| | |
|---|---|
| 氏　　　　名 | 山下　恭広 |
| 学位の種類 | 博士（工学） |
| 学位記番号 | 博甲第１０１２号 |
| 学位授与の日付 | 平成 20 年 3 月 22 日 |
| 学位授与の要件 | 課程博士(学位規則第 4 条第１項) |
| 学位授与の題目 | 担体充填生物ろ床を用いた排水処理における硫酸塩還元微生物の動き |
| 論文審査委員（主査） | 池本　良子（自然科学研究科・教授） |
| 論文審査委員（副査） | 関　平和（自然科学研究科・教授），古内　正美（自然科学研究科・教授），川西　琢也（自然科学研究科・准教授），清水　芳久（京都大学・教授） |


## ABSTRACT

In this study, role of sulfate reducing microorganisms was examined in the two kinds of biological filter reactors. First, a new anaerobic–oxic biological filter reactor, which was packed with carbon fibre and aerated with micro-bubbles, was proposed and the reactor performance was examined using dye works wastewater. Effluent SS from the experimental reactor was significantly lower than that from the activated sludge reactor, and transparency was higher. The sulfate reducing activity of biofilm in the oxic zone was higher than those in the anaerobic zone, meaning that the sulfate reduction-oxidation cycles were established in the biofilm of the oxic zone. Microbial community of sulfate reducing bacteria was examined by a FISH method. *Desulfobulbus* spp. was most common sulfate reducing bacteria in the anaerobic zone. In the oxic zone, *Desulfobulbus* spp. and *Desulfococcus* spp. were observed. Next, denitrification using chopsticks and cedar 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. In the single anoxic biological filter reactor, denitrification and sulfate reduction occurred simultaneously in the anoxic bed. The sulfate reducing activities of the biofilm in both reactors were high, meaning that sulfate reduction played an important role on decomposition of chopsticks and cedar. 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. Moreover, it was observed that *Desulfonema* spp. was attached with *Thiothrix nivea*, and sulfur oxidation-reduction cycle was established in the biofilm under anoxic condition.


## 1. 序論

自然界の硫黄の循環（Fig.1）において，微生物が鍵となる重要な役割を担っており，元素硫黄や硫化物のような還元型硫黄酸化物は硫黄酸化細菌や光合成硫黄細菌によって酸化されるかあるいは自然酸化されて，最終的に硫酸塩へと変換される。硫酸塩は硫黄の存在形態としてはもっとも安定なものであるが，これを自然界の硫黄の循環において存在形態を変換させる役割を担っているのが硫酸塩還元細菌である。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，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，本研究では，中程度の有機性排水を処理する方法として嫌気好気生物ろ過法を，下水や生活

排水の処理水からの窒素リン除去法として木質充填生物ろ床法を提案し，処理実験を行なうことにより，硫酸塩還元細菌の役割について検討を行なった。

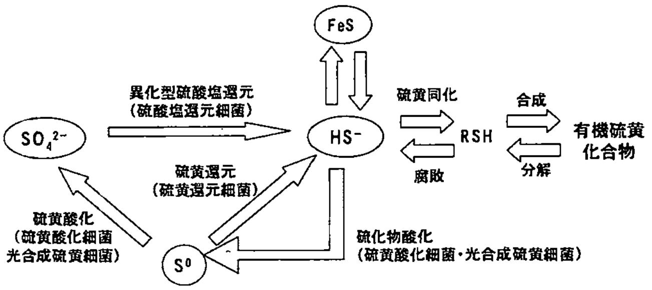



Fig. 1 Sulfur cycle in nature

## 2. 硫酸塩還元細菌を活用した円筒型嫌気好気生物ろ過装置による染色排水処理

染色排水処理では，活性汚泥法が用いられることが多いが，有機物濃度が高いため曝気に膨大なエネルギーを必要とすることや，大量に発生する余剰汚泥の処分が大きな問題となっている。そこで，本研究では，従来型の活性汚泥法に代わる省エネルギー型の処理法として，炭素繊維とマイクロバブルを組み合わせた円筒型嫌気好気生物ろ過装置を開発し，染色排水による連続処理実験を行なった。

