

# 嫌氣的硫黄酸化発生時の UASB リアクターにおける 硫黄関連機能遺伝子を標的とした遺伝子解析

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

## 1. はじめに

本研究室では, UASB (Up-flow Anaerobic Sludge Blanket: 上昇流嫌気性汚泥床) リアクターにおいて, UASB 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 UASB リアクター上部で再び硫酸塩へ酸化される嫌氣的硫黄酸化反応が確認された. 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の反応であると考えられる. 嫌氣的硫黄酸化は, 流入水の温度が低温 (12.5 ~ 10.0 °C), ORP (酸化還元電位) 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<sup>1)</sup>. また, 硫化物の再酸化とともにメタンが発生していることから, 炭酸塩を電子供与体として以下の反応式が提案されている<sup>1)</sup>.



本研究では, 実下水を処理している UASB リアクターを対象として, 嫌氣的硫黄酸化反応進行・非進行時における硫化物, 硫酸塩濃度プロファイルの作成および硫黄酸化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 1178 L, 高さ 4.7 m の遮光性 UASB リアクターを用いた (図-1). HRT は 8 h とし, 外気温で運転した. 基質として 150 mg-S/L の硫酸ナトリウムを添加した実下水を供給し, 嫌氣的硫黄酸化反応の進行をプロファイリングした. 水温および ORP はそれぞれポータブル pH メーター (東興科学研究所 TRX-999SI), ポータブル ORP メーター (東興科学研究所 TRX-999) を用いて測定を行った. 硫酸塩濃度の測定は高速液体クロマトグラフィー (LC-20-AD SP, SHIMADZU) を用いて行った. 硫化物の測定は, 下水試験方法に準じて測定を行った.

### 2.2 DNA 抽出, PCR

サンプルの採取は, 嫌氣的硫黄酸化反応進行・非進行時の UASB リアクターの Port 5 から行った. DNA

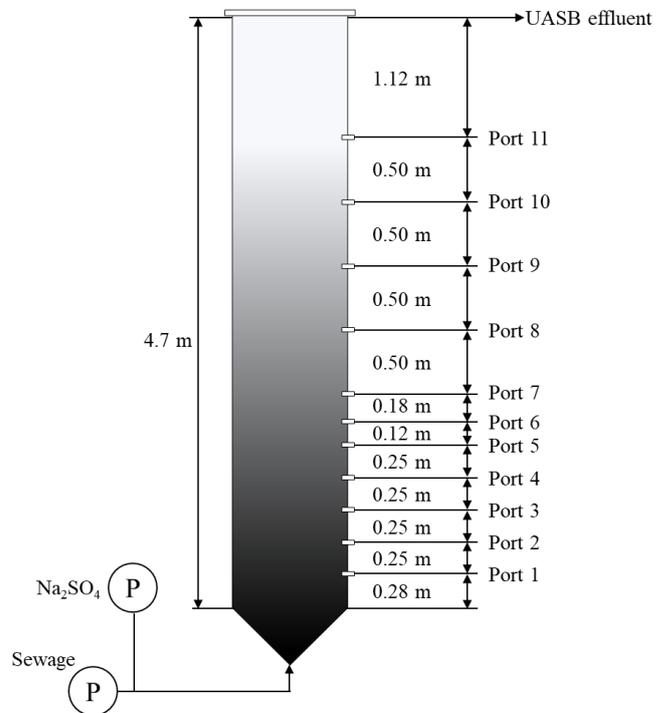


図-1 リアクター概略図

の抽出は, FastDNA SPIN Kit for Soil (MP-Biomedicals) を用いて, プロトコルに従って行った. DNA 濃度は NanoDrop ND-100 (Thermo Fisher Science) を用いて測定した. PCR は, *aprA* 遺伝子を対象とし, AprA-1-FW (TGGCAGATCATGATY MAYGG), Apr-5-RV (GCG CCAACNGGDCCRTA) を用いた<sup>2)</sup>. 反応条件は 94°C 2 min, [94°C 60 sec, 48°C 60 sec, 72°C 60 sec] × 40 cycle, 72°C 7 min で行った. *Desulfovibrio vulgaris* の純粋菌株から抽出した DNA をポジティブコントロールとして用いた.

## 3. 結果および考察

図-2 に UASB の高さ方向における硫化物, 硫酸塩濃度プロファイル結果を示す. 反応進行時の硫化物, 硫酸塩プロファイルを (a), 反応非進行時の硫化物, 硫酸塩プロファイルを (b) とした. (a) では下部で硫酸還元反応, 上部で嫌氣的硫黄酸化反応が進行していることが確認された. 一方で, (b) は下部において硫酸還元反応が進行しているが, リアクター上部にお

ける嫌氣的硫黄酸化反応の進行を確認できなかった。(a), (b)における水温, pH, ORP の測定値を以下に示す。反応が進行していた(a)では, 水温は 12°C程度, ORP は -300~-364 mV であり, 反応が進行していない(b)では, 水温は 26°C程度, ORP は-275~-373 mV であった。pH は(a),(b)とも中性付近であった。これらの結果は, 既報で報告されている嫌氣的硫黄酸化反応の進行条件と同様の結果となったり, ORP および pH に差異は見られなかったことから, 嫌氣的硫黄酸化には水温の低下が重要な要因であることが示唆された。水温の低下により, UASB リアクター内の微生物群集が変化することで嫌氣的硫黄酸化反応が進行すると予想される。

