

## 嫌氣的硫黄酸化反応を担う微生物の培養と微生物群集解析

長岡技術科学大学 学生会員 ○臼井考, 正会員 幡本将史, 中村明靖, 山口隆司  
東北大学 正会員 高橋優信, 長岡高専 正会員 荒木信夫, 高知高専 正会員 山崎慎一

### 1. はじめに

嫌気性生物処理法は省エネルギーかつ低コストという特徴を有しており、現在、この処理法を低温条件の下水処理に適用する新規技術の研究開発が盛んに行われている。この処理法には、低温条件下において、メタン生成古細菌の活性低下により処理性能が悪化するという問題がある。そこで我々の研究グループは、低温環境下においても活性を維持することが可能な硫酸塩還元細菌に注目し、硫黄の酸化還元サイクルを用いた処理プロセスの研究開発を行っている。この研究開発において、実下水処理を行っていたUp-flow anaerobic sludge blanket (UASB) リアクター内で、硫化物が硫酸塩に酸化される現象が確認された。硫黄酸化が起きたUASBリアクター内は酸素や硝酸塩などといった電子受容体が存在しない嫌気的環境下であったことから、この現象は既知の硫黄酸化細菌や光合成細菌による反応とは異なる反応機構と考えられた。しかし、嫌気条件下における硫黄酸化反応の報告はほとんどなく、現在のところその詳細は不明である。これまでの調査により、UASBリアクター内の酸化還元電位 (ORP) が比較的高い条件下で、尚且つ比較的低い温度条件下において、嫌氣的硫黄酸化反応が進行する事がわかっている。そのため、ORPと温度がこの反応の鍵を握っているのではないかと考えられる。そこで本研究では、電位制御型培養装置を用いてORPを制御した環境下でUASBリアクター内の汚泥を培養し、培地中の硫酸塩濃度の変化を観察することで硫黄酸化反応の進行状況を調査した。また、培養前後の汚泥の微生物群集を調査した。

### 2. 実験方法

本研究で用いた電位制御型培養装置を図1に示す。培養装置は容量約350 mLの2つの培養瓶からなり、2つの瓶の接続部には陽イオン交換膜を挟んだ。培養槽には炭素電極と参照電極 (Ag/AgCl電極) を、対照槽には炭素電極のみを取り付けた。実験には硫酸塩を含んだ無機塩培地を用い、培養槽側には硫化物として硫化ナトリウムを培地中濃度で100 mg-S/Lとなるように、また電子メディエータを培地中で2 mMとなるようにそれぞれ添加した。植種汚泥は硫黄の酸化還元サイクルを用いて実下水の処理を行っているUASBリアクター (高さ=4 m, 容量=1,148 L) から採取した。本研究ではリアクターの底部からの高さが500 mm, 1,250 mm, 2,250 mm (それぞれ第2, 第5, 第8ポート) の位置にある汚泥を採取した。汚泥は基質洗浄を行った後、培養槽側の培地に投入した。汚泥は培地300 mLに対し、20 g程度を投入した。その後、窒素パーージで槽内を嫌気状態にした後、完全密閉した。電位制御装置と各槽の電極を接続し、制御装置で培地のORPを-200 mVに調整し、暗所20 °Cで培養を開始した。また培養前後の汚泥からDNAを抽出し、細菌の16S rRNA遺伝子を標的としたTerminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 解析を用いて、培養前後における微生物群集の変化を解析した。

### 3. 実験結果および考察

嫌氣的硫黄酸化反応に対する植種汚泥の影響を調べるため、電位制御装置を用いて電位を-200 mVに設定し、UASBリアクター内汚泥を用いて培養を行った。培養期間を通して、硫酸塩濃度が上昇を示していればその実験系では硫黄酸化反応が進行していると判断した。図2にUASBリアクターの第2ポートから採取した汚泥 (2010年10月採取) を用い

