

河口域, 内陸河川および湖沼における硫酸還元菌の分布と 鉄化合物に関する一考察

杉 森 賢 司¹ 中 村 真 樹¹ 松 尾 基 之²

Distribution of Sulfate-reducing Bacteria in Estuarine Areas, Inland Rivers and
Lakes, and their Consideration with Iron Compounds

Kenji SUGIMORI¹, Masaki NAKAMURA¹, Motoyuki MATSUO²

1. はじめに

地球環境を考えた場合, 炭素や窒素の循環とあわせ, 硫黄の循環は重要な指標となっている。自然界での硫黄は硫気や火山地域において S^0 やガスの状態で存在しているが, 一方では微生物がこの硫黄の循環において酸化系や還元系として大いに関与している¹⁾。酸化系においては温泉や火山との関連性が知られており²⁻⁴⁾, 鉱山廃水処理やバクテリアリーチングの分野でも応用されている⁵⁾。また, 還元系においては硫酸還元菌 (sulfate-reducing bacteria) が都市部での悪臭の原因とされることで, 環境問題の観点から重要視されている。その悪臭の原因は H_2S で, 本菌は SO_4^{2-} を還元しエネルギーを得ることができる嫌気性菌の総称である⁶⁾。特に都市型河川での河口域においてはこの“悪臭”が生活環境上問題となり, また, H_2S が腐食物質としても注目され, その原因となる硫酸還元菌の動向について, 環境浄化や富栄養化の観点からも研究が進められている⁷⁻⁹⁾。都市型河川等における硫酸還元菌の動向を知ることは環境科学上非常に重要なことであると考え。本研究において, 都市河川における硫酸還元菌の動向を調査研究するとともに, 湖沼との比較や鉄化合物との関連性についても考察する。

2. 調査地点および材料と方法

2-1. 試料採取地点と現地調査の状況および採取試料

都市型河川の代表例として東京都と神奈川県の間にある多摩川および神奈川県中央部を流れる相模川を調査対象とした。多摩川河口においては河口から 2 km 上流の海老取川と合流する地点において, 内径 11 cm のアクリル製パイプを用いコアサンプラーにて底泥 (干潮時干潟状態になる) を採取した。相模川においては茅ヶ崎側の河口域で, 汚水処理場からの排水と本流が合流した地点において, 多摩川と同じ方法で底泥コアサンプル採取した。

内陸河川の代表例として東京都墨田区内の北十間川を調査対象とした。北十間川は隅田川に

¹ 東邦大学医学部生物学研究室 Department of Biology, Toho University Faculty of Medicine

² 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻・環境分析化学研究室 Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

接しており、江戸時代に作られた運河の一部として位置付けられている。流れはほとんどない状態だが、満潮時には海水の影響を受けている。湖沼として、沖縄県旧金武（きん）ダム湖を調査対象とした。米軍により利水用に作られた人工湖だが、周囲には養豚施設があり富栄養化が進んでいる湖である。北十間川と旧金武ダム湖はボート上から内径 2.5 cm 長さ 4 m の塩化ビニール製パイプを用いコアサンプルを採取した。

採取したコアサンプルは底泥表層上部より 3 cm ごとに切り分け、その一部は硫酸還元菌測定試料とし、滅菌チューブにとりわけた。他は酸素を通さないパウチ袋（三菱ガス化学）に入れ、試料はすべて現地で窒素ガスを充填した状態で封をし、研究室へ持ち帰った。その後、すぐに冷凍保存した。

研究対象としたのは 4 地点であるが、比較の目的で中国青海省青海湖（Qinghai Lake）の湖岸の試料についても解析を行った。

また、河川（湖）水も採取し、現地では水温、pH、電気伝導率、濁度、溶存酸素、塩分濃度について水質チェッカー U-10（堀場製作所）を用い測定した。

2-2. 硫酸還元菌の培養

硫酸還元菌を培養するには Postogate によって開発された培地（Table 1）¹⁰ を用いた。硫酸還元菌は多種あるが、今回は *Desulfovibrio* 属菌を対象とし、乳酸を電子供与体として培地に加えた。培養はパウチ袋を用い、脱酸素剤（三菱ガス化学）を封入した嫌氣的条件下で、30℃に設定したインキュベーター F1 型（Toyo Incubator）にて行った。

