

塩の添加による超音波オゾンマイクロバブル殺菌の高効率・高機能化

幕田 寿典

山形大学大学院理工学研究科

概要 近年、塩素に代わる水の消毒手法としてオゾンが注目されている。オゾンはその強力な酸化力、および自己分解時に発生するラジカルの酸化力で菌を不活化することが可能である。その一方で、水に難溶解性のためオゾンガスの溶解が困難、人体に有害であるため放出オゾンガスの抑制・分解処理が必要などの課題を有する。したがって、オゾンによる効果的な消毒には、投入したオゾンガスを効率良く水中で溶解・消費させる溶解促進技術が求められている。一方、直径 100 μm 以下の気泡であるマイクロバブルは体積当たりの表面積が大きい・液中滞在時間が長いなどの特徴を持ち、高い溶解能を有している。

本助成研究者らは、これまでの研究で超音波を用いてオゾンガスをマイクロバブル化して供給する「超音波オゾンマイクロバブル」によって大腸菌の殺菌処理を行なうと、従来のオゾン気泡を供給する手法や超音波のみを加える手法に比べ、不活化効果が増強されることを明らかにした。その一方で、本手法にはオゾンが水中で自己分解するため溶存オゾン濃度が時間とともに低下し最終的には 0 となるため殺菌の持続性が無いという課題が残されている。そこで本研究では、純水および 1%、3%の NaCl 水溶液中の大腸菌に対して超音波オゾンマイクロバブルによる殺菌処理を行った結果、処理対象に塩を添加することで、超音波オゾンマイクロバブル処理の殺菌効率が更に向上すること、および殺菌処理後の菌の再繁殖が抑制できることを示した。これは塩を添加することによってマイクロバブルがより微細化し、オゾン溶解効率が改善するため、液中のオゾン濃度を速やかに高い濃度に保つことが可能となったためと考えられる。また、再繁殖の抑制に関しては、3% NaCl 水溶液では菌数の更なる低下が見られた一方、濃度が 1%前後の場合には純水より再繁殖が生じやすい環境となったため、再繁殖を抑制する場合には好ましくは 3%以上とする必要であることが判明した。

本研究での殺菌は塩を添加するため、上水プロセスなどへの適用は難しいものの、表面形状が複雑で殺菌が難しいとされる生野菜の殺菌や、塩分が存在する漬物などの殺菌プロセスなどには有効であると見込んでおり、今後は昨年食中毒の事件で問題となった浅漬けを想定した塩分濃度や殺菌効果の評価などを行なう予定である。

1. 緒言

近年、O-157 による集団食中毒やノロウイルスの集団感染、温泉施設でのレジオネラ感染など食や水環境において、有害な微生物による健康被害が深刻な問題となっている。例えばノロウイルスを代表とする水系感染症は、上水あるいは下水場において、適切な殺菌および消毒が行われれば、ウイルスによる水系感染症の危険性は低くなる。現在、一般的な水処理の手段として用いられているのが塩素消毒である。塩素消毒はその手法が確立されており、消毒効果が高く持続性を有し、コストも安価であるといった

メリットがある。その一方で、有害なトリハロメタンの発生や塩素臭の問題、水質条件による消毒効果の低減、クリプトスポリジウム等の原虫やウイルスといった塩素では消毒不可能な微生物の存在などの問題を抱えている。

これら塩素殺菌の抱える問題に対して、塩素に代わる水の消毒手法としてオゾンが注目されている。オゾンはその強力な酸化力、および自己分解時に発生するラジカルの酸化力で菌を不活化することが可能である。その一方で、水に難溶解性のためオゾンガスの溶解が困難、人体に有害であるため放出オゾンガスの抑制・分解処理が必

要などの課題も有する¹⁾。したがって、オゾンによる効果的な消毒には、投入したオゾンガスを効率良く水中で溶解・消費させる溶解促進技術が求められている。一方、直径 100 μm 以下の気泡であるマイクロバブルは体積当たりの表面積が大きい・液中滞在時間が長いなどの特徴を持ち、高い溶解能を有している²⁾。

