〈論 文〉

硫酸還元菌の計数法および硫酸還元活性の測定法

Methods for the determination of the number and the activity of
sulfate-reducing bacteria

竹 内 準 一*   田 口 幸 夫**
Jun-ichi TAKEUCHI   Yukio TAGUCHI
佐 竹 研 一***   森 忠 洋****
Kenichi SATAKE   Tadahiro MORI

Abstract

For enumerating the sulfate-reducing bacteria, the most probable number method was recommended because of its reliability. The modified ISA medium (Mara and Williams, 1970) facilitated the early growth and metabolism of the bacteria, and then could shorten their incubation period. The sulfate-reducing bacteria in natural habitats, i.e., mixed culture with other heterotrophic bacteria, were able to enumerate easily by using the semi-liquid agar medium without reducing agents. Because the medium did not precipitate after being autoclaved, it was suitable for forming the distinct black colonies. Anaerobic pouches were available for the isolation as well as the enumeration.

The rate of bacterial sulfate reduction was determined with a radiotracer of ^{35}S . In the case of aquatic sediment, a whole core sample or the sub-sampled mud suspension was used for the incubation. Two types of procedure for recovering acid-soluble sulfides were introduced: a stripping method with an inert gas or an absorbing method with a filter paper. The latter, simple and rapid procedure was more suitable for routine works. These methods for the quantification of the bacterial number and activity, described herein, are considered to be practically used to research in the applied field, such as sewage treatment.

Key words: bacterial enumeration, modified ISA medium, anaerobic pouches, sulfate reduction rate, radiotracer technique

1. はじめに

最近、ビルビット廃水および下水処理場の汚泥処理過程で発生する脱水ケーキなどからの悪臭の発生が問題になっているが、これは硫酸還元菌による硫化水素(H_2S)の生成が主要な原因となっている。生成した H_2S は有害物質であるため、急性的には作業員の人命にかかわるばかりでなく、慢性的にも施設に損傷を与えている。例えば、下水管渠、都市ガス管および水道管

の腐食は、硫酸還元菌による H_2S 生成とイオウ酸化細菌による硫酸の生成に起因することがわかってきた。

このような悪臭の発生および埋設管の腐食の機構を解明し、対策を講じるためにも、まず、その場における硫酸還元菌数や硫酸還元活性を測定することを通して、硫酸還元菌の生理・生態について十分把握することが必要不可欠である。

硫酸還元菌は嫌気的条件下で乳酸やプロピオン酸等

- * 東京都下水道局新河岸処理場 〒175 東京都板橋区新河岸3-1-1, Shingashi Sewage Treatment Plant, Bureau of Sewage-works, Tokyo Metropolitan Government, Shingashi 3-1-1, Itabashi, Tokyo 175 Japan
- ** 東京都水道局金町浄水管理事務所 〒125 東京都葛飾区金町浄水場1-1, Kanamachi Water Purification Plant, Bureau of Water-works, Tokyo Metropolitan Government, Kanamachi Jyōsuijō 1-1, Katsushika, Tokyo 125 Japan
- *** 国立公害研究所計測技術部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16-2, Chemistry and Physics Division, The National Institute for Environmental Studies, Onogawa 16-2, Yatabe, Ibaraki 305 Japan
- **** 島根大学農学部 〒690 島根県松江市西川津町1060, Faculty of Agriculture, Shimane University, Matsue, Shimane 690 Japan

の限られた有機物を電子供与体として利用し、最終的には硫酸塩に電子伝達してエネルギーを獲得するという特異な代謝を営む従属栄養細菌の一群で、孢子非形成の *Desulfovibrio* 属や孢子形成の *Desulfotomaculum* 属が代表的である。この菌は偏性嫌気性菌であるので、自然界では酸素の欠乏しやすい汚濁した河川、湖沼、内湾の底泥に多く生息し、そこでの硫化物生成の主役を演じている¹⁾。

従来の知見によれば、硫酸還元菌は生育の結果、環境中に主要な代謝産物として酢酸を蓄積すること²⁾、すなわち、有機物の嫌氣的分解過程における中間段階を担っていることが知られていた。しかし、この菌の中には酢酸を代謝し得る菌種も発見された³⁾ため、イオウ循環のみならず有機物の分解無機化の面でも重要な微生物と認識されるに至った。

そもそも硫酸還元菌は偏性嫌気性菌としては特異な細菌であり、菌種によっては純粋培養でも3時間程度の通気では死滅しない⁴⁾上、自ら H_2S という還元性物質を生産し、自身の増殖環境を整える。さらに H_2S は環境中に豊富にある鉄分と反応し、硫化鉄 (FeS) の不溶性の凝集体を形成し、硫酸還元菌はその内部で生育する⁵⁾ため、好氣的環境下での生存にも有利となっている可能性がある。実際に、硫酸還元菌は湖沼の表層水などの好氣的な水体でも少なからず検出され^{6,7)}、生態学的見地からすれば通性嫌気性菌であるかのような挙動を見せる。

硫酸還元菌数とその活動の証である硫化物の集積量との関係を調べてみても、しばしば両者の間には明瞭な相関が得られない⁸⁾といわれている。従って、調査や研究に際しては、比較的容易に得られる菌数データのみならず、必要に応じて硫酸還元活性や他の物理化学的な環境条件の測定値も加味して、その場での硫酸還元菌が増殖状態 (growing state) にあるのか生残状態 (surviving state) にあるのかを判断する必要もある。

微生物が関与する現象の解析には、上記のような特定機能を有する“生物としての細菌”個体群の動態に着目するアプローチの他に、物質の流れに着目する生物地球化学的なアプローチがある。中でもラジオアイソトープ (RI) を用いるトレーサー法は設備と熟練を要するが、特定元素の転流を知る直接的な手法である。³⁵S を用いた硫酸還元活性の測定は、主に水界堆積物を対象に研究が進められた⁹⁾。その結果、硫酸還元活性は温度によって影響を受ける (Q_{10} 値は3.4~3.9) ため著しい季節変動を示すこと、一般に淡水域では硫酸塩 (電子受容体) に、海域では有機物 (電子供与体) に制限を受けること、さらにメタン発酵とは競合関係にあることが明らかにされてきた。このような水界堆積物に対する研究手法は、ほとんどそのまま先に述べた下水処理の現場の課題にも適用し得ると考えられる。

