

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660061

研究課題名(和文) ケイ酸を利用した活性汚泥中でのバチルス属細菌の新奇生存戦略の解明と余剰汚泥減容化

研究課題名(英文) Survival strategy of silicate-utilizing Bacillus species in activated sludge and the related excess sludge reduction

研究代表者

池田 丈 (Ikeda, Takeshi)

広島大学・先端物質科学研究科・助教

研究者番号：10505754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：一部のBacillus属細菌が培養液中のケイ酸を取り込み孢子殻上にシリカとして蓄積することが知られている。活性汚泥にケイ酸を主とするミネラルを添加するとBacillus属細菌が優占化するという現象のメカニズムを解析するために、シリカが蓄積されたBacillus属細菌孢子のストレス耐性の評価を行った。その結果、シリカ蓄積に伴い、孢子の塩素耐性が向上していることを見出した。一部のBacillus属細菌優占化プロセスでは返送汚泥の塩素処理を経ているため、シリカ蓄積による塩素耐性の向上が、活性汚泥中でのBacillus属細菌優占化に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bacillus cereus and its close relatives take up soluble silicate (Si[OH]4) from the environment and accumulate it as insoluble silica (SiO2) in and around a spore coat layer. We hypothesized that silica deposition in Bacillus spores plays an important role in silicate-induced dominance of Bacillus species in activated sludge. Since some wastewater treatment plants use hypochlorite in addition to silicate to facilitate the predominance of Bacillus species, we investigated the mechanism underlying this and found that silica deposition enhances spore resistance to hypochlorite.

研究分野：生物学

キーワード：細菌 孢子 活性汚泥

1. 研究開始当初の背景

活性汚泥法による廃水中の有機物の分解は、下水処理場や浄化槽などで広く利用されているが、本処理によって発生する余剰汚泥は主要な産業廃棄物のひとつとなっている。余剰汚泥は脱水・焼却・埋め立て等によって処分されているが、埋め立て余地の減少や処理コストの高騰のため、余剰汚泥の減容化が急務となっている。活性汚泥にケイ酸マグネシウムを主とするミネラルを添加することで、活性汚泥微生物群衆中の *Bacillus* 属細菌の割合が増加し、水処理性能の向上・臭気の抑制・余剰汚泥の低減といった効果が得られることが経験的に知られている。余剰汚泥の減容化は、優占化した *Bacillus* 属細菌の持つ高い有機物分解活性によるものと予想されているが、その優占化メカニズムは明らかとなっていない。

一方、我々は、一部の *Bacillus* 属細菌(特に *B. cereus* とその近縁種)が孢子形成時に環境中のケイ酸を取り込むことを発見した(文献 1)。取り込まれたケイ酸は細胞内で重合され、不溶性のシリカ(SiO_2)として孢子殻上に蓄積される。シリカが蓄積された孢子は酸に対する耐性が有意に向上することも明らかとなっている。孢子はもともと熱・紫外線・化学物質などの各種ストレスに対する耐性が高いが、さらにシリカの殻を纏うことで、環境ストレスに対する耐性を一層高め、生存率を向上しているのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

上記の知見を合わせると、*Bacillus* 属細菌が環境中のケイ酸を取り込み孢子のストレス耐性を向上させることで、活性汚泥における生存率を高めて優占化しているのではないかという仮説が浮かび上がった。つまり、*Bacillus* 属細菌によるケイ酸の取り込みとシリカの蓄積が、新活性汚泥法における *Bacillus* 属優占化(ケイ酸添加による *Bacillus* 属の生存率向上)ならびに余剰汚泥の低減に関与しているのではないかと予想した。本研究では、この仮説を実験的に検証することを目的として、以下の実験を実施した。

3. 研究の方法

(1) ラボスケールでの *Bacillus* 属細菌優占化の再現に関する試み

ケイ酸添加による *Bacillus* 属細菌優占化の検証を行うため、ラボスケールの活性汚泥装置2台を作製した(1台はコントロール用)。当初は装置の取り扱いを容易にするため、曝気槽と沈殿槽に分かれた連続式ではなく、ひとつの曝気槽内で『汚水投入 曝気 曝気停止(汚泥の沈殿) 処理水の排出』のサイクル

