

下水生物膜内における硫黄酸化細菌群集の解析

北海道大学大学院 学生会員 杉田 謙一 北海道大学大学院 伊藤 司
 北海道大学大学院 正会員 岡部 聡 北海道大学大学院 フェロー 渡辺 義公

1. 背景と目的

下水処理に用いられる生物膜や下水管渠内の付着生物膜内には、硫化水素 (H_2S) の生成および酸化反応による硫黄循環が存在する。硫酸塩還元反応によって生成された H_2S は、生物膜内に侵入した溶存酸素 (DO) や硝酸塩 (NO_3^-) により再び硫酸塩 (SO_4^{2-}) まで酸化される。この生物膜内の硫黄循環の重要性としては、(1) 硫酸塩還元反応によって有機物が除去される (2) H_2S 酸化により大量の DO が消費される (3) H_2S 自体が有毒性である (4) 下水処理施設および下水管渠において腐食や悪臭の原因となる、等が指摘されている。しかしながら、生物膜内の硫黄循環は、液本体中から把握することが困難であり、かつ、厚さわずか数 mm 程度の生物膜内で生じるために、その反応機構および関与する微生物について不明な点が多い。特に、生物学的な硫黄酸化反応は多岐の分類群にわたる細菌が関与すると考えられるために従来の培養法では解析が難しく、生物膜を直接解析できる FISH 法やクローン解析の適用が有効であると考えられる。そこで本研究では、生物膜リアクターの水質および硫黄酸化活性の測定に加え、16S rRNA 遺伝子に基づく微生物群集解析により、 H_2S の生物学的な酸化機構および関与する硫黄酸化細菌群集を明らかにすることを目的とした。

2. 実験概要

札幌市創成川下水処理場の最初沈殿池流出水を流入基質とする回転円板リアクターを用い生物膜を馴養した。 NO_3^- を添加することで、液本体を NO_3^- ; 約 $120 \mu\text{M}$, DO ; 約 $40 \mu\text{M}$ の好気的環境に保った。約 80 日間の生物膜の馴養期間、経日的にリアクター水質 (SO_4^{2-} , S^0) および生物膜内の硫黄化合物濃度 (S^0 (単体硫黄), AVS ($\text{H}_2\text{S}+\text{FeS}$), CRS (FeS_2)) を測定した。異なる電子受容体 (O_2 , NO_3^-) と電子供与体 (S^0 , H_2S) の組み合わせにより、馴養初期 (約 20 日目) と後期 (約 60 日目) の生物膜の硫黄酸化活性を回分培養により測定した。回分試験直後の各バイアル瓶中の培養液および馴養後期の生物膜について 16S rRNA 遺伝子のクローン解析を行った。試料から全 DNA を抽出した、*Bacteria* の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマー GM3F-GM4R を用い PCR 増幅とクローニングを行い、16S rRNA 遺伝子を分離し系統解析し近縁種を推定した。クローン解析の結果に基づいて ClustalW と Probe Check を用いた多重整列解析を行い、蛍光 DNA プローブを設計し、FISH 法により生物膜内 *in situ* で硫黄酸化細菌の検出を行った。

3. 結果と考察

図-1 にリアクター水質を示す。流入水中のほぼ一定の SO_4^{2-} 濃度 (約 $250 \mu\text{M}$) に対し、流出水中では実験開始から約 10 日目より SO_4^{2-} 濃度が徐々に減少した。約 40 日目には SO_4^{2-} 濃度が最小値 (約 $20 \mu\text{M}$) を示すと同時に、減少した SO_4^{2-} 濃度に相当する S^0 の蓄積が認められた。その後、 S^0 濃度は減少、一方 SO_4^{2-} 濃度は増加し、約 70 日目では流出水中の SO_4^{2-} 濃度は流入水中の濃度と同程度となり、水質からは硫酸塩還元および硫黄酸化反応は認められなかった。この間、生物膜内には硫黄化合物が徐々に蓄積していた。水質において最も SO_4^{2-} 濃度が減少していた 40 日前後に、膜内の S^0 濃度は急激に増加したが、その後、変化はゆるやかになった。一方、微小電極測定の結果から、馴養後期の生物膜内に高い硫酸塩還元活性および硫黄酸化活性が見られ内部硫黄循環が形成されていることが明らかであった⁽²⁾。回分培養による硫黄酸化活性試験の結果を表-1 に示す。馴養初期は H_2S 酸化活性が S^0 酸化活性に比べて高く、後期は S^0 酸化活性の方が H_2S 酸化活性より高かった。流出水中と生物膜内において S^0 が蓄積していた結果を考慮すると、生物膜内における H_2S の酸化は、初期には H_2S S^0 の反応が、後期は更に続いて S^0 SO_4^{2-} の反応が進行し H_2S S^0 SO_4^{2-} のように逐次反応が生じていることが推察された。

