

(22) 杉間伐材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

山下 恭広¹・池本 良子^{1*}

¹金沢大学大学院自然科学研究科 (〒920-1192石川県金沢市角間町)

* E-mail: rikemoto@t.kanazawa-u.ac.jp

硫酸塩還元細菌及び脱窒細菌の有機炭素源として杉間伐材を用いた窒素除去の検討を行なった。杉材を充填した嫌気生物ろ床では硫酸塩還元が進行した。硫酸塩還元細菌はセルロースの分解に関与していると推定された。無酸素生物ろ床では、窒素除去に伴い重炭酸塩が生成された。担体の周りに付着した生物膜では他栄養性脱窒が、担体内部では硫酸塩還元と硫黄脱窒の活性が高かった。FISH法を適用した結果、嫌気生物膜内には *Desulfobacter* spp. および *Desulfonema* spp. と推定される完全酸化型の硫酸塩還元細菌が検出されたが、無酸素生物膜では *Desulfonema* spp. と推定される硫酸塩還元細菌のみが検出された。また、硫黄脱窒細菌 *Thiomicrospira denitrificans* と *Thiobacillus denitrificans* は検出されなかった。

Key Words : cedar chips, denitrification, sulfate reduction, sulfur denitrification, FISH method

1. 序論

閉鎖性水域の富栄養化の進行を抑制するためには、排水処理における窒素除去が不可欠である。大規模な処理場では、高度処理を導入し栄養塩除去を行うことが可能であるが、小規模な下水処理施設や浄化槽、産業排水処理では、処理施設の変改を伴わない後処理としての脱窒が有効であると考えられる。これらの排水中には有機炭素源がほとんど含まれていないことから、生物学的窒素除去のための電子供与体の添加が不可欠である。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¹⁾、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。また、硫酸塩還元細菌には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気的に処理すれば、硫化水素を発生させることができ、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、著者らは、食堂などから大量に発生する割り箸に着目し、割り箸を生物学的窒素除去に用いる方法として、嫌気条件下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、その有効性の検討を行なった。その結果、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起こること、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ることを報告した。また、単槽処理方式でも処理槽内に硫酸塩還元細菌と硫黄脱窒細菌が共存し、脱窒が可能であることを報告している²⁾。

一方、日本国内の森林は国土面積の67%であるが、そのうち人工林が全森林面積中41%を占め、約7割が杉であるとされている。また、間伐材・林地残材は年間600万トンに上り、有効利用の対策が急務となっている³⁾。杉間伐材の微生物学的利用として、杉オガクズを用いた実験では、きのこ栽培、バイオマスエネルギー生産に有効であることが示唆され、セルロース分解酵素であるセルラーゼ生産にも適しているという報告がされている⁴⁾。杉材を割り箸と同様に脱窒に利用することができれば、割り箸よりも安定した供給源となると考えられる。

そこで、本研究では、まず、杉材を充填した嫌気生物ろ床を用いて杉材が硫酸塩還元細菌の有機炭素源として利用可能であるかどうかについて検討を行った。次に、硫酸塩還元により生成された硫化水素を硫黄脱窒細菌の電子供与体とすることにより窒素除去を行なう方法として、無酸素生物ろ床による窒素除去の検討を行なった。

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、16S rRNA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

(1) 実験装置と運転方法

実験装置の概要をFig. 1に示す。装置は、内径62mm、高さ330mmの亚克力製カラムを用い、Table 1に示す木質を有機炭素源かつ担体として充填した後、20℃の恒温室内に設置した。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。装置1は、木質担体として杉材を20×20×10mmにカットしたものを180g充填し、硝酸塩を含まない人工排水(NaHCO_3 35mg/l, CaCl_2 46mg/l, KCl 87mg/l, KH_2PO_4 46mg/l, MgSO_4 76mg/l)を通水した。運転開始直後は、空塔滞留時間12時間とし、43日目から、24時間に変更した。装置2は、杉材を約10mm角にカットしたものを180g充填し、運転開始から56日目までは硝酸塩を含まない人工排水(NaHCO_3 35mg/l, CaCl_2 46mg/l, KH_2PO_4 46mg/l, K_2SO_4 58mg/l)を通水した。その間、22日目までは空塔滞留時間24時間とし、その後、空塔滞留時間12時間に変更した。57日目からは、人工排水に硝酸塩(NaNO_3 85mg/l)を添加したものに變更し、空塔滞留時間12時間に設定した運転を継続したが、227-344日は24時間とした。装置3は、アテの枝打ちしたものを180g充填し、装置2の57日目以降と同様の硝酸塩を含む人工排水を用いて、滞留時間12時間の運転を行った。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。

(2) 処理槽内生物膜の活性測定

装置1では運転開始125日後に、装置2では運転開始292

日後と419日後に処理槽内の生物膜を担体ごと取り出し、生物膜を剥離して担体の外部に付着していた生物膜（剥離生物膜）と杉担体に付けた後、回分実験によって、硫酸塩還元活性、脱窒活性、硫黄脱窒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。回分実験の条件をTable 2に示す。添加した基質は硫酸塩、硝酸塩、チオ硫酸塩、モリブデン酸塩以外はすべて人工排水と同組成のものをを用いた。S 1-4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る。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である。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。TN 1-2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。AS 1-2及びAN 1-2は、種汚泥として用いた活性汚泥について、S 1-2及びN 1-2と同条件で行なったものである。さらに、S 4mとAS 2mは、モリブデン酸塩を添加して硫酸塩還元抑制条件で行ったものである。実験では、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。また、処理槽内に投入していた杉担体は3×2×1mm程度に切断して用いた。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

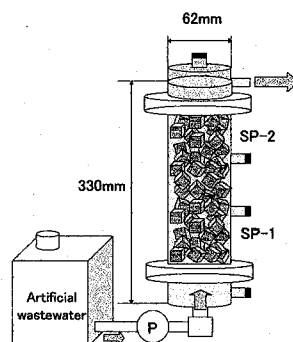


Fig. 1. Experimental set up.

