

## パルス電界による海水の殺菌

中田 悠太\*, 瑞慶覧 章朝\*<sup>1</sup>, 澤井 淳\*, 和田 理征\*, 豊角 浩之\*\*, 乾 貴誌\*\*

(2017年3月7日受付; 2017年7月24日受理)

## Inactivation of Microorganisms in Seawater by Pulsed Electric Field

Yuta NAKADA\*, Akinori ZUKERAN\*<sup>1</sup>,

Jun SAWAI\*, Risei WADA\*, Hiroyuki TOYOZUMI\*\* and Takashi INUI\*\*

(Received March 7, 2017; Accepted July 24, 2017)

The purpose of this study is to investigate an inactivation effect on microorganisms in seawater using a pulsed electric field. The pulsed electric field was generated in the seawater by applying a pulse high voltage between electrodes. The survival ratio was estimated by colony count. The HClO concentration and temperature of the seawater were measured to investigate the influences of electrolysis and heat sterilization, and the influence of radicals generated by discharge was estimated. The form of microorganisms were also observed using a scanning electron microscope (SEM). As a result, the survival ratio in the seawater decreased with an increase in the number of pulses, an increase in the applied voltage, and a decrease in the electrode gap. The temperature of the seawater increased as the number of pulses increased. This fact indicates that increasing the temperature contributes to the inactivation. Furthermore, a destruction of the cell wall was also observed by SEM. Therefore, the inactivation effect is most likely due to the electroporation and the increase in the seawater temperature.

## 1. はじめに

水は生活に必要不可欠である。水道水の細菌を処理できなければ、感染症、疫病などの流行の危険がある。そのため、世界的に水の殺菌が必要とされている。水の殺菌は、生活水の他に海水にも需要がある。その一例として、貨物船などの重しとして使用されるバラスト水が挙げられる。バラスト水は採水した国とは異なる国で排水される。このため、バラスト水に含まれている水生生物の国際間移送による生態系の攪乱や感染症の拡大が懸念されている。1991年にはコレラ菌が南米に排出されたことで、100万人が感染し1万人が死亡している<sup>1)</sup>。

海水の主要な殺菌方法として、薬剤<sup>2)</sup>、UV<sup>3)</sup>、電気分解<sup>4)</sup>、オゾン利用<sup>5)</sup>などが挙げられ、研究段階ではあるが放電プラズマを利用した例もある<sup>6)</sup>。薬剤殺菌は、水質の制限を受けにくい薬剤が水中に残留し、また船内に薬剤保管スペースを確保する必要がある。UV殺菌は構造がシンプルで薬剤を使用しないが、消費電力が大き

く、照射ランプの交換が必要である。電気分解殺菌は、コンパクトで薬剤が不要だが、水質の影響を受けること、電極の劣化が問題である。オゾン利用は、配管が容易で薬剤が不要だが消費電力が大きく、オゾン漏洩対策が必要である<sup>7)</sup>。また、上記の処理方法は、いずれも50 µm以上のプランクトン及び細菌を含む海洋生物が処理されにくいことが報告されている<sup>8)</sup>。そのため50 µm以上の海洋生物をフィルターで捕集し、50 µm以下の海洋生物を薬剤、UV、電気分解及びオゾンなどで処理する二段式構成が一般的である。

一方、液体食品の非加熱殺菌<sup>9)</sup>などを目的としてパルス電界を利用した殺菌方法が提案されている。微生物のサイズが大きいほど殺菌効果が高い、電極の劣化が少ないこと、物理的な殺菌方法であるという特徴がある。

パルス電界を用いることで、薬剤、電極の交換が不要であり、50 µm以上の水生生物に対しても有効な、従来にはない特徴をもつバラスト処理装置が開発できる可能性がある。バラスト水処理を目的としたパルス電界殺菌<sup>6)</sup>や高導電率の液体に対する研究<sup>10)</sup>は行われているが、いずれも海水は用いられておらず、それを用いた研究例はあまり見掛けない。そこで本研究では、パルス電界を用いた海水の殺菌を試みた。海水の殺菌効果、及び殺菌要因を検討したので報告する。

キーワード：パルス電界、殺菌、バラスト水、電気穿孔

\* 神奈川工科大学

(〒243-0292 神奈川県厚木市下荻野 1030)

