J. Inst. Electrostat. Jpn.
論　　文
静電気学会誌，**40**, 2（2016）102-107

水溶性切削油から単離された細菌のパルス放電に対する耐性の検証

廣澤　充*，谷野　孝徳*，牧田　康平*，大嶋　孝之*, 1

（2015年9月24日受付；2016年2月26日受理）

Analysis of Bacterium Isolated from Used Soluble Cutting Oil and its Tolerance Toward Pulsed-discharge Plasma Treatment

Makoto HIROSAWA*, Takanori TANINO*, Kouhei MAKITA* and Takayuki OHSHIMA*, 1

（Received September 24, 2015; Accepted February 26, 2016）

In this study, we focused on a bacterium that was isolated from used soluble cutting oil after pulsed-discharge plasma treatment. A bacteria identification analysis based on the 16s rRNA coding sequence region concluded that the bacterium is *Bacillus barbaricus* with 98.30％ homology. Isolated *B. barbaricus* was cultivated both in liquid medium for 4, 22 h and on agar plate for 1 week. The former condition could allow *B. barbaricus* to be vegetative cell form and the later condition could allow it to form spore. All cells showed tolerance toward puled-discharge plasma inactivation treatment in distilled water. We also investigated tolerances of *B. barbaricus* toward heat and ozone inactivation treatments. Contrary to our expectations, it didn't show significant tolerance toward heat but showed relatively high tolerance toward ozone.

1. はじめに

近年，難生分解性有機物の分解や微生物の殺菌を目的とした水処理技術として水溶液中で放電プラズマの利用が検討されている．水の絶縁破壊電圧は 1 MV/cm 以上と空気の 30 kV/cm に対し非常に高いため，水中で単純に電極上へ電圧を印加するのみでは安定した放電プラズマを発生させることは容易ではない．このため水の移動を伴わない *in situ* での水処理技術への放電プラズマの応用に際しては，内部に電極を配し気体を流通させた円管を水中へ浸漬し放電を液体に照射する手法[1]，水中での放電プラズマの発生は高電界による水の分解によって生じるバブルがトリガーになっているとするバブル説[2-5]に基づき水中の電極近傍に気体を吹き込み，バブルを放電プラズマの発生トリガーとして積極的に用いる手法[6, 7]などが検討されている．我々はこれらの手法を用い水中でのパルス放電プラズマの連続的な発生，ならびにタンパク質[8]や界面活性剤[9]などの有機物分解，大腸菌や枯草菌芽胞の殺菌[6]などにおける有効性をこれまでに報告している．パルス放電プラズマは種々の殺菌手法に対し高い耐性を示す枯草菌芽胞に対しても殺菌効果を示しており，菌種を問わず様々な菌の殺菌が可能であると考えられた．

我々は水中パルス放電プラズマの応用の一つとして，微生物の増殖に伴い発生する悪臭が問題となっている水溶性切削油に対してパルス放電プラズマ処理を行い，切削油中での放電プラズマの殺菌効果の有効性の検討を行った．この研究過程において，我々の関心を惹く放電プラズマによる殺菌が困難な菌が発見された．

本研究ではこの菌を #3 と呼称し，菌 #3 の微生物学的分類を確認するため外部機関に同定試験を依頼した．また油中における有機物等の影響をなくすため菌 #3 を懸濁する溶媒を滅菌水に変更し，放電プラズマによる殺菌処理に対する耐性の確認に加え，熱およびオゾン処理に対する耐性の有無を調査した．

2. 各実験方法・手順

2.1　電源と放電プラズマ処理装置

本研究では高電圧パルスを発生させるために，図 1 に示す回路図のネオントランス式高電圧パルス発生装置を用いた．家庭用交流電圧をスライドトランスを用いて電圧調整をした後，ネオントランスによって昇圧することで交流高電圧とした．交流高電圧を 5 MΩ の保護抵抗を介し高電圧ダイオードで半波整流し 2 nF 容量のコンデンサーに蓄え，スパークギャップ間の短絡により高電圧パルスを処理槽に設置した電極へ印加した．

