低温 (20 °C) UASB 反応器と常温 DHS 反応器を組み合わせたシステムによる模擬醤油製造廃水の高負荷連続処理

黒田 恭平^{1,2,3)} 當房 陸¹⁾ 幡本 将史⁴⁾
山口 隆司⁵⁾ 渡部 紀一⁶⁾ 南條 忠彦⁶⁾
山内 正仁¹⁾ 山田 真義^{1),†)}

High Organic Loading Treatment of Synthetic Soy-sauce Production Wastewater Using a Combined System Consisting of a Psychrophilic (20 °C) UASB Reactor and a DHS Reactor at Ambient Temperature

Kyohei KURODA^{1,2,3)}, Atsushi TOBO¹⁾, Masashi HATAMOTO⁴⁾,
Takashi YAMAGUCHI⁵⁾, Norikazu WATANABE⁶⁾, Tadahiko NANJO⁶⁾,
Masahito YAMAUCHI¹⁾ and Masayoshi YAMADA^{1),†)}

¹⁾ Department of Urban Environmental Design and Engineering, National Institute of Technology, Kagoshima College, 1460-1 Shinko, Hayato-cho, Kirishima, Kagoshima 899-5193, Japan

²⁾ Department of Creative Engineering, National Institute of Technology, Kitakyushu College, 5-20-1 Shii, Kokuraminamiku, Kitakyushu, Fukuoka 802-0985, Japan

³⁾ Department of Energy and Environment Science, Nagaoka University of Technology, 1603-1 Kamitomioka, Nagaoka, Niigata 940-2188, Japan

⁴⁾ Top Runner Incubation Center for Academia-Industry Fusion, Nagaoka University of Technology, 1603-1 Kamitomioka, Nagaoka, Niigata 940-2188, Japan

⁵⁾ Department of Science of Technology Innovation, Nagaoka University of Technology, 1603-1 Kamitomioka, Nagaoka, Niigata 940-2188, Japan

⁶⁾ Benears Co.,Ltd., 3-2-37 Mitsu, Matsuyama, Ehime 791-8061, Japan

Abstract

To establish an effective soy-sauce production wastewater treatment system, we designed a combined system consisting of a psychrophilic (20 °C) up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor and a down-flow hanging sponge (DHS) reactor under ambient temperature. The COD removal rate of 87±7% was achieved at a 26±3.6 kgCOD m⁻³ d⁻¹ organic loading rate (6,500±900 mgCOD L⁻¹ as influent synthetic soy-sauce based wastewater) in the UASB reactor. 16S rRNA gene sequence analysis revealed that syntrophs belonging to class *Deltaproteobacteria*, phylum *Firmicutes*, and phylum *Thermotogae*, Bacteria belonging to phylum *Synergistetes*, and methanogens mainly degrade approximately 40% of the COD of soy-sauce-based synthetic wastewater in the UASB reactor. Syntrophic associations require low hydrogen partial pressure because of the difficulty of this reaction. Therefore, this study revealed that the UASB-DHS system can be applied to real soy-sauce production wastewater containing high organics and sodium concentrations because syntrophic associations were well developed.

Keