

## PCR 法による牛舎内環境からのクレブシエラ属菌の検出

鈴木良地<sup>1)</sup>・高橋麗子<sup>2)</sup>・瀧澤秀明<sup>3)</sup>・浅見逸夫<sup>1)</sup>

**摘要**：環境性乳房炎の原因菌であるクレブシエラ属菌 2 種 (*Klebsiella pneumoniae* 及び *Klebsiella oxytoca*) を特異的に検出する PCR プライマーを開発した。このプライマーを利用した牛舎内環境試料の定量 PCR 分析では、オガクズ及び竹粉に多量のクレブシエラ属菌が含まれていることが明らかとなった。また、オガクズを副資材とした発酵初期の未成熟な堆肥にもクレブシエラ属菌が含まれていたが、堆肥化の進行とともに速やかに検出されなくなった。

また、オガクズ、竹粉及び発酵初期の未成熟な堆肥からは懸濁法や熱抽出法などの簡易な DNA 抽出法でもクレブシエラ属菌を検出できた。

**キーワード**：*Klebsiella pneumoniae*、*Klebsiella oxytoca*、乳房炎、PCR、牛舎内環境

## PCR Assays for Detecting *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* in Cowshed Environments

SUZUKI Ryoji, TAKAHASHI Reiko, TAKIZAWA Hideaki and ASAMI Itsuo

**Abstract**: We developed polymerase chain reaction (PCR) primers for detecting two species of *Klebsiella* (*Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*) that are major causes of environmental bovine mastitis. We collected samples from cowshed environments and examined these samples by using quantitative PCR with the two primers. We detected large numbers of *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* in sawdust and bamboo powder. We also found *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* in immature compost, including sawdust; however, these populations decreased rapidly during composting.

On the other hand, we were able to detect *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* by using PCR assays with DNA that had been extracted simply from sawdust, bamboo powder, and immature compost, by using suspension or heat-extraction methods..

**Key Words**: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, Bovine Mastitis, PCR, Cowshed Environments

---

<sup>1)</sup> 環境基盤研究部    <sup>2)</sup> 環境基盤研究部 (現食育推進課)    <sup>3)</sup> 畜産研究部

## 材料及び方法

## 緒言

乳房炎は酪農経営上重要な乳牛の疾患の一つであり、特に乳牛の飼育環境にその原因があるものを環境性乳房炎という。クレブシエラ (*Klebsiella*) 属菌は環境中に広く存在する常在菌であるが、乳牛に環境性乳房炎を引き起こす原因菌でもある<sup>1)</sup>。臨床材料で検出されるクレブシエラ属菌は*Klebsiella pneumoniae*及び*K. oxytoca*の2種が大半を占めており、これらによる乳房炎は重篤な症状を呈しやすいことが知られている<sup>2)</sup>。

現在、酪農現場において環境中からクレブシエラ属菌を検出する方法として、培養法が広く用いられている<sup>3, 4)</sup>。培養法は、適切な選択培地を用いれば比較的簡単に同定や定量ができる。しかし、希釈作業が煩雑であることや、検体数が多い場合には不向きであること、同定までに2日間から3日間を要するなどの欠点がある。そのため、迅速かつ網羅的な分析を要求される現場では問題も多い。

近年、PCRを用いた遺伝子解析技術が進み、クレブシエラ属菌についても、主に系統分類を目的とした種間の識別<sup>5-7)</sup>に関する研究事例が報告されている。しかし、環境中からクレブシエラ属菌を特異的に検出する技術に関しては、Brisse and Verhoef<sup>5)</sup>により設計され、その後Chanderら<sup>7)</sup>によりクレブシエラ属菌に特異性があるとされたプライマーセットgyrA. A(F)-gyrA. C(R)が報告されているのみである。

本研究では主な乳房炎原因菌である*K. pneumoniae*及び*K. oxytoca*を特異的に検出するために、既報のプライマーセットgyrA. A(F)-gyrA. C(R)を検証するとともに、新たなプライマーセットを設計し、適用性の検討を行った。また、乳牛舎内や堆肥に存在するクレブシエラ属菌を定量し、さらに抽出に係る時間の短縮化を試みた。

## 1 供試菌株の分離とDNA抽出

2013年6月に当試験場畜産研究部の搾乳牛舎から乳牛ふん、乳牛体毛、畜舎内のほこりを採取し、ただちにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 溶液で希釈してLysogeny Broth (LB) 培地に塗布した。敷料や家畜ふん堆肥の原料として使われるオガクズや未利用資源である竹粉についても同様に処理して、培地に塗布した。37°Cで24時間培養後に出現したコロニーを分離培養し、表1の大腸菌群を得た。また、*K. pneumoniae* は愛知県農業共済組合連合会から譲渡された乳房炎乳由来の菌株から得た。

種の同定は、16SrDNAの塩基配列の相同性比較により行った。培養コロニーの抽出DNAを鋳型として、バクテリアの16SrDNAのV6-V8可変領域を標的とするユニバーサルプライマーF984 (5'-AACGCGAAGAACCCTAC-3') 及びR1378 (5'-CGGTGTGTACAAGCCCGGGAACG-3') によりPCRを行った。得られた増幅産物をpGEM-T Easy Vector (プロメガ株式会社、東京) を用いてクローニングした後、遺伝子解析システムCeq8000 (ベックマン・コールター株式会社、東京) を用いて、16SrDNAの塩基配列を解読した。その後、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の相同性検索 (BLAST) を行い、種を同定した。

培養コロニーからのDNA抽出は、ISOPLANT DNA抽出キット (株式会社ニッポンジーン、東京) を用いて、添付のプロトコルに従って行った。また、乳牛ふん、乳牛体毛、畜舎ほこり及び乳牛ふん堆肥からのDNA抽出は、Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, USA) を用いた。なお、乳牛ふん堆肥は2011年度にオガクズを副資材として作成され、その後-80°Cで凍結保存されたものを用いた。オガクズ及び竹粉からのDNA抽出は、DNAすいすいW (リーズ株式会社、つくば) を用いた。DNA抽出に用いた牛舎内環境試料及び乳牛ふん堆肥試料については表2に示した。

表1 分離培養で得られた大腸菌群菌株

No.	種名	由来	採取場所
1	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	乳牛体毛	愛知県農業総合試験場
2	<i>Citrobacter freundii</i>	畜舎ほこり	愛知県農業総合試験場
3	<i>Enterobacter aerogenes</i>	竹粉	愛知県農業総合試験場
4	<i>Enterobacter asburiae</i>	竹粉	愛知県農業総合試験場
5	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	竹粉	愛知県農業総合試験場
6	<i>Enterobacter cloacae</i>	オガクズ	愛知県農業総合試験場
7	<i>Enterobacter kobei</i>	竹粉	愛知県農業総合試験場
8	<i>Erwinia tasmaniensis</i>	オガクズ	愛知県農業総合試験場
9	<i>Escherichia coli</i>	乳牛ふん	愛知県農業総合試験場
10	<i>Pantoea agglomerans</i>	オガクズ	愛知県農業総合試験場
11	<i>Pantoea dispersa</i>	オガクズ	愛知県農業総合試験場
12	<i>Proteus penneri</i>	乳牛ふん	愛知県農業総合試験場
13	<i>Proteus vulgaris</i>	乳牛ふん	愛知県農業総合試験場
14	<i>Serratia marcescens</i>	オガクズ	愛知県農業総合試験場
15	<i>Klebsiella oxytoca</i>	オガクズ	愛知県農業総合試験場
16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	乳房炎乳	愛知県農業共済組合連合会

表2 DNA抽出に用いた試料

牛舎内環境		乳牛ふん堆肥	
乳牛ふん	-1	乳牛ふん堆肥	0日目
	-2		1日目
	-3		3日目
乳牛体毛	-1		1週目
	-2		2週目
畜舎ほこり	-1		3週目
	-2		4週目
オガクズ	-1		6週目
(未使用品)	-2		8週目
	-3		10週目
	-4		12週目
	-5		16週目
竹粉	-1		
(未使用品)	-2		

なお、*K. pneumoniae* 及び *K. oxytoca* 菌株は、PCRの定量解析に用いるため、希釈平板法によりコロニー形成単位 (CFU) を計測した。

## 2 プライマーの設計

既報のクレブシエラ属菌に特異的なプライマーとして、Brisse and Verhoef<sup>5)</sup>による *gyrA*. A (F) 及び *gyrA*. C (R) を用いた。また、新しく *atpD* 遺伝子領域 (ATP synthase  $\beta$  subunit) の配列から *kpo1* (F) 及び *kpo2* (R) を設計した。プライマー配列は表 3 に示した。

## 3 PCR反応液の調整及び反応条件

PCR反応液は、7.5  $\mu$ L の 2  $\times$  FastStart Master Mix (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社、東京)、0.66  $\mu$ g/ $\mu$ L の BSA (シグマアルドリッチジャパン合同会社、東京)、0.33  $\mu$ M のプライマー、1.0  $\mu$ L の鋳型DNAを含む総量 15.0  $\mu$ L とした。サーマルサイクラーは PC320 (株式会社アステック、福岡) を用い、増幅条件は 95°C 5 分の後、95°C 15 秒、58°C 1 分、72°C 20 秒を 30 サイクルとして PCR 反応を行った。反応終了後の増幅産物は 2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、紫外線照射下でバンドパターンを確認した。

## 4 DNAの簡易抽出法

採取試料から簡易にDNAを抽出する方法として、上記のキットによる抽出法とは別に、下記の 2 通りの抽出法を試みた。DNA抽出試料には、オガクズー 6、竹粉ー 1 及び乳牛ふん堆肥 (1 日目) を用いた (表 2)。

### (1) 懸濁法

試料 100 mg を 1 mL の蒸留水に懸濁し、1000 rpm で 1 分間遠心分離した後、上清を 13000 rpm で 3 分間遠心分離した。沈殿に 100  $\mu$ L の Tris-EDTA (TE) 液を加えて懸濁した後、13000 rpm で 1 分間遠心分離し、上清を DNA 試料とした。

### (2) 熱抽出法

試料 100 mg を 1 mL の蒸留水に懸濁し、1000 rpm で 1 分間遠心分離した後、上清を 13000 rpm で 3 分間遠心分離した。沈殿に 100  $\mu$ L の TE 液を加えて懸濁し、沸騰水中で 10 分間加熱した後、13000 rpm で 1 分間遠心分離し、上清を DNA 試料とした。

## 5 リアルタイムPCRによるクレブシエラ属菌の定量

牛舎内環境試料及び乳牛ふん堆肥から抽出したDNAについて、プライマーセット *kpo1* (F)-*kpo2* (R) を用いて、リアルタイムPCR装置 StepOne (ライフテクノロジーズジャパン株式会社、東京) により、リアルタイム PCR を行った。反応液は、10.0  $\mu$ L の 2  $\times$  FastStart Universal SYBR Green Master (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社、東京)、0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L の BSA、0.3  $\mu$ M のプライマー、1.0  $\mu$ L の鋳型DNAを含む総量 20.0  $\mu$ L とした。増幅条件は、95°C 10 分の後、95°C 15 秒、58°C 1 分、72°C 20 秒を 40 サイクルとした。PCR 反応の特異性は、*K. pneumoniae* 菌株の抽出DNAを陽性コントロールとして、融解曲線分析により Tm 値を比較することで確認した。菌数は、 $7.9 \times 10^7$  CFU/ml に調整した *K. pneumoniae* 培養液のDNA抽出液を 10 段階して作成した検量線をもとに算出した。

