

## B-21 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

○朱 健康<sup>1</sup>・山下 恭広<sup>1</sup>・池本 良子<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>金沢大学大学院自然科学研究科 (〒920-1192石川県金沢市角間町)

\* E-mail: rikemoto@t.kanazawa-u.ac.jp

### 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、杉間伐材を充填した無酸素生物ろ床の長期運転を行い、木質内微生物のセルロース分解を検討するとともに、PCR法による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のように下部に木質(約12mm角) 95.0gを、上部に鉄片(鉄鋼記号S 55 C (主要化学成分C 0.52~0.58%, Mn 0.60~0.90%), 厚さ0.1~0.2mm, 幅0.5~1mm) 40.0gを充填した。種汚泥として金沢市都市下水処理場の活性汚泥を乾燥重量で1.2gに調整したものを添加し、人工排水

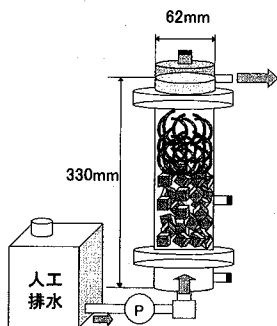


図1 装置概要図

( $\text{NaHCO}_3$  35mg/l,  $\text{CaCl}_2$  46mg/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  46mg/l,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  58mg/l,  $\text{NaNO}_3$  85mg/l) を通水して1300日間の連続運転を行った。

#### (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(周囲の付着生物膜を含む)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。S 1, 2は、硝酸塩を含まない基質を用いて嫌気条件で行ったものである。N 1, 2は硝酸塩を含み硫酸塩を含まない基質を用いて無酸素条件で行ったものである。TN 1はチオ硫酸塩と硝酸塩を含む基質で行なったものである。回分実験は、100mlのバイアル瓶を用いて以下の手順で行なった。乾燥重量で8gの木質をバイアル瓶に投入した。そこに、窒素パー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。0, 24, 48, 72時間後に採水し、硫酸塩、チオ硫酸塩、硝酸塩、亜硝酸塩、有機酸、重炭酸塩の分析を行った。

#### (3) 微生物群集解析

PCR法による硫酸塩還元細菌の微生物群集解析を行なった。表2に実験に用いたプライマーを示す。また、実験はLoyら(2004)<sup>1)</sup>とDalyら(2000)<sup>2)</sup>の方法に準拠した。

表1 回分実験条件

| Exp. No.                                                    | S 1 | S 2 | N 1 | N 2 | TN 1 |
|-------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|------|
| 木質 (g dry weight/90ml)                                      | 8   | 8   | 8   | 8   | 8    |
| セルロース (g/90ml)                                              | -   | 0.2 | -   | 0.2 | -    |
| 基質 (mg/l)                                                   |     |     |     |     |      |
| $\text{NaHCO}_3$                                            | 35  | 35  | 35  | 35  | 35   |
| $\text{CaCl}_2$                                             | 46  | 46  | 46  | 46  | 46   |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                                    | 46  | 46  | 46  | 46  | 46   |
| $\text{K}_2\text{SO}_4$                                     | 181 | 181 | 0   | 0   | 0    |
| $\text{NaNO}_3$                                             | 0   | 0   | 137 | 137 | 137  |
| $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0   | 0   | 0   | 0   | 250  |

### 3. 実験結果と考察

#### (1) 硫酸塩還元活性及び脱窒活性

1300日間脱窒が継続し、脱窒速度は $1.0\text{mg/l} \cdot \text{hr}$ を維持していた。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を用いた条件 (Exp. S1) と硫酸塩を含む基質にセルロースを添加した条件 (Exp. S2) で行なった回分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無機炭素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、セルロースを添加した条件 (Exp. S2) 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。酢酸塩やプロピオン酸塩の増加は認められなかった。図2 (b)は硝酸塩を含む基質を用いた条件

(Exp. N1) と硝酸塩を含む基質にセルロースを添加した条件 (Exp. N2) で行なった回分実験結果を比較したものである。両条件で硝酸塩の減少と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。一方、硫酸塩の増加も認められたことから、硫黄脱窒も進行していたものと考えられる。また、セルロースを添加した条件 (Exp. N2) の方が、硝酸塩の減少、重炭酸塩の生成が多かった。このことから、セルロースの分解に伴って脱窒が進行していたことが示唆される。硫酸塩を含む基質を用いた条件と同様に、酢酸塩やプロピオン酸塩の増加は認められなかった。図2 (c)はチオ硫酸塩と硝酸塩を含む基質を用いた条件 (Exp. TN1) で行なった回分実験結果である。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

