

(2) グラニュール汚泥の高硫酸塩条件への馴致過程における
メタン生成菌と硫酸還元菌の空間分布の変遷

Structural Analysis of Microbial Community Change in Response to Feed
Sulfate Strength by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Method

荒木 信夫*, 山口 隆司**, 関口 勇地***, 原田 秀樹***

Nobuo ARAKI*, Takashi YAMAGUCHI**, Yuji SEKIGUCHI***, Hideki HARADA***

ABSTRACT; Competitive interaction between methane producing bacteria and sulfate reducing bacteria in UASB granules was investigated by applying fluorescence in situ hybridization (FISH) of DNA-targeted probes specific to five different bacterial groups. Granules grown in an UASB reactor were imposed on a stepwise perturbation of feed sulfate strength from 33 to 1,000 mg $\text{SO}_4\text{-S}\cdot\text{L}^{-1}$. Under the low sulfate condition, *Methanobacterium* and *Methanosaeta* were found to be predominant, respectively, at the outer surface layer and at the internal portion of granules. Relatively small amounts of *Desulfovibrio* and *Desulfobulbus* were observed dispersively at the outer surface layer in the form of individual singular cell. Under the high sulfate fed condition *Desulfobulbus* became thin layered form to cover the whole granule surface. Hydrogen consumers, mainly such as *Methanobacterium* and *Desulfovibrio*, entirely disappeared in the granules, and completely-oxidizing sulfate reducing bacteria were abundantly observed.

Keywords; microbial structure, fluorescent in situ hybridization, methane producing bacteria, sulfate reducing bacteria, sulfidogenic granule.

1. はじめに

紙・パルプ工場や食用オイル工場等からの廃液には比較的高濃度の硫酸塩を含む場合が多い。このような硫酸塩を含む産業廃水の処理に嫌気性生物プロセスを適用することが進んでいる¹⁻⁵⁾。廃水の硫酸塩濃度が高い場合、UASB反応器内ではグラニュールの形成が困難とされており、Anaerobic Filterを組み合わせたハイブリッド型反応器⁶⁾や多段化したUASB^{7, 8)}の適用が検討されている。これらのプロセスではスタートアップ期間を短縮するために、種汚泥としてUASBで培養されたグラニュール汚泥を投入することが多い⁹⁾。

硫酸塩を含む廃水を嫌気性処理すると、反応器内には硫酸塩を電子受容体とする硫酸還元菌が生育する。硫酸還元菌は、電子供与体として、乳酸やアルコールといった易分解性の基質以外に、水素や有機酸を利用する¹⁰⁾。したがって、通常の嫌気性微生物反応の最終段階では水素生成性酢酸生成菌やメタン生成菌と硫酸還元菌との間に水素や有機酸等の各中間生成物を奪い合う基質競合が発生する (Fig.1)。また、硫酸還元反応に伴って生成する硫化水素はより強くメタン生成菌に障害を与えることから、ある程度の硫酸塩を含む廃水の処理では硫酸還元菌が優占し、長期間の運転後にはCODの減少がほぼ硫酸還元反応によって遂行されるようになる場合もある^{3, 11)}。

近年、複合微生物系の解析には分子生物学的な手法が用いられている。合成DNAプローブのFluorescent in situ hybridization (FISH)法は微生物の培養を伴わずに目的微生物の特異的な検出が可能であるといった特長を有している。本研究は、人工廃水中の硫酸塩濃度をステップ的に変化させた後のグラニュール内のメタン生成菌と硫酸還元菌の共生および競合関係を評価するために、合成DNAプローブのFISH法をパラフィン包埋によって作成したグラニュール切片に適用し、両者

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

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

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

のグラニュール内での空間分布の変遷を追跡したものである。このような手法によるグラニュール内部の微生物分布の調査は、Harmsenら¹²⁾と筆者らのグループが報告しているだけであり、*in-situ*での硫酸還元菌とメタン生成菌の空間分布の変遷を評価した報告はこれが初めてである。

2. 実験方法

2.1 反応器の運転条件と処理性能の評価

実験には2基のUASBリアクターを用いて供試汚泥の培養を行った。反応器はウォータージャケットにより35℃恒温に保った。流入硫酸塩濃度33 mgSO₄²⁻・S・L⁻¹（低硫酸塩系、Run 1と称す）で2年以上培養されたグラニュール汚泥を、流入硫酸塩濃度1000 mgSO₄²⁻・S・L⁻¹（高硫酸塩系）の反応器に植種汚泥として供した。以降本報では、植種後高硫酸塩系で2週間運転を行った汚泥をRun2、10週間後の汚泥をRun3と称する。

