

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：13102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14057

研究課題名(和文) 未知反応「嫌氣的硫黄酸化」のメカニズム解明とリアクター内での反応制御への挑戦

研究課題名(英文) Revealing mechanism of anaerobic sulfur oxidation

研究代表者

山口 隆司 (Yamaguchi, Takashi)

長岡技術科学大学・工学研究科・教授

研究者番号：10280447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、低温条件(15度)で、硫酸塩とともに乳酸、蟻酸、酢酸を炭素源として供給する5つの上向流嫌気性汚泥床(UASB)にて嫌氣的硫黄酸化を起こす微生物の多様性について評価を行った。嫌氣的硫黄酸化が、酸素、亜硝酸、硝酸、鉄という電子受容体の存在しないリアクター環境でも起きることを確認した。UASB内で観察される嫌氣的硫黄酸化の生物多様性を網羅的に解析して、微生物の特定と硫黄酸化への寄与とを進めた。ユニークな現象である硫黄酸化反応は、5つの全てのリアクターで確認できた。また、リアクター底部では硫酸塩還元細菌が優先して存在していた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the diversity of microbes involved in anaerobic sulfur oxidation in five upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors used for treating lactate, formate, and acetate as carbon source with sulfate under lower-temperature (15°C) conditions. Anaerobic sulfur oxidation occurred in the absence of oxygen, with nitrite and nitrate as electron acceptors; however, reactor parameters demonstrated that anaerobic conditions were maintained. In order to gain insights into the underlying basis of anaerobic sulfur oxidation, the microbial diversity that exists in the UASB sludges were analyzed comprehensively to determine their identities and contribution to sulfur oxidation. An occurrence of a unique phenomenon, the "anaerobic sulfur oxidation reaction", were confirmed in all UASB reactors. In the reactor bottom, sulfate-reducing bacteria is existed as dominant.

研究分野：水環境工学

キーワード：排水処理 硫酸塩還元 硫黄酸化

1. 研究開始当初の背景

嫌氣的硫酸化反応は、都市下水処理を行う UASB (Up-flow Anaerobic Sludge Blanket、廃水を水槽タンクの下部から流入させ、微生物汚泥床と接触させることで廃水を浄化し、浄化した水をタンクの上部から流出させる水処理装置) リアクターの研究において発見された (Takahashi *et al.*, Bioresource Technology.102, pp. 753-757, 2011)。この反応は嫌氣 (酸化還元電位 -300 mV) 且つ低温条件 (水温 17) で UASB リアクター下部での硫酸還元により発生した。硫化物が UASB 装置上部で酸化される現象である。

これまでの研究で本反応は下水だけではなく乳酸などの複数種の有機物源、硫酸塩及び重炭酸イオンを基質として供した状態でも発生することが確認されている (THUY ら, 第 49 回日本水環境学会年会発表講演集, p. 58, 2015)。

しかしながら、嫌氣的硫酸化反応の反応経路及び関与微生物種は依然特定されていない。また、基質毎の菌叢の違いに関する知見も乏しいため、供給基質と菌叢の関係性を明らかにすることで本反応に関与する微生物の推定が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、UASB リアクター内の汚泥について 16SrRNA 遺伝子に基づいた微生物群集解析を行い、嫌氣的硫酸化反応に関与する微生物群について知見蓄積を行うこととした。

3. 研究の方法

本実験に用いた UASB リアクターは有効容積 7.6L、高さは 1.5 m とし、流入部より 0.3 m 毎に採水ポートを設けた。リアクターは 15 の恒温室に設置し水理学的滞留時間は 8 時間とした。植種汚泥は嫌氣的硫酸化反応が確認された下水処理 UASB リアクター内部のグラニュール汚泥とした。実験は COD 源の異なる 3 系を行った (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)。硫酸源には硫酸ナトリウムを 1.5 mM、緩衝剤として重炭酸ナトリウムを 15mM 供給した。微生物解析は嫌氣的硫酸化反応が確認された UASB リアクターの汚泥について 16S rRNA 遺伝子に基づき実施した。シーケンシングには MiSeq reagent Kit V2 (illumina 社) を用いた。

