

コンクリート腐食に関する微生物群集の構造解析

北海道大学大学院 正 岡部 聡、小田切 光典、伊藤 司
 八戸工業大学 正 佐藤 久、エヌエス環境 小山田 浩之
 北海道大学大学院 フェロー 渡辺 義公

1. はじめに

我が国の下水道普及率は全国平均で60%を超え、現在では下水処理施設の維持管理が重要となってきた。下水道施設管理において下水管渠等のコンクリート腐食は極めて重要かつ早急な対策が要求される問題点である。特に微生物が関与するコンクリート腐食は進行が著しく早く、施設耐用年数を大幅に減少させるため大きな問題となっている¹⁾。コンクリート腐食現象は古くから知られており、その防止対策に関しても様々な研究がなされてきた。一般的に、嫌気条件で硫酸還元細菌により生成された硫化水素が気相中に放散し、下水管表面の結露水中で化学的または硫黄酸化細菌により生物学的に硫酸まで酸化され、コンクリート成分と反応し腐食を進行させると考えられている。コンクリート腐食の制御・防止対策を検討するためには、コンクリート腐食の直接的原因となる硫化水素の生成および酸化反応に関与する微生物群集を明らかにし、その反応機構の詳細を理解する必要がある。しかしながら、従来の培養に基づく方法では培養可能な細菌は全体の1割以下であるうえ、細菌の同定は困難であり、コンクリート腐食に関与する微生物群集構造とその機能に関しては未知の部分が多い。そこで本研究では、腐食が進行している下水道施設内に設置したモルタル供試体に付着した生物膜および石膏内の微生物群集構造を培養を介さない16S rRNA アプローチを用いて解析し、コンクリート下水管の腐食機構について検討を行った。さらに、付着生物膜内の硫酸還元および硫黄酸化反応については、O₂、H₂S、pH 微小電極を用いて定量的に解析した。解析結果は本講演会で別途発表する。

2. 実験方法

本研究では、青森県八戸市東部終末処理場の汚泥濃縮層上澄み返流管に接続されたマンホール内に、モルタル供試体(高さ48cm×4cm×4cm)を設置した。このマンホール内では1時間に45分間返流水の流入があり、水深は0センチから約30cmまで周期的に変動した。設置から約1ヵ月後にモルタル供試体に付着した底部生物膜(底から3cm;この部分は常時水面下に存在する)および水面付近生物膜(底から20cm;この部分は周期的に水中と気相中に曝される)からサンプルを採取した。また腐食部(底から30cm以上の腐食した部分;この部分は常に気相中にあるが水滴等により湿潤状態にある)に関しては設置から約6ヵ月後にサンプルを採取した。モルタル供試体の部位別サンプルからそれぞれ全DNAをFast DNA Spin Kit for Soil (BIO101)を用いて抽出し、全細菌をターゲットとしたプライマー(63f-1387r、Bac11f-Univ1492r)を用いてPCR増幅し、増幅断片を大腸菌にクローニングし、16S rDNAのほぼ全領域の塩基配列をABI 3100-Avantにより解析し、これに基づき系統解析を行った。また16S rDNAクローン解析に基づき、コンクリート腐食に関与していると考えられる硫黄酸化細菌および硫酸塩還元細菌の検出をFISH法(Fluorescent in situ Hybridization)を用いて行った。

3. 結果と考察

マンホール内の気相中のH₂Sガス濃度は30±20ppm、返流水中のH₂S濃度は6.2±2.2mg-S/Lであった。返流水中のDO濃度は2.4±0.6mg/Lであった。この結果より、マンホール内(液相および気相中)は常に硫化水素が発生する環境下であり、硫化水素濃度はかなりのレベルであることが伺える。設置から約1ヵ月が経過したモルタル供試体は、底から3cm~20cm(水面付近)の部分には灰色のゲル状の生物膜が形成されていた。水面付近の生物膜表面は白色の糸状生物膜が付着していた。底から約30cm(気相中)の生物膜は白色の二水石膏主体の固形物がモルタル表面に付着していた。この白色固形物を剥ぎ取るとモルタル表面は腐食が進行しかかっていたことが確認できた。

