

平成 21年 5月 22日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19780189

研究課題名 (和文) 変温下で農産物表面に形成されるバイオフィルムの特性把握と制御法の確立

研究課題名 (英文) Investigation of formational characteristics of bacterial biofilm on fresh agricultural produces under unsteady conditions

研究代表者

濱中 大介 (HAMANAKA DAISUKE)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：60399095

研究成果の概要：本研究は、農産物の表面に付着している微生物が形成するバイオフィルムについて、それらの形成防止・除去法の確立を最終目的として、基礎的な特徴把握を試みたものである。検討の結果、微生物の種や属の多寡により、形成パターンが変動すること、また、変動する温度環境下でバイオフィルムを形成させた場合、一定温度で形成した場合より付着レベルが高まることが明らかとなった。青果物の流通では、周辺環境が非定常状態となるが、このような条件は微生物的な品質も大きく低下させる危険性が高まることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	420,000	3,520,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業工学・農業環境工学

キーワード：バイオフィルム、変温環境、腐敗、品質、病原微生物

## 1. 研究開始当初の背景

生鮮農産物表面では、微生物は数種～数十種、あるいはそれ以上の微生物で構成されるバイオフィルムを形成し、熱、乾燥、薬剤等の外部ストレスに対して非常に高度な防御能力を獲得していることが近年明らかにされている。このようなバイオフィルムは、農産物に密着しており、薬剤や水洗浄処理で殺菌・除去することが非常に困難であるため、とくにサルモネラや大腸菌 0157 等の食性病原菌がバイオフィルムを形成していた場合、重大な食品事故を招くことも報告されている。バイオフィルムの形成や除去に関する既

往の研究では、単一微生物を栄養条件が比較的良好な培地を使用し、一定温度下でバイオフィルムを形成させた後、各種ストレスに対する抵抗性を検討する機会が多い。一方、実際の農産物流通過程では、このような理想的な定常環境となることは非常に稀であり、種々の環境条件、とくに保存温度が大きく変動するとともに、複数種の微生物が混在する非定常環境である。しかしながら、このような変温下におけるバイオフィルム形成と、その除去・制御法に関する報告は見受けられない。それゆえ、農産物表面に形成されるバイオフィルムを効果的に除去し得る方法の確

立と、温度変動下におけるバイオフィーム形成に関するデータ蓄積が生鮮農産物の微生物的安全確保上、極めて重要である。

## 2. 研究の目的

農産物表面に形成されるバイオフィームを効果的に除去できる殺菌方法の確立と、流通中での形成防止と品質保持を考慮に入れた保存条件を明らかにすることを最終目的とするが、具体的には、一定温度条件下での青果物由来微生物のバイオフィーム形成の特徴把握、変動温度条件下でのバイオフィーム形成の特徴把握、さらに、病原微生物のバイオフィーム形成の特徴把握を遂行するものである。

## 3. 研究の方法

### (1) 一定温度条件下での青果物由来微生物のバイオフィーム形成の特徴把握

福岡市内の量販店で購入したキュウリ果実をストマッカーによって磨砕し、標準寒天培地を用いて培養後、コロニーを単離した。単離した微生物はトリプチケースソイブロス (TSB) 培地を用い、ポリスチレン試験管内で種々の条件下で培養し、バイオフィームを形成させた。なお、栄養条件の違いによる影響を検討するため、TSB 濃度は数段階設定した。バイオフィーム形成能はクリスタルバイオレット (CV) 染色によって微生物を染色させた後、99.5%エタノールに懸濁させたときの 500nm の吸光度として評価した。また、実験に用いた微生物は、16S-rDNA の塩基配列の違いを利用した相同性判定により、属種を同定した。

### (2) 変動温度条件下でのバイオフィーム形成の特徴把握

実験サンプルには、福岡市内小売店で購入したキャベツおよびキュウリ果実を用い、サンプルをストマッカーによって滅菌蒸留水とともにホモジナイズした際の破砕液に含まれる微生物について、ポリスチレン表面へのバイオフィーム形成能を調査した。形成試験では TSB を培養培地とし、富栄養および貧栄養の 2 水準を設定した。培養温度は、30°C および 5°C を隔日変動させた。形成能および属種の同定については、上記 (1) と同様に、CV 染色後の吸光度評価および 16SrDNA 遺伝形質の違いを利用した相同性判定によった。

