

バイオフィルムの環境と増加の関係を探る

石川県立金沢泉丘高等学校理数科

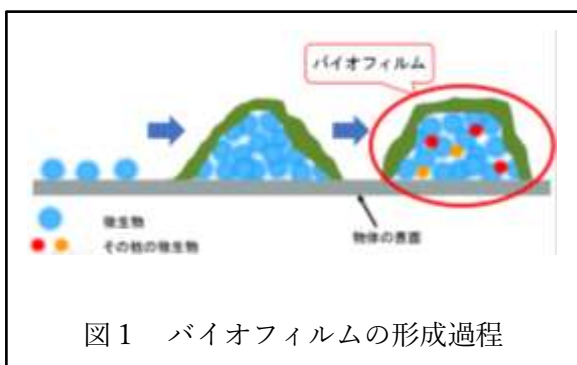
中村 優花 藤本 和奏 林 大樹 宮北 蒼大 吉尾 友希

要旨

バイオフィルムは微生物が作る構造体である。そして、バイオフィルム形成で構造外多糖が合成されることにより、浄化作用をもつようになる。研究を通し、環境条件を変えた際のバイオフィルム形成量の違いを調べ、効率的なバイオフィルムの形成条件を見つけることにより、バイオフィルムの工業利用につなげる。さらに、その浄化作用がどの成分に浄化作用を示すかを調べることにより、バイオフィルムの浄化作用の工業的利用価値に迫った。

1. 研究背景・目的

バイオフィルムは水道管や風呂場で見られるぬめりがその一例で、細菌が一般的な生態環境において固体や液体の表面に付着し、都合のよい生息状況を獲得し、生体膜を作ったものの事を指す（図1）。



ゆえにバイオフィルムは細菌と細菌がつくる菌体外多糖などの生産物が集まってできた構造体である。その際バイオフィルム形成において重要となるのは構造外多糖で、それにより、バイオフィルムは強固なものとなり、固体表面に固着するようになる。つまりバイオフィルムとはそれぞれのものが一つの構造体であるため、元の細菌の性質とは異なる性質を持つようになる。例として、バイオフィルムはそれらの形成にかかわる遺伝子の発現により、保水性をもつ細胞外多糖が合成されることや、バイオフィルムを形成することによ

る機能や構造の変化により水質浄化作用や抗菌性が生まれることが知られている。一方で現在、企業はバイオフィルムの除去に力を入れており、利用の面では先行研究の少ない分野である。そこで私たちは、これらの性質を工業的に利用していくために、バイオフィルムの効率的な作り方を見つけることにした。この研究を進めていくことにより、川に洗剤が流れ出てプランクトンが大量発生した際や、石油タンカーが海に沈み石油が海に流れ出た際に、バイオフィルムが川の水質を浄化することや石油の汚れを浄化することにも貢献できるのではないかと考えた。

2. 仮説と概要

私たちは実験を始めるにあたりバイオフィルムの形成量は環境によって変化するという研究の枠組みとなる仮説を立てた。そしてその環境には外的要因と内的要因があると考えた。その仮説に基づき外的要因として、光の有無や温度条件などによりバイオフィルムの形成量が増えるという可能性について調べた。内的要因の一つ目としてバイオフィルムに含まれる細菌の種類や量に注目した。また、バイオフィルムを構成している成分の多くは糖類であること、細菌の呼吸基質が糖類であることから

糖類の多い環境ではバイオフィームが多く形成されるという仮説を立てた。それについて糖類の多い環境下での実験を行った。細菌は糖類を単糖にまで分解して吸収するため、単糖、二糖、多糖の順番で効果があると考えた。さらに、別の視点としてバイオフィームに水質浄化作用が生まれるのは川の汚れの指標となる成分にバイオフィームが影響を与えるためなのではないかという仮説を立て、実際にどのような物質に対していかに影響を与えているのかについて明らかにするため以下の実験を行った。

