

(28) パルミチン酸・プロピオン酸分解過程における
硫酸塩還元細菌と水素生産性酢酸生成細菌の活性に及ぼす硫化物の影響

**Effects of sulfide on the activities of sulfate-reducing bacteria and hydrogen-producing
proton-reducing bacteria in anaerobic degradation of palmitate and propionate**

山口隆司*, 原田秀樹**

Takashi YAMAGUCHI* and Hideki HARADA**

ABSTRACT ; Influence of sulfide on the activities of sulfate-reducing bacteria (SRB) and hydrogen-producing proton-reducing bacteria (PRB) in anaerobic degradation of palmitate and propionate was investigated using four anaerobic sludge consortia (referred to as R1 through R4) derived from different sources. Four sludge consortia were categorized as follows according to the type of reactor and the level of sulfide for sludge cultivation: R1 as CSTR-low sulfide, R2 as CSTR-high sulfide, R3 as UASB-low sulfide, and R4 as UASB-high sulfide.

As for R1 sludge (CSTR, low sulfide), palmitate degradation activity (Pal-DA) by a symbiosis between palmitate-degrading PRB (Pal-PRB) and hydrogen-scavenging SRB (H-SRB) was 2.6 times as large as that by palmitate-oxidizing SRB (Pal-SRB). Pal-DA of R2 sludge (CSTR, high sulfide) by the symbiosis of Pal-SRB with H-SRB was only one-fifth of that of R1 sludge. As for R3 sludge (UASB, low sulfide), a symbiosis between PRB and hydrogen-scavenging methanogens (H-MPB) performed the same magnitude of propionate degradation activity (Pro-DA) as propionate-oxidizing SRB (Pro-SRB) did. Pro-DA of R4 sludge (UASB, high sulfide) was entirely attributable by Pro-SRB solely.

Two distinctive patterns were observed with respect to sulfide effect on Pal-DA and Pro-DA. High-sulfide sludge consortia, R2 and R4 showed a tendency to consistently decrease Pal-DA and Pro-DA, respectively, with increasing sulfide concentration. On the contrary, Pal-DA and Pro-DA of low-sulfide sludge, R1 and R3 possessed optima around $50 \text{ mgH}_2\text{S} \cdot \text{S}^{-1}$, above which point both activities inhibited by sulfide in the same manner as the case of high-sulfide sludge.

KEY WORDS ; Anaerobic digestion, Hydrogen-producing proton-reducing acetogen, Palmitate, Propionate, Sulfate-reducing bacteria, Sulfide

1 はじめに

自然水圏環境や廃水処理プロセスにおける硫酸塩還元細菌 (Sulfate-reducing bacteria, SRB) の生態学的役割の重要性を再認識する研究が進展している^{1~3)}。

硫酸塩還元細菌は、硫酸塩を硫化物に還元することでエネルギーを得て生育する嫌気性微生物であり、自然界に幅広く且つ高い割合で存在していることが知られている³⁾。硫酸塩負荷の低い嫌気的環境下において、有機物は中間生成物 (脂肪酸、アルコール等) を介して、最終的にメタンと二酸化炭素にまで分解される。一方、硫酸塩負荷の高い嫌気的環境下では、SRB によって分解される有機物の割合が高くなり、メタンと二酸化炭素に加えて硫化物が盛んに生成される。ある種の産業廃水、特にパルプ・食品加工過程等ではこのような高濃度の硫酸塩含有廃水が排出され、メタン生成を阻害することが知られている⁵⁾。

しかし、硫化物が微生物の有機物利用特性に与える影響に関する報告は、乏しい現状にある。特に、廃水処理において処理律速となり易いプロピオン酸⁵⁾ や高級脂肪酸⁶⁾ を分解する SRB や水素生産性酢酸生成細菌

* 呉工業高等専門学校 環境都市工学科 (Kure National College of Technology, Department of Civil Engineering)

** 長岡技術科学大学工学部 環境システム系 (Nagaoka University of Technology, Department of Environmental Systems Engineering)

(Hydrogen-producing proton-reducing acetogen, PRB) の代謝活性に及ぼす硫化物の影響を評価した知見はほとんどみられない。

そこで、本研究では、パルミチン酸（飽和高級脂肪酸、炭素数16）とプロピオン酸（揮発性脂肪酸、炭素数3）を実験対象基質として注目し、これら脂肪酸の分解過程における SRB と PRB の活性に及ぼす硫化物の影響を評価することを目的に研究を行った。

実験では、4 基の嫌気性反応器（R1, R2, R3, 及び R4）を用いた。R1 と R2 の汚泥の培養は、パルミチン酸を主要炭素源とする硫酸塩含有人工基質（1100mgCOD・ l^{-1} , 150mgSO₄²⁻・ S^{-1} ・ l^{-1} ）を 2 基の完全混合型反応器に半連続供給して行った（脱硫措置の違いにより、反応槽硫化水素濃度(mgH₂S・ S^{-1} ・ l^{-1})は、R1 で1～15, R2 で50～100であった）。R3 と R4 の汚泥の培養は、硫酸塩負荷の異なる（流入硫酸塩濃度(mgSO₄²⁻・ S^{-1} ・ l^{-1})：R3 で33；R4 で1000）糖・揮発性脂肪酸混合基質（2000mgCOD・ l^{-1} ）を 2 基のUASB反応器に連続供給して行った（処理水硫化水素濃度(mgH₂S・ S^{-1} ・ l^{-1} eff. liquid)；R3 で2～9；R4 で50～100）。4 種の培養汚泥をバイアル活性試験に供して、微生物の脂肪酸分解活性に与える硫化物の影響を評価した。

2 実験方法

2.1 実験装置・反応器運転条件

実験には、2 基の完全混合型反応器（R1 (low H₂S), R2 (high H₂S)）と 2 基のUASB反応器（R3 (SO₄²⁻ poor), R4 (SO₄²⁻ rich)）を用いた。Table 1 に反応器運転条件を示す。R1, R2 の培地はTable 1 の基質構成物に、以下の微量元素(単位：mg・ l^{-1})を添加して構成した；NH₄Cl, 500; MgCl₂・6H₂O, 400; CaCl₂・2H₂O, 150; FeCl₂・4H₂O, 2; MnCl₂・2H₂O, 0.50; CoCl₂・6H₂O, 0.17; ZnCl₂, 0.07; H₃BO₃, 0.06 NiCl₂・6H₂O, 0.04; CuCl₂・2H₂O, 0.027; Na₂MoO₄・2H₂O, 0.025; EDTA, 5。一方、R3, R4 の微量元素(単位：mg・ l^{-1})には、R1, R2 の微量元素に加え、KH₂PO₄, 200とKCl, 300を添加した（ただし、FeCl₂・4H₂O, 5; EDTA, 0とした）。また、供給硫酸塩は、それぞれ、以下のように構成した：R2, H₂SO₄；R3, Na₂SO₄；R4, Na₂SO₄：K₂SO₄：(NH₄)₂SO₄ = 1500：1500：1600。pH 緩衝剤として、R1 と R2 にはリン酸（30mM）を、R3 と R4 にはの重炭酸ナトリウム（1000～2000 mg・ l^{-1} ）を用いた。

Table 1 Reactor operating conditions (Cultivation condition).

Run	R1	R2	R3	R4
Reactor (volume, liter)	CSTR (2.0)		UASB (14.5)	
Carbon source (mgCOD・ l^{-1})	palmitate:yeast extract = 10:1, (1100 a)		sucrose:propionate:acetate:peptone = 45:22.5:22.5:10, (2000)	
Influent sulfate (mgSO ₄ ²⁻ ・ S^{-1} ・ l^{-1})	150 a)	150 a)	33	1000
Sulfide removal device	continuous b)	intermittent c)	without	continuous b)
H ₂ S in the effluent (mgH ₂ S・ S^{-1} ・ l^{-1})	3.5±3.4	54.6±24.8	5.4±3.4	79.9±22.7
Effluent pH	7.0±0.3		7.0±0.2	7.6±0.2
Loading (kgCOD・ m^{-3} ・ d^{-1})	1.1		15	2.0
COD removal efficiency (%)	80～90		80～90	

Temp. 35±1℃. a) concentration in reactor- liquid after feeding (filling).

b) Sulfide stripper has been running continuously.

c) Liquid phase was purged with N₂ for 10 min (30 min on after 46th day) prior to each feeding.

R1とR2の植種汚泥には、当研究室で長期間運転している182l容量のUASB反応器（原廃水：牛乳，入基質濃度 $3800 \text{ mgCOD} \cdot \text{l}^{-1}$ ，硫酸塩濃度 $25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ，容積負荷 $6 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ，COD除去率 90%以上， 35°C ）から採取したグラニユーल汚泥を分散処理した汚泥を用いた。R3，R4の植種汚泥には、長岡市下水処理場の中温消化汚泥を自然沈降濃縮したものをを用いた。

基質の供給は、R1とR2ではフィル・アンド・ドロー操作（混合液を引き抜いた）による回分方式で1日1回行い、R3，R4では連続供給方式で行った。R1～R4は、いずれも 35°C で運転を行った。

2.2 反応槽内生成硫化物の脱硫方法

反応器R1（供給硫酸塩濃度（ $\text{mgSO}_4^{2-}\text{-S} \cdot \text{l}^{-1}$ ），150），R2（同，150），R4（同，1000）には、硫酸塩還元反応の結果生成する硫化物による保持汚泥活性の低下軽減を目的に脱硫措置を施した。CSTRのR1とR2の相違点は、生成硫化物の脱硫方法にある。R1の脱硫装置は、生成ガスを反応器気相部と脱硫カラム（容積2.0l，酸化鉄ペレット（日産ガードラー触媒，N-IDS）を充填）間を循環させることで反応槽の硫化物を除去する構成とした（循環ガス流量： $5 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ ；1min運転，4min停止サイクル）。R2でも脱硫措置は行なったが、脱硫は1バッチ当たり1回、液相部に対して窒素パージ（ $2 \text{ liter} \cdot \text{min}^{-1}$ ，約10min間）する方法とした（反応器運転46日目以降窒素パージ時間を30minに増加した）。R4には、流出水を不活性ガスで曝気脱硫する装置を付加して、脱硫水を反応基底部から返送（基質流入に対する返送の比は2）し、硫化物負荷を低減した。

2.3 バイアル活性試験の方法

培養汚泥に対して、パルミチン酸分解活性（palmitate-degrading activity, Pal-DA），プロピオン酸分解活性（Propionate-degrading activity, Pro-DA），メタン生成活性（Methane-producing activity, MPA），硫酸塩還元活性（Sulfate-reducing activity, SRA）を求めた（何れもCOD換算として， $\text{gCOD} \cdot \text{gVSS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ の単位で求めた）。活性試験は120ml容量バイアル瓶を用いて行った（詳細は、山口らの方法による¹⁾）。添加硫酸塩濃度は、微生物群の分解能を考慮して適宜 $100 \sim 300 \text{ mgSO}_4^{2-}\text{-S} \cdot \text{l}^{-1} \text{ vial liquid}$ とした。クロロホルムを添加するときは $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ vial liq.}$ となるように注入した。活性に対する硫化物の影響を評価する活性試験では、硫化物源として硫化ナトリウムを用い、硫化ナトリウム添加時（活性試験初期）のバイアル液相のpHは7.0に調整した。

なお、パルミチン酸分解活性（Pal-DA）は、パルミチン酸からの酢酸生成活性で評価した。この試験は、1モル（100%COD）のパルミチン酸が β 酸化されると、8モル（69.6%COD）の酢酸と14モル（30.4%COD）の水素とに分解される量論特性を活用したものであり、酢酸生成量に量論係数1.44（100% / 69.6%）を乗じてPal-DAを求めた。本実験で酢酸以外の中間生成物は $5 \text{ mgCOD} \cdot \text{l}^{-1}$ 以下であり、Pal-DAの評価において無視できるレベルであった。

