酢酸資化性メタン生成菌の担体への選択的固定化

Selective Immobilization of Aceticlastic Methanogens to Support Material

野村 俊之, 長尾 孝徳, 吉原 章仙, 徳本 勇人, 小西 康裕

Toshiyuki Nomura, Takanori Nagao, Akinori Yoshihara, Hayato Tokumoto, Yasuhiro Konishi

Received 22 March 2006 ; Accepted 19 May 2006

The effect of electrostatic and hydrophobic properties of microorganisms in anaerobic sludge on the immobilization onto support materials was experimentally studied. As a result, *Methanosaeta concilii* which is the most popular aceticlastic methanogen was electrically neutral and hydrophobic. *Methanosarcina barkeri* of a methyltrophic methanogen and acidogens cultivated selectively from the anaerobic sludge were negatively charged and hydrophobic. In addition, the immobilized microorganisms on support materials were incubated with sodium acetate. It was found that the methanogens were significantly immobilized onto bamboo charcoal in contrast to hydrophilic alumina. It was also shown that *Methanosaeta*-like microorganism is immobilized to bamboo charcoal. These experimental results suggest that the hydrophobic and negatively charged support material is suitable for the selective immobilization of *Methanosaeta* sp., which is the most important microorganism in the methane fermentation, by suppressing the immobilization of the microorganisms other than *Methanosaeta* sp.

Keywords : Biocolloid, Immobilization, Methanogen, Electrophoretic mobility, Hydrophobicity

1. 緒 言

「循環型社会形成推進基本法」をはじめとする各種リサイクル法の整備により、循環型社会の構築をめざす取り組みが各方面において急速に進められている。そのような状況の中で、高含水率で腐敗しやすく、直接燃焼によってエネルギーを回収できない有機性廃棄物に有効なバイオエネルギー抽出技術として、メタン発酵技術が再注目されている。しかし、従来のメタン発酵プロセスは、メタン生成菌の増殖速度が非常に遅い上、発酵槽内のメタン生成菌が流出するなどの理由により発酵効率が低く、未消化の残渣処理も必要のため、まだまだ多くの課題を抱えているのが現状である。それらの問題を解決し、高効率メタン発酵プロセスを実現するには、発酵槽内のメタン生成菌を高濃度に保持することが必要不可欠である。

発酵槽内のメタン生成菌を高濃度に保持する方法として、担体に菌体を固定化する方法が検討されている。ガラス、スラグ、樹脂、発泡石、ゼオライトなど様々な担体を用いた菌体の固定化について実験的に検討が行われ、菌体が付着しやすい表面形状をした担体、疎水性表面を有する担体が適していることなどが報告されている。しかし、中には親水性表面に付着しやすいといった逆の報告もなされており、菌体の固定化メカニズムはまだ十分に理解されていないのが現状である¹⁾。これは、対象とする処理廃水の種類が異なることや、同種の廃水であっても季節などによってその組成が異なってしまうことなどによってメタン発酵に関わる微生物群が変化してしまうので、担体に固定化される菌種が異なることが大きな理由として挙げられる。言い換えれば、菌体を固定化するための担体の表面性状や素材を実験的に検討した研究は多いが、メタン発酵菌群を構成する各種微生物の表面性状に着目した研究が少ないことが原因として考えられる。

そこで本研究では、菌体を生物微粒子と見なした微粒子工学的アプローチにより、発酵槽内のメタン生成菌を高濃度に保持する方法について検討する。菌体が

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 大阪府堺市学園町1-1) TEL 072-254-9300
Department of Chemical Engineering, Osaka Prefecture University
(1-1 Gakuen-cho, Sakai, Osaka 599-8531, Japan)

Fig. 1 Schematic drawing of methane fermentation process

固体界面に付着する場合、主に固体表面と菌体との間に働く電気的、疎水的、特異的相互作用が関与すると考えられる。本研究では、液相中の菌体が固体表面に固定化されるメカニズムを解明するための第一段階として、電気的、疎水的相互作用に着目し、実際のメタン発酵槽から採取したメタン発酵菌群を用いて、メタン発酵プロセスで律速段階と言われている酢酸資化性メタン生成菌を選択的に固定化する方法について検討を行った。

