



微生物の付着現象の解明とその応用に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2016-02-17 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 吉原, 章仙 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24729/00000175

大阪府立大学博士論文

微生物の付着現象の解明と
その応用に関する研究

2015年7月

吉原 章仙

— 目次 —

第 1 章 序論

1.1 はじめに	1
1.2 既往の研究	3
1.2.1 バイオフィルム	3
1.2.2 微生物の表面物性	5
1.2.3 微生物の付着挙動	21
1.2.4 微生物の付着力	22
1.2.5 メタン発酵プロセス	24
1.2.6 粒子複合化プロセス	27
1.3 本論文の目的と構成	30
Nomenclature	32
References	34

第 2 章 微生物の表面性状が付着挙動に及ぼす影響

緒言	43
2.1 実験方法	43
2.1.1 実験に用いた試料	43
2.1.2 キャラクタリゼーション	44
2.1.3 微生物の自己凝集実験	47
2.1.4 微生物の固体表面への付着実験	47
2.2 実験結果および考察	48
2.2.1 微生物の形態観察	48
2.2.2 微生物の帶電性	48
2.2.3 微生物のぬれ性	52
2.2.4 微生物の表面官能基	55
2.2.5 微生物の自己凝集	55
2.2.6 微生物の固体平板への付着	59
2.2.7 微生物の球状粒子への付着	61

結言	64
Nomenclature	65
References	66

第 3 章 微生物の細胞外構造物が付着挙動に及ぼす影響

緒言	68
3.1 実験方法	68
3.1.1 実験に用いた試料	68
3.1.2 キャタクタリゼーション	69
3.1.3 微生物の固体表面への付着実験	70
3.2 実験結果および考察	71
3.2.1 表面性状	71
3.2.2 細胞外代謝物が付着挙動に及ぼす影響	76
3.2.3 細胞外器官が付着挙動に及ぼす影響	78
結言	80
Nomenclature	81
References	82

第 4 章 平行平板流れ場を用いた微生物の付着力分布の評価

緒言	83
4.1 実験方法	84
4.1.1 実験に用いた試料	84
4.1.2 キャラクタリゼーション	84
4.1.3 平行平板流れ場を用いた微生物の付着・脱離実験	85
4.2 実験結果および考察	87
4.2.1 表面性状	87
4.2.2 平行平板流れ場の流動状態	90
4.2.3 微生物の付着挙動の評価	90
4.2.4 微生物の脱離挙動の評価	94
結言	102

Nomenclature	103
References	105

第 5 章 平行平板流れ場を用いた微生物の細胞外構造物が付着力分布に及ぼす影響の評価

緒言	106
5.1 実験方法	106
5.1.1 実験に用いた試料	106
5.1.2 キャラクタリゼーション	107
5.1.3 平行平板流れ場を用いた微生物の付着・脱離実験	107
5.2 実験結果および考察	110
5.2.1 表面性状	110
5.2.2 細胞外器官が微生物の付着・脱離挙動に及ぼす影響	110
5.2.3 細胞外代謝物が微生物の付着・脱離挙動に及ぼす影響	120
結言	125
Nomenclature	126
References	127

第 6 章 メタン発酵プロセスへの応用

緒言	128
6.1 実験方法	128
6.1.1 実験に用いた試料	128
6.1.2 キャラクタリゼーション	129
6.1.3 消化発酵液を用いたメタン発酵実験	129
6.1.4 微生物の担体への固定化実験	130
6.1.5 マイクログラニュールの形成実験	130
6.2 実験結果および考察	132
6.2.1 表面性状	132
6.2.2 消化発酵液中に存在するメタン生成古細菌の基質選択性	136
6.2.3 メタン生成古細菌の担体への選択的固定化	138

6.2.4 マイクログラニュールの急速形成	140
結言	143
Nomenclature	144
References	144
 第 7 章 粒子複合化プロセスへの応用	
緒言	145
7.1 実験方法	146
7.1.1 実験に用いた試料	146
7.1.2 キャラクタリゼーション	146
7.1.3 粒子複合化実験	147
7.2 実験結果および考察	149
7.2.1 粉体材料の熱特性	149
7.2.2 材料表面のぬれ性	149
7.2.3 粒子複合化処理	155
結言	160
Nomenclature	161
References	162
 第 8 章 結論	
謝辞	163
謝辞	167

第1章 序論

1.1 はじめに

近年、微生物の工業的な利用を目的とした研究が数多く報告されている。例えば、低純度鉱石や廃棄工業品に含まれる貴金属を回収するバイオリーチング[1,2]、工場や家庭から出た有害物質により汚染された自然環境を復元するバイオレメディエーション[3,4]、非食用バイオマスや再生可能資源からバイオ燃料や樹脂を作り出すバイオリファイナリー[5-12]が挙げられる。これらの研究が加速した背景には、1994年に国連大学が提唱したゼロエミッション研究構想(Zero Emissions Research Initiative, ZERI)がある[13-15]。自然生態系では、植物は大気中のCO₂と土壤から得た水や栄養源を元に光合成を行い、有機物と酸素を作る。これらは動物の生命活動を支えている。動物の排出物や死骸、植物の枯れ葉などは、土壤中の微生物により分解される。分解によって生じたCO₂は大気中に放出され、無機物は水に溶けて植物の栄養源となる。これらを用いて植物は再び光合成を行う。このサイクルでは、排泄物は他者のエネルギー源として活用され、すべてが連鎖的につながっている。つまり、自然界では様々な種がクラスター化することで、廃棄物を出さずに生息することになる。このサイクルをヒントに、ZERIでは複数の産業がクラスター（連環）を構築することで、廃棄物を資源として再利用し、最終的な廃棄物をゼロにすることを目指している。以上のように、産業構造の仕組みを変えようという動きは、従来の石油依存性社会からの脱却にも繋がり、自然の力を活用するバイオプロセスは、複数の産業がクラスターを形成する上で必要不可欠である。

化学反応で用いられる触媒として微生物を用いると、活性化エネルギーが低く、省エネ効果による環境負荷の低減が期待できる環境調和型プロセスの構築が可能となる。また、微生物には化学プロセスでは困難な反応を触媒する種も存在する。しかし、十分な生成物を得るには、相応量の微生物を必要とすることから、微生物プロセスでは反応装置内の微生物濃度を高い状態で保持する手法が検討されている。微生物が高密度化した状態はバイオフィルムと呼ばれ、微生物プロセスでは、反応率の向上や微生物の流出を抑制するとともに、反応槽内の環境変動にも強くなるため、この形成制御を行うことでプロセスの安定

性も期待できる。バイオフィルムは界面において、微生物が付着・脱離・増殖を繰り返すことで形成される[16]。しかし、この詳細な形成メカニズムは明らかではないため、高効率な微生物プロセスを構築するためには、バイオフィルム形成における微生物の界面現象を理解し、その制御因子を把握する必要がある。

微生物の界面挙動は、微生物が生息する周りの環境要因（温度、栄養状態、pH、塩濃度、流体流れなど）に依存した、物理化学的因素（van der Waals 力や静電気力）[17,18]や生物学的因素（運動性、細胞外ポリマー、相補的な分子構造による特異的な吸着など）が、「微生物－微生物」や「微生物－固体」の界面相互作用に影響を及ぼすことで決まる。微生物の界面に働く物理化学的な相互作用の評価には、静電気力と van der Waals 力の和からコロイド分散系の安定性を評価する DLVO (Derjaguin–Landau– Verwey–Overbeek) 理論や熱力学的安定性を考慮した拡張 DLVO 理論が利用されてきた[19–21]。また、微生物の付着力を直接測定する方法として、原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy, AFM) による測定が検討されている[22–25]。しかし、AFM は静止場における付着力の測定には優れているが、環境中の微生物に作用しているせん断場における付着力の測定では、プローブ部に負荷がかかるため検出が難しくなる[26]。一方、せん断場における微生物の付着現象の評価法として、平行平板流れ場 (Parallel Plate Flow Chamber, PPFC) を用いた直接観察法が提案されている[18,27–32]。PPFC は観察部に流体を層流で供給できるマイクロ流路で、*in vitro* 試験に適している[33–35]ため、流動条件や流路壁の材質を変えれば、様々な環境での微生物の界面挙動が観察可能となる。ここで、微生物の付着力は、生育条件の違いや界面の不均一性などの影響で、広い分布が存在すると考えられる。この点、PPFC は数百の微生物の界面挙動を同時に *in situ* 観察できるため、統計的な解析に向いている。しかし、PPFC を用いて微生物の付着力分布の解析まで行った事例はない。

そこで本論文では、微生物をコロイド粒子と見なしたコロイド科学と熱力学の観点から、「微生物－微生物」や「微生物－固体」の表面間に働く相互作用を、DLVO 理論や Gibbs 自由エネルギー変化 ΔG を用いて評価するとともに、PPFC を用いた微生物の付着力分布の新たな解析法を提案し、微生物の付着現象の解明を試みた。また、微生物プロセスの一つであるメタン発酵プロセスと、微生物と同様に表層が高分子物質で被覆された複合粒子の製造プロセスに着目し、これらのプロセスにおける粒子の付着現象の解明を試みた。

1.2 既往の研究

微生物細胞は、細胞コア表層に高分子鎖が生えたバイオコロイド粒子と捉えることができる。このような粒子の表面物性や固体表面への付着現象の解析は、種々の研究が報告されている。以下に、(1) バイオフィルム、(2) 微生物の表面物性、(3) 微生物の付着挙動、(4) 微生物の付着力について、概要を記述する。

1.2.1 バイオフィルム

環境中の微生物は、浮遊微生物と付着微生物に大別され、付着微生物の 99.9% 以上は環境変化や化学物質などから身を守るために、生息密度の高いコロニーを形成する[36]。これらはバイオフィルムと呼ばれ、嫌気性微生物から好気性微生物まで、多様多種の微生物群で形成されるコミュニティーである。

バイオフィルムの形成は Fig. 1.1 のように進むと考えられている[17,37–39]。まず環境中のイオンや有機物などが吸着され、微生物が付着できる状態に固体表面がコンディショニングされる。次に、浮遊している菌体が液中での流れやブラウン運動または生物特有の鞭毛運動や線毛運動などにより付着表面に近づき、物理化学的相互作用による引力（van der Waals 力や静電気力）[17,18]に影響されて可逆的付着と脱離を繰り返す。ある菌体が固体表面に付着した際、生体活動に伴う細胞外高分子物質（Extra polymeric substance, EPS）の生成とともに、不可逆付着が起こり（固定化）、その菌体の増殖や、多層吸着を繰り返すことでバイオフィルムが発達する。バイオフィルムが成長するとともに、固体表面上に微生物が高密度化される。さらに発達すると、一部が浮遊して別の固体表面に付着し、広範囲にわたってバイオフィルムの形成が進行する。

バイオフィルム関連の研究は、2000 年代に入り急速に報告数が増加しており、2014 年では年間投稿数が 2000 報を超えた（Elsevier 社提供 Scopus より）。研究分野は、食品や医療などの身近な物から、環境、エネルギー、海洋構造物など多岐にわたる。しかし、それらはすべて、微生物と対象固体の界面の問題と見なすことができる。微生物と付着対象の表面について知ることは、バイオフィルムの形成メカニズムを解き明かすための原点となり、大変重要となる。

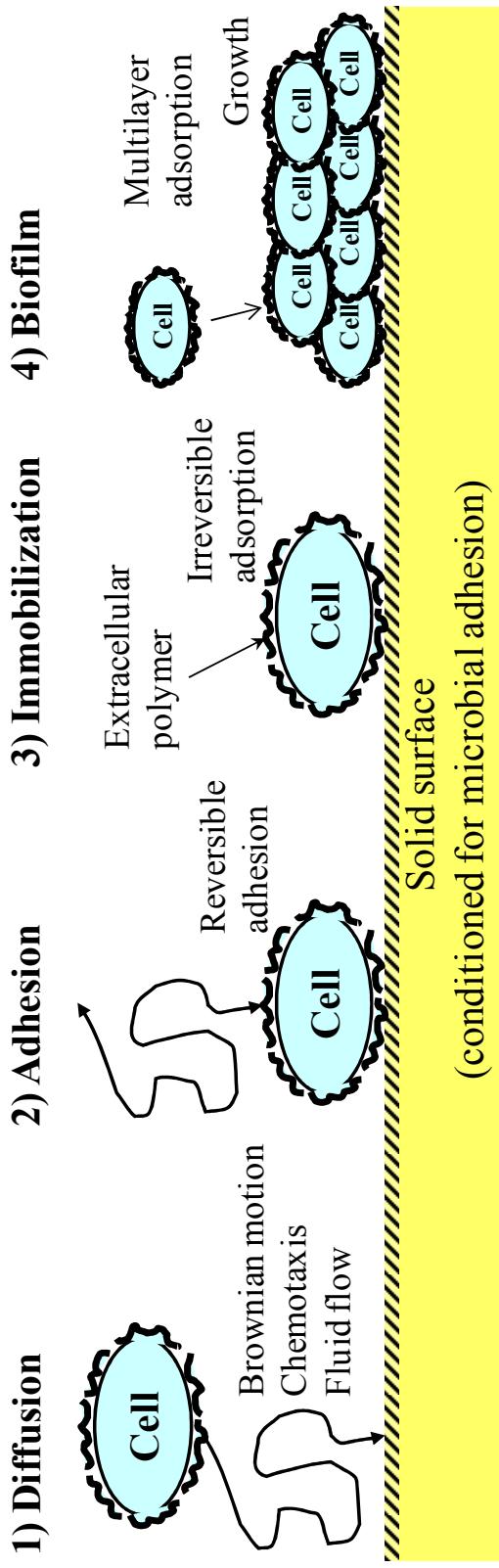


Fig. 1.1 Schematic of mechanism for biofilm formation onto solid surface. 1) Diffusion, a microbial cell floating in water approaches to the solid surface through brownian motion, chemotaxis, and fluid flow. 2) Adhesion, a reversible adhesion occurs near the surface when the attractive force acts between microbial and solid surface. 3) Immobilization, the microbial cell is irreversibly immobilized onto the solid surface by extracellular polymer substances (EPS). 4) Biofilm, a microcolony is formed from the growth of the immobilized cells and multilayer adsorption of cells floating in water.

1.2.2 微生物の表面物性

(1) 帯電特性

液中に分散した粒子は多くの場合、表面に存在する官能基の解離、イオン吸着等により表面に電荷を持ち、帯電している。表面が帯電している状態で粒子を電解質溶液に分散させた時、電解質イオン中の対イオンが粒子表層に導かれ、拡散電気二重層を形成する。この状態の粒子に外部から電場 E をかけると、この電場から力を受けて対電荷の電極方向に粒子が動き出す。粒子は次第に速度を増し、やがて電解質溶液からの粘性抵抗と力がつりあつたところで等速運動をする。この等速で移動する現象を電気泳動という。また、この時の速度を電気泳動速度といふ。外部電場の大きさ E が小さい範囲では電気泳動速度 v は E に比例する。そこで、電気泳動を評価するにあたつては v を E で割った量 (v/E) である電気泳動移動度 u を用いる。固体の球状粒子では、この u の計測結果から種々の導出式により、Fig. 1.2 に示す粒子と液が相対的に動く面(すべり面)を無限遠点から見たゼータ(ζ)電位を算出し、これを粒子界面電位に用いている。

ここで、粒子半径 a の球状剛体粒子 (Fig. 1.3a) が外部電場 E のもと、粘性率 η の液体中を速度 u で等速運動している場合を考える。この粒子の電荷を Q とした時、この粒子に働く電気力は QE であり、この力が粒子に働く Stokes の粘性抵抗とつりあうことから、粒子に働く力について Eq. (1.1) が成り立つ。

$$QE = 6\pi\eta au \quad (1.1)$$

球状粒子の表面電位 ψ_0 と電荷 Q の関係は次式で表すことができる。

$$\psi_0 = \frac{Q}{4\pi\epsilon_r\epsilon_0 a} \quad (1.2)$$

ここで、 ϵ_r は電解質溶液の比誘電率、 ϵ_0 は真空の誘電率である。表面電位をゼータ電位とみなすと、電気泳動移動度は Eq. (1.3) で与えられる。

$$u = \frac{2\epsilon_r\epsilon_0}{3\eta} \zeta \quad (1.3)$$

これは、Hückel の式[40]と呼ばれており、電気二重層の厚さが粒子の大きさに比べて十分に厚い ($a \ll 1/\kappa$)、または電気二重層が存在しない時に適用が可能である。 κ は Debye-Hückel のパラメータである。一方、 a が電気二重層厚さ $1/\kappa$ よりも十分に大きい場合には、Eq. (1.4) で表わされる Smoluchowski の式が用いられる[41,42]。

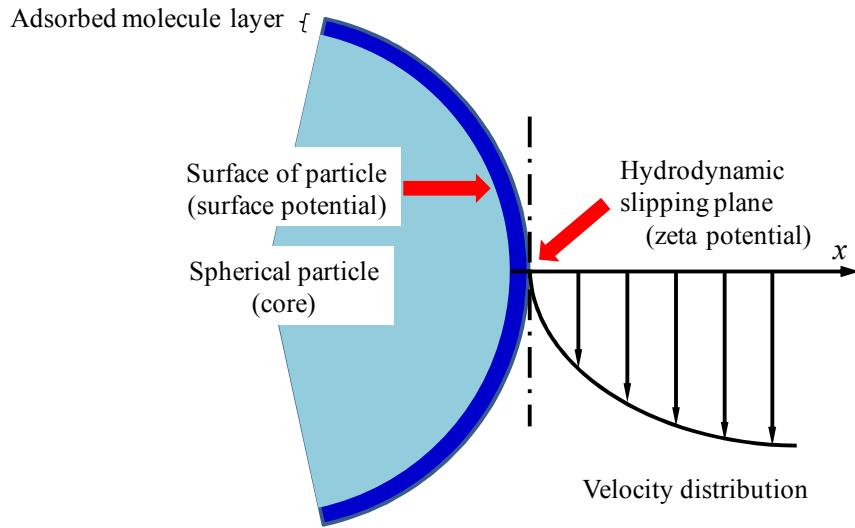


Fig. 1.2 Zeta potential and velocity distribution around a particle surface.

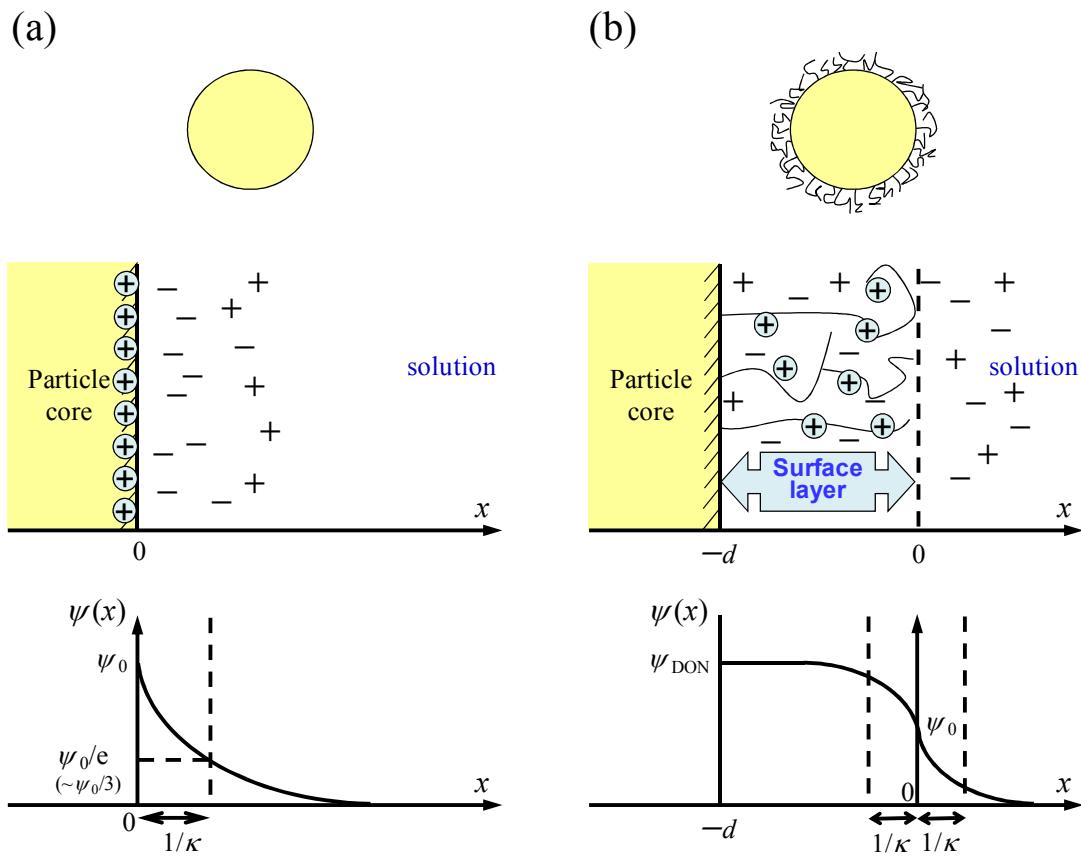


Fig. 1.3 Ion and potential distribution around a particle, (a) a hard surface and (b) a soft surface.

$$u = \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{\eta} \zeta \quad (1.4)$$

さらに、 $\kappa a \approx 1$ の場合は、粒子の存在による外部電場の歪みを考慮した式が必要となり、Eq. (1.5)で示す Henry の式[43]が提案されている。

$$u = \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{\eta} \zeta f(\kappa a) \quad (1.5)$$

ここで、 $f(\kappa a)$ は Henry 関数である。Henry 関数に関しては、誤差 1%未満の近似式が Ohshima によって導かれている[44]。

$$f(\kappa a) = \frac{2}{3} \left[1 + \frac{1}{2 \left(1 + \frac{2.5}{\kappa a \{ 1 + 2 \exp(-\kappa a) \}} \right)^3} \right] \quad (1.6)$$

ただし、これらは拡散電気二重層の変形（緩和効果）が無視できる、 ζ 電位が低い範囲でのみ適用が可能である。1 倍の対称型電解質において ζ 電位の大きさが約 50 mV [19] を超える場合は、Ohshima–Healy–White の式 ($\kappa a \geq 10$) [45] や O’Brien–White の数値計算プログラム ($\kappa a \leq 10$) [46] が適用される。

しかし、本論文で対象とする微生物細胞のように粒子表面が帶電した高分子層（表面電荷層）によって覆われている場合 (Fig. 1.3b)、表面電荷層の内部と外部の電解質溶液との間に電位差が発生する。この電位は Donnan 電位と呼ばれており、このような粒子の界面電気現象に深く関わるため、固体粒子が持つ ζ 電位の概念が適用できない。そこで大島らは、このような粒子を“柔らかい粒子”と命名し、電気泳動移動度に対して、以下の式を提案している[47–53]。

$$u = \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{\eta} \frac{\psi_0 / \kappa_m + \psi_{DON} / \lambda}{1 / \kappa_m + 1 / \lambda} + \frac{ZeN}{\eta \lambda^2} \quad (1.7)$$

ここで、 ψ_{DON} は高分子層の Donnan 電位、 ψ_0 は粒子の表面電位、 κ_m は表面電荷層内の Debye–Hückel のパラメータ、 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、 N は表面電荷層内に存在する解離基の密度である。 $1/\lambda$ は流れの浸入距離であり、柔らかさのパラメータである。また、 ψ_{DON} と ψ_0 、 κ_m はそれぞれ次の式で与えられる。

$$\psi_{\text{DON}} = \frac{kT}{ze} \ln \left[\frac{ZN}{2zn} + \left\{ 1 + \left(\frac{ZN}{2zn} \right)^2 \right\}^{1/2} \right] \quad (1.8)$$

$$\psi_0 = \frac{kT}{ze} \left(\ln \left[\frac{ZN}{2zn} + \left\{ 1 + \left(\frac{ZN}{2zn} \right)^2 \right\}^{1/2} \right] + \frac{2zn}{ZN} \left[1 - \left\{ 1 + \left(\frac{ZN}{2zn} \right)^2 \right\}^{1/2} \right] \right) \quad (1.9)$$

$$\kappa_m = \kappa \left\{ 1 + \left(\frac{ZN}{2zn} \right)^2 \right\}^{1/4} \quad (1.10)$$

$$\kappa = \left(\frac{2ne^2 z^2}{\epsilon_r \epsilon_0 kT} \right)^{1/2} \quad (1.11)$$

ここで、 k は Boltzmann 定数、 T は溶液の温度、 z は電解質溶液のイオン価数、 n は電解質溶液の個数濃度である。本理論では、柔らかい粒子の電気的挙動は、電荷密度 ZeN と柔らかさのパラメータ $1/\lambda$ で決定づけられる。

なお、本論文中で用いる粒子の表面電位は、球状粒子を仮定して評価を行った。円柱状粒子についてより詳細な考察を行う場合には、長手方向が電場方向に平行に移動する場合の移動度 $u_{//}$ と垂直に移動する場合の移動度 u_{\perp} を考慮した、平均移動度 u_{av} を用いる。

$$u_{av} = \frac{1}{3} u_{//} + \frac{2}{3} u_{\perp} \quad (1.12)$$

ここで、 $u_{//}$ は Eq. (1.4) の Smoluchowski の式で与えられ、 u_{\perp} は Henry 関数を Eq. (1.13) の近似式を用いて計算した Eq. (1.5) の Henry の式から求めることができる [54,55]。

$$f(\kappa a) = \frac{1}{2} \left[1 + \frac{1}{\left(1 + \frac{2.55}{\kappa a \{ 1 + \exp(-\kappa a) \}} \right)^2} \right] \quad (1.13)$$

また、円柱状の柔らかい粒子については、Eq. (1.12)において、 $u_{//}$ は Eq. (1.7)を用い、 u_{\perp} は大島 [56,57] によって導出されている Eq. (1.14)が適用される。

$$u_{\perp} = \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{\eta} \frac{\psi_0 / \kappa_m + \psi_{\text{DON}} / \lambda}{1 / \kappa_m + 1 / \lambda} f \left(\frac{d_L}{a} \right) + \frac{ZeN}{\eta \lambda^2} \quad (1.14)$$

ここで、

$$f\left(\frac{d_L}{a}\right) = \frac{1}{2} \left[1 + \frac{1}{(1+d_L/a)^2} \right] \quad (1.15)$$

なお、 $d_L/a \ll 1$ 、 $d_L/a \gg 1$ の場合は、極限を取ることで近似解を得ることができる。

(2) 表面張力

液相のバルクにある 1 個の分子に着目した際、Fig. 1.4 のようにその周囲に存在する分子との間には分子間力が働く。分子自体は熱運動により、逐次その位置を変えるが、絶えず周囲には別の分子が存在するため、同じような分子間力が働くことで比較的安定な状態を保つことができる。一方、液相が別の相（例えば、空気などの気相）と接し、界面を形成した時、液相表面に存在する分子に着目すると、そこに働く分子間力はバルク側と気相側の 2 方向から受けることとなる。しかし、バルク側の分子の密度が圧倒的に高い為、表面に存在する分子は、常にバルクに潜り込もうとする。その際に発生する、液相の表面積を小さくしようとする表面を縮めるように働く力が表面張力である[58,59]。一方、表面張力をエネルギーとして捉える場合、気相側に相互作用する相手分子が少ない為、それ自体のエネルギーを下げることができない。バルク分子と比較すると、その分だけエネルギーが高くなってしまい、この表面分子が持つ単位面積当たりの過剰なエネルギーが表面自由エネルギーと捉えられる。共に次元は $[MT^{-2}]$ となり、表面張力と表面自由エネルギーは等価となる。

$$\begin{cases} \text{Surface tension} = \left| \frac{\mathbf{N}}{\mathbf{m}} \right| = \left| \frac{\mathbf{kg} \cdot \mathbf{m}}{\mathbf{s}^2} \right| \left| \frac{1}{\mathbf{m}} \right| = \left| \frac{\mathbf{kg}}{\mathbf{s}^2} \right| \\ \text{Surface energy} = \left| \frac{\mathbf{J}}{\mathbf{m}^2} \right| = \left| \frac{\mathbf{kg} \cdot \mathbf{m}^2}{\mathbf{s}^2} \right| \left| \frac{1}{\mathbf{m}^2} \right| = \left| \frac{\mathbf{kg}}{\mathbf{s}^2} \right| \end{cases} \quad (1.16)$$

液体の表面張力の測定方法は、ガラスや白金板を用いて引上げ力を測定する Wilhelmy 法（プレート法、垂直板法）[60] や白金環を用いて引上げ力を測定する du Noüy 法（リング法、輪環法）[61]、針先に形成した液滴の形状を解析する懸滴法[62–64]などの方法が用いられるが、固体の表面張力は液体の場合と異なり、直接的測定が困難である。そこで、既知の表面張力を持つ液体を接触させた際の静的接触角を液滴法により測定することで、固体の表面自由エネルギーに対応する物性を推算する手法が用いられる。本論文で対象とする微生物表面に關

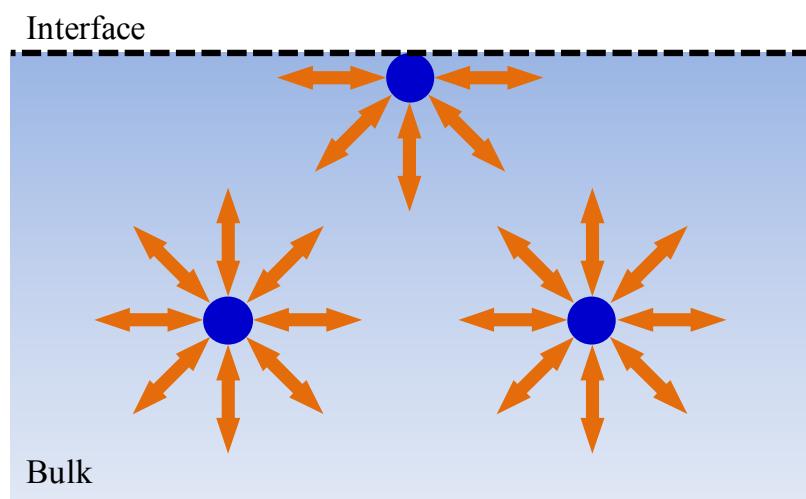


Fig. 1.4 The intermolecular interactions at the interface and the bulk solution.

しても、静的接触角測定法を用いた方法が用いられている。以下に計測方法と解析方法を述べる。

(2.1) 静的接触角測定

固体表面に1滴の液体を滴下した場合を考える。液滴は固体表面に接触した瞬間から固体表面でぬれ広がり始める。この時、端点では固体の表面張力と液体の表面張力、液体／固体間の界面張力の3つの力が働いており、ある場所で端点は停止する。この時、**Fig. 1.5**に示す固体／液体の端点で生じる角度 θ は接触角と呼ばれる。3つの力と接触角の関係は、次のYoungの式で表わされる[65]。

$$\gamma_{12} + \gamma_{13} \cos \theta = \gamma_{23} \quad (1.17)$$

ここで、粒子が固体表面に付着する際の、界面自由エネルギー変化についても考える。各表面エネルギーは**Fig. 1.6**のように γ_{13} 、 γ_{23} 界面が消失し、 γ_{12} 界面が生成するが、その際のエネルギーは保存されなければならないことから、界面部の自由エネルギー変化 ΔG_{12} は次のDupréの式で表わされる[66]。

$$\Delta G_{12} = \gamma_{12} - \gamma_{13} - \gamma_{23} \quad (1.18)$$

前節において、表面自由エネルギーは分子間力に由来する旨を述べた。そこでFowkes[67]は、表面自由エネルギーは分子間力の発現機構に基づいて成分分けできるという考え方を提唱し、GirifalcoとGood[68]は、界面では各成分の幾何平均が相互作用をするというBerthelotの幾何平均則を取り入れた。このことを発端にさまざまな成分分けの手法が提案されてきた。

(2.2) 固体の表面自由エネルギーの解析

固体の表面自由エネルギーを接触角から解析する手法として、種々が提案されている。以下に、代表的な方法について記述する。

(2.2.1) Owens-Wendt の方法 [69]

OwensとWendtは、表面自由エネルギー成分を分散成分(γ^d)と水素結合と双極子-双極子相互作用とに基づく成分(γ^h)に分けて考えている。

$$\gamma^{\text{Total}} = \gamma^d + \gamma^h \quad (1.19)$$

この理論において、各成分の相互作用エネルギーは幾何平均で表現される。

(2.2.2) Kaelble-Uy の方法 [70,71]

KaelbleとUyは、表面自由エネルギー成分を分散成分(γ^d)と極性成分(γ^p)に分けて考えている。

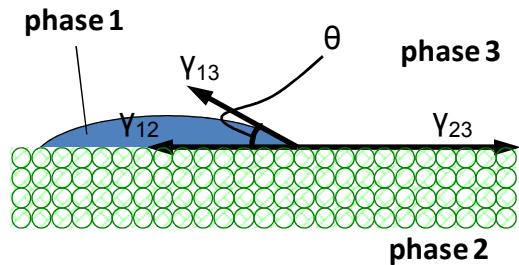


Fig. 1.5 Schematic of contact angle (θ) between a liquid (1), a solid or microbial lawn (2) and an air (3) phase, and the surface energies in the Young equation for a liquid on a solid (microbial lawn) surface. Where, γ_{12} is the solid (microbial lawn) / liquid interfacial free energy, γ_{23} is the solid (microbial lawn) surface free energy, and γ_{13} is the liquid surface free energy.

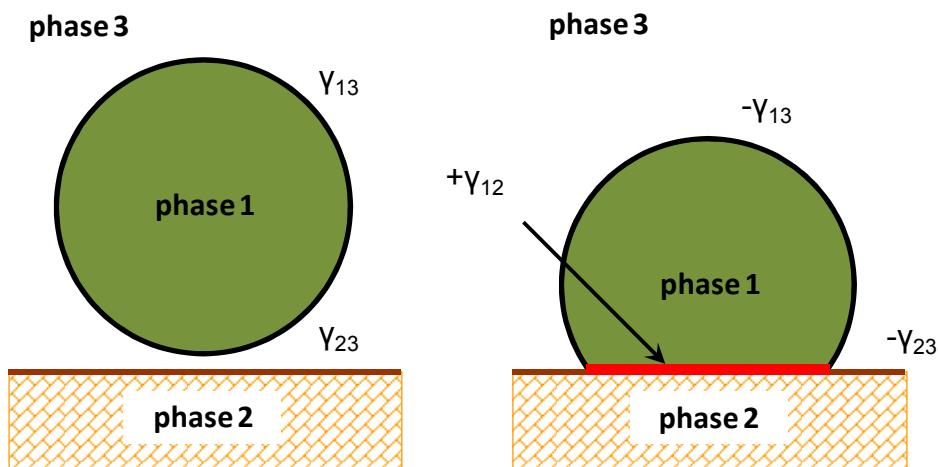


Fig. 1.6 Schematic of thermodynamic interfacial free energies changed in the adhesion of a liquid (1) to a solid (2) surface in an air (3) phase. In the case that the phase 3 is liquid, this schematic image shows the microbial adhesion in a liquid suspension for a microbial cell (1) and a solid (2) surface. In contrast, if both phase 1 and 2 are microbial cell, this image shows the adhesive interaction between two microbial cells (aggregation or coaggregation).

$$\gamma^{\text{Total}} = \gamma^d + \gamma^p \quad (1.20)$$

この理論において、各成分の相互作用エネルギーは幾何平均で表現される。

(2.2.3) Kitasaki-Hata の方法 [72-74]

北崎と畠は、表面自由エネルギー成分を3種に分ける手法を試みている。それぞれには、分散成分、極性成分、水素結合成分として表記されるが、水素結合成分は必要な場合にのみ考慮するとしている。

$$\gamma^{\text{Total}} = \gamma^d + \gamma^p + \gamma^h \quad (1.21)$$

この理論において、各成分の相互作用エネルギーは幾何平均で表現される。

(2.2.4) Wu の方法 [75,76]

Wu は、表面自由エネルギー成分を分散成分と極性成分に分けている。この点は、Kaelble-Uy の方法と同様であるが、各成分の相互作用エネルギーは、幾何平均ではなく調和平均で近似している点が他の理論とは異なる。

(2.2.5) 酸塩基理論 [69,77-79]

酸塩基理論では、表面自由エネルギー成分を Lifshitz-van der Waals (LW) 成分と Lewis 酸塩基 (AB) 成分に分けている。

$$\gamma^{\text{Total}} = \gamma^{\text{LW}} + \gamma^{\text{AB}} \quad (1.22)$$

この理論では LW 成分は非極性成分、AB 成分は極性成分として扱われる。また、各成分の相互作用エネルギーは幾何平均で表現される。

以上のように、種々の表面自由エネルギーの解析法について提案がされている。本論文では、微生物コロイド表面の表面自由エネルギーの解析方法としてよく用いられている酸塩基理論を用いた。本理論を用いた場合の固体の表面エネルギーの解析は下記の通りである。

まず Eq. (1.17) と Eq. (1.18) より γ_{12} と γ_{23} を消去し整理する。Young-Dupré の式が得られる。

$$\gamma_{13}(1+\cos\theta) = -\Delta G_{12} \quad (1.23)$$

次に、Fig. 1.4において、phase 1 を液体、phase 2 を表面張力測定対象の固体とする。その場合の液体と固体の表面自由エネルギーは酸塩基理論を用いると、次のように表記できる。

$$\gamma_{13}^{\text{Total}} = \gamma_{13}^{\text{LW}} + \gamma_{13}^{\text{AB}} \quad (1.24)$$

$$\gamma_{23}^{\text{Total}} = \gamma_{23}^{\text{LW}} + \gamma_{23}^{\text{AB}} \quad (1.25)$$

また、界面での LW 相互作用は、Good–Girifalco–Fowkes の結合規則から[80,81]、

$$\gamma_{12}^{\text{LW}} = \left(\sqrt{\gamma_{13}^{\text{LW}}} - \sqrt{\gamma_{23}^{\text{LW}}} \right)^2 = \gamma_{13}^{\text{LW}} + \gamma_{23}^{\text{LW}} - 2\sqrt{\gamma_{13}^{\text{LW}} \cdot \gamma_{23}^{\text{LW}}} \quad (1.26)$$

しかし、AB 相互作用は 2 つの非加法的なパラメータである電子供与成分と電子授与成分から構成されるため、界面での AB 成分の自由エネルギー変化は、

$$\Delta G_{12}^{\text{AB}} \equiv -2 \left(\sqrt{\gamma_{13}^+ \cdot \gamma_{23}^-} + \sqrt{\gamma_{13}^- \cdot \gamma_{23}^+} \right) \quad (1.27)$$

と定義される。ここで、成分 1 間の AB 成分自由エネルギー変化を考えると、

$$\Delta G_{11}^{\text{AB}} \equiv -4\sqrt{\gamma_{13}^+ \cdot \gamma_{13}^-} \quad (1.28)$$

Eq. (1.18)において、同様に成分 1 間の AB 成分を考え、Eq. (1.28)を代入すると、

$$\gamma_{13}^{\text{AB}} \equiv 2\sqrt{\gamma_{13}^+ \cdot \gamma_{13}^-} \quad (1.29)$$

ここで、Eq. (1.18)の AB 成分に Eqs. (1.27)と(1.29)を代入すると、

$$\begin{aligned} \gamma_{12}^{\text{AB}} &= \Delta G_{12}^{\text{AB}} + \gamma_{13}^{\text{AB}} + \gamma_{23}^{\text{AB}} \\ &= -2 \left(\sqrt{\gamma_{13}^+ \cdot \gamma_{23}^-} + \sqrt{\gamma_{13}^- \cdot \gamma_{23}^+} \right) + 2\sqrt{\gamma_{13}^- \cdot \gamma_{13}^+} + 2\sqrt{\gamma_{23}^- \cdot \gamma_{23}^+} \end{aligned} \quad (1.30)$$

Eqs. (1.18)と(1.26)、(1.27)を Eq. (1.23)に代入すると、酸塩基理論での Young–Dupré の式は、Eq. (1.31)となる。

$$\gamma_{13}(1 + \cos \theta) = 2 \left(\sqrt{\gamma_{13}^{\text{LW}} \cdot \gamma_{23}^{\text{LW}}} + \sqrt{\gamma_{13}^+ \cdot \gamma_{23}^-} + \sqrt{\gamma_{13}^- \cdot \gamma_{23}^+} \right) \quad (1.31)$$

3 種類以上の極性の異なる液滴の接触角を用いると、固体表面の表面エネルギーを推算することができる。また、この際の界面自由エネルギー変化 ΔG^{Total} は LW 成分と AB 成分の和として次のように表わされる[20,82–85]。

$$\Delta G^{\text{Total}} = \Delta G^{\text{LW}} + \Delta G^{\text{AB}} \quad (1.32)$$

$$\Delta G^{\text{LW}} = -2\sqrt{\gamma_{13}^{\text{LW}} \cdot \gamma_{23}^{\text{LW}}} = -2 \left(\sqrt{\gamma_1^{\text{LW}}} - \sqrt{\gamma_3^{\text{LW}}} \right) \left(\sqrt{\gamma_2^{\text{LW}}} - \sqrt{\gamma_3^{\text{LW}}} \right) \quad (1.33)$$

$$\Delta G^{AB} = 2\left(\sqrt{\gamma_1^+} - \sqrt{\gamma_2^+}\right)\left(\sqrt{\gamma_1^-} - \sqrt{\gamma_2^-}\right) - 2\left(\sqrt{\gamma_1^+} - \sqrt{\gamma_3^+}\right)\left(\sqrt{\gamma_1^-} - \sqrt{\gamma_3^-}\right) - 2\left(\sqrt{\gamma_2^+} - \sqrt{\gamma_3^+}\right)\left(\sqrt{\gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_3^-}\right) \quad (1.34)$$

ここで、phase 2が 1と同じ表面(同じ微生物細胞)である場合を考えると、Eq. (1.33)と Eq. (1.34)は以下の式にまとめることができる。

$$\Delta G^{LW} = -2\left(\sqrt{\gamma_1^{LW}} - \sqrt{\gamma_3^{LW}}\right)^2 \quad (1.35)$$

$$\Delta G^{AB} = -4\left(\sqrt{\gamma_1^+} - \sqrt{\gamma_3^+}\right)\left(\sqrt{\gamma_1^-} - \sqrt{\gamma_3^-}\right) \quad (1.36)$$

Eq. (1.35)を見ると、 ΔG^{LW} は必ず負の値を示す。しかし、微生物細胞同士を考えた場合、微生物表面の非極性成分は水に近い場合が多く[86]、媒体が水の場合、 ΔG^{LW} の値はそれほど大きくはない。よって、水中における微生物細胞同士の場合、 ΔG^{AB} が負のとき凝集が起こる可能性が高いと考えられる。

(3) 表面官能基

表面官能基は、付着界面に影響を与える重要な因子である。以下では、本論文で取り扱った微生物表面の官能基の分析方法として、(1) 赤外分光法、(2) ラマン散乱法、(3) 酸塩基滴定法、について概説を述べる。

(3. 1) 赤外分光法

分析対象物に対し、赤外領域の光の吸収や発光を赤外光の波数の関数として計測すると、赤外スペクトルが得られる。この中には主に物質固有の振動スペクトルが現れており、解析することで物質の状態分析が可能である。測定方法は透過測定法と反射測定法に分けられる。本論文では、反射測定法の中でも全反射 (Attenuated total reflection, ATR) 測定を用いて固体表面の赤外分光分析を行った。ただし、空間分解能は $10 \mu\text{m}$ 程度であるため、微生物のような大きさが $1 \mu\text{m}$ 程度のコロイド粒子を測定する際には、ATR セル上に微生物薄膜を形成させたものを測定する。微生物の ATR 測定は実績が多数あり、代表的な吸収位置を

Table 1.1 に示す。

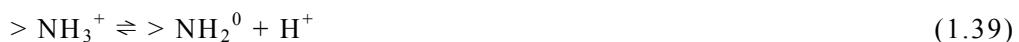
(3. 2) ラマン散乱法

対象とする物質に光を照射し、散乱光の振動数と入射光の振動数の差に対して、散乱光強度を測定するとラマンスペクトルが得られる。ラマン散乱光は散乱光

の内、入射光と異なる振動数の光のことであり、入射光と散乱光のエネルギー差（振動数差）をラマンシフトと言う。ただし、赤外分光と同様に物質の振動スペクトルが現れるが、各振動バンドの相対強度は両者で異なるため、相互補完的に用いられる。空間分解能は 1 μm 程度であるため、赤外分光よりも高く、微生物のようなコロイド粒子をピンポイントで測定することも可能である。また、赤外分光とは異なり、水中での粒子分析や、ガラスなどの透明容器中の試料のスペクトルも得ることができる。さらに近年、高感度手法として、表面増強ラマン散乱（Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS）法が用いられている。SERS は金属表面（Ag, Au, Cu, Pt など）に設けられた数十 nm の凹凸に吸着した分子に対し、レーザを照射すると、表面局所プラズモン共鳴により異常に大きなラマン散乱を示す現象を利用している。本手法は微生物の表面分析にも利用されてきており、微生物細胞に見られる代表的な吸収位置を **Table 1.2** に示す。

(3.3) 酸塩基滴定法

表面官能基は解離することによって、表面電荷に作用している。微生物表面にはカルボキシル基、アミノ基、リン酸基およびヒドロキシル基のような官能基が存在する。それぞれの官能基は溶液の pH に応じて、次式のように解離する[87–89]。



ここで、“>”は官能基が存在する細胞表面の高分子成分を示す。これらの反応は、



にまとめることができ、Eqs. (1.41)と(1.42)の平衡定数は、

$$\frac{\{>\text{RO}^-\}[\text{H}^+]}{\{>\text{RH}^0\}} = K_1, \quad \frac{\{>\text{ROH}^0\}[\text{H}^+]}{\{>\text{ROH}_2^+\}} = K_2 \quad (1.43)$$

である。よって、それぞれの反応における $\text{p}K_a$ は Eq. (1.44) で表される。

$$\text{p}K_a = -\log K \quad (1.44)$$

これより、溶液の pH を測定することで表面官能基の解離定数を推察することができる。解離定数を推察することで、表面に存在する官能基を特定するこ

Table 1.1

Assignment of the Fourier transform infrared (FTIR) bands of microbial cell [90–97].

Peak position (cm^{-1})	Assignment	Main group with source	References
~1735–1745	ν_{as} (C=O)	fatty acid	[91]
~1720–1730	ν_{as} (COOH)	protonated carboxylic acid group	[90,96,97]
~1700–1710	ν_{as} (C=O)	carboxylic groups	[91,94,95]
~1637–1652	ν (C=O)	amide I (Proteins)	[90–97]
~1595	δ (O–H)	Water	[94]
~1540–1550	δ (N–H), ν (C–N)	amide II (Proteins)	[90–97]
~1450–1482	δ_{sc} (CH ₂), δ_{sc} (CH ₃)	fatty acid	[90–95,97]
~1360–1450	ν_{s} (COO [−])	carboxylic acids	[90–95,97]
~1400	ν_{s} (C=O)	COO [−] of carboxylic groups	[94,96]
~1200–1260	ν_{as} (PO ₂ [−])	phosphoryl group, nucleic acid	[90–95,97]
~1233–1260	ν (C–O), ν (C–O–C)	–COOH, esters	[94,97]
~900–1200		polysaccharides, nucleic acid	[90–95,97]

Table 1.2

Assignment of the Raman bands of microbial cell [98–106].