2.4 分析方法

分析方法は以下の通り：ガス組成（ガスクロマトグラフ，T CD，Unibeads-C，60/80，Col.Temp. 145°C ，Carrier press $1.60 \text{ kgf} \cdot \text{cm}^{-2}$ Ar），揮発性脂肪酸（ガスクロマトグラフ，FID，Thermon3000，5%，60/80，Col.Temp. 130°C ，Carrier press $0.75 \text{ kgf} \cdot \text{cm}^{-2}$ N_2 ），硫酸塩（イオンクロマトグラフ，CDD，Shimpack-A1，Col.Temp. 40°C ，Movel phase:Potassium hydrogenphthalate 2.5mM）。その他の分析法は、下水試験方法⁷⁾によった。

3 実験結果・考察

3.1 パルミチン酸分解に及ぼす硫化物の影響（R1，R2）

3.1.1. 汚泥の培養

Fig. 1, Fig. 2 に、それぞれ、R1 (low H_2S) と R2 (high H_2S) の反応器運転特性を示す。Fig. 1, Fig. 2 中の A 図は、バッチ毎の単位容積当たりのメタン生成量と硫酸塩還元量を示す。R1, R2 共に、培養開始後 1 週間程度で投入したパルミチン酸基質を 24 時間以内に完全に分解するようになり、その後分解反応は安定した。R2 では、反応槽内の硫化水素濃度が $60 \text{ mgH}_2\text{S} \cdot \text{l}^{-1}$ となった運転 50 日目頃からメタン生成が阻害された (60~150 日頃の期間)。硫化水素によるメタン生成阻害を低減するために、運転 46 日以降脱硫措置 1 回当たりの窒素ガスパージ時間を 10min から 30min に増加し、また、pH を定常運転よりも高い 7.0~7.6 の間に調整した。更に、水理学的滞留時間を 3 倍にすることで容積負荷を定常時 ($1.1 \text{ gCOD} \cdot \text{l}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) の 1/3 にまで低減した。この結果、運転 150 日目頃からパルミチン酸分解能は、R1 と同レベルの容積負荷 $1.0 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ を許容するまでに回復した。

B 図は、(硫酸塩還元反応による COD 除去量)/(総 COD 除去量)の経日変化を示す。ここで、総 COD 除去量とは、硫酸塩還元反応による COD 利用量とメタン生成量の和であり、A 図を基に算出した。この割合は、運転期間を通して R1 では 0.216 ± 0.074 (平均 $\pm$ 標準偏差)、R2 で 0.216 ± 0.066 であった。パルミチン酸が不完全酸化した場合、1 モルのパルミチン酸から、8 モルの酢酸と 14 モルの水素 (分解 COD 30.4% にあたる) が生成される⁶⁾。本実験で得られた硫酸塩還元菌による COD 除去量の割合は、水素経路で代謝される COD の割合 0.304 以下であった。

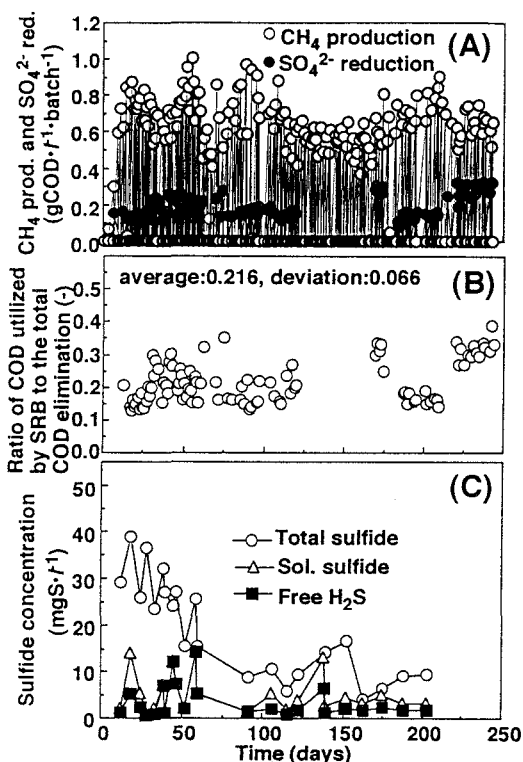


Fig.1 Cultivation of R1 sludge (low sulfide) by a CSTR operated in fill-and-draw mode and equipped with a continuous sulfide removal device.

- (A) Methane production and sulfate reduction (both based on COD equivalent) per batch.
(B) Contribution of sulfate reduction to total COD reduction (methane formation plus sulfate reduction).
(C) Sulfide concentration.

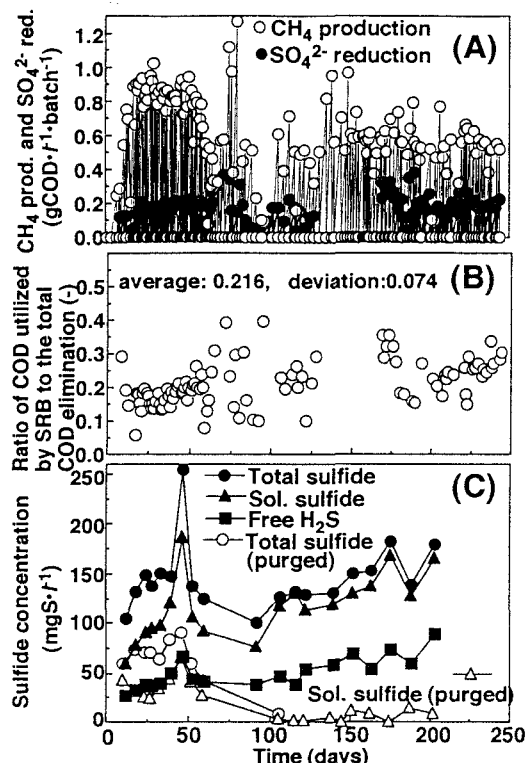


Fig.2 Cultivation of R2 sludge (high sulfide) by a CSTR operated in fill-and-draw mode and equipped with an intermittently-operated sulfide removal device.

Figs (A) through (C) are same as given in Fig. 1.

