解して酸とガスを産生する通性嫌気性の細菌の一群を言い、水質などの環境衛生管理上の汚染指標菌と考えられている。*E. coli* はこの中でも糞便系大腸菌群に属しており、糞便に生存しやすく、自然界では死滅しやすい特徴を持つ。このことから、*E. coli* が検出された場合、直接または間接的に糞便汚染を受けた可能性が高い事を示している (総合食品安全事典編集委員会 1997)。本研究では糞便汚染の指標として大腸菌(以後、*E. coli* と表記)と、環境衛生管理上の指標として *E. coli* を除

いた大腸菌群（以後、大腸菌群と表記）に分けて、それぞれ分析・議論を行った。

これら、*E. coli*や大腸菌群等の病原性を持つ菌が生残している未熟堆肥を畑地に施用した場合、降雨や表面流に伴い、*E. coli*や大腸菌群が河川や湖沼に流出する可能性がある。その結果、河川の細菌汚染といった水質汚染や、流域の衛生環境の悪化を引き起こす可能性がある。特に、牛は*E. coli*や大腸菌群の保有率が高く(中澤、鮫島 2002)、牛糞由来の未熟堆肥を施用した畑地においては、より多くの*E. coli*や大腸菌群が流出する可能性がある。既往の研究においても河川が感染症の感染経路になるとの報告もあることから(田村ら 2006、三品ら 2007)、未熟堆肥の施用による*E. coli*、大腸菌群の拡散は重大な環境汚染の一つであると言える。

これらの問題に対し、日本では、平成 11 年 11 月 1 日に「家畜排せつ物の管理の適正化及び利用の促進に関する法律」が施行され、牛や馬ならば 10 頭、豚ならば 100 頭、鶏であれば 2000 羽以上飼育している畜産農家には、家畜糞尿を直接土壌に散布する「野積み」を禁止している。さらに Photo 1-3 のような、コンクリートその他の不浸透性材料で築造した管理施設の設営や、糞尿の発生量や処理方法、処理量の記録を付けることが義務付けられている。しかし、小規模農家では、10 頭以上飼育していても、慣習的に野積みを行っており、日本においても下流域への*E. coli*、大腸菌群の流出が懸念される(Photo 1-4)。また、発展途上国においては堆肥化に関する知識や技術が十分ではなく、Photo 1-5 のように牛糞がそのま

ま農地に施用されている。さらに、畜舎とため池が隣接していることも多く、日本以上に重大な問題となっていると考える (Photo 1-6)。

これらのことから、未熟堆肥を施用した畑地における *E. coli*、大腸菌群の流出特性の解明、施用後および堆肥化過程における *E. coli*、大腸菌群の流出に関する保全対策の考案が求められてきた。

そこで、本研究では *E. coli*、大腸菌群の流出特性の解明と保全対策の提案を目的に、未熟堆肥を施用した畑地からの *E. coli*、大腸菌群の流出特性の解明、未熟堆肥を施用した畑地、および堆肥化過程における *E. coli*、大腸菌群の抑制対策の3つの項目について検証した。

未熟堆肥を施用した畑地からの *E. coli*、大腸菌群流出のメカニズムの解明から、その保全対策まで検証した本研究は、今後発展途上国に技術移転をしていく上での基礎となるため、意義のある研究であると考えられる。

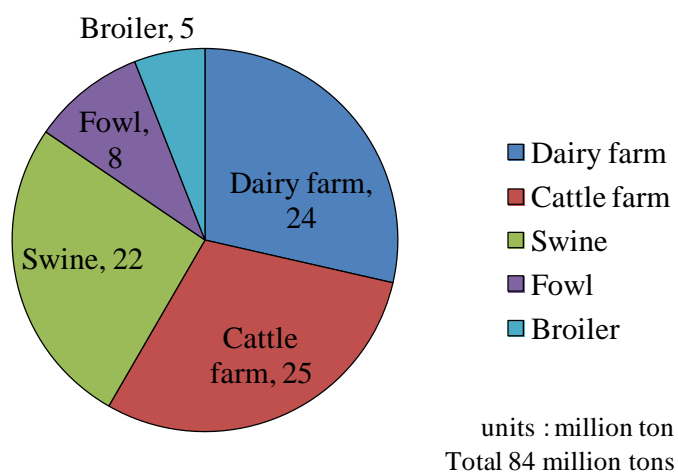


Fig. 1-1 Detail of dung emission



Photo 1-1 Situation of making manure

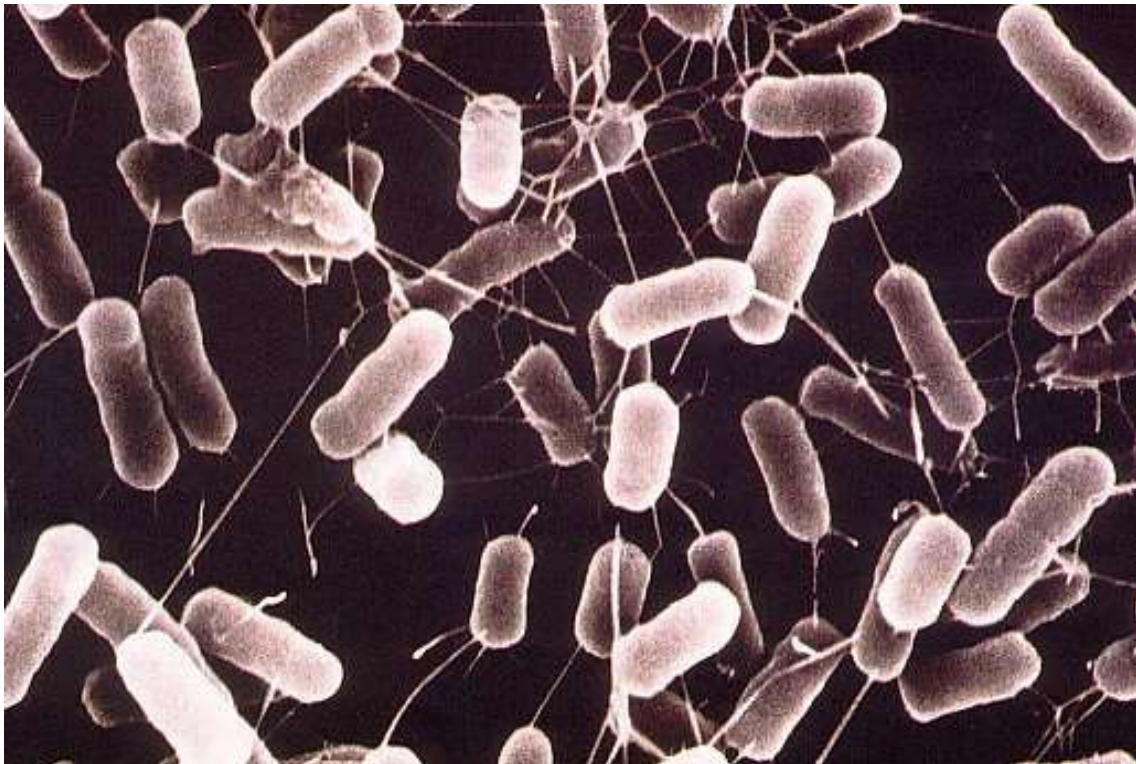


Photo 1-2 *Escherichia coli*



Photo 1-3 Maintenance facilities of cow dung



Photo 1-4 Situation of field heaping



Photo 1-5 Situation of manure applying in developing country



Photo 1-6 Situation of barn in developing country

第 2 節 従来の研究と課題

未熟堆肥を施用した畑地における *E. coli*、大腸菌群に関する既往の研究として、湊(2005)や Islam et al.(2005)は、Ashour and Lee(2000)によって、長期間にわたる土壌中での *E. coli*、大腸菌群の生存を確認している。流出について見てみると、MISHRA ら(2008)は牛糞堆肥施用直後に降雨があった場合に下流の水域に大きな細菌負荷をもたらすとの報告している。また、八倉ら(2006)は牛放牧地から政令値を上回る大腸菌群が流出したとも報告しているが、未熟堆肥を施用した農地における *E. coli*、大腸菌群の流出特性に関する議論は充分とは言えない。

さらに、土壌・肥料成分の流出対策については、緩衝帯の設置(川井ら 2007, 上野ら 2001, Lalita ら 2009)や沈砂池(山本ら 2004)、土砂溜など、多くの流出抑制対策が講じられているが、*E. coli*、大腸菌群の流出に関する保全対策については、ほとんど議論がされていない。

また、堆肥化過程における *E. coli*、大腸菌群の抑制技術に関連した既往の研究として、微生物の生育に必要な温度、水分、pH などを用いて議論されている。温度については、森, 崎本(1999)が間欠通気を用いて発酵を促進させ、発酵熱を高めることで *E. coli*、大腸菌群の抑制している。しかし、このような方法はコストがかかるため、発展途上国への技術移転の視点から、より簡易な方法を考案する必要がある。

そこで、簡易な方法として、風乾処理による水分調整があ

る。Saito and Mihara(2010)は牛糞に風乾処理を施したところ、*E. coli*の抑制効果があることを明らかにした。しかし、堆肥化に必要な微生物を含む一般細菌への影響についての議論は不十分であり、一般細菌の生残とあわせて、堆肥化に影響のない抑制方法の議論を行う必要がある。

一方、pH調整も有効な*E. coli*、大腸菌群の抑制方法の一つとされている。仲西・丸山(2009)によると*E. coli*、大腸菌群はpH 4.4~9.0の範囲で生育が可能であると言われており、医学や食品の分野において、殺菌に関する多くの研究がなされている。その一つとして、ホタテ貝殻焼成粉末(Heated Scallop-Shell Powder : HSSP)の添加が挙げられている。このHSSPによって、村田ら(2006)は生理食塩水中の大腸菌を殺菌したことを報告している。また、一色ら(1994)や澤井ら(2003)、澤井(2007)によると、加熱した貝殻粉末を添加することで、食品中の大腸菌や微生物の生育が抑制するなどの効果が立証されている。堆肥化過程においてもpH調整が試みられている。既往の研究において、湊(2001)は牛糞に石灰窒素を添加してpHを12.0付近に調整することで大腸菌群の抑制効果があると報告しているが、同時に一般細菌が減少することも報告している。また、堆肥化における最適なpHとして、北脇、藤田(1984)はpH 8~10において堆肥中の微生物が活発になると報告している。これらのことから、堆肥のpHを9.0付近に調整することで、有益な微生物を含む一般細菌に影響を与えることなく*E. coli*や大腸菌群の殺菌が可能であると仮説立てた。

第 3 節 本研究の構成

本研究は Fig. 1-2 のように、全 8 章から構成されている。第 I 章では研究の背景と目的について述べた。第 II 章では *E. coli*、大腸菌群の流出に関する現状を調査した、第 III 章では *E. coli*、大腸菌群の流出特性の解明、第 IV 章、第 V 章では未熟堆肥を施した畑地からの *E. coli*、大腸菌群の流出抑制技術の解明、第 VI 章、第 VII 章では堆肥化過程における *E. coli*、大腸菌群の抑制技術について、それぞれ述べ、その後研究の総括を述べた。各章の詳細については以下の通りである。

第 I 章では研究の背景と目的を示した。未熟堆肥の利用に *E. coli*、大腸菌群の流出の可能性を示すとともに、本研究と関連した既往の研究を述べることで、取り組むべき課題を明確にした。

第 II 章では大腸菌群流出の現に関する調査として、埼玉県 A 沼付近の野積み現場周辺における *E. coli*、大腸菌群流出の実態について現地調査を行った。

第 III 章では *E. coli*、大腸菌群の流出特性の解明を目指して、模型斜面ライシメータと人工降雨装置を用いたモデル実験を行った。異なる施用方法における *E. coli*、大腸菌群流出の違いを比較するとともに、流出水を濾過することで、懸濁液と上澄み液に分けて比較を行った。

第 IV 章では、*E. coli*、大腸菌群の流出抑制対策として、緩衝帯の設置による流出抑制効果を検証するため、人工降雨装置を用いた流出実験を行った。

第 V 章では、土砂溜に玉砂利、活性炭、石灰窒素の 3 種類のフィルター層を設置して *E. coli*、大腸菌群の流出抑制効果の比較検討を行った。

第 VI 章では、堆肥化過程における *E. coli*、大腸菌群の抑制技術の一つとして、風乾処理を試みた。微生物の生育に欠かせない水分を調整することが *E. coli*、大腸菌群の生残に与える影響について検証した。あわせて、堆肥化に必要な一般細菌数についても調べることで、堆肥化への影響も検討した。

第 VII 章では、pH 調整が堆肥中の *E. coli*、大腸菌群、一般細菌の生残に与える影響について検証するため、石灰窒素、ホタテ貝殻焼成粉末 (HSSP) を用いて pH を 9.0 付近に調整し、微生物相の変化を追った。

第 VIII 章では研究の総括と、今後の課題について述べた。

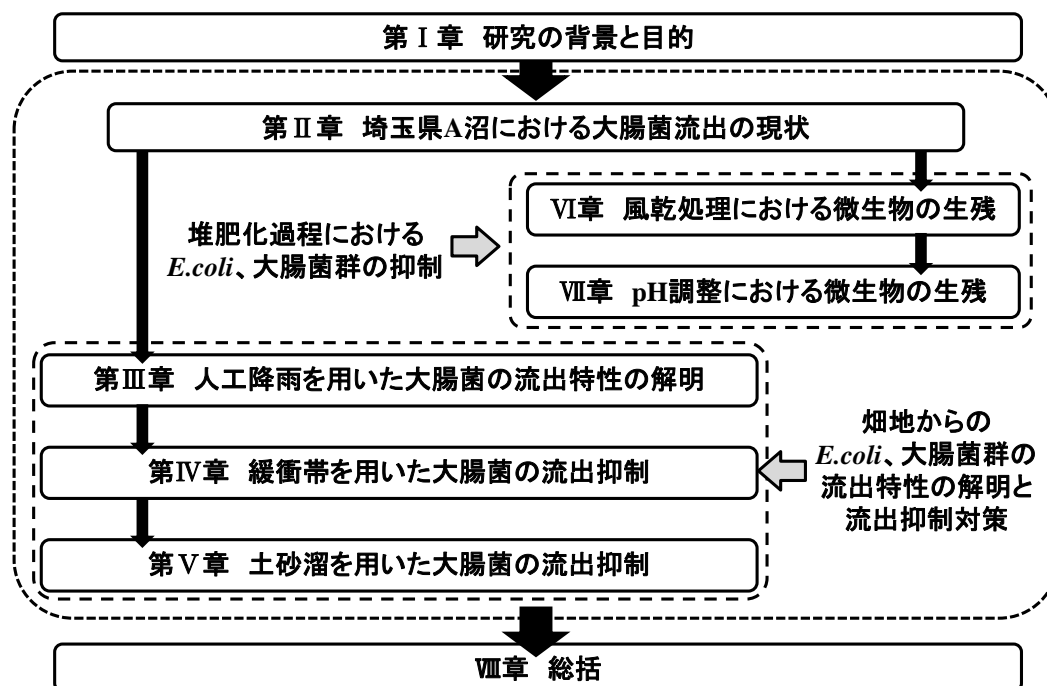


Fig. 1-2 Research structure of this dissertation

参考・引用文献（第 I 章）

農林水産省 HP 家畜排せつ物の発生と管理の状況：

http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kankyo/taisaku/t_mondai/02_kanri/index.html

糞春明，越田淳一，森山典子，王曉丹，有働武三，井上興一，
染谷孝(2005)：種々の堆肥中における大腸菌群等の生残

日本土壌肥料学雑誌． Vol.76 No.6 pp.865-874

総合食品安全事典編集委員会(1997)：食中毒性微生物．株式会社
産業調査会 pp.17-18

中澤宗生，鮫島俊哉(2002)：牛の腸管出血性大腸菌 O157：H7
の排菌と飼料の関連．感染症学雑誌 第 76 巻 1 号 pp.76-77

田村広子，佐々木美江，畠山敬，川野みち，谷津壽郎，秋山
和夫(2006)：宮城県における腸管出血性大腸菌感染症の発
生要因と予防対策の検証．宮城県保健環境センター年報 第
24 号 pp.50-54

三品道子，高橋恵美，佐々木美江，畠山敬，上村弘，谷津壽
郎，齋藤紀行(2007)：腸管出血性大腸菌感染症が多発した
地域における感染経路の解明．宮城県保健環境センター年
報 第 25 号 pp.34-37

農林水産省 HP 家畜排せつ物の管理の適正化及び利用の促進
に関する法律について

http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kankyo/taisaku/t_mondai/03_about/pdf/1_law1.pdf

湊啓子(2005)：乳牛ふん尿の処理・利用過程における大腸菌

の動態と流出防止対策．畜産技術 No.604 pp.6-10

Mahbub Islam, Michael P. Doyle, Sharad C. Phatak, Patricia Millener, Xieping Jiang(2005) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on carrots and onions grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. Food Microbiology, Vol.22, 63-70

Jamal Abu-Ashour, Hung Lee(2000) : Transport of Bacteria on Sloping Soli Surfaces by Runoff. Environmental Toxicology Vol.15 No.2 pp.149-153

Anurag Mishra, Brian L. Beanham, Saied Mostaghimi(2008) : Bacterial Transport from Agricultural Lands Fertilized with Animal Manure. Water Air Soil Pollution Vol.189 No.1-4 PP.127-134

八倉寿代，多田哲子，安富政治(2006):牛放牧場からの窒素、リン、大腸菌の流出量．京都府畜産技術センター試験研究報告 第3号 pp.71-73

上野貴司，三原真智人，Janya Sang-Arun，土器屋由紀子(2001) : 植生帯を用いた畑地土壌の流出負荷制御．土壌の物理性 No.88 pp.11-18

川井聡之，河村征，三原真智人(2007) : *Ophiopogon japonicus* Ker-Gawl.を用いた土壌および窒素・リン成分の捕捉特性に与える植生幅の影響．環境情報科学論文集 21 pp.591-594

Lalita Siri wattananon, Toshiyuki Kawai and Machito Mihara(2009) : Effects of Grass Buffer Strips using *Ophiopogon japonicas* on Reducing Soil and Nitrogen Losses

under Different Fertilization. Journal of Environmental Information Science Vol.37 No.5 pp.61-66

山本尚行，三原真智人，駒村正治(2004)：フィルター層の目詰まりによる排水機能の低下を考慮した沈砂池構造．環境情報科学論文集 18 pp.403-408

森達摩，崎元道男(1999)：大腸菌死滅を目的とした間欠通気による牛糞の高温発酵堆肥化．大阪府立農林技術センター研究報告 第35号 pp.60-63

Yu Saito and Machito Mihara(2010) Management of manure taking into account of *E. coli* loss from farmland. IJERD-International Journal of Environmental and Rural Development, 1-1, pp.175-180

金子栄廣，藤田賢二(1986)：堆肥化反応における水分の限界に関する研究．土木学会論文集 第369号 pp.303-309

仲西寿男．丸山務(2009)：食品由来感染症と食品微生物．中央法規出版 p.283

村田亜悠美，小尾信子，中平比沙子，宮原龍郎，落合宏(2008)：ホタテ貝殻焼成粉末の殺菌および殺インフルエンザウイルス作用について．富山大学看護学会誌 第7巻2号 pp.39-49

一色堅司，栖原浩，水内健二，徳岡敬子(1994)：カルシウム製剤による微生物制御の可能性について．日本食品工業学会誌 第41巻第2号 pp.135-140

澤井淳，五十嵐英夫，菊池幹夫(2003)：加熱処理した貝殻粉末の抗菌活性を応用した微生物制御．日本食品微生物学会

雑誌 Vol.20 No.1 pp.1-7

澤井 淳 (2007) : 酸化カルシウムを主成分とする焼成ホタテ貝殻粉末の細胞芽胞に対する抗菌特性. *New Food Industry* Vol.49 No.2 pp.41-48

湊啓子, 田村忠, 前田善夫 (2001) : 石灰窒素の添加が牛ふんの堆肥化および大腸菌の消長に及ぼす影響. 北海道立畜産試験場研究報告 第24号 pp.11-17

湊啓子, 田村忠, 前田善夫 (2001) : 石灰窒素の牛ふん中大腸菌に対する殺菌効果. 第24号 pp.21-24

北脇秀敏, 藤田賢二 (1984) : 低級脂肪酸による堆肥化過程の阻害に関する研究. 衛生工学研究論文集 第20巻 pp.175-182

Photo.1-2

<http://www.biological-j.net/blog/daityoukin.jpg>

第Ⅱ章

埼玉県 A 沼における 大腸菌流出の現状

第 1 節 本章の目的

本章では現場における *E. coli*、大腸菌群流出の現状を知ることがを目的とし、埼玉県にある農業用ため池、A 沼付近の野積み現場や畑地周辺において現地調査を行い、水中および底泥中の *E. coli*、大腸菌群数がどのように分布しているかを調査した。

第 I 章で述べたように、牛糞堆肥を施用した畑地からは *E. coli*、大腸菌群流出による水質汚染が懸念される。これらの問題を受け、日本では平成 11 年 11 月 1 日における「家畜排せつ物の管理の適正化及び利用の促進に関する法律」の施行など、*E. coli*、大腸菌群流出抑制に向けた家畜糞尿管理に関心が注がれてきた。しかし、上記の法律は牛ならば 10 頭未満の畜産農家では適用の範囲外である。また、管理施設の設営、家畜糞尿処理に関する膨大なコストなどの面から、未だ慣習的に野積みを行っている畜産農家も少なくない。本章で調査を行った埼玉県 A 沼付近もその一つであり、法律や技術が整備されている日本においても、河川や湖沼への *E. coli*、大腸菌群流出に関する議論は未だに必要である。

これらのことから、現地における *E. coli*、大腸菌群流出の現状を知ることがは、今後、流出特性の解明や、保全対策を論じていく上で必要な情報を得ることが出来る重要な位置づけであると考えられる。そのため、本章は次章以降の室内実験を行っていくうえで、背景となる部分となる。

第 2 節 実験方法

1. 調査対象地

調査対象地である A 沼は埼玉県に位置する、面積約 3.8 ha、貯水量約 57,000 m³ のため池である (Photo. 2-1)。A 沼は、水田の灌漑施設として利用されているが、平成 11 年度から 21 年度にかけての埼玉県営事業により、親水・景観利用保全施設として整備が行われ、護岸工事のほか遊歩道・湿性植物園などが作られ、周辺住民の憩いの場となっている (Photo. 2-2)。この A 沼へ通じる農業用排水路周辺に野積み現場や未熟堆肥を施用している畑地があり (Photo. 2-3)、周辺住民への聞き取りによると沼が黒くなるなどの水質汚染が懸念されている。

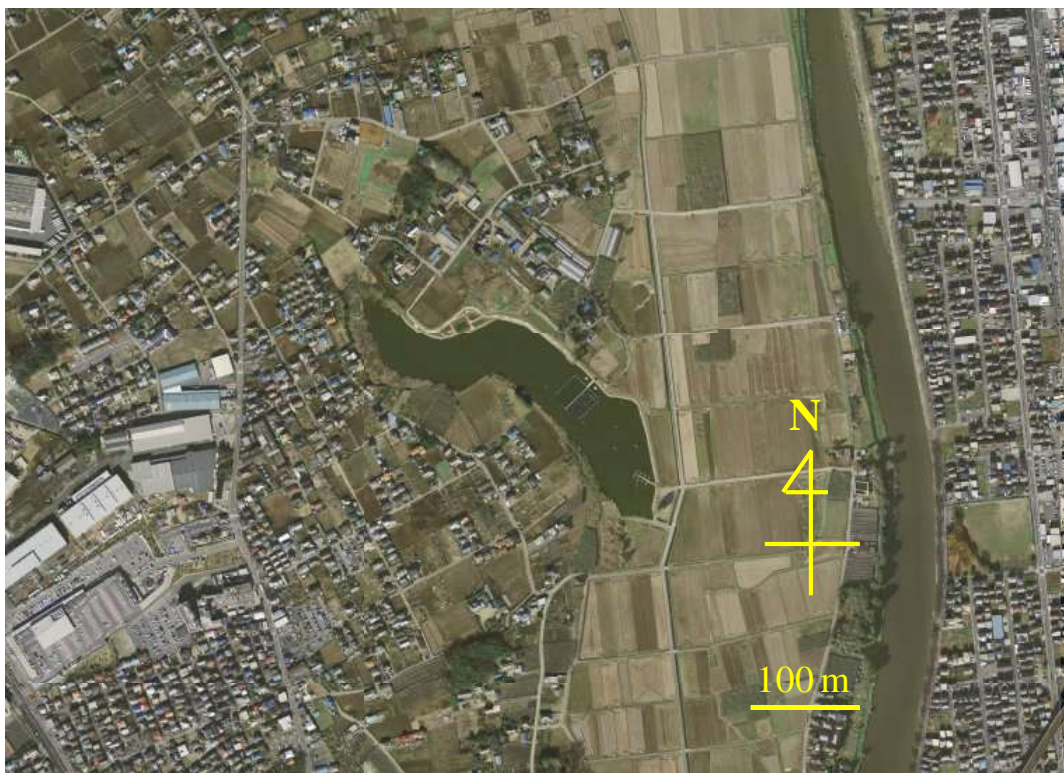


Photo. 2-1 Location of A swamp



Photo. 2-2 Situation of A swamp



Photo. 2-3 Situation of field heaping in A swamp

2. 調査方法

調査は 2011 年 5 月、Photo. 2-4 のように、A 沼周辺の野積み現場、畑地付近の農業用水路の流れに沿って 10 m 毎に 12 ヶ所で水と底泥を採取した。また、Photo.2-4 の No.4 地点においては土砂溜 (Photo. 2-5)があったため、水路と同様に水・底泥を採取した。なお、前年に行なった測定の結果、本現場の上流部においては *E. coli*、大腸菌群は検出されなかった。



Photo. 2-4 Location of sampling point



Photo. 2-5 Sedimentation tank

3. 分析項目

採水した水、底泥中の *E. coli* 数、大腸菌群数を測定した。

E. coli、大腸菌群数は希釈平板法にて Fig. 2-1 のように、数段階希釈後、37 °C で培養し、出現した青いコロニーを *E. coli*、紫色のコロニーを大腸菌群として、それぞれ個別に計数した。なお、培地は *E. coli*、大腸菌群専用の選択培地である XM-G 寒天培地を用いた (Photo. 2-6)。

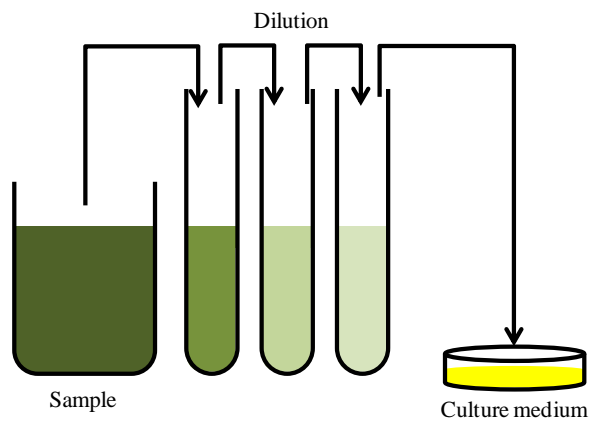


Fig. 2-1 Dilution plate technique

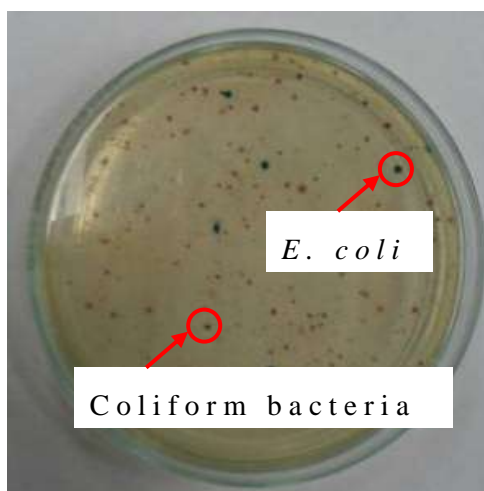


Photo. 2-6 Colonies of *E. coli* and coliform bacteria

第 3 節 結果及び考察

1. 水中・底泥中における *E. coli*、大腸菌群の分布

水中および、底泥中における *E. coli*、大腸菌群の分布をそれぞれ、Fig. 2-2、Fig. 2-3、Fig. 2-4、Fig. 2-5 に示した。

水中における *E. coli* については、ほとんどの箇所では *E. coli* が検出限界であった。一方、大腸菌群では場所の違いに関わらず、 $10^4 \sim 10^5$ cfu/L と高濃度の *E. coli* が流出していた。

一方、底泥中における *E. coli*、大腸菌群の分布について見てみると、野積み現場周辺および通過前においては $10^4 \sim 10^5$ cfu/g の *E. coli* が検出されたが、野積み現場通過後では、ほぼ検出されなかった (Fig. 2-4)。また、大腸菌群については野積み現場通過前での $10^5 \sim 10^6$ cfu/g に対し、野積み現場通過後では $10^4 \sim 10^5$ cfu/g へと濃度が減少する傾向が見られた。これは、畑地から高濃度の *E. coli*、大腸菌群が流出していき、底泥の堆積などによって減少したためと考察した。

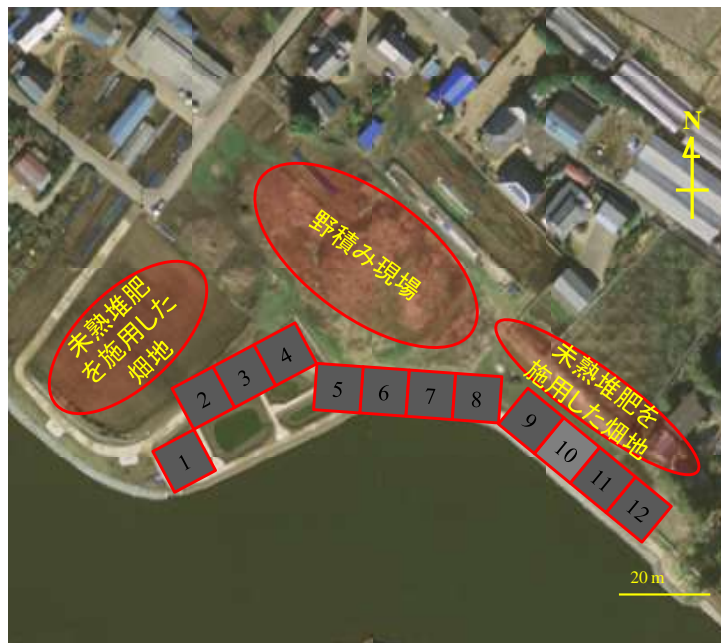
糞便系大腸菌群である *E. coli* は糞便において生存するが、自然界では死滅しやすい傾向がある (総合食品安全事典編集委員会 1997)。このことから、糞便を含む底泥に多く生残していると考察した。一方、大腸菌群は自然界に広く存在し、糞便と離れても生残可能であるため、水中、底泥ともに高濃度であったと考察した。

以上のことから、野積み現場周辺では特に底泥中に多くの *E. coli* が生残していることが明らかとなった。



<i>E. coli</i> (cfu/L)							
	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6

Fig. 2-2 Number of *E. coli* in water



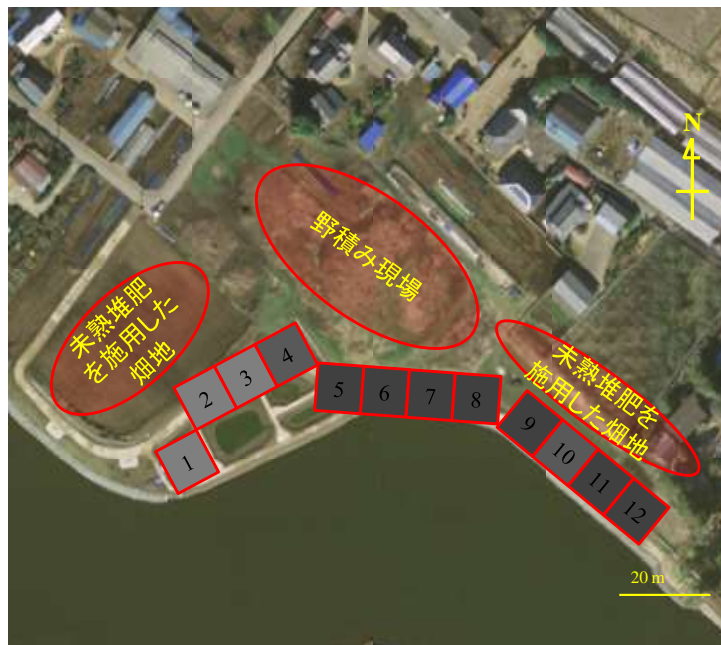
Coliform bacteria (cfu/L)							
	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6

Fig. 2-3 Number of coliform bacteria in water



<i>E. coli</i> (cfu/g)							
	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶

Fig. 2-4 Number of *E. coli* in sludge



Coliform bacteria (cfu/g)							
	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶

Fig. 2-5 Number of coliform bacteria in sludge

2.土砂溜と水路の底泥中における *E. coli*、大腸菌群数の違い

Fig. 2-6、Fig. 2-7 は Photo. 2-4 の No.4 地点に設置されていた土砂溜、および同地点における水路内に蓄積した底泥中の *E. coli* 数、大腸菌群数を示している。

Fig. 2-6 に示したように、*E. coli* については水路内の底泥からは検出されず、土砂溜内の底泥でのみ 350 cfu/g 程度の *E. coli* が検出される結果となった。一方、大腸菌群について見てみると、水路、土砂溜双方で 10^4 cfu/g と、同程度の大腸菌群数が検出された。また、T 検定の結果、水路と土砂溜の間に有意差は見られなかった (Fig. 2-7)。

先述したように、*E. coli* は糞便系大腸菌群という糞便汚染の指標菌である。糞便性大腸菌群は、糞便内においては長期間の生存が可能であるが、糞便の無い自然界では死滅しやすい特徴がある。このことから、流速のある水路よりも水流が緩やかになる土砂溜内の底泥中に糞便が蓄積し、*E. coli* が生残したと考察した。あわせて、流速が速く、糞便が堆積しにくい水路では *E. coli* が検出されなかったと考察した。また、自然界に広く存在し、糞便が無くても生残が可能な大腸菌群は、糞便の有無に関係なく一定の濃度を保つことが可能であったと考察した。

以上の結果より、土砂溜内の底泥中には高濃度の *E. coli*、大腸菌群が生残していることが明らかとなり、土砂溜の改良を行うことで、*E. coli*、大腸菌群流出を抑制する機能を付与出来る可能性が示された。

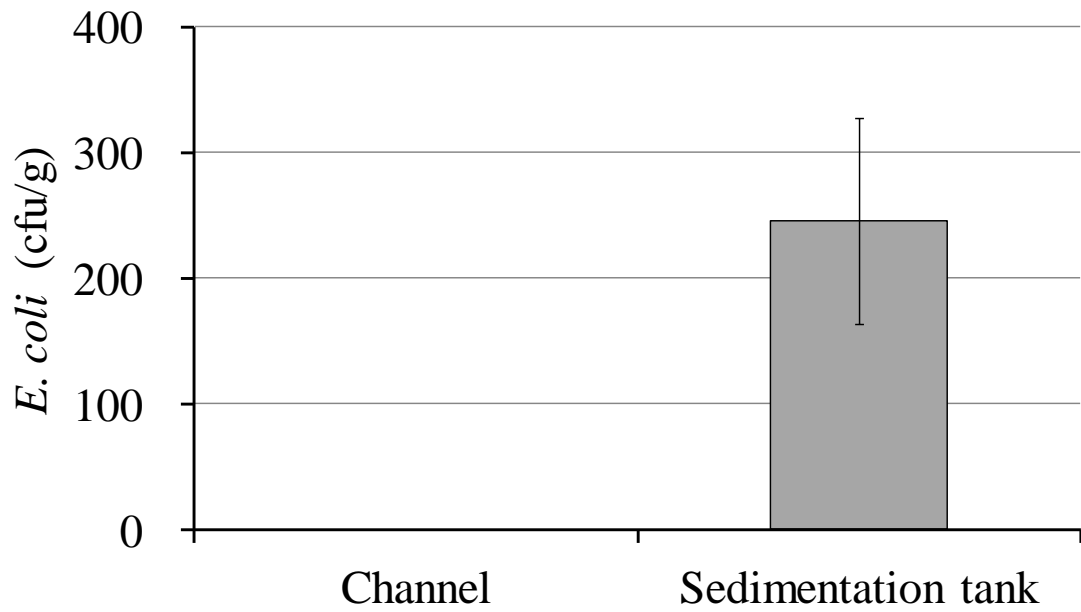


Fig. 2-6 Number of *E. coli* in channel and sedimentation tank

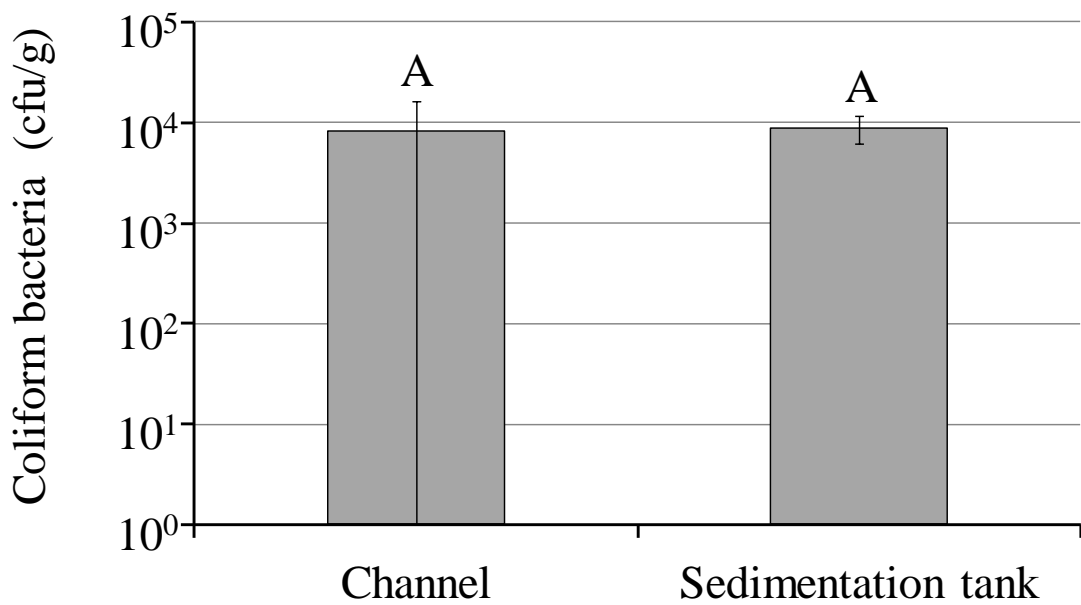


Fig. 2-7 Number of coliform bacteria in channel and sedimentation tank

第 4 節 本章のまとめ

本実験では埼玉県 A 沼付近にある野積み現場、畑地周辺における *E. coli*、大腸菌群の流出に関する現状を調査した。

野積み現場、畑地周辺の水と底泥中の *E. coli*、大腸菌群数を測定したところ、糞便が少ない水中では糞便性大腸菌群である *E. coli* はほぼ検出されなかった。しかし、糞便を多く含む底泥中においては野積み現場を中心に高濃度の *E. coli* が検出され、底泥などの流出に伴う *E. coli* 流出の可能性が示された。

一方、自然界に広く存在し、糞便から離れても生残可能な大腸菌群については水、底泥ともに広範囲で高濃度の *E. coli* が検出される結果となった。

あわせて、水路と土砂溜内の底泥中における *E. coli* を比較したところ、優位差こそ見られなかったが、土砂溜中に多くの *E. coli*、大腸菌群が生残している傾向が見られた。

これらの結果から、*E. coli*、大腸菌群は糞便や底泥などの懸濁物質とともに流出している可能性が示された。あわせて、土砂溜内に *E. coli*、大腸菌群を殺菌する仕組みを備えることで、流出抑制効果を付与することが出来ると考察した。

本章の結果より、*E. coli*、大腸菌群の流出特性の一つとして、底泥などの懸濁物質の流出に伴う可能性が見られた。そのため、次章では室内実験を通して *E. coli*、大腸菌群の流出特性の解明を試みた。

参考・引用文献（第Ⅱ章）

農林水産省 HP 家畜排せつ物の発生と管理の状況：

http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kankyo/taisaku/t_mondai/02_kanri/index.html

農林水産省 HP 家畜排せつ物の管理の適正化及び利用の促進に関する法律について

http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kankyo/taisaku/t_mondai/03_about/pdf/1_law1.pdf

はすだ観光協会：

<http://hasuda-kankokyokai.com/yamanokami.html>

総合食品安全事典編集委員会(1997)：食中毒性微生物．株式会社 産業調査会 pp.17-18

第Ⅲ章

人工降雨を用いた 大腸菌の流出特性の解明

第 1 節 本章の目的

本章では *E. coli*、大腸菌群の流出特性を解明することを目的に、試料を施した模型斜面ライシメータと人工降雨装置を用いて *E. coli*、大腸菌群の流出実験を行った。

第 II 章の結果の通り、牛糞を野積み現場や畑地から多くの *E. coli*、大腸菌群の流出が確認された。特に、水中に比べ、底泥中に多くの *E. coli*、大腸菌群が検出される結果となった。このことから、底泥などの懸濁物質が *E. coli*、大腸菌群流出に関与している可能性が示唆された。

既往の研究において、湊(2005)や Islam ら(2005)、Ashour and Lee(2000)は長期間における土壌中の *E. coli*、大腸菌群の生残を報告している。このことから、現地において長期にわたる *E. coli*、大腸菌群の流出が懸念される。あわせて、畑地(MISHRA ら, 2008)や牛放牧地(八倉ら, 2006)からの *E. coli*、大腸菌群の流出が報告されているが、多くは畜産農場との関連についての議論であり、未熟堆肥を施用した畑地における *E. coli*、大腸菌群の流出メカニズムについて議論されたものは少ない。

本章では人工降雨装置を用いた流出実験を通して *E. coli*、大腸菌群の流出特性の解明を図ることを目的に 2 種類の実験を行った。一つは表面施肥、すき込みという二種類の施用方法間での *E. coli*、大腸菌群の流出特性の比較検討、もう一つは表面流における *E. coli*、大腸菌群の流出が懸濁液成分と上澄み液成分のどちらに多く生残しているかの比較検討である。

第 2 節 実験方法

1. 実験方法

1)異なる施用方法による *E. coli*、大腸菌群の流出特性の比較

試料は東京農業大学富士畜産農場にて採取した牛糞、一次発酵堆肥を使用した(Photo. 3-1)。牛糞は当日排出されたもの、一次発酵は牛糞を約 2 週間発酵させたものを使用した(Table 3-1)。各試料中の乾燥重量 1 g あたりの *E. coli* 数はそれぞれ 197×10^5 、 21×10^3 cfu/g であった。また、大腸菌はそれぞれ 28×10^5 、 12×10^5 cfu/g であった(Table 3-2)。

流出実験は 2011 年 8 月、人工降雨装置下に模型斜面ライシメータ(斜面長 1.3 m、幅 0.11 m、深さ 0.05 m)を設置して行った(Photo. 3-2)。傾斜角度は農業機械が入れる最大角度である 8° に設定し、土壌は関東ローム土を用いた(Table 3-3)。実験開始の 24 時間前に少量ずつ水を流し、土壌水分を均一化後、実験を行った。なお、事前の実験の結果、土壌中に *E. coli*、大腸菌群は検出されなかった(Table 3-4)。試料は各ライシメータに表面施肥、すき込みで 10 t/ha の量で施用した。すき込みはスコップを使い、ロータリー耕耘を模してすき込んだ(Photo. 3-3)。降雨強度は 60 mm/h に設定し、観測は 2 時間行った。実験開始より最初の 1 時間は 15 分、後の 1 時間は 30 分毎に表面流出水を採水し、実験終了 24 時間後に浸透流出水を採水した(Fig. 3-1)。



Photo. 3-1 Situation of manures

Table 3-1 Properties of manures

	Sub material	Fermentation length	Water contents (%)	Organic matter (%)
Cow dung	sawdust	0 days	82	88
Manure fermented for 2 weeks	sawdust	2 weeks	73	87

Table 3-2 Number of microorganisms in manures

	<i>E. coli</i> (cfu/g)	Coliform bacteria (cfu/g)
Cow dung	197×10^5	28×10^5
Manure fermented for 2 weeks	21×10^3	12×10^5

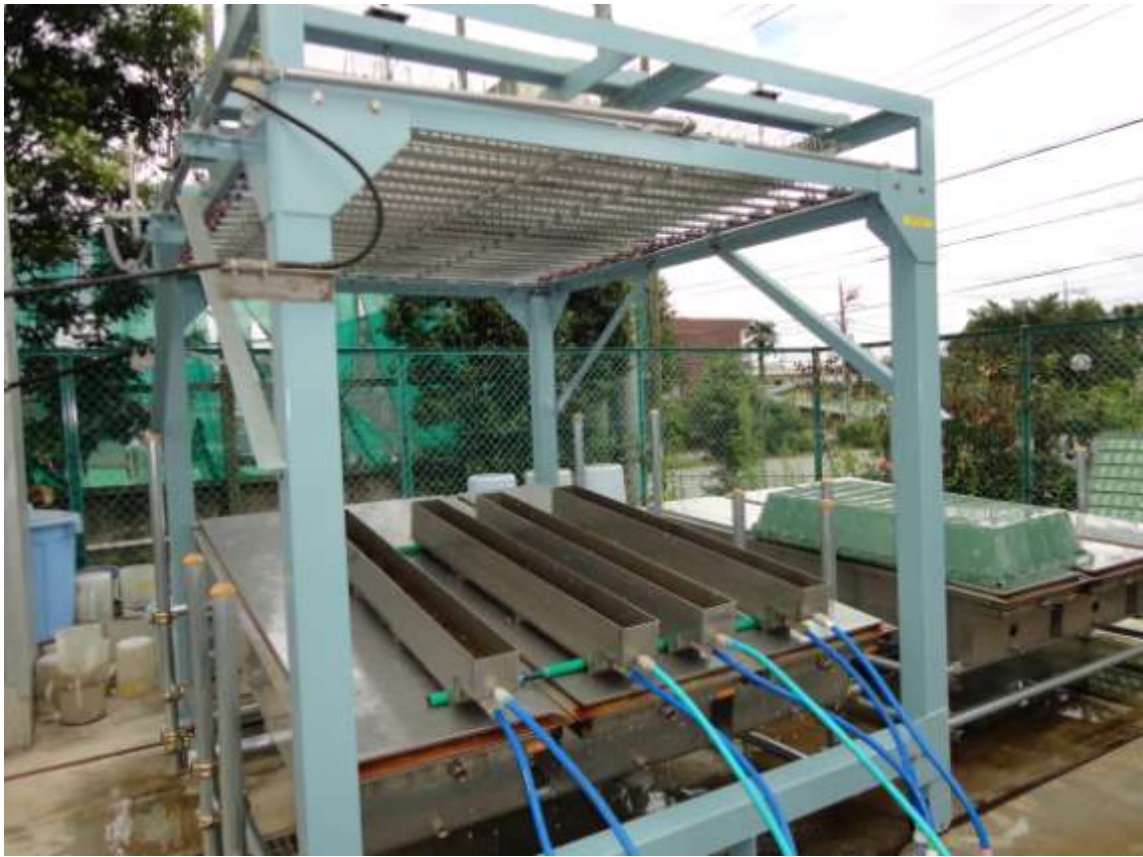


Photo.3-2 Situation of artificial rainfall simulator

Table 3-3 Properties of soil

Specific gravity	Particle size distribution (%)					Soil texture
	Gravel	Coarse sand	Fine sand	Silt	Clay	
2.67	0.9	21.8	26.7	30.6	20.0	CL

Table 3-4 Chemical and biological properties of soil

Ignition loss (%)	EC (mS/m)	pH	<i>E. coli</i> (cfu/g)	Coliform bacteria (cfu/g)
14.31	39.7	5.88	0	0



Photo. 3-3 Situation of incorporating

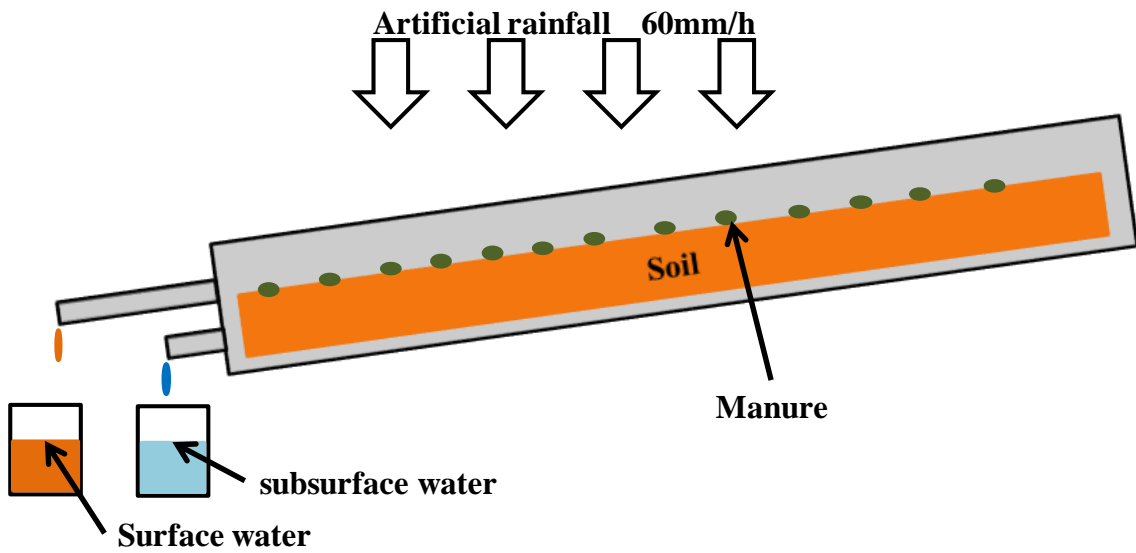


Fig. 3-1 Outline of runoff experiment

2)懸濁液と上澄み液の違いによる *E. coli*、大腸菌群流出量の比較

試料は東京農業大学富士畜産農場にて採取した牛糞と、一次発酵堆肥を使用した。各試料の含水率はそれぞれ 82、69%であり、有機物量は牛糞では 86%、一次発酵堆肥では 85%であった (Table 3-5)。各試料中の乾燥重量 1 g あたりの *E. coli* 数はそれぞれ 14×10^5 、 14×10^4 cfu/g であった。また、大腸菌はそれぞれ 25×10^5 、 3×10^3 cfu/g であった (Table 3-6)。

流出実験は 2013 年 8 月に、施用方法の比較と同様に、人工降雨装置下に模型斜面ライシメータを設置して行った (Photo. 3-4)。傾斜角度は農業機械が入れる最大角度である 8°に設定し、土壌は関東ローム土を使用した (Table 3-7、Table 3-8)。牛糞、一次発酵堆肥は表面施肥で 10 t/ha の量で施用し、降雨強度は 60 mm/h に設定した。観測は 2 時間行い、30 分経過毎に表面流出水を採水した。

採取後、流出水の懸濁物質が沈降するまで静置し、上澄み液を 2.5 μ m メッシュの濾紙を用いて濾過した。濾過後の上澄み液を懸濁液と併せて分析した (Fig. 3-3)。

Table 3-5 Properties of manures

	Sub material	Fermentation length	Water contents (%)	Organic matter (%)
Cow dung	sawdust	0 days	82	86
Manure fermented for 2 weeks	sawdust	2 weeks	69	85

Table 3-6 Number of microorganisms in manures

	<i>E. coli</i> (cfu/g)	Coliform bacteria (cfu/g)
Cow dung	14×10^5	25×10^5
Manure fermented for 2 weeks	19×10^4	3×10^3

Table 3-7 Properties of soil

Specific gravity	Particle size distribution (%)					Soil texture
	Gravel	Coarse sand	Fine sand	Silt	Clay	
2.68	0.3	19.9	29.4	31.4	18.9	CL

Table 3-8 Chemical and biological properties of soil

Ignition loss (%)	EC (mS/m)	pH	<i>E. coli</i> (cfu/g)	Coliform bacteria (cfu/g)
14.56	45.9	5.29	0	0

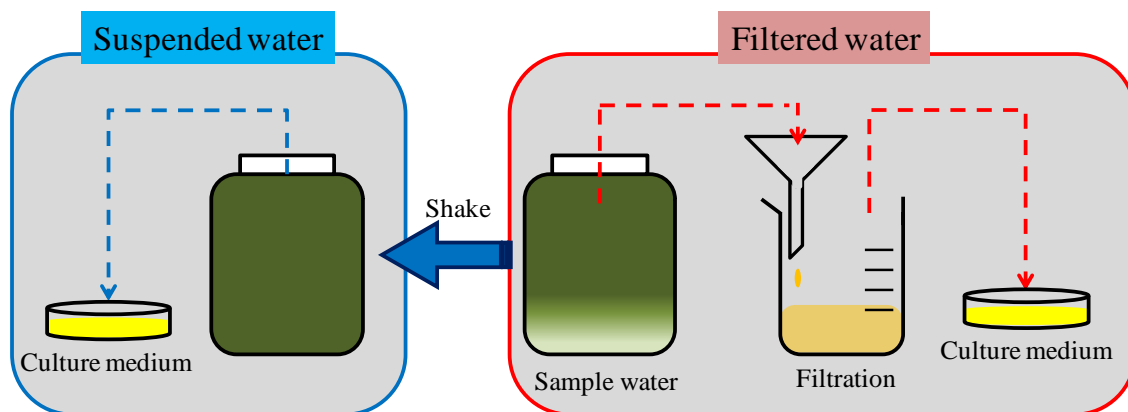


Fig. 3-2 Filtration of sample

2. 分析項目

採水した試料中の *E. coli* 数、大腸菌群数を測定した。

E. coli 数は希釈平板法にて Fig. 3-3 のように数段階の希釈を行い 37 °C で培養後、出現した青いコロニーを *E. coli*、紫色のコロニーを大腸菌群として、それぞれ個別に計数した。なお、培地は *E. coli*、大腸菌群専用の選択培地である XM-G 寒天培地を用いた (Photo. 3-4)。

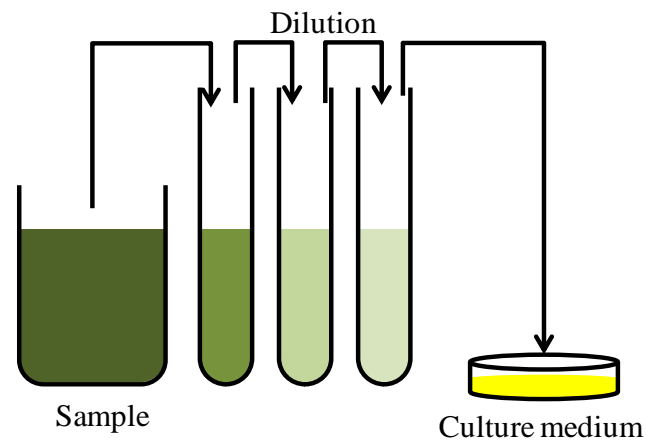


Fig. 3-3 Dilution plate technique

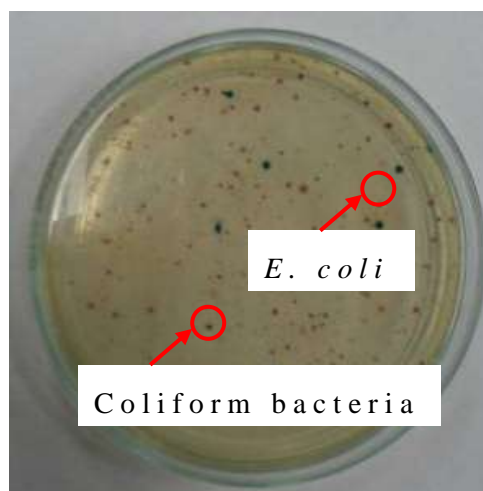


Photo. 3-4 Colonies of *E. coli* and coliform bacteria

第 3 節 結果及び考察

1. 施用方法の違いによる *E. coli*、大腸菌群の収支

牛糞、一次発酵堆肥における *E. coli*、大腸菌群の収支をそれぞれ、Fig. 3-4、Fig. 3-5、Fig. 3-6、Fig. 3-7 に示した。

牛糞における *E. coli* の収支では表面施肥、すき込みの施用方法に関わらず、2 時間の降雨で投入量と同程度の *E. coli* が流出した。また、分散分析を行ったところ、投入量と 2 つの試験区からの流出量との間に有意差は見られなかった。一次発酵堆肥についても同様に、投入量と同程度以上の *E. coli* が流出した。

大腸菌群について見てみると、*E. coli* と同様、投入量と同程度以上の大腸菌群が表面施肥、すき込みの双方の試験区から流出した。また、分散分析の結果、有意差は見られなかった。

これは、通性嫌気性細菌である大腸菌群が、嫌気性である保存状態から、好気性であるライシメータに施用した際に増殖したため、同程度以上の量が流出したと考察した。

また、施用方法別に比較してみると、発酵段階に関わらず、施用方法の違いによる *E. coli*、大腸菌群流出量に明確な差が見られず、有意差も見られなかった。

以上のことから、2 時間の降雨で投入量と同程度流出し、施用方法は *E. coli*、大腸菌群流出に大きな影響を与えないと考察した。

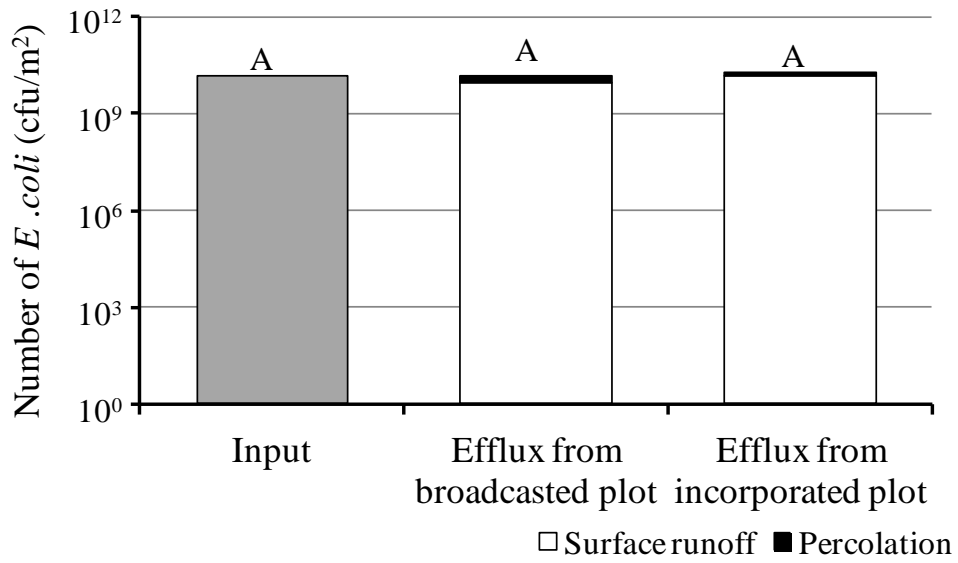


Fig. 3-4 Number of *E. coli* input in fresh cow dung and *E. coli* efflux through surface runoff and percolation

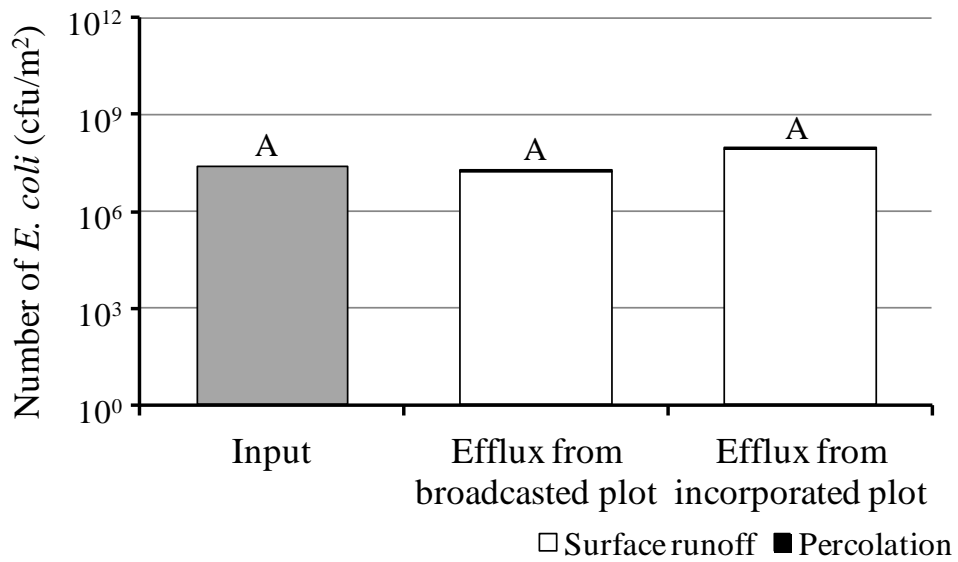


Fig. 3-5 Number of *E. coli* input in 2 weeks fermented manure and *E. coli* efflux through surface runoff and percolation

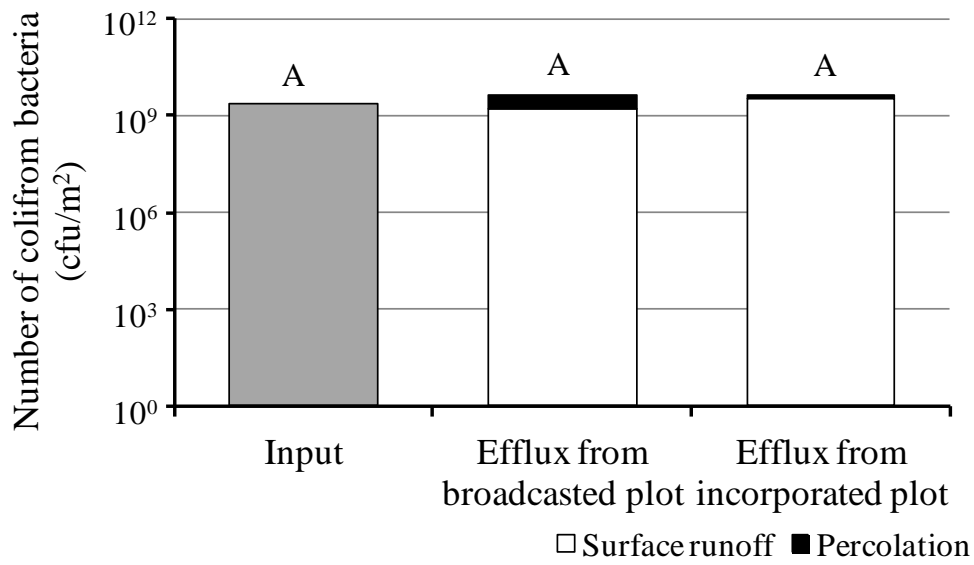


Fig. 3-6 Number of coliform bacteria input in fresh cow dung and coliform bacteria efflux through surface runoff and percolation

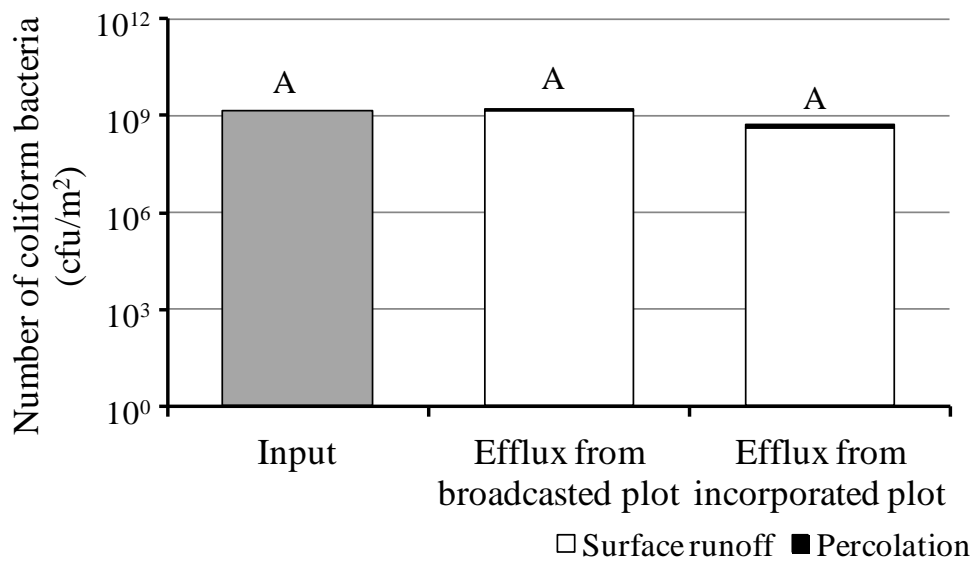


Fig. 3-7 Number of coliform bacteria input in fresh cow dung and coliform bacteria efflux through surface runoff and percolation

2. *E. coli*、大腸菌群の表面流出、浸透流出

牛糞、一次発酵堆肥における *E. coli*、大腸菌群の表面流出量、浸透流出量をそれぞれ、Fig.3-8、Fig.3-9 に示した。

発酵段階や施用方法に関わらず、牛糞を施用した試験区からの流出量が、一次発酵堆肥の試験区を上回る傾向が見られた。

E. coli については発酵段階、施用方法に関わらず、表面流が浸透流を上回る傾向が見られた。それぞれ T 検定を行ったところ、牛糞のすき込み区で表面流出が浸透流出を有意で上回る傾向が見られたが、他の試験区では同様の傾向は見られなかった (Fig. 3-8)。

また、大腸菌群については、牛糞の表面施肥区では浸透流出量が表面流出量を上回ったが、すき込み区においては、同程度の大腸菌群が表面流出と浸透流出量を通じて流出した。あわせて、T 検定の結果、表面流出、浸透流出の間に明確な差は見られなかった。一方、一次発酵堆肥について見てみると、表面施肥区、すき込み区双方で、表面流出量が浸透流出量を上回る傾向が見られたが、T 検定の結果、表面流出量と浸透流出量の間で有意差は見られなかった。

これらのことから、施用方法に関わらず、*E. coli*、大腸菌群は表面流、浸透流双方を通じて流出するため、表面流、浸透流双方で *E. coli*、大腸菌群の流出対策を行う必要があると考察した。

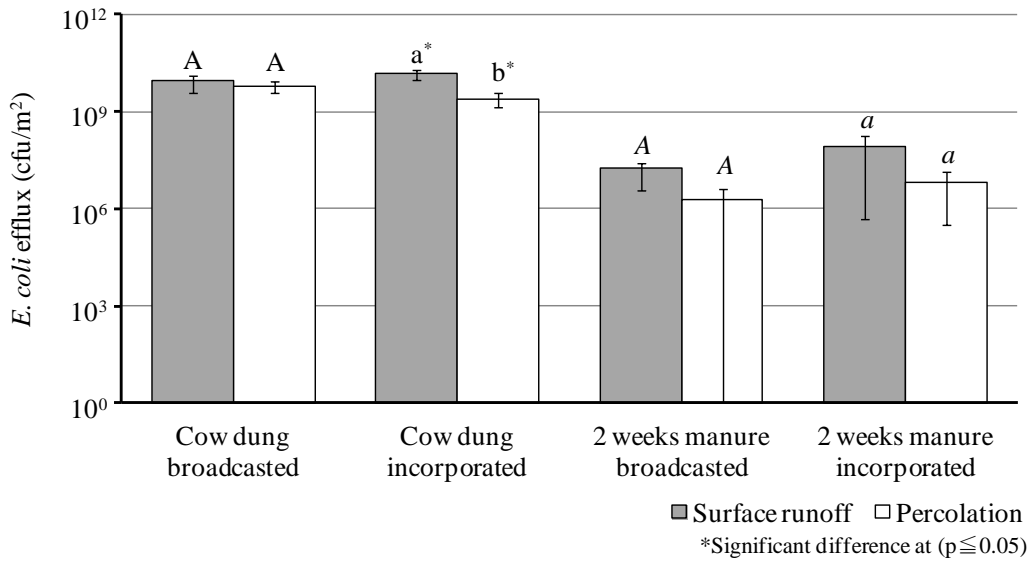


Fig. 3-8 Total efflux of *E. coli* from plots applied fresh cow dung or 2 weeks fermented manure by broadcasting or incorporating

