

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06627

研究課題名（和文）センサーを用いたハイスループットな排水処理生物膜の安定性評価法の構築

研究課題名（英文）High throughput evaluation method for the bacterial biofilm stability in wastewater treatment using a sensor

研究代表者

小林 拓朗（Kobayashi, Takuro）

国立研究開発法人国立環境研究所・資源循環・廃棄物研究センター・主任研究員

研究者番号：10583172

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：嫌気性汚水処理は、省エネルギーかつ廃棄物としての汚泥の発生量を抑制する処理方法として、生物学的処理方式のひとつとして定着しつつある。嫌気性微生物は増殖が遅いため、技術の鍵となるのは生物の付着滞留である。本研究では、センサーを使い生物膜を短時間で評価する方法を考案し、その方法を応用して、生物膜の発達阻害となるカチオンの共存の問題について、現象の解明を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嫌気性処理は応用範囲が近年大きく拡大し、様々な業種で採用されるようになった。生物膜法は最も安価に実現可能な効率的処理方法である。近年は排水に含有される成分に起因する生物膜の形成阻害により本法の適用が制限されるケースが認められるようになった。本研究では、センサーを使った微小な質量変化から、短期間で生物膜の発達を評価する方法を構築した。これを利用し、阻害の原因物質やその濃度、さらに阻害軽減のための方策について、実験室内で検討することが可能であることが示された。

研究成果の概要（英文）：Anaerobic wastewater treatment is an established method for energy-saving and reducing waste production. Retention of attached microorganisms is a key to overcome the slow growth rate of anaerobic microorganisms. In this study, we proposed an effective evaluation method to detect slight change caused by biofilm formation using a sensor. Using the proposed method, we elucidated the phenomenon regarding reduced biofilm formation in the presence of cationic substances.

研究分野：環境工学

キーワード：生物膜 センサー 嫌気性処理

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

嫌気性の汚水処理は比較的高い有機物濃度の汚水を処理する場合に、活性汚泥法と比較して省エネ・創エネ・余剰汚泥の削減といった点での優位性が際立つことから、主として産業排水への応用が進められてきた。一般に、嫌気性微生物の増殖速度及び菌体収率は好気性微生物と比較して小さい。嫌気性処理の産業排水への適用は、固形物滞留時間(SRT)を水理学的滞留時間(HRT)に対していかに大きく取るかが、効率的な処理の鍵である。中でも汚泥床法とはじめとする生物膜式処理方式がSRTを増大させる手法として最も一般的である。本技術の適用可能な汚水種の範囲は技術開発によって大きく拡大してきたが、一部の高塩濃度の化学工場排水や食品加工排水では、生物膜の発達が阻害されるために効率的な処理が困難とされてきた。

2. 研究の目的

生物膜の形成を評価してきたこれまでの研究は、長期間の培養を必要とするものであったため、個々のカチオン種および濃度の影響が詳細に調べられることがなかった。本研究では、まずセンサー上の微小な質量変化をモニタリングすることで多数の設定条件の下で初期の生物膜形成を短時間で評価する方法を構築し、カチオンの種類と濃度が嫌気性生物膜に対して及ぼす影響を幅広く検討した。次に、絞り込んだ条件の下で、汚泥床方式のバイオリクターを用いた高塩濃度排水の連続処理実験において、生物膜の形成の促進を検討した。以上のようにして、高カチオン濃度下における生物膜形成の評価を目的とした研究を行った。

3. 研究の方法

3.1. 生物膜発達

実施に由来するグラニューク汚泥から、Na型イオン交換樹脂を使って Extracellular polymeric substances (EPS) を抽出し、菌体と分離した。菌体は目開きサイズ 0.3 mm のふるいを通させたものを使用した。分離菌体とEPSの混合液、各種金属の混合液を別々に嫌気性に保持された密封容器に保持した。2本の密封容器からそれぞれポンプでフローセルに対して送液し、直前でT字コネクタを使って合流させてフローセルに流入する仕組みとした。フローセルには液相用水晶振動子センサーが組み込まれている。システムは35℃のインキュベータ内に設置した。振動子表面はPVCで被覆した。フローセルに対して送液を始めてからのセンサーの周波数変化をロギングして、一定時間内における変化量を評価した。一定周波数で振動する振動子の電極表面に物質が付着することで周波数が減少する。そのため、本実験では周波数累積減少量を振動子への物質の吸着量として解釈した。

