

(34)

嫌気好気活性汚泥による鉄の酸化還元と

嫌気条件での微生物相互作用

Biological Iron Oxidation-Reduction and Effects on Metabolism in the Anaerobic Conditions in an Anaerobic-Oxic Activated Sludge

池本良子*,

小森友明*,

宮里直樹**

Ryoko YAMAMOTO-IKEMOTO, Tomoaki KOMORI, Naoki MIYAZATO

ABSTRACT; Ferric and ferrous iron contents in an activated sludge were examined. Total iron in the sludge was 10 mg/gMLSS and 60% of iron was accumulated as Fe(III). Iron oxidation occurred in the activated sludge, and the iron oxidation rate increased, when the initial iron concentration increased. Biological iron reduction also occurred in the activated sludge and the iron reducing rate could be described using the Monod equation. It was estimated that iron reducing bacteria utilize hydrogen. Sulfur oxidation and iron oxidation occurred simultaneously and they competed for oxygen. Iron oxidation and sulfur oxidation activities were almost the same. Sulfate reduction and iron reduction also occurred simultaneously. Iron reduction outcompeted with sulfate reduction for hydrogen and propionate like organic matter. On the other hand, sulfate reduction stimulated the iron reduction, since chemical reduction by produced sulfur occurred simultaneously. Denitrification suppressed iron reduction and sulfate reduction. These results were explained thermodynamically. Poly-P release was also suppressed under the anoxic conditions.

KEYWORDS:: activated sludge; iron reduction; sulfate reduction; iron oxidation, sulfur oxidation, denitrification; poly-P accumulation.

1. 緒言

標準活性汚泥法は曝気条件であることから、従来、嫌気呼吸を行う硫酸塩還元細菌や鉄還元細菌の役割については重要視されてこなかった。しかし、近年、硫酸塩還元細菌が好気条件でも存在することが明らかになってきており¹⁾、また、活性汚泥法に嫌気部を設ける処理方式が一般化してきたことから、これらの細菌の重要性が高まってきた。筆者ら^{2),3)}は、硫酸塩還元細菌が活性汚泥中で活性を持って高濃度の存在すること、これらの細菌の増殖が糸状性硫黄酸化細菌の増殖に起因するバルキングの原因になっていることを報告した。さらに、嫌気好気活性汚泥法において、硫酸塩還元がPoly-P蓄積細菌によりりんの放出に影響を与えていることも報告している⁴⁾。これらのことから、硫酸塩還元のコントロールが活性汚泥制御のために重要であると考えられる。

一方、底泥や土壌中で硫黄の酸化還元とともに、鉄の酸化還元が起こっていることはよく知られている。鉄酸化細菌については、多くの報告があるが、鉄還元細菌についての知見は非常に少ない。Nealsonら⁵⁾は、鉄還元がpoly-P蓄積細菌によりりんの放出を阻害することを報告しており、Bosque-Hamiltonら⁶⁾は活性汚泥中の鉄還元が硫酸塩還元に影響を与えていることを報告している。鉄還元は硫酸塩還元細菌よりも熱力学的に有利であることから、鉄還元細菌も活性汚泥中に存在し、鉄酸化細菌とともに鉄酸化還元サイクルを形成していることは十分に考えられる。また、沈降性改善のために鉄系凝集剤を添加すると、鉄還元が優先化して硫酸塩還元が抑制されることを報告されている⁷⁾。以上のことから、活性汚泥中の鉄の酸化還元を明らかにすることは、バルキング抑制と栄養塩除去に極めて重要である。

*金沢大学工学部土木建設工学科 (Dept. of Civil Engineering, Kanazawa University) ,

**金沢大学工学部自然科学研究科博士前期課程 (Master course Student at Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University)

鉄塩はきわめて水に溶けにくいことから、流入下水中に高濃度に存在することは考えにくい、活性汚泥ブロックには鉄が含有されていることが報告されている⁹⁾。活性汚泥中に蓄積された鉄が、酸化還元されると考えられる。本研究では、まず最初に活性汚泥中の鉄塩を鉄(III)と鉄(II)に分離して定量し、鉄の存在形態を明らかにした。次に、鉄酸化と硫酸化の相互作用を調べ、最後に鉄還元と硫酸塩還元、脱窒、りん放出の相互作用を検討した。

2. 実験方法

2. 1 実験に用いた活性汚泥とその鉄含有量の測定方法

嫌気好気法で運転を行っている金沢市A水質浄化センターの返送汚泥を採取し、実験室に持ち帰って実験に供した。実験期間は1998年年度および1999年度の9～1月であり、降雨中および降雨後1日は採取を見合わせた。鉄含有量は、汚泥を超音波破壊機で5分間破壊した後、原子吸光光度法により測定した。鉄(III)および鉄(II)は、塩酸により汚泥ごとpHを1.0以下まで下げて鉄を溶出させた後、メンブレンフィルターを用いてろ過し、イオンクロマトグラフ遷移金属測定装置により、分離定量を行った。

2. 2 鉄および硫黄の酸化還元回分実験の方法

1) 好気条件の回分実験の方法

活性汚泥を遠心分離し、基質を添加して最終MLSS2000mg/Lとなるように調整した後、曝気を開始して、経時的に採水した。採取した混合液は、0.2μmのメンブレンフィルターでろ過し、硫酸塩・硝酸塩・亜硝酸塩（イオンクロマトグラフ）、有機酸・リン酸（イオンクロマトグラフ有機酸分析装置）、TOC（TOC分析計）の分析を行った。別に、2-1と同様な方法で塩酸により汚泥ごとpHを1.0以下まで下げて鉄を溶出させた後、鉄(III)とFe(II)の分離定量を行った。Table 1に添加した基質濃度をまとめて示した。実験に用いた基質は、硫化ナトリウムまたは塩化第二鉄もしくはその両者を実験基質に添加したものである。活性汚泥を添加しないブランク実験も同時に行った。実験シリーズ1は硫化物濃度を一定として鉄(II)濃度を変化させたものであり、実験シリーズ2は鉄(II)濃度を一定として硫化物濃度を変化させた実験である。

2) 嫌気条件の回分実験

乾燥重量で0.1gの活性汚泥を遠心分離し、容積100mLの腐乱瓶に投入した後、基質を満たして気泡が入らないように密栓する。同様な腐乱瓶を複数個作成し、経時的に1本ずつ開栓して分析に供した。分析項目は、好気条件と同様である。実験に用いた基質をTable 2にまとめて示した。電子受容体は硫酸塩、鉄(III)、硝酸塩を組み合わせたものであり、電子供与体として、ペプトン、酢酸、プロピオン酸、水素を用いている。また、硫酸塩還元細菌の阻害剤としてモリブデン酸ナトリウムを用いた。実験シリーズ3は鉄および硫酸塩濃度の影響を調べるために、添加硫酸塩および鉄(III)濃度を変化させた実験である。実験シリーズ4は

硫酸塩還元により生成された硫化物による鉄還元を検討するために、硫化物を添加して行った実験である。実験シリーズ5は、鉄還元細菌の利用基質を検討するために様々な基質を用いて鉄還元実験を行ったものであり、実験シリーズ6は鉄還元と硫酸塩還元の基質競合を調べるために、硫酸塩と鉄(III)共存下で様々な基

Table 1 Substrates using in the aerobic batch experiments.