放電プラズマ処理装置の全体図を図 2 に示す．

キーワード：パルス放電，不活性化，*Bacillus barbaricus*，耐性

* 群馬大学大学院理工学府環境創生部門
（〒376-8515　群馬県桐生市天神町 1-5-1）
Department of Environmental and Engineering science, Graduated School of Engineering, Gunma University, 1-5-1, Tenjin-cho, Kiryu city, Gunma, 376-8515, Japan
[1] tohshima@gunma-u.ac.jp

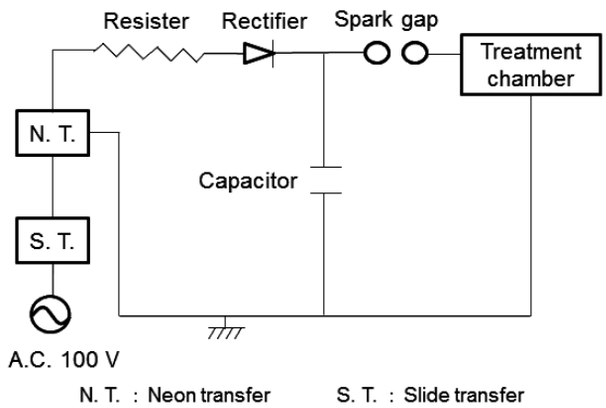

図 1　ネオントランス式パルス発生装置
Fig.1　Neon transformer type pulse generator.

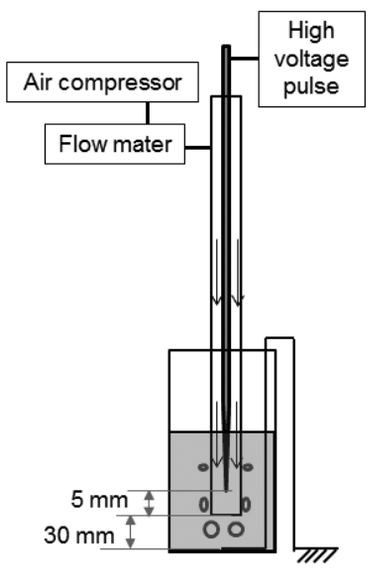

図 2　パルス放電処理装置
Fig.2　Pulsed-discharge plasma treatment chamber.

処理槽として 1 L 容量のトールビーカーを用いた．アクリルパイプ（外径 10 mmϕ，内径 5 mmϕ）内に電極として先端を尖らせたステンレス棒（2 mmϕ）を 5 mm 埋没させて配置し，アクリルパイプ内に 1 L/min の流量で空気を流通させながら処理槽内の処理液へ浸漬した．また，処理槽底部にリング状の金属端子を付けた線を配し接地した．本研究では電極に 12 kV の高電圧パルスを印加し，水中でのパルス放電プラズマを発生させた．放電の周波数は 50 Hz，ギャップ長は 35 mm，放電の種類はスパークである．この際のパルス放電プラズマ発生時の電圧ならびに電流波形を図 3 に示す．

