

(64) 割り箸を有機炭素源とした脱窒処理における硫酸塩還元細菌および硫黄脱窒細菌の役割

Role of sulfate reduction and sulfur oxidation bacteria on denitrification using disposable chopsticks as organic carbon source

山下恭広*, 池本良子*

Takahiro YAMASHITA*, Ryoko YAMAMOTO-IKEMOTO*

ABSTRACT; Denitrification using chopsticks as organic carbon source was examined in an anaerobic-anoxic biological filter reactor and an anoxic biological filter reactor. In the two phase anaerobic-anoxic reactor, sulfate reduction and acetate production occurred in the anaerobic bed packed with chopsticks. In the anoxic bed connected to the anaerobic bed with chopsticks, sulfur denitrification and heterotrophic denitrification occurred. In the single anoxic biological filter reactor, denitrification and sulfate reduction occurred simultaneously in the anoxic bed packed with chopsticks. The sulfate reducing activities of the biofilm in both reactors packed with chopsticks were high, meaning that sulfate reduction played an important role on decomposition of chopsticks. Microbial community of sulfate reducing bacteria and sulfur oxidation bacteria was examined by a FISH method. *Desulfobulbus* spp., *Desulfobactor* spp. and *Desulfonema* spp. were most common sulfate reducing bacteria grown in the anaerobic bed of the two phase reactor and the anoxic bed of the single reactor. *Thiobacillus denitrificans* was also observed in the anoxic biofilm with the chopsticks of the single reactor. It was observed that *Desulfonema* spp. was attached with *Thiothrix nivea*, and sulfur oxidation-reduction cycle was established in the biofilm under anoxic condition.

KEYWORDS; sulfate reducing, sulfur denitrification, heterotrophic denitrification, disposable chopsticks, FISH.

1. 序論

硝化が進行した下水処理水, 農業系排水, 地下水など, 硝酸塩濃度が高く有機物が少ない排水からの生物学的窒素除去には, 脱窒のための電子供与体の添加が不可欠である。電子供与体として様々な有機物の添加方法が提案されているが, 反応速度が遅かったり, 添加した電子供与体が処理水に流出するなどの問題がある。間伐材などの木質系廃棄物を有機炭素源として脱窒に用いる試みがいくつかなされているが, 反応速度が遅いこと, 分解が継続しないことが指摘されている。割り箸は飲食店や旅館などから大量に発生する廃棄物であるが, アスペン材を加工したものが多く市販されている。アスペン材は耐朽性に富む木材に含まれている抗菌性の抽出成分ポリフェノールやキノン, トロポノイド系化合物が含まれていないために, 木材の中では耐朽性をもっとも低い分類に入っていることから¹⁾, 微生物による分解が進行しやすいことが期待できる。

一方, 電子供与体として還元型硫黄を添加して硫黄脱窒により窒素除去を行う方法が多く提案されている²⁾。チオ硫酸塩を用いることにより極めて高速で安定した脱窒が可能であることが報告されているが³⁾, チオ硫酸塩と無機炭素を連続的に供給する必要がある。また, 硫黄粒はその利用速度が遅いのが欠点である⁴⁾。一方, 硫酸塩還元細菌は自然界に広く分布する嫌気性細菌であるが, 下水処理の分野では施設の腐食や固液分離の悪化, 悪臭の原因として知られている。しかし, この硫酸塩還元細菌は増殖収率が低いことから⁵⁾, 積極的に排水処理に活用することが有効であると考えられる。硫酸塩還元細菌にセルロース分解能があることが知られていることから, 木質系廃棄物を有機炭素源として嫌氣的に処理すれば, 硫化水素を発生させる

* 金沢大学大学院自然科学研究科 (Graduate School of Natural Science & Technology, Kanazawa University)

ことができ、その硫化物を電子供与体とした硫黄脱窒処理が可能となると考えられる。

そこで、本研究では、割り箸を窒素除去に用いる方法として、嫌気条件で硫酸塩還元を促進し生成した硫化物を用いて硫黄脱窒による窒素除去を行う方式（嫌気無酸素方式）と、直接間伐材を脱窒に利用する方法（単槽方式）について、その有効性を検討した。さらに、両処理装置内の硫酸塩還元細菌および硫黄脱窒細菌の微生物活性を測定するとともに、16SrRNA をターゲットとした FISH 法による解析を行うことにより、両微生物群の役割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

実験装置の概要を Fig. 1 に示す。装置 1 は、嫌気無酸素方式を想定し、内径 100mm、高さ 260mm のアクリル製カラムを 2 本連結したものをを用いた。第 1 槽に約 20mm に切断した割り箸（アスペン材製）を乾燥重量 187g 充填し、第 2 槽には、微生物付着担体として発泡ポリプロピレン担体を充填した。装置 2 は単槽方式を想定し、装置 1 の第 1 槽と同様の割り箸を充填したカラム 1 本を用いた。実験装置は 20℃ の恒温室内に設置し、種汚泥として下水処理場返送汚泥を添加して運転を開始した。運転に用いた人工排水の組成を Table 1 に示す。装置 1 には硝酸塩を含まない人工無機排水を第 1 槽下部から連続的に流入させ、第 2 槽には第 1 槽流出水と硝酸排水を 1:1 で流入させた。装置 2 では、硝酸塩を含む無機排水を直接流入させた。流入流量を段階的に増大させることにより、装置 1 の第 1 槽および装置 2 の空塔滞留時間を 24 時間から 6 時間まで短縮した。定期的に流入水、処理水及び各サンプリングタップからの流出水を採取し、0.2 μm メンブレンフィルターでろ過した後、塩化物、硝酸塩、亜硝酸塩、硫酸塩、チオ硫酸塩（イオンクロマトグラフ、島津 IC-10AD）および有機酸、重炭酸塩（イオンクロマトグラフ有機酸分析システム、島津 LC-10AD）の分析を行った。