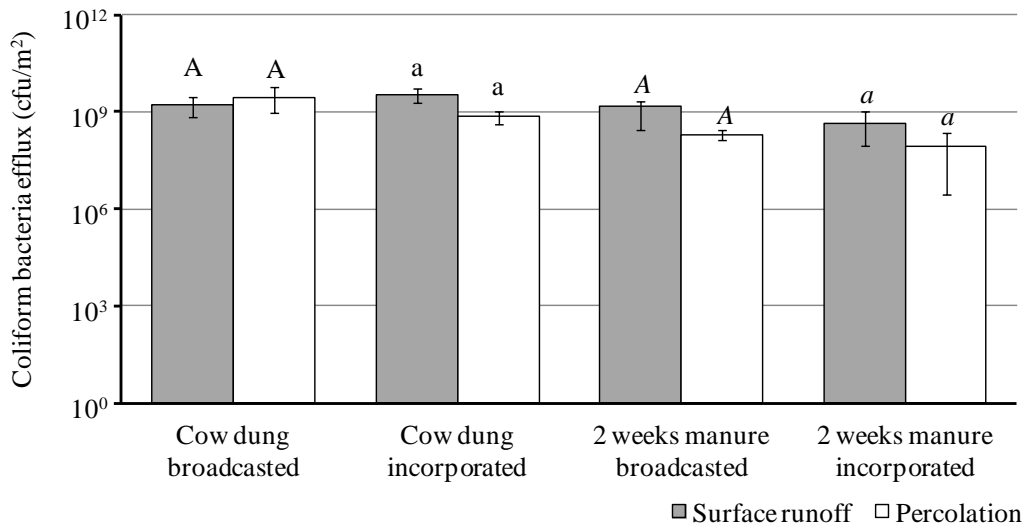


Fig. 3-9 Total efflux of coliform bacteria from plots applied fresh cow dung or 2 weeks fermented manure by broadcasting or incorporating

3. 懸濁液成分、上澄み液成分中の *E. coli*、大腸菌群数

流出水中における、懸濁液成分、上澄み液成分中の *E. coli* 数、大腸菌群数の割合をそれぞれ、Fig. 3-10、Fig. 3-11 に示した。

E. coli について見てみると、牛糞では 90% 以上の *E. coli* が懸濁液成分に生残している結果となった。一方、一次発酵堆肥では 80% と大部分の *E. coli* が懸濁液成分から検出された (Fig. 3-10)。また、大腸菌群においても *E. coli* と同様に、牛糞、一次発酵堆肥ともに、90% と大部分の大腸菌群が懸濁液成分から検出される結果となった (Fig. 3-11)。

また、懸濁液成分、上澄み液成分中の *E. coli* 数、大腸菌群数の割合の経時変化を、Fig. 3-12、Fig. 3-13、Fig. 3-14、Fig. 3-15 にそれぞれ示した。

E. coli では降雨初期では懸濁液成分の割合が最も高くなり、時間経過とともに上澄み液成分の割合が増加する傾向が見られたが、2 時間の降雨中では懸濁液成分に過半数の *E. coli* が検出される結果となった (Fig. 3-12、Fig. 3-13)。一方、大腸菌群についても *E. coli* と同様に、2 時間の降雨内では時間経過に関わらず、80% 程度の大腸菌群が懸濁液成分から検出された (Fig. 3-14、Fig. 3-15)。これは、懸濁液成分の方が糞便等の有機物が多く含まれており、*E. coli*、大腸菌群の生育に適していたためと考察した。

これらの結果から、表面流出水中において、*E. coli*、大腸菌群は糞便等の懸濁液成分のとともに流出すると考察した。

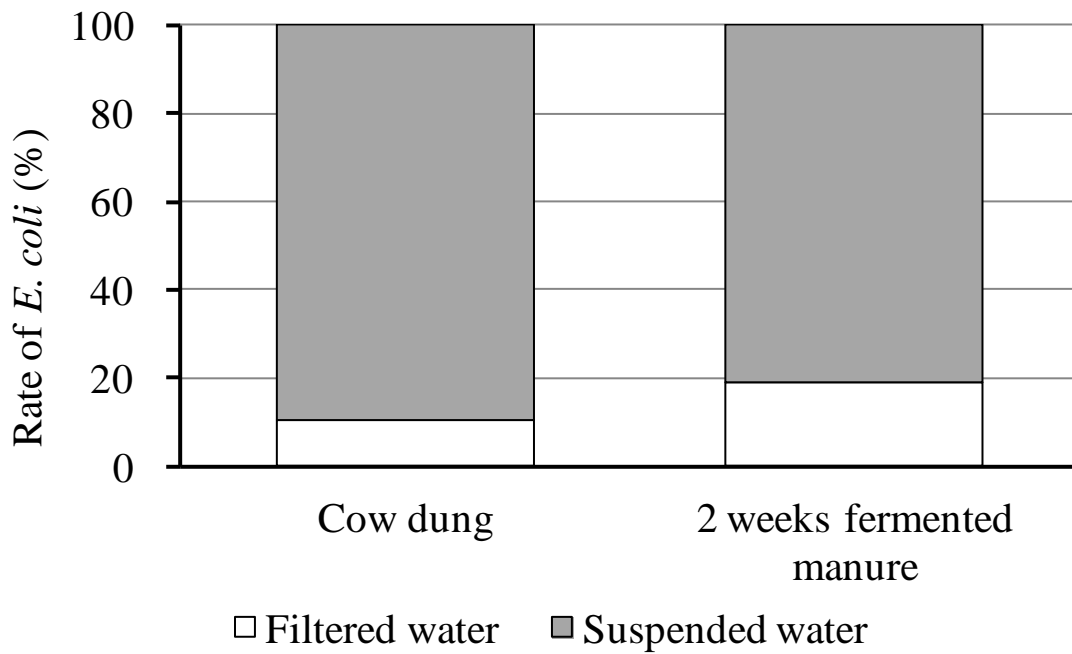


Fig. 3-10 Rate of *E. coli* efflux in suspended water or filtered water

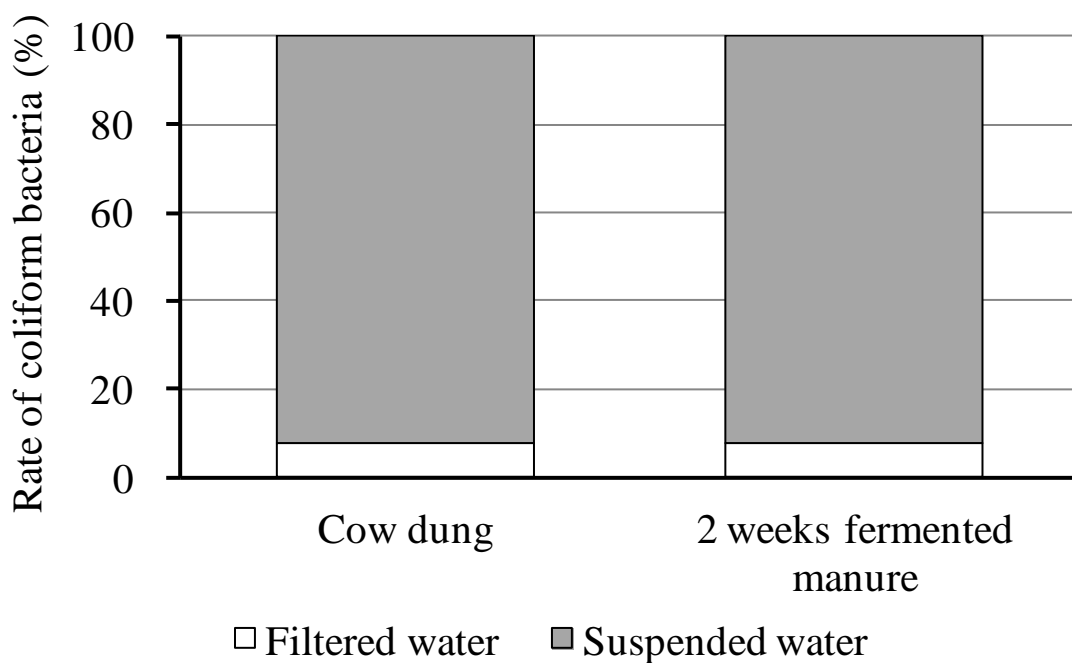


Fig. 3-11 Total efflux of coliform bacteria in suspended water or filtered water

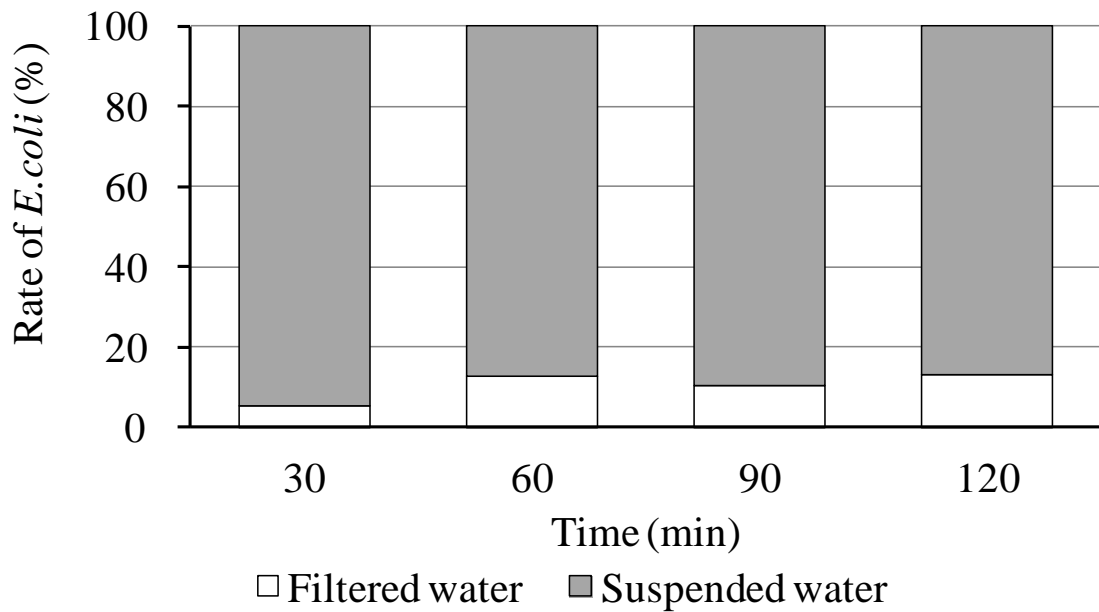


Fig. 3-12 Changes in total efflux of *E. coli* in suspended water or filtered water (cow dung)

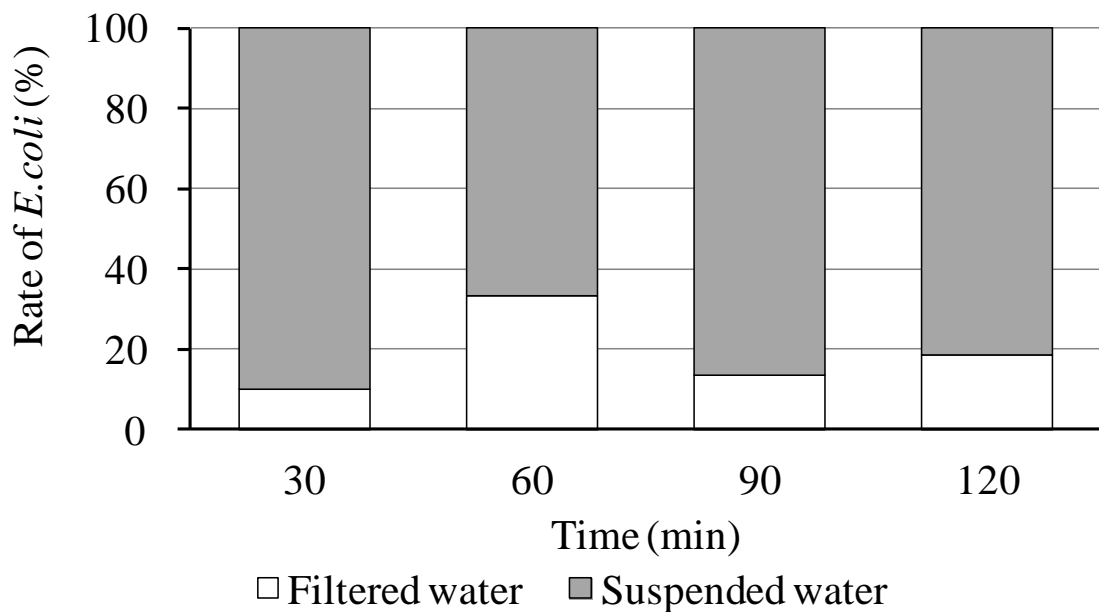


Fig. 3-13 Changes in total efflux of *E. coli* in suspended water or filtered water (2 weeks fermented manure)

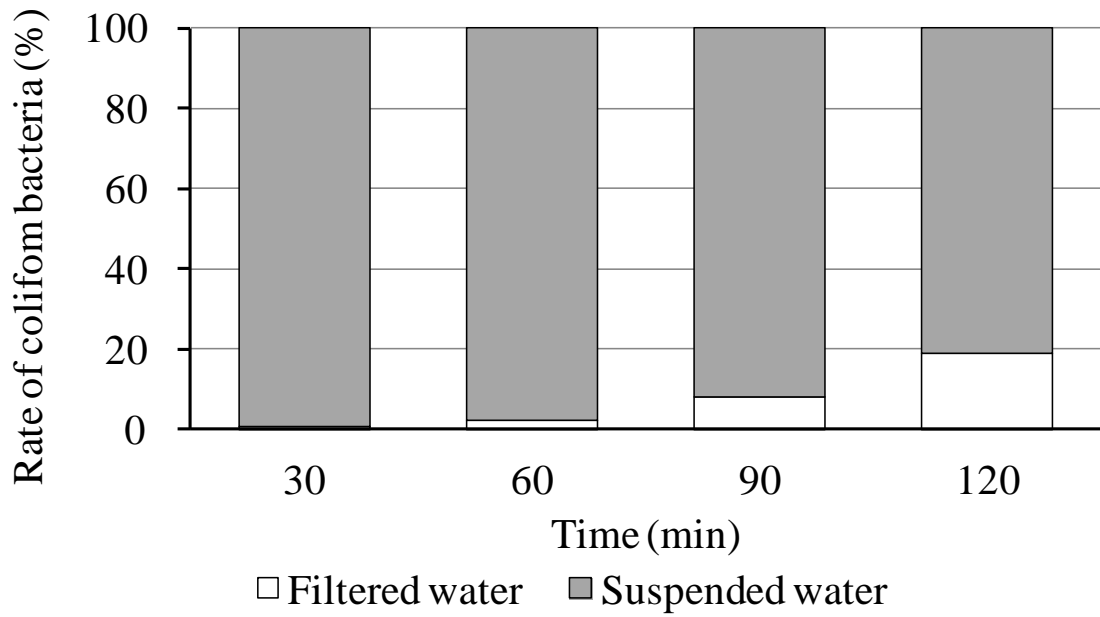


Fig. 3-14 Total efflux of coliform bacteria in suspended water or filtered water (cow dung)

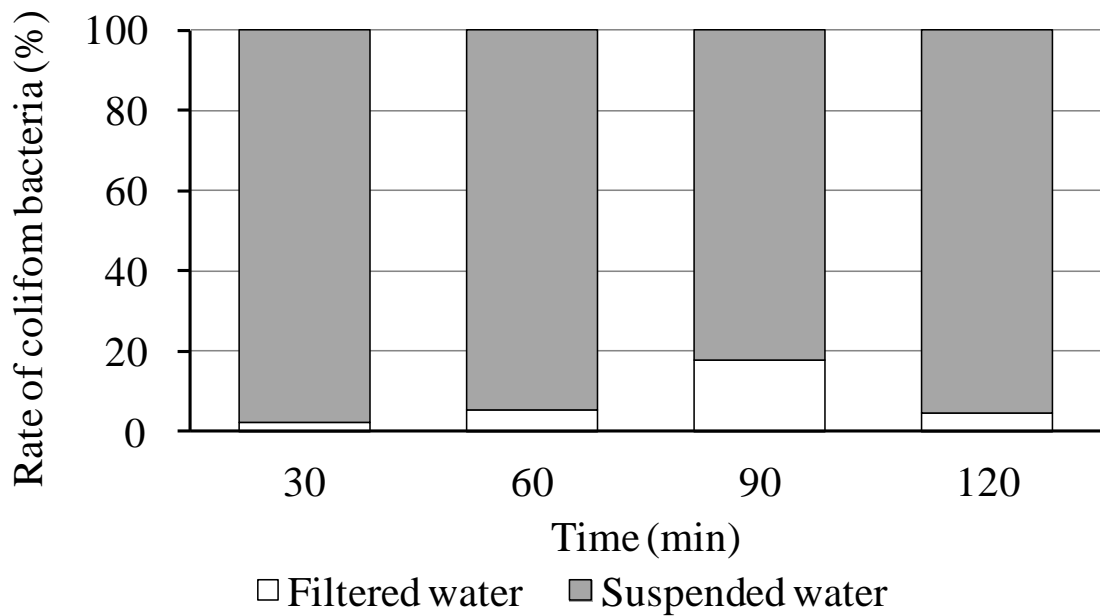


Fig. 3-15 Total efflux of coliform bacteria in suspended water or filtered water (2 weeks fermented manure)

第 4 節 本章のまとめ

本実験では *E. coli*、大腸菌群の流出特性を解明するために、人工降雨装置を用いて流出実験を行った。

流出した水中の *E. coli*、大腸菌群数を測定したところ、2 時間の降雨実験で投入量と同程度以上の *E. coli*、大腸菌群が流出し、異なる施用方法間では *E. coli*、大腸菌群の流出量に違いが見られなかった。また、*E. coli*、大腸菌群の表面流出量と浸透流出量を比較したところ、発酵段階や施用方法の違いに関わらず表面流、浸透流で同程度流出する結果となった。

加えて、*E. coli*、大腸菌群の表面流出について、懸濁液成分と上澄み液成分に分けたところ、大部分の *E. coli*、大腸菌群が懸濁液成分から検出された。

以上のことから、牛糞堆肥を施用した畑地から *E. coli*、大腸菌群は表面流、浸透流双方を通じて流出し、表面流においては懸濁液成分とともに流出することが明らかとなった。そのため、堆肥化過程において *E. coli*、大腸菌群数を低減させることが土壌、水環境保全上重要であると結論付けた。あわせて、*E. coli*、大腸菌群の流出には土壌、肥料成分の流出抑制対策が有効な可能性があるかと結論付けた。

これらの結果を受け、第 IV 章、第 V 章では畑地における *E. coli*、大腸菌群の流出抑制対策について、既存の土壌、肥料成分の流出抑制対策を用いて評価した。また、第 VI 章、第 VII 章では堆肥化過程における *E. coli*、大腸菌群の抑制方法について議論した。

参考・引用文献（第Ⅲ章）

湊啓子(2005)：乳牛ふん尿の処理・利用過程における大腸菌の動態と流出防止対策．畜産技術 No.604 pp.6-10

Mahbub Islam, Michael P. Doyle, Sharad C. Phatak, Patricia Millener, Xieping Jiang(2005) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on carrots and onions grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. Food Microbiology, Vol.22, 63-70

Jamal Abu-Ashour, Hung Lee(2000)：Transport of Bacteria on Sloping Solid Surfaces by Runoff. Environmental Toxicology Vol.15 No.2 pp.149-153

Anurag Mishra, Brian L. Beanham, Saied Mostaghimi(2008)：Bacterial Transport from Agricultural Lands Fertilized with Animal Manure. Water Air Soil Pollution Vol.189 No.1-4 PP.127-134

八倉寿代，多田哲子，安富政治(2006)：牛放牧場からの窒素、リン、大腸菌の流出量．京都府畜産技術センター試験研究報告 第3号 pp.71-73

第 IV 章

緩衝帯を用いた大腸菌の流出抑制

第 1 節 本章の目的

本章では畑地における緩衝帯の設置が *E. coli*、大腸菌群の流出の与える抑制効果を検証するため、模型斜面ライシメータと人工降雨装置を用いた流出実験を行った。

第 III 章の結果より、表面流出中において *E. coli*、大腸菌群は糞便等の懸濁液成分に伴って流出していることが明らかとなり、土壌、肥料成分の流出抑制対策が有効な可能性が示唆された。このことから、本章では土壌、肥料成分対策の一つである緩衝帯に着目した。

緩衝帯は維持管理をほとんど必要としないため、多くの農家で実施されており、第 II 章で調査を行った埼玉県 A 沼周辺の畑地においても設置されていたため、実用性は高いと考える (Photo. 4-1)。

本章では緩衝帯による *E. coli*、大腸菌群の流出抑制効果について評価することを目的とした。



Photo. 4-1 Buffer strips in field around A swamp

第 2 節 実験方法

1. 実験方法

試料は東京農業大学富士畜産農場にて採取した牛糞、一次発酵堆肥を使用した。牛糞は当日排出されたもの、一次発酵は牛糞を約 2 週間発酵させたものを使用した (Table 4-1)。各試料の含水比はそれぞれ 82%、73%であり、有機物量は 88%、87%であった。各試料中の乾燥重量 1 g あたりの *E. coli* 数はそれぞれ 197×10^5 、 21×10^3 cfu/g であった。また、大腸菌群はそれぞれ 28×10^5 、 12×10^5 cfu/g であった (Table 4-2)。

緩衝帯には土壌、肥料成分流出抑制の研究でもよく用いられ、環境適応に優れた品種である玉龍 (*Ophiopogon japonicus* Ker Gawl.) を使用した (Photo. 4-1)。模型斜面ライシメータの下流部から 30 cm の植栽幅、 2000 stems/m^2 の植栽密度で植栽した。

流出実験は 2012 年 8 月、人工降雨装置下に模型斜面ライシメータ (斜面長 1.3 m、幅 0.11 m、深さ 0.05 m) を設置して行った (Photo. 4-2)。傾斜角度は前章と同様、農業機械が入れる最大角度である 8° に設定し、土壌は関東ローム土を使用した (Table 4-3)。なお、Table 4-4 に示した通り、土壌中に *E. coli*、大腸菌群は検出されなかった。各ライシメータに試料を表面施肥で施用した。降雨強度は 30 mm/h に設定し、観測は 2 時間行った。実験開始より最初の 1 時間は 15 分、後の 1 時間は 30 分毎に表面流出水を採水した (Fig. 4-1)。

Table 4-1 Properties of cow dung and manures

	Sub material	Fermentation length	Water contents (%)	Organic matter (%)
Cow dung	sawdust	0 days	82	88
Manure fermented for 2 weeks	sawdust	2 weeks	75	86

Table 4-2 Number of microorganisms in manures

	<i>E. coli</i> (cfu/g)	Coliform bacteria (cfu/g)
Cow dung	66×10^6	5×10^6
Manure fermented for 2 weeks	18×10^3	13×10^3



Photo. 4-2 *Ophiopogon japonicus* Ker Gawl.

Table 4-3 Properties of soil

Specific gravity	Particle size distribution (%)					Soil texture
	Gravel	Coarse sand	Fine sand	Silt	Clay	
2.68	0.3	19.9	29.4	31.4	18.9	CL

Table 4-4 Chemical and biological properties of soil

Ignition loss (%)	EC (mS/m)	pH	<i>E. coli</i> (cfu/g)	Coliform bacteria (cfu/g)
14.56	45.9	5.29	0	0

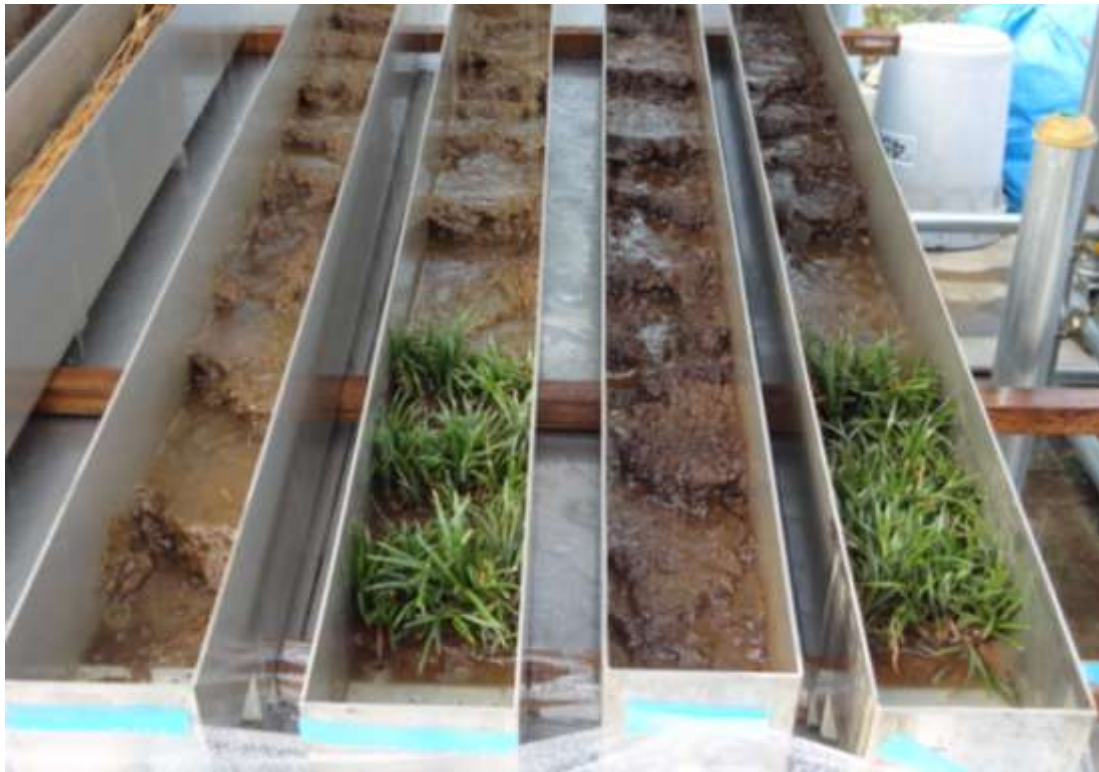


Photo. 4-3 Situation of slope model

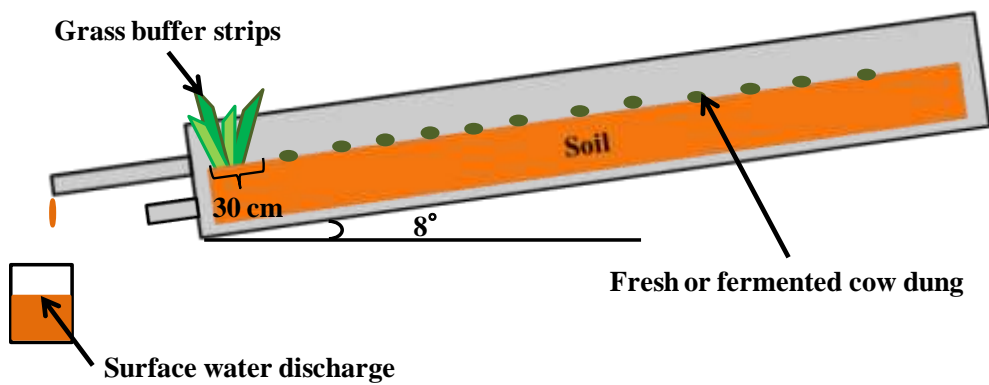


Fig. 4-1 Outline of runoff experiment

2. 分析項目

採水した試料中の *E. coli* 数、大腸菌群数を測定した。

E. coli 数は希釈平板法にて Fig. 4-2 のように数段階の希釈を行い 37 °C で培養後、出現した青いコロニーを *E. coli*、紫色のコロニーを大腸菌群として、それぞれ個別に計数した。なお、培地は *E. coli*、大腸菌群専用の選択培地である XM-G 寒天培地を用いた (Photo. 4-4)。

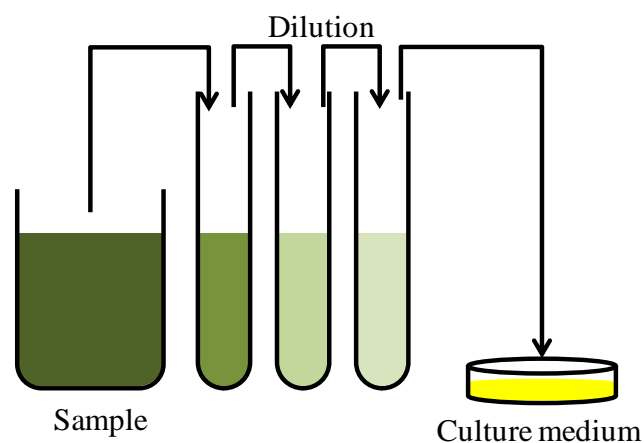


Fig. 4-2 Dilution plate technique

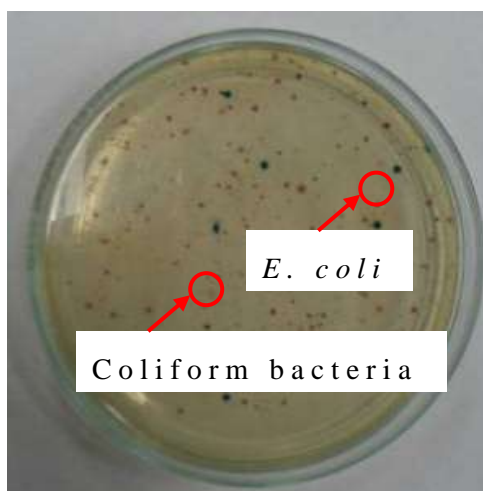


Photo.4-4 Colonies of *E. coli* and coliform bacteria

第 3 節 結果及び考察

1. 緩衝帯の有無による *E. coli*、大腸菌群の流出量の違い

牛糞、一次発酵堆肥における *E. coli* の流出量をそれぞれ、Fig. 4-3、Fig. 4-4、Fig. 4-5 に示した。

牛糞ではコントロール区と緩衝帯を設置した試験区双方で 10^{10} cfu/m² の *E. coli* が流出し、明確な差が見られなかった。また、T 検定の結果、有意差も見られなかった (Fig. 4-3)。一方、一次発酵堆肥では緩衝帯の設置により、*E. coli* の減少が見られ、92% の *E. coli* 流出が抑制された (Fig. 4-4、Fig. 4-5)。これは、牛糞では緩衝帯を通過できる微小な粒子中にも多量の *E. coli* が生残していたため、緩衝帯による流出抑制効果が見られなかったと考察した。また、一次発酵堆肥では発酵により微小な粒子中の *E. coli* が死滅し、緩衝帯を通過できない大きな粒子中に多くの *E. coli* が生残していたため、緩衝帯による流出抑制効果が見られたと考察した (Fig. 4-6)。

あわせて、牛糞、一次発酵堆肥における大腸菌群の流出量をそれぞれ、Fig. 4-7、Fig. 4-8 に示した。

大腸菌群については、発酵段階の違いに関わらず、緩衝帯を設置した試験区がコントロール区を上回る結果となった。これは、緩衝帯に大腸菌群が付着して可能性が考えられる。また、緩衝帯による流出抑制効果が見られなかったのは糞便から独立しても生残可能な大腸菌群は、緩衝帯に捕捉されず流出したと考察した。

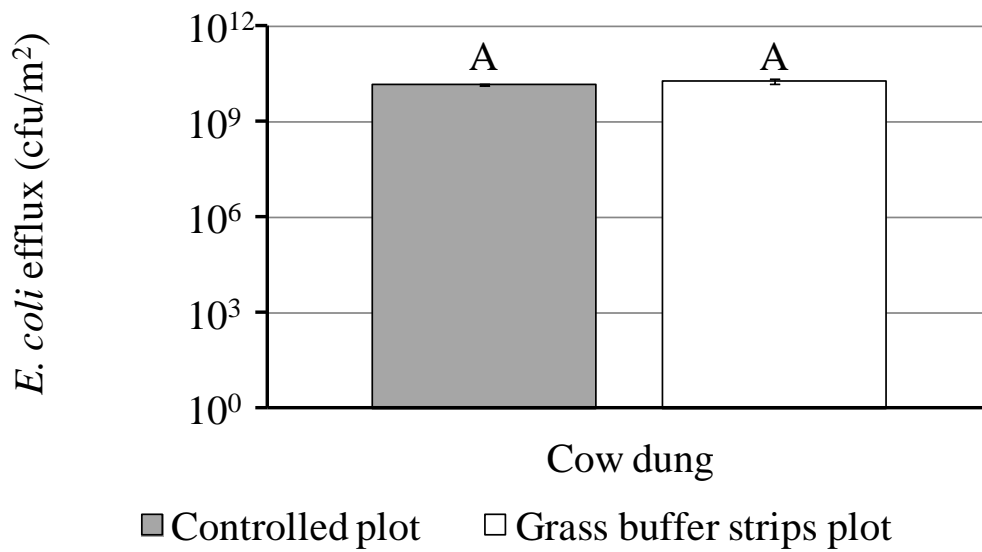
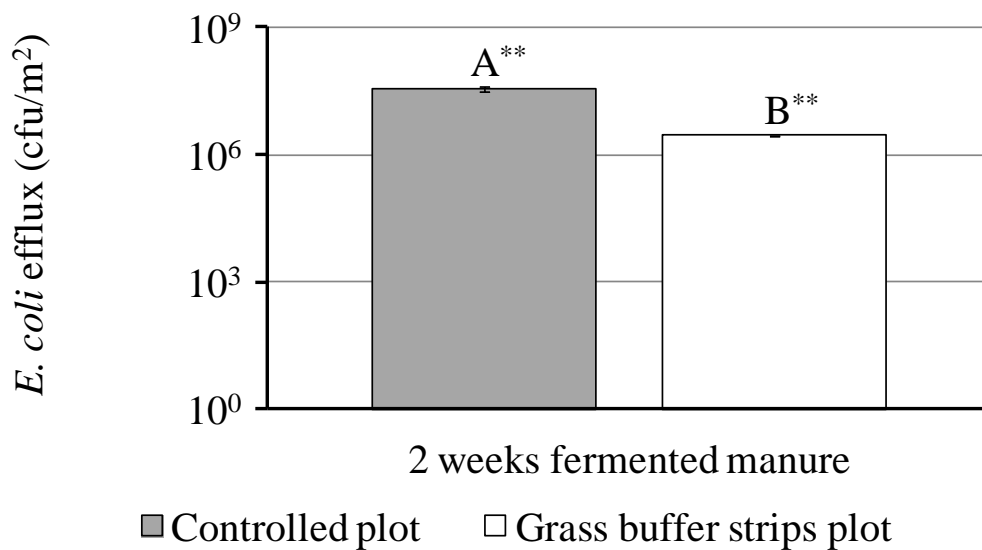