3.2. 生物膜発達

農業残渣のガス化発電の副産物として得られた炭化物(バイオチャー)と Fe_3O_4 を混合し、ボールミルによる混合で作成した鉄修飾バイオチャー(biochar/Fe)を使用し、高塩濃度下における生物膜の発達促進を意図して、連続実験でその効果を検証した。有効容積が1Lである2台のUASBリアクターを35℃で150日間以上運転した。基質中の塩分濃度を10g-Na/Lとした。グルコースを有機炭素源とした合成排水をリアクターに投入し、流入COD(化学的酸素要求量)濃度を10g/Lに維持した。2台のUASBの種汚泥は300 μm の篩でろ過したものであり、HRT(水力滞留時間)を4日から1日に段階的に短縮した。ガス生成量とガス組成を毎日記録、流出水の水質とリアクター内で培養できた汚泥の性状を定期的に分析した。

4. 研究成果

4.1. センサーへの微生物の付着および定量性

上述の方法でのフローセル内のセンサー表面への生物膜形成を確認するために、通液時間10分および70分に設定して行った各実験の終了後のセンサー表面をレーザー顕微鏡で観察した。表面にはEPSと思しき凹凸物の膜とその上に付着した微生物細胞が観察された。10分の通液時間の表面と比較して、70分通液した表面は明らかに細胞の付着量が多く、クラスターが形成されており、生物膜の発達が進行していることが確認された。次に、異なる通液時間の周波数変化測定実験を全13回行い、各実験での累積の周波数変化と実験終了後にクリスタルバイオレット染色で定量したバイオマス量との比較を行った。その結果、両者には正の相関関係が認められた($R^2=0.84$)。以上の一連の結果から、本研究で用いた手法は初期の生物膜の形成を評価する方法として有効であると判断した。

4.2. 金属カチオン濃度の生物膜形成に及ぼす影響

まず、上述の方法を用いて生物膜形成に及ぼすCa濃度の影響を検討した。カチオンが生物膜形成に及ぼす影響は、微生物細胞やEPSの表面電位への影響と多価カチオン架橋によって説明される。まず2価のカチオンである Ca^{2+} 濃度の影響を70分間の送液による実験で検討した。図1Aに示すように、生物膜付着量は8mMまではCa濃度に応じて増大し、それ以降は逆に濃度に応じた減少を見せた。このような挙動は表面電位の変化と連動していると思われる。Pevere¹⁾がグラニューク汚泥を使って示しているように、Ca濃度の増大に応じて汚泥の ζ 電位はマイナスから上昇し、等電点を迎えた後、過剰の Ca^{2+} の存在によりプラスへと転じて増大を続ける。生物膜付着量が増大したCa濃度域は、表面電位が低い域と一致していると推察される。一方、1価のカチオンである Na^+ は濃度に関わらず付着量を増大させなかった。これは、架橋が生じないことと、表面電位の上昇が起きにくい¹⁾ことによって説明ができそうである。高いバイオガス中の CO_2 濃度と平衡する嫌気性リアクター内液相を想定し、Ca濃度を16mMに固定したまま、

炭酸濃度を変化させていった実験結果が図 1B である。図に示すように炭酸塩形成により Ca^{2+} は減少する。生物膜付着量も炭酸濃度の増大に応じて減少した。以上の結果から、 Ca^{2+} は特定の濃度域で生物膜形成にポジティブな影響を及ぼすが、嫌気性リアクター内では炭酸塩形成のために Ca の実効濃度が変化するので、上の結果とは最適な濃度域が異なる可能性が示された。