2-3. 硫酸還元菌の測定

硫酸還元菌の生菌数を測定する方法として、滅菌チューブ（東洋科学機材）に硫酸還元菌

Table 1 Composition of medium for *Desulfovibrio*

Medium I (980 ml) ※ pH7.4	
K ₂ HPO ₄	0.5 g
NH ₄ Cl	1.0 g
Na ₂ SO ₄	1.0 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.0 g
Sodium lactate	3.5 g
Yeast extract	1.0 g
Medium II (10 ml) ※ Adjust for low pH	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.0 g
Medium III (10 ml) ※ pH7.4	
Sodium thioglycolate	0.1 g
Ascorbic acid	0.1 g

※ After autoclaved, medium I, II and III were mixed and final pH of this medium was adjusted to 7.4

用培地を5 ml 入れ，そこに採取した試料（泥）を0.5 g 加え，試験管ミキサー S-5（Taiyo Bussan）にて1分間攪拌した。また，滅菌チューブに同培地を1.8 ml ずつ入れた状態で準備し，攪拌後の試料上清を0.2 ml 加え攪拌し，10倍段階希釈を行った。各希釈試料は滅菌シャーレ（90 × 15 mm；Iwaki 製）に0.1 ml ずつ入れ，そこに1.5%になるように寒天（Bact Agar; Difco）を加えた硫酸還元菌用培地を加え，試料が均一になるよう混和後，インキュベーターで1ヶ月間培養した。培養は嫌氣的条件下で行うため，パウチ袋を用い，脱酸素剤を封入した状態で培養した。培養後に出来た黑色コロニーを計測し，生菌数とした。

多摩川底泥の試料より分離培養された硫酸還元菌の増殖に関しては血球計算盤（ビルケルチュルク氏二重計算盤；日本臨床機械工業（株））を用い，顕微鏡下で直接計測した。増殖した試料については0，2，9，14日目に菌数測定を行った。同時に，産生された硫化水素量についても培養後，1，2，3日目に硫化水素測定用検知管（検知管法；（株）ガステック）を用い測定した。

2-4. 硫酸還元菌の同定

多摩川底泥を用い培養した微生物試料について，できた黑色のコロニーを分離株とした。形態はグラム染色後，顕微鏡観察（オリンパス）を行い，必要に応じ写真撮影を行った。

分離株の16S rRNA 遺伝子をPCRで増幅後に塩基配列決定し，NCBIにおいてFASTAプログラムによりデータベース検索を行った。塩基配列情報に基づいてUPGMA法により分子系統解析を行った。

3. 結果と考察

3-1. 試料採取地点の水と底泥の状態

現地での水温，pH，電気伝導率，濁度，溶存酸素，塩分濃度についてはTable 2に示した。また，採取したコアサンプルの状態はTable 3に示した。

比較対照とした中国青海省青海湖（Qinghai Lake）は周囲360 km，湖面の標高3,150 m，水深19 m（平均），最大深度28 mの中国最大の塩湖（Salinity 14.15 g/L）である。湖岸で測定した水温は20.5℃，pH 9.17であった。湖の北側および南東側湖岸の波打ち際や水深1 cm下の底質の状態はその表面から黑色で，裏返した石の裏面も黑色の状態で，硫化水素臭がした。

