

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651082

研究課題名(和文)コロイド科学的技法を用いた硝化・脱窒菌積層型バイオフィルムの設計

研究課題名(英文) Design of composite biofilm of denitrifying bacteria and nitrifying bacteria using colloidal technique

研究代表者

野村 俊之 (Nomura, Toshiyuki)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00285305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：コロイド科学の観点から、自然界のバイオフィルムを模倣した硝化菌と脱窒菌の複合バイオフィルムの人為的設計を試みた結果、次のような結論を得た。硝化菌と脱窒菌は熱力学的に共凝集しないことが分かった。自発的に凝集しない硝化菌と脱窒菌を人為的に共凝集させるには、ポリドーパミンが有効であることが分かった。さらに、ポリドーパミンを用いることで、硝化菌と脱窒菌の複合バイオフィルムの形成に成功した。

研究成果の概要(英文)：From the viewpoint of colloid science and technology, we were attempted to design a composite biofilm of the denitrifying bacteria and nitrifying bacteria that imitate a biofilm in the nature. As a result, it was found that the denitrifying bacteria and nitrifying bacteria could not be co-aggregated thermodynamically. The polydopamine was effective to promote the co-aggregation of the denitrifying bacteria and nitrifying bacteria artificially. Finally, the composite biofilm of the denitrifying bacteria and nitrifying bacteria was successfully formed using polydopamine.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：バイオフィルム 生物学的脱窒法 バイオコロイド

1. 研究開始当初の背景

微生物を利用して富栄養化の原因となる窒素源を処理する方法は、物理化学的手法と比べて運転コストが低いため、廃水処理施設で広く利用されている。この生物学的脱窒法では、硝化と脱窒の2工程によりアンモニア態窒素を無害な窒素に変換する。しかし、硝化反応では好気的環境、脱窒反応では嫌気的環境が要求されるため、必然的に2つの反応槽が必要となってしまう。研究代表者は、1) 硝化反応において、アンモニア態窒素を亜硝酸イオンに酸化するアンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas europaea* と、亜硝酸イオンを硝酸イオンに酸化する亜硝酸酸化細菌 *Nitrobacter winogradskyi* の2つの菌の混合液に、硝化槽から単離した *Bacillus* 属の菌株を添加すると、そのままでは凝集しない硝化菌が凝集し、処理効率が向上することを発見した。2) 嫌気発酵槽からコロイド科学的に付着性の高い水素生成菌を単離し、固定化担体上にバイオフィームを形成させることで水素発酵の高効率化に成功している。

環境中に形成されるバイオフィーム下部層は、その上層部で酸素が消費されるため嫌気的環境になっていることが知られている。この自然界のバイオフィームに学び、著者らの研究成果を融合・発展させると、『固定化担体上に脱窒菌のバイオフィーム、その上層に好気的環境を要求する硝化菌のバイオフィームを形成させると、酸素は上部層の硝化菌により消費され、下部層では脱窒菌が生育しやすい嫌気的環境となり、同じバイオフィーム内で異なる生育環境を創出することができ、別々の処理槽で行うしかなかった処理を単一槽で実現できる』と考えたのが本研究の着想に至った経緯である。

2. 研究の目的

微生物を用いたバイオプロセスは、従来の化学プロセスでは困難な反応が可能である一方、反応容積当たりの処理速度が遅いため、実用化プロセスの構築は容易ではない。それを解決する方法として、微生物を担体上に付着させてバイオフィームを形成することで高密度化することが有効な手段の一つとして挙げられる。

一般家庭や工場などから排出される廃水には、アンモニア、硝酸、亜硝酸、有機体窒素の形態で窒素が含有されており、河川、湖沼、内海における富栄養化の原因となっている。微生物を利用して富栄養化の原因となる窒素源を処理する方法は、物理化学的手法と比べて運転コストが低いため、廃水処理施設で広く利用されている。生物学的脱窒法では、硝化と脱窒の2工程によりアンモニア態窒素を無害な窒素に変換する。しかし、硝化反応では好気的環境、脱窒反応では嫌気的環境が

要求されるため、必然的に2つの反応槽が必要となる。一方、自然界に形成されるバイオフィームの上部層は好気状態、下部層は嫌気状態となっている。これは、一つのバイオフィーム内に異なる環境を創出できることを意味している。

