細菌の固体界面への初期付着現象における 細胞外ポリマーと線状器官の役割

Role of Extracellular Polymeric Substance and Filamentous Appendages on Initial Bacterial Adhesion onto Solid Surface

吉原 章仙^{a, b*}, 栖原 久哉^a, 笹野 勝裕^a, 豊田 峻介^a,
Akinori Yoshihara, Hisaya Narahara, Katsuhiko Sasano, Syunsuke Toyoda,
徳本 勇人^a, 小西 康裕^a, 野村 俊之^{a*}
Hayato Tokumoto, Yasuhiro Konishi, Toshiyuki Nomura

Received 8 August 2014; Accepted 17 October 2014

The effect of extracellular polymeric substance (EPS) and filamentous appendages (flagella and pili) on microbial adhesion onto solid surfaces was investigated using DLVO theory and thermodynamic approaches. Nonmotile *Lactococcus lactis* and motile *Escherichia coli* were used as model microbes. Negatively and positively charged silica particles and glass slide were used as model substrates. The estimated surface potentials and tensions of microbial cells and substrates were used for the prediction of microbial adhesion. As a result, the microbial cells with EPS or filamentous appendages were able to adhere to solid surfaces even though the DLVO theory predicted an insurmountable potential barrier in low ionic strength. The adhesion of nonmotile *Lactococcus lactis* onto the silica particles was promoted in the presence of EPS. In contrast, the effect of EPS on adhesion of motile *Escherichia coli* onto the glass substrate was reduced in the presence of filamentous appendages.

Keywords: Bacteria, Adhesion, Colloid, DLVO, Thermodynamic approach

1. 緒 言

昨今の食中毒問題を契機に、食品粉体を含む食品産業の製造現場では、衛生管理が社会的急務となっている。食品工場では、原料、製造装置、作業員など、製造環境のあらゆる界面に付着した微生物が食品汚染の原因と

なる¹⁾。特に、界面に付着した微生物が増殖してバイオフィルムを形成すると、それ自体が汚染源になるだけでなく、増殖の際に産生した細胞外ポリマー（EPS）により様々な耐性（熱や薬剤等）が発現し、微生物の除去や殺菌が極めて困難となる²⁾。また、微生物の付着現象は、食品汚染以外にも、医療器具汚染、配管の目詰まり、感染症など、トラブルの原因になるケースが極めて多い^{3, 4)}。したがって、微生物が関わるトラブルを未然に防ぐには、微生物が界面にどのように付着しているのかについて知ることが重要である。一方、微生物付着は、バイオリアクターにおける固定化法のように積極的に利用される場合もある^{5, 6)}。以上のように、微生物の界面付着現象は、あらゆる界面において観察されるにも関わらず、その詳細なメカニズムが明らかにされているとはいえないのが現状である。

そこで本研究では、乳酸菌と大腸菌をモデル微生物として、液中における菌体の固体界面への初期付着現象

a 大阪府立大学大学院 工学研究科 物質・化学系専攻 化学工学分野

(〒599-8531 大阪府堺市中央区学園町1-1)

Department of Chemical Engineering, Osaka Prefecture University

(1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan)

b 住友ベークライト株式会社 生産技術本部 コーポレートエンジニアリングセンター

(〒426-0041 静岡県藤枝市高柳2100)

Corporate Engineering Center, Corporate Production Management & Engineering Division, Sumitomo Bakelite Co., Ltd.

(2100 Takayanagi, Fujieda, Shizuoka 426-0041, Japan)

* 責任著者連絡先 ayoshihara@sumibe.co.jp,

nomura@chemeng.osakafu-u.ac.jp

に及ぼす細胞外に存在する EPS や線状構造物（鞭毛や線毛）の影響について、菌体と固体の表面性状の実測値を用いた DLVO 理論と熱力学に基づいて検討を行った。

2. 実験方法

2. 1 実験に用いた試料

モデル微生物として、鞭毛を持たない非運動性球菌の乳酸菌 *Lactococcus lactis* (JCM 5805 株) と周鞭毛を持つ運動性桿菌の大腸菌 *Escherichia coli* (JM 109 株) を用いた。乳酸菌は MRS 培地により 30℃ で静置培養、大腸菌は LB 培地により 30℃ で振とう培養を行った。前培養した菌液は、吸引ろ過により不純物を除去してから遠心分離により集菌した。集菌した菌体の一部は、ボルテックスミキサー (Scientific Industries, Vortex Genie 2) を用いて生理食塩水でさらに 3 回洗浄 (各 30 s) し、菌体に付着した EPS を極力取り除いた⁷⁾。実験には、これらの菌体をそれぞれ所望の濃度に調製した NaCl 水溶液に分散させて菌体濃度を調製してから用いた。以後、不純物を除去しただけの菌体を“未洗浄菌体”、洗浄により EPS を除去した菌体を“洗浄菌体”と呼ぶ。

乳酸菌の付着実験に用いた粒子は、公称径 100 μm の球状シリカ (デグサジャパン, Sipernart 22) である。通常、シリカ粒子は負帯電のため、以下の方法によりシリカ表面にアミノ基を導入することで正帯電のシリカ粒子も調製した。0.2 M の 3- アミノプロピルトリエトキシシラン ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$) のトルエン溶液 20 mL にシリカ粒子 1.0 g を添加し、80℃ で 3 時間加熱することでアミノ基導入シリカを調製した。以後、未修飾のシリカ粒子を NT シリカ、アミノ基を導入したシリカ粒子を AmP シリカと呼ぶ。

また、大腸菌の付着実験には、負に帯電したスライドガラス (松浪硝子, S1225) を用いた。なお、スライドガラスは超純水に浸漬して超音波洗浄 (15 min) 後、エタノールで洗浄し、乾燥させたものを用いた。

2. 2 表面性状

菌体とシリカ粒子の電気泳動移動度 EPM は電気泳動光散乱光度計 (大塚電子, ELS-800)、菌体の粒子径は動的光散乱式粒度分布計 (Particle Sizing System, ICOMP 380 ZLS) により測定した。EPM の測定結果に基づき、シリカ粒子のゼータ電位は Smoluchowski の式、菌体の表面電位は Eq. (1) で表される Ohshima ら^{8, 9)} が提案した“柔かい粒子モデル”の EPM 近似式、を用いてそれぞれ算出した。

$$u = \frac{\varepsilon \phi_0 / \kappa_m + \phi_{\text{DON}} / \lambda}{\eta (1 / \kappa_m + 1 / \lambda)} + \frac{ZeN}{\eta \lambda^2} \quad (1)$$

ここで、 u は菌体の EPM [$\text{m}^2 / (\text{V} \cdot \text{s})$]、 ε は分散媒の誘電率 [F / m]、 η は分散媒の粘度 [$\text{Pa} \cdot \text{s}$]、 ϕ_0 は表面電位 [V]、 ϕ_{DON} は Donnan 電位 [V]、 κ_m は表面電荷層内の Debye-Hückel パラメータ [m^{-1}]、 $1/\lambda$ は流れの侵入距離 [m]、 Z は表面電荷層内に存在する解離基の価数 [-]、 e は電気素量 [C]、 N は表面電荷層内に存在する解離基の密度 [$1/\text{m}^3$] である。

また、動的接触角測定装置 (First Ten Ångströms, FTA125) を用いて、菌体をフィルター上に集菌した菌体層と、シリカ粒子を圧密したタブレット上における極性の異なる 3 種類の溶媒 (純水、ホルムアミド、 α -プロモナフタレン) の接触角を測定した¹⁰⁾。

Van Oss ら¹¹⁾ は、表面張力を Lifshitz-van der Waals 非極性相互作用 (LW) と酸塩基極性相互作用 (AB) の成分に分ける方法を提案している。得られた接触角の実測値に基づき、Eq. (2) で表される Young-Dupré の式を用いて各種表面張力を見積もった^{12, 13)}。

$$\gamma_L (1 + \cos \theta) = 2 (\sqrt{\gamma_1^{\text{LW}} \gamma_2^{\text{LW}}} + \sqrt{\gamma_1^+ \gamma_2^-} + \sqrt{\gamma_1^- \gamma_2^+}) \quad (2)$$

また、Eqs. (3)~(5) で与えられる、液体 (L) 中に分散した微生物 (B) が固体 (S) 界面に付着するときの表面自由エネルギー変化 ΔG [J / m^2] を見積もり、界面に付着した微生物の熱力学的安定性を評価した。

$$\Delta G = \Delta G^{\text{LW}} + \Delta G^{\text{AB}} \quad (3)$$

$$\Delta G^{\text{LW}} = -2 (\sqrt{\gamma_B^{\text{LW}}} - \sqrt{\gamma_L^{\text{LW}}}) (\sqrt{\gamma_S^{\text{LW}}} - \sqrt{\gamma_L^{\text{LW}}}) \quad (4)$$

$$\begin{aligned} \Delta G^{\text{AB}} = & 2 (\sqrt{\gamma_B^+} - \sqrt{\gamma_S^+}) (\sqrt{\gamma_B^-} - \sqrt{\gamma_S^-}) \\ & - 2 (\sqrt{\gamma_B^-} - \sqrt{\gamma_L^-}) (\sqrt{\gamma_B^+} - \sqrt{\gamma_L^+}) \\ & - 2 (\sqrt{\gamma_S^+} - \sqrt{\gamma_L^+}) (\sqrt{\gamma_S^-} - \sqrt{\gamma_L^-}) \end{aligned} \quad (5)$$

ここで、 θ は接触角 [degree]、 γ は表面張力 [J / m^2]、上添字+と-はそれぞれ酸塩基相互作用の電子受容成分および電子供与成分である。

菌体のモルフォロジーは、原子間力顕微鏡 AFM (アサイラム, MFP-3D) を用いて観察した。

2. 3 付着実験

イオン強度が 5~40 mM になるように調製した NaCl 水溶液に、乳酸菌を加えて初期吸光度 A_0 が約 0.2 になるように分散した懸濁液 5.0 mL とシリカ粒子 10 mg を試

Fig. 1 Atomic force microscope (AFM) images of microbial topography
(a) *L. lactis* (b) *E. coli*

験管に加えて 120 rpm で撹拌した。1 時間後、試験管を 3 分間静置してシリカ粒子を沈降させてから懸濁液の吸光度 A_t を測定した。乳酸菌のシリカ粒子への付着率 F [%] は $F = (1 - A_t/A_0) \times 100$ として評価した。

また、イオン強度が 10~150 mM になるように調製した NaCl 水溶液に、大腸菌を加えて初期吸光度 A_0 が約 0.3 になるように分散した懸濁液 70 μ L をスライドガラス上に滴下し、カバーガラス (24 mm $\times$ 32 mm) を乗せて厚さ約 90 μ m の液膜を形成した。4 分間静置後、生物顕微鏡 (オリンパス, BH-2) を用いて、スライドガラスに付着している菌体数を計測した。なお、大腸菌は鞭毛が存在するため、ガラス表面に付着して動かない菌体と鞭毛により付着して微動している菌体を区別しながら計数を行った。

2. 4 有意差検定

得られた実測値は、洗浄菌体に対する未洗浄菌体の

データ差異が有意であるかどうかについて、平均もしくは代表値の差を検定することで評価した。母平均の差は t 検定、代表値の差はカイ二乗検定で判定した。有意水準は 5 % (*) または 1 % (**) とした。

3. 実験結果および考察

3. 1 表面性状

実験に用いた乳酸菌と大腸菌の AFM 像を Fig. 1 に示す。これより、乳酸菌は球菌で細胞表面に線状構造物は観察されなかった。一方、大腸菌は複数の鞭毛を持つ桿菌で多数の線毛も存在することが確認された。また、洗浄菌体の中位径は、乳酸菌が 0.95 μ m⁷⁾、大腸菌が 0.63 μ m であった。

分散媒のイオン強度を変えたときの洗浄と未洗浄の乳酸菌⁷⁾ と大腸菌の EPM の測定結果を Fig. 2 (a)、それらの測定結果を Eq. (1) の Ohshima の式でフィッティ

Fig. 2 Electrical surface properties of microbes and substrates in NaCl aqueous solutions as a function of ionic strength
(a) Electrophoretic mobility (b) Surface potential
(*) $P < 0.05$ and (**) $P < 0.01$ versus washed cells, mean $\pm$ SEM, $N \geq 3$.

Table 1 Softness parameter $1/\lambda$ and spatial charge density ZN

Microbe	$1/\lambda$ [nm]	ZN [M]
<i>L. lactis</i> (Washed)	0.84	-0.091
<i>L. lactis</i> (Intact)	0.86	-0.074
<i>E. coli</i> (Washed)	0.72	-0.116
<i>E. coli</i> (Intact)	0.80	-0.111

ングして推算した表面電位、シリカ粒子の EPM の測定結果から Smoluchowski の式を用いて求めたゼータ電位、およびスライドガラスの表面電位¹⁴⁾を Fig. 2 (b) に示す。なお、EPM のフィッティングに用いたパラメータとして、流れの侵入距離 $1/\lambda$ と固定電荷密度 ZN を **Table 1** に示した。分散媒のイオン強度が増加すると、菌体、シリカ粒子、スライドガラスともに、電位の絶対値は減少した。また、電気泳動移動度は、大腸菌では洗浄菌体と未洗浄菌体で有意差が見られなかったが、乳酸菌では EPS を除去すると EPM が減少することが分かった。大腸菌と比較して乳酸菌は EPS の代謝量が多いため、表面電荷に影響を及ぼしたものと推察される。しかし、推算した乳酸菌と大腸菌の表面電位は、洗浄菌体と未洗浄

菌体で有意差がないことも分かった。未修飾の NT シリカは負帯電、アミノ基を導入した AmP シリカは正帯電であることが確認された。

乳酸菌⁷⁾、大腸菌、NT シリカ、AmP シリカ、およびスライドガラス¹⁴⁾の接触角と、それらの測定結果から求めた表面張力を **Table 2** に示す。いずれの物質も水に対する接触角は 25° 以下で、表面エネルギーは 40 mJ/m^2 以上の親水性表面を有していた。また、それらの結果に基づき、菌体が固体表面に付着したときの表面自由エネルギー変化 ΔG の計算結果を **Table 3** に示す。本研究で行った付着実験の組み合わせでは、いずれの場合においても ΔG は正となった。これより、熱力学的には、乳酸菌はシリカ粒子、大腸菌はガラス表面に安定的に付着しないことが示唆された。

3. 2 乳酸菌の付着現象

分散媒のイオン強度を変えたときのシリカ粒子表面への乳酸菌の付着率を **Fig. 3** に示す。これより、菌体付着率は、洗浄、未洗浄に関わらず NT シリカよりも AmP シリカの方が明らかに高いこと、イオン強度が増加すると NT シリカでは増加し、AmP シリカでは減少するこ

Table 2 Contact angles and surface tensions of microbes and substrates

Materials	Contact angle [degree]			Surface tension [mJ/m ²]				
	θ^{Wa}	θ^{Fo}	θ^{Br}	γ^{Total}	γ^{LW}	γ^{AB}	γ^+	γ^-
Probe liquid								
Water (Wa)				72.8	21.8	51.0	25.5	25.5
Formamide (Fo)				58.0	39.0	19.0	2.28	39.6
α -Bromonaphthalene (Br)				44.4	44.4	0	0	0
Microbe								
<i>L. lactis</i> (Washed)	17 $\pm$ 1	37 $\pm$ 1	31 $\pm$ 1	41	38	2.7	0.03	67
<i>L. lactis</i> (Intact)	13 $\pm$ 1	22 $\pm$ 1	33 $\pm$ 1	52	38	15	0.96	58
<i>E. coli</i> (Washed)	22 $\pm$ 2	34 $\pm$ 1	37 $\pm$ 1	46	36	9.5	0.38	60
<i>E. coli</i> (Intact)	22 $\pm$ 1	30 $\pm$ 1	36 $\pm$ 1	49	36	12	0.65	56
Substrate								
NT silica	12 $\pm$ 1	16 $\pm$ 1	21 $\pm$ 1	54	42	13	0.71	55
AmP silica	20 $\pm$ 2	31 $\pm$ 3	24 $\pm$ 1	47	41	5.7	0.14	59
Glass slide	17 $\pm$ 1	31 $\pm$ 1	21 $\pm$ 1	46	42	4.1	0.07	62

$\pm$ signs indicate standard error of the mean over seven measurements

Table 3 Interfacial energy and Hamaker constant between microbial cell and substrate

Substrate	Microbe	Interfacial energy [mJ/m ²]			Hamaker constant A [J]
		ΔG^{LW}	ΔG^{AB}	ΔG	
NT silica	<i>L. lactis</i> (Washed)	-5.5	50	44	5.1×10^{-21}
	<i>L. lactis</i> (Intact)	-5.2	41	36	4.8×10^{-21}
AmP silica	<i>L. lactis</i> (Washed)	-5.3	55	50	4.9×10^{-21}
	<i>L. lactis</i> (Intact)	-5.0	45	40	4.7×10^{-21}
Glass slide	<i>E. coli</i> (Washed)	-4.7	51	46	4.4×10^{-21}
	<i>E. coli</i> (Intact)	-4.9	47	42	4.6×10^{-21}

Fig. 3 Adhesion ratio of *L. lactis* to silica particles as a function of ionic strength
open symbol : washed cell, closed symbol : intact cell, circle : NT silica, square : AmP silica
(*) $P < 0.05$ and (**) $P < 0.01$ versus washed cells, mean $\pm$ SEM, $N \geq 3$.

とが分かった。また、洗浄菌体と未洗浄菌体の各粒子への付着率を比較すると、シリカ粒子では洗浄菌体よりも未洗浄菌体の方が高いが、AmP シリカでは洗浄菌体と未洗浄菌体の間に有意差がないことも分かった。これらの結果について、以下に DLVO 理論を用いて考察を行った。

乳酸菌とシリカ粒子の表面物性の実測値に基づき、DLVO 理論を用いて洗浄菌体と NT シリカ、AmP シリカ間の全相互作用エネルギーを各イオン強度に対して計算した結果を **Fig. 4** に示す。なお、洗浄菌体と未洗浄菌体では、ポテンシャル曲線にほとんど違いは見られなかつ

Fig. 4 Potential curves between washed *L. lactis* and silica particle calculated using DLVO theory

たため、洗浄菌体の計算結果のみを示した。DLVO 理論の計算に用いた van der Waals ポテンシャル V_{vdW} [J] と静電気ポテンシャル V_{EL} [J] は、球-平板モデルの近似式を用いた¹⁵⁾。

$$V_{vdW} = -\frac{Aa}{6d} \quad (A = -12\pi d_0^2 \Delta G^{LW}) \quad (6)$$

$$V_{EL} = \pi \epsilon a \left[2\varphi_1 \varphi_2 \ln \frac{1 + \exp(-\kappa d)}{1 - \exp(-\kappa d)} + (\varphi_1^2 + \varphi_2^2) \ln \{1 - \exp(-2\kappa d)\} \right] \quad (7)$$

ここで、 A は Hamaker 定数 [J] (Table 3), a は菌体半径 [m], d は菌体-粒子表面間の距離 [m], φ_1 , φ_2 はそれぞれ菌体と粒子と電位 [V], $1/\kappa$ は電気二重層厚さ [m], d_0 ($=1.57 \times 10^{-10}$ m^{15, 16)}) は表面間の最小接触距離である。

乳酸菌-NT シリカ間では、分散媒のイオン強度が増加すると、ポテンシャル障壁は減少し、40 mM でほぼ消失することが分かった。洗浄菌体の付着率は、イオン強度の増加とともにわずかに増加したが、ポテンシャル障壁が消失した 40 mM においても、菌体付着率は大幅に増加しなかった。これは、ポテンシャル障壁が消失することで、菌体は粒子表面に接近することができるが、振とう場では菌体に外力が作用する上に ΔG が正のため、安定に付着できなかつたと推察される。一方、未洗浄菌体の付着率が大幅に増加したのは、EPS の曲率は菌体自身と比べて明らかに小さいため、EPS-固体間にはポテンシャル障壁が存在しないことが理由として考えられる。さらに、熱力学的には安定に付着できない上に外力が作用しているにも関わらず、未洗浄菌体の付着率がかなり高いことから、菌体は EPS によりシリカ表面に不可逆的に付着したものと推察される。