また, 嫌気条件下の UASB リアクター内で生物学的な嫌氣的硫黄酸化反応が進行するためには, 硫黄酸化・還元に関与する酵素の存在が重要であると思われる。特に, 低温環境に適応でき, 硫黄酸化・還元に関与する酵素を保有する微生物が嫌氣的硫黄酸化反応に関与している可能性がある。そこで, 硫酸還元および硫黄酸化に関する重要な酵素であるアデノシン 5'ホスホ硫酸 (APS) レダクターゼ  $\alpha$  サブユニットをコードする *aprA* 遺伝子<sup>3)</sup>を対象とし, (a), (b)の汚泥から抽出した DNA について PCR を行った(図-3)。結果, (a)の条件時に UASB リアクターから回収した汚泥から *aprA* 遺伝子の存在を確認することができた。一方で, (b)の条件時に UASB リアクターから回収した汚泥からは *aprA* 遺伝子の存在を確認することができなかった。この結果から, 嫌氣的硫黄酸化反応には *aprA* 遺伝子を保有する微生物が関与していることが示唆された。

#### 4. まとめ

本研究では実下水を処理する UASB リアクターにおいて嫌氣的硫黄酸化反応を確認した。また, 硫黄酸化関連機能遺伝子 *aprA* を対象とした PCR を行った結果, 嫌氣的硫黄酸化反応進行時の UASB リアクターから回収した汚泥からのみ *aprA* 遺伝子の存在を確認することができた。この結果から, *aprA* 遺伝子を保有する微生物が嫌氣的硫黄酸化反応に関与することが示唆された。今後は, *aprA* 遺伝子を対象とした微生物群集構造解析を行い, 嫌氣的硫黄酸化反応に関与している微生物の検出を行う予定である。

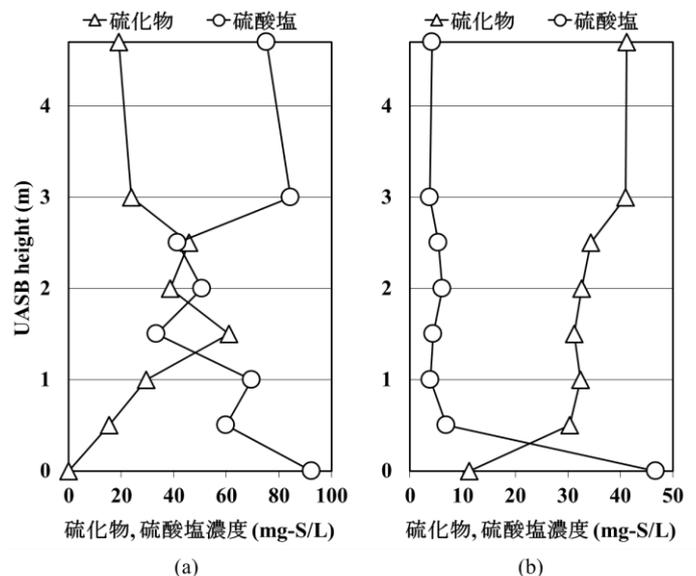


図-2 UASB 高さにおける硫化物, 硫酸塩濃度プロファイル。(a)嫌氣的硫黄酸化反応進行時, (b)嫌氣的硫黄酸化非進行時。

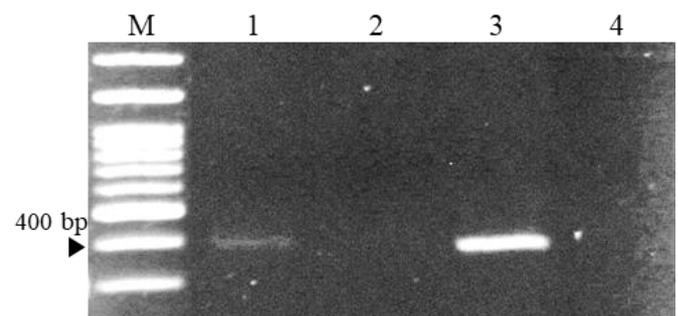


図-3 *aprA* 遺伝子を対象とした PCR。M: 分子量マーカー。1: 反応進行時汚泥。2: 反応非進行時汚泥。3: PC (*Desulfovibrio vulgaris*)。4: NC。

#### 5. 参考文献

- 1) 幡本ら. (2014). 嫌気性排水処理リアクターで起こる嫌氣的硫黄酸化反応. *日本微生物生態学会誌*. 29:76-77.
- 2) Aoki, M. *et al.* (2015). Phylogenetic diversity of *aprA* genes in subseafloor sediments on the northwestern pacific margin off Japan. *Microbes. Environ.* 30:276-280.
- 3) Meyer, B. *et al.* (2007). Molecular analysis of the diversity of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes in the environment, using *aprA* as functional marker gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7664-7679.