3. 実験方法

水槽で一定期間バイオフィームをスライドガラス上に形成させ、質量の相対変化量を測定し、バイオフィーム量とした。水の量は6Lで、期間は一部を除き1週間、スライドガラスの面積は2.60×6.55(cm)で、統一した。また、一部を除き実験は日光のもとで行った(図2)。

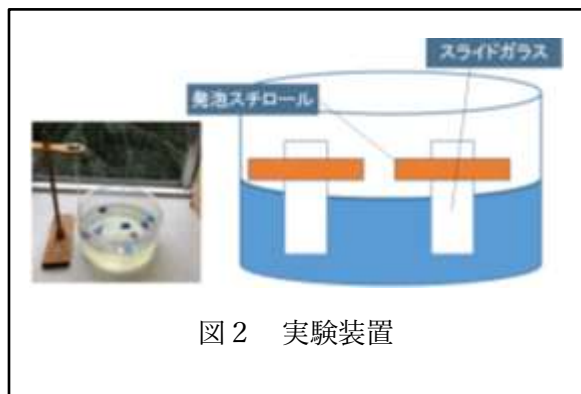


図2 実験装置

実験1) 日光下、非日光下でバイオフィームを形成させた。その結果を元に、蛍光灯を用いた明所と暗所の条件下、温度を一定にするためにヨーグルトメーカーを用いた異なる温度の条件下でのバイオフィーム形成量の変化を調べた。

実験2) ラップをかけて空中浮遊細菌の影響をなくした場合や、滅菌して水中に細菌のいない状況にした場合において、バイオフィームを形成する細菌が空中浮遊細菌か水中細菌のど

ちらの影響が大きいのか調べた。また、川の水の種類を変えることで、バイオフィームに含まれる細菌の種類や量、イオン濃度の違いによるバイオフィーム形成量の変化を調べた。

実験3) 糖類(単糖であるグルコース、二糖であるスクロース、多糖であるデンプン)を与えたときのバイオフィーム形成量の違いを調べた。また、溶質の質量パーセント濃度を変化させ(コントロール、0%、0.1%、0.3%、1.0%、3.0%、10%)それぞれにおける形成量の変化を調べた。

実験4) 水質の指標となる硝酸イオン、リン酸イオン、アンモニウムイオンを含む物質を人為的に加え、バイオフィーム形成前後でそのイオン濃度の変化を調べた。この際、硝酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、塩化アンモニウムを水槽の水に加えた。

4. 実験結果と考察

予備実験1)「実験に使用した水について」本研究で用いた水についてその水質がこの研究に大きく関わってくると考え、その水質を市販の水質調査キットを用いて水道水、用水の水、伏見川(学校付近の川)の水で調べた(図3、表1)。ここで調べたイオン濃度はいずれも水の汚さの指標になるものである。CODとは化学的酸素要求量のことを指し、川の水の汚れを表す指標となる。ここでは数値が大きいほど汚れた水だと言える。

	水道水	用水路の水	伏見川の水
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	0.15	0.60	0.06
NO ₂ ⁻ (mg/L)	0	0.033	0.066
NO ₃ ⁻ (mg/L)	2.15	1.806	1.622
NH ₄ ⁺ (mg/L)	0.26	0.26	2.6
COD(mg/L)	2	4	2

表1 各水のイオン濃度

表1より水道水は硝酸イオン濃度、用水路の水ではリン酸イオン濃度とCODが、伏見川の水

ではアンモニウムイオン濃度と亜硝酸イオン濃度が特に高いことがわかった。

予備実験2)「バイオフィルムの時間による増加量の変化」

実験でバイオフィルムを形成させる際、その質量変化の過程を2週間ほどかけて調べた。スライドガラスを日数分水槽に沈め1日ごとに取り出して計測をした。また、この実験において質量変化量と溶存酸素量の2種類の指標をもちいた。溶存酸素量はバイオフィルムのついたスライドガラスを水の入ったビーカーに入れ、スライドガラス投入1日後の溶存酸素量を測ることにより調べた。結果は下の図4、5に示す。データ数は一個でn=1とした(以後同様に表す)。

