

氏 名(本籍)	あさ 浅	の 野	りょう 亮	き 樹
学 位 の 種 類	博 士 ( 農 学 )			
学 位 記 番 号	農 博 第 8 7 9 号			
学位授与年月日	平 成 19 年 3 月 27 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研 究 科 専 攻	農学研究科資源生物科学専攻 (博士課程)			
学 位 論 文 題 目	コンポストおよび環境からの硫黄酸化細菌の分離と硫化 水素除去への応用			
論文審査委員	(主 査)	教 授	中 井	裕
	(副 査)	教 授	谷 口	和 也
		教 授	伊 藤	義 文

# 論文内容要旨

## 第1章

### 緒論

家畜より発生する排泄物は農地に肥料として投入されることにより有効利用されてきた。しかし近年排泄物の農地への還元が次第に困難になり、家畜排泄物により環境問題が引き起こされるまでになっている。

畜産経営に起因する苦情のうち悪臭に関する苦情が最も多く全体の半分以上を占め、畜産環境問題を考える場合悪臭対策は避けて通れない課題である。

硫化物は硫黄を分子中に含む物質の総称で、低濃度で臭気を発するものが多い。動植物の体内において硫黄はおもにシステインやメチオニンなどの含硫アミノ酸として存在し、硫黄原子はこれらの分子では-SH基の形をとる。含硫アミノ酸が腸管内および排泄物中で微生物によって嫌気分解されると硫化水素 ( $H_2S$ ) が発生する。

硫化水素は微量でも強い臭気を発し、毒性も強いため現在では悪臭防止法により規制されており、0.2ppm 以下という規制が設けられている。硫化水素は排泄物や汚水を放置すると嫌気条件が促進され、硫酸が還元されることによっても発生するので、畜産排泄物は速やかにコンポスト処理や廃水処理により硫酸に酸化させることが重要である。

植物の生育に硫黄は必須であるが、ほとんどの植物は硫酸態で硫黄を吸収する。一度動植物の体内から放出され、分解された硫黄は硫酸まで酸化しなければ再び有機体に吸収されないため、硫黄の循環において硫黄酸化は重要な反応である。

硫黄酸化細菌は、環境中に存在する硫化水素、硫黄元素などを酸化し、最終産物として硫酸を生成する細菌を指す。環境中の硫黄酸化はこれらの細菌が関係している。

畜産排泄物はコンポスト処理や廃水処理を経て環境中に放出される。硫黄酸化細菌は生活排水処理において研究が進められており (Cha ら 1999, Aralp と Ardinler 2001, Lin ら 2002, Ito ら 2004, Okabe ら 2006)、畜産排水処理過程においても硫黄酸化細菌株の分離がすでに行われている (Chung ら 1996)。しかしコンポスト処理過程における硫黄酸化細菌の研究は畜産排泄物のみならず生活コンポスト処理過程

を含めてもほとんど行われていない。

排泄物処理過程の硫化水素放出について、排泄物中に蓄積された硫化水素が過程の初期において攪拌、通気され空気中へ放出される。この拡散を防止するため処理を密閉空間内で行い、排気口に硫化水素除去装置を設置し硫化水素を取り除く必要がある。

硫黄酸化細菌を利用した生物型硫化水素除去装置は化学物理的処理に比べランニングコストが安いなどの利点があり、嫌気消化ガスの脱硫などに用いられている。生物型硫化水素除去装置はその性質上、外環境微生物が混入し硫黄酸化細菌の生育および硫化水素除去能力を阻害する恐れがある。また硫黄酸化細菌は下水道のコンクリートや金属を腐食することが報告されているが (Vincle ら 1999、Lee ら 2004)、硫化水素除去装置の硫黄酸化細菌が下水中へ流入する影響についての報告はほとんどない。本研究では装置内において環境中温性微生物の増殖防止、さらに外環境に放出された硫黄酸化細菌の活動抑制を目的とした高温性硫黄酸化細菌を用いた生物型硫化水素除去装置を提案する。本研究ではコンポストにおける硫黄酸化細菌の調査、および高温性硫黄酸化細菌による硫化水素除去の検討を行った。

## 第2章

### コンポストおよび富硫黄環境における硫黄酸化細菌の検索

コンポストおよび硫黄が多く含まれる環境における硫黄酸化細菌の生態を明らかにするため、硫黄酸化細菌の計数、分離した硫黄酸化細菌の分離をおこなった。

Cha 培地 (Cha ら 1999) および Cha 改変培地を用いて培養を行い、培養後に硫酸の蓄積が認められたものを硫黄酸化細菌として、MPN法によりその数を測定した(図2-1)。硫黄酸化細菌は、酸性湖底泥からは検出されなかったが、コンポストからは最大  $1.1 \times 10^3$  cells/g、温泉排水底泥からは  $3.5 \times 10^5$  cells/g が検出された。環境中には培養不可能な微生物が多数存在することが知られているが、これらの環境中に培養可能な硫黄酸化細菌が生息することが明らかとなった。また、コンポスト中の硫黄酸化細菌は本研究

