PB-021

集積培養を伴うMPN-PCRによる高度好熱菌 *Calditerricola* 属細菌の定量的検出

○浅田 実¹、村山 幸¹、田代 幸寛¹、酒井 謙二¹
¹九大院・生資環

鹿児島市の下水余剰汚泥を高温発酵させて製造されるコンポストから高度好熱菌である *Calditerricola* 属細菌が分離され、その後の研究で、常温で処理された原料の脱水汚泥からも本菌が検出されたことからその由来に興味が持たれた。そこで、培養を伴わない検出法として用いられていた nested PCR を伴う特異的 MPN-PCR 法を開発し生態学的検討を行ったところ、本法は分布や定量性について再現性が低いことが示唆された。そこで本研究では、*Calditerricola* 属細菌の新たな検出・計数法として集積培養を伴う MPN-PCR 法を検討し、本菌の由来の解明を目的とした。

Calditerricola 属細菌の純粋培養液に対してダイレクトカウント法、希釈平板法、*Calditerricola* 属細菌特異的プライマーを用いて nested PCR を伴う MPN-PCR 法および集積培養を伴う MPN-PCR 法を行い、MPN-PCR 法の有用性を検討した。さらに2種類の MPN-PCR 法をそれぞれ3連で行い、正確性および再現性を検討した。

2種類の MPN-PCR 法とダイレクトカウント法および希釈平板法による菌数を比較した結果、ほぼ同程度の値が得られた。汚泥・コンポスト中には多種類の微生物が存在することを考慮すると、*Calditerricola* 属細菌を特異的に検出できる MPN-PCR 法が有用であることが示唆された。さらに2種類の MPN-PCR 法をそれぞれ3連で行った結果、nested PCR を伴う MPN-PCR 法では、菌数に大きなばらつきが見られた一方、集積培養を伴う MPN-PCR 法ではばらつきがほとんどなかったことから、後者の正確性、再現性が優れていることが示唆された。

今後、本法の検出感度を検討し、サツマソイルや脱水汚泥等の *Calditerricola* 属細菌を検出・計数する予定である。

Key words: MPN-PCR, Enrichment culture, nested PCR, *Calditerricola* sp.

PB-022

キュウリの栽培過程における大腸菌 O157 の汚染機構の解明第1報 大腸菌 O157 の栽培土壌から可食部への移行の可能性

○前田 征之¹、加納 義高²、甲斐 憲朗³、木嶋 伸行⁴
¹新潟農総研、²新潟農総研高農技、³宮崎農総試、⁴農研機構・野茶研

【目的】生食用野菜可食部の食中毒菌による汚染は、消費者の健康害に加えて生産者にとっても経済的な損失につながる。適切な汚染低減技術の確立が求められるが、そのためには対象とする野菜品目の可食部が食中毒菌に汚染される可能性を実験的に正確に把握する必要がある。そこで、本研究では非病原性大腸菌 O157 を接種した土壌でキュウリを栽培し、根系を通じた可食部移行の可否を検討した。【方法】土壌に非病原性大腸菌 O157 株を添加 (10^7 cfu/g) し、ハウス内でキュウリを栽培した。あわせて、キュウリ根部をメスで切断し、外傷部に大腸菌液を接種したものを栽培し、接種大腸菌の可食部への移行を調査した。収穫した可食部は次亜塩素酸ナトリウムで表面殺菌し、ホモジナイザーで破碎したものを分析試料とし、接種大腸菌の有無を希釈平板法、集積培養および PCR 法を併用して評価した。キュウリ可食部を破碎し、浮遊物を除去した後濾過滅菌したものを水溶性画分とし、臨床分離株を含む12種の大腸菌を接種し24時間培養した後の生菌数を測定した。【研究成果の概要】キュウリでは、大腸菌汚染土壌および根部の傷からは、大腸菌は可食部には移行しないことが明らかとなった。一方で、組織内に浸潤し可食部内部に侵入したことを想定し、キュウリ果実水溶性画分に接種した各種大腸菌はいずれも旺盛な生育した。以上の結果から、汚染土壌におけるキュウリ栽培では根系を通じた可食部が汚染される可能性は低いと考えられる。しかしながら、可食部中には大腸菌が生育するための条件がそろっており、整枝作業により生じた傷からの侵入、大腸菌以外の食中毒菌の影響について検討を進める必要がある。

Key words: E. coli O157, cucumber
 E-mail: mmaeda@ari.pref.niigata.jp

ポスター PC

廃水処理生態系

PC-001

活性汚泥処理システムに存在する *Aeromonas* 属細菌における Quorum Sensing 及びバイオフィルム形成の解析

○落合 聖史^{1,2}、山田 和希²、飯田 菜¹、石塚 美和¹、諸星 知広^{1,2}、池田 幸^{1,2}

¹宇都宮大・院工、²JST, CREST、³(株)東芝

Quorum Sensing とは細胞密度依存性の遺伝子発現制御機構であり、多くのグラム陰性細菌は、シグナル物質であるアシル化ホモセリンラクトン (AHL) を介して周囲の菌体密度を感知し、様々な遺伝子の発現を制御している。活性汚泥は細菌を含む多数の微生物の集合体であるが、活性汚泥内における Quorum Sensing シグナリングの役割に関してはほとんど明らかになっていない。本研究では、活性汚泥処理システム内部に存在する AHL 合成細菌をスクリーニングし、機能解析を行った。まず、栃木県下の7ヶ所の浄化センターより採取した活性汚泥からランダムに細菌を単離し、AHL 合成細菌のスクリーニングを行った。活性汚泥単離株と AHL レポーター株である *Chromobacterium violaceum* CV026 株及び VIR07 株をクロスストリークさせ、AHL レポーター株が応答した菌株を AHL 合成細菌として選択した。16S rRNA 塩基配列を用いて菌種の同定を行った結果、ほとんどの AHL 合成細菌が *Aeromonas* 属細菌であることが明らかとなった。次に工場内下水およびその生物処理水から AHL 合成細菌をスクリーニングしたところ、こちらも同様にほとんどが *Aeromonas* 属細菌であった。以上より、AHL 生産性 *Aeromonas* 属細菌は、活性汚泥内だけでなく下水や処理水中にも高い割合で存在することが明らかになった。次に、これらの *Aeromonas* 属細菌の AHL 合成遺伝子破壊株を製し、バイオフィルム形成量を測定したところ、野生株と比較して AHL 合成遺伝子破壊株はバイオフィルム形成量が増加したが、外部から AHL を添加することで野生株レベルまで減少したことから、バイオフィルム形成が Quorum Sensing により負に制御される可能性が示唆された。

Key words: quorum sensing, acylhomoserine lactone, activated sludge, *Aeromonas*, biofilm

PC-002

活性汚泥から単離した *Acinetobacter* 属細菌によるアシル化ホモセリンラクトン分解機構の解析

○篠崎 匡広^{1,2}、落合 聖史^{1,2}、安本 世良¹、諸星 知広^{1,2}、池田 幸^{1,2}
¹宇都宮大・院工、²JST, CREST

多くのグラム陰性細菌は、Quorum Sensing と呼ばれる細胞密度依存性の遺伝子制御機構を有しており、シグナル物質であるアシル化ホモセリンラクトン (AHL) を介して周囲の菌体密度を感知し、様々な遺伝子の発現を制御している。活性汚泥は細菌を含む多数の微生物の集合体であり、活性汚泥フロックは高菌体密度で構成されているため、活性汚泥内における Quorum Sensing シグナリングが廃水処理活性に影響を及ぼしている可能性が考えられる。本研究では、栃木県下の7ヶ所の浄化センターより採取した活性汚泥から細菌を単離し、AHL 分解細菌のスクリーニングを試みた。AHL 分解細菌のスクリーニングには、AHL レポーター株である *Chromobacterium violaceum* CV026 株及び VIR07 株を用いた。AHL を混合した培地で活性汚泥単離菌株を24時間培養し、培養上清中の残存 AHL を AHL レポーター株を用いて検出し、AHL レポーター株の応答が見られなくなった菌株を AHL 分解細菌として選択した。菌種の同定を行った結果、すべての浄化センター由来の活性汚泥から *Acinetobacter* 属細菌が AHL 分解細菌として検出された。これらの *Acinetobacter* 属細菌を用いて、アシル鎖長の異なる AHL に対する分解活性を調べたところ、すべての *Acinetobacter* 属細菌がアシル鎖長の長い AHL に対して高い分解活性を有することが明らかとなった。また、AHL 分解産物の構造解析を行ったところ、*Acinetobacter* 属細菌は AHL のアミド結合を切断する AHL アシラーゼ活性を有する可能性が示唆された。現在、これらの AHL 分解活性を有する *Acinetobacter* 属細菌から AHL 分解遺伝子のクローニングを試みている。

Key words: quorum sensing, acylhomoserine lactone, activated sludge, *Acinetobacter*, degradation