

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26870095

研究課題名(和文)大腸菌の増殖を促進するカーボン材料の開発

研究課題名(英文)Preparation of carbon materials with E. coli growth-promoting ability

研究代表者

松井 雅義(Matsui, Masayoshi)

群馬大学・大学院理工学府・助教

研究者番号：50415791

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)：アルギン酸由来のカーボン材料は大腸菌に対する毒性を示さないため、大腸菌増殖促進剤のベースとなる材料として有望であることがわかった。カーボン材料の親水性と大腸菌の増殖との相関を明らかにするために必要不可欠であると考えられるバイオフィルムの形成条件および定量法に関して、培地組成や染色、脱色条件を検討することで高い再現性が得られた。さらに、プラズマジェット処理装置による迅速且つ簡便な平板状カーボン材料の親水処理方法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Carbon materials derived from alginic acid did not show any toxicity toward Escherichia coli (E. coli). Thus, these materials were found to be the potential candidate of the base material for the growth-promoting agents of E. coli. The growing condition and quantitative method for E. coli biofilm was also optimized to investigate the effect of hydrophilicity of carbon materials on the growth of E. coli. Furthermore, the rapid and simple surface treatment method of flat-plate carbon materials using a plasma jet device was developed.

研究分野：応用微生物学

キーワード：大腸菌 増殖 カーボン材料 バイオフィルム

### 1. 研究開始当初の背景

カーボン材料の分野における既往の研究では、大腸菌はカーボン材料の生体毒性や抗菌剤の性能を評価するための指標として捉えられており、「大腸菌をいかに減らすか」に着目した研究が進められてきた。例えば、単層カーボンナノチューブ (single-walled carbon nanotube: SWCNT) や多層カーボンナノチューブ (multi-walled carbon nanotube: MWCNT) が大腸菌に対して毒性を示すことや、酸化グラフェン (graphene oxide: GO) および還元した酸化グラフェン (reduced graphene oxide: rGO) が大腸菌の抗菌剤として機能することが報告されている。前述の研究に対して、本研究は「大腸菌をいかに増やすか」に主眼を置いている。大腸菌は遺伝子組換えによる医薬品等の生産に利用され、食品検査の衛生指標菌としても扱われており、我々人類にとって有用であるという側面を持っている。これらの技術分野では生産効率の向上や検出時間の短縮が課題となっており、大腸菌の増殖を促進する技術が求められている。

### 2. 研究の目的

本研究では、親水性の高いカーボン材料をベースとした大腸菌の増殖促進剤を開発する。プラズマ処理等により特定の含酸素表面官能基を導入した平板状のカーボン材料の表面で大腸菌を培養し、大腸菌の固着の速度、バイオフィルムの密度および厚み、大腸菌の形態の変化等を評価する。この結果から、大腸菌の増殖を最も促進する含酸素表面官能基を明らかにする。実用化の観点から、アルギン酸やキトサン等のバイオポリマーを炭素前駆体として選択し、炭素化条件や表面修飾方法について検討することで大腸菌の増殖を最も促進する含酸素表面官能基をより多く導入できる条件を見出し、大腸菌増殖促進剤を開発する。

### 3. 研究の方法

(1) バイオポリマーから調製したカーボン材料の大腸菌増殖への影響

カーボン材料の中には SWCNT や MWCNT のように大腸菌に対する毒性を示すものが存在する。本研究を進める上で、大腸菌増殖促進剤のベースとなるバイオポリマー由来のカーボン材料についても、大腸菌に対する毒性の有無を明らかにする必要がある。市販のアルギン酸を 1000 °C、1 h の条件で炭素化したカーボン材料 (ALG1000) を一定量丸底チューブに量りとり、LB 培地を 5 ml 加えた。ボルテックスミキサーで各種カーボン材料を分散させたのち、大腸菌のフリーズストックから植菌し、30 °C で一定時間 (8、12、18 h) 振盪培養した。振盪培養後に生じた沈殿を再分散させた状態で培養液を採取し、LB 培地で 1000 倍希釈したものを LB 寒天培地のプレート (LB プレート) に塗布し、37 °C、

20 h 静置培養した。LB プレート上に形成されたコロニー数を計測し、コロニー形成単位を算出した。対照実験としてカーボン材料を添加しない条件で同様の操作を行い、得られた結果を比較した。

(2) 大腸菌のバイオフィルム形成および定量条件の検討

カーボン材料を添加した状態で大腸菌を培養すると、バイオフィルムの形成が確認された。バイオフィルム形成と大腸菌の増殖との相関を明らかにするために、クリスタルバイオレット染色によるバイオフィルムの定量を試みたが、LB 培地中で形成されたバイオフィルムの構造は不均一であり、洗浄の際に崩壊しやすいため、再現性を得ることが極めて困難であった。この主な要因として、培地を構成する成分が高濃度であることが考えられるため、より成分が少ない最小培地を用いることで問題解決を図った。さらに、既報の実験条件を本研究に適用したところ、クリスタルバイオレットをバイオフィルムから完全に脱色することが困難であり、且つ脱色液が揮発するため、正しく評価できないという問題点があった。そこで、脱色液の揮発防止法と脱色時間についても検討した。

