

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-300902

(P2007-300902A)

(43) 公開日 平成19年11月22日(2007.11.22)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 Q	1/06	(2006.01)	C 1 2 Q	1/06	4 B 0 6 3
C 0 5 F	3/00	(2006.01)	C 0 5 F	3/00	4 H 0 6 1

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2006-135806 (P2006-135806) (22) 出願日 平成18年5月15日 (2006.5.15)	(71) 出願人 501275558 財団法人▲祐▼生研究基金會 台湾台北市中山區長春路137巷3號2樓之1 (74) 代理人 100107962 弁理士 入交 孝雄 (72) 発明者 林 俊興 台湾台北市中山北路七段114巷33弄8号6階 Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ20 QR58 QR60 QR69 QR75 QR79 QR80 QS05 QS28 QX02 4H061 AA10 CC39 GG48 HH41
---	--

(54) 【発明の名称】 コンポストトイレの堆肥中の伝染性病原菌の検出方法

(57) 【要約】

【課題】コンポストトイレにより処理され、堆肥化される排泄物中の病原菌などの増殖の有無を簡単、かつ確実に判定する。

【解決手段】消化器系伝染性病原菌又はそのダミーとなる菌種内にlac Zマーカーを有するプラスミドを遺伝子導入し、大量に増殖させた菌液を得て、所定のコロニー総数を含む所定量の菌液を人体排泄物が処理されるコンポストトイレの被処理物中に入れ、処理された堆肥を所定の時間間隔で取り出して磨砕した後、

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド) を含有するLB培地で培養し、前記マーカープラスミドを有する前記伝染性病原菌の菌種がlac Z遺伝子を有し、X-galを加水分解することにより発現する、青色コロニーの数を算定する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コンポストトイレなどで処理された堆肥中の伝染性病原菌の検出方法であって、
遺伝子組替技術を用いて消化器系伝染性病原菌又はそのダミーとなる菌種内に lac Z マー
カーを有するプラスミドを遺伝子導入し、大量に増殖させた後菌液を得て、所定のコロニ
ー総数を含む所定量の菌液を人体排泄物が処理されるコンポストトイレの被処理物中に入れ、
処理された堆肥を所定の時間間隔で取り出して磨砕した後、

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリ
ル- β -D-ガラクトシド)を含有するLB培地で培養し、前記マーカープラスミドを有する前
記伝染性病原菌の菌種が lac Z 遺伝子を有し、X-gal を加水分解することにより発現する、
青色コロニーの数を算定することにより、消化器系伝染性病原菌の増殖が堆肥化処理によ
って抑制されるか否かを推定する、
ことを特徴とするコンポストトイレなどで処理された堆肥中の伝染性病原菌の検出方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、コンポストトイレの堆肥中の伝染性病原菌の検出方法に関し、特に人体
排泄物がコンポストトイレによって処理されてなる堆肥物に含まれる菌量をサンプリ
ング・検出して安全量以内に抑制し、消化器系の伝染性疾患の伝播を防止する方法に
関する。

20

【背景技術】

【0002】

目下、人体排泄物がコンポストトイレで処理されてなる堆肥には大量の大腸菌及び枯草
菌など伝染性疾患の病原菌が含まれ、これらの菌種は常に胃腸などの消化器に伝染性疾患
を引き起こすが、腸内細菌の成長を効果的に抑制するには、選択培地で特定の菌種を培養
する以外、検出に用いられる適切な検査方法は今まではなかった。コンポストトイレ又は
これによって処理してなる堆肥中で腸内細菌の成長を効果的に抑制できるか否かをモニタ
し、コンポストトイレ又はこれによって処理してなる堆肥の安全性を確保するための新規
な検出方法の研究開発は、解決が急務となる課題である。

30

人間の排泄物の正常な糞便に含まれる各種の微生物・常在菌は、例えば *Escherichia coli*、*Kleisiella* spp、*Enterobacter* Spp、*Proteus* spp、*Bacterioides* spp、*Fusobacterium* spp、*Bifidobacterium* spp、*Eubacterium* spp、*Trichomonas hominis* など300種を
超えており、食物又は飲用水からの媒介感染により胃腸炎又は中毒を引き起こす微生物は
伝染性病原菌と呼ばれている。

【0003】

伝染性病原体の種類に関して、糞便中の伝染性病原体は3種類に大別されうる。

(1) 細菌類

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*)

40

セレウス菌 (*Bacillus cereus*)

大腸菌 (*Escherichia coli*) 0157:H7

サルモネラ菌属 (*Salmonella* spp)

赤痢菌属 (*Shigella* spp)

カンピロバクター属 (*Campylobacter* spp)

ビブリオ属 (*Vibrio* spp)

エルシニア属 (*Yersinia* spp)

リステリア属 (*Listeria* spp)

(2) ウイルス類

ロタウイルス (*Rotavirus*)

50

ポリオウイルス (Poliovirus)

A 型ウイルス肝炎 (Viral hepatitis type A)

(3) 原虫類

エントアメーバ (Entamoeba)

条虫 (Tapeworm)

回虫 (Ascaris)

【0004】

本発明において、人体排泄物がコンポストトイレによって処理されてなる堆肥物に含まれる菌量を測定して安全量以内に抑制されているか否かを判定するために供することが出来る測定方法が必要であるが、以下主要な菌種につきその特性、疾患と採用されている実験室の測定方法を挙げる。 10

黄色ブドウ球菌は、グラム陽性球菌で、耐熱性エンテロトキシンを産生し、食中毒の主因となっており、実験室の測定方法ではLB培地のコロニー周囲における溶血現象が観察される。黄色ブドウ球菌のコアグラゼ試験ではウサギの血漿とともにインキュベートされた後、血漿を凝固させることができる。DNA (デオキシリボ核酸) 酵素加水分解試験では、指示薬及びDNAを含有する培養皿にコロニーを接種すると、コロニーの周囲が赤紫色に変色して陽性反応を示す。

【0005】

セレウス菌は、グラム陽性桿菌で、耐熱性エンテロトキシンを産生し、食中毒の主因ともなる。実験室の測定方法としてはLB培地で16~18時間培養した後、コロニーの周囲に透明な溶血環が形成され、そして運動性を示す。酵素分解レシチンを用いる際に陽性反応を示し、またゼラチン (gelatin) を加水分解することができる。 20

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic E. coli) は、グラム陰性桿菌で、志賀様毒素1型及び2型 (Shiga-like(Vero) toxin 1 and 2) を産生するため、出血性大腸炎及び溶血性尿毒症 (Hemolytic uremic syndrome; HUS) を引き起こし、この菌は血清学的な分類でほとんどO157:H7に属する。実験室の測定方法としては、この菌はD-sorbitolを利用して酸を産生することができず、他の大腸菌と異なっており、またβ-ガラクトシダーゼ (β-galactosidase) に対して陰性反応を示す。

【0006】

赤痢菌 (Shigella species) はグラム陰性桿菌で、常に赤痢を引き起こす。実験室における測定方法は、XLD (xylose-lactose-deoxycholate) 培地のような選択性の強い培地を用いて透明なコロニーを釣菌した後、更に生化学的性状試験用キットでこの菌の生化学反応を行い、反応結果に基づき測定する。 30

サルモネラ菌 (Salmonella species) は、グラム陰性桿菌で、下痢を起こす。実験室における測定方法は、XLD (xylose-lactose-deoxycholate) 培地のような選択性の強い培地を用いて黒色のコロニーを釣菌した後、更に生化学的性状試験用キットでこの菌の生化学反応を行い、反応結果に基づき測定する。

また、コレラ菌 (Vibrio cholerae) は、グラム陰性菌で、常に水様性下痢を起こす。実験室の測定方法としては、マッコンキー (MacConkey) 培地上でピンク色のコロニーを形成し、LB培地上で滑らかで白色でβ溶血を示すコロニーを形成する。生化学的性状試験用キットでこの菌の生化学反応を行い、反応結果に基づき測定する。この菌はオキシダーゼ (oxidase) を含有し、臨床上においてこの菌とその他の腸内細菌とを見分ける最も重要な指標となる。この菌の血清型を判定するために、更にスライド凝集反応試験を行う必要がある。 40

エルシニア・エンテロコリティカ (Yersinia enterocolitica) は、下痢を起こす小型グラム陰性球桿菌である。実験室の測定方法としては、マッコンキー (MacConkey) 培地上で薄ピンク色のコロニーを形成し、LB培地上で小さくて灰白色でβ溶血を示さないコロニーを形成する。生化学的性状試験用キットでこの菌の生化学反応を行い、反応結果に基づき測定する。この菌は乳糖を発酵させることなくショ糖を発酵させることができ、即ち 37 で運動性を示すことなく25 で運動性を示す。 50

ロタウイルス (Rotavirus) に関しては、ロタウイルスに対する特異抗体を結合させるラテックス粒子 (latex particles) が検体中のロタウイルスと凝集反応を行う商品化されたテストキット (The Murex Rotavirus Latex Test) を用いてこのウイルスを測定する。

回虫 (Ascaris) 及び鉤虫 (Hook worm) に関しては、CFEA濃縮集卵法を用いてサンプリングして直接検査し、更にMIFによる染色法で人体排泄物のコンポストトイレによる処理後の堆肥物を採集して得られた検体中の寄生虫卵を検査する。

【 0 0 0 7 】

住宅地で通常使用される好気性又はコンポスト型嫌気性堆肥化反応槽のバイオ再生システム (Bioregenerative system) の効率及びそれが環境に及ぼす影響を評価する際に、本発明の方法で培養された遺伝子マーカーを有する大腸菌及び枯草菌の残存率を、胃腸疾患の伝染性細菌がバイオ再生システムに処理された後に残存できる否かの基準とする。 10

【特許文献1】特表2001-524444号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

人間の排泄物の再生利用においては、種々の伝染病媒介物の食物連鎖への混入による問題を考慮すべきで、種々の伝染病媒介物が堆肥化処理後除去されることが出来るものの、異なる方法によって効率にも相違がある。各種のバイオ再生法における枯草菌孢子の残存率は、伝染性細菌が各種のバイオ再生システムによって処理された後に残存できるか否かの基準とすることが可能で、自然界の枯草菌に汚染されることによって判定結果が妨害されることを避けるため、本発明の方法は遺伝子組替技術でマーカーを有するプラスミドを枯草菌に導入した後、枯草菌を大量に増殖させ、それを冷蔵庫内の生理食塩水に入れて孢子の形成を誘導し、更に堆肥中に加え、所定の時間間隔でサンプリングしてマーカープラスミドを有する枯草菌の残存の有無を検査することによって、各種の堆肥化処理の細菌への影響を知ることが出来る。 20

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 9 】

上述に鑑みて本発明者は、鋭意検討を重ねた結果、大腸菌又は枯草菌などの菌種内に遺伝子組替技術でlac Zマーカーを有するプラスミド (plasmid) を遺伝子導入し、菌種を大量に増殖させて菌液を得て、所定量の該菌液をコンポストトイレ又は堆肥に入れ、所定の時間間隔でサンプリングし、サンプルを生理食塩水で均一に混合した後、X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド、以下X-galと略称) を含有するLB培地 (以下、LB培地と略称) に所定量の抽出液を接種して37℃で培養し、マーカープラスミドを有する前記菌種がlac Z遺伝子を有し、X-galを加水分解して青色のコロニーを産生することができることを利用して、単位量当たりのコンポストトイレ内で処理された人体排泄物中の培養された青色コロニーを検査することにより、コンポストトイレ又はこれによって処理してなる堆肥が腸内細菌の成長を抑制できるか否かを知ることができ、更にコンポストトイレ又は同様の施設によって処理する堆肥の熟成に必要な時間を測定することも出来ることを見出し、本発明を完成させるに至った。 30 40

【 0 0 1 0 】

本発明の方法は、遺伝子組替技術を用いて大腸菌、枯草菌等の菌種内にlac Zマーカーを有するプラスミドを遺伝子導入し、大量に増殖させた後菌液を得て、所定量の菌液を人体排泄物が処理されたコンポストトイレ内に入れ、所定の時間間隔でサンプリングしてX-galを含有するLB培地で培養する。マーカープラスミドを有する前記菌種がlac Z遺伝子を有し、X-galを加水分解することができるため、青色コロニーの数を算定することにより、腸内細菌の成長が堆肥化処理により抑制されるか否かを推定することができる。

