

嫌氣的硫黄酸化反応の発生時および非発生時における微生物群集構造の比較

長岡技科大院・工 (学)○中原 望, (学)黒田 恭平, (学)チャンティタントウイ
(正)幡本 将史, (正)山口 隆司

1. はじめに

嫌氣的硫黄酸化反応は, 都市下水を処理する上昇流嫌氣性スラッジブランケット (UASB) 反応槽において下水温が低下する冬期に確認された¹⁾。嫌氣的硫黄酸化反応は, UASB 反応槽下部において硫酸塩還元により生成された硫化物が, 反応槽上部にて硫酸塩へと再酸化される現象が嫌氣条件下で起こる反応である。本研究では, 数種類の COD 源および硫酸塩を主成分とした人工基質を用い, ラボスケールの反応槽で嫌氣的硫黄酸化反応を再現することに成功した²⁾。しかしながら, 嫌氣的硫黄酸化反応の反応機構は明らかになっておらず, 発生に関与する微生物を明らかにすることが急務である。

本研究では供給基質の違いにより, 嫌氣的硫黄酸化反応が発生した系と発生しなかった系において, 微生物群集の違いを 16S rRNA と 16S rDNA に基づいて比較し, 嫌氣的硫黄酸化反応に関与していると考えられる微生物群を調査した。

2. 実験方法

2-1. 実験装置

本実験に用いた UASB 反応槽は, 内径 0.1 m, 反応部高さは 1.75 m, 有効容積 13.7 L とした。UASB 反応槽には, 流入部 (高さ 0 m) から 0.3 m ごとに 5 つのサンプリングポートを設けた。植種汚泥には, 嫌氣的硫黄酸化が確認された下水処理 UASB 反応槽のグラニューール汚泥を用い, 高さ 1.2 m 程度まで投入した。UASB 反応槽は, 15°C 程度に保った恒温室内に設置した。

供給基質は, COD 源に乳酸塩またはギ酸塩, 硫黄源に硫酸塩, pH 調整剤として重炭酸塩を用い, 栄養塩を添加して作成した。基質の COD は, 200~300 mg/L, 硫黄濃度は 1.5mM (50 mg-S/L) に調整した。HRT は 8 h とした。

2-2. 微生物群集構造解析

乳酸塩を COD 源とした期間とギ酸塩を COD 源とした期間において, UASB 反応槽の Port 1 (高さ 0.3 m), Port 2 (高さ 0.6 m) および Port 3 (高さ 0.9 m)

から汚泥を採取し, 16S rRNA および 16S rDNA に基づく微生物群集構造解析を行った。RNA 抽出には FastRNA Pro Soil-Direct Kit (MP Biomedicals 社) を用い, 得られた RNA は Univ806R を使用して逆転写を行ったのち, Univ515F で PCR 反応を行った。DNA 抽出には FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals 社) を用い, 得られた DNA は, Univ515F-Univ806R のプライマーセットを用いて PCR 反応を行った。

超並列 DNA シークエンシングには MiSeq reagent Kit v2 (500 サイクル, illumina 社) を用いた。得られた全ての 16S rRNA 遺伝子配列のデータ解析には QIIME パイプラインを用い, 系統分類には Greengenes ver. 13_8 を用いた。BLAST による属レベルでの分類を行った。

3. 実験結果

3-1. 水質プロファイル

図-1 に水質プロファイル結果を示す。乳酸塩を供給基質に用いた場合, Port2 (0.6 m) まで, 硫酸塩が硫化物に還元された。Port 2 (0.6 m) から Port3 (0.9 m) にかけては, 硫化物濃度が減少し, 硫酸塩濃度が増加する嫌氣的硫黄酸化反応が確認された (図-1 a)。

ギ酸塩を供給基質に用いた場合, Port1 (0.3 m) まででほぼすべての硫酸塩が硫化物へと還元された。以降, 硫化物, 硫酸塩ともに濃度変化はほぼなく,

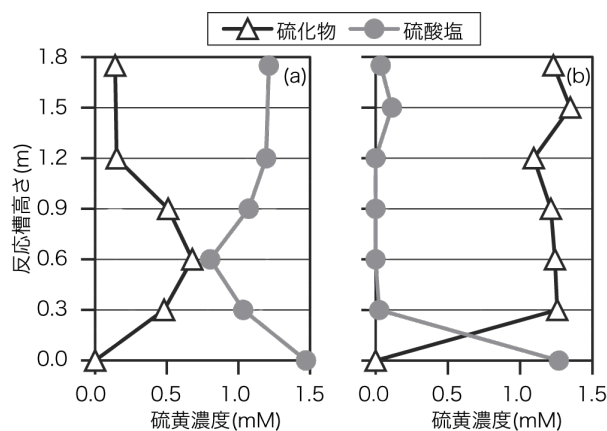


図-1 水質プロファイル
(a) 乳酸塩, (b) ギ酸塩

キーワード: 嫌氣的硫黄酸化, 硫酸還元細菌, 古細菌
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
TEL: 0258-47-9612 E-mail: s145023@stn.nagaokaut.ac.jp

嫌氣的硫黄酸化反応は確認されなかった (図-1 b). これより, 供給する基質 (COD 源) は嫌氣的硫黄酸化の発生に影響を与えることが分かった.