そこで本研究では、コロイド科学の技法を駆使することで、自然界のバイオフィームを模倣した硝化菌と脱窒菌の複合バイオフィームの人為的設計を試みた。

3. 研究の方法

(1) 実験に用いた微生物

実験に用いた脱窒菌 (DNB) は、*Pseudomonas denitrificans* NBRC 13302 株、*Paracoccus denitrificans* NBRC 102528 株、*Bacillus firmus* NBRC 15306 株、*Alcaligenes sp.* NBRC 100442 株、*Pseudomonas fluorescens* NBRC 14160 株の5種類、硝化菌は、*Nitrosomonas europaea* NBRC 14298 株 (AOB)、*Nitrobacter winogradskyi* NBRC14297 株 (NOB) の2種類である。脱窒菌は702培地 (ポリペプトン 10 g/L、酵母エキス 2 g/L、MgSO₄ · 7H₂O 1 g/L) を用いて30℃にて24時間振とう培養した。硝化菌は829培地 (MgSO₄ · 7H₂O 0.1 g/L、KH₂PO₄ 0.5 g/L、NaHCO₃ 0.5 g/L、(NH₄)₂SO₄ 2.5 g/L、HEPES 11.92 g/L、Fe-EDTA 0.075 g/L、CaCl₂ · 2H₂O 0.005 g/L) を用いて28℃にて14日間静置培養した。前培養した菌体は、生理食塩水で洗浄後、所定の水溶液中に分散させてから実験に用いた。

(2) 表面性状評価

微生物の表面電位は、分散媒のイオン強度を変えて電気泳動移動度を測定し、柔らかい粒子モデルから見積もった。また、微生物の表面張力は、メンブレンフィルター上に集菌させた菌体層に極性の異なる純水、ホルムアミド、 α -ブロモナフタレンの液滴をそれぞれ滴下したときの菌体層上に形成される接触角を測定し、Young-Dupréの式から見積もった。さらに、この実測値から、微生物が界面に付着したときのGibbs自由エネルギー変化 ΔG を見積もり、微生物のコロイド的な挙動について推測した。

(3) 硝化菌と脱窒菌の共凝集

脱窒菌懸濁液 (1.5×10^8 cells/mL) 0.25 mL、硝化菌懸濁液 (1.5×10^8 cells/mL) 0.25 mL、およびこれらの微生物の凝集を促進させるための第三成分を添加して所定の濃度に調製した液0.5 mLを、1.5 mL容のマイクロチューブに加え、ダググローターを用いて室温下で1時間混合した。その後、共焦点レーザー顕微鏡 CLSM (オリンパス FV-1000D) を用いて、混合液中の微生物群を観察した。なお、微生物の生死を判別するために、細胞膜透過性 SYTO 9 により全菌体、細胞膜非透過性

Propidium iodide (PI) により死菌を蛍光染色した。さらに、FISH 法により菌叢解析を行った。混合液は PBS 緩衝液で洗浄後、パラホルムアルデヒドで固定し、ゼラチンコーティングしたガラス基板に定着させた。これに、DNA プローブ溶液を添加して 46°C で 4 時間ハイブリダイゼーションを行い、細胞膜透過性の 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) により全菌体を蛍光染色した。また、16SrRNA 標的 FISH に用いたオリゴヌクレオチドプローブは、*Pseudomonas* 属に特異的な PSE1284 (GATCCGGACTACGATCGGTTT) で 5'末端に蛍光色素 Cy5 を修飾したものをを用いた。

(4) 硝化菌と脱窒菌のバイオフィーム形成
ガラスボトムディッシュに脱窒菌懸濁液 0.1 mL を滴下して 15 分間静置後、洗浄により浮遊菌体を除去した。次に、702 培地 2 mL を添加し、ガラス表面に付着した菌体を 30°C で 24 時間、静置培養して脱窒菌のバイオフィームを形成後、洗浄により浮遊菌体と代謝物を除去した。さらに、硝化菌懸濁液とドーパミン溶液の混合液 0.2 mL を添加して 30 分間静置静置した。洗浄によりドーパミンと浮遊菌体を除去してから、酵母エキス 0.5 g/L を含む 829 培地 1.5 mL を添加して 30°C で 7 日間静置培養した。形成された複合バイオフィームは、FISH 法により菌叢解析を行った。