乳酸菌-AmP シリカ間では、静電引力が働くため、イオン強度によらずポテンシャル障壁は存在しないことが分かった。洗浄菌体の付着率がイオン強度の増加とともに減少したのは、菌体とシリカ粒子の電位の絶対値が減少して菌体-粒子間に働く静電相互作用の影響が減少したためである。加えて、 ΔG が正のため熱力学的に安定に付着できない上に外力が作用しているにも関わらず、付着率が NT シリカと比べて明らかに高いことから、界面近傍の水和斥力よりも、菌体-AmP シリカ間の静電引力の影響の方が支配的であるためと推察される。

3. 3 大腸菌の付着現象

分散媒のイオン強度を変えたときの、スライドガラス表面への単位面積あたりの大腸菌の付着菌体数と、付着

Fig. 5 Adhesion behavior of *E. coli* to slide glass as a function of ionic strength
open symbol : washed cell, closed symbol : intact cell, circle : number of adhered cell, triangle : flagellar adhesion
(*) $P < 0.05$ and (**) $P < 0.01$ versus washed cells, mean $\pm$ SEM, $N \geq 9$.

菌体のうち鞭毛のみで付着している菌体の割合を **Fig. 5**, 大腸菌とスライドガラスの表面物性の実測値に基づき, DLVO 理論を用いて計算した大腸菌-ガラス間のポテンシャル曲線を **Fig. 6** に示す。図中には, ポテンシャル障壁と分散媒のイオン強度の関係も示した。なお, 洗浄菌体と未洗浄菌体では, ポテンシャル曲線にほとんど違いは見られなかったため, 洗浄菌体の計算結果のみを示した。Fig. 5 より, イオン強度が増加すると, ガラス表面に付着する菌体数は増加することが分かった。これは, Fig. 6 に示したように, イオン強度が増加するとポテンシャル障壁が減少するためと考えられる。しかし, 40 mM 以下の低イオン強度条件では, 菌体-ガラス間には高いポテンシャル障壁が存在するため, DLVO 理論に基づく菌体の付着は困難と考えられるにも関わらず, 菌体はガラス表面に多数付着しており, その一部は鞭毛により付着して微動していることが分かった。Fig. 1 (b) より, 鞭毛は菌体-ガラス間に働く相互作用距離や EPS, 線毛の長さとは比べて十分長く¹⁷⁾, また EPS と同様に先端の曲率も小さいため, 鞭毛運動によりガラス表面に接近した菌体が鞭毛により付着したものと考えられる。加えて, 鞭毛により付着して微動している菌体は, 再び脱離して別の場所へ移動して再付着する現象も観察されたことから, 菌体自体はポテンシャル障壁を越えずに可逆的に付着していると考えられる。一方, ガラス表面に付着して動かない菌体の脱離はほとんど観察されな

Fig. 6 Potential curves between washed *E. coli* and slide glass calculated using DLVO theory
Inset : Potential barrier as a function of ionic strength

かったことに加えて, 洗浄菌体と未洗浄菌体の付着菌体数に大きな違いは見られなかったことから, ガラス表面に付着して動かない菌体は EPS よりも長い線毛により不可逆的に付着していると推察される。さらに, 高イオン強度条件では, 鞭毛だけで付着している菌体は 5 % 以下となった。これは, イオン強度が高くなると, 菌体-ガラス間のポテンシャル障壁が消滅するためと考えられる。なお, ΔG が正のため熱力学的に安定に付着できないと推測されるにも関わらず, 菌体が固体界面に付着しているのは, 静止場に近い環境のため, 付着力を上回る外力が菌体に作用していないことも影響していると推察される。

4. 結 言

非運動性の乳酸菌, 運動性の大腸菌をモデル微生物として, 細胞外に存在する EPS や線状構造物 (鞭毛や線毛) が菌体の固体界面への初期付着現象に及ぼす影響について, DLVO 理論と熱力学に基づいてコロイド科学的見地から検討を行った結果, 以下の結論を得た。

表面性状の実測値を用いて, 菌体と固体表面間の相互作用を DLVO 理論により計算したところ, 低イオン強度では高いポテンシャル障壁が存在することが分かった。DLVO 理論に基づく, 菌体の付着が困難と予測される領域においても, EPS や線状構造物が存在すると, 菌体は固体界面に付着することが分かった。これは, EPS や線状構造物の曲率は菌体自身と比較して明らかに小さいため, 固体表面との間にはポテンシャル障壁が