## 試験結果

### 1 PCR反応

*K. pneumoniae* 及び *K. oxytoca* を含む 16 種の大腸菌群から抽出したDNAを鋳型として、既報のプライマーセット *gyrA*. A (F)-*gyrA*. C (R) 及び本研究で新たに設計したプライマーセット *kpo1* (F)-*kpo2* (R) を用いて PCR を行った。プライマーセット *gyrA*. A (F)-*gyrA*. C (R) ではクレブシエラ属菌 2 種に加え、*Citrobacter amalonaticus* 及び *Escherichia coli* でもバンドが確認された (図 1 A)。これに対し、プライマーセット *kpo1* (F)-*kpo2* (R) では、クレブシエラ属菌だけバンドが確認された (図 1 B)。

### 2 牛舎内環境試料及び乳牛ふん堆肥の検定

牛舎内環境試料及び乳牛ふん堆肥からキットにより抽出したDNAを鋳型として、本研究で設計した *kpo1* (F)-*kpo2* (R) をプライマーに用いて PCR を行った。その結果、オガクズー 6、竹粉ー 1 及び竹粉ー 2 から *K. pneumoniae* 及び *K. oxytoca* に特異的なバンドが確認された (図 2 A)。また、乳牛ふん堆肥からは 1 日目の試料でバンドが確認された (図 2 B)。これらのバンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (株式会社キアゲン、東京) を用いてアガロースゲルからDNAを抽出し、シークエンスを行ったところ、*K. pneumoniae* 又は *K. oxytoca* であることを確認した (表 4)。

表 3 本試験で用いたプライマー配列

プライマー名	配列	標的遺伝子	増幅DNA断片 (bp)	文献
<i>gyrA</i> . A (F)	5'-CGCGTACTATACGCCATGAACGTA-3'	<i>gyrA</i>	439	Brisse and Verhoef (2001) <sup>5)</sup>
<i>gyrA</i> . C (R)	5'-ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG-3'			
<i>kpo1</i> (F)	5'-TCATGAACGTACTGGGYCAA-3'	<i>atpD</i>	371	本研究
<i>kpo2</i> (R)	5'-CACCAGGGATACTTTATCGAT-3'			

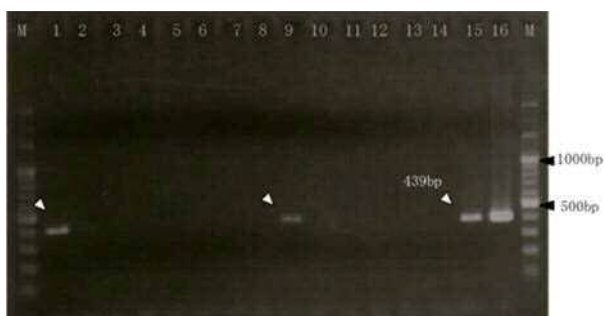


図 1 A gyrA. A(F)-gyrA. C(R)によるPCRの電気泳動像

Lane 1~16 : 大腸菌群 (表 1)

M : 100bp

矢印は、PCR増幅産物



図 1 B kpo1(F)-kpo2(R)によるPCRの電気泳動像

Lane 1~16 : 大腸菌群 (表 1)

M : 100bp

矢印は、PCR増幅産物

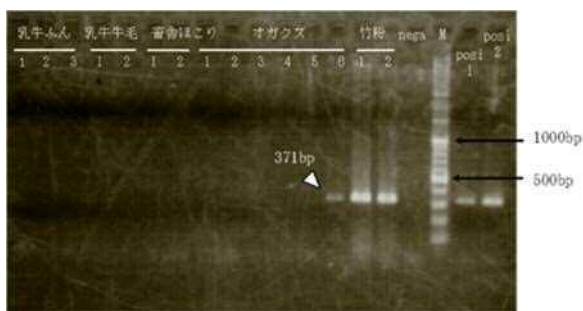


図 2 A 牛舎内環境試料抽出DNAのPCRの電気泳動像

M : 100bp

nega : 鋳型なし

posi 1 : *K. pneumoniae*

posi 2 : *K. oxytoca*

矢印は、PCR増幅産物



図 2 B 乳牛ふん堆肥抽出DNAのPCRの電気泳動像

M : 100bp

nega : 鋳型なし

posi 1 : *K. pneumoniae*

posi 2 : *K. oxytoca*

矢印は、PCR増幅産物

表 4 アガロースゲルから抽出したDNAの同定結果

	種名	相同性 <sup>1)</sup>	Accession No.
オガクス-6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	98.1%	CP006659
竹粉-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	97.7%	CP006659
竹粉-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	97.7%	CP006659
乳牛ふん堆肥 1日目	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99.1%	CP003683

1) *atpD* 遺伝子

表5 牛舎内環境試料及び乳牛ふん堆肥中の*K. pneumoniae* (CFU/g)

CFU/g		CFU/g	
乳牛ふん-1	-	乳牛ふん堆肥 0日目	186
乳牛ふん-2	-	乳牛ふん堆肥 1日目	25316
乳牛ふん-3	-	乳牛ふん堆肥 3日目	-
乳牛体毛-1	-	乳牛ふん堆肥 1週目	-
乳牛体毛-2	-	乳牛ふん堆肥 2週目	-
畜舎ほこり-1	-	乳牛ふん堆肥 3週目	-
畜舎ほこり-2	-	乳牛ふん堆肥 4週目	-
オガクズ-1	-	乳牛ふん堆肥 6週目	-
オガクズ-2	-	乳牛ふん堆肥 8週目	-
オガクズ-3	-	乳牛ふん堆肥 10週目	-
オガクズ-4	-	乳牛ふん堆肥 12週目	-
オガクズ-5	-	乳牛ふん堆肥 16週目	-
オガクズ-6	75512		
竹粉-1	20918516		
竹粉-2	10858784		

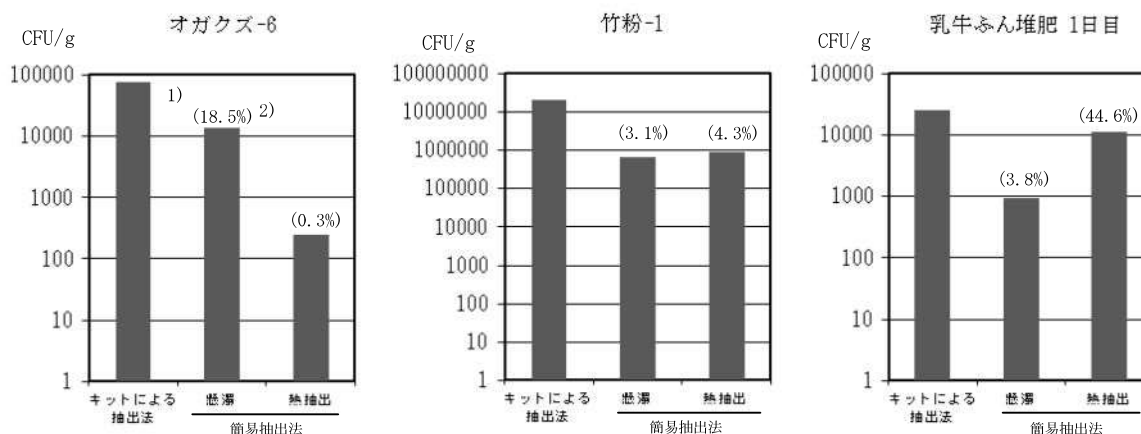


図3 簡易抽出法によるDNA収量の比較

- 1) グラフの高さは3反復の平均値。
- 2) カッコ内の数値は、キットによる抽出法に対する収量率を示す。

### 3 リアルタイムPCRによる定量

牛舎内環境試料及び乳牛ふん堆肥からキットにより抽出したDNAを鋳型として、プライマーセットkpo1(F)-kpo2(R)を用いてリアルタイムPCRを行い、CFUを算出した。オガクズ-6のクレブシエラ属菌は $7.6 \times 10^4$  CFU/g、竹粉は最大で $2.1 \times 10^7$  CFU/gであった(表5)。

また、乳牛ふん堆肥では1日目の試料が $2.5 \times 10^4$  CFU/gだったが、3日目以降は検出されなかった。

### 4 簡易抽出法によるDNA収量

簡易抽出したDNAを鋳型として、リアルタイムPCRによりCFUを算出し、キットによる抽出法と収量を比較した(図3)。オガクズについては、熱抽出法の収量が著しく減少した。竹粉については、いずれの簡易抽出法でも収

量率は5%以下だった。乳牛ふん堆肥については、熱抽出法の収量が比較的優れていた。

## 考 察

*atpD* 遺伝子領域は微生物内で高い安定性と普遍性をもち、16SrDNAと同様にバクテリアの種属間の系統分類に用いられることが多い領域である<sup>8-9)</sup>。そこで本研究では、*atpD* 遺伝子領域から*K. pneumoniae* 及び*K. oxytoca* に特異的なプライマーセットkpo1(F)-kpo2(R)を設計し、大腸菌群からの特異的な検出を試みたところ、*K. pneumoniae* 及び*K. oxytoca* のクレブシエラ属菌2種だけを検出することができた。一方、既報のプライマーセ

ット gyrA. A(F)-gyrA. C(R) では *K. pneumoniae* 及び *K. oxytoca* 以外にも非特異的な反応があることが明らかとなった (図 1A)。特に酪農現場において最も一般的な大腸菌 *Escherichia coli* が検出されてしまうことは、実用上問題があると考えられた。

牛舎内環境試料のPCR及びリアルタイムPCRの結果、乳牛ふん、乳牛体毛、畜舎ほこりからはクレブシエラ属菌は検出されなかったが、オガクズからは  $7.6 \times 10^4$  CFU/g、竹粉からは  $2.1 \times 10^7$  CFU/g が検出された。

クレブシエラ属菌は生木の心材部からも分離されることから<sup>10)</sup>、オガクズのクレブシエラ属菌は元々の原材料由来と考えられる。クレブシエラ属菌に汚染されたオガクズは、乳房炎の原因の一つであることが知られており<sup>11-14)</sup>、特に  $10^6$  CFU/g 以上で乳房炎の発症の危険性が高くなるといわれている<sup>12, 13)</sup>。本研究の結果においてもオガクズが乳房炎のリスクとなることが再確認された。また、竹粉についても培養法によりクレブシエラ属菌が検出されることが報告されているが<sup>15)</sup>、本研究ではさらに定量分析によりその濃度を明らかにした。竹粉や竹チップなどは、未利用資源として今後多方面に利用が期待されている資材<sup>16-18)</sup> だけに、敷料として使用する場合には注意する必要がある。

乳牛ふん堆肥のリアルタイムPCRによる定量では、特に堆肥化1日目が高濃度だった。この極めて初期の堆肥化段階において検出されたクレブシエラ属菌は、副資材として混ぜられたオガクズ由来と推測されるが、その後の堆肥化の進行とともに数日で速やかに減少した。このことから、十分な堆肥化期間を経た堆肥であれば、敷料として利用できること明らかとなった。

懸濁法と熱抽出法の簡易抽出法の比較では、試料によってDNA収量率が明らかに異なった。オガクズでは熱抽出法の収量が著しく低かったが、これは木材に含まれるリグニンやタンニンなどが熱処理により溶液中に拡散し、PCRが阻害された可能性が考えられる。また、いずれの抽出法もキットを用いた場合の収量には至らなかったが、PCRによる検出を目的とした場合、オガクズについては懸濁法が、堆肥については熱抽出法が十分に適用できると考えられる。竹粉については両法とも収量率は低いが、元々菌数が非常に多いため十分に検出できるレベルであると考えられる。

本研究で開発されたプライマーを用いてPCRを行うことで、牛舎内環境中からクレブシエラ属菌を特異的に検出できることが明らかとなった。簡易抽出法を併用すれば、コストをかけずに午前中に試料を採取して午後に出検を終えることが可能となる。常法である培養法と比較して大幅な時間の短縮になることから、乳房炎の発生要因を特定するための網羅的な分析やクレブシエラ属菌の動態のモニタリングも可能となると考えられる。

