

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24655068

研究課題名(和文)細菌/導電性ポリマ複合体の作製と電氣的接続の研究

研究課題名(英文) Designing and characterization of conducting interfaces between conducting polymer films and bacteria

研究代表者

長岡 勉 (NAGAOKA, TSUTOMU)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00172510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：この研究では、細菌/導電性ポリマ複合体を作製し、細菌と外部電極と間で良好な電氣的接合の形成を試みた。申請者らは最近、導電性ポリマが細菌を極めて容易に取り込むことを見いだした。この研究では、このポリマ膜を利用して、細菌/導電性ポリマ複合体による電氣的接合子を作製し、細菌内の情報を電氣的に読み取り、さらに、電氣刺激により細菌の機能を制御する技術の確立を目指した。実施した項目は以下の通りである。  
(1)細菌/ポリピロール複合膜の作製に関する検討、(2)細菌/導電性高分子/金属ナノ粒子コンポジットの作製、(3)細菌/ポリピロール複合体を用いた計測法の検討、(4)細菌からの直接電流観測

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is to develop a unique technique to establish a conducting interface between bacteria and a polymer film. We found that a conducting polymer is doped with bacteria in a high density to compensate for the positive charge arising on the polymer backbone.

The following research topics were carried out in this project. (1) fabrication of polypyrrole/bacteria composite films, (2) synthesis of nano-composites consisting of metal nano particles, bacterial, conducting polymer, (3) development of an analytical technique to quantize bacteria density, and (4) direct observation of bacteria redox currents.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：細菌 導電性高分子 化学センサ ドープ 金属ナノ粒子 ナノコンポジット

### 1. 研究開始当初の背景

細菌の性質の計測は生物化学的な分析や顕微鏡などの方法によって、様々な観点から行われている。この研究は導電性ポリマを用いた新しい細菌の固定化法を開発し、それにより、電気化学的に細菌の性質を測定する新しい計測技術を発展させることを目的とした。

細菌の測定に関しては顕微鏡やスペクトル観測など多くの技術があるが、集団で測定されることが多く、1個体の観測および解釈には困難が伴う。一方、細菌の活動には膜電位など電気的性質が深く関与するので、細菌1個の内部情報、あるいはさらに進展してその一部に関する情報取得が電気的に可能となれば、提案手法は細菌の物性をモニター可能にする重要な分析技術に発展すると考えた。

### 2. 研究の目的

この研究では、細菌/導電性ポリマ複合体を作製し、細菌と外部電極と間で良好な電気的接合の形成を試みた。これにより、細菌の物性の検討や細菌のリアルタイムセンシング技術への発展を目指した。

申請者らは最近、導電性ポリマが細菌を極めて容易に取り込むことを見いだした(図1)。図に示すように細菌(緑膿菌)は極めて高密度かつ全て垂直にポリピロール膜に取り込まれていることがわかる。

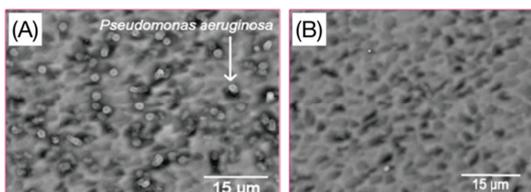


図1 金電極上に作製したポリピロール膜のSEM像:(A) 緑膿菌ドープ膜,(B) 過酸化ポリピロール膜.

この研究では、この現象を利用して、細菌/導電性ポリマ複合体による電気的接合を達成し、細菌内の情報を電気的に読み取り、さらに、電気刺激により細菌の機能を制御する技術の確立を目指した。

この知見を基に、本研究では、細菌の電気的性質を検討するため、細菌/導電性ポリマ複合体を作製し、電極と良好な電気的接合の形成を試みた。これにより、細菌の観測技術への発展を目指した。

### 3. 研究の方法

研究は導電性ポリマの薄膜を金属、カーボン、ITO被覆ガラス電極上に作製した。薄膜はモノマを電気化学的に酸化重合することにより得られた。薄膜合成時にバクテリア分散液を添加すると、バクテリアが負に帯電す

ることから、ポリマ薄膜に容易に組み込まれた。この薄膜を利用して、以下の研究を展開した。

バクテリアとして、緑膿菌、大腸菌などを使用した。バクテリアの生存率は市販の染色キットを用いて行った。電気化学装置、蛍光顕微鏡などはいずれも市販の標準的な装置であった。