硫酸塩の供与は、低硫酸塩系ではNa₂SO₄を用い、高硫酸塩系では硫黄基準でNa₂SO₄:K₂SO₄:(NH₄)₂SO₄ = 345:282:373とした。尚、高硫酸塩系の硫酸塩濃度は、流入CODを完全分解する量に相当する。炭素源は、COD濃度・組成が同一のものを供給した（2000 mgCOD・L⁻¹；シュクロース：酢酸：プロピオン酸：ペプトン = 45:22.5:22.5:10 as COD）。低硫酸塩系、高硫酸塩系の供給基質は、上記の硫酸塩と炭素源の他に、以下の微量元素を添加して構成した（mg・L⁻¹）；NH₄Cl, 500; MgCl₂・6H₂O, 400; KCl, 300; KH₂PO₄, 200; CaCl₂・2H₂O, 150; 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。実験期間中、pH制御は1000～2000 mg・L⁻¹のNaHCO₃の添加操作で行った。リアクターのCOD収支は以下の項目について評価した：硫酸塩還元によるCOD除去量、ガス体メタン、溶解性メタン、溶解性COD、固形性COD。硫黄収支は、以下の項目について評価した：ガス体硫化物、沈殿性硫化物、溶解性硫化物、流出硫酸塩。

2.2 FISH法で用いた合成プローブ

Table2に本実験で用いた合成DNAプローブとその検出目的微生物、ハイブリダイズ条件を示す。プローブの5'末端にはTetramethylrhodamine-isothiocyanate（以後TRITCと略す）を蛍光標識として付加した。また、SRB385dにはFluorescein-isothiocyanate（以後FITCと略す）を付加した。Fig.1にこの5種の合成DNAプローブの検出する微生物群を示した。硫酸還元菌を検出する3種のプローブは、*Desulfovibrio vulgaris marburg* (DSM2119)、*Desulfohalobium propionicus* MUD (DSM6523)、*Desulfohalobium latus* sp. の純粋株を用いて最適ハイブリダイズ条件を評価した。

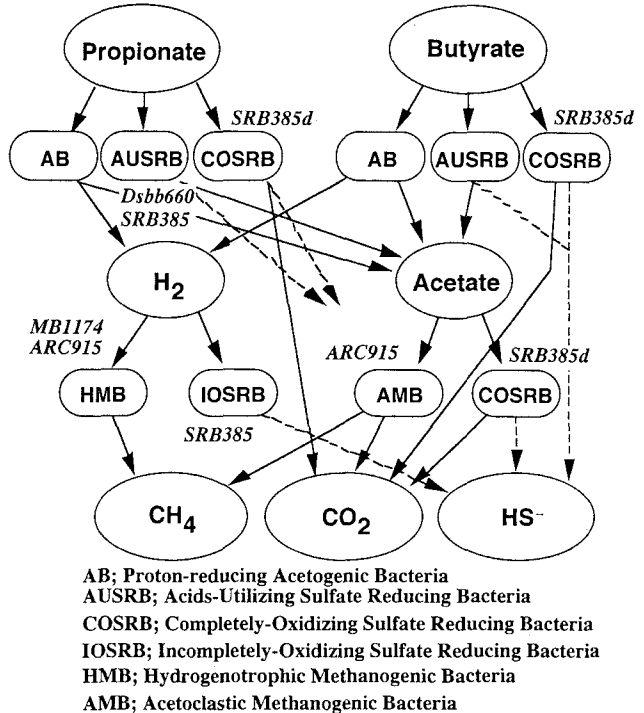


Fig.1 Carbon and electron flow through the various trophic groups of microbes in anaerobic environments oxidizing butyrate, propionate, and acetate.

Table 1 Oligonucleotide probes and hybridization conditions applied in this study.

Probe	Specificity	Probe sequence(5'-3')	Target Site	°C**	% FA	Ref.
ARC915	Archaea	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	915-934	45	30	(13)
Mb1174	<i>Methanobacteriaceae</i>	TACCGTCGTCCTCCTTCCTC	1174-1195	45	30	(14)
SRB385*	δ -group Proteobacteria	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	385-402	45	10	(15)
SRB385d	complete oxidizing SRB	CGGCGTTGCTGCGTCAGG	385-402	45	20	(16)
Dsbb660	<i>Desulfobulbus</i>	GAATTCACCTTTCCCCTCTG	660-679	45	20	(17)

*: Several non-target sequences share the target sequence of SRB385, **: Hybridization Temperature.

FA%: Formamide concentration in hybridization buffer.

2.3 グラニュール切片への FISH 法の適用

UASB から採取したグラニュール試料は PBS Buffer で洗浄後、パラホルムアルデヒド溶液 (4% Paraformaldehyde, 390mM PBS Buffer, 30mM NaCl, 4°C, 24hrs) で固定した後エタノールを用いて脱水、キシレンを用いて脱脂した。次に、このグラニュール試料を 80°C に溶解させたパラフィン (Paraplast, Sherwood Medical) に浸して固定し、氷冷後マイクロトームを用いてグラニュールを 2 μ m の厚さに切断し切片を作成した。グラニュール切片はゼラチンコートしたスライドガラスに移し、パラフィンを除去した後、脱水、空気乾燥させたものを FISH 法に供した。

ハイブリダイゼーションは、Amann の方法¹⁸⁾ に準拠して行った。まず、Hybridization Buffer 16 μ L (0.9M NaCl, 20mM Tris-HCl pH7.2, 0.01% Sodium Dodecyl Sulfate(SDS), Block Ace 25% (雪印乳業), Formamide) を切片上にスポットし、さらに 2 μ L (250ng のプローブを含む) のプローブ溶液を加えてハイブリダイズした。ハイブリダイゼーションは Table1 に示した条件で 2 時間行った。未付着プローブの洗浄は Hybridization Buffer を用いてハイブリダイゼーション温度より 2°C 高い条件で 20 分間行った。試料中の全微生物数を計測するために 4',6-diamidino-2-phenylindole (以後 DAPI と略す) 染色を行った (6.25mg-DAPI $\cdot$ L⁻¹, 1M NaCl, 0.1M Tris pH7.2, 5min)。

DAPI 染色及び FITC、TRITC を標識としたプローブで染色した試料は落射蛍光顕微鏡 (Olympus BX60-FLA) を用いて観察した。DAPI 細胞の観察は Olympus フィルターセット WU、プローブによる染色細胞の観察は Olympus フィルターセット WIB 及び WIG を用いた。

2.4 活性試験

培養汚泥に対して、メタン生成活性 (Methane-producing activity, MPA)、プロピオン酸酸化活性、硫酸還元菌によるプロピオン酸酸化活性、及び、硫酸塩還元活性 (Sulfate-reducing activity, SRA) を評価した。活性は、何れも COD 換算として、gCOD $\cdot$ gVSS⁻¹ $\cdot$ d⁻¹ の基準で評価した。培養汚泥を培地 (リン酸緩衝液、無機塩、還元剤、酸化還元指示薬等を含む) 中で嫌氣的に分散処理し、122mL バイアル瓶に分注した。バイアル瓶にテスト基質である酢酸、水素、プロピオン酸を添加し、これを 35°C 恒温ロータリーシェーカーに装着した。バイアル瓶中のガスの量と組成、有機物濃度、硫酸塩濃度を経時的に測定した (詳細は : Yamaguchi ら¹⁾ の方法を参照)。また、添加硫酸塩濃度は、微生物群の分解能を考慮して適宜 100 あるいは 300 mgSO₄²⁻-S $\cdot$ L⁻¹ vial liquid とした。メタン生成菌の代謝阻害剤としてクロロホルムを添加するときは 5 mg $\cdot$ L⁻¹ vial liq. となるように注入した。硫酸還元菌によるプロピオン酸酸化活性は、バイアル瓶に 110 ~ 50 kPa の水素を充填し、プロピオン酸資化性水素生成性酢酸生成菌の代謝を阻害して求めた。

2.5 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, TCD, Unibeads-C, 60/80, Col.Temp. 145 °C, Carrier press. 1.60 kgf $\cdot$ cm⁻² Ar), 揮発性脂肪酸 (ガスクロマトグラフ, FID, Thermon-3000, 5%, 60/80, Col.Temp. 130°C, Carrier press. 0.75 kgf $\cdot$ cm⁻² N₂), 硫酸塩 (イオンクロマ

トグラフ, CDD, Shimpack-A1, Col.Temp. 40℃, Mobile phase: Potassium hydrogen phosphate 2.5 mM)。その他の分析法は、下水試験方法¹⁹⁾ によった。

3. 結果と考察

3.1 リアクターの運転結果

Fig.2にRun1におけるCODと硫黄の物質収支を示す。低硫酸塩系Run1は、COD容積負荷を15 kgCOD・m⁻³・d⁻¹に設定して、COD除去率80%以上を保持しつつ2年以上運転した。Run1では、回収CODの80%がメタンに対応し、メタン発酵の卓越した反応器であったことがわかる。また、硫酸塩還元によるCOD除去の比率は2.0 ± 1.5%と低いレベルであった。