底から3cm、20cm、30cmの生物膜および白色固形物からそれぞれランダムに、71個、62個、101個のクローンを選択し塩基配列を解読した。図-1には、水面付近生物膜および底から30cmの白色固形物中の微生物の群集構成を示す。底3cmの生物膜から系統解析により、*-Proteobacteria*(検出割合:11/71、以下同様)、*-Proteobacteria*(26/71)、*Actinobacteria*(11/71)を中心に、*Cytophaga/Flexibacter/Bacteroides(CFB)*や*Firmicutes*など系統学的に幅広い細菌が検出された。種レベルでの細菌の多様性は底3cmの生物膜が最も大きかった。これは返流水中には多様な有機物が存在するためと考えられる。水面付近生物膜からは系統解析で*-Proteobacteria*に属す*Thiothrix* sp.(相同性98%、11/62、以下同様)が検出された(図-1)。*Thiothrix*は従属栄養性であるが硫化水素を酸化することもできる好気性もしくは微好気性の硫黄酸化細菌であり、一般的に硫化水素を含む堆積物表面に生息するとの報告がある。また*Thiothrix*と同様に従属栄養性細菌であるが還元型無機硫黄化合物を酸化できる*Bosea thiooxidans*(98%、1/62)が検出された。全体としては水面付近生物膜からは底部生物膜ほど多様性は高くないが*-Proteobacteria*を中心とした細菌が系統解析で検出された。一方、底から30cmの白色固形物中(腐食が進行している部分)からは、系統解析により硫黄酸化細菌*Halothiobacillus neapolitanus*(97%、6/101)が検出された(図-2)。*H. neapolitanus*は硫化水素、単体硫黄、チオ硫酸などの還元型硫黄化合物を酸化し硫酸を生成し、低pHにも耐えることができる(生育可能範囲pH4.5~8.5)好気性化学独立栄養性細菌である。

キーワード：下水道施設、コンクリート腐食、生物膜、16S rRNA アプローチ、微生物群集解析
 連絡先：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都市環境工学専攻 岡部 聡
 E-mail: sokabe@eng.hokudai.ac.jp Tel&Fax: 011-706-6266

また紅色非硫黄細菌として知られる *Rhodobacter capsulatus* (95%、2/101) が検出された。*Rhodobacter capsulatus* は水素またはチオ硫酸を電子供与体として好気性化学合成独立栄養生物として増殖することができる。そのほか *-Proteobacteria* に属す *Pseudoxanthomonas* sp.(98%、26/101)と *Thermomonas fusca*(95%、17/101)が検出されたクローンの約半数(43%)を占めた。

一方、FISH 法においてはプローブ SRB385 と SRB385Db で検出できる硫酸塩還元細菌 (*Desulfovibrionaceae* と *Desulfobacteriaceae*) が底部生物膜と水面付近生物膜で確認された。また *Thiothrix* に特異的なプローブ G-123T によって水面付近生物膜の表層部に多くの *Thiothrix* の存在が確認された。腐食部分では *H. neapolitanus* の属する *-Proteobacteria* が多く確認されたこと、底部においては種の特定はできなかったが多くの *-Proteobacteria* が検出されたことは系統解析の結果と一致した。

以上の結果から底部および水面付近に存在する硫酸塩還元細菌が硫化水素を生成していると考えられる。底部で生成された硫化水素はその多くが液相中に放出されていると考えられる。一方、水面付近で生成された硫化水素の一部は生物膜表層に存在する *Thiothrix* に利用され体内に単体硫黄として蓄積される、もしくは硫酸まで酸化されている可能性がある。しかし、生成される硫酸は返流水により希釈されるため腐食を引き起こすほど高濃度には蓄積しないため腐食は進行していないと考えられる。底から 30cm の白色固形物内で検出された *H. neapolitanus* は独立栄養性のため還元性硫黄化合物と硫黄しか利用できないことから、本実験の場合、液相中から揮発した硫化水素を利用していると考えられる。揮発した硫化水素を腐食部表面に存在する *H. neapolitanus* が利用した結果硫酸が生成される。

