

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：52301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14750

研究課題名(和文) 微生物による無機溶存物質存在下の硫酸塩還元抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of sulfate-reduction inhibition mechanism by inorganic dissolved substances

研究代表者

宮里 直樹 (Miyazato, Naoki)

群馬工業高等専門学校・環境都市工学科・准教授

研究者番号：00435413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：し尿処理場において、ケイ酸などの無機溶存物質が十分に存在する活性汚泥では、悪臭が発生しない事例や大腸菌の増加が抑制されているという実験結果が報告されている。そこで、本研究ではケイ酸を主とした無機溶存物質に着目して、硫化水素の発生状況や硫酸塩還元微生物および硫酸塩還元細菌に及ぼす影響を調べた。また微生物群集の変化を次世代シーケンサーにより解析した。その結果、ケイ酸を添加した活性汚泥では硫酸塩還元活性が抑制される傾向があることが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水環境中には多くの無機溶存物質が存在しており、生物の生態に大きな役割を果たしている。しかし、下水処理に関わる微生物との関連性についてはほとんど研究されていないことから、本研究結果により、これまで知られていない微生物相互作用を解明する手掛かりとなる。また、硫化水素の発生抑制が可能となれば、人口減少社会において下水道の長寿命化技術の開発が期待できる

研究成果の概要(英文)：Corrosion of concrete sewer pipe due to sulfuric acid produced by sulfate reducing bacteria (SRB) is serious problem today. There is a report that odors such as activated sludge do not occur in the excreta disposal treatment facility centered on inorganic materials. The aim of this study is to influence microorganisms involved in wastewater treatment by inorganic materials. For this purpose, we focus on inorganic materials mainly composed of silicic acid, and investigate sulfate reducing, and its nitrification activity and denitrification activity, and its effect on sulfate reducing bacteria (SRB). Microbial community changes were analyzed using a next-generation sequencer. As a result, it was presumed that the activated sludge growth using silicic acid tended to suppress the sulfate reduction activity.

研究分野：衛生工学

キーワード：硫酸塩還元 活性汚泥 Bacillus属細菌 無機溶存物質 シリカ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

硫酸塩還元細菌は、自然界において有機物の最終酸化を担う微生物として知られており、底泥や土壌中の硫酸塩還元細菌に関して多くの報告がある。都市下水中には硫酸塩が 100-1000mg/l 含まれており、下水道施設では、硫酸塩還元細菌による管渠等の腐食問題やポンプ場での悪臭問題の原因の 1 つであることが知られている。一方で近年、し尿処理の分野では、ケイ酸などのミネラル成分を定期的に曝気槽内に投入することにより発生臭気を抑制し、作業環境の改善や維持管理費の低減が期待できるという報告がある。ケイ酸は地球上で 2 番目の多く存在する元素であり、海洋汚染の研究では窒素やリンに次ぐ栄養塩類として認識されている。しかし、下水などにおいて、ケイ酸等の無機物質は下水中に多く含まれているという予想されている。

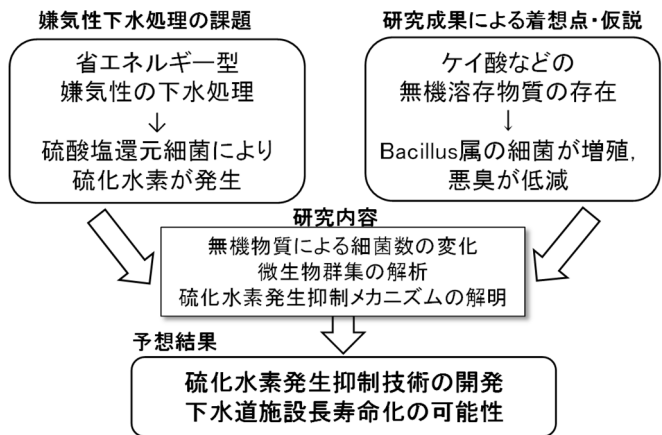


図-1 研究背景と研究内容，予想結果

2. 研究の目的

本研究の目的は、嫌気性下水処理において、毒性が高く、メタン発酵の阻害、さらに悪臭の原因である硫化水素について、微生物による発生の抑制機構を解明することである。ケイ酸などの無機溶存物質が十分に存在する活性汚泥では、悪臭が発生しないという報告や大腸菌の増加が抑制されているという実験結果から、各処理場汚泥に関する硫酸塩還元細菌の存在状態を調査すること、ケイ酸などの無機溶存物質に着目して活性汚泥を馴養し、微生物群集の変化を調べ、優占化する微生物を明らかにし、硫酸塩還元に関わる微生物の群集解析などを行うこと、次世代シーケンサーを用いて、上記 および の活性汚泥中の部生物群集解析を行うこ戸を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各処理場活性汚泥の硫酸塩還元細菌数と硫酸塩還元活性調査対象施設