代表研究者らは、これまでの研究で超音波を用いてオゾンガスをマイクロバブル化して供給する「超音波オゾンマイクロバブル」によって大腸菌の殺菌処理を行なうと、従来のオゾン気泡を供給する手法や超音波のみを加える手法に比べ、不活化効果が増強されることを明らかにした³⁾。この殺菌効果の増強は、マイクロバブルによる速やかな溶存オゾン濃度の上昇に加え、超音波の圧力振動そのものが菌を物理的に殺菌していること、および溶存状態のオゾンが超音波印加によって酸化力がより強い OH ラジカルの生成促進されることなどに起因した相乗効果によるものであることを示した。その一方、オゾン殺菌の欠点は、オゾンが水中で自己分解するため溶存オゾン濃度が時間とともに低下し最終的には 0 となるため殺菌の持続性が無いことである。

そこで本研究では、オゾン処理後の菌の再繁殖を抑制するために塩を添加することを着想した。塩の添加は、マイクロバブルの発生・維持を促進することも報告されているため⁴⁾、再繁殖の抑制だけでなく、超音波オゾンマイクロバブルの殺菌能力の向上も見込まれる。本研究では、純水および 1%、3% の NaCl 水溶液中の大腸菌に対して超音波オゾンマイクロバブルによる殺菌処理を行った結果、塩の添加によってオゾン濃度の速やかな増加、オゾン自己分解の抑制が確認され、殺菌能力が塩無添加の場合に比べ格段に向上することが明らかとなった。

2. 実験方法および測定手法

2.1 超音波マイクロバブル装置

本研究で用いた「超音波オゾンマイクロバブル」は、超音波によるマイクロバブル発生技術によって発生されたオゾンのマイクロバブルを指す。この超音波を用いたマイクロバブル発生技術は、気体の放出部で形成される気液界面近傍において超音波振動を加えると気液界面が波立つような不安定な形状となり、強い超音波振動下においては界面からの微細な気泡を放出が起こることを利用した技

術である⁵⁾。また、マイクロバブルの発生部と超音波の発生部が原理上極めて近くなるため、マイクロバブルが超音波の圧力振動によって膨張・収縮する際に内部が瞬間的に高温・高圧状態となる。このことを利用して難分解性物質の分解など反応に有効であることも報告されている⁶⁾。

本研究でのマイクロバブル発生には、Fig. 1 に示す超音波ホモジナイザー (SMT, UH-50) に内部がガス通過可能な中空ホーン (出口内径 - 外径; $\phi 2.6 - \phi 6$) を取り付け装置を用いた。Fig. 1 中のホーン左側のポートより導入された気体は超音波ホーン内部を通り、Fig. 1 中下部のホーン先端より放出され、ホーン先端を振幅 20 μm で振動させることで Fig. 2 のように瞬間的にマイクロバブルとなる。

2.2 実験装置および実験手法

Fig. 3 に実験装置の概略図を示す。試験部には 300 mL ビーカーを用い、上から前節の気泡発生装置を固定する。オゾンは酸素を原料にオゾン発生装置 (エコデザイン, ED-OG-R4 および中遠電子工業, OZ0001-12R) を用いて発生させ、供給オゾンガスは気相オゾンモニタ (荏原実業株式会社, EG-600) を用いて測定した。

殺菌試験としては、300 mL の殺菌対象となるサンプルを試験部に入れ、クールスターラ (アズワン, CSB-900N) を用いて 400 rpm で攪拌、溶液温度を 20°C に保ち、前節に記載した装置を用いて発生させた超音波オゾンマイクロバブルを吹き込むことにより殺菌処理を行なう。殺菌対象