C図は、硫化物濃度の経日変化を示す。図中の硫化物の凡例は以下の硫化物から構成される； Total sulfide（固形性硫化物、遊離硫化物(H_2S)、 HS^- 、 S^{2-} の和）； Soluble sulfide（遊離硫化物(H_2S)、 HS^- 、 S^{2-} の和）； Free H_2S （遊離硫化物）； Total sulfide (purged)（窒素パージ脱硫措置直後のTotal sulfide）； Soluble sulfide (purged)（窒素パージ脱硫措置直後のSoluble sulfide）。R1では連続脱硫措置を施したため、運転期間を通して硫化水素濃度は $1 \sim 15 \text{ mgH}_2\text{S} \cdot \text{S} \cdot \text{l}^{-1}$ （平均±標準偏差, $3.5 \pm 3.4 \text{ mgH}_2\text{S} \cdot \text{S} \cdot \text{l}^{-1}$ ）と低く維持できた。R2では、間欠脱硫措置（基質供給1バッチ当たり1回、窒素を液層部に対してパージした）であったために、脱硫措置前の硫化水素濃度は、 $40 \sim 90 \text{ mgH}_2\text{S} \cdot \text{S} \cdot \text{l}^{-1}$ （平均±標準偏差, $54.6 \pm 24.8 \text{ mgH}_2\text{S} \cdot \text{S} \cdot \text{l}^{-1}$ ）と高いレベルであった。

3.1.2 R1とR2のメタン生成・硫酸塩還元活性

Fig. 3に、運転426日目のR1 (low H_2S)とR2 (high H_2S)のメタン生成活性(MPA), 硫酸塩還元活性(SRA, COD換算活性)を評価した結果を示す。活性試験のテスト基質には、酢酸、水素、パルミチン酸を用いた。パルミチン酸からMPAは、硫酸塩添加系と無添加系について評価した。パルミチン酸分解過程におけるSRA評価バイアルにはクロロホルムを添加して評価した。水素、酢酸基質に対してMPBとSRBが競合することが知られているが、R1とR2においてMPBはこれらの基質に対する活性は高く保持されていた。SRAについてみると、R1、R2共に水素還元性SRAが酢酸、パルミチン酸基質の活性と比較して高かった。この結果から、SRBがパルミチン酸の分解過程で特に、水素除去者として寄与していたことがわかる。パルミチン酸からのMPAは、硫酸塩添加によって、R1では1.7倍 ($0.816/0.493$)に増大、R2では0.67倍 ($2.56/3.81$)に減少した。このことから、R1には、酢酸生成を活発に行うパルミチン酸還元性SRB (Pal-SRB)が増殖したことが示唆できる。一方、R2では、Pal-SRBのパルミチン酸分解寄与度の低いことが推測できる。なお、R2のパルミチン酸からのMPAが、硫酸塩添加によって低下した原因には、酢酸、水素をめぐってMPBとSRBが競合したためと考えられる。

3.1.3 SRBとPRBとによるパルミチン酸酸化

Fig. 4に、運転426日目のR1 (low H_2S)とR2 (high H_2S)のパルミチン酸分解活性 (Pal-DA)を、パルミチン酸からの酢酸生成より評価した結果を示す。実験では3種のバイアル条件を用いた。3バイアルには共に、パルミチン酸とクロロホルム (MPBによる酢酸分解の阻害剤)を添加した。また、バイアル1では、気相部に窒素を充填し、液相部に硫酸塩を添加した。バイアル2では、気相部に H_2/CO_2 (80/20(v/v), %, 130kPa)を

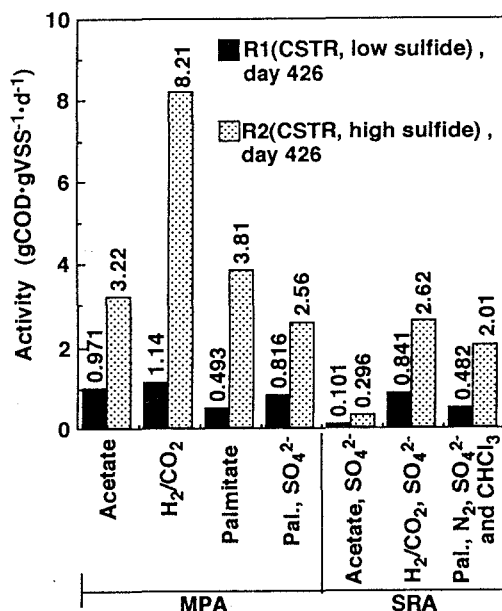


Fig.3 Methane producing activity (MPA) and sulfate reducing activity (SRA), both based on COD equivalent, for R1 sludge and R2 sludge.

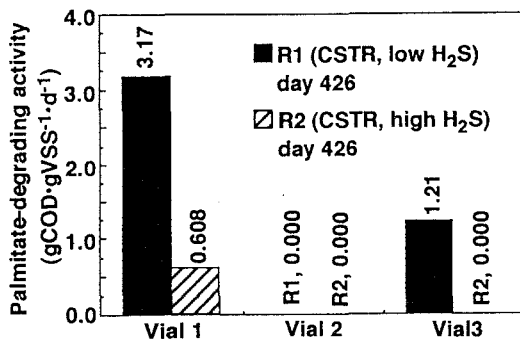


Fig.4 Palmitate degrading activity (Pal-DA) for R1 and R2 sludge.

Respective vial gas/liquid phases contained: vial 1 : N_2 / palmitate, SO_4^{2-} and CHCl_3 ; vial 2 : H_2 / palmitate and CHCl_3 ; and vial 3 : H_2 / palmitate, SO_4^{2-} and CHCl_3 .

