

Evaluation of novel disinfection system in conjunction with electrochemical and TiO₂-sonocatalytic treatments

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/30180

二酸化チタン・超音波触媒法と 電気化学を組み合わせた新規殺菌法の開発

荒川 雅幸¹, 仁宮 一章², 清水 宣明²

¹〒920-1192 金沢市角間町 金沢大学大学院自然科学研究科

²〒920-1192 金沢市角間町 金沢大学環日本海域環境研究センター

Arakawa, M., Ninomiya, K., Shimizu, N.

Evaluation of novel disinfection system in conjunction with electrochemical and TiO₂-sonocatalytic treatments.

1 緒言

微生物による水質汚濁は発展途上国のみならず、先進国においてもレジオネラやノロウイルスによる感染が深刻な社会問題となっている。現在殺菌方法として主に塩素殺菌が用いられているが、クリプトスポリジウムのような有害な塩素耐性微生物の出現や、フミン質と塩素が反応することによりトリハロメタンのような発癌性物質が生成するといった問題が生じている。

近年、新たな殺菌方法として、二酸化チタンの光触媒反応を利用したものが注目されている。これは二酸化チタンに波長 390 nm 以下の光を照射することにより電子が励起する現象を利用したものであり、この現象により二酸化チタン表面に活性酸素種が生成する。生成した活性酸素種は微生物を酸化し、死滅させることができる。光触媒反応を利用した殺菌の特徴として、生成する活性酸素種は非常に酸化力が強いので毒素の分解が可能であることや、耐性菌が生じ難いといった特徴が考えられる。さらに、二酸化チタンそのものには毒性がないという特徴がある。このような、優れた特徴を有している殺菌方法ではあるが、実際の水質浄化の分野で応用しようと考えた場合、紫外光は波長が短いため回折能が悪く、深部への照射が困難であるという問題がある。

本研究室では新たなエネルギー源として周波数 20 kHz 以上の音波である超音波に着目した。超音波を用いる利点として紫外光より波長が長く回折能が良いため、深部への照射が可能となるということが考えられる。これまで本研究室では、水溶液中で二酸化チタン粒子に超音波を照射した場合にも活性酸素種であるヒドロキシルラジカルが高濃度生成することを報告した。更に、二酸化チタン粒子と超音波を用いた方法（以下、二酸化チタン・超音波触媒法）を用いて、大腸菌およびレジオネラに対して殺菌効果が得られることを確認し報告した。

本研究では二酸化チタン・超音波触媒法による殺菌のメカニズム解析、更に本方法のより効果的な使用方法として二酸化チタン・超音波触媒法と通電の併用方法について検討を行った。

2 理論

2.1 キャビテーション効果

超音波は流体中を縦波として伝わる。従って、流体中に超音波を照射すると高圧域と低圧域が形成され、圧力変動が生じる。この圧力変動により、キャビテーション気泡とよばれる気泡の生成・成長・圧壊という一連の現象が起こる。キャビテーション気泡の圧壊時には中心温度数千度、圧力数百気圧の極限場が形成され、様々な効果が生じる（キャビテーション効果）。

キャビテーション効果により、水分子が熱分解しヒドロキシルラジカルが生成することや、強い機械的作用を示す衝撃波の発生が報告されている。

2.2 二酸化チタン・超音波触媒法

二酸化チタンに超音波を照射することにより、二酸化チタンがキャビテーション気泡の核となり、キャビテーション気泡の数が増加する。その結果、高濃度のヒドロキシルラジカルが生成することを確認し、報告している。生成経路としては、キャビテーション気泡の圧壊に伴う (1) 水分子の熱分解 (2) 二酸化チタンの熱励起によって生じた正孔による水分子の分解の二点が考えられる。

2.3 ヒドロキシルラジカル

ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) は非常に酸化力が強く、そのエネルギーは 120 kcal/mol である。一方、有機化合物を構成する分子中の結合エネルギーは、C-C 結合 (83 kcal/mol)、C-H 結合 (99 kcal/mol)、C-N 結合 (73 kcal/mol)、C-O 結合 (84 kcal/mol)、O-H 結合 (111 kcal/mol)、N-O 結合 (93 kcal/mol) とヒドロキシルラジカルのそれに比べて小さい。このため、ヒドロキシルラジカルはこれらの結合を容易に切断することができる。

生物への影響としては、「脂質」、「タンパク質」、「酵素」あるいは「核酸」などに障害を与えやすく、脂質過酸化、タンパク質変性、酵素失活、核酸分解などを引き起こし、細胞死を招く引き金になり得ると考えられている。

3 実験

3.1 殺菌因子の検討

殺菌因子としてはヒドロキシルラジカルとキャビテーション気泡の圧壊に伴う機械的作用が考えられる。そこで、ラジカル捕捉剤 (ラジカルスカベンジャー)、すなわち活性酸素種を消去し、無毒化する働きを有する物質を超音波照射する前の試料に添加し、殺菌因子としてヒドロキシルラジカルが関与しているかどうかの検討を行った。

実験方法

LB 培地で大腸菌 (*Novablue*) を 13 時間培養し、培養後の培養液を遠心分離機 (2000 G、5 min) で集菌し、PBS を用いて洗浄した。同様の操作を再度行い、 $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 不織布タイプ二酸化チタン (アナターゼ) 1 枚を添加した PBS (pH7.4、2 mL) あるいは tert-ブチルアルコール (30 mM) PBS (pH7.4、2 mL) に懸濁させた。この試料に超音波照射 (36 kHz, 300 W) を行った後、コロニーカウント法により殺菌評価を行った。

3.2 膜酸化の評価

ヒドロキシルラジカルは外膜の一部ならびに細胞膜を構成しているリン脂質と連鎖的過酸化脂質反応を起こし、過酸化脂質を生成する。そこで、ヒドロキシルラジカルが関与していることを確認するため、直接的な証拠である過酸化脂質の測定を行った。過酸化脂質の測定には Diphenyl-1-pyrenyl phosphine (Dppp) を用いた。Dppp は過酸化脂質と反応し、Dppp oxide (DpppO) を生成する。この DpppO は励起波長 352 nm、蛍光波長 380 nm をもつ。従ってマイクロプレートリーダーにて DpppO を測定することにより過酸化脂質の測定を行うことができる。

実験方法

3.1 と同様の操作を行い、大腸菌を $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 不織布タイプ二酸化チタン (アナターゼ) 1 枚を添加した PBS (pH7.4、2 mL) あるいは tert-ブチルアルコール (30 mM)、グルタチオン (30 mM) PBS (pH7.4、2 mL) に懸濁させた。この試料に超音波照射 (36 kHz, 300 W) を行った。照射後の試料に 100 μM となるように Dppp を添加し、室温、暗所で 10 min 反応させた。その後、マイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度 (EX:360/40 nm, EM:395/25 nm) を測定した。

3.3 外膜損傷の評価

外膜は細胞壁の最も外側の部分に相当し、多糖からなる Lipopolysaccharide (LPS)、リン脂質、タンパク質で構成されている。外膜は最初に活性酸素種によって攻撃を受ける部分であり、またバリアーとしての役割を担っている。そこで、殺菌メカニズムの解析を行うに当たり、二酸化チタン・超音波触媒法が及ぼす外膜損傷への影響を評価した。外膜損傷評価には Carboxy fluorescein diacetate (CFDA) を用いた。CFDA は細胞内でエステラーゼにより加水分解され、Carboxy fluorescein (CF) となる。この CF は励起波長 410-510 nm、蛍光波長 520 nm をもつ。外膜損傷により CFDA がより細胞内に取り込まれるようになるので、CF をマイクロプレートリーダーにて測定することにより外膜損傷の評価を行うことができる。

実験方法

3.1 と同様の操作を行い、大腸菌を $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 不織布タイプ二酸化チタン（アナターゼ）1枚を添加した PBS (pH7.4, 2 mL) あるいは tert-ブチルアルコール (30 mM) PBS (pH7.4, 2 mL) に懸濁させた。この試料に超音波照射 (36 kHz, 300 W) を行った。照射後の試料に $100 \mu\text{M}$ となるように CFDA を添加し、37 °C、暗所で 10 min 反応させた。その後、マイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度 (EX:485/20 nm, EM:530/25 nm) を測定した。