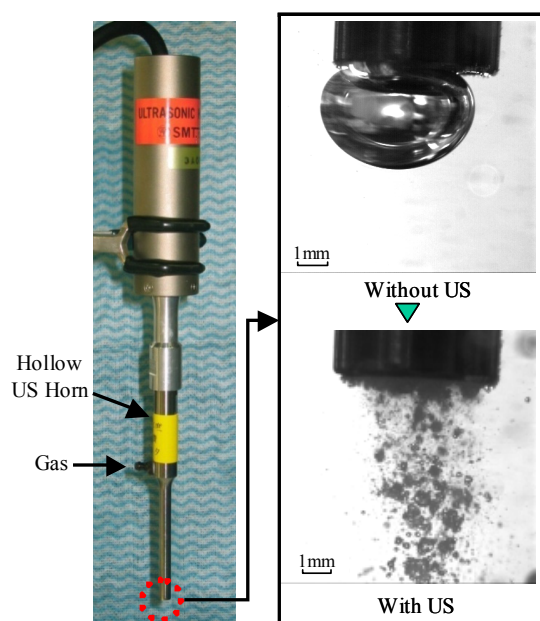


Figure 1. Microbubble generator with ultrasonic oscillation

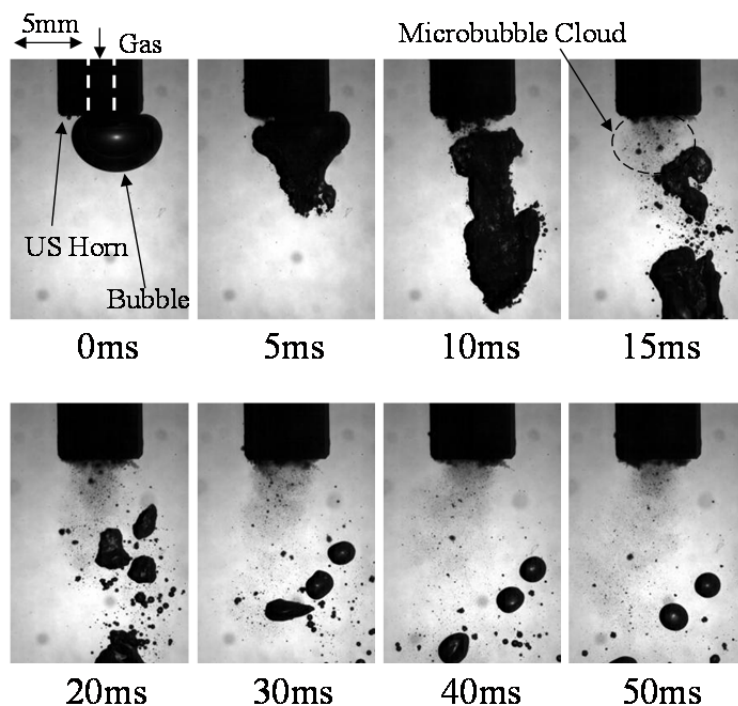


Figure 2. Microbubble generation behavior from the oscillating hollow ultrasonic horn

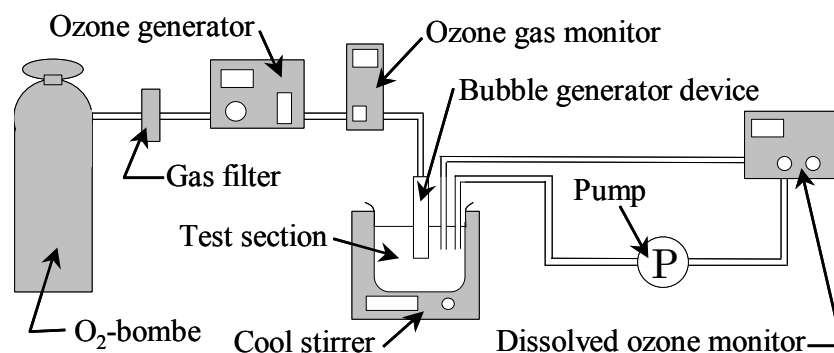


Figure 3. Experimental apparatus for *E. coli* disinfection

としては、大腸菌 (*E. coli*, ATCC8739) を用いた。この菌に関しては、MicroBioLogics 社の EZ-CFU One Step を DOX 専用液体培地 (アズワン, M4503) に投入し、ウォーターバスを用いて 37°C、24 時間培養した。また、菌数の測定には食品細菌検査装置 (バイオシータ, DOX-30F) を用いてサンプル 1 mL 中の大腸菌数を測定した。