により初めて検出されたものであった。

Cha 培地による平板培地を用いて、各環境から硫黄酸化細菌を分離した(表 2-1)。

コンポストから分離した C153 株および C157 株は性状解析および、遺伝子解析の結果(図 2-2)、*H. neapolitanus* と同定した。コンポストに *H. neapolitanus* が存在することは、本研究で示された新知見であった、集積培養法を試みた結果、温泉排水底泥および酸性湖底泥から、硫黄酸化細菌 3 菌株が分離された。16S rRNA 遺伝子配列の比較の結果 *Thiomonas* 属に属する新規の硫黄酸化細菌であることが示唆された(図 2-2)。

### 第 3 章

#### 新規硫黄酸化細菌 HS255 株を用いた中度好温性生物型硫化水素除去

温泉排水より分離した HS255 株は最適硫黄酸化温度 45℃、最適 pH6.5 の偏性好気性の硫黄酸化細菌であり、中度好温性生物型硫化水素除去に好適と考えられた(表 3-1)。そこで、HS255 株を用いた硫化水素除去試験をおこなった。1/10 濃度に調整したトリプトソーヤブイヨン培地(日本水産) 500ml に本株を接種して三角コルベンに入れ、約 20ppm の硫化水素を含む空気を流速 0.5ml/min で培地底部に設置した散気管を通じて培地中に流入させ、培地上部より排出されるガスをコルベン外に導いて硫化水素を測定した。流入量と流出量の差により硫化水素除去量を求めた。120 時間目まで観察を行った結果を図 3-1 に示した。試験開始 24 時間後に最大除去率である 96%まで上昇したが、その後低下していき 60 時間目には 72%、72 時間目には 26%となり、84 時間目以降は、除去は認められなかった。

pH の低下および、硫酸の蓄積が除去率低下の原因として考えられたため、pH 緩衝剤を Cha 培地に加えて試験を行った(図 3-2)。除去率の低下過程を観察しやすくするため硫化水素の負荷を約 1/5 に落として実験を行った。240 時間の観察を行ったが、硫酸の蓄積は認められたが、pH は低下せず、硫化水素除去能力にも低下は認められなかった。本実験装置を用いた HS255 株の硫化水素除去能力の低下は、硫酸濃度ではなく pH の低

下が原因であることが明らかとなった。

pH 低下抑制のため、培地を定期的に交換する方式として、担体を用いることを検討した (図 3-3)。試験開始後第 1 回測定で 12 時間で最大除去率 99%を示したが、緩衝剤無添加のために pH が低下し、硫化水素の除去率は低下した。そこで、60 時間の測定後、PVA を取り出し滅菌蒸留水で洗浄した後、新鮮な培地に交換して、試験を続行した。培地交換後最初となる 72 時間の測定では除去率 79%と、PVA 洗浄前と同様の値を示したが、84 時間では、全く除去は認められなかった。

洗浄した PVA 内部に硫酸が残留しそれが交換後の培地に放出されたためと考えられたので、PVA からの硫酸放出の経時変化を測定した (図 3-4)。蒸留水浸漬後 24 時間の蒸留水中の硫酸濃度を基準とすると、1 時間では PVA 内部の硫酸の 60%が放出され、3 時間では 77%、6 時間では 95%の硫酸が放出された。この結果より PVA 内部から硫酸をほぼ完全に洗い流すためには 6 時間が必要であり、短時間での洗浄は効果的ではないことが示された。

## 第 4 章

### HS255 株の環境微生物混在下における硫化水素除去および環境への影響

試験管に各種環境の微生物を含む試料を混合し、HS255 株のチオ硫酸に対する硫黄酸化能力を観察した (図 4-1)。各試験区間に有意差は見られず ( $P>0.05$ )、環境微生物混在下でも、本株の硫黄酸化能力は影響を受けないことが明らかとなった。

コンポストを硫化水素除去装置に添加して硫化水素除去能力の変化を観察した (図 4-2)。対照区としたコンポストのみ接種では、若干の硫化水素の除去が認められるに留まった。コンポストと HS255 株を混合接種した区では、HS255 株を単独接種した区と比較して、接種後 72 時間まで硫化水素除去はやや低値であったが、84 時間以降は単独接種よりも高い値を示した。このことは、コンポストを混入しても、硫化水素除去率は低下しないことを示しており、HS255 株は、環境微生物を混在下でも、硫黄酸化能力を十

分に発揮するものと考えられた。

畜舎排水中での HS255 株の生存性を観察するために、畜舎排水に HS255 株を接種して静置して、硫黄酸化細菌および硫酸濃度を検索した (図 4-3)。接種時および 1 日、3 日後に採材し、MPN 法および CFU 法で細菌数を測定した。MPN 法では硫酸の蓄積により、CFU 法ではコロニー形状および指示薬による培地 pH の低下により硫黄酸化細菌数を求めた。

畜舎排水のみの対照区からは硫黄酸化細菌は検出されなかったため、本試験で検出された硫黄酸化細菌は HS255 株と考えられた。滅菌した排水と混合した場合、3 日静置後においても硫黄酸化細菌は検出されたが、未滅菌の排水と混合すると、硫黄酸化細菌は CFU 法では検出されず、MPN 法で実験開始時の 1/500 に低下していた。これらのことから、HS255 株は畜舎排水中では、畜舎排水に混在する微生物の影響によって速やかに死滅することが明らかとなった。

