

嫌氣的硫黄酸化反応が発生した UASB リアクター保持汚泥中の微生物群集構造の解析

長岡技術科学大学大学院 学生会員 ○内田 翔太

長岡技術科学大学 正会員 幡本 将史, 山口 隆司

1. 研究背景, 目的

嫌氣的硫黄酸化反応とは硫酸塩が UASB 下部で還元された後再度上部で酸化される現象であり、本研究室での硫酸還元菌の機能を利用した低温条件 UASB (Up-flow Anaerobic Sludge Blanket) の研究において発見された¹⁾。この反応は水温 17℃以下, ORP は-200~-300 mV の条件で, 重炭酸イオンを供した状態で発生することが知られている。又, 当初は都市下水に硫酸塩を添加した際に発生が確認されていたが乳酸と硫酸塩を供給した状態でも発生することが判明している²⁾、しかしながら現在も本反応における反応系路は解明されておらず, 関与微生物も不明である。一方で嫌氣的硫黄酸化反応が確認された UASB 内部の汚泥の微生物解析を実施したところ僅かながら硫黄酸化細菌が確認された³⁾。一連の研究では硫黄酸化細菌について系統学的解析を実施した例がなく, 系統学的解析により硫黄酸化細菌の評価を行うことで関与微生物についての知見が得られると考えられる。本研究では UASB 内部で確認された硫黄酸化細菌について系統学的解析を行い, 関与微生物の系統分類について調査した。

2. 実験, 分析方法

2. 1 実験装置

実験には高さ 1.5 m, 有効容積 7.6 L の UASB リアクターを用いた。リアクターは 15℃の恒温室に設置し, HRT を 8 時間とした。実験には供給基質中の有機物源の異なる 3 系 (UASB1: 乳酸ナトリウム, UASB2: 乳酸ナトリウム+酢酸ナトリウム, UASB3: 乳酸ナトリウム+ギ酸ナトリウム, いずれも濃度は 300 mg-CODcr/L) を実験に使用した。また, 供給基質には, 有機物源の他に硫黄源として硫酸ナトリウムを 1.5 mM, 緩衝剤として重炭酸ナトリウムを 15 mM 混合し供給した。

2. 2 微生物群集構造解析

微生物群集構造解析は, 嫌氣的硫黄酸化反応が確認された UASB 内部の汚泥について実施した。試料はリアクター高さ 0.3 m 及び 0.9 m 地点から採取した。DNA 抽出には ISOIL for Beads Beating ((株) NIPPON GENE) を使用し, 抽出した DNA は原核生物の 16S rRNA 遺伝子を標的とした Univ515F-Univ806R のプライマーセットを用い, PCR を行った。超並列 DNA シーケンシングには MiSeq reagent Kit V2 (illumina 社) を用いた。得られた遺伝子配列は相同性 97%以上を同一の Operational Taxonomic Unit (OTU) とし, 系統分類は Greengenes データベース Ver. 13_8 を用い, BLAST により属レベルまで分類した。硫黄酸化細菌の系統樹は MEGA7 を用い近隣結合法で作成した。

3. 実験結果及び考察

汚泥解析に際し, 運転 332 日目にプロファイル実験を実施した。その結果, 硫化物濃度が高さ 0.3 m 地点で上昇し, それに伴い硫酸塩濃度の減少も確認された。また, 0.9 m 地点においては硫化物濃度の減少及び硫酸塩濃度の上昇が見られ, 嫌氣的硫黄酸化反応の発生が確認されたため, 汚泥解析も実施した。微生物群集構造解析の結果, 細菌及び古細菌の平均検出率は, 0.3 m 地点ではそれぞれ 94.1%, 5.9%で, 0.9 m 地点ではそれぞれ 95.1%, 4.9%であった。表 1 に装置内で優占した微生物科とその検出率を示す。古細菌においてはいずれのリアクター及び高さ地点においても *Methanomicrobia* 綱及び *Methanobacteria* 綱のメタン生成古細菌が優占していることが確認された。0.3 m 地点では硫酸還元菌である *Syntrophobacteraceae* 科細菌が最も優占した。0.9 m 地点では *Syntrophobacteraceae* 科細菌の割合が減少し, *Anaerolinaceae* 科細菌の割合が増加した。*Anaerolinaceae* 科細菌は培養例の少ない細菌群であ

キーワード 嫌氣的硫黄酸化, UASB, 微生物群集構造解析, 系統学的解析

連絡先 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1, TEL : 0258-47-9612 Mail : s165036@stn.nagaokaut.ac.jp