4. 研究成果

(1) 微生物の付着特性の評価

まず、電気泳動移動度の測定結果より、脱窒菌と硝化菌の細胞表面はいずれも負に帯電していることが分かった。次に、接触角の測定の実測値から推算した脱窒菌と硝化菌の表面張力を用いて、菌体が界面に付着したときの自由エネルギー変化 ΔG を求めた結果を Table 1 に示す。硝化菌同士、脱窒菌同士の自己凝集、硝化菌と脱窒菌の共凝集における ΔG は、いずれの場合も正の値となり、熱力学的に菌体の付着は起こり難いことが分かった。これらの結果より、硝化菌と脱窒菌は自発的に凝集し難いことが明らかとなった。したがって、硝化菌と脱窒菌の複合バイオフィームを形成するには、細胞に無害な第 3 物質を用いて菌体の付着を促進させる必要があることが分かった。

以上より、高分子架橋が期待できる細胞破砕液と、細胞の表面は負に帯電していることから、アミノ基を備えたカチオン系凝集剤の

Table 1 Change in free energy of interaction, ΔG^* .

Cell	Self-aggregate	AOB	NOB
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	17.1	9.9	8.6
<i>Paracoccus denitrificans</i>	8.9	10.6	8.5
<i>Bacillus firmus</i>	25.8	22.6	21.4
<i>Alcaligenes sp.</i>	25.8	24.5	24.0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4.1	7.7	5.5
<i>N. europaea</i> (AOB)	13.4	13.4	10.4
<i>N. winogradskyi</i> (NOB)	9.2	10.4	9.2

* [mJ/m²]

キトサン、アミノ基を備えた非脂質性ポリカチオンのポリエチレンイミン PEI、カテコールとアミノ基を備えたポリマーのドーパミンを第 3 成分として選定した。

(2) 硝化菌と脱窒菌の共凝集

ガラスビーズで脱窒菌の細胞破砕し、それぞれ同種の脱窒菌懸濁液に添加して 1 時間攪拌後の画像を Fig.1 に示す。*P. fluorescens* の細胞破砕液を添加すると約 30 μm の凝集体が確認されたが、その他の細胞破砕液では 24 時間攪拌しても顕著な凝集体は形成されなかった。これより、*P. fluorescens* の細胞破砕液が菌体の凝集を促進する効果が高いことが分かった。

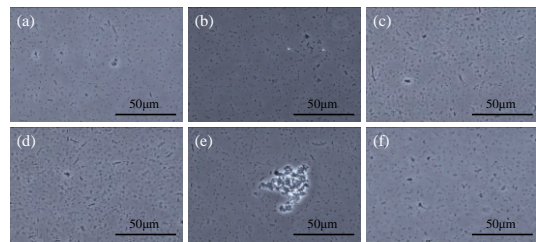


Fig.1 Optical images of microbial cells exposed to disrupted cell suspension. (a) *Pseudomonas denitrificans*, (b) *Paracoccus denitrificans*, (c) *B. firmus*, (d) *Alcaligenes sp.*, (e) *P. fluorescens*, (f) *N. europaea*.

次に、脱窒菌と硝化菌の混合懸濁液に *P. fluorescens* の細胞破砕液の濃度を変化させて添加したときの CLSM 像を Fig.2 に示す。細胞破砕液の濃度は、破砕前の菌体懸濁液の菌体数換算で生菌数に対して 2、10、20 倍とした。細胞破砕液濃度が 2 倍の条件では、約 10 μm の凝集体が形成された。濃度を 10 倍にすると、肉眼でも確認できる 50 μm 以上の凝集体が形成された。しかし、濃度を 20 倍にしても凝集体の大きさは変わらず、凝集体の形成速度が速くなることもなかった。これは、濃度が増加すると混合液の粘性も増加したためと推察される。以上より、*P. fluorescens* の細胞破砕液の濃度は菌体数換算で生菌数の 10 倍とした。

次に、アミノ基を備えた第 3 物質として、キトサン、PEI、ドーパミンを加えて脱窒菌と硝化菌を共凝集させたときの CLSM 像を Fig.3 に示す。キトサンと PEI を添加した場合、