Fig. 4-3 Total efflux of *E. coli* from controlled plot and grass buffer strips plot (cow dung)



**Significant difference at ($p \leq 0.01$)

Fig. 4-4 Total efflux of *E. coli* from controlled plot and grass buffer strips plot (2 weeks fermented manure)

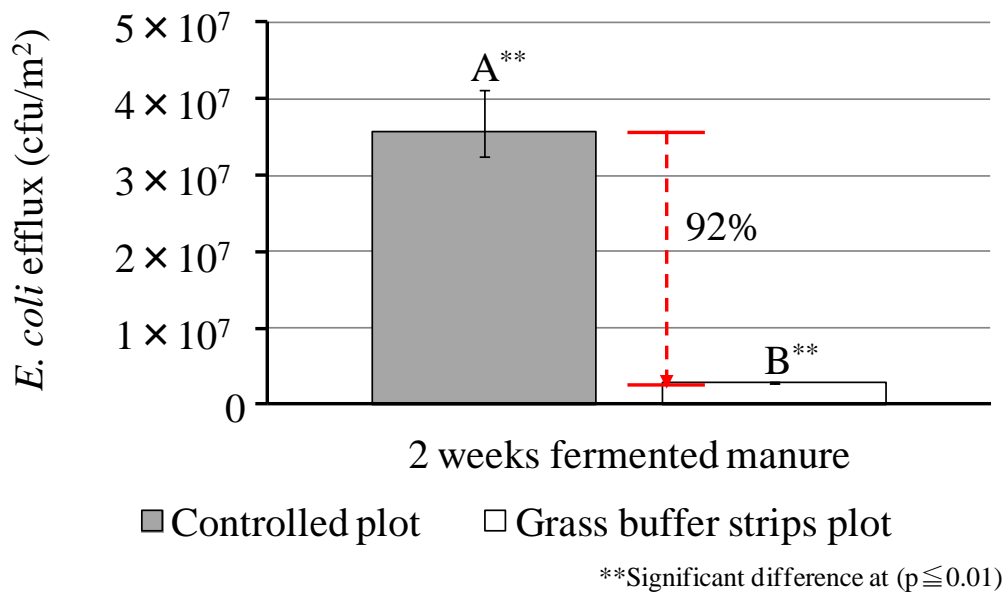


Fig. 4-5 Total efflux of *E. coli* from controlled plot and grass buffer strips plot (2 weeks fermented manure)

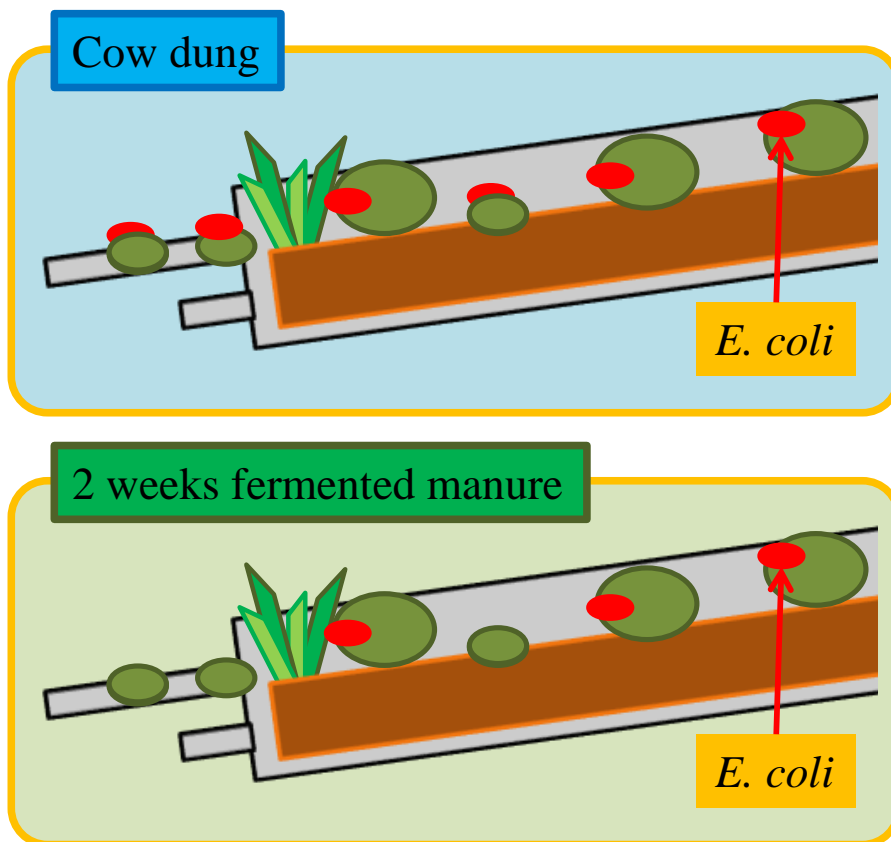


Fig. 4-6 *E. coli* efflux around grass buffer strips

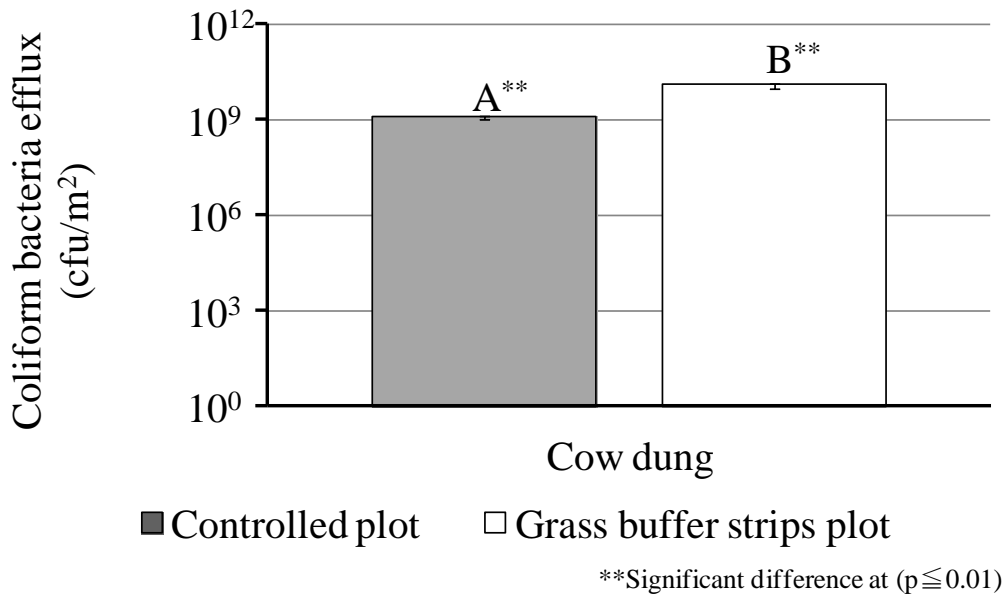


Fig. 4-7 Total efflux of coliform bacteria from controlled plot and grass buffer strips plot (cow dung)

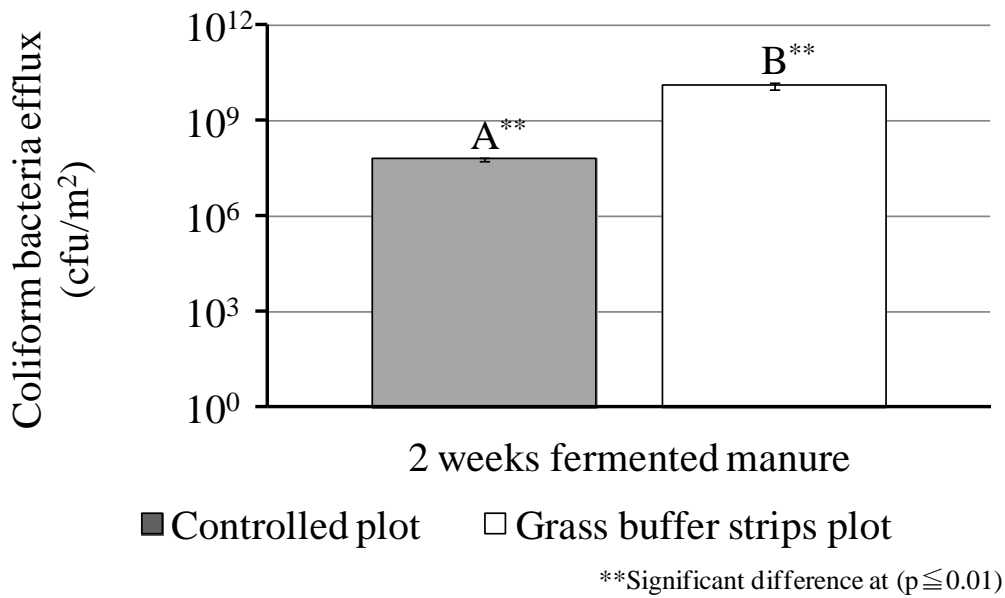


Fig. 4-8 Total efflux of coliform bacteria from controlled plot and grass buffer strips plot (2 weeks fermented manure)

第 4 節 本章のまとめ

本章では緩衝帯の設置による *E. coli*、大腸菌群の流出抑制効果について検討するために、人工降雨装置を用いて流出実験を行った。

流出した水中の *E. coli*、大腸菌群数を測定したところ、*E. coli* では緩衝帯を通過できる微細な粒子中に *E. coli* が生残している牛糞において、明確な流出抑制効果は見られなかった。一方、発酵によって微細な粒子中の *E. coli* が死滅している一次発酵堆肥では、緩衝帯によって *E. coli* の流出抑制効果が見られ、92%の *E. coli* が捕捉された。

また、牛糞から独立しても生残可能な大腸菌群についてみると、牛糞、一次発酵堆肥ともに、緩衝帯を設置した試験区がコントロール区を上回る結果となり、緩衝帯による流出抑制効果は見られなかった。

これらの実験結果から、一次発酵堆肥を施用した畑地では緩衝帯の設置による *E. coli* の流出抑制が期待できると結論付けた。

本章により、畑地における *E. coli*、大腸菌群の流出抑制について議論したが、依然高濃度の *E. coli*、大腸菌群が流出する可能性が示された。そこで、次章である第 V 章では水路中において *E. coli*、大腸菌群の流出を抑制する方法を提案し、畑地から下流域への *E. coli*、大腸菌群の流出抑制について試みた。

参考・引用文献（第IV章）

上野貴司，三原真智人，Janya SANG-ARUN，土器屋由紀子
(2001)：植生帯を用いた畑地土壌の流出負荷制御．土壌の
物理性 No.88 pp.11-18

川井聡之，河村征，三原真智人(2007)：Ophiopogon japonicus
Ker-Gawl.を用いた土壌および窒素・リン成分の捕捉特性に
与える植生幅の影響．環境情報科学論文集 21 pp.591-594

Lalita Siri wattananon, Toshiyuki Kawai and Machito
Mihara(2009)：Effects of Grass Buffer Strips using
Ophiopogon japonicas on Reducing Soil and Nitrogen Losses
under Different Fertilization. Journal of Environmental
Information Science Vol.37 No.5 pp.61-66

総合食品安全事典編集委員会(1997)：食中毒性微生物．株式
会社 産業調査会 pp.17-18

第 V 章

土砂溜を用いた大腸菌の流出抑制

第 1 節 本章の目的

本章ではフィルター層を有する土砂溜の *E. coli*、大腸菌群の流出に対する抑制効果について検討を行った。

第Ⅲ章の結果より、*E. coli*、大腸菌群の表面流出は懸濁液成分に伴って流出していることが明らかとなった。そこで、Ⅳ章において、畑地における抑制技術として緩衝帯を用いた流出抑制効果を検証した。その結果、一次発酵堆肥の *E. coli* については流出抑制効果が見られたが、依然高濃度の *E. coli*、大腸菌群の流出が確認されたため、畑地から流出後の対策についても講じる必要があると考えた。そこで、本研究では土壌流出抑制対策の一つである土砂溜に着目した。

土砂溜は流域の末端などに設置される土壌を沈降、滞砂させる土壌流出抑制対策であり、第Ⅱ章で現地調査をした埼玉県 A 沼においても設置されていた (Photo. 5-1)。

本章では土砂溜に玉砂利、活性炭、石灰窒素の 3 種類の異なるフィルター材を設置して、大腸菌群の流出抑制効果を比較検討した。



Photo. 5-1 Sedimentation tank around A swamp

第 2 節 実験方法

1. 実験方法

実験で使用した土砂溜は、ポリプロピレン製の土砂溜をベースに作製した (Photo. 5-2)。仕切りは懸濁水が底の隙間から流入できるように設置した。また、上部に三角堰を設け、豪雨を想定して越流できる構造とした (Fig. 5-1)。

フィルター材は、土壌流出抑制 (山本ら 2004) の研究でも用いられている玉砂利 (Photo. 5-3) や活性炭 (Photo. 5-4) に加えて、*E. coli* や大腸菌群の殺菌効果が報告されている石灰窒素 (Photo. 5-5) の合計 3 種類を使用した。活性炭と石灰窒素は Fig. 5-2 のように、底部から 100 mm 敷き詰め、その上に玉砂利を 50 mm 敷き詰めた。また、玉砂利は底部から 150 mm まで敷き詰めた。

流出実験は 2012 年 9 月に実施した。実験は乾燥質量 30 g の牛糞を 30 L に混合した懸濁水を 10 L/h の流量で流入させた。流出水発生から 3 時間流入を続け、その後 21 時間放置した。この作業を 3 日間連続で行い、30 分経過毎に流出水を採取した (Fig. 5-3)。なお、懸濁液作成に用いた試料は東京農業大学富士畜産農場にて採取した牛糞を使用した。牛糞は当日排出された乳牛と肉牛の糞を混合したもので、含水率は 84%、各試料中の乾燥重量 1 g あたりの *E. coli* 数、大腸菌群数はそれぞれ 13×10^6 、 4×10^6 cfu/g であった。(Table 5-2)。



Photo. 5-2 Sedimentation tank

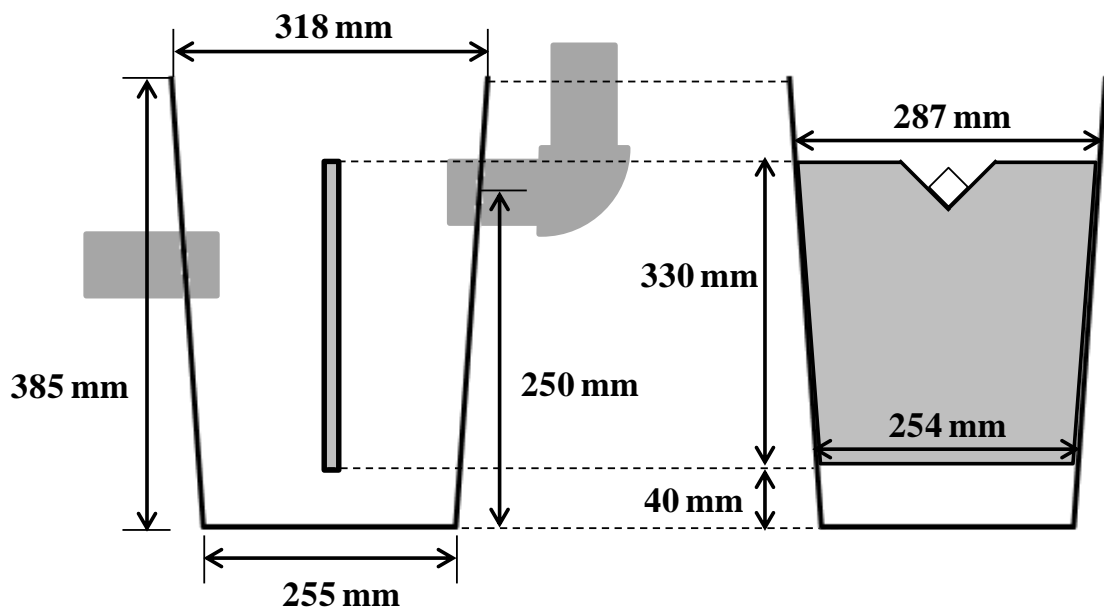


Fig. 5-1 Outline of sedimentation tank



Photo. 5-3 Gravel



Photo. 5-4 Carbon



Photo. 5-5 Lime nitrogen

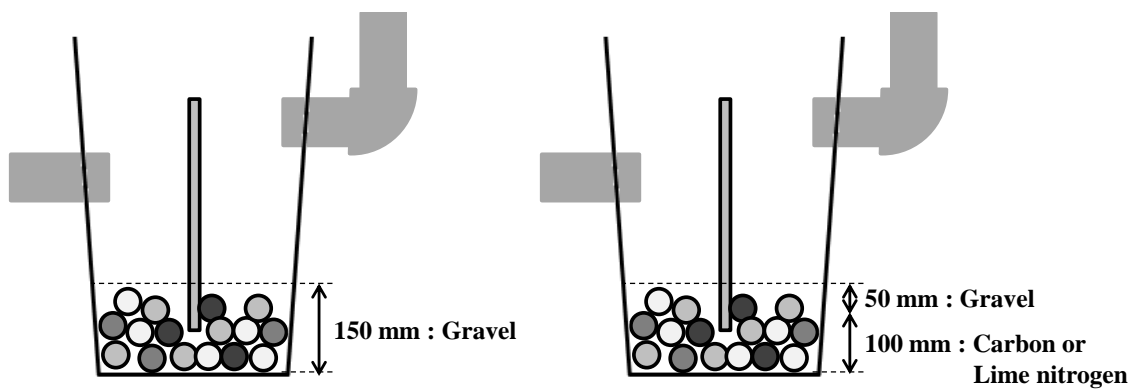


Fig. 5-2 Outline of Filter layer

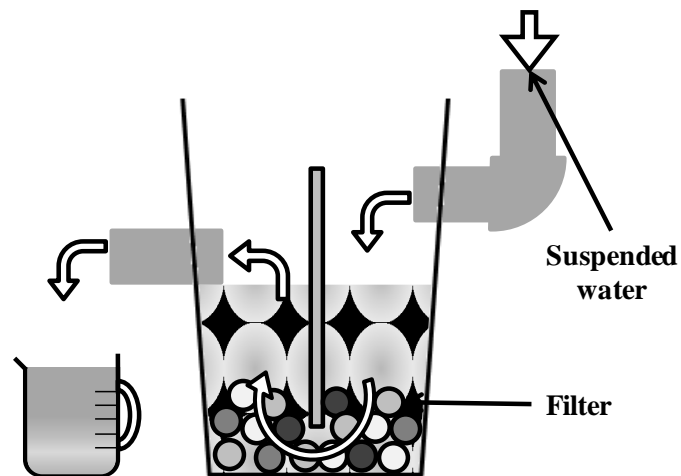


Fig. 5-3 Outline of runoff experiment

Table 5-1 Properties of cow dung

	Sub material	Fermentation length	Water contents (%)	Organic matter (%)
Cow dung	sawdust	0 days	84	89

Table 5-2 Number of microorganisms in manures

	<i>E. coli</i> (cfu/g)	Coliform bacteria (cfu/g)
Cow dung	13×10^6	4×10^6

2. 分析項目

採水した試料中の *E. coli* 数、大腸菌群数を測定した。

E. coli 数は希釈平板法にて Fig. 3-3 のように数段階の希釈を行い 37 °C で培養後、出現した青いコロニーを *E. coli*、紫色のコロニーを大腸菌群として、それぞれ個別に計数した。なお、培地は *E. coli*、大腸菌群専用の選択培地である XM-G 寒天培地を用いた (Photo. 5-6)。

あわせて、pH をガラス電極法にて測定した。

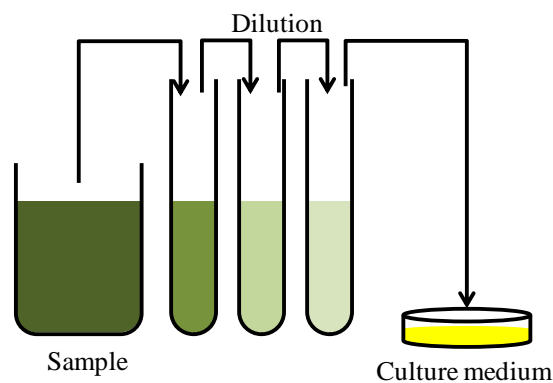


Fig. 5-4 Dilution plate technique

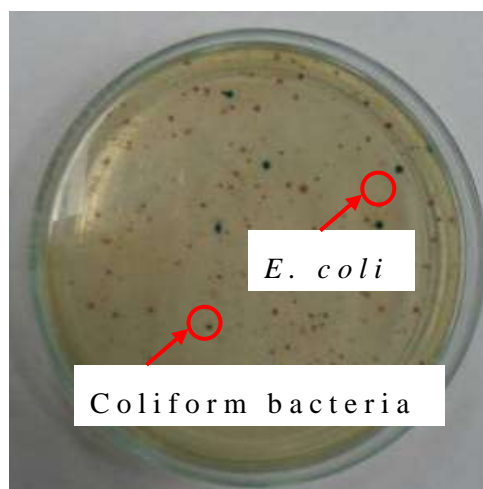


Photo. 5-6 Colonies of *E. coli* and coliform bacteria

第 3 節 結果及び考察

1. フィルター材の違いによる *E. coli*、大腸菌群の抑制効果

玉砂利、活性炭の試験区における *E. coli*、大腸菌群の収支をそれぞれ、Fig. 5-5、Fig. 5-6、Fig. 5-7、Fig. 5-8 に示した。

玉砂利については *E. coli*、大腸菌群ともに 3 日間の実験期間中において、 $10^6 \sim 10^7$ cfu の投入量に対し、流出量は $10^6 \sim 10^7$ cfu と同程度以上の *E. coli*、大腸菌群が流出し、玉砂利による流出抑制効果は見られなかった (Fig. 5-5、Fig. 5-6)。また、活性炭についても玉砂利と同様に、 $10^6 \sim 10^7$ cfu の *E. coli*、大腸菌群を 3 日間流入させた結果、明確な流出抑制効果は見られなかった (Fig. 5-7、Fig. 5-8)。

石灰窒素の試験区における *E. coli*、大腸菌群の収支をそれぞれ、Fig. 5-9、Fig. 5-10 に示した。

E. coli については 10^6 cfu の *E. coli* を 3 日間流入させても、流出水中からは *E. coli* は検出されなかった (Fig. 5-9)。大腸菌群についても同様に、3 日間の実験を通じて大腸菌群の流出は見られず、完全に抑制される結果となった (Fig. 5-10)。

玉砂利や活性炭のような物理的なフィルター材では *E. coli*、大腸菌群の流出を抑制することは出来なかった。これは、フィルター材では捕捉できない細かな粒子に *E. coli*、大腸菌群が生残していたためと考察した。一方、石灰窒素は pH 12 の高アルカリ材である。pH は微生物の生育に不可欠な要素であり、フィルター層通過前後の pH の変化に着目した。

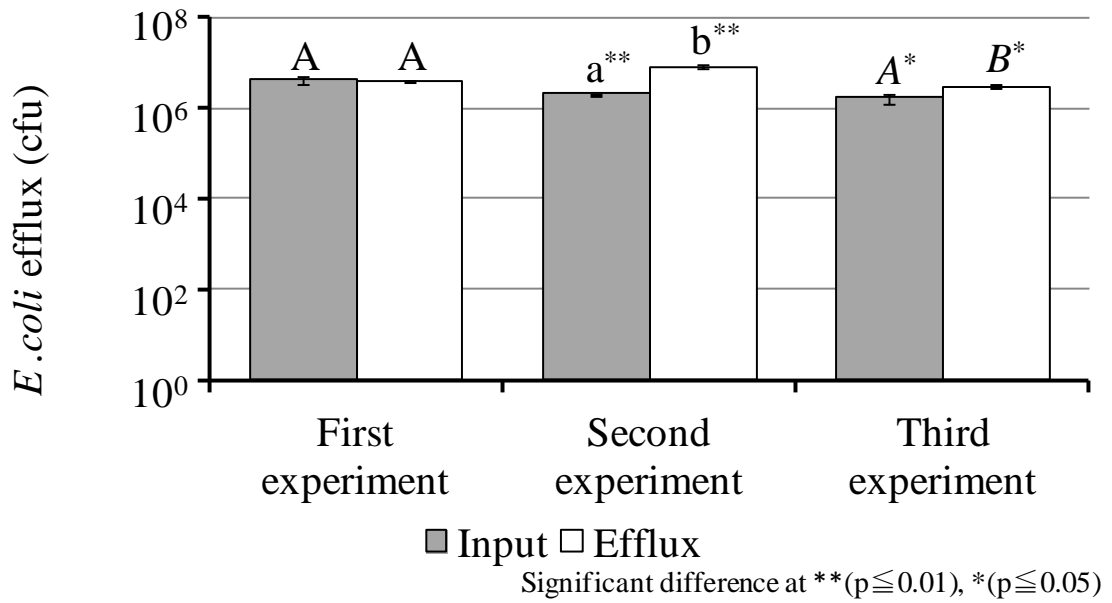


Fig. 5-5 Number of *E. coli* input and *E. coli* efflux (gravel)

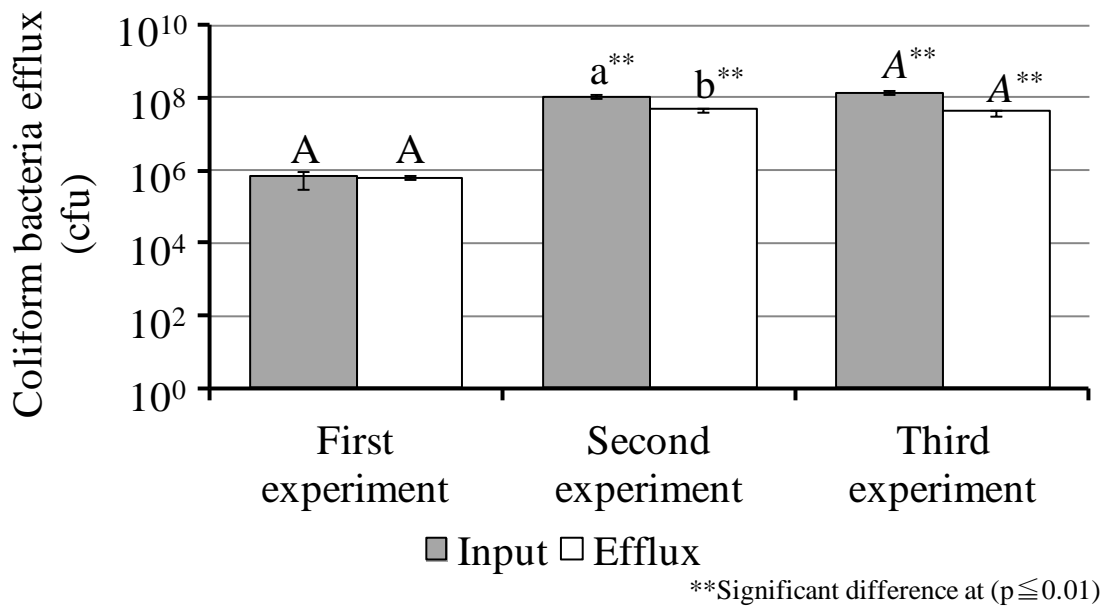


Fig. 5-6 Number of coliform bacteria input and coliform bacteria efflux (gravel)

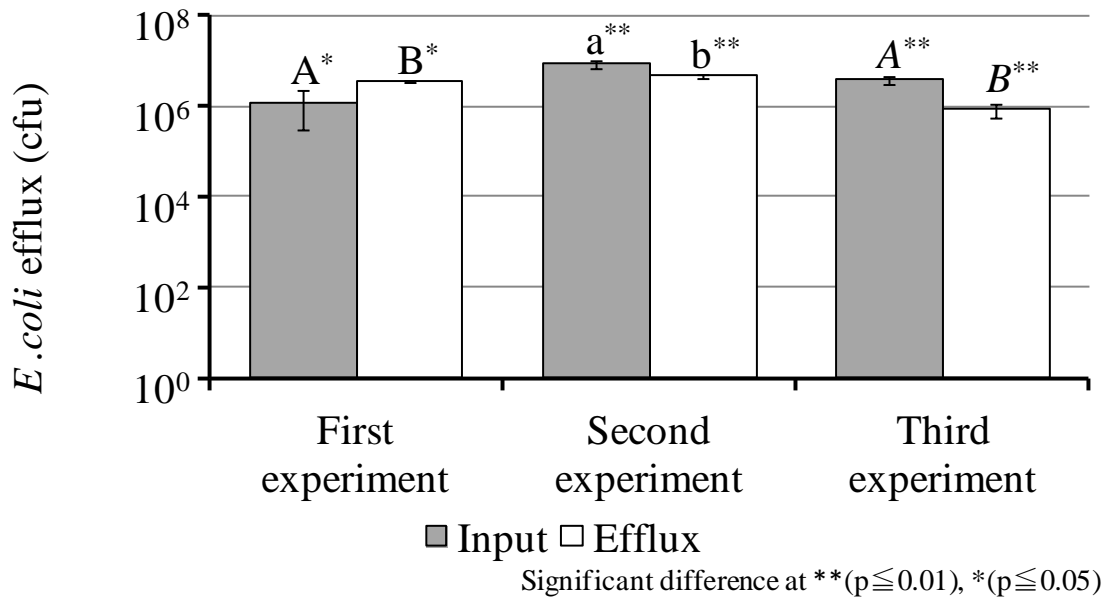


Fig. 5-7 Number of *E. coli* input and *E. coli* efflux (carbon)

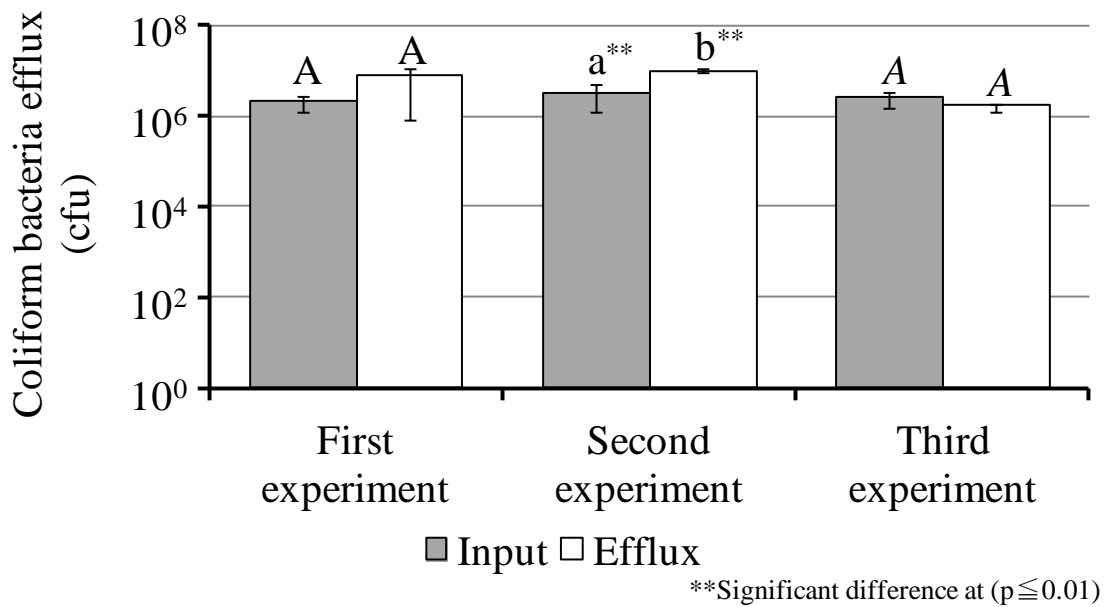


Fig. 5-8 Number of coliform bacteria input and coliform bacteria efflux (carbon)

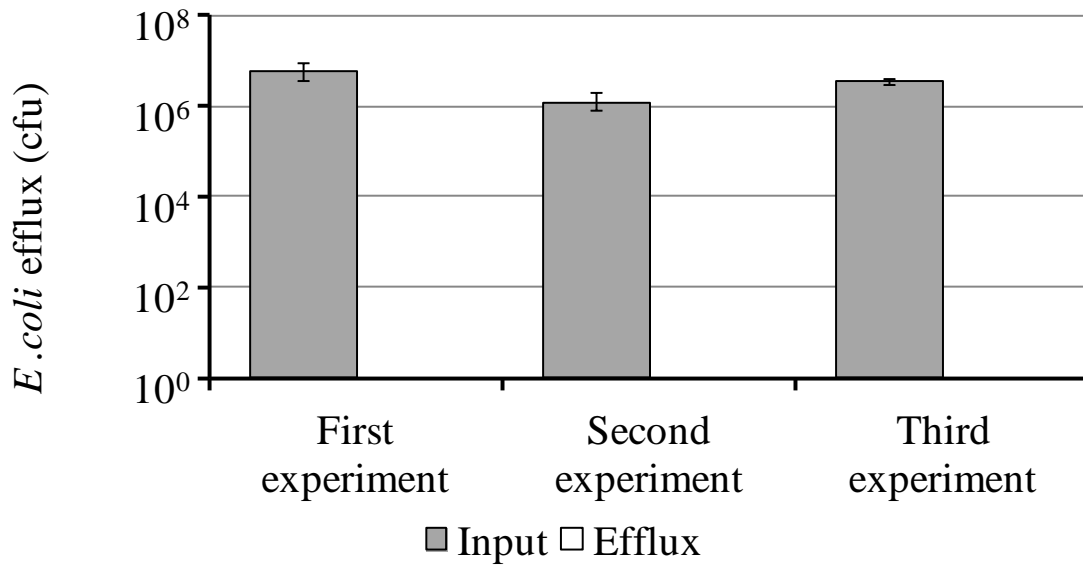


Fig. 5-9 Number of *E. coli* input and *E. coli* efflux (lime nitrogen)