高硫酸塩系のRun2とRun3は、COD容積負荷を2.0kgCOD・m⁻³・d⁻¹に設定して運転を行った。高硫酸塩系のリアクターでは、運転後1週間程度でメタンが生成されなくなったことから、COD除去は硫酸塩還元反応によってのみ行われるようになったと考えられる。高硫酸塩系(1000 mgSO₄²⁻・S・L⁻¹, 2000 mgCOD・L⁻¹)で10週間運転した反応器では(Run-3と全く同条件)メタン生成が停止し、槽内にはCOD成分として主に酢酸が蓄積していた。この時の全除去CODは4割であり、対応して除去硫酸塩も4割となった。この時の硫化物濃度は、全硫化物で200mgS・L⁻¹、溶解性で160mgS・L⁻¹、および硫化水素とし40mg・L⁻¹であった(Run1では全硫化物で5mgS・L⁻¹以下であった)。本実験で運転した高硫酸塩系リアクターと同じ運転条件でUASBリアクターを3年間運転した。その結果、酢酸資化性硫酸還元菌が増殖するに従ってCOD除去は硫酸塩還元反応によってのみ行われるようになり、最終的にCOD除去率は80%程度にまで達した。

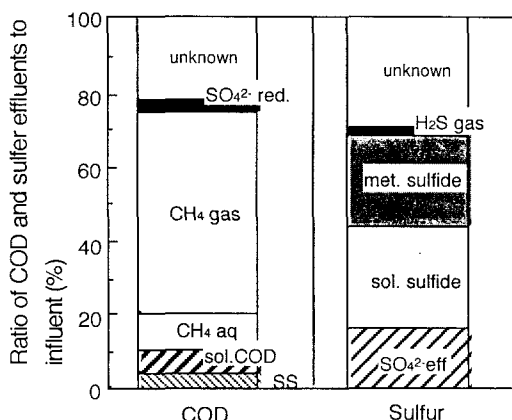


Fig.2 COD and sulfur mass balance during a UASB reactor operation; COD: COD reduced by sulfate reduction, methane gas, dissolved methane, soluble COD, suspended solid as COD; Sulfur: hydrogen sulfide gas, metallic sulfide, soluble sulfide, sulfate in the effluent.

3.2 グラニュールの活性試験

Table2は、メタン生成活性、硫酸塩還元活性、プロピオン酸酸化活性をRun1について評価した結果、およびRun2とRun3と同様の運転条件で3年間連続培養した汚泥を評価した結果¹⁾を示す。低硫酸塩系のRun1では、酢酸、水素ともに運転期間を通してメタン生成活性のほうが硫酸塩還元活性よりも卓越していた。しかし、水素基質では硫酸塩還元活性は、メタン生成活性の6分の1程度の活性レベルであった。硫酸還元菌によるプロピオン酸酸化活性は、水素生成性酢酸生成菌とメタン生成菌共生系による活性の1.3倍のポテンシャルを発現した。また、プロピオン酸酸化に対応して酢酸が蓄積した。一方、高硫酸塩培養汚泥では、酢酸・水素除去者として硫酸塩還元細菌が卓越し、プロピオン酸の分解は、硫酸還元菌によってのみ行われた。

Run1のように低硫酸塩負荷で硫酸還元菌がプロピオン酸分解に寄与した理由としては、硫酸還元菌が発酵によって増殖したことが考えられる。これまで不完全酸化型のプロピオン酸資化性硫酸還元菌としては、*Desulfobulbus propionics*、*Desulfobulbus enlogate*などが報告されている²⁰⁾。Tasakiら²¹⁾は、*Desulfobulbus propionics* strain MUDが硫酸塩の存在しない環境下でアルコールやアルデヒドを炭素源として増殖できることを報告している。活性試験において、酢酸資化性硫酸還元活性がゼロであったこと、プロピオン酸の分解に伴って酢酸が蓄積したことから、本実験Run1で増殖した硫酸還元菌としては、不完全酸化型のプロピオン酸資化性硫酸還元菌と判断できる。この

ため、後述のFISH法によるグラニүүл内の微生物構造解析では、不完全酸化型硫酸還元菌の増殖に注目した。また、高硫酸塩培養汚泥の水素利用硫酸還元ポテンシャルが低硫酸塩系よりも低下した原因は、高分子基質が硫酸還元菌に利用されることにより水素の生成が減少したものと考えられる。

Table2 Activities of cultivated sludge grown in Run 1 (sulfate low), and in a reactor (sulfate high) which reported by Yamaguchi *et al*¹⁾ previously.

Sludge	Activities (gCODVSS ⁻¹ · d ⁻¹)					
	Methane-production		Sulfate-Reduction		Propionate-oxidation	
	Acetate	CO ₂ /H ₂	Acetate	Hydrogen	by PRB ^{a)}	by SRB ^{b)}
Run 1 (sulfate low)	1.8	2.1	0.022	0.36	0.084	0.11
Run 3 ^{c)} (sulfate high)	0.14	0.00	0.27	0.26	0.02	1.52

a) by proton-reducing acetogenic bacteria, b) by sulfate-reducing bacteria. Chloroform was added, and hydrogen partial pressure was kept 130-50 kPa during the activity test., c) data on granules adapted for over 3 year under the condition as same as Run 3.

