

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 8 月 4 日現在

機関番号：31302

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H01301

研究課題名(和文) 捕食者共存下で環境浄化細菌の有効利用を可能にするエンジニアリング手法の確立

研究課題名(英文) Development of an engineering method to make a contaminant-degrading bacterium survive in the field where indigenous protist exist

研究代表者

中村 寛治 (Kanji, NAKAMURA)

東北学院大学・工学部・教授

研究者番号：90382655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,600,000円

研究成果の概要(和文)：トリクロロエチレン分解能を持つCupriavidus sp. KN1の組換え体2株(以下、A株、B株)を利用して、捕食抵抗性の形成を検討した。2株は異なる薬剤耐性を有し、抗生物質含有培地によって選択的に検出できる。直列に繋いだ2槽の完全混合リアクターを運転し、第1槽ではA株を培養し、第2槽では原生生物による捕食を受けるようにした。第2槽流出水は残存A株と原生生物が含まれるが、本流出水に回分培養B株を添加し、残存性を比較調査した。その結果、原生生物と未接触のB株が優先的に捕食され、A株は残存することが確認された。細菌は原生生物との共存下で捕食抵抗性を形成し、残存性が上がることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで環境分野では細菌と原生動物の共存下における、細菌の形態変化を伴わない、一般性を持った捕食抵抗獲得に関する報告例はなく、我々の成果が初めてである。従来の微生物による環境浄化研究は、主に細菌の分解能に焦点が当てられており、捕食抵抗獲得プロセスを伴った環境浄化の研究は行われていない。それゆえ、我々が示した捕食抵抗形成に関するデータは、汚染現場での添加分解細菌の長期活用等、新要素を含む環境浄化技術開発へと繋がると考えられる。さらに、このような細菌と原生動物の関係把握の研究は、環境中に漏れいした日和見感染菌や病原菌等、広く環境中での細菌を管理する新たな手法の確立へと繋がっていく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Two transformants of Cupriavidus sp. KN1 having trichloroethene degradability were utilized to investigate the formation of predation resistance to a protist. These two strains (StrainA and StrainB) could selectively colonize on antibiotic-containing agar media. A continuous culture device was operated by using StrainA. The device consisted of two connected completely mixed reactors. StrainA was cultivated in the first reactor to undergo predation by a bacterivorous protist in the second reactor. The effluent of the second reactor contained residual StrainA and the protist. This effluent was supplemented with StrainB not in contact with the protist to perform comparative evaluations of the two strains as prey. Consequently, it was found that the protist-untouched StrainB were predated preferentially, and StrainA survived significantly. Thus, the bacterial grazing resistance was developed in the presence of a protist.

研究分野：環境保全工学

キーワード：環境浄化 捕食抵抗性 原生生物 捕食者 分解細菌

## 1．研究開始当初の背景

環境浄化の一手法である、バイオオーグメンテーションでは、導入された浄化細菌が分解能力を発揮し、浄化へと繋がった例は極めて少ない。これは現場に放出された培養浄化細菌が、汚染物質分解によって増殖することが出来ない場合、放出時の個体数が急激に減少するためである。

我々の過去の研究<sup>1), 2)</sup>では、汚染現場に限らず、地下水や河川水に添加された培養細菌は、土着原生生物に捕食され、極めて短時間にその数を減らすことが分かっている。一方、それらの環境水中に生息する細菌は、あまり原生生物に捕食されることなく残存することが示されている。つまり、浄化目的で培養、添加された環境浄化細菌は、土着の原生生物によって速やかに捕食されるが、土着細菌は捕食されにくいことになる。

## 2．研究の目的

前項の背景の培養細菌が選択的に捕食される現象については、その原因が全く分かっていないため、本研究では、その機構の解明を試みた。土着細菌は、元々、土着原生生物と共存しているため、ある種の捕食抵抗性を有していても不思議ではない。細菌の捕食抵抗性に関しては、抗原生動物活性を有するピオラセインの生産細菌や、糸状に形態変化させる細菌等の報告例があるが、これらは性質や形態的な変化を伴うものである。一方、一般的な土着細菌はこの様な特殊な変化を伴わず、捕食抵抗性を獲得していると考えられるが、国内外に本現象を説明できる報告例はない。そこで、我々は一般的な環境浄化細菌として、トリクロロエチレン分解能を有するフェノール資化細菌 *Cupriavidus* sp. KN1 を選出し、室内実験での捕食抵抗性の獲得現象の立証を試みた。捕食抵抗性の獲得条件が明らかになれば、対象とする環境浄化細菌に、捕食抵抗性の獲得を意図的に行わせ、抵抗性を付与した上で汚染浄化に利用する、「新たなエンジニアリング技術」へと展開できる可能性を見出せる。

## 3．研究の方法

本研究では、原生生物に捕食され、残存する際に、何らかの捕食抵抗性が生み出されるか否かを検討した。具体的には、*Cupriavidus* sp. KN1 株を親株として、異なる 2 株の形質転換体を作成した。2 株には、異なる薬剤耐性および蛍光タンパク生産能を持たせ、個々の株を区別して検出できるようにした。その上で、2 種類の菌株をそれぞれ、捕食を受ける場合とそうでない場合の 2 つの条件下で調整し、混合した上で、被捕食性を比較評価した。以下に詳しく説明する。

### (1) 使用した細菌と原生生物

本研究の捕食実験に利用した捕食者の原生生物は、鞭毛虫の *Spumella* sp. TGKK2 (NBRC111014) である。使用した被食細菌は、野生株である *Cupriavidus* sp. KN1 の形質転換体である。*Cupriavidus* sp. KN1 はフェノール資化細菌で、そのフェノールヒドロキシラーゼがトリクロロエチレン分解能を有している。形質転換体は 2 株作成した。一株目の *Cupriavidus* sp. KN1-TGF は緑色蛍光タンパク質 (GFP) を生産し、Tetracycline 耐性 (Tc<sup>r</sup>) である。二株目の *Cupriavidus* sp. KN1-KRF は赤色蛍光タンパク質 (RFP) を生産し、Kanamycin 耐性 (Km<sup>r</sup>) であ

る。2 株は異なる薬剤耐性および蛍光色素を有し、寒天培地上での選択的な生育、Colony Forming Unit (CFU) での計測が可能であり、加えてその蛍光色による確認が可能である。

## (2) 細菌の培養

### 【回分培養】

捕食実験用の細菌、*Cupriavidus* sp. KN1-TGF、および *Cupriavidus* sp. KN1-KRF は、LB 培地を使って 30°C、200 rpm で 1 晩振とう培養した。培養液は NSY-IB 培地（無機栄養塩を含む）で 2 回洗浄（11,100×g, 5 min, 4°C で集菌し、上澄みを捨て、NSY-IB 培地に懸濁）し、NSY-IB 培地に再懸濁した。その後、20°C、200 rpm で 1 日間振とうした上で利用した。

### 【連続培養】

連続培養用の試験装置は、図-1 に示す様に、2 つのリアクターを直列につないだ構成とした。供給した基質は 2 mM の乳酸ナトリウムを含有する NSY-IB 培地である。リアクターの実容積は 100mL で、滞留時間 (=HRT) は 30 時間に設定した ( $Q=3.33$  mL/hr)。温度は  $20\pm 1^\circ\text{C}$  に設定し、槽内の攪拌はスターにて 400 rpm に設定した。第一槽は細菌培養槽で、培地中の乳酸ナトリウムが分解され細菌が増殖する。第二槽は

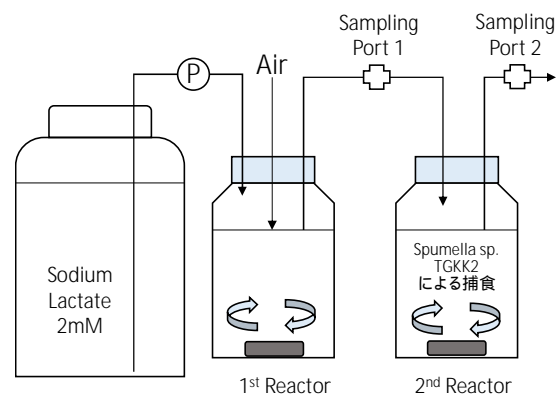


図-1 連続培養の試験装置

原生生物捕食槽で、増殖細菌が *Spumella* sp. TGKK2 に捕食される槽である。第一槽の流出水は Sampling Port 1 で、第二槽の流出水は Sampling Port 2 で採取した。本連続装置は、Run1 および Run2 の 2 系列を同時に運転し、Run1 では *Cupriavidus* sp. KN1-TGF を、Run2 では *Cupriavidus* sp. KN1-KRF を被食細菌として使用した。

