

二酸化チタン懸濁装置内照度の紫外線殺菌に及ぼす影響

菅原 崇 聖*・船山 齊

Effects of average light intensity in sterilizer suspended with TiO₂ particle on UV-inactivation rate.

Munesato SUGAWARA* and Hitoshi FUNAYAMA

(2007年11月30日受理)

Recently, UV sterilization is one of the widely used sterilization process in various industries. It is more efficiently for a sterilization process to use the UV-irradiation method with the photo catalyst. However, the average light intensity in a sterilizer decreases with the TiO₂ particle concentration. Therefore, it is necessary for UV sterilizer design to obtain the practical information of them. In this study, we measured the average light intensity in a sterilizer using the decolorize reaction of Rose Bengal pigment and the UV inactivation rate of *Bacillus subtilis* spores and *E.coli*. As a result, the average light intensity in a sterilizer suspended with TiO₂ particle decreased with TiO₂ concentration slowly. Additive effects of UV-irradiation and photo catalyst were obtained in the region of dilute TiO₂ concentration for *Bacillus subtilis* spores, but similar effects were confirmed for *E.coli*.

1. 緒言

光殺菌は、一般には主波長を253.7nmとする低圧水銀灯を光源として用いる殺菌方法のことである。光殺菌の原理は細胞内のDNAの吸収スペクトルと253.7nmが非常に近いために、紫外線が細菌のDNAに損傷を与え、それによって不活性化されるというものである。光殺菌は添加物を加えないことから、塩素殺菌の様な残留性の心配がないといった特徴がある。そのため、光殺菌は食品工業や排水処理、半導体製造に使用される超純水の製造など、広い分野で使用されている。他方、あらゆる産業において生産性の向上が求められており、それに伴って、光殺菌にも高効率化が求められている。効率化に向けた手法の一つとして、紫外線による光殺菌方法にチタニア光触媒¹⁾を併用する方法が考えられる。チタニア光触媒はいくつかの結晶構造を持っており、一般的にチタニア光触媒と呼ばれているものはアナターゼ型のものである。アナターゼ型のチタニア光触媒は、波長380nm以下²⁾の紫外線照射下でバンドギャップ以上のエネルギーを吸収すると価電子帯の

電子が伝導帯へと励起される。このとき価電子帯には正孔が生じ、水中の水酸化物イオンなどから電子を奪いOHラジカルを生成する。生成したOHラジカルは強力な酸化力を有するため、接触した有機物を酸化・分解する。チタニア光触媒による殺菌力はこの酸化力によって細菌を酸化・分解することで殺菌力を得るというものである。チタニア光触媒の市販品には、ゾルタイプのもをガラスや金属に塗布し、表面にチタニア光触媒膜を形成するものや、チタニア微粒子そのものがある。本研究では、チタニア微粒子を懸濁することによって光殺菌効果を向上させることを考えた。この様な系ではチタニア微粒子を液中に分散させると白濁してしまうため、水中の光の透過率は低下する。そのため、殺菌効果を向上させるには槽内の照度を低下させない様にチタニア微粒子濃度をできる限り希薄にして使用する必要がある。そこで本研究では、最初にチタニア微粒子を懸濁した系に紫外線を照射した際の大腸菌と枯草菌の殺菌特性について検討した。次に、殺菌槽内の照度に関しては、ローズベンガル色素の光脱色反応³⁾を利用して装置内の照度を測定し、チタニア微粒子の光殺菌に対する真の影響を明らかにした。

