

平成 21 年度研究助成報告（兼、終了報告）

研究題名	食品産業において汚染源となる微生物の付着現象に関する基礎的研究
研究期間	平成 19 年 4 月 01 日～平成 22 年 3 月 31 日
研究機関・所属 研究者名	大阪府立大学大学院 工学研究科 野村 俊之

1. 平成 21 年度研究成果の概要

本研究では、微生物による食品汚染の防止技術を確立するための基礎的な情報として、固体界面における微生物の付着現象に関する基礎的研究を行うことを目的としている。平成 21 年度の研究成果は以下の通りである。

平成 20 年度に構築した平行平板流れ場において微生物のガラス表面における付着・脱離プロセスを光学顕微鏡でリアルタイムに観察できるシステムを用いて、菌体周りに細胞外ポリマーが存在する培養後そのままの菌体（未洗浄菌体）の付着力を評価し、洗浄により細胞外ポリマーを除いた菌体との比較検討を行った。鞭毛を持たない非運動性の大腸菌をモデル微生物として用い、帯電性の異なる負帯電ガラスと正帯電ガラスへ付着特性の違いを比較した。まず、菌体懸濁液を測定セルに供給した時の菌体のガラス表面への付着現象を観察した。その結果、洗浄菌体と同様に、イオン強度が増加すると、菌体の負帯電ガラスへの付着率は増加した。一方、正帯電ガラスへの付着率は、イオン強度に依らず負帯電ガラスよりも高いことが分かった。また、表面性状がほぼ同じであるにもかかわらず、未洗浄菌体の両ガラスへの付着菌体数は、洗浄菌体に比べて多いことが分かった。これは、菌体の周りに付着した細胞外ポリマーの曲率が菌体自身に比べて非常に小さく、菌体-固体表面間のポテンシャル障壁を容易に越えることができるためと考えられる。次に、ガラス表面に付着した菌体の脱離現象について観察を行った。その結果、ガラスに付着した未洗浄菌体を脱離するのに必要な抗力は、洗浄菌体に比べて小さいことが分かった。付着実験では、細胞外ポリマーが存在すると菌体のガラス表面への付着が促進されたので、細胞外ポリマーにより菌体の付着力は増加して、脱離が起り難いと予測されたが、結果は逆であった。未洗浄菌体の脱離が洗浄菌体に比べて起りやすいのは、細胞外ポリマーによって付着することで、菌体と固体表面への接触面が小さくなったこと、付着菌体と固体界面間の距離が長くなったことなどが理由として考えられる。このことは、微生物の生育環境の違いにより、その付着力も異なることを示唆しており、今後更なる知見の蓄積が必要不可欠である。

2. 助成期間内での研究成果の概要

1. はじめに

昨今の食中毒問題を契機に、食品粉体製造を含む分野において製造現場の衛生管理が社会的急務となっている。食品工場では、原料、装置、建物、作業員などあらゆる固体界面に付着した微生物が食品汚染を引き起こす。特に、付着微生物が固体表面に定着、増殖してバイオフィームが形成されると汚染源になるだけでなく、増殖の際に産生した細胞外多糖類により、様々な抵抗性（熱、薬剤等）を発現し、その結果、微生物の除去（殺菌）が極めて困難となる。したがって、微生物が関わるトラブルを未然に防ぐためには、製造現場において微生物がどのように付着、定着して生きているのかを知ることが重要課題と言える。本研究では、微生物による食品汚染の防止技術を確立するための基礎的な情報として、液相中における固体界面における微生物の付着現

象に関する基礎的研究を行うことを目的とした。具体的には、測定セルとして平行平板流れ場を用いて、微生物のガラス表面における付着・脱離プロセスを光学顕微鏡でリアルタイムに観察できるシステムを構築し、コロイド科学の観点から大腸菌をモデル微生物として1個菌体と固体表面における初期付着力の定量的評価を試みた。

2. 実験方法

2.1 実験試料

モデル微生物には、粒径約 0.8 μm の鞭毛をもたない非運動性の大腸菌を用いた。実験試料には、LB 培地で培養した菌体を生理食塩水で洗浄して細胞外ポリマー(EPS)を除去した洗浄菌体と、そのままの未洗浄菌体を用いた。固体表面には、負帯電(NC)ガラスとアミノ基を導入した正帯電(PC)ガラスを用いた。

