

(9) UASB-DHSシステムによる高濃度フェノール廃水の連続処理特性とUASB内微生物叢解析

山田 真義^{1*}・久保田 健吾²・高橋 優信³・田中 秀治⁴・山口 隆司³・
長野 晃弘⁴・原田 秀樹²・山内 正仁¹

¹鹿児島工業高等専門学校 都市環境デザイン工学科（〒899-5193 鹿児島県霧島市隼人町真孝1460-1）

²東北大学大学院工学研究科 土木工学専攻（〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06）

³長岡技術科学大学工学部 環境・建設系（〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1）

⁴三機工業株式会社 技術開発本部研究開発部（〒242-0001 神奈川県大和市下鶴岡1742-7）

* E-mail: m-yamada@kagoshima-ct.ac.jp

本研究では、高濃度フェノール廃水を処理するために、ラボスケールのUASB-DHSシステムによる、約1,200日間の連続処理実験を行った。また、UASBに保持されたグラニュール汚泥のメタン生成活性試験と微生物叢解析を行った。この結果、UASBで約83%、DHSで約98%のCOD除去率が得られ、UASB-DHSシステムで良好な処理が可能であった。微生物叢解析の結果から、UASBにおけるフェノールの分解は、水素酸化性微生物との共生下において、フェノールから酢酸まで単独の微生物により分解、あるいは二種以上の微生物によりフェノールから安息香酸を経由し酢酸まで分解される2つの経路が想定された。またリアクター下部では、メタン生成古細菌よりも硫酸還元菌との共生関係が優占している可能性が示唆された。

Key Words: mesophilic methane fermentation, UASB-DHS system, phenol wastewater, methanogenic activity test, microbial community

1. はじめに

フェノールは、生物に有害で化学物質排出移動量届出（PRTR）制度の対象となっており容易に環境中に排出することができない^{1)・2)}。フェノール廃水は石炭変換過程、石油生成工場、プラスチック工場などから排出され、主成分となるフェノールを10～7,500 mg/L程度含有している³⁾。フェノール廃水の処理は、高濃度の場合（1,000 mg/L程度以上）は活性炭吸着法や溶媒抽出法でフェノールの回収を行い、低濃度の場合（500 mg/L程度）はフェノールの影響が出ないように希釈してから活性汚泥法により生物処理を行っている。しかし、活性炭吸着法や溶媒抽出法はコストがかかり、また活性汚泥法は、莫大な余剰汚泥の発生やエネルギー消費（曝気にかかる電気代）の点で問題を有する。さらに活性汚泥は、強い生物阻害作用を有するフェノールにさらされると微生物が損傷を受け、処理性能が悪化するため、フェノール廃水処理に活性汚泥法を用いるには高度な技術管理が必要である⁴⁾。そのため、フェノールの無害化処理を行うにあたり、低コストでエネルギー消費を最小限にし、

かつ維持管理が容易なプロセスの開発が求められている。

本研究グループでは、嫌気性処理と好気性処理の優れた点を活かす新たな廃水処理システムとして、無曝気・省エネルギー型のUASB-DHS（Upflow Anaerobic Sludge Blanket – Down flow Hanging Sponge）システムを提案し、下水を中心に各種廃水処理の処理特性や適用性の検討を行ってきた^{5)～8)}。UASB-DHSシステムで採用されている前段の嫌気性処理は、好気性処理と比較し高濃度の廃水負荷に耐えることができ、かつメタンを回収することができる。しかしながら多くの場合、嫌気性処理だけでは一律排水基準⁹⁾を十分に満たすことができない。そこで嫌気性処理によりフェノール濃度が低減された廃水を、曝気不要で好気性処理が可能なDHSリアクターを用いて後段処理することができれば、上記問題を克服しうる新規処理システムとして提案することができる。本研究は、このUASB-DHSシステムを用いた新規フェノール処理プロセスを開発することを目的に、ラボスケールのUASB-DHSシステムを用いて約1,200日間の連続処理実験を行い、処理性能の評価を行った。また、UASBリアクターに保持されたグラニュール汚泥のメタン生

成活性試験と微生物叢解析を行った。

2. 実験方法および実験装置

(1) UASB-DHSシステム

図-1に本実験で用いたUASB-DHSシステムのフローシート、表-1にDHSリアクターに使用したスポンジの仕様を示す。UASBリアクターは、高さ110 cm、内径10 cm（角形）、容量11 L（液浸総容積）である。UASBリアクターには、最上部にGSS（Gas-Solids-liquid Separator）を設置した。生成バイオガス量の測定は湿式ガスメーター（シナガワ製、WS-1）により測定した。リアクター温度はウォータージャケットで35℃付近に制御した。また、廃水は最下部から供給し、最下部から5 cmにPort 1を設置し、15 cmおきに5カ所のサンプリングポートを設けた（図-1）。

DHSリアクターは、高さ190 cm（最上部の散水装置と最下部の沈殿槽を含む）、スポンジ充填高さは128 cm、内径20 cm（角形）、容量44 L（スポンジ充填容積）、リアクター温度は無加温運転とした。DHSリアクターに使用したスポンジ担体は、ポリウレタン製で、一辺が34 mmの立方体スポンジをポリエチレン製ネットリング（内径φ31 mm×高さ34 mm）に挿入したものを、スポンジ充填容積に対し、充填率54%（表-1）になるようにランダムに充填した。また、高さ方向に4カ所のスポンジサンプリングポートを設置した。

有機物容積負荷（OLR：Organic Loading Rate）と液滞留時間（HRT：Hydraulic Retention Time）は、UASBリアクターでは液浸総容積、DHSリアクターではスポンジ体積を基準として算出した。

