The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	活性汚泥法への遺伝子組換え体の活用に関する基礎的研究
Author(s)	池, 道彦
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3067972
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

活性汚泥法への遺伝子組換え体の活用に関する基礎的研究

1993年3月

池　道彦

活性汚泥法への遺伝子組換え体の活用に関する基礎的研究

1993年3月

池　道彦

目　次

緒　論 …… 1

第１編　活性汚泥法における出現細菌およびプラスミドに関する研究

第１章　活性汚泥法における出現細菌相に関する研究
第１節　緒言 …… 4
第２節　実験材料および方法 …… 4
第３節　実験成績および考察 …… 6
第４節　要約 …… 14

第２章　活性汚泥法における細菌プラスミドの分布に関する研究
第１節　緒言 …… 15
第２節　実験材料および方法 …… 15
第３節　実験成績および考察 …… 18
第４節　要約 …… 25

第２編　遺伝子操作による水処理微生物の育種に関する研究

第１章　サリチル酸ヒドロキシラーゼ遺伝子を用いた多成分基質分解菌の育種に関する研究
第１節　緒言 …… 26
第２節　実験材料および方法 …… 26
第３節　実験成績および考察 …… 29
第４節　要約 …… 34

第２章　カテコール２，３オキシゲナーゼ遺伝子を用いたフェノール分解菌の育種に関する研究
第１節　緒言 …… 35
第２節　実験材料および方法 …… 35

第３節　実験成績および考察 …… 37
第４節　要約 …… 42

第３編　活性汚泥法における遺伝子組換え体の活用法に関する基礎的研究

第１章　組換え体の遺伝的安定性に関する研究
第１節　緒言 …… 43
第２節　実験材料および方法 …… 43
第３節　実験成績および考察 …… 45
第４節　要約 …… 50

第２章　組換え体の生態学的安定性に関する研究
第１節　緒言 …… 51
第２節　実験材料および方法 …… 51
第３節　実験成績および考察 …… 53
第４節　要約 …… 58

第３章　組換え体の活性汚泥法への活用に関する検討
第１節　緒言 …… 60
第２節　組換え体の混合系利用と純粋系利用 …… 60
第３節　混合系利用法の検討 …… 61
第４節　純粋系利用法の検討 …… 63
第５節　要約 …… 64

総括並びに結論 …… 65

文　献 …… 68

緒　論

活性汚泥法は、細菌、真菌類、原生動物、後生動物など多種多様な微生物の代謝活動を利用して、下排水中の汚濁物質を分解・除去する生物学的処理法の一つであり、その高い処理性能と経済性から広く世界に普及し、水域の保全に重要な役割を担ってきた。しかし、近年の産業活動の多様化や生活水準の向上に伴って、より高度な水質管理へのニーズが高まる中、表－１に示すような種々の問題が顕在化し、処理技術の本質的な改良が必要となってきた。

表－１　活性汚泥法の問題点

① 急激な流入水の水量・水質変動に対応しきれない
② 余剰汚泥が大量に発生する
③ 窒素・燐等の栄養塩類の除去率が低い
④ 難分解性物質の十分な処理ができない
⑤ 毒物・重金属等の流入で汚泥がダメージを受ける
⑥ 膨化現象の発生で汚泥の固液分離が悪化する
⑦ 発泡・スカム生成により固液分離障害と悪臭問題が起こる

活性汚泥法の技術改良は従来、プロセスの設計、操作条件の最適化、設備装置の性能向上など、処理環境の制御法を対象に検討されてきた。この種のアプローチは、浄化反応に関与する微生物についてはブラックボックスとしたまま活性汚泥を一つの生体触媒として取扱い、その機能を発揮させることに主眼をおいており、動力学理論が体系化され[1]、計装機器を用いた自動制御システムが実用化に移されるなど[2)3)]大きな成果をあげている。

これに加えて最近では、活性汚泥を微生物サイドからとらえた研究が数多く行われ、その成果に基づいた技術改良の方向がクローズアップされるようになった。活性汚泥法の微生物学的側面からの研究を分類すると表－２のようになる。このうち、生態学的見地にたった微生物相の変化や有用・障害微生物の挙動に関する研究（例えば表－２の②～⑥）は、活性汚泥生態系の合理的管理に役立つ種々の知見を提供している。中でも、窒素・燐除去プロセスの開発[4)-7)]や糸状性バルキングあるいは発泡の抑制技術[8)-10)]などは、このような知見が有効に活用された好例である。

表－２　活性汚泥法に関する微生物学的研究

① 病原微生物の消長に関する衛生学的研究
② フロック形成微生物の探索・分離とフロック形成機構の解明に関する研究
③ 膨化・発泡原因微生物の探索・分離とその制御法に関する研究
④ ＳＲＴ等処理制御の変化に伴う微生物相の変遷と優占微生物の挙動解明に関する研究
⑤ 各種微生物の相互作用と基質利用特性に関する研究
⑥ 特殊機能（硝化・脱窒，脱燐，化学物質分解，重金属蓄積等）を持つ微生物の探索とその機構解明に関する研究
⑦ 特殊微生物の活性汚泥への組み込みによる処理性能の向上に関する研究

他方、研究例は僅かではあるが、難分解性物質分解や重金属蓄積など特殊機能を持つ微生物を探索・育種し、これを処理系に組み込む試みも行われている[11)12)]。これは、活性汚泥の触媒としての能力そのものを高める新しい技術改良のアプローチを示しているが、その成否は、一義的には、すぐれた機能をもつ微生物を選択し、育種できるか否かにかかっている。

この観点から、１９７０年代以降、応用微生物学の分野で著しい発展を遂げた遺伝子操作技術の水処理分野への活用が提案されている[13)-16)]。遺伝子操作は、変異の誘発と選択を繰り返す従来の育種法とは異なり、計画的かつ意図的な微生物育種を可能にした。即ち、理論上は、微生物機能を目的通りに改変・増強することができる。遺伝子操作によって、表－３に示すような水処理微生物の持つ各種有用機能を強化した微生物、あるいはこれらの機能を数多く併せ持つ微生物を育種し、活用することができれば、処理性能の飛躍的向上が望める。例えば、高負荷運転に耐え、有害物質に強く、難分解性物質を効率よく分解し、しかも汚泥の沈降性が良好で、有価物の回収さえも可能な高機能・多機能型の活性汚泥法の開発も十分に期待できる。

表－３　水処理微生物の持つ有用機能

① フロック形成・生物膜付着促進能
② 難分解性物質（芳香族、塩素化化合物・合成高分子等）分解能
③ 硝化・脱窒能
④ 燐酸蓄積能
⑤ 重金属耐性・蓄積能
⑥ 毒物耐性・分解解毒能
⑦ 低ｐＨ・低温高温耐性
⑧ 悪臭分解能
⑨ メタン生成能
⑩ 光合成・化学合成能

遺伝子操作により育種された微生物、いわゆる遺伝子組換え体の活用は、発酵工業など物質生産の分野では既に実用の段階に達しており、培養プロセスの最適制御や安定管理についての知見が体系化されている[17)]。また、組換え体の野外利用に伴うバイオハザードのリスクアセスメントの立場から、土壌や水系における組換え体の挙動についての研究が行われ、その生態特性についての知見が集積されつつある[18)-20)]。しかし、活性汚泥法を始めとする排水処理分野での組換え体の活用については、その高い有用性が示唆されているにもかかわらず、机上での論議がなされているにとどまり、実用的検討はほとんど行われていないのが現状である。この原因は主に、組換え体の開放系利用が現段階で制約を受けていることにあるが、これに加えて、活用の場となる活性汚泥についての微生物学的・遺伝学的知識が十分にまとめられておらず、そのため、排水処理系内での組換え体の挙動に関する情報が欠如していることも重要な要因となっている。従って、今後、活性汚泥法における組換え体の挙動についての理論的・実験的研究を行い、その活用法を検討しておくことが極めて重要である。

本論文は、活性汚泥法の高度化・効率化に高いポテンシャルを持つ遺伝子組換え体の活用に注目し、その実用化を目的として、活性汚泥法における組換え体の挙動解明を中心に基礎的検討を行ったものである。

本研究を３編に分け、各編・各章の研究内容をまとめると以下のようになる。

第１編では、まず、組換え体活用の場としての活性汚泥法の特性を明らかにするために、処理系

における細菌群とプラスミドの挙動を調べ、その微生物学的・遺伝学的知見の集積と体系化を試みた。第１章では、各種活性汚泥から優占細菌を分離し、同定試験の成績から細菌相の特徴付けを行うとともに、処理の最も重要な操作因子である活性汚泥滞留時間との関連について考察を加えた。また、分離された優占菌の遺伝子操作材料としての有用性について論じた。第２章では、下水および活性汚泥から優占菌および薬剤耐性菌を分離し、そのプラスミドの検索により、処理系のプラスミド・プロファイルを調べた。この結果から、組換えプラスミドの導入が活性汚泥に及ぼす影響を考察した。

第２編では、芳香族化合物分解遺伝子を用いた水処理微生物の育種とその培養特性の検討を通じ、組換え体を利用した活性汚泥法の効率化について論じた。第１章では、フェノール分解菌 *Pseudomonas putida* PpG1064株にサリチル酸オキシダーゼ遺伝子を導入して、サリチル酸の分解能を賦与し、両基質を同時分解できる組換え体を育種した。また、この組換え体と野性株の分解特性を比較し、本育種の利点を示した。第２章では、*Pseudomonas putida* BH株 のフェノール代謝経路のうち、カテコール２，３オキシゲナーゼにより触媒される反応を強化し、その分解速度を増大させた。これにより、中間代謝経路の強化という新しい育種法の概念を提案した。

第３編では、組換え体の活用において最も重要な安定性の問題を、遺伝的・生態学的両側面から検討し、この知見を基に、活性汚泥法における組換え体の有効な活用法を検討した。第１章では、芳香族化合物分解遺伝子を組み込んだ組換えプラスミドの各種宿主菌株内での安定性を、連続継代培養により調べた。さらに、その解析結果から、遺伝的に安定な遺伝子組換え体の特性を明らかにした。第２章では、活性汚泥に組換え体を添加し、その挙動を追うことによって、生態学的安定性を評価した。特にここでは、回分・連続両試験を通じて、組換え体の生態学的安定性に及ぼす各種因子の影響について検討した。第３章では、これらの情報を基に、組換え体を活用した活性汚泥処理プロセスについて種々検討を加えた。また、これにより、活性汚泥法における組換え体活用の指針を示した。

第１編　活性汚泥法における出現細菌およびプラスミドに関する研究

第１章　活性汚泥法における出現細菌相に関する研究

第１節　緒　言

活性汚泥微生物集団の中で最大のポピュレーションを占めるのは、好気性の従属栄養細菌群である。これら細菌群は、下排水中の汚濁物質を直接摂取・分解するなど、最も重要な役割を担っており、その生態特性が活性汚泥の浄化機能を決定しているといっても過言ではない。一方、細菌宿主を用いた遺伝子組換え系は、大腸菌、枯草菌から、*Pseudomonas*属を始めとする各種細菌にまで拡大されており[1)-6)]、水処理分野でもその活用が期待できるものとなっている。従って、活性汚泥法への遺伝子操作の適用は、細菌群を対象とするのが最も効果的かつ実用的であるといえる。この場合、遺伝子組換え体を活用する生態系としての特性を明らかにしておく上でも、また有用な育種材料を探索・選択する上でも、活性汚泥中の細菌群の数や種構成を、詳細に検討しておくことが重要である。

活性汚泥の細菌学的研究については多数の報告がある[9)-15)]。中には、優占菌の検索や細菌相の変化などを取り扱ったものも少なくないが、これらの研究から得られた結果はそれぞれ異なっており、体系的な知見の提出には至っていない。この主な原因は、対象とした試料の流入水質、温度、活性汚泥滞留時間（ＳＲＴ）などの運転条件が各々違っているために、その成果が互いに比較できない点にある。従って今後は、各種汚泥の優占菌や細菌相が個々の例としてではなく、処理の操作因子との関連から解明されていくことが必要である。

そこで本章では、活性汚泥の細菌相を、処理の最も重要な操作因子であるＳＲＴとの相関から調べた。即ち、異なるＳＲＴ制御下で培養された活性汚泥の細菌構成を明らかにし、その比較から活性汚泥の細菌学的・生態学的特性について考察した。

第２節　実験材料および方法

１．実験材料

(1)活性汚泥：　各種ＳＲＴ活性汚泥調製のための種汚泥には、肉エキス、ペプトンを主成分とする合成下水（表１－１－１の原液を水道水にて希釈したもの）にfill and draw方式で 長期間馴致された活性汚泥を用いた。また、参考のため、大阪府下のＴ住宅団地合併処理場およびＳ下水処理場から採取した実処理場汚泥についても細菌相を調査した。Ｔ住宅団地合併処理場は住宅団地の生活排水のみを処理しており、ＳＲＴ

表１－１－１　合成下水原液の組成

成　分	濃　度 (*g/l*)
肉エキス	２０
ペプトン	３０
ＮａＣｌ	１．５
ＫＣｌ	０．７
$CaCl_2$	０．７
$MgSO_4$	０．５
$NaHCO_3$	１０．５

＊ＣＯＤcr＝50,000 *mg/l*

を極めて長期に設定した全酸化型の運転がなされていた。一方、S下水処理場は合流式都市型下水処理場であり、SRTは約5日に保たれていた。

(2)使用培地：　活性汚泥細菌の分離および培養には、表1－1－2に組成を示したCGY寒天培地[16]、およびこれから寒天を除いて調製したCGY液体培地を用いた。

表1－1－2　CGY培地の組成

成　分	濃　度(g/l)
カシトン	5
グリセリン	5
酵母エキス	1
寒天	15

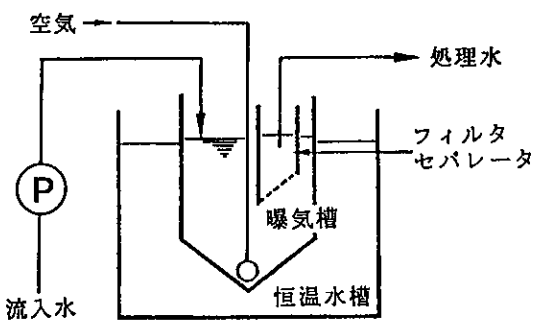
＊pH=7.2

2．実験方法

(1)各種SRT活性汚泥の調製：　図1－1－1の連続式活性汚泥処理装置を図中に示した条件で運転し、各種SRT活性汚泥を調製した。SRTは1日当たりに引き抜かれる余剰汚泥量に対する処理系内の全汚泥量の比率であり、活性汚泥の比増殖速度の逆数を表す重要な操作因子である。流入水は、表1－1－1の原液を水道水にて100倍希釈した合成下水を使用し、これを定量ポンプで10*l/day*となるように連続的に供給した。流入水の水質は全有機炭素濃度TOC＝157*mg/l*、化学的酸素要求量CODcr＝500*mg/l*であったため、全実験を通じて曝気槽（容量6*l*）への負荷量は5.0*g-CODcr/day*に保たれていた。SRTは、2日、5日、10日、15日の4段階に変化させて運転し、各々の定常期間に試料を採取した。図に示した通り固液分離はフィルター・セパレータ（住友スリーエム製、工業用パッド・タイプAベリーファイン）にて行われ、処理水SS濃度は極めて低かったため、SRT（*day*）は次のように定義した。

$$SRT = V/Q_w \quad または \quad Q_w = V/SRT$$

ここで、Vは曝気槽容量（*l*）、Q_wは引き抜き汚泥量（*l/day*）を示す。従って、Q_w値を変化させることによりSRTを設定した。また、表1－1－3に示した汚泥分析および水質分析を行った。



曝気槽容量	6	*l*
流入水流量	10	*l/day*
通気量	0.6	vvm
設定温度	25±1	℃
水理学的滞留時間	14.4	*hr*
CODcr容積負荷	0.83	*g-CODcr/m³/day*

図1－1－1　連続式活性汚泥処理装置

表1－1－3　汚泥・水質分析項目

分析項目	方　法
汚泥分析	
MLSS	遠心分離法
SVI	30分間静置沈降
水質分析	
TOC	燃焼－赤外線分析法
TKN	ケルダール法
NH_4-N	インドフェノール法
NO_3-N	ブルシン法
T－P	モリブデン青法

＊下水試験方法[17]による
TOCは島津TOC-10B使用

(2)活性汚泥細菌の分離：　活性汚泥の生菌数測定および細菌株の分離は、図１－１－２に示した平板培養法[18]で行った。この方法によれば、活性汚泥中の大部分の細菌にコロニーを形成させることができる。この平板培養で 10⁶希釈平板の任意の１枚に出現したコロニーのうち、他と隣接あるいは混合していない全コロニーを釣菌し、その各々をＣＧＹ液体培地に２回植え継いだ後、再びＣＧＹ培地平板上にコロニーを形成させ、活性汚泥細菌の分離株を得た。この過程で形態の異なったコロニーが出現した場合には、その各々を分離株とした。なお、破砕したフロックあるいは菌体細胞の再凝集を防止するため、希釈水には分散効果の優れた 5mg/l トリポリ燐酸ナトリウム水溶液[16]を使用した。

活性汚泥の洗浄・希釈
・活性汚泥試料適量を遠心分離（4°C, 10,000×g, 5分）
・希釈水で洗浄（4°C, 10,000×g, 5分）
・10vol.の希釈水に懸濁

↓

フロック破砕
・10倍希釈試料50mLを超音波発振機（日本精機製作所 GT200）で振動指示200μＡにて 2.5分間処理

↓

塗抹平板培養
・試料を適減希釈し、0.1mlをＣＧＹ培地に塗抹
・22°Cにて10～12日間培養

図１－１－２　　活性汚泥の平板培養法

(3)活性汚泥細菌の同定試験：　分離された活性汚泥分離株について、表１－１－４に示した項目の形態学的・生理学的試験を行い、その結果を基に、Steel and Cowan の第１次鑑別表[20]および Bergey's manual of systematic bacteriology[21]の記載に従って、およそ属レベルまでの同定を行った。

表１－１－４　　細菌同定試験項目および方法

試験項目	方　　法
グラム染色	Huckerの変法[19]
細胞形態	光学顕微鏡観察（×１，５００）[19][20]
運動性	光学顕微鏡観察（×１，５００）[19]
胞子	位相差顕微鏡観察[20]
オキシターゼ	Kovacsのオキシターゼ試験紙[19][20]
カタラーゼ	３％H_2O_2による発泡観察[19][20]
ＯＦテスト	Hugh and Leifsonの方法[19][20]

第３節　　実験結果および考察

１．活性汚泥の性状および処理性能

ＳＲＴを２日、５日、10日、15日の４段階に設定して調製された各種活性汚泥の、定常運転期間における平均的な性状を表１－１－５に示した。ＳＲＴの増加に伴って、曝気槽内の微生物濃度を示すＭＬＳＳ濃度は、ほぼ直線的に増大した。一方、汚泥容量指標（30分静置した活性汚泥1gの占める容量をmlで示す）ＳＶＩは、ＳＲＴ２日、10日の活性汚泥で各々 195、107 と高く、やや沈降性が悪かったが、ＳＲＴ５日、15日では各々、65、56と低い値を示し、極めて沈降性が良好であった。

表１－１－６には、各ＳＲＴの定常状態における活性汚泥処理装置の処理成績を示した。概して、ＳＲＴの増加に伴って処理水質は良好となったが、ＴＯＣおよび全ケルダール窒素（有機性窒素お

表1－1－5　各種ＳＲＴ活性汚泥の性状

項　目	ＳＲＴ			
	２日	５日	１０日	１５日
ＭＬＳＳ（mg/l）	309	784	1,078	1,473
ＳＶＩ（mg/l）	195	65	107	56
色調	淡褐色	黄褐色	褐色	暗褐色
３０分静置後の上澄	SS多い	SSやや多い	僅かにSS有り	澄明
フロック性状	線状フロック 圧密性に乏しい	微粒状フロック 沈降速度が遅い	粒状フロック 綿状フロック が潜在	粒状フロック 沈降性・圧密性 良好

＊定常期間約１週間の平均性状

よびアンモニア性窒素）ＴＫＮ濃度は、ＳＲＴ５日以上ではそれぞれ6.5～7.6mg/l および5.4～8.7mg/l の値でほぼ安定した。ＴＯＣ除去率は、ＳＲＴ２日～15日を通じて90%以上と高く保たれていたが、ＴＫＮ除去率は、ＳＲＴ５日以上で80%以上であったのに対し、ＳＲＴ２日では44%と低くなった。他方、全窒素Ｔ－Ｎ除去率は、ＳＲＴの増加につれて40%から15%に低下した。本実験では、曝気槽は常に好気的に保たれていたので、Ｔ－Ｎの除去は硝化－脱窒ではなく、活性汚泥への取り込みと汚泥引き抜きによると考えられる。

表1－1－6　各種ＳＲＴにおける活性汚泥処理成績

項　目		ＳＲＴ			
		２日	５日	１０日	１５日
流入水					
ＴＯＣ	(mg/l)	157.0	157.0	157.0	157.0
ＴＫＮ	(mg/l)	43.0	43.0	43.0	43.0
Ｔ－Ｐ	(mg/l)	3.8	3.8	3.8	3.8
処理水					
ＴＯＣ	(mg/l)	12.0	7.4	7.6	6.5
ＴＫＮ	(mg/l)	24.0	8.7	8.2	5.4
NH_4-N	(mg/l)	15.8	6.1	7.8	4.7
NO_3-N	(mg/l)	2.6	17.1	23.9	31.0
Ｔ－Ｎ	(mg/l)	26.6	25.8	32.1	36.4
ＴＯＣ	(mg/l)	2.7	3.5	2.2	3.1
除去率					
ＴＯＣ	(%)	92.4	95.3	95.2	95.9
ＴＫＮ	(%)	44.2	79.8	80.9	87.4
Ｔ－Ｎ	(%)	38.1	42.4	25.3	15.3

＊定常期間約１週間の平均水質

以上のように、ＳＲＴ制御に伴って活性汚泥の性状および処理性能が変化したことから、それぞれの活性汚泥の細菌相にも何らかの相違のあることが推測された。ここで、活性汚泥の機能は、一義的にはその細菌相によって決まると考えられるが、ＴＯＣ除去率がＳＲＴの変化に影響を受けな

かったことは興味深い。一方、TKN除去、即ち硝酸生成がSRT2日で急激に低下したことは、曝気槽から硝化細菌が流出したためと推測され、SRT制御によって一部の細菌が重要な選択を受けることを示している。

2．活性汚泥細菌の分離および同定試験

各種SRT活性汚泥の平板培養により得られた生菌数を表1－1－7に示した。MLSS 1g当たりの生菌数は、SRT5日以上でほぼ一定となったが、SRT2日では他の2～3倍の高い値となった。しかし、活性汚泥混合液 1ml当たりの生菌数は、MLSS濃度と同様にSRTが大きくなるにつれて増大した。表中には実処理場汚泥の生菌数についても併記した。SRT約5日で運転されているS下水処理場汚泥が、ここで調製したSRT5日活性汚泥とほぼ同じ生菌数を示したのに対し、全酸化型運転のT住宅団地合併処理場汚泥のMLSS 1g当たりの生菌数はかなり低い値を示し、SRTが長くなるにつれて生菌数が減少することが明らかとなった。

各試料の 10^6希釈平板上には 30～150のコロニーが出現し、分離に適当であったため、任意の1枚を選び細菌株の分離に供した。平板上でコロニー相互を区別できたものは、全コロニーの約70～90%で、これらをもれなく釣菌し、分離菌とした。分離の過程で増殖しなくなったコロニーや、2種の細菌から構成されていた混成コロニーが若干認められたが、最終的にSRT2日、5日、10日、15日の活性汚泥からそれぞれ36、60、68、90の分離株を得た。また、T処理場汚泥から32株、S処理場汚泥から30株を分離した。

表1－1－7　各種SRT活性汚泥および実処理場汚泥の生菌数

活性汚泥	生菌数 (cfu/ml)	生菌数 (cfu/g-MLSS)
各種SRT汚泥		
SRT 2日	4.9×10^{8}	2.0×10^{12}
SRT 5日	6.6×10^{8}	7.6×10^{11}
SRT10日	8.2×10^{8}	9.7×10^{11}
SRT15日	1.1×10^{9}	8.6×10^{11}
実処理場汚泥		
T団地処理場	4.6×10^{8}	5.9×10^{10}
S下水処理場	6.8×10^{8}	7.2×10^{11}

これらの活性汚泥分離株を、各種形態並びに生理試験の成績から分類すると表1－1－8のようになった。分離された細菌株の多くはグラム陰性の桿菌であり、オキシダーゼ、カタラーゼ活性を示したが、OFテストでグルコースから酸を生成するものは約10%と比較的少なかった。特に、嫌気的に酸を生成する通性嫌気性細菌は1株も認めらなかった。グルコースから酸を生じる活性汚泥細菌が全体の約10%にすぎなかった観察は、Diasand Bhat[12]によっても報告されている。表1－1－8に記載した各分類は Bergey's manual[21]に従って、以下のように同定される。ただしここで、OFテストでは培地に酵母エキスを加えるなどの修正を加えたのにも関わらず、細菌株が増殖を示さなかった場合も多々あったため、"－"の結果がでた株についてはこれを考慮した。また、一部の株にはさらに詳細な生理試験を行い、同定の助けとした。

分類Ⅰ-1～2 は、グラム陽性球菌でカタラーゼ活性を有することから *Micrococcus*属に同定したが、分類Ⅰ-3～4 は、グラム陽性球菌に該当する属がなく未同定とした。グラム陽性桿菌のうち、

表1－1－8　活性汚泥細菌の同定試験成績による分類

グラム染色	細胞形態	運動性	オキシダーゼ	カタラーゼ	胞子形成	色	OFテスト	分類	各種SRT活性汚泥 2日	5日	10日	15日	実処理場汚泥 T団地	S下水
	球状	－	＋	＋	－	黄	－	Ⅰ－1	0	0	0	1	0	0
			－	＋	－	赤	－	Ⅰ－2	0	0	1	0	0	0
			－	－	－	橙	－	Ⅰ－3	1	0	4	0	0	0
			－	－	－	－	－	Ⅰ－4	0	0	0	0	1	0
＋	桿状	＋	＋	＋	＋	－	－	Ⅱ	0	1	1	1	0	0
		－	＋	－	－	－	－	Ⅲ	0	0	0	0	0	2
	不規則状	－	－	＋	－	黄	－	Ⅳ－1	0	0	2	0	0	0
			－	＋	－	－	－	Ⅳ－2	0	6	0	17	2	0
			－	－	－	－	－	Ⅳ－3	4	3	10	1	2	0
－	桿状	＋	＋	＋	－	黄	O	Ⅴ－1	0	2	0	0	0	0
			＋	＋	－	黄	－	Ⅴ－2	3	3	4	0	4	0
			＋	＋	－	－	O	Ⅴ－3	12	2	5	5	3	2
			＋	＋	－	－	－	Ⅴ－4	12	41	33	37	14	24
		－	＋	＋	－	黄	O	Ⅵ－1	2	0	0	0	1	0
			＋	＋	－	黄	－	Ⅵ－2	1	1	8	28	4	2
			＋	＋	－	－	－	Ⅵ－3	1	1	0	0	0	0
			－	＋	－	－	－	Ⅵ－4	0	0	0	0	1	0
								（合計）	36	60	68	90	32	30

＊同定試験結果を株数で表示
＋，陽性；－，陰性

胞子を形成する分類Ⅱは*Bacillus*属としたが、分類Ⅲの２株は同定し得なかった。分類Ⅳ-1～3 は、グラム陽性の不規則状の桿菌でCoryneform groupの細菌と推測できた。このうち半数以上は培養につれて形態が変化するため、*Arthrobacter*属の細菌と考えられる。運動性を示すグラム陰性桿菌でオキシダーゼ、カタラーゼ陽性の分類Ⅴ-1～4 は、活性汚泥から分離されたことおよび各種有機物の資化性試験から *Pseudomonas*属に同定した。分類Ⅵ-1～2 は、運動性がなく黄色色素をもつグラム陰性桿菌であることからこれを*Flavobacterium*属とした。また、分類Ⅵ-3～4 は *Acinetobacter* または *Moraxella*の類縁属細菌と思われたが、同定できなかった。これをまとめると表１－１－９のようになる。ここで試験した活性汚泥中の細菌の大部分は *Pseudomonas*属、*Flavobacterium*属、Coryneform groupに属していたが、*Bacillus*属、*Micrococcus*属の細菌も 少数ながら確認された。

表１－１－９　活性汚泥細菌の同定結果

同定（属）	各種ＳＲＴ活性汚泥				実処理場汚泥	
	２日	５日	１０日	１５日	Ｔ団地	Ｓ下水
グラム陽性菌						
Bacillus	0	1	1	1	0	0
Micrococcus	0	0	1	1	0	0
Coryreform group	4	9	12	18	4	0
未同定（桿菌）	0	0	0	0	0	2
（球菌）	1	0	4	0	1	0
グラム陰性菌						
Pseudomonas	27	48	42	42	21	26
Flavobacterium	3	1	8	28	5	2
未同定（桿菌）	1	1	0	0	1	0
（総数）	36	60	68	90	32	30

３．活性汚泥の細菌相

表１－１－９より各種ＳＲＴ活性汚泥別に細菌の構成比率を求め、図示すると図１－１－３のようになった。*Pseudomonas*属と *Flavobacterium*属を合わせたグラム陰性菌が、全体の73～83%とほとんどを占めたが、Coryneform groupを中心とするグラム陽性菌も、ＳＲＴに関わらず14～27%の割合で認められた。*Alcaligenes*属 を含め、ここで認められたグラム陰性菌は、多くの研究者によってかなりの頻度で分離されており[9)-10)]、活性汚泥の優占菌種であると考えられているが、ここでの結果はこれを裏付けるものとなった。一方、Coryneform groupのようなグラム陽性菌は、活性汚泥中で優占菌となることは少ないが、本研究では*Arthrobacter*属を中心とするCoryneform groupの細菌が比較的多数分離された。グラム陽性菌が優占菌として分離された例には、van Gils[15)] がグルコースと硫酸アンモニウムを含む合成下水で培養した活性汚泥の構成細菌のうち24%が*Micro-*

