

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450356

研究課題名(和文) 超微細気泡混合水によるバイオフィルムの構造変化と効果的除去法の提案

研究課題名(英文) Application of nano-bubbled water to the removal process of bacterial biofilm on material surface

研究代表者

濱中 大介 (HAMANAKA, DAISUKE)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授

研究者番号：60399095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微生物が形成するバイオフィルム(BF)に対し、超微細気泡混合水(NBW)を用いた効果的な除去方法について検討した。NBWによるBF除去について、水道水との比較を検討したが、除去効果にほとんど差は認められなかった。さらに、NaClOの処理濃度低減を目標として、NBWとの併用を試みた結果、有効塩素濃度100ppmの水を原水とするNBWは、250ppmのNaClO水溶液と同等かそれ以上のBF除去効果を有することが確認でき、このような除去・殺菌効果は、細胞外多糖類等によって形成されるBFの構造的な特徴が大きく影響を及ぼしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the application of nano-bubbled water(NBW) to the washing process of microbial biofilm developed on the surface of stainless steel. There was no significant difference in the removal potential between NBW and tap water. However, NBW generated by sodium hypochlorite solution with 100 ppm active chlorine concentration were effective in BF removal compared with simple sodium hypochlorite solution (250 ppm). It was suggested that the micro-structural property of BF affected on the contact efficiency of active chlorine in NBW with bacterial cells and extra-polysaccharides of BF developed on the material surface.

研究分野：ポストハーベスト工学

キーワード：バイオフィルム 洗浄 殺菌 食の安全 バブル水

1. 研究開始当初の背景

食中毒や腐敗に代表される生鮮農産物や食品の危害は、国内外問わず多数報告があるが、その原因微生物は表面に強力に密着し、細胞外多糖類(EPS)を含む物質を産生しながらバイオフィーム(BF)を形成していることが知られている。安全性確保や保存性向上を図るためには、BF そのものの特徴を理解しつつ、形成抑制処理、あるいは効率的な除去処理の提案が重要となる。しかしながら既往の研究では、極めて理想的な培養条件下で形成された BF に対する除去処理例が多く、現実とは大きな乖離があると言わざるを得ない。

BF の除去では、いかに効率的に内部構造を破壊し、物体表面から剥離させるかが重要となる。これまでに次亜塩素酸 Na や各種界面活性剤等に代表される化学薬剤が広く利用されているが、残留性や風味への影響から敬遠される傾向にある。また、束子やスポンジ等による処理は、物体表面で微小傷の原因となり、これが品質劣化や二次汚染発生源になることが問題となる。このような背景から本研究では、確実な BF の除去と、無残留性、装置劣化防止を同時に達成する方法として、超微細気泡混合水の利用を検討した。

ナノバブル水として知られている超微細気泡混合水(NBW)は、主に直径 100 ナノメートル以下の気泡を含む水であり、近年、様々な分野への応用が検討されている。一般的な特徴として、その自己加圧効果から水中に長時間滞留し、消滅し難いことが明らかとなっている。消滅する際には、表面電荷の濃縮とともにフリーラジカルの生成が確認されている。また、気泡表面は負に帯電しており、タンパクや塩類等と結合し易いことが知られている。詳細なメカニズムは明らかにされていないが、実用例として、蒸留水等と比較して種子発芽や植物の生育を有意に促進させる効果を有すること、また、灌水として土壌改良にも効果を発揮することも報告されている。このような特徴を持つ超微細気泡混合水が、BF の効率的な除去法としての確立するために、基礎的なデータの収集が重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究では、微生物が形成する BF に対する超微細気泡混合水を用いた効果的な除去法の確立を目的として、先ず、形成される BF の立体構造の把握と除去効果について検討した。さらに、一般的に洗浄に多用されている次亜塩素酸ナトリウム(NaClO)について、その併用による濃度低下効果の確認を目的とした。また、カット青果物に対するバイオフィーム除去効果についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 供試微生物：BF 形成微生物として *Pseudomonas fluorescens*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus cereus*、*Salmonella enterica*、*Escherichia*

coli を用いた。

(2) 懸濁液の調整と BF 形成：トリプチケースソイ液体培地(TSB)で増菌させた後、遠心分離と上澄みの除去を 3 回繰り返すことで菌体を洗浄し、滅菌蒸留水を用いて 10^7 個/mL 程度の細胞密度となるように調整した細菌懸濁液を作製した。この懸濁液を用いて、ステンレス(SUS304、#3)小片(1x7cm²)上に BF を形成させた。まず、小片を中性洗剤で洗浄した後、アセトンによって表面の油分を除去後、オートクレーブ滅菌した。滅菌 TSB に対して小片を細菌懸濁液 0.1mL とともに投入し、緩やかに攪拌後にインキュベータ内で培養することで BF サンプルを作成した。顕微鏡観察のための BF では、滅菌カバーガラスを底部に張り付けたプラスチックシャーレに細菌懸濁液と滅菌 TSB を注入してインキュベータ内で培養して BF を形成させた。