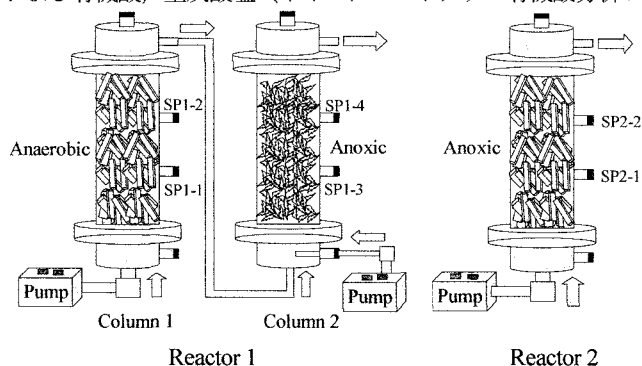


Table 1. Artificial wastewater

Substrate (mg/l)	Reactor 1		Reactor 2
	Column 1	Column 2	
NaHCO ₃	35	0	35
CaCl ₂	46	0	46
KH ₂ PO ₄	46	0	46
K ₂ SO ₄	58	0	58
NaNO ₃	0	170	85
conditions	anaerobic	anoxic	anoxic

Fig. 1. Experimental set up.

2.2 処理槽内生物膜の活性測定

運転開始 100 日後に装置 2 の処理槽内の生物膜を、運転開始 115 日後に装置 1 の第 1 槽（嫌気槽）内の生物膜を取り出し、回分実験によって、脱窒活性、硫黄脱窒活性、硫酸塩還元活性を評価するとともに、これらの相互作用について検討した。実験に用いた基質を Table 2 に示す。S 1-3 は、電子受容体として硝酸塩を含まず硫酸塩のみを含む基質を用いて嫌気条件で行ったものであり、N 1-3 は硝酸塩を含み硫酸塩を含まない基質を用いて無酸素条件で行ったもの、SN 1-3 は硝酸塩、硫酸塩ともに含む基質を用いたものである。さらに、TN 1-3 は電子供与体としてチオ硫酸塩を、電子受容体として硝酸塩を添加したものである。すべての基質条件で、木材を添加しない場合と、アスペン材および杉材を用いた場合の 3 種類の実験を行った。アスペン材は、装置に充填したものと同じ割り箸をカッターナイフにより 5×5×5mm 程度に切断して用いた。杉材は、杉の間伐材の樹皮を除き厚さ 1mm 程度、5×10mm 程度の木片に切断して用いた。両者とも、蒸留

水に 2 昼夜浸して表面から溶出する有機物を除いた後、回分実験に使用した。回分実験は、容積 50ml のシリンジを用い、遠心分離により集めた生物膜を最終濃度 1000mg/l となるように投入し、木質を添加した後窒素パージした基質を注入して、20℃の恒温室内で攪拌培養を行った。0, 6, 12, 24, 48 時間後に採水し、硫酸塩、チオ硫酸塩、硝酸塩、亜硝酸塩の分析を行った。

Table 2. Experimental conditions using the batch experiments

Exp. No.	S 1	S 2	S 3	N 1	N 2	N 3	SN 1	SN 2	SN 3	TN 1	TN 2	TN 3
Lumber												
Aspen	-	○	-	-	○	-	-	○	-	-	○	-
Cedar	-	-	○	-	-	○	-	-	○	-	-	○
Minerals (mg/l)												
NaHCO ₃	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
CaCl ₂	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46
KH ₂ PO ₄	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46	46
K ₂ SO ₄	58	58	58	0	0	0	58	58	58	0	0	0
NaNO ₃	0	0	0	274	274	274	274	274	274	274	274	274
Na ₂ S ₂ O ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	83	83	83

2.3 微生物群集解析

処理槽内の硫酸塩還元細菌と硫黄酸化細菌と硫黄脱窒細菌について FISH 法による群集解析を行った。実験に用いた 16S rRNA を標的とした DNA プローブは、Table 3 に示す硫酸塩還元細菌をターゲットとしたプロローブ 5 種 (660, 687, 221, 129, DMNA657), *Thiothrix* spp. をターゲットとしたプロローブ 4 種 (G1B, G2M, G3M, G123T) および、本研究で設計した硫黄脱窒細菌 *Thiomicrospira denitrificans* および *Thiobacillus denitrificans* をターゲットとしたプロローブ (TMDN101, TBDN1441) の計 11 種である。G123T のプロローブのみ、FITC により蛍光標識し、それ以外のプロローブは Cy3 により蛍光標識した。

Table 3. 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes used in this study