(a) Series 1											
Exp.O1	S(II) (mg/L)	Fe(II) (mg/L)	Sludge (g/L)	Exp.O4	S(II) (mg/L)	Fe(II) (mg/L)	Sludge (g/L)	Exp.O11	S(II) (mg/L)	Fe(II) (mg/L)	Sludge (g/L)
O1-1	7.3	0	0	O4-1	7.3	0	0	O11-1	0	0	0
O1-2	7.3	0	2	O4-2	7.3	0	2	O11-2	0	0	2
O1-3	7.3	4.4	2	O4-3	7.3	22	2	O11-3	0	4.4	2
O1-4	7.3	8.8	2	O4-4	7.3	44	2	O11-4	0	8.8	2
O1-5	7.3	33	2	O4-5	7.3	110	2	O11-5	0	33	2

(b) Series 2											
Exp.O2	S(II) (mg/L)	Fe(II) (mg/L)	Sludge (g/L)	Exp.O3	S(II) (mg/L)	Fe(II) (mg/L)	Sludge (g/L)	Exp.O5	S(II) (mg/L)	Fe(II) (mg/L)	Sludge (g/L)
O2-1	0	22	0	O3-1	0	22	0	O5-1	0	44	0
O2-2	0	22	2	O3-2	0	22	2	O5-2	4.3	44	2
O2-3	1.4	22	2	O3-3	1.4	22	2	O5-3	15.6	44	2
O2-4	2.8	22	2	O3-4	2.8	22	2	O5-4	35.6	44	2
O2-5	7.3	22	2	O3-5	7.3	22	2	O5-5	15.5	44	2
O2-6	15.5	22		O3-6	15.5	22					

Several Concentration of Na_2S and FeCl_2 were added in the mineral substrate consisted of NaHCO_3 (23.7 mg/L), KCl (58 mg/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (17.3 mg/L) and KH_2PO_4 (30.7 mg/L).
S(II): Na_2S (concentration mgS/L) Fe(II): FeCl_2 (Concentration, mgFe/L)

Table 2 Substrate using in the anaerobic batch experiments.

(a) Experimental Series 3					(b) Experimental Series 4					(d) Experimental Series 6					(e) Experimental Series 7				
	Base	SO ₄	Fe(III)	Mo		Base	SO ₄	Fe(III)	S(II)		Base	SO ₄	Fe(III)	Mo		Base	SO ₄	Fe(III)	NO ₃
A1-1	S	85	0		A13-1	S	85	44		A27-1		33	50	0	A21-1	S	0	0	0
A1-2	S	85	21		A13-2	S	85	44	7.3	A27-2		33	50	48	A21-2	S	0	21	0
A1-3	S	85	42		A13-3	S	85	44	7.3	A28-1	Pro	33	0	0	A21-3	S	0	0	219
A1-4	S	85	105		Blank					A28-2	Pro	33	50	0	A21-4	S	0	21	219
A2-1	S	0	21							A28-3	Pro	33	50	48	A22-1	S	33	0	0
A2-2	S	50	21							A29-1		66	0	0	A22-2	S	33	100	0
A2-3	S	100	21							A29-2		66	50	0	A22-3	S	33	0	22.2
A2-4	S	200	21							A29-3		66	50	48	A22-4	S	33	100	22.2
A3-1	S	85	0							A30-1	Pep	33	0	0	A23-1	S	0	0	0
A3-2	S	0	21							A30-2	Pep	33	50	0	A23-2	S	0	100	0
A3-3	S	85	21							A30-3	Pep	33	50	48	A23-3	S	0	0	22.2
A3-4	S	85	21	48						A31-1	H ₂	33	0	0	A23-4	S	0	100	22.2
A4-1	S	85	0							A31-2	H ₂	33	50	0	A24-1	S	0	0	0
A4-2	S	85	2.1							A31-3	H ₂	33	50	48	A24-2	S	0	50	0
A4-3	S	85	8.4							A32-1	N ₂	33	0	0	A24-3	S	0	0	22.2
A11-1	S	0	4.1							A32-2	N ₂	33	50	0	A24-4	S	0	50	22.2
A11-2	S	0	8.3							A32-3	N ₂	33	50	48	A25-1	S	33	0	0
A11-3	S	0	16.7							A33-1	S	66	0	0	A25-2	S	33	100	0
A11-4	S	0	41.3							A33-2	S	66	50	0	A25-3	S	33	0	22.2
A12-1	S	0	10							A33-3	S	66	50	48	A25-4	S	33	110	22.2
A12-2	S	0	21							A34-1	Ace	66	0	0	A26-1	S	0	0	0
A12-3	S	0	41							A34-2	Ace	66	50	0	A26-2	S	0	50	0
A12-4	S	0	83							A34-3	Ace	66	50	48	A26-3	S	0	0	220
A12-5	S	0	165												A26-4	S	0	50	220

I: Mineral substrate consisted of NaHCO₃ (23.7 mg/L), KCl (58 mg/L), CaCl₂·2H₂O (17.3 mg/L) and KH₂PO₄ (30.7 mg/L).
 S: Organic substrate consisted of CH₃COOK (66.7 mg/L), polypeptone (133.3 mg/L), Yeast Extract (13.3 mg/L) and Mineral substrate. Ace: CH₃COONa (100mg as Acetate/L), Pro: CH₃CH₂COONa (100mg as propionate/L), Pep: polypeptone (133.3 mg/L), H₂: Purged with H₂ gas, N₂: Purged with N₂ gas, SO₄: (concentration mgSO₄/L), S(II): Na₂S (concentration mgS/L), Fe(III): FeCl₃ (Concentration, mgFe/L), Mo: Sodium Molybdate (48 mgMo/L),

