

木質を用いた脱窒生物ろ床 における硫酸塩還元細菌の役割

金沢大学大学院自然科学研究科 朱 健慶
金沢大学大学院自然科学研究科 学 山下 恭広
金沢大学大学院自然科学研究科 正 池本 良子

1. はじめに

閉鎖性水域の富栄養化の進行を抑制するためには、排水処理における窒素除去が不可欠である。しかし、小規模な下水処理施設や浄化槽、産業排水処理の処理水には、有機炭素源がほとんど含まれていないことから、生物学的窒素除去を行なうためには、電子供与体の添加が必要である。電子供与体として、木質系の廃棄物が有望視されているが、脱窒速度が遅いことが普及の妨げとなっている。筆者らは、木質を電子供与体とした脱窒について検討を行い、木質内に脱窒細菌とともに硫酸塩還元細菌が増殖していることを報告した。木質内の硫酸塩還元細菌の役割を明らかにすることは、脱窒促進のために重要であると考えられる。

そこで、本研究では、長期運転を行っていた杉間伐材を充填した無酸素生物ろ床を終了させ、回分実験により、木質担体内部生物膜の活性を測定し、PCR法により硫酸塩還元細菌の群集解析を行った。

2. 実験方法

(1) 実験装置と運転方法

実験装置は、図1のような内径62mm、高さ330mmの亚克力製カラムを用い、中に杉間伐材を約10mm角にカットしたものを180g充填し、人工排水(NaHCO_3 35mg/l, CaCl_2 46mg/l, KH_2PO_4 46mg/l, K_2SO_4 58mg/l, NaNO_3 85mg/l)を通水して約1800日間運転を行っていた。

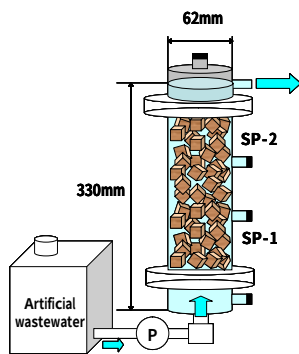


図1 実験装置の概要

表1 回分実験条件

	S1	S2	S3	N1	TN1
木質 (g乾燥質量/90ml)	8(表面削った)	8	8	8	8
セルロース(g/90ml)	-	-	100	-	-
基質(mg/l)					
K_2SO_4	181	181	181	-	-
NaNO_3	-	-	-	137	137
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	250
CaCl_2	46	46	46	46	46
KH_2PO_4	46	46	46	46	46
NaHCO_3	35	35	35	35	35
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24

(2) 処理槽内生物膜の活性測定

運転終了時に処理槽内の木質を取り出し、回分実験によって硫酸塩還元活性、脱窒活性、硫黄脱窒活性を測定した。回分実験の条件を表1に示す。回分実験は、100mlのバイアル瓶を用いて、乾燥重量約8gの木質担体をバイアル瓶に投入し、窒素パージした各条件の基質を90ml入れ、密閉して20℃の恒温室内で静置培養を行なった。S1の条件のみ、木質担体の表面を約0.5mm削ったものを使用した。0, 24, 48, 72時間ごとに採水し、硫酸塩、チオ硫酸塩、硝酸塩、有機酸、重炭酸塩の分析を行った。

(3) 微生物群集解析

LoyらとDalyらの方法に準拠し、16S rRNA遺伝子をターゲットとして、硫酸塩還元細菌のPCRを行った。表2に実験に用いたプライマーを示す。

3. 実験結果と考察

(1) 硫酸塩還元活性及び脱窒活性

図2に運転終了時に装置から取り出した木質を用いて行なった回分実験結果の典型例を示す。図2(a)は硫酸塩を含む基質で担体深部生物膜(表面を削った担体)を用いた条件(S1)と担体内部生物膜を用いた条件(S2)で行った実験結果を比較したものである。両条件で硫酸塩の減少と重炭酸塩の増加が認められたことから、硫酸塩還元に伴う木質の分解が進行したことがわかる。また、担体深部生物膜の方が担体内部生物膜より硫酸塩の減少と重炭酸塩の増加が多か

表2 本研究で用いたプライマー

Primer	Sequence (5' - 3') ^a	Specificity
616V 630R	AGA GTT TGA TYM TGG CTC CAK AAA GGA GGT GAT CC	Most <i>Bacteria</i>
DFM140 DFM842	TAG MCY GGG ATA ACR SYK G ATA CCC SCW WCW CCT AGC AC	<i>Desulfotomaculum</i> spp.
DBB121 DBB1237	CGC GTA GAT AAC CTG TCY TCA TG GTA GKA CGT GTG TAG CCC TGG TC	<i>Desulfobulbus</i> spp.
DBM169 DBM1006	CTA ATR CCG GAT RAA GTC AG ATT CTC ARG ATG TCA AGT CTG	<i>Desulfobacterium</i> spp.
DSB127 DSB1273	GAT AAT CTG CCT TCA AGC CTG G CYY YYY GCR RAG TCG STG CCC T	<i>Desulfobacter</i> spp.
DCC305 DCC1165	GAT CAG CCA CAC TGG RAC TGA CA GGG GCA GTA TCT TYA GAG TYC	<i>Desulfonema</i> spp., <i>Desulfococcus</i> spp., <i>Desulfosarcina</i> spp. and <i>Desulfovibrio</i>
DSV230 DSV838	GRG YCY GCG TYY CAT TAG C SYC CGR CAY CTA GYR TYC ATC	<i>Desulfovibrio</i> spp. and <i>Desulfomicrobium</i> spp.

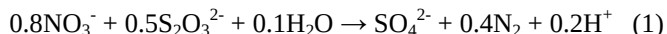
^a 16S rDNA position according to *E. coli* numbering.

