

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成23年 5月25日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21241022

研究課題名（和文） バイオフィーム形成メカニズムの解明とその制御技術の開発

研究課題名（英文） Elucidation of biofilm formation and its control technology

研究代表者

野村 俊之（NOMURA TOSHIYUKI）

大阪府立大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：00285305

研究成果の概要（和文）：本研究では、バイオフィーム形成メカニズムの解明と、磁場を利用したバイオフィームの形成制御技術の開発を行った。その結果、バイオフィームの形成パターンは、微生物が固体界面に付着するときの自由エネルギー変化の値により異なることを明らかにした。また、流れ場においてバイオフィームが形成されやすい場所に、予め分解酵素を吸着させた磁性粒子を磁場により固定化しておくこと、バイオフィーム形成を抑制できることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this research, elucidation of biofilm formation and development of its control technology were attempted. As a result, it was found that the pattern of biofilm formation depended on the change of free energy of interaction when a microbial cell adheres to a solid surface. Moreover, it was clarified that the magnetic particle adsorbed degradative enzyme fixed on the place where the biofilm was formed easily in the flow field using the magnetic field preliminarily could inhibit the biofilm formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	11,300,000	3,390,000	14,690,000
2010年度	14,700,000	4,410,000	19,110,000
2011年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	30,800,000	9,240,000	40,040,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学 環境技術・環境材料

キーワード：バイオフィーム、相互作用、付着力、帯電性、疎水性、磁性粒子

1. 研究開始当初の背景

バイオフィームは、廃水処理、有価物生産、バイオリッチングなどの分野で積極的に利用される一方、食品・医療器具汚染、金属腐食、虫歯など、トラブルの原因となる場合も多い。しかし、バイオフィームは機能的・構造的に非常に複雑であるため、それらの問題に適切に対応できる技術は皆無である。従って、バイオフィームの形成過程を学術的に理

解し、自在に制御することは、工業、農業、医学などの幅広い分野において極めて重要な課題である。

本研究では、従来の研究が“生化学的観点”からのみ解明が試みられていたバイオフィーム形成を、コロイド科学と流体力学という“物理的観点”を加えた3つの視点から、バイオフィームの形成制御を行うことを目的とした。現実系における配管内のバイオフィ

ルム形成を定量的に把握することは困難である。この難題の本質的理解には、バイオフィルムのその場観察とモニタリングに加えて、シミュレーションによるアプローチが必要不可欠である。それらに、材料工学の視点から、バイオフィルム形成を抑制する物質を磁性粒子に固定化し、磁場を利用して目的箇所にピンポイントにアタックさせるというアイデアを加えると、環境調和型バイオフィルム形成制御技術が確立できるとの着想に至った。

2. 研究の目的

バイオフィルムのトラブルには重大なものが多い。例えば、一見、関連性がないような金属配管の腐食でさえも微生物が関わっており、1年間で30~50億ドルの被害が出ていると言われている(微生物劣化)。また、微生物の混入に細心の注意を払う食品分野でも、バイオフィルム除去のために年間数回生産ラインを止めることは避けられない(微生物汚染)。さらに、厄介なのは、微生物がバイオフィルムを形成すると、様々な耐性を発現するため、大量の薬剤添加をもってしても、バイオフィルムの除去が困難になることである。

そこで本研究では、流れ場における微生物のバイオフィルム形成機構を解明し、それが原因となる微生物劣化や微生物汚染の防止技術を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) キャラクタリゼーション

大腸菌、乳酸菌、メタン菌、脱窒菌をバイオフィルム形成のモデル微生物として用いた。また、ポリエチレン(PE)、ポリプロピレン(PP)、テフロン(PTFE)、ポリスチレン(PS)、アクリル(PMMA)、塩化ビニル(PVC)、ガラスなどの材質をバイオフィルム形成用の担体として用いた。

菌体と担体表面の電気泳動移動度を測定し、表面電位を見積もった。また、極性の異なる溶媒を用いて、菌体層表面における接触角を測定し、表面張力を見積もった。

(2) バイオフィルム形成

ひだ付き三角フラスコに液体培地と担体を入れ、菌体を接種後、振とう培養を行った。定期的に新しい培地と交換し、繰り返し培養を行い、担体上に形成されたバイオフィルムの3次元像を共焦点レーザ顕微鏡(CLSM)により観察を行った。