3. 実験結果および考察

3.1 超音波オゾンマイクロバブルによる殺菌効果

まず超音波オゾンマイクロバブルの殺菌効果について、一般的な散気管と比較した殺菌実験を行った。今回比較として用いた多孔質散気管は、細孔径が 40 μm から 50

μm の物を使用した。多孔質散気管では 400 μm ~ 500 μm の気泡が放出されるのに対して、超音波によってマイクロバブルを発生させた場合 100 μm 以下の気泡が多く発生し、散気管より極めて微細な気泡の発生が可能である。

Fig. 4 に超音波オゾンマイクロバブルによる処理 (US μ B プロセス) と、多孔質散気管でオゾンバブルを供給した場合 (MB プロセス)、および超音波のみ印加した場合 (US プロセス)、多孔質散気管でオゾンバブルを供給すると同時に超音波を印加した場合 (US+MB プロセス) の大腸菌殺菌試験の結果 (横軸は処理時間、縦軸は大腸菌残存率) を示す。本殺菌試験の大腸菌サンプルは菌濃度 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL で、オゾンガス濃度は 150 mg/L、オゾン-

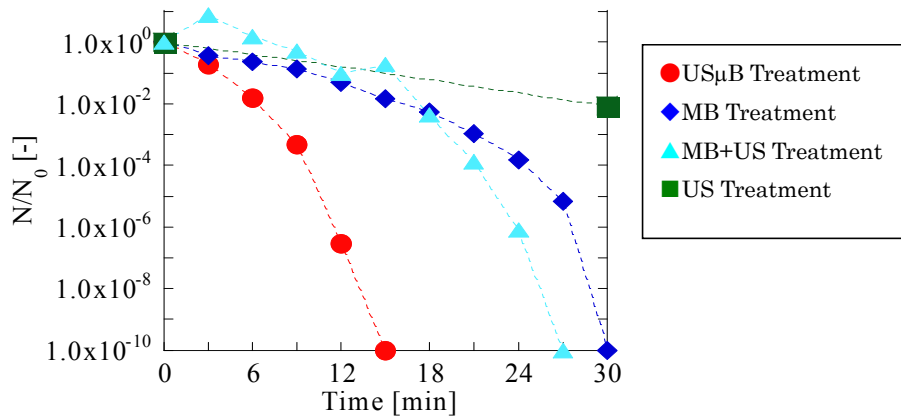


Figure 4. Survival rates of *E. coli* in water versus treating time

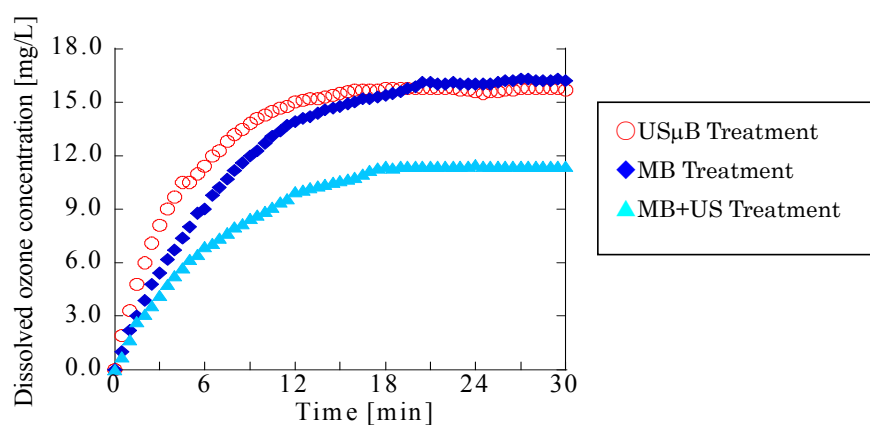


Figure 5. Dissolved ozone concentrations in water versus treating time

酸素混合気の供給流量は 50 mL/min と設定した。また、US プロセスおよび US+MB プロセスにおいては、中空超音波ホーンにガスを供給しないで発振させて液体中に超音波の印加を行なった。Fig. 4 より USμB プロセスでは 15 分で菌数が 0 となっているのに対し、MB プロセスでは菌数を 0 にするまでに 30 分要していることから、USμB プロセスで殺菌を行った場合、極めて良好な殺菌能力を持っていることが分かる。また、US プロセスについては 30 分で 90% 以上の菌を不活化しているものの、滅菌が可能であった他のプロセスとは異なり 30 分処理しても 10⁵ CFU/mL の濃度で菌が生存していることから、超音波単独での物理的な殺菌効果は USμB プロセスおよび MB プロセスに比べると低いことも明らかとなった。

