

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580364

研究課題名(和文) 農産施設内の空中浮遊菌の殺菌に関する研究

研究課題名(英文) Study on disinfection of airborne microorganisms in postharvest facilities

研究代表者

小出 章二 (KOIDE, SHOJI)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：70292175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、農産施設内の空中浮遊菌の調査および殺菌を目的としたものである。はじめに、農産施設空間内の浮遊微粒子の粒子数や空中浮遊菌濃度を計測し評価した。次に、電気集じん装置は、種々の湿度の条件下で空中の微生物を集菌できることを示した。また光触媒溶液は、紫外線(UV-A)照射下で溶液内の生菌数を検出限界値以下まで減少できることを明らかとした。本研究では、上記した集菌・殺菌法を実際の農産施設内に応用することで、施設内の空中浮遊菌の集菌・殺菌を可能とした。

研究成果の概要(英文)：This study aims the assessment and disinfection of airborne microorganisms in postharvest facilities. In the first, concentrations of airborne particles and the populations of airborne microorganisms in a postharvest facility were assessed and evaluated. Next, we found that the electrostatic precipitator could collect microorganisms in the air under various relative humidity. It was also found that the photocatalyst solution under UV-A irradiation decreased the microbial populations in the solution to uncountable levels. Finally, the collection and disinfection of airborne microorganisms in postharvest facilities was indicated as possible, by application of above methods.

研究分野：ポストハーベスト工学

キーワード：農産施設 空中浮遊菌 殺菌 浮遊微粒子 電気集じん 光触媒 公衆衛生

1. 研究開始当初の背景

一般に、農産施設内はバイオエアロゾル(空中浮遊菌、ウイルス、花粉、ダニ等)が多く浮遊している。このなかで空中浮遊菌は、農産施設内の農産物の腐敗やカビ毒産生の原因ともなり、また浮遊微粒子および真菌やグラム陰性菌由来のエンドトキシンは作業員のアレルギー性疾患等の誘発の原因となる。よって、農産施設内の浮遊微粒子や空中浮遊菌の調査および公衆衛生学的評価は、農産物の安全性向上や労働環境改善の観点から社会的ニーズが高まるものと考えた。そこで、本研究では、農産施設内の浮遊微粒子および浮遊微生物の定点観測と季節依存性を測定することを立案した。

併せて、本研究では、農産施設内の空中浮遊菌の殺菌に着目した。現在、農産施設においてはウェットスクラバーやバクフィルター、サイクロンなどによる空気洗浄は行われているが、農産施設内の空中浮遊菌の殺菌装置は実用化されていない。そこで本研究では、研究代表者が開発した電気集じん装置および光触媒水中殺菌装置の応用展開を図ることとした。ここに電気集じんは、空中浮遊菌にマイナスイオンを帯電させ捕集する方法であり、光触媒水中殺菌は、空中浮遊菌をアパタイト被覆二酸化チタン光触媒水溶液(光触媒)の入ったインピンジャーに流入させ、UV-A ライトを照射して水中で殺菌する方法である。本研究では、これら装置の集菌・殺菌特性を明らかにするとともに、農産施設で実機試験を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究は「農産施設内の空中浮遊菌濃度調査」と「空中浮遊菌殺菌」の2つのテーマから構成される。本研究は、はじめに農産施設空間内の浮遊微粒子の粒径分布や粒子数および空中浮遊菌濃度(一般生菌・真菌)の定点観測や同定を行い、バイオエアロゾルリッチな農産施設内の公衆衛生学的評価を行うことを目的とした。次いで、大腸菌および枯草菌を用いて電気集じん処理および光触媒水中殺菌処理の殺菌特性を求めるとともに、電気集じん処理および光触媒水中処理を実際の農産施設内に導入し空中浮遊菌の殺菌を考究することを研究の目的とした。本研究を遂行することで農産施設内の農産物品質を高度に維持しながら、施設内の環境の保全、労働安全の確保が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 農産施設内の空中浮遊菌濃度調査