4. 研究成果

16S rRNA 遺伝子に基づく微生物解析の結果、高さ 0.3m 地点における 3 つのリアクターの細菌及び古細菌の平均検出率は、それぞれ 94.1%、5.9%であった。また、高さ 0.9m 地点ではそれぞれ 95.1%、4.9%であった。古細菌については、いずれのリアクター及びポートにおいてもメタン生成古細菌

(*Methanobacteria* 綱及び *Methanomicrobia* 綱) が大半を占めていた。細菌については、高さ 0.3 m 地点では硫酸還元菌の多くが属 *Deltaproteobacteria* 綱細菌が最も優占した (全リアクター平均 $44.6 \pm 12.2\%$) もの、高さ 0.9m 地点では優占割合が減少し (全リアクター平均 $27.5 \pm 5.1\%$)、*Anaerolineae* 綱細菌の割合が増加した (全リアクター平均 $29.2 \pm 1.7\%$)。

図 1 に各リアクター及び高さにおける科レベルでの検出割合を示す。0.3 m 地点では主に *Anaerolinaceae* 科細菌 (UASB1: 20.2%、UASB2: 11.1%、UASB3: 21.8%) 及び硫酸還元菌である *Syntrophobacteraceae* 科細菌 (UASB1: 32.7%、UASB2: 56.4%、UASB3: 22.5%) が優占した。0.9 m 地点では *Syntrophobacteraceae* 科細菌の割合が減少し (UASB1: 15.4%、UASB2: 24.6%、UASB3: 19.7%)、*Anaerolinaceae* 科細菌の割合が増加した (UASB1: 29.2%、UASB2: 25.9%、UASB3: 30.6%)。

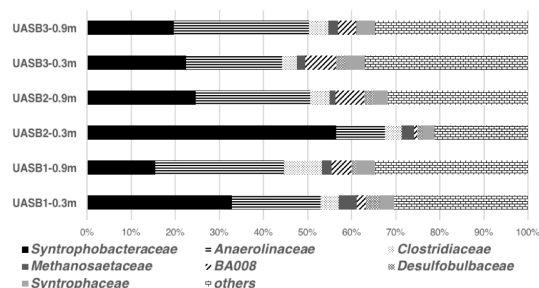


図 1 各 UASB の高さ毎の科レベルでの解析結果

表 1 に検出された硫酸化細菌の科とその割合を示す。0.3 m 地点では硫酸化細菌とされる微生物科は殆ど見られなかったが、UASB1 及び 2 の 0.6 m 地点で *Halothiobacillaceae* 科細菌の検出率が増加し、*Acidithiobacillaceae* 科細菌も確認された。UASB3 では先述の細菌科は見られなかったが、1 及び 2 で見られなかった *Thiotrichaceae* 科細菌が確認された。UASB1 及び 2 で確認された *Halothiobacillaceae* 科細菌は好氣性の硫酸化細菌として知られているものの、近年では同科の *Halothiobacillus* 属細菌の嫌氣性下水処理装置での利用例も提案されている (Yu *et al.*, PCT Patent, WO2013137322 A1, 2013)。本研究で確認された *Halothiobacillaceae* 科細菌は種レベルまで推定はできなかったものの本科細菌が乳酸又は酢酸供給時の嫌氣的硫酸化反応に関与する可能性が示唆された。一方、ギ酸供給時には異なる硫酸化細菌が確認されたため、有機物種により嫌氣的硫酸化反応に関与する細菌の変化が示唆された。

表 1 確認された硫黄酸化細菌の科とその検出率

微生物科	高さ地点	
	0.3 m	0.6 m
<i>Acidithiobacillaceae</i>	○	●
UASB1 <i>Halothiobacillaceae</i>	●	●●
<i>Thiotrichaceae</i>	○	○
<i>Acidithiobacillaceae</i>	○	●
UASB2 <i>Halothiobacillaceae</i>	○	●●
<i>Thiotrichaceae</i>	○	○
<i>Acidithiobacillaceae</i>	○	○
UASB3 <i>Halothiobacillaceae</i>	○	○
<i>Thiotrichaceae</i>	○	●

