

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12232

研究課題名(和文)電気浸透流によるバイオフィルムポリマーの荷電特性の解析と応用

研究課題名(英文) Analysis of the characteristics of biofilm polymers by electroosmotic liquid flow

研究代表者

森崎 久雄 (Morisaki, Hisao)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：50125671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：バイオフィルム(BF)は水と接する固体表面に環境を問わず形成される。BFに含まれるポリマーは荷電を持ち、周囲の物質と静電的に相互作用し、BFに特異的な機能を与えている。本研究では、BFポリマーの荷電を電気浸透流により解析するシステムの構築を目指し、次の成果を得た。1) 電気浸透流速度を精確に測定できる簡便なシステムを構築した。2) 電気浸透流速度をゼータ電位に変換する手法を確立した。3) 淡水および海水環境で形成されたBFポリマーの荷電特性が異なる可能性を見いだした。さらに、4) 従来の電気泳動法では測定できなかった水より重いサンプルでも、本研究で構築したシステムで測定可能となった。

研究成果の概要(英文)：Biofilms are formed on a solid surface contacting with water over a wide range of environments. Biofilm contains polymers carrying electric charges. Hence the polymers interact electrostatically with various substances in the surrounding water, giving the biofilm specific functions. This study aimed to develop a system combining instrument and method for the analysis of the electric charges of biofilm polymers by using electroosmotic liquid flow. The following results are obtained; 1) an instrument enabling to measure the electroosmotic liquid flow precisely and easily was developed; 2) an experimental method to convert the velocity of electroosmotic liquid flow to zeta potential was confirmed; 3) a difference in the extent of electric charges was found between biofilm polymers formed under terrestrial and sea water; and 4) samples heavier than water, which cannot be measured by the conventional electrophoretic method, can be analyzed by the system developed in this study.

研究分野：環境微生物学

キーワード：電気浸透流 バイオフィルム ゼータ電位 電気泳動 イオン強度

1. 研究開始当初の背景

バイオフィーム(石などの固体表面に微生物が付着し、細胞外に親水性のポリマーを生産し、これらポリマー間に多量の水分を含んだ微生物の集合体)は環境中の至る所に見られ、水質の浄化・保全、物質の循環、様々な微生物の遺伝子プールになるなど重要な役割を果たしている。一方、バイオフィームは食品の汚損、金属腐食、薬剤耐性菌の住処となる等の問題も引き起こしている。

バイオフィームのポリマーは負に帯電しており、まわりの物質と静電的に相互作用している。この相互作用がバイオフィームの様々な機能と密接に関連している。しかし、バイオフィームポリマーの荷電に関しては、我々の研究グループが電気泳動法で測定した例以外に、ほとんど報告されていない。この電気泳動法では、高価で複雑な測定機器、多量のバイオフィームサンプルを要し、かつサンプルが水溶液中で浮遊している状態ではなければならない。このような制約がバイオフィームポリマーの荷電の測定を困難にしている。

上記制約を克服できれば、バイオフィームに関する研究が多いに進展すると期待される。そこで、本研究では電気浸透現象を利用した方法によりバイオフィームポリマーの荷電を測定できる簡便なシステムの構築を目指した。

2. 研究の目的

環境中に普遍的に見られる微生物共同体(バイオフィーム)の重要な構成要素であるバイオフィームポリマーに関する次の諸点を研究目的とした。(1)バイオフィームポリマーの荷電特性を電気浸透流により解析する測定システムを構築する。次に、(2)このシステムを様々なバイオフィームに適用し、バイオフィームポリマーの一般的な、あるいは各種バイオフィームポリマーの特異的な荷電特性を明らかにする。さらに、(3)本研究の測定原理である電気浸透現象を応用し、微量のバイオフィーム形成を検知可能かを確認する。さらに、電気浸透流によりバイオフィーム内部の間隙水の流入、流出が可能かを確かめる。