質を組み合わせたてで行った実験である。実験シリーズ7は嫌気条件と硝酸を添加した無酸素条件を組み合わせ脱窒との相互作用を検討した実験である。

3 実験結果と考察

3. 1 活性汚泥中の鉄含有量

実験に用いた活性汚泥中には常に糸状性細菌Type 021Nが検出されたが、その現存量は0.5-1x10³cm/mgMLSSで、SVIC（希釈SVI）は100-200mL/gと沈降性は良好な状態を保っていた。汚泥フロックは150-250μmとやや大きめであった。

流入下水および曝気槽混合液をろ過して鉄イオンの測定を行ったが、ろ液中には鉄イオンが検出されることはなかった。これは、鉄(II)、鉄(III)ともにpHが中性付近ではほとんどが不溶性の鉄化合物として存在するために、活性汚泥微生物とともにSSの方に含まれてしまうためと考えられる。そこで、汚泥ごとpHを下げて、鉄塩を鉄イオンとして溶出させた後、汚泥と分離して検出する方法を検討した。実験に先立ち、pHの値を決めるために塩化鉄(II)および塩化鉄(III)を活性汚泥に添加して、その回収率を検討した。その結果、鉄(II)はpH3以下でほぼ回収可能であるが、鉄(III)は、pH=3では50%程度しか回収できず、pHを1以下にすると、ほぼ回収できることがわかったので、pH1以下にすることとした。採取してきた活性汚泥の鉄(II)、および鉄(III)濃度をTable3に示した。活性汚泥中には鉄(III)が鉄(II)の3.6倍検出された。下水は曝気槽に入るまでは嫌気条件であるために、鉄塩は鉄(II)の状態での流入してくると

Table 3 Iron Contents in the anaerobic-oxic activated sludge

Date	Total Iron (mg/gMLSS)	Fe(II) (mg/gMLSS)	Fe(III) (mg/gMLSS)	Others (mg/gMLSS)
1999.9.8	11.7	0.0	8.4	3.3
1999.9.20	8.5	2.0	5.6	0.9
1999.10.6	13.7	1.4	12.1	0.2
1999.10.18	8.8	1.6	4.7	2.45
1999.11.4	9.5	0.8	3.7	4.95
1999.11.18	10.5	1.7	9.4	-0.6
1999.11.29	12.5	2.8	7.6	2.1
1999.12.2	9.5	0.8	3.7	5
1999.12.13	9.7	3.9	6.3	-0.55
1999.12.16	10.7	2.8	7.4	0.5
1999.12.22	7.5	1.9	4.5	1.1
Average (mg/gMLSS) (%)	10.2 100%	1.8 18%	6.7 65%	1.8 17%

考えられることから、微量に流入した鉄(II)が活性汚泥内で鉄(III)に酸化され、不溶性の水酸化物またはリン酸塩として蓄積されていると考えられる。本実験では、同時に、汚泥ごと超音波破壊してフロックに存在する鉄塩を原子吸光光度法で直接測定した。その結果をTable 3に合わせて示した。直接測定により検出された活性汚泥の鉄塩含有量は約10mg/gMLSSであった。柿井⁹⁾は下水処理場活性汚泥の金属塩の含有量を調べた結果、鉄が乾燥汚泥あたり11-30 mg/g含まれることを報告し、フロックの凝集との関連を指摘した。本実験では鉄の測定の際に加水分解を行っていないので、測定された鉄含有量は報告されている鉄含有量よりやや小さかったが、フロックの凝集に役割を果たしていると考えられる。また直接測定された鉄の内、65%が鉄(III)として、18%が鉄(II)として検出されたことから、フロックに蓄積している鉄塩の約83%程度が本方法で測定可能であったと考えられる。

3. 2 活性汚泥による鉄と硫黄の酸化

Fig. 1は、好気条件の回分実験結果の典型例 (O4, O5の一部) を示したものである。汚泥を添加しないブランク試験O4-1 [S(II) 7.3mg/L, Brank] およびO5-1 [Fe(II)44mg/L, Brank] , では、硫酸塩の増加も鉄塩の変化も認められないことから、本実験条件では生物反応が関与しない硫化物、鉄(II)の酸化は無視できることがわかる。活性汚泥存在下で鉄(II)のみを添加したO5-2 [Fe(II)44mg/L] では、鉄(II)

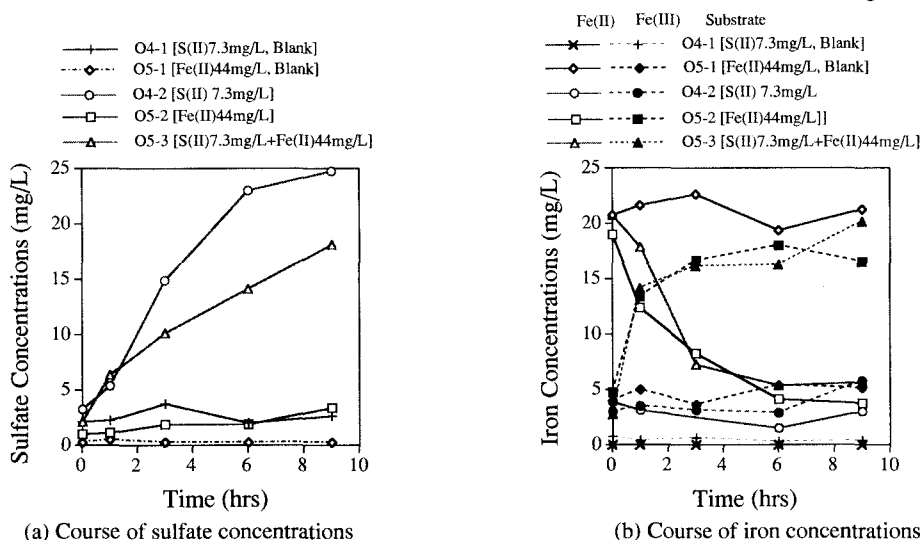


Fig. 1 Results of aerobic batch experiment. (A part of Exp. O4 and O5 in the Exp. Series 1)

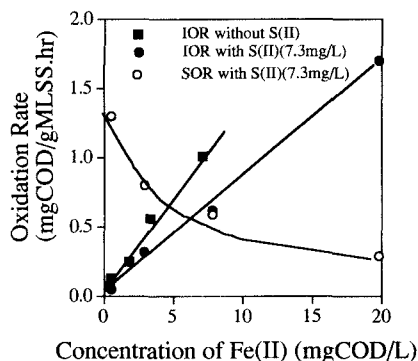


Fig. 2 Effects of ferrous iron concentrations on sulfide oxidation (Exp. O11, O1, O4 in Exp. Series 1)

