

(18) 嫌気性流動床における有機物分解と酢酸生成にはたす
硫酸塩還元菌の役割について

ROLES OF SULFATE - REDUCING BACTERIA IN ORGANIC
MATTER DECOMPOSITION AND ACETIC ACID FORMATION
BY THE ANAEROBIC FLUIDIZED BED TREATMENT

○松井 三郎*・井手 慎司**・大滝 裕一**
Saburo Matsui Shinji Ide Yuichi Otaki

ABSTRACT: Experiments were conducted with an anaerobic fluidized bed to clarify the roles of sulfate-reducing bacteria in organic substance decomposition and acetic acid formation. The fluidized bed was operated in the conditions of the hydraulic retention time 11 ± 1.0 min., the bed expansion ratio 1.10 ± 0.04 , the microorganism density $11.8 \sim 22.6$ gVSS/l, temperature 22.0 ± 1.2 °C and pH 7.05 ± 0.45 .

Sulfate-reducing bacteria utilized lactate, formate, propionate and ethanol as electron donor. The stoichiometric reactions involved are respectively formulated as follows. $2 \text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{S} + 1/2 \text{H}_2\text{O} + 3/2 \text{H}_2\text{CO}_3 + 3/2 \text{OH}^- + 1/2 \text{HCO}_3^-$, $4\text{HCOO}^- + 4 \text{H}_2\text{O} + \text{SO}_4^{2-} + 1/2 \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{H}_2\text{S} + 5/2 \text{H}_2\text{O} + 3/2 \text{OH}^- + 9/2 \text{HCO}_3^-$, $4/3 \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 8/3 \text{H}_2\text{O} + 1/2 \text{H}_2\text{CO}_3 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 4/3 \text{CH}_3\text{COO}^- + 4/3 \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{S} + 5/2 \text{H}_2\text{O} + 1/2 \text{HCO}_3^- + 3/2 \text{OH}^-$, $2 \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2 \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{S} + 2 \text{H}_2\text{O}$.

The bacteria, however, did not utilize acetic acid, *n*- and *iso*-butyrates, and *n*- and *iso*-valerates. Glucose and skim milk were indirectly utilized by the bacteria after conversion of those substrates into various intermediates by coexisting other anaerobic bacteria in the bed. Sulfate-reducing reaction was considered to be unfavourable for the anaerobic process. Since propionate was found to be easily converted to acetic acid by sulfur-reducing bacteria, the positive utilization of sulfur-reducing bacteria may improve the acid formation process in terms of avoiding the build up of propionate which is found to be difficult for methane bacteria to use.

KEYWORDS; fluidized bed, sulfur-reducing bacteria, propionate, acetate, lactate

* 金沢大学建設工学科 Kanazawa Univ. Dept. of Construction & Environmental Eng. ** 金沢大学大学院工学研究科 Kanazawa Univ. Graduate School of Engineering 2-40-20 Kodatsuno, Kanazawa City, Japan, 920

1. はじめに

近年、固着微生物を利用した下 wastewater 処理技術の開発が盛んに試みられている。我々の研究室では流動床を用いて嫌気性処理の研究を行ってきたが、有機酸生成の反応と硫酸塩還元反応に興味深い関係を見出した。

本研究において、流動床を用いた嫌気性有機物分解を試みたところ、有機酸生成に伴ない顕著な SO_4^{2-} 濃度の低下が見られた。これは反応槽内において、硫酸塩還元菌が活発に活動しているためと考えられる。硫酸塩還元菌は SO_4^{2-} を最終電子受容体とする電子伝達系を持っており、この電子伝達系より生じるエネルギーを用いて、生体の維持あるいは増殖を行っていることが知られている。しかし、この系が成り立つためには、電子受容体としての SO_4^{2-} の存在と同時に、電子を供給する物質（電子供与体）の存在がまた不可欠である。

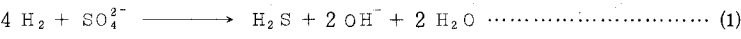
酢酸生成におよぼす硫酸塩還元の影響を考えると、どのような物質が電子供与体として硫酸塩還元菌に用いられているのか、そして用いられた電子供与体がどのような物質に変化するのか、あるいは硫酸塩還元反応による電子供与体の変化によって、酢酸生成における中間生成蓄積物の構成がどのように変わるのかといった点が問題となってくる。

