

乳牛糞和虻糞的菌相調查⁽¹⁾

梁世祥⁽²⁾⁽⁴⁾ 李佳馨⁽³⁾ 王思涵⁽³⁾

收件日期：111 年 8 月 3 日；接受日期：113 年 9 月 16 日

摘 要

本研究以固液分離後的乳牛糞做為黑水虻幼蟲的飼養基質，探討經幼蟲轉化後的乳牛糞殘餘物即虻糞，其菌相組成變化與乳牛糞之差異，透過乳牛糞及虻糞的微生物的消長變化，評估應用黑水虻幼蟲處理乳牛糞產出虻糞的衛生安全性。本研究自乳牛糞和虻糞樣品中共獲得 35 與 34 百萬鹼基對，分別有 72,027 和 62,530 條操作分類單元，樣品之菌分類群比例在科級分類階層歧異度逐漸增加，在屬和種的分類階層歧異度差異更為明顯。與乳牛糞中菌種相比較，在虻糞含有可能造成牛致病的菌種，比例下降的菌共有 13 種，可能造成牛致病的菌種，比例上升的共有 9 種，這些菌種大部分上升幅度都不高，其中梭菌屬的菌種是否屬機會性致病菌，則需進一步探討。結果顯示虻糞存有少量的牛致病菌，比例雖然不高，但使用上仍應有衛生安全操作觀念，避免機會型致病菌對牛隻造成可能的危害。

關鍵詞：乳牛糞、虻糞、黑水虻幼蟲、菌相。

緒 言

依據 109 年農業統計年報，臺灣地區牛隻飼養種類包括水牛、乳牛、黃牛和雜種牛，在養頭數分別為 2,002、143,532 和 15,590 頭，總計 161,124 頭（行政院農業委員會，2021），若以平均每頭牛體重約 500 公斤，其每日排出糞量約 25 公斤做為計算基礎（行政院農業委員會畜產試驗所，2010），在養牛隻每天總共產生牛糞 4,028 公噸，全年共生產牛糞 147 萬公噸，是很可觀的數量。國內主要是利用微生物堆肥化操作管理，將固液分離後的乳牛糞製作成有機質堆肥，便於回歸農業耕地應用（林，1998）。由於有機質堆肥生產過程費時耗能，且產生難聞氣味、溫室氣體、污水和粉塵，也會影響堆肥工作人員身心健康和建築與設備的耗損。因此應用昆蟲黑水虻幼蟲轉化乳牛糞進行資源再利用處理，快速減少乳牛糞的體積和重量，縮短難聞氣味存在的時間，避免溫室氣體的產生，排放較少的污水和產生較少的粉塵，為有助於改善畜牧業廢棄物污染防治的經營管理課題（梁及蕭，2014）。

黑水虻 (Black Soldier Fly, *Hermetia illucens*) 屬於完全變態類的昆蟲，幼蟲取食有機資源物，成蟲以貝氏擬態模擬類似木胡蜂等昆蟲，以警告天敵避免被捕食，廣泛分佈在溫帶和熱帶區域。世界糧農組織在可食性昆蟲專刊提到，黑水虻是具有量產養殖潛力的昆蟲種類，能有效轉換農業有機資源物為高附加價值副產物，協助農業資源循環再利用，是對人類有益且重要的資源昆蟲 (FAO, 2013)。幼蟲能生活在各種腐敗的有機資源物中，例如畜禽糞、廚餘和食品廢棄物等 (Oonincx *et al.*, 2015)，推測幼蟲體內具有抑菌和抗菌等物質，使幼蟲在各種極端的環境條件仍適應生長。幼蟲也富含蛋白質、脂肪酸、礦物質和維生素，有機會成為區域性的動物性蛋白質飼料原料資源，可替代畜禽生產使用之飼料原料中的魚粉和大豆蛋白 (Cullere *et al.*, 2016; Tomberlin *et al.*, 2002)，所以幼蟲是否帶有或沾黏潛在危險的致病病原菌，是許多國家在發展微型畜牧業（即昆蟲產業）於飼料衛生安全應用評估中，關切的議題 (de Smet *et al.*, 2018)。

乳牛糞經黑水虻幼蟲處理後的殘餘物，可稱之為虻糞 (frass)，後續可再做為堆肥的原料或其它產業的材料應用 (Beesigamukama *et al.*, 2020)，例如固態衍生燃料 (refuse derived fuel, RDF) 等，為了解乳牛糞和虻糞，是否可能帶有對人或動物健康造成危害的人畜共通致病菌 (Zoonotic pathogens)，使工作人員存有接觸風險，或可能因施用或使用

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2802 號。

(2) 農業部畜產試驗所技術服務組。

(3) 農業部畜產試驗所北區分所。

(4) 通訊作者，E-mail: shliang@tlri.gov.tw。

受污染的副產物或產品，造成病原存在於環境以致於感染動物甚至是人，危及人畜生命等衛生安全風險，故從現場管理操作人員的健康安全風險和副產物或產品的衛生安全風險考量（羅，2015），針對乳牛糞和蛇糞進行初步的菌相調查，有助於釐清潛在的衛生安全風險。