4. 結論

本実験では 16S rRNA に基づく系統解析および FISH 法を用いてコンクリート腐食が実際に生じたモルタル供試体から採取した底部生物膜、水面付近生物膜、白色固形物内それぞれの微生物群集解析をおこなった。この結果から腐食の機構は底部で硫酸塩還元細菌により生成された硫化水素が液相に放出され揮発し水面よりもさらに高い位置に生育する *Halothiobacillus neapolitanus* などによって硫酸に酸化されている可能性が示唆された(図-3)。このような分子生物学的手法を用いた腐食コンクリート試料内の微生物群集構造に関する情報は極めて少なく、本研究の結果は貴重は基礎的データとなる。

今後は、腐食が進行していた気相部の白色固形物中に存在する *Halothiobacillus neapolitanus* に近縁な硫黄酸化細菌を単離し、その生理学的特性を明らかにし、コンクリート腐食制御技術確立の糸口とする予定である。

参考文献

- 1) 日本下水道事業団・技術評価委員会・防食専門委員会(2002) 下水道構造物に対するコンクリート腐食抑制技術及び防食技術の評価に関する報告書、水、44(1)、32-40

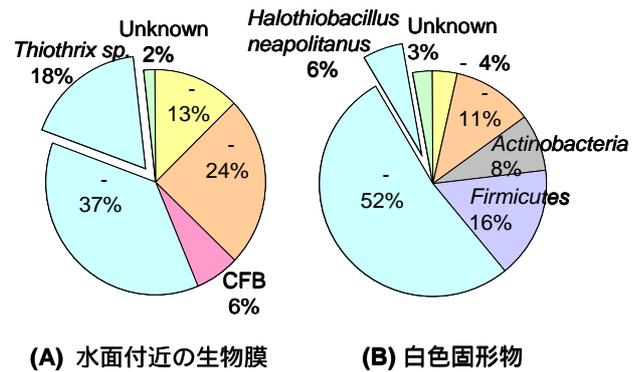


図-1. 水面付近(底から約 20cm)生物膜(A)および腐食が進行している底から約 30cm の白色固形物(B)内から得られたクローン構成

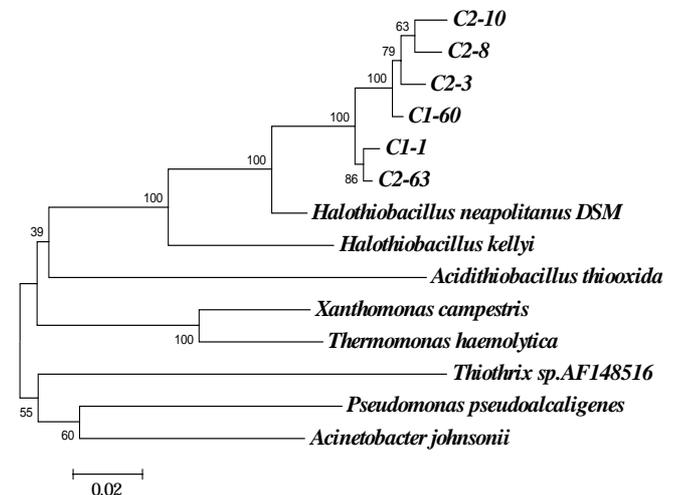


図-2. *H. neapolitanus* と得られた近縁なクローンの系統樹

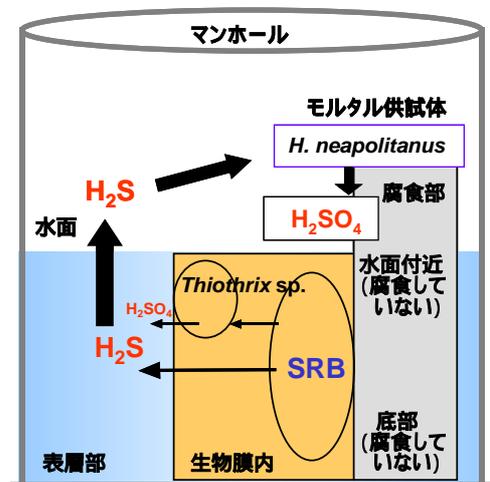


図-3. 解析結果のまとめと予想される下水管の腐食機構