コロイド科学的手法による微生物の付着制御

Control of Microbial Adhesion with Colloid Science Techniques

野村 俊之

Toshiyuki Nomura

The microbial adhesion is positively utilized for the immobilization of microorganisms in bioreactors although it causes troubles in medical implants and devices, food, metallic corrosion, pipeline, dental caries. Microbial adhesion is inevitable when solid surfaces are exposed to an aqueous phase. However, the mechanism of microbial adhesion to solid surface has not been well understood. In this paper, the interactions between microorganisms and solid surfaces are briefly reviewed. From the viewpoint of the colloid science, the measurements of the microbial surface characteristics, analysis of the microbial adhesion and its application are introduced.

Keywords : Microorganism, Microbial adhesion, Biocolloid, Interaction, Anaerobic biotechnology

1. はじめに

微生物の付着現象は、固定化微生物を用いたバイオリアクターによる有価物生産や、固定生物膜リアクターによる環境浄化などにおいて積極的に利用されている一方で、食品汚染、医療器具汚染、金属腐食、配管の目詰まり、虫歯など、トラブルの原因になることも多い。このような微生物の付着現象は、身の回りや自然界などに多種多様に存在する界面において頻繁に観察されるにもかかわらず、その基礎となる微生物の固体表面への付着メカニズムの詳細は明らかにされていないのが現状である。したがって、コロイド科学の側面から、微生物の表面の性質を知り、固体表面への付着メカニズムを明らかにすることは、工業、農業、医学などのあらゆる分野において、付着した微生物を

利用もしくは駆除したり、微生物の付着を予防したりする上で極めて重要な課題であると言える。

本稿では、環境中の微生物に働く相互作用について概観し、筆者がこれまでに行ってきた微生物の表面性状評価、およびそれらの測定結果に基づいた微生物の付着現象に関する検討とその応用について紹介する。

2. 微生物に働く相互作用

2.1 DLVO 理論

微生物表面には、カルボキシル基、リン酸基、アミノ基などの解離基が存在しており、通常条件（中性領域）では、カルボキシル基、リン酸基が解離して負に帯電している。また、カチオンはアニオンに比べて水和されやすいので、カチオンは水溶液中、アニオンは界面に移動して安定化しやすく、環境中における界面は微生物と同じく負に帯電していることが多い。界面における微生物の挙動は、微生物表面と固体界面の表面電荷に起因する静電斥力と、物質を構成する分子間に普遍的に働く van der Waals 力を考慮した DLVO 理論により議論されてきた¹⁾。しかし、微生物の付着現象を考える場合、これだけでは不十分な場合もあり、疎水性相互作用、微生物表面の柔らかさ、微生物であることに由来した相互作用などについても考慮する必要がある。

2.2 疎水性相互作用

浮遊微生物が固体界面に付着する場合、微生物 b と

2006年7月10日受付

大阪府立大学大学院工学研究科

(〒599-8531 大阪府堺市中区学園町1-1) TEL 072-254-9300

Department of Chemical Engineering, Osaka Prefecture University

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

< 著者紹介 >

1993年3月京都大学工学部卒業、1995年3月同大学院工学研究科修士課程修了、1996年8月同大学院工学研究科博士課程退学、同年9月大阪府立大学工学部助手、2005年4月同大学院工学研究科講師。博士（工学）

専門：化学工学、粉体工学。現在は、微生物の付着現象とその利用について研究

液体 l の界面 bl と、固体 s と液体 l の界面 sl が消滅し、固体 s と微生物 b の界面 sb が新たに生成される。微生物の付着による単位面積当たりの自由エネルギー変化 ΔF_{adh} (J/m²) は、界面張力 γ (J/m²) を用いて次式で与えられる。

$$\Delta F_{adh} = \gamma_{sb} - \gamma_{sl} - \gamma_{bl} \tag{1}$$

表面張力は、London 分散力による寄与分 γ^d と分子の極性による寄与分 γ^p の和として考えられる。Busscher ら²⁾ は、Fowkes の分子間相互作用の幾何平均式³⁾を用いて、固体の表面張力を変化させたときの微生物の付着に関する判別式として、次式を提案している。

$$\frac{d(\Delta F_{adh})}{d\gamma_s} = (\gamma_s^p)^{-1/2} [(\gamma_l^p)^{1/2} - (\gamma_b^p)^{1/2}] \tag{2}$$

$\gamma_l^p > \gamma_b^p$ のとき、固体の表面張力 γ_s が小さくなると、すなわち、疎水性が高くなると、 $\Delta F_{adh} < 0$ となって微生物は固体界面に付着しやすくなる。逆に、 $\gamma_l^p < \gamma_b^p$ のとき、固体表面の疎水性が低くなると、微生物は付着しにくくなる。

2. 3 微生物の電気泳動移動度

微生物は、通常の固体粒子とは異なり、表面に帯電した高分子層が存在する。大島らは表面に帯電した高分子の層が吸着した粒子を「柔らかい粒子」と呼び、次のような電気泳動移動度 u (m²/(V・s)) の式を提案している^{4, 5)}。

$$u = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \psi_0 / \kappa_m + \psi_{DON} / \lambda}{\eta} + \frac{ZeN}{\eta \lambda^2} \tag{3}$$

ここで、 ε_r は溶液の比誘電率 (-), ε_0 は真空の誘電率 (F/m), η は溶液の粘度 (Pa・s), $1/\lambda$ 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/m³), ψ_0 は微生物の表面電位 (V), ψ_{DON} は微生物のドナン電位 (V), κ_m は表面電荷層内の Debye パラメータ (m) である。

Eq. (3) において、 $1/\lambda \rightarrow 0$ とすると Smoluchowski の式が得られる。

$$u = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0}{\eta} \psi_0 \tag{4}$$

Fig. 1 に、*Methanosarcina barkeri* (JCM 10043 株) の電気泳動移動度の測定結果を示す⁶⁾。懸濁液のイオン強度が増加すると、*M. barkeri* の電気泳動移動度の

Fig. 1 Electrophoretic mobility of *Methanosarcina barkeri* as a function of ionic strength

絶対値は減少している。しかし、その収束値は、固体粒子のように 0 とはならず $-1.9 \times 10^{-8} \text{ m}^2 / (\text{V} \cdot \text{s})$ であった。これは、微生物のような柔らかい粒子の電気泳動移動度の特徴である⁷⁾。大島らの式と Smoluchowski の式からそれぞれ求めた *M. barkeri* の表面電位を Fig. 2 に示す。Smoluchowski の式を用いて求めた微生物の表面電位の絶対値は、大島らの式を用いて求めたものと比べてかなり大きく見積もっていることが分る。

2. 4 微生物由来の相互作用

微生物由来の相互作用として、特異的相互作用と架橋作用が挙げられる。特異的相互作用とは、相補的な分子構造の関係により、特定分子を選択的に認識する

Fig. 2 Surface potential of *Methanosarcina barkeri* calculated by the theory of Ohshima or Smoluchowski

Fig. 3 Adhesion ratio of *Escherichia coli* to the glass and potential barrier energy between *E. coli* and the glass surface as a function of ionic strength

ときのスペシフィックな力である。微生物が栄養分、温度、光などを感知して集まってくる走化性などがある。架橋作用とは、高分子がもつ多数の吸着サイトにより粒子同士が架橋されることである。例えば、鞭毛はその直径がわずか10nm程度であるので、大きさが数 μm の微生物本体と比べて電气的反発エネルギーは大幅に減少する。このことは、微生物と固体表面間のポテンシャル障壁が高くても、細胞外ポリマーは十分に越えられることを意味しており、ポテンシャル障壁を越えて固体表面に達したポリマーは、それがもつ多数の吸着サイトにより不可逆的に吸着する⁸⁾。

Fig. 3に、大腸菌 *Escherichia coli* (JM 109株) のガラス表面への付着率と、DLVO理論より求めたポテンシャル障壁を示す⁹⁾。懸濁液のイオン強度が10 mol/m³の時、菌体-ガラス間のポテンシャル障壁は400 kT程度とかなり高いにもかかわらず、大腸菌が40%程度ガラス表面に付着していた。この付着菌体内、40%以上が鞭毛によりガラス表面に付着しており、鞭毛のような曲率の小さい細胞外ポリマーは、

ポテンシャル障壁を越えて固体表面に付着できることを示唆している。

3. 嫌気性バイオテクノロジーへのコロイド科学的手法の導入

3.1 メタン発酵プロセス

近年、循環型社会の形成、新エネルギーの開発、地球温暖化の防止などの観点から、廃棄物系バイオマスの再生技術としてメタン発酵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なため、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。