2. 硫酸塩還元機構¹⁾

硫酸塩還元に関するほとんどの研究は *Desulfovibrio desulfuricans* を用いて行なわれたものであり、*D. desulfuricans* に関しては絶対嫌気性条件下で、以下に示すように無機栄養的にも、有機栄養的にも生息できることが知られている。

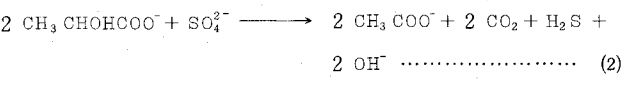
a. 無機栄養の硫酸塩還元

水素の存在下で *D. desulfuricans* は次の反応式に従い、 SO_4^{2-} を非常に速やかに還元することができる。



b. 有機栄養の硫酸塩還元

D. desulfuricans は乳酸、ピルビン酸などの単純有機物を電子供与体として利用することができる。特に、乳酸の酸化に関しては(2)式に従うことがわかっている。



以上は *D. desulfuricans* における代謝であるが、同様の電子供与体を資化できる硫酸塩還元菌においても、同じ反応式が成り立つものと考えられる。しかし、硫酸塩還元菌は種によっては有機栄養的にしか生息できないものもあり、また、有機電子供与体と成り得る物質も種によって様々である。

3. 実験装置および実験条件

実験装置の概要を Fig.-1 に示す。流動床カラムは高さ 100 cm、内径 5 cm のアクリル樹脂製円筒よりできており、流出口は高さ 80 cm の位置に取り付けられている。生物膜担体としては、造粒型軽量骨材（ビルトン；住友金属、密度 $P = 2.32 \text{ g/cm}^3$ ）を用い、粒径は日本工業規格 No. 0.4 mm と、No. 0.85 mm の篩によって整えた（有効径 0.42 mm、均等係数 1.58、平均径 0.65 mm）。

担体上への微生物の付着は、金沢市 A 下水処理場における初沈越流水を用いて行った。また、実験期間中は、その性状が比較的都市下水に類似していると考えられるスキム

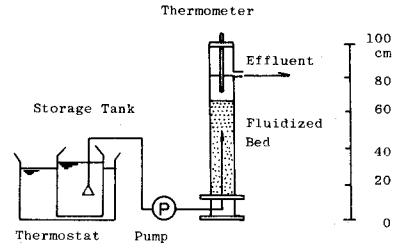


Fig. 1. Experimental apparatus of an anaerobic fluidized bed.

TABLE 1. Experimental conditions

Item	Values
Hydraulic Retention Time	11.1 ± 1.0 min.
Flow Rate	109 ± 10 ml/min.
Initial Height of Bed	56.4 ± 2.5 cm
Expanded Height of Bed	62.0 ± 2.7 cm
Bed Expansion Rate	1.10 ± 0.04
Velocity	5.67 ± 0.054 cm/min.
Microorganism Density VSS	11.8 - 22.6 g/l
Temperature	22.1 ± 1.2 °C
PH	7.05 ± 0.45

ミルク主体の人口下水を基質として与えた。

SO_4^{2-} 、オルトリン酸、乳酸、酢酸およびプロピオン酸の定量には細管式等速電気泳動装置（島津社製 IP-IB）を用い、TOC は全有機炭素分析計（島津 TOC-10 A）によって、その他の測定はすべて下水道試験法に従って行った。なお、流動床の反応時間は水理学的滞留時間と同じで、流入条件の変化に対して滞留時間の 3 倍以上の時間経過で安定状態になった。

主要な実験条件を TABLE-1 に示す。

4. 実験結果および考察

4.1 純粋基質による定性実験

嫌気性消化の酸生成段階で蓄積されうる主要な物質（蟻酸（純度 90%）、酢酸（99%）、プロピオン酸（99.3%）、n-酪酸（98%）、iso-酪酸（98%）、n-吉草酸（98%）、iso-吉草酸（98%）、乳酸（85~92%）、エタノール（99.5%））を純粋基質として流動床に与え、硫酸塩還元の有無、生成物質を調べた結果を TABLE-2 に示す。

TABLE-2 より、硫酸塩還元は乳酸、エタノール、プロピオン酸については盛んに起こっているが、酢酸、n-酪酸、iso-酪酸、n-吉草酸、iso-吉草酸については、ほとんど起こっていないことがわかる。なお、蟻酸に関しては分析機器における分離能力にの問題から、濃度の十分高い場合を実験できなかったが、次の実験において、硫酸塩還元が起こることが証明されている。