次に、 Ca と Na との共存が生物膜形成に及ぼす影響を検討した。あらかじめ行ったグラニュー汚泥に対する Ca および Na の吸着実験から、 Ca と Na の間で吸着の競合が生じることが明らかであった。主要な吸着サイトと考えられる表面官能基はイオン交換性である。図 2 は一定の Ca 濃度下で共存する Na 濃度を变化させた場合の実験結果である(70分測定)。これまで、嫌気性生物膜に対する Na の影響は 10 g/L 以上の極めて高濃度の場合しか検討されて来なかったが、図 2 の結果は 50 mM (約 1 g/L) 以上で、生物膜付着量に対して明らかにネガティブな影響が現れることを示している。このような結果は、 Na の共存なしの際に Ca が吸着されることで生じたポジティブな影響が、吸着カチオンが Na に交換されることで消失したことによると考えられる。そのように考えると、 Ca/Na の比率をより上昇させることが高塩濃度下での生物膜形成の増進に寄与すると考えられるものの、 Ca 濃度の上昇による微生物の障害があるために、そのような手段には限界がある。事実、1 g/L (25 mM) 程度の Ca 濃度において障害が報告されている。

4. 3. カチオンポリマー濃度の生物膜形成に及ぼす影響

上述のようにカチオンが生物膜形成に及ぼす影響の一つとしてカチオン架橋がある。この側面を強化することで、 Na 共存下でも Ca よりも低濃度の条件で生物膜形成にポジティブな影響が得られる可能性がある。本研究では有機系のカチオンポリマーとしてポリ-L-リシン(PLL)を無機系のポリマーとしてポリ硫酸第二鉄と PAC を使用した。図 3 は、150 mM の Na 濃度下での各ポリマーそれぞれの濃度下での生物膜付着量である(70分測定)。各ポリマーの添加は、生物膜付着量の増大に対して有意に寄与していることが確認された。特にポリ硫酸第二鉄の添加による増大が大きかった。PLL については、低分子量のものよりもより複雑なマトリックス形成が期待される高分子量のものの方が生物膜形成に大きな影響を及ぼした。こうしたポリマーは、 Ca よりもはるかに低濃度で、高塩濃度下でも生物膜付着量にポジティブな影響をもたらすことが明らかとなった。また、こうしたポリマーの共存下でメタン生成活性試験を実施したところ、20 mg/L までは顕著な悪影響が発生しないことが確認された。

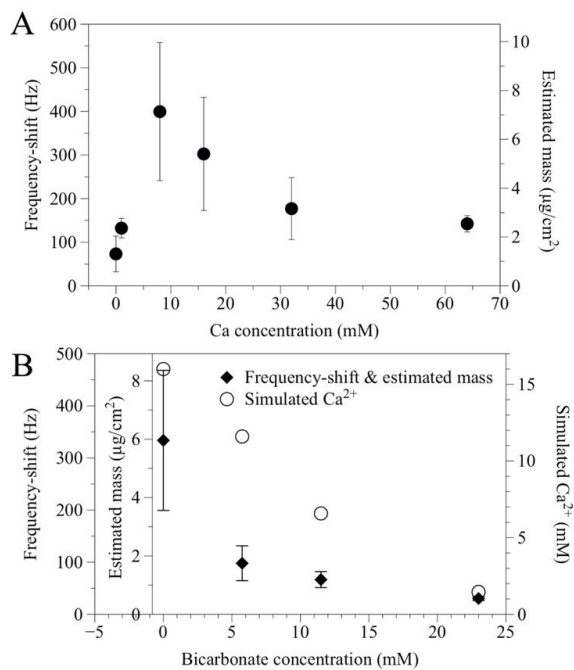


図 1 異なる Ca 濃度下における生物膜形成時の生物膜付着量(A)と 16 mM Ca かつ変化する炭酸濃度下での生物膜形成時の生物膜付着量(B)

