

(6) EGSB リアクターによる低濃度有機性排水の高速メタン発酵処理

High Rate Treatment of Low Strength Wastewater by an EGSB Reactor.

川崎達也^{***}、大橋晶良^{*}、原田秀樹^{*}、珠坪一晃^{**}

Tatsuya KAWASAKI^{***}, Akiyoshi OHASHI^{*}, Hideki HARADA^{*}, Kazuaki SYUTSUBO^{**}

ABSTRACT; In this study, an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor, inoculated with mesophilic granular sludge, was applied to the treatment of low strength wastewater (0.6-0.8 gCOD/L) in order to investigate the process reliability. The EGSB reactor was operated at 20°C for over 200 days. The upflow velocity of wastewater in the reactor was set at 5 m/h by the recirculation of effluent. The EGSB reactor achieved 12 kgCOD/m³/day with HRT of 1.5 hr at the day 76. After that, process performance was well maintained for over 140 days. At the COD loading of 12 kgCOD/m³/day, the COD removal and the total methane conversion were 60-70% and 40-50% respectively. The settleability of retained sludge slightly deteriorated during first 70 days. However, after that, sludge settleability was improved due to the reconstruction of granular sludge. As a result, sludge concentration was maintained around 45-50 gVSS/L throughout the experiment. Low temperature operation caused a drastic increase of 20°C activity of the retained sludge. As compared with the activity of seed sludge, acetate-fed methanogenic activity increased upto 35 times at 20°C (0.5 gCOD/gVSS/day) and 16 times at 35°C (1.8 gCOD/gVSS/day) on day 254.

KEYWORDS; EGSB; Granular sludge; Low strength wastewater; Low temperature; Methane fermentation

1. はじめに

近年、嫌気性微生物群の凝集塊であるグラニュール汚泥を装置内に形成・維持する UASB 法などの生物膜利用技術の開発により、産業排水の高速処理とメタン回収が可能になってきた。このような嫌気性処理法は、曝気動力不要で余剰汚泥の発生が少なく、エネルギーとして利用可能なメタンガスが得られるという利点から、省・創エネルギー型排水処理技術として注目され適用が拡大している。しかしこれらの処理プロセスは、生物膜の形成や維持のため、中・高濃度(2~10 gCODcr/L)の易分解性の有機性排水に適用されることが多く、運転温度もメタン生成細菌の至適温度である 37°C(中温)や 55°C(高温)に維持するのが一般的である¹⁾²⁾。しかし、実際には低濃度の有機性排水(0.3~1.0 gCODcr/L)の排出量が最も多く³⁾、水温も平均して 15~20°C と低い⁴⁾。通常、これらの低濃度排水の処理には、活性汚泥法などの好気性処理が適用されているが、曝気動力による多大なエネルギー消費を伴い、また処理の結果、多量の余剰汚泥が発生するなどの問題を抱えている。

低濃度排水に UASB 法を適用した場合、高効率メタン発酵のキーとなるメタン生成生物膜(グラニュール汚泥)の形成や維持が困難であることが知られている⁵⁾⁶⁾。その主な理由として、低温・低有機物濃度によるメタン生成細菌の不活性化や、生成ガスが少ないことによるスラッジベッドの物理的攪拌不足、汚泥と排水(基質)との接触性の低下による生物膜の崩壊等の問題が挙げられる。

* 長岡技術科学大学 環境システム工学系 (Dept. of Environ. Sys. Eng., Nagaoka Univ. of Tech.)

** (独) 国立環境研究所 水土壤環境研究領域 (Water and Soil Environ. Div., Natl. Inst. Environ. Stud.)

そこで本研究では、メタン発酵不適排水（低有機物濃度）処理に対応する無加温メタン発酵プロセス開発のため、1. 植種汚泥として中温グラニュール汚泥を用いることで、スタートアップ期間の汚泥滞留時間の維持と適切な有機物負荷の付与（排水の滞留時間の短縮）を可能にする、2. 処理水循環を行うことで、スラッジベッドへの適度な物理的攪拌を与え、同時に汚泥と排水との接触効率を向上させることを特徴とする生物膜流動型メタン発酵プロセス(EGSB: Expanded Granular Sludge Bed)による低有機物濃度排水の20℃における連続処理実験を行い、排水処理特性などの評価を行った。

本研究では、以下の項目に関する検討に重点を置いた: ①スタートアップ期間におけるCOD除去特性、メタン発酵特性の把握、②スタートアップ期間における汚泥の物理的性状(SVI、平均粒径)の推移と汚泥滞留時間の把握、③保持汚泥中のメタン生成細菌の動態をメタン生成活性の温度依存性推移から把握、④上昇線流速の変化がCOD除去性能に及ぼす影響評価、⑤保持汚泥の生態学的構造把握(SEM観察、分子生物学的手法を用いた菌叢構造解析)。

2. 実験方法

2.1 EGSBリアクターによる排水処理実験

Fig. 1 に本実験に用いたラボスケールリアクターの概略図を示す。排水の連続処理実験は、全容積16.8 L(GSS: 5.1 L, Column: 11.7 L)のEGSBリアクターにより行った。本リアクターは、処理水の一部を循環させて、上昇線流速を与えることで反応槽内の保持汚泥を流動化させる特徴を有している。排水循環による反応槽内の上昇線流速(V_{up})は、実験期間中5 m/hに設定した。リアクターの運転温度はウォータージャケットにより20℃に制御した。植種汚泥として、糖系排水処理中温グラニュール汚泥を用いた(植種汚泥量: 360 gVSS/reactor)。サンプリングポートは、カラム底部より5 cm上にPort 1を設置し、以降、反応器高さ方向に10 cmの間隔で設置した。供試排水はスクロース、酢酸、プロピオン酸、酵母エキス(CODcr比4.5: 2.25: 2.25: 1)を炭素源とする人工排水を用いた。人工排水の組成をTable 1に示す。排水の流入有機物濃度は実験期間中0.6~0.8 gCODcr/Lとなるように調整した。また、流入水中の硫酸塩濃度は水道水由来で40~50 mgSO₄/Lであった。運転開始時のHRT(Hydraulic Retention Time: 水理学的滞留時間)は12時間、COD容積負荷は1.6 kgCOD/m³/dayとし、処理の安定化とともに、HRTの短縮により段階的に負荷を上昇させた。