メタン発酵プロセスは、多種多様な微生物が高濃度に存在する人工生態系の一つである。これらの微生物をすべて考慮することは事実上不可能であるので、酸生成菌としてタンパク質分解菌群、炭水化物分解菌群、脂肪分解菌群の3種類と、メタン生成菌として *Methanosaeta concilii* (DSM 3671株) と *Methanosarcina barkeri* (JCM 10043株) の2種類を選定し、それらの表面性状の測定を行い、メタン生成菌の選択的固定化について検討した。

3.2 代表的な微生物の表面性状

メタン発酵における代表的な微生物の表面性状をTable 1に示す¹⁰⁾。微生物の電気泳動移動度はpH7.0、イオン強度100 mol/m³のリン酸緩衝液で測定した。3種類の酸生成菌と *M. barkeri* は負に帯電した微生物であることが分る。*E. coli* に代表されるように、微生物は負に帯電している場合がほとんどである。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る。これは、一般的な微生物

Table 1 Physico-chemical properties of microorganisms in anaerobic sludge

Microorganism	Electrophoretic mobility ($10^{-8} \text{ m}^2 / (\text{V} \cdot \text{s})$)	MATH (%)
Methanogen <i>Methanosaeta concilii</i>	0.09	66.7
<i>Methanosarcina barkeri</i>	-1.60	56.0
<i>Proteolytic bacteria</i>	-2.19	49.7
Acidogen <i>Amylolytic bacteria</i>	-1.35	73.7
<i>Lipolytic bacteria</i>	-1.32	67.1
Control <i>Escherichia coli</i>	-1.45	6.4

Fig. 4 Methane production using immobilized microorganisms with incubation time (medium : DSM120 medium, substrate : sodium acetate (initial concentration : 20 mol/m^3))

物コロイドとは大きく異なる特徴的な結果であり、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¹¹⁾。

微生物の疎水性は、MATH 法¹²⁾ により有機溶媒への微生物の付着率として評価した。*E. coli* の有機溶媒への付着率が約 6 % であるのに対して、*M. concilii*, *M. barkeri* および 3 種類の酸生成菌の付着率はほぼ 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と推察できる。したがって、菌体の極性に起因する表面張力は水に比べて明らかに小さく、Eq. (2) において $\gamma_L > \gamma_B$ となり、固体表面が疎水性になると微生物は付着しやすくなると予測される。

3. 3 固定化微生物によるメタン発酵

微生物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ガス発生量を Fig. 4 に示す¹⁰⁾。担体には、大きさが約 5mm の竹炭（負帯電、疎水性）とアルミナ（正帯電、親水性）を用いた。固定化担体として竹炭を用いた時、メタンガスの発生が観察されたが、アルミナを用いた時、メタンはほとんど発生しなかった。竹炭に固定化された微生物の SEM 写真を Fig. 5 に示す¹⁰⁾。竹炭表面には鞘状の *Methanosaeta* 属が多く付着していることが分った。なお、アルミナ表面には微生物がほとんど付着していなかった。これらの結果より、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が分った。

Fig. 5 SEM image of immobilized microorganisms on the bamboo charcoal

この理由は、微生物の表面性状に基づいて次のように推察できる。竹炭の場合、*Methanosaeta* 属の間には静電斥力はほとんど作用せず、van der Waals 引力により固体表面に接近した微生物は、その疎水性により竹炭表面に安定に固定化される。一方、*Methanosaeta* 属以外の微生物は負に帯電した疎水性微生物であるため、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。一方、アルミナ-微生物間には静電引力が作用して微生物は表面に接近できるが、両者の疎水性の違いにより安定的に固定化されない。

Fig. 6 に、竹炭に固定化された微生物を長期培養したときの SEM 写真を示す¹³⁾。竹炭上には鞘状の *Methanosaeta* 属が優占種となっており、コロイド科学的側面から得られた上記の推察を裏付ける結果である。

4. おわりに

コロイド科学で対象とされる固体粒子と微生物粒子

Fig. 6 SEM image of immobilized microorganisms of the long term culture on the bamboo charcoal