## (3) 捕食抵抗評価実験

前述の回分培養および連続培養された細菌を利用して、捕食抵抗性の評価に関する実験を行った。回分培養された細菌を使ったケースでは、*Cupriavidus* sp. KN1-TGF を *Spumella* sp. TGKK2 に捕食させ、4 週間後に、残存細菌と同レベルの、原生生物と未接触の *Cupriavidus* sp. KN1-KRF を添加し、どちらの菌株がより捕食されやすいかを比較評価した。また、細菌株を入れ替えて同様の実験を行った。連続培養された細菌のケースでは、試験装置の流出液中に含まれる残存細菌数や原生生物数が一定になった時期を定常状態と仮定し、捕食実験用に検水采取了。具体的には、残存する *Cupriavidus* sp. KN1-TGF と *Spumella* sp. TGKK2 を含有する Run1 の第二槽の流出液に、捕食される前の *Cupriavidus* sp. KN1-KRF が含まれる Run2 の第一槽流出液を添加し、それらが捕食される過程を比較、評価した。また、この組み合わせの逆で、Run2 の第二槽の流出液に Run1 の第一槽の流出液を添加し、同様の捕食実験を行った。

捕食実験では、滅菌済ポリプロピレン製試験管を使用し、定期的にサンプリングを行った。利

用した細菌濃度の範囲は  $10^6 \sim 10^9$  CFU/mL である。原生生物濃度は、トーマの血球計算盤で測定し、調整した。回分培養の細菌を利用する際は、初期濃度は  $10^3$  protist-cells/mL に調整した。連続培養の細菌を利用する場合は、第二槽に含まれる原生生物（約  $8 \times 10^5$  protist-cells/mL）をそのまま利用した。捕食実験は、振とう培養装置で実施し、 $20^\circ\text{C}$ にて 180 rpm で振とうした。また、被食細菌の残存数は、抗生物質を含む LB 寒天培地を使って CFU により計測した。*Cupriavidus* sp. KN1-TGF と KN1-KRF は、前述したように区別して計測することが可能である。

#### 4. 研究成果

##### (1) 回分培養細菌を利用した捕食抵抗評価

図-2A に示すように、*Cupriavidus* sp. KN1-TGF を 3 種類の異なる初期濃度 ( $3 \times 10^6, 3 \times 10^7, 3 \times 10^8$  cells/mL) に調整し、*Spumella* sp. TGKK2 を終濃度で  $10^3$  protist-cells/mL になるように添加した。。その結果、4 週間後の KN1-TGF の残存細菌数は、細菌の初期濃度に係わらず約  $10^6$  CFU/mL に落ち着いた。4 週間後に、残存する *Cupriavidus* sp. KN1-TGF に、実験開始時に、同時に回分培養で調整した *Cupriavidus* sp. KN1-KRF を同等レベルの濃度で添加した。一週間後に、細菌数を計測した結果、捕食を経て残存した KN1-TGF は、細菌数にほとんど変化はなかったが、新たに添加した KN1-KRF が初期の 2~3% の値まで低下した

本現象が KN1-TGF と KN1-KRF の本来の特質によるものではないことを証明する目的で、両株の組み合わせを逆にし、同様の実験を行った。結果を図-2B に示す。実験を開始して 4 週までの各濃度の被食細菌の減少は、前の実験とほぼ同様で、約  $10^6$  CFU/mL に落ち着いた。また、KN1-TGF を添加して一週間後には、添加細菌のみが著しい低下を示し、添加時の約 2% まで低下した。

これらの図-2A, 2B に示した実験結果から、捕食後に残存する細菌は、捕食を受けていない培養細菌と比較して、原生生物に捕食されにくく、開始時から 4 週間の捕食を受けている期間に、何らかの捕食抵抗性を獲得していることが示唆された。

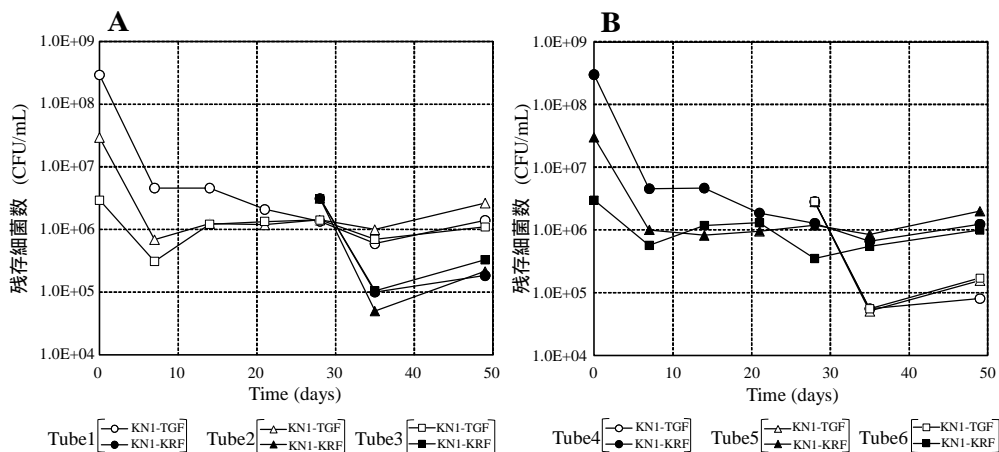


図-2 回分培養細菌を利用した捕食抵抗性評価試験

##### (2) 連続培養細菌を利用した捕食抵抗評価

前項の結果から、原生生物の捕食を受けた残存細菌には何らかの捕食抵抗性が付与されていることが示唆された。本現象を検証するため、図-1 の連続実験装置を 2 系列 (Run1, Run2) 運転

した。運転開始後 26 日目 (HRT の 20.8 倍) に、捕食実験用のサンプルを採取した。

捕食実験は 26 日目の Run1 および Run2 の第一および第二槽の流出液を混合して行った。A 系では Run1 の第二槽流出液に、Run2 の第一槽流出液を添加した。一方、B 系では、その逆で、Run2 の第二槽流出液に、Run1 の第一槽流出液を添加した。各系の実験は繰り返し実施した。A 系および B 系の実験結果を、図-3A および 3B にそれぞれ示す。A 系においては、添加された Run2 の第一槽流出液に含まれる KN1-KRF は速やかに捕食され、一週間後には初期値の 0.1 ~ 0.2% にまで低下した。一方、捕食を受けた Run1 第二槽流出液中の KN1-TGF の減少は遅く、1 週間後には 25 ~ 50% が残存した。残存値も、原生生物との接触歴を持つ KN1-TGF の方が約 100 倍大きくなった。その後は、約 100 倍多い KN1-TGF の残存菌数はゆっくり低下し、KN1-KRF はほとんど一定であった。B 系は、KN1-TGF と KN1-KRF の組み合わせを逆にした実験であるが、ほとんど同じ傾向を示し、接触歴を持たない KN1-TGF は、接触歴を持つ KN1-KRF と比較して、極めて速い速度で捕食された。接触歴を持たない KN1-TGF の一週間後の残存率は 14 ~ 18% と低下したが、その他の傾向は同様であった。この様に、同じ細菌種であっても、原生生物の接触歴を持つものは、捕食に対して何らかの抵抗性を持っていることが明らかとなった。