Kanagawa Institute of Technology, 1030, Shimo-ogino, Atsugi-shi, Kanagawa 243-0292, Japan

\*\* 富士電機株式会社

(〒191-8502 東京都日野市富士町 1)

Fuji Electric Co., Ltd., 1, Fuji-machi, Hino-city, Tokyo 191-8502, Japan

<sup>1</sup> zukeran-akinori@ele.kanagawa-it.ac.jp

## 2. 殺菌要因

海水にパルス電界を加えた際の殺菌要因として、電気

分解, 活性種の生成, 海水の温度上昇, 電気穿孔の4つが考えられる。

海水は導電率が高いため, 電気分解が起こりやすい。また, 海水中には NaCl が存在しており, 電気分解によって殺菌効果のある次亜塩素酸を生成する可能性がある。次亜塩素酸は, 微生物の細胞内部へ透過し細胞の内部組織を直接酸化するため高い殺菌効果が得られる。

高電圧を印加するため, 放電が発生し, その影響で活性種が生成される可能性もある。活性種には OH ラジカルなどが考えられ, 高い酸化力によって殺菌する。

パルス電界を海水に加えることで, 海水温度も上昇すると考えられる。微生物は環境の急激な変化に弱く, 特に温度変化は様々な殺菌の用途で用いられている。微生物が加熱されることによって, タンパク質の熱変性や膜構造の破壊が起こり死滅する。

海水中にはイオンが豊富に存在するため, 電気穿孔も起きると考えられる。細胞は主に細胞膜, 細胞質で構成されている。細胞膜は電氣的に絶縁体であり, 細胞質はイオンを含んだ導電性流体である。パルス電界を海水に印加すると, 細胞内と海水中のイオンが細胞膜の内側と外側に整列する。それにより, 細胞膜にマクスウェル応力が生じ, 孔を形成する<sup>11,12)</sup>。特に細胞膜に生じる電位差が1 V を超えると電気穿孔が起こるといわれている。孔が小さい場合は, 細胞膜が自己修復するが, 孔が大きいと修復されずに内部組織が流出する。

### 3. 実験方法

実験システムの概要を図1に示す。実験システムは, パルス電源(株式会社末松電子製作所, MPC3010S-50SP)とビーカー(ガラス製, 200 mL)によって構成

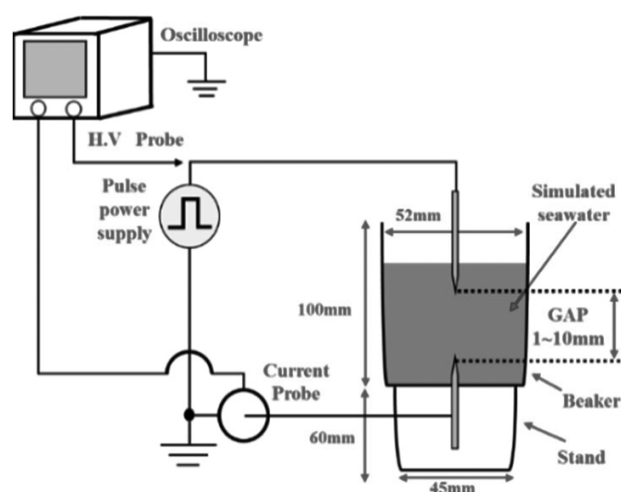


図1 実験システムの概要

Fig. 1 Schematic diagram of experimental system.

した。専用の台の上に置かれたビーカーに針電極(炭素工具鋼, 直径2 mm, 曲率半径0.028 mm)を1~10 mmの電極間隔で対向させ配置し, 人工海水(富田製薬株式会社, マリンアート・スーパーフォーミュラ, 導電率約50 mS/cm, 塩濃度約3.4%)を投入した。一方の電極を接地し, 他方の電極に高電圧パルスを印加することで, 電極間に高パルス電界を発生させた。

