

発表番号 10

塩水環境中において固体表面に強固に付着する

微生物の分離とその生産物利用

田谷 正仁 (大阪大学大学院基礎工学研究科)

西岡 求 (大阪大学大学院基礎工学研究科)

【背景】

固体表面上に付着し、いわゆるバイオフィーム状態で生育する微生物に対する関心が近年高まっている。バイオフィームを構成する微生物の付着・増殖にはタンパク質・多糖類・脂質成分などから構成されるEPS(菌体外高分子物質)が関与しているものと考えられ、微生物の多様性同様、様々な成分、構造および生理学的機能を有したものが存在するものと期待される。

本研究では、種々の環境下の金属表面を分離源として、塩水環境中で金属表面に強固に付着し、バイオフィーム形成に重要な役割を果たす微生物を取得し、固体表面への付着とその後のバイオフィーム形成過程における微生物の生理学的特性の解明を行った。

【結果および考察】

採取した試料から栄養培地上で生育する微生物群を分離し、これらの中より、ステンレス小片上に付着する菌を分離した。分離微生物群より、11種類の菌株を単離し細胞付着能を比較したところ、廃水処理槽より単離したWW2株が高い細胞密度を示し、この株が金属表面に強固に付着する能力をもつことがわかった。WW2株は、通性嫌気性をグラム陰性菌で長さ約2 μ mの桿菌であり、16SrDNAの相同性より*Providencia*属であると考えられた。

WW2株の細胞付着量に対する培養条件を検討したところ、塩濃度に依存した付着特性が見られ、NaCl濃度15kg/m³の時、極めて高い細胞付着(10 \times 10⁷ cells/cm²)が認められた。また本菌にはH₂S生成能が認められたので、ステンレスおよび銅に対する腐食能を検討したところ、銅に関して静置培養(酸素制限条件)において硫化銅の生成を伴う金属腐食が確認でき、バイオフィーム形成と細胞代謝との関係が示唆された。

近年、バイオフィームが遺伝子交換の場として機能するという仮説が提唱されている。WW2株の細胞表面構造すなわちEPSとDNAとの相互作用を検討したところ、バイオフィーム状態のWW2細胞のみがDNA吸着能を有していることが示され、本菌のEPSがDNAのような生体分子を濃縮する“バイオバンド”となりうる可能性が示唆された。

24

助成番号 0224

塩水環境中において固体表面に強固に付着する微生物の分離とその生産物利用

田谷正仁 (大阪大学大学院基礎工学研究科)

西岡 求 (大阪大学大学院基礎工学研究科)

1. 研究目的

固体表面上に付着し、いわゆるバイオフィーム状態で生育する微生物に対する関心が近年高まっている。バイオフィーム中における微生物付着・増殖のメカニズムに関しては、いまだ解明されていない点も多いが、Fig. 1 に示すように、タンパク質に加え、多糖類や脂質成分などを含むいわゆる EPS (菌体外高分子物質) が関与しているものと考えられ^[1]、微生物の多様性同様、様々な成分、構造および生理学的機能を有したものが存在するものと期待される。

本研究課題では、海洋資材表面すなわち塩水環境中において固体表面に強固に付着する微生物群を分離し、固体表面への付着とその後のバイオフィーム形成過程における微生物の生理学的特性の解明を行った。

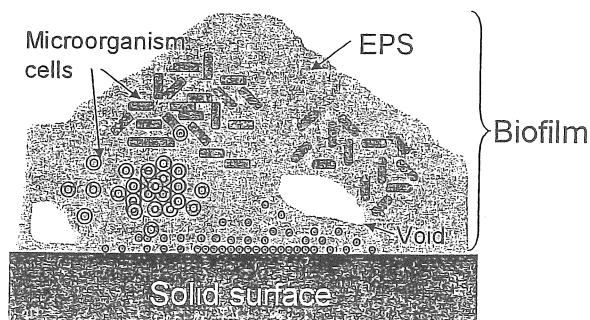


Fig. 1 Structure of biofilm

2. 研究方法

2.1. 付着性微生物の分離法

分離源として、海水に長期間浸漬した金属プレート (以下、海水環境と略記)、研究棟外壁に取り付けられた排水管内壁 (排水管と略記)、下水処理場の処理槽内部の金属表面の汚泥 (下水と略記) を対象とした。海水環境から採取した試料を LBS 培地 (5 kg polypeton, 5 kg yeast extract, 0.75 m³ seawater per m³, pH 7.6) 中 25℃ で培養してからコロニーを分離した。排水管や下水からの試料も同様に、LB 培地 (10 kg polypeton, 5 kg yeast extract, 10 kg sodium chloride per m³, pH 7.2) で培養してからコロニーを分離した。それぞれの環境から分離された菌を別々にステンレス小片が入っている 3 つのフラスコに入れ、1 週間ごとに小片をよく洗った後で培地を交換した。1 ヶ月培養した後で、小片上に付着した菌を取り、再度固体培地上で分離し、候補菌とした (Fig. 2)。