3.4 細胞膜損傷の評価

外膜の内側にはペプチドグリカンがあり、更にその内側にはリン脂質とタンパク質で構成された細胞膜がある。細胞膜は細胞質と直接接しているため、細胞膜が過度の損傷を受けると、溶菌することが考えられる。そこで、殺菌メカニズムの解析を行うに当たり、二酸化チタン・超音波触媒法が及ぼす細胞膜損傷への影響を評価した。細胞膜損傷評価には Propidium iodide (PI) を用いた。PI は細胞膜の損傷により細胞内に入り、核とインターカレートすることにより、強い蛍光 (励起波長 410-510 nm、蛍光波長 620 nm) を発するようになる。従って、マイクロプレートリーダーにて測定することにより細胞膜損傷の評価を行うことができる。

実験方法

3.1 と同様の操作を行い、大腸菌を $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 不織布タイプ二酸化チタン（アナターゼ）1枚を添加した PBS (pH7.4, 2 mL) に懸濁させた。この試料に超音波照射 (36 kHz, 300 W) を行った。照射後の試料に $60 \mu\text{M}$ となるように PI を添加し、氷水上、暗所で 10 min 反応させた。その後、マイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度 (EX:485/20 nm, EM:645/40 nm) を測定した。

3.5 核酸への影響の評価

ヒドロキシルラジカルは核酸と反応し、核酸を断片化することが知られている。そこで、殺菌メカニズムの解析を行うに当たり、二酸化チタン・超音波触媒法が及ぼす核酸への影響をアガロースゲル電気泳動法を用いることにより評価した。

実験方法

3.1 と同様の操作を行い、大腸菌を $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 不織布タイプ二酸化チタン（アナターゼ）1枚を添加した PBS (pH7.4, 2 mL) に懸濁させた。この試料に超音波照射 (36 kHz, 300 W) を行い、試料を採取した。その後、エタノール沈殿、アガロースゲル電気泳動を行った。

3.6 殺菌効果の増強に関する検討

二酸化チタン・超音波触媒法を用いた殺菌の特徴として、殺菌は二酸化チタン近傍あるいは表面で起こることが考えられる。この特徴を考慮すると、二酸化チタンと大腸菌との親和性が重要であるということが考えられる。二酸化チタンと大腸菌との親和性はそれぞれの表面の帯電状態に大きく依存するが、通常的环境下 (pH7 付近) では二酸化チタン（アナターゼ）の等電点は pH6 付近、大腸菌は pH3 付近であることから、親和性は良くない。

そこで、効果的な殺菌方法の開発を目的とし、電気化学的手法を取り入れた。すなわち、二酸化チタンを陽極として用い集菌効果を期待した新規殺菌方法の検討を行った。

実験方法

陽極には不織布タイプの二酸化チタン（アナターゼ、 $1.5 \times 3.5 \text{ cm}^2$ ）、陰極には白金（ $1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$ ）を用い、電解液にはリン酸緩衝液（ 0.1 M 、 $\text{pH } 7.1$ ）を用いた。

LB 培地で大腸菌を 13 時間培養し、培養後の培養液を遠心分離機（ 2000 G 、 5 min ）で集菌し、リン酸緩衝液を用いて洗浄した。同様の操作をもう一度行い、リン酸緩衝液（ 0.1 M 、 $\text{pH } 7.1$ 、 40 mL ）に懸濁させた。その後、 10 mA の定電流下で通電を行いながら、超音波照射（ 36 kHz 、 300 W ）を行った。試料を採取し、コロニーカウント法により殺菌評価を行った。なお、対照実験として、通電のみ、通電は行わず超音波照射のみ、更には、超音波照射時に逆向きに通電を行った実験を同時に行った。

4 結果および考察

4.1 殺菌因子の検討

実験結果を Fig. 1 に示す。ラジカルスカベンジャーである tert-ブチルアルコール存在下で 120 分超音波照射を行うことにより、初期濃度の 95% の死滅を確認した。一方、無添加の場合では 99 % の死滅を確認した。また、照射 5 min、10 min、15 min、30 min、60 min、90 min でも無添加の場合においてそれぞれ 29 %、36 %、37 %、24 %、18 %、9 % の生存率であった。このようにラジカルスカベンジャーを添加することにより殺菌効果が抑制されることを確認した。ラジカルスカベンジャーは活性酸素を消去し無毒化する働きを有するので、二酸化チタン・超音波触媒法の殺菌因子としてヒドロキシルラジカルが考えられる。また、十分量のスカベンジャーを添加した場合でも殺菌効果が得られることより、キャビテーション気泡の圧壊に伴う機械的作用も殺菌因子として示唆される。なお、ヒドロキシルラジカル同士の結合により生じる過酸化水素も殺菌因子として考えられるが、過酸化水素生成濃度（120 min 照射で $8.2 \mu \text{ M}$ ）における影響を調べたところ、直接的には影響を与えないという結果が得られた。

