微小電極を用いた微好気性生物膜内の硫酸塩還元反応の検討

佐藤 久* 岡部 聡*
伊藤 司* 渡辺 義公*

Microelectrode Measurements of Sulfate Reduction in Microaerobic Biofilms

Hisashi SATOH*, Satoshi OKABE*,
Tsukasa ITOH* and Yoshimasa WATANABE*

* Department of Urban and Environmental Engineering Hokkaido University, North 13, West 8, Kita-ku, Sapporo 060-0813 Japan

Abstract

The vertical zonation of O_2 respiration, NO_3^- respiration, H_2S oxidation and SO_4^{2-} reduction in microaerobic biofilms grown on rotating biological contactors (RBCs) of treating domestic wastewater was studied by measuring concentration profiles in the biofilms with microelectrodes for O_2 , NO_3^- , H_2S and pH. From those profiles, *in situ* specific reaction rates and substrate fluxes were calculated by using a simple one-dimensional diffusion reaction model and were related to population densities of sulfate-reducing bacteria (SRB) and potential sulfate reduction rates determined by standard batch experiments. The maximum population densities and the highest potential sulfate reduction rates were found in the outermost biofilm. On the contrary, the *in situ* sulfate reduction rates were restricted in a narrow zone located in the middle biofilm incubated $DO = 100 \mu mol \cdot l^{-1}$. An increase in the O_2 and/or NO_3^- penetration depth in the biofilm induced a shift of sulfate reduction zone to the deeper biofilm and a decrease in the specific sulfate reduction rate. This is probably because that the potential sulfate reduction rate decreased toward the depth and addition of nitrate enhanced oxidation of the produced sulfide or increased competition for electron donor with denitrifiers, or both. The microelectrode measurements with the high spatial resolution enable us to quantitatively measure *in situ* SO_4^{2-} reduction rate in microaerobic biofilms, which could not be detected measuring sulfide or sulfate flux across the water-biofilm interface.

Key words: microaerobic biofilm, microelectrodes, SO_4^{2-} reduction, H_2S oxidation O_2 and/or NO_3^- penetration depth

1. はじめに

下水処理プロセスで用いられる好気性生物膜は、多種多様の微生物から構成され、複雑な生態学的構造を有している。一般に生物膜内部では、菌体密度が高く菌体の滞留時間も長いので、下水中の有機物やアンモニア性窒素の除去は効率よく行われる。一方、このことは好気性生物膜が多量の溶存酸素(DO)を消費することを意味しており、一般に好気性生物膜内にDOは僅か数100 μm 程度しか侵入せず、生物膜表層部は好氣的であっても深層部は嫌氣的となり、膜深さ方向にゾーン化することが知られている^{1,2)}。一般に都市下水中にはアンモニア性窒素と同程度の硫酸塩(SO_4^{2-})が含まれているため、たとえ反応槽内が好氣的条件であっても、生物膜内部に嫌氣的領域が形成されれば、硫酸塩還元細菌(SRB)による硫

酸塩還元反応が生じる^{1,2)}。下水処理プロセスにおける硫酸塩還元反応の重要性としては、(1)発生する硫化水素(H_2S)は有害であり悪臭の原因となる^{3,4)}、(2)下水処理施設および下水管路等の微生物腐食を引き起こす^{5,6)}、(3)発生した H_2S の化学的再酸化により相当量のDOが消費される^{1,4)}、等数多くの点が指摘されている。故に下水処理プロセスにおける硫黄(S)の挙動を把握するためには、生物膜内での硫酸塩還元活性、発生した硫化水素の酸化速度および経路、また水環境条件(例えば、DOや硝酸塩(NO_3^-)濃度等)の硫酸塩還元活性や硫化水素の再酸化に及ぼす影響等の定性的、定量的な把握が必要となる。

生物膜内での硫酸塩還元活性を把握するためには発生した H_2S を定量することが必要となるが、好気性生物膜内で発生した H_2S は表層の好氣的領域でDOにより

SO₄²⁻まで再酸化される(すなわち、内部の硫黄循環)、または鉄やマンガン等と結合するために生物膜外で検出されることは希であり、リアクター内でのSO₄²⁻およびH₂Sの物質収支のみから、好気性生物膜内の硫酸塩還元活性を把握することは困難である。従って、好気性生物膜内の硫酸塩還元活性や硫化水素の再酸化を解明するためには、生物膜内の現位置(*In Situ*)において発生するH₂S濃度を定量することが重要になる。しかしながら、既往の解析技術では厚さわずか数mm程度の生物膜内のH₂S濃度分布を測定することは困難であり、複雑な好気性生物膜内の硫黄循環に関する知見は皆無に等しい。

近年、先端径が僅か数μm程度の各種イオン選択性微小電極や酵素電極が開発され、廃水処理に携わる生物膜や微生物フロックに応用されている^{1,2,7-9)}。これら微小電極は生物膜内等のマイクロスケールの各種イオン濃度や代謝産物濃度プロファイルの測定が任意の現位置において可能であり、これまでブラックボックス的に取り扱ってきた生物膜や微生物集塊内の基質除去機構(微生物活性)や生態学的構造の解析に有効な分析方法であると考えられる。廃水処理における生物膜を代表とする複合系生物膜内の、複雑な硫酸塩還元反応¹⁾のみならず硝化^{7,8)}および脱窒反応機構⁹⁾の解明を目的とした、微小電極を用いた研究事例が報告されている。DeBeerら⁸⁾は流動床リアクター内で馴養された微生物集塊内のNH₄⁺、NO₃⁻、DOおよびpH濃度分布を測定し、硝化活性は微生物集塊の表層100~120μmの領域で最も高く深部では低いという特徴をもった、活性のゾーン化構造を示した。Kuhl and Jorgensen¹⁾は微小電極を用いて散水汙床生物膜内のH₂S濃度分布を測定し、SO₄²⁻および有機物濃度の増加に伴い生物膜内の硫酸塩還元活性が高まることを報告している。SRBの電子受容体であるSO₄²⁻、および電子供与体である有機物濃度の影響評価に加えて、硫酸塩還元反応は嫌氣的反応であるため、生物膜内のDO濃度およびNO₃⁻濃度の硫酸塩還元活性に与える影響を定量的に評価する必要がある。しかしながら、これらの影響を評価した研究事例は報告されていない。

