活性汚泥から単離された硫酸還元細菌の 特性評価と硫化水素生成*

高 橋 唯¹ 佐 藤 晋 太 郎²
須 藤 孝 一³ 井 上 千 弘⁴

Characterization and Hydrogen Sulfide Generation of Sulfate-Reducing Bacterium Isolated from Activated Sludge in a Wastewater Treatment Plant

by Yui TAKAHASHI^{a*}, Shintaro SATO^a, Koichi SUTO^a and Chihiro INOUE^a

a. Department of Environmental Studies, Graduate school of Environmental Studies, Tohoku
University, 6-6-20, Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

(*Corresponding author E-mail: yuta@er.kankyo.tohoku.ac.jp / FAX: +81-(0)22-795-7402)

This paper describes hydrogen sulfide generation, isolation and characterization of sulfate-reducing bacteria in the activated sludge obtained from wastewater treatment plant. The sludge, collected from aerobic treatment system, was used as inoculums for hydrogen sulfide generation and for isolation of sulfate-reducing bacteria. Hydrogen sulfide was generated when the sludge was inoculated into a pH controlled medium. Two strains G2 and G3 of sulfate-reducing bacteria were isolated from the sludge. The characteristics and identification of these isolates was based on culture of the experiments and molecular analysis. Reduced sulfate rates in G2 and G3 is 0.39 and 0.41 mmol/dm³ respectively. Two isolates located in the genus *Desulfovibrio* in the phylogenetic tree based. First one was 16S rRNA gene analysis with the highest homology, 96.6 %, as *Desulfovibrio carbinophilus* (DSM 17524^T). However, the branch of the isolates was separated from the relatives and no strain was recognized in this branch. Also the dsr gene of isolate G3 had the highest homology with *Desulfovibrio fructosovorans* (DSM 3604^T), 92.7 %. The isolates G2 and G3 belonged to the genus *Desulfovibrio* as confirmed by the results of these analyses, however, these isolates oxidized organic compounds to carbon dioxide completely although relative strain oxidized it completely. Therefore, these isolates have high possibility that they should be recognized as a new strain.

KEY WORDS: Sulfate-Reducing Bacteria, Hydrogen Sulfide, Sulfur Compound, Dissimilatory Sulfate Reduction, Phylogenetic Analysis

1. 緒 言

硫黄は生命体にとって必須元素であり、地球上に多量に存在する元素の一つである。また、幅広い酸化状態 (-2 ~ +6) をとることができ、化学的および生物的に変換されながら環境中を循環している。特に、短期の硫黄循環には微生物が重要な役割を果たしており、その還元反応の大部分は硫酸還元細菌によるものである¹⁻⁴⁾。硫酸還元細菌については古くから研究されており、これまでに硫酸還元メカニズムをはじめ多様な基質利用性、硫酸のみならず元素状硫黄やその他の硫黄化合物の還元能力を有する細菌の存在が明らかにされている⁴⁻¹⁵⁾。例えば、乳酸を利用した硫酸の還元反応は以下の式で表せる。

一方、太陽光を利用して硫化水素から水素を生成する光触媒が開発され、硫化水素が新たなエネルギー源として注目されている¹⁶⁾。この反応により水素原子を切り離された硫黄原子は、ポリ硫化物イオンとして存在していることが確認されている^{17, 18)}。生じたポリ硫化物イオンを再度硫化水素へと還元することが可能となれば、本反応は硫黄原子を媒介する形で、水から水素を生成するシステムとして確立することになる。そこで、ポリ硫化物イオンを硫化水素へと還元する手法として、硫酸還元細菌の利用が検討され、硫酸還元条件下で集積培養された微生物によるポリ硫化物還元が確認された¹⁹⁾。

一方、下水処理場においては、余剰汚泥減容化およびバイオガス回収のために消化プロセスを有している場合がある。消化槽では、嫌気性細菌群集によって有機物分解がなされ、最終的にメタン生成菌によってメタンおよび二酸化炭素へと変換されている。しかしながら、このような嫌気性細菌群集には硫酸還元細菌も含まれており、硫酸イオンが硫化水素へと変換されるため、脱硫プロセスにより硫酸や元素状硫黄として回収されている^{20, 21)}。

*2009年5月7日受付 2009年12月1日受理

1. 普通会員 環境科学博士 東北大学大学院環境科学研究科 リサーチフェロー

2. 東北大学大学院環境科学研究科 大学院生

(現 エヌ・ティ・ティ・コムウェア株式会社)

3. 普通会員 工学博士 東北大学大学院環境科学研究科 准教授

4. 普通会員 農学博士 東北大学大学院環境科学研究科 教授

[著者連絡先] FAX: 022-795-7402

E-mail: yuta@er.kankyo.tohoku.ac.jp

キーワード: 硫酸還元細菌, 硫化水素, 硫黄化合物, 異化的硫酸還元, 系統分類

そこで本研究では、下水処理場における硫化水素生成に関与する硫酸還元細菌について詳細な検討を行うため、下水汚泥中より硫酸還元細菌を単離し、その特性評価および系統分類の解析*を実施した。

2. 実験方法

2・1 使用した下水汚泥

本研究で用いた下水汚泥は、2005年10月14日に仙台市の南蒲生浄化センターにて採取した。採取した汚泥は、好気処理プロセスにおける生物処理後に排出される活性汚泥で、脱水前の液状のものであった。採取の際には、なるべく酸素に触れないようにするため、ねじ式フタ付きのポリタンクに一杯まで汚泥を入れて密封し、研究室に持ち帰った。実験に使用する前に汚泥を遠心分離機により（約12,000×g〔重力加速度〕、10分間）、固体状の汚泥と上澄み液に分離した。分離した固体汚泥は50cm³遠心チューブに少量ずつ分けて入れ、微生物の活動を抑えるために-80℃の冷凍庫で保存した。得られた固体汚泥中の炭素を測定した結果、全炭素量は44%であった。そのうち無機態炭素は0.1%以下であり、ほとんどが有機態炭素として有機物の状態で存在していることが分かった。また、硫黄および硫黄化合物はほとんど含まれていなかった。一方の上澄み液は500cm³遠心ボトルに分けて入れ、3℃の冷蔵庫で保存した。培養実験の際には、その都度小分けにしたサンプルを冷蔵庫、冷凍庫から取り出して使用した。

2・2 培養方法

硫酸還元細菌の培養には硫酸還元細菌用基本培地を使用した。この培地は、硫酸還元細菌に汎用性の高いPostgate mediumを参考に作成したものであり、KH₂PO₄ 0.5 g, NH₄Cl 1.0 g, Na₂SO₄ 1.0 g, CaCl₂・2H₂O 0.1 g, MgSO₄・7H₂O 2.0 g, Yeast extract 1.0 g, Na-lactate (70%) 5.0 g, CH₃COONa・3H₂O 2.8 g, Na-thioglycolate 0.1 g, Na-ascorbate 0.1 g, FeSO₄・7H₂O 0.05 gを1 dm³中に含む^{1, 22)}。230cm³バイアルに硫酸還元細菌用基本培地を170cm³と固体汚泥10g（湿潤重量）を入れ、混合液とヘッドスペースに脱酸素したN₂ガスを通して嫌気状態にし、プチルゴム栓とアルミシールで密閉後、30℃で静置培養をした。本実験で使用する培地には、硫酸還元細菌の電子供与体となる物質として乳酸と酢酸が含まれており、完全酸化型および不完全酸化型の双方の菌種が生息可能なものである。培養の初期pHは、N₂による脱気後に1mol/dm³の水酸化ナトリウム溶液を用い、7.4となるように調整した。

2・3 硫化水素生成試験

硫化水素生成試験では、基本培地中に含まれるFeSO₄・7H₂Oを1/4量としたものを用いた。これは、生成した硫化水素が硫化鉄として沈殿することを避けるためである。実験方法は、前節で記載した培養方法と同様である。培養実験中は数十時間ごとに培養液を採取し、高速液体クロマトグラフ（HPLC：東ソー製）により発生硫化水素量を、pHメータ（Beckman社製）により培養液のpHの値を測定した¹⁹⁾。培養実験中のpH調整は、1mol/dm³の水酸化ナトリウム溶液を用いて行った。サンプリングにおけるpH測定値から、培養液pHが硫酸還元細菌の活動pHである7.2~7.6となるよう添加量を算出し、所定量の水酸化ナトリウム溶液を注射器で加えた。添加後は一度全体を攪拌し、再び培養液を採取してpHの値を確認した。HPLCのピーク面積と硫化水素濃度の検量線は、メチレンブルー吸光度法（JIS-K0101）にて定量された、既知濃度の硫化物イオン溶液を用いて作成した。得られた培養液中の硫化水素濃度より、ヘンリー則が成立していると仮定し、実験系中の総硫化水素量を求めた。HPLCによって得られた硫化水素濃度C[mmol/dm³]は、溶液中に存在する各化学種の総和であり、

(2) 式で表される。

$$C = [\text{H}_2\text{S}] + [\text{HS}^-] + [\text{S}^{2-}] \quad \dots\dots\dots (2)$$

溶液中の硫化水素H₂Sは次のように解離している。

$$K_1 = [\text{H}_2\text{S}] / ([\text{H}^+][\text{HS}^-]) = 10^{-7.02} \quad \dots\dots\dots (4)$$

$$K_2 = [\text{HS}^-] / ([\text{H}^+][\text{S}^{2-}]) = 10^{-13.9} \quad \dots\dots\dots (6)$$

よって、各化学種の濃度は平衡定数を用いて次のように表される。

$$[\text{H}_2\text{S}] = C[\text{H}^+]^2 / ([\text{H}^+]^2 + K_1[\text{H}^+] + K_1K_2) \quad \dots\dots\dots (7)$$

$$[\text{HS}^-] = CK_1[\text{H}^+] / ([\text{H}^+]^2 + K_1[\text{H}^+] + K_1K_2) \quad \dots\dots\dots (8)$$

$$[\text{S}^{2-}] = C K_1K_2 / ([\text{H}^+]^2 + K_1[\text{H}^+] + K_1K_2) \quad \dots\dots\dots (9)$$

30℃、分圧 = 101.3kPaにおけるヘンリー定数はH=1094[Pa・m³/mol]。ヘンリーの法則より気相中の硫化水素の分圧p(H₂S)[Pa]は、

$$p(\text{H}_2\text{S}) = H[\text{H}_2\text{S}] \quad \dots\dots\dots (10)$$

となる。

気相の体積をv_g[m³]とすると、気相中の硫化水素量n[mmol]は気体の状態方程式より得られる。

$$n = p(\text{H}_2\text{S}) v_g / (RT) \quad R = 8.31 [\text{Pa} \cdot \text{m}^3 / (\text{mol} \cdot \text{K})] \quad \dots\dots\dots (11)$$

よって、バイアル瓶中に存在する総硫化水素量C'[mmol]は培養液の体積をv_l[m³]とすると以下のように求められる。

$$C' = 1000 \times C v_l + n \times 1000 \quad \dots\dots\dots (12)$$

2・4 汚泥を用いた集積培養からの硫酸還元細菌の単離操作

本実験では寒天平板培地を作成し、培養後汚泥から硫酸還元細菌の単離を試みた。平板培地は、基本培地に培地用寒天を1.5%加えてオートクレーブ滅菌し、シャーレに流して固めたものである。滅菌蒸留水で段階的に希釈した集積培養液をプレート上に塗布し、酸素吸収・炭酸ガス発生剤（AnaeroPack・ケンキ：三菱ガス化学株式会社製）を入れた嫌気ジャー中にて1~2週間培養した。培養温度は30℃である。コロニー形成後、形状・色・大きさなどの特徴別に釣菌し、液体培地に移して硫酸還元活性の有無を確認した。この操作を数回繰り返すことによって硫酸還元細菌単離株を得た。なお、ここで使用した器具、蒸留水はオートクレーブ滅菌を行い、液体培養操作はクリーンベンチ内で、固体培養操作はN₂ガスを通したグローブボックス内で行った。

2・5 単離株による硫化水素生成および基質利用性

硫化水素生成試験については、2.2と同様である。単離株の基質利用性について、電子供与体（有機酸等）*および電子受容体（硫黄化合物）*の利用性について検討した。電子供与体としては、乳酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、エタノール、フマル酸ナトリウムについて利用実験を行った。一方、電子受容体としては、硫酸イオンの他、亜硫酸イオンおよびチオ硫酸イオンを用いた。電子供与体の利用性実験では、標準培地中の乳酸ナトリウムおよび酢酸ナトリウムを除き、そこに検討対象となる1種類のみの電子供与体を添加した。電子供与体の添加量は、培地に含まれる硫酸イオン約15 mmol/dm³に対し水素量が120 mmol/dm³となるよう

Fig.1 Hydrogen sulfide production by activated sludge with pH control at 7.3.

に添加した。一方、電子受容体利用性実験では、標準培地中にある硫酸塩をすべて塩化物塩に置き換え、硫黄化合物（電子受容体） 15 mmol/dm^3 を添加した。培養方法は、上述と同様であり、硫化鉄沈殿形成の有無によって活性を確認した。

2・6 単離株の16S rRNA遺伝子*解析

単離株からの遺伝子抽出は、遠心分離により得られた細菌細胞のペレットを数回、凍結融解を施した後に、Proteinase K（タカラバイオ株式会社）を用いて細胞を溶かすことによって行った。Proteinase K (20 mg/cm^3)、 10 mm^3 とTTNEバッファ 50 mm^3 をペレットに加え、攪拌した。TTNEバッファは、 40 mM Tris-HCl (pH8.0)、 0.2 mM EDTA、 $1\%[\text{v/v}]$ Tween20、 $0.2\%[\text{v/v}]$ Nonidet P-40を混合したものである。その後 60°C のインキュベータ内で30分間反応させたのち、 95°C のオープン内で10分間保温する。反応後は 4°C 、 $15340 \times \text{g}$ で5分間遠心分離し、上澄みに溶解したDNAを回収した。得られたDNA試料の一部を蒸留水で希釈し、 260 nm の吸光度から濃度を計算した。

PCR*は、サーマルサイクラー (GeneAmp® PCR System 9700 : アプライドバイオシステムズ社製)で行った。PCR酵素はPrimeStar HS (タカラバイオ株式会社製)を用い、反応条件はメーカープロトコルに従った。