### (1) 実験装置と実験方法

Fig.2 に示す実験装置を染色工場排水処理施設に設置し，平成 15 年 8 月から連続運転を行った。実験装置は嫌気好気生物ろ床とし，生物付着担体として炭素繊維を充填した。好気槽では，マイクロバブルによる微細空気の供給を行ない，槽内に旋回流を形成させる構造とした。定期的に原水，嫌気槽，好気槽，処理水を採水し，水質分析を行なった。また，比較として活性汚泥処理水を採水した。Table 1 に実験に用いた染色排水の組成を示す。さらに，実験装置内の生物膜と活性汚泥の硫酸塩還元活性を回分実験により求めるとともに，FISH 法による硫酸塩還元細菌の群集解析を行なった。FISH 法で用いた 5 種類のプローブを Table 2 に示す。

### (2) 実験結果と考察

実験装置の SS 除去能や脱色能は，活性汚泥槽と比較して優れていた。

Fig.3 に処理槽内の水質変化の典型例として運転開始から 259 日目（水温 24℃）の結果を示す。嫌気槽で硫酸塩還元に伴い，酢酸が生成され，好気槽で硫黄酸化と有機物の除去が進行していた。DOC 除去率は約 84%であったが，BOD 除去率は約 93%であった。嫌気槽における硫酸塩還元量と処理水の DOC で比較すると，硫酸塩還元が良好に進行した場合に処理水の水質が向上することが示され，水温が 22℃以上であれば 70%以上の DOC 除去率を示した。

Table 3 に硫酸塩還元細菌のプローブを用いて FISH 法を適用した結果を示す。嫌気槽で *Desulfobulbus* spp.が優占的に存在し，主に酢酸生成に関与していたと考えられる。一方，好気槽生物膜では *Desulfococcus* spp.が優占的に存在し，硫黄酸化細

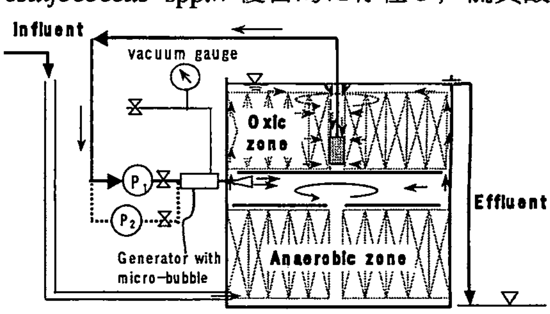



Fig.2 Experimental reactor

Table 1 Composition of the dye works wastewater using the experiment.

| | Concentrations |
|---|---|
| BOD (mg/l) | 200～500 |
| DOC (mg/l) | 250～850 |
| SS (mg/l) | 20～90 |
| Sulfate (mg/l) | 240～560 |
| pH | 9～12 |

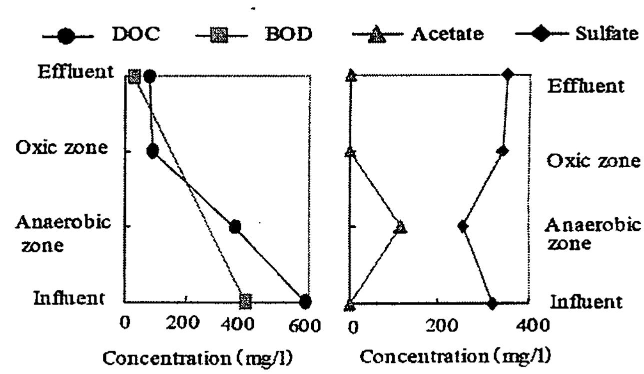



Fig.3 Change in sulfur and organic matter through the reactor.

Table 2 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes used in this study.

| Probe | Specificity | Sequence of probe(5' - 3') | Target site[a] | FA[b] conc. (%) | Reference |
|---|---|---|---|---|---|
| 660 | *Desulfobulbus* spp. | GAATTCCACTTTCCCCTCTG | 660-679 | 30 | Deverex *et al*. 1992 |
| 687 | *Desulfovibrio* spp. plus members of the genera *Geobacter*, *Desulfomonas*, *Desulfuromonas*, *Desulfomicrobium*, *Bilophila*, and *Pelobacter* | TACGGATTTCACTCCT | 687-702 | 0 | Deverex *et al*. 1992 |
| 221 | *Desulfobacterium* spp. | TGCGCGGACTCATCTTCAAA | 221-240 | 20 | Deverex *et al*. 1992 |
| 129 | *Desulfobacter* spp. | CAGGCTTGAAGGCAGATT | 129-149 | 10 | Deverex *et al*. 1992 |
| DNMA657 | *Desulfonema* spp. *Desulfococcus* spp. | TTCCG(C/T)TTCCCTCTCCCATA | 657-676 | 20 | Fukui *et al*. 1999 |

[a] 16S rRNA position according to *E. coli* numbering.
[b] Formamide concentration in the hybridization buffer.