*coccus*属であったとした報告がある。このような知見は、活性汚泥細菌相の決定因子が、下水組成や操作条件など多数の要因に支配されていることを示唆しており、今後の研究課題となる。

ここでの実験では操作因子としてＳＲＴのみを変化させた。この結果、図１－１－３から明らかなように、ＳＲＴ制御により活性汚泥細菌相はかなり変化した。即ちＳＲＴ２日、５日の活性汚泥では、*Pseudomonas*属が全体の各々75%、80%と極めて高い割合を占めていたが、ＳＲＴが長く設定されるに伴って*Flavobacterium*属 と Coryneform groupの割合が増し、*Pseudomonas*属は 47%にまで減少した。ＳＲＴの逆数は活性汚泥の比増殖速度μを表すので、ＳＲＴ制御により、曝気槽内の細菌のうち１／ＳＲＴ以下のμを持つ細菌が引き抜き汚泥として系外に排出されることになる。従って、ＳＲＴ２日活性汚泥に見られる細菌は、μが0.5day^{-1}以上で増殖する細菌に限られる一方、ＳＲＴ15日ではμが 0.07day^{-1}程度の増殖速度が遅い細菌も含まれていることになる。このような増殖速度による選択により、ＳＲＴの増加とともに比較的小さいμを持つ細菌までが槽内に保持され、構成細菌の多様性が増すものと考えられる。参考のため図中に併記した実処理場の汚泥においても、制御ＳＲＴの長いＴ住宅団地合併処理場汚泥の方がＳ下水処理場汚泥に比べて多様な細菌構成となったことは、μによる選択が実処理施設でも起こっていることを示しており、ＳＲＴが活性汚泥細菌相に重要な影響を与える因子であることを示唆している。

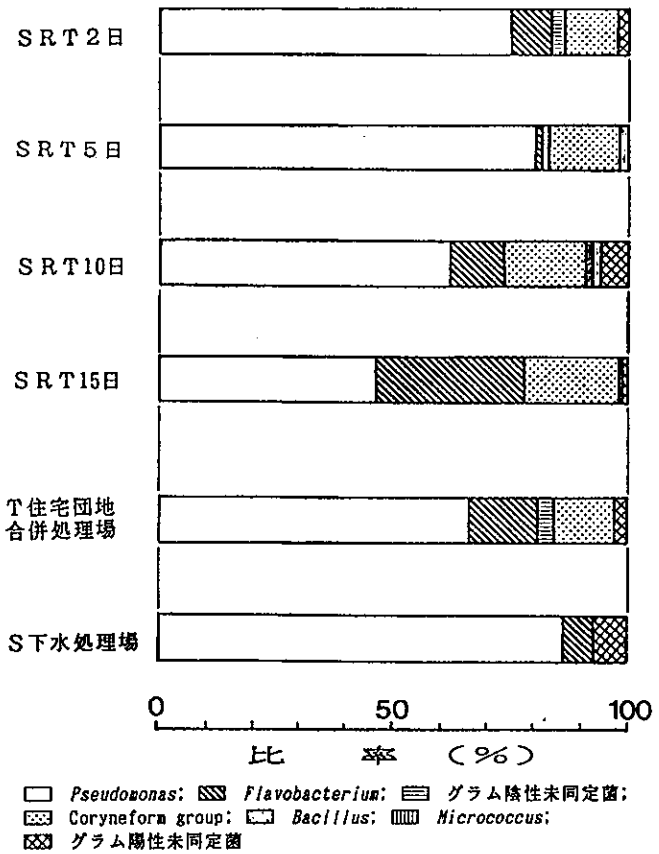


図１－１－３　各種ＳＲＴ活性汚泥および処理場汚泥の細菌構成

ＳＲＴによる細菌相の変化をさらに詳細に検討するため、活性汚泥混合液 1*ml*あるいはＭＬＳＳ 1*g*当たりの生菌数と各種構成細菌の比率から、ＳＲＴと活性汚泥中の各種構成細菌数の関係を図示したところ、図１－１－４ および 図１－１－５が得られた。図１－１－４から明らかなように、

ＳＲＴの増加に伴って混合液1*ml*当たりの全細菌数は増加するのに対し*Pseudomonas*属細菌はＳＲＴ５日以上ではほとんど増加せず、一定に保たれていた。一方、*Flavobacterium*属細菌はＳＲＴ10日から15日の間で著しく増加し、Coryneform groupの細菌はＳＲＴの増加とともにほぼ一定の割合で増加した。従って、ＳＲＴの増加に伴う *Pseudomonas*属の構成比率の減少は *Pseudomonas*属細菌の減少ではなく、他の細菌の増加に起因することが解った。また、図１－１－５に示す通り、ＳＲＴ５日以上ではＭＬＳＳ1*g*当たりの *Pseudomonas*属細菌は減少し、*Flavobacterium*属細菌がそれを補うようにして増加して、全細菌数が一定に保たれていた。ここで、Coryneform group細菌はＳＲＴに関わらず、ＭＬＳＳ1*g*当たりでは一定数を示した。Mckinney[22] によれば *Pseudomonas*属細菌は基質の分解に直接関与する１次的優占細菌、*Flavobacterium*属細菌は１次的優占細菌の自己分解生成物をよく利用し増殖する２次的優占菌に位置付けられている。この知見と図に示された構成細菌数の変化を考え合わせると、ＳＲＴによる選択は間接的に、代謝産物を介しての細菌間の相互作用に大きく影響を及ぼしているものと推測される。

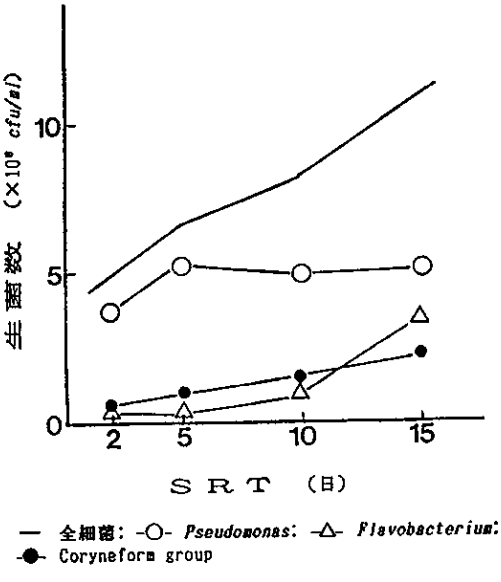


図１－１－４　ＳＲＴと活性汚泥構成細菌数の関係（*cfu/ml*）

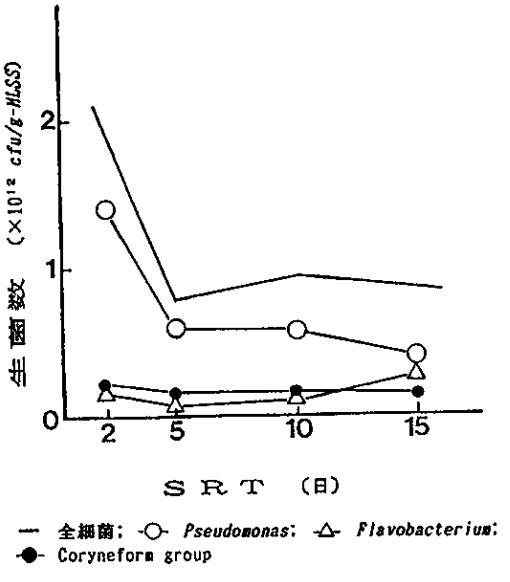


図１－１－５　ＳＲＴと活性汚泥構成細菌数の関係（*cfu/g-MLSS*）

４．各種ＳＲＴ活性汚泥の出現細菌の性質

ＳＲＴ制御に伴い活性汚泥の細菌相が変化することが明らかになったが、汚泥の性状や処理性能との明確な関連は認められなかった。しかし、実験を通じて出現細菌の性質について調べ、以下のような興味ある知見が得られた。

254の分離株について、ＣＯＤcr＝500*mg/l*の合成下水を基質としたＬ字管による振盪培養を行ったところ、特にＳＲＴ15日の活性汚泥から分離された*Flavobacterium*属細菌の多くが、他の細菌に

表1－1－10　各種ＳＲＴ活性汚泥の代表菌株の特性

ＳＲＴ	菌株	性質													
		ｸﾞﾗﾑ染色	細胞形態	運動性	色	ｵｷｼﾀﾞｰｾﾞ	ｶﾀﾗｰｾﾞ	ｾﾞﾗﾁﾝ	ﾃﾞﾝﾌﾟﾝ	硝酸還元	ｸｴﾝ酸	ｲﾝﾄﾞｰﾙ	MRﾃｽﾄ	VPﾃｽﾄ	OFﾃｽﾄ
2日	202	－	桿状	＋	黄	++	＋	++	＋	＋	－	－	－	－	－
	203	－	桿状	－	黄	＋	＋	++	－	++G	－	－	－	－	O
	206	－	桿状	＋	－	＋	＋	－	－	＋	＋	－	－	－	O
	217	－	桿状	＋	－	＋	＋	－	－	++	－	－	－	＋	－b
	232	＋	不規則状	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
5日	508	＋	不規則状	－	－	－	＋	－	－	＋	＋	－	－	－	－
	514	－	桿状	＋	－	＋	＋	－	－	++G	－	＋	－	－	－b
	517	－	桿状	＋	－	＋	＋	++	＋	＋	－	－	－	－	－b
	526	－	桿状	＋	－	＋	＋	－	－	＋	－	－	－	－	－b
10日	1008	＋	球状	－	橙	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
	1011	－	桿状	＋	－	＋	＋	－	－	++	－	－	－	－	－b
	1019	＋	不規則状	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－b
	1040	－	桿状	＋	－	＋	＋	－	－	＋	－	－	－	－	－b
	1045	－	桿状	＋	－	＋	＋	－	－	＋	－	－	－	－	－b
	1050	－	桿状	＋	－	＋	＋	＋	－	－	－	－	－	－	O
15日	1503	－	桿状	－	黄	＋	++	－	－	－	－	－	－	－	－b
	1516	－	桿状	－	黄	＋	++	－	－	－	－	－	－	－	－b
	1525	－	桿状	＋	－	＋	＋	－	－	＋	－	－	－	－	－b
	1527	－	桿状	＋	－	＋	＋	＋	－	－	－	＋	－	－	－b
	1555	＋	不規則状	－	－	－	＋	＋	－	＋	－	－	－	－	－

＊ ＋,陽性；－,陰性；++,反応強陽性；G,ガス生成；b,アルカリ生成

比べて粘着性に富む壁面への旺盛な付着成長を示した。ＳＲＴ15日の汚泥のＳＶＩが低く、沈降性が極めて良好であったことは、このような付着性細菌の存在によるものと考えられ、構成細菌の培養・増殖特性が活性汚泥の性状に影響を及ぼすことが示唆された。

また、ＳＲＴ制御によって活性汚泥を構成する細菌の属組成が変化したのみならず、出現細菌の性質も異なっていた。表１－１－10に、各種ＳＲＴ活性汚泥から分離された代表菌株の詳細な生理試験の結果を示した。ただしここで、代表菌株は、コロニー形状の観察から、平板上に比較的高い比率で認められたものを選択した。表示した通り、同じ種汚泥を用いたにも関わらず、各種ＳＲＴ活性汚泥の代表菌株の性質はそれぞれ異なっており、どの汚泥からも共通して分離された菌株はなかったといえる。このことは、活性汚泥中では優占菌種の変遷が絶えず起こっていること、および常に優占種となる特定菌種は存在しないことを示唆している。

以上のような知見を含め、ここでの研究の結果は、活性汚泥法に遺伝子組換え体を活用する上で重要な意味を持つものと考えられる。例えば、遺伝子組換えの対象菌株として、活性汚泥の優占属となりやすい *Pseudomonas*属の細菌を選択することは有効であるといえる。*Pseudomonas*属 細菌の遺伝子組換え系については、近年研究が進み、RSF1010由来のレプリコンを利用した 有用なベクター[4)5)]が開発されるなど、その活用が十分に期待できる。一方、活性汚泥中では常に構成細菌の変遷が起こっているとの示唆から *Pseudomonas*属のみならず、*Flavobacterium*属やCoryneform group の細菌についても、遺伝子組換え技術を開発しておくことが望まれる。また、ここで検討したように、ＳＲＴなどの操作因子が活性汚泥の細菌相に及ぼす影響についての知見を集積し、処理系に導入した組換え体の挙動を予測することも重要な課題である。

第４節　要　約

遺伝子組換え体活用の場として、活性汚泥細菌相の特性を明らかにすることを目的として、ＳＲＴの異なる活性汚泥の細菌相を調べ、以下の知見を得た。

1)　各種ＳＲＴ活性汚泥の優占菌として *Pseudomonas*属、*Flavobacterium*属、およびCoryneform groupの細菌が分離された。また、少数ではあるが*Micrococcus*属、*Bacillus*属、およびグラム陰性・陽性の未同定菌が認められた。

2)　ＳＲＴ制御によって活性汚泥の細菌構成が変化した。ＳＲＴ２日および５日では、大部分が *Pseudomonas*属細菌であったのに対し、ＳＲＴ10日および15日では *Flavobacterium*属とCoryneform groupの細菌の構成比率が増加し、多様な細菌相の形成が見られた。

3)　各種ＳＲＴ活性汚泥の細菌相や分離された優占菌株の性質と汚泥性状・処理性能の関連について検討し、組換え体活用上参考となる若干の興味ある知見を得た。

第２章　活性汚泥法における細菌プラスミドの分布に関する研究

第１節　緒　言

土壌や水系などの自然生態系中には、抗生物質産生プラスミドや分解系プラスミドを始めとする、いわゆる野生型プラスミドを保持する細菌が多数存在している[1)-3)]。これらプラスミドは、同一宿主内に安定に共存できない不和合性群に分かれ、他の細菌間を移動する自己伝達能・可動化能や、遺伝子交換による組換え能を示すものも少なくないため、各種遺伝子の消長・伝播や適応進化に対して重要な役割を果たしているといわれている。従って、遺伝子組換え体が導入された生態系においては、外来遺伝子の挙動は、土着細菌およびそれらの保持する野生型プラスミドに多大な影響を与えるとともに、逆にその存在が大きく影響されるといえる[4)5)]。

排水処理系における組換え遺伝子の移動については、バイオハザードの評価を目的とした Gealt *et al.* による一連の研究[6)-8)]が、興味深い知見を提供している。これらの研究では、下水中に存在する野生型薬剤耐性プラスミドの介在により、活性汚泥に添加された組換え体の持つ非伝達性プラスミドが、処理系の土着細菌に転移することが明らかにされた。また、このことから、組換え体に導入された外来遺伝子が、２次的な宿主となる土着細菌中で定着することが示唆され、組換え体が排水処理系内で生態学的・遺伝学的に安定化し得ることが指摘された。特に、ここで示された導入遺伝子の定着は、組換え体に賦与された有用機能を活性汚泥法に積極的に活用する観点からも注目に値するものである。即ち、有用外来遺伝子が活性汚泥中の種々の細菌に伝播し、安定に保持されれば、自ずと処理機能の向上が期待できる。従って、外来遺伝子の安定化に影響を及ぼす野生型プラスミドの活性汚泥プロセス内での分布、およびその動態を明らかにしておくことは、極めて重要な意義を持つ。

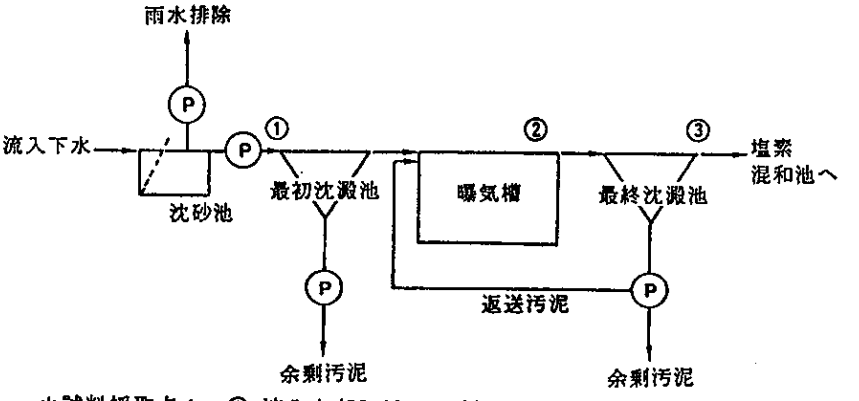
そこで本章では、概して自己伝達能とリンクしている可能性の高い薬剤耐性マーカーに着目して、下水および活性汚泥中の細菌からプラスミドを検索し、活性汚泥法におけるプラスミド分布を調査した。また、この結果から、組換え体活用の場としての活性汚泥法の特性について検討を加えた。

第２節　実験材料および方法

１．実験材料

(1)対象下水処理場：　大阪府下のＳ下水処理場を対象として細菌プラスミドの検索を行った。Ｓ下水処理場における水処理工程を図１－２－１に示した。本処理場への流入下水は、主に家庭排水であるが、一部食品工業を中心とする工場排水も流入している。また、降水時には雨水の流入する合流式処理場である。図中には、プラスミド検索を行った試料の採取点を併記している。図示した通り、流入下水（流入水）は沈砂池出口から、曝気槽混合液（活性汚泥）は曝気槽の出口付近から、また２次処理水（処理水）は最終沈澱池越流口から、それぞれ採取した。

(2)使用培地：　優占菌の分離にはＣＧＹ培地を用いた（第１章：表１－１－２）。ここで、優占菌とは活性汚泥中では10^8～10^9 *cfu/ml*以上、流入水および処理水中では10^5～10^6 *cfu/ml*以上存在し



＊試料採取点：　① 流入水(SS=62.3mg/l)　② 活性汚泥(MLSS=944mg/l)
③ 処理水(SS=9.2mg/l)

沈砂池		
水面積負荷（雨水）	3,600	m³/m²/日
（汚水）	1,800	m³/m²/日
滞留時間（雨水）	24.1	m³/秒
（汚水）	4.68	m³/秒

曝気槽		
BOD－SS負荷	0.3	kg/kg/日
曝気時間	5.3～6.0	時間
返送比	25～50	%
空気量	40	m³/BOD-kg/日

最初沈澱池		
水面積負荷	35	m³/m²/日
沈澱時間	2	時間

最終沈澱池		
水面積負荷	25	m³/m²/日
沈澱時間	2.5	時間

図1－2－1　S下水処理場の概要

ている、即ち高い比率で存在している細菌と定義した。大腸菌群は、デスオキシコーレイト培地（栄研化学製）を用いて分離した（表1－2－1）。また、各種抗生物質耐性菌は、CGY培地に抗生物質を加えた培地にて分離した。使用した抗生物質はアンピシリン（Ap）、カナマイシン（Km）、テトラサイクリン（Tc）、およびストレプトマイシン（Sm）で、各々表1－2－2に示した終濃度となるように添加した。抗生物質は単独で使用したが、Ap、Km、およびTcの3重耐性菌検索のため、この3者を全て含む培地も用いた。さらに、分離株の培養にはL培地（表1－2－3）を使用した。ただし、抗生物質耐性菌の培養では、適宜抗生物質を添加した培地を用いた。

表1－2－1　ﾃﾞｽｵｷｼｺｰﾚｰﾄ培地の組成

成　分	濃　度 (g/l)
ペプトン	10
乳酸	10
ﾃﾞｽｵｷｼｺｰﾙ酸ﾅﾄﾘｳﾑ	1
NaCl	5
K_2HPO_4	2
ｸｴﾝ酸鉄ｱﾝﾓﾆｳﾑ	0.033
寒天	15

＊栄研化学製

表1－2－2　抗生物質の使用濃度

抗生物質	使用濃度 (mg/l)
アンピシリン（Ap）	100
カナマイシン（Km）	80
テトラサイクリン（Tc）	25
ストレプトマイシン（Sm）	50
Ap＋Km＋Tc	100+80+25

表1－2－3　L培地の組成

成　分	濃　度(g/l)
ペプトン	10
酵母エキス	5
NaCl	5

＊pH＝7.4

2．実験方法

(1)活性汚泥細菌の分離：　流入水、活性汚泥、および処理水からプラスミド検索に供する細菌を分離した。試料は遠心分離にて固形物を洗浄した後、これを適宜希釈して先に示した各種培地に平板培養し、優占菌、大腸菌群、および各種抗生物質耐性菌の生菌数を計測した。この培養により出現したコロニーを形態から分類し、各培地上での代表的なコロニーを釣菌して細菌株を得た。なお、活性汚泥試料については、第1章の図1－1－2に示した生菌数測定法に準じたフロック破砕を行い、平板培養に供した。ただし、抗生物質耐性菌を正しく計数・分離するため、培養は30°Cで5～7日間の短時間とした。また、試料の洗浄、希釈には、一貫して 5*mg/l*トリポリ燐酸ナトリウム水溶液を使用した。

(2)粗プラスミドの抽出：　分離株からの粗プラスミド抽出液の調製はKado and Liuの方法[9]に一部修正を加えた図1－2－2の手順[10]に従って行った。原法に加えた修正は主に、プラスミド検索の作業効率を高めるため反応系を6分の1スケールとし 1.5*ml*容のマイクロチューブで操作を行ったこと、および検出感度を上げるためプラスミドDNAを約20倍に濃縮するエタノール沈澱の工程を設けたこと、の2点である。

(3)プラスミドの検索：　粗プラスミド抽出液の 1～3*μl*を Meyers *et al.*の方法[11]に準じてアガロースゲル電気泳動に供し、プラスミド検索を行った。ただし、泳動用緩衝液には、40mM Tris、2mM EDTA 、20mM 酢酸の組成を使用し、泳動装置には水平型サブマリン電気泳動装置 Mupid-2（アドバンス製） を使用して、100Vで20～30分の泳動を行った。泳動後、ゲルを 0.5*μg/ml*のエチジウムブロマイド溶液で染色し、紫外線照射装置 TL-33（フナコシ薬品製）下で可視化し、プラスミド・バンドの有無を調べた。また、プラスミドのサイズをλ－*Hind*Ⅲ断片を標準とし、別途求めた cc-formDNAとの泳動距離の相関から推定した。

菌体の集菌・洗浄
- 培養液（OD_{600}＝0.8）1.5*ml*を遠心分離にて集菌（4°C, 10,000×*g*, 10分）
- 50mM燐酸緩衝液で洗浄（4°C, 10,000×*g*, 10分×2）

↓

溶菌処理
- ペレットをE緩衝液（40mM Tris, 2mM EDTA, pH=7.9）165*μl*に懸濁
- 溶菌液（3% SDS, 50mM Tris, pH=12.6）330*μl*を添加、攪拌
- 50～60°Cで20分間加熱

↓

高分子DNA、タンパクの変性除去
- フェノール－クロロホルム溶液（1：1） 1*ml*を添加、攪拌
- 遠心分離（4°C, 10,000×*g*, 15分）で水相を採取

↓

プラスミドDNAの濃縮（エタノール沈澱）
- 1/10 vol.3M酢酸ナトリウム溶液（pH=4.8）および2vol.エタノールを添加、攪拌
- -20°Cで40分間保持
- 遠心分離（4°C, 25,000×*g*, 10分）で上澄除去
- ペレットを乾燥
- TE緩衝液（10mM Tris, 1mM EDTA, pH=8.0）25*μl*に溶解

図1－2－2　Kado and Liuの修正法によるプラスミド抽出

第３節　実験結果および考察

１．抗生物質耐性菌の分布

生菌数測定によって得られた流入水、活性汚泥、および処理水中の全細菌、大腸菌群、各種抗生物質耐性菌の数を表１－２－４に示した。ここで、全細菌はＣＧＹ培地で、大腸菌群はデスオキシコーレイト培地を用いて計数した。表示された通り、流入水中には、今回試験された抗生物質の少なくとも１つに耐性を示す細菌が6.4×10^3 ～ 4.3×10^5 *cfu/ml*存在していた。Ｔｃ耐性菌は流入水中の全細菌の0.15%にすぎなかったが、それ以外の抗生物質に耐性を示す細菌は、4.53～8.11%とかなり高い比率を占めていることが明らかとなった。また、代表的な薬剤耐性・自己伝達プラスミドであるＲＰ4と同様に、Ａｐ、Ｋｍ、Ｔｃへの３重耐性を示す菌も 0.015%の比率で認められた。Mcpherson and Gealt [7]は、Philadelphia下水処理場の流入水中の抗生物質耐性菌を調べ、全細菌2.4×10^6 *cfu/ml*のうち、Ａｐ耐性菌は9.96%と多数存在していたが、他の抗生物質耐性菌（Ｋｍ、Ｔｃ、Ｓｍを含む）は0.12～0.87%であったと報告している。これと比較すれば、ここで試験したＳ処理場の流入水にはかなり多くの耐性菌が存在しているものといえる。なお、大腸菌群については、他の下水処理場の流入水[12]と大きな差はなかった。

抗生物質耐性菌の比率は、活性汚泥中では 0.01～1.40%（３重耐性菌は0.003%）と低かった。表から明らかなように、流入水および活性汚泥中の耐性菌数にはさほど差がなかったが、全細菌数が活性汚泥中で高くなったために、耐性菌の比率が低く表れたものといえる。逆に、処理水では抗生物質耐性菌の比率が高くなり、流入水とほぼ同等となった。

表１－２－４　Ｓ下水処理場における抗生物質耐性菌の分布

計数培地	試料		
	流入水	活性汚泥	処理水
ＣＧＹ培地	5.3×10^6	1.0×10^8	1.3×10^5
ﾃﾞｽｵｷｼｺｰﾚｲﾄ培地	3.2×10^5 (6.04)	9.8×10^4 (0.10)	3.0×10^3 (2.31)
ＣＧＹ＋Ａｐ	2.4×10^5 (4.53)	1.3×10^5 (0.13)	3.8×10^3 (2.92)
ＣＧＹ＋Ｋｍ	4.3×10^5 (8.11)	2.2×10^5 (0.22)	6.0×10^3 (4.62)
ＣＧＹ＋Ｔｃ	6.4×10^3 (0.12)	1.2×10^4 (0.01)	1.8×10^2 (0.14)
ＣＧＹ＋Ｓｍ	2.5×10^5 (4.72)	1.4×10^6 (1.40)	5.2×10^3 (4.00)
ＣＧＹ＋Ap, Km, Tc	7.8×10^2 (0.015)	3.2×10^3 (0.003)	7.7×10^1 (0.06)

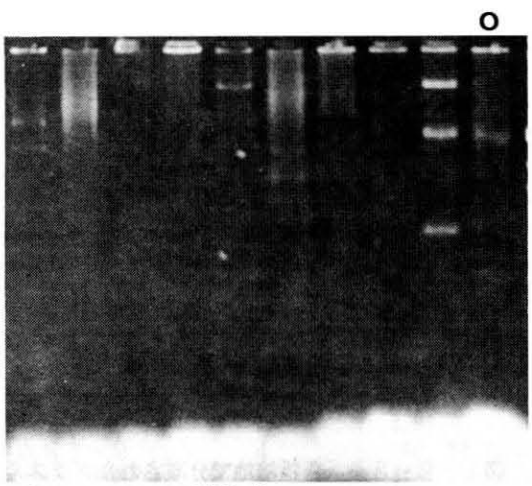
＊生菌数(*cfu/ml*)で表示．（ ）内はＣＧＹ培地での計数に対する比率(%)

2．プラスミド検索成績

流入水、活性汚泥、および処理水の平板培養により出現したコロニーから、それぞれ培地ごとに典型的な10の優占コロニーを選択し、表1－2－5に示す番号を付し、プラスミドを検索した。この電気泳動の例を写真1－2－1に示した。ここで明確なDNAバンドの認められた株をプラスミド保持株とした。

表1－2－5　プラスミド検索に供した分離株の命名

試料	培地	菌株命名
流入水	CGY培地	ICGY－1～10
	ﾃﾞｽｵｷｼｺｰﾚｲﾄ培地	IDES－1～10
	CGY＋Ap	IA－1～10
	CGY＋Km	IK－1～10
	CGY＋Tc	IT－1～10
	CGY＋Sm	IS－1～10
	CGY＋Ap, Km, Tc	IAKT－1～10
活性汚泥	CGY培地	SCGY－1～10
	ﾃﾞｽｵｷｼｺｰﾚｲﾄ培地	SDES－1～10
	CGY＋Ap	SA－1～10
	CGY＋Km	SK－1～10
	CGY＋Tc	ST－1～10
	CGY＋Sm	SS－1～10
	CGY＋Ap, Km, Tc	SAKT－1～10
処理水	CGY培地	ECGY－1～10
	ﾃﾞｽｵｷｼｺｰﾚｲﾄ培地	EDES－1～10
	CGY＋Ap	EA－1～10
	CGY＋Km	EK－1～10
	CGY＋Tc	ET－1～10
	CGY＋Sm	ES－1～10
	CGY＋Ap, Km, Tc	EAKT－1～10



0: λ-*Hind*Ⅲ消化物

写真1－2－1　プラスミド検索の例
（IAKT1～10）

この結果をまとめ、表1－2－6に示した。また、ここで検出された保持株について、そのプラスミド数およびサイズを、表1－2－7に示した。

試験された合計 210株のうち25%に当たる52株が保持株であり、総数150 のプラスミド・バンドが検出された。これを試料別に見ると、それぞれ試験された70株のうち、流入水では23株、活性汚泥では 9株、処理水では20株がプラスミドを有していた。

また、分離培地別にこの結果をまとめると図1－2－3になる。一般に、抗生物質耐性はプラスミド上にコードされているケースが多いため、耐性菌がプラスミドを保持している確率は高いと予想される。しかし、図に示された通り、抗生物質耐性とプラスミド保持には特に相関が認められず、むしろ抗生物質を含まないCGY培地およびデスオキシコーレイト培地で分離された、優占菌および大腸菌群の方が、保持菌の比率が高かった。優占菌の30%がプラスミドを保持していたことは、活性汚泥処理系においてプラスミドが普遍的に存在していることを示唆している。