### 4. 研究成果

(1) 細菌/ポリピロール複合体の作製に関する検討 細菌をドープしたポリピロール薄膜を金電極上に作製した。細菌として、緑膿菌、大腸菌などを検討した。細菌は生きた状態で膜内に取り込む必要があるため、弱酸性から中性のpH条件で検討した。また、ピロール膜にアルギン酸を同時ドープした膜についても生存率の検討を行った。さらにチオフェン系のポリマ膜についても検討を行った。検討の結果、pH中性条件で重合が可能なチオフェン膜が特に高い生存率を与えた。

(2) 細菌/導電性高分子/金属ナノ粒子コンポジットの作製 まず、細菌・ナノ粒子複合体の検討を行った。細菌は負に帯電しており、陽電荷を有する金属ナノ粒子で複合体の形成が確認された。一方、陰電荷を有するナノ粒子ではこのような複合体形成は見られず、複合体形成には金属ナノ粒子の電荷が重要であることが分かった。また、ナノ粒子としてポリアニリン・ナノ粒子からなるコロイド粒子を作用させたところ、非常に強固な吸着がおり、強い散乱光が観測され、細菌の検出に応用できることが分かった。

(3) 細菌/ポリピロール複合体を用いた計測法の開発 上記の成果を基に、作製した複合体が実際に機能するかを検討した。まず細菌をドープしたポリピロール膜およびPEDOT膜を作製した。この細菌デバイスに対して外部刺激(栄養源)を与えて起電力の変化を調査した。その結果、グルコース添加時に電位の変化が確認された。このような変化は細菌が存在しない膜には観測されなかったことから、細菌の活動に起因すると考えられた。

(4) 細菌からの直接電流観測 以上の結果から、この細菌デバイスは電気化学的に機能することが判明したので、このデバイスを用いて細菌が関与するボルタンメトリ観測を行った。細菌の生存率をデバイスの作製の前後、また、ボルタンメトリ観測後に比較したところ、どの場合でも90%前後の高い生存率が確認でき、電気化学応答が生きた細菌によるものと考えられた。また、デバイスの酸化還元試験による細菌の損傷は殆ど無いことが確認された。この結果に基づき、栄養源(グルコース)に対する細菌の電流応答を

観測したところ，酸素還元電流の減少が確認され，電流観測によって細菌の活動度が観測できることがわかった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- 1) H. Shiigi, Y. Muranaka, M. Iwamoto, K. Masuda, Y. Yamamoto, T. Nagaoka, "One-step Hybrid Preparation of Glucose Oxidase-Gold Nanoparticle and Electron Transfer Mechanism in the Hybrid Electrode System", *Bunseki Kagaku*, 63 (2014)73-78.  
査読有り  
doi.org/10.2116/bunsekikagaku.63.73
- 2) H. Shiigi, T. Nagaoka, "Molecularly Bridged Gold Nanoparticle Array for Sensing Applications", *Anal. Sci.*, 30 (2014) 89-96.  
査読有り  
doi.org/10.2116/analsci.30.89
- 3) 長岡 勉, 椎木 弘, 西野智昭, 床次志保, 「酸化ポリピロール膜を用いる細菌鑄型センサの作製」, *Proceedings of the 56th Chemical Sensors Symposium*, 30 (2014) 22-24.  
査読無し
- 4) Q.D. Le, 細末健太, 中田啓之, 中土井祐, 床波志保, 椎木 弘, 長岡 勉, 「導電性ポリマへの桿菌の固定と化学センサへの応用」, *Proceedings of the 54th Chemical Sensors Symposium*, 29 (2013) 111-113.  
査読無し
- 5) T. Nagaoka, H. Shiigi, S. Tokonami, K. Saimatsu, "Entrapment of Whole Cell Bacteria into Conducting Polymers", *J. Flow Injection Anal.*, 29 (2012) 7-10.  
査読有り  
[http://jafia.kyushu-u.ac.jp/japanese/jfia/contents/29\\_1/HP/JFIA29\(1\)\(2012\)PP.7.pdf](http://jafia.kyushu-u.ac.jp/japanese/jfia/contents/29_1/HP/JFIA29(1)(2012)PP.7.pdf)
- 6) H. Shiigi, R. Morita, Y. Muranaka, S. Tokonami, Y. Yamamoto, H. Nakao, T. Nagaoka, "Mass Production of Monodisperse Gold Nanoparticles in Polyaniline Matrix", *J. Electrochem. Soc.*, 159 (2012) D442-D446.  
査読有り  
doi: 10.1149/2.071207jes
- 7) S. Tokonami, K. Saimatsu, Y. Nakadoi, M. Furuta, H. Shiigi, T. Nagaoka, "Vertical Immobilization of Viable Bacilliform Bacteria into Polypyrrole Films", *Anal. Sci.*, 28 (2012) 319-321.  
査読有り  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/28/4/28\\_4\\_319/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/28/4/28_4_319/_pdf)