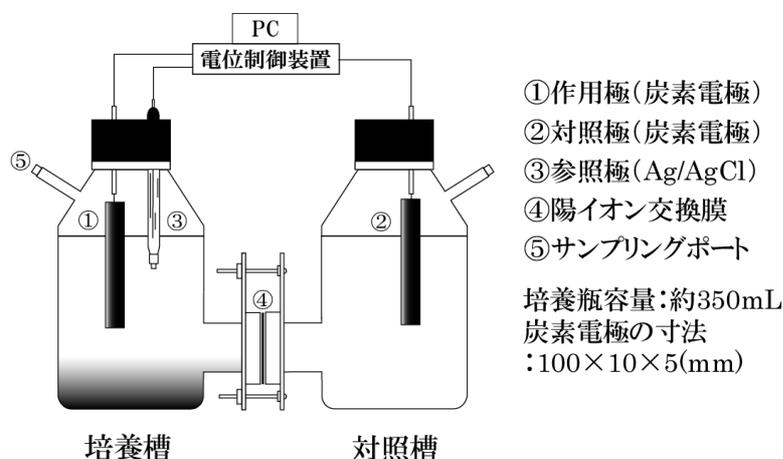


図1 電位制御型培養装置の概要図

キーワード：嫌気性処理, 硫黄酸化反応, 酸化還元電位

連絡先：〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1 長岡技術科学大学 環境・建設 電話番号：0258 (47) 9642

た実験系と、そのコントロール系(汚泥を投入していない実験系)の硫酸塩濃度の経日変化を示す。培養3日目までは硫酸塩濃度に大きな変化は見られなかったが、それ以降汚泥を投入した実験系では顕著な硫酸塩濃度の上昇が観察された。一方、コントロール系では培養期間内に硫酸塩濃度の上昇は見られなかった。したがって、汚泥を用いた実験系では嫌氣的な硫酸化反応が進行していたと考えられる。次に、異なる汚泥を用いても硫酸化反応が進行するか検討するため、採取ポートおよび採取時期の異なる第5、第8ポート(2011年5月採取)から採取した汚泥を用いた実験系と、汚泥を投入していないコントロール系を設置し、培地のORPを-200 mVに設定して計3回のバッチ培養実験を約200日間継続して行った。バッチ培養実験は、同一の汚泥を繰り返し培養し、培地の入れ替えを行うまでを1バッチとした。実験の結果、いずれのバッチ培養実験においても、培養日数の経過と共に培地中の硫酸塩濃度が上昇するという現象が見られた。このバッチ培養実験結果の一例を図3に示す。汚泥を用いた2つの実験系については共に培養開始後の数日間は硫酸塩濃度の大きな変化は見られなかったが、培養開始後の10日目前後から顕著な硫酸塩濃度の上昇が観察された。一方、コントロール系では培養期間内に硫酸塩濃度の上昇は見られなかった。したがって、嫌氣的硫酸化反応には汚泥内の微生物が重要な役割を果たしていると考えられる。また、2つのバッチ培養実験の結果から、採取時期が異なる汚泥を培養に用いることで硫酸化の進行速度が変わることが確認された。これは採取時期のUASB内温度と微生物に何らかの関係があると考えられる。次に、これらのバッチ培養実験で用いた汚泥中の微生物群集をT-RFLP解析を用いて解析した。解析には第5ポート汚泥の培養前のものと、培養167日目に培養槽から採取したものをを用いた。これらの汚泥におけるT-RFLP解析結果を図4に示す。培養前後の結果を比較すると、培養後の結果では培養前には見られなかったピークが確認された。このことから、電位を制御した環境下でUASB内汚泥を培養することで嫌氣的硫酸化反応に関与すると考えられる細菌群集が増殖した可能性が考えられる。