以下、筆者らが実施している硫酸還元菌の計数法ならびに硫酸還元活性の測定法について、河川、下水、汽水湖底泥での事例を混じえながら検討を加え、応用分野にも適した方法として提示したい。

2. 硫酸還元菌の計数法

硫酸還元菌は自然界に普遍的に分布している。例えば、Fig. 1 のように河川の上流部でも検出され、植種源は至る所にあることがうかがえる。しかし、流下に伴ってその数を急激に増していることから、大局的には有機汚濁との関連も示唆される。この菌の生育には強い硫化水素臭と硫化物生成による著しい黒変を伴うこともあって、硫酸還元という現象は数ある微生物の作用の中でも古くから着目され、その生態学的研究も比較的早期に着手された¹⁰⁾。

それにもかかわらず、調査研究の基礎となる硫酸還元菌の計数法となると、今日まで種々提案されてはきたが、その標準的な手法は未だ確立されているとはい

Fig. 1 Distribution of sulfate-reducing bacteria (SRB) in the running water of the Tamagawa River. Viable counts were obtained by using the m-ISA medium and an anaerobic jar (Duplicates, 3 days' incubation).

い難い。その主たる原因は、この菌の培養が特に困難であるという生理学的理由によるわけではなく、むしろ共存する他の細菌との相互作用に影響されるという生態学的理由によるものと考えられる。すなわち、自然の試料はもともと混合培養系であるので、計数にあたっては系の一部を培養容器内にもち込むこととなり、そこでは硫酸還元菌と他の細菌との不断の相互作用が展開されることになり、その顛末によって計数結果は左右されることになる。

この共雑菌の影響は、余分な酸素を消費したり、有機酸などを生産して硫酸還元菌の生育に片利共生的に作用する¹¹⁾こともある一方、後述するように硫酸還元菌のコロニー計数に支障をきたすこともある。そこで目的に応じて2つの計数法を使い分ける必要がある。

2.1 計数法の選択

培養による計数法は大きく2つに分けられる。すなわち、増殖の有無とその確率頻度に基づくMPN（最確数）法と寒天培地中にコロニーを作らせるコロニー計数法である。

硫酸還元菌は選択寒天培地中で独特な黒いコロニーを形成する。このコロニーは菌体自身の集塊である通常の細菌コロニーと異なり、硫酸還元菌の増殖部位を核に菌が生産する H_2S と培地成分中の鉄塩とが反応して生成する FeS による沈着で“黒色コロニー”と称されている。菌数の多いとき、あるいは H_2S 生成の活発なときには、時間経過とともにコロニーは互いに重なり合って培地全体が黒色を呈するようになる。硫酸還元菌の検出はすべてこの黒変(blackening)に基づいている。従って、MPN法もコロニー計数法も本質的には変わらず、増殖の有無のみか、それにコロニー数という重みを付加したデータを得るかの違いにすぎない。

しかし、実際は、両者には労力と精度、それと結果が得られる確かさの点で大きな差がある。MPN法では試料の希釈段階さえ適切にとれば、まず失敗は考えられないが、5本法の場合、1検体につき少なくとも

15本の小試験管への接種操作が必要となる。しかも得られる推計値には95%信頼区間でも約3倍から1/3倍もの幅が許容されている。すなわち、精度の点で劣る¹²⁾。

一方、コロニー計数法の操作は通常の混釈平板法とほとんど変わらず簡便であり、しかも得られた黒色コロニーは一般の細菌コロニーと同じ扱いが可能とされている¹³⁾。しかし、次のようなコロニー計数時の障害を経験し、計数できない場合が生じることがわかっている。①沈殿の生成する培地を用いると沈殿自身も黒変して黒色コロニーの判別が困難となる。②共雑菌の中には嫌気条件下で大量のガスを産出するものがあり、寒天培地中に亀裂が生じてしまう。③共雑菌の中には硫化物を可溶化または消費してしまう種類の細菌がいることがあり、黒色コロニーが消失してしまう。④特に海水試料中には好気性および嫌気性の寒天分解菌が多数存在し、寒天を液化するため黒色コロニーが流れてしまうことがある。①と②は培地を選択することにより避けられるが、Fig. 2に示すように③と④の対策は困難である。

以上のように、自然試料中の硫酸還元菌のコロニー計数には幾多の不確実さを抱えているので、野外調査のように未知試料で、かつただ一度限りしか入手し得ない貴重な試料を扱う場合には、労力や精度を犠牲にしても確実に計数値の得られるMPN法を採用するのが無難といえよう。一方、室内実験などで菌数の変動を把握するような場合には、予備的検討の上でコロニー計数法を採用することが可能である。

なお、計数に先立ち試料の分散処理は欠かせないが、その条件を一律に決めるのは困難である。参考までに筆者らの条件を一例に示せば、ワーリング・ブレンダー（日本精機製）を用いて、河川水で2分間、活性汚泥で5分間の前処理を施している。

2.2 培養法

硫酸還元菌の平板培養法にはFig. 3に示すような4つの手法が考えられる。Aは通常の混釈平板に培地

Fig. 2 Difficulties in counting the specific colonies of sulfate-reducing bacteria. A: Unknown bacteria which oxidize the deposits of sulfide, B: Agar-decomposing bacteria which solubilize agar media.

Fig. 3 Schematic diagrams, showing various types of plate counting of sulfate-reducing bacteria. A : Aerobic pour plate, B : Semi-anaerobic pour plate, C : No gaseous phase PT-pouch, D : Anaerobic pour plate.

