

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月27日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2012

課題番号：20681009

研究課題名（和文）

微生物群集のデザイン化による高効率型廃水処理技術の開発

研究課題名（英文）

Development of advanced wastewater treatment technology by deigning the microbial community

研究代表者

惣田 訓 (SODA SATOSHI)

大阪大学・工学研究科・准教授

研究者番号：30322176

研究成果の概要（和文）：バイオオーグメンテーションによる微生物群集のデザイン化による廃水処理機能の高度化方法を提案した。まず、活性汚泥中の細菌やプラスミドの分布を調査した。その後、難分解性有機物である 2,4 ジクロロフェノキシ酢酸の分解遺伝子を持つプラスミドを活性汚泥に導入し、廃水処理におけるその除去能の向上を実証した。また、有毒金属であるセレンを還元する細菌を嫌気性反応槽に導入し、廃水処理性能の向上を実証した。

研究成果の概要（英文）：Application of bioaugmentation as a design method of the microbial community was proposed for advanced wastewater treatment. Distribution of bacteria and plasmids in activate sludge were investigated. Plasmid-mediated bioaugmentation was demonstrated for enhancing removal of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid as a persistent organic pollutant by introducing bacteria harboring 2,4-D-degrading plasmid. Cell bioaugmentation was demonstrated for enhancing removal of selenium as a toxic metal by introducing a selenium-reducing bacterium.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2010 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2011 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2012 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
総計	17,000,000	5,100,000	22,100,000

研究分野：環境工学

科研費の分科・細目：環境技術・環境材料

キーワード：活性汚泥、プラスミド、バイオオーグメンテーション

1. 研究開始当初の背景

生物学的廃水処理プロセスは、混合微生物系での処理が前提であり、その中で有用な微生物を制御する必要があるが、難分解性化学物質・重金属を除去できる微生物は存在数が当然少なく、浄化能力の高い細菌を外部から処理系に導入するバイオオーグメンテーシ

ョンという手法が注目されている。しかし、外来細菌が導入環境で生き残ることは容易ではなく、その試みは失敗に終わることも少なくない。本研究では、新たな方策として、通常のセルオーグメンテーション（cell bioaugmentation）に加え、プラスミドオーグメンテーション（plasmid-mediated

bioaugmentation) を介した微生物群集の遺伝子デザインによる廃水処理機能の高度化という手法を提案した。染色体外の環状の DNA であるプラスミドには、通常の生育には不要であるが、特殊環境下の生存において不可欠な遺伝情報が含まれており、自然界の多くの細菌がプラスミドを有している。プラスミド上には廃水処理に有用な遺伝子がコードされている場合があり、さらに接合伝達性プラスミドは、細菌の属種を超えて伝達されるものもある。有用遺伝子を持つプラスミドが、土着細菌群の優占種に接合伝達されれば、植種した細菌自身は淘汰されてしまっても、有用遺伝子は残り、目的は達成できる可能性がある。ある特定の外来細菌の生存数を維持しようと制御するよりも、広宿主域プラスミドを活用し、常に変遷する優占種に有用遺伝子を受け渡し、廃水処理リアクターの処理性能の向上を期待するほうが合理的であるともいえる。

2. 研究の目的

(1) 廃水処理プロセス中のプラスミドの分布実態調査

下水処理場の活性汚泥に代表される生物学的廃水処理プロセス中の微生物群集構造の解析、ならびにその中におけるプラスミドの分布状況を明らかにする。

(2) 難分解性物質の分解プラスミドのオーグメンテーションによる微生物群集構造のデザイン

難分解性物質のモデルとして 2,4 ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) の分解遺伝子と接合伝達遺伝子群を持つプラスミド pJP4 を活性汚泥プロセスにオーグメンテーションする。pJP4 の宿主の変遷を追跡し、廃水処理機能の高度化の実証を行う。

(3) 重金属耐性菌のオーグメンテーションによる微生物群集構造のデザイン

金属のモデルとしてセレンを対象とし、その代謝遺伝子群を持つ細菌またはプラスミドを生物学的廃水処理プロセスにバイオオーグメンテーションする。その細菌の挙動を追跡し、廃水処理機能の高度化の実証を行う。

3. 研究の方法

(1) 廃水処理プロセス中のプラスミドの分布実態調査

大阪府下の M 下水処理場より採取した活性汚泥を実験に供した。抗生物質としてストレプトマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、重金属として塩化水銀(II)、亜ヒ酸ナトリウム、セレン酸ナトリウム、硝酸鉛(II)、塩化カドミウム 2.5 水和物を単独で添加した R2A 寒天培地に段階希釈した活性汚泥試料を塗布し、28°C、7 日間の培養で形成したコロニーを耐性菌と

