

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24710034

研究課題名(和文) 家畜伝染病防除のための消石灰散布が生態系に及ぼす影響

研究課題名(英文) The influence on ecosystem by sprinkling slaked lime for prevention of domestic animal infectious diseases.

研究代表者

森 美穂 (MORI, Miho)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：70581031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：家畜伝染病が発生すると、消毒および防疫措置として大量の消石灰が畜舎やその周辺に散布される。本研究ではin vitroの実験系で消石灰の殺菌効果を検証するとともに、野外土壌上に様々な濃度の粉末状消石灰を散布し、生態系(主に微生物)に及ぼす影響を調査した。in vitroの実験系では、消石灰消毒が家畜伝染病予防には非常に効果的であることが示された。屋外の実験では、消石灰散布は微生物の生菌数には影響を及ぼさないが、土壌のpHとCa濃度は長期間経過後も高いままであることが示された。

研究成果の概要(英文)：When domestic animal infectious diseases occur, a large amount of slaked lime is sprinkled on cattle sheds and the surrounding for disinfection and prevention. In this study, we verified bactericidal effect of slaked lime in vitro experiment and investigated the influence on ecosystem (mainly microorganism) by sprinkling powder slaked lime of various density on the field soil. In vitro experiment, disinfection by slaked lime was shown to be very effective for prevention of domestic animal infectious diseases. Field experiment showed that sprinkling slaked lime did not influence on the number of living microorganism, but pH and calcium concentration of the soil were remaining high even after a long period elapse.

研究分野：環境微生物学

キーワード：消石灰 土壌微生物 殺菌 家畜伝染病 水酸化カルシウム

### 1. 研究開始当初の背景

鳥インフルエンザや口蹄疫などの家畜伝染病が発生すると、家畜伝染病予防法に基づき、消毒および防疫措置として大量の消石灰が畜舎やその周辺に散布される。消石灰はカルシウムの水酸化物で、強いアルカリ性を示す。用途としては、酸性化河川や土壌の中和処理、土壌改良剤、酸性ガスの除去、災害時の殺菌・消毒など身近に多用されているほか、歯科領域においては、水酸化カルシウムペーストとして口腔内への治療・充填剤としても用いられている。消石灰は安価で入手しやすく、大気中の二酸化炭素と反応して、最終的には無毒の炭酸カルシウムになるため、環境負荷が小さい化合物であると考えられている。しかし一方で、消石灰は毒物・劇物には指定されていないものの、人の皮膚に付着した場合、粘膜・皮膚を侵し、重篤な眼の損傷を引き起こすことや、過剰散布による周辺の植物の枯死や水生生物への悪影響なども報告されている。

農林水産省は、家畜伝染病が発生すると、感染施設とその周辺に 1 m<sup>2</sup>あたり 0.5~1.0 kg を目安に消石灰消毒するよう各都道府県に通達している(図1)。しかし実際は、特に気になるような所は多めに散布する、効果を持続させるために散布を複数回行うというような、非常にあいまいな方法で実施されており、散布量の上限は決められていない。また、伝染病を未然に防ぐため防疫上、非感染区域でも定期的に消石灰を散布する待ち受け消毒も行なわれている。人から人へと感染する新型インフルエンザが出現し、大流行してしまう深刻なリスク対策としては止むを得ないと考えられているが、これまで広範囲にわたって、高濃度の消石灰が環境中に散布されてきたにもかかわらず、散布濃度に明確な基準は存在しておらず、生態系に及ぼす影響について詳細な調査は行われていない。また、これまでの消石灰の殺菌濃度に関する報告は、実験室レベルで、対象とする菌も口腔内細菌、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、インフルエンザウイルスなど、病原性菌しか検討されておらず、土着微生物に対する影響に関する報告例は存在していない。