畜舎排水に HS255 株の接種した場合、培養液中に含まれた硫酸のために、接種時において  $12.3 \mu\text{mol}$  の硫酸が検出された (図 4-4)。滅菌畜舎排水に接種した場合も硫酸の蓄積はほとんど認められず、未滅菌の排水に接種した場合は、3 日で大きく減少し、その値は、未接種の畜舎排水同様の値となった。これらのことから、畜舎排水中では、HS255 株の硫酸産生はほとんどないものと考えられた。

HS255 株を単独で  $25^{\circ}\text{C}$  培養を行ったが、まったく生育は認められなかった。

以上より畜舎排水中では HS255 株は増殖および硫黄酸化を行わず、緩やかに生存数も減少していくため、コンクリートおよび金属を腐食するなどの環境への悪影響はほとんどないものと思われた。

## 総括

1. コンポストおよび温泉排水底泥の培養可能な硫黄酸化細菌数は、 $1.1 \times 10^3/\text{g}$  および  $3.5 \times 10^5/\text{g}$  であった。

2. コンポスト中に硫黄酸化細菌が存在することが初めて示され、*Halothiobacillus neapolitanus* が同定された。
3. 温泉排水底泥および酸性湖底泥から *Thiomonas* に属する新規の硫黄酸化細菌が分離された。
4. 分離株中温泉排水底泥から分離された *Thiomonas* sp. HS255 株が 45°C における高い硫黄酸化能力を示した。
5. HS255 株は培地に吹き込まれた硫化水素を除去する高い能力を示したが、その能力の維持のためには pH を中性付近に保つことが必要であった。
6. PVA（ポリビニールアルコール）担体中で HS255 株は活発に増殖し、高い硫化水素除去能力を示した。
7. PVA の水洗によって、硫酸を除去することが可能であり、HS255 株の硫化水素除去能力の長期間の維持が可能と考えられた。
8. 環境微生物を多量に含むコンポストなどの存在下においても、HS255 株は高い硫化水素除去能力を保持した。
9. HS255 株は、25°C では生育せず、畜舎汚水環境下では速やかにその多くが死滅して、硫酸を産生しないことから、コンクリートや金属の腐食などの環境への影響はないものと考えられた。

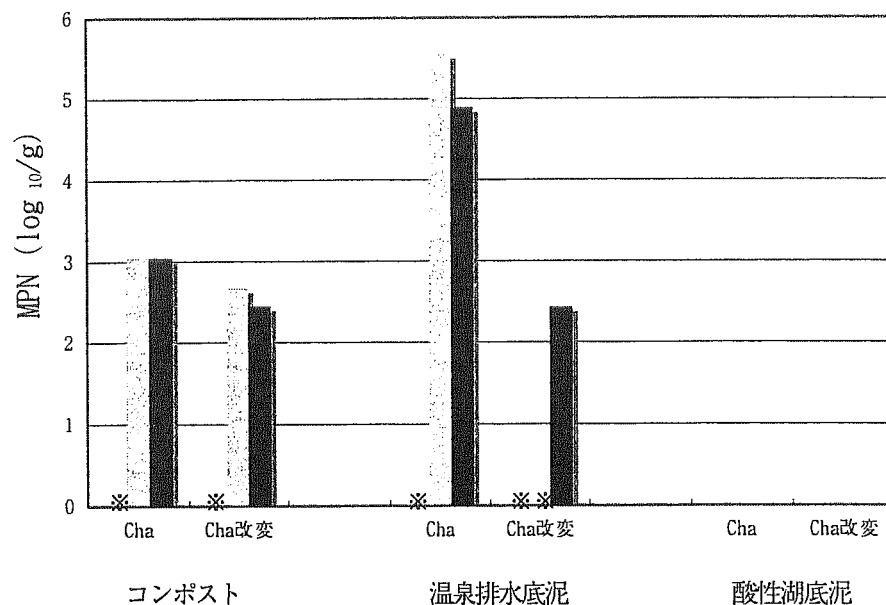


図 2-1 Cha培地を用いたMPN法により計数された各環境の硫黄酸化細菌数

□ : 30℃      □ : 45℃      ■ : 60℃

※チオ硫酸が消費され、硫酸が蓄積しなかった試験区

表2-1 分離菌株の特徴

株名	C153	C157	HS159	KL160	HS255
菌体形状	桿状	桿状	桿状	桿状	桿状
グラム染色	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
滑走性	○	○	○	○	○
平板培地上の コロニー形成	○	○	×	×	○
無機独立栄養生育	○	○	×	×	×
従属栄養生育	×	×	×	×	×
嫌気生育	×	×	×	×	×
混成栄養条件での 生育の向上	○	○	○	○	○
最近縁種の硫黄酸 化能	○	○	○	○	○