Peak position (cm^{-1})	Assignment	Main group with source	References
~1612–1680		Amide I (Proteins)	[98,101–103,105]
~1540–1650	ν_{as} (COO [−])	Carbohydrates	[101–104]
~1360–1450	ν_{s} (COO [−])	Carbohydrates	[101–104]
~1200–1350		Amide III (Proteins)	[98,100–105]
~1135–1145	NH ₂ twist	Proteins	[101]
~1000–1003	Ring breath Phe	Phenylalanine (Proteins)	[98,101–106]
~1000–1200	ν (C–C), C–O–C Glycosidic link	Carbohydrates	[101–103]
~780–800	C, U	DNA/RNA	[101,102]
~720–730	ν_{s} (CH ₂), ν_{as} (CH ₂)	Polysaccharide	[102–104]
~670–720	A	DNA/RNA	[98,100,103]

とができると考えられる。しかし、表面官能基が解離することによって生じた水素イオンが、バルク層中にどのように拡散していくかによって溶液 pH は異なってくる。現在、表面官能基の解離によって生じたイオンの拡散モデルとして、以下のモデルが提案されている。

(3.3.1) 非静電モデル (Non-Electrostatic Model, NEM) [94,107–109]

固体表面上に荷電因子が集まっているとするモデルであり模式図を **Fig. 1.7a** に示す。NEM では解離定数が一定であるとし、Eq. (1.43)を用いて解離定数の計算を行う。

(3.3.2) 拡散層モデル (Diffuse Layer Model, DLM) [110]

模式図を **Fig. 1.7b** に示す。表面に電荷を持つような場合、平衡定数は Eq. (1.41) に加えて、Eq. (1.45)で表される。

$$K_{\text{intrinsic}} = K_{\text{observed}} \exp\left(\frac{zF_r\psi}{RT}\right) \quad (1.45)$$

ここで、 R は気体定数、 T は温度、 z は電解質の価数、 F_r はファラデー定数である。ある表面官能基における溶液中の物質収支は Eq. (1.43)より、

$$\{>\text{ROH}\}_{\text{Total}} = \{>\text{ROH}^0\} + \{>\text{RO}^-\} + \{>\text{ROH}_2^+\} \quad (1.46)$$

で表され、官能基濃度が算出される。また、面電荷密度 σ は Eq. (1.47)から求まる。

$$\sigma = F_r \sum_j \left(\frac{-\{>\text{RO}^-\}_j + \{>\text{ROH}_2^+\}_j}{SSA} \right) \quad (1.47)$$

なお、電位 ψ は Eq. (1.48)で表される。

$$\psi = \frac{2RT}{zF_r} \sinh^{-1} \left(\frac{\sigma}{\sqrt{8RT\varepsilon_r\varepsilon_0 c}} \right) \quad (1.48)$$

(3.3.3) 定容量モデル (Constant Capacitance Model, CCM) [87–89,93,109,111–119]

模式図を **Fig. 1.7c** に示す。CCM では DLM の Eq. (1.47)で、面電荷密度 σ と表面電位 ψ の間に Eq. (1.49)が成立する。

$$\psi = \sigma/C, \quad (1.49)$$

ここで、 C を容量と呼ぶ。ただし、CCM では DLM と比較して式を簡略化できるが、Eq. (1.48)を使わないとめイオン強度による表面電位の変化は考慮していない。

(3.3.4) ドナン容量モデル (Donnan Shell Model, DSM) [120–124]

模式図を Fig. 1.7d に示す。DLM や CCM では表面電荷が表面に出てきていると仮定しているが、DSM では電荷がメンブラン状の表層空間（シェル）に分布していると仮定している。単位シェルにおける体積電荷密度は、Eq. (1.50)で表される。

$$\sigma_s = \sum_j \left(\frac{-\{>\text{RO}^-\}_j + \{>\text{ROH}_2^+\}_j}{DV} F \right) \quad (1.50)$$

ここで、 DV は Donnan 容量であり、Donnan 電位 ψ_{DON} は Eq. (1.51)で表わされる。

$$\psi_{\text{DON}} = \frac{RT}{zF_r} \sinh^{-1} \left(\frac{\sigma_s}{2zF_r c} \right) \quad (1.51)$$

柔らかい粒子モデルでは、Donnan 電位を用いて解析を行っている。また、Donnan 電位は Eq. (1.52)で表現することもできる。

$$\psi_{\text{DON}} = \frac{RT}{zF_r} \sinh^{-1} \left(\frac{\alpha_D z_g [L_T]}{2zc} \right) \quad (1.52)$$

ここで、 c は電解質濃度、 $\alpha_D z_g [L_T] = ZN$ は表面電荷層内の固定電荷密度である。 α_D は Eq. (1.53)で与えられる。

$$\alpha_D = \alpha_n + \left[\frac{[\text{H}^+]_{\text{bulk}} - \frac{K_w}{[\text{H}^+]_{\text{bulk}} \gamma_\pm^2}}{[L_T]} \right] \quad (1.53)$$

$[\text{H}^+]$ はバルク層の水素イオン濃度、 K_w は水のイオン積、 γ は活量、 $[L_T]$ は全表面官能基濃度であり、 α_n は Eq. (1.54)で与えられる。

$$\alpha_n = \text{moles OH}^-_{\text{added}} / \text{moles } [L_T] \quad (1.54)$$

この他にもシュテルンモデル (Basic Stern Model, BSM / Double Layer Model, DLM) [87,117,125] や三層モデル (Triple Layer Model, TLM / Three Plane Model, TPM) [117,126]、Langmuir Isotherm Model (Langmuir–Freundlich Model) [108,109,127]、Donnan Electrostatic Model (NICA(non ideal competitive adsorption)–Donnan Model) [122,128–130]、表面錯体生成モデル (Surface Complexation Model, SCM) [87,131–133] などが考案されている。酸塩基滴定法では、得られた水素イオン濃度バランスを各種理論でフィッティングし、官能基濃度を最適化することで、FTIR 測定など別の官能基比を測定できる手法を併用して粒子表面の電荷密度や官能基密度の考察が可能である。

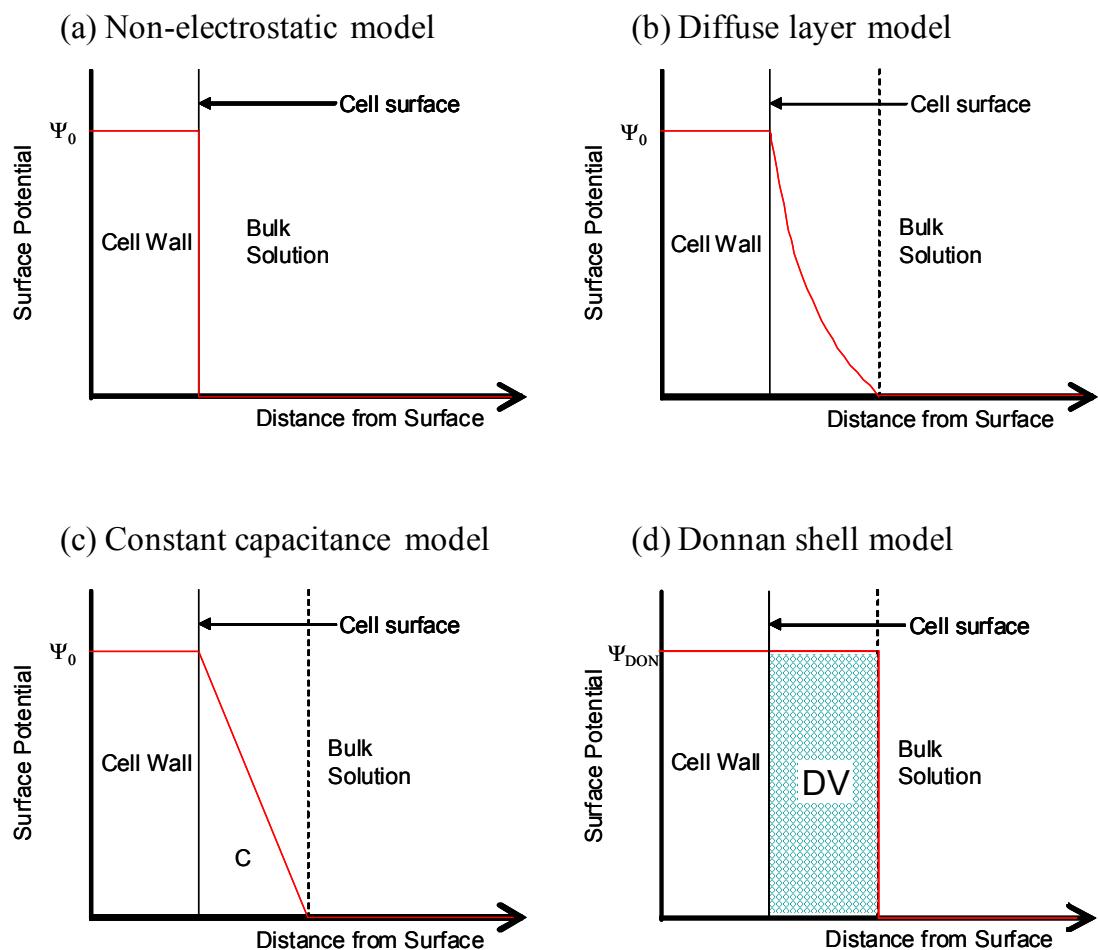


Fig. 1.7 Schematic of several versions of surface layer model.

1.2.3 微生物の付着挙動

(1) DLVO 理論

DLVO 理論はコロイド分散液の安定性を評価する理論として Hamaker により提案されていたが[134]、1941 年にロシアの研究者である Derjaguin と Landau が、1948 年にはオランダの研究者である Verwey と Overbeek においても同様の理論を発表した。後に発表者の名前を取って DLVO 理論と命名された[77,135–142]。本理論においてコロイドの分散性は、van der Waals 相互作用エネルギー V_{LW} と電気的相互作用エネルギー V_{EL} の和によって評価される。球状粒子間モデルの場合、それぞれの相互作用は以下の式で与えられる[143–146]。

$$V = V_{\text{LW}} + V_{\text{EL}} \quad (1.55)$$

$$V_{\text{LW}} = -\frac{Aa_1a_2}{6(a_1 + a_2)d} \quad (1.56)$$

$$V_{\text{EL}} = \frac{\pi\varepsilon_r\varepsilon_0a_1a_2(\psi_1^2 + \psi_2^2)}{a_1 + a_2} \left\{ \frac{2\psi_1\psi_2}{\psi_1^2 + \psi_2^2} \ln\left(\frac{1+e^{-\kappa d}}{1-e^{-\kappa d}}\right) + \ln(1-e^{-2\kappa d}) \right\} \quad (1.57)$$

ここで、 A は Hamaker 定数、 a は粒子半径、 d は球表面間の分離距離、 ψ は粒子の表面電位を示し、下添字 1 と 2 はそれぞれの粒子を示す。Hamaker 定数は次式で与えられる[19,20,146]。

$$A = -12\pi d_0^2 \Delta G^{\text{LW}} \quad (1.58)$$

ここで、 d_0 は最接近距離であり、本論文では $d_0 = 1.57 \times 10^{-10}$ m を用いる[83,145–147]。なお、球平板間相互作用を考える場合には、Eqs. (1.56) と (1.57) で $a_2 \rightarrow \infty$ とした Eqs. (1.59) と (1.60) で計算することができる。

$$V_{\text{LW}} = -\frac{Aa_1}{6d} \quad (1.59)$$

$$V_{\text{EL}} = \pi\varepsilon_r\varepsilon_0a_1(\psi_1^2 + \psi_2^2) \left\{ \frac{2\psi_1\psi_2}{\psi_1^2 + \psi_2^2} \ln\left(\frac{1+e^{-\kappa d}}{1-e^{-\kappa d}}\right) + \ln(1-e^{-2\kappa d}) \right\} \quad (1.60)$$

(2) 拡張 DLVO 理論

微生物の付着機構を議論する際に、先述の DLVO 理論とは別に表面自由エネルギー変化を考慮する熱力学的アプローチからの考察が行われてきた[148]。熱力学的アプローチは DLVO 理論とは矛盾する面もあるが、親水表面には親水性微生物が付着しやすく、疎水表面には疎水性微生物が付着しやすいという経験

論に当てはまる[149]。そこで、van Ossらは Lifshitz 理論において熱力学項を考慮したことに始まり、界面張力 γ^{Total} を Eq. (1.22) のように Lifshitz–van der Waals 成分 γ^{LW} と Lewis の酸塩基成分 γ^{AB} に分けるという Fowkes の理論を組み込んだ拡張 DLVO 理論を提唱した[79,150]。拡張 DLVO 理論において 2 種の物質間に働く相互作用エネルギー V_T は、Lifshitz–van der Waals 相互作用 V_{LW} 、電気的相互作用 V_{EL} 、酸塩基相互作用 V_{AB} の和として表される。

$$V = V_{\text{LW}} + V_{\text{EL}} + V_{\text{AB}} \quad (1.61)$$

球状粒子間モデルの場合、 V_{AB} は下記の式で表わされる[145,148,151]。

$$V_{\text{AB}} = 2\pi \frac{a_1 a_2}{a_1 + a_2} \chi \Delta G^{\text{AB}} \exp\left(\frac{d_0 - d}{\chi}\right) \quad (1.62)$$

χ は電解液中での遅延長さを示し、0.6 nm を用いて計算する[19,79,152]。

1.2.4 微生物の付着力

環境浄化のようにバイオフィルムの代謝を利用して有害物を無害化できる場合もあれば、体内で発達することで、生体疾患の原因となることもある。そのため、これまでにバイオフィルムの発達を制御するために微生物の初期付着現象について、付着表面のモルフォロジーや物理化学的特性、環境因子、微生物そのものの性質など、様々な側面から解析が試みられてきた[17]。微生物の付着力を評価・測定する方法についても付着現象を解析するためのアプローチとして、種々の研究が行われてきた[28]。その一つとして、1980 年代初頭から研究が進められている流動場を用いる方法が挙げられる。流動場を用いると、微生物が付着しないために必要な、または一度付着させた微生物を脱離させるために必要な流体力学的作用力を評価することが可能である。また、2000 年前後に、物理化学的相互作用力を評価する DLVO 理論を用いて、付着力を推定する方法が盛んに報告された。さらに、近年は機器が高性能化したため、より微小領域についても検討できるようになったことから、付着力を直接測定することも可能となった。その代表として原子間力顕微鏡や光ピンセットが用いられている。しかし、付着力の直接測定法では、個々の微生物に着目して定量評価が可能である一方、微生物群として測定するには工数を要する点や、基材に対して垂直方向の力の検出には優れているが、一般環境中で生じる流動場のような

せん断方向の力の影響との分離が難しい点[30]などの短所も有しております。現在でも流動場を用いる測定方法は用いられ続けている。以下に、生物学的ケースにおいて付着挙動や付着力を測定する手法に関して、代表的なものを示す[153]。

(1) マイクロピペット吸引 (Micro Pipette Aspiration, MPA) 法[154,155]

主に、動物細胞の付着特性評価に用いられる手法。マイクロピペットで単一細胞を吸引し、管内に入った細胞の伸びや大きさを *in situ* で観察し、解析を行う。マイクロピペットの管径や吸引圧などをパラメータとすることで、細胞の評価が可能。細胞表面の弾性や粘性、蛍光観察を併用すると表層の脂質やタンパク質の分布などが評価できる手法である。

(2) バイオコロイドプローブ AFM 法[22–24,156]

AFM は、探針と試料表面との間に及ぼされる力を pN オーダーで検出できる高精度の力測定器である。力の検出は非接触であるため、探針－試料間距離をサブナノメートルの精度で制御しながらの測定が可能である。特に、生理食塩水下でも精度良い測定ができるため、生物学の領域でも分子間力相互作用の知見を得るために、用いられるようになっている。1998 年に Bowen ら[156]は、微生物細胞を探針に直接取り付けた “cell probe” を用いて、微生物と固体表面間の付着力の測定に成功した。また、固体表面から脱離する際のフォースカーブを詳細に解析することで、バイオポリマーによる付着機構などの分析に用いられるようになった[157]。しかしながら、AFM は定常状態中の付着力の測定に優れるが、検出部であるプローブに負荷がかかる流動場中の付着力測定には不向きという欠点がある[26]。また、AFM で測定できる付着力は垂直離型力として出力され、自然環境中で発生すると考えられるせん断方向における付着状態を正確に評価することは難しい。

(3) 生体膜カプローブ (Biomembrane Force Probe, BFP) 法[158–160]

MPA 法と AFM 法をベースに改良された細胞間の接着強度を測定する手法で、主に内皮細胞の接着性を測定する際に用いられている。赤血球膜をバネプローブとして利用する方法で、バネ定数が 0.1~3 pN/nm と非常に小さいため、細胞膜上の分子間相互作用や構造安定性の測定に向いている。方法はマイクロピペット内に吸引した細胞をプローブに押し付け、ピペット端部に取り付けられたマノメータにより、吸引圧と押付圧を測定することで、細胞間の接着力を解析す

る。測定領域は、 $0.5 \sim 10^3$ pN と幅広いレンジで検出できる点が特徴である。

(4) せん断流脱離 (Shear Flow Detachment, SFD) 法

コーンプレート型流れ場 (Cone-and-plate flow chamber, CPFC) [155,161] もしくは平行平板流れ場 (Parallel-plate flow chamber, PPFC) [18,27–31,162] を用いる方法が挙げられる。CPFC はコーンプレートの間に微生物懸濁液を入れ、コーンプレートの回転によって下板に付着した微生物にせん断力をかけることで、付着挙動を測定する方法である。この仕組みは、主に粘弾性測定に使われており、微生物の測定法としては、例が多くないため、以下では PPFC について記す。

PPFC 装置は、マイクロ流路であることから流体を層流域にコントロールして供給することができるため、*in vitro* 試験に有用である[33–35]。このようなマイクロ流路は、微生物の付着やバイオフィルム形成の研究に 1970 年代後半から用いられるようになり[163]、1990 年代前半には Busscher らのグループにより解析手法の基礎が築かれた[164–168]。コンピュータの発展と共に、数百の付着粒子について *in situ* で計測を行うことができるようになったため、統計的な解析もより簡便となり、現在でも種々の系において利用されている[18,27–32,162,169,170]。

以上のように、微生物をはじめとするバイオポリマーを表層に持つ粒子に関して、その付着現象を解析するための様々な手法が提案されている。これらは、同種もしくは異種界面での付着挙動を検証するためのツールとして用いることができるため、工業プロセスにおいて粒子付着を制御するための解析手法としても利用が期待できる。本論文では、利用例としてメタン発酵プロセスと、粒子複合化プロセスへの応用を試み、有用性の検証を行った。

1.2.5 メタン発酵プロセス

メタン発酵は、有機性廃棄物からバイオエネルギーを抽出するバイオプロセス技術として古くから知られているが、国内では平成 12 年に施行された循環型社会形成推進基本法の整備と共に、廃棄物、リサイクル政策の基盤が確立されたことで、廃棄物系バイオマスの再資源技術として再注目されることとなった。しかし、メタン発酵技術には、発酵効率や処理速度への課題がある。

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 1 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[171,172]。メタン発酵プロセスの概略を **Fig. 1.8** に示す。有機物が嫌気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[173]。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古細菌の働きによってメタンと二酸化炭素へと変換される。

メタン発酵で発生するメタンの約 70%は、液化段階で生成した酢酸に由来する[174,175]が、多くの発酵性微生物にとって酢酸は主要生成物であり、酢酸を資化できる菌種は少ない。メタン生成古細菌の中でも酢酸をエネルギー源として利用できる菌種は *Methanosaeta* 属のわずか 2 属しか見つかっていない[176–178]。これらのメタン生成古細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、メタン発酵ではこの酢酸からメタンへの変換過程が律速段階となる[171,179,180]。また、発酵槽内のメタン生成古細菌が流出してしまう点も発酵効率が低い一因であり、未消化の残渣処理も必要なため、まだ多くの課題を抱えているのが現状である。したがって、こ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、この酢酸資化性メタン生成古細菌を発酵槽内で高濃度に保持することが必要不可欠となる。

メタン生成古細菌を高密度に含む粒状菌体塊をグラニュールという。このグラニュールを利用することで、廃水処理能力を比較的高く引き上げたリアクターが、上向流嫌気性スラッジブランケット (Upflow anaerobic sludge blanket, UASB) リアクターである。近年ではより改良を施した、嫌気性バッフルドリアクター (Anaerobic baffled reactor, ABR) [181,182] や分割供給型嫌気性バッフルドリアクター (Split-feed anaerobic baffled reactor, SFABR) [183]、可逆流入型嫌気性バッフルドリアクター (Reversible flow anaerobic baffled reactor, RABR) [184]、ハイブリッドメンブレンエアレーション型バイオフィルムリアクター (Hybrid membrane-aerated biofilm reactor, HMABR) [185,186]、などが提案されている。いずれのリアクターも、発酵槽内のメタン生成古細菌を高濃度に保持し、立ち上げを高速する目的で開発さ

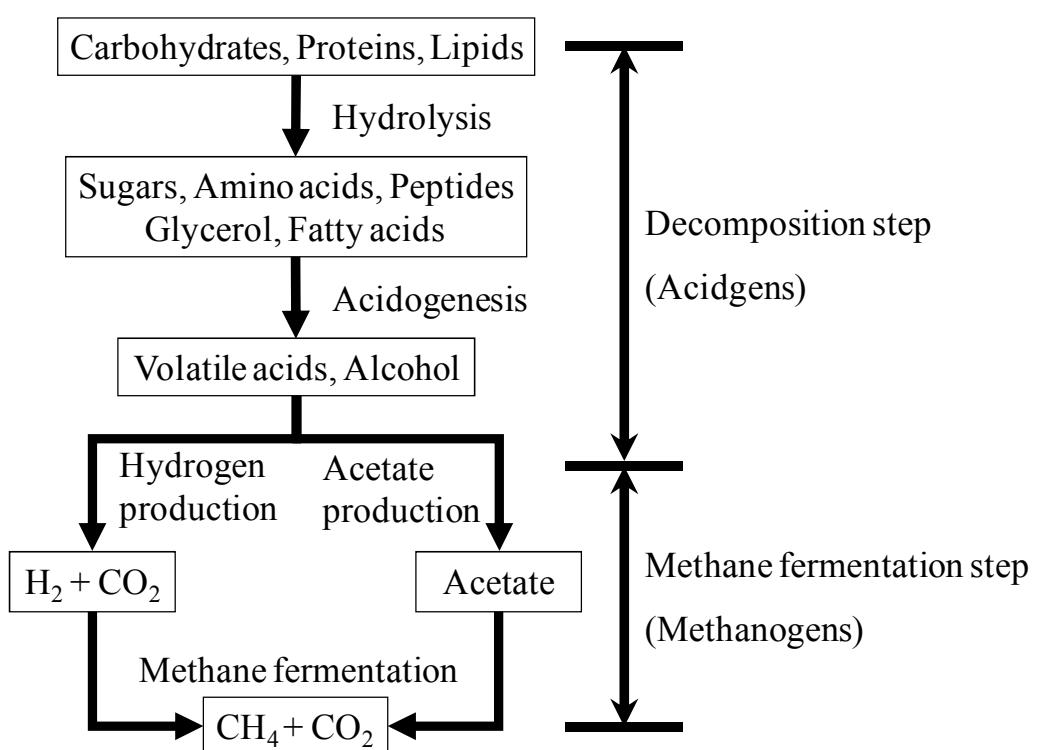


Fig. 1.8 Schematic drawing of methane fermentation process.

れた。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や担体として疎水性表面が適することなどが報告されており、HMABR[185,186]の開発などに繋がった。

ここで、UASB や SFABR で形成されるグラニュールの核である糸状菌の *Methanosaeta* 属[183,187,188]は酢酸のみを選択的に資化することができるが、資化速度はそれほど高くはない。一方、基質親和性は *Methanosaeta* 属程ではないにせよ *Methanosarcina* 属は広い基質資化性を有しており[189]、*Methanosaeta* 属よりも酢酸を早く資化できる[190]。これらの 2 属のメタン生成古細菌を高濃度でリアクター内に固定化できれば、発酵効率のさらなる向上が期待できる。Rocheleau ら[191]はこれらの 2 属の菌から構成されるグラニュール断面の構造について、共焦点レーザ顕微鏡を用いた染色観察を行っている。その結果、*Methanosaeta concilii* と共生微生物群からなるコアの表層に、*Methanosarcina barkeri* の層が存在する多層構造を有していると報告しており、メタン発酵プロセスにとってこれら 2 属は重要な役割を担っていると考えられる。

しかし、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る場合、メタン発酵に関わる微生物群が変化してしまい、担体に固定化される菌種が異なることがある。これは、その固定化メカニズムはまだ十分に理解されていないことが一つの原因であり[171]、選択的にメタン生成古細菌を固定化した安定的なグラニュールの形成には、メタン生成古細菌の付着メカニズムを明らかにすることが必要である。

1.2.6 粒子複合化プロセス

産業分野の様々な製造プロセスにおいて、粉体の混合操作が利用されている。この混合プロセスでの課題の一つとして、偏析の防止が挙げられる。従来、対策としては、主に水平円筒型混合機やリボン混合機について制御条件の検討が進められてきた[192,193]。しかし、混合プロセス以外の輸送や供給プロセスなどでも再偏析する場合があり、単一の単位操作のみによる偏析防止は困難であった。近年、トナーや化粧品、顔料などの精密混合が要求される分野では、特に高度な製品品質が要求されるため、偏析の防止策として、分散や微粉碎、表面

改質などと組み合わせたハイブリッドプロセスが用いられている。特にトナー製造プロセスでは、処方粉体（バインダ樹脂や着色剤、電荷制御剤、離型剤）を流動型混合機で分散混合し、ジェットミルにより得られた粉碎物を所定の粒度になるように分級したコア粒子に対し、流動性や帶電性、クリーニング性を改善するためにコロイダルシリカや酸化チタン、アルミナなどの微粒子が高速流動型混合機によりコーティング処理されている[194]。また、鉄系粉末冶金分野において上ノ菌ら[195,196]は、鉄粉表面に黒鉛粉およびバインダ成分を固着させ、潤滑剤を混ぜたワックス系偏析防止プレミックス粉について紹介している。このような偏析防止粉は自動車焼結部品などに用いられ、混合粉を構成する各種粉末の比重差によるプロセス中（混合から焼結部品の成形工程まで）での偏析防止による品質ばらつきや発塵の低減に役立っている。

また、粉体操作のもう一つの課題として、原料の装置内への付着による閉塞や収率の低下が挙げられる。粉体の付着現象についての研究は古くから行われており[197,198]、静電気的理論や拡散理論、化学的理論などが提唱されている。その中で Sharpe と Schonhorn[199]などが、付着を完全に界面現象として捉え、Young–Dupréの式から熱力学的に説明しようとする熱力学理論を1960年代前半に提唱した。

高分子物質の固体粒子表面への複合化処理（コーティング）により、コアシェル型粒子を作製した場合を考える。この処理は、粒子表面に高分子物質が付着する界面現象と捉える事ができる。物質界面の性質を表すパラメータの一つとして表面エネルギーが挙げられるが、その測定方法としては種々の手法が提案されてきた[200]。固体の表面エネルギーの評価方法は、液滴法による接触角測定を用いた解析が簡便である。接触角は基材表面と液滴、媒体（空気など）間の熱力学的なエネルギー収支を表しており、液滴を固体表面に滴下した際の接触角を Young の式を用いて解析することで、表面エネルギーを見積もることができる。高分子物質が固体粒子表面に付着した際に形成される界面では、固体粒子と媒体空気、高分子物質と媒体空気の界面が消滅し、新たに固体粒子と高分子物質の界面が形成することから、自由エネルギー変化 ΔG が生じる。 ΔG が負に大きいほど、熱力学的に現象は自発的に進行し、高分子物質の固体表面への付着が促進されると考えられる。

van Oss ら[19,78]は、表面エネルギー γ^{Total} を Lifshitz-van der Waals 非極性相互作用(LW)と酸塩基相互作用(AB)成分に分ける方法を提案しており Eq. (1.22)で表される。この方法では、Young-Dupréの式は Eq. (1.31)で表わされる。以下、Eq. (1.31)での下添字 13 は液体を表わす“L”、下添字 23 は固体を表わす“S”と表記する。

Borras [201]は、表面に凹凸がある場合、表面積を考慮した接触角の補正が必要と報告しており、その補正式として Wenzel の式[202,203]や Cassie の式を挙げている。固体表面の凹凸が比較的小さく、液が凹部を十分満たす場合、実面積係数 r で補正した Eq. (1.63)に示す Wenzel の式が用いられる[204]。

$$\cos\theta_W = r \cos\theta \quad (1.63)$$

ここで、 θ_W は粗面上における接触角である。

したがって、Eq. (1.63)を Eq. (1.31)に代入し、得られる Eq. (1.64)の行列式から、表面エネルギーが既知である最低 3 種類以上の極性の異なる液滴の接触角を用いると、粗い固体表面の表面エネルギーを推算することができる。

$$\begin{bmatrix} \gamma_{L1}^{\text{Total}}(1 + \frac{\cos\theta_{W1}}{r_1})/2 \\ \gamma_{L2}^{\text{Total}}(1 + \frac{\cos\theta_{W2}}{r_2})/2 \\ \vdots \\ \gamma_{Ln}^{\text{Total}}(1 + \frac{\cos\theta_{Wn}}{r_n})/2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \sqrt{\gamma_{L1}^{\text{LW}}} & \sqrt{\gamma_{L1}^-} & \sqrt{\gamma_{L1}^+} \\ \sqrt{\gamma_{L2}^{\text{LW}}} & \sqrt{\gamma_{L2}^-} & \sqrt{\gamma_{L2}^+} \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ \sqrt{\gamma_{Ln}^{\text{LW}}} & \sqrt{\gamma_{Ln}^-} & \sqrt{\gamma_{Ln}^+} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \sqrt{\gamma_S^{\text{LW}}} \\ \sqrt{\gamma_S^+} \\ \sqrt{\gamma_S^-} \end{bmatrix} \quad (1.64)$$

1.3 本論文の目的と構成

近年、微生物を工業的に利用する取り組みが進んでいる。化学反応で用いられる触媒として微生物を用いると、活性化エネルギーが低く、省エネ効果による環境負荷の低減が期待できる環境調和型プロセスの構築が可能となる。しかし、十分な生成物を得るには、相応量の微生物を必要とすることから、微生物プロセスでは反応槽内に微生物を高濃度に保持する手法が検討されている。微生物が高密度化した状態はバイオフィルムと呼ばれ、微生物プロセスでは、反応率の向上や微生物の流出を抑制するとともに、反応槽内の環境変動にも強くなるため、この形成制御を行うことでプロセスの安定性も期待できる。バイオフィルムは界面に付着した微生物が増殖して EPS 生産による結果、形成される[16]が、この形成に至る詳細なメカニズムは明らかではない。よって、高効率な微生物プロセスを構築するためには、バイオフィルム形成における微生物の付着現象を理解し、その制御因子を把握する必要がある。

本論文は、微生物細胞を細胞コア表層に高分子鎖が生えたコロイド粒子と捉えて、「微生物-微生物」 や「微生物-固体」 の表面間に働く相互作用を、DLVO 理論および付着による Gibbs 自由エネルギー変化 ΔG に基づいて定量的に把握するとともに、PPFC を用いた微生物の付着力分布の新しい解析法を提案し、微生物の付着現象の解明をすることを研究目的として行ったものである。さらに、微生物細胞の表層特性評価手法を応用して、メタン発酵プロセスにおけるメタン生成古細菌の担体粒子への付着現象（固定化） や凝集塊（グラニュール） 形成現象、また微生物と同様に表層が高分子物質で被覆された複合粒子の製造プロセスにおける粒子付着現象の解明を試みた。本論文は 8 章で構成されている。以下に、各章の概要を述べる。

第 1 章では、本論文の研究背景をまとめるとともに、研究目的と本論文の構成について述べた。

第 2 章では、二種類のメタン生成古細菌 *Methanosarcina barkeri* と *Methanosaeta concilii* をモデル微生物として、コロイド科学の観点から細胞表層特性を評価し、その特性が付着挙動に及ぼす影響について、微生物間の凝集試験や固体表面への付着試験を通じて検証した。

第3章では、鞭毛を持たない非運動性の乳酸菌 *Lactococcus lactis* と鞭毛を持つ運動性の大腸菌 *Escherichia coli* をモデル微生物に用いて、EPS や線状構造物（鞭毛や線毛）が微生物の付着挙動に及ぼす影響について検討した。

第4章では、鞭毛が欠損した親水性の *E. coli* と疎水性の *M. barkeri* を非運動性モデル微生物に用いて、平行平板流れ場の固体表面における微生物の付着・脱離挙動を直接観察した。

第5章では、前章で提案した平行平板流れ場における微生物の付着力分布評価法に基づいて、細胞外構造物が固体表面への微生物の付着・脱離現象に及ぼす影響について解析した。運動性微生物 *E. coli* KP7600 株とその鞭毛に関わる変異株（運動性欠損株と鞭毛欠損株）を用いて、負帯電ガラスへの微生物の付着・脱離現象を直接観察した。

第6章では、前章で得られた基礎的知見を基に、メタン発酵プロセスの高効率化を図るためのコンセプトを確立した。発酵槽内におけるメタン生成古細菌を高密度に保持する方法として、固定化担体を用いる方法とメタン生成古細菌と酸生成菌のヘテロ凝集によるマイクログラニュール形成法を検証した。

第7章では、前章で得られた基礎的知見を拡張して、高分子をコア粒子に被覆する粒子複合化プロセスにおける付着現象を解明し、複合化粒子の生産効率を向上させるための方策を提案した。

第8章では、本論文における各章の研究成果を総括したうえで、今後の研究展望を示した。

Nomenclature

a	= Particle radius	(m)
A	= Hamaker constant	(J)
C	= Electronic capacity	(F/m ²)
d	= Separation distance	(m)
d_0	= Minimum equilibrium distance	(m)
d_L	= Thickness of absorbed molecular layer	(m)
e	= Elementary electronic charge	(C)
E	= Electric field	(V/m)
F_r	= Faraday constant	(C/mol)
k	= Boltzmann's constant	(J/K)
K	= Equilibrium constant	(-)
n	= Concentration of bulk ions	(1/m ³)
N	= Density of charged group within the polymer layer	(1/m ³)
Q	= Electric charge of particle	(C)
R	= Gas constant	(J/mol/K)
T	= Absolute temperature	(K)
u	= Electrophoretic mobility	(m ² /(V·s))
V	= Interaction energy	(J)
z	= Valence of bulk ions	(-)
Z	= Valency of charged groups within the polymer Layer	(-)
ΔG	= Free energy of interaction	(mJ/m ²)
γ	= Surface tension	(mJ/m ²)
γ^+	= Electron-acceptor parameter of surface tension	(mJ/m ²)
γ^-	= Electron-donor parameter of surface tension	(mJ/m ²)
ϵ_0	= Permittivity in vacuum	(F/m)
ϵ_r	= Relative permittivity of the electrolyte solution	(-)
ζ	= Zeta potential	(V)
η	= Viscosity of the suspension	(Pa·s)

θ	= Contact angle	(degree)
κ	= Debye–Hückel parameter	(m)
κ_m	= Debye–Hückel parameter of polymer layer	(m)
λ	= Reciprocal of softness parameter	(1/m)
v	= Electrophoretic velocity	(m/s)
σ	= Surface charge density	(C/m ²)
ψ_0	= Surface potential	(V)
ψ_{DON}	= Donnan potential	(V)
χ	= Correlation length (gyration radius of water molecules in a solution)	(m)

subscript / superscript

AB	= Lewis acid–base component
LW	= Lifshitz–van der Waals component

subscript

EL	= Electronic component
----	------------------------

superscript

d	= Variance component
h	= hydrogen bonding and dipolar interaction component
p	= Polar component
Total	= Sum of components

References

- [1] A. González, S. Bellenberg, S. Mamani, L. Ruiz, A. Echeverría, L. Soulère, A. Doutheau, C. Demergasso, W. Sand, Y. Queneau, M. Vera, N. Giuliani, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97** (2013) 3729–3737.
- [2] H.R.R. Watling, *Hydrometallurgy* **84** (2006) 81–108.
- [3] P.M. Tribelli, C. Di Martino, N.I. López, L.J. Raiger Iustman, *Biodegradation* **23** (2012) 645–651.
- [4] S.J. Edwards, B. V. Kjellerup, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97** (2013) 9909–9921.
- [5] F.G. Fermoso, J. Bartacek, S. Jansen, P.N.L. Lens, *Sci. Total Environ.* **407** (2009) 3652–3667.
- [6] B. Wu, C. Feng, L. Huang, Z. Lv, D. Xie, C. Wei, *Bioresour. Technol.* **157** (2014) 305–309.
- [7] T. Nomura, A. Naimen, S. Toyoda, Y. Kuriyama, H. Tokumoto, Y. Konishi, *Int. J. Hydrogen Energy* **39** (2014) 1280–1287.
- [8] Y. Shinozaki, T. Morita, X. Cao, S. Yoshida, M. Koitabashi, T. Watanabe, K. Suzuki, Y. Sameshima-Yamashita, T. Nakajima-Kambe, T. Fujii, H.K. Kitamoto, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97** (2013) 2951–2959.
- [9] H.K. Kitamoto, Y. Shinozaki, X.-H. Cao, T. Morita, M. Konishi, K. Tago, H. Kajiwara, M. Koitabashi, S. Yoshida, T. Watanabe, Y. Sameshima-Yamashita, T. Nakajima-Kambe, S. Tsushima, *AMB Express* **1** (2011) 44.
- [10] H. Nishihashi, *DIC Tech. Rev.* (2007) 21–35.
- [11] M. Inui, Y. Go, *Soc. Biosci. Bioeng. Japan* **92** (2014) 680–684.
- [12] Y. Miki, *Kobunshi* **61** (2012) 197–198.
- [13] G. Pauli, *Ecodecision* **16** (1995) 26–30.
- [14] G. Pauli, *Technol. Forecast. Soc. Change* **58** (1998) 53–62.
- [15] G. Pauli, Blue Economy-10 Years, 100 Innovations, 100 Million Jobs, Paradigm Pubns, 2010.
- [16] H. Morisaki, H. Ohshima, K. Isobe, Biofilm, 3rd ed., Science Forum, Tokyo, 2003.
- [17] D. Campoccia, L. Montanaro, C.R. Arciola, *Biomaterials* **34** (2013) 8533–8554.
- [18] H. Wang, M. Sodagari, L.K. Ju, B.M. Zhang Newby, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **109** (2013) 32–39.
- [19] C.J. van Oss, Interfacial Forces In Aqueous Media, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, 2006.

- [20] Y. Mao, P.K. Subramaniam, K. Tawfiq, G. Chen, *J. Adhes. Sci. Technol.* **25** (2011) 2155–2168.
- [21] M. Hermansson, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **14** (1999) 105–119.
- [22] E.S. Ovchinnikova, B.P. Krom, H.J. Busscher, H.C. van der Mei, *BMC Microbiol.* **12** (2012) 281–287.
- [23] Y. Liu, J. Strauss, T. a. Camesano, *Biomaterials* **29** (2008) 4374–4382.
- [24] B.-J.J. Park, T. Haines, N.I. Abu-Lail, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **73** (2009) 237–243.
- [25] R.M. Goulter, E. Taran, I.R. Gentle, K.S. Gobius, G.A. Dykes, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **119** (2014) 90–98.
- [26] H.C. van der Mei, J. de Vries, H.J. Busscher, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **78** (2010) 372–375.
- [27] H.J. Busscher, H.C. van Der Mei, *Clin. Microbiol. Rev.* **19** (2006) 127–141.
- [28] N.P. Boks, W. Norde, H.C. van der Mei, H.J. Busscher, *Microbiology* **154** (2008) 3122–3133.
- [29] J.W. McClaine, R.M. Ford, *Biotechnol. Bioeng.* **78** (2002) 179–189.
- [30] M.R. Nejadnik, H.C. van der Mei, H.J. Busscher, W. Norde, *Appl. Environ. Microbiol.* **74** (2008) 916–919.
- [31] J.M.R. Moreira, J.D.P. Araújo, J.M. Miranda, M. Simões, L.F. Melo, F.J. Mergulhão, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **123** (2014) 1–7.
- [32] J. Li, H.J. Busscher, W. Norde, J. Sjollema, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **84** (2011) 76–81.
- [33] B. Gottenbos, H.C. van der Mei, F. Klatter, P. Nieuwenhuis, H.J. Busscher, *Biomaterials* **23** (2002) 1417–1423.
- [34] J. Barros, L. Grenho, C.M. Manuel, C. Ferreira, L.F. Melo, O.C. Nunes, F.J. Monteiro, M.P. Ferraz, *Int. Microbiol.* **16** (2013) 191–198.
- [35] J. Kim, H.-D. Park, S. Chung, *Molecules* **17** (2012) 9818–9834.
- [36] R.M. Donlan, J.W. Costerton, *Clin. Microbiol. Rev.* **15** (2002) 167–193.
- [37] W.E.G. Müller, X. Wang, P. Proksch, C.C. Perry, R. Osinga, J. Gardères, H.C. Schröder, *Mar. Biotechnol.* **15** (2013) 375–398.
- [38] H. Gu, D. Ren, *Front. Chem. Sci. Eng.* **8** (2014) 20–33.
- [39] J.E. Heindl, Y. Wang, B.C. Heckel, B. Mohari, N. Feirer, C. Fuqua, *Front. Plant Sci.* **5** (2014) 176.

- [40] E. Huckel, *Phys. Zeitschrift* **25** (1924) 204–210.
- [41] M. von Smoluchowski, in:, Bull. Int. l'Académie Des Sci. Cracovie. Cl. Des Sci. Mathématiques Nat., 1903, pp. 182–200.
- [42] M. Von Smoluchowski, *Zeitschrift Fuer Phys. Chemie* **92** (1917) 129–168.
- [43] D.C. Henry, *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **133** (1931) 106–129.
- [44] H. Ohshima, *J. Colloid Interface Sci.* **168** (1994) 269–271.
- [45] H. Ohshima, T.W. Healy, L.R. White, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **79** (1983) 1613–1628.
- [46] R.W. O'Brien, L.R. White, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **74** (1978) 1607–1626.
- [47] H. Ohshima, T. Kondo, *J. Colloid Interface Sci.* **130** (1989) 281–282.
- [48] H. Ohshima, T. Kondo, *Biophys. Chem.* **39** (1991) 191–198.
- [49] H. Ohshima, M. Nakamura, T. Kondo, *Colloid Polym. Sci.* **270** (1992) 873–877.
- [50] H. Ohshima, *J. Colloid Interface Sci.* **163** (1994) 474–483.
- [51] H. Ohshima, *Adv. Colloid Interface Sci.* **62** (1995) 189–235.
- [52] H. Ohshima, K. Makino, T. Kato, K. Fujimoto, T. Kondo, H. Kawaguchi, *J. Colloid Interface Sci.* **159** (1993) 512–514.
- [53] K. Makino, S. Yamamoto, K. Fujimoto, H. Kawaguchi, H. Ohshima, *J. Colloid Interface Sci.* **166** (1994) 251–258.
- [54] H. Ohshima, *J. Colloid Interface Sci.* **180** (1996) 299–301.
- [55] H. Ohshima, Electrical Phenomena at Interfaces and Biointerfaces, John Wiley & Sons, Inc., 2012.
- [56] H. Ohshima, *Colloid Polym. Sci.* **275** (1997) 480–485.
- [57] H. Ohshima, *Colloid Polym. Sci.* **279** (2001) 88–91.
- [58] P.-G. de Gennes, F. Brochard-Wyart, D. Quere, Capillarity and Wetting Phenomena: Drops, Bubbles, Pearls, Waves, Springer, New York, 2003.
- [59] T. Ishii *et al.*, Wettability Technology Hand Book ~Fundamentals•Measurement Valuation Data~, 2nd ed., Techno System, 2005.
- [60] L. Wilhelmy, *Ann. Der Phys. Und Chemie* **195** (1863) 177–217.
- [61] L. Du Noüy, *Nature* **135** (1935) 397.
- [62] V. Vacek, *Chem. Eng. J.* **9** (1975) 167–169.
- [63] C.I. Chiwetelu, V. Hornof, G.H. Neale, *J. Colloid Interface Sci.* **125** (1988) 586–601.
- [64] F.K. Hansen, G. Rødsrud, *J. Colloid Interface Sci.* **141** (1991) 1–9.

- [65] T. Young, *Philos. Trans. R. Soc. London* **95** (1805) 65–87.
- [66] A.M. Dupré, P. Dupré, Théorie Mécanique de La Chaleur, Gauthier-Villars, Paris, 1869.
- [67] F.M. Fowkes, *Ind. Eng. Chem.* **56** (1964) 40–52.
- [68] L.A. Girifalco, R.J. Good, *J. Phys. Chem.* **61** (1957) 904–909.
- [69] D.K. Owens, R.C. Wendt, *J. Appl. Polym. Sci.* **13** (1969) 1741–1747.
- [70] D.H. Kaelble, K.C. Uy, *J. Adhes.* **2** (1970) 50–60.
- [71] D.H. Kaelble, *J. Adhes.* **2** (1970) 66–81.
- [72] T. Hata, Y. Kitazaki, T. Saito, *J. Adhes.* **21** (1987) 177–194.
- [73] Y. Kitazaki, T. Hata, *J. Adhes. Soc. Japan Adhes.* **8** (1972) 131–142.
- [74] T. Hata, *Kobunshi* **32** (1983) 648–653.
- [75] S. Wu, *J. Polym. Sci. Part C Polym. Symp.* **34** (1971) 19–30.
- [76] S. Wu, *J. Adhes.* **5** (1973) 39–55.
- [77] C.J. van Oss, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **54** (2007) 2–9.
- [78] C.J. van Oss, R.J. Good, M.K. Chaudhury, *J. Colloid Interface Sci.* **111** (1986) 378–390.
- [79] C.J. van Oss, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **78** (1993) 1–49.
- [80] R.J. Good, L.A. Girifalco, *J. Phys. Chem.* **64** (1960) 561–565.
- [81] F.W. Fowkes, *J. Phys. Chem.* **67** (1962) 2538–2541.
- [82] C.J. van Oss, M.K. Chaudhury, R.J. Good, *Adv. Colloid Interface Sci.* **28** (1987) 35–64.
- [83] C.J. van Oss, M.K. Chaudhury, R.J. Good, *Chem. Rev.* **88** (1988) 927–941.
- [84] C.J. van Oss, *J. Mol. Recognit.* **3** (1990) 128–136.
- [85] C.J. van Oss, R.J. Good, M.K. Chaudhury, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **376** (1986) 111–119.
- [86] H.C. van der Mei, H.J. Busscher, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **11** (1998) 213–221.
- [87] C.J. Daughney, J.B. Fein, *J. Colloid Interface Sci.* **198** (1998) 53–77.
- [88] L. Leone, D. Ferri, C. Manfredi, P. Persson, A. Shchukarev, S. Sjöberg, J. Loring, *Environ. Sci. Technol.* **41** (2007) 6465–6471.
- [89] J.R. Haas, T.J. Dichristina, R. Wade, *Chem. Geol.* **180** (2001) 33–54.
- [90] S.J. Parikh, J. Chorover, *Langmuir* **22** (2006) 8492–8500.
- [91] J. Schmitt, H.C. Flemming, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **41** (1998) 1–11.
- [92] M. Kansiz, P. Heraud, B. Wood, F. Burden, J. Beardall, D. McNaughton, *Phytochemistry* **52** (1999) 407–417.

