

大腸菌の食品加工・調理器具素材への付着とバイオフィーム形成

徳島大学 金丸 芳・横井川久己男

1、はじめに

食品加工の製造設備や調理器具は、特有の性質を有する様々な素材で作られている。ステンレスは鉄とクロムの合金であるが、クロムが酸素と結合して不動体皮膜を形成するため錆びにくい。また、この皮膜は物理的に壊されても、酸素があれば再度形成される。また、加工性、耐熱性、強度においても優れているため、食品加工・調理器具の素材として広く使用されている。アルミニウムは、軽く、耐食性や加工性に優れているため、調理器具や包材等に広く使用されている。チタンは、鉄の約半分の比重で、強度は鉄と同等であり、酸化チタンの不動体皮膜を形成し酸塩基にも耐性となる。そのため、調理器具素材として広く使用されている。ガラスやプラスチックは、安価で様々な形状に加工することが容易であり用途も広い。これらの素材に微生物が付着してバイオフィームを形成すると、恒常的な食品の二次汚染を招くことになるが、各種素材に対する微生物の付着性を比較検討した報告は少ない。

筆者らは、これまでに大腸菌 O157 の付着性を、種々の食品加工・調理器具素材を用いて検討し報告した^(1, 2)。本菌の付着性が最も高い素材は、ステンレスやチタンであり、続いてガラスであった。また、アルミニウムやプラスチック類に対しては低い付着性を示した。大腸菌 O157 は胃の酸性バリアを容易に通過する高い酸耐性を有し、また本菌が生産する志賀毒素は出血性大腸炎の原因となり、溶血性尿毒症症候群や脳症を引き起こして死に至り得る。従って、食品への本菌の混入や食品加工・調理器具を介しての食品の二次汚染は避けるべき重要な課題である。

一方、食品には様々な微生物が混入する可能性があるが、大腸菌が重要な指標となっている。大腸菌はヒトの腸管内正常菌叢に含まれるグラム陰性桿菌であるが、食品中に大腸菌群が存在することは、不衛生な環境で食品が製造されたことを示し、他の腸管系病原菌の混入を示唆するため、食品の微生物学的な安全性をはかる指標とされている。

今回は、筆者等が考案した2種類のバイオフィーム作製法を用いて、大腸菌の各種素材に対する大腸菌の付着性とバイオフィーム形成並びに除去法について記載する。

2、大腸菌群の各種非生物素材に対する付着性

6株の大腸菌群について、各種非生物素材への付着性を調べた。図1に結果を示す。菌株によって、それぞれの素材に対する付着性は少し異なるが、全体として大腸菌群の付着性の高さは、ステンレス>ガラス>ポリ塩化ビニル=アルミニウム=ポリスチレン=ポリエチレン=ポリプロピレンの順となった。この結果は、大腸菌 O157 の場合と同様であり、大腸菌群は各種非生物素材に対する付着性の点で類似の性質を有すると考えられた。

図1の挿入

3、大腸菌のガラス表面でのバイオフィーム形成

ガラスシャーレに大腸菌の細胞懸濁液を入れて室温で1時間放置後、細胞懸濁液を捨て、生理食塩水で3回洗浄した。続いて、ガラス表面に付着した細胞の上から、48度に保温した大腸菌群測定用のエオシン-メチレンブルー（EMB）寒天培地を流し込んで固化させ、37°Cに設定したインキュベーター中で培養し、ガラス表面でバイオフィームを形成させた。バイオフィーム形成時間は、1-6日間とした。その後、ガラスシャーレから EMB 寒天培地を剥がし、生理食塩水でガラス表面を十分に洗浄したものを、形成バイオフィームとした。バイオフィームの定量は、クリスタルバイオレット染色法により行った⁽³⁾。即ち、ガラス表面の形成バイオフィームに対して、クリスタルバイオレット溶液バイオフィームに結合しない過剰のクリスタルバイオレットを水洗浄で除去した。バイオフィームに結合したクリスタルバイオレットは、エタノールで抽出し、抽出液の吸光値（590 nm）を測定後、抽出に使用したエタノール液量と吸光値を掛けた値を、バイオフィームの相対量として示した。図2は、継時的なバイオフィームの形成を示したものである。大腸菌の付着後、バイオフィーム量は時間の経過と共に増大していると考えられる。このように作成したバイオフィームを用いて、次に中性洗剤に対するバイオフィームの抵抗性を調べた。

図2挿入

4、バイオフィームの中性洗剤に対する耐性

バイオフィームは、物理的にも化学的にも高い耐性を有することが知られて

いる。ガラス表面の形成バイオフィルムに対して、0.1%又は1%中性洗剤溶液 (Scat 20X-N) を 15 ml 添加し、室温で1時間放置後、中性洗剤を捨て、ガラス表面を生理食塩水で3回洗浄後、ガラス表面の残存バイオフィルムとした。このバイオフィルム量をクリスタルバイオレット染色法で調べたものが図3である。相対バイオフィルム量は、図1と比べて、0.1%中性洗剤でも大きく減少していた (図3A) が、1%中性洗剤でも完全に除去できないことが判明した (図3B)。

図3挿入

5、バイオフィルムの殺菌剤耐性

前述の形成バイオフィルムの次亜塩素酸ナトリウムについて検討を行った。種々の有効塩素濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液 (0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300 ppm) をシャーレに加え1時間の殺菌処理後、次亜塩素酸ナトリウム溶液を捨てた。続いて、シャーレを生理食塩水 5 ml で3回洗浄後、48°Cに保温した EMB 寒天培地を流し入れ、37°Cで48時間培養した。生菌が残存すれば、ガラス表面に黒色コロニーが観察されることが考えられ、黒色コロニーが観察されない次亜塩素酸ナトリウム濃度を、次亜塩素酸ナトリウムの完全殺菌濃度とした。図4は、バイオフィルムの形成時間と完全殺菌濃度の関係を示したものである。浮遊状態の本菌 (約 400 cells/ml) は、0.1 ppm の有効塩素濃度で完全殺菌が可能であったが、バイオフィルムを形成させた場合、形成時間が1日間であった場合も 20 ppm の有効塩素濃度が完全殺菌に必要であり、この値は時間とともに増大した。次亜塩素酸殺菌では有機物の存在が殺菌効力を弱めることが知られており、バイオフィルムの形成時間を延長するに伴い菌体量や細胞外多糖の量も増大することから、必ずしもバイオフィルムの次亜塩素酸耐性が時間と共に増大したとは言えないが、少なくとも付着後、ガラス表面で増殖した細胞の次亜塩素酸ナトリウム耐性は浮遊細胞に比べて著しく増大していると考えられる。

図4挿入

6、低栄養条件下で形成されたバイオフィルムの次亜塩素酸耐性

大腸菌をガラスシャーレに付着させた後、0.01%又は0.1%ペプトン水をシャーレに加えて、37°Cでバイオフィルムを形成させた場合の、次亜塩素酸ナトリウム耐性についても同様に検討を行った。図5は、バイオフィルム形成時間と完全殺菌に必要な次亜塩素酸ナトリウムの関係を示したものである。低栄養下では、バイオフィルム形成時間が3日間まで、図3と比較すると大きな耐性の増大は見られず、6日目で高い耐性となった。低栄養下では、ガラス表面に付着する有機物の量も少ないと考えられ、大腸菌細胞の増殖速度も低いと考えられ、次亜塩素酸ナトリウムの有効塩素濃度を低下させる有機物も少ないと考えられるが、6日間のバイオフィルム形成時間では、著しく耐性が増大し、バイオフィルムが形成されたことを示唆している。

図5挿入

7、終わりに

今回は、2種類のバイオフィルム生成条件を用いてバイオフィルムの除去・殺菌に関する実験結果を示した。高栄養条件では、ガラス表面に大腸菌を付着させ、上からEMB寒天培地を流し入れて固化させた。寒天培地を用いた理由は、寒天を含まない培地を加えた場合、細胞分裂に伴って浮遊化した細胞が急速に増殖し、バイオフィルムの形成が進まないためである。寒天培地を用いた場合には、細菌の増殖はガラス表面で進み、後に寒天培地を剥がした際、細菌は寒天培地に移らず、ガラス表面で生育した集落を形成する。一方、低栄養条件下では、大腸菌の生育は遅いものの、付着した細胞はガラス表面で徐々に増殖してバイオフィルムを形成した。後者の条件がバイオフィルム形成には適していると思われるが、実験を短期間で行う際には有効と考えられる。

これまで述べたように、大腸菌は食品加工・調理器具素材に対して容易に付着し、その後、栄養状態にかかわらず時間の経過と共にバイオフィルムを形成する。そのため、食品加工設備・調理器具の使用後は、迅速な洗浄・殺菌が不可欠である。