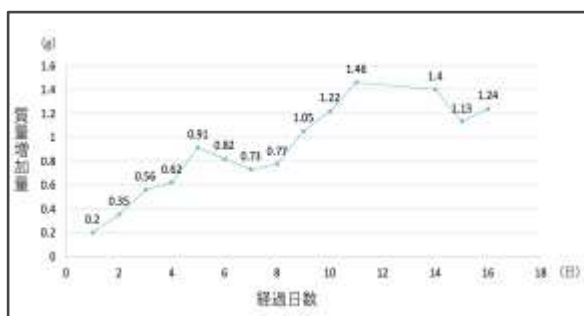


図4 質量変化2週間グラフ (n=1)

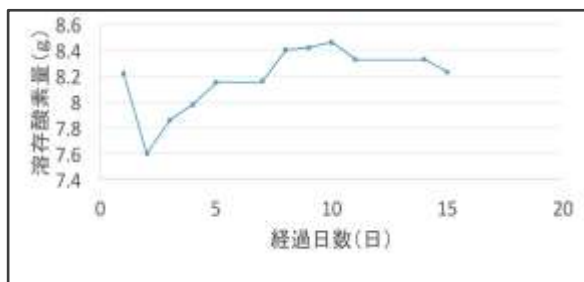


図5 溶存酸素量2週間グラフ (n=1)

このことからバイオフィルムは11日頃に質量の最大値をとり、一定の値に収束していくことがわかった。このとき11日間では質量がおおよそ比例的に増加したことから、形成期間を1週間で行っても結果の誤差は少ないと判断した。

一方、溶存酸素量については初日に大きく減少したもののその後は上昇し、やがて一定の値

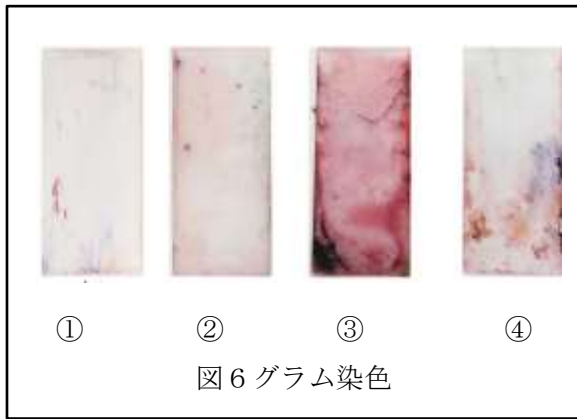
となった。溶存酸素濃度は細菌が水中に多いほど小さくなるため、バイオフィルムに含まれる細菌が多くなればなるほど値は小さくなると私たちは予想したが、異なる結果となった。これは、光合成細菌などがバイオフィルム中に含まれていたため溶存酸素量が大幅に減少しなかったものと考えた。したがって、溶存酸素濃度を測ることは、バイオフィルム量を測ることに繋がらないと言える。

予備実験3)「バイオフィルム量を測る指標」

バイオフィルム量を測る指標として質量と溶存酸素量と染色法の3つを考えた。しかし、予備実験2において溶存酸素量はバイオフィルム量の変化を見ることに適していないことがわかった。また、質量変化量を指標に用いることは、バイオフィルム量に対して誤差が大きくなる可能性が有るという欠点はあるものの、バイオフィルム増加の過程を確認することは可能であることがわかった。

次に染色法について、4種類の異なるバイオフィルム量の条件でクリスタルバイオレットとサフラニンを用いてグラム染色を行った。グラム染色とは、主として細菌類を色素によって染色する方法の一つで、細菌を分類する基準の一つである。これにより、グラム陽性菌は紫色に染色され、グラム陰性菌は赤色に染色される。

