

【解説】

バイオフィルムとオゾン(2)

オゾンによるバイオフィルムの殺菌・除去作用

立川真理子

日本医療・環境オゾン研究会会報, Vol.16, No.1, 12-14. (2009)

解説

バイオフィームとオゾン (2) オゾンによるバイオフィームの殺菌・除去作用

日本大学薬学部 立川真理子

1. はじめに

水中微生物に対する殺菌効果は種による抵抗性の違いだけでなく、実際にはそれぞれの微生物が環境水中で器物に付着しているか、凝集しているか、さらにはバイオフィームを形成しているかなどで大きく異なり、さらには試験水の有機物含量などによっても異なることが指摘されている^{1, 2)}。環境において、微生物の多くは器物に付着して、マイクロコロニー (micro-colony) やバイオフィーム (biofilm) を形成して存在しており、水道敷設管、水処理施設、プール水や浴場水の循環ろ過装置、そして医療用機器などにおけるバイオフィーム形成が問題となっている。一般にバイオフィーム形成により微生物の環境変化や殺菌剤に対する抵抗性の増加が知られており、その要因として微生物自体の抵抗性の変化に加えて分泌される細胞外多糖類 (extracellular polysaccharide, EPS) の保護効果、そしてレジオネラ (*Legionella pneumophila*) などで指摘されているバイオフィーム形成によるアメーバとの共生による耐性の増加などが挙げられる。これらのことから前報³⁾ではバイオフィーム形成機序とその構成成分、特にその構造維持に主要な役割を果たす EPS について解説を行った。続く本報ではオゾンによるバイオフィーム殺菌・除去の実験例を検索し、EPS の関与に注目して解説を試みた。

2. バイオフィームとオゾン

オゾンによるバイオフィームに対する作用、しかも EPS を視野に入れた実験例は数少ない。著者らは環境常在菌 (*Pseudomonas fluorescens* および *Pseudomonas aeruginosa*) を用いてバイオフィームを調製し、バッチおよび流水式曝露でのオゾンによる殺菌・除去作用を比較検討した⁴⁾。実験に用いた両細菌は同属のグラム陰性桿菌であるが、形成したバイオフィームは *P. fluorescens* ではその形成が肉眼でも観察されたが、*P. aeruginosa* では肉眼での観察はできず、またガラス片 (14×26 mm) 上に付着している細菌数は *P. fluorescens* が $2-8 \times 10^8$ 、*P. aeruginosa* は $2-3 \times 10^7$ であり、それぞれのバイオフィームの構成成分と構造は大きく異なることが予想された。バイオフィーム形成により *P. fluorescens* と *P. aeruginosa* では浮遊細菌に比べそれぞれ 3000 倍と 10 倍ほどオゾンに対する抵抗性は増したが、いずれのバイオフィームにおいても流水式でのおよそ 1 mg/L、5 分の曝露により生菌率は 1% 以下に低下した。またいずれのバイオフィームにおいても曝露時間が増加すると不活化率が低下することが観察され、バイオフィーム構成成分とオゾンの反応によりオゾンの浸透の妨害が生じることが示唆された。これらのことからバイオフィームの殺菌に有効なオゾン濃度はそれぞれのバイオフィームにより異なり、浮遊細菌から得られる CT 値 (Concentration × Time) のみではその効果は予測できないことが示唆された。共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による観察では先に述べたようなバイオフィームにおける菌体密度や構造の違いが明らかになり、*P. fluorescens* では菌体同志が密に接着したバイオフィームが形成するが、*P. aeruginosa* では個々の菌体が EPS 中に散在するようなバイオフィームが形成し、これらの相違によるオゾン殺菌効果への影響が示唆された。*P. fluorescens* の EPS は蛍光色素を抱合したレクチンを結合させることにより染色が可能であり、オゾン水曝露後の EPS 層の変化を比べたところ、バイオフィーム中の EPS の減少が観察され、オゾンによる効果的なバイオフィームの殺菌・除去において EPS 除去が重要であることが示唆された。

Viera ら⁵⁾は *P. fluorescens* のバイオフィームを 5 種の金属 (ステンレススチール (SS)、低炭素鋼 (MS)、真鍮 (brass)、銅-ニッケル合金 (Cu-Ni)、およびチタン (Ti)) の小片に形成させ、オゾン水曝露 (0.18 ~ 0.5 mg/L、~ 1 hr) による殺菌効果について比較した。金属の種類による違いは観察されず、いずれの金属片のバイオフィームにおいても 15 分間の曝露ではおよそ 3-log の減少が観察されたが、それ以上曝露時間を延長しても不活化は進まなかった。しかし曝露時に水流を起こすことにより不活化効果が増強されることから、オゾンのバイオフィーム中への透過が妨害されていることを示唆した。また彼ら⁶⁾は同様の実験条件下で金属腐食関連細菌である 2 種の硫黄還元細菌 (*Desulfovibrio vulgaris*, および *Desulfovibrio desulfuricans*) を用いて SS および MS 片上に形成させたバイオフィームに対するオゾンの殺菌効果を調べた。その効果は

