

# 細菌捕食性細菌の生態と環境技術への応用

伊藤 菜々子\*<sup>1</sup>・山本 哲史\*<sup>1</sup>

Keywords : predatory bacteria, biocontrol, microbial control agent, biofilm

細菌捕食性細菌, 生物的防除, 微生物防除剤, バイオフィーム

## 1. はじめに

当社では、特定の微生物が有する環境汚染物質の分解能力を活用して土壌・地下水浄化や排水処理といった環境技術の開発を進めている。近年、特定の細菌を基質として増殖する細菌捕食性細菌の存在が明らかとなり、それを活用した環境技術の可能性が期待されている。著者らの研究グループでも、細菌捕食性細菌を用いた環境技術の利用可能性についての調査及び研究を行っている。本稿では、細菌捕食性細菌を用いた環境技術の研究事例を紹介するとともに、既往の細菌捕食性細菌を用いた基礎的な検討について紹介する。

## 2. 細菌捕食性細菌の生態

細菌は生育に利用する主要な炭素源の種類によって、二酸化炭素を利用する独立栄養細菌と、有機炭素を利用する従属栄養細菌の二種類に分類される。さらに、従属栄養細菌の中には、他の生きた細菌を自身の栄養源とする細菌捕食性細菌が存在する。ここでは、そのユニークな生態的特徴について紹介する。

細菌捕食性細菌は土壌や淡水、海水、下水等の水環境中や動物の体内など環境中に普遍的に生息し、現在までに Oligoflexia 綱に属する *Bdellovibrio*, *Bacterivorax*, *Peredibacter*, *Halobacterivorax*, *Alphaproteobacteria* 綱に属する *Micavibrio* などが報告されている<sup>1)</sup>。なかでも *Bdellovibrio bacteriovorus* はモデル細菌として広く研究に用いられており、次節では *B. bacteriovorus* の生態的特徴について述べる。

### 2.1 *B. bacteriovorus* の捕食機構

*B. bacteriovorus* の生育形態には宿主細菌に依存して増殖する HD 型 (Host dependent) と、自己増殖が可能な HI 型 (Host independent) が存在する。HD 型の大きな特徴は、他の微生物細胞内に侵入し、溶菌させるこ

とであり、*B. bacteriovorus* の捕食作用は以下に示すようなサイクルで進行する<sup>2)</sup>(図-1A)。

- ① 1秒間に体長の100倍以上(160 μm/s)の速さで遊泳する。
- ② ランダムに宿主細菌に付着する。
- ③ 宿主細菌を認識後、外膜に孔をあけペリプラズム内に侵入する。
- ④ 侵入時に分泌するペプチドグリカンエンドペプチダーゼにより宿主細菌を bdelloplast と呼ばれる球状の細胞構造へと変化させる。Bdelloplast 構造は他の細菌捕食性細菌の新たな侵入を阻害する。
- ⑤ 宿主細菌の栄養分を分解して取り込み、フィラメント状に伸長生長する。
- ⑥ 宿主細菌の栄養成分を使い終わるとフィラメント状の細胞が複数の娘細胞へと分裂する。
- ⑦ 宿主細菌を溶菌し、娘細胞が放出される。
- ⑧ (①) 再び捕食相手を求めて遊泳する。

図-1 B には、筆者らが *B. bacteriovorus* HD100 の *Escherichia coli* HB101 に対する捕食作用を位相差顕微鏡を用いて観察した画像結果を示している。この観察では、撮影開始から3時間後に bdelloplast の形成が観察され、その後、宿主の細胞内で *B. bacteriovorus* HD100 が増殖している様子を確認した。このように細菌捕食性細菌の捕食機構は直接的に観察できるが、細菌捕食性細菌と宿主細菌との相互作用などの詳細なメカニズムには不明な点が多い。

### 2.2 バイオフィームに対する捕食作用

バイオフィームとは物質表面に付着した微生物の集合体であり、バイオフィーム中の細胞は自身が生産する細胞外マトリクスに覆われているため、せん断応力や薬剤といった物理的、化学的ストレスに対する耐性が向上し、自由に動き回る浮遊細菌とは異なる性質を示す<sup>3)</sup>。