私たちは、グラム染色を行うことにより、色の濃度からバイオフィルムに含まれる細菌量がわかると考えた。また、2種類の染色液を用いることで細菌がグラム陰性菌かグラム陽性菌かを調べることも可能であるため良い定量方法だと考えた。染色した後のスライドガラスの結果が図6である。このとき、もっともバイオフィルム形成量が多かったのは③であり最も少なかったのは①であるとわかる。



しかしグラム染色法を用いた場合、染色液をすすぐ段階や脱色段階において手作業の工程が多い分誤差が大きくなることや色の濃度を数値化する方法について、吸光度計やソフトウェアを用いたが、その方法が正確だとは断定できないことから今回の研究には適していないと考えた。よって今後の実験においては質量変化量をバイオフィーム形成量の測定の指標とした。

実験1-①「日光がバイオフィーム形成にあたる影響」

日向は水槽を窓ガラスの前に置き、日陰はダンボールの箱を置いて実験した(図7)。



結果が図8である。グラフバーは標準偏差を示す(以下同様に表す)。

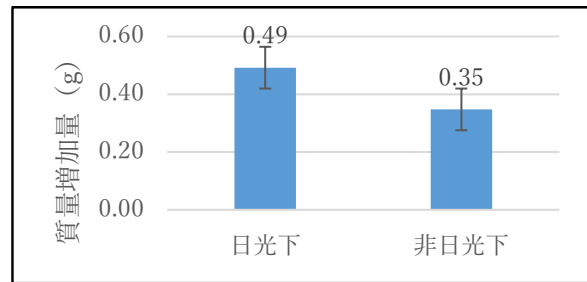


図8 日光下と非日光下での質量増加量(n=4)

図8より、日光下のほうがバイオフィーム形成を促進させる効果があることがわかった。この結果について、私たちは2つの原因を考えた。1つ目は光により光合成細菌の活動が活発になったためバイオフィーム量が増加したという、バイオフィーム形成は光によって促進されるという仮説であり(実験1-①)、2つ目は日光を当てることにより水温が高くなり細菌の繁殖が促進されたという仮説である(実験1-②)。そこでこれらの仮説の検証実験を行った。

実験1-②「光(蛍光灯)がバイオフィーム形成に与える影響」

暗室で蛍光灯を当てた水槽と暗室に置き暗幕で覆った水槽を設置し、温度変化の少ない条件でおこなった。結果が図9である。この際の水温は明所が16℃、暗所が16.5℃であり、差はほぼなかった。

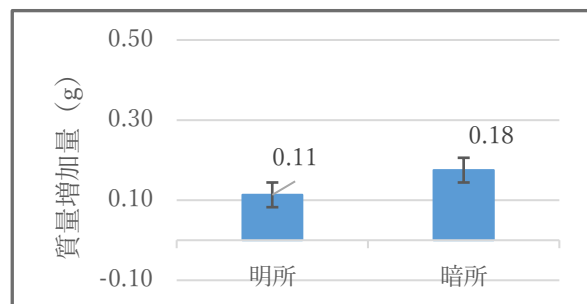


図9 暗室、蛍光灯での実験(n=6)

図9より明所と暗所では質量増加量がほとんど変わらなかったことから、光の有無はバイオフィーム形成に影響を与えないことがわかった。

実験 1-③「温度がバイオフィーム形成に与える影響」

ヨーグルトメーカーを用い、温度を一定に保った環境下で実験を行った。

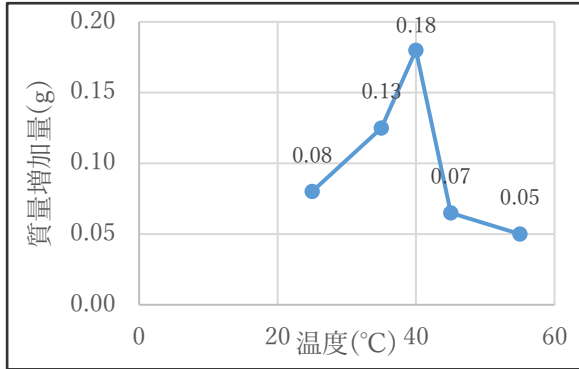


図 10 温度変化の実験(n=2)

