

# 微生物混合培養系中のバクテリオファージの変動要因に関する研究

## Study on Changing Factors of Bacteriophages on Mixed Bacterial Culture

学籍番号 66831

氏 名 北坂 真一 (Kitasaka, Shinichi)

指導教員 味埜 俊 教授

活性汚泥法はこれまで工学的側面と生物学的側面からよく研究されてきた。生物学的側面では特に活性汚泥を構成する微生物の種類や挙動についてよく研究されてきた。こうした研究から、有機物処理やリン除去、窒素除去に寄与していると考えられる微生物が同定され、その生理的特長や微生物群の挙動が詳しく記述されてきた。しかしながら、微生物の生理的特長や分布を明らかにしただけでは水処理の処理性能に結びつけることは難しく、さらなる知見を入手することが必要とされている。

例えば、バクテリオファージに関して言えば、活性汚泥槽には非常に高濃度にバクテリオファージが存在することが報告されたり(Ewart and Paynter, 1980)、リン酸蓄積細菌などのリン除去に関わる有用細菌を溶菌するバクテリオファージが分離されたりする(Lee et al., 2006)など、活性汚泥中の微生物群集に対して重要な影響力を持つことを示唆する研究結果がいくつか報告されてきている。

また、近年、海洋(Fuhrman, 1999; Fuhrman and Noble, 1995; Suttle and Chan, 1994; Weinbauer, 2004; Wommack and Colwell, 2000)や土壌(Wdowiak et al, 2000; Ashelford et al., 2000; Ashelford et al., 2003)においては、バクテリオファージの存在数やコミュニティを調べる解析手法が開発され、バクテリオファージの微生物コミュニティに対するインパクトが評価されてきた。その結果、海洋などの自然環境に生息する細菌は、バクテリオファージによって 15%から 20%程度溶菌されていることが明らかにされ(Wommack and Colwell, 2000)、バクテリオファージは宿主である細菌に対して重要な影響力を持っていることが認識されてきた。

以上のような理由から、バクテリオファージが細菌コミュニティや実処理場の処理能力に対してどのような影響を与えているのかを明らかにする必要があると考えられる。しかし、活性汚泥は極めて複雑な生物複合系であり、In situ で起こるバクテリオファージによる溶菌作用や微生物間の相互作用、原生動物による捕食作用はこれまでほとんど評価されていない。

培地上に純菌を生やした状態では決して捕らえることのできない実際の処理槽内での微生物間の相互作用やバクテリオファージの影響を捕らえ、その知見を下水処理能の安定化や向上に還元していくために、微生物の周辺や生物間で起こる事象を詳細に捉え、一般化することが重要であると考えられるようになり、最近これらの研究が始まった。2006 年に

は **Otawa** によってパルスフィールド電気泳動(PFGE)法や直接計数法、PicoGreen 法など、培養に依存しないバクテリオファージ解析法が活性汚泥に新規に導入・確立された。その結果から、ファージコミュニティが時間的に変化している様子が明確に捉えられた。これらの特徴から、バクテリオファージの役割は未だに不明確であるものの、活性汚泥の中で活発に増減を繰り返していることは確かであり、微生物混合系を構成する一員として今後認識して行くべきであることが確認された。

本研究では **Otawa** によって活性汚泥中のファージコミュニティの解析に導入・確立された手法である PFGE 法と PicoGreen 法を用いて、実験室規模の活性汚泥リアクターにおけるバクテリオファージのコミュニティをモニタリングし、ファージの挙動にどのような特徴があるのかを調べる。また、微生物群集構造の変化や水質の変化に対して、ファージコミュニティの挙動がどのように関連しているのかについて調べる。特に、リアクターの運転中に、炭素源を減らしたり、なくしたり、抗生物質を与えたりすることでバクテリオファージや微生物の群集構造がどのような影響を受けるのかに注目する。

マイトマイシン C の添加と基質を与える量が微生物混合培養系中のバクテリオファージの変動要因となりうるか、またなりうるとすればどのような影響を与えるのかを検討するために、3 回のバッチ実験を行った。

3 回のバッチ実験の内、第 1 次バッチ実験と第 2 次バッチ実験において、マイトマイシン C を微生物混合培養系に添加し、そのバクテリオファージにどのような影響を与えるのか調査した。その結果、最大  $0.5 \mu\text{g/mL}$  のマイトマイシン C(和光純薬工業株式会社)を添加した RUN は、そのサイクルで急激に DOC とファージ DNA 濃度が増加することがわかった。ファージ DNA 濃度については、その後のサイクルで減少してしまうことがあった。また、DOC とバクテリオファージの挙動についての関係はよくわからなかった。今回のバッチ実験においては、これらの事象の例外も見受けられた。

また PFGE の結果において、最大  $5 \mu\text{g/mL}$  のマイトマイシン C(和光純薬工業株式会社)を添加した RUN には他の RUN には見られないバンドが出現することがわかった。マイトマイシン C の添加によって生じた様々な事象は、宿主菌体中の溶原性ファージが誘発されたことによって生じたのかもしれない。

また、第 3 次バッチ実験においては基質を与えないサイクルを作ること、微生物混合培養系中のバクテリオファージの挙動がどのように変動するのかについて調べた。しかし、今回の実験だけでは特にその影響を捉えることはできなかった。

本研究では、マイトマイシン C の添加と基質を与える量が微生物混合培養系中のバクテリオファージの挙動にどのような影響を与えるのかを調べたが、今後はこの他に汚泥の pH を変えたり、炭素基質を酢酸からグルタミン酸に変えたりする実験を行うことでさらなる知見を得ることが可能である。また、マイトマイシン C 以外の抗生物質が流入した場合の影響を調査したり、今回行った基質を与えないバッチ実験をより長期間で行うことで微生物混合培養系中の細菌を飢餓状態にした際の影響を検討したりするのも有効であろう。

バクテリオファージは活性汚泥も含めたその周辺の環境中の微生物に大きな影響を与えているのではないかと示唆されてきている。よって、さらなる実験によって活性汚泥中あるいはその他の微生物混合培養系中のバクテリオファージ自体の挙動の変動要因を見つけ出し、バクテリオファージの挙動がコントロールできれば、実処理場での廃水処理をより効率的にできるかもしれない。

また、今回のバッチ実験ではバルキングに煩わされないために、沈殿と汚泥の引き抜きの工程を省いてしまったが、これらの工程を踏みより実処理場の処理プロセスに近い方法でバッチ実験が行えれば、その成果を実際の廃水処理に還元しやすくなるだろう。