強固なバイオフィルムは各種耐性を有し、その除去・殺菌は一般に困難とされている。人工的に作成したバイオフィルムでも、洗剤や殺菌剤で簡単に除去・殺菌できるものではないが、不可能とも言えない。今後、有効な除去・殺菌

法の研究開発に取り組みたいと考えている。

(参考文献)

- (1) 金丸 芳, 達 牧子, 横井川 久己男 : 食品加工・調理器具への微生物の付着と殺菌剤耐性, 食品機械装置, 53(10), 50-55, 2016.
- (2) Tsuji Makiko and Kumio Yokoigawa : Attachment of Escherichia coli O157:H7 to abiotic surfaces of cooking utensils. Journal of Food Science, 77(4) 194-199, 2012.
- (3) Taff HT, Nett JE, Andes DR: Comparative analysis of Candida biofilm quantitation assays. Med Mycol 50(2), 214–218, 2012.

図のキャプション

図1 大腸菌群の各種非生物素材に対する付着性

図2 バイオフィルムの形成時間とバイオフィルム相対量

図3 バイオフィルムの中性洗剤による除去 (A: 0.1% Scat X20-N, B: 1% Scat X20-N)

図4 バイオフィルムの次亜塩素酸ナトリウム耐性

図5 低栄養条件下 (0.01%ペプトン水) で形成されたバイオフィルムの次亜塩素酸ナトリウム耐性

著者紹介

金丸 芳

徳島大学大学院生物資源産業学域

食品加工保蔵学研究室

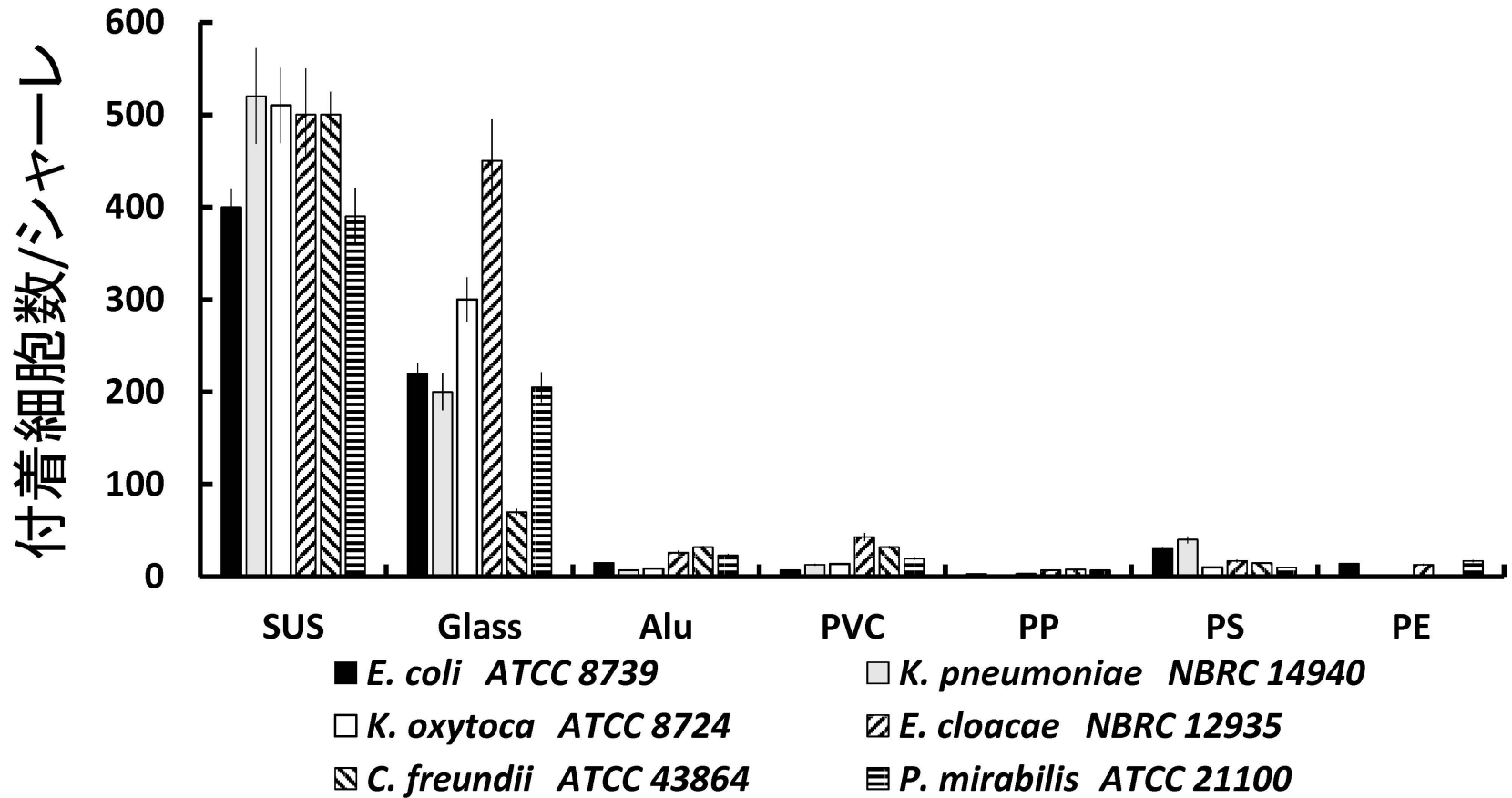
准教授

横井川久己男

徳島大学大学院生物資源産業学域

食品微生物学研究室

教授



素材

SUS:ステンレス、Glass: ガラス、Alu: アルミニウム、PVC: ポリ塩化ビニル、
 PP: ポリプロピレン、PS: ポリスチレン、PE: ポリエチレン

