

II-397 下水処理系における細菌プラスミドの分布

大阪大学工学部 （正員）藤田 正憲

（正員）池 道彦

鈴木ひとみ

1. はじめに

毒物、重金属などの有害物質や芳香族化合物、合成高分子化合物などの難分解性物質の自然環境や下
 廃水処理系への流入が問題化している。これら化学物質の汚染をうけた生態系では、耐性菌や分解菌が
 出現し微生物生態系の適応（あるいは進化）が起こるが、この場合、染色体外レプリコンであるプラス
 ミドが各種関連遺伝子の消長・伝播や組換えに大きな役割を果たしているものと考えられている。従っ
 て、微生物生態系による汚染化学物質の潜在的浄化能力を評価し、またその機構を解明するためには、
 生態系におけるプラスミドの分布および動態を知ることが重要である。ここでは、概して自己伝達能と
 リンクしている抗生物質耐性プラスミドに着目し、下水、活性汚泥、および2次処理水中の耐性菌を中
 心に優占細菌からプラスミドを検索した結果を基に、下水処理系におけるプラスミド・プロファイルを
 明らかにした。

2. 実験材料並びに方法

○ 供試試料： 大阪府下のM下水処理場の流入下水、活性汚泥（曝気槽混合液）および2次処理水
 （沈澱池越流水）から細菌を分離し、プラスミド検索を行った。

○ 培地： CGY培地(Casitone 5g, Glycerol 5g, Yeast extract 1g, Agar 15g/L)に各試料を平板
 培養(30℃)して出現したコロニーを外觀から分類し、優占種とおもわれるものを約10株ずつ採取した。
 また、アンピシリン(Ap, 100mg/L)、テトラサイクリン(Tc, 25mg/L)、カナマイシン(Km, 80mg/L)、ストレ
 プトマイシン(Sm, 50mg/L)の各種抗生物質を単一で、あるいは複数含むCGY培地、さらに大腸菌群用の
 デスオキシコーレイト培地からも同様に主要な細菌株を分離し、これらの株をプラスミド検索に供した。
 プラスミド抽出のための菌株の培養には、L培地(Peptone 5g, Yeast extract 5g, NaCl 1g/L)を用いた。

○ プラスミド検索： 分離株からのプラスミドの抽出は KadoとLiuの方法(1)に一部修正を加えて行っ
 た。ここで調製された粗プラスミド溶液は 0.7%アガロースゲルを使用した電気泳動に供し、エチジウム
 ブロマイド溶液による染色後、紫外線照射によりDNAバンドを観察してプラスミドの有無を調べた。

3. 実験成績並びに考察

(1) 抗生物質耐性菌の分布

各種抗生物質含有培地で得られた
 生菌数から、M下水処理場における
 抗生物質耐性菌の分布（CGY培地
 で得られた全好気性細菌数に対する
 比率）を求め、表-1に示した。流
 入下水中では1つの抗生物質に耐性
 を示す細菌が比較的高い比率（Tc以
 外では約5～8%）で存在していた。
 また、代表的な薬剤耐性プラスミド

表-1 M下水処理場における各種抗生物質耐性菌の分布

培 地	流入下水	活性汚泥（曝気槽）	2次処理水
CGY	5.3×10^4 (100)	1.0×10^6 (100)	1.3×10^5 (100)
デスオキシコーレイト	3.2×10^5 (6.04)	9.8×10^4 (0.10)	3.0×10^3 (2.31)
CGY + Ap	2.4×10^4 (4.53)	1.3×10^5 (0.13)	3.8×10^3 (2.92)
CGY + Tc	6.4×10^4 (0.12)	1.2×10^4 (0.01)	1.8×10^2 (0.14)
CGY + Km	4.3×10^4 (8.11)	2.2×10^4 (0.22)	6.0×10^3 (4.62)
CGY + Sm	2.5×10^4 (4.72)	1.4×10^4 (1.40)	5.2×10^3 (4.00)
CGY + Ap, Tc, Km	7.8×10^2 (0.02)	3.2×10^3 (0.003)	7.7×10^1 (0.06)

* 数字は生菌数(CFU/mL)

