

平成21年4月3日現在

研究種目：若手研究（A）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18681013  
 研究課題名（和文） 難分解性物質含有廃水処理のためのプラスミド・オーグメンテーション  
 手法の開発  
 研究課題名（英文） Plasmid-mediated augmentation for wastewater treatment

研究代表者  
 惣田 訓（SOUA SATOSHI）  
 大阪大学・大学院工学研究科・准教授  
 研究者番号：30322176

研究成果の概要：2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（2,4-D）を部分分解できるプラスミド pJP4 を用い、連続回分式活性汚泥プロセス（SBR）にプラスミドオーグメンテーションを実施した。pJP4 を導入しなかった対照系 SBR は、2,4-D を分解できなかった。2,4-D を完全分解できる JMP134（pJP4）を導入した SBR は、3日目まで高い分解率を示した後、JMP134 の淘汰に伴って分解率が低下し、transconjugant が増加した20日目から分解率が回復した。2,4-D を分解できない HB101（pJP4）を導入した SBR は、7日間は2,4-D を分解できなかったが、transconjugant が増加した20日目から分解率が向上した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	7,900,000	2,370,000	10,270,000

研究分野：環境・エネルギー工学

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：難分解性物質、廃水処理、プラスミド

## 1. 研究開始当初の背景

第2期科学技術基本計画において環境分野が重点項目に指定され、難分解性化学物質 POPs（Persistent Organic Pollutants）の管理強化が強調された。これは来年度からの第3期科学技術基本計画でも継続されると予想される。多種多様な物質が流入する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コントロールする必要があるが、POPs を除去できる微

生物は存在数が当然少なく、POPs 含有廃水の処理においては、浄化能力の高い微生物（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。すなわち、リアクター中で外来細菌が能力を発揮するためには、まず、その現場の pH や温度条件に順応し、土着細菌との基質・空間を巡る競合や、原生

動物による捕食圧に打ち勝ち、さらに各細胞が期待される能力を発現しなくてはならない。研究代表者は、フェノール分解能力を強化した微生物をモデルとして、生物学的廃水処理プロセスの代表である活性汚泥において、バイオオーグメンテーションの可能性を証明したが、外来細菌が淘汰されるにつれ、やはりその効果が薄れていくことが確認された。また外来細菌と土着細菌の相互作用や、フロック（微生物凝集体）への外来細菌細胞の吸脱着プロセス、生物膜内の微生物生態系のダイナミクスを研究し、廃水処理系での生き残りを期待するには、系外に流出しにくいように、フロックや生物膜を形成する高い能力を持った細菌を植種に選択することが一つの方策であることを提案してきた。

本研究では、新たな方策として、プラスミド・オーグメンテーションという手法を提案する。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、自然界の多くのバクテリアがプラスミドを有している。外来細菌のプラスミド上には POPs の分解遺伝子のような有用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、性繊維毛を通じて細菌の属種を超えて細胞から細胞へと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（図1）。廃水処理系における優占種は、廃水の流入量、濃度、温度等によって変化するものであり、どのような条件でも生き残れる万能な微生物など存在しないと考えられる。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、二次・三次伝達によって常に変遷する優占種に有用遺伝子を受け渡し、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。本研究では、プラスミド・オーグメンテーションのモデル実験として、POPs の一種である 2,4 ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) の分解遺伝子を有し、さらに水銀耐性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ことを試み、プラスミド・オーグメンテーションの効果と安全性を評価することを目的とする。

## 2. 研究の目的

廃水処理に広く用いられている活性汚泥法の難分解性化学物質の処理性能を向上させるため、処理に有用な外来菌を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。バイオオーグメンテーションのうち、外来菌に難分解性化学物質を直接分

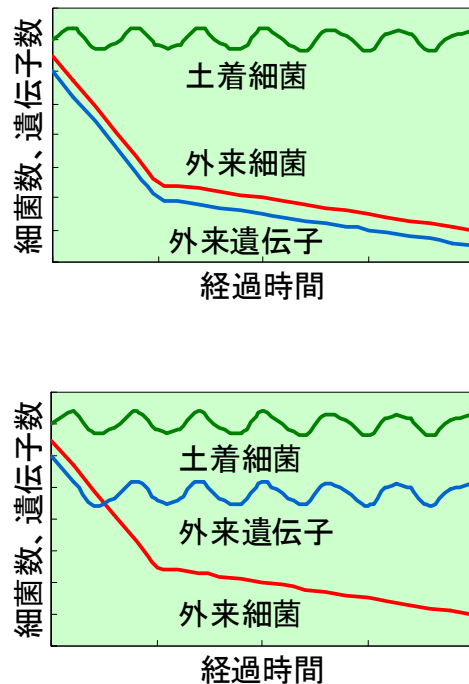


図1 プラスミド・オーグメンテーションのコンセプト。上：従来のオーグメンテーション。外来細菌とともに有用遺伝子も淘汰されてしまう。下：プラスミド・オーグメンテーション。外来細菌が淘汰されても土着細菌にプラスミドが連続的に伝達され、有用遺伝子が機能発現する可能性が高い。