3-2. 微生物群集構造解析

表-1 に各供給基質における 16S rRNA/16S rDNA 検出率を示す. 嫌氣的硫黄酸化反応が確認された乳酸塩を用いた系では, 16S rRNA に基づいた微生物群集解析結果から, *Desulforbulbus* 属細菌, *Desulfohabdus* 属細菌の硫酸塩還元細菌が高い検出率を示した. 古細菌においては, 酢酸資化性の *Methanosaeta* 属の検出率が最も高かった (表-1 A).

一方で, 嫌氣的硫黄酸化反応が確認されなかったギ酸塩を用いた系では, 16S rRNA/16S rDNA において, 酢酸を生成する *Acetobacterium* 属細菌が優占して検出された. 次に従属栄養細菌である *Desulfomicrobium* 属細菌の硫酸塩還元細菌が多く検出された. 古細菌においては, 16S rRNA に基づく微生物群集構造解析結果から, H₂/CO₂ 資化性の *Methanobacterium* 属が多く検出された (表-1 B).

嫌氣的硫黄酸化反応の発生時と非発生時に検出された微生物群のうち, 16S rRNA, 16S rDNA とともに *Desulfomicrobium* 属の硫酸塩還元細菌の検出率が著しく変化していた. また非発生時には, 16S rRNA において嫌氣的硫黄酸化発生時に高い検出率を示した *Methanosaeta* 属に代わり, *Methanobacterium* 属が高い検出率を示した.

4. 考察

嫌氣的硫黄酸化反応は, 硫酸塩ではなく硫化物を硫黄源として用いた場合, 発生しなくなることが報告されている²⁾. 従って, 嫌氣的硫黄酸化反応の発生には, 反応槽下部にて硫酸塩還元反応が起こることが重要であると考えられている. ギ酸塩を供給した場合では, 反応槽下部にて硫酸塩還元反応が起こ

っていたのにも関わらず, 上部での硫黄酸化反応は確認されなかった (図-1 b). 乳酸塩とギ酸塩を供給した場合の菌叢を比較したところ, *Desulfomicrobium* 属細菌の検出率の変化が顕著であった. このことから, 硫酸塩還元細菌の種類の違いが嫌氣的硫黄酸化反応の発生の有無に関与している可能性が考えられた. また, 嫌氣的硫黄酸化非発生時は, 基質としてギ酸塩を供給したため, *Acetobacterium* 属細菌 (*Clostridiales* 目) が優占したと考えられた. 既報でも 9℃の低温でギ酸塩を炭素源, 硫酸塩を硫黄源とした嫌気性流動床内で *Desulfomicrobium* 属細菌と *Clostridiales* 目の未培養微生物が顕著に検出されたと報告されている³⁾. 本研究においても, ギ酸塩を供給した場合には *Acetobacterium* 属細菌と *Desulfomicrobium* 属細菌が優占した. このことから, これらの微生物が優占した際には, 硫酸塩還元反応のみしか起こらず, 嫌氣的硫黄酸化反応の発生機構に *Desulfomicrobium* 属細菌は関与しない可能性が考えられた.

5. おわりに

嫌氣的硫黄酸化の発生の有無には, 供給する基質が影響することがわかった. また, 乳酸塩を用いて嫌氣的硫黄酸化を再現した場合, *Desulforbulbus* 属, *Desulfohabdus* 属の硫酸還元細菌が重要である可能性が示された.

6. 今後の予定

有機酸などの代謝産物の定量を行い, 嫌氣的硫黄酸化反応のより詳細な反応機構の解明を行う.

参考文献

- 1) Takahashi, M. et al. *Bioresource Technol.* 102 pp.753-757, 2011.
- 2) 大槻ら, 第 48 回日本水環境学会年会発表講演集, pp.504, 2014.
- 3) Auvinen, H. et al. *Biotechnol Bioeng.* 104 pp.740-751, 2009

表-1 各供給基質における 16S rRNA/rDNA の検出率
(A) 乳酸塩 (B) ギ酸塩

(A) 供給基質：乳酸塩						
Genus	RNA_Port1	RNA_Port2	RNA_Port3	DNA_Port1	DNA_Port2	DNA_Port3
<i>Desulforhabdus</i>	17.3%	22.1%	15.9%	11.9%	17.0%	12.0%
<i>Methanosaeta</i>	4.8%	11.3%	14.2%	3.4%	7.8%	10.1%
<i>Trichococcus</i>	1.2%	0.3%	0.1%	23.1%	7.6%	4.2%
<i>Desulforbulbus</i>	5.9%	9.3%	4.9%	0.7%	0.6%	0.5%
<i>Desulfomicrobium</i>	6.2%	2.8%	2.4%	3.0%	1.6%	0.6%
<i>Uncultured bacteria (Clostridiaceae)</i>	0.1%	0.1%	0.7%	1.7%	3.9%	9.8%

(B) 供給基質：ギ酸塩						
Genus	RNA_Port1	RNA_Port2	RNA_Port3	DNA_Port1	DNA_Port2	DNA_Port3
<i>Acetobacterium</i>	49.4%	30.3%	18.8%	42.4%	34.6%	18.3%
<i>Desulfomicrobium</i>	18.3%	26.2%	22.5%	27.4%	27.2%	25.1%
<i>Methanobacterium</i>	4.8%	10.5%	7.8%	1.5%	3.2%	3.9%
<i>Desulforhabdus</i>	0.0%	0.8%	9.2%	0.0%	0.5%	4.8%
<i>Methanosaeta</i>	0.3%	0.8%	3.2%	0.7%	2.7%	6.4%
<i>Xanthobacter</i>	4.7%	3.3%	1.3%	2.4%	1.1%	0.4%