2.2. ステンレス表面への微生物付着性試験

分離した菌のステンレス表面への付着性を比較するために、それぞれの菌を別々にビーカーで培養した (Fig. 3)。二週間培養した後でそれぞれのステンレス板に付着した細胞を細胞溶解溶液 (1% sodium dodecyl sulfate, 0.2% NaOH) で溶かして、波長 280 nm の吸光度 (タンパク質の最大吸収波長) を測定し、金属表面積当りの細胞数に換算した。対照として、大腸菌 MM 294 株を用いた。

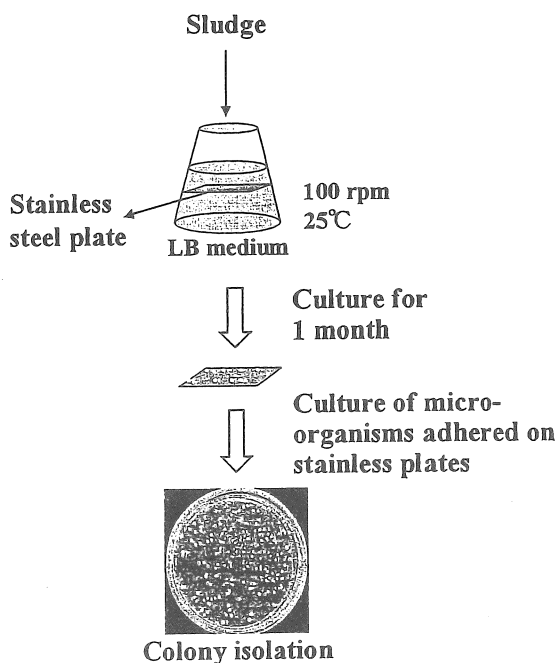


Fig. 2 Procedure for isolation of microorganisms capable of attaching to metal surfaces from several environments

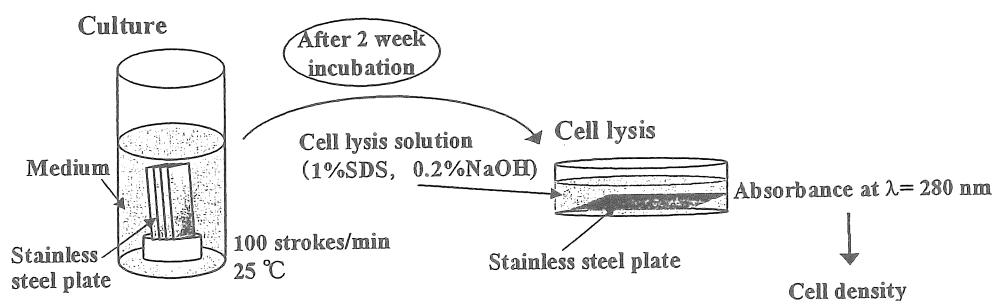


Fig. 3 Measurement of cell density on stainless steel plates

2.3. 微生物同定法

分離菌の分子生物学的同定を行うため、染色体 DNA よりポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により 16S リボソーム RNA をコードしている遺伝子 16S rDNA を取得した。PCR 反応は、KOD Dash DNA ポリメラーゼを使用し、次のプライマー配列、反応温度および時間で行った。

Forward primer : 5' -TAATGGATCCTNANACATGCAAGTCGAKCG-3'

Reverse primer : 5' -CGGCAAGCTTACGGGCGGTGTGTRC-3'

変性 94°C 30 秒, アニーリング 54°C 15 秒, 伸長 74°C 30 秒を 30 サイクル

得られた PCR 産物は, 大腸菌ベクターにクローニングし, 塩基配列を決定した. また DNA ホモロジー解析は, 国立遺伝学研究所の BLAST 解析システムを利用し, 分子系統樹作成には近隣結合法を用いた.