を重ねる重層法¹⁴⁾, Bはシャーレの上皿を逆転して用いる二重皿平板法^{13),15)}, Cは耐熱ラミネートフィルムの袋の中で混釈後, 熱シールして気相を欠く状態に封じるパウチ法^{16),17)}, DはAを嫌気ジャー内で培養するガスパック法¹⁸⁾である。嫌気度はA, B, C, Dの順に厳密になっている。

この4通りの手法を河川水試料を用いて比較した結果はTable 1のようであった。なお, 本稿で示した計数結果はすべて30℃で培養したものである。MPN法による計数値(7日間培養)は参考値であるが, 多摩川のような硫酸還元菌の少ない試料と江戸川や坂川のように多い試料とでは各手法でのコロニー計数値(3日間培養)の関係が違って、1つの傾向がみられた。すなわち, 菌数の少ない試料の場合, 好気培養(A, B)の値は嫌気培養(C, D)の値より低めであったが, 逆に菌数の多い試料では, 好気培養の値が嫌気培養の値より高くなる傾向にあった。このようになる理由は

明らかではないが, 硫酸還元菌の種類や生理状態に相違があるか, または共存する他の従属栄養細菌による影響があったものと考えられる。

なお, ガスパック法は嫌気培養法の1つの理想であるが, その装置はまだ高価である。しかし, ここでのデータから安価なパウチ法で代替することが可能であることがわかる。実際, パウチ法は厳密な嫌気度を要求するボツリヌス菌¹⁹⁾やウェルシュ菌²⁰⁾の分離や計数にすでに用いられている実績がある。

次に, MPN法による場合であるが, 通常は5連の小試験管を用いて, 液体培地での増殖の有無, 硫酸還元菌の場合には培地の黒変の有無によってMPN値が求められる。試料接種後の小試験管は嫌気ジャーに入れて培養してもよいが, ふつうは滅菌済みの流動パラフィンに液体培地の上部に重層させて空気を遮断して嫌気状態を保つ。しかし, 流動パラフィンはシール材としては扱いにくいので, 代わりにオートクレーブ後, 固化直前まで冷却させた寒天を液体培地の上部に穏やかに流し込み, 固化させることで封じても, 同等の成績を得ることができる。さらに検体数の多い場合には, 液体培地に0.3%くらいとなるよう寒天を加えて半流動培地とし, 試料を接種した後にボルテックスミキサーで均一に分散させて, そのまま培養する方法もとれる。ただし, これらの簡便法は還元剤の添加を必要としないほど過剰な有機物を含む培地との組み合わせでしか適当でない。

なお, MPN法による計数値とコロニー計数値との間にはFig. 4に示すような関係があり, MPN値の方がコロニー計数値より若干高めとなる傾向がある。この原因はそもそもMPN値が真の値よりも高めに出てくる特性を有している²¹⁾という理由の他に, 硫酸還元菌のコロニー計数の場合, あまり長く培養を続けると, 特に接種量の多い時に培地全体に黒変が広まって計数困難となるので, 培養日数を短縮せざるを得ないからと考えられる。なお, 計数結果はMPN法では $\text{MPN} \cdot \text{ml}^{-1}$, コロニー計数法では $\text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ と表示した。MPNとはmost probable number, CFUとは

Table 1 Comparison of the number of sulfate-reducing bacteria obtained by using various kinds of counting technique and the m-ISA medium (Table 2)

Sample	A Pour Agar (aerobic)	B Pour Agar (semi-anaerobic)	C PT-pouch (no gas phase)	D Pour Agar (anaerobic)	E MPN (control)
Tamagawa	5.4	5.6	15.0	9.4	17.0
Tamagawa	4.0	9.0	11.0	11.4	14.0
Edogawa	133	99	38	39	350
Sakagawa	4800	3100	1700	1700	22000

The above figures indicate the viable counts per 1 ml of river water.

Fig. 4 Viable counts of sulfate-reducing bacteria determined by the pouch method (5 replicates, 3days' incubation) and by the MPN method (5 tubes, 7 days' incubation). Samples were collected from urban rivers, and cultivated by using the m-ISA medium.

colony-forming units の略である。

2.3 培地の選択

硫酸還元菌用の計数培地は、これまで数多く報告されてきたが、基本的組成に大差はない。すなわち、いずれも乳酸、硫酸塩、2価鉄塩を共通に含むが、各々の役割は電子供与体、電子受容体、 H_2S 検出のための一種の指示薬である。Table 2 に代表的な3種類の培地組成を記したが、これらの培地は上記の成分に加え

Table 2 Composition of counting media for sulfate-reducing bacteria; each ingredient (g) in 1000 ml of distilled water

Ingredient	SM ^{*1}	PE ^{*2}	m-ISA ^{*3}
Bacto-peptone (Difco)	2.0	—	—
Tryptone (Difco)	—	—	10.0
Yeast extract (Difco)	—	1.0	—
Beef extract (Difco)	1.0	—	—
Sodium lactate (70%)	5.0	5.0	5.0
Na_2SO_4	1.5	1.0	—
Na_2SO_3	—	—	0.5
K_2HPO_4	0.5	0.5	—
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.0	2.0	2.0
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	—	0.5	0.5
$(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	0.4	—	—
Iron (III) ammonium citrate	—	—	0.5

* 1 Standard methods for the examination of water and wastewater; 16th ed., 1985⁽²²⁾

* 2 Postgate's E medium; Postgate, 1979⁽²⁾

* 3 The modified ISA medium; Mara and Williams, 1970⁽²³⁾, partially modified by Matsumoto, 1971⁽¹⁴⁾

て、①過剰の有機物を与えて共存細菌による酸素消費を促す米国スタンダードメソッド⁽²²⁾の培地(略称SM培地)、②有機物を極力制限した代わりに生育因子として酵母エキスを加えている Postgate⁽²⁾のE培地(PE培地)、③共雑菌によるガス生成を抑えるため亜硫酸塩を含んでいる Mara と Williams⁽²³⁾の改変 ISA 培地(m-ISA 培地)である。なお、PE 培地の一部改変された処方⁽²⁴⁾が「下水試験方法⁽²⁵⁾」に採用されている。また、m-ISA 培地の原報(食品衛生検査用の Oxid 社製 Iron Sulphite Agar 培地を硫酸還元菌用に改変した処方、後に Postgate の F 培地となる)のクエン酸鉄は松本⁽¹⁴⁾により、クエン酸鉄アンモニウムに代替され、「上水試験方法⁽²⁶⁾」に採用されているが、この方が培地調製時の溶解性に優れる。