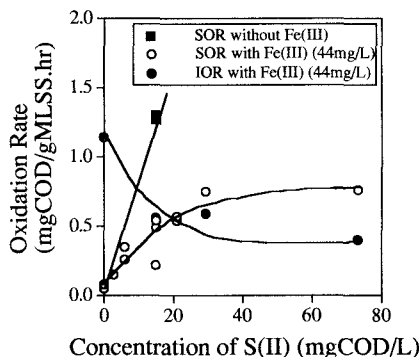


Fig. 3 Effects of sulfide concentrations on sulfide oxidation rate (SOR) and iron oxidation rate (IOR) (Exp. O2, O3, O5 in Exp. Series 2)

が速やかに鉄(III)へ酸化された。鉄酸化細菌としては、独立栄養細菌である *Ferrobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus ferrooxidans* の他、従属栄養細菌の *Sphaerotilus*, *Leptothrix*, *Gallionella* 等様々な種類の細菌が知られており¹⁰⁾、これらが活性汚泥中に存在していることが示唆された。一方、活性汚泥存在下で硫化物のみを含む基質 O4-1 [S(II) 7.3mg/L] を添加して曝気すると、硫黄酸化により硫酸塩が経時的に増大した。さらに、硫化物と鉄(II)の両者を添加した場合の O5-4 [S(II) 7.3mg/L+Fe(II)44mg/L] では、硫黄酸化と鉄酸化の両者が起こった。このとき、硫化物の酸化は鉄の共存によって抑制された。一方、鉄(II)の酸化は硫化物の共存により顕著な影響は見られず、硫化物により汚泥中に存在していた鉄(III)が鉄(II)に還元されることにより、鉄(III)の初期値が増大する傾向にあった。

Fig. 2は初期鉄(II)濃度を変化させて行った実験シリーズ1 (実験O11, O1, O4) の結果から得られた、鉄(II)初期濃度と鉄酸化初速度のおよび硫黄酸化初速度の関係を示したものである。両者の比較をしやすいようにすべてCOD濃度に換算して示してある。硫化物の共存の有無にかかわらず鉄濃度に比例して鉄酸化速度が増大していることから、鉄酸化反応を1次反応とみなすことができる。また、硫化物が存在すると硫化物の酸化が同時に起こることにより鉄酸化速度が低下することがわかる。硫黄酸化初速度は初期鉄(II)濃度が上昇すると低下する傾向にあった。Fig. 3は、実験シリーズ2 (実験O2, O3, O4) から得られた硫化物初期濃度と硫黄酸化初速度および鉄酸化初速度の関係を示したものである。硫黄酸化初速度は硫化物濃度20mgCOD/Lまでは、鉄酸化初速度と同様に直線的に増大するが、その後は一定値になった。鉄(II)が共存すると硫黄酸化速度が低下した。また、硫化物初期濃度の増加に伴って、鉄酸化初速度が減少することがわかる。以上の結果は、硫黄酸化と鉄酸化は互いに競合関係にあることを示唆している。また、硫黄酸化速度と鉄(II)酸化速度を比較すると、大きな差は認められなかったことから、本活性汚泥の鉄酸化活性も硫黄酸化活性も同程度であると考えられる。

3. 3 活性汚泥による鉄と硫黄の還元

Fig. 4は、嫌気条件の回分実験結果の典型例として実験A3の結果を示したものである。電子供与体として鉄(III)21mg/Lのみを基質に添加した場合 (A3-2) は、鉄(III)が還元されてほぼ当量の鉄(II)が生成されている。同様に硫酸塩85mg/Lのみを含む基質A3-1を用いた場合は、硫酸塩還元が主体的に起こり、汚泥中に存在した鉄(III)が鉄(II)に還元されている。さらに鉄(III)21mg/Lと硫酸塩85mg/Lの両者を含む基質A3-3で回分実験を行うと、硫酸塩のみを添加した場合と比較して硫酸塩還元が抑制された。また、鉄(III)濃度の減少、鉄(II)濃度の増加ともに、鉄(III)のみを添加した場合と比べてやや多くなっ

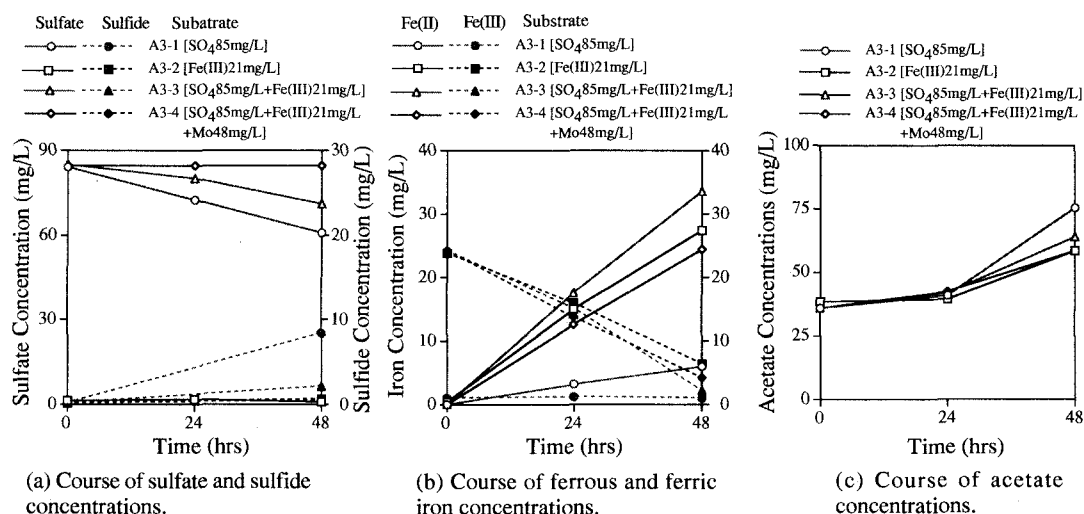


Fig. 4 Typical results of the batch experiment under the anaerobic conditions. (A3).

