

プロセス破綻した高温 UASB リアクターのフマル酸添加による回復効果と微生物挙動解析

水圏土壌環境制御研究室 中村猛利

指導教官 大橋晶良

1. はじめに

高温 UASB リアクターは、中温 UASB リアクターに比べ高速処理が可能である。しかし、高温プロセスは、中温プロセスに比べ、環境変動に弱くプロセスが不安定であるという問題を抱えている。特に不安定時には、リアクター中にプロピオン酸が蓄積し、最悪の場合にはプロセスが破綻してしまう。プロセス破綻した場合には、多額の費用をかけて汚泥を入れ替えるか原水を停止する等の処置が必要となり、廃水処理施設にとっては許容できない問題となる。そこで、プロセス破綻したリアクターの早期回復化技術が求められている。我々は、嫌気性廃水処理プロセスで最も重要な細菌の一つとなる高温プロピオン酸酸化細菌 (*Pelotomaculum thermopropionicum*, Strain SI : SI 株) を単離し、ゲノム解析によりプロピオン酸代謝経路 (Methylmalonyl-CoA pathway : MCP) を明らかにした。MCP 経路の主要なステップは、プロピオン酸がコハク酸、フマル酸、リンゴ酸、ピルビン酸を経由し酢酸へと代謝されるものである。SI 株を用いた共生環境におけるバッチ試験やマイクロアレイ解析により、MCP 経路後半の代謝産物であるフマル酸の添加が、プロピオン酸分解の促進に有効であることが示唆された。そこで、本研究では、フマル酸によるプロピオン酸分解の促進効果を高温 UASB リアクターで実証することを目的として、高温 UASB リアクターの処理性能を定常状態から破綻させ、フマル酸添加によりプロセス破綻した高温 UASB リアクターの処理性能の回復が早まるか調査した。

一方、現在までプロセス破綻に至る明確なメカニズムは不明である。それは、UASB リアクターでは、様々な微生物が関与しており、リアクターの処理性能が定常～悪化～回復へと変化した時に、何の因子で、どの微生物がダメージを受け、そのダメージの状態（生死や活性低下など）がどうなっているかについては全く見えない状況である。そこで、本研究では、2つ目の目的として、高温 UASB リアクターの処理性能を変化させ（定常～破綻～回復）、その間の微生物挙動として LIVE/DEAD 法による生菌率の推移および FISH 法による菌数割合の推移を調査した。さらに、LIVE/DEAD 法においては、微生物モニタリングにより、リアクターの性能を判定できるか評価した。

2. 実験方法

2.1 フマル酸添加による早期回復化試験

高温 UASB リアクターは、容積負荷 $7\text{kg-COD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ 、HRT 5.6 時間で運転を行った。定常時の運転(0 日目)は、供給基質としてプロピオン酸単独基質 $1,700\text{mgCOD/L}$ (15mM) を用いた。続いて、プロセスを破綻させるために、基質濃度を 10 倍 ($17,000\text{mgCOD/L}$) に上げ、低 pH 条件 ($\text{pH}=5$) で 12 時間暴露しプロピオン酸を蓄積させた (0.5 日目)。その後、回復試験として定常時の基質にフマル酸 $1,700\text{mgCOD/L}$ (18mM) を混合し 1.5 日および 7 日間添加した。比較試験 (BL 試験) としてフマル酸を添加しない系も実施した。フマル酸添加による回復効果の評価は、プロピオン酸除去率の回復日数やメタンガス発生量を BL 試験と比較して行った。

2.2 微生物挙動解析

(1) LIVE/DEAD 法による生菌率調査

実験操作は、Molecular Probe Inc 社の L7012 LIVE/DEAD Bac Light™ Bacterial Viability Kit の Product information に準拠して行った。前処理は、グラニュール汚泥を数個採取し、破砕したあとに超音波分散処理を行った。次に、サンプルを軽く遠心した後、観察しやすい程度に希釈し、マイクロチューブに 0.5ml 分取した。そこへ LIVE/DEAD Kit を $1.5\mu\text{l}$ 添加し攪拌後、暗所で 15 分間染色した。染色終了後、黒色メンブランフィルターを用いて吸引し過した。フィルターは、カバーガラス上で自然乾燥し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

(2) FISH 法による菌数割合調査

FISH 法は、Sekiguchi らの方法に準じて行った。プローブには、古細菌の 16S rRNA を標的とした ARC915 プローブとバクテリアの 16S rRNA を標的とした EUB338 プローブ、SI 株の 16S rRNA を標的とした TGP690 プローブを用い、その 5' 末端には Cy3 を標識した。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーションバッファー (900mM NaCl , 20mM Tris-HCl [$\text{pH}7.2$], 0.01% SDS, formamide : ARC915 および EUB338 は 20% 、TGP690 は 15% とした) に $0.5\mu\text{M}$ のプローブを加え、 46°C で 10 時間以上行った。余剰なプローブの洗浄は、スライドをハイブリダイゼーションバッファーに浸して、 48°C で 20 分間行った。FISH 法前処理終了後に、DAPI で全菌染色を行った。