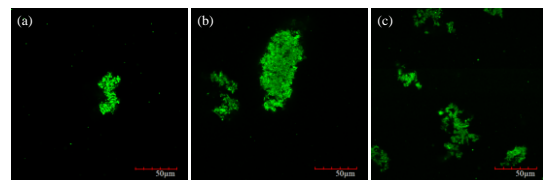


Fig.2 CLSM images of *P. fluorescens* and *N. europaea* exposed to disrupted *P. fluorescens* suspension. The cell number ratio of living cells and disrupted cells is (a) 2, (b) 10, (c) 20.

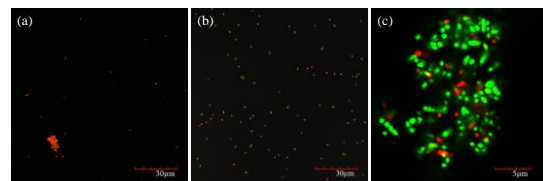


Fig.3 CLSM images of *P. fluorescens* and *N. europaea* exposed to (a) chitosan (5 mg/L, 1 h), (b) PEI (250 mg/L, 1 h), (c) dopamin (2 mg/L, 30 min).

凝集体はほとんど形成されず、細胞が死滅していることが分かった。これは、キトサンと PEI が細胞膜に強く吸着して、細胞膜を損傷したためと推察される。一方、ドーパミンを添加した場合、処理時間が増加すると凝集体が大きくなり、細胞は生存していることが分かった。しかし、60 分間処理するとドーパミンが析出することが分かった。以上より、アミノ基を備えた第 3 物質として、ドーパミンを添加して 30 分間処理したものが最適であることが分かった。

上記の実験において、形成された凝集体を FISH 法により菌叢解析を行った。*P. fluorescens* の細胞破砕液（濃度 10 倍、1 時間処理）およびドーパミン溶液（2 mg/L、30 分間処理）を添加することによって形成された凝集体の FISH-CLSM 像を Fig.4 に示す。硝化菌と脱窒菌の生菌数の比を 1 として細胞破砕液を添加した時、凝集体を形成している菌体のほとんどが赤色に蛍光していることから *P. fluorescens* が選択的に凝集していることが分かった。硝化菌と脱窒菌の生菌数の比を 25 とすると、赤色に蛍光した *P. fluorescens* の細胞数と青色に蛍光した硝化菌の細胞数が同程度になることが分かった。しかし、細胞の生育速度が極めて遅い硝化菌の菌体数を 1 桁以上増やす必要がある。一方、ドーパミンを添加した時、凝集体を形成している菌体の約半数が青色に蛍光していることから、脱窒菌と硝化菌がランダムに凝集していることが分かった。以上より、*P. fluorescens* の細胞破砕物は、脱窒菌に対して生化学的な特異的相互作用により自己凝集を促し、ドーパミンが重合したポリドーパミンはランダムな共凝集を促すと推察される。したがって、複合バイオフィルムを人為的に設計するにはドーパミンが適していることが分かった。

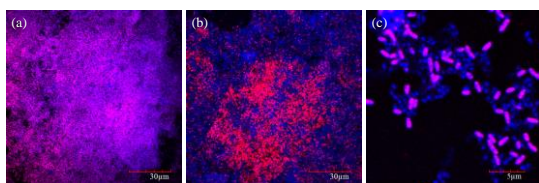


Fig.4 FISH-CLSM images of *P. fluorescens* (DNB) and *N. europaea* (AOB) exposed to (a) disrupted DNB suspension ([AOB]/[DNB] = 1, 1 h), (b) disrupted DNB suspension ([AOB]/[DNB] = 25, 1 h), (c) dopamine (2 mg/L, 30 min).