- [93] M. Dittrich, S. Sibler, *J. Colloid Interface Sci.* **286** (2005) 487–495.
- [94] N. Yee, L.G. Benning, V.R. Phoenix, F.G. Ferris, *Environ. Sci. Technol.* **38** (2004) 775–782.
- [95] L.G. Benning, V.R. Phoenix, N. Yee, M.J. Tobin, *Geochim. Cosmochim. Acta* **68** (2004) 729–741.
- [96] H.T.M. Heinrich, P.J. Bremer, C.J. Daughney, A.J. McQuillan, *Langmuir* **23** (2007) 2731–2740.
- [97] W. Jiang, A. Saxena, B. Song, B.B. Ward, T.J. Beveridge, S.C.B. Myneni, *Langmuir* **20** (2004) 11433–11442.
- [98] O. Samek, K. Mlynariková, S. Bernatová, J. Ježek, V. Krzyžánek, M. Šiler, P. Zemánek, F. Růžička, V. Holá, M. Mahelová, *Int. J. Mol. Sci.* **15** (2014) 23924–23935.
- [99] R.M. Jarvis, A. Brooker, R. Goodacre, *Faraday Discuss.* **132** (2006) 281–292.
- [100] Y. Wang, K. Lee, J. Irudayaraj, *J. Phys. Chem. C* **114** (2010) 16122–16128.
- [101] N.P. Ivleva, M. Wagner, A. Szkola, H. Horn, R. Niessner, C. Haisch, *J. Phys. Chem. B* **114** (2010) 10184–10194.
- [102] N.P. Ivleva, M. Wagner, H. Horn, R. Niessner, C. Haisch, *Anal. Bioanal. Chem.* **393** (2009) 197–206.
- [103] M. Wagner, N.P. Ivleva, C. Haisch, R. Niessner, H. Horn, *Water Res.* **43** (2009) 63–76.
- [104] N.P. Ivleva, M. Wagner, H. Horn, R. Niessner, C. Haisch, *Anal. Chem.* **80** (2008) 8538–8544.
- [105] V. Prabhawathi, T. Boobalan, P.M. Sivakumar, M. Doble, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **123** (2014) 461–468.
- [106] B.D. Beier, R.G. Quivey, A.J. Berger, *AMB Express* **2** (2012) 35–40.
- [107] D. Borrok, J.B. Fein, C.F. Kulpa, *Geochim. Cosmochim. Acta* **68** (2004) 3231–3238.
- [108] D. Gorman-Lewis, J.B. Fein, M.P. Jensen, *Geochim. Cosmochim. Acta* **70** (2006) 4862–4873.
- [109] J.B. Fein, J.F. Boily, N. Yee, D. Gorman-Lewis, B.F. Turner, *Geochim. Cosmochim. Acta* **69** (2005) 1123–1132.
- [110] J.D. Allison, D.S. Brown, K.J. Novo-Gradac, Minteq2/Prodefa2, a Geochemical Assessment Model for Environmental Systems: Version 3.0 User'S Manual, ATHENS, 1991.
- [111] N. Yee, J. Fein, *Geochim. Cosmochim. Acta* **65** (2001) 2037–2042.
- [112] B.T. Ngwenya, I.W. Sutherland, L. Kennedy, *Appl. Geochemistry* **18** (2003) 527–538.
- [113] X. Gu, L.J. Evans, *J. Colloid Interface Sci.* **307** (2007) 317–325.
- [114] C.J. Daughney, D.A. Fowle, D. Fortin, *Geochim. Cosmochim. Acta* **65** (2001) 1025–1035.

- [115] P.G. Wightman, J.B. Fein, D.J. Wesolowski, T.J. Phelps, P. Bénézeth, D.A. Palmer, *Geochim. Cosmochim. Acta* **65** (2001) 3657–3669.
- [116] C.J. Daughney, J.B. Fein, N. Yee, *Chem. Geol.* **144** (1998) 161–176.
- [117] Y. Gao, A. Mucci, *Geochim. Cosmochim. Acta* **65** (2001) 2361–2378.
- [118] J. HAAS, *Chem. Geol.* **209** (2004) 67–81.
- [119] D. Xu, C. Chen, X. Tan, J. Hu, X. Wang, *Appl. Geochemistry* **22** (2007) 2892–2906.
- [120] R.E. Martinez, D.S. Smith, E. Kulczycki, F.G. Ferris, *J. Colloid Interface Sci.* **253** (2002) 130–139.
- [121] A. Hetzer, C.J. Daughney, H.W. Morgan, *Appl. Environ. Microbiol.* **72** (2006) 4020–4027.
- [122] P.-G. Burnett, H. Heinrich, D. Peak, P.J. Bremer, A.J. McQuillan, C.J. Daughney, *Geochim. Cosmochim. Acta* **70** (2006) 1914–1927.
- [123] N. Yee, D.A. Fowle, F.G. Ferris, *Geochim. Cosmochim. Acta* **68** (2004) 3657–3664.
- [124] J.H.A.M. Wonders, H.P. Van Leeuwen, J. Lyklema, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **120** (1997) 221–233.
- [125] S.T. Martin, J.M. Kesselman, D.S. Park, N.S. Lewis, M.R. Hoffmann, *Environ. Sci. Technol.* **30** (1996) 2535–2542.
- [126] S. Goldberg, *J. Colloid Interface Sci.* **285** (2005) 509–517.
- [127] R.E. Martinez, F.G. Ferris, *J. Colloid Interface Sci.* **243** (2001) 73–80.
- [128] D.G. Kinniburgh, W.H. Van Riemsdijk, L.K. Koopal, M. Borkovec, M.F. Benedetti, M.J. Avena, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **151** (1999) 147–166.
- [129] L.K. Koopal, T. Saito, J.P. Pinheiro, W.H. Van Riemsdijk, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **265** (2005) 40–54.
- [130] H. Seki, A. Suzuki, S.-I. Mitsueda, *J. Colloid Interface Sci.* **197** (1998) 185–190.
- [131] X. Châtellier, D. Fortin, *Chem. Geol.* **212** (2004) 209–228.
- [132] J. Lützenkirchen, *J. Colloid Interface Sci.* **210** (1999) 384–390.
- [133] A.Z. Al-Hamdan, K.R. Reddy, *Adsorption* **11** (2005) 529–546.
- [134] H.C. Hamaker, *Physica* **4** (1937) 1058–1072.
- [135] B. Derjaguin, L. Landau, *Prog. Surf. Sci.* **43** (1993) 30–59.
- [136] J. Sun, B. V. Velamakanni, W.W. Gerberich, L.F. Francis, *J. Colloid Interface Sci.* **280** (2004) 387–399.

- [137] E.J.W. Verwey, J.T.G. Overbeek, K. Van Ness, Theory of the Stability of Lyophobic Colloids-The Interaction of Soil Particles Having an Electrical Double Layer, Elsevier, New York, 1948.
- [138] J.N. Israelachvili, D. Tabor, *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **331** (1972) 19–38.
- [139] H. Krupp, *Adv. Colloid Interface Sci.* **1** (1967) 111–239.
- [140] O.F. Devereux, P.L. de Bruyn, Interaction of Plane-Parallel Double Layers Devereux, MIT Press, Cambridge, 1963.
- [141] E. Barouch, E. Matijević, T.A. Ring, J.M. Finlan, *J. Colloid Interface Sci.* **67** (1978) 1–9.
- [142] R. Hogg, T.W. Healy, D.W. Fuerstenau, *Trans. Faraday Soc.* **62** (1966) 1638–1651.
- [143] M. Farahat, T. Hirajima, K. Sasaki, K. Doi, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **74** (2009) 140–149.
- [144] A. Jacobs, F. Lafolie, J.M. Herry, M. Debroux, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **59** (2007) 35–45.
- [145] A. Ozkan, H. Berberoglu, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **112** (2013) 302–309.
- [146] R. Bos, H.C. van Der Mei, H.J. Busscher, *FEMS Microbiol. Rev.* **23** (1999) 179–229.
- [147] C.J. van Oss, R.J. Good, *Colloids and Surfaces* **8** (1984) 373–381.
- [148] P.K. Sharma, K. Hanumantha Rao, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **29** (2003) 21–38.
- [149] M. Katsikogianni, Y.F. Missirlis, *Eur. Cells Mater.* **8** (2004) 37–57.
- [150] C.J. van Oss, *Cell Biophys.* **14** (1989) 1–16.
- [151] J.A. Brant, A.E. Childress, *Environ. Eng. Sci.* **19** (2002) 413–427.
- [152] S. Bhattacharjee, A. Sharma, P.K. Bhattacharya, *Ind. Eng. Chem. Res.* **35** (1996) 3108–3121.
- [153] J.N. Israelachvili, Intermolecular and Surface Forces, 3rd ed., Academic Press, 2011.
- [154] R.M. Hochmuth, *J. Biomech.* **33** (2000) 15–22.
- [155] Y. Chao, Z. Xiaohan, G. Yichen, M. Fanjie, S. Frederick, G. Jun, *Biochim. Biophys. Acta* **1853** (2015) 1889–1904.
- [156] W.R. Bowen, N. Hilal, R.W. Lovitt, C.J. Wright, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **136** (1998) 231–234.
- [157] M. Diao, E. Taran, S. Mahler, T.A.H. Nguyen, A. V Nguyen, *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **115** (2014) 229–236.
- [158] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, E. Evans, *Nature* **397** (1999) 50–53.
- [159] C. Gourier, A. Jegou, J. Husson, F. Pincet, *Cell. Mol. Bioeng.* **1** (2008) 263–275.

- [160] K. Kinoshita, A. Leung, E. Evans, *Seibutsu Butsuri* **49** (2009) 30–34.
- [161] T.D. Brown, *J. Biomech.* **33** (2000) 3–14.
- [162] J. Li, H.J. Busscher, H.C. van der Mei, W. Norde, B.P. Krom, J. Sjollema, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **87** (2011) 427–432.
- [163] R.A. van Wageningen, J.D. Andrade, *J. Colloid Interface Sci.* **76** (1980) 305–314.
- [164] J. Sjollema, H.J. Busscher, A.H. Weerkamp, *J. Microbiol. Methods* **9** (1989) 73–78.
- [165] J.M. Meinders, H.C. van der Mei, H.J. Busscher, *J. Microbiol. Methods* **16** (1992) 119–124.
- [166] T.G. van Kooten, J.M. Schakenraad, H.C. Van der Mei, H.J. Busscher, *J. Biomed. Mater. Res.* **26** (1992) 725–738.
- [167] J.M. Meinders, H.J. Busscher, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **80** (1993) 279–285.
- [168] R. Bos, H.C. van der Mei, J.M. Meinders, H.J. Busscher, *J. Microbiol. Methods* **20** (1994) 289–305.
- [169] B. Gottenbos, H.C. Van Der Mei, H.J. Busscher, *Methods Enzymol.* **310** (1999) 523–534.
- [170] J. V. Forrester, J.M. Lackie, *J. Cell Sci.* **70** (1984) 93–110.
- [171] R. E. Speece, *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*, Archae Press, Tennessee, 1996.
- [172] P.L. McCarty, D.P. Smith, *Environ. Sci. Technol.* **20** (1986) 1200–1206.
- [173] T. Murata, *Haikibutsu No Shigenka Gijutsu*, Ohmsha, Ltd., Tokyo, 2000.
- [174] J.S. Jeris, Perry L. McCarty, *Water Pollut. Control Fed.* **37** (1965) 178–192.
- [175] D.R. Boone, *Appl. Envir. Microbiol.* **43** (1982) 57–64.
- [176] Y. Koga, *Kosaikin*, Tokyo Daigaku Shuppankai, Tokyo, 1988.
- [177] R.A. Mah, M.R. Smith, L. Baresi, *Appl. Environ. Microbiol.* **35** (1978) 1174–1184.
- [178] A.J.B. Zehnder, B.A. Huser, T.D. Brock, K. Wuhrmann, *Arch. Microbiol.* **124** (1980) 1–11.
- [179] H.F. Kaspar, K. Wuhrmann, *Appl. Environ. Microbiol.* **36** (1978) 1–7.
- [180] R.E. Speece, *Environ. Sci. Technol.* **17** (1983) 416A–427A.
- [181] S. Hassan, I. Dahlan, *Open Eng.* **3** (2013) 389–399.
- [182] G. Zhu, R. Zou, A.K. Jha, X. Huang, L. Liu, C. Liu, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **45** (2014) 1243–1276.
- [183] P.J. Sallis, S. Uyanik, *Bioresour. Technol.* **89** (2003) 255–265.
- [184] A. Abdul-Raof, A. Ohashi, H. Harada, *Doboku Gakkai Ronbunshu* (2004) 115–123.

- [185] S. Hu, F. Yang, S. Liu, L. Yu, *Water Res.* **43** (2009) 381–388.
- [186] W. Wang, Q. Yang, S. Zheng, D. Wu, *Bioresour. Technol.* **149** (2013) 292–300.
- [187] L.W. Hulshoff Pol, S.I. De Castro Lopes, G. Lettinga, P.N.L. Lens, *Water Res.* **38** (2004) 1376–1389.
- [188] Y. Liu, J.H. Tay, *Biotechnol. Adv.* **22** (2004) 533–563.
- [189] P. Westermann, B.K. Ahring, R.A. Mah, *Appl. Environ. Microbiol.* **55** (1989) 514–515.
- [190] B.A. Huser, K. Wuhrmann, A.J.B. Zehnder, *Arch. Microbiol.* **132** (1982) 1–9.
- [191] S. Rocheleau, C.W. Greer, J.R. Lawrence, C. Cantin, L. Laramée, S.R. Guiot, *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (1999) 2222–2229.
- [192] A. Meio, *J. Res. Assoc. Powder Technol. Japan* **5** (1968) 986–992.
- [193] T. Yano, K. Terashita, *J. Res. Assoc. Powder Technol. Japan* **11** (1974) 392–399.
- [194] S. Sakashita, *J. Japan Soc. Color Mater.* **77** (2004) 75–85.
- [195] S. Uenosono, Y. Ozaki, H. Sugihara, *Mater. Japan* **39** (2000) 187–189.
- [196] S. Uenosono, Y. Ozaki, H. Sugihara, *J. Japan Soc. Powder Powder Metall.* **48** (2001) 305–310.
- [197] R. Aoki, *J. Res. Assoc. Powder Technol. Japan* **3** (1966) 2–5.
- [198] K. Tsutsumi, *J. Japan Soc. Compos. Mater.* **2** (1976) 107–113.
- [199] H. Schonhorn, H. Hansen, *Chem. Eng. News* **41** (1963) 67–88.
- [200] A. W. Adamson, Physical Chemistry of Surface, John Wiley and Sons, New York, 1990.
- [201] A. Borras, A.R. González-Elipe, *Langmuir* **26** (2010) 15875–15882.
- [202] R.N. Wenzel, *J. Ind. Eng. Chem.* **28** (1936) 988–994.
- [203] R.N. Wenzel, *J. Phys. Colloid Chem.* **53** (1949) 1466–1467.
- [204] X.-S. Wang, S.-W. Cui, L. Zhou, S.-H. Xu, Z.-W. Sun, R.-Z. Zhu, *J. Adhes. Sci. Technol.* **28** (2013) 161–170.

第2章 微生物の表面性状が付着挙動に及ぼす影響

微生物プロセスは、従来の化学プロセスでは困難な反応が可能である一方、反応容積当たりの速度が遅いため、実用化プロセスの構築は容易ではない。この課題を解決する方法の一つとして、有用微生物の固定化による高密度化（バイオフィルム形成）が挙げられる。しかし、その初期段階である微生物の付着現象には界面の性状が重要な役割を担っていると考えられるが、微生物の固体表面での固定化メカニズムの詳細は明らかとなっていない。固定化メカニズムを明らかにするためには、まず「微生物－微生物」、「微生物－固体」間の表面相互作用について明らかにすることが重要である。微生物は、その大きさがミクロンオーダであることから、微生物を“生きたコロイド”として捉えたコロイド科学的観点からの付着特性評価が有効と考えられる。

第2章では、微生物プロセスの一つであるメタン発酵において重要なメタン生成古細菌をモデル微生物とし、コロイド科学の観点から微生物細胞表層の特性分析を行い、それらが界面付着挙動に及ぼす影響について検討を行った。

2.1 実験方法

2.1.1 実験に用いた試料

実験に用いたメタン生成古細菌は、独立行政法人理化学研究所のバイオリソースセンターJCMから調達した *Methanosaeta concilii* JCM 10043 と、ドイツの微生物保存機関 DSMZ から調達した *Methanosaeta concilii* DSM 3671 である。前者は M.P. Bryant ら[1]により、後者は G.B. Patel[2]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古細菌である。これらの菌株は、推奨培地（前者は DSM 120 培地、後者は DSM 318 培地）を用いて嫌気性条件下で静置培養を行った[3]。培養温度は共に 37°C、pH は前者が 6.8、後者が 7.0 である。培養には 120 ml 容の加圧培養瓶に培地 40 ml を加えた後、ブチルゴム栓をアルミシールクリップにより固定して密閉した後、ガス置換装置（IP-8、三紳工業）により N₂ (80%)-CO₂ (20%) 混合ガスで 1.2 気圧に置換したものを用いた。対数増殖期末期まで培養した菌液は、定性濾紙（No.2、ADVANTEC）を用いて吸引濾過により培地成分を除去した後、遠心分離（8400×g、4 °C、10 min）により集菌した。

微生物を付着させる固体には、負帯電性スライドガラス（S7224、松浪硝子工業）と、アミノ基が修飾された正帯電性スライドガラス（S9227、松浪硝子工業）を用いた。これらは、使用前にエタノールで 10 分間、超純水で 5 分間、超音波洗浄し、50°C 無塵環境下で乾燥したものを使用した。以降、S7224 を NC ガラス（Negatively-Charged glass）、S9227 を PC ガラス（Positively-Charged glass）と表記する。

2.1.2 キャラクタリゼーション

集菌した微生物は、100 mol/m³ のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH = 7.0) に分散後、細胞固定液である 2.0v/v% グルタルアルデヒドを加えて一晩冷蔵静置した (4°C)。固定化後、微生物は 100 mol/m³ のリン酸緩衝液を用いて 6 回洗浄し（各 10 min 浸漬）、上昇アセトン系列 (50, 70, 80, 90, and 100%; 各濃度 30 min 浸漬) により脱水した。最後に、t-ブチルアルコールによって 4 回洗浄し（各 15 min 浸漬）、固定化した微生物を t-ブチルアルコール溶媒中に再分散して 20 min 冷凍庫内に静置した。以上の手順により作製した凍結サンプルは、真空凍結乾燥器 (ES-2020、日立) を用いて凍結乾燥し、メタン生成古細菌の乾燥サンプルを得た。乾燥微生物は、アルミシールテープ上に固定し、オートファインコーナ (JFC-1600、JEOL) を用いて微生物上に Au-Pd を蒸着させ、電界放出形電子顕微鏡 (JSM-6700F、JEOL) によって加速電圧 10 kV の高真空モードで形態を観察した。

微生物表層の物理化学的性質として、表面電位、ぬれ性、および表面官能基を評価した。表面電位は、集菌した微生物を所望の濃度に調整した NaCl 水溶液中で、ボルテックスミキサー (Vortex Genie 2、Scientific Industries) により 3 回攪拌洗浄し、微生物に付着した細胞外高分子物質 (Extra polymeric substance, EPS) を取り除いたものを実験試料とした。ゼータ電位測定装置 (ELS-800、大塚電子) と粒子径・ゼータ電位測定装置 (Zetasizer Nano ZS、Malvern) とを用いて、NaCl 水溶液中での微生物の電気泳動移動度 (Electrophoretic mobility, EPM) を測定し、柔らかい粒子モデルから表面電位を見積もった。また、ゼータ電位・粒径測定システム (ELS-Z、大塚電子) と平板試料用セルを用いて、モニター粒子の EPM を測定し、森・岡本の式[4]によりガラス表面の電位も見積もった。

表面のぬれ特性は、2 種類の手法を用いて評価した。まず、簡易的に MATH (Microbial adhesion to hydrocarbon assay) 法[5]を用いて、微生物表面の疎水度を定性的に評価した。集菌した微生物は、PUM 緩衝液 (pH 7.1, 22.2 g K₂HPO₄ · 3H₂O, 7.26 g

KH_2PO_4 , 1.8 g urea, 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and distilled water to 1,000 ml) に分散させた。その後、2.4 ml の微生物懸濁液に対し、有機相として 0.4 ml の *n*-ヘキサデカンを加えた。なお、微生物と *n*-ヘキサデカン[6]が共に負の電荷を帯びていたため、イオン強度を高い状態 (350 mol/m^3) に保つことで、電気的な相互作用を極力抑えて実験を行った。ヘキサデカンを加えた混合相は十分に乳化させるため、ボルテックスミキサーを用いて 2 min 搅拌した。その後 15 min 静置して水相と有機相に分離させた。微生物表面の疎水度は、微生物の有機相への付着率 F (%) として以下の式で評価した。

$$F = (1 - A_t / A_0) \times 100 \quad (2.1)$$

ここで、 A_0 はボルテックス搅拌前の微生物懸濁液の初期吸光度 (-)、 A_t は搅拌静置後の水相の吸光度 (-) である。吸光度はデジタル比色計 (Mini Photo 10、三紳工業) を用いて、波長 660 nm での吸収量として評価した。

次に、微生物のぬれ特性を定量的に評価するため、液滴法を用いて接触角測定を行った。なお、集菌した微生物は生理食塩水 (0.9% w/v NaCl) で 3 回洗浄し、微生物表層の EPS を取り除いたものを実験試料として用いた。まず、吸引濾過によりセルロースアセテートフィルター (C045A047A、ADVANTEC) 上に微生物を積層させたシートを作製した。その後、約 60 分間常温で静置させて余分な水分を除去し、接触角測定装置 (FTA125、First Ten Ångstroms) により、Table 2.1 に示した極性の異なる溶媒を微生物層上に滴下することで接触角を測定した (Fig. 2.1)。各溶媒の接触角測定結果より、Young–Dupré の式 (Eq. (1.31)) を用いて微生物の表面張力を見積もった[7,8]。スライドガラスも同様に測定を行った。

一般的に、中性の分散液中の微生物表面はカルボキシル基やリン酸基などの解離により負に帯電している。そこで、微生物表面の官能基について、FTIR と酸塩基滴定により分析を試みた。FTIR には、ATR–FTIR (FTIR8700、島津製作所) を用いて 2000–800 cm^{-1} で測定した。分解能は 4 cm^{-1} 、積算回数は 40 回に設定した。なお、微生物は集菌後、生理食塩水で 3 回洗浄し、微生物に付着した EPS を取り除いたものを用いた。酸塩基滴定は、 $30 \text{ mol/m}^3 \text{ HNO}_3$ で洗浄した微生物懸濁液を、 $100 \text{ mol/m}^3 \text{ HCl}$ または NaOH を用いて滴定し、次式で過剰電荷密度 $[\text{H}^+]_{\text{ex}}$ を求めた。実験は溶存 CO_2 の影響を除くため、 N_2 雰囲気下で行った。

$$[\text{H}^+]_{\text{ex}} = C_{\text{HCl}} - C_{\text{NaOH}} - [\text{H}^+] + K_w / [\text{H}^+] \quad (2.2)$$

C_{HCl} と C_{NaOH} は HCl と NaOH の添加濃度 (mol/L)、 K_w は水のイオン積 (mol^2/L^2) である。

Table 2.1

Surface tensions of probe liquid for contact angle measurement [9].

Probe liquid	Surface tension (mJ/m^2)				
	γ^{Total}	γ^{LW}	γ^{AB}	γ^+	γ^-
Water	72.8	21.8	51.0	25.5	25.5
Formamide	58.0	39.0	19.0	2.28	39.6
Methylene iodide	50.8	50.8	0	0	0
α -Bromonaphthalene	44.4	44.4	0	0	0

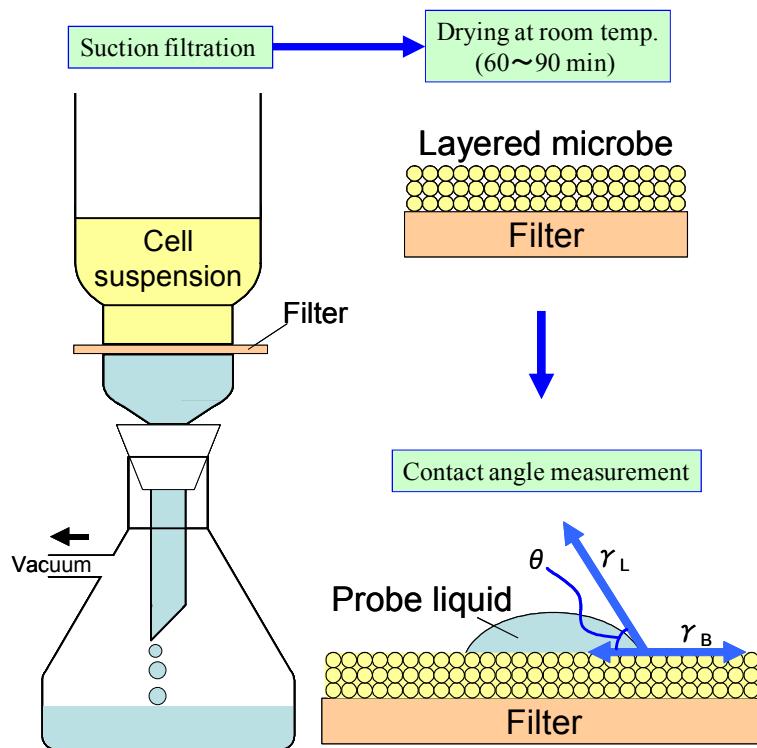


Fig. 2.1 Method for preparing a microbial lawn for contact angle measurement [10].

2.1.3 微生物の自己凝集実験

イオン強度を 5~160 mol/m³に調製した NaCl 水溶液に微生物 (*M. barkeri*, *M. concilii*) を分散させた懸濁液 3.0 ml を試験管に入れ、波長 660 nm での吸光度 A_0 を測定した。その後、180 rpm で 24 時間振盪し、振盪後の懸濁液の波長 660 nm における吸光度 A_t を測定した。微生物の自己凝集率 F_{agg} (%) は次式を用いて算出した。

$$F_{agg} = (1 - A_t / A_0) \times 100 \quad (2.3)$$

2.1.4 微生物の固体表面への付着実験

スライドガラスを用いて、固体平板上へのメタン生成古細菌の固定化を検討した。イオン強度を 5~80 mol/m³に調製した NaCl 水溶液に微生物 (*M. barkeri*) を分散させた懸濁液にスライドガラスを浸漬させ、180 rpm で 24 時間振盪した。微生物濃度は、波長 660 nm における吸光度が 0.2 になるように調製した。微生物が付着したスライドガラスは、洗浄・乾燥してから 1.0% クリスタルバイオレット水溶液によって染色し、明視野顕微鏡 (BX60、オリンパス) で観察した。観察画像は ImageJ (Version 1.39, National Institutes of Health (NIH)) を用いて解析し、スライドガラス上に付着した微生物による面積占有率を求めた。

次に、球状粒子へのメタン生成古細菌の固定化を検討した。粒子は、親水性ビニルポリマー表面に第 4 級アンモニウム基を導入した陰イオン交換樹脂 (TOYOPEARL SuperQ-650M、東ソー) とスルホ基を導入した陽イオン交換樹脂 (TOYOPEARL SP-650M)、ブチル基を導入した疎水性樹脂 (TOYOPEARL Butyl-650M) の 3 種類を用いた。これらの粒子径は、40~90 μm である。遠心分離により集菌し、生理食塩水で 3 回洗浄後、100 mol/m³ の NaCl 水溶液に分散させた *M. barkeri* 懸濁液 ($A_{660} = 0.6$) 3.0 ml に対し、固定化担体を 0.02 ml ずつ添加し、振盪機 (MMS-110、EYELA) によって 240 rpm で振盪した。所望の時間において、振盪を止め 2 min 静置することで担体を沈降させ、上澄みの吸光度を測定した。振盪前後の吸光度より、以下の式を用いて担体への微生物の付着量 W を算出した。

$$W = V_s (C_0 - C_t) / M \quad (2.4)$$

ここで、 V_s は微生物懸濁液の容量、 C_0 は振盪前の液中に存在する微生物の乾燥重量、 C_t は振盪後の液中に存在する微生物の乾燥重量、 M は固定化担体の量である。

2.2 実験結果および考察

2.2.1 微生物の形態観察

メタン生成古細菌の電子顕微鏡像を **Fig. 2.2** に示す。*M. barkeri* は球菌であり 1 微生物菌体あたりの直径はおよそ $1\sim2 \mu\text{m}$ であることがわかった。また、*M. concilii* は桿菌であり短径が約 $0.5 \mu\text{m}$ 、長径がおよそ $5\sim10 \mu\text{m}$ であることがわかった。

2.2.2 微生物の帶電性

微生物懸濁液のイオン強度とメタン生成古細菌の EPM の関係を **Fig. 2.3** に示す。*M. concilii* の EPM は *M. barkeri* と比べて非常に小さいことがわかった。*M. barkeri* のデータは異なる測定装置を用いた場合も比較したが、ほぼ一致していた。また、共にイオン強度が増加すると EPM の絶対値は減少し、*M. concilii* はほぼ 0 ($-0.09 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/(\text{V}\cdot\text{s})$) に収束するが、*M. barkeri* は 0 ではない一定値 ($-1.45 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/(\text{V}\cdot\text{s})$) に収束した。次に、この微生物の EPM 測定結果を固定電荷密度 ZeN と流れの侵入距離 $1/\lambda$ をパラメータとして Ohshima の式によりフィッティングし、微生物の表面電位を推算した。なお、パラメータの最適解はグラフ作成ソフト Kaleida Graph (Version 4.5, Synergy Software) を用いて計算した。各イオン強度でのメタン生成古細菌とスライドガラスの表面電位の推算値を **Table 2.2** に示す。これより、NC ガラスは負、PC ガラスは正に帶電していることが確認された。また、*M. concilii* は *M. barkeri* に比べて表面電位が低く、ほとんど帶電していなかったが、イオン強度が高くなると、*M. barkeri* の表面電位もゼロに漸近することがわかった。*M. barkeri* と *M. concilii* の固定電荷密度 ZeN はそれぞれ -1.15×10^6 と $-7.27\times10^7 \text{ C/m}^2$ 、流れの進入距離 $1/\lambda$ はそれぞれ 3.35 と 1.05 nm であった。これより、*M. concilii* の細胞表面には高分子鎖が少なく、そのために固定電荷密度が小さくなつたと推察される。さらに、 $10 \text{ mol/m}^3 \text{ NaCl}$ 水溶液に微生物を分散し pH を調製した時のメタン生成古細菌の EPM を **Fig. 2.4** に示す。*M. concilii* の等電点は pH 4.5 付近であることがわかった。一方、*M. barkeri* では、分散媒の pH が 1.5 以下になると溶菌したため測定できなかつたが、 $80 \text{ mol/m}^3 \text{ NaCl}$ 水溶液 (pH 1.1) では、正の EPM ($0.275 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/(\text{V}\cdot\text{s})$) が得られたので、*M. barkeri* は pH 2 付近に等電点を持つことがわかつた。

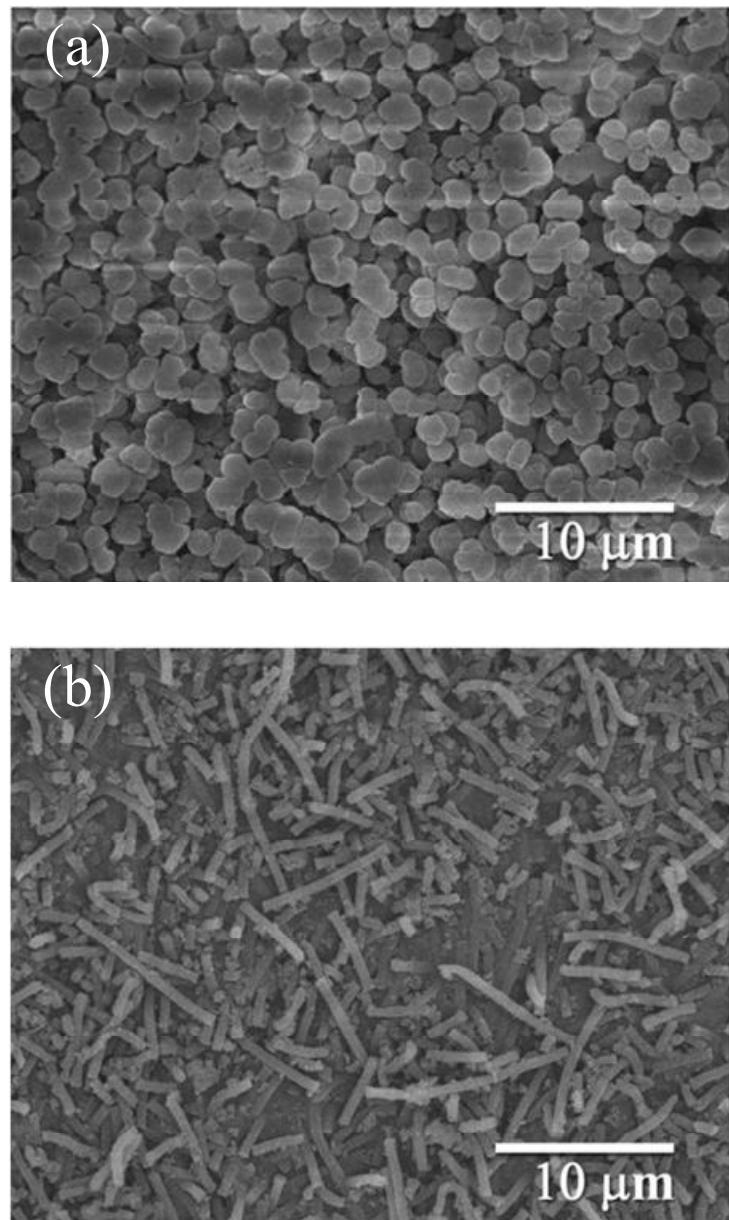


Fig. 2.2 Scanning electron microscopy images: (a) *M. barkeri*, (b) *M. concilii*.

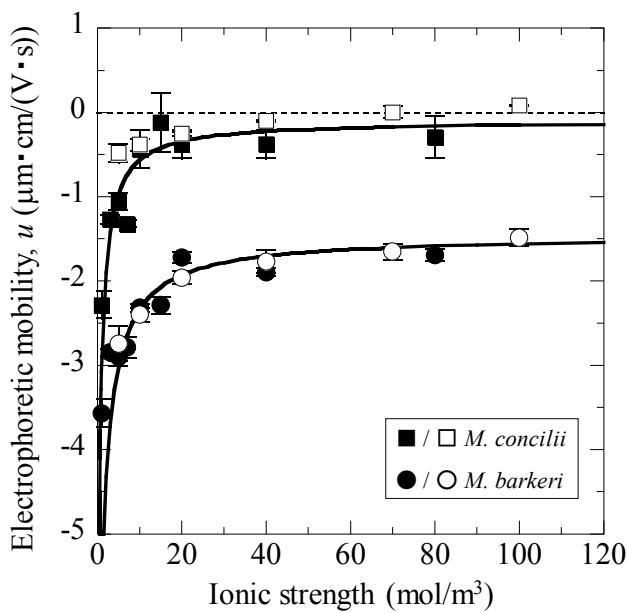


Fig. 2.3 Electrophoretic mobility of *M. barkeri* and *M. concilii* as a function of ionic strength of cell suspension. Open symbols, measured by ELS-800; Closed symbols, measured by Zetasizer Nano ZS.

Table 2.2

Surface potentials (mV) of methanogen and slide glass. \pm signs indicate SEM, $N \geq 3$.

Ionic strength (mol/m ³)	Microbial cell		Substratum	
	<i>M. barkeri</i>	<i>M. concilii</i>	NC-glass	PC-glass
5	-14.0	-9.28	-61.2 \pm 0.5	31.9 \pm 0.3
10	-7.45	-4.78	-33.1 \pm 0.3	34.6 \pm 0.5
20	-3.80	-2.41	-23.7 \pm 0.4	32.3 \pm 0.6
40	-1.91	-1.21	-18.8 \pm 0.4	21.5 \pm 0.4
80	-0.96	-0.60	-10.8 \pm 0.3	18.5 \pm 0.4
100	-0.77	-0.48	-	-
160	-0.48	-0.30	-3.61	12.0

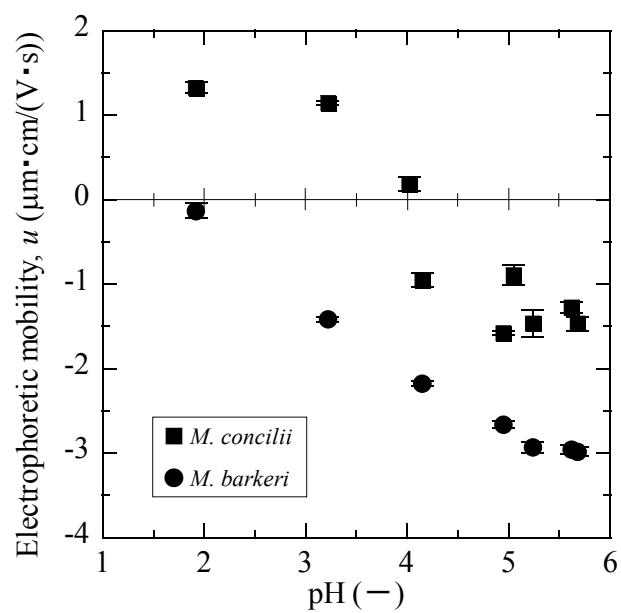


Fig. 2.4 Electrophoretic mobility of *M. barkeri* and *M. concili* as a function of pH of cell suspension.
The ionic strength of microbial suspension is $10 \text{ mol}/\text{m}^3$.

2.2.3 微生物のぬれ性

Fig. 2.5に微生物懸濁液の初期吸光度 A_0 と微生物の有機相への付着率 F との関係を示す。親水性で知られる *Escherichia coli* JM109 を比較対象として用いた。*M. barkeri* と *M. concilii* は初期吸光度が 0.1 の時、共に 60%以上の微生物が *n*-ヘキサデカン相に移動することがわかった。初期吸光度を変えると、*E. coli* の有機相への移動率は約 10%で推移し、大きく変動しなかった。一方、*M. barkeri* と *M. concilii* は初期吸光度の増加と共に、移動率が減少した。ここで、*M. barkeri* を例にとり、有機相に取り込まれた量を乾燥重量として計算した。まず、*M. barkeri* の乾燥重量 C (g/L) を知るために、吸光度 A_{660} を調整した微生物懸濁液を平板ペトリ皿に移し、95°Cで重量減少が見られなくなるまで約 2 時間加熱した。吸光度と乾燥重量の関係を **Fig. 2.6a** に示す。吸光度が 0.7 以下において、吸光度と乾燥重量との間には線形性が確認でき、その関係式は $C = 1.23 A_{660}$ ($r^2 = 0.998$) であることがわかった。次に、有機相への取り込み量を計算した結果を **Fig. 2.6b** に示す。初期吸光度の増加に対して、取り込み量はほぼ一定 (0.86 g/L) であり、MATH 法では初期吸光度が高い時には微生物の移動量が飽和してしまうため、正確に評価できない可能性が示唆された。*M. concilii* でも、初期吸光度が 0.2 以下の時、付着量は急激に上昇することから、0.2 以上では正確に評価できないと考えられる。*E. coli* と比較して、メタン生成古細菌は共に疎水性であることが確認できた。

二種のメタン生成古細菌と二種のスライドガラスの接触角を測定した結果を **Table 2.3** に示す。また、Eq. (1.31)に示した Young–Dupré の式を用いて推算した表面張力を **Table 2.4** に示す。*M. barkeri* と *M. concilii* の表面張力はそれぞれ 25 mJ/m^2 と 27 mJ/m^2 となり、両者の間に大きな違いは見られなかった。例えば、乳酸菌 (*Lactococcus lactis*) [11]の表面張力 41 mJ/m^2 と比較するとメタン生成古細菌の表面はやや疎水性と推察される。また、NC ガラスと PC ガラスの表面張力はそれぞれ 46 mJ/m^2 と 53 mJ/m^2 となり、表面修飾が施された分 PC ガラスの方がやや高い値となっているが、それほど大きな違いはなかった。微生物の付着による自由エネルギー変化 ΔG を Eqs. (1.32)~(1.36)を用いて計算した結果を **Table 2.5** に示す。*M. barkeri* 同士が付着するときの ΔG^{Total} は負の値であることから、*M. barkeri* は自己凝集し易いと推察される。一方、*M. concilii* 同士の付着による ΔG^{Total} はわずかながら正の値であることから、*M. concilii* は自己凝集し難いと考えられる。これ

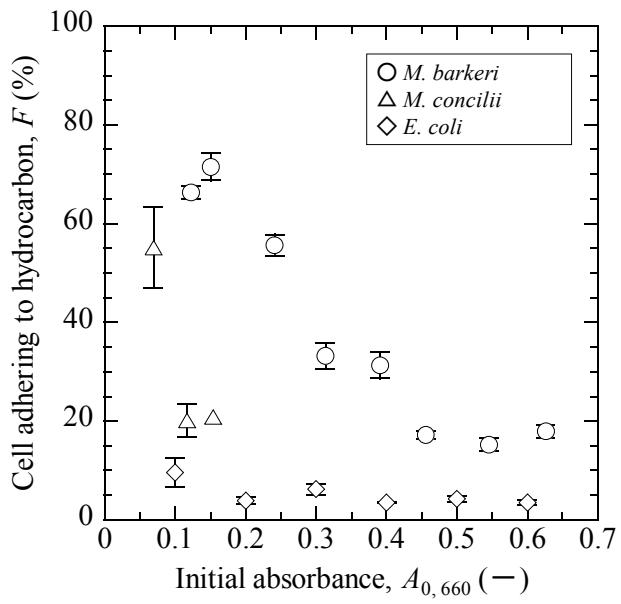


Fig. 2.5 Microbial adhesion to hydrocarbon as a function of the initial absorbance of the cell suspension. (cell: *M. barkeri*, *M. concilii* and *E. coli*; hydrocarbon: *n*-hexadecane).

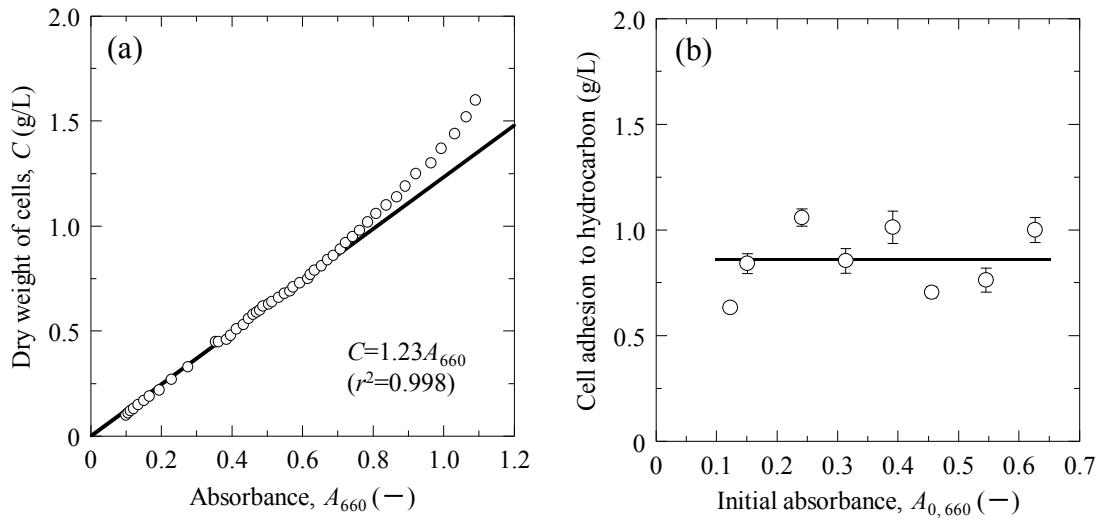


Fig. 2.6 (a) Relationship between dry weight of *M. barkeri* cells, C and the absorbance of the cell suspension, A_{660} , (b) Relationship between *M. barkeri* adhesion to *n*-hexadecane and the initial absorbance of the cell suspension.

Table 2.3

Contact angles of methanogen and slide glass. \pm signs indicate SEM, $N \geq 7$ (except for *M. concilii*). The value of *M. concilii* cell is the mean of two measurements.

Microbe / Substratum	Contact angle (degree)			
	$\theta^{\text{Wa} \alpha}$	$\theta^{\text{Fo} \alpha}$	$\theta^{\text{Mi} \alpha}$	$\theta^{\text{Br} \alpha}$
<i>M. barkeri</i>	78 \pm 3	73 \pm 5	68 \pm 2	
<i>M. concilii</i>	66.3	66.6	62.6	
NC-glass	17 \pm 1	31 \pm 1		21 \pm 1
PC-glass	56 \pm 1	30 \pm 1		6 \pm 1

^a Wa: Water, Fo: Formamide, Mi: Methylene iodide, Br: α -Bromonaphthalene

Table 2.4

Surface tensions of methanogen and slide glass.

Microbe / Substratum	Surface tension (mJ/m ²)				
	γ^{Total}	γ^{LW}	γ^{AB}	γ^+	γ^-
<i>M. barkeri</i>	25	24	0.98	0.01	16
<i>M. concilii</i>	27	27	0.06	0	28
NC-glass	46	42	4.4	0.08	62
PC-glass	53	44	8.4	1.1	17

Table 2.5

Change of free energies of interaction between microbial cell and slide glass, and between microbial cells (mJ/m²).

Cell / Glass, Cell / Cell	ΔG^{LW}	ΔG^{AB}	ΔG^{Total}
<i>M. barkeri</i> / NC-glass	-0.8	18	18
<i>M. barkeri</i> / PC-glass	-0.9	-18	-19
<i>M. barkeri</i> (Self-aggregate)	-0.1	-19	-19
<i>M. concilii</i> (Self-aggregate)	-0.6	4.9	4.3

より、メタン生成古細菌の中でも付着特性に違いがあることがわかった。また、*M. barkeri* の NC ガラスへの付着による ΔG^{Total} は正、PC ガラスへの付着による ΔG^{Total} は負であることから、熱力学的観点から *M. barkeri* は NC ガラスに安定的に付着し難く、PC ガラスに付着し易いと推察される。

2.2.4 微生物の表面官能基

ATR-FTIR 分析により得られたメタン生成古細菌のスペクトルを Fig. 2.7 に示す。どちらのメタン生成古細菌においても、 1648 cm^{-1} にペプチド結合における C=O の伸縮振動の amide I、 1540 cm^{-1} に N-H 変角振動と C-N 伸縮振動の amide II のピーク [12] が確認され、両メタン生成古細菌のそれぞれのピーク強度はほぼ同じであった。また、 1411 cm^{-1} に COO^- の対称伸縮振動のピーク [13]、 1244 cm^{-1} に PO_2^- の非対称伸縮振動のピーク [14] が得られたが、*M. concilii* のピーク強度は *M. barkeri* のものと比べて弱かった。*M. barkeri* では 1727 cm^{-1} に COOH の C=O の非対称伸縮振動のピーク [15] が検出されたが、*M. concilii* では検出されなかった。 $900\text{--}1200 \text{ cm}^{-1}$ に見られるブロードなピークは C-OH、C-C、C-O-C、多糖類などに由来するものが重なり合ったもの [16] で、これも *M. barkeri* と比べて *M. concilii* は弱かった。

次に、酸塩基滴定の結果を Fig. 2.8 に示す。 $[\text{H}^+]_{\text{ex}}$ は *M. concilii* と比べて *M. barkeri* の方が多く、また *M. concilii* の滴定曲線では、 $[\text{H}^+]_{\text{ex}}=0$ となる等量点が pH 4.5 付近であったのに対し、*M. barkeri* の等量点は pH 4 以下であることがわかった。これらの結果は、Fig. 2.4 から得られた *M. barkeri* と *M. concilii* の等電点と定性的に良く一致しており、低い pH に解離定数を持つ官能基が *M. barkeri* 表面に多く存在していることを示唆している。以上より、*M. concilii* の細胞表面電荷が小さい原因是、*M. barkeri* と比較して低い pH に解離定数を持つカルボキシル基 ($\text{pK}_a = 4.3\text{--}4.9$) [17-21] やリン酸基 ($\text{pK}_a = 5.9\text{--}6.9$) [17,19,21] が細胞表層に少ないためと推察される。

2.2.5 微生物の自己凝集

分散媒のイオン強度を変えたときの微生物の自己凝集率を Fig. 2.9 に示す。イオン強度の増加とともに *M. barkeri* の自己凝集率は増加したが、*M. concilii* の自己凝集率はイオン強度によらず一定であることがわかった。*M. barkeri* 同士の付着

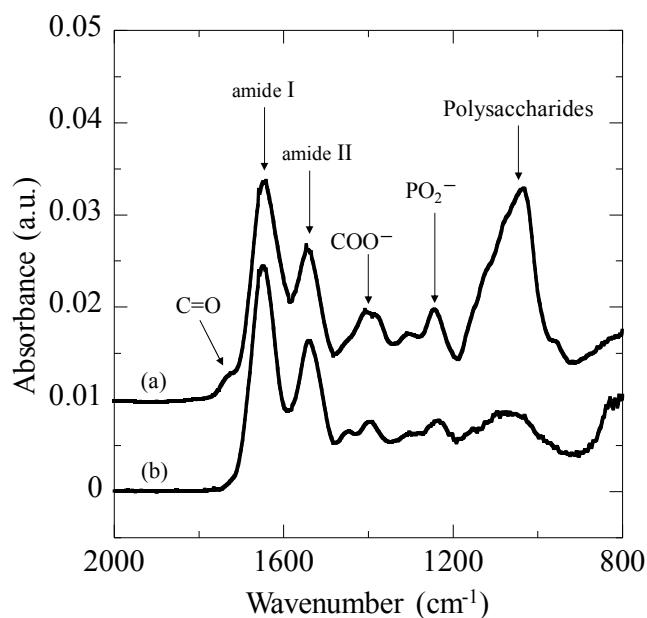


Fig. 2.7 ATR-FTIR spectra of *M. barkeri* (spectrum a) and *M. concili* (spectrum b).

