

M06**微好気環境における硫酸還元菌の菌叢解析**

(北九州高専) ○(学)原田 奏也 ・ (正)水野 康平*

【緒 言】

環境問題への関心が高まる中、人の生活圏や産業活動区域における硫化水素の発生メカニズムの解明が待たれている。主な原因は、硫酸還元菌による硫酸の代謝とされているが、その発生メカニズムは不明な点も多い。硫酸還元菌は、硫酸を最終電子受容体として代謝して硫化水素を生成する。一般に硫酸還元菌は嫌気状態で増殖するが、複雑に多様化した細菌叢の中で硫酸還元菌が増殖する条件は、十分に予測できないのが現状である。通常、好気的環境において純粋培養した硫酸還元菌は増殖しない。しかし、好気的な排水処理施設などの硫化水素発生は多数報告されている。これは硫酸還元菌が、ヘム合成能を有し、近年、カタラーゼをはじめとする抗酸化酵素も発見され、酸素代謝能力の潜在力があるためだと考えられる。従って、古細菌 1 属を含む 23 属にまたがる多様な硫酸還元菌のいずれかには、酸素耐性を有するものも存在すると考えられる。そこで、本研究では、主に排水処理中から取得される硫酸還元菌が、どの程度、酸素耐性を有しているかを調べ、菌叢解析を通して環境中におけるその寄与を検討することを目的とする。

【方 法】**硫酸還元菌の培養**

硫酸還元菌培養のため、硫酸還元菌専用培地である Postgate 培地を作成した。Postgate 培地のオートクレーブ (121°C、20 分) 直後、モデル硝化槽の微好気排水を 1% 容量 Postgate 培地 10ml に接種した。排水を混合後、培地 pH を 6.0 から 7.4~8.0 に調整した。嫌気培養は脱酸素剤（アネロパック、三菱ガス化学）を使用した嫌気ジャーで、37°C、72 時間、行った。

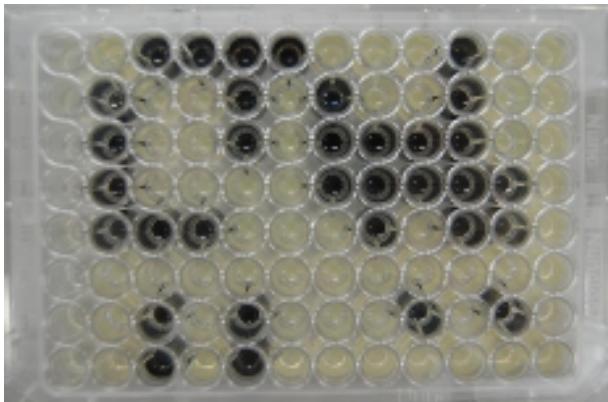
最大希釈法による硫酸還元菌の純粋分離

上記の通り培養した後、硫酸還元菌を分離するために最大希釈法を行った。すなわち、前培養液を遠心分離 (25°C、3,000 rpm、5 min) にかけて、硫化鉄の結晶を沈降させ、その上清を採取して、 $10^{-1} \sim 10^{-10}$ まで段階希釈した。段階希釈は 96 穴プレート（ナルジエヌンク社）に上清を分注して、37°C、72 時間、嫌気培養した。その後、プレート上で硫化鉄の生成による黒色化により、培養を目視判定し、生育がなくなる希釈率の 1 オーダー高い希釈率を最大希釈率とした。次に、最大希釈率で生育したプレート上の well から 10ml の新鮮 Postgate 培

地に接種して培養したものと更に $10^{-6} \sim 10^{-12}$ に希釈して $200 \mu\text{l}$ ずつ新たな 96 穴プレートに分注し、37°C、72 ~ 96 時間、嫌気培養した。その後、 10^{-12} の培養液を光学顕微鏡 ($\times 1,000$) にて観察し分離の程度を確かめた。

【結 果】

最大希釈法による分離を試みる際、 $10^{-1} \sim 10^{-10}$ までの希釈系列を作り 96 穴プレートを用いて培養した。その結果、 10^{-6} が最大希釈率であることが判明した。この結果より、1 次培養では、 10^{-6} 希釈での 96 穴プレートによる培養を行った。これを光学顕微鏡による観察の結果、異なる形態の細菌が複数種確認できたことから、純粋分離には至っていないことが分かった。そこで、 10^{-6} 希釈の培養液を用いて 10^{-12} 希釈での 96 穴プレートによる培養を行なった。その結果、1 次培養と同培養時間 (72 時間) では 硫化鉄による黒い沈殿を確認することができなかった。そこで、培養時間を 96 時間にすることで 10^{-12} 希釈の培養に成功した。また、光学顕微鏡による観察の結果、同一形態の硫酸還元菌と思われる運動性を有した細菌を発見した。本菌は、代表的な硫酸還元菌である *Desulfovibrio* 属が有する局鞭毛による走性と類似する運動性を有していた。

図. 10^{-12} 希釈での 96 穴プレートによる培養

※硫化鉄による黒色沈殿が硫酸還元菌の生えている箇所

【結 論】

今回の研究結果より、通気攪拌によって十分に微好気的な状態にあるモデル硝化槽の排水から硫酸還元菌と思われる菌の分離を行なった。

* Tel&FAX : 093-964-7303

E-mail : mizuno@kct.ac.jp