3.3 グラニүүл内での微生物の空間分布

Fig.3にRun1のグラニүүлの切片にプローブARC915、Mb1174、Dsb660とDAPIによって二重染色したものを、落射蛍光顕微鏡のU励起とG励起視野で観察した結果を示す。U励起視野ではDNAがDAPIで染色されたすべての細胞が観察されるに対し、G励起視野ではプローブによって検出される細胞だけが観察される。グラニүүлの切片は約50μm厚さの表層と内部層から構成されており、DAPI染色による観察でもこの領域で微生物叢が大きくことが観察された (**Fig.3(a)**)。古細菌を検出するARC915プローブの信号はグラニүүл表層の周辺部と内部層全体に存在しており、内部層に密集している古細菌はその形態からグラニүүлの核となる *Methanosaeta* と考えられる (**Fig.3(a)-G**)。一方、*Methanobacteriase*を検出するMb1174の信号は主にグラニүүл表層の周辺部で強く確認された。 (**Fig.3(b)-G**)。水素資化性硫酸還元菌である *Desulfovibrio* とプロピオン酸を資化する *Desulfohalobus* を検出するSRB385の信号はグラニүүл表層部に点在していた。また、*Desulfohalobus* 属だけを検出するDsb660も表層部に確認できた (**Fig.3(c)-G**)。

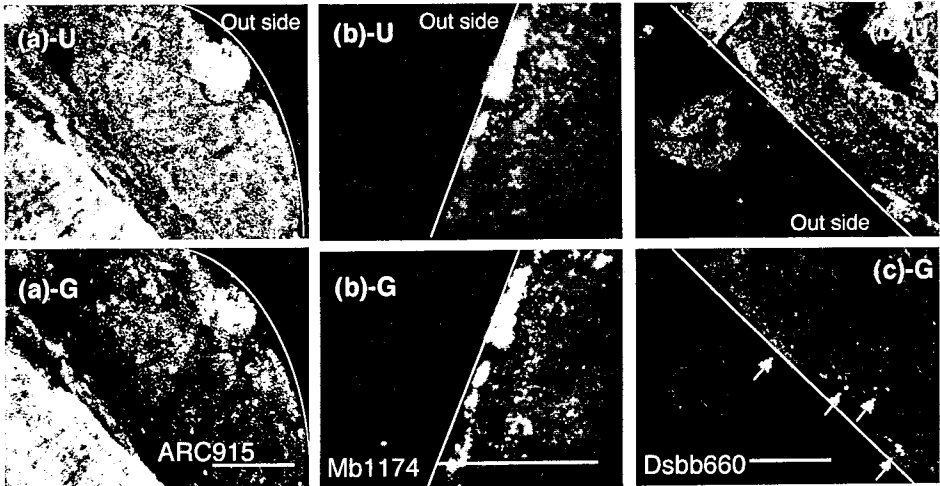


Fig.3 In situ analysis of sections of granules in Run 1 by FISH technique with probe ARC915 (a), Mb1174 (b) and Dsb660 (c), respectively. The section were simultaneously stained with the TRITC-labeled probes and DAPI, and viewed by epifluorescence microscopy with a filter set of U-excitation and G-excitation. Scale bar, 20μm.

グラニュール外部から拡散してくる基質は、グラニュール表層によって酸生成および酢酸生成が進行する。Mb1174とSRB385で染色される細胞がこの領域に検出されたが、酸生成段階で生成する水素は*Methanobacteriase*や水素資化性硫酸還元菌によって速やかに消費されていたと判断できる。硫酸還元菌の基質ではエネルギー的に水素を資化する場合が最も有利であることから²²⁾、*Desulfovibrio*が水素を利用していたことが考えられる。一方、プロピオン酸および水素を資化できる*Desulfobulbus*²³⁾もグラニュールの表層部にわずかに存在していた。3.2でも述べたようにRun1では硫酸還元菌によるプロピオン酸酸化ポテンシャルが酢酸生成菌とメタン生成菌共生系の1.3倍であり、Run1における*Desulfobulbus*は硫酸塩制限下で基質からの中間生成物を発酵的に利用していたと推測できる。