早期的研究指出，額外添加出血性大腸桿菌 (*Escherichia coli* O157:H7) 和沙門氏桿菌 (*Salmonella* spp.) 在以牛糞或雞糞為黑水虻幼蟲的飼養基質中，與未含有黑水虻幼蟲存在之飼養基質為對照組進行比較。對照組之病原性微生物的數量與加入時沒有顯著差異，試驗組之病原性微生物數量會因幼蟲的存在，呈現大量減少的結果，顯示幼蟲確實具有抑菌和抗菌等物質，能影響環境或飼養基質中不同微生物種類的生長與殘存 (Erickson *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2008)。以雞飼料和植物性廢料做為黑水虻幼蟲飼養基質試驗，顯示飼養基質的種類和飼養時間的長短等，其菌相調查得到的結果都不相同。除了幼蟲本身的影響外，不同微生物菌種之間彼此的生存競合，也會影響菌相調查的結果 (Boccazzi *et al.*, 2017)。在以雞飼料和廚餘為飼養基質的試驗中，*Providencia* spp. 是幼蟲消化道中主要存在的共同菌種，*Morganella* spp. 和 *Brevibacterium* spp. 為雞飼料飼養的幼蟲消化道中主要菌種，而 *Staphylococcus* spp. 和 *Bordetella* spp. 則是以廚餘飼養的幼蟲消化道為主要菌種 (Shumo *et al.*, 2021)。還有以雞飼料、草屑和蔬果渣分別做為黑水虻幼蟲飼養基質，發現 3 種不同的飼養基質，對幼蟲消化道的微生物菌相並不會造成顯著的影響，表示幼蟲消化道中存在有核心的微生物菌落，這些菌落是由多種低豐度分類群支持，像是 *Actinomyces* spp.、*Dysgonomonas* spp. 和 *Enterococcus* spp.，這些微生物種類在幼蟲消化道內協助轉換有機資源物的營養代謝及吸收 (Klammsteiner *et al.*, 2020)。而透過幼蟲處理乳牛糞或堆肥，能減少揮發性脂肪酸的積累，提升總養分含量，最終能改善蛇糞或堆肥的質量 (Liu *et al.*, 2019)。目前大多數研究以探討幼蟲消化道菌相為主，少部分探討蛇糞菌相和原材料如乳牛糞之間的比較，故本研究探討用乳牛糞做為飼養黑水虻幼蟲基質前後，乳牛糞和蛇糞的菌相種類及變化，可做為後續其製成之副產品和產品接觸使用的衛生安全評估參考。

材料與方法

I. 供試黑水虻材料及試驗方法

試驗所使用的黑水虻西湖品系 (Xihu line) 是 2010 年於苗栗縣西湖鄉野外誘引，經鑑定比對確認，在農業部畜產試驗所北區分所實驗室內，繼代飼養超過 10 代以上獲得，維持其族群供試驗使用。黑水虻幼蟲在直立式生長箱（溫度 27 ± 1 ；溼度 75%；光照 16L:8D）進行飼養，餵飼經滅菌過的配方飼料，由麩皮和玉米粉組成（重量比 4:1），含水率 65%。黑水虻幼蟲發育至預蛹期，具有類似跳蚤習性，即老熟幼蟲化蛹前會離開飼料基質，另尋乾燥縫隙處化蛹 (Sheppard *et al.*, 2002)，因此利用雙層塑膠密盆（內盆，長 36.4 cm × 寬 28.5 cm × 高 7.8 cm；外盆，長 52.5 cm × 寬 42.4 cm × 高 12.5 cm）飼養，內盆放入約 3,000 隻幼蟲，當幼蟲發育到預蛹期時，即爬出內層密盆，於內外塑膠密盆夾縫間化蛹（圖 1），將收集的蛇蛹另以密盆裝盛，置放於繁殖網室內（長 3 m × 寬 2 m × 高 1.8 m）。準備珍珠板置於繁殖室的置物架（長 60 cm × 寬 45 cm × 高 90 cm）上以便收集蛇卵，珍珠板先以 75% 酒精擦拭及噴灑，以減少微生物污染，待成蟲羽化交尾後，雌蛇將會在珍珠板上產卵。收集的水蛇卵團以塑膠容器（直徑 9 cm × 高 9 cm）保存，水蛇卵團再置於生長箱內孵化，完成世代循環飼養。