Table 3 Sulfate-reducing bacterial community structure in the analysis of composite DAPI and FISH images.

| Sulfate reducing Bacteria | Biofilm in the anaerobic zone | Biofilem in the oxic zone | Activated sludge |
|---|---|---|---|
| *Desulfobulbus* spp. | 2.3 | 1.0 | 1.2 |
| *Desulfovibrio* spp. plus members of the genera *Geobacter, Desulfomonas, Desulfuromonas, Desulfomicrobium, Bilophila,* and *Pelobacter* | 0.0 | 0.4 | 2.9 |
| *Desulfobacterium* spp. | 0.7 | 0.3 | 0.1 |
| *Desulfobacter* spp. | 0.1 | 0.0 | 1.4 |
| *Desulfonema* spp. | 0.1 | - | 3.7 |
| *Desulfococcus* spp. | - | 14.0 | - |

SRB area / DAPI area (%)

菌と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と考えられる。

## 3.硫酸塩還元細菌を活用した箱型嫌気好気生物ろ過装置による染色排水処理

前述の円筒型嫌気好気生物ろ過装置では，既存の処理槽が活用できないという問題があり，さらに装置が小さかったため，汚泥発生量の削減量等が不明確であった。そこで，本研究では，既設処理場に設置可能な箱型処理装置を提案し，染色工場排水処理への適用を試みた。

### (1) 実験装置と実験方法

実験装置を Fig.4 に示す。縦 800mm，横 1300mm，容積 $2m^3$ の箱型反応槽を縦に半分に仕切り，下部には生物付着担体として炭素繊維を充填し嫌気条件とした。上部には同様に炭素繊維を充填し，マイクロバブルによる微細空気の供給と槽横方向の水流を形成し，ろ過機能をもたせる構造とした。定期的に原水，嫌気槽，好気槽，処理水を採水し，水質分析を行なった。さらに，実験装置内の生物膜の硫酸塩還元活性を回分実験により求めるとともに，PCR 法による硫酸塩還元細菌の群集解析を行なった。

### (2) 実験結果と考察

Fig.5 に実験装置の処理水質の典型例を示す。流出水 BOD の増加は SS の流出に依存していたことがわかる。DOC 除去率は実験装置の水温に依存し，高い水温で硫酸塩還元が刺激されることによって，向上すると推定された。

余剰汚泥は，運転期間中，好気槽から 3 回引き抜かれた。引き抜いた汚泥は汚泥量を測定した後，嫌気槽に戻したが，水質が悪化することはなかった。運転期間中，全余剰汚泥量は0.19kgであり，除去DOC当たりの余剰汚泥は，2.9mgSS/gTOC と非常に少なかった。