Fig.4にRun2のグラニュール切片にプローブSRB385、Dsb660とDAPIによって二重染色したものを、U励起及びG励起視野で観察した結果を示す。高硫酸塩条件にシフトすると、グラニュールの表層部が崩壊する傾向にあった。この表層部内部にはプローブDsb660で検出される*Desulfobulbus*のコロニーが多数存在するようになった (Fig.4(a)-G)。また、プローブSRB385の信号は、*Desulfobulbus*と思われるコロニー以外に検出する細胞はほとんどなくなり、*Desulfovibrio*は減少傾向にあった (Fig.4(b)-G)。実際に高硫酸塩条件では水素利用硫酸還元活性の値が低下した (Table2)。一方、Run1で表層部に優占していた*Methanobacteriase*はまったく検出されなかった (データ非表示)。グラニュール内部層ではRun1とほとんど変化せず、*Methanosaeta*と思われるARC915で検出される菌が依然として多数を占めていた (データ非表示)。

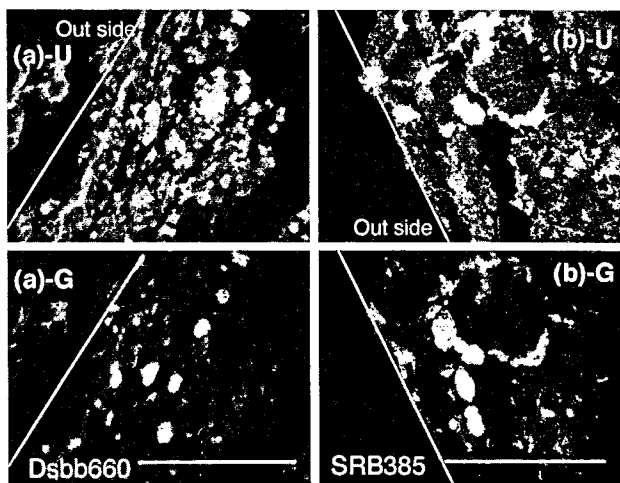


Fig.4 In situ analysis of sections of granules in Run 2 by FISH technique with probe Dsb660 (a) and SRB385 (b), respectively. Scale bar, 20µm.

Fig.5にRun3のグラニュール切片にプローブARC915、SRB385及びDsb660とDAPIによって二重染色したものを、U励起及びG励起視野で観察した結果を示す。Run2で崩壊傾向にあったグラニュール表層は新たな微生物層が形成され、平滑な表面を呈していた。この表層にはARC915で染色される菌はほとんど存在していなかった (Fig.5(a))。また、内部層の*Methanosaeta*形態の菌もわずかにコロニーを形成しているにすぎなかった (データ非表示)。一方、Run2では表層のやや内部に大型のコロニーを形成した*Desulfobulbus*は、グラニュール表面を覆うように増殖していた (Fig.5(b))。また、完全酸化型の硫酸還元菌を検出するプローブSRB385dの信号は、Run1とRun2では全く確認されなかったが、Run3ではグラニュール内部に点在する様子が確認されるようになった (Fig.5(c))。

近年、*Syntrophobacter fumaroxidans*のような共生プロピオン酸酸化細菌が硫酸塩利用能を有していることが報告されている²⁴⁾。しかし、Table 2において高硫酸塩系 (Run3) の水素生成性酢酸化菌のプロピオン酸酸化活性が、硫酸還元菌のそれに比べて低く発現しなかった。この結果から、高濃度硫酸塩系の環境下では*Desulfobulbus*のような硫酸還元菌が優勢となってプロピオン酸分解に寄与することが推察できる (実際にRun3では*Desulfobulbus*が優位に観察された)。硫酸還元菌とメタン生成菌の酢酸をめぐる基質競合は、pHに強く依存し²⁵⁾、長期間の運転によって硫酸還元菌が優占するという報告がある^{3, 11)}。本研究のRun3では、プローブSRB385dで染色されるcoccusまたはsarcina状の細胞が確認された。Rabusら¹⁶⁾はSRB385 dで*Desulfobacter*や*Desulfococcus*等の多くの種の完全酸化型の硫酸還元菌が検出されたと報告している。これら完全酸化型硫酸還

元菌の多くの菌は高い塩濃度条件で生育する海洋性細菌である²⁰⁾が、*Desulfococcus multi-*
vorans が sewage digester で、*Desulfococcus biacutus* が anaerobic digester sludge で生
 育するという報告がある²⁶⁾。本実験結果ではSRB385dが検出した細胞がどの種に属するものか
 は判断できないが、高硫酸塩条件では10週間程度で完全酸化型の硫酸還元菌が出現することが確
 認できた。

