

学位論文題名

Eco-physiological Role of Sulfate-Reducing Bacteria
and Sulfur Cycle in Wastewater Biofilms Analyzed
by Molecular Biological Techniques

(分子生物学的手法を用いた生物膜内の
硫酸塩還元細菌の生態学的役割と硫黄循環の解析)

学位論文内容の要旨

生物学的下排水処理プロセスにおいて、硫酸塩還元細菌によって生成される硫化水素は処理施設における臭気、金属腐食、 H_2S 酸化に伴う大量の溶存酸素の消費、バルキング等の原因となる一方で、その硫酸塩還元反応は下水処理生物膜において相当量(50%以上)の有機物除去に貢献していると報告されており、硫酸塩還元は極めて重要な反応である。しかしながら、生物膜内では硫黄の内部循環が存在するうえ、硫酸塩還元細菌は多様な代謝能を有するため、生物膜内での硫酸塩還元細菌の多様性や機能、および硫黄の挙動に関する情報は皆無である。この問題にアプローチするためには、僅か数 mm の生物膜に対し空間的および時間的に高い分解能で測定できる技術の開発と、複雑な微生物群集の生態学的構造を機能に結び付けた議論が必要となる。

本研究は、このような背景の基に、微生物群集の構造と機能を高解像度で解析できる技術を開発し生物膜に適用することにより、下水処理生物膜内における硫酸塩還元細菌の生態学的役割を明らかにし、生物膜内における硫黄循環を解明することを目的として行った。

具体的には、FISH 法、DGGE 法、16S rDNA クローンライブラリー法による微生物群集構造の解析と生物膜内 *in situ* における硫酸塩還元細菌の検出・同定、機能の解析として微小電極を用いた *in situ* における硫酸塩還元活性度分布の測定および MAR-FISH 法を用いた硫酸塩還元細菌の系統学的検出・同定と基質資化特性の同時評価を行った。得られた結果を総合的に評価し、生物膜内における硫黄循環機構、および関連する硫酸塩還元細菌の基質(有機物、水素、酸素、硝酸)に対する利用特性および多様性を明らかにした。

本論文の各章の内容は以下のようになっている。

第1章では、一般的な硫黄循環および近年その多様性が明らかにされつつある硫酸塩還元細菌の特徴についてまとめた上で、下水処理における硫黄循環の重要性を指摘した。さらに、これまで研究が遅滞していた理由について言及し、現象解明のために有効な方法を概説、最後に本論文の目的と構成について述べた。

第2章は、生物膜内の硫黄循環および硫酸塩還元細菌の空間分布について、膜厚僅か 1-2mm 程度の柔脆で扱いが難しい生物膜を、FISH 法、微小電極といった新しい手法と、マイクロスライシングや培養に基づく従来法とを併用し、それぞれを総合的に比較検討することによって解析した。このような手法の組み合わせによる生物膜の解析は世界的にも初めての試みであった。その結果、従来絶対嫌気性菌と考えられていた硫酸塩還元細菌が好気的な生物膜表層にも高密度に存在していることを明らかにした。また、数十 μm の高い空間的分解能をもつ微小電極を用いた測定により、生物膜表層の深さ 300 μm の範囲内に硫酸塩還元活性、硫黄酸化活性ともに、非常に高い活性度で存在し、生物膜内の硫黄循環が海底のそれより 1000~10000 倍も速いことを示した。また、単体硫黄(S^0)が H_2S 酸化における重要な中間生成物であること、下水中の溶解性鉄濃度が低いため Fe-S (鉄-硫黄) 循環が生物膜内の硫黄循環に占める割合が低い(1%以下)ことを示した。

第3章では、生物膜内での有機物分解における硫酸塩還元細菌の役割について、硫酸塩還元細菌が属レベルで利用できる電子供与体が異なることに注目し、検討した。硫酸塩還元細菌に対する活性阻害実験、16S rDNA

クローンライブラリー法による硫酸塩還元細菌の群集構造解析を行い、つづく FISH 法では群集構造解析の結果検出された硫酸塩還元細菌に特異的なプローブを用いて生物膜内の空間分布を求めた。微生物の空間分布は基質濃度分布と密接であることから、これを異なる有機物を電子供与体として用いて測定した微小電極の結果と比較した。硫酸塩還元細菌は生物膜内の嫌気分解においてプロピオン酸から酢酸への分解に関与し、プロピオン酸酸化性の *Desulfobulbus* が重要な SRB であることを明らかにした。その他にも糸状性の *Desulfonema* を含む 5 属の硫酸塩還元細菌が検出され、水素や長鎖脂肪酸の酸化への関与を示唆した。また、生物膜内深さ方向の有機物濃度分布を考慮し、嫌氣的に生成される酢酸は生物膜表層で脱窒反応により無機化されることを示した。