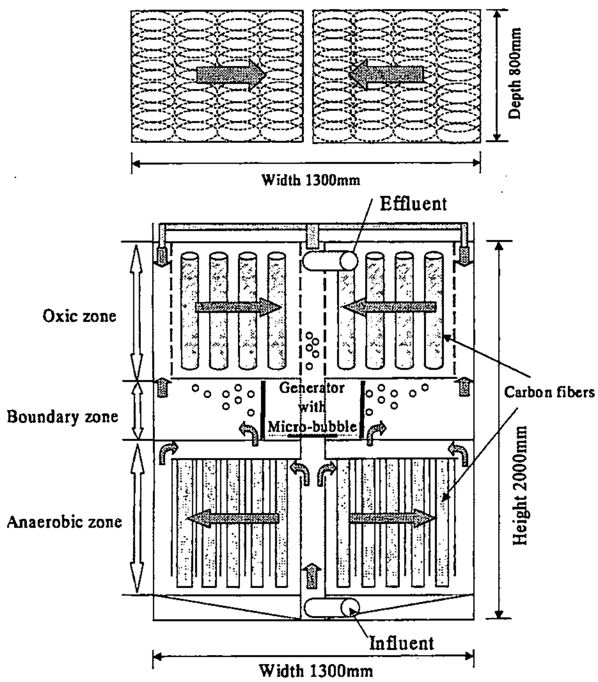


Fig.4 Experimental reactor

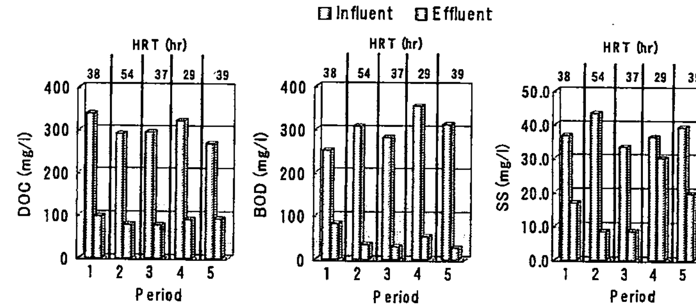


Fig.5 Summary of the reactor performance.

Table 4 Sulfate reduction and sulfur oxidation activities obtained in the batch experiments.

| | Sulfate reduction rate (mgCOD/gSS･hr) | | Sulfur oxidation rate (mgCOD/gSS･hr) |
|---|---|---|---|
| | Influent water as substrate | Activated sludge treatment water as substrate | |
| Biofilm in oxic zone | 0.92 | 0.87 | 2.17 |
| Biofilm in boundary zone | 1.56 | 0.62 | 2.96 |
| Biofilm in anaerobic zone | 0.98 | 0.23 | - |

Table 4 に回分実験から得られた硫酸塩還元活性と硫黄酸化活性を示す。硫酸塩還元活性と硫黄酸化活性はともに高い値を示し，好気槽の硫酸塩還元細菌は生物分解された生成物を利用していたと推定された。

## 4. 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

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，硫黄脱窒が有効であると考えられる。しかし，硫黄脱窒には電子供与体としての還元型硫黄の添加が必要である。そこで，飲食店や旅館などから大量に発生する廃棄物である割り箸に着目し，割り箸を有機炭素源とした生物学的窒素除去法について実験的検討を行なった。

### (1) 実験装置と実験方法

実験装置を Fig.6 に示す。本研究では，嫌気無酸素方式と，直接間伐材を脱窒に利用する単槽方式について，その有効性を検討した。装置 1 は，嫌気無酸素方式を想定し，内径 62mm，高さ 330mm のアクリル製カラムを 2 本連結したものを用いた。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 5 に示す。

さらに，実験装置内の生物膜の硫酸塩還元活性と脱窒活性を回分実験により求めるとともに，FISH 法による硫酸塩還元細菌と硫黄酸化細菌と硫黄脱窒細菌の群集解析を行なった。FISH 法で用いた 11 種類のプローブを Table 6 に示す。

### (2) 実験結果と考察

各装置の処理槽内の水質変化を Fig.7 に示す。装置 1 の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，装置 2 の単槽処理方式でも，高速の脱窒が可能であった。また，無酸素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。

Table 7 に硫酸塩還元細菌のプローブを用いて FISH 法を適用した結果を示す。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.と推定される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，その根幹部には *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。単槽処理方式の無酸素槽では，本研究で設計した *Thiobacillus denitrificans* と推定される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。

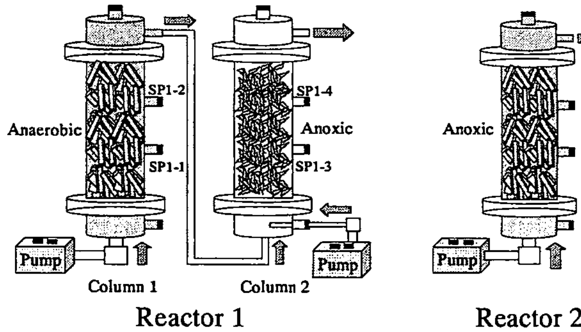



Fig.6 Experimental reactor

Table 5 Artificial wastewater

| Substrate (mg/l) | Reactor 1 | | Reactor 2 |
|---|---|---|---|
| | Column 1 | Column 2 | |
| $NaHCO_3$ | 35 | 0 | 35 |
| $CaCl_2$ | 46 | 0 | 46 |
| $KH_2PO_4$ | 46 | 0 | 46 |
| $K_2SO_4$ | 58 | 0 | 58 |
| $NaNO_3$ | 0 | 170 | 85 |
| conditions | anaerobic | anoxic | anoxic |

Table 6 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes used in this study.

