

バイオフィーム形成細菌に感染する ファージの単離とバイオフィーム形成阻害能の調査

長岡技術科学大学 学生会員 ○井山 棕香 長岡技術科学大学 学生会員 根本 優作
長岡技術科学大学 正会員 幡本 将史 長岡技術科学大学 正会員 山口 隆司

1. 目的

膜分離活性汚泥法 (MBR : Membrane bioreactor) は、従来の活性汚泥法と比較し、高度な処理水質が得られること等の利点を有することから、廃水処理において導入が進んでいる¹⁾。しかし、MBR の課題として、継続運転に伴いバイオフィームが膜面に形成され、膜が閉塞する現象 (膜ファウリング) が挙げられる。バイオフィームは、バイオフィーム形成細菌が放出する可溶性微生物代謝産物 (SMP : Soluble microbial products) や細胞外高分子物質 (EPS : Extracellular polymeric substances) で形成されることが報告されており、これらを制御することが膜ファウリング制御において重要である²⁾。

近年、膜ファウリング制御において、バクテリオファージ (以下ファージ) を利用する技術が報告されている³⁾。ファージは、特定の宿主細菌にのみ感染し、感染した細菌を溶菌するウイルスである。ファージは他の微生物群に大きな影響を与えることなく宿主となる細菌を殺傷できる。また、ある種のファージは SMP を分解する酵素を有し、バイオフィームの形成を抑制する手段として期待されている。

そこで我々は、実下水処理 MBR の膜面に形成されたバイオフィームからバイオフィーム形成細菌を分離培養し、プラークアッセイ法によりバイオフィーム形成細菌に感染するファージの単離を試みた。本報告では、*Stenotrophomonas rhizophila* と *Stenotrophomonas maltophilia* に感染するファージの単離、および単離したファージのバイオフィーム形成阻害試験の結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 宿主細菌

ファージの分離に使用した宿主細菌は、下水を処理する MBR の膜面より分離し、バイオフィームを形成することが確認された *S.rhizophila* と *S.maltophilia* である。宿主細菌は Mn^{2+} と Mg^{2+} を添加した LB 液体培地で 24

時間培養したものをプラークアッセイ試験に使用した。

2.2 ファージ試料の前処理方法

我々の研究では、MBR 曝気槽内の活性汚泥をファージの分離源 (以下、ファージ試料と呼ぶ) として用いた。ファージ試料には、ファージと細菌が混在しているため、ファージ試料の前処理が必要となる。本研究では2種類の前処理法を用いた。前処理法の手順を図1に示す。前処理1は活性汚泥中に浮遊形態で存在するファージを分離することを目的とした前処理である。前処理1を行った試料をファージ溶液1とした。前処理2では、ファージの前培養を行った。ファージの前培養とは、宿主細菌とファージ試料を混合し、培養することで溶液中のファージ濃度を高める操作である。前処理2を行った試料をファージ溶液2とした。

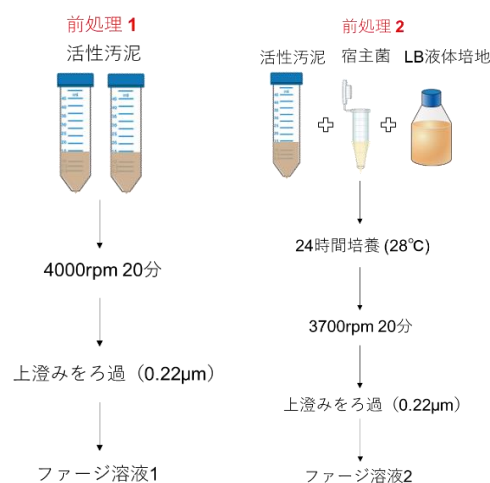


図1 ファージ溶液の前処理1・2

2.3 ファージによるバイオフィーム形成量に対する影響の調査

宿主細菌の *S.rhizophila* と *S.maltophilia* を Mn^{2+} と Mg^{2+} を添加した LB 液体培地で OD 0.1 から 0.2 となるまで振とう培養したものを宿主培養液とした。この宿主培養液と LB 液体培地および段階的に希釈したファージ溶液 ($10^5 \sim 10^8$ PFU/mL) を 96-well プレートのウェル内で混合させた。その後、各ウェルに専用のペグを被せ

キーワード 膜分離活性汚泥法, MBR, バイオフィーム, 膜ファウリング, バクテリオファージ
連絡先 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学 TEL 0258-47-1611-6646

28℃で24時間インキュベートし、クリスタルバイオレット法を用いて、ペグ上に形成されたバイオフィルム量を調査した。

3. 結果および考察

3.1 プラークアッセイ試験

前処理を施したファージ溶液 1, 2 と LB 寒天 (Mn^{2+} , Mg^{2+} 入り) および宿主細菌 *S.rhizophila* または *S.maltophilia* を混合し、プラークアッセイ試験を行った結果、ファージ溶液 1 と *S.rhizophila* の組み合わせで直 0.5mm から 2mm のプラークが確認され (図 2), ファージ溶液 2 と *S.maltophilia* の組み合わせで直径 0.5mm から 1mm のプラークが確認された (図 3)。それぞれのプラークを採取し、再度プラークアッセイ試験を行うことで、それぞれの宿主に感染するファージの単離を行った。その結果、*S.rhizophila* に感染するファージ SR-P1, および *S.maltophilia* に感染するファージを SM-P1 の単離に成功した。