\* 1 技術センター 都市基盤技術研究部 環境研究室

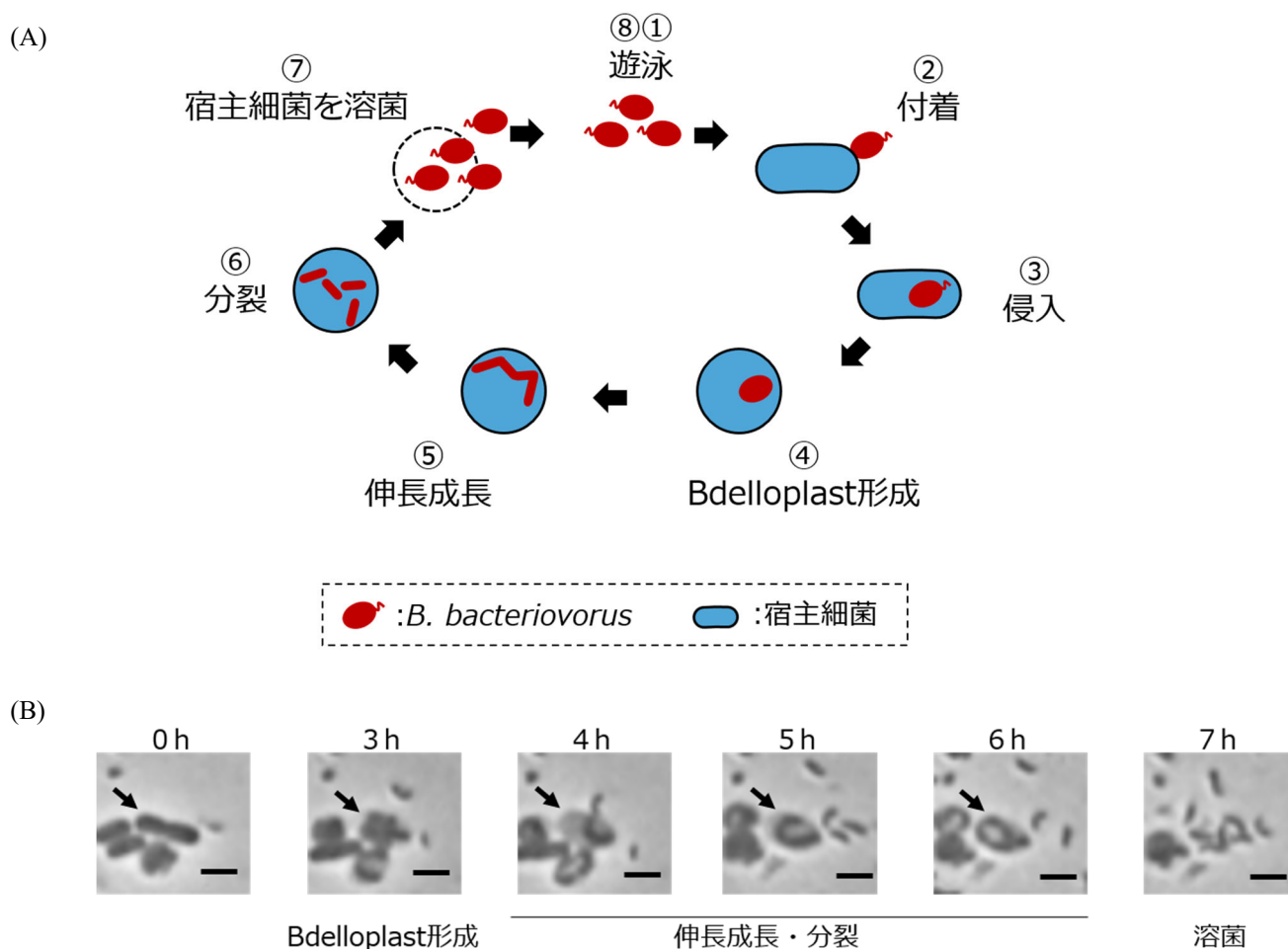


図-1 *B. bacteriovorus* の捕食サイクル

(A) *B. bacteriovorus* の捕食サイクルの模式図。(B) *B. bacteriovorus*HD100 の *E. coli* HB101 に対する捕食作用の位相差顕微鏡画像。矢印は *E. coli* HB101 を示す。スケールバーは 2 μm。

