

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：54101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420795

研究課題名(和文) バイオフィーム生成超初期における金属材料表面への細菌の付着性の評価

研究課題名(英文) adhesion behavior of microorganisms and biofilms on various materials revealed by AFM

研究代表者

平井 信充 (Nobumitsu, Hirai)

鈴鹿工業高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：50294020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：各種材料表面上への浮遊細菌の付着性やバイオフィーム形成能を原子間力顕微鏡(AFM)を用いて評価し、細菌やバイオフィームが付着しにくい材料についての知見を得ることが目的である。その結果、グラッシーカーボン、各種プラスチック、各種金属上への緑膿菌や海洋性ビブリオ菌の付着量やそれらの菌が形成するバイオフィーム付着量や形態をAFMを用いて評価することに成功した。またこれらの付着挙動が基板により異なる理由について明らかにするために、バイオフィーム含有成分を含む水溶液とこれら基板上への付着仕事についても評価を行い、各種細菌やバイオフィームの付着量や形態と付着仕事の関係についても考察を行った。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to obtain knowledge about the materials on which the adhesion of microorganisms and biofilms is limited, revealed by AFM observation on the behavior of adhesion volume and shape of microorganisms and biofilms on various materials. It has been found that the adhesion volume and shape of microorganisms and biofilms are strongly dependent on the materials revealed by AFM observation. Adhesion work of the water containing some of the components of biofilms, such as alginate or rhamnolipid, on various materials has been also investigated, and the relationship between the adhesion work and the adhesion volume and shape of biofilms has been discussed.

研究分野：界面制御工学

キーワード：バイオフィーム 原子間力顕微鏡 微生物 細菌 細胞外重合物質 濡れ性 走査型プローブ顕微鏡 微生物腐食

1. 研究開始当初の背景

微生物誘起腐食(MIC)が水環境下での構造材について問題となってきた。MICの防止には原因の1つであるバイオフィーム生成の抑制が必要であり、そのためには浮遊細菌の金属材料への付着を制御する必要がある。従来MICの防止・抑制の指標として、主に材料の「抗菌性」が用いられていたが、「抗菌性」と「バイオフィーム生成能」が一致しないケースが存在することがわかってきた。その理由の1つとして「抗菌性」と「浮遊細菌の付着性」が一致しない場合があるためと考えられる。

2. 研究の目的

以上の背景を元に、各種材料表面への浮遊細菌の付着性やバイオフィーム形成能を原子間力顕微鏡(AFM)を用いて評価し、細菌が付着しにくい材料、バイオフィームが付着しにくい材料についての知見を得ることが本研究の目的である。そのために以下の研究を行った。

(1) グラッシーカーボン上への緑膿菌の付着性についてAFMを用いて評価を行った。

(2) 各種プラスチック基板(塩化ビニル、フッ素樹脂、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ナイロン6、ナイロン6,6)上への緑膿菌の付着性やバイオフィーム生成挙動についてAFMを用いて評価を行った。

(3) 緑膿菌バイオフィームの成分であるアルギン酸塩やラムノリピッドに着目し、これらを溶解した溶液や、菌の培養液をバイオフィームの模擬物質と考え、これらの溶液を各種プラスチック上に滴下した際の接触角測定から、バイオフィームの付着性の評価を行った。また、実際に菌液から発生したバイオフィームを各種プラスチック基板に付着させ染色することにより、バイオフィームの付着量との比較を行った。

3. 研究の方法

(1) 各種基板(SS400, SUS304, リジンコートプラスチック、グラッシーカーボン(GC))について、M9培地で培養した緑膿菌(濃度 10^7 個 cm^{-3})を含む1mlの培養液に、一定時間浸漬し取り出したものを、AFMのタッピングモードを用いて大気中観察を行なった。

(2) 使用した菌液や浸漬条件は(1)と同様である。観察を行ったプラスチックは塩化ビニル、フッ素樹脂、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ナイロン6、ナイロン6,6である。

(2) バイオフィームの作製には、実験室バイオフィーム加速生成試験機(Laboratory Biofilm Reactor; 以下LBR)を用いた。LBRの外観写真を図1に示す。ポンプにより水道水を循環させるが、途中の経路にファンを設置し、効率よく落下大気中の細菌を巻き込む構造である。また、水槽の温度は温度コントローラーにより約30℃に保持した。基板をカ

ラム部に設置して、水道水を一定時間循環しバイオフィームを生成した後、装置を分解して基板を取り出した。バイオフィームを生成させた基板は(2)に用いたのと同じである。



