

M05

環境細菌叢の動態分析用指標遺伝子に関する研究

(北九州高専) ○(学)森下 由唯・佐田 隆宏・(正)水野 康平*

【緒 言】

環境問題への関心が高まる中、人の生活圏や産業活動区域における硫化水素の発生メカニズムの解明が待たれている。主な原因は、硫酸還元菌による硫酸の代謝とされているが、その発生メカニズムは不明な点も多い。一般に硫酸還元菌は嫌気状態で増殖する為、複雑に多様化した細菌叢の中で硫酸還元菌が増殖する条件は、十分に予測できないのが現状である。

そこで、本研究では排水処理汚泥の菌叢解析を行い、硫酸還元反応による硫化水素発生の細菌学的条件とその影響因子について検討する。私たちは、硫酸還元菌をモニターする指標遺伝子として、硫酸還元の鍵酵素である亜硫酸還元酵素遺伝子 (*dsrB*) に着眼した。本遺伝子をターゲットとして排水中の細菌叢を解析することにより、どのような細菌学的条件で、どのような種類の硫酸還元菌が増殖するかを調べることを目的とする。このような分析の蓄積が排水処理施設などの細菌叢での硫化水素生成の制御に貢献できると考えている。

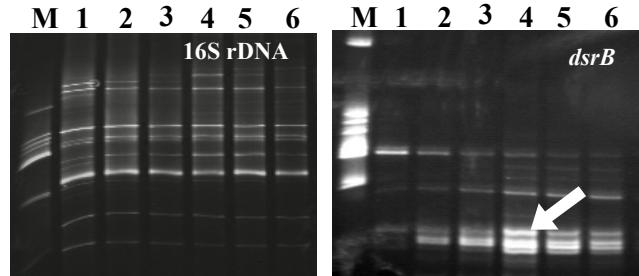
【方 法】

無機窒素化合物を主体とする排水処理施設の微生物汚泥を用いて試験を行った。この汚泥を嫌気・微好気下で約3週間培養し、酸化還元電位 (ORP) を経時的に測定した。また、排水に 1g/l-KNO₃、4g/l-KNO₃ を添加して、硫酸還元代謝への影響を調べた。排水の電位に変化が見られる場所や一定の時間ごとにサンプルを採取し、PCR-DGGE に供した。

上記のサンプルを鋳型として DGGE 用 GC クランプ付きプライマーを使用し、16S rDNA (600 bp) および *dsrB* (380 bp) を PCR で增幅した。この PCR 産物を 30μl ずつ 20~60% 変性剤濃度勾配アクリルアミドゲルで、60°C、60V、16h の泳動条件で DGGE を行った。この DGGE 解析結果より、特徴的なバンドをそれぞれから 7 個程度切り出し、シーケンスを行った。また、初期 (0h) と終期 (561h) の試料より、ランダムに約 25 個の *dsrB* のクローニングを行い、シーケンスにより培養前後で菌叢にどのような変化があるか検討を行った。

【結 果】

図 1 に示す通り、16S rDNA の DGGE では、硫酸還元菌を検出することは難しかったが、*dsrB* の DGGE パター

図 1. 低硝酸濃度系の 16S rDNA、*dsrB* の DGGE 解析結果

Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6 は、嫌気シフトにしてからそれぞれ 0, 2, 8, 5.7, 8.8, 16, 19 日後の試料。Lane 4(8.8 日)前後で初期状態になかった *dsrB* のシグナルが見られた。(矢印) M:マーカー

ンでは、排水が嫌気状態へシフトしたことによって生じたと考えられるバンドパターンのシフトを検出することができた。また、硝酸イオン濃度の 1g/l-KNO₃ と 4g/l-KNO₃ の系を比較した結果、硝酸イオンの添加によって硫酸還元菌の存在を示す *dsrB* の検出が有意に減少したと考えられた。この結果は、一般的に硝酸の添加が硫化水素生成を抑制するという知見を支持する結果と言える。よって、*dsrB* を分子マーカーとして、硫化水素ガスを発生する可能性のある硫酸還元菌のグループを検出できる可能性が示唆された。このバンドのシーケンスを行ったところ、*Desulfovibrio* 属の酵素であることがデータベースとの照合により示唆された。

また、培養後のサンプルよりランダムに 25 個ずつクローニングし、シーケンスを行った。培養後の低硝酸濃度の方にのみ、*Desulfovibrio* 属が検出された。

この結果が、DGGE 解析と一致することから硫化水素ガスを急激に発生させている菌は *Desulfovibrio* 属タイプの酵素である可能性が示唆された。また、*Syntrophobacter* 属が DGGE 解析、ランダムクローニング解析の双方から検出されたことは、原因は不明だが、興味深い結果である。

【結論】

本研究より、排水処理槽の嫌気状態へのシフトによる硫化水素ガス発生には、*Desulfovibrio* 属タイプの *dsr* (亜硫酸還元酵素) が関与すること、及び、硝酸添加により硫酸還元代謝が抑えられることが示唆された。

* Tel&FAX : 093-964-7303

E-mail : mizuno@kct.ac.jp