解させることを狙った cell bioaugmentation では、外来菌が淘汰され、分解能力が持続できない可能性がある。そこで、難分解性化学物質の分解関連遺伝子をコードしたプラスミドを活性汚泥細菌群(recipient)に伝播させ、分解能を増強させる plasmid-mediated bioaugmentation(プラスミドオーグメンテーション)という手法が有効な浄化戦略として注目されている。しかしながら、活性汚泥内の DNA を制御する発想自体が新しいため、プラスミドオーグメンテーションによる難分解性化学物質の分解能の増強を証明した例は少なく、プラスミドの挙動や活性汚泥細菌群への影響に不明な点が多い。そこで本研究では、Sequencing Batch Reactor(SBR)にて、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)の部分分解遺伝子をコードする自己伝達性プラスミド pJP4 を用いて、プラスミドオーグメンテーションの有効性の実証実験を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 供試菌株、プラスミド

供試菌株にはプラスミド pJP4 を保持し、プラスミド pJP4 の元の宿主であり、2,4-D を完全に分解できる *Cupriavidus necator* JMP134 と 3-oxoadipate を分解できないため、2,4-D を資化できない *Escherichia coli* HB101 を用いた。

## (2) SBR

下水処理場より採取した活性汚泥を用いて 24 サイクルの SBR を作成し、2,4-D を 200 mg/L の濃度となるように添加した合成下水の処理を行った。*E. coli* HB101 (pJP4) および *C. necator* JMP134 (pJP4) をそれぞれ導入することで、系 H および系 J を構築した。同時に donor を植種しない control 系(系 C) も作成した。

## (3) Real-Time PCR 法による特定 DNA の解析

SBR からの DNA の抽出は、供試汚泥 0.5 mL を ISOIL for Beads Beating を用いて、添付のプロトコルに従って行った。また、夾雑物を除去するために、MagExtractor-PCR&Gel Clean up-を用いて精製し、50 $\cdot$ 1 の TE Buffer に溶かしたものを DNA テンプレートとして試験に供した。transconjugant の DNA 抽出は、培養液 0.5 mL を ISOIL for Beads Beating を用いて、添付のプロトコルに従って行った。調整した DNA テンプレートを用い、Real-Time PCR 法により *C. necator* JMP134 (pJP4) の染色体上の *phlA* 遺伝子および *E. coli* HB101 (pJP4) の染色体上の *tbpA* 遺伝子、プラスミド pJP4 上の *tfdB* 遺伝子の各遺伝子を保持する菌数をそれぞれ定量した。*phlA* 遺伝子および *tbpA* 遺伝子は、それぞれ thiamin binding protein および phenol hydroxylase regulatory protein をコードした遺伝子であり、一般環境中に存在しにくいことから、これらを標的とした。Real-Time PCR は ABI PRISM 7000 Sequence Detection System を用いて、SYBR Green I を用いたインターカレーター法によって、反応液を 20 $\cdot$ L (SYBR Green PCR Master Mix 10 $\cdot$ L, forward primer 200 nM, reverse primer 200 nM template 2 $\cdot$ L) で実行した。増幅開始後はサイクル毎に増幅産物に由来する蛍光の強度を測定し、一定の蛍光強度に達するサイクル数 (threshold cycle; Ct 値) を求めた。その上で、濃度が既知のスタンダードにおける初期濃度と Ct 値との関係を基に作成した回帰曲線を用いて、サンプル中の標的 DNA を定量した。プライマーは [tbp-F, tbp-R]、[phl-F, phl-R]、[tfd-F, tfd-R] を用いて行った。200 nM を用いた。また、PCR は、シャトル PCR (95 $^{\circ}$ C (15 秒)、各プライマーのアニーリング温度 Ta (20 秒)、72 $^{\circ}$ C (30 秒) を 1 サイクルとして 40 サイクル) によって実行した。定量値は、希釈平板培養法で生菌数を計数し

た各導入菌から抽出した DNA をスタンダードに用い、各標的遺伝子をそれらを保持する菌数当量 (CFU-equivalent/mL; CFU-eq/mL) として算出した。