Fig. 5 に USμB プロセス、MB プロセス、US+MB プロセスを用いて純水にオゾン吹き込んだ場合の溶存オゾン濃度の時間変化(横軸は処理時間、縦軸は溶存オゾン濃

度)を示す。Fig. 5 より USμB プロセスでは MB プロセスに比べオゾン濃度の上昇が早く、30 分未満では MB プロセスよりも高いオゾン濃度が確認された。したがって、USμB プロセスによる殺菌能力が高い要因の一つとして、オゾン濃度の速やかな増加が考えられる。その一方で USμB および MB における溶存オゾン濃度の上昇曲線の差に比較して両プロセスの殺菌能力の差が顕著となったことに関しては、超音波の印加によってオゾンの自己分解が促進され、オゾンより酸化力・殺菌力の強いヒドロキシルラジカルの発生量が増加したためと考えられる⁷⁾。その一方、US+MB プロセスにおいて溶存オゾン濃度が低く抑えられた理由としては、超音波による自己分解の促進に加え超音波による脱気作用⁸⁾により溶解したオゾンが液面から抜けてしまったものと考えられる。

以上のことより、超音波オゾンマイクロバブルを用いたプロセスでは、マイクロバブルの高い溶解能力および超音

波印加に伴う液体中の溶存オゾンの促進酸化効果により高い殺菌能力を有することを確認した。

3. 2 NaCl 添加による殺菌効果および再繁殖への影響

前節で示したように、超音波オゾンマイクロバブルによる殺菌処理は高い殺菌能力を有している。その一方で、オゾンはその強い酸化力により時間とともに分解し最終的には酸素となるため、殺菌効果に持続性がないことが課題であった。そこで、抗菌に効果があるとされる塩を添加した際の殺菌処理プロセスへの影響および再繁殖への影響を評価した。

本実験では、大腸菌を含む水または NaCl 水溶液に前節での US μ B プロセスを用いてオゾン殺菌を行った。大腸菌のサンプルは菌濃度 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL で、NaCl の濃度としては 1%、3% とした。オゾンガス濃度は 10 mg/L、オゾン-酸素混合気の供給流量は 50 mL/min と設定した。なお、前節を同じ殺菌条件で殺菌試験を行ったところ、最初の測定点から菌が 0 となったため、オゾン濃度を下げて実験を行った。

Fig. 6 に各 NaCl 濃度での殺菌結果 (横軸は時間、縦軸は大腸菌残存数) を示す。Fig. 6 より純水条件では、初期菌数に比べ約 10% まで菌数が減少した。一方、1% NaCl 水溶液では、30 分処理を行なった際に菌が検出されず、15 分の処理においても純水条件よりも菌数が少なかった。更に、3% NaCl 水溶液においては、15 分の処理においても菌が検出されなかったことから、溶液に対する NaCl の添加により殺菌能力が格段に向上することを確認した。

Fig. 7 に各 NaCl 濃度での溶存オゾン濃度の経時変化 (横軸は時間、縦軸は溶存オゾン濃度) を示す。溶存オゾン濃度については Fig. 7 に示すように、NaCl の濃度が増えるにしたがって、溶存オゾン濃度の上昇速度の増加が見られ、溶存オゾンの平衡濃度についても純水の場合 1.1 mg/L であったのに対し、1% NaCl 水溶液では約 1.5 mg/L、3% NaCl 水溶液では約 1.9 mg/L と高い溶存オゾン濃度を示すことが確認できる。これは、NaCl が溶解してイオン濃度が高くなると気泡が安定化することが知られており⁴⁾、今回のケースでも、超音波オゾンマイクロバブルを吹き込んだ際、純水の場合はほぼ透明だったのに対し、3% NaCl 水溶液では白濁し、明らかなマイクロバブルの発生量増加が確認された。また、**Fig. 8** に各 NaCl 濃度の水溶液に超音波で発生させたマイクロバブルの気泡径分布を示