図2

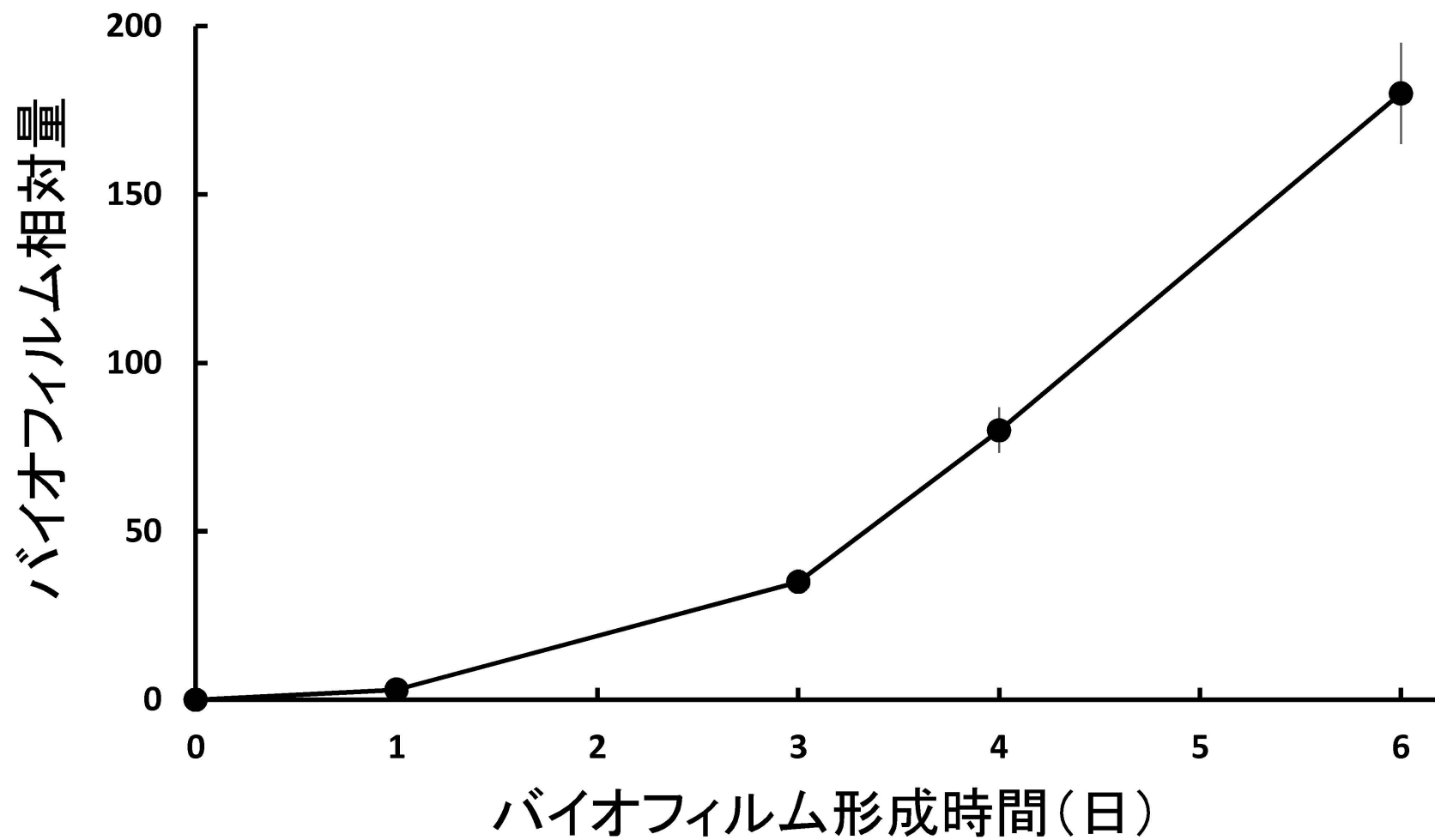