検出率 [%] ≥0.1 : ●● ≥0.01 : ● <0.01 : ● 0 : ○

まとめとして、UASB リアクター下部では硫酸還元菌の大半を含む *Deltaproteobacteria* 綱細菌が優占したものの上部では *Anaerolineae* 綱細菌の割合が増加した。硫黄酸化細菌の検出率を調査した結果、有機物種により検出される硫黄酸化細菌が変化し、それぞれ嫌氣的硫黄酸化反応に役割を有することが示唆された。今後は UASB2 及び 3 の有機物種を酢酸又はギ酸のみに置換し、これによる菌叢の変化について検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Masashi Hatamoto, Kota Ohtsuki, Namita Maharjan, Shinya Ono, Kazuya Dehama, Kenichi Sakamoto, Masanobu Takahashi, Takashi Yamaguchi, Performance evaluation of the sulfur-redox-reaction-activated up-flow anaerobic sludge blanket and down-flow hanging sponge anaerobic/anoxic sequencing batch reactor system for municipal sewage treatment, *Bioresource Technology*, 査読有, Volume 204, March 2016, Pages 171-176.

Azrina A. Aida¹, Kyohei Kuroda, Masamitsu Yamamoto, Akinobu Nakamura, Masashi Hatamoto, Takashi Yamaguchi, Diversity Profile

of Microbes Associated with Anaerobic Sulfur Oxidation in an Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor Treating Municipal Sewage, *Microbes and Environments*, 査読有, Vol. 30 (2015) No. 2 p. 157-163.

[学会発表](計 7 件)

中原望、黒田恭平、TRAN THANH THUY、幡本将史、山口隆司、2015、嫌氣的硫黄酸化反応の発生時及び非発生時における微生物群衆構造の比較、平成 27 年度土木学会全国大会 第 70 回年次学術講演会、□-005.

塩澤大和、TRAN THANH THUY、中原望、荒木信夫、山崎慎一、幡本将史、山口隆司、2015、ラボスケール UASB による嫌氣的硫黄酸化反応の再現性評価、平成 27 年度土木学会関東支部新潟会研究調査発表会、No.211.

塩澤大和、TRAN THI THANH THUY、中原望、牧慎也、幡本将史、山口隆司、山崎慎一、荒木信夫、2016、ラボスケール UASB リアクター内における嫌氣的硫黄酸化反応発生時の供給基質条件の検討および再現性評価、第 50 回日本水環境学会年会、日本水環境学会年会講演集 p415.

塩澤大和、山口隆司、幡本将史、荒木信夫、山崎慎一、2016、ラボスケール UASB リアクター内における嫌氣的硫黄酸化反応の再現性評価、平成 28 年度土木学会全国大会 第 71 回年次学術講演会、-108.

内田翔太、塩澤大和、松浦哲久、幡本将史、山口隆司、2016、供給基質の違いによる嫌氣的硫黄酸化反応の挙動解析、平成 28 年度土木学会関東支部新潟会研究調査発表会、No.208.

内田翔太、塩澤大和、山口隆司、松浦哲久、幡本将史、2017、UASB リアクター内の嫌氣的硫黄酸化反応関与微生物の評価、第 51 回日本水環境学会年会、1-G-09-4.

塩澤大和、内田翔太、幡本将史、山口隆司、2017、嫌氣的硫黄酸化反応進行時の基質条件の検討、第 51 回日本水環境学会年会、3-H-16-3.

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

研究者（研究室）ホームページ等
<http://ecolab.nagaokaut.ac.jp/j/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 隆司 (YAMAGUCHI, Takashi)
長岡技術科学大学・工学研究科・教授
研究者番号：10280447

(2) 研究分担者

幡本 将史 (HATAMOTO, Masashi)
長岡技術科学大学・産学融合トップランナー養成センター・特任准教授
研究者番号：20524185

(3) 連携研究者

なし()

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし()