

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780242

研究課題名(和文) 構造的特徴と機械的性質に基づいたバイオフィルムの効果的除去法の確立

研究課題名(英文) ESTABLISHMENT OF EFFECTIVE REMOVAL PROCESS OF BACTERIAL BIOFILM BASED ON THE MECHANICAL AND STRUCTURAL PROPERTIES

研究代表者

濱中 大介 (HAMANAKA, Daisuke)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60399095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：バイオフィルムそのものが有する物理的な特徴を把握するため、インデンテーション法によるバイオフィルムの機械的特徴の把握を試みたところ、同法はバイオフィルムの物理的特性の測定に有効な手法の一つであると考えられた。バイオフィルムの形成に用いたポリスチレンと、バイオフィルムそのものの圧縮剛性の値を比較することで膜厚を算出するとともに、硬度との関係を探ったところ、膜厚が薄いバイオフィルムは、硬度が大きくなる傾向を示した。この結果は、食品の製造環境等で形成される小さなバイオフィルムは、除去し難いことを示すものであり、物理的・化学的・生物的に適切な除去方法を見直す必要があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the physical characteristics of bacterial biofilm, the mechanical properties were evaluated by indentation analysis with spherical probe. The biofilm thickness was calculated by comparison of the compression stiffness between the developed biofilm and polystyrene base. The biofilm with greater hardness were observed from the thinner one. These results could indicate that the smaller biofilm produced on the food and food contacting surface may have strong physical properties, and be difficult to remove by several treatments. Therefore it is suggested that the appropriate removal process should be applied physically, chemically and biologically for ensuring food safety.

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：食の安全 バイオフィルム インデンテーション 力学的強度

1. 研究開始当初の背景

生鮮農産物の表面には多種多様な微生物が存在し、それらが腐敗や食中毒の原因となり、保存性・安全性の低下を招いていることは言うまでもない。我が国では、平成8年に大阪府堺市で発生したカイワレ大根が原因とされる大腸菌 O157:H7 による食中毒事件は記憶に新しいが、最近でも長野県塩尻で発生した長ネギの大腸菌 O148 汚染、海外では米国コロラド州で発生したデザート用メロンのリステリア菌汚染(15名死亡)、ドイツを発端とする欧州諸国におけるスプラウトの大腸菌 O104 汚染(37名死亡)等、食中毒事故の発生事例は枚挙に暇が無く(<http://www.cdc.gov/DataStatistics/>)、生鮮農産物における効果的な微生物制御法の提案は必須の課題である。

生食を主目的として流通している生鮮農産物の安全性確保を検討する場合、最小限の農産物の品質低下と、高い表面付着微生物の殺滅・除去効果の両立が可能な技術の導入が重要である。また、青果物の更なる微生物的安全性確保のためには、表面付着微生物によるバイオフィーム形成の未然防止と除去が重要である。このバイオフィームは、培養温度・栄養濃度の違い、異種微生物の組合せの他、温度や pH の変動により、生菌数や細胞外多糖類(EPS: extracellular polysaccharides)生産量は大きく影響される。

表面に形成されるバイオフィームは、内部構造を変化させシティとも称される、微生物細胞とそれらの代謝副産物で構成される複雑なネットワークを形成しながら成熟することが知られている。このネットワークを形成する過程で、バイオフィームの骨格構造の基礎を成すとともに、保護バリアとしての役割を果たす EPS が生産されることにより、バイオフィームは物理的・化学的な外的ストレスに対して高い防御能力を持つこととなる。これまでに、バイオフィームの評価については、平板培地を用いた培養による生菌数測定、染色した細胞や EPS の吸光度測定、EPS も含めたバイオフィームの総バイオマス生産量評価等が行われてきたが、バイオフィームそのものの構造的特徴と力学的特性に関する評価は検討されていないのが現状であった。

2. 研究の目的

形成されたバイオフィームに対する対策は、水流洗浄による除去処理が一般的である。しかしながら、上述のような評価法では、処理前後の生菌数や総バイオマス量の評価は可能であるものの、どのような物理的な強度を持つバイオフィームが、「どの程度破壊されたのか、評価には大きな困難を伴っている。本研究では、一般的に塗料等の薄膜の強度評価に用いられているインデンテーション法を用いて、バイオフィームの機械的性質を評価した。