() 内はCGY培地での値(全生菌数)に対する比率を%表示したもの

RP4と同様にAp, Tc, Kmの3重耐性を示す細菌も僅かながら存在していた。活性汚泥中の耐性菌数は、流入下水と大きな差は認められなかったが、全好気性細菌数が活性汚泥で下水の約20倍と高くなるため、存在比率は低下する傾向となった。一方、2次処理水中では耐性菌数は流入下水の10～100分の1に減少するが、存在比率としてはほぼ同等であった。

(2) プラスミドの分布

表-2 M下水処理場におけるプラスミド検索結果

CGY培地、デスオキシコーレイト培地、および各種抗生物質含有培地上に出現したそれぞれ約10の代表的コロニーからプラスミドを検索した結果を表-2に示し、図-1に図示した。検索されたプラスミド保持株は流入下水において70株中24株、活性汚泥において71株中9株、処理水において71株中20株であ

分離培地	流入下水		活性汚泥（曝気槽）		2次処理水	
	検索株数	プラスミド保持株数	検索株数	プラスミド保持株数	検索株数	プラスミド保持株数
CGY	10	4 (24)	11	1 (2)	10	4 (11)
デスオキシコーレイト	10	4 (11)	10	3 (10)	11	6 (22)
CGY + Ap	10	2 (6)	10	1 (1)	10	2 (5)
CGY + Tc	10	4 (13)	10	0	10	2 (4)
CGY + Km	10	3 (8)	10	3 (7)	10	2 (2)
CGY + Sm	10	3 (8)	10	1 (1)	10	2 (2)
CGY + Ap, Tc, Km	10	4 (8)	10	0	10	2 (5)
合計	70	24 (78)	71	9 (21)	71	20 (51)

が、抗生物質耐性の有無とプラスミド保持の間に明確な相関は認められず、必ずしも薬剤耐性プラスミドでないものと考えられた。プラスミドは流入下水中ではかなり高い確率で存在するが、曝気槽内においてはその比率が低下し、処理水中では再び増加する傾向が認められた。このことから、高密度で細菌が保持される最終沈澱池においてプラスミドの伝達が起こっており、沈澱池が下水処理系における遺伝子移動の場となっていることが示唆された。なお、ここで検索されたプラスミド保持株の約4分の3は、複数個（最大11個）のプラスミドを保持していた。

(3) プラスミドの性状

検索された150のプラスミドをそのサイズから分類した結果を図-2に示した。図示した通り、大部分は10kb以下の小さいプラスミドであったが、一方では100kb以上の巨大プラスミドも比較的多数認められた。巨大プラスミドは概して自己伝達能を示し、また、小さいサイズのプラスミドは自然界でみられる遺伝子組換えの際に現れることが知られていることから、下水処理場においてもこれらのプラスミドが介在した遺伝子の再編成が起こっているものとも考えられる。このことは、遺伝子組換え体が下水処理系に流入した場合、あるいは適用された場合に、外来遺伝子が処理系内で複雑な挙動を示すことを示唆しており、このような観点からも今後さらに進んだ研究が望まれる。

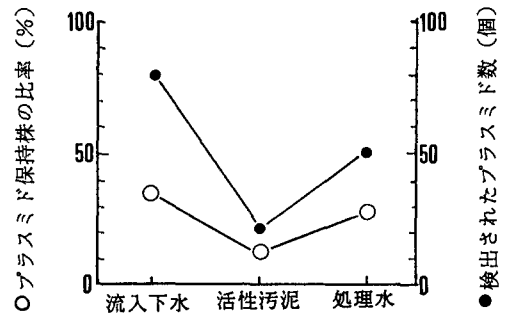


図-1 M下水処理場におけるプラスミドの分布

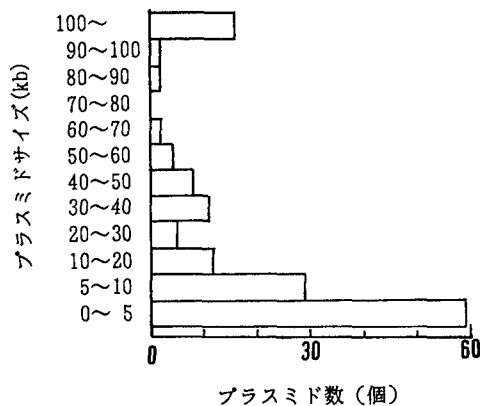


図-2 検出されたプラスミドのサイズの分布

《参考文献》 (1) Kado, C. I. and Liu, S. T. (1981) J. Bacteriol., 145, 1365-1373