

高温 UASB リアクターにおける環境変動時の微生物群集解析

水圏土壌環境制御研究室 田村英輔
指導教員 山口隆司

1. はじめに

UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) 法は、様々な産業廃水処理に適用されている。特に中温 (37 °C 付近) UASB 法は、既に成熟段階に達した技術と見なされ高く評価されている。しかしながら、アルコール蒸留廃水や食品加工廃水は、60-90 °C と高温で排出されるため、中温度域まで冷却して処理されている。そこで現在、高温 (55 °C 付近) UASB 法の開発が進められている。高温 UASB 法は高温廃水を処理する際、廃水の冷却に必要となるエネルギーが少なく済むという利点がある。また、高温 UASB 法は、中温 UASB 法と比較して数段活性の高いメタン生成古細菌を反応器内に保持しているため、高温・高濃度の有機性廃水を高速・高負荷で処理することが期待されている。実際に、容積負荷 100 kgCOD · m³ · day⁻¹ を達成した高温 UASB リアクターの報告もある¹⁾。しかしながら、高温 UASB 法が普及しない原因として、環境変動に弱く、プロピオン酸がプロセス内に蓄積することで良好な処理水質が得られなくなることが多々報告されている^{1),2)}。

これを解明するために、高温 UASB リアクターのプロセス破綻に関する研究として、容積負荷 7.3 kgCOD · m³ · day⁻¹ で運転している高温 UASB リアクターを用いて様々な条件の過負荷曝露試験を行なった³⁾。その結果、意図的に 10 倍負荷で曝露することで有機酸が蓄積しても、pH 低下が起こらなければメタン生成は活発に行われ、定常時の基質に戻すことにより即座に定常状態に戻った。ところが 10 倍負荷で曝露することで有機酸が蓄積し、間接的にリアクターの pH が 5.0 まで低下するとリアクター内微生物群集がダメージを受け、定常時の基質に戻した後もプロピオン酸の蓄積が長期に渡った。また、低 pH 期間が長くなることで微生物群集のダメージは大きくなり、回復必要日数も長期化することを明らかにした。しかしながら、リアクター内のどの微生物がどの程度のダメージを受けているか、微生物群集の

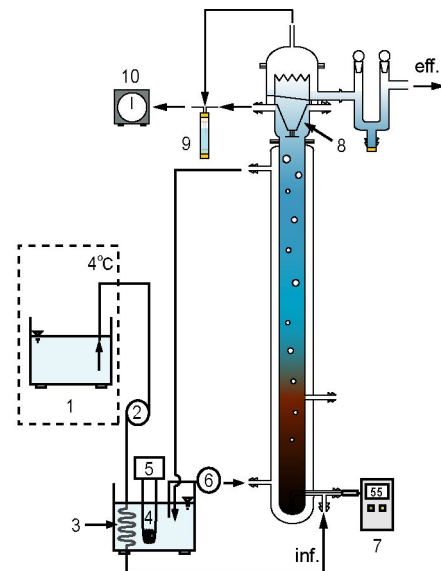
ダメージは菌の死滅なのか、活性低下によるものなのかは明らかにすることができなかった。

そこで本研究は、低 pH 曝露によって高温 UASB 処理性能が悪化した際、プロピオン酸酸化細菌やメタン生成古細菌がどのようにダメージを受けているのか解明するため、意図的にリアクターを低 pH 環境下に曝して処理性能を悪化させ、グラニュール汚泥を構成する微生物群集の変遷を分子生物学的手法で解析した。

2. 実験方法

(1) 高温 UASB リアクター

本研究に用いた高温 UASB リアクターを Fig.1 に示す。本リアクターは、高さ 720 mm、内径 φ 60 mm のガラス製で反応容積 2.24 L、0.2 L の GSS (Gas-Solid-liquid Separator) を設けている。リアクター



- | | |
|------------------------|------------------------|
| 1. Substrate reservoir | 6. Recirculation pump |
| 2. Feed pump | 7. Temp. sensor |
| 3. Pre-heating coil | 8. Gas-solid separator |
| 4. Heater | 9. Water sealed bath |
| 5. Temp. controller | 10. Wet-test gas meter |

Fig.1 Schematic diagram of the UASB reactor.

一内温度は、ウォータージャケットにより恒温水を循環させ 55.0 ± 1.0 °C に制御した。COD 容積負荷と水理的滞留時間 (HRT) は、反応容積を用いて算定した。本リアクターの植種汚泥は、焼酎蒸留粕廃液を 1 年以上に渡り処理しているパイロットスケールの高温 UASB より採取したグラニューール汚泥を重力沈降して用いた。

(2) 定常時の基質

本実験に用いた人工基質の組成を Table 1 に示した。プロピオン酸を唯一の炭素源とし、濃度 5000 mgCOD · L⁻¹ とした。なお、プロピオン酸とプロピオン酸ナトリウムを混合することにより、pH は 7.0 ± 0.1 に調節している。人工基質は 4 °C の恒温室で保存し、供給する際には恒温槽を通過させて 55 °C に加熱した。

(3) 分析項目

人工基質並びに処理水中の COD_{Cr} は HACH 法、pH は卓上 pH メーター (HM30-R) で測定した。バイオガス組成は、Unibeads C (60/80 mesh) を充填した 2 m × 3 mm stainless steel カラムを搭載した TCD 型検出器ガスクロマトグラム (Shimadzu GC-8A) により測定した。VFA は 30 m × 0.53 mm、膜厚 0.25 μm

Table 1 Composition of artificial wastewater.

carbon source	Conc. (mgCOD · L ⁻¹)
CH ₃ CH ₂ COONa	4780
CH ₃ CH ₂ COOH	220
pH buffer	Conc. (mg · L ⁻¹)
NaHCO ₃	500
mineral	Conc. (mg · L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	11
CaCl ₂ ·7H ₂ O	5
MgCl ₂ ·6H ₂ O	33
KCl	16
NH ₄ Cl	222
trace element	Conc. (mg · L ⁻¹)
FeCl ₂ ·4H ₂ O	3.93
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.17
ZnCl ₂	0.07
H ₃ BO ₃	0.06
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.50
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.04
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.03
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.03

の Stabilwax-DA カラムを搭載した FID 型検出器ガスクロマトグラム (Shimadzu GC-1700) により測定した。人工基質、処理水の溶解性試料はメンブレンフィルター (Advantec ; 孔径 0.2 μm) で濾過したものを用いた。

(4) 低 pH 曝露試験

低 pH 曝露試験は、供給基質濃度 5000 mgCOD · L⁻¹、HRT 4.0 hr と固定し、プロピオン酸とプロピオン酸ナトリウムの混合比を変えることで pH 4.9 ± 0.1 に調製した基質を 12 時間供給することにより行なった。その後、即座に定常時の基質に戻し、自己回復を図った。バイオガスおよび処理水のサンプリングは、低 pH 曝露時では 3 時間毎、定常時の基質に変更直後では 6 時間毎、それ以外は 1 日毎に行なった。また、定常時、低 pH 曝露終了時、回復期間においてグラニューール汚泥のサンプリングを行い、配列特異的 SSU rRNA 切断法による解析に供した。

(5) 配列特異的 SSU rRNA 切断法

採取したグラニューール汚泥からの RNA 抽出は、ビーズビーター法により行なった。RNA 溶液の濃度測定は、RiboGreen Quantitation Kit (Molecular Probes) と分光光度計 (Shimadzu ; RF-5300PC) を用いて行なった。

