

(33) 酢酸とペプトンで馴養した活性汚泥における硫酸塩還元細菌と
poly-P蓄積細菌およびType 021Nの相互作用

INTERACTIONS AMONG SULFATE REDUCING BACTERIA,
POLY-P ACCUMULATING BACTERIA AND TYPE 021N IN ACTIVATED
SLUDGE CULTIVATED WITH ACETATE AND PEPTONE

池 本 良 子* ・ 小 森 友 明* ・ 藤 谷 寛**

Ryoko YAMAMOTO-IKEMOTO, Tomoaki KOMORI, Hiroshi FUJITANI,

河 北 浩 一 郎** ・ ボ ス ク ハ ミ ル ト ン エ ジ ャ コ フ ィ **

Koichirou KAWAKITA, Bosque-Hamilton Edja Kofi

ABSTRACT; Interactions among sulfate reducing bacteria, poly-P accumulating bacteria and filamentous sulfur bacteria Type 021N were examined in the activated sludge cultivated with peptone and acetate. When sulfate reducing bacteria grew and the sulfate reducing rate obtained from a batch experiment was great, Type 021N grew predominantly. The sulfate reducing rate was related to the number of sulfate reducing bacteria, and the sulfate reducing rate of a unit sulfate reducing bacteria was about $0.8 \times 10^{-8} \text{gSO}_4/\text{hr}$. Sulfate reduction and phosphate release were occurred simultaneously in the batch experiment. It was a tendency that when sulfate reducing rate was great, phosphate release was also great. When sodium molybdate was added to the substrate in the batch experiment, the amount of phosphate release slightly increased. As the results of estimation of the amount of produced acetate by sulfate reducing bacteria from the batch experiments, sulfate reducing bacteria reduced three moles of sulfate and produced four moles of acetate. Sulfate reducing bacteria utilized propionate and/or unknown organic substances produced from peptone.

KEYWORDS; activated sludge, filamentous bulking, sulfate reduction, Type 021N, sulfate reducing bacteria.

1. 緒言

都市下水処理場においてバルキングのコントロールは未だに重要な課題である。わが国の都市下水処理場におけるバルキング原因微生物はType 021Nの場合が圧倒的に多いことが知られている¹⁾が、この糸状性細菌は還元型硫黄種を酸化してエネルギーを得ることのできる糸状性硫黄細菌の1種である²⁾。一方、硫酸塩還元細菌は自然界において有機物の最終酸化を行う微生物として知られており、下水道施設においても、下水やビルピットなど嫌気性の部分において、容易に硫酸塩還元が起こることが知られている。筆者らは、多くの室内実験および実下水処理場の調査を行うことにより、活性汚泥中でも硫酸塩還元細菌が活動して糸状性硫黄細菌と硫黄の酸化還元サイクルを形成しており、硫酸塩還元が活発化することがバルキング発生の一因であることを指摘している^{3), 4), 5), 6), 7)}。一方、嫌気好気法はリンの除去とバルキング防止効果が期待できることから、近年多くの処理場で採用されているが、筆者らは、嫌気好気法においても硫酸塩還元が活発に起こるとバルキングが起こるだけでなく、リン除去が阻害されることを報告している³⁾。安定したリン除去とバルキング防止のためには、活性汚泥中での硫酸塩還元細菌の挙動とこれらの細菌の相互作用を明らかにする必要がある。

筆者らは、酢酸とペプトンを主体とする人工廃水を用いた室内実験を行った結果、硫酸塩還元が活発に起こり、Type 021Nが増殖することを報告している。また、回分実験結果から、硫酸塩還元細菌が、ペプ

*金沢大学工学部土木建設工学科 Department of Civil Engineering, Kanazawa University

**金沢大学大学院土木建設工学専攻 The Master Course Majoring in Civil Engineering, Kanazawa University

トンからの酢酸生成に関与していることを推定した。本研究では、同様な室内実験を継続し、硫酸塩還元細菌数と硫酸塩還元速度および糸状体長の計測を行うことにより、硫酸塩還元細菌、Type 021Nおよびpoly-P蓄積細菌の相互作用を明らかにするとともに、硫酸塩還元細菌の呼吸阻害剤であるモリブデンを添加した回分実験を行うことにより硫酸塩還元細菌の利用基質について検討を行った。

