硫黄酸化還元に関与する機能遺伝子を標的とした嫌気的硫黄酸化反応に関与する微生物の解析

長岡技科大院・工　○小林直央, 幡本将史, 牧慎也, 渡利高大, 惣中英章, 山口隆司
阿南高専　川上周司　　長岡高専　荒木信夫, 押木守

1.　はじめに

低濃度有機性排水を処理する Up-flow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) リアクターにおいて, リアクター下部で硫酸塩の還元により発生した硫化物がリアクター上部で再び硫酸塩へ酸化される嫌気的硫黄酸化反応が確認された [1]. 本反応は, 酸素, 硝酸, 亜硝酸などの電子受容体や光が存在しない環境下で起こる新規な反応であると考えられる. 既往の研究から, 嫌気的硫黄酸化反応は, 流入水の温度が 17℃以下, ORP が-200 ~ -300 mV, pH が中性付近 (6.9 ~ 7.3) の条件下において反応が進行することが報告されている [1].

異化的硫酸還元を触媒する酵素として, Sulfate adenylyltransferase (Sat), adenosine phosphosulfate (APS) reductase (Apr), dissimilatory sulfite reductase (Dsr) が挙げられる. これらは異化的硫酸還元を次のように触媒する. まず, Sat により硫酸塩が APS に活性化される. その後, Apr が APS を AMP と亜硫酸塩に変換し, 最終的に Dsr が硫化物まで還元する. いくつかの無酸素光栄養性および通性嫌気性硫黄酸化細菌に Sat, Apr および Dsr の相同タンパク質が存在していることから, 硫化物を硫酸塩に酸化することが示唆されている. また, Apr はすべての硫酸塩呼吸原核生物に存在する硫酸塩呼吸における重要な酵素である. そのため, 本研究ではラボスケール UASB リアクターを運転し, 本反応の再現および 16S rRNA 遺伝子と硫黄の酸化還元に関与する機能遺伝子の解析を行った.

2.　方法

2.1 運転条件, サンプリング, 水質分析

本研究では, 容積 13.7 L, 高さ 1.7 m の遮光性 UASB リアクターを用いた (図-1). HRT は 8 h とし, 室温を 17℃に設定し運転した. 基質として 1.5 mM の硫酸ナトリウムを添加した糖蜜模擬廃水を供給し, 嫌気的硫黄酸化反応の進行をプロファイリングした.

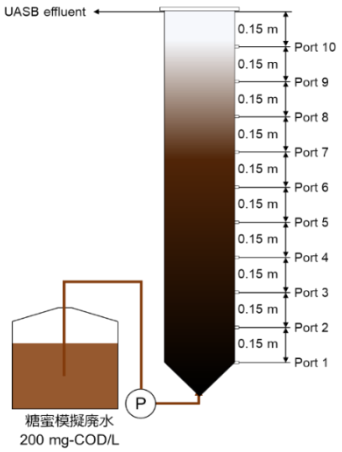

図-1 ラボスケール UASB リアクター概略図

水温および ORP はそれぞれポータブル pH, ORP メーターを用いて測定を行った. 硫酸塩濃度の測定は HPLC を用いて行った. 硫化物の測定は下水試験方法に従い, 測定を行った.

2.2 DNA 抽出, PCR (16S rRNA 遺伝子, *aprA* 遺伝子)

解析に用いた汚泥サンプルは UASB リアクターの Port 1, 3, 5, 7 から採取した. DNA の抽出は FastDNA SPIN Kit for Soil (MP-Biomedicals)を用いて行った. 16S rRNA 遺伝子の PCR には Univ 515F および Univ 806R プライマーセットを用いた. 反応条件は 94℃ 3 min, [95℃ 45 sec, 50℃ 60 sec, 72℃ 90 sec]× 20 cycle, 72℃ 10 min で行った. *aprA* 遺伝子の PCR には AprA-1-FW, Apr-5-RV を用いた [2]. 反応条件は 94℃ 2 min, [94℃ 60 sec, 60℃ 60 sec, 72℃ 60 sec]× 40 cycle, 72℃ 7 min で行った. PCR 産物を終濃度 2 nM まで希釈後, MiSeq シーケンサー (Illumina) を用いて解析した.

3.　結果および考察

3.1 水質プロファイル

図-2 にプロファイル結果を示す. UASB における pH, 水温および ORP の平均値はそれぞれ 7.24±0.25, 16.0±0.5℃および-312±129 mV であった. リアクター下部において硫酸塩濃度が減少し, 硫化物濃度が増加した. 一方で, Port 5 地点から Port 7 地点において

キーワード　UASB リアクター, 嫌気的硫黄酸化, *aprA* 遺伝子
連絡先　〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学 水圏土壌環境研究室 Tel 0258-47-1611-6646