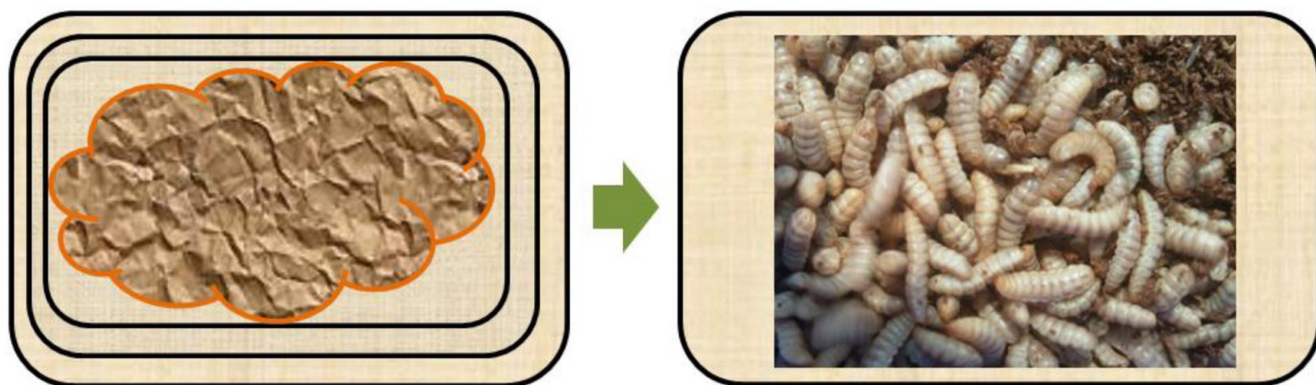


圖 1. 雙層塑膠盆培養示意圖。左：雙層塑膠密盆飼養，右：取出內盆，蛇蛹即在盆內。

Fig. 1. The diagram of double plastic pot culture. Left: double plastic pot culture; Right: take out the inner pot, the prepupa was in the pot.

II. 試驗材料採樣和處理設計

在畜產試驗區北區分所乳牛場採集經固液分離之乳牛糞 (CM) 固形物樣本，乳牛糞樣立即分裝做為飼料基質使用或保存於 -20 °C 冰箱備用。準備經酒精擦拭過的塑膠杯，每杯裝填 142 公克乳牛糞，加入滅菌飼料配方飼養 10 天的黑水虻幼蟲 2.84 公克 (約 142 隻)，以 32 目白色塑膠網蓋在塑膠杯上，避免被其它生物入侵污染，將塑膠杯放入直立式生長箱內養殖 5 天後，過篩將虻糞 (乳牛糞殘餘物) 和幼蟲分開，虻糞 (F) 採樣後，置於離心管備用，計 3 重覆 (圖 2)。



圖 2. 試驗設計。乳牛糞和虻糞收集條件。左：乳牛糞，中：乳牛糞和幼蟲放入培養容器，右：虻糞。

Fig. 2. Experimental design. Cow manure and frass collection conditions. Left: cow manure; Middle: cow manure (142 g) and larvae (2.84 g) in breeding containers; Right: frass.

III. 乳牛糞和虻糞之微生物總體基因體萃取與分析

乳牛糞樣品和虻糞樣品，每重覆收集 0.2 g 置於 2 mL 離心管，以 Genomic DNA Kit (Qiagen, Inc) 萃取套組，萃取基因組 DNA 10 µg，由圖爾斯生物科技股份有限公司利用聚合酶鏈反應增幅細菌的 16S 核糖體基因 (rDNA) 序列的第三至第四變異區，採用的引子組序列如下：16s_illumina_V3F 引子：(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') 及 16s_illumina_V4R 引子：(5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')，進行 PCR 增幅反應，所增幅細菌菌群的 16S rDNA 序列，在 Illumina NovaSeq 6000 定序平臺將 DNA 樣品建庫定序及菌相資訊統計分析，針對不同樣品之間的微生物群落組成做差異分析比較。根據物種註釋及操作分類單元 (operational taxonomic units, OTUs) 豐度資訊，將相同分類的 OTUs 資訊合併處理得到物種豐度表，根據每個樣品的計數量化樣品之間的成分差異的統計量 (Moore, *et al.*, 2017)。

結果與討論

I. 樣品菌相初步分析

本研究自乳牛糞和虻糞樣品中共獲得約 35,041,113 與 33,941,858 鹼基對 (bp)，72,027 和 62,530 條 OTUs，經由 Illumina NovaSeq 6000 定序所得之結果，經生物資訊分析後，共發現 612 個細菌的 16S rDNA 序列片段，分別於乳牛糞得到 417 個序列，虻糞得到 522 個序列，其在各生物分類階層的相對豐度概觀，不同菌分類群在不同生物分類階層由不同顏色顯示，菌分類群比例以條帶的長度顯示，不同生物分類階層間顏色並無相關性，2 樣品之菌分類群比例在科級的分類階層有顯著差異增加，可能由於乳牛糞經幼蟲改質後，受幼蟲帶有的菌群影響，造成菌分類群及其比例的差異在屬級和種級的分類階層更為顯著 (圖 3)。黑水虻幼蟲能在不同種類的基質環境生長，被認為其自身帶有相伴共生的核心菌群 (Klammsteiner *et al.*, 2020)，並非單純的以乳牛糞中原有的菌種去進行應用，來達到營養轉化的目的，這點從種級分類階層的菌種豐度不同即可看出差異。