(3) 硝化菌と脱窒菌の複合バイオフィルム

硝化菌と脱窒菌の複合バイオフィルムを CLSM 解析するには、ガラス基板上にバイオフィルムを形成する必要がある。しかし、硝化菌もしくは脱窒菌がガラス表面に付着するときの ΔG はすべて正であったため、安定的にバイオフィルムを形成することは困難であることが予測された。

そこで、菌体を生きたまま固定することができるポリドーパミンコートを実施したものと、処理を施していないガラスボトムディッ

シュを用いてバイオフィルムを形成させた。まず、複合バイオフィルムの下層として、ガラス基板上に形成した脱窒菌のバイオフィルムの CLSM 像を Fig.5 に示す。ドーパミンコートなしのガラス表面では、菌体が離散的に付着しているのに対して、ドーパミンコートを施すことで、密なバイオフィルムを形成できることが分かった。

次に、脱窒菌のバイオフィルムをドーパミンコートしてから硝化菌を付着させて 7 日間培養したときのバイオフィルムの FISH-CLSM 像を Fig.6 に示す。硝化菌の推奨培地 829 培地のみで培養した場合、硝化菌はほとんど付着していないことが分かった。これは、培養時間が長くなると、無機培地では従属栄養生物である脱窒菌がほとんど生育せず死滅するため、脱窒菌のバイオフィルム上に形成したポリドーパミンが剥離したためと推察される。また、硝化菌の増殖速度は脱窒菌と比べて非常に遅いため、硝化菌の増殖中に脱窒菌が死滅してしまうことも要因として考えられる。一方、829 培地に酵母エキスを添加して培養した場合、コロニー状の硝化菌が脱窒菌のバイオフィルム上に形成されることが確認された。これは、ポリドーパミンの効果に加えて、脱窒菌の代謝物によって硝化菌が生化学的に付着したことも要因として考えられる。

以上より、硝化菌と脱窒菌の増殖速度のバランスを考慮して複合フィルムを形成することが重要であることが示唆された。

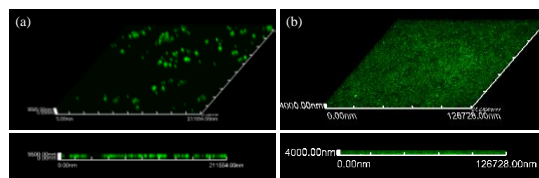


Fig.5 CLSM images of *Pseudomonas denitrificans* biofilm formed on glass substrate coated (a) without dopamine, (b) with dopamine.

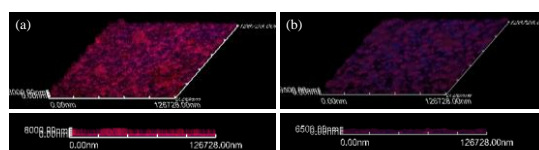


Fig.6 FISH-CLSM images of composite biofilm of *Pseudomonas denitrificans* and *N. europaea* incubated using (a) 829 medium, (b) 829 medium added yeast extract.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① T. Nomura: “Control of Microbial Adhesion Using Fine Particle Technology”, *Advanced Powder Technology*, 査読有, 23, 532-537 (2013).
- ② 大山 彩, 宮崎準平, 徳本勇人, 小西康裕, 野村俊之: “固定化担体上への脱窒菌のバイオフィルム形成”, *粉体工学会誌*, 査読有, 49, 883-888 (2012).

[学会発表] (計 5 件)

- ① A. Oyama, Y. Konishi, T. Nomura: “Biofilm

Formation of Denitrifying Bacteria on Polymeric Carrier”, The First OPU-TKU International Symposium on Frontier Chemistry and Materials for the 21st Century, P-18 (2013/11/19, Sakai).

- ② 野村俊之: “微粒子工学を利用した環境バイオテクノロジー”, 第 86 回テクノラボツアー『化学工学分野の最先端研究』, 講演要旨集, 2 (2013/10/16, 堺).
- ③ 野村俊之: “微生物と微粒子工学で環境問題解決!”, APPIE 産学官連携フェア 2013, 講演要旨集, 46 (2013/10/10, 大阪).
- ④ T. Nomura (Invited): “Microbial Adhesion Phenomena and Their Applications”, 5th Asian Particle Technology Symposium (APT2012), 36-37 (2012/7/5, July).
- ⑤ 大山 彩, 野村俊之, 小西康裕: “脱窒菌の固定化担体上への人為的バイオフィルム形成”, 2012 年度粉体工学会春期研究発表会, 講演要旨集, 15-16 (2012/5/22, 京都). (BP 賞受賞)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 俊之 (NOMURA Toshiyuki)

大阪府立大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 00285305