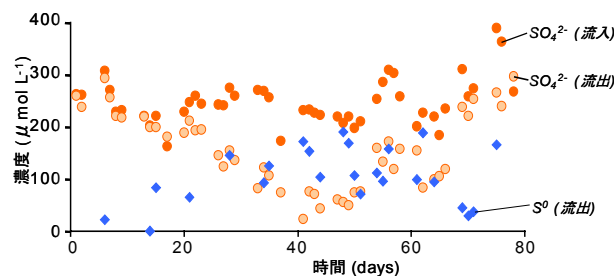


図-1 生物膜リアクターの水質

表-1 回分培養による生物膜の硫黄酸化活性

電子供与体 \ 電子受容体	初期生物膜		後期生物膜	
	NO_3^-	O_2	NO_3^-	O_2
S^0	0.9	3.2	2.8	9.2
H_2S	1.7	3.9	2.1	3.0

($\mu\text{mol cm}^{-3} \text{h}^{-1}$)

キーワード 硫黄循環、硫黄酸化細菌、腐食、生物膜、クローン解析、FISH 法

連絡先 〒060-8628 札幌市北区北 13 条西 8 丁目 Tel 011-706-6266 Fax 011-706-6266

硫酸化反応 ($H_2S \rightarrow S^0 \rightarrow SO_4^{2-}$) に関与する細菌を特定するために、馴養後期の生物膜について 16S rRNA 遺伝子のクローン解析を行った。図-2 に生物膜の細菌構成および解析したクローンの数に対して検出された属の数を累積した曲線を示す。解析した 102 のクローンは 35 属に分類され、系統学的にも広範囲に分布していた。また、その約半数を CFB 群や Gram-Positive Bacteria 群の嫌気性従属栄養性細菌が占めた。硫酸化細菌は、好気性従属栄養性で H_2S を付加的に酸化する *Thiothrix* (同源性 98%, 検出割合 1/102) のみが検出された。*Thiothrix* に特異的なプローブ G123T を用いた FISH 法により馴養後期の生物膜表面層部から幅 2-3 μm 長さ 100 μm 以上の糸状細菌が確認された。解析したクローンの数に対して検出された属の種類数はほぼ飽和しており、本条件での解析で検出可能な細菌はおよそ網羅されていると考えられることから、生物膜の直接の解析でこれ以上の硫酸化細菌の多様性を把握することは難しいと考えられた。そこで、各硫酸化反応 ($H_2S \rightarrow S^0, S^0 \rightarrow SO_4^{2-}$) に関与する細菌を特定するために、馴養初期と後期の生物膜を異なる電子受容体 (O_2, NO_3^-) と異なる電子供与体 (S^0, H_2S) の組み合わせで培養したそれぞれの系について 16S rRNA 遺伝子のクローン解析を行った。図-3 に各培養系の細菌構成の一部を示す。全ての系において CFB 群の細菌が約半数を占めたが、この群の細菌の生理生態から還元型硫黄ではなく菌体や細胞外代謝産物等の有機物を代謝していると考えられた。初期生物膜 $H_2S+NO_3^-$ 培養系と後期生物膜 S^0+O_2 培養系は、特に顕著な細菌構成となった。初期生物膜 $H_2S+NO_3^-$ 培養系では *Thiomicrospira denitrificans* (同源性 99%) が 11/33 の割合で、後期生物膜 S^0+O_2 培養系では *-Proteobacteria* 群の Uncultured eubacterium SRang2.5⁽³⁾ と 95% 相同なクローン so07 が 17/47 の割合で検出された。*Tms. denitrificans* は通性嫌気性独立栄養細菌であり、 NO_3^- を利用して H_2S を酸化し S^0 を細胞外に沈積すると考えられる。SRang2.5 は図-4 のように既知の細菌とは系統学的に離れた未同定のクローンである。その生理機能は未知であるが、*Thiobacillus* 属と比較的近縁であることや硫黄マットから検出されている⁽³⁾ ことから S^0 を酸化する可能性がある。SRang2.5 に特異的な蛍光 DNA プローブを多重整列解析により設計し、このプローブを用いた FISH 法を行った。その結果、 S^0+O_2 培養系から直径約 3 μm のクラスターが確認され、馴養後期の生物膜内でもほぼ同じ大きさのクラスターが確認された。