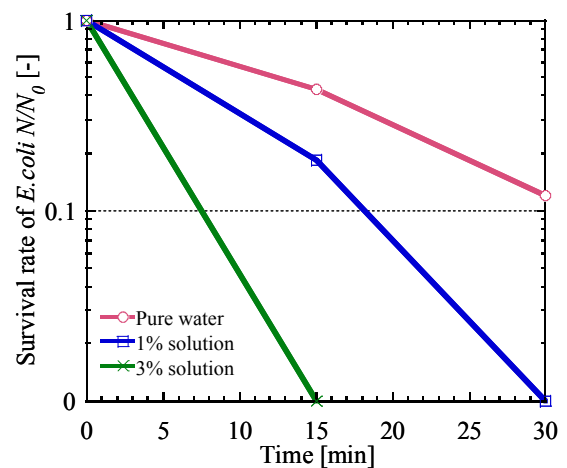


Figure 6. Survival rates of *E. coli* in water and NaCl aqueous solution versus treating time

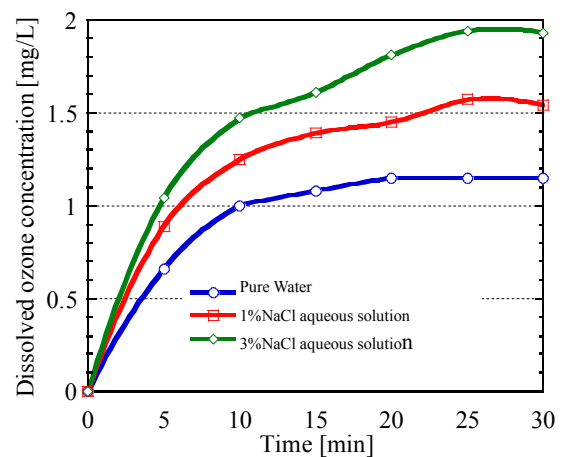


Figure 7. Dissolved ozone concentrations in water and NaCl aqueous solution versus treating time

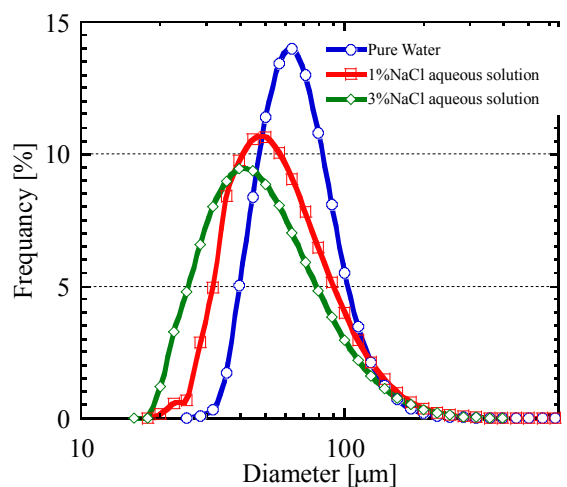


Figure 8. Bubble diameter distributions in water and NaCl aqueous solution

す。

Fig. 8 に示すように、純水時には 60 μm の気泡の頻度がピークだったのに対し、1% NaCl 水溶液では 50 μm 、3% NaCl では 40 μm が最頻値となっており、NaCl の添加によって純水より微細な気泡が処理プロセス中に発生していることが明らかとなった。同一体積の供給で、径が微細化する場合、液体と気体の接触面積が増加するため、気体の溶解効率が向上する。したがって、NaCl の添加によるオゾンマイクロバブルが微細化し溶解効率が上がり、処理液体中の溶存オゾン濃度が速やかに上昇したことが、結果として純水に超音波オゾンマイクロバブル処理をした場合より殺菌効果が高まった要因として考えられる。