人工海水, ビーカーは事前にオートクレイブ(TOMY, SS-320)で高圧蒸気滅菌処理したものを用い, 殺菌実験はクリーンベンチ内で行った。人工海水は20 ml~30 mlとし, 電極間隔に合わせて調整した。本研究では, 取扱上安全で海水中でも生息できる耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* NBRC1130を試験菌として使用した。この *Z. rouxii* の濃度を  $10^4 \sim 10^5$  CFU/mL とした人工海水を装置へ投入した。ただし, *Z. rouxii* は無菌試験用ブドウ糖ペプトン培地(栄研化学株式会社)にて室温(25℃)で1週間から9日間培養後, 遠心分離機にて培地成分を除去している。最大電圧15 kV<sub>p</sub> のパルス電圧を繰り返し周波数50 ppsで印加することで, 電極間に電界を発生させた。パルス電圧印加回数1000回ごとに攪拌, 5000回ごとに試験液を採取した。なお, 印加回数はパルス電源に付属しているカウンタで測定した。

試験後, パールコアポテトデキストロース寒天培地(栄研化学株式会社)にて25℃で3日間培養し, 菌コロニー数を計測した。計測したコロニー数から(1)式で生存率を求め, 殺菌効果に対する電圧印加回数と電極間隔の影響を検討した。

$$\text{生存率} = \log(N/N_0) \quad (1)$$

ただし,  $N_0$  は初期菌濃度 [CFU/mL],  $N$  は電圧印加後の菌濃度 [CFU/mL] である。

また, パルス電圧印加回数毎に海水温度, pH(株式会社東興化学研究所, TPX-999i), 残留遊離塩素濃度(株式会社タクミナ, DCT-01)も測定した。測定の際は海水を攪拌させ, 電極とビーカー円面の中間付近を測定位置とした。ただし, これらの測定の際は *Z. rouxii* は海水中に投入していない。また, 残留遊離塩素濃度は測定器の性能上海水での測定が困難なため, 海水と同じ塩分濃度に調整した食塩水を使用し測定した。

パルス電界を印加した際, 針先端に僅かな発光と気泡が確認できた。そのため, 放電による活性種の生成が考えられる。そこで, L-ヒスチジン(和光純薬工業株式会社, 082-00683)をラジカルスカベンジャー<sup>13)</sup>として, 海水中に5 mMもしくは50 mMの濃度で添加し, 活性種の生成の確認及び殺菌効果の変化を検討した。

加熱のみの殺菌効果は、温度毎の海水の生存率と時間の関係を測定することで検討した。試験管に *Z. rouxii* の入った海水（20 ml）を投入し、水槽に設置した。水槽内の水温はサーモミNDER（タイテック株式会社, SM-05）を用いて 40℃～50℃の任意の温度で一定に制御した。実験は3回行い再現性を確認した。

#### 4. 実験結果及び考察

##### 4.1 基礎特性

電極間隔 1 mm, 10 kV 印加時のパルス電圧波形の例を図2に示す。ただし、人工海水中で印加した際の結果である。約 100 ns でピーク値まで立ち上がり、約 200 ns で立ち下がっている。瞬間的に高電圧を加えることができる。そのときのパルス電流波形の例を図3に示す。電圧とほぼ同相であり、ピーク値は約 150 A である。各電極間隔における人工海水中の電圧電流特性を図4に示す。電圧、電流はすべてパルスのピーク値で示している。

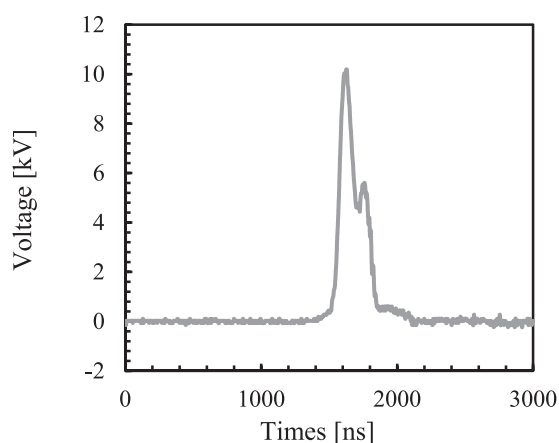


図2 パルス電圧波形  
Fig. 2 The pulse voltage waveform.