2. 実験方法

2. 1 実験装置と運転方法

Fig. 1に示す2系列の活性汚泥連続処理装置を20°Cの恒温室に設置して、金沢市A都市下水処理場返送汚泥を種汚泥として7カ月にわたる連続運転を2回行った。実験装置は容積6Lの反応槽と3Lの沈殿槽から成っており、標準法では反応槽の容積を3Lずつに仕切り板でしきり、嫌気好気法では半分もしくは1/3の位置に仕切り板を設けて前段部は曝気を行わず攪拌機による攪拌を行った。反応槽内の水理学的滞留時間は24時間、返送率は100%、汚泥日令は15日に設定した。Table 1に示す組成の人工廃水は腐敗を防ぐため、毎日作成し冷蔵庫に保管して供給した。週に2-3回の割合で余剰汚泥を用いてMLSSおよびSVIC（希釈SVI）⁸⁾の測定と顕微鏡観察を行った。

2. 2 装置内水質分析（装置実験）の方法

実験開始から2週間以上経過した後、反応槽2槽から混合液を採取するとともに、流入人工廃水、処理水、および返送汚泥を採取し、分析に供した。分析項目は、硫化物含有量（検知管法）および、0.45μmのメンブレンフィルターのろ液について、TOC（島津TOC-5000）、炭水化物（アンスロン法）、蛋白質（ローリー法）、有機酸・リン酸（液体クロマトグラフ有機酸分析システム、島津LC-6A）、硫酸塩・硝酸塩（イオンクロマトグラフ、島津HIC-6A）である。別に反応槽2槽目から採取した活性汚泥を用いて、MLSS、SVIC、糸状体長（顕微鏡ビデオモニター装置）⁸⁾および硫酸塩還元細菌数（m-ISA培地を用いたMPN法）の計測を行った。

2. 3 回分実験の方法

反応槽2槽目から活性汚泥を採取し、MLSS、SVIC、糸状体長、および硫酸塩還元細菌数の測定を行うとともに、以下に示す手順で嫌気条件下の回分実験を行った。採取した活性汚泥を遠心分離し、最終濃度で1000mg/Lになるように容積100mLのふ卵瓶に攪拌子とともに投入し、基質を満たして気泡が入らないように栓をして、マグネチックスターラーによって攪拌した。同様に作成したふ卵瓶を複数個準備し、1本のみふ卵瓶を直ちに開栓し、装置実験と同様の分析を行った。残りは3-24時間毎に開栓して分析に供した。用いた基質は人工廃水と同組成の基質もしくは装置実験で槽内に検出された有機物（ペプトン、プロピオン酸、iso-吉草酸、乳酸）それぞれ100mg/Lに人工下水と同組成の無機分を添加した基質と、それらにモリブデン酸ナトリウム（ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、960mg/L）を添加した基質である。

Table 1 Composition of artificial wastewater

CH_3COOH	200mg/L
Polypeptone	200
Yeast Extract	40
NaHCO_3	71
KCl	174
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	157.5
CaCl_2	52
KH_2PO_4	92

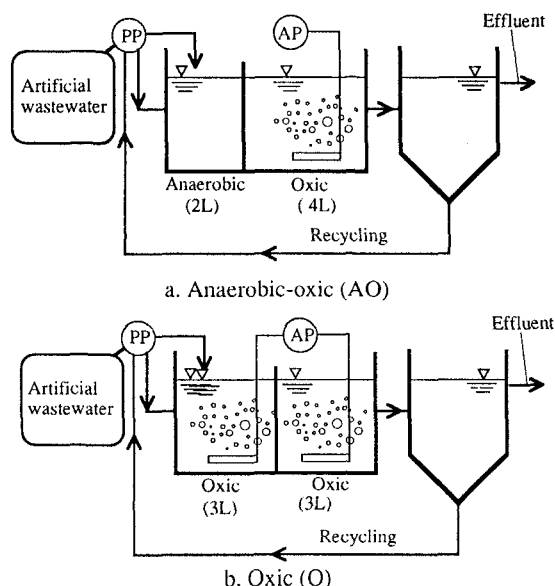


Fig. 1 Experimental set up.