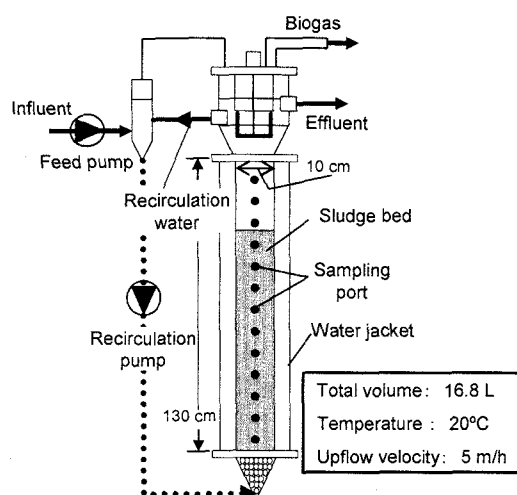


Fig. 1 Schematic diagram of an EGSB reactor.

Table 1 Medium composition of feed solution.

Substrates	mg / L	Trace Element	mg/L
Sucrose	360 (as COD)	FeSO ₄ ·7H ₂ O	7
CH ₃ COONa	180 (as COD)	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.17
Yeast Extract	80 (as COD)	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.15
CH ₃ CH ₂ COOH	180 (as COD)	H ₃ BO ₃	0.06
Minerals	mg / L	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.5
NH ₄ Cl	37	NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.04
KH ₂ PO ₄	33	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.027
MgCl ₂ ·6H ₂ O	13	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.025
CaCl ₂ ·2H ₂ O	33		
NaHCO ₃	1200		

2.2 分析項目

(1) 水質分析

経時的に流入・流出水のCODcr濃度(以後CODに略す)、pH、VFA(Volatile Fatty Acid: 揮発性脂肪酸)、硫酸塩濃度、ガス生成量、ガス組成等の分析を行った。COD及び硫酸塩濃度の測定には、多項目迅速水質

分析計 DR-2500 (HACH)を用い、標準プロトコルに従って分析した。VFA の分析は、FID を備えたガスクロマトグラフ (GC-14A、Shimazu)、ガス組成分析は TCD を備えたガスクロマトグラフ(GC-8A、Shimazu)によって行った。また、流出水中の SS、VSS 濃度測定には、保留粒子径 $0.4 \mu\text{m}$ のガラス繊維ろ紙(GB-140、ADVANTEC)を用いた。

(2) 保持汚泥の物性測定

リアクター保持汚泥のサンプル(Port No.4、高さ 35 cm より採取)について、汚泥濃度(MLVSS、MLVSS)、汚泥沈降指標(SVI: Sludge Volume Index)、粒径を測定した。粒径の測定は、採取した汚泥をシャーレに乗せてデジタルカメラで撮影し、500 個以上の汚泥顆粒について、画像解析ソフトを用いて長径と短径を測定した。グラニューールを回転楕円体と仮定し、測定した長径と短径より体積を求め、また、それを同体積の球体の直径に換算してグラニューールの粒径とした。粒径の測定結果はグラニューールの個数基準(全個数=100 %)と体積基準(全生物膜体積=100 %)の相対割合で表した。

2.3 保持汚泥の増殖収率・死滅定数、汚泥滞留時間(SRT: Sludge Retention Time)の算定

低有機物濃度排水の処理を安定的に行うためには、装置内に十分量の汚泥を保持し、長い汚泥滞留時間(SRT)を維持する必要がある。SRT は系外に流出する汚泥量とリアクター内の全保持汚泥量により算定することが出来る(式(1))。

$$\text{SRT (day)} = \frac{\text{Total retained VSS (gVSS)}}{\text{VSS washout (gVSS/day)}} \quad (1)$$

連続運転期間における SRT を算定するためには、ある測定日におけるリアクター保持汚泥量を求める必要がある。そこで、1 日当たりの汚泥増殖量、菌体の死滅による損失量、保持汚泥の流出量を算出するために、Syutsubo らの方法に準拠し⁷⁾、保持汚泥の増殖収率(Y_g)、及び菌体死滅定数(kd)を以下の式(2)、(3)、(4)により求めた。

$$\left(\frac{dx}{dt}\right)_{acc,i} = -\left(\frac{ds}{dt}\right)_i \cdot \overline{Y_g - kd} \cdot X_{i-1} - \left(\frac{dx}{dt}\right)_{lost,i} \quad (2)$$

$$X_i = X_{i-1} + \left(\frac{dx}{dt}\right)_{acc,i} \cdot t \quad (3)$$

$$S = \sum_i (\overline{X_i} - X_i)^2 \quad (4)$$

ここで、

- $(dx/dt)_{acc,i}$: i 日目のリアクターへの汚泥蓄積速度 [gVSS/L/day]
- $(ds/dt)_i$: i 日目における基質消費速度 [gCOD/L/day]
- $(dx/dt)_{lost,i}$: i 日目における汚泥流出速度 [gCOD/L/day] (Sampling loss 含む)
- X_i, X_{i-1} : i 日目、i-1 日目におけるリアクターの MLVSS 濃度 [gVSS/L]
- t : リアクター保持汚泥濃度の計算間隔、ここでは 1 日 [day]
- $\overline{Y_g}$: 増殖収率 [gVSS/gCOD]
- $\overline{kd}$: 死滅定数 [1/day]
- $\overline{X_i}$: i 日目における保持汚泥濃度実測値 [gVSS/L]