Probe	Specificity	Sequence of probe (5' - 3')	Target site ^a	FA ^b concn (%)	Reference
660	<i>Desulfobulbus</i> spp. <i>Desulfovibrio</i> spp. plus members of the genera <i>Geobacter</i> ,	GAATTCACCTTCCCTCTG	660-679	30	Deverex <i>et al.</i> 1992
687	<i>Desulfomonas</i> , <i>Desulfuromonas</i> , <i>Desulfomicrobium</i> , <i>Bilophila</i> , and <i>Pelobacter</i>	TACGGATTTCACCTCT	687-702	0	Deverex <i>et al.</i> 1992
221	<i>Desulfobacterium</i> spp.	TGCGCGGACTCATCTTCAAA	221-240	20	Deverex <i>et al.</i> 1992
129	<i>Desulfobacter</i> spp.	CAGGCTTGAAGGCAGATT	129-149	10	Deverex <i>et al.</i> 1992
DMNA657	<i>Desulfonema</i> spp.	TTCCG(C/T)TTCCCTCTCCATA	657-676	20	Fukui <i>et al.</i> 1992
G1B	<i>Thiothrix disciformis</i>	TGTGTTTCGATTCTTGC	1029-1046	30	Kanagawa <i>et al.</i> 2000 Aruga <i>et al.</i> 2002
G2M	<i>Thiothrix eikelboomii</i>	GCACCACCGACCCCTTAG	842-859	35	Kanagawa <i>et al.</i> 2000 Aruga <i>et al.</i> 2002
G3M	<i>Thiothrix flexilis</i>	CTCAGGGATTCTGCCAT	996-1013	30	Kanagawa <i>et al.</i> 2000 Aruga <i>et al.</i> 2002
G123T	<i>Thiothrix nivea</i> group, <i>Thiothrix disciformis</i> , <i>Thiothrix eikelboomii</i> and <i>Thiothrix flexilis</i>	CCTTCCGATCTCTATGCA	697-714	40	Kanagawa <i>et al.</i> 2000 Aruga <i>et al.</i> 2002
TMDN101	<i>Thiomicrospira denitrificans</i>	CTTTGAGGTACATTAACAT	101-120	10	This study
TBDN1441	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	GTCATGAACCCCGCTGGT	1441-1460	20	This study

^a 16S rRNA position according to *E. coli* numbering.

^b Formamide concentration in the hybridization buffer.

装置 1 では運転開始から 115 日目に嫌気槽の生物膜を、装置 2 では 100 日目に無酸素槽の生物膜を取り出してパラフォルムアルデヒドにより固定化を行った後、Amann ら⁷⁾の手順に準拠してハイブリダイゼーションと、DAPI 染色による二重染色を行った。蛍光顕微鏡画像を複数枚撮影し、画像解析・計測ソフト (Win Roof: 三谷商事) を用いて、DAPI 染色による蛍光が検出された細胞の面積と、FISH 法で特異的蛍光が検出された細胞の面積を計測し、両者の面積比を算出した。

3. 実験結果及び考察

3.1 処理水質の変化

Fig. 2 に装置 1 の流入水および処理水の水質の経日変化を示す。Fig. 3 に処理槽縦方向の水質変化の典型例を示す。第 1 槽で硫酸塩が減少し、第 2 槽で再び増加していることから、第 1 槽で硫酸塩が還元され第 2 槽で再酸化されていることがわかる。一方、第 1 槽で酢酸塩及びプロピオン酸塩の増加が認められた。無機炭素の増大も認められたことから、硫酸塩還元条件下で木質の分解に伴う酢酸の生成が起っていたことがわかる。滞留時間 12 時間までは、第 1 槽でほとんどの硫酸塩が還元されたが、6 時間では硫酸塩がやや残存した。また、滞留時間の縮小に伴い、酢酸の生成量が減少した。一方、第 2 槽に添加された硝酸塩は滞留時間 6 時間まではほぼすべて消失しているが、滞留時間 3 時間では亜硝酸塩が検出され、硝酸塩も残存した。第 2 槽では、硫酸塩の増加と酢酸の消失が認められることから、他栄養性脱窒と硫黄脱窒の両者が進行したと考えられる。処理水中の硫酸塩濃度は、第 1 槽で硫酸塩還元が起らなかったと仮定して求めた理論硫酸塩濃度の 90% 以上の値を示しており、第 2 槽に流入した還元型硫黄がほとんど硫酸塩に再酸化されたことがわかる。第 2 槽での反応の詳細を検討するために以下の方法で第 2 槽

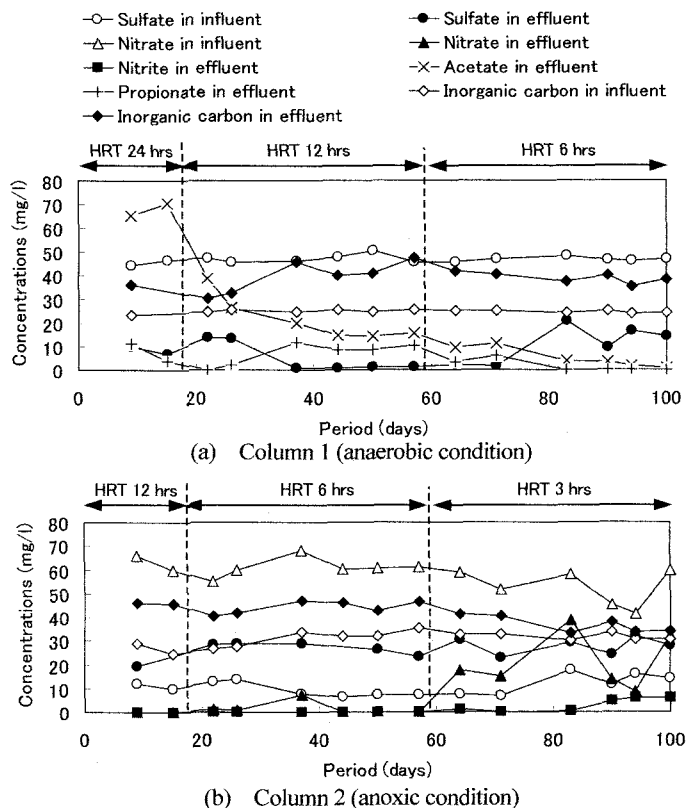


Fig. 2. Course of the sulfate, nitrate, nitrite, acetate and propionate concentrations through the columns in reactor 1.