2.2　殺菌対象微生物の調製

本研究ではクリーンルームではなく開放系の工場で用いられた使用済み切削油に対し，プラズマ放電殺菌処理

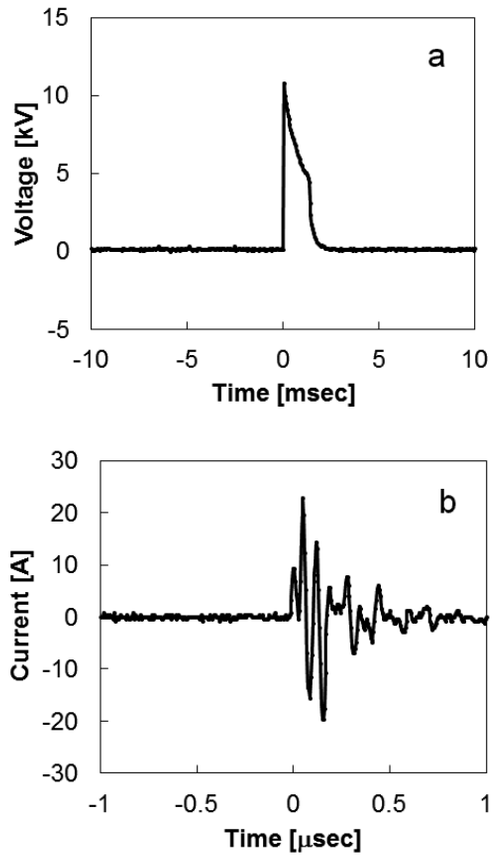

図 3　パルス放電発生時の電圧（a）および電流（b）波形
Fig.3　Voltage（a）and current（b）waveforms of pulse discharge plasma.

を行った後に残存していた菌である菌 #3 を実験に用いた．菌 #3 の培養には 702 培地（Bacto peptone 1（W/V）%, Bacto yeast extract 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%）を 10% Na_2CO_3 水溶液を用いて pH 8.47 に調製した 702-pH8 培地を用いた．菌 #3 が胞子形成能を有する場合を想定し，微生物細胞が栄養細胞または胞子形成の形態をとりうる条件で培養を行い殺菌実験に用いた．栄養細胞の形態としては 702-pH8 寒天培地を用い 30℃にて 42 時間培養した後，702-pH8 液体培地 10 ml にシングルコロニーを植菌し 37℃にて培養を行い，対数増殖期後期となる培養 4 時間後，ならびに定常期となる培養 22 時間後の細胞を回収した．また菌 #3 が芽胞形成能を有する可能性を考慮し，702-pH8 寒天培地上で 30℃にて 1 週間静置培養した後，蒸留水に懸濁しプレート上から回収した．各種培養後回収した菌 #3 は遠心分離（10,000 rpm, 5 分 , 30℃）し培養液と菌体を分離し洗浄を行った．洗浄の具体的な手法は分離した菌体を滅菌済み蒸留水に懸濁することで菌体を洗浄し，再度遠心分離することで菌体を回収した．本操作を 2 回行ったものを菌体濃度 10^4 cells/ml となるように滅菌水に再懸濁し殺菌試料として用いた．

2.3　殺菌試験

上記の手順で調整した殺菌試料に対してパルス放電殺菌試験，熱殺菌試験，オゾン殺菌試験を実施した．

パルス放電殺菌試験は殺菌試料 500 ml を対象として実施し，10分毎に放電を停止しサンプリングを行った．

熱殺菌試験は殺菌試料 5 ml をガラス製試験管に入れ，温度を調整したウォーターバス内で加熱処理を行った．10分毎にサンプリングを行い，サンプルは氷上で急冷した．

オゾン殺菌試験はウォーターバスを用いて 20℃にて実施した．20℃に保温した殺菌試料に対し 3 ppm のオゾン水を終濃度 0.6, 0.75, 1.5 ppm となるように加え 3分または 6分間の殺菌処理を実施した．反応後，特別な反応停止処理は行わず直ちに下記のように培地上に植菌を行った．

各処理においてサンプルは生理食塩水を用いて適当に希釈した後 702-pH8 寒天培地（702-pH8 培地＋Agar 1.5％）に植菌し，サンプル中に生存する菌 #3 を 37℃にて 42時間培養しコロニーを形成させた．形成したコロニーをカウントし生菌率を測定した．

3.　実験結果および考察

3.1　パルス放電処理後の切削油から検出された菌の単離および同定結果

本研究で注目した菌 #3 は使用済み水溶性切削油（シミロン SCF383，日立金属株式会社）50 ml に対しパルス放電処理を 4時間行ったものを 702-pH8 寒天培地に塗布したところコロニーの形成を示した菌体の一つである．形成されたコロニーの様子を図 4 に示す．

形成された複数のコロニーのうちコロニー ③を形成した微生物を #3 と名付け数度のシングルコロニーアイソレーションを行った．顕微鏡観察結果（図 5）から菌 #3 が桿菌であることが確認された．微生物種の正確な

