

バイオフィルムの定量方法の比較検討

甲斐 穂高*¹、中根 十愛²、梅川 響¹、東浦 芙宇¹、平井 信充¹

¹ 鈴鹿工業高等専門学校 生物応用化学科 (〒510-0294 三重県鈴鹿市白子町)

² 鈴鹿工業高等専門学校 専攻科 総合イノベーション工学専攻 (〒510-0294 三重県鈴鹿市白子町)

*kai@chem.suzuka-ct.ac.jp

Comparison for biofilm quantification methods

Hotaka KAI,¹ Toa NAKANE,² Hibiki UMEKAWA,¹
Fuu HIGASHIURA,¹ and Nobumitsu HIRAI¹

¹ Department of Chemistry and Biochemistry, National Institute of Technology, Suzuka College,
Shiroko, Suzuka, Mie 510-0294, Japan

² Advanced Engineering Course of Science and Technology for Innovation, National Institute of Technology,
Suzuka College, Shiroko, Suzuka, Mie 510-0294, Japan

(Received April 7, 2021; Accepted May 14, 2021)

Abstract

When an environment-improving material that uses steelmaking slag as a raw material is constructed in a sea area, the lack of nutrients in the sea area can be resolved. As a result, marine plants such as algae grow, and the environment of the sea area is improved satisfactorily. In this initial process, a biofilm is formed on the surface of the material. Whether the seaweed grows up depends on the amount of biofilm formed. That is, the quantification of the biofilm formed on the surface of the slag-based environment-improving material is an important factor for the biofilm forming conditions. In this study, the authors investigated a new method of quantifying biofilms formed on the surface of glass substrates and slags by measuring the total organic carbon (TOC) and the bioluminescence of adenosine triphosphate, adenosine diphosphate and adenosine monophosphate (the A3 method).

The greater the amount of biofilm formed on the surface of the glass substrate, the larger the amounts of bioluminescence of ATP and of TOC are detected. From these results, positive correlations were observed between the amount of biofilm and ATPs and the amount of biofilm and TOC. Furthermore, from this viewpoint, the amount of biofilm produced on the slag surface can be evaluated from the amount of bioluminescence of ATPs and the amount of TOC. However, quantifying biofilm by the A3 method is a supplementary position for TOC. From the results, we conclude that it is possible to quantify biofilms by measuring TOC and ATPs.

Key words: Biofilm, Quantification, Slag, TOC, ATPs

1. 諸言

鉄鋼業における精錬の過程で、副産物として数種類のスラグが生産される。日本では、2018年において製鋼スラグが1,374万9千トン、高炉スラグが2,273万7千トン生産されている。高炉スラグは道路、地盤改良材、土木、セメント用として活用され、埋立等の使用実績が0千トンであることから、高炉スラグは100%リサイクル(再利用)されている[1]。製鋼スラグも道路等として再利用されているが、製鋼スラグの使用量(1,398万トン)に対して約

1.8%(約25万トン)が再利用されずに埋立処分されている。2018年4月1日現在において、産業廃棄物最終処分場の残余年数16.4年である[2]。埋立処理費用の高騰と新たな最終処分場の建設が容易でなく、スラグの機能や特徴を活かした新しい利活用手法の構築は急務である。

製鋼スラグの類である転炉系スラグは、リン、硫黄、鉄などの様々な元素を含んでいる。転炉系製鋼スラグの利活用方法の一つとして、磯焼け沿岸海域や貧酸素水塊や嫌気条件が生成される海域底質の環境修復剤への利用がある。

例えば、JFE スチール株式会社の製鋼スラグ底質改善剤「マリンスターン」による海域の底質改善の実証試験[3]、日本製鉄株式会社の製鋼スラグと腐食物質を原材料とした藻場造成用資材による海洋環境改善試験[4]が展開されている。両者の試験において、試験区海域底質の嫌気状態の解消やコンブの繁茂とそれの維持に成功している。また、これら開発した資材が環境に対して悪影響を与えないことも報告されている[5-6]。

海域にスラグ系環境改善資材を施工した際、この資材に海藻を主とする海洋性の植物が繁茂していく。その初期過程において、資材の表面にバイオフィーム (Biofilm) が生成される。バイオフィームは、細菌が産生または分泌する細胞外重合物質 (Extracellular Poly Substance : EPS) によって覆われた細菌の膜状集合体である[7]。自然環境中で生成されるバイオフィームは水質浄化に寄与したり、バイオフィームから藻や苔が繁殖してこれらが生物の餌になったりすることで、環境に対してプラスに作用する。海域にスラグ系環境改善資材を施工すると、その表面にバイオフィームが生成され、藻場創生と水質浄化を主とする海洋環境の修復の機能が発揮される。スラグ系環境改善資材表面におけるバイオフィームの生成条件を明らかにすることは、製鋼スラグの利活用促進のために重要である。資材表面への藻類繁茂は、生成されるバイオフィーム量に左右される。よって、スラグ系環境改善資材表面に生成されるバイオフィームの定量は、同資材の環境改善能力評価において重要な指標となる。本研究では、スラグ系環境改善資材として活用例がある転炉系スラグ (名称 : F) と、転炉系スラグと同じように様々な元素を含んでおり環境改善資材としての利活用が見込まれる溶銑予備処理スラグ (名称 : 5-2) を選択し、これらスラグ表面に生成されるバイオフィーム定量方法の有効性について検討と評価を行ったので、本論ではその成果について報告する。