(3) NBW の調整：本研究で用いた NBW は高速回転式によって作成した。使用水は水道水、使用気体は空気である。なお、NBW による BF 除去処理が NaClO の使用濃度低減化に関する検討では、脱イオン水に対して有効塩素濃度 100 および 250ppm となるように調整した後に試験を実行した。試験時の pH は 7.4、電気伝導度は $270 \mu\text{S/cm}$ であった。

(4) NBW 処理：NBW 作成機に対して 4L の水道水あるいは NaClO 水を 5 分間循環させることで NBW を生成した。これに対して BF を形成させたステンレス小片を静置し、一定時間保持した後に、以下に示す方法で残存 BF 量および残存生菌数を評価した。

(5) 残存 BF 量の評価：ステンレス小片を試験管中で 99%メタノールに浸漬して固定し後に 2%クリスタルバイオレット溶液で 5 分間染色した。余剰な溶液を脱イオン水で洗浄除去した後、30%酢酸に溶解させ、完全に攪拌させた。酢酸溶液の 630nm における吸光度を測定し、その値をステンレス板 1 枚当たりの BF 残存量とした。

(6) 残存 BF の生菌数評価：洗浄後のステンレス小片を滅菌蒸留水に入れ、攪拌させるとともに 5 分間の超音波洗浄処理によって表面から残存 BF を完全に剥離させた。これを適度に希釈し、標準寒天培地による平板培養法によって生菌数を評価した。

(7) 共焦点レーザー顕微鏡観察：プラスチックシャーレ底部のガラス表面に BF を形成させた後、TSB を取り除くとともに滅菌蒸留水で洗浄した。余剰の水分を除いた後、0.1% の FITC-ConcanavalinA によって 20 分間染色することで観察サンプルを作成した。観察はオリンパス製の倒立型走査共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)を用い、付属のソフトウェアによって画像を取得した。観察画像の取得は縦方向に $1 \mu\text{m}$ 毎とし、全ての取得画像を重ねて三次元の BF 像を再合成した。

(8) カット青果物材料：材料として鹿児島市内の小売店より購入したキャベツを実験室内に搬入後、すぐにスライサーによって厚さ

2mmの千切りキャベツを調整した。水道水によって5分間洗浄したものを洗浄処理用サンプルとして用いた。

(9) NBWによる洗浄処理：上記(4)と同様に生成したNBWを用いた。カットキャベツサンプルの10倍量のNBWに対してサンプルを浸漬させ、ガラス棒でゆっくりと攪拌しながら20分間の洗浄処理を実施した。

(10) 生菌数の測定：洗浄処理後のサンプルを滅菌脱イオン水とともに破碎し、その混濁液を菌液として、標準寒天培地を用いた平板培養法によって生菌数を測定した。

4. 研究成果

(1) 形成BFの構造的特徴

形成された *P. fluorescens* のBFは、培養温度および培養時間によって、その形状は大きく変化することが分かった(図1)。25°Cで一定温度にて培養した場合、大きな塊として現れるBFはほとんど観察されず、観察像全体に、細胞数の均質な拡大が認められた。一方、5°C環境への暴露は大きなBFが形成される傾向を示すとともに、この塊は縦方向の高さは低いものの、半球型のドーム構造を有していることが確認できた。低温時間が長くなるとその横方向への面積拡大が認められたことから、低温暴露はBFの体積の増大は抑えられるものの、物体表面に強固に付着するBFが形成されることが明らかとなった。また、5°C暴露後に25°Cで培養した場合、縦方向にもBFが増大する傾向も示された。すなわち、一定温度でのBF形成は、低温では面積拡大、25°C程度の常温では体積増大に寄与するが、低温と常温の組み合わせでは、面積と体積の増大に加え、物理的に強固なBFを形成する可能性が認められたことから、温度が変動するような環境下においては、強大なBFが形成する可能性も考えられ、洗浄等の管理が非常に重要であることが示された。