P. fluorescens のバイオフィームに対する効果とほとんど変わらないこと、また実験に用いた金属片に対するオゾンによる腐食については、動電位分極曲線 (potentiodynamic polarization) 分析から、SS と Ti においてはバイオフィーム不活化に用いたオゾン濃度 (< 1 mg/L, 1 hr) では金属腐食は生じないであろうと報告している。

リステリア (*Listeria monocytogenes*) はヒト、動物、植物、昆虫、および土壌などに広く生息するグラム陽性の桿菌で、人獣共通の感染症 (リステリア症) を起こし、ヒトへの感染は罹患した動物 (家畜やペット) との接触、排泄物や汚染食品からの感染が疑われ、特に、汚染したチーズや食肉の摂取を介して腸管からの感染が多く知られている。リステリアは低温でも増殖し、高温 (85 °C、5 分) にも耐える。Robbins ら⁷⁾ は *L. monocytogenes* の Scott A 株と 10403 S 株をもちいて SS 片上にバイオフィームを形成させ、リン酸カリウム緩衝液 (50 mM、pH 7) 中で 3 分間のオゾン曝露を行い、その殺菌効果を浮遊細菌での結果と比較している。浮遊細菌の Scott A 株と 10403 S 株の完全な不活化 (およそ 8-log の減少) にはそれぞれ 0.25 mg/L および 1.0 mg/L のオゾン濃度が必要であった。そしてそれぞれのバイオフィームにおいて同様の不活化を得るには、いずれの株においても 4.0 mg/L が必要であり、バイオフィーム形成により抵抗性が増加していた。同時に行われた次亜塩素酸カルシウムへの曝露 (100 mg/L、5 分間) では浮遊細菌とバイオフィームのいずれにおいても不活化率はおよそ 5-log であり、オゾンは塩素に比べて *L. monocytogenes* の不活化に有効であることが示唆された。

食品製造中に形成するバイオフィームに対する殺菌効果を調べるために、Dosti ら⁸⁾ は高温殺菌をほどこした牛乳を培養液として牛乳腐敗の原因菌である *P. fluorescens*、*P. fragi* および *P. putida* の培養液を添加し、それぞれのバイオフィームを SS 片上に調製した。これらのバイオフィームについて PBS (リン酸等張緩衝液) 中でオゾン (0.6 mg/L、10 分) と塩素 (100 mg/L、2 分) のそれぞれの曝露による生存率を調べた結果、*P. fragi* のバイオフィームではオゾンと塩素ともに 2.9-log の減少、*P. fluorescens* のバイオフィームではオゾンと塩素ともに 4.2-log の減少が観察された。*P. putida* のバイオフィームではオゾンでは 3-log の減少、塩素では 2-log の減少が観察された。本実験ではいずれのバイオフィームにおいても塩素に対する抵抗性が高い。著者らの 1% のグルコースを添加した無機塩培地から調製した *P. fluorescens* バイオフィームに対する次亜塩素酸ナトリウムでの不活化結果 (pH 7.4、有効塩素 1.5 mg/L、5 分間曝露でおよそ 2.5-log 減少)⁹⁾ と比べても高い抵抗性を示している。このことより脂肪とタンパク質を含む培養液中で形成するバイオフィームでは塩素に対する抵抗性が増すことが考えられる。Guzel-Seydim ら¹⁰⁾ は SS 片を市販の無脂肪調整乳中に置いてオートクレーブにかけ、SS 片表面についたタンパク汚れに対するぬるま湯 (40 °C、15 分間) とオゾン水 (10 °C、15 分間オゾンガスを吹き込んだもの) のすすぎによる除去効果を比べている。そしてオゾン水によるすすぎでは SS 片上に残る有機物量が少ないこと、そして SS 表面の汚れの落剥が著しいことを走査型顕微鏡による観察で明らかにしている。