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

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

[b] Formamide concentration in the hybridization buffer.

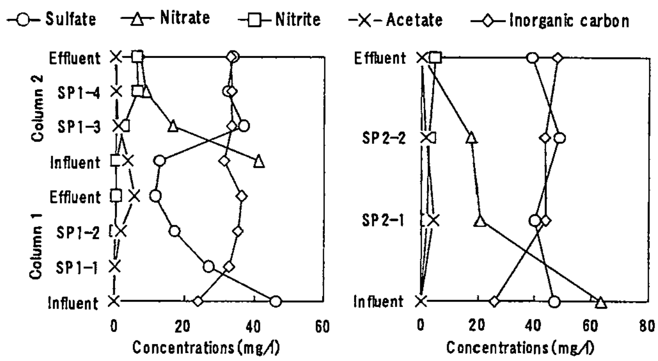
## 5. 杉間伐材を有機炭素源とした脱窒処理における硫酸塩還元細菌および硫黄脱窒細菌の役割

本研究では，間伐材の有効利用として，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。さらに，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。

### (1) 実験装置と実験方法

実験装置を Fig.8 に示す。実験装置は, 内径 62mm, 高さ 330mm のアクリル製カラムを用い, 装置 1 は,




(a) Reactor 1 (After 94 days)　(b) Reactor 2 (After 94 days)

Fig. 7. Change of water characteristics in the reactor 1.

Table 7 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 | *Desulfobulbus* spp. | 3.5 | 4.3 |
| 687 | *Desulfovibrio* spp. plus members of the genera *Geobacter, Desulfomonas, Desulfuromonas, Desulfomicrobium, Bilophila,* and *Pelobacter* | 0.0 | 0.0 |
| 221 | *Desulfobacterium* spp. | 0.0 | 0.0 |
| 129 | *Desulfobacter* spp. | 6.7 | 7.3 |
| DMNA657 | *Desulfonema* spp. | 8.6 | 5.3 |
| G1B | *Thiothrix disciformis* | 0.0 | 0.0 |
| G2M | *Thiothrix eikelboomii* | 0.0 | 0.0 |
| G3M | *Thiothrix flexilis* | 0.0 | 0.0 |
| G123T | *Thiothrix nivea* group, *Thiothrix disciformis, Thiothrix eikelboomii* and *Thiothrix flexilis* | 27.0 | 48.0 |
| TMDN101 | *Thiomicrospira denitrificans* | 1.0 | 1.8 |
| TBDN1441 | *Thiobacillus denitrificans* | 0.8 | 6.9 |

Probe hybridized area / DAPI stained area (%)

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。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。57 日目からは, 人工排水に硝酸塩($NaNO_3$ 85mg/l)を添加したものに変更し, 運転を行なった。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。さらに, FISH 法による硫酸塩還元細菌と硫黄脱窒細菌の群集解析を行なった。FISH 法で用いたプローブは, Table 6 に示す硫黄酸化細菌のプローブを除く 7 種類のプローブを用いた。

### (2) 実験結果と考察

装置 1 の経日変化を Fig.9 に示す。装置 1 では, 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。装置 2 の無酸素生物ろ床においては, 木質の分解に伴なう脱窒が進行し, 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。

Table 8 に硫酸塩還元細菌のプローブを用いて FISH 法を適用した結果を示す。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。

## 6. 木質と鉄を電子供与体とした脱窒とそれに伴なうリン除去

閉鎖性水域の富栄養化防止の観点から, 排水処理において窒素のみでなくリンの除去が不可欠であることから, 廃棄物材料である鉄くずと間伐材などの木質を共存させることにより, 窒素とリンを除去する方法を提案し, 人工排水を用いた連続処理実験によりその有効性を検討した。

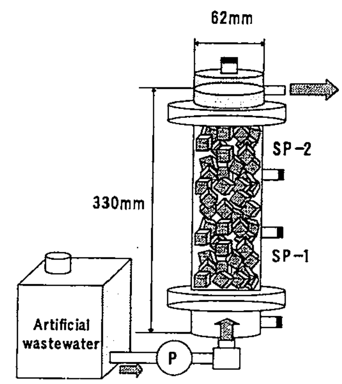



Fig. 8. Experimental set up.