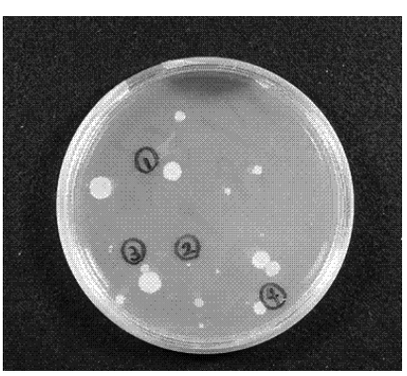

図 4　放電処理後の切削油から検出された菌
Fig.4　Bacteria colonies detected from cutting oil after pulsed-discharge plasma treatment.

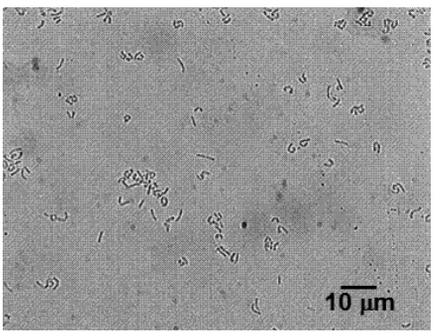

図 5　菌 #3 の顕微鏡写真
Fig.5　Micrograph of bacterium #3.

把握を行うため東洋紡バイオロジックス株式会社に 16s rRNA 遺伝子解析に基づく菌 #3 の微生物同定試験を依頼した．16s rRNA 遺伝子配列の解析結果とデータベース（MicroSeqID: Applied Biosystems Inc.）上に保存されている種々の微生物 16s rDNA 配列とのアラインメントを行い，アラインメントの結果菌 #3 は相同性 98.30％で *Bacillus barbaricus* であるとの同定試験結果が得られた．顕微鏡観察と同定試験の結果から菌 #3 を *B. barbaricus* であると結論づけた．

B. barbaricus は分類・同定における最も有名である Bergey's Manual[10] においても一般的な微生物とは異なり僅かな記載があるのみであり，種々の処理により殺菌を試みたという研究報告はなされていない．しかしながら過酷な外部環境にも耐える芽胞を形成する *Bacillus* 属であることから，パルス放電に対する耐性は強靭な芽胞を形成することが原因であることが疑われた．

3.2　*B. barbaricus* へのパルス放電殺菌試験

パルス放電殺菌後の使用済み切削油から分離された *B. barbaricus* のパルス放電殺菌に対する挙動を確認するため，切削油の影響を排除するため *B. barbaricus* を蒸留水中に懸濁しパルス放電殺菌を試みた（図 6）．

殺菌に用いた *B. barbaricus* は上述のように液体振盪培養において栄養細胞の形態である対数増殖後期の培養 4時間，定常期の培養 22時間，芽胞を形成しうる寒天培地上での培養 1週間のものを用いた．また比較対象として広く殺菌試験に用いられる大腸菌 *Escherichia coli*，*B. barbaricus* と同じ *Bacillus* 属であり熱殺菌をはじめ種々の殺菌手法に対しても高い耐性を示すことが知られている *B. subtilis* の芽胞（spore）とその栄養細胞（veg.），使用済み切削油中から検出される *Pseudomonas oleovorans*[11] に対するパルス放電殺菌も実施した．比較対象として用いた *E. coli*，*B. subtilis* 栄養細胞，*P. oleovorans* ではパルス放電殺菌時間の経過とともに生菌数が減少し，本実験で用いたパルス放電手法が微生物殺菌に対し有効である

