

機能遺伝子 *apsA* および *dsrAB* を標的とした下水処理汚泥内の硫酸塩還元細菌群に関する構造解析

長岡工業高等専門学校 学生会員 北 幸寛
 長岡工業高等専門学校 非会員 阿部 憲一
 長岡工業高等専門学校 正会員 荒木 信夫
 広島県産業科学技術研究所 正会員 角野 晴彦

1. はじめに

近年、排水処理にも省エネルギーが求められるようになってきた。そこで、嫌気性排水処理(UASB)が再注目されはじめている。しかし、UASBは都市下水のような低温低濃度有機排水をうまく処理できず、都市下水処理には不向きであった。そこで我々はこの問題を解決した硫黄酸化還元サイクル UASB を開発中である。これは、排水処理の主流である活性汚泥法と比べ、消費電力も余剰汚泥発生量も格段に少なく。また、従来のUASBと違い低濃度低温有機排水も処理が可能である。よって硫黄酸化還元サイクル UASB は現代社会に最適な処理方法だと判断できる。この硫黄酸化還元サイクル UASB(Fig.1)は、前段のUASB型反応槽で硫酸還元菌群(SRB)が硫酸還元とBOD除去に寄与し、後段の好気性処理槽で硫黄酸化菌群(SOB)が硫黄酸化に寄与している。その一部を前段のUASB型反応槽に返送する事により、硫酸濃度を維持させ排水処理を向上させている。しかし、処理の大半を担っているSRBは多様性が大きく、存在数や活性はおろか全ての菌種すら把握出来ていない。そこで、本研究ではSRBだけが持つ独自の機能遺伝子(Fig.2)である *ApsA*(アデニル硫酸から亜硫酸への還元の際、触媒となる酵素をコードする遺伝子)と *DsrAB*(亜硫酸から硫化物への還元の際、触媒となる酵素をコードする遺伝子)をターゲットとし遺伝子の塩基配列を解読し、SRBの菌種の特異性と系統内分布を把握する。

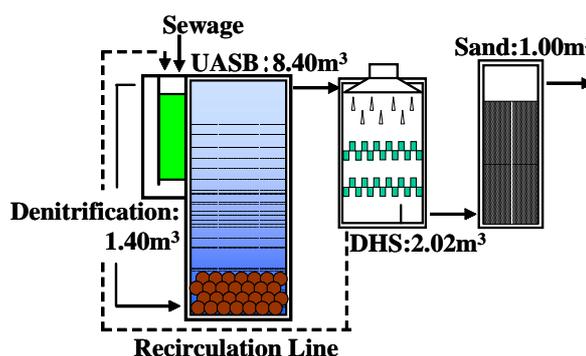


Fig.1 Pilot plants of enhancing sulfur rebox cycle action.

2. 実験方法

2-1. 汚泥採取

汚泥サンプルは東広島浄化センターにて運転中であるパイロットプラント UASB 内から運転 6 5 日目のものを採取した。

2-2. DNA抽出、精製

汚泥サンプルにはPCR阻害物質である硫黄化合物が多量に存在するため、リン酸 buffer で基質洗浄を行い、Bead-beater法を用いてDNA抽出を行い、フェノール、クロロホルム、エタノール沈殿した後、RNase処理を行った。その後、GENE CLEAN kit Turbo(Q-BIO gene)を用いて精製を行い、Pico GreenによりDNA濃度を測定した。

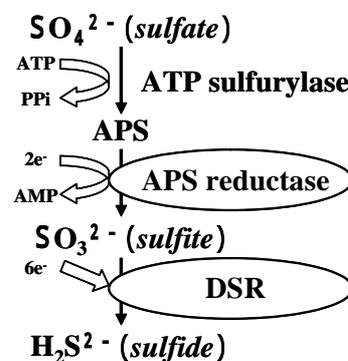


Fig.2 Dissimilatory sulfate reduction.

2 - 3 . PCR (Polymerase Chain Reaction)およびPCR産物のクローニング

PCR には *ApsA* 遺伝子をターゲットとした APS7F(APS7aF)と APS8R、*DsrAB* 遺伝子をターゲットとした DSR1Fdeg.と DSR4Rdeg.という3種類の Primer Set(Table 1)を用いて、特定領域を増幅した。得られた PCR 産物は TA Cloning を用いてクローニングを行った。得られたクローンから *ApsA* および *DsrAB* をコードした遺伝子を PCR により再増幅し、塩基配列を解読した。

2 - 4 . 分子系統解析

分子系統解析では、解読したクローンの塩基配列を BLAST search で相同性のある菌が存在することを確かめ、CLUSTAL X package によってアライメントを行い、MEGA package によって近隣接合法で進化距離の推定、系統樹の作成を行った。また既知種の硫酸還元菌のデータと織り交ぜ系統的位置を示した。

