

## B-31 微生物の成長制御に対する パルス印加の効果

○立石 貴浩<sup>1\*</sup>・西村 尚博<sup>1</sup>・高橋 克幸<sup>2</sup>・颯田 尚哉<sup>1</sup>・高木 浩一<sup>3</sup>

<sup>1</sup>岩手大学農学部 (〒020-8550 岩手県盛岡市上田3-18-8)

<sup>2</sup>シンド静電気株式会社 技術開発センター (〒224-0033 神奈川県都筑区茅ヶ崎東4-7-21)

<sup>3</sup>岩手大学工学部 (〒020-8551 岩手県盛岡市上田4-3-5)

\* E-mail: ttateisi @iwate-u.ac.jp

### 1. はじめに

パルスパワーとは、時間的空間的に圧縮して得られる高密度で高いピークを有する電圧またはエネルギーを指す。近年、排ガス処理、水処理、殺菌、医療など様々な分野でパルスパワーの応用が試みられている。微生物を供試材料としたパルス利用に関する従来の研究では、微生物の成長と分化の促進的効果、微生物の殺菌といった抑制的効果に関するものが多い。前者の研究では、食用キノコの生産に電気刺激を利用することで増産を目指しており<sup>1)</sup>、シイタケなどの収量の増加が認められたが、パルス印加処理による子実体発生のメカニズムの解明には至っていない。一方、後者の研究では、様々なパルス印加条件による微生物の不活性化や殺菌の効果について検討されている<sup>2)</sup>。このように、パルスパワーによる微生物の成長の促進的および抑制的効果の検討は、それぞれ個別に検討されており、パルスパワーの連続的な変化とこれに対応した微生物の成長の促進的・抑制的影響を同時に扱った研究は見られない。そこで、本研究では、純粋培養系で増殖した菌類菌糸の乾燥重量または細菌などの細胞数を成長のパラメータとみなし、パルスによるエネルギーの連続的な強度変化と微生物の成長の促進・抑制現象との間の相関性を明らかにすることを目的として、以下の実験を行った。

### 2. 実験方法

#### (1) 供試菌株

供試菌株として、担子菌類 4 種、アミスギタケ (*Favolus arcularius*) NBRC 4959, スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) NBRC 30749, ネナガノヒトヨ

タケ (*Coprinus cinereus*) NBRC 31333, エノキタケ (*Flammulina velutipes*) NBRC 30600, 不完全菌類の *Trichoderma viride* NBRC 5720, 酵母の *Saccharomyces cerevisiae* NBRC 2346, グラム陽性細菌の *Bacillus subtilis* NBRC 3009, グラム陰性細菌の *Escherichia coli* NBRC 13168を使用した。

#### (2) 担子菌類および不完全菌類の培養

ガラスビーズ (直径2.5~3.5 mm) 45.0 gを100 ml容トールビーカーに充填し、ポテトデキストロース液体培地 16 mlを分注した。開口部をアルミホイルで覆った後に、オートクレーブ滅菌した。これに、担子菌類4種および *T. viride* を接種し、担子菌類4種は接種後3日間、*T. viride* は接種後1日間、暗所25°Cで培養した。この後に、パルス印加の処理を行い、照射下(300lux)または暗所、25°Cで培養を続けた。担子菌類は、接種後3週目に、*T. viride* は、接種後1週目に、菌糸を回収し、乾燥重量を測定した。なお、ネナガノヒトヨタケの子実体形成の実験では、接種後5日目に、最終濃度が0.150 g N/Lとなるように、尿素溶液を無菌的に液体培地に添加した。

#### (3) 酵母および細菌の培養

*S. cerevisiae* の培養にはYM液体培地、*E. coli*、*B. subtilis* の2菌株の培養には、ペプトン酵母エキス液体培地を用いた。液体培地20 mlに前培養の菌液を接種し、暗所30°Cで24時間振とう培養した。培養液の菌体は遠心により回収し、1 M PBSで洗浄した。菌体は、PBSで懸濁し、その1 mlをオートクレーブ滅菌済みのPBS 29 mlが入った100 ml容トールビーカー5本に分注した。この容器を、パルス印加の反応槽として利用した。パルス印加後の菌体を含む溶液の生菌数は、希釈平板法により測定した。各微生物の培養には、前述の液体培地に寒天を加

えた組成のものを使用した。培養は、暗所30°Cで72時間行い、寒天培地上に形成されたコロニー数を計数し、cfu (colony forming unit) として表示した。

#### (4) パルス印加

パルス発生装置として、磁気パルス圧縮型パルスパワー電源(末松電子製作所, MPC3000S-SP)を用い、反応槽中の電極にパルス電圧を印加した<sup>3)</sup>。パルス電圧の最大値は10~30 kVの範囲、印加回数は50~38,400回の範囲で調整した。担子菌類および*T. viride*の栄養菌糸へのパルス印加では、前節(1)の培養で調製した栄養菌糸とガラスビーズを含む100 mL容トールビーカーをそのまま反応槽として使用した。一方、*S. cerevisiae*および細菌2種の菌体への印加には、前節(2)で調製した反応槽を使用した。2本のステンレス線を反応槽であるビーカーの内壁にそって底面まで挿入し、電極とした。一連の印加はクリーンベンチ内の無菌環境で行った。