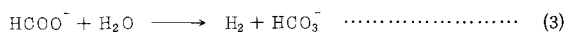
4.2 純粋基質による定量実験

(A) 蟻酸

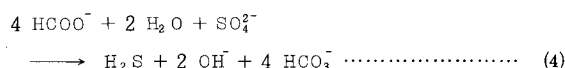
蟻酸による硫酸塩還元機構には、次の 2通りの考え方がある。

(1) 間接的蟻酸の代謝

最初に次式を使った蟻酸からの水素発生を考える。²⁾



こうして発生した水素分子を硫酸塩還元菌が無機栄養的に利用していると考え、全体としての反応式は(4)式のようになる。



(2) 直接的蟻酸の代謝

硫酸塩還元菌が蟻酸を有機電子供与体として利用していると考え、結果としての反応式は(4)式と

TABLE 2. Results of preliminary experiment on availability of fatty acids and ethanol by sulfate-reducing bacteria.

Substrate	Input		Output			Sulfate Reduction rate
	Substrate conc.	SO_4^{2-} conc.	Substrate conc.	SO_4^{2-} conc.	CH_3COOH conc.	
Acetic acid	357.7 ^{mg/l}	72.3 ^{mg/l}	344.4 ^{mg/l}	76.4 ^{mg/l}	0 ^{mg/l}	0%
Lactic acid	359.3 + 122.1 ⁺⁺	77.2 82.6	73.6 16.6	12.8 39.5	143.9 59.5	83.4 52.2
Ethanol	293.3 65.2	78.5 76.2	0 0	1.8 37.8	136.5 53.4	97.7 50.4
Formic acid	82.4	76.2	0	57.6	7.4	24.4 ⁺⁺⁺
Propionic acid	284.2	75.3	225.9	13.5	61.5	82.1
n-Butyric acid	216.3 50.0	75.1 79.4	0 0	66.5 75.3	29.5 19.0	11.5 5.2
iso-Butyric acid	314.4	76.4	0	72.9	27.1	4.6
n-Valeric acid	311.1	77.2	0	70.3	11.8	8.9
iso-Valeric acid	300.1	76.2	0	74.0	7.4	2.9

+ Upper line indicated the result under sufficient substrate conc..

++ Lower line indicated the result under substrate conc. limited.

+++ This data showed less availability of formic acid by sulfate-reducing bacteria. But, it was proved that formic acid was fully utilized by the bacteria in the following experiment. In this experiment, high conc. of formic acid was not detected by the capillary type isotachopheretic analyzer(Shimadzu IP-IB).

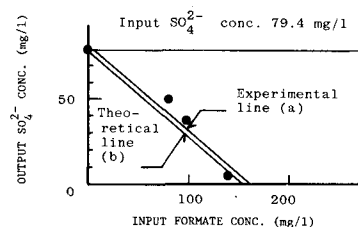


Fig. 2. Relation between input formate conc. and output SO_4^{2-} conc.

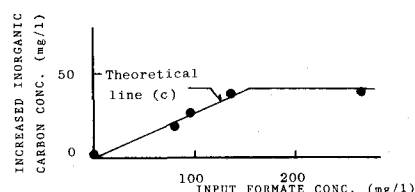


Fig. 3. Relation between input formate conc. and output increased inorganic carbon conc.

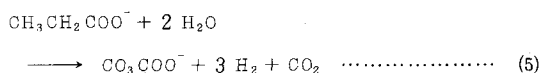
同じになると考えられる。

Fig-2は、流入蟻酸濃度に対して流出 SO_4^{2-} 濃度をプロットしたものである。流入 SO_4^{2-} 濃度は、 Na_2SO_4 を添加して調整した。図中、直線(a)は実験結果より最小2乗法によって求めたものであり、また、直線(b)は硫酸塩還元反応が(4)式に従うと仮定して流入蟻酸濃度より求めた理論線である。Fig-3は流入蟻酸濃度に対して、無機炭素の増加濃度をプロットしたものである。同図における直線(c)は除去 SO_4^{2-} 量より(4)式を用いて求めた無機炭素増加濃度の計算値である。更にFig-4は、計算値アルカリ度に対して、実測値によるアルカリ度の増分をプロットしてみたものである。(4)式より、 SO_4^{2-} が1mole除去されることによって300gのアルカリ度が増加することがわかる。計算値アルカリ度とはこの関係を用いて、除去 SO_4^{2-} 量より求めたアルカリ度の増加量の予想値である。各図より、先に仮定した(4)式の妥当性が推測できる。残された問題は、蟻酸が硫酸塩還元に直接的に用いられているが、あるいは、間接的に用いられているかといった点である。Fig-3より、無機炭素の増加分濃度は流出 SO_4^{2-} 濃度の消失した条件でその上昇が停止していることが分かる。もし、(3)式に示されるような硫酸塩還元菌以外の菌による脱水素反応が、ここでの硫酸塩還元反応に介在しているのであれば、無機炭素は硫酸塩還元反応の完了に関係なく流入蟻酸濃度に比例して、増加し続けるはずである。したがって、本流動床における硫酸塩還元菌による蟻酸の利用は、有機栄養的な直接代謝であろうと考えられる。

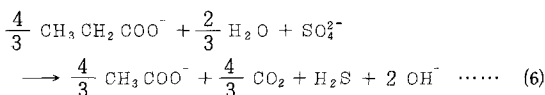
(B) プロピオン酸

プロピオン酸を資化できる硫酸塩還元菌の報告例はない³⁾。したがって、本流動床において起こったプロピオン酸による硫酸塩還元を説明するためには、次の2つの方法をとらねばならない。

(1) なんらかの細菌がプロピオン酸の脱水素反応を行い、これによって生じる水素分子を硫酸塩還元菌が無機栄養的に利用していると考えする方法。Bryantらは次式に従う acetogenic 菌の存在を仮定している⁴⁾。



(5)式に無機機栄養的反応式(1)式を代入すると(6)式のようになる。



(2) なんらかの細菌がプロピオン酸を、硫酸塩還元菌の利用可能な有機電子供与体に転換し、これを硫酸塩還元菌が有機栄養的に代謝していると考えする方法。代謝の経路としては、例えばL-リンゴ酸などが中間生成物となるものが考えられるが、全体としての反応式は結果的に(6)式に等しいものとなる。

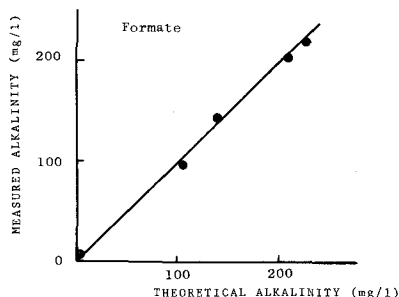


Fig. 4. Theoretical Alkalinity vs. measured Alkalinity in output

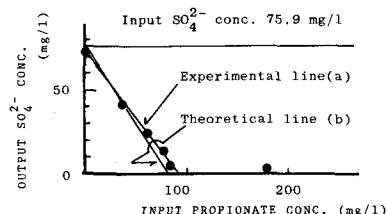


Fig. 5. Relation between input propionate conc. and output SO_4^{2-} conc..

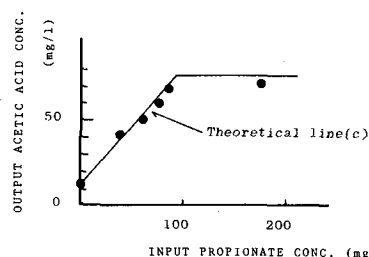


Fig. 6. Relation between input propionate conc. and output acetic acid concentration.

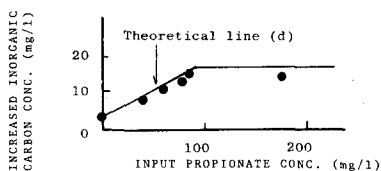


Fig. 7. Relation between input propionate conc. and output increased inorganic conc..

Fig-5, 6, 7は、流入プロピオン酸濃度に対して、それぞれ流出 SO_4^{2-} 濃度、流出酢酸濃度、無機炭素増加濃度をプロットしたものである。Fig-5において、直線(a)は実験データより最小2乗法を用いて求めたものであり、直線(b)は流入プロピオン酸濃度より(6)式を用いて求めた理論線である。またFig-6の直線(c)およびFig-7の直線(d)は除去 SO_4^{2-} 量より(6)式を用いて求めた計算値である。更に、Fig-8には、除去 SO_4^{2-} 量より(6)式を用いて求めた計算値アルカリ度と実測値アルカリ度の比較を行っている。各図より、先に仮定した(6)式が妥当であることが推測できる。Fig-9は、流入プロピオン酸濃度を一定とし、流入 SO_4^{2-} 濃度に対して流出プロピオン酸濃度をプロットしてみたものである。図中直線(e)は除去 SO_4^{2-} 量より(6)式を用いて求めた計算値であるが、実験値との間にかなりのずれが見られる。先に述べた acetogenic 菌による水素発生には、発生した水素を速かに除去する反応（ここでは硫酸塩還元）の存在が不可欠であり、したがって(6)式に従わないピロピオン酸除去反応は考えにくい。むしろこれは、プロピオン酸がなんらかの菌によって硫酸塩還元菌の利用できる有機物に変換されていることの裏付けと考えられる。

(C) 乳酸

硫酸塩還元菌による乳酸の代謝は(2)式に従うことが分っている。¹⁾ Fig-10, 11, 12は流入乳酸濃度に対して、それぞれ流出 SO_4^{2-} 濃度、流出酢酸濃度、無機炭素増加濃度をプロットしたものである。除去 SO_4^{2-} 量より求めた計算値、Fig-11(c)およびFig-12(d)が比較的实验結果に一致しているのに対して、Fig-10における理論値(b)は実験値(a)とかなりの差異を示している。また、流出酢酸濃度や無機炭素増加濃度は、流出 SO_4^{2-} 濃度の消失にかかわらず流入乳酸濃度に比例した増加の傾向にある。このような原因としては、乳酸は硫酸塩還元菌によって直接的に利用されるだけでなく、その他、蟻酸生成菌、プロピオン酸生成菌などによっても利用され、このような利用効率の悪さが生じてくるものと思われる。また、Fig-13に計算値アルカリ度と実測値アルカリ度の比較を示している。同図においては、先の蟻酸、プロピオン酸の実験の際のような一致性が見られない。これもやはり、硫酸塩還元以外の反応が関与しているためと考えられる。

(D) エタノール

エタノールによる硫酸塩還元には、1. エタノールを直接資化できる硫酸塩還元菌による反応、2. 脱水素反応の介在による無機栄養的硫酸塩還元反応、3. 他の細菌によ

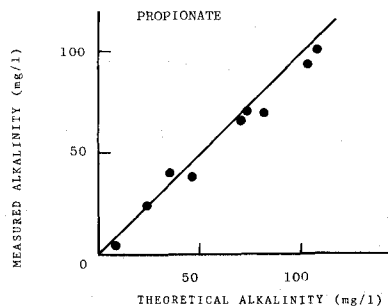


Fig. 8. Theoretical Alkalinity vs. measured Alkalinity in output

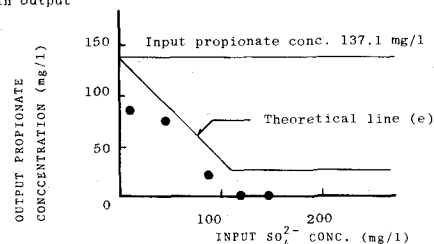


Fig. 9. Relation between input SO_4^{2-} conc. and output propionate conc..

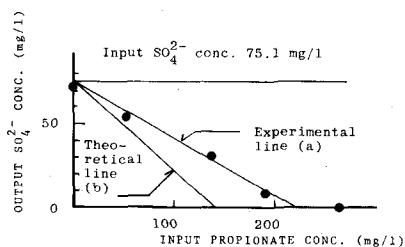


Fig. 10. Relation between input lactate conc. and output SO_4^{2-} conc..

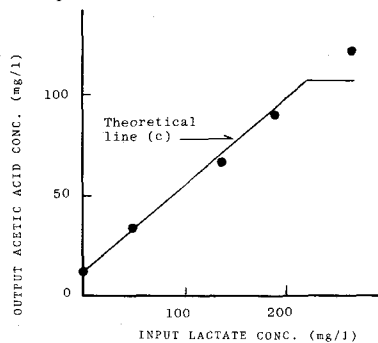


Fig. 11. Relation between input lactate conc. and output acetic acid concentration.