Table 1. Microbial supported media

	Lumber	Size (mm)	Packing volume (g)	HRT (h)
Reactor 1	Cedar	20×20×10	180	12-24
Reactor 2	Cedar	10×10×10	180	12-24
Reactor 3	Arborvitae	-	180	12

Table 2. Experimental conditions using the batch experiments

Exp. No.	S 1	S 2	S 3	S 4	S 4m	N 1	N 2	N 3	SN 1	SN 2	SN 3	TN 1	TN 2	AS 1	AS 2	AS 2m	AN 1	AN 2
Biofilm	○	○	-	○	○	○	○	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-
Activated sludge	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	○	○	○	○
Lumber																		
Cedar	-	○	-	-	-	-	○	-	-	○	-	-	-	-	○	○	-	○
Cedar in the reactor	-	-	○	○	○	-	-	○	-	-	○	-	○	-	-	-	-	-
Concentrations (mg/l)																		
SO_4^{2-}	32	32	32	32	32	0	0	0	32	32	32	0	0	32	32	32	0	0
NO_3^-	0	0	0	0	0	200	200	200	200	200	200	200	200	0	0	0	200	200
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	118	118	0	0	0	0	0
MoO_4^{2-}	0	0	0	0	62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	62	0	0

なるように投入し、木質を乾燥重量1g添加した後、窒素ペ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、有機酸、重炭酸塩の分析を行った。

(3) 処理槽内生物膜の活性測定

処理槽内の硫酸塩還元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ーブ5種(660, 687, 221, 129, DNMA657)と、硫黄脱窒細菌*Thiomicrospira denitrificans*および*Thiobacillus denitrificans*をターゲットとしたプローブ(TMDN101, TBDN1441)の計7種であり、Cy3により蛍光標識した。

装置1では運転開始から125日目には嫌気槽の生物膜を、装置2では96日目と292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⁹⁾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

(1) 処理水質の変化

装置1では、基質中に溶存酸素4mg/l程度含んでいたが槽内にはDOは検出されず、装置内は嫌気状態となっていた。装置1の硫酸塩濃度の経日変化をFig. 2に示す。42日目までは滞留時間12時間で運転したが、硫酸塩の減少が少なかったため、滞留時間24時間にしたところ、60%程度の硫酸塩減少率を示した。処理槽内の硫酸塩の縦方向変化の典型例をFig. 3に示す。硫酸塩濃度が処理槽上部にいくにしたがって減少しており、硫酸塩還元が処理槽内全体で起こっていたことがわかる。処理槽内の硫酸塩還元速度は28 g-SO₄/m³dayであり、本実験装置に割り箸187g(本実験装置で用いた杉材とほぼ同量)を充填し、同様の条件の下で行なった実験で得られた硫酸塩還元速度(140 g-SO₄/m³day)の約1/5の速度であった。割り箸を用いた場合と同様に硫黄脱窒槽を後段に接続することにより窒素除去が可能であると推定される。

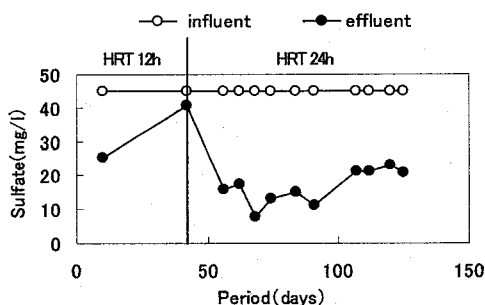


Fig. 2. Course of the sulfate concentrations in Reactor 1.

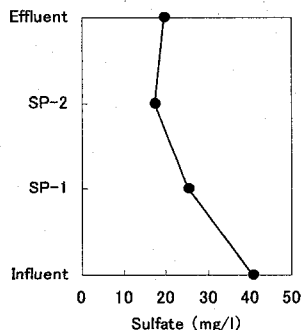


Fig. 3. Change of water characteristics in Reactor 1. (61 days HRT 24h)

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> ,	GAATTCACCTTCCCCCTCTG	660-679	30	Deverex <i>et al.</i> 1992 ⁸⁾
687	<i>Desulfomonas</i> , <i>Desulfuromonas</i> , <i>Desulfomicrobium</i> , <i>Bilophila</i> , and <i>Pelobacter</i>	TACGGATTCTACTCCT	687-702	0	Deverex <i>et al.</i> 1992 ⁸⁾
221	<i>Desulfobacterium</i> spp.	TGCGCGGACTCATCTTCAAA	221-240	20	Deverex <i>et al.</i> 1992 ⁸⁾
129	<i>Desulfobacter</i> spp.	CAGGCTTGAAGGCAGATT	129-149	10	Deverex <i>et al.</i> 1992 ⁸⁾
DNMA657	<i>Desulfonema</i> spp.	TTCCG(C/T)TCCCTCTCCATA	657-676	20	Fukui <i>et al.</i> 1992 ⁹⁾
TMDN101	<i>Thiomicrospira denitrificans</i>	CTTTGAGGTACATTAACATAT	101-120	10	Yamashita <i>et al.</i> 2005 ²⁾
TBDN1441	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	GTCATGAAACCCCGCTGGT	1441-1460	20	Yamashita <i>et al.</i> 2005 ²⁾

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

^b Formamide concentration in the hybridization buffer.

