

B-16 硫酸還元機能遺伝子(*apsA*)を用いた新規下水処理システム内における 硫酸還元菌の検出と定量法の開発

長岡工業高等専門学校 ○阿部憲一 荒木信夫 呉工業高等専門学校 山口隆司
広島県産業科学技術研究所 高橋優信 岐阜工業高等専門学校 角野晴彦
高知工業高等専門学校 山崎慎一 広島大学 西尾尚道

1. はじめに

UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket)法による嫌気性廃水処理は標準活性汚泥法に比べて、電力エネルギーと発生する余剰汚泥量がごく少量であり、「持続可能な社会」に適したサステナブルな技術として、再注目されている。現在、国内において UASB 法は食品・ビール・醸造廃水など中高濃度廃水処理に広く用いられているが、いずれも中高温条件下での処理に限られており、都市下水といった低温低濃度排水には不向きとされてきた。しかし近年、硫黄の酸化還元サイクルを活用して UASB 法を都市下水処理に適応させた新規な下水処理システムが開発された¹⁾。この処理プロセスでは硫酸還元菌と硫黄酸化細菌がキー微生物であり、硫酸還元菌は UASB 内における有機物分解の最終段階を担っているとされている。しかしながら都市下水処理における硫酸還元菌の知見は少なく、どのような硫酸還元菌が有機物分解に関与しているかは不明である。そこで本研究では硫酸還元機能遺伝子である *apsA* 遺伝子に基づいたクローン解析により、UASB 内の硫酸還元菌種の特定し、Real-time PCR 法を用いて季節変化による遺伝指数の変動を定量した。

2. 実験方法

2.1 実験装置及びサンプリング

本研究で用いた実験装置は、東広島浄化センター内に建設したパイロットスケールのプラント(図 1)であり、2003 年 6 月よりスクリーン通過後の都市下水を原水とした連続通水試験を実施した。本システムの処理フローは脱窒槽と UASB による嫌気性処理、接触曝気槽(ABR)による好気性処理を行った後、沈殿槽を経て放流するものであり、沈殿槽下部から脱窒槽にかけて循環ラインを設け、運転開始から 184 日目まで(RUN1)を循環比 2.0、184 日目から 273 日目まで(RUN2)を循環比 0.3、273 日目以降(RUN3)を循環比 1.0 として運転を行った。全行程共にシステム全体の HRT は 24hr に設定し、温度制御はフリーとした。硫酸還元菌相解析に用いたグラニュール汚泥は、UASB 底部より 1m の地点におけるサンプリングポートから運転 65 日目(8 月 20 日)と 205 日目(1 月 7 日)に採取した。Real-time PCR による *apsA* 遺伝子定量には、運転開始 29 日目から約 1 ヶ月間隔で採取したグラニュール汚泥を用いた。

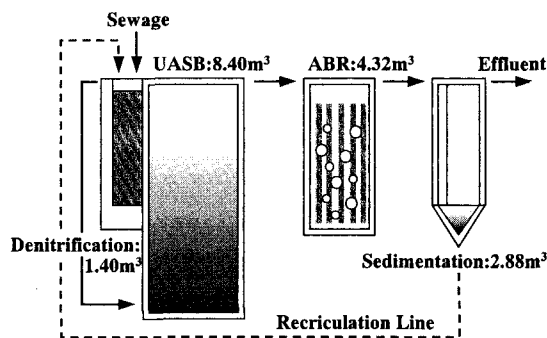


図 1 新規下水処理システムの構造

2.2 *apsA* 遺伝子に基づいた UASB 汚泥内のクローン解析

採取したグラニュール汚泥からの DNA 抽出には Bead-beater 法を採用した。PCR による *apsA* 遺伝子の増幅には、APS7F-8R と APSa7F-8R の 2 種類のプライマーセット(表 1)を用いた。*apsA* 遺伝子の増幅産物は TA Cloning kit(Novagen)によりクローン化させ、得られた単一の *apsA* 遺伝子の塩基配列を決定した。これらの塩

基配列データは NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)の BLAST search によって既知種とのホモロジーサーチを行った。また、既知種のデータと共に ClustalX package、MEGA package を用いて作製した系統樹から、グラニューール汚泥由来の *apsA* 遺伝子(ApsA アミノ酸配列)の系統的位置を示し、菌種の特定制を行った。