植種汚泥としてUASBリアクターには、酢酸系廃水を処理していた中温グラニューク汚泥（0.42 kgVSS/UASBリアクター容積）、DHSリアクターには、

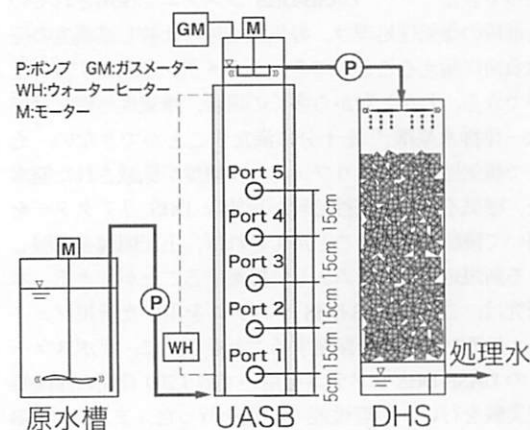


図-1 UASB-DHSシステムの処理フローシート

国分単人クリーンセンターの標準活性汚泥プロセスの返送汚泥を用いた。

連続処理実験に使用した人工廃水組成を表-2に示す。本研究に用いたフェノール単一人工廃水は、フェノール（和光純薬工業（株）製、和光一級）を各Phaseで供給フェノール濃度が630～1,260 mg/L（1,500～3,000 mgCOD/L）になるように水道水で希釈調整した。また、微量元素などを表-2に示すように添加した。なお、スタートアップ期間については、フェノールの炭素源以外にメタン菌のメタン生成活性を上昇させる目的で900 mgCOD/Lの炭素源（酢酸ナトリウム）を追加した。

表-1 DHSリアクターに使用したスポンジの仕様

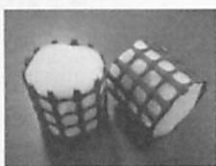
担体種		
		G3-2
スポンジ	材質	ポリウレタン
	セル径 [mm]	φ0.89
	サイズ [各mm]	長さ34×奥行き34×高さ34
	空隙率 [体積%]	98.5%
スポンジ保護材	材質	ポリエチレン
	形状	ネットリング
	サイズ [各mm]	外径φ35×内径φ31×高さ34
スポンジ充填率 [体積%]		54%

表-2 連続処理実験に使用した人工廃水組成

薬品名	化学式	mg/L
フェノール	C ₆ H ₅ OH	250～1,250
硫酸ナトリウム	Na ₂ SO ₄	120
硫酸マグネシウム	MgSO ₄	210
塩化カルシウム・2水和物	CaCl ₂ ・2H ₂ O	150
塩化カリウム	KCl	300
リン酸二水素カリウム	KH ₂ PO ₄	150
塩化アンモニウム	NH ₄ Cl	110
重炭酸ナトリウム	NaHCO ₃	1000
硫酸鉄・7水和物	FeSO ₄ ・7H ₂ O	7
塩化コバルト・6水和物	CoCl ₂ ・6H ₂ O	0.17
硫酸亜鉛・7水和物	ZnSO ₄ ・7H ₂ O	0.15
ほう酸	H ₃ BO ₃	0.06
塩化マンガン・4水和物	MnCl ₂ ・4H ₂ O	0.42
塩化ニッケル・6水和物	NiCl ₂ ・6H ₂ O	0.04
塩化銅・2水和物	CuCl ₂ ・2H ₂ O	0.027
モリブデン酸ナトリウム・2水和物	Na ₂ MoO ₄ ・2H ₂ O	0.025

(2) 運転条件

約 1,200 日間の連続処理実験は、スタートアップ期間とは別に、供給フェノール濃度によって、4 つのフェイズに区分した(表-3)。実験期間 1~152 日目(スタートアップ期間)、153~213 日目(Phase 1)、214~334 日目(Phase 2)、335~1,057 日目(Phase 3)、1,058~1,200 日目(Phase 4)とした。Phase 1~4 の実験期間を通して HRT は、UASB リアクターで 92 時間、DHS リアクターで 17.3 時間、UASB-DHS システム全体で 26.5 時間とした。流入 COD 濃度は、前段の UASB で Phase 1 で 1,500 mgCOD/L とし、それ以後 Phase 毎に 500 mgCOD/L ずつ上昇させ、Phase 4 で 3,000 mgCOD/L とした。UASB-DHS システムの OLR は Phase 1 で 1.4 kgCOD・m⁻³・d⁻¹ (UASB 単独で 3.9 kgCOD・m⁻³・d⁻¹)、Phase 2 で 1.8 kgCOD・m⁻³・d⁻¹ (UASB 単独で 5.2 kgCOD・m⁻³・d⁻¹)、Phase 3 で 2.3 kgCOD・m⁻³・d⁻¹ (UASB 単独で 6.5 kgCOD・m⁻³・d⁻¹)、Phase 4 で 2.8 kgCOD・m⁻³・d⁻¹ (UASB 単独で 7.8 kgCOD・m⁻³・d⁻¹) とした。また、Phase 3 の 390~393 日にポンプ故障により一時中断、456~474 日には一時休止した。

(3) 分析方法

COD_C の測定は重クロム酸カリウムによる酸素要求量 (HACH 社 DR4000U 吸光度計)、pH の測定はコンパクト pH 計 (HORIBA 製、B-212)、SS 及び VSS の測定は下水試験方法に準拠した¹⁰⁾。UASB 流出水及び DHS 流出水のフェノール濃度は FID 型ガスクロマトグラフ (Shimadzu GC-14B)、バイオガス組成 (CH₄, CO₂, H₂) は TCD 型ガスクロマトグラフ (Shimadzu GC-8A IT) により測定した。供給廃水及び処理水の溶解性試料は、ガラス繊維濾紙 (ADVANTEC GBI40) で濾過したものを用いて分析した。

(4) メタン生成活性試験

一般基質 (水素、酢酸、プロピオン酸、グルコース) のメタン生成活性試験は、Phase 3 (940 日目) と Phase 4 (1,141 日目) の UASB リアクターのグラニューール汚泥について行った。各フェノール基質濃度 (1,000, 2,000, 2,500, 3,000, 4,000, 5,000 mgCOD/L) のメタン生成活性試験は、Phase 2 (221 日目) と Phase 4 (1,141 日目) の UASB リアクターのグラニューール汚泥について行った。混合基質 (フェノール/酢酸; 0/2,000, 500/1,500, 1,000/1,000, 1,500/500, 2,000/0 mgCOD/L) のメタン生成活性試験は、Phase 1 (204 日目) のグラニューール汚泥について行った。

メタン生成活性試験に供したグラニューール汚泥のサンプル採取時期とサンプリングポート、供試したメタン生成活性試験を表-4 に示す。詳細な手順は既報¹¹⁾に準じた。

表-3 運転条件

Phase	期間(日)	流入COD濃度(mg/L) 流入フェノール濃度(mg/L) OLR(kgCOD m ⁻³ d ⁻¹)			
		UASB	UASB	UASB	UASB-DHS
1	61	1,500	630	3.9	1.4
2	121	2,000	840	5.2	1.8
3	723	2,500	1,050	6.5	2.3
4	143	3,000	1,260	7.8	2.8