### (3) 病原微生物のバイオフィーム形成の特徴把握

実験には *Staphylococcus aureus* NBRC100910 および *Salmonella enterica* NBRC13245 を用いた。培養液は上記と同様に TSB を用い、貧栄養あるいは富栄養下でバイオフィーム形成能を調査した。また、培養温度は 5°C および 30°C の変動をいくつかの

パターンで組み合わせることで設定した。形成能の評価は上記と同様に CV 染色後の吸光度評価によった。

## 4. 研究成果

### 1) 一定温度条件下での青果物由来微生物のバイオフィーム形成の特徴把握

まず、青果物表面に付着している微生物のバイオフィーム形成能を把握するため、キュウリ果実より微生物を分離し、一定の培養温度において、栄養条件の違い (トリプチケースソイブロス濃度) と微生物の混合が形成能に及ぼす影響を検討した。その結果、バイオフィーム形成能は種類によって大きく異なり、単離した微生物 9 種のうち 2 種 (*Comamonas teststeroni*、*Pseudomonas oleovorans*) は強い形成能力を示した (図 1)。また、バイオフィームの形成は栄養条件が豊富な場合にのみ促進されるわけではなく、貧栄養下でも促進される種も存在することが明らかとなり、バイオフィーム形成に関する栄養要求性は微生物の種類に依存していると考えられた。さらに、微生物の混合培養がバイオフィーム形成に及ぼす影響を検討したところ、単独で強いバイオフィーム形成能を示した上記 2 種の混合培養では、バイオフィーム形成能はほとんど変化しなかった一方、単独培養において弱いバイオフィーム形成能を示した残りの 7 種の混合培養では、その形成能が増加する傾向を示した。

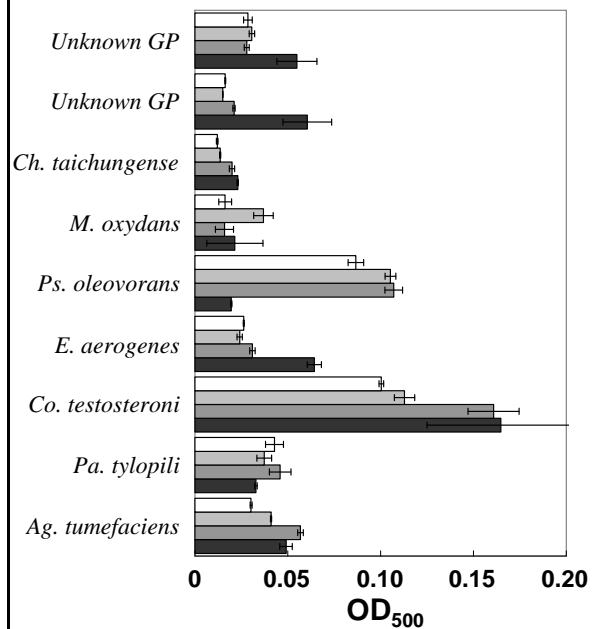


図 1 キュウリ果実より分離した微生物のバイオフィーム形成能に及ぼす培養液濃度の影響

■ : 100%, ■ : 5%, □ : 2%, □ : 1% (カタログ値を 100% としたときの TSB 濃度) GP はグラム陽性細菌を示している。

## 2) 変動温度条件下でのバイオフィーム形成の特徴把握

キュウリ果実由来微生物の場合、5°C一定温度では栄養条件の違いはバイオフィーム形成能に大きな影響を与えなかったものの、15、30°Cの一定温度での培養では、バイオフィーム形成能は富栄養よりも貧栄養条件で高まり、その値は約2倍となった(図2)。また、変温下でのバイオフィーム形成能は、15、30°Cの一定温度培養と同程度となることが明らかとなった(図3)。一方、キャベツ由来微生物では、栄養条件の相違がバイオフィーム形成能に及ぼす影響は認められなかった。しかしながら、温度を変動させた場合、5°Cから30°Cへの温度上昇時に急激なバイオフィーム形成能の増加が認められた。キャベツより検出された微生物は、キュウリ果実のものと比較すると、検出された属が多いことが特徴であった。キュウリ果実からは *Acinetobacter* 属や *Pseudomonas* 属が多く検出されたが、キャベツではこれらに加え、腸内細菌下の *Erwinia* 属や *Klebsiella* 属、*Pantoea* 属等、更にグラム陽性細菌の *Staphylococcus* 属も検出された。以上のことから、バイオフィーム形成の特徴の差は、構成する微生物叢の種類が多寡に影響されると考えられた。