Fig. 4に装置2における硫酸塩、硝酸塩、酢酸塩および無機炭素の経日変化を示す。装置1と同様に装置内の溶存酸素はわずかであり、硝酸塩を含まない人工排水を用いた56日目までは、硫酸塩の減少と無機炭素の増大が認められたことから、木質の分解に伴い硫酸塩還元が進行したことがわかる。硫酸塩還元速度は装置1と同程度であり、無機塩の濃度の影響はないことがわかる。人工排水に硝酸塩を添加してからは、硫酸塩の減少が認められなくなり、変わって硝酸塩が減少し、30%程度の脱窒が進行した。運転開始227日後から空塔滞留時間を24時間に延長した結果、脱窒率が急激に上昇し、80%以上となった。回分実験のために292日目に装置内の生物膜を取り出した後、杉担体のみを装置内に戻したが、脱窒は継続したことから杉担体内部に増殖した生物膜が大きな役割を担っていたと推定される。345日目に空塔滞留時間を12時間に戻した結果、脱窒率は約30%に戻った。

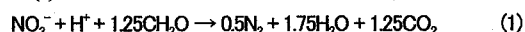
運転期間を通しての脱窒速度は $43 \text{ g-NO}_3/\text{m}^3\text{day}$ であり、割り箸を充填して同様の条件で運転した装置($180 \text{ g-NO}_3/\text{m}^3\text{day}$)の約1/4程度の値を示した。また、割り箸を充填した装置では、嫌気槽で酢酸塩及びプロピオン酸塩の増加が起こっていたのに対し、本実験で用いた杉材を充填した装置では、運転開始時に酢酸塩の生成が認められたが、それ以降は酢酸塩もプロピオン酸塩も検出されなかつ

た。さらに、割り箸を充填した装置では、滞留時間を短くすることで、亜硝酸塩が検出されたが、本装置では滞留時間を短縮しても亜硝酸塩は検出されなかった。

Fig. 5にアテを用いた装置3の経日変化を示す。分解しやすい葉が混ざっていたせいか、当初脱窒が良好に進行したが、その後、徐々に脱窒率が低下し300日以降11%程度で安定した。脱窒速度は $16 \text{ g-NO}_3/\text{m}^3\text{day}$ であり、杉装置の40%程度であった。以上のことから、充填する木質の性質が脱窒速度に大きく影響すると考えられる。

Fig. 6, 7に装置2及び3の処理槽縦方向の水質変化の典型例を示す。両者とも、硫酸塩の変化は認められず、脱窒が装置全体で進行していた。

Fig. 8は、装置2と装置3の硝酸塩減少量と無機炭素増加量の関係を示したものである。硝酸塩の減少に伴ない無機炭素が増加していることから、脱窒に伴って充填した間伐材の分解が進行したことがわかる。木質中のセルロースの分解に伴って脱窒が進行したと仮定した場合の反応は(1)式のように表すことができる。



式(1)より、1mol (62g)の硝酸塩の減少に伴って1.25mol (15g)の無機炭素が生成されることになるが、本実験結果は、量論値に近い値が得られており、セルロースの分解に伴って脱窒が進行していたことが示唆される。

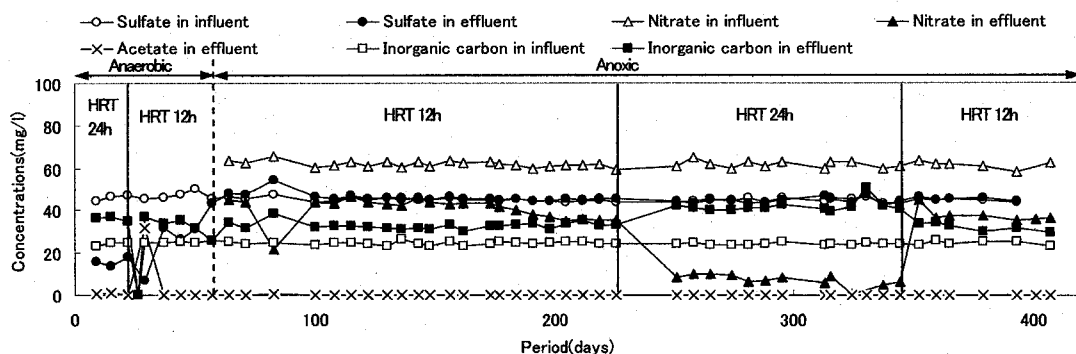


Fig. 4. Course of the sulfate, nitrate, acetate and inorganic carbon concentrations in Reactor 2.

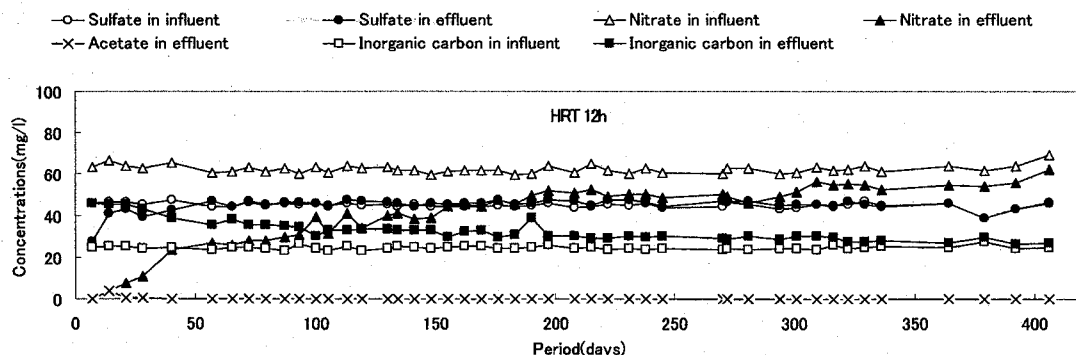


Fig. 5. Course of the sulfate, nitrate, acetate and inorganic carbon concentrations in Reactor 3.

