

## 金属腐食性細菌のバイオフィルムの顕微ラマン分光

<sup>1</sup>関学大院理工, <sup>2</sup>筑波大院生命環境科学  
○重吉康平<sup>1</sup>, 尾花望<sup>2</sup>, 重藤真介<sup>1</sup>

### Raman Microspectroscopic Study of Bacterial Biofilms That Corrode Stainless Steel

○Kohei Shigeyoshi<sup>1</sup>, Nozomu Obana<sup>2</sup>, Shinsuke Shigeto<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Science and Technology, Kwansei Gakuin University, Japan

<sup>2</sup> Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Japan

**【Abstract】** The marine bacterium *Aestuuriibacter* sp. FT01 has been found to form biofilms on the surface of stainless steel and corrode the stainless steel. Although visualization of biofilm formation and corroded steel surface has been reported, the molecular mechanism of this microbially induced corrosion (MIC) and its relationship with biofilm formation remain largely unclear. In the present study, we used confocal Raman microspectroscopy, which can monitor biofilm formation in a nondestructive manner and with high molecular specificity, to investigate biofilms of FT01 with a view to elucidate the mechanism of MIC. We observed space-resolved Raman spectra of FT01 biofilms forming on stainless steel. During the course of the observation, we found that after a certain culture time, a characteristic Raman band appears at  $\sim 1737\text{ cm}^{-1}$ , and that the intensity of this band increases with the biofilm development. This Raman band is most likely assignable to the C=O stretch mode of the ester linkage in exopolysaccharides and is closely related to the biofilm formation.

**【序】** 海洋由来の *Aestuuriibacter* 属細菌 FT01 はステンレス鋼表面にバイオフィルムを形成し、その下でステンレス鋼を腐食するということが先行研究により見出されている[1]。反射顕微鏡技術を用いたバイオフィルム形成過程および金属腐食の可視化は報告されているものの[1]、微生物腐食の詳細な機構については完全に解明されていない。そこで本研究では、バイオフィルムの非破壊解析に適したラマン分光法[2]を用いることで、FT01 のバイオフィルム形成およびその金属腐食との関係を明らかにすることを目的とした。様々な培養時間における FT01 バイオフィルムの観察を行う過程で、バイオフィルムの成長に伴って特徴的なラマンバンドが  $1737\text{ cm}^{-1}$  付近に現れることを見出したので報告する。このバンドを与える生体物質はバイオフィルム形成に重要な役割を果たす細胞外多糖である可能性が考えられる。

**【実験】** バイオフィルム中の生体物質に関する基礎的な知見を獲得するため、まずステンレス鋼 (SUS303) の腐食を起こすことが確認されている条件 (培地中の  $\text{Fe}^{2+}$  濃度が  $0.4\text{ }\mu\text{M}$  以下) とそうでない条件 ( $[\text{Fe}^{2+}] > 0.6\text{ }\mu\text{M}$ ) で FT01 (筑波大学・野村研究室提供) をステンレス鋼なしで培養し、形成されたバイオフィルムを自作の倒立型共焦点顕微ラマン分光装置 (励起波長  $632.8\text{ nm}$ , レーザーパワー約  $3\text{ mW}$ , 露光時間  $300\text{ s}$ ) を用いて測定した。一方、実際にステンレス片表面に形成された FT01 のバイオフィ

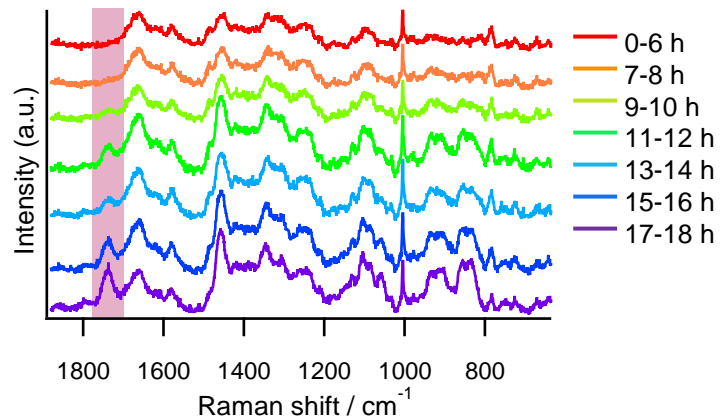
イルムの測定には、正立型共焦点顕微ラマン分光装置 (XploRA Nano, HORIBA ; 励起波長 532 nm, レーザーパワー約 4.4 mW) を用いた。超長作動距離対物レンズ (50×, NA 0.5) を使用することで、対物レンズを液体培地に浸すことなく測定することを可能にした。