4. まとめ・今後の予定

UASBリアクターから採取した汚泥を用いてORPを-200 mVに制御した状態で培養を行い、嫌氣的硫酸化反応の進行状況を調査した結果、培養日数の経過とともに培地中の硫酸塩濃度が上昇し、硫酸化反応が進行することが確認できた。また、異なる種類の汚泥を用いて培養を行った場合でも反応の進行が確認できた。汚泥を投入していない実験系では硫酸化反応が進行しなかったことから、この嫌氣的硫酸化反応は微生物の働きによるものであることが示唆された。さらにT-RFLP解析の結果から、培養前後で汚泥内の微生物叢に違いが見られたことから、嫌氣的硫酸化反応を担う微生物が存在し、反応に関与している可能性が考えられた。今後はこの実験で用いた汚泥について詳細な微生物解析を行い、嫌氣的硫酸化反応に関与している微生物を明らかにするとともに、ORPを変化させた培養を行い、ORPが硫酸化反応へ及ぼす影響を詳細に調査する予定である。

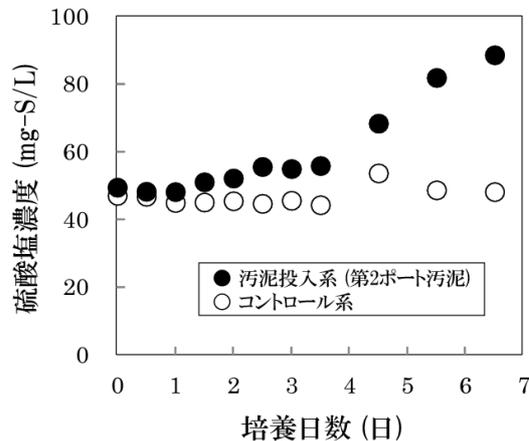


図2 UASB内汚泥(第2ポート)を用いてORP制御培養を行った際の硫酸塩濃度の変化

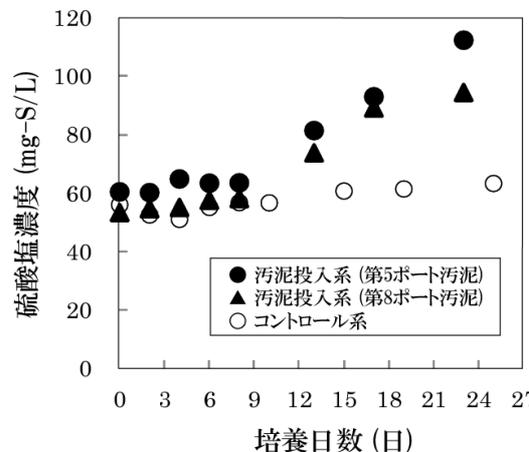


図3 第5、第8ポートの汚泥を用いてORP制御培養を行った際の硫酸塩濃度の変化

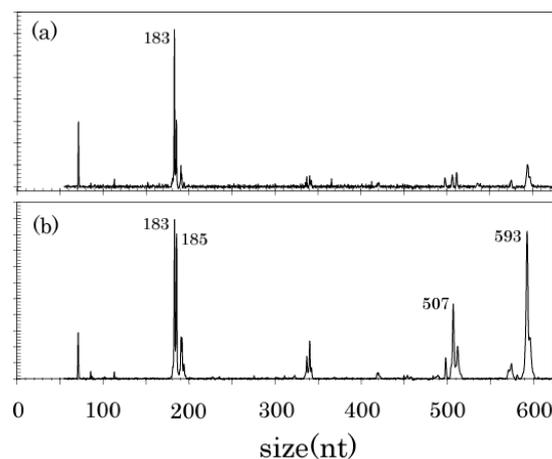


図4 第5ポート汚泥のT-RFLP解析結果 (a)培養前の汚泥 (b)培養167日目の汚泥

汚泥を投入していない実験系では硫酸化反応が進行しなかったことから、この嫌氣的硫酸化反応は微生物の働きによるものであることが示唆された。さらにT-RFLP解析の結果から、培養前後で汚泥内の微生物叢に違いが見られたことから、嫌氣的硫酸化反応を担う微生物が存在し、反応に関与している可能性が考えられた。今後はこの実験で用いた汚泥について詳細な微生物解析を行い、嫌氣的硫酸化反応に関与している微生物を明らかにするとともに、ORPを変化させた培養を行い、ORPが硫酸化反応へ及ぼす影響を詳細に調査する予定である。