一方、処理水の着色は認められず、DOCを測定した結果、装置2及び装置3ともにDOCの増加もほとんど認められなかったことから、木質の分解によって溶解性の有機物が流出することはないことが確認された。

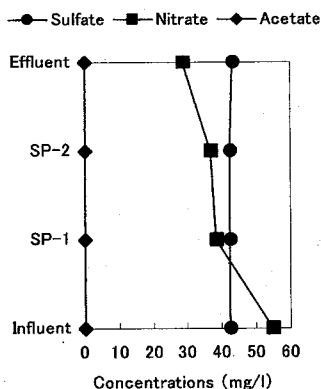


Fig. 6. Change of water characteristics in Reactor 2. (94 days HRT 12h)

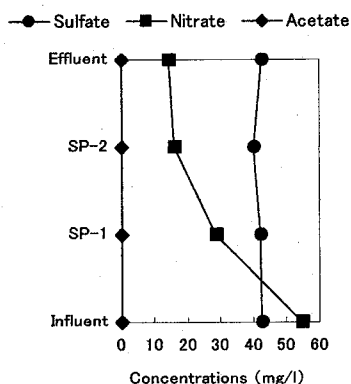
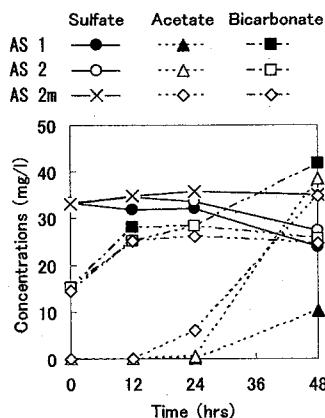
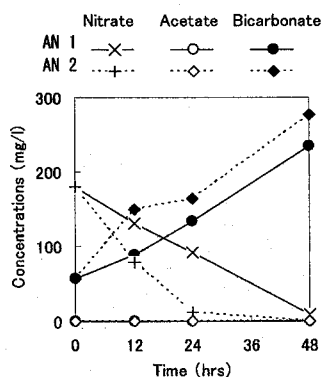


Fig. 7. Change of water characteristics in Reactor 3. (51 days HRT 12h)



(a) Exp. AS 1-2 and AS 2m



(b) Exp. AN 1-2

Fig. 9. Typical results of the batch experiments using activated sludge.

(2) 活性汚泥による杉材の分解性

Fig. 9は種汚泥として用いた活性汚泥を用いて回分実験を行なった結果を示す。Fig. 9 (a)は硫酸塩を含む基質を用いた条件 (Exp. AS 1-2 and AS 2m) で行った回分実験結果を比較したものである。杉材を添加していない (Exp. AS 1) と杉材を添加した (Exp. AS 2) ではいずれも硫酸塩が減少し酢酸が生成していたが、硫酸塩還元速度にはほとんど差がないことがわかる。しかし、Exp. AS 2では、Exp. AS 1よりも酢酸濃度が高くなっていることから、杉材を活性汚泥に添加することにより、酢酸が生成されることがわかる。さらに、Exp. AS 2mでモリブデンを添加して硫酸塩還元を抑制しても酢酸生成量が変わらないことから、活性汚泥の硫酸塩還元細菌は杉材の分解による酢酸生成にほとんど関与していないことがわかる。Fig. 9 (b)の硝酸塩を含む基質を用いた条件 (Exp. AN 1-2) においても、杉材の有無に関わらず脱窒が進行したが、杉材を添加した条件 (Exp. AN 2) の方が杉材を添加していない条件 (Exp. AN 1) よりも硝酸塩の減少が大きいことから、杉材を脱窒に用いることのできる細菌が存在していたことがわかる。

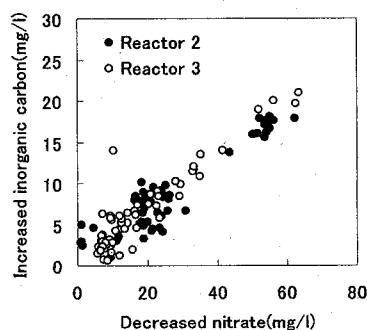


Fig. 8. Relationship between decreased nitrate and increased inorganic carbon.

(3) 硫酸塩還元活性及び脱窒活性

Fig. 10に運転開始125日目に装置1から採取した生物膜と担体の杉材を用いて行った回分実験の結果を示す。Fig. 10(a)は硫酸塩を含む基質を用いた条件(Exp. S 1-4)で行った回分実験結果を比較したものであるが、いずれの条件でもFig. 9に示した種汚泥を用いた回分実験よりも多くの硫酸塩の減少と無機炭素の増加が認められたことから、装置内に硫酸塩還元細菌が集積されたことがわかる。これらの硫酸塩の減少速度から硫酸塩還元速度を求めた。担体から剥離した生物膜のみの条件(Exp. S 1)では、生物膜内に蓄積された有機物の分解もしくは生物膜の自己分解による硫酸塩還元が進行したと考えられるが、剥離生物膜に洗浄した新しい杉材を添加すると(Exp. S 2)硫酸塩還元減少量が増大し、重炭酸塩も多く生成された。さらに、装置内から採取した杉担体を添加すると(Exp. S 4)、硫酸塩還元量も重炭酸塩生成量もより多くなった。馴養された生物膜中に増殖した硫酸塩還元細菌は、杉材の分解に関与していたと推定される。一方、装置内から採取した杉担体だけExp. S 3でも硫酸塩還元が進行したことから、担体内部に硫酸塩還元細菌が増殖していたことがわかる。さらに、剥離生物膜に杉材もしくは装置内杉担体を添加した条件(Exp. S 2及びExp. S 4)で酢酸塩濃度の増加が認められたのに対し、生物膜を添加しないで杉担体のみで行ったExp. S 3では酢酸塩の生成は認められなかったことから、剥離生物膜内には、杉材由来の有機物を酢酸塩にまで分解することができる細菌が集積されていたと考えられる。Fig. 10(b)は、剥離生物膜と杉担体を用いて、モリブデンを添加して硫酸塩還元を抑制した条件(Exp. S 4m)とモリブデン未添加の条件(Exp. S 4)で行った結果を比較したものである。酢酸塩の増加量は両者に差はなかったが、重炭酸塩の増加量が、モリブデンを添加した条件(Exp. S 4m)よりも添加しない条件(Exp. S 4)の方が多くなった。このことは、硫酸塩還元細菌が、木