4 . 結論

生物膜リアクターの水質および硫酸化活性の測定、各培養系の硫酸化細菌群集の解析から、生物膜内の硫酸化反応は図-5 のように推察された。馴養期間を通じて *Tms. denitrificans* が H_2S から S^0 の反応 ($H_2S \rightarrow S^0$) に関与し、後期では更に続いて、SRang2.5 が生物膜内で生成し蓄積された S^0 から SO_4^{2-} への反応 ($S^0 \rightarrow SO_4^{2-}$) に関与すると考えられた。この現象を、生物膜内深さ方向の O_2, NO_3^-, S^0, H_2S 濃度分布を考慮し⁽¹⁾、空間的に考察すると、 H_2S は *Tms. denitrificans* が中層まで侵入した NO_3^- を利用して S^0 に酸化され ($H_2S \rightarrow S^0$)、蓄積した S^0 が表面層で SRang2.5 により O_2 を利用して SO_4^{2-} へ酸化されている ($S^0 \rightarrow SO_4^{2-}$) と考えられた。また、 H_2S や S^0 の酸化には *Thiothrix* の関与も考えられた。以上のように、生物膜内で生成した H_2S は S^0 を中間生成物として SO_4^{2-} まで酸化されていることが示唆された。

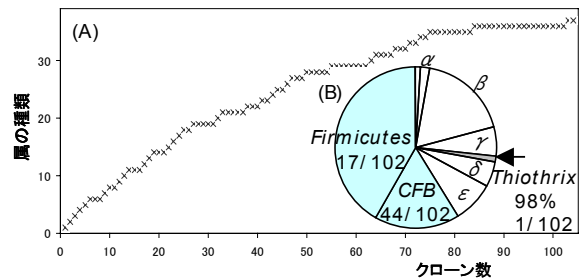


図-2 生物膜の細菌構成 (A) 生物膜内の細菌の種の多様性 (B) 102クローンの検出割合 CFBはCytophaga-Bacteroides群, はProteobacteira群の subgroup, x% は同源性, x/yは検出頻度

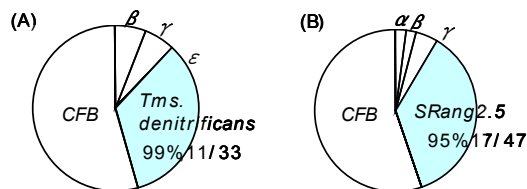


図-3 回分培養した生物膜の細菌構成 (A) 初期生物膜 $H_2S+NO_3^-$ 培養系の33クローンの検出割合 (B) 後期生物膜 S^0+O_2 培養系の47クローンの検出割合

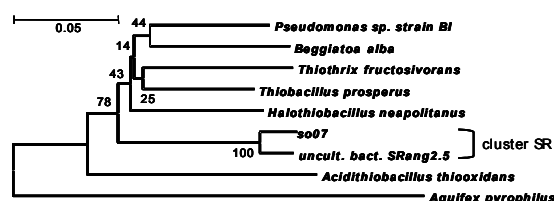


図-4 SRang2.5とso07および近縁な既知細菌との系統関係 数値はbootstrap値、横軸は進化距離 (0.05は約5%の塩基の相違)、*Aquifex pyrophilus*はout group

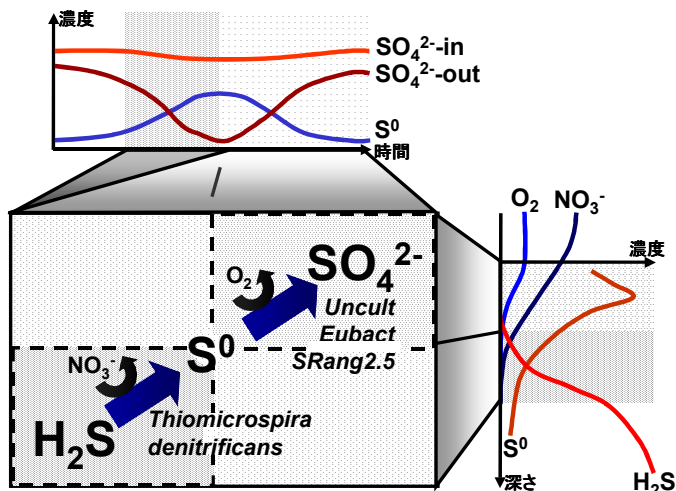


図-5 リアクター水質と生物膜内の O_2, NO_3^-, H_2S, S^0 濃度分布⁽²⁾ および予想された硫酸化反応機構と関与する硫酸化細菌の模式図

参考文献 : (1) Okabe et al. 1999. AEM. 65:5107-5116. (2) Ito et al. 2002. AEM. 68:1392-1402. (3) Angert et al. 1998. American Mineralogist. 83:1583-1592.