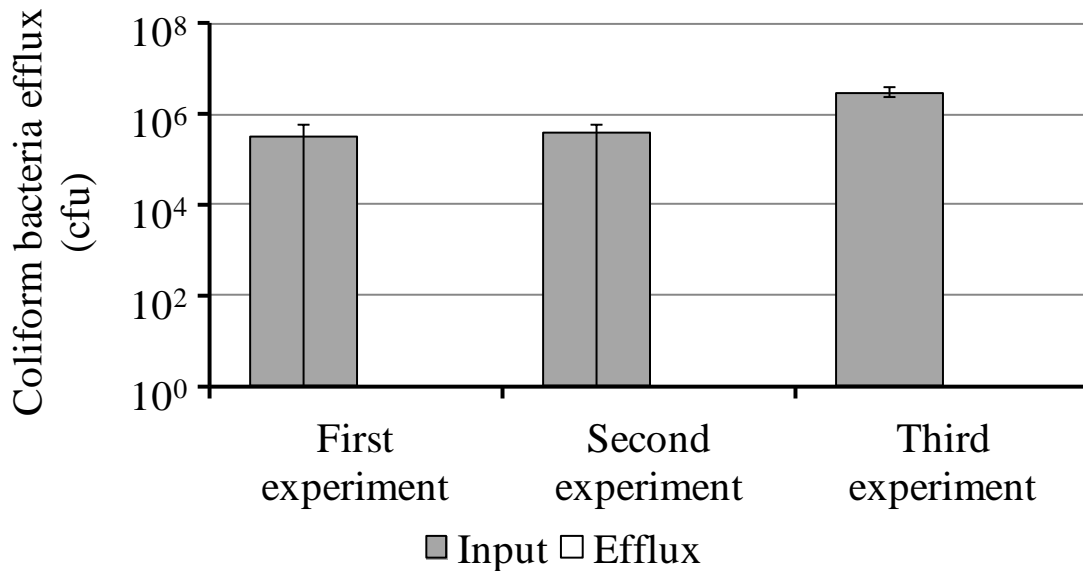


Fig. 5-10 Number of coliform bacteria input and coliform bacteria efflux (lime nitrogen)

2. フィルター層通過による pH の変化

フィルター層通過前後における水中の pH を Fig. 5-11 に示した。

玉砂利と活性炭の試験区ではフィルター層通過前後の間に変化が見られず、T 検定の結果、有意差は見られなかった。一方、石灰窒素の試験区においてはフィルター層通過に伴い、*E. coli* や大腸菌群の生育限界である pH 9.0 を上回り、pH 11 付近となった。これは、石灰窒素の主成分である酸化カルシウムが水と反応し、高アルカリである水酸化カルシウムとなって水中の pH を上昇させたためである。

また、既往の研究において村田ら(2008)は pH 12 の水中に 5 分接触させることで *E. coli* の大幅な減少があったと報告している。本実験における水のアルカリ材との接触時間は 10 分程度であった。

これらのことから、石灰窒素などのアルカリ性のフィルター材に 10 分程度接触させれば *E. coli*、大腸菌群の流出抑制効果が見込めると考察した。

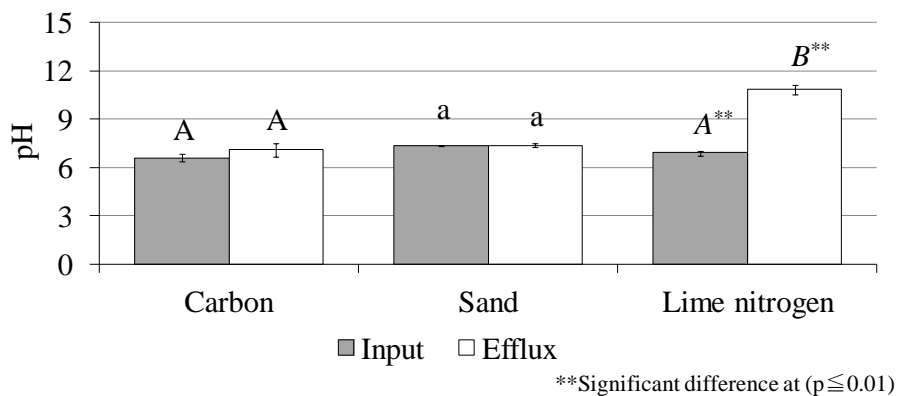


Fig. 5-11 Changes in pH of water

第 4 節 本章のまとめ

本実験では土砂溜に玉砂利、活性炭、石灰窒素の3種類のフィルター層を設け、*E. coli*、大腸菌群の流出抑制効果を評価した。

流出した水中の *E. coli*、大腸菌群数を測定したところ、3日間の実験を通して玉砂利、活性炭のような物理的なフィルター材では *E. coli*、大腸菌群の流出抑制効果は見られなかった。一方、石灰窒素のフィルター層では3日間の実験において、流出水中から *E. coli*、大腸菌群は検出されず、完全な抑制効果が見られた。

また、流出水中の pH を測定したところ石灰窒素のフィルターを通過した流出水において *E. coli*、大腸菌群の生育限界である pH 9.0 を上回る結果となり、T 検定の結果有意差が見られた。フィルター層と水の接触時間は10分程度であり、10分程度接触させることで pH の上昇を行うことが出来たと考察した。

これらの事から、土砂溜に石灰窒素などの高アルカリ性のフィルター層を設け、10分程度接触させるように設計することで、*E. coli*、大腸菌群の流出抑制効果を付与することが可能であると結論付けた。

第 II 章から第 V 章までにおいて、未熟堆肥を施用した畑地における *E. coli*、大腸菌群の流出特性の解明と、その保全対策について議論してきた。次章からは堆肥化過程における *E. coli*、大腸菌群の抑制技術について議論していく。

参考・引用文献（第Ⅴ章）

翁長謙良，米須竜子，新垣あかね(1999)沖縄における赤土等流出の経緯と対策．琉球大学農学部学術報告 第46号 pp.71-82

山本尚行，三原真智人(2006): 植生帯による土壌および窒素・リン成分の捕捉能を考慮した持続的な土壌保全システムの構築．農業土木学会論文集 第74巻 第2号 pp.199-205

山本尚行，三原真智人，駒村正治(2004): フィルター層の目詰まりによる排水機能の低下を考慮した沈砂池構造．環境情報科学論文集 18 pp.403-408

仲西寿男．丸山務(2009): 食品由来感染症と食品微生物．中央法規出版 p.283

村田亜悠美，小尾信子，中平比沙子，宮原龍郎，落合宏(2008): ホタテ貝殻焼成粉末の殺菌および殺インフルエンザウイルス作用について．富山大学看護学会誌 第7巻 2号 pp.39-49

第 VI 章

風乾処理における微生物の生残

第 1 節 本章の目的

本章では堆肥化過程において、風乾処理による水分低下が、堆肥中の *E. coli*、大腸菌群及び一般細菌の生残に与える影響について検証した。

第 II 章、第 III 章の結果より、牛糞を施用した畑地から多くの *E. coli*、大腸菌群が表面流や浸透流を通じて流出していた。また、第 IV 章、第 V 章において流出抑制対策を議論したところ、高アルカリ性のフィルター層を設置した土砂溜以外では *E. coli*、大腸菌群の流出抑制を行うことが出来ず、畑地からは依然多くの *E. coli*、大腸菌群が流出していた。このことから、施用前である堆肥化過程において、*E. coli* 数、大腸菌群数を低減させる方法の検討が不可欠であると考えた。微生物の生残に必要な条件には気温、水分、pH、酸化還元電位などがあるが、本章では微生物の活動に必要な水分に着目し、既往の研究 (Saito and Mihara 2010) においても低減効果が報告されている風乾処理に着目した。

あわせて、堆肥化過程であるため、*E. coli* 数、大腸菌群数の低減以外にも、堆肥化に必要な一般細菌数への影響についても議論が必要であると考えた。そのため、本章の実験では *E. coli*、大腸菌群に加え、一般細菌の生残についても議論を行った。また、発酵段階によっても牛糞堆肥中の微生物相は変化する (菊池・安宅 1998) ため、本章では牛糞、一次発酵堆肥の 2 種類を実験対象とした。

第 2 節 実験方法

1. 実験方法

試料は牛糞、一次発酵堆肥を使用した。採取は静岡県の東京農業大学富士畜産農場にて行った。各資料の含水比、有機物量は Table 6-1 に示したように、含水比はそれぞれ 84、73%、有機物量は 89、88%であった。各試料中の乾燥重量 1 g あたりの *E. coli* 数は牛糞においては 13×10^6 cfu/g であり、一次発酵堆肥では *E. coli* は検出されなかった。大腸菌群数はそれぞれ 4×10^6 、 13×10^4 cfu/g、一般細菌はそれぞれ 84×10^7 、 74×10^6 cfu/g であった (Table 6-2)。

風乾実験は 2010 年 8 月 11 日から 9 月 8 日の 28 日間、東京農業大学人工降雨装置試験場にて行った (Photo.3-1)。実験開始 0、4、7、11、14、18、28 日経過時に試料の採取を行った。あわせて、酸素供給と風乾処理の均一化を図るための攪拌を採取と同時にこなった。なお、実験期間中の気温は 27~37 °C であった (Fig. 6-1)。

Table 6-1 Properties of manures

	Sub material	Fermentation length	Water contents (%)	Organic matter (%)
Cow dung	sawdust	0 days	84	89
Manure fermented for 2 weeks	sawdust	2 weeks	73	88

Table 6-2 Number of microorganisms in manures

	<i>E.coli</i> (cfu/g)	Coliform bacteria (cfu/g)	General bacteria (cfu/g)
Cow dung	13×10^6	4×10^6	84×10^7
Manure fermented for 2 weeks	0	13×10^4	74×10^6



Photo. 6-1 Situation of air drying experiment

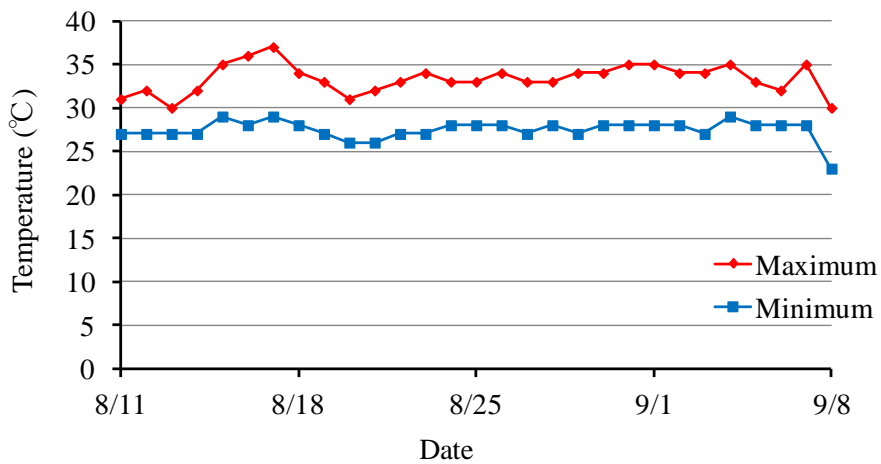


Fig. 6-1 Changes in Temperature

2. 分析項目

採取した試料中の *E. coli* 数、大腸菌群数、一般細菌数及び含水率を測定した。

E. coli 数、大腸菌群数は Fig. 6-2 のように、希釈平板法で数段階の希釈を行い、その希釈液を塗布した培地を培養し、XM-G 寒天培地上に出現した青色のコロニーを *E. coli*、紫色のコロニーを大腸菌群として計数した (Photo.6-2)。一般細菌は希釈平板法で普通寒天培地に培養後出現した白色のコロニーを計数した (Photo.6-3)。

含水率は炉乾法にて以下の式を用いて測定した。

$$\text{含水率} = \frac{\text{水の質量}}{\text{全体の質量}} \times 100$$

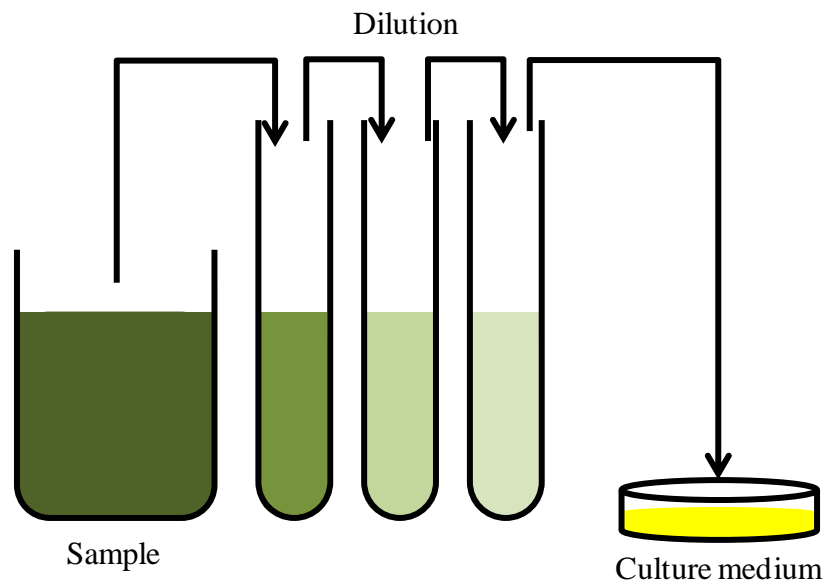


Fig. 6-2 Dilution plate technique

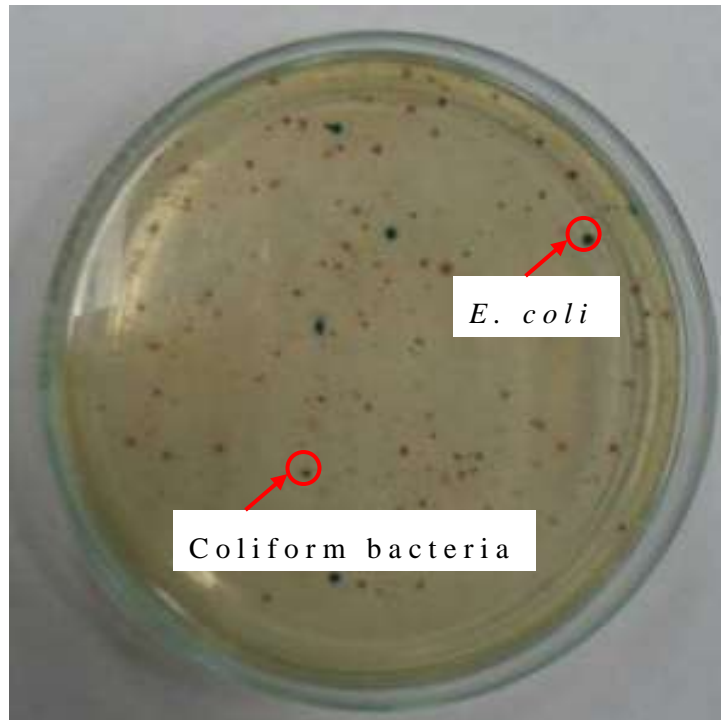


Photo. 6-2 Colonies of *E. coli* and coliform bacteria



Photo. 6-3 Colonies of general bacteria

第 3 節 結果および考察

1. 風乾処理が *E. coli* の生残に与える影響

風乾処理の進行に伴う *E. coli* 数と含水率の経時変化をそれぞれ Fig.6-3、Fig.6-4 に示した。

牛糞では風乾の進行に伴い、含水率は減少していき、7 日経過以降は 10%前後で大きな変化は見られなくなった。*E. coli* について見てみると、風乾の進行に伴い、*E. coli* 数が減少していったが完全には殺菌されず、28 日を経過しても 10^4 cfu/g の *E. coli* が生残していた。分散分析の結果、風乾処理の 0 日目と 4 日以降の間に有意差が見られた。

既往の研究において、Ashour and Lee(2000)は半乾燥土壌において長期間の *E. coli* の生存を確認している。あわせて、実験開始時と実験終了時の試料の状態を比較してみると、Photo. 6-4 のように塊上になった試料が見られた。これらのことから、塊内部に残存する水分を使って *E. coli* が生残していたと考察した。

また、一次発酵堆肥については実験期間中 *E. coli* は検出されなかった(Fig.6-4)。これは、試料を採取した東京農業大学富士畜産農場における、発酵に伴う、発酵熱のためであると考察した。

以上の結果より、風乾処理は *E. coli* の低減効果はあるが、牛糞では完全なる殺菌には至らないと考察した。

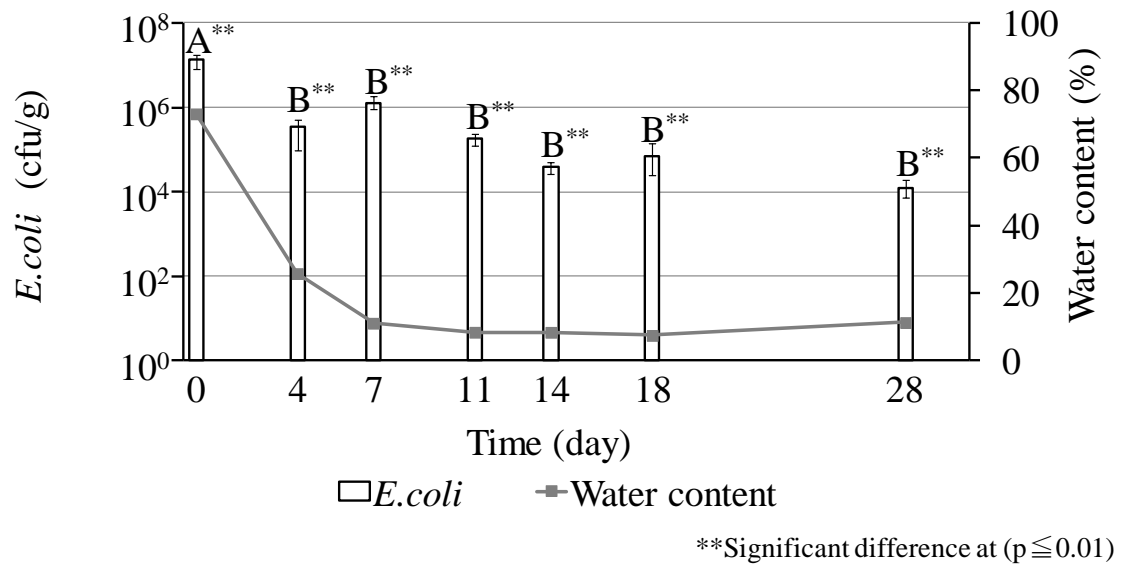


Fig. 6-3 Changes in *E. coli* and water content in cow dung

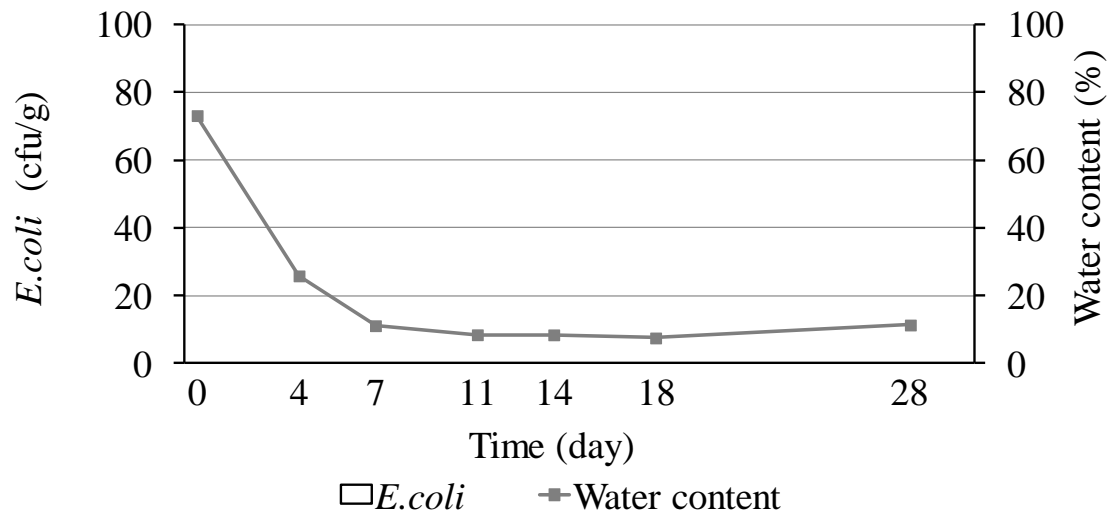


Fig. 6-4 Changes in *E. coli* and water content
in 2 weeks fermented manure



Photo. 6-4 Situation of dried cow dung

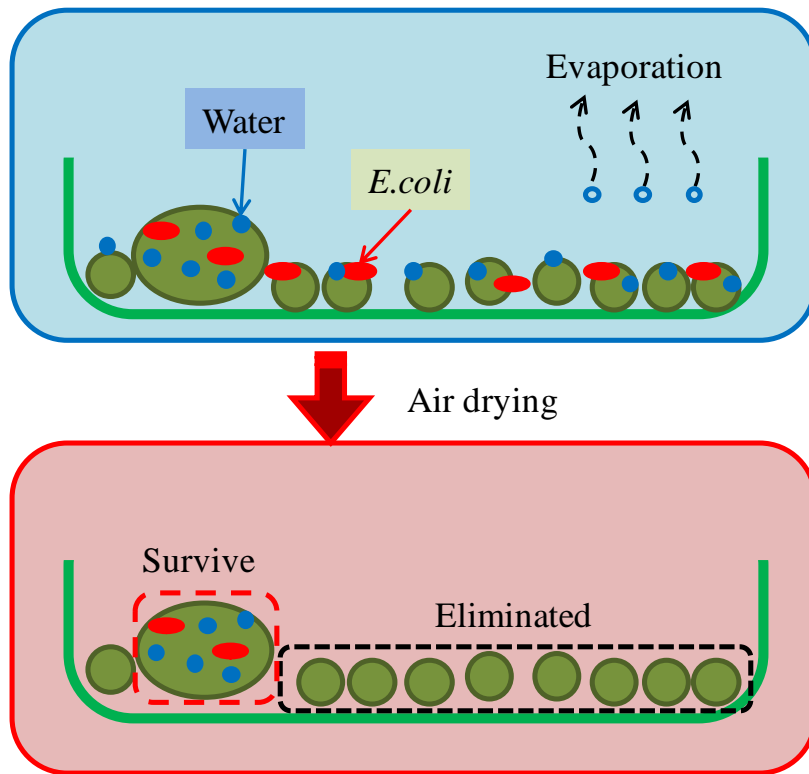


Fig. 6-5 Outline of *E. coli* surviving in cow dung

2. 風乾処理が大腸菌群の生残に与える影響

風乾の進行に伴う大腸菌群数と含水率の経時変化をそれぞれ Fig.3-3、Fig.3-4 に示した。

牛糞では *E. coli* と同様、風乾の進行による含水率の低下に伴い、大腸菌群数が減少していったが、4 日経過後は減少が緩やかとなり、ほぼ一定となった。加えて、28 日経過時においても含水率が 10% 程度であるにも関わらず、乾燥質量 1 g あたり 10^4 cfu の大腸菌群が検出されるなど、風乾実験開始時の約 1000 分の 1 まで減少させることが出来たが、完全な殺菌には至らなかった。また、分散分析の結果より、0 日目と 4 日目以降で 99% の有意差が見られた。

このことから、牛糞において、風乾処理によって、水分を低下させることは *E. coli*、大腸菌群を低減させることは出来ても、完全に殺菌することは出来ないことが明らかとなった。

一方、一次発酵堆肥においては 0 日目では 3×10^4 cfu/g いた大腸菌群が、風乾の進行に伴い減少していき、11 日以降検出されなくなった。加えて、風乾処理の 0 日目と 4 日以降の間に 99% の有意差が見られた。

このことから、牛糞堆肥においては、一次発酵堆肥の状態まで発酵させて初期の *E. coli* 数、大腸菌群数を減少させれば、風乾処理で大腸菌群の完全殺菌を行うことが可能であると考察した。

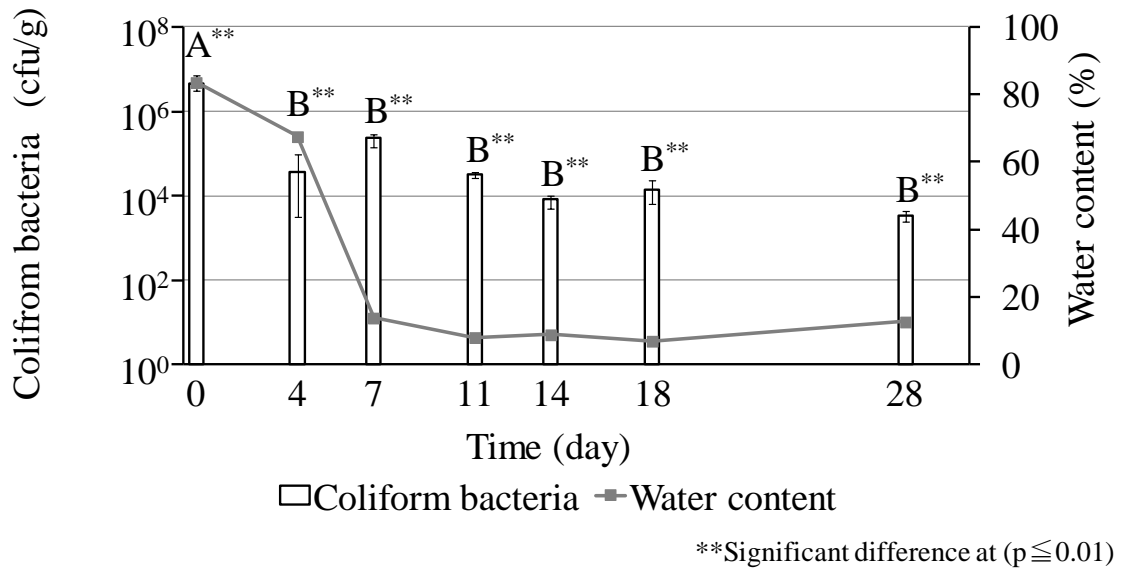


Fig. 6-6 Changes in coliform bacteria and water content
in cow dung

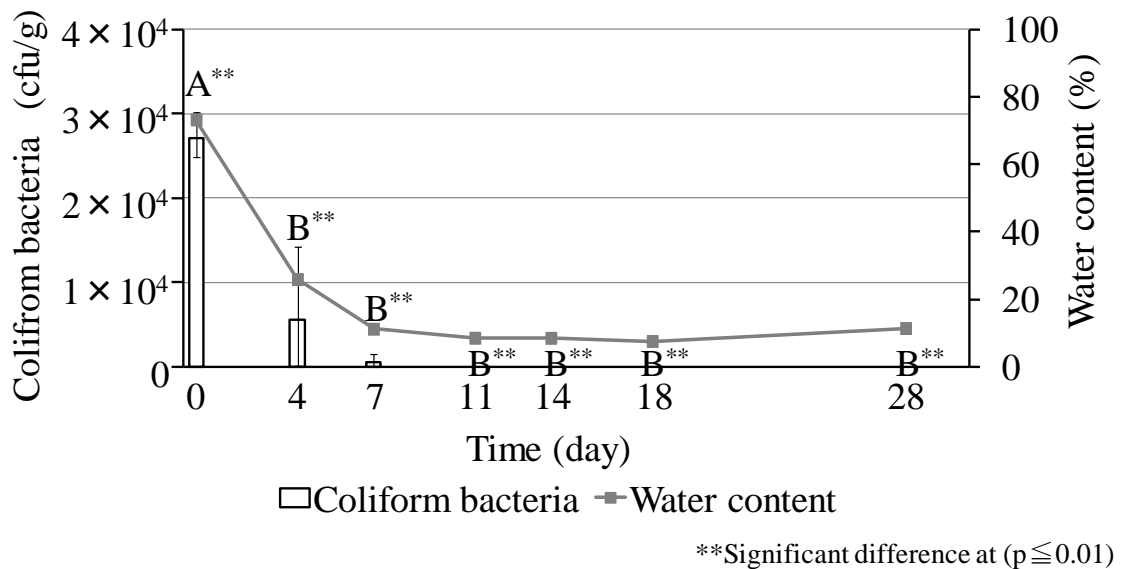


Fig. 6-7 Changes in coliform bacteria and water content
in 2 weeks fermented manure

3. 風乾処理が一般細菌の生残に与える影響

風乾の進行に伴う一般細菌数と含水率の経時変化をそれぞれ Fig.3-5、Fig.3-6 に示した。

牛糞では風乾の進行に伴い、 10^9 cfu/g いた一般細菌数が減少していき、14 日経過時には 10^6 cfu/g と 1000 分の 1 まで減少した。また、分散分析の結果、風乾処理の 7 日目までとそれ以降の間に有意差が見られた。

一次発酵についても牛糞と同様に、風乾の進行による含水率の低下に伴い、0 日目から 4 日目の間で急激に減少し以降は一定となった。しかし、 10^8 cfu/g の実験開始時と比較して、 10^6 cfu/g と 100 分の 1 まで減少する結果となるなど、風乾処理による一般細菌の減少が確認された。あわせて、分散分析の結果、0 日目とそれ以降の間に 99% の有意差が見られた。

藤田(1993)や金子・藤田(1986)によると、含水率 15~36% では発酵が起こらないとされており、10%前後である 7 日経過後では一般細菌が検出されてはいるが、ほとんどが休眠状態にあると考える。そのため、風乾処理によって含水率を 10% まで低下させた場合、発酵が起こりにくく、一般細菌による分解は期待できないと考察した。

このことから、風乾処理は *E. coli*、大腸菌群のみならず、堆肥化に必要な微生物まで減少させてしまうことが明らかとなった。同時に一般細菌の減少に起因する発酵の速度の低下が懸念された。

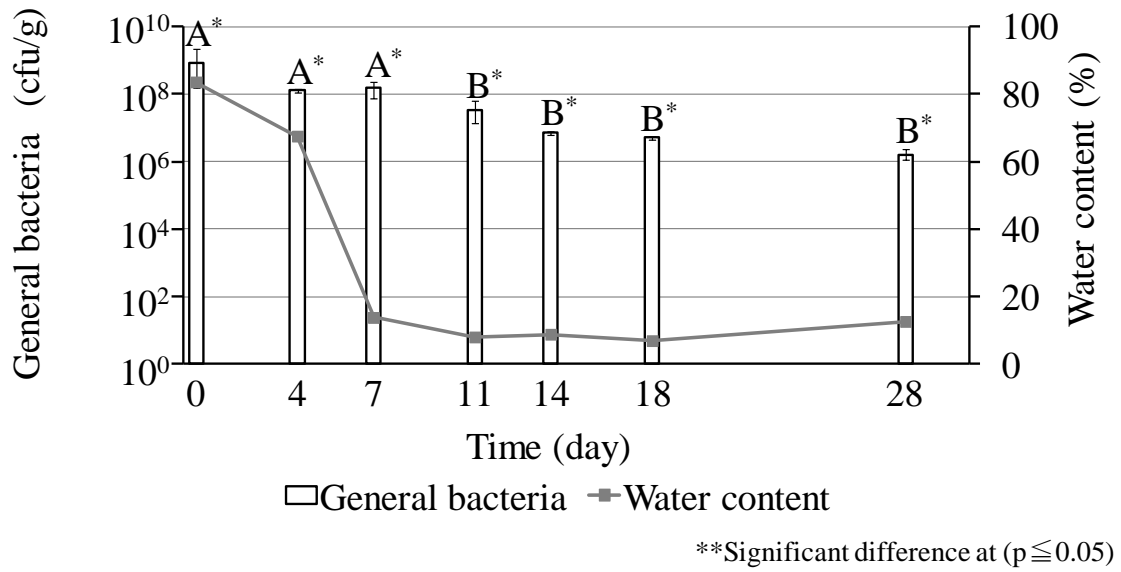


Fig. 6-8 Changes in general bacteria and water content in cow dung

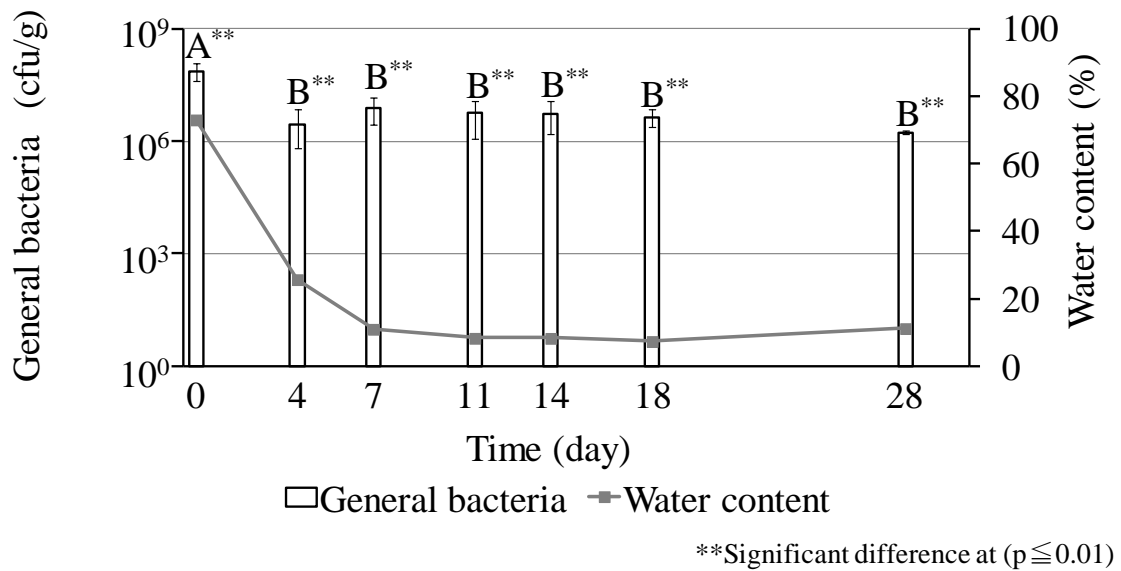


Fig. 6-9 Changes in general bacteria and water content in 2 weeks fermented manure

第 4 節 本章のまとめ

本章では試料に風乾処理を施し、*E. coli*、大腸菌群、一般細菌の生残に与える影響について調査した。

採取した試料中の *E. coli* 数、大腸菌群数、一般細菌数を調べたところ、発酵段階に関わらず、風乾処理の進行に伴い、*E. coli* 数、大腸菌群数は減少していった。分散分析の結果より、風乾処理の 0 日目と 4 日以降の間に有意差が見られた。このことから、風乾処理は *E. coli*、大腸菌群の抑制に一定の効果があると考察した。

しかし、堆肥化に必要な微生物を含む一般細菌についても *E. coli* や大腸菌群と同様の経時的変化を示し、風乾処理の 7 日目までとそれ以降の間に有意差が見られた。この一般細菌の減少は堆肥化に悪影響を及ぼすことが懸念された。

これらのことから、堆肥化過程における風乾処理は適切ではなく、施用する前に風乾処理を行うことが望ましいと判断できた。

風乾処理は発展途上国等でも実施可能な簡易な方法であるため、適切な時期に風乾処理を施せば、*E. coli*、大腸菌群の抑制は可能であると考えられる。

本章の結果より、風乾処理による堆肥化と *E. coli*、大腸菌群の抑制の両立は難しいと判断した。そのため、次章では微生物の生育に必要な pH の調整による堆肥中の微生物相の変化を追うことにした。

参考・引用文献（第VI章）

森達摩・崎元道男(1999)：大腸菌死滅を目的とした間欠通気による牛糞の高温発酵堆肥化．大阪府立農林技術センター研究報告 No.35 pp.60-63

Yu Saito and Machito Mihara (2010) Management of manure taking into account of *E.coli* loss from farmland. IJERD-International Journal of Environmental and Rural Development, 1-1, pp.175-180.