- 8) S. Tokonami, Y. Yamamoto, H. Shiigi, T. Nagaoka, "Synthesis and bioanalytical applications of specific-shaped metallic nanostructures: A review", *Anal. Chim. Acta*, 716 (2012) 76-91.  
査読有り  
doi: org/10.1016/j.aca.2011.12.025

〔学会発表〕(計 7 件)

- 1) 細末健太, L. Q. Dung, 陶国智史, 床波志保, 椎木弘, 長岡 勉, 「菌体複合ポリピロール膜によるバイオテンプレートの開発」, 日本分析化学第 62 年会(近畿大学, 2013 年 9 月 10 日 ~ 12 日)
  - 2) 細末健太, L. Q. Dung, 陶国智史, 床波志保, 椎木 弘, 長岡 勉, 「ポリピロールに固定化したバクテリアの呼吸活性の電気化学的評価」, 2013 年電気化学秋季大会(東京工業大学大岡山キャンパス, 2013 年 9 月 27 日 ~ 28 日)
  - 3) T. Nagaoka, "Development of bacterial sensing platform using bacteria-imprinted-polymers", 2nd International Congress on Advanced Materials 2013 招待講演, (Zhenjiang, China, 2013 年 5 月 16 日 ~ 19 日)
  - 4) L. Q. Dung, 細末健太, 中田啓之, 中土井祐, 床波志保, 椎木 弘, 長岡 勉, 「導電性ポリマへの桿菌の固定と化学センサへの応用」, 電気化学会創立第 80 周年記念大会(東北大学, 2013 年 3 月 29 日 ~ 31 日)
  - 5) 長岡 勉, 椎木 弘, 床波志保, 細末健太, 「細菌を固定した導電性高分子膜の物性」, 日本分析化学会第 61 年会(金沢大学, 2012 年 9 月 19 日 ~ 21 日)
  - 6) S.Tokonami, Y. Nakadoi, M. Takahashi, M. Ikemizu, T. Kadoma, K. Saimatsu, H. Shiigi, T. Nagaoka, "Vertical Entrapment of Bacilliform Bacteria into Polypyrrole Films, and Application to MIP Sensors", MIP2012, (AgroParis Tech, Paris, 2012 年 8 月 27 日 ~ 30 日)
  - 7) 細末健太, 中土井祐, 床波志保, 椎木弘, 長岡 勉, 「細菌の導電性ポリマーへの固定方法の開発」, 第 72 回分析化学討論会(鹿児島大学, 2012 年 5 月 19 日 ~ 20 日)
- 〔図書〕(計 3 件)
- 1) 長岡 勉, 椎木弘, 「プラズモンナノ材料開発の最前線と応用」, 第 2 章 6", 総ページ 278, (p.103-111) CMC 出版 (2013).

- 2) 床波志保, 椎木弘, 長岡 勉, 「金属ナノ・マイクロ粒子の最新技術と応用」, 総ページ 236 ,(p.218-224) CMC 出版 (2013).
- 3) S. Tokonami, H. Shiigi, T. Nagaoka, "Molecularly Imprinted Overoxidized Polypyrrole Films for Sensor Applications from Enantio recognition to Trace Analysis", S. Li, Y. G. Sergey, A. Piletsky, J. Lunec eds., 総 ペ ー ジ 370, p.73-89, Molecularly Imprinted Sensors: Overview and Applications, Elsevier B. V. (2012).

〔その他〕

ホームページ等

<http://tokachi.riast.osakafu-u.ac.jp/%7Esentan1/home.html>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

長岡 勉 (NAGAOKA, Tsutomu)

大阪府立大学・工学研究科・教授

研究者番号：00172510