配列特異的 SSU rRNA 切断法は、Table 2 に示す DNA プローブを用いて以前に報告された方法に準じて行なった⁴⁾。RNA フラグメントは RNA 6000 Nano Kit (Agilent) を用いて、Agilent 2100 Bioanalyzer によって電気泳動を行なった。RNA サンプルと電気泳動の試薬は、RNA 6000 Nano Kit 内説明書に従って調製した。電気泳動内の個別のバンドの蛍光強度は、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent ; export 2100) に付属しているソフトウェアで解析した。蛍光強度は、それぞれ異なる反応試薬で行なった 2 サンプルによって計算した。なお、MX825mix および SARCI551 を用いて解析を行ったところ、両プローブに特異的な微生物は検出されなかった。そのため、TMX745m を用いて解析した結果を酢酸資化性メタン生成古細菌の値として評価した。また、ARC915 を用いて得られた結果と TMX745m を用いて得られた結果の差を水素資化性メタン生成古細菌の値として評価した。

Table 2 DNA scissor probes (Narihiro & Sekiguchi, in preparation)

Probe name	<i>E. coli</i> pos.	Target group	Probe sequence (5-3)	FA (%)	Cleavage coefficient
EUB338mix	338-355	Most of the domain <i>Bacteria</i>	GCWGCCWCCCGTAGGWT	60	97
ARC915	915-934	Domain <i>Archaea</i>	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	70	99
Glh821m	821-840	<i>Desulfotomaculum</i> lh group	ACCTCCTACACCTAGCACCC	60	95
MX825mix	825-845	<i>Methanosaeta</i>	TCGCACCGTGGCYGACACCTAGC	60	99
TMX745m	743-762	Thermophilic <i>Methanosaeta</i>	CCCTTGCCGTCGGATCCGTT	65	97
SARCI551	551-570	<i>Methanosarcina</i>	GACCCAATAATCACGATCAC	30	97

3. 実験結果

(1) 高温 UASB リアクターの定常状態

リアクターパフォーマンスの経日変化を Fig.2 に示す。本リアクターは、スタートアップから負荷を段階的に上昇させて運転した。負荷の上昇は、HRT を固定し、供給基質の濃度を上昇することにより行なった。運転開始 72 日目に容積負荷 $30 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{day}^{-1}$ で、COD 除去率 ([inf. COD 濃度-eff. COD 濃度]/inf. COD 濃度 $\times 100$) 95%以上、メタン生成速度 $20\text{-}25 \text{ NL} \cdot \text{day}^{-1}$ という定常状態に達した。定常状態においてスラッジベッドの高さ変動は無く、 $37 \text{ gVSS} \cdot \text{reactor}^{-1}$ の汚泥が保持されていた。この時の汚泥負荷は、 $1.8 \text{ kgCOD} \cdot \text{kgVSS}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ であった。

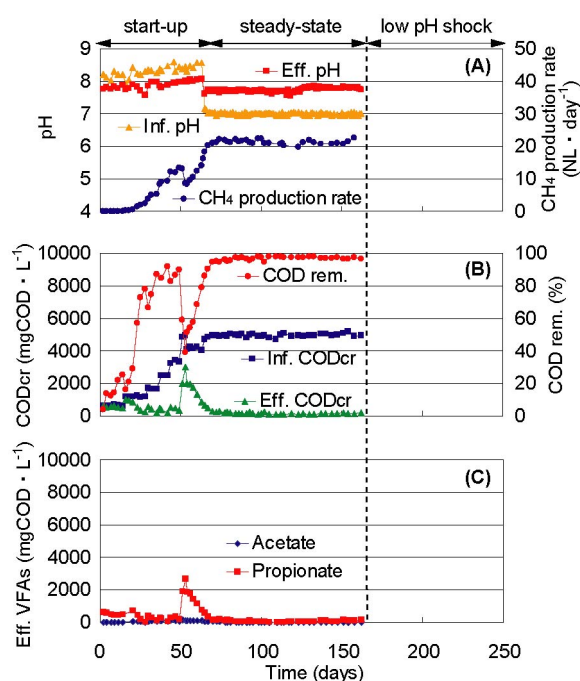


Fig.2 Time course of process performance during start-up operation. (A) Changes in influent pH, effluent pH and methane production rate. (B) Time course of COD concentration and COD removal efficiency. (C) Changes in effluent VFA concentration.