(3) バイオフィルム形成の制御

インキュベータ内において、ひだ付き三角フラスコに液体培地とチューブの入口と出口を入れ、ペリスタポンプを用いて循環系を形成した。液体培地に微生物を植菌し、所定の時間循環させることで、チューブ内表面上

にバイオフィルムを形成させた。バイオフィルムが形成された場所に分解酵素を固定化した磁性粒子を磁力により誘導し、付着させることでバイオフィルムを分解する実験(バイオフィルム分解実験)と、予めバイオフィルムが生成されやすい場所に、分解酵素を固定化した磁性粒子を磁力により固定化しておき、バイオフィルムの形成を抑制する実験(バイオフィルム抑制実験)の2種類の実験を主に行った。

(4) シミュレーション

現実を想定した輸送管系における微生物の軌跡を予測するためのシミュレーションに関しては、汎用流体解析ソフトウェアであるFluentを採用した。本シミュレーションでは、実際の輸送管系でみられる乱流状態での粒子運動や壁面に対する付着・脱離現象が重要であるため、それらの状況下での微生物に働く抗力および揚力を明らかにし、それらをFluentのサブモデルとして搭載する必要がある。そこで、直接数値計算法(Direct Numerical Simulation: DNS)により、一様脈動流中および壁面近傍での球形粒子に働く流体力を評価した。

(5) モニタリング

実際の配管内におけるバイオフィルムの形成・分解の様子を把握する為、細胞外ポリマー(EPS)を解析した。そこで、*Pseudomonas fluorescens*を培養し、バイオフィルムを人為的に*in vitro*で形成させた。これを、アルカリ溶液で洗浄してEPSを回収し、全有機炭素、窒素濃度を測定した。一方、形成させたバイオフィルムには、種々の分解酵素を添加して分解試験を行った。酵素は糖分解酵素(β -glucosidase)及び、タンパク質分解酵素2種類(Protease, Type XIV, Carboxypeptidase Y)を使用した。分解後の上清を回収し、同様に全有機炭素・窒素濃度を測定し、EPS分解に適した分解酵素のスクリーニングと分解挙動の評価を行った。

(6) 分解酵素固定化用磁性粒子

二価と三価の塩化鉄を含む溶液に水溶性高分子ポリビニルアルコール(PVA)を溶解し、アンモニア水溶液を添加して共沈させ、粒径約10 nmの超常磁性酸化鉄ナノ粒子を合成した。得られた粒子分散液に塩化金酸を添加し、超音波振動子により溶液をミスト化し、キャリアガス(Air)によりミストを反応管に輸送した。反応管内で塩化金酸が熱分解され、金(金属)粒子が生成する。生成した金は酸化鉄ナノ粒子凝集体コア(100~200 nm)の周囲に担持される。これにより超常磁性を保持したまま、磁気による操作性にも優れた粒子となる。また、得られた粒子にアミラーゼを吸着させ、デンプンの分解活性測定により酵素活性を評価した。合成条件はガス流量を2.5 L/min、反応管温度を623 K、出発溶

液の酸化鉄分散液濃度を 0.1 g/L で一定とし、塩化金酸濃度を 0-0.5 g/L と変化させた。この合成粒子を回収し、TEM により粒径・構造評価を、SQUID 磁力計により磁化測定を、ICP 発光分光分析により酸化鉄と金の組成比分析を行った。

4. 研究成果

(1) キャラクタリゼーション

菌体分散液のイオン強度を変えて電気泳動移動度を測定し、柔らかい粒子モデルを用いて菌体の表面電位を推算した。その結果、いずれの菌体においても、生理食塩水に分散させた菌体の表面電位は数 mV 程度となることが分かった。これより、微生物が担体に付着する際、静電相互作用の影響はほとんど無いことが分かった。また、菌体層表面の接触角測定を行い、Young-Dupré の式を用いて菌体の表面張力を推算した。これらの結果を用いて、菌体が担体に付着したときの自由エネルギー変化 ΔG を計算した。その結果、菌体により多少違いはあるが、菌体は PE、PP、PTFE、PS、PVC 表面に熱力学的に付着しやすく、PMMA、ガラス表面には付着し難い傾向があることが分かった。