II. 乳牛糞的菌相分析

乳牛糞所含的細菌 16S rDNA 序列，經生物資訊分析後，得到共 417 個 16S rDNA 序列片段，隸屬於 16 門、29 綱、53 目、93 科和 282 屬，其細菌種類鑑定與分布變化，在門的分類層級，以擬桿菌門、厚壁菌門和變形菌門 3 者占 90.1% 的豐度，分別為 42.7、32.2% 和 14.9%；在綱的分類層級，以擬桿菌綱、梭菌綱和丙型變形菌綱 3 者占 77.0% 的豐度，分別為 32.1、31.2 和 13.7%；在目的分類層級，以擬桿菌目、芽孢桿菌目和假單胞菌目 3 者占 73.8% 的豐度，分別為 32.1、31.2 和 10.5%；在科的分類層級，以紫單胞菌科、毛螺菌科、莫拉氏菌科、瘤胃菌科和擬桿菌科 5 者占 59.6% 的豐度，分別為 11.3、11.1、10.1、9.8、9.6 和 7.7%；在屬的分類層

級，以不動桿菌屬的豐度最高，占 10.1%，其它無法鑑定屬別，且豐度在 5% 以上的有 5 個，占 38.9% 的豐度，5-7N15 屬占 5.6% 的豐度；在種的分類層級，有 190 種類被鑑定出來，其中不動桿菌屬 (*Acinetobacter*) 的 *A. lwoffii* 和 *A. johnsonii*，分別占 3.7% 和 2.8% 的豐度，其它無法鑑定種別，且豐度在 5% 以上的有 6 個，占 44.5% (圖 3)。

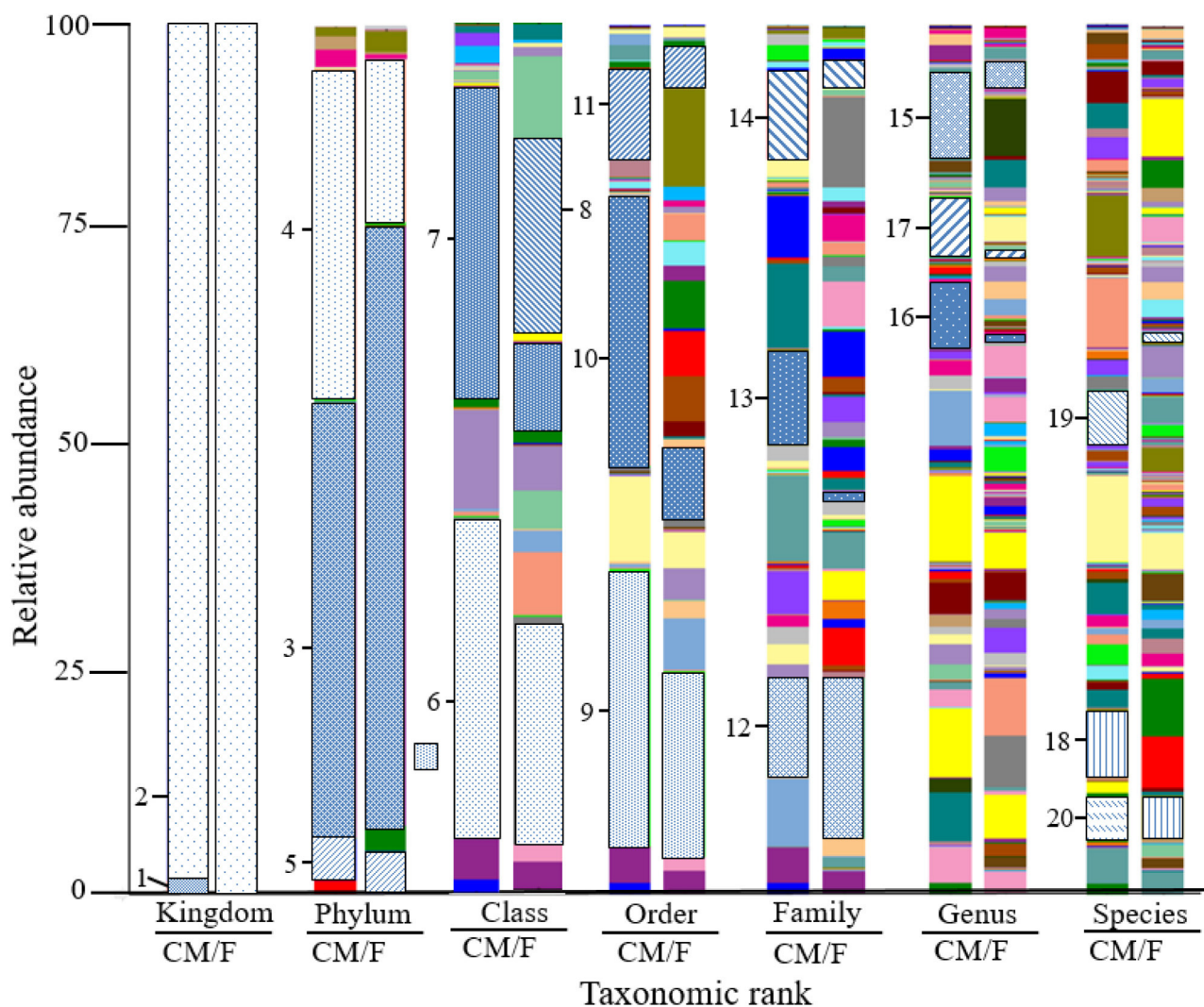


圖 3. 乳牛糞和蛇糞樣品菌群在生物分類階層的相對豐度概觀。僅列各分類階層前三優勢群。界：1：古菌界，2：細菌界；門：3：擬桿菌門，4：厚壁菌門，5：變形菌門；綱：6：擬桿菌綱，7：梭菌綱，8：丙型變形菌綱；目：9：擬桿菌目，10：真細菌目，11：假單胞菌目；科：12：紫單胞菌科，13：毛螺菌科，14：莫拉氏菌科；屬：15：不動桿菌屬，16：瘤胃菌科未鑑定屬，17：梭菌類群未鑑定屬，種：18：紫單胞菌科未鑑定種，19：5-7N15 屬未鑑定種，20：毛螺菌科未鑑定種。

Fig. 3. Overview of the relative abundance of mycobiota in the taxonomic rank of dairy cow manure and frass samples. List only the top three dominant groups of each taxonomic rank. Kingdom: 1: Archaea, 2: Bacteria; Phylum: 3: Bacteroidetes, 4: Firmicutes, 5: Proteobacteria, Class: 6: Bacteroidia, 7: Clostridia, 8: Gammaproteobacteria; Order: 9: Bacteroidales, 10: Clostridiales, 11: Pseudomonadales, Family: 12: Porphyromonadaceae, 13: Lachnospiraceae, 14: Moraxellaceae; Genus: 15: *Acinetobacter*, 16: *Ruminococcaceae_unclassified*, 17: *Clostridiales_unclassified*, Species: 18: *Porphyromonadaceae_unclassified*, 19: *5-7N15_unclassified*, 20: *Lachnospiraceae_unclassified*.

III. 蛇糞的菌相分析

蛇糞所含的細菌 16S rDNA 序列，經生物資訊分析後，得到共 522 個序列片段，隸屬於 17 門、33 綱、63 目、129 科和 311 屬，其細菌種類鑑定與分布變化，在門的分類層級，以變形菌門、擬桿菌門和厚壁菌門 3 者占 93.5% 的豐度，分別為 45.8、37.4 和 10.3%；在綱的分類層級，以擬桿菌綱、丙型變形菌綱、甲型變形菌綱、梭

菌綱、乙型變形菌綱和黃桿菌綱 6 者占 79.4% 的豐度，分別為 21.2、18.3、18.2、8.2、7.6 和 5.9%；在目的分類層級，以擬桿菌目、異單胞菌目、芽孢桿菌目、黃桿菌目、鞘脂單胞菌目、紅細菌目和根瘤菌目和假單胞菌目 7 者占 62.3% 的豐度，分別為 21.2、11.2、8.2、5.9、5.5、5.2 和 5.1%；在科的分類層級，以紫單胞菌科、異單胞菌科、紅細菌科和鞘脂單胞菌科 4 者占 39.1% 的豐度，分別為 18.4、10.3、5.2 和 5.2%；在屬的分類層級，以嗜蛋白菌屬、纖維弧菌屬和紫單胞菌屬 3 者占 19.0% 的豐度，分別為 6.6、6.5 和 5.9%；在種的分類層級，有 183 種類被鑑定出來，其中菌種豐度在 5% 以上，只有 *Proteiniphilum acetatigenes* 和嗜硫石單胞菌 (*Petrimonas sulfuriphila*)，豐度分別為 6.6 和 5.9%，其它無法鑑定種別，且豐度在 5% 以上的只有 *Cellvibrio* 屬，占 6.6% (圖 3)。蛇糞因含有多樣的菌種，被認為若施用到田間，能改變土壤微生物群落，傾向於增加微生物活性和作物產量，能為環境健康帶來正向的影響，是對作物生產和環境安全可持續性的選項 (Fuhrmann *et al.*, 2022; Praeg and Klammersteiner, 2024)。

IV. 蛇糞中與乳牛致病性相關之細菌消長變化

與未經黑水蛇幼蟲處理的原始乳牛糞樣品相比，蛇糞含有可能造成牛致病的菌種，比例下降的共有 13 種，其中屬於厭氧性梭菌科 (*Clostridiaceae*) 的 80% 菌種明顯降低，此類絕對厭氧菌，會產生多種外毒素 ($\alpha\beta\gamma$ 等 12 種)，導致食物中毒及壞疽，可引起牛羊與人類致死性腸毒血症。解沒食子酸鏈球菌 (*Streptococcus gallolyticus*) 舊稱牛鏈球菌 (*Streptococcus bovis*)，屬革蘭氏陽性球菌，在乳牛糞占比為 6.1‰，在蛇糞中下降了 30 倍，此類細菌多數是在人和動物表皮、呼吸道和胃腸道等處的共生菌 (commensal flora)，有相當數量的致病菌種。彎曲桿菌 (*Arcobacter*) (Yesilmen, *et al.*, 2014) 在乳牛糞占比為約 4‰，在蛇糞下降約 50%，其可在患乳房炎牛的乳汁被分離出來，一般能引起發燒發熱和造成體溫過高，會增加呼吸速率、喘息、呼吸速迫和呼吸過度，造成心搏過速、速脈和心跳速率增加，乳腺和乳房疼痛或皮膚叩診下陷或凹下去的地方恢復遲鈍等症狀，屬人畜共通傳染病。志賀菌 (*Shigella*) 在乳牛糞占比為約 5.8‰，在蛇糞下降了 21 倍 (表 1)，是一種革蘭氏陰性細菌，會污染食物或飲水，引發食物中毒，志賀菌引起之感染，限於腸胃道，很少侵入血液，會破壞腸細胞造成潰瘍，特徵是出血性腹瀉，癒合後形成疤痕，可能會導致腸阻塞。