本研究では、真正細菌の16S rRNA遺伝子および硫酸還元細菌が保有する異化的亜硫酸還元酵素*をコードするdsr遺伝子*をPCRにより増幅した。真正細菌の16S rRNA遺伝子の増幅用には、ユニバーサルプライマーであるEu 10F (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3')およびEu 1400R (5' - ACGGGCGGTGTGTACAAG - 3')を使用した。ユニバーサルプライマーは、Gene Bankに登録されている真正細菌の16S rDNAのデータベースに基づき、種に依存しない塩基配列の共通保存領域から選択されたものである²³⁾。dsr遺伝子の増幅には、DSR 1F (5' - ACSCACTGGAAGCAGC - 3')およびDSR 4R (5' - GAAGAASATGWACGGGTT - 3')を使用した。これらのプライマーは*Desulfovibrio vulgaris*のdsr遺伝子配列より得られたものであり、多様な硫酸還元細菌からのdsr遺伝子増幅に汎用性が高いとの報告がなされている²⁴⁻²⁶⁾。PCR反応後、対象遺伝子の増幅を電気泳動によって確認し、得られたPCR産物はGenElute Mammalian Total DNA Miniprep Kit (SIGMA社製)を使って精製した。このPCR産物を鋳型*とし、シーケンサー (DNA Sequencer 3130, アプライドバイオシステムズ社製)により塩基配列を決定した。シーケンス方法は、メーカープロトコルに従った。

得られた各塩基配列は、BLAST解析*によってGenBank/

DDBJ/EMBLのデータベースと照合した。また、Clustal W*を用いて系統解析を行った。

本実験で得られた塩基配列は、単離株G2の16S rRNA遺伝子 (accession number: AB495405) およびG3の16S rRNA遺伝子 (AB495406)、単離株G3のdsr遺伝子 (AB495407)としてGenBankのデータベースに登録された。

3. 実験結果および考察

3・1 下水処理場汚泥による硫化水素生成

所定量の下水処理場汚泥を培地に加え、汚泥中に存在する硫酸還元細菌による硫化水素生成実験を行った。培地の初期pHは7.4に調整していたが、培養実験を通じて徐々に低下し、最終的に約pH5となった。硫酸還元細菌の増殖に適pHは7.2～7.6であり、このpH条件では硫酸還元細菌の活動は抑制されると考えられる^{1,4)}。実際、黒色の硫化鉄沈殿が形成したことにより硫化水素生成は認められたものの、測定可能な濃度には至っていなかった。そのため、pH調整を随時行い、硫酸還元細菌の増殖に適pHを維持したうえで、硫化水素生成実験を行った。なお、このpHの低下は、汚泥中に生息している酸生成細菌の活動による有機酸の生成によるものであると考えられる^{27,28)}。

pH調整を行った場合における硫化水素生成挙動をFig. 1に示す。本実験において、培養液のpHは実験期間を通じてほぼ7.3となっていた。実験系内において生成された硫化水素は培養開始約120時間経った頃から検出され始め、開始から約220時間で約6 mMまで達し、その後安定した。これは自らの活動によって生成された硫化水素によって硫酸還元細菌自体が増殖や硫酸還元活性の阻害を受けているためだと考えられる²⁹⁻³¹⁾。本実験の結果より、培地中に含まれる硫酸量 (約15 mM)の約40%が硫化水素へと還元され、硫化水素生成速度は $0.052 \text{ mmol/dm}^3/\text{h}$ であった。本結果より、使用した下水処理汚泥中に硫酸還元細菌の存在が確認できた。

3・2 下水処理汚泥からの硫酸還元細菌の単離および特性評価

下水汚泥を培養した培養液より単離操作を行った結果、計2種の硫酸還元細菌が単離できた。これらをG2およびG3株と名付けた。これらのコロニーは白色かつ円形をしていた。コロニーの周りは発生した硫化水素と培地中の鉄イオンとの反応によって形成される硫化鉄沈殿によって黒く変色しており、液体培養へ移す前に硫酸還元活性をもっていることを確認することができた。これらの菌株は、光学顕微鏡による観察の結果、大きさが $0.7\text{--}1 \mu\text{m}$ 程度のビブリオ形状をしており、また、ともにグラム陰性細菌であった。Table 1に各菌株の特徴をまとめて示す。

各菌株における硫化水素生成実験を行ったところ、菌株による個体差はほぼなく、これらは同等の硫化水素生成能力を持つことが示された (Fig. 2)。単離株を用いた培養実験では、硫化水素生成までに要した時間は約50時間であり、汚泥を用いた培養と比較して短時間であった。硫化水素生成時における硫化水素生成速度は、G2株で $0.39 \text{ mmol/dm}^3/\text{h}$ 、G3株で $0.41 \text{ mmol/dm}^3/\text{h}$ であった。硫酸還元率については、約83%の硫酸を硫化水素へと還元していることが分かった。この値は汚泥培養時の硫酸還元率と比較すると飛躍的に高い数値である。汚泥中には硫酸還元細菌以外にさまざまな細菌が存在しており、細菌間における基質利用の競合が想定される。したがって硫酸還元細菌が利用可能な基質が減少し、硫化水素生成までに時間を要するとともに生成速度および生成量が小さくなると考えられる。

一方、光触媒を用いた硫化水素からの水素生成と微生物による硫化水素供給を組み合わせると、一般的に家庭100軒分の電力を供

Table 1 Characteristics of isolates of this study and the relatives.