図3

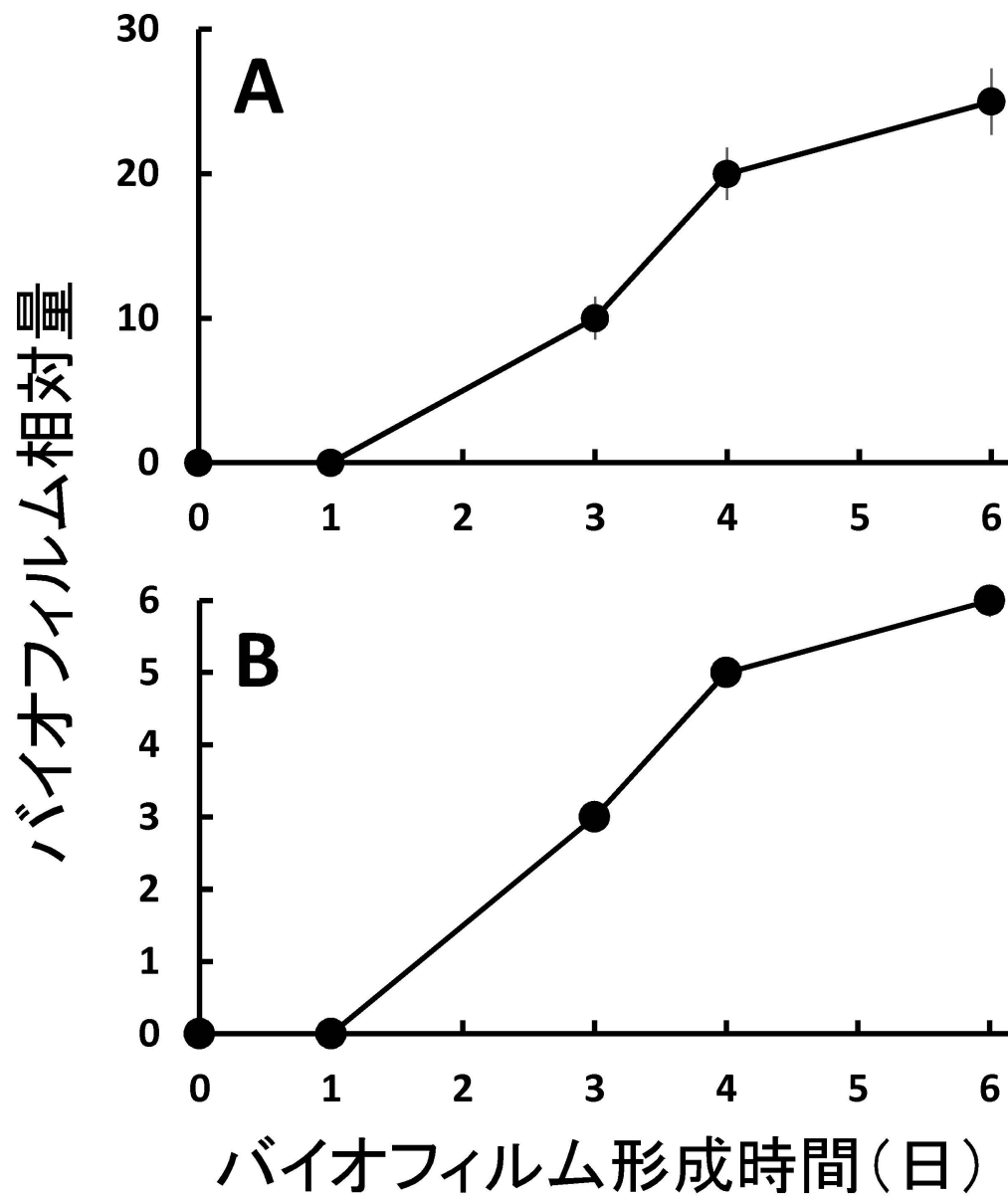


図4