3-2. 硫酸還元菌の分離培養と分布

硫酸還元菌用培地を用い，各試料およびその10倍段階希釈試料を作製し，平板培地にて嫌氣的条件下で培養した結果，約1ヶ月後に各地点において黑色を呈するコロニーが観察された。これは培養液に含まれている鉄と硫化水素ガスが反応し，硫化鉄を形成したためこの様な色になったと考える。また，培地に電子供与体として乳酸ナトリウムを加えたことは還元電位も低く抑えてあるので，選択的に*Desulfovibrio* 属の細菌を培養することができる¹¹⁾。このことから，黑色コロニーを計測し，硫酸還元菌の分布について調べたところ，Table 4-1, 4-2の結果が得られた。多摩川と相模川の試料において，硫酸還元菌の分布は底泥表層部では少なく，多摩川では泥表層から24～27 cm，相模川では泥表層から15～18および30～33 cmの所に多く見られ，それより深部になると少なくなる傾向にあった。多摩川や相模川は流域面積が広く，さらに河口付近では干満差で水の動きがあり，泥表層部が水層から露出またはそれに近い状態

Table 2 Sampling data of Tama River, Sagami River, Kita-jyukken River and Kin Lake

	Temp.	pH	Cond.	Turb.	D.O.	Salinity
Tama R.	19.3	7.60	14.8	90	6.63	0.86
Sagami R.	21.4	7.78	23.3	36	7.70	1.24
Kita-jyukken R.	18.9	7.45	3.61	23	15.4	0.18
Kin L.	18.9	8.60	0.32	40	9.28	0.01

Table 3 Conditions of sampling mud from each point

	Condition
Tama R.	表層部は茶色がかった灰色で、砂状。20 cm より深層部では黒く粘土状で、硫化水素臭あり。
Sagami R.	上層部は小石。10 cm より深層部では泥質。多摩川試料に類似。
Kita-jyukken R.	表層部より全て黒色。
Kin L.	砂を含む泥質で黒色。他の試料より水分が多め。

にあることから、還元的な状態が保たれていないという環境下にある。また、北十間川では多摩川と相模川の状況とは異なり、底泥表層部より 36 cm の地点まで、多くの硫酸還元菌の分布が認められ、また、金武ダム湖でも底泥表層部～10 cm ならびに 30～50 cm の地点で多くの硫酸還元菌の分布が認められた。つまり、北十間川と金武ダム湖では水の動きはほとんど無く、水の汚れが目立ち悪臭もする状況なので、底泥表層部においても還元条件下にあると考えられる。北十間川の表層水中には底泥と比較し 2～3 倍量の硫酸還元菌の生息が確認され、水までも還元条件下にあると考えられた。金武ダム湖における硫酸還元菌の分布は二峰性で、10～30 cm では硫酸還元菌が少なかった。その理由として考えられるのはその部分において酸化的要因が強くなり、還元的な条件が弱くなるような要因が考えられたが、それが何かは特定できなかった。

3-3. 硫酸還元菌の同定

多摩川の試料については硫酸還元菌数計測用とは別に用意した試料を同様に培養し、硫酸還元菌用平板培地にて分離培養を試みた結果、培養後、10～20 日程で同様の黒色のコロニー（矢印）(Fig. 1) が得られた。それを純培養株とし、グラム染色後、光学顕微鏡観察を行った結果、分離株はグラム陰性の桿菌で、菌体は少々彎曲した桿状（バナナ状；ピブリオ型）を呈していた (Fig. 2)。形態からも *Desulfovibrio* 属の細菌であることが推測され、16S rRNA について他株と比較し分子系統解析を行ったところ、分離された純培養株 (Isolate) は Fig. 3 の様になり、*D. desulfuricans* と近縁関係にあった。

青海湖 (Qinghai Lake) にて採取した試料を同様に分離培養したところ、寒天平板状で国内試料より得られたものと同様の黒色コロニーが観察された。北部湖岸の試料からグラム陰性桿

Table 4-1 The distribution of sulfate-reducing bacteria for the depth of sediment, Tama River and Sagami River