Isolate	G2	G3	<i>Desulfovibrio carbinoliphilus</i> DSM 17524	<i>Desulfovibrio fructosovorans</i> DSM 3604
Source	Activated sludge		Gas condensate-contaminated aquifer	estuarine sediment
Cell shape (size)	vibrio (0.4-0.6×0.6-1.0μm)	vibrio (0.4-0.6×0.6-1.0μm)	curved rod (0.6-0.7×2.4-3.0 μm)	curved rod (0.5-0.7×2.0-4.0 μm)
Closest species (homology)	<i>Desulfovibrio carbinoliphilus</i> DSM 17524 (96.6 %)	<i>Desulfovibrio carbinoliphilus</i> DSM 17524 (96.6 %)	<i>Desulfovibrio carbinoliphilus</i> DSM 17524 (96.6 %)	<i>Desulfovibrio carbinoliphilus</i> DSM 17524 (95.6 %)
Electron acceptor				
sulfate	+	+	+	+
sulfite	+	+	+	+
thiosulfate	+	+	+	+
elemental sulfur	ND	ND	-	+
Electron donor				
acetate	+	+	-	-
lactate	+	+	+	+
pyruvate	-	-	+	+
fumalate	+	+	-	+
ethanol	+	+	+	ND
fructose	ND	ND	-	+

給することを想定した場合において、要求される硫化水素生成速度は、ポリ硫化物を発酵物質した場合に、 7.8×10^{-13} mol/ (cell-h) とされる¹⁹⁾。本研究における単離株による硫酸イオンからの硫化水素生成速度は、細菌数が 1×10^7 cells/cm³ とすると 1 桁小さいものとなるが、十分に対応可能であると考えられる。

単離株の基質利用性を Table 1 に示す。G2 株および G3 株とも電子供与体として乳酸、酢酸、エタノールおよびフマル酸を利用できることがわかった。酢酸を利用できることから、これらの菌株は完全酸化型の細菌であることが示された。ただし、G2 株の酢酸利用性は、若干ではあるが G3 株と比べて小さいことも示された。一方、電子受容体の利用性については、両株とも硫酸、亜硫酸およびチオ硫酸を利用することが示された。

3・3 単離株の同定および系統解析

単離株 G2 株および G3 株の 16S rRNA 遺伝子配列のほぼ全長について遺伝子配列を決定した。その配列に対し、DDBJ データベース上に登録されているデータとの相同性解析を行った。その結果、単離株 G2 株および G3 株の 16S rRNA 遺伝子は、互いの相同性が 98.0 % となった。Table 1 に示したように、両者は細胞形態および基質利用性なども似通っていることから、ほぼ同一種の細菌であると推定できる。また、最近縁種は、どちらの単離株についても *Desulfovibrio carbinoliphilus* (DSM 17524^T) となり、その相同性は 96.6 % であった。16S rRNA 遺伝子による細菌の同定に関して、その相同性が 97% 以上では、同属同種、95% 以上では同属とされる³²⁻³⁴⁾。Fig. 3 に示す δ -proteobacteria に属する硫酸還元細菌を中心に描いた系統中においても、単離株 G2 および G3 株は、*Desulfovibrio* 属の細菌中に位置している。さらに最近縁種である *Desulfovibrio carbinoliphilus* (DSM 17524^T) は、2008 年にメタン生成細菌と共生する培養系から単離された新しい細菌であり、様々なアルコール類を電子供与体として利用できる不完全型の硫酸還元細菌である³⁵⁾。Table 1 に示すように本研究の単離株は酢酸利用性を示しており、完全酸化型の硫酸還元細菌である

Fig.2 Hydrogen sulfide production by strain G2 and G3 with pH control at 7.3.