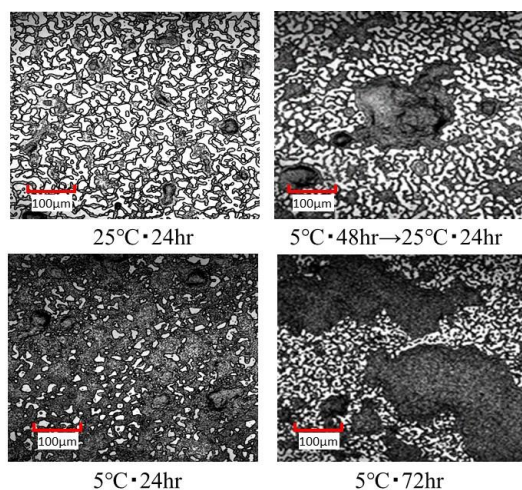


図1 異なる培養温度条件下で形成された *Pseudomonas fluorescens* のBFの顕微鏡観察像

(2) NBWによる除去効果

図2にはBF形成培養日数の違いと、種々

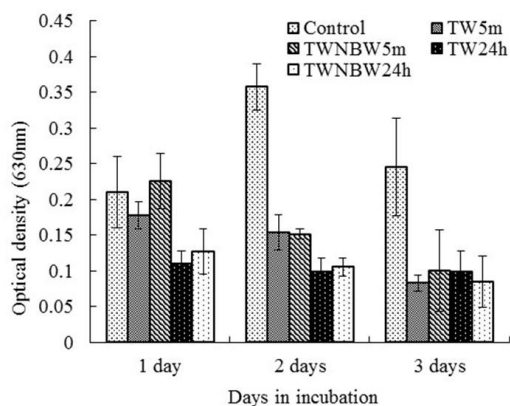


図2 *Pseudomonas fluorescens* の形成BFに対する種々洗浄処理後の残存BF量

TW5m: 水道水による5分間洗浄処理

TWNBW5m: 水道水原水NBWによる5分間洗浄処理

TW24h: 水道水による24時間洗浄処理

TWNBW24h: 水道水原水NBWによる24時間洗浄処理

の洗浄処理が *P. fluorescens* のBF残存量に及ぼす影響を示している。水道水、NBWともに洗浄時間が長くなるほど残存BF量が減少する傾向が見られた。しかしながら、水道水とNBWを比較すると、5分間洗浄と24時間洗浄で残存BF量に差は認められなかった。さらにBFの形成培養日数については、1日培養に比べ、2日および3日培養のほうが、BFが吸光度で0.1~0.2程度、剥離しやすい結果となった。図3にはBFの形成培養日数ごとの種々の洗浄処理に対する残存BFの生菌数を示している。5分よりも24時間洗浄したほうが残存生菌数は0.5~1.0Log程度小さくなった。また24時間の洗浄処理では、NBWのほうが残存生菌数は小さくなる傾向は示されたものの、有意な洗浄効果の向上は認められなかった。

残存BF量においては、1日培養より2日あるいは3日培養の方が剥離しやすかったのは、BF形状が時間の経過とともに変化するためであると考えられる。BFは、細菌の付着・増殖、細胞外多糖類(EPS)の分泌を経て厚みを増し、コロニーが巨大化するが、巨大化して内部の細胞密度が過密になるとコロニーが破壊され細菌が放出される。これはBFの生残戦略として、時々刻々構造・組成・