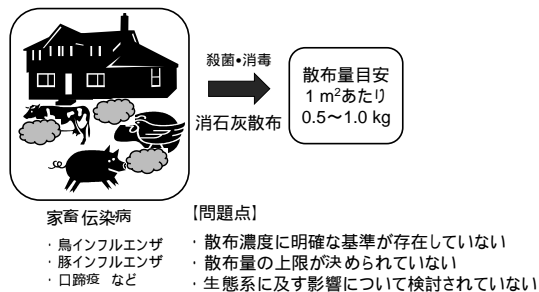


図1 消石灰散布量の目安と問題点

### 2. 研究の目的

家畜伝染病が発生すると、消毒および防疫措置として大量の消石灰が畜舎やその周辺

に散布される。これまで広範囲にわたって、高濃度の消石灰が環境中に散布されてきたにもかかわらず、散布濃度に明確な基準や上限は存在しておらず、生態系に及ぼす影響について詳細な調査は行われていない。本研究では実際に屋外の土壌上に様々な濃度の粉末状消石灰を散布し、微生物に及ぼす影響を経時的に調査する。同時に土壌環境から菌の単離を行い、それらの菌に対する消石灰の殺菌濃度についても検証する。得られた結果から、有害微生物防除に効果があり、生態系に影響が少ない適切な散布量の算出を試みる。

### 3. 研究の方法

#### (1) *in vitro*における消石灰の殺菌力測定

標準菌株と土壌単離菌を用いて飽和水酸化カルシウム溶液の試験管内における殺菌試験を行った。各菌液を 0~10 分間反応させ、反応後リン酸緩衝液 (pH 7.0) で中和と希釈を行った。その後、SCD 寒天培地上に 100  $\mu$ L 塗抹し、*Salmonella* 属菌は 28  $^{\circ}$ C で 2 日間培養、それ以外の株は 37  $^{\circ}$ C で 2 日間培養を行い培地上に現れたコロニー数を計測した。真菌に着目した殺菌試験は、反応時間 60 分、PDA 寒天培地で 28  $^{\circ}$ C、3 日間培養した以外は上記と同様の方法で実施した。また、土壌由来の微生物群を用いた殺菌試験では、pH はほぼ中性 (土壌 a:7.30、b:7.06、c:6.80) で水分量が異なる (土壌 a:16.0%、b:5.0%、c:3.5%) 3 箇所 of 土壌を用いて評価した。LB 寒天培地と土壌 1 g を用いたこと以外は上記と同様の方法で実施した。

家畜伝染病であるサルモネラ症を想定し、土壌存在下における消石灰の殺菌効果を *S. Typhimurium* NBRC 13274 を用いて検討した。殺菌効果の比較対象のために液体消毒剤として使用されているパコマ、クリアキル-100 (逆性石鹼)、動物用タナベゾール (オルソ剤) を用いた。土壌 60 g をガラスビンの中に入れ、0.85% 滅菌生理食塩水で約  $OD_{630} = 1.2$  に調製した培養液 250  $\mu$ L を土壌上に均一に散布した。次に、各ビンの土壌に液体消毒剤と消石灰 (アルカリ分 70%) をそれぞれの殺菌有効濃度になるように散布した。10 分、3 日、7 日後に滅菌生理食塩水 (消石灰を散布したビンでは 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) を使用) 200 mL で懸濁液を作製し、適宜段階希釈した。希釈液 100  $\mu$ L を ES サルモネラ寒天培地に塗抹し、37  $^{\circ}$ C で 1 日間培養後培地上に現れた黒色コロニー数を計測した。また、消石灰については最も効果がある散布量と方法を明らかにするために、500 g/m<sup>2</sup> と 1000 g/m<sup>2</sup> の濃度と水分量を組み合わせた系で同様の試験を行なった。

#### (2) 野外消石灰散布試験 (単回散布)

1 m 四方の土地に 0, 300, 500 および 1000 g/m<sup>2</sup> の濃度になるように消石灰を 1 回のみ散布し (図 2) 経時的に表面土壌と深さ 5 cm

の土壌（5 cm 土壌）のサンプリングを行い、pH測定およびR2A寒天培地を用いた微生物の生菌数測定を行った。

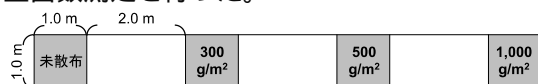


図2 消石灰単回散布地の濃度配置

### (3) 野外消石灰散布試験（複数回散布）

単回散布とは別の2 m四方の土地に上記(2)と同じ濃度で1週間ごとに繰り返して、計3回散布を行った(計0, 900, 1000, 1500, 3000 g/m<sup>2</sup> 散布)(図3)。経時的にサンプリングした表面土壌と5 cm 土壌は上記と同様の方法でpH測定および微生物の生菌数測定を行った。さらに、原子吸光度計を用いて交換性陽イオン(Na, Mg, K, Ca) 吸光度法による可給態リン酸およびアンモニア態窒素の測定も行った。