HRTは、Phase 1~4を通してUASBで9.2時間、DHSで17.3時間とした。

表-4 メタン生成活性試験に用いたグラニューール汚泥

サンプル採取時期	サンプリングポート	供試した実験基質
Phase 1 (204日目)	Port 1 (供給口から5 cm)	混合基質 (フェノール/酢酸)
Phase 2 (221日目)	Port 1 (供給口から5 cm)	各フェノール基質
Phase 3 (940日目)	Port 1 (供給口から5 cm)	一般基質
Phase 4 (1,141日目)	Port 5 (供給口から65 cm)	一般基質、各フェノール基質

(5) UASB内グラニューール汚泥の微生物解析方法

UASB リアクターからのサンプリングはリアクター運転 1,148 日目 (Phase 4) に Port 1 (リアクター下部) および Port 5 (リアクター上部) から行った。汚泥からの DNA 抽出は ISOIL (ニッポンジーン) を用いて行った。16S rRNA 遺伝子の増幅は、*Bacteria* は Eub8f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')¹²⁾-UNIV1500r (5'-GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-3')¹²⁾ を、*Archaea* は Arc109f (5'-AHD GCT CAG TAA CAC RT-3')¹³⁾-UNIV1500r を用いて行った。PCR 産物の精製は MinElute PCR Purification Kit (キアゲン) を用いて行った。ライゲーションおよび大腸菌の形質転換は、TOPO TA Cloning Kit (インビトロジェン) を用いて行った。*Bacteria* については 100 クローン以上、*Archaea* については 25 クローン以上ピックアップし、それぞれ約 600 塩基を解読した。得られたクロノンのシーケンスデータは mothur¹⁴⁾ を用いて 97% identity を閾値とした Operational Taxonomic Unit (OTU) に分類した。Chao 1, ACE, Shannon-Wiener の算出には Estimate S ver. 8.2.0 (<http://viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS>) を用いた。Coverage¹⁵⁾ および Evenness¹⁶⁾ は既報に従い算出した。また、各 OTU の代表配列を用い、系統解析ソフト ARB¹⁷⁾ および NCBI の BLAST 相同性検索ツール (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) を用いて近縁種の推定を行った。

3. 実験結果及び考察

(1) UASB-DHSシステムの連続処理特性

図-2 に約 1,200 日間の UASB-DHS システムの連続処理実験結果の経日変化を示す。UASB-DHS システムのスタートアップ期間として、152 日間の運転を行った。HRT は 53 日目までは 44.3 時間 (UASB : 18.4 時間, DHS : 18.3 時間) に設定した。UASB リアクターに関し