Fig.1 The predatory cycle of *B. bacteriovorus*.

(A) Schematic representation of *B. bacteriovorus* predatory cycle. (B) Phase contrast microscopy image of predation on *E. coli* HB101 by *B. bacteriovorus* HD100. Arrows indicate *E. coli* HB101. Scale bar is 2 μm.

工学分野や医療分野等におけるバイオフィルムの形成は金属腐食や配管の汚染、および重篤な感染症等を引き起こすため、物理的・化学的な手法によりバイオフィルムの除去が行われている。物理的処理には、バイオフィルムの付着面をブラッシングするほか、空気洗浄や逆流洗浄が用いられる。化学的処理には殺菌剤や抗生物質が用いられる。しかし、使用する薬剤の安全性や環境負荷への懸念、さらには薬剤耐性菌の出現などバイオフィルムの形成を抑制し続けることは困難であるものと考えられる。

*B. bacteriovorus* は遊泳状態の宿主細菌だけでなく、バイオフィルムを構成する細菌に対しても捕食作用を示し、バイオフィルムの形成を抑制できることが明らかになっている<sup>4)</sup>。さらに *B. bacteriovorus* の捕食作用

は、バイオフィルム表面だけに限定されず、バイオフィルム内部に侵入し、内部の細菌を死滅させることが示されている<sup>5,6)</sup>。また、薬剤耐性菌が形成するバイオフィルムに対しても捕食作用を示し、ヒトをはじめとする哺乳類に対して細胞毒性を持たないことから、抗生物質に替わる新たな衛生管理手法の提案がなされている。

### 3. 細菌捕食性細菌の環境技術への応用

細菌捕食性細菌は薬剤耐性菌をはじめとした細菌が形成するバイオフィルムを破壊できることに加え、人や動物に対して無害であることから、医療分野では抗生物質に代わる新たな薬剤として、感染症治療に活用