2.4. 金属線へ及ぼす付着 WW2 株の影響

WW2 株の付着金属への影響を検討するため, ステンレス線 (SUS304, 直径 0.3 mm) および銅線 (JIS C 3102, 直径 0.3 mm) を浸漬したフラスコに WW2 株を植菌し, 25°C で培養した. 溶存酸素量の影響も併せて検討するため, 振とう培養 (100 rpm) と静置培養の 2 種を行った. 培養終了後, 金属線を 1% NaCl 水溶液で洗浄し, 続いて細胞溶解液に浸漬することで金属線に付着した細胞を除去した. 金属線は 99% エタノールで洗浄後, 走査型電子顕微鏡 (SEM) による表面観察およびエネルギー分散型 X 線分析 (EDX) による組成分析を行った.

2.5. DNA 吸着量測定

WW2 細胞の DNA 吸着能を検討するため, モデル DNA として大腸菌プラスミド pUC 19 を用い, WW2 細胞への吸着量を測定した. 一定量 (5×10^6 cells/ml) の WW2 細胞 (懸濁培養, 固体寒天培養およびバイオフィルム状態) と DNA (75 ng/ml) を 250 mM NaCl 水溶液中で懸濁・静置し (25°C, 60 分), 遠心分離後, 上澄みの DNA 濃度を Hoechst 33258 を用いた蛍光光度法により測定した. 初期量との差分を細胞による吸着量として評価した.

3. 研究結果

3.1. ステンレス表面へ付着する微生物の分離

種々の環境からステンレス表面に強固に付着する微生物のスクリーニングを行い, コロニーの形状が異なる 11 種類の候補菌株を分離した (Table 1). 顕微鏡観察から, 細胞の形態は球菌が 2 株存在し, 他は桿菌であった. 分離した 11 種の菌のステンレス表面への付着量を調べたところ, 海水環境から分離した SW2 株と下水から分離した WW2 株が高い細胞密度 (それぞれ 7.5×10^7 , 1.0×10^8 cells/cm²) を示したことから, これら両菌株は金属表面に強固に付着する能力を有し, バイオフィルムの一次的な構造を形成する微生物種となりうるものと考えられた.

Table 1 Properties of isolated microorganisms

Origin	Strain	Cell Shape	Cell density (10^7 cells/cm ²)
Seawater	SW1	Short bacilli	0.2
	SW2	Bacilli	7.5
	SW3	Bacilli	0.7
Drain pipe	DP1c	Bacilli	1.4
	DP1b	Bacilli	1.8
	DP2	Long bacilli	1
	DP3	Cocci	0.2
Waste water	WW1	Long bacilli	2.4
	WW2	Short bacilli	10
	WW3	Bacilli	0.9
	WW4	Cocci	0.3
Control	<i>E. coli</i> MM294		0.7

3.2. SW2 および WW2 株の特性

Fig. 4 は、ステンレス表面に付着した SW2 および WW2 細胞の走査型電子顕微鏡写真である。いずれも長さ約 2 μm の桿菌であった。また SW2 および WW2 株の分類学的試験を行った結果、両菌ともにグラム陰性菌の通性嫌気性菌であり、WW2 株は鞭毛およびカタラーゼ活性を有していた。このような特徴より、SW2 および WW2 株は *Enterobacteriaceae* 科に属する細菌であることが示唆された。

高い付着能を有する WW2 株に関して、16S リボソーム DNA 遺伝子のホモロジー解析を行った結果、*Providencia stuartii* と 98 %、*Providencia alcalifaciens* と 97 % の相同性が認められた。さらに高い相同性が得られた微生物および分類学上近縁と考えられるグループに属する標準菌の DNA 配列情報に基づき分子系統樹を作成したところ、WW2 株が *Providencia* 属であることが示されたため、*Providencia* sp. WW2 と命名した (Fig. 5)。

3.3. WW2 株の増殖およびステンレス表面への付着へ及ぼす NaCl 濃度の影響

微生物の固定表面への付着において、共存するイオン強度がその付着量に影響を及ぼすことが知られている。SW2 および WW2 株の NaCl 濃度に対する増殖速度を検討したところ、25 kg/m³ 以上の高 NaCl 濃度では増殖が抑制され、NaCl 濃度 10 kg/m³ での比増殖速度は 1.2 h⁻¹ (SW2 株) および 1.1 h⁻¹ (WW2 株) であった。