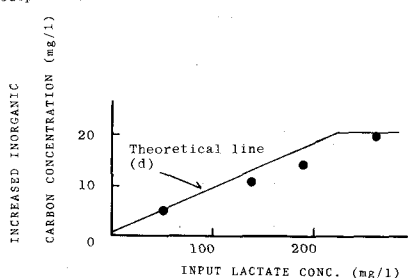


Fig. 12. Relation between input lactate conc. and output increased inorganic carbon concentration.

るエタノール代謝産物を用いた有機栄養的硫酸塩還元反応、以上の3つが考えられる。しかし、いずれにせよ反応式は(7)式のように仮定できる。

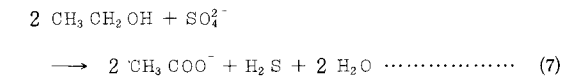


Fig.-14, 15は、流入エタノール濃度に対して、流出 SO_4^{2-} 濃度、流出酢酸濃度をプロットしたものである。両図において、理論値(b)と除去 SO_4^{2-} 量からの計算値(c)は実験値とよく一致しており、(7)式が妥当であると判断できる。なお、Fig.-15における高濃度エタノールでの計算値(c)と実験値とのずれは、明らかに硫酸塩還元菌以外の細菌の関与によるものと考えられる。

(E) グルコース

グルコースによる硫酸塩還元反応は、グルコースの酸生成段階における生成物を硫酸塩還元菌が利用して起こっているものと考えられる。様々な経路がここでは考えられるが、概略としてはFig.-16に示すようなものになると推測される。ここでsubstrate specific bacteriaとは、基質選択性のある細菌を強調するために区別したものである。

Fig.-17, 18に、グルコースを200 ppm, 400 ppmと一定にし、流入 SO_4^{2-} 濃度を変動させた際の除去 SO_4^{2-} 濃度と流出酢酸濃度の実験結果を示す。

5. ま と め

以上A～Dの基質と、グルコースそれに複合基質として性状が比較的都市下水に類似していると考えられるスキムミルクについての実験結果（単位重量当りの除去 SO_4^{2-} 量及び硫酸塩還元菌による利用効率）をTABLE-3に示す。

一般に、嫌気性処理において硫酸塩還元は好ましくない現象としてとらえている。これは、硫酸塩還元がメタン発酵を抑制するためであるが、特に低濃度有機廃水の処理を考える場合においては、 SO_4^{2-} の有機物に対する相対的濃度が高くなり、硫酸塩還元が完全にメタン生成を抑止してしまう可能性すら考えている。したがって、本流動床のように酸生成槽において SO_4^{2-} をあらかじめ除去することができるのであれば、総括的な有機物除去及びメタン生成に関して非常に有利になるはずである。

本実験結果より SO_4^{2-} 除去は、酸生成槽に流入してくる有機物のみによって達成することも可能であるが、極端に SO_4^{2-} の濃度の高いような廃水においては、さらに有機物の添加を行ってやる必要が生じてくる。また、硫酸塩還元反応において興味深い結果として、硫酸塩還元菌はプロピオン酸を酢酸に転換することが可能で

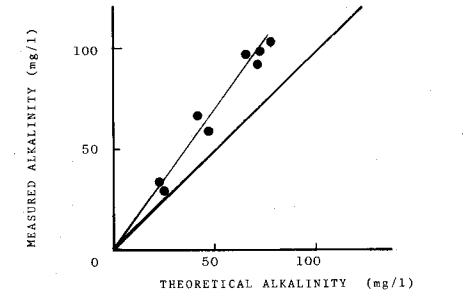


Fig. 13 Theoretical Alkalinity vs. measured Alkalinity in output

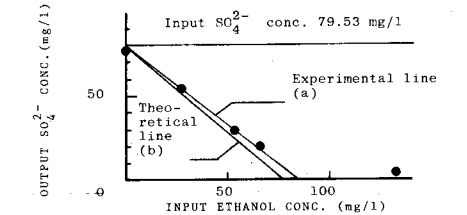


Fig. 14. Relation between input ethanol conc. and output SO_4^{2-} concentration.

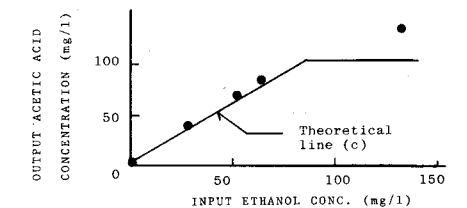


Fig. 15. Relation between input ethanol conc. and output acetic acid concentration.