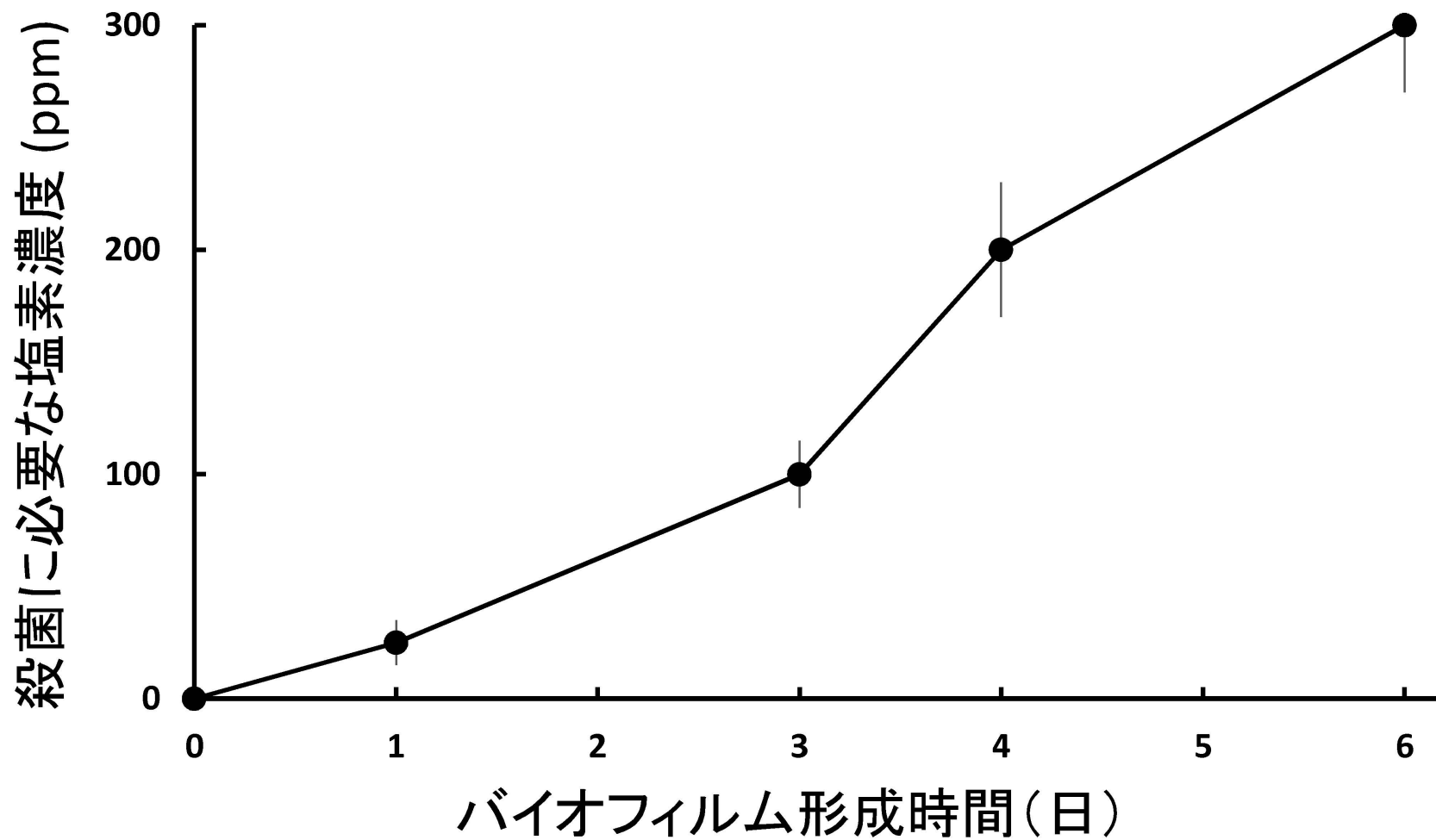


図5