菊池政則・安宅一夫(1998)：牛堆肥の発酵過程における微生物相．酪農学園大学紀要．自然科学編 第22巻 第2号 pp.225-229

Jamal Abu-Ashour and Hung Lee (2000) : Transport of bacteria on sloping soil surfaces by runoff. Environmental Toxicology, Vol.15, 2, pp.149-153

藤田賢二(1993)：コンポスト化技術 廃棄物有効利用のテクノロジー．技報堂 p66

金子栄廣、藤田賢二(1986)：堆肥化反応における水分の限界に関する研究．土木学会論文集 第369号 pp.303-309

第 VII 章

pH 調整における微生物相の生残

第 1 節 本章の目的

本章では石灰窒素、ホタテ貝殻焼成粉末 (Heated Scallop-Shell Powder : HSSP) の添加によって堆肥中の pH を 9.0 付近に調整する事が、*E. coli*、大腸菌群及び一般細菌の生残に与える影響について検証した。

第 II、III 章の結果より、牛糞堆肥を施した農地から多量の *E. coli*、大腸菌群が流出していることが判明した。また、第 IV、V 章において流出抑制対策を試した結果、物理的な方法では依然多くの *E. coli*、大腸菌群流出が発生していた。これらのことから、堆肥化過程における *E. coli*、大腸菌群の抑制対策を講じることが土壌、水質保全上重要であると考察した。しかし、第 VI 章において、風乾処理を試みたところ、*E. coli*、大腸菌群のみならず、堆肥化に必要な一般細菌まで減少させてしまうことが明らかとなった。これらのことから、水分調整以外での堆肥化過程における *E. coli*、大腸菌群の抑制技術を考案する必要がある。

そこで本章では微生物の生残に必要な要素の一つであり、第 V 章のフィルター層を有する土砂溜を用いた実験においても大きな抑制効果を示した pH に着目した。

既往の研究 (湊 2001, 北脇・藤田 1984) より、pH 9.0 付近へ調整することが、堆肥化に必要な一般細菌への影響が少なく *E. coli*、大腸菌群を抑制するのに最適であると仮説立て、*E. coli*、大腸菌群、一般細菌数の経時変化を検証した。

第 2 節 実験方法

1. 実験方法

1) 石灰窒素添加実験

試料は東京農業大学富士畜産農場にて採取した牛糞、一次発酵堆肥を使用した (Photo. 7-1)。牛糞は当日、一次発酵堆肥は約 2 週間発酵させた物を使用した。副資材にはオガクズが用いられ、含水比はそれぞれ 76、75%、有機物量は 90、89%であった (Table 7-1)。各試料中の乾燥重量 1 g あたりの *E. coli* 数はそれぞれ 20×10^5 、 4×10^2 cfu/g、大腸菌群数はそれぞれ 1×10^5 、0 cfu/g、一般細菌はそれぞれ 13×10^7 、 6×10^6 cfu/g であった (Table 7-2)。

石灰窒素は電気化学工業株式会社製の家庭用園芸窒素 (Photo. 7-1) を使用した。石灰窒素の主成分はカルシウムシアナミドが 55%、酸化カルシウム等が 45% であり、pH は 12.15 ± 0.05 であった。

実験は試料 3 kg に石灰窒素を 0.06 kg 添加、混合し、その後インキュベーター内に 2010 年 11 月 25 日から 12 月 9 日の 14 日間静置した (Photo. 7-2)。温度は *E. coli*、大腸菌群が最も活発になる 37 °C に設定し、0、4、7、11、14 日経過時に試料の採取を行った。あわせて、酸素供給のための攪拌および、水分供給を行った。なお、水分供給は浸透圧等への影響を考慮して生理食塩水を用いた。



Photo. 7-1 Situation of cow dung and manure

Table 7-1 Properties of manures (lime nitrogen)

	Sub material	Fermentation length	Water contents (%)	Organic matter (%)
Cow dung	sawdust	0 days	76	90
Manure fermented for 2 weeks	sawdust	2 weeks	75	89

Table 7-2 Number of microorganisms in manures (lime nitrogen)

	<i>E. coli</i> (cfu/g)	Coliform bacteria (cfu/g)	General bacteria (cfu/g)
Cow dung	20×10^5	1×10^5	1×10^8
Manure fermented for 2 weeks	4×10^2	0	6×10^6



Photo. 7-2 Lime nitrogen



Photo. 7-3 Situation of incubator

2) HSSP 添加実験

試料は石灰窒素添加実験と同様、東京農業大学富士畜産農場にて採取した牛糞と、約 2 週間発酵させた一次発酵堆肥を使用した。副資材にはオガクズが用いられ、含水比はそれぞれ 78、69%、有機物量は 90、89%であった (Table 7-3)。各試料中の乾燥重量 1 g あたりの *E. coli* 数はそれぞれ 14×10^6 、0 cfu/g、大腸菌群数はそれぞれ 37×10^5 、 2×10^5 cfu/g、一般細菌はそれぞれ 2×10^8 、 6×10^6 cfu/g であった (Table 7-4)。

HSSP の作成には北海道にて養殖されたホタテの貝殻 (Photo. 7-4) を使用した。作成方法は既往の研究 (澤井ら 2003, 澤井 2007) を参考に貝殻をハンマーと粉砕機を用いて粉末状にし、電気炉にて 1000 °C で 1 時間加熱することで作成した (Fig. 7-6)。なお、HSSP の pH は 12.40 ± 0.02 と高いアルカリ性を示していた。

実験は試料 600 g に HSSP を 12 g 添加し、2012 年 11 月 8 日から 11 月 22 日の 14 日間、インキュベーター内に静置し、石灰窒素添加実験と同様に、温度は *E. coli*、大腸菌群が最も活発になる 37 °C に設定した。0、4、7、11、14 日経過時に試料の採取、攪拌および、生理食塩水による水分供給を行った。

Table 7-3 Properties of manures (HSSP)

	Sub material	Fermentation length	Water contents (%)	Organic matter (%)
Cow dung	sawdust	0 days	78	90
Manure fermented for 2 weeks	sawdust	2 weeks	69	89

Table 7-4 Number of microorganisms in manures
(HSSP)

	<i>E. coli</i> (cfu/g)	Coliform bacteria (cfu/g)	General bacteria (cfu/g)
Cow dung	14×10^6	37×10^5	2×10^8
Manure fermented for 2 weeks	0	2×10^5	6×10^6



Photo. 7-4 Scallop-Shell

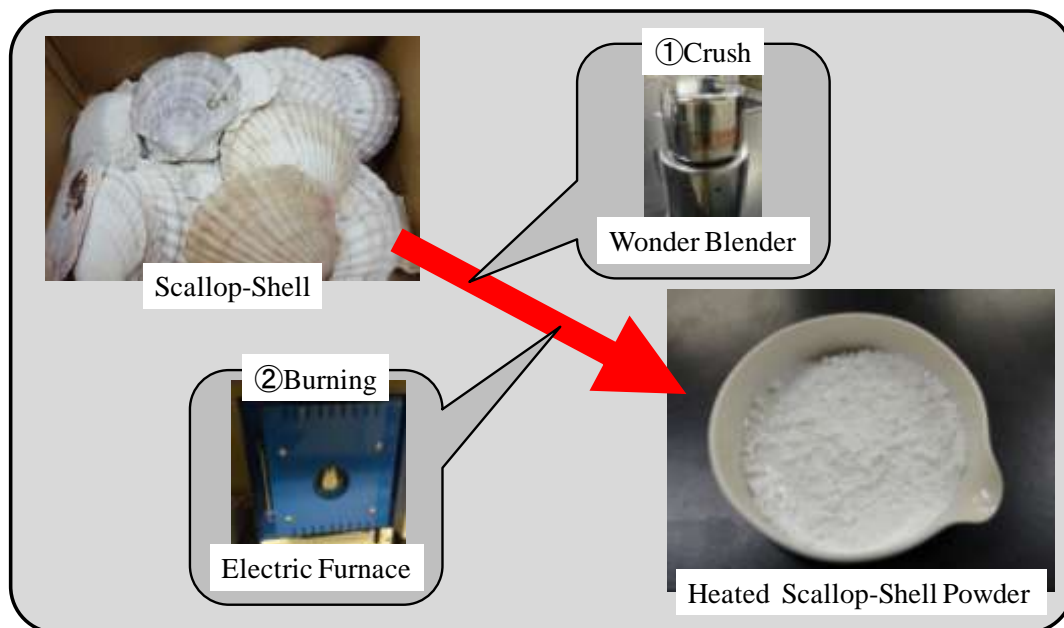


Fig.7-1 Process of making Heated Scallop-Shell Powder

2. 分析項目

採取した試料中の *E. coli* 数、大腸菌群数、一般細菌数及び pH を測定した。

pH はガラス電極法を用いて測定した。

E. coli 数、大腸菌群数は Fig. 7-2 のように希釈平板法で数段階希釈を行い、その希釈液を培地に塗布し、37 °C 条件下で 18~22 時間培養後、XM-G 寒天培地上に出現した青色のコロニーを *E. coli*、紫色のコロニーを大腸菌群として計数した (Photo.7-5)。

一般細菌は同じく希釈平板法で 37 °C で培養後、普通寒天培地に出現した白色のコロニーを計数した (Photo.7-6)。

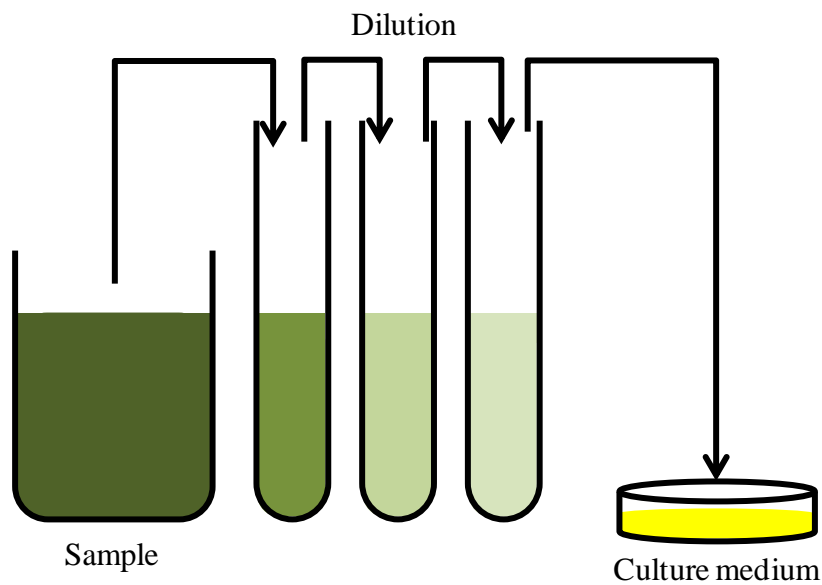


Fig. 7-2 Dilution plate technique

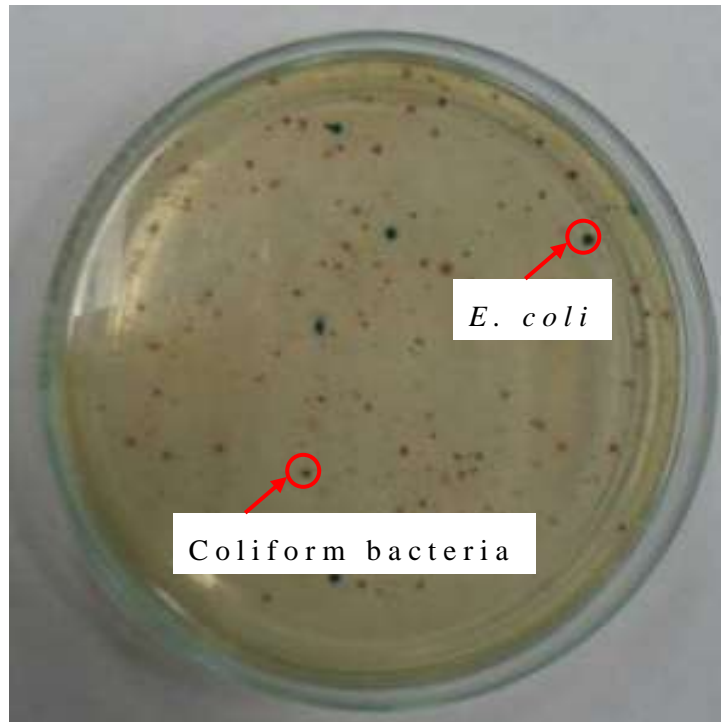


Photo. 7-5 Colonies of *E. coli* and coliform bacteria



Photo. 7-6 Colonies of general bacteria

第 3 節 結果および考察

1. 石灰窒素、HSSP 添加による pH の変化

石灰窒素、HSSP 添加前後における試料の pH 変化をそれぞれ Fig.7-3, Fig.7-4 に示した。堆肥に対し 2% の量と少ない添加量に関わらず、全ての試料で添加前では pH 7~8 とほぼ中性を示していた。添加 *E. coli*、大腸菌群の生育限界である pH 9.54 (総合食品安全事典編集委員会 1997) に近く、堆肥化に最も適しているとされる (北脇・藤田 1984)、pH 9.0 付近となった。

これは石灰窒素の主成分である酸化カルシウムが $\text{CaO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}(\text{OH})_2$ のように、堆肥中の水分と反応し、強アルカリである水酸化カルシウムとなって全体の pH を上昇させたためである。

また、HSSP についてはホタテ貝殻の主成分である炭酸カルシウムが焼成処理によって、 $\text{CaCO}_3 \rightarrow \text{CaO} + \text{CO}_2$ の化学式のように、高温で酸化カルシウムとなり、石灰窒素と同様に堆肥中の水分と反応して水酸化カルシウムへと変化して溶解し、全体の pH を上昇させたものと考察した。

以上の結果より、pH 12 の石灰窒素、HSSP を重量ベースで牛糞の 2% 程度添加することによって、pH 9.0 付近への調整が可能であると考察した。

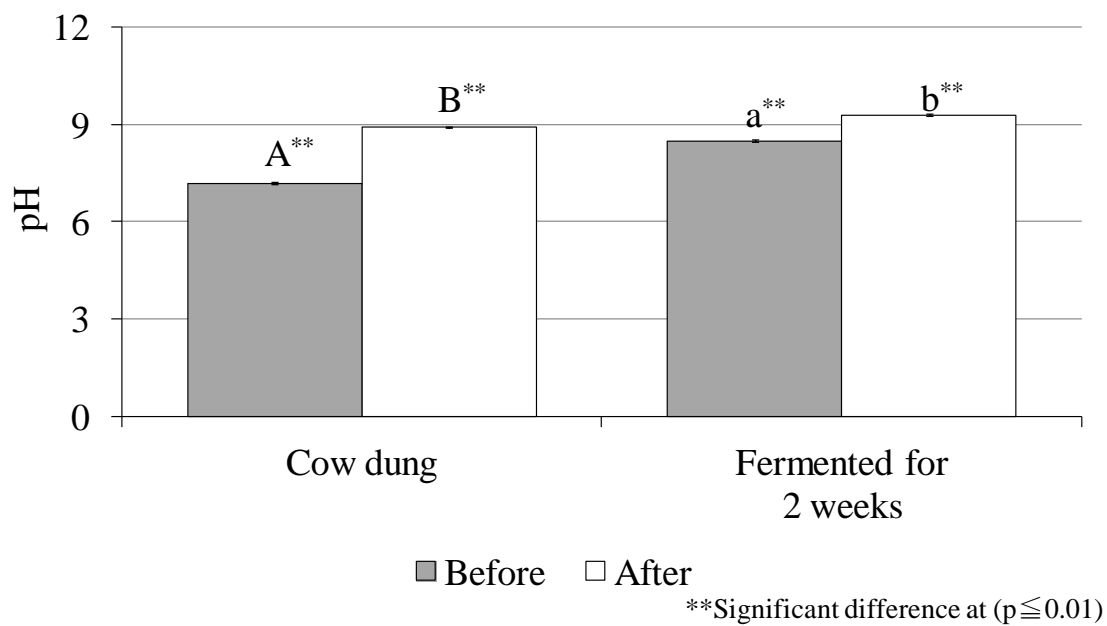


Fig. 7-3 Changes in pH (lime nitrogen)

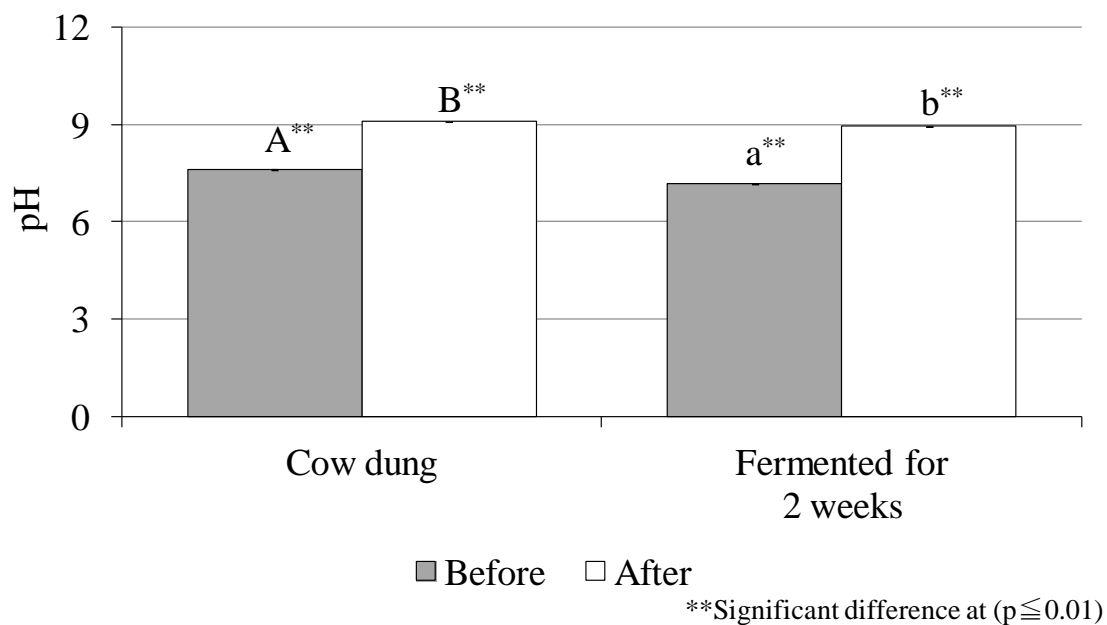


Fig. 7-4 Changes in pH (HSSP)

2. 石灰窒素、HSSP 添加が *E. coli* の生残に与える影響

石灰窒素、HSSP 添加による *E. coli* 数の経時変化をそれぞれ Fig. 7-5、Fig. 7-6、Fig. 7-7、Fig. 7-8 に示した。

石灰窒素添加実験の牛糞 (Fig. 7-5) について見てみると、添加前の牛糞中に生存していた 2×10^6 cfu/g の *E. coli* が石灰窒素添加による pH 調整直後に完全に死滅した。また、分散分析を行ったところ、石灰窒素添加前後で 99% の有意差が見られた。一次発酵堆肥 (Fig. 7-6) では分散分析の結果、有意差こそ見られなかったが、石灰窒素添加直後に、*E. coli* が死滅し、以降 14 日間、検出はされないという、牛糞と同様の傾向が見られた。

一方、牛糞に HSSP を添加した場合についても石灰窒素添加実験と同様に、HSSP を添加して pH を上昇させた直後に 14×10^6 cfu/g の *E. coli* が完全に死滅し、以降検出されない結果となった。加えて、分散分析の結果、HSSP の添加前と添加後の間に 99% の有意差が見られた (Fig. 7-7)。また、Fig. 7-8 に示したように HSSP 添加実験における一次発酵堆肥からは、実験期間中、*E. coli* は検出されなかった。これは、採取した東京農業大学富士畜産農場における、発酵の進行が要因であると考えられる。

以上のことから、石灰窒素や HSSP を添加することによる pH 調整は高い *E. coli* の抑制効果を有しており、発酵段階に関わらず、有効であることが明らかとなった。

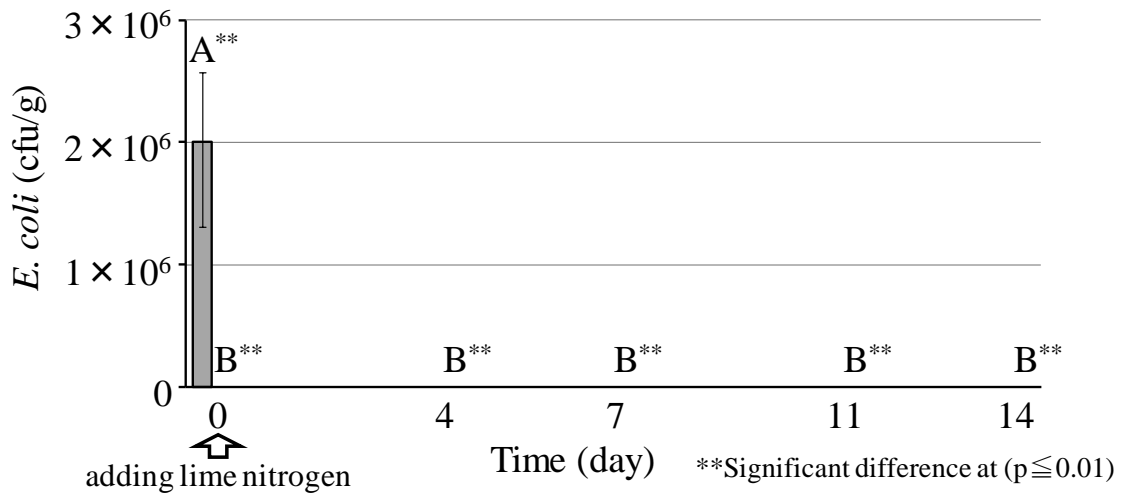


Fig. 7-5 Changes in *E. coli* in cow dung (lime nitrogen)

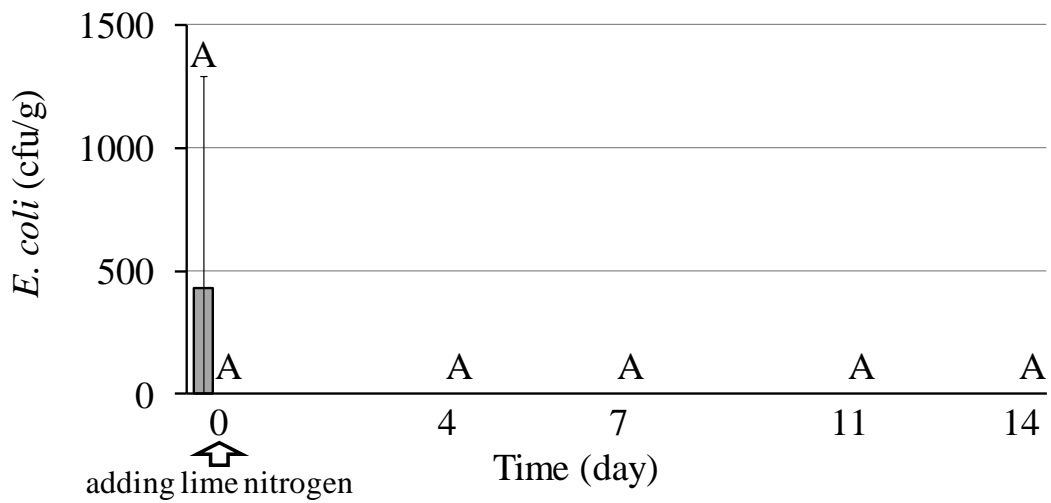


Fig. 7-6 Changes in *E. coli* in 2 weeks fermented manure (lime nitrogen)

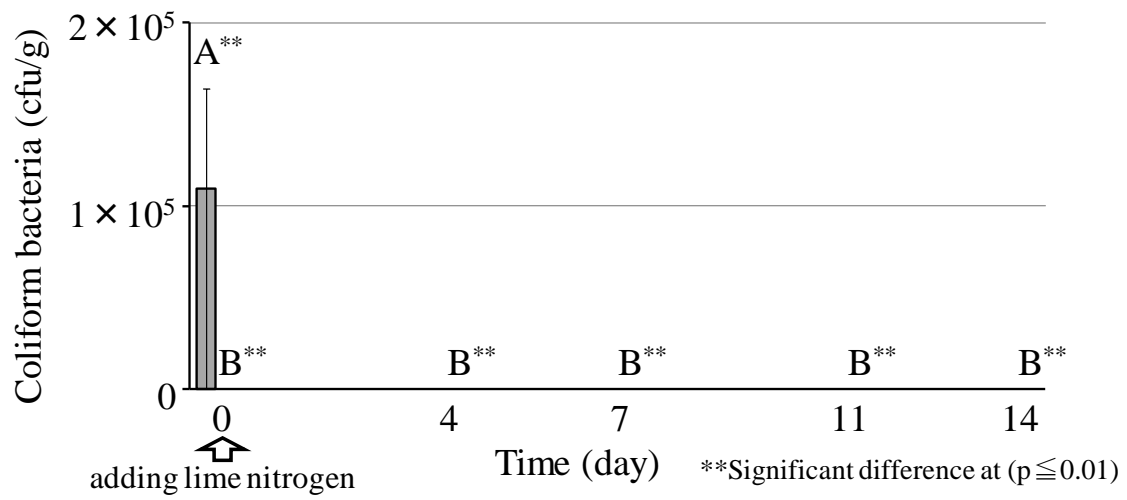


Fig. 7-7 Changes in *E. coli* in cow dung (HSSP)

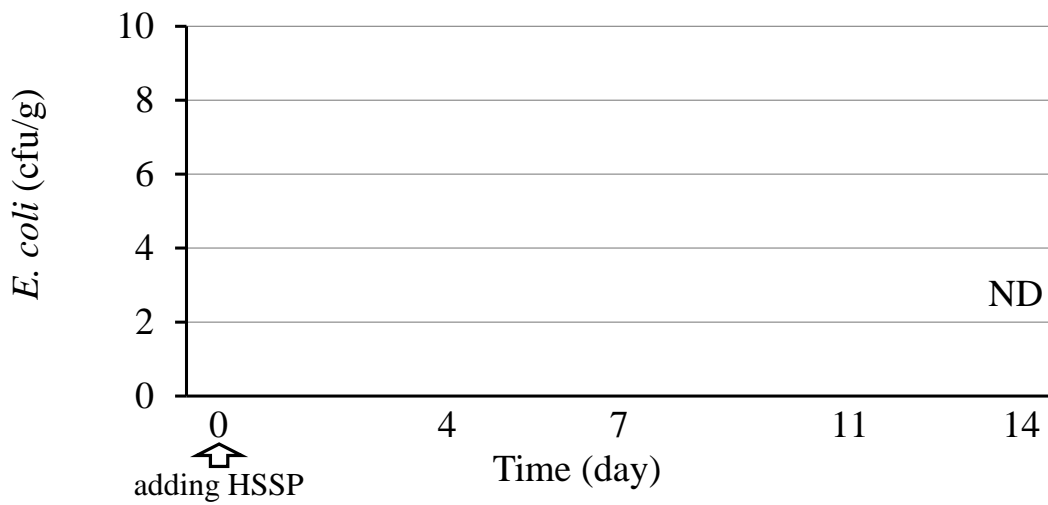


Fig. 7-8 Changes in *E. coli* in 2 weeks fermented manure (HSSP)

2. 石灰窒素、HSSP 添加が大腸菌群の生残に与える影響

Fig. 7-9、Fig. 7-10、Fig. 7-11、Fig. 7-12 はそれぞれ石灰窒素、HSSP 添加による大腸菌群数の経時変化を示している。

石灰窒素添加実験の牛糞では *E. coli* の結果と同様に、pH 調整をした直後に、 2×10^6 cfu/g いた大腸菌群が死滅し、以降検出されなかった。また分散分析の結果、石灰窒素添加前と添加後の間に有意差が見られた (Fig. 7-9)。また、Fig. 7-10 を見てみると、一次発酵堆肥では実験を行った 14 日間、大腸菌群は検出されなかった。これは、東京農業大学富士畜産農場における、牛糞から一次発酵堆肥に至るまでの発酵によるものであると考察した。

HSSP 添加実験における牛糞 (Fig. 7-11) では、石灰窒素添加実験と同様、HSSP 添加による pH 上昇後、大腸菌群が完全に死滅し、以後検出されなかった。また、分散分析を行ったところ、HSSP の添加前後の間で 99% の有意差が見られた。一次発酵堆肥については添加 11 日経過後まで大腸菌群が検出されたが、時間経過とともに減少を続け、14 日経過後には検出されなくなった (Fig. 7-12)。これは、HSSP 実験における一次発酵堆肥は含水率が 68% と、他の試験区よりも低いために酸化カルシウムと水分の反応が進まず、pH が上昇しきらない部分があったためであると考察した。

以上の結果より、石灰窒素や HSSP の添加による pH 調整は発酵段階に関わらず、大腸菌群などの有害な菌の抑制に効果があることが明らかとなった。

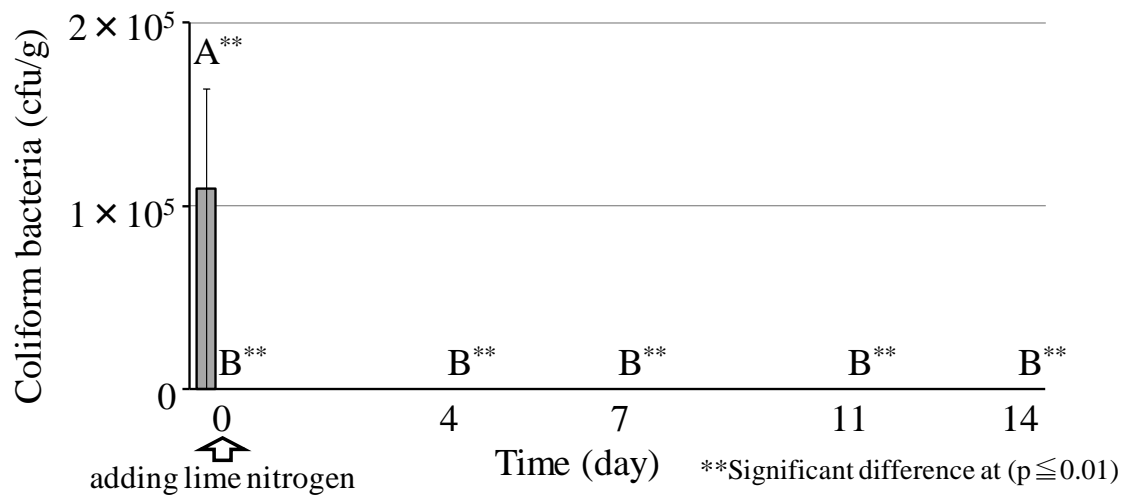


Fig. 7-9 Changes in coliform bacteria in cow dung
(lime nitrogen)

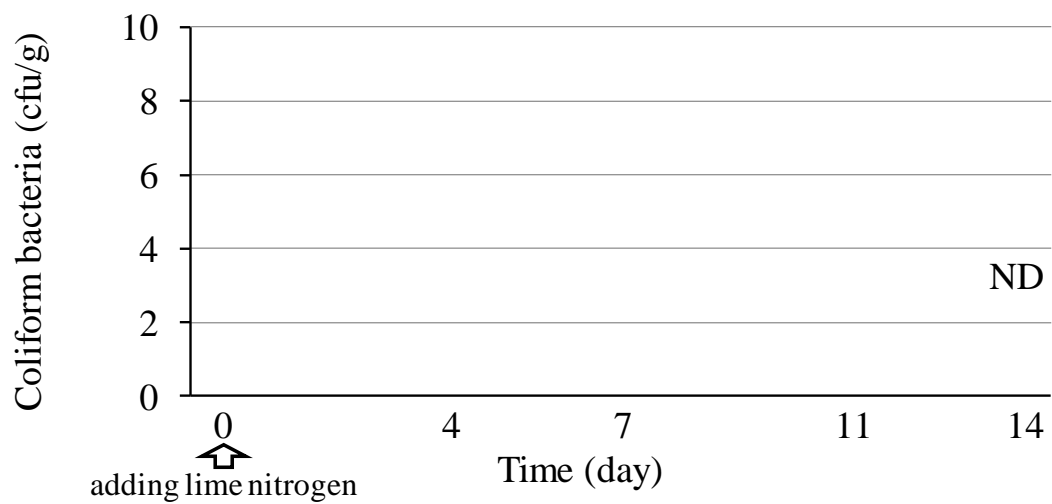


Fig. 7-10 Changes in coliform bacteria in 2 weeks fermented
manure (lime nitrogen)