3. 実験結果と考察

3. 1 装置実験と回分実験の結果

本実験では、標準法でも嫌気好気法でも糸状性硫黄細菌Type 021Nの増殖が認められ、標準法に比較して嫌気好気法によるバルキング抑制効果は認められなかった。すべての運転において、Type 021Nの消長が硫酸塩還元細菌数および硫酸塩還元速度の消長に追従する傾向が認められた。

Fig. 2は装置実験の典型例として嫌気好気法の処理装置内の水質変化を示したものである。有機物は嫌気部でほとんど消費されているが、りんの放出も取り込みもほとんど認められなかった。本装置では滞留時間が長いためにPoly-P蓄積細菌の集積を行うことができなかったものと考えられる。一方、処理槽内の硫酸塩濃度の変化はほとんど認められなかった。

Fig. 3は、嫌気好気法の処理装置から採取した活性汚泥に、人工下水と同組成の基質およびそれにモリブデン酸ナトリウム960mg/Lを添加した基質を加えた回分実験の結果の一例を示したものである。モリブデンを添加しない場合には、硫酸塩の減少に伴い硫化物が生成されている。硫酸塩の減少量と硫化物の生成量がほぼ一致していることから、硫酸塩の減少は硫酸塩還元細菌の活動によるものと判断できる。硫酸塩の減少速度を0次反応と仮定して硫酸塩還元速度を求めた。一方、りんの放出が硫酸塩還元と同時に起こっており、硫酸塩還元細菌とpoly-P蓄積細菌は共存することが可能であることがわかる。処理槽内でりんの顕著な放出と取り込みは認められなかったが、poly-P蓄積細菌が処理槽内に存在していたと考えられる。曝気槽から採取した活性汚泥を用いて回分実験を行っているため、曝気槽におけるりんの蓄積量の指標として回分実験におけるりんの放出量を求めた。

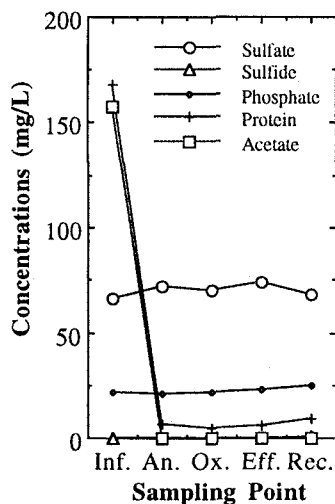


Fig. 2 Results of a unit experiment of anaerobic-oxic system.

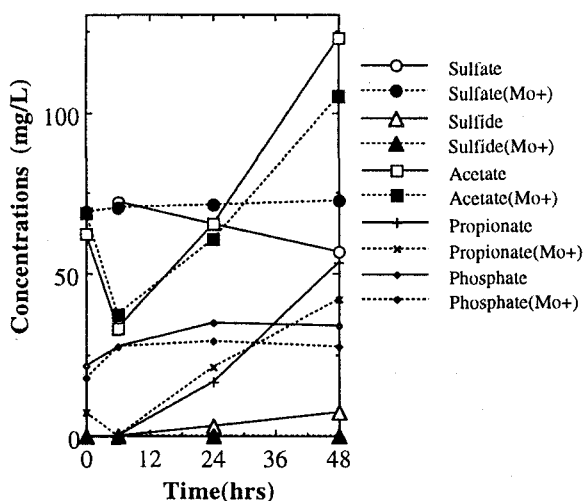


Fig. 3 Results of a batch experiment using artificial wastewater as a substrate.