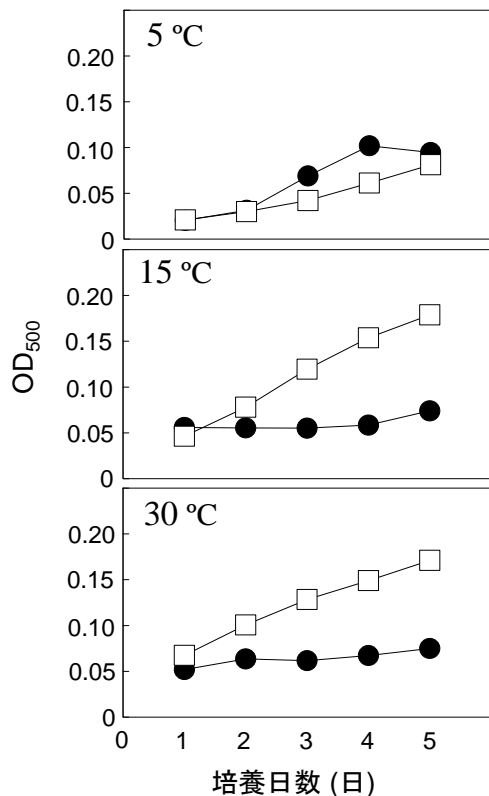


図2 キュウリ果実由来微生物のバイオフィーム形成能に及ぼす温度および培養液濃度の影響

● : 100%, □ : 5%  
(カタログ値を100%としたときのTSB濃度)

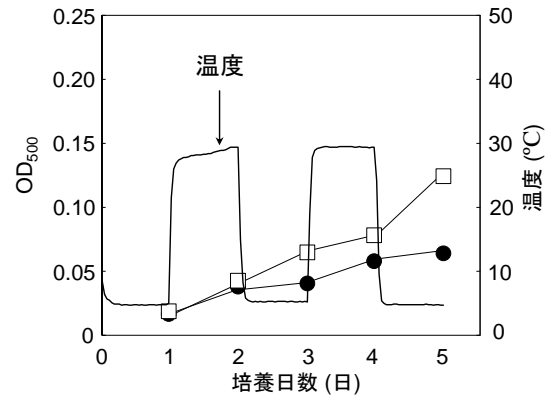


図3 キュウリ果実由来微生物のバイオフィーム形成能に及ぼす変動温度および培養液濃度の影響

● : 100%, □ : 5%  
(カタログ値を100%としたときのTSB濃度)

## 3) 病原微生物のバイオフィーム形成の特徴把握

温度変動がバイオフィーム形成に対して影響を及ぼすことが明らかとなったことから、病原微生物についても検討した。培養温度を5°Cおよび30°Cの変動をいくつかのパターンで組み合わせて検討したところ(図4)、5°Cから30°Cへ上昇させた場合は、30°C一定温度区と比較して、顕著な形成能の増加を示した。その後、培養温度を5°Cへ低下させたとしても形成能の低下は僅かであった(図5)。この傾向は供試した黄色ブドウ球菌とサルモネラ双方について同様であり、低温管理中の一時的な高温暴露はバイオフィーム形成を促進させる可能性があると考えられた。

