

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：13102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19873

研究課題名（和文）電位制御-微生物増殖担体を用いた難培養微生物分離技術の開発と環境工学への新展開

研究課題名（英文）Challenges for cultivation and isolation of anaerobic fastidious microorganism using conductive microbial growth medium and its application to environmental engineering

研究代表者

幡本 将史（HATAMOTO, MASASHI）

長岡技術科学大学・工学研究科・准教授

研究者番号：20524185

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ポリビニルアルコール製の微生物増殖担体に導電性物質を混合する事で、担体に保持されるメタン生成古細菌や嫌気共生細菌の存在割合が大幅に増加した。この担体を使う事で、分離培養が難しい脂肪酸分解細菌を効率的に培養することが可能となった。また、本担体に保持された微生物のみを植種源とした培養も可能であった。嫌気性メタン酸化脱窒微生物の培養では分離膜を用いたメタン供給を実施したが、気相中に直接メタンを供給する方式のほうがより適しているという事がわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物増殖担体に導電性物質を混合するだけという非常に簡単な方法でメタン発酵の鍵となるメタン生成古細菌や嫌気共生細菌を効率的に担体に保持できるため、メタン発酵法の安定化に貢献できる技術である。また嫌気性微生物の新しい培養方法としても活用できる成果であり、学術的意義も非常に高い。また嫌気性メタン酸化脱窒微生物の培養では基質であるメタンの供給方法が鍵であることがわかり、今後の研究開発の方向性の一つとなる。

研究成果の概要（英文）：Effective anaerobic microbial carrier, which was mixing the conductive materials into polyvinyl alcohol (PVA), was developed in this study. Using the newly developed microbial carrier the ratio of methanogens and anaerobic syntrophic microorganisms were largely increased compared to conventional PVA microbial carriers. This showed novel microbial carrier holds key microorganism of anaerobic digestion effectively. It was also possible to culture only the microorganisms retained in this carrier as a source of inoculation. For enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidation microorganisms, the way of methane supplying is key parameters and direct supply of methane from atmosphere is more appropriate than membrane permeation.

研究分野：環境工学

キーワード：廃水処理 メタン 微生物 嫌気共生細菌 導電性物質 アーキア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物学的窒素除去(硝化・脱窒)プロセスは、廃水からの窒素除去法として広く用いられている。しかし、近年では窒素除去プロセスから放出される強温室効果ガスである亜酸化窒素(N_2O)が問題視されており、その排出削減が求められている。嫌気性メタン酸化脱窒微生物(DAMOアーキア)は、通常の脱窒反応における中間代謝物である強温室効果ガスの N_2O を経由しない新奇な脱窒代謝経路を保持しているとして、世界的に注目されている微生物群である。しかしながら、このDAMOアーキアは増殖が遅く、培養が非常に難しいため分離培養がなされておらず、新奇な脱窒経路も推定の域を出ていないのが現状である。

嫌気性メタン酸化反応はバクテリアとの共生が必要な反応であるため、その反応に関わる微生物の分離培養は難しいとされる。このような微生物の一種に嫌気条件下で脂肪酸の分解を担う嫌気共生細菌がある。メタン生成環境下における脂肪酸の分解には、熱力学的な制約から水素を利用する水素資化性メタン生成古細菌と脂肪酸分解細菌との強固な共生関係が必要である。この関係は、種間水素伝達と呼ばれていたが近年では種間電子伝達も起こっていることが発見された。そのため、導電性物質を添加することでこの種間電子伝達を促進しメタン生成環境下での脂肪酸分解を促進する事が判明している。

これまでに、セルソーターなどを用いて微生物を1細胞ずつ分離し、新規な微生物を分離する手法が提案されている。しかしながら、本手法を嫌気性細菌の分離に導入し、成功した例はほとんどない。この原因は、培養の難しい嫌気性微生物の多くが、1細胞のみでは生育できない共生関係を必要とする微生物だからであると申請者は考えている。そこで、共生関係を維持したまま、セルソーターなどの手法を適用するために、導電性のある微小な微生物増殖担体を用いれば良いのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、導電性微生物増殖担体の開発とその効果を検証し、これを用いた新規微生物のシングルセル分離培養システムの開発を行う。そして、本手法を用いて、嫌気性メタン酸化脱窒微生物群(DAMOアーキア)の純粋培養への挑戦を行う。また、分離培養に向けてDAMOアーキアの高度集積培養を膜分離リアクターにより試みる。

3. 研究の方法

導電性のある微生物増殖担体にはポリビニルアルコール(PVA)ゲルの担体に各種物質を混合することで作成した。PVAゲル担体はBae et.al. (2015)を参照して作成した。PVAゲル担体にはマグネタイトや活性炭を混合することで導電性を付与した。硫酸ナトリウム溶液にゲル状のPVA粒体を所定時間浸漬させて、PVA粒体の強度を高めることで微生物を保持し長期間使用可能な導電性のPVA担体を作成した。作成したPVAゲル担体を図1に示す。