質の無機化に関与していたことを示している。約30gの硫酸塩還元に伴って約35gの重炭酸塩が生成されており、これはセルロースの分解に伴ない1 mol (96g)の硫酸塩還元によって、2 mol (122g)の重炭酸塩が増加する(式(2))という量論と近い値が得られており、硫酸塩還元細菌はセルロースの無機化に関与していたことが示唆される。



Fig. 11に運転開始292日目に装置2から採取した剥離生物膜および杉担体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 1-4)(Fig. 11(a))では、担体から剥離した生物膜のみを用いた条件(Exp. S 1)でも、生物膜に新しい杉材を添加した条件(Exp. S 2)でも、硫酸塩の減少がほとんど認められないのに対し、杉担体を用いた条件(Exp. S 3)と剥離生物膜と杉担体を混合した条件(Exp. S 4)では硫酸塩の減少が認められた。担体内部に硫酸塩還元細菌が集積されていたと考えられる。また、Exp. S 4はExp. S 3よりも高い硫酸塩減少率を示していたことから、剥離生物膜にも担体の杉材を分解することができる硫酸塩還元が集積されていたと推定される。一方、装置1と同様に剥離生物膜に新しい杉材を添加した条件(Exp. S 2)と杉担体と剥離生物膜を混合した条件(Exp. S 4)で多くの酢酸生成が認められたことから、剥離生物膜には、杉材を酢酸塩にまで分解することができる細菌が集積されていたことがわかる。Fig. 11(b)に示すように硝酸塩を含む基質を用いた場合(Exp. N 1-3)では、いずれの条件でも、硝酸塩の減少と炭酸塩の増大が認められたことから、他栄養性脱窒が進行していることがわかる。硝酸塩の減少速度から脱窒速度を求めた。担体から剥離した生物膜だけ(Exp. N 1)では硝酸塩の減少はわずかであったが、剥離生物膜に新しい杉材を添加した条件(Exp. N 2)では硝酸塩の急激な減少と炭酸塩の増加が認められた。これは、担体の外側に脱窒細菌が増殖し杉由来の有機物の

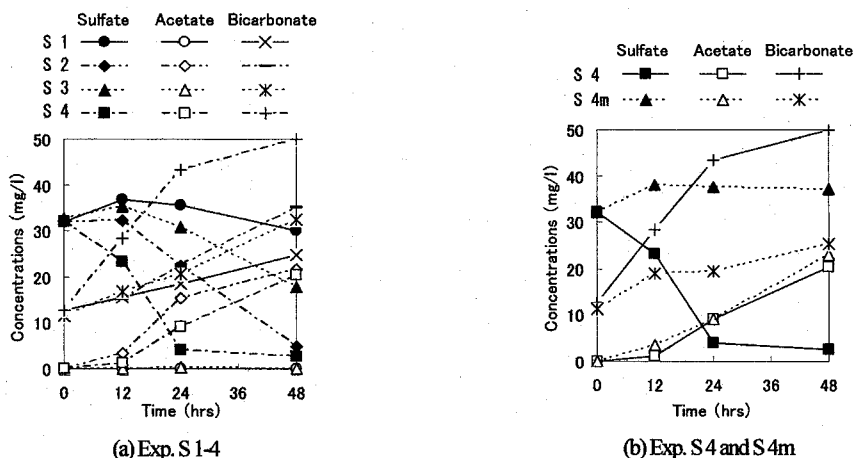
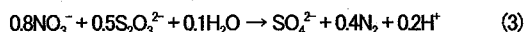


Fig. 10. Typical results of the batch experiments using biofilm in Reactor 1. (125 days)

分解を担っていたことを示すものである。一方、周囲の生物膜を剥離させた杉担体のみを用いた条件(Exp. N3)でも、多くの硝酸塩の減少と無機炭素の増大が認められたことから、担体の内部にも担体である杉材由来の有機物を利用する脱窒細菌が集積されていたと考えられる。硝酸塩の減少量と無機炭素の増加量は、装置内の水質変化と同様にセルロースの分解の量論と一致していた。Fig. 11 (c) は硫酸塩と硝酸塩を含む基質を用いた場合(Exp. SN 1-3)の結果を示しているが、硫酸塩が存在しても硝酸塩のみを用いた条件(Exp. N 1-3)とほとんど同じ傾向が認められた。硫酸塩の存在が脱窒にほとんど影響を与えないことがわかるが、仮に硫酸塩還元が進行したとしても、生成した硫化物は速やかに硫黄脱窒細菌によって利用され硫酸塩に酸化されるので、あたかも他栄養性脱窒が進行した場合と同じ結果となることから、両者が共存したことを否定することはできない。Exp. N1-3と同様に硝酸塩の減少速度から脱窒速度を求めた。Fig. 11 (d)はチオ硫酸塩と硝酸塩を含む基質を用いた場合(Exp. TN 1-2)の結果を示しているが、剥離生物膜を用いた条件(Exp. TN 1)

でも、杉担体を用いた条件(Exp. TN 2)でも、チオ硫酸塩の減少に伴い、硝酸塩の減少と硫酸塩の増加が認められた。チオ硫酸塩を用いた硫黄脱窒の反応は(3)式のように表すことができる。



式(3)より、1mol (96g)の硫酸塩の増加により硝酸塩が0.8mol (49g)減少することになるが、Exp. TN 1はこの量論にほぼ従っていたことから、チオ硫酸塩を利用した硫黄脱窒が進行していることがわかる。そこで、硫酸塩の増加速度から硫黄脱窒速度を求めた。一方、杉担体を用いたExp. TN 2では、硝酸塩の減少量が量論値を大きく上回っていたが、これは、杉担体を用いた脱窒が同時に進行していたためと考えられる。剥離生物膜を用いたExp. TN 1よりも杉担体を用いたExp. TN 2の方が硫酸塩の増加量が多かったことから、担体内部に硫黄脱窒細菌が多く集積されていたと推定される。

