短 報

過酸化カルシウム剤の土壤嫌気性菌
Clostridium 増殖抑制効果

白神伸江, 鈴木邦夫, 山口 勇

理化学研究所動物・細胞システム研究室

(平成3年3月28日受理)

Inhibitory Effect of Calcium Peroxide
on the Growth of *Clostridium*,
Anaerobic Soil BacteriaNobue SHIRAGAMI, Kunio SUZUKI
and Isamu YAMAGUCHIAnimal and Cellular Systems Laboratory,
The Institute of Physical and Chemical Research,
Hirosawa, Wako 351-01, Japan

Effects of calcium peroxide on the growth of anaerobic bacteria were investigated in terms of preventing fresh-water contamination by *Clostridium*. Calper® powder (35% CaO_2), a plant-growth regulator which produces oxygen gradually in soil, was used as the source of calcium peroxide. Filtrate of marsh sediments and the filtrate enriched with EG broth (an anaerobes-growth medium) were prepared as the media for the anaerobic bacteria tested. The number of *Clostridium butyricum* significantly decreased in inverse relation to the increase of oxidation-reduction potentials (ORP) in both media by the addition of calcium peroxide. The growth of *Corynebacterium* was also inhibited by the addition of calcium peroxide, but the number of *Corynebacterium* was larger in the EG broth than in the filtrate of marsh sediments. These results suggest that calcium peroxide inhibits the growth of anaerobic bacteria with an increase of ORP, and the effect is influenced by the amount of organic matter in a medium.

緒 言

日本では水鳥のボツリヌス菌によると思われる中毒症が夏期に各地で認められている¹⁾。最近、鉢須ら²⁾はカルガモの *Clostridium botulinum* type C1, および type D によるボツリヌス症例を報告している。ボツリヌス菌などの土壤嫌気性菌が湖沼において増加するメカニズムとしてはヘドロなどの有機物中で好気性菌が水温の上昇により増殖し酸素を消費するため、結果的に嫌気性菌の増殖しやすい環境が作られるものと考えられる。

嫌気性菌の増殖を抑制するひとつの方法としては溶存酸素レ

ベルを高めることが考えられる。著者らは植物成長調整剤として市販されている過酸化カルシウム (カルパー® 粉剤: CaO_2 含量 35%, 保土谷化学工業) をこれに応用することを試みた。過酸化カルシウムは次の反応式によって土壤中などで徐々に分解し、酸素を発生する。

本報では、嫌気性菌の発育抑制におよぼす過酸化カルシウムの効果を *in vitro* で検討し、湖沼汚染細菌とくに高温の続く夏季に異常増殖する *Clostridium* 属の浄化のための基礎的知見を得ることを目的とした。

実験方法

供試菌株は偏性嫌気性菌の *Clostridium butyricum* ATCC 14823 と通性嫌気性菌 *Corynebacterium* sp. 1 を用いた。理化学研究所敷地内の自然沼よりヘドロを採取し、ろ紙 (Watman No. 1) でろ過したものを培養基とした。培養基 1 l あたりに還元剤としてシステイン・HCl を 0.5 g, およびアスコルビン酸を 50 mg, さらに酸化還元指示薬としてレザズリン 1 mg をそれぞれ加え、酸素を含まない炭酸ガス下で嫌気性培地を作製し原水培地とした。この原水培地のほかに自然界の富栄養状態を想定して、嫌気性菌用培地である EG ブロス³⁾ 0.4 ml を原水培地 20 ml に加えた培地を作成した。それぞれの培地を 16×180 mm の試験管に 20 ml ずつ分注し、 $1.8 \times 10^7/\text{ml}$ の *C. butyricum* を 0.1 ml (最終濃度 $9 \times 10^4/\text{ml}$) 接種するとともに過酸化カルシウム (カルパー® 粉剤) を添加して 37°C でアルミキャップ栓をして好気静置培養した。*Corynebacterium* については原水培地と EG ブロス培地で培養した。カルパー® 粉剤の濃度は 0, 0.01%, 0.1%, 0.3%, 0.5% および 1% とし、24 時間後の菌数と培地の酸化還元電位を測定した。培地の製法および菌数測定は光岡³⁾の方法に準拠して行なった。酸化還元電位は ORP 複合電極 (堀場) により測定した。

