

微生物群集構造から診る高級脂肪酸阻害耐性メカニズム

東北大学 (正) ○久保田健吾, (非) 射手園章吾, (非) 谷川大輔, (正) 原田秀樹
国環研 (正) 珠坪一晃, 長岡技術科学大学 (正) 山口隆司, 産総研 (非) 関口勇地

1. 背景と目的

嫌気性廃水処理技術は、余剰汚泥の発生が好気性処理に比べ少ない上に、エネルギーとしてメタンを回収可能であることなどの理由から、高濃度有機性廃水をはじめ、今日では下水処理への適用も模索されるなど、様々な廃水種に適応されている。しかしながら、例えばパームオイル圧搾廃液など脂質を多く含む廃水への適応にはいくつかの問題を抱えている。その理由として、脂質の加水分解によって生成する高級脂肪酸が 1) 熱力学的に難分解性である、2) 汚泥に吸着し、汚泥をウォッシュアウトさせてしまう、3) 微生物に阻害性を有すること、が挙げられる。特に高級脂肪酸の阻害特性は、既往の研究より、飽和高级脂肪酸に比べ不飽和高级脂肪酸の方が阻害を受けやすく、また水素資化性メタン生成古細菌より酢酸資化性メタン生成古細菌の方が阻害を受けやすいことが知られている。

しかしながら、高級脂肪酸の分解に馴致した汚泥と馴致していない汚泥を用いて飽和高级脂肪酸と不飽和高级脂肪酸の阻害作用を比較した報告例や、高級脂肪酸の阻害が微生物コミュニティレベルに与える影響を報告した例はない。

そこで本研究では、高級脂肪酸の分解に馴致することが高級脂肪酸の阻害へ与える影響を上記の視点から評価するために、高級脂肪酸の分解に馴致した汚泥としてパームオイル圧搾廃液 (POME, Palm Oil Mill Effluent) を処理している汚泥と、馴致していない汚泥として下水処理場の消化汚泥を用いて、高級脂肪酸の阻害特性の比較を行った。また、特定の微生物群に対して定量 real-time PCR を行うことによって、高級脂肪酸の阻害作用による微生物群の挙動を把握し、阻害メカニズムを考察した。

2. 実験方法

2.1 高級脂肪酸阻害実験

供試汚泥には、S 市の下水処理場の中温消化汚泥とマレーシアで実規模で稼働している POME を処理している消化槽内の中温汚泥を用いた。POME は、パルミチン酸を結合状態で約 5,400 mgCOD/L、オレイン酸を結合状態で 3,500 mgCOD/L 含む廃液であることから、POME を処理している消化槽内の汚泥は、高級脂肪酸の分解に馴致していると考えられる。阻害実験には、飽和高级脂肪酸としてパルミチン酸 (C16:0)、不飽和高级脂肪酸としてオレイン酸 (C18:1) を用いた。実験方法は、メタン生成活性試験に準じて行い、各バイアルに高級脂肪酸と酢酸あるいは水素を加えた。

2.2 微生物群集構造解析

Bacteria と *Archaea* の 16S rRNA 遺伝子を標的としたクローニングにより、下水処理場の消化汚泥と POME 処理消化汚泥の微生物群集構造解析を行った。クローニングの結果から *Bacteria*、*Archaea*、*Syntrophomonadaceae* 科、*Methanosaeta* 属、*Methanospirillum* 属、*Methanolinea* 属を標的とした定量 real-time PCR を行った。なお定量 real-time PCR を行ったサンプルは、水素資化性メタン生成活性を評価した汚泥については基質投入後と約 12 時間経過したものを、酢酸資化性メタン生成活性を評価した汚泥については基質投入後と約 24 時間経過したものとした。

3. 実験結果

3.1 高級脂肪酸阻害特性

高級脂肪酸を添加しない系でのメタン生成活性を 100 とした場合に対する高級脂肪酸がメタン生成活性に及ぼす影響を相対的に表した結果を図 1 に示す。図 1 (a) は水素資化性メタン生成能、図 1 (b) は酢酸資化

キーワード パームオイル圧搾廃液、嫌気性ラグーン、微生物群集構造

連絡先 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 東北大学大学院工学研究科 TEL 022-795-7466

性メタン生成能を示す。水素資化性メタン生成能と酢酸資化性メタン生成能の阻害傾向から、酢酸資化性メタン生成能の方が低い高級脂肪酸負荷で相対メタン生成活性が低下しているため、阻害を受けやすいことがわかった。この結果は既往の知見とも一致している。