^b Ambiguities: R (G or A); Y (C or T); K (G or T); M (A or C); S (G or C); W (A or T).

ったことから、木質担体深部により多くの硫酸塩還元細菌が増殖していたと考えられる。さらに、担体深部生物膜で、酢酸塩の生成が認められたことから、木質担体深部に不完全酸化型の硫酸塩還元細菌が優占的に増殖し、担体表面近くの担体に完全酸化型の硫酸塩還元細菌が増殖していたと考えられる。

図2(b)は担体内部生物膜を用いて硫酸塩を含む基質条件(S2)と硫酸塩を含む基質にセルロースを添加した条件(S3)で行った実験結果を比較したものである。セルロースを添加した条件(S3)の方が、硫酸塩の減少、重炭酸塩の生成が多かったことから、木質内に増殖した硫酸塩還元細菌はセルロースの分解に関与していたと考えられる。

図2 (c)は担体内部生物膜を用いてチオ硫酸塩と硝酸塩を含む基質を用いた条件(TN 1)で行なった実験結果である。チオ硫酸塩の減少に伴い、硝酸塩の減少と硫酸塩の増加が認められた。チオ硫酸塩を用いた硫黄脱窒の反応は式(1)のように表すことができる。



式(1)により、0.5ml(56g)のチオ硫酸塩の減少により 0.8mol(50g)の硝酸塩の減少することになるが、本実験結果は、量論値に近い値が得られたことから、チオ硫酸塩を用いた硫黄脱窒が起こっていたと考えられる。一方、0.5ml(56g)のチオ硫酸塩の減少により1mol(96g)の硫酸塩が増加するはずであるが、本実験結果は、量論値よりも小さい値であった。このことから、硫酸塩還元も同時に起こっていた可能性が示唆された。

図2(d)は担体内部生物膜を用いて硝酸塩を含む基質を用いた条件(N 1)で行った実験結果である。硝酸塩の減少と重炭酸塩の増加が認められたことから、木質の分解に伴う他栄養性脱窒が進行していたことがわかる。

回分実験から求められた硫酸塩還元速度と脱窒速度を表3に示す。担体内部生物膜の硫酸塩還元活性では、1800日以上運転を行っていたにも関わらず、高い硫酸塩還元活性が認められたことから、硫酸塩還元細菌が担体内部に集積されていたことがわかった。また、セルロースを添加することにより、セル

ロースを添加しない条件よりも高い活性を示した。チオ硫酸塩を用いた硫黄脱窒活性は、脱窒活性よりも高く、また高い硫酸塩還元活性が得られたことから、硫酸塩還元細菌と硫黄脱窒細菌が共存していたと推定される。

(2)微生物群集

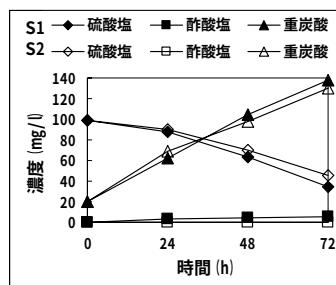
16S rDNA領域で6グループの硫酸塩還元細菌種を検出するプライマーを用いた結果、担体深部生物膜では、*Desulfovibrio* spp.と*Desulfomicrobium* spp.をコードしたDSVプライマーでバンドが検出された。これらの硫酸塩還元細菌種は、プロピオン酸などを酢酸にまで分解する不完全酸化型硫酸塩還元細菌である。このことから、担体内部の嫌気域では、不完全酸化型の硫酸塩還元細菌が優占的に増殖していたと推定される。この結果は回分実験の結果と一致した。

4. 結論

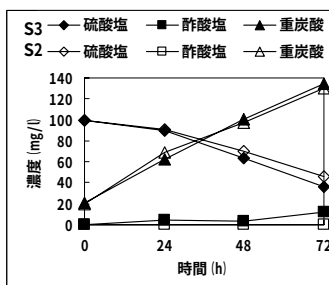
- 1)担体深部生物膜の方が担体内部生物膜より硫酸塩還元活性が高かった。さらに、担体深部生物膜で、酢酸塩の生成が認められたことから、木質担体深部に不完全酸化型の硫酸塩還元細菌が優占的に増殖し、担体表面近くの担体に完全酸化型の硫酸塩還元細菌が増殖していたと考えられる。
- 2)木質内に増殖した硫酸塩還元細菌はセルロースの分解に関与していたと推定された。
- 3)担体深部生物膜では、*Desulfovibrio* spp.と*Desulfomicrobium* spp.と推定される細菌が検出された。

表3 硫酸塩還元速度と脱窒速度

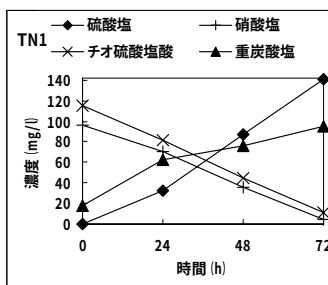
	活性(mgCOD/gSS・h)		
	硫酸塩還元	脱窒	硫黄脱窒
削った担体深部生物膜	0.75	-	-
担体内部生物膜	0.62	0.49	1.14
担体内部生物膜+セルロース	0.74	-	-



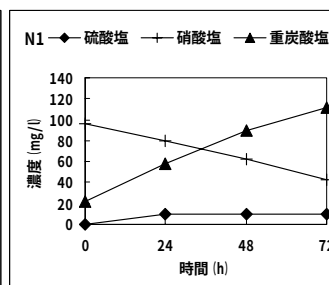
(a)S1,S2



(b)S2,S3



(c)TN1



(d)N1

図2 処理槽内の木質担体を用いた回分実験の結果