① 農産施設

農産施設内の浮遊微粒子および空中浮遊菌濃度の定点観測は岩手県内の青果物貯蔵庫を用いて2012年9月(稲収穫期)、11月(青果物収穫期)、2013年1月(貯蔵期間)に行った。図1に青果物貯蔵庫のレイアウトを示す。青果物貯蔵庫は農産施設内にあり、庫内

寸法は1200 mm × 7000 mm × 5500 mm (ドア側は1200 mm × 7000 mm × 6000 mm)である。流入口から吸入された空気は冷凍機で冷却され庫内上部のダクトにある吹出口から庫内に一定温度(5°C)で流入される(吸排気口風速: 3 m/s, 風量: 5184 m³/h)。庫内の定点観測は図1(b)に示すA点(地表高1.5 m)、庫外はB点(地表高1.5 m)とした。ここにB点は選果場内に位置する。農産施設は農場(稲・野菜・リンゴ生産)に面しており、施設の扉を開放すればフォークリフト等で青果物やリンゴの入庫が可能となる。

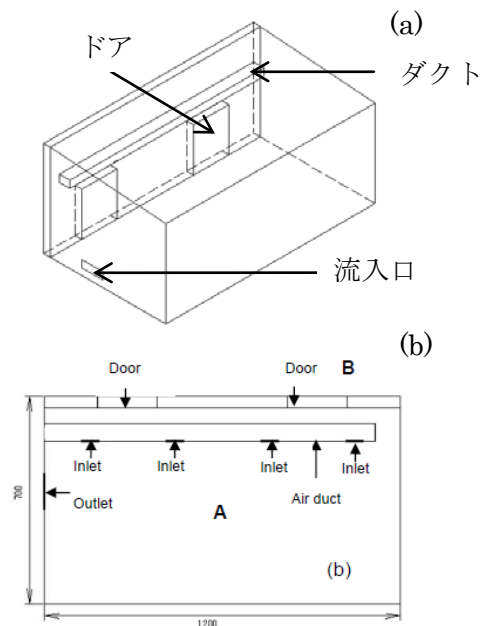


図1 青果物貯蔵庫の概略

② 浮遊微粒子・空中浮遊菌濃度の測定

青果物施設内外の空間中の粒子数と粒径分布を、パーティクルカウンター(KC-52, リオン社製)を用いて計測した。空中浮遊菌は、エアサンプラー(RCS エアサンプラー, Biotest社製)を用いTC培地とSDX培地に捕集し、一般生菌は35°Cで2日間、真菌は25°Cで5日間培養した。その後コロニー数をカウントし、空気1L中の微生物数を算定した。またSDX培地上に発生したコロニーは分子生物学的手法による同定に備え、スラントに分離し継代培養した。

③ 空中浮遊菌(真菌)の同定

青果物貯蔵施設内に存在した真菌を継代培養し、菌株の28S rRNA(カビ)遺伝子配列を増幅させ、direct sequencingにより塩基配列を決定後、同定した。

(2) 空中浮遊菌殺菌

① 電気集じん処理

図2に電気集じん装置の概略図を示す。実験前にドライイースト顆粒(ふっくらパンドライイースト, 日本製粉株式会社)をすりつぶし、篩で150 μm以下に濾した粉末20 gをガラス容器内に用意した。電気集じんリアク

タは同軸円筒型とし、アクリル管と線電極 (SUS304, 直径 1.0 mm)、円筒電極 (SUS304, 外径 100 mm, 厚さ 0.1 mm) により構成した。線電極はリアクタの中心軸上に配置し、電極間距離は 50 mm、装置の長さは 200 mm とした。線電極には直流高圧電源 (AKT-0100K05NS, 東和計測社製) を接続し、円筒電極はアースに接続した。

実験では、乾燥空気を流量計で流量 2 L/min に調整し、ガラス容器内 (スターラーにて攪拌) に流入した後、流入空気と混合させ、ドライイースト粉末 (以後、空中浮遊菌と称す) を飛散させた。これに加温式バブリング装置にて湿度調整した空気を混合させ、総流量 10 L/min となるように電気集じんリアクタに送り込んだ (図 2)。実験時間は 30 分間とし、実験終了後インピンジャー容器内溶液を適宜希釈し、これを PDA 培地に塗抹して培養し、出現したコロニー数を計測して希釈倍率から Log_{10} CFU/mL を算出した。

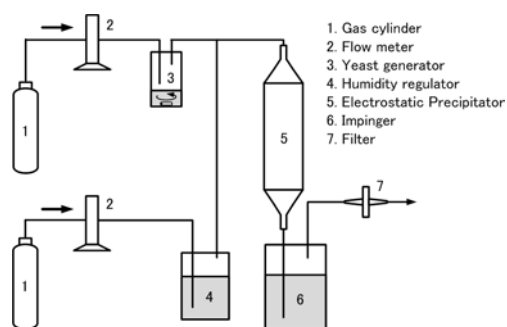


図 2 電気集じん装置の概略図

② 光触媒水中殺菌処理

供試菌株として大腸菌 (*Escherichia coli*) NBRC3301 と枯草菌 (*Bacillus subtilis*) NBRC3009 の 2 種の菌株を用いた。 *E. coli* は BHI 液体培地、 *B. subtilis* は NA 液体培地にて培養後、 10^8 CFU/mL の菌懸濁液を作成し、これを滅菌生理食塩水にて 10^5 CFU/mL となるようにビーカー内で希釈調整した。

次に、アパタイト被覆二酸化チタン光触媒 (Nanowave, NSP-P001) (以後、光触媒と称す) を濃度 15%, w/v となるように調整した後、ビーカー上面をラッピング用フィルムでシールした。その後、溶液の温度を 25°C に保ち攪拌しながら、以下 4 つの条件下で菌数の経時変化を測定した。すなわち、菌懸濁液 + 光触媒 + ブラックライト照射 (UVA 紫外線強度 0.8 mW/cm^2) (以下、光触媒区と記す)、菌懸濁液 + 光触媒 + 暗黒条件 (光触媒コントロール区と記す)、菌懸濁液 + ブラックライト照射 (UV コントロール区と記す)、菌懸濁液 + 暗黒条件 (コントロール区と記す) の 4 条件である。測定開始後一定時間毎に採取した溶液を適宜希釈し TSA 培地 (枯草菌の場合は NA 培地) に塗抹後、37 °C で 24 時間培養し、出現したコロニー数を計測して 1 mL あたりの菌数を算出した。本研究では上記の実験区以外に、光触媒区にラジカルスカベンジ

ャーとして glutathione を添加し光触媒殺菌した区を設け、光触媒の殺菌メカニズムについても検討した。

③ 紫外線照射によるカビ胞子の不活性化

①と②の測定に加えて、紫外線照射 (UV-C) がカビ胞子の不活性化に与える影響を測定した。測定は、*Aspergillus niger* 胞子を供試し、種々の水分活性の条件下でカビ胞子を不活性化させ、その D 値を算出した。また *A. niger* 胞子を接種したリンゴに紫外線を照射して、カビによる病斑形成を抑制する紫外線照射エネルギーを計測した。

④ 農産施設内での空中浮遊菌の殺菌

図 3 に示すように、電気集じん装置、光触媒水中殺菌装置および空気吸引装置を農産施設内にタンデム配置し、それをバイオエアロゾルリッチな環境下で稼働して、電気集じんによる集菌特性、続けて光触媒水中殺菌処理による殺菌特性を求めた。装置内の風量は 10 L/min、電気集じん時間は 100 分間とし、線電極に印加する直流電圧は 0 kV (Control) と、-15 kV の 2 条件とした。空中浮遊菌の殺菌の測定はインピンジャー内溶液を適宜希釈し、これを PCA 培地および PDA 培地に塗抹して培養することにより、一般生菌数とカビ・酵母数を算出した。