(3) 平板状カーボン材料の親水処理

カーボン材料の親水性と大腸菌のバイオフィルム形成との相関を明らかにするために、ガラス状カーボンやカーボクロス等の平板状カーボン材料の親水処理方法を検討した。平板状カーボン材料に対して迅速且つ簡便に親水処理することが可能なプラズマジェット処理装置を開発した。更に、様々なガス (アルゴン、二酸化炭素、窒素等) を任意の組成であらかじめ混合した状態で流通させ、平板状カーボン材料表面の親水性を精密に制御することが可能となるように改良した。

### 4. 研究成果

(1) バイオポリマーから調製したカーボン材料の大腸菌増殖への影響

TEM 観察の結果から、ALG1000 には 10-20 nm の微細な細孔が多く存在し、鋭利な突起状の構造は認められなかった (Fig. 1A)。また、炭素網面および積層構造が未発達であることから、ALG1000 はアモルファス構造を持つカーボン材料であることがわかった (Fig. 1B)。

異なる培養時間における大腸菌の CFU の変化を比較した結果を Fig. 2 に示す。対照試料 (Control) の CFU は 8 h と比較して 12 h、18 h ではそれぞれ約 5 倍、10 倍と大幅に増加した。本研究の条件では 8 h まで大腸菌の増殖が起こりにくい誘導期が続き、それ以降に対数増殖期に入るため大腸菌の増殖が盛んになり、時間の経過とともに培養液中に生菌数が増えたことで CFU が増加したと考えら

れる。ALG1000 を 1 mg/ml の濃度で添加した場合も同様の傾向を示し、8 h、12 h、18 h の CFU の値はそれぞれ Control とほぼ同じであった。ALG1000 の添加量を増加させた場合 (2mg/ml) も同様の結果が得られたため、ALG1000 は大腸菌の増殖に影響を与えないことが分かった。

既往の研究では、カーボン材料に対する細菌の吸着や、バイオフィルムの形成が細菌の増殖に影響することが示唆されている。光学顕微鏡を用いて大腸菌の培養液を経時的に観察した結果、増殖初期 (8 h) において、大腸菌は ALG1000 に吸着せず、時間の経過と共に AGL1000 の周囲で増殖し、ALG1000 を取り込みながらバイオフィルムを形成することがわかった (12 h、18 h)。従って、大腸菌は ALG1000 の影響を受けにくい状態で増殖していることがわかった。カーボン材料のサイズおよび形態に着目すると、ALG1000 は粒子径が 106  $\mu\text{m}$  以下の粒子であり、大腸菌よりもサイズが大きい。また、TEM 像 (Fig. 1) からわかるように鋭利な突起状の構造が存在しないことから、ALG1000 はバイオフィルムに取り込まれ、大腸菌との接触が起こり得る場合においても菌体に損傷を与えにくいと考えられる。

以上の結果から、ALG1000 は大腸菌に対する毒性を示さないため、大腸菌増殖促進剤のベースとなる材料として適していると考えられる。

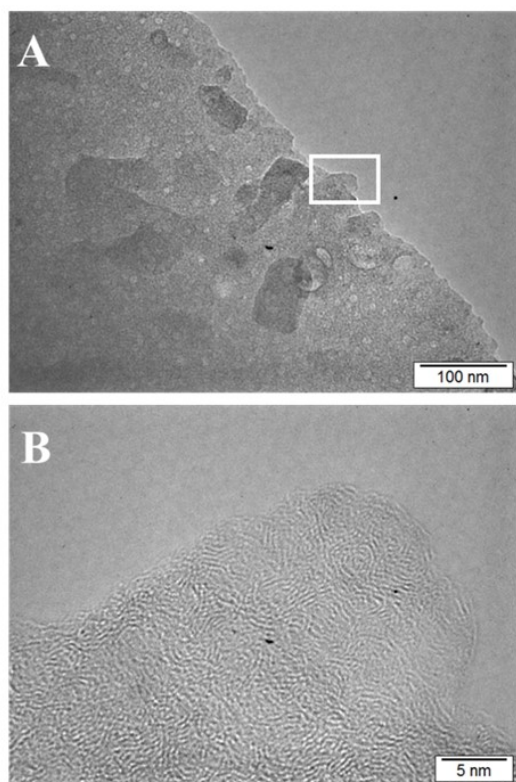


Fig. 1 ALG1000 の TEM 像 (A: 40K、B: A の四角部分の拡大図、600K)

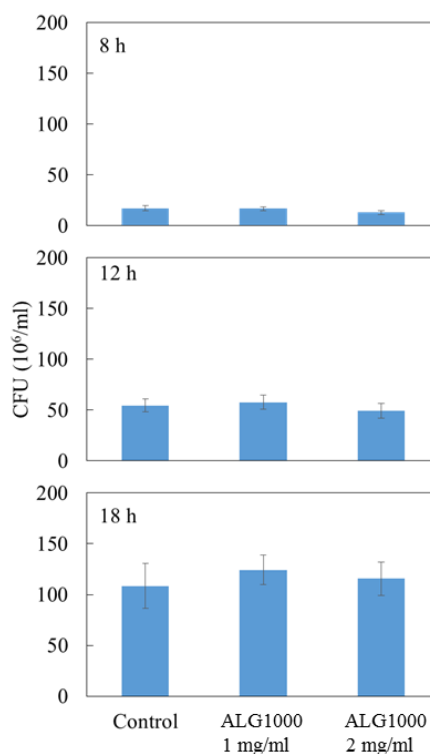


Fig. 2 CFU の比較

## (2) 大腸菌のバイオフィルム形成および定量条件の検討

大腸菌の培地を LB 培地と比較してより成分が少ない M9 最小培地に変更し、24 穴のマイクロプレートに O.D. 660 nm = 0.8 となるように調製した菌懸濁液を 1 ml ずつ分注して 37 °C、24 h の条件で静置培養し、バイオフィルムを形成させた。その結果、LB 培地で形成させたバイオフィルムと比較して洗浄に対してより強い耐性を示し、強固で均一なバイオフィルムを形成させることに成功した (Fig. 3)。このことにより、洗浄によるバイオフィルムの崩壊に起因する誤差を最小限に抑えることができた。さらに、バイオフィルムの定量について、0.1 %クリスタルバイオレット水溶液で染色後、滅菌水による洗浄を経て、脱色液 (80 %エタノール、20 %アセトン) による脱色操作の際に、プレートシールで密封することにより、18 h 程度まで脱色液の揮発を防止することに成功した。この条件下において、染色したバイオフィルムを完全に脱色することができた。以上の検討により、バイオフィルムを再現良く定量可能な実験条件を確立した。



Fig. 3 マイクロプレートに形成された大腸菌のバイオフィルム (写真左)

### (3) 平板状カーボン材料の親水処理

様々なガスを任意の組成であらかじめ混合した状態で流通させ、平板状カーボン材料の表面を迅速、簡便且つ精密に親水処理することが可能なプラズマジェット処理装置を開発した。従来の硝酸等を用いる親水処理は、試料の洗浄や乾燥等の後処理が煩雑であり、多量の廃液が生じることが問題である。本方法はこれらの後処理が不要で、廃液も生じないため、より効率的である。カーボンを試料とした場合、処理時間わずか10sで表面を親水化することが可能となった (Fig. 4)。親水性の度合いは混合ガスの組成および処理時間の違いによって容易にコントロールできる (Fig. 5)。本方法はカーボン材料の親水性と大腸菌のバイオフィルム形成との相関を評価するために極めて有効であると考えられる。

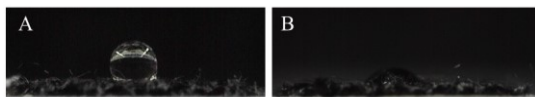


Fig. 4 カーボンを試料とした場合、処理時間わずか10sで表面を親水化することが可能となった (Fig. 4)。親水性の度合いは混合ガスの組成および処理時間の違いによって容易にコントロールできる (Fig. 5)。本方法はカーボン材料の親水性と大腸菌のバイオフィルム形成との相関を評価するために極めて有効であると考えられる。

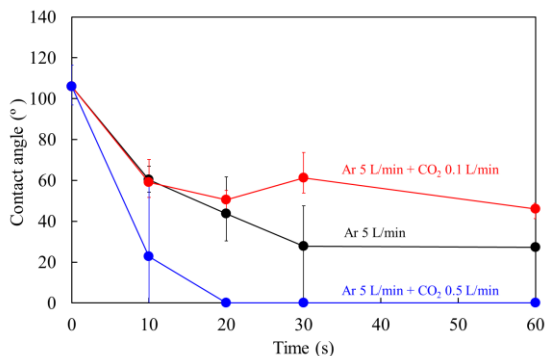


Fig. 5 各種ガス流通下においてプラズマジェット処理したカーボンクロス表面の接触角の変化

### 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0件)

[学会発表] (計1件)

①ダントインズン、松井雅義、尾崎純一、「アルギン酸を原料とするカーボン材料の大腸菌増殖に対する影響」、第41回炭素材料学会年会、2014. 12. 8、大野城まどかぴあ (福岡県)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

### ○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

### ○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

なし

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

松井 雅義 (MATSUI, Masayoshi)  
群馬大学・大学院理工学府・助教  
研究者番号：50415791

#### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

#### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

#### (4) 研究協力者

( )