2.2 表面性状

スライドガラスと菌体の表面電位は、分散液のイオン強度を変えて測定した電気泳動移動度から見積もった。また、液滴法により、菌体層とスライドガラスの接触角を測定した。液滴には純水、ホルムアミド、 α -プロモナフタレンを用い、Young-Dupré の式から表面張力を見積もった。

2.3 測定システム

測定システムは、流量制御して送液するためのマイクロシリンジポンプ、付着・脱離プロセスの動画をキャプチャーする CCD カメラの付いた倒立型位相差顕微鏡、顕微鏡のステージ上に置いた平行平板流れ場、画像解析に用いる PC などから構成される(Fig. 1)。また、平行平板流れ場の底部にスライドガラスを取り付けることで、長さ 60 mm×幅 10 mm×高さ 0.127 mm の流路を形成した。

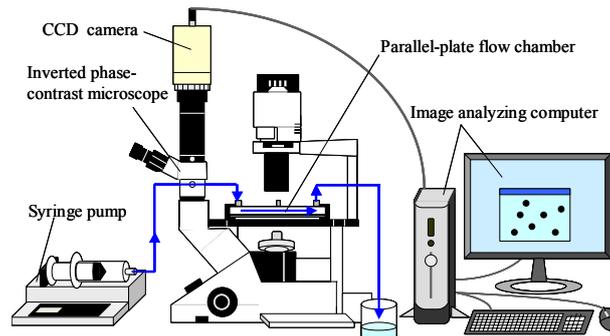


Fig. 1 Measurement system

2.4 付着実験

イオン強度を調製したNaCl水溶液を測定セル内に気泡が残らないように供給し、系を平衡状態にした。次に、所定のイオン強度のNaCl水溶液に、菌体濃度が約 2.5×10^7 cells/mlになるように菌体を分散した懸濁液を、流量 0.01 ml/minで測定セルに供給し、菌体のガラス上での付着現象を観察した。その後、画像解析により付着菌体数を計数した。

2.5 脱離実験

ガラス表面に菌体が付着している測定セルに、菌体を含まない NaCl 水溶液を供給することで、系内に存在する浮遊菌体を除去した。次に、NaCl 水溶液の流速を変えてセルに供給することで付着菌体を脱離させ、脱離が起こらなくなった平衡状態に達するごとに、段階的に流速を増加させた。その後、画像解析により、各流速段階の終わりに付着して残っている菌体数を計数することで、各抗力における脱離菌体数を求め、付着菌体の脱離に必要な抗力の分布を求めた。

3. 実験結果および考察

3.1 表面性状

菌体およびガラスの表面特性を Table 1 に示す。菌体およびNC ガラスは負帯電、アミノ基を導入した PC ガラスは正帯電であることが確認された。また、菌体およびガラスの水の接触角は

比較的小さく、全て親水性であることが分かった。また、洗浄および未洗浄菌体の表面特性はほぼ同じであることが分かった。

Table 1 Surface physico-chemical properties of *E. coli* and glass.

Cell	Surface potential [mV]						Contact angle [deg]			Surface tension [mJ/m ²]				
	Solid	5 mM	10 mM	20 mM	40 mM	80 mM	160 mM	θ^{Wa*}	θ^{Fo*}	θ^{Br*}	γ^{LW}	γ^+	γ^-	γ^{AB}
Washed cell	-59.6	-43.7	-29.4	-17.9	-9.82	-5.08	15.9	34.5	36.5	36.3	0.24	65.3	7.91	44.2
Intact cell	-61.9	-45.8	-31.3	-19.3	-10.7	-5.57	13.6	23.9	34.7	37.0	0.90	58.3	14.5	51.5
NC-glass	-61.2	-33.1	-23.7	-18.8	-10.8	-3.61	16.5	30.5	21.3	41.6	0.09	61.7	4.7	46.3
PC-glass	31.9	34.6	32.3	21.5	18.5	12.0	55.8	29.8	6.2	44.3	1.06	16.6	8.4	52.7