3. 2 poly-P 蓄積細菌、硫酸塩還元細菌と Type 021N の関係

嫌気好気法によるバルキング抑制機構は、poly-P蓄積細菌が嫌気部で有機物を摂取するために好気部に利用可能な有機物が持ち込まれず絶対好気性細菌である糸状性細菌の増殖が抑制されると説明されている^{9), 10)}。Fig. 4は、回分実験におけるりんの放出量と糸状性細菌の現存量の関係を示したものである。両者の間には関連は認められず、嫌気好気汚泥においてはバルキング汚泥の方がむしろりんの放出量の多い傾向が認められた。筆者らは、実下水処理場においてバルキングが発生しているときでも嫌気部末端部で有機物が残存していることを報告している⁹⁾。poly-P蓄積細菌と糸状性細菌の直接的関係だけではバルキング抑制機構を説明することは難しいと考えられる。

一方、筆者らは、グルコースとペプトンを主体とする人工廃水を用いた室内実験において、硫酸塩還元が処理槽内で顕著に起こるとりんの除去が低下することを報告した⁹⁾。また、実下水処理場の活性汚泥の

貯留時には、硫酸塩還元速度が大きいとりんの放出量が少ない傾向があることを報告している⁶⁾。しかし本実験では、Fig. 2において、人工下水にモリブデンを添加した基質(Mo+)を用いて硫酸塩還元を抑制した場合のりんの放出量は、モリブデンを添加しない場合(Mo-)と比較して大きな変化がないか、幾分減少する傾向が認められた。実下水処理場活性汚泥を用いた回分実験でも同様な結果が得られている。Fig. 5は回分実験にお

けるりんの放出量と硫酸塩還元速度の関係を示したものである。硫酸塩還元速度が速い方がりんの放出量が多い傾向が認められた。筆者らは活性汚泥中の硫酸塩還元細菌が酢酸の生成に関与していることを報告している^{3), 4), 5), 6)}。一方、poly-P蓄積細菌は酢酸をきわめて利用しやすいことが知られている。本実験条件では、硫酸塩還元細菌とpoly-P蓄積細菌の間に酢酸の供給と利用という関係が、幾分生じていたことが予想される。先に報告したような硫酸塩の減少が顕著な場合には、生成した硫化物の毒性効果が現れ、りんの放出量が減少したものと推察される。

筆者らは、硫酸塩還元が糸状性バルキングの一因であることを指摘している^{3), 4), 5), 6), 7)}。そこで、硫酸塩還元細菌数および回分実験から得られた硫酸塩還元速度と糸状体長の関係をFig. 6および7に示した。硫酸塩還元細菌数が多く硫酸塩還元速度が速い活性汚泥は糸状性細菌の現存量が多いことが明らかである。硫酸塩還元がType 021Nの増殖の原因であると考えられる。筆者らは、実下水処理場の活性汚泥を用いて好気性の回分実験を行った結果、好気条件下で硫酸塩還元細菌と硫黄酸化細菌が硫黄の酸化還元サイクルを形成していることを

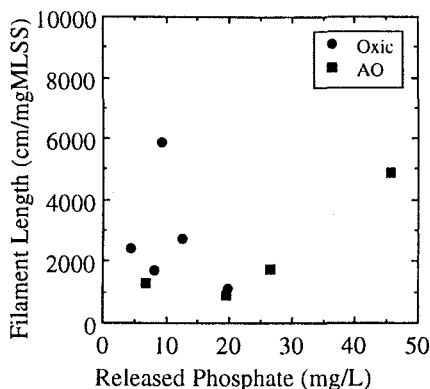


Fig. 4 Relationship between released phosphate and filament length in the activated sludge.

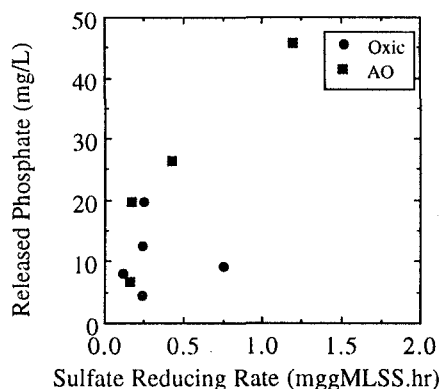


Fig. 5 Relationship between the sulfate reducing rate and released phosphate in the activated sludge batch experiment.