* 秋田高専専攻科学生

2. 実験装置及び実験方法

2.1 殺菌実験

実験装置の概略図を図1に示した。紫外線の光源には、主波長を253.7nmとする15w 低圧水銀灯(東芝, GL-15)を用いた。発光長を10mmになるように不要な部分を黒画用紙で覆った。光殺菌槽の光入射面は光源から鉛直下方、55mmの位置にある。殺菌槽は50×50×50mmの角型アクリル製で、殺菌溶液は100mlである。また、槽内には長さ35mm中央部分の直径が7mmの回転子を投入し、スターラーを用いて一定速度で攪拌した。殺菌実験の対象菌はブイヨン液体培地で30℃で24時間振とう培養した大腸菌と、シェファー液体培地で72時間以上振とう培養し、芽胞形成状態とした枯草菌の2種類である。菌体の濃度は $10^4 \sim 10^5$ 個/mlになるように調整したものを使用した。水中に懸濁させるチタニア微粒子は平均粒径が $100 \mu\text{m}$ のアナターゼ型 TCA-123P(トーケムプロダクツ製)である。チタニア微粒子の懸濁濃度 C_w [g/l] は、0.01, 0.05, 0.1の3種類とした。なお、比較のためにチタニア微粒子を懸濁させない系でも測定した。実験では懸濁液をスターラーで攪拌しながら菌体を加えた後、紫外線を照射した。各時間でサンプリングを行い、ブイヨン寒天培地に塗布した。37℃で24時間培養後にコロニーカウント法でコロニー数をカウントして次式で定義した生存割合 f [-] を計算した。

$$f = N/N_0 \quad (1)$$

ここで、 N は各時間 t [min] におけるコロニー数、 N_0 は $t = 0$ 時におけるコロニー数である。

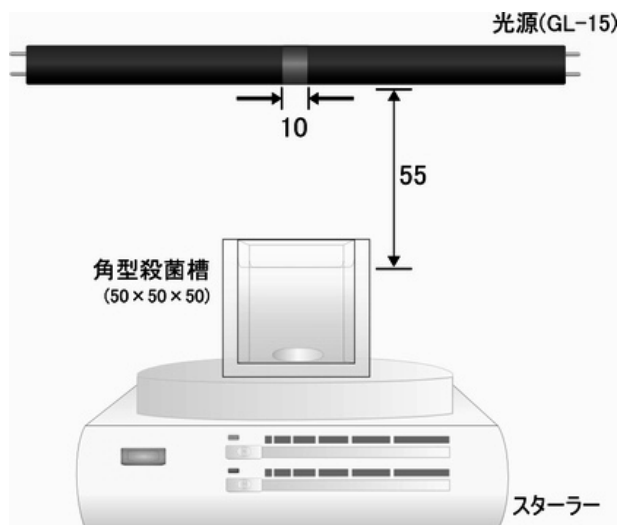


図1 実験装置の概略

2.2 照度測定

照度測定にはローズベンガル色素の脱色反応を利用した。ローズベンガル色素³⁾は、光沢のある赤褐色の粒または粉末で水溶液は青赤色を呈する。エタノールとグリセリンには溶けるが油脂には溶けない。また、耐熱性(105℃)があり、耐光性はよくないものの通常の照明下では十分安定である。ローズベンガルは赤色105号とも呼ばれ、主要国では日本でしか使用されていない。純度は85%以上で不純物のほとんどは無機塩類である。食品添加物として使用されている量は0.01~0.0005%で、毒性については認められていない。分子量は1017.65g/molである。ローズベンガル色素による槽内照度の測定にも図1に示した実験装置を用いた。ただし、懸濁するチタニア微粒子は、アナターゼ型であるTCA-123Pを電気炉で空気雰囲気中にて1050℃で3時間焼成し、ルチル型に転移させたものを使用した。これはチタニア微粒子によるOHラジカルの酸化力でローズベンガル色素の脱色反応を起こさせないためである。焼成後にルチル型への転移を確認するために粉末XRDで試料の同定を行い、ルチル型であることを確認した。なお、焼成後のチタニア微粒子はメノウ乳鉢で十分粉碎してから水に懸濁させた。懸濁濃度 C_w は殺菌実験時と同様、あらかじめ0.5g/lの濃度で調整しておいた懸濁液をホールピペットで量り取り、メスフラスコ中で水で希釈して0.01, 0.05, 0.1g/lの3種類とする。一方、ローズベンガル色素の初濃度は 1.0×10^{-5} mol/lとする。この溶液を100ml槽へ移し、殺菌時と同じく攪拌しながら紫外線を照射し、各時間でサンプリングを行う。チタニア微粒子が懸濁しているため、メンブレンフィルターでチタニア微粒子を分離した後、分光光度計により吸光度を測定した。吸光度はローズベンガル色素の最大吸収波長である549nmの吸光度を測定し評価した。ローズベンガル色素の脱色反応の初期反応速度は次式に示すように一次反応となる。