© Japan Society of Civil Engineers

硫化物濃度が減少し，硫酸塩濃度が増加した．この結果から，Port 5 から嫌気的硫黄酸化反応が進行していることを確認した．

3.2 遺伝子解析結果

図-3 に 16S rRNA 遺伝子に基づく UASB リアクター高さ方向における門レベルでの微生物群集構造解析結果を示す．UASB リアクター全体において有機物の発酵に関与する微生物の存在割合が大部分を占めていることが確認された．また，Port 7 において細菌叢の系統学的多様性の指標である PD whole tree，種数の推定量である Chao1 および ACE の値が他の Port と比較して高くなっていることから，微生物叢が大きく変化していることが明らかとなった (表-1)．しかしながら，硫黄酸化反応が進行していた Port 5 および Port 7 において硫黄酸化に関わる微生物の特異的な優占種は確認されなかった．そのため，硫黄酸化に関わる細菌に焦点を当てるため，*aprA* 遺伝子の解析を行った．図-4 に *aprA* 遺伝子に基づくリアクターの高さ方向における微生物群集構造解析結果を示す．リアクター高さが上昇するにつれて OTU 1454 の存在割合が減少し，OTU 661 の存在割合が増加していることが確認された．OTU 661 は Blast 検索の結果，硫酸還元菌である *Desulfobulbus* 属に近縁であることが明らかとなった．この結果から，*Desulfobulbus* 属細菌が本反応に関与している可能性が示唆された．

16S rRAN 遺伝子の解析だけでは，硫黄代謝に関わる機能を有している微生物の多様性の解析は困難であった．しかし，*aprA* 遺伝子の解析により硫黄代謝に関わる機能遺伝子に焦点を当てることで，嫌気的硫黄酸化反応進行時に存在割合が増加した微生物種を特定できたと考える．今後は DNA に基づく遺伝子解析だけなく mRNA に注目した遺伝子発現解析やタンパク質発現解析を行い，本反応に関連する微生物の特定を目指す．

4. まとめ

嫌気的硫黄酸化反応進行時の UASB リアクターの高さ方向で *aprA* 遺伝子を解析した結果，硫酸還元菌である *Desulfobulbus* 属に近縁である OTU 661 が検出され，本反応に関与している可能性が示唆された．

参考文献

1) Aida, A. A. *et al.* (2014). *J. Biosci. Bioeng.* 118:540-545.
2) Aoki, M. *et al.* (2015). *Microbes. Environ.* 30:276-280.

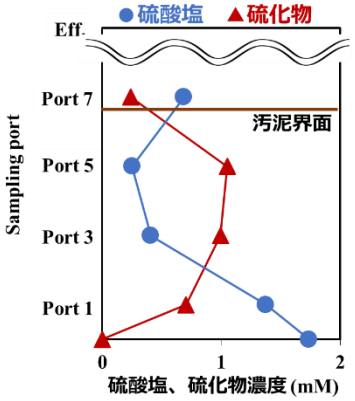

図-2 UASB リアクター高さ方向の水質プロファイル測定結果

表-1 UASB リアクター高さ方向における微生物の多様性

UASB	PD whole tree	chao1	ACE
Port 7	158	4435	4400
Port 5	82	2084	2017
Port 3	85	1468	1485
Port 1	96	1741	1869

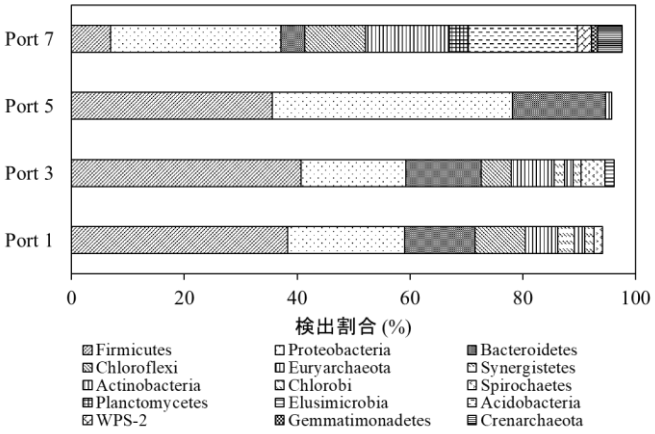

図-3 16S rRNA 遺伝子に基づく UASB リアクター高さ方向における門レベルでの微生物群集構造解析結果

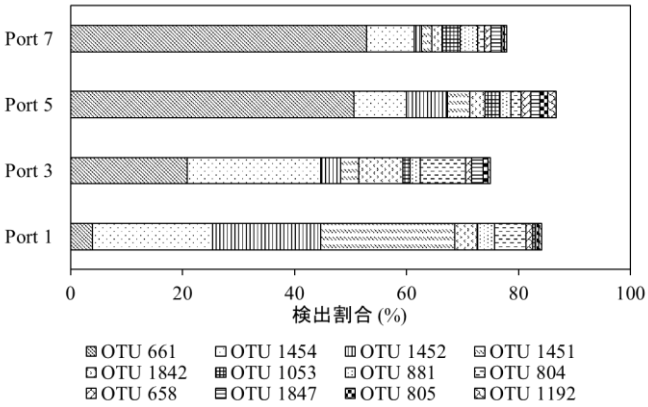

図-4 *aprA* 遺伝子に基づく UASB リアクター高さ方向における微生物群集構造解析結果

© Japan Society of Civil Engineers