**【結果・考察】** 倒立型顕微ラマン分光装置を用いて FT01 バイオフィーム内で測定した空間分解ラマンスペクトル (培地などによるバックグラウンドは差し引いてある) を植菌後の経過時間ごとに平均したものを Fig. 1 に示す。培養時間が長くなるのに伴って、 $\sim 1737\text{ cm}^{-1}$  のラマンバンドの強度が大きくなるのがわかる。したがって、このバンドを示す成分はバイオフィームの成長とともに濃度が増加する物質であると推測することができる。

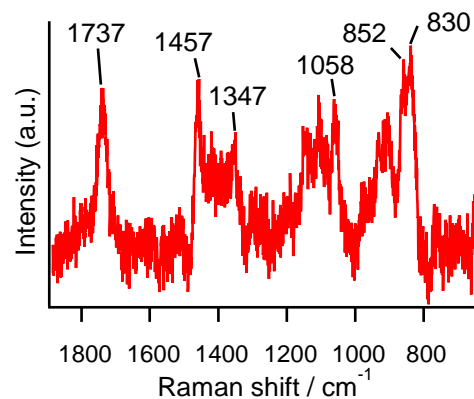
$1737\text{ cm}^{-1}$  バンドの帰属の手がかりを得るため、このバンドが観測されたラマンスペクトルから観測されなかったラマンスペクトル (短い培養時間におけるスペクトル) を引いた差スペクトルを計算した (Fig. 2)。Fig. 1 から、タンパク質のラマンバンド (例えば  $\sim 1655\text{ cm}^{-1}$  のアミド I 振動や  $1003\text{ cm}^{-1}$  のフェニアラニン残基の環呼吸振動) の強度が培養時間に対してほとんど変化していないことがわかるので、ここでは  $1003\text{ cm}^{-1}$  バンドの強度を基準として引き算を行った。Fig. 2 の差スペクトルから、 $1737\text{ cm}^{-1}$  バンドを示す成分は、 $1347, 1457\text{ cm}^{-1}$  付近 (C-H 変角振動) や  $830, 852, 1058\text{ cm}^{-1}$  などにも顕著なバンドを有することが明らかになった。細胞のラマンスペクトルに現れる  $1740\text{ cm}^{-1}$  付近のラマンバンドは一般的に、エステル結合の C=O 伸縮振動に由来することが知られている。したがって、Fig. 2 の差スペクトルを与える生体物質の候補の一つとして、生体膜の構成成分であるリン脂質が挙げられる。しかし、リン脂質のラマンスペクトルに現れるその他の特徴的なラマンバンド ( $\sim 1654\text{ cm}^{-1}$  の C=C 伸縮振動や  $\sim 1303\text{ cm}^{-1}$  の  $\text{CH}_2$  ねじれ振動など) がまったく観測されていないことから、この可能性は高くないと考えられる。我々は現在のところ、Fig. 2 のラマンスペクトルを与える物質は、バイオフィームマトリックスの主要構成成分である細胞外多糖ではないかと解釈している。実際、細胞外多糖の一種であるアルギン酸は  $1740\text{ cm}^{-1}$  付近に強いラマンバンドを示すことが報告されているが[3]、バイオフィーム中での観測例は限られており、その意味で本研究の結果は重要である。

### 【参考文献】

- [1] 宮野, 稲葉, 野村, 材料と環境, **64**, 492 (2015).
- [2] Y.-T. Zheng, M. Toyofuku, N. Nomura, and S. Shigeto, *Anal. Chem.* **85**, 7295 (2013).
- [3] N. P. Ivleva, M. Wagner, H. Horn, R. Niessner, and C. Haisch, *Anal. Bioanal. Chem.* **393**, 197 (2008).



**Fig. 1.** Averaged space-resolved Raman spectra of FT01 biofilms measured at different culture times.



**Fig. 2.** Difference Raman spectrum associated with the component showing the  $1737\text{ cm}^{-1}$  band.