## (4) 水質分析および活性汚泥の性状分析

SBR より処理水を採取し、遠心分離 (8,500 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 10 min) により集菌し、上清液をニトロセルロースフィルター (孔径 0.45 $\cdot$ m) で濾過し、そこに 2N-HCl を終濃度約 5% となるように添加することで生物反応を停止させたものをサンプルとして水質分析に供した。なお、サンプルは分析に供するまで -20 $^{\circ}$ C で保存した。2,4-D の測定はシステムコントローラ (SCL-10AVP)、送液ポンプ (LC-10AVP)、デカッサ (DGU-10AF)、カラムオーブン (CTO-10AVP)、UV-VIS 検出器 (SPD-10AVP)、オートサンプラ (SCL-10AF からなる HPLC ユニット) を使用した。

## 4. 研究成果

### (1) 2,4-D の分解

各 SBR における 2,4-D の分解率を図 2 に、donor とプラスミドの挙動を図 3 に示す。試験開始 3 日目までは、系 C および系 H では 2,4-D の分解率は約 10% であった。一方、系 J では 2,4-D の完全分解が確認されたが、3~7 日目には約 15~23% にまで分解率が低下した。これは 2,4-D 分解菌である *C. necator* JMP134 (pJP4) が淘汰されたためであると考えられた。その後、プラスミド pJP4 を保持する導入菌を添加した系 H および系 J においては、12 日目から 2,4-D 分解率の上昇が確認され、16 日目以降には 2,4-D が完全に分解された。この要因として、系 J では導入菌数の回復に加え、2,4-D を分解できる transconjugant 数が増加したことにより分解が促進されたものと考えられ、系 H では *E. coli* HB101 (pJP4) の染色体上の *tbpA* 遺伝子は導入後、著しく減少したが、プラスミド pJP4 上の *tfdB* 遺伝子は 6~15 日目に 10<sup>6</sup>CFU-eq/mL 以上で存在していたことから、土着微生物群に対してプラスミド pJP4 が伝播することにより、2,4-D 分解菌が増加し、分解能が上昇したものと考えられた。

### (2) Transconjugant の特徴づけ

試験開始 7 日目および 20 日目の transconjugant を同定した。2,4-D 分解率が低い 7 日目において、系 H および系 J とともに検出された transconjugant は全て *Pseudomonas* 属の細菌であったのに対して、2,4-D 分解率が高い 20 日目において、系 H および系 J とともに検出された transconjugant は全て *Burkholderia* 属であった。また、transconjugant の 2,4-D 資化能を調査したところ、*Pseudomonas* 属の transconjugant は

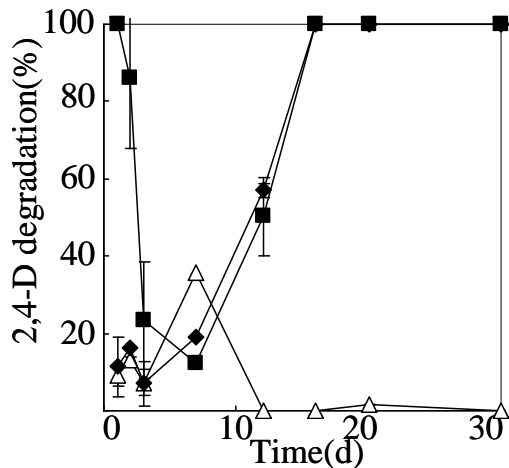


図2 SBR の 2,4-D 分解率. (△)SBR C(対照系), (◆)SBR H (*E. coli* HB101 (pJP4) を植種), (■)SBR J (*C. necator* JMP134 (pJP4) を植種) .

2,4-D を資化できなかつたが、*Burkholderia* 属は資化することができた。SBR が 2,4-D を完全に分解したのは 16 日目以降であったことから、これは、*Burkholderia* にプラスミドが伝播したためだと考えられた。このことから、元の donor が淘汰されてしまったとしても、高い難分解性化学物質の分解能を獲得する recipient に対して、プラスミドを伝播させることがプラスミドオーグメンテーションを成功させる鍵であるといえる。

### 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 3 件)

- ① Inoue, D., Soda, S., Tsutsui, H., Yamazaki, Y., Murashige, K., Sei, K., Fujita, M., and Ike, M. (2009) Occurrence and persistence of indigenous transconjugants carrying conjugative plasmids in soil. *J. Biosci. Bioeng.*, (in press)、査読有
- ② 惣田訓, 筒井裕文, 井上大介, 清和成, 池道彦(2008)プラスミドオーグメンテーションによる廃水処理プロセスの性能向上の可能性, 月刊水, 50 (11), 14-21. 査読無
- ③ Soda, S., Ohtsuki, H., Inoue, D., Tsutsui, H., Sei, K., and Ike, M. (2008) Transfer of antibiotic multiresistant plasmid RP4 from *Escherichia coli* to activated sludge bacteria. *J. Biosci. Bioeng.*, 106 (3),