表 2 本研究で用いた 16S rDNA-targeted PCR プライマー

| Primer  | Sequence (5'-3') <sup>b</sup>  | Targeted <sup>a</sup> | Specificity                                           | Annealing Temp. (°C) | Reference                     |
|---------|--------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------|----------------------|-------------------------------|
| 616V    | AGA GTT TGA TYM TGG CTC        |                       | Most Bacteria                                         | 52                   | Juretschko <i>et al.</i> 1998 |
| 630R    | CAG AAA GGA GGT GAT CC         |                       |                                                       |                      | Juretschko <i>et al.</i> 1998 |
| DSRmixF | DSR1F ACS CAC TGG AAG CAC G    |                       | Dissimilatory (bi)sulfite reductase genes             | 48                   | Wagner <i>et al.</i> 1998     |
|         | DSR1Fa ACC CAY TGG AAA CAC G   |                       |                                                       |                      | Loy <i>et al.</i> 2004        |
|         | DSR1Fb GGC CAC TGG AAG CAC G   |                       |                                                       |                      | Loy <i>et al.</i> 2004        |
| DSRmixR | DSR4R GTG TAG CAG TTA CCG CA   |                       |                                                       |                      | Wagner <i>et al.</i> 1998     |
|         | DSR4Ra GTG TAA CAG TTT CCA CA  |                       |                                                       |                      | Loy <i>et al.</i> 2004        |
|         | DSR4Rb GTG TAA CAG TTA CCG CA  |                       |                                                       |                      | Loy <i>et al.</i> 2004        |
|         | DSR4Rc GTG TAG CAG TTK CCG CA  |                       |                                                       |                      | Loy <i>et al.</i> 2004        |
| DFM140  | TAG MCY GGG ATA ACR SYK G      | 140-158               | <i>Desulfotomaculum</i> spp.                          | 58                   | Daly <i>et al.</i> 2000       |
| DFM842  | ATA CCC SCW WCW CCT AGC AC     | 842-823               |                                                       |                      | Daly <i>et al.</i> 2000       |
| DBB121  | CGC GTA GAT AAC CTG TCG TCA TG | 121-142               | <i>Desulfobulbus</i> spp.                             | 66                   | Daly <i>et al.</i> 2000       |
| DBB1237 | GTA GKA CGT GTG TAG CCC TGG TC | 1237-1215             |                                                       |                      | Daly <i>et al.</i> 2000       |
| DBM169  | CTA ATR CCG GAT RAA GTC AG     | 169-183               | <i>Desulfobacterium</i> spp.                          | 64                   | Daly <i>et al.</i> 2000       |
| DBM1006 | ATT CTC ARG ATG TCA AGT CTG    | 1006-986              |                                                       |                      | Daly <i>et al.</i> 2000       |
| DSB127  | GAT AAT CTG CCT TCA AGC CTG G  | 127-148               | <i>Desulfobacter</i> spp.                             | 60                   | Daly <i>et al.</i> 2000       |
| DSB1273 | CYY YYY GCR RAG TCG STG CCC T  | 1273-1252             |                                                       |                      | Daly <i>et al.</i> 2000       |
| DCC305  | GAT CAG CCA CAC TGG RAC TGA CA | 305-327               | <i>Desulfonema</i> spp., <i>Desulfococcus</i> spp.,   | 65                   | Daly <i>et al.</i> 2000       |
| DCC1165 | GGG GCA GTA TCT TYA GAG TYC    | 1165-1144             |                                                       |                      | Daly <i>et al.</i> 2000       |
| DSV230  | GRG YCY GCG TYY CAT TAG C      | 230-248               | <i>Desulfovibrio</i> spp. and <i>Desulfomicrobium</i> | 61                   | Daly <i>et al.</i> 2000       |
| DSV838  | SYC CGR CAY CTA GYR TYC ATC    | 838-818               |                                                       |                      | Daly <i>et al.</i> 2000       |

<sup>a</sup> 16S rDNA position according to *E. coli* numbering.

<sup>b</sup> 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).

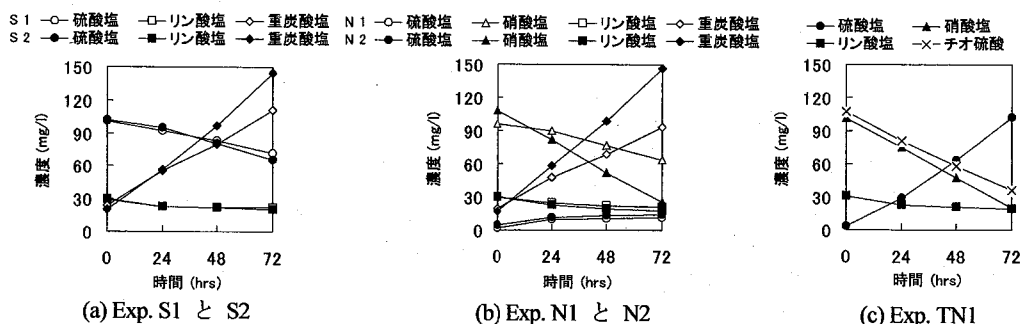
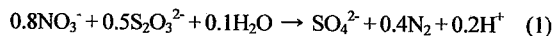


図2 処理槽内の木質を用いた回分実験の結果

うに表すことができる。



式(1)により、0.5mol (56g)のチオ硫酸塩の減少により1mol (96g)の硫酸塩が増加することになる。Exp. TN Iではこの量論値に近い値が得られたことから、チオ硫酸塩を利用した硫黄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速度は、運転開始478日目に嫌気条件とし2日間通水した時の硫酸塩還元速度とほぼ一致していたことから、1300日近い運転を行っていたにも関わらず、硫酸塩還元細菌が木質内に集積されていたことがわかる。また、セルロースを添加することにより、硫酸塩還元速度、他栄養性脱窒速度ともに上昇した。一方、チオ硫酸塩を用いた硫黄脱窒活性は、他栄養性脱窒に匹敵する値を示した。このことは、木質内に硫酸塩還元細菌と硫黄脱窒細菌が共存していることを示唆している。

## (2)微生物群集解析

亜硫酸塩還元酵素をコードしたDSR1Fmix-DSR4Rmixを用いた結果では、装置の担体内部生物膜でバンドを検出した。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では、*Desulfobulbus* spp.をコードしたDBBプライマー、*Desulfobacter* spp.をコードしたDSBプライマー、*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、*Desulfobacter* spp.を除き、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。

また、これまでの研究から、FISH法を用いて担体から剥離した生物膜の硫酸塩還元細菌の群集解析を行なった結果、*Desulfonema* spp.と推定される細菌が検出された。この硫酸塩還元細菌は、酢酸を二酸化炭素にまで酸化する完全酸化型の硫酸塩還元細菌である<sup>3)</sup>。

これらのことから、担体の外側と内側では、内側に不

完全酸化型の硫酸塩還元細菌が、外側に完全酸化型の硫酸塩還元細菌が優占的に増殖し、硫酸塩還元細菌の棲み分けが起こっていたと考えられる。

## 4. まとめ

- 1)脱窒生物ろ床において、約1300日の長期運転を行なった結果、担体内部生物膜では硫酸塩還元活性が継続して認められた。
- 2)担体内部生物膜では、高い硫黄脱窒活性が認められたことから、木質内部で硫酸塩還元細菌と硫黄脱窒細菌が共存し、窒素除去が行われていたと推定された。
- 3)硫酸塩還元活性ではセルロースを添加することにより、活性が高くなり、無機炭素の増加も認められたことから、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。
- 4)微生物群集解析を行なった結果では、*Desulfovibrio* spp., *Desulfomicrobium* spp., *Desulfobulbus* spp., *Desulfobacter* spp.と推定される硫酸塩還元細菌が担体内部生物膜で検出された。

## 参考文献

- 1)Loy, A., Küsel, K., Lehner, A., Drake, H. L., and Wagner, M. (2004) Microarray and functional gene analyses of sulfate-reducing prokaryotes in low-sulfate, acidic fens reveal cooccurrence of recognized genera and novel lineages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 (12), 6998-7009.
- 2)Daly, K., Sharp, J. R., and McCarthy, J. A. (2000) Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria. *Microbiol.*, 146, 1693-1705.
- 3)山下恭広, 池本良子: 杉間伐材を有機炭素源とした脱窒処理における硫酸塩還元細菌および硫黄脱窒細菌の役割, 環境工学研究論文集, Vol.43, pp.169-179, 2006.

表3 担体内部生物膜の硫酸塩還元速度と他栄養性脱窒速度及び硫黄脱窒速度

|         | 活性 (mgCOD/gSShr) |                    |        |                     |      |
|---------|------------------|--------------------|--------|---------------------|------|
|         | 硫酸塩還元            | 硫酸塩還元<br>(セルロース添加) | 他栄養性脱窒 | 他栄養性脱窒<br>(セルロース添加) | 硫黄脱窒 |
| 担体内部生物膜 | 0.29             | 0.41               | 0.34   | 0.72                | 0.26 |

表4 PCR法を適用した結果

|         | プライマー        |                    |                  |                   |                   |                   |                   |                  |
|---------|--------------|--------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
|         | 616V<br>630R | DSRmixF<br>DSRmixR | DFM140<br>DFM842 | DBB121<br>DBB1237 | DBM169<br>DBM1006 | DSB127<br>DSB1273 | DCC305<br>DCC1165 | DSV230<br>DSV838 |
| 担体内部生物膜 | +            | +                  | -                | +                 | -                 | +                 | (+)               | +                |

注) + …濃いバンドの検出

(+) … 薄いバンドの検出

- …バンドの検出なし