$$-\left(\frac{dC_R}{dt}\right)_{init.} = k_1 C_R \quad (2)$$

そこで、次式より一次反応速度定数 k_1 を求めた。

$$k_1 = -\frac{1}{t} \ln \frac{C_R}{C_{R,0}} \quad (3)$$

ここで $C_{R,0}$ は $t = 0$ 時におけるローズベンガル色素の初濃度、 C_R は各時間 t におけるローズベンガル色素の濃度、 k_1 [min⁻¹] はローズベンガルの初期反応速度定数である。ただし、初濃度は549nmにおけるローズベンガルの吸光度の比と等価であるので、これを用いて初期反応速度定数 k_1 を求めた。

3. 実験結果

3.1 大腸菌の殺菌特性

大腸菌の殺菌実験結果を図2に示した。縦軸に菌の生存割合 $f[-]$ を、横軸に紫外線照射時間 $t[\text{min}]$ をとり、片対数紙上に示した。実験条件はチタニア微粒子の懸濁量 C_w を変化させた。実験結果から、水のみで殺菌した場合が最も死滅速度が速く、チタニア微粒子の懸濁量が増加していくに従って死滅速度が低下しているのが分かる。また、それぞれの懸濁濃度で菌の生存割合 f は対数軸上ではほぼ直線的に減少していることから、指数関数的に死滅をしていることが分かる。大腸菌の生存割合 f は、次式で近似できると考えた。

$$f = \exp(-kt) \quad (4)$$

ここで k は死滅速度定数 $k[\text{min}^{-1}]$ である。そこで各実測値より平均の死滅速度定数 k を用いて計算した生存割合 f と光照射時間との関係が図2の実線である。0.01, 0.05g/l 懸濁した場合は、ばらつきが多いが、0, 0.1g/l 時は実験値を良く再現している。

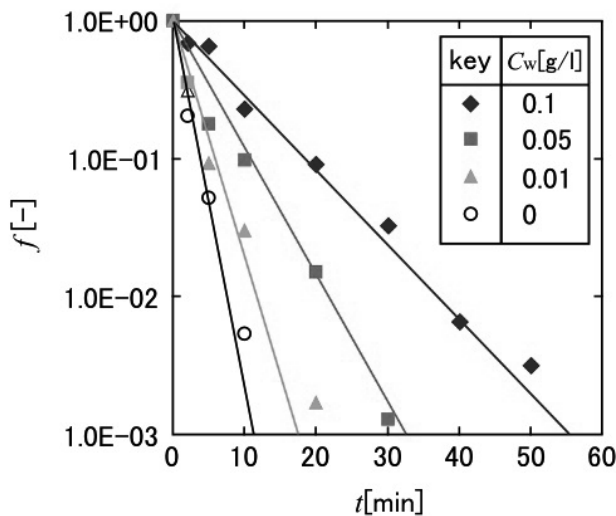


図2 大腸菌の死滅速度と計算結果

次に大腸菌の相対死滅速度定数とチタニア微粒子濃度の関係を整理した結果を図3に示した。これはチタニア微粒子を懸濁していないときの死滅速度定数 k_0 を基準としたものである。この図より、大腸菌の死滅速度は、チタニア微粒子が0.01g/lと殺菌槽の底面が確認できる濃度とした場合は、水の場合に比べて死滅速度定数が急激に低下すること、さらに半透明から光を全く通さなくなる濃度である0.05, 0.1g/lと懸濁量を増やしていくと、懸濁量に

