

阻碍群体感应的新型生物膜抑制剂

A novel biofilm control agent that inhibits quorum sensing

星光 PMC 株式会社
制纸用药品事业部 五十岚 亮二
久保 武

1. 序言

众所周知，在工业区、生活区、医疗环境等含水环境为微生物提供了生长的温床，微生物在其中增殖并形成生物膜（BF）¹⁾。BF 是由细菌的集合体及其产生的多糖等代谢物组成的粘性膜状沉积物，会出现在各种固体表面，譬如水槽、浴室、厕所、排水管、医疗器械、反渗透膜（RO 膜）、化学品储罐和冷却塔。这些不仅会引起人类生理上的不适，还会造成各种巨额经济损失和卫生危害，譬如金属部件腐蚀、生产率降低、产品污染、恶臭污染和传染病等。据统计，美国每年因 BF 相关的金属腐蚀所造成的经济损失约为 1.1 万亿美元（2016, NACE International Institute 数据），这个问题已成为各个不同领域的一个关键问题。

BF 不同于浮游细菌，不受杀菌剂等化学药剂和物理清洁的影响，不易防除，缺乏根本性解决方案。传统的杀菌方式包括“用杀菌剂杀菌”和“通过清洗去除细菌”²⁾，但效果都不明显，且当杀菌剂的使用量受限或物理清洁不到位时，BF 就更容易产生。有一种可能解决上述问题的方法就是“抑制 BF 本身的形成”。近年的研究表明，BF 的形成是根据细菌之间的化学物质交换，即群体感应(QS)的信号转导³⁾，并且已经进行了许多尝试，通过以各种方式阻碍或扰乱 QS，从生理功能上抑制 BF 形成⁴⁾⁵⁾。

虽然有很多已知的阻碍 QS 的物质，但还都尚未投入实际使用，因为其中许多是在成本和稳定性方面不易操作的生物物质以及不易大规模生产的合成化合物。在这种环境下，我们公司从基础阶段进行开发，包括筛选有效物质，并率先推出了新型化学药剂（生物膜抑制剂，即 BFC 剂），将 QS 阻碍技术提升到了实用水平。在本文中，我们在概述 BFC 剂的同时也向大家介绍其在各种不同用途中的实证事例。

2. 生物膜抑制剂概要

2-1. BFC 剂的概要与特长

BFC 剂与依赖杀菌效果的常规药剂不同，能通过生理机制抑制生物膜形成。具体而言，BFC 剂是通过阻碍 QS 信号分子的生成来抑制 BF 的形成，能在弥补传统杀菌剂的缺点的同时抑制 BF 的沉积。QS 是指细菌之间通过信号转导的一种生理功能，当形成 BF 的细菌达到一定密度，QS 信号分子浓度达到阈值时，就能触发 BF 的形成。所以，通过使用 BFC 剂，即使在正常形成 BF 的环境中，系统中存在的细菌也不会促进 BF 的形成，并保持分散状态容易经水流排出（见图 1）。