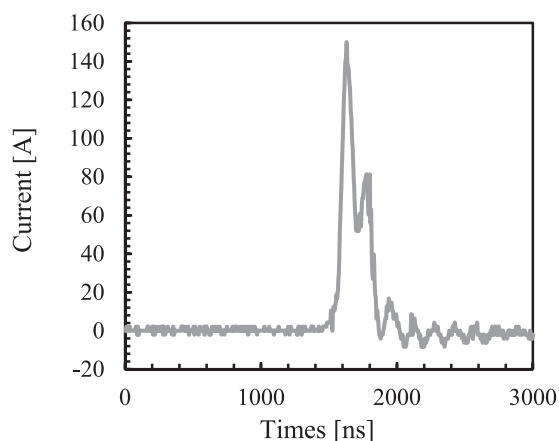


図3 パルス電流波形  
Fig. 3 The pulse current waveform.

いずれの電極間隔においても、電圧が高くなる毎に電流値が大きくなっている。さらに、すべての電極間隔で電圧 15 kV<sub>p</sub> 以上、最大電流 200 A<sub>p</sub> 以上が得られた。電気穿孔は印加電圧が高いほど起こりやすい<sup>14)</sup>と考えられるため、殺菌実験では電圧を 1 kV<sub>p</sub>～15 kV<sub>p</sub> に設定した。

パルス印加回数と海水温度の関係を図5に示す。ただし、印加電圧は 10 kV<sub>p</sub> である。いずれの電極間隔においても、パルス印加回数が増えるとともに海水温度は上昇した。また、電極間隔が狭いほど海水温度が上昇しており、電極間隔 1 mm ではパルス印加回数 25000 回で 20℃ 上昇し、水温約 40℃ となった。これは、電極間隔が狭いほど、海水の抵抗が小さくなり加わる電力が増加するためである。図2, 3 よりパルス印加にかかる電力量を式(2)で求めた。ただし、 $V$ ,  $I$  は時間  $t$  における印加電圧 [V] および電流 [A],  $N$  はパルス印加回数である。

$$W = \int VI dt \times N \quad [\text{J}] \quad (2)$$

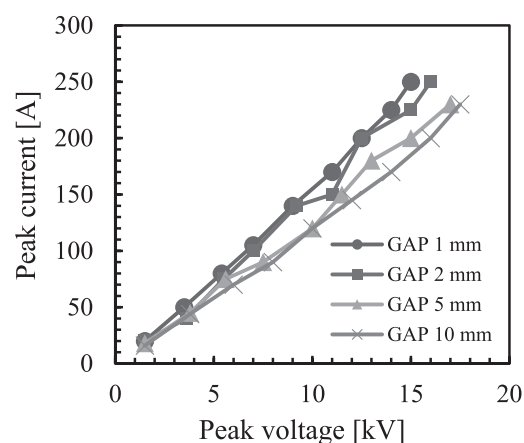


図4 各電極間隔におけるピーク電圧に対するピーク電流の特性  
Fig. 4 Peak current as a function of peak voltage for various electrode gaps.

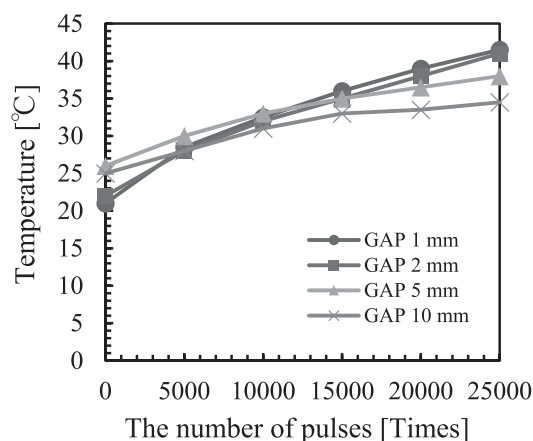


図5 各電極間隔におけるパルス印加回数と水温の関係  
Fig. 5 Temperature increment as a function of the number of pulses for various electrode gaps.

その結果, 25000回印加時の電力量は 3692 Jであった. 海水の比熱を  $4.00 \text{ J/g}^\circ\text{C}^{15)}$  とすると, 海水 20 mL の質量は 20.3 g であったので温度上昇量は,

$$\frac{3692}{4.00 \times 20.3} = 45.4 \quad (3)$$

と求められ, 海水 20 mL を約  $45^\circ\text{C}$  上昇させることができる. 実測値と比べ倍程度であり, 約 56% が放熱したと考えられる.

パルス印加回数と pH の関係を図 6 に示す. ただし, 印加電圧は  $10 \text{ kV}_p$  である. pH はパルス電圧の印加回数によらず, ほぼ一定であった.