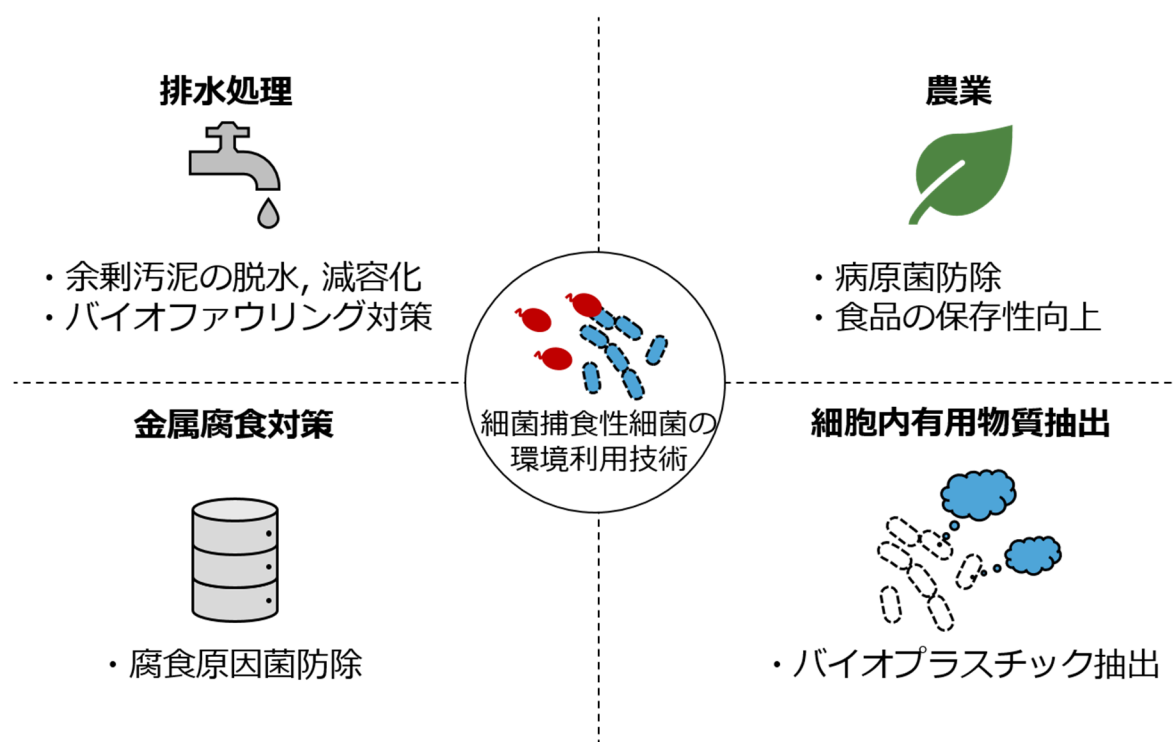


図-2 細菌捕食性細菌の環境利用技術の概要

Fig.2 Overview of predatory bacteria biotechnological applications discussed throughout the review.

することを目的とした研究が進められている。

さらに近年では、図-2 に示すような農業、環境工学分野においても細菌捕食性細菌を微生物防除剤や宿主細胞内に蓄積された有用物質の抽出に活用することを目的とした研究が報告されており、それらの研究報告を概説する。

### 3.1 排水処理分野での利用

下水や工場排水の多くは、微生物による有機物等の分解・除去能力を活用した活性汚泥法にて処理されている。この処理では、安定的に汚水を浄化できる一方で、処理に伴い大量の余剰汚泥（増殖した微生物）が発生する。これらの処分方法には焼却処分が挙げられるが、含水率が高い余剰汚泥の焼却には、補助燃料として重油などの化石燃料を多量に必要とする。汚泥焼却に用いる化石燃料を削減するためには、その含水率を低下させることが肝要である。そこで Yu らは汚泥の脱水性の向上を目的として、余剰汚泥に細菌捕食性細菌を添加した試験を実施している。その結果、細菌捕食性細菌を添加することにより汚泥の脱水性を示す濾過比抵抗と毛管吸引時間がそれぞれ 53.4%、23.8%低下することが示されている<sup>7)</sup>。余剰汚泥中の水分量が下がることにより、汚泥焼却の化石燃料の使用量を抑制でき、結果として CO<sub>2</sub> 削減が期待できる。

他方、活性汚泥法の一つである膜分離活性汚泥法は、

処理設備のコンパクト化が図れることから、近年、技術導入が進められている。この処理方式では、分離膜を用いて汚泥と処理水を分離できるが、継続的な使用に伴い分離膜の表層にバイオフィームが形成され膜の閉塞（バイオフィアウリング）が生じる。Yilmaz らは、膜分離活性汚泥法におけるバイオフィアウリングの対策として細菌捕食性細菌の利用可能性を評価したところ、*B. bacteriovorus* HD100 を添加することで濾過流速が改善し、バイオフィアウリングを抑制できること報告している<sup>8)</sup>。一方で、稲葉らの研究では、有機物濃度が高い排水中での捕食性細菌の適用は、捕食された微生物の残骸が積み重なることによりバイオフィアウリングが発生する可能性が指摘されている<sup>9)</sup>。