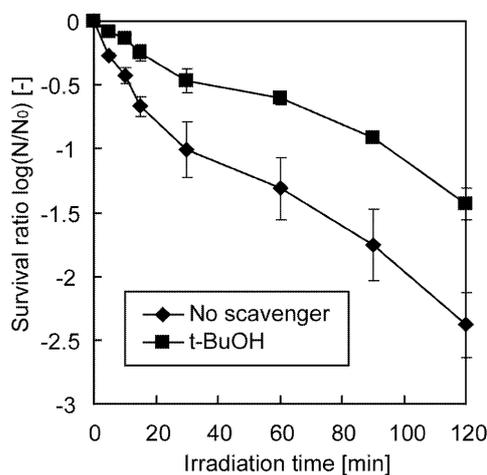


Fig. 1 Effect of radical scavenger on the *E. coli* disinfection during ultrasonic irradiation with TiO_2 .

4.2 膜酸化の評価

実験結果を Fig. 2 に示す。それぞれの蛍光強度の値は測定値からバックグラウンドとして、溶液の蛍光強度の値を差し引いた値を示した。ラジカルスカベンジャー無添加の場合では、超音波照射 5 min で蛍光

強度が増加し、その後一定となるという結果が得られた。一方、ラジカルスカベンジャーである tert-ブチルアルコール、グルタチオンを添加した場合には超音波照射を行っても蛍光強度の増加は確認されなかった。このことから、二酸化チタン・超音波触媒法で生成したヒドロキシルラジカルが殺菌過程において大腸菌のリン脂質と反応し、過酸化脂質が生成する反応、すなわち連鎖的過酸化脂質反応を起こしていることが考えられ、ヒドロキシルラジカルの関与が強く示唆された。

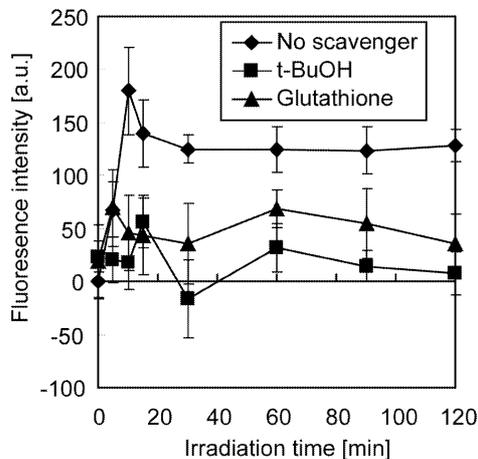


Fig. 2 Evaluation of lipidperoxide caused by TiO₂/ultrasound method.

4.3 外膜損傷の評価

実験結果を Fig. 3 に示す。ラジカルスカベンジャー無添加の場合、超音波照射に伴い蛍光強度が増加し、15 min でピークとなり、その後減少していく結果が得られた。このことから、超音波照射に伴い外膜の損傷が起こること、さらに蛍光強度の減少から照射時間に伴い酵素活性が失われていくことが示唆される。一方、ラジカルスカベンジャーである tert-ブチルアルコールを添加した場合には、無添加の場合に比べて蛍光強度の増加が時間的に遅れるという結果が得られた。この結果から外膜の損傷にヒドロキシルラジカルが関与していることが示唆される。

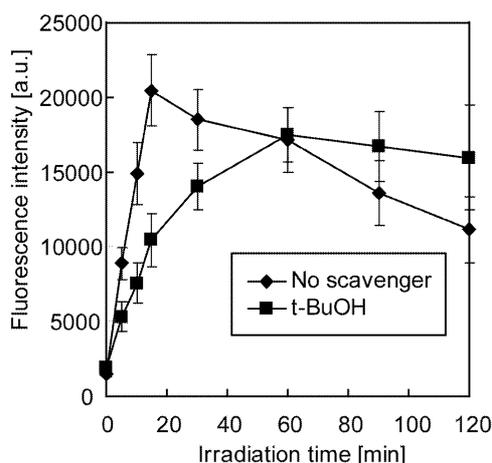


Fig. 3 Evaluation of outer membrane disruption caused by TiO₂/ultrasound method.

4.4 核酸への影響の評価

細胞膜の損傷で溶出してくる核酸をアガロースゲル電気泳動法により解析した。実験結果を Fig. 4 に示す。白く光っている部分が核酸に相当する。照射時間に伴いバンドは薄くなり、低分子側に断片化することを確認した。このことより、大腸菌が短時間で溶菌され、溶出した核酸は生成したヒドロキシルラジカルにより断片化され、低分子化したことを確認した。

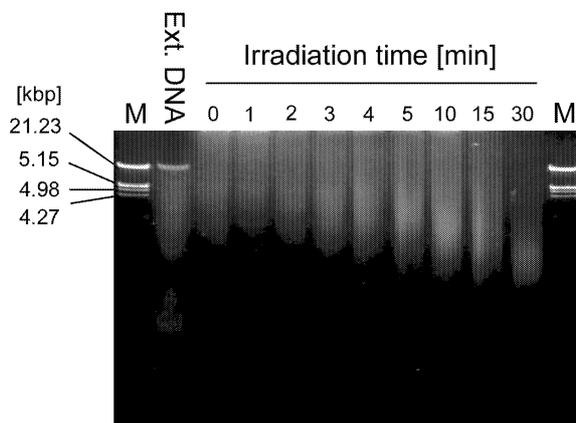


Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of DNA released upon cell lyses during ultrasonic irradiation with TiO_2 . M, DNA size marker; Ext. DNA, chromosomal DNA extracted from *E. coli*.

4.5 殺菌効果の増強に関する検討

実験結果を Fig. 5 に示す。通電により超音波単独の場合と比較してより高い殺菌効果が得られ、また、逆向きに通電することで殺菌効果が抑制されるという結果が得られた。超音波単独の場合に比べて、電圧を印加することにより殺菌効果が促進された理由として、二酸化チタン表面で電子が引き抜かれる効果、すなわち、表面酸化の効果が加わったことが考えられる（カロメル電極に対して+0.7 V で起こることが報告されている）。更に大腸菌の細胞表面は負に帯電しており、ヒドロキシルラジカルやキャビテーション気泡の圧壊による機械的作用の発生頻度が高い二酸化チタン近傍に集菌されたため殺菌効果が促進された可能性が示唆される。

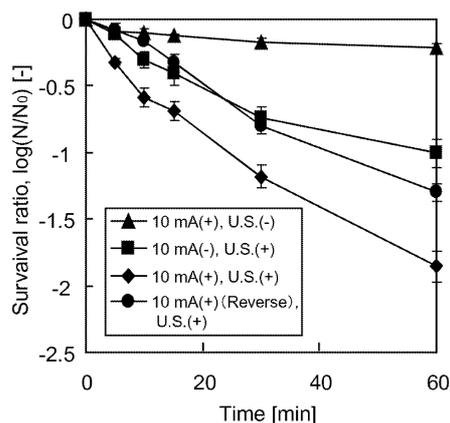


Fig. 5 Effect of applied current with TiO_2 /ultrasound method on *E. coli* disinfection.

5 結言

本研究により以下の点が明らかとなった。

- 1) 二酸化チタン・超音波触媒法を用いた殺菌メカニズムの要因としては、キャビテーション気泡の

圧壊時に生じるヒドロキシルラジカル、衝撃波などによる機械的作用が考えられる。

- 2) 二酸化チタン・超音波触媒法と通電を併用したとき、殺菌効果の相乗効果が得られた。
- 3) 殺菌効果の促進理由として、二酸化チタン表面で電子が引き抜かれる効果、すなわち表面酸化の効果が加わったこと、およびヒドロキシルラジカルや機械的作用の発生頻度が高い二酸化チタン表面近傍に集菌されたことに起因する可能性が示唆された。

参考文献

- [1] Shimizu, N. et al., *Ultrason. Sonochem.*, 15, 988-994, 2008.
- [2] Dadjour, M.F., Ogino, C., Matsumura, S., Nakamura, S., Shimizu, N. *Water Res.*, 40(6), 1137-1142, 2006.
- [3] Dadjour, M.F., Ogino, C., Matsumura, S., Shimizu, N. *Biochem. Eng. J.* 25, 243-248, 2005.