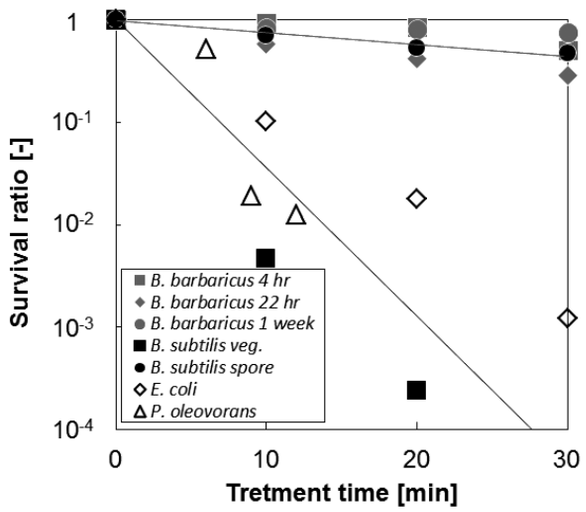

図 6　パルス放電による *B. barbaricus*，*B. subtilis*，*E. coli* および *P. oleovorans* の殺菌

Fig.6　Inactivation of *B. barbaricus*, *B. subtilis*, *E. coli* and *P. oleovorans* by the pulsed-discharge plasma treatment.

ことが確認される．しかしながら，*B. barbaricus* を殺菌対処とした場合，細胞の状態に関わらず用いた全ての細胞に対して顕著な殺菌効果は確認されず，*B. subtilis* 芽胞と同様に 30 分処理後に生菌数にして 1 桁未満の殺菌効果しか確認されなかった．この結果より，使用済み切削油へのパルス放電殺菌後に *B. barbaricus* が検出された原因は，使用済み切削油中に含まれる成分に起因するのではなく，*B. barbaricus* 自体がパルス放電殺菌に対し高い耐性を有することが原因であることが確認された．またその高い耐性は栄養細胞の形態をとる対数増殖期の細胞においても確認され，芽胞の形成により獲得されているものではないことが示された．

3.3　*B. barbaricus* への熱殺菌ならびにオゾン殺菌試験

B. barbaricus がパルス放電殺菌に対し高い耐性を示したことから，*B. barbaricus* は種々の殺菌手法に対しても高い耐性を示すことが考えられた．そこで最も広く用いられている殺菌技術である熱殺菌と静電気技術であり高度水処理技術として実用化されているオゾン殺菌に対する耐性についても調査を行った．これらの殺菌試験には栄養細胞の形態である対数増殖後期の培養 4 時間，ならびに芽胞を形成し得る寒天培地上での培養 1 週間の細胞を用いた．

熱殺菌試験の結果を図 7 に示す．いずれの細胞においても，70℃においては顕著な殺菌効果は確認されなかった．温度の上昇とともに殺菌効果が確認され，85℃においては 20 分処理以降の生菌は確認されなかった．図 7 の結果から得られた熱殺菌特性から Arrhenius plot を作成し，殺菌試験に広く用いられる *E. coli*，ならびに *B. subtilis* の芽胞 [12] と比較を行った（図 8）．*B. barbaricus* は *E. coli* に比べ比較的高い熱耐性を有するものの，*B. subtilis* のような顕著な熱耐性を有しているわけではないことが明らかとなった．