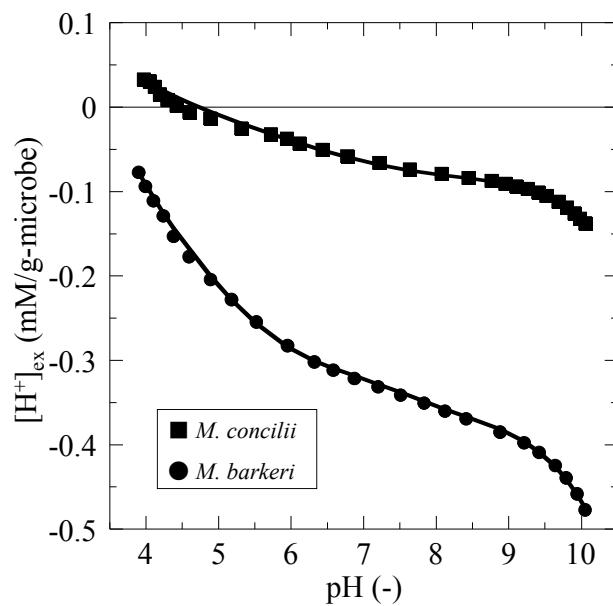


Fig. 2.8 H^+ exchanged for acid-base titration of *M. barkeri* and *M. concili*.

による自由エネルギー変化 ΔG^{Total} は負のため、熱力学的には安定的に付着し易い。また、イオン強度の増加とともに *M. barkeri* の表面電位は小さくなるため静電斥力の影響は小さくなる。このため、イオン強度の増加とともに自己凝集が起こり易くなつたと考えられる。一方、*M. concilii* 同士の付着による自由エネルギー変化 ΔG^{Total} は正のため、熱力学的には安定的に付着し難い。また、*M. concilii* はほぼ無帶電であるため、静電斥力はほとんど作用しない。このため、*M. concilii* の自己凝集率は、イオン強度によらず一定であったと考えられる。自己凝集率が 15~20%であったのは、*M. concilii* の形態がロッド状であるため、振盪によりその一部が絡まつたためと推察される。

ここで改めて、電気泳動移動度から導出される表面電位について考える。既往の研究において、微生物細胞の電気泳動移動度に対して Smoluchowski の式は適用できないことが報告されている[22–26]。例えば、Sonohara ら[25] はグラム陰性菌 *E. coli* とグラム陽性菌 *Staphylococcus aureus* の電気泳動移動を解析し、*E. coli* の表層に存在するリボ多糖層は *S. aureus* が有しているペプチドグリカン層よりも負に帶電しており、柔らかい粒子理論を用いた解析と良く一致したと述べている。これは、粒子表面に存在する高分子鎖が電気泳動移動度に影響を与えるためだと考えられており[27,28]、van der Mei ら[29]は、柔らかい粒子理論によつて求められた電荷密度と柔らかさは、原子間力顕微鏡を用いて実測した微生物細胞表層の性状と良く一致していたと報告していることからも、微生物細胞の EPM 解析でも、細胞表面の高分子層を考慮する必要があると考えられる。そこで、*M. barkeri* を事例に、EPM を Smoluchowski の式と Ohshima の式で解析した結果を比較した。**Fig. 2.10** は Fig. 2.3 で ELS-800 を用いて測定した EPM を Ohshima の式と Smoluchowski の式を用いて解析したときの表面電位である。例えば、分散液のイオン強度が 100 mol/m³ の場合、Ohshima の式では -0.77 mV、Smoluchowski の式では -19.0 mV となり、特にイオン強度が高くなると両者の乖離は大きくなつた。これは、Smoluchowski の式では微生物表層に存在する高分子電荷層内の液流れを考慮できないため、表面電位が過大に評価されていることが挙げられる。そこで、液相中におけるコロイド粒子の分散性を評価できる DLVO 理論を用いて、Ohshima の式による表面電位 (V_{oh}) と Smoluchowski の式による表面電位 (V_{smol}) から *M. barkeri* 間に働くポテンシャルを計算した。

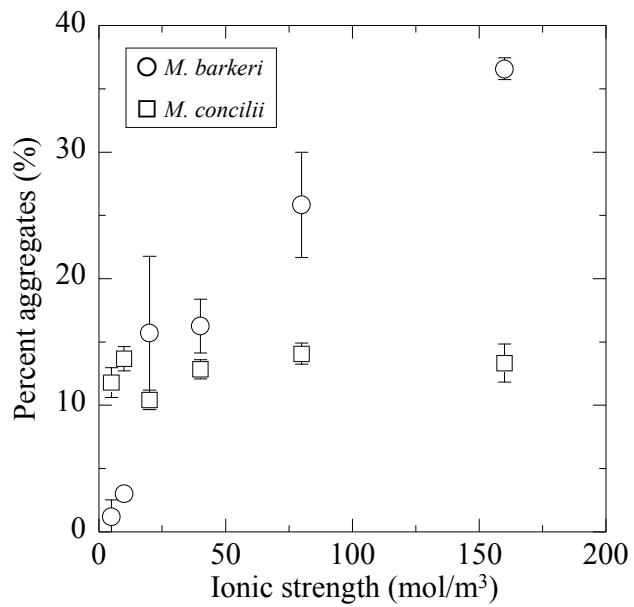


Fig. 2.9 Percent aggregates of *M. barkeri* and *M. concili* as a function of ionic strength of cell suspension.

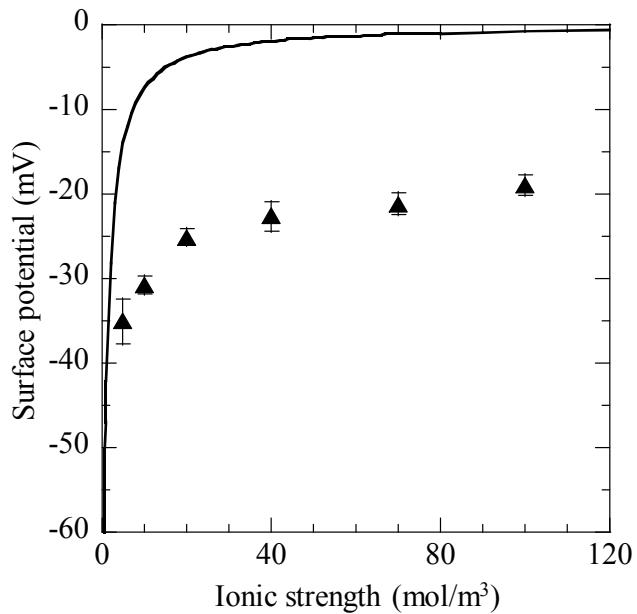


Fig. 2.10 Surface potential of *M. barkeri* in an NaCl aqueous solution as a function of the ionic strength. The solid line represents the curve of the Ohshima equation. The solid triangles denote the estimation from the Smoluchowski equation.

M. barkeri 間に働くポテンシャルを計算した結果の一例(イオン強度: 40 mol/m³)を **Fig. 2.11a** に示す。*M. barkeri* の粒子径は 3 μm を用いた。Smoluchowski の式による表面電位を使って微生物間ポテンシャルを計算すると、475 kT のポテンシャル障壁があることがわかった。一方、 V_{oh} を用いた場合、ポテンシャル障壁は存在しなかった。**Fig. 2.11b** は、各イオン強度における V_{smol} と V_{oh} を用いて計算されたポテンシャル障壁を比較した結果である。いずれのイオン強度においても、 V_{smol} を用いると 300 kT 以上のポテンシャル障壁が出ているが、 V_{oh} の場合 40 mol/m³ を下回るイオン強度で初めてポテンシャル障壁が出現することが分かる。ここで、Fig. 2.10 の自己凝集実験の結果と比較すると、5 と 10 mol/m³においては自己凝集率が大きく低下する一方、40 mol/m³ 以上では自己凝集していることが分かる。このことは、*M. barkeri* の自己凝集は、DLVO 理論を用いた粒子の分散凝集理論に従っており、 V_{oh} は *M. barkeri* の表面電位を表現できていることを示唆している。よって、微生物細胞の表面電位を正確に解析する場合には、細胞表層の高分子電荷層を考慮する必要があることが示唆された。

2. 2. 6 微生物の固体平板への付着

分散媒のイオン強度を変えたときにスライドガラス上に付着していた *M. barkeri* の面積占有率を **Fig. 2.12** に示す。イオン強度によらず、*M. barkeri* は NC ガラスにはほとんど付着しないことがわかった。*M. barkeri* の NC ガラスへの付着による自由エネルギー変化 ΔG^{Total} は正のため、熱力学的に付着し難く、*M. barkeri*、NC ガラスとともに負に帯電しているため静電斥力が作用し、安定的に付着できなかったものと考えられる。一方、*M. barkeri* は PC ガラスによく付着することがわかった。*M. barkeri* の PC ガラスへの付着による自由エネルギー変化 ΔG^{Total} は負のため、熱力学的に付着し易く、PC ガラスは正に帯電しているため静電引力が作用して、安定的に付着したものと考えられる。また、イオン強度が増加すると、*M. barkeri* の面積占有率は減少した。これは、イオン強度が増加すると、*M. barkeri* と PC ガラスの表面電位の絶対値は減少し、静電引力が弱くなつたためと考えられる。

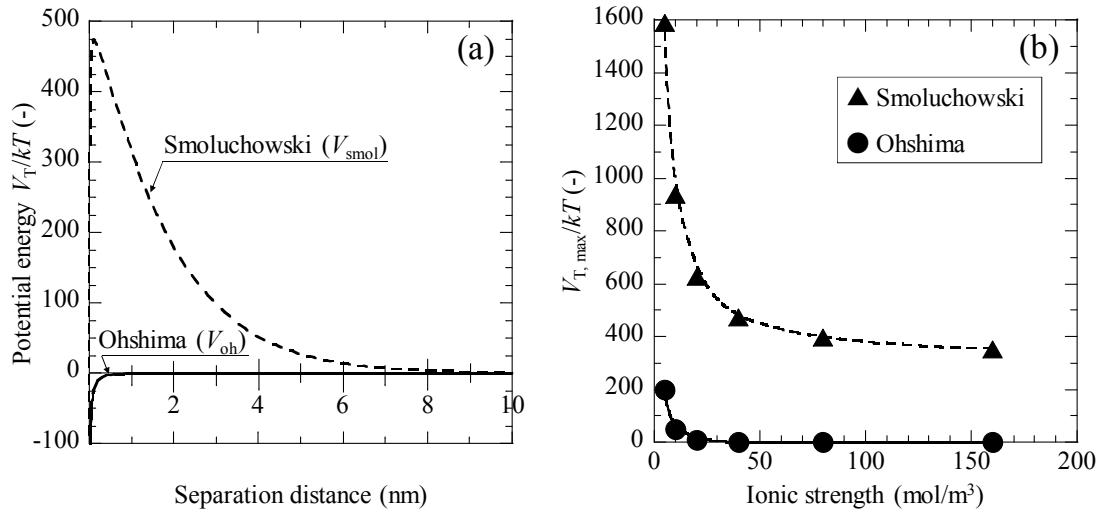


Fig. 2.11 (a) Interaction energies between 3 μm microbial cells of *M. barkeri* in a 40 mM NaCl solution as a function of the separation distance: the solid and the dash lines represent the DLVO theory using the surface potential data estimated by the Ohshima and the Smoluchowski equations, respectively. (b) The potential energy barriers as a function of the ionic strength.

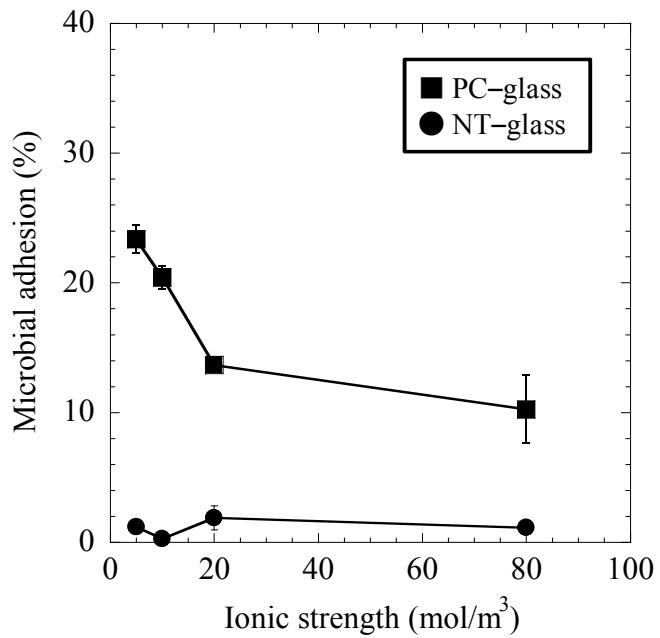


Fig. 2.12 Microbial adhesion of *M. barkeri* to NT-glass and PC-glass as a function of ionic strength of cell suspension.

2.2.7 微生物の球状粒子への付着

Fig. 2.13 に *M. barkeri* を各固定化担体へ付着させた場合の付着量の経時変化を示す。付着量は、いずれの場合も約 2 時間振盪させた段階でほぼ一定となったそこで、6 時間振盪させた際の各固定化担体について、固定化担体の添加量を変えることで吸着等温図を作成した。その結果を **Fig. 2.14** に示す。ここで、横軸の平衡濃度は 6 時間振盪後に固定化担体のみを沈降させた上澄みである *M. barkeri* 懸濁液の吸光度から、Fig. 2.6a の相関式を用いて換算した微生物濃度を示す。*M. barkeri* は陰イオン交換樹脂に対し I 型の吸着等温線を示し、III 型を示す疎水性樹脂と比較してよく付着することがわかった。一方、陽イオン交換樹脂にはほとんど付着しないことがわかった。100 mol/m³ NaCl 溶液中での *M. barkeri* の表面電位は -0.77 mV と推察される (Table 2.2) ので、固定化担体と微生物間に電気的な引力が殆んど作用していないことから、微生物は陰イオン交換樹脂に対し、表層のカルボキシル基やリン酸基などの酸性官能基によって付着していると推察される。一方、疎水性樹脂に対しては、平衡濃度が上昇するにつれ付着が進行したことから、微生物間の ΔG^{Total} が負である *M. barkeri* が微生物濃度の上昇と共に凝集し、接触面積が増えることでぬれ性が支配因子となって、付着していると推察される。

固定化実験後、陰イオン交換樹脂と疎水性樹脂の粒子表面を電子顕微鏡により観察した。平衡濃度が 0.4 g/L の際の観察像を **Fig. 2.15** に示す。陰イオン交換樹脂表面には均一に微生物が付着している様子が観察された。一方、疎水性樹脂表面には、微生物の凝集体が所々付着している様子が観察された。陰イオン交換樹脂が、メタン生成古細菌の固定化担体として有用である可能性が示された。

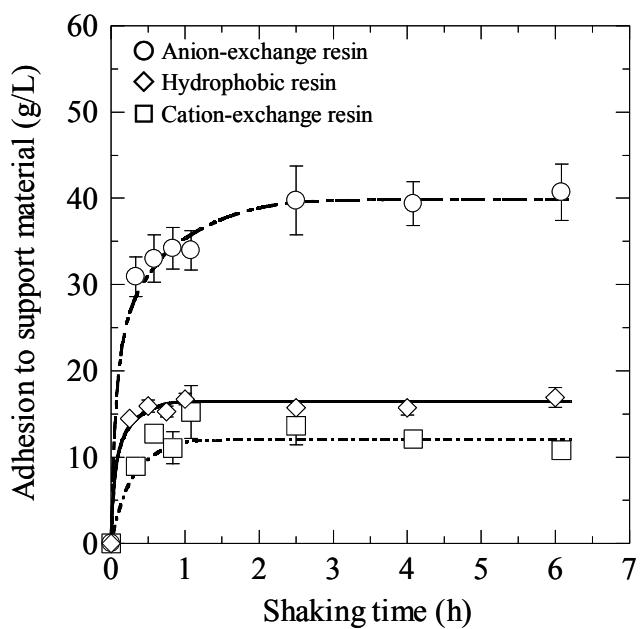


Fig. 2.13 Adhesion of *M. barkeri* to support materials as a function of the shaking time. (Ionic strength, 100 mol/m³; initial absorbance of the cell suspension, 0.6; volume of the cell suspension, 3.0 ml; volume of support materials, 0.02 ml; support materials: anion-exchange resin with quaternary ammonium groups (SuperQ-650M), cation-exchange resin with sulfopropyl groups (SP-650M), and hydrophobic resin with butyl groups (Butyl-650M)).

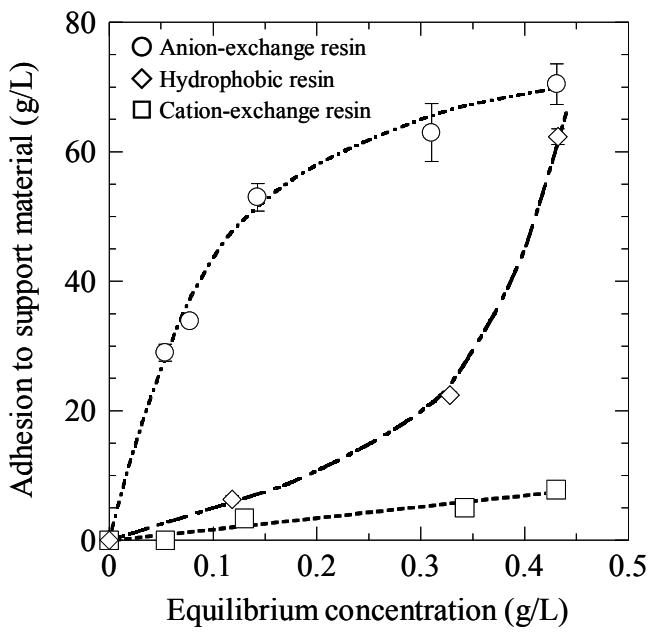


Fig. 2.14 Adhesion of *M. barkeri* to support materials as a function of the equilibrium concentration of the cells. (Ionic ionic strength, 100 mol/m³; support materials: anion-exchange resin with quaternary ammonium groups (SuperQ-650M), cation-exchange resin with sulfopropyl groups (SP-650M), and hydrophobic resin with butyl groups (Butyl-650M)).

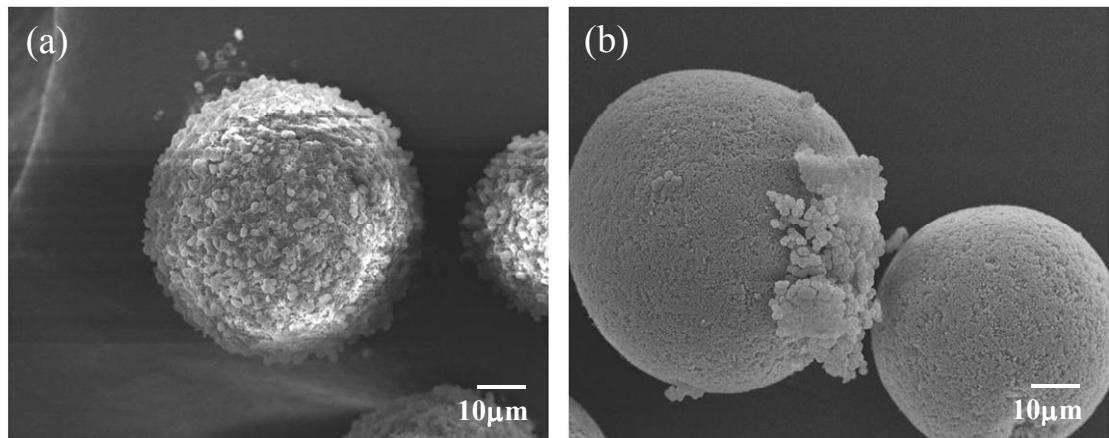


Fig. 2.15 Scanning electron microscope images of *M. barkeri* on support material for an equilibrium concentration of the cell suspension of about 0.4 g/L: (a) anion-exchange resin, (b) hydrophobic resin.

結言

微生物をバイオコロイドと見なしたコロイド科学の観点から、メタン生成古細菌をモデル微生物として細胞の表面性状分析を行い、それらが界面付着現象に及ぼす影響について検討を行った。その結果、以下の結論を得た。

- 1) pH が一定の時 *M. barkeri* と *M. concilii* はイオン強度が増加すると EPM の絶対値は減少し、中性では *M. concilii* はほぼ 0 ($-0.09 \text{ }\mu\text{m}\cdot\text{cm}/(\text{V}\cdot\text{s})$) に収束するが、*M. barkeri* は 0 ではない一定値 ($-1.45 \text{ }\mu\text{m}\cdot\text{cm}/(\text{V}\cdot\text{s})$) に収束することがわかった。また、*M. barkeri* は pH 2 附近に等電点を持つ負帯電性の微生物、*M. concilii* は pH 4.5 附近に等電点を持つほぼ無帯電の微生物であることがわかった。
- 2) FTIR 分析と酸塩基滴定より、両者の帶電性の違いは、細胞表面に存在する低い pH に解離定数を持つカルボキシル基やリン酸基の量の違いであることがわかった。
- 3) MATH 法を用いて、メタン生成古細菌の疎水性を定性分析した結果、*E. coli* と比較して、メタン生成古細菌は共に疎水性であることがわかった。また、微生物層の接触角測定の結果から、*M. barkeri* と *M. concilii* の表面張力はそれぞれ 25 mJ/m^2 と 27 mJ/m^2 であり、共に低い表面張力を有することがわかった。
- 4) メタン生成古細菌の自己凝集実験より、微生物懸濁液のイオン強度が高くなると *M. barkeri* 同士の静電斥力が減少して自己凝集が進行することがわかった。一方、*M. concilii* 同士では静電斥力はほとんど作用せず、熱力学的に付着し難いため、イオン強度によらず自己凝集率は低いことがわかった。
- 5) 微生物細胞の表面電位を推算する際には、細胞表層の高分子電荷層を考慮する必要があることを確認した。柔らかい粒子モデルにより計算された表面電位を用いて *M. barkeri* の分散性を DLVO 理論によって計算した結果は、*M. barkeri* の自己凝集試験の結果と一致した。
- 6) 固体平板上への微生物付着を検討した結果、*M. barkeri* は付着による自由エネルギー変化 ΔG^{Total} が負であり、正に帶電している PC ガラスへ良く付着することがわかった。
- 7) 球状担体上への固定化試験を行った結果、*M. barkeri* は陰イオン交換樹脂表面に均一に付着することが分かり、疎水性樹脂表面には部分的に凝集体が付着することがわかった。一方で、陽イオン交換樹脂には付着しなかった。固定化担体としては陰イオン交換樹脂が適していることが示唆された。

Nomenclature

A_0	= Initial absorbance of cell suspension before agitation	(-)
A_t	= Absorbance of cell suspension after agitation	(-)
C	= Dry weight of cells	(g/L)
C_0	= Initial dry weight of cells in the solution	(g/L)
C_t	= Dry weight of cells in the solution after agitation	(g/L)
e	= Elementary electronic charge	(C)
F	= Percent cell adhering to hydrocarbon	(%)
F_{agg}	= Percent aggregates of microbial cell	(%)
N	= Density of charged group within the polymer layer	(1/m ³)
T	= Temperature	(K)
u	= Electrophoretic mobility	(m ² /(V·s))
V_{oh}	= Potential estimated by Ohshima's equation	(J)
V_{smol}	= Potential estimated by Smoluchowski equation	(J)
V_s	= Volume of microbial cell suspension	(L)
Z	= Valency of charged groups within the polymer Layer	(-)
γ	= Surface tension	(J/m ²)
γ^+	= Electron–acceptor parameter of surface tension	(J/m ²)
γ^-	= Electron-donor parameter of surface tension	(J/m ²)
ΔG	= Free energy of interaction	(J/m ²)
θ	= Contact angle	(degree)
λ	= Softness parameter	(1/m)

Superscript

AB	= Lewis acid–base component
LW	= Lifshitz–van der Waals component
Total	= Sum of components

References

- [1] M.P. Bryant, D.R. Boone, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37** (1987) 169–170.
- [2] G.B. Patel, *Can. J. Microbiol.* **30** (1984) 1383–1396.
- [3] K. R. Sowers and H. J. Schreier, *Archaea A Laboratory Manual Methanogens*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1995.
- [4] S. Mori, H. Okamoto, *Fusen* **27** (1980) 117–126.
- [5] M. Rosenberg, D. Gutnick, E. Rosenberg, *FEMS Microbiol. Lett.* **9** (1980) 29–33.
- [6] G.I. Geertsema-Doornbusch, H.C. van der Mei, H.J. Busscher, *J. Microbiol. Methods* **18** (1993) 61–68.
- [7] H.C. van der Mei, A.H. Weerkamp, H.J. Busscher, *J. Microbiol. Methods* **6** (1987) 277–287.
- [8] H.C. van der Mei, H.J. Busscher, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **11** (1998) 213–221.
- [9] C.J. van Oss, *Interfacial Forces In Aqueous Media*, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, 2006.
- [10] H.J. Busscher, A.H. Weerkamp, H.C. van Der Mei, A.W. van Pelt, H.P. de Jong, J. Arends, *Appl. Environ. Microbiol.* **48** (1984) 980–983.
- [11] T. Nomura, H. Narahara, H. Tokumoto, Y. Konishi, *Adv. Powder Technol.* **20** (2009) 537–541.
- [12] J.L. Kadurugamuwa, T.J. Beveridge, *J. Bacteriol.* **177** (1995) 3998–4008.
- [13] G. Socrates, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York, 2004.
- [14] W. Jiang, A. Saxena, B. Song, B.B. Ward, T.J. Beveridge, S.C.B. Myneni, *Langmuir* **20** (2004) 11433–11442.
- [15] F.D. Castro, J. Sedman, A.A. Ismail, B. Asadishad, N. Tufenkji, *Environ. Sci. Technol.* **44** (2010) 4136–4141.
- [16] A. Omoike, J. Chorover, *Biomacromolecules* **5** (2004) 1219–1230.
- [17] R.E. Martinez, D.S. Smith, E. Kulczycki, F.G. Ferris, *J. Colloid Interface Sci.* **253** (2002) 130–139.
- [18] A. Hetzer, C.J. Daughney, H.W. Morgan, *Appl. Environ. Microbiol.* **72** (2006) 4020–4027.
- [19] P.-G. Burnett, H. Heinrich, D. Peak, P.J. Bremer, A.J. McQuillan, C.J. Daughney, *Geochim. Cosmochim. Acta* **70** (2006) 1914–1927.
- [20] N. Yee, D.A. Fowle, F.G. Ferris, *Geochim. Cosmochim. Acta* **68** (2004) 3657–3664.

- [21] B.T. Ngwenya, I.W. Sutherland, L. Kennedy, *Appl. Geochemistry* **18** (2003) 527–538.
- [22] M.C. van Loosdrecht, J. Lyklema, W. Norde, G. Schraa, A.J. Zehnder, *Appl. Environ. Microbiol.* **53** (1987) 1898–1901.
- [23] S. Kawahata, H. Ohshima, N. Muramatsu, T. Kondo, *J. Colloid Interface Sci.* **138** (1990) 182–186.
- [24] H.H.M. Rijnaarts, W. Norde, J. Lyklema, A.J.B. Zehnder, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **4** (1995) 191–197.
- [25] R. Sonohara, N. Muramatsu, H. Ohshima, T. Kondo, *Biophys. Chem.* **55** (1995) 273–277.
- [26] S. Takashima, H. Morisaki, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **9** (1997) 205–212.
- [27] H. Ohshima, K. Makino, T. Kato, K. Fujimoto, T. Kondo, H. Kawaguchi, *J. Colloid Interface Sci.* **159** (1993) 512–514.
- [28] K. Makino, S. Yamamoto, K. Fujimoto, H. Kawaguchi, H. Ohshima, *J. Colloid Interface Sci.* **166** (1994) 251–258.
- [29] H.C. van Der Mei, H.J. Busscher, R. Bos, J. De Vries, C.J.P. Boonaert, Y.F. Dufrêne, *Biophys. J.* **78** (2000) 2668–2674.

第3章 微生物の細胞外構造物が付着挙動へ及ぼす影響

固体界面に付着した微生物は、増殖する際に、細胞外高分子物質（Extra polymeric substance, EPS）を産生してバイオフィルムを形成することで、様々な耐性（熱や薬剤等）が発現し、環境適用性が向上する。このため、医療器具の病原菌による汚染や食中毒の原因となる食品工場内の汚染など、微生物の除去や殺菌が必要なケースにおいてバイオフィルムが形成されれば、排除が極めて困難となる[1]。また、鞭毛などの細胞外線状器官がある場合、微生物固体間にボテンシャル障壁が生じたとしても、低い曲率によりその影響を受けず、固体表面に到達することができるため、微生物の付着を促進する要因となる[2]。したがって、微生物の付着現象を考える場合、細胞表層の EPS や線状構造物（鞭毛や線毛）の影響因子を考慮することは必要不可欠である。

第3章では、鞭毛を持たない非運動性の乳酸菌と鞭毛を持つ運動性の大腸菌をモデル微生物に用いて、EPS や線状構造物が微生物の付着挙動に及ぼす影響について、微生物と固体の表面性状の実測値を用いた DLVO 理論と Gibbs 自由エネルギー変化 ΔG による検討を行った。

3.1 実験方法

3.1.1 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 と周鞭毛を持つ運動性桿菌の大腸菌 *Escherichia coli* JM 109 を用いた。*L. lactis* は MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) 培地により 30°C で静置培養、*E. coli* は Luria–Bertani 培地 (1.0% w/v tryptone, 0.5% w/v yeast extract (Bacto) and 1.0% w/v NaCl) により 30°C で振盪培養を行った。前培養した菌液は、吸引ろ過により培地成分を除去してから遠心分離により集菌した。集菌した微生物の一部は、ボルテックスミキサーを用いて生理食塩水でさらに 3 回洗浄（各 30 s）し、微生物に付着した EPS を極力取り除いた[3]。実験には、これら微生物をそれぞれ所望の濃度に調製した NaCl 水溶液に分散してから用いた。以後、培地成分を除去しただけの微生物を“未洗浄微生物”、洗浄により EPS を除去した微生物を“洗浄微生物”と

呼ぶ。

L. lactis 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。200 mol/m³ 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°C 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、*E. coli* を用いた付着実験には、負に帯電したスライドガラス (S1225、松波硝子工業；表面性状は S7224 同等品) を用いた。なお、スライドガラスは 2.1.1 節に準じて前処理した。

3.1.2 キャラクタリゼーション

L. lactis と *E. coli*、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 (ELS-800、大塚電子) で、*L. lactis* と *E. coli* の粒子径は動的光散乱式粒度分布計 (NICOMP 380 ZLS、Particle Sizing System) で測定し、流体力学相当径を得た。EPM の測定結果より、シリカ粒子のゼータ電位は Smoluchowski の式、微生物の表面電位は Eq. (1.7) で表される柔らかい粒子モデルを用いてそれぞれ算出した。スライドガラスの表面電位は、Table 2.2 で示した NC ガラスの値を用いた。

また、動的接触角測定装置 (FTA125、First Ten Ångstroms) を用いて、微生物をフィルター上に集菌した微生物層と、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 -ブロモナフタレン) の接触角を測定し、Eq. (1.31) に示した Young–Dupré の式を用いて微生物とシリカ粒子の各種表面張力を見積もった。スライドガラスの表面張力は第 2 章の Table 2.4 で示した NC ガラスの値を用いた。

微生物のモルフォロジーは、原子間力顕微鏡 (MFP-3D-BIO-J、アサイラムリサーチ) により、シリコンカンチレバー (OMCL-AC200TS、オリンパス) を用いて観察した。

3.1.3 微生物の固体表面への付着実験

微生物の代謝物が付着挙動に及ぼす影響を *L. lactis* のシリカ粒子への付着実験で確認した。イオン強度が 5~40 mol/m³になるように調製した NaCl 水溶液に、*L. lactis* を加えて波長 500 nm における初期吸光度 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 を試験管に加えて 120 rpm で攪拌した。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、懸濁液の吸光度 A_t を測定した。*L. lactis* のシリカ粒子への付着率 F (%) は、Eq. (2.1)を用いて評価した。

微生物の細胞外器官が付着挙動に及ぼす影響を *E. coli* のスライドガラス上への付着実験で確認した。イオン強度が 10~150 mol/m³になるように調製した NaCl 水溶液に、*E. coli* を加えて波長 660 nm における初期吸光度 A_0 を約 0.3 に調製した懸濁液 70 μl をスライドガラス上に滴下し、カバーガラス (24 mm × 32 mm) を乗せて厚さ約 90 μm の液膜を形成した。4 分間静置後、生物顕微鏡 (BH-2、オリンパス) を用いて、スライドガラスに付着している微生物を計数した。なお、*E. coli* は鞭毛が存在するため、ガラス表面に付着して動かない微生物と鞭毛で付着して微動している微生物は区別した。

3.2 実験結果および考察

3.2.1 表面性状

実験に用いた *L. lactis* と *E. coli* の AFM 像を **Fig. 3.1** に示す。*L. lactis* は中位径 D_{p50} が約 1 μm の球菌で細胞表面に線状構造物は観察されなかった。一方、*E. coli* は複数の鞭毛と多数の線毛を持つ中位径 D_{p50} が約 0.6 μm の桿菌であることが確認された。また、各微生物の粒度分布測定結果から求めた中位径と幾何標準偏差を **Table 3.1** に示す。*L. lactis* は文献値[3]を記載した。

分散媒のイオン強度を変えた時の洗浄と未洗浄の *L. lactis*[3]と *E. coli* の EPM 測定結果を **Fig. 3.2** に示す。また測定結果を Ohshima の式でフィッティングして推算した表面電位、シリカ粒子の EPM 測定結果から Smoluchowski の式を用いて求めたゼータ電位を Table 3.1 に示す。なお、EPM のフィッティングパラメータである、流れの侵入距離 $1/\lambda$ と固定電荷密度 ZeN も Table 3.1 に併記した。

分散媒のイオン強度が増加すると、微生物、シリカ粒子は、共に電位の絶対値が減少した。また、EPM は、*E. coli* では洗浄と未洗浄微生物で有意差が見られなかつたが、*L. lactis* では EPS を除去すると EPM が減少することがわかつた。*E. coli* と比較して *L. lactis* は EPS の代謝量が多く、*L. lactis* 表面に存在する EPS が表面電荷に影響を及ぼしたことが原因と推察される。しかし、推算した *L. lactis* と *E. coli* の表面電位は、洗浄微生物と未洗浄微生物で有意差がないこともわかつた。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。

L. lactis[3]、*E. coli*、NT シリカ、AmP シリカの接触角を **Table 3.2** に、測定結果から求めた表面張力を **Table 3.3** 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、これらの結果に基づき、微生物がスライドガラス表面に付着した時の表面自由エネルギー変化 ΔG の計算結果を **Table 3.4** に示す。いずれの場合においても ΔG^{Total} は正となつた。これより、熱力学的には、*L. lactis* はシリカ粒子、*E. coli* はガラス表面に安定的に付着しないことが示唆された。

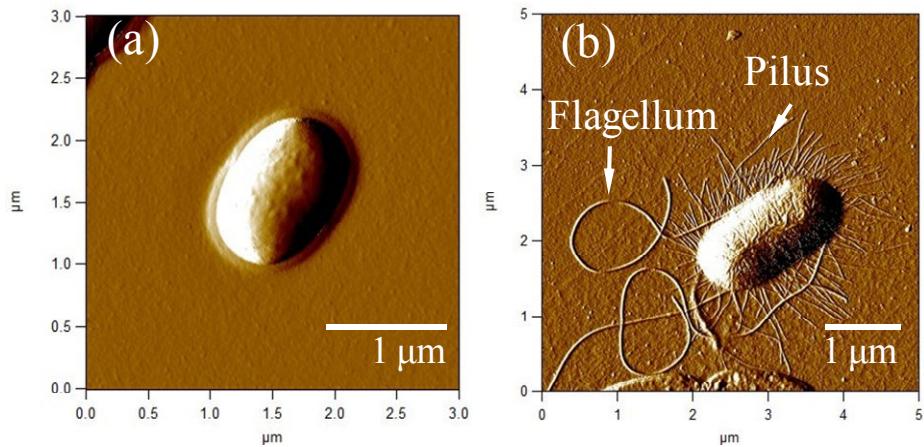


Fig. 3.1 Atomic force microscopy image of (a) *L. lactis* JCM5805 and (b) *E. coli* JM109. Both images are intact cells.

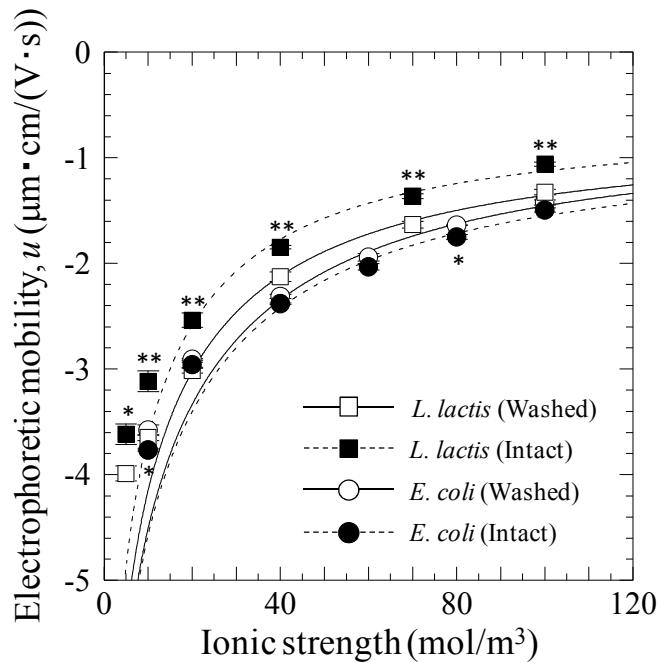


Fig. 3.2 Electrophoretic mobility of *L. lactis* JCM5805 and *E. coli* JM109 cells in NaCl aqueous solutions as a function of ionic strength. The curve fits are based on Ohshima's equation. (*) $P < 0.05$ and (**) $P < 0.01$ versus washed cell. Error bars indicate SEM, $N \geq 3$.

Table 3.1 Hydrodynamic diameters and electrostatic surface properties of *L. lactis* JCM5805 and *E. coli* JM109 cells and substrate. D_{p50} is the hydrodynamic diameter, and σ_g is the standard deviation of the cell size distribution in the 160 mol/m³ NaCl aqueous solution. ± signs indicate SEM, $N \geq 5$.

Bacterial cell / Substrate	Hydrodynamic diameter		Surface potential (mV)						Soft particle fitting parameter	
	D_{p50} (μm)	σ_g (-)	5 mol/m ³	10 mol/m ³	20 mol/m ³	40 mol/m ³	80 mol/m ³	160 mol/m ³	$1/\lambda$ (nm)	ZeN (M C/m^3)
Bacteria										
<i>L. lactis</i> JCM5805 (washed) [3]	0.95	1.29	-54.2	-38.7	-25.2	-14.8			0.84	-8.8
<i>L. lactis</i> JCM5805 (intact)			-52.7	-37.3	-24.1	-14.0			0.86	-7.1
<i>E. coli</i> JM109 (washed)	0.62	1.28		-41.6	-27.6	-16.5	-9.0	-4.6	0.72	-11.2
<i>E. coli</i> JM109 (intact)	0.65	1.27		-40.6	-26.8	-15.9	-8.6	-4.4	0.80	-10.7
Substrate										
NT silica			-25.2	-21.3	-17.4	-14.6				
			± 0.1	± 0.4	± 0.4	± 0.3				
AmP silica			6.5	6.2	5.1	5.1				
			± 0.5	± 1.1	± 0.7	± 0.3				

Table 3.2 Contact angles of *L. lactis* JCM5805 and *E. coli* JM109 cells and substrate. \pm signs indicate SEM, $N \geq 7$.

Bacterial cell / Substrate	Contact angle (degree)		
	$\theta^{\text{Wa} \alpha}$	$\theta^{\text{Fo} \alpha}$	$\theta^{\text{Br} \alpha}$
Bacteria			
<i>L. lactis</i> JCM5805 (washed)	17 \pm 1	37 \pm 1	31 \pm 1
<i>L. lactis</i> JCM5805 (intact)	13 \pm 1	22 \pm 1	33 \pm 1
<i>E. coli</i> JM109 (washed)	22 \pm 2	34 \pm 1	37 \pm 1
<i>E. coli</i> JM109 (intact)	22 \pm 1	30 \pm 1	36 \pm 1
Substrate			
NT silica	12 \pm 1	16 \pm 1	21 \pm 1
AmP silica	20 \pm 2	31 \pm 3	24 \pm 1

^a Wa, Water; Fo, Formamide; Br, α -Bromonaphthalene

Table 3.3 Surface tensions of *L. lactis* JCM5805 and *E. coli* JM109 cells and substrate.

Bacterial cell / Substrate	Surface tension (mJ/m ²)				
	γ^{Total}	γ^{LW}	γ^{AB}	γ^+	γ^-
Bacteria					
<i>L. lactis</i> JCM5805 (washed)	41	38	3.0	0.03	67
<i>L. lactis</i> JCM5805 (intact)	52	38	15	0.96	58
<i>E. coli</i> JM109 (washed)	46	36	9.7	0.40	60
<i>E. coli</i> JM109 (intact)	49	36	12	0.67	56
Substrate					
NT silica	54	42	13	0.74	55
AmP silica	47	41	5.9	0.15	59

Table 3.4 Interfacial free energies ΔG , and Hamaker constant A , between *L. lactis* or *E. coli* strains and the substrate.

Substrate	Bacteria	Interfacial energy (mJ/m ²)			Hamaker constant A (J)
		ΔG^{LW}	ΔG^{AB}	ΔG^{Total}	
NT silica	<i>L. lactis</i> JCM5805 (washed)	-5.4	50	44	5.1×10^{-21}
	<i>L. lactis</i> JCM5805 (intact)	-5.2	41	36	4.8×10^{-21}
AmP silica	<i>L. lactis</i> JCM5805 (washed)	-5.2	55	50	4.9×10^{-21}
	<i>L. lactis</i> JCM5085 (intact)	-5.0	45	40	4.7×10^{-21}
Glass slide	<i>E. coli</i> JM109 (washed)	-4.7	50	46	4.4×10^{-21}
	<i>E. coli</i> JM109 (intact)	-4.8	47	42	4.6×10^{-21}

3.2.2 細胞外代謝物が付着挙動に及ぼす影響

分散媒のイオン強度を変えた時のシリカ粒子表面への *L. lactis* 付着率を Fig. 3.3 に示す。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とがわかった。また、洗浄と未洗浄微生物の各粒子への付着率を比較すると、NT シリカでは洗浄よりも未洗浄微生物の方が高いが、AmP シリカでは洗浄と未洗浄微生物の間に有意差がないこともわかった。これらの結果について、1.2.2 節に準じて DLVO 理論を用いて考察を行った。

Fig. 3.4 は *L. lactis* とシリカ粒子の表面物性の実測値に基づき、DLVO 理論を用いて洗浄微生物と NT、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である。なお、洗浄と未洗浄微生物では、ポテンシャル曲線にはほとんど違いが見られなかつたため、洗浄微生物の計算結果のみを示した。

L. lactis-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 mol/m^3 でほぼ消失することがわかった。洗浄微生物の付着率は、イオン強度の増加と共に多少増加したが、ポテンシャル障壁が消失した 40 mol/m^3 においても、微生物付着率は大幅に増加しなかつた。これは、ポテンシャル障壁が消失することで微生物は粒子表面に接近できるが、振盪場では微生物に外力が作用する上に ΔG^{Total} が正のため、安定に付着できなかつたと推察される。一方、未洗浄微生物の付着率が大幅に増加した原因是、EPS の曲率が微生物自身と比べて小さいと推測されるため、EPS-固体間にポテンシャル障壁が存在しないことが理由と考えられる。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、未洗浄微生物の付着率がかなり高いことから、微生物は EPS によりシリカ表面に不可逆的に付着したと推察される。

L. lactis-AmP シリカ間では、イオン強度によらずポテンシャル障壁は存在しなかつた。洗浄微生物の付着率がイオン強度の増加と共に減少した理由は、微生物と AmP シリカの電位の絶対値が減少したことにより、微生物-粒子間の静電相互作用が減少したためと、 ΔG^{Total} 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、微生物-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。

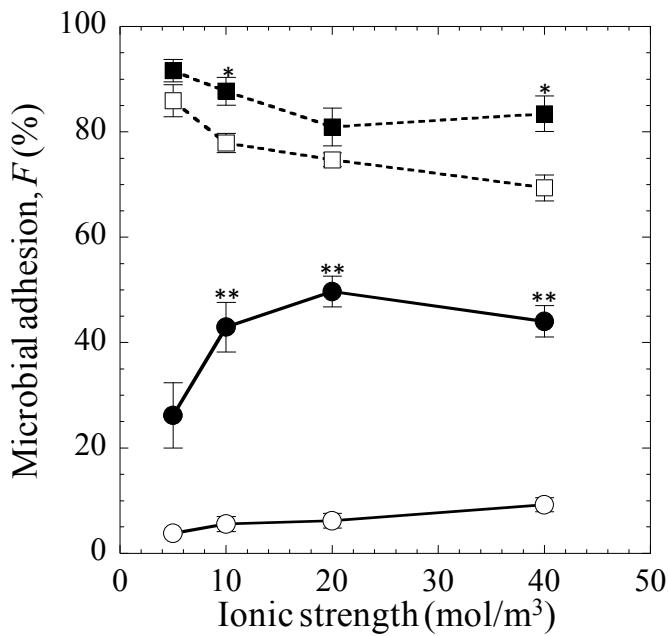


Fig. 3.3 Adhesion ratio of *L. lactis* to silica particles as a function of ionic strength; open symbol: washed cell, closed symbol: intact cell, circle: NT silica, square: AmP silica. (*) $P < 0.05$ and (**) $P < 0.01$ versus washed cell. Error bars indicate SEM, $N \geq 3$.

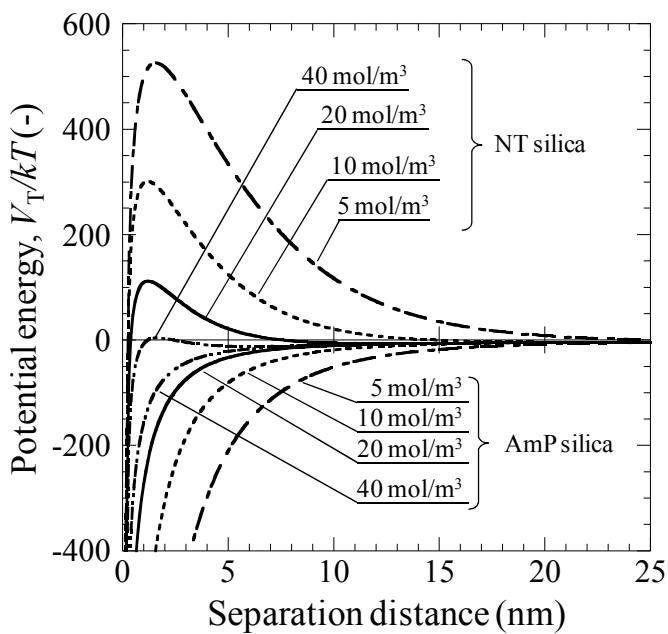


Fig. 3.4 Potential curves between washed *L. lactis* and silica particle calculated using DLVO theory.