PE 培地は硫酸還元菌の培養生理上の知見に基づき生育に必要な成分のみで構成されているが、SM 培地と m-ISA 培地は過剰の有機物を含むため、硫酸還元菌と共雑菌の両者を共に生育させる性質を有している。また、PE 培地はオートクレーブ後に著しい沈殿を生じるが、m-ISA 培地では全く生じない。SM 培地の方は PE 培地ほどではないが沈殿を生じる。m-ISA 培地でも天然海水を用いて培地を調製した場合には沈殿は避けられないが、Colwell の四塩人工海水(2.4% NaCl, 0.7% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.53% $MgCl_2$, 0.07% KCl)を用いれば沈殿は生じない。沈殿はコロニー計数の障害となるが、汙過すると H_2S 検出に必要な鉄分が不足してしまうことがわかっている。コロニー計数法には沈殿の生じない m-ISA 培地との組み合わせが最適である。

硫酸還元菌は増殖にあたり低い酸化還元電位を要求する。従って、0.01%程度のアスコルビン酸かチオグリコール酸のどちらか、または両方を添加することが多い。いずれもナトリウム塩の形で与えることもある。通常は嫌気状態の指示薬としてレサズリンを培地中に添加しておく。試料と培地の種類によっては、還元剤を添加せずに培地中の過剰な有機物を利用する共雑菌によって十分な還元状態を作ることができる⁽²⁷⁾。ただし、純粋培養菌の培養には還元剤の添加は必要不可欠である。培地に用いるペプトンは含硫タンパクに富む製品は避けた方が無難と考えられる。そのような培地成分からはタンパクの好気的な分解経路を通じ、微量ながら硫化物が生成してプラスの誤差を与える恐れがある。含硫タンパクから H_2S を産出する細菌は自然水域で全従属栄養細菌のおよそ1割であるが、硫酸還元菌と比べて高い数となっている⁽²⁸⁾。

上記の3種類の培地を用いて、河川水と下水試料中の硫酸還元菌を MPN 法で計数した例を Fig. 5 に示

Fig. 5 Time course of the number of sulfate-reducing bacteria enumerated by using the following media: m-ISA medium (●), SM medium (▲), and PE medium (■). Viable counts of sulfate-reducing bacteria were evaluated by the MPN method.

す。MPN 法の小試験管での生育経過をみると、m-ISA 培地は接種した翌日には培地の黒変が始まり、極めて良好な生育を示した。SM 培地はそれに次ぐが、両培地とも黒変が培地全体に及んだのに対し、PE 培地では沈殿を中心に黒変した。PE 培地の沈殿は鉄を主体としたものなので、硫化物の生成に先行して沈殿の色調が暗い灰色に変わるが、これは3価の鉄が2価の鉄に還元されたためと思われる。また、獣肉ペプトンを多く含む培地では微弱ながら黒い沈殿を生じることがあるが、このような不明瞭な変化は偽陽性とし、硫酸還元陰性と判定する必要があるだろう。

硫酸還元菌用の培地は電子受容体、電子供与体、還元剤の点でまだ改良の余地があると思われる。m-ISA 培地を用いると H₂S の生成が早まるが、それはこの培地だけに含まれる Na₂SO₃ の添加効果によるものと推測される。実際、PE 培地に0.05%の Na₂SO₃ を添加してやるだけで、Fig. 6 に示すように硫酸還元菌の初期の生育が促進された。硫酸還元菌の中には亜硫酸塩やチオ硫酸塩を電子受容体として利用する菌種も少なくない⁴⁾。また、電子供与体として乳酸の他にプロピオン酸、安息香酸、酪酸、酢酸を用いる菌種の存在することが知られている⁴⁾。とりわけ、嫌氣的代謝が開始されると酢酸が多量に蓄積される²⁹⁾ため、そのような場では酢酸利用性の硫酸還元菌の多いことが期待される。Nedwell⁹⁾は底泥中の硫酸還元菌と硫酸還元活性との相関が高くない場合の原因を、従来の培地組成では計数し得ない硫酸還元菌の一群がいるからであろうと指

摘している。従って、そのような菌種も同時に、あるいは分別して計数できるような培地の考案も急務である。なお、より強い還元剤として、10~30mg · l⁻¹のハイドロサルファイトナトリウムを用いている例³⁰⁾があり、この方法でも硫酸還元菌の初期の生育を早めることが可能である。同様の効果を鉄釘の添加で得る例³¹⁾もあるが、これらの作用機構については不明の点があり、今後の探究が必要である。

Fig. 6 Effect of the addition of sulfite on the viable counts of sulfate-reducing bacteria, which were evaluated by the MPN method. Broken line shows the addition of 0.05% Na₂SO₃ to the PE medium.

3. 硫酸還元活性の測定法

微生物の関与する現象を解析する際、その菌数を求めることは比較的容易であり、まず第一に着手すべきことではあるが、培養計数法を用いて得られた生菌数が必ずしも特定機能に関する微生物活性、換言すれば、特定物質の生産速度を反映しているとは限らない。なぜならば、計数に用いた培地および培養条件下で生育した細菌が、現場における栄養および環境条件下でも活性が高いとは限らないからである。そこで、現場における微生物の機能をより正確に知るためには、なるべく現場に近い栄養および環境条件を設定し、その機能の発現の結果生じる現象、例えば特定物質の生産速度を指標とした微生物活性を測定することが必要となる。

硫酸還元菌は硫酸塩を異化的に還元して H_2S を生成する。従って、 H_2S の生成速度は硫酸還元菌の活性を表している。 H_2S の生成速度は、 ^{35}S でラベルした硫酸ナトリウム ($\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$) をトレーサーとして試料中に添加し、一定期間培養後に生成した H_2^{35}S の放射活性を測定して求めることができる。