図からわかるように温度によってバイオフィーム形成量に違いが見られた。もっとも形成が促進されたのは、水温が 40 度のときであった。実験 1-①では水温は 20 度から 40 度の間であったため、日光下のときのほうが非日光下のときよりも水温が高くなり、バイオフィーム量も増加したと考えられる。

実験 2) 「バイオフィームを構成している細菌について」

私たちはバイオフィーム形成に関わっている細菌は大きく分けて 2 種類あると考えた。一つ目は水中細菌で、二つ目は空中浮遊細菌である。私たちはこの 2 種類のうちどちらがバイオフィーム形成に影響を与えているか調べた。この場合、空中浮遊細菌とは空気中にある微生物の総称で、水中細菌とは水の中にある微生物の総称である。また、細菌の量や種類によっても形成量は変化するか、実験を行った。

実験 2-①「空中浮遊細菌の影響(ラップ使用)」

ラップを用いて空中浮遊細菌の影響をなくして実験を行った。実験は川の水で行った。結果は図 11 である。

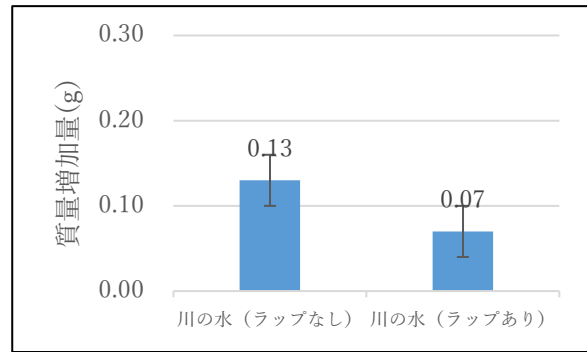


図 11 空中浮遊細菌の影響(ラップ使用、n=4) 川の水はラップをつけた場合も、つけなかった場合も質量増加量の変化があまり見られなかった。このことから空中浮遊細菌の影響が少ないと考えられる。しかしラップをかけることで水槽内の温度や溶存酸素濃度が変化した可能性が考えられるため正確な実験とはいえない。そこで、この問題を解決するため実験 2-②を行った。

実験 2-②「空中浮遊細菌の影響(滅菌)」

水道水、川の水をそれぞれ滅菌したものとそうでないものをつくり、それらを用いて実験を行った。結果は下の図 12 である。

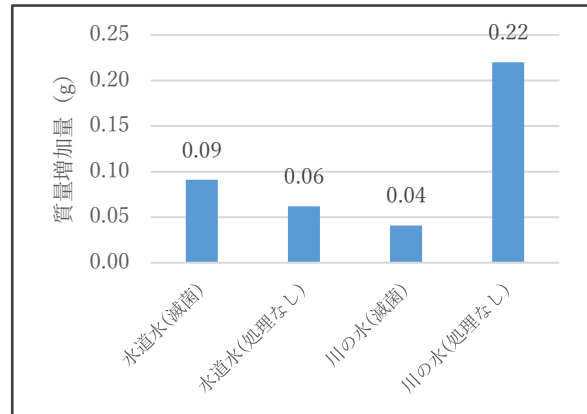


図 12 空中浮遊細菌の影響(滅菌、n=1)

水道水では、滅菌したものとそうでないものの差があまり見られなかった。これは水道水が塩素消毒されており、もともと細菌が少なかったためだと考えられる。川の水は滅菌したものとそうでないものの差が顕著に現れた。このことから、バイオフィームを形成している多くの細菌は水中細菌であると考えられる。