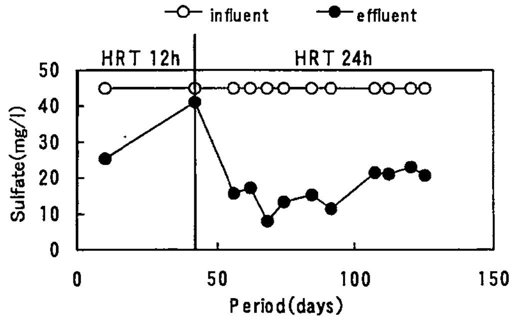


Fig. 9. Course of the sulfate concentrations in Reactor 1.

Table 8 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 | 96days | 292days |
| | | Anaerobic bed biofilm | Anoxic bed biofilm | Anoxic bed biofilm |
| 660 | *Desulfobulbus* spp. | 0.6 | 0.0 | 0.1 |
| 687 | *Desulfovibrio* spp. plus members of the genera *Geobacter, Desulfomonas, Desulfuromonas, Desulfomicrobium, Bilophila,* and *Pelobacter* | - | 0.0 | 0.0 |
| 221 | *Desulfobacterium* spp. | 0.3 | 0.0 | 0.4 |
| 129 | *Desulfobacter* spp. | 1.7 | 1.4 | 0.1 |
| DNMA657 | *Desulfonema* spp. | 2.1 | 1.8 | 2.7 |
| TMDN101 | *Thiomicrospira denitrificans* | 0.4 | 0.0 | 0.0 |
| TBDN1441 | *Thiobacillus denitrificans* | 0.3 | 0.0 | 0.0 |

Probe hybridized area / DAPI stained area (%)

### (1) 実験装置と実験方法

Fig. 10 に実験装置の概要を示す。実験装置には，高さ 330mm，内径 62mm，容積 1ℓ のアクリル樹脂性の円筒形カラムを用い，装置内に生物付着担体兼電子供与体として木質と鉄片を充填し，連続処理実験を行なった。木質は薪として市販されているものを約 12mm 角にカットして用い，鉄片は，鉄鋼記号 S 55 C（主要化学成分 C 0.52～0.58%，Mn 0.60～0.90%）の鉄板を厚さ 0.1～0.2mm，幅 0.5～1mm に削ったものを使用した。装置 1 には装置下部に木質 95.0g を，装置上部に鉄片 40.0g を充填し，装置 2 には鉄片 40.0g と木質 95.0g を混合して充填した。両装置には，種汚泥として金沢市都市下水処理場の活性汚泥を乾燥重量で 1.2g に調整したものを添加した。装置 3 は，コントロールとして鉄片 40.0g のみを充填し，植種は行なわなかった。すべての装置は，装置内の水理学的滞留時間（HRT）を 24 時間に設定し，人工排水（$NaHCO_3$ 35mg/l，$CaCl_2$ 46mg/l，$KH_2PO_4$ 46mg/l，$K_2SO_4$ 58mg/l，$NaNO_3$ 85mg/l）を装置下部から通水して運転を開始した。その後，50 日目に人工排水中のリン酸塩濃度を 1/2 とした。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。さらに，実験装置内の生物膜の硫酸塩還元活性と脱窒活性を回分実験により求めるとともに，PCR 法による硫酸塩還元細菌の群集解析を行なった。Table 9 に群集解析に用いたプライマーを示す。

### (2) 実験結果と考察

実験装置は鉄を充填することにより，脱窒とそれにともなうリン除去が可能であった。また，木質を共存させることにより，木質の分解に伴う脱窒と鉄の酸化に伴う脱窒素の両者が進行した。木質内には，他栄養性脱窒活性のみならず，高い硫酸塩還元活性と硫黄脱窒活性が認められたことから，木質内に硫酸塩還元細菌と硫黄脱窒細菌が共存し硫黄の酸化還

元サイクルと形成していると推定された。また，セルロース懸濁液の添加によって硫酸塩還元と脱窒が促進されたことから，両者がセルロースの分解に関与していたと推定された。鉄に付着した生物膜は，独立栄養脱窒活性が高く，鉄粉の添加によって脱窒が促進されたことから，独立栄養脱窒細菌が鉄に付着して増殖していたと推定された。