Sampling Area	depth of sediments (cm)	number of bacteria (cells/1 g of sediment)
Tama River	0 ~ 3	4.5×10^2
	12 ~ 15	2.5×10^2
	24 ~ 27	2.3×10^3
	36 ~ 39	9.5×10^2
Sagami River	water	4.5×10^2
	0 ~ 3	2.0×10^2
	15 ~ 18	4.2×10^3
	30 ~ 33	3.5×10^3
	45 ~ 48	2.0×10^3

Table 4-2 The distribution of sulfate-reducing bacteria for the depth of sediment, Kita-jyukken River and Kin Lake

Sampling Area	depth of sediments (cm)	number of bacteria (cells/1 g of sediment)
Kita-jyukken River	water	1.0×10^4
	0 ~ 3	4.9×10^3
	6 ~ 9	3.3×10^3
	12 ~ 15	3.8×10^3
	18 ~ 21	3.3×10^3
	24 ~ 27	2.8×10^3
	33 ~ 36	3.7×10^3
Kin Lake	0 ~ 2.5	1.4×10^3
	2.5 ~ 10	4.8×10^3
	10 ~ 20	6.8×10^2
	20 ~ 30	5.0×10^2
	30 ~ 40	5.6×10^3
	40 ~ 50	4.0×10^3

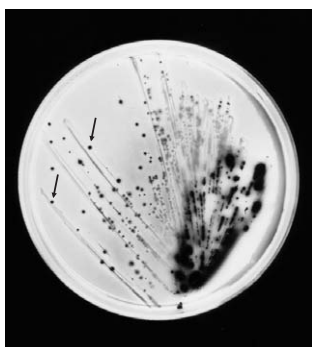


Fig. 1 Colony of isolated bacteria from Tama River sediments



Fig. 2 Gram staining of sulfate-reducing bacteria isolated from Tama River sediments

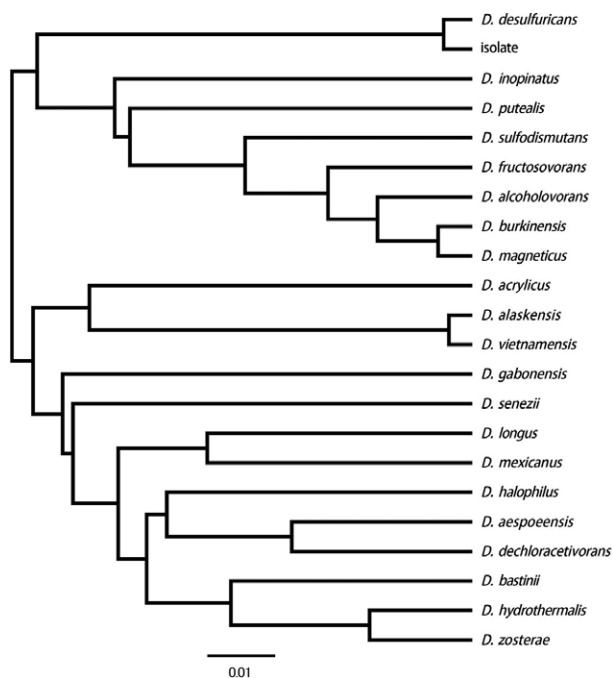


Fig. 3 Phylogenetic tree among *Desulfovibrio* species constructed from sequences of the 16S rRNA gene data

菌 1 株（まっすぐな桿菌），南東部湖岸の試料からグラム陰性桿菌 2 株（まっすぐな桿菌と彎曲型の桿菌）が得られた。16S rRNA 解析を行った結果，北部湖岸の株は *Desulfomicrobium apsheronum*，南東部の 2 株のうち彎曲した形態をとる株は *Desulfovibrio* sp. で，他株は uncultured bacterium であった。

3-4. 硫酸還元菌の増殖とそれに伴う硫化水素量

多摩川の試料より分離された硫酸還元菌 (*Desulfovibrio* sp.) を用い, その増殖状態をみたところ, Fig. 4 の様であった. 増殖に伴う硫化水素産生量は Fig. 5 の様に, 培養 2 日目にピークを迎えた.

