メタン発酵槽の微好気環境下で硫黄を蓄積する microbial sulfur mat の解析

東北大学 ○(学)小林 拓朗, 李 玉友, 久保田 健吾, 原田 秀樹

1. 目的

メタン発酵によって得られるバイオガスを有効利用するためには、バイオガス中の硫化水素の除去が不可欠である。硫化 水素が高濃度の場合、一般的に利用される鉄系脱硫剤は交換頻度が多くなり費用がかかる。一方、発酵槽のガス生成領域に 対して微量の空気を吹き込むことで、硫黄酸化菌の働きにより硫化水素が硫黄と硫酸及び水に変換されることが知られてい る。この脱硫方式は簡易かつ経済的であり現在注目されている。しかしながら、現状では硫化水素からの硫黄、硫酸等への 反応経路を制御できず不安定である。特に硫酸の生成は好ましくない。筆者らは硫酸を生成せず、高度に硫黄(S⁰)を蓄積し た特異な microbial sulfur mat をバイオガスプラントで発見した。本研究では、この sulfur mat を SEM&EDX、微小電極、16S rRNA gene cloning、Fluoresce in situ hybridization 等を用いた多角的なアプローチによって微生物生態学的な特徴づけを行い、 硫化水素からの sulfur mat 生成機構の解明を試みた。

2. 実験方法

サンプルは、乳牛ふん尿を処理するメタン発酵槽から採取した。このメタン発酵 槽では生成バイオガス量に対し5%~7%の割合で空気を吹き込み、バイオガス中に 含まれる硫化水素約3000~3500 ppm に対して約80%の除去率を維持している。採 取したサンプルのうちの一つについて全体図a)及び断面図b)を図1に示す。サンプ ルは厚さ2~3cm ほどの膜であり、メタン発酵槽の微好気領域において壁面全体に 一様に付着していた。断面構造を見ると、表面は白く、内部は白い層と黒い層が交 互に積み重なった構造をしている(図 1b))。SEM による写真撮影は日本電子 JSM-5800LV、EDX 分析は堀場製作所 EMAX-5770W を用いた。写真撮影部分は sulfur mat の白い層の側方断面である。16S rRNA gene clone 解析には、sulfur mat の 表面付近の白い層と黒い層の一対を直方体状に切り出し、さらに白い層と黒い層に 切り分けてからそれぞれ抽出した DNA を用いた。PCR には EUB338-I~IIImixF と UNIV1500R のプライマーペアを用いた。実験に使用した微小電極は、O₂及び H₂S 電極が Clark-type、pH 電極が L.I.X.-type(UNISENSE)である。微小電極による測定方 法は、採取したサンプルを合成ガスで通気して発酵槽と同様の条件を再現したリア



図1 採取した sulfur mat

クター内に設置し、3~4日間培養してから測定を行った。測定値は5つの異なる sulfur mat の測定の平均値とした。

3. 結果と考察

3.1. sulfur mat の構造

図2は、sulfur mat の白い層側方断面のSEM 写真及びEDX 分析の結果である。図において上が表面方向である。図2から明らかなように白い層は、鉛直方向に向かって伸びる多数の密集したフィラメント状の物質で構成されている。これらのフィラメントは長いもので 500 µm に達する(図2a))。また、表面には球状の微生物らしき物体が多数付着していた(図2c))。これらのフィラメントについて EDX 分析を行ったところ、図2に示すようにフィラメントはほとんどS元素のみから構成されていることが示された。一方、イオンクロマトグラフの分析では、この sulfur mat から SO₄²は検出されなかった。以上のことから、本研究の sulfur mat はフィラメント状をした硫黄(S⁰)を高度に蓄積しており、これらが上方へ伸びていくことで発達していったことが示唆された。