*Wa: Water, Fo:Formamide, Br: α -Bromonaphtalene

3.2 付着実験

NCガラスへの付着菌体数の経時変化をFig.2に示す。洗浄菌体では、イオン強度が低い5, 10 mol/m³では菌体のNCガラスへの付着が起こらなかつた。20 mol/m³以上では、NCガラスへの付着菌体数が一定の割合で増加することが分かった。また、イオン強度が大きくなるほど、NCガラスへの付着菌体数が増加する傾向が見られた。これはイオン強度が大きくなると、菌体とNCガラス表面の拡散電気二重層が圧縮され、菌体-NCガラス間に作用する静電斥力の影響が弱まるためと考えられる。一方、菌体周りにEPSが存在する未洗浄菌体のNCガラスへの付着菌体数は、洗浄菌体に比べて多かつた。このことから、EPSが存在することで、菌体の付着が促進されると考えられる。PCガラスへの付着菌体数の経時変化をFig.3に示す。PCガラス系では、低イオン強度である5, 10 mol/m³においても、菌体の付着が起こつた。また、イオン強度を増加させても、PCガラスへの付着菌体数はあまり変化せず、NCガラスの付着菌体数に比べて多いことが分かつた。これは、イオン強度に依らず、菌体-PCガラス間には常に静電引力が作用しているためと考えられる。また、未洗浄菌体では、NCガラス系と同様に付着菌体数は洗浄菌体に比べて多く、EPSが存在することで、付着が促進されると考えられる。

菌体・ガラスの実測値を用いて、洗浄菌体-ガラス表面間のポテンシャルエネルギーをDLVO理論により計算し、実験結果とポテンシャル障壁についてまとめたものをTable 2に示す。NCガラス系ではイオン強度が大きくなるとポテンシャル障壁が減少し、付着が起こりやすくなると予測される。一方、PCガラス系では、イオン強度に依らずポテンシャル障壁が存在しないため、付着が起こりやすいと予測される。これらの予測は実験結果とよく一致した。また、NCガラス系では、ポテンシャル障壁が小さくなると付着菌体数が大きく変化していることが分かつた。また、表面性状がほぼ同じであるにもかかわらず、EPSが存在すると付着が促進されたのは、EPSの曲率が菌体自身に比べて非常に小さく、ポテンシャル障壁を容易に越えることができるためと考えられる。

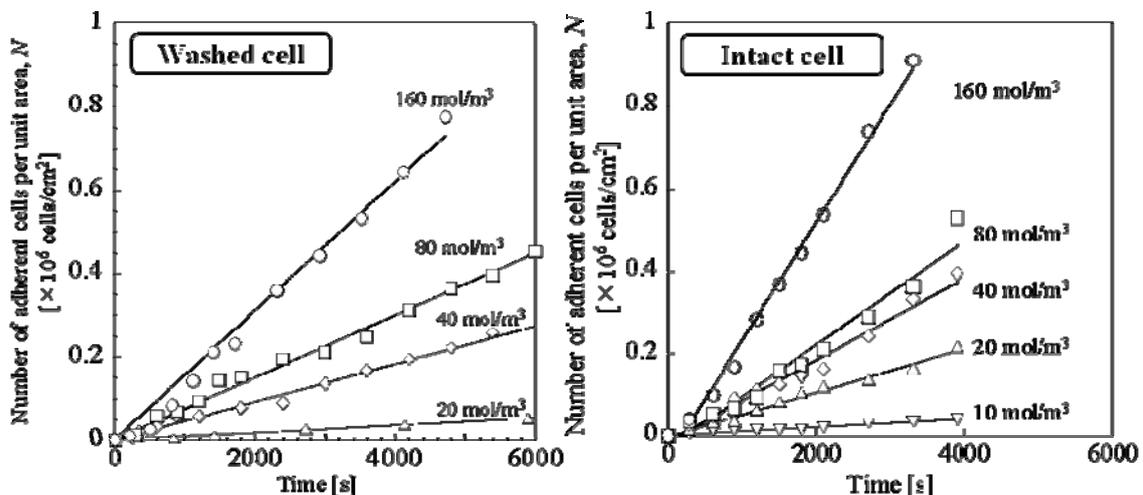


Fig. 2 The number of attached cells per unit area on NC-glass as a function of time.