た。一方、O3-4では硫酸塩還元細菌の呼吸阻害剤であるモリブデン酸ナトリウム48mg/Lを添加した。硫酸塩還元は全く起こらなかったが、このとき鉄還元は硫酸塩を添加しない場合と同程度となった。すなわち、硫酸塩還元が起こる条件では鉄酸化がやや促進されることが示された。

実験シリーズ3のうち実験A1, A4, A11, A12, A13では鉄(III)の初期濃度を変化させて鉄還元と硫酸塩還元の初速度を検討した。鉄還元初速度を鉄(II)の増加速度から求め、初期鉄(III)濃度との関係をFig. 5に示した。硫酸塩の共存の有無に関わらず、初期鉄(III)濃度と鉄還元初速度はの関係はモノー式で表すことができた。また、硫酸塩の共存により鉄還元速度がやや増大する傾向が認められた。Fig. 6は硫酸塩還元速度に及ぼす初期鉄(III)濃度の影響を示したものである。鉄(III)濃度が増大すると、硫酸塩還元が顕著に抑制され、鉄(III)濃度が7mgCOD/L以上存在すると硫酸塩還元は全く起こらなくなった。実験A2, A3では、添加硫酸塩濃度を変化させてその影響を検討した。Fig. 7は硫酸塩還元初速度に及ぼす硫酸塩初期濃度の影響を示したものである。本実験で用いた硫酸塩濃度の範囲内では、硫酸塩濃度が増加しても硫酸塩還元速度は大きな変化は認められなかった。Fig. 5で得られた結果と同様に、鉄(III)が共存すると硫酸塩還元が抑制された。Fig. 8は同実験における初期硫酸塩濃度と鉄還元初速度の関係を示したものである。硫酸塩が共存すると鉄還元がやや促進される傾向にあった。

実験は20℃と30℃の条件で行ったが (Figs. 5-8) , 硫酸塩還元速度は温度が10℃上昇することにより約2倍程度に増大したのに対し、鉄還元速度は1-1.5倍程度の増大であり、硫酸塩還元細菌の方が温度依

Sulfate concentratin (mg/L)	Temp (C)	Vmax (mgCOD/gMLSS.hr)	Ks (mgCOD/L)
0	20	0.09	1.37
85	20	0.14	2.59
85	20	0.18	1.72

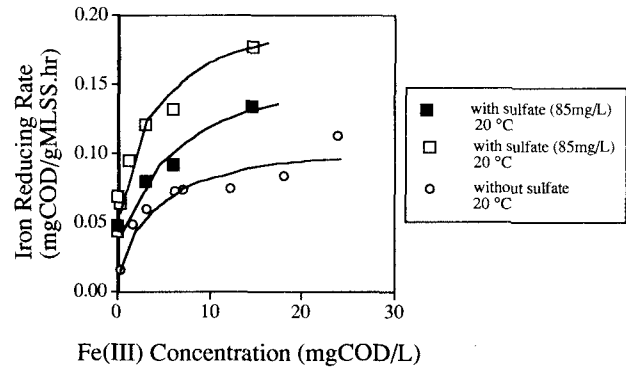


Fig. 5 Effects of Fe(III) concentration on iron reducing rate. (Exp. A11, A12, A13, A1, A4)

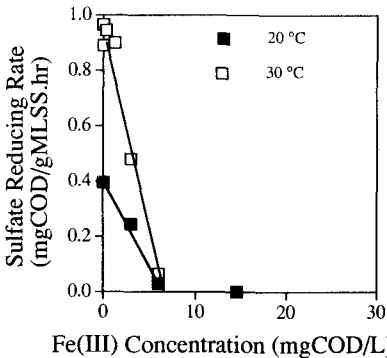


Fig. 6 Effects of Fe(III) concentrations on sulfate reducing rate (SRR) in Exp. A1 and A4.

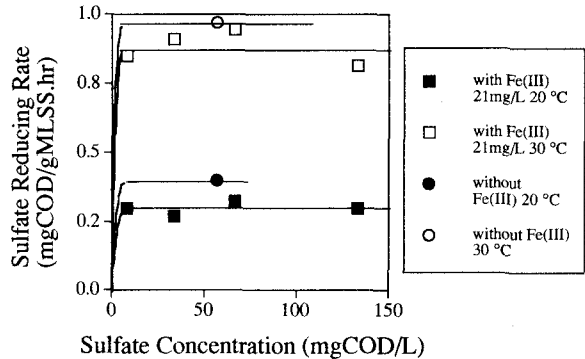


Fig. 7 Effects of sulfate concentrations on sulfate reducing rate in Exp. A2.

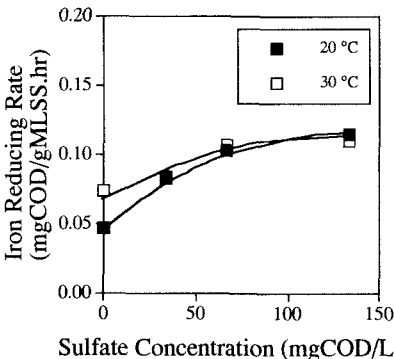


Fig. 8 Effects of sulfate concentrations on iron reducing rate (IRR) in Exp. A2.

存性が高いことがわかる。また、20℃での硫酸塩還元速度は鉄(III)還元速度の2倍程度であり、両者の活性に大きな差はないと考えることができる。流入下水中には硫酸塩は十分に含まれるが、鉄塩濃度が極めて少ないにも関わらず、このような結果が得られたのは、活性汚泥中に蓄積された鉄が汚泥中で酸化還元のサイクルを繰り返していることを示唆するものである。

活性汚泥を添加しないブランク実験では、硫酸塩還元も鉄還元も起こらないことが確認されていることから、生物学的な鉄還元および硫酸塩還元が起こっていることは明らかであるが、両者の相互作用は、微生物間の相互作用で起こったか、もしくは硫酸塩還元によって生成した硫化物が鉄(III)を還元し、その結果硫酸塩に再酸化されたのかを検討した。Fig. 9は硫化物による鉄の還元に及ぼす活性汚泥の存在の影響を検討した実験シリーズ4、実験A13の結果を示したものである。活性汚泥に硫酸塩85mg/Lと鉄44mg/Lの共存する基質A13-1を添加した場合には、Fig. 5の結果と同様に、硫酸塩還元と鉄還元が同時に起こった。同様な条件でさらに硫化物7.5mg/Lを添加すると(A13-2)、添加直後に硫化物によって鉄(III)の一部が還元されたために初期値が低下し、曝気を開始すると硫酸塩の変化がないにもかかわらず鉄の還元が進行した。一方、同一の条件で汚泥を添加しないブランク実験(A13-3)では、同様に鉄(III)の初期値が低下し、その後は鉄の濃度の変化は認められなかった。このことは、生物学的な鉄還元と化学的な鉄還元の両者が起こり得ることを示している。すなわち、硫酸塩還元により鉄還元が促進されるのは、硫化物による鉄の還元が進行することが一因と考えられる。そこで、還元された鉄のうち、鉄の還元による硫化物の硫酸塩への再酸化量を量論的に検討した。理論的には鉄55.8mgの還元で硫酸塩が12mg生成されることになる。Fig. 10は鉄の還元量と鉄(III)存在による硫酸塩還元の抑制量の関係をプロットしたものである。すべてのデータで硫酸塩還元の抑制量は、鉄還元による硫化物の再酸化量の理論値を大きく上回っていた。この結果は、化学的な酸化により硫化物が硫酸に再酸化される以外に、鉄還元により硫酸塩還元が抑制されたことを示すものである。以上のことから、鉄還元細菌と硫酸塩還元細菌の相互作用によって、硫酸塩還元が抑制されることが考えられる。