存在しないためである。非運動性の乳酸菌では、EPS が存在すると菌体の界面への付着は促進されるが、運動性の大腸菌では、EPS よりも長い線状構造物（鞭毛や

線毛）が存在するため、EPS の有無の影響は減少することが分かった。

References

- 1) Liu, N. T., X. Nou, A. M. Lefcourt, D. R. Shelton and Y. M. Lo : "Dual-species biofilm formation by *Escherichia coli* O157 : H7 and environmental bacteria isolated from fresh-cut processing facilities", *Int. J. Food Microbiol.*, **171**, 15-20 (2014)
- 2) Cappitelli, F., A. Polo and F. Villa : "Biofilm Formation in Food Processing Environments is Still Poorly Understood and Controlled", *Food Eng. Rev.*, **6**, 29-42 (2014)
- 3) Chen, X., H. Wu, Y. Cao, X. Yao, L. Zhao, T. Wang, Y. Yang, D. Lv, Y. Chai, Y. Cao and Z. Zhu : "Ion-pairing chromatography on a porous graphitic carbon column coupled with time-of-flight mass spectrometry for targeted and untargeted profiling of amino acid biomarkers involved in *Candida albicans* biofilm formation", *Mol. Biosyst.*, **10**, 74-85 (2014)
- 4) Netea, M. G., G. D. Brown, B. J. Kullberg and N. A. Gow : "An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system", *Nat. Rev. Microbiol.*, **6**, 67-78 (2008)
- 5) Wu, B., C. Feng, L. Huang, Z. Lv, D. Xie and C. Wei : "Anode-biofilm electron transfer behavior and wastewater treatment under different operational modes of bioelectrochemical system", *Bioresour. Technol.*, **157**, 305-309 (2014)
- 6) Feroso, F. G., J. Bartacek, S. Jansen and P. N. L. Lens : "Metal supplementation to UASB bioreactors : from cell-metal interactions to full-scale application", *Sci. Total Environ.*, **407**, 3652-3667 (2009)
- 7) Nomura, T., H. Narahara, H. Tokumoto and Y. Konishi : "The role of microbial surface properties and extracellular polymer in *Lactococcus Lactis* aggregation", *Adv. Powder Technol.*, **20**, 537-541 (2009)
- 8) Ohshima, H. : "Electrophoretic mobility of soft particles", *J. Colloid Interface Sci.*, **163**, 474-483 (1994)
- 9) Ohshima, H. : "Electrophoresis of soft particles", *Adv. Colloid Interface Sci.*, **62**, 189-235 (1995)
- 10) Busscher, H. J., A. H. Weerkamp, H. C. van der Mei, A. W. van Pelt, H. P. de Jong and J. Arends : "Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion", *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 980-983 (1984)
- 11) van Oss, C. J., R. J. Good and M. K. Chaudhury : "The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in "hydrophobic interactions" between biopolymers and low energy surfaces", *J. Colloid Interface Sci.*, **111**, 378-390 (1986)
- 12) van der Mei H. C., A. H. Weerkamp and H. J. Busscher : "A comparison of various methods to determine hydrophobic properties of streptococcal cell surfaces", *J. Microbiological Methods*, **6**, 277-287 (1987)
- 13) van der Mei H. C., R. Bos and H. J. Busscher : "A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles", *Colloids and Surf. B: Biointerfaces*, **11**, 213-221 (1998)
- 14) Yoshihara, A., H. Narahara, Y. Kuriyama, S. Toyoda, H. Tokumoto, Y. Konishi and T. Nomura : "Measurement of Microbial Adhesive Forces with a Parallel Plate Flow Chamber", *J. Colloid Interface Sci.*, **432**, 77-85 (2014)
- 15) Bos, R., H. C. van der Mei and H. J. Busscher : "Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study", *FEMS Microbiol. Rev.*, **23**, 179-230 (1999)
- 16) van Oss, C. J. and R. J. Good : "The "equilibrium distance" between two bodies immersed in a liquid", *Colloids. Surf.*, **8**, 373-381 (1984)
- 17) Dorobantu, L. S. and M. R. Gray : "Application of Atomic Force Microscopy in Bacterial Research", *Scanning*, **32**, 74-96 (2010)