**謝辞:** 本研究にあたり、*Klebsiella pneumoniae* 菌の培養液を提供いただいた愛知県農業共済組合連合会の伊藤隆晶氏に深く感謝いたします。

## 引用文献

1. Knittel, M. D., Seidler, R. J., Eby, C. and Cabe, L. M. Colonization of the botanical environment by *Klebsiella* isolates of pathogenic origin. *Applied and Environmental Microbiology*. 34(5), 557-563 (1977)
2. 久枝啓一, 今村智子, 園部隆久, 杉山美恵子, 井原晴喜, 那須正信, 永幡肇. 大腸菌群による甚急性乳房炎の診断に関する一考察. *日本家畜臨床感染症研究会誌*. 6(3), 91-106(2011)
3. Bagley, S. T. and Seidler, R. J. Primary *Klebsiella* identification with MacConkey inositol carbenicillin agar. *Applied and Environmental Microbiology*. 36(3), 536-538(1978)
4. Ohtomo, R. and Saito, M. A new selective medium for detection of *Klebsiella* from dairy environments. *Microbes and Environments*. 18(3), 138-144(2003)
5. Brisse, S. and Verhoef, J. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, gyrA and parC genes sequencing and automated ribotyping. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51, 915-924(2001)
6. Wang, M., Cao, B., Yu, Q., Liu, L., Gao, Q., Wang, L. and Feng, L. Analysis of the 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer region in *Klebsiella* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 46(11), 3555-3563(2008)
7. Chander, Y., Ramakrishnan, M. A., Jindal, N., Hanson, K. and Goyal, S. M. Differentiation of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* by multiplex polymerase chain reaction. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. 9(2), 138-142(2011)
8. Christensen, H., Kuhnert, P., Olsen, J. E. and Bisgaard, M. Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54, 1601-1609(2004)
9. Beran, P. and Mráz, I. Species-specific PCR primers for detection of *Xanthomonas vesicatoria*. *Crop Protection*. 43, 213-215(2013)
10. Bagley, S. T., Seidler, R. J., Talbot, H. W. and Morrow, J. E. Isolation of *Klebsiella* from within living wood. *Applied and Environmental Microbiology*. 36(1), 178-185(1978)
11. Fairchild, T. P., McArthur, B. J., Moore, J. H. and Hylton, W. E. Coliform counts in various bedding materials. *Journal of Dairy Science*. 65

- (6), 1029-1035(1982)
12. 細田紀子, 渡辺工一. 環境性乳房炎の予防. 畜産の研究. 51(2), 290-294(1997)
13. Zdanowicz, M. Sand and sawdust bedding affect populations of coliforms, *Klebsiella* spp. and *Streptococcus* spp. on teat ends of dairy cows housed in freestalls. Master of science in the faculty of graduate studies (The University of British Columbia). 1-47(2002)
14. Munoz, M. A. , Ahlström, C. , Rauch, B. J. and Zadoks, R. N. Fecal shedding of *Klebsiella pneumoniae* by dairy cows. Journal of Dairy Science. 89(9), 3425-3430(2006)
15. 溝添暁子, 里岡嘉宏, 甲斐由美, 中田一則. 県内未利用資源を利用した脱室に関する研究. 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告. 52, 3-5(2007)
16. 芹澤駿治, 藤井信吾, 池田博保. 竹等の敷料資源としての利用特性の検討. 静岡県畜産試験場試験研究報告. 28, 32-34(2002)
17. 坂井隆弘, 脇屋裕一郎, 岩永致悦. 竹チップを副資材として利用した乳牛ふんの堆肥化. 佐賀県畜産試験場試験研究成績書. 40, 115-120(2004)
18. 太田壮洋. 竹材の敷料及びたい肥化副資材としての利用に関する研究. 山口県農林総合技術センター畜産技術部研究報告. 23, 59-64(2008)