

II-396

活性汚泥処理装置内における遺伝子組換え体の残存に関する研究

大阪大学工学部 （正員）池 道彦
 （正員）藤田 正憲
 上杉 和也

1. はじめに

活性汚泥法による下廃水処理の高度化・効率化を図る上で、有用な機能をもつ遺伝子組換え体（GEM）を育種し活用することは、極めて魅力的な手段である。この場合、処理系に導入したGEMがその個体数を維持し、生態学的に安定な地位を占めることが重要であるが、活性汚泥処理系におけるGEMの挙動についてはほとんど知られていないのが現状であり、その検討が急務となっている。ここでは、ベンチスケールの活性汚泥処理装置内におけるGEMの残存について調べた。

2. 実験材料並びに方法

○ 遺伝子組換え体： GEMには *Escherichia coli* C600 (pBH500) 株および *Pseudomonas putida* BH (pBH500) 株の2種を使用した。大腸菌C600株およびフェノール分解菌BH株に導入された組換えプラスミドpBH500は、広宿主域ベクターpKT230にBH株由来のカテコール分解遺伝子*pheB*を挿入して作成したものであり、ストレプトマイシン (Sm) 耐性をコードしている。

○ 活性汚泥処理装置： 装置の模式図を図-1に示した。装置は5Lの有効容量をもつ曝気槽と有効容量1Lの沈澱槽から成り、沈澱槽の下部からローラーポンプを用いて4.3L/dayの流量で汚泥を返送した。流入水には肉エキス、ペプトンおよび尿素を主成分とする合成下水 (TOC=300mg/L) を用い 5L/dayの流量で連続的に供給した。また、曝気量は0.4vvm、汚泥引き抜き量（曝気槽より）は0.25L/day、曝気槽温度は25℃

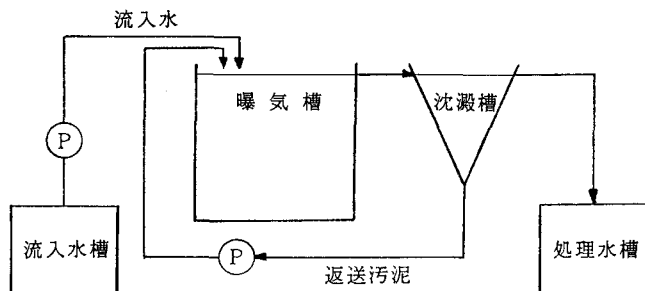


図-1 活性汚泥処理装置

に設定した。なお、各実験を通じて曝気槽内MLSS濃度は1500~2000mg/Lに保たれていた。

○ GEMの残存試験： L培地 (Peptone 10g, Yeast extract 5g, NaCl 1g/L) で培養したGEMを適量集菌し、活性汚泥処理装置の曝気槽内に投入し、約24hr流入水をとめて汚泥とGEMをよく混和した後、処理装置を運転した。運転開始後、適宜引き抜き汚泥をCGY培地 (Casitone 5g, Glycerol 5g, Yeast extract 1g, Agar 15g/L) および各GEMの選択培地にプレーティングし、その計数から全活性汚泥細菌数およびGEM数の変化を調べた。ここで C600 (pBH500) の検出には100mg/LのSmを含むデスオキシコーレイト培地を、BH (pBH500) の検出には50mg/LのSmを含む安息香酸培地 (500mg/L安息香酸ナトリウムを単一炭素源とした無機塩培地) を、それぞれ選択培地として用いた。

3. 実験成績並びに考察

(1) C600 (pBH500) の残存

約 5×10^6 cfu/mLの濃度で添加したC600 (pBH500) 株の処理装置内での残存の様子を図-2に示した。

C600(pBH500)は処理装置の運転開始後から急激に減少し、その個体群は10日目は 10^4 cfu/mLのレベルにまで低下したが、その後は明らかな減少は認められなくなり $10^3 \sim 10^4$ cfu/mLの間で安定化した。このことから、GEMは活性汚泥処理系内で減少はするものの完全には淘汰されず、ある一定の個体群を保ち安定に残存することができるものといえる。従って、処理能力の高いGEMや安定する個体群レベルの高いGEMを活用すれば、活性汚泥処理の効率化が可能であると考えられる。