3-5. 硫酸還元菌の分布と鉄化合物の分布に関する考察

松尾らは河口域における底質中の鉄の化学的状態を知るための調査を行っている. その手段としてメスbauer分光法 (AUSTIN S-600 メスbauer分光分析器; 線源は $^{57}\text{Co}/\text{Rh}$) を用い^{12, 13)}, 深度方向に対する鉄化合物の分布について報告しているが, 特に pyrite に関しては興味深い結果が見いだされている^{14, 15)}. pyrite とは FeS_2 であり, 硫化鉄 (FeS) 等の鉄化合物とともに河川底質より検出される¹⁶⁾ が, 硫化鉄より pH 等の変化に強く安定な物質である. 底質中での pyrite は通常の黄鉄鉱といわれている鉱石の結晶とは異なり, 木イチゴ状 (framboidal) の形態をとっていることが知られている¹⁶⁾.

底質における硫酸還元菌の分布調査と同時に行われた pyrite の分布についてみると, 硫酸還元菌の分布と pyrite の分布間には相関関係があることがわかった. つまり, 硫酸還元菌が多く生息する環境下では pyrite の量も多く, 硫酸還元菌が少ない環境では pyrite の量も少ないという^{17, 18)}. この pyrite はどのような条件下で無機的に合成されるのかについては数百度の高温, 高压環境下でおこなわれるのが通例である^{19, 20)}. しかし, それより低い 65°C での合成も報告されている²¹⁾. しかし, 河川底質においてはこのような温度の条件下において pyrite が生成されたとは考えにくい. そこで, 本研究では無機的な合成経路とは異なる条件下において pyrite が生成された可能性が高いと考えた. 本研究で用いた培地と培養条件下において, 硫酸還元菌 (*Desulfovibrio* sp.) を数日~1 年かけて培養して得た培養沈殿物についての解析^{22, 23)} では鉄の濃度にもよるが, 150~180 日目の沈殿物よりメスbauer分光法により pyrite が検出された. 硫酸還元菌を加えずに同様の条件下で培養した対照試料からは pyrite が検出されなかったことにより, 硫酸還元菌が関与することにより, pyrite が作られたと考えた²³⁾. その生成過程においても最初に pyrrhotite 様の硫化鉄ができ, その後 pyrite 化が進行するが, 1 年近く過ぎると再び pyrrhotite 様になるという報告がされた²³⁾.

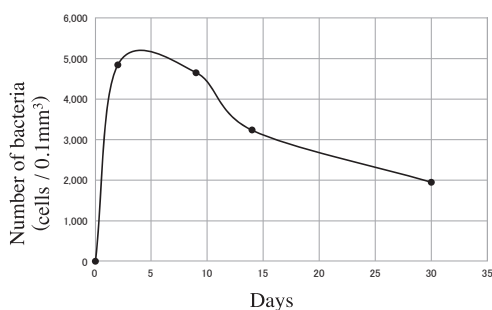


Fig. 4 Growth of sulfate-reducing bacteria

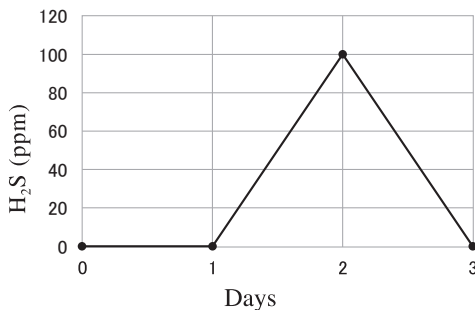


Fig. 5 H₂S production with growth of sulfate-reducing bacteria

3-6. 青海湖試料との比較

青海湖南端の湖岸では硫化水素臭がし、波打ち際は泡立っていた。石を裏返しにすると石の裏は黒色で、その下の泥も黒色であった。青海湖の底泥に関する研究は Kuno らにより行われた²⁴⁾。中国科学院が採取した 380 cm 底泥コアサンプルについて、メスbauer分光分析器を用いた鉄の状態分析により、深さ方向の底泥各地点において pyrite が検出された。青海湖の底泥に硫酸還元菌が生息することは我々の研究より明らかであるので、還元的環境と硫酸還元菌の関与がそろうことにより、pyrite が作られるという状況がここでも確認されたと考えられた。