判断した。活性汚泥中の細菌株のうち、プラスミドを複数保持していたものの属種の同定を行った。

(2) 難分解性物質の分解プラスミドのオーグメンテーションによる微生物群集構造のデザイン

合成廃水に馴養させた sequencing batch reactor (SBR) にバイオオーグメンテーションを実施した。SBR の処理水を排出後、沈殿汚泥 40 ml に対して波長 600 nm の光学濃度=5.0 となるようにプラスミド供与細菌を植種し、30 分放置した後に 2、4-D 含有合成廃水を加えた。また、プラスミド供与細菌を導入しない対照系も用意した。プラスミド供与細菌を植種した日を実験 0 日目と定義した。プラスミド供与細菌の導入後は、200 mg/l の 2、4-D 含有廃水を SBR で処理した。

(3) 重金属耐性菌のオーグメンテーションによる微生物群集構造のデザイン

セレンを含有する廃水の生物処理実験を行った。金属精錬工場廃水からセレンを除去するため、セレン酸および亜セレン酸還元菌を用いた新規生物処理プロセスを開発した。細菌が、これらのオキソアニオン態のセレンを元素態セレンに還元することは、解毒作用の役割を持っている。2つのパイロットスケールの嫌気バイオリアクターを構築した。

4. 研究成果

(1) 廃水処理プロセス中のプラスミドの分布実態調査

従属栄養細菌数(CFU/mL)は 10^8 オーダーで検出され、耐性細菌はテトラサイクリンの 10^4 オーダーを除いて、全て $10^6 \sim 10^7$ オーダーで検出された。各選択圧から 23~80 株(合計 417 株)を選択し、プラスミドの保持を確認した。83 株においてプラスミドが検出され、検出されたプラスミドの総数は 113 本であった。

伝達能に関わる遺伝子の保持に必要な 30 kb 以上が 77%を占め、検出されたプラスミドの大部分が伝達能を有する可能性が考えられた。また、プラスミドを保有している 83 株のうち 48%が不和合性群 IncP-1 のプラスミドを保有していることが分かった。IncP-1 プラスミドは、多様な細菌が保有可能な広宿主域のものであり、自己伝達能や各種の耐性・分解能をもつものが多い。下水処理場の活性汚泥中では、IncP-1 プラスミドなどにコードされた伝達因子によってさまざまな薬剤に対する耐性能が自然に受け渡しされ、維持されているものと考えられた。

4 種以上のプラスミドを持つグラム陰性細菌として、テトラサイクリン耐性細菌 Tc2-1 株、クロラムフェニコール耐性細菌 Cm2-13 株、アンピシリン耐性細菌 Ap1-10 株、水銀耐性細菌 Hg1-2 株、また、グラム陽性細菌と

してセレン耐性細菌である Se1-1-22 株の特徴を調べた。Tc2-1 株は *Shigella* 属、Cm2-13 株は *Afipia* 属、Ap1-10 株は *Acidovorax* 属、Hg1-2 株は *Acidovorax* 属、Se1-1-22 株は *Leucobacter* 属と高い相同性を示した。これらのうち、IncP-1 プラスミドの複製制御遺伝子 *trfA* 遺伝子が検出されたのは、Ap1-10 株だけであった。また、Tc2-1 株および Hg1-2 株のプラスミド抽出液からは、それぞれテトラサイクリンの細胞外への排出に関与する *tetA* 遺伝子および水銀の還元酵素を司る *merA* 遺伝子が検出された。これらの細菌の保持するプラスミドは 30kb 以下のものが多かった。

(2) 難分解性物質の分解プラスミドのオーグメンテーションによる微生物群集構造のデザイン

バイオオーグメンテーションを実施する前の SBR は、2,4-D を含まない合成廃水に対し、90% 以上の良好な溶存態有機物 (DOC) 除去率を示した。2,4-D を 200 mg/l 添加した合成廃水に対し、7 日目を除き、その除去率は 15% 以下であった。合成廃水中の易分解性成分は十分に分解されていたものの、2,4-D が処理水中に残留していたため、DOC 除去率は 80% を下回った。実験 20 日目までの SBR の汚泥濃度 (MLSS) 濃度は 1500~2000 mg/l であり、汚泥沈降指数 (SVI) は 50 以下であった。処理水質の測定は行わなかったが、20 日目以降も SBR による処理を継続したところ、26 日目には SVI が 295 にまで増加し、汚泥の沈降性が悪化した。