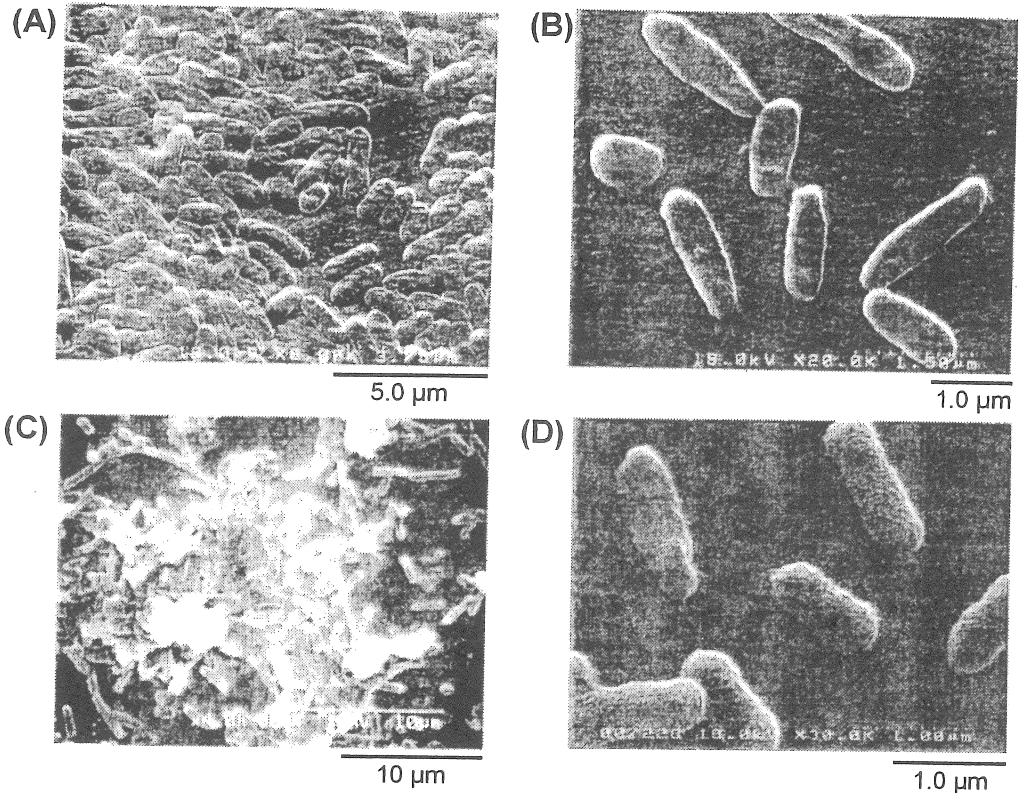


Fig. 4 SEM images of SW2 and WW2 cells adherent to stainless steel surface after two week incubation. (A) Cell cluster (SW2); (B) Magnified cell image (SW2); (C) Cell cluster (WW2); (D) Magnified cell image (WW2).

細胞付着量に対する NaCl の効果に関して、SW2 株は NaCl 濃度にあまり影響を受けなかった。一方、WW2 株のステンレス表面への付着量は、培養 1 週間では、NaCl 濃度にかかわらず顕著な付着は認められなかったが、培養 2 週間目において NaCl 濃度 15 kg/m^3 のときに、極めて高い付着量（約 $1.3 \times 10^8 \text{ cells/cm}^2$ ）が認められた (Fig. 6)。

3.4. WW2 株の H_2S 生成能と付着金属に及ぼす影響

通性嫌気性菌である WW2 株は、好氣的生育過程と嫌氣的生育過程ではその代謝および生理的特性が異なることが予想された。事実、 H_2S 生成能試験では、嫌氣的条件でその生成がよく見られた。硫化物の生成を伴う金属腐食は、硫酸還元菌 (SRB) で見られるように、重要な腐食機構の一つであることから^[2]、WW2 が生成する H_2S による金属腐食能の有無を検討した。溶存酸素濃度の差異による生理活性の変化を考慮に入れるため、振とう培養（好気）および静置培