Table 10 に PCR 法による硫酸塩還元細菌の群集解析を行なった結果を示す。木質内生物膜から抽出した DNA では，*Desulfonema* spp., *Desulfococcus* spp., *Desulfosarcina* spp., *Desulfovibrio* spp., *Desulfomicrobium* spp.を特異的に増幅する primers でバンドが検出された。一方，鉄付着生物膜では，*Desulfobulbus* spp., *Desulfobacter* spp., *Desulfonema* spp., *Desulfosarcina* spp., *Desulfovibrio* spp., *Desulfomicrobium* spp. を特異的に増幅する primers でバンドが検出された。

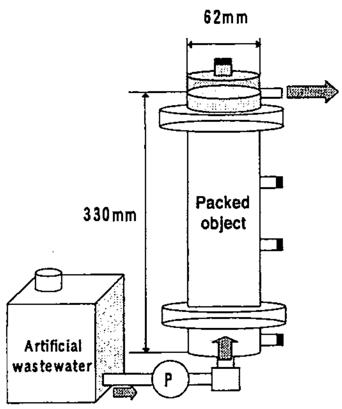



Fig. 10. Experimental set up.

Table 9 16S rDNA-targeted PCR primers and dissimilatory (bi)sulfite reductase genes PCR primers used in this study.

| Primer | | Sequence (5' - 3')[b] | Target site[a] | Specificity | Annealing temp. (°C) | Reference |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 616V | | AGA GTT TGA TYM TGG CTC | | Most *Bacteria* | 52 | Juretschko *et al*. 1998 |
| 630R | | CAK AAA GGA GGT GAT CC | | | | Juretschko *et al*. 1998 |
| DSRmixF | DSR1F | ACS CAC TGG AAG CAC G | | Dissimilatory (bi)sulfite reductase genes | 48 | Wagner *et al*. 1998 |
| | DSR1Fa | ACC CAY TGG AAA CAC G | | | | Loy *et al*. 2004 |
| | DSR1Fb | GGC CAC TGG AAG CAC G | | | | Loy *et al*. 2004 |
| DSRmixR | DSR4R | GTG TAG CAG TTA CCG CA | | | | Wagner *et al*. 1998 |
| | DSR4Ra | GTG TAA CAG TTT CCA CA | | | | Loy *et al*. 2004 |
| | DSR4Rb | GTG TAA CAG TTA CCG CA | | | | Loy *et al*. 2004 |
| | DSR4Rc | GTG TAG CAG TTK CCG CA | | | | Loy *et al*. 2004 |
| DFM140 | | TAG MCY GGG ATA ACR SYK G | 140-158 | *Desulfotomaculum* spp. | 58 | Daly *et al*. 2000 |
| DFM842 | | ATA CCC SCW WCW CCT AGC AC | 842-823 | | | Daly *et al*. 2000 |
| DBB121 | | CGC GTA GAT AAC CTG TCY TCA TG | 121-142 | *Desulfobulbus* spp. | 66 | Daly *et al*. 2000 |
| DBB1237 | | GTA GKA CGT GTG TAG CCC TGG TC | 1237-1215 | | | Daly *et al*. 2000 |
| DBM169 | | CTA ATR CCG GAT RAA GTC AG | 169-183 | *Desulfobacterium* spp. | 64 | Daly *et al*. 2000 |
| DBM1006 | | ATT CTC ARG ATG TCA AGT CTG | 1006-986 | | | Daly *et al*. 2000 |
| DSB127 | | GAT AAT CTG CCT TCA AGC CTG G | 127-148 | *Desulfobacter* spp. | 60 | Daly *et al*. 2000 |
| DSB1273 | | CYY YYY GCR RAG TCG STG CCC T | 1273-1252 | | | Daly *et al*. 2000 |
| DCC305 | | GAT CAG CCA CAC TGG RAC TGA CA | 305-327 | *Desulfonema* spp., *Desulfococcus* spp., | 65 | Daly *et al*. 2000 |
| DCC1165 | | GGG GCA GTA TCT TYA GAG TYC | 1165-1144 | *Desulfosarcina* spp. and *Desulfovibrio* spp. | | Daly *et al*. 2000 |
| DSV230 | | GRG YCY GCG TYY CAT TAG C | 230-248 | *Desulfovibrio* spp. and *Desulfomicrobium* | 61 | Daly *et al*. 2000 |
| DSV838 | | SYC CGR CAY CTA GYR TYC ATC | 838-818 | spp. | | Daly *et al*. 2000 |

[a] 16S rDNA position according to *E. coli* numbering.
[b] Ambiguities: R (G or A); Y (C or T); K (G or T); M (A or C); S (G or C); W (A or T).