そこで本研究では、微小電極を用いて生物膜内のH₂S、DO、NO₃⁻、pH濃度プロファイルを測定し、濃度プロファイルより*In Situ*の硫酸塩還元、H₂S酸化、DO消費、NO₃⁻消費速度および活性領域を求め、微好気性生物膜内の硫酸塩還元反応およびH₂S酸化反応を定量的に評価した。さらに、DOおよびNO₃⁻濃度の変動が*In Situ*の硫酸塩還元速に与える影響についても検討した。

2. 実験装置と実験方法

2.1 リアクターと生物膜の馴養条件

生物膜は札幌市創成川下水処理場に設置したベンチスケールの全没型回転円板装置(RBC)(反応槽容積=5.6L、円板回転速度=13r.p.m.)を用いて馴養した。形状を変化させずに生物膜試料を採取できるように、円板の一部(1cm×6cm)は容易に取り外せるように加工した¹⁰⁾。流入基質には、札幌市創成川下水処理場の最初沈殿池流出水と、これを流入基質とした半水没型RBCの処理水を1:1に混合したものをを用いた。

2.2 微小電極の制作

生物膜内基質濃度プロファイルを測定するために本実

験室においてDO、NO₃⁻、H₂SおよびpH微小電極を制作した。

(1) DO微小電極

DO微小電極(カソードタイプ)はRevsbech and Jorgensen¹¹⁾の方法を参考にし制作した。DePeX¹²⁾を被膜した後の電極の先端直径は約15μm、90% response timeは2~3sであった。キャリブレーションは、DO濃度が一定であるバルク水中および生物膜内の嫌気部分の2点の値を用いて行った¹⁾。バルク水中のDO濃度はDOメーター(YSI DISSOLVED OXYGEN METER MODEL 58)により定量した。

(2) NO₃⁻微小電極

NO₃⁻微小電極はDeBeerら¹³⁾の方法を参考にし制作した(先端直径は5μm程度)。liquid ion-exchanging membrane(LIX)にはNitrate Ionophore-Cocktail A(Fluka)を用いた。キャリブレーションは、測定用基質のNO₃⁻濃度を10μmol・l⁻¹~1000μmol・l⁻¹の範囲内で5段階に調整し行った(r²=0.99)。NO₃⁻濃度はイオンクロマトグラフ(DIONEX DX-100 カラム:IonPac AS12A)により定量した。また、NO₃⁻微小電極のイオン選択性(K^{Pot})をseparate solution method¹⁴⁾に従って求めたところ、Cl⁻に対するK^{Pot}は0.04であった。この値はZhenら¹⁵⁾が同じLIXを用いて制作した微小電極のK^{Pot}と同程度であり、本研究で使用した微小電極の有用性が確認された。

(3) H₂S微小電極

H₂S微小電極はRevsbech and Jorgensen¹¹⁾の方法を参考にし制作した(先端直径は25μm程度)。キャリブレーションは、ビーカーに測定用基質を入れN₂脱気し、Na₂Sを全H₂S濃度(H₂S、HS⁻およびS²⁻の総濃度、以下T-H₂Sとする)として1μmol・l⁻¹~1000μmol・l⁻¹の範囲内で5~8段階になるように添加した後、pHを7程度に調整し行った(r²=0.99)。T-H₂Sの酸化を防ぐために測定時には水面にN₂ガスを吹きつけた。T-H₂S濃度はメチレンブルー法¹⁶⁾により定量した。

H₂S微小電極はS²⁻を選択的に検出する電極であるが、メチレンブルー法ではT-H₂Sが測定されるので、S²⁻に対するキャリブレーションを求める必要がある。そこで、メチレンブルー法で測定したT-H₂S濃度を、式(1)を用いてS²⁻濃度に換算し、上記の方法で求めたT-H₂SのキャリブレーションをS²⁻のキャリブレーションに変換した。

$$[S^{2-}] = \frac{[T-H_2S]}{\frac{[H^+]^2}{K_1 K_2} + \frac{[H^+]}{K_2} + 1} \quad (1)$$

ここで、K₁およびK₂: T-H₂Sの第1および第2解離定数(μmol・l⁻¹)(pK₁およびpK₂はそれぞれ7.05, 17.1とした¹⁾), [H⁺]: pHから計算した水素イオン濃度(μmol・l⁻¹), [T-H₂S]: メチレンブルー法によって測定された全H₂S濃度(μmol・l⁻¹), [S²⁻]: H₂S微小電極から求めたS²⁻濃度(μmol・l⁻¹)である。

生物膜内のT-H₂S濃度は微小電極を用いて測定した生物膜内のS²⁻濃度およびH⁺濃度から式(2)によって算出した。

$$[T-H_2S] = [S^{2-}] \times \left(\frac{[H^+]^2}{K_1 K_2} + \frac{[H^+]}{K_2} + 1 \right) \quad (2)$$

(4) pH 微小電極

pH 微小電極は DeBeer ら¹⁷⁾の方法を参考にし制作した(先端直径は5 μm 程度)。キャリブレーションは HCl および NaOH を用いて、測定用基質の pH を pH=7 ~ pH=9 の範囲内で7~10段階に調整し行った ($r^2=0.99$)。