3 . 結果および考察

系統解析の結果を Fig.3 に示す。クローン APS02 と APS26 の検出頻度は 1/34 と少ないが、*Desulfovibrionales* 科の細菌がリアクター内に存在することが示唆された。クローン APS11 も検出頻度 2/34 と少ないがどのクラスターにも類似しない未知の菌であることが示唆された。また、今回検出したクローンの大半が独自のクラスターを形成した。現在までにこのようなクラスターを形成したという知見はないので、これらは APS を持った未知の菌である可能性が示唆される。また検出頻度 5/34 で、*Syntrophobacter fumaroxidans* に近縁な硫酸還元菌が検出された。*Cholorobium vinosum* や *Allochrochmatium tepidum*TLS といった *ApsA* を持ちながら硫酸還元菌ではない菌はやはり系統的に離れた位置に示された。

Table 1. Primer used for PCR amplification in this study.

| Primer | Sequence(5'-3') ^(b) | Primer binding site ^(a) |
|-----------|--------------------------------|------------------------------------|
| APS7F | GGGYCTKTCCGCGYATCAAYAC | 206-236 |
| APS7aF | GGGYCTSAGCGCYATCAAY | 206-234 |
| APS8R | GCACATGTCGAGGAAGTCTTC | 1139-1159 |
| DSR1Fdeg. | ACSCAYTGGAAARCACG | 420-436 |
| DSR4Rdeg. | GTGTARCAGTTDCCRCA | 2329-2346 |

^a Positions of the *Desulfovibrio-vulgaris* *ApsA* and *DsrAB* open reading frame.

^b D : not C K : G or T R : G or A S : C or G Y : C or T

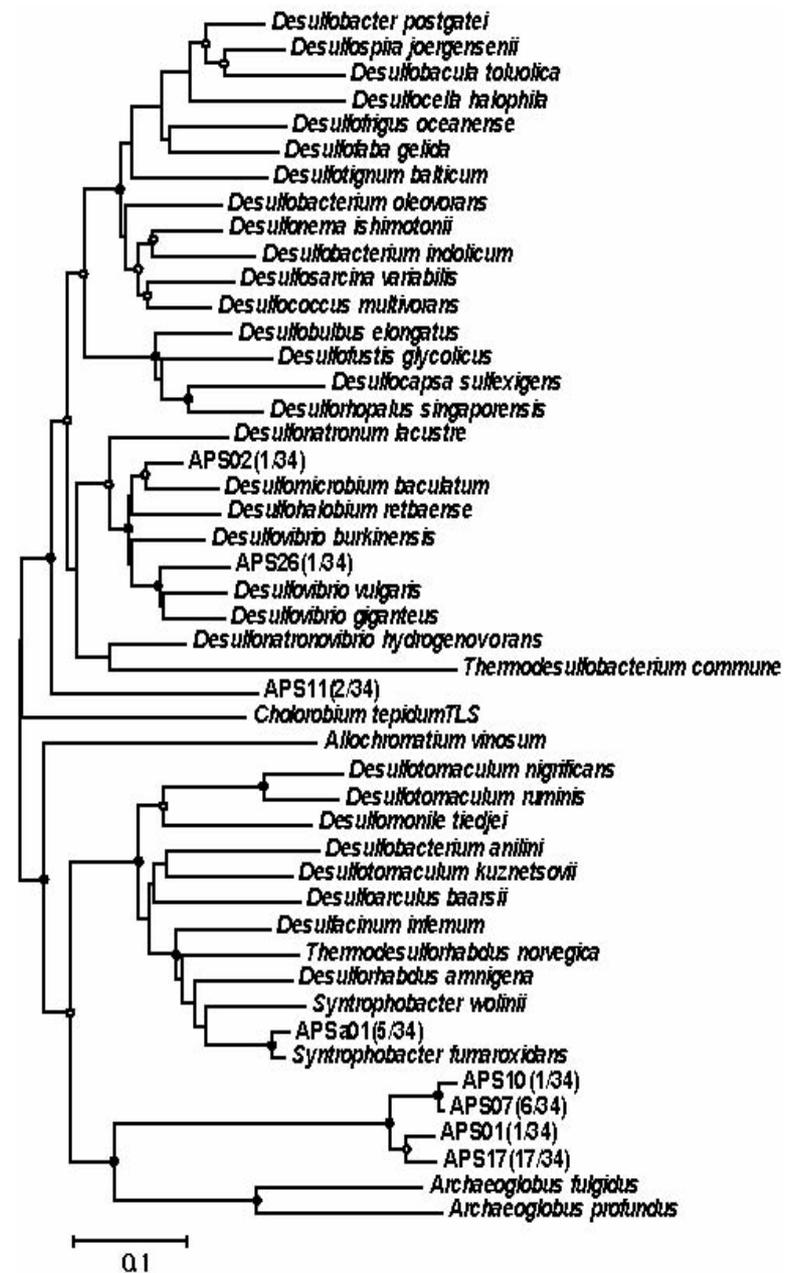


Fig.3 Phylogenetic trees of ApsA-based from major lineages of the sulfate-respiring microorganisms and UASB granule samples. This tree was constructed with the neighbor-joining(N-J) method. Solid circles, nodes with a bootstrap of >80% for all analysis; open circles, nodes with support of >60 and <80%. The scale bar, 0.1 changes per nucleotide position.