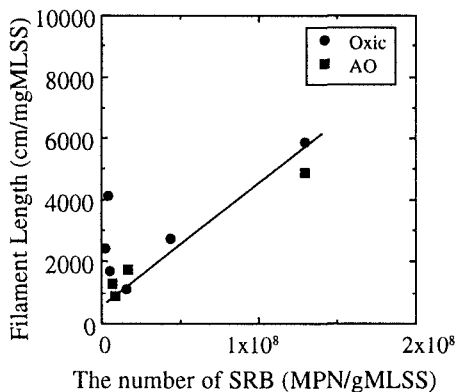


Fig. 6 Relationship between the number of sulfate reducing bacteria (SRB) and filament length in the activated sludge.

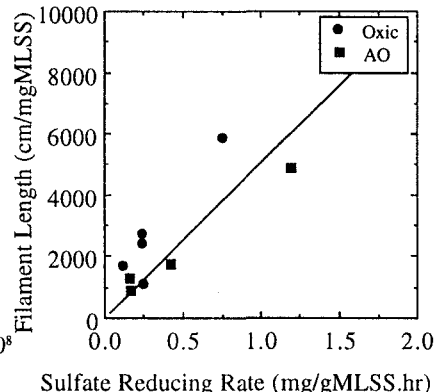


Fig. 7 Relationship between sulfate reducing rate and filament length in the activated sludge.

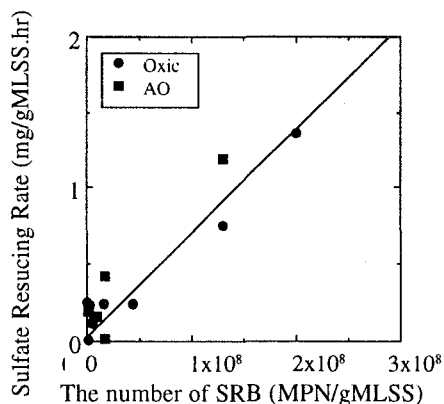


Fig. 8 Relationship between the number of sulfate reducing bacteria (SRB) and the sulfate reducing rate in the activated sludge.

報告している⁷⁾。本実験においても、処理槽内で硫酸塩の酸化と還元が同時に起こっているため、硫酸塩濃度の変化は認められなかったものと考えられる。

Fig. 8は硫酸塩還元細菌数と硫酸塩還元速度の関係を示したものである。両者はほぼ比例しており、本実験条件で検出できた硫酸塩還元細菌1 MPNあたりの硫酸塩還元速度は 0.8×10^{-8} mg/hrであった。環境中では硫酸塩還元細菌数とその活性は一致しないことが知られており、筆者らは、実下水処理場の調査を行った結果、硫酸塩還元速度と菌数は一致しないことを報告している⁹⁾。一方、グルコースとエタノールを主体とする人工廃水を用いた室内実験においては硫酸塩還元速度は菌数に比例し、1MPNの硫酸塩還元細菌の振とう条件で求めた硫酸塩還元速度は 10^{-6} ~ 10^{-7} mg/hrであることを別に報告している⁹⁾。人工下水によってやや違いがみられるが、室内実験の場合には、流入下水からの硫酸塩還元細菌の供給がないために硫酸塩還元細菌数と活性が一致するものと考えられる。

3. 3 硫酸塩還元細菌の利用基質の推定

Fig. 2において、酢酸は、同基質を用いた場合とともに6時間目まで減少し、その後増加している。6時間目までは、りん酸の放出が顕著に起こっており、poly-P蓄積細菌の活動により酢酸が消費されたと考えられる。また、6時間目以降の酢酸の増加は、モリブデンを添加した方が少なくなっており、硫酸塩還元細菌が酢酸の生成に関与していると考えられる。6時間目以降プロピオン酸の蓄積も認められるが、モリブデンを添加した方がプロピオン酸の蓄積量が多い傾向が認められた。硫酸塩還元菌がプロピオン酸からの酢酸の生成に関与していることが考えられる。

Fig. 9は嫌気好気運転の活性汚泥に、中間生成物として検出されたiso-吉草酸を添加した回分実験の結果を示したものである。硫化物の増加に伴いiso-吉草酸が減少し、酢酸が生成している。硫酸塩還元菌によるiso-吉草酸の分解反応は次式で表すことができる。

$$4(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{COO}^- + 5\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 8\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{HCO}_3^- + 3\text{H}^+ + 5\text{HS}^- \quad (1)$$
本実験結果は量論的にはほぼ上式と一致しており、本回分実験において、硫酸塩還元細菌はiso-吉草酸もしくはiso-吉草酸の代謝産物を利用して酢酸を生成したものと考えられる。