表 1 に示す、群馬県内の 4 つの処理場反応槽混合液を採取し、活性汚泥中の硫酸塩還元細菌数 (MPN 個) ,MLSS を計測した。計測を実施した処理場の処理方式、処理能力を表 1 に示す。

表 1 硫酸塩還元細菌数測定を実施した処理施設

施設	処理対象物	処理方式	処理能力 (K <sub>2</sub> /day)
A	都市下水	標準活性汚泥法	45900
J	都市下水	標準活性汚泥法	13000
R	都市下水	標準活性汚泥法	240
G	し尿	高負荷	40

硫酸塩還元細菌の測定方法

硫酸塩還元細菌は「下水試験方法」の MPN 法を一部改良した、活性汚泥中の硫酸塩還元細菌数に有無及びその数を調べる MPN 乳酸法を用いた。培地は、Mara と Williams の改編 ISA 培地 (表 2) を用いた。培地の組成を表 2 に示す。培地を試験管に 4.5ml 注入した後、生理食塩水で希釈した試料水を 10<sup>3</sup>~10<sup>7</sup> 倍となるように培地に各倍率 3 本ずつ分注後、0.5ml 接種し、37 で 10 日間培養後に培地の変色を確認した。培地内で硫化物が生成され、黒色に変化したものを硫酸塩還元細菌陽性と判定した。この反応が起こった培地の数を測定し、最確値法より硫酸塩還元細菌数を算出した。なお、MLSS は下水試験方法のガラス繊維ろ紙法に基づき測定を行なった。

表 2 培地の組成

名称	濃度
トリプトン	10.0g/L
乳酸ナトリウム溶液(70%)	5.0g/L
亜硫酸ナトリウム	0.5g/L
硫酸マグネシウム・7水和物	2.0g/L
硫酸第二鉄・7水和物	0.5g/L
クエン酸アンモニウム	0.5g/L

硫酸塩還元活性試験(回分試験)の方法

ペプトンを主とした基質(表 3 に示す)と処理場から採取した活性汚泥で MLSS1000mg/L に調整し Si を 100mg/L として添加した。また、作成したもののそれぞれに硫酸マグネシウム, Si を添加する。図 2 に示す注射器を用いて回分試験を行い、開始から 0h, 24h, 48h として計三回の試料採取を行い、イオン分析 (IA300, 東亜 DKK) で硫酸塩濃度の測定を行なった。

表 3 回分試験に用いた基質組成

	(mg/l)
Poypeptone	200
CH <sub>3</sub> COOK	100
Yeast extract	20
NaHCO <sub>3</sub>	71
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	157
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	44
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	39

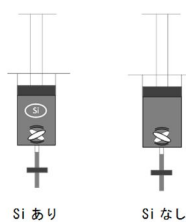


図 1 注射器を用いた回分試験(嫌気条件)

(2) 回分式活性汚泥法を用いた微生物馴養試験

回分式活性汚泥法を用いた馴養装置

群馬県内の都市下水処理場等では Bacillus 属細菌の存在が報告されている。なお、前橋市の R 処理場活性汚泥（以下、R 系汚泥）は、Bacillus 属細菌が高崎市の A 処理場活性汚泥（以下 A 系汚泥）に比べて優占的に検出されている。この活性汚泥にペプトンを主とした基質に、シリカ（Si）を添加した条件と活性汚泥と基質のみ（ブランク）の条件で 20 の恒温槽内にて馴養を行った。活性汚泥を基質によって MLSS を 2000mg/L に調整し、馴養には容積 2000mL のプラスチック製の容器を用いた。

