

## 活性汚泥中のバイオフィルムの顕微ラマン分析

(National Chiao Tung Univ.<sup>1</sup>、筑波大院生命環境科学<sup>2</sup>、東大院理<sup>3</sup>)○重藤真介<sup>1</sup>、Hemanth Nag<sup>1</sup>、八幡穰<sup>2</sup>、野村暢彦<sup>2</sup>、濱口宏夫<sup>1,3</sup>

【序】バイオフィルムは、多糖類などの細胞外高分子物質のマトリックス中に形成される、バクテリアや菌類の凝集体である。われわれの身近なところでは、パイプに付着した「ぬめり」やデンタルプラークなどが一例として挙げられる。バイオフィルムの構造やそれを形成する微生物の種類は環境によってさまざまであり、バイオフィルムが有する機能との関係に大きな興味を持たれている。とくに、廃水処理施設で用いられている活性汚泥中のバイオフィルムは、廃水浄化における重要な役割を担っている。活性汚泥を高活性化し、廃水処理の効率を上げるためには、活性汚泥中のバイオフィルムの詳細な分析が不可欠であるが、有効な分析手法が確立されていないため、いまだ難しいのが現状である。ラマン分光法と共焦点顕微鏡を組み合わせた顕微ラマン分光法は、そのようなバイオフィルムの有力な分析手法になり得る。この手法では、sub  $\mu\text{m}$  の空間分解能での非破壊・非侵襲分析が可能である。また、染色などの前処理を必要としないため探索的な研究が可能という点でも、未知な部分の多いバイオフィルムの研究に適している。本研究では、顕微ラマン分光法を用いて、活性汚泥中のバイオフィルム試料にどのような物質がどのような形態で存在しているのかを分子レベルで明らかにし、その機能との関連を明らかにすることを目的とした。

【実験】2種類の異なるバイオフィルム試料(バイオフィルム 1,2、図 1)の空間分解ラマンスペクトルを測定した。図 1 からわかるように、バイオフィルム 1 は白色不透明なフィルム状であるのに対して、バイオフィルム 2 は暗緑色で液体に近い。8  $\mu\text{L}$  のバイオフィルムをそれぞれ採取し、カバーガラスとスライドガラスの間に挟んで測定試料とした。ラマンスペクトルの測定は共焦点顕微ラマン分光計により行った。励起光には He-Ne レーザーの発振線 632.8 nm を用いた。試料位置でのレーザーパワーは 1.2 mW、積算時間は 60 秒(バイオフィルム 1)および 10 秒(バイオフィルム 2)であった。

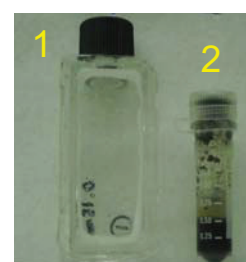


図 1. 測定に用いたバイオフィルム試料

【結果と考察】バイオフィルム 1 のラマンスペクトルを図 2 に示す。光学顕微鏡写真の中央付近に見える小胞状構造内の 2 点 a(黒い球状の固体)および b、そしてその外部の 1 点 c にそれぞれレーザーを集光してラマンスペクトルを測定した。このような構造はバイオフィルム

1 中に広く存在している。c で観測された構造のないスペクトルをバックグラウンドとして、a,b で得られたスペクトルから差し引いた。スペクトル a では、 $996\text{ cm}^{-1}$  の非常に強く鋭いラマンバンドを初めとして、いくつかラマンバンドが観測された。それに対して b では、 $996\text{ cm}^{-1}$  および  $1440\text{ cm}^{-1}$  付近のバンドがごく弱く現れているだけで、それ以外にラマンバンドは観測されなかった。光学像とあわせて考えると、黒い球状の固まり

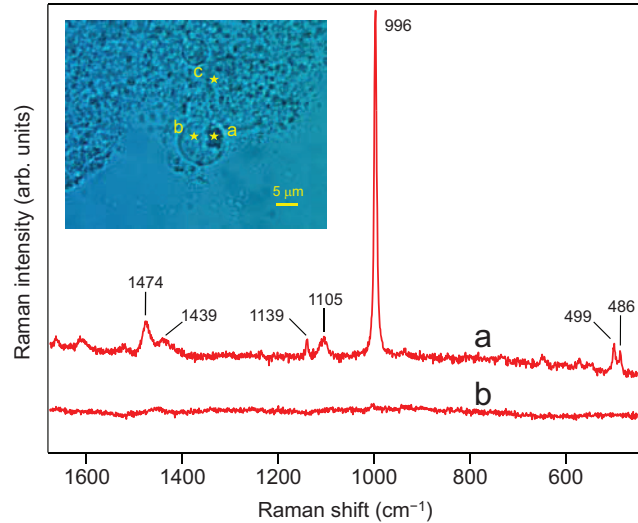


図 2. バイオフィーム 1 に存在する小胞状構造内部のラマンスペクトルおよび光学顕微鏡写真。

は小胞状構造内の物質が非常に高密度に凝集したものである可能性がある。炭素骨格に特徴的なラマンバンド(CH 変角振動など)が強く観測されていないことと、 $996\text{ cm}^{-1}$  が  $\text{SO}_4^{2-}$  対称変角振動の振動数に近いことから、現在のところこの固まりの主成分は硫酸塩化合物ではないかと考えている。

バイオフィーム 2 には、図 3 の光学像および SEM 像に示すようならせん状の構造が多く見られる。特徴的ならせん構造とその大きさから、単細胞藻類の一種である *Spirulina* と推測される。らせん上の 1 点にレーザーを集光して測定したラマンスペク

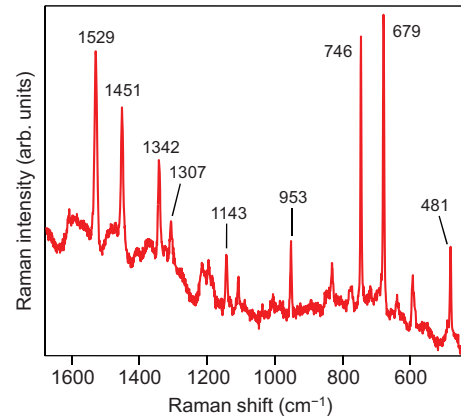
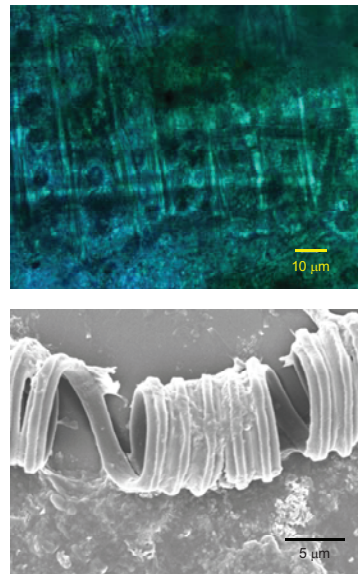


図 3. バイオフィーム 2 に存在するらせん構造の光学像 (左上)、SEM 像 (左下)、およびラマンスペクトル (右)。

トルを図 3 に示す。バイオフィーム 1 のラマンスペクトルとはまったく違った、多くのバンドからなる複雑なスペクトルを示すことがわかった。*Spirulina* の主な構成物質はタンパク質やカロテノイド、多糖類などであることが知られているので、それをもとに現在、個々のラマンバンドの帰属を検討中である。

本研究において、顕微ラマン分光法が、不均一かつ多様な形態を持つバイオフィームの構造と機能を分子レベルで解析するための有用な手法となる可能性が示された。