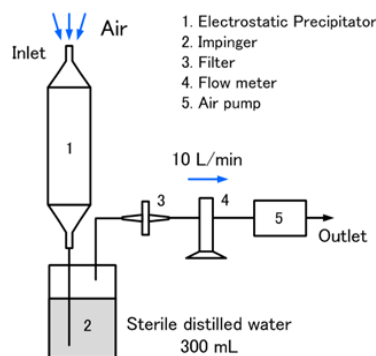


図 3 農産施設内での空中浮遊菌殺菌装置

4. 研究成果

(1) 農産施設内の空中浮遊菌濃度調査

① 浮遊微粒子・空中浮遊菌濃度の測定結果

浮遊微粒子の粒径分布の測定結果を図 4 に示す。浮遊微粒子の粒径分布は、エアロゾルの粒径分布を表す際に用いられる Junge 式によく適合した。また月別の粒子数の変動は小さく庫内より庫外のほうが粒子数が多い傾向を示した。次に青果物貯蔵庫内外における浮遊微粒子数を ISO 規格における清浄度クラス (ISO 14644-1) で評価した。その結果、清浄度は最も低い Class 9 と評価された。今回の結果は、作業場としては特に問題の無いレベル (晴天時の外気相当) ではあったが、食品工場の清浄度クラスは Class 8 以下が推奨されるため、施設内で農産食品の製造を行う際は空気の清浄が必要となろう。WHO によ

れば、粒径 10 μm 未満の浮遊粒子は塵肺等を引き起こす可能性が示されている。今後、浮遊微粒子に関する詳細なデータの収集が必要となる。

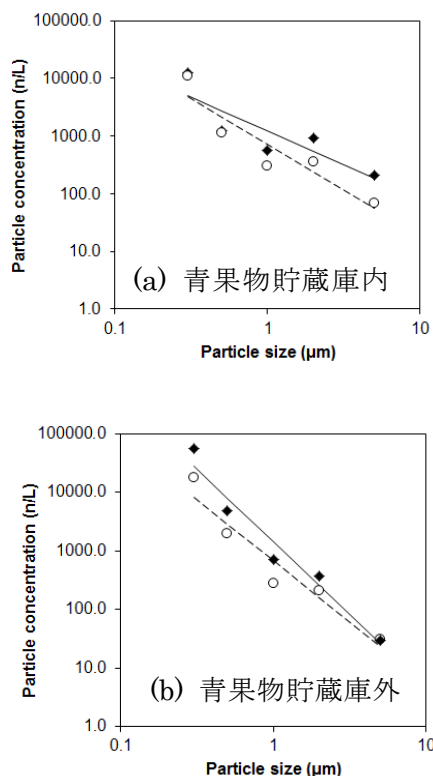


図4 青果物貯蔵庫内外の浮遊微粒子の粒径分布 (◆は11月、○は1月の測定値)

次に、空中浮遊菌濃度の測定結果を図5に示す。空中浮遊菌濃度は、貯蔵庫内外ともに貯蔵期である1月に大きく減少した。本結果を欧州の規格 (Commission of the European Communities: Indoor Air Quality & its Impact on Man, EUR 14988 EN) に当てはめると9月は貯蔵庫内の真菌数が「多い」、1月は「少ない」という評価となる。9月と11月の計測時は農産物収穫期 (9月は籾収穫、11月はリンゴ収穫) と重なったため空中浮遊菌濃度が多くなったと考える。一方、1月は施設周辺が根雪となり微生物の発生・飛散が少なくなったこと、併せて1月は施設内温度も5°C前後であり青果物貯蔵庫の冷凍機も間欠的に稼働していたこと等から空中浮遊菌濃度が少なくなったと考える。

② 空中浮遊菌 (真菌) の同定

空中浮遊菌 (真菌) を同定した結果、リンゴ貯蔵庫内のカビは *Penicillium rugulosum*, *Penicillium* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium* sp. がメインであった。今回、リンゴ貯蔵において問題となるパツリンを産生する *P. expansum* は検出されなかったが、本実験で同定された菌株はカビ毒を生産するものもあり、また喘息などの