の大きな違いは、微生物が『生きたコロイド』であるという点である。すなわち、微生物は固体界面を能動的に感知して付着（棲息）していることが十分に考えられる。また、微生物が棲息している界面は、バルク相の巨視的環境とは異なる微視的環境を形成することができ、自然生態系では異なる微生物の棲み分けを可能としているのかもしれない。さらに、付着微生物は、固体界面からの表面間力を強く受ける場に存在す

るため、微生物表層に非対称性が誘起され、それが微生物内部に伝達することによる生理活性の向上も期待できるかもしれない。

以上のように、微生物の付着現象を積極的に利用したり、予防したりするためには、本稿で紹介したコロイド科学的側面からのアプローチに加えて、微生物特有の諸現象も考慮しながら、固体表面への付着メカニズムを明らかにしていく必要がある。

Nomenclature

e : elementary electrical charge	(C)	γ_s^p : polar component of surface energy of solid	(J/m ²)
N : density of the charged groups in the polyelectrolyte layer	(1/m ³)	ΔF_{adh} : interfacial free energy of adhesion	(J/m ²)
u : electrophoretic mobility	(m ² /(V · s))	ϵ_r : relative permittivity of the medium	(-)
Z : valance of charged group in the polyelectrolyte layer	(-)	ϵ_0 : permittivity of a vacuum	(F/m)
γ_{bl} : bacterium-solid interfacial free energy	(J/m ²)	η : viscosity of the medium	(Pa · s)
γ_b^p : polar component of surface energy of bacterium	(J/m ²)	κ_m : Debye-Hückel parameter of the polyelectrolyte layer	(m)
γ_l^p : polar component of surface energy of liquid	(J/m ²)	$1/\lambda$: softness of the polyelectrolyte layer	(m)
γ_s : surface energy of solid	(J/m ²)	ψ_{DON} : Donnan potential in the polyelectrolyte layer	(V)
γ_{sb} : solid-bacterium interfacial free energy	(J/m ²)	ψ_0 : potential at the boundary between the polyelectrolyte layer and the medium	(V)
γ_{sl} : solid-liquid interfacial free energy	(J/m ²)		

References

- 1) Marshall, K. C. : "Interfaces in Microbial Ecology", Harvard University Press (1976)
- 2) 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)
- 3) Fowkes, F. M. : "Attractive Forces at Interfaces", *Ind. Eng. Chem.*, **12**, 40-53 (1964)
- 4) 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)
- 5) Ohshima, H. and T. Kondo : "On the Electrophoretic Mobility of Biological Cells", *Biophys. Chem.*, **39**, 191-198 (1991)
- 6) Nomura, T., A. Yoshihara, K. Sasano, T. Nagao, S. Nagamine and Y. Konishi : "Electrophoretic Mobilities and Hrdrophobicities of Methanogens", Proc. of the 43rd Symposium on Powder and Technology, pp.266-269 (2005)
- 7) Morisaki, H., S. Nagai, H. Ohshima, E. Ikemoto and K. Kogue : "The Effect of Motility and Cell-Surface Polymers on Bacterial Attachment", *Microbiology*, **145**, 2797-2802 (1999)
- 8) Vigeant, M. A. -S., R. M. Ford, M. Wagner and L. K. Tamm : "Reversible and Irreversible Adhesion of Motile *Escherichia coli* Cells Analyzed by Total Internal Reflection Aqueous Fluorescence Microscopy", *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2794-2801 (2002)
- 9) Sasano, K. : "Effect of Surface Characteristics of Bacteria on Microbial Adhesion", B. S. Thesis, Osaka Prefecture University (2005)
- 10) Nomura, T., T. Nagao, A. Yoshihara, H. Tokumoto and Y. Konishi : "Selective Immobilization of Aceticlastic Methanogens to Support Material", *J. Soc. Powder Technol., Japan*, **43**, 653-659 (2006)
- 11) Sharma, P. K., A. Das, K. H. Rao and K. S. E. Forssberg : "Surface Characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* Cells Grown under Different Conditions", *Hydrometallurgy*, **71**, 285-292 (2003)
- 12) Bellon-Fontaine, M. N., J. Rault and C. J. van Oss : "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)
- 13) Sakuta, N. : "High Efficient Methane Fermentation Using Bamboo Charcoal as Support Material to Immobilize Methanogens", B. S. Thesis, Osaka Prefecture University (2005)