【 0 0 1 1 】

〔式1〕

lac Z

X-gal -----> 青色コロニー

【発明の効果】

【0012】

本発明は、コンポストトイレ又は同様の施設によって処理する堆肥中の各種細菌、特に消化器系の伝染性病原体の増殖の有無をこれらの堆肥の実際の使用条件に即して、簡易な手順により確認することが出来るため、これらのコンポストトイレの有効性、堆肥の効果的な熟成期間などの評価を容易に、かつ確実に行うことが出来る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

以下、実施例を挙げながら本発明の技術内容を詳しく説明する。ただ、本発明の請求の範囲はこれらの実施例によって限定されるものではない。 10

【実施例1】

【0014】

大腸菌は常に衛生基準として用いられるため、各種のバイオ再生法における大腸菌の残存率は、伝染性細菌が各種のバイオ再生システムに処理された後に残存できるか否かの基準とされることが出来る。本発明の方法は、自然界の大腸菌に汚染されることによって判定結果を妨害されることを避けるため、遺伝子組替技術で遺伝子マーカーを有するプラスミドを大腸菌(XL-1 Blue菌株)内に導入し、大腸菌を大量に増殖させて、実験室で培養した大腸菌XL-1 Blue菌株(コロニー総数が約107個)をコンポストトイレに入れ、それぞれ1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月堆肥化後、コンポストトイレの最終堆肥からサンプリングして粉碎し、その後25mg、2.5mgをそれぞれとって15mlのLB培地(Ampicilin、x-gal、IPTG(isopropylthiogalactoside)を含む)の入った試験管に移し、均一に混合してから培養皿に入れ、凝固した後35℃の恒温で終夜培養してから再度サンプリングし、検査した結果、マーカープラスミドを有するいかなる残存大腸菌も分離されず、実験室で培養した大腸菌XL-1 Blue菌株の成長が完全に抑制されていることを十分示していた。 20

【0015】

本発明の方法を行う前に、伝染病媒介物(特に伝染性細菌)の伝播を抑制するべきで、これは落下細菌試験で証明されることが出来る。通常、クリーンな空気におけるグラム陰性桿菌の数は1000CFU/m³以下にされるべきである(Jager and Zeschmar.,1994a)。現在、ドイツでは室内及び作業区域の法定最大及び平均落下細菌数が10000CFU/m³以下と規定している(Brown et al.,1995)。本発明の方法を行う際に、便座を覆わなくても空気中には遺伝子マーカーを有する大腸菌がい不见ることが見出され、汚染されていないことを示している。同時に、室内のその他の落下細菌を検査しても室内及び作業区域の平均落下細菌数の規定にも適合し、この結果はコンポストトイレの伝染病媒介物が空気に散布されていないことを示していた。 30

【0016】

同時にコンポストトイレ又はこれによって処理してなる堆肥の安全性を確保し、伝染性病原菌が通風管を介して日常生活の共通環境を害するか否かを検査するため、通風管に濾紙を置いて伝染性病原菌がコンポストトイレの堆肥化処理過程に通風管を介して伝播されるか否かを測定した。通風管の落下細菌試験では、黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)及びサルモネラ菌(Salmonella group β、コロニー総数が約10⁷個)など大量の伝染性病原菌をトイレに加えると同時に、通風口に2枚の滅菌濾紙を置き、1日後濾紙を取ってLB培地(BAP)、EMB Agar(Difco)、HE Agar(Difco)、SS Agar(Difco)に敷き、濾紙を取り出してから終夜培養し、細菌の培養及び測定を行った結果、細菌の成長は観察されなかった。このことから、日常生活の環境で使用するコンポストトイレは安全性と環境保全性において心配する必要がないことが明らかになった。 40

本発明者は、更に、黄色ブドウ球菌、サルモネラ菌、セレウス菌、腸管出血性大腸菌、赤痢菌などの液肥で伝播される伝染性疾患の細菌がコンポストトイレによって処理された後依然として残存できるか否かを以下の実験によって評価した。