アレルギーあるいは真菌症の原因となる菌株もある。このことと前述したように浮遊真菌濃度は屋内環境としては高いため、農産施設内の空中浮遊菌の殺菌 (捕集) の必要性は極めて高いと考える。

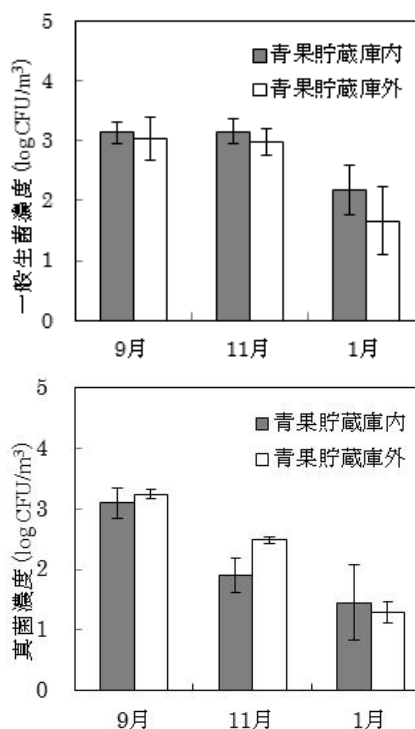


図5 青果物貯蔵庫内外の空中浮遊菌濃度

(2) 空中浮遊菌殺菌

① 電気集じん処理による集菌の効果

図6に、電気集じんにおいて相対湿度を変化させたときの微生物 (*S. cerevisia*) 捕集能を、図7に放電極への印加電圧極性を変化させた場合の微生物捕集能を示す。図6および図7に示す菌数は、電気集じん装置を通過した菌をインピンジャーで捕捉して、その溶液内の菌数を表したものであり、縦軸の値が低いほど、電気集じんの集菌効果は高い。

図6より、電気集じん装置は相対湿度に大きく影響されずに微生物を1対数以上捕集できることが示された。また今回の実験において実験装置内のオゾンの生成は認められなかった。このことより、青果物貯蔵庫などの高湿度環境下においても電気集じん処理による集菌は有効であるといえる。次に、印加電圧極性については、正極性のほうが負極性よりも集菌に適することが示された。この要因として、微生物が本来負の電位を持っていることが考えられ、正極性電圧を用いた実験後の線電極には酵母菌が多く付着していることが明らかとなった。コロナ放電を生成する線電極が酵母菌等の付着で汚染されると、放電の不安定化や電極メンテナンスの煩雑化が生じることから、微生物捕集に着目したESPの電源電圧としては、負極性が適当と考える。

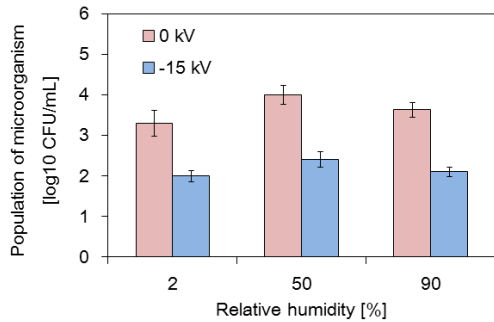


図6 相対湿度が電気集じん処理後の集菌に与える影響

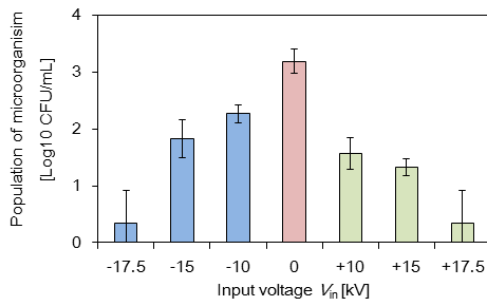


図7 印加電圧極性が電気集じん処理後の集菌に与える影響

② 光触媒水中殺菌処理による殺菌効果

図8に *E. coli* を用いた場合の光触媒水中殺菌処理後の光触媒区、光触媒コントロール区、UVコントロール区、コントロール区の生存比の経時変化を示す。図9は *B. subtilis* を用いた場合である。図8より光触媒区では、供試菌は処理時間とともに指数関数的に殺菌され、一定時間経過すると菌数は検出限界値以下となった。次に殺菌メカニズムについて検討する。光触媒コントロール区、UVコントロール区、コントロール区の菌数に有意な差がなかったことと、光触媒区に glutathione を添加し光触媒殺菌した区では殺菌が殆ど進行しなかったことから、アパタイト被覆二酸化チタン光触媒の殺菌メカニズムは光触媒により発生する活性酸素種によると推察された。また、光触媒区にて殺菌後も生存した供試菌は、コントロール区（殺菌処理をしていない区）と比べ、コロニー形成速度が遅く、損傷菌を多く含むことが示された。

③ 紫外線照射によるカビ胞子の不活性化

紫外線照射 (UV-C) による *A. nigar* 胞子の D 値の水分活性依存性を図10に示す。図より、カビ胞子の不活性化は水分活性に影響されないことが示された。また、カビ胞子が接種されたリンゴの病斑形成を抑制する紫外線照射エネルギーは、1平方cmあたり1.62Jであることが算出された。

本研究より、農産施設内の農産物表面を短時間紫外線照射することで、農産物のカビ腐敗・汚染を水分活性の高低に関わらず抑制できる可能性が示唆された。

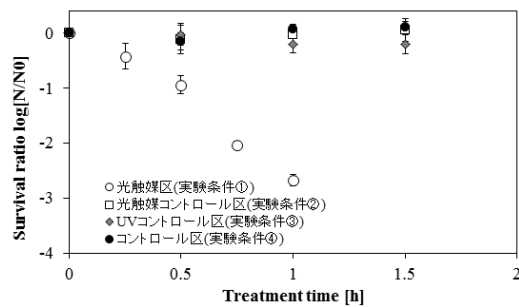


図8 光触媒水中殺菌処理後の *E. coli* の生存比

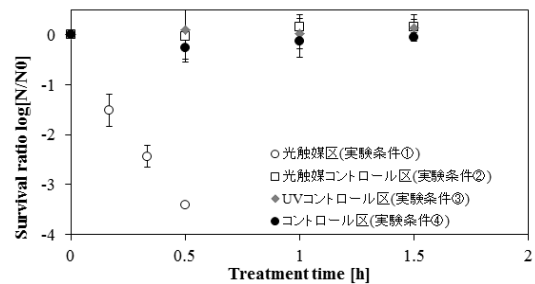


図9 光触媒水中殺菌処理後の *B. subtilis* の生存比

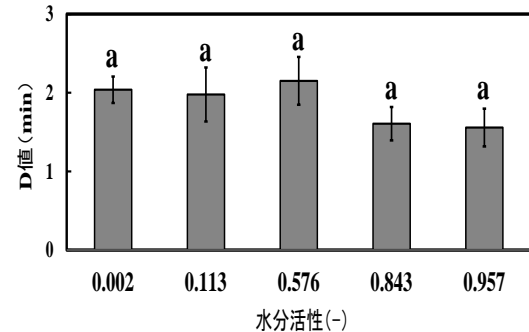


図10 水分活性が紫外線照射によるカビ胞子の不活性化に与える影響

④ 農産施設内での空中浮遊菌の殺菌

実際の農産施設内で電気集じん処理および光触媒水中殺菌処理による空中浮遊菌の殺菌試験を試みた。図11には電気集じん処理後のインピンジャー内の微生物数を示す。電圧の印加によってインピンジャーの微生物が減少することが明らかであり、特にカビや酵母は電気集じんの影響が顕著であった。この要因としては、カビの胞子がバクテリアよりも大きいため、帯電量が大きく、クーロン力を強く受けたことが考えられる。表1には、農産施設内での空中浮遊菌の殺菌を、光触媒水中殺菌処理のみで行ったときの結果を示す。ここに光触媒濃度15%w/vとし、紫外線照射時間は24時間、電気集じん装置の