2. メタン発酵プロセス

本研究で対象とするメタン発酵プロセスは、多種類の菌体が高密度に存在する人工生態系の一つで、それらの菌体が複雑な分解過程を経て、有機性廃棄物からメタンを生成している²⁾。Fig. 1に、メタン発酵プロセスの概略を示す。有機物が嫌氣的に分解されてバイオガスになるメタン発酵プロセスは、液化段階とメタン発酵段階に分類される³⁾。液化段階では、多種類の通性嫌気性菌により高分子有機物が分解されて固体から水溶性物質に変換される。まず、複雑な有機化合物は加水分解により単純な有機化合物に分解される。分解された有機物は、酸発酵によりモノカルボン酸やアルコールなどへ変換される。メタン発酵段階では、生成されたモノカルボン酸やアルコールが水素生成菌や酢酸生成菌により酢酸と水素に変換され、最終的に偏性嫌気性菌であるメタン生成菌の働きによってメタンと二酸化炭素へと変換される。

メタン発酵により発生するメタンの約70%は、液化段階で生成した酢酸由来⁴⁾であるにも関わらず、多くの発酵性微生物にとって酢酸は主要生成物であって、酢酸を資化することができる菌種は少ない。メタ

ン生成菌の中でも酢酸をエネルギー源として利用できる酢酸資化性メタン生成菌は、*Methanosarcina* 属と *Methanosaeta* 属のわずか2属が報告されているに過ぎない⁵⁾。これらのメタン生成菌は増殖速度が極めて遅く、酢酸をメタンに変換する速度も遅いため、メタン発酵プロセスではこの酢酸からメタンへの変換過程が律速段階と言われている¹⁾。したがって、高効率メタン発酵プロセスを実現するには、この酢酸資化性メタン生成菌を発酵槽内において高濃度に保持することが必要不可欠である。

3. 実験試料及び方法

3.1 菌体及び固体化担体

本研究では、メタン発酵菌群に多種類存在する嫌気性菌から代表的な5種類の菌体を選定した。有機性廃棄物は、多糖、タンパク質、脂質などの高分子物質から構成されるので、これら3種類の高分子物質を低分子化する酸生成菌をそれぞれ選択培養した。また、酢酸資化性メタン生成菌はメタン発酵菌群からの選択培養が難しいので、*Methanosarcina barkeri* (JCM 10043株)と *Methanosaeta concilii* (DSM 3671株)を純粋培養した。前者はM. P. Bryantら⁶⁾により、後者はG. B. Patel⁷⁾により、共に消化発酵槽から単離された酢酸資化性メタン生成菌である。メタン発酵菌群は、京都府八木町にあるバイオエコロジーセンターの消化発酵槽より採取した消化発酵液を用いた。

3種類の酸生成菌は、それぞれ異なる基質を加えたPGY培地(ペプトン2g/l、酵母エキス1g/l、グルコース0.5g/l)にメタン発酵菌群を植菌し、37℃、pH7.0で選択培養した。基質をスキムミルク(10g/l)で選択培養した菌体はタンパク質分解菌群、可溶性でんぷん(2g/l)で培養した菌体は炭水化物分解菌群、トリブチリン(5g/l)で培養した菌体は脂質分解菌群である。*M. barkeri* および *M. concilii* は、ドイツの微生物保存機関DSMZが推奨する培養方法により純粋培養した⁸⁾。培養温度は共に37℃、pHは前者が6.8、後者が7.0である。また、一般的な微生物の代表として大腸菌 *Escherichia coli* (JM 109株)も純粋培養した。

前培養した菌液は、吸引濾過(東洋濾紙No. 2)により、不純物を除去した後、遠心分離(10,000rpm, 10min)により集菌した。集菌した菌体は0.9%の生理食塩水で3回洗浄し、菌体に付着した細胞外ポリマーを取り除いたものを実験試料として用いた。以後、この菌体を洗浄菌体と呼ぶ。

Fig. 2 Immobilization of microorganisms existed in anaerobic sludge and methane fermentation using immobilized microorganisms on support material