表 1. 蛇糞含有的乳牛致病菌比例下降的菌種

Table 1. Species with a reduced proportion of dairy cow pathogenic bacteria contained in frass

strain	CM* (%)	F** (%)
Bacteria;Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Prevotellaceae;Prevotella_9;Prevotella_9_unclassified	6.25E-05	4E-05
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Streptococcaceae;Streptococcus;Streptococcus_gallolyticus_subsp.	0.006183	0.0002
Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Clostridiaceae_1;Clostridium_sensu_stricto_1;Clostridium_sensu_stricto_1_unclassified	0.001499	8.01E-05
Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Clostridiaceae_1;Clostridium_sensu_stricto_1;uncultured_bacterium	0.004622	0.00044
Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Clostridiaceae_1;Clostridium_sensu_stricto_3;uncultured_bacterium	0.012554	8.01E-05
Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Ruminococcaceae;Eubacterium_coprostanoligenes_group;uncultured_Clostridium_sp.	0.001499	8.01E-05
Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae;Lachnoclostridium;uncultured_Clostridiales_bacterium	0.000312	0.00016
Bacteria;Fusobacteria;Fusobacteriia;Fusobacteriales;Fusobacteriaceae;Fusobacterium;Fusobacterium_varium	0.000312	0.0002
Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Brucellaceae;Brucellaceae_unclassified;Brucellaceae_unclassified	0.000125	8.01E-05
Bacteria;Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacteriales;Campylobacteraceae;Arcobacter;Arcobacter_unclassified	0.003685	0.001721
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Enterobacteriales;Enterobacteriaceae;Escherichia_Shigella;Escherichia_Shigella_unclassified	0.005871	0.00028
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Enterobacteriales;Enterobacteriaceae;Proteus;Proteus_mirabilis	0.009993	0.001481
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Pseudomonadaceae;Pseudomonas;Pseudomonas_unclassified	0.01118	0.001801

* CM: cow manure; ** F: frass.

而在與未經黑水蛇幼蟲處理的原始乳牛糞樣品相比，蛇糞含有可能造成牛致病的菌種，比例上升的共有 9 種，大部分菌種上升幅度都不高。僅梭菌屬的 *Christensenellaceae_R_7_group* (Morotomi *et al.*, 2012) 有 85 倍上升，占比約為 0.25‰，同屬於梭菌屬的 *Proteiniclasticum* (Zhang *et al.*, 2010) 有 1.8 倍上升，占比約為 0.01‰，這 2 菌種是否屬機會性致病菌，則需進一步試驗探討 (表 2)。本研究在蛇糞分析僅得到少量的大腸桿菌與沙門氏菌，分別為 5 和 1 個片段，占總鑑定數量的 0.007% 和 0.001%，其中大腸桿菌在乳牛糞中的鑑定數量為 113 個片段，顯示菌種數量在經過處理操作後有減少的趨勢 (Liu *et al.*, 2008)，在應用黑水蛇幼蟲處理雞糞時也有相似的情況 (Erickson *et al.*, 2004)，但沙門氏桿菌卻沒有在乳牛糞中被鑑定到，可能因其它微生物的抑菌物質或抗生素影響，導致沙門氏菌沒被檢測到，但在蛇糞中卻有存在少量，顯示黑水蛇幼蟲的消化道中確有沙門氏菌的存在，只是在菌種數量上的占比較少。

表 2. 蛇糞含有的乳牛致病菌比例上升的菌種

Table 2. Species with an increased proportion of dairy cow pathogenic bacteria contained in frass

strain	CM* (%)	F** (%)
Bacteria;Actinobacteria;Actinobacteria;Corynebacteriales;Corynebacteriaceae;Corynebacterium;Corynebacterium_unclassified	6.25E-05	0.0002
Bacteria;Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Porphyromonadaceae;Porphyromonadaceae_unclassified;Porphyromonadaceae_unclassified	6.25E-05	0.000761
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Streptococcaceae;Streptococcus;uncultured_bacterium	0	4E-05
Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Christensenellaceae;Christensenellaceae_R_7_group;Clostridium_sp.	0.00025	0.021294
Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Clostridiaceae_1;Proteiniclasticum;Clostridium_sp.	0.008557	0.01521
Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Brucellaceae;Pseudochrobactrum;uncultured_bacterium	0	8.01E-05
Bacteria;Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacteriales;Campylobacteraceae;Campylobacter;Campylobacter_sp.	6.25E-05	0.009887
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Pseudomonadaceae;Pseudomonas;Pseudomonadaceae_bacterium_X2	0.000125	0.0002
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Pseudomonadaceae;Pseudomonas;Pseudomonas_formosensis	0.001062	0.008326

* CM: cow manure; ** F: frass.