反応の結果生成した H_2^{35}S を回収するには、培養後の試料に酸を添加した後、不活性ガスを吹き込んで H_2^{35}S を気化し、酢酸亜鉛溶液に吸収させる(これをストリップング法と呼ぶ)か、または酢酸亜鉛を含む濾紙に吸収させる(これを濾紙吸収法と呼ぶ)方法がある。

硫酸還元を行わせる条件としては、水界堆積物を対象とする場合、コアサンプルのままの状態で一定の深さごとに $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ を注入して培養する方法と、一定の深さごとにあらかじめ分取した試料(懸濁液)に $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ を添加して培養する方法とがある。両者には一長一短があり、コアサンプルのままであるとトレーサーを均一に添加することが困難であり、一方、分取して懸濁液とすればもはや元の底泥の状態を再現し得ない³²⁾といわれる。結局、現場の状態に近いまま“観察”するという意味ではコアサンプルをそのまま用いた方が望ましいが、硫酸還元及ばす各種環境因子の影響を検討していくには均一化した試料で培養条件を任意に設定して“実験”する方が適切と思われる。以下、本稿では H_2S の回収法を中心に2つの手法の長短を比較してみる。

3.1 ストリッピング法

この方法は Jørgensen, B. B. らによって確立された³³⁾。まず、直径3 cm、長さ15~25 cmの底泥コアサンプルを採取する。採泥管の横に深さ方向に1~2 cm間隔で直径2~3 mmの穴をあけ、シリコンゴムで密栓しておく。このゴム栓を通して1 μCi の

$^{35}\text{SO}_4^{2-}$ 溶液を底泥中に注入して培養に供する。培養後のコアサンプルは-25°Cで凍結する。凍結したサンプルを一定の深さごとに切断し、Fig. 7に示す容器Aに移し、Bから1 Nの塩酸を加え、酸素フリーの窒素ガスを吹き込んでサンプルから H_2S を追い出し、吸接管C内の酢酸亜鉛に吸収させる。この H_2S の回収操作は室温で20~30分間行う。次いで酢酸亜鉛に吸収されて生成した Zn^{35}S の放射活性を液体シンチレーションカウンタで測定した後、 H_2S の生成速度、すなわち硫酸還元活性は添加した $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ に対する生成した H_2^{35}S の割合を求め、それに試料中の SO_4^{2-} 濃度を乗じ、これに RI のクエンチングを補正して算出する。

この方法を用いてフィヨルド湖の底泥中における硫酸還元活性の季節変化³⁵⁾をみると、Fig. 8に示すように最も活性が高かったのは1975年の夏季であり、底泥0~2 cm層の400 $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ であった。一方、冬季の活性は低めで、25 $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ 以下であった。全般的に硫酸還元活性は表層で高く、深度に応じて低くなる傾向であることがわかった。

以上、例示したように、ストリップング法は水界の底泥における硫酸還元活性の研究に貢献したが、次のような点で改良の余地があった。① H_2S 発生・吸収装置を設置するには十分なスペースが必要であるが、通常のドラフトでは2台程度しか収容できず、一度に多くの試料を測定することができない。②この装置はかなり高価である。③ジョイント部分が多いので、そこから H_2S が漏れる危険性がある。④不活性ガスの流速を一定にするために注意が必要である。⑤不活性ガス

Fig. 7 Instrument for stripping and absorbing hydrogen sulfide³⁴⁾.

Fig. 8 Sulfate reduction rate in the upper 10 cm of coastal marine sediment³⁵⁾.

の費用はかなり高い。従って、これらの問題点のない
 汙紙吸収法が開発されることとなった。

3.2 汙紙吸収法

ストリップング法における問題点を改善した。すな
 わち、一度に多数の試料を測定でき、 H_2S の漏出を防
 止し、不活性ガスを通気させないで済む簡易的な手法
 として汙紙吸収法が Rosser と Hamilton³⁶⁾ および
 Munson³⁷⁾ によって発表された。

汙紙吸収法では不活性ガスを通さず、吸尿管の代わり
 に酢酸亜鉛を浸した汙紙を用いて H_2S を吸収させる。
 汙紙はアコーディオン状に折り、吸収面積を大きくさせ、
 酢酸亜鉛を浸み込ませて Fig. 9 のように培養フラ
 スコ内につるしたり³⁷⁾、あるいは Fig. 10 のように試薬
 瓶の中に入れた状態で培養に供する。培養後の試料は
 塩酸または硫酸を加えて pH を下げ、 H_2S を遊離させ
 る。 H_2S を汙紙に完全に吸収させるための回収時間は
 Fig. 11 に示す検討結果に基づき24時間に設定した。

Fig. 9 Completely assembled reactions flask³⁷⁾.

Fig. 10 Completely assembled reaction bottle.

Fig. 11 Effect of trapping period on recovery ratio.

Na_2S を用いて H_2S 回収実験を行ったところ、Fig. 12 に示すように95%程度を回収することができた。なお、 ^{35}S をトレーサーとして硫酸還元速度を求める場合、RI のクエンチングおよび濾紙による吸収に対する補正をしておかねばならない。Rosser と Hamilton³⁶⁾ は Na_2^{35}S を用いてその検討を行った結果、補正係数として1.26が得られた。筆者らはクエンチングと吸収を合わせた補正係数として1.6を用いている。

Fig. 12 Relationship between recovered sulfur and added sulfur.