計算は以下に記した方法で行った。

- 1) 増殖収率(Y_g)と死滅定数(kd)に予め任意の値を与え、式(2)により運転開始後 i 日目の汚泥蓄積速度(dx/dt) $_{acc,i}$ を算出する。基質消費速度(dx/dt) $_i$ 及び汚泥流出速度(dx/dt) $_{lost,i}$ は、 i 日目のルーチンデータから実測値を代入する。
- 2) 式(2)で求められた汚泥蓄積速度(dx/dt) $_{acc,i}$ を式(3)に代入することにより i 日目の保持汚泥濃度を算出する。
- 3) 実測の保持汚泥濃度と、式(2)、(3)の計算によって求められた保持汚泥濃度の差の2乗の総和、 S (式(4))が最小となるように(最小二乗推定法)、 Y_g 及び kd の値を変化させ、上記のステップを繰り返し計算することにより、EGSBリアクターの連続運転期間中における増殖収率(Y_g)、及び死滅定数(kd)を求めた。

2.4 メタン生成活性

保持汚泥のメタン生成活性は植種汚泥(0日目)、運転開始後35日目、104日目、254日目に、珠坪ら⁷⁾の方法に準拠して測定した。活性試験は10、15、20、35、45℃の温度条件下で行い、試験基質には、酢酸(初発濃度: 2,000 mgCOD/L)、水素(H_2/CO_2 : 80/20 [v/v]、1.4 atm)、プロピオン酸(1,000 mgCOD/L)を用いた。バイアルの振とうは、各温度条件に設定したウォーターバスシェーカー(往復振とう、120 rpm)によった。活性測定は各基質、温度ともに2系列(2連)で行った。供試汚泥は、Port No.4 (35cm)より採取し、25 mM リン酸バッファーで基質洗浄を行った後、ホモジナイザーで均一に分散させバイアルに分注した。各試験温度で数時間振とうした後、各基質を投入して試験を開始した。経時的にバイアルからのメタン量を測定することにより、単位汚泥量(gVSS)当たりの活性を算出した。

2.5 上昇線流速の変化が有機物処理特性に与える影響評価

上昇線流速の変化が排水処理特性に及ぼす影響を評価するために、HRT 2.5 時間(COD 容積負荷 7 kgCOD/m³/day、平均 COD 除去率 70%)時に反応槽内の上昇線流速(V_{up})を変化させ、有機物除去率、リアクター高さ方向の基質濃度プロファイル、スラッジベッド膨張率を調査した。1.25、2.5、5.0、7.5 m/h の各試験流速に設定して一定時間(HRT の3倍以上)経過後、サンプリングを行った。流入水、流出水、循環水、およびリアクターPort No.1 (高さ: 5cm)、No.4 (35cm)、No.7 (65cm)、No.10 (95cm)、No.13 (125cm)からサンプルを採取し、0.4 μ m シリンジフィルターで濾過したものを COD の測定に供した。

2.6 保持生物膜の走査型電子顕微鏡 (SEM) による形態観察

リアクター保持生物膜の形態的变化を、0日目(植種汚泥)および254日目の保持汚泥について、SEM (Scanning Electron Microscope) 観察により調査した。リアクターPort No.4より採取した試料を100 mM カコジル酸バッファーで洗浄し、その後2.5 %グルタルアルデヒドで固定した。次いでエタノールシリーズで脱水を行った後に酢酸イソアミル溶液で置換した。臨界点乾燥及びPt-Pd 蒸着を施した後、SEM (Hitachi、S-4500)により観察を行った。

2.7 保持生物膜の DGGE 法による菌叢解析

経時的にサンプリングした汚泥試料から全DNAを抽出し、真性細菌(Domain Bacteria)⁸⁾、および古細菌(Domain Archaea)⁹⁾にそれぞれ特異的なプライマーセット(Bacteria: 341F-GC-534R、Archaea: Arc692F-GC-Arc915R)を用いてPCR増幅を行い、変成剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)により菌叢解析を行った。汚泥試料はサンプリング後ホモジナイザーで分散し、濃度を5,000 mgVSS/Lに調整した試料0.5 mLからビーズビーター法¹⁰⁾を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAに対し、それぞれのプライマーセットを用いてTouch-down PCRを行い、D-Code (BioRad)によりDGGEを行った。泳動は、変成剤濃度勾配35-55%、泳動時間3.5時間、60℃の温度条件下で行い、VistraGreen 染色後、バンドの確認を行った。主要なバンドを切り出してシーケンス解析を行い、得られた塩基配列についてBLAST search¹¹⁾により近縁種の同定を行った。

3. 実験結果及び考察

3.1 低濃度有機性排水の連続処理特性

Fig. 2 に EGSB リアクターによる低濃度排水の処理状況を示した。HRT 12 時間、COD 容積負荷 $1.6 \text{ kgCOD/m}^3/\text{day}$ で運転を開始し、75 日目までに、HRT 2.5 時間、COD 容積負荷 $7 \text{ kgCOD/m}^3/\text{day}$ まで、負荷を段階的に上昇させた。75 日目までの COD 除去率は 80～90%、メタン転換率は投入 COD 基準で 60～70% (溶存メタン 10% 含む) であり、安定した有機物の除去とメタン生成が行われていた。運転開始後 76 日目には HRT を 1.5 時間に短縮し、COD 容積負荷は $12 \text{ kgCOD/m}^3/\text{day}$ にまで達した。この時の COD 除去率、およびメタン転換率はそれぞれ 60～70%、40～50% (溶存メタン 10～15% 含む) となった。負荷上昇の結果、COD 除去率

とメタン転換率の減少が見られたものの、その後 140 日以上安定したプロセスの運転が可能であり、低濃度有機性排水の 20°C における高速処理、メタン回収が可能であった。連続処理実験の結果、各 HRT における処理水質 (流出 COD 濃度) の平均は、HRT 4、2.5、1.5 時間でそれぞれ、91、120、235 mgCOD/L であり、HRT 2.5 時間以上の条件下では、一般的な下水放流レベルの水質を得ることが可能であった。しかし、河川放流レベルにまで処理する場合、有機物のみならず、窒素、リン等の栄養塩の除去も必要のため、適切な後段処理法との組み合わせが必要である。後段処理を行うことを前提とすれば、HRT 1.5 時間の高速前段処理・メタン回収を行うことも十分に可能である。また、処理水中の VFA は主に酢酸、プロピオン酸で、特に大きな蓄積は見られなかったものの (30～100 mgCOD/L 程度)、負荷の上昇により、酪酸や吉草酸などの比較的高分子の VFA の蓄積も確認された (30～50 mgCOD/L , HRT 1.5 時間時)。また、HRT 1.5 時間では処理水中に、未分解のスクロースも若干検出された (4～8 mgCOD/L , 酵素法による定量)。実験期間を通じて流入排水中の硫酸塩濃度は 40～50 mgSO_4/L であったが、処理水中には硫酸塩は検出されず、完全に消費されていた。除去 COD に対する硫酸塩還元の寄与は平均 3% (COD 容積負荷 $1.6 \text{ kgCOD/m}^3/\text{day}$)～5% ($12 \text{ kgCOD/m}^3/\text{day}$) であった。

3.2 保持汚泥の物理的性状変化

リアクター保持汚泥の濃度 (MLVSS) および沈降性 (SVI) の経日変化を Fig. 3 に示す。保持汚泥濃度は実験期間を通じて 45～50 gVSS/L 程度であり高い濃度を維持出来た。また、0 日目 (植種汚泥) の SVI は約 14 mL/gVSS であり、運転経過に伴い若干悪化する傾向が見られたが、実験期間中、概ね 15～20 mL/gVSS を維持していた。

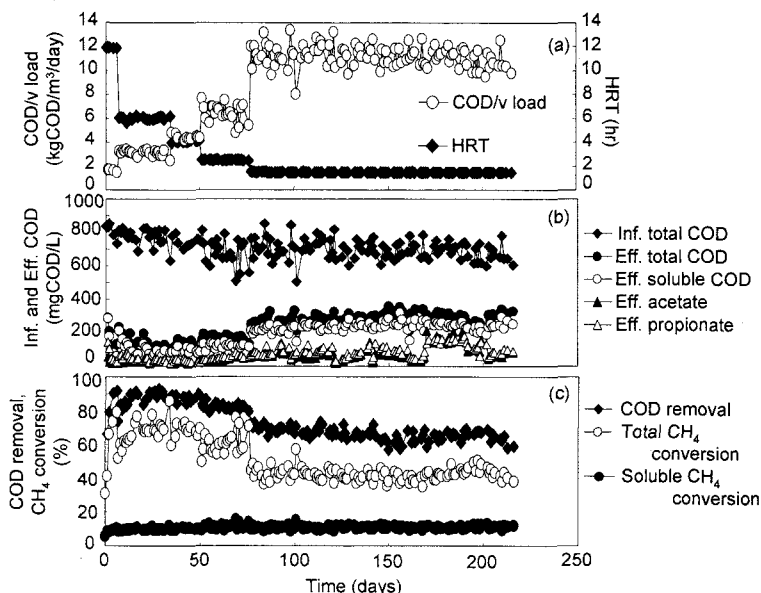


Fig. 2 Process performance of the EGSB reactor at 20°C . (a) HRT and COD volumetric loading; (b) Influent and effluent COD, effluent acetate and propionate; (c) COD removal, CH_4 conversion rate.

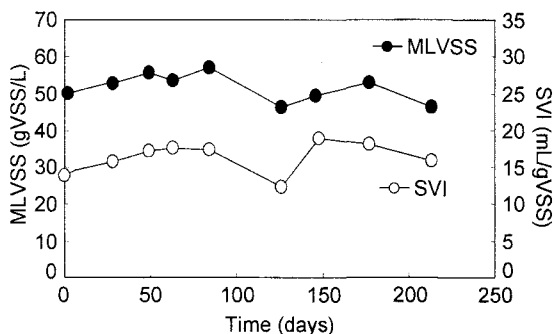


Fig. 3 Time course of MLVSS and SVI of the retained sludge.

保持生物膜の粒径を、0日目(植種汚泥)、63日目($7\text{ kgCOD/m}^3/\text{day}$)、126日目($12\text{ kgCOD/m}^3/\text{day}$)に測定した。保持生物膜の個数基準、体積基準の粒径分布の変化を Fig.4 に示す。この結果から、植種汚泥の生物膜粒径は個数基準、体積基準ともに $1.5\sim 3.5\text{ mm}$ に集中しているのに対し、63日目、126日目には個数基準において、粒径 1 mm 以下の剥離、崩壊した生物膜の増加が見られた。一方、体積基準で見ると、63日目には $2.0\sim 4.0\text{ mm}$ 、126日目には 2.5 mm 以上の粒径の生物膜が増加してきていることから、生物膜再形成の進行が確認出来る。この様に、排水循環によるスラッジベッドへの物理的攪拌の付与と、適切な有機物負荷の維持により、低濃度排水の 20°C における処理においても物性に優れる生物膜の維持が可能であった。一方、粒径の増大により一部の保持汚泥が浮上する等の現象も確認されており、今後、排水組成が生物膜の構造や物性に与える影響を調査していく予定である。

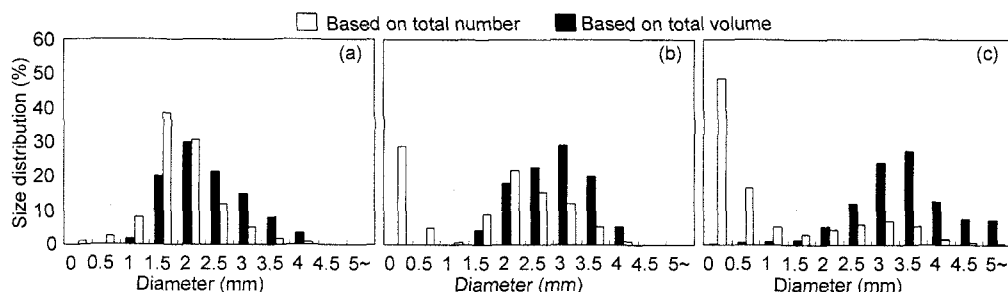


Fig. 4 Size distribution of granular sludge, expressed in percentage of the total number and the total volume of granules. (a) day 0; (b) day 63; (c) day 126.