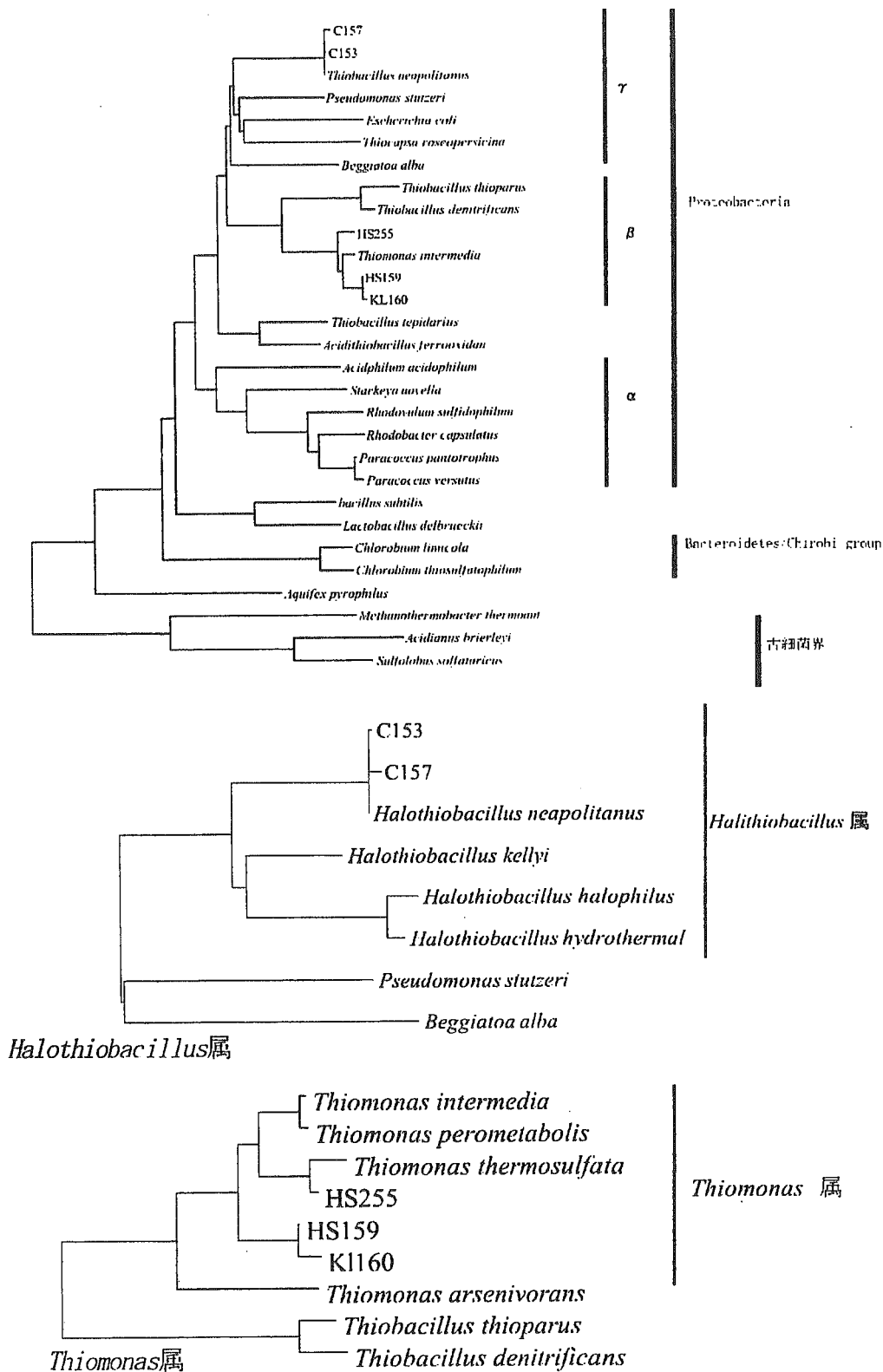


図2-2 分離菌株の系統樹

表3-1 HS255株の生育特性と中度好温性硫化水素除去への適性

要求された条件	HS255株生育特性	硫化水素除去への適性
栄養条件	$S^{2-}$ を $SO_4^{2-}$ まで酸化できる	硫化水素を無害化・安定化
	低栄養塩で良好な硫黄酸化	ランニングコスト低下
温度条件	最適硫黄酸化温度45℃	中温性細菌増殖の防止
	35℃以下での活動停止	環境放出の影響低い
pH条件	最適生育pH6.5	硫化水素溶解度
酸素条件	好気条件下で生育	好気処理装置における使用
	嫌気条件下では生育しない	嫌気消化ガスには空気混合が必要