と考えられ、その特性からも別種であることがわかる。これらのことから、本研究における単離株 G2 および G3 株は、同一の細菌であり、*Desulfovibrio* 属の硫酸還元細菌であると推定される。以上より、単離株を *Desulfovibrio*. sp と同定する。

Fig. 3 より単離株 G2 および G3 株は最近縁種と異なるブランチに位置している。これは、現在認知されているいかなる細菌とも系統的には異なることを示しており、本単離株が新種である可能性を示している。新種であることを示すためには、今後より詳細な検討が不可欠である。

3・4 単離株の *dsr* 遺伝子解析

本研究では、遺伝子解析として 16S rRNA 遺伝子のほかに異化的硫酸還元を司る機能遺伝子である *dsr* 遺伝子についても解析を行った。PCR により単離株 G2 および G3 株の *dsr* 遺伝子の増幅を試みたが、G3 株からのみ増幅が確認された。そこで、得られた G3 株の *dsr* 遺伝子について、16S rRNA 遺伝子の場合と同様に解析を行った。結果を Fig. 4 に示す。

Fig. 4 より、単離株 G3 の *dsr* 遺伝子は、*Desulfovibrio* 属の中に位置し、Fig. 3 で示した 16S rRNA 遺伝子による系統解析と同様であることがわかる。G3 株の *dsr* 遺伝子と最も高い相同性を有するのは、*Desulfovibrio fructosovorans* (DSM 3604^T) の *dsr* 遺伝子であり、その相同性は 92.7 % であった。しかしながら、Fig. 3 に示す 16S rRNA 遺伝子による系統解析では、両者の相同性は 95.5 % であり、異なるブランチに分岐されている。両菌株は、遺伝子的に非常に近い菌株ではあるが、進化系統的には異なることが示されている。また、*dsr* 遺伝子は硫酸還元細菌種間において水平伝搬が行われていることが知られており、*dsr* 遺伝子による系統解析は、16S rRNA 遺伝子による場合とは異なることがある^{25, 36-39)}。

Desulfovibrio fructosovorans (DSM 3604^T) は河口付近の堆積物中から単離された細菌であり、フルクトースを電子供与体として利用できる不完全酸化細菌である⁴⁰⁾。本単離株は完全酸化型であり、その機能は全く異なっている。すなわち、単離株 G3 株はほぼ *Desulfovibrio* 属の中に分類される結果となり、*Desulfovibrio* sp. と同定されるものの、これまで知られていない未知の硫酸還元細菌であると推測される。

4. 結 論

南蒲生浄化センターより採取された下水汚泥中に硫酸還元細菌が生息していることが確認され、硫酸還元細菌用基本培地を用い

Fig.3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence analysis. Branch length is proportional to the number of bases. The number at the branch nodes indicates bootstrap confidence values (%) based on 1000 replicates. The scale bar denotes 0.1 base changes per nucleotide position.

Fig.4 Phylogenetic tree based on dsr gene sequence analysis. Branch length is proportional to the number of bases. The number at the branch nodes indicates bootstrap confidence values (%) based on 1000 replicates. The scale bar denotes 0.1 base changes per nucleotide position.

て嫌氣的に培養することによって硫化水素を発生させることができた。

培養後の汚泥から2株の硫酸還元細菌を単離することができた。それらの細菌はいずれも高い硫酸還元能力を示し、基質の利用性においても様々な物質を利用することが可能なことが分かった。これらの電子供与体利用性より、単離株が完全酸化型の硫酸還元細菌であることが確認された。16S rRNA 遺伝子より、単離株は *Desulfovibrio* 属に属することが示唆され、*Desulfovibrio* sp. と同定された。しかしながら、最近縁種である *Desulfovibrio carbinolophilus* (DSM 17524^T) との 16S rRNA 遺伝子の相同性が 96.6% であること、系統中におけるブランチが異なることなどから別種の細菌であり、これまでに認められていない新種であると推定される。さらに G3 株については異化的硫酸還元を司る機能遺伝子である *dsr* 遺伝子についても解析を行い、*Desulfovibrio fructosovorans* (DSM 3604^T) の *dsr* 遺伝子との相同性が最も高いことがわかった。しかしながら、これらの最近縁種とは 16S rRNA 遺伝子配列および硫酸還元型も異なることから別種であることが示され、本研究で得られた単離株は未知の硫酸還元細菌である可能性が高いと言える。

謝辞 活性汚泥試料を提供していただいた仙台市南蒲生浄化センターの職員各位に感謝する。また、本研究の一部は平成 15 - 17 年度環境省廃棄物処理等科学研究補助金 (K1747) によって行われた。ここに謝意を表する。

〈用 語 集〉

系統分類の解析：

系統分類とは、生物を系統関係（進化的道筋）と表現型（形態、生理特性など遺伝によって子孫に伝達される性質）の類似性との両方に基づく分類。系統樹で表すことができ、枝分かれは系統（進化）の分岐を示し、枝の長さは進化の程度や時間経過を表す。基本的には類似した表現型を有する生物群が同じ分岐に属する。

電子供与体 / 受容体：

生体酸化還元反応において電子伝達系 ** のように、電子が酸化還元電位の低い成分から高い成分へ渡される場合、前者を電子供与体、後者を電子受容体という。

**** 電子伝達系：**細胞内異化過程において、種々の脱水素反応によって生じた水素は、プロトンと電子に分けられる ($H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$)。このうち電子が一連の酸化還元物質に順次渡され、最終的に分子状酸素（好気呼吸）あるいは硝酸などの無機イオンを還元する系。硫酸還元細菌の場合、有機物の酸化あるいは水素を電子供与体として硫酸イオンを還元する。