充填した。バイアル3では、気相部に同じく H_2/CO_2 を充填し、液相部に硫酸塩を添加した。これらの条件により、各バイアルでパルミチン酸分解（酢酸生成）に寄与し得る微生物群は、それぞれ以下になる；バイアル1：パルミチン酸酸化性PRB（Pal-PRB）と水素酸化性SRB（H-SRB）の共生系、及び、パルミチン酸酸化性SRB（Pal-SRB）；バイアル2：パルミチン酸分解を行う微生物群無し；バイアル3：Pal-SRBのみ。なお、酢酸酸化性SRBによる酢酸蓄積の関与は、Fig.3でその活性がR1で0.101、R2で0.295とFig.4の活性（0.608～3.18）と比較して低いので考慮しないものとした。

バイアル1ではR1とR2共にPal-DAを有したが、一方、バイアル3ではR1のみPal-DAが認められた。また、バイアル2ではPal-DAはゼロであった。この結果より、R1（low H_2S ）では、Pal-PRBとPal-SRBの両方がパルミチン酸分解に寄与し、一方、R2（high H_2S ）では、Pal-PRBのみがパルミチン酸分解者として増殖したことがわかる。なお、Fig.3でR1のパルミチン酸分解過程におけるSRAがR2のそれよりも低くなったことと逆に、Fig.4でR1のPal-DAがR2よりも高くなった理由については今後の検討課題である。

3.1.4 パルミチン酸分解活性と硫化水素濃度の関係

Fig. 5に、運転426日目のR1とR2のパルミチン酸分解活性（Pal-DA）と硫化水素濃度の関係を示す。Fig. 5-Bは、Fig. 5-Aを基にした活性比率を示す（活性比率は、硫化水素濃度が最も低い条件で試験を行った活性値をコントロール（100%）として求めた）。活性試験の結果、Pal-DA比率が、100%、50%、5%以下になる硫化水素濃度（ $mgH_2S \cdot S^{-1} \cdot l^{-1}$ ）は、それぞれ、R1（low H_2S ）では、50、150、470、R2では、80、360、450のレベルとなった。また、R2（high H_2S ）では、 $180 mgH_2S \cdot S^{-1} \cdot l^{-1}$ で最大活性（コントロールのPal-DAの1.28倍）を得た。Fig. 5の結果より、硫化水素によるPal-DAの挙動には2種類のケースがあるといえる。即ち、R1（low H_2S ）にみられる、硫化物濃度の増大に準じて活性（Pal-DA）が一様に低下するケース（ケース1（一様低下））と、R2（high H_2S ）にみられる、硫化水素の増大によって活性（Pal-DA）が上昇しピークを有してから低下するケース（ケース2（ピーク有り））とがある。

以上、Fig. 4とFig. 5の結果から、パルミチン酸分解過程で、Pal-PRBと水素除去者（ここではH-SRB）共生系と、Pal-SRBのPal-DAに対する硫化水素の影響は、次のように整理できる：①Pal-PRBは、硫化水素に対してケース2（ピーク有り）のような特性を有する。②Pal-SRBが硫化水素に対してケース1（一様低下）の特性を有することを示唆する。これらより、Pal-PRBの硫化水素耐性が、Pal-SRBのそれよりも高いことが推察できる。

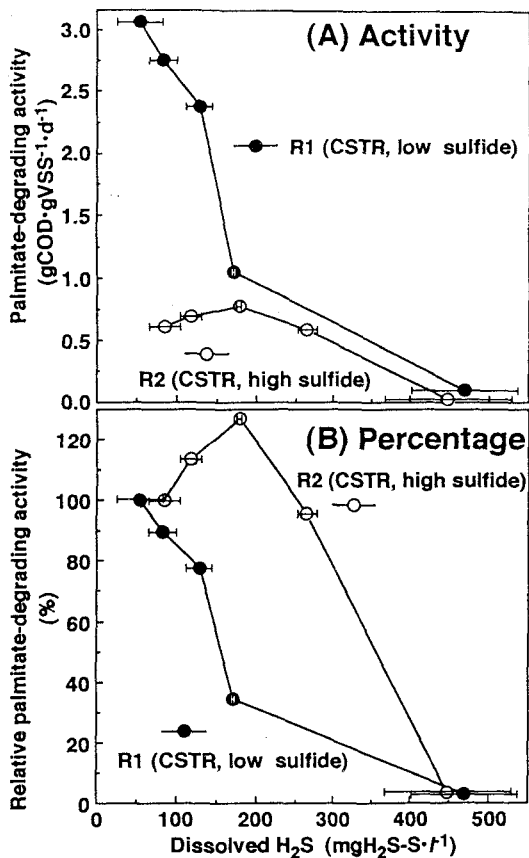


Fig.5 Effect of hydrogen sulfide on palmitate degrading activity (Pal-DA) for R1 sludge (acclimatized to low H_2S) and R2 sludge (high H_2S). (A):activity; (B):relative activity, employing Pal-DA at the lowest H_2S as a reference. Bar indicates the range of H_2S concentration during each vial test.

また、Fig. 5-A の R 1 の Pal-DA が硫化水素濃度190 mgH₂SS・l⁻¹程度まで急激に低下した原因には、この濃度範囲内でPal-SRBによるPal-DAが顕著に低下したことが考えられる。

Fig.5のバクテリア分解活性と硫化水素濃度の影響で、Pal-SRB とPal-PRBではケース1とケース2のような違いが生じた。SRBの活性を低下させる原因には、(1) 硫化物がSRBの硫黄還元酵素を阻害すること⁸⁾、(2) 硫化物がSRBによる硫酸塩還元反応の生成物であり反応進行性を低下させることが挙げられる。一方、SRB、PRBの活性を高める原因には、硫化物添加によって、より還元的な環境条件（低ORP）が嫌気性細菌に提供されることが挙げられる。本研究でバクテリア分解活性がケース1（一様低下）のような傾向となったのは、バクテリア分解過程では総じて活性を低下する方の影響が顕在化したものと考えられる（ケース1（一様低下）を示したR1では、硫化水素によるPal-SRBの活性低下の特性が顕在化し、Pal-PRBのケース2（ピーク有り）の特性がFig.5で表れなかったと推察される）。また、R 2 でみられたケース2（ピーク有り）の特性は低酸化還元電位環境の提供により、Pal-PRBの活性が上昇したものと推測される（後述のプロピオン酸分解活性に対する硫化水素濃度の影響評価結果でも、ケース1とケース2がみられるが同様な原因と思われる）。

3.2 プロピオン酸分解に及ぼす硫化物の影響（R 3，R 4）

3.2.1 汚泥の培養

糖系基質を2基のUASB反応器（R 3，R 4；Table 1 参照）に供給し、2種の汚泥を培養した。2基とも運転は Table 1 の条件で1年以上行い、運転におけるCOD除去率は80%以上であった。培養における処理水硫化水素濃度(mgH₂SS・l⁻¹ eff. liquid)は、R3 (SO₄²⁻ poor)で、2～10（平均±標準偏差：5.4±3.4）、R4 (SO₄²⁻ rich)では50～100（平均±標準偏差：79.9±22.7（運転302日～887日）、92.4±51.8（全期間））であった。R 3 はメタン発酵の卓越した培養系となった。一方、R 4 では有機物分解の100%が硫酸塩還元反応によって遂行され、硫酸塩還元が卓越した培養系となった。