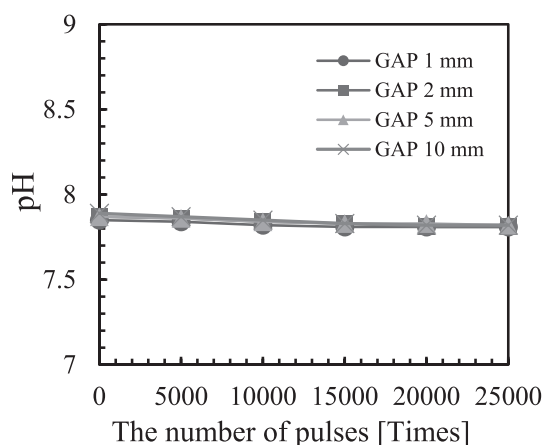


図 6 各電極間隔におけるパルス印加回数と pH の関係  
Fig. 6 Relationship between pH and the number of pulses for various electrode gaps.

#### 4.2 殺菌効果の検討

生存率とパルス印加回数の関係を図 7 に示す. ただし, 印加電圧は  $10 \text{ kV}_p$  である. いずれの電極間隔においても印加回数の増加に伴い, 生存率は減少している. また, 電極間隔が狭くなるほど殺菌効果が高くなった.

生存率と印加電圧の関係を図 8 に示す. いずれの結果も電極間隔 1 mm, パルス印加回数 25000 回での生存率である. 印加電圧の上昇とともに生存率が低下している. 以上の結果から, パルス印加回数が多く, 電極間隔が短く, 電圧が高いほど殺菌効果が高くなることが示された.

#### 4.3 殺菌要因の検討

図 7, 8 で示された殺菌効果向上の要因として, 電気分解, 活性種の生成, 海水温度の上昇および電気穿孔が考えられる. そこで, これら 4 つの要因に対してそれぞれ検討を行った.

水溶液中に NaCl が存在すると, 電気分解によって殺菌効果のある次亜塩素酸が生成する<sup>16,17)</sup>. そこで, 印加電圧  $10 \text{ kV}_p$ , パルス印加回数 5000 回ごとの残留遊離塩素濃度を測定し, その値から次亜塩素酸濃度を求めた.

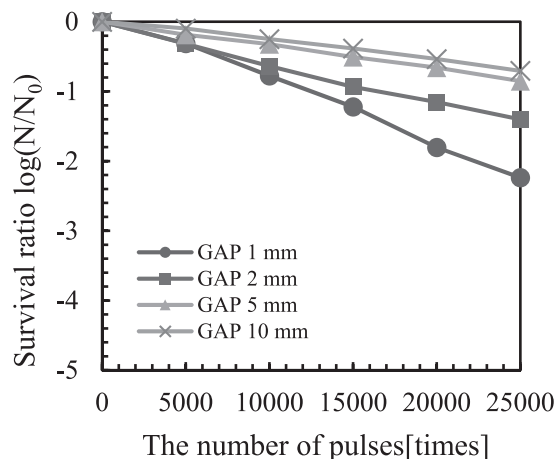


図 7 各電極間隔における生存率とパルス印加回数の関係  
Fig. 7 The survival ratio as a function of the number of pulses for various electrode gaps.

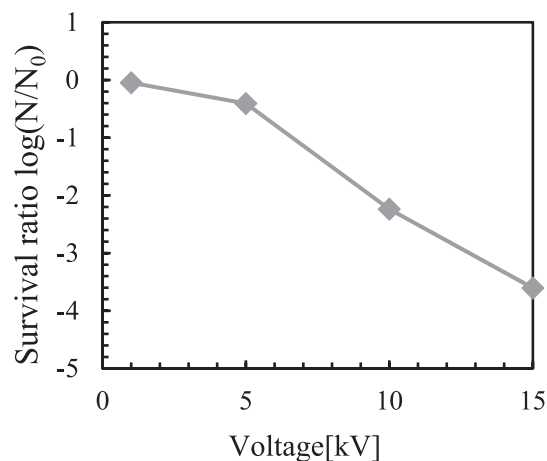


図 8 生存率と印加電圧の関係  
Fig. 8 The survival ratio as a function of the applied voltage.

