微粒子工学的手法を用いたバイオフィーム設計

Design of Biofilm Using Fine Particle Technology

11112

研究代表者 大阪府立大学大学院 工学研究科 准教授 野村 俊之 Toshiyuki Nomura

The biological denitrification process is widely used in waste water treatment due to the low operational cost compared with that in physicochemical treatment. However, two different reactors are required in this process because ammonia nitrogen is converted into harmless nitrogen gas through two different biological steps (nitrifying and denitrifying steps) required for different environment (aerobic and anaerobic conditions). The purpose of our research is to design a composite biofilm of denitrifying bacteria and nitrifying bacteria that imitate a biofilm in the nature from the viewpoint of fine particle technology. Five different types of denitrifying bacteria and two different types of nitrifying bacteria were used as model bacteria. Surface physicochemical properties can be treated as an indicator of the adhesive properties of microbial cells. The electrophoretic mobility was measured as a function of ionic strength using the laser Doppler method and the surface potential was estimated using the soft particle theory. The microbial cells used in this study were charged negatively. The contact angle between a microbial lawn and a droplet of a specified fluid was measured using the sessile drop technique and the change in the free energy of interaction, ΔG , between one species of microbial cells, between different species of microbial cells. This result indicated that denitrifying bacteria and nitrifying bacteria could not be aggregated thermodynamically because ΔG was positive in all combinations. To promote the microbial adhesion, disrupted microbial cell suspension, chitosan, polyethyleneimine and dopamine were added to the mixed cell suspension, respectively. It was found that polydopamine was effective to aggregate denitrifying bacteria and nitrifying bacteria artificially. Finally, the formation of the composite biofilm of denitrifying bacteria and nitrifying bacteria were succeeded.

研究目的

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。

研究成果の概要

1. 実験方法

1.1 実験に用いた試料

実験に使用した脱窒菌 (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* NBRC 14297株 (NOB) の2種類である。脱窒菌は702培地(ポリペプトン 10g/L、酵母エキス 2g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g/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($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g/L、 KH_2PO_4 0.5g/L、 $NaHCO_3$ 0.5g/L、 $(NH_4)_2SO_4$ 2.5g/L、HEPES 11.92g/L、Fe-EDTA 0.075g/L、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.005g/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。

1.2 キャラクタリゼーション

菌体の表面電位は、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¹⁾を用いて見積もった。また、菌体の表面張力は、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溶媒(純水、ホルムアミド、 α -プロモナフタレン)の液滴を滴下したときの接触角を測定し、Young-Dupréの式を用いて見積もった。さらに、この結果を用いて、菌体が界面に付着したときの自由エネルギー変化 ΔG を計算し、菌体のコロイド的挙動を予測した。

1.3 硝化菌と脱窒菌の共凝集実験

脱窒菌懸濁液 (1.5×10^8 cells/mL) 0.25mL、硝化菌

懸濁液 (1.5×10^8 cells/mL) 0.25mL、および所定の濃度に調製した第三成分0.5mLを1.5mL容のマイクロチューブ内で混合し、ダグローターにて60rpm、室温下で1時間振とうした。振とう後の懸濁液を共焦点レーザー顕微鏡CLSM (オリンパス、FV-1000D)により観察した。この時、菌体の生死判別するために、細胞膜透過性のSYTO 9により全菌体、細胞膜非透過性のPropidium iodide (PI)により死菌を蛍光染色した。さらに、Amann²⁾の方法に従ってFISH法により菌叢解析を行った。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を修飾して使用した。菌体混合液はPBS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に定着させた。これに、DNAプローブ溶液を添加して46℃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。

1.4 複合バイオフィームの形成実験

ガラスボトムディッシュのガラス表面をドーパミン溶液 (2 mg/mL, Tris-HCl pH 8.5)でコーティングし、脱窒菌懸濁液0.1mL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℃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0.2mL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0.5g/Lを含む829培地1.5mLを添加して30℃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。

2. 実験結果及び考察

2.1 菌体の付着特性

接触角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にくいことが分かった。これより、硝化菌と脱窒菌の複合バイオフィ

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。また、電気泳動移動度測定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たので、高分子架橋が期待できる細胞破砕液に加えて、アミノ基を備えたカチオン系凝集剤のキトサン、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ジアミン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。

2.2 硝化菌と脱窒菌の共凝集

5種類の脱窒菌をガラスビーズで細胞破砕し、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 の菌体体が確認されたが、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。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倍では、約10 μm の凝集体が形成された。濃度を10倍にすると、

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/m^2]

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*.

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.

肉眼で確認できる $50\mu\text{m}$ 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*の細胞破碎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、凝集体はほとんど形成されず、細胞が死滅することも分かった。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。

上記の検討において、形成された凝集体をFISH法により菌叢解析を行った。*P. fluorescens*の細胞破碎液（濃度10倍、1時間処理）およびドーパミン溶液（ 2mg/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として細胞破碎液を添加した時、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つ

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

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

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.

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。

2.3 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 はすべて正であるため、安定的にバイオフィルムを形成することは困難と予測される。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³⁾を施したガラスボトムディッシュに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と密なバイオフィルムを形成することが分かった。

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に死滅するため、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。以上の結果より、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。

3. まとめ

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。

発表論文等

- 1) H. Ohshima, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **62**, 189-235 (1995).
- 2) R.I. Amman *et al.*, *Microbiological Reviews*, **59**, 143 (1995).
- 3) H. Lee *et al.* *Science*, **318**, 426 (2007).

発表論文

- 1) 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, 49, 883-888 (2012).

学会発表

- 1) 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 (2012年5月, 京都), 講演要旨集, 15-16. (BP賞受賞)
- 2) T. Nomura (Invited): “Microbial Adhesion Phenomena and Their Applications”, 5th Asian Particle Technology Symposium (APT2012) (Singapore, July, 2012).
- 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 (2013年10月, 大阪), 講演要旨集, 46.
- 4) 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 (Sakai, November, 2013).