結 論

本研究針對乳牛糞和蛇糞進行菌相初步調查，利用細菌 16S rDNA 序列比對方式，可以在不進行細菌培養情況下，大量地解析乳牛糞和蛇糞的細菌分類群，樣品中的菌種及其所占比例也可概觀呈現，牛的可能致病菌也可進一步地比對篩出，例如乳牛糞中含有普羅維登斯菌屬 (*Providencia*) 細菌占比約 1.3%，在蛇糞中占比僅 0.1%，這是一種革蘭氏陰性機會性病原菌，已知從各種環境和生物中都能分離到，由於此類病原菌會從糞便的接觸傳染或傷口傳染，造成人類免疫力低下的，個體有腹瀉 (diarrhea) 的病徵，嚴重時可能會造成菌血症 (bacteremia)，透過本研究可知，應用黑水虻幼蟲處理乳牛糞轉質為蛇糞，可改變原本乳牛糞中的可能致病菌群種類和數量，使大多數的致病菌群具有明顯地下降，但仍有少部分機會型病原菌存在且數量增加，使產生的終產物蛇糞，在與下游農業或產業銜接應用時，對操作管理人員造成潛在的衛生安全風險，因此仍應對蛇糞增加滅菌操作，降低管理操作人員潛在的感染風險，也應考慮教育現場作業人員具有良好衛生安全風險觀念，本研究仍有許多微生物種類未能完成鑑別，及黑水虻幼蟲在其它畜禽糞管理上的病原菌生態仍屬未知，這些都有待更進一步地科學論證分析，期許未來能有更多相關的研究成果探討不同原料來源的蛇糞的衛生安全性。

誌 謝

本研究承農業部 (108 農科 -17.2.1- 畜 -L2) 經費支持。試驗期間畜產試驗所北區分所邱家和同仁協助樣品準備和試驗工作，國立中興大學生命科學系博士後謝儒樑研究生協助資料分析，始克順利完成，謹此誌謝。

參考文獻

- 行政院農業委員會。2021。農業統計年報。pp. 118。臺北市。
- 行政院農業委員會畜產試驗所。2010。畜禽糞尿及其成分。行政院農業委員會畜產試驗所推廣專輯第 141 號。pp. 20-24。臺南市。
- 林財旺。1998。優良畜禽糞堆肥製作。臺灣省畜產試驗所四十週年所慶畜牧經營及廢棄物處理研討會論文專輯。臺灣省畜產試驗所編印。pp. 23-32。臺南市。
- 梁世祥、蕭宗法。2014。新型畜禽有機資源物循環利用方式。畜產專訊 90：8-9。
- 羅致逯。2015。堆肥中人畜共通致病菌之管理簡介。農政與農情 273：93-95。
- Beesigamukama, D., B. Mochoge, N. K. Korir, K. K. M. Fiaboe, D. Nakimbugwe, F. M. Khamis, S. Subramanian, T. Dubois, M. W. Musyoka, S. Ekesi, S. Kelemu, and C. M. Tanga. 2020. Exploring black soldier fly frass as novel fertilizer for improved growth, yield, and nitrogen use efficiency of maize under field conditions. *Front. Plant Sci.* 11: 574-592. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.574592>.
- Boccazzi, I. V., M. Ottoboni, E. Martin, F. Comandatore, L. Vallone, T. Sprangers, M. Eeckhout, V. Mereghetti, L. Pinotti, and S. Epis. 2017. A survey of the mycobiota associated with larvae of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) reared for feed production. *Plos One* 12: e0182533. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182533>.