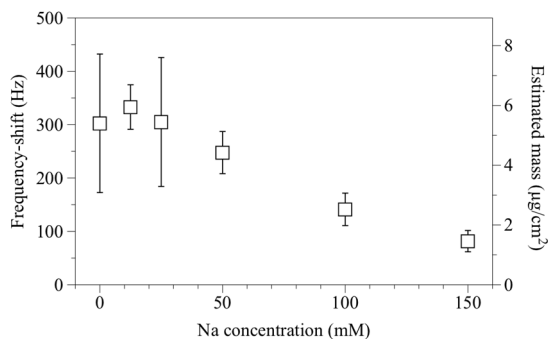


図 2 16 mM の Ca 濃度の下での異なる Na 濃度が生物膜付着量に及ぼす影響

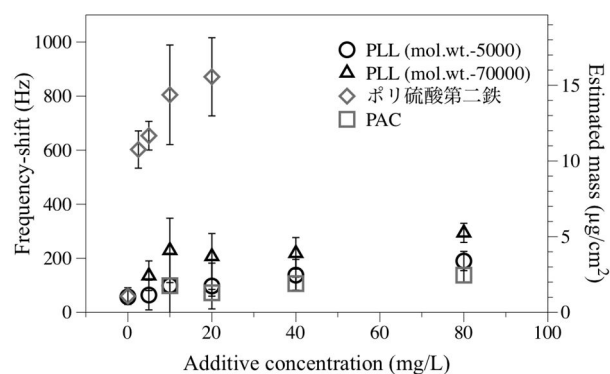


図 3 150 mM の Na 濃度の下での異なる各種カチオンポリマー濃度が生物膜付着量に対して及ぼす影響

4.4. UASB リアクターの処理性能

UASB リアクターの連続実験による処理の状況は図 4 に示す通りであった。実験開始から 19 日目は連続実験のスタートアップ期間である。HRT を 2 日から 1 日に段階的に短縮するに従い、2 台の UASB リアクターのメタンガス生成速度は共に増加したが、Biochar/Fe を添加した系のメタン生成速度は 1.58 L/L/d であり、Biochar/Fe を添加しなかった系の 1.20 L/L/d より高かった。一方、両リアクター内の汚泥濃度は、HRT の短縮に伴い、減少したことが判明した。Biochar/Fe を添加した UASB リアクター内の SS は 21.62 g/L から 19.95 g/L に減少し、Biochar/Fe を添加しなかった UASB リアクター内の SS は 16.36 g/L から 14.09 g/L にまで低下した。これは、高塩濃度による生物膜形成の阻害により、微生物が浮遊し、流出したことを示している。流出水の pH について、2 台の UASB とも処理水の pH は 6.9 以上に維持され、処理自体の問題は認められなかった。

4.5. 培養されたグラニュール汚泥の性状

実験開始 55 日目 (HRT 2 d) と 146 日目 (HRT 1 d) に 2 台の UASB から採取したグラニュール汚泥サンプルの性状を分析した結果を図 5 に示す。HRT 2 d の条件において、両リアクター内のグラニュールの粒径は 4.5 ~ 615 μm の範囲に分布し、Biochar/Fe を添加した系のグラニュールのメジアン径 D50 は 55.01 μm であり、Biochar/Fe 添加なしの系のグラニュールの 46.63 μm より高かった。また、HRT 1 d の条件において、Biochar/Fe を添加した系のグラニュールの粒径分布範囲は 4.5 ~ 875 μm に拡大した一方、Biochar/Fe 添加なし UASB のグラニュールの粒径分布範囲は 4.5 ~ 435 μm に縮小した。Biochar/Fe を添加した UASB のグラニュールのメジアン径 D50 は 63.20 μm であり、Biochar/Fe 添加なしリアクター内のグラニュールの 56.20 μm より高かった。以上の結果から、Biochar/Fe の添加により、UASB リアクターの処理性能が明らかに向上したと、グラニュールを構成する生物膜の発達が促進されたことが明らかとなった。

参考文献

- 1) Pevere A. et al. (2007) Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 306, 142–149