測定の結果, 残留遊離塩素濃度は測定器の測定限界 ( $0.02 \text{ ppm}$ ) 以下であった. また, 図 6 に示した pH の測定結果においても変化はなく, 殺菌の原因となる次亜塩素酸の生成や, pH を変動させるような顕著な電気分解は起こっていないといえる.

活性種の生成を検討するため, ラジカスカルベンジャーとして L-ヒスチジンを  $5 \text{ mM}$ ,  $50 \text{ mM}$  の濃度で添加した場合と海水のみの場合で生菌数の比較を行った. 生菌数の比とパルス印加回数の関係に対する L-ヒスチジン濃度の影響を図 9 に示す. ただし, 印加電圧は  $10 \text{ kV}_p$ , 電極間隔は 1 mm である. 生菌数の比は (4) 式より求めた.

$$\text{生菌数の比} = (N_L/N_S) \quad (4)$$

ただし,  $N_S$  は海水のみの場合の生菌数,  $N_L$  は L-ヒスチジン添加時の生菌数である. 比が 1 より大きければ, 生菌数が増えており, 放電により生成された活性種がラジカスカルベンジャーによって消費されていることを示



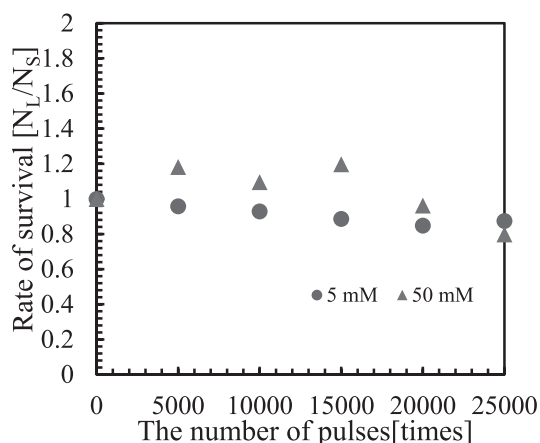


図9 生菌数の比とパルス印加回数に対する L-ヒスチジン濃度の影響

Fig. 9 The rate of survival as a function of the number of pulses for various L-Histidine concentrations.

す。結果より、いずれの濃度においても生菌数の比はほぼ1であり、ラジカルスカベンジャー添加の影響はない。すなわち、殺菌に寄与するほどの活性種は放電によって生成されていないといえる。

海水温度の影響の関係を検討するため、パルス電界を加えず、海水の温度を変化させ生存率を測定した。生存率の時間変化に対する海水温度の影響を図10に示す。海水温度40℃では、時間に対して生存率に変化はみられない。45℃では、投入直後から生存率が低下し、40分で $10^{-4}$ に達した。50℃では、さらにその傾向は強まり、20分で $10^{-4}$ に達した。図5に示したように、パルス電界を加えた際は、水温が最大40℃程度であり、高い殺菌効果を得られる温度に達していない。しかし、電極付近ではより高温となっていることが予想される。さらに、パルス電界殺菌における細胞穿孔の要因については投入されたエネルギーによるジュール熱の影響もあると言われている<sup>18)</sup>。そのため、熱が殺菌に寄与していると考えられる。そこで、パルス電界を印加した際の海水温度と生存率の関係を図11に示す、図7の横軸を図5をもとに温度に変換した。いずれの電極間隔においても、海水温度の上昇とともに生存率が減少している。しかし、同一温度においても電極間隔が狭いほど生存率が低い。電極間隔が狭いほど、すなわち電界が強いほど生存率が低下していることから、殺菌要因として局所的な温度上昇の他に、電気穿孔が考えられる。

電気穿孔による殺菌では、細胞膜を破壊するため電界処理後の菌の形状に変化があると考えられる。そこで、電子顕微鏡を用いて電界処理前後及び加熱処理後の菌の形状を観察した。観察結果を図12に示す。ただし、電界処理は印加電圧10 kV、電極間隔1 mm時の結果、加

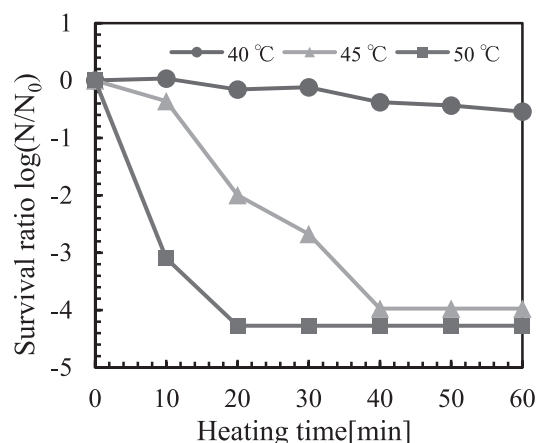


図10 生存率の時間変化に対する海水温度の影響

Fig. 10 The survival ratio as a function of heating time for various water temperature.

