

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 3 日現在

機関番号：33114

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05919

研究課題名（和文）廃水処理における硫黄酸化細菌の株レベルの群集構造解析による生育特性の決定

研究課題名（英文）Strain-level community structure analysis in wastewater treatment to determine the growth characteristics of sulfur-oxidizing bacteria

研究代表者

浅野 亮樹（Asano, Ryoki）

新潟食料農業大学・食料産業学科・講師

研究者番号：20646137

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：調査を行った都市廃水処理場の硫黄酸化細菌は、1年間にわたる調査期間を通し特定の種（*Sulfuritalea hydrogenivorans*）が90%以上を占め続けること、この種の遺伝子数は最大で約30倍の変動があることが明らかとなった。異なる地域にある施設の微生物群集解析も行ったところ、すべてでこの種が硫黄酸化細菌の90%以上を占めていることが明らかとなった。またこの種の生育的特性より都市廃水処理過程における硫黄酸化は脱窒と共役した反応である可能性が示された。以上より下水処理施設の硫黄酸化は少数の種の硫黄酸化細菌が役割を担っている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

硫黄酸化細菌は廃水処理過程において悪臭の抑制だけでなく、脱窒に共益するなど重要な役割を果たすが、これまでの研究は科、属レベルでの群集解析にとどまっており、硫黄酸化細菌の生育的特徴は不明であった。本研究では種、株レベルでの解析に踏み込むことにより、廃水処理過程の硫黄酸化細菌は*S. hydrogenivorans*が種レベルで優占していることを明らかにした。またこの種の生育的特性より、廃水処理過程の硫黄酸化の大部分は脱窒と共役している可能性が示された。このことは廃水処理過程における大きな目的の一つである脱窒は従属栄養的な脱窒微生物のみならず硫黄酸化細菌が大きく貢献している可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：This study revealed that sulfur-oxidizing bacteria in the urban wastewater treatment plant surveyed continue to account for more than 90% of specific species (*Sulfuritalea hydrogenivorans*) throughout the one-year survey period, and the number of genes in this species fluctuates up to about 30 times. Microbial community analysis of facilities in different regions also revealed that this species accounts for more than 90% of sulfur-oxidizing bacteria in all cases. In addition, growth characteristics in this species indicates that sulfur oxidation in the process of urban wastewater treatment may be a reaction coupled with denitrification. From the above, it was shown that a small number of species of sulfur-oxidizing bacteria may play a role in sulfur oxidation in sewage treatment facilities.

研究分野：環境微生物学

キーワード：硫黄酸化細菌 微生物群集構造 廃水処理

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

排泄物や廃水に含まれる含硫アミノ酸が微生物によって嫌気分解されると硫化水素など硫化物が発生する。硫化物は硫黄を分子中に含む物質の総称で、硫化水素やメチルスルフィドなど低濃度で臭気を発するものが多い。また硫化物は分解され硫酸まで酸化されなければ再び生物に吸収されないため、硫黄酸化は廃水処理やコンポスト処理の臭気抑制だけでなく環境中の硫黄循環においても重要な反応である。

硫黄酸化細菌は環境中の硫化物や硫黄の酸化に関与する細菌で、一般的には硫黄酸化によりエネルギーを獲得する化学合成独立性の硫黄酸化細菌をいう。硫黄酸化細菌は悪臭の原因となる硫化物の除去を行うだけでなく、一部の種は嫌気条件下では硫黄酸化と供役して脱窒を行う。また一部の硫黄酸化細菌は汚泥沈殿不良の原因ともなるため(*Thiothrix*など)、硫黄酸化細菌群集の情報は廃水処理過程において重要である。

硫黄酸化細菌は硫黄を様々な経路を用いて酸化するため、反応の鍵となる酵素およびその遺伝子を絞るのは難しい。また系統的にも多様な位置に分散している。そのため分子生物学的手法を用いた環境硫黄酸化細菌の群集構造解析は難しく、2010年代に入っても測定バイアスの大きい培養法を用いた論文が発表されていた。

その後廃水処理施設を含むさまざまな環境の硫黄酸化細菌群集について次世代シーケンサーを用いた研究が行われてきたが、膨大なデータを取り扱い解析が煩雑となるため、他の研究者の報告は科、属レベルでの群集解析にとどまっている。細菌が硫黄酸化を行うか否かは属レベルの分類で十分だが、生育温度、生育 pH、耐塩性などの生育的特徴は種・株レベルでの詳細な分類が必要となる。これらの研究では硫黄酸化細菌がいることが確認できて群集を制御している条件や、脱窒などへの関与を決定することはできなかった。つまり、「どのような生育特徴を持つ硫黄酸化細菌」が存在しているかは不明であった。

2. 研究の目的

日本国内の廃水処理過程の細菌群集について、次世代シーケンサーにより遺伝子配列から詳細な構造を決定し、既存の研究よりも数段詳細な種・株レベルでの硫黄酸化細菌の群集構造を決定した。これにより廃水処理過程における硫黄酸化細菌の基質利用性、脱窒への関与など生育的な特徴まで踏み込んだ解析を行った。既存の解析システムに独自のプログラムを用いる事により多量の国内廃水処理過程の試料を効率的に解析し、硫黄酸化細菌と物理化学的特徴の関係および相関が高い微生物種を明らかにして、最終的には廃水処理過程における硫黄酸化細菌の制限要因を特定し、硫化物の悪臭抑制の明確な条件を決定する事を目指した。