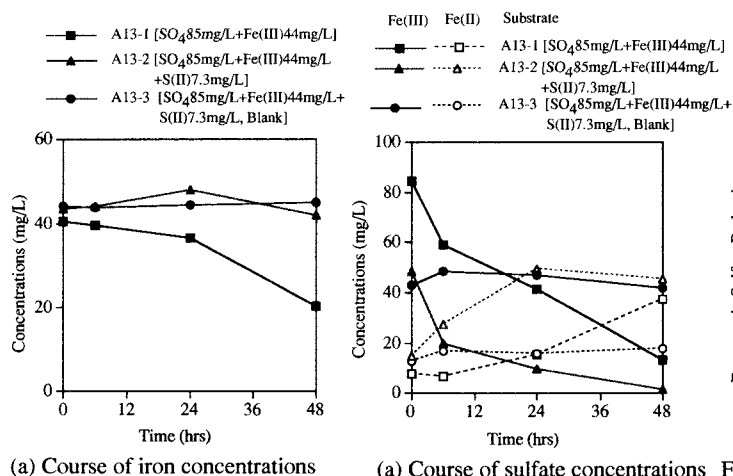


Fig. 9 Results of anaerobic batch experiment with sulfide. (Exp. A13)

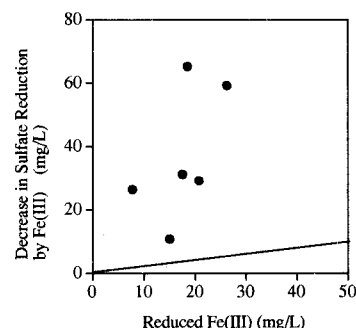


Fig. 10 Relationship between reduced Fe(III) and decrease in sulfate reduction using the substrate [S+Fe(III)+SO₄]

3. 4 鉄還元細菌と硫酸塩還元細菌の基質競合

Fig. 7(c)に、嫌気条件の回分実験における酢酸塩の生成量を示したが、鉄還元条件で酢酸の生成量が減少する傾向が認められた。Fig. 11は、硫酸塩と鉄(III)共存下で、鉄還元量と酢酸生成抑制量の関係を示したものである。鉄濃還元量が多いと、酢酸生成量が減少する傾向が認められた。しかし、温度により傾きが異なることから、鉄還元に伴って酢酸が消費されるとは考えにくい。筆者らは、活性汚泥中の硫酸塩還元細菌による酢酸の生成量がほぼプロピオン酸からの酢酸生成量の両論に従っている、

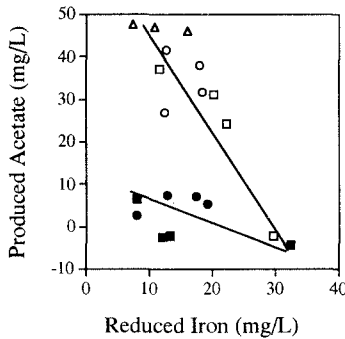


Fig. 11 Effects of reduction on acetate production in the anaerobic conditions.

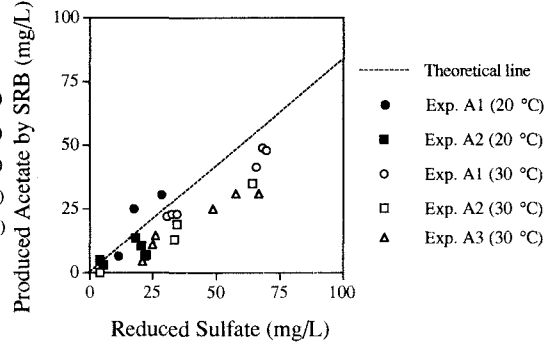


Fig. 12 Relationship between reduced acetate and produced acetate by SRB in the anaerobic conditions.

即ち、1分子の硫酸塩の還元に伴って4/3分子の酢酸が生成されることを実験的に明らかにしている。本実験で、鉄還元が起こると酢酸生成量が減少するのは、鉄還元によって硫酸塩還元が抑制されたためであると考え、鉄還元によって抑制された硫酸塩還元量と同じく抑制された酢酸生成量の関係をFig. 12に示した。両者の関係は、硫酸塩還元に伴って生成される酢酸の両論とよく一致していることから、鉄還元によって酢酸の生成量が減少したのは、鉄還元によって硫酸塩還元が抑制された結果、硫酸塩還元細菌の生成する酢酸量が減ったためであると判断できる。すなわち、鉄還元細菌は、本実験条件では、酢酸の消費にも生成にも関与していなかったものと考えられる。

鉄還元細菌がどのような基質を利用しているかを検討するために、実験シリーズ5（実験A14～A16）では、種々の基質を与えて鉄還元を比較した。48時間の間の、鉄還元量と酢酸生成量、およびプロピオン酸生成量をTable 4にまとめて示した。ペプトン、酢酸、プロピオン酸を比較すると（A14）、ペプトンを用いた場合がもっとも鉄還元が活発に起こることがわかる。また、酢酸やプロピオン酸を用いた場合には、鉄還元条件でこれらの生成量が減少することから、鉄還元は酢酸やプロピオン酸の分解に伴って起こると考えられる。しかし、ペプトンを用いた場合には、酢酸、プロピオン酸の蓄積に変化が認められなかったことから、その他の有機物の分解に伴って鉄還元が起こっていたと考えられる。一方、実験A16の結果から、水素も鉄還元の電子供与体となっていると考えられる。以上のことから、鉄還元細菌は有機物の分解に伴って生成される水素を電子供与体として利用していると推定することができる。

次に、硫酸塩還元細菌と鉄還元細菌の間の基質の競合関係について検討するために、実験シリーズ6（A27-A34）では様々な有機基質を用いて硫酸塩還元細菌と鉄還元細菌の相互作用を検討した。Table 5は、48時間の硫酸塩還元量、鉄還元量、酢酸生成量およびプロピオン酸生成量を比較したものである。実験A1～A4と同様に、酢酸以外の有機基質を用いた場合には鉄還元が起こると硫酸塩還元が阻害された。しかし、有機物を添加しなかった場合（A29, A32）には、鉄還元が起こったが硫酸塩還元を阻害することはなかった。このことは、鉄(III)を添加することによる毒性等で硫酸塩還元が阻害されるのではないことを示している。この条件では、硫酸塩還元細菌や鉄還元細菌が利用できる有機物を外部から添加していないために、これらの細菌は蓄積物質を利用して硫酸塩還元もしくは鉄還元を行っていたと考えられる。蓄積物質の競合がないことから、同一細菌が硫酸呼吸と鉄呼吸を行っているのではなく、異なる細菌同士の競合関係が存在していると推定することができる。さらに、酢酸の生成量に着目すると、有機物を添加していない場合と酢酸のみを添加した場合には、酢酸の生成量が増加する傾向にあった。蓄積物質由来の鉄還元では酢酸生成が起こることを示している。また、水素を添加した場合（A31）には、水素を競合する結果、有機酸に変化は無く、プロピオン酸を添加した場合（A28）には鉄還元により顕著な酢酸生成量の減少が認められた。以上のことから、プロピオン酸以上の有機物もしくはそれらの分解によって生成される水素に関して、硫酸塩還元細菌と鉄還元細菌の間に競合関係が成立しているものと考えられる。

Table 4 Reduced iron, produced acetate and propionate during 48 hrs cultivation in the experiment series 5 (A13-16).

Exp. No	Substrate	Reduced Fe(II) (mg/L)	Produced Acetate (mg/L)	Produced Propionate (mg/L)
A-14	A14-1 Ace	4.8		13.7
	A14-2 Ace+Fe	13.3	-29	5.7
	A14-3 Pro	3.2	12.9	-9.4
	A14-4 Pro+Fe	13	9.2	-18.2
	A14-5 Peptone	2.7	24.2	12
A15	A14-6 Peptone+Fe	17	25.3	13.3
	A15-1	3.5	2.3	2.4
	A15-2 Fe	8.5	2.7	0
	A15-3 Ace	2.3	-14.5	6.2
A16	A15-4 Ace+Fe	8.8	-1.5	7.6
	A16-1 H2	-0.5	2.7	2.5
	A16-2 H2+Fe	4.6	0	0
	A16-3 N2	-1	0	-0.8
	A16-4 N2+Fe	0.5	0	-0.9

Table 5 Reduced sulfate and Fe(III) and produced organic acids during 48 hrs cultivation in the experimental series 6 (Exp. A27-A34).

Exp. No	Substrate	Reduced SO ₄ (mg/L)	Reduced Fe(II) (mg/L)	Produced Acetate (mg/L)	
A27	A27-1 SO ₄	0.41	0.5	8.14	1.68
	A27-2 SO ₄ +Fe		22.56		
	A27-3 SO ₄ +Fe+Mo	0	6.07	2.52	7.86
A28	A28-2 SO ₄ +Pro	26.64	3.31	20.13	1.66
	A28-3 SO ₄ +Pro+Fe	0.56	14.87	15.06	1.83
	A28-4 SO ₄ +Pro+Fe+Mo	0	7.81	17.89	5.12
A29	A29-1 SO ₄	20.59	4.66	27.4	10.16
	A29-2 SO ₄ +Fe	20.32	30.18	34.17	11.34
	A29-3 SO ₄ +Fe+Mo	2.15	15.27	21.11	16.84
A30	A30-1 Peptone+SO ₄	31.66	2.81		28.75
	A30-2 Peptone+SO ₄ +Fe	34.32	31.74	60.89	31.67
	A30-3 Peptone+SO ₄ +Fe+Mo	0	18.18	54.45	39.31
A31	A31-1 H ₂ +SO ₄	29.07	7.79	3.71	3.71
	A31-2 H ₂ +SO ₄ +Fe	18.25	17.53	3.46	3.46
	A31-3 H ₂ +SO ₄ +Fe+Mo	0.27	10.60	6.97	6.97
A32	A32-1 N ₂ +SO ₄	6.12	1.17	8.46	3.8
	A32-2 N ₂ +SO ₄ +Fe	9.85	13.04	16.89	6.96
	A32-3 N ₂ +SO ₄ +Fe+Mo	0	6.96	8.82	6.81
A33	A33-1 S+SO ₄	31.2	7.74	52.5	33.68
	A33-2 S+SO ₄ +Fe	25	44.21	54.34	34.5
	A33-3 S+SO ₄ +Fe+Mo	0	23.56	37.73	38.96
A34	A34-1 Ace+SO ₄	16.29	6.17	24.02	13.29
	A34-2 Ace+SO ₄ +Fe	17.65	53.62	33.11	20.36
	A34-3 Ace+SO ₄ +Fe+Mo	0	17.53	18.19	22.85

3. 5 鉄還元と脱窒，りん放出の相互作用

脱窒は硫酸塩還元や鉄還元と比較して熱力学的に有利であることから，実験シリーズ7では硝酸塩の存在する無酸素条件でのそれらの細菌の相互作用を検討した。Fig. 13は嫌気条件と無酸素条件の鉄還元実験の結果の典型例として実験A26の結果を示したものである。鉄(III)も硝酸塩も存在しない条件A26-1では，汚泥内の鉄(III)の還元がわずかに起こり，りんは溶出と酢酸塩の取り込みが認められる。鉄(III)50mg/Lのみを添加すると(A26-2)鉄還元が優先的に起こり，poly-P蓄積細菌によるりんの放出と酢酸の取り込みがやや抑制された。一方，硝酸塩220mg/Lのみを添加すると(A26-3)，硝酸塩の減少に伴って酢酸が急激に消費され，硝酸塩と鉄(III)が共存すると(A26-4)脱窒が優先的に起こり，硝酸塩が消失した後に鉄還元が起こることがわかる。筆者らは，嫌気条件と無酸素条件での硫酸塩還元実験によ