図1 LBRの外観写真

(3) 各種プラスチック基板としてポリプロピレン、フッ素樹脂、塩化ビニル、ナイロン66、ナイロン6、ポリカーボネートの6種類を使用した。それらの各種基板に以下の溶液を注射器で1滴(約0.05mL)滴下したものについて、プリズムを用いて側面から顕微鏡観察し、接触角を10回以上測定し平均値と標準偏差を算出した。滴下した溶液は、緑膿菌バイオフィームの主成分の1つであるアルギン酸塩(本研究ではアルギン酸ナトリウムを使用)の水溶液、それに緑膿菌バイオフィームの成分であり界面活性作用を有するラムノリピッドを添加した溶液、海洋性ビブリオ菌の1つである *Vibrio fischeri* の培養液である。また、プラスチック基板を菌液に漬けてバイオフィームを付着生成させ、付着したバイオフィームを染色し、それをエタノールにつけることでエタノールを染色した。染色されたエタノールを少量取り、染色したエタノールの吸光度を測定した。この操作を各基板に対し4回ずつ行った。

4. 研究成果

(1) リジンコートプラスチックは表面が柔らかすぎて、SS400は腐食が激しく、SUS304は腐食はおこらないものの、AFMスケールでは水中の酸化に伴い、表面の凹凸が増すため、これらは、AFMでの菌付着の観察には適さないことがわかった。

一方、GC上を2時間浸漬した後の表面観察像を図2に示す。図に示すように約 $2\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ 程度の大きさの突起物が観察された。既に報告されている超臨界 CO_2 乾燥処理を行った緑膿菌バイオフィームのSEM観察結果と比較して、観察された突起物は緑膿菌であることがわかった。

また、浸漬時間の増加に伴い、菌の付着量が増加する傾向も見られた。具体的には、今回の実験条件では、浸漬1時間程度では緑膿菌は殆ど付着しないが、2時間程度で付着し

始めることがわかった。4時間浸漬したGCの表面には、大小さまざまな緑膿菌の凝集塊が観察でき、また、分泌物も見られたため、4時間程度でバイオフィームが形成し始めることがわかった。また、6時間浸漬したグラスカーボンの表面では、緑膿菌の凝集がより進行するとともに、分泌物の量も増加しており、6時間程度でバイオフィームの形成がより進行することがわかった。

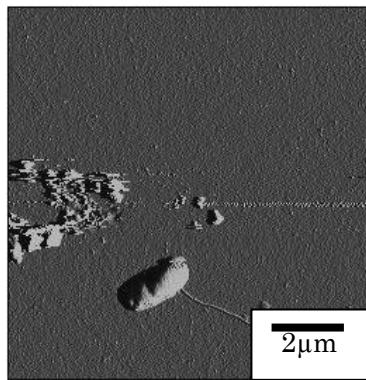


図2 GC表面のAFM像(浸漬2h)

(2) 塩化ビニル、6ナイロン、66ナイロンを緑膿菌液に2時間浸漬したものの表面観察結果より、緑膿菌が観察できたため、塩化ビニル、6ナイロン、66ナイロンでの観察が可能であることが分かった。一方、フッ素樹脂を緑膿菌液に浸漬したものの表面観察結果より、不明付着物の増加が観察できたが、緑膿菌が見られなかったため、再現性を確認することが今後の課題である。また、塩化ビニルを緑膿菌液に2時間と3時間浸漬したものの表面観察結果より、緑膿菌が2~3時間程度で塩化ビニル表面に付着することが分かった。塩化ビニルを緑膿菌液に6時間浸漬したものの表面観察結果より、大小さまざまな緑膿菌の凝集塊と分泌物が観察できたため、6時間でバイオフィーム形成初期過程であることが分かった。

(2) 基板の種類に関わらず、浸漬時間が増加するとバイオフィームのラフネスは徐々に増加し、またバイオフィームの成長量も増加するが、3日間以上ではほぼ一定になることがわかった。バイオフィームの成長速度は、他のプラスチックに比べ6ナイロンと66ナイロンが大きいことがわかった。成長したバイオフィームのラフネスは、フッ素ゴム上が一番大きく、次いで、6ナイロンや66ナイロンであり、その他の基板上的バイオフィームのラフネスはそれらより小さかった。

(3) プラスチック基板表面への各種液滴の接触角の測定結果を図3、図4に示す。

図3に10g/Lのアルギン酸ナトリウム水溶液20mLに(1)ラムノリピッドを添加していない溶液、(2)ラムノリピッドを0.1mL添加した溶液、(3)ラムノリピッドを1.0mL添加し

た溶液の液滴の接触角の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示している。図3よりラムノリピッドの添加量が多いほど、接触角が小さくなることがわかる。またプラスチック基板の中でナイロン類の接触角が他に比べ小さいこともわかる。

図4に海洋性ビブリオ菌培養液の液滴の接触角平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示している。図4よりPP、フッ素上での接触角が大きく、6N、66N上での接触角が小さくなるなど、図3と同様の挙動を示すことがわかる。