3.3 保持汚泥の SRT 経日変化

リアクター全保持汚泥量の実測値と計算値、及び SRT の経日変化を Fig. 5 に示す。ルーチン分析から得られた COD 除去量と流出 VSS、及び保持汚泥量の実測値より求めた保持汚泥の増殖収率(Y_g)と死滅定数(k_d)は、 $Y_g = 0.13\text{ gVSS/gCOD}$ 、 $k_d = 0.0001\text{ 1/day}$ となった。本実験における Y_g の値は、中温 UASB リアクター¹²⁾・高温 UASB リアクター保持汚泥⁷⁾よりも 2 倍以上高い値を示した。また、低温条件下では、中温条件下と比較して酸生成細菌群の増殖収率が非常に高く(0.22 gVSS/gCOD)、死滅定数が非常に小さいという報告もあり¹³⁾、本実験の結果と同様な傾向を示している。

得られた保持汚泥の増殖収率(Y_g)と死滅定数(k_d)を用いて各測定日の汚泥増殖量を計算し、全保持汚泥量の経日変化(計算値)を求めた。全保持汚泥量は COD 容積負荷の上昇(HRT の短縮)に伴い、運転開始後から徐々に増加するが、 $12\text{ kgCOD/m}^3/\text{day}$ (HRT 1.5 時間)以降はほぼ横ばいになった。この全保持汚泥量及び流出 VSS 量からリアクター保持汚泥の SRT を求めたところ、HRT 2.5 時間では平均 83 日、HRT 1.5 時間では平均 38 日となり、負荷の上昇によって SRT の減少が見られたが、安定的な値が維持出来た。中温性メタン生成細菌 *Methanothrix* (*Methanosaeta*)の倍加時間(doubling time)は 37°C で $3.3\sim 4.6$ 日と遅く¹⁴⁾、低有機物濃度、低温度条件下では活性及び増殖速度がさらに低下すると考えられるが、本リアクター保持汚泥の SRT はプロセスの良好な運転(メタン生成細菌の維持)に十分な値であった。この良好な汚泥保持能の実現により低濃度排水の高速処理が可能だったと考えられる。

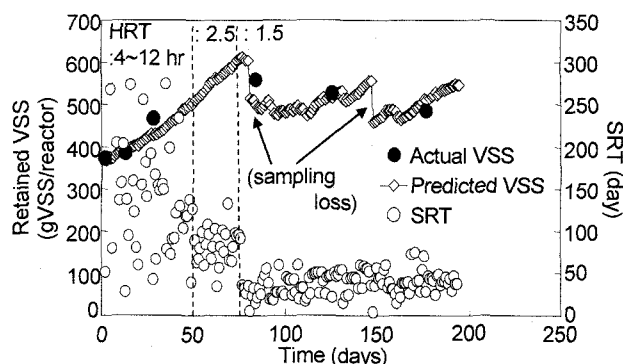


Fig. 5 Time course of total retained VSS and SRT.

3.4 メタン生成活性の温度依存性

リアクター保持汚泥のメタン生成活性の温度依存性を、酢酸、水素、プロピオン酸基質について、10～45℃の温度条件下で測定した。メタン生成活性試験の結果を Fig. 6 (a)～(c)に示す。各基質における最大活性は、酢酸、プロピオン酸基質で35℃、水素基質で40℃付近にあり、20℃でのリアクター運転によっても至適温度域の変化は見られず、本リアクターの保持汚泥中には中温付近に至適温度を持つメタン生成細菌、およびプロピオン酸分解細菌が存在していることが分かった。リアクター運転温度である20℃における植種汚泥(0日目)のメタン生成活性は、酢酸、水素、プロピオン酸基質でそれぞれ0.014、0.052、0.021 gCOD/gVSS/dayであったが、254日目にはそれぞれ0.5、0.79、0.16 gCOD/gVSS/dayにまで増加した。

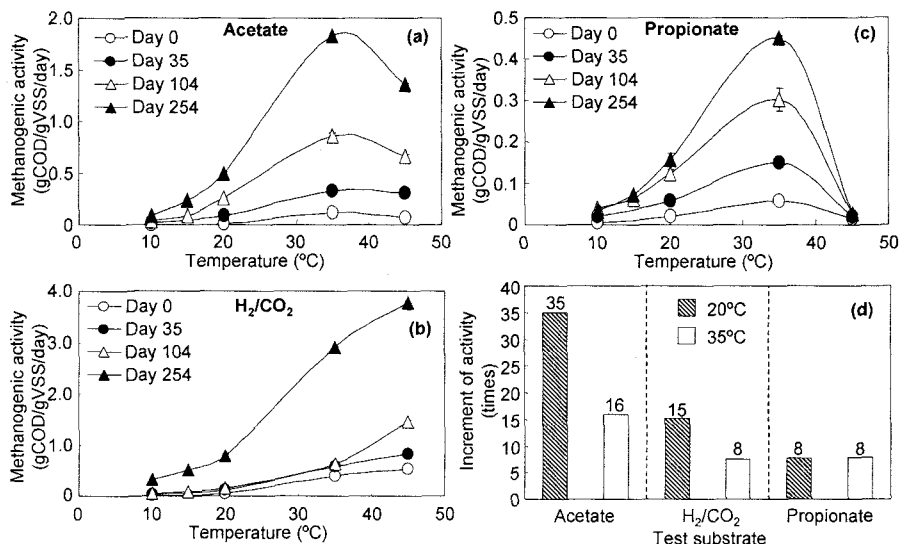


Fig. 6 Temperature dependency of methane producing activity of the retained sludge. (a) acetate; (b) H₂/CO₂; (c) propionate; (d) increment of the methanogenic activity on day 254 as compared with activity of seed sludge at 20°C and 35°C.