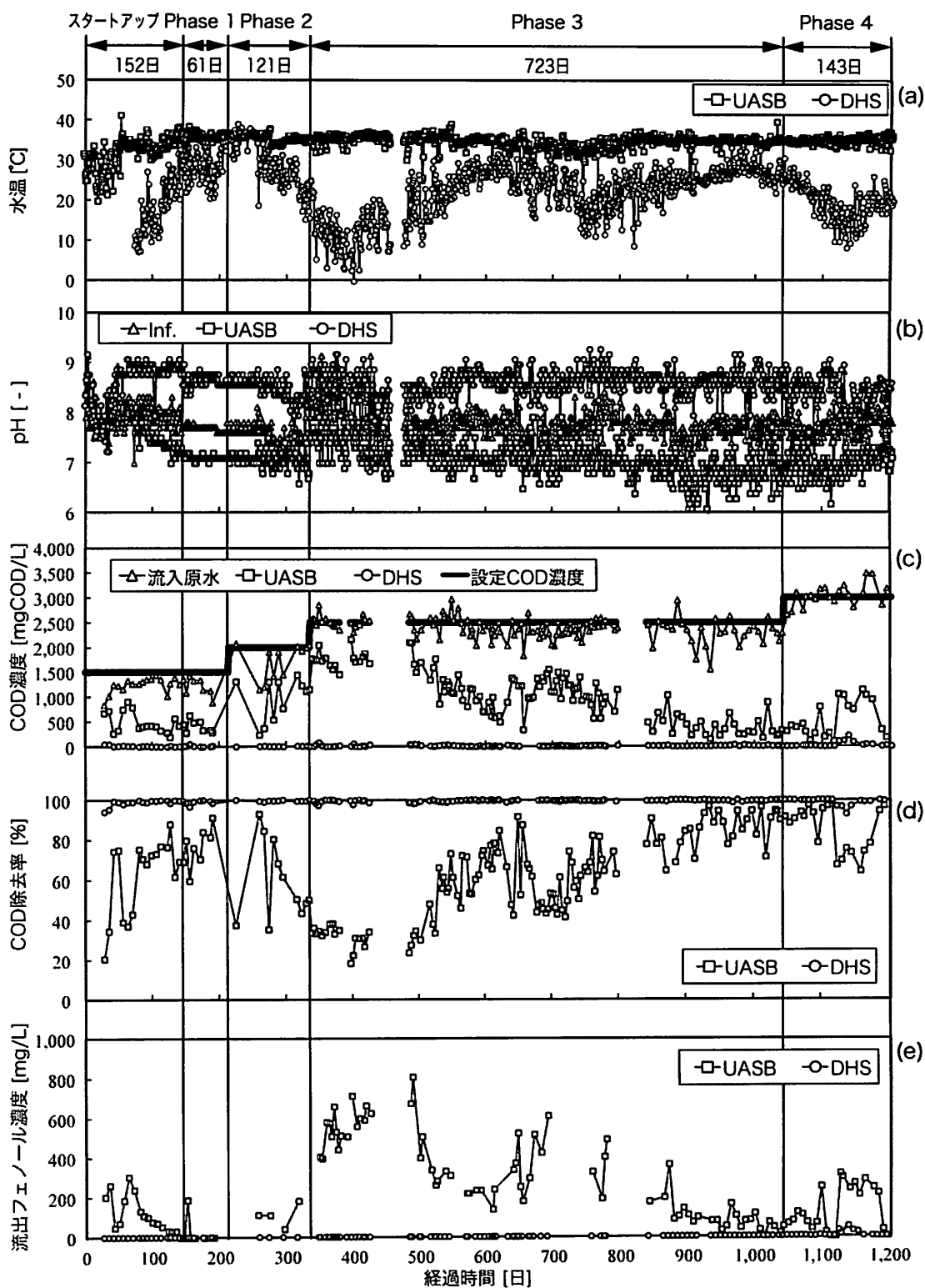


図-2 UASB-DHS システムの連続処理実験結果
(a)水温, (b)pH, (c)COD 濃度, (d)COD 除去率, (e) 流出フェノール濃度

ては、酢酸で集積培養されたメタン生成菌は嫌気性プロセスにおいて、5～30日間かけてフェノールに馴化させた後では、フェノールは即座に嫌気性分解されるようになる¹⁸⁾ことから、スタートアップ期間では、フェノール単一基質ではなく、フェノール(600 mgCOD/L)に酢酸(900 mgCOD/L)を加えた人工廃水で運転を行った。43日目からはフェノール濃度を1,000 mgCOD/L、酢酸濃度500 mgCOD/Lで運転を行ったが、全COD除去率は低下することがなかったため、50～68日目までの19日間、酢酸の投入を止め、フェノール単一基質で処理を行った。しかし、メタンガス量、全COD除去率(約40%)、フェノールの除去率の全てが低下した。そこで69日目以降は、再び酢酸を500 mgCOD/Lに設定し、処理が安定するまで定常運転を行った。123日目以降、UASBリアクターの流出フェノール濃度が低下し、COD除去率が約80%まで上昇し、バイオガスに対するメタンガスの割合が80%を超えるようになった。このことから、UASB内グラニューール汚泥がようやくフェノールに馴化され、処理が安定したことが考えられる。スタートアップ期間のDHSリアクターに関しては、14日目には全COD除去率とフェノール除去率ともに95%以上となり、安定した処理性能が得られた。

153日目からPhase 1とし、UASB-DHSシステムのOLRは $1.4 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ (UASB単独で $3.9 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$)、フェノール単一基質で流入フェノール濃度は1,500 mgCOD/L、HRTは26.5時間(UASB:92時間、DHS:17.3時間)で61日間の運転を行った。UASBリアクターのHRTを18.4時間から9.2時間に短縮したことから一時的に流出フェノール濃度が200 mg/Lを越えたが、すぐに処理水質は向上し、COD除去率90%程度を達成した。Phase 1のDHSリアクターの処理性能は、全COD除去率とフェノール除去率95%以上となり、安定した処理性能が得られた。

214日目からPhase 2とし、UASB-DHSシステムのOLRは $1.8 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ (UASB単独で $5.2 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$)、流入フェノール濃度は2,000 mgCOD/L、HRTは26.5時間(UASB: 9.2時間、DHS: 17.3時間)で121日間の運転を行った。負荷上昇後、UASB流出COD濃度が1,300 mgCOD/Lとなり、COD除去率が37%まで低下した。Phase 2に移行した際の1点目のフェノール濃度については分析機器故障により測定できなかったが、UASBリアクター処理水COD濃度から推測すると、500 mg/L程度のフェノールが後段のDHSリアクターに流入したと考えられた。274日目には原水供給フェノール濃度が2,000 mgCOD/Lから1,158 mgCOD/Lと減少するなどの負荷変動により、COD除去率40%程度に低下した。Phase 1では、すぐにCOD濃度が回復したが、Phase 2ではCOD除去率の回復が見られなかったため、グラニューール汚泥

の馴致に非常に時間がかかることが示唆された。UASBリアクターの処理性能が悪化しても、DHSリアクターの処理性能には全く影響を及ぼさなかったことから、UASB-DHSシステムとしては適用可能であったと考えられたため、335日目から流入フェノール濃度を2,500 mgCOD/Lに上昇させた。

Phase 3では、UASB-DHSシステムのOLRは $2.3 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ (UASB単独で $6.5 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$)、流入フェノール濃度は2,500 mgCOD/L、HRTは26.5時間(UASB: 9.2時間、DHS: 17.3時間)で723日間の運転を行った。Phase 3では、390～393日と456～474日に原水ポンプの故障などにより連続処理実験を休止した。Phase 3に移行してもUASBリアクターのCOD除去率の回復が見られず、500日目までCOD除去率が30～40%で推移した。500日目以降は、UASBリアクターの温度が24時間、30℃まで低下し、一時的にCOD除去率は低下したが、COD除去率も徐々に回復し、COD除去率40～80%程度で運転が可能であった。700日目以降から徐々にCOD除去率が回復し、COD除去性能は、原水COD濃度が約2,300 mgCOD/Lに対し、UASBリアクター処理水で約417 mgCOD/L、DHSリアクター処理水で約7.8 mgCOD/Lであった。COD除去率は、UASBリアクターで約82%、DHSリアクターで約99%となった。このことから、1,043日目に流入COD濃度を3,000 mgCOD/Lに上昇させ、連続処理実験を継続した。

Phase 4では、UASB-DHSシステムのOLRは $2.8 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ (UASB単独で $7.8 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$)、流入フェノール濃度は3,000 mgCOD/L、HRTは26.5時間(UASB: 9.2時間、DHS: 17.3時間)で143日間の運転を行った。供給開始直後に負荷を上昇させたことから一時的にCOD除去率は低下したが、後段のDHSリアクターの処理性能に影響を与えることなく安定した処理が行えるようになった。しかし、1,121日目にはUASBリアクターの上部汚泥がウォッシュアウトしたことが原因で、COD除去率が低下し、1,170日までCOD除去率が60%程度で推移した。しかし、1,170日目以降は良好な処理性能が得られ、Phase 4の運転期間のCOD除去性能は、原水COD濃度が約2,970 mgCOD/Lであったのに対し、UASBリアクター処理水で約510 mgCOD/L、DHSリアクター処理水で約32.7 mgCOD/Lであった。COD除去率は、UASBリアクターで約83%、DHSリアクターで約98%であった。約1,200日間の連続処理実験を通じ、pHの推移はUASB処理水では6～7、DHS処理水では8～9であった。また、DHSリアクターは、10℃以下の水温においても常に良好な処理性能が得られた。

表-5にUASB-DHSシステムのPhase 3の汚泥濃度を示す。UASBリアクターのMLSS濃度は、Port 1, Port 3, Port 5で各々22,689 mg/L (VSS/SS比52.9%)、51,347 mg/L (VSS/SS比74.9%)、4,738 mg/L (VSS/SS比63.6%)で

あった。DHS リアクターの MLSS 濃度は、上段、下段で各々 19,985 mg/L・スポンジ容積 (VSS/SS 比 78.3%)、38,840 mg/L・スポンジ容積 (VSS/SS 比 44.6%) であった。UASB リアクターでは、下部の VSS/SS 比が非常に低くなっており、スケールが溜まっている可能性が示唆された。また、DHS リアクターでは下段の流出側で VSS/SS 比が 44.6%であり、付着汚泥の半数が無機物であることがわかった。しかし、通常の活性汚泥の 10 倍以上の微生物濃度がスポンジ担体に保持されていることから、UASB-DHS システムでは、UASB リアクターの処理性能が低下したときにでも、DHS リアクターが許容し、良好な処理性能を維持したと考えられた。

1,149 日目 (Phase 4) の UASB リアクターの COD 除去率が一時的に低下したときのリアクター高さ方向の処理状況を表-6 に示した。測定項目は pH、COD 濃度、MLSS 濃度の調査を行った。リアクター上部に到達するに連れ、COD 濃度が低下し、port 5 では COD 除去率が 63%に達した。また、pH については、7.89 から 6.55 まで低下した。

(2) UASBグラニューール汚泥のメタン生成活性試験結果

一般基質のメタン生成活性試験結果を図-3 に示す。一般基質のメタン生成活性試験は、904 日 (Phase 3) と 1,141 日 (Phase 4) に実施し、904 日は UASB リアクターの Port 1、1,141 日は Port 5 のグラニューール汚泥を用いた。904 日と 1,141 日の各々のメタン生成活性値は、水素基質では 0.21、0.37、酢酸基質では 0.12、0.30、プロピオン酸基質では 0.004、0.032、グルコース基質では 0.14、0.11 gCOD/gVSS/d であった。メタン生成活性試験を実施したグラニューール汚泥の条件が異なるが、流入直後の Port 1 と流出直前の Port 5 を比較すると水素基質では約 1.8 倍、酢酸基質では約 2.5 倍、プロピオン酸基質では 8 倍、グルコース基質では 0.8 倍となり、グルコース基質以外で全てメタン生成活性値が流出直前の Port 5 で高くなった。

各フェノール基質濃度のメタン生成活性試験結果を図-4 に示す。各フェノール濃度 (1,000、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000 mgCOD/L) のメタン生成活性試験は、221 日 (Phase 2) と 1,141 日 (Phase 4) の UASB リアクターのグラニューール汚泥について行った。221 日と 1,141 日の各々のメタン生成活性値は、フェノール濃度 1,000 mgCOD/L では 0.038、0.058、2,000 mgCOD/L では 0.027、0.028、2,500 mgCOD/L では 0.012、0.048、3,000 mgCOD/L では 0.008、0.069、4,000 mgCOD/L では 0.003、0.045、5,000 mgCOD/L では 0.003、0.037 gCOD/gVSS/d であった。フェノール基質のメタン生成活性値は酢酸基質のメタン生成活性値よりもワンオーダー以上低く、プロピオン酸基質と同レベルのメタン生成活性値であった。特に 221 日のグラニューール汚泥では、2,000 mgCOD/L を越えると

表-5 UASB-DHSシステムのPhase3の汚泥濃度[※]

	MLSS (mg/L)	MLVSS (mg/L)	VSS/SS (%)
UASB-Port 1	22,689	12,000	52.9
UASB-Port 3	51,347	38,246	74.5
UASB-Port 5	4,738	3,014	63.6
DHS上段	19,985	15,152	78.3
DHS下段	38,840	17,914	44.6

※サンプリングは、564、596、655、685、714 日の計 5 回の平均値

表-6 UASBリアクターの高さ方向のpHとCOD濃度

UASB リアクターの 高さ方向のサンプリング箇所	pH (-)	COD _c (mgCOD/L)	MLSS (mg/L)
UASB流入水	7.89	3,050	
Port 1 (5 cm)	7.03	1,794	40,238
Port 2 (20 cm)	6.89	1,635	40,464
Port 3 (35 cm)	6.78	1,265	20,116
Port 4 (50 cm)	6.67	1,170	2,798
Port 5 (65 cm)	6.63	1,134	576
UASB処理水	6.55	1,182	14

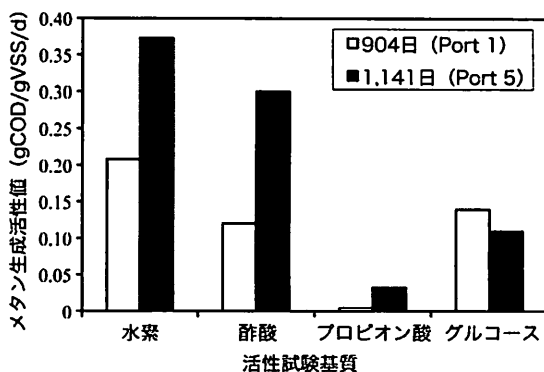


図-3 一般基質のメタン生成活性試験結果

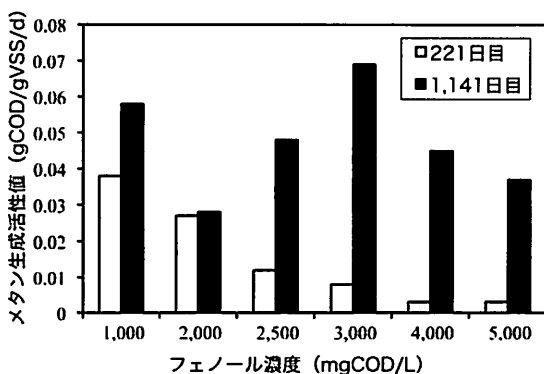


図-4 各フェノール基質濃度のメタン生成活性試験結果

急激にメタン生成活性値が低下したことから、連続処理実験で使用している嫌気性グラニューール汚泥は、流入フェノール濃度を2,000 mgCOD/L程度で運転するのが妥当であったと考えられる。また、221日のグラニューール汚

泥は4,000 mgCOD/L以上になると2,000 mgCOD/Lと比べて1/10 以上、メタン生成活性値が低下した。1,141日のグラニュー汚泥のメタン生成活性値は、フェノール濃度2,000 mgCOD/L以上でも急激にメタン生成活性値が低下することではなく、221日目のグラニュー汚泥のメタン生成活性値と比較し、フェノール基質に対し馴化されていたと考えられた。