図5に各種プラスチック基板を海洋性ビブリオ菌培養液に一定時間浸漬した際のバイオフィームの生成量の測定結果を示す。吸光度が高いほどバイオフィームの付着量が多いことを示している。よって、図3~5より模擬液の付着仕事大きい基板ほどバイオフィーム付着量が多いという傾向が見られることがわかった。

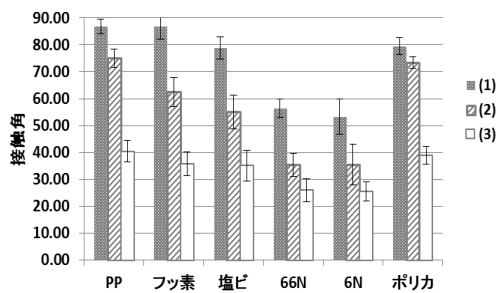


図3 各基板に対する模擬液(アルギン酸ナトリウム+ラムノリピッド溶液)の接触角

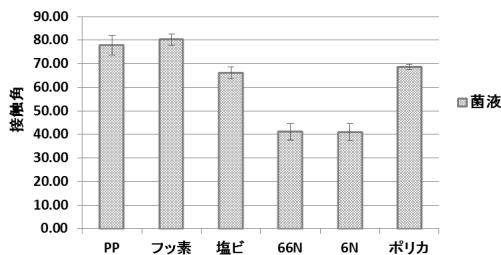


図4 各基板に対する模擬液(海洋性ビブリオ菌培養液)の接触角

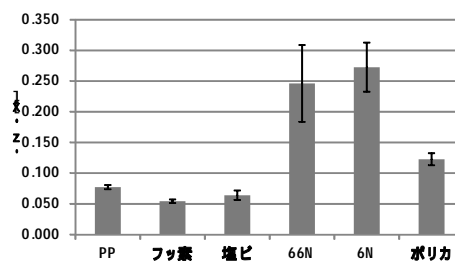


図5 各基板に対する吸光度の平均値

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計15件)

N. Hirai, M. K. Mun, T. Matsuda, H. Itoh, H. Kanematsu, Atomic force microscopy analysis of biofilms formed on different plastics, Materials Technology, 査読有, Vol. 30, (2015) B57-B60.
DOI: 10.1179/1753555714Y.0000000238

N. Hirai, M. K. Mun, Z. Bao, H. Kanematsu, H. Ikegai, Biofilm formation on various plastics revealed by AFM, Proc. Asia Steel 2015, 査読無, (2015) 76-77.

平井, 金田, 黒木, 幸後, 兼松, 各種基板上へのバイオフィルム付着量評価の試み, CAMP-ISIJ, 査読有, Vol. 28, (2015) 471-472.

平井, カームン, 増田, 伊藤, 兼松, 各種合成樹脂上に形成されたバイオフィルムのAFMによる解析, CAMP-ISIJ, 査読有, Vol. 27, (2014) 606-607.

〔学会発表〕(計13件)

平井信充, 小澤ひかり, 生貝初, グラッシーカーボン上に形成した緑膿菌バイオフィルムのAFM観察, 日本鉄鋼協会第168回秋季講演大会「微生物が促進する鉄鋼材料の腐食」自主フォーラムシンポジウム, 2014年9月25日, 名古屋大学.

N. Hirai, H. Kanematsu, T. Kanata, H. Ozawa, H. Itoh, T. Masuda, T. Tanaka, Biofilm formation processes on steel surface revealed by AFM, 17th Inter. Cong. on Marine Corrosion and Fouling (ICMCF 2014), 2014年7月8日, シンガポール.

N. Hirai, T. Kanata, M. Suzuki, S. Katsuyama, T. Tanaka, H. Kanematsu, Fundamental study for in-situ observation for in-situ observation of biofilm in water by means of AFM, Materials Science and Technology (MS&T) 2013, 2013年10月30日, カナダ モントリオール

〔図書〕(計2件)

兼松秀行, 生貝初, 黒田大介, 平井信充, バイオフィルムとその工業利用, 米田出版, (2015) p156.

Nobumitsu Hirai, Energy Problems-Fuel Cell in "Biofilm and Material Science", Springer, (2015).

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

平井 信充 (HIRAI NOBUMITSU)
鈴鹿工業高等専門学校・生物応用化学科・准教授
研究者番号: 50294020

(2)研究分担者

兼松 秀行 (KANEMATSU HIDEYUKI)
鈴鹿工業高等専門学校・材料工学科・教授
研究者番号: 10185952
生貝 初 (IKIGAI HAJIME)
鈴鹿工業高等専門学校・生物応用化学科・教授
研究者番号: 60184389