2.3 Real-time PCR 法による UASB 汚泥内の *apsA* 遺伝子定量

クローン解析より UASB 内に存在することが示唆された硫酸還元菌のグループ毎に、*apsA* 遺伝子に特異的なプライマーセットを作製し、それぞれのグループ毎に定量系を確立した。定量 PCR には Real-time PCR 法を用い、蛍光取得には SYBR Green I によるインターカレート法を採用した。検量線とキャリブレーションには各グループで最も検出頻度の高かったクローンの *apsA* 遺伝子断片を用い、増幅産物の電気泳動による分画化と融解曲線解析から、特異的な増幅であることを確認した。定量値は抽出した total-DNA 1ng 中の遺伝子数として、季節変化による遺伝子数を定量した。

3. 実験結果と考察

3.1 *apsA* 遺伝子に基づいた UASB 汚泥内のクローン解析

運転 65 日目(以後、夏サンプル)と運転 205 日目(以後、冬サンプル)から検出された *apsA* 遺伝子をもとに、ApsA アミノ酸配列に基づいて作製した系統樹を図2に示す。解析したクローンは夏サンプルで APS7F-8R: 24 クローン、APS7aF-8R:10 クローン、冬サンプルで APS7F-8R:26 クローン、APS7aF-8R:13 クローンであり、夏冬通して4~5つのグループ(Cluster A~E)を形成することが判明した。この内 Cluster C と Cluster E は今回検出されたクローンのみで形成されたグループであり、Cluster E においては夏冬通して高い頻度で検出されていることから、この新規下水処理システム内では未知の硫酸還元能を持つ細菌が有機物分解に関与している

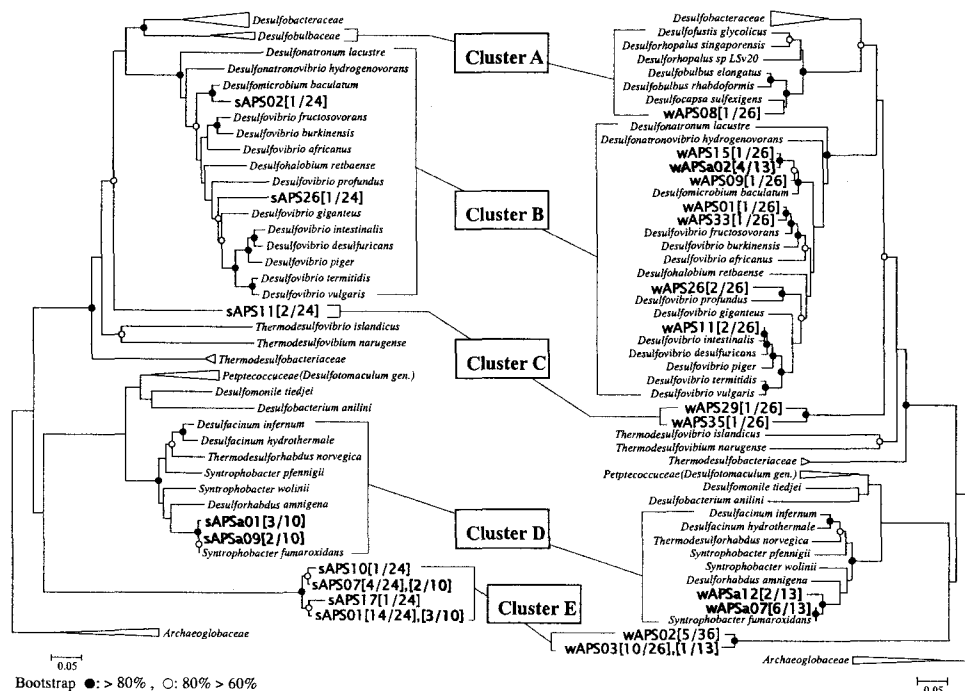


図2 UASB 汚泥内から検出したクローンの ApsA アミノ酸配列に基づいた系統樹

表 1 *apsA* 遺伝子増幅に用いたプライマー

Primer	Sequence(5'-3') ^a
APS7F	GGGYCTKTCCGCGYATCAAYAC
APS7aF	GGGYCTSAGCGCGYATCAAY
APS8R	GCACATGTCGAGGAAGTCTTC

^a K, G or T; S, C or G; Y, C or T.