実験結果の一例として、生理食塩水に分散させた種々の脱窒菌を各種担体上に付着させた時の菌体の面積占有率と ΔG の関係を図 1 に示す。これより、菌体の付着は ΔG と正の相関があることが分かり、 ΔG が微生物の界面への付着の判断指標になることが明らかになった。

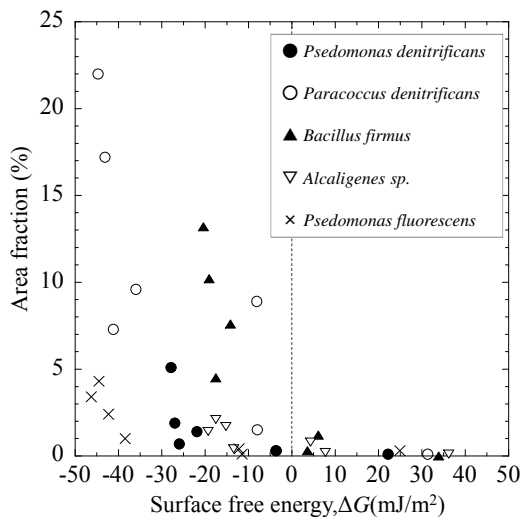
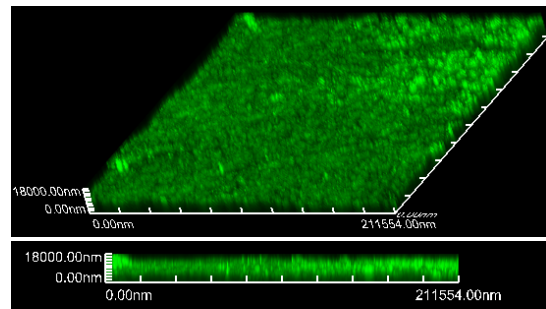


図 1 付着菌体の面積占有率と自由エネルギー変化 ΔG の関係

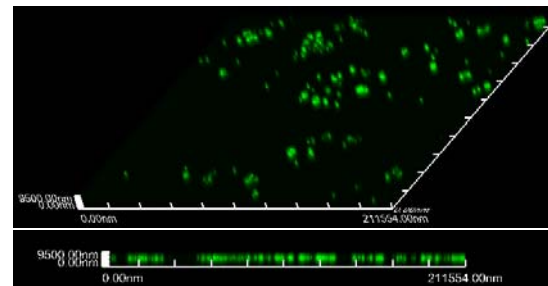
(2) バイオフィーム形成

実験結果の一例として、PE もしくはガラスの平板上に *Paracoccus denitrificans* のバイオフィームを形成させたときの CLSM 像を図 2 に示す。まず、PE - *Paracoccus*

denitrificans の組み合わせの ΔG は -43.1 mJ/m^2 と負の値であるため、熱力学的に微生物が固体表面に付着し易い傾向がある。このため、菌体は、平板表面に均一に付着してから増殖することで緻密なバイオフィームが形成されることが分かった。一方、ガラス - *Paracoccus denitrificans* の組み合わせの ΔG は 31.3 mJ/m^2 と正の値であるため、微生物は固体表面に付着し難い傾向がある。このため、部分的に付着した微生物がその場で増殖することでコロニー状のバイオフィームが形成されることが分かった。以上より、バイオフィームの形成パターンは、微生物が固体界面に付着するときの自由エネルギー変化の値により異なることが明らかになった。