混合基質のメタン生成活性試験結果を図-5 に示す。混合基質（フェノール/酢酸；0/2,000，500/1,500，1,000/1,000，1,500/500，2,000/0 mgCOD/L）のメタン生成活性試験は、Phase 1（204 日目）のグラニュー汚泥について行った。混合基質（フェノール/酢酸）からのメタン生成活性値は、酢酸基質のみ添加の 0/2,000 mgCOD/L では 0.20 gCOD/gVSS/d，フェノール基質のみ添加の 2,000/0 mgCOD/L では 0.055 gCOD/gVSS/d の1段階のメタン生成活性値が得られたのに対し、フェノール基質と酢酸基質（フェノール濃度/酢酸濃度）を割り振った 500/1,500 mgCOD/L では 0.23 と 0.086 gCOD/gVSS/d，1,000/1,000 mgCOD/L は 0.23 と 0.082 gCOD/gVSS/d，1,500/500 mgCOD/L では 0.16 と 0.055 gCOD/gVSS/d の2段階の傾きが得られた。0/2,000 と 2,000/0 mgCOD/L のメタン生成活性値から 500/1,500，1,000/1,000，1,500/500 mgCOD/L の各々のメタン生成活性値である 0.23，0.23，0.16 gCOD/gVSS/d は酢酸からのメタン変換，0.086，0.082，0.055 gCOD/gVSS/d はフェノールからのメタン変換である可能性が示唆された。

このことから、フェノール基質を連続処理している嫌気性グラニュー汚泥でも、フェノールを選択的に消費するのではなく、メタンに変換しやすい酢酸基質から消費することが示唆された。

(3) UASBグラニュー汚泥の微生物叢解析結果

フェノールを処理するUASBグラニュー汚泥の *Bacteria* および *Archaea* の16S rRNA遺伝子に基づくクローン解析を行った。UASBリアクターの高さ方向に異なる2カ所のサンプリングポートから採取した汚泥それぞれについてクローンライブラリーを構築した。採取したクローン数は、ポート1は *Bacteria* が117クローン，*Archaea* が38クローン，Port 5は *Bacteria* が106クローン，*Archaea* が27クローンである。97%相同性を閾値としたOTU分類を行うと，Port 1の *Bacteria* は30，*Archaea* は5，Port 5の *Bacteria* は27，*Archaea* は4のOTUに分類された。この他，統計解析結果を含むクローンライブラリーの概要を表-7に示す。Coverageは *Bacteria*，*Archaea* で0.85を超え，群集構造を解析するのに十分なクローン数であったと言える。しかしながら *Bacteria* についてはChao 1，ACE共に1.5-3倍のOTUが存在している可能性を示唆していた。Evennessは *Bacteria* においてもさほど高くなく，一部のグループが

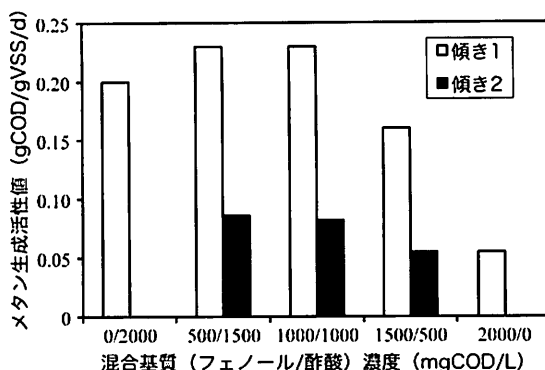


図-5 混合基質のメタン生成活性試験結果

表-7 クローンライブラリーの概要

	Port 1		Port 5	
	<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>
No. of clone	117	38	106	27
No. of OTU	30	5	27	4
Chao 1	75.33	8	40	4
ACE	102.25	8	43.9	4
Shannon-Wiener	2.7	0.98	2.63	1.16
No. of single clone	17	3	13	1
Coverage	0.85	0.92	0.88	0.96
Evenness	0.79	0.61	0.80	0.84

優占していることを示唆していた。

表-8 にクローンライブラリー中で、存在率の高かったものに加え、既存の分離株に比較的相同性が高く、機能を推定できるクローンをまとめた。嫌気環境下では、フェノールは水素資化性微生物との共生下で酢酸まで分解される。微生物群集構造からみる本 UASB リアクターにおけるフェノールの分解は、*Syntrophorhabdus aromaticivorans*⁹⁾ によって酢酸にまで直接分解されるもの（経路1）と、*Cryptanaerobacter phenolicus*²⁰⁾ によって安息香酸に転換され、それを *Syntrophus buswellii*²¹⁾，*Syntrophus aciditrophicus*²²⁾ などが酢酸にまで分解する（経路2）という2パターンが想定される。UASB リアクター下部（Port 1）ではフェノールから酢酸まで分解可能な *Syntrophorhabdus aromaticivorans* に近縁なクローンが28クローン（B1-1, 15）と全体の23%を占めていたが，UASB リアクター上部では10クローン（B5-4, 11, 16）と減少していた。また，*Cryptanaerobacter phenolicus* に近縁なクローンも UASB リアクター下部では10クローン（9%；B1-4）得られたが，上部では3クローン（3%；3クローン）しか得られていない。一方，リアクター下部では20クローン（17%）であった *Syntrophus buswellii* に近縁なクローン（B1-2）は，UASB リアクター上部では32クローン（B5-1）と全体の30%を占め，最も優占化していた。このことは UASB リアクター下部では経路1お