印加電圧は 0 kV とした。これより、光触媒水中殺菌処理は農産施設空間内の浮遊菌を検出限界値以下まで殺菌できた。

以上より、電気集じん処理および光触媒水中殺菌処理を用いることで、農産施設内の空中浮遊菌を集菌・殺菌できることが示された。本研究で開発した電気集じん装置や光触媒水中殺菌装置は今後ポストハーベスト空間での実用化が大いに期待できると考える。

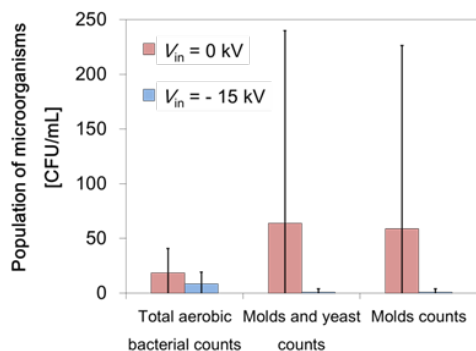


図 11 電気集じん処理後のインピンジャー内の微生物数（農産施設内での試験）

表 1 光触媒水中殺菌試験前後のインピンジャー内の微生物数（農産施設内での試験）

	初菌 (log CFU/ml)	光触媒処理後 (log CFU/ml)
一般生菌数	1.1 ± 0.4	ND
カビ酵母数	2.2 ± 0.5	ND
カビ数	2.1 ± 0.6	ND

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 2 件）

- ① Koide, S., Orikasa, T., Kumagai, K., Takeda, J., Uchino, T. Study on airborne particles and airborne microorganism in a low-temperature storage facility, Proceedings of the 7th International Symposium on Machinery and Mechatronics for Agriculture and Biosystems Engineering, 査読有, (CD version), 2014.
- ② 小出章二、村田大地、折笠貴寛、武田純一、ポストハーベストへの応用を目指したアパタイト被覆二酸化チタン光触媒の殺菌特性の評価、農業食料工学会東北支部報、査読無、60 巻、2013、43-46.

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① Koide, S., Orikasa, T., Kumagai, K.,

Takeda, J., Uchino, T., Study on airborne particles and airborne microorganism in a low-temperature storage facility, 7th International Symposium on Machinery and Mechatronics for Agriculture and Biosystems Engineering (ISMAB), National Ilan University, 2014 年 5 月 22 日, Yilan, Taiwan.

- ② 小出章二、熊谷 翔、折笠貴寛、伊吹竜太、武田純一、農産施設空間内の空中浮遊物質および空中浮遊菌に関する研究、平成 25 年度農業機械学会東北支部大会、2013 年 8 月 22 日、福島県農業総合センター、福島県。
- ③ 村田大地、小出章二、折笠貴寛、内野敏剛、アパタイト被覆二酸化チタン光触媒殺菌の基礎的特性の解明と、そのポストハーベストへの応用、農業環境工学関連学会 2012 年合同大会（宇都宮大学）、2012 年 9 月 12 日、宇都宮大学、栃木県。
- ④ 村田大地、小出章二、折笠貴寛、只野嘉人、熊谷 翔、光触媒溶液を用いた水中殺菌に関する基礎的研究、平成 24 年度農業機械学会東北支部大会、2012 年 8 月 30 日、宮城大学食産業学部、宮城県。

〔図書〕（計 1 件）

- ① 小出章二、電気学会出版（パルスパワーおよび放電の農水系利用調査専門委員会編）、静電気を利用した空中浮遊菌の除去、「パルスパワーおよび放電の農水系利用」、東京、2015. pp. 24-26.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小出 章二 (KOIDE SHOJI)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：70292175

(2) 研究分担者

高木 浩一 (TAKAKI KOICHI)

岩手大学・工学部・教授

研究者番号：00216615

(3) 連携研究者

重茂 克彦 (OMOE KATSUHIKO)

研究者番号：23380177

岩手大学・農学部・教授

平成 24 年 5 月逝去

八十川大輔 (YASOKAWA DAISUKE)

北海道立総合研究機構・食品加工研究センター・科長

研究者番号：なし