2,4-D を資化できる *C. necator* JMP134 (pJP4) を SBR に導入した。この実験系は、セル バイオオーグメンテーションとジーン バイオオーグメンテーションの両者の効果を評価するために作成した。2,4-D は試験開始 1 日目は 100% が除去された。しかし、2,4-D の除去率は 7 日目には 12% と著しく低下した。その後、2,4-D 除去率の上昇が生じ、16 日目以降には 100% に回復した。DOC 除去率も 2 日目は 90% であり、7 日目には約 80% にまで低下したものの、11 日目には再び 90% 近くにまで回復した。MLSS 濃度は 1500~2000 mg/l であり、26 日目まで SBR による処理を継続したが、SVI は 50 以下であり、汚泥の沈降性は良好であった。*C. necator* JMP134 の染色体上の *phlA* 遺伝子とプラスミド pJP4 に由来する *tfdB* 遺伝子は、導入後 7 日目まで減少した。その後、両遺伝子は微増し、11~20 日目になると、*tfdB* 遺伝子は *phlA* 遺伝子より $10^1\sim 10^2$ 倍高い値で検出された。7 日目、20 日目の汚泥試料から 1 株ずつの接合伝達株が得られた。7 日目に分離された E7-1 株は、*Pseudomonas plecoglossicida* であると推定され、2,4-D の資化能を有していなかった。一方、20 日目の汚泥から検出された E20-1 株は、*Burkholderia sacchari* であり、2,4-D 資化能を有していた。

2,4-D を資化できない *E. coli* HB101 (pJP4) を SBR に導入した。この実験系は、ジーン バイオオーグメンテーションの効果を評価するために作成したものである。2,4-D 除去率は、試験開始から 7 日目にかけて 20% 以下の低値であった。しかし、その後は速やかに 2,4-D 除去率の上昇が確認され、16 日目以降は 100% が除去された。DOC 除去率も、1 日目は 70% 程度であったが、16 日目以降は 90% 以上となった。MLSS 濃度は、1500~2000 mg/l であり、6 日目まで SBR による処理を継続したが、SVI は 50 以下であり、汚泥の沈降性は良好であった。*E. coli* HB101 の染色体上の *tbpA* 遺伝子は、0~3 日目にかけて著しく減少し、7 日目には 10^4 CFUeq/ml 以下となったが、プラスミド pJP4 に由来する *tfdB* 遺伝子は 7~15 日目に 10^6 CFUeq/ml、20 日目に 10^8 CFUeq/ml 以上となり、顕著に増加した。7 日目、20 日目の汚泥試料から 1 株ずつの接合伝達株が得られた。7 日目に分離された F7-1 株は、*P. plecoglossicida* であると推定され、2,4-D の資化能を有していなかった。一方、20 日目の汚泥から検出された F20-1 株は、*B. sacchari* であり、2,4-D 資化能を有していた。(3) 重金属耐性菌のオーグメンテーションによる微生物群集構造のデザイン

リアクター A には、UASB リアクターから採取したグラニューール汚泥を植種した。リアクター B には、アクリル製の担体を設置し、下水汚泥の消化槽から採取した浮遊汚泥を植種した。しかしながら、これらの嫌気リアクターは、セレンの除去に失敗してしまった。そこで、好気性のセレン還元菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I をリアクターにバイオオーグメンテーションした。亜セレン酸含有廃水に対しては、グラニューール汚泥と *P. stutzeri* NT-I が共存するリアクター A は、65 mg/l のセレンの 95% をわずか 2 日で除去した。アクリル担体に *P. stutzeri* NT-I を植種したリアクター B は、5 日間で 98% のセレンを除去した。セレン酸含有廃水に対しては、リアクター A は 30 mg/l のセレンを 7 日間でわずか 54% しか除去しなかった。また、リアクター B は、わずか 3 日で 90% 以上のセレンを除去することができた。元素態セレンは不溶性であるため、容易に水相から除去でき、両リアクターはその蓄積によって深い赤色を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

① Tsutsui, H., Anami, Y., Matsuda, M., Hashimoto, K., Inoue, D., Sei, K., Soda, S., Ike, M. Plasmid-mediated bioaugmentation of sequencing batch reactors for enhancement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid removal in

wastewater using plasmid pJP4. Biodegradation, 24, (2013) 343-352.