回分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では、木質担体から剥離した生物膜も担体内部に増殖した生物膜も高い硫酸塩還

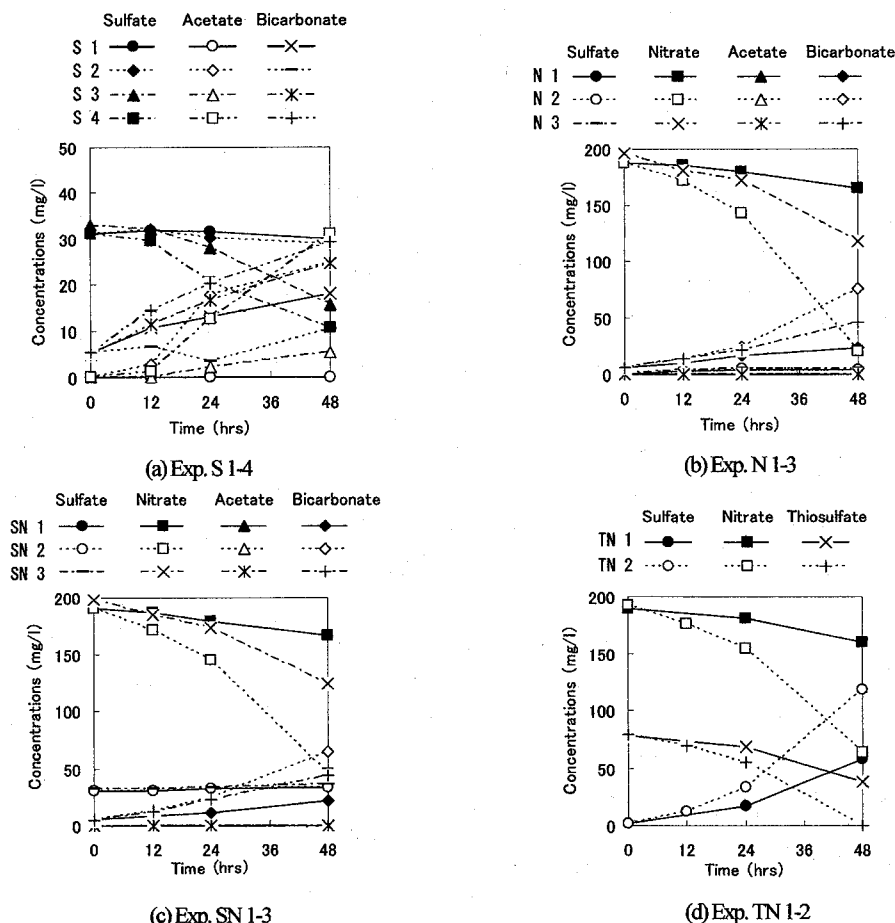


Fig. 11. Typical results of the batch experiments using biofilm in Reactor 2. (292 days)

元活性を有しており、これらの微生物が木質成分の分解に関与していることがわかる。割り箸を用いた同様の実験では、生物膜に杉材を添加した場合の硫酸塩還元速度は0.7 mgCOD/gSShrと報告されており、本実験で馴養した生物膜の1.5倍程度の活性を示していた。しかし、前述したように処理装置内での硫酸塩還元速度は割り箸を用いた場合の方が約4倍速かった。これは、杉材を用いた場合に、割り箸を用いた場合よりも、処理槽内の担体の充填率が大きくなるため、実滞留時間が短くなったことと、生物膜の付着量が杉材を用いた場合の方が少なかったことが原因と考えられる。生物膜の付着量を増大させることができれば処理速度を増大することが可能であると考えられる。

運転開始292日目の装置2では、担体の周りに付着した生物膜内に硫酸塩還元細菌、他栄養性脱窒細菌、硫黄脱窒細菌が共存していたことがわかる。割り箸を充填した生物ろ床内の生物膜に杉材を添加した場合の脱窒速度は0.87 mgCOD/gSShrであり、割り箸を添加した場合でも1.15 mgCOD/gSShrであったと報告されており、本実験の装置2の脱窒活性の方が高い値を示していた。嫌気性ろ床と同様に、装置の改良によってより高速な脱窒を行うことができる可能性があると考えられる。また、杉材を用いた硫酸塩還元活性は装置1の生物膜の1/10程度であり、同生物膜の脱窒活性と比べると3桁低い値であった。杉担体の外に付着した生物膜では、杉の分解によって供給された有機物を用いた脱窒が主に進行していたと考えられる。硫黄脱窒活性が他栄養性脱窒活性の1/3であり硫酸塩還元活性と比較するとかなり高い値を示しているのは、後述する担体内部の生物膜内の硫酸塩還元細菌に

より生成された硫化物を利用していると考えられるよりも、硫黄酸化能を有する脱窒細菌によるものであると考えた方が妥当であろう。

一方、装置2の担体内部の生物膜の硫酸塩還元活性は、嫌気条件の装置1と同程度であり、担体内部に硫酸塩還元細菌が増殖していることがわかる。また、担体から剥離した生物膜と比較すると担体内部生物膜の硫酸塩還元活性は約5倍、硫黄脱窒活性は約1.5倍の値を示している。生物膜の活性は生物膜の単位乾燥重量当たり値であるのに対し、杉担体内部の値は担体の単位乾燥重量当たりの数値であり、担体中の生物膜あたりの活性ははるかに高い値であると推定される。以上のことから、担体内部で硫酸塩還元細菌と硫黄脱窒細菌が共存し、木質の分解に伴う硫酸塩還元と、硫酸塩還元により生成した硫化物を用いた脱窒が進行していたと推定できる。運転開始292日目の回分実験の後に、杉担体のみを処理槽にもどして運転を継続した。その結果、先に示したように脱窒は進行したが、担体の外側に生物膜の増殖はきわめて少なく、運転開始419日目には剥離生物膜を得ることができなかった。杉担体のみで回分実験を行った。しかし、担体内部生物膜の活性を測定した結果、292日目の剥離生物膜が多く存在した時期よりも高い硫酸塩還元活性を示していた。無酸素条件の運転の継続により担体内部での硫酸塩還元が促進され、脱窒に重要な役割を担っていたと推定される。