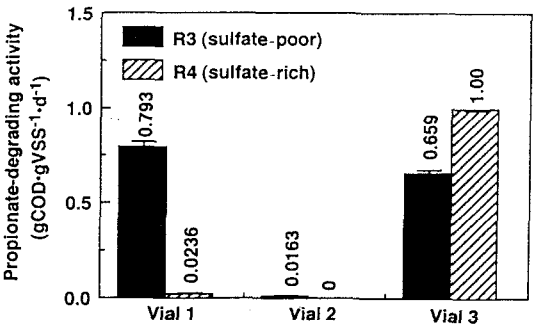


Fig.6 Propionate degrading activity (Pro-DA) for R3 and R4 sludge.

R3 and R4 sludge samples were harvested on the day 751 from UASB receiving the sulfate-poor waste and the sulfate-rich waste, respectively. Respective vial gas/liquid phases contained: vial 1 : N₂ / propionate; vial 2 : H₂ / propionate and CHCl₃; and vial 3 : H₂ / propionate, SO₄²⁻ and CHCl₃.

Table 2 Methane-producing and sulfate-reducing activities (gCOD·gVSS⁻¹·d⁻¹) for R3 (sulfate poor) and R4 (sulfate rich).

UASB reactor	Methane-producing activity		Sulfate-reducing activity	
	acetate	H ₂ /CO ₂	acetate ^{a)}	H ₂ /CO ₂ ^{b)}
R3 (751st d.)	2.74±0.08 ^{c)}	2.16±0.02	0.00±0.00	0.33±0.00
R4 (861st d.)	0.14±0.01	0.00±0.00	0.27±0.01	0.26±0.00

^{a)} acetate-utilizing activity due to sulfate reduction.
^{b)} hydrogen-utilizing activity due to sulfate reduction.
^{c)} average ± standard deviation

Table 2 に R 3 (運転 751 日目), R 4 (運転 861 日目) の (SRA) を示す。R 3 と R 4 の活性試験は, 2 回行い平均を活性とした。Table 2 の結果から, R 3 で MPB が優勢であったことと, R 4 で SRB が卓越したことがわかる。

3.2.2 SRB と PRB とによるプロピオン酸分解

Fig. 6 に R 3 (SO_4^{2-} poor) と R 4 (SO_4^{2-} rich) のプロピオン酸分解活性 (Pro-DA) 評価実験の結果を示す。実験では 3 種のバイアル条件を用いた。3 バイアルには共に, プロピオン酸を炭素源として添加した。また, バイアル 1 では, 気相部に窒素を充填した。バイアル 2 では, 気相部に H_2/CO_2 (80/20(v/v), %, 130kPa) を充填し, 液相部にクロロホルムを添加した。バイアル 3 では, 気相部に同じく H_2/CO_2 を充填し, 液相部にクロロホルムと硫酸塩を添加した。これらの条件により, 各バイアルでプロピオン酸分解に寄与し得る微生物群は, それぞれ以下のようになる; バイアル 1: プロピオン酸資化性 PRB (Pro-PRB) とメタン生成細菌 (MPB) の共生系; バイアル 2: プロピオン酸分解を行う微生物群無し; バイアル 3: プロピオン酸資化性 SRB (Pro-SRB) のみ。

Fig. 6 から, R 3 では, バイアル 1 とバイアル 3 の両条件下で Pro-DA が比較的高い活性を有する結果となり, 汚泥内にプロピオン酸分解者として Pro-PRB と Pro-SRB の両者が増殖したことがわかった。

一方, R 4 では, バイアル 1 (Pro-PRB と MPB の共生) の Pro-DA は, 無視できる低いレベル (0.0236 $\text{gCOD} \cdot \text{gVSS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) となった。R 4 の Pro-PRB による Pro-DA は, 別なバイアル活性試験で, 水素資化性メタン生成活性細菌株 *Methanobacterium* sp. を水素除去者として十分量添加 (Table 2, H-MPA がゼロであったため添加した) しても高まらなかった (データ不提示)。さらに, R 4 の vial 3 (Pro-PRB) の Pro-DA は, 1.00 $\text{gCOD} \cdot \text{gVSS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ と大きな値を示したことで併せて考察すると, R 4 では Pro-SRB がプロピオン酸分解者としてのニッチを獲得していたと推察できる。嫌気性汚泥コンソーシアでの Pro-SRB の挙動に関しては, Harmsen ら⁹⁾ が 16S rRNA 遺伝子プローブを用いて評価している。彼らの実験系ではプロピオン酸を炭素源として高硫酸塩負荷 UASB と硫酸塩無添加 UASB を運転し, その結果 Pro-SRB である *Desulfobulbus* が高負荷系で増大し, 無添加系でも共生性プロピオン酸化細菌 (Pro-PRB) に駆逐されずに存在したことを報告しており, 我々の R 3, R 4 の実験結果の妥当性を裏付けている。

3.2.3 プロピオン酸分解活性と硫化水素濃度の関係

Fig. 7 に, R 3 (SO_4^{2-} poor) と R 4 (SO_4^{2-} rich) のプロピオン酸分解活性 (Pro-DA) に硫化水素濃度が与える影響をバイアル活性試験 (反応器運転 658 日目と 773 日目) で評価した結果を示す。Fig. 7-A は Pro-DA を示し, Fig. 7-B は, Fig. 7-A を基にした活性比率を示す (活性比