4. ま と め

多摩川河口域底泥試料より嫌気性細菌が分離培養され、その形態と 16S rRNA の解析から分離株は *Desulfovibrio* sp. であると同定された。また、青海湖試料より同じ方法により分離純培養された 1 株は *Desulfovibrio* sp. であったが、他 2 株は彎曲をせずストレート型の形態で、16S rRNA の解析から同定されたのは *Desulfomicrobium apsheronum* と uncultured bacterium であり、後者は新種の可能性がある。*Desulfovibrio* は $3\text{SO}_4^{2-} + \text{CH}_2\text{CHOHCOOH} + 2\text{H}^+ \rightarrow 3\text{H}_2\text{S} + 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} + \text{energy}$ の様な反応を行い、安定的な硫化水素を産生しエネルギーを得ていると考えられる。

硫酸還元菌の動向についてみると、水の動きのある大型河川河口域底泥における硫酸還元菌の分布では、ある程度の深さになると菌数が増え、さらにその地点より深くなると菌数は減る傾向にあった。それは表層部よりある程度の深さになると泥の色が真っ黒な状態で観察されることと一致した。また、その部分の泥を分析すると、そこには framboidal pyrite が含まれている事がわかった。多摩川の試料では表層部より 20 ~ 30 cm、相模川の試料では表層部より 15 ~ 30 cm の中層部にて多くの硫酸還元菌と pyrite の存在が確認された。この事は中層部でケイ酸塩と結合していた Fe^{2+} が硫酸還元菌活性の高いこの領域で pyrite として固定されていると考えられた²³⁾。また、この深さは間隙水中の亜硫酸イオン、チオ硫酸イオンが増加する位置とも一致する事が先行研究で明らかになっている²⁵⁾。

北十間川と金武ダム湖における硫酸還元菌の分布は大型河川とは異なり、水中や表層部にも多くの硫酸還元菌の存在が認められた。海水の影響がないこのような場所では SO_4^{2-} の供給源が家庭排水や工場排水と考えられ、あわせて BOD、COD 値が高い事からも有機物が豊富にその排水に含まれているとも考えられている²³⁾。金武ダム湖の周辺では養豚臭がしたので、有機物が豊富な排水等の混入も考えられた。ここでは表層部より硫酸還元菌の数が多く、途中少なくともなくなったがさらなる深層部では再び多くなるという興味深い二峰性の分布が見られた。

対照とした青海湖 (Qinghai Lake) では水面下数 cm の所から還元的な環境になっており、硫酸還元菌が認められた。この湖も近隣からの生活排水が流入し、富栄養化が進み、環境問題が生じているようだ。