歯科領域でのバイオフィーム形成は口腔内での歯垢だけでなく治療ユニットでの送水システム (dental unit water system, DUWS) においても重要な問題となっている^{11, 12)}。Nagayoshi ら¹³⁾ は脱灰した人歯表面に *Streptococcus mutans* によるバイオフィームを形成させ、バイオフィーム中の細菌の生死を蛍光染色により区別し、オゾン (4 mg/L、120 秒) およびポピドンヨウ素 (2.3 mg/L、120 秒) 曝露による殺菌効果を示している。Walker ら¹⁴⁾ は DUWS に付属する送水チューブでのバイオフィーム形成の再現性を検討し、さらにバイオフィームが形成した送水チューブを用いて滅菌水やオゾン水によるフラッシングおよび 17 種の殺菌剤による浮遊細菌とバイオフィームに対する殺菌効果を調べている。薬剤間の効果の比較は曝露方法や使用濃度が異なるために比較は一概にはできないが、その中で、滅菌水によるフラッシング (通常の歯科業務における最大流量 80 ml/min、2 分) では浮遊細菌もバイオフィームもほとんど減少しなかったこと、オゾン (発生量は 200 mg/h で 10 分間とあるが、実際の作用状態や濃度などは不明) では半減したが、完全な除去には至らなかったと報告している。

3. まとめ

以上のことから、オゾンによるバイオフィーム殺菌・除去作用の有効性は単にオゾンの殺菌効果によるだけでなく、オゾンによってバイオフィーム中の EPS もしくはそれに含まれる汚れの分解・除去が同時に生じているために効果が増していることが示唆された。バイオフィームの除去を効果的に行うためには微生物株

の違いのみならず、環境等に由来するEPSの多様性を考慮したさらなる検討が必要と考えられる。

4. 引用文献

- 1) White, G.C. (1999) "Handbook of chlorination and alternative disinfectants", Jhon Wiley & Sons, NY, pp.1205-8.
- 2) Rice, E. (2006) Disinfection. EPA CH0505-04-2006.
- 3) 立川真理子 (2008) 日本医療・環境オゾン研究会会報, Vol.15 (4), 95-97.
- 4) Tachikawa, M., Yamanaka, K., Nakamuro, K. (2009) Studies on the disinfection and removal of biofilms by ozone water using an artificial microbial biofilm system. *Ozone Sci. Engineering*, 31 (1), 3-9.
- 5) Viera, M.R., Guiamet, P.S., De Mele, M.F.L., Videla, H.A. (1999) Biocidal action of ozone against planktonic and sessile *Pseudomonas fluorescens*. *Biofouling*, 14, 131-141.
- 6) Viera, M.R., Guiamet, P.S., De Mele, M.F.L., Videla, H.A. (1999) Use of dissolved ozone for controlling planktonic and sessile bacteria in industrial cooling systems. *Int. Biodeterioration & Biodegradation*, 44, 201-207.
- 7) Robbins, J.B., Fisher, C.W., Moltz, A.G., Martin, S.E. (2005) Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide. *J. Food Protection*, 68 (3), 494-498.
- 8) Dosti, B., Gunzel-Seydim, Z., Greene, A.K. (2005) Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media. *Int. J. Dairy Technology*, 58 (1), 19-24.
- 9) Tachikawa, M., Tezuka, M., Morita, M., Isogai, M., Okada, S. (2005) Evaluation of some halogen biocides using a microbial biofilm system. *Water Research*, 39, 4126-4131.
- 10) Gunzel-Seydim, Z.B., Wyffels, J.T., Greene, A.K., Bodine, A.B. (2000) Removal of dairy soil from heated stainless steel surfaces: use of ozonated water as a prerinse. *J. Dairy Sci.* 83, 1887-1891.
- 11) Marsh, P.D. (1995) Dental plaque. In *Microbial Biofilms*, ed. Lappin-Scott, H.M. Costerton, J.F., pp.282-300. Cambridge Univ. Press, UK.
- 12) Walker, J.T., Bradshaw, D.J., Bennet, A.M., Fulford, M.R., Martin, M.V., Marsh, P.D. (2000) Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (8), 3363-3367.
- 13) Nagayoshi, M., Fukuizumi, T., Kitamura, C., Yano, J., Terashita, M., Nishihara, T. (2004) Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. *Oral microbial. Immunol.*, 19, 240-246.
- 14) Walker, J.T., Bradshaw, D.J., Fulford, M.R., Marsh, P.D. (2003) Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory model of a dental unit water system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (6), 3327-3332.

尾形賞、尾川賞の推薦を受け付けております。

すでに、これら各賞の創設は、昨年4月に開催された第13回総会において承認されております。2008年度第3回運営委員会(11月22日)において、これらの賞は、原則として記念行事において授与することになりました。今年は、日本医療・環境オゾン研究会の創立15周年に当たりますので、これら賞の該当者の公募を行っております。推薦人は最低3人を必要とします。事務局へ推薦文とともにご提出ください。