### 3. 結果および考察

#### (1) 担子菌類の菌糸成長に対するパルス印加の効果

担子菌類4種の栄養菌糸の増殖に対するパルス印加の効果を検査した。子実体形成を誘導させないため、パルス印加(30kV・200回)後は、暗所で培養した。栄養菌糸の乾燥重量は、パルス印加と無印加との間で危険率5%で有意差を示さず(図-1(a))、パルス印加の処理は、栄養菌糸そのものの成長を促進させるような効果は無いことがわかった。

一方、子実体形成を誘導するため、前述の担子菌類の栄養菌糸に照射し、パルス印加の子実体形成に対する効果を検討した。アミスギタケでは、15kV・100回の印加処理、スエヒロタケおよびエノキタケでは、30kV・200回の印加処理を行った。栄養菌糸にパルス印加後、照射しても、これら3種の担子菌類で子実体は形成し

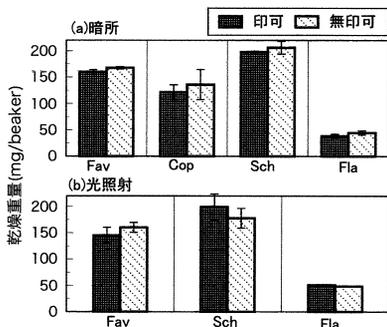


図-1 担子菌類の菌糸成長に対するパルス印加の効果。(a)暗所での培養、(b)照射下(3001lux)での培養、縦のバーは標準偏差を示す。

表-1 各パルス印加のパターンと投与エネルギー

電圧(kV)	印加回数	投与エネルギー(J)
10	200	0.554
20	200	0.72
30	50	1.438
30	100	1.44
30	200	2.88
30	500	7.2
30	1000	14.4
30	2000	28.8

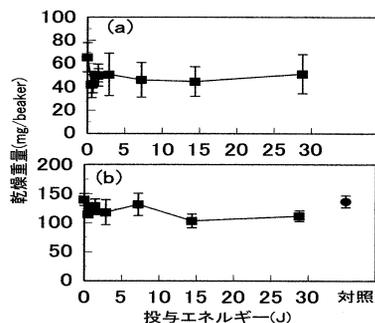


図-2 ネナガノヒトヨタケの子実体形成に対する印加の効果。(a)子実体、(b)全菌糸。縦のバーは標準偏差を示す。

なかった。そのため、栄養菌糸と未分化の組織を加えた全菌糸の乾燥重量を、パルス印加・無印加の間で比較したところ、アミスギタケ、スエヒロタケでは有意差は認められなかった(図-1(b))。一方、エノキタケでは、他の2菌と異なり、印加・無印加の間で有意差を示したもの(p<0.05)、その差は非常に小さかった。

照射下で子実体が形成されたネナガノヒトヨタケでは、表1に示す様々な条件でパルス印加を行い、子実体形成に対する影響について調べた。各パルス印加の条件における投与エネルギーを算出し、各投与エネルギーにおける子実体または全菌糸の乾燥重量を図-2に示した。0~30 Jの範囲では、子実体乾燥重量に有意差は認められ

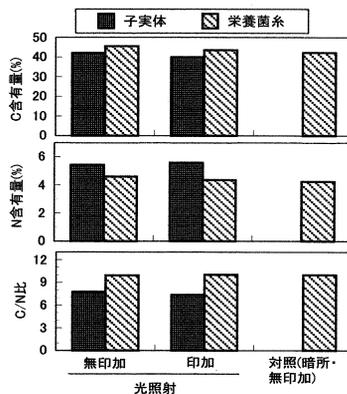


図-3 ネナガノヒトヨタケの栄養菌糸および子実体の全炭素含量、全窒素含量およびC/N比。照射下で2.88 J印加処理、無処理および対照の各試料の結果を示す。

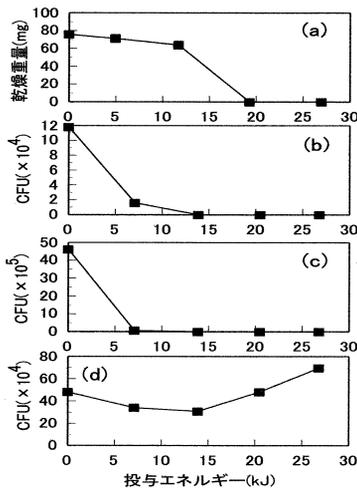


図-4 パルス印加の各微生物種の成長に対する抑制効果。(a) *T. viride*, (b) *S. cerevisiae*, (c) *E. coli*, (d) *B. subtilis*.

