

様式2

平成29年度 生体医歯工学共同研究実施報告書

受理年月日	
受理番号	2035

平成 30 年 3 月 20 日

生体医歯工学共同研究拠点 研究所長会議 議長 殿

共同研究代表者

所属機関 鈴鹿工業高等専門学校

職 名 准教授

氏 名 平井 信充

印

勤務先所在地 〒510-0294

鈴鹿市白子町

電話番号 059-368-1823

FAX番号 059-368-1820

E-mailアドレス : hirai@chem.suzuka-ct.ac.jp

下記により、共同研究の実施報告を致します。

記

研 究 題 目	(和)単一菌バイオフィルムの生成超初期過程の走査型イオン伝導顕微鏡観察 (英)SICM observation of initial growth process of biofilms formed by one kind of microorganisms		
研 究 領 域	1. 生体材料に関する基礎・応用研究 2. 生体工学に関する基礎・応用研究 3. 生体機能分子に関する基礎・応用研究 ④ 化学・電気・機械・材料工学の生体応用研究		
研 究 期 間	平成 29 年 6 月 1 日 ~ 平成 30 年 3 月 31 日		
研究組織			
氏 名	所属機関・部局等	職 名	役割分担
平井信充 岩田 太	鈴鹿工業高等専門学校 生物応用化学科 静岡大学 電子工学研究所	准教授 教授	研究総括・実験 装置開発・実験
生体医歯工学共同研究拠点内対 応教員	(共同研究をした教員名を記載) 静岡大学 電子工学研究所 岩田 太 教授		

研究成果

本研究の目的は、単一菌である枯草菌を用いての、SICMによる生理食塩水中枯草菌バイオフィルムの形態の観察である。実験には枯草菌(MSQ15202)と培養液 Trypticase Soy Broth (カゼイン-スイ消化ペプトン 17.0 g, 大豆-パパン消化ペプトン 3.0 g, NaCl 5.0 g, K₂HPO₄ 2.5 g, ブドウ糖 2.5 g)を使用した。SICM 観察に用いる枯草菌バイオフィルムは以下の手順で作製した。普通寒天培地から枯草菌(MSQ15202)1)をニコロムループで 1 コロニー釣菌し、培養液 50ml を用いて菌液を作製した。この菌液を大気雰囲気下培養器中(設定温度 30°C)で 24h 静置した。1 日培養した菌液は液面に菌膜を形成しているため、菌膜を取り除いた後、ピンセットを用いてガラス板(10 mm x 10 mm x 1 mm)を菌液に浸漬し、すぐに菌液から取り出した。以上の操作をクリーンベンチ内で行った。菌液から取り出したガラス板はプラスチックシャーレの中に入れ、再び大気雰囲気下の培養器中(設定温度 30°C)で 24h 培養し、ガラス表面上に枯草菌バイオフィルムを形成させた。その後 SICM に導入し生理食塩水中において表面観察を行った。右図に得られた SICM 像の一例を示す。SICM 像の走査領域は 25×25 μm、画素数は 128×128 である。図において、より明るい部分がより高く、より暗い部分がより低いところを表している。平坦なガラス基板上に、とぎれとぎれではあるが線が絡み合ったような構造を有するバイオフィルムがみられることがわかる。以上の通り、枯草菌バイオフィルムの SICM 観察に成功した。



使用した設備・資料・試料等

走査型イオン伝導顕微鏡、実験室バイオフィルム加速生成機、走査型電子顕微鏡、原子間力顕微鏡、光学顕微鏡、ラマン分光分析装置、マイクロピペットプラー等

本研究成果に関連する論文発表状況

得られた研究成果について直接関連している今年度の発表は主に以下の通りである。

- 1) Scanning Ion Conductance Microscopy of Indigenous Bacteria Biofilms formed on Glass Surface in Artificial Sea Water (ポスター発表), N. Hirai, H. Sawada, S. Iida, T. Shirasawa, M. Yoshioka, Y. Eguchi, F. Iwata, H. Ikegai, H. Kanematsu, , 8th International Symposium on Surface Science (ISSS-8), 2017/10/25
- 2) SICM observation on biofilm formed on glass substrates, N. Hirai, F. Iwata, H. Kanematsu, The 2nd International Symposium on Biomedical Engineering, 2017/11/9
- 3) 走査型イオン伝導顕微鏡による枯草菌バイオフィルムの水中形態観察の試み, 平井信充 白澤樹、岩田太, 2017 生体医歯工学共同研究拠点成果報告会, 2018/3/9

以上の成果をまとめて、近々(4月末投稿締め切りの特集号)、論文投稿を行う。

次年度の共同研究継続の有無

④ ・ 無

拠点内対応教員とご相談の上ご記入ください。

継続の場合には次年度の研究計画をご記入願います。

次年度の研究計画(継続の場合)

昨年度および今年度の研究の結果、常在菌および単一菌バイオフィルムの生成超初期過程の走査型イオン伝導顕微鏡観察技術の確立に成功した。次年度は、添加物(フミン酸)が常在菌バイオフィルム生成超初期過程に与える影響について、本 SICM 観察を通じて明らかにする。具体的には以下の通りである。常在菌バイオフィルムは、フミン酸共存下で著しく成長することが本申請者の研究により明らかになった。フミン酸は鉄鋼スラグを海の緑化に使用する際の添加剤として実際の製品に用いられている。従来は、フミン酸は、鉄イオンをキレート化することにより鉄イオンを必要とする海藻の生育速度の向上に寄与しているように考えられてきたが、フミン酸添加により鉄鋼スラグ上のバイオフィルムの成長速度が加速し、その結果、バイオフィルムを足場および栄養源として海藻の成長が加速されている側面があることがわかった。以上の背景より、バイオフィルムにおよぼすフミン酸の添加効果に関する研究はきわめて重要である。そこで、次年度は、液中から取り出さず、バイオフィルムの生成超初期過程を観察可能という特徴を有するSICMを用いて、添加物(フミン酸)が常在菌バイオフィルム生成超初期過程に与える影響を明らかにする。