を繰り返す回分式にて運転を行った。下水処理施設の活性汚泥を種菌として運転を行い、1台のみにケイ酸を始めとするミネラルを添加するとともに、経時的に全菌数ならびに熱耐性孢子の計数を行ったが、ケイ酸添加による *Bacillus* 属細菌優占化が観察されなかった。そこで、装置をより実プロセスに近い連続式に改良した。添加するミネラルの種類・濃度を変えて運転を行い、経時的に全菌数ならびに熱耐性孢子の計数を行った。

(2) シリカ蓄積孢子のストレス耐性の評価

シリカを蓄積した *Bacillus* 属細菌孢子の各種ストレスに対する耐性の評価を行った。これまでに熱・UV・酸・アルカリに対する孢子の生存率評価を行い、シリカ蓄積に伴い酸耐性が優位に向上することが既に判明している(文献 1)。これらの他に、活性汚泥中において *Bacillus* 属細菌孢子が遭遇しうるストレスの候補として、原生生物による捕食耐性ならびに次亜塩素酸に対する耐性について新たに評価を行った。100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のケイ酸を添加した mR2A 培地中で *B. cereus* YH64 株を培養することで、シリカを蓄積した孢子を調製した。また、ケイ酸を添加しない培地でも同様に培養を行い、シリカ非蓄積孢子を調製した。得られた孢子を用いて捕食耐性・次亜塩素酸耐性の評価を行った。原生生物による捕食耐性の評価は、Klobutcher らの方法(文献 2)に従った。また、次亜塩素酸に対する耐性の評価は、Young らの方法(文献 3)を一部改変して行った。

(3) シリカ蓄積量の異なる孢子の調製と次亜塩素酸耐性の評価

シリカ蓄積と次亜塩素酸耐性の関係について詳細な解析を行うため、培地に添加するケイ酸の濃度を調整することで、シリカ蓄積量の異なる孢子の調製を試みた。培養上清に含まれるケイ酸濃度を経時的に測定することで、細胞内に取り込まれたケイ酸量(蓄積されたシリカ量)を評価した。ケイ酸濃度の測定には Merck 社 silicate (silicic acid) Test キットを用いた。得られた孢子を用いて、(2)の方法と同様に次亜塩素酸耐性の評価を行った。

(4) シリカ蓄積量が異なる菌株の孢子の次亜塩素酸耐性の評価

シリカ蓄積量が異なる複数の *B. cereus* の菌株について、それぞれ孢子を調製し、(2)の方法と同様に次亜塩素酸耐性の評価を行った。

4. 研究成果

(1) ラボスケールでの *Bacillus* 属細菌優占化の再現に関する試み

ラボスケールの活性汚泥装置を作製し、研究室での *Bacillus* 属細菌優占化の再現を

試みた。しかし、種々の条件検討を行ったものの、ケイ酸添加に伴う *Bacillus* 属細菌優占化の様子は観察されなかった。そこで、活性汚泥装置の運転方法を当初の回分式からより実プロセスに近い連続式に変更して、さらなる条件検討を行った。しかしながら、やはり *Bacillus* 属細菌優占化の様子は観察されなかった。実際の廃水処理プロセスでの *Bacillus* 属細菌優占化の報告例は多いものの、ラボスケールでの再現についてはこれまでに報告がないことから、スケールの違いやそれに起因するなんらかの要因が *Bacillus* 属細菌優占化に関与している可能性が考えられたが、その原因を特定するには至らなかった。