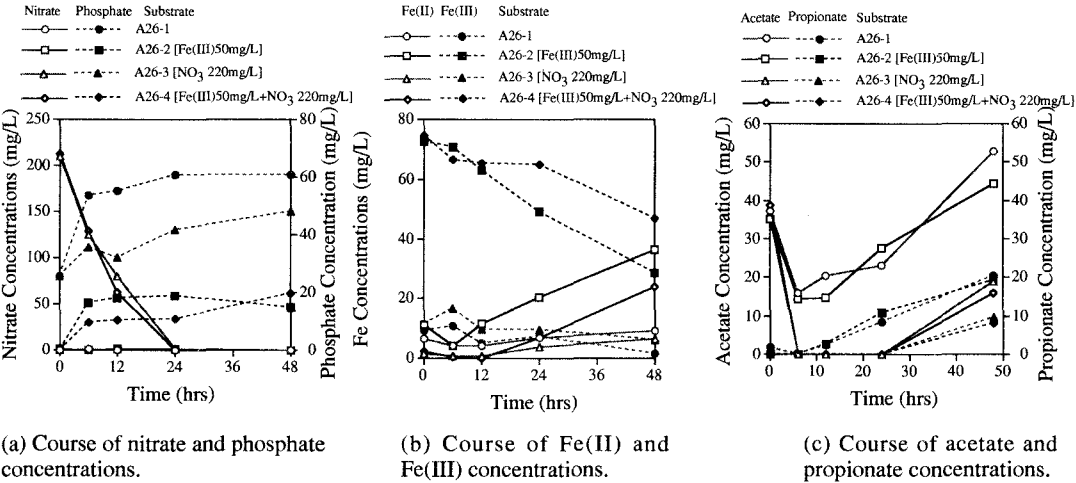


Fig. 13 Results of anaerobic and anoxic batch experiments of A 26.

り、脱窒が終了してから硫酸塩還元が起こることを報告しており、極めて類似の結果となった。以上のことから、活性汚泥において、脱窒、鉄還元、硫酸塩還元の優先順位で反応が進行することがわかる。これは、熱力学的な優先順位と一致しており、これらの細菌間に基質の競合関係が成立していると推定することができた。一方、りん放出も、硝酸塩が存在すると抑制された。酢酸、プロピオン酸の生成量を比較すると、脱窒が起こると、これらの消費が卓越し、生成量が非常に減少することがわかる。脱窒細菌が有機物の完全酸化を行うため、酢酸やプロピオン酸などの低分子有機物の取り込みによって生じるりん放出も、脱窒細菌との競合で抑制されると推定できる。

4 結言

活性汚泥の鉄の酸化還元細菌について検討した結果、以下のようにまとめられる。

1. 本研究で使用した都市下水処理場活性汚泥中の鉄塩濃度は約10mg/gMLSSであり、そのうち約65%が鉄(III)塩として、18%が鉄(II)として検出された。
2. 好気条件の回分実験により活性汚泥による鉄酸化を調べた結果、鉄酸化反応は極めて早く、酸化速度は濃度に比例した。鉄酸化と硫黄酸化が同時に起こったが、鉄濃度が増加すると硫黄酸化速度が減少し、硫黄濃度が増加すると鉄酸化速度が減少した。COD換算した両者の速度を足し併せると、ほぼ一定値となることから、両者の細菌の間に酸素の競合関係が存在すると推定された。
3. 嫌気条件の回分実験により活性汚泥による鉄還元を調べた結果、鉄還元反応が微生物学的に起こることが確認され、その反応をモノ一型の反応速度式で表すことができた。鉄還元と硫酸塩還元は同時に起こり、基質の競合により鉄還元は硫酸塩還元を抑制した。一方、硫酸塩還元で生成した硫化物による化学的鉄還元が起こることにより、鉄還元をやや促進する傾向にあった。
4. 鉄還元細菌と硫酸塩還元細菌の競合基質は、プロピオン酸以上の炭素数の有機物もしくはそれらの分解に伴って生成される水素であると推定された。
5. 無酸素条件では脱窒が優先的に起こり、鉄還元を阻害した。このことより、脱窒、鉄還元、硫酸塩還元は熱力学的有利さの順で進行することが示された。さらに、無酸素条件ではpoly-P蓄積細菌によるりん放出も顕著に抑制された。

参考文献

- 1) Lens, P. N., Depoorter, M. P., Cronenberg, C. C. and Verstraete, W. H. (1995) Sulfate reducing and methane producing bacteria in aerobic wastewater treatment systems. *Wat. Res.* **29**, 371-880.
- 2) Yamamoto, R. I., Komori, T. and Matsui, S. (1991). Filamentous bulking and hindrance of phosphate removal due to sulfate reduction in activated sludge. *Wat. Sci. Tech.*, **23**, 927-935.
- 3) Yamamoto-Ikemoto, R., Matsui, S. and Komori, T. (1994a). Ecological interactions among denitrification, poly-P accumulation, sulfate reduction, and filamentous sulfur bacteria in activated sludge. *Water Sci. Tech.*, **30**, 201-210.
- 4) Yamamoto-Ikemoto, R., Matsui, S., Komori, T. and Bosque-Hamilton, E. J. (1996) Symbiosis and competition among sulfate reduction, filamentous sulfur, denitrification, and poly-P accumulation bacteria in the anaerobic-oxic activated sludge of a municipal plant., *Wat. Sci. Tech.*, **34**, 119-128.
- 5) Yamamoto-Ikemoto, R., Matsui, S., Komori, T. and Bosque-Hamilton, E. J. (1998a) Interactions between filamentous sulfur bacteria, sulfate reducing bacteria and poly-P accumulating bacteria in anaerobic-oxic activated sludge of a municipal plant., *Wat. Sci. Tech.*, **37**, 4-5.
- 6) Nielsen, P. H. (1996). The significance of microbial Fe(III) reduction in the activated sludge process. *Wat. Sci. Tech.*, **34**, 5-6.
- 7) Yamamoto-Ikemoto, R., Matsui, S., Komori, T. and Bosque-Hamilton, E. J. (1998b) Control of filamentous bulking and interactions among sulfur oxidation-reduction and iron oxidation-reduction in activated sludge using iron coagulant. *Wat. Sci. Tech.*, **38**, 9-17.
- 8) E. K. Bosque-Hamilton, R. Yamamoto-Ikemoto, T. Komori and T. Takekuma (1999) Simultaneous microbial sulfur and iron oxidation-reduction and phosphate release in anaerobic-oxic activated sludge, *ã-ã'çHäwãšãÜð_idèW*, Vol. 36, pp. 145-153,