Bacillus 属細菌の培養

馴養活性汚泥を用いて、1 週間ごとに Bacillus 属細菌のコロニー培養を行った。培地の組成は、ニュートリエントブロス 0.8%、グルコース 0.8%、塩化ナトリウム 0.6%、寒天 1.7% 水溶性デンプン 1.0% である。これらを蒸留水に投入して加熱溶解後、この液体培地をオートクレーブで滅菌し、シャーレに各 20ml 注入して冷蔵庫で 2 日間以上保管し、寒天平板培地を作成した。次に攪拌した試料水を滅菌した生理食塩水（0.85 塩化ナトリウム溶液）で希釈倍率は  $10^3, 10^4, 10^5$  として希釈試料水を作成した。培地に希釈試料水 0.1ml 滴下し表面に均等に塗り広げ、1 つの希釈試料水に対して 2 枚ずつ培地を作成し、30 に保った恒温槽に 48 時間培養後、培地上に現れたコロニー数のカウントを行った。

(3) NGS（次世代シーケンサー）による微生物群集解析

Bacillus 属細菌の増殖条件の検討および馴養試験に用いた活性汚泥の生物叢の解析をするために、本実験では前橋市の R 処理場活性汚泥（以下 R 系汚泥）と高崎市の A 処理場活性汚泥（以下 A 系汚泥）、馴養汚泥、高崎市の城南処理場の活性汚泥、西吾妻処理場の活性汚泥の DNA を QI Aamp DNA Blood Mini Kit を用いて抽出し、NGS（次世代シーケンサー）による微生物群集解析（16S rRNA 遺伝子によるシーケンス解析）を金沢大学に依頼して実施した。使用した NGS は Miseq であり、イルミナ社のデスクトップ型の次世代シーケンサー（NGS）である。

4. 研究成果

(1) 各処理場活性汚泥の硫酸塩還元細菌数と硫酸塩還元活性  
各処理場における菌数の比較

各処理場の硫酸塩還元細菌数を表 4 に示す。日により差はあるものの、概ね  $10^5$  から  $10^6$  MPN 個/gMLSS であった。硫酸塩還元菌は流入下水中の  $SO_4^{2-}$  濃度により、影響を受けることが報告されており、活性汚泥を採取した時期により、下水の水質が変化することが考えられるため、分析結果に差が出たと考えられる。

硫酸塩濃度およびシリカ濃度の変化

採取した活性汚泥に Si を加えた系（以下、Si 系）のもの、Si を加えていない系での回分試験の結果を図 2 に示す。48h 時点での Si 添加時の硫酸塩濃度をブランクと比較すると、両者の硫酸濃度に差があった。また、図 3 より 0h~24h の Si 濃度がやや減少しており、その後一定であった。硫酸塩還元細菌の働きに対して影響があった可能性も考えられる。Si が硫酸塩還元細菌に何らかの影響を与えているということが示唆された。なお、活性汚泥中に存在する他の微生物に Si が影響を与え、その微生物が間接的に硫酸塩還元細菌の活動に影響を及ぼしたことも否定はできないと考えられる。

硫酸塩還元活性(硫酸塩濃度減少)への影響

図 4 に硫酸塩濃度の減少速度(活性)と硫酸塩還元細菌数との相関を示す。図 3 より処理場 A

表 4 各処理場活性汚泥の硫酸塩還元細菌数

処理場(採取日)	菌数(MLSS個)
A(7/2)	$4.7 \times 10^6$
N(7/2)	$5.3 \times 10^5$
R(7/23)	$1.8 \times 10^5$
A(7/31)	$6.8 \times 10^5$
J(8/8)	$2.6 \times 10^6$
A(9/7)	$3.3 \times 10^6$
A(9/25)	$9.5 \times 10^5$
A(10/25)	$9.1 \times 10^5$
N(12/17)	$7.5 \times 10^5$
A(12/25)	$1.1 \times 10^6$

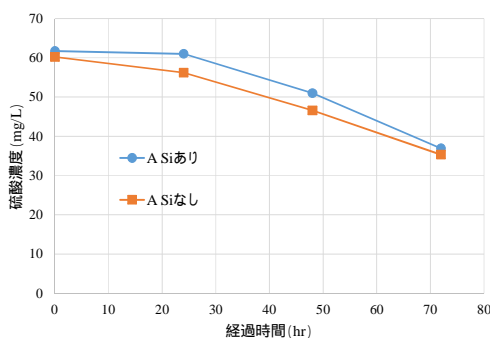


図 2 硫酸塩濃度の変化(回分試験)