(2) 低 pH 曝露による高温 UASB 処理性能の応答

Fig.3 に低 pH 曝露試験におけるリアクター処理性能の経日変化を示す。

本リアクターは、定常状態において COD 除去率 95%以上、メタン生成速度 $20\text{-}25 \text{ NL} \cdot \text{day}^{-1}$ と非常に良好な処理性能を示していた。しかし、僅か 12 時間の低 pH 曝露により、メタン生成速度 $0 \text{ NL} \cdot \text{day}^{-1}$ 、COD 除去率ほぼゼロ%まで処理性能が悪化した。この時、プロピオン酸の分解は行われておらず、処理水中に $4800 \text{ mgCOD} \cdot \text{L}^{-1}$ 程度蓄積していた。このことから、低 pH 曝露によりプロピオン酸酸化細菌が大きなダメージを受けていることが推察される。また、メタン生成も行なわれていない状態にあるが、これはメタン生成古細菌がダメージを受けたことによるのか、それともプロピオン酸分解が行われなかったため基質となる水素や酢酸が供給されないだけなのかは、処理パフォーマンスからは不明であった。

そこで、低 pH 曝露試験中のグラニューール汚泥を配列特異的 SSU rRNA 切断法により解析した。

(3) 低 pH 曝露による高温 UASB 微生物群集の変遷

Fig.4 に低 pH 曝露試験中の全 RNA 量および各微生物群の RNA 量 (全 RNA 量 [$\mu\text{g} \cdot \text{g-sludge}^{-1}$] \times 各微生物群由来の RNA の割合) の変遷を示す。

低 pH 曝露により、プロピオン酸酸化細菌が属する *Desulfotomaculum* lh group の RNA 量は、配列特異的 SSU rRNA 切断法の検出限界以下まで低下した。一方、各メタン生成古細菌の RNA 量は、定常状態の 50%程度までしか減少していない。このことから、プロピオン酸酸化細菌とメタン生成古細菌の至適 pH は共に中性付近であるにも関わらず、プロピオン酸酸化細菌は致命的なダメージを受けるが、メタン生成古細菌は比較的ダメージが小さいことが示された。これまでの結果から、高温プロセスにおけるプ

ロピオン酸蓄積の原因は、僅か12時間程度の低pH環境下に曝されることによりグラニュール汚泥内微生物群集の中でもプロピオン酸酸化細菌が直接的に大きなダメージを受けることによるものであると示唆された。ただし、微生物のRNA量変化の解析だけでは、微生物群集のダメージが菌体の死滅であるのか、活性低下によるものであるのかは不明である。しかしながら、回復期間におけるメタン生成速度、処理水中のプロピオン酸濃度から比増殖速度および倍加時間を算出すると、それぞれ 0.12 day^{-1} 、 5.8 day となった。これは、以前に報告されている高温嫌気環境下のプロピオン酸酸化細菌⁵⁾の値と同程度である。このことから、低pH曝露によりプロピオン酸酸化細菌は死滅し、定常時の基質に戻すと生き残ったプロピオン酸酸化細菌が基質を消費しながら増殖していくのではないかと考えることができる。

4. まとめ

高温UASBにおけるプロピオン酸の蓄積は、有機酸蓄積による間接的なpH低下がグラニュール汚泥内のプロピオン酸酸化細菌に致命的なダメージを与えることが一因であると示唆された。また、グラニュール汚泥内のプロピオン酸酸化細菌は低pH曝露により死滅するが、定常時の基質に変更すると生き残った菌体が基質を消費しながら増殖していくため、定常状態までの回復に長期を要すると考えられた。