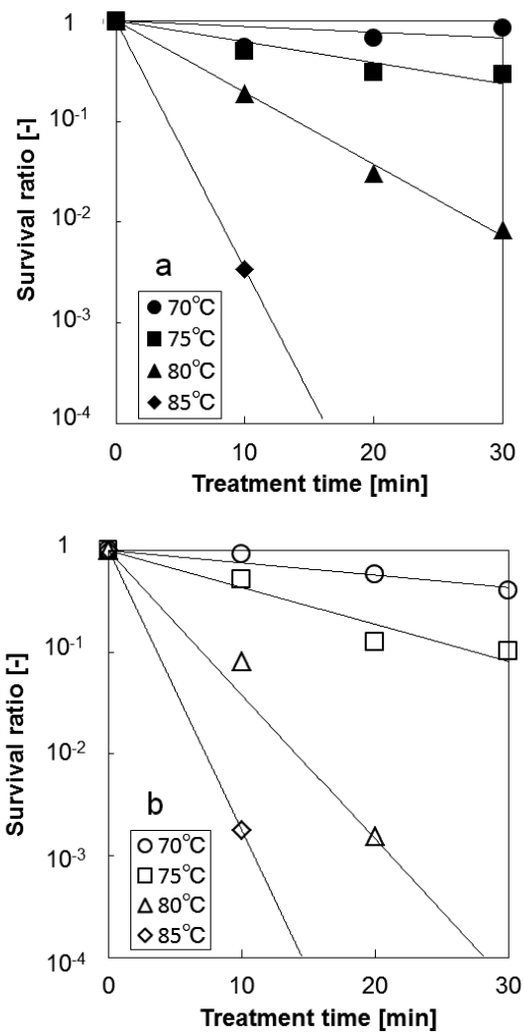

図 7　加熱による *B. barbaricus* の殺菌；（a）培養 4 時間，（b）培養 1 週間

Fig.7　Inactivation of *B. barbaricus* by the heat treatment ; (a) 4 h and (b) 1 week cultivation cells.

また *B. barbaricus* の熱殺菌試験（図 7）において 80℃ならびに 85℃の処理における培養 4 時間の細胞と培養 1 週間の細胞を比較すると，培養 1 週間の細胞のほうが熱殺菌に対して僅かながら高い感受性を示している．このことから *B. barbaricus* は一般的な *Bacillus* 属微生物において芽胞を形成する培養条件では芽胞を形成しない，あるいは芽胞を形成しても芽胞は *B. subtilis* のように高い熱耐性を示さないことが確認された．

オゾン殺菌試験は熱殺菌試験と同様に菌体濃度を 10^4 cells/ml に調整した *B. barbaricus* に加え，同菌体濃度とした *E. coli*，*B. subtilis* 芽胞と栄養細胞の菌体試料それぞ

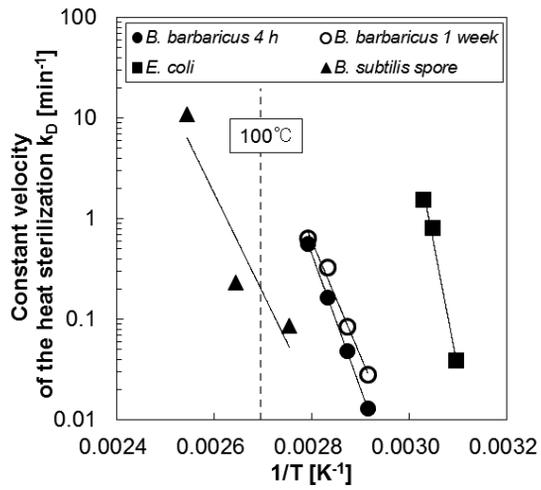

図 8　*B. barbaricus*，*E. coli* ならびに *B. subtilis* 胞子の加熱殺菌速度のアレニウスプロット

Fig.8　Arrhenius plots of *B. barbaricus*, *E. coli* and *B. subtilis* spore inactivation in heat treatment.

れに終濃度 0.6，0.75，1.5 ppm となるようオゾン水を混合することで実施した．培養 4 時間の細胞では終濃度 0.6，0.75 ppm のオゾンの混合では殺菌効果はそれぞれ 1 桁未満であったが（図 9a, b），終濃度 1.5 ppm のオゾンの混合により生菌は確認されなくなった（図 9c）．一方で培養 1 週間の細胞では終濃度 0.6 ppm のオゾンの混合により生菌が確認されなくなった（図 9a）．

E. coli，*B. subtilis* 芽胞に対して行ったオゾン殺菌試験では *E. coli* では最も薄い終濃度 0.6 ppm のオゾンの混合により生菌が確認されなくなる一方で，*B. subtilis* 芽胞は最も濃い終濃度 1.5 ppm のオゾンの混合においても 1 桁未満の殺菌効果が確認されるにとどまった．これらの結果より，培養 4 時間の細胞は対数増殖期後期の栄養細胞であるにも関わらず *B. subtilis* 芽胞ほどではないもののオゾンに対し耐性を有することが明らかとなった．また熱殺菌の場合と同様にオゾン殺菌においても培養 1 週間の細胞は培養 4 時間の細胞に比べオゾンに対し高い感受性を示した．パルス放電殺菌においては培養期間の異なる細胞間でこの様な殺菌効果の差異は確認されずオゾン殺菌における挙動とは異なることが確認された．