ほぼ比例して減少していくことが分かった。

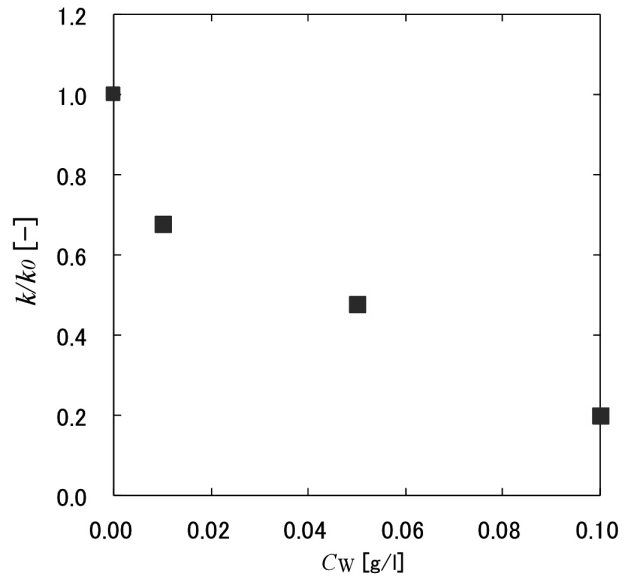


図3 大腸菌の相対死滅速度定数

3.2 枯草菌の殺菌特性

枯草菌の殺菌実験結果を図4に示した。縦軸に菌の生存割合 $f[-]$ を、横軸に紫外線照射時間 $t[\text{min}]$ をとり、図3と同様に片対数紙上に示した。実験条件はチタニア微粒子の懸濁量 C_w を変化させた。大腸菌の殺菌特性と比較すると、枯草菌の殺菌特性は光照射初期に誘導期があることが分かる。また、全ての濃度において、大腸菌の実験結果に比べて枯草菌の方が短時間で死滅していることが分かる。枯草菌の殺菌特性が大腸菌のそれと異なることから、枯草菌の実験結果を定量的に表現するために、多重標的モデルを適用した。このモデルは、生体構造中の重要部分に直接エネルギーが吸収されて生体が損傷を受けるという標的⁴⁾があると仮定し、その標的が全てヒットされた時に細菌が死滅するというモデルである。特に細胞内に重要部分が複数あり、全ての標的がヒットされた時に細胞が死滅するという標的モデルを多重標的モデルという。ここで枯草菌の標的数は文献値⁵⁾より5と得られるので、枯草菌の多重標的モデル式は次のようになる。

$$f = 1 - [1 - \exp(-kt)]^5 \quad (5)$$

これに適当な $k[\text{min}^{-1}]$ の値を入れ、最小二乗法により最も実験結果を再現できるように k の値を試行錯誤法により求めた。得られた k の値を多重標的モデルに代入し、菌の生存割合 f を計算したものが図4の実線である。

