

# 産業用排水中の硫酸還元菌叢へ与える硝酸添加の属特異的な効果

森下 由唯・原田 奏也・水野 康平・安東 晶子<sup>\*1</sup>・平田 舞<sup>\*2</sup>・田中 賢二<sup>\*2</sup>

Genus-specific effects of nitrate on a sulfate-reducing bacterial community

as revealed by *dsrB*-based DGGE analyses of wastewater reactors

Yui MORISHITA, Souya HARADA, Kouhei MIZUNO, Akiko ANDO<sup>1</sup>, Mai HIRATA<sup>2</sup> and Kenji TANAKA<sup>2</sup>

## Abstract

The biogenic production of hydrogen sulfide is a serious problem in industrial processes. The aim of this study was to investigate the inhibitory effect of nitrate on the dynamics of sulfate-reducing bacteria (SRB) community in a laboratory-scale wastewater reactor, originating from a denitrifying plant using activated sludge. For this purpose, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis targeting the *dsrB* (dissimilatory sulfite reductase) was used in combination with chemical analyses and measurement of oxidation and reduction potential (ORP). The reactors were initially dosed with 1.0 and 4.0 g/L potassium nitrate and anaerobically incubated for 490 h. Addition of 4.0 g/L nitrate to the reactor was associated with a prolonged inhibition (over 300 h, i.e., 12.5 days) of sulfate reduction and this was consistent with a rapid decrease in ORP associated with nitrate depletion. The DGGE analysis revealed that nitrate addition remarkably attenuated a distinct group of *dsrB* related to *Desulfovibrio*, whereas other *dsrB* groups were not influenced. Furthermore, a 3-years follow-up analysis was conducted in the same reactor. The dominance of the *Desulfovibrio* in the early period was found to be reproducible. These results suggest that the nitrate effect on SRB community is genus specific and its duration time depends on the dynamics of SRB community structure.

**Key words:** Sulfate-reducing bacteria, *Desulfovibrio*, Bacterial community dynamics, Activated sludge, Dissimilatory sulfite reductase

## 1. 諸言

排水処理において、微生物による硫化水素発生は処理槽内の硫化鉄沈着や硫化水素ガスの人体への有害性など産業活動区域において深刻な問題である。原因は硫酸還元菌 (Sulfate reducing bacteria : SRB) の代謝とされるが、複雑な菌叢中での SRB の増殖条件、硫化水素発生の具体的なプロセスは未だ解明できていない。私達は、活性汚泥法排水処理槽が嫌気状態へ移行する際の菌叢動態分析を DNA 解析で行い、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してきた<sup>(1)</sup>。従来、DNA 解析で用いられる 16S rRNA 遺伝子は全細菌対象のため、SRB の動態を追跡することは難しい。そこで私達は、SRB の動態分析用指標遺伝子として硫酸還元代謝酵素である亜硫酸還元酵素遺伝子 (*dsrB*) に着眼した。本遺伝子は保存性が高く、SRB の分類指標遺伝子として種レベルの情報を得られると期待できる<sup>(2,3,11,12)</sup>。本研究では、この *dsrB* を用いて硫化水素発生時の菌叢変化、関与する SRB の種を同定することを試みた。さらに、一般に硫化水素発生を抑制すると言われる硝酸塩を排水に添加した際の菌叢動態の変化を検討することとした<sup>(8,9,10)</sup>。

## 2. 実験方法

### 1. 実験試料の調製

異なる 2 か所の実排水処理槽 A 及び B より排水を採取した。処理槽 A 及び B は処理能力 768 m<sup>3</sup>/day、処理槽サイズ 100 m<sup>3</sup> の活性汚泥法による窒素処理槽である。これらの排水処理槽から採取した排水 150 ml に作成した人工

培地を 150 ml (1.0 or 4.0 g/l KNO<sub>3</sub>, 0.05 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 g/l FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5% CH<sub>3</sub>OH) 添加し、全量 300 ml のモデル排水とした。この排水を、40 ml/min 窒素通気により嫌気状態とした後、30°C、600 時間で培養させた。モデル排水に添加する人工培地の硝酸カリウム濃度を 1 g/l、4 g/l と変更したのは、一般に硫化水素発生を抑制する効果があるといわれる硝酸塩を添加し酸化還元電位および硫酸還元反応への影響検討を行うためである<sup>(5)</sup>。この 2 つの排水試料の培養系の目視観察、ORP 測定を行った (東亜 DKK 株式会社製の PST-5721C)。また、測定と並行して、DNA 解析を行うために排水のサンプリングを行った。

### 2. 排水からの DNA 抽出法

採取した排水から、PCR-DGGE サンプル用に DNA 抽出を行った。まず、溶菌操作として排水 0.5 ml に 10%-リゾチームを 10 µl 添加し、37°C、0.5 時間反応、その後 10% -SDS を 30 µl 添加し 37°C、0.5 時間反応を行った。次にタンパク除去をフェノール/クロロホルム抽出法により行った。この水層から DNA を得るために 3M-酢酸ナトリウムを用いた塩析を行った。50 µl の ddH<sub>2</sub>O に DNA を溶解させた。

### 3. PCR による 16S rRNA 遺伝子および *dsrB* の増幅法

16S rRNA 遺伝子および *dsrB* をターゲットとした PCR 反応液を作製した (Green Master Mix Promega 社製)。鋳型には上記に示した DNA 抽出物を使用し、16S rRNA 遺伝子 (600 bp) をターゲットとした場合では、341F-GC (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')、907R (5'-CCG TCA ATT CCT TT[A/G]AGT TT-3')<sup>(2)</sup> を、*dsrB* (380 bp) をターゲットとした場合では DSR4R (5'-GTG TAG CAG TTA CCGCA-3')、DSRp2060F (5'-CAA CAT CGT YCA YACCCA GGG-3')<sup>(3)</sup> のプライマーを用いた。DGGE 解析用のサンプル作成時に

\*1 九州電力 (株) 総合研究所生物資源研究センター

\*2 近畿大学産業理工学部生物環境化学科 応用生物学研究室

は表記したフォワードプライマーの配列に 20 塩基の GC クランプが付加したものを使用した。この PCR 反応液をサーマルサイクラー (SANYO 社製 DNA AMPLIFIER MIR-D40) で反応させた。

#### 4. 16S rRNA 遺伝子および *dsrB* の DGGE 解析法

The Dcode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad 社製) を用いて解析を行った。まず、DNA 変性剤 20% アクリルアミド (変性剤 0% アクリルアミド溶液 15 ml、変性剤 80% アクリルアミド溶液 5 ml)、DNA 変性剤 60% アクリルアミド (変性剤 0% アクリルアミド溶液 5 ml、変性剤 80% アクリルアミド溶液 15 ml) を 15 ml ずつと、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン 15  $\mu$ l (WAKO 社製)、10% 過硫酸アンモニウム 100  $\mu$ l (WAKO 社製) を用いて、上部から下部にかけて 20~60% の変性剤濃度勾配付ゲルを作成した。作成したゲルに、PCR 法で作成したサンプルを、30  $\mu$ l/well の量をアプライし、60°C、60 V の条件で 16SrRNA 遺伝子では 16 時間、*dsrB* では 12.5 時間の泳動を行った<sup>(2,6)</sup>。泳動したゲルは、SYBR Green (Takara bio 社製) で染色を行った。このゲルから遺伝子配列解析用に、特徴的なバンドを 16S rRNA 遺伝子からは 8 つ、*dsrB* からは 7 つ切り出し-21°C で保存した。

#### 5. 目的遺伝子の塩基配列決定

切り出した DNA バンドの塩基配列を PCR 法にて GC クランプのついていない状態で増幅させた。この DNA サンプルをインサートとして、TOPO TA cloning Kit (Invitrogen 社製) を用いて形質転換を行い、目的のプラスミドが導入されたポジティブクローンを分離した。この分離した大腸菌から QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN 社製) によるプラスミド抽出を行った。塩基配列の決定は北海道システムサイエンス (株) に依頼した。その配列を Web 上解析プログラム BLAST (<http://blast.genome.jp>) を用いて菌種同定を行った<sup>(7)</sup>。