また、高濃度の高級脂肪酸を含む POME を分解している（すなわち馴致していると考えられる）汚泥では、下水処理場の消化汚泥と比べて、高濃度のパルミチン酸負荷でもメタン生成プロセスが破綻していないため、馴致することが阻害耐性に大きく影響すると考えられた。一方、オレイン酸の場合、両汚泥において同程度のオレイン酸負荷でメタン生成プロセスが阻害を受けたため、馴致することによる阻害耐性の向上効果は小さいと考えられた。そのため、パルミチン酸のような飽和高級脂肪酸の阻害耐性には、微生物コミュニティが大きく関係していることが推察された。一方で、オレイン酸のような不飽和高級脂肪酸の阻害耐性は、微生物コミュニティの変化だけでは大きく影響しない可能性が示唆された。

3.2 微生物群集構造解析

使用した各々の汚泥のクローニングの結果、POME を処理している汚泥と下水処理場の消化汚泥では *Bacteria*、*Archaea* とともに異なる微生物コミュニティ構造が見られた。特に POME 処理汚泥は約 50% が *Firmicutes* 門に属し、その門に属し、高級脂肪酸を分解する事で知られている *Syntrophomonadaceae* 科に属するクローンが 9/106 クローン検出された。一方、下水処理場の消化汚泥からは *Syntrophomonadaceae* 科に属するクローンは検出されなかった。*Archaea* については、両汚泥から検出された酢酸資化性メタン生成菌は、*Methanosaeta* 属に属するクローンのみであった。両汚泥で検出された *Methanosaeta* のクローン同士の相同性は 98 % 以上であった。そのため、メタン生成古細菌の中で高級脂肪酸の阻害を受けやすいとされていた酢酸資化性メタン生成古細菌の阻害耐性ポテンシャルは、株レベルで大きく異なる可能性が示唆された。また水素資化性メタン生成古細菌は、下水処理場の消化汚泥では *Methanolinea* 属や *Methanospirillum* 属に属するクローンが約半分得られたのに対し、POME 処理汚泥からは *Methanospirillum* 属に属する 1 クローン（約 3%）しか得られなかった。

高級脂肪酸の阻害作用を受けることによる微生物群の挙動を Real-time PCR によって定量を行った結果、両汚泥において、水素資化性メタン生成古細菌である *Methanolinea* 属や *Methanospirillum* 属に比べ *Methanosaeta* 属の存在比が阻害の前後によって減少したことから、微生物コミュニティレベルでも、水素資化性メタン生成古細菌に比べ酢酸資化性メタン生成古細菌が阻害を受けていることが確認された。

一方、*Archaea* と *Bacteria* の関係は、POME を処理している消化汚泥において、*Archaea* に比べて *Bacteria* の存在比が阻害の前後によって減少する傾向となった。既往の研究からは、酢酸資化性メタン生成古細菌が阻害を受けることが起因となってメタン生成プロセスが破綻してしまう阻害メカニズムが通説であったが、今回の結果は、高級脂肪酸の分解に馴致した系、あるいは高級脂肪酸の阻害耐性を有している酢酸資化性メタン生成古細菌が存在する系では、酢酸資化性メタン生成古細菌が阻害を受けてメタン生成プロセスが破綻する前に、*Bacteria* の方が先に阻害を受けている可能性が示唆された。

謝辞

この研究は環境省の環境研究総合推進費（S2-03）および科学技術振興機構の支援を受けた。

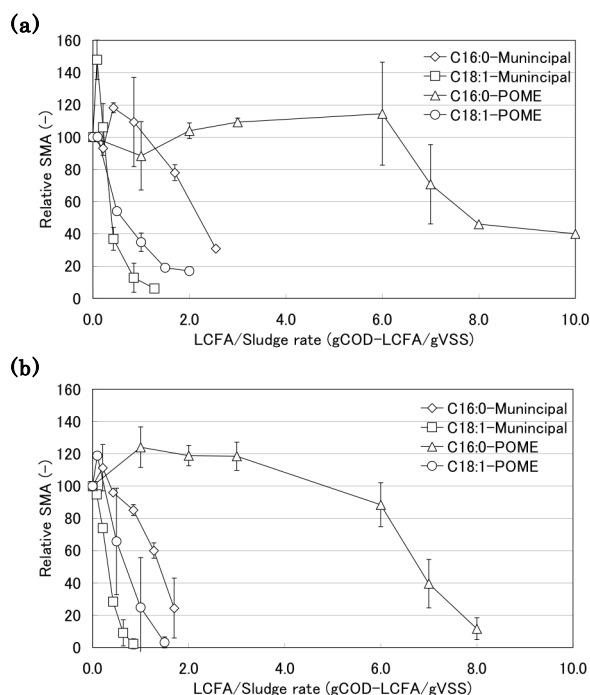


図1 相対メタン生成活性に及ぼす高級脂肪酸負荷の影響
(a) 水素資化性メタン生成能 (b) 酢酸資化性メタン生成能