



Title	活性汚泥の難分解性化学物質分解能の増強を目的としたプラスミドオーグメンテーションに関する研究
Author(s)	筒井, 裕文
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58374
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	つづ い 裕 文
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 2 4 6 0 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 23 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科環境・エネルギー工学専攻
学 位 論 文 名	活性汚泥の難分解性化学物質分解能の増強を目的としたプラスミドオーグメンテーションに関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 池 道彦 (副査) 教 授 東海 明宏 准教授 近藤 明

論 文 内 容 の 要 旨

活性汚泥内の優占菌に、処理対象物質に対する分解遺伝子をコードしたプラスミドを伝達させることで分解能を付与するプラスミドオーグメンテーションは、廃水処理プロセスの難分解性化学物質分解能を増強させ、安定化させる手法の一つとして注目を集めている。一方、その技術としての有効性を示すための科学的知見は乏しく、実用化に向けて、用いる導入菌やプラスミドの種類に関する検討や運転制御因子の影響を明らかにすることが求められている。本論文は、プラスミドオーグメンテーションの実用化と効果的な運転制御に向けた知見の集積を行うことを目的とし、導入菌およびプラスミドの種類や汚泥滞留時間 (SRT) が活性汚泥内におけるプラスミドの伝達性に及ぼす影響を評価するとともに、ラボスケール活性汚泥リアクターを用いて、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分解能の増強メカニズムの解明を試みたものであり、緒論と2章からなる本論、総括並びに結論から構成されている。

第1章では、緒論として、本研究の背景を述べ、その目的を示した。

第2章では、*Escherichia coli* C600と*E. coli* HB101あるいは*Pseudomonas putida* KT2440に保持させた広宿主域自己伝達性プラスミドRP4とpJP4をフィルターメイティングにより活性汚泥細菌へ伝達させ、導入菌およびプラスミドの種類やSRT制御がプラスミドの伝達へ及ぼす影響を調査した。処理方式の異なる2種類の汚泥試料のいずれに対してもプラスミドの伝達が確認され、一部のtransconjugantはプラスミド上の機能を高効率で発現できることが示された。また、導入菌やプラスミドの種類により、接合伝達頻度や検出されるtransconjugantの種類に違いが生じた。さらに、SRTを長く設定した活性汚泥を用いた系で、高い接合伝達頻度と多様な表現型のtransconjugantが観察されたことから、導入菌の選定や活性汚泥プロセスの運転操作によって活性汚泥内のプラスミドの挙動をある程度制御できることが示された。

第3章では、第2章で用いた2種類の汚泥に、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)と2,4-D部分分解遺伝子群をコードするプラスミドpJP4を保持させた*E. coli* HB101および*Cupriavidus necator* JMP134の2種類の菌を導入したラボスケール活性汚泥リアクターを作成し、プラスミドオーグメンテーション試験による2,4-D分解性能向上を試みた。各系における2,4-D分解率を評価するとともに、導入菌とpJP4の定量、検出されたtransconjugantの特徴付けを行ったところ、プラスミドオーグメンテーションを行った全ての系で2,4-D分解能が増強されたが、その効果は導入菌の種類によって異なることが示された。また、pJP4が活性汚泥中の優占菌に伝達され続けることで、安定した2,4-Dの分解が行われ得ることが明らかとなった。

総括並びに結論では、以上の結果を踏まえた上で、活性汚泥を利用した廃水処理プロセスにおける難分解性化学物質の分解能増強策としてのプラスミドオーグメンテーションの有効性と効率的な運転制御に関して議論するとともに、実用化に向けた今後の課題と期待について述べた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

活性汚泥内の優占菌に、処理対象物質に対する分解能をコードしたプラスミドを伝達させることで分解能を付与する“プラスミドオーグメンテーション”は、廃水処理プロセスにおける難分解性化学物質の処理性能を増強、安定化させる手法の一つとして注目を集めている。一方、実用化に向けては、プラスミドの種類やその導入に用いる宿主細菌に関する検討、オーグメンテーションの効率を左右する運転制御因子の同定等、多くの研究課題が残されている。

本論文は、プラスミドオーグメンテーションの実用化に向けた基礎的知見の集積を行うことを目的として、プラスミド／宿主の種類や汚泥滞留時間 (SRT) が活性汚泥内におけるプラスミドの伝達性に及ぼす影響を評価するとともに、ラボスケール活性汚泥リアクターを用いたプラスミドオーグメンテーション試験において、難分解性化学物質分解能が増強されるメカニズムの解明を試みたものであり、緒論と2章からなる本論、総括並びに結論から構成されている。

第1章では、緒論として、本研究の背景を述べ、その目的を示している。

第2章では、宿主として*Escherichia coli* C600、*E. coli* HB101、あるいは*Pseudomonas putida* KT2440に保持させた広宿主域自己伝達性プラスミドRP4とpJP4をフィルターメイティングにより活性汚泥細菌へ伝達させ、これら導入菌の種類やSRT制御が、活性汚泥細菌へのプラスミド伝達に及ぼす影響を調査している。その結果、処理方式の異なる2種類の汚泥試料のいずれに対してもプラスミドの伝達が確認されたが、導入菌やプラスミドの種類により、接合伝達頻度や検出されるtransconjugantの種類に違いが生じること、一部のtransconjugantはプラスミド上の機能を高効率で発現できること等を明らかにしている。また、SRTを長く設定した活性汚泥を用いた系で、高い接合伝達頻度と多様な表現型のtransconjugantが観察されたことから、導入菌の選定や活性汚泥プロセスの運転操作によって活性汚泥内のプラスミドの挙動をある程度制御できることを示唆している。

第3章では、第2章で用いた2種類の汚泥に、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)と2,4-D部分分解遺伝子群をコードするプラスミドpJP4を保持させた*E. coli* HB101、あるいは*Cupriavidus necator* JMP134を導入したラボスケール活性汚泥リアクターを作成して、プラスミドオーグメンテーション試験による2,4-D分解性能向上を試み、各系における2,4-D分解率を評価するとともに、導入菌とpJP4の定量、検出されたtransconjugantの特徴付けを行っている。その結果、プラスミドオーグメンテーションを行った全ての系で2,4-D分解能が増強されたが、その効果は導入菌の種類によって異なることを明らかにしている。また、pJP4が活性汚泥中の優占菌に伝達され続けることで、安定した2,4-Dの分解が行われ得ることを明らかにしている。

総括並びに結論では、以上の結果を踏まえた上で、活性汚泥法における難分解性化学物質の分解能増強策としてのプラスミドオーグメンテーションの有効性と効率的な運転制御に関して議論するとともに、実用化に向けた今後の課題と期待について述べている。

以上のように、本論文は環境・エネルギー工学、特に難分解性化学物質を含有する廃水の処理技術の向上に寄与するところが大きい。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。