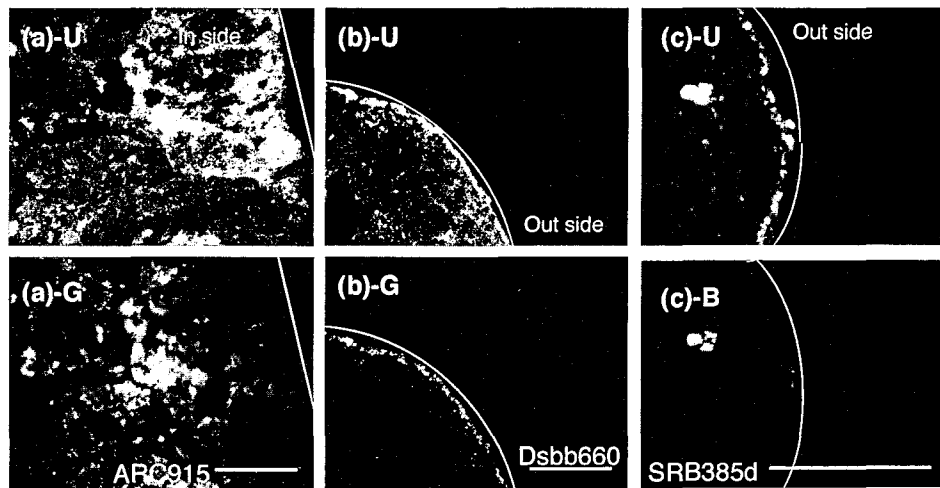


Fig.5 In situ analysis of sections of granules in Run 1 by FISH technique with TRITC-labeled probe ARC915 (a), Dsbb660 (b) and FITC-labeled SRB385d (c). The section were simultaneously stained with the probes and DAPI, and viewed by epifluorescence microscopy with a filter set of U-excitation, G-excitation and B-excitation. Scale bar, 20 μ m.

低硫酸塩条件で培養したグラニュールを高硫酸塩条件に馴致する場合、グラニュール内の微生物構造の変化は次のようにまとめられる。低硫酸塩条件ではプロピオン酸を発酵的に利用していた *Desulfobulbus* はじめ有機酸利用の硫酸還元菌が活発に硫酸塩還元反応を開始し、水素の生成が停止する。硫化物阻害に敏感とされる *Methanobacteriase*^{27, 28)} および水素資化性硫酸還元菌 *Desulfovibrio* が消失し、グラニュール表層部が崩壊する。酢酸より高次の有機酸等を資化する硫酸還元菌は新たなグラニュール表層を形成する。グラニュール内部に大型のコロニーを形成して存在していた *Methanosaeta* は活性を失い緩やかに消失し始める。それに代わってグラニュール内に蓄積した酢酸を資化する硫酸還元菌がその内部に出現する。

4. まとめ

以上本研究で得られた結果をまとめると以下のようになる。

- 1) メタン生成の卓越している低硫酸塩条件ではグラニュール表層部には *Methanobacteriase*、グラニュール内部には *Methanosaeta* 属が優占していた。また、グラニュール表層部には *Desulfovibrio* 属と *Desulfobulbus* 属がわずかに点在していた。この条件ではSRBによるプロピオン酸酸化ポテンシャルが比較的大きく存在していた。これは、*Desulfobulbus* 属が発酵的に生育してプロピオン酸分解に寄与したためと考えられる。
- 2) 高硫酸塩条件にシフトすると、グラニュールの表層部の崩壊が進行し、表層部から *Methanobacteriase* と *Desulfovibrio* が消失するとともに *Desulfobulbus* 属のコロニーが出現した。
- 3) 10 週間の高硫酸塩条件への馴致の結果、グラニュールの最表面には *Desulfobulbus* 属が優占し、新しい表層部が形成された。また、グラニュール内部には完全酸化型の硫酸還元菌が出現した。