3. 研究の方法

(1)バイオフィームポリマーの荷電特性解析装置(図1参照);表面が電氣的に中性のプラスチック製の細いシリンジ(内径数mm)の下部にサンプルをセットした。このシリンジをより太いプラスチック製シリンジに入れ、両シリンジ上部に電極を挿入した。両シリンジ内部、および連結部を低イオン強度(3mM)の溶液で満たし、両電極間に電圧(100~200V程度)を付与し、電極の正負を一定時間ごとに交換した。内部のシリンジの液面の上下方向への移動(電気浸透流による)をカメラで録画し、

液面の移動速度より電気浸透流速度を算出した(図2参照)。

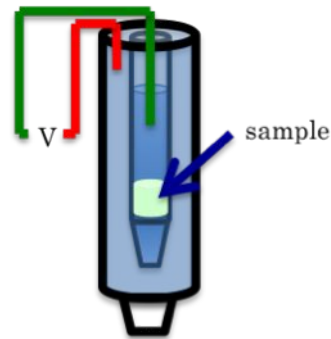


図1 電気浸透流測定システムの概略図

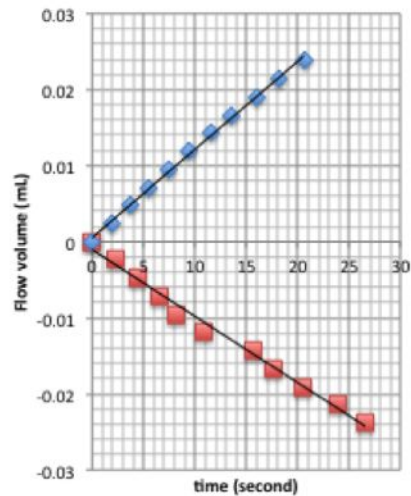


図2 電圧付与により移動した水溶液量と時間の関係

(2)様々なバイオフィームポリマーの荷電特性の解析;琵琶湖、広瀬川など淡水域の石、ヨシ表面に形成されたバイオフィーム、海水域の石表面で形成されたバイオフィームなど様々なバイオフィームサンプルを採取し、ポリマーの荷電特性を電気浸透流により解析した。

(3)微量バイオフィームの検知およびバイオフィーム内部間隙水の流出、流入実験;バイオフィームを医療用ガーゼで拭き取り、極微量でも電気浸透流が発生するか、また速度がどの程度かを調べた。電気浸透流速度測定システムの2本の電極の電位を制御し、バイオフィーム内部と外部の溶液の交換が可能かを検討した。

4. 研究成果

(1)簡便かつ精度の高い電気浸透流速度測定システムを構築できた。容易に入手可能な

市販の器具、機器により精確に電気浸透流速を測定できるシステムを構築できた。また、得られた電気浸透流速をゼータ電位に変換する電気化学的手法も確立できた。さらに、標準試料（ガラス繊維）に対し、電気泳動法で測定したゼータ電位と本研究で開発したシステムにより得られたゼータ電位が一致したことより、本研究で構築した測定システムおよび測定法の信頼性を確認できた。

(2) 淡水および海水環境下で形成されたBFポリマーの荷電特性に相違を見いだした。琵琶湖、広瀬川の石表面に形成されたバイオフィームと海水中の石表面に形成されたバイオフィームとを比較したところ、海水中で形成されたバイオフィームのポリマーの方が荷電に富むという傾向を見いだした。今後、サンプル数を増やし、一般性を確かめていく予定である。

(3) サンプルが極微量でも測定可能であった。本研究では医療用ガーゼで各種バイオフィームを拭き取り、このガーゼをシリンジに詰め、電気浸透流速を測定する。このとき、ガーゼがうすく色づく程度の微量のバイオフィームでも多量のバイオフィームを拭き取ったサンプルと同等の電気浸透流速が得られた(図3参照)。多量のバイオフィームを必要とする従来の方法(電気泳動法)にはない利点といえる。なお、バイオフィームからの溶液の流出あるいはバイオフィームへの溶液の流入の促進実験に関しては、装置の選定・組立までを終えた。

