

## バイオフィーム形成細菌に感染するバクテリオファージの単離

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

### 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、余剰汚泥の発生を抑えられること等の利点を有することから、廃水処理において注目されている<sup>1)</sup>。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、特定の細菌群 (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非常に重要である<sup>2)</sup>。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) を利用する技術が考案されている。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ターゲットとなる細菌を殺傷できる他、特定の種はSMPを分解する酵素を有するため、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。我々の研究チームは、ファージの単離方法としてプラークアッセイ法を用い、ファージの単離を試みている。これは宿主である細菌と軟寒天およびファージ溶液を混合し、寒天平板に添加する方法である。これにより、ファージに感染した細菌細胞を中心に細菌の増殖が見られない溶菌班 (プラーク) が形成され、プラークからファージの単離を行うことができる。本稿では、4通りのファージ試料の前処理方法を用いて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。その結果 *Stenotrophomonas rhizophila* と *Stenotrophomonas maltophilia* に感染するファージの単離に成功したことを報告する。

### 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 の膜面より分離したバイオフィームを形成することが確認された計10種の細菌である (表1)。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。

表1 バイオフィーム形成細菌

Sample No.	BLAST family	genus
1	Enterobacteriaceae	<i>Raoultella terrigena</i>
2	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium columnare</i>
3	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium oxydans</i>
4	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonadaceae extremaustralis</i>
5	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonadaceae protegens</i>
6	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonadaceae saponiphila</i>
7	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
8	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>
9	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
10	Yersinia enterocolitica	<i>Yersinia enterocolitica</i>

#### 2. 2 ファージ試料の前処理方法

##### 2. 2. 1 前処理1・2

前処理1・2を図1に示す。我々の研究では、MBR曝気槽内の活性汚泥をファージ試料として用いた。ファージは活性汚泥固形物に吸着した状態 (吸着状態) と液中に浮遊した状態 (浮遊形態) で存在すると考えられるため、2通りの前処理方法を実施した。前処理1は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は、汚泥フロックなどに吸着状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2を行った試料をファージ溶液2とした。また、固形物に吸着したファージを分離・誘出する処理として3%ビーフエキス溶液 (pH: 9) を使用した。

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 水圏土壌環境研究室 TEL : 0258-47-1611-6646

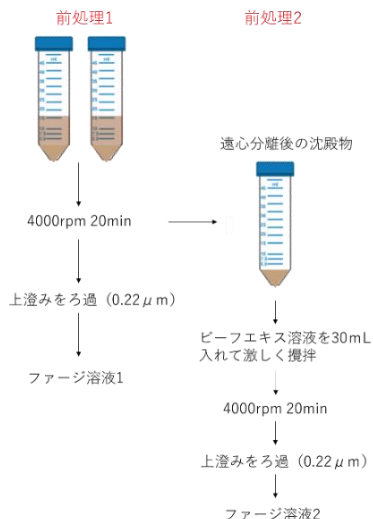


図 1 ファージ溶液の前処理 1・2

2. 2. 2 前処理 3・4

ファージ溶液の前処理 3 を図 2 に、前処理 4 を図 3 に示す。前処理 3 では、ファージの前培養を行った。ファージの前培養とは、宿主菌とファージ溶液を混合し、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 3 を行った試料をファージ溶液 3 とした。前処理 4 では、前処理 3 と同じくファージの前培養を行った。前処理 3 との相違点として前処理 4 では、活性汚泥をファージの前培養に使用した。前処理 4 を行った試料をファージ溶液 4 とした。

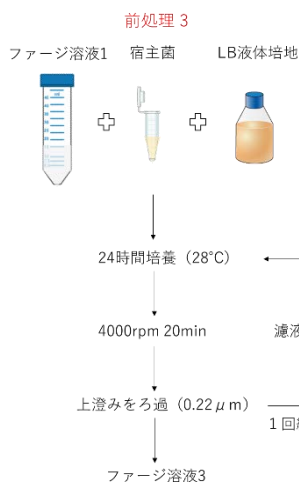


図 2 ファージ溶液の前処理 3

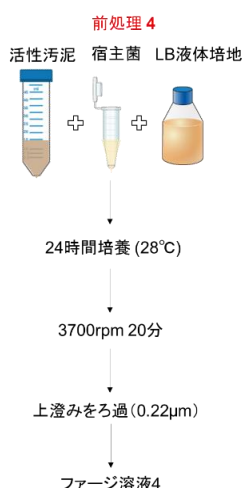


図 3 ファージ溶液の前処理 4

3. 結果と考察

前処理を施したファージ溶液 1 から 4 と LB 寒天 (Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>入り) および宿主細菌 (表 1) 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

宿主細菌 No.9 (*S. rhizophila*) の組み合わせで直径 0.5 mm から 2 mm のプラークが確認され (図 4), ファージ溶液 4 と宿主細菌 No.7 (*S. maltophilia*) の組み合わせで直径 0.5 mm から 1 mm のプラークが確認された (図 5). また, *S. rhizophila* については, ファージ溶液 3 との組み合わせでも図 4 と同様なプラークが確認された。以上結果から, プラークが発生する前処理方法はファージや宿主細菌ごとに異なっており, プラークアッセイにおいては適切な前処理方法の選択が重要であることが示唆された。

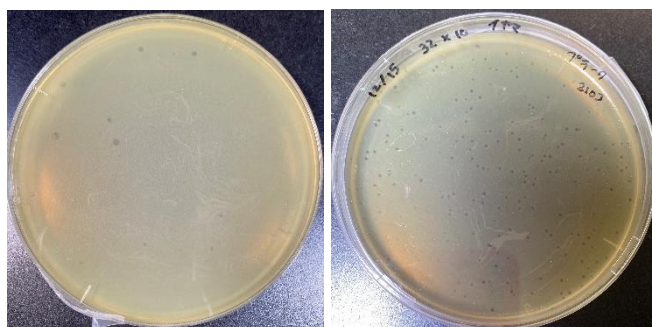


図 4 ファージ溶液 1 と宿主細菌 *S. rhizophila* で発生したプラーク

図 5 ファージ溶液 4 と宿主細菌 *S. maltophilia* で発生したプラーク

4. 今後の研究予定

単離に成功したファージの形態を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察し, 種類を同定する。また, クリスタルバイオレット法を用いてバイオフィーム形成阻害能を調査する。

謝辞

MBR の運転では長岡中央浄化センターに実験場所を提供していただきました。

参考文献

- 1) Cui, Y., Gao, H., Yu, R., Gao, L., Zhan, M. (2021). Biological-based control strategies for MBR membrane biofouling: a review. *Water Science & Technology* 83(11), 2597-2614.
- 2) Ishizaki, S., Fukushima, T., Ishii, S., Okabe, S. (2016). Membrane fouling potentials and cellular properties of bacteria isolated from fouled membranes in a MBR treating municipal wastewater. *Water Research*. 100, 448-457.