なかった。一方、全菌糸乾燥重量では、対照（暗所・無印加）および無印加（0 J）の区に比べて14.4 kJの区で、若干の成長の抑制が認められた ( $p < 0.05$ )。

子実体形成時に、栄養菌糸から子実体原基、子実体へと窒素化合物の転流が起きることが知られている。そこで、無印加（0 J）および2.88 Jの処理区で得られた菌糸試料中の全炭素含量、全窒素含量、およびC/N比を分析した。栄養菌糸の全炭素含量は、いずれの処理区も子実体のそれより若干低かった（図-3）。一方、全窒素含量は、栄養菌糸に比べて、子実体の方が高くなる傾向にあった。このような違いを反映して、子実体のC/N比は、栄養菌糸のそれに比べて低くなっていたが、パルス印加・無印加の処理の間には違いは認められなかった。

今回の担子菌類を用いた実験では、パルス印加が菌糸全体の重量を増加させるような効果は認められず、子実体を形成したネガナノヒトヨタケにおいても、子実体形成を誘導させるような効果は確認できなかった。つまり、子実体を含めた菌糸の成長は、培地中の基質・養分の量に規定されており、パルス印加という刺激がこれを越える成長を誘導することはないと考えられた。しかし、ほだ木などを利用した栽培では、今回の実験とほぼ同様の条件によるパルス印加で、子実体発生の促進が認められており、印加による菌糸表面へのクラックの形成が、子実体原基を誘導していると指摘されている<sup>1)</sup>。ほだ木栽培の場合、天然の原木を培地として使用しているため、印加処理により、ほだ木内の化学組成が菌糸にとって利用しやすい成分に変化した可能性がある。ほだ木内での養分状態の改善が、子実体を含むバイオマスの増加に結びついた可能性も考えられ、今後の検討が必要である。

## (2) パルス印加の *T. viride*, *S. cerevisiae*, *B.*

## *subtilis*, *E. coli*の成長に対する抑制的効果

不完全菌類 *T. viride*、酵母 *S. cerevisiae*、グラム陽性細菌 *B. subtilis*、グラム陰性細菌 *E. coli* を用い、各微生物の細胞増殖と死滅に対するパルス印加の影響を調べた。*T. viride* に対しては、30 kV で 19,200 回、38,400 回、57,600 回の条件でパルス印加し、それぞれの投与エネルギーは、4.96, 11.7, 19.3, 27 kJ に相当した。一方、*S. cerevisiae*, *B. subtilis*, *E. coli* に対しては、30 kV で 9,600 回、19,200 回、28,800 回、38,400 回の条件でパルス印加し、それぞれの投与エネルギーは、7.1, 13.9, 20.5, 26.8 kJ に相当した。

5~12 kJ に相当するパルス印加では、*T. viride* の栄養菌糸の成長は、顕著な影響を受けず、6~16% の減少にとどまった（図-4）。しかし、20 kJ をこえると、成長は完全に抑制された。*S. cerevisiae*、および *E. coli* では、7 kJ 以上でその成長は大きく抑制され、14 kJ 以上では、成長は完全に抑制された。一方、*B. subtilis* では、パルス印加による顕著な成長の抑制は認められず、27 kJ においては、無印加区を越える細胞が生存していた。これは、*B. subtilis* は、内生孢子を形成することができ、内生孢子が印加処理の影響を受けず、処理後の培養期間中に栄養細胞へと変化したためと考えられる。

## 4. まとめ

本研究では、パルスパワーをエネルギー表示に変換し、パルスによるエネルギーの連続的な強度変化と、微生物細胞の成長の促進・抑制現象との間の相関性の解明を試みた。0~10<sup>4</sup> J に相当するパルス印加は担子菌の子実体形成や栄養成長に対して、促進的・抑制的のどちらの効果も示さず、その成長は培地中の基質・養分量に規定されていた。一方、10<sup>2</sup> J 以上に相当するパルス印加は、微生物細胞の不活性化や死滅を引き起こし、微生物の生存や成長に対して抑制的な効果を示した。しかし、微生物の種類によってその効果に違いが認められ、芽胞形成するような環境ストレスに耐性をもつ細菌においては、30 kJ のような投与エネルギーでも死滅しない場合があった。

## 参考文献

- 1) 大賀祥治：きのこ生産システムにおける電気刺激の適用，バイオインダストリー，Vol. 23, pp. 33-42, 2006.
- 2) 佐藤正之：高電圧パルスによる微生物制御，日本食品工学会誌，Vol. 8, pp. 191-199, 2007.
- 3) 高橋克幸，高木浩一，颯田尚哉，秋山雅裕：水中気泡内放電を用いた1,4-ジオキサンの分解，環境工学研究論文集，Vol. 47, pp. 507-514, 2010.