菌体の固定化用担体には、竹炭（負帯電，疎水性）とアルミナ（正帯電，親水性）の2種類を用いた。それらの粒子径はふるいにより4.8~5.6mmとした。

3. 2 メタン発酵実験

内容積21mlのバイアル瓶（Perkin Elmer製，20-CV）にメタン発酵菌群4mlと基質溶液1mlを入れ，ブチルゴム栓とアルミキャップでシールした後，ガス置換装置（三紳工業社製，IP-8）を用いてヘッドスペースのガスをN₂（80%）-CO₂（20%）混合ガスで1.2気圧に置換した。嫌気状態としたバイアル瓶は37℃のインキュベータで培養を行った。用いた基質は酢酸ナトリウムもしくはメタノール，初期基質濃度は20mol/m³とした。メタンガスの発生量はガスクロマトグラフィー（島津製作所製，GC-8APT）により定量した。また，基質溶液の代わりに水のみを加えた実験を行い，メタン発酵菌群に残存した有機物からのメタン発生量を差し引いた。実験は以下のものも含め全ての条件について3回以上行った。

3. 3 電気泳動移動度測定

洗浄菌体をリン酸緩衝液（pH7.0，イオン強度100mol/m³）に分散した懸濁液を調製し，電気泳動光散乱光度計（大塚電子社製，ELS-800）を用いて，レーザードップラー法により菌体の電気泳動移動度を測定した。

3. 4 疎水性評価

菌体および担体の疎水性はMATH（Microbial adhesion to hydrocarbon）法^{9）}により評価した。まず，洗浄菌体をPUM緩衝液（pH7.1，K₂HPO₄・3H₂O 22.2g/l，KH₂PO₄ 7.26g/l，尿素 1.8g/l，MgSO₄・7H₂O 0.2g/l）に分散させた懸濁液の吸光度A₀（-）が0.3程度になるように調製した。次に，菌体懸濁液2.4mlとn-ヘキサデカン0.4mlを試験管に入れ，

ボルテックスによりn-ヘキサデカンが乳化する程度の強さで2分間攪拌した。15分間静置することにより油水分離してから水相側の吸光度A_t（-）を測定した。また，担体については乳鉢で粉砕したものを用いて同様の実験を行った。吸光度は，紫外可視分光光度計（島津製作所製，UVmini-1240）により波長400nmで測定した。攪拌前後の吸光度の測定結果から，菌体および担体の疎水性は，次式で示した有機溶媒への付着率F（%）として評価した。

$$F = (1 - A_t / A_0) \times 100 \quad (1)$$

3. 5 菌体の固定化実験

Fig. 2に，メタン発酵菌群に存在する嫌気性菌の担体への固定化実験の概略図を示す。メタン発酵実験と同様のバイアル瓶にメタン発酵菌群を5%植菌したDSM120液体培地⁸⁾4mlと固定化担体1gを入れ，ブチルゴム栓とアルミキャップでシールした後，ヘッドスペースのガスをN₂（80%）-CO₂（20%）混合ガスで1.2気圧に置換した。用いた基質は酢酸ナトリウムで，初期基質濃度は20mol/m³とした。嫌気状態としたバイアル瓶は37℃のインキュベータで培養と菌体の固定化を同時に行った。培養を始めてから20日間経過後，メタンガスの発生が収束した培養液から担体を取り出し，担体に付着した不純物を取り除くため0.9%の生理食塩水で洗浄した。洗浄した菌体固定化担体は，基質として酢酸ナトリウムの初期濃度が20mol/m³となるように調製したDSM120液体培地4mlの入ったバイアル瓶に投入し，N₂（80%）-CO₂（20%）混合ガスで1.2気圧に置換して嫌気状態とした後，37℃のインキュベータで培養を行った。メタンガスの発生量はガスクロマトグラフィーにより定量した。

Fig. 3 Methane production using different substrate with incubation time

3. 6 菌体の直接観察

担体に固定化された菌体は、走査型電子顕微鏡 SEM（日本電子社製、JSM-6700F）を用いて直接観察した。所望のサンプルはグルタルアルデヒドで固定化した後、上昇アセトン系列で脱水し、*t*-ブチルアルコールで置換してから凍結真空乾燥装置（日立製作所製、ES-2020）を用いて凍結乾燥したものを SEM 観察試料とした。