り、現時点では硫黄化合物を代謝できる株は確認されていない。従って、これらの細菌群が嫌氣的硫黄酸化反応に及ぼす影響は不明である。表 2 に本研究で検出された硫黄酸化細菌の属する科とその割合を示す。UASB1 及び 2 の 0.9 m 地点では *Halothiobacillaceae* 科細菌の検出率が増加し、*Acidithiobacillaceae* 科細菌も確認された。UASB3 では、UASB1 及び 2 で検出されなかった *Thiotrichaceae* 科細菌が確認された。今回検出された硫黄酸化細菌の 16S rRNA 遺伝子配列を用いて作成した系統樹を図 2 に示す。UASB1 で確認された OTU1893 は硫化物濃度の高い熱水で確認された *Thiobacillus barengensis* の配列⁴⁾と比較的近いことが確認された(相同性 97%)。この他に UASB1 及び 2 で確認された OTU1446 は *A. ferrooxidans* に、UASB2 で確認された OTU2449 は *Halothiobacillus* 属細菌とそれぞれ近縁であることが示された(相同性は、OTU1446 : 99%, OTU2449 : 100%)。一方で他の OTU (3431, 295, 4415, 375 及び 3754) と既知の硫黄酸化細菌の 16S rRNA 遺伝子配列の相同性は低いことが示唆された。また、UASB3 において検出された硫黄酸化細菌は既知の硫黄酸化細菌を含む *Thiotrichaceae* 科細菌であったものの、系統解析を行った結果 *Salinispirillum marinum*⁵⁾ の配列が最も近縁であった。この細菌は海洋沿岸部での単離が報告されており⁵⁾,

表 1 装置内で優占した微生物科と検出率 [%]

優占微生物科		高さ地点	
		0.3 m	0.9 m
UASB1	<i>Syntrophobacteraceae</i>	32.7	15.4
	<i>Anaerolinaceae</i>	20.2	29.2
	<i>Clostridiaceae</i>	4.12	8.54
UASB2	<i>Syntrophobacteraceae</i>	56.4	24.7
	<i>Anaerolinaceae</i>	11.1	25.9
	<i>Clostridiaceae</i>	3.84	4.35
UASB3	<i>Syntrophobacteraceae</i>	22.5	19.7
	<i>Anaerolinaceae</i>	21.8	30.6
	<i>Clostridiaceae</i>	3.30	4.46

表 2 確認された硫黄酸化細菌の科とその検出率 [%]

硫黄酸化細菌科		高さ地点	
		0.3 m	0.9 m
UASB1	<i>Acidithiobacillaceae</i>	0	0.0056
	<i>Halothiobacillaceae</i>	0.0046	0.12
	<i>Thiotrichaceae</i>	0	0
UASB2	<i>Acidithiobacillaceae</i>	0	0.0038
	<i>Halothiobacillaceae</i>	0	0.48
	<i>Thiotrichaceae</i>	0	0
UASB3	<i>Acidithiobacillaceae</i>	0	0
	<i>Halothiobacillaceae</i>	0	0
	<i>Thiotrichaceae</i>	0	0.0043

Salinispirillum 属においては現時点で硫黄酸化を行う株は報告されていない。従って、本研究において UASB3 内部で確認された *Thiotrichaceae* 科細菌は硫黄酸化を行う細菌と異なることが示唆された。

4. まとめ

嫌氣的硫黄酸化反応が進行する UASB 上部では *Anaerolineaceae* 科細菌の割合が増加したものの硫黄酸化反応との関係性は不明であった。検出された硫黄酸化細菌について系統学的解析を実施した結果、UASB1 で確認された硫黄酸化細菌の配列は高温の硫黄泉で確認された *T. barengensis* の 16S rRNA 遺伝子配列と近縁であることが確認された。また、UASB2 では *Halothiobacillus* 属細菌に近縁な配列が検出された。また、これらのリアクターに供給している有機物種は異なっており、有機物の違いにより検出される硫黄酸化細菌が異なることが示唆された。

参考文献

1) Takahashi et al, Bioresource Technology.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) 内田ら, 第51回日本水環境学会年会発表講演集, pp.60, 2017
4) Hedoin et al, Applied and Environmental Microbiology, v. In press, 2004
5) Shahinpei et al, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64(PT 11), pp. 3610-3615, 2014

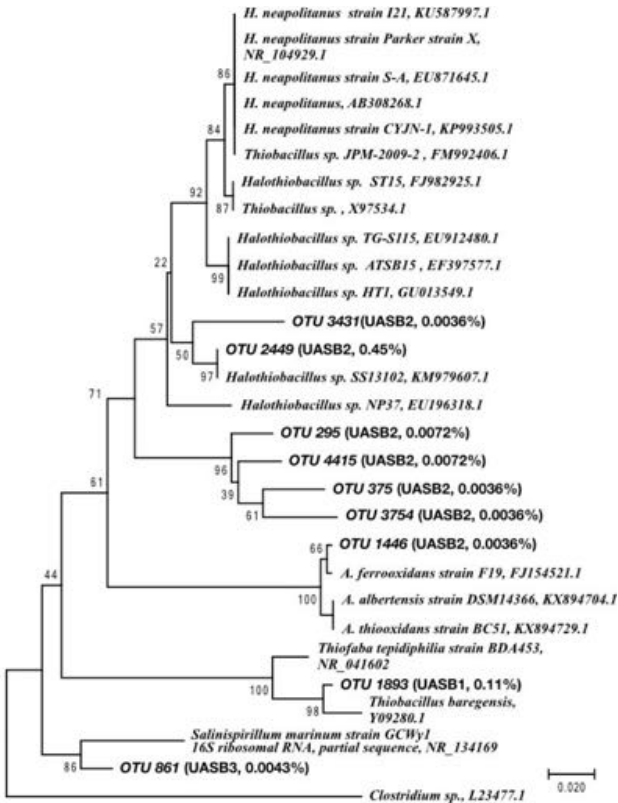


図 2 UASB 槽内部で検出された硫黄酸化細菌の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統解析結果 (OTU 表記が装置内で確認された配列)