一方、検出された保持株をそのプラスミド数から分類し、図1－2－4を得た。図から、プラスミドを1つだけ保持するものが52株中16株（32.5%）と最も高い比率を占めるものの、複数個保持する株も多数存在していたことが解る。

表1－2－6　S下水処理場におけるプラスミド検索結果

試　料	培　　地	保持株(数)*	非保持株
流 入 水	CGY培地	4 (24)	6
	ﾃﾞｽｵｷｼｺｰﾚｲﾄ培地	4 (11)	6
	CGY＋Ap	2 (6)	8
	CGY＋Km	3 (8)	7
	CGY＋Tc	3 (13)	7
	CGY＋Sm	3 (8)	7
	CGY＋Ap, Km, Tc	4 (8)	6
活性汚泥	CGY培地	1 (2)	9
	ﾃﾞｽｵｷｼｺｰﾚｲﾄ培地	3 (10)	7
	CGY＋Ap	1 (1)	9
	CGY＋Km	3 (7)	7
	CGY＋Tc	0 (0)	10
	CGY＋Sm	1 (1)	9
	CGY＋Ap, Km, Tc	0 (0)	10
処 理 水	CGY培地	4 (11)	6
	ﾃﾞｽｵｷｼｺｰﾚｲﾄ培地	6 (22)	4
	CGY＋Ap	2 (5)	8
	CGY＋Km	2 (2)	8
	CGY＋Tc	2 (4)	8
	CGY＋Sm	2 (2)	8
	CGY＋Ap, Km, Tc	2 (5)	8

＊ 検索されたプラスミド保持株数．（ ）内は検索されたプラスミドの総数．

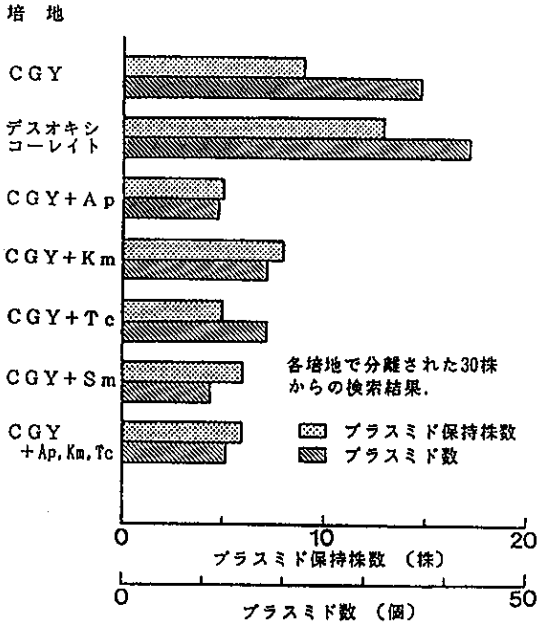


図1－2－3　各種培地で分離されたプラスミド保持株およびプラスミド数

表1－2－7　　検索されたプラスミド保持株およびそのプラスミド

菌　株	プラスミド数	プラスミドのサイズ (kb)
ICGY－2	5	89.9, 13.8, 6.87, 4.75, 2.45
－3	6	25.0, 8.35, 4.64, 3.68, 3.20, 2.45
－4	4	123, 87.0, 6.40, 3.03
－9	9	103, 67.6, 48.1, 12.4, 8.60, 4.04, 3.47, 2.80, 2.32
IDES－1	3	44.4, 5.62, 3.55
－3	5	46.5, 8.12, 5.15, 3.49, 2.74
－6	1	3.65
－7	2	4.43, 3.49
IA－4	2	91.2, 8.53
－7	4	4.75, 4.59, 4.21, 3.02
IK－2	4	129, 39.3, 3.53, 2.48
－4	3	129, 42.9, 3.53
－5	1	147
IT－1	3	9.51, 5.38, 3.37
－2	8	22.1, 12.3, 7.51, 7.17, 6.47, 6.20, 4.59, 3.80
－3	2	2.91, 1.79
IS－1	6	31.9, 19.6, 4.36, 3.37, 2.82, 2.24
－3	1	7.44
－7	1	131
IAKT－1	2	123, 29.5
－5	2	44.0, 22.5
－7	3	123, 35.9, 2.89
－9	1	4.62
SCGY－5	2	114, 38.1
SDES－3	3	56.5, 3.03, 2.74
－5	5	53.8, 7.20, 4.21, 3.06, 2.29
－9	2	7.20, 4.65
SA－8	1	16.0
SK－1	1	106
－2	3	103, 31.2, 3.15
－8	3	124, 25.7, 16.7
SS－2	1	16.0
ECGY－2	2	7.24, 4.13
－3	5	31.4, 19.2, 6.77, 4.04, 3.12
－7	3	104, 33.8, 7.24
－10	1	6.86
EDES－1	5	53.8, 32.8, 6.56, 3.89, 3.49
－2	5	92.9, 44.4, 14.0, 10.8, 4.56
－3	2	47.6, 30.7
－4	2	3.43, 2.80
－7	6	40.5, 15.2, 6.07, 4.89, 4.01, 3.34
－9	2	34.2, 2.97
EA－4	4	50.7, 5.11, 2.68, 2.28
－8	1	105
EK－4	1	10.0
－5	1	117
ET－1	3	8.77, 5.11, 2.85
－3	1	5.11
ES－2	1	2.37
－8	1	8.91
EAKT－2	4	140, 61.7, 35.9, 8.08
－9	1	4.47

また、検出されたプラスミドをサイズで分類し、図１－２－５に示した。ここでプラスミドは、微小（5kb以下）、小（5～10kb）、中（10～30kb）、大（30～100kb）、および巨大（100kb以上）の５段階に類別した。微小プラスミドは、複製に必要な領域以外には僅かな構造遺伝子しか保持し得ない。また、大プラスミドは、自己伝達性をコードする *tra*領域を含み得るサイズと意味付けることができる[5]。図から明らかなように、分離されたプラスミドのうち約40%は微小プラスミドであったが、30kb以上の大 および 巨大プラスミドも、約30%の比率を占めた。このことは、活性汚泥処理系には自己伝達能（または可動化能）をコードし得る、大分子量のプラスミドが比較的多数存在していることを示唆している。一方、微小プラスミドは、細菌の生存に有利な遺伝子の取得や、不利な遺伝子の削除など、処理系内で起こっている遺伝子再編成[13] によって生じたものとも考えられる。

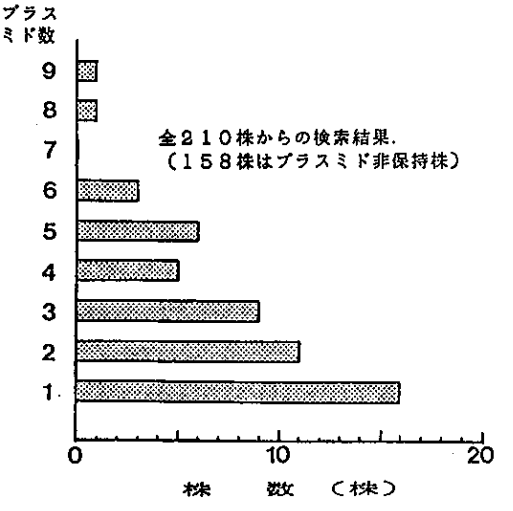


図１－２－４　　保持株の持つプラスミド数

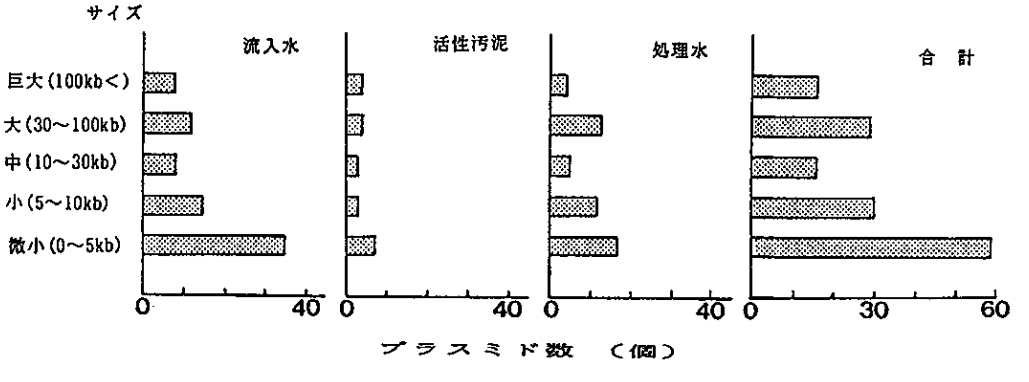


図１－２－５　　各試料から分離されたプラスミドのサイズ

図1－2－6にはプラスミドのサイズによる分類を培地別に示したが、分離培地により保持菌のもつプラスミドのサイズがかなり異なっている様子が伺える。このような観察から、細菌種や薬剤耐性とプラスミドに何らかの関係があるとも考えられるが、検出されたプラスミドの機能については、今後の研究を要する。

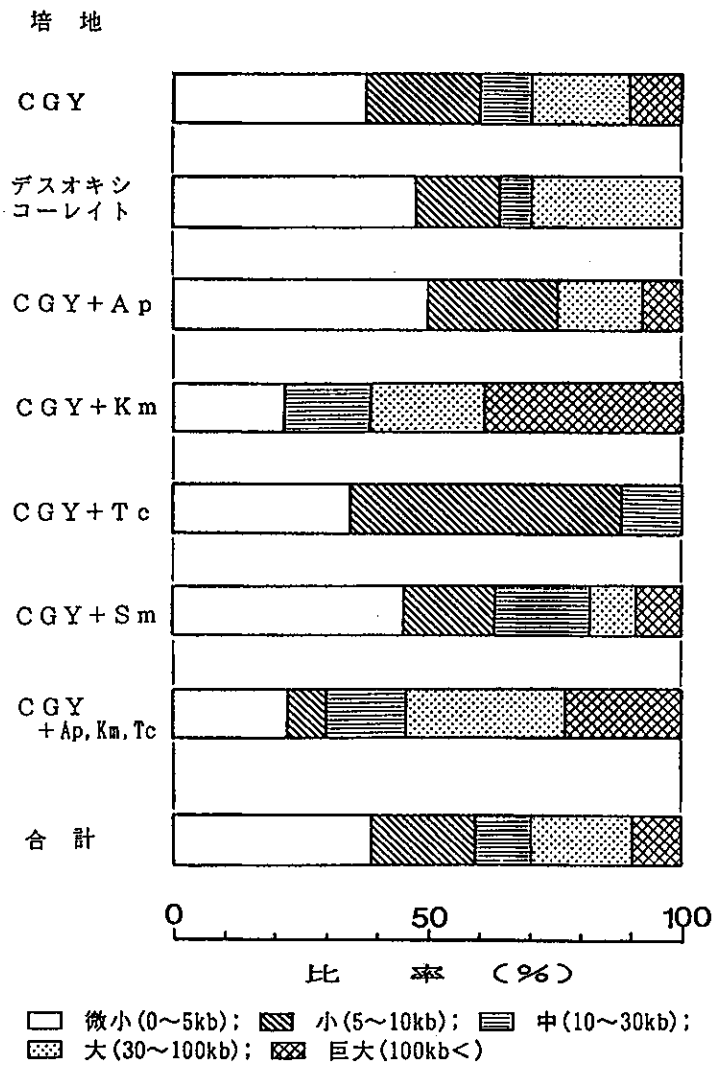


図1－2－6　各種培地から分離されたプラスミドのサイズ

３．活性汚泥法におけるプラスミドの分布

流入水、活性汚泥、処理水から分離されたプラスミド保持株およびプラスミドの数を、図１－２－７に図化した。これは、Ｓ下水処理場におけるプラスミドの分布、即ちプラスミド・プロファイルを示したものといえる。

ＣＧＹ培地で分離された菌株は、各試料中の優占菌であることから、図は処理場におけるプラスミド保持菌の存在頻度を大まかに表しているといえる。これより、細菌プラスミドは流入水中にかなり高い比率で存在しているが、曝気槽内では存在比率が低下することが明らかである。また、処理水中では再びその比率が高まることが解る。このプラスミド分布の様子は、大腸菌群およびＫｍ耐性菌を除く各種抗生物質耐性菌についても認められた。活性汚泥中でプラスミド保持菌の比率が低下することは、保持菌が曝気槽内で淘汰されやすいことを示唆している。

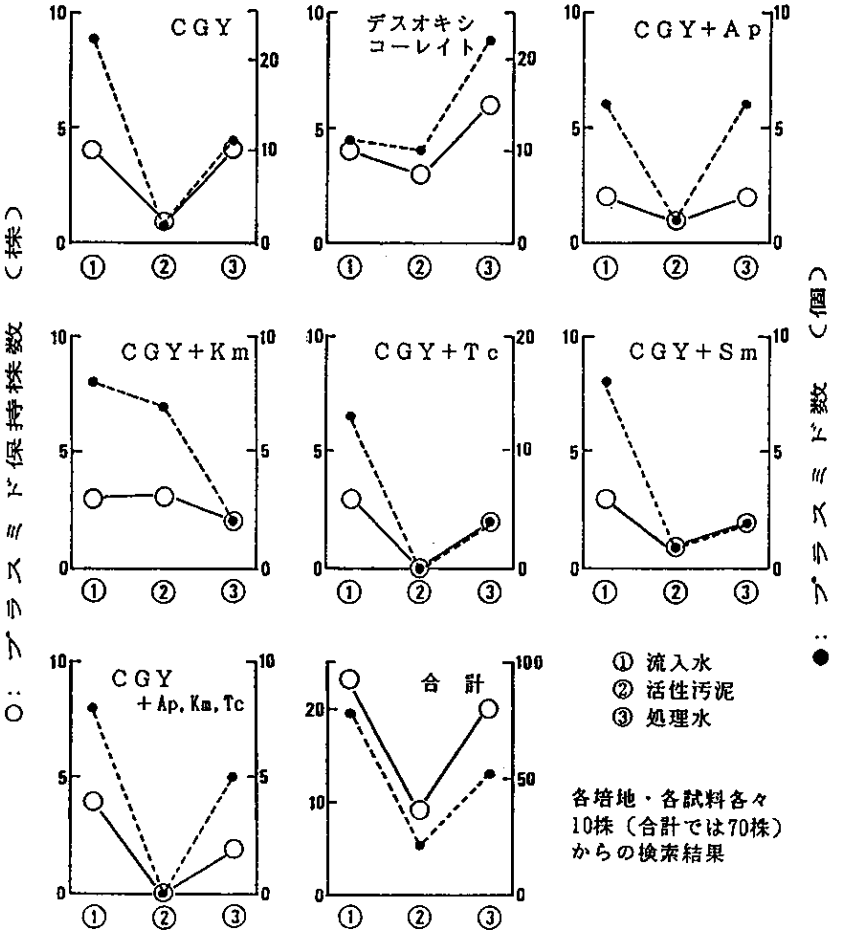


図１－２－７　　Ｓ下水処理場におけるプラスミドの分布

一般に、プラスミドにコードされている物質分解や抗生物質・重金属耐性などは、ある環境下においては宿主細菌の生存に有利に働くといわれているが[5]、曝気槽内においてはプラスミド保持の効用がなかったことになる。活性汚泥法に組換えプラスミドを導入した組換え体を活用する場合、この現象は重要な問題と考えられ、今後この機構の解明が望まれる。例えば、活性汚泥中において宿主の生存に有利に作用するプラスミドの機能・特性を明らかにすることができれば、水処理微生物の育種に有効な遺伝子組換え系（ベクター系）の開発が期待できる。このような観点から見れば、ここで活性汚泥の優占菌株から分離されたプラスミドには、有用な遺伝子組換え材料となるものが含まれていると考えられる。プラスミド保持菌の多くは複数のプラスミドを有していたが、このような不和合性群の異なるプラスミドを分離し、それぞれベクターとして活用することができれば、下水処理系由来の材料によって幅広い水処理微生物の育種が可能になる。

一方、処理水中で保持菌の比率が増加することは、プラスミド保持株の方が沈降性の良い活性汚泥フロックに取り込まれにくく処理水中に流出しやすいこと、あるいは最終沈澱池でプラスミドを持つ細菌の方が増加したことを意味している。一般的には、前者のような現象が起こることは考えにくいが、後者については、Mancini *et al.*[8]がベンチスケールの活性汚泥処理装置におけるプラスミドの挙動を調べ、最初および最終沈澱池でプラスミド伝達が起こることを示した報告や、Mach and Grimes[14]が 両沈澱池において高頻度でRプラスミドが伝達されることを認めた報告から、S下水処理場においても最終沈澱池でプラスミドの伝達が起こり、保持菌の比率が増加したと考えれば理解できる。

第4節　要　約

活性汚泥法において、遺伝子組換え体およびその遺伝子の挙動に多大な影響を及ぼすと考えられる、野生型プラスミドの分布を明らかにすることを目的として、S下水処理場の流入水、活性汚泥、および処理水中の細菌からプラスミドを検索し、以下の知見を得た。

1)　流入水、活性汚泥、処理水から分離した優占菌、大腸菌群、各種抗生物質耐性菌、合計 210株のうち、25%に当たる52株から総数 150のプラスミドが検索された。ここで、プラスミド保持株の約3分の2は複数のプラスミドを保持していた。

2)　検出されたプラスミドの約40%は 5kb以下の微小なプラスミドであったが、自己伝達能をコードし得る30kb以上のサイズを持つ大きいプラスミドも約30%を占めた。

3)　プラスミドを保持する細菌は、流入水中ではかなり高い比率（30～40%）で存在するが、曝気槽内ではその比率が低下した。また、処理水中ではその比率が再び高くなり、沈澱池でのプラスミド保持菌の増加が示唆された。

4)　組換え体活用の立場から、活性汚泥処理系におけるプラスミドの挙動について考察した。また、ここで検索されたプラスミドが、水処理微生物育種の材料として有用であることを示唆した。

第２編　遺伝子操作による水処理微生物の育種に関する研究

第１章　サリチル酸ヒドロキシラーゼ遺伝子を用いた多成分基質分解菌の育種に関する研究

第１節　緒　言

活性汚泥法に遺伝子操作を適用する目的は、物質分解効率の向上、毒性物質に対する耐性の獲得、フロック形成の促進、特殊環境下での処理など多岐に渡っている。中でも、難分解性物質の分解は、近年における最も重要な問題の一つであるが、各種分解菌に関する生化学的・遺伝学的知見が比較的多く得られているため、有用組換え体育種の可能性が高く、遺伝子操作による問題解決に大きな期待が寄せられている。

既に、ナフタレン、トルエンなど芳香族化合物の分解遺伝子を取り扱った応用研究では、２種以上の代謝経路の組み合わせや広範な基質特異性を持つ分解酵素の付加によって、一つの細菌に幾つかの新たな化合物の分解能を賦与する、いわゆる多成分基質分解菌の育種も報告され[1)-8)] その環境浄化への適用が提案されている。特に、多様な難分解性物質が混入する排水処理系においては、このような多成分基質分解菌の利用価値は極めて高いものと考えられる。しかし、既往研究の多くは、物質分解域の拡大という現象の解明に焦点を当てているため、育種菌の水処理微生物としての特性とその有用性については十分な検討がなされていない。このため、活性汚泥法への活用を図る上では、育種された多成分基質分解菌の増殖・基質除去特性を明らかにし、実用的側面からその機能の評価を行っておく必要がある。

本章では、フェノール分解菌*Pseudomonas putida* PpG1064にサリチル酸ヒドロキシラーゼ遺伝子を組み込むことで、フェノール、サリチル酸両基質を分解することのできる組換え体を育種し、基質除去特性を種々検討することを通じて、その有用性を評価した。また、分解遺伝子の発現制御に関する考察を加え、排水処理に有効な多成分基質分解菌の育種法を論じた。

第２節　実験材料および方法

１．実験材料

(1)供試菌株およびプラスミド：　表２－１－１に、本章の実験に用いた細菌株およびプラスミドを整理した。遺伝子操作の対象菌株には、図２－１－１に示した *ortho*経路でフェノールおよび安息香酸を分解・資化する*Pseudomonas putida* PpG1064を使用した。本菌株は、ナフタレン、サリチル酸の*meta*経路での分解（図２－１－１に併記）をコードしたプラスミドＮＡＨを有する野生株*P. putida* PpG1064(ＮＡＨ)[9)]を 1.5$\mu g/ml$マイトマイシンＣおよび0.05%ＳＤＳを含むＬ培地（第１編第２章：表１－２－３）にて約48時間培養（30°C）して得たプラスミド消去株である。本株へのサリチル酸資化能の賦与に用いたサリチル酸ヒドロキシラーゼ（サリチル酸からカテコールへの変換反応を触媒する）遺伝子（*nahG*）は、ＮＡＨプラスミドＤＮＡからクローニングした。クロー

ニング用ベクターにはpBR325[11]、受容菌には*Escherichia coli* C600[10]を用い、さらに広宿主域ベクターとしてpKT230[12]を用いた。ヘルパープラスミドRP4[13]は*E. coli* C600に保持されていた。一方、pHF100およびpHF400は *nahG*のクローニングの結果得られた組換えプラスミドである。

(2)使用培地： 菌株の培養には第1編第2章表1－2－3に示したL培地を使用した。フェノールおよびサリチル酸の分解試験では、表2－1－2の無機塩培地にフェノールを 500*mg/l*の濃度で加えたフェノール培地、サリチル酸を400*mg/l*の濃度で加えたサリチル酸培地、および両基質を各々、300*mg/l* の濃度で加えたフェノール－サリチル酸培地を用いた。なお本培地にはトリプトファン（20*mg/l*）を補っている。また、形質転換株および接合伝達株の選択培地は、培地に適宜、抗生物質（Ap25*mg/l*、Sm50*mg/l*）を加え、1.5% 寒天で固化して調製した。

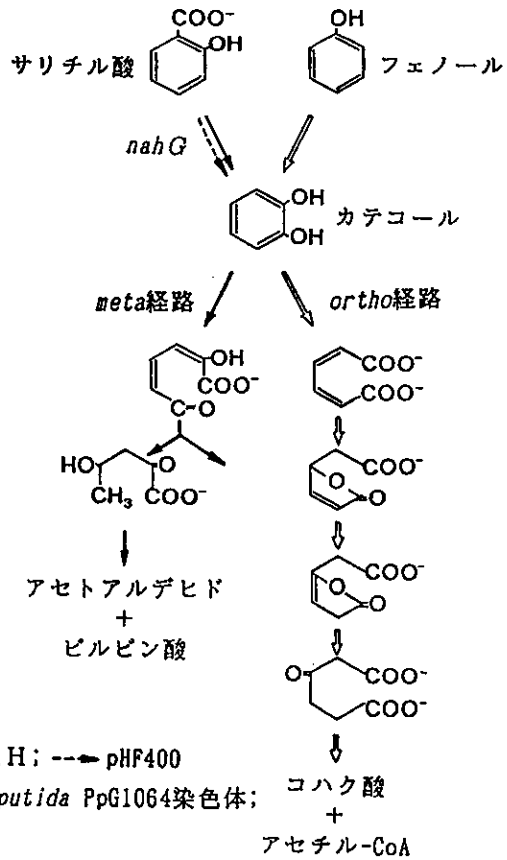


図2－1－1　*P. putida* PpG1064(NAH)および *P. putida* PpG1064(pHF400)によるフェノールおよびサリチル酸分解経路

表2－1－1　供試菌株およびプラスミド

菌株／プラスミド	表現型／遺伝子型	文献
菌　株		
P. putida PpG1064	*trp*, Phe⁺, Ben⁺(*ortho*)	9)
E. coli C600	*leu, thr, thi, hsdR, hsdM*	10)
プラスミド		
NAH	Nah⁺, Sal⁺(*meta*), *nahG*	9)
pBR325	Ap^r, Tc^r, Cm^r	11)
pKT230	Sm^r, Km^r, *mob*	12)
RP4	Ap^r, Km^r, Tc^r, *tra*	13)
pHF100	pBR325-*nahG*; Ap^r, Tc^s, Cm^r	14)
pHF400	pKT230-*nahG*; Sm^r, Km^s, *mob*	14)

＊Phe⁺, フェノール分解; Ben⁺, 安息香酸; Nah⁺, ナフタレン; Sal⁺, サリチル酸; (*ortho*), オルソ経路; (*meta*), メタ経路.
Ap, アンピシリン; Km, カナマイシン; Tc, テトラサイクリン; Cm, クロラムフェニコール; Sm, ストレプトマイシン

表2－1－2　無機塩培地の組成

成　分	濃　度 (*g/l*)
K_2HPO_4	1.0
$(NH_4)_2SO_4$	1.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
$FeCl_3$	0.02
NaCl	0.1
$CaCl_2$	0.1

＊pH=7.4

２．実験方法

(1)ＤＮＡの分離、切断、結合：　プラスミドＤＮＡは、Birnboim and Dolyの方法[15]で分離し、必要に応じて塩化セシウムーエチジウムブロマイド平衡密度勾配遠心分離[16]により純化した。制限酵素（*Hind*Ⅲ）は宝酒造より購入し、使用説明書に従って37°C、90分の反応によりＤＮＡの切断を行った。切断したＤＮＡは第１編第２章同様のアガロースゲル電気泳動によって分析した。また、ＤＮＡ断片を回収する場合には低融点アガロースゲル（ベセスダ製）を用い、目的ＤＮＡ断片を含むゲルを68°C、15分温浴で保持した後、フェノール抽出およびエタノール沈澱を行った。ＤＮＡ切断末端の燐酸基除去およびＤＮＡの結合はそれぞれ、ＣＩＡＰおよびＴ４ＤＮＡリガーゼを用いるライゲーションキット（いずれも宝酒造製）を使用し、使用説明書に準じて反応を行った。ここで反応に用いた緩衝液などは、Molecular cloning[17]に従って調製した。

(2)形質転換、接合伝達：　*E. coli* C600へのプラスミドの導入は、Morisonの方法[18]で調製したコンピテントセルを用いた形質転換[17]により行った。一方、*P. putida* PpG1064への組換えプラスミドの導入は、ヘルパー *E. coli* C600(ＲＰ4)を用いたBradley *et al.* の方法[19]による三親接合伝達によった。ただしここで、matingは供与菌、ヘルパー、および受容菌の培養液（Ｌ培地、30°C、一晩培養）を５：５：１の比率で混合し、Ｌ培地平板上30°C、４時間の条件で行った。

(3)*nahG*のクローニング：　*nahG*は、pBR325をベクター、*E. coli* C600を受容菌に用いたＮＡＨプラスミドＤＮＡのショットガン・クローニングにより単離した。即ち、*Hind*Ⅲで消化したＮＡＨおよびpBR325各々0.1μgを 50μlの反応系で結合させ、*E. coli* C600に形質転換し、サリチル酸およびＡｐを含むＬ培地に平板培養した。この選択培地では *nahG*をもつクローンはサリチル酸からカテコールを生成し、これが空気酸化により褐色を呈するため容易に検出できる。

(4)フェノールおよびサリチル酸分解試験：　菌株の１白金耳をＬ培地にて一晩往復振盪培養（30°C、ストローク長40mm、80rpm）したものを前培養液とし、この1mlを 300ml容の三角フラスコに分注した 120mlの試験培地に植菌して、30°C、160rpmで回転振盪培養した。培養開始後から経時的にサンプリングを行い、菌体濃度および遠心分離上澄液（15,000×g、10分）の基質濃度を測定した。ここで、菌体濃度は OD_{600}で、また基質濃度としてフェノール濃度を4-アミノアンチピリン変法[20]で、サリチル酸濃度をShellの方法[21]で測定した。

(5)酵素活性の測定：　適宜菌体のカテコール１，２オキシゲナーゼ（Ｃ１２Ｏ）活性およびカテコール２，３オキシゲナーゼ（Ｃ２３Ｏ）活性を、以下の方法で調製した粗酵素液について測定した。菌体培養液を50mM燐酸緩衝液（ｐＨ 7.5）で２回洗浄した後、ペレットを再びこの緩衝液に懸濁して超音波発振機（日本精機製作所 GT200）で細胞を破砕し、これを遠心分離して（25,000×g、20分、4°C） 上澄を粗酵素液とした。Ｃ１２ＯおよびＣ２３Ｏ活性は Nakazawa and Yokotaの方法[22]で測定した。ここで酵素活性は、Ｃ１２Ｏについては1分間にカテコールからcis,cis-ムコン酸が生成される速度（μmole/min）、Ｃ２３Ｏについては2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドが生成される速度（μmole/min）を粗酵素液タンパク質重量当たりについて求め、Unit/g-proteinの単位で表した。なお、粗酵素液のタンパク質濃度は、牛血清アルブミンを標準としたLowry *et al.*の

方法[23]で測定した。

第３節　実験結果および考察

１．*nahG*のクローニング

pBR325をベクターとして用いた、ＮＡＨのプラスミド*Hind*Ⅲ消化物の受容菌*E. coli* C600へのクローニングにより選択培地上で褐色を呈したコロニーを選択した。Lehrbach *et al.*[24]は、ＮＡＨプラスミド*Hind*Ⅲ消化16断片のうち、3.1kb断片に*nahG*が存在していることを示している。そこで、本クローンの組換えプラスミドに挿入されたＤＮＡ断片を調べたところ、そのサイズは 3.1kbであり、また、本クローンをサリチル酸を含むＬ培地で培養したところ、培地中のサリチル酸濃度が減少したことから、*nahG* を含むＮＡＨの3.1kb *Hind*Ⅲ断片がクローニングされたことが確認された。この組換えプラスミドをpHF100とし、その構造を図２－１－２に示した。

２．多成分基質分解菌 *P. putida* PpG1064(pHF400)の育種

pHF100は大腸菌専用のベクターpBR325で構築されたため *P. putida* PpG1064にそのまま導入することができない。そこで*P. putida* PpG1064に*nahG*を導入するために、pHF100から切り出した 3.1 kb *Hind*Ⅲ断片と広宿主域ベクターpKT230の*Hind*Ⅲ消化物を結合し、これを *E. coli* C600に形質転換し、先と同様の選択により組換えプラスミドpHF400を得た。この構造を図２－１－３に示した。