4. 実験結果及び考察

4. 1 メタン発酵実験

Fig. 3 に、メタン発酵菌群を用いて異なる基質でメタン発酵したときのメタンガス発生量の経時変化を示す。基質を酢酸ナトリウムとした場合、初日からメタンガスの発生が観察された。一方、メタノールを基質とした場合には 2 日間程度の誘導期の後、メタンガスの発生が観察された。メタン生成菌の中で、酢酸をエネルギー源として利用できるものは *Methanosarcina* 属と *Methanosaeta* 属のわずか 2 属に過ぎない。これらは、酢酸資化能力がある点では共通しているが、*Methanosarcina* 属はメタノールをはじめとするメチル化合物や水素を資化でき、基質利用性が広いメタン生成菌であるのに対して、*Methanosaeta* 属は酢酸しか資化できず、基質利用性が狭い⁵⁾。また、*Methanosarcina* 属は、同時に複数の利用可能な基質が存在する場合、酢酸代謝は抑制され、メタノールのような利用しやすい基質を優先的に資化する¹⁰⁾。これらのことより、今回用いたメタン発酵菌群には、*Methanosarcina* 属と *Methanosaeta* 属が共に存在するが、*Methanosaeta* 属が優占種であることが分かった。メタン発酵菌群を用い

Fig. 4 Methane conversion ratio using different substrate with incubation time

てメタン発酵したときのメタンガス発生量を、基質からメタンガスへの転化率（炭素基準）としたものを Fig. 4 に示す。最終的なメタン転化率は、酢酸ナトリウムの場合で 55 %、メタノールの場合で 75 % であった。各基質からのメタン生成反応式とそれらの標準自由エネルギー変化量 $\Delta G^{\circ'}$ は次の通りである¹¹⁾。

これらの化学量論式より、炭素基準のメタンの理論転化率は、酢酸の場合で 50 %、メタノールの場合で 75 % であることから、加えた基質はすべてメタン発酵菌群により資化されていることも分かった。

4. 2 電気的相互作用

Table 1 に、菌体の電気泳動移動度の測定結果を示す。測定は pH7.0、イオン強度 100 mol/m^3 のリン酸緩衝液で行った。参考までに Smoluchowski 式より求めたゼータ電位も示す。ただし、菌体の表層には、高分子鎖が海藻のように生えていて、この中における溶液の流れを無視できないため、Smoluchowski 式より求めたゼータ電位はあくまで目安である^{12~14)}。メタン発酵菌群から選択培養した 3 種類の酸生成菌（タンパク質分解菌群、炭水化物分解菌群、脂肪分解菌群）は、すべて負に帯電した微生物コロイドであることが分かった。また、*M. barkeri* も同様に負帯電性コロイドであることが分かった。大腸菌 *E. coli* に代表されるように、一般的に微生物は負帯電性コロイドである。酸生成菌および *M. barkeri* は一般的な微生物

Table 1 Electrophoretic mobilities of microorganisms measured by Laser Doppler method

	Sample	Electrophoretic mobility ($\times 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V/s}$)	Zeta-potential (mV)
Methanogen	<i>Methanosaeta concilii</i>	0.09	1.2
	<i>Methanosarcina barkeri</i>	-1.60	-20.7
	<i>Proteolytic bacteria</i>	-2.19	-28.3
Acidogen	<i>Amylolytic bacteria</i>	-1.35	-17.5
	<i>Llipolytic bacteria</i>	-1.32	-17.2
Control	<i>Escherichia coli</i>	-1.45	-18.8
Support material	Bamboo charcoal	Negatively-charged	
	Alumina	Positively-charged	

Table 2 Hydrophobicities of microorganisms and support materials measured by MATH method

	Sample	MATH F (%)
Methanogen	<i>Methanosaeta concilii</i>	66.7
	<i>Methanosarcina barkeri</i>	56.0
	<i>Proteolytic bacteria</i>	49.7
Acidogen	<i>Amylolytic bacteria</i>	73.7
	<i>Llipolytic bacteria</i>	67.1
Control	<i>Escherichia coli</i>	6.4
Support material	Bamboo charcoal	86.6
	Alumina	7.3

と同様の傾向であった。それに対して、*M. concilii*の電気泳動移動度は非常に小さく、ほぼ無帯電であることが分かった。これは、一般的な微生物コロイドとは大きく異なる特徴的な結果である。現在のところ、至適 pH 付近において無帯電と報告された微生物は数種類に過ぎない¹⁵⁾。