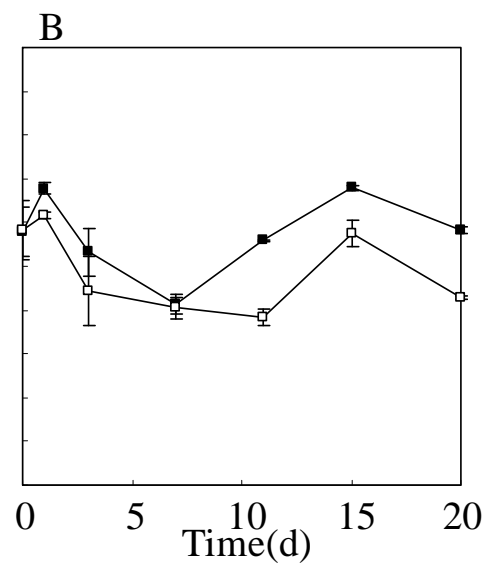
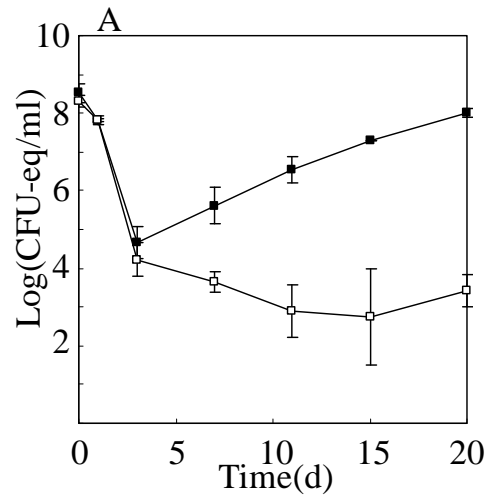


図3 染色体またはプラスミドの遺伝子の挙動. (A)SBR H (*E. coli* HB101 (pJP4) を植種), (B)SBR J (*C. necator* JMP134 (pJP4) を植種). (■)プラスミド, (□) 染色体上の遺伝子.

292 -296. 、査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① Tsutsui, H., Matsuda, M., Anami, Y., Inoue, D., Sei, K., Soda, S., and Ike, M. (2009) Transfer of plasmid pJP4 from *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida* to activated sludge-derived bacteria by filter mating. International Symposium on Frontiers of Environmental and Industrial Biotechnology, 2009.1.21, 豊中.
- ② 穴見泰崇, 筒井裕文, 松田真佐美, 井上大介, 清和成, 惣田訓, 池道彦 (2008) フィルターメイティングによる活性汚泥細菌群へのプラスミドpJP4の伝播. 日本

- 水処理生物学会第 45 回大会, 2008. 11. 13, 秋田.
- ③ Inoue, D., Soda, S., Tsutsui, H., Yamazaki, Y., Murashige, K., Sei, K., Fujita, M., and Ike, M. Occurrence and persistence of indigenous transconjugants carrying conjugative plasmids in soil microcosms. International Biotechnology Symposium and Exhibition, 2008. 10.14, 中国大連
- ④ Tsutsui, H., Takeda, S., Otsuki, H., Inoue, D., Sei, K., Soda, S., and Ike, M. Transfer of plasmid pJP4 from *Escherichia coli* by filter mating to and its expression in activated sludge-derived bacteria. International Biotechnology Symposium and Exhibition, 2008. 10.13, 中国大連
- ⑤ 筒井裕文, 山崎祐二, 井上大介, 清和成, 惣田訓, 池道彦, 藤田正憲. 2,4-D汚染土壌スラリーの外来菌導入による浄化が土着微生物生態系に及ぼす影響の評価. 第 41 回日本水環境学会年会, 2007. 3. 14, 大阪.
- ⑥ 惣田訓, 山崎祐二, 村重勝士, 井上大介, 清和成, 池道彦, 藤田正憲. 伝達性プラスミドの環境内挙動のモデル解析. 日本水処理生物学会第 43 回大会, 2006. 11. 15, 仙台.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

惣田 訓 (SOUDA SATOSHI)  
大阪大学 大学院工学研究科 准教授  
研究者番号 : 30322176

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者