3. 研究の方法

(1) バイオフィームの作成

供試菌株は *Pseudomonas fluorescens* NBRC13922 である。トリプチケースソイブロス(TSB)にて前培養させた後、滅菌蒸留水による懸濁と遠心分離を繰り返すことで洗浄し、*P. fluorescens* 懸濁液(10^6 CFU/mL に調製)を作成した。この懸濁液をポリスチレン試験小切片に塗布し、乾燥させることで細胞を付着させた。この小切片を TSB に浸漬させ、 $30^{\circ}\text{C} \cdot 24$ 時間培養することでバイオフィームを表面に形成させた。24 時間後に TSB から取り出し、1 時間乾燥後、再度 TSB にて培養させる操作を 7 日繰り返すことでインデンテーション試験に用いるバイオフィームサンプル小切片を作成した。なお、単純な TSB による培養の他、塩化鉄、塩化カルシウム、塩化マグネシウムを微量含ませた TSB によって形成させたバイオフィームも作成し、インデンテーション試験に用いた。

(2) インデンテーション試験の概要

インデンテーション試験には、テンシロン万能試験機を用いた。ロードセル容量は 5N、荷重測定範囲はロードセル容量の 1/500 まで、荷重制度は読み値の $\pm 1.0\%$ 、圧子先端は球状のものを用いた。測定では下方を載荷、上方を除荷とし、測定開始点の変位をゼロとして試験を実施した。圧子の移動速度は $1.2\mu\text{m}$ とし、動作は変位制御によって行った。

測定では、初めに $20\mu\text{m}$ の載荷と $10\mu\text{m}$ の除荷を行った後、 $30\mu\text{m}$ の載荷と $20\mu\text{m}$ の除荷を、圧子の先端がポリスチレン表面に到達するまで繰り返した。得られたデータより、硬度・変位曲線を作成した。

4. 研究成果

インデンテーション法による薄膜の硬度測定では、一般的対象材料は塗料、金属メッキ等、硬質材料である。そこで、バイオフィームの機械的性質の測定可能性について

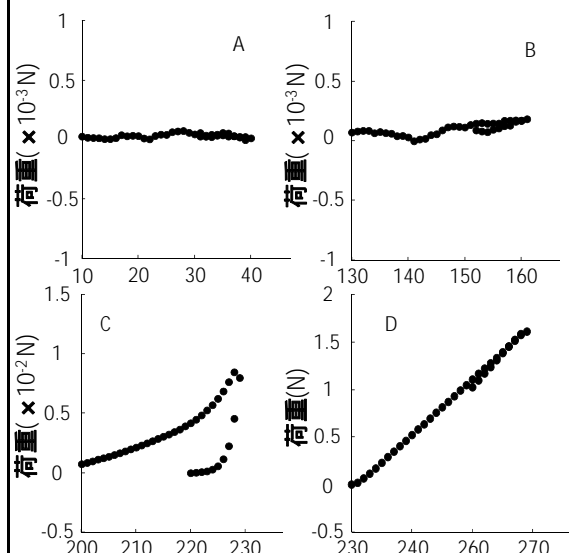


図1 様々な変位における変位・荷重曲線

検討した。図1は典型的な挙動を示したバイオフィームの変位荷重曲線である。なお、図1におけるA~Dは、載荷・除荷処理の1サイクルでの曲線を示している。

図1に示したバイオフィームの厚さはおよそ220 μm 程度であるが、100 μm 程度まではバイオフィーム表面の水膜に未接触状態であり、載荷・除荷もほぼ変化なくゼロ付近であることが分かる(図1A)。徐々に下方に変位させると、130 μm 程度で水膜に接触し、検出荷重値が変化の様子が伺える(図1B)。さらに下方では、150 μm 程度でバイオフィームに接触し、220 μm 程度までは図1Cに示すような曲線を描き、最終的には図1Dのように載荷と除荷を示す曲線が一致し、弾性的となり、ポリスチレン表面に接触したことが分かる。この結果から、インデンテーション法によるバイオフィームの硬度測定は可能であることが明らかとなった。しかしながら、バイオフィームは水分がほぼ100%に近く、極めて軟弱な物質であることから、詳細な機械的特性の把握にはマイクロニュートンレベルでの測定が必要である。この結果は、金属イオンが含まれた状態でも同様であり、食品製造や青果物加工現場における金属表面での形成バイオフィームの効率的洗浄処理を正確に評価する可能性を認めることができた。

上述の測定において、バイオフィームそのものの膜厚が硬度に及ぼす影響を検討した。まず、測定圧子のバイオフィームへの接触時およびポリスチレン表面への接触時の圧縮剛性の違いから、実験に用いたバイオフィームサンプルの膜厚を算出したところ、図2に示すような度数分布を得た。このデータに限らず、全てのバイオフィームサンプルの多くは100 μm 以下であり、とくに40~50 μm 程度のバイオフィームが多く形成されることが分かる。