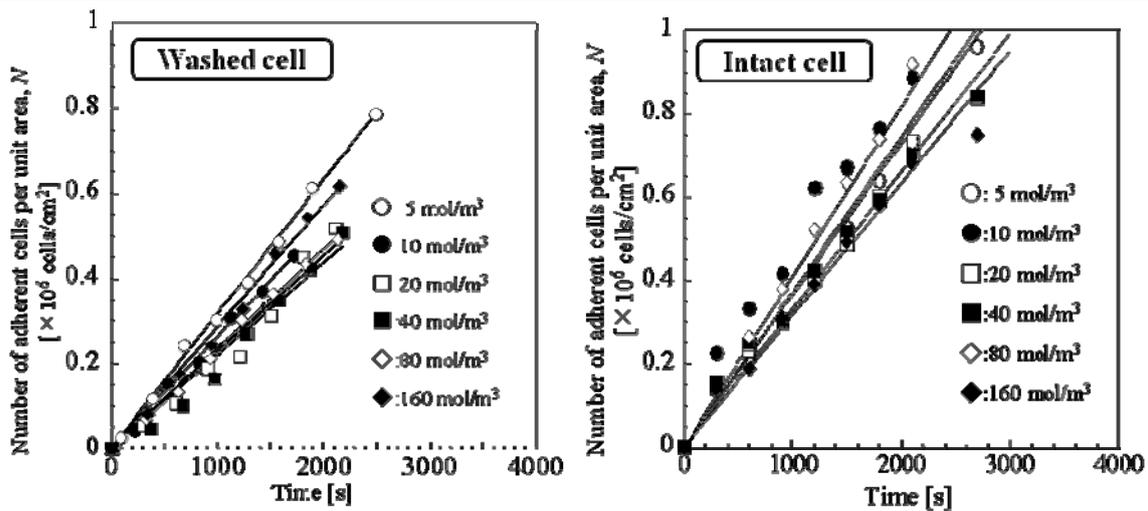


Fig. 3 The number of attached cells per unit area on PC-glass as a function of time.

Table 2 Relationship between adhesion rate and potential barrier.

Washed cell				Intact cell			
Solid surface	Ionic strength, I [mol/m ³]	Adhesion rate, $F \times 10^6$ [-]	Potential barrier, $V_{max} \# T$ [-]	Solid surface	Ionic strength, I [mol/m ³]	Adhesion rate, $F \times 10^6$ [-]	Potential barrier, $V_{max} \# T$ [-]
NC-glass	5	0.00	1829	NC-glass	5	0.30	1900
	10	0.00	591		10	0.42	611
	20	0.34	216		20	2.33	229
	40	1.72	47		40	3.58	53
	80	2.84	-		80	4.33	-
	160	5.87	-		160	10.08	-
PC-glass	5	11.9	-	PC-glass	5	14.07	-
	10	9.96	-		10	15.49	-
	20	8.56	-		20	13.81	-
	40	8.26	-		40	12.52	-
	80	8.86	-		80	15.46	-
	160	10.8	-		160	12.02	-

3.3 脱離実験

測定セルに供給する NaCl 水溶液の流量を増加させた時に、脱離せずにガラス上に残っている菌体の割合を表したものを Figs.5, 6 に示す。菌体が特定の大きさの力で付着していれば、ある流量に達した時に、一斉に脱離すると予想されたが、実際は流速が小さい時に脱離するものもあれば、かなり高流速下でも脱離しないものも存在し、流速の増加に伴い残留付着菌体率は指数関数的に減少することが分かった。この傾向は、ガラス表面の帯電性、菌体の洗浄の有無に関わらず類似していたが、洗浄菌体よりも未洗浄菌体の方が脱離し易い傾向が見られた。また、静電引力の影響により、正帯電ガラスよりも負帯電ガラスの方が脱離し易いことも確認された。次に、脱離実験から得られた、各抗力における脱離菌体数より、付着菌体を脱離するのに必要な抗力の分布を求め、まとめたものを Figs.7, 8 に示す。微生物に作用する流体力学的な抗力 D は、微生物が理想的な単一球形粒子と仮定することで見積もった。洗浄菌体-NC ガラス系では、イオン強度が増加しても、脱離するのに必要な抗力はほとんど変化しなかった。一方、洗浄菌体-PC ガラス系では、イオン強度が増加すると脱離するのに必要な抗力が小さくなる傾向が見られた。さらに、ガラスに付着した未洗浄菌体を脱離するのに必要な抗力は、洗浄菌体に比べて小さいことが分かった。この傾向は、未洗浄菌体においてもほぼ同じであった。さらに、菌体-ガラス間に作用する最小接触距離における全相互作用力を DLVO 理論により計算し、まとめたものを Fig.9 に示す。NC ガラス系では、van der Waals 引力が静電斥力に対して常に支配的であるため、全相互作用力はイオン強度に依らず一定になると予測された。このことは、脱離するのに必要な抗力