謝 辞

Desulfobacter latus sp. は東京都立大学理学部 助教授 福井学氏より分与していただきました。記して謝意を表します。

参考文献

- 1) Yamaguchi, T., H. Harada, T. Hisano, S. Yamazaki, I-Cheng Tseng (1999) Process Behavior of UASB Reactor Treating a Wastewater Containing High Strength Sulfate, *Wat. Res.*, **33** (印刷中) .
- 2) Clancy, P.B., N. Venkataraman and L.R. Lynd (1992) Biochemical Inhibition of Sulfate Reduction in Batch and Continuous Anaerobic Digesters, *Wat. Sci. Tech.*, **25**, 51-60.
- 3) Harada, H., S. Uemura, and K. Momono, (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.
- 4) Hilton, B.L., and J. A. Oleszkiewicz (1987) Anaerobic Treatment of High Strength, High Sulfate Waste, 41st Purdue University Industrial Waste Conference Proceedings, Purdue University, Lewis Publishers, Chelsea, MI, 156-166.
- 5) Lettinga, G. and L.W. Holshoff P. (1991) UASB-Process Design for Various Type of Wastewaters, *Wat. Sci. Tech.*, **24**, 87-107.
- 6) 原田秀樹 (1997) 新規の多段型高温 UASB リアクターによる超高速廃水処理装置の現実化～アルコール蒸留廃水の高速処理特性と高濃度生物保持性能の評価～、環境工学研究論文集、**34**, 327-336.
- 7) 今井剛、浮田正夫、関根雅彦、中西弘、深川勝之 (1997) UAHB(Uplow Anaerobic Hybrid Blanket)法及び2段階接触酸化法を組み合わせた嫌気好気循環プロセスによる発酵廃液の処理に関する研究、環境工学研究論文集、**34**, 203-210.
- 8) 多川 正、大橋晶良、原田秀樹 (1998) 新規の多段型高温 UASB リアクターによる高濃度脂質含有廃水の嫌気性処理特性、環境工学研究論文集、**35**, 51-60.
- 9) Syutsubo K., H. Harada, A. Ohashi and H. Suzuki (1997) An Effective Start-Up of Thermophilic UASB Reactor by Seeding Mesophilically-Grown Granular Sludge, *Proc. of The 8th International Conference on Anaerobic Digestion*, Vol.1, 388-396.
- 10) Widdel, F. and Bak, F. (1991) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, in *The Prokaryotes* 1991 4th ed., 3352-3392.
- 11) Yoda, M., Kitagawa, M. and Miyaji, Y. (1987) Long term competition between sulfate-reducing and methane-producing bacteria for acetate in anaerobic biofilm, *Wat. Res.*, **21**, 1547-1556.
- 12) Harmsen, H. J. M., Akkermans, A. D. L., Stams, A. J. M. & de Vos, W. M. (1996). Population dynamics of propionate oxidizing bacteria under methanogenic and sulfidogenic conditions in anaerobic granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2163-2168.
- 13) Stahl, D.A., B. Flesher, H.R. Mansfield and L. Montgomery (1988) Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1079-1084.
- 14) Raskin, L. (1987) Structural and functional analysis of anaerobic biofilm communities: an integrated molecular and modeling approach, Ph.D thesis, Univ. Illinois at Urbana-Champaign.
- 15) Amann, R.I., B.J. Binder, R.J. Olson, S.W. Chisholm, R. Devereux and D.A. Stahl (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1919-1925.
- 16) Rabus, R., M. Fukui, H. Wilkes and F. Widdel (1996) Degradative capacities and 16S rRNA-targeted whole-cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3605-3613.
- 17) Devereux, R., M.D. Kane, J. Winfrey and D.A. Stahl (1992) Genus- and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria, *System. Appl. Microbiol.* **15**, 601-609.
- 18) Amann, R.I. (1995) In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.3.6: 1-15, Kluwer Academic Publishers in the Netherlands.
- 19) 社団法人日本下水道協会, 下水試験方法 1984 年版 .
- 20) Widdel, F. and Bak, F. (1991) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, in *The Prokaryotes* 1991 4th ed., 3352-3392.
- 21) Tasaki, M., Y. Kamagata, K. Nakamura, and E. Mikami (1992) Propionate Formation from Alcohols or Aldehydes by *Desulfobulbus propionicus* in the Absence of Sulfate, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **73**, No.4, 329-331.
- 22) Yamaguchi, T., H. Harada, and I-Cheng Tseng (1997) Competitive Exclusion of Methane-Producing Bacteria by Sulfate-Reducing Bacteria in Anaerobic Degradation of Long-Chain Fatty Acids, *Proceedings of International Conference of Anaerobic Digestion*, **2**, 62-370.
- 23) Widdel, F. and N. Pfennig (1982) Studies on Dissimilatory Sulfate-Reducing Bacteria that Decompose Fatty Acids: II. Incomplete Oxidation of Propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov. sp. nov., *Arch Microbiol.* **131**, 360-365.
- 24) Harmsen, H.J.M., B.L.M. van Kuijk, C.M. Plugge, A.D.L. Akkermans, W.M. De Vos, and A.J.M. Stams (1998) *Syntrophobacter fumaroxidans* sp. nov., a syntrophic propionate-degrading sulfate-reducing bacterium, *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48**, 1383-1387.
- 25) Visser, A., L.W. Hulshoff pol, G. Lettinga (1996) Competition of methanogenic and sulfidogenic bacteria, *Wat. Sci. Tech.*, **33**(3), 99-110.
- 26) Postgate, J.R (1984) *The Sulphate-reducing Bacteria*, 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge.
- 27) Zehnder, A.J.B. and K. Wuhrmann (1977) Physiology of a Methanobacterium Strain AZ, *Arch. Microbiol.*, **111**, 199-205.
- 28) Grotenhuis, J. T. C., M. Smit, C. M. Plugge, X. Yuansheng, A. A. M. Van Lammeren, A. J. M. Stams and A. J. B. Zehnder (1991) Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrate, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1942-1949.