2.3 生物膜内基質濃度プロファイルの測定

生物膜の付着した支持体をフローセル(容積:150ml)内に固定し測定用基質 (Table. 1) で満たした後、パスツールピペットを用いて水面に N_2 ガスを吹きつけ、DO を調整すると同時に生物膜表面に流速(約2 $\text{cm}\cdot\text{sec}^{-1}$)を与えた (Fig. 1)。微小電極はマイクロマニピュレーター(中央精機株式会社 MM スタANDARD Z 昇降ステージ ALV-104-HP および X-Y ステージ ALD-106-H1P)に固定し、コントローラドライバ(中央精機株式会社 CAT-ED)により制御した。DO 微小電極は比較電極に対して-0.75V の電圧をかけピコアンペアメーター (TOA DC MICROVOLT AM METER PM-18U) に、 NO_3^- 、 H_2S および pH 微小電極は直接 pH メーター (HORIBA pH/ION METER F-23) に接続し

Table 1 The medium composition used for concentration profile measurements by microelectrodes

Components	Concentration ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
NaNO_3	0, 100, 280
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1000
Sodium acetate	2000
NH_4Cl	300
Na_2HPO_4	570
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	84
CaCl_2	200
$\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$	270

Fig. 1 Schematic diagram of the flow cell reactor setup for concentration profile measurements by microelectrodes

た。比較電極には Ag/AgCl タイプ (HORIBA 2010A-06T) を用いた。微小電極、マイクロマニピュレーターおよびフローセルは電気的ノイズを遮断するためにファラデーケージ内に設置した。全ての装置は恒温室内に設置し測定用基質の水温を $20 \pm 1^\circ\text{C}$ に保った。

生物膜を2時間程度測定用基質で馴致した後、生物膜内濃度プロファイルの測定を開始した。各濃度プロファイルを測定する前に、顕微鏡を用いて生物膜を観察しながら微小電極により支持体と膜表面の位置を確認し、膜表面を膜深さ方向の基準点とした。DO、 NO_3^- および pH 濃度プロファイルを測定する際には、微小電極をバルク水中から支持体に向かって下降させたのに対し、 $\text{T-H}_2\text{S}$ 濃度プロファイルを測定する際には、 H_2S 微小電極は高濃度から低濃度へ測定することが望ましいので、微小電極を支持体付近からバルク水中に向かって上昇させた。各濃度プロファイルの測定は生物膜の異なる地点において膜深さ方向に50 μm もしくは100 μm 間隔で、各成分につき1回から3回行った。

2.4 生物膜単位体積当たりの基質消費速度 (R) および基質フラックス (J) の算出

各実験における DO 消費、 NO_3^- 消費、 SO_4^{2-} 消費 (すなわち硫酸塩還元)、 $\text{T-H}_2\text{S}$ 消費 (すなわち $\text{T-H}_2\text{S}$ 酸化) 速度を定量的に評価するために、実測した基質濃度プロファイルから以下の手順により各基質の平均消費速度 (R) を求めた。

生物膜内の基質濃度プロファイルが (正味の) 消費および濃度拡散のみによって決定されると仮定すると、Fick の第2法則より式(3)が成立する¹⁸⁾。

$$\frac{\partial C(i)}{\partial t} = D(i) \frac{\partial^2 C(i)}{\partial x^2} - R(i) \quad (3)$$

ここで、C: 活性が生ずる地点からの距離 x における基

Fig. 2 Schematic presentation of evaluation of the specific consumption rate and the flux of substrates. The biofilm surface is at depth 0 μm .

質濃度 ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), i : 消費された基質の種類, D : 拡散係数 ($\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$), R : 生物膜単位体積当たりの基質消費速度 ($\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$) である (Fig. 2 を参照)。

D は生物膜深さ方向の間隙率の変化に依存するが, 本研究においては活性領域はわずか数 $100\mu\text{m}$ であり, この範囲内では顕著な間隙率の変化は見られなかったこと, また, 拡散係数に及ぼす間隙率の影響が明確に定量化されていないことより, 活性領域内において D を一定と仮定した。また, R は生物膜内の基質濃度および菌体密度分布に依存する。しかしながら, 本研究では微小電極の分解能を考慮し基質濃度の測定間隔を $50\mu\text{m}$ もしくは $100\mu\text{m}$ としたため, 活性領域 (深さ数 $100\mu\text{m}$) 内の測定点が少なく, 以下に示す方法からは膜深さ方向の R の詳細な分布を求めることは困難である。そこで, R を活性領域内の総括的な平均基質消費速度と定義し, 以下の方法より求めた。

定常状態を仮定し式(3)を積分すると式(4)が得られる。

$$C(i) = \frac{R(i)}{2D(i)} x^2 - \sqrt{\frac{2R(i)Cs(i)}{D(i)}} x + Cs(i) \quad (4)$$

境界条件: $x=0$ において $C=C_s$

$$x=La \text{ において } \frac{\partial C}{\partial x} = 0$$

(Fig. 2 を参照)

式(4)は, 生物膜内の基質濃度プロファイルが, 基質消費活性が生ずる領域においては2次曲線に, 生じない領域においては直線になることを示している。2次曲線で近似可能な領域を決定するために, 任意の近似対象領域を設定し, 実測した濃度プロファイルに2次曲線をカーブフィットさせ, その相関係数 (r^2) が0.9以上であるならば2次近似が可能であると定義し, 一本の2次曲線で近似した。 r^2 が0.9以下となる領域については, 新たに別の2次曲線を用いて実測した基質濃度プロファイルを同様に近似した。 R は, 得られた2次曲線の x^2 の係数に ($2 \times D$) をかけることで算出した。ここで, 20°C における DO , NO_3^- , $\text{T-H}_2\text{S}$ の拡散係数はそれぞれ $2.09 \times 10^{-5} \text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$, $1.23 \times 10^{-5} \text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$, $1.39 \times 10^{-5} \text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ とした¹⁹⁾。このように, R を一定として2次近似した場合でも相関係数が非常に高いことより, 任意の領域内の基質消費速度分布を平均値で表現し, 本研究の目的である異なる環境下に置かれた生物膜の基質消費速度を比較することが可能であると考えられる。