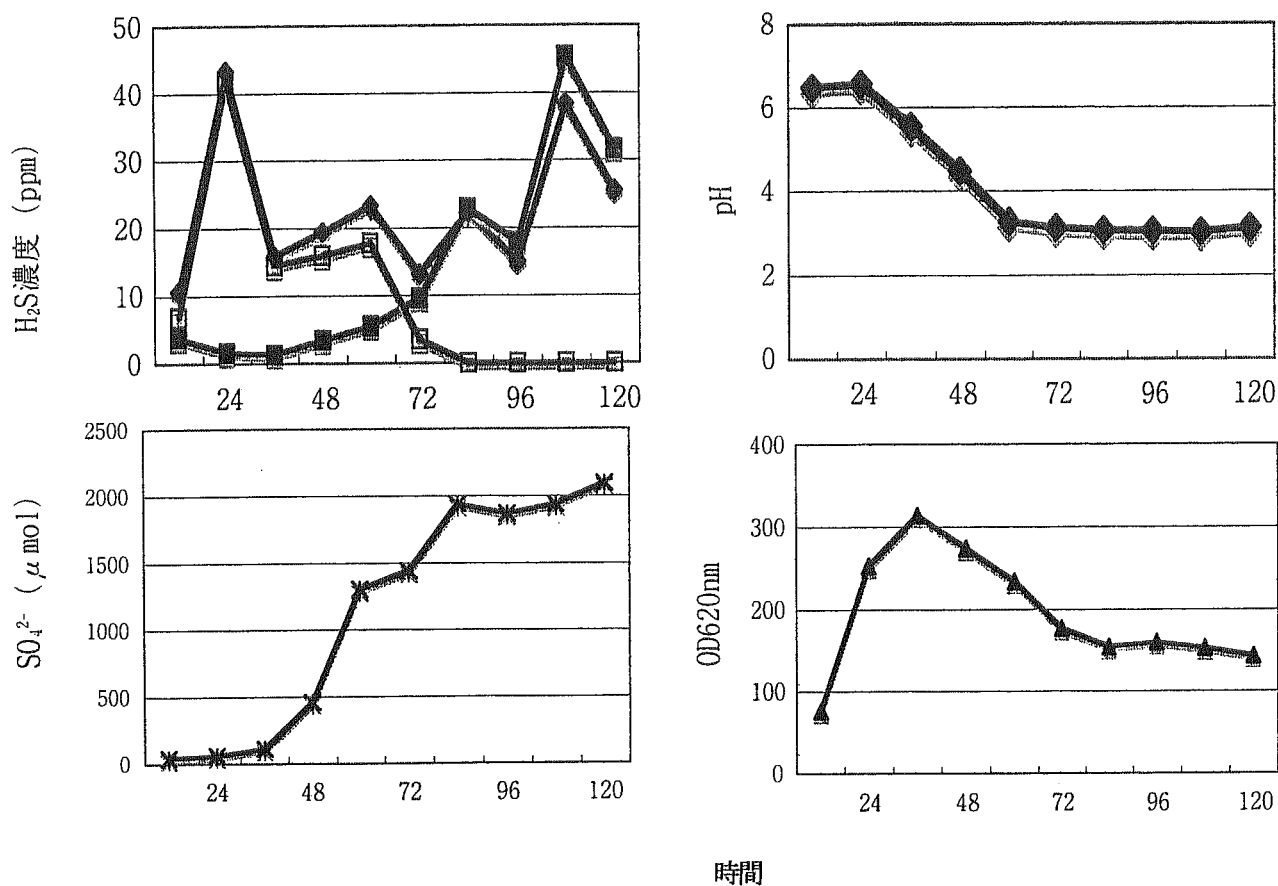


図3-1 HS255株による硫化水素除去

◆: H<sub>2</sub>S流入量 ■: H<sub>2</sub>S流出量 □: H<sub>2</sub>S流入量除去量  
 ×: SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>蓄積量 ●: 培地pH ▲: 培地吸光度(620 nm)

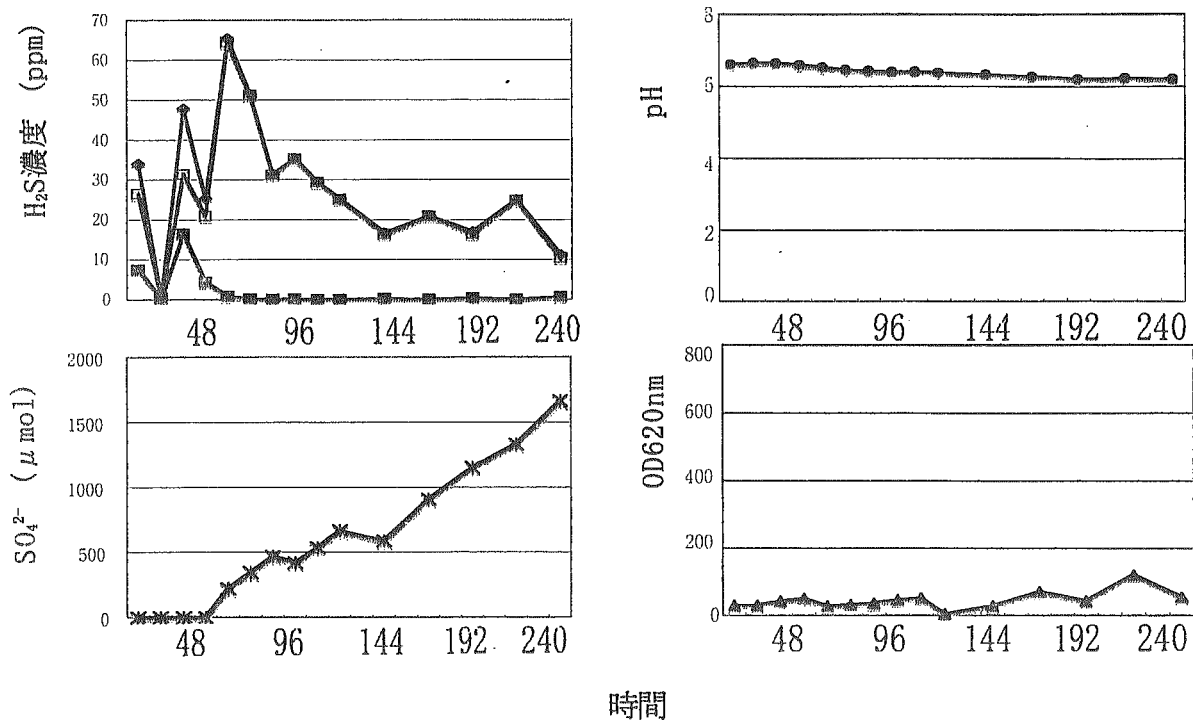


図3-2 HS255株による硫化水素除去 (pH緩衝剤添加)