参考文献

- 1) Harada et al. (1997). "Realization of super high-rate anaerobic wastewaters treatment by a novel multi-staged thermophilic UASB reactor.", *Environmental Engineering Research*, Vol.34, pp.327-336.
- 2) Wiegant & Lettinga (1985). "Thermophilic anaerobic digestion of sugars in upflow anaerobic sludge blanket reactors.", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.27, No.11, pp.1603-1607.
- 3) 田村ら (2007). "過負荷による高温UASBリアクター処理性能の破綻および回復", *環境工学研究論文集*, Vol.44, pp.589-596.
- 4) Uyeno et al. (2004). "Sequence-specific cleavage of small-subunit (SSU) rRNA with oligonucleotides and RNase H: rapid and simple approach to SSU rRNA-based quantitative detection of microorganisms.", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.70, No.6, pp.3650-3663.
- 5) Imachi et al. (2002). "*Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. Nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol.52, No.5, pp.1729-1735.

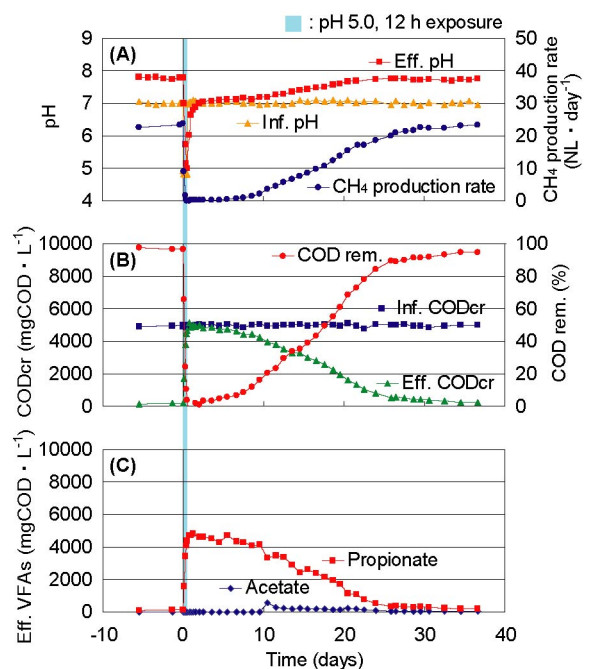


Fig.3 Process performance of thermophilic UASB reactor during experimental period. (A) Changes in influent pH, effluent pH and methane production rate. (B) Time course of COD concentration and COD removal efficiency. (C) Changes in effluent VFA concentration.

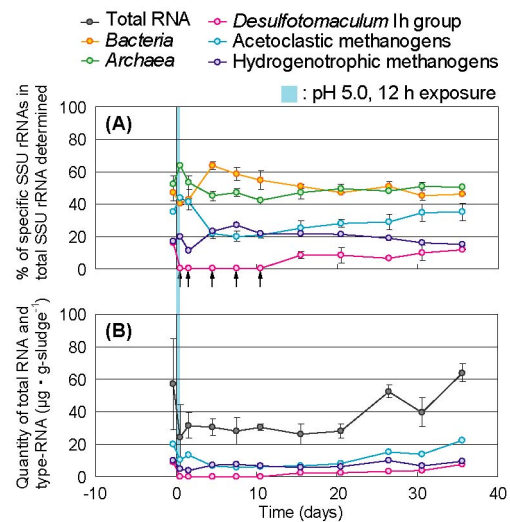


Fig.4 Transition of microbial consortia during deterioration and recovery of performance. (A) Estimated values of percentages of specific 16S rRNA to total 16S rRNA by sequence-specific rRNA cleavage method. Arrows indicate detection limit of the cleavage method. Error bars indicate the standard deviation of duplicate. (B) A change of the quantity of total RNA and type-RNA. Error bars indicate the standard deviation of triplicate.