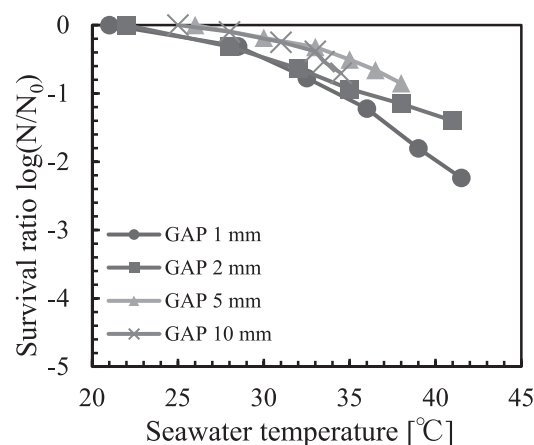
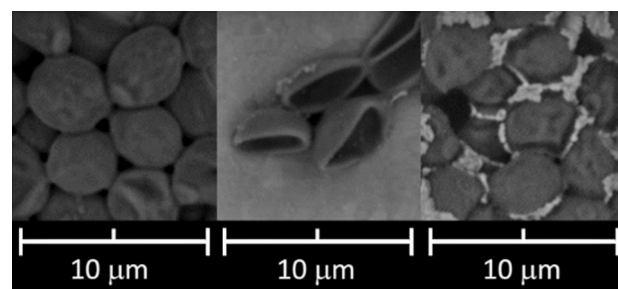


図11 パルス電界印加時の海水温度と生存率の関係

Fig. 11 The survival ratio as a function of seawater temperature by pulsed electric field.



(a) before (b) pulsed electric field (c) heating treatment

図12 *Z. rouxii* の電子顕微鏡写真

Fig. 12 The SEM images of *Z. rouxii* before and after applying the pulsed electric field.

熱処理は60℃で60分間処理した結果である。(a)の処理前の菌は球形状のものが多く、(b)の電界処理後の菌は内容物がなくなりしぼんだような形状となっている。これは電気穿孔によって細胞膜が破壊され、細胞質が放出されたためであると考えられる。パルス電界処理

後のビール酵母の観察<sup>19)</sup>でも内容物の漏出した様子の観察結果が報告されており、パルス電界処理によって菌の細胞膜に孔が空き内容物が漏出することが示唆された。また、パルス電界殺菌は、処理温度に依存し温度が高いほど効果があるとの報告がある<sup>20)</sup>。そのため、本実験においても、海水の温度上昇に伴い電気穿孔が発生しやすくなったと考えられる。(c)の加熱処理の結果から、加熱処理では形状に変化がみられないことがわかる。以上のことから、電気穿孔は殺菌効果の要因であるといえる。すなわち、パルス電界による海水の殺菌では、海水温度の上昇、電気穿孔による細胞膜の破壊が複合的に作用し、効果が得られているといえる。また、本実験条件では電気分解及び活性種による効果はないといえる。

## 5. まとめ

パルス電界による海水の殺菌効果及び、殺菌要因を検討した結果、以下のことが明らかとなった。

- ①海水中にパルス電界を加えることによって、殺菌効果が得られた。
- ②生存率は、パルス印加回数が多く、電圧が高く、電極間隔が狭いほど低下した。
- ③パルス電界による海水の温度上昇が殺菌要因として示された。
- ④電界処理前後の菌の形状を観察した結果、処理後の菌に形状の変化が見られ、電気穿孔が殺菌要因として示された。
- ⑤パルス電界による海水の殺菌は温度上昇、電気穿孔の複合効果によるものである。