以上の測定結果より、酸生成菌および *M. barkeri* は、菌体-担体間の静電相互作用によりアルミナに附着しやすいが、竹炭には附着しにくいと予測される。一方、*M. concilii* はほぼ無帯電のため、菌体-担体間に静電斥力はほとんど作用せず、ファンデルワールス引力により竹炭にもアルミナにも附着しやすいと予測される。

4. 3 疎水性相互作用

Table 2 に、MATH 法により測定した菌体および担体の有機溶媒への附着率を示す。親水性菌体の代表である大腸菌の有機溶媒への附着率が 6.4 % であるのに対して、*M. concilii*、*M. barkeri* および 3 種類の酸生成菌（タンパク質分解菌群、炭水化物分解菌群、脂肪分

Fig. 5 Methane production using immobilized microorganisms with incubation time

解菌群)の附着率はほぼ 50 % 以上であることから、メタン発酵菌群に存在する嫌気性菌は疎水性であることが分かった。また、固定化担体は、竹炭の附着率が 86.6 % であることから疎水性、アルミナが 7.3 % であることから親水性であることも確認した。

以上の測定結果より、酸生成菌とメタン生成菌は、疎水性相互作用により竹炭に附着しやすく、アルミナには附着しにくいと予測される。先の電気泳動移動度の測定結果も考慮すると、メタン発酵プロセスで律速段階と言われている酢酸資化性メタン生成菌の内、*Methanosaeta* 属は、竹炭に選択的に固定化されやすいと予測される。

4. 4 菌体の担体への固定化

Fig. 5 に、菌体を固定化した担体を用いてメタン発酵したときのメタン発生量の経時変化を示す。固定化担体として竹炭を用いた時、メタンの発生が観察された。一方、アルミナを用いた時、メタンはほとんど発

Fig. 6 SEM images of microorganisms and immobilized microorganisms on support material

生しなかった。これは、竹炭には酢酸資化性メタン生成菌が付着しているが、アルミナにはほとんど付着していないことを意味しており、菌体の電気泳動移動度と疎水性の測定結果から予測される傾向とよく一致していた。さらに、担体に固定化された菌体および培養液のSEM写真をFig. 6に示す。培養液 (Fig. 6 (a)) には桿菌状の菌体が多数存在しているのに対して、竹炭表面 (Fig. 6 (b)) には鞘状の *Methanosaeta* 属が多く付着していることが分かった。また、アルミナ表面 (Fig. 6 (c)) には菌体がほとんど付着していなかった。これらのSEM写真より、竹炭に固定化された菌群に *Methanosaeta* 属が占める割合は培養液よりも明らかに高いことから、*Methanosaeta* 属は竹炭に選択的に固定化されやすいことが分かった。

Busscher ら¹⁶⁾ は、固体の表面張力が大きくなると、すなわち、固体表面が親水性になると微生物はエネルギー的に吸着しにくくなり、逆に疎水性になると付着しやすくなることを報告している。Busscher らの知見と菌体の固定化実験の結果より、竹炭と *Methanosaeta* 属との間には静電斥力はほとんど作用せず、ファンデルワールス引力により竹炭に接近した菌体は、その疎水性により疎水性担体である竹炭表面に安定に固定化されたと推察できる。一方、*Methanosaeta* 属以外の菌体は負に帯電した疎水性菌体であるため、竹炭との間には静電斥力が作用することによって付着が抑制されるが、一部は疎水性相互作用により付着したと予測される。また、アルミナ表面に菌体がほとんど付着していないのは、アルミナ-菌体間には静電引力が作用して菌体は担体に接近できるが、両者の疎水性の違いにより安定的に固定化されなかったと推察できる。したがって、メタン発酵プロセスにおいて最も重要な菌体である *Methanosaeta* 属は疎水性かつ無帯電という特異的な微生物であるのに対して、メタン発酵菌群に含まれるその他の嫌気性菌は疎水性か

つ負帯電であるので、後者が静電斥力により付着が抑制される負帯電かつ疎水性の担体を用いると *Methanosaeta* 属が選択的に固定化されやすいことが示唆された。