16S rRNA 遺伝子：

rRNA は、リボソーム ** を構成する RNA であり、バクテリアでは、大きさによって 23S, 16S, 5S rRNA に分類される。rRNA はウィルスを除く全生物に存在し、タンパク質合成に関わる重要な分子であるため、進化速度が比較的遅く、種のレ

ベルにおいて高い相同性を示すことが知られている。バクテリアの系統分類には、約 1500 塩基の 16S rRNA 配列が用いられている。基準株と 97%以上の相同性があれば類縁関係があり、99%以上であれば同種である可能性が高い。

現在では 10000 以上の 16S rRNA 配列が決定され、日本 DNA データバンク (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) や GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) などの公的な遺伝子バンクに登録され利用されている。なお、登録された配列データはすべてアクセッションナンバーを持ち、公開されている。

**** リボソーム** : あらゆる生物の細胞中に存在する、遺伝情報に基づいたタンパク質合成に関わる構造体。RNA とタンパク質で構成される。

PCR :

Polymerase Chain Reaction の略。DNA を増幅する方法の一つ。

2 本鎖 DNA は、水溶液中で高温になると 1 本鎖 DNA に分かれる (変性)。1 本鎖 DNA となった溶液を冷却していくと、相補的 ** な DNA が互いに結合し再び 2 本鎖となる (アニーリング)。この性質を利用し PCR 法では、増幅対象の DNA (鋳型、テンプレート)、DNA 合成酵素 (DNA ポリメラーゼ) および増幅部分の両端に相補的な DNA 断片 (プライマー) と呼ばれるオリゴヌクレオチドを予め混合し、温度を変化させることで、人為的に特定の DNA 領域を増幅する。

**** 相補的** : DNA は A(Adenine), T(Thymine), C(Cytosine), G(Guanine) の 4 塩基で構成される。塩基の相補性とは、A, T, G, C の 4 種のうち、1 種を決めればそれと水素結合で結ばれるもう 1 種も決まる性質である。これは塩基によって水素結合の数が異なるためであり A-T, C-G 間でのみ、水素結合が生じる。

異化 :

外部の有機物あるいは無機物を分解し、エネルギーを得る代謝。

亜硫酸還元酵素 :

亜硫酸イオンを硫化物イオンに還元する反応に関与する酵素。

dsr 遺伝子 :

異化的硫酸還元酵素 (Dissimilatory sulfite reductase : DSR) をコードする (酵素やタンパク質の遺伝情報を保持している) 遺伝子。硫酸還元細菌は DSR 酵素によって硫化水素を生成するため、必ず dsr 遺伝子を有している。

鋳型 :

テンプレート。核酸や蛋白などの高分子物質の生合成に際して、その物質の一次構造を決定するために必要なもの。PCR では、鋳型 DNA の配列に相補的な DNA が合成される。

BLAST 解析 :

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) は、DNA の塩基配列あるいはタンパク質のアミノ酸配列の類似配列の検索を行うためのアルゴリズム、またそのアルゴリズムを実装したプログラムをいう。ある塩基配列について、BLAST を用いデータベースを検索することにより、特定の閾値以上のスコアで類似する配列群を発見することが可能である。

Clustal W :

複数の塩基配列やアミノ酸配列を、可能な限り一致するように並べる (マルチプルアライメント) ツール。配列一致度を距離尺度に用いたクラスタリングを行い、系統樹を作成できる。