#### 6. *dsrB* のクローニング法

排水の培養開始時と、硫化鉄沈殿確認時のサンプルから増幅させた *dsrB* をターゲットに上記と同様の方法でクローニングを行った。ランダムに 50 個ずつポジティブクローンを分離し、上記と同様の方法でプラスミドを抽出した。このプラスミドに導入された *dsrB* の塩基配列の決定を行い、培養前後での菌叢変化を比較した。

### 3. 実験結果

#### 1. 硝酸塩添加による酸化還元電位への影響検討

無機窒素化合物を主体とした排水 A に硝酸を 1 g/l、4 g/l 加えたものをそれぞれ 600 時間嫌気培養し、定期的に電位測定を行った結果を図 1 に示した。1 g/l 硝酸添加系は約 2 日目で -653.7 mV、4 g/l 硝酸添加系は約 2 日目で -245 mV にシフトしてから約 9 日目で -449 mV に ORP が落ちている。嫌気状態で培養すると、硫酸還元代謝により発生した硫化水素と培養系の鉄イオンが反応し、硫化鉄が沈殿する。その硫化鉄沈殿が確認できたのは図 1 の矢印の時刻であ

る。比較すると、1 g/l 硝酸添加系の方が 10 日以上早く硫化鉄沈殿が確認出来ており、硫酸還元菌増殖速度が速く、硝酸カリウムは硫酸還元代謝を抑制する効果があることがわかる。

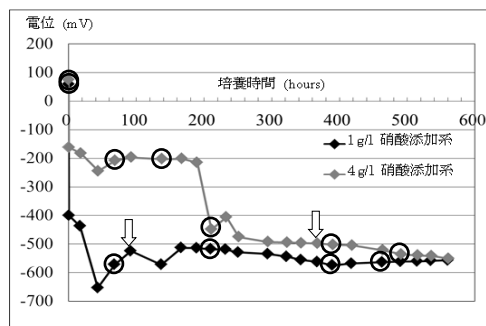


図 1. 排水 A の酸化還元電位 (ORP) の推移  
図中の矢印は目視による硫化鉄沈殿確認時刻

○の箇所は PCR-DGGE 解析を行った排水を採取した箇所

#### 2. 排水 A の DGGE 解析

排水 A の DGGE 解析結果を図 2 に示す。16S rRNA 遺伝子の結果 (図 2-A, B) からは、電位、時間、硝酸の濃度の変化に伴うバンドパターンの変化は見られず、バンドのシーケンス結果 (表 1) から硫酸還元菌は検出されなかった。一方、*dsrB* の結果では、1 g/l 硝酸添加系 (Fig. 2-C) に比べ、4 g/l 硝酸添加系 (Fig. 2-D) の方が *dsrB* のバンドシグナル著しく弱く、1 g/l 硝酸添加系に、著しく電位の低下している 2.8 日目以降で、特有のバンドが濃く検出された (図 2-C バンド l, m, n)。培養系に硫化鉄沈殿が確認されたレーン 2 の 2.8 日目に検出されたこの特徴的なバンドは、全て *Desulfovibrio vulgaris* タイプであった (表 2)。この 1 つ上に検出された、バンド l-n と同様の傾向を示すバンド k は、*Syntrophobacter fumaroxidans* であった。この菌は *D. vulgaris* と共生することが報告されている<sup>(4)</sup>。

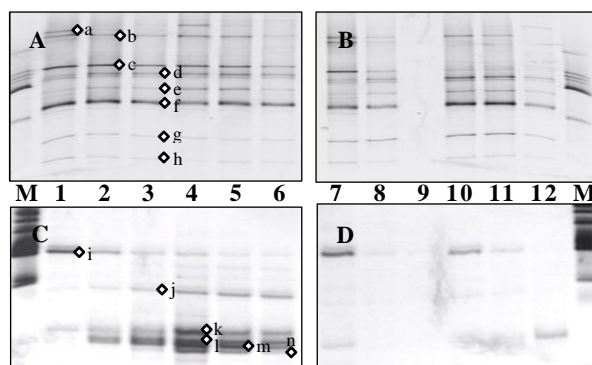


図 2. 排水 A の DGGE 解析結果

A: 排水 A の 1 g/l 硝酸添加系の 16S rRNA 結果、B: 排水 A の 4 g/l 硝酸添加系の 16S rRNA 結果、C: 排水 A の 1 g/l 硝酸添加系の *dsrB* 結果、D: 排水 A の 4 g/l 硝酸添加系の *dsrB* 結果、レーン 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: 1 g/l 硝酸添加系の培養 0, 2.8, 5.7, 8.8, 16, 19 日の試料、レーン 8, 9, 10, 11, 12, 13: 4 g/l 硝酸添加系の培養時間 5, 6, 7, 12, 13 日の試料、M: マーカー表内に示す a-n のアルファベットは、塩基配列を調べた箇所である。

表 1. 16S rDNA の DGGE バンドのシーケンス結果

Band	16S rDNA type	Homology (%)
a	Uncultured bacterium	99
b	Bacterium Ellin6075	95
c	<i>Hyphomicrobium zavarinii</i>	99
d	<i>Clostridium</i> sp. Strain P6	95
e	<i>Nitrospira</i> sp.	92
f	Uncultured bacterium	87
g	<i>Nitrospira</i> sp. Clone b30	92
h	<i>Nitrospira</i> sp.	92

表 2. *dsrB* の DGGE バンドのシーケンス結果

Band	<i>dsrB</i> type	Homology (%)
I	<i>Desulforhopalus singaporensis</i>	86
J	<i>Desulfofustis glycolicus</i>	83
K	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	85
L	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	88-91
M	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	89
N	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	91

### 3. 排水 B の DGGE 解析

異なる排水で排水 A と同様の実験を行い、どのような傾向がみられるか試験を行った結果である。16S rRNA 遺伝子の結果 (図 3-E, F) では、排水 A 同様、電位、時間、硝酸の濃度の変化に伴うバンドパターンの変化は見られない。*dsrB* の結果では、1 g/l 硝酸添加系培養 5 日目以降、特有のバンドが濃く検出されており、硫化鉄沈殿を確認時と出現時間と合致している。さらに、同時に解析を行った *D. vulgaris* 基準株のバンドと同等の位置に検出されていることから、排水 A の結果と同様の傾向が異なる活性汚泥をベースにした排水 B においても見られた。さらに、1 g/l 硝酸添加系の培養 9 日目以降は *D. vulgaris* のバンドが徐々に弱くなり、上部に他の硫酸還元菌のバンドを検出した。

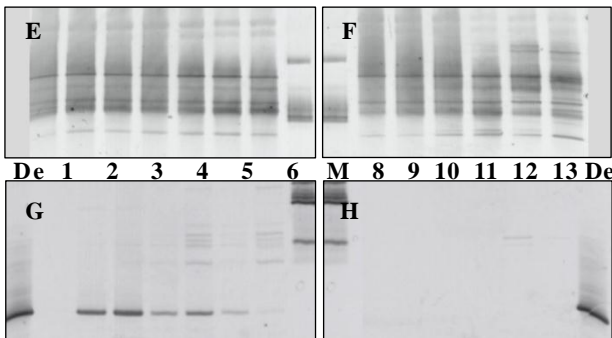


図 3. 排水 B の DGGE 解析結果

E: 排水 B の 1 g/l 硝酸添加系の 16S rRNA 結果、F: 排水 B の 4 g/l 硝酸添加系の 16S rRNA 結果、G: 排水 B の 1 g/l 硝酸添加系の *dsrB* 結果、H: 排水 B の 4 g/l 硝酸添加系の *dsrB* 結果、レーン 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: 1 g/l 硝酸添加系の培養 0, 5, 6, 7, 12, 13 日の試料、レーン 8, 9, 10, 11, 12, 13: 4 g/l 硝酸添加系の培養時間 5, 6, 7, 12, 13 日の試料、M: マーカー、De: *D. vulgaris* 基準株の純粋培養液

### 4. 排水 A の DGGE 解析結果の年次変化

排水 A の培養前後のサンプルの DGGE 解析結果 3 年分を以下の図 4 にまとめた。硫化鉄確認時期が年度ごとに硫化鉄沈殿時期が異なるのは、培養を行った季節が関わっている可能性がある。図 4 の DGGE 解析結果を見ると、2009 年に比べ 2010、2011 年のバンドパターンは多様性が小さ

くなり、*D. vulgaris* タイプのみとなっている。2010 年、2011 年の排水は、排水処理槽のメンテナンスを行った直後のものであったため、硫酸還元菌の菌叢の多様性がなくなった可能性が考えられる。また、どの年度も培養系の硫化鉄沈殿確認時と同時期に *D. vulgaris* のバンドが強く検出されるという結果 2 と相同性のある結果を得た。

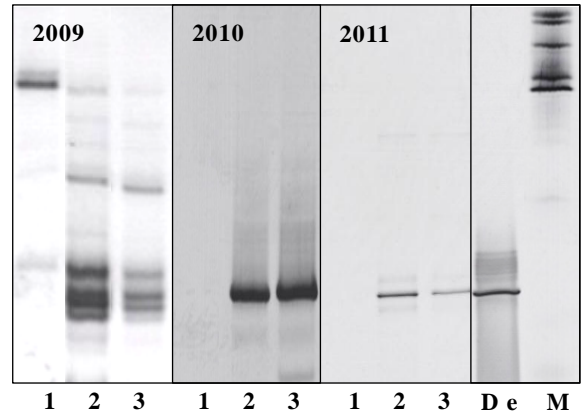


図 4. 排水 A の 3 年間 (2009~2011 年) の *dsrB*-DGGE 解析追跡調査結果

M: マーカー、De: *D. vulgaris* 基準株の純粋培養液、レーン 1, 2, 3 はそれぞれ、培養開始時、硫化鉄沈殿確認時、培養終了時を示す。

### 5. 排水 A、B の培養前後の *dsrB* ランダムクローニング

排水 A、B の培養前後のサンプルからランダムに 50 個ずつ採取した *dsrB* のシーケンス結果を表 3 に示す。DGGE の結果と相同性のある結果をランダムクローニングの結果から得た。1 g/l 硝酸添加系の培養後のサンプルから、排水 A では 48 個中 23 個、排水 B では 41 個中 29 個の *D. vulgaris* タイプの *dsrB* を検出した。この *D. vulgaris* は、1 g/l 硝酸添加系の DGGE 解析結果に見られた硫化鉄沈殿確認時とほぼ同時に検出された特徴的なバンドと同種である。

表 3. 排水 A、B の培養前後の *dsrB* ランダムクローニング結果

Closest match of <i>dsrB</i> type	Accession number	Wastewater A		Wastewater B	
		1 g/l KNO <sub>3</sub>	7	1 g/l KNO <sub>3</sub>	6 (days)
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	AF218452	40	3	21	
<i>Desulforhopalus singaporensis</i> DSM 12130	AF418196	5	2	18	
<i>Desulfobulbus propionicus</i> DSM 2032	CP002364	2			
<i>Desulfobacca acetoxidans</i>	AY167463	1			
<i>Desulfofustis glycolicus</i> DSM 9705	AF418191		4	12	1
<i>Desulfotomaculum hermosapovorans</i>	AF271769		1		
<i>Desulfomicrobium</i> sp. ADR28	AM493693		4		
<i>Desulfonatronum lacustre</i> DSM 10312	AF418189				1
<i>Desulfacinum infernum</i>	AF482454				1
<i>Desulfobotulus sapovorans</i>	U58120		10		2
<i>Desulfosarcina</i> sp. CME1	AF360646				7
<i>Desulfovibrio butyratiphilus</i>	AB490775		3		
<b><i>Desulfovibrio vulgaris</i></b>	<b>U16723</b>				<b>10</b>
<b><i>Desulfovibrio vulgaris RCH1</i></b>	<b>CP002297</b>		<b>23</b>		<b>19</b>
Total number		48	48	51	41

#### 4. 総括

今回、我々は *dsrB* をターゲットに DNA 解析を行うことで、16S rRNA 遺伝子では検出されなかった硫酸還元菌の培養時間、硝酸濃度、及び電位の変化による動態を明瞭に確認することができた。排水 A の *dsrB*-DGGE 解析結果より、1 g/l 硝酸添加系にのみ目視観察による硫化鉄沈殿確認と同時に *D. vulgaris* が検出された。また、排水 A の 3 年間にわたる追跡調査、排水 B との比較、すべての試験で硫化鉄沈殿確認と同時に *D. vulgaris* のバンドを強く検出した。さらには、排水 A、B の培養前後のサンプルを用いて行った *dsrB* ランダムクローニング結果 (n=50) から、1 g/l 硝酸添加系の培養後の菌叢は約 50% が *D. vulgaris* であるという結果を得た。このことから、排水 A、B における硫化鉄沈殿確認時の優勢種は硫酸還元菌の特定のグループである可能性が高く、それは *D. vulgaris* と同じ *dsrB* を有するものであった。

今後、硫化水素の定量、FISH 法による解析、排水から菌を分離して解析するなどの研究を重ねていくことで、より詳細な菌叢の動態が解明できると考えられる。

#### 5. 謝辞

本稿を執筆する機会を下さった水野康平准教授に感謝いたします。また、下記の皆様に感謝いたします。調査試料を提供していただいた九州電力 (株) 総合研究所生物資源研究センター、安東晶子研究員、化学分析を実施していただいた近畿大学産業理工学部、平田舞氏、田中賢二教授、北九州工業高等専門学校 物質化学工学専攻 2 年、原田奏也氏。

#### 6. 文献

- (1) Mizuno K, Morishita Y, Ando A, Tsuchiya N, Hirata M and Tanaka K. Genus-specific and phase-dependent effects of nitrate on a sulfate-reducing bacterial community as revealed by *dsrB*-based DGGE analyses of wastewater reactors. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* Aug. (2011)
- (2) Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 695–700 (1993)
- (3) Shabir A, Dar LY, Dongen U, Kuenen JG and Muyzer G. Analysis of diversity and activity of sulfate-reducing bacterial communities in sulfidogenic bioreactors using 16S rRNA and *dsrB* genes as molecular markers. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 594–604 (2007)
- (4) Hermie JMH, Van Kuijk BLM, Plugge CM, Akkermans ADL, De Vos WM and Stams AJM. *Syntrophobacter furnaroxidans* sp. nov., a syntrophic propionate-degrading sulfate reducing bacterium *International Journal of*

*Systematic Bacteriology* **48**: 1383–1387 (1998)

- (5) Strickland JDH, Parsons TR. A practical handbook of seawater analysis. *Fish Res Board Can Bull* **167**:311 (1968)
- (6) Geets J, Borremans B, Diels L, Springael D, Vangronsveld J, Lelie D, Vanbroekhoven K. *DsrB* gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiology Methods* **66**:194–205 (2006)
- (7) Altschul DJ, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**:403–410(1990)
- (8) Telang AJ, Ebert S, Foght JM, Westlake DWS, Jenneman GE, Gevertz D, Voordouw G. The effect of nitrate injection on the microbial community in an oil field as monitored by reverse sample genome probing. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:1785–1793 (1997)
- (9) Hubert C, Voordouw G. Oil field souring control by nitrate-reducing *Sulfurospirillum* spp. that outcompete sulfate-reducing bacteria for organic electron donors. *Applied and Environmental Microbiology* (2007) **73**:2644–2652
- (10) Mohanakrishnan J, Gutierrez O, Meyer RL, Yuan Z. Nitrite effectively inhibits sulfide and methane production in a laboratory scale sewer reactor. *Water Res* **42**:3961–3971 (2008)
- (11) Stahl DA, Fishbain S, Klein M, Baker BJ and Wagner M. Origins and diversification of sulfate-respiring microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 189–195 (2002)
- (12) Friedrich MW. Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms. *Journal of Bacteriology* **184**: 278–289 (2002).

(2011 年 11 月 7 日 受理)