2. 実験方法

2.1 バイオフィームと定量方法の概要

既述したとおり、バイオフィームは、EPS と細菌の膜状集合体である。EPS の成分は多糖類やタンパク質、DNA、脂質などであり、その他にも種々のイオンが吸着されている。細菌は、バイオフィームを生成することで環境中に拡散している希薄な栄養成分を効率よく獲得でき、また環境中の捕食者から逃れられるなどの特徴がある。バイオフィ

ームは次の過程で生成される；まず、環境中に存在する有機物が材料表面に吸着することによりコンディショニングフィルムが生成される。次に、浮遊細菌がコンディショニングフィルムに付着して増殖し、増殖した細菌類が EPS を産生または分泌して膜状集合体が生成され、その中でさらに細菌類が増殖する。そして、バイオフィームが成熟していき、水の流れの勢いや水に流されてきた物体に接触する等の作用を受けて成熟したバイオフィームが破壊されたり崩壊したりすることで、バイオフィームを生成する細菌の一部が浮遊細菌として放出され、これが新しい材料表面のコンディショニングフィルムに付着する。

バイオフィームは、細菌と EPS から構成されていることから、有機物としての炭素が含まれている。バイオフィームの大小は、バイオフィームを構成している細菌の量、および EPS 量と比例関係にあると予想される。よって、バイオフィーム中の有機炭素量 (Total Organic Carbon: TOC) を測定することで、バイオフィームの定量を行うことが可能である (以下、TOC 測定法)。

また、バイオフィームを構成している細菌は、体内におけるエネルギーの貯蔵や放出に関する物質であるアデノシン三リン酸 (Adenosine Triphosphate : ATP)、アデノシン二リン酸 (Adenosine Diphosphate : ADP)、アデノシン一リン酸 (Adenosine Monophosphate : AMP) を持っている。バイオフィームが大きければ、その中に含まれる細菌も多くなり、バイオフィーム中に存在する ATP、ADP、AMP も多いと予想される。よって、これら 3 物質の量 (以下、ATP 類) を測定することで、バイオフィームの定量を行うことが可能であると示唆される (以下、A3 測定法)。

一方で、クリスタルバイオレット (Crystal Violet : CV) はトリフェニルメタン骨格を有する塩基性の紫色色素であり、これは細菌の細胞壁を染色することができる従来の技術である[8]。クリスタルバイオレットは、EPS も染色する。バイオフィームは細菌によって構成されていることから、クリスタルバイオレットで染色されたバイオフィーム中の細菌や EPS をクリスタルバイオレットによって染色し、その染色液の濃淡を測定する[9]ことで、バイオフィームの定量が可能である (以下、CV 測定法)。

以上より、次に示す実験を展開し、TOC 測定法、A3 測定法、CV 測定法によるバイオフィーム定量の評価を行った。

2.2 ガラス基板表面バイオフィルムの定量

2.2.1 ガラス基板表面へのバイオフィルム生成

寒天培地 (Difco™ Marine Agar) 上に培養した海洋菌 *Aliivibrio fischeri* (JCM18803) のコロニーを試験管に分注した液体培地 (Difco™ Marine Broth 2216) へ懸濁した試料を作成し、これを海洋菌懸濁液とした。この海洋菌懸濁液を人工海水 D-PBS (富士フィルム和光純薬株式会社) を用いて、2 倍希釈、4 倍希釈、8 倍希釈、16 倍希釈した。これら 4 段階に希釈した海洋菌懸濁液 15 mL をシャーレに移し、約 25 mm×40 mm にカットしたスライドガラス (ガラス基板) 複数枚、または、約 25 mm 角にカットしたスライドガラスを 3 枚ずつ浸漬し、22°C の恒温槽で 2 日間静置して、ガラス基板へのバイオフィルム生成を試みた。

2.2.2 ガラス基板表面バイオフィルムの CV 測定法

クリスタルバイオレット染色による測定法の手順は以下のとおりである。2.2.1 によって準備したシャーレ内の水分を除去し、10 mL のクリスタルバイオレット水溶液を添加した。30 分程度染色したあと、過剰な色素を除き水で緩やかに約 1 分洗浄した。残った水滴を出来る限り振り落としてから、風乾し、写真撮影を行った。さらにクリスタルバイオレット染色後、各条件においてよく染まっている試料を選択し、試料 1 枚につき 3 か所の染色の程度を測定した。染色の程度は、色計測機器 (CR-13、コニカミノルタ株式会社) を用いて明度 (L) と彩度 (C) を測定した。さらに、クリスタルバイオレットによって染色されたガラス基板を各条件において 1 枚選択し、エタノール 20 mL に 1 時間浸漬して 99.5 %エタノール中にクリスタルバイオレットを溶出させ、紫外可視吸光度計 (UV-1800、島津製作所) を用いてこれの 590 nm 吸光度を測定した。

2.2.3 ガラス基板表面バイオフィルムの TOC 測定

ガラス基板上のバイオフィルム定量を TOC 測定により試みるため、次のとおりに操作を行った。2.2.1 のガラス基板に純水をかけてやさしく洗浄し、20 mL の純水が入ったビーカーにガラス基板を入れ、超音波ホモジナイザー (Ultrasonic Generator US-600T, 株式会社日本精機製作所) を用いて、表と裏をひっくり返して、各 1 分間ずつ超

音波破碎処理を行った。この超音波処理によって、ガラス基板表面のバイオフィルムを純水中に剥離および懸濁させることができ、この試料を TOC 測定した。バイオフィルムの TOC 測定は、全有機体炭素計 (TOC-V、津製作所製) によって行った。今回は、燃焼酸化方式 (試料を高温の燃焼炉に注入して試料中の有機物を燃焼させ、その際に発生する二酸化炭素量を測定する手法) による不揮発性有機炭素 (Non-Purgeable Organic Carbon :NPOC) を測定して、バイオフィルムに含まれる TOC を測定した。測定手順は、付属のマニュアルに従い、フタル酸水素カリウム (161-24661 富士フィルム和光純薬) を用いて炭素濃度 0~25 mg/L の検量線から測定した。

2.2.4 ガラス基板表面バイオフィルムの A3 測定

ガラス基板上のバイオフィルム定量を A3 法により試みるため、次のとおりに操作を行った。2.2.1 のガラス基板に純水をかけてやさしく洗浄し、20 mL の純水が入った遠沈管内にガラス基板を入れ、1 分間ボルテックスミキサーで振動し、スラグ表面のバイオフィルムを純水中に剥離および懸濁させた後の上澄み液をルミテスター (smart、キッコーマンバイオケミファ製) によって測定した。ルミテスターは、ホタル腹部の発光器の中で起きている酵素反応を利用し ATP 類の測定ができる装置である。ATP は、ルシフェリンと酸素の存在下でルシフェラーゼ (酵素) を反応させると AMP に変化する。その際に光エネルギー (生物発光) が放出され、この発光量を測定することで ATP の量を測定することが可能である。なお、この手法は ADP と AMP を ATP に変換して測定することから、高い発光量を得る事ができるメリットを有しており、これら 3 種類の物質を全て検出できる原理となっている。

2.3 スラグ表面のバイオフィルム定量

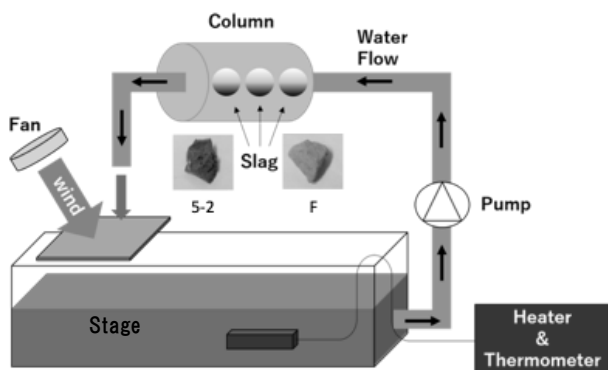
2.3.1 スラグ表面へのバイオフィルム生成

図 1 に示した実験室バイオフィルム加速生成器 (Laboratory Biofilm Reactor : LBR) を用いて、次の手順で実験を行った。LBR の Column 内にスラグをセットし、30 °C で 2 週間、LBR 内の塩分濃度約 3 %人工海水 (マリナーアート SF、富田製薬) を循環させながら、大気中の常在菌を LBR 内に取り込み、常在菌バイオフィルムをスラグ表面に生成させた。大気中の常在菌を LBR 内に取り込む工程

は、次のとおりである。図 1 中で Column から出てきた循環水が経路から大気に曝されるかたちで放出され、水槽直上の Stage にあたり、この Stage から水が落下して水槽に回収される。この Stage に循環水が当たる際に、Fan から強制的に風を送っている。この過程で、大気中の常在菌が循環水に懸濁されていくことで、LBR 内に大気中の常在菌が取り込まれる。実験に供したスラグは、緒言に記載した

Fig. 1 Overview of LBR.

溶銑予備処理スラグ 5-2 と転炉スラグ F である。図 1 中



にこれら 2 種類の外観を示しており、体積 5cm³程度のもを用いた。これらスラグ 2 種の組成は、表 1 のとおりである。

Table 1. Chemical compositions of slag used for this study [mass %]

	Total CaO	f-CaO	SiO ₂	Al ₂ O ₃	MgO
Slag 5-2	37.6	-	22.6	4.2	6.5
Slag F	52.2	15.9	14.1	3	2.8
	Fe	MnO	P ₂ O ₅	S	C/S
Slag 5-2	4.7	12	5.4	0.02	1.67
Slag F	12.2	4.3	2.9	-	3.71

-: not measured

2. 3. 2 スラグ表面バイオフィルムの TOC 測定

2. 3. 1 に示したとおりに LBR によってバイオフィルムを生成させたスラグは、次のとおりに処理を行い、TOC を測定した。純水 20 mL が入った遠沈管内にバイオフィルム生成スラグを入れ、2 分間ボルテックスミキサーで振動し、スラグ表面のバイオフィルムを純水中に剥離および懸濁させた。これを超音波ホモジナイザーで 5 分間の超音波破碎処理を行い、遠心分離 (5 分間, 4800rpm) した後の上

澄み液を試料として、TOC を測定した。

2. 3. 3 スラグ表面バイオフィルムの A3 測定

2. 3. 1 に示したとおりに LBR によってバイオフィルムを生成させたスラグは、次のとおりに処理して A3 測定を行った。純水 20 mL が入った遠沈管内にバイオフィルム生成スラグを入れ、2 分間ボルテックスミキサーで振動し、スラグ表面のバイオフィルムを純水中に剥離および懸濁させた。この上澄み液をミテスターによって測定した。

3. 結果と考察

3. 1 ガラス基板表面へのバイオフィルム生成量

25 mm 角のガラス基板表面にバイオフィルムの生成を試みたところ、培地濃度が高い試料ほどクリスタルバイオレットによってガラス基板表面のバイオフィルムが濃く染色される傾向であった。また、培地濃度が高いシャーレでは、培地濃度が低いシャーレと比較して、培地がより白濁していた。クリスタルバイオレット染色されたバイオフィルムガラス基板を各培地濃度 1 枚ずつ選択し、2. 2. 2 の手順に従いクリスタルバイオレットを溶出させたエタノールの 590nm 吸光度結果を図 2 に示した。この結果から、培地濃度が高い試料ほど、クリスタルバイオレットの吸光度が高いため、より多くのバイオフィルムが生成されていることが示された。また、2 倍希釈と 4 倍希釈の吸光度にほとんど差が認められなかったため、2 倍希釈試料においてはガラス基板上に生成されているバイオフィルムは飽和状態と示唆された。以上の結果から、培地濃度が濃い方が、実験系内における菌の生育が盛んであり、ガラス基板表面へのバイオフィルム量が多くなることが確認された。

本実験系におけるガラス基板表面へのバイオフィルムの定量方法として、2. 2. 2 に示した色計測機器を用いた測定 [10] について、結果を図 3 に示した。図 3 は、それぞれの試料の彩度と明度の相関をあらわしたものである。一般的に色が濃い場合、彩度の値は大きくなり、また明度の値は低くなる。同図より、培地濃度が濃い試料では、彩度値は大きく明度値は小さい関係、培地濃度が薄い試料では、彩度値は小さく明度値は大きい関係が示され、これらの関係をまとめると直線的な相関が得られることがわかった。以上の結果から、色計測器を用いて、ガラス基板上に生成されるバイオフィルム量の多い少ないを把握することが可能であることが示された。色計測器を用いることで、吸

光度測定よりも操作が簡便であり、迅速にバイオフィルム量の多い少ないを判定することが可能である。

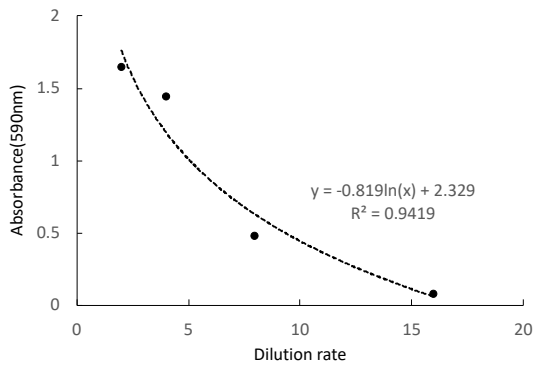


Fig. 2. 590nm absorbance of crystal violet detecting biofilm on glass substrate.

When the absorbance is high, it means that there are many biofilms stained with crystal violet. The higher the medium concentration is, the higher the absorbance is detected.