この組換えプラスミドを持つ供与菌*E. coli* C600(pHF400)と ヘルパー*E. coli* C600(ＲＰ4)および受容菌*P. putida* PpG1064による三親接合伝達でpHF400を*P. putida* PpG1064に導入したところ、得られた接合伝達株はサリチル酸培地（無機塩培地にサリチル酸、トリプトファン、およびＳｍを添加した培地）上で増殖することができた。即ち、接合株*P. putida* PpG1064(pHF400) は、宿主の有していたフェノールおよび安息香酸の資化能に加えて、サリチル酸の資化能を賦与された多成分基質分解菌である。*P. putida* PpG1064 は、先に述べたように染色体にコードされた *ortho*経路でフェノールおよび安息香酸を分解する。ここで育種された *P. putida* PpG1064(pHF400)は、pHF400にコードされた *nahG*の発現でサリチル酸をカテコールに変換し、これを宿主の持つ *ortho*経路により完全分解・資化するものといえる（図２－１－１参照）。

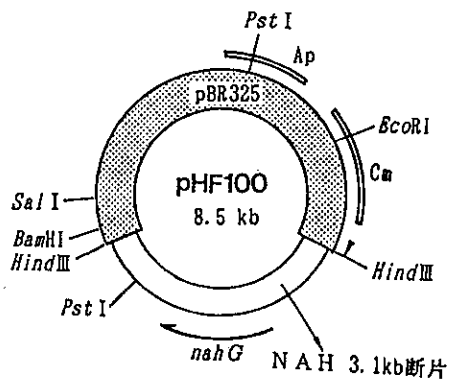


図２－１－２　ｐＨＦ１００の構造

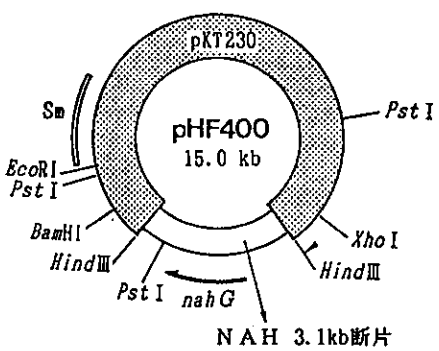
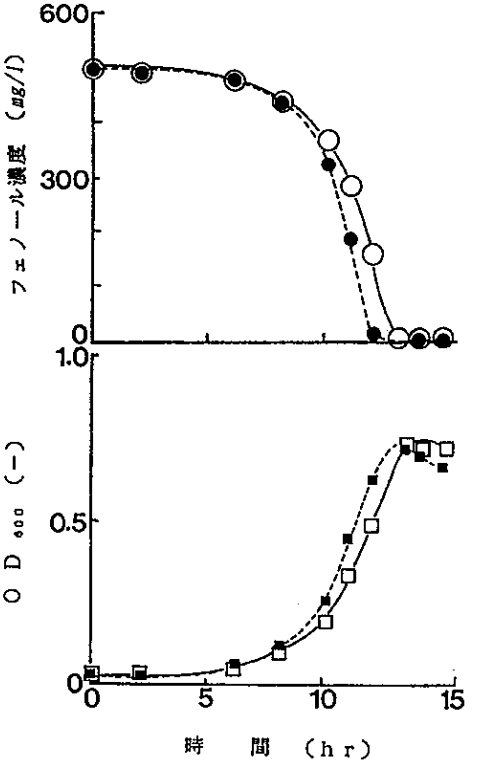


図２－１－３　ｐＨＦ４００の構造

3．フェノールおよびサリチル酸分解試験成績

振盪培養試験により *P. putida* PpG1064(pHF400)のフェノール、サリチル酸分解および両基質の同時分解特性を調べ、野生株*P. putida* PpG1064(ＮＡＨ)との比較を行った。

(1)フェノール分解：　組換え体 *P. putida* PpG1064(pHF400)、および宿主菌 *P. putida* PpG1064（ＮＡＨプラスミド消去株）によるフェノール分解試験の結果を、図２－１－４に比較した。これは、組換えプラスミドの導入が宿主のフェノール分解に及ぼす影響を示したものといえる。図示したように、組換え体の増殖およびフェノール分解は宿主より僅かに遅くなった。pHF400は、フェノール分解に関しては何等の情報もコードしていないため、この場合、組換えプラスミドの保持は、むしろ組換え体にとって負担となることが示された。また、*P. putida* PpG1064(ＮＡＨ)について同様の試験を行ったところ、増殖速度およびフェノール分解速度は、組換え体よりもさらに低くなり、野生株についてもプラスミド保持の負荷が確認された。



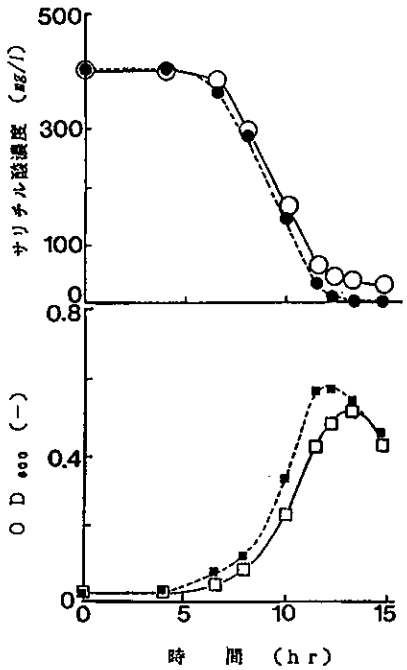
P. putida PpG1064(pHF400)：—○— フェノール濃度；—□— ＯＤ600
P. putida PpG1064：--●-- フェノール濃度；--■-- ＯＤ600

図２－１－４　*P. putida* PpG1064 および *P. putida* PpG1064(pHF400)による フェノール分解試験成績

(2)サリチル酸分解：　組換え体 *P. putida* PpG1064(pHF400) および 野生株 *P. putida* PpG1064(ＮＡＨ)によるサリチル酸分解試験の様子を、図２－１－５に示した。両株ともにサリチル酸を分解して増殖したが、野生株の方がやや速い増殖および基質除去を示した。サリチル酸の分解において、組換え体は、pHF400上の*nahG*により サリチル酸をカテコールに変換し、これを宿主の*ortho*経路で完全分解する。一方、野生株は、ＮＡＨプラスミド上の一連の分解遺伝子により 主に*meta*経路での分解を行う（図２－１－３参照：野生株がカテコール分解において*meta*経路を選択することは、この試験におけるＣ１２０およびＣ２３０活性の測定により確認した）。ここで、野生株ではサリチル酸分解遺伝子群は１つのオペロンを成し、効率よく発現の制御が行われているが、組換え体では *nahG*がベクターのプロモーターの制御下におかれているのに対し、カテコール以下

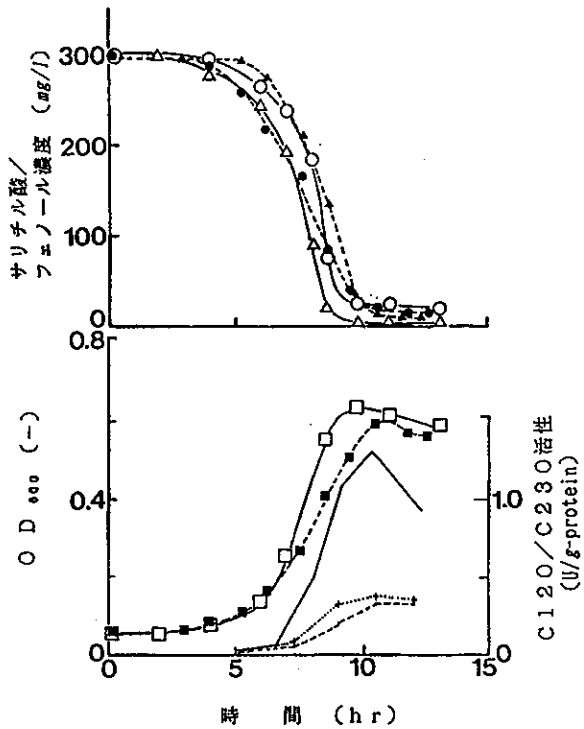
の分解経路（*ortho*経路）の遺伝子群は 宿主染色体上でオペロンを構成しており、サリチル酸分解は異なる２つの制御機構による調節を受けることになる。従って、ここでの試験結果は、分解遺伝子群が統一された全体の調節制御系を持つ方が分解効率が高くなることを示唆している。しかし、組換え体のサリチル酸分解能が野生株とほぼ同等に高かったことから、ここで示したような宿主の分解経路を活用した物質分解域の拡大は、水処理微生物育種の有効な方法の一つといえる。

(3)フェノール、サリチル酸の同時分解： 図２－１－６に、フェノール－サリチル酸培地を用いた培養試験での組換え体*P. putida* PpG1064(pHF400)および野生株*P. putida* PpG1064(ＮＡＨ)の基質分解の様子を示した。図に示された通り、フェノールとサリチル酸はほぼ同時に分解されたが、野生株ではサリチル酸の方がフェノールよりも早く分解が開始されたのに対し、組換え体ではフェノール分解が先行した。一般に*meta*経路は基質誘導、*ortho*経路は 代謝物誘導といわれているため、この両経路を持つ野生株では、*meta*経路で代謝されるサリチル酸分解が先行したものと考えられる。



P. putida PpG1064(pHF400)：—○— サリチル酸濃度；
—□— ＯＤ600
P. putida PpG1064(ＮＡＨ)：--●-- サリチル酸濃度；
--■-- ＯＤ600

図２－１－５　*P. putida* PpG1064(ＮＡＨ)
および *P. putida* PpG1064(pHF400)
によるサリチル酸分解試験成績



P. putida PpG1064(pHF400)：—○— サリチル酸濃度；
—△— フェノール濃度；—□— ＯＤ600；—Ｃ１２０活性
P. putida PpG1064(ＮＡＨ)：--●-- サリチル酸濃度；
--▲-- フェノール濃度；--■-- ＯＤ600；--+--Ｃ１２０活性；
----- Ｃ２３０活性

図２－１－６　*P. putida* PpG1064(ＮＡＨ)
および *P. putida* PpG1064(pHF400)による
フェノール、サリチル酸同時分解試験成績

このように両株のフェノールおよびサリチル酸の分解開始時期は異なっていたが、菌体増殖および基質分解速度は組換え体の方が速かった。図にはC120およびC230活性の変化を併記している。これより、組換え体では *ortho*経路（C120）が極めて高いレベルまで誘導され、両基質の分解を行っていたのに対し、野生株はフェノール、サリチル酸から生成されたカテコールを *ortho*、*meta*の両経路で分解し、その誘導レベルが低く抑えられていたことが伺える。両株の基質分解特性の差は、このようなカテコール代謝経路の差に依存しているものと考えられ、ここでは *ortho*経路のみによる代謝が 両経路によるよりも有効であることが示されたといえる。

4．*P. putida* PpG1064(pHF400)の増殖および基質除去特性

試験成績から*P. putida* PpG1064(pHF400) の増殖、基質分解特性を、下式で定義される比増殖速度μ および 基質除去速度K（フェノールに対してKp、サリチル酸に対してKs）で表し、野生株 *P. putida* PpG1064(NAH) と比較して表2－1－3にまとめた。また、各実験におけるC120およびC230活性（最大活性）を表2－1－4に示した。

$$\mu = (dX/dt)/X$$

$$K = (-dS/dt)/S$$

ここで、Xは 菌体濃度（OD_{600}）、Sは フェノールまたはサリチル酸濃度（mg/l）、tは 時間（hr）である。

表2－1－3　フェノールおよびサリチル酸分解試験における *P. putida* PpG1064(pHF400) および *P. putida* PpG1064(NAH)の比増殖速度μおよび基質分解速度K

菌株	μ/K (hr^{-1})	試験培地			
		フェノール培地	サリチル酸培地	フェノール－サリチル酸培地	
				Kp	Ks
P. putida PpG1064	μ	0.179	－	N.T.	
	K	0.663	－	N.T.	－
P. putida PpG1064(NAH)	μ	0.163	0.173	0.172	
	K	0.562	0.254	0.455	0.190
P. putida PpG1064(pHF400)	μ	0.167	0.166	0.198	
	K	0.574	0.201	0.614	0.437

＊－，分解能なし；N.T.，試験せず

表２－１－４　フェノールおよびサリチル酸分解試験における *P. putida* PpG1064(pHF400) および *P. putida* PpG1064(ＮＡＨ)のＣ１２０およびＣ２３０活性

菌　株	酵素	試験培地		
		フェノール培地	サリチル酸培地	フェノール－サリチル酸培地
P. putida PpG1064	C120	1,360	N.T.	N.T.
	C230	－	－	－
P. putida PpG1064(NAH)	C120	778	155	383
	C230	12	2,060	324
P. putida PpG1064(pHF400)	C120	1,280	1,420	1,310
	C230	－	－	－

＊－,分解能なし; N.T.,試験せず, 酵素活性は U/g-protein で表示

表２－１－３に示されたように*P. putida* PpG1064(pHF400) は、野生株とほぼ同等のサリチル酸分解速度を示し、またフェノール、サリチル酸の同時分解では野生株に比べかなり増殖・基質分解速度が高くなった。従って、本組換え体は、多様な芳香族化合物が混入する排水処理系への活用に有用な特性を持つことが明らかになった。

また、表２－１－４から、この基質分解速度の向上は、野生株がフェノール、サリチル酸から生成されたカテコールを *ortho*、*meta*の両経路で分解したのに対し、組換え体が *ortho*経路のみを使用したためと考えられた。一般に、芳香族化合物の分解遺伝子群は精緻な誘導・抑制システムによって制御されているが、カテコールの２つの代謝経路の誘導システムは異なっている。即ち、カテコールの *ortho*開裂酵素は低レベルで構成的に生産されており、カテコール存在下においてその代謝物 (cis,cis-ムコン酸、β-ケトアジピン酸など) により誘導を受けるのに対し、*meta*開裂酵素は上位の特定基質（サリチル酸、フェノールなど）の存在下でのみ誘導されることが知られている。従って、*meta*経路は特定基質に対する専用経路、*ortho*経路は カテコールに変換される全ての基質に対する共用経路といえる。ここで試験した野生株では *ortho*、*meta*経路が共存しており、これらが同時に誘導された場合、カテコール分解において競合して両経路の分解活性がともに低下してしまう現象が認められた。このことから、一方のカテコール代謝経路による分解の方が効率が高くなることが示唆された。従って、どちらか一方のみのカテコール代謝経路を持つ細菌を宿主とした分解菌の育種は、基質の分解速度を向上させる上で有効といえる。またさらに、*meta*経路は基質によっては誘導されないため、多成分基質分解菌の育種においては、*ortho* 経路の活用が有効であると結論できる。

第4節　要 約

ＮＡＨプラスミドからクローニングしたサリチル酸ヒドロキシラーゼ遺伝子 *nahG*を用いて多成分基質分解菌を育種し、その基質分解特性を種々検討して以下の結果を得た。

1)　フェノールおよび安息香酸を *ortho*経路で分解する *P. putida* PpG1064に *nahG*を導入し、さらにサリチル酸を資化することのできる多成分基質分解菌 *P. putida* PpG1064(pHF400)を育種した。

2)　組換え体 *P. putida* PpG1064(pHF400)は サリチル酸を*meta*経路で分解する野生株*P. putida* PpG1064(ＮＡＨ)とほぼ同等のサリチル酸分解能を示した。また、フェノール およびサリチル酸の混合培地を用いた分解試験では、両基質を野生株よりも速く分解したため、多様な化合物の混入する排水の処理に有効であると考えられた。

3)　組換え体および野生株のフェノールおよびサリチル酸分解経路に関する考察から、芳香族化合物分解域の拡大には、カテコールの *ortho*分解経路を持つ宿主菌を活用することが有効であると結論した。

第2章　カテコール2，3オキシゲナーゼ遺伝子を用いたフェノール分解菌の育種に関する研究

第1節　緒　言

活性汚泥法における難分解性物質除去の効率を高めるためには、目的物質の分解速度が速い組換え体を作成することが重要である。微生物による物質分解の速度は、代謝系路上の律速反応に依存して決まるものであるから、分解速度の向上を図るためには、一連の分解酵素によって触媒される反応の中から最も速度の遅い反応ステップを同定し、その分解酵素活性を増強する必要がある。

芳香族化合物の分解に関しては、一般に、フェノールあるいはサリチル酸からカテコールへの変換のように、芳香環に水酸基を付加する、いわば第1ステップの反応が律速と考えられているが、一部のフェノール分解微生物ではカテコールを著しく蓄積する例が報告されており[1)-3)]、下流の代謝経路の反応も律速となり得ることが示唆されている。また、先章で述べたように、遺伝子操作により新たな芳香族化合物の分解能を賦与したり、その分解制御機構を改変した菌株では、下流の分解反応がこれに同調せず、カテコール様の中間代謝物を蓄積する場合も多々あると推測される。従って、このような菌株に対しては、カテコールなどの中間代謝物の分解経路を強化すれば、フェノール、サリチル酸など目的物質自体の分解効率を高めることができると考えられる。

以上のような観点から、本章では、フェノール分解菌*P. putida* BH株の染色体からクローニングされたカテコール2，3オキシゲナーゼ遺伝子を、組換えプラスミドの形で多コピー化して元株に戻し、フェノール代謝経路のうちカテコール酸化の反応を補強した組換え体を育種した。また、この組換え体のフェノール分解特性を元株と比較することにより、遺伝子増幅の効果を評価し、中間代謝経路の強化という新しい分解微生物育種法の概念を示した。

第2節　実験材料および方法

1．実験材料

(1)供試菌株およびプラスミド：

表2－2－1に、本章で使用した細菌株およびプラスミドを示した。遺伝子操作の対象に使用した*Pseudomonas putida* BH[4)]は、活性汚泥より分離されたフェノール分解菌である。本株のフェノール分解経路を図2－2－1に示した。フェノールはカテコールに変換された後、*meta*経路で完全分解される。図中には、分解反応の各ステップに関与する酵素および遺伝子

表2－2－1　供試菌株およびプラスミド

菌株／プラスミド	表現型／遺伝子型	文献
菌　株		
P. putida BH	Phe^+(*meta*), Ben^+(*ortho*), *pheB*	4)
E. coli JM103	Sm^r, *thi*, *hsdR*	5)
E. coli C600	*leu*, *thr*, *thi*, *hsdR*, *hsdM*	6)
プラスミド		
pUC19	Ap^r, *lacp/o*	7)
pKT230	Sm^r, Km^r, *mob*	8)
RP4	Ap^r, Km^r, Tc^r, *tra*	9)
pBH100	pUC19-*pheB*; Ap^r, *lacp/o*	10)
pBH500	pKT230-*pheB*; Sm^r, Km^r, *mob*	11)

＊Phe^+, ﾌｪﾉｰﾙ分解; Ben^+, 安息香酸; (*ortho*), ｵﾙﾄ経路; (*meta*), ﾒﾀ経路.
Ap, ｱﾝﾋﾟｼﾘﾝ; Km, ｶﾅﾏｲｼﾝ; Tc, ﾃﾄﾗｻｲｸﾘﾝ; Sm, ｽﾄﾚﾌﾟﾄﾏｲｼﾝ.

を併記している。*P. putida* BHはプラスミドを保持していないため、これら一連の分解遺伝子は染色体上に存在しているといえる。代謝経路の補強に用いた *pheB*は、カテコールから2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒド（2-HMS）への変換反応を触媒する、カテコール２，３オキシゲナーゼ（Ｃ２３０）をコードしている。

pheB のクローニングには、ベクターpUC19[7]および受容菌 *E. coli* JM103[5]を用いた。この組み合わせは 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド（X-gal） を含む培地で、マルチクローニングサイトにＤＮＡ断片が挿入された株を白色コロニーとして直接検出できる。また別途、広宿主域ベクターpKT230[8]および受容菌 *E. coli* C600[6]を使用した。pBH100およびpBH500は、ここで作成された組換えプラスミドである。

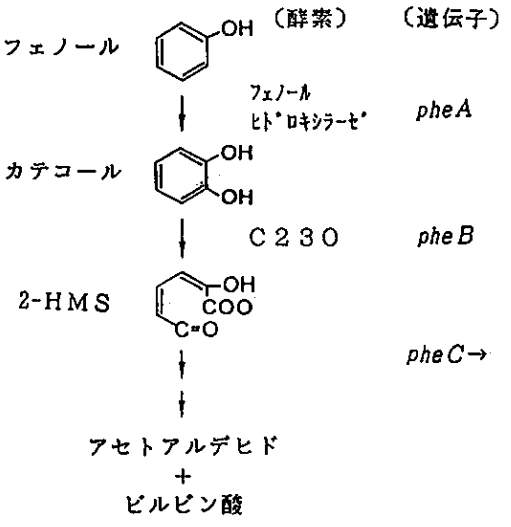


図２－２－１　*P. putida* BH による
フェノール分解経路

(2)使用培地：　菌株の培養には、第１編第２章表１－２－３に示したＬ培地を使用し、適宜抗生物質（Ａｐ25*mg/l*、Ｓｍ50*mg/l*）やフェノールを添加した。また、pUC19 を用いたクローニングでの１次選択では50*mg/l* Ａｐ、50*mg/l* X-gal、および1mM イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ） を添加し1.5%寒天で固化したものを使用した。フェノール培地は、第１章表２－１－２の無機塩培地にフェノールを所定濃度で加えて調製し、接合伝達株の選択（Ｓｍを添加し1.5%寒天で固化）およびフェノール分解試験に用いた。

２．実験方法

(1)ＤＮＡの分離、切断、結合：　*P. putida* BH からの染色体ＤＮＡの分離はSaito and Miuraの方法[12] によった。プラスミドＤＮＡの分離、制限酵素によるＤＮＡの切断、ＤＮＡの結合などの操作は、第１章第２節に準じて行った。

(2)形質転換、接合伝達：　第１章第２節に準じた。ただし、*E. coli* JM103 のコンピテントセルはKushunerの方法[13]で調製した。

(3)*pheB*のクローニング：　以下のように、クローニングベクターpUC19を用いて受容菌 *E. coli* JM103中に*P. putida* BH 染色体ＤＮＡの遺伝子ライブラリを構築し、*pheB*を単離した。*P. putida* BHの染色体ＤＮＡを、制限酵素（*Pst*Ｉ、*Sal*Ｉ、*Eco*RＩ および*Hind*Ⅲ）により部分消化した後、低融点アガロースゲル電気泳動で約 5～10kbの断片を回収し、適当な制限酵素で切断したpUC19 と１：３の比率で混合して、0°C、20分の結合を行った。これを *E. coli* JM103に形質転換し、Ａｐ、X-gal、ＩＰＴＧを含む１次選択培地に平板培養した。１次選択培地上で白色を呈する形質転換株を断片挿入株として選択し、Ａｐおよびフェノール（400*mg/l*） を含むＬ培地にレプリカして目的

クローンの検出を行った。即ち、培地上のコロニーにカテコール溶液（1g/l）を噴霧すれば *pheB* 保持株は2-HMSを生成し、蛍光的な黄色を呈することで検出される。

(4)フェノール分解試験：　フェノール分解試験は、以下の振盪培養にて行った。菌株の１白金耳をL培地にて30°Cで一晩住復振盪培養（ストローク長40mm、80rpm）し、この１*ml*をさらに新しいL培地 100*ml*に植え継ぎ、300*ml*容 三角フラスコ中30°C、160rpmで約18時間回転振盪培養したものを試験の前培養液とした。この前培養液 1*ml*を 500*ml*容三角フラスコに分注した 200*ml*の試験培地に植菌し、先と同様の回転振盪培養を行い、経時的に菌体濃度、および遠心分離上澄液（15,000×*g*、10分）のフェノール、TOC、および2-HMS濃度を測定した。ここで菌体濃度は OD_{600}で、2-HMSは OD_{375}で（1mM 2-HMSの OD_{375}は41.1）、TOC濃度は 島津TOC分析機 TOC-500で、またフェノール濃度は TSKgel ODS-80TM（Tosoh製）を用いたHPLC分析（移動相水：アセトニトリル＝１：１、流量1*ml/min*）により測定した。

(5)C230活性の測定：　第１章第２節に準じた。

第３節　実験結果および考察

１．*pheB*のクローニング

制限酵素 *Pst*Ⅰによって作成した *P. putida* BHの染色体の遺伝子ライブラリのスクリーニングの結果、約2,300株の１次選択されたクローン（DNA断片挿入株）のうち、カテコール噴霧により黄色を呈した２株を目的の *pheB*保持株として選択した。両クローンの保持していた組換えプラスミドは同じであり、ベクター pUC19に5.65kbの *Pst*Ⅰ断片が挿入されていたため、これをpBH100と命名し、各種制限酵素によるサブクローニング実験に供した。解析より明らかになった本DNA断片の制限酵素地図 および*pheB*の推定位置を、図２－２－２に示した。また、図にはpBH100の構造も示している。C230をコードする遺伝子については、これまでナフタレン（サリチル酸）分解菌、トルエン分解菌、およびジ

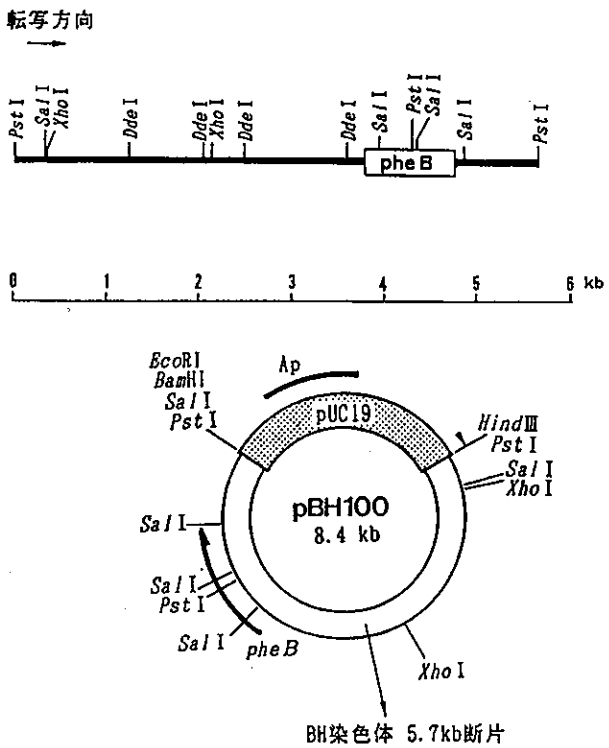


図２－２－２　クローニングされたDNA断片の制限酵素地図およびpBH100の構造

メチルフェノール（フェノール）分解菌の持つプラスミドからそれぞれ、*xylE*[14]、*nahH*[15]、および*dmpB*[16]がクローニングされ、その高い相同性が示されている。これに対して *pheB*は、染色体から分離されたが、図示したＤＮＡ断片の制限酵素地図は、特に *dmpB*のものと酷似しており、本遺伝子もこれらの遺伝子と高い相同性を持つものと考えられる。ここで*pheB*のサイズを*dmpB*と同じ 約0.95kbと仮定すれば、今回クローニングされたＤＮＡ断片上には、*pheB*以外の情報をコードした領域が 約4.7kb存在していることになる。一連のフェノール分解関与遺伝子はクラスターを成していると考えられるため、この領域には他の分解遺伝子が存在している可能性が示唆された。そこで、この領域について他のフェノール分解遺伝子を検索したが、その存在は認められなかった。本遺伝子に関する詳細な検討は今後の課題である。

２．中間代謝経路強化菌*P. putida* BH(pBH500)の育種

pUC19 は大腸菌専用のベクターなので、これで構築されたpBH100を*P. putida* BHに導入することはできない。そこで、pBH100を*Hind*Ⅲおよび *Bam*ＨＩで二重消化して *pheB*を含むＤＮＡ断片を切り出し、同様に二重消化した広宿主域ベクターpKT230と結合させて*E. coli* C600に形質転換し、カテコール噴霧にて黄色を呈するクローンから組換えプラスミドpBH500を得た。このpBH500の構造を図２－２－３に示した。

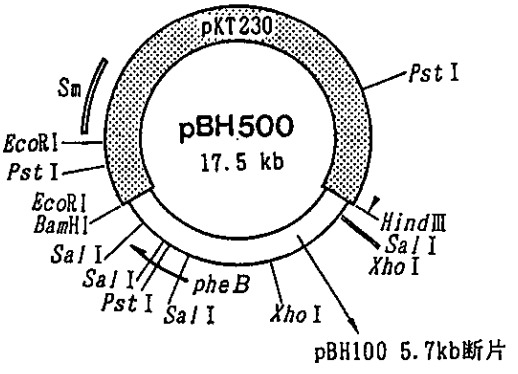


図２－２－３　　ｐＢＨ５００の構造

この組換えプラスミドを供与菌*E. coli* C600(pBH500)から、前章と同様にヘルパー *E. coli* C600(ＲＰ4)を介した三親接合伝達にて、元株 *P. putida* BHに導入し、*P. putida* BH(pBH500)を育種した。本株は、*P. putida* BHが染色体上に持つ１コピーの *pheB*に加え、pBH500により10～20コピーの *pheB*を賦与された組換え体であり、フェノール代謝経路のうちＣ２３Ｏ触媒反応が強化されたものといえる。

この*pheB*遺伝子増幅の効果を評価するため、異なる濃度でフェノールを含む（0～ 400*mg/l*）Ｌ培地で培養した*P. putida* BH(pBH500)のＣ２３Ｏ活性を測定し、*P. putida* BHと比較した。結果を表２－２－２に示した。元株*P. putida* BHが誘導基質であるフェノール存在下でのみ、染色体上の*pheB*を発現してＣ２３Ｏ活性を示したのに対し、組換え体*P. putida* BH(pBH500)は フェーノール誘導の有無に関わらず、pBH500上の *pheB*を構成的に発現した。また、元株のＣ２３Ｏ活性はフェノール濃度にほぼ比例していたが、組換え体はいずれの濃度でも元株より 約20Units/*g*-protein高い値となった。従って、*pheB*増幅の効果は認められたが、フェノール濃度が高くなるほど その効果は減少するものといえる（表２－２－２"比率"欄参照）。