References

- 1) L. L. Barton. *Sulfate-Reducing Bacteria*, (Plenum Press, New York and London. 1995),
- 2) D. E. Canfield, E. Kristensen and B. Thamdrup: *Adv. mar. biol.*, **48** (2005), 314-381.
- 3) D. E. Canfield and R. Raiswell: *Am. J. Sci.*, **299** (1999), 697-723.
- 4) R. Rabus, T. A. Hansen and F. Widdel: Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes *In* M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (ed.), *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*, 3 ed., vol. 2. (Springer, New York, 2006), pp. 659-768.
- 5) W. Badziong and R. K. Thauer: *Arch. Microbiol.*, **125** (1980), 167-174.
- 6) A. Brandis and R. K. Thauer: *J. Gen. Microbiol.*, **126** (1981), 249-252.
- 7) F. Widdel and N. Pfennig: *Arch. Microbiol.*, **131** (1982), 360-365.
- 8) F. Bak and F. Widdel: *Arch. Microbiol.*, **146** (1986), 177-180.
- 9) K. Brysch, C. Schneider, G. Fuchs and F. Widdel: *Arch. Microbiol.*, **148** (1987), 264-274.
- 10) S. Daumas, R. Cord-Ruwisch and J. L. Garcia: *Antonie van Leeuwenhoek*, **54** (1988), 165-178.
- 11) H. Cypionka: *Methods. Enzymol.*, **243** (1994), 3-14.
- 12) D. R. Lovley, J. D. Coates, J. C. Woodward and E. J. P. Phillips: *Appl. Environ. Microbiol.*, **64** (1995), 953-958.
- 13) H. R. Baller, A. M. Spormann, P. K. Shirma, J. R. Cole and M. Reinhard: *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** (1996), 1188-1196.
- 14) R. Boopathy, C. F. Lulpa and J. Manning: *Bioresour. technol.*, **63** (1998), 81-89.
- 15) U. J. Ndon, A. A. Randall and T. Z. Khouri: *Environmental monitoring and assessment*, **60** (2000), 329-336.
- 16) T. Arai, S. Senda, Y. Sato, H. Takahashi, K. Shinoda, B. Jeyadevan and K. Tohji: *Chem. Mater.*, **20** (2008), 1997-2000.
- 17) T. S. Dzhabiev and B. B. Tarasov: *J. Photochem. Photobiol. A*, **79** (1993), 23-27.
- 18) K. Hara, K. Sayama and H. Arakawa: *J. Photochem. Photobiol. A*, **128** (1999), 27-31.
- 19) Y. Takahashi, K. Suto, C. Inoue and T. Chida: *J. Biosci. Bioeng.*, **106** (2008), 219-225.
- 20) L. Raskin, B. E. Rittmann and D. A. Stahl: *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** (1996), 3847-3857.
- 21) K. Ingvorsen, M. Y. de Nielsen and C. Joulain: *FEMS Microbiol. Ecol.*, **46** (2003), 129-137.
- 22) F. Widdel and F. Bak: Gram-Negative Mesophilic Sulfate-Reducing Bacteria, *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Herder, and K. H. Schleifer (ed.), *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria, Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, 2ed. (Springer, New York, 1992), pp. 18010-1839.
- 23) W. G. Weisburg, S. M. Barns, D. A. Pelletier and D. J. Lane: *J. Bacteriol.*, **173** (1991), 697-703.
- 24) R. R. Karkhoff-Schweizer, D. P. W. Huber and G. Voordouw: *Appl. Environ. Microbiol.*, **61** (1995), 290-296.
- 25) M. Wagner, A. J. Roger, J. L. Flax, G. A. Brusseau and D. A. Stahl: *J. Bacteriol.*, **180** (1998), 2975-2982.
- 26) Ø. Larsen, T. Lien and N.-K. Birkeland: *Extremophiles*, **3** (1999), 63-70.
- 27) S. Jiang, Y. G. Chen, Q. Zhou and G. W. Gu: *Water Research*, **41** (2007), 3112-3120.
- 28) S. Danesh and J. A. Oleszkiewicz: *Water Environ. Res.*, **69** (1997), 1106-1111.
- 29) M. A. M. Reis, J. S. Almeida, P. C. Lemos and M. J. T. Carrondo: *Biotechnol. Bioeng.*, **40** (1992), 593.
- 30) S. Okabe, P. H. Nielsen, W. L. Jones and W. G. Characklis: *Water research*, **29** (1995), 571-578.
- 31) S. Okabe, P. H. Nielsen and W. G. Characklis: *Biotechnol. Bioeng.*, **40** (1992), 725-734.
- 32) C. R. Woese: *Microbiological review*, **51** (1987), 221-271.
- 33) G. J. Olsen, C. R. Wpese and R. Overbeek: *J. Bacteriol.*, **176** (1994), 1-6.
- 34) E. Stackebrandt and B. M. Goebel: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44** (1994), 846-849.
- 35) T. D. Allen, P. F. Kraus, P. A. Lawson, G. R. Drake, D. L. Balkwill and R. S. Tanner: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **58** (2008), 1313-1317.
- 36) W. M. Hipp, A. S. Pott, N. Thum-Schmitz, I. Faath, C. Dahl and G. H. Trüper: *Microbiology*, **143** (1997), 2891-2902.
- 37) M. Klein, M. K. Freidrich, A. J. Roger, P. Hugenholtz, S. Fichbain, H. Abicht, L. L. Blackall, D. A. Stahl and M. Wagner: *J. Bacteriol.*, **183** (2001), 6028-6035.
- 38) A. Dhillion, S. Goswami, M. Riley, A. Teske and M. Sogin: *Astrobiology*, **5** (2005), 18-29.
- 39) V. Zverlov, M. Klein, S. Luckner, M. W. Friedrich, J. Kellermann, D. A. Stahl, A. Loy and M. Wagner: *J. Bacteriol.*, **187** (2005), 2203-2208.
- 40) B. Olivier, R. Cordruwisch, E. C. Hatchikian and J. L. Garcia: *Arch. Microbiol.*, **149** (1988), 447-450.