表-8 クローンライブラリーの代表的な OTU とその近縁株

OTU番号	クローン数	近縁株 (アクセッション番号)	相同性
Bacteria			
ポート1			
B1-1	27	<i>Syntrophorhabdus aromaticivorans</i> (AB212873)	610/626 (97%)
B1-2	20	<i>Syntrophus buswellii</i> (NR_029294)	623/627 (99%)
B1-3	12	<i>Acidaminococcus intestinalis</i> (EF028685)	539/634 (85%)
B1-4	10	<i>Cryptanaerobacter phenolicus</i> (NR_025757)	614/634 (97%)
B1-5	6	<i>Ruminofilibacter xylanolyticum</i> (DQ141183)	575/644 (89%)
B1-6	4	<i>Desulfovibrio aminophilus</i> (NR_024916)	623/627 (99%)
B1-7	4	<i>Desulfovibrio ferrophilus</i> (AY274449)	588/632 (93%)
B1-9	3	<i>Desulfovibrio aminophilus</i> (NR_024916)	610/631 (97%)
B1-12	2	<i>Syntrophus gentianae</i> (NR_029295)	582/626 (93%)
B1-13	2	<i>Desulfovibrio sulfodismutans</i> (NR_026480)	614/631 (97%)
B1-14	1	<i>Syntrophus aciditrophicus</i> (GU993263)	598/632 (95%)
B1-15	1	<i>Syntrophorhabdus aromaticivorans</i> (AB212873)	606/628 (96%)
B1-26	1	<i>Longilinea arvoryzae</i> (AB243673)	591/630 (94%)
B1-27	1	<i>Longilinea arvoryzae</i> (AB243673)	594/627 (95%)
ポート5			
B5-1	32	<i>Syntrophus buswellii</i> (NR_029294)	634/638 (99%)
B5-2	11	<i>Desulfovibrio sulfodismutans</i> (NR_026480)	613/631 (97%)
B5-3	8	<i>Thermaerobacter marianensis</i> (CP002344)	547/647 (85%)
B5-4	7	<i>Syntrophorhabdus aromaticivorans</i> (AB212873)	610/625 (98%)
B5-5	7	<i>Nocardia seriolae</i> (GQ376193)	536/641 (84%)
B5-6	6	<i>Acidaminococcus intestinalis</i> (EF028685)	539/635 (85%)
B5-7	5	<i>Ignavibacterium album</i> (AB478415)	561/627 (89%)
B5-9	3	<i>Cryptanaerobacter phenolicus</i> (NR_025757)	621/632 (98%)
B5-10	2	<i>Desulforhabdus amnigena</i> (NR_029289)	601/633 (95%)
B5-11	2	<i>Syntrophorhabdus aromaticivorans</i> (AB212873)	605/626 (97%)
B5-15	1	<i>Desulfobacterium anilini</i> (NR_025348)	603/643 (94%)
B5-16	1	<i>Syntrophorhabdus aromaticivorans</i> (AB212873)	594/633 (94%)
Archaea			
ポート1			
A1-1	21	<i>Methanosaeta concilii</i> (CP002565)	620/622 (99%)
A1-2	14	<i>Methanosaeta harundinacea</i> (AY970347)	627/630 (99%)
A1-3	1	<i>Methanolinea tarda</i> (NR_028163)	608/618 (98%)
A1-4	1	<i>Thermococcus mexicalis</i> (AY099181)	526/635 (83%)
A1-5	1	<i>Methanobacterium</i> sp. (AB598270)	630/630 (100%)
ポート5			
A5-1	12	<i>Methanosaeta concilii</i> (CP002565)	631/631 (100%)
A5-2	9	<i>Methanolinea tarda</i> (NR_028163)	617/629 (98%)
A5-3	5	<i>Methanosaeta harundinacea</i> (AY970347)	625/630 (99%)
A5-4	1	<i>Methanobacterium</i> sp. (AB598270)	628/630 (99%)

よび経路2が、上部では経路2の安息香酸の分解が主な分解経路となっている可能性がある。クローン解析からだけでは、2つの分解パターンのフェノール分解への貢献度は推察することはできないが、フェノール単一基質のUASBリアクターにおいて、このように複数の分解パターンが存在することは、各微生物の基質親和性の違いなど、今後より詳細な解析が必要である。

Bacteria のクローンライブラリーには *Desulfovibrio* 属に近縁なクローン (B1-6, 7, 9, 13, B5-2, 10, 15) が、*Archaea* のクローンライブラリーには *Methanolinea* 属 (A1-3, A5-2), *Methanobacterium* 属 (A1-5, A5-4) に近縁なクローンが得られたことから、これらの水素資化性の微生物との共生によりフェノールの分解は進行したと考えられる。Port 1 のクローンライブラリーから水素資化性のメタン生成古細菌が2クローン (5%) しか得られなかったのに対し、Port 5 では10クローンと全体の37%を占めた。これは流入水中に硫酸根が含まれることから、硫酸還元菌とメタン生成古細菌の競合関係から、硫酸還元共生がUASBリアクター下部でより行われ、UASBリアクター上部でメタン生成共生がより行われている可能性を示唆するものである。最後に、生成された酢酸は *Methanosaeta* 属によってメタンへと転換されていると考えられる。

この他に割合の大きかったOTUにB1-3 (12クローン) とB5-3 (8クローン) がある。B1-3は *Nitrospirae* 門のクローンクラスターに属し、B5-3は *candidate division* Hyd24-12に属した (Silva²⁰) による門のリストによる)。B1-3に近縁なクローンにはTCEやフタル酸ジエチル、安息香酸を処理する嫌気性リアクターから回収されたものがあり、またB5-3に近縁なクローンはPCPやトルエンを処理する微生物叢から検出されている。

4. まとめ

ラボスケールのUASB-DHSシステムにより、約1,200日間のフェノール廃水の連続処理実験とUASBグラニューール汚泥のメタン生成活性試験と微生物叢解析を行った結果、以下の知見を得た。

- 1) 連続処理実験結果から、前段のUASBリアクターの処理性能は安定しない時期はあったが、後段のDHSリアクターの処理性能は長期間を通じて良好であり、UASB-DHSシステムとしてはフェノール濃度1,260 mg/L (3,000 mgCOD/L) での運転が可能であることがわかった。
- 2) 突発的にUASBリアクターの除去率が低下しても、十分にDHSリアクターの処理性能でカバーできるこ

とがわかった。

- 3) DHSリアクターは、10℃以下の水温においても常に良好な処理性能が得られた。
- 4) メタン生成活性試験の結果からUASBリアクターのグラニューール汚泥の馴致を行えば、更なる高負荷での運転が可能であることが示唆された。
- 5) 微生物群集構造の結果から、本UASBリアクターにおけるフェノールの分解は、単独の微生物によりフェノールから酢酸にまで分解されるもの (経路1) と、2種以上の微生物によりフェノールから安息香酸を中間代謝物として経由し酢酸にまで分解されるもの (経路2) の2パターンが想定され、UASBリアクター下部では経路1および経路2、上部では経路2が主な分解経路となっている可能性が示唆された。

謝辞：本研究の連続データの取得には鹿児島工業高等専門学校専攻科土木工学専攻に所属する平賀祐朝氏、小丸哲吾氏をはじめ多くの学生の協力を得た。ここに記して謝意を表します。

参考文献

- 1) 独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構：化学物質の初期リスク評価書No.32 フェノール, p.6, 2005.
- 2) 独立行政法人製品評価技術基盤機構ホームページ (http://www.prttr.nite.go.jp/prtr/new_class1.html).
- 3) Veeresh, Gali S., Kumar P. and Mehrotra I.: Treatment of phenol and cresols in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) process: a review, *Water Research*, Vol. 39, pp.154-170, 2005.
- 4) 藤田正憲, 池道彦：バイオ環境工学, pp.18-22, CMC出版, 2006.
- 5) 高橋優信, 山口隆司, 上村繁樹, 大橋晶良, 原田秀樹：発展途上国に適用可能なエネルギー最小消費型の下水処理プロセスの開発—スポンジ担体散水ろ床 (DHS-G3) リアクターの処理特性—, *環境工学研究論文集*, Vol. 41, pp.175-186, 2004.
- 6) 倉本恵治, 高橋優信, 角野晴彦, 山口隆司, 西尾尚道：多段嫌気性反応槽 (UASB) と下降流懸架式スポンジ (DHS) 反応槽を組み合わせた高濃度有機性廃水処理システムの開発, *水環境学会誌*, Vol. 30, No.2, pp.83-88, 2007.
- 7) Yamaguchi, T., Bungo, Y., Takahashi, M., Sumino, H., Nagano, A., Araki, N., Imai, T., Yamazaki, S. and Harada, H.: Low strength wastewater treatment under low temperature conditions by a novel sulfur redox action process, *Water Science & Technology*, Vol. 53, No.6, pp.99-105, 2006.
- 8) Takahashi, M., Yamaguchi, T., Kumamoto, Y., Nagano, A., Shimozaaki, S., Sumino, H., Araki, N., Yamazaki, S., Kawakami, S. and Harada, H.: Performance of a pilot-scale sewage treatment: An up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) and a down-flow hanging sponge (DHS) reactors combined system by sulfur-redox reaction process under low-temperature conditions, *Bioresour. Technology*, Vol. 102, pp.753-757, 2011.
- 9) 日本下水道協会：下水道施設計画・設計指針と解説 (前編) 2001年版, pp.158-159, 2001.
- 10) 日本下水道協会：下水試験方法 (上巻), 1997.
- 11) 珠坪一晃, 原田秀樹, 曾根慎, 桃井清至：高温UASBリアクター保持汚泥のグラニューール形成過程における構造的持

- 性とメタン生成活性の推移, 環境工学研究論文集, Vol. 31, pp.57-67, 1994.
- 12) Weisburg, W. G., Bams, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. : 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *Journal of Bacteriology*, Vol. 173, pp. 697-703, 1991.
 - 13) Miyashita, A., Mochimaru, H., Kazama, H., Ohashi, A., Yamaguchi, T., Nunoura, T., Horikoshi, K., Takai, K. and Imachi, H. : Development of 16S rRNA gene-targeted primers for detection of archaeal anaerobic methanotrophs (ANMEs), *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 297, pp. 31-37, 2009.
 - 14) Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J. and Weber, C. F. : Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75, pp. 7537-7541, 2009.
 - 15) Good, I. J. : The population frequencies of species and the estimation of population parameters, *Biometrika*, vol. 40, pp. 237-264, 1953.
 - 16) Magurran, A. E. : Measuring Biological Diversity, Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2004.
 - 17) Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grunmann, S., Hermann, S., Jost, R., Konig, A., Liss, T., Lussmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. and Schleifer, K. H. : ARB: a software environment for sequence data, *Nucleic Acids Research*, Vol. 32, pp. 1363-1371, 2004.
 - 18) Speece, R. E. : Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters, Published by Archæ Press, 1996.
 - 19) Qiu, Y. L., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y. and Sekiguchi, Y. : *Syntrophorhabdus aromaticivorans* gen. nov., sp. nov., the first cultured anaerobe capable of degrading phenol to acetate in obligate syntrophic associations with a hydrogenotrophic methanogen, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 74, pp. 2051-2058, 2008.
 - 20) Juteau, P., V. Côté, Duckett, M.-F., Beaudet, R., Lépine, F., Villemur, R. and Bisailon, J.-G. : *Cryptanaerobacter phenolicus* gen. nov., sp. nov., an anaerobe that transforms phenol into benzoate via 4-hydroxybenzoate, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 55, pp. 245-250, 2005.
 - 21) Mountfort, D. O., Brulla, W. J., Krumholz, L. R. and Bryant, M. P. : *Syntrophus buswellii* gen. nov., sp. nov.: a benzoate catabolizer from methanogenic ecosystems, *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 34, pp. 216-217, 1984.
 - 22) Jackson, B. E., Bhupathiraju, V. K., Tanner, R. S., Woese, C. R. and McInemey, M. J. : *Syntrophus aciditrophicus* sp. nov., a new anaerobic bacterium that degrades fatty acids and benzoate in syntrophic association with hydrogen-using microorganisms, *Archives of Microbiology*, Vol. 171, pp. 107-114, 1998.
 - 23) Priesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B., Ludwig, W., Peplies, J. and Glöckner, F. O. : SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB, *Nucleic Acids Research*, Vol. 35, pp. 7188-7196, 2007.

(2011.5.30 受付)

Process performance of UASB-DHS system treating high concentration phenol wastewater and its microbial community analysis of UASB

Masayoshi YAMADA¹, Kengo KUBOTA², Masanobu TAKAHASHI³, Hideharu TANAKA⁴, Takashi YAMAGUCHI³, Akihiro NAGANO⁴, Hideki HARADA² and Masahito YAMAUCHI¹

¹Dept. of Urban Environmental Design and Engineering, Kagoshima National College of Technology

²Dept. of Environmental Engineering, Nagaoka University of Technology

³Dept. of Civil and Environmental Engineering, Tohoku University

⁴Dept. of Research and Development, Sanki Engineering Co., LTD

A lab-scale UASB-DHS system with a working volume of 11 L and 44 L was operated for treatment of a synthetic wastewater containing high levels of phenol for a period of 1,200 days. The total experimental duration of 1,200 days were divided into 4 distinct phases in terms of the influent phenol strength. The HRT of all phases were maintained at 26.5 hrs for the whole UASB-DHS system (9.2 hrs for UASB plus 17.3 hrs for DHS). The UASB-DHS system achieved an excellent removal of above 98 % at a loading rate of 2.8 kgCOD·m⁻³·d⁻¹. Two different pathways were suggested for degradation of phenol: conversion of phenol to acetate directly or via benzoate formation as an intermediate product.