3.2.3 細胞外器官が付着挙動に及ぼす影響

分散媒のイオン強度を変えた時の、スライドガラス表面への単位面積あたりの *E. coli* の付着微生物数と、付着微生物のうち鞭毛で付着している微生物の割合を **Fig. 3.5**、*E. coli* 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 *E. coli*-スライドガラス間のポテンシャル曲線を **Fig. 3.6a** に示す。**Fig. 3.6b** 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、洗浄微生物と未洗浄微生物では、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、洗浄微生物の計算結果のみを示した。**Fig. 3.5** より、イオン強度が増加すると、ガラス表面に付着する微生物数は増加することがわかった。これは、**Fig. 3.6b** 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 mol/m^3 以下の低イオン強度条件では、微生物-ガラス間には高いポテンシャル障壁が存在するため、DLVO 理論に基づくと微生物の付着は困難と考えられるにも関わらず、微生物はガラス表面に多数付着しており、その一部は鞭毛で付着し、鞭毛運動により微動していることがわかった。**Fig. 3.1b** より、鞭毛は微生物-ガラス間に働く相互作用距離や EPS、線毛の長さと比べて十分長く [4]、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微生物が鞭毛で付着したものと考えられる。加えて、鞭毛で付着して微動している微生物は、再び脱離して別の場所に移動して再付着する現象も観察されたことから、微生物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微生物の脱離はほとんど観察されなかったことに加えて、洗浄微生物と未洗浄微生物の付着微生物数に大きな違いは見られなかつたことから、ガラス表面に付着して動かない微生物は 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、鞭毛で付着している微生物は 5% 以下となった。これは、イオン強度が高くなると、微生物-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^{Total} 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、微生物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微生物に作用していないことも影響していると推察される。

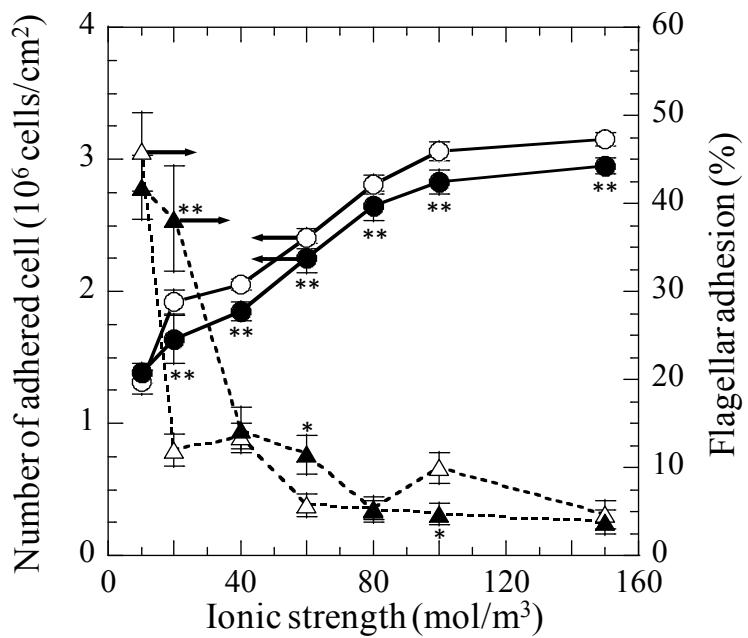


Fig. 3.5 Adhesion behavior of *E. coli* to slide glass as a function of ionic strength; open symbol: washed cell, closed symbol: intact cell, circle: number of adhered cell, triangle: flagellar adhesion.
(*) $P < 0.05$ and (**) $P < 0.01$ versus controls. Error bars indicate SEM, $N \geq 9$.

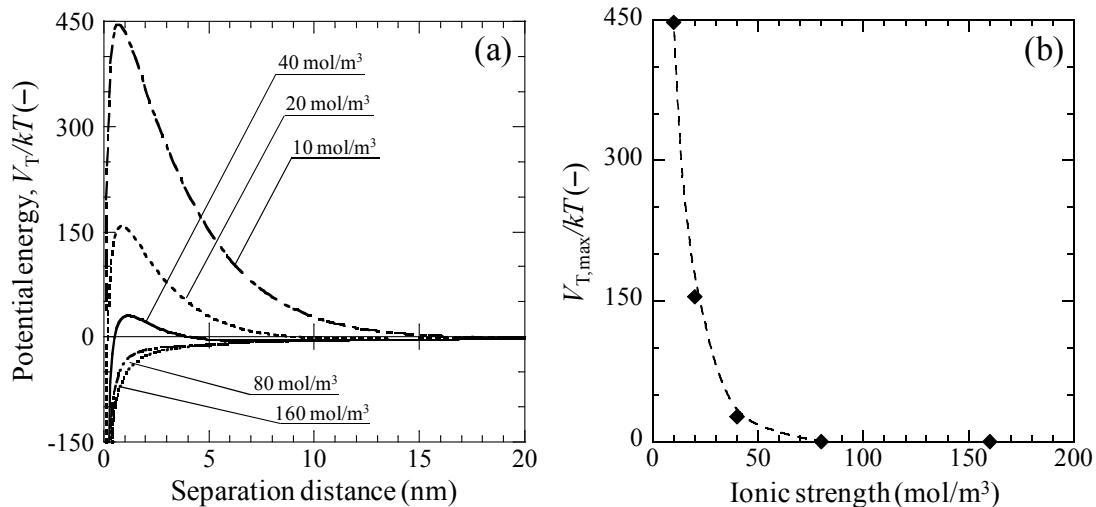


Fig. 3.6 (a) Potential curves between washed *E. coli* and slide glass calculated using DLVO theory.
(b) Potential barrier as a function of ionic strength.

結言

乳酸菌と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）が微生物の固体界面への付着現象に及ぼす影響について、DLVO 理論と Gibbs 自由エネルギー変化 ΔG による検討を行った。その結果、以下の結論を得た。

- 1) 微生物と固体表面間の相互作用について DLVO 理論による計算から、低イオン強度で高いポテンシャル障壁が存在し、微生物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、微生物は固体界面に付着できることがわかった。これは、EPS や線状構造物の曲率は微生物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と推察される。
- 2) 非運動性の *L. lactis* では、EPS が存在すると微生物の界面への付着は促進されるが、運動性の *E. coli* 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 の有無による影響は減少することがわかった。
- 3) 微生物が固体界面上に付着する際の ΔG^{Total} が正の場合でも、静電気的な影響が支配的になる領域や微生物特有の EPS や線状構造物が存在する場合には、固体界面上に微生物は付着することがわかった。

Nomenclature

A	= Hamaker constant	(J)
A_0	= Initial absorbance of cell suspension before agitation	(-)
A_t	= Absorbance of cell suspension after agitation	(-)
d	= Separation distance	(nm)
D_{p50}	= Median hydrodynamic diameter of particle	(μm)
e	= Elementary electronic charge	(C)
F	= Percent cell adhering to silica particle	(%)
k	= Boltzmann constant	(J/K)
N	= Density of charged group within the polymer layer	($1/\text{m}^3$)
T	= Temperature	(K)
u	= Electrophoretic mobility	($\text{m}^2/(\text{V}\cdot\text{s})$)
V_T	= Total potential energy	(J)
Z	= Valency of charged groups within the polymer layer	(-)
γ	= Surface tension	(mJ/m^2)
γ^+	= Electron-acceptor parameter of surface tension	(mJ/m^2)
γ^-	= Electron-donor parameter of surface tension	(mJ/m^2)
ΔG	= Free energy of interaction	(mJ/m^2)
θ	= Contact angle	(degree)
λ	= Reciprocal of softness parameter	($1/\text{m}$)
σ_g	= Geometric standard deviation in the cell size distribution	(-)

superscript

AB	= Lewis acid-base component
LW	= Lifshitz-van der Waals component
Total	= Sum of components

References

- [1] F. Cappitelli, A. Polo, F. Villa, *Food Eng. Rev.* **6** (2014) 29–42.
- [2] K. Hori, S. Matsumoto, *Biochem. Eng. J.* **48** (2010) 424–434.
- [3] T. Nomura, H. Narahara, H. Tokumoto, Y. Konishi, *Adv. Powder Technol.* **20** (2009) 537–541.
- [4] L.S. Dorobantu, M.R. Gray, *Scanning* **32** (2010) 74–96.

第4章 平行平板流れ場を用いた微生物の付着力分布の評価

微生物の固体表面への付着を制御するには、初期の付着力を知ることが重要である。微生物付着の初期段階では、物理化学的な相互作用力（van der Waals 力や静電気力）が支配的であると言われている[1,2]。そのため、微生物の付着力は、微生物表面の物理化学的性質から DLVO 理論や拡張 DLVO 理論を用いて推算する方法、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いたなどによって評価されてきた。特に、AFM は微生物の付着力を直接測定する方法としてよく用いられている。しかし、一般的な AFM で検出できる付着力は付着面に対して垂直方向の力であり、流れ場での測定や剪断方向の力を検出するためには工夫が必要である。一方、流れ場における微生物の付着・脱離現象を評価する方法としては、平行平板流れ場 (Parallel-plate flow chamber, PPFC) が用いられてきた。微生物が固体表面に付着した際の付着力は、微生物の種類や大きさ、付着環境などにより大きく異なると考えられる。このことから、微生物の付着力はある一定の力ではなく、菌種や付着条件によって、その大きさや分布は異なると考えられる。しかしながら、流動場において微生物が付着した時の付着力分布についての議論はされてこなかった。PPFC を用いると、数百の付着微生物について付着・脱離挙動を同時に観察できることから、統計的な解析が可能となるため、流動場での付着力分布を見積もるための測定手法として有力である。

第4章では、PPFC システムを用いて種々のイオン強度における微生物の固体表面上への付着・脱離挙動について直接観察を行った。モデル微生物には、共に非運動性のグラム陰性菌 *Escherichia coli* とメタン生成古細菌 *Methanosarcina barkeri* を、付着基材には、正帯電および負帯電ガラスを用いた。これらの表面性状の実測値に基づいた DLVO 理論と Gibbs 自由エネルギー変化 ΔG により、微生物の付着挙動を評価した。また、流動条件を変えることで得られた流体力学的な脱離抗力から付着力分布を計算する手法として、Weibull 分布関数による解析方法を提案し、微生物の固体表面での付着力分布を評価した。

4.1 実験方法

4.1.1 実験に用いた試料

実験に用いた微生物は、National BioResource Project (NBRP) から調達したグラム陰性菌の *E. coli* JD23004 と独立行政法人理化学研究所のバイオリソースセンター JCM から調達したメタン生成古細菌の *M. barkeri* JCM10043 である。なお、*E. coli* JD23004 株は鞭毛形成にかかわる遺伝子 (*fliC*) を欠損させたトランスポゾン変異株であり、運動性はない。*E. coli* は Luria–Bertani 培地を用いて 30°C で振盪培養した。メタン生成古細菌は 2.1.1 節に準じて、1.0% v/v メタノールを基質として純粋培養した。実験には、対数増殖期末期の培養微生物を遠心分離 (8400×g, 4 °C, 10 min) し、生理食塩水によって 3 回ボルテックス攪拌洗浄することで、培地成分や細胞外代謝物を取り除いたものを用いた。その後、所定のイオン強度に調製した NaCl 水溶液に再分散したものを実験試料として用いた。微生物濃度は、微生物分散液の 660 nm における吸光度を紫外可視分光光度計 (UV-mini 1240、島津製作所) によって測定し、微生物個数を Petroff–Hausser 計算盤を用いて計数することで調製した。また、微生物のモルフォロジーは原子間力顕微鏡 (MFP-3D-BIO-J、アサイラムリサーチ) を用いて観察した。

微生物付着用基板には 2.1.1 節に準じて前処理した負帯電ガラス (NC ガラス; S7224) と正帯電ガラス (PC ガラス; S9227) の 2 種類を用いた。

4.1.2 キャラクタリゼーション

E. coli の表面電位は、2.1.2 節に準じて、微生物は柔らかい粒子モデルに基づいて解析した。*M. barkeri* とガラス基板の表面電位は Table 2.2 の値を用いた。また、電気泳動・粒径測定システム (ELS-Z、大塚電子) を用いて、微生物の流体力学相当径を計測した。

E. coli のぬれ性は、3.1.2 節に準じて液滴法により接触角を測定し、Young–Dupré の式を用いて、表面張力を見積もることで評価した。*M. barkeri* とガラス基板の表面張力は第 2 章 Table 2.4 の値を用いた。

4.1.3 平行平板流れ場を用いた微生物の付着・脱離実験

Fig. 4.1 は、微生物のガラス基板上での付着・脱離挙動を直接観察するために用いた PPFC システムである。本システムは、液を供給するシリジンポンプ (IC3210、KD Scientific)、微生物の付着・脱離挙動を観察する倒立型位相差顕微鏡 (CKX41、オリンパス)、観察像を録画するための 38 万画素カラーCCD カメラ (DXC-108、SONY) とコンピュータ、ビデオキャプチャカード (GV-VCP3R/PCI、I-O Data)、録画ソフトウェア (I-O Data)、および PPFC セル (#31-011、GlycoTech) で構成される。PPFC セルはアクリル製の矩形台座とシリコン製ガスケット、ガラス基板から構成される。ガスケットを台座と基板の間にセットすると、幅 10 mm×長さ 60 mm×深さ 0.127 mm の流れ場を形成できる。また、微生物懸濁液は台座に取り付けた流入口から注入することで、流れ場内に懸濁液を導入できる。流れ場の中心点は、長焦点レンズ (LCACHN 40×PH/NA=0.55、LCACHN 20×PH/NA=0.4、オリンパス) を取り付けた倒立型位相差顕微鏡でモニタリングし、微生物の付着・脱離挙動を *in situ* 観察した。なお、画像視野は、40×レンズと 20×レンズを用いた時でそれぞれ 0.0169 mm^2 と 0.0665 mm^2 である。また、付着脱離実験中に撮影した動画からの静止画の抽出には Virtual Dub (<http://www.virtualdub.org>) を用いて、付着微生物数の計数には Image J (Version 1.47、NIH) を用いた。なお、一度付着した後脱離し、再付着した微生物を計数から除くため、セグメント中の 3 枚の画像を合成することで、静止付着微生物を取出した[3]。ガラス基板近傍を浮遊する微生物を静止画中から消すために、キャプチャー時のフレームレートは 9 fps とした。

微生物の付着実験は、まず脱気した所定のイオン強度 ($5\sim160 \text{ mol/m}^3$) の NaCl 水溶液で流路内を満たし、残留ガスを除去した。その後、微生物懸濁液 (*E. coli* の場合 $1\times10^7 \text{ cells/ml}$ 、*M. barkeri* の場合 $3\times10^7 \text{ cells/ml}$) を 0.01 ml/min で流れ場内に供給し、ガラス基板表面に付着する微生物数の経時変化を約 100 分間観測した。

微生物の脱離実験は、付着実験後に微生物の供給を停止し、付着実験開始から 3 時間経過した微生物付着基板を用いて行った。静置後に所定のイオン強度を有する、微生物を含まない NaCl 水溶液を 0.01 ml/min で流通させ、浮遊微生物を除去した。その後、**Fig. 4.2** に示した条件に従って段階的に 50 ml/min まで NaCl 水溶液の流速を上昇させることで、各流速における微生物の残存付着数を計数し、付着力分布の解析に用いた。

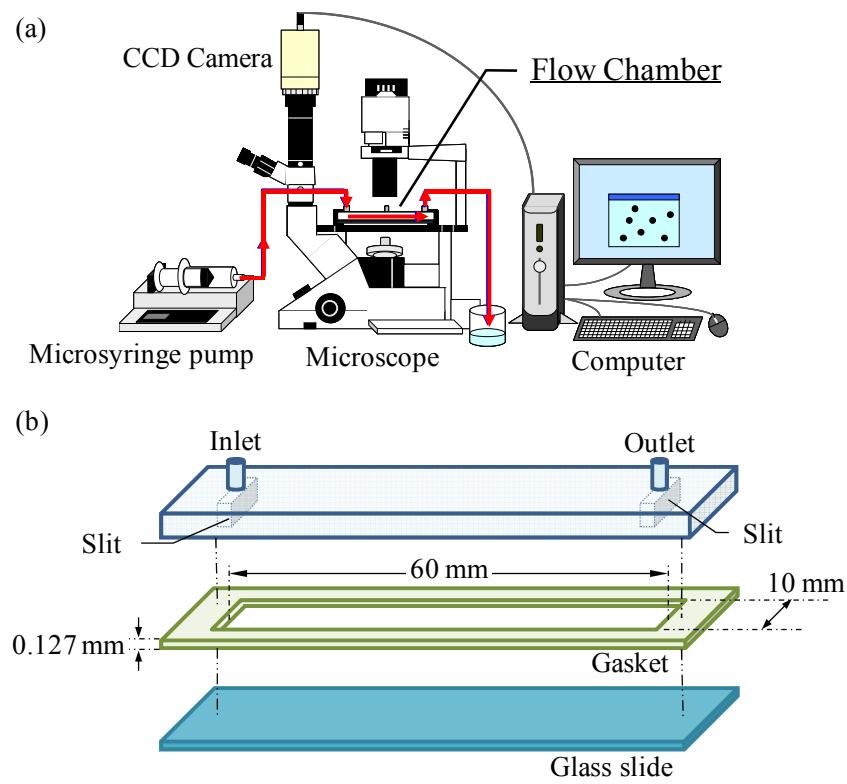


Fig. 4.1 Parallel-plate flow apparatus: (a) observation system, (b) flow chamber.

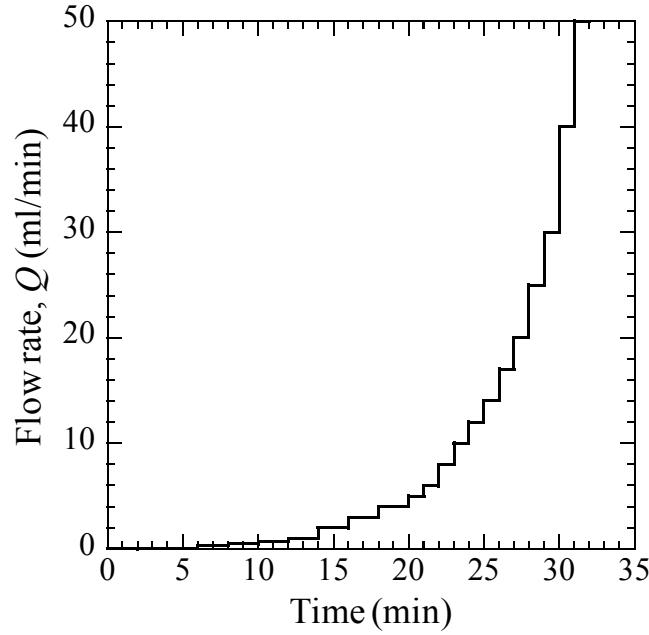


Fig. 4.2 Operating condition of flow rate in the detachment test.

4.2 実験結果および考察

4.2.1 表面性状

本実験で用いた微生物の AFM 像を Fig. 4.3 に、粒子径の測定結果を Table 4.1 に示す。*E. coli* は中位径が約 $0.8 \mu\text{m}$ の短桿菌で、*M. barkeri* は中位径が約 $3.7 \mu\text{m}$ の凝集性のある球菌であることがわかった。これらの微生物は共に鞭毛などの細胞外器官は有しておらず、運動性を有していないことも確認している。

E. coli の電気泳動移動度 (EPM) の測定結果を Fig. 4.4 に示す。EPM は *M. barkeri* と同様に、イオン強度の増加と共にゼロではないある一定の値 ($-0.70 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$) に収束した。次に、EPM データを Eqs. (1.7)~(1.11) を用いて解析し、固定電荷密度 ZeN と流れの侵入距離 $1/\lambda$ を求めた。その結果、*E. coli* では $ZeN = -8.29 \times 10^6 \text{ C/m}^3$ と $1/\lambda = 0.87 \times 10^{-9} \text{ m}$ であった。2.2.2 節で求めた *M. barkeri* の各パラメータと比較すると、*M. barkeri* の $1/\lambda$ は *E. coli* の約 4 倍であることから、*M. barkeri* は *E. coli* よりも柔らかい表面を持っていることが分かる。また、 ZeN は *M. barkeri* の方が *E. coli* よりも小さく、表面電荷の違いに表れていると考えられる。Bos ら [4] は Ohshima の式を用いた KCl 溶液中の EPM の解析結果から、フィブリル化した *S. salivarius* HB 株の $1/\lambda$ が表層纖維を取り除いた HBC12 株よりも大きいことを示しており、これは電子顕微鏡像と傾向が一致したと報告している。このことから、*M. barkeri* の $1/\lambda$ が *E. coli* と比べて非常に大きい原因是、古細菌である *Mehtanosarcina* 属は約 100 nm のメタノコンドロイチン層と呼ばれる多糖類の表層を有している一方、グラム陰性菌である *E. coli* は、ペプチドグリカン層の外側に非常に薄いリポ多糖層があるのみ [5] であることが考えられる。EPM の解析から得られた *E. coli* の表面電位は Table 4.2 に示し、以下の計算ではこれらの値を用いた。

E. coli の微生物層に対する、超純水とホルムアミド、 α -ブロモナフタレンの接触角を測定した結果、それぞれ $16 \pm 1^\circ$ と $35 \pm 1^\circ$ 、 $37 \pm 1^\circ$ であった。これより、Eq. (1.31) に示した Young–Dupré の式を用いて表面張力を計算すると、 $\gamma^{\text{Total}} = 44 \text{ mJ/m}^2$ 、 $\gamma^{\text{LW}} = 36 \text{ mJ/m}^2$ 、 $\gamma^+ = 0.23 \text{ mJ/m}^2$ 、 $\gamma^- = 66 \text{ mJ/m}^2$ であった。*E. coli* はガラス基板と表面張力が近く、親水性表面を持っていることがわかった。

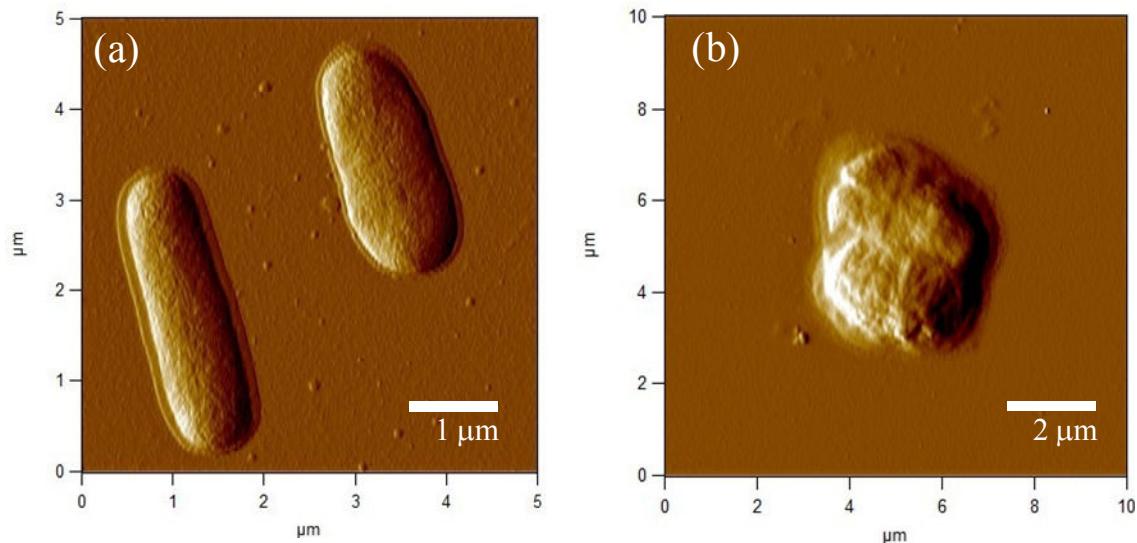


Fig. 4.3 Atomic force microscope images of microbial topography: (a) *E. coli*, (b) *M. barkeri*.

Table 4.1

Median diameter D_{p50} and geometric standard deviation σ_g of microbes. \pm signs indicate standard error of the mean over five measurements.

Microbe	D_{p50} (μm)	σ_g (-)
<i>E. coli</i>	0.82 ± 0.02	1.41 ± 0.02
<i>M. barkeri</i>	3.71 ± 0.07	1.35 ± 0.01

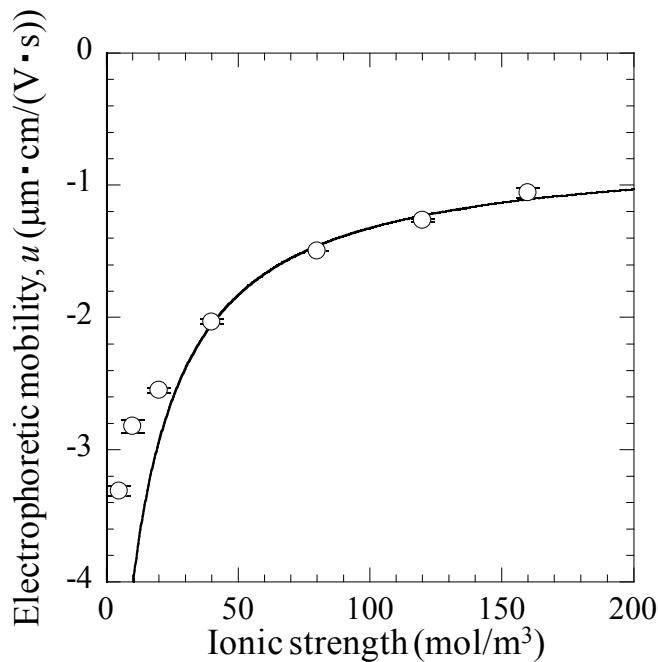


Fig. 4.4 Electrophoretic mobilities of *E. coli* JD23004 suspended in NaCl aqueous solutions as a function of ionic strength. The curves fits are based on Ohshima's equation. Error bars indicate the standard error of the mean over three experiments.

Table 4.2
Surface potentials of *E. coli* suspended in NaCl aqueous solutions.

Ionic strength (mol/m^3)	Surface potential (mV)
5	-50.3
10	-35.2
20	-22.4
40	-12.8
80	-6.74
160	-3.43

4.2.2 平行平板流れ場の流動状態

本実験で用いたシリンジポンプの押出能力は、最大 50 ml/min である。そこで、平行平板流れ場の流動状態について考える。流路断面が矩形である管路内レイノルズ数は次式で表される。

$$Re = \rho \frac{Q}{(w+2b)\eta} \quad (4.1)$$

ここで、 ρ は流体密度、 Q は体積流量、 w は流路幅、 b は流路深さの 2 分の 1 である。また、流れが十分に発達するのに必要な、流れ場への流入口からの距離 Le は式(4.2)で表される[6]。

$$Le = C \cdot b \cdot Re \quad (4.2)$$

ここで、 C は比例定数である。

Eq. (4.1)を用いて、流れ場内のレイノルズ数を計算すると最大 82.3 であり、その際の Le は比例定数を 0.026 [6]とした時、0.136 mm であった。観察位置は、流れ場への注入口から 30 mm と十分に距離をとっているため、本実験での流れ場は層流である。

4.2.3 微生物の付着挙動の評価

ガラス基板上への微生物の積算付着分率の経時変化を Fig. 4.5 に示す。*E. coli* と *M. barkeri* のガラス基板への付着速度は、NC ガラスでは共に、イオン強度が増加するにつれて上昇することがわかった。一方、PC ガラスではイオン強度によらずほぼ一定であることがわかった。Fig. 4.6 に DLVO 理論を用いて微生物とガラス基板間のポテンシャルエネルギーを計算した結果を示す。また、微生物とガラス基板間の界面自由エネルギー変化 ΔG の計算結果と Eq. (1.58)で計算される Hamaker 定数を Table 4.3 に示す。*E. coli* の Hamaker 定数は $4.5\sim4.9\times10^{-21}$ J、*M. barkeri* の Hamaker 定数は $0.7\sim0.9\times10^{-21}$ J であった。既報[7,8]では、微生物とガラス基板間の Hamaker 定数は $0.7\sim3.7\times10^{-21}$ J と報告されていることから、ほぼ一致しており、実測値から求めた Hamaker 定数は妥当と考えられる。また、*M. barkeri* の Hamaker 定数は *E. coli* と比較して小さいことから、*M. barkeri* とガラス基板間の van der Waals 引力は *E. coli* と比較して小さいことが予測できる。そこで、 20 mol/m^3 の場合において、NC ガラスと微生物間のポテンシャル曲線を見ると、*E. coli* の場合は約 130

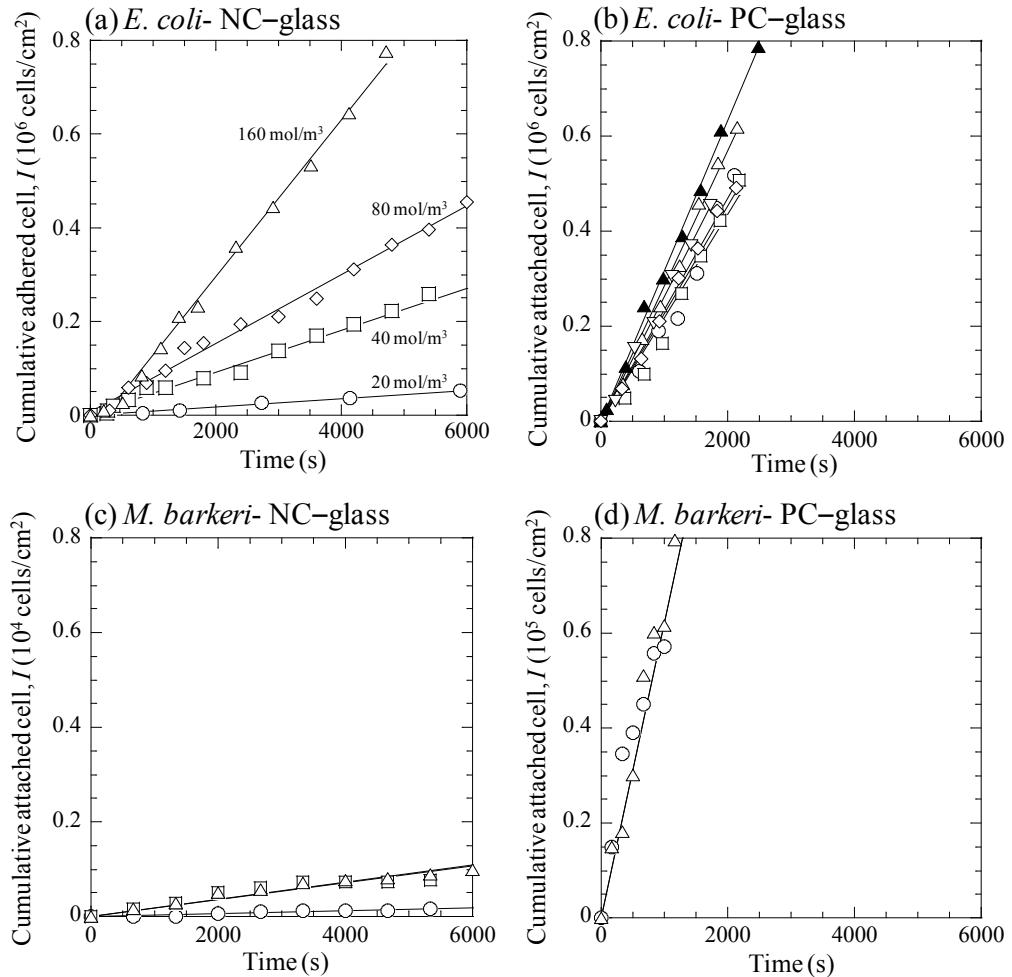


Fig. 4.5 Cumulative number of adhered cells per unit area on glass substratum as a function of time. The ionic strength was: 5 mol/m 3 (closed triangle); 10 mol/m 3 (open inverted triangle); 20 mol/m 3 (open circle); 40 mol/m 3 (open square); 80 mol/m 3 (open diamond); 160 mol/m 3 (open triangle).

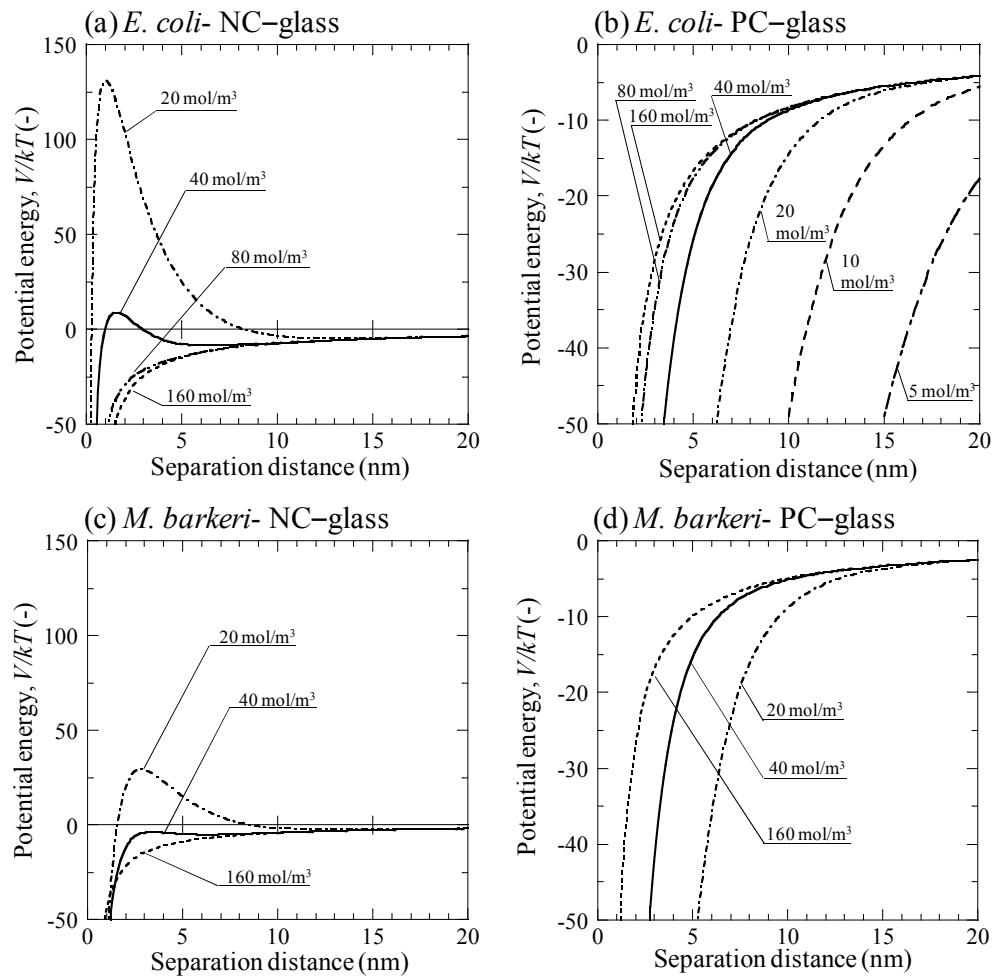


Fig. 4.6 Potential energy curves for microbial cells on glass substratum.

Table 4.3

Free energies ΔG and Hamaker constants A between microbial cells and glass substratum.

Microbe	Substratum	Interfacial free energy (mJ/m^2)			A (J)
		ΔG^{LW}	ΔG^{AB}	ΔG^{Total}	
<i>E. coli</i>	NC-glass	4.8	55	50	4.5×10^{-21}
	PC-glass	-5.3	16	10	4.9×10^{-21}
<i>M. barkeri</i>	NC-glass	-0.8	18	17	0.76×10^{-21}
	PC-glass	-0.9	-18	-19	0.85×10^{-21}

kT のポテンシャル障壁があるのに対して、*M. barkeri* の場合は約 $30 kT$ しかない。さらに、イオン強度が増加すると、ポテンシャル障壁は減少し、 40 mol/m^3 付近でほぼなくなっている。さらに、NC ガラスへの微生物の付着速度は、DLVO 理論で計算されるポテンシャル障壁の減少と共に増加している。同様に、PC ガラスの場合をみると、ポテンシャル障壁はいずれの条件においても見られない。以上のことから、微生物の付着挙動は、DLVO 理論から予測される微生物ガラス基板間の相互作用によって説明できることがわかった。

4.2.4 微生物の脱離挙動の評価

積算脱離微生物数 F と流速との関係を Fig. 4.7 に示す。 F は次式で表わされる。

$$F = 1 - I/I_0 \quad (4.3)$$

ここで、 I_0 は脱離実験前の初期付着微生物数、 I はある流速での基板上に残っている残存微生物数である。NC ガラス表面では、*E. coli* と *M. barkeri* は共に、流速が増加するに従って指数関数的に微生物が脱離することがわかった。また、イオン強度の増加と共に微生物の脱離率は上昇することがわかった。これは、イオン強度の増加とともに、静電的な力が弱まることが原因と考えられる。一方、PC ガラスでは、*E. coli* は流速の増加と共に指数関数的に微生物が脱離したが、*M. barkeri* は脱離することがなかった。このような挙動は、例えば微生物表面に結合している水分子が関与する水和力のように非 DLVO 力に起因していることが考えられる。水和力は、表面間の電子受容体と供与体による Lewis 酸塩基相互作用短距離力に含まれる[9,10]。Table 4.3において、*M. barkeri* と PC ガラス間の界面自由エネルギー変化の内、酸塩基相互作用成分 ΔG^{AB} のみ負であることが分かる。このため、*M. barkeri* と PC ガラス間の全界面自由エネルギー変化 ΔG^{Total} も負となり、*M. barkeri* は PC ガラス表面からの脱離が困難であったと推察される。さらに、細胞表層に存在するポリマー成分も生化学的因子として作用した可能性も考えられる。古細菌である *Methanosaicina* 属は、表層に S-layer とグルクロン酸やガラクトロン酸、N-アセチルガラクトサミン、グルコースなどで構成されるヘテロ多糖外層(メタノコンドロイチン)を有している[5,11-13]。一般的に、グルクロン酸は *M. barkeri* の凝集に関わる成分と言われている[11,14]。よって、表面に存在するバイオ高分子が PC ガラス上への固定化を促進している可能性

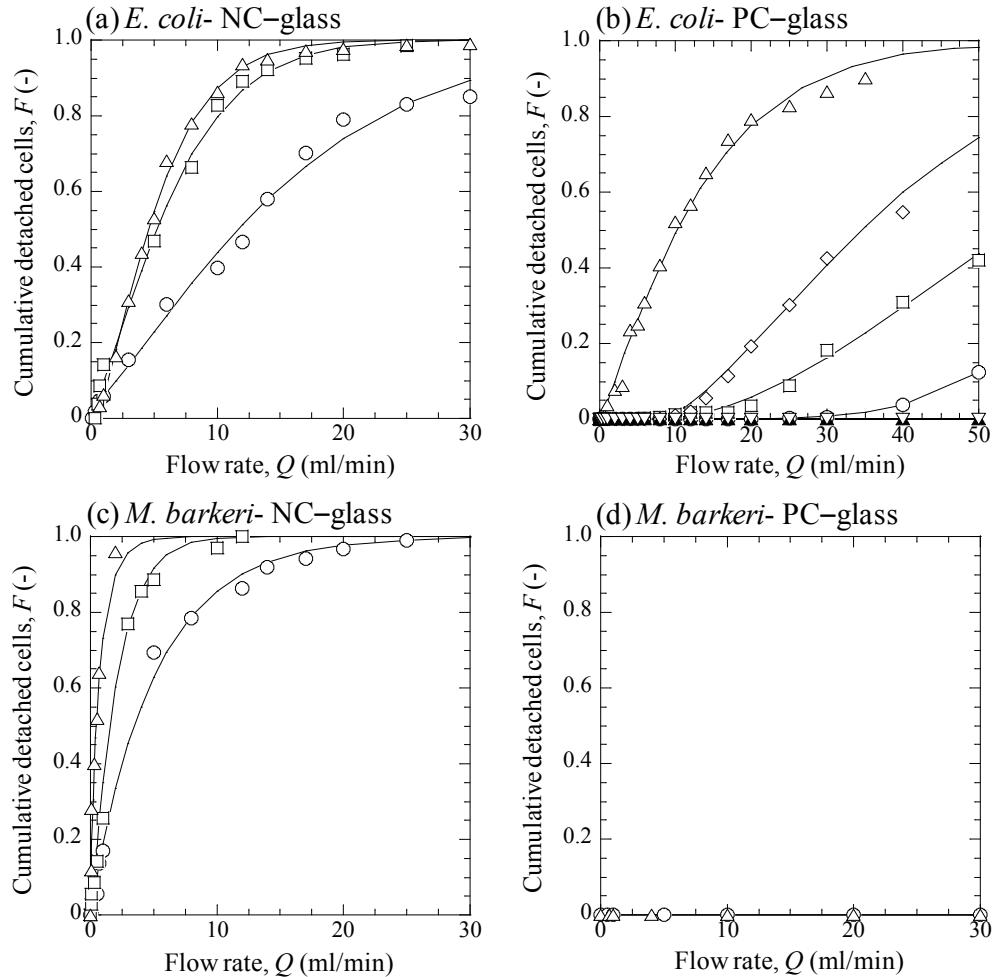


Fig. 4.7 Cumulative number of detached cells on glass substratum as a function of flow rate. The ionic strength was: 5 mol/m³ (closed triangle); 10 mol/m³ (open inverted triangle); 20 mol/m³ (open circle); 40 mol/m³ (open square); 80 mol/m³ (open diamond); 160 mol/m³ (open triangle).

が考えられるが、この点を明らかにするためには、さらなる検討が必要である。

次に、一次せん断流れ場中で、单一球状粒子が平滑なプレート表面に付着しているという理想的な系を仮定した時に、粒子が流体から受ける力について考える。流体場において粒子に作用する力を **Fig. 4.8** に示す。流体力学的な抗力 D は Eq. (4.4) で与えられる壁せん断応力を用いて、Eq. (4.5) で表わされる [15,16]。

$$\tau_w = \frac{3}{2} \frac{\eta Q}{b^2 w} \quad (4.4)$$

$$D = 32\tau_w a_1^2 \quad (4.5)$$

また、揚力 L は Eq. (4.6) で与えられる粒子レイノルズ数を用いて、Eq. (4.7) で表わされる [16]。

$$Re_p = \frac{a_1^2 \tau_w}{\nu \eta} \quad (4.6)$$

$$L = 9.257 \tau_w a_1^2 Re_p \quad (4.7)$$

ν は動粘度である。Eqs. (4.5) と (4.7) は、粒子同士が十分に離れていて（粒子間距離 $> 1.5a$ ）、 $b > 15a$ であれば適用可能である [17]。

付着微生物が脱離する直前に受ける力について、摩擦係数 f を用いて收支を取ると、Eq. (4.8) で表わすことができる。

$$D = f \left(W + mg - L - mg \frac{\rho_f}{\rho_p} \right) \quad (4.8)$$

ここで、 W は固体表面上に付着した微生物の付着力、右辺の第 4 項は浮力である。流体から微生物が受ける抗力が摩擦力よりも大きくなった時、微生物の脱離が生じる。DLVO 理論によると、微生物と固体表面間の最接近距離が 0.157 nm の時、5 nN 以上の付着力を有する。ここで、微生物一つ当たりの質量はピコグラムオーダーであり、微生物細胞の約 80% は水であることから、重力及び浮力項は無視できる。また、層流場において、揚力 L は 50 pN 以下であることから、流体中の微生物の脱離は微生物と基板の付着力に依存することとなる。よって、微生物が脱離する時、Eq. (4.8) は付着力 W と流体抗力 D とを用いて Eq. (4.9) と表わすことができる。

$$D = fW \quad (4.9)$$

ここで、脱離抗力は、微生物が固体表面から脱離する挙動を観測することで推

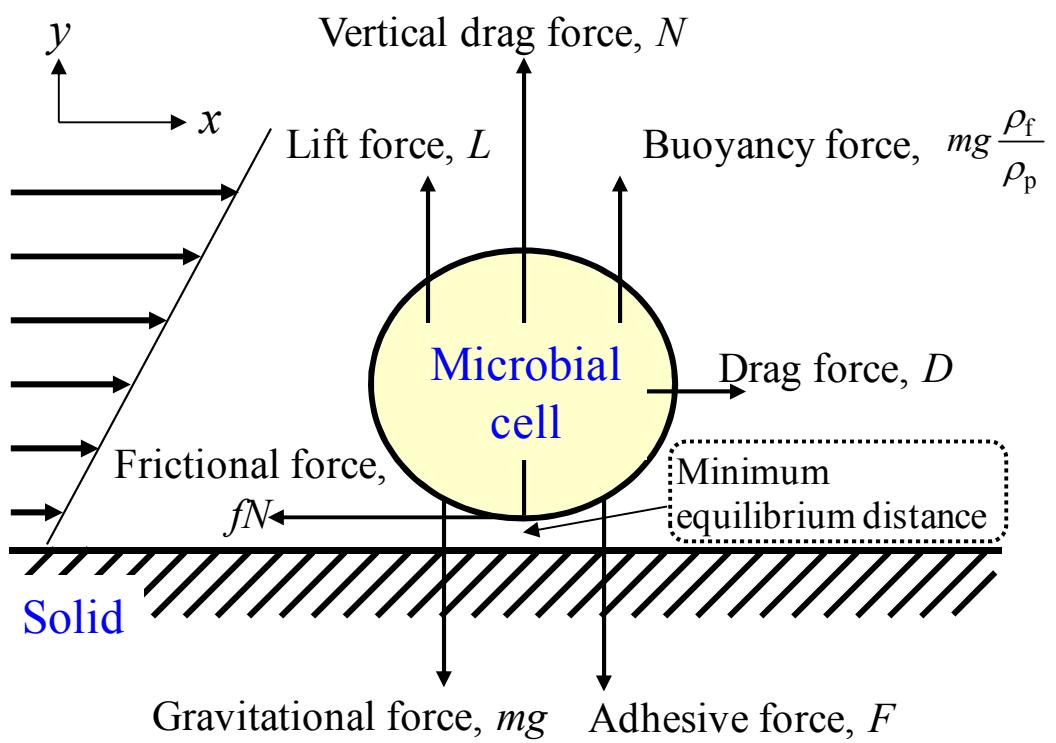


Fig. 4.8 Schematic diagram of the forces interacting with the attached cell onto the solid surface.

定できる。そこで、付着した微生物を基板上から脱離させるために必要な抗力の分布を見積もった。ここでは、Fig. 4.7で示した流速に対する積算脱離微生物数を次式の Weibull 分布関数[18–20]を用いてフィッティングし、解析を行った。

$$\begin{cases} F = 1 - \exp\left\{-\left(\frac{Q - Q_u}{Q_n}\right)^t\right\}, & Q > Q_u \\ F = 0, & Q \leq Q_u \end{cases} \quad (4.10)$$

ここで、 Q_u は $I/I_0=1$ を満たす Q の値であり、 t は Weibull 因子(形状パラメータ)、 Q_n は規格化パラメータ(スケールパラメータ)である。これらの Weibull パラメータは Kaleida Graph を用いて解析した。その結果、Weibull 分布関数モデルは、実験に良く相関することがわかった。ここで抗力の計算方法について考える。Eqs. (4.4)と (4.5)より、流速と抗力の関係は以下の式で表わすことができる。

$$D = \frac{48\eta a_1^2}{b_w^2} Q \quad (4.11)$$

よって、抗力分布は、次式によって算出することができると考えられる。

$$f(\ln D) = \frac{dF}{d(\ln D)} \quad (4.12)$$

ここで、

$$\int_0^\infty f(\ln D)d(\ln D) = 1 \quad (4.13)$$

ガラス基板上から微生物を脱離させるために必要な流体抗力の計算結果を Fig. 4.9 に示す。なお、PC ガラスに付着した *M. barkeri* に関しては、脱離しなかつたため、本実験の範囲内では定量的に評価できなかった。また、流体抗力の中位値 D_{50} と幾何標準偏差 σ_D を Table 4.4 に示す。幾何標準偏差は、Weibull プロットにおける 84.13% 値を 50% 値で除算した値として算出した。NC ガラスと PC ガラスにおいて、160 mol/m³ の時 *E. coli* の抗力分布はほぼ同じ値を示した。これは、高イオン強度では静電的な相互作用が弱まり、van der Waals 相互作用が支配的になったためと推察される。また、NC ガラス上の *E. coli* において、40 mol/m³ と 160 mol/m³ での抗力分布を比較すると、ほぼ同じ値を示した。以上のことから、

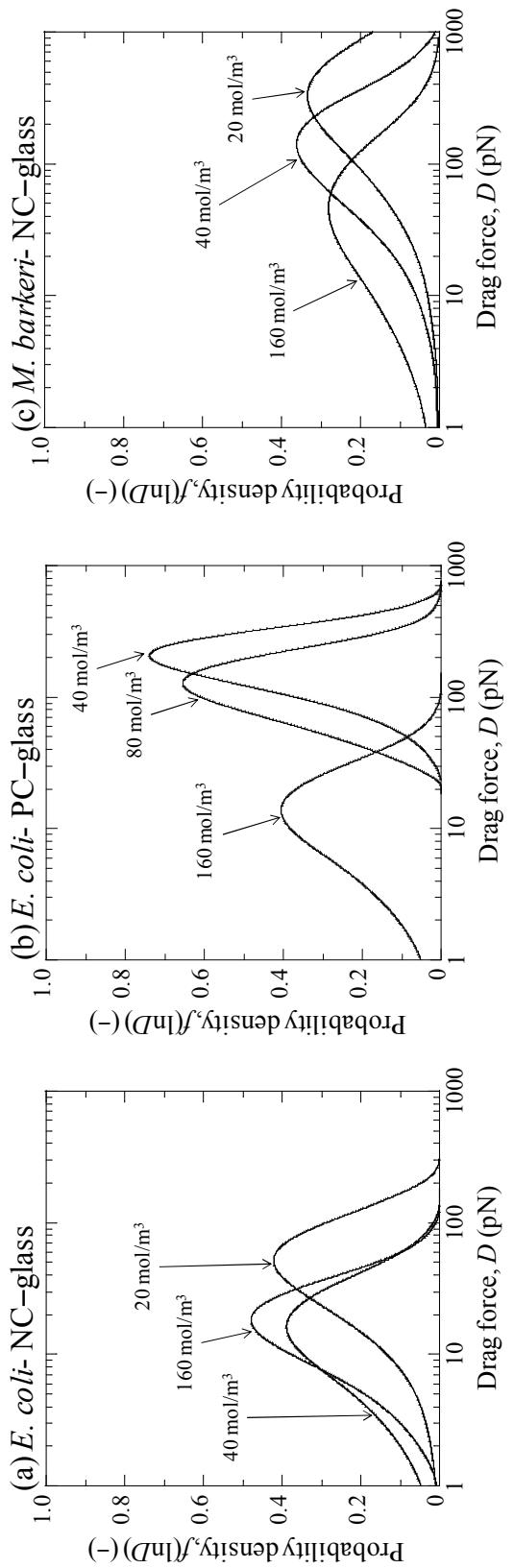


Fig. 4.9 Distributions of drag forces required to remove attached cells from glass substratum.

Table 4.4

Median drag force D_{50} and geometric standard deviation σ_D .

Microbe	Substratum	Ionic strength (mol/m ³)	D_{50} (pN)	σ_D (-)
<i>E. coli</i>	NC-glass	20	37.7	2.2
		40	10.6	2.5
		160	13.6	2.0
	PC-glass	5	N.D.*	
		10	N.D.*	
		20	N.D.*	
		40	165	1.7
		80	107	1.7
		160	8.6	2.5
<i>M. barkeri</i>	NC-glass	20	204	2.9
		40	83.4	2.7
		160	27.7	3.2
	PC-glass	20	N.D.*	
		160	N.D.*	

* N.D.: Not determined.

高イオン強度では、van der Waals 相互作用が支配的になっており、静電的な相互作用はあまり働いていないことが示唆された。また、低イオン強度では、高いポテンシャル障壁が抗力の増加に寄与していることが確認できる。一方、PC ガラス上の *E. coli* の抗力分布は、イオン強度の減少に伴って大きくなることがわかった。この原因として、イオン強度の減少とともに、静電的な相互作用が大きくなり、静電引力が支配的になったことが考えられる。これらの結果は、静電相互作用によって大きく変わるポテンシャル障壁が、微生物の付着力に大きな影響を及ぼしており、静電相互作用は重要な因子であることを示している。そのため、*M. barkeri*においてもポテンシャル障壁の影響を顕著に受け、イオン強度が減少するとともに、NC ガラスからの脱離抗力は大きくなる方にシフトすることがわかった。次に、抗力分布での標準偏差 σ_D と粒子径分布における標準偏差 σ_g を *E. coli* と *M. barkeri* で比較した。その結果、 σ_D の方が大きく、抗力分布の方が幅を持っていることが示唆された。これは、付着微生物のランダム配向や微生物表面の不均一性や微生物の変形、付着時の分離距離にも分布がありそれらが考慮されていることなどが原因として考えられる。基板上の微生物に加わる外力のバランスは Eq. (4.9) で表わすことができる。このことは、脱離時の抗力は付着力に密接に関係していることを示している。よって、付着力も同様の分布を持っていることが推察され、抗力分布は微生物の付着およびバイオフィルム形成の初期段階を制御するための非常に重要なツールであることを示している。

結言

微生物のガラス基板上における付着・脱離挙動について、PPFC システムを用いてコロイド科学の観点から解析を行った。その結果、以下の結論が得られた。

- 1) 負帯電ガラスの場合には、イオン強度の増加とともに、DLVO 理論によって推定されるポテンシャル障壁が減少することで、微生物の付着率は増加した。一方、正荷電ガラス上の微生物の付着率は、イオン強度および微生物種の表面物性にほとんど影響がなかった。これらの結果は、DLVO 理論の予測とよく一致していることがわかった。
- 2) 付着した微生物を脱離するために必要な抗力に関して、PPFC システムを用いて推算を試みた。流速を徐々に上昇させ、ガラス基板上から微生物を脱離させることで、ある流速における残存積算微生物数を計数し、Weibull 分布関数でフィッティングすることで、付着した微生物を脱離するために必要な流体力学的な力として抗力分布を算出することができた。
- 3) 微生物脱離時の抗力は広い分布を有しており、静電相互作用の減少とともに、その抗力の中央値も減少することがわかった。しかし、*M. barkeri* の場合、正帯電ガラス上から脱離させることができなかった。これは、界面自由エネルギー変化が負になっていることが原因の一つと考えられ、Gibbs 自由エネルギー変化 ΔG^{Total} により説明できることがわかった。

Nomenclature

a	= Particle radius	(m)
A	= Hamaker constant	(J)
b	= Half height of the channel	(m)
D	= Drag force	(N)
D_{p50}	= Median hydrodynamic diameter of particle	(μm)
e	= Elementary electronic charge	(C)
F	= Cumulative number of detached cells	(-)
I	= Number of cells initially attached to the substrate	(-)
I_0	= Number of residual cells left on the substrate	(-)
L	= vertical lift force	(N)
Le	= Development length for laminar flow	(m)
N	= Density of charged group within the polymer layer	(1/m ³)
Q	= Flow rate	(m ³ /s)
Q_n	= Normalized parameter (scale parameter) in Weibull	(m ³ /s)
Re	= Reynolds number	(-)
t	= Weibull factor (shape parameter)	(-)
u	= Electrophoretic mobility	(m ² /(V·s))
w	= Width of the channel	(-)
W	= Adhesive force of the attached cell on the substrate	(N)
Z	= Valency of charged groups within the polymer Layer	(-)
γ	= Surface tension	(mJ/m ²)
γ^+	= Electron-acceptor parameter of surface tension	(mJ/m ²)
γ^-	= Electron-donor parameter of surface tension	(mJ/m ²)
ΔG	= Free energy of interaction	(mJ/m ²)
η	= Viscosity of the suspension	(Pa·s)
θ	= Contact angle	(degree)
λ	= Reciprocal of softness parameter	(1/m)
ν	= Kinetic viscosity of the suspension	(m ² /s)

ρ	= Fluid density	(kg/m ³)
σ_D	= Geometric standard deviation in the Weibull distribution	(–)
τ_w	= Wall shear stress	(Pa)

superscript

AB	= Lewis acid-base component
LW	= Lifshitz-van der Waals component
Total	= Sum of components

References

- [1] D. Campoccia, L. Montanaro, C.R. Arciola, *Biomaterials* **34** (2013) 8533–8554.
- [2] H. Wang, M. Sodagari, L.K. Ju, B.M. Zhang Newby, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **109** (2013) 32–39.
- [3] J.M. Meinders, H.C. van der Mei, H.J. Busscher, *J. Microbiol. Methods* **16** (1992) 119–124.
- [4] R. Bos, H.C. van der Mei, H.J. Busscher, *Biophys. Chem.* **74** (1998) 251–255.
- [5] S.-V. Albers, B.H. Meyer, *Nat. Rev. Microbiol.* **9** (2011) 414–426.
- [6] R.A. van Wagenen, J.D. Andrade, *J. Colloid Interface Sci.* **76** (1980) 305–314.
- [7] M. Farahat, T. Hirajima, K. Sasaki, K. Doi, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **74** (2009) 140–149.
- [8] L. Feriancikova, S.L. Bardy, L. Wang, J. Li, S. Xu, *Environ. Sci. Technol.* **47** (2013) 5720–5728.
- [9] C.J. van Oss, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **78** (1993) 1–49.
- [10] A. Jacobs, F. Lafolie, J.M. Herry, M. Debroux, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **59** (2007) 35–45.
- [11] K.R. Sowers, J.E. Boone, R.P. Gunsalus, *Appl. Environ. Microbiol.* **59** (1993) 3832–3839.
- [12] L. Rohlin, D.R. Leon, U. Kim, J. a. Loo, R.R. Ogorzalek Loo, R.P. Gunsalus, *Archaea* **2012** (2012).
- [13] O. Kandler, H. König, *Cell. Mol. Life Sci.* **54** (1998) 305–308.
- [14] D.E. Culley, W.P. Kovacik, F.J. Brockman, W. Zhang, *J. Microbiol. Methods* **67** (2006) 36–43.
- [15] M. Mercier-Bonin, A. Dehouche, J. Morchain, P. Schmitz, *Int. J. Food Microbiol.* **146** (2011) 182–191.
- [16] B. Boulbene, J. Morchain, M.M. Bonin, S. Janel, F. Lafont, P. Schmitz, *AIChE J.* **58** (2012) 3614–3624.
- [17] S.B. Brooks, A. Tozeren, *Comput. Fluids* **25** (1996) 741–757.
- [18] H.C. van der Mei, J. de Vries, H.J. Busscher, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **78** (2010) 372–375.
- [19] A. Khalili, K. Kromp, *J. Mater. Sci.* **26** (1991) 6741–6752.
- [20] W. Qu, H.J. Busscher, J.M.M. Hooymans, H.C. van der Mei, *J. Colloid Interface Sci.* **358** (2011) 430–436.

第 5 章 平行平板流れ場を用いた 微生物の細胞外構造物が付着力分布に及ぼす影響の評価

第 3 章では、乳酸菌と大腸菌をモデル微生物として用いて、微生物が固体表面に付着する際に、細胞外に存在する高分子物質（Extra polymeric substance, EPS）や線状構造物（鞭毛や線毛）が付着挙動に及ぼす影響について定性的に検討を行った。その結果、EPS や細胞外構造物が存在すると、固体表面との間に存在するポテンシャル障壁の影響受けずに付着が可能であることを明らかにした。また、第 4 章では、微生物の固体表面の付着・脱離挙動について、非運動性の大腸菌とメタン生成古細菌をモデル微生物として用い、PPFC での脱離挙動から得た、流速と残存積算微生物数の関係を、Weibull 分布関数でフィッティングすることで、付着した微生物を脱離するために必要な流体力学的な力として抗力分布を算出した。

第 5 章では、前章で提案した平行平板流れ場における微生物の付着力分布評価法に基づいて、細胞外構造物が固体表面への微生物の付着・脱離現象に及ぼす影響について解析した。

5.1 実験方法

5.1.1 実験に用いた試料

モデル微生物として、乳酸菌 *Lactococcus lactis* JCM 5805 と鞭毛を持ち運動性を有する *Escherichia coli* KP7600、KP7600 株の鞭毛モータースイッチを欠損させた JD28032 (*ΔfliG*) 株、鞭毛タンパクを欠損させた JD23004 (*ΔfliC*) 株を用いた。*L. lactis* と *E. coli* の培養は 3.1.1 節と同様に行った。培養した菌液は、吸引ろ過により培地成分を除去してから遠心分離により集菌した。集菌した *L. lactis* の一部は、ボルテックスミキサーを用いて生理食塩水でさらに 3 回洗浄（各 30 s）し、微生物に付着した EPS を極力取り除いたものも調製した[1]。これらの微生物をそれぞれ所望の濃度に調製した NaCl 水溶液に分散し、実験に用いた。培地成分を除去しただけの微生物を“未洗浄微生物”、洗浄により EPS を除去した微生物を“洗浄微生物”と呼ぶ。

付着・脱離実験には負帯電ガラス（NC ガラス；S7224）をモデル固体表面として用いた。なお、ガラス基板は 2.1.1 節と同様に前処理した。

5.1.2 キャラクタリゼーション

E. coli KP7600 とその変異株の EPM および粒子径は電気泳動・粒径測定システム（ELS-Z、大塚電子）を用いて測定した。EPM の測定結果より、微生物の表面電位は Eq. (1.7) で表される柔らかい粒子モデルを用いて算出した。ガラス基板の表面電位は Table 2.2 で示した NC ガラスの値を、*L. lactis* の表面電位は Table 3.1 に示した値をそれぞれ用いた。

また、3.1.2 節と同様に *E. coli* の接触角を測定し、Young–Dupré の式を用いて各種表面張力を見積もった。ガラス基板は Table 2.4 で示した NC ガラスの値を、*L. lactis* は Table 3.3 の値をそれぞれ用いた。

E. coli の鞭毛の有無は Leifson 鞭毛染色法[2]によって染色し、光学顕微鏡（BX60、オリンパス）を用いて 100× レンズ（LMPlanFI、オリンパス）により観察した。*E. coli* KP7600 のモルフォロジーは、原子間力顕微鏡（MFP-3D-BIO-J、アサイラムリサーチ）を用いて観察した。

5.1.3 平行平板流れ場を用いた微生物の付着・脱離実験

細胞外器官である鞭毛が固体表面で微生物の付着に及ぼす影響について、4.1.3 節に準じて PPFC を用いた付着力分布評価法により、KP7600 株とその変異株を用いて確認した。微生物の分散には 10 もしくは 160 mol/m³ の NaCl 水溶液を用い、微生物濃度が 1×10^7 cells/ml となるように調製した。微生物懸濁液を PPFC 内に 0.01 ml/min で流入させ、ガラス基板上への付着挙動を観測した。流れ場壁には NC ガラスを用い、ガラス表面への微生物付着数を 90 分間観察した。次に、微生物を含まない生理食塩水をセルに供給して浮遊微生物を除去し、付着実験を開始してから約 3 時間後に、脱離実験を実施した。脱離実験は 160 mol/m³ NaCl 水溶液の場合のみ行った。

また、EPS が固体表面で微生物の付着に及ぼす影響について、同様に PPFC を用いた付着力分布評価法により、*L. lactis* を用いて確認した。微生物は 160 mol/m³ NaCl 水溶液を用い、微生物濃度が 2×10^7 cells/ml となるように調製した。

微生物懸濁液を PPFC 内に 0.01 ml/min で流入させ、洗浄の有無による固体表面への付着挙動の違いについて観測した。流れ場壁には NC ガラスを用い、ガラス表面への微生物付着数を 90 分間観察した。次に、微生物を含まない生理食塩水をセルに供給して浮遊微生物を除去してから、脱離実験を実施した。洗浄微生物の脱離挙動は、付着実験開始から 3 時間経ったものと、24 時間経ったものに関して実施した。さらに、*L. lactis* の細胞外表層はレーザーラマン顕微鏡（inVia Reflex St、レニショー）を用いて分析した。観察部の構成を **Fig. 5.1** に示す。石英ペトリディッシュ上に置いた Au ナノロッドアレイ光増強基板（Wavelet、ニデック）上に生理食塩水中に分散した *L. lactis* 懸濁液を滴下し、基板上に微生物を固定した。その後、液浸レンズ（HCX PL APO 63×/NA=1.2、ライカ）を用いて微生物と基板界面にピントを合わせ、785 nm レーザ（3 mW）を 10 秒間当てた際のストークスラマン散乱を計測した。得られたスペクトルは、Renishaw WiRE software ver. 4.1 を用いて解析した。1 時間固定した微生物と、24 時間固定した微生物の表層ラマンスペクトルを取得し、比較した。1 時間固定した微生物については、洗浄微生物と未洗浄微生物についても比較した。

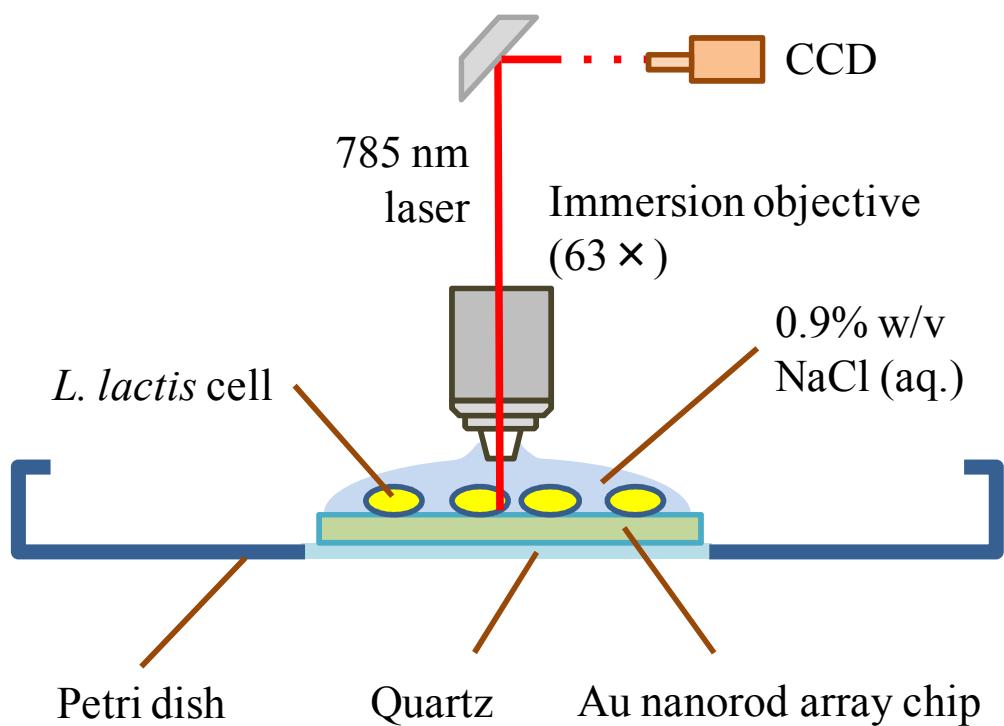


Fig. 5.1 Schematic of *in situ* surface-enhanced raman scattering system for microbial cell surface analysis.

5.2 実験結果および考察

5.2.1 表面性状

実験に用いた *E. coli* の AFM 像および鞭毛染色像を **Fig. 5.2** に示す。*E. coli* KP7600 は複数の鞭毛を持つ桿菌であることが確認された。鞭毛染色により、KP7600Δ $fliG$ 株は鞭毛様のものを有しているが運動性が無いこと、KP7600Δ $fliC$ 株は鞭毛を有しておらず運動性もないことを確認した。また、各微生物の粒度分布測定結果から得られた中位径と幾何標準偏差を **Table 5.1** に示す。

分散媒のイオン強度を変えた時の *E. coli* KP7600 とその変異株の EPM 測定結果を **Fig. 5.3** に示す。また測定結果を Ohshima の式でフィッティングして推算した表面電位を Table 5.1 に示す。なお、EPM のフィッティングパラメータである、流れの侵入距離 $1/\lambda$ と固定電荷密度 ZeN も Table 5.1 に併記した。

分散媒のイオン強度が増加すると共に、EPM の絶対値は減少した。*E. coli* KP7600 とその変異株を比較すると、EPM の傾向に大きな違いはないことがわかった。しかし、柔らかさのパラメータ $1/\lambda$ を比較すると、KP7600 株と KP7600Δ $fliG$ 株は KP7600Δ $fliC$ 株よりも長く、柔らかい粒子であることがわかった。この違いは、鞭毛の有無に起因すると考えられ、 $1/\lambda$ の値に鞭毛が寄与している可能性を示唆している。

E. coli の接触角測定結果を **Table 5.2** に、接触角測定結果から求めた表面張力を **Table 5.3** に示す。いずれの菌株も水に対する接触角は 25°以下で、表面エネルギーは 40 mJ/m² 以上の親水性表面を有していた。また、これらの結果に基づき、微生物が NC ガラス表面に付着した時の表面自由エネルギー変化 ΔG の計算結果を **Table 5.4** に示す。Table 5.4 には、Table 3.3 に示した *L. lactis* の表面張力の値を用いて、*L. lactis* が NC ガラス表面に付着した時の ΔG も併せて示した。いずれの場合においても ΔG^{Total} は正となることがわかった。これより、熱力学的には、*E. coli* および *L. lactis* は NC ガラス表面に安定的に付着しないことが示唆された。

5.2.2 細胞外器官が微生物の付着・脱離挙動に及ぼす影響

E. coli KP7600 とその変異株を用いて、鞭毛の有無が固体表面上に付着する際の影響を PPFC システムにより確認した。流れ場内に各微生物を分散させた懸濁

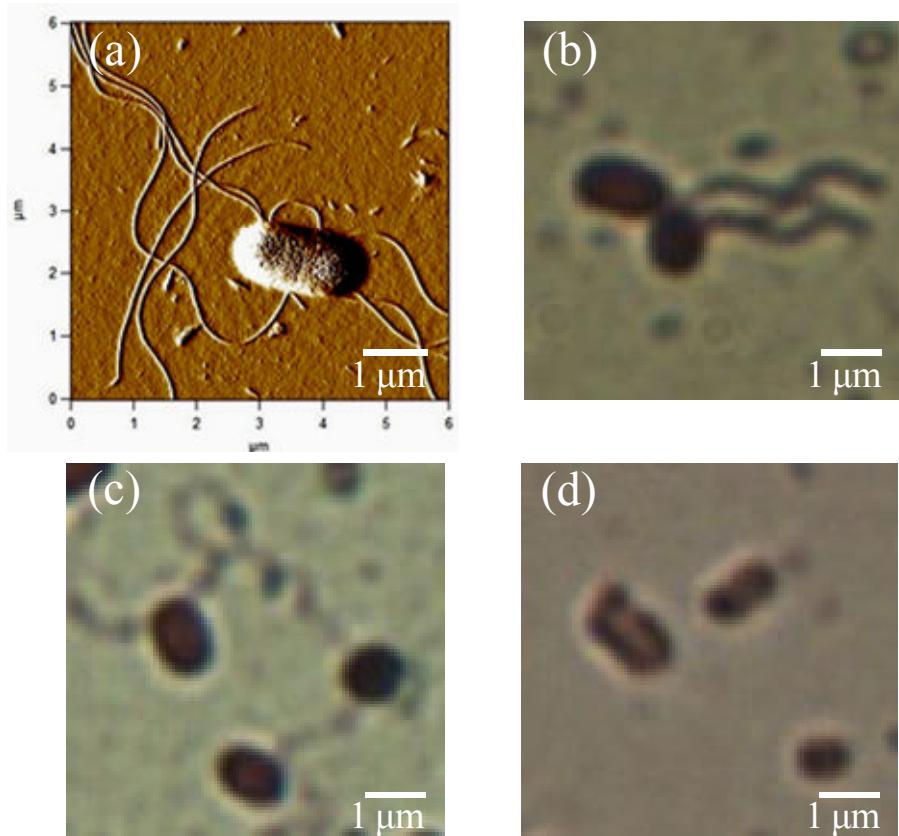


Fig. 5.2 (a) Atomic force microscopy image of *E. coli* KP7600. Optical microscopy images of *E. coli* strains: (b) KP7600, (c) KP7600 Δ fliG, and (d) KP7600 Δ fliC.

Table 5.1 Hydrodynamic diameters and electrostatic surface properties of *E. coli* cells. D_{p50} is the hydrodynamic diameter, and σ_g is the standard deviation of the cell size distribution in the 160 mol/m³ NaCl aqueous solution. \pm signs indicate SEM, $N \geq 5$.

Bacteria	Hydrodynamic		Surface potential		Soft particle fitting	
	diameter		(mV)		1/ λ	ZeN
	D_{p50} (μm)	σ_g (-)	10 mol/m ³	160 mol/m ³		
<i>E. coli</i> KP7600 (Wild-type, intact)	0.87 ± 0.03	1.32 ± 0.03	-32.0	-2.9	1.08	-7.1
<i>E. coli</i> JD28032 (KP7600 $\Delta fliG$, intact)	0.91 ± 0.01	1.28 ± 0.01	-29.4	-2.6	1.12	-6.2
<i>E. coli</i> JD23004 (KP7600 $\Delta fliC$, intact)	0.87 ± 0.01	1.29 ± 0.03	-39.5	-4.2	0.67	-10.2

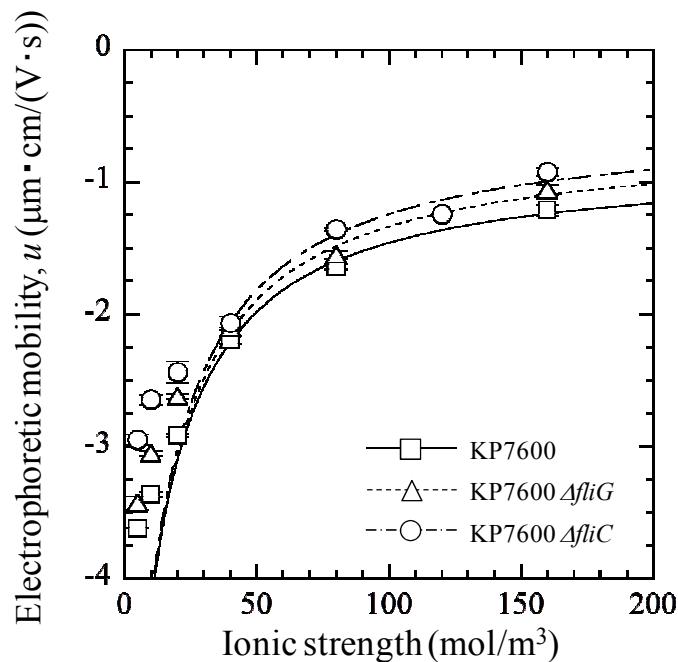


Fig. 5.3 Electrophoretic mobility of *E. coli* KP7600 and two transposon insertion mutants cells in NaCl aqueous solutions as a function of ionic strength. The curve fits are based on Ohshima's equation. Error bars indicate SEM, $N \geq 3$.

Table 5.2 Contact angles of *E. coli* cells. \pm signs indicate SEM, $N \geq 7$.

Bacteria	Contact angle (degree)		
	$\theta^{\text{Wa} \alpha}$	$\theta^{\text{Fo} \alpha}$	$\theta^{\text{Br} \alpha}$
<i>E. coli</i> KP7600 (Wild-type)	21 \pm 1	25 \pm 1	37 \pm 2
<i>E. coli</i> JD28032 (KP7600 <i>AflG</i>)	17 \pm 2	22 \pm 2	35 \pm 1
<i>E. coli</i> JD23004 (KP7600 <i>AflC</i>)	14 \pm 1	24 \pm 3	35 \pm 2

α Wa, Water; Fo, Formamide; Br, α -Bromonaphthalene

Table 5.3 Surface tensions of *E. coli* cells.

Bacteria	Surface tension (mJ/m^2)				
	γ^{Total}	γ^{LW}	γ^{AB}	γ^+	γ^-
<i>E. coli</i> KP7600 (Wild-type)	52	36	16	1.1	54
<i>E. coli</i> JD28032 (KP7600 <i>AflG</i>)	53	37	16	1.2	55
<i>E. coli</i> JD23004 (KP7600 <i>AflC</i>)	52	37	15	0.92	58

Table 5.4 Interfacial free energies ΔG , and Hamaker constant A , between *E. coli* or *L. lactis* strains and the NC-glass substratum.

Bacteria	Interfacial energy (mJ/m^2)			Hamaker constant
	ΔG^{LW}	ΔG^{AB}	ΔG^{Total}	A (J)
<i>E. coli</i> KP7600 (Wild-type)	-4.8	44	39	4.5×10^{-21}
<i>E. coli</i> JD28032 (KP7600 <i>AflG</i>)	-5.0	45	40	4.6×10^{-21}
<i>E. coli</i> JD23004 (KP7600 <i>AflC</i>)	-5.1	48	43	4.7×10^{-21}
<i>L. lactis</i> JCM5805 (washed)	-5.4	58	52	5.1×10^{-21}
<i>L. lactis</i> JCM5085 (intact)	-5.2	47	42	4.8×10^{-21}

液を 0.01 ml/min で流入させた際に、ガラス表面上に付着する微生物の積算付着分率の経時変化を Fig. 5.4 に示す。160 mol/m³ の NaCl 水溶液では、時間の経過と共に、付着量は増加することがわかった。一方、10 mol/m³ の NaCl 水溶液では、160 mol/m³ 中と比較してその約 10 分の 1 しか付着していないことがわかった。この傾向はいずれの菌株でも同じであった。そこで、DLVO 理論によって、ガラス基板と *E. coli* 間のポテンシャルを計算した結果を Fig. 5.5 に示す。160 mol/m³ の NaCl 水溶液中の場合、ガラス基板と微生物間にはいずれの場合もポテンシャル障壁は存在しないことがわかった。一方、10 mol/m³ の NaCl 水溶液中の場合、400 kT を超える高いポテンシャル障壁が存在している。このことから、微生物の付着挙動は、DLVO 理論から予測される挙動と良く一致することが示唆された。次に、160 mol/m³ の NaCl 水溶液中での微生物の付着速度に着目した。Fig. 5.4 において、KP7600 株と KP7600Δ*flG* 株、KP7600Δ*flC* 株のガラス基板への付着速度は、それぞれ 420、380、390 cells/cm²/s であった。3 種の菌株間には有意差がないことから、ガラス基板上への付着には、鞭毛や運動性は重要ではなく、DLVO 力 (van der Waals 力や静電気力) が支配的であることが示唆された。一方、10 mol/m³ の NaCl 水溶液中においても、付着速度に菌株間で有意差はなく、ポテンシャル障壁がある場合の鞭毛の効果は本実験においては確認できなかった。しかし、ポテンシャル障壁を突き抜けて付着する現象についても報告はされている。Horlら[3]は、微生物細胞は基板上に曲率が小さく、ポテンシャル障壁を通り抜けることができるナノファイバーや EPS を用いて付着すると報告している。また、Dorobantu ら[4]は、異種表面のモルフォロジーが様々な細胞外器官 (EPS も含む) の存在と直接関係すると述べている。よって、微生物の付着現象を考える際には、DLVO 力に加えて、纖維状構造物 (鞭毛や線毛など) や EPS (炭水化物やタンパク、脂質、および他の高分子) を考慮する必要がある。

次に、付着実験によりガラス基板上に付着させた微生物について、脱離実験を行った。積算付着残留率を Fig. 5.6a に示す。なお、10 mol/m³ の時は解析に必要な付着微生物数に達しなかったため、160 mol/m³ の時のみ実施した。KP7600 株は 2 種の変異株と比較して、最も脱離しにくいことがわかった。そこで、脱離曲線を Eq. (4.10) に示した Weibull 分布関数により解析した。解析に用いたパラメータを Table 5.5 に示す。KP7600 株の Q_n は最も値が大きく、これは脱離しにくいこ

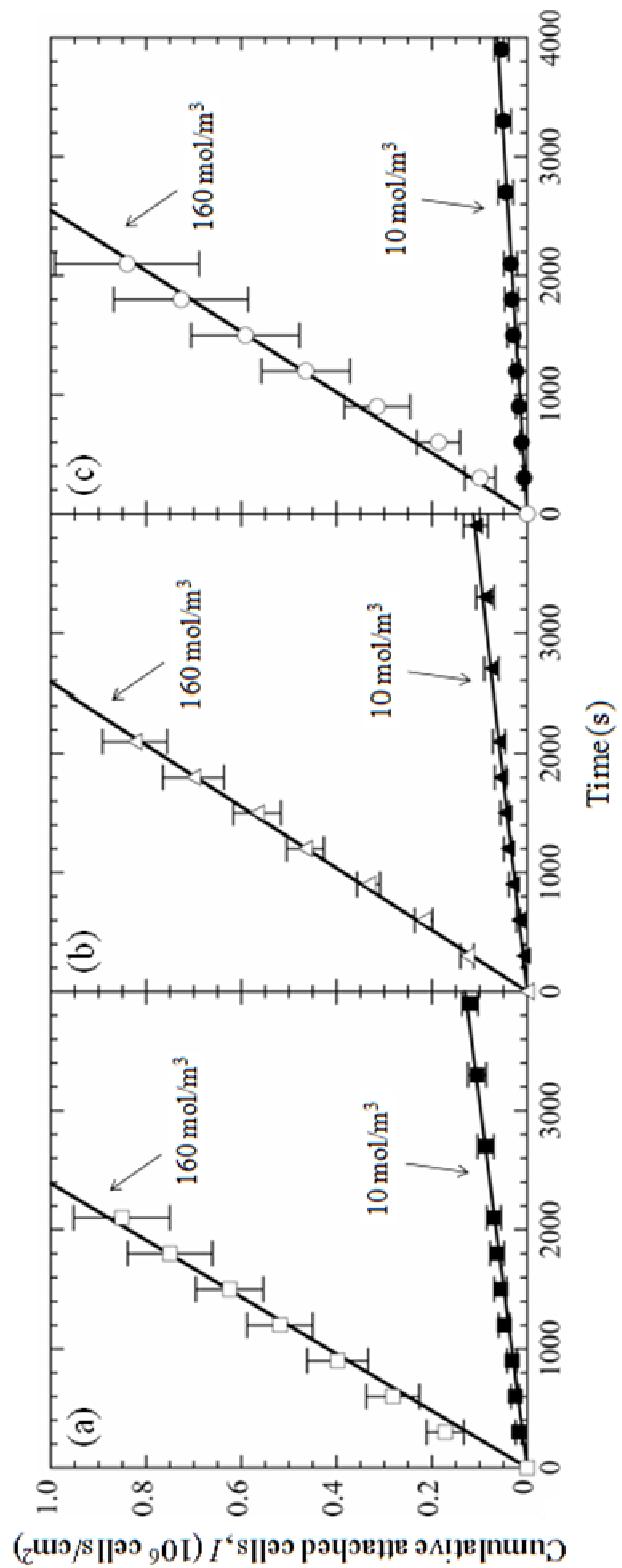


Fig. 5.4 Cumulative number of cells adhered per unit area on the glass, as a function of time: (a) KP7600 (Wild-type), (b) KP7600 $\Delta fliG$, and (c) KP7600 $\Delta fliC$. The error bars indicate SEM, $N \geq 4$.

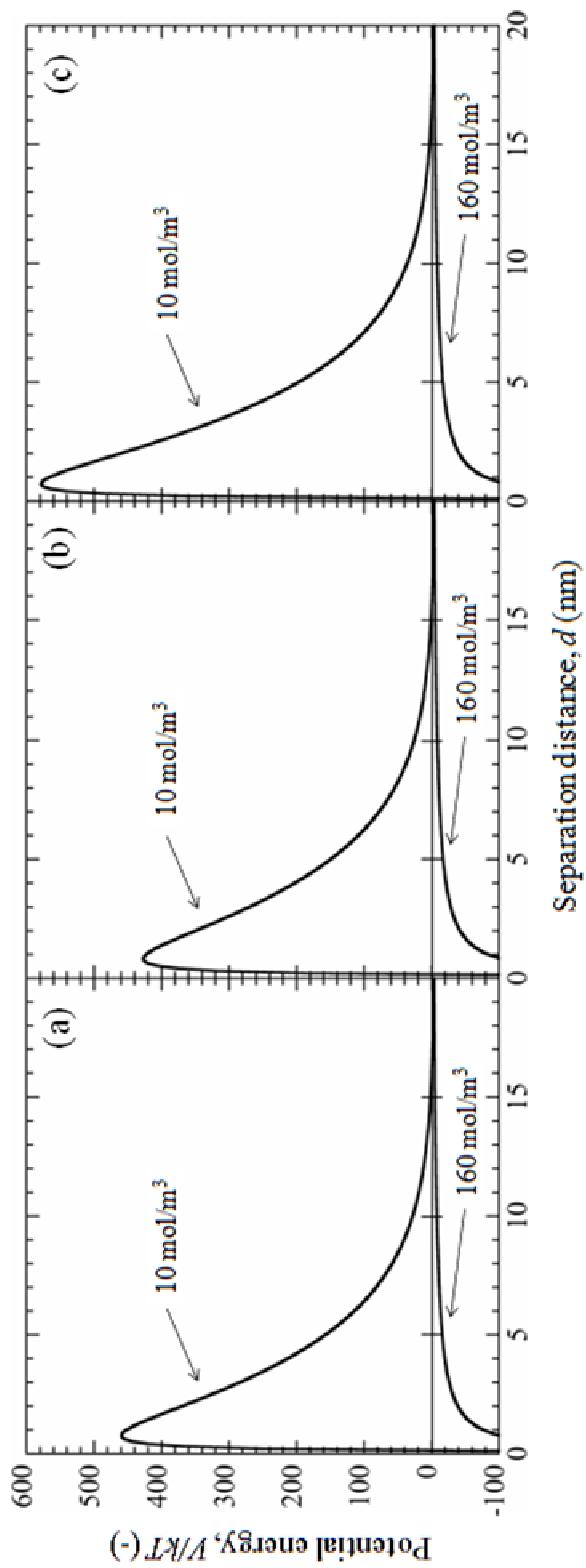


Fig. 5.5 Potential energy curves for *E. coli* strains on the glass surface estimated using the DLVO theory using the estimated values: (a) KP7600 (Wild-type); (b) KP7600Δ*fliG*; and (c) KP7600Δ*fliC*.

とを示している。さらに、 t 値は菌株間で違いはなく、これは同じ分布幅を持っていることを示唆している。Weibull 分布モデルは、本脱離実験においても F と Q の間で良い相関を示した。そこで、Eqs. (3.5)と(3.6)を用いて、ガラス基板上から微生物が脱離するために必要な抗力分布を確率密度関数として計算した結果を Fig. 5.6b に示す。併せて、流体抗力の中央値 D_{50} と幾何標準偏差 σ_D を Table 5.5 に示す。流体抗力の中央値を比較すると、KP7600*AfliG* 株は KP7600*AfliC* 株の約 2 倍することがわかった。さらに、KP7600 株は、KP7600*AfliG* 株の約 3 倍、KP7600*AfliC* 株の 7 倍以上あることがわかった。この結果は、鞭毛や鞭毛による運動性が固体表面上からの微生物の脱離を妨げていると推察される。また、幾何標準偏差を比較すると、菌株間で大きな違いはなかった。しかし、粒度分布と比較した結果を Fig. 5.7 に示すと、抗力分布における分布幅は、粒度分布における分布幅よりも非常に広いことがわかった。これは、*L. lactis* の場合も同様であり、微生物表面の不均一性のため、微生物と基板との間の分離距離にランダム性が生じるためと考えられる (Dorobantu ら[4]により論じられている)。よって、微生物表面の不均一性は、微生物の粒度分布と比較して、ブロードな分布を示す重要な因子の一つであると考えられる。Fig. 5.6b における D_{99} 値と $D_{99.9}$ 値を Table 5.5 に示す。ここで、 D_{99} と $D_{99.9}$ はそれぞれ、ガラス基板上に付着していた微生物の内 99% および 99.9% が脱離する際の流体抗力を示す。 D_{99} 値は D_{50} 値の 10 倍以上大きく、 $D_{99.9}$ 値は D_{50} 値の約 30 倍大きいことがわかった。Morisaki[5]はリン酸緩衝液中において石英基板上から *Bacillus* 属の微生物を取り除くために必要な力を電気浸透により引き起こされる流体場を利用して測定し、微生物は特定の力で取り除かれるのではなく、取り除くための力は広い分布を有していることを実証した。この結果は、本実験で得られた結果の傾向と良く一致している。以上より、界面に付着した微生物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、微生物が少しでも界面に付着していると容易に成長するバイオフィルムを制御する上で、微生物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り、微生物の付着・脱離現象を制御するための指標として利用できること示唆している。

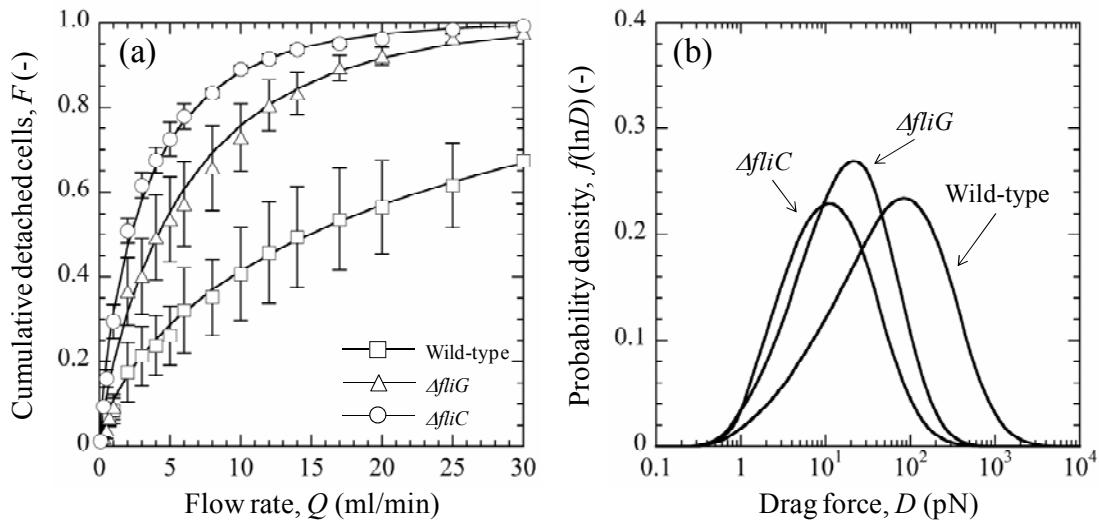


Fig. 5.6 Analysis of cell detachment process in the PPFC system: (a) cumulative number of cells detached from the glass substratum as a function of flow rate; (b) probability density distributions of drag forces required to remove the attached cells from the glass substratum. The NaCl concentration was 160 mol/m³. The error bars indicate SEM, $N \geq 4$.

Table 5.5 Weibull fitting parameters, drag forces, and geometric standard deviation σ_D .

<i>E. coli</i> strain	Weibull parameter			Drag force (pN)			σ_D (-)
	t	Q_n	Q_u	D_{50}	D_{99}	$D_{99.9}$	
KP7600 (Wild-type)	0.67	25.6	0.22	56	948	1739	4.3
JD28032 (KP7600 $\Delta fliG$)	0.78	6.5	0.21	18	190	319	3.4
JD23004 (KP7600 $\Delta fliC$)	0.66	3.0	0.31	8	116	215	3.9

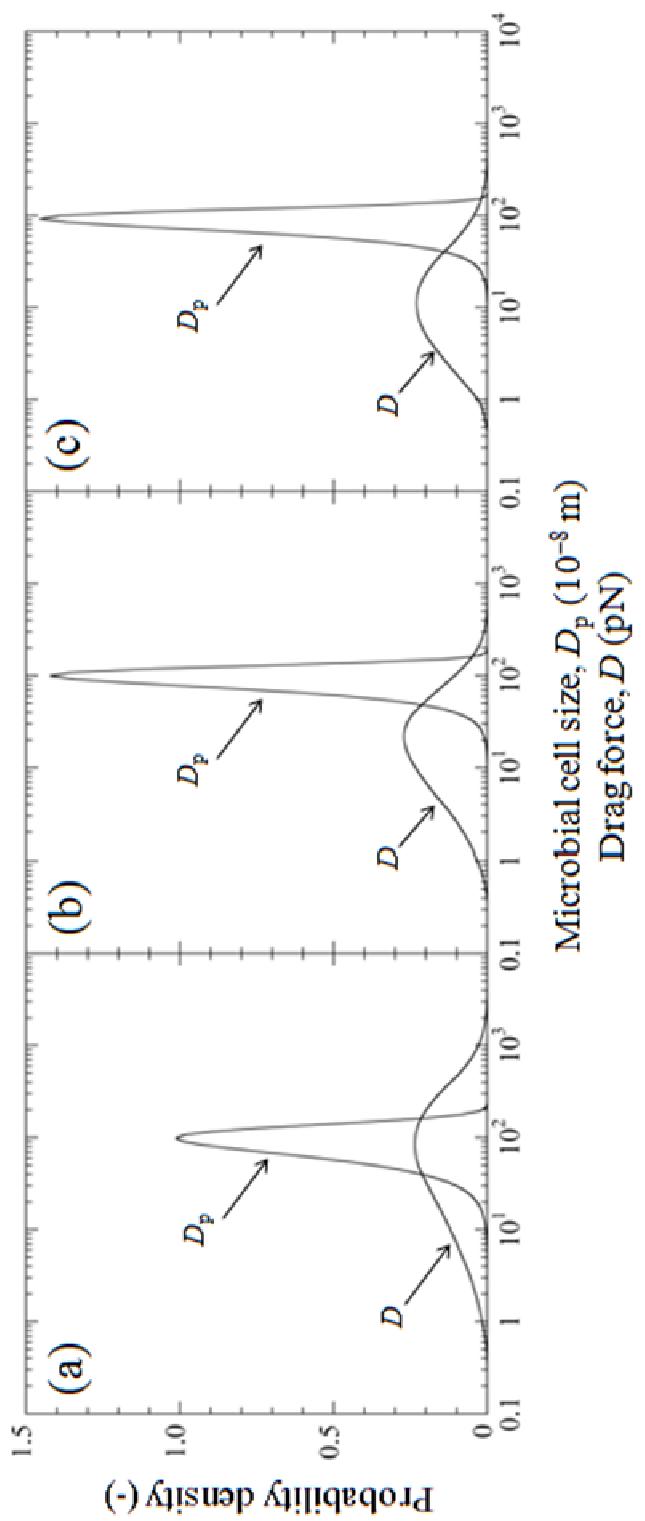


Fig. 5.7 A comparison between the microbial cell size and the drag force distribution for three strains: (a) KP7600 (Wild-type); (b) KP7600*fliG*; and (c) KP7600*fliC*.

5.2.3 細胞外代謝物が微生物の付着・脱離挙動に及ぼす影響

EPSによる固体表面上の付着現象をより詳細に検証するため、PPFCを用いて、*L. lactis*のガラス表面への付着・脱離試験を実施した。付着実験の結果を Fig. 5.8 に示す。未洗浄微生物のガラス基板に対する付着速度は $190 \text{ cells/cm}^2/\text{s}$ 、洗浄微生物は $130 \text{ cells/cm}^2/\text{s}$ であり、未洗浄微生物の方が洗浄微生物よりもガラス表面に付着しやすいことがわかった。この結果は、シリカ粒子に対する付着挙動と一致しており、未洗浄微生物表面の EPS が影響を及ぼしている可能性が考えられる。そこで、付着実験開始から、3 時間および 24 時間スライドガラス表面に固定した微生物について脱離実験を行った。Fig. 5.9 は流速に対する積算脱離微生物数の解析結果である。未洗浄微生物は洗浄微生物よりも脱離しやすいことがわかった。この原因は、微生物表面に存在する EPS により微生物とガラス基板間の接触距離が変わり、付着力に影響したことが考えられる。また、付着実験開始から 24 時間静置した洗浄微生物は 3 時間静置させた微生物よりも脱離しにくいことがわかった。さらに、付着実験開始から 24 時間静置した未洗浄微生物でも、同様であった。以上の結果は、代謝などの要因によって壁表面との親和性が向上し、付着力の上昇が顕著に現れた結果であると推察される。次に、得られた積算脱離微生物数から Weibull 近似により抗力分布を算出した。計算結果を Fig. 5.10 に、この際の抗力の中央値 D_{50} 、標準偏差 σ_D を Table 5.6 に示す。洗浄微生物は未洗浄微生物の 3 倍以上の抗力ピークが現れた。また、24 時間静置すると、洗浄と未洗浄微生物は共に 3 時間静置後と比較して 2 倍以上の抗力ピークを示した。静置時間とともに細胞外に代謝された EPS の影響で、付着力が向上したためと考えられる。また、分布幅に着目すると、未洗浄微生物は洗浄微生物よりもブロードな分布を示した。このことから、EPS による不均一な付着や微生物とガラス表面の分離距離のばらつきが、分布がブロードとなった原因と考えられる。

次に、微生物を固体表面上に付着させた際の静置時間の違いによる表面状態の違いをラマン分光スペクトルによって評価した。得られたスペクトルを Fig. 5.11 に示す。いずれのスペクトルにおいても、 1000 cm^{-1} にフェニルアラニン由来のピークが確認できたことから[6–12]、細胞外マトリックスに含まれる糖タンパク成分が検出されていると考えられる。洗浄と未洗浄微生物を比較すると、未洗

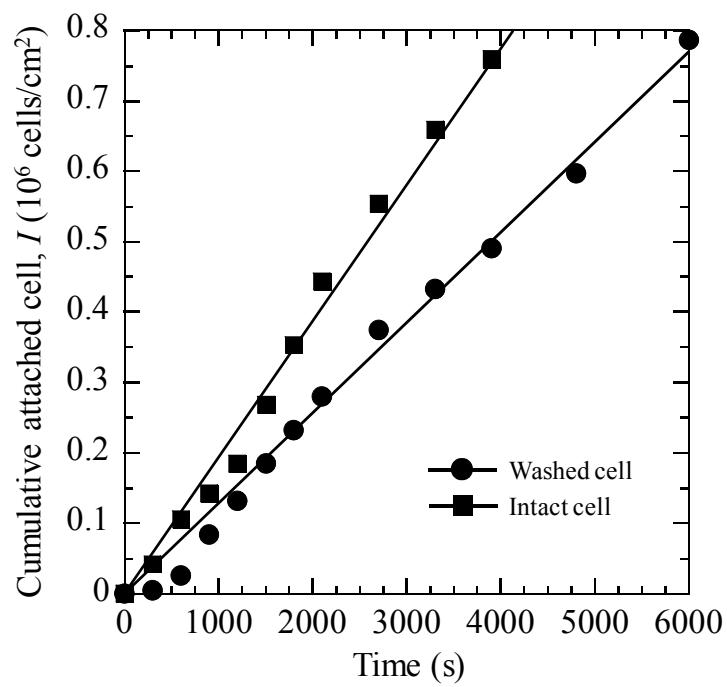


Fig. 5.8 Cumulative number of adhered *L. lactis* cells per unit area on glass substratum as a function of time.

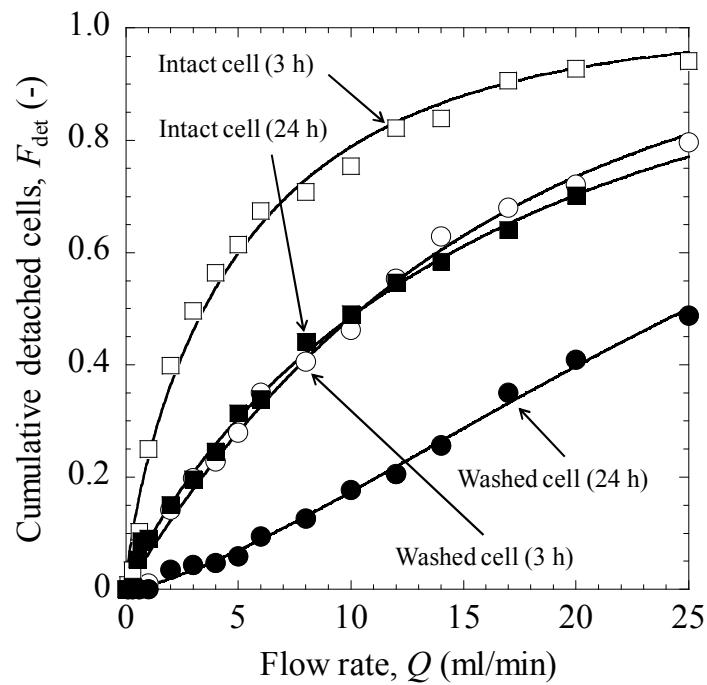


Fig. 5.9 Cumulative number of detached *L. lactis* cells on glass substratum as a function of flow rate.

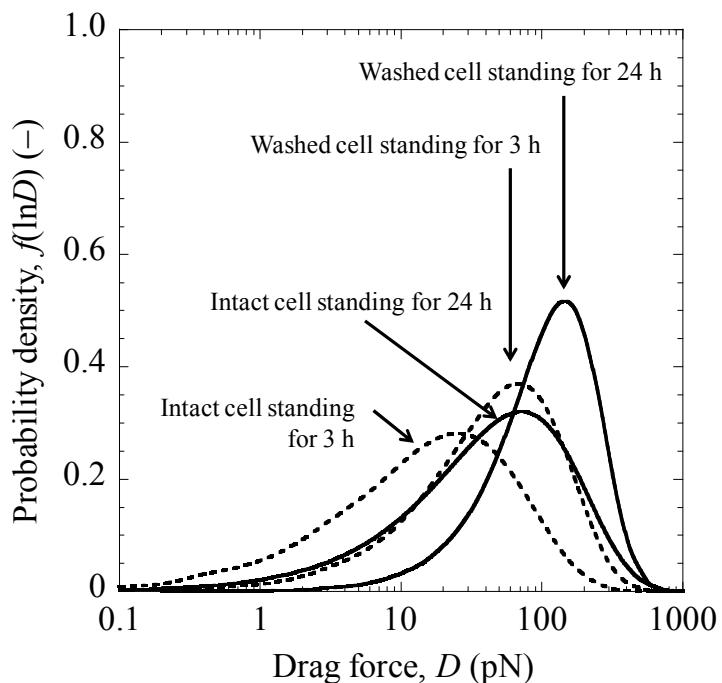


Fig. 5.10 Distributions of drag forces required to remove attached *L. lactis* cells from glass substratum.

Table 5.6 Median drag force D_{50} and geometric standard deviation σ_D .

Cell condition	D_{50} (pN)	σ_D (-)
Intact cell standing for 3 h	13.6	3.84
Washed cell standing for 3 h	42.6	2.67
Intact cell standing for 24 h	42.7	3.14
Washed cell standing for 24 h	101	2.00

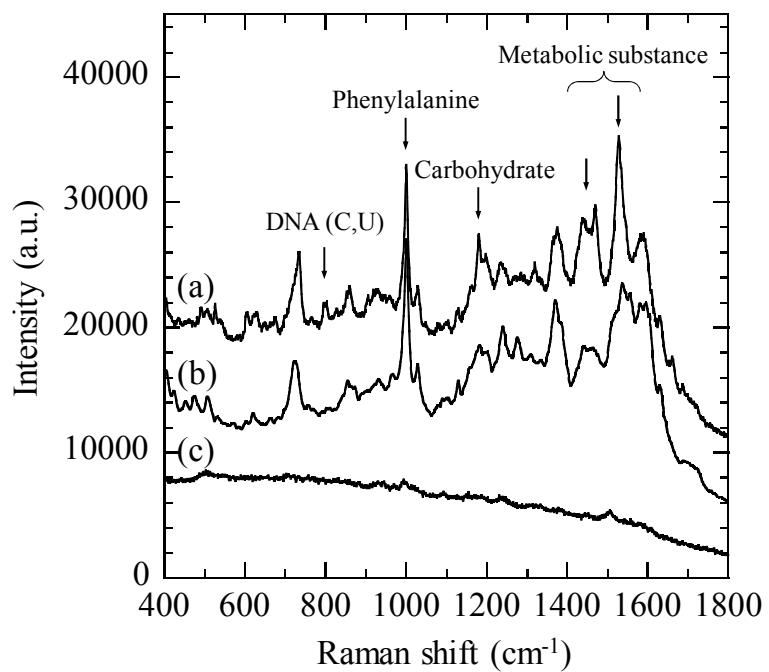


Fig. 5.11 Raman spectra of *L. lactis* cell surface. (a) washed cell standing for 24 h, (b) washed cell standing for 1 h, and (c) intact cell standing for 1 h onto the Au nanorod array chip for surface-enhanced raman scattering.

浄微生物のラマン散乱強度は洗浄微生物と比べて弱いことがわかった。これは、未洗浄微生物表面に残留した培地成分による影響に加え、PPFC 脱離試験において、未洗浄微生物の脱離が容易であったことから、増強基板上と微生物表面との距離が長いため、基板上に微生物が密着しておらず、十分な強度のラマン散乱が得られていない可能性が考えられる。そこで、静置時間の影響に関しては、洗浄微生物のみで確認を行った。1 時間固定したものと、24 時間したもので比較すると、24 時間固定した時のスペクトルは強度の向上が見られた。 1180 cm^{-1} 付近には、糖質由来の C–C 伸縮振動が見られる[7–9]。また、 799 cm^{-1} には、DNA/RNA 成分であるシトシン (C) と RNA 成分であるウラシル (U) 由来のピークが見られた[7,8]。 733 cm^{-1} 付近のピークは DNA/RNA 成分のアデニン[6,9,13]もしくは多糖由来[8–10]のピークであることから、24 時間静置することによって、EPS の產生が行わされたと推察される。さらに、 $1400\text{--}1600\text{cm}^{-1}$ はピークに顕著な違いが見られたが、適切な文献がないため、乳酸菌特有の代謝物の可能性があり、この点はさらなる検討を要する。以上より、24 時間静置後の微生物では、EPS により付着力が向上した可能性が示され、微生物付着において EPS は大きく寄与していることがわかった。

結言

大腸菌と乳酸菌をモデル微生物として、細胞外に存在する鞭毛や EPS が微生物の固体界面への付着現象に及ぼす影響について、PPFC を用いて解析を行った。その結果、以下の結論を得た。

- 1) *E. coli* KP7600 とその変異株を用いて、ガラス基板に対する微生物の付着速度を検討したところ、鞭毛の有無による付着速度の差は見られなかった。流動場における微生物の付着過程において、鞭毛は必ずしも付着を促進する因子ではないことがわかった。
- 2) *E. coli* KP7600 とその変異株を用いて、ガラス基板からの脱離挙動を観察した。脱離挙動は、Weibull 分布関数で相關することができ、微生物の脱離に必要な抗力分布を算出した所、抗力の中央値 D_{50} は鞭毛があり運動性がある KP7600 株、KP7600Δ $fliG$ 株（運動性欠損株）、KP7600Δ $fliC$ 株（鞭毛欠損株）の順に大きいことが分かり、鞭毛と運動性は、微生物の脱離を妨げる要因となることがわかった。
- 3) ガラス基板上に付着した *E. coli* の内 99.9% の微生物を取り除くために必要な流体抗力は、抗力の中央値の約 30 倍の力が必要であることが分かり、バイオフィルム形成の初期段階である微生物付着を防止するためには、非常に大きな外力を加える必要があることがわかった。
- 4) 抗力分布における分布幅は、粒度分布における分布幅よりも非常に広いことがわかった。これは、微生物表面の不均一性のため、付着界面での分離距離にランダム性が生じるためと考えられる。
- 5) EPS が微生物の付着挙動に与える影響を *L. lactis* の洗浄と未洗浄微生物を用いて検討した。未洗浄微生物は、洗浄微生物よりも付着率が増加し、これは EPS の曲率が微生物自身と比べて明らかに小さいことが理由と考えられる。また、固定時間を変えた際の脱離挙動を PPFC により解析した結果、洗浄と未洗浄微生物では共に 24 時間静置することで、その抗力ピークは 2 倍に増加し、脱離しにくくなつた。微生物表面のラマン分光分析結果より、表面に EPS 由来のピークが確認されたことから、EPS は微生物付着に大きく寄与することがわかった。

Nomenclature

A	= Hamaker constant	(J)
D	= Drag force	(N)
D_{50}	= Median drag force	(N)
D_{99}	= Drag force at which 99% of the attached cells on the substratum are removed	(N)
$D_{99.9}$	= Drag force at which 99.9% of the attached cells on the substratum are removed	(N)
D_p	= Hydrodynamic diameter of particle	(μm)
D_{p50}	= Median hydrodynamic diameter of particle	(μm)
e	= Elementary electronic charge	(C)
F_{det}	= Cumulative number of detached cells	($-$)
I	= Number of cells initially attached to the substrate	($-$)
I_0	= Number of residual cells left on the substrate	($-$)
k	= Boltzmann constant	(J/K)
N	= Density of charged group within the polymer layer	($1/\text{m}^3$)
Q	= Flow rate	(m^3/s)
Q_n	= Normalized parameter (scale parameter) in Weibull	(m^3/s)
t	= Weibull factor (shape parameter)	($-$)
T	= Temperature	(K)
u	= Electrophoretic mobility	($\text{m}^2/(\text{V}\cdot\text{s})$)
Z	= Valency of charged groups within the polymer Layer	($-$)
γ	= Surface tension	(mJ/m^2)
γ^+	= Electron-acceptor parameter of surface tension	(mJ/m^2)
γ^-	= Electron-donor parameter of surface tension	(mJ/m^2)
ΔG	= Free energy of interaction	(mJ/m^2)
θ	= Contact angle	(degree)
λ	= Reciprocal of softness parameter	($1/\text{m}$)
σ_D	= Geometric standard deviation in the Weibull distribution	($-$)
σ_g	= Geometric standard deviation in the cell size distribution	($-$)

superscript

AB	= Lewis acid–base component
LW	= Lifshitz–van der Waals component
Total	= Sum of components

References

- [1] T. Nomura, H. Narahara, H. Tokumoto, Y. Konishi, *Adv. Powder Technol.* **20** (2009) 537–541.
- [2] E. Leifson, *J. Bacteriol.* **62** (1951) 377–389.
- [3] K. Hori, S. Matsumoto, *Biochem. Eng. J.* **48** (2010) 424–434.
- [4] L.S. Dorobantu, S. Bhattacharjee, J.M. Foght, M.R. Gray, *Langmuir* **24** (2008) 4944–4951.
- [5] H. Morisaki, *J. Gen. Microbiol.* **137** (1991) 2649–2655.
- [6] O. Samek, K. Mlynáriková, S. Bernatová, J. Ježek, V. Krzyžánek, M. Šiler, P. Zemánek, F. Růžička, V. Holá, M. Mahelová, *Int. J. Mol. Sci.* **15** (2014) 23924–23935.
- [7] N.P. Ivleva, M. Wagner, A. Szkola, H. Horn, R. Niessner, C. Haisch, *J. Phys. Chem. B* **114** (2010) 10184–10194.
- [8] N.P. Ivleva, M. Wagner, H. Horn, R. Niessner, C. Haisch, *Anal. Bioanal. Chem.* **393** (2009) 197–206.
- [9] M. Wagner, N.P. Ivleva, C. Haisch, R. Niessner, H. Horn, *Water Res.* **43** (2009) 63–76.
- [10] N.P. Ivleva, M. Wagner, H. Horn, R. Niessner, C. Haisch, *Anal. Chem.* **80** (2008) 8538–8544.
- [11] V. Prabhawathi, T. Boobalan, P.M. Sivakumar, M. Doble, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **123** (2014) 461–468.
- [12] B.D. Beier, R.G. Quivey, A.J. Berger, *AMB Express* **2** (2012) 35–40.
- [13] Y. Wang, K. Lee, J. Irudayaraj, *J. Phys. Chem. C* **114** (2010) 16122–16128.

第6章 メタン発酵プロセスへの応用

メタン発酵は、有機性廃棄物からバイオエネルギーを抽出できるバイオプロセスである。メタン発酵で発生するメタンの約70%は、メタン生成古細菌が酢酸を資化することで生成される。しかし、酢酸をエネルギー源に利用できる菌種は*Methanosaeta*属と*Methanosarcina*属の2属が報告されているに過ぎない。また、メタン生成古細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、メタン発酵では酢酸からメタンへの変換過程が律速段階となる。さらに、発酵槽内の菌が流出してしまう点も、発酵効率が上がらない一因である。これらの課題を解決し、高効率メタン発酵プロセスを実現するためには、酢酸資化性メタン生成古細菌を発酵槽内に高密度に保持することが必要となる。

第2章では、コロイド科学の観点から、メタン生成古細菌表層の性状が付着挙動に及ぼす影響について検討した。その結果、*Methanosaeta*属のメタン生成古細菌である*Methanosaeta concilii*は疎水性・無帶電という特異的な微生物であり、*Methanosarcina*属のメタン生成古細菌である*Methanosarcina barkeri*は疎水性・負帯電であることがわかった。さらに、*M. barkeri*の固体表面への付着現象を定性的に評価した結果、正帯電表面や疎水性表面に付着しやすいことがわかった。

そこで第6章では、これらの知見をもとに、メタン生成古細菌を発酵槽内に高密度に保持する方法について検討した。具体的には、メタン生成古細菌の固定化に適すると考えられる、正帯電と疎水性を有する担体を選定し、消化発酵液に含まれるメタン生成古細菌を選択的に固定化できるか検討した。また、消化発酵液から選択培養した3種類の酸生成菌とメタン生成古細菌のヘテロ凝集実験を行い、上向流嫌気性スラッジプランケット(Upflow anaerobic sludge blanket, UASB)リアクターなどで見られる、凝集物(グラニュール)の形成を試みた。

6.1 実験方法

6.1.1 実験に用いた試料

有機性廃棄物は、多糖、タンパク質、脂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、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種菌として集積培養を行った。それぞれ異なる基質を加えた PGY 培地(ペプトン 2 g/L、酵母エキス 1 g/L、グルコース 0.5 g/L)に、消化発酵液 1%を接種し、37°C、pH 7 の嫌気性条件下で繰り返し培養を行った。基質をスキムミルク (10 g/L) で集積培養した微生物はタンパク質分解菌群 (Proteolytic microbe)、可溶性でんぶん (2 g/L) で集積培養した微生物は炭水化物分解菌群 (Amylolytic microbe)、トリブチリン (5 g/L) で集積培養した微生物は脂質分解菌群 (Lipolytic microbe) である。

培養した菌液は、吸引ろ過 (ADVANTEC No.2) により培地成分を除去した後、遠心分離 (8400×g、4 °C、10 min) により集菌した。集菌した微生物は生理食塩水で 3 回攪拌洗浄し、微生物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。また、微生物の固定化用担体には、ふるいにより粒子径を 4.8~5.6 mm とした竹炭とアルミナの 2 種類を用いた。

6.1.2 キャラクタリゼーション

粒子径・ゼータ電位測定装置 (Zetasizer Nano ZS、Malvern) を用いて、所望の濃度に調整した NaCl 水溶液に分散した微生物および担体の電気泳動移動度 (EPM) を測定し、微生物は柔らかい粒子モデル、担体は Smoluchowski の式を用いて表面電位を見積もった。なお、担体は乳鉢で粉碎したものを測定に用いた。

微生物および担体の疎水性は、動的接触角測定装置 (FTA125、First Ten Ångstroms) を用いて評価した。フィルター上に積層させた微生物層、および乳鉢で粉碎した担体を圧密したペレット上における種々の極性の異なる溶媒 (Table 2.1) の接触角を測定し、Young-Dupré の式を用いて各種表面張力を見積もった。

6.1.3 消化発酵液を用いたメタン発酵実験

内容積 21 ml のバイアル瓶 (20-CV, Perkin-Elmer Japan) に消化発酵液 4 ml と基質溶液 1 ml 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 (IP-8、三紳工業) 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°C のインキュベータで静置培養を行った。用いた基質は酢酸ナトリウムもしくはメタノール、初基質濃度は 20 mol/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

(GC-8APT、島津製作所)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、消化発酵液に残存した有機物からのメタン発生量を差し引いた。実験は全ての条件について3回以上行った。

6.1.4 微生物の担体への固定化実験

消化発酵液中の嫌気性菌を担体へ固定化するための実験概略図をFig. 6.1に示す。メタン発酵実験と同様のバイアル瓶に消化発酵液を5%加えたDSM 120液体培地4 mlと固定化担体1 g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20 mol/m³とした。嫌気状態としたバイアル瓶は37°Cのインキュベータで培養と微生物の固定化を同時に行った。培養を始めて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、生理食塩水で洗浄した。洗浄した微生物固定化担体は、基質として酢酸ナトリウムの初期濃度が20 mol/m³となるように調製したDSM 120液体培地4 ml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°C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。

6.1.5 マイクログラニュールの形成実験

UASBや処理水を内部循環させ、より高い処理効率で低コスト、汚泥発生量、敷地面積などの低減を実現したIC(Internal circulation)リアクターで見られるグラニュールはメタン生成古細菌と酸生成菌の集合体と言われている[1-3]。そこで、純粋培養したメタン生成古細菌と集積培養した酸生成菌のヘテロ凝集実験を行った。各微生物を10 mol/m³のNaCl水溶液に分散させ、波長660 nmにおける吸光度を0.2に調製した。メタン生成古細菌と酸生成菌の懸濁液を1.5 ml容マイクロチューブに0.5 mlずつ添加し、5秒間ボルテックスミキサーで攪拌して1時間静置後、パストールピペットにより懸濁液を採取し、倒立型位相差顕微鏡(CKX41、オリンパス)で微生物の凝集状態を観察した。また、凝集体はグルタルアルデヒドで固定後、上昇アセトン系列で脱水、t-ブチルアルコールで置換して凍結乾燥したものを電界放出形走査電子顕微鏡(JSM-6700F、JEOL)で観察した。

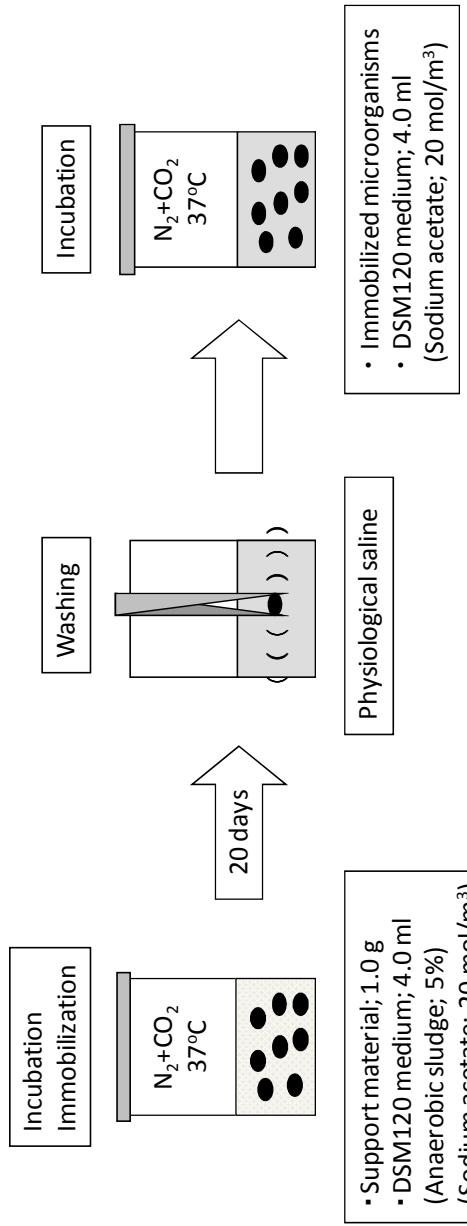


Fig. 6.1 Immobilization of microorganisms existed in anaerobic sludge and methane fermentation using immobilized microorganisms on support material.

6.2 実験結果および考察

6.2.1 表面性状

集積培養した 3 種類の酸生成菌の EPM の測定結果を **Fig. 6.2** に示す。3 種類の酸生成菌の EPM は、すべて負の値を示した。また、イオン強度が増加すると EPM の絶対値は減少し、脂質分解菌は $-1.69 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/(\text{V}\cdot\text{s})$ 、タンパク質分解菌は $-0.38 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/(\text{V}\cdot\text{s})$ 、炭水化物分解菌はほぼ 0 ($-0.01 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/(\text{V}\cdot\text{s})$) に収束した。メタン生成古細菌に関しても、純粋培養した微生物の EPM はすべて負の値を示すことから (2.2.2 節)、消化発酵液中でのメタン生成に携わると考えられる菌表面は負に帯電していることがわかった。これら EPM の測定結果を固定電荷密度 ZeN と流れの侵入距離 $1/\lambda$ をパラメータとして Ohshima の式によりフィッティングを行い、微生物の表面電位を推算した。各イオン強度における酸生成菌 3 種類、メタン生成古細菌 2 種類、および担体 2 種類の表面電位の推算値を **Table 6.1**、フィッティングパラメータを **Table 6.2** に示す。竹炭は負、アルミナは正に帯電していることが確認された。微生物は、低イオン強度の時、表面電位に違いが見られたが、高イオン強度では、いずれの微生物も表面電位が非常に低くほとんど帯電していないことから、微生物が担体に付着するとき、静電相互作用はほとんど寄与しないと推察される。

酸生成菌とメタン生成古細菌、担体の接触角測定結果を **Table 6.3** に、Young–Dupré の式を用いて推算した表面張力を **Table 6.4** に示す。タンパク質分解菌、炭水化物分解菌、脂質分解菌の順に水の接触角は大きい値を示したが、いずれの酸生成菌もメタン生成古細菌よりも水の接触角は小さく、やや親水性と推察される。また、炭水化物分解菌、タンパク質分解菌、脂質分解菌の表面張力はそれぞれ 58 mJ/m^2 、 58 mJ/m^2 、 47 mJ/m^2 となり、メタン生成古細菌よりも高いことがわかった。担体に用いた竹炭とアルミナの水の接触角はそれぞれ 64° と 2° となり、竹炭は疎水性、アルミナは親水性であることが確認された。しかし、酸塩基理論に基づく表面張力は、それぞれ 49 mJ/m^2 と 56 mJ/m^2 となり、水の接触角ほど大きな違いはないことがわかった。微生物の担体への付着による自由エネルギー変化 ΔG の計算結果を **Table 6.5** に示す。メタン生成古細菌と脂質分解菌が竹炭に付着したときの ΔG^{Total} は負の値、それ以外の組み合わせはすべて正の

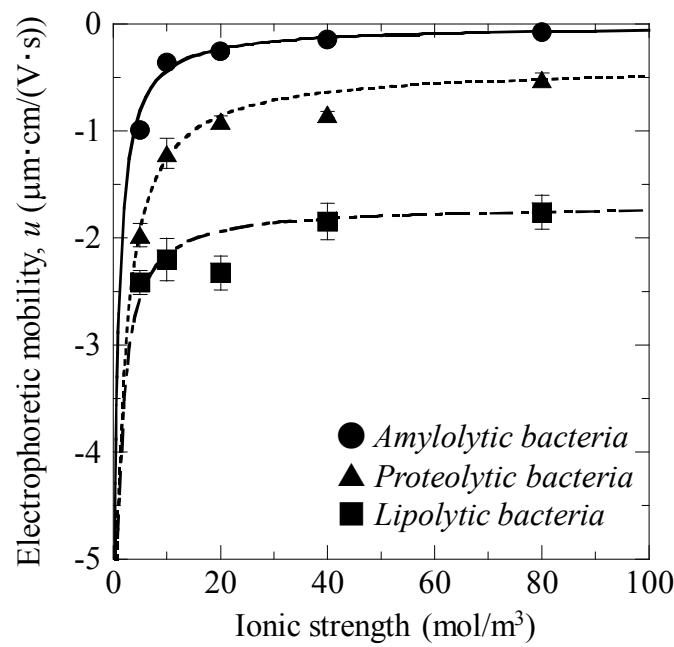


Fig. 6.2 Electrophoretic mobility of acidogens as a function of ionic strength.

Table 6.1 Surface potential of microbial cells and support materials.

Microbial cell / Support		Ionic strength (mol/m³)					
		5	10	20	40	80	160
Acidogen	Amylolytic microbe	-9.47	-4.88	-2.46	-1.23	-0.62	-0.31
	Proteolytic microbe	-15.4	-8.31	-4.26	-2.14	-1.07	-0.54
	Lipolytic microbe	-7.24	-3.69	-1.85	-0.93	-0.46	-0.23
Support	Bamboo charcoal		-54.5				-24.2
	Alumina		31.1				7.4

Table 6.2 Fitting parameter for the acidogenic cell in the soft particle theory.

Microbial cell	ZeN (MC/m³)	$1/\lambda$ (nm)
Amylolytic microbe	-0.74	0.38
Proteolytic microbe	-1.29	1.60
Lipolytic microbe	-0.56	5.20

Table 6.3 Contact angles of microbial cells and support materials

Microbial cell / Support		Contact angle (degree)		
		$\theta^{\text{Wa} \alpha}$	$\theta^{\text{Fo} \alpha}$	$\theta^{\text{Br} \alpha}$
Acidogen	Amylolytic microbe	22 ± 1	21 ± 1	67 ± 1
	Proteolytic microbe	16 ± 2	23 ± 1	65 ± 1
	Lipolytic microbe	47 ± 4	36 ± 1	54 ± 1
Support	Bamboo charcoal	64 ± 2	40 ± 5	12 ± 1
	Alumina	2 ± 1	9 ± 2	14 ± 2

^aWa, Water; Fo, Formamide; Br, α-Bromonaphthalene

Table 6.4 Surface tension of microbial cells and support materials

Microbial cell / Support		Surface tension (mJ/m ²)				
		γ^{Total}	γ^{LW}	γ^{AB}	γ^+	γ^-
Acidogen	Amylolytic microbe	58	21	37	7.0	49
	Proteolytic microbe	58	22	35	5.7	54
	Lipolytic microbe	47	28	19	3.2	30
Support	Bamboo charcoal	49	43	5.3	0.6	12
	Alumina	56	43	13	0.7	56

Table 6.5 Change of free energy of interaction between microbial cell and support material (mJ/m²).

Support	Microbial cell	ΔG^{LW}	ΔG^{AB}	ΔG^{Total}
Bamboo charcoal	<i>M. barkeri</i>	-0.9	-24	-24
	<i>M. conciliii</i>	-2.1	-13	-15
	Amylolytic microbe	0.1	9.1	9.2
	Proteolytic microbe	0.0	12	12
Alumina	Lipolytic microbe	-2.4	-6.5	-8.9
	<i>M. barkeri</i>	-0.9	16	15
	<i>M. conciliii</i>	-2.0	27	25
	Amylolytic microbe	0.1	28	28
	Proteolytic microbe	-0.3	33	32
	Lipolytic microbe	-2.4	19	17

値となることがわかった。先述の通り、微生物と担体との間に静電斥力は作用しないことから、メタン生成古細菌は竹炭表面に熱力学的に付着し易いことが推察される。

6.2.2 消化発酵液中に存在するメタン生成古細菌の基質選択性

Fig. 6.3 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。酢酸を資化できるメタン発酵菌群は、*Methanosaeta* 属と *Methanosarcina* 属のみであるが、*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[4]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[6]。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わかった。メタン発酵菌群を用い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. 6.4** 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 ΔG^0 は次の通りである[7]。



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わかった。そこで、以降ではこの発酵液を用いて、メタン生成古細菌の固定化について検討を行った。

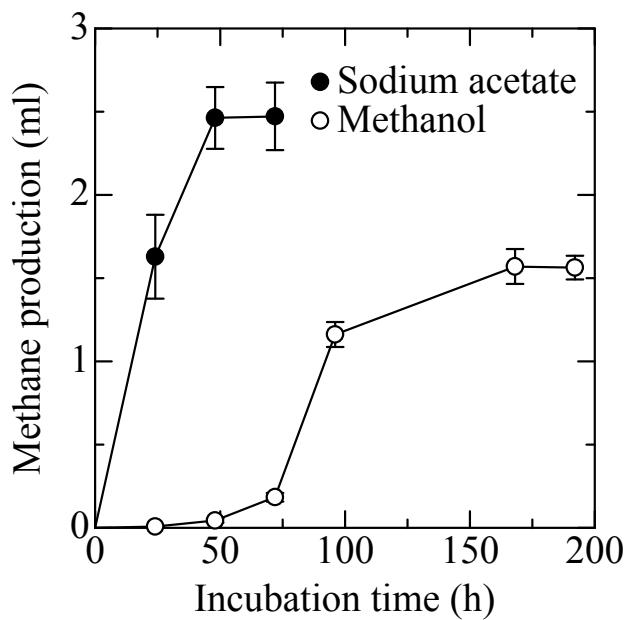


Fig. 6.3 Methane production using different substrate with incubation time.

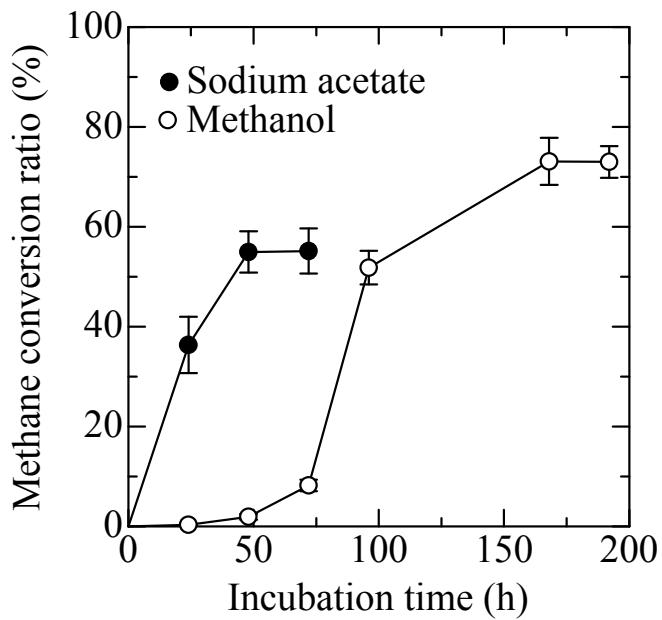


Fig. 6.4 Methane conversion ratio using different substrate with incubation time.

6.2.3 メタン生成古細菌の担体への選択的固定化

Fig. 6.5に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生しなかった。これは、竹炭には酢酸資化性メタン生成古細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、微生物の EPM と ΔG^{Total} の計算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微生物および培養液の SEM 写真を **Fig. 6.6** に示す。培養液 (Fig. 6.6a) には桿菌状の微生物が多数存在しているのに対して、竹炭表面 (Fig. 6.6b) にはロッド状の *Methanosaeta* 属が多く付着していることがわかった。また、アルミナ表面 (Fig. 6.6c) には微生物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わかった。

Busscher ら[8]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 らの知見と微生物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、van der Waals 引力により竹炭に接近した微生物は、熱力学的に安定である竹炭表面に固定化されたと推察できる。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、アルミナ表面に微生物がほとんど付着していないのは、アルミナー微生物間に静電引力が作用して微生物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つたと推察できる。したがって、メタン発酵プロセスにおいて最も重要な微生物である *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。

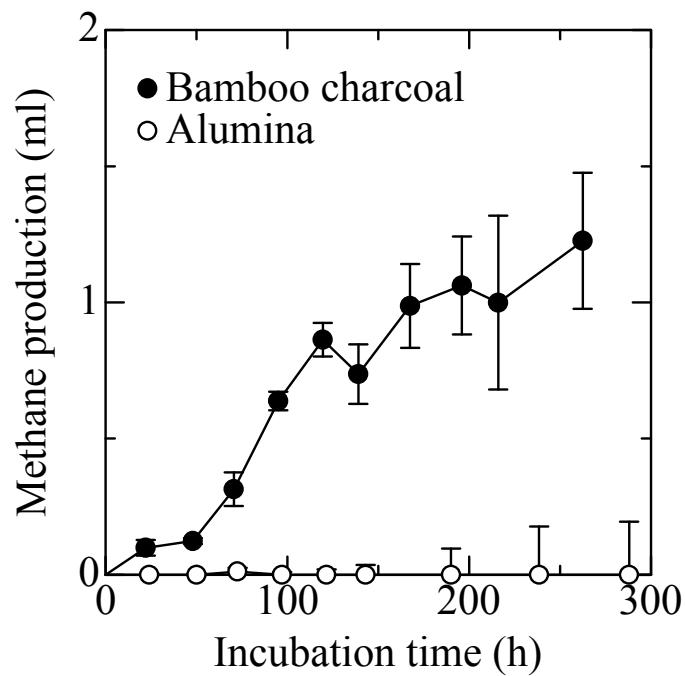


Fig. 6.5 Methane production using immobilized microorganisms with incubation time.

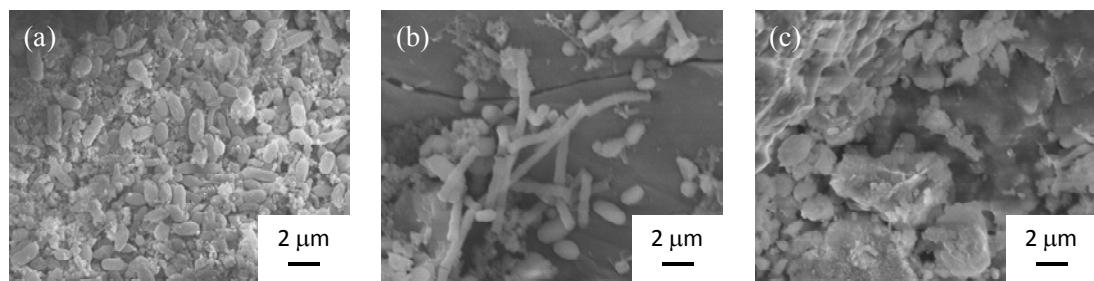


Fig. 6.6 SEM images of microorganisms and immobilized microorganisms on support material. (a) Microorganisms existed in anaerobic sludge, (b) Immobilized microorganisms on bamboo charcoal, (c) Immobilized microorganisms on alumina.

6.2.4 マイクログラニュールの急速形成

2種類のメタン生成古細菌と3種類の酸生成菌からそれぞれ1種類ずつ混合し、1時間静置後の凝集状態を観察した。実験は、メタン生成古細菌のみ、酸生成菌のみの凝集実験も併せて行った。その結果、いずれの組み合わせにおいても顕著な凝集は見られなかった。そこで、酸生成菌を培養後、生理食塩水による洗浄操作を行わず、遠心分離により培地のみを除いた微生物をメタン生成古細菌の懸濁液に加えてみたところ、*M. barkeri* の懸濁液に未洗浄のタンパク質分解菌を添加すると、混合後すぐに目視できるぐらい急速に凝集することがわかった。形成された凝集物の光学顕微鏡写真とSEM写真をFig. 6.7に示す。タンパク質分解菌が、接着剤のような働きをして大きなグラニュールを形成している様子が観察された。

次に、この凝集現象について、コロイド科学の観点から検討を行った。凝集効果を発現した未洗浄のタンパク質分解菌のEPMは、洗浄微生物と違いは見られなかった。また、接触角測定結果から求めた各種表面張力は、 γ^{LW} は22 mJ/m²と洗浄微生物のものとほぼ同じであったが、 γ^+ は0.4 mJ/m²、 γ^- は69 mJ/m²、 γ^{Total} は32 mJ/m²となり、電子受容性成分の γ^+ の値が小さくなつたため、表面張力は若干低いことがわかった。Table 6.6に凝集による自由エネルギー変化 ΔG の計算結果を示す。 ΔG^{Total} が負の値、すなわち熱力学的に付着し易い組み合わせは、脂質分解菌と*M. barkeri*、およびTable 2.4で示した*M. barkeri*同士の凝集だけであった。脂質分解菌と*M. barkeri*の ΔG^{Total} は-2.7 mJ/m²とほぼゼロのため、凝集安定性は高くないと思われる。実験に用いた10 mol/m³ NaCl分散液中では、2.2.5節に示したように、微生物間に静電斥力が作用するために*M. barkeri*微生物間での急速な凝集は進行し難い。これらの結果より、未洗浄のタンパク質分解菌と*M. barkeri*は熱力学的にヘテロ凝集し難く、また両者とも負に帶電していて静電斥力が作用するにも関わらず急速凝集するのは、物理化学的な相互作用ではなく、生物学的な相互作用が寄与しているものと推察される。また、洗浄したタンパク質分解菌と*M. barkeri*は凝集しなかつたことから、微生物の洗浄液に含まれる細胞外ポリマーを*M. barkeri*の懸濁液に添加して同様の実験を行つたが、凝集は観察されなかつた。現段階では、その理由は明確ではないが、付着に関与していると考えられる細胞外ポリマーに含まれる高分子物質が微生物上にある場合とそ

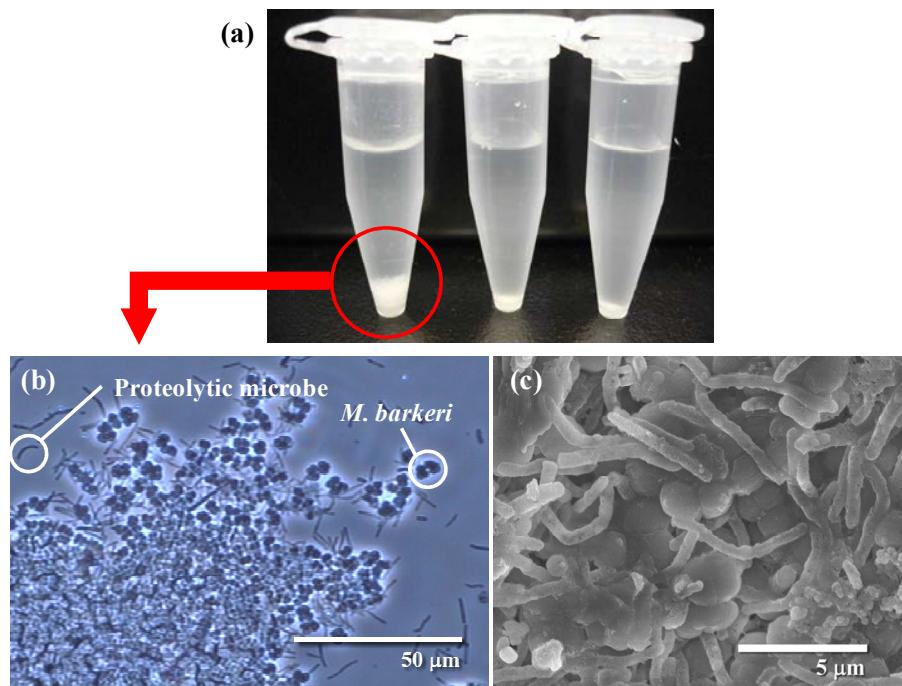


Fig.6.7 Coaggregates of *M. barkeri* and acidogens; (a) Photo image of *M. barkeri* coaggregation test with Proteolytic microbe (left), Amylolytic microbe (center) and Lipolytic microbe (right), (b) phase contrast microscopic image and (c) SEM image.

Table 6.6 Change of free energy of interaction between microbial cells (mJ/m^2).

Microbial cell		ΔG^{LW}	ΔG^{AB}	ΔG^{Total}
<i>M. barkeri</i>	Amylolytic microbe	0.0	14	14
	Proteolytic microbe	0.0	18	18
	Proteolytic microbe (Intact)	0.0	24	24
	Lipolytic microbe	-0.3	-2.4	-2.7
<i>M. concili</i>	Amylolytic microbe	0.0	20	21
	Proteolytic microbe	-0.1	25	25
	Lipolytic microbe	-0.7	5.7	5.0
Self-aggregate	Amylolytic microbe	-0.0	18	18
	Proteolytic microbe	0.0	25	25
	Lipolytic microbe	-0.7	5.4	4.6

うでない場合では、3次元構造が異なっていることなどが予想される。

さらに、生物学的な相互作用が働く理由について基質伝達の観点から検討を行った。集積培養した3種類の微生物について、培養時の生成ガス成分をガスクロマトグラフィーにより分析を行った。その結果、*M. barkeri* と急速凝集したタンパク質分解菌のみ水素を生成することがわかった。*Methanosaeta* 属が酢酸しか資化できない一方で、*Methanosarcina* 属は基質利用性が広いメタン生成古細菌であり、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、メタノールや水素のような利用しやすい基質を優先的に資化する[6]。これらより、メタン発酵槽内において、*M. barkeri* の基質となる水素を効率よく伝達するために、またタンパク質分解菌にとって生成物の水素が生育を阻害することもあるために、これらの微生物が付着して共生することは両微生物にとって好都合と考えられ、生物学的な相互作用が働いている可能性が考えられる。他のメタン生成菌においても類似した共生例が報告されている[5]。エタノールから水素を生成するS菌は水素で生育が阻害されるため、メタン生成菌により水素を除去してもらわないと生育できない。また、水素からメタンを生成する*Methanobacterium byantii* はエタノールを分解できないが、水素が存在することで生育してメタンを生成できる。このため、これらの微生物は強く付着して共生している。絶対嫌気性菌を単離して純粋培養することは困難なため、長い間、エタノールからメタンを生成する*Methanobacterium omelianski* という単一の純粋菌として保存されていた。

以上より、本研究で集積培養したタンパク質分解菌を利用すれば、メタン生成菌が急速に凝集してグラニュールを短時間で形成させることができるために、UASBリアクターのスタートアップに必要な時間が大幅に短縮されるものと期待できる。

結言

メタン発酵プロセスで律速段階となっている酢酸資化性メタン生成古細菌を選択的に固定化する方法について検討した。実際のメタン発酵槽から採取した消化発酵液を用いて、担体上へのメタン生成古細菌の選択的固定化を試みた。また、メタン生成古細菌と消化発酵液中に存在する酸生成菌とのヘテロ凝集実験を行い、メタン生成古細菌のグラニュール形成について検討を行った。その結果、以下の結論を得た。

- 1) 消化発酵液から選択培養した酸生成菌（脂質分解菌、タンパク質分解菌、炭水化物分解菌）はいずれも負に帯電していることがわかった。また、表面のぬれ性を測定した結果、酸生成菌は、メタン生成古細菌よりも親水性であることがわかった。
- 2) 消化発酵液中には、メタン生成古細菌である *Methanosarcina* 属と *Methanosaeta* 属が共に存在するが、基質を変えた際のメタン生成挙動から、用いた発酵液は *Methanosaeta* 属が優占種であることがわかった。
- 3) 消化発酵液中に固定化担体を投入して馴養した結果、アルミナ表面には微生物がほとんど付着しておらずメタンの生成も確認されなかった。一方、竹炭にはロッド状の *Methanosaeta* 属様の微生物が多く付着しておりメタンも生成することがわかった。*Methanosaeta* 属は疎水性かつ無帶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である担体として竹炭を用いると *Methanosaeta* 属が選択的に固定化されやすいことがわかった。
- 4) 2 種類のメタン生成菌、3 種類の酸生成菌とアルミナ、竹炭の組み合わせの内、メタン生成古細菌の竹炭への付着による自由エネルギー変化だけが負の値であった。この結果は、担体への固定化実験で *Methanosaeta* 属が選択的に固定化されやすい結果と一致することがわかった。
- 5) 未洗浄のタンパク質分解菌を *M. barkeri* の懸濁液に添加すると急速凝集することがわかった。これは、タンパク質分解菌が *M. barkeri* の基質となる水素を生成するために、両者が付着して共生することによる利点が作用した生物学的な相互作用によるものと推察される。集積培養したタンパク質分解菌は、メタン生成菌のグラニュールを迅速に形成するバイオ凝集剤としての利用が期待できる。

Nomenclature

e	= Electron charge	(C)
N	= Density of charged group within the polymer layer	(1/m ³)
Z	= Valency of charged groups within the polymer Layer	(-)
γ	= Surface tension	(J/m ²)
γ^+	= Electron-acceptor parameter of surface tension	(J/m ²)
γ^-	= Electron-donor parameter of surface tension	(J/m ²)
ΔG	= Free energy of interaction	(J/m ²)
ΔG^0	= Standard change of free energy	(kJ/mol)
θ	= Contact angle	(degree)
λ	= Softness parameter	(1/m)

Superscript

AB	= Lewis acid-base component
LW	= Lifshitz-van der Waals component
Total	= Sum of components

References

- [1] P. Shen, J. Zhang, J. Zhang, C. Jiang, X. Tang, J. Li, M. Zhang, B. Wu, *Bioresour. Technol.* **131** (2013) 333–340.
- [2] M.I. Baloch, J.C. Akunna, M. Kierans, P.J. Collier, *Bioresour. Technol.* **99** (2008) 922–929.
- [3] G. Zhu, R. Zou, A.K. Jha, X. Huang, L. Liu, C. Liu, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **45** (2014) 1243–1276.
- [4] M.P. Bryant, D.R. Boone, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37** (1987) 169–170.
- [5] Y. Koga, Kosaikin, Tokyo Daigaku Shuppankai, Tokyo, 1988.
- [6] K. Ueki, Kenki Biseibutsugaku, Yokendo, Tokyo, 1993.
- [7] P. L. McCarty, Water Pollution Microbiology, Wiley Interscience, New York, 1972.
- [8] H.J. Busscher, A.H. Weerkamp, H.C. van Der Mei, A.W. van Pelt, H.P. de Jong, J. Arends, *Appl. Environ. Microbiol.* **48** (1984) 980–983.

