

VII-78

FISH 法による好気性生物膜内の硫酸塩還元細菌の存在形態

北海道大学大学院 学 大西 徳子 学 伊藤 司
北海道大学大学院 正 岡部 聡 正 渡辺 義公

1. はじめに

下水処理プロセスにおいて、炭素(C)、窒素(N)、リン(P)に関する研究は多くの研究者によって行われてきたが、硫黄(S)に関する研究事例は少ない。下水中には比較的多くの硫黄化合物が含まれており、様々に形態を変化させながら循環していると考えられる。例えば好気性生物膜内でも膜厚の増加に伴って膜深部は嫌気化し、硫酸塩還元反応が生じると考えられる。硫酸塩還元によって発生した H_2S は、化学的及び生物学的に硫酸塩まで再酸化される、いわゆる“硫黄の内部循環”が存在するため、反応器内の硫酸塩及び硫化水素の物質収支のみでは好気性生物膜内の硫酸塩還元反応は把握できない。そこで本研究では、16S rRNA 標的蛍光 DNA プローブを用いた Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) 法、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡 (CSLM) 等を併用し、好気性生物膜内における硫黄循環において重要な役割を担う硫酸塩還元細菌(SRB)の存在形態を解析した結果について報告する。

2. 実験方法

本研究では、札幌市創成川下水処理場に設置したベンチスケールの半没型回転円板装置に最初沈殿池流出水を入れ、生物膜を馴養した。リアクターの流入、流出水の水質を定期的に測定し、定常状態に達した生物膜を用いて以下の実験を行った。

(1) 下水組成から見た SRB 優占種の推定実験：流入下水を密閉したバイアル瓶(130mL)に入れ、SRB の活性を阻害するモリブデン酸ナトリウムを最終濃度が 20mM になるように添加した系と添加しない系を作成し嫌気的条件下で培養した。両系における有機酸の蓄積を比較することにより SRB の優占種の推定を行った。

(2) FISH 法による SRB の生態学的構造解析：生物膜の構造を崩さないように、円板から抜き取り直ちに 4%パラフォルムアルデヒド溶液で固定し、OCT-compound で包埋して凍結し、これをクライオミクロトームで支持体に対して垂直及び水平方向にスライスしてスライドガラス上に貼り付けた。これに対し EUB338、SRB385、SRB385Db、SRB の属別に (*Desulfobacter*, *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacterium*) 特異的な 4 種類のプローブを用いて FISH 法を行った。ハイブリダイゼーションの条件・方法は、AMANN ら¹⁾の方法に従った。ハイブリダイズした試料を共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡(CLSM)を用いて観察した。

(3) 膜深さ方向の SRB 分布の測定：生物膜を実験②と同様に底層から表層へ5層に分けてクライオセクションし、各層ごとにホモジナイズした。これをスライドガラス上にスポットし、SRB に特異的な SRB385、SRB385Db の2種類のプローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、プローブにより染色された SRB が占める面積と、全バイオマスの面積との比を各層ごとに画像解析により求めた。

3. 結果と考察

生物膜が定常状態に達したときの流入水、流出水の水質分析結果の平均を表1に示す。DO は反応槽内では $5.0 \pm 1.5 \text{ mg/L}$ であり、95%以上の流入 NH_4^+-N は硝酸塩まで酸化されていた。このような好気的条件下で、流出 SO_4^{2-} 濃度は流入より平均で 2.7 mg-S/L 増加していた。この理由として、主に下水中の有機硫黄化合物が分解され H_2S となり、これが SO_4^{2-} まで再び酸化されたためと考えられる。故に実際に生物膜内部で硫酸塩還元反応が起こっていると予想されるが、硫黄の物質収支のみからは確認できなかった。

Keywords: 硫酸塩還元細菌、好気性生物膜、硫黄循環、FISH

連絡先: 060-0813 札幌市北区北13条西8丁目北海道大学大学院工学研究科

表1 平均流入水・流出水水質

分析項目(mg/L)	流入	流出
DO	ND	5(1.5)
TOC	37(32)	20(26)
DOC	17(7.6)	8.4(4.2)
H_2S-S	0.1(0.39)	0.017(0.012)
$\text{SO}_4^{2-}-S$	7.2(2.7)	9.9(2.8)
NH_4^+-N	15(16)	0.75(1.4)
NO_2^--N	0(0)	0.56(1.2)
NO_3^--N	1.0(1.5)	22(14)