【0017】

遺伝子組替技術を用いて黄色ブドウ球菌、サルモネラ菌、セレウス菌、腸管出血性大腸菌、赤痢菌などの菌種内にlac Zマーカーを有するプラスミドを遺伝子導入し、大量に増殖させた後菌液を得て、所定量の菌液（コロニー総数がそれぞれ約 10^7 ）を人体排泄物が処理されたコンポストトイレ内（コンポストトイレを1ヶ月ほど引き続いて使用した後、該コンポストトイレの使用を停止し、2ヶ月程度堆肥化处理を行う）に入れ、処理後の堆肥を取り出して磨砕し、X-gal

（5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド）を含有するLB培地で培養することで、黴菌及び細菌を培養した。

細菌の培養は粉碎された堆肥をそれぞれ25mg、2.5mgとって15mlのLB培地及び15mlのマッコニー寒天培地MacConkey Agar（Difco）の入った試験管に移し、均一に混合してから培養皿に入れ、凝固した後35℃の恒温室で終夜培養し、コロニーをエンテロチューブEnterotube（Becton Dickinson）試薬キットで測定した。その結果、大腸菌（*E.coli*）、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）、桿菌類（*Bacillus species*）、コアグラージェ陰性ブドウ球菌（Coagulase-negative Staphylococci）などの複数種の常在菌が分離されることが発見されている。

3ヶ月まで引き続いて堆肥化し、堆肥を取り出して磨砕した後、25mgの堆肥を5mlの生理食塩水に入れ、激しく振とうして数分間静置し、10 μ lの上清液をそれぞれ取ってBAP及びHE Agarに接種し、白金耳で展開後、35℃の恒温室で終夜培養し、その結果、グラム陽性桿菌の成長が観察された。マーカープラスミドを有する前記菌種がlac Z遺伝子を有し、X-galを加水分解することができるため、青色コロニーの数を算出することにより、腸内細菌の成長が堆肥化处理に抑制されるか否かを推定することができる。

【0018】

液体培地で黄色ブドウ球菌を培養し、コロニー総数が約 10^7 個の黄色ブドウ球菌を含有する菌液をコンポストトイレに入れ、それぞれ2週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月堆肥化後、サンプリングして粉碎し、その後25mg、2.5mgをそれぞれとって15mlのLB培地を入れた試験管に移し、均一に混合してから培養皿に入れ、凝固した後35℃の恒温室で終夜培養した。

コンポストトイレに投入前の黄色ブドウ球菌は、そのコロニー周囲において溶血現象が見られ、コアグラージェを産生してウサギの血漿を凝固させた。また、黄色ブドウ球菌は指示薬及びDNAを含有する培養皿内（DNA酵素加水分解試験）で、コロニーの周囲が赤紫色になった。マンニトール（mannitol）を利用して酸を産生した。

堆肥化後のサンプルについて、2週間目のサンプルでは黄色ブドウ球菌が分離されたものの、その後のサンプリング検査ではいかなる残存黄色ブドウ球菌も分離されておらず、黄色ブドウ球菌の菌株の成長が1ヶ月後に完全に抑制されることが示されている。しかし、2週間目のサンプリングの際に黄色ブドウ球菌が分離されたため、1ヶ月以内の場合には少量の黄色ブドウ球菌の菌株が残存する可能性があることが明らかにされた。

【0019】

サルモネラ菌に関しては、まず液体培地でサルモネラ菌B群（安全のためにチフスを起こさない菌株）を大量に増殖させ、コロニー総数が約 10^7 個のサルモネラ菌を含有する菌液をコンポストトイレに入れ、それぞれ2週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月堆肥化後、サンプリングして粉碎し、その後25mg、2.5mgをそれぞれとって15mlのLB培地を入れた試験管に移し、均一に混合してから培養皿に入れ、凝固した後35℃の恒温室で終夜培養した。まずXLD（xylose-lactose-deoxycholate）培地のような選択性の強い培地を用いて黒色のコロニーを釣菌し、更に生化学的性状試験用キットでこの菌の測定を行った。2週間目にサルモネラ菌が分離されたものの、その後のサンプリング検査ではいかなる残存サルモネラ菌が分離されておらず、サルモネラ菌の菌株の成長が1ヶ月後に完全に抑制されることが示されている。しかし、2週間目のサンプリングの際に一部のサルモネラ菌が分離されたため、1ヶ月以内に少量のサルモネラ菌の菌株が残存する可能性があることが明らかになった。