第7章 粒子複合化プロセスへの応用

近年、機械・電子部品の小型化・高機能化に伴い、半導体やLED、太陽電池などのパッケージ化に用いられる封止材には、高放熱性や耐半田クラック性、低反り性などとともに、高い均一性が求められるようになってきている。しかし、封止材は主剤としてエポキシ樹脂やシリコーン樹脂などの有機材料と、充填剤としてシリカなどの無機粒子や各種添加材で構成されるハイブリット材料であるため、処方によっては粉体材料の粒度分布や比重差が大きくなってしまい、偏析が生じることがある。そこで、この課題を解決するために、粒子を複合化してコアシェル型にし、粒度分布や比重差を小さくすることで、偏析を低減する方法が試みられている。その反面、複合化材料の製造プロセスでは材料が装置内壁へ付着することにより、均一性や収率の低下などのトラブルに繋がる場合が多いことがわかつってきた。

前章では、微生物細胞を細胞コア表層に高分子鎖が生えたコロイド粒子と捉え、その界面付着現象について Gibbs 自由エネルギー変化 ΔG による検討を行った。その結果、微生物は付着による ΔG^{Total} が負になると付着し、正の場合はその表層の帶電性や細胞外構造物の影響によって付着することがわかつた。

そこで第7章では、これらの基礎的知見を拡張して、高分子物質をコア粒子に被覆する粒子複合化プロセスにおける付着現象を解明し、複合化材料の生産効率を向上させるための方策を提案した。具体的には、複合化装置内では粒子混合による局所的な高温場が生じることから、装置内壁素材と複合化処理材料の表面自由エネルギーを高温下で実測した接触角から推算し、複合化処理による ΔG に基づいて、複合化材料の装置内壁への付着による材料損失を低減できる内壁素材を探査した。

7.1 実験方法

7.1.1 実験に用いた試料

粉体材料は、粉碎後所定の粒度分布に分級した溶融球状シリカ ($D_{p50} = 57.7 \mu\text{m}$, $\sigma_g = 1.02$) とビフェニルノボラック型エポキシ樹脂 ($D_{p50} = 37.4 \mu\text{m}$, $\sigma_g = 1.09$)、モントン酸エステルワックス ($D_{p50} = 33.2 \mu\text{m}$, $\sigma_g = 1.10$) を用いた。

7.1.2 キャラクタリゼーション

粉体材料に用いたエポキシ樹脂とワックスの動的粘弹性挙動は、並行平板型粘弹性測定装置 (Advanced Rheometric Expansion System (ARES), Rheometric Scientific Inc. acquired by TA Instruments–Waters LLC, January 2003) を用いて、角周波数 1 rad/s、最大ひずみ振幅 10%、昇温速度 5°C/min で操作した際の 30~180°C における動的粘性率を評価した。また、相変化挙動は示差走査熱量計 (MSDC-2920, TA Instruments) を用い、30~180°Cにおいて 5°C /min で昇降温させた際の熱流束を測定することで評価した。

固体材料の表面エネルギーは、自動接触角測定装置 (DM-500、協和界面科学) を用いて、液滴を固体表面に滴下した際の接触角より求めた。液滴は、極性が異なる Table 2.1 に示した 4 種類と、1,1,2,2-テトラブロモエタン ($\gamma^{\text{Total}} = 49.7 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^{\text{LW}} = 49.7 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma^+ = 3.13 \text{ mJ/m}^2$) [1,2]を用いた。エポキシ樹脂とワックスは、一度溶融させて SUS304 板上に塗膜を形成し、固化させた表面を測定した。

表面積と投影面積の比率を表す実面積係数 r (–) は、テストピースの表面積を共焦点レーザ顕微鏡 (VK-9710、KEYENCE) により測定し、ピース上の異なる 8 箇所の算術平均値から算出した。

また、複合化処理において野城ら[3]は、加える機械的エネルギーが製品内に蓄積され、粒子界面において著しい温度上昇が生じると報告している。本検討でも粒子界面での温度上昇による高分子物質の軟化が考えられるため、自動接触角測定装置に加熱ユニットを取り付け、高分子物質の軟化点以上となる 110°C 霧囲気中でテストピースと溶融高分子物質との接触角も測定した。

7.1.3 粒子複合化実験

実験には水平円筒型の混合機を用いた。装置の概略図をFig. 7.1に示す。装置は、水冷ジャケットを有するSUS304製の水平円筒状チャンバと、水平回転軸上に設けられた攪拌羽根から構成される。攪拌羽根とチャンバ壁面のクリアランスで処理材料に剪断・圧縮力がかかることにより複合化処理が進む。また、処理材料の遠心対流運動により、粒度分布や比重差を持つ粉体の精密混合が期待できる。円筒の上下には粉体の投入・拔出穴が設けられており、ここにφ31.8 mmの表面処理を施したテストピースを取り付けた。テストピースはSUS304に、ポリテトラフルオロエチレン (Polytetrafluoroethylene, PTFE) メッキ、無電解ニッケルPTFEメッキ (NiP/PTFE)、高純度アルミナ (Al_2O_3) 溶射、ジルコニア (ZrO_2) 溶射により表面処理したものを用いた。処理中はジャケット内にチラー水を注入し、装置内壁を15°Cに保った。本装置内にシリカ500 gとエポキシ樹脂もしくはワックスの混合粉体を投入後、1 kW (約1,400 rpm) で40 min 運転し、複合化処理前後のテストピースの重量を測定することで、テストピースへの粉体付着量を算出した。高分子物質添加量は、半導体封止材の汎用配合比をもとに、主剤として用いられるエポキシ樹脂はシリカに対して4.5 wt% (シリカへの目標被覆厚が約1 μm)、添加材として用いられるワックスは0.2 wt%とした。対照実験はシリカのみの処理とした。処理粉体は、その粒子断面をクロスセクションポリッシャー (SM-09010, JEOL) で作製し、電界放出形走査電子顕微鏡 (JSM-7401F, JEOL) で処理状態を観察した。

一般的に、高分子材料は、複数の成分を混合することにより機能性を持たせている。そこで、エポキシ樹脂とワックスを逐次添加した場合の処理粉体の収率についても検討を行った。まず、シリカ500 gを、1 kWで20 min 処理し、排出して重量を測定した。その後、回収したシリカを再投入し、エポキシ樹脂をシリカに対し4.5 wt%となるように添加して1 kWで40 min 処理後、さらにワックスをシリカに対し0.2 wt%添加した。1 kWで40 min 処理後、全量排出して重量を求めた。処理粉体の収率は、回収前後の物質収支から計算した。同様に、シリカにワックス0.2 wt%、エポキシ樹脂4.5 wt%の順で添加した実験も行い、それらの収率を比較した。なお、水平円筒型混合装置の内壁はSUS304とした。

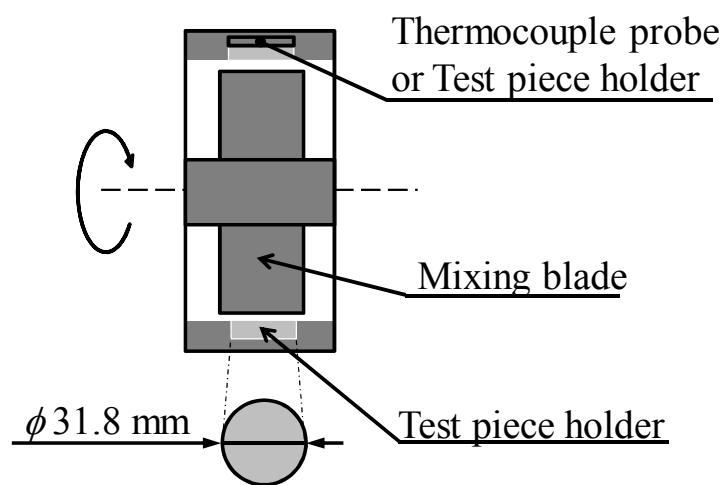


Fig. 7.1 Schematic image of mixer used in this study.

7.2 実験結果および考察

7.2.1 粉体材料の熱特性

エポキシ樹脂とワックスの動的粘弾性挙動を Fig. 7.2 に示す。エポキシ樹脂は、温度の上昇とともに、粘度は徐々に減少し、90°C 付近で一定となった。一方、ワックスは 60°C 付近から粘度が急速に減少し、エポキシ樹脂と同様に 90°C 付近で一定となることがわかった。また、相変化挙動の測定結果を Fig. 7.3 に示す。ワックスは 75°C 付近に融点があり相転移したが、エポキシ樹脂の相転移は見られず、軟化するだけであることがわかった。なお、いずれの樹脂も 30~180°C の範囲ではヒステリシスを示すことから、溶融固化後の樹脂組成に変化は見られないと推察される。

7.2.2 材料表面のぬれ性

テストピース上の接触角 θ_W および実面積係数 r の測定結果を Table 7.1 に示す。SUS304 と比較し、PTFE 系表面処理では、水に対する接触角は増加して 90°以上となり疎水性となった。一方、セラミックス系表面処理では、水に対する接触角は減少して親水性となった。実面積係数は、いずれも SUS304 よりも増加することから、表面処理を施することで表面が粗くなっていることがわかった。得られた接触角からテストピースの表面エネルギーを推算するには、実面積係数を考慮する必要があることが示唆された。テストピースに対する接触角と実面積係数の実測値より求めたテストピースの表面エネルギーの計算結果を Table 7.1 に示す。接触角は、2 種類の極性溶媒（水とホルムアミド）と、無極性溶媒のジヨードメタン、 α -ブロモナフタレン、1,1,2,2-テトラブロモエタンのいずれか 1 種類の実測値を用いた。その結果、無極性溶媒としてジヨードメタン、 α -ブロモナフタレンの接触角を用いた場合、表面エネルギー成分の平方根が負となり、解が得られない場合があることがわかった。この原因として、Tretinnikov [4,5] は、液滴として用いたハロゲン化炭化水素の γ^+ が約 0.5 mJ/m² であるものに対して、計算時に $\gamma^+ = 0$ と見なすことに原因がある、と報告している。van Oss ら [6] も、ハロゲン化炭化水素の γ^+ の値は 0 ではなく、ジヨードメタンに関しては、0.06 mJ/m² よりも小さい値を持っていると報告しており、 γ^+ の不確かさが計算誤

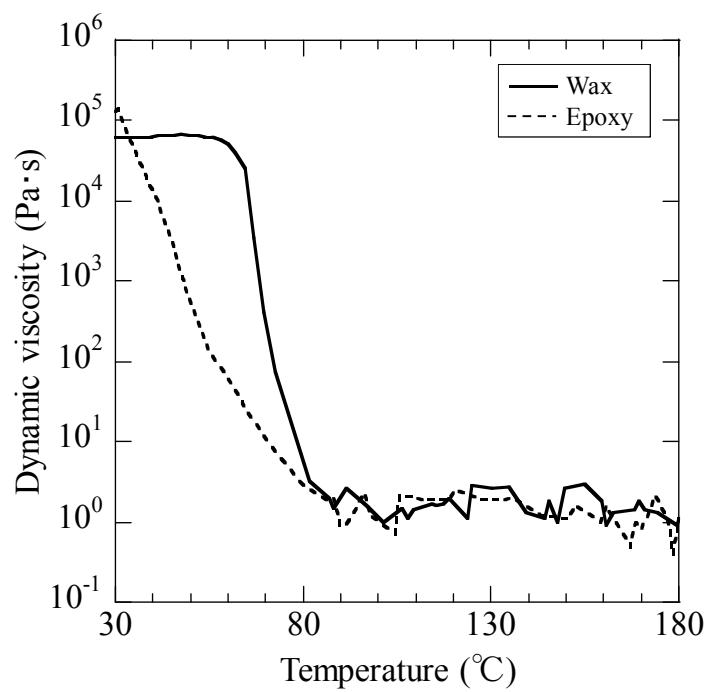


Fig. 7.2 Dynamic viscosity of epoxy and wax resin.

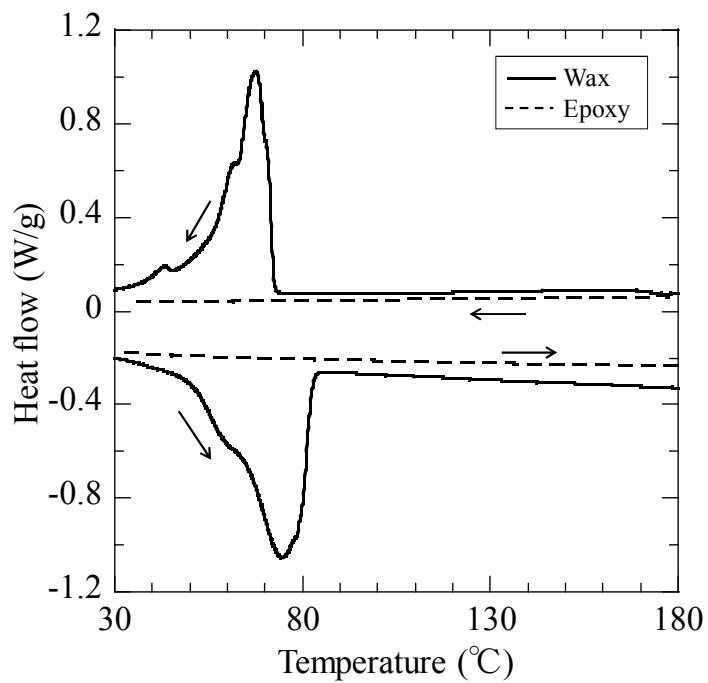


Fig. 7.3 Reverse heat cycle of epoxy and wax resin.

Table 7.1

Contact angles, roughness factors and square roots of surface tension component. ± signs indicate SEM, $N \geq 8$.

Resin/ Substrate	Contact angle θ_w [degree]			Roughness						Square roots of surface tension component [$(\text{mJ/m}^2)^{1/2}$]							
	W_a	Fo	Di	Br	Te	factor r [-]		Wa-Fo-Di		Wa-Fo-Br		$\sqrt{\gamma^{LW}}$		$\sqrt{\gamma^-}$		$\sqrt{\gamma^+}$	
						Ave.	±S.E.	$\sqrt{\gamma^{LW}}$	$\sqrt{\gamma^-}$	$\sqrt{\gamma^-}$	$\sqrt{\gamma^+}$	$\sqrt{\gamma^-}$	$\sqrt{\gamma^+}$	$\sqrt{\gamma^-}$	$\sqrt{\gamma^-}$	$\sqrt{\gamma^+}$	
W_a (solid)	108.2	81.3	—	55.1	—	1.090	0.008	—	—	—	5.09	0.31	0.12	—	—	—	—
Epoxy (solid)	79.5	63.6	—	31.1	—	1.006	0.001	—	—	—	6.41	1.95	0.30	—	—	—	—
SUS304	88.8	68.2	47.9	37.2	45.7	1.117	0.003	5.65	1.84	-0.05	5.67	1.84	-0.07	5.26	1.80	0.35	
PTFE	107.3	102.2	79.5	70.9	78.3	1.505	0.024	4.00	2.76	-0.67	4.07	2.76	-0.74	3.32	2.70	0.02	
NiP/PTFE	112.1	93.3	84.6	67.9	76.8	1.157	0.015	3.85	0.99	0.31	4.43	1.04	-0.27	3.97	1.00	0.20	
Al_2O_3	55.6	38.6	35.1	20.2	33.7	1.937	0.042	5.07	4.20	0.43	4.96	4.19	0.54	4.01	4.10	1.50	
ZrO_2	81.4	54.0	42.9	25.1	38.8	1.588	0.018	5.21	2.53	0.54	5.24	2.54	0.50	4.63	2.48	1.12	

Legend: W_a = water; Fo = formamide; Di = diiodomethane; Br = α -bromonaphthalene; Te = 1,1,2,2-Tetrabromoethane

差の原因と考えられる。よって本研究では、水とホルムアミド、 γ^+ の値を有する 1,1,2,2-テトラブロモエタンの接触角の実測値から得られた表面エネルギーを以後の解析に用いた。得られた表面エネルギーを **Table 7.2** にまとめる。なお、エポキシ樹脂とワックスの表面エネルギーは溶媒との相性により、水とホルムアミド、 α -ブロモナフタレンの接触角の実測値を用いて計算した。また、シリカ粒子の表面エネルギーは毛管上昇法を用いて測定された文献値[7]を示した。

混合機中では局所的な剪断場による高分子物質の軟化が考えられるため、加熱雰囲気下でのテストピースと溶融した高分子液滴との接触角も測定した (**Fig. 7.4**)。SUS304 テストピースに PTFE 系の表面処理を施すと、エポキシ樹脂及びワックスの溶融液滴の接触角は増加していることから、ぬれにくくなることがわかった。一方、セラミックス系の表面処理を施すと、溶融液滴の接触角は減少していることから、ぬれやすくなることがわかった。また、溶融ワックスは溶融エポキシ樹脂よりもいずれのテストピースに対してもぬれやすいことがわかった。次に、固体の表面エネルギーが既知の場合、以下の手順によって溶融高分子物質の表面エネルギーを見積もることができると考えた。

まず、液体 L が同一の物質、固体 S が異なる物質となるため、Eq. (1.64) は行列 A を用いて Eq. (7.1) に書き換えることができる。

$$\begin{bmatrix} \frac{\gamma_L^{\text{Total}}}{2} \left(1 + \frac{\cos \theta_{W1}}{r_1}\right) \\ \frac{\gamma_L^{\text{Total}}}{2} \left(1 + \frac{\cos \theta_{W2}}{r_2}\right) \\ \vdots \\ \frac{\gamma_L^{\text{Total}}}{2} \left(1 + \frac{\cos \theta_{Wn}}{r_n}\right) \end{bmatrix} = A \begin{bmatrix} \sqrt{\gamma_L^{\text{LW}}} \\ \sqrt{\gamma_L^+} \\ \sqrt{\gamma_L^-} \end{bmatrix}, A = \begin{bmatrix} \sqrt{\gamma_{S1}^{\text{LW}}} & \sqrt{\gamma_{S1}^-} & \sqrt{\gamma_{S1}^+} \\ \sqrt{\gamma_{S2}^{\text{LW}}} & \sqrt{\gamma_{S2}^-} & \sqrt{\gamma_{S2}^+} \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ \sqrt{\gamma_{Sn}^{\text{LW}}} & \sqrt{\gamma_{Sn}^-} & \sqrt{\gamma_{Sn}^+} \end{bmatrix} \quad (7.1)$$

ここで、両辺に左から行列 A に対する擬似逆行列 A^+ をかけ、整理すると Eq. (7.2) が得られる。

$$A^+ \begin{bmatrix} \left(1 + \frac{\cos \theta_{W1}}{r_1}\right)/2 \\ \left(1 + \frac{\cos \theta_{W2}}{r_2}\right)/2 \\ \vdots \\ \left(1 + \frac{\cos \theta_{Wn}}{r_n}\right)/2 \end{bmatrix} = \frac{1}{\gamma_L^{\text{Total}}} \begin{bmatrix} \sqrt{\gamma_L^{\text{LW}}} \\ \sqrt{\gamma_L^+} \\ \sqrt{\gamma_L^-} \end{bmatrix} \equiv \begin{bmatrix} x \\ y \\ z \end{bmatrix} \quad (7.2)$$

そして、左辺の行列式を MATRIX.XLA Ver 2.3.1 [8]を用いて計算し、代数 x 、 y 、 z を算出した。また、Eq. (7.2)を Eq. (1.22) に代入して γ_L^{Total} を変形すると Eq. (7.3)が得られ、

$$\begin{aligned}\gamma_L^{\text{Total}} &= \gamma_L^{\text{LW}} + \gamma_L^{\text{AB}} \\ &= \left(\sqrt{\gamma_L^{\text{LW}}} \right)^2 + 2\sqrt{\gamma_L^+} \sqrt{\gamma_L^-} \\ &= (\gamma_L^{\text{Total}} x)^2 + 2(\gamma_L^{\text{Total}} y)(\gamma_L^{\text{Total}} z) \\ &= (x^2 + 2yz)\left(\gamma_L^{\text{Total}}\right)^2\end{aligned}\quad (7.3)$$

$\gamma_L^{\text{Total}} > 0$ より Eq. (7.4)が成り立つ。

$$\gamma_L^{\text{Total}} = \frac{1}{x^2 + 2yz} \quad (7.4)$$

そして、Eq. (7.4)を Eq. (7.2)に代入すると、Eq. (7.5)が得られるので、既知の固体の表面エネルギーより溶融高分子物質の表面エネルギーを求めることができる。

$$\begin{bmatrix} \sqrt{\gamma_L^{\text{LW}}} \\ \sqrt{\gamma_L^+} \\ \sqrt{\gamma_L^-} \end{bmatrix} = \gamma_L^{\text{Total}} \begin{bmatrix} x \\ y \\ z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{x}{x^2 + 2yz} \\ \frac{y}{x^2 + 2yz} \\ \frac{z}{x^2 + 2yz} \end{bmatrix} \quad (7.5)$$

溶融エポキシ樹脂と溶融ワックスの表面エネルギーを Eq. (7.5) を用いて計算した結果を Table 7.2 に示す。溶融エポキシ樹脂と溶融ワックスの表面エネルギーを別途、懸滴法によって測定すると、それぞれ $49.6 \pm 0.1 \text{ mJ/m}^2$ 、 $32.3 \pm 0.1 \text{ mJ/m}^2$ であったことから、計算結果は近い値が得られていることがわかった。さらに得られた表面エネルギーを用いて、粒子や高分子物質が固体表面に付着する際の界面自由エネルギー変化 ΔG を計算し、それらの付着特性について評価した。媒体である空気の表面エネルギーは 0 とみなすことができるため、酸塩基相互作用を考慮した時の ΔG を求める Eqs. (1.32)～(1.34)は、Eqs. (7.6)～(7.8)と単純化される。

Table 7.2

Surface tension parameters used in this study.

Material		Surface tension parameter (mJ/m^2)				
		γ^{Total}	γ^{LW}	γ^{AB}	γ^+	γ^-
Filler	Silica	54.2	41.1	13.1	0.80	53.9
Resin	Wax (melted)	32.0	24.6	7.32	4.51	2.97
	Wax (solid)	26.0	25.9	0.08	0.01	0.09
	Epoxy (melted)	56.4	39.7	16.7	7.00	10.0
	Epoxy (solid)	42.2	41.1	1.16	0.09	3.82
Substrate	SUS304	28.9	27.6	1.26	0.12	3.24
	PTFE	11.1	11.0	0.08	0	7.27
	NiP/PTFE	16.1	15.8	0.40	0.04	1.00
	Al_2O_3	28.4	16.1	12.3	2.26	16.8
	ZrO_2	27.0	21.5	5.56	1.26	6.15

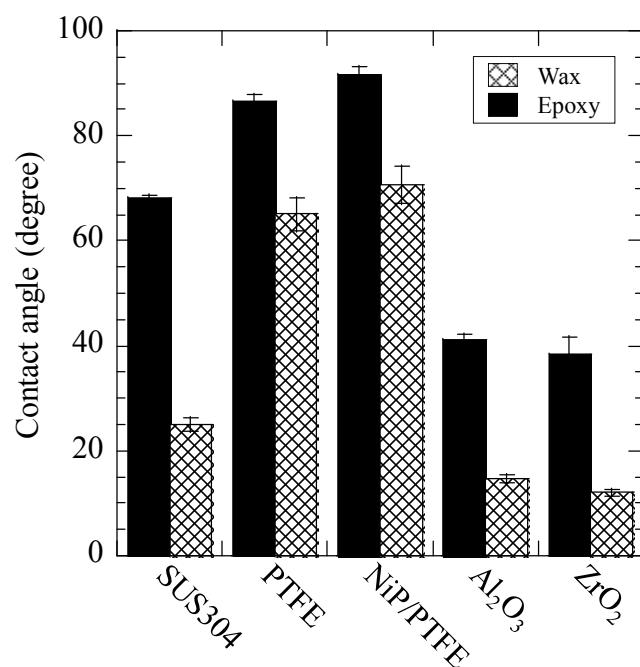


Fig. 7.4 Contact angle between melted resin and substrates at 110 degrees C.

$$\Delta G^{\text{Total}} = \Delta G^{\text{LW}} + \Delta G^{\text{AB}} \quad (7.6)$$

$$\Delta G^{\text{LW}} = -2\sqrt{\gamma_P^{\text{LW}}} \sqrt{\gamma_W^{\text{LW}}} \quad (7.7)$$

$$\Delta G^{\text{AB}} = -2\left(\sqrt{\gamma_P^+} \sqrt{\gamma_W^-} + \sqrt{\gamma_P^-} \sqrt{\gamma_W^+}\right) \quad (7.8)$$

ここで、下添字 P は処理材料、W は壁面である。 ΔG^{Total} が負に大きいほど、自発的に系が進行し、材料の壁面への付着が促進される。シリカおよび高分子物質とテストピース間の ΔG を計算した結果を **Table 7.3** に示す。シリカのテストピースに対する ΔG^{Total} は、SUS304 とセラミック系処理でほぼ同じであるが、PTFE 系処理では少し正に大きくなり、付着しにくくなることが予想される。また、溶融エポキシ樹脂と溶融ワックスについてもシリカと同様の傾向であった。溶融エポキシ樹脂と溶融ワックスはシリカに対する ΔG^{Total} がそれぞれ-125 mJ/m²、-97.9 mJ/m² といずれのテストピースと比較しても最も負に大きく、溶融高分子物質はシリカ表面によく付着（コーティング）すると予測される。

7.2.3 粒子複合化処理

装置内壁に取り付けたテストピースの違いによる粉体付着量を、テストピースと粉体間の ΔG に着目することで、熱力学的観点から検討を行った。まず、シリカにコーティングを行いたいエポキシ樹脂を複合化した処理粉体をサンプリングし、その粒子の断面を SEM によって観察した (**Fig. 7.5**)。シリカ粒子表面を樹脂が約 1 μm の厚さで被覆し、コアシェル構造を形成していることがわかつた。このことは、処理装置内は、局所的に高温状態になっており、エポキシ樹脂が軟化することで、シリカ表面に付着したことを示している。

次に、シリカとエポキシ樹脂またはワックスとの混合物を処理した時のテストピースへの付着量を比較した。テストピースへの付着量と高分子物質－テストピース間の ΔG^{Total} との関係、およびシリカのみを処理した場合のテストピースへの付着量とシリカ－テストピース間の ΔG^{Total} との関係を **Fig. 7.6** に示す。 ΔG の計算では、エポキシ樹脂とワックスの値は室温のものを使用した。シリカのみを処理した場合、 ΔG^{Total} の絶対値が小さくなるに伴い付着量は減少しており、

固体粒子の付着には ΔG^{Total} が寄与していることがわかった。このことは、装置内壁の表面エネルギーを制御することで、粉体の付着量を抑制できることを示唆しており、本検討では、PTFE メッキ処理が最も適していることがわかった。一方、高分子物質を混合した複合化材料の場合、シリカのみの場合と比較して、すべてのテストピースに対して付着量は減少してほぼ一定であった。これは、テストピースの表面エネルギーが付着量に影響を及ぼしていないことを示唆している。エポキシ樹脂とワックスの各テストピースに対する ΔG^{Total} を比較すると、ワックスと比較してエポキシ樹脂の方が一様に負に大きいことから、エポキシ樹脂はテストピースに付着しやすいと推察され、実験結果の傾向と良く一致している。このことから、テストピース間でエポキシ樹脂とワックスの付着量に差がなかった原因として、高分子物質を混合することで、テストピース表面も高分子物質でコーティングされることにより、すべてのテストピースで同じような処理条件になっていることが推察される。この結果は、高分子物質を混合処理することにより、装置内壁へのプレコーティングが促され、それに伴う粉体付着量の低減に効果があることを示唆している。

さらに、高分子物質材料を逐次添加しながら複合化処理した粉体の収率について検討を行った。エポキシ樹脂とワックスの添加順序を変えて複合化処理した際の歩留まり損失を Fig. 7.7 に示す。まず、シリカのみを混合処理した後、処理粉体を取り出すとその収率は 94.9% であった。次に、高分子物質を逐次添加すると、エポキシ樹脂よりもワックスを先に添加した方が歩留まり損失は低く抑えることができ、高分子物質の添加順序により複合化材料の収率が異なることがわかった。これは、先に装置に投入した高分子物質の影響があることを示唆しており、逐次添加の順序を考慮すると、複合化材料の収率向上に寄与できることが期待される。

Table 7.3
Interfacial energies (mJ/m^2) between particle and substrates.

Material	Silica			Epoxy (melted)			Epoxy (solid)			Wax (melted)			Wax (solid)		
	ΔG^{LW}	ΔG^{AB}	ΔG^{Total}	ΔG^{LW}	ΔG^{AB}	ΔG^{Total}	ΔG^{LW}	ΔG^{AB}	ΔG^{Total}	ΔG^{LW}	ΔG^{AB}	ΔG^{Total}	ΔG^{LW}	ΔG^{AB}	ΔG^{Total}
SUS304	-67.4	-8.3	-75.8	-66.2	-11.7	-78.0	-67.4	-2.4	-69.8	-52.2	-8.8	-61.0	-53.6	-0.7	-54.2
PTFE	-42.6	-5.1	-47.7	-41.9	-14.4	-56.2	-42.6	-1.7	-44.3	—	—	—	—	—	—
NiP/PTFE	-50.9	-4.7	-55.6	-50.0	-6.5	-56.5	-50.9	-1.4	-52.2	—	—	—	—	—	—
Al_2O_3	-51.4	-29.4	-80.8	-50.5	-31.2	-81.7	-51.4	-8.3	-59.7	-39.8	-22.6	-62.4	-40.8	-1.9	-42.8
ZrO_2	-59.4	-20.9	-80.3	-58.3	-20.2	-78.6	-59.4	-5.9	-65.2	-46.0	-14.4	-60.4	-47.2	-1.3	-48.5
Silica	-82.2	-26.3	-108	-80.8	-44.5	-125	-82.2	-7.9	-90.0	-63.7	-34.3	-97.9	-65.3	-2.3	-67.6

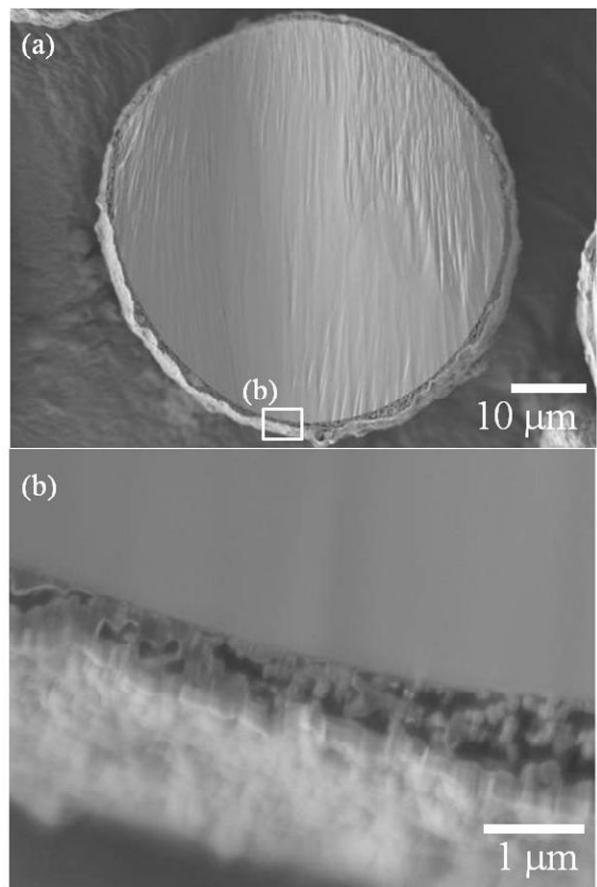


Fig. 7.5 SEM images of epoxy-coated silica particle. (a) Cross sectional view of particle; (b) Particle interface.

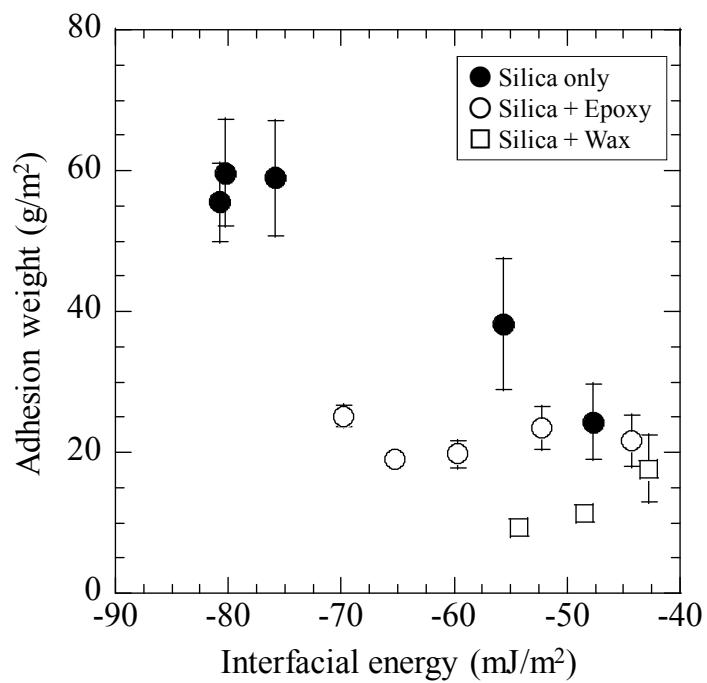


Fig. 7.6 Adhesion weight to surface-treated test pieces as a function of total interfacial energies.

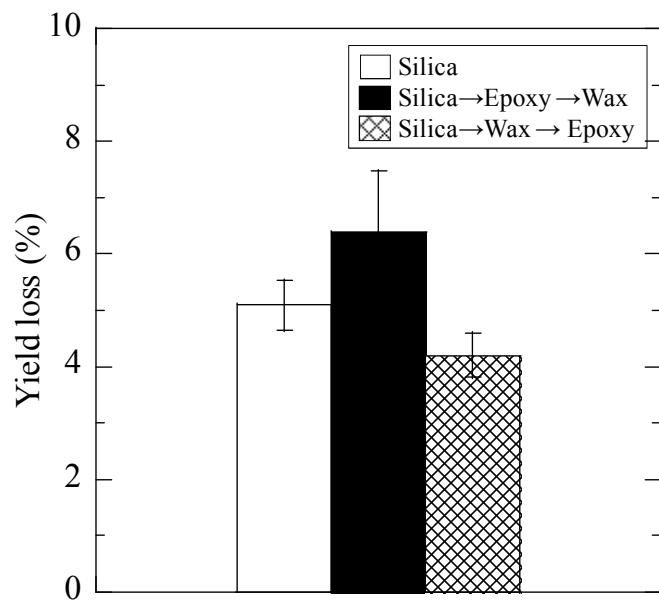


Fig. 7.7 Yield loss in the sequential process.

結言

微生物の界面付着現象を検討した際に得られた基礎的知見を拡張して、高分子物質をコア粒子に被覆する粒子複合化プロセスにおける付着現象を解明し、複合化材料の生産効率を向上させるための方策を検討した。複合化処理による ΔG に基づいて、複合化材料の装置内壁への付着による材料損失を低減できる内壁素材を探査した。その結果、以下の結論を得た。

- 1) シリカのみの処理では、付着による ΔG^{Total} と壁面へのシリカ付着量の間には相関性があり、耐付着性の高い壁面材としてPTFEメッキ処理が有効であることがわかった。
- 2) 低軟化点を持つ高分子物質を添加する場合、高分子物質により壁面がコーティングされるため、付着挙動は高分子物質の表面エネルギーに依存することがわかった。
- 3) 材料の添加順序を変更することにより、複合化材料の収率が変化することがわかった。

Nomenclature

D_{p50}	= Median hydrodynamic diameter of particle	(μm)
r	= Roughness factor	($-$)
γ	= Surface tension	(mJ/m^2)
γ^+	= Electron-acceptor parameter of surface tension	(mJ/m^2)
γ^-	= Electron-donor parameter of surface tension	(mJ/m^2)
ΔG	= Free energy of interaction	(mJ/m^2)
θ	= Contact angle of ideal flat surface	(degree)
θ_W	= Contact angle of Wenzel	(degree)

subscript

L	= Liquid
P	= Processing material
S	= Solid
W	= Wall

superscript

AB	= Lewis acid-base component
LW	= Lifshitz-van der Waals component
Total	= Sum of components

References

- [1] B. Jańczuk, W. Wójcik, A. Zdziennicka, *Powder Technol.* **76** (1993) 233–239.
- [2] B. Jańczuk, A. Zdziennicka, W. Wójcik, *Appl. Surf. Sci.* **120** (1997) 35–42.
- [3] K. Nogi, M. Naitoh, A. Kondoh, A. Nakahira, K. Niihara, T. Yokoyama, *J. Japan Soc. Powder Powder Metall.* **43** (1996) 396–401.
- [4] O.N. Tretinnikov, *J. Colloid Interface Sci.* **229** (2000) 644–647.
- [5] O.N. Tretinnikov, Y. Tamada, *Langmuir* **17** (2001) 7406–7413.
- [6] C.J. van Oss, W. Wu, A. Docoslis, R.F. Giese, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **20** (2001) 87–91.
- [7] H. Alloul, T. Roques-Carmes, T. Hamieh, A. Razafitianamaharavo, O. Barres, J. Toufaily, F. Villiéras, *Powder Technol.* **246** (2013) 575–582.
- [8] Team Foxes, Tutorial of Numerical Analysis for MATRIX.XLA (2007).

第8章 結論

バイオリーチングやバイオレメディエーション、バイオリファイナリーなどの微生物機能を活用したバイオプロセスが鉱工業分野で研究開発されている状況のなか、高効率なプロセスを構築するためには、反応装置内の微生物濃度を高い状態で保持する必要がある。そのため、微生物が高密度化したバイオフィルムは利用価値が高く、その形成における微生物の付着現象を理解し、その制御因子を把握することは意義深いことである。本論文は、微生物細胞を細胞コア表層に高分子鎖が生えたコロイド粒子と捉えて、「微生物-微生物」や「微生物-固体」の表面間に働く相互作用を、静電気力と van der Waals 力の和からコロイド分散系の安定性を評価する DLVO(Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) 理論および付着による Gibbs 自由エネルギー変化 ΔG に基づいて定量的に把握するとともに、平行平板流れ場を用いた微生物の付着力分布の新しい解析法を提案し、微生物の付着現象の解明をすることを研究目的として検証した結果をまとめたものである。各章で得られた結論は、以下の通りである。

第2章では、二種類のメタン生成古細菌 (*Methanosaeta barkeri* と *Methanosaeta concilii*) をモデル微生物として、コロイド科学の観点から細胞表層特性を評価した。その結果、*M. barkeri* は pH 2 付近に等電点を持つ負帯電の微生物、*M. concilii* は pH 4.5 付近に等電点を持つほぼ無帯電の微生物であり、両者ともに疎水性表面をもつ微生物であることがわかった。また、両者の帶電性の違いは、微生物表層におけるカルボキシル基やリン酸基の存在量が異なることに起因することを明らかにした。以上の研究結果を踏まえて、メタン生成古細菌の自己凝集実験を行った。その結果、溶液のイオン強度が増加すると微生物の凝集が進行し、この現象は柔らかい粒子モデルで推算した微生物の表面電位と、微生物層に対する極性の異なる種々の溶媒の接触角から得られる表面エネルギーを用いて推算した微生物間の ΔG^{Total} で説明できることがわかった。

第3章では、鞭毛を持たない非運動性の乳酸菌 *Lactococcus lactis* と鞭毛を持つ運動性の大腸菌 *Escherichia coli* をモデル微生物に用いて、細胞外高分子物質 (Extra polymeric substance, EPS) や線状構造物 (鞭毛や線毛) が微生物の付着挙動に及ぼす影響について検討した。その結果、微生物の付着による ΔG^{Total}

が正、かつ DLVO 理論から微生物－固体間に高いポテンシャル障壁が存在して付着が困難と評価できる場合でも、微生物細胞と比較して曲率が小さい細胞外構造物が存在すると、微生物は固体表面に付着できることが明らかになった。また、非運動性微生物 *L. lactis* では EPS の存在によって微生物の固体表面への付着は促進されたが、運動性微生物 *E. coli* では線状構造物の存在により EPS による付着促進効果は減少することがわかった。

第 4 章では、鞭毛が欠損した親水性の *E. coli* と疎水性の *M. barkeri* を非運動性モデル微生物に用いて、平行平板流れ場の固体表面における微生物の付着・脱離挙動を直接観察した。その結果、微生物の付着速度は、負帯電ガラスではイオン強度の増加とともに増加し、正帯電ガラスではイオン強度とは無関係に一定となり、DLVO 理論によって合理的に説明できることがわかった。また、固体表面に付着した微生物に作用する流体抗力から、微生物の脱離に必要な抗力を定量的に評価した結果、脱離抗力は Weibull 分布関数で相關できることがわかった。得られた抗力の中央値は、イオン強度の増加に伴い減少したが、高イオン強度ではほぼ一定値を示した。これは、高イオン強度の領域では、静電相互作用が弱まり、van der Waals 相互作用が支配的になったためと考えられる。

第 5 章では、前章で提案した平行平板流れ場における微生物の付着力分布評価法に基づいて、細胞外構造物が固体表面への微生物の付着・脱離現象に及ぼす影響について解析した。運動性微生物 *E. coli* KP7600 株とその鞭毛に関わる変異株（運動性欠損株と鞭毛欠損株）を用いて、負帯電ガラスへの微生物の付着・脱離現象を直接観察した。その結果、鞭毛の有無によって付着速度に有意差はなく、鞭毛や運動性は必ずしも微生物の付着を促進する因子ではないことが判明した。一方、微生物の脱離に必要な抗力の中央値は、運動性微生物 KP7600 株、運動性欠損株、鞭毛欠損株の順に増加したことから、鞭毛と運動性は微生物の脱離を抑制する要因になることがわかった。また、ガラスに付着した微生物の 99.9%を除去するために必要な抗力は、いずれの菌株でも抗力の中央値に対して約 30 倍も大きく、またその分布幅は微生物の粒子径分布よりも広いことから、バイオフィルムは微生物の付着界面で強固な相互作用が働くことにより形成されることが示唆された。さらに、非運動性微生物 *L. lactis* の洗浄細胞 (EPS 除去) と未洗浄細胞を用いて、負帯電ガラスへの微生物の付着・脱離現象を観

察した。未洗浄細胞は、洗浄細胞よりも付着速度が増加したことから、EPS が微生物の付着を促進することがわかった。さらに、両微生物細胞を 24 時間静置した場合には、その前後で微生物脱離に必要な抗力の中央値は 2 倍に増加したことから、静置期間内に産出された EPS が微生物付着に大きく寄与することが明らかになった。

第 6 章では、前章で得られた基礎的知見を基に、メタン発酵プロセスの高効率化を図るためのコンセプトを確立した。まず、発酵槽内におけるメタン生成古細菌を高密度に保持する方法として、固定化担体を用いる方法を検証した。*Methanosaeta* 属のメタン生成古細菌は疎水性・無帶電という特異的な微生物であるのに対し、消化発酵液に含まれる他の嫌気性微生物は疎水性・負帶電であることが判明したことから、メタン生成古細菌だけを選択的に付着できる固定化担体としては負帶電・疎水性表面を持つ竹炭が適していると判断した。この検証実験を行った結果、*Methanosaeta* 様の微生物はアルミナ担体（正帶電・親水性表面）には付着せずに竹炭担体に数多く付着し、メタンガスも産出されることが明らかになった。次に、メタン生成古細菌と酸生成菌のヘテロ凝集実験を行い、メタン生成古細菌の固定化方法となるマイクログラニュールの形成を試みた。その結果、未洗浄のタンパク質分解菌とメタン生成古細菌 *M. barkeri* は、急速凝集してマイクログラニュールを形成することがわかった。タンパク質分解菌が産出する水素ガスがメタン生成古細菌の基質となることから、両微生物細胞の凝集には種間水素伝達を効率的に行うための生物学的因素が寄与している可能性が示唆された。

第 7 章では、前章で得られた基礎的知見を拡張して、高分子をコア粒子に被覆する粒子複合化プロセスにおける付着現象を解明し、複合化粒子の生産効率を向上させるための方策を提案した。具体的には、複合化装置内では粒子混合による局所的な高温場が生じることから、装置内壁素材と複合化処理材料の表面自由エネルギーを高温下で実測した接触角から推算し、複合化処理による ΔG^{Total} に基づいて、複合化材料の装置内壁への付着による材料損失を低減できる内壁素材を探査した。その結果、耐付着性の高い壁面素材としてポリテトラフルオロエチレンが有力であることを示した。また、高分子の被覆順序を変更することで、複合化粒子の収率が向上することを明らかにした。

以上に本研究で得られた成果について述べた。以下では、得られた成果における今後の課題について述べる。まず、平行平板流れ場を用いた微生物の付着・脱離挙動の評価においては、今まで検証されてこなかった流動場における付着力分布の評価法について提案できたが、見積もった抗力分布を真の付着力分布に変換するためには、微生物の界面に働く静止摩擦係数の評価が必要であり、この点を解決できる打開策が見つかれば、微生物の付着メカニズムのみならず、本解析方法は様々なコロイド分散系の付着現象の解析にも応用が可能であると思われる。次に、メタン発酵プロセスにおけるメタン生成古細菌の担体粒子への付着においては、メタン生成古細菌表層での化学的な固定化因子や固定化による微生物活性への影響について考察するには至らなかった。また、凝集塊（グラニュール）形成現象については、凝集の原因となった物質の同定までには至らなかった。これらの固定や凝集に関わる因子について定量的な評価が可能なれば、メタン生成古細菌の高密度化を制御することが容易になると思われる。最後に、微生物と同様に表層が高分子物質で被覆された複合粒子の製造プロセスにおいて、処理する材料が多岐に亘る場合には、本論文で検討した表面エネルギー以外にも、粉体の帶電性、湿度依存性などを考慮した上で、処理温度、樹脂混練比などの混練プロセスを最適化していくことが、装置内への粉体の付着を防止し、製品収率を向上させる方法として重要であると思われる。

－謝辞－

本研究を行うにあたり、長年に亘って厳しくも終始丁寧にご指導賜りました大阪府立大学大学院工学研究科物質・化学系専攻の小西康裕教授ならびに野村俊之准教授に心から感謝の意を表します。

また、本論文を執筆するにあたり、貴重なご示唆とご助言を賜りました同専攻の荻野博康教授、綿野哲教授に厚く御礼申し上げます。

本論文の根幹である、微生物の取扱方法を基礎から丁寧にご指導いただいた同専攻の徳本勇人講師、長尾孝徳先輩、石井亮先輩には深く感謝申し上げます。

粒子の表面処理についてご指導いただいた現京都大学大学院工学研究科化学工学専攻の長嶺信輔准教授をはじめ、研究に対してご助力いただきました、当時大阪府立大学大学院工学研究科物質・化学系専攻に在席されていた諸先生方には深く御礼申し上げます。

また、研究を進めていく上で、切磋琢磨した作田伸彰、笹野勝裕、檜原久哉、田中雅浩、高山俊之の諸氏には感謝の意が絶えません。実験データを提供していただいた、矢野哲司氏、宮崎準平氏、延平典隆氏、栗山雄太氏、豊田峻介氏、また実験をサポートしていただいた、先濱和彦先輩、安井章子氏、奥野恭子氏には御礼申し上げます。

住友ベークライト株式会社において、本研究を続けることができたのも、旧LαZ宇都宮工場建設プロジェクトチーム小笠維義リーダーをはじめ、金沢敏秀氏、瀧本恭史氏とチームメンバーの諸氏、旧生産技術研究所の関根貢一郎所長、太田賢博士、河口竜巳博士、古川剛氏、中野尚吾氏、河野芳章氏、そして人材開発部の皆様のお陰であり、大変感謝しております。

最後に、私を家族として体調を気遣いながらも支え続けてくれました、父の幸次朗、母の実千代、弟の隆仙には厚く感謝申し上げます。