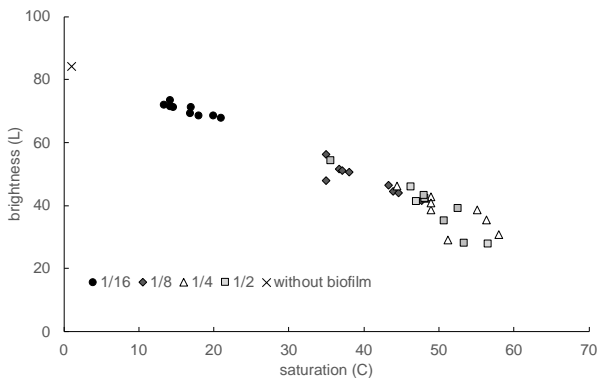


Fig. 3. Correlation between brightness and saturation of crystal violet-dyed glass substrate When measured with a color measuring instrument.

A glass substrate on which a large amount of biofilm is formed has low brightness and high saturation.

3.2 ガラス基板表面バイオフィルムの TOC 測定と A3 測定

図 4 にガラス基板表面に生成させたバイオフィルムを 2.2.3 に示した方法で処理した試料の TOC 分析結果を示した。3.1 で示した結果をふまえると、同図より培地濃度が濃い試料、つまりバイオフィルム生成量が多い試料において TOC 量が多く検出された。そして、この結果は、クリス

タルバイオレット染色法の結果 (図 2) と相関が高いことが示された。図 5 にガラス基板表面に生成させたバイオフィルムを 2.2.4 に示した方法で処理した試料の A3 測定分析結果を示した。図中の発光量 RLU は、ATP 類が試薬と反応して発光した際の発光強度を表す数値であり、この数値が高いほど測定試料に含まれる ATP 類が多いことを示しており、培地濃度と発光量の相関は、ほぼ比例関係であった。同結果より、3.1 で示した述べた結果をふまえると、試料中の培地濃度が濃いほど発光量が高い値を示しており、クリスタルバイオレット染色法の結果 (図 2) と相関が高い結果が示された。TOC 測定はバイオフィルム全体に対する定量方法であることに対し、A3 法は菌体のみに着目した定量方法である。A3 法による定量方法は、TOC 測定による定量方法を補助する関係にあると考えている。なお、A3 法の結果と TOC 測定の結果についてそれぞれについて相関性を比較した際、TOC 測定の方が培地濃度と TOC 結果の相関が低い (4 倍希釈と 8 倍希釈でほぼ同じ TOC 分析値となっている)。これは、実験条件の都合により、1 試料につき 1 回の分析しかできていないため、平均値を算出できておらず、誤差が大きくなったためと考えている。

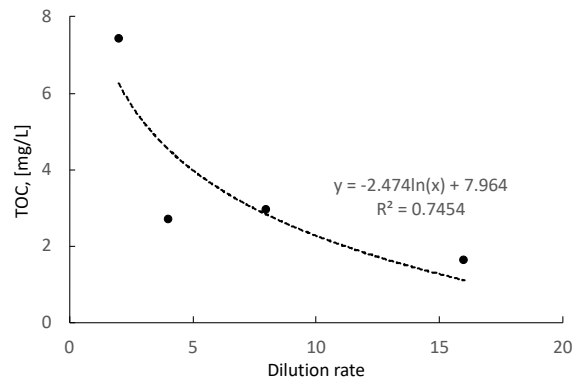


Fig. 4. TOC detecting biofilm on glass substrate. When the TOC is high, it means that there are many organic carbons in the biofilms. The higher the medium concentration is, the higher TOC is detected.

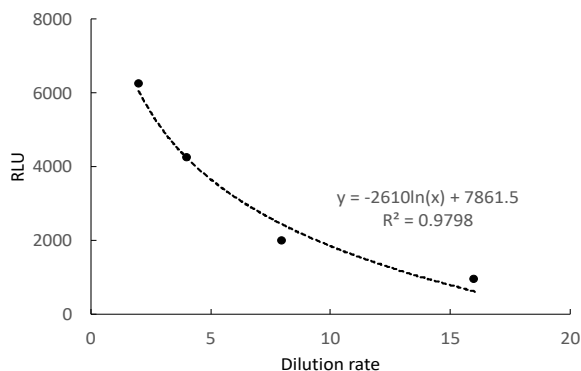


Fig. 5. RLU detecting biofilm on glass substrate. When the RLU is high, it means that there are many ATPs in the biofilms. The higher the medium concentration is, the higher the RLU is detected.