すべての試料採取地点において pyrite が検出され、生物が関与した pyrite 産生の可能性を示唆している結果であった。

※金武ダム湖については現在新しいダムサイトが出来、貯水量も多くなり、かつての汚れた状態ではない様子である。

参考文献

1. 安岡則武：自然界におけるイオウの循環の分子機構, 構造生物, 4: 23-33, 1998.
2. 杉森賢司, 高柳進之輔, 千頭道子, 相川嘉正: 硫黄泉に生息する *Thiobacillus* の簡便な分類・同定法, 東邦教養紀要, 16: 49-63, 1984.
3. 杉森賢司, 高柳進之輔, 代谷次夫, 加藤尚之, 塚本邦子, 相川嘉正: 箱根湯の花沢温泉 (含硫酸酸性泉) に生息する硫黄細菌の性状, 東邦教養紀要, 20: 39-48, 1988.
4. Sugimori K, Takano B, Matsuo M, Suzuki K, Fazlullin MS: Activity of sulfur oxidizing bacteria in the acidic crater lake. Proceedings of the 8th International Symposium on the Water-Rock Interaction, A. A. Balkema, Rotterdam, p327-329, 1995.
5. 伊東一郎: バクテリアリーチング, 132P, 講談社サイエンティフィック, 1976.
6. Postgate J.R.: The sulfate-reducing bacteria, Second edition, 208P, Cambridge University Press, 1984.
7. 滝井 進: 多摩川下流域における有機物の嫌氣的分解, (財)とうきゅう環境浄化財団研究助成報告書, No91, 1986.
8. 高野穆一郎: 多摩川河口域における悪臭発生機構に関する基礎的研究 一特に底泥における硫黄起源の悪臭物質について一, (財)とうきゅう環境浄化財団研究助成報告書, No146, 1993.
9. 上木厚子: 有機物の嫌氣的分解過程における細菌の生態, 生物科学, 40: 1-12, 1988.
10. 根井外喜男編: 微生物の保存法 (p179 参照), 433P, 東京大学出版会, 1978.
11. 山中健生: 微生物のエネルギー代謝, 254P, 学会出版センター, 1986.
12. 松尾基之: メスバウアースペクトロメトリーの地球化学・環境化学への応用, 一堆積物中の鉄の化学状態を指標とした堆積環境の推定一, RADIOISOTOPES, 63: 215-225, 2014.
13. 松尾基之, 小林孝彰: ^{57}Fe メスバウアー分光法による河川懸濁物の非破壊状態分析, 分析化学, 41: 527-532, 1992.
14. Matsuo M., Takano B., Sugimori K.: ^{57}Fe Mössbauer spectroscopic study of estuarine sediments taken from the Tama River in Tokyo, Il Nuovo Cimento D, 50: 757-760, 1996.
15. Kuno A., Matsuo M., Takano B.: Mössbauer spectroscopic study on vertical distribution of iron components in estuarine sediments collected from Tama River in Tokyo, Hyperfine Interact. (C), 3: 328-331, 1998.
16. Meyer B.: Sulfur cycles: Sulfur, Energy, and Environment, Elsevier / North-Holland Inc., New York, (p142-168) 448P, 1977.
17. 松尾基之: 多摩川底質中に含まれる鉄の化学状態を指標とした環境特性評価に関する研究, (財)とうきゅう環境浄化財団研究助成報告書, No185, 125P, 1997.
18. 松尾基之: 多摩川底質中の硫酸還元菌による硫化鉄化合物生成と悪臭低減に関する研究, (財)とうきゅう環境浄化財団研究助成報告書, No250, 128P, 2005.
19. Sweeny R.E., Kaplan I.R.: Pyrite Framboid Formation: Laboratory Synthesis and Marine Sediments, Econ. Geol., 68: 618-634, 1973.
20. Wilkin R.T., Barnes H.L.: Pyrite formation by reactions of iron monosulfides with dissolved inorganic and organic sulfur species, Geochim. Cosmochim. Acta, 60: 4167-4179, 1996.
21. Schoonen M.A.A., Barnes H.L.: Reactions forming pyrite and marcasite from solution: I. Nucleation of FeS_2 below 100°C, Geochim. Cosmochim. Acta, 55: 1495-1504, 1991.
22. 川上美也子: メスバウアー分光法を用いた硫酸還元菌による鉄化合物の状態変化に関する研究, 東京大学大学院理学系研究科化学専攻修士論文, 53P, 1996.
23. 小野島直子: 河川底質中における硫酸還元菌の硫化鉄化合物生成に関する研究, 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻広域システム科学系修士論文, 110P, 2000.
24. Kuno A., Zheng G.D., Matsuo M., Takano B., Shi J.A., Wang Q.: Mössbauer spectroscopic study on vertical distribution of iron species in sediments from Qinghai Lake, China, Hyperfine Interact., 141: 321-326, 2002.
25. 加藤拓弥: 河口域堆積物中の硫酸還元に関する研究, 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻広域システム科学系修士論文, 84P, 1998.