3. 結果及び考察

3.1 フマル酸添加による早期回復化試験

高温 UASB リアクターのフマル酸添加試験により得られたプロピオン酸除去率の結果を図 1 に示した。フマル酸を 1.5 日添加した系では、プロピオン酸除去率 80% までの回復日数が BL 試験に比べて約 2 日早かった。これは、フマル酸添加により SI 株の MCP サイクルが促進され、早期に SI 株の活性が回復したためと考えられる。メタンガス発生量は、フマル酸を添加すると 1.5 日後に定常時の 30% 程度のガス発生量が確認でき BL 試験と比べて約 4.5 日早かった。これは、SI 株がフマル酸を分解し、その後の酢酸～メタン生成が進行したためと考えられる。従って、プロセス破綻しプロピオン酸化細菌がダメージを受けても、酢酸資化性メタン生成菌や水素資化性メタン生成菌は、ダメージを受けないまたは回復が早いものと推察できる。

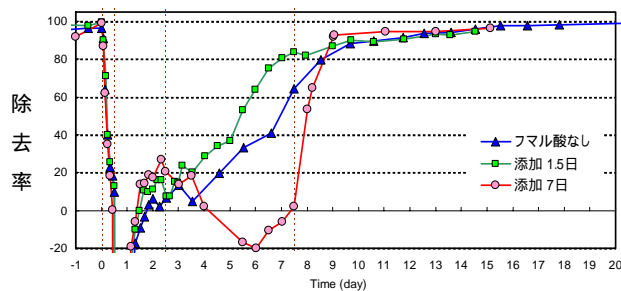


図 1 プロピオン酸除去率の推移

3.2 微生物挙動解析

(1) LIVE/DEAD 法による生菌率調査

LIVE/DEAD 法により得られた生菌率測定画像を図 2 に、リアクターの状態を変化させた時の生菌率の推移を図 3 に示した。高温 UASB リアクターの状態を変化（定常～破綻～回復）させた時におけるグラニューール汚泥中の生菌率の推移は、定常時に約 50% であったが、プロセス破綻時に 20% まで低下し、プロセスを回復期に移すと直ぐに 50% まで回復した。これらの事から微生物は、プロセス破綻時に生菌の半数以上がダメージを受け（50% 20%）、リアクターを回復状態に戻すと直ぐに回復することが分かった。

(2) FISH 法による菌数割合調査

FISH 法により得られた画像を図 4 に、リアクターの状態を変化させた時の菌数割合の推移を図 5 に示した。

FISH 法による菌数割合の変化については、定常状態における高温 UASB リアクターのグラニューール汚泥中の各菌数割合は、アーキア：31%、バクテリア：52%（内プロピオン酸化細菌 SI 株は 11% とバクテリア

の約 20% を占める）、アーキアとバクテリアの含量が 83% であった。プロセス破綻時においては、アーキア：44%、バクテリア：42%（内プロピオン酸化細菌 SI 株は 8%）アーキアとバクテリアの含量が 86% であった。この結果より、菌数割合については、定常時とプロセス破綻時であまり差が認められないことが分かった。

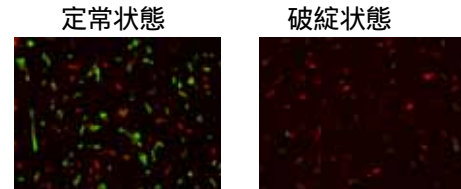


図 2 LIVE/DEAD 法による生菌率測定画像

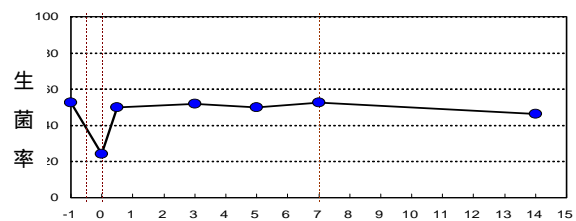


図 3 リアクター状態変化における生菌率の推移

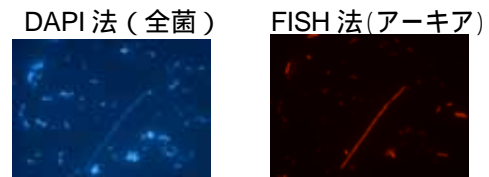


図 4 FISH 法の画像

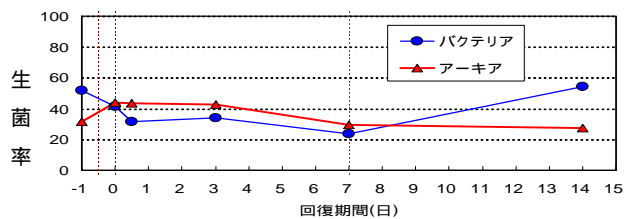


図 5 FISH 法の画像

4. まとめ

プロセス破綻した高温 UASB リアクターへのフマル酸添加による回復効果が示唆された。

プロセスの状態を変化（定常～破綻～回復）させた時の微生物挙動（生菌率および菌数割合の変化）が分かった。

生菌率モニタリングによるプロセス状態の判定は、プロセス破綻について検出できたが、回復期は出来なかった。