3.3 スラグ表面バイオフィームの TOC 測定と A3 法 測定結果

図 6 は、TOC 分析結果から算出した各スラグ上に生成したバイオフィームの有機炭素量である。この結果より、バイオフィームが生成されると有機炭素量が増加することが明らかとなり、TOC 分析によりバイオフィームの定量が可能であることが示された。なお、同図から、スラグ 5-2 上のバイオフィーム有機炭素量は、スラグ F 上のものより多かった。このことから、スラグ 5-2 の方がバイオフィームを生成しやすいと思われる。この理由は、スラグの塩基度に起因していると考えられる。具体的には、塩基度が高いと水中に浸漬させた際にスラグ表面近傍の pH が大きくなり、スラグ F の表面に付着した菌の活性が低下したため、スラグ F 上に生成のバイオフィーム量は減少したためと予想される。

図 7 は、A3 法により各スラグ上に生成されたバイオフィームにおける ATP 類の生物発光量の結果であり、バイオフィームが生成されると生物発光量が増加していた。図 6 と図 7 を比較すると、バイオフィーム生成によって、有機炭素量も生物発光量も増加していることから、両者には正の相関があると判断できる。ただし、有機炭素量はバイオフィーム全体に対する定量方法である一方で、A3 法は菌体のみに着目した定量方法である。よって、A3 法によるバイオフィーム定量方法は、有機炭素量によるバイオフィーム定量方法の補助的な位置づけであると考えている。

図 8 と図 9 は、スラグ 5-2 とスラグ F の表面に生成したバイオフィームを剥離および懸濁する際に適応する超

音波破碎の時間を 0 分、1 分、3 分、5 分と変化させた際の ATP 類生物発光量の測定結果である。

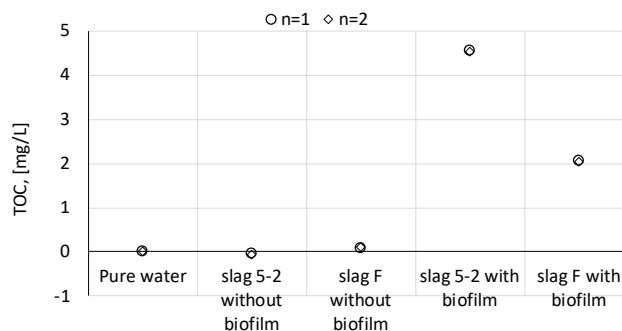


Fig. 6. Attempt to quantify biofilm on slag surface by TOC measurement.

Slag 5-2 with biofilm and slag F with biofilm are samples adapted for biofilm formation in LBR. In these samples TOC was detected, it was shown that a biofilm was formed on their surface. Since TOC is quantitative numerical values, it is possible to discuss numerically the number of biofilms.

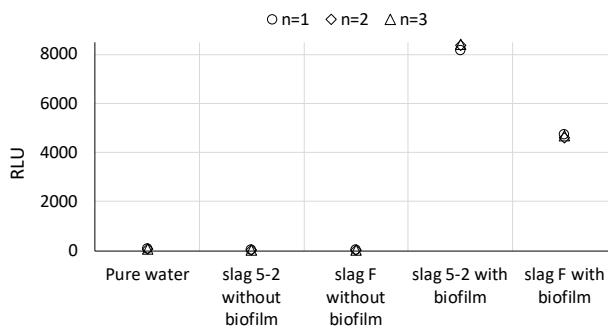


Fig. 7. Attempt to quantify biofilm on slag surface by A3 measurement.

Slag 5-2 with biofilm and slag F with biofilm are samples adapted for biofilm formation in LBR. In these samples RLU was detected, it was shown that a biofilm was formed on their surface. Since RLU are quantitative numerical values, it is possible to discuss numerically the number of biofilms.

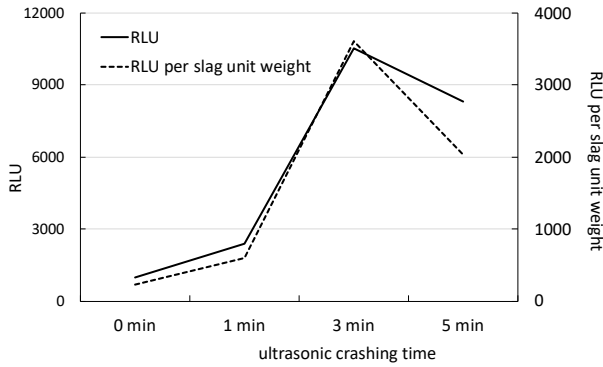


Fig. 8. RLU detection results of biofilm on slag 5-2 when crushing time was changed.

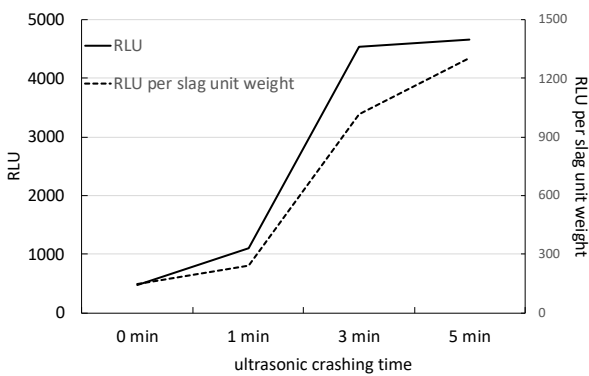


Fig. 9. RLU detection results of biofilm on slag F (b) when crushing time was changed.