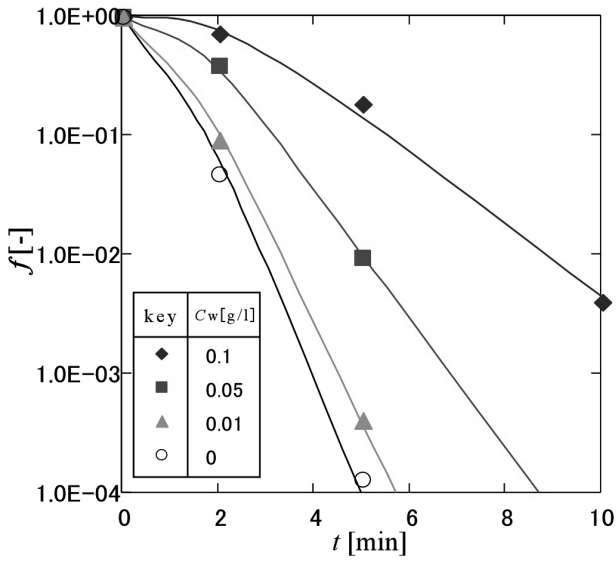


図4 枯草菌の死滅速度と計算結果

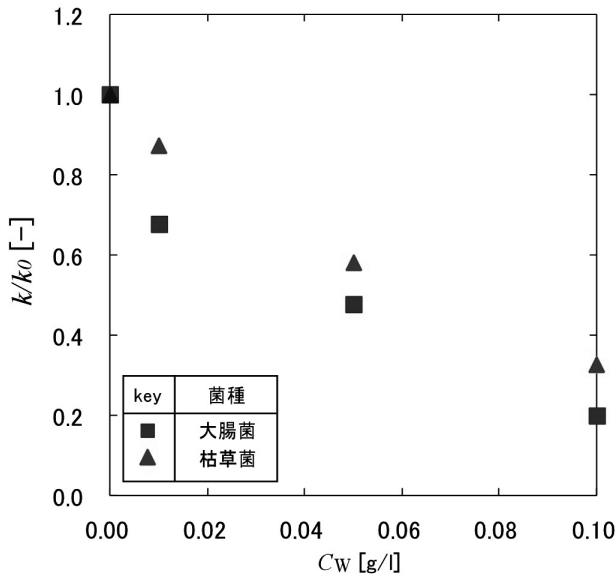


図5 枯草菌の相対死滅速度定数

次に大腸菌の相対死滅速度定数を図5に示した。

これはチタニア微粒子を懸濁していないときの死滅速度定数 k_0 を基準としたものである。比較のために大腸菌を用いた場合の結果も同時に示した。大腸菌の場合、相対死滅速度定数は 0.01g/l 時に70%程度まで低下している。一方、枯草菌は90%程度まで低下している。 $0\sim 0.01\text{g/l}$ までの間で大腸菌の死滅速度定数は急激な減少を示したのに対して、枯草菌の場合は若干下に凸ではあるがチタニア微粒子の懸濁量にほぼ比例して低下していることが分かった。

3.3 殺菌槽内の照度

槽内の照度測定結果を図6に示した。縦軸にローズベンガル色素の相対濃度 $C_R/C_{R,0}$ [-] を、横軸に紫外線照射時間 t [min] をとり、片対数紙上に示した。実験条件は殺菌実験と同様にチタニア微粒子の懸濁量 C_w を変化させた。微粒子を懸濁した場合でも、ローズベンガル色素の脱色反応は片対数紙上でほぼ直線的に減少していることが分かる。そこで、反応率が30%以下のデータをもとに(3)式を用いて初期反応速度定数を求めた。なお、図6中の実線はこのようにして求めた初期反応速度定数よりローズベンガルの未反応率と光照射時間との関係性を計算した結果である。一方、ローズベンガル色素の脱色反応の初期反応速度定数 k_1 は吸収光量すなわち槽内の照度に比例することが分かっている³⁾。それゆえ、槽内の相対照度は反応速度定数の比として次式で求められることになる。