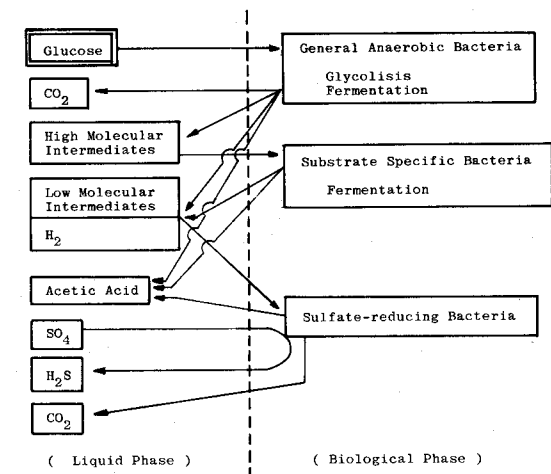
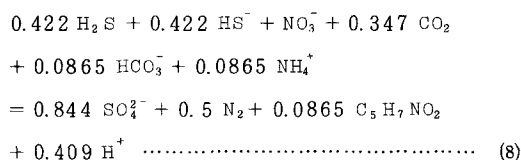


Fig. 16. Pathway of glucose to acetic acid through activities of anaerobic bacteria and sulfate-reducing bacteria.

ある。このことは、 SO_4^{2-} を添加して硫酸塩還元を積極的に行なわせることによって、メタン生成菌にとって資化しにくいとされているプロピオン酸の酸生成相での蓄積を回避できる可能性をも示している。

硫酸塩還元反応には上記のような有効利用法の他に、生成される硫化水素の有効的な利用法も考えられる。すなわち、*Thiobacillus denitrificans*を用いた無機栄養の脱窒法である。*T. denitrificans*は(8)式に従って硝酸性窒素を窒素ガスに還元することが知られている。^{5) 6)}



この方法をとると、他の脱窒法のような有機物の添加が不用となり、廃水中の窒素分を安定化できることになる。硫酸は非常に安価な物質であり、そのまま処理水中に含まれ排水されても、水質汚染とならないところから実用性の高い処理システムと考えられる。

〈参考文献〉

- 1) Dolle, H. W., "Bacterial Metabolism". Academic Press, (1968).
- 2) Mitchell, R., "Water Pollution Microbiology." WILEY - INTERSCIENCE, (1978).
- 3) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th edition.
- 4) Bryant, M. P. "Microbial Energy Conversion," Pergamon Press, (1976).
- 5) C. T. Driscoll and J. J. Bisogni. "The use of sulfur and sulfide in packed bed reactors for autotrophic denitrification." Jour. WPCF, (1978).
- 6) B. Batchelor and A. W. Lawrence. "Autotrophic denitrification using elemental Sulfur." Jour. WPCF, (1978).

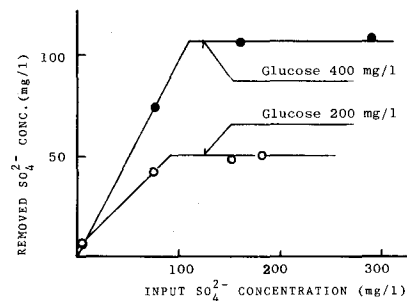


Fig. 17. Relation between Input SO_4^{2-} conc. and removed SO_4^{2-} conc. for different glucose concentration levels.

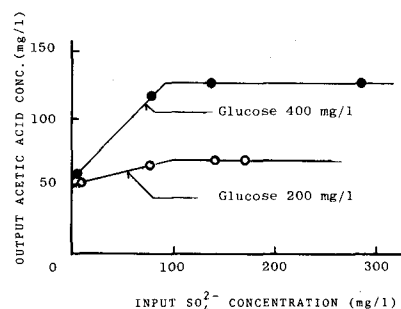


Fig. 18. Relation between input SO_4^{2-} conc. and output acetic acid concentration for different glucose conc. levels.

TABLE 3. Substrate utilization and sulfate reduction

Substrate	Reduced SO_4^{2-} mg / Utilized substrate mg	Reduced SO_4^{2-} mg / Substrate TOC mg
Formic acid	0.50	1.92
Propionic acid	0.77	1.58
Lactic acid	0.33	0.83
Ethanol	0.94	1.80
Glucose	0.26	0.64
Skim-milk	-	0.62