## 参考文献

- 1) 国土交通省：「船舶のバラスト水及び沈殿物の規制及び管理のための国際条約」の採択について、報道資料、平成16年2月16日(2004)
- 2) 岡本幸彦、片岡 久：船舶バラスト水処理装置 JFE バラストエース、日本マリンエンジニアリング学会誌, **46** [4] (2011) 97-102
- 3) 岡部和弘、母倉修司、植野慎也：UV バラスト水処理装置 (ECOMARINE-UV) の FDA 法による生物殺滅性能、日本マリンエンジニアリング学会誌, **51** [2] (2016) 215-221
- 4) 浅野昌道、藤瀬和彦、岡田弘一：フィルターろ過処理と電界塩素処理による複合処理システム、日本マリンエンジニアリング学会誌, **41** [2] (2006) 69-74
- 5) 植木修次：オゾン利用によるバラスト水処理の開発、静電気学会誌, **37** [6] (2013) 262-267
- 6) 猪原 哲、伊藤博徳、小林倫宣、井上侑子、寺東宏明、玉川雅章：水中キャビテーション・放電プラズマ併用方式によるプランクトンおよび大腸菌処理、電気学会論文誌 A (基礎・材料・共通部門誌), **135** [6] (2015) 357-365
- 7) 小西和広、田平 悠、大久保貴史、大川内享：バラスト水処理システムと期間艀装、日本マリンエンジニアリング学会誌, **48** [1] (2013) 7-11
- 8) 大村卓朗：バラスト水処理技術の開発経過と現状、日本海難防止協会情報誌、海と安全 2016 冬, pp.10-15 (2016)
- 9) 大嶋孝之、高橋克幸：水産業・食品加工への高電界活用～鮮度維持と有用成分抽出～、電気学会誌, **136** [12] (2016)
- 10) 村上裕一、村本裕二、清水教之：高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす水溶液中のイオンの影響、静電気学会誌, **40** [2] (2016) 114-119
- 11) U. Zimmermann, G. Pilwat and F. Riemann : DIELECTRIC BREAKDOWN OF CELL MEMBRANES. Biophysical Journal, **14** (1974) 881
- 12) 村上裕一、村本裕二、清水教之：高電界パルスによる大腸菌殺菌に及ぼす水溶液中のアミノ酸の影響、電気学会論文誌 A (基礎・材料・共通部門誌) **136** [9] (2016) 568-573
- 13) 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] (2011) 37-42
- 14) H.Hülshager, J.Potel, and E.-G. Niemann : Killing of Bacteria with Electric Pulses of High Field Strength. Radiat Environ Biophys, **20**, pp.53-65 (1981)
- 15) LEROY A. BROMLEY, VALERIA A. DESAUSSURE, JAMES C. CLIPP and JAMES S. WRIGHT : Heat Capacities of Sea Water Solutions at Salinities of 1 to 12 ‰ and Temperatures of 2° to 80°C. JOURNAL OF CHEMICAL AND ENGINEERING DATA, **12** [2], pp.202-206, APRIL 1967
- 16) 橋口拓也、瑞慶覧章朝、澤井 淳、乾 貴誌：食塩水中緑膿菌の殺菌に対する電解の効果、第13回環境技術学会年次大会予稿集, pp.58-59 (2013)
- 17) 乾 貴誌、瑞慶覧章朝、浅川大輔、豊角浩之、澤井 淳、當山広幸、中田栄寿、江原由泰：電気分解による海水のアルカリ上昇に及ぼす海水成分の影響 ―海水による湿式スクラバの性能向上に関して―、環境技術, **44** [2] (2015) 105-112
- 18) 齋藤高輝、遠藤僚太、野澤康仁、南谷靖史、深田秀樹：パルス電界殺菌における細胞穿孔に対する絶縁破壊理論の適用に関する一考察、電気学会論文誌 A (基礎・材料・共通部門誌), **135**, No.6, pp.341-346, 2015
- 19) 佐藤正之、鴫田恵子、定方正毅、佐賀井武：微生物殺菌に対する高電圧水中パルス放電の効果、化学工学論文集, **14** [4] (1988) 556-559
- 20) Takayuki Ohshima, Kanako Okuyama, Masayuki Sato : Effect of culture temperature on high-voltage pulse sterilization of Escherichia coli. Journal of ELECTROSTATICS **55** (2002) 227-235