がほぼ一定であることとよく一致している。一方、PC ガラス系では、イオン強度が増加すると静電引力の影響が減少していくため、全相互作用力はイオン強度の増加に伴い小さくなると予測された。このことは、イオン強度が増加すると脱離するのに必要な抗力が小さくなる傾向とよく一致している。さらに、洗浄菌体と未洗浄菌体でそれぞれまとめた菌体の脱離に必要な抗力と DLVO 理論から見積もった付着力の間にはそれぞれ良い相関関係があることが分かった。付着実験では、細胞外ポリマーが存在すると菌体のガラス表面への付着が促進されたので、細胞外ポリマーにより菌体の付着力は増加して、脱離が起こり難いと予測されたが、結果は逆であった。未洗浄菌体の脱離が洗浄菌体に比べて起こりやすいのは、EPS によって付着することで、菌体と固体表面への接触面が小さくなったこと、付着菌体と固体界面間の距離が長くなったことなどが理由として考えられる。さらに、菌体の粒度分布の幾何標準偏差は約 1.1 と非常に分布が狭いが、抗力分布の幾何標準偏差は約 2.6~5.7 であるため、粒度分布に比べて非常に広い分布が存在することも分かった。これは菌体と固体表面の不均質性や、付着における最小接触距離にも分布が存在することが主な原因として考えられる。

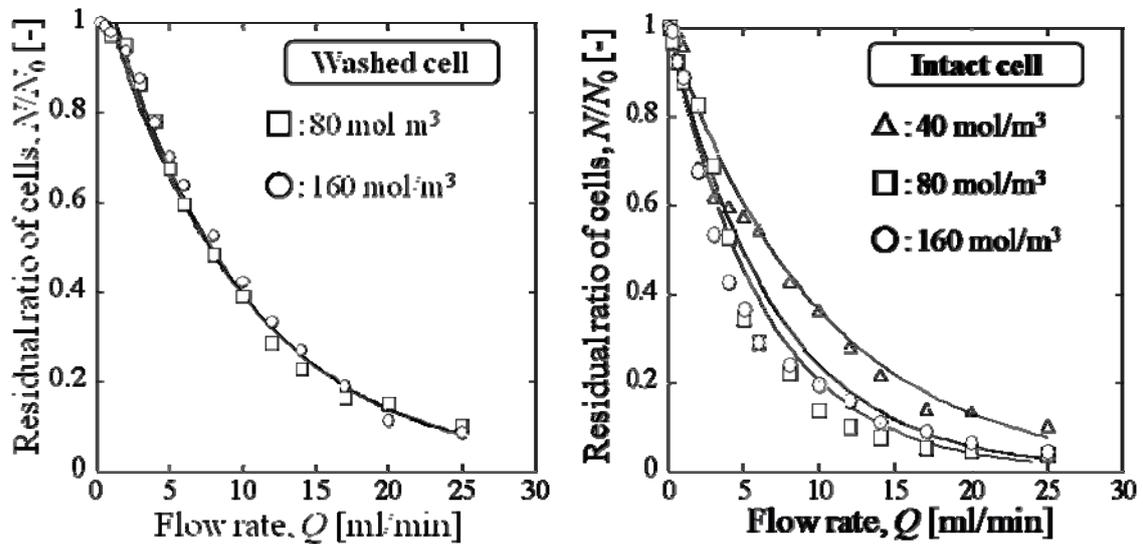


Fig. 5 Residual ratio of cells on NC-glass as a function of flow rate.