RLU showed a tendency to increase until the crushing time was 3 minutes. However, the ultrasonic crushing treatment for 5 minutes did not show the increasing tendency of 0 to 3 minutes. From the viewpoint of operation, it is considered that ultrasonic crushing treatment for 5 minutes or longer is unnecessary.

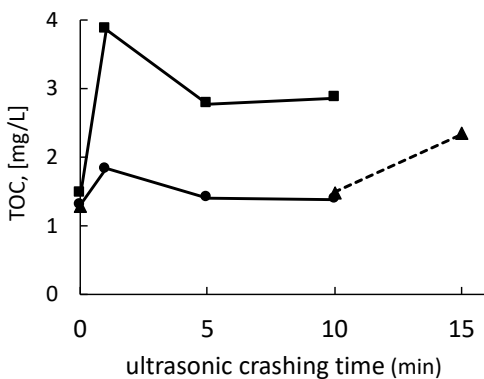


Fig. 10. TOC detection results of biofilm on porous material when crushing time was changed.

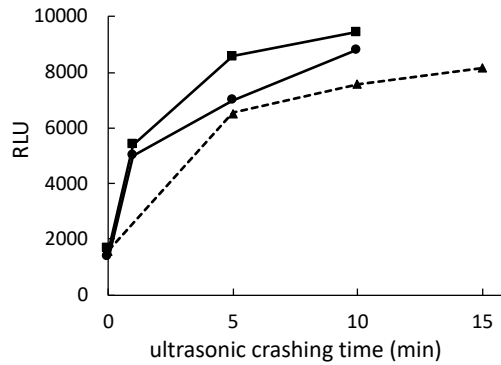


Fig. 11. RLU detection results of biofilm on porous material when crushing time was changed.

Both showed a tendency to increase until the crushing time was 1 minutes compared than 0 minutes. However, the ultrasonic crushing treatment for 5 minutes did not show the increasing tendency of 0 to 1 minutes. From the viewpoint of operation, it is considered that ultrasonic crushing treatment for 5 minutes or longer is unnecessary. ● and ■: ultrasonic crushing was 0, 1, 5 and 10minutes. ▲: ultrasonic crushing was 0, 5 10 and 15minutes. However, No TOC data for 5 minutes, because the measurement was not successful. RLU data is average of three measurements.

これらの結果から、超音波破碎時間を長くするほど、スラグ表面からバイオフィームが剥離および懸濁されていることが示唆される。しかし、図に示した同 A3 法の結果では、スラグ 5-2 において 5 分間超音波処理した試料は、同 3 分処理資料と比較して生物発光量が低下した。バイオフィームを生成させるために供しているスラグの大きさ、形状、表面積などの条件がスラグ 1 個ずつで異なり、実験の過程上、複数試料の準備と繰り返し測定が不可能であるため、3 分と 5 分における発光強度の優位差検定が行えず、5 分処理時の発光強度が低下していると判断することはできない。

2.3.1 に示した実験方法とは異なるが、多孔質素材に対して魚類飼育水槽、ろ過器、温度調節ヒーターからなる簡易式 LBR によって多孔質素材表面に対してバイオフィーム生成を試みた。そして、2.3.2 と 2.3.3 に示した手順に準じ、超音波処理を 0 分、1 分、5 分、10 分、15 分間適応して多孔質素材表面からバイオフィームを剥離および懸

濁した試料を作成した（今回は、A3 法においても超音波処理を行なっている点が、2.3.3 と異なっている点である）。これら試料の TOC 測定と A3 法測定結果は図 10 と図 11 のとおりであった。結果から、超音波破碎時間を 10 分まで伸ばしても TOC 濃度は時間に比例して増加傾向を示さなかった。A3 法では、5 分から 10 分の超音波処理における生物発光量の増加量は、0 分から 5 分の同量と比べて小さかった。

Table 2 The relationship between ultrasonic crashing time and Total Carbon (TC): Results of TOC analysis of lakes containing suspended components [11].

ultrasonic crashing time, [sec]	TC, [mg/L]	SD	CV, [%]
10	13.6	0.56	4.1
15	13.4	0.26	1.99
20	13.4	0.23	1.74
25	13.2	0.23	1.78

n=3

Table 3 The relationship between ultrasonic crashing time and Total Carbon (TC): Results of TOC analysis of wastewater containing suspended components [12].

ultrasonic crashing time, [min]	TC, [mg/L]	SD	CV, [%]
0	1.25	0.09	7.0
1	1.57	0.03	2.2
5	1.57	0.11	2.2
10	1.53	0.20	1.8
20	1.55	0.11	1.0

n=8

表 2 と表 3 に示した福田ら [10] や合田ら [11] の研究報告によると、懸濁成分を含む試料に対して超音波処理の破碎時間を変化させても検出される TOC 量の差は認められない。以上の見解から、測定にかかる時間の短縮もふまえると、スラグ表面のバイオフィルムを剥離させるための超音波処理の最適時間は 5 分で十分であると考えられる。

4. 結論

本研究では、スラグ系環境改善資材表面に生成されるバイオフィルムの定量を目指して、ガラス基板表面やスラグ表面に生成されたバイオフィルムの定量方法とその有効性について検討した。以下に得られた成果をまとめて示す。

- (1) ガラス基板表面に生成されるバイオフィルム量が多いほど、ATP 類の生物発光量、検出される TOC 量ともに大きくなることから、バイオフィルム量と

ATP 類、バイオフィルム量と TOC 量には、相関性が認められる。

- (2) ガラス基板表面のバイオフィルム生成量の多少は、色計測器を用いて評価することができる。この方法は、吸光度計を用いないため、簡易的に評価できる利点を有する。
- (3) 塩基度が高いスラグの表面に生成されるバイオフィルム量は少なくなる。これは、水中に浸漬させた際にスラグ表面近傍の pH が大きくなり、スラグ F の表面に付着した菌の活性が低下するためである。
- (4) スラグ表面に生成されるバイオフィルム量の多少について、ATP 類の生物発光量と TOC 量から評価することが可能である。なお、有機炭素量はバイオフィルム全体に対する定量方法である一方で、A3 法は菌体のみに着目した定量方法である。よって、A3 法によるバイオフィルム定量方法は、有機炭素量によるバイオフィルム定量方法の補助的な位置づけとする。
- (5) スラグ表面からバイオフィルムを剥離させるための超音波処理時間は 5 分で十分であり、5 分以上処理を行っても ATP 類発光強度や TOC 量の大幅な増加は認められない。なお、測定に必要な時間の観点からも 5 分以上の超音波処理は不要と考えられる。

謝辞

本研究は、日本鉄鋼協会研究会 I 評価・分析・解析部会「バイオフィルム被覆によるスラグ 新機能創出 (2017-2019)」および JSPS 科研費 JP16K06819, JP20K05185 等の支援を受けて実施された。

文献

- 1) 鉄鋼スラグスラグ協会、鉄鋼スラグ統計年報、2-10 (2019)
- 2) 環境省、報道発表資料、産業廃棄物処理施設の設置、産業廃棄物処理業の許可等に関する状況、2020 年 6 月 2 日、<http://www.env.go.jp/press/107913.html>, (最終確認日 2021 年 3 月 29 日)。
- 3) 宮田康人、林明夫、桑山道弘、山本民次、谷敷多穂、卜部憲登、製鋼スラグによる底泥中硫化水素抑制の実海域試験、鉄と鋼、100 (11)、pp.1426-1432 (2014)
- 4) 山本光夫、浜砂信之、福嶋正巳、沖田伸介、堀家茂一、

- 木曾英滋、渋谷正信、定方正毅、スラグと腐植物質による磯焼け回復技術に関する研究、日本エネルギー学会誌、85 (25)、pp. 971-978 (2006)
- 5) 植木知佳、加藤敏朗、三木理、ノリの生育に対するスラグ系施肥材の効果実証実験、海洋理工学会誌、17 (1)、pp. 49-55 (2011)
- 6) 加藤敏朗、小杉知佳、木曾英滋、スラグ資材の海域適用時の影響評価、新日鉄住金技報、399、pp. 85-89 (2014)
- 7) 兼松秀行、生貝初、黒田大介、平井信充、バイオフィームその工業利用、pp. 13-20、米田出版 (2015)
- 8) 森川正章、生物工学基礎講座 バイオよもやま話 バイオフィームを調べてみよう、生物工学会誌、pp. 246-250 (2012)
- 9) 兼松秀行、生貝初、吉武道子、HACCP 対応抗菌エコープレートとバイオフィーム、ふえらむ、13、pp. 27-34 (2008)
- 10) H. Kanematsu, R. Nakagawa, K. Sano, D. Barry, A. Ogawa, N. Hirai, D. Kuroda, N. Wada, S. Lee and Y. Mizunoue. Graphene-dispersed silane compound used as a coating to sense immunity from biofilm formation. *Medical Devices and Sensors*. 2019;2:e10043 (<https://doi.org/10.1002/mds3.10043>)
- 11) 福田明彦、南條吉之、平尾優年、九鬼貴弘、湖沼のTOC 分析結果について、鳥取県衛生環境研究所報、35、pp61-65 (1995)
- 12) 合田悟、千葉真弘、泉敏彦、伊藤八十男、燃焼酸化赤外線分析法による水中の全有機炭素 (TOC) 分析法の検討、北海道立衛生研究所報、54、pp47-49 (2004)