5. 結 言

メタン発酵プロセスにおいて律速段階である酢酸からメタンへの変換にかかわる酢酸資化性メタン生成菌の担体への固定化について、実際のメタン発酵槽から採取したメタン発酵菌群を用いて検討を行った。その結果、今回用いたメタン発酵菌群には *Methanosarcina* 属と *Methanosaeta* 属が共存しているが、*Methanosaeta* 属が優占種であることが分かった。このメタン発酵菌群から選択培養した3種類の酸生成菌 (タンパク質分解菌群、炭水化物分解菌群、脂肪分解菌群) および *Methanosarcina barkeri* (JCM 10043 株) は、疎水性かつ負帯電性の微生物であることが分かった。それに対して、*Methanosaeta concilii* (DSM 3671 株) は疎水性かつ無帯電という特異的な微生物であることが分かった。竹炭とアルミナを用いてメタン発酵菌群の固定化実験を行ったところ、酢酸資化性メタン生成菌はアルミナ (正帯電、親水性) にはほとんど付着しないが、竹炭 (負帯電、疎水性) には付着しやすいことが分かった。また、担体に固定化された菌体を電子顕微鏡により直接観察した結果、竹炭には *Methanosaeta* 様の菌体が多数付着していることも確認された。

以上の結果より、メタン発酵プロセスにおいて最も重要な菌体である *Methanosaeta* 属を選択的に固定化するには、メタン発酵菌群に含まれるその他の嫌気性菌の付着が抑制できる疎水性かつ負帯電の担体が適していることが明らかとなった。

〔謝辞〕本研究の一部は、21世紀COEプログラム (水を反応場を用いる有機資源循環科学・工学) の助成によって行われた。ここに付して謝意を表します。

Nomenclature

A_0 : initial absorbance of cell suspension (400nm)	(400nm)	(—)
A_t : absorbance of cell suspension after voltex	F : adhesion ratio of cell to organic solvent (%)	(—)
	ΔG^0 : standard change of free energy	(kJ/mol)

References

- 1) Speece, R.E.: "Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters", p. 25, p. 127, Archae Press (1996)
- 2) McCarty, P. L. and D. P. Smith: "Anaerobic Wastewater Treatment", *Environ. Sci. Technol.*, **20**, 1200-1206 (1986)
- 3) Murata, T.: "Haikibutsu no Shigenka Gijutsu", p.32, Ohmsha (2000)
- 4) Jeris, J. S. and P. L. McCarty: "Biochemistry of Methane Fermentation Using C14 Tracers", *J. Wat. Poll. Control Fed.*, **37**, 178-192 (1965)
- 5) Koga, Y.: "Kosaikin", p.17, Tokyo Daigaku Shuppan (1988)
- 6) Bryant, M. P. and D. R. Boone: "Emended Description of Strain MST (DSM800T), The Type Strain of *Methanosarcina - barkeri*", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **37**, 169-170 (1987)
- 7) Patel, G. B.: "Characterization and Nutritional Properties of *Methanoxthrix - concillii sp - nov*, A Mesophillic, Aceticlastic methanogen", *Can. J. Microbiol.*, **30**, 1383-1396 (1984)
- 8) Sowers, K. R. and H. J. Schreier: "Archaea A LABORATORY MANUAL Methanogens", p. 15, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1995)
- 9) Bellon-Fontaine, M. N., J. Rault and C. J. vanOss: "Microbial adhesion to solvents: A novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells", *Colloids and Surface B*, **7**, 47-53 (1996)
- 10) Ueki, K. and S. Nagai: "Kenki Biseibutsugaku", p. 95, Yokendo (1993)
- 11) McCarty, P. L.: "Water Pollution Microbiology", p. 91, Wiley (1972)
- 12) Ohshima, H. and T. Kondo: "Approximate Analytic-expression for the Electrophoretic Mobility of Colloidal Particles with Surface-charge Layers", *J. Colloid Interface Sci.*, **130**, 281-282 (1989)
- 13) Ohshima, H. and T. Kondo: "On the Electrophoretic Mobility of Biological Cells", *Biophys. Chem.*, **39**, 191-198 (1991)
- 14) Ohshima, H., M. Nakamura and T. Kondo: "Electrophoretic Mobility of Colloidal Particles Coated with a Layer of Adsorbed Polymers", *Colloid Polym. Sci.*, **270**, 873-877 (1992)
- 15) Sharma, P.K., A. Das, K.H. Rao and K.S.E. Forssberg: "Surface characterization of *Acidithiobacillus ferro-oxidans* cells grown under different conditions", *Hydrometallurgy*, **71**, 285-292 (2003)
- 16) 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)