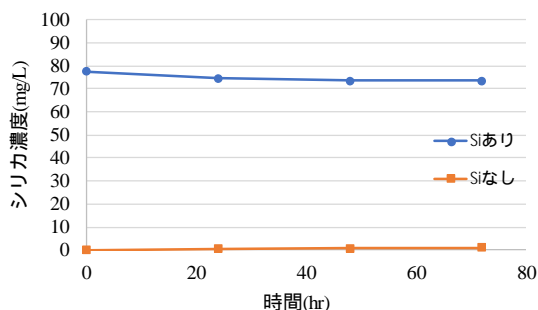


図 3 シリカ濃度の変化(回分試験)

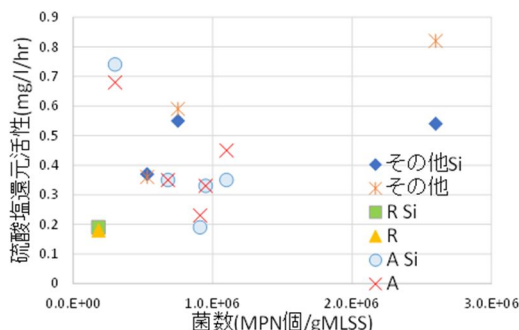


図 4 シリカによる硫酸塩減少速度への影響

の結果をでは、Si 添加系の活性がブランクの活性の値をやや下回っている。この結果から Si を加えた際、硫酸塩還元細菌の活動を抑制できたと示唆された。また、A および R 処理場の硫酸塩還元細菌数にそれほど差はなく硫酸濃度の減少速度にも Si 添加時、ブランク共に大きな違いは見られなかった。

(2) 回分式活性汚泥法を用いた微生物馴養試験

Bacillus 属細菌の変化

馴養開始から約 2 週間後の基質のみのブランクと Si を添加した条件の Bacillus 属細菌 (*Bacillus subtilis*) のコロニー培養結果を表 5、微生物群集解析結果を図 5 に示した。表 5 より培養結果を Si なしと Si ありの条件で比較すると希釈倍率が  $10^5$  のときコロニー数に差がみられた。また、図 5 より、NGS (次世代シーケンサー) の解析結果からも約 2 週間後に Bacillus 属細菌の割合が高くなったことが明らかになった。従って、シリカ ( $SiO_2$ ) を添加することによって Bacillus 属細菌が増殖したと推察された。

表 5 *Bacillus subtilis* コロニー培養結果 (馴養から 2 週間後)

	<i>Bacillus subtilis</i>	
	ブランク	Si 添加
$10^{-6}$ (個)	0	0
$10^{-6}$ (個)	0	0
$10^{-5}$ (個)	2	8
$10^{-5}$ (個)	2	6
$10^{-4}$ (個)	44	49
$10^{-4}$ (個)	42	32

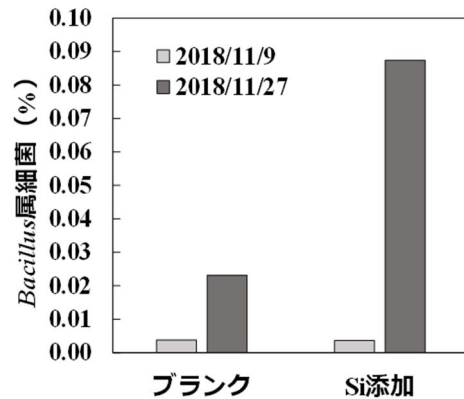


図 5 Bacillus 属細菌の変化

(3) NGS (次世代シーケンサー) による微生物群集解析結果

都市下水処理場活性汚泥の群集解析結果

R 系汚泥と A 系汚泥の硝化菌、脱窒菌、硫酸塩還元細菌の属レベルの解析結果より、A 系汚泥は Bacillus 属細菌が 0.004%、R 系汚泥には 0.02% 存在していることが明らかとなった。このことから A 系汚泥より R 系汚泥のほうが Bacillus 属細菌は、優占的に検出されることが推察された。A 系汚泥と R 系汚泥に存在した硝化菌の結果から R 系、A 系どちらの汚泥にも硝化の働きをする Nitrospira が存在し、R 系汚泥には、同様に硝化菌である Nitrospina が存在した。R 系汚泥の硝化菌と A 系汚泥のデータと比較すると、A 系汚泥は硝化菌の存在割合が少なかった。A 系汚泥と R 系汚泥に存在した脱窒菌では、両汚泥において存在している割合に大きな変化はなかった。また、図 6 に示す硫酸塩還元細菌に関して、存在の割合としては A 系汚泥と R 系汚泥でほとんど変わらないことが解析結果より得られた。両汚泥は、硫酸塩還元活性の働きをする Desulfovibrio と Desulfomicrobium が存在している。R 系汚泥においては、硫酸塩、亜硫酸塩、およびチオ硫酸塩を硫化水素に還元する Desulfomicrobium が存在している。R 系汚泥は、硫酸塩還元細菌が A 系汚泥よりもやや割合が小さいことが微生物群集解析の結果から得られた。