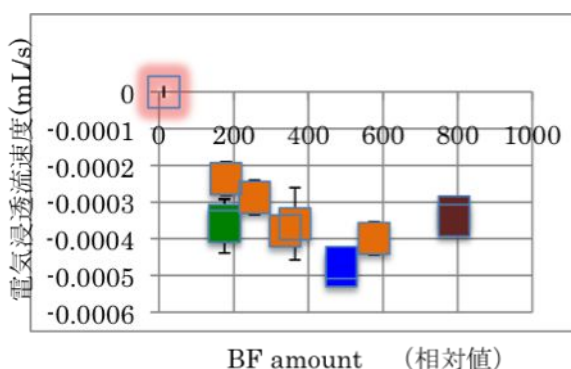


図3 バイオフィーム量と電気浸透流速の関係

(4) 従来の電気泳動法では測定できなかったサンプルにも本システムを適用できた。本研究で構築した測定システムでは測定対象はシリンジ中に固定されており、電気泳動法のように水中に浮遊している必要はない。これは、シリンジ内に入るサンプルであれば、どのようなものでもその表面電位を測定できることを意味する。例えば、水より重く水中に沈んでしまうようなサンプルでも表面電位を測定可能である。試験的に植物種子を用いたところ、電気浸透流速を測定できた(図4参照)。植物種子の表面電位、種子発芽後の表面電位など、これまでになかった新規なデータが得られる可能性がある。

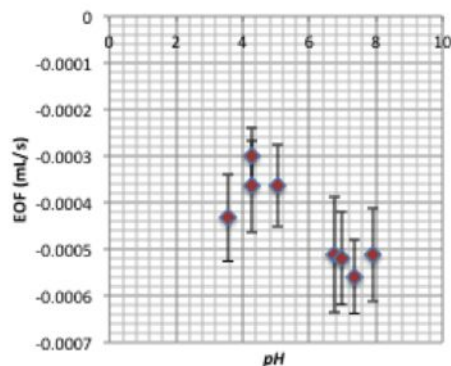


図4 シュンギク種子の表面荷電による電気浸透流

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 2件)

Yuki Tsuchiya, Shima Eda, Chiho Kiriyama, Tomoya Asada, and Hisao Morisaki. Analysis of dissolved organic nutrients in the interstitial water of natural biofilms. *Microbial Ecology*, 査読有、2016, 72(1), 85-95. doi: 10.1007/s00248-016-0749-1

Andi Kurniawan, Yuki Tsuchiya, Shima Eda, Hisao Morisaki. Characterization of the internal ion environment of biofilms based on charge density and shape of ion. *Colloids and Surfaces (B): Biointerfaces*. 査読有、2015, 136, 22-26. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.08.047

[学会発表](計 6件)

土屋雄揮、浅田智也、廣田絵理奈、中尾春香、森崎久雄、「光によるバイオフィーム内の環境変化—微生物の増殖と糖の動態に着目して—」、環境微生物系学会合同大会、2017年

安田怜子、大和優作、土屋雄揮、江田志磨、森崎久雄、「抗菌材表面に形成されるバイオフィーム初期の性状変動」、第31回日本微生物生態学会、2016年

浅田智也、中尾春香、土屋雄揮、江田志磨、森崎久雄、「バイオフィーム間隙水中での微生物の増殖」、第31回日本微生物生態学会、2016年

浅田智也、土屋雄揮、江田志磨、森崎久雄、「バイオフィーム間隙水中の有機物は微生物の栄養基質となりうるか」、第30回日本微生物生態学会、2015年

安田怜子、土屋雄揮、江田志磨、森崎久雄、「バイオフィーム形成に抗菌材が与える影響の解析」、第30回日本微生物生態学会、2015年

年

花田芽衣、安田怜子、土屋雄揮、江田志磨、森崎久雄、「抗菌材表面に形成されたバイオフィルム内の細菌群集構造解析」、第30回日本微生物生態学会、2015年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森崎 久雄 (MORISAKI, Hisao)
立命館大学・生命科学部・教授
研究者番号：50125671

(2) 研究分担者

土屋 雄揮 (TSUCHIYA, Yuki)
日本大学・生物資源科学部・助教
研究者番号：10636806

江田 志磨 (EDA, Shima)
立命館大学・生命科学部・助教
研究者番号：50420005