Rosser と Hamilton³⁶⁾ は濾紙吸収法の再現性を検討するために深さ方向に5層の底泥について硫酸還元活性を求めたところ、Table 3 に示すように泥深10~11 cm での変動係数は26%、4~5 cm でのそれは19%であったが、他に関しては13%以下に納まった。このことから、濾紙吸収法による硫酸還元活性の測定結果はかなり再現性が高いものといえよう。本法はまた、コアサンプルの状態ですulfate還元を起こさせた試料の H_2S 回収のみの手段としても用いることが可能である。

筆者らは濾紙吸収法を用いて汽水湖である中海底泥の表層5 cm 層の硫酸還元活性を求めた。底泥試料の採取には表層部が比較的容易に得られるペンシル型コアサンプラー³⁸⁾を用いた。1つの地点で3本以上のコ

Table 3 Sulfate reduction rate at different sediment depths³⁶⁾

	Sediment depth (cm)				
	0 ~ 1	4 ~ 5	7 ~ 8	10 ~ 11	14 ~ 15
Mean	333	81.0	16.5	2.66	10.6
SD	25.8	15.2	0.97	0.70	1.84
Coefficient of variation (%)	7.74	18.78	5.87	26.29	12.55

n = 5

アサンプル（直径0.5cm、長さ10cm）を採取後、ゴム栓で密栓を施し、アイスボックスに入れ研究室に搬入した。

あらかじめデシケーター内で3回酸素フリーの窒素で置換した、培養と回収とを行う反応容器(Fig. 10)を嫌気ボックスに入れ、20ml のバイアルを取り出し、その中に前述のコアサンプルを1 cm (0.5ml) ごとに切断して入れ、さらに窒素置換した底泥直上水を4.5ml 加え、底泥試料を分散させた。そのように調製した懸濁液は再び先の反応容器に戻し、ブチルゴム栓で密栓した。この操作はすべて嫌気ボックス内で窒素を噴射しながら行う。

以上の処理を施した試料を RI センターに運び、そこで注射器を用いて $1 \mu\text{Ci}^{35}\text{SO}_4^{2-}$ を注入して培養に供する。培養条件は現場の温度で20時間とした。培養時間が長い理由は試料によっては数時間の誘導期があるためである。培養後、試料の入ったバイアルに1N-HCl を添加して酸性にし、発生した H_2^{35}S を隣接する濾紙に吸収させた。次いで、濾紙の入ったバイアルを取り出し、それにシンチゾルを添加してボルテックスミキサーで十分に攪拌した後、 Zn^{35}S を液体シンチレーションカウンターで測定し、硫酸還元活性を計算で求めた。

Fig. 13 および Fig. 14 はそれぞれ中海の中心部および中海で汚濁が最も進行している米子湾において、1月と9月の硫酸還元活性の垂直分布を求めた例である。中海の中心部における0~1 cm 層の9月の硫酸還元活性は $200 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ であったが、1~2 cm 層では急激に低下し $50 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ となり、3~4 cm 層まではほぼ同じ値で、4~5 cm 層ではさらに低下した。また、1月は水温の低下に伴い各層ともに100

Fig. 13 Sulfate reduction rate of sediment at the center of Lake Nakanoumi. Samples were incubated at 25°C (●) or 8°C (○).

Fig. 14 Sulfate reduction rate of sediment at Yonago Bay in Lake Nakanoumi. Samples were incubated at 25°C (●) or 8°C (○).

nmol·cm⁻³·d⁻¹以下になったが、0～1 cm層より1～2 cm層の方が硫酸還元活性が高くなり極大を示した。この理由は底泥表層の酸化還元電位(Eh)が高くなったためと考えられる。

一方、汚濁が進んだ米子湾では中海の中心部と比べて全般的に硫酸還元活性は高く、9月の0～1 cm層では300 nmol·cm⁻³·d⁻¹以上となり、1～2 cm層でも120 nmol·cm⁻³·d⁻¹の値を示した。また、1月の0～1 cm層で200 nmol·cm⁻³·d⁻¹の値を示し、表層が常に最も高い値であった。これは米子湾の底泥表層は冬季でも強い還元状態にあるためであろうと思われる。

硫酸還元活性は、以前は硫酸還元菌の有するヒドロゲナーゼ活性を利用して、水素の吸収をマンメトリーによってポテンシャルな活性として間接的に求めていた³⁹⁾。しかし、今日、制約はあるものの、RIの利用によって直接的にH₂Sの生成速度を測定することが可能になった。中でも本稿で述べた汚紙吸収法は、当初用いられていたストリッピング法と比べて測定時のトラブルが少なく、多数の試料を扱う上で優れている。本法の活用によって、自然水域の研究のみならず水処理現場の抱える課題に対しても実験的な究明の一手段として貢献し得るものと期待される。

4. おわりに

硫酸還元菌が関与している現象についての調査研究にあたる者が遅かれ早かれ遭遇する関門は、この菌の培養であろう。本稿で紹介したMaraとWilliamsの提案になるm-ISA培地は今日まで普及をみなかったものの、筆者らが第一に推奨したい培地である。Maraは現在、英国Leeds大学の土木工学教室の教授だが、これまでも各種培地の改良を手掛けている。この培地

はコロニーが容易かつ明瞭にできるだけでなく、河川水のような硫酸還元菌の活性が抑制を受けていると考えられる試料に対して特に有利なので、m-ISA培地が「上水試験方法」に採用されたことは実に理にかなっている。

嫌気性菌のコロニーを得る一手法として、“shake agar tube”と称する試験管の中で試料と培地とを混和し、固化させる深層培養法が今日なお用いられている^{3),23)}が、目的が計数であっても分離であっても難点が多い。その点、本稿で紹介したパウチ法は当初、米国で考案されたもの¹⁶⁾であるが、わが国でも独自の素材で製品開発され容易に入手できる。硫酸還元菌への適用にあたっては、平板状なのでコロニーは見やすく、ラミネートフィルム製なので滅菌メスで容易に切開でき、釣菌もしやすいなどshake agar tubeに数段勝っているものと思われる。

本稿では主として陸水域の試料を扱う場合を例に述べてきたが、海域や極限環境下に生息する硫酸還元菌の取り扱いには別の配慮が必要となるかもしれない。海洋環境に由来する試料中の硫酸還元菌を扱う際に参考となる文献としては、すでに総説⁴⁰⁾および実験書⁴¹⁾があるので参照されたい。

わが国における硫酸還元菌の生理・生態学的研究は、チトクロームの発見⁴²⁾、完全合成培地の考案⁴³⁾、沿岸ならびに河口域での分布調査¹⁰⁾、オートラジオグラフィを用いた水田土壌断面における活性部位の観察³⁹⁾等の優れた研究が早くから着手され、当初決して諸外国に引けを取らなかった。しかし、RI使用規制の緩い外国における硫酸還元活性を軸としたこの分野における近年の進歩には著しいものがある。硫酸還元菌の培養にしても、これまでは乳酸と硫酸塩をその培地組成の基調とすることがなかなか常識化されてきたが、WiddelとPfennigが光合成細菌を培養中に、たまたま酢酸利用性の*Desulfotomaculum acetoxidans*³⁾を発見し、続いて海洋環境からも同様な*Desulfobacter postgatei*³⁰⁾を分離するに至って、硫酸還元菌の分類学的および生態学的知見は大幅に書き換えられるに及んだ⁴⁴⁾。