- Cullere, M., G. Tasoniero, V. Giaccone, R. Miotti-Scapin, E. Claeys, S. De Smet, and A. Dalle Zotte. 2016. Black soldier fly as dietary protein source for broiler quails: apparent digestibility, excreta microbial load, feed choice, performance, carcass and meat traits. *Animal* 10: 1923-1930. [https://doi: 10.1017/S1751731116001270](https://doi.org/10.1017/S1751731116001270).
- de Smet, J., E. Wynants, P. Cos, and L. V. Campenhout. 2018. Microbial community dynamics during rearing of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) and its impact on exploitation potential. *Appl. Environ. Microbiol.* 84: e02722-17. [https://doi: 10.1128/AEM.02722-17](https://doi.org/10.1128/AEM.02722-17).
- Erickson, M., J. Liao, and M. Doyle. 2004. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* enterica serovar enteritidis in chicken manure by larvae of the black soldier fly. *J. Food Protect.* 67: 685-690.
- FAO. 2013. Edible insects. Future prospects for food and feed security. Food and agriculture organization of the united nations. pp. 201. Rome, FAO. <http://www.fao.org/3/i3253e/i3253e.pdf>.
- Fuhrmann, A., B. Wilde, R. F. Conz, S. Kantengwq, M. Konlambigue, B. Masengesho, K. Kintche, K. Kassa, W. Musazura, L. Späth, M. Gold, A. Mathys, J. Six and M. Hartmann. 2022. Residues from black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae rearing influence the plant-associated soil microbiome in the short term. *Fornt. Microbiol.* 13: 2022.994091. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.994091>.
- Klammsteiner, T., A. Walter, T. Bogataj, C. D. Heusster, B. Stres, F. M. Steiner, B. C. Schlick-Steiner, W. Arthofer, and H. Insam. 2020. The core gut microbiome of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae raised on low-bioburden diets. *Fornt. Microbiol.* 11: 993. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00993/full>.
- Liu, T., M. K. Awasthi, H. Y. Chen, Y. Duan, S. K. Awasthi, and Z. Q. Zhang. 2019. Performance of black soldier fly larvae (Diptera: *Stratiomyidae*) for manure composting and production of cleaner compost. *J. Environ. Manage.* 251: 109593. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479719313118>.
- Liu, Q. L., J. K. Tomberlin, J. A. Brady, M. R. Sanford, and Z. N. Yu. 2008. Black soldier fly (Diptera: stratiomyidae) larvae reduce *Escherichia coli* in dairy manure. *Environ. Entomol.* 37: 1525-30.
- Moore, S. G., A. C. Ericsson, S. E. Poock, P. Melendez, and M. C. Lucy. 2017. Hot topic: 16S rRNA gene sequencing reveals the microbiome of the virgin and pregnant bovine uterus. *J. Dairy Sci.* 100: 4953-4960.
- Morotomi, M., F. Nagai, and Y. Watanabe. 2012. Description of *Christensenella minuta* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, which forms a distinct branch in the order Clostridiales, and proposal of *Christensenellaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 144-149.
- Oonincx, D. G. A. B., A. van Huis, and J. J. A. van Loon. 2015. Nutrient utilisation by black soldier flies fed with chicken, pig, or cow manure. *J. Insects as Food Feed* 1: 131-139. [https://doi: 10.3920/JIFF2014.0023](https://doi.org/10.3920/JIFF2014.0023).
- Praeg, N, and T. Klammsteiner. 2024. Primary study of frass fertilizers from mass-reared insects: species variation, heat treatment effects, and implications for soil application at laboratory scale. *J. Environ. Manage.* 356: 120622. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120622>.
- Sheppard, D. C., J. K. Tomberlin, J. A. Joyce, B. C. Kiser, and S. M. Sumner. 2002. Rearing methods for the black soldier fly (Diptera: *Stratiomyidae*). *J. Med. Entomol.* 39: 695-698.
- Shumo, M., F. M. Khamis, F. L. Ombura, C. M. Tanga, K. K. M. Fiaboe, S. Subramanian, S. Ekesi, O. K. Schlüter, A. van Huis, and C. Borgemeister. 2021. A Molecular survey of bacterial species in the guts of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) reared on two urban organic waste streams in Kenya. *Front. Microbiol.* 12: 687103. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.687103>.
- Tomberlin, J. K., D. C. Sheppard, and J. A. Joyce. 2002. Selected life-history traits of black soldier flies (Diptera: *Stratiomyidae*) reared on three artificial diets. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95: 379-386.
- Yesilmen S., A. Vural, M. E. Erkan, and I. H. Yildirim. 2014. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Arcobacter* species in cow milk, water buffalo milk and fresh village cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 188: 11-14.
- Zhang, K., L. Song, and X. Dong. 2010. *Proteiniclasticum ruminis* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic proteolytic bacterium isolated from yak rumen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 2221-2225.

An investigation of the mycobiota of the daily cow manure and black soldier fly frass ⁽¹⁾

Shih-Hsiang Liang ⁽²⁾⁽⁴⁾ Chia-Xin Lee ⁽³⁾ and Szu-Han Wang ⁽³⁾

Received: Aug. 3, 2022; Accepted: Sep. 16, 2024

Abstract

In this study, the cow manure after solid-liquid separation was used as the feeding substrate for the larvae of black soldier fly. The residues of cow manure transformed by larvae namely frass were investigated. The difference between changes in mycobiota composition and daily cow manure was adopted to evaluate the hygienic safety of treating frass produced from daily cow manure using the larvae of black soldier fly, through the changes of growth and decline in microorganism of daily cow manure and frass. A total of 35 and 34 million base pairs was collected from dairy cow manure and frass samples, with 72,027 and 62,530 operational taxonomic unit, respectively. The heterogeneity of sample forming proportion in the taxonomic stratum increased eventually, resulting in more distinct diversity in the classification of genus and species. Compared with the Mycobiota in daily cow manure, there are 13 species of bacteria in frass that could decrease the proportion of bovine pathogens opposite and 9 species of bacteria in frass increase the proportions of bovine pathogens. However, the infection of such bacteria was not high and whether the species of *Clostridium* being the pathogens requires further investigation. The results showed a small amount of bovine pathogenic bacteria in the frass and in spite of the small proportion, hygienic and safe operation of dairy cow manure should still be taken into consideration to avoid possible hazard caused by opportunistic pathogenic bacteria on the cows.

Key words: Cow manure, Frass, Black soldier fly, Mycobiota.

(1) Contribution No. 2802 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Ministry of Agriculture (MOA).

(2) Technical Service Division, MOA-TLRI, HsinHua, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Northern Region Branch, MOA-TLRI, Miaoli 36843, Taiwan, R. O. C.

(4) Corresponding author, E-mail: shliang@tlri.gov.tw.