(4) 硫酸塩還元細菌の群集解析

Table 5 に装置1と装置2の剥離生物膜内の硫酸塩還元細菌と硫黄脱窒細菌の群集解析結果を示す。装置1では、

Table 4 Summary of denitrification and sulfate reduction rates

		Rates (mgCOD/gSShr)			
		S 1-4 sulfate reducing rate	N 1-3 denitrification rate	SN 1-3 denitrification rate	TN 1-2 sulfur denitrification rate
Reactor 1 (anaerobic bed biofilm) 125days	Attached biofilm	0.13	-	-	-
	Biofilm inside wood	0.25	-	-	-
	Attached biofilm + Cedar	0.51	-	-	-
	Attached biofilm + Biofilm inside wood	0.34	-	-	-
Reactor 2 (anoxic bed biofilm) 292days 419days	Attached biofilm	0.04	0.38	0.35	0.86
	Biofilm inside wood	0.19	0.84	0.86	1.16
	Attached biofilm + Cedar	0.06	2.79	2.31	-
	Attached biofilm + Biofilm inside wood	0.15	-	-	-
	Biofilm inside wood	0.26	0.93	0.74	-

129プローブで特異的な蛍光が検出される*Desulfobacter* spp.と推定される細菌とDNMA657プローブで特異的な蛍光が検出される*Desulfonema* spp.と推定される細菌が優占的に存在していた。割り箸を用いた実験でも、同様な細菌が検出されており、嫌気条件下の木質の分解では、この2種類の硫酸塩還元細菌が優占的に増殖すると推定された。しかし、割り箸を用いた実験では660プローブで特異的な蛍光を示す*Desulfobulbus* spp.と推定される細菌も多く検出されていたが、本装置ではほとんど検出されなかった。*Desulfobacter* spp. 及び*Desulfonema* spp.は完全酸化型の硫酸塩還元細菌であり、*Desulfobulbus* spp.はプロピオン酸などを酢酸にまで分解する不完全酸化型の硫酸塩還元細菌であることが知られている¹⁾。本装置で不完全酸化型の硫酸塩還元細菌が検出されなかったことは、処理槽内に酢酸が検出されなかったこと、及び回分実験の結果で硫酸塩還元に伴う酢酸の生成が認められなかったことと一致していた。しかし、その存在割合は割り箸を用いた場合よりも小さい値を示しており、その他の硫酸塩還元細菌も共存した可能性が残される。一方、宮里ら¹⁰⁾は、活性汚泥中の硫酸塩還元細菌について検討した結果、*Desulfobulbus* spp. 及び*Desulfonema* spp.と推定される細菌が検出されることを報告している。木質を充填し嫌気条件で運転を行なうことにより、活性汚泥中に存在した硫酸塩還元細菌の群集が変化し、完全酸化型の硫酸塩還元細菌が優占種となったものと考えられる。

一方、装置2では、運転開始96日目（嫌気条件から無酸素条件に切り替えて40日目）には、装置1と同様に*Desulfobacter* spp.と推定される細菌と*Desulfonema* spp.と推定される細菌が優占的に検出されたのに対し、運転開始292日目には*Desulfonema* spp.と推定される硫酸塩還元細菌のみが検出された。嫌気条件で増殖した*Desulfobacter* spp.と*Desulfonema* spp.のうち無酸素条件では*Desulfonema* spp.が担体の外側に残ったものと推定される。担体内部の硫酸

塩還元活性が高く、担体を用いた回分実験でも酢酸の生成が認められなかったことから、担体内部の嫌気域に*Desulfobacter* spp.が増殖していたことが示唆される。また、硫黄脱窒細菌では、TMDN101プローブで特異的な蛍光を示す*Thiomicrospira denitrificans*とTBDN1441プローブで特異的な蛍光を示す*Thiobacillus denitrificans*の検出を行なったが、嫌気条件の装置1の生物膜内にわずかであるが蛍光が検出された。装置1には硝酸塩の供給はなかったが基質中に溶存酸素が含まれていたため、これらの細菌が溶存酸素を利用した硫黄酸化を担っていたと推定される。一方、装置2では、これら2種類の硫黄脱窒細菌はほとんど検出されなかった。前述したように、剥離生物膜の硫酸塩還元活性が低かったため、硫黄脱窒細菌の現存量は非常に少なかったと考えられる。割り箸を用いた装置では、*Thiomicrospira denitrificans* 及び *Thiobacillus denitrificans*に加え、*Thiothrix nivea* groupが硫酸塩還元細菌の近傍に多く検出されたが、本装置では、*Thiothrix* spp.もまったく検出されなかった。これらの微生物群集の違いが、脱窒速度の差異に現れたものと考えられる。木質担体を用いた回分実験では高い脱窒活性を示していたことから、担体内部生物膜に硫黄脱窒細菌が多く集積されていたと考えられるが、担体内部に増殖した細菌のFISH法での検出および担体内部生物膜からのDNA抽出を試みたが、困難であったことから、今後、DNA抽出方法について検討を行う必要がある。

以上の結果から、装置2内の微生物の働きをFig. 12のように推定することができる。剥離生物膜には、硫酸塩還元細菌では*Desulfonema* spp.と他栄養性脱窒細菌が木質由来の有機物を競合し、他栄養性脱窒細菌が優占化していたと推定される。一方、担体内部には、*Desulfobacter* spp.などの硫酸塩還元細菌がセルロースの分解に伴って硫化水素を生成し、そのごく近傍で生成された硫化水素を硫黄脱窒細菌が酸化するとともに脱窒を行うという硫黄の

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	
		125days Anaerobic bed biofilm	96days Anoxic bed biofilm	292days Anoxic bed biofilm
660	<i>Desulfobulbus</i> spp.	0.6	0.0	0.1
687	<i>Desulfovibrio</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.	0.3	0.0	0.4
129	<i>Desulfobacter</i> spp.	1.7	1.4	0.1
DNMA657	<i>Desulfonema</i> spp.	2.1	1.8	2.7
TMDN101	<i>Thiomicrospira denitrificans</i>	0.4	0.0	0.0
TBDN1441	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	0.3	0.0	0.0

Probe hybridized area / DAPI stained area (%)

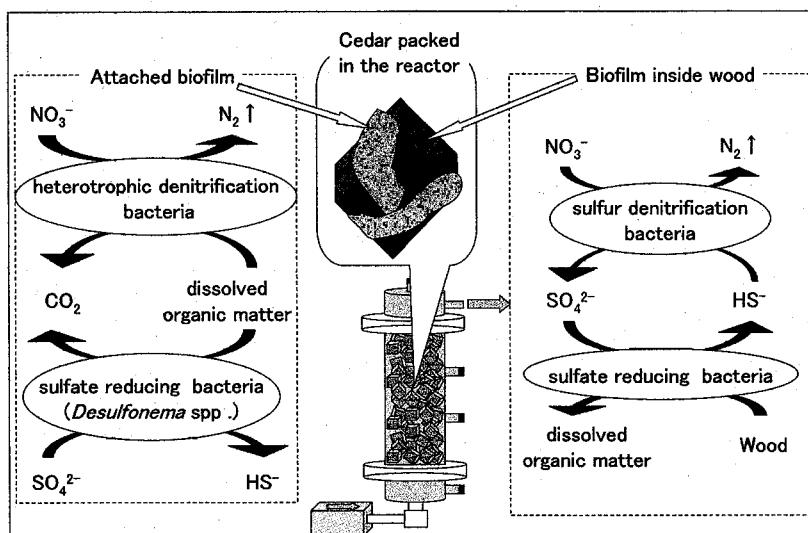


Fig. 12. Microbial reaction model in the biofilm of the anoxic biological filter reactor packed with cedar.

酸化還元サイクルが形成され、脱窒が進行していたと考えられる。

4. 結論

杉間伐材を有機炭素源とした脱窒処理における硫酸塩還元細菌及び硫黄脱窒細菌の役割として以下の結果が得られた。

1) 種汚泥として用いた活性汚泥中には、杉材を利用できる硫酸塩還元細菌は少ないが、杉材を充填したカラムにより、杉材を利用する硫酸塩還元細菌を集積することができた。処理槽内に集積された硫酸塩還元細菌は、セルロースの無機化に関与していると推定された。生物膜にFISH法を適用した結果、嫌気生物ろ床では、完全酸化型の硫酸塩還元細菌である *Desulfobacter* spp. 及び *Desulfonema* spp. と推定される細菌が検出された。

2) 杉材及びアテを充填した無酸素条件の生物ろ床において、木質の分解に伴う脱窒が進行した。脱窒速度は杉材の方が速かったが、割り箸を用いた場合の1/4であった。しかし、脱窒活性には大きな差はなかったことから、装置の改良により脱窒速度を向上させることが可能であると考えられた。

3) 杉材を充填した無酸素生物ろ床では、担体の外側で他栄養性脱窒が、内部で硫酸塩還元と硫黄脱窒が進行した。担体から剥離した生物膜には硫酸塩還元細菌 *Desulfonema* spp. と推定される硫酸塩還元細菌が検出されたが、硫黄脱窒細菌 *Thiomicrospira denitrificans* と *Thiobacillus denitrificans* は検出されなかった。杉担体内部の微生物群集を検出することはできなかった。

今後、間伐材内部の微生物群集を明らかにすることが重要である。

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））、研究室卒業生、山口達也氏に、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. 15989127）の補助を得てまとめました。

参考文献

- 1) Odom and Singleton Editors: The Sulfate-Reducing Bacteria, Springer-Verlag, 1993.
- 2) 山下 恭広, 池本 良子: 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, 環境工学研究論文集, Vol.42, pp581-590, 2005.
- 3) 中村太士, 小池孝良: 森林の科学, 朝倉書店, 2005.
- 4) 小川喜八郎, 杉田浩一: 杉間伐材の微生物学的利用, 宮崎大学農学部研究報告, Vol.34(1), pp.149~155, 1987.
- 5) Ramaraj Boopathy, Charles F. Kulpa and John Manning: 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Fukui, M., Teske, A., Afmus, 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.
- 10) 宮里直樹, 池本良子, 高松さおり: 活性汚泥の硫黄酸化還元活性と関連微生物の変動特性, 土木学会論文集, No. 804/VII-37, pp.93-100, 2005.

(2006.5.26受付)

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

Takahiro YAMASHITA¹, Ryoko YAMAMOTO-IKEMOTO¹

¹Graduate School of Natural Science & Technology, Kanazawa University

Sulfate reduction and denitrification using cedar as organic carbon source were examined in an anaerobic biological filter reactor and an anoxic biological filter reactor. In the anaerobic reactor packed with cedar chips, sulfate reduction occurred and bicarbonate was produced. It was estimated that sulfate reducing bacteria utilized cellulose. In the anoxic biological filter reactor packed with cedar chips, nitrate decreased and bicarbonate increased. It was estimated that heterotrophic denitrification mainly occurred in the attached biofilms, although sulfate reducing bacteria coexisted with sulfur denitrification bacteria inside of wood. Microbial community of sulfate reducing bacteria and sulfur denitrification bacteria was examined by a FISH method. *Desulfobacter* spp. and *Desulfonema* spp. were most common sulfate reducing bacteria detected in the anaerobic biological filter reactor. In the anoxic biological filter reactor, only *Desulfonema* spp. was detected in the attached biofilm. Sulfur denitrification bacteria such as *Thiomicrospira denitrificans* and *Thiobacillus denitrificans* weren't observed in the attached biofilm.