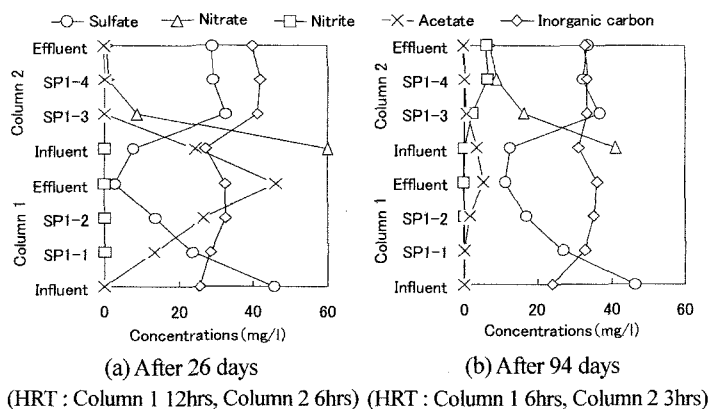


Fig. 3. Change of water characteristics in the reactor 1.

における窒素収支を計算した。まず、第2槽流入理論 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度から処理水中の $\text{NO}_3\text{-N}$ および $\text{NO}_2\text{-N}$ をさし引いて脱窒量を求めた。次に、第2槽で増大した硫酸塩がすべて硫酸脱窒室に利用されたと仮定して、硫酸脱窒室によって消費された $\text{NO}_3\text{-N}$ を求めた。最後に、脱窒量と硫酸脱窒量の差を他栄養性脱窒室によって消費された $\text{NO}_3\text{-N}$ として求めた。

Fig. 4 は、第2槽における窒素収支を示したものであるが、滞留時間に関わらず、硫酸脱窒による窒素除去量が一定量を占めており、残りが他栄養性脱窒室によって除去されている。第1槽での硫酸塩還元促進が窒素除去率を増大させるために最も重要であることがわかる。

Fig. 5 に装置2の流入水および処理水の水質の経日変化を、Fig. 6 に処理槽縦方向の水質変化の典型例を示す。装置2では脱窒が優先的に起こっているが、滞留時間12時間までは、装置上部で硫酸塩の減少と酢酸の生成が同時に認められた。滞留時間6時間では硫酸塩の減少も酢酸の生成も認められなかったが、硝酸塩が残存した。嫌気無酸素方式では、嫌気槽内の硫酸塩還元速度および無酸素槽内の脱窒速度から、脱窒を良好に進行させるための嫌気槽の硫酸塩負荷は $0.14 \text{ kg-SO}_4/\text{m}^3 \text{ day}$ 、無酸素槽の硝酸塩負荷は $0.25 \text{ kg-NO}_3/\text{m}^3 \text{ day}$ と推定された。一方、無酸素の単槽方式では、 $0.18 \text{ kg-NO}_3/\text{m}^3 \text{ day}$ の硝酸塩負荷であれば、硝酸塩をすべて除去可能であると推定された。以上の結果から、間伐材により生成した硫化物を脱窒に用いる嫌気無酸素方式は、安定した処理が可能であるが、単槽方式でも、高速の窒素除去が可能であることがわかった。

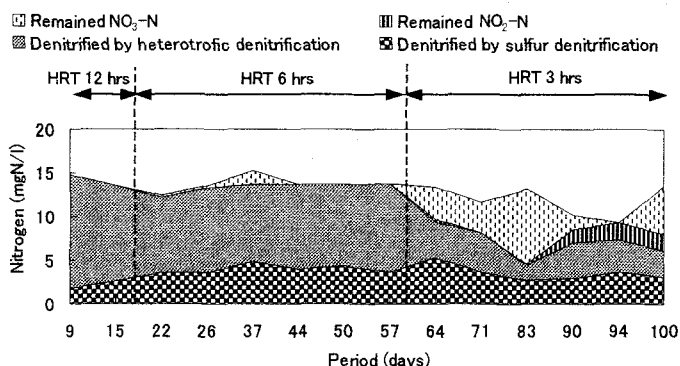


Fig. 4. Nitrogen balance in the column 2 of reactor 1.

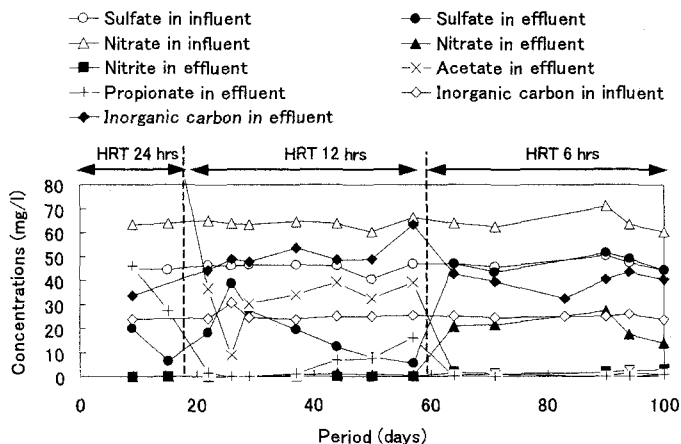


Fig. 5. Course of the sulfate, nitrate, nitrite, acetate and propionate concentrations through the column in reactor 2.

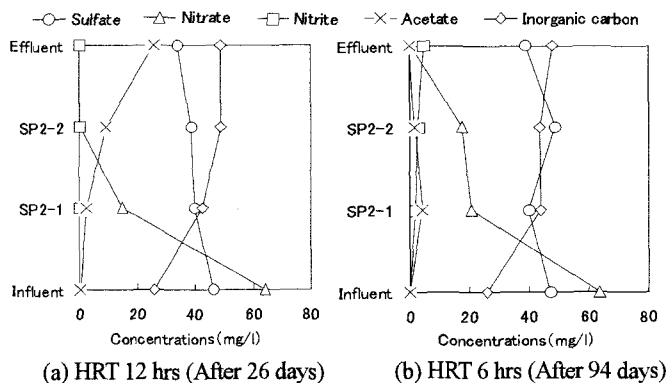


Fig. 6. Change of water characteristics in the reactor 2.

3.2 硫酸塩還元活性及び脱窒活性

Fig. 7 に装置 1 の第 1 槽から採取した生物膜を用いて行った回分実験の結果を示す。硫酸塩を含む基質を用いた条件 (Exp. S 1-3) では、微生物の自己分解により 12 時間以降に硫酸塩還元が進行したが、アスペン材 (Exp. S2) や杉材 (Exp. S3) を添加することにより硫酸塩還元が促進された。これは、硫酸塩還元細菌が木質由来の有機物を利用していることを示している。また、硫酸塩の減少速度から硫酸塩還元速度を求めた。一方、硝酸塩を含む基質を用いた場合 (Exp. N 1-3) には、硝酸塩の減少と硫酸塩の増加が認められた。基質中には還元型硫黄は添加していないことから、処理槽内に蓄積された硫化物や硫黄粒などの還元型硫黄を用いた硫黄脱窒が進行したものと考えられる。さらに木材を添加すると (Exp. N2, 3), 脱窒が促進された。馴養基質中には硝酸塩は含まれていないことから、処理槽内では発酵的代謝を行っている細菌が、電子受容体として硝酸塩を利用したものと考えられる。硫酸塩の増加速度から硫黄脱窒速度を、硝酸性窒素 + 亜硝酸性窒

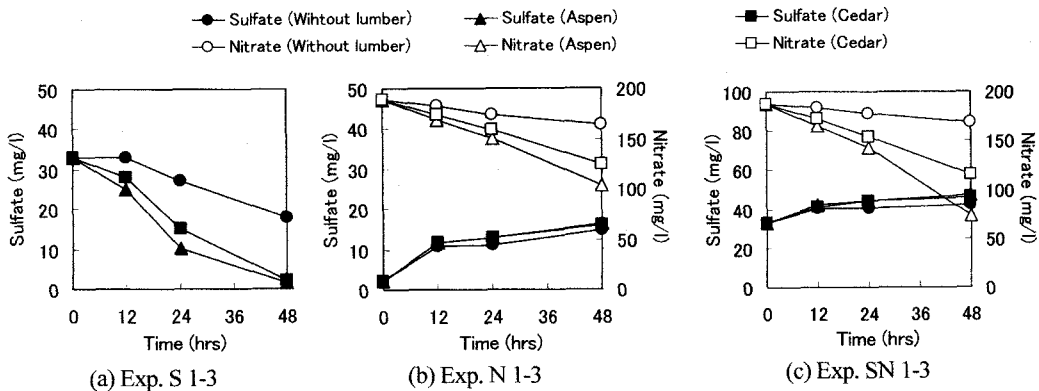


Fig. 7. Typical results of the batch experiments using biofilm in the column 1 of reactor 1.