第 4 章では、好氣的な領域に硫酸塩還元細菌が高密度に存在したという第 2 章の結果を受けて、好気条件下における硫酸塩還元細菌の機能について、どの種の硫酸塩還元細菌がどのような有機物分解を行っているのか解析した。これは微生物細胞レベルで種の同定・特異的検出ができる FISH 法と、FISH 法と同程度の解像度で微生物の基質利用特性を評価できるマイクロオートラジオグラフィ（MAR）の組み合わせ（MAR-FISH 法）により初めて可能にした。その結果、*Desulfobulbus* が酸素や硝酸塩存在下においてもプロピオン酸を利用し活性を示すということを証明した。また、硫酸塩存在下においては、*Desulfobulbus* は極めて特異的にプロピオン酸を利用すること、これまで利用不可とされていた酢酸を利用できることを明らかにした。一方、嫌気条件下で水素を利用した微生物全体の約 40% を硫酸塩還元細菌が占め、嫌気分解過程における水素除去者として重要であることを示した。

第 5 章では、生物膜内における硫酸塩還元細菌の分布と硫酸塩還元活性の発達・形成過程を空間的に解析した結果について述べた。生物膜の成長とともに優占となる硫酸塩還元細菌を FISH 法と DGGE により解析し、変化する硫酸塩還元活性および活性領域と関連付けた。その結果、硫酸塩還元活性領域は徐々に生物膜表面の好気嫌気境界面に移動し、それに伴い、硫酸塩還元細菌の菌体密度も表層側で増加することを示した。これは生物膜表面に特に高密度に存在する他栄養性細菌が、膜内に侵入する溶存酸素を急激に消費し尽くすことによるものであると推察した。さらに、生物膜内の硫酸塩還元細菌群集に関する詳細な情報を得るため 16Sr DNA クローン解析を行い、*Desulfobulbus*、*Desulfovibrio*、*Desulfomicrobium* の存在を確認した。

第 6 章では、本論文の結論と今後の展望、課題について述べた。

本研究は、僅か数 mm の生物膜の内部で硫黄循環が生じていることを明らかにした。また、生成された硫化水素は自然界の硫黄循環の 1000 倍もの速度で、中間生成物としての S^0 を経由し SO_4^{2-} へ酸化されていると推定された。このような生物膜内の硫黄循環は、硫酸塩還元細菌の種および機能の多様性によって説明できた。生物膜内に存在する硫酸塩還元細菌は属レベルでも実に多様で、それぞれが特徴的な基質代謝能を有する。中でも硫酸塩還元細菌は、プロピオン酸および水素利用に果たす役割が大きいと考えられた。また、硫酸塩還元細菌は、嫌気条件下のみならず、好氣的条件下においても活性を示し、環境変動に強い微生物群集であることが伺える。このような硫酸塩還元細菌の多様性が、好気嫌気境界において硫酸塩還元反応が生じることを可能にし、その結果、生成された硫化水素がすばやく酸素や硝酸を用いた生物学的硫黄酸化により硫酸塩へ再酸化されるようになると結論づけた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	渡辺	義公
副査	教授	高桑	哲男
副査	教授	真柄	泰基
副査	教授	棟方	正信
副査	助教授	岡部	聡

学位論文題名

Eco-physiological Role of Sulfate-Reducing Bacteria and Sulfur Cycle in Wastewater Biofilms Analyzed by Molecular Biological Techniques

(分子生物学的手法を用いた生物膜内の
硫酸塩還元細菌の生態学的役割と硫黄循環の解析)

下水処理プロセスにおける硫酸塩還元反応の重要性としては、(1)有毒な H_2S の発生、(2) H_2S による処理施設や下水管路等の腐食、(3) 悪臭の発生、(4) H_2S の酸化に伴う大量の溶存酸素の消費、(5) バルキングの原因、等があげられる一方で、硫酸塩還元反応は下水処理プロセスにおいて相当量(50%以上)の有機物除去に貢献しており、極めて重要な反応である。しかしながら、下水生物膜内に存在する硫酸塩還元細菌(SRB)は、生理学および系統分類学的に極めて多様であることや、生物膜内では硫黄の内部循環が存在すること、また H_2S は鉄やマンガン等の重金属類と結合・不溶化し生物膜内に蓄積するため、生物膜内での硫酸塩還元細菌の優占種や多様性およびその活性に関する情報は極めて少ない。反応槽内での SO_4^{2-} および H_2S の物質収支のみから、生物膜内で生じる複雑な硫黄(S)の挙動を把握することは極めて困難である。この問題にアプローチするためには、僅か数 mm の生物膜に対し時間的・空間的分解能の高い測定技術の開発と、複雑な微生物群集の生態学的構造を機能に結び付けた議論が必要となる。

以上の背景の下に本学位論文は、微生物群集の構造と機能を高解像度で解析できる技術を開発し生物膜に適用することにより、下水処理生物膜内における硫酸塩還元細菌の生態学的役割を明らかにし、生物膜内における硫黄循環の解明を目的としたものである。具体的には、異なる分子生物学的手法 (Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) 法、Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 法、16S rDNA クローンライブラリー法) を適用し、生物膜内 *in situ* における硫酸塩還元細菌の検出・同定、空間分布および Population dynamics を解析した。次に、各種微小電極を作製・適用することにより、生物膜内 *in situ* における硫酸塩還元活性分布を測定した。さらに、Microautoradiography and Fluorescent *In Situ* Hybridization (MAR-FISH) 法によりシングルセルレベルでの硫酸塩還元細菌の系統学的検出・同定と基質資化特性の同時評価を行った。これら得られた結果を統合し総合的に評価することによって、生物膜内に存在する硫酸塩還元細菌の多様性と Population dynamics および基質利用特性を明らかにしたうえで、内部硫黄循環を明らかにした。本論文は6章で構成されている。