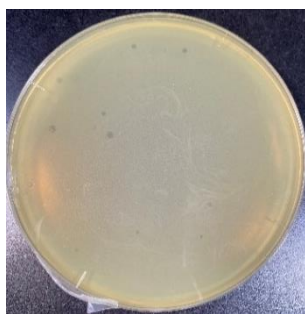


図 2 ファージ溶液 1 と宿主細菌 *S.rhizophila* で発生したプラーク

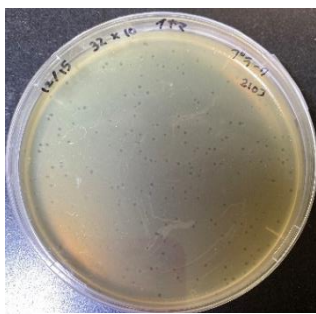


図 3 ファージ溶液 2 と宿主細菌 *S.maltophilia* で発生したプラーク

3.2 ファージによるバイオフィルム形成阻害能

図 4・図 5 にクリスタルバイオレット法で測定した *S.rhizophila* と *S.maltophilia* のバイオフィルム形成量を示す。ファージを混合していないコントロールの OD を 100% とし、バイオフィルムの相対形成量を求めた。ファージ SR-P1 を混合した培養では、混合したファージ濃度に依存して *S.rhizophila* のバイオフィルムの形成を阻害し、最も高いファージ濃度 (10^8 PFU/mL) ではバイオフィルム形成量を 87% 減少させた。一方、SM-P1 を混合した培養では、混合したファージ濃度では *S.maltophilia* のバイオフィルムの形成を阻害することができなかった。以上結果から、ファージにはバイオフィルムの形成を抑制できるファージとバイオフィルムの形成を抑制できない、またはバイオフィルムの形成を促進するファージが存在していることが示唆された。

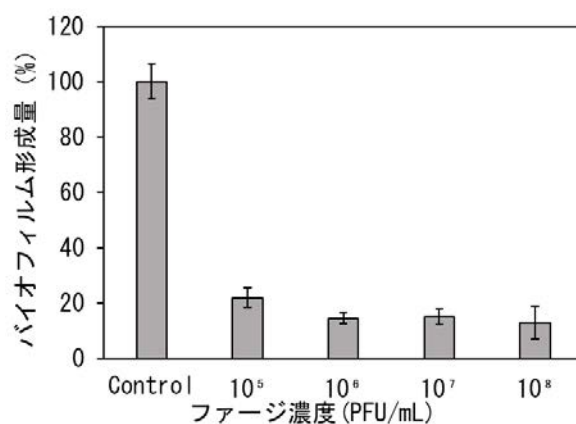


図 4 $10^5 \sim 10^8$ PFU/mL のファージ溶液に 24 時間暴露した後の *S.rhizophila* バイオフィルム形成量

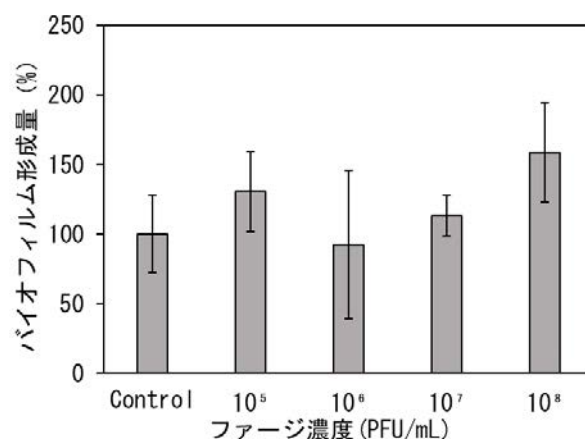


図 5 $10^5 \sim 10^8$ PFU/mL のファージ溶液に 24 時間暴露した後の *S.maltophilia* のバイオフィルム形成量

4. まとめ

プラークアッセイ法によりバイオフィルム形成細菌に感染するファージの単離を試みた結果、*S.rhizophila* に感染するファージ SR-P1, および *S.maltophilia* に感染するファージ SM-P1 の単離に成功した。単離したファージのバイオフィルム形成阻害能を調査したところ、SR-P1 は、ファージ濃度に依存して宿主細菌のバイオフィルム形成を阻害したが、SM-P1 は、混合したファージ濃度では宿主細菌のバイオフィルム形成を阻害することができなかった。そのため、ファージにはバイオフィルムの形成を抑制できるファージとバイオフィルムの形成を抑制できない、またはバイオフィルムの形成を促進するファージが存在していることが示唆された。

参考文献

- 1) Cui, Y. et. al. (2021) Water Science & Technology 83(11), 2597-2614.
- 2) Ishizaki, S. et. al. (2016) Water Research. 100, 448-457.
- 3) Wu, B. et. al. (2017) Water Research, 110, 120-132.