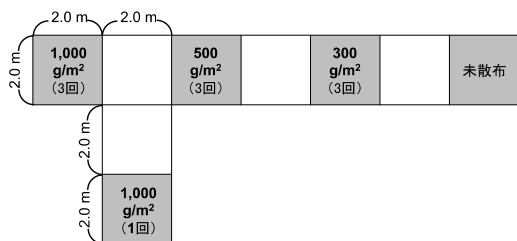


図3 消石灰複数回散布地の濃度配置

## 4. 研究成果

### (1) *in vitro*における消石灰の殺菌力測定

標準菌株と土壌単離菌を用いた殺菌力測定

一般的に殺菌試験に用いられている標準4細菌株を使用した水酸化カルシウムの試験管内における殺菌力測定では、*Staphylococcus aureus*を除いて10分以内に2 Log以上生菌数が減少しており、高い殺菌効果が認められた。感受性の高い順に並べると、*Escherichia coli* > *Bacillus subtilis* > *Pseudomonas aeruginosa* > *S. aureus*となった。また、*E. coli*は最も感受性が高く1分以内に検出下限に達した。また、家畜伝染病の豚コレラを想定した *Salmonella* Enteritidisと *S. Typhimurium*は共に1分以内に検出下限に達し、極めて高い感受性を示した。形態的特徴から優占種であると判断した土壌からの単離・同定細菌を用いた殺菌能力試験の結果、殺菌効果の感受性に大きな差異が認められた。また、真菌に対しても同様の試験系で殺菌効果を検証した結果、*Aspergillus niger*, *Candida albicans* および土壌単離真菌は1時間の処理後も1 Log未満の菌数の減少しかみられなかった。以上のことから、土壌細菌の優占種の中には水酸化カルシウムに対して感受性が高いものが存在しており、真菌は水酸化カルシウムに対して感受性が低いことが明らかとなった。

土壌由来微生物群を用いた殺菌力測定

土壌 a ( $9.7 \times 10^7$  から  $5.3 \times 10^7$  CFU/g) と土壌 b ( $5.3 \times 10^6$  から  $5.9 \times 10^6$  CFU/g) においては殺菌効果がみられなかったが、土壌 c ( $4.9 \times 10^6$  から  $3.1 \times 10^5$  CFU/g) においては1 Log程度の減少がみられた。また、真菌のみに着目して同様の試験系で殺菌効果を検証した結果、3つの土壌とも変化がみられないか、1 Log未満の菌数の減少であった。以上のことから、土壌が存在している状態では水酸化カルシウムの殺菌効果が減少する可能性が示唆された。

### 液体消毒剤と消石灰の殺菌効果の比較

殺菌有効濃度に調製した液体消毒剤は試験管内における殺菌試験で1分以内に検出下限に達することを確認した。消毒剤未散布の土壌と比べ、10分、3日、7日後の殺菌力測定において、パコマとクリアキル-100ではほとんど殺菌効果が認められず、消石灰が最も *S. Typhimurium* の生菌数を減少させた。また、消石灰濃度は500 g/m<sup>2</sup> よりも1000 g/m<sup>2</sup> 散布した時の方が殺菌効果は高く、1000 g/m<sup>2</sup> 散布の時のみ、水分が多いほど持続効果が高くなった。以上のことから、1000 g/m<sup>2</sup> の濃度で消石灰を散布後、十分に散水することが土壌上の殺菌には有効であることが示された。

### (2) 野外消石灰散布試験（単回散布）

土壌 pH の測定結果

土壌の pH は表面土壌、5 cm 土壌ともに消石灰散布土壌は未散布土壌と比較して高い値を示し、その差は時間が経過するにつれて大きくなる傾向がみられた。散布して1年3カ月経過後も未散布土壌と比較して0.2~1程度高い値を示した。