Table 2は種々の基質を用いた回分実験から得られた硫酸塩還元速度をまとめたものである。プロピオン酸やペプトンを用いた場合の硫酸塩還元速度は同一汚泥で人工下水を用いた場合の硫酸塩還元速度とほぼ等しいのに対し、iso-吉草酸や乳酸を用いた場合は、硫酸塩還元速度が遅くなっている。このことは、

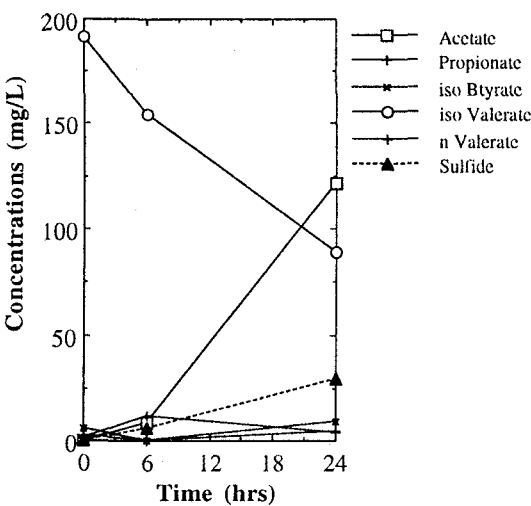
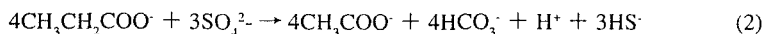


Fig. 9 Results of a batch experiment using iso-valerate as a substrate.

Table 2 Sulfate reducing rate obtained from batch experiment using several organic compounds as a substrate.

Exp. No.	Substrate	Sulfate reducing rate (mgSO ₄ /gMLSS.hr)
94.7.26 AO	artificial wastewater	0.16
	propionate	0.13
94.7.26 O	artificial wastewater	0.11
	propionate	0.09
94.8.9 AO	artificial wastewater	0.16
	iso-valerate	0.15
94.8.9 O	artificial wastewater	0.75
	iso-valerate	0.43
94.10.5 O	artificial wastewater	0.24
	propionate	0.21
	iso-valerate	0.15
94.10.26 O	artificial wastewater	0.23
	peptone	0.23
	lactate	0.07

硫酸塩還元細菌は、活性汚泥処理装置内では上述のiso-吉草酸を添加した回分実験のようにiso-吉草酸を主に利用するのではなく、ペプトンから生成されたプロピオン酸もしくはプロピオン酸類似の化合物を利用していると予想される。iso-吉草酸添加実験においてもiso-吉草酸から生成されたプロピオン酸を硫酸塩還元細菌が利用したことも考えられる。ある種の硫酸塩還元細菌は次式によりプロピオン酸から酢酸を生成することが知られている。量論的には3分子の硫酸塩の還元によって4分子の酢酸が生成されることになる。



本実験において、硫酸塩還元細菌が関与した酢酸の生成量は、モリブデン無添加回分実験における酢酸の増加量 $\Delta\text{Ace}(\text{Mo-})$ からモリブデン添加回分実験における酢酸の増加量 $\Delta\text{Ace}(\text{Mo+})$ を差し引いた $|\Delta\text{Ace}(\text{Mo-}) - \Delta\text{Ace}(\text{Mo+})|$ として求めることができる。Fig. 10は、硫酸塩還元量とそれに伴う酢酸生成量の関係をすべての回分実験についてプロットしたものである。図中の点線は硫酸塩還元が(2)式に従って起こったと仮定したときの理論線である。両者はほぼ一致しており、硫酸塩3分子の還元により酢酸が4分子生成されていることが明らかである。一方、硫酸塩還元細菌が関与したプロピオン酸の消費量は、同様に、モリブデン添加回分実験におけるプロピオン酸の増加量 $\Delta\text{Pro}(\text{Mo+})$ からモリブデン無添加回分実験におけるプロピオン酸の増加量 $\Delta\text{Pro}(\text{Mo-})$ を差し引いた $|\Delta\text{Pro}(\text{Mo+}) - \Delta\text{Pro}(\text{Mo-})|$ から求めることができる。この値と硫酸塩還元量の関係を、(2)式の理論線とともにFig. 11に示す。プロピオン酸の消費量は理論線はかなり下回っ

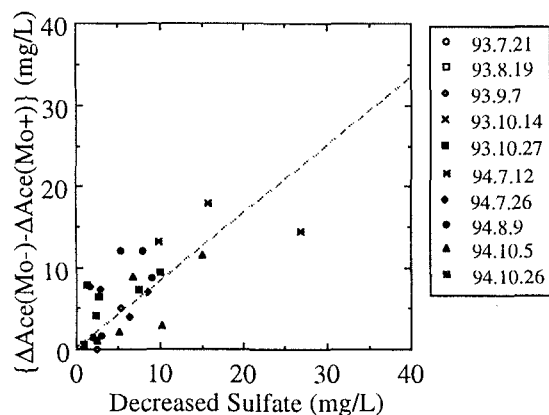


Fig. 10 Relationship between decreased sulfate and produced acetate by sulfate reducing bacteria.

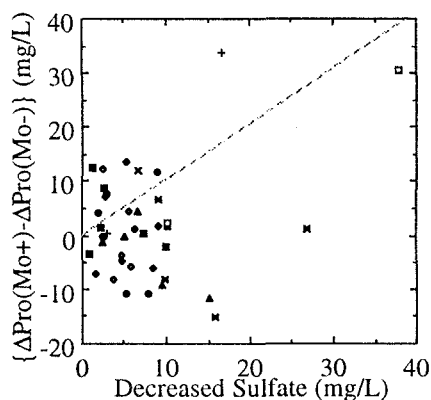


Fig. 11 Relationship between decreased sulfate and utilized acetate by sulfate reducing bacteria.

ていることが多い。硫酸塩還元細菌は3分子の硫酸塩の還元によって4分子の酢酸が生成されるようなプロピオン酸類似の未知の化合物の分解に関与したものと考えられる。筆者らは、実下水処理場の活性汚泥を用いて同様の回分実験を行い、ほぼ同じ量論結果を得ている⁷⁾。硫酸塩還元細菌は処理槽において蛋白質から生成されたプロピオン酸もしくはプロピオン酸と類似の化合物からの酢酸生成に関与していると判断することができる。

以上のことより、本実験で生成された活性汚泥中の硫酸塩還元細菌とpoly-P蓄積細菌および糸状性硫黄細菌の相互作用はFig. 12のように推定される。硫酸塩還元の抑制には酸素の供給よりもむしろ硫酸塩還元細菌の利用基質の供給を制限することが有効であると考えられるので、活性汚泥中の硫酸塩還元細菌がどのような有機物を利用しているかを明らかにすることが重要である。

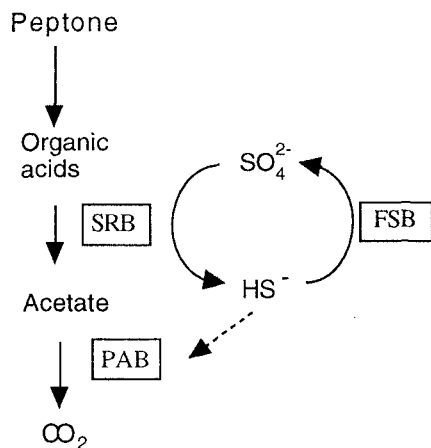


Fig. 12 Interactions among sulfate reducing bacteria (SRB), poly-P accumulation bacteria (PAB) and filamentous sulfur bacteria (FSB)