$$(I/I_0) = (k_1/k_{1,0}) \quad (6)$$

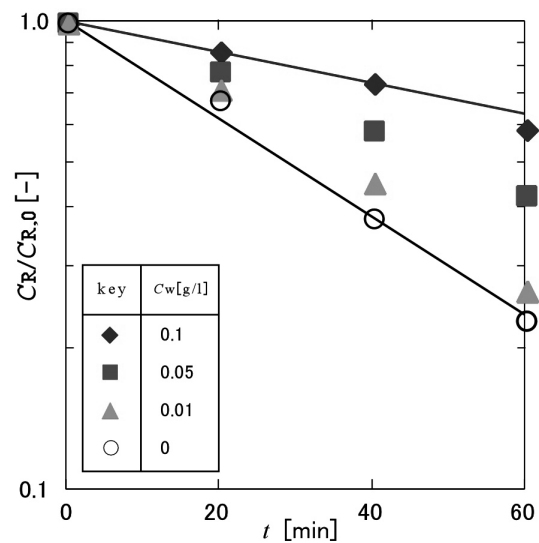


図6 照度測定結果

図6の結果をもとに、槽内の相対照度を求め整理した結果を図7に示した。縦軸は相対照度 (I/I_0) 、横軸はチタニア微粒子の懸濁濃度 C_w をとってある。懸濁濃度の増加と共に下に凸の曲線を描いており、 C_w が 0.1 の場合には照度が約60%程度減少することがわかる。

4. 考察

図5の結果より大腸菌、枯草菌の相対死滅速度定

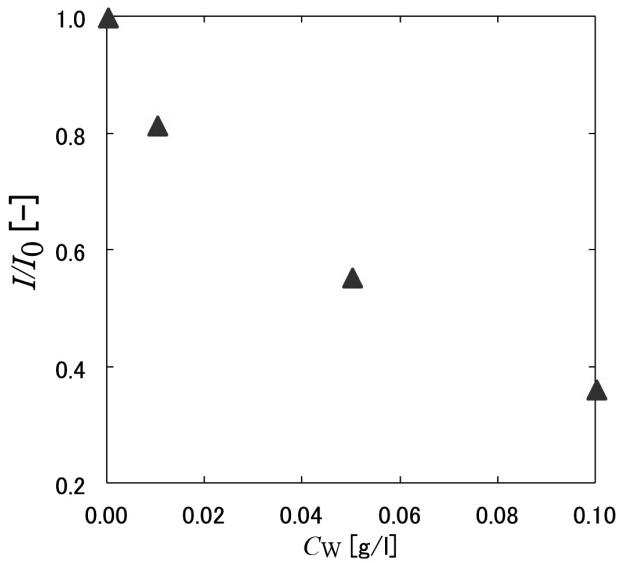


図7 槽内相対照度

数が槽内のチタニア濃度の増大とともに減少すること、および図7より殺菌槽内の照度も同様な傾向を示すことがわかった。このことから、相対死滅速度定数の低下は照度の低下が一因となることが予想される。そこでチタニア微粒子の光殺菌への真の影響を定量化するためには、各懸濁濃度における照度を考慮した相対死滅速度定数で評価しなおす必要があると考えた。照度補正した計算結果を図8に示した。縦軸は相対死滅速度定数を相対照度で割った補正した値 $(k/k_0)/(I/I_0)$ [-]、横軸はチタニア微粒子の懸濁濃度 C_w をとってある。チタニア微粒子濃度が希薄な領域では、枯草菌の殺菌速度が1以上になっていることがわかる。しかしながら、この濃度が比較的濃厚な濃度域や大腸菌の殺菌では殺菌速度が1以下となっていることも分かる。このことより、枯草菌は大腸菌に比べてOHラジカルによる酸化の影響を受けやすいことが分かる。なお、チタニア光触媒膜をコーティングした殺菌槽を用いて同様の殺菌実験を行った場合にも、大腸菌にはチタニア光触媒の効果無く、枯草菌には効果が有るという結果が得られている⁶⁾。さらに、チタニア微粒子を懸濁しているときの殺菌速度が1以下となる領域が存在することから、光触媒が照度低下以外の負の効果があることも予想される。

ところで、紫外線によるDNAへの影響は細菌の細胞内部で起こるが、OHラジカルによる酸化は細菌の表面で接触した場合に起こる。また、大腸菌はグラム陰性、枯草菌はグラム陽性の菌であり、菌体の大きさは同程度である。それゆえ、大腸菌、枯草菌の光殺菌におけるチタニア微粒子懸濁による影響