Table 10 Summary of results for PCR amplifications.

+ , A visible band of PCR products on an agarose gel.
(+), A weak band of PCR products on an agarose gel.
— , Negative hybridization signal in the presence or absence of a visible band of PCR products on an agarose gel.

| | Primer pair | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 616V 630R | DSRmixF DSRmixR | DFM140 DFM842 | DBB121 DBB1237 | DBM169 DBM1006 | DSB127 DSB1273 | DCC305 DCC1165 | DSV230 DSV838 |
| Biofilm inside the wood | | | | | | | | |
| Reactor 1 | + | + | — | + | — | + | (+) | + |
| Reactor 2 | (+) | — | — | — | — | — | — | — |
| Biofilm surface of iron | | | | | | | | |
| Reactor 1 | + | + | — | — | — | + | — | + |
| Reactor 2 | + | + | — | (+) | — | — | + | + |
| Reactor 3 | + | — | — | — | — | — | — | — |

## 7. 結論

第 2 章，第 3 章では，炭素繊維とマイクロバブルを用いた嫌気好気生物ろ過装置を開発し，染色排水による連続処理実験を行なった結果，SS 除去能や脱色能は，活性汚泥法と比較して優れており，水温が22℃以上であれば 70％以上の DOC 除去率を示した。また，実験装置で生成された余剰汚泥は極めて少なく，硫酸塩還元が増加すると DOC 除去が促進された。嫌気槽では *Desulfobulbus* spp.と推定される硫酸塩還元細菌が増殖し，好気槽では *Desulfobulbus* spp.及び *Desulfococcus* spp.と推定される硫酸塩還元細菌が硫黄酸化細菌と共存し，硫黄の酸化還元サイクルを形成していた。

第 4 章，第 5 章，第 6 章では，窒素リン除去法として，人工排水を用いた木質と鉄充填生物ろ床による連続処理実験を行なった結果，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。また，木質の分解に伴なう脱窒と鉄の酸化に伴なう脱窒の両者が進行し，それに伴なうリン除去が可能であった。さらに，硫酸塩還元を促進することにより，木質の分解や鉄腐食が進行し，窒素リンの向上につながることがわかった。硫酸塩還元により，セルロースの分解が促進されることが示唆され，硫酸塩還元細菌 *Desulfosarcina* spp.と推定される細菌の多くが，硫黄酸化細菌 *Thiothrix nivea* group 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。このことから，処理槽内でこれらの細菌が共存し，硫黄の酸化還元サイクルが形成されていたと推定された。

以上のことから，本処理法により硫酸塩還元細菌が重要な役割を担っており，硫酸塩還元を促進させることが，処理水質向上さらには除去率向上につながるということが明らかになった。

# 学位論文審査結果の要旨

提出学位論文について，第１回審査委員会において審査方針を決定するとともに，１月 30 日の公聴会の後に第２回審査委員会を開催し，慎重に審査を行なった結果，以下のように判定した。

提出論文は，硫酸塩還元細菌を活用した２種類の排水処理法を提案し，処理槽内の硫酸塩還元細菌の働きについて明らかにしたものである。まず，汚泥発生量の少ない小規模有機性排水処理法として嫌気好気生物ろ過装置を開発し，染色工場排水を対象とした長期的な処理実験を行うことにより処理性能を把握するとともに，硫酸塩還元細菌が汚泥量の削減と処理水質の向上に重要な役割を果たしていることを明らかにした。次に，木質を用いた栄養塩除去法を提案し，その有効性を示すとともに，木質内に不完全酸化型の硫酸塩還元細菌が増殖し，木質の分解に関与していること，木質表面では，硫黄酸化細菌と完全酸化型の硫酸塩還元細菌が近接して存在し，脱窒細菌とともに窒素除去を担っていることを明らかにしている。さらに，鉄を共存させることにより，水素資化性硫酸塩還元細菌および脱窒細菌による鉄腐食に伴うりん除去も可能であることを示した。いずれも，処理装置の開発と，微生物群集解析の両者の側面から新しい排水処理法の開発を行なったものであり，土木学会，水環境学会において奨励賞などを受けるなど，国内外で高く評価されている。

以上のことから，本論文は，新規性，有用性に優れた論文であると判断できることから，博士（工学）の学位に値すると判断した。