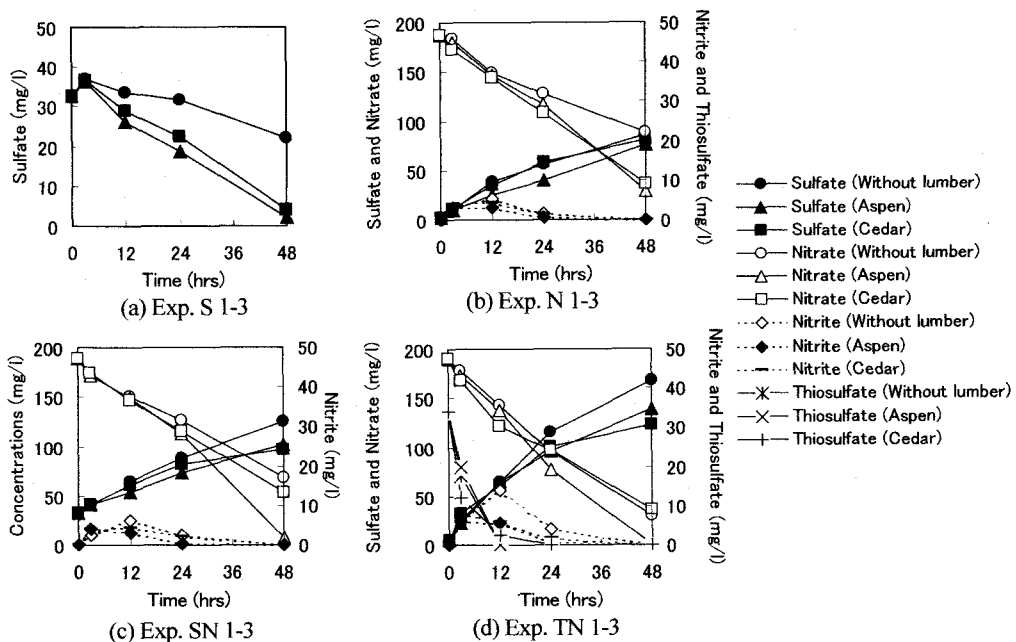


Fig. 8. Typical results of the batch experiments using biofilm in the column of reactor 2.

素の減少量から硫黄脱窒により脱窒された窒素量を補正することにより他栄養性脱窒速度を求めた。硫酸塩と硝酸塩の両者を含む基質を用いた場合 (Exp. SN 1-3) にも、同様に硝酸塩の減少と硫酸塩の増加が認められた。硝酸塩の減少は硝酸塩のみを含む基質を用いた Exp. N 2, 3 よりも多かった。同様に硫黄脱窒速度と他栄養性脱窒速度を求めた。

Fig. 8 は装置 2 の処理槽内微生物を用いた回分実験結果を示したものである。Exp. S 1-3 では、装置 1 と同様に木質の添加により硫酸塩還元促進が認められた。Exp. N 1-3 および SN 1-3 では、硝酸塩の減少に伴い硫酸塩の著しい増加が認められた。Fig. 9 は、処理槽内微生物の顕微鏡写真を示しているが、大量の硫黄粒を蓄積した糸状性細菌が認められたことから、硫黄粒を用いた脱窒が進行していることがわかる。また、亜硝酸塩の蓄積が認められた。装置 1 と同様に、硫黄脱窒速度と他栄養性脱窒速度を計算した。一方、チオ硫酸塩と硝酸塩を添加した場合 (Exp. TN 1-3) では、チオ硫酸塩の減少に伴い硫酸塩の増加と硝酸塩の減少および亜硝酸塩の蓄積が認められた。チオ硫酸塩の消失後も硫黄粒を用いた脱窒が進行し、硫酸塩の増加が続いたが、12 時間までの硫酸塩の増加速度から硫黄脱窒速度を求めた。

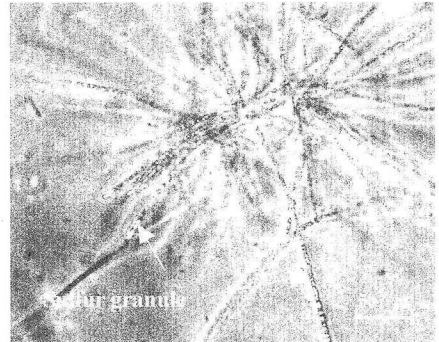


Fig. 9. Accumulated sulfur granule of filamentous bacteria in the column 2 of reactor 1.

実験から求められた硫酸塩還元速度と脱窒速度をまとめて Table 4 に示す。装置 1, 2 ともに硫酸塩還元速度はアスペン材を用いた場合が最も速かったが、杉を添加した場合も木質を添加しなかった場合と比較すると 2 倍以上の速度で進行したことから、硫酸塩還元細菌は木質の分解に関与していたと考えられる。また、処理装置に杉の間伐材を用いても同様な処理が可能であると予想される。装置 2 の生物膜は硝酸塩が存在する条件で運転されていたにもかかわらず、硫酸塩還元速度は装置 1 の 1/2 以上の値を示している。硫酸塩還元細菌は他栄養性脱窒細菌と比較して熱力学的に極めて不利であるにも係わらず、高い硫酸塩還元活性を示したことから、両者の間に基質の競合関係は存在していなかったと推定することができる。一方、他栄養性脱窒速度も、木質を添加した方が 2 倍以上の値を示しており、木質の分解に伴う脱窒も進行していたと考えられる。さらに、装置 2 の生物膜の硫黄脱窒速度は極めて速く、脱窒の約 1/3 を担っていた。硫酸塩還元活性が高いこと、硫酸塩が共存した方が脱窒速度が速いこと、およびチオ硫酸塩を添加した場合の硫黄脱窒活性が極めて高いこと等を考え合わせると、実際には硫酸塩還元と硫黄脱窒が同時に進行して硫黄が繰り返し

Table 4. Summary of denitrification and sulfate reduction rates

Rates (mgCOD/gSS hr)		Reactor 1 Anaerobic bed biofilm			Reactor 2 Anoxic bed biofilm		
		Without lumber	Aspen	Cedar	Without lumber	Aspen	Cedar
S 1-3	sulfate reducing rate	0.32	0.83	0.72	0.22	0.49	0.47
N 1-3	denitrification rate	0.34	1.15	0.87	1.39	2.16	2.04
	sulfur denitrification	0.11	0.13	0.13	0.85	0.75	0.81
	heterotrophic denitrification rate	0.23	1.02	0.74	0.54	1.41	1.23
SN 1-3	denitrification rate	0.26	1.50	0.99	1.62	2.41	1.83
	sulfur denitrification	0.08	0.13	0.13	0.95	0.71	0.67
	heterotrophic denitrification rate	0.18	1.37	0.86	0.67	1.70	1.16
TN 1-3	sulfur denitrification rate	-	-	-	2.42	2.43	2.17