基質フラックス (J) は Fick の第1法則 (式(5)) から算出した。ここで, 濃度勾配 ($\partial C / \partial x$) は, DO および NO_3^- に関してはバルク水-膜表面間に存在する拡散層内, これに対し, $\text{T-H}_2\text{S}$ に関しては生物膜内の硫酸塩還元および $\text{T-H}_2\text{S}$ 酸化領域の間に存在する直線的な基質濃度プロファイルから求めた。これらの領域内における基質濃度プロファイルの近似直線の r^2 はすべて0.99以上であった。基質フラックスは $R \times La$ から求めることが可能であるが, R は総括的な平均消費速度である上, 上述したように, 2次近似にはある程度のバイアスが含まれるため, 濃度勾配から直接基質フラックスを求める方法がより妥当であると考えられる。

$$J(i) = -D(i) \frac{\partial C(i)}{\partial x} \quad (5)$$

2.5 硫酸塩還元活性ポテンシャルおよびSRB菌体密度分布の測定

硫酸塩還元活性ポテンシャルは嫌氣的バイアル瓶 (130ml) を用いた回分培養試験により求めた。実験方法は採取した生物膜を Microslicer™ を用いて支持体と平行に5層にスライスし¹⁰⁾, 各試料をホモジナイズした後, N_2 脱気した培地 (100ml) に植種し, バイアル瓶を密閉した。培地には有機炭素源として酢酸ナトリウムとプロピオン酸ナトリウム (それぞれ $500 \text{mg}\cdot\text{C}\cdot\text{l}^{-1}$) を添加した Post-gate medium B²⁰⁾ を用いた。バイアルを 25°C の暗所で振とう培養しながら, 定期的に生成した $\text{T-H}_2\text{S}$ および FeS 濃度を定常状態に達するまで測定し, 初期の濃度変化を直線で近似し, その傾きより硫酸塩還元活性ポテンシャルを求めた。

SRB 菌体密度は最確値法 (MPN 法) により求めた。上記の培地をハンゲイトタイプ試験管に 9ml 注入し N_2 脱気した後, 密栓しオートクレーブした。上記と同様に Microslicer™ を用いてスライスした生物膜断片をホモジナイズした後, 試料 1ml を試験管に植種し, 21日後に硫化鉄が蓄積し黒く変色した試験管をカウントした。

2.6 還元性硫黄化合物 (AVS, CRS および S^0) の測定

生物膜内に蓄積する酸揮発性硫化物 (acid volatile sulfides (AVS): S^{2-} , HS^- , H_2S および FeS), クロミウム還元性硫化物 (chromium reducible sulfide (CRS): FeS_2), および S^0 濃度を Fossing and Jorgensen²¹⁾ および Nielsen ら²²⁾ のシングルステップ抽出法に準じて測定した。生物膜を採取し直ちに AVS (S^{2-} , HS^- , H_2S および FeS) の酸化を防ぐため, 1% 酢酸亜鉛溶液 (ZnAC) 内で生物膜を Microslicer™ を用いてスライスした。測定はまず最初に各試料中から S^0 をエタノール (99.6%) で24時間振とう抽出し, 遠心分離により S^0 が溶解した上澄エタノールと残さ物に分離した。 S^0 は逆相カラム (Partisil 5 ODS-3, 移動相: メタノール) を装備した HPLC (Whatman, 波長 254nm , 流量 $0.4 \text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, サンプル注入量 $100 \mu\text{l}$) を用いて定量した。次に, 遠心分離後の残さ物に 1% ZnAC 溶液を 10ml 添加した後, 硫化水素トラップ装置²²⁾に移し, 12N HCl (2ml) を加え AVS を H_2S ガスに揮発させ, N_2 で通気することにより 1% ZnAC 溶液 (H_2S 濃度に合わせ容量は適宜調整した) でトラップした。CRS は AVS の抽出後の抽出液 (12ml の 2N HCl 溶液) に, 2.5ml の 1M Cr^{2+} (in 0.5N HCl) 溶液²¹⁾ を直接添加し, CRS を H_2S ガスに揮発させ, 同様に 1% ZnAC 溶液でトラップした。トラップした H_2S はメチレンブルー法によって定量した。AVS と CRS の回収率はそれぞれ $86 \pm 7\%$, $73 \pm 24\%$ であった。

3. 結果と考察

3.1 リアクターの処理性

Table 2 に実験期間中の流入および流出水の平均水質を示す。リアクター内の平均 DO 濃度は約 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ であり, 微好気条件で馴養された生物膜表面は糸状性で灰色を呈していた。 SO_4^{2-} 濃度は流入水に比べ流出水においてわずかに高く, 硫酸塩還元反応による SO_4^{2-} 濃度の減少は見られなかった。 NO_3^- 濃度の減少 ($230 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 程度) は主に脱窒によるものと考えられる。これに対し,

Table 2 Average influent and effluent water qualities during a experimental period

Average water qualities ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)		
	Influent	effluent
SO_4^{2-}	290(± 60)	330(± 80)
NO_3^-	530(± 180)	300(± 180)
NH_4^+	500(± 190)	640(± 240)
DOC	1560(± 530)	1250(± 510)
DO		40(± 30)
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)		13.7(± 5.2)
pH		6.9(± 0.3)

(± standard deviation)

NH_4^+ 濃度の減少は見られず、 NO_2^- 濃度は流入および流出水においてそれぞれ $14\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 、 $7\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 程度と低かったことから、硝化反応は起こっていなかったと考えられる。