### 3.2 バイオプラスチック抽出での利用

化石燃料の使用による二酸化炭素排出や、化石燃料の枯渇を防ぐため、石油由来のプラスチックの代替として生物由来のバイオプラスチックが注目されている。バイオプラスチックの一種であるポリヒドロキシアルカン酸 (Polyhydroxyalkanoate, PHA) は自然環境中において炭酸ガスと水に分解される再生可能バイオマスであるという利点を持ち、生分解性プラスチックの原料となる。そのため、井上らは下水処理場で発生する余剰汚泥の高付加価値化を目指し、下水汚泥を活用した PHA 生産を試みている<sup>10)</sup>。一方で PHA は、細胞内

で合成・蓄積されるため、それを回収するために、機械的な細胞の破壊あるいは、溶剤や酵素を用いて細胞を分解する手法などが提案されており、PHAの回収率は高いものの、抽出コストが高いことや手順が複雑であることが課題として挙げられる<sup>11)</sup>。このような背景から、細菌捕食性細菌を細胞内に蓄積されたPHAを抽出するための“抽出触媒”として捕食性細菌の利用が期待されている。

Martínezらは*B. bacteriovorus* HD100が*Pseudomonas putida*や*Cupriavidus necator*を捕食し、細胞内部に蓄積されたPHAを抽出できることを明らかにした。しかし、*B. bacteriovorus* HD100はPHAデポリメラーゼを生産し、宿主細胞から溶出したPHAを分解して自身の栄養源として利用するため、PHAの回収率は54~60%にとどまる。そこで彼らは、*B. bacteriovorus* HD100に保存されるPHA分解関連遺伝子を欠損させることで、80%以上のPHA回収を可能とした<sup>12)</sup>。以上の結果から、PHAの回収に細菌捕食性細菌を利用できる可能性が示され、従来の回収方法で使用されていた溶剤や酵素の使用量を減らし、抽出コストの削減と抽出手順の簡略化が期待できる。

### 3.3 微生物農薬としての利用

農業現場では、植物病原細菌によって安定的な作物生産が脅かされ、多額の損失が生じている。植物病原細菌の防除対策として、前世紀半ばから農薬への依存度が高まっていたが、環境負荷低減と食の安心・安全が今日の農業において重要な課題となっており、農薬に代わる手法の開発が強く求められている。現在では、病害抵抗性品種の育成等による耕種的防除法や、熱水・土壌消毒等による物理化学的防除法に加え、生物的防除法が開発され、数は少ないが微生物農薬が販売され実用化に至っている。

近年では微生物農薬として新たに細菌捕食性細菌を利用する研究が進められ、作物の表面に*B. bacteriovorus* HD100を塗布することでジャガイモの軟腐病や、キノコの褐斑病等の細菌の感染によって発生する作物の病害を抑制し、保存期間を延長する効果が確認されている<sup>13,14)</sup>。

### 3.4 微生物腐食対策での利用

微生物腐食とは、細菌が金属表面でバイオフィルムを形成し、金属からの電子の引き抜きや、酸性の代謝産物を生産することで生じる金属腐食である。微生物腐食に関与する原因菌についての知見が少ないことや、実験室環境での腐食再現試験が難しいため、詳細な腐食機構は不明な点が多い。そのため、腐食発生個所の

予測や適切な対策が難しく甚大な被害が生じている。実際に、鉄橋や船舶などの海洋構造物、発電所の冷却水系等の我々の生活に必要なインフラ設備に甚大な被害もたらし、被害額は米国で年間4兆ドル、日本においても年間3.9兆円と試算されている<sup>15)</sup>。

現在、微生物腐食の対策として金属表面への細菌の付着を防ぐためのコーティングや、殺菌剤、高耐食性材料が使用されている。しかしながら、これらの方法はコストが高いことや、殺菌剤の流出による環境汚染が懸念される。そのため、経済的損失の削減に加え、環境保全の観点からも有効な予防・対策技術の確立が求められている。

*B. bacteriovorus*は嫌気条件下における微生物腐食の主要な原因菌とされる硫酸塩還元菌が引き起こす微生物腐食を抑制できることが確認され<sup>16)</sup>、低コストかつ環境負荷の少ない新たな防食技術として提案されている。しかしながら、*B. bacteriovorus*は酸素が存在する環境下で作用する好気性細菌であるため、硫酸塩還元菌が腐食を起こす嫌気条件下において、*B. bacteriovorus*による捕食作用をいかに継続させるかが課題である。

そこで、著者らの研究グループでは、嫌気条件下における*B. bacteriovorus*の捕食作用の評価を行った。

炭素源を含まない溶液中において硫酸還元菌*Desulfovibrio vulgaris*と*B. bacteriovorus* HD100を好気条件および嫌気条件下で30℃、72時間共培養し、24時間ごとにOD<sub>600</sub>(濁度)を測定した。なお、細菌捕食性細菌は細胞が非常に小さいため、細菌捕食性細菌の増殖は濁度に反映されにくいことを事前に確認している。その結果、濁度の低下は硫酸還元菌と捕食性細菌を好気条件下で培養したときのみ確認され、それ以外の系では明確な濁度低減は確認できなかった(図-3)。今回実施した嫌気条件下での培養は、窒素パーズを十分に行った後、各菌株を添加して試験を開始したことから、*B. bacteriovorus* HD100の捕食反応は酸素が必要であるものと推察された。そのため、嫌気条件下で生育する硫酸還元菌に対して、好気性細菌である*B. bacteriovorus* HD100の捕食作用を発揮させるためには、酸素の供給が必要であることが考えられた。

## 4. おわりに - 今後の展望 -

本稿では細菌捕食性細菌の生態と、その特徴を活かした微生物防除剤としての利用可能性を紹介した。

細菌捕食性細菌を微生物防除剤として利用することは、洗浄や殺菌剤を用いる物理的・化学的な微生物除

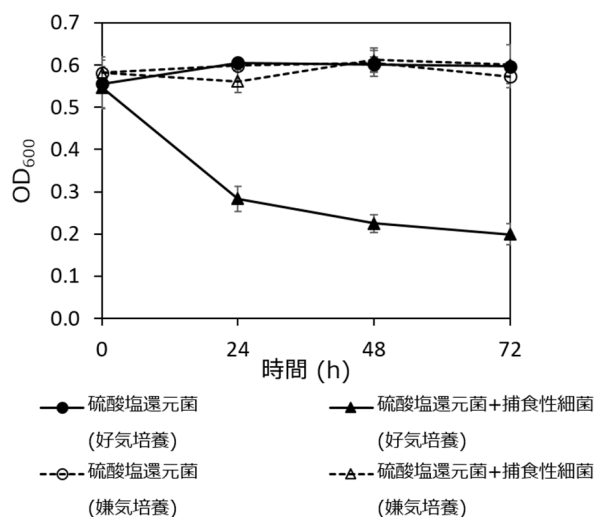


図-3 *B. bacteriovorus* HD100 存在下における *D. vulgaris* の OD<sub>600</sub> 測定

Fig.3 Quantification of *D. vulgaris* OD<sub>600</sub> over time in the presence of *B. bacteriovorus* HD100.

去方法で問題となる処理コストや、薬剤による環境汚染といった課題を解決できる可能性がある。

一方で、膜ファウリングの抑制対策のように細菌捕食性細菌に捕食された微生物の残骸が積み重なり、膜が閉塞するような新たな課題が生じることも明らかとなっている。そのため、このような課題を解決するための実用研究も今後、必要であると考えられる。

捕食性細菌の環境技術への応用は、特定の捕食性細菌を添加するだけでなく、その能力を十分に発揮できる諸条件を明らかにし、工学的な最適化を図ることが重要である。また、排水処理などの大規模な設備に捕食性細菌を活用する際には、捕食性細菌を大量に培養する技術や製剤化技術の確立も求められる。そのため、今後は、細菌捕食性細菌の生態解明に関する基礎研究と、環境利用のための応用研究を両輪で進めていくことが重要であると考えられる。

### 参考文献

- 1) Qian, H., Hou, C., Liao, H., Wang, L., Han, S., Peng, S., ... & Luo, X. : The species evenness of "prey" bacteria correlated with Bdellovibrio-and-like-organisms (BALOs) in the microbial network supports the biomass of BALOs in a paddy soil., *FEMS Microbiol. Ecol.*, Vol. 96, No. 12, fiae195. 2020.
- 2) Bratanis, E., Andersson, T., Lood, R., & Bukowska-Faniband, E. : Biotechnological potential of Bdellovibrio and like organisms and their secreted enzymes., *Front. Microbiol.*, Vol. 11, No. 662. 2020
- 3) Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. : Biofilms: an emergent form of bacterial life., *Nat. Rev. Microbiol.*, Vol. 14, No. 9, 563-575, 2016
- 4) Kadouri, D., and O'Toole, G. A. : Susceptibility of biofilms to Bdellovibrio bacteriovorus attack., *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 71, No. 7, 4044-4051, 2005
- 5) Kadouri, D. E., and Tran, A. : Measurement of predation and biofilm formation under different ambient oxygen conditions using a simple gasbagbased system., *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 79, No. 17, 5264-5271, 2013
- 6) Gupta, S., Tang, C., Tran, M., & Kadouri, D. E. : Effect of predatory bacteria on human cell lines., *PLoS One*, Vol. 11, No. 8, e0161242, 2016
- 7) Yu, R., Zhang, S., Chen, Z., & Li, C. : Isolation and application of predatory Bdellovibrio-and-like organisms for municipal waste sludge biolysis and dewaterability enhancement., *Front. Environ. Sci. Eng.*, Vol. 11, No.1, 1-11, 2017
- 8) Yilmaz, H., Celik, M. A., Sengezer, C., & Ozkan, M. : Use of Bdellovibrio bacteriovirus as biological cleaning method for MBR systems., In 2nd International Conference on Emerging Trends in Engineering and Technology (ICETET'2014). 2014
- 9) Inaba, T., Hori, T., Aizawa, H., Ogata, A., & Habe, H. : Architecture, component, and microbiome of biofilm involved in the fouling of membrane bioreactors., *npj Biofilms and Microbiomes*, Vol. 3, No.1, 1-8. 2017
- 10) 井上大介. 下水汚泥を活用したバイオプラスチック生産: 下水処理で発生する廃棄物の高付加価値資源への転換. 生産と技術= Manufacturing & technology, Vol. 71, No.1, 98-100, 2019.
- 11) Kunasundari, B., & Sudesh, K. : Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates., *Express Polymer Letters*, Vol. 5, No.7,620-634, 2011
- 12) Martínez, V., Herencias, C., Jurkevitch, E., & Prieto, M. A. : Engineering a predatory bacterium as a proficient killer agent for intracellular bio-products recovery, The case of the polyhydroxyalkanoates. *Sci. rep.*, Vol.6, No.1, 1-12. 2016
- 13) Saxon, E. B., Jackson, R. W., Bhumbra, S., Smith, T., & Sockett, R. E. : Bdellovibrio bacteriovorus HD100 guards against Pseudomonas tolaasii brown-blotch lesions on the surface of post-harvest Agaricus bisporus supermarket mushrooms., *BMC Microbiol.*, Vol.14, No.1, 1-12. 2014
- 14) Youdkes, D., Helman, Y., Burdman, S., Matan, O., & Jurkevitch, E. : Potential control of potato soft rot disease by the obligate predators Bdellovibrio and like organisms., *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 86, No. 6, e02543-19. 2020
- 15) 腐食コスト調査委員会: 「わが国の腐食コスト」, 腐食防食協会, 日本防錆技術協会 Zairyō-to-Kankyō, Vol. 50, No. 11, 490-512, 2001
- 16) Qiu, L., Mao, Y., Gong, A., Zhang, W., Cao, Y., & Tong, L. : Inhibition effect of Bdellovibrio bacteriovorus on the corrosion of X70 pipeline steel induced by sulfate-reducing bacteria., *Anti-Corrosion Methods and Materials.*, Vol. 63, No. 4, 269-274, 2016