20℃及び35℃における254日目保持汚泥のメタン生成活性の増加率(0日目の活性と比較)を Fig. 6(d)に示した。これより、酢酸及び水素基質の20℃での活性増加率はそれぞれ35倍、15倍となり、明らかに35℃活性の増加率よりも大きかった。この結果から、20℃でのリアクター運転により、低温耐性のあるメタン生成細菌の保持汚泥中への集積化の可能性が示された。一方、プロピオン酸基質では、20℃と35℃の活性増加率に大きな差は見られなかった。

3.5 上昇線流速の変化が排水処理特性に及ぼす影響調査

各上昇線流速(Vup)における高さ方向におけるCOD濃度プロファイルの結果を Fig. 7に示す。各流速における流入CODに対するCOD除去率は、Vupが1.25、2.5、5 m/hで差が見られず、約69%とほぼ同程度の値を示したが、7.5 m/h時には61%となり、明らかに除去率の低下

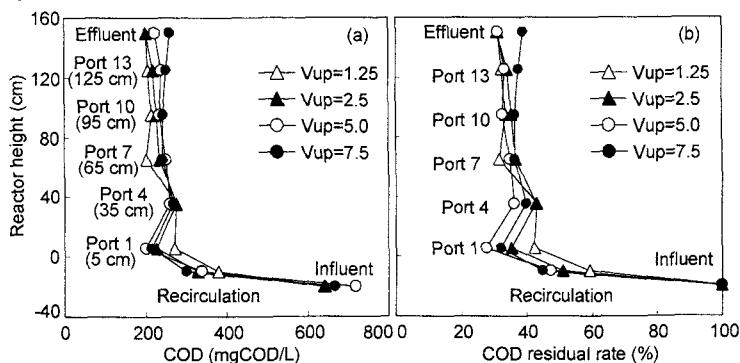


Fig. 7 Profiles of COD concentration (a) and COD residual rate (b) along the reactor height (7 kgCOD/m³/day, HRT 2.5 hrs).

が見られた。高さ方向による COD 濃度勾配に、上昇線の影響による大きな差は見られないものの、リアクター流入直前の循環水では V_{up} が高いほど処理水循環により希釈され、生物膜への基質供給濃度が低くなる傾向にあった。さらにスラッジベッドは上昇線流速の上昇に伴って膨張し、 $V_{up}=0$ m/h のベッド高さを 100 %とした場合、 V_{up} がそれぞれ 1.25、2.5、5.0、7.5 m/h 時には 111、125、141、154 %となった。以上の結果から、高い V_{up} により、流入水が希釈されて生物膜への基質供給濃度が低くなるとともに、スラッジベッドの膨張によってリアクター単位体積当たりの保持汚泥濃度が減少する等の影響が生じることが分かった。酢酸資化性メタン生成細菌である *Methanosaeta concilii* の k_s 値 (半飽和定数)は、1.5 mM (COD 換算: 90 mgCOD/L)と高く¹⁵⁾、酢酸濃度が低下するとメタン生成細菌による基質取り込みが律速となり、処理が悪化する可能性が高い。

EGSB リアクター (全容積: 2.5 L、処理温度: $30^{\circ}\text{C} \pm 2$)による低濃度排水(500~700 mgCOD/L)処理実験で、COD 容積負荷が約 7~12 kgCOD/ m^3/day のとき、 V_{up} 2.5 m/h 時に COD 除去率が最大となり、上昇線流速の増加によって除去率が低下することが報告されている¹⁶⁾。一方、有機物濃度 500 mgCOD/L の有機性排水処理で、上昇線流速を 2~5 m/h にした EGSB 法では、UASB 法(V_{up} : 1 m/h 未満)に対して COD 除去率が 5~10%上昇したとの報告もなされている¹⁷⁾。これは、排水循環によりスラッジベッドと排水の接触効率が高くなったためと考えられる。今後、上昇線流速を変化させた長期の運転を行うことにより、保持汚泥の物性等に及ぼす線流速の影響の評価を行っていきたいと考えている。

3.6 SEM による生物膜の形態観察

Fig. 8 に植種汚泥およびリアクター保持汚泥 (254 日目) の SEM 観察結果を示す。植種汚泥の表面には、桿菌やポリマー状の物質が観察されるが、254 日目の保持汚泥の表面では糸状性の酸生成細菌が表面を覆う様に優占化してきていることが確認出来た。またリアクター運転の継続により、生物膜内部には高密度に酢酸資化性メタン生成細菌 *Methanosaeta* の集積化が確認され、運転経過に伴う保持汚泥のメタン生成活性の増加と一致する傾向にあった。

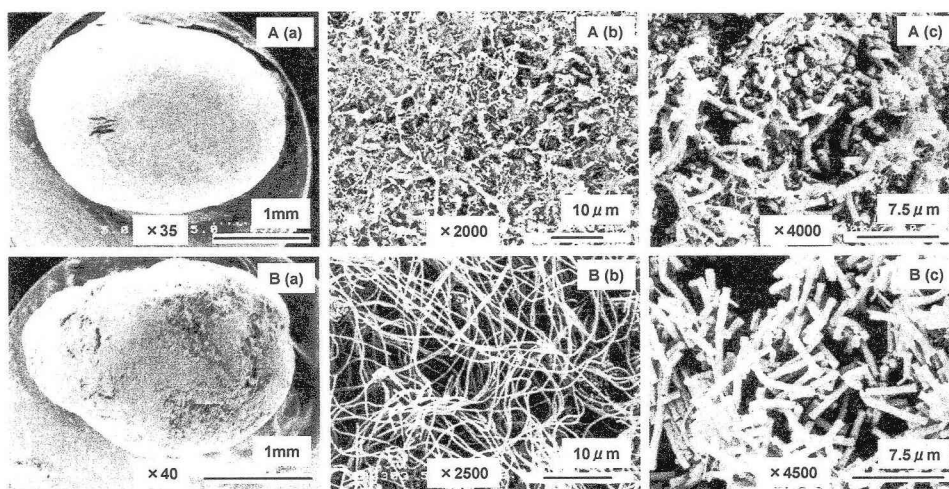


Fig. 8 Scanning electron micrographs (SEM) of retained granular sludge. A: Mesophilically grown granular sludge treating sugars used as seed. B: The granular sludge obtained from EGSB reactor on day 254. (a) Entire view of granular sludge; (b) The outer surface structure of granular sludge; (c) Interior structure of granular sludge.

EGSB リアクターより採取した汚泥試料に対し、糸状性酸生成細菌に特異的な GNSB (green non-sulfur bacteria)-941¹⁸⁾プローブを用いて FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization)を行った結果、糸状性 GNSB 細菌が

多数検出された(データ示さず)。この *Chloroflexi* 門に属する GNSB 細菌は高温グラニュール汚泥表層での存在が確認されている¹⁹⁾。

3.7 DGGE 法による保持生物膜の菌叢解析

保持汚泥の DGGE 解析結果と優占バンド、既知細菌種および相同性を Fig. 9 に示した。これより、酸生成細菌などの真性細菌(Domain Bacteria)は多様性に富んでおり(バンドが多数検出)、運転の経過に伴って菌叢の大きな変化が見られた。真性細菌では、運転の経過によって図中のバンド 13、14、15 に示された *Lactococcus* や *Anaerobivrio* 等の乳酸を生成する糖分解細菌に近縁な酸生成細菌群の増殖が確認された。生物膜の形成にはメタン生成細菌の他に、酸生成細菌の存在が重要であることが知られている²⁰⁾。本研究で用いた排水は sucrose を含むことから、これらの酸生成細菌群の集積化が生じたと考えられた。また、図中バンド 16 に示される *Clostridium* に近縁な低温性の酸生成細菌²¹⁾も検出された。さらに、プロピオン酸分解細菌 *Syntrophobacter* 属²²⁾²³⁾に近縁な種のバンドが 10、11、12 で検出され、硫黄や硫酸塩の酸化、還元に参加していると考えられるバンド 2、6 も検出された。

一方、古細菌(メタン生成細菌)については、運転の継続による菌叢の変化は確認されず、水素資化性のメタン生成細菌 *Methanobacterium formicicum* (バンド 17)や酢酸資化性メタン生成細菌 *Methanosaeta soehngenii* (バンド 18)に近縁な種が検出された。これらの細菌は中温性のメタン生成細菌として知られている。活性増加率の比較結果より、メタン生成細菌については 35℃ よりも 20℃ での活性増加率が明らかに高いことから、低温適応のメタン生成細菌が集積化している可能性が示されており、現在、細菌の単離、クローン解析等により詳細な調査を行っている。

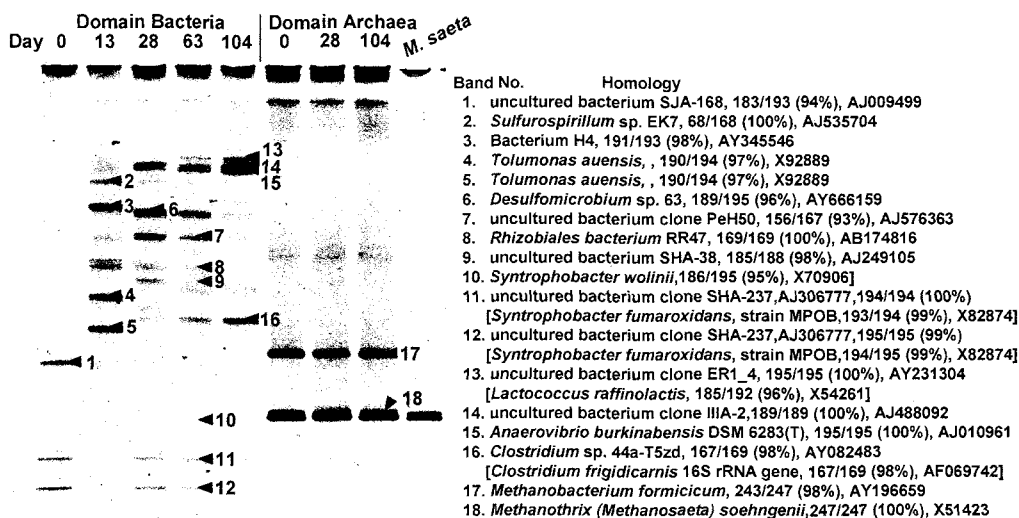


Fig. 9 Microbial community structure analysis of the retained sludge by PDR-DGGE and homological analysis.

4. まとめ

EGBS リアクターによる低濃度排水の連続処理実験の結果、以下の知見を得た。

- 1) 運転開始後 76 日目には HRT 1.5 時間、COD 容積負荷 12 kgCOD/m³/day を許容し、短期間で負荷上昇が行えた。HRT 1.5 時間時の COD 除去率は平均 60~70%、メタン転換率は溶存メタンを含め 40~50% であり、低濃度排水の高速処理、メタン回収を長期間(4 ヶ月以上)継続出来た。