(a) PE 平板上に形成された *Paracoccus denitrificans* のバイオフィーム



(b) ガラス平板上に形成された *Paracoccus denitrificans* のバイオフィーム

図 2 繰り返し培養 (3 回) により担体上に形成されたバイオフィーム

(3) バイオフィーム形成の制御

種々の流れ場を形成し、バイオフィーム実験を行った結果、オリフィスの出口側付近において、バイオフィームが最もよく形成されることが分かった。実験結果の一例として、材質が PVC のチューブ内表面上に形成された *Pseudomonas fluorescens* のバイオフィームの CLSM 像を図 3 に示す。なお、本系の ΔG は -31.0 mJ/m^2 で、熱力学的に微生物が固体表面に付着し易い系である。これより、流れ場においても、 ΔG が負の場合は緻密なバイオフィームが形成されていることが確認された。しかし、ひだ付き三角フラスコ内で形成させたバイオフィームと比べて、流体の流れが一様でないため、その密度にはかなり分布があることも分かった。

次に、DNA 分解酵素を吸着させた金／磁性複合ナノ粒子を、オリフィスの出口側付近に形成されたバイオフィームに、磁力により固定し、バイオフィームを分解する実験と、バイオフィームが形成されやすいオリフィスの出口側付近に、DNA 分解酵素を吸着させた金／磁性複合ナノ粒子を予め磁力を利用して固定化しておき、バイオフィームの形成を抑制する実験の 2 種類を行った。磁性粒子を固定化していた磁石を外した後のバイオフィームの CLSM 像を図 4 に示す。分解実験、抑制実験ともに、図 3 と比べて、明らかにバイオフィームの量が激減しており、金／磁性複合ナノ粒子に固定化した酵素による分解、抑制効果は高いことが分かった。また、部分的にバイオフィームが残っている場所には、磁石を外してもチューブ上に磁性粒子が残存しており、これらに外力を与えて除去すると、バイオフィームはほぼ除去されることが分かった。なお、広範囲で確認すると、バイオフィームが形成されやすい場所に、予め分解酵素を固定化した粒子を磁力により配置しておく方法の方が効果的であった。

さらに、磁性粒子の代わりにナノ粒子を用いた実験も行った。バイオフィームを分解することは出来ないが、正帯電性のラテックス粒子を添加すると、バイオフィーム表面に付着して、分解酵素を固定化しなくても、バイオフィームを形成している微生物の多くを死滅させることができ、新たな技術開発の可能性が見出された。

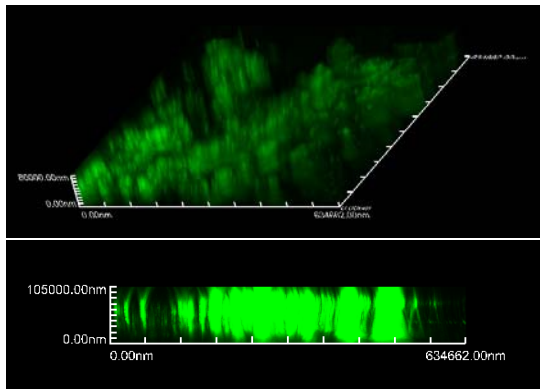
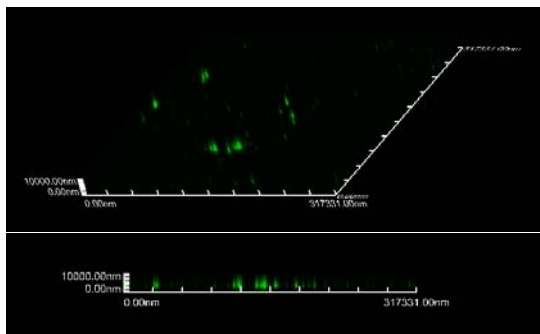
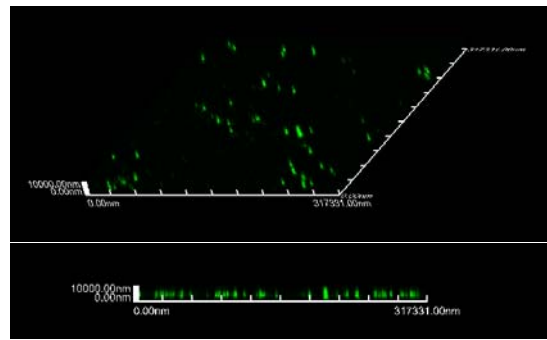


図 3 PVC チューブ上に形成された *P. fluorescens* のバイオフィームの CLSM 像



(a) バイオフィーム分解実験

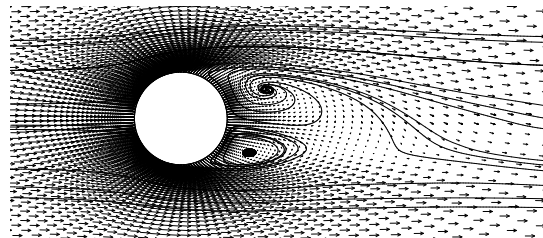


(b) バイオフィーム抑制実験

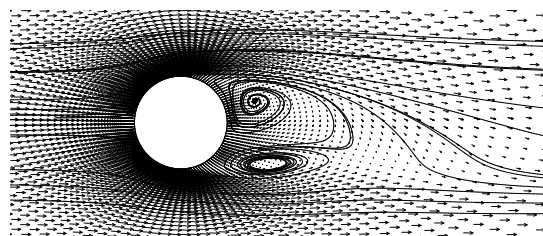
図 4 バイオフィーム分解・抑制実験後の CLSM 像

(4) シミュレーション

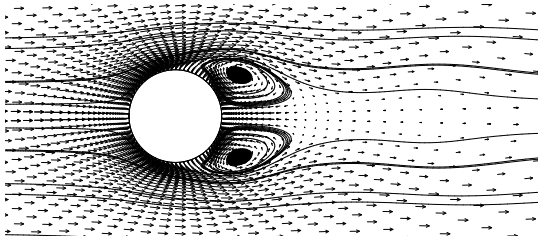
脈動流中に置かれた単一粒子周りの流れを直接数値計算法により解析を行うシミュレーションコードを開発した。図 5 に示すように、粒子の後に現れる非定常なはく離渦が周囲流の変動の大きさ・周波数により変化することがわかった。また、直接数値計算により得られた流れ場の計算結果を用いて、単一粒子に働く流体力を明らかにした。それにより、粒子レイノルズ数が 100 以下ならば、粒子の運動方向への非常に大きな振幅・高周波変動であっても、従来の微小振幅・低周波変動での予測式が適用できることが分かった。一方、粒子レイノルズ数が 300 以上ならば粒子の後に現れる非定常なはく離渦が周囲流の変動の大きさ・周波数により変化し、従来法では十分な予測ができないことが分かった。また、揚力は特に顕著に粒子の後に現れる非定常なはく離渦の影響を強く受けるため、時間平均値、変動の大きさも全く異なる値を示すことがわかった。



(a) 定常流



(b) 脈動流 : $A=0.05$ $Sr=0.2$



(c) 脈動流 : $A=0.5$ $St=0.2$

図 5 単一粒子周りの流れ場 : 粒子レイノルズ数 $Re_p=300$

図 6 に壁面近傍を移動する粒子に働く揚力係数を示す。ここで、 C_L は揚力係数、 L^* は粒子直径により無次元化された壁面からの距離 L と粒子レイノルズ数の積である。これらの結果を用い、粒子に働く揚力を得た。

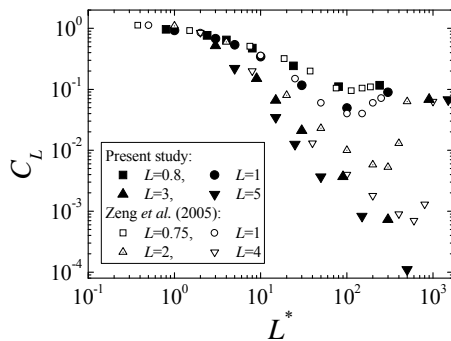


図 6 壁面により誘起される揚力

(5) モニタリング

Pseudomonas fluorescens の培養により形成したバイオフィームは、酵母由来のカルボキシペプチターゼ Y が、最終濃度 1 U/ml の濃度で投与した時に、最も EPS の分解率が高く、約 8 割が分解されるという結果が得られた。分解により流れ場に遊離してくる EPS 中の有機炭素や窒素は、河川などの有機炭素の測定でよく知られる、全有機炭素測定装置で容易に測定が可能である。また、*in vitro* assay 系の構築により、遊離 EPS の分析を皮切りに、バイオフィーム形成量、分解量との相関を取ると、モニタリング技術の構築に加え、理論的な挙動解析にも繋がる。

(6) 分解酵素固定化用磁性粒子

図 7 に合成粒子の TEM 像を示す。100~300 nm のコントラストの薄い球形の酸化鉄粒子 (凝集体) の表面に数十 nm の黒い斑点状の金粒子が担持されていることが分かった。また、金の濃度を増加させると、金ナノ粒子の担持量は増加するが、酸化鉄表面はほぼ被覆され、飽和磁化は減少することが分かった。また、アミラーゼを吸着させた磁性粒子を用いてデンプンの分解活性測定を行った結果、塩化金酸濃度 0.1 g/L の低濃度条件においても、固定化された酵素が失活せずに、高い活性を発現することがわかった。

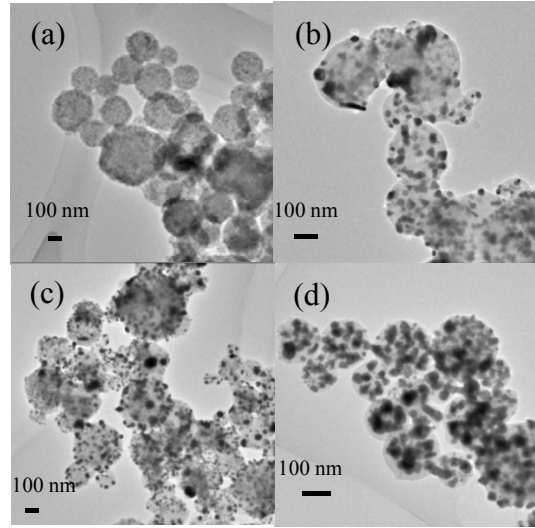


図 7 金/磁性複合ナノ粒子の TEM 像 (原料 Au 濃度 : (a) 0 g/L, (b) 0.1 g/L, (c) 0.2 g/L, (d) 0.5 g/L)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① 野村俊之, 吉原章仙, 徳本勇人, 小西康裕, 酸生成菌共存下での酢酸資化性メタン生成菌の付着・凝集挙動, 粉体工学会誌, 印刷中, 有
- ② 宮本顕久, 徳本勇人, 小西康裕, 野村俊之, PSL ナノ粒子が大腸菌に及ぼす環境毒性評価, 粉体工学会誌, 印刷中, 有
- ③ 野村俊之, 吉原章仙, 徳本勇人, 小西康裕, 酢酸資化性メタン生成菌の付着・凝集特性の評価, 粉体工学会誌, 49, 260-265, 2012, 有
- ④ H. Tokumoto, M. Tanaka, Novel anaerobic digestion induced by bacterial components for value-added byproducts from high-loading glycerol. *Bioresource Technology*, 107, 327-332, 2012, 有
- ⑤ T. Nomura, H. Narahara, H. Tokumoto, Y. Konishi, The Role of Microbial Surface Properties and Extracellular Polymer in *Lactococcus Lactis* Aggregation, *Adv. Powder Technol.*, 20, 537-541, 2009, 有
- ⑥ 杉岡健一, 見上信, 塚田隆夫, 小森悟, 一様な脈動流中の球形固体粒子に働く抗力の評価, 日本機械学会論文集 B 編, 75, 2128-2134, 2009, 有

[学会発表] (計 22 件)

- ① 野村俊之, 宮崎準平, 延平典隆, 矢野哲司, 檜原久哉, 小西康裕, 微生物の界面付着現象のコロイド科学的検討, 2011年度粉体工学会秋期研究発表会, 2011/10/19, 大阪
- ② T. Tani, S. Watanabe, T. Kinoshita, M.

- Adachi, Synthesis of gold/iron-oxide composite nanoparticles and adsorption of bovine serum albumin on particle surface, 6th Asia Pacific Chemical Reaction Engineering Symposium, 2011/9/20, 北京, 中国
- ③ 名間瑞樹, 木下卓也, 足立元明, 液相レーザーアブレーションによる金/酸化鉄磁性複合ナノ粒子の合成, 化学工学学会第43回秋季大会, 2011/9/14, 名古屋工業大学
- ④ 宮崎準平, 矢野哲司, 小西康裕, 野村俊之, バイオフィルムの形成と酵素による分解の三次元評価, 化学工学学会第43回秋季大会, 2011/9/14, 名古屋
- ⑤ 野村俊之, 微生物の付着現象の解明とその利用技術の開発, 第63回コロイドおよび界面化学討論会(招待講演), 2011/9/8, 京都
- ⑥ 宮崎準平, 矢野哲司, 野村俊之, 小西康裕, 微生物の付着現象における細胞外ポリマーと運動性の役割, 2011年度粉体工学学会春期研究発表会, 2011/5/24, 東京
- ⑦ 木下卓也, 小坂康平, 谷俊之, 足立元明, ポリマー被覆型複合磁性微粒子の合成, 化学工学学会第76年会, 2011/3/22, 東京農工大学
- ⑧ 野村俊之, 微粒子工学から微生物工学へ, 2010年度秋期研究発表会(招待講演), 2010/11/30, 東京ビックサイト
- ⑨ 矢野哲司, 檜原久哉, 野村俊之, 小西康裕, 大腸菌-ガラス表面間に働く付着力の評価, 第46回粉体工学学会夏期シンポジウム, 2010/8/9, 関西セミナーハウス
- ⑩ 矢野哲司, 檜原久哉, 野村俊之, 小西康裕, 微生物-ガラス表面間に働く付着力の評価, 第41回化学工学学会秋季大会, 2009/9/17, 広島大学
- ⑪ 木下卓也, 藤川祐喜, 吉川基宏, 足立元明, 清野智史, 山本孝夫, バイオ応用を目指した金/磁性酸化鉄複合ナノ粒子の合成, 第26回エアロゾル科学・技術研究討論会, 2009/8/19, 岡山大学
- ⑫ T. Nomura, Estimation of Adhesive Force between a Biological Cell and a Glass Surface, 35th APhS Seminar: Young Researchers Meeting 2009 in UK, 2009/12/16, York, UK
- ⑬ Y. Fujikawa, M. Yoshikawa, T. Kinoshita, M. Adachi, S. Seino, T. A. Yamamoto, Synthesis of highly-dispersive gold/iron-oxide magnetic nanoparticles, 2009 MRS FALL MEETING, 2009/12/1, Boston, USA
- ⑭ H. Tokumoto, M. Tanaka, H. Yoshida,

Glycerol Based Novel Hydrogen and Methane Fermentation Processes, The 1st Korea-Japan International Symposium on Microbial Ecology, 2009/5/29, Jeju, Korea

- ⑮ T. Nomura, A. Yoshihara, Y. Konishi, Effect of surface properties of acetate-utilizing methanogens on anaerobic granulation, The 1st Korea-Japan International Symposium on Microbial Ecology, 2009/5/29, Jeju, Korea

〔図書〕(計1件)

- ① 徳本勇人(分担), 社会との垣根を越える大学の挑戦, 株式会社エヌ・ディー・エス, 280-281, 2011

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

- ① 名称: グリセリンの処理方法
 発明者: 徳本勇人, 井口太輔, 田中雅浩
 権利者: 大阪府立大学
 種類: 特願
 番号: 2010-186025号
 出願年月日: 平成22年8月23日
 国内外の別: 国内
- ② 名称: グリセリンの処理方法および下水
 余剰汚泥の処理方法
 発明者: 徳本勇人, 木村知恵
 権利者: 大阪府立大学
 種類: 特願
 番号: 2010-182642号
 出願年月日: 平成22年8月17日
 国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 俊之 (NOMURA TOSHIYUKI)
 大阪府立大学・大学院工学研究科・准教授
 研究者番号: 00285305

(2) 研究分担者

杉岡 健一 (SUGIOKA KENICHI)
 東北大学・大学院工学研究科・助教
 研究者番号: 80438233

(3) 研究分担者

徳本 勇人 (TOKUMOTO HAYATO)
 大阪府立大学・大学院工学研究科・助教
 研究者番号: 70405348

(4) 研究分担者

木下 卓也 (KINOSHITA TAKUYA)
 大阪府立大学・大学院工学研究科・助教
 研究者番号: 90453141