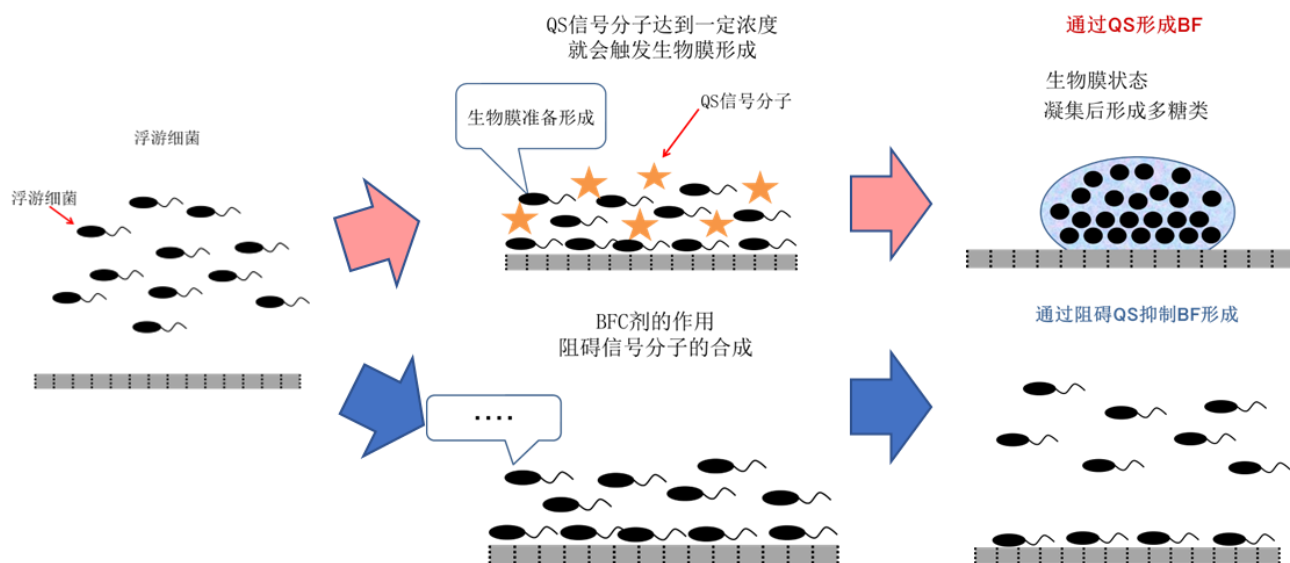


图 1. BF 形成与抑制机理（上列：未处理，下列：BFC 剂处理）

基于上述设计开发的 BFC 剂的概要如下表 1 所示。BR-109 是一种只含有阻碍 QS 成分的产品，适用于表面活性剂使用受限以及与各种现有药剂并用的用途。BR-110 是一种含有对 BF 有较高渗透与剥离效果的表面活性剂，采用了抑制 BF 形成和去除效果的双重设计。与现有杀菌剂相比，这两只产品均具有对人体安全性更高、成分非氧化、不损伤部件、pH 范围广等特点。

表 1. BFC 剂概要

产品名	有效成分	效果
BR-109	芳香氮化合物 芳香醇	BF 抑制
BR-110	芳香氮化合物 芳香醇 界面活性剂	BF 抑制 BF 去除

2-2. BFC 剂对 QS 的阻碍效果

绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 是一种 BF 形成菌，它会出现在不同环境中形成的 BF 不易清除。这种细菌会在 QS 被激活形成 BF 时分泌一种叫做绿脓菌素的绿色色素⁶⁾，可用作监测对 QS 的阻碍效果和 BF 的形成状态，也能用作评价 BF 用的菌种（见图 2）。能通过氯仿提取并测量 520nm 处的吸光度来定量分泌到液体中的绿脓菌素浓度（见图 3）。在本研究中，我们以绿脓菌素的生成率，

即，细胞中的绿脓菌素浓度来评价对 QS 的阻碍效果。如表 2 所示，通过 BFC 剂处理，明显降低了绿脓菌素的生成率，这证实了对阻碍 QS 起到了作用。此外，以浊度 (OD_{630}) 表示的培养液的细胞密度未下降，这证明抑制 BF 的形成在于通过阻碍 QS 而产生的生理状态变化，而不在于抑菌或杀菌效果。