3. 研究の方法

同一の都市廃水処理過程において、本研究の標的である硫黄酸化細菌がどの程度変化するかを確認するため、同じ都市廃水処理場から1年間にわたり流入下水から放流水まで処理過程の複数の個所の試料を採取し、解析を行った。試料からDNAを抽出し真正細菌および古細菌の16S rRNA 遺伝子を増幅し、次世代シーケンサーMiSeqを用いて塩基配列を決定した。この塩基配列情報より硫黄酸化細菌群集について種・株レベルの分類を行った。さらにリアルタイムPCRにより16S rRNA 遺伝子数を決定した。

同時に廃水の易酸性硫黄含量、硫酸イオン、浮遊懸濁物質、pH、電気伝導度、イオン濃度などの物理化学的特性についても決定した。

さらに都市排水処理過程において硫黄酸化細菌は1種(または非常に少ない種)が優占することが共通するものかを明らかにするため、他の廃水処理場からも試料を採取し解析を行った。

4. 研究成果

同じ都市廃水処理場の硫黄酸化細菌は、調査期間を通し特定の種(*Sulfuritalea hydrogenivorans*)が90%以上を占め続けること、全原核生物に対する硫黄酸化細菌の割合は0.4%から2.0%の間で変動があることが明らかとなった。上記の変動が、硫黄酸化細菌の数が変動しているのか、原核生物全体の数が変化しているのか、を明らかにするため、群集構造解析を行った試料に対しリアルタイムPCRを用いて16S rRNA 遺伝子数を決定し、これに群集構造解析から得られた種ごとの割合(%)を乗じて、優占する硫黄酸化細菌 *S. hydrogenivorans* の遺伝子数を求めた。その結果 *S. hydrogenivorans* の遺伝子数は 6.5×10^5 copy number/mL から 2.8×10^6 copy number/mL で変動していた。そのため、調査した下水処理施設では *S. hydrogenivorans* が硫黄酸化細菌として優占し続けていたものの、その数は季節により変動することが明らかになった。

2つの異なる地域より得られた5か所の都市下水処理施設の微生物群集解析を行ったところ、すべての施設で硫黄酸化細菌は *S. hydrogenivorans* が90%以上を占めていることが明らかとなった。*S. hydrogenivorans* は硫黄酸化を嫌気条件下においてのみ硝酸を電子受容体として脱窒を同時に行う特性を持つ。このため、都市廃水処理過程における硫黄酸化はかなり多くの部分が脱窒と共役した反応である可能性が示された。

以上より下水処理施設の硫黄酸化は少数の種の硫黄酸化細菌が役割を担い、特に日本においては *S. hydrogenivorans* がその役割を果たしている可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Asano Ryoki, Hayakawa Atsushi, Fukushima Jun, Nakai Yutaka, Shimura Yoichiro, Abe Midori, Inamoto Tamio	4. 巻 8
2. 論文標題 Changes in Bacterial Communities in Seawater-Flooded Soil in the Four Years After the 2011 Tohoku Tsunami in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Marine Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 76 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jmse8020076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Lee Chol Gyu, Baba Yasunori, Asano Ryoki, Fukuda Yasuhiro, Tada Chika, Nakai Yutaka	4. 巻 130
2. 論文標題 Identification of bacteria involved in the decomposition of lignocellulosic biomass treated with cow rumen fluid by metagenomic analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 137 ~ 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.03.010	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maeda Koki, Miyatake Fumihito, Asano Ryoki, Nakajima Kei-ichi, Maeda Takeki, Iwabuchi Kazunori	4. 巻 206
2. 論文標題 Response of the denitrifier community and its relationship with multiple N ₂ O emission peaks after mature compost addition into dairy manure compost with forced aeration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 310 ~ 319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chemosphere.2018.04.169	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takizawa Shuhei, Asano Ryoki, Fukuda Yasuhiro, Feng Mengjia, Baba Yasunori, Abe Kenichi, Tada Chika, Nakai Yutaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Change of Endoglucanase Activity and Rumen Microbial Community During Biodegradation of Cellulose Using Rumen Microbiota	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 603818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.603818	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayakawa Atsushi, Funaki Yu, Sudo Tatsuya, Asano Ryoki, Murano Hirotsu, Watanabe Shintaro, Ishida Tomoko, Ishikawa Yuichi, Hidaka Shin	4. 巻 66
2. 論文標題 Catchment topography and the distribution of electron donors for denitrification control the nitrate concentration in headwater streams of the Lake Hachiro watershed	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 906 ~ 918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00380768.2020.1827292	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 太田仁志, 早川敦, 浅野亮樹, 石川祐一, 高橋正
2. 発表標題 八郎潟干拓地の水田土壌における硫黄脱窒の評価
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 Hayakawa, A., Ota, H., Asano, R., Murano, H., Ishikawa, Y., Takahashi, T
2. 発表標題 Sulfur denitrification in riverbank soils derived from marine sedimentary rocks.
3. 学会等名 the NARO-MARCO International Symposium "Nitrogen Cycling and Its Environmental Impacts in East Asia" (国際学会)
4. 発表年 2018年 ~ 2019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
研究分担者	早川 敦 (Hayakawa Atsushi) (10450280)	秋田県立大学・生物資源科学部・准教授 (21401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------