516 固体表面に施した微細矩形溝が紅色光合成細菌の バイオフィーム形成に与える影響

Effects of microscopic rectangular grooves on solid surface on biofilm formation by purple photosynthetic bacteria

○柿崎佑太(東工大), 野沢良(首都大), 吉田真(首都大), 正 角田陽(首都大),
正 諸貫信行(首都大), 正 太田正廣(首都大)

Yuta KAKIZAKI*, Ryo NOZAWA**, Makoto YOSHIDA**, Akira KAKUTA***,
Nobuyuki MORONUKI***, and Masahiro OTA**

*Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology,
2-12-1 Ohokayama, Meguro-ku, Tokyo

**Department of Mechanical Engineering, Tokyo Metropolitan University,
1-1 Minamiosawa, Hachioji-shi, Tokyo

*** Department of Human Mechatronics Systems, Tokyo Metropolitan University,
6-6 Asahigaoka, Hino-shi, Tokyo

Key Words : Biofilm Formation, Purple Photosynthetic Bacteria, Microscopic Rectangular Grooves

1. 緒 言

ある種の細菌は、固体表面に付着すると自ら分泌する粘液で細胞を囲んで増殖し、バイオフィームと呼ばれる細菌社会を形成する^[1]。バイオフィームは私たちの生活にも関わりがあり、役に立つ場合と問題を引き起こす場合がある。例えば、污水处理施設では水質浄化をする際に微生物の働きを利用しているので、污水处理施設の水槽壁面を、よりバイオフィームを形成しやすいものにすれば、污水处理の効率を向上させることができる。一方、バイオフィームは水道管のパイプ壁面を腐食させたり、管内を通る水を汚染したりするので、パイプ壁面はバイオフィームが形成しづらいものにすることが望ましい^[2]。

我々はバイオフィームが付着する固体表面の形状に注目し、固体表面に施した微細矩形溝によりバイオフィームの形成を制御することを考えた。近年の微細加工技術では、nmの精度での加工が可能であり、細菌と同程度か、それ以下のスケールでの加工が可能である^[3]。本研究の目的は、シリコンウエハ上に微細矩形溝を加工し、そこにバイオフィームがどのように付着するか、またどの程度付着するかを調査し、微細矩形溝によるバイオフィーム形成の制御の可能性を模索することである。

2. 実験装置・実験方法

2.1. 試験片

試験片は集積回路製造用の直径 100 mm、厚さ 450 μm の片側鏡面仕上げのシリコンウエハを 7×10 mm の短冊状に切り分け、鏡面側にフォトリソグラフィおよびエッチングにより溝加工した。試験片の表面に施した微細矩形溝の概形を Fig.1 に、各試験片の仕様を Table1 に示す。

Fig.1 Design of microscopic rectangular grooves.
Grooves were etched by photolithography on silicon wafers. Specifications of test pieces are summarized in Table 1.

Table1 Specifications of test pieces.

Symbol	Upper width (μm)	Groove width (μm)	Depth (μm)
B2	1.5	1.7	1.6
B5	1.4	6.7	1.1
B10	1.4	9.9	1.1
B15	1.5	15.5	1.1
C5	3.3	4.6	1.5
D5	4.2	5.2	1.4
F5	6	4.4	1.6
X	—	—	—

The surface of X is a mirror surface.

2.2. 細菌の付着実験

紅色光合成細菌の培養には PYS 培地を用いた^[4]。試験片の裏面にオートクレープテープを貼り、治具で固定し、試験管に入れ、PYS 培地 11 ml を注いだ後、オートクレ

ープ(120°C, 20 min)を行った。培地が十分に冷めた後、紅色光合成細菌(*Rhodospseudomonas palustris* CGA009)の前培養から 10 μ l を植菌し、試験管を水槽に設置し細菌を培養した。培養中は分光光度計を用いて各培養の光学密度を測定し、細菌の増殖を測定した。光学密度は細菌数に比例する。培養開始から 5 日および 10 日が経過した時点で試験片を培地中から取り出し、細菌の付着状況を評価した。

試験片の裏面に貼ったオートクレープテープを剥がして試験片の裏面に付着した細菌を除去した後、キュベットに試験片と蒸留水を試験片の表面 1 cm² 当たり 1 ml 加え、超音波洗浄(周波数 42 kHz, 5 min)を行い、その洗液の光学密度を測定した。

共焦点レーザー顕微鏡を用いて試験片の表面における細菌の付着状況を観察した。また得られた画像を画像処理ソフト Scion Image (<http://www.scioncorp.com/>)を用いて画像処理し、細菌による溝部と山部の被覆率を計算した。

3. 実験結果・考察

培養後の各試験片表面に付着した細菌の量を Fig.2 に示す。試験片 B5, B10, F5 では培養 5 日間に比べ、培養 10 日間での細菌の付着量が増加していた。各試験片の溝部および山部における細菌被覆率を Fig.3 に示す。培養日数に関わらず、溝部よりも山部の細菌被覆率が小さかった。培養 10 日間になると、山部および溝部の細菌被覆率が共に大きくなり、試験片の表面全体に細菌が付着していた。特に培養 5 日間では試験片 B2, B5, B10 の山部での細菌被覆率が極端に小さかった。これらの試験片は山幅が共に約 1.5 μ m であり、細菌の大きさとほぼ同程度もしくはそれ以下のものであった。細菌の付着量が特に増加した試験片 B5, B10, F5 の山部の細菌被覆率は、培養 5 日間では小

Fig.2 Amount of bacteria attached on test pieces.

Optical densities due to bacteria washed into distilled water by ultrasonication are shown. Each test piece was washed with 1 ml of distilled water per 1 cm². Open bars represent 5-days cultures and striped bars represent 10-days cultures. The averages of three independent measurements are shown with error bars indicating standard deviation. Those without error bars represent single measurement.

さかったが、培養 10 日間ではほぼ 100%になり、試験片のほぼ全面に被覆した。

これらの結果から、細菌は溝部に比べ山部に付着しにくく、特に山幅が細菌の大きさと同程度もしくはそれ以下だと、極端に付着しにくくなり、細菌はまず溝部に多く付着し、溝部が埋め尽くされた後に山部に付着するようになるのではないかと考えられる。

Fig.3 Bacterial coverage of upper and groove areas.

Bacterial coverage calculated by image analysis after 5-days (a) and 10-days (b) cultures. Open bars show bacterial coverage at upper part and striped bars show those in grooved areas. The averages of three independent measurements are shown with error bars indicating standard deviation. Those without error bars represent single measurement.

4. 参考文献

- [1] H. J. Busscher, R. Bos and H. C. van der Mei. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. FEMS Microbiology Letters. 128: 229-234. (1995)
- [2] 谷口弘芳 バイオフィーム入門—環境の世紀の新しい微生物像— 日科技連 (2005)
- [3] 近藤英一 機械・材料系のためのマイクロ・ナノ加工の原理 共立出版 (2005)
- [4] K. V. P. Nagashima, A. Hiraishi, K. Shimada and K. Matsuura. Horizontal transfer of genes coding for the photosynthetic reaction centers of purple bacteria. Journal of Molecular Evolution. 45(2): 131-136. (1997)