3.2 微好気性生物膜内の硫酸塩還元反応

Fig. 3 に微小電極を用いて測定した生物膜深さ方向の DO、 $\text{T-H}_2\text{S}$ 、pH 濃度プロファイルと、計算により求めた硫酸塩還元、 $\text{T-H}_2\text{S}$ 酸化、DO 消費速度および活性領域を示す(膜厚は $1200\mu\text{m}$ 程度)。バルク水中に $100\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 程度存在した DO は膜表面から約 $450\mu\text{m}$ の地点で枯渇し、嫌気領域となった膜表面から約 $700\mu\text{m}$ 以深では硫酸塩還元反応が生じた。これに対し、DO 消費活性は膜表面から約 $450\mu\text{m}$ の領域に存在し、DO および SO_4^{2-} 呼吸活性は膜深さ方向に明確に分離し層状化していた。硫酸塩還元速度は $R(\text{SO}_4^{2-}) = 15.8\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ 、 $J(\text{SO}_4^{2-}) = 0.16\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ であった。ここで、 $J(\text{SO}_4^{2-})$ を用いて化学量論式(式(6))から硫酸塩還元反応により消費される酢酸量を求めたところ、 $0.16\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ となった。

微小電極により求めた *In Situ* の硫酸塩還元領域と SRB 菌体密度分布との関係を明らかにするために、生物膜深さ方向の SRB 菌体密度分布および硫酸塩還元活性ポテンシャルを求め、その結果を Fig. 4 に示す。SRB 菌体密度は膜表面から $0\mu\text{m}$ ~ $200\mu\text{m}$ の領域で最も高く ($4.6 \times 10^8 \text{MPN}\cdot\text{cm}^{-3}$)、深層に向かうに従い減少した。また、硫酸塩還元活性ポテンシャルも SRB 菌体密度と同様に表層から深層に向かうに従い低下した。以上の結果から、SRB 菌体密度および硫酸塩還元活性ポテンシャルは表層において最も高いものの、*In Situ* の硫酸塩還元活性は膜表面から約 $700\mu\text{m}$ 以深の中層において最も高いことが明らかになった。この理由として、硫酸塩還元反応は酸化還元電位が -150mV ~ -200mV 以下で起こる嫌気反応であるために、*In Situ* の硫酸塩還元活性は嫌氣的となる膜中層以深に限られ、好気的な表層では活性が阻害されるのに対し、絶対嫌気条件下で測定された硫酸塩還元活性ポテンシャルは SRB 菌体密度に比例し、SRB が高密度に存在する表層において最も高くなったと考えられる。

Fig. 3 において、硫酸塩還元反応により発生した T

Fig. 3 Steady-state concentration profiles of DO, H_2S and pH in a microaerobic biofilm ($\text{DO} = 100\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). The microzonation and specific reaction rates (R) of O_2 respiration, H_2S oxidation and SO_4^{2-} reduction are indicated by boxes. The biofilm surface is at depth $0\mu\text{m}$.

$\text{-H}_2\text{S}$ 濃度は膜表面から約 $950\mu\text{m}$ の地点で $260\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 程度に達したものの、膜表面に近づくに従い急激に減少し、膜表面から $200\mu\text{m}$ の地点では検出限界値以下となり、バルク水中では検出されなかった。 $200\mu\text{m}$ ~ $450\mu\text{m}$ の領域において DO 濃度プロファイルと $\text{T-H}_2\text{S}$ 濃度プロファイルが重なり合うことから、 $\text{T-H}_2\text{S}$ は DO により酸化されたと考えられる。ここで、発生したすべての $\text{T-H}_2\text{S}$ が SO_4^{2-} にまで酸化されると仮定すると、発生した $\text{T-H}_2\text{S}$ 濃度 ($J(\text{T-H}_2\text{S})$) が $0.16\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ であることから、化学量論式(7)によれば $0.32\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ の DO が必要になる。しかしながら、 $J(\text{DO})$ は $0.07\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ であり、発生した全ての $\text{T-H}_2\text{S}$ は SO_4^{2-} にまで完全に酸化されないことは明らかである。酸化された $\text{T-H}_2\text{S}$ 濃度とその際消費された DO 濃度のモル比 ($\text{O}_2/\text{T-H}_2\text{S}$ 比) が 1 以下の場合においては、最終生成物として SO_4^{2-} ではなく S^0 および $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ が優先的に生成することが知られている²³⁾。DO 濃度と $\text{T-H}_2\text{S}$ 濃度プロファイルが重なり合う領域における $\text{O}_2/\text{T-H}_2\text{S}$ 比は 0.2 以下であり、 S^0 および $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ が優先的に生成していると推測される。そこで、発生したすべての $\text{T-H}_2\text{S}$ が $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ よりも DO 要求量の少ない S^0 に酸化されたと仮定すると(式(8)、式(9))、消費された DO は $J(\text{DO}) (=0.07\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$ と同程度の $0.08\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ となる。しかしながら、DO が酢酸を酸化するためにも消費されることを考慮すると、発生したすべての $\text{T-H}_2\text{S}$ が DO のみで完全に酸化されたとは考えにくい。

以上のことから、生成した $T\text{-H}_2\text{S}$ のある程度は鉄およびマンガン等の金属と結合していたものと考えられる。

そこで、生成された $T\text{-H}_2\text{S}$ の酸化経路を検討するた

Fig. 4 Spatial distribution of SRB population density and potential sulfate reduction rate in a biofilm. The biofilm surface is at depth 0 μm.

Fig. 5 Concentration profiles of S^0 , AVS and CRS in a biofilm. The biofilm surface is at depth 0 μm.