図1 本研究で作成したPVAゲル担体

本研究で作成したPVAゲル担体が効率的に嫌気共生細菌を保持できるか確認するため、メタン生成環境下におけるプロピオン酸分解細菌を標的としてPVA担体の有効性を評価した。実験はバイアル瓶を用いたバッチ培養で行った。通常のPVA担体、導電性物質を転換したPVA担体と担体なしの条件で嫌気性汚泥を培養しメタン生成量からその効果を評価し、さらに最終的に担体に保持された微生物を16S rRNA遺伝子配列に基づいて解析した。

DAMOアーキアの高度集積培養には中空糸膜リアクター(HfMBR)を用いた。2台HfMBRを用いてHRTは9.5時間でメタン供給は3.6 L/day、運転温度は30℃の条件で実験を行った。HfMBRの流入水と流出水の硝酸及び亜硝酸の濃度はUV-VIS検出器を備えた高速液体クロマトグラフ(SPD-20AV, Shimadzu)を用いて測定した。集積された微生物は16S rRNA遺伝子配列に基づいて解析した。

4. 研究成果

PVAゲル担体を用いたバッチ培養を行った。実験では嫌気性消化汚泥のみ、PVA担体を添加、PVAに活性炭を添加(PVA-AC)、PVAにマグネタイトを添加(PVA-MT)、PVAに導電性のある碎石を添加(PVA-GT)の条件で実施した。実験の結果、全ての実験系でプロピオン酸の分解に従ってメタンが生成することが確認できた。プロピオ

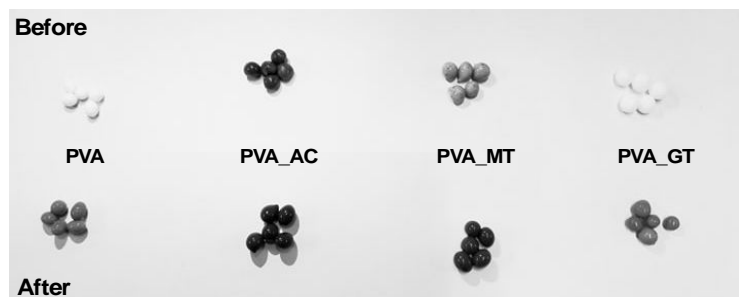


図2 培養前後のPVA微生物担体の様子

ン酸の添加は3回実施し、プロピオン酸分解細菌の集積を行った。その後、PVA担体を取り出しPVA担体のみを新しいバッチに移植する事で、PVA担体に付着した微生物の評価を行った。図2に取り出したPVA担体を示す。培養後は嫌気性微生物が担体に保持されていることが確認できた。

図3に微生物が付着したPVA担体のみを使ったバッチ培養の結果を示す。導電性物質を添加したPVA担体では基質として添加したプロピオン酸が順調に分解している一方で、純粋なPVA担体のみの実験系ではプロピオン酸はあまり分解できていない事が明らかとなった。次に、この担体に保持されている微生物群集を明らかにするために16S rRNA遺伝子配列を標的とした微生物解析を実施した。その結果、各担体には *Syntrophus* 属や *Syntrophobacter* 属の嫌気性プロピオン酸分解共生細菌を保持していることが明となった。特に、導電性物質を添加したPVA担体には水素資化性メタン生成古細菌である *Methanomicrobia* sp.が30%以上の存在割合で検出された。その一方で、従来の導電性物質を添加していないPVA担体においてはメタン生成古細菌の存在割合は1%以下であった。以上の結果から、微生物増殖担体を用いる事で従来では培養が難しいとされていた嫌気共生細菌の1種である嫌気性プロピオン酸分解共生細菌を効率的に培養することが可能となった。

DAMOアーキアの高度集積培養実験では2つの異なった植種源を用いた2台のHfMBRを用いた実験をおこなった。実験ではアンモニアと硝酸および亜硝酸による窒素源の供給とメタンガスの供給有無により、各種条件を設定し集積培養を行った(表1)。HfMBR1とHfMBR2を比較するとリアクター1のほうがより高い硝酸除去活性を有していることが確認できた。しかしながらその速度は以前の研究で開発したスポンジを用いたリアクター方式には及ばない値であった。保持汚泥中の微生物解析を実施した結果を図4に示す。リアクターに植種したサンプルと比較し、両リアクターでは特定の微生物が増殖しており集積培養が進行している事が確認できた。ただ、目的としたDAMOアーキアの集積が進行することは確認できなかった。従って、以前の研究で用いたスポンジを用いたリアクター方式のほうがより適していると考えられる。

嫌気性微生物のモデル微生物としてメタン生成古細菌を用い、微生物増殖担体を模擬したドロップレットを用いてセルソーター分離する実験を行った。その結果、通常の大気条件において分離したメタン生成古細菌が増殖する事が確認できた。従って、微生物増殖担体を用いて培養しその後増殖担体ごとセルソーター等で分離するという本研究の目標とする方法は実現可能性が非常に高いと考えられる。

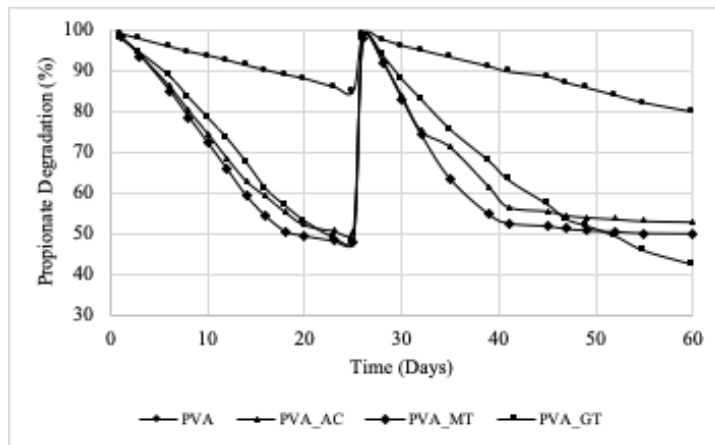


図3 微生物を保持したPVA担体のみを用いたプロピオン酸の分解実験結果

表1 DAMOアーキアの集積培養条件

Phase	N sources (mgN·L ⁻¹ ·day ⁻¹)	N removal (mgN·L ⁻¹ ·day ⁻¹)	
		HfMBR1	HfMBR2
1	NaNO ₃ (74.2), (NH ₄) ₂ SO ₄ (35.0)	NO ₃ ⁻ : 12.0 NH ₄ ⁺ : 2.40	NO ₃ ⁻ : 14.9 NH ₄ ⁺ : 3.09
2	NaNO ₂ (25.3), (NH ₄) ₂ SO ₄ (35.8)	NO ₂ ⁻ : 11.23 NH ₄ ⁺ : 11.89	NO ₃ ⁻ : 17.7 NH ₄ ⁺ : 3.04
3	NaNO ₂ (26.6)	NO ₂ ⁻ : 16.21	NO ₂ ⁻ : 11.1
4	NaNO ₂ (25.3)	NO ₂ ⁻ : 18.6	NO ₂ ⁻ : 17.6
5	NaNO ₃ (32.3)	NO ₃ ⁻ : 7.24	NO ₃ ⁻ : 10.5
6	NaNO ₃ (31.0)	NO ₃ ⁻ : 12.4	NO ₃ ⁻ : 10.4

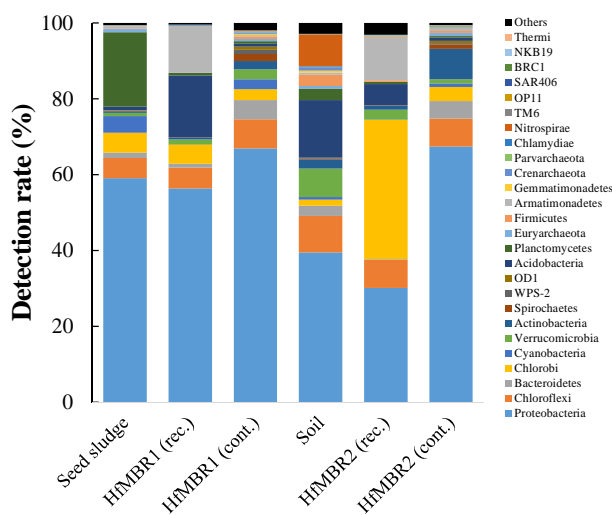


図4 HfMBR保持汚泥中の微生物群集解析結果

参考文献

H. Bae, M. Choi, C. Lee, Y.C. Chung, Y.J. Yoo, S. Lee. Enrichment of ANAMMOX bacteria from conventional activated sludge entrapped in poly(vinyl alcohol)/sodium alginate gel. Chem. Eng. J., 281 (2015), pp. 531-540

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 2件）

1. 発表者名 黒田恭平、延優、成廣隆、幡本将史、山口隆司、山内正仁、山田真義
2. 発表標題 天然鉱物「十和田石」を用いたメタン生成に關与する微生物群の解析
3. 学会等名 第53回 日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sitthakarn SITTHI, Masashi HATAMOTO, Takahiro WATARI, Takashi YAMAGUCHI
2. 発表標題 Enhancing an anaerobic syntrophic propionate degradation using modified PVA gel beads
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sitthakarn SITTHI, Masashi HATAMOTO, Takahiro WATARI, Takashi YAMAGUCHI
2. 発表標題 Microbial Promoting of DIET via modified PVA beads in syntrophic propionate degradation
3. 学会等名 12th International Conference on Challenges in Environmental Science & Engineering (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nur Aina Afiqah Binti Abdul Rahman, Sitthakarn Sitthi, 幡本将史, 渡利高大, 山口隆司
2. 発表標題 導電性材料を介したDIETによるメタン生成の促進
3. 学会等名 第37回 土木学会関東支部新潟会研究調査発表会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 微生物担体及び廃液処理方法	発明者 幡本 将史、シッタ カーン シッテイ、 山口 隆司、渡利	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-199827	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----