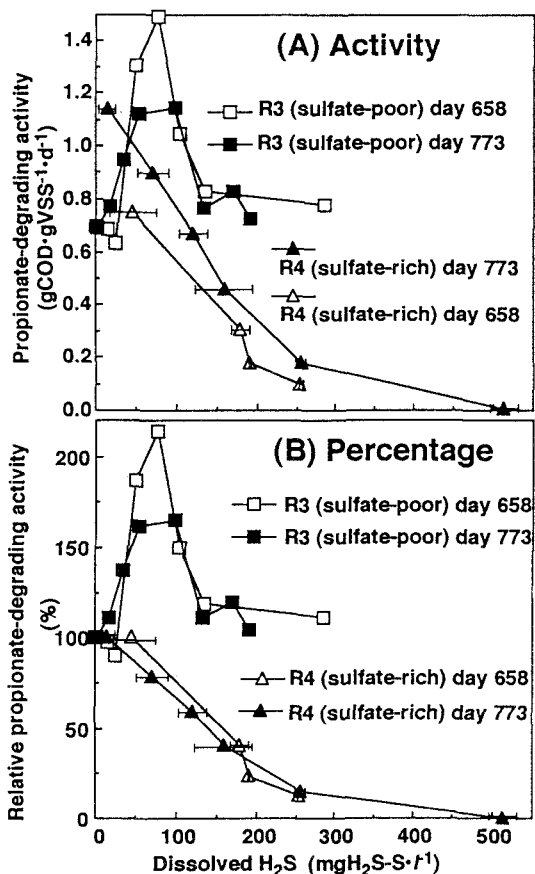


Fig.7 Effect of hydrogen sulfide on propionate degrading activity (Pro-DA) for R3 sludge (cultivated in an UASB receiving a sulfate-poor waste) and R4 sludge (sulfate-rich). (A):activity; (B):relative activity, employing Pro-DA at the lowest H_2S as a reference. Bar indicates the range of H_2S concentration during each vial test.

率は、硫化水素濃度が最も低い条件で試験を行った活性値をコントロール（100%）として求めた）。

硫化水素に対して、R 3 の Pro-DA は、 $80 \text{ mgH}_2\text{S}\cdot\text{f}^{-1}$ で最大ピーク（コントロールの1.7~2.2倍）となり、 $300 \text{ mgH}_2\text{S}\cdot\text{f}^{-1}$ まではコントロールの1.1~1.3倍のレベルを維持した（Fig. 7-B）。R 3 の挙動は、パルミチン酸で培養した R 1 で観察された硫化水素に対する Pal-DA の挙動ケース 2（ピーク有り）と同様である（Fig. 5 参照）。一方、Pro-SRBのみがプロピオン酸分解者として卓越した R 4 の Pro-DA は、硫化水素濃度の上昇に準じて連続的に低下した（パルミチン酸分解に対する硫化水素の影響で観察されたケース 1（一様低下）と同様の現象）。

Rinzema ら¹⁰⁾ は、プロピオン酸を主要炭素源とした硫酸塩含有人工廃水をUASB反応器に供して、連続運転における槽内硫化物濃度とプロピオン酸分解速度との関係の評価し、硫化水素濃度が $100 \text{ mgH}_2\text{S}\cdot\text{f}^{-1}$ 程度にまで高くなると、プロピオン酸分解能が顕著な低下をみせたと報告している。本研究のバイアル活性実験より得られたPro-DAは、Rinzemaらの結果よりも、プロピオン酸分解者の硫化水素耐性が高いことを示す結果となった。Rinzemaらは、プロピオン酸分解能低下の原因として、硫化物による水素除去者（H-MPB，H-SRB）の活性阻害を挙げている。

Boone ら¹¹⁾ は、*Syntrophbacter wolinii* sp. (Pro-PRB)と *Desulfovibrio* sp. (H-SRB)の2者共生系に、硫化ナトリウムを 5 mM ($160 \text{ mgS}\cdot\text{f}^{-1}$)， 10 mM ($320 \text{ mgS}\cdot\text{f}^{-1}$) 添加した場合、プロピオン酸分解が、硫化ナトリウム無添加の場合に対して、それぞれ、77%，49%にまで阻害されたことを報告している。Okabe¹²⁾ らは、乳酸基質利用の最大比増殖速度に対する阻害定数(Ki)を $250 \text{ mgS}\cdot\text{f}^{-1}$ と算出した。Okabe らの阻害定数 $250 \text{ mgS}\cdot\text{f}^{-1}$ は、Boone らのプロピオン酸分解が 49 %にまで低減した硫化物濃度 $320 \text{ mgS}\cdot\text{f}^{-1}$ に近いレベルであり、硫化物によって *Syntrophbacter wolinii* sp. のプロピオン酸分解が低下したとは断定しがたい。R eisら¹³⁾ の報告では、*Desulfovibrio* sp.の乳酸利用硫酸塩還元活性は、硫化水素濃度の上昇に準じて低減し、 $547 \text{ mgH}_2\text{S}\cdot\text{f}^{-1}$ で完全に阻害される。これまで硫化物負荷によってPRBの有機物分解活性がどのように影響を受けるかを評価した知見は少なく、本実験のように、PRBの活性が最大に高められる最適硫化物濃度の提示ははじめてといえる。

4 まとめ

4基の反応器（R 1，R 2，R 3，及びR 4）で培養した汚泥をバイアル活性試験に供して、パルミチン酸とプロピオン酸の嫌氣的分解過程における硫酸塩還元細菌（SRB）と水素生産性酢酸生成細菌（PRB）の活性に及ぼす硫化物の影響に関して評価を行ったところ以下の知見が得られた。ここで、R 1とR 2の汚泥の培養は、パルミチン酸を主要炭素源とする基質（ $1000 \text{ mgCOD-palmitate}\cdot\text{f}^{-1}$ ， $150 \text{ mgSO}_4^{2-}\cdot\text{S}\cdot\text{f}^{-1}$ ）を、完全混合型反応槽に半連続方式で供給して行った。R 1とR 2の槽内硫化水素濃度（ $\text{mgH}_2\text{S}\cdot\text{f}^{-1} \text{ reactor liq.}$ ）は、それぞれ、 3.5 ± 3.4 （平均±標準偏差）， 54.6 ± 24.8 （同）の範囲であった。R 3とR 4の汚泥の培養は、スクロース、プロピオン酸、酢酸、ペプトンで構成する基質（ $2000 \text{ mgCOD}\cdot\text{f}^{-1}$ ）を、UASB反応器に供給して行った（流入硫酸塩濃度（ $\text{mgSO}_4^{2-}\cdot\text{S}\cdot\text{f}^{-1}$ ）はR 3で、33，R 4で1000とした）。R 3とR 4の処理水硫化水素濃度（ $\text{mgH}_2\text{S}\cdot\text{f}^{-1} \text{ eff. liq.}$ ）は、それぞれ、 5.4 ± 3.4 （平均±標準偏差）， 92.4 ± 51.8 （同）の範囲であった。