採取した sulfur mat について、Na₂S を S 源とした *Thiobacillus* medium を用いて voltex-aelation で培養し、S²消費活性を調べた ところ、生物反応由来の S²消費速度は、化学反応由来のそれの 5 倍以上であった。そのため sulfur mat 内には硫酸を生成せ ず、硫化水素を硫黄へと変換する微生物が存在することが推察された。

Key words: メタン発酵,生物脱硫,microbial sulfur mat,硫黄酸化細菌 〒980-8579 宮城県仙台市荒巻字青葉 6-6-06 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 E-mail:kobayashi@epl1.civil.tohoku.ac.jp



図 2 sulfur mat の白い層側方断面の SEM 写真及び EDX 分析

3.2. sulfur mat 内の反応機構

図3a)に sulfur mat の白い層表面からの鉛直方向微小 電極測定プロファイルを,図3b)にはそれを基に算出 した活性値を示す。pH は表面から700 µm の深さまでは 約9.0 であったが,その後直線的に減少し,3000 µm で は約7.5 となった。 O_2 は600 µm まで25 µM 程度を維持 したがその後急激に減少し1100 µm でほぼ 0 µM になっ た。H₂S は600 µm まで緩やかに減少したが,その後減 少率が拡大し1300 µm で検出されなくなった。以上か ら、 O_2 が顕著に減少した領域と H₂S が顕著に減少した 領域はほぼ同じ位置で算出される。しかし H₂S 消費活性 領域はほぼ同じ位置で算出されることから, 酸素濃度が非常に低い領域においても高い脱 <u>sampl</u> 硫活性を保持していることが示唆された。

3.3. sulfur mat 内の微生物群構造

表1に*Bacteria*を標的とした clone library を, 図4に硫黄酸化細菌に近縁な clone の系統解 新結果を示す。白い層では42%,黒い層では 34%が *H.neapolitanus*に99%の相同性であった。また 白い層で22%,黒い層で16%が *S.denitrificans*に 94-95%の相同性であった。白い層,黒い層ともに, 50%以上が硫黄酸化細菌に近縁な clone で占められ た。*H.neapolitanus*は微好気環境下で S^0 生成の報告が あり¹⁾, *S.denitrificans*は微好気~嫌気性環境下でH₂S 酸化を行う。それ故,これらの細菌が sulfur mat の構成 に寄与していることが推察された。現在,これらの細 菌の sulfur mat 内における分布と活性を把握するため FISH 法による解析を行っている。







sample	OTU	frecuency	closest match	accession	identity
White	WSM1	42/101	Halothiobacillus neapolitanus	AF173169	1172/1173 (99%)
	WSM2	22/101	Sulfurimonas denitrificans DSM 1251	CP000153	1076/1133 (94%)
	WSM3	12/101	Dysgonomonas mossii	AJ319867	1144/1149 (99%)
	WSM4	6/101	Atopostipes suicloacalis	AF445248	541/544 (99%)
Black	BSM1	37/109	Halothiobacillus neapolitanus	AF173169	1169/1171 (99%)
	BSM2	19/109	Dysgonomonas mossii	AJ319867	1140/1149 (99%)
	BSM3	17/109	Sulfurimonas denitrificans DSM 1251	CP000153	1079/1133 (95%)
	BSM4	12/109	Atopostipes suicloacalis	AF445248	1113/1125 (98%)



図4 硫黄酸化細菌に近縁な clone の系統解析

The bar shows 10% estimated divergence, and the numbers on node present bootstrap values (1000 replicate)

sulfur mat は上方へ伸びるフィラメント状の硫黄を

高度に蓄積していた。微生物による H_2S の消費は主に 600 μ m \sim 1300 μ m の深さで顕著であり O_2 が顕著に減少した領域とほぼ一致した。微生物群集においては、硫黄酸化細菌である *H.neapolitanus* と *S.denitrificans* に近縁な細菌が優勢であった。

5. 参考文献

4. 結論

1) Visser J.M. et al., Appl. Environ. Microbiol., 63, 2300-2305, 1997.