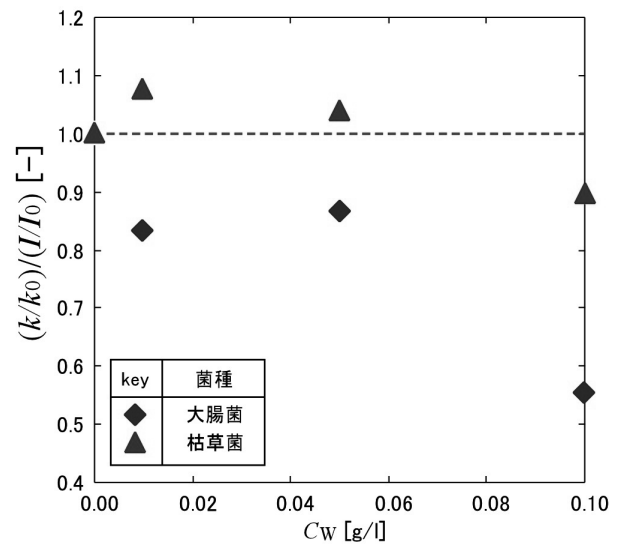


図8 照度補正計算結果

の違いは、細胞壁の構造の違いによる可能性が高いのではないかと考えた。しかし、今回の実験では、大腸菌と枯草菌の2種類の菌のみでの評価であったため、グラム陽性、陰性の細胞壁による差異を比較検討する必要がある。さらに、細胞壁の構造による違いを観察するため、顕微鏡を用いた大腸菌、枯草菌の殺菌前後の比較や、また、好気性、嫌気性といった細胞の代謝の種類別のOHラジカルによる酸化の違いについても検討する必要がある。

5. まとめ

本研究では、まず光殺菌槽内にチタニア微粒子を懸濁させた場合の殺菌速度を求めた。次に、ローズベンガル色素の脱色反応を用いて槽内の照度を求めた。その上で、チタニア微粒子の殺菌に対する真の影響を評価したところ次のことが分かった。最初に、紫外線を用いた光殺菌にチタニア微粒子を懸濁したところ、大腸菌、枯草菌とも死滅速度がほぼ単純に減少し、同時に殺菌槽内の相対照度も死滅速度と同様に減少した。次に、照度を考慮に入れた死滅速度を求めたところ、チタニア微粒子の濃度が希薄な領域において枯草菌の殺菌速度が増加した。このことから、光触媒による酸化作用は枯草菌の殺菌に対して有効であることが分かった。

参考文献

- 1) K.Honda and A.Fujishima: "Electrochemical Photolysis of Water at a Semiconductor"

二酸化チタン懸濁装置内照度の紫外線殺菌に及ぼす影響

- Electrode”, *Nature*, 238, P.37-38 (1972)
- 2) 埜田博史：“今日からモノ知りシリーズトントンやさしい光触媒の本”，日刊工業新聞社 P.16, 26, 52
 - 3) 本田善大：“ローズベンガル水溶液の光脱色反応を利用した化学光量計の開発”平成11年度 秋田工業高等専門学校 専攻科特別研究論文集 P.125-132 (2000).
 - 4) (財)日本原子力文化振興財団：“標的説”，原子力図書館げんじろう http://atomica.nucpal.gr.jp/atomica/dic_1161_01.html (2007.9月参照)
 - 5) Sugawara.T, M.Yoneya, H.Ohashi and S.Tamagawa：“Inactivation Rate of *Bacillus subtilis* Spores Irradiated by ultraviolet Rays”, *J.Chem.Eng.Japan*, 14, P.252-257 (1981)
 - 6) 田中学：“光殺菌特性に及ぼす光触媒と超音波の影響”，平成17年度 秋田工業高等専門学校 専攻科特別研究論文集 P.105-112, (2005).