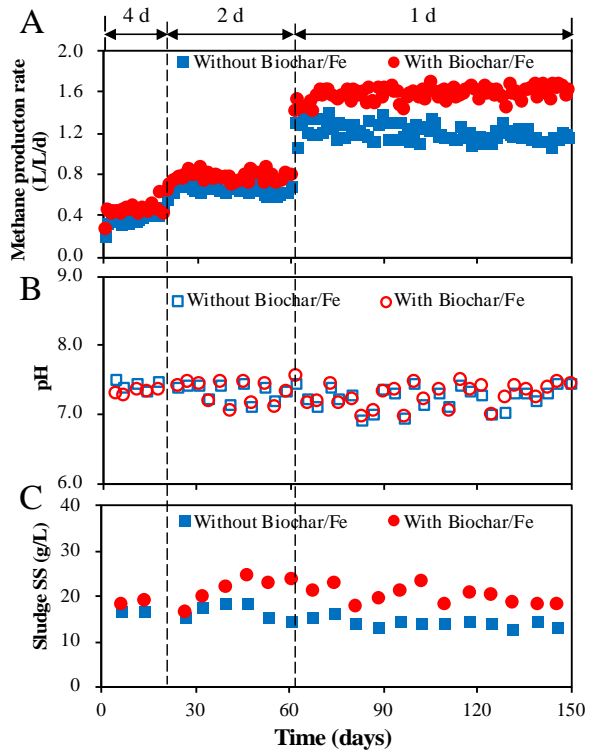


図 4 UASB リアクターの処理状況

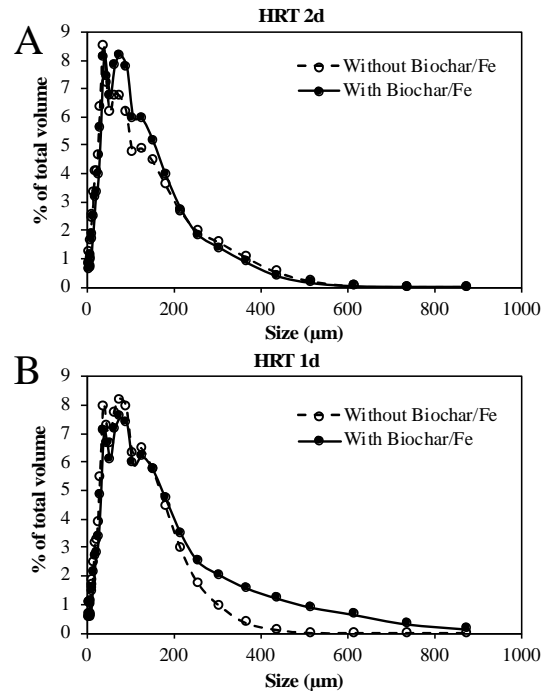


図 5 グラニュール汚泥の粒径分布

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yong Hu, Chen Shi, Takuro Kobayashi, Kai-Qin Xu	4. 巻 27
2. 論文標題 An Integrated Anaerobic System for On-Site Treatment of Wastewater From Food Waste Disposer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Science and Pollution Research	6. 最初と最後の頁 17587-17595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11356-019-06651-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takuro Kobayashi, Hu Yong, Kai-Qin Xu	4. 巻 257
2. 論文標題 Impact of cationic substances on biofilm formation from sieved fine particles of anaerobic granular sludge at high salinity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioresource Technology	6. 最初と最後の頁 69-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yong Hu, Chen Shi, Haiyuan Ma, Takuro Kobayashi, Kai-Qin Xu
2. 発表標題 Biofilm formation enhancement in anaerobic treatment of high salinity wastewater: Effect of ferric polymer addition
3. 学会等名 The 4th International Conference on Alternative Fuels, Energy and Environment (ICAFFEE 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 胡勇, Chen SHI, 馬海元, 小林拓朗, 徐開欽
2. 発表標題 農業残渣の炭化物を活用したメタン生成グラニューールの発達促進
3. 学会等名 SATテクノロジー・ショーケース2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林拓朗、徐開欽
2. 発表標題 嫌気性生物膜形成に及ぼす金属カチオン等の相互作用による影響
3. 学会等名 第21回日本水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi T., Xu K-Q.
2. 発表標題 Monitoring and characterization of biofilm development in anaerobic treatment systems under different conditions using quartz crystal sensor
3. 学会等名 The 2nd International Conference on Alternative Fuels and Energy (ICAFE ' 17) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kobayashi T., Xu K-Q.
2. 発表標題 Monitoring and characterization of biofilm formation in anaerobic treatment systems under different conditions using quartz crystal sensor
3. 学会等名 The 2017 International Environmental Engineering Conference & Annual Meeting of the Korean Society of Environmental Engineers (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考