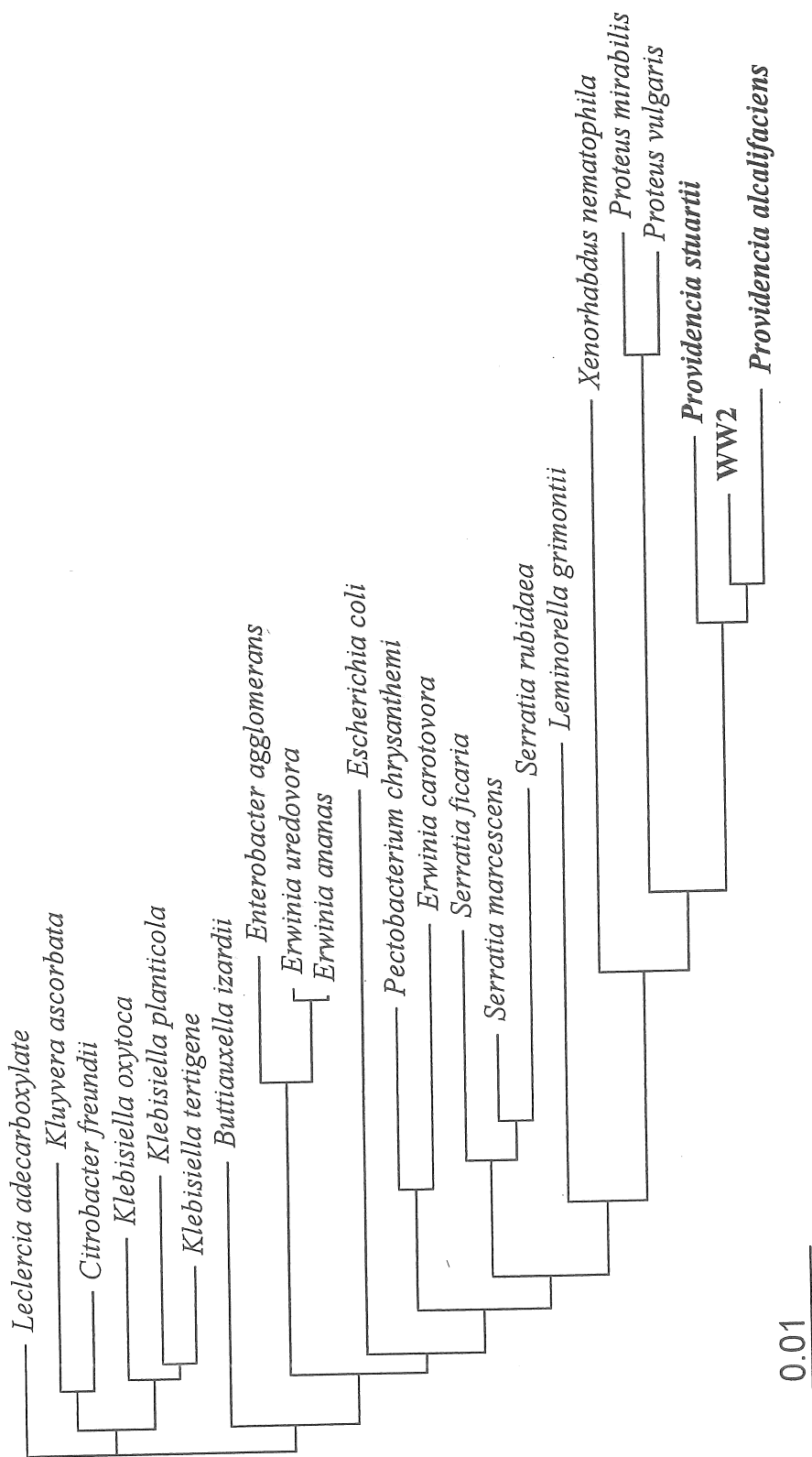


Fig. 5 Phylogenetic tree based on 16S rDNA homology. The 16S rDNA sequences were compared with the GenBank database.