る可能性が示唆された。同じ科内の硫酸還元菌では ApsA アミノ酸配列の相同性はほんなに低くても 70%を下回らないことから、これら独自のグループを形成するクローンはホモロジーサーチの結果(表 2)からも、既知の硫酸還元菌とは系統分類的に明確に異なる新規な細菌であることがわかる。

3.2 Real-time PCR 法による UASB 汚泥内の

apsA 遺伝子の定量

クローン解析よりサンプル由来の *apsA* 遺伝子を含む 4 グループそれぞれに特異的なプライマーセットを作製し、Real-time PCR 法により運転 29 日目から約 1 ヶ月間隔で採取したグラニュール汚泥内の *apsA* 遺伝子数を定量した(図 3)。グループ 1 は *Desulfobacteriales* 目と *Desulfovibrionales* 目から成るグループ (Cluster A+B)、グループ 2 は夏冬共に僅かに検出されたクローンの中のみのグループ (Cluster C)、グループ 3 は *Syntrophobacteraceae* 科から成るグループ(Cluster D)、グループ 4 は夏冬共に最も検出頻度が高かったクローンの中のみのグループ(Cluster E)である。運転期間中はグループ 1(丸:灰色)とグループ 2(丸:白色)は共に運転 106 日目(9 月 30 日)で大きく減少した後に徐々に増加し、運転 205 日目(1 月 7 日)において最大値を示した。こ

れはおそらく季節変化に伴う UASB 内の水温低下により、硫酸還元菌と同基質をめぐる競争関係にあったメタン生成菌の活性が低下したため、硫酸還元菌が優占的に増殖したと考えられる。この結果からグループ 2 に属する細菌はグループ 1 の硫酸還元菌と同様に硫酸還元を伴って生息している可能性が示唆された。

一方、グループ 3(四角:灰色)とグループ 4(四角:白色)は運転期間中を通して大きな変動は見られず一定の割合で存在していることが判明した。グループ 3 は *Syntrophobacter fumaroxidans* と極めて相同性が高い(99%)クローンであり、この種は硫酸還元能は有するが環境中では水素資化性細菌と共生し、プロピオン酸分解を行うことが知られている。このことからグループ 3 と同様の変動を示すグループ 4 に属する細菌は、UASB 内では硫酸還元を伴わない共生系を築いて生息している可能性があることが示唆された。

4. まとめ

apsA 遺伝子に基づいたクローン解析の結果、新規下水処理システム UASB 内には一年を通して 4~5 グループの硫酸還元菌群が存在しており、その中には新規な硫酸還元能を持つ細菌も含まれていた。それぞれのグループ毎に *apsA* 遺伝子の定量法を確立し、季節変化による遺伝子数の変動を定量したところ、秋から冬にかけてグループ 1 とグループ 2 に属する細菌の増殖が確認されたが、グループ 3 とグループ 4 に属する細菌は一年を通して大きな変動は見られなかった。このことからグループ 2 の細菌は硫酸還元に伴い生息する新規な硫酸還元菌である可能性が示唆された。またグループ 4 に属する細菌は硫酸還元を伴わずに共生系を築いて生息している新規な細菌の可能性が示唆された。

表 2 ApsA アミノ酸配列の相同性

Sulfate-reducing microorganism	% Amino acid seq. similarity to:	
	wAPS03	wAPS35
<i>Desulfobacter postgatei</i>	47	69
<i>Desulfobulbus rhabdiformis</i>	43	62
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	43	65
<i>Thermodesulfobacterium commune</i>	45	53
<i>Thermodesulfovibrio islandicus</i>	48	58
<i>Desulfotomaculum ruminis</i>	52	51
<i>Desulfomonile tiedjei</i>	55	53
<i>Syntrophobacter wolnii</i>	54	50
<i>Archaeoglobus veneficus</i>	56	53

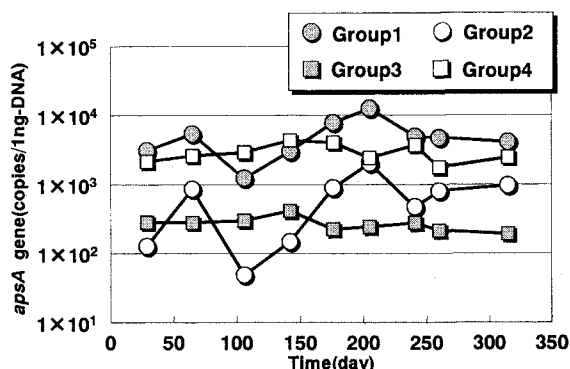


図 3 各グループにおける *apsA* 遺伝子数の変動