硫酸還元活性に関しても、最近の知見⁹⁾によれば、水界堆積物中での有機物の分解無機化に際し、硫酸還元菌の貢献度は淡水域では高々2%にしか達しないが、海域では53%も寄与していると見積もられた。このことは海洋生態系における硫酸還元菌の有機物分解者としての位置づけを明確にするのみならず、今後の廃水の嫌気的処理への可能性をも示唆している。

本稿の初めに掲げた陸上に埋設した管渠の腐食の問題でも、一般に海岸に近く、間隙水に硫酸塩が多いと考

えられる土壌環境で外部からの腐食が進行しやすいと考えられるが、硫酸塩以外の他のイオウ源にも留意する必要がある。例えば、下水中の豊富な有機物も共細菌の作用で硫酸還元菌の電子供与体、電子受容体に転換されることになる。中でも水位変動により嫌気と好気の両状態が繰り返される下水管渠の内壁にできるスライム層の酸化—還元境界層では、硫化物の自動酸化によって生成したチオ硫酸塩が再び硫酸還元菌の電子受容体として利用され“short sulfur cycle”⁴⁾を形成している可能性が考えられる。また、特殊な例ではパルプ廃水や温泉排水は各々、亜硫酸塩や元素イオウを含むが、これらも硫酸還元菌の電子受容体として利用され得るので、このような廃・排水を受ける管渠および水域では、たとえ硫酸塩に乏しくても硫酸還元菌が活発に活動できる素地があるといえよう。

硫酸還元菌の関わる課題が山積みされていく一方で、硫酸還元菌ならびに硫酸還元活性に関する知見は現在、急速に進展しつつある。よって、本稿で記述した硫酸還元菌の計数法および硫酸還元活性の測定法も、これに留まることなく、新たな知見を踏まえて、今後さらに検討を加えていく予定である。

(原稿受理 昭和62年9月26日)

引用文献

- 1) 畑幸彦 (1965) 沿岸海域の底土堆積物中における硫化物の生成, 水大研報, **14**, 37-83.
- 2) J.R. Postgate, (1979) The Sulphate-reducing Bacteria. 151pp., Cambridge University Press, London.
- 3) F. Widdel and N. Pfennig (1977) A new anaerobic, sporing, acetate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum* (emend.) *acetoxidans*, *Arch. Microbiol.*, **112**, 119-122.
- 4) H. Cypionka, F. Widdel and N. Pfennig (1985) Survival of sulfate-reducing bacteria after oxygen stress, and growth in sulfate-free oxygen-sulfide gradients, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **31**, 39-45.
- 5) N. Wakao and C. Furusaka (1976) Presence of micro-aggregates containing sulfate-reducing bacteria in a paddy-field soil, *Soil Biol. Biochem.*, **8**, 157-159.
- 6) 福原晴夫, 福井学 (1986) 新潟県湖沼の陸水生態学的研究III. 佐潟(新潟市)における硫酸還元菌数の季節変化, 新潟大学教育学部紀要, **28**, 1-13.
- 7) 竹内準一, 滝井進 (1987) 沼沼と水月湖の湖水中における硫酸還元菌の分布, 用水と廃水, **29**, 1019-1023.
- 8) 手塚泰彦 (1975) 生物指標としてのバクテリア, 「環境と生物指標2」(津田松苗, 菊地泰二編), 40-45, 共立出版.
- 9) D.B. Nedwell, (1982) The cycling of sulphur in marine and freshwater sediments. "Sediment Microbiology" (Ed. D.B. Nedwell and C.M. Brown), 74-106, Academic Press, London.
- 10) Y. Hata, H. Kadota, H. Miyoshi and M. Kimata (1965) Microbial production of sulfides in polluted coastal and estuarine regions, *Adv. Water Poll. Res.*, **3**, 287-302, Pergamon Press, Oxford.
- 11) Y. Tezuka (1966) A commensalism between the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* and other heterotrophic bacteria, *Bot. Mag., Tokyo*, **79**, 174-178.
- 12) 微生物研究法懇談会 (1975) 微生物学実験法, 199-217, 講談社サイエンティフィク.
- 13) N. Wakao and C. Furusaka (1972) A new agar plate method for the quantitative study of sulfate-reducing bacteria in soil, *Soil Sci. Plant Nutr.*, **18**, 39-44.
- 14) 松本淳彦 (1971) スライムに関する研究(2)スライムから分離した一硫酸還元菌とその培養法の考察, 都立衛研年報, **23**, 319-326.
- 15) 関文威 (1976) 水界微生物生態研究法, 126pp., 共立出版.
- 16) B.O. Bladel and R.A. Greenberg (1965) Pouch method for the isolation and enumeration of Clostridia, *Appl. Microbiol.*, **13**, 281-285.
- 17) 竹内準一, 田口幸夫 (1985) 河川水中の硫酸還元菌の計数法の検討, 第50回陸水学会講演要旨集, 171.
- 18) J.H. Brewer and D.L. Allgeier (1966) Safe selfcontained carbon dioxide-hydrogen anaerobic system, *Appl. Microbiol.*, **14**, 985-988.
- 19) 阪口玄二, 大石巖 (1975) ボツリヌス菌の簡易検査法, 食品衛生研究, **25**, 775-785.
- 20) 村上一, 神崎政子, 春田三佐夫 (1975) 嫌気性フィルムバウチ法による食品中のウェルシュ菌の検出, メディヤ・サークル, **20**, 1-4.
- 21) 清水潮 (1985) 培養計数法, 「海洋微生物研究法」(門田元, 多賀信夫編), 41-52, 学会出版センター.
- 22) APHA, AWWA and WPCF (1985) Standard Methods for the Examination of Water and Waste, 16th Ed., 1019-1029, American Public Health Association, Washington.
- 23) D.D. Mara and D.J.A. Williams (1970) The evaluation of media used to enumerate sulphate reducing bacteria, *J. Appl. Bacteriol.*, **33**, 543-552.
- 24) 土壌微生物研究会編(1977)土壌微生物実験法, 440, 養賢堂.
- 25) 日本下水道協会 (1984) 下水試験方法, 387-399, 日本下水道協会.
- 26) 日本下水道協会 (1985) 上水試験方法, 583-602, 日本下水道協会.
- 27) Y. Tezuka (1979) Distribution of sulfate-reducing bacteria and sulfides in aquatic environments, *Jpn. J. Ecol.*, **29**, 95-102.
- 28) 西島敏隆 (1968) 水圏におけるイオウの循環に関する微生物化学的研究, 修士学位論文(京大), 31pp.
- 29) 古坂澄石 (1986) 硫酸還元菌, アーバンクボタ, No25, 32-41.
- 30) F. Widdel and N. Pfennig (1981) Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids, I. Isolation of new sulfate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments, Description of *Desulfobacter postgatei* gen. nov., sp. nov., *Arch. Microbiol.*, **129**, 395-400.
- 31) 和田秀徳 (1986) 硫酸還元菌, 「微生物の分離法」, 498-501, R & D プランニング.
- 32) 河合章 (1985) 現場活性の測定法——底泥, 「海洋微生物研究法」(門田元, 多賀信夫編), 218-222, 学会出版センター.
- 33) B.B. Jørgensen (1978) A comparison of methods for the