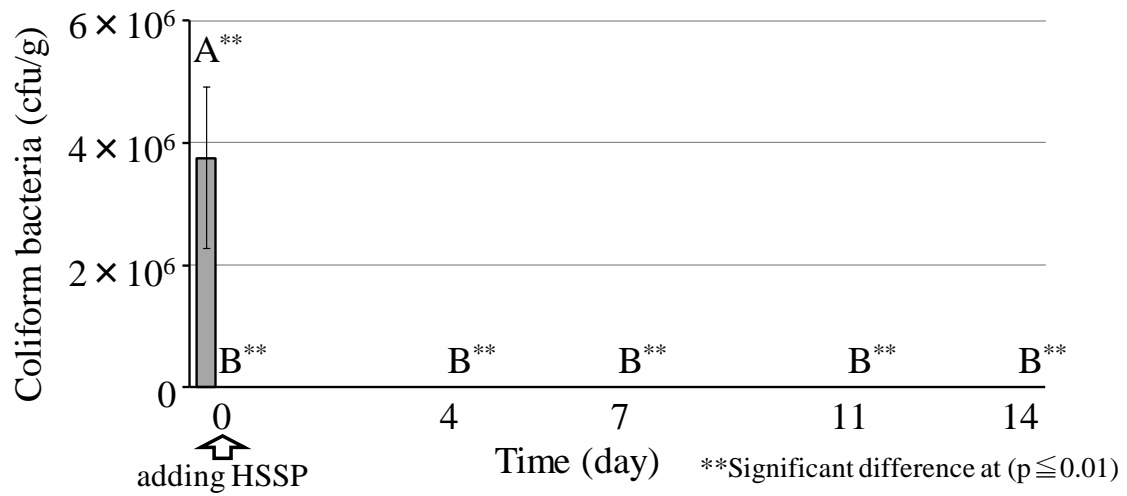


Fig. 7-11 Changes in coliform bacteria in cow dung (HSSP)

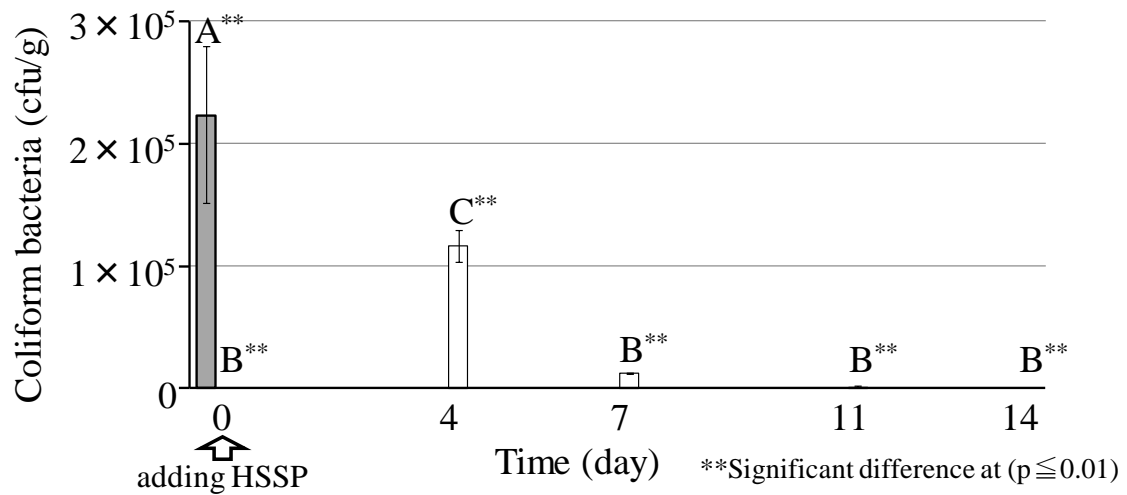


Fig. 7-12 Changes in coliform bacteria in 2 weeks fermented manure (HSSP)

3. 石灰窒素、HSSP 添加が一般細菌の生残に与える影響

石灰窒素、HSSP 添加による一般細菌数の経時変化をそれぞれ Fig. 7-13、Fig. 7-14、Fig. 7-15、Fig. 7-16 に示した。

石灰窒素を添加した牛糞では有意差こそ見られなかったが、添加前の 10^8 cfu/g から $10^{10} \sim 10^{11}$ cfu/g へと上昇する傾向が見られた (Fig. 7-13)。一次発酵堆肥についても同様に、実験期間中 $10^8 \sim 10^9$ cfu/g とほぼ一定であった。加えて、分散分析の結果、一定の傾向は見られなかった (Fig. 7-14)。

HSSP 添加実験について見てみると、Fig. 7-15 に示したように牛糞では HSSP 添加によって pH が上昇しても、大きな減少は見られず、 $10^8 \sim 10^9$ cfu/g の一般細菌数を維持していた。一次発酵堆肥についても同様に、HSSP を添加しても一般細菌は減少することなく、分散分析を行っても、特に一定の傾向は見られなかった (Fig. 7-16)。

既往の研究において北脇・藤田 (1984) は pH 9～10 の条件下では堆肥中の微生物が活発になると報告しており、一般細菌数が上昇したのは pH の上昇に伴う、微生物の活発化が要因であると考察した。このことから、石灰窒素、HSSP によって pH 9.0 付近へ調整しても一般細菌は減少しないことが立証された。

以上の結果より、pH を 9.0 付近へ調整しても、一般細菌数が減少せず、堆肥化に与える影響も少ないと考察した。

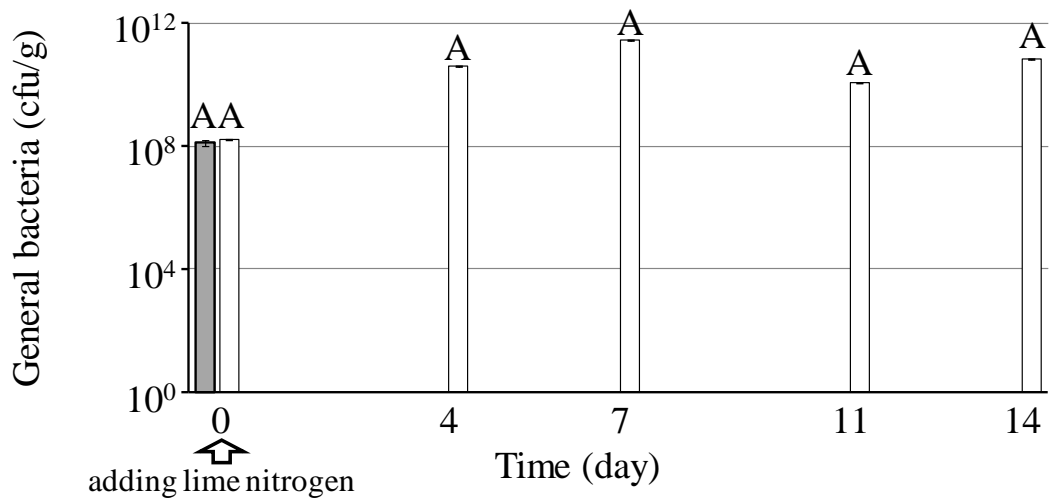


Fig. 7-13 Changes in general bacteria in cow dung
(lime nitrogen)

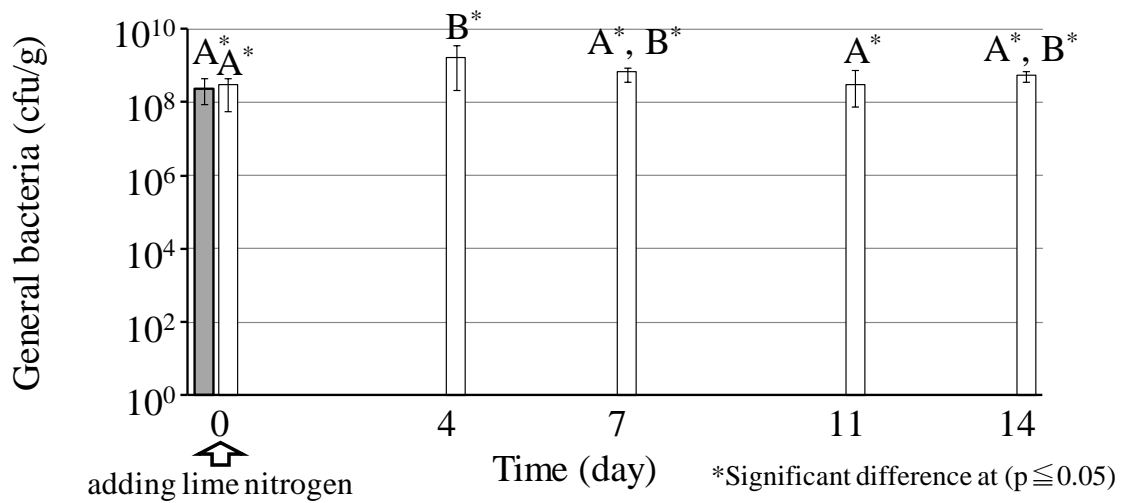


Fig. 7-14 Changes in general bacteria in 2 weeks fermented
manure (lime nitrogen)

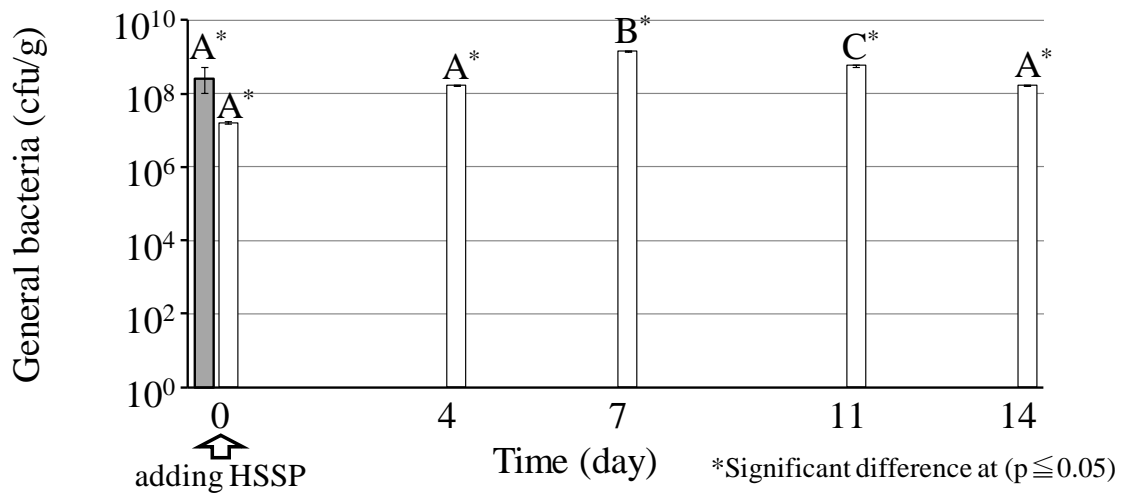


Fig. 7-15 Changes in general bacteria in cow dung (HSSP)

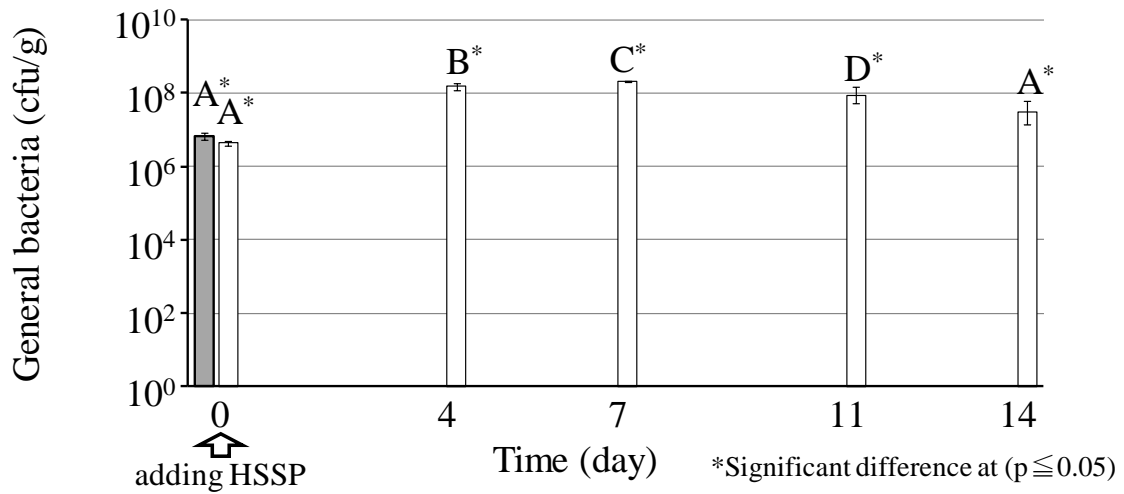


Fig. 7-16 Changes in general bacteria in 2 weeks fermented manure (HSSP)

第 4 節 本章のまとめ

本章では堆肥化過程における *E. coli*、大腸菌群の抑制技術の考案を目指し、石灰窒素、HSSP 添加による pH 9.0 付近への調整が堆肥中の *E. coli*、大腸菌群、一般細菌の生残に与える影響について調査した。

各試料の pH を測定したところ、全ての試料で石灰窒素、HSSP 添加によって *E. coli*、大腸菌群の生育限界であり、堆肥化に最適とされている pH 9.0 付近となった。

採取した試料中の *E. coli* 数、大腸菌群数、一般細菌数を調べたところ、発酵段階に関わらず、石灰窒素、HSSP 添加直後に *E. coli*、大腸菌群は減少し、14 日経過時には検出されなかった。また、堆肥化に必要な微生物を含む一般細菌について見てみると、石灰窒素や HSSP を添加しても一般細菌数に大きな変化は見られず、分散分析の結果より、石灰窒素や HSSP を添加する前と添加した後の間に有意差は見られなかった。

これらのことから、石灰窒素や HSSP などのアルカリ剤を添加して pH 9.0 付近にすることは、堆肥化過程における *E. coli*、大腸菌群の抑制について、発酵段階に関わらず有効であると判断した。

本章の結果は貝殻や卵殻等、炭酸カルシウム、酸化カルシウムを主成分とする物質があれば、発展途上国でも容易に適用可能であるため、応用性が高いと考える。

参考・引用文献（第Ⅶ章）

湊啓子，田村忠，前田善夫(2001)：石灰窒素の添加が牛ふんの堆肥化および大腸菌の消長に及ぼす影響．北海道立畜産試験場研究報告 第24号 pp.11-17

湊啓子，田村忠，前田善夫(2001)：石灰窒素の牛ふん中大腸菌に対する殺菌効果．第24号 pp.21-24

澤井淳，五十嵐英夫，菊池幹夫(2003)：加熱処理した貝殻粉末の抗菌活性を応用した微生物制御．日本食品微生物学会雑誌 Vol.20 No.1 pp.1-7

澤井淳(2007)：酸化カルシウムを主成分とする焼成ホタテ貝殻粉末の細胞芽胞に対する抗菌特性．New Food Industry Vol.49 No.2 pp.41-48

三原義広、高田智哉、宇野直嗣、杉本敬祐(2008)：簡単な操作で作製された焼成ホタテガイ貝殻-ガラス複合成形帯の抗菌・抗カビ効果．Journal of the Ceramic Society of Japan Vol.116 pp.S1-S4

村田亜悠美，小尾信子，中平比沙子，宮原龍郎，落合宏(2008)：ホタテ貝殻焼成粉末の殺菌および殺インフルエンザウイルス作用について．富山大学看護学会誌 第7巻2号 pp.39-49

一色堅司，栖原浩，水内健二，徳岡敬子(1994)：カルシウム製剤による微生物制御の可能性について．日本食品工業学会誌 第41巻第2号 pp.135-140

仲西寿男．丸山務(2009)：食品由来感染症と食品微生物．中

央法規出版 p.283

北脇秀敏，藤田賢二(1984)：低級脂肪酸による堆肥化過程の
阻害に関する研究．衛生工学研究論文集 第20巻
pp.175-182

第 VIII 章

総括

本研究では未熟堆肥を施用した畑地からの *E. coli*、大腸菌群の流出特性の解明、畑地および牛糞の堆肥化過程における *E. coli*、大腸菌群の保全対策の提案を目指し、人工降雨装置を用いた流出実験や微生物の生残実験を行った。

一連の実験の結果、*E. coli*、大腸菌群の流出は施用方法や発酵段階に関わらず、表面流と浸透流双方を通じて起こり、表面流の多くは糞便などの懸濁液成分の移動に伴って流出する結果となった。

畑地からの *E. coli*、大腸菌群の流出抑制対策については、緩衝帯やアルカリ材のフィルター層を設置した土砂溜が *E. coli*、大腸菌群の流出抑制に有効である可能性が示された。

また、堆肥化過程における *E. coli*、大腸菌群の抑制技術について見てみると、風乾処理による水分調整では *E. coli*、大腸菌群の減少効果は見られたが、堆肥化に必要な一般細菌についても減少する結果となった。一方、石灰窒素やホタテ貝殻焼成粉末(HSSP)などの、アルカリ材添加による pH 9.0 付近への調整では *E. coli*、大腸菌群に対する殺菌効果が見られ、堆肥化に必要な一般細菌については明確な減少は見られなかった。

これらのことから、緩衝帯や土砂溜など、既往の土壌・肥料成分流出対策を改良することで *E. coli*、大腸菌群の抑制が可能であることが明らかとなった。また、貝殻や卵殻等のカルシウムを多く含み、アルカリ材として利用可能な物質があれば、堆肥化過程や畑地における *E. coli*、大腸菌群の拡散、流出抑制への応用が可能であると結論づけた。

Fig. 8-1 は第 II 章で現地調査を行った埼玉県 A 沼をモデルとした、本研究結果の提案である。堆肥化過程では pH 調整と風乾処理を行うことで、施用前の *E. coli*、大腸菌群数を抑制できると考える。また、施用後については畑地では水路に沿って緩衝帯を設置することで、*E. coli* の流出を抑えることが出来ると考える。あわせて、土砂溜内にアルカリ性のフィルター層を設置することで、A 沼への *E. coli*、大腸菌群の流出を抑制することが可能である。

本研究より、既往の土壌・肥料成分流出対策を改良することで *E. coli*、大腸菌群の抑制が可能であること、あわせて、堆肥化過程における *E. coli*、大腸菌群の抑制に適した pH が示された。本研究の結果は今後の *E. coli*、大腸菌群の流出抑制対策の確立をしていく上で、指標となると考える。特にアジアやアフリカなどの発展途上国においては、現地の貝殻 (Photo. 8-1) や卵殻などを焼成すれば *E. coli*、大腸菌群の抑制が可能であるため、応用性が高いと考える。

今後の展望として、十分な成果を得られなかった畑地における保全対策として、緩衝帯に代わる *E. coli*、大腸菌群の保全対策の検討が必要であると考えられる。また、本研究では主に日本国内の事例を元に研究を進めたが、日本以上に *E. coli*、大腸菌群の流出が深刻な発展途上国については議論が不十分である。そこで、発展途上国の現地に即した保全対策の確立、及びそれらの技術の普及についての議論等を進めていくことが必要である。



Fig. 8-1 Proposal plan in A swamp



Photo. 8-1 Shell in developing country

謝 辞

博士前期および後期課程 5 年間に渡り、主査である東京農業大学地域環境科学部生産環境工学科の三原真智人教授には終始丁寧なご指導を賜りました。

あわせて、副査である東京農業大学地域環境科学部生産環境工学科の中村好男教授、藤川智紀准教授、同大学応用生物科学部生物応用化学科の岡田早苗教授にも論文の構成などについて助言を賜りました。

研究を進めるにあたり、東京農業大学大学院修了生の川井聡之氏、荘司康太氏、河村征氏、宝田浩太郎氏、斉藤優氏には実験、分析に関する技術だけでなく、研究に対する姿勢、大学院生としての在り方について多くのことを教えていただきました。また、東京農業大学富士畜産農場の皆様にはお忙しい中、試料の牛糞堆肥を提供していただきました。

共に研究に励んだ仲間として、TORILLO Julian Jr.氏をはじめ、地域資源利用学研究室の皆様には、実験や発表練習など多くのご協力を頂きました。

最後に、大学生活 9 年間に関わった方皆様、そして経済的、精神的に支えていただいた両親に心より感謝申し上げます。

Summary

Study on Eliminating *Escherichia coli* Efflux from
Upland Fields Applied Cow Dung Manure

A Thesis

by

Yuta Ishikawa

Submitted to Graduate School of Agriculture,
Tokyo University of Agriculture

in partial fulfillment of the requirements for the degree of
Doctor of Philosophy

March 2014

1. Introduction

In Japan, about 84 million tons of dung has been produced annually from cattle farms. The point of view of organic agriculture, making manure was considered as proper treatment. However, bulk production of manure may possibly contain immature fermented manure. In addition, the pathogenic bacteria known as *E. coli* or coliform bacteria may survive and remain in immature fermented manure. These bacteria may be released from grazed land and upland field applied with immature fermented manure. The efflux of *E. coli* or coliform

bacteria affects water quality. So, solution of coliform bacteria efflux and treatment for eliminating *E. coli* and coliform bacteria should be considered.

In this study, three objectives were determined. First is to evaluate the characteristics of coliform bacteria efflux. Second is to consider treatment for eliminating coliform bacteria efflux in upland field. Third objective is to observe the differences of survival rate of several microorganisms such as *E. coli*, coliform bacteria and general bacteria under air drying treatment and pH control.

2. Study on Coliform Bacteria Efflux around A Swamp of Saitama Prefecture

A field survey was conducted in A swamp of Saitama prefecture. Based on the experimental results of analysis of *E. coli* and coliform bacteria in drainage canals around upland fields applied cow dung manure, there was a tendency that *E. coli* and coliform bacteria survived in bottom muds were more in number than that in water. Thus, it was considered that *E. coli* and coliform bacteria may accumulate in bottom muds. In addition, more *E. coli* and coliform bacteria were survived in sedimentation tank. So, it was considered that it may be reasonable to improve the structure of sedimentation tank for eliminating *E. coli* and coliform bacteria.

3. Study on Characteristic of Coliform Bacteria Efflux under Artificial Rainfall Simulator

Two objectives of this chapter were determined. First is to investigate *E. coli* efflux under different application methods of cattle manure. The other is to compare with *E. coli* in suspended water and in filtrate water. Slope modeling experiment was conducted under an artificial rainfall simulator. Slope plots were filled with soil then fresh cow dung and 2 weeks fermented manures were applied into the plots. Both samples were applied with 2 application methods: the broadcasting method and the incorporating method. Based on the experimental results, it was found that the amounts of *E. coli* efflux were similar to that of input in either plot. In addition, there were tendencies that *E. coli* was released through not only surface runoff but also percolation. Furthermore, around 80-90% of *E. coli* was found in water with suspended solid before filtration. Therefore, it was considered that pathogenic bacteria as *E. coli* should be eliminated during fermentation process.

4. Study on Eliminating Coliform Bacteria Efflux with Grass Buffer Strips

In this chapter, model experiment was carried out to observe the effects of grass buffer strips on eliminating coliform bacteria efflux. The experimental results showed that *E. coli*

efflux from cow dung was not affected by grass buffer strips. However, in the case of 2 weeks fermented manure, grass buffer strips succeeded to capture around 92% of *E. coli*. Therefore, it was considered that grass buffer strips are applicable in upland fields applied 2 weeks fermented manure for controlling *E. coli* efflux.

5. Study on Eliminating Bacteria Efflux with Filtering System in Sedimentation Tank

A model experiment of sedimentation tank with filtering system was carried out. In this experiment, 3 types of filtering materials were applied; gravel, carbon and lime nitrogen. Each of these materials was installed in the bottom of sedimentation tank. Then, suspended water with cow dung manure was discharged into the sedimentation tank with filtering system. Based on the experimental results, *E. coli* and coliform bacteria efflux were not eliminated with the filtering materials of gravel or carbon. However, lime nitrogen was remarkably effective to eliminate *E. coli* and coliform bacteria. Accordingly, it was concluded that sedimentation tank with alkaline filter materials such as lime nitrogen was effective to eliminate *E. coli* and coliform bacteria.

6. Survival Rate of Microorganisms under Air Drying

Treatment

This chapter dealt with the observation on the survival rate of microorganisms under air drying treatment. In the experiment, 2 types of cow manure, fresh cow dung and 2 weeks fermented manure were employed. Air drying treatment was carried out for 28 days. The experimental results showed that the number of *E. coli* and coliform bacteria decreased with passing day of air drying process. However, the number of general bacteria also decreased with time of air drying process. Therefore, it was concluded that air drying treatment for fresh cow dung is not a proper way but is applicable to the manure fermented for 2 weeks.

7. Study on Survival Rate of Microorganisms under pH

Control

The survival rate of microorganisms under pH control with lime nitrogen or Heated Scallop-Shell Powder (HSSP) was observed in this chapter. Each of the alkaline materials was mixed with cow manure for controlling pH at around 9.0. The experimental results showed that *E. coli* and coliform bacteria suddenly decreased after pH control. On the other hands, general bacteria which contain beneficial bacteria were not decreased with pH control. So, it was concluded that the pH control at around 9.0 with alkaline materials such as lime

nitrogen or HSSP is effective to decrease pathogenic bacteria in fermentation process.

7. Conclusion

Based on the study, it was indicated that *E. coli* and coliform bacteria released through both surface runoff and percolation. Thus, some of treatments such as grass buffer strips or sedimentation tank with filtering systems are applicable for eliminating *E. coli* and coliform bacteria efflux. In addition, pH control at around 9.0 with alkaline materials such as lime nitrogen or Heated Scallop-Shell Powder (HSSP) in fermentation process is effective to eliminate pathogenic bacteria without decreasing general bacteria. It is considered that the outcomes from this study may contribute well to the proper treatments of *E. coli* and coliform bacteria in Asian or African developing countries.

Appendix

第Ⅱ章 水中の*E. coli*数

Point. 1

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/L)	Average
1	Point. 1 ①	1.E+04	6.7.E+03
2	Point. 1 ②	0	
3	Point. 1 ③	1.E+04	

Point. 2

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/L)	Average
1	Point. 2 ①	0	3.3.E+03
2	Point. 2 ②	0	
3	Point. 2 ③	1.E+04	

Point. 3

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/L)	Average
1	Point. 3 ①	0	0
2	Point. 3 ②	0	
3	Point. 3 ③	0	

Point. 4

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/L)	Average
1	Point. 4 ①	0	0
2	Point. 4 ②	0	
3	Point. 4 ③	0	

Point. 5

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/L)	Average
1	Point. 5 ①	0	0
2	Point. 5 ②	0	
3	Point. 5 ③	0	

Point. 6

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/L)	Average
1	Point. 6 ①	0	0
2	Point. 6 ②	0	
3	Point. 6 ③	0	

Point. 7

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/L)	Average
1	Point. 7 ①	20000	6.7.E+03
2	Point. 7 ②	0	
3	Point. 7 ③	0	

Point. 8

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/L)	Average
1	Point. 8 ①	0	0
2	Point. 8 ②	0	
3	Point. 8 ③	0	

Point. 9

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/L)	Average
1	Point. 9 ①	0	0
2	Point. 9 ②	0	
3	Point. 9 ③	0	

Point. 10

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/L)	Average
1	Point. 10 ①	0	0
2	Point. 10 ②	0	
3	Point. 10 ③	0	

Point. 11

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/L)	Average
1	Point. 11 ①	0	0
2	Point. 11 ②	0	
3	Point. 11 ③	0	

Point. 12

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/L)	Average
1	Point. 12 ①	0	0
2	Point. 12 ②	0	
3	Point. 12 ③	0	

第Ⅱ章 水中の大腸菌群数

Point. 1

	Sample	Coliform bacteria (cfu/L)	Average
1	Point. 1 ①	5.6.E+05	3.8.E+05
2	Point. 1 ②	3.8.E+05	
3	Point. 1 ③	2.0.E+05	

Point. 2

	Sample	Coliform bacteria (cfu/L)	Average
1	Point. 2 ①	4.0.E+05	3.1.E+05
2	Point. 2 ②	3.0.E+05	
3	Point. 2 ③	2.3.E+05	

Point. 3

	Sample	Coliform bacteria (cfu/L)	Average
1	Point. 3 ①	5.1.E+05	3.8.E+05
2	Point. 3 ②	2.5.E+05	
3	Point. 3 ③	3.8.E+05	

Point. 4

	Sample	Coliform bacteria (cfu/L)	Average
1	Point. 4 ①	1.6.E+05	1.9.E+05
2	Point. 4 ②	2.3.E+05	
3	Point. 4 ③	1.9.E+05	

Point. 5

	Sample	Coliform bacteria (cfu/L)	Average
1	Point. 5 ①	2.1.E+05	2.0.E+05
2	Point. 5 ②	2.5.E+05	
3	Point. 5 ③	1.4.E+05	

Point. 6

	Sample	Coliform bacteria (cfu/L)	Average
1	Point. 6 ①	2.0.E+05	2.6.E+05
2	Point. 6 ②	2.2.E+05	
3	Point. 6 ③	3.7.E+05	

Point. 7

	Sample	Coliform bacteria (cfu/L)	Average
1	Point. 7 ①	1.4.E+05	1.9.E+05
2	Point. 7 ②	2.6.E+05	
3	Point. 7 ③	1.8.E+05	

Point. 8

	Sample	Coliform bacteria (cfu/L)	Average
1	Point. 8 ①	1.1.E+05	1.3.E+05
2	Point. 8 ②	1.3.E+05	
3	Point. 8 ③	1.5.E+05	

Point. 9

	Sample	Coliform bacteria (cfu/L)	Average
1	Point. 9 ①	2.1.E+05	1.8.E+05
2	Point. 9 ②	1.4.E+05	
3	Point. 9 ③	1.8.E+05	

Point. 10

	Sample	Coliform bacteria (cfu/L)	Average
1	Point. 10 ①	2.0.E+05	2.9.E+05
2	Point. 10 ②	3.7.E+05	
3	Point. 10 ③	2.9.E+05	

Point. 11

	Sample	Coliform bacteria (cfu/L)	Average
1	Point. 11 ①	9.0.E+04	9.0.E+04
2	Point. 11 ②	9.0.E+04	
3	Point. 11 ③	9.0.E+04	

Point. 12

	Sample	Coliform bacteria (cfu/L)	Average
1	Point. 12 ①	3.3.E+05	5.0.E+05
2	Point. 12 ②	6.6.E+05	
3	Point. 12 ③	5.0.E+05	

第Ⅱ章 底泥中の*E. coli*数

Point. 1

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/g)	Average
1	Point. 1 ①	0	0
2	Point. 1 ②	0	
3	Point. 1 ③	0	

Point. 2

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/g)	Average
1	Point. 2 ①	0	0
2	Point. 2 ②	0	
3	Point. 2 ③	0	

Point. 3

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/g)	Average
1	Point. 3 ①	0	9.5.E+01
2	Point. 3 ②	1.9.E+02	
3	Point. 3 ③	9.5.E+01	

Point. 4

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/g)	Average
1	Point. 4 ①	0	0
2	Point. 4 ②	0	
3	Point. 4 ③	0	

Point. 5

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/g)	Average
1	Point. 5 ①	4.8.E+04	5.2.E+04
2	Point. 5 ②	5.7.E+04	
3	Point. 5 ③	5.2.E+04	

Point. 6

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/g)	Average
1	Point. 6 ①	6.7.E+03	7.7.E+03
2	Point. 6 ②	8.6.E+03	
3	Point. 6 ③	7.7.E+03	

Point. 7

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/g)	Average
1	Point. 7 ①	7.8.E+03	7.1.E+03
2	Point. 7 ②	6.4.E+03	
3	Point. 7 ③	7.1.E+03	

Point. 8

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/g)	Average
1	Point. 8 ①	2.5.E+04	2.1.E+04
2	Point. 8 ②	1.6.E+04	
3	Point. 8 ③	2.1.E+04	

Point. 9

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/g)	Average
1	Point. 9 ①	3.6.E+04	5.0.E+04
2	Point. 9 ②	6.3.E+04	
3	Point. 9 ③	5.0.E+04	

Point. 10

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/g)	Average
1	Point. 10 ①	5.9.E+03	4.8.E+03
2	Point. 10 ②	3.7.E+03	
3	Point. 10 ③	4.8.E+03	

Point. 11

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/g)	Average
1	Point. 11 ①	8.5.E+04	1.1.E+05
2	Point. 11 ②	1.3.E+05	
3	Point. 11 ③	1.1.E+05	

Point. 12

	Sample	<i>E. coli</i> (cfu/g)	Average
1	Point. 12 ①	6.7.E+03	5.8.E+03
2	Point. 12 ②	4.9.E+03	
3	Point. 12 ③	5.8.E+03	

第Ⅱ章 底泥中の大腸菌群数

Point. 1

	Sample	Coliform bacteria (cfu/g)	Average
1	Point. 1 ①	1.2.E+05	1.1.E+05
2	Point. 1 ②	1.1.E+05	
3	Point. 1 ③	1.1.E+05	

Point. 2

	Sample	Coliform bacteria (cfu/g)	Average
1	Point. 2 ①	1.4.E+04	1.3.E+04
2	Point. 2 ②	1.2.E+04	
3	Point. 2 ③	1.3.E+04	

Point. 3

	Sample	Coliform bacteria (cfu/g)	Average
1	Point. 3 ①	3.4.E+04	3.3.E+04
2	Point. 3 ②	3.1.E+04	
3	Point. 3 ③	3.3.E+04	

Point. 4

	Sample	Coliform bacteria (cfu/g)	Average
1	Point. 4 ①	1.6.E+04	8.2.E+03
2	Point. 4 ②	0.0.E+00	
3	Point. 4 ③	8.2.E+03	

Point. 5

	Sample	Coliform bacteria (cfu/g)	Average
1	Point. 5 ①	3.0.E+06	3.0.E+06
2	Point. 5 ②	3.1.E+06	
3	Point. 5 ③	3.0.E+06	

Point. 6

	Sample	Coliform bacteria (cfu/g)	Average
1	Point. 6 ①	2.5.E+06	2.4.E+06
2	Point. 6 ②	2.3.E+06	
3	Point. 6 ③	2.4.E+06	

Point. 7

	Sample	Coliform bacteria (cfu/g)	Average
1	Point. 7 ①	2.5.E+06	2.5.E+06
2	Point. 7 ②	2.5.E+06	
3	Point. 7 ③	2.5.E+06	

Point. 8

	Sample	Coliform bacteria (cfu/g)	Average
1	Point. 8 ①	2.2.E+06	2.2.E+06
2	Point. 8 ②	2.2.E+06	
3	Point. 8 ③	2.2.E+06	

Point. 9

	Sample	Coliform bacteria (cfu/g)	Average
1	Point. 9 ①	2.3.E+06	2.1.E+06
2	Point. 9 ②	2.0.E+06	
3	Point. 9 ③	2.1.E+06	

Point. 10

	Sample	Coliform bacteria (cfu/g)	Average
1	Point. 10 ①	7.4.E+05	9.4.E+05
2	Point. 10 ②	1.1.E+06	
3	Point. 10 ③	9.4.E+05	

Point. 11

	Sample	Coliform bacteria (cfu/g)	Average
1	Point. 11 ①	1.5.E+06	1.6.E+06
2	Point. 11 ②	1.7.E+06	
3	Point. 11 ③	1.6.E+06	

Point. 12

	Sample	Coliform bacteria (cfu/g)	Average
1	Point. 12 ①	2.8.E+06	3.0.E+06
2	Point. 12 ②	3.1.E+06	
3	Point. 12 ③	3.0.E+06	

第II章 水路・土砂溜における底泥中の*E. coli*数

	Channel	Sedimentation tank
<i>E. coli</i> (cfu/g)	0	1.6.E+02
	0	3.3.E+02
	0	2.5.E+02
AVERAGE	0	2.5.E+02
MAX-AVE	0	8.2.E+01
AVE-MIN	0	8.2.E+01

	Channel	Sedimentation tank
Coliform bacteria (cfu/g)	1.6.E+04	1.2.E+04
	0	6.2.E+03
	8.2.E+03	8.9.E+03
AVERAGE	8.2.E+03	8.9.E+03
MAX-AVE	8.2.E+03	2.7.E+03
AVE-MIN	8.2.E+03	2.7.E+03

第三章 *E.coli*流出の収支

Loss from broadcasted plot (cow dung)

	Input	Surface runoff	Percolation
<i>E. coli</i> (cfu/m ²)	3.4.E+10	1.1.E+10	3.9.E+09
	5.8.E+09	3.8.E+09	8.4.E+09
	5.8.E+09	1.2.E+10	5.8.E+09
AVERAGE	1.5.E+10	9.0.E+09	6.1.E+09
MAX-AVE	1.9.E+10	3.4.E+09	2.4.E+09
AVE-MIN	9.3.E+09	5.3.E+09	2.1.E+09

Loss from incorporated plot (cow dung)

	Input	Surface runoff	Percolation
<i>E. coli</i> (cfu/m ²)	3.4.E+10	9.4.E+09	1.4.E+09
	5.8.E+09	1.8.E+10	3.9.E+09
	5.8.E+09	1.9.E+10	2.1.E+09
AVERAGE	1.5.E+10	1.6.E+10	2.5.E+09
MAX-AVE	1.9.E+10	3.7.E+09	1.4.E+09
AVE-MIN	9.3.E+09	6.1.E+09	1.1.E+09

Loss from incorporated plot (2 weeks fermented manure)

	Input	Surface runoff	Percolation
<i>E. coli</i> (cfu/m ²)	1.4.E+07	2.4.E+07	1.3.E+06
	2.8.E+07	2.6.E+07	4.3.E+06
	2.8.E+07	3.8.E+06	1.0.E+00
AVERAGE	2.4.E+07	1.8.E+07	1.9.E+06
MAX-AVE	4.6.E+06	8.2.E+06	2.5.E+06
AVE-MIN	9.2.E+06	1.4.E+07	1.9.E+06

Loss from incorporated plot (2 weeks fermented manure)

	Input	Surface runoff	Percolation
<i>E. coli</i> (cfu/m ²)	1.4.E+07	8.2.E+07	1.9.E+06
	2.8.E+07	1.8.E+08	6.0.E+06
	2.8.E+07	4.9.E+05	3.4.E+05
AVERAGE	2.4.E+07	8.7.E+07	2.7.E+06
MAX-AVE	4.6.E+06	9.1.E+07	3.3.E+06
AVE-MIN	9.2.E+06	8.6.E+07	2.4.E+06

第三章 大腸菌群の収支

Loss from broadcasted plot (cow dung)

	Input	Surface runoff	Percolation
Coliform	5.0.E+09	1.4.E+09	9.4.E+08
bacteria	8.9.E+08	7.1.E+08	6.2.E+09
(cfu/m ²)	8.9.E+08	3.0.E+09	1.1.E+09
AVERAGE	2.2.E+09	1.7.E+09	2.7.E+09
MAX-AVE	2.7.E+09	1.3.E+09	3.4.E+09
AVE-MIN	1.4.E+09	1.0.E+09	1.8.E+09

Loss from incorporated plot (cow dung)

	Input	Surface runoff	Percolation
Coliform	5.0.E+09	1.8.E+09	4.1.E+08
bacteria	8.9.E+08	5.0.E+09	1.0.E+09
(cfu/m ²)	8.9.E+08	3.2.E+09	8.5.E+08
AVERAGE	2.2.E+09	3.3.E+09	7.6.E+08
MAX-AVE	2.7.E+09	1.7.E+09	2.6.E+08
AVE-MIN	1.4.E+09	1.5.E+09	3.5.E+08

Loss from incorporated plot (2 weeks fermented manure)

	Input	Surface runoff	Percolation
Coliform	1.1.E+09	2.2.E+09	1.7.E+08
bacteria	1.5.E+09	1.8.E+09	2.8.E+08
(cfu/m ²)	1.5.E+09	2.8.E+08	1.4.E+08
AVERAGE	1.4.E+09	1.4.E+09	2.0.E+08
MAX-AVE	1.1.E+08	7.7.E+08	8.1.E+07
AVE-MIN	2.1.E+08	1.2.E+09	5.8.E+07

Loss from incorporated plot (2 weeks fermented manure)

	Input	Surface runoff	Percolation
Coliform	1.1.E+09	1.1.E+09	2.2.E+08
bacteria	1.5.E+09	1.5.E+08	2.9.E+06
(cfu/m ²)	1.5.E+09	9.1.E+07	2.5.E+07
AVERAGE	1.4.E+09	4.3.E+08	8.3.E+07
MAX-AVE	1.1.E+08	6.2.E+08	1.4.E+08
AVE-MIN	2.1.E+08	3.4.E+08	8.0.E+07

第三章 懸濁液成分、上澄み液成分中の*E. coli*数

Cow dung

Time (min)	Suspended water	Filtered water	Suspended-Filtered	Ratio of Filtered	Ratio of Suspended
30	3.1.E+06	1.7.E+05	2.9.E+06	6	94
60	1.9.E+06	2.4.E+05	1.6.E+06	13	87
90	1.5.E+06	1.6.E+05	1.4.E+06	10	90
120	8.0.E+05	1.1.E+05	6.9.E+05	13	87
AVERAGE	1.8.E+06	1.7.E+05	1.6.E+06	10	90
MAX-AVE	1.3.E+06	6.8.E+04	1.2.E+06	3	5
AVE-MIN	1.0.E+06	6.2.E+04	9.6.E+05	5	3

2 weeks fermented manure

Time (min)	Suspended water (cfu/L)	Filtered water (cfu/L)	Suspended-Filtered	Ratio of Filtered	Ratio of Suspended
30	2.6.E+05	2.7.E+04	2.4.E+05	10	90
60	9.0.E+04	3.0.E+04	6.0.E+04	33	67
90	7.3.E+04	1.0.E+04	6.3.E+04	14	86
120	2.5.E+05	4.7.E+04	2.0.E+05	19	81
AVERAGE	1.7.E+05	2.8.E+04	1.4.E+05	19	81
MAX-AVE	9.4.E+04	1.8.E+04	9.6.E+04	14	9
AVE-MIN	9.6.E+04	1.8.E+04	8.1.E+04	9	14

第三章 懸濁液成分、上澄み液成分中の大腸菌群数

Cow dung

Time (min)	Suspended water	Filtered water	Suspended-Filtered	Ratio of Filtered	Ratio of Suspended
30	1.3.E+07	9.0.E+04	1.3.E+07	1	99
60	3.8.E+06	8.3.E+04	3.7.E+06	2	98
90	5.3.E+05	4.3.E+04	4.9.E+05	8	92
120	6.0.E+05	1.1.E+05	4.9.E+05	19	81
AVERAGE	4.4.E+06	8.3.E+04	4.3.E+06	7	93
MAX-AVE	8.3.E+06	3.1.E+04	8.3.E+06	11	7
AVE-MIN	3.9.E+06	3.9.E+04	3.9.E+06	7	11

2 weeks fermented manure

Time (min)	Suspended water	Filtered water	Suspended-Filtered	Ratio of Filtered	Ratio of Suspended
30	6.7.E+06	1.6.E+05	6.5.E+06	2	98
60	1.4.E+06	7.7.E+04	1.4.E+06	5	95
90	1.2.E+06	2.1.E+05	9.8.E+05	18	82
120	1.0.E+06	4.7.E+04	9.5.E+05	5	95
AVERAGE	2.6.E+06	1.3.E+05	2.4.E+06	8	92
MAX-AVE	4.1.E+06	8.8.E+04	4.1.E+06	10	5
AVE-MIN	1.6.E+06	7.8.E+04	1.5.E+06	5	10

第IV章 *E.coli*流出量の違い

Cow dung

	Controlled plot	Grass buffer strips plot
<i>E.coli</i> (cfu/m ²)	1.7.E+10	1.6.E+10
	1.4.E+10	1.8.E+10
	1.6.E+10	2.2.E+10
AVERAGE	1.5.E+10	1.9.E+10
MAX-AVE	1.2.E+09	3.4.E+09
AVE-MIN	1.5.E+09	3.0.E+09

2 weeks fermented manure

	Controlled plot	Grass buffer strips plot
<i>E.coli</i> (cfu/m ²)	3.2.E+07	2.8.E+06
	4.1.E+07	2.7.E+06
	3.3.E+07	2.9.E+06
AVERAGE	3.6.E+07	2.8.E+06
MAX-AVE	5.5.E+06	1.0.E+05
AVE-MIN	3.2.E+06	6.8.E+04

第IV章 大腸菌群流出量の違い

Cow dung

	Controlled plot	Grass buffer strips plot
Coliform bacteria (cfu/m ²)	1.1.E+09	1.4.E+10
	1.4.E+09	1.0.E+10
	1.3.E+09	1.4.E+10
AVERAGE	1.3.E+09	1.3.E+10
MAX-AVE	1.4.E+08	1.3.E+09
AVE-MIN	1.9.E+08	2.5.E+09

2 weeks fermented manure

	Controlled plot	Grass buffer strips plot
Coliform bacteria (cfu/m ²)	5.4.E+07	1.5.E+10
	7.4.E+07	1.0.E+10
	6.4.E+07	1.6.E+10
AVERAGE	6.4.E+07	1.4.E+10
MAX-AVE	1.0.E+07	2.0.E+09
AVE-MIN	1.0.E+07	3.5.E+09

第V章 *E.coli*、大腸菌群の収支(玉砂利)

E. coli input (gravel)

	First experiment	Second experiment	Third experiment
<i>E. coli</i> input (cfu)	4.2.E+06	2.1.E+06	2.1.E+06
	3.3.E+06	2.1.E+06	1.8.E+06
	5.1.E+06	1.8.E+06	1.2.E+06
AVERAGE	4.2.E+06	2.0.E+06	1.7.E+06
MAX-AVE	9.1.E+05	1.0.E+05	4.0.E+05
AVE-MIN	9.1.E+05	2.0.E+05	5.0.E+05

E. coli efflux (gravel)

	First experiment	Second experiment	Third experiment
<i>E. coli</i> efflux (cfu)	4.0.E+06	9.0.E+06	3.2.E+06
	3.8.E+06	7.7.E+06	2.9.E+06
	4.3.E+06	7.9.E+06	2.9.E+06
AVERAGE	4.0.E+06	8.2.E+06	3.0.E+06
MAX-AVE	2.3.E+05	7.6.E+05	2.2.E+05
AVE-MIN	2.2.E+05	4.6.E+05	1.3.E+05

Coliform bacteria input (gravel)

	First	Second	Third
Coliform bacteria (cfu/m ²)	3.0.E+05	1.2.E+08	1.2.E+08
	9.1.E+05	1.1.E+08	1.2.E+08
	9.1.E+05	9.8.E+07	1.7.E+08
AVERAGE	7.0.E+05	1.1.E+08	1.4.E+08
MAX-AVE	2.0.E+05	1.1.E+07	3.1.E+07
AVE-MIN	4.0.E+05	1.1.E+07	1.7.E+07

Coliform bacteria efflux (gravel)

	First experiment	Second experiment	Third experiment
Coliform bacteria (cfu/m ²)	7.0.E+05	5.2.E+07	4.4.E+07
	5.6.E+05	4.2.E+07	3.3.E+07
	6.6.E+05	4.8.E+07	4.6.E+07
AVERAGE	6.4.E+05	4.7.E+07	4.1.E+07
MAX-AVE	6.4.E+04	4.6.E+06	5.1.E+06
AVE-MIN	8.2.E+04	5.6.E+06	7.9.E+06

第V章 *E.coli*、大腸菌群の収支(活性炭)

E. coli input (carbon)

	First experiment	Second experiment	Third experiment
<i>E. coli</i> input (cfu)	3.0.E+05	9.6.E+06	3.1.E+06
	9.1.E+05	8.3.E+06	4.7.E+06
	2.1.E+06	6.7.E+06	4.0.E+06
AVERAGE	1.1.E+06	8.2.E+06	3.9.E+06
MAX-AVE	1.0.E+06	1.4.E+06	7.7.E+05
AVE-MIN	8.1.E+05	1.5.E+06	8.1.E+05

E. coli efflux (carbon)

	First experiment	Second experiment	Third experiment
<i>E. coli</i> efflux (cfu)	3.3.E+06	4.0.E+06	1.1.E+06
	3.6.E+06	5.2.E+06	5.5.E+05
	3.9.E+06	4.8.E+06	8.6.E+05
AVERAGE	3.6.E+06	4.6.E+06	8.4.E+05
MAX-AVE	2.9.E+05	5.1.E+05	2.7.E+05
AVE-MIN	2.8.E+05	6.9.E+05	2.9.E+05

Coliform bacteria input (carbon)

	First	Second	Third
Coliform bacteria (cfu/m ²)	2.1.E+06	5.1.E+06	1.5.E+06
	2.7.E+06	3.0.E+06	3.3.E+06
	1.2.E+06	1.2.E+06	2.7.E+06
AVERAGE	2.0.E+06	3.1.E+06	2.5.E+06
MAX-AVE	7.1.E+05	2.0.E+06	8.0.E+05
AVE-MIN	8.1.E+05	1.9.E+06	1.0.E+06

Coliform bacteria efflux (carbon)

	First experiment	Second experiment	Third experiment
Coliform bacteria (cfu/m ²)	8.5.E+05	9.3.E+06	1.9.E+06
	1.0.E+07	9.1.E+06	1.9.E+06
	1.1.E+07	1.1.E+07	1.2.E+06
AVERAGE	7.5.E+06	9.9.E+06	1.7.E+06
MAX-AVE	3.8.E+06	1.5.E+06	2.4.E+05
AVE-MIN	6.7.E+06	8.7.E+05	4.4.E+05

第V章 *E.coli*、大腸菌群の収支(石灰窒素)

E. coli input (lime nitrogen)

	First experiment	Second experiment	Third experiment
<i>E. coli</i> input (cfu)	3.8.E+06	8.3.E+05	2.9.E+06
	9.2.E+06	8.3.E+05	4.0.E+06
	4.1.E+06	1.9.E+06	3.8.E+06
AVERAGE	5.7.E+06	1.2.E+06	3.6.E+06
MAX-AVE	3.5.E+06	7.4.E+05	4.8.E+05
AVE-MIN	1.9.E+06	3.7.E+05	6.7.E+05

E. coli efflux (lime nitrogen)

	First experiment	Second experiment	Third experiment
<i>E. coli</i> efflux (cfu)	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
AVERAGE	0	0	0
MAX-AVE	0	0	0
AVE-MIN	0	0	0

Coliform bacteria input (lime nitrogen)

	First	Second	Third
Coliform bacteria (cfu/m ²)	1.0.E+00	6.0.E+05	2.4.E+06
	6.1.E+05	1.0.E+00	3.9.E+06
	3.0.E+05	6.0.E+05	2.4.E+06
AVERAGE	3.0.E+05	4.0.E+05	2.9.E+06
MAX-AVE	3.0.E+05	2.0.E+05	1.0.E+06
AVE-MIN	3.0.E+05	4.0.E+05	5.0.E+05

Coliform bacteria efflux (lime nitrogen)

	First experiment	Second experiment	Third experiment
Coliform bacteria (cfu/m ²)	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
AVERAGE	0	0	0
MAX-AVE	0	0	0
AVE-MIN	0	0	0

第V章 pHの変化

Lime nitrogen

	Input			Efflux		
	Gravel	Carbon	Lime nitrogen	Gravel	Carbon	Lime nitrogen
pH	7.34	6.47	6.73	7.51	7.25	10.95
	7.34	6.87	6.96	7.20	7.52	11.09
	7.41	6.35	7.04	6.70	7.36	10.54
AVE	7.36	6.56	6.91	7.13	7.38	10.86
MAX-AVE	0.05	0.31	0.13	0.38	0.14	0.23
AVE-MIN	0.03	0.21	0.18	0.44	0.13	0.32

第VI章 含水率の変化

0 day

	Sample	Can[g]	Can+Sample [g]	Can+Sample (Dried)[g]	Water contents [%]	Average
1	Cow dung ①	76.69	83.86	77.93	82.71	83.59
2	Cow dung ②	77.18	83.69	78.21	84.18	
3	Cow dung ③	41.7	44.99	42.23	83.89	
4	2 weeks manure ①	77.06	80.97	78.1	73.40	73.13
5	2 weeks manure ②	76.49	80.54	77.55	73.83	
6	2 weeks manure ③	77.22	79.95	77.98	72.16	

4 days

	Sample	Can[g]	Can+Sample [g]	Can+Sample (Dried)[g]	Water contents [%]	Average
1	Cow dung ①	77.74	78.35	77.95	65.57	67.55
2	Cow dung ②	76.31	77.52	76.72	66.12	
3	Cow dung ③	76.42	76.73	76.51	70.97	
4	2 weeks manure ①	41.67	42.52	42.27	29.41	25.81
5	2 weeks manure ②	41.57	41.96	41.84	30.77	
6	2 weeks manure ③	39.9	40.48	40.38	17.24	

7 days

	Sample	Can[g]	Can+Sample [g]	Can+Sample (Dried)[g]	Water contents [%]	Average
1	Cow dung ①	76.16	77.17	76.87	29.70	13.82
2	Cow dung ②	76.21	77.57	77.4	12.50	
3	Cow dung ③	76.01	77.53	77.3	15.13	
4	2 weeks manure ①	77.18	78.69	78.52	11.26	11.10
5	2 weeks manure ②	76.57	78.56	78.34	11.06	
6	2 weeks manure ③	76.38	78.93	78.65	10.98	

11 days

	Sample	Can[g]	Can+Sample [g]	Can+Sample (Dried)[g]	Water contents [%]	Average
1	Cow dung ①	76.7	77.88	77.78	8.47	8.04
2	Cow dung ②	76.89	78.39	78.27	8.00	
3	Cow dung ③	76.56	78.13	78.01	7.64	
4	2 weeks manure ①	76.92	78.48	78.35	8.33	8.42
5	2 weeks manure ②	76.28	78.07	77.92	8.38	
6	2 weeks manure ③	76.2	78.77	78.55	8.56	

14 days

	Sample	Can[g]	Can+Sample [g]	Can+Sample (Dried)[g]	Water contents [%]	Average
1	Cow dung ①	77.18	78.42	78.31	8.87	8.85
2	Cow dung ②	77.08	78.07	77.99	8.08	
3	Cow dung ③	76.16	77.41	77.29	9.60	
4	2 weeks manure ①	76.73	77.77	77.69	7.69	8.40
5	2 weeks manure ②	76.03	77.01	76.92	9.18	
6	2 weeks manure ③	77	77.96	77.88	8.33	

第VI章 含水率の変化

18 days

	Sample	Can[g]	Can+Sample [g]	Can+Sample (Dried)[g]	Water contents [%]	Average
1	Cow dung ①	76.92	78.49	78.36	8.28	6.95
2	Cow dung ②	76.56	77.47	77.42	5.49	
3	Cow dung ③	76.19	77.46	77.37	7.09	
4	2 weeks manure ①	77.03	77.81	77.75	7.69	7.48
5	2 weeks manure ②	76.69	77.62	77.55	7.53	
6	2 weeks manure ③	76.28	77.25	77.18	7.22	

28 days

	Sample	Can[g]	Can+Sample [g]	Can+Sample (Dried)[g]	Water contents [%]	Average
1	Cow dung ①	76.04	77.68	77.46	13.41	12.64
2	Cow dung ②	76.71	78.41	78.2	12.35	
3	Cow dung ③	76.56	78.04	77.86	12.16	
4	2 weeks manure ①	76.3	78.09	77.89	11.17	11.30
5	2 weeks manure ②	76.73	78.9	78.65	11.52	
6	2 weeks manure ③	76.05	78.1	77.87	11.22	

第VI章 *E.coli*数の変化

Cow dung

	0 day	4 day	7 day	11 day	14 day	18 day	28 day
<i>E.coli</i> (cfu/g)	7.9.E+06	5.1.E+05	1.0.E+06	2.3.E+05	2.7.E+04	4.6.E+04	2.0.E+04
	1.7.E+07	9.6.E+04	9.3.E+05	1.3.E+05	3.9.E+04	1.4.E+05	9.0.E+03
	1.5.E+07	4.4.E+05	1.8.E+06	1.9.E+05	5.0.E+04	2.5.E+04	7.4.E+03
AVERAGE	1.3.E+07	3.5.E+05	1.3.E+06	1.8.E+05	3.9.E+04	7.0.E+04	1.2.E+04
MAX-AVE	3.7.E+06	1.6.E+05	5.5.E+05	5.0.E+04	1.1.E+04	6.8.E+04	7.6.E+03
AVE-MIN	5.5.E+06	2.5.E+05	3.3.E+05	5.8.E+04	1.2.E+04	4.5.E+04	4.6.E+03

2 weeks fermented manure

	0 day	4 day	7 day	11 day	14 day	18 day	28 day
<i>E.coli</i> (cfu/g)	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
AVERAGE	0	0	0	0	0	0	0
MAX-AVE	0	0	0	0	0	0	0
AVE-MIN	0	0	0	0	0	0	0

第VI章 大腸菌群数の変化

Cow dung

	0 day	4 day	7 day	11 day	14 day	18 day	28 day
Coliorm bacteria (cfu/g)	3.0.E+06	9.6.E+04	2.9.E+05	3.3.E+04	5.0.E+03	1.1.E+04	4.2.E+03
	3.7.E+06	3.1.E+03	1.4.E+05	3.7.E+04	8.9.E+03	2.4.E+04	3.3.E+03
	7.3.E+06	1.2.E+04	2.8.E+05	2.6.E+04	1.0.E+04	6.5.E+03	2.5.E+03
AVERAGE	4.7.E+06	3.7.E+04	2.4.E+05	3.2.E+04	8.0.E+03	1.4.E+04	3.4.E+03
MAX-AVE	2.6.E+06	5.9.E+04	5.4.E+04	5.1.E+03	2.2.E+03	1.0.E+04	8.8.E+02
AVE-MIN	1.6.E+06	3.4.E+04	9.7.E+04	5.8.E+03	3.0.E+03	7.2.E+03	8.4.E+02

2 weeks fermented manure

	0 day	4 day	7 day	11 day	14 day	18 day	28 day
Coliorm bacteria (cfu/g)	2.5.E+04	2.3.E+03	1.5.E+03	0	0	0	0
	3.0.E+04	1.4.E+04	0	0	0	0	0
	2.6.E+04	1.4.E+02	0	0	0	0	0
AVERAGE	2.7.E+04	5.6.E+03	4.9.E+02	0	0	0	0
MAX-AVE	3.1.E+03	8.7.E+03	9.7.E+02	0	0	0	0
AVE-MIN	2.1.E+03	5.4.E+03	4.9.E+02	0	0	0	0

第VI章 一般細菌数の変化

Cow dung

	0 day	4 day	7 day	11 day	14 day	18 day	28 day
General	2.5.E+08	1.1.E+08	7.8.E+07	2.4.E+07	7.7.E+06	5.3.E+06	1.3.E+06
bacteria	2.1.E+09	1.4.E+08	1.5.E+08	6.2.E+07	6.4.E+06	4.5.E+06	1.1.E+06
(cfu/g)	1.5.E+08	1.5.E+08	2.4.E+08	1.4.E+07	7.5.E+06	5.7.E+06	2.4.E+06
AVERAGE	8.5.E+08	1.3.E+08	1.6.E+08	3.3.E+07	7.2.E+06	5.2.E+06	1.6.E+06
MAX-AVE	1.3.E+09	1.7.E+07	8.4.E+07	2.9.E+07	5.1.E+05	5.4.E+05	8.2.E+05
AVE-MIN	6.9.E+08	2.4.E+07	8.0.E+07	1.9.E+07	8.0.E+05	6.5.E+05	4.8.E+05

2 weeks fermented manure

	0 day	4 day	7 day	11 day	14 day	18 day	28 day
General	4.1.E+07	6.4.E+05	2.7.E+06	3.6.E+06	1.2.E+07	7.1.E+06	1.9.E+06
bacteria	5.9.E+07	7.3.E+05	1.4.E+07	1.2.E+07	1.5.E+06	2.9.E+06	1.6.E+06
(cfu/g)	1.2.E+08	6.9.E+06	6.0.E+06	1.1.E+06	2.1.E+06	2.4.E+06	1.6.E+06
AVERAGE	7.4.E+07	2.8.E+06	7.6.E+06	5.6.E+06	5.2.E+06	4.1.E+06	1.7.E+06
MAX-AVE	4.8.E+07	4.2.E+06	6.6.E+06	6.5.E+06	6.7.E+06	3.0.E+06	2.0.E+05
AVE-MIN	3.3.E+07	2.1.E+06	4.9.E+06	4.5.E+06	3.6.E+06	1.7.E+06	1.3.E+05

第IV章 pHの変化

Lime nitrogen

	Before		After		Lime nitrogen
	Cow dung	2 weeks manure	Cow dung	2 weeks manure	
pH	7.2	8.47	8.95	9.33	12.1
	7.22	8.56	8.92	9.29	12.19
	7.16	8.48	8.95	9.27	12.17
AVERAGE	7.19	8.50	8.94	9.30	12.15
MAX-AVE	0.03	0.06	0.01	0.03	0.04
AVE-MIN	0.03	0.03	0.02	0.03	0.05

HSSP

	Before		After		HSSP
	Cow dung	2 weeks manure	Cow dung	2 weeks manure	
pH	7.62	7.19	9.08	8.95	12.4
	7.63	7.2	9.09	8.94	12.38
	7.61	7.18	9.1	8.94	12.41
AVERAGE	7.62	7.19	9.09	8.94	12.40
MAX-AVE	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
AVE-MIN	0.01	0.01	0.01	0.00	0.02

第七章 *E.coli*数の変化

Cow dung (lime nitrogen)

	Before	After				
		0 day	4 day	7 day	11 day	14 day
<i>E.coli</i> (cfu/g)	2.1.E+06	0	0	0	0	0
	1.3.E+06	0	0	0	0	0
	2.6.E+06	0	0	0	0	0
AVERAGE	2.0.E+06	0	0	0	0	0
MAX-AVE	5.6.E+05	0	0	0	0	0
AVE-MIN	6.9.E+05	0	0	0	0	0

2 weeks fermented manure (lime nitrogen)

	Before	After				
		0 day	4 day	7 day	11 day	14 day
<i>E.coli</i> (cfu/g)	0	0	0	0	0	0
	1.3.E+03	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
AVERAGE	4.3.E+02	0	0	0	0	0
MAX-AVE	8.6.E+02	0	0	0	0	0
AVE-MIN	4.3.E+02	0	0	0	0	0

Cow dung (HSSP)

	Before	After				
		0 day	4 day	7 day	11 day	14 day
<i>E.coli</i> (cfu/g)	1.3.E+07	0	0	0	4.5.E+02	0
	1.5.E+07	0	0	0	0	0
	1.4.E+07	0	0	0	0	0
AVERAGE	1.4.E+07	0	0	0	1.5.E+02	0
MAX-AVE	7.1.E+05	0	0	0	3.0.E+02	0
AVE-MIN	8.3.E+05	0	0	0	1.5.E+02	0

2 weeks fermented manure (HSSP)

	Before	After				
		0 day	4 day	7 day	11 day	14 day
<i>E.coli</i> (cfu/g)	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
AVERAGE	0	0	0	0	0	0
MAX-AVE	0	0	0	0	0	0
AVE-MIN	0	0	0	0	0	0

第七章 大腸菌群数の変化

Cow dung (lime nitrogen)

	Before	After				
		0 day	4 day	7 day	11 day	14 day
Coliorm	0	0	0	0	0	0
bacteria	1.6.E+05	0	0	0	0	0
(cfu/g)	1.6.E+05	0	0	0	0	0
AVERAGE	1.1.E+05	0	0	0	0	0
MAX-AVE	5.5.E+04	0	0	0	0	0
AVE-MIN	1.1.E+05	0	0	0	0	0

2 weeks fermented manure (lime nitrogen)

	Before	After				
		0 day	4 day	7 day	11 day	14 day
Coliorm	0	0	0	0	0	0
bacteria	0	0	0	0	0	0
(cfu/g)	0	0	0	0	0	0
AVERAGE	0	0	0	0	0	0
MAX-AVE	0	0	0	0	0	0
AVE-MIN	0	0	0	0	0	0

Cow dung (HSSP)

	Before	After				
		0 day	4 day	7 day	11 day	14 day
Coliorm	2.E+06	0	0	0	0	0
bacteria	5.E+06	0	0	0	0	0
(cfu/g)	4.E+06	0	0	0	0	0
AVERAGE	4.E+06	0	0	0	0	0
MAX-AVE	1.E+06	0	0	0	0	0
AVE-MIN	1.E+06	0	0	0	0	0

2 weeks fermented manure (HSSP)

	Before	After				
		0 day	4 day	7 day	11 day	14 day
Coliorm	3.E+05	0	1.3.E+05	1.2.E+04	2.2.E+03	0
bacteria	2.E+05	0	1.0.E+05	1.2.E+04	9.3.E+02	0
(cfu/g)	2.E+05	0	1.2.E+05	1.3.E+04	6.2.E+02	0
AVERAGE	2.E+05	0	1.2.E+05	1.2.E+04	1.2.E+03	0
MAX-AVE	6.E+04	0	1.3.E+04	8.2.E+02	9.3.E+02	0
AVE-MIN	7.E+04	0	1.3.E+04	7.2.E+02	6.2.E+02	0

第七章 一般細菌数の変化

Cow dung (lime nitrogen)

	Before	After				
		0 day	4 day	7 day	11 day	14 day
General bacteria (cfu/g)	1.6.E+08	3.4.E+07	1.1.E+11	7.4.E+11	9.5.E+09	3.9.E+10
	1.0.E+08	9.2.E+07	3.8.E+09	5.3.E+10	9.6.E+09	1.1.E+11
	1.2.E+08	3.5.E+08	6.5.E+09	5.9.E+10	1.5.E+10	6.1.E+10
AVERAGE	1.3.E+08	1.6.E+08	3.9.E+10	2.8.E+11	1.1.E+10	7.0.E+10
MAX-AVE	3.4.E+07	1.9.E+08	6.7.E+10	4.5.E+11	3.6.E+09	4.1.E+10
AVE-MIN	2.4.E+07	1.3.E+08	3.5.E+10	2.3.E+11	1.8.E+09	3.2.E+10

2 weeks fermented manure (lime nitrogen)

	Before	After				
		0 day	4 day	7 day	11 day	14 day
General bacteria (cfu/g)	1.7.E+08	3.7.E+08	1.2.E+09	8.9.E+08	7.5.E+07	5.4.E+08
	8.6.E+07	5.6.E+07	2.1.E+08	3.7.E+08	9.7.E+07	3.7.E+08
	4.5.E+08	4.4.E+08	3.5.E+09	7.4.E+08	7.6.E+08	6.9.E+08
AVERAGE	2.4.E+08	2.9.E+08	1.7.E+09	6.7.E+08	3.1.E+08	5.3.E+08
MAX-AVE	2.1.E+08	1.5.E+08	1.9.E+09	2.2.E+08	4.5.E+08	1.6.E+08
AVE-MIN	1.5.E+08	2.3.E+08	1.4.E+09	2.9.E+08	2.4.E+08	1.6.E+08

Cow dung (HSSP)

	Before	After				
		0 day	4 day	7 day	11 day	14 day
General bacteria (cfu/g)	1.1.E+08	1.9.E+07	1.7.E+08	1.6.E+09	4.2.E+08	2.1.E+08
	5.3.E+08	2.4.E+07	1.7.E+08	1.3.E+09	4.7.E+08	1.6.E+08
	1.1.E+08	4.9.E+06	1.7.E+08	1.3.E+09	8.3.E+08	1.4.E+08
AVERAGE	2.5.E+08	1.6.E+07	1.7.E+08	1.4.E+09	5.7.E+08	1.7.E+08
MAX-AVE	2.8.E+08	8.1.E+06	4.2.E+06	1.6.E+08	2.6.E+08	3.9.E+07
AVE-MIN	1.4.E+08	1.1.E+07	4.6.E+06	8.8.E+07	1.6.E+08	3.3.E+07

2 weeks fermented manure (HSSP)

	Before	After				
		0 day	4 day	7 day	11 day	14 day
General bacteria (cfu/g)	8.6.E+06	5.1.E+06	1.4.E+08	2.0.E+08	1.5.E+08	6.1.E+07
	5.5.E+06	5.1.E+06	1.2.E+08	1.9.E+08	5.4.E+07	1.8.E+07
	6.6.E+06	3.6.E+06	1.9.E+08	2.2.E+08	6.0.E+07	1.4.E+07
AVERAGE	6.9.E+06	4.6.E+06	1.5.E+08	2.0.E+08	8.8.E+07	3.1.E+07
MAX-AVE	1.7.E+06	5.3.E+05	3.7.E+07	1.5.E+07	6.2.E+07	3.0.E+07
AVE-MIN	1.4.E+06	1.0.E+06	2.9.E+07	8.2.E+06	3.4.E+07	1.7.E+07