【0020】

セレウス菌では、まず液体培地でセレウス菌を大量に増殖させ、コロニー総数が約 10^7 個のセレウス菌を含有する菌液をコンポストトイレに入れ、それぞれ2週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月堆肥化後、サンプリングして粉碎し、その後25mg、2.5mgをそれぞれとって15mlのLB培地を入れた試験管に移し、均一に混合してから培養皿に入れ、凝固した後35℃の恒温槽で終夜培養した。セレウス菌はLB培地で16～18時間培養された後、コロニーの周囲に透明な溶血環を形成し、運動性を示す。また、酵素分解レシチンでは陽性反応を示し、ゼラチンを加水分解することができる。

1ヶ月後のサンプリング検査では、上述の特徴を有するセレウス菌が分離されていない。

また、腸管出血性大腸菌に関しては、まず液体培地で腸管出血性大腸菌を大量に増殖させ、コロニー総数が約 10^7 個の腸管出血性大腸菌を含有する菌液をコンポストトイレに入れ、それぞれ2週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月堆肥化後、サンプリングして粉碎し、その後25mg、2.5mgをそれぞれとって15mlの綿羊の血液を含む培地を入れた試験管に移し、均一に混合してから培養皿に入れ、凝固した後35℃の恒温槽で終夜培養した。更に血清学的な分類でこの菌がO157:H7に属するか否かを測定した。大腸菌O157:H7が他の大腸菌と異なるのはD-sorbitolを利用して酸を産生できないことで、上記のサンプリングの結果いずれもガラクトシダーゼ (galactosidase) では陰性反応を示している。

【0021】

赤痢菌については、まず液体培地で赤痢菌を大量に増殖させ、コロニー総数が約 10^7 個の赤痢菌を含有する菌液をコンポストトイレに入れ、それぞれ2週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月堆肥化後、サンプリングして粉碎し、その後25mg、2.5mgをそれぞれとって15mlのLB培地を入れた試験管に移し、均一に混合してから培養皿に入れ、更にXLD (xylose-lactose-deoxycholate) 培地のような選択性の強い培地を用いて透明なコロニーを釣菌し、その後生化学的性状試験用キットでこの菌の測定を行った。

腸管出血性大腸菌の場合と同様、いずれのサンプルにおいても菌株が残存する可能性は見出せなかった。

コンポストトイレの堆肥を土壌に混入して堆肥物になるかの指標としてカビ菌の培養を行った。

土壌には種々の菌類やカビ菌が存在し、多くは酸素の多い地表近くに存在する。グラムあたりのカビ菌数約 $10^4 \sim 10^5$ 個のカビ菌系が存在する土壌は、水分により団粒構造となりやすく、農業用土壌として適する。

カビ菌の培養では、上記同様の方法で前記3ヶ月堆肥化処理して磨砕された堆肥を均一に混合して培養皿に入れ、凝固してから室温 (25℃) の恒温槽でカビ菌を培養し、大量のアオカビ (Penicillium)、クモノスカビ (Rhizopus)、コウジカビ (Aspergillus) などの菌系体を分離することができた。これらの菌系体はアルカリ性の環境ではグラム陽性球菌の成長を抑制し、酸性の環境ではグラム陰性菌の成長を抑制することができる。

【0022】

以上の実験結果から、コンポストトイレにより処理された堆肥において各種の病原性のある腸内細菌、及び大腸菌、枯草菌がいずれも増殖できず、衛生上安全であること、そして、これら衛生管理上の指標とされる病原性のない大腸菌及び枯草菌の増殖の有無が容易に判定できることから、衛生上の指標とされる病原性のない大腸菌、枯草菌に遺伝子操作技術によってlacZマーカーを有するプラスミドを導入したダミー菌種を用いた本発明の検査方法が有効であることが確認された。

本発明の検査方法は、このようにこれらのコンポストトイレにより処理された堆肥において、その堆肥化処理の適否を簡易に判定することが可能であり、そのほか同様に処理されて肥料化される排泄物由来の堆肥類の衛生管理上、簡易且つ信頼性の高い検査方法として広く適用できることが明らかとなった。