

B-37 微好気性生物膜内における硫酸塩還元細菌の空間的分布と硫黄の挙動

北海道大学大学院工学研究科 ○伊藤 司 佐藤 久
岡部 聡 渡辺 義公

1. はじめに

下水処理施設において硫酸塩還元反応によって発生する硫化水素 (H_2S) は、悪臭、管きよの腐食、硝化反応の阻害、及び溶存酸素の消費といった問題を引き起こす。また、配管内に形成された生物膜内で H_2S を代謝するバルキング原因糸状性細菌が増殖し、活性汚泥槽内への供給源となる可能性がある。その一方で、硫酸塩還元反応は下水処理において嫌氣的な有機物分解に関与している。生物膜の機能を強化し安定的な処理を確立するためには、生物膜内の硫酸塩還元及び硫化物酸化機構に関わる硫酸塩還元細菌 (SRB) の役割を解明する必要がある。しかしながら、生物膜内では硫黄の内部循環が存在し、リアクター内の物質収支のみから把握することは困難である。従って、生物膜内における硫酸塩還元及び硫化物酸化の機構を解明するためには、硫黄関連微生物の定量と現位置 (*in situ*) での SRB 活性の測定が重要となる。近年、FISH (蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション) 法の生物膜等への適用により、目的とする微生物の *in situ* での検出が可能となった。本研究では、微好気性の都市下水生物膜を対象とし、FISH と CLSM (共焦点走査型レーザー顕微鏡) の併用により硫酸塩還元細菌を菌体レベルで検出し、生物膜内の空間分布を測定した。さらに先端径がわずか $10\mu\text{m}$ 程度の微小電極を用いて *in situ* での硫酸塩還元活性及び硫化物酸化活性を測定した。これら FISH と微小電極の測定結果より、微生物の空間的分布を活性分布に関連付け、硫酸塩還元細菌を中心とした生物膜内における硫黄の挙動について検討を加えた。

2. 実験方法

本研究では札幌市 S 下水処理場に設置したベンチスケールの全水没型回転円板装置 (反応槽容積 5.6L) を用いて生物膜を馴養した。流入基質には最初沈殿池流出水を用い、反応槽内の硝酸性窒素濃度が約 3mg-N/L になるように硝酸塩を槽内に連続的に添加した。

2.1 SRB 菌体密度分布の測定

採取した生物膜は Amann の方法に準じて FISH を施した。用いたプローブは SRB385 他 14 種類である。試料の観察には LSM510 (Ar, HeNe-laser 装備) を使用した。画像内の自家蛍光の判別を容易にするため LP560 (for Rhodamine: 赤) 及び LP505 (for FITC: 緑) の 2 波長でそれぞれスキャンし、一つの画像に重ね合わせた。これによりプローブの蛍光が赤の場合、自家蛍光は橙色となる。菌数の測定には 63 倍対物レンズを使用して生物膜深さ当たり任意の投影画像を 15 枚作成、個々の画像について目視で自家蛍光を判別しながらセルをカウントした。画像から得られたバイオマスの体積と、別途に求めた生物膜の間隙率を加味することにより生物膜単位体積当たりの菌体密度を求めた。さらにこれを深さ方向に整理し、菌体密度分布とした。

2.2 生物膜内基質濃度プロファイルの測定

反応器の処理水質が定常となった後に生物膜を採取し、基質 (SO_4^{2-} : 0.3mM 、 NO_3^{2-} : 0.25mM 、酢酸ナトリウム: 0.9mM or プロピオン酸ナトリウム: 0.6mM) を満たしたフローセル内に固定し、生物膜内基質濃度プロファイルを測定した。測定には本研究室で制作した DO、 H_2S 、pH 微小電極を用いた。DO 及び H_2S 微小電極の制作は Revsbeck and Jorgensen の、pH 微小電極の制作は de Beer and van den Heuvel の方法に準じた。

2.3 還元性硫黄化合物 (S^0 、AVS) の測定

酢酸亜鉛で処理した生物膜を Microslicer™ により支持体に平行に3層にスライス、エタノール抽出後、遠心分離にかけ、上澄水中の S^0 を HPLC (254nm) で測定した。続いて遠心分離後の沈殿物内の酸揮発性硫化物 (AVS: FeS 及び H_2S) 濃度を Fossing and Jorgensen の方法に準じて定量した。