表2－2－2　*P. putida* BH(pBH500) および *P. putida* BH のC230活性

培　地	C230活性 (U/g-protein)		差*1	比率*2
	P. putida BH	*P. putida* BH(pBH500)		
L培地	＜1	23.9	23.9	(23.9＜)
L＋100mg/l フェノール	29.2	49.0	19.8	1.68
L＋200mg/l フェノール	54.4	75.8	21.4	1.39
L＋300mg/l フェノール	62.8	80.6	17.8	1.28
L＋400mg/l フェノール	100.4	121.2	20.8	1.21

*1　BH(pBH500)のC230活性 － BHのC230活性
*2　BH(pBH500)のC230活性 ／ BHのC230活性

3．フェノール分解試験成績

振盪培養試験により*P. putida* BH(pBH500)の増殖およびフェノール、ＴＯＣ分解特性を調べ、元株*P. putida* BHと比較した。ここで培養は、フェノール濃度を100、200、300、400mg/lの４段階に変化させて行った。両菌株はフェノールを完全分解して増殖したが、その様子は、培地フェノール濃度によって異なっていた。この結果の例を図２－２－４および図２－２－５に示した。両図はそれぞれ、培地フェノール濃度が 100mg/l、および 300mg/lの場合を示している。

培地フェノール濃度が 100mg/lでは、組換え体が元株に比べてかなり速い増殖を示し、速くフェノールおよびＴＯＣを分解・除去した（図２－２－４）。また、培地フェノール濃度が 200mg/l、300mg/lにおいては 組換え体と元株の増殖・基質除去特性に大きな差はなかったが、培養初期では僅かに組換え体が速くフェノールを分解し、増殖する傾向が伺えた（図２－２－５）。一方、フェノール濃度 400mg/lでの試験では、逆に元株が組換え体よりもやや速い増殖を示した。

4．*P. putida* BH(pBH500)の増殖およびフェノール分解特性

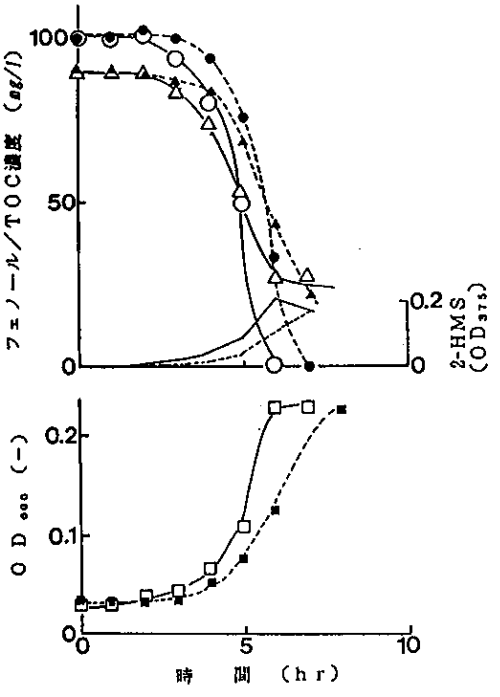
概して、回分培養における微生物の増殖および基質分解は、２段階の対数的増加および減少期に分かれることが知られ、初期は分解酵素の誘導が徐々に起こりはじめる期間（適応期間）、後期は分解酵素が完全な誘導レベルに達した期間（適応後の期間）と説明されている。そこで、菌体濃度および基質濃度の経時変化を対数プロットしたところ、本試験の結果も２段階の対数的変化になったため、以下の各式で定義される比増殖速度μおよびフェノール分解速度Kp、ＴＯＣ分解速度Ktを、それぞれ適応期間（μ_1、Kp_1、Kt_1）および適応後（μ_2、Kp_2、Kt_2）について求めた。

$$\mu = (dX/dt)/X$$

$$Kp = (-dPhe/dt)/Phe$$

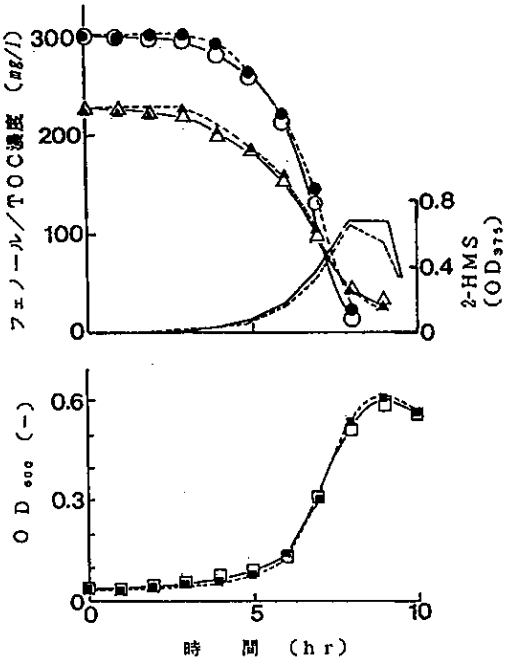
$$Kt = (-dTOC/dt)/TOC$$

ここでXは菌体濃度（OD_{600}）、Pheは フェノール濃度（mg/l）、TOCはＴＯＣ濃度（mg/l）、tは時間（hr）を表す。



P. putida BH(pBH500): —○— フェノール濃度; —△— TOC濃度; —□— OD_{600}; ——2-HMS
P. putida BH: --●-- フェノール濃度; --▲-- TOC濃度; --■-- OD_{600}; ----2-HMS

図2－2－4　*P. putida* BH および *P. putida* BH(pBH500)によるフェノール分解試験成績（培地フェノール濃度＝100mg/l）

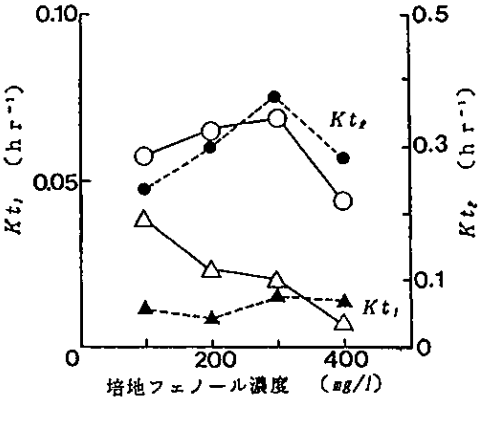


P. putida BH(pBH500): —○— フェノール濃度; —△— TOC濃度; —□— OD_{600}; ——2-HMS
P. putida BH: --●-- フェノール濃度; --▲-- TOC濃度; --■-- OD_{600}; ----2-HMS

図2－2－5　*P. putida* BH および *P. putida* BH(pBH500)によるフェノール分解試験成績（培地フェノール濃度＝300mg/l）

これらの値を、初期培地フェノール濃度に対してプロットしたところ、図2－2－6～図2－2－8のようになった。図示された通り、組換え体の適応期間の増殖・基質分解特性値（μ_1、Kp_1、Kt_1）は、フェノール濃度が低い場合（ここでは特に100mg/l）に元株より高くなり、フェノール濃度が高くなるにつれて、その差が減少する傾向が認められた。一方、適応後の値（μ_2、Kp_2、Kt_2）については、両者の差は明確には表れなかった。

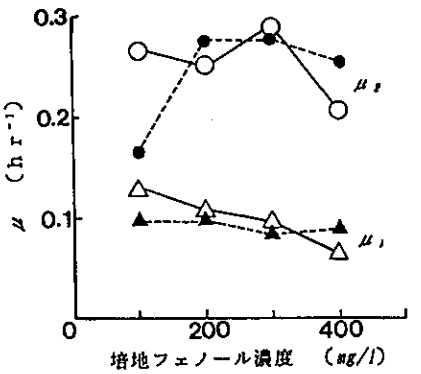
以上より、*pheB* の増幅による代謝経路強化の効果は、比較的フェノール濃度が低い場合の、特



P. putida BH(pBH500): —△— Kt_1; —○— Kt_2
P. putida BH: --▲-- Kt_1; --●-- Kt_2

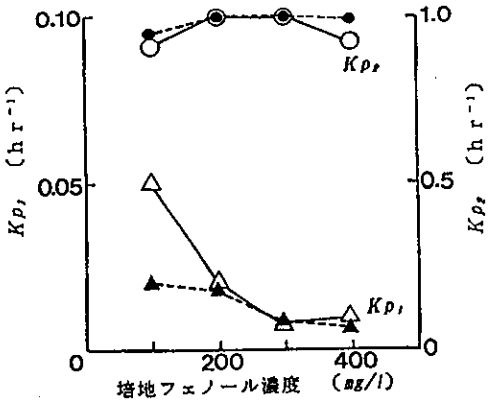
図2－2－6　μ値に及ぼす培地フェノール濃度の影響

に適応期間に表れ、フェノールの分解効率を向上させたといえる。従って、*P. putida* BHのフェノール分解においては、低濃度基質下での分解酵素誘導期にC２３０の触媒反応が律速となっており、組換え体では *pheB*遺伝子の増幅で、この律速が取り払われたため、フェノール分解が活性化されたことが示唆された。



P. putida BH(pBH500): -△- μ_1; -○- μ_2
P. putida BH: --▲-- μ_1; --●-- μ_2

図２－２－７　*Kp*値に及ぼす培地フェノール濃度の影響



P. putida BH(pBH500): -△- Kp_1; -○- Kp_2
P. putida BH: --▲-- Kp_1; --●-- Kp_2

図２－２－８　*Kt*値に及ぼす培地フェノール濃度の影響

この中間代謝経路強化の概念を図２－２－９に示した。一方、高濃度基質下ではC２３０が比較的速く高いレベルにまで誘導されたため、*pheB*導入による 活性強化の効果が軽減されたものと考えられる。また、培地フェノール濃度 400*mg/l*での逆転の傾向は、フェノールの阻害がプラスミド保持という負担を持つ組換え体に、より大きい影響を及ぼした結果と理解できる。実際の下排水処理系においては、流入水中のフェノールなどの難分解物質濃度は比較的低く、しかも絶えず変動する。従って、ここで明らかにされた*P. putida* BH(pBH500)のフェノール分解特性（低濃度域での高い分解活性、短い適応／誘導期間）は、排水処理への活用に非常に有用であると考えられる。

現在、芳香族化合物分解菌の育種に関する研究のほとんどは、カテコール以下の分解経路を持つ細菌宿主に、カテコールまでの代謝をコードする第１ステップの分解遺伝子を導入して新たな物質の分解能を与え、また高発現ベクターによりその活性を高めることに集中している。これに対して、ここで紹介した育種は、野生株の代謝経路の増強により律速反応を取り払い、分解速度を向上させようという試みであり、既住の研究とは異なる新しい育種の方向を与えるものといえる。このような中間代謝経路の強化は、遺伝子操作により一連の分解酵素の反応のバランスが崩れ、カテコールなどを著しく蓄積するようになった育種菌の基質分解効率を向上させる上でも有効な手段と考えられ、第１章で示した多成分基質分解菌の育種との併用によって、排水処理に有効に活用できる強力な分解菌を生み出す可能性を有している。

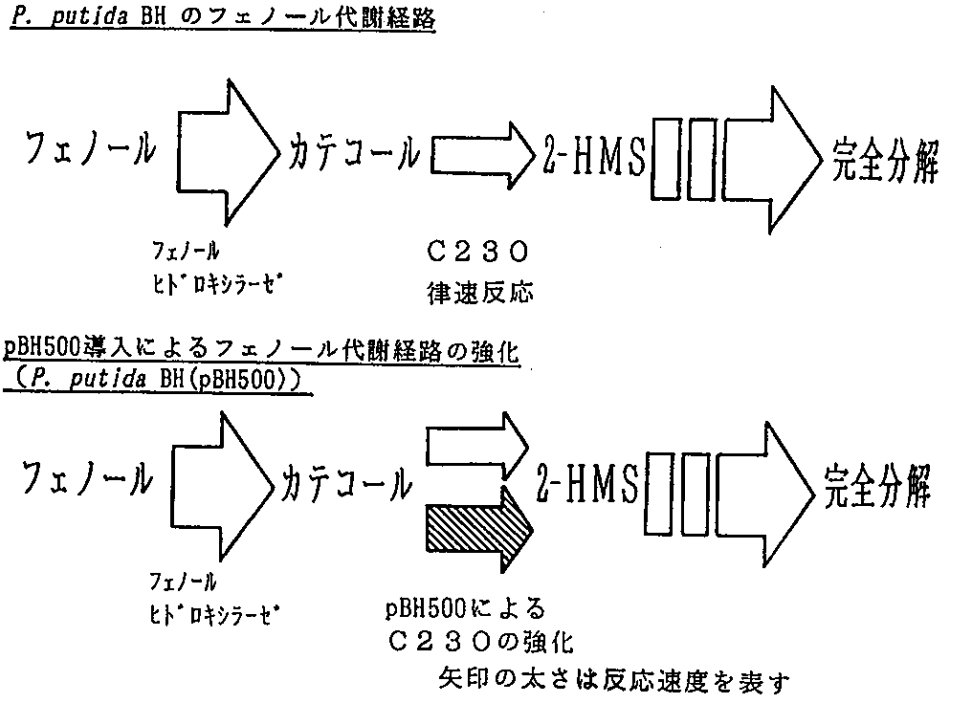


図2－2－9　*P. putida* BHのフェノール分解代謝経路強化の概念

第4節　要　約

P. putida BHの染色体からクローニングしたカテコール2，3オキシゲナーゼ（C230）遺伝子 *pheB*を用いて、本株のフェノール代謝経路を強化し、その分解特性について検討した結果、以下の知見を得た。

1)　*P. putida* BHの染色体から *pheB*遺伝子をクローニングし、その制限酵素地図を作成した結果、本遺伝は *Pseudomonas* sp. CF600から分離されたC230遺伝子 *dmpB*と酷似していることが明らかとなった。

2)　*pheB*を 組換えプラスミドの形で*P. putida* BHに導入し、フェノール代謝経路のうちC230によって触媒される反応を強化した組換え体*P. putida* BH(pBH500)を育種した。この組換え体は *pheB* を構成的に発現し、元株よりも高いC230活性を示した。

3)　*P. putida* BH(pBH500)のフェノール分解特性を元株と比較し、培地フェノール濃度が低い培養の誘導期に、元株よりも速くフェノールを分解・除去し、増殖することを示した。この組換え体の特性は、排水処理系への適用に有効であると考えられる。

4)　中間代謝経路の補強という新しい分解菌育種の方法について解説し、水処理微生物育種への活用の有用性について論じた。

第３編　活性汚泥法における遺伝子組換え体の活用法に関する基礎的研究

第１章　組換え体の遺伝的安定性に関する研究

第１節　緒　言

遺伝子組換え体を利用する際の最も重要な問題の一つは、組換え遺伝子の安定性である。難分解性物質分解遺伝子を導入した組換え体を、活性汚泥法に組み込むことができたとしても、目的遺伝子が不安定であれば、高い処理効率を維持することはできない。これは、導入された遺伝子が、宿主細胞内で変化したり欠落したりすることなく、どれだけ長い期間生理的に安定に保持され発現するかの問題であり、組換え体の遺伝的安定性と呼ぶことができる。

組換え体の遺伝的安定性については、工業分野への活用を目的として、特に組換えプラスミドを持つ育種菌を中心に詳細な研究が行われている。その中で、プラスミドの脱落や部分的欠失、脱落・欠失株の優勢な増殖など、目的遺伝子の宿主内での保持と発現を不安定にする各種現象に関する解析が進んだ結果[1)-15)]、プラスミド脱落頻度を低下させる分配関与遺伝子[16)-20)]や 宿主・プラスミド間の栄養要求相補性[21)]を利用した 安定な組換え体の育種など、遺伝的安定性を高める方策が開発されている。しかし、ここで開発された安定化法は、一定組成の培地を使用し、安定制御下におかれる純粋培養系を対象としたものであるため、流入水質・水量や処理条件が絶えず変動し、しかも他の微生物との相互作用の影響が無視できない活性汚泥法にそのまま適用することができない。従って、活性汚泥法への活用では、この特殊な培養系においてもその遺伝的安定性が高い組換え体を選択・育種し、処理環境の変化に影響されない安定化手法を確立することが重要である。

本章では、活性汚泥法に適した、遺伝的に安定な組換え体の選択を目的として、*pheB*を 組み込んだ組換えプラスミドの各種宿主細菌内での安定性を、選択圧のない栄養培地を用いた連続継代培養により調べた。また、結果の解析から、遺伝的安定性の高い組換え体の特性を明らかにし、この観点から有効な組換え体の活用法を検討した。

第２節　実験材料および方法

１．実験材料

(1)供試組換え体：　表３－１－１に、本章で安定性試験に供した遺伝子組換え体を示した。組換え体は、第２編第２章で構築した *pheB*を持つ組換えプラスミド pBH100 およびpBH500を *E. coli* および *P. putida*の各種菌株に導入して作成した。また、第２編第１章で構築した組換えプラスミドpHF400を導入した*P. putida* BH-1(pHF400)を対照実験に用いた。宿主に用いた*P. putida* BH-1は、第２編第２章で使用した*P. putida* BHへの紫外線照射によって得られたフェノール分解能欠失変異株である。組換えプラスミドの宿主への導入は、*E. coli* については形質転換法、*P. putida* には形質転換法またはヘルパー *E. coli* C600(ＲＰ4)を介した三親接合伝達法によった。ここで行った

形質転換法および接合伝達法は、第２編第１章第２節で示した方法に準じている。

(2)使用培地：　菌株の培養、プラスミド安定性試験には、第１編第２章表１－２－３に示したＬ培地を用いた。ただし、組換え体の前培養およびプラスミド・マーカーの試験では、適宜プラスミドに応じた抗生物質（pBH100に対してはＡｐ、pBH500、pHF400に対してはＳｍ）を加え、また固形培地は 1.5%の寒天を加えて調製した。

２．実験方法

(1)プラスミド安定性試験：　組換え体１白金耳をＬ字管中で30°Cにて一晩培養したものを前培養液とし、この 0.1*ml*を、抗生物質を含まないＬ培地10*ml*に植菌して30°Cで往復振盪培養（ストローク長40mm、90rpm）を行い、20～30時間毎に新しい培地に同様の植え継ぎ培養を繰り返してプラスミド安定性試験を行った。この連続継代培養において、適宜培養液を採取してＬ培地に平板培養し、30°C、2日間の 培養で出現したコロニーから任意に約100～300個を選択し、そのプラスミド・マーカーを調べた。ここで、組換えプラスミドのベクターにコードされた抗生物質耐性は、コロニーを抗生物質を含む培地にレプリカして培養し（30°C、1～2日間）、増殖の有無により調べた。また、組換え遺伝子 *pheB*の発現（Ｃ２３０活性）は、コロニーへのカテコール噴霧による黄変により調べた（黄変するものがＣ２３０活性保持性株）。なお、植え継ぎに際して OD_{600}により培養液の菌体濃度を測定し、下式で定義した１回の継代における世代数ｎを求めた。試験開始からの継代世代数はこの総和で表される。

$$2^n = ODe / ODi$$

ここで、ＯＤｉは培養開始時のOD_{600}、ＯＤｅは培養終了時のOD_{600}である。

また、培養液のＣ２３０活性を、第２編第１章第２節に準じて測定した。

(2)プラスミドの検索および解析：　必要に応じて、安定性試験中に選択したコロニーからプラスミドを抽出し、その解析を行った。プラスミドの抽出は Birnboim and Dolyの方法で行い、第１編第２章第２節に準じてアガロースゲル電気泳動に供して解析した。この際使用した制限酵素は宝酒造より購入し、使用説明書に従ってプラスミドＤＮＡの切断を行った。

表３－１－１　供試組換え体

菌　株	表現型／遺伝子型
E. coli JM103(pBH100)	Sm^r, *thi*, *hsdR* (*pheB*, Ap^r)
E. coli C600(pBH100)	*leu*, *thr*, *thi*, *hsdR*, *hsdM* (*pheB*, Ap^r)
E. coli C600(pBH500)	*leu*, *thr*, *thi*, *hsdR*, *hsdM* (*pheB*, Sm^r)
P. putida KT2440[22] (pBH500)	Ben^+, *hsdR*, (*pheB*, Sm^r)
P. putida PpG1064(pBH500)	Phe^+, Ben^+, *trp* (*pheB*, Sm^r)
P. putida BH-1(pBH500)	Ben^+, *pheB* (*pheB*, Sm^r)
P. putida BH-1(pHF400)	Ben^+, *pheB* (*nahG*, Sm^r)

＊Phe^+, ﾌｪﾉｰﾙ分解; Ben^+, 安息香酸.
Ap, ｱﾝﾋﾟｼﾘﾝ; Sm, ｽﾄﾚﾌﾟﾄﾏｲｼﾝ.

第３節　実験結果および考察

１．プラスミド安定性試験成績

各種組換え体の安定性試験におけるプラスミド・マーカーの検索結果を、表３－１－２にまとめた。表中の検索株数は、全試験期間を通じての総数を示している。表示したように、全試験において検索された株のほとんどは、抗生物質耐性およびＣ２３０活性の両マーカーをもつ供試組換え体、あるいは両マーカーを失った株であった。即ちベクター部分のマーカー（抗生物質耐性）と組換え遺伝子部分のマーカー（Ｃ２３０活性）の安定性は、高い相関を示した。ここで、両表現形質を示すコロニーを任意に選択し、プラスミドを検索したところ、前者は完全な形で組換えプラスミドを持つ保持株、後者は、プラスミドを持たない脱落株であることが確認された。またこれに加えて、*E. coli* C600(pBH500)を用いた試験では、Ｓｍ耐性は示すがＣ２３０活性を示さない株も少数ながら検出された。この株はプラスミドを保持していたため、何らかの遺伝的変化により *pheB*の発現がなくなった変異株と考えられた。即ち、試験を通じて、プラスミドの脱落（または消滅）と変異という、組換え体の遺伝的安定性に関わる２つの現象が認められた。

表３－１－２　プラスミド安定性試験におけるマーカーの検索結果

菌　株	表　現　型*1			
	(Ap^r/Sm^r, $C230^+$)	(Ap^r/Sm^r, $C230^-$)	(Ap^s/Sm^s, $C230^+$)	(Ap^s/Sm^s, $C230^-$)
E. coli JM103(pBH100)	466	0	0	234
E. coli C600(pBH100)	149	0	0	271
E. coli C600(pBH500)	1,455	24	0	1,458
P. putida KT2440(pBH500)	1,180	0	0	606
P. putida PpG1064(pBH500)	1,159	0	0	1,674
P. putida BH-1(pBH500)	2,024	0	0	223

＊試験を通じて検出されたコロニー数で表現．
*1 Ap^r,ｱﾝﾋﾟｼﾘﾝ耐性; Ap^s,ｱﾝﾋﾟｼﾘﾝ感受性; Sm^r,ｽﾄﾚﾌﾟﾄﾏｲｼﾝ耐性;
Sm^s,ｽﾄﾚﾌﾟﾄﾏｲｼﾝ感受性; $C230^+$,C230活性有; $C230^-$,C230活性無

(1)プラスミドの脱落：　２つのプラスミド・マーカーを発現している株をプラスミド保持株とみなし、その全体に対する比率をプラスミド保持率と定義して、この変化をＣ２３０活性の変化と併せ、図３－１－１（pBH100保持株）および図３－１－２（pBH500保持株）に示した。なお *E. coli* C600(pBH500)の試験については先に述べた変異株の比率も示している。図から明らかなように、出現時期は異なるものの、いずれの組換え体においても、プラスミドを失った脱落株が出現し、世代（継代）を重ねるに従って、プラスミド保持率が急激に低下した。また、これにほぼ同調して培養液のＣ２３０活性も低下した。従って、組換え体の機能を活用する上で、プラスミドの脱落が極めて重要な問題であることが確認された。

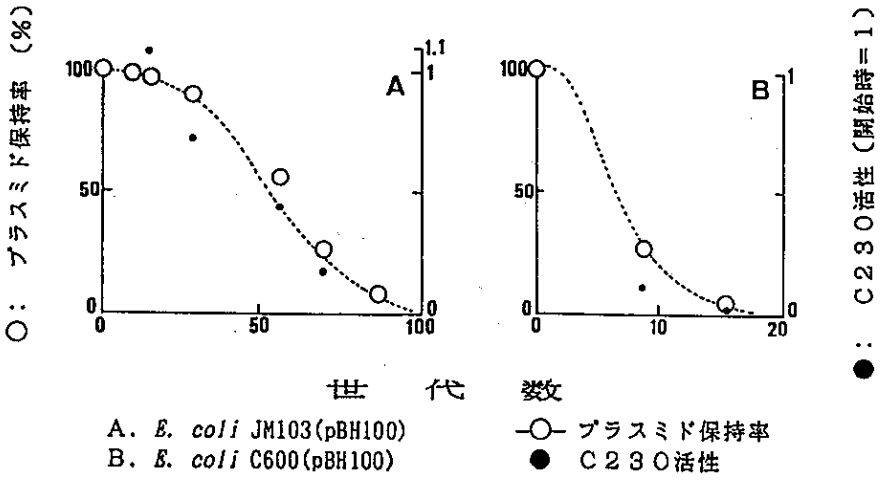


図3－1－1　pBH100の安定性試験成績

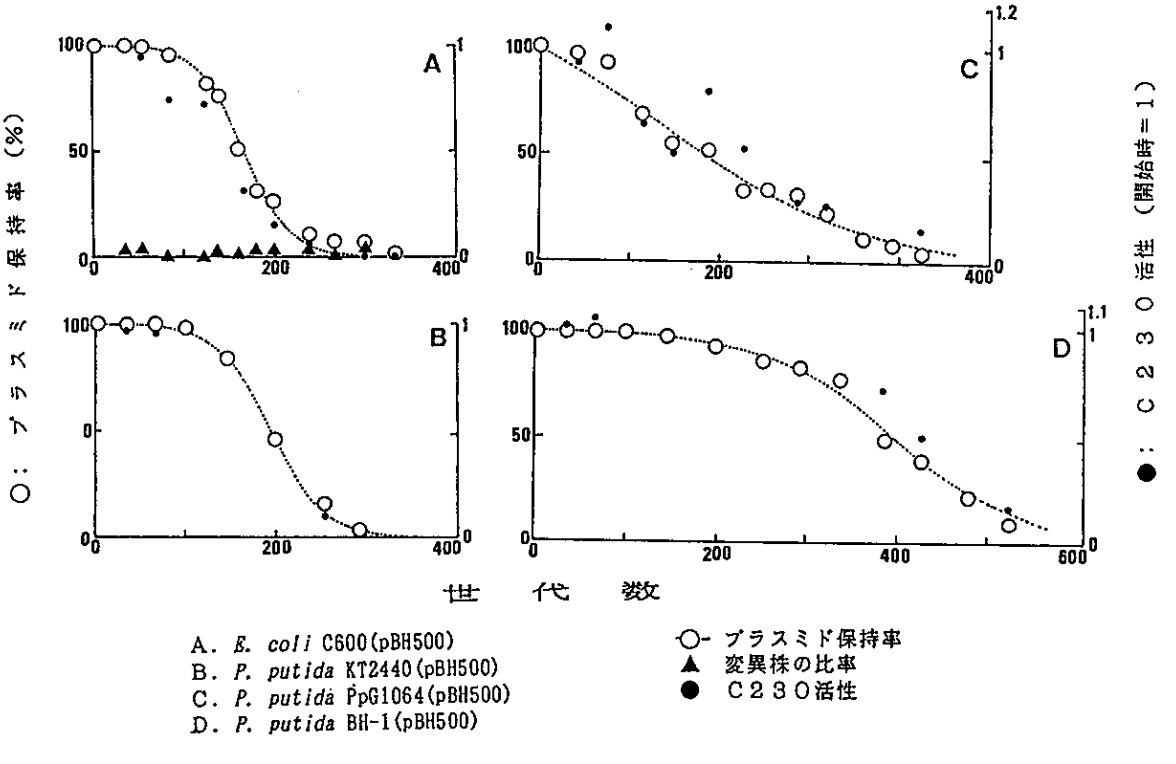


図3－1－2　pBH500の安定性試験成績

一般に、プラスミドにコードされた遺伝子の発現が強くなるほどその安定性は低下すると考えられている。表３－１－３に示した供試組換え体のＣ２３Ｏ活性（組換えプラスミドの遺伝子発現）および図３－１－１、図３－１－２から概ねこの傾向が確認された。即ち、高発現ベクター pUC19により構築されたpBH100の宿主内安定性は、遺伝子発現がさほど高くないpBH500に比べて非常に低いことが示された。しかし、pBH500保持株間の比較では遺伝子発現（Ｃ２３Ｏ）が C600>PpG1064>BH-1≧KT2440 であったのに対し、プラスミドの安定性は、BH-1>PpG1064>KT2440≧C600となり、必ずしもこの傾向は伺われなかった。このことは、遺伝子の発現が比較的高い上に、プラスミド安定性の高い組換え体を育種することが 可能なことを示しており、興味深い。ここでは、*P. putida*PpG1064(pBH500) が、かなり高いＣ２３Ｏ活性とプラスミドの安定性を示したことから、有効な組換え体といえる。一方、*P. putida* BH-1(pBH500)は 300世代後でもプラスミド保持率が80%以上であり、同等のＣ２３Ｏ活性を示した*P. putida* KT2440(pBH500)に比べて極めて高い安定性を示した。排水処理では目標の水質基準を維持することが目的であることから、遺伝子の高発現も重要ではあるが、水質・水量変動に左右されない安定性がさらに重要であり、これらの組換え体は有効な活用が期待できる。以上のように、目的遺伝子を様々なベクターに組み込み各種宿主菌株内での安定性を調べれば、有用な組換え体の選択が可能であるといえる。