4. 結言

酢酸とペプトンを主体とする人工廃水を用いた室内実験を行い、硫酸塩還元細菌の阻害剤であるモリブデンを添加した回分実験を行った結果、以下のことがわかった。

- 1) 糸状性細菌Type 021Nの現存量と回分実験におけるりんの放出量には関連は認めらず、poly-P蓄積細菌とType 021Nの直接的関係だけでは、バルキング抑制機構を説明できなかった。
- 2) 嫌気条件で硫酸塩還元とりんの放出は同時に起こり、硫酸塩還元を抑制するとりんの放出量が少なくなる傾向が認められた。また、硫酸塩還元速度が速い汚泥の方がりんの放出量が多かった。これらのことから、硫酸塩還元細菌によって生成された酢酸をpoly-P蓄積細菌が利用すると考えられた。
- 3) 硫酸塩還元細菌が多く増殖し、硫酸塩還元速度が速い活性汚泥中に糸状性硫黄細菌Type 021Nの現存量が多い傾向が認められたことから、硫酸塩還元がType 021Nの増殖の原因であることが明らかとなった。
- 4) 本実験条件で生成した活性汚泥の硫酸塩還元速度は硫酸塩還元細菌数に比例しており、検出できた硫酸塩還元細菌 1 MPN当たりの硫酸塩還元速度は $0.8 \times 10^{-6} \text{ mg/hr}$ であった。
- 5) 活性汚泥中に増殖した硫酸塩還元細菌は3分子の硫酸塩の還元により、4分子の酢酸を生成していた。
- 6) 硫酸塩還元細菌は、人工下水中のペプトンから生成されたプロピオン酸もしくはプロピオン酸類似の有機物を利用していた。

<謝辞> 本研究に協力いただきました金沢大学大学院修了生、三宅祐司氏（現日本道路公団）、金沢大学大学院生、金井一人氏、谷川孝弘氏および金沢大学卒業生川吾浩樹氏（現愛媛県庁）に感謝いたします。本研究の一部は、文部省科学研究費補助金奨励研究A（No. 05750519）の補助を受けて行いました。

<参考文献>

- 1) 中村正雄・境好雄・河野哲郎：下水処理場における糸状性バルキングについて，下水道協会誌，Vol. 22, No. 252, pp. 2-12, 1990.
- 2) Kohno, T and Inomata, S.; Discrimination, physiology and dissimilatory sulfur nutrition of filamentous bacteria in activated sludge. *Journal of Water and Waste*, Vol. 31, pp. 17-41, in Japanese, 1989.
- 3) Yamamoto, R. I., Komori, T. and Matsui, S. : Filamentous bulking and hindrance of phosphate removal due to sulfate reduction in activated sludge. *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 23, pp. 927-935, 1991.
- 4) 山本（池本）良子・小森友明・松井三郎：酢酸とペプトンで馴養した活性汚泥における硫酸塩還元と糸状性バルキングの関係、衛生工学研究論文集、Vol. 28, pp. 93-103, 1992.
- 5) Yamamoto-Ikemoto, R., Matsui S., and Komori, T.: Ecological interactions among denitrification, poly-P accumulation, sulfate reduction, and filamentous sulfur bacteria in activated sludge., *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 11, pp. 201-210, 1994.
- 6) 池本良子・小森友明・三宅祐司・松井三郎：都市下水処理場の嫌気好気活性汚泥におけるバルキングおよび硫酸塩還元に関する研究、環境工学研究論文集、Vol. 31, pp. 295-303, 1994.
- 7) Yamamoto-Ikemoto, R., Matsui S., and Komori, T.: Symbiosis and competition among sulfate reduction, filamentous sulfur, denitrification, and poly-P accumulation bacteria in the anaerobic-oxic activated sludge of a municipal plant., *Water Quality International 96, Singapore*, 投稿中.
- 8) Yamamoto, R. and Matsui, S.: Measuring the growth rate of filamentous bacteria and influence of the bacteria on settleability, thickening property and floc configuration of activated sludge. *Advances in Water Pollution Control, "Water Pollution Control in Asia", IAWPRC*, pp. 329-339, 1988.
- 9) Shao, Y. J. and Jenkins, D. : The use of anaerobic selectors for the control of low F/M activated sludge bulking. *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 21, pp. 609-619, 1989.
- 10) Wanner, J., Kucman, K., Ottova, V. and Grau, P. : Effect of anaerobic conditions on activated sludge filamentous bulking in laboratory systems. *Water. Res.*, Vol. 12, pp. 1541-1546, 1987.