- (1) R 1 (low H_2S)では、パルミチン酸分解者として Pal-PRB と Pal-SRB が増殖した（Pal-PRB と SRB の共生による Pal-DA（活性： $\text{gCOD}\cdot\text{gVSS}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ）が 3.17，Pal-SRB のみの Pal-DA が 1.21）。R 2 (high H_2S)では、Pal-PRB のみがパルミチン酸分解者として生育した（Pal-DA：0.608）。
- (2) R 3 (SO_4^{2-} -poor)では、プロピオン酸分解者として Pro-PRB と Pro-SRB が増殖した（Pro-PRB と MPB の共生による Pro-DA が 0.79，Pro-SRB のみの Pro-DA が 0.66）。R 4 (SO_4^{2-} -rich)では、Pro-SRB のみがプロピオン酸分解者として卓越した（Pro-SRB の Pro-DA：1.0）。

- (3) 硫化水素に対するパルミチン酸、プロピオン酸分解活性の挙動には、2種類のケースがあった：①硫化物濃度の増大に準じて活性が一様に低下するケース（ケース1）、②硫化水素の増大によって活性が上昇しピークを有してから低下するケース（ケース2）。
- (4) パルミチン酸分解過程で、Pal-PRBは硫化水素に対して(3)のケース2(ピーク有り)の特性を示し、一方、Pal-SRBは、ケース1(一様低下)の特性を有することが示唆された。
- (5) プロピオン酸分解過程で、Pro-PRBとMPBの共生系は硫化物に対して(3)のケース2(ピーク有り)の特性、一方、Pro-SRBはケース1(一様低下)の特性を有した。

略記号一覧

H-MPB	: hydrogen-utilizing methane-producing bacteria, 水素資化性メタン生成細菌
H-SRB	: hydrogen-utilizing sulfate-reducing bacteria, 水素資化性硫酸塩還元細菌
MPA	: methane-producing activity, メタン生成活性
MPB	: methane-producing bacteria, メタン生成細菌
PRB	: hydrogen-producing proton-reducing acetogenic bacteria, 水素生産性酢酸生成細菌
Pal-DA	: palmitate-degrading activity, パルミチン酸分解活性
Pal-PRB	: palmitate-degrading hydrogen-producing proton-reducing acetogenic bacteria, パルミチン酸資化性水素生産性酢酸生成細菌
Pal-SRB	: palmitate-degrading sulfate-reducing bacteria, パルミチン酸資化性硫酸塩還元細菌
Pro-DA	: propionate-degrading activity, プロピオン酸分解活性
Pro-PRB	: propionate-degrading hydrogen-producing proton-reducing acetogenic bacteria, プロピオン酸資化性水素生産性酢酸生成細菌
Pro-SRB	: propionate-degrading sulfate-reducing bacteria, プロピオン酸資化性硫酸塩還元細菌
SRA	: sulfate-reducing activity, 硫酸塩還元活性
SRB	: sulfate-reducing bacteria, 硫酸塩還元細菌

参考文献

- 1) 山口隆司, 原田秀樹, 桃井清至, 曾 怡禎 (1995) 高級脂肪酸の嫌氣的分解過程における硫酸塩還元菌の生態学的役割, 水環境学会誌, Vol.18, 499-510.
- 2) Harada, H., Uemura, S. and Momonoi, K. (1994) Interaction between sulfate-reducing bacteria and methane-producing bacteria in UASB reactors fed with low strength wastes containing different levels of sulfate, Wat. Res., 28, 355-367.
- 3) Widdel, F. (1988) Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria, in Biology of Anaerobic Microorganisms (Ed. Zehnder, A.J.B.), Wiley Interscience, 469-584.
- 4) Clancy, P.B., N. Venkataraman, and L.R. Lynd (1992) Biochemical Inhibition of Sulfate Reduction in Batch and Continuous Anaerobic Digestors, 6th International symposium anaerobic digestion in Brazil, 43-61
- 5) 珠坪一晃, 原田秀樹, 曾 怡禎, 桃井清至 (1994) 高温UASBリアクター保持汚泥のグラニューール形成過程における構造的特性とメタン生成活性の推移, 衛生工学研究論文集, 第31巻, 57-67.
- 6) 花木啓祐, 松尾友矩, 長瀬道彦 (1981) 嫌気性消化における脂肪酸の代謝, 下水道協会誌, 18, 30-39.
- 7) 社団法人日本下水道協会, 下水試験方法 1984年版.

- 8) Fauque, G., D. Herve, and J. LeGall (1979) Structure Function Relationship in hemoproteins: the role of cytochrome C in the Reduction of Colloidal Sulfur by Sulfate Reducing Bacteria, Arch. Microbiol., 121, 261-264.
- 9) Harmsen, H.J.M., A.D.L. Akkermans, A.J.M. Stams, and W.M. De Vos (1996) Population Dynamics of Propionate-Oxidizing Bacteria under Methanogenic and Sulfidogenic Conditions in Anaerobic Granular Sludge, Appl. Environ. Microbiol., 62, 2163-2168.
- 10) Rinzema A. and Lettinga G (1988) The effect of sulphide on the anaerobic degradation of propionate, Environ. Technol. Lett., 9, 83-88.
- 11) Boone D.R. and Bryant M.P. (1980) Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov., from Methanogenic ecosystems, Appl. Environ. Microbiol. 40, 626-632.
- 12) Okabe, S., P.H. Nielsen, W.L. Jones and W.G. Characklis (1995) Sulfide Product Inhibition of *Desulfovibrio desulfuricans* in Batch and Continuous Cultures, Wat. Res. 29, 571-578.
- 13) Reis M.A.M., Almeida J.S., Lemos P.C., Carrondo M.J.T. (1992) Effect of hydrogen sulfide on growth of sulfate reducing bacteria, Biotechnol. Bioeng., 40, 593-600.