(2) BH(pBH500)の残存

(1) 同様の試験をBH(pBH500)株を用いて行った結果を図-3に示した。C600(pBH500)株同様BH(pBH500)でも個体群の初期の急激な減少（約10日目まで）とその後の安定維持が観察された。しかし、安定化したレベルは約 10^3 cfu/mLであり、C600(pBH500)に比べやや低くなった。即ち、同じプラスミドをもつGEMの安定性が宿主菌株によって異なることが示されたが、本来活性汚泥中の優占菌種である *Pseudomonas* 宿主の方が安定性が低かったことは興味深い。

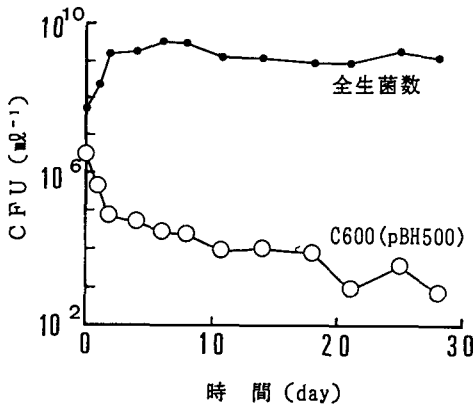


図-2 C600(pBH500)の残存

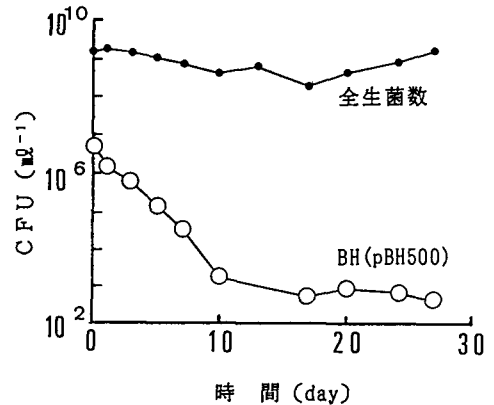


図-3 BH(pBH500)の残存

(3) BH(pBH500)の継続添加実験

別途行った回分培養試験からGEMの残存はその添加量に依存することが示されたため、処理装置の運転開始後BH(pBH500)の添加を繰り返し、残存に及ぼす影響を調べた（図-4）。しかし、図示したように継続的添加の効果は認められずBH(pBH500)の安定性を高めることはできなかった。図には処理水中のGEM数の変化についても示しているが、添加直後でもその数に大きな変化はなかったことから、GEMは添加後速やかにフロックに取り込まれ、その内部で生態学的な選択を受けると考えられる。今後は、活性汚泥処理装置内でGEM個体群を高レベルに保つ方策の検討が望まれる。

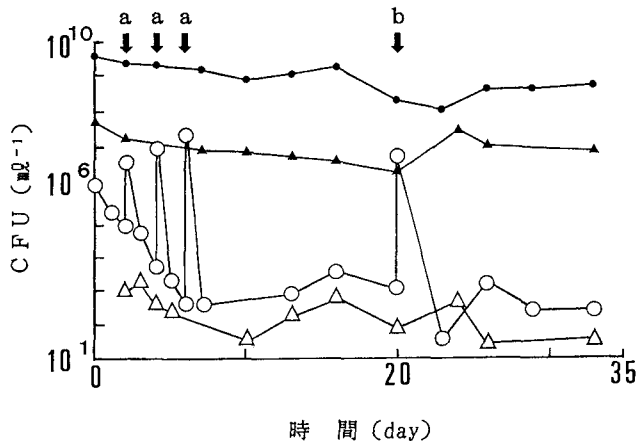


図-4 BH(pBH500)の継続的添加の効果

- : 全生菌数（曝気槽内） ○: BH(pBH500)（曝気槽内）
- ▲: 全生菌数（処理水中） △: BH(pBH500)（処理水中）
- BH(pBH500)添加（a: 1hr流入水停止 b: 24hr流入水停止）