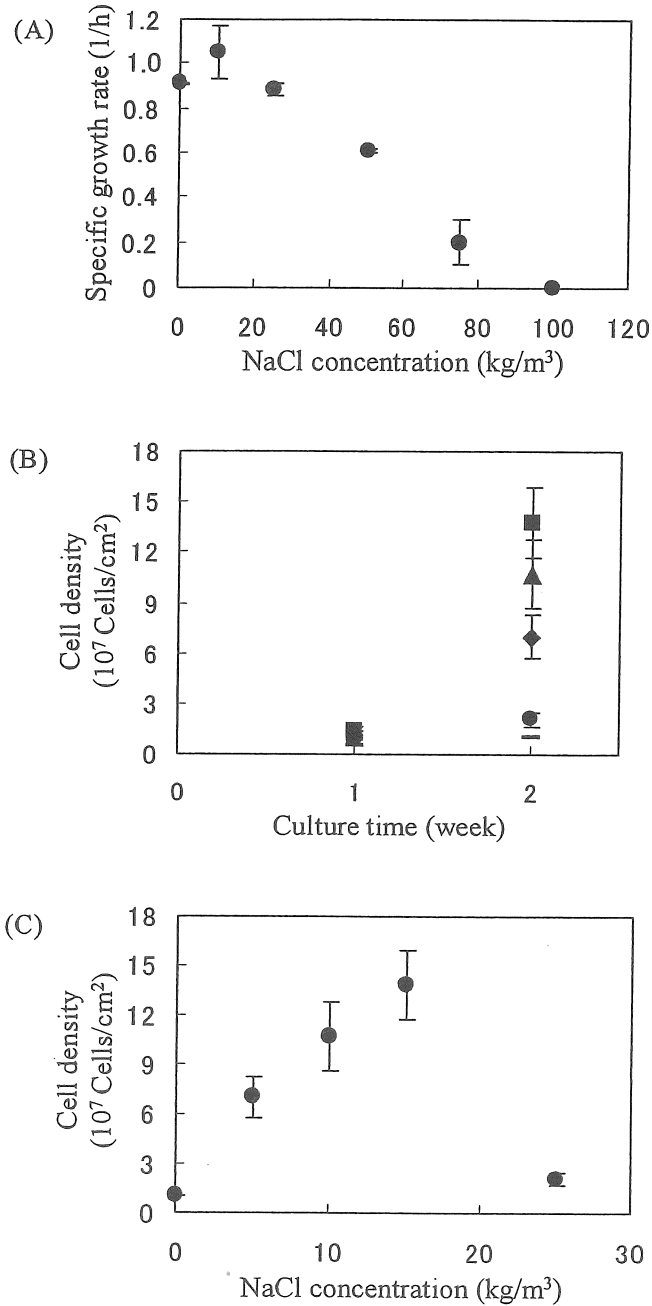


Fig. 6 (A) Effect of NaCl concentration on growth of WW2, (B) Time profile of the amount of WW2 cells attached to stainless steel surfaces (0 kg/m³, —; 5 kg/m³, ◆; 10 kg/m³, ▲; 15 kg/m³, ■; 25 kg/m³, ●), (C) Effect of NaCl concentration on the amount of WW2 cells attached to the plates

養（低酸素）の方法により WW2 の培養を行った。ステンレス線に対しては、WW2 の付着が見られたが、ステンレス線そのものの腐食・劣化は SEM 観察および EDX 分析によっても見られなかった（データ未掲載）。一方、銅線の場合では、振とう培養条件下では、銅線表面への WW2 株の付着が見られたが、銅線表面のなめらかさが失われていた (Fig. 7 (B))。しかしながら、 H_2S 生成に伴う硫化物生成はほとんど認められなかった (Table 2)。静置培養の場合では、銅線表面に黒色膜層の形成が見られ (Fig. 7 (C))、EDX 分析からも著量の S 元素が検出されたことから、WW2 株が生成した H_2S による腐食作用により CuS が生成した可能性が示唆された。

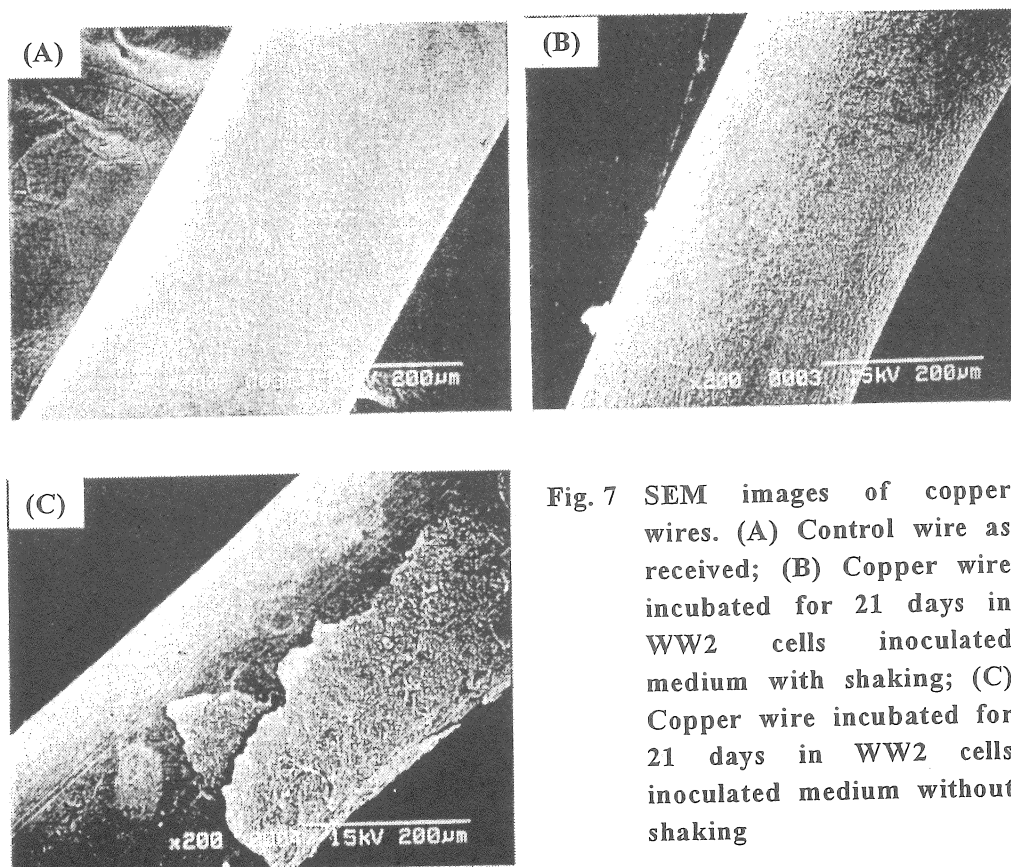


Fig. 7 SEM images of copper wires. (A) Control wire as received; (B) Copper wire incubated for 21 days in WW2 cells inoculated medium with shaking; (C) Copper wire incubated for 21 days in WW2 cells inoculated medium without shaking

Table 2 Elemental composition of copper wires

	Composition [wt %]		
	Copper	Sulfur	Oxygen
Control wire as received	96.5	0.6	2.9
Incubated wire for 21 days with shaking	87.5	1.8	10.7
Incubated wire for 21 days without shaking	74.4	12.8	12.7

3.5. WW2 細胞の DNA 吸着能の検討

WW2 株の細胞表層の特性が DNA 捕獲能に及ぼす影響を検討するため、WW2 株の培養状態を変化させ、細胞への DNA 吸着量を測定した。懸濁培養および固体寒天培地で培養した細胞では、DNA の吸着はほとんど見られなかったが、ステンレス線上に形成したバイオフィーム細胞では、 9×10^{-6} ng/cells の吸着が認められた。

4. 考察

固体表面上に強固に付着し生育する微生物は、同一微生物種においても液体培養や一般的な固体寒天培養で生育している場合とは異なった特性を有していることが近年明らかになりつつある^[3]。このような特性の中には、金属板などの付着基材の汚損や腐食、薬剤など化学薬品に対する抵抗性の獲得など望ましくない効果を及ぼすものも含まれているが、化学薬品耐性を利用した有害化学物質処理や特異的な付着物質の利用など我々の社会・技術・生活に有益に活用できる可能性も大いに含まれている。このような観点から、本研究では、種々の環境中から金属表面に強固に付着する微生物を分離し、その特性の解析および利用を試みた。

微生物の利用を考えた場合は、比較的速い増殖速度が必要となるため、本研究では、有機栄養分を十分に含む培地中で金属表面に強固にかつ多量に付着する微生物の取得を試みた。3種類の環境中より最終的に11種類の候補菌が得られたが、この中で著量の付着を見せる菌株は2種類と少なかった。他の菌株はこれらの優先付着種と共生的に付着生育するか、あるいは混合培養的な環境でなければ金属表面への付着があまり見られないことが考えられた。

これら2種の分離菌の内、より多量の付着が認められた WW2 株について集中的に検討を行った。系統分類を行ったところ、WW2 株は *Providencia stuartii* あるいは *Providencia alcalifaciens* と近縁な細菌であることが判明し、*Providencia* sp. WW2 と命名した。*Providencia* 属は腸内細菌群の属する細菌であり *P. stuartii*

および *P. alcalifaciens* が代表的な菌株であるが、これまで金属付着能に関する報告はなされていない。本菌の増殖に関しては、通常微生物が生育する範囲の塩濃度では増殖速度に大きな差は見られなかったが、付着量の関しては塩濃度依存性が認められた。微生物の付着に関与する EPS については、そのポリマー強度に Ca^{2+} などの 2 価イオンが関係していることが知られており、NaCl 濃度についても EPS の組成、物理化学的特性、生成量に何らかの影響を与えている可能性が考えられた。また、本菌の生理学特性の一つとして銅に対する付着性と H_2S 生成についての知見が得られた。銅そのものには微生物に対する抗菌活性があるが WW2 株の付着には影響を及ぼさない。攪拌状態で銅線とともに培養した場合、付着した WW2 株は銅表面を培地成分あるいは溶存酸素による化学的腐食から銅線を保護すると思われる効果が得られた。一方、静置培養により酸素供給を制限した場合、 H_2S 生成とそれに伴う硫化銅生成による銅線の腐食が観察され、同一菌の付着現象においても生理活性の違いにより差異が生じることが示された。WW2 株の特性をうまく活用できれば付着菌（バイオフィーム）による微量重金属イオンの回収に展開できる可能性が考えられる。