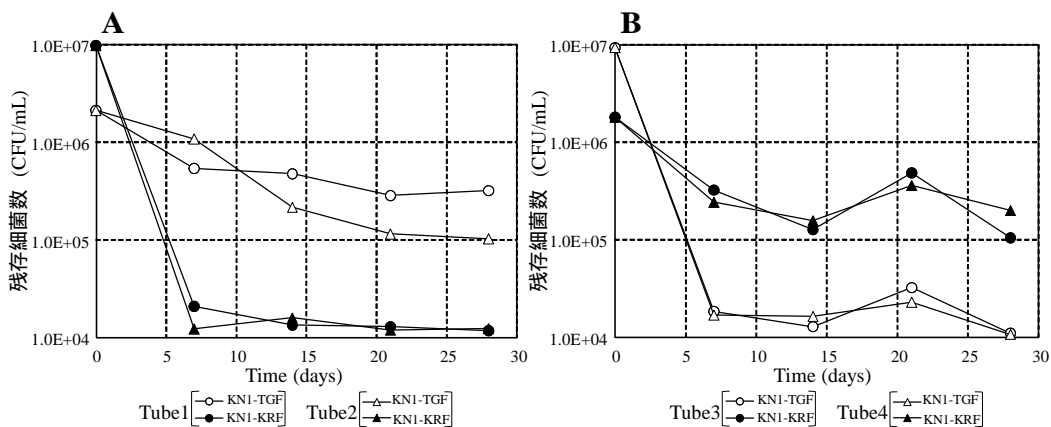


図-3 連続培養細菌を利用した捕食抵抗性評価試験

### (3) まとめ

この様に、回分培養した細菌でも、連続培養した細菌でも、原生生物との接触歴のある細菌の方が、ゆっくりとした減少を示すと共に、最終的な残存濃度も高く、何らかの捕食抵抗性が獲得されることが明らかとなった。ここで明らかとなった「捕食抵抗性」を、対象の環境浄化細菌に付与することによって、新たなエンジニアリング技術の開発へと展開できると考える。

### <引用文献>

- 1) 中村寛治, 石田浩昭, 飯泉太郎: トリクロロエチレン汚染現場に注入された *Ralstonia eutropha* KT-1 の地下水中微生物群集構造への影響評価, 環境工学研究論文集, Vol.39: 333-344 (2002)
- 2) 榊あや, 奥山加代子, 中村寛治: 特定細菌放出に伴う土着細菌群集への影響: 評価手法の検討, 環境工学研究論文集, Vol.45: 203-210 (2008)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>中村 寛治、増子 宙、三平 武史、奥田 春香   | 4. 巻<br>75            |
| 2. 論文標題<br>単離および土着の原生動物に捕食される細菌の残存性に関する評価  | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>土木学会論文集G（環境）   | 6. 最初と最後の頁<br>395-402 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.2208/jscej.75.7_III_395  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-             |
| 1. 著者名<br>中村 寛治、奥田 春香  | 4. 巻<br>74            |
| 2. 論文標題<br>細菌捕食性原生動物の18S rRNA遺伝子を標的としたユニバーサルPCRプライマーの設計と適用   | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>土木学会論文集G（環境）   | 6. 最初と最後の頁<br>239-245 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.2208/jscej.74.III_239  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-             |
| 1. 著者名<br>中村 寛治、加藤 俊明、高橋 光、高橋 京平、盛 尚樹  | 4. 巻<br>73            |
| 2. 論文標題<br>フェノールヒドロキシラーゼのハイブリッド化による高TCE分解能の発現  | 5. 発行年<br>2017年       |
| 3. 雑誌名<br>土木学会論文集G（環境）   | 6. 最初と最後の頁<br>195-202 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.2208/jscej.73.III_195  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-             |
| 1. 著者名<br>Kanji NAKAMURA and Masao FUKUDA  | 4. 巻<br>9             |
| 2. 論文標題<br>BACTERIAL GRAZING-RESISTANCE DEVELOPED DURING CO-EXISTENCE WITH A BACTERIVOROUS PROTIST | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of JSCE  | 6. 最初と最後の頁<br>86-93   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.2208/journalofjsce.9.1_86  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kanji NAKAMURA   |
| 2. 発表標題<br>Design of Universal qPCR Primers for Detecting 18S rRNA Genes of Bacterivorous Protozoa in the Environment |
| 3. 学会等名<br>2019 ASM (American Society for Microbiology) General Meeting (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kanji NAKAMURA   |
| 2. 発表標題<br>Introduction of Violacein Producing Genes into Trichloroethene-Degrading Bacteria to Avoid Protozoan Predation |
| 3. 学会等名<br>Battelle 2018 Chlorinated Conference (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>片倉啓佑                           |
| 2. 発表標題<br>河川水中からのピオラセイン生産細菌の単離と関連遺伝子群の解析 |
| 3. 学会等名<br>令和2年度 土木学会東北支部技術研究発表会          |
| 4. 発表年<br>2021年                           |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                     | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                 | 備考 |
|-------|---|---------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 福田 雅夫<br><br>(FUKUDA Masao)<br><br>(20134512) | 中部大学・応用生物学部・教授<br><br><br><br>(33910) |    |

6. 研究組織（つづき）

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|-------|---|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 宮内 啓介<br><br>(MIYAUCHI Keisuke)<br><br>(20324014) | 東北学院大学・工学部・教授<br><br><br><br>(31302) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |