UASB リアクターによる焼酎蒸留粕廃液の高温メタン発酵処理特性および保持汚泥の嫌気性微生物群集の動態解析

長岡技術科学大学　学　クーシヴィライ　パイラヤ
正　原田秀樹　大橋晶良

1. はじめに

乙類焼酎の製造過程に伴い発生する蒸留粕は高濃度の有機性廃液かつ高温(90℃)で排出されるため、廃水が保有する熱を有効的に利用した高温メタン発酵による処理法が最適と考えられる。高温（55℃）メタン発酵処理法は中温（35℃）メタン発酵処理法と比べて数倍高い処理速度を有しているが、高温グラニュールの形成の困難さなどといった問題により実際のプラントが普及していない。高温メタン発酵を普及させるためにはこれらの問題を詳しく解明し知見を得ることが要求される。本研究は植種源として中温消化汚泥を用い、多段型 UASB による甘藷焼酎蒸留粕廃液の高温メタン発酵処理特性の把握および連続運転期間中における中温性メタン生成古細菌から高温性のメタン生成古細菌へのポピュレーションシフトをメタン生成活性試験および分子生物学的手法（クローニング、RFLP）を用いて解析を行った。

2. 実験方法

連続処理実験には全容積 8L の多段型 UASB リアクターを用い、リアクター内温度を 55℃に制御した。供給廃水はデカンター式遠心分離機により SS 成分を除いた甘藷焼酎蒸留粕廃液（COD_{Cr}total 44,000mg･l^{-1}、SS 2,600mg･l^{-1}、pH4.0）を水道水で所定の濃度まで希釈を行い、微量元素及び栄養塩類を添加し、重炭酸塩より pH を中性付近に調整したものを用いた。COD 容積負荷は HRT の短縮及び流入 COD 濃度の増加により段階的に増加させた。リアクターへの植種汚泥は、都市下水処理中温（35℃）消化汚泥を重力沈降により濃縮したものを用いた。

保持汚泥の嫌気性微生物群集の動態解析には試験温度 25～70℃の温度条件下において酢酸基質及び水素基質についてメタン生成活性試験を行った。また、サンプリングした保持汚泥からビーズビーダー法により DNA を抽出し、古細菌由来の 16S rDNA を PCR 増幅後、クローン化し、ランダムに選択したクローンについて *HaeIII*及び *Hha I* の制限酵素を用いた RFLP 解析により断片パターン解析し、各パターンを代表するクローンについて塩基配列を決定した。

3. 実験結果および考察

Fig.1 に長期連続処理実験の結果を示した。運転開始後 278 日目で、最大負荷 100 kg COD・m^{-3}・d^{-1}、HRT 2.4 hr、流入廃水 COD 濃度 10,000 mg･l^{-1} の超高負荷運転を許容し、その間、常時 COD 除去率 90%前後の良好な処理性能を示した。処理水中の揮発性脂肪酸（VFA）濃度は非常に低く、超高負荷運転時（100 kg COD・m^{-3}・d^{-1}）の処理水中の VFA 濃度は酢酸 30 mg COD･l^{-1} 程度、プロピオン酸 50 mg COD･l^{-1} 程度を保っていた。

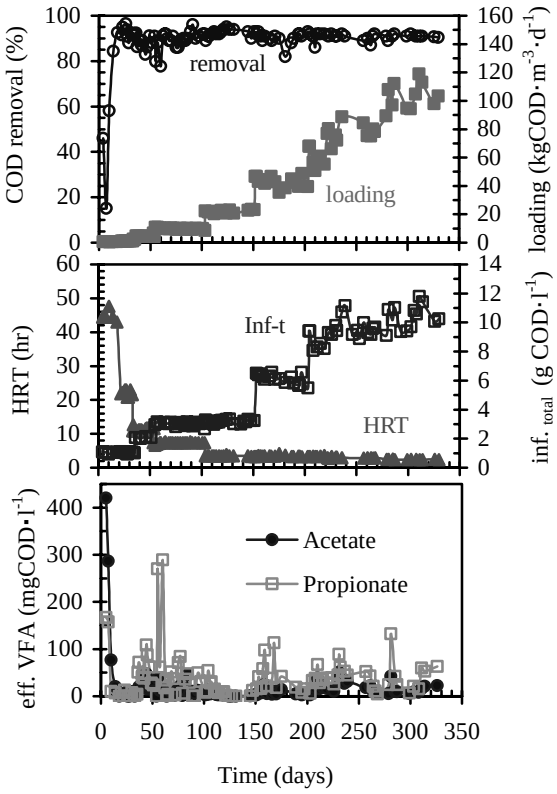

Fig.1　Time course of process performance

キーワード：UASB リアクター、高温メタン発酵、焼酎蒸留粕廃液、メタン生成活性、RFLP
連絡先：〒940-2128　新潟県長岡市上富岡町 1603-1　長岡技術科学大学　環境システム工学
Tel.0258-47-1611 (ext.6646)　Fax.0258-47-9600　E-mail: pairaya@stn.nagaokaut.ac.jp

Table1 に植種汚泥（都市下水中温消化汚泥）および運転開始後 335 日目（容積負荷 100 kgCOD･m^{-3}･d^{-1} を安定的に許容）保持汚泥におけるメタン生成活性の温度依存性の推移を示した。至適温度は酢酸基質において 30℃から 65℃へ、H_2/CO_2 基質は 35℃から 65℃へとシフトした。培養温度でのメタン生成活性値を比較すると、酢酸基質で 46 倍、H_2/CO_2 基質では 93 倍という高活性な高温グラニュールが形成された。

また、両汚泥より抽出した DNA について古細菌由来の 16S rDNA のクローンライブラリーを作成し、それぞれランダムに 30 クローン程度を選択し、制限酵素 *Hae III* 及び *Hha I* を用いて RFLP 解析を行った結果、植種汚泥は 5 種、335 日目保持汚泥は 7 種の RFLP パターンが確認された（Fig.2）。各パターンを代表するクローンについて塩基配列を解析した結果を Table2 にまとめた。つまり、植種汚泥において高頻度に検出されたクローンは、中温酢酸資化性メタン生成古細菌である *Methanosaeta concilii*（23/29clone 全クローン）及び中温水素・ギ酸資化性メタン生成古細菌である *Methanospirillum hungatei*（5/29clone）である。一方、運転開始後 335 日目の保持汚泥は高温酢酸資化性メタン生成古細菌である *Methanosaeta thermophila*（17/25clone）及び高温水素資化性メタン生成古細菌である *Methanothermobacter thermautotrophicus*（8/25clone）に最も近縁な種であった。これより、中温性メタン生成古細菌から高温性メタン生成古細菌へのポピュレーションのシフトにより、メタン生成活性の温度依存性が高温側へシフトしたことが確認された。

今後、T-RFLP 手法を用いて更にスタートアップ期間中保持汚泥においての嫌気性微生物群集の動態をより詳細に解析する予定である。

Table1　Temperature dependency of methanogenic activities

Test sludge	Test temp. (℃)	Methanogenic activities (g COD･g VSS^{-1}･d^{-1})	
		Acetate	H_2/CO_2
seed sludge (Mesophilically grown digested sludge)	25	0.009	0.007
	30	0.091	0.033
	35*	0.07	0.13
	40	0.057	0.089
	50	0.018	0.047
	55	0.013	0.02
day 335th retained sludge	45	1.81	6.86
	50	2.38	9.88
	55*	3.25	12.07
	60	3.2	10.87
	65	3.88	13.2
	70	3.39	10.36
	75	0.067	4.74

*) cultivated temperature

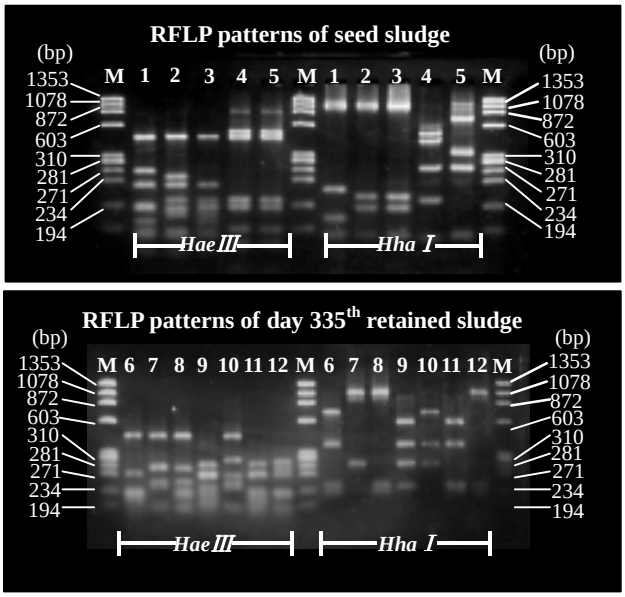

Fig.2　RFLP patterns analysis of seed sludge and day335th retained sludge

Table2　The homologous analysis of detected clones

Test sludge	Clone no.	Clone frequency	Most homologous microorganism	Similarity (%)
seed sludge (Mesophilically grown digested sludge)	1	1/29	*Methanosaeta concilli*	95
	2	1/29	*Methanosaeta concilli*	98
	3	21/29	*Methanosaeta concilli*	98
	4	5/29	*Methanospirillum hungatei*	97
	5	1/29	*Uncultured archaeon clone AS08-3*	96
day 335th retained sludge	6	1/25	*Methanosaeta thermophilla*	93
	7	1/25	*Methanothermobacter thermautotrophicus*	95
	8	15/25	*Methanosaeta thermophilla*	93
	9	5/25	*Methanothermobacter thermautotrophicus*	98
	10	1/25	*Methanothermobacter thermautotrophicus*	97
	11	1/25	*Methanothermobacter thermautotrophicus*	97
	12	1/25	*Methanosaeta thermophilla*	93