- quantification of bacterial sulfate reduction in coastal marine sediments. 1. Measurement with radiotracer techniques, *Geomicrobiol. J.*, **1**, 11-27.
- 34) 並木博 (1982) 詳解・工場排水試験方法, 249, 日本規格協会.
- 35) B.B. Jørgensen (1977) The sulfur cycle of a coastal marine sediment (Limfjorden, Denmark), *Limnol. Oceanogr.*, **22**, 814-832.
- 36) H.R. Rosser and W.A. Hamilton (1983) Simple assay for accurate determination of [^{35} S] sulfate reduction activity, *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1956-1959.
- 37) D.A. Munson (1977) Simplified method for the determination of acid-soluble sulfides in marine sediments, *Mar. Biol.*, **40**, 145-150.
- 38) K. Satake (1983) A small handy corer for sampling of lake surface sediment, *Jpn. J. Limnol.*, **44**, 142-144.
- 39) 古坂澄石 (1968) 水田土壌における硫酸還元菌群の化学的活性について, 東北大農研報, **19**, 101-184.
- 40) 畑幸彦 (1974) 硫黄サイクルと微生物との関連, 「海洋微生物」(多賀信夫編), 187-204, 東大出版会.
- 41) 畑幸彦 (1985) 硫酸還元細菌および無色硫黄細菌, 「海洋微生物研究法」(門田元, 多賀信夫編), 117-127, 学会出版センター.
- 42) M. Ishimoto, J. Koyama and Y. Nagai (1954) Sulfate-reducing bacteria IV, The cytochrome system of sulfate-reducing bacteria, *J. Biochem., Tokyo*, **41**, 763-770.
- 43) 門田元, 三好英夫 (1964) 沿岸海域の底土中における硫酸還元菌の生態とその従属栄養生理, 京大食糧科学研報, **27**, 9-29.
- 44) N., Pfennig, F. Widdel, and H.G. Trüper, (1981) The dissimilatory sulfate-reducing bacteria, "The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria" (Ed. M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows and H. Schlegel), 926-940, Springer Verlag, Berlin.

論文要旨

糸状性微生物同定支援システムの開発に関する研究

平岡 正勝* 津村 和志* 圓佛 伊智朗*

* 京都大学衛生工学科

〈水質汚濁研究 Vol.11 No.1 (1988) pp.29~37〉

糸状性バルキングを考える上で、実際に汚泥中に出現する糸状性微生物のタイプを正確に同定し、その結果を情報として使用することの意義は、これまでの多くの研究により明らかにされている。今回、オペレータが汚泥の検鏡結果を基に、計算機と対話的に応答することで容易に同定が行えるような支援システム（知識ベースシステム）の開発を試みたので、その内容を報告し、併せて知識工学的アプローチの可能性を探ることが本論文の目的である。

試作したプロトタイプシステムは、約67%の信頼性をもつことが確認された。この信頼性（知的能力）は、知識ベースの改善によって今後の向上が望めるものである。今回の支援システムの開発を通して、下水処理分野への知識工学的アプローチの有用性が明らかになった。

硫酸還元菌の計数法および硫酸還元活性の測定法

竹内 準一* 田口 幸夫** 佐竹 研一*** 森 忠洋****

* 東京都下水道局新河岸処理場 ** 東京都水道局金町浄水管理事務所 *** 国立公害研究所計測技術部 **** 島根大学農学部

〈水質汚濁研究 Vol.11 No.1 (1988) pp.38~49〉

硫酸還元菌の計数には安定して結果の得られる MPN 法がよく、改変 ISA 培地 (Mara and Williams, 1970) を用いれば菌の生育が早いので培養期間を短縮できる。また、有機物が多いので還元剤の添加が省略でき、半流動培地にして混釈すれば流動パラフィンによる封入も要しない。この培地は沈殿を全く生じないので寒天培地中で明瞭なコロニーを作らせることが可能である。パウチに寒天培地を封じることで容易に嫌気的な平板培養ができる。

硫酸還元活性の測定は³⁵S でラベルした硫酸塩の還元速度で求める。生成した硫化水素は酸性下で不活性ガスを通気して吸収液に固定させ(ストリップング法)、放射活性を測定する。硫化水素の回収法としては、他に吸収液を含ませた濾紙に吸収させる方法(濾紙吸収法)があり、この方法を用いることによって、測定時のトラブルも少なく、迅速に多数の試料を処理することが可能となり、応用分野の調査研究にも適していると思われる。