馴養活性汚泥の群集解析結果

馴養活性汚泥の NGS 解析結果を図 7 に示した。Si 添加により硝化菌はやや減少することが示唆された。また図 7 より、硫酸塩還元細菌は、ブランクでは減少していくが、Si 添加により減少することなく維持することが示唆された。

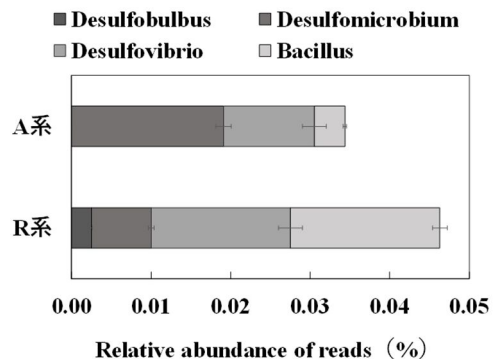


図 6 硫酸塩還元細菌 (属レベル) の割合

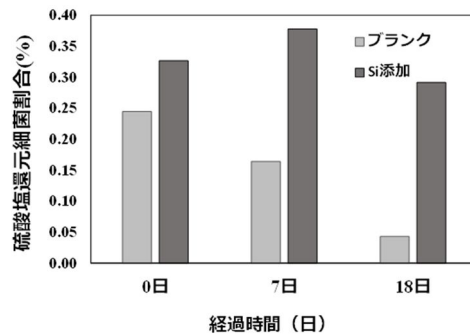


図 7 馴養汚泥の硫酸塩還元細菌の変化割合

## 5. 主な研究発表

(学会発表5件、研究代表者に下線)

1. 無機溶存物質存在下における排水処理微生物および窒素除去性能への影響，宮里直樹、新井亮、島田優里奈、青井透，第52回日本水環境学会年会，2018
2. シリカ(Si)添加による活性汚泥中の Bacillus 属細菌の優占化と窒素除去性能の検討，石井敦大，岡田 幸，青井透，宮里直樹，第46回土木学会関東支部技術研究発表会，2019
3. 無機溶存物質の排水処理微生物および回転円盤処理による窒素除去への影響，宮里直樹，岡田 幸，石井敦大，青井透，第53回日本水環境学会年会，2019
4. ケイ酸による活性汚泥中の排水処理微生物への影響，石井敦大，原 幸也，原田怜央菜，青井透，宮里直樹，第56回環境工学研究フォーラム，2019
5. 無機溶存物質添加による活性汚泥中の排水処理微生物への影響，石井敦大，原 幸也，青井透，宮里直樹，第54回日本水環境学会年会，2020
6. The Wastewater Treatment Performance Of Rotating Biological Disk Reactor With Bacillus Species, Naoki Miyazato, Atsuhiko Ishii, Yuki Okada, Toru Aoi, the IWA World Water Congress & Exhibition, 2021

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮里直樹(MIYAZATO, Naoki)

群馬工業高等専門学校・環境都市工学科 准教授

研究者番号：00435413

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮里 直樹, 岡田 幸, 石井 敦大, 青井 透
2. 発表標題 無機溶存物質の排水処理微生物および回転円盤処理による窒素除去への影響
3. 学会等名 第52回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井 敦大, 岡田 幸, 宮里 直樹, 青井 透
2. 発表標題 シリカ(Si)添加による活性汚泥中のBacillus属細菌の優占化と窒素除去性能の検討
3. 学会等名 第46回土木学会関東支部技術研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮里直樹、新井 亮、島田優里奈、青井 透
2. 発表標題 無機溶存物質存在下における排水処理微生物および窒素除去性能への影響
3. 学会等名 公益社団法人日本水環境学会 第52回日本水環境学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 島田優里奈、新井 亮、 青井 透、宮里直樹
2. 発表標題 高専下水を用いたバチルス属細菌優先化回転円盤の窒素除去特性
3. 学会等名 公益社団法人土木学科関東支部 第45回関東支部技術研究発表会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----