② 惣田訓、穴見泰崇、筒井裕文、橋本くるみ、松田真佐美、井上大介、清和成、池道彦、ジーン バイオオーグメンテーションによる活性汚泥リアクターの2,4-D除去能の向上、土木学会論文集 G (環境), 68 巻、(2012) III369-III377.

③ Soda, S., Takahashi, H., Kagami, T., Miyake, M., Notaguchi, E., Sei, K., Iwasaki, N., and Ike, M. Biotreatment of selenium refinery wastewater using pilot-scale granular sludge and swim-bed bioreactors augmented with a selenium-reducing bacterium *Pseudomonas stutzeri* NT-I. Japanese Journal Water Treatment Biology, 48, (2012) 63-71.

④ 橋本くるみ、井上大介、惣田訓、池道彦、活性汚泥内の抗生物質耐性細菌および重金属耐性細菌の保有するプラスミドの特徴づけ、下水道協会誌論文集、49/594 (2012) 104-111.

⑤ Inoue, D., Yamazaki, Y., Tsutsui, H., Sei, K., Soda, S., Fujita, M., Ike M. Impacts of gene bioaugmentation with pJP4-harboring bacteria of 2,4-D-contaminated soil slurry on the indigenous microbial community. Biodegradation, 23 (2011) 263-276.

⑥ Tsutsui, H., Anami, Y., Matsuda, M., Inoue, D., Sei, K., Soda, S., and Ike, M. Transfer of plasmid pJP4 from *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida* to bacteria in activated sludge developed under different sludge retention times. Journal of Bioscience and Bioengineering, 110 (2010) 684-689

⑦ Tsutsui, H., Soda, S., Takeda, S., Ohtsuki, H., Inoue, D., Sei, K., and Ike, M. Transfer of plasmid pJP4 from *Escherichia coli* to activated sludge bacteria by filter mating Japanese Journal of Water Treatment Biology, 45 (2009) 185-191.

[学会発表] (計7件)

① Hashimoto, K., Tsutsui, H., Inoue, D., Sei, K., Soda, S., Ike, M. Isolation and characterization of plasmids harbored by antibiotic- and metal-resistant bacteria in activated sludge. The 4th International Water Association –Asia-Pacific Region Conference & Exhibition、2011.10.4、東京国際フォーラム

② Tsutsui, H., Anami, Y., Matsuda, M., Hashimoto, K., Inoue, D., Sei, K., Soda, S., and Ike, M. Plasmid-mediated bioaugmentation of sequencing batch reactor for enhancement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid removal in wastewater using plasmid pJP4 The 4th International Water Association –Asia-Pacific Region Conference & Exhibition. 2011.10.4、東京国際フォーラム

③ Soda, S., Takahashi, H., Kagami, T., Miyake, M., Notaguchi, E., Sei, K., Iwasaki, N., and Ike, M. Biotreatment of selenium refinery wastewater using pilot-scale UASB and swim-bed bioreactors augmented with a selenium-reducing bacterium *Pseudomonas stutzeri* NT-I. The 4th International Water Association –Asia-Pacific Region Conference & Exhibition、2011.10.4、東京国際フォーラム

④ 橋本くるみ、筒井裕文、池道彦、井上大介、清和成、惣田訓、池道彦、活性汚泥内に存在する抗生物質・重金属耐性細菌の有するプラスミドの特徴づけ第47回日本下水道研究発表会、2010.7.28、ポートメッセなごや

⑤ 井上大介、松田真佐美、龐俊琴、筒井裕文、清和成、惣田訓、池道彦、実下水処理場内の微生物群集の構造と炭素源資化能の解析日本水処理生物学会第47回大会、2010.11.19、筑波大学会館

⑥ 橋本くるみ、筒井裕文、井上大介、清和成、惣田訓、池道彦活性汚泥内の重金属と抗生物質耐性細菌の有するプラスミドの特徴づけ第45回日本水環境学会年会、2011.3.18、北海道大学

⑦ 惣田訓、穴見泰崇、筒井裕文、松田真佐美、井上大介、清和成、池道彦 プラスミド・オーグメンテーションによる活性汚泥プロセスの2、4-D分解能の強化日本水処理生物学会、2009.11.13、高知市文化プラザかるぽーと

6. 研究組織

(1) 研究代表者

惣田 訓 (SODA SATOSI)

大阪大学・工学研究科・准教授

研究者番号：30322176