- 2) 実験期間を通じて保持汚泥濃度は 45～50 gVSS/L、SVI は 15～20 mL/gVSS であり、排水の循環による物理的攪拌の付与と適切な有機物負荷の維持により、保持汚泥濃度、物性を良好に維持することが出来た。
- 3) 保持汚泥の増殖収率は中温・高温 UASB リアクター保持汚泥の値と比べて高く(0.13 gVSS/gCOD)、SRT も COD 容積負荷 12 kgCOD/m³/day (HRT 1.5 時間)時に平均 38 日と、プロセスの良好な運転に十分な値を維持出来た。
- 4) 保持汚泥のメタン生成活性は、酢酸、水素基質において 20℃の活性増加率が 35℃よりも顕著に増加しており、低温適応のメタン生成細菌群の集積化が生じているものと考えられた。また、保持汚泥の DGGE 解析、SEM 観察結果より、低温に順応した酸生成細菌や糸状性酸生成細菌の存在が確認された。

謝辞

本研究は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)「産業技術研究助成事業費助成金」(研究代表者: 珠坪一晃、課題番号: 03B68004)の助成を受けて実施したものである。記して、関係者各位に深謝致します。

参考文献

- 1) 原田秀樹「微生物固定化法による排水処理」(須藤隆一編). 1988. 第 7 章スラッジブランケット(USB)法, 産業用水調査会, 220-280.
- 2) Lettinga G. and Hulshoff pol, L. W. (1991). UASB process design for various types of wastewaters. *Wat. Sci. Tech.*, **24**, 87-107.
- 3) Lettinga, G., Rebac, S., Parshina, S., Nozhevnikova, A., Van Lier, J. B. and Stams, A. J. M. (1999). High-rate anaerobic treatment of wastewater at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(4), 1696-1702.
- 4) Rebac, S., Van Lier, J. B., Lens, P., Stams, A. J. M., Dekkers, F., Swinkels K. T. M. and Lettinga, G. (1999). Psychrophilic anaerobic treatment of low strength wastewater. *Wat. Sci. Tech.*, **39**(5), 203-210.
- 5) Singh, K. S., Harada, H. and Viraraghavan T. (1996). Low-strength wastewater treatment by a UASB reactor. *Bioresource Technology*, **55**, 187-194.
- 6) Agrawal, L. K., Ohashi, Y., Mochida, E., Okui, H., Ueki, Y., Harada, H. and Ohashi, A., (1997). Treatment of raw sewage in a temperature climate using a UASB reactor and the hanging sponge cubes process. *Wat. Sci. Tech.*, **36**(6-7), 433-440.
- 7) Syutsubo, K., Harada, H. and Ohashi, A. (1998). Granulation and sludge retainment during start-up of a thermophilic UASB reactor. *Wat. Sci. Tech.*, **38**(8-9), 349-357.
- 8) Muyzer G., S. Hottentrager, A. Teske, and C. Wawer. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyze the genetic diversity of mixed microbial communities *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.4.4.:1-23.
- 9) Stahl D. A. and Amann R. I. (1991). Development and application of nucleic acid probes. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, pp. 204-248.
- 10) Miller D. N., Bryant J. E., Madsen E. L., Ghiorse W. C. (1999). Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(11), 4715-24.
- 11) Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. and Lipman D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**(3), 403-410.
- 12) Pavlostathis S. G. and Giraldo-Gomez E. (1991). Kinetics of anaerobic treatment. *Wat. Sci. Tech.*, **24**(8), 35-59.

- 13) Van Lier, J. B., Rebac, S., Lens, P., Bijnen, van F., Oude Elferink, S. J. W. H., Stams, A. J. M. and Lettinga, G. (1997). Anaerobic treatment of partly acidified wastewater in a two-stage expanded granular sludge bed (EGSB) system at 8 °C. *Wat. Sci. Tech.*, **36**(6-7), 317-324.
- 14) Kamagata, Y. and Mikami, E. (1990). Some characteristics of two morphotypes of *Methanothrix soehngenii* from mesophilic anaerobic digesters. *J. Ferment. Bioeng.*, **70**(4), 272-274.
- 15) Schmidt, J. E. and Ahring, B. K. (1999). Immobilization patterns and dynamics of acetate-utilizing methanogens immobilized in sterile granular sludge in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(3), 1050-1054.
- 16) Kato, M. T., Field, J. A., Versteeg, P. and Lettinga, G. (1994). Feasibility of Expanded granular sludge bed reactors for the anaerobic treatment of low-strength soluble wastewater. *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 469-479.
- 17) Jeison, D. and Chamy, R. (1999). Comparison of the behaviour of expanded granular sludge bed (EGSB) and upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors in dilute and concentrated wastewater treatment. *Wat. Sci. Tech.*, **40**(8), 91-97.
- 18) Gich, F., Garcia-Gil, J. and Overmann, J. (2001). Previously unknown and phylogenetically diverse members of the green nonsulfur bacteria are indigenous to freshwater lakes. *Arch. Microbiol.*, **177**(1), 1-10.
- 19) Sekiguchi, Y., Yamada, T., Hanada, S., Ohashi, A., Harada H. and Kamagata, Y. (2003). *Anaerolinea thermophila* gen. nov., sp. nov. and *Caldilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain Bacteria at the subphylum level. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 1853-1851.
- 20) Syutsubo, K., Sinthurat, N., Ohashi, A. and Harada, H. (2001). Population dynamics of anaerobic microbial consortia in thermophilic granular sludge in response to feed composition change. *Wat. Sci. Tech.*, **43**(1), 59-66.
- 21) Broda, D. M., Lawson, P. A., Bell, R. G. and Musgrave, D. R. (1999). *Clostridium frigidicarnis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium associated with 'blown pack' spoilage of vacuum-packed meats. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**(4), 1539-1550.
- 22) Harmsen, H. J., Wullings, B., Akkermans, A. D., Ludwig, W. and Stams, A. J. (1993). Phylogenetic analysis of *Syntrophobacter wolinii* reveals a relationship with sulfate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.*, **160**(3), 238-240.
- 23) Harmsen, H. J., Kengen, H. M. P., Akkermans, A. D. M. and Stams, A. J. M. (1995). Phylogenetic analysis of two syntrophic propionate-oxidizing bacteria in enrichment cultures. *Syst. Appl. Microbiol.*, **18**, 67-73.