土壌微生物の生菌数測定結果

生菌数測定の結果、表面土壌、5 cm 土壌ともに、消石灰散布と未散布の間では各土壌中に存在する生菌数に差異は認められず、濃度による違いもみられなかった。

### (3) 野外消石灰散布試験（複数回散布）

土壌 pH の測定結果

複数回散布の場合も単回散布の結果と同様に、土壌の pH は表面土壌、5 cm 土壌ともに消石灰散布土壌は未散布土壌と比較して高い値を示し、5 cm 土壌ではその差は時間が経過するにつれて大きくなる傾向がみられた(図4と5)。散布して2年3カ月経過後も未散布土壌と比較して0.2~1程度高い値を示した。これらの結果より、消石灰を散布することで土壌はアルカリ性に傾き、長期間経過後も元の環境に戻っていないことが明らかとなった。

土壌微生物の生菌数測定結果

生菌数測定の結果、単回散布の結果と同様に、消石灰散布濃度による土壌中の生菌数に差異は認められなかった。

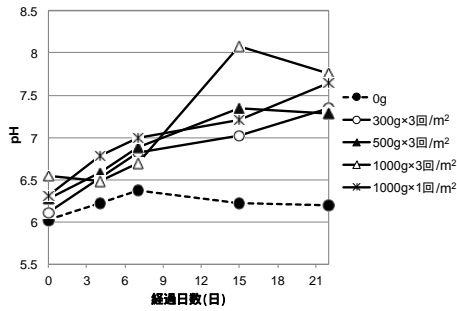


図4 消石灰複数回散布後の5 cm土壌のpH変化(短期間)

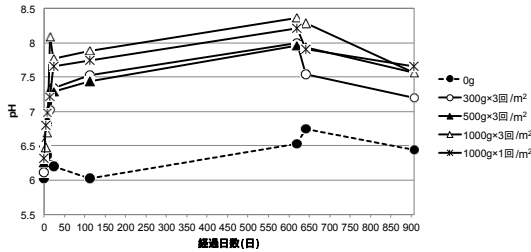


図5 消石灰複数回散布後の5 cm土壌のpH変化(長期間)

#### 陽イオンの変化

交換性陽イオン濃度の比較では未散布と比べて、Na, Mg, K に大きな変化は見られなかった。Ca に関しては散布土壌では高い数値を示し、総散布量が多いほど値が高い傾向がみられたが、大きな差はみられなかった。これは消石灰のほとんどが土壌中へイオン交換されずに表面に残っているためであると考えられる。散布後約600日以上経過後に300gを3回複数散布した場所のCaのみがコントロールと同程度まで濃度が低下した(図6)。可給態リン酸およびアンモニア態窒素についても未散布との違いは認められなかった。

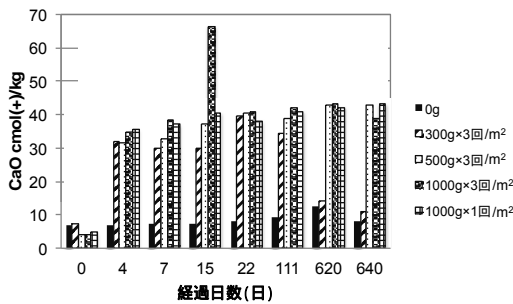


図6 交換性カルシウムの経時的変化

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

(1)南 純一、中村太郎、濱崎洋輔、坂上吉一、森 美穂：家畜伝染病防除で多用される消石灰散布の野外環境中での殺菌効果の検証と

土壤微生物への影響、日本生物工学会、2014年9月11日、札幌コンベンションセンター(北海道)

(2)南 純一、濱崎洋輔、坂上吉一、森 美穂：消石灰散布が土壤微生物に及ぼす影響、日本農芸化学会、2014年3月28日、明治大学生田キャンパス(神奈川)

(3)南 純一、濱崎洋輔、坂上吉一、森 美穂：消石灰散布が環境微生物に及ぼす影響、防菌防黴学会、2013年9月10日、千里ライフサイエンスセンター(大阪)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

森 美穂 (MORI Miho)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：70581031