表３－１－３　供試組換え体のＣ２３Ｏ活性

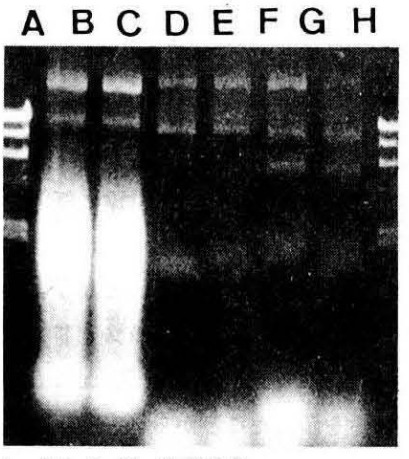
菌　株	Ｃ２３Ｏ活性(U/g-protein)
E. coli JM103(pBH100)	２３３．７
E. coli C600(pBH100)	８５４．６
E. coli C600(pBH500)	７３．０
P. putida KT2440(pBH500)	２３．９
P. putida PpG1064(pBH500)	６０．８
P. putida BH-1(pBH500)	２５．１

(2)プラスミドの変異：　*E. coli* C600(pBH500)の安定性試験で出現した変異株（表３－１－２に示した(Sm^r,$C230^-$)の表現型を持つ24株のうちの1株）を、*E. coli* C600-W304 と名付け、その詳細を調べた。本株は、組換え遺伝子の発現がプラスミドの脱落以外の原因で低下あるいは欠失してしまう現象として重要である。

先に述べたように、本変異株はアガロースゲル電気泳動によりプラスミドを保持することが確認された（写真３－１－１）。しかし、ここでのアガロースゲル電気泳動による解析からは、本プラスミドとpBH500の制限酵素切断パターンに差はなく、プラスミド上の変異は明らかにならなかった。また宿主菌についても性質を種々調べたが、明確な変異を見いだすことはできなかった。Mizutani *et al.*[4]は、α－アミラーゼ遺伝子を含む組換えプラスミドの*Bacillus*宿主内での安定性を調べ、ケモスタット培養で出現したα－アミラーゼ活性欠失株が、プラスミド上の組換え遺伝子断片が、2kb に及ぶ欠損を受けた変異株であったことを報告している。これを参考にすれば C600-W304は、pBH500上の微小な部分に挿入、欠失などの変異を生じたものとも考えられる。

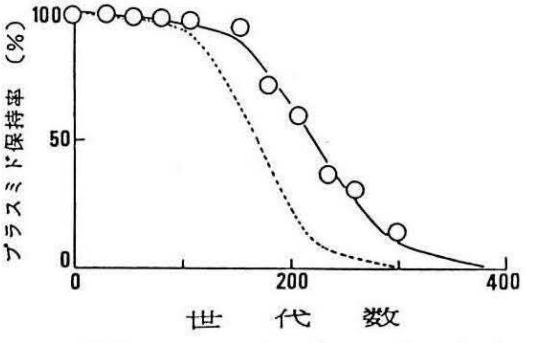
さらに、C600-W304 からＣ２３Ｏ活性復帰株が形成されるかを確認し、またそのプラスミドの安定性を評価するため、本株についても連続継代培養による安定性試験を行った。結果を図３－１－

3に示した。ここでもプラスミド脱落株が出現し、保持率の急激な低下が確認されたが、C230活性を示す復帰株は得られなかった。また、本株では元株*E. coli* C600よりも若干プラスミドの安定性が高くなった。このことは、組換え体で生じた自然突然変異が、プラスミドの安定性を向上させる可能性を示唆している。



A，H：λ-*Hind*Ⅲ消化物
B：*E. coli* C600(pBH500)の粗プラスミド
C：*E. coli* C600-W304の粗プラスミド
D：*E. coli* C600(pBH500)，*Hind*Ⅲ消化
E：*E. coli* C600-W304，*Hind*Ⅲ消化
F：*E. coli* C600(pBH500)，*Hind*Ⅲ-*Bam*HI消化
G：*E. coli* C600-W304，*Hind*Ⅲ-*Bam*HI消化

写真3－1－1　*E. coli* C600-W304のプラスミド



点線は*E. coli* C600(pBH500)のデータ

図3－1－3　*E. coli* C600-W304の安定性試験成績

2．プラスミド安定性のモデル解析

プラスミドの安定性は一般的には、保持株から脱落株が形成される頻度と、保持株と脱落株の増殖速度の差に依存する。Imanaka and Aiba[23] は、プラスミドを持つ細菌が回分培養で指数増殖している場合、n回細胞分裂後（n世代後）のプラスミド保持率Fn が下式で表されることを示した。

$$Fn = (1-\alpha-p) / \{1-\alpha-p \cdot 2^{n(\alpha+p-1)}\}$$

ただし、pは1回の細胞分裂当たりにプラスミド脱落株が形成される確率、αはプラスミド脱落株の保持株に対する比増殖速度μの比である。ここで、通常、プラスミドによる負荷を持つ保持株のμは、脱落株のμに比べて小さく、αは1以上の値となる。

本試験の条件は、ほぼこのモデル式の仮定を満たすため、実験データを本式に適用し、最小自乗近似により各組換え体のp値およびα値を推定した。この解析結果を表3－1－4に示した。また、図3－1－1～図3－1－3に示した曲線は、本式に推定されたパラメータを代入して求めている。図示したように、他の菌株と異なるプラスミド保持率の低下パターンを示した *P. putida* PpG1064 (pBH500) を除き、モデル式は実験データとよく一致した。

表3－1－4　プラスミド安定性に関するパラメータ推定値

菌　株	推定パラメータ		データ数	誤差自乗和
	p	α		
E. coli JM103(pBH100)	0.0009	1.13	7	0.0039
E. coli C600(pBH100)	0.0004	2.96	3	0.0008
E. coli C600(pBH500)	0.00006	1.06	13	0.0249
P. putida KT2440(pBH500)	0.00006	1.05	8	0.0022
P. putida PpG1064(pBH500)	0.003	1.01	13	0.0336
P. putida BH-1(pBH500)	0.00007	1.02	13	0.0163

推定されたp値はいずれの組換え体に対しても小さい値となり、プラスミドにより異なっていたが、宿主による差はさほどなかった。また、安定性との明確な相関は認められなかった。一般に、pBH100やpBH500など特別な宿主内安定化機構を持たないプラスミドは、細胞分裂時、両娘細胞にランダム配分される。この場合、pはプラスミド・コピー数Nに依存し、下式で示される[11]。

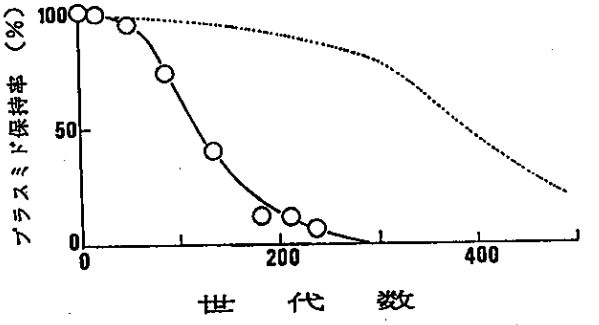
$$p = 2^{1-N}$$

これによれば、pBH100およびpBH500の宿主内でのコピー数はそれぞれ、11～12個および14～15個と試算される。通常 pUC19は宿主細胞当たり約50～60個、pKT230は約15～20個存在し、これにより構築された組換えプラスミドでは、コピー数が若干低下するといわれている。従って、pBH500に対して推定されたp値は妥当といえるが、pBH100に対するp値はかなり高く推定されたことになり、pBH100保持株ではランダム配分による脱落株の形成以外に、例えばプラスミドの消滅のような、別な脱落株の形成過程があったものと考えられる。よって、puC19 のような高発現ベクターを組換え体構築に使用する場合には、特にその安定性について十分注意を払う必要があるといえる。

一方、α値は予想通り1以上と推定されたが、この値が高く推定された組換え体ほどプラスミドの安定性が低くなる傾向が認められた。従って、脱落株が保持株よりも大きいμで増殖し、優勢になることがプラスミド保持率低下の主因と考えられる。また、このことから、安定性の高い組換え体を育種するためには、プラスミド保持が宿主の増殖に及ぼす影響の少ない宿主－プラスミド系を選択することが重要であるといえる。

本試験で、特に安定性の高かった*P. putida* BH-1(pBH500)は、α＝1.02と推定され、組換えプラスミドpBH500の導入が宿主の増殖に及ぼす影響が少ない組換え体であると推測された。そこで、μを実験的に求め、宿主*P. putida* BH-1と比較したところ、プラスミド脱落株の保持株に対するμの比、α＝1.003 という実測値を得た。他のpBH500保持菌株について同様に実測値を求めたところ、α＝1.04～1.23となり、*P. putida BH-1*が他の宿主に比べ、pBH500保持により増殖速度が低下しにくいことが確認された。*pheB* は、*P. putida* BHの染色体からクローニングされた遺伝子であり、*P.putida* BH-1はBHの派生株である。このことは、宿主由来の遺伝子を元株に導入した場合 組換えプラスミドの安定性が高くなることを示唆しているものともいえ、興味深い。そこで、pBH500を構

築したベクターpKT230に*nahG* を組み込んだプラスミドpHF400を *P. putida* BH-1に導入し、その安定性を調べたところ、図３－１－４のようになった。図示した通り、プラスミド保持率の低下は極めて速くなり、上記の推測を裏付ける結果となった。このことから、第２編第２章で示したような、染色体からクローニングした遺伝子を組換えプラスミドの形で元株に戻す中間代謝経路の強化は、遺伝的に安定な組換え体を得る上でも有効な育種法と考えられる。



点線は*P. putida* BH-1(pBH500)のデータ

図３－１－４　*P. putida* BH-1(pHF400)の安定性試験成績

第４節　要　約

遺伝的安定性の高い組換え体の特性を明らかにすることを目的として、*pheB* を組み込んだ組換えプラスミドの各種宿主内での安定性を連続継代培養によって調べ、以下の知見を得た。

1)　試験した全組換え体の培養において、プラスミドを失った脱落株が出現し、培養につれてプラスミド保持株の比率は低下した。従って、選択圧のない条件下でプラスミドの安定性が重要な問題であることが確認された。

2)　*E. coli* C600(pBH500)の試験では、プラスミドは保持するが、組換え遺伝子の発現がない変異株が出現した。この変異株は元株よりもプラスミドの安定性がやや高かった。

3)　安定性試験の結果と組換え体の遺伝子発現（Ｃ２３０活性）の比較から、遺伝子発現が比較的高く、しかもプラスミドの安定性が高い組換え体や、遺伝子発現は低いが、極めて安定性の高い組換え体の存在を示し、これらが排水処理への活用に有効であると考察した。

4)　安定性試験のモデル解析から、各試験におけるプラスミドの脱落頻度ｐ、および脱落株の保持株に対する比増殖速度μの比率αを求めた。この結果から、安定性の高い組換え体はα値が小さい、即ち、プラスミド保持が宿主の増殖速度を低下させないことを示唆した。また、染色体からクローニングされた遺伝子を、元株に導入した場合αの小さい株が得られ、安定性の高い組換え体の育種が可能であることを示唆した。

第２章　組換え体の生態学的安定性に関する研究

第１節　緒　言

活性汚泥法は多種多様な微生物の混合系であるため、遺伝子組換え体の活用においては、その遺伝的安定性に加えて、生態学的安定性が重要な問題となる。ただし、ここで、生態学的安定性とは、難分解性物質分解などの有用機能を有している組換え体が、生態系においてどれだけ安定にその個体群を維持することができるかを意味している。即ち、生態学的に不安定な組換え体は、活性汚泥処理系から淘汰され、消滅してしまうため、いくら目的遺伝子の発現と遺伝的安定性が高くとも、その機能を生かして処理性能を向上させることができない。

組換え体の生態学的安定性を取り扱った研究としては、近年、湖水、土壌やミクロコズムでの残存性について比較的多くの検討がなされている[1)-8)]が、活性汚泥中での生態挙動に関してはほとんど報告がない。僅かに、McClure *et al.*[9)10)]がモデル活性汚泥処理装置に3-クロロ安息香酸分解遺伝子を導入した組換え体 *P. putida* UWC1(pD10) を投入し、その生存と遺伝子発現を追跡した例が目をひくのみである。この報告では、UWC1(pD10)の個体群は投入直後の急激な減少に引き続き、さらに減衰し、3-クロロ安息香酸の除去効率も向上しなかったことから、生態学的安定性の重要さが確認された。一方で、組換え遺伝子が転移したと考えられる土着の活性汚泥細菌が、比較的高い安定性を持つことが示されるなど、興味深い知見も得られており、今後さらに詳細な検討が望まれている。

本章では、*pheB* を導入した組換え体の活性汚泥中における挙動を、回分および連続両試験によって調べた。また、その生態学的安定性に及ぼす、組換え体の植種量、ＳＲＴ、選択圧となる基質の添加などの影響を種々検討した。

第２節　実験材料および方法

１．実験材料

(1)供試組換え体および活性汚泥：　第１編第２章で構築された組換えプラスミドpBH500を持つ２種の組換え体*P. putida* BH(pBH500)および*E. coli* C600(pBH500)を用い、その活性汚泥内挙動を調べた。また、活性汚泥には第１編第１章同様、肉エキス、ペプトンを主成分とする合成下水に長期間馴致されていたものを用いた。

(2)使用培地：　ここで使用した組換え体*P. putida* BH(pBH500)は安息香酸を単一炭素源として増殖し、*E. coli* C600(pBH500)は大腸菌群検出用培地で増殖することができる。また、両株ともに、pBH500由来のＳｍ耐性を示す。このことから、*P. putida* BH(pBH500)および*E. coli* C600(pBH500)の選択培地には、無機塩培地（第２編第１章：表２－１－２）に 安息香酸ナトリウム（500*mg/l*）およびＳｍ（50*mg/l*）を加えて固化した安息香酸培地、およびデスオキシコーレイト培地（第１編第２章：表１－２－１）にＳｍ（100*mg/l*） を加え固化した培地を使用した。なお、活性汚泥を組換え体の選択培地に平板培養したところ、30°C、2 日の培養では、生菌数は 10^0 *cfu/ml*以下となっ

た。また、活性汚泥および処理水の全生菌数の計数には、CGY培地（第1編第1章：表1－1－2）を用いた。組換え体の培養はL培地（第1編第2章：表1－2－3）を用い、30°C、100rpm、一晩の回転振盪により行った。

2．実験方法

(1)回分培養活性汚泥内における組換え体の残存試験（回分試験）：　組換え体培養液を遠心分離（10,000×g、15分）して菌体を回収し、その適量をMLSS濃度 約2,000mg/lの活性汚泥 100mlと混合して、300ml容 三角フラスコ中、25°C、100rpmの回転振盪培養を行い、組換え体残存試験を行った。フラスコは1日サイクルの fill and draw方式で培養した。即ち、毎日一定量の活性汚泥を引き抜き、約30分の静置沈降により固液分離を行って上澄を排除した後、表3－2－1の合成下水 2mlを供給し、滅菌したイオン交換水で水位を 100mlに戻す操作を繰り返した。ここで引き抜かれた汚泥を第1編第1章図1－1－2に準じて、CGY培地および組換え体の選択培地に平板培養し、活性汚泥中の全生菌数および組換え体数を測定した。ただし、組換え体数は30°C、2 日の培養により得られたコロニー計数から算出した。なお、汚泥引き抜き量 Qw（ml）を変化させて、下式で定義されるSRT（day）を設定した。

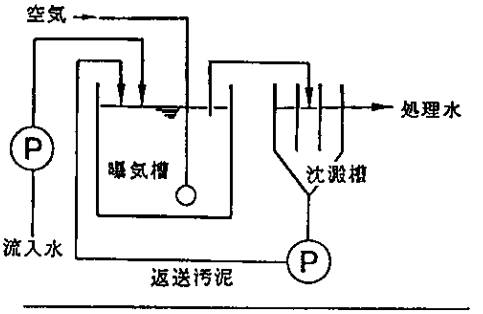
$$SRT = V / Q_w$$

ここで、Vは活性汚泥培養量（=100ml）である。

表3－2－1　合成下水の組成

成　分	濃　度（g/l）
肉エキス	20
ペプトン	30
尿素	5
NaCl	1.5
KCl	0.7
$CaCl_2$	0.7
$MgSO_4$	0.5
Na_2HPO_4	2.4

(2)連続式活性汚泥処理装置内における組換え体の残存試験（連続試験）：　組換え体を、図3－2－1に示した連続式活性汚泥処理装置の曝気槽に投入し、その残存を調べた。処理装置は、容量5lの曝気槽と1lの沈澱槽から成り、沈澱槽底部から定量ポンプにて汚泥返送が行われる。流入水には表3－2－1の合成下水を水道水で約60倍に希釈して用い、図中に示した処理条件の維持につとめた。ここで回分試験同様に、装置運転開始から経時的に曝気槽から引き抜いた汚泥の平板培養を行い、全生菌数および組換え体数を調べた。また、本試験では処理水についても全生菌数及び組換え体数を測定した。なお、SRT（day）は 下式で定義し、処理水SS濃度を考慮して、曝気槽からの余剰汚泥の引き抜きにより制御した。



曝気槽容量	5	l
沈澱槽容量	1	l
流入水流量	5	l/day
通気量	0.4	vvm
設定温度	25±1	°C
返送汚泥量	4.3	l/day
水理学的滞留時間	24.0	hr
CODcr容積負荷	0.83	g-CODcr/m³/day

図3－2－1　連続式活性汚泥処理装置

$$SRT = V \cdot S / \{Q_w S + (Q_s - Q_w) S_e\}$$

ここで、Vは 曝気槽容量（=6*l*）、Sは 曝気槽内MLSS濃度（*mg/l*）、Seは 処理水SS濃度（*mg/l*）、Qwは余剰汚泥引き抜き量（*l/day*）、Qsは流入水流量（*l/day*）である。

表3－2－2に、連続式活性汚泥処理装置を用いて行った一連の実験の目的、および実験条件・方法をまとめた。

表3－2－2　連続式活性汚泥処理装置を用いた組換え体の残存試験の目的および実験条件

Run No.	菌株	実験条件			目的
		植種	SRT	その他	
Run.C-1	*E. coli* C600 (pBH500)	開始時	15日		C600(pBH500)残存の基本特性の把握
Run.B-1	*P.putida* BH (pBH500)	開始時	15日		BH(pBH500)残存の基本特性の把握
Run.B-2	*P.putida* BH (pBH500)	開始時 2,4,6,20日目	15日		繰り返し植種の効果の評価
Run.B-3	*P.putida* BH (pBH500)	開始時 13日目	30日		SRTの影響の評価
Run.B-4	*P.putida* BH (pBH500)	開始時 22日目	5日		SRTの影響の評価
Run.B-5	*P.putida* BH (pBH500)	開始時 8,20日目	15日	21日目から フェノール添加 (100*mg/l*)	増殖基質添加の影響の評価

第3節　実験結果および考察

1．回分試験成績

回分試験では活性汚泥内における組換え体残存の基本パターンを明らかにし、さらに組換え体の植種量およびSRT制御が及ぼす影響について検討した。

(1)回分試験における組換え体の残存： 回分試験によって得られた*E. coli* C600(pBH500)および*P. putida* BH(pBH500)の活性汚泥中での残存の様子を、図3－2－2に示した。図は、SRTを20日に設定した場合の一例である。図示された通り、両組換え体とも、活性汚泥への添加直後から急激に減少した後、比較的安定な個体群を維持して汚泥生態系内にとどまることが明らかになった。即ち、活性汚泥内での組換え体の残存曲線は、初期の急激な減少の期間（急減期）と、個体群が安

定化する、あるいは緩やかな減少をみせる期間（安定期）に分かれた。

この試験では*E. coli* C600(pBH500)は、10日目までに3.5×10⁹*cfu/ml*から2.0×10⁶*cfu/ml* に減少し、30日目まで 約1.5×10⁶*cfu/ml* で安定に保持された。

一方、*P. putida* BH(pBH500) は、2.3×10⁹*cfu/ml* で添加され、培養21日目までに、約1000分の１に減少した後、さらに緩やかに減少したが、50日目まで3.5×10⁵*cfu/ml* のレベルで残存していた。従って、組換え体は、活性汚泥内で減少するものの完全には淘汰されず、長期間残存できるものといえる。なお、fill and draw 方式による培養において、静置沈降後の上澄液は２日目以降は極めて澄明であったことから、組換え体は分散状態ではなく、活性汚泥フロックに取り込まれた形で残存していたと推測される。

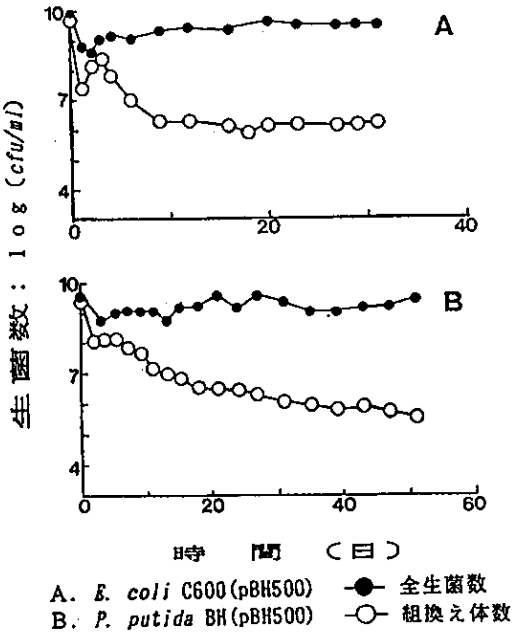
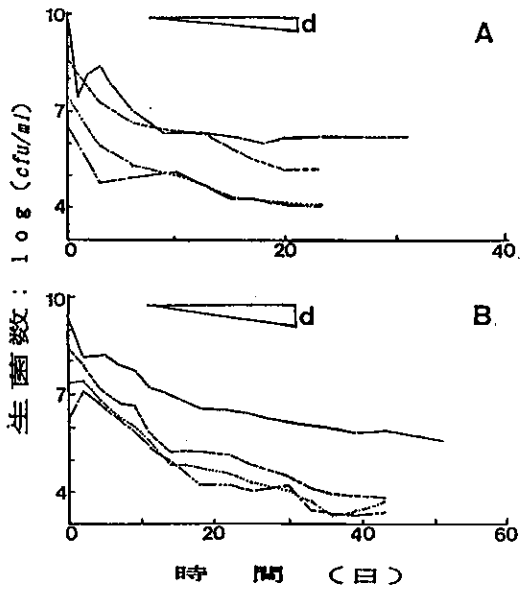


図３－２－２　回分試験における組換え体の残存（ＳＲＴ＝20日）

(2)植種量の影響： 図３－２－３に植種量を種々変化させた場合の組換え体の残存曲線を比較した。図から、*E. coli* C600(pBH500)、*P. putida* BH(pBH500)ともに、急減した後安定化（漸減）する残存曲線を示すが、植種量が多いほど安定後の残存組換え体数が高くなる傾向が認められた。従って、回分培養においては、組換え体の植種量は、生態学的安定性に重要な影響を及ぼす要因の一つであるといえる。

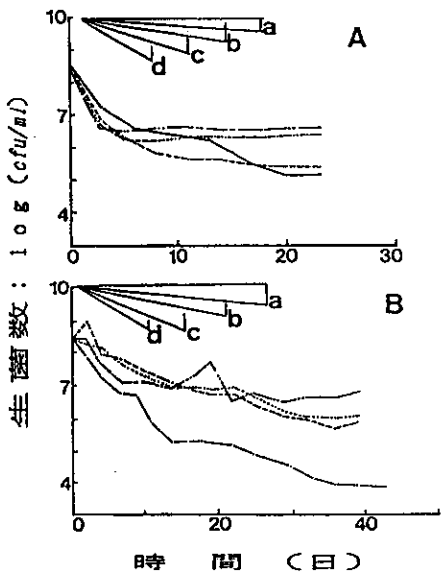
(3)ＳＲＴの影響： 活性汚泥の培養ＳＲＴを変化させて行った組換え体残存試験の結果を、図３－２－４に示した。図には、植種菌体が増殖しないと仮定した場合の汚泥引き抜きによる組換え体の単純な減少速度を併せて示している。図の通り、*E. coli* C600(pBH500)、*P. putida* BH(pBH500)ともに、制御ＳＲＴを短くするほど組換え体が高いレベルで残存し、安定化することが明らかになった。また、この安定性の向上は、*E. coli* C600(pBH500)では、ＳＲＴを短くするほど急減期の期間が短縮され、さらにまた安定期の組換え体の漸減が起こりにくくなったことに、また *P. putida* BH(pBH500)では、急減・安定両期間における組換え体の減少速度が低下したことに、それぞれ起因していることが伺える。ここで、ＳＲＴが短くなるほど、汚泥引き抜きによる組換え体の減少速度が高くなることから、ＳＲＴの減少に伴って組換え体の増殖速度が高くなっていることが明らかである。

(4) *E. coli* C600(pBH500)および*P. putida* BH(pBH500)の比較：　回分試験では、活性汚泥の優占属である *Pseudomonas*を宿主とした組換え体*P. putida* BH(pBH500)と、活性汚泥中ではほとんど検出されない大腸菌を宿主とした*E. coli* C600(pBH500)を使用して、種々の試験を行ったが、ほぼ同じ条件下では両者の活性汚泥中での残存に大きな差は認められなかった。McClure *et al.* [10]は、モデル活性汚泥内での組換え体挙動を調べた研究で、組換え遺伝子が転移したと考えられる土着細菌が比較的高い安定性を持っていたことから、処理環境に適合した宿主の選択が重要であることを指摘している。一般的に考えれば、活性汚泥の優占菌種を宿主とした組換え体は、非優占菌種を宿主とした場合より、その生態学的安定性は高くなるものといえるが、そうならなかったことは興味深い。



A. *E. coli* C600(pBH500)
B. *P. putida* BH(pBH500)
d,汚泥引き抜きによる組換え体の減少速度

図3－2－3　組換え体の残存に及ぼす植種量の影響（SRT=20日）



A. *E. coli* C600(pBH500)
B. *P. putida* BH(pBH500)
SRT：—— 3日；------ 5日；---- 10日；—— 20日
a,b,c,d,汚泥引き抜き（SRT=20,10,5,3日）による組換え体の減少速度.

図3－2－4　組換え体の残存に及ぼすSRTの影響

２．連続試験成績

連続式活性汚泥処理装置による組換え体残存試験の結果を図３－２－５（*E. coli* C600(pBH500)：Run.C-1）および図３－２－６（*P. putida* BH(pBH500)：Run.B-1～B-5）に示した。一連の連続試験は、回分試験で得られた知見が実際の処理条件下にも適用できるかを確認し、活性汚泥内における組換え体の安定化法を 模索することを目的とした。特に、Run.B-2～B-5 では、*P. putida* BH(pBH500)を処理装置内に高い生菌数レベルに保持するための検討を行った（表３－２－２参照）。

(1)連続試験における組換え体の残存： Run.C-1（図３－２－５）およびRun.B-1（図３－２－６（Ａ））は、活性汚泥処理装置内における*E. coli* C600(pBH500)および*P. putida* BH(pBH500)の残存の基本パターンを把握するために行った試験である。曝気槽内においては*E. coli* C600(pBH500)、*P. putida* BH(pBH500)ともに、運転開始後から急激に減少したが、その後は明らかな減少がなくなり、各々10^3～10^4*cfu/ml* および約10^3*cfu/ml*で安定化した。従って、連続処理系においても組換え体は完全に淘汰されず、ある一定レベルで維持できることが明らかになった。この残存パターンは、回分試験で認められたものと類似するが、同様の植種量での結果と比べると、安定化した組換え体数はやや低くなった。また 連続試験でも、両組換え体の残存数には大差はなかった。

(2)繰り返し植種の効果： 植種量を高くすると組換え体の残存数が高まるという回分試験の結果から、Run.B-2 （図３－２－６（Ｂ））では*P. putida* BH(pBH500)の繰り返し植種を行った。試験開始後、2、4、6 日目に繰り返し植種を行ったが、組換え体の残存数を高めることはできなかった。試験開始時には植種後約24時間流入水の供給を停止し、活性汚泥フロックへの組換え体の取り込みを図ったが、この繰り返し植種では流入停止を約１時間としたことが原因とも考えられた。そこで20日目に再び植種を行い、24時間の混和を行ったが、やはり効果は認められなかった。連続式処理装置への組換え体の効果的な添加方法については、さらに検討が必要である。また、繰り返し植種直後にも処理水中の組換え体数はさほど高くならなかったことから、添加された組換え体は曝気槽内で淘汰されたものと推測される。

(3)ＳＲＴの影響： Run.B-3、B-4（図３－２－６（Ｃ）（Ｄ））ではＳＲＴを30日および５日に変化させた。これらとＳＲＴ15日のRun.B-1、B-2を比較し、ＳＲＴの影響を検討した。図から、回分試験と同様にＳＲＴを短くするほど組換え体の残存数が高くなる（ＳＲＴ５日では10^4～10^5*cfu/ml*、15日では 約10^3*cfu/ml*、30日では 約10^2*cfu/ml*）ことが解る。従って、組換え体を活性汚泥処理系において高いレベルに維持するためには、ＳＲＴを短くする運転が有効であることが明らかとなった。なお、ここでも繰り返し植種を行ったが、その効果は認められなかった。

(4)流入水へのフェノール添加の影響： 組換え体が特異的に資化できる基質の流入は、その残存に多大な影響を及ぼすものと考えられる。Run.B-5 （図３－２－６（Ｅ））では、21日目から流入水に組換え体が資化できるフェノールを添加し、その影響を調べた。図から、フェノールを添加した直後には、組換え体数がやや増加したが、明確な影響は認められなかった。多種多様な基質利用性を持つ微生物が混在する活性汚泥中においては、このような増殖基質の添加は、必ずしも組換え体の残存に影響を及ぼさないものといえる。

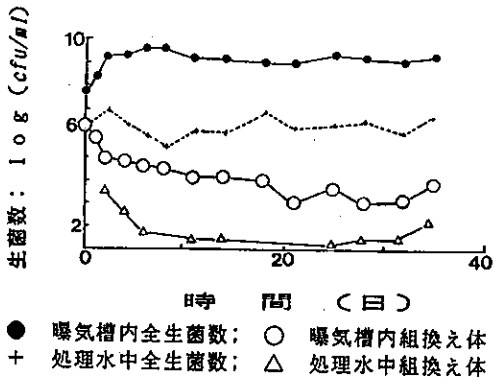
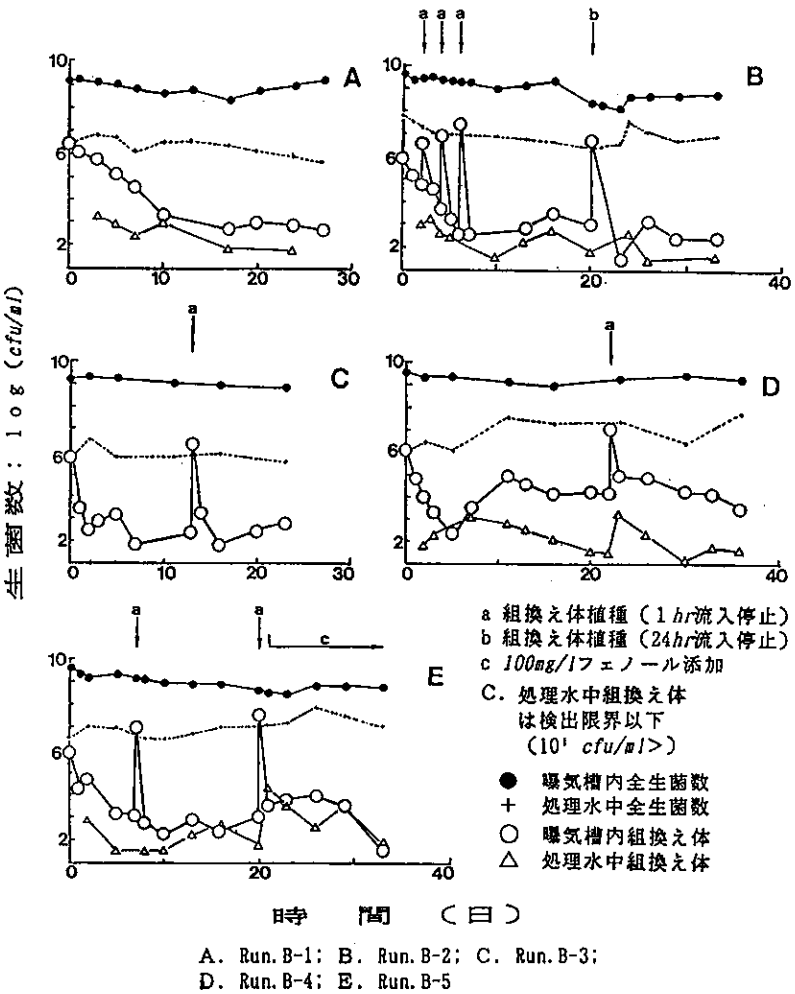


図3－2－5　連続試験における *E. coli* C600(pBH500)の残存
(Run．C－1)



A．Run.B-1；B．Run.B-2；C．Run.B-3；
D．Run.B-4；E．Run.B-5

図3－2－6　連続試験における*P. putida* BH(pBH500)の残存
(Run．B－1～B－5)

(5)処理水中の組換え体数：　一連の試験を通じて、処理水中から曝気槽内の 約10分の１～100分の１の組換え体が検出され、系外への流出が示された。従って、組換え体の活用に際しては、２次処理水の滅菌や限外ろ過膜による細菌除去など、ハザード対策の必要性が確認された。

３．活性汚泥中における組換え体の淘汰・残存機構に関する考察

回分・連続両試験の結果から、活性汚泥に添加された組換え体は急激に減少するが、その後かなり安定な個体群を保ち、活性汚泥処理系に長期間残存し得ることが明らかになった。このことは、組換え体を活性汚泥に投入し、その機能を利用することができることを示唆している。しかし、モデル処理装置内で組換え体*P. putida* BH(pBH500)の生態学的安定性が最も高かったRun.B-4 でも、その残存数は10^4～10^5*cfu/ml*であり、組換え体を活性汚泥の優占細菌として維持することはできなかった。従って、組換え体を高いレベルに維持するために、活性汚泥中における淘汰や定着のメカニズムを解明することが重要であると考えられる。本実験で得られた組換え体の残存特性からは、淘汰機構の一部を以下のように推測することができる。

一般に、活性汚泥中における特定細菌数の増減は、主にその増殖と系外への排出によって決まるといわれる。しかし、本試験における組換え体の活性汚泥への添加直後の減少は、余剰汚泥の引き抜きによる排出では説明できないほど急激であったため、急減期には組換え体に対する他の強い淘汰圧が働いていたといえる。ここで、この淘汰圧には、原生動物による捕食、他の微生物との競合、種々の環境因子による致死効果などがあげられ、ひとまとめにして活性汚泥生態系の淘汰圧と表現することができる。一方、安定期では生態系の淘汰圧が小さかったものといえる。即ち、急減期では、組換え体の添加によってバランスの崩れた活性汚泥生態系が安定化するために、強い淘汰圧が作用したのに対し、安定期では、組換え体が一定の生態学的地位を獲得した比較的安定した生態系が形成され、淘汰圧が弱かったものと解釈できる。また、本章の検討では、ＳＲＴを短く設定することが、組換え体の残存性を高める上で有効であることが明らかとなった。このことは、第１編第１章で示されたように、ＳＲＴを短くすると活性汚泥細菌相の多様性が低下し、種々の環境因子をめぐって組換え体と競合する土着細菌群が減少するため、組換え体への淘汰圧が軽減された結果と考えられる。

第４節　要　約

活性汚泥に組換え体*P. putida* BH(pBH500)および*E. coli* C600(pBH500)を添加し、回分振盪培養および連続式処理装置による試験でその残存を調べ、組換え体の生態学的安定性に関する以下の知見を得た。

1)　回分・連続両試験において、活性汚泥に添加された組換え体は急激な対数減少を示した後、比較的安定な生菌数を維持し系内に長期間とどまった。従って、組換え体を活性汚泥に投入し、活用することは可能といえるが、残存数を高める工夫が必要である。ここで、*P. putida* BH(pBH500)と*E. coli* C600(pBH500)の残存数に大きな差はなかった。

2)　回分培養試験で、組換え体植種量を多くし、またＳＲＴを短く設定すると、組換え体が高い

レベルで残存することを示した。

3) 連続式処理装置による*P. putida* BH(pBH500)の残存試験でも、ＳＲＴを短くすると組換え体の残存数が高くなったが、植種の繰り返しや増殖基質であるフェノールの添加による明確な影響は認められなかった。また、処理水からは曝気槽内の10分の１～100分の1の組換え体が検出された。

4) 組換え体の活性汚泥法への活用では生態系の淘汰圧が重要な問題であり、これが活性汚泥の微生物相に依存すると考察した。

第３章　組換え体の活性汚泥法への活用に関する検討

第１節　緒　言

近年、著しい進歩を遂げたバイオ関連周辺技術は、微生物を多様な形で、しかも効率よく活用する種々の方法を提供している。微生物の固定化、限外ろ過膜を用いた固液分離、計装機器によるプロセスの自動制御などは、既に水処理分野にも転用されており[1)-6)]、活性汚泥法に組換え体を活用する上でも有用と考えられる。この場合、使用する組換え体の特性を考慮して適用技術を選択することが重要である。特に、良好な処理水質を常に維持することを目標とする排水処理においては、組換え体の機能と安定性を十分に考慮した活用法の検討が必須となる。

本編第１章、第２章では、組換え体の安定性について遺伝的・生態学的両面から検討し、この問題の解決が極めて重要な課題であることを確認した。しかし一方、第１章では遺伝的安定性の高い組換え体の存在が示され、第２章では生態学的安定性に大きな影響を及ぼす要因の一部が明らかになり、活性汚泥法における組換え体活用の可能性が示唆された。即ち、目的に合った機能と安定性をもつ組換え体に、適切な周辺技術を適用すれば、処理の効率化・高度化を達成することができると考えられる。

本章では、第１章、第２章で得られた知見をふまえて、活性汚泥法における組換え体の有効な活用方法を模索した。即ち、活性汚泥法における組換え体の活用を、混合培養系および純粋培養系での利用に分けて、実用プロセスの提案と評価を行っている。

第２節　組換え体の混合系利用と純粋系利用

活性汚泥法における組換え体の活用には主に、混合培養系および純粋培養系の２つの利用形態が想定できる（混合系利用および純粋系利用）。混合系利用は、組換え体を活性汚泥に添加して両者の能力を一つの処理槽内で発揮させる方法であり、純粋系利用は、組換え体を活性汚泥とは別の処理槽で純粋培養の形で活用する方法である。

多様な微生物が混在する活性汚泥処理槽内で組換え体を活用する混合系利用では、第２章で示したように生態学的安定性の問題があり、また合理的な運転制御が困難であることから、組換え体の持つ有用機能を十分に発揮させることが容易ではない反面、半自然生態系の特徴を生かした安定かつ経済的な処理が行えるメリットがある。一方、純粋系利用では、合理的な培養系の管理によって組換え体の機能を効率的に活用できるが、処理が不安定になりやすく、複数の処理系列を設ける必要があるため高コストとなる可能性がある。従って、両者にはそれぞれの得失があるといえ、処理の目的にかなった活用方法を採用することが重要である。後節では、混合系利用、純粋系利用の各々について、いくつかの実用的プロセスを提案し、これを種々検討することを通じて、活性汚泥法への組換え体活用法について考察した。

第３節　混合系利用法の検討

組換え体の混合系利用の中で、最も単純な方法は、組換え体を直接活性汚泥に添加する方法である。組換え体の定着により活性汚泥の機能が高められれば、現在の標準的なプロセス、装置をそのまま利用した経済的な処理の効率化・高度化が望め、ある意味で理想的である（図３－３－１）。しかし、第２章で示されたように、活性汚泥中に投入した組換え体は急激に減少し、その数は高いレベルに維持されにくいため、遺伝子発現が低ければ処理性能の大幅な向上は期待できない。また、曝気槽の運転においては、必ずしも組換え体の活用に有利な処理（培養）条件を保つことができない欠点がある。従って、この利用形態でも有効に使用することのできる組換え体の育種が重要な課題である。例として、微量有害物質の分解、燐除去の効率化、フロック形成能の増強などがあげられる。これらの例では、活性汚泥に定着し得る少数の組換え体によっても、処理の目標が達成できる可能性がある。

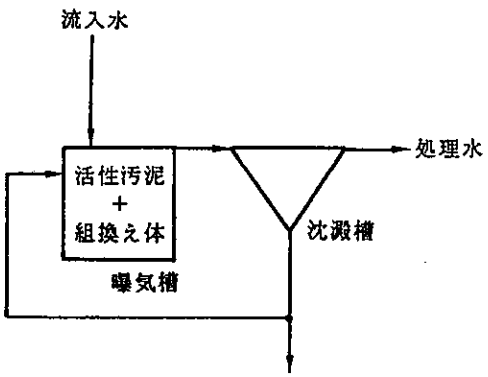


図３－３－１　標準活性汚泥プロセスにおける組換え体の混合系利用

一方、組換え体を回分式反応槽で別途培養しておき、これを曝気槽に添加して混合系利用を行う図３－３－２のプロセス（Enricher Reactor System[9]）の適用が提案できる。このプロセスでは、曝気槽に絶えず組換え体が供給されるため、その濃度が高く保たれる。従って、曝気槽内で組換え体の機能を高いレベルで活用することが可能となり、難分解性物質を比較的高い濃度で含む排水の処理などに有効であると考えられる。この方法では組換え体の培養基質を使用するという経済面での問題があるが、生態学的安定性の問題を回避できる利用形態として期待できる。

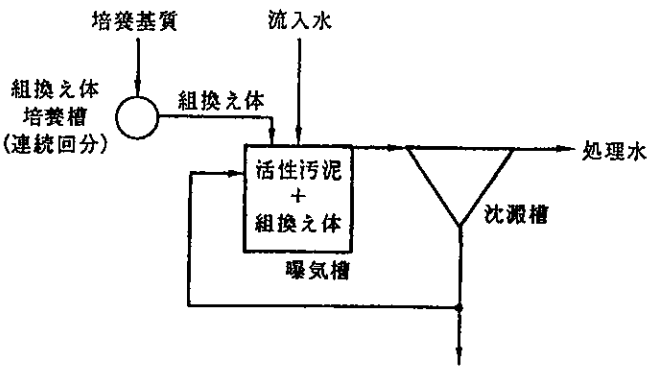


図３－３－２　Enricher Reactor Systemによる組換え体の混合系利用

また、組換え体を活性汚泥内で安定保持する一つの方策として、固定化の利用があげられる。即ち、組換え体を固定化し、これを曝気槽に添加して活性汚泥との併用処理を行う混合系利用形態である。固定化は、組換え体を他の活性汚泥微生物と隔離し、その生存空間（「すみか」）を与える手段であるが、細胞を高濃度に保ち、温度、ｐＨなど環境因子の変動によるショックを緩和する上、組換えプラスミドの安定性を高めるとの報告[10)-12)] もあり、非常に多くのメリットがある。さらに、活性汚泥との分離が容易であるため、曝気槽から固定化菌体を回収し、別槽で活性化を図ることもできる。このプロセスの概念を図３－３－３に示した。固定化法には、活性炭のような担体に微生物を固着させる結合固定化と、高分子材料のペレットで微生物を包み込む包括固定化があるが[1)-3),13)]、幅広い微生物に適用が可能な後者が実用的である。固定化には材料費が高いという欠点があるが、近年ではＰＶＡを用いた安価で耐久性のよい方法[2)3)]も開発され、実用性が高まっている。従って、固定化法は極めて有効な混合系利用法であり、多様な目的への適用が可能と考えられる。しかし、活性汚泥中での固定化組換え体の機能発現については僅かに橋本と藤田[14)] によるフラスコ試験の報告があるのみで、今後の詳細な検討が必要とされている。

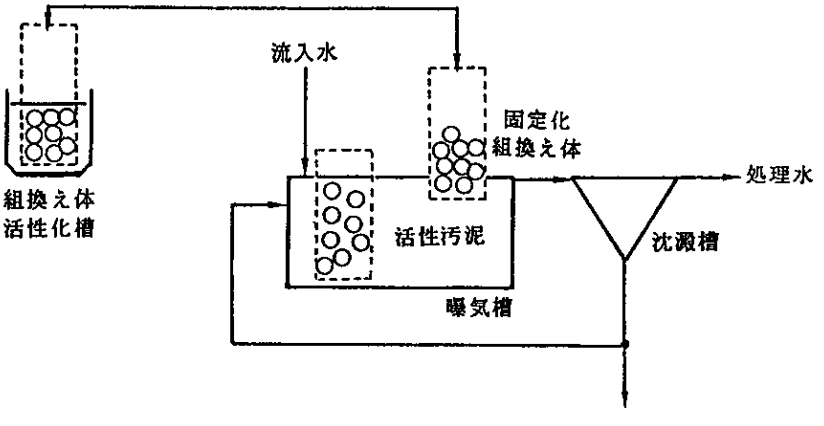


図３－３－３　固定化組換え体を使用した組換え体の混合系利用

以上から、混合系利用は、処理槽内に高濃度に組換え体を維持する技術の実用的検討が必要であるが、一般下水処理から産業排水の処理まで広範な活用が期待でき、活性汚泥法の高機能化に高いポテンシャルを持つものといえる。

第４節　純粋系利用法の検討

産業排水処理の分野で、特定の化学物質を多量に含む排水を、高い分解能を持つ微生物の純粋培養系を用いて処理するいわゆる「純粋菌培養法[15]」が提案され 一部実用化されている（図３－３－４）。この方式では、微生物による処理効率を著しく向上させることが可能であり、これに組換え体を活用すればさらに処理性能は高まると考えられる。しかし、特定の微生物あるいは組換え体のみでは、活性汚泥に匹敵する良好な処理水質を得ることはできないため、組換え体利用槽を処理プロセスにいかにうまく組み込むか、が重要である。

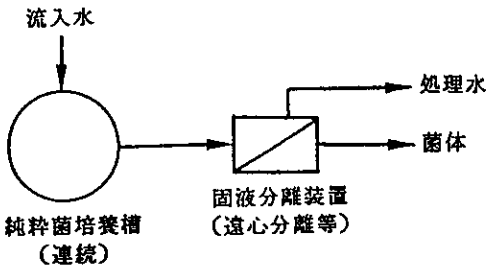


図３－３－４　純粋菌培養法による排水処理

図３－３－５に、組換え体利用槽を曝気槽の前段に設置した純粋系利用プロセスを例示した。本プロセスは、処理に有害な難分解性物質や毒性物質を含む特殊産業排水を組換え体利用槽で処理し、この処理水を他系列の一般排水とともに曝気槽に送り、活性汚泥処理することを想定している。組換え体に持たせる機能には他に、栄養塩類の効率的取り込み、重金属類の除去、廃水ｐＨの適正化などが考えられ、特に活性汚泥処理に悪影響を及ぼす排水を前処理するために有効である。ここで、特殊排水と一般排水を分別せずに組換え体利用槽に導き合併処理する形式では、目的とする物質の濃度が低下し、水理学的滞留時間も短くなるため、処理効率が低下するものといえる。従って、このプロセスは、分別収集された特殊産業排水の処理への適用が有効であると考えられる。また、同一系統の化学物質を含む排水を混合し、第２編第１章で育種したような多成分基質分解菌で処理することも可能である。一方、組換え体利用槽においては長期間の連続培養が行われることになるので、組換え体を遺伝的にも、生態学的にも安定に維持するために、培養系を適正な環境条件に保ち、他の微生物の汚染を防止する工夫が必要である。このためには、先に示した組換え体の固定化、計装機器による培養系の自動制御、オゾン処理や限外ろ過膜による流入水の滅菌・除菌などの周辺技術が活用できる。また、第１章で示したように遺伝的安定性の高い組換え体を活用することも重要である。

組換え体利用槽を活性汚泥処理槽の後段に設けるプロセスも、図３－３－６のような形態で想定することができる。通常、活性汚泥処理槽で除去しきれない物質（ＣＯＤ成分、色度など）を対象とした高度処理を、組換え体利用槽で行う方式である。しかし、図示したように、この方式で組換え体の純粋系利用を行うためには、曝気槽、組換え体利用槽の両者に対して固液分離の工程が必要であり、割高な設備・運転費用に見合ったメリットがない限り、現実的なプロセスとはなり得ない。また、組換え体利用槽への流入水中には、ほとんど有機物が含まれていないため、組換え体の増殖基質の供給も必要となる。

以上より、純粋系利用では、分別収集された特殊排水の処理工程として、活性汚泥処理の前段に

組換え体利用槽を設置する形式が有望であり、難分解性物質・有害物質除去の効率化を図れる実用プロセス構築の可能性は高いといえる。

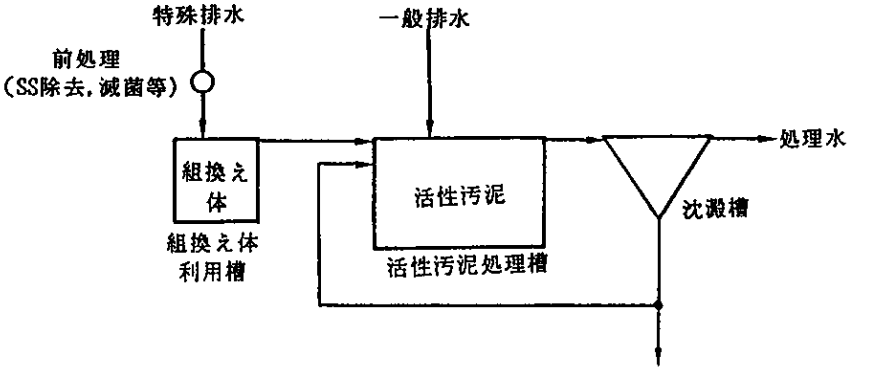


図3－3－5　組換え体の純粋系利用プロセス（1）

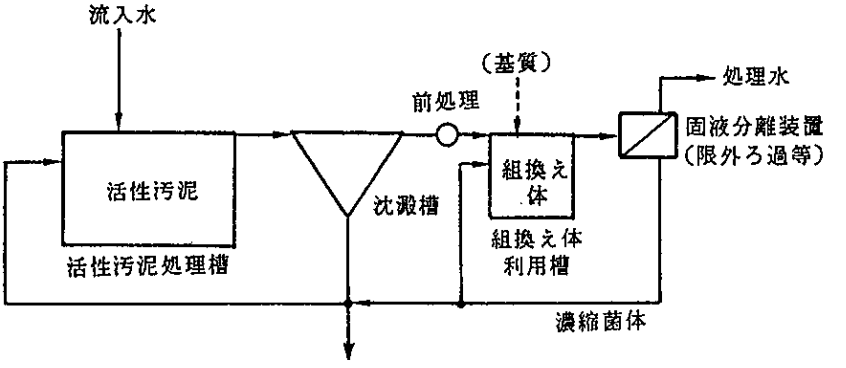


図3－3－6　組換え体の純粋系利用プロセス（2）

第5節　要　約

活性汚泥法への組換え体の有効な活用法について検討し、以下のように考察した。

1)　組換え体の利用形態を、活性汚泥処理槽内で使用する混合系利用、および別途組換え体利用槽を設ける純粋系利用に分類した。

2)　混合系利用では、活性汚泥内での組換え体の生態学的安定性が重要な問題であるが、組換え体の培養槽を設ける Enricher Reactor Systemの適用や固定化法の活用によってこの問題を解決すれば、経済的かつ安定な高機能型処理が行えるものと考えられる。

3)　純粋系利用では、分別収集された特殊排水の処理工程として、活性汚泥処理の前段に組換え体利用槽を設置する形式が有望であり、効率的な難分解性物質・有害物質の除去が行える実用プロセスを構築できる可能性が高いといえる。

総 括 並びに 結 論

活性汚泥法は、下排水処理の中心技術として、長年水域の汚濁防止に重要な役割を担ってきた。しかし近年、生活様式や産業活動の多様化・高度化に伴って、難分解性物質の分解、栄養塩類の除去、急激な水質・水量変動への対応など、従来の処理では対処しきれない種々の問題が顕在化している。このような問題の解決には本法の本質的な改良が必要とされるが、一方策として、１９７０年代以降急速な発展を遂げた遺伝子操作技術の適用が提案できる。有用な機能を付加あるいは強化した遺伝子組換え体を育種し、これを活用すれば、処理性能の飛躍的な向上が望める。

本論文は、活性汚泥法の高度化・効率化に高いポテンシャルを持つ遺伝子組換え体の活用に注目し、その実用化を目的として行った基礎的研究をまとめたものである。

第１編では、組換え体活用の場としての活性汚泥の微生物学的、遺伝学的特性の把握を目的とし、活性汚泥法における出現細菌およびそのプラスミドに関する実験・調査を行った。

第１編第１章では、最も重要な操作因子である活性汚泥滞留時間（ＳＲＴ）を種々変化させて培養した活性汚泥から、優占細菌を分離し、細菌相の変化を調べた。各種活性汚泥の優占菌として、*Pseudomonas*属、*Flavobacterium*属、および Coryneform groupの細菌が分離されたが、ＳＲＴ制御によって活性汚泥の細菌構成が変化した。即ちＳＲＴ２日および５日では 大部分が*Pseudomonas*属細菌であったのに対し、ＳＲＴ10日および15日では、*Flavobacterium*属およびCoryneform groupの細菌の構成比率が増加し、構成細菌相が多様化した。また、細菌相の変化や代表菌株の性質と汚泥性状・処理性能の関連から、若干の興味ある知見が得られた。活性汚泥細菌相の変化は、組換え体の挙動にも多大な影響を及ぼすものと考えられ、今後さらなる研究が必要とされる。

第１編第２章では、下水処理場の流入水、活性汚泥、および処理水中の細菌株からプラスミドを検索し、その処理場内での分布を調べた。分離された優占菌、大腸菌群、および各種抗生物質耐性菌、合計 210の分離株のうち、25%に当たる52株から総数 150のプラスミドが検索された。ここで、検出されたプラスミドの約40%は 5kb以下の微小プラスミドであったが、自己伝達能をコードし得る30kb以上のサイズを持つ大きいプラスミドも約30%を占めた。プラスミドを保持する細菌は、流入水中ではかなり高い比率（30～40%）で存在していたが、曝気槽内ではその比率が低下し、処理水中ではその比率が再び高くなる傾向が示された。野生型プラスミドは、活性汚泥処理系における組換え体の消長や組換え遺伝子の転移に関わる重要な因子であり、その機能についての解明が望まれる。

第２編では、活性汚泥法の機能向上に有効な組換え体の育種を取り上げ、芳香族化合物分解遺伝子を材料とした遺伝子操作を紹介した。

第２編第１章では、ＮＡＨプラスミドからクローニングしたサリチル酸ヒドロキシラーゼ遺伝子*nahG*を用いて 多成分基質分解菌を育種した。フェノール および 安息香酸を分解する *P. putida*

PpG1064に *nahG*を導入し、さらにサリチル酸資化能の賦与された*P. putida* PpG1064(pHF400)が得られた。本組換え体は、野生株 *P. putida* PpG1064(ＮＡＨ)とほぼ同等のサリチル酸分解能を示した。また、フェノールおよびサリチル酸の共存下では、両基質を野生株よりも速く分解し、旺盛に増殖したことから、多様な化合物の混入する排水の処理に有効であることが示された。さらに、組換え体および野生株の基質分解経路に関する考察から、遺伝子操作による芳香族化合物分解域の拡大には、カテコールの *ortho*分解経路を持つ宿主菌を活用することが有利であることを示唆した。

第２編第２章では、*P. putida* BHの染色体からクローニングしたカテコール２，３オキシゲナーゼ（Ｃ２３Ｏ）遺伝子*pheB* を用いて本株のフェノール代謝経路を強化した。まず、*P. putida* BHの染色体から*pheB*をクローニングし、その制限酵素解析から、*Pseudomonas* sp. CF600のフェノール分解プラスミドから分離されたＣ２３Ｏ遺伝子*dmpB*との高い相同性を認めた。この*pheB*を組換えプラスミドの形で元株に戻し、フェノール代謝経路のうちＣ２３Ｏ触媒反応を強化した組換え体*P. putida* BH(pBH500)を育種した。本組換え体は *pheB*の構成的発現により、元株よりも高いＣ２３Ｏ活性を示し、低フェノール濃度下での誘導期に速くフェノールを分解・除去した。排水処理では流入水に含まれるフェノール等の物質の濃度は低く、しかも絶えず変動するため、この組換え体の特性は非常に有用であるといえる。この例により、中間代謝経路の補強という新しい分解菌育種の概念を示した。

第３編では、組換え体の活用において最も重要な安定性の問題について、実験的に検討し、この結果をふまえて活性汚泥法への組換え体の有効な活用法を模索した。

第３編第１章では、*pheB* を組み込んだ組換えプラスミドの各種宿主内での安定性を、プラスミドへの選択圧を持たない培地を使用した連続継代培養によって調べた。試験した全組換え体の培養において、プラスミド脱落株の出現による急激なプラスミド保持株の比率の低下が認められ、選択圧のない条件下でプラスミドの安定性が重要な問題であることが示された。一方で、*E. coli* C600(pBH500)の試験では、プラスミドは保持するが、組換え遺伝子の発現がない変異株が出現した。また、遺伝子発現が比較的高く、しかもプラスミドの安定性が高い組換え体や、遺伝子発現は低いが、極めて安定性の高い組換え体の存在が示され、これらが排水処理への活用に有効であると考察した。次に、安定性試験のモデル解析から、プラスミドの脱落頻度ｐ、および脱落株の保持株に対する比増殖速度の比率αを推定し、安定性の高い組換え体はα値が小さい、即ち、プラスミド保持が宿主の増殖速度を低下させないことを示した。さらに、染色体からクローニングされた遺伝子を、元株に導入した場合、プラスミド安定性の高い組換え体が得られることを示唆した。これらより、活性汚泥法への適用に有効な、遺伝的安定性の高い組換え体の選択が可能であると結論した。

第３編第２章では、２種の組換え体*P. putida* BH(pBH500)および*E. coli* C600(pBH500)の活性汚泥内での残存を、回分培養および連続式処理装置により調べ、生態学的安定性について検討した。活性汚泥に添加された組換え体は急激な対数減少を示した後、低レベルではあるが比較的安定な生菌数を維持し、長期間残存した。従って、組換え体を活性汚泥に投入し活用することは可能ではあるが、残存数を高める工夫が必要であると考えられた。そこで、回分培養試験では、植種量を多く

し、あるいはＳＲＴを短く設定したところ、組換え体が比較的高いレベルに維持された。連続式処理装置による*P. putida* BH(pBH500)の残存試験でも、ＳＲＴを短くすると、組換え体の残存数が高くなったが、植種の繰り返しや増殖基質であるフェノールの添加では、明確な効果は認められなかった。またここで、処理水からは曝気槽内の10分の１～100分の1の組換え体が検出され、ハザード対策の必要性が示唆された。活性汚泥内における組換え体の淘汰、残存のメカニズムについては、さらに検討が望まれる。

第３編第３章では、ここまでの研究で得られた知見を考慮して、活性汚泥法への組換え体の有効な活用法について検討した。まず、組換え体の利用形態を、活性汚泥処理槽内で使用する混合系利用、および別途組換え体利用槽を設ける純粋系利用に分類し、想定される処理プロセスの評価を行った。混合系利用では、組換え体の生態学的安定性が重要な問題となるが、組換え体培養槽を設ける Enricher Reactor Systemや固定化法を活用すれば、高機能型処理も可能であることを提案した。一方、純粋系利用では、分別収集された特殊排水の処理工程として、活性汚泥処理の前段に組換え体利用槽を設置する形式が有望であり、難分解性物質・有害物質の除去を目的とした実用プロセスが構築できることを明らかにした。