3. 実験結果と考察

3.1 好気性生物膜内における SRB の分布およびその存在形態

図1に生物膜内 SRB の菌体密度分布および存在形態の分布を示す。SRB は生物膜全体に $4 \sim 10 \times 10^9$ cells/(cm³-biofilm) 存在し、好氣的と思われる表層 100 μ m でも $8 \sim 10 \times 10^9$ cells/(cm³-biofilm) 存在した。菌体当たりの乾燥重量、最大基質消費速度 V_{max} 、及び硫酸塩還元活性ポテンシャルの実験値から計算により求めた生物膜内 SRB 菌体密度 ($0.1 \sim 1.4 \times 10^9$ cells/(cm³-biofilm)) は、FISH から得られたオーダーと同じであったことから、FISH を用いた方法の妥当性が示されたといえる。MPN 法による測定では有機源として酢酸、プロピオン酸を用いた両者で $10^5 \sim 10^7$ MPN/(cm³-biofilm) 存在し、表層から底層へ減少する傾向を示した。また、FISH を用いた方法より $10^2 \sim 10^4$ 低い値であった。

SRB の存在形態は生物膜深さ方向に明らかに傾向が見られた。表層から中層 (0~1000 μ m) にかけては 90%以上がシングルセルで存在していたが、底層 (1000 μ m~) では急激にクラスターセルの割合が増加し、30~40%がクラスターを形成していた。クラスターは硝化細菌に見られるような球状ではなく、直径 5~10 μ m 程度のいびつな形状であった。一般に好気的な環境に生息する SRB はクラスターを形成するといわれているが、本実験では逆に嫌気的な底層にクラスターが多い結果が得られた。本実験で用いた生物膜は O_2 が表面から約 100 μ m 程度で枯渇する好気的な環境であったため、表層における O_2 濃度は SRB に影響を与えず、クラスター形成に至らなかったと考えられるが、詳細については不明である。

3.2 好気性生物膜内の硫化物酸化

表1にリアクターの平均水質を示す。硫酸塩は約 200 μ M 還元され、生成された H_2S が酸化されることにより AVS (酸揮発性硫化物) および S^0 (単体硫黄) が 50 μ M と 100 μ M 検出された。そこで膜内に蓄積する硫化物を測定したところ、 S^0 は表面 0~200 μ m の領域に、AVS は S^0 ピークの下 150~400 μ m の領域に最も多く蓄積しており、それぞれ $9 \sim 17 \mu$ mol/(cm³-biofilm)、 $3 \sim 10 \mu$ mol/(cm³-biofilm)であった (図2)。図3に微小電極を用いて測定した生物膜深さ方向の O_2 、T- H_2S 、pH 濃度プロファイルと、計算により求めた硫酸塩還元、T- H_2S 酸化、 O_2 消費速度および活性領域を示す。バルク水中に 100 μ M 程度存在した O_2 は表面から 100 μ m 程度で枯渇し、 O_2 消費活性は表面から 0~100 μ m の領域に存在した。また、硫酸塩還元活性は表面から 650~1100 μ m の領域に存在した。 H_2S が SO_4^{2-} まで完全に酸化されたと仮定し、全 O_2

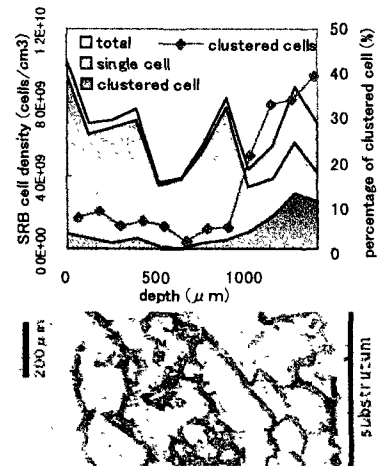


図1. 生物膜の構造と生物膜内 SRB 菌体密度及びセル形態の分布
生物膜表面 = 0 μ m

表1. リアクターの平均水質
($\pm$ standard deviation)

	Influent (μ M)	Effluent (μ M)
SO_4^{2-}	220(± 45)	31(± 76)
S^{2-}	11(± 8)	61(± 72)
S^0	6(± 6)	98(± 68)
NH_4^+	1100(± 220)	1100(± 190)
NO_3^-	240(± 55)	4(± 5)
DOC	1900(± 430)	1300(± 300)

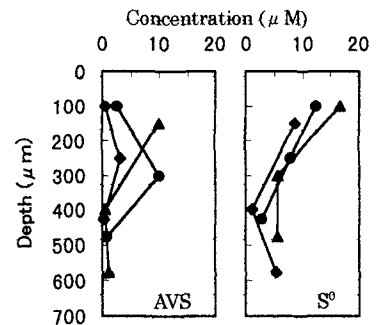
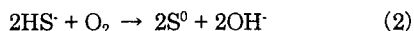
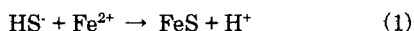


図2. 生物膜内 S^0 、AVS 濃度プロファイル
生物膜表面 = 0 μ m

消費量に占める H_2S 酸化の割合を求めたところ 45%であった。

しかし、生物膜内には S^0 、 AVS が蓄積していることから、生成された H_2S は全てが O_2 によって完全に SO_4^{2-} まで酸化されておらず、実際の H_2S 酸化に消費された O_2 の割合は求めた値より小さくなるものと考えられる。

図2と図3より中層部で生成された H_2S の酸化の過程が伺える。生物膜内に存在する全 Fe 濃度は $10\sim 30\ \mu\text{mol}/(\text{cm}^3\text{-biofilm})$ であるが、表面より $150\ \mu\text{m}$ 以深において H_2S は初めに Fe^{2+} によって酸化され FeS として膜内に蓄積する (式 (1))。 Fe^{2+} と結合しなかった H_2S は膜表面 $0\sim 200\ \mu\text{m}$ で O_2 によって酸化され S^0 として蓄積する (式 (2))。図3において膜表面での pH の上昇は (2) 式により生成された OH^- に起因すると考えられる。



生物膜表層における H_2S の酸化は O_2 による化学的酸化に加え、生物学的酸化も考慮しなければならない。顕微鏡観察の結果、生物膜表面は糸状性細菌によって覆われており、これら糸状性細菌が H_2S 酸化に寄与しているものと考え、*Beggiatoa*, *Haliscomenobacter*, *Leptothrix*, *Leucothrix*, *Sphaerotilus*, *Thioploca*, *Thiothrix*, *Eikelboom type 021N* のプローブを用い FISH を行った。これらの糸状性細菌のうち *Beggiatoa*, *Leucothrix*, *Thioploca*, *Thiothrix*, *Eikelboom type 021N* は H_2S 酸化細菌である。その結果生物膜表層において *Sphaerotilus* 及び *Thiothrix* が検出された。両者はともに微好気的環境を好み、その上 *Thiothrix* は H_2S を酸化し細胞内に硫黄の顆粒を生成することから、膜表層における S^0 の蓄積に寄与している可能性が高い。

3.3 微好気性生物膜内の有機物酸化

基質の有機炭素源を酢酸のみとプロピオン酸のみの2系列に分け、回分実験により膜深さ方向の硫酸塩還元ポテンシャルと、微小電極を用いた測定により *in situ* の硫酸塩還元活性をそれぞれ求めた。酢酸系列の硫酸塩還元ポテンシャルと *in situ* の硫酸塩還元活性は、プロピオン酸系列のそれより表層に存在し、いずれも酢酸系列が 1.6~3.5 倍プロピオン酸系列より高い傾向を示した。平均水質から硫酸塩は約 $200\ \mu\text{M}$ 還元されているが、この硫酸塩還元量より i) 酢酸資化性 SRB が卓越している場合、ii) プロピオン酸資化・酢酸生成 SRB と酢酸資化性 SRB のカスケード反応の場合を仮定し、全 DOC 酸化量に占める硫酸塩還元によって消費された有機物量の割合を求めた。その結果、i) においては 40%、ii) では 24% の DOC が SRB によって酸化された試算となった。

4. 結論

本研究では FISH と微小電極を併用し、微好気性生物膜内の SRB 空間分布および硫黄の挙動について検討した結果、以下のことが明らかになった。

(1) SRB は全層にわたって $4\sim 10\times 10^9\ \text{cells}/(\text{cm}^3\text{-biofilm})$ 存在し、その存在形態は表層では 90% がシングルセルであり、底層では急激にクラスターの割合が増え 40% に達した。また、得られた値は従来の MPN 法に比べ $10^2\sim 10^4$ 高く、SRB 活性と高い相関を示した。

(2) 硫酸塩還元活性は生物膜中層領域に、 H_2S 酸化活性領域はその上層に位置し、 H_2S 酸化活性領域において FeS 、 S^0 の蓄積が認められた。また、 H_2S 酸化により消費された O_2 量は全 O_2 消費量の約 45% に達した。

(3) 酢酸資化性の SRB 活性はプロピオン酸資化性の SRB 活性より 1.6~3.5 倍高い傾向を示した。

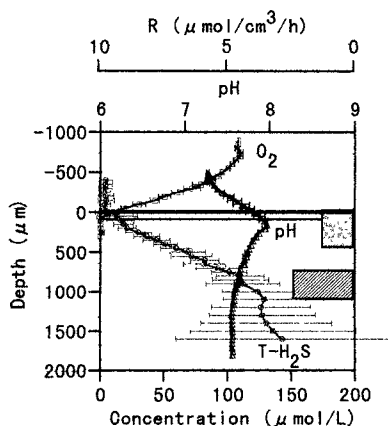


図3. 生物膜内 O_2 , $\text{T-H}_2\text{S}$, pH 濃度プロファイル 生物膜表面 = $0\ \mu\text{m}$