

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 ISOLATION, CHARACTERIZATION OF BACTERIOPHAGES
AND THEIR POTENTIAL SIGNIFICANCE IN THE ACTIVATED
SLUDGE PROCESSES

(活性汚泥からのバクテリオファージの単離とその性質、お
よびバクテリオファージが活性汚泥に及ぼす影響)

氏名 カーン ムナワール アリ

本研究は、活性汚泥プロセスからのバクテリオファージについて検討した物である。これまで、活性汚泥中の微生物群集に関する解析は多く行われてきているが、バクテリオファージをあつかった研究は非常に限られている。バクテリオファージは活性汚泥プロセスによる下廃水中の汚染物質の除去を直接になうことはないが、活性汚泥プロセスにおける水質浄化作用を担っている細菌などの微生物群集の構造に大きな影響を与えうる活性汚泥微生物生態系の構成要素の一つであると考えられる。

本研究は、活性汚泥から実際にバクテリオファージを単離し、その宿主域などの基本的な生態的特性を解析することを通じて、活性汚泥中におけるバクテリオファージの持つ重要性について検討したものである。そのために、(1)活性汚泥からの宿主細菌およびバクテリオファージの単離、(2)バクテリオファージの宿主域の解明、(3)活性汚泥細菌中の溶原性バクテリオファージに関する検討、をおこなった。また、活性汚泥中でバクテリオファージの挙動を解析したり、あるいは、バクテリオファージの宿主特異性を利用して活性汚泥中の細菌を同定するための手法として、(4)蛍光バクテリオファージプローブ法について検討を行った。本研究の成果は、本論文を以下のように構成としてまとめた。

まず、第1章において研究の背景などの序論を述べ、また、研究の目的を提示した。第2章において、既往のバクテリオファージに関する研究をレビューした。第4章から第7章までの4つの章は、本研究における実験的検討について述べた章であり、第3章ではこれら4つの章に共通する手法について述べた。第4章では、活性汚泥からの宿主細菌およびバクテリオファージの単離について述べた。第5章はバクテリオファージの宿主域について検討を行った。第6章は、バクテリオファージプローブ法の

導入について、基礎的な検討を行った。第7章は、活性汚泥から単離された細菌中に存在する溶原性バクテリオファージについて、検討を行った。以上の成果に基づいて、第8章において、活性汚泥中のバクテリオファージの果たしている役割について議論した。これに続けて、第9章に結論と今後の展望を述べた。

活性汚泥中のバクテリオファージに関する研究は、非常に限られている。また、その中の多くは流入下水と同時に活性汚泥プロセスに流入してくる腸管系細菌に寄生するバクテリオファージに関する研究である。特に主要な研究として、Ewert and Paynter (1980)、および Hantula et al. (1991)をあげることができ、これらの研究は活性汚泥中におけるバクテリオファージが存在していることを示している。海洋等環境中のバクテリオファージに関する研究は広く行われており、溶菌による炭素循環への寄与や、宿主域の広いバクテリオファージによる遺伝子水平伝達の媒介の可能性が示唆されている。海洋生態分野における研究成果は、活性汚泥中の微生物群集においてもまたバクテリオファージが非常に重要な役割を担っている可能性があることを示唆している。

第4章では、実際に活性汚泥プロセスから細菌を単離し、それを宿主としてバクテリオファージの単離を試みた。細菌の単離は、平板培地法による。また、バクテリオファージは活性汚泥プロセスの反応槽上澄水、または、活性汚泥混合液からのビーフエキストラクトによる誘出水、または、これらを供試細菌と培養し、バクテリオファージを集積した集積液のいずれかを、対数増殖期の供試細菌と寒天培地上で培養することにより、プラークの形成をはかった。さらに、単離した細菌の性状を、主としてグラム染色法および Biolog 法により調べた。

単離した細菌は、19株がグラム陽性、18株がグラム陰性と確認できた。

人工下水を流入水として用いる系では、計30株の従属栄養細菌を単離し、そのうち16株においてプラークが形成された。また、実下水を用いた系では15株の宿主について検討し、そのうち9株がプラークを形成した。

人工下水を用いた系での検討において、初期においてグルコースを主成分とする培地を用いた結果、10株の細菌の内2株のみにプラークの形成が見られた。一方、培地に酢酸を添加した場合、20株中14株にプラークの形成が見られた。プラーク形成のために酢酸基質の方がよい結果が得られたが、これは、用いた活性汚泥が酢酸を主成分とする人工下水により馴致されていたためかもしれない。

ほとんどのバクテリオファージは、上澄水中ではなく、ビーフエキストラクトによる誘出液の中に見いだされた。その数は、人工下水で馴致した活性汚泥混合液中で $2.5 \times 10^2 \sim 3.5 \times 10^2$ 程度であった。一方、実下水処理活性汚泥プロセスでは、 $1.5 \times 10^3 \sim 3.5 \times 10^4$ 程度であった。

人工下水処理活性汚泥から単離されたバクテリオファージは直径1～2 mmのプラークを形成したのに対し、実下水処理活性汚泥から単離されたバクテリオファージは2～3 mmの直径のプラークを形成した。いずれも、形成されたプラークはほとんどのばあい透明であった。一つのプラークからバクテリオファージを拾い、宿主細菌を含む平板培地上で培養を繰り返すことによりバクテリオファージの純化を行った。

4 5 株の細菌のうち、8 株について対象の寒天培地上でプラークの形成が観察された。細菌細胞中に溶原性バクテリオファージが存在していることがわかった。

第5章では、第4章で単離したバクテリオファージの宿主域について検討した。人工下水で馴致した活性汚泥の場合、13株のバクテリオファージの内6株についてグラム陽性と陰性の宿主の双方でプラークの形成が見られた。また、実下水処理活性汚泥から単離したバクテリオファージでは、8株について試験し、2株についてグラム陽性と陰性の双方の宿主でプラークの形成が見られた。このような広い宿主域をもつバクテリオファージはこれまで報告されていない。宿主域試験の際に溶原性バクテリオファージが活性化された可能性は否定できないものの、活性汚泥中には種特異性がきわめて低いバクテリオファージが存在することが明確に示された。

また、宿主域試験の結果、もともとの宿主にプラークを形成しないバクテリオファージが9例見られた。宿主がバクテリオファージによる溶菌への抵抗性を獲得する現象はこれまでも報告されているが、25株のバクテリオファージのうち、9例、すなわち、全体の4割弱という高い確率でバクテリオファージによる溶菌への抵抗性の獲得が観察された。溶原性の獲得が頻繁に観察されるということは、活性汚泥中においてバクテリオファージと細菌との関係が非常に緊密であることを示唆していると考えられる。

第6章では、蛍光染色したバクテリオファージを細菌に作用させることにより、宿主細菌を蛍光染色して顕微鏡下で観察する、FLP法 (fluorescently labeled phage 法) の適用を試みた。活性汚泥から単離した、比較的プラーク形成が速やかに見られるバクテリオファージ ϕ P 3 0 を選び、DAPI を添加した液体培地中で対数増殖中にある宿主細菌 P 3 0 に感染させ、完全に宿主を溶菌させた。Dnase および Rnase により遊離の核酸を分解し、限外ろ過法 (分画分子量5万) により精製・回収し、さらにクロロホルムによる精製を行って、ろ過し、 $10^5 \sim 10^6$ PFU/ml の蛍光ラベル化バクテリオファージ溶液を得た。なお、この蛍光ラベル化バクテリオファージの調整は、Hennes et al. 1995 によった。

蛍光ラベル化バクテリオファージを宿主細菌と混合した結果、直後から数分間は安定して宿主細胞を蛍光観察することができた。また、2時間程度の後には、宿主細胞

が溶菌していることが観察された。

蛍光ラベル化バクテリオファージ法を宿主域の検討のために応用し、第5章でのプラーク法による宿主域と比較した。φP30はプラーク法ではP30、P30a、P35株にプラークを形成した。一方、蛍光ラベル化バクテリオファージはP30およびP30aは染色したが、P35株はほとんど染色しなかった。この原因は明らかではないが、蛍光ラベル化バクテリオファージ法は真の宿主域とはことなる結果が得られる場合があるものの、宿主域の確認のために一定の範囲で有効であることが確認できた。

また、蛍光ラベル化バクテリオファージをもとの活性汚泥に対して適用した結果、P30株とは形態的に異なる細菌が染色された。蛍光ラベル化プローブ法は、活性汚泥中の細菌を迅速に同定するために用いることができると考えられるが、適用性には限界があるようである。

第7章では、活性汚泥中の溶原性細菌について検討した。細菌の培養液にMitomycin Cを添加し、溶原バクテリオファージを刺激し、一定の時間後、培養液の濁度および上澄中のバクテリオファージ様粒子のDAPI染色による観察を行った。15株の細菌について試験したが、そのうち14株についてバクテリオファージ様粒子の形成が観察された。

以上の結果から、活性汚泥中においてバクテリオファージが非常に重要な役割を果たしていることがわかった。非常に広い宿主域を持つバクテリオファージが存在すること、宿主とバクテリオファージは、どうやら緊密な関係にあること、また、溶原性を持つ細菌が非常に多いことが確認できた。また、バクテリオファージの宿主域を調べたり、あるいはバクテリオファージを利用して微生物群集構造を調べる技術として、蛍光ラベル化プローブ法について検討した。本研究が、活性汚泥中におけるバクテリオファージに関する研究の今後の発展に寄与することを願う。