図3に、これらの膜厚ごとの硬度を示した。図に示されるように、膜厚が小さい場合、極めて大きな硬度を示すことが分かる。

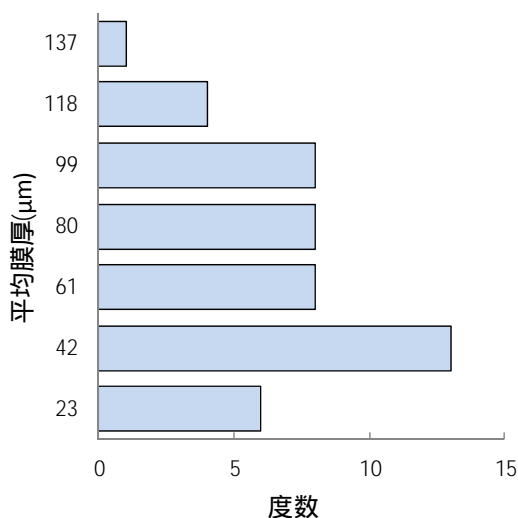


図2 供試したバイオフィームサンプルの膜厚の違いにおける度数分布

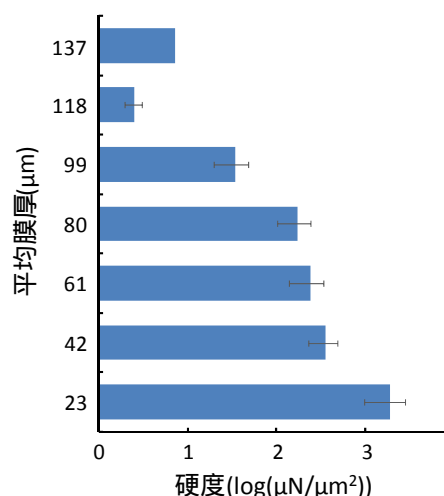


図3 供試したバイオフィームサンプルの膜厚の違いにおける硬度

この結果は、これまで我々が共焦点レーザー顕微鏡を用いたバイオフィームの内部構造観察においても明らかにした内容とも矛盾するものではない。膜厚の小さなバイオフィームでの硬度の増加は、洗浄効率の低下にも直結するものであり、効果的な処理方法の提案も今後の重要な課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

江口広大, 堀海, 森本愛子, 濱中大介, 金山素平, 田中史彦, 内野敏剛, インデンテーション法によるバイオフィームの力学特性評価の可能性, 農業食料工学会九州支部誌, 査読有, 62巻, 2013, 1-5.
K. Morimatsu, D. Hamanaka, F. Tanaka, T. Uchino, Effects of temperature fluctuation on biofilm formation with bacterial interaction between *Salmonella enterica* and *Pseudomonas putida*, Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, 査読無, 58(1), 2013, 125-129.

〔学会発表〕(計6件)

今村光, 森松和也, 濱中大介, 田中史彦, 内野敏剛, 水分活性が微生物のバイオフィーム形成に及ぼす影響, 農業環境工学関連学会2012年合同大会, 宇都宮大学
江口広大, 濱中大介, 田中史彦, 内野敏剛, 森松和也, バイオフィームを形成した *Pseudomonas putida* への洗浄効果, 第66回農業機械学会九州支部例会, 宮崎県
D. Hamanaka, F. Tanaka, T. Uchino, Y.-C. Hung, Effect of low temperature exposure on pathogenic bacteria biofilm formation, 16th World Congress of Food Science and Technology(IUFoST2012), Foz do Iguassu, Brazil
D. Hamanaka, N. Norimura, N. Baba, M.

Tsukazaki, F. Tanaka, T. Uchino,
Decontamination of fruits surface by
combining treatment of infrared
radiation heating and ultraviolet
irradiation, ASHS annual conference,
Palm Desert, CA, USA.

堀海, 江口広大, 濱中大介, 金山素平,
田中史彦, 内野敏剛, 成熟した
Pseudomonas 属バイオフィルムにおける
力学的特性の測定の可能性, 第67回農業
機械学会九州支部例会, 立命館アジア太平
洋大学

江口広大, 堀海, 森本愛子, 濱中大介,
金山素平, 田中史彦, 内野敏剛, インデン
テーション法によるバイオフィルムの力
学特性評価の可能性, 農業食料工学会第
72回年次大会, 帯広畜産大学

〔図書〕(計1件)

濱中大介, 「食品における非加熱殺菌技術
研究の最新動向」第9講 赤外線照射との
併用による-紫外線殺菌技術の向上, エ
ヌ・ティー・エス, 137-148(2013)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.bpes.kyushu-u.ac.jp/~www-pestharvest/index.htm>

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