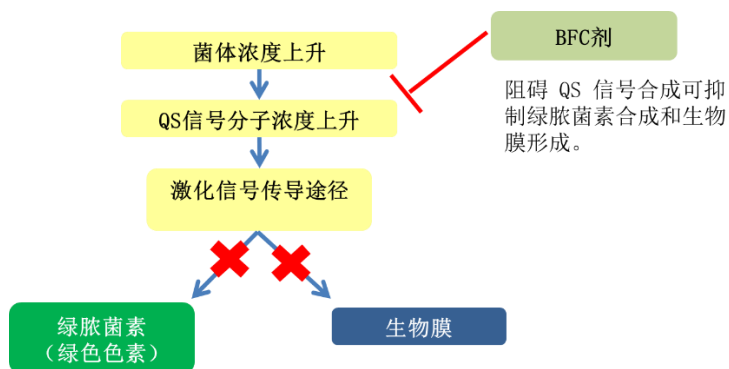


图 2. 绿脓杆菌的群体感应

表 2. 绿脓菌素生成率

	未处理	BFC 剂
绿脓菌素生成率*	100 %	1.2 %
浊度 (OD_{630})	1.8	1.6

*未处理浓度为 100% 的相对值



图 3. 绿脓菌素含量比较

2-3. 生物膜形成的抑制与去除试验

我们采用聚苯乙烯多孔板，对 BFC 剂的 BF 形成抑制和去除效果进行了试验，试验结果如表 3 所示。BF 抑制效果试验是通过使用 12 孔板，在添加 BR-110 的培养基中培养绿脓杆菌，与未添加系列比较器壁上的 BF 量（见表 3-1）。BF 去除效果试验是通过在器壁上预先形成的 BF 中添加 BR-110，在 BF 剥离后，与未添加系列比较器壁上残留的 BF 量（见表 3-2）。两次试验中，均将多孔板壁上形成的 BF 用结晶紫染色，测定用乙醇洗脱的液体在 595nm 处的吸光度来计算 BF 的形成率和残留率。其结果显示，添加 BFC 剂后，BF 生成率为 12% (BF 生成抑制率为 88%)，BF 残留率为 23% (BF 去除率为 77%)。培养基浊度 (OD₆₃₀)，即，浮游细菌密度的检测显示，添加和未添加 BR-110 的结果几乎无差异，这表明 BR-110 的作用发挥不依赖抑菌或杀菌性。因此，通过

预先添加 BR-110，不仅可以抑制 BF 的形成，还能去除已形成的 BF。

同时，我们确认了 BFC 剂对多种主要菌株的 BF 抑制效果（见表 4）。这表明 BFC 剂具有跨领域水平的 QS 抑制作用，这也意味着 BFC 剂在更多领域中具有应用潜力。

表 3-1. BF 抑制试验

	未添加	BR-110 (0.35 %)
BF 形成量 (吸光度 595 nm)	5.9	0.7
BF 形成率	100 %	12 %
浊度 (OD ₆₃₀)	1.7	1.5

表 3-2. BF 去除试验

	未添加	BR-110 (0.35 %)
BF 残存量 (吸光度 595 nm)	6.9	1.6
BF 残存率	100 %	23 %

表 4. 具有 BF 抑制效果的菌种

菌种	高等分类 (门)	革兰氏染色	主要分布场所
<i>Brevundimonas diminuta</i>	Alpha proteobacteria	阴性	水系统、土壤、临床
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Gamma proteobacteria	阴性	水系统、土壤、临床
<i>Klebsiella sp</i>	Gamma proteobacteria	阴性	水系统、临床
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gamma proteobacteria	阴性	水系统、土壤、临床
<i>Shewanella algae</i>	Gamma proteobacteria	阴性	海洋、临床
<i>Vibrio harveyi</i>	Gamma proteobacteria	阴性	海洋、临床
<i>Chryseobacterium sp</i>	Bacteroidetes	阴性	水系统、土壤、临床
<i>Microbacterium hominis</i>	Actinobacteria	阳性	临床
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Firmicutes	阳性	临床

2-4. BF 抑制效果的共焦显微镜可视化

为了 BF 抑制效果的可视化,我们利用共焦显微镜对 RO 膜表面上的 BF 经时变化进行了观察(见图 4)。首先,我们将 RO 膜浸泡在 BFC 剂中一段时间,使其有效成分被吸附到膜表面,然后使用共焦显微镜在一定时间内观察 BF 的形成状况。RO 膜表面的绿脓杆菌通过绿色荧光显示,未经 BFC 剂处理的系列在经过 17 小时后, BF 明显增厚,而经过 BFC 剂处理的系列,在膜表面的附着量虽有所增加,但 BF 的垂直生长明显受到抑制。这说明通过阻碍 QS,减少了生物膜主要成分的胞外多糖的合成。试验结果表明 BFC 剂处理后的 BF 抑制效果达到 90%。

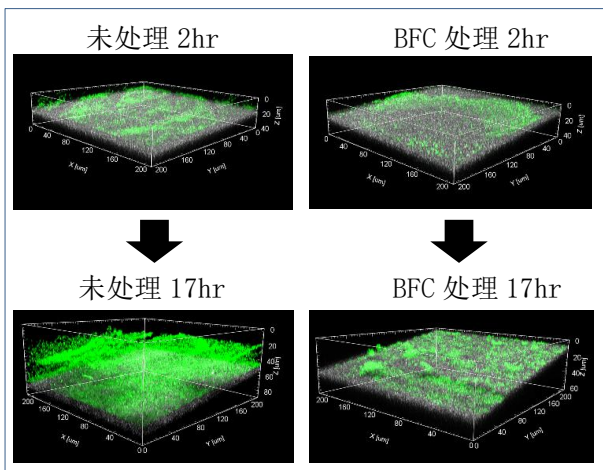


图 4. 共焦显微镜下的 RO 膜上形成的 BF

3. 抑制 RO 膜上的 BF 形成

RO 膜被用于工业高纯度水的精制、海水淡化和废水回收等水处理设备中,是全球范围确保水资源的关键技术。然而,在过滤膜上形成的 BF 会导致处理效率下降,这种现象被称为“生物污垢”,在目前解决这种问题的方法相对匮乏。譬如,通常使用的次氯酸盐杀菌剂会导致 RO 膜劣化,因此不能使用在一般的 RO 膜上,而有机类杀菌剂的安全性却不高。相对这些问题,BFC 剂能够在抑制 BF 形成的同时解决对 RO 膜的损坏问题和安全性问题。