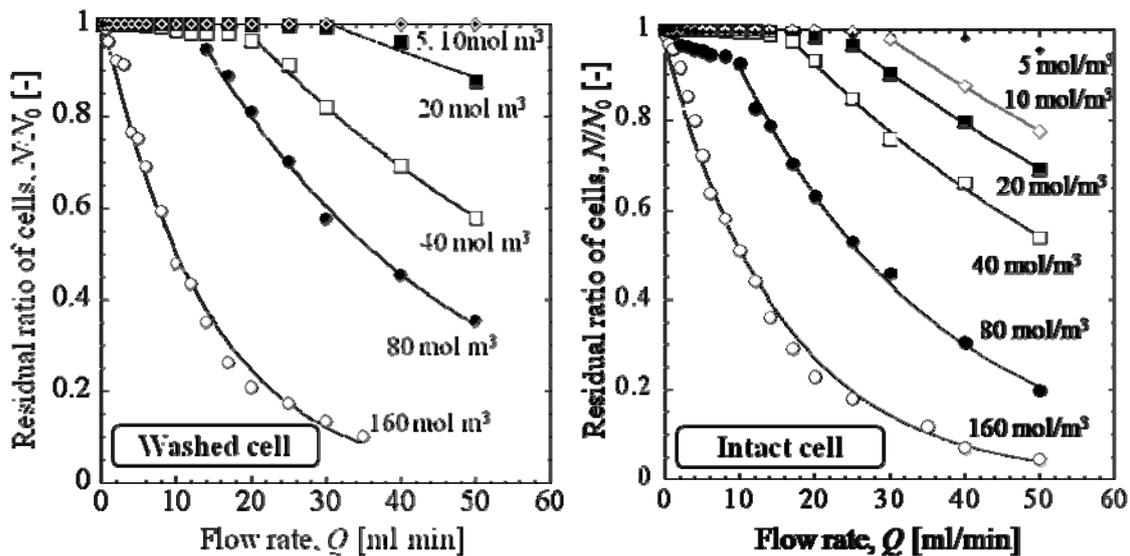


Fig. 6 Residual ratio of cells on PC-glass as a function of flow rate.

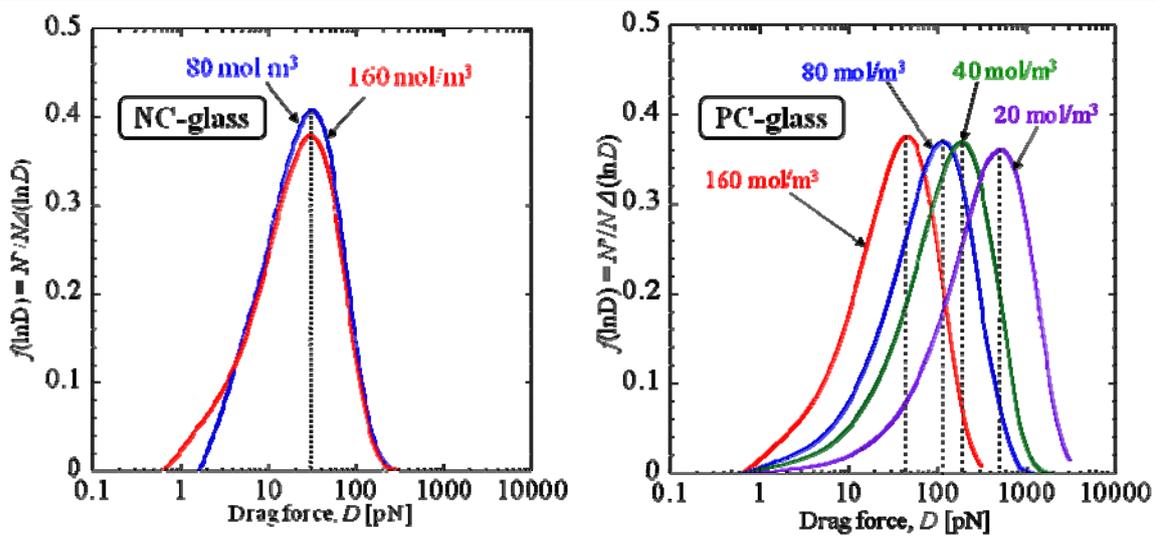


Fig. 7 Distribution of drag force required to remove the attached washed cells.