次に、殺菌処理後 48 時間経過した後の菌数を測定し、再繁殖への影響について評価した。Fig. 9 に各 NaCl 濃度での殺菌処理前、殺菌処理後、殺菌処理 48 時間後の菌数変化を示す。なお、殺菌処理時間については、未検出とならないよう 5 分に短縮した。Fig. 9 に示すように、殺菌処理においては前述のように NaCl の添加量に応じて殺菌効果が強まった一方、48 時間後の再繁殖に関しては、3% NaCl 水溶液では残存菌が更に殺菌され菌数が検出されなかった。一方、純水および 1% NaCl 水溶液では菌数が再繁殖見られ、特に 1% では純水よりも再繁殖が顕在化した。この理由については、1% は生理食塩水とほぼ同等で、大腸菌の希釈液としても用いられるため、大腸菌と

の浸透圧差がほとんどないため、純水よりも再繁殖がしやすい環境であったためと考えられる。したがって、NaCl の添加は殺菌処理そのものには有効である反面、濃度が 1% 前後の場合純水より再繁殖を生じやすい環境となるため、再繁殖を抑制する場合には好ましくは 3% 以上とする必要であることが判明した。

4. 結 言

本研究では、純水および 1%、3% の NaCl 水溶液中の大腸菌に対して超音波オゾンマイクロバブルによる殺菌処理を行った結果、処理対象に塩を添加することで、超音波オゾンマイクロバブル処理の殺菌効率が更に向上すること、および殺菌処理後の菌の再繁殖が抑制できることを示した。これは塩を添加することによってマイクロバブルがより微細化し、オゾン溶解効率が改善するため液中のオゾン濃度を速やかに高い濃度に保つことが可能となったためと考えられる。また、再繁殖の抑制に関しては、3% NaCl 水溶液では、菌数の更なる低下が見られた一方、濃度が 1% 前後の場合には純水より再繁殖が生じやすい環境となったため、再繁殖を抑制する場合には好ましくは 3% 以上とする必要であることが判明した。

本研究での殺菌は塩を添加するため、上水プロセスなどへの適用は難しいものの、表面形状が複雑で殺菌が難しいとされる生野菜の殺菌や、塩分が存在する漬物など

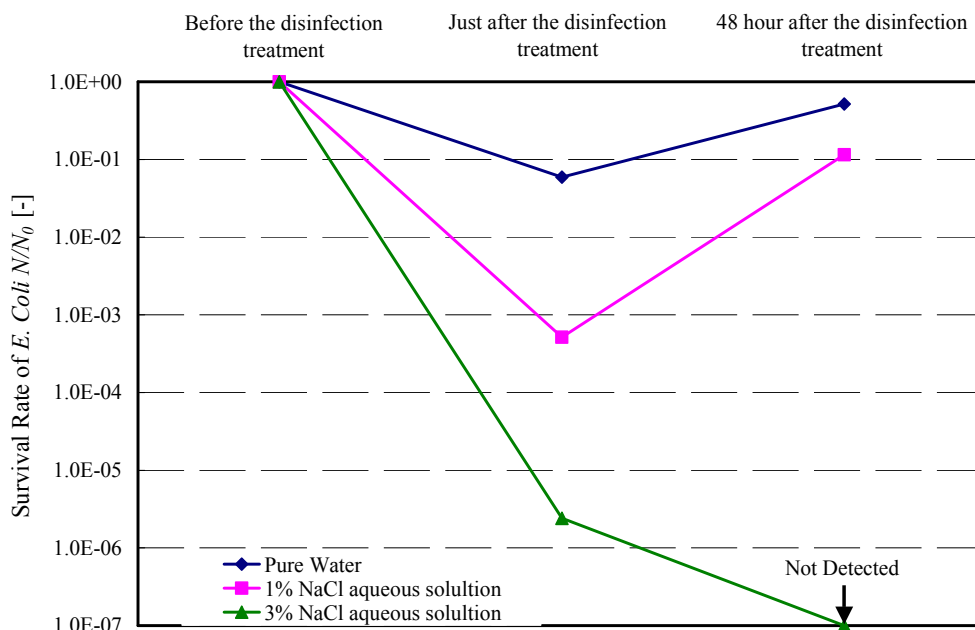


Figure 9. Survival rates of *E. coli* in water and NaCl aqueous solution before and after the disinfection treatment