以上の総括から、組換え体供給システム、安定化法や、組換え体用リアクターの開発などの実用的検討が進めば、組換え体を活用した活性汚泥法の効率化、高機能化が達成されるものと結論できる。特に、中小規模の産業排水処理プラントやコミュニティプラントでは、プロセスの変更、設備・装置の新設、処理制御の合理化などが比較的容易であるため、組換え体を有効に利用した各種プロセス構築の可能性は高い。また、このようなプラントでは特定の排水あるいは水質項目に目標を定めて処理を行えるため、目的にあった組換え体を育種・選択することができ、有効な活用が期待できる。一方、一般の都市型下水処理場への組換え体の適用は、設備・装置の変更、新設が大規模な工事を必要とする点、あるいは固定化などでは材料コストがかかる点で、組換え体の曝気槽への直接添加以外に有効な活用法は提案できない。しかしここで、ＳＲＴを短く設定するほど組換え体の残存数が高まるという本研究の知見は、一つの示唆を与えるものである。近年、流入水の増大により下水処理の高速化が進み、ＳＲＴを短く設定せざるを得ない反面、窒素や難分解性物質の除去のためにはＳＲＴを長く設定せねばならないというジレンマが生じているが、アンモニアの硝化や難分解性物質分解の能力を賦与した組換え体を活用し、ＳＲＴを短期にとった運転を行えば、この問題を解決できる可能性がある。今後さらに曝気槽内における組換え体の生態学的安定性についての検討が進めば、本例のように、一般的な下水処理場における組換え体の有効な活用法が種々提案され、処理の効率化に大いに寄与するものと考えられる。

参考文献

緒　論

1）　橋本　奨：微生物増殖動力学からみた活性汚泥法の管理基礎，水処理技術，15，615-620(1974)

2）　日野沢　敏克：下水処理施設における自動制御システム，下水処理の自動制御と水質の計測監視に関するワークショップ論文集(環境技術研究会)，161-164(1980)

3）　平岡　正勝，津村　和志：中小規模下水処理場における制御システムに関する研究，下水処理の自動制御と水質の計測監視に関するワークショップ論文集（環境技術研究会)，185-188(1980)

4）　Barnard, J.L.：Biological denitrification, *Wat. Pollut. Cont.*, 72, 705-720(1970)

5）　橋本　奨，古川　憲治：嫌気－好気式高濃度活性汚泥法による窒素除去（Ⅰ），下水道協会誌，14(153)，16-20(1977)

6）　Galdieri, J.V.：Remove phosphate biologically, *Water & Waste Engg.*, 16, 43-44 (1979)

7）　Barnard, J.L.：The influence of nitrogen on phosphorous removal in activated sludge plants, *Wat. Sci. Technol.*, 14, 31-45(1982)

8）　Chudoba, J., Grau, P. and Ottova V.：Control of activated sludge bulking, Ⅱ. Selection of microorganisms by means of a selector, *Wat. Res.*, 7, 1389-1406(1973)

9）　Chudoba, J., Blaha, J. and Madera, V.：Control of activated sludge bulking, Ⅲ. Effect of sludge loading, *Wat. Res.*, 8, 231-237(1974)

10）　Richards, T., Nungesser, P. and Jones, C.：Solution of *Nocardia* foaming problems, *Res. J. Wat. Pollut. Cont. Fed.*, 62, 915-919(1990)

11）　橋本　奨，藤田　正憲：活性汚泥によるフェノール廃水処理の効率化に関する研究 (1) －フェノール馴養活性汚泥による処理－，下水道協会誌，23(270)，39-46(1986)

12）　大竹　久夫：細菌の六価クロム防御機能を利用する有害六価クロムの処理：1989年会 環境科学シンポジウム講演要旨集，142(1989)

13）　Kobayashi, H.A.：Application of genetic engineering to industrial waste/wastewater treatment, *In* Genetic control of environmental pollutants(Eds. Omenn, G.S. and Hollaender, A.), 47-80, Plenum Press, New York-London(1984)

14）　藤田　正憲：バイオテクノロジーを応用した水処理技術，科学と工業，61，307-313 (1987)

15）　橋本　奨：下・廃水処理におけるバイオテクノロジーの概観と展望，用水と廃水，27，1091-1101(1985)

16）　McClure, N.C., Frey, J.C. and Weightman, A.J.：Genetic engineering for waste-water treatment, *J. Inst. Wat. Environ. Mangt.*, 5, 608-616(1991)

17）　小林　猛：遺伝子組換え菌の培養，*In* 化学工学の進歩 20. バイオテクノロジー(化学工学協会編)，125-142，槇書店(1986)

18）　大竹　久夫：プラスミド保有微生物の生態系での挙動，環境科学セミナー講演要旨(環境庁保健調査室)，54-57(1985)

19）　坂口　玄二：ＤＮＡ組み替え体（微生物）の土壌中における挙動，環境科学セミナー講演要旨(環境庁保健調査室)，58-61(1985)

20) 岡崎　光雄：ＤＮＡ組み替え体（微生物）の河川水中における挙動，環境科学セミナー講演要旨(環境庁保健調査室),62-66(1985)

第１編第１章

1) Baum,J.A., Coyle,D.M., Gilbert,M.P., Jany,C.S. and Gawron-Burke,C. : Novel cloning vectors for *Bacillus thuringensis*, *Appl.Environ.Microbiol.*,56,3420-3428(1990)
2) Rangwala,S.H., Fuchs,R.L., Drahos,D.J. and Olins,P.O. : Broad host-range vector for efficient expression of foreign genes in gram-negative bacteria, *Biotechnol.*,477-479(1991)
3) Fukuda,M. and Yano,K. : Construction of broad host range cloning vectors for gram-negative bacteria, *Agric.Biol.Chem.*,49,2719-2724(1985)
4) Bagdasarian,M., Lurz,R., Rucket,B, Flanklin,F.C.H., Bagdasarian,M.M., Frey,J. and Timmis,K.N. : Specific purpose plasmid cloning vectors, RSF1010-derived vectors and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*, *Gene*,16,237-247(1981)
5) Labes,M., Puhler,A. and Simon,R. : A new family of RSF1010-derived expression and *lac*-fusion broad-host-range vectors for gram-negative bacteria, *Gene*,89,37-46(1990)
6) 高橋　豊三：グラム陰性菌のための広宿主域クローニングベクター(1)，バイオインダストリー,6,628-642(1989)
7) 高橋　豊三：グラム陰性菌のための広宿主域クローニングベクター(2)，バイオインダストリー,6,705-713(1989)
8) 高橋　豊三：グラム陰性菌のための広宿主域クローニングベクター(3)，バイオインダストリー,6,763-776(1989)
9) 常政　典貴：処理水質と活性汚泥細菌相，下水道協会誌,28(321),34-39(1991)
10) Pike,E.B. and Carrington,E.G. : Recent developments in the study of bacteria in the activated-sludge process, *Wat.Pollut.Cont.*,71,583-600(1972)
11) Prakasam,T.B.S. and Dondero,N.C. : Aerobic heterotrophic bacterial population of sewage and activated sludge, Ⅱ.Method of characterization of activated sludge bacteria, *Appl.Microbiol.*,15,1122-1127(1967)
12) Dias,F.F. and Bhat,J.V. : Microbial ecology of activated sludge, Ⅰ.Dominant bacteria, *Appl.Microbiol.*,12,412-417(1964)
13) Pipes,W.O. : The ecological approach to the study of activated sludge, *Advances in Appl.Microbiol.*,8,61-103(1969)
14) Ueda,S. and Earle,R.L. : Microflora of activated sludge, *J.Gen.Appl.Microbiol.*,18,239-248(1972)
15) van Gils,H.W. : Bacteriology of activated sludge, T.N.O. report No.32: Research Institute for Public Health Engineering(1964)
16) Pike,E.B., Carrington,E.G. and Ashburner,P.A. : An evaluation of procedures for enumerating bacteria in activated sludge, *J.Appl.Bacteriol.*,35,309-321(1972)
17) 日本下水道協会編：下水試験方法 1984年版(1984)
18) 橋本　奨，藤田　正憲，池　道彦：活性汚泥細菌の計数法に関する研究，下水道協会誌,26(298),45-48(1989)

19) 駒形　和男：細菌の分類と同定 (1)好気性細菌, *In* 微生物の分類と同定(長谷川武治編),203-245,学会出版センター(1975)
20) Cowan,S.T. and Steel,K.J. : Manual for the identification of medical bacteria, 2nd edition, Cambridge Univ. Press(1973)
21) Holt,J.G.(Ed.) : Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams & Wilkins Co.,Baltimore-London(1984)
22) Mckinney,R.E. : Microbiology for sanitary engineering,139,McGraw-Hill Book Co. Inc.,New York(1962)

第1編第2章

1) 松原　謙一：プラスミド，講談社(1976)
2) Chakrabarty,A.M. : Plasmids in *Pseudomonas*, *Ann.Rev.Genet.*,10,7-30(1976)
3) Nakahara,H., Yonekura,I. and Sato,A. : Mercury resistance and R plasmids in *E. coli* isolated from aquatic environment, *Yamanashi Med.J.*,2,103-109 (1987)
4) Silver,S. : Plasmid-determined metal resistance mechanisms: Range and overview, *Plasmid*,27,1-3(1992)
5) Stotzky,G. and Babich,H. : Survival and genetic transfer by genetically engineered bacteria in natural environment, *Advances in Appl.Microbiol.*, 31,93-137(1992)
6) Gealt,M.A., Chai,M.D., Alpert,K.B. and Boyer,J.C. : Transfer of plasmids pBR322 and pBR325 in wastewater from laboratory strains of *Escherichia coli* to bacteria indigenous to the waste disposal system, *Appl.Environ. Microbiol.*,49,836-841(1985)
7) McPherson,P. and Gealt,M.A. : Isolation of indigenous wastewater bacterial strains capable of mobilizing plasmid pBR325, *Appl.Environ.Microbiol.*,51, 904-909(1986)
8) Mancini,P., Fertels,S., Nave,D. and Gealt,M.A. : Mobilization of plasmid pHSV106 from *Escherichia coli* HB101 in a laboratory-scale waste treatment facility, *Appl.Environ.Microbiol.*,53,665-671(1987)
9) Kado,C.I. and Liu,S.T. : Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids, *J.Bacteriol.*,145,1365-1373(1981)
10) Fujita,M., Ike,M. and Suzuki,H. : Screening of plasmid from wastewater bacteria, *Wat.Res.*(submitted)
11) Meyers,J.A., Sanchez,D., Elwell,L.P. and Falkow,S. : Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid, *J.Bacteriol.*,127,1529-1537(1976)
12) 横浜市下水道局：水質試験年報 昭和60年度(1985)
13) 外村　健三，川崎　東彦：分解系プラスミドの遺伝子再編成，微生物,1,15-22 (1985)
14) Mach,P.A. and Grimes,D.J. : R-plasmid transfer in a wastewater treatment plant, *Appl.Environ.Microbiol.*,44,1395-1403(1982)

第2編第1章

1) Chakrabarty, A.M. : Genetic fusion of incompatible plasmids in *Pseudomonas*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 1641-1644(1973)

2) Kellog, S.T., Chatterjee, D.K. and Chakrabarty, A.M. : Plasmid-assisted molecular breeding: New technique for enhanced biodegradation of persistent toxic chemmicals, *Science*, 214, 1133-1135(1981)

3) Haugland, R.A., Schlemm, D.J., LyonsⅢ, R.P., Sferra, P.R. and Chakrabarty, A.M. : Degradation of the chlorinated phenoxyacetate herbicides 2,4-dichloro-phenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by pure and mixed bacterial cultures, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1357-1362(1990)

4) Krockel, L. and Focht, D.D. : Construction of chlorobenzen-utilizing recombinants by progentive manifestion of a rare event, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2470-2475(1987)

5) Reineke, W. and Knackmuss, H-J. : Hybrid pathway for chlorobenzoate metabolism in *Pseudomonas* sp. B13 derivatives, *J. Bacteriol.*, 142, 467-473 (1980)

6) Chapman, P.J. : Constructing microbial strains for degradation of halogenated aromatic hydrocarbons, *In* Environmental biotechnology: Reducing risks from environmental chemicals(Ed. Omenn, G.S.), 81-95, Plenum Press, New York(1988)

7) Hardman, D.J. : Microbial control of environmental pollution : The use of genetic techniques to engineer organisms with novel catalytic capabilities, *In* Environmental Biotechnology(Eds. Forster, C.F. and Wase, D.A.J.), 295-317, Ellis Horwood Ltd., Chichester(1987)

8) Timmis, K.N., Rojo, F. and Ramos, J.L. : Prospects of laboratory engineering of bacteria to degrade pollutants, *In* Environmental biotechnology: Reducing risks from environmental chemicals(Ed. Omenn, G.S.), 61-79, Plenum Press, New York(1988)

9) Dunn, N.W. and Gunsalus, I.C. : Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*, *J. Bacteriol.*, 114, 974-979(1973)

10) Applyard, R.K. : Segregation of new lysogenic types during growth of a double lysogenic strain derivative from *Escherichia coli* K12, *Genetics*, 39, 440-446(1954)

11) Bolivar, F. : Construction and characterization of new cloning vectors, Ⅲ. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique *Eco*RI sites for selection of *Eco*RI generated recombinant DNA molecules, *Gene*, 4, 121-136(1978)

12) 第1編第1章 4) の文献

13) Datta, N., Hedge, R.W., Shaw, E.J., Sykes, R.B. and Richmond, M.H. : Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.*, 108, 1244-1249 (1971)

14) Fujita, M., Hashimoto, S., Takeo, M. and Hagino, K. : Plasmid-coded degradation of salicylate using the catechol cleavage pathway of the host, *J. Ferment. Bioengg.*, 67, 286-290(1989)

15) Birnboim, H.C. and Doly, J. : A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.*, 7, 1513-1523(1979)

16) Dazin, A. and Chakrabarty, A. M. : Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from mucoid cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.*, 159, 9-18(19849
17) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Shambrook, J. (Eds.) : Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982)
18) Morison, D. A. : Transformation and preservation of competent bacterial cells by freezing, *Methods in Enzymol.*, 68, 326-331(1979)
19) Bradly, D. E., Taylor, D. E. and Choen, D. R. : Specification of surface mating system among conjugative drug resistant plasmids in *Escherichia coli* k-12, *J. Bacteriol.*, 143, 1466-1470(1980)
20) Yang, R. D. and Humphrey, A. E. : Dynamic and steady state studies of phenol degradation in pure and mixed culture, *Biotechnol. Bioengg.*, 17, 1211-1235 (1975)
21) Shell, M. A. : Cloning and expression in *Escherichia coli* of the naphthalene degradation genes from plasmid NAH7, *J. Bacteriol.*, 153, 822-829(1983)
22) Nakazawa, T. and Yokota, T. : Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2, demonstration of two benzoate pathway, *J. Bacteriol.*, 153, 822-829(1983)
23) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farra, L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275(1951)
24) Lehrbach, P. R., Zeyer, J., Reineke, W., Knackmuss, H-J. and Timmis, K. N. : Enzyme recruitment in *vitro*: Use of cloned gene to extend the range of haloaromatics degraded by *Pseudomonas* sp. strain B13., *J. Bacteriol.*, 58, 1025-1032(1984)

第２編第２章

1) Evans, W. C. : Oxidation of phenol and benzoic acid by some soil bacteria, *Biochem. J.*, 41, 373-382(1947)
2) 伊藤　昌雄，藤川　昇：酵母によるフェノールの分解，発酵工学会誌，57, 421-428 (1979)
3) 根井　仁三朗，田中　義博，高田　信男：フェノール廃液からの酵母によるカテコールの生産，発酵工学会誌，52, 28-34(1974)
4) 橋本　奨，藤田　正憲：活性汚泥より分離した３種のフェノール分解菌の同定とその性質について，下水道協会誌，24(237), 27-33(1987)
5) Messing, J., Crea, R. and Seeburg, P. H. : A system for shot gun DNA sequencing, *Nucleic Acids Res.*, 9, 309-321(1981)
6) 第２編第１章 10) の文献
7) Vieira, J. and Messing, J. : The pUC-plasmid, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers, *Gene*, 19, 259-268(1982)
8) 第１編第１章 4) の文献
9) 第２編第２章 13) の文献

10) Fujita,M., Kamiya,T., Ike,M., Kawagoshi,Y. and Shinohara,N. : Catechol 2,3-oxygenase production by genetically engineered *Escherichia coli* and its application to catechol determination, *World J.Microbiol.Biotechnol.*,7,407-414(1991)
11) Fujita,M, Ike,M. and Hashimoto,S. : Feasibility of wastewater treatment using genetically engineered microorganisms, *Wat.Res.*,25,979-984(1991)
12) Saito,H. and Miura,K. : Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment, *Biochemica et Biophysica Acta*,72,619-629(1963)
13) 第２編第１章 17) の文献
14) Nakai,C., Kagamiyama,H. and Nozaki,M. : Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2, *J.Biol.Chem.*,258,2923-2928(1987)
15) Ghosal,D., You,I.S. and Gonsalus,I. : Nucleotide sequence and expression of gene *nahH* of plasmid NAH7 and homology with gene *xylE* of TOL plasmid pWW0, *Gene*,55,19-28(1987)
16) Bartilson,M. and Shingler,V. : Nucleotide sequence and expression of catechol 2,3-oxygenase-encoding gene of phenol-catabolizing *Pseudomonas* CF600, *Gene*,85,233-238(1989)

第３編第１章

1) Jones,I.M., primrose,S.B., Robinson,A. and Ellwood,D.C. : Maintenance of some ColE1-type plasmids in chemostat culture, *Molec.Gen.Genet.*,180,579-584(1980)
2) Koizumi,J., Monden,Y. and Aiba,S. : Effect of temperature and dilution rate on the copy number of recombinant plasmid in continuous culture of *Bacillus stearothermophilis*(pLP11), *Biotechnol.Bioengg.*,27,721-728(1985)
3) Mizutani,S., Iijima,S. and Kobayashi,T. : Fed-batch culture of *Escherichia coli* harboring a runaway-replication plasmid, *J.Chem.Engg.Jap.*,19,111-116(1986)
4) Mizutani,S., Fukuzono,S., Tukagoshi,N, Udaka,S. and Kobayashi,T. : Stability of a recombinant plasmid containing α-amylase gene in chemostat, *J.Chem.Engg.Jap.*,18,220-224(1985)
5) Shoham,Y. and Demain,A.L. : Effect of medium composition on the maintenance of a recombinant plasmid in *Bacillus subtilis*, *Enzyme Microbiol.Technol.*, 12,330-336(1990)
6) Horn,U., Krug,M. and Sawistowski,J. : Effect of high density cultivation on plasmid copy number in recombinant *Escherichia coli* cells, *Biotechnol.Lett.*, 12,191-196(1990)
7) Bentley,W.E., Mirjalili,N., Anderson,D.C., Davis,R.H. and Kompala,D.S. : Plasmid-encoded protein: The principal factor in "metabolic burden" associated with recombinant bacteria, *Biotechnol.Bioengg.*,35,668-681(1990)
8) Brownlie,L., Stephenson,J.R. and Cole,J.A. : Effect of growth rate on plasmid maintenance by *Escherichia coli* HB101(pAT153), *J.Gen.Microbiol.*, 136,2471-2480(1990)

9) Bernardez, E. R. and Dhurjati, P. S. : Effect of a broad-host range plasmid on growth dynamics of *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*, *Biotechnol. Bioengg.*, 29, 558-565 (1987)
10) Siegel, R. and Ryu, D. D. Y. : Kinetic study of instability of recombinant plasmid pPLc23*trpAI* in *E. coli* using two-stage continuous culture system, *Biotechnol. Bioengg.*, 27, 28-33 (1985)
11) Satyagel, V. S. and Agrawal, P. : Modeling the behavior of plasmid-harboring cells in nonselsctive media, *Biotechnol. Bioengg.*, 34, 265-272 (1989)
12) San, K. and Weber, A. E. : Data analysis of plasmid maintenance in CSTR, *Biotechnol. Bioengg.*, 35, 451-459 (1989)
13) Weber, A. E. and San, K. : Population dynamics of a recombinant culture in a chemostat under prolonged cultivation, *Biotechnol. Bioengg.*, 36, 727-736 (1990)
14) Kim, B. G. and Shuler, M. L. : A structured, segregated model for genetically modified cells and its use for prediction of plasmid stability, *Biotechnol. Bioengg.*, 36, 581-592 (1990)
15) Bentley, W. E. and Kompala, D. S. : Stability in continuous cultures of recombinant bacteria: A metabolic approach, *Biotechnol. Lett.*, 12, 329-334 (1990)
16) Nordstrom, K. and Agaard-Hansen, H. : Maintenance of bacterial plasmids: Comparison of theoretical calculations and experiments with plasmid R1 in *Escherichia coli*, *Molec. Gen. Genet.*, 197, 1-7 (1984)
17) Grinter, N., Brewster, G. and Barth, P. T. : Two mechanisms necessary for the stable inheritance of plasmid RP4, *Plasmid*, 22, 203-214 (1989)
18) Roberts, R. C., Burioni, R. and Helinski, D. R. : Genetic characterization of the stabilizing functions of a region of broad-host-range plasmid RK2, *J. Bacteriol.*, 172, 6204-6216 (1990)
19) Gerlitz, M., Hrabak, O. and Schwab, H. : Partitioning of broad-host-range plasmid RP4 is a complex system involving site-specific recombination, *J. Bacteriol.*, 172, 6194-6203 (1990)
20) Ruiz-Echevarria, M. J. R, Torrontegui, G., Gimenez-Gallego, G. and Diaz-Orejas, R. : Structure and functional comparison between the stability systems ParD of plasmid R1 and Ccd of plasmid F, *Molec. Gen. Genet.*, 225, 355-362 (1991)
21) Satyagel, V. S. and Agrawal, P. : On the effectiveness of selsction pressure through use of a complementary product, *Biotechnol. Bioengg.*, 34, 273-277 (1989)
22) 第１編第１章 ４）の文献
23) Imanaka, T. and Aiba, S. : A perspective on the application of genetic engineering: Stability of recombinant plasmid, *Ann. Rev. N. Y. Acad. Sci.*, 361, 1-14 (1981)

第３編第２章

1) Amy, P. S. and Hiatt, H. D. : Survival and detection of bacteria in an aquatic environment, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 788-793 (1989)

2) Ramos, J.L. Duque, E. and Ramos-Ganzalez, M. : Survival in soils of an herbicide-resistant *Pseudomonas putida* strain bearing a recombinant TOL plasmid, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 260-266(1991)
3) Short, K.A., Doyle, J.D., King, R.J., Seidler, R.J, Stotzky, G. and Olsen, R.H. : Effects of 2,4-dichlorophenol, a metabolite of genetically engineered bacterium, and 2,4-dichlorophenoxyacetate on some microorganism-mediated ecological processes in soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 412-418(1991)
4) Jones, R.A., Broder, M.W. and Stotzky, G. : Effects of genetically engineered microorganisms on nitrogen transformations and nitrogen-transforming microbial population in soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3212-3219(1991)
5) Scanfelato, V.S., Orvos, D.R., Cairns Jr. J. and Lacy, G.H. : Genetically engineered *Ervinia carotovora* in aquatic microcosms: Survival and effects on functional groups in indigenous bacteria, *Appl. Environ. Micobiol.*, 55, 1477-1482(1989)
6) Awong, J., Bitton, G. and Chaudhry, G.R. : Microcosm for assessing survival of genetically engineered microorganisms in aquatic environments, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 977-983(1990)
7) Wagner-Dobler, I., Pipke, R., Timmis, K.N. and Dwyer, D.F. : Evaluation of aquatic sediment microcosms and their use in assessing possible effects of introduced microorganisms on ecosystem parameters, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1249-1258(1992)
8) Bentjen, S.A., Frederickson, J.K., van Voris, P. and Li, S.W. : Intact soil microcosm for evaluating the fate and ecological impact of the release of genetically engineered microorganism, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 198-202 (1989)
9) McClure, N.C., Weightman, A.J. and Frey, J.C. : Survival of *Pseudomonas putida* UWC1 containing cloned catabolic genes in a model activated-sludge unit, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2627-2634(1989)
10) McClure, N.C., Frey, J.C. and Weightman, A.J. : Survival and catabolic activity of natural and genetically engineered bacteria in a laboratory-scale activated-sludge unit, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 336-373(1991)

第３編第３章

1) 橋本　奨，古川　憲治，濱　宏：活性汚泥の固定化とその浄化機能に関する研究，下水道協会誌, 22(253), 42-50(1985)
2) 橋本　奨，古川　憲治，濱　宏：活性汚泥の固定化とその浄化機能に関する研究，－ＰＶＡ－冷凍法について－，下水道協会誌, 23(261), 16-22(1986)
3) 橋本　奨，古川　憲治，濱　宏：活性汚泥の固定化とその浄化機能に関する研究，－ＰＶＡ－ホウ酸法について－，下水道協会誌, 23(262), 41-48(1986)
4) 松尾　友矩：膜分離法による排水処理の意義と技術的課題，用水と廃水, 29, 921-928(1987)
5) 砂原　広志：生物処理における平膜限外ろ過の活用，用水と廃水, 29, 929-939 (1987)
6) 田中　康男：膜分離法を組み込んだ都市下水処理，用水と廃水, 29, 940-945(1987)
7) 緒論　2）の文献

8) 緒論 3）の文献
9) Cardinal, L.J. and Stenstrom, M.K. : Enhanced biodegradation of polyaromatic hydrocarbons in the activated sludge process, *Res. J. Wat. Pollut. Cont. Fed.*, 63, 950-957 (1991)
10) Nasri, M., Sayadi, S., Barbotin, J-N., Dhulster, P. and Thomas, D. : Influence of immobilization on the stability of pTG201 recombinant plasmid in some strains of *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 740-744 (1987)
11) Taxis, P.P., Dhulster, P., Barbotin, J-N. and Thomas, D. : Plasmid instability and biomass production: Comparison between free and immobilized cell cultures of *Escherichia coli* BZ18 (pTG201) without selection pressure, *J. Bacteriol.*, 165, 871-877 (1986)
12) Huang, J., Dhulster, P., Thomas, D. and Barbotin, J-N. : Agitation rate effects on plasmid stability in immobilized and free-cell continuous cultures of recombinant *E. coli*, *Enzyme Microbiol. Technol.*, 12, 933-939 (1990)
13) 橋本　奨：固定化活性汚泥法，*In* バイオテクノロジー活用の高機能型活性汚泥法，101-143, 技報堂 (1989)
14) 橋本　奨，藤田　正憲：固定化細菌による芳香族化合物含有排水の処理に関する研究，衛生工学研究論文集, 25, 179-186 (1989)
15) 三村　精男：純粋菌培養法による産業廃液処理技術の開発，発酵と工業, 34, 352-361 (1976)

謝　辞

本研究の遂行と、本論文の作成にあたり、直接御指導を賜った恩師大阪大学教授藤田正憲博士に深く感謝の意を表します。

また、本論文の査読・御校閲を賜り、その完成に多くの貴重な御助言をいただいた大阪大学教授吉田敏臣博士、同教授高野光男博士に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究の構想、着手の段階で懇切なる御指導を賜った恩師大阪大学名誉教授橋本奨博士に心から感謝の意を表します。

さらに、本研究について有益な御助言と御援助をいただいた大阪大学助教授古川憲治博士、同助手岩堀恵祐博士、ならびに宮崎ゆり子技官に深謝いたします。

なお、大阪大学工学部環境工学科第５講座の諸兄に、直接間接の御協力をいただきましたことを感謝いたします。特に、第１編第１章では阿武秀治、中村文治両氏、第１編第２章では鈴木ひとみ氏、第２編第１章では武尾正弘、萩野貴世子両氏、第２編第２章では神谷俊行、篠原直規　両氏、第３編第１章では山下孝氏、第３編第２章では上杉和也氏に、それぞれ共同研究者として本研究に貢献していただいた。

最後に、本論文を丹念に校正し、図表の作成を手伝ってくれた妻晶子に感謝します。

本論文に関連のあるおもな報告

○ 雑誌掲載論文

1) 橋本　奨、藤田　正憲、池　道彦
ＳＲＴ制御に伴う活性汚泥細菌の構成変化
衛生工学研究論文集, Vol.23, pp.251-258 (1987)

2) 橋本　奨、藤田　正憲、池　道彦
活性汚泥細菌の計数法に関する研究
下水道協会誌, Vol.26, No.298, pp.45-48 (1989)

3) 藤田　正憲、池　道彦、岡田　博、森　一博
排水処理系におけるフェノール分解菌検出に用いるＤＮＡプローブの特異性
日本水処理生物学会誌, Vol.27, pp.59-65 (1991)

4) Fujita,M., Kamiya,T., Ike,M., Kawagoshi,Y. and Shinohara,N.
Catechol 2,3-oxygenase production by genetically engineered *Escherichia coli* and its application to catechol determination
World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol.7, pp.407-414 (1991)

5) Fujita,M., Ike,M. and Hashimoto,S.
Feasibility of wastewater treatment using genetically engineered micro-organisms
Water Research, Vol.25, pp.979-984 (1991)

6) Fujita,M., Ike,M. and Kamiya,T.
Accelerated phenol removal by amplifying the gene expression with a recombinant plasmid encoding catechol 2,3-oxygenase
Water Research, Vol.27, pp.9-13 (1993)

7) Fujita,M., Ike,M. and Suzuki,H.
Screening of plasmids from wastewater
Water Research (in press)

○ 国際会議等発表

1) Fujita,M., Ike,M. and Hashimoto,S.
Feasibility of wastewater treatment using genetically engineered micro-organisms
Water Pollution Research and Control, Kyoto, July 29-August 3, 1991

2) Fujita,M., Ike,M. and Kamiya,T.
Accelerated phenol removal by amplifying the metabolic pathway with a re-combinant plasmid encoding catechol 2,3-oxygenase
Water Quality International '92, Washington D.C., May 24-30, 1992

3) Fujita,M. and Ike,M.
Detection of specific microorganisms
International Workshop on Environmental Biomonitoring, Ohtsu, November 11, 1991