実験 2-③ 「水の違いの影響」

私たちは水の違いによるバイオフィーム形成量の違いをみるため用水の水と伏見川の水でバイオフィーム形成量の変化を調べた。結果は下の図 13 である。

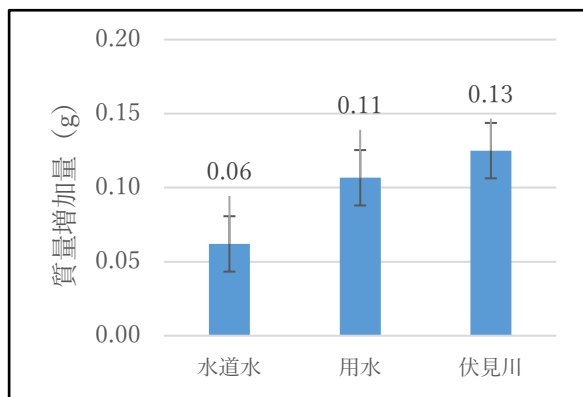


図 13 用水の水伏見川の水水道水での質量増加量 (n=5)

図 13 からわかるように用水路の水と伏見川の水は質量増加量がほとんど変わらない結果となった。また、細菌量の少なく、予備実験 1 で測ったイオン濃度も全体的に低かった水道水はバイオフィーム量が少ない結果となったため、細菌の量、または水質はバイオフィーム形成に関わっていると言える。

実験 3) 「糖類がバイオフィーム形成に与える影響」

大きく分けて 2 つの実験を行った。水に溶かす物質を変えるもの (実験 3-①) と、溶かす物質の濃度を変えるもの (実験 3-②) である。

実験 3-① 「水に溶かす物質を変える」

水に溶かす物質について単糖類であるグルコース、二糖類であるスクロース、多糖類であるデンプンを水に溶かし、濃度 1.0% で行った。結果は図 14 である。

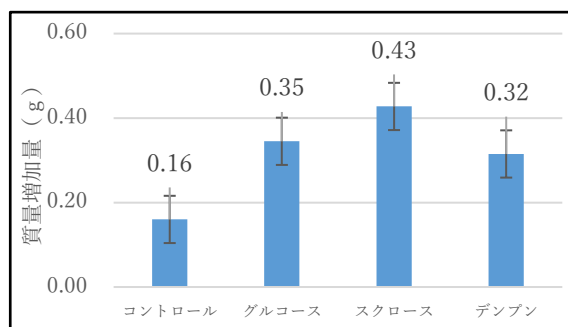


図 14 糖類 3 種を入れた際の質量増加量 (n=4)

図 14 から、糖類を入れることにより、バイオフィーム形成量を大幅に増やすことができた。3 種類の物質で比べると、スクロースでの形成量が最も多く、次にデンプン、最後にグルコースという結果となった。

当初、私たちは細菌が単糖を最も吸収しやすいためグルコースを入れた際のバイオフィーム形成量が最も多くなると予想していたが、二糖であるスクロースで最もバイオフィーム形成量が多くなるという結果となった。

実験 3-② 「水に溶かす物質の濃度を変える」

溶ける物質の濃度を変化させて影響を調べた。濃度は 0/0.1/0.3/1.0/3.0/10.0% で行った。結果は下の図 15 である。

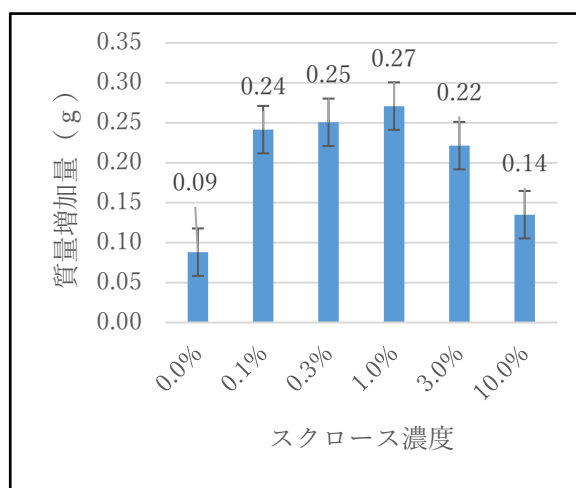


図 15 スクロースの濃度変化における質量増加量 (n=36)