第1章では緒言であり、研究の背景と必要性および硫黄循環と硫酸塩還元細菌の特徴についてまとめた。また、現象解明のために有効な方法を概説、最後に本論文の目的と構成について述べた。

第2章は、生物膜内の硫黄循環および硫酸塩還元細菌の空間分布について、膜厚僅か1-2mm程度の生物膜を、FISH法、微小電極、マイクロスライシング法や培養に基づく従来法とを併用し、それぞれを総合的に比較検討することによって解析した。このような手法の組み合わせによる生物膜の解析は世界的にも初めての試みであった。その結果、従来絶対嫌気性菌と考えられていた硫酸塩還元細菌が好気的な生物膜表層にも高密度に存在していることを明らかにした。また、数十 μm の高い空間的分解能をもつ微小電極を用いた測定により、生物膜表層の深さ300 μm の範囲内に硫酸塩還元活性、硫酸化活性ともに、非常に高い活性度で存在し、生物膜内の硫黄循環が海底のそれより1000-10000倍も速いことを示した。また、単体硫黄(S^0)が H_2S 酸化における重要な中間生成物であること、下水中の溶解性鉄濃度が低いことためFe-S(鉄-硫黄)循環が生物膜内の硫黄循環に占める割合が低い(1%以下)ことを示した。

第3章では、生物膜内での有機物分解における硫酸塩還元細菌の役割について検討した。硫酸塩還元細菌に対する活性阻害実験、16S rDNA クローンライブラリー法による硫酸塩還元細菌の群集構造解析を行った。FISH法では群集構造解析の結果検出された硫酸塩還元細菌に特異的なプローブを用いて生物膜内の空間分布を求めた。FISH法により求められた微生物の空間分布と微小電極により求められた基質濃度分布から、硫酸塩還元細菌は生物膜内の嫌気分解においてプロピオン酸から酢酸への分解に関与し、プロピオン酸資化性の*Desulfobulbus*が重要なSRBであることを明らかにした。その他にも糸状性の*Desulfonema*を含む5属の硫酸塩還元細菌が検出され、水素や長鎖脂肪酸の酸化への関与を示唆した。また、生物膜内深さ方向の有機物濃度分布を考慮し、嫌気的に生成される酢酸は生物膜表層で脱窒反応により無機化されることを示した。

第4章では、好気的な領域に硫酸塩還元細菌が高密度に存在したという第2章の結果を受けて、好気条件下における硫酸塩還元細菌の代謝機能について、異なる電子受容体の存在下でどの種の硫酸塩還元細菌がどのような有機物分解を行っているのか解析した。これは微生物細胞レベルで種の同定・特異的検出ができるFISH法と、FISH法と同程度の解像度で微生物の基質利用特性を評価できるマイクロオートラジオグラフィー(MAR)を組み合わせることで解析できた。その結果、*Desulfobulbus*が酸素や硝酸塩存在下においてもプロピオン酸を利用し活性を示すことを明らかにした。また、硫酸塩存在下においては、*Desulfobulbus*は極めて特異的にプロピオン酸を利用すること、これまで利用不可とされていた酢酸を利用できることを明らかにした。一方、硫酸塩還元細菌は、嫌気条件下で水素を利用した微生物全体の約40%を占め、嫌気分解過程における水素除去者として重要な役割を果たしていることを明らかにした。

第5章では、生物膜内における硫酸塩還元細菌の分布と硫酸塩還元活性の発達・形成過程を時間的・空間的に解析した。生物膜の成長とともに優占となる硫酸塩還元細菌をFISH法とDGGE法により解析し、発達する硫酸塩還元活性および活性領域と関連付けた。その結果、硫酸塩還元活性領域は徐々に生物膜表面の好気/嫌気境界面に移動し、それに伴い、硫酸塩還元細菌の菌体密度も同領域で増加することを示した。さらに、生物膜内の硫酸塩還元細菌群集の菌相解析のため、16S rDNA クローン解析を行い、*Desulfobulbus*、*Desulfovibrio*、*Desulfomicrobium*の存在を確認した。

第6章は、結論であり、研究結果の総括と今後の当該研究分野の展望、課題について述べた。

以上要するに著者は、異なる分子生物学的手法と微小電極、マイクロオートラジオグラフィー法を併用し、僅か数mmの生物膜内に存在する硫酸塩還元細菌の多様性と特異的検出、および有機物分解に果たす役割を解明した。また、その結果より、生物膜内部で生じる硫黄循環を明らかにした。これらの成果を応用して生物膜リアクターの機能向上および下水管渠の適切な設計・維持管理に関する方途を示すことにより、下水処理の新たな展開に向けての有用な情報を多く提供しており、環境工学の発展に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士(工学)の学位を授与される資格あるものと認める。