◆:  $\text{H}_2\text{S}$ 流入量 ■:  $\text{H}_2\text{S}$ 流出量 □:  $\text{H}_2\text{S}$ 流入量除去量

×:  $\text{SO}_4^{2-}$ 蓄積量 ●: 培地pH ▲: 培地吸光度(620 nm)

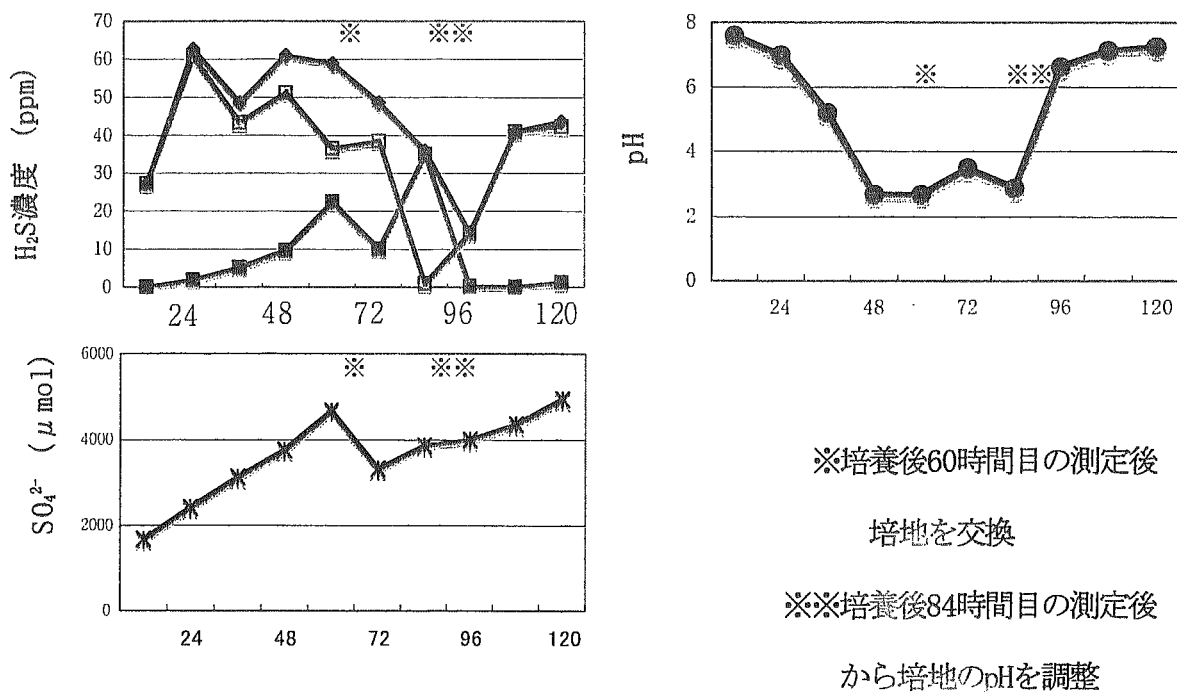


図3-3 PVAに固定したHS255株による硫化水素除去

◆:  $\text{H}_2\text{S}$ 流入量 ■:  $\text{H}_2\text{S}$ 流出量 □:  $\text{H}_2\text{S}$ 除去量