今回分離されたパルス放電に耐性を示す菌 *B. barbaricus* は同定試験の結果 *Bacillus* 属に属することから，パルス放電に対する耐性は過酷な外部環境に対して耐性を有する芽胞の形成に起因したものであることが考えられた．しかしながら，パルス放電に対しては栄養細胞と芽胞を形成するような培養条件共に高い耐性を示す一方で，熱に対しては耐性を示さず，オゾンに対しては芽胞を形成するような培養条件においては *E. coli* などと同様に高い感受性を示した．このことから *B. barbaricus* は培養状態

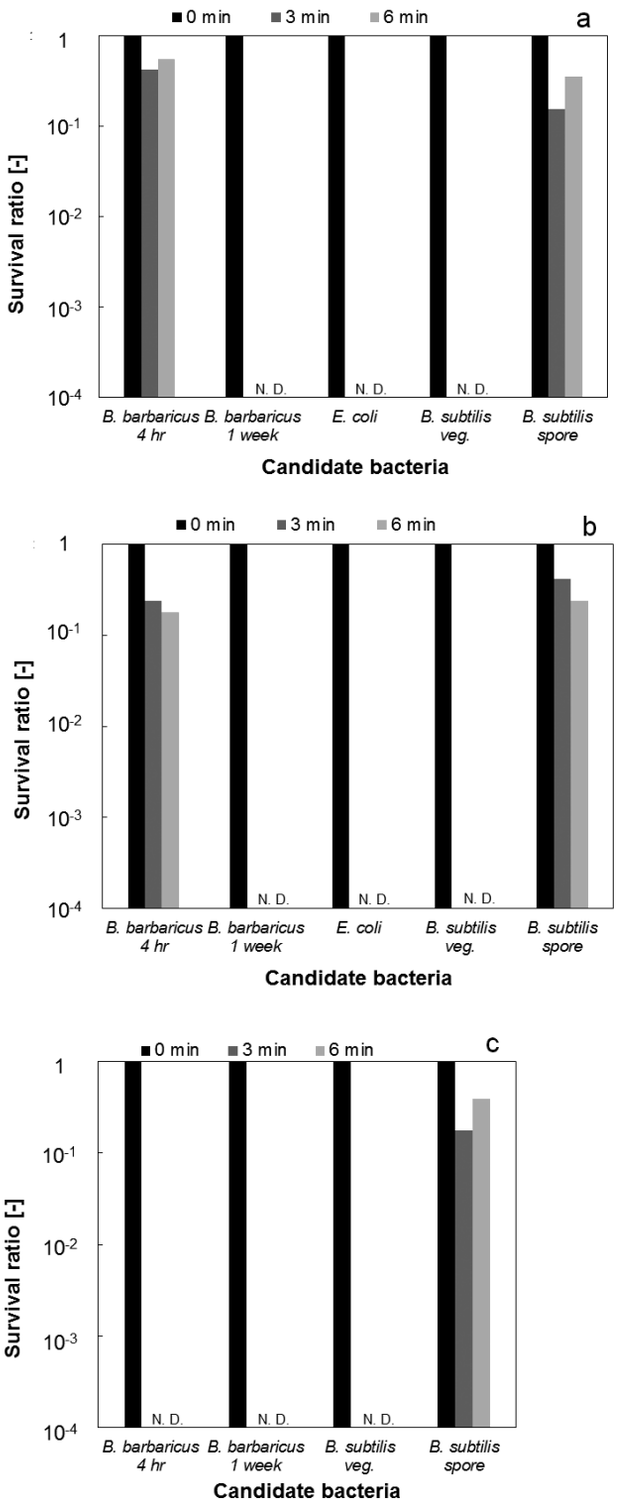

図 9　オゾン水による *E. coli*，*B. barbaricus* および *B. subtilis* の殺菌；オゾン水終濃度（a）0.6，（b）0.75，（c）1.5 ppm

Fig.9　Inactivation of *E. coli*, *B. barbaricus* and *B. subtilis* by ozone treatment ; at final ozone concentration of（a）0.6,（b）0.75 and（c）1.5 ppm, respectively.

に関わらずパルス放電に対して高い耐性を示し，芽胞を形成しないか形成したとしても過酷な外部環境に耐えうるような強固な構造を有しないと考えられる．

4. 結言

使用済み切削油から分離されたパルス放電に対し高い耐性を示す菌について，微生物同定試験ならびにパルス放電をはじめとする種々の殺菌試験を行い以下の結果を得た.

I. パルス放電処理した使用済み水溶性切削油から検出された菌 #3 は *B. barbaricus* と同定された.

II. 菌 #3 は細胞の状態によらず 30 分のパルス放電殺菌における生菌率の減少は 1 桁未満であり，栄養細胞の状態でもパルス放電に対し高い耐性を示すことが確認された.

III. 菌 #3 は熱に対しては耐性を示さなかった．パルス放電殺菌では確認されなかった培養時間の違いによる耐性の差がオゾン殺菌では見られ，培養 1 週間の細胞ではオゾン耐性は確認されなかったが，培養 4 時間の細胞はオゾンに対し比較的高い耐性を示した.

パルス放電を含むプラズマによる水処理では活性種の生成を含め様々な化学的・物理的作用が生じるため，耐性菌の存在は考えられないと思われてきた．そのため今回検出された *B. barbaricus* とされる菌 #3 は非常にめずらしい菌と考えられる．特に栄養細胞の状態でもプラズマ耐性を示すので, このメカニズムの解明が必要である.

参考文献

1）米澤彩子，高橋克幸，颯田尚哉，高木浩一：水中プラズマを用いたジクロロメタンの分解特性．静電気学会誌，**35**［1］（2011）31-37

2）J.F. Kolb, R.P. Joshi, S. Xiao and K.H. Schoenbach: Streamers in water and other dielectric liquids. L. Phys. D. Appl. Phys., **41**（2008）234007

3）S. Ghershman, O. Mozgina, A. Belkind, K. Becker and E. Kunhardt: Pulsed Electrical Discharge in Bubbled Water. Contrib. Plasma Phys., **47**（2007）19

4）K. Schoenbach, J. Kolb, S. Xiao, S. Katsuki, Y. Minamitani and R. Joshi: Electrical breakdown of water in microgaps. Plasma Sources Sci. technol., **17**（2008）024010

5）J. Qian: Microbubble-based model analysis of liquid breakdown initiation by a submicrosecond pulse. J. Appl. Phys., **97**（2005）113304

6）谷野孝徳，柳沢美貴，大嶋孝之：投げ込み式水中バブル - パルス放電装置の殺菌特性. 静電気学会誌, **36**［1］（2012）37-42

7）大嶋孝之，谷野孝徳，成毛由典：投げ込み式水中バブル - パルス放電装置の試作と放電特性. 静電気学会誌, **35**［3］（2011）145-150

8）大嶋孝之，堀野太希，柴田義幸，長谷川優子，佐藤正之：水中パルス放電による可溶性タンパク質の分解．静電気学会誌，**33**［1］（2009）14-19

9）谷野孝徳，中村ふみ，大嶋孝之，佐藤正之：マイクロバブルを用いた水中放電プラズマによる界面活性剤の分解．静電気学会誌，**34**［1］（2010）31-36

10）Paul De Vos, George M. Garrity, Dorothy Jones, etc.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology SECOND EDITION Volume Three The Firmicutes Springer（2009）

11）C. O. TANT and E. O. BENNETT：The Isolation of Pathogenic Bacteria from Used Emulsion Oils. Appl Microbiol., **4**［6］（1956）332-338

12）渡部一仁，土戸哲明，坂上吉一：微生物胞子―制御と対策―，サイエンスフォーラム（2011）362