在研究中,我们通过利用因 BF 形成在短时间内产生的膜阻塞的实机 RO 膜装置对 BFC 剂的效果(RO

膜阻塞抑制)进行了验证。我们将 RO 膜入口压力上升作为膜阻塞的指标,并定期进行 BFC 剂处理,然后追踪 RO 入口压力达到阻塞指标 0.8 MPa 以上的活动过程(见图 5)。水处理过程中采用螺旋型 RO 膜,采用地下水供水(见表 5)。为提高 BF 形成的抑制效果,在造水运行之前,首先对备用的 RO 膜进行预处理,通入 3.5%浓度的 BR-110 溶液,并静置 3 小时使有效成分吸附在膜表面后开始水处理。

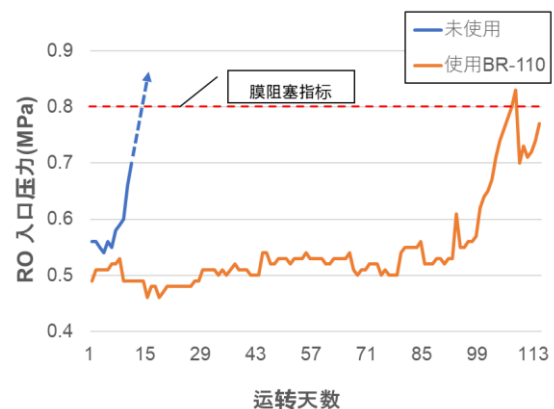


图 5. 使用 RO 膜设备的 BF 抑制试验

表 5. 使用 BFC 剂的 RO 膜设备的运行条件

供水	地下水
流量	(供水) 9300 L/hr、(处理水) 6000 L/hr
BFC 剂处理	(预处理)
	向备用 RO 膜中通入 BR-110, 3.5%静置 3 小时
	(定期处理)
	BR-110 每周 1 次通入 0.35%, 浸泡 1 小时

水处理开始后,每周一次停止运行进行定期处理,通入 0.35 %浓度的 BR-110 到 RO 膜后静置 1 小时。结果显示,使用 BR-110 的比未使用的能延长膜阻塞产生的时间约 7 倍。

本研究的结果表明,BFC 剂可以抑制实机 RO 膜设备的膜阻塞。特别是通过化学品投入过程的自动化能明显降低成本提高效率。

4. 抑制化学品储罐的 BF 形成

工业用化学品的稀释槽内部因 BF 形成产生了诸多问题。譬如，切削油和脱模剂在稀释槽内经时后会产生 BF，导致化学品性能变差，可回收性变差，产生气味，堵塞流路，从而影响综合成本。然而能解决这些问题的方法并不多，因为从安全角度考虑，有机类杀菌剂的使用量有限，更不能使用反应性的氧化类杀菌剂。

在本研究中，我们在预先添加了 20ppm 有机杀菌剂的水性乳液罐中添加 BR-109，以 100ppm 进行混合，然后对 BF 形成的抑制效果进行评价。结果显示，在仅含有机杀菌剂的槽中，2 周内整个内壁就形成了可见的 BF，而混合了 BR-109 的槽中 3 周后还保持清洁状态（见图 6）。通常，杀菌剂即使在相对较低浓度下也能抑制悬浮细菌，但随着 BF 的形成，其杀菌效果会明显下降。从试验中得知 BR-109 既能抑制储罐中 BF 形成的同时，还能发挥杀菌剂原有的杀菌效果。试验表明 BFC 剂在解决各种化学品储罐的储存问题的同时，还能通过杀菌剂的减量使用改善环境和安全性问题。

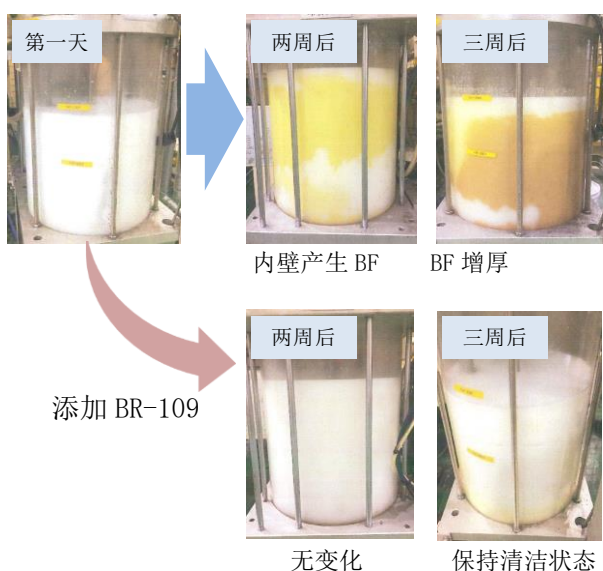


图 6. 抑制水性乳液储罐中 BF 形成

5. BFC 剂用于涂布

近年来，抗菌制品技术协议会一直致力于将抗生物膜作为继抗菌、防霉和抗病毒之后的新认证体系⁷⁾。对具有抗生物膜性能的材料和长期提供类似性能的涂层的需求很大，我们旨将 BFC 剂应用于，譬如，空调内部和家庭用水周围的部件等，能影响到设备性能和卫生且不易日常清洁的用途中。

使用涂有含 BR-109 的试验片的 BF 生成抑制试验如图 7 所示。使试片与菌液接触形成 BF 后，用结晶紫染色并定量，结果显示用 BFC 剂涂布的试验片比未涂布的能有效抑制 84% 的 BF 形成。相比用于液体制剂，作为涂布剂使用，能有效成分集中在目标

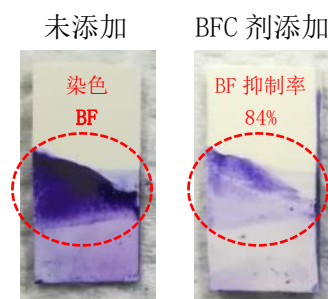


图 7. BFC 剂涂布的试验片的 BF 抑制效果

材料表面上，具有少量使用就能发挥效果的优势。在效果持久性的需求这方面，我们将继续通过示范测试致力于产品性能改良。

6. 结语

本文介绍了 BFC 剂以及其应用实例。它不同于杀菌剂，能通过新机理抑制 BF 的形成。BFC 剂的市场也多种多样，除了本文介绍的水处理膜、化学品储罐、涂布剂之外，用于冷却塔、医疗设备清洗等其他用途的试验也在进行中。生物膜形成问题在水质差、环境管理不充分的地区更为严重，因此相比日本，海外的市场应该更大，具有更大的成长空间。我们将继续与顾客共享有关信息，未来，我们希望能广泛推广 BFC 剂，以便解决水资源、能源和环境卫生等问题。

<参考文献>

- 1) 冈部聡: 从生物膜的理解和控制到共存, 日本海水学会杂志, 第 66 卷, 第 4 号, p191~197, (2012) .
- 2) K.Sauer: 消灭生物膜, 日经科学, 3 月号, p68~73, (2018) .
- 3) M. Juhas, L. Eberli, B. Tummli :Quorum sensing:the power of cooperation in the world of Pseudomonas. *Appl. Env. Microbiol.*, 7, 4, 459~471, (2005) .
- 4) 寺田昭彦, 高桥惠理加, 片山美怜, 细见正明: 水和废水处理领域的抑制生物膜形成材料的进展, 环境生物技术杂志, 第 14 卷, 第 2 号, 131~137, (2015) .
- 5) 池田宰, 诸星知宏: 基于 Quorum Sensing 抑制的生物膜形成抑制, 环境生物技术杂志, 第 10 卷, 第 1 号, 15~18, (2010) .
- 6) Y Dessaux, E Chappelle, D Faure : Quorum Sensing and Quorum Quenching in Soil Ecosystems. *Biocommunication in Soil Microorganisms*, p339~367, (2011) .
- 7) 中津川直树: 建立抗生物膜加工品认证体系, 表面技术, 第 72 卷, 5 号 (2021) .

研究员简介



星光 PMC 株式会社
制纸用药品事业部
技术统括部
市原研究所
科长 五十嵐 亮二
(Ryoji Igarashi)



星光 PMC 株式会社
制纸用药品事业部
技术统括部
市原研究所
主任 久保 武
(Takeshi Kubo)