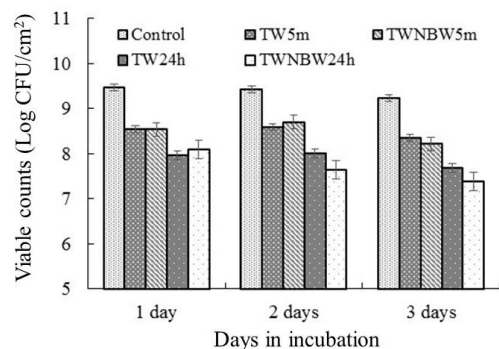


図3 *Pseudomonas fluorescens* の形成BFに対する種々洗浄処理後の残存BFの生菌数

TW5m: 水道水による5分間洗浄処理

TWNBW5m: 水道水原水NBWによる5分間洗浄処理

TW24h: 水道水による24時間洗浄処理

TWNBW24h: 水道水原水NBWによる24時間洗浄処理

機能を動的に変えていくためと言われている。そのため、BFの形成培養日数が長くなるほど、浸漬洗浄の際に剥離しやすくなったと考えられた。

BFの除去効果にはNBWそのものの効果はほとんど認められないことが示唆されたことから、食品産業の洗浄において最も用いられている次亜塩素酸Naについて、その濃度低減効果を目的として、NBWとの併用を試み、図4には1日培養のBFを種々の洗浄方法によって処理したときの残存BF量を示した。次亜塩素酸Naの有効塩素濃度が高いほどBFの洗浄効果が高く、100ppmでも250ppmでもNBWで洗浄した方が吸光度で0.09~0.14程度洗浄効果が高くなった。また、100ppmの次亜塩素酸NaのNBW洗浄は250ppm次亜塩素酸Na水単独と同程度かそれ以上の洗浄効果が認められた。図5には残存BF中の生菌数を示している。図3で示した無処理(洗浄なし)と比較すると、すべての処理区で99.9%程度の生菌数減少が認められた。しかしながら、次亜塩素酸Na洗浄と次亜塩素酸NaのNBW洗浄を比較しても、ともに5.5~6.6(LogCFU/cm²)程度を示し、生菌数に差は見られなかった。

残存BF量について、水道水洗浄とNBW洗浄に差は見られなかった一方、次亜塩素酸Na水溶液との併用効果を検討した場合、高いBF除去効果が認められた。このような結果が得られた要因としては様々なものがあげられるが、BF内部の構造的な違いが影響し

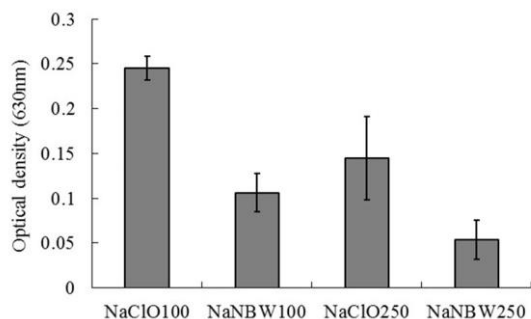


図4 *Pseudomonas fluorescens*の形成BFに対する種々洗浄処理後の残存BF量

NaClO100: 有効塩素濃度100ppmの次亜塩素酸Na溶液による洗浄
 NaNBW100: NaClO100を原水とするNBWによる洗浄
 NaClO250: 有効塩素濃度250ppmの次亜塩素酸Na溶液による洗浄
 NaNBW250: NaClO250を原水とするNBWによる洗浄

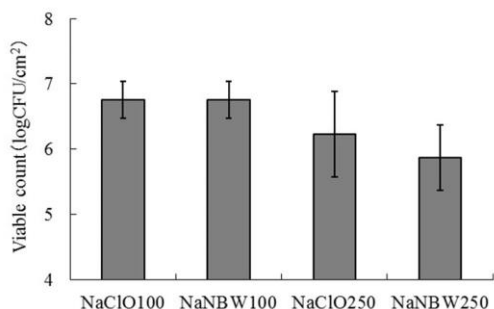


図5 *Pseudomonas fluorescens*の形成BFに対する種々洗浄処理後の残存BFの生菌数

NaClO100: 有効塩素濃度100ppmの次亜塩素酸Na溶液による洗浄
 NaNBW100: NaClO100を原水とするNBWによる洗浄
 NaClO250: 有効塩素濃度250ppmの次亜塩素酸Na溶液による洗浄
 NaNBW250: NaClO250を原水とするNBWによる洗浄

ているものと思われる。BF形成は、細胞の表面付着から始まり、顕微鏡観察においても示されたように面積と体積を増加させながら拡大していくが、1日培養のBFは、表面近傍に高い細胞密度を有するとともに、外側を覆うようにEPSが産生されていたと思われる。本研究では、NaNBWによってBF除去量には、次亜塩素酸Na水よりも優位に大きな効果が認められた一方、残存生菌数には差がなかったのは、表面のEPSを効果的に取り除くことが可能であったものの、ステンレス小片表面付近の細胞を効果的に除去・殺菌するには至らなかったと思われる。このような結果は、本研究で用いた他の指標細菌でも認められたことから、NBWによる洗浄処理を繰り返す等、工夫が必要である。いずれにしてもNBWを次亜塩素酸Na水を併用すると使用濃度を低減することができたことから、作業環境の改善や金属等の腐食の軽減に、NBW処理は大きく寄与することが期待できる。

(3) カットキャベツに対する洗浄効果

無洗浄のカットキャベツには6~7(LogCFU/g)の一般生菌が存在していた。これを滅菌蒸留水で洗浄した場合においては、生菌数の低下はほとんど認められなかった。NBWで処理すると、およそ1.0LogCFU程度の減少、次亜塩素酸NaとNBWを併用した場合は、無処理と比較して1.8LogCFU程度の減少効果が認められた。しかしながら、単純な次亜塩素酸Na水溶液でも同程度の菌数低下効果があり、NBWとの併用が処理濃度の低減化といった効果を示すことはなかった。本実験では空気のみを用いて調整したNBWであったが、オゾンや酸性電解水といった様々な殺菌効果を有する処理法との併用を検討するとともに、処理水が有する各種物性の明確化によって、殺菌効果向上法の確立とそのメカニズムの解明が今後の課題である。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① D. Hamanaka, Y. Inamori, E. Yasunaga, Y. Watanabe, Effect of ultraviolet A, B and C irradiation on the postharvest quality of broccoli floret, Proceedings of ISMAB, 査読無, 8, 2016, 321-325
- ② D. Hamanaka, Novel postharvest technologies for prolonging fruit shelf life in Japan, Journal of Food Science and Agricultural Technology, 査読無, 1, 2015, 7-10
- ③ 森松和也、田中那奈、濱中大介、内野敏剛、田中史彦、バイオフィルムを形成した *Pseudomonas putida* に対する次亜塩素酸ナトリウムの除去及び殺菌効果、防菌

- 防黴、査読有、42 巻、2014、647-650
- ④ Nguyen, M. D., L. D. Manh, D. Hamanaka, H. V. Duong, F. Tanaka, T. Uchino, Surface conditioning of stainless steel coupons with skim milk, buttermilk, and butter serum solutions and its effect on bacterial adherence, Food Control, 査読有, 42, 2014, 94-100 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.040>

[学会発表] (計 10 件)

- ① 濱中大介、赤外線と紫外線の併用殺菌、日本防菌防黴学会年次大会、2016. 9. 27、品川区立総合区民会館 (東京都品川区)
- ② 濱中大介、本村咲、安永円理子、中本義範、渡部由香、ファインバブル水による *Pseudomonas* バイオフィルムの除去効果、農業食料工学会第 75 回年次大会、2016. 5. 28、京都大学 (京都市左京区)
- ③ D. Hamanaka, Y. Inamori, E. Yasunaga, Y. Watanabe, Effect of ultraviolet A, B and C irradiation on the postharvest quality of broccoli floret, International Symposium on Machinery and Mechatronics for Agriculture and Biosystems Engineering, 2016. 5. 23, 新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市)
- ④ D. Hamanaka, Combining treatment of ultraviolet irradiation and infrared heating for the microbial reduction of agricultural produce, Food and Agriculture Panel Annual meeting of United States and Japan Cooperative Program in Natural Resources, 2015. 11. 16, 金沢東急ホテル (石川県金沢市)
- ⑤ 堀海、濱中大介、内野敏剛、田中史彦、低温暴露が *Pseudomonas* 属バイオフィルムの立体構造へ及ぼす影響、農業施設学会年次大会、2014. 8. 27、神戸大学 (兵庫県神戸市)
- ⑥ 森本愛子、江口広大、濱中大介、田中史彦、内野敏剛、硬質材料表面に形成するバイオフィルムの硬度と膜厚の関係、第 67 回農業食料工学会九州支部例会、2014. 9. 1、九州大学 (福岡県福岡市)
- ⑦ 吉田葵、田中那奈、濱中大介、田中史彦、内野敏剛、種々の条件における微細気泡混合水を用いたバイオフィルム除去効果の検討、第 67 回農業食料工学会九州支部例会、2014. 9. 1、九州大学 (福岡県福岡市)
- ⑧ D. Hamanaka, K. Eguchi, A. Morimoto, F. Tanaka, T. Uchino, Evaluation of mechanical properties of bacterial biofilm by micro-indentation analysis, World Congress of Food Science and Technology, 2014. 8. 17, モントリオール

ル国際会議場 (モントリオール市、カナダ)

- ⑨ D. Hamanaka, A. Nagayama, R. Cho, F. Tanaka, T. Uchino, Effects of temperature and relative humidity on the photocatalytic inactivation of mild ascospores, International Symposium on Machinery and Mechatronics for Agriculture and Biosystems Engineering, 2014. 5. 21, 国立宜蘭大学 (宜蘭市、台湾)
- ⑩ 田中那奈、吉田葵、濱中大介、田中史彦、内野敏剛、ファインバブル水によるバイオフィルム除去効果の検討、農業食料工学会第 73 回年次大会、2014. 5. 16、琉球大学 (沖縄県中頭郡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱中 大介 (HAMANAKA, Daisuke)
鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授
研究者番号：60399095

(2) 研究分担者

内野 敏剛 (UCHINO, Toshitaka)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：70134393
(2014 年度迄)

田中 史彦 (TANAKA, Fumihiko)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：30284912
(2014 年度迄)