複数の微生物からなるバイオフィーム内では、栄養分をはじめとする化学成分が保持され共同で利用されていると思われる^[4]。さらに近年、そのようなバイオフィーム内において DNA すなわち遺伝子の微生物間移動が生じることが注目されている^[5]。本研究では細胞表層の違いにより DNA を捕獲する能力に差が生じるのかということに着目し、WW2 の培養状態を変えて DNA 吸着量の検討を行った。その結果、バイオフィーム状態の細胞において顕著な量の DNA 吸着が認められ、バイオフィーム状態の細胞が生成する EPS が DNA のような生体分子を濃縮する“バイオボンド”となりうる可能性が示唆された (Fig. 8)。

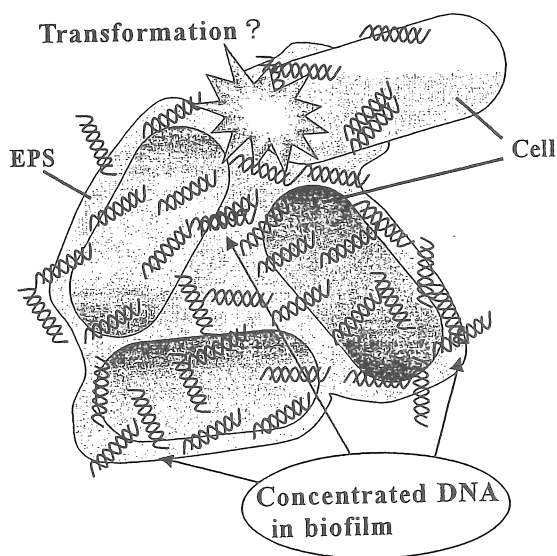


Fig. 8 Conceptual illustration showing condensation of biomolecules such as DNA in biofilm

5. 今後の課題

WW2 株の生成する EPS の化学的分析を進め、NaCl 濃度をはじめとする培養条件とその特性の関係、H₂S 等の細胞代謝との関係、そして DNA やウイルスなど遺伝子媒体との相互作用を明らかにし、その利用方法を開発していく予定である。

6. 参考文献

- [1] 森崎久雄, 大島広行, 磯部賢治: バイオフィルム –その生成メカニズムと防止のサイエンス–, サイエンスフォーラム (1998).
- [2] Potekhina J. S., N. G. Sherisheva, L. P. Povetkina, A. P. Pospelov, T. A. Rakitina, F. Warnecke, G. Gottschalk: Role of microorganisms in corrosion inhibition of metals in aquatic habitats, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**:639-646 (1999).
- [3] Watnick P., R. Kolter: Biofilm, city of microbes, *J. Bacteriol.*, **182**:2675-2679 (2000).
- [4] 森崎久雄: 社会問題～今科学は⑤ バイオフィルム研究の現状と課題, *バイオサイエンスとインダストリー*, **60**:45-48 (2002)
- [5] Doyle, R. J. (ed.): *Methods Enzymol.*, vol.336 (2001)

Isolation of microorganisms capable of attaching tightly on solid surfaces in saline solution and utilization of their products

Masahito Taya, Motomu Nishioka

Division of Chemical Engineering, Graduate School of Engineering Science,
Osaka University

Summary

Microorganisms which attach to solid surfaces and form biofilm has attracted attention in recent years. Extrapolymeric substances (EPSs), mainly consisting of proteins, polysaccharides, and lipids, are deeply concerned with biofilm formation. It is expected that EPSs vary in their structures, chemical components, and biological functions depending on microorganisms themselves and culture conditions.

In the present research, microorganisms were isolated from different origins to screen a candidate for a biofilm former on metal surfaces. Among 11 isolates, strain WW2, isolated from wastewater, was selected as a microbe giving high cell density (1×10^8 cells/cm²) on stainless steel surface. The strain was classified into *Enterobacteriaceae* family and identified as *Providencia* sp. based on the 16S rDNA homology. The amount of cells attached to stainless steel surface was increased with increasing NaCl concentration up to 15 kg/m³, whereas specific growth rate was almost constant in the range of NaCl concentration.

To investigate the interaction between strain WW2 and metal surfaces, stainless steel and copper wires were immersed in the culture of WW2 cells with or without shaking. Scanning electron microscopy and energy-dispersive X-ray spectroscopy analyses revealed that biogenically produced H₂S by strain WW2 precipitated copper ions as copper sulfide on the wire surface under a static culture condition.

Recently, it has been reported that DNA migration as well as transmission of metabolites and signal molecules occurs among microorganisms in biofilm. The examination on DNA adsorption to WW2 cells showed that only WW2 cells grown on the metal surfaces had ability to adsorb DNA molecules, suggesting that WW2 EPSs, can be a "bio-bond" for condensing biomolecules like DNA.