このグラフから、スクロース濃度が 0% から 1.0% ではバイオフィーム量が単調に増加し、3.0%、10.0% になると形成量はあまり増えな

くなった。このことから、スクロースが多量に溶けたことにより、結合水の割合が増えたことで浸透圧が高くなったため、細菌の繁殖が抑制されたと考えられる。結合水とはタンパク質や炭水化物などの物質と結合状態または水和状態にある水のことを指す。また、1.0%で最もバイオフィーム形成量が多くなったため、バイオフィームを形成する細菌の最適な浸透圧が1.0%であるのではないかと考えられる。

またグルコースでも同様の実験を濃度0/0.1/0.3/1.0/3.0%で行った(図16)。

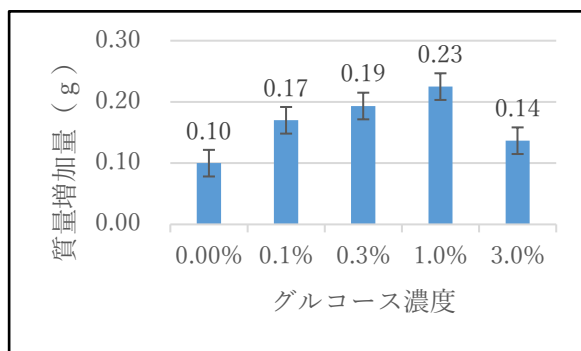


図16 グルコース濃度変化における質量増加量(n=4)

スクロースの際と同様にグルコース濃度が1.0%のときまではバイオフィーム量が増加し10%まで増えると減少することがわかった。このことから浸透圧が高すぎるとバイオフィーム形成に効果が少ないことがわかった。

実験4)「バイオフィームの水質浄化作用について」

バイオフィームの水質浄化作用について、私たちの実験途中でも確認ができたため、その効果についてどのような物質に影響を与えるのか調べた。水質浄化を確認する物質として水の汚さの指標となる3種類のイオン(NH₄⁺、NO₃⁻、PO₄³⁻)を用いた。塩化アンモニウム、硝酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウムを水槽に入れ、バイオフィーム形成前と形成後のイオン濃度の変化を水質調査キットの使用により確認した。結果は図17~図19である。このときイオ

ン濃度の減少率は(実験後のイオン濃度)/(実験前のイオン濃度)で算出した。

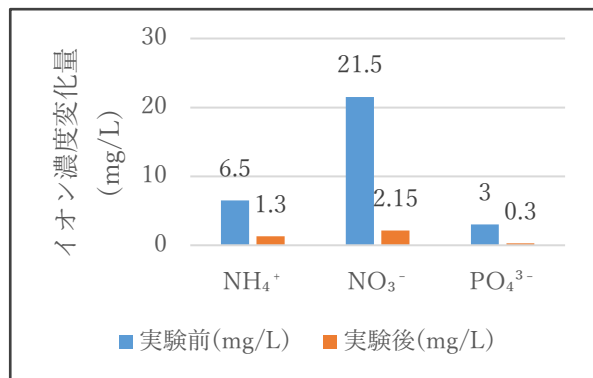


図17 川の水のイオン濃度変化(n=1)

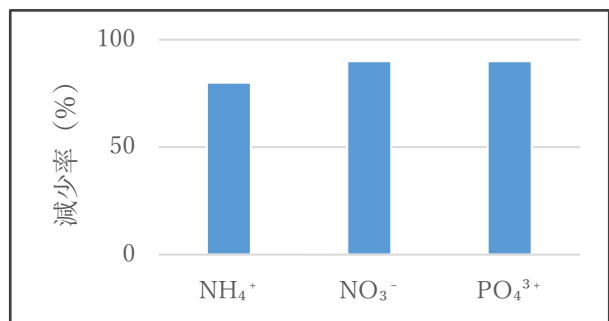


図18 川の水でのイオン濃度減少率(n=1)