めに、生物膜内に蓄積した還元性硫黄化合物 (S^0 , AVS および CRS) の濃度分布を測定し、その結果を Fig. 5 に示す。ここで示した結果は馴養開始から65日後の生物膜における還元性硫黄化合物濃度分布である。 S^0 は測定した還元性硫黄化合物のうち生物膜全体に最も多く蓄積しており、その濃度は最大約 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{S}\cdot\text{cm}^{-3}$ 程度にまで達した。また、AVS 濃度は DO 濃度の枯渇する表層から約 $300 \mu\text{m}$ 付近で著しいピーク ($41 \mu\text{mol}\cdot\text{S}\cdot\text{cm}^{-3}$) を示したが、 FeS_2 は生物膜全体に僅かに蓄積していた。流入水中に S^0 は検出されなかったことより、生成した $T\text{-H}_2\text{S}$ の一部は DO により S^0 にまで酸化され生物膜内に蓄積することが明らかとなった。また AVS の蓄積より、 $T\text{-H}_2\text{S}$ の酸化に鉄-硫黄のサイクルが密接に関与していることも示唆された。これらのことを考慮すると実際に $T\text{-H}_2\text{S}$ の酸化によって消費される DO 量は、算出した値よりも少ないものと予想される。このように、 $T\text{-H}_2\text{S}$ の酸化経路は非常に複雑であり、本研究では定量的にその経路を特定することはできなかったものの、生物膜内の嫌気領域において硫酸塩還元反応が生じ、発生した $T\text{-H}_2\text{S}$ の再酸化により生物膜内の DO が相当量消費されることが明らかとなった。このことは、好気的な有機物酸化および硝化反応が阻害される可能性を示唆している。

3.3 硫酸塩還元反応に対する NO_3^- および DO 濃度の影響

Fig. 6 にバルク水中に NO_3^- を約 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 添加した後に測定した DO, NO_3^- , $T\text{-H}_2\text{S}$ および pH 濃度プロ

Fig. 6 Effect of nitrate concentration ($\text{DO}=50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{NO}_3^-=100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) on the microzonation of O_2 respiration, H_2S oxidation and SO_4^{2-} reduction. The biofilm surface is at depth 0 μm.

Fig. 7 Effect of nitrate concentration ($\text{DO}=70 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{NO}_3^- = 280 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) on the microzonation of O_2 respiration, anaerobic H_2S oxidation and SO_4^{2-} reduction. The biofilm surface is at depth $0 \mu\text{m}$.

ファイルと硫酸塩還元, $\text{T-H}_2\text{S}$ 酸化, DO 消費および NO_3^- 消費速度および活性領域を示す (膜厚は $1400 \mu\text{m}$ 程度)。Fig. 3 と比較すると, DO はバルク水中の濃度が $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 程度と低かったために膜表面から約 $300 \mu\text{m}$ で枯渇し, $J(\text{DO})$ は $0.02 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ に低下した。 NO_3^- は $300 \mu\text{m}$ ~ $500 \mu\text{m}$ の領域で消費され ($J(\text{NO}_3^-) = 0.036 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$), $500 \mu\text{m}$ 以深では検出限界値の約 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ となった。硫酸塩還元反応は, DO が枯渇し NO_3^- が低濃度になった $700 \mu\text{m}$ ~ $850 \mu\text{m}$ の領域において起こり, $R(\text{SO}_4^{2-})$ および $J(\text{SO}_4^{2-})$ はそれぞれ $0.7 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$, $0.006 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ であった。 $\text{T-H}_2\text{S}$ 酸化活性領域に注目すると, $\text{T-H}_2\text{S}$ 濃度プロファイルは DO 濃度プロファイルとはわずかに (約 $50 \mu\text{m}$) 重なり合う程度であるが, NO_3^- 濃度プロファイルとは約 $150 \mu\text{m}$ 重なり合っている。このことは, 生成した $\text{T-H}_2\text{S}$ が DO のみならず NO_3^- によっても酸化される可能性を示唆している。また, バルク水中に NO_3^- が添加された結果, 生物膜内では DO , NO_3^- および SO_4^{2-} 呼吸活性が順に膜深さ方向に層状化した。

次に, Fig. 7 にバルク水中の NO_3^- 濃度を約 $280 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ に増加した後に測定した DO , NO_3^- , $\text{T-H}_2\text{S}$ および pH 濃度プロファイルと硫酸塩還元, $\text{T-H}_2\text{S}$ 酸化, DO 消

Fig. 8 Effect of dissolved oxygen concentration ($\text{DO}=10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) on SO_4^{2-} reduction activity. The biofilm surface is at depth $0 \mu\text{m}$.

費および NO_3^- 消費速度および活性領域を示す (膜厚は $1600 \mu\text{m}$ 程度)。Fig. 3 および Fig. 6 と比較すると, バルク水中の NO_3^- 濃度がさらに増加したために, 硫酸塩還元反応はより深層の膜表面から $1350 \mu\text{m}$ 以深の支持体付近に限られ, $R(\text{SO}_4^{2-})$ および $J(\text{SO}_4^{2-})$ はそれぞれ $0.14 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$, $0.002 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ に低下した。硫酸塩還元反応によりわずかながら発生した $\text{T-H}_2\text{S}$ は膜表面から約 $750 \mu\text{m}$ の地点で検出限界値以下となった。 $\text{T-H}_2\text{S}$ 酸化領域 ($750 \mu\text{m}$ ~ $1050 \mu\text{m}$) に注目すると, DO は膜表面から約 $500 \mu\text{m}$ の地点で枯渇しており, $\text{T-H}_2\text{S}$ 濃度プロファイルは DO 濃度プロファイルとは重なり合っていないのに対し, NO_3^- 濃度プロファイルと重なり合っていることから, $\text{T-H}_2\text{S}$ は NO_3^- により酸化されたと考えられる。 NO_3^- を電子受容体とする $\text{T-H}_2\text{S}$ の生物学的な酸化には, 独立栄養性の硫黄脱窒細菌等が関与していると考えられる²⁴⁾。本研究においても, 回分実験により硫黄脱窒活性が認められており, 生物膜内の硫酸塩還元反応 (硫黄の循環) は有機物の分解のみならず, 間接的に脱窒 (窒素の循環) にも関与することを示唆している。また, Fig. 3, Fig. 6 および Fig. 7 の $J(\text{DO})$ はそれぞれ異なったが ($0.07 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, $0.02 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, $0.042 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$), これはバルク水中の DO 濃度に比例したためであり, NO_3^- 濃度の増加に対してはさほど影響されなかったと考えられる。

ここで, 微好気性生物膜内の硫酸塩還元反応に及ぼす NO_3^- 濃度 (NO_3^- 侵入深さ) の影響を評価するために, Fig. 3, Fig. 6, Fig. 7 および Fig. 8 (詳細は以下に示した) における硫酸塩還元領域 ($La(\text{SO}_4^{2-})$), $R(\text{SO}_4^{2-})$ および $J(\text{SO}_4^{2-})$ をまとめて Table. 3 に示す。Table. 3 から, NO_3^- 侵入深さが増加するのに伴い, 硫酸塩還元領

Table 3 A summary of the effect of DO and NO_3^- concentrations in the bulk liquid on sulfate reduction zone, sulfate reduction rate and sulfate flux

Substrate concentration ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)		$\text{La}(\text{SO}_4^{2-})$ (μm)	$\text{R}(\text{SO}_4^{2-})$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)	$\text{J}(\text{SO}_4^{2-})$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)
DO	NO_3^-			
10	0	0-450	21.1	0.40
100	0	700-950	15.8	0.18
50	100	700-850	0.7	0.006
70	280	1300-1450	0.14	0.002

域が深層に移動すること、同時に $\text{R}(\text{SO}_4^{2-})$ が低下することが明らかになった。この理由として、(1) NO_3^- には酸化還元電位を増加させ硫酸塩還元反応を抑制する効果があることが知られており²⁰⁾、このために Fig. 6 に比べより深く NO_3^- が侵入した Fig. 7 の中層においては硫酸塩還元活性が生じなかったこと、(2) NO_3^- の添加により NO_3^- を電子受容体とする硫黄脱窒反応が促進され、微小電極によって検出される T- H_2S 濃度が低下したこと、(3) NO_3^- を添加したことにより脱窒細菌の活性が高まり、有機物をめぐる競合関係にある SRB の活性が低下したこと、さらには、(4) SRB 菌体密度分布および硫酸塩還元活性ポテンシャルは深層ほど低く (Fig. 4 を参照)、硫酸塩還元領域が深層に移動することに伴い $\text{R}(\text{SO}_4^{2-})$ が低下したこと、等が考えられる。In Situ の硫酸塩還元活性の低下は DO および NO_3^- 侵入深さのみならず膜厚の減少²⁵⁾、 SO_4^{2-} および有機物濃度¹⁾ の減少によっても起こることが報告されている。しかしながら、硫酸塩還元反応および生成された硫化水素の再酸化に及ぼす NO_3^- の影響については未知の部分が多く、今後の研究課題である。

さらに、Fig. 7 の測定終了後、 NO_3^- を含まず ($\text{NO}_3^- = 0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)、DO 濃度を約 $10\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ に調整した測定用基質に生物膜を馴養し、T- H_2S および pH 濃度プロファイルを測定したところ、Fig. 8 に示すように膜表面から $450\mu\text{m}$ の表層においても硫酸塩還元反応が起こった。このことから、DO および NO_3^- による硫酸塩還元活性の抑制は一時的なものであり、リアクター内の DO および NO_3^- 濃度が変動するのに伴い、生物膜の硫酸塩還元速度および活性領域も変動すると推測される。また、Fig. 3 と比較して $\text{R}(\text{SO}_4^{2-})$ および $\text{J}(\text{SO}_4^{2-})$ がそれぞれ $21.1\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ 、 $0.40\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ に高まったのは (Table. 3)、硫酸塩還元活性ポテンシャルが表層ほど高いことによると考えられる。DO は低濃度であったために濃度プロファイルは測定できなかったが、生物膜内において T- H_2S の酸化が見られなかったことから、生物膜内には DO が侵入していないものと推測される。そのため、T- H_2S 濃度は膜表面から $450\mu\text{m}$ の地点において $650\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 、膜表面においても $280\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ に達し、バルク水中においても検出された。バルク水中の $0\mu\text{m}\sim 400\mu\text{m}$ の領域において T- H_2S 濃度勾配が直線的に変化していることは、この領域の T- H_2S 濃度の変化が主に濃度拡散によるものであり、正味の T- H_2S の生成および消費はないことを示している。

4. 結 論

本研究では、微小電極を用いて微好気性生物膜内の DO、 NO_3^- および T- H_2S 濃度プロファイルを測定し、硫酸塩還元活性を定量的に評価した。また、DO および NO_3^- 濃度が硫酸塩還元反応に与える影響を検討した。得られた結果より以下のような結論を導くことができる。

1) バルク水中の物質収支のみでは解明できない生物膜内の硫酸塩還元反応を定量的に評価するにあたって、微小電極は非常に有効なツールであることが示された。

2) 硫酸塩還元活性ポテンシャルは SRB 菌体密度と同様に表層において最も高かったのに対し、In Situ の硫酸塩還元速度は中層の嫌気領域において最も高く、好気的な表層では見られなかった。このようにポテンシャルと In Situ の硫酸塩還元活性は異なる場合があることがわかった。

3) DO および NO_3^- 侵入深さが増加することに伴い、表層および中層において硫酸塩還元反応は抑制され、硫酸塩還元領域は徐々に深層に移動すると同時に、硫酸塩還元速度の低下を引き起こした。この理由として、SRB 菌体密度分布が深層に向かうに従い減少することが挙げられる。

謝 辞

実験データの採取に、本学大学院工学研究科の修了生、現 環境庁水質保全局の松田尚之君の協力を得たことを付記し、感謝致します。本研究の一部は文部省科学研究費補助金 (課題番号 08750661) および科学技術振興事業団の戦略的基礎研究推進事業 (CREST) の「環境低負荷型の社会システム」プロジェクトの援助を受けて行われた。ここに記して謝意を表します。

(原稿受付 1997年11月17日)

(原稿受理 1998年4月1日)

参 考 文 献

- 1) Kuhl, M. and Jorgensen, B.B. (1992) Microsensor measurements of sulfate reduction and sulfide oxidation in compact microbial communities of aerobic biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1164-1174.
- 2) Lens, P., Massone, A., Rozzi, A., and Verstraete, W. (1995) Effect of sulfate concentration and scraping on aerobic fixed biofilm reactors, *Wat. Res.*, **29**, 857-870.
- 3) 森忠洋, 小泉淳一 (1988) 排水処理におけるイオウ関連細菌制御の重要性, *水処理技術*, **29**, 719-725.
- 4) Norsker, N.H., Nielsen, P.H. and Hvitved-Jacobsen, T. (1995) Influence of oxygen on biofilm growth and potential

- sulfate reduction in gravity sewer biofilm. *Wat. Sci. Tech.*, **31** (7), 159-167.
- 5) Mori, T., Nonaka, T., Tazaki, K., Koga, M., Hikosaka, Y. and Noda, S. (1992) Interactions of nutrients, moisture and pH on microbial corrosion of concrete sewer pipes, *Wat. Res.*, **26**, 29-37.
 - 6) Lee, W., Lewandowski, Z., Okabe, S. and Characklis, W.G. (1993) Corrosion of mild steel underneath aerobic biofilms containing sulfate-reducing bacteria, Part I: at low dissolved oxygen concentration. *Biofouling*, **7**, 197-216.
 - 7) Schramm, A., Larsen, L.H., Revsbech, N.P., Ramsing, N.B., Amann, R. and Schleifer, K. (1996) Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 4641-4647.
 - 8) De Beer, D., Van Den Heuvel, J.C., and Ottengraf, S.P.P. (1993) Microelectrode measurements of the activity distribution in nitrifying bacterial aggregates, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 573-579.
 - 9) Nielsen, L.P., Christensen, P.B., Revsbech, N.P. and Sørensen, J. (1990) Denitrification and oxygen respiration in biofilms studied with a microsensor for nitrous oxide and oxygen, *Microb. Ecol.*, **19**, 63-72.
 - 10) Okabe, S., Hirata, K., Ozawa, Y. and Watanabe, Y. (1996) Spatial microbial distribution of nitrifiers and heterotrophs in mixed-population biofilms, *Biotechnol. Bioeng.*, **50**, 24-35.
 - 11) Revsbech, N.P. and Jørgensen, B.B. (1986) Microelectrodes: Their use in microbial ecology, *Adv. Microb. Ecol.*, **9**, 293-352.
 - 12) Revsbech, N.P. (1983) In situ measurement of oxygen profiles of sediments by use of oxygen microelectrodes, in "Polarographic oxygen sensors" (ed. by Gnaiger and Forstner), pp.265-273, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
 - 13) DeBeer, D. and Sweerts, J.P.R.A. (1989) Measurement of nitrate gradients with an ion-selective microelectrode, *Analytica Chimica Acta*, **219**, 351-356.
 - 14) Ammann, D. (1986) Ion-selective microelectrodes, principles, design and application, pp.70-71, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
 - 15) Zhen, R., Smith, S.J. and Miller, A.J. (1992) A comparison of nitrate-selective microelectrodes made with different nitrate sensors and the measurement of intracellular nitrate activities in cells of excised barley roots, *J. Exp. Bot.*, **43**, 131-138.
 - 16) Eaton, A.D., Clesceri, L.S. and Greenberg, A.E. (1995) Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th Ed., (4) 124-125, APHA AWWA WEF.
 - 17) De Beer, D. and Van Den Heuvel, J.C. (1988) Gradients in immobilized biological systems, *Analytica Chimica Acta*, **213**, 259-265.
 - 18) Nielsen, L.P., Christensen, P.B., Revsbech, N.P. and Sørensen, J. (1990) Denitrification and oxygen respiration in biofilms studied with a microsensor for nitrous oxide and oxygen, *Microb. Ecol.*, **19**, 63-72.
 - 19) Perry, J.H. (1963) Chemical engineers' handbook, Fourth edition, McGraw Hill, New York.
 - 20) Postgate, J.R. (1984) The sulfate-reducing bacteria, 2nd Ed., pp.32, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
 - 21) Fossing, H. and Jørgensen, B.B. (1989) Measurement of bacterial sulfate reduction in sediments: evaluation of a single-step chromium reduction method, *Biogeochem.*, **8**, 205-222.
 - 22) Nielsen, P.H., Lee, W., Lewandowski, Z., Morison, M. and Characklis, W.G. (1993) Corrosion of mild steel in an alternating oxic and anoxic biofilm system, *Biofouling*, **7**, 267-284.
 - 23) Janssen, A.J.H., Sleyster, R., van der Kaa, C., Jochemsen, A., Bontsema, J. and Lettinga, G. (1995) Biological sulphide oxidation in a fed-batch reactor, *Biotechnol. Bioeng.*, **47**, 327-333.
 - 24) Sublette, K.L. and Sylvester, N.D. (1987) Oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacillus denitrificans*: desulfurization of natural gas, *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 249-257.
 - 25) Nielsen, P.H. (1987) Biofilm dynamics and kinetics during high-rate sulfate reduction under anaerobic conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 27-32.