() の値は標準偏差を示す。

ND: 測定せず。

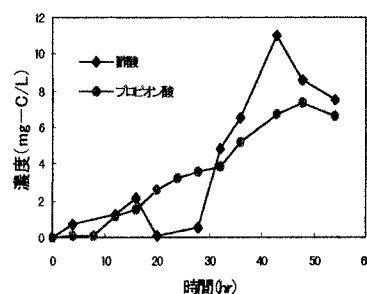


図1 SRBの活性を阻害した場合に蓄積した酢酸、プロピオン酸濃度

実験①において、モリブデン添加系及び無添加系内に蓄積した各種有機酸を測定した。その中で、蓄積が顕著であった酢酸とプロピオン酸について、モリブデン添加系の濃度から無添加系の濃度を差し引いた値をプロットした（図1）。両系の濃度差は培養開始直後から徐々に増加し、45時間後には酢酸で約11mg-C/L、プロピオン酸で7.0mg-C/Lに達した。モリブデン無添加系では培養開始より徐々に H_2S の生成が認められたのに対し、モリブデン添加系では全く H_2S の生成は認められなかったことより、これらの有機酸の蓄積はSRBの活性を阻害したこと起因する。この結果より、下水組成から推定される下水由来のSRB優占種は、主に酢酸酸化性もしくはプロピオン酸酸化性であると考えられる。次に、実験②の16S rRNA 蛍光 DNA プローブを用いたFISH法により、SRBの存在形態及びその空間的分布を解析した結果、図2に示すようにSRBは生物膜の全層にわたって密なクラスター（集塊）又はシングルセルの形態で存在していることが明らかとなった。クラスターを形成するSRBは小さな球菌であるのに対し、シングルセルで存在するSRBは比較的大きな桿菌であり、菌種が異っている様子が観察された（図3）。クラスターの大きさは直径5~30 μm と様々だが、硝化細菌のクラスターのように球形又は楕円形でなく、不均一な形状のものが多く見られた。SRB属に特異的な4種類のプローブを用いてハイブリダイズした結果、*Desulfobulbus*属に特異的なプローブに対してのみ膜全層にわたって良好なシグナルが得られた。プローブで染色された*Desulfobulbus*属の存在形態はSRB385で観察された形態と非常に類似していた。EUB338プローブとSRB385プローブを用いた2重染色を行った結果、EUB338プローブで染色された細菌が密に存在する場所ではSRBの菌数は少なく、シングルセルで分散して存在していた。一方、生物膜の間隙が大きい場所では、クラスターとしてバイオマス内部でなくバイオマスと液相の境界部分に存在する割合が多くなる傾向が認められた。これは、生物膜の間隙が大きいと基質を獲得し易い反面、溶存酸素による影響が大きいため、密なクラスターとして存在し、周囲を一般細菌で取り囲まれている場合は、分散又は小さなクラスターとして存在する方が基質獲得の面で有利となるためではないかと推察される。

生物膜深さ方向のSRB分布を定量的に評価するために、実験③において全バイオマス面積に対するSRBの面積比を膜深さ方向にプロットした結果、好気的な表層部においても存在比は約2~3%であり、膜深さ方向に増加し、嫌気的領域と考えられる底層では約18%であった。（図4）。しかし、①SRB385、SRB385Dbの両プローブはSRBのみに特異的ではなく他の細菌とも結合する²⁾こと、②CSLMの投影画像（z厚=20~40 μm ）より面積比を求めているため過大評価する可能性がある、など実際のSRBの存在比はより小さいと思われる。本実験ではより厳しいハイブリダイゼーション条件でハイブリを行い、非特異的ハイブリの可能性は低いこと、*Desulfobulbus*属に特異的なプローブでも同様の検出がなされたことを総合すると、好気性生物膜内においてプロピオン酸酸化性及び酢酸酸化のSRBが、プロピオン酸→酢酸→ CO_2 の有機物酸化経路にある程度関与していることが推測される。

4. 結論

本研究で得られた結果を以下に示す。

- (1) 好気性生物膜内にも絶対嫌気性細菌であるSRBは存在し、その優占種は酢酸酸化性もしくはプロピオン酸酸化性のSRBであることが推測された。
- (2) SRBはクラスター及びシングルセルの形態で膜深部に多く分布しているが、表層部にも存在することが示唆された。

【参考文献】

- 1) Rudolf, I. Amann, *Molecular Microbial Ecology Manual*. 3. 3. 6, 1-15
- 2) R. Rabus, M. Fukui, H. Wilkes and F. Widdel. (1996) *Applied and Environmental Microbiology* Oct. 1996, p. 3605-3613

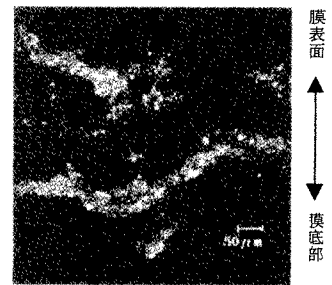


図2 SRB存在形態（垂直方向）

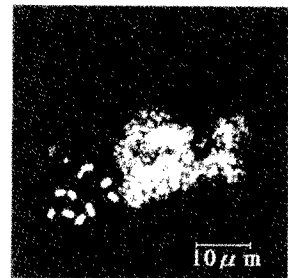


図3 SRB存在形態（拡大図）

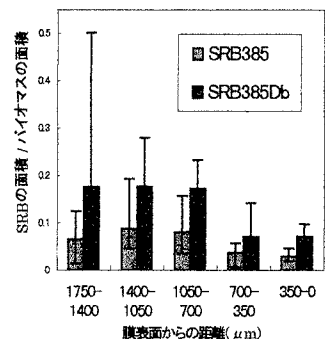


図4 膜深さ方向のSRB分布