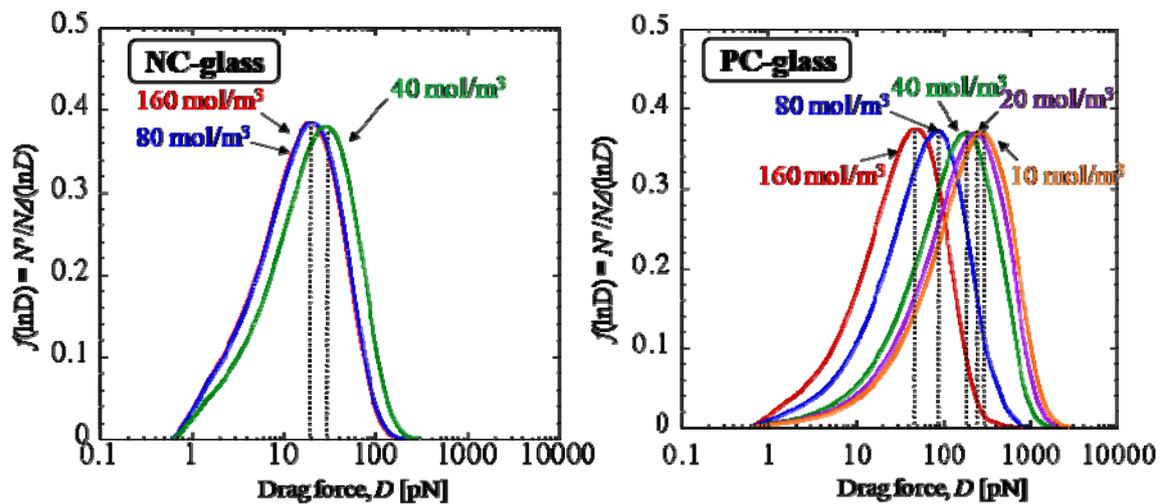


Fig. 8 Distribution of drag force required to remove the attached intact cells.

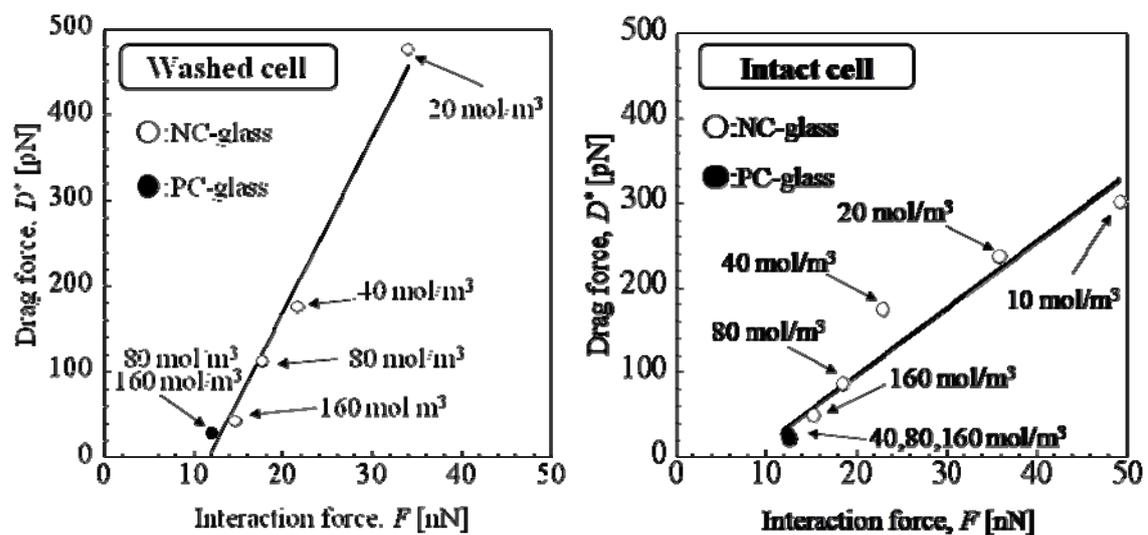


Fig. 9 Relationship between drag force and interaction force.

4. おわりに

粉体工学情報センターより、平成19年から21年までの3年間、「食品産業において汚染源となる微生物の付着現象に関する基礎的研究」をテーマとして研究助成を頂き、平行平板流れ場において微生物のガラス表面における付着・脱離プロセスを光学顕微鏡でリアルタイムに観察できるシステムを構築することができた。そして、微生物をバイオコロイドとみなすことで、微生物の固体表面への初期付着力の定量化を試みた。その結果、DLVO理論によって計算した菌体のガラス表面への付着力と、付着菌体を脱離するのに必要な抗力の間には良好な相関関係があることが分かった。さらに、菌体と固体表面の不均質性などの影響により、菌体の固体表面への付着力には非常に広い分布が存在することが明らかとなった。この知見は、菌体が少しでも付着していると容易に発達するバイオフィルムの形成を制御する上で、菌体の固体表面における付着力の分布について正確に知ることが極めて重要であることを示している。

3. 研究発表

平成19年度

- (1) 吉原章仙, 野村俊之, 小西康裕, メタン生成古細菌の細胞表面性状評価, 第39回化学工学会秋季大会, 北海道大学, 2007年9月
- (2) T. Nomura, A. Yoshihara, H. Tokumoto and Y. Konishi, Evaluation of Surface Physico-Chemical Properties of Acetate Utilizing Methanogens, International symposium on Microbial Ecology ISME Asia 2007 and 23rd Annual Meeting of Japanese Society of Microbial Ecology (JSME 23), Matsuyama, Japan, 2007/9
- (3) 野村俊之, 微生物(生物微粒子)の付着現象の解明とその応用, 第45回粉体に関する討論会, 岡山国際交流センター, 2007年10月
- (4) T. Nomura, A. Yoshihara, and Y. Konishi, Effects of Surface Properties of Bacterial Cells on Microbial Adhesion, 14th APHS Seminar: Young Researchers Symposium, Melbourne, Australia, 2007/12
- (5) T. Nomura, Adhesion and Coadhesion Phenomena of Acetate-Utilizing Methanogens, The Ian Wark Research Institute Nano-interface Workshop, Adelaide, Australia, 2007/12

平成20年度

- (6) 野村俊之, 微粒子工学の視点から見た微生物の付着制御, 第46回粉体技術専門講座, 東京, 2008年7月, 講演要旨集, 41-50
- (7) 野村俊之, 榎原久哉, 小西康裕, 乳酸菌を用いた微生物の付着特性評価, 第44回粉体工学会夏期シンポジウム, 京都, 2008年8月, 講演要旨集, 17-18
- (8) T. Nomura, Elucidation of microbial adhesion and its application, 20th Advanced Particle Handling Science Seminar, Kyoto, Japan, 2008/8
- (9) 榎原久哉, 野村俊之, 小西康裕, 微生物-ガラス表面間に働く付着力の定量的評価, 2008年度粉体工学会秋期研究発表会, 幕張, 2008年10月, 講演論文集, 35-36 (榎原久哉(M2): ベストプレゼンテーション賞を受賞)
- (10) T. Nomura, Adhesion phenomena of biological cells and their applications, The 17th Nisshin Engineering Particle Technology International Seminar (NEPTIS-17), Nara, Japan, 2008/12, Proc. of the 17th Nisshin Engineering Particle Technology International Seminar, 50-57

平成21年度

- (11) T. Nomura, H. Narahara, H. Tokumoto and Y. Konishi, The Role of Microbial Surface Properties and Extracellular Polymer in *Lactococcus Lactis* Aggregation, Advanced Powder Technology, 20[6], 537-541 (2009).
- (12) T. Nomura, A. Yoshihara, Y. Konishi, Effect of surface properties of acetate-utilizing methanogens on anaerobic granulation, The 1st Korea-Japan International Symposium on Microbial Ecology (Jeju, Korea, May, 2009).

- (13) T. Nomura, Estimation of Adhesive Force between a Biological Cell and a Glass Surface, 35th APHS Seminar: Young Researchers Meeting 2009 in UK (York/Leeds, UK, December, 2009)
- (14) 矢野 哲司, 榎原 久哉, 野村 俊之, 小西 康裕, 微生物-ガラス表面間に働く付着力の評価, 第41回化学工学会秋季大会 (9月, 東広島), 研究発表講演要旨集, AE2P15.