の殺菌プロセスなどには有効であると見込んでおり、今後は昨年食中毒の事件で問題となった浅漬けを想定した塩分濃度や殺菌効果の評価などを行なう予定である。

参考文献

- 1) 宗宮 功ら, オゾンハンドブック, 日本オゾン協会 (2004).
- 2) 高橋 正好ら, 微細気泡の最新技術, NTS 出版 (2006).
- 3) N. Syukuya, T. Makuta, An experimental study on disinfection system using ozone microbubbles generated by the hollow ultrasonic horn, J. Jpn. Soc. Exp. Mech., 11 (2011), 116-121.
- 4) 松浦 秀俊, 佐田 富道雄, 川原 顕磨呂, マイクロバブル発生装置の性能と多目的用途に関する研究:水と海水への酸素溶存特性, 日本機械学会九州支部講演論文集, 61 (2008), 49-50.
- 5) T. Makuta, R. Suzuki, T. Nakao, Generation of microbubbles from hollow cylindrical ultrasonic horn,

Ultrasonics, 53 (2013) 196-202.

- 6) T. Makuta, Y. Aizawa, R. Suzuki, Sonochemical reaction with microbubbles generated by hollow ultrasonic horn, Ultrason. Sonochem., 20 (2013), 997-1001.
- 7) N. Syukuya, T. Makuta, A clarification of the inactivation mechanisms of highly effective disinfection treatment using ultrasonically-generated ozone microbubbles, J. Jpn. Soc. Exp. Mech., 12 (2012), 11-16.
- 8) D. Kobayashi, Y. Hayashida, K. Sano, K. Terasaka, Agglomeration and rapid ascent of microbubbles by ultrasonic irradiation, Ultrason. Sonochem., 18 (2011), 1191-1196.

成果発表

- 1) 相澤 優太, 佐々木 登子, 幕田 寿典, 超音波オゾンマイクロバブル殺菌処理に及ぼす塩添加の影響, 第 15 回化学工学会学生発表会, 2013 年 3 月 2 日.

The Influence of Salt Addition to the Disinfection Process Using Ultrasonically Generated Ozone Microbubbles

Toshinori Makuta

Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University

Summary

An ozone oxidation is widely used for the water disinfection since it has powerful oxidation ability. In general, an ozone disinfection treatment is performed by bubbling an ozone gas through disperser into water. However, a solubility of ozone in water is low, the ozone disinfection treatment needs long contact time or complicated contactor for an ozone dissolution into water.

Meanwhile, microbubbles with diameters less than 100 μm are receiving attention because of their properties such as large surface area per unit volume, low rising velocity, and self-pressurization due to surface tension. Therefore, we developed a new disinfection treatment using ozone microbubbles generated by the hollow ultrasonic horn (US μ B treatment). US μ B treatment has higher disinfection ability to *Escherichia coli* than conventional treatments such as treatment with ozone bubbles generated by the porous gas disperser (MB treatment), treatment with ultrasonic irradiation to test sample (US treatment), and treatment with ozone bubbles generated by the porous gas disperser and ultrasonic irradiation (MB+US treatment).

The treatment using the ozone microbubbles generated by the hollow ultrasonic horn has high disinfection ability, however, this treatment cannot inhibit bacterial growth because ozone itself decomposed in water and changed to oxygen. Thus, we added salt to the US μ B treatment for inhibiting bacterial growth. We investigated the disinfection abilities of US μ B treatments in pure water, 1% NaCl aqueous solution and 3% NaCl aqueous solution. These experimental results revealed that US μ B treatment in NaCl aqueous solution has higher disinfection ability than that in pure water and NaCl concentration increasing enhances the disinfection ability. The enhancement of disinfection ability by NaCl addition is caused by the increase of ozone dissolution rate since the diameter distribution of microbubbles generated in NaCl aqueous solution is smaller than that of the microbubbles generated in pure water. In addition, 3% NaCl aqueous solution could inhibit bacterial growth within 48 hours while 1% NaCl aqueous solution could not inhibit bacterial growth because osmotic pressure of 1% NaCl aqueous solution is approximately same as those of *Escherichia coli*.