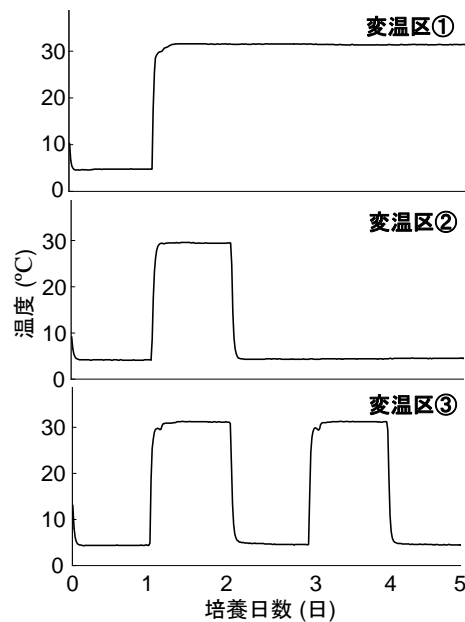


図4 バイオフィーム形成試験における温度条件

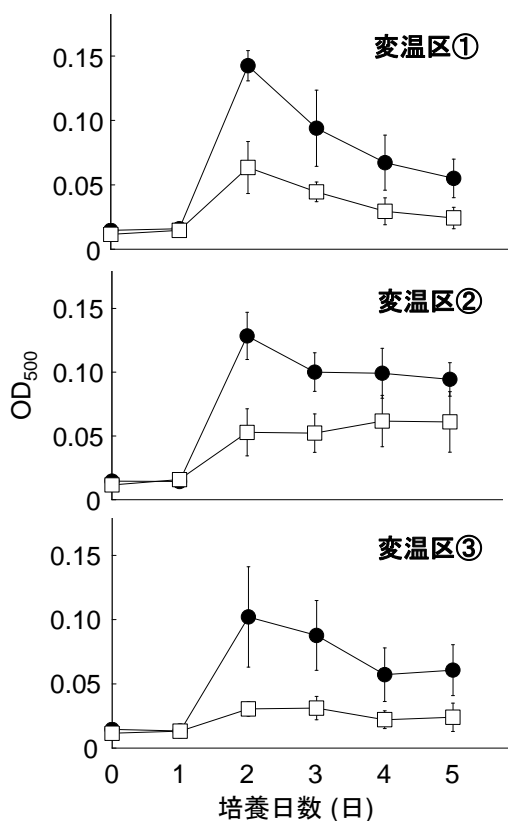


図5 変動温度条件での *Sal. enterica* のバイオフィーム形成能

● : 100%, □ : 5%  
(カタログ値を100%としたときのTSB濃度)

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

- ① D. Hamanaka, (1番目), 他3名, Study on biofilm formation of bacteria isolated from cucumber fruits, *Acta Horticulturae*, 746, 2007, 395-399.
- ② D. Hamanaka, (1番目), 他5名, Effect of culture condition on the adhesion of bacteria isolated from cucumber fruit, *Proc. Int' l Seminar on Agric. Struc. Agric. Eng.*, 2007, 130-135.
- ③ 濱中大介, 農産物付着微生物の計測, 分離, 同定法-遺伝子解析を利用した微生物属種の同定-, *農業機械学会九州支部誌*, 56, 2007, 41-44.
- ④ D. Hamanaka, (1番目), 他5名, Effect of fluctuating temperature on adhesion of bacteria related to fresh produce, *Acta Horticulturae*, 印刷中.
- ⑤ 濱中大介, (2番目), 他3名, 温度変動がサルモネラおよび黄色ブドウ球菌の表面付着に及ぼす影響, *防菌防黴*, 2009, 印刷中.

[学会発表] (計4件)

- ① D. Hamanaka, (1番目), 他5名, Effect of

fluctuating temperature on adhesion of bacteria related to fresh produce, *Asia-Pacific Symposium on Assuring Quality and Safety of Agri-Food (APS2008)*, 2008年8月4日, Bangkok, Thailand.

- ② 濱中大介, (3番目), 他4名, 培養条件が青果物から分離した微生物の表面付着能に及ぼす影響, *農業機械学会九州支部例会*, 2008年8月20日, 熊本県立大学.
- ③ 濱中大介, (2番目), 他3名, 変動温度条件がキュウリ果実に表在する微生物群のバイオフィーム形成に及ぼす影響, *農業機械学会九州支部例会*, 2008年8月20日, 熊本県立大学.
- ④ 濱中大介, (1番目), 他4名, 青果物付着微生物のバイオフィーム形成能に及ぼす培養条件の影響, *日本防菌防黴学会*, 2008年9月12日, 浜松市.

[図書] (計1件)

- ① 濱中大介, *カット野菜品質・衛生管理ハンドブック*, 第6章 品目別カット青果物の品質特性, *サイエンスフォーラム*, 2009, 124-128(全429ページ).

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱中大介 (HAMANAKA DAISUKE)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号: 60399095