利用されており、全体の窒素除去のうち、硫黄脱窒が担っていた割合はもっと大きかったことが推定される。

3.3 硫酸塩還元細菌および硫黄酸化細菌の群集解析

装置1の生物膜には生物膜内に糸状性細菌が観察された。一方、装置2には、多量の硫黄粒を蓄積し、ロゼットを形成した糸状性硫黄酸化細菌 *Thiothrix* spp.が大量に認められた。そこで、硫酸塩還元細菌と糸状性硫黄酸化細菌 *Thiothrix* spp.および硫黄脱窒素細菌の群集について FISH 法により検討した。Table 5 は、それぞれの細菌の生物膜内の存在割合を示している。両生物膜ともに、硫酸塩還元細菌が高密度で検出された。装置1の嫌気槽生物膜では、660 プローブで特異的な蛍光を示す *Desulfobulbus* spp.と推定される細菌、129 プローブで特異的な蛍光を示す *Desulfobacter* spp.と推定される細菌、および DMNA657 プローブで特異的な蛍光を示す *Desulfonema* spp.と推定される細菌が多く検出された。*Desulfobulbus* spp.はプロピオン酸等を酢酸まで分解し、*Desulfobacter* spp.や *Desulfonema* spp.は酢酸を主に利用することが知られていることから、第1槽（嫌気槽）での酢酸の生成と消費にかかわっていたと推定される。一方、装置2の生物膜では、同様なプローブで特異的な蛍光が観察された。これは、硫酸塩還元速度が第1槽の1/2以上の値を示したことも一致しており、硫酸塩還元細菌が高密度で活性を持って存在していたと推定される。滞留時間12時間では装置内で硫酸塩還元が認められていたが本生物膜を採取したのは、滞留時間を6時間に変更し、硫酸塩の減少が認められなくなって40日以上経過したものである。硫酸塩還元細菌が発酵的代謝を行って生物膜内に存在していたか、もしくは生物膜内で硫酸塩還元が進行しているが、脱窒によって再酸化された結果、硫酸塩の減少が認められなかったことが推定される。さらに、*Desulfobulbus* spp.および *Desulfobacter* spp.と推定される微生物の蛍光は生物膜内に広く観察されたが、*Desulfonema* spp.と推定される細菌の多くは、糸状性細菌 *Thiothrix* spp.のロゼットの根幹部に付着して存在していることが確認された。

Thiothrix spp.を検出する
プローブを用いた場合には、両装置生物膜ともに存在した糸状性細菌は G123T プローブで特異的な蛍光を示し、G1B, G2M, G3M では蛍光が検出されなかった。ロゼットの形成やゴニジアの生成などの *Thiothrix nivea* の形態的特徴も一致していたことから、本糸状性細菌は *Thiothrix nivea* group と判断することができる。この *Thiothrix nivea* group は、硫化物を硫酸塩にまで酸化できるが、細胞内に硫黄粒を大量に蓄積することが特徴である。また、電子受容体として酸素を利用するが、硝酸塩を亜硝酸塩まで還元することができる。装置1では、硝酸塩は存在しない

Table 5. Community structure of sulfate reduction and sulfur oxidation bacteria in the analysis of composite DAPI and FISH images

Probe	Specificity	Reactor 1	Reactor 2
		Anaerobic bed biofilm	Anoxic bed biofilm
660	<i>Desulfobulbus</i> spp.	3.5	4.3
687	<i>Desulfobulbus</i> spp. plus members of the genera <i>Geobacter</i> , <i>Desulfomonas</i> , <i>Desulfuromonas</i> , <i>Desulfomicrobium</i> , <i>Bilophila</i> , and <i>Pelobacter</i>	0.0	0.0
221	<i>Desulfobacterium</i> spp.	0.0	0.0
129	<i>Desulfobacter</i> spp.	6.7	7.3
DMNA657	<i>Desulfonema</i> spp.	8.6	5.3
G1B	<i>Thiothrix disciformis</i>	0.0	0.0
G2M	<i>Thiothrix eikelboomii</i>	0.0	0.0
G3M	<i>Thiothrix flexilis</i>	0.0	0.0
G123T	<i>Thiothrix nivea</i> group, <i>Thiothrix disciformis</i> , <i>Thiothrix eikelboomii</i> and <i>Thiothrix flexilis</i>	27.0	48.0
TMDN101	<i>Thiomicrospira denitrificans</i>	1.0	1.8
TBDN1441	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	0.8	6.9

Probe hybridized area / DAPI stained area (%)

が、溶存酸素が存在したために、硫酸塩還元細菌によって生成された硫化物の一部を酸化していたものと推定される。一方、装置2の生物膜には *Thiothrix nivea* group がより多く存在していた。亜硝酸塩の生成が認められたことから、本装置では *Thiothrix nivea* group は溶存酸素の消費の他に硝酸塩の亜硝酸塩への還元も担っていたと推定される。前述したように、これらの細菌のごく近傍に硫酸塩還元細菌 *Desulfonema* spp. が多く存在していたことから、両者が共存し生物膜内で硫黄の酸化還元サイクルが形成されていたと考えられる。

硫黄脱窒細菌に関しては、本研究で設計したプローブ2種を用いて解析を行った。装置1では、両プローブで特異的な蛍光を示す細菌は極めて少なかったが、装置2では、TBDN1441 に特異的な蛍光を示す *Thiobacillus denitrificans* と推定される細菌が多く観察された。本脱窒装置では、*Thiobacillus denitrificans* が主に硫黄脱窒を行っていたと推定された。

4. 結論

割り箸を有機炭素源とした脱窒処理における硫黄の酸化還元微生物の役割として以下の結果が得られた。

1) 嫌気無酸素処理方式では、嫌気槽で硫酸塩還元に伴う還元型硫黄の生成と木質の分解に伴う酢酸の生成が、無酸素槽では他栄養性脱窒と硫黄脱窒が起こり、安定した窒素除去が可能であった。一方、単槽処理方式でも、高速の脱窒が可能であった。

2) 嫌気無酸素処理方式の割り箸を充填した嫌気槽では、木質の分解に伴う硫酸塩還元が起こった。単槽処理方式では、無酸素条件（硝酸塩が存在する条件）であるにも関わらず、高い硫酸塩還元活性を示したことから、硫酸塩還元細菌が木質の分解に関与していたと推定された。

3) FISH 法を適用した結果、木質充填槽は嫌気槽、無酸素槽生物膜ともに硫酸塩還元細菌 *Desulfobulbus* spp., *Desulfobacter* spp. 及び *Desulfonema* spp. をターゲットとするプローブに特異的な蛍光を示す細菌が多く存在していることが確認された。さらに、両生物膜において、糸状性細菌 *Thiothrix nivea* group が多く存在しており、溶存酸素の消費と硝酸塩から亜硝酸塩への還元を担っていた。さらに、その根幹部に *Desulfonema* spp. の付着が観察されたことから、*Desulfonema* spp. と *Thiothrix nivea* group の共存により、硫黄の酸化還元サイクルが形成されていたことが示唆された。

4) 単槽処理方式の無酸素槽では、本研究で設計した *Thiobacillus denitrificans* を標的とするプローブで特異的な蛍光を示す細菌が多く観察されたことから、*Thiobacillus denitrificans* が硫黄脱窒を担っていると推定された。

以上のことから、割り箸は硫酸塩還元条件で分解することにより脱窒に利用可能であることが示された。今後、継続性を検討する必要があるであろう。

謝辞

実験に御協力くださいました研究室修了生、森茂紀氏（国土計画（株））に、感謝します。本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金（萌芽研究）（No. 15656127）の補助を受けてまとめました。

参考文献

- 1) 甲斐勇二：アスペン材青変菌汚染の脱色，静岡大学農学部研究報告，No.35，pp. 43-47, 1985
- 2) 池本良子，小森友明，井出康行，金井一人：硫酸塩還元・硫黄脱窒プロセスによる有機物窒素除去に関する基礎的研究，環境技術，Vol. 27, No. 6, pp.432-439, 1998.
- 3) R. Yamamoto-Ikemoto *et al.*: Nitrogen removal from hydroponic culture wastewater by autotrophic denitrification using thiosulfate, *Water Science and Technology*, Vol. 42, No. 3-4, pp. 369-376, 2000.
- 4) 古米弘明，西川智世子，神子直之：粒状層硫黄脱窒による地下水からの硝酸性窒素除去—添加基質濃度の影響，水道協会雑誌，68(12)，pp.12-21，1999.

- 5) Odom and Singleton Editors: The Sulfate-Reducing Bacteria, 1993.
- 6) R. Boopathy *et al.*, Anaerobic biodegradation of explosives and related compounds by sulfate-reducing and methanogenic bacteria: A review: *Bioresource Technology*, Vol. 63, Issue 1, pp. 81-89, 1998.
- 7) Amann, R.L.: *In situ* identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, *Molecular Microbial Ecology Manual*, 3.3.6: pp. 1-15, 1995.
- 8) Amann, R.L., Atromley, J., Devereux, R., Key, R. and Stahl, D.A.: Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 58, No. 2, pp. 614-623, 1992.
- 9) Devereux, R., Kane, M.D., Winfrey, J., Stahl, and D.A.: Genus- and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria, *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 15, pp. 601-609, 1992.
- 10) Fukui, M., Teske, A., A β mus, B., Muyzer, G and Widdel, F.: Physiology, phylogenetic relationships, and ecology of filamentous sulfate-reducing bacteria (genus *Desulfonema*). *Archives of Microbiology*, Vol. 172, pp. 193-203, 1999.
- 11) Kanagawa, T., Kamagata, Y., Aruga, S., Kohno, T., Matthias, H., and Michael, W.: Phylogetic analysis of and oligonucleotide probe development for Eikelboom type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, pp. 5043-5052, 2000.
- 12) Aruga, S., Kamagata, Y., Kohno, T., Harada, S., Nakamura, K. and Kanagawa, T.: Characterization of filamentous Eikelboom type 021N bacteria and description of *Thiothrix disciformis* sp. nov. and *Thiothrix flexilis* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 52, pp. 1309-1316, 2002.
- 13) 長谷川聖, 栗栖太, 花木啓祐: 土壌中における硫黄脱窒細菌 *Thiobacillus denitrificans* の FISH 法による検出, 第 37 回環境工学研究フォーラム講演集, pp. 95-97, 2000.