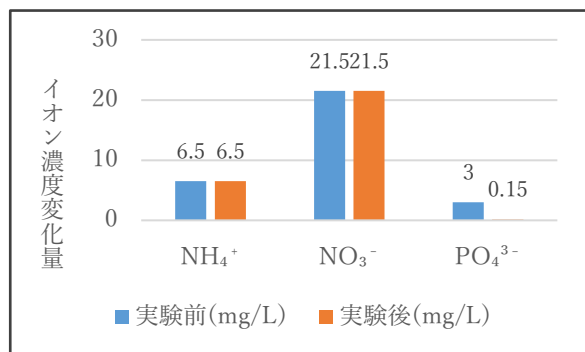


図19 水道水でのイオン濃度変化(n=1)

バイオフィーム形成量の少ない環境である水道水を用いた場合、リン酸イオン濃度は減少したが、アンモニウムイオン濃度、硝酸イオン濃度は実験前後で変化しなかった。このことによりバイオフィームの形成により、これらのイオンが減少したと考えられる。また、川の水においてどのイオンにおいても減少率が80%、90%であったことからバイオフィームがこれらの物質の減少に大きく影響を与えることが

わかった。

5. 結論

水道水ではバイオフィームはほとんど形成されなかった。これより、バイオフィームを形成している大半の細菌は元々水中にいたものが繁殖したと考えられる。スクロースの濃度は低すぎると効果が薄い、高すぎると浸透圧が高くなり、成長を阻害しあうと考えられる。またその浸透圧はグルコース、スクロースのいずれの場合でも 1.0%において最もバイオフィーム形成が促進された。いずれのイオンにおいてもバイオフィームの形成により、大きく濃度が減少した。これらのイオンは汚さの指標に用いられるため、バイオフィームの水質浄化作用を確認できた。

6. 今後の課題

今回の実験では、気候などの環境による影響がバイオフィーム形成に影響をあたえると考えられるため、一部の実験ではデータ量を増やし、有意検定を行ったが、すべての実験において行えたわけではないため今後行っていきたい。また、水中のイオン濃度を測る際に水質調査キットを用いたため、細かい数値を得ることが難しく、水中のイオン濃度を測る方法を確立させなければいけないと感じた。

実験 3-①で単糖類、二糖類を比べると二糖類でバイオフィーム形成量が多くなり、当初の私たちの予想とは異なる結果となった。このような結果になった原因について調べていきたい。

実用化するためには海水など違った環境で生息する細菌のバイオフィームの浄化作用を利用する必要がある。その細菌では適合する環境が違う可能性もあるので、これから条件を複雑化した実験が必要である。

7. 謝辞

本研究に際してバイオフィームの基礎を一からご指導を頂きました鈴鹿工業専門学校の平井信充教授をはじめ、本校教諭の中島正宏先生、北陸先端科学技術大学院大学の小田和司先生に深く感謝いたします。

8. 参考文献

- ・日本微生物生態学会 (2005) . 「バイオフィーム入門—環境の世紀の新しい微生物像」 . 日科技連
- ・兼松秀行・生貝初・黒田大介・平井信充 (2015) 「バイオフィームとその工業利用」 . 米田出版
- ・栗原伸一・丸山敦史. (2017). 「統計学図鑑」 . オーム社
- ・上田拓治. (2009) . 「44の例題で学ぶ統計学検定と推定の解き方」 . オーム社
- ・大久保卓也. (1994) . 小水路における水質変化に及ぼす河床生物膜の影響.
<http://iss.ndl.go.jp/books/R100000002-I000000082150-00>