結果および考察

はじめに原水培地および EG ブロス添加原水培地に過酸化カルシウム (カルパー® 粉剤) を添加したときの 24 時間後の酸化還元電位の変化を調べた。Fig. 1 に示すように、添加濃度の増加にともない酸化還元電位は原水培地および EG ブロス添加原水培地ともに増加がみられたが、EG ブロス添加原水培地の酸化還元電位は原水培地のそれに比べて常に高い値を示した。しかし、薬剤添加による培地の pH 変化を測定したところ、いずれも 6.78~6.98 の中性領域であり対照の無添加培地との差はみられず、本剤添加による培地の pH への影響は観察されなかった。

C. butyricum の増殖は、過酸化カルシウム剤の添加濃度の増加にともなって抑制され、培養 24 時間後の菌数が減少した。原水培地の場合はほぼ 0.3% 以上で発育抑制効果が現われたが、

Fig. 1 Effect of calcium peroxide on the growth of *Clostridium butyricum* ATCC14823 and oxidation-reduction potentials in media.

The dotted line indicates the number of inoculum. Symbols: ●, bacterial counts in sediment medium; ▲, bacterial counts in enriched sediment medium; ○, ORP in sediment medium; △, ORP in enriched sediment medium. Dose (%) indicates the concentration of Calper®, which contains 35% CaO_2 as active ingredient.

EG プロス添加原水培地の場合は 0.5%以上の添加濃度が必要であった。いずれも過酸化カルシウム剤添加濃度を 1% (CaO_2 として約 3.5 mg/ml) とした場合は菌の生存はまったく見られなかった (Fig. 1)。

一方、*Corynebacterium* に対する過酸化カルシウム剤の添加効果は、原水培地では *C. butyricum* の場合と同様菌の発育抑制が認められるが、EG プロスの場合は 5% でもかなり高い菌数が維持されていた。この場合も過酸化カルシウム剤添加濃度が 1% では菌の生存はまったく見られなかった (Fig. 2)。

以上のことより、過酸化カルシウムは酸化還元電位を上昇させて嫌気性菌の発育を抑制する効果を有することが明らかとなった。さらに EG プロスが含まれる培地における結果からみて、その効果は有機物量の影響を強く受けることも示唆された。有機物量が多いと酸化還元電位の上昇による *Clostridium* の抑制が著明にみられない原因についてはよくわからないが、酸素毒に対する細菌の解毒のためのエネルギー源が豊富であることに関係しているのかもしれない。自然の状態における *Clostridi-*

Fig. 2 Effect of calcium peroxide on the growth of *Corynebacterium* sp. 1.

Symbols: ●, bacterial counts in sediment medium; ▲, bacterial counts in EG broth. Inoculum size: around 10^3 /ml.

um の増殖はさらに微妙なバランスの上に成り立っていると想定され、一概にこれらのデータから自然状態における同菌の増殖に対する過酸化カルシウムの効果を推測することはできないが、その適用の可能性を示唆していると考えられる。

今後は、実際に湖沼において *Clostridium* が増殖している状態と類似の有機物量と酸化還元電位を *in vitro* で再現して実験を行なうとともに、ボツリヌス菌 (*C. botulinum*) に対する過酸化カルシウム剤の効果を検討する必要がある。また、カルパー®粉剤の徐々に溶解する性質を考慮した経時的な添加効果や溶存酸素レベルの測定によってその効果をよりいっそう明確にすることができるものとする。

本実験におけるカルパー®粉剤を供与いただいた保土ヶ谷化学工業株式会社に謝意を表す。

引用文献

- 1) 伊藤 武・斉藤香彦・坂井千三・田淵 清: 麻布大学獣医学部研究報告 **3**, 75 (1978)
- 2) 鉢須桂一・鴻巣 泰・松岡俊和・飯島雄二・今岡ミオ・鈴木 智・小山 香・大野矢泰則・宮沢一男・坂口玄二: 第110回日本獣医学会講演要旨集, p. 192, 1990
- 3) 光岡知足編: 腸内細菌学, 朝倉書店, 東京, 1990