×:  $\text{SO}_4^{2-}$ 蓄積量 ●: 培地pH ▲: 培地OD620nm

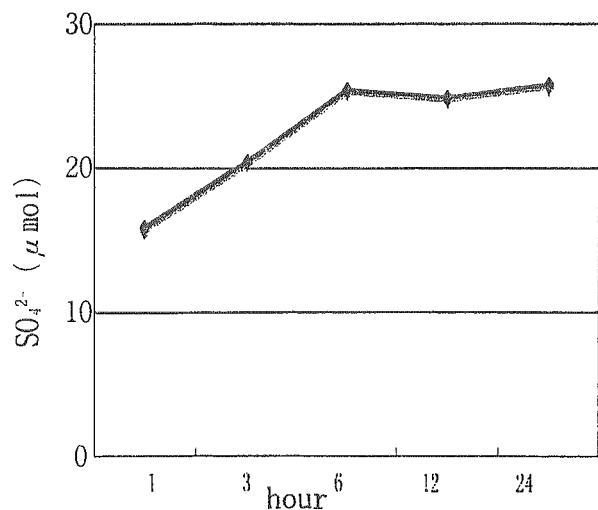


図3-4 蒸留水中におけるPVA  
ゲルビーズからの硫酸放出量

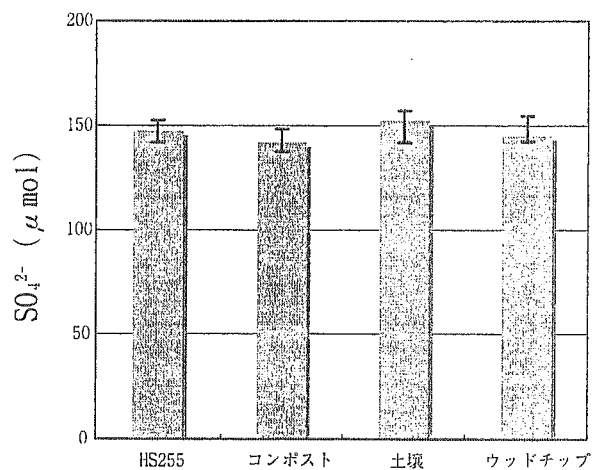


図4-1 混合培養における  
HS255株の硫黄酸化能

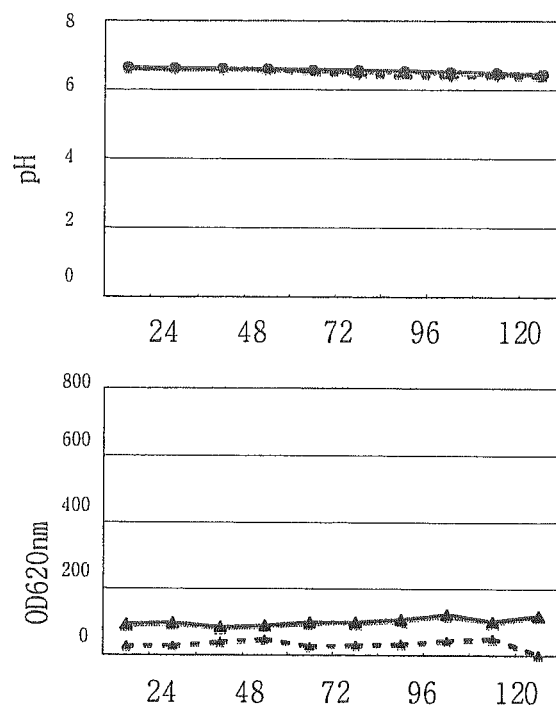
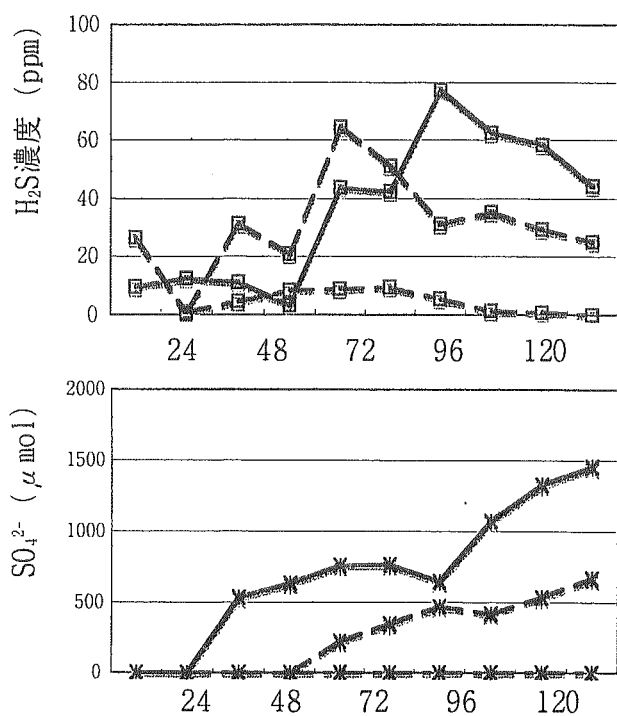


図4-2 混合培養におけるHS255株の硫化水素除去能力

□: H<sub>2</sub>S除去量 ×: SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>蓄積量 ●: 培地pH ▲: 培地吸光度 (OD620nm)

— HS255株・コンポスト抽出物 - - - HS255株 .....コンポスト抽出物

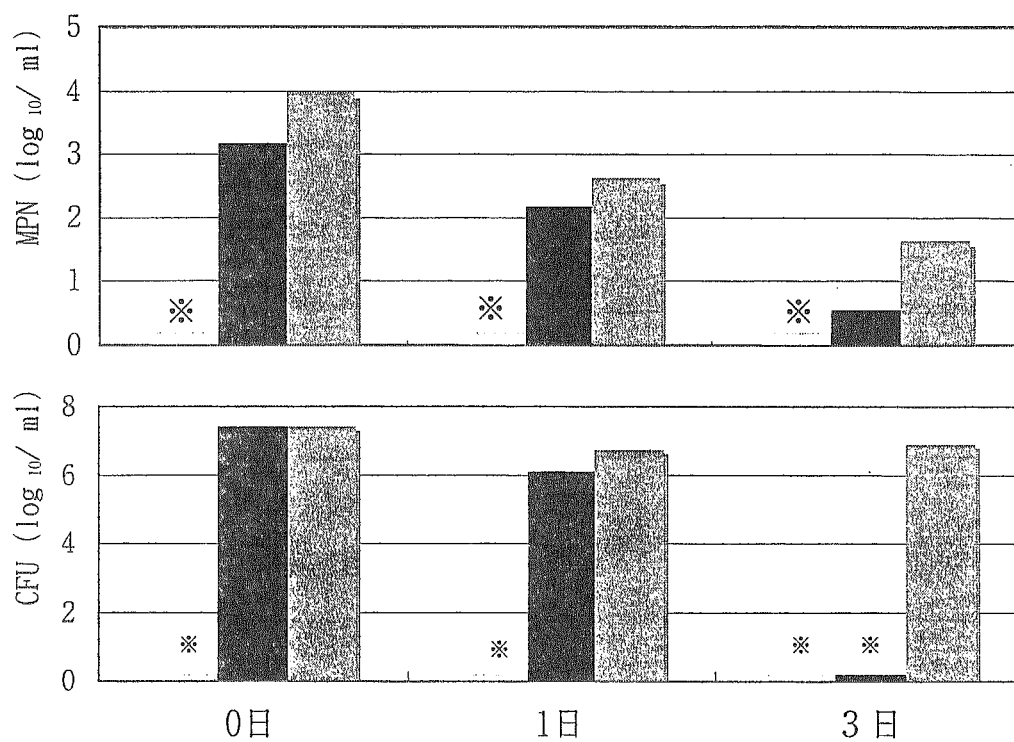


図4-3 畜舎排水にHS255株接種時の硫黄酸化細菌数

畜舎排水
  畜舎排水・HS255
  滅菌畜舎排水・HS255

※検出されず

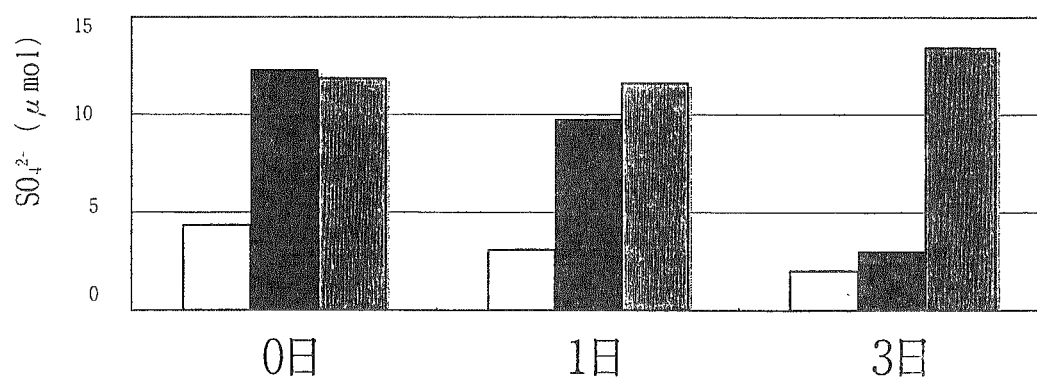


図4-4 畜舎排水における硫酸量の変化

畜舎排水
  畜舎排水・HS255
  滅菌畜舎排水・HS255

## 論文審査結果要旨

畜産業にかかわる環境問題の中でも悪臭に関する問題が深刻で、その対策が必須である。臭気ガスの中でも、硫化水素は強い臭気を発し、毒性も強い。硫化水素はコンポスト処理や廃水処理を経て環境中に放出される。排水処理と比べてコンポスト処理過程においては、硫黄酸化細菌の研究はほとんど行われていなかった。硫黄酸化細菌を利用した生物型硫化水素除去装置は、一部で実用化されているが、装置への環境生物の混入や、装置から硫黄酸化細菌が環境に放出される影響はほとんど研究されていなかった。本研究ではコンポストにおける硫黄酸化細菌の検索、分離した硫黄酸化細菌を用いた中度高温性生物型硫化水素除去の検討を行った。

コンポストおよび富硫黄環境における硫黄酸化細菌の計数と分離を行った。本研究により初めてコンポスト中に培養可能な硫黄酸化細菌が生息することが明らかにされた。コンポストから分離された硫黄酸化細菌は遺伝子解析の結果、*Halotheobacillus neapolitanus* と同定された。コンポストに *H. neapolitanus* が存在することは、本研究で示された新知見であった。温泉排水底泥および酸性湖底泥から、硫黄化細菌 3 菌株が分離され、16S rRNA 遺伝子配列の比較の結果、*Thiomonas* 属に属する新規の硫黄酸化細菌である可能性が示唆された。分離株中温泉排水底泥から分離された *Thiomonas* sp. HS255 株が 45℃における高い硫黄酸化能を示した。

HS255 株を用いた中度高温性生物型硫化水素除去を検討したが、除去能を維持するためには pH を中性付近に保つことが必要であった。pH 低下抑制のため、担体を用い培地を定期的に交換することを検討した。PVA 担体中で HS255 株は活発に増殖し、高い硫化水素除去能を示した。PVA 内の硫酸は水中に浸漬することにより除去が可能であった。これらのことから、担体中に本菌株を高濃度に維持しながら硫化水素除去を連続的に行わせることが可能であることを明らかにした。

環境微生物を混在させても、HS255 株の硫黄酸化能力は影響を受けず、高い硫化水素除去能を保持した。HS255 株は、下水などの環境下では容易にその多くが死滅し、コンクリートや金属の腐食などの環境へ影響を及ぼさないものと考えられた。

本研究で得られた結果は、微生物生態学における新知見と同時に、汚泥やコンポストなどから生じる硫化物の除去に利用可能な新技術に発展しうる微生物学的知見を含むものであり、博士論文として十分な価値を持つものと判断された。