(2) シリカ蓄積胞子のストレス耐性の評価

ケイ酸添加による活性汚泥中の *Bacillus* 属細菌の優占化の理由として、*Bacillus* 属細菌が添加されたケイ酸を取り込み、胞子殻上にシリカとして蓄積することで、胞子の生存率を高めていることが予想された。そこで、シリカを蓄積することで、どのようなストレスに対する耐性が高まっているかを調べることにした。活性汚泥中において *Bacillus* 属細菌胞子が遭遇しうるストレスの候補として、原生生物による捕食耐性ならびに次亜塩素酸に対する耐性について評価を行った。シリカを蓄積した胞子と、蓄積していない胞子を調製し、これらのストレスに対する耐性を比較した。その結果、原核生物による捕食耐性については、シリカ蓄積の有無による有意な差は見られなかったものの、次亜塩素酸に対する耐性については、シリカ蓄積に伴って耐性が有意に向上していることが見出された。一部の *Bacillus* 属細菌優占化プロセスでは、処理水の一部を回収してミネラルを添加するとともに次亜塩素酸処理を行った後、曝気層に返送するという過程を含む(文献4)。このことから、シリカ蓄積による次亜塩素酸耐性の向上が、活性汚泥中での *Bacillus* 属細菌優占化に関与している可能性が示唆された。ただし、次亜塩素酸処理を行わない *Bacillus* 属優占化プロセスも多く存在することから、優占化には次亜塩素酸耐性以外の要因も関与していると予想されるため、さらなる研究が必要であると考えられる。

(3) シリカ蓄積量の異なる胞子の調製と次亜塩素酸耐性の評価

培地に添加するケイ酸の濃度を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に変更することで、標準的な培養法で調製した *B. cereus* YH64 株のシリカ蓄積胞子に比べ、シリカ蓄積量が約 1/3 に低下した胞子を調製することができた。得られた胞子の次亜塩素酸耐性を評価したところ、標準的なシリカ蓄積胞子とシリカ非蓄積胞子の中間の生存率を示した。これらの結果より、胞子に蓄積されるシリカ量と塩素耐性

向上の度合いとの間に正の相関があることが示唆された。

(4) シリカ蓄積量が異なる菌株の胞子の次亜塩素酸耐性の評価

同じ *B. cereus* に分類される菌であっても株によってシリカ蓄積量が異なることが分かっている(文献1)。そこで、(3)の実験と並行して、シリカ蓄積量が異なる複数の *B. cereus* の菌株について次亜塩素酸耐性の評価を行った。その結果、シリカ蓄積量が最も多い *B. cereus* YH64 株では、前述の通り、シリカ蓄積に伴い次亜塩素酸耐性の有意な向上が認められたが、YH64 株に比べシリカ蓄積量が少ない一部の株では塩素耐性の有意な向上は認められなかった。これらの結果は、胞子に蓄積されるシリカの量と塩素耐性向上の度合いとの間に正の相関があるという上記の結果を支持するものであった。

<引用文献>

1. R. Hirota, Y. Hata, T. Ikeda, T. Ishida, A. Kuroda, The silicon layer supports acid resistance of *Bacillus cereus* spores, J. Bacteriol., vol.192, 2010, pp.111-116.
2. L.A. Klobutcher, K. Ragkousi, P Setlow, The *Bacillus subtilis* spore coat provides "eat resistance" during phagocytic predation by the protozoan *Tetrahymena thermophila*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.103, 2006, pp.165-170
3. S.B. Young, P. Setlow, Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide, J. Appl. Microbiol., vol.95, 2003, pp.54-67
4. 川北 護一, 藤原 和弘, 浦上 逸男, 古屋 政彦, 山本 孝夫, 常温微生物方式脱臭・汚泥減容化システム「バイオデオ」のしくみ, 環境浄化技術, 9巻, 2010, pp.19-24.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 2 件)

1. 石井 智康, 池田 文, 本村 圭, 廣田 隆一, 黒田 章夫, ケイ酸添加による活性汚泥中の *Bacillus* 属優占化メカニズムの解析, 第 65 回日本生物工学会大会(2013), 2013 年 9 月 20 日, 広島国際会議場(広島県広島市)
2. 石井 智康, 池田 文, 本村 圭, 廣田 隆一, 黒田 章夫, ケイ酸添加による活性汚泥中の *Bacillus* 属優占化メカニズムの解析, 環境バイオテクノロジー学会 2013 年度大会, 2013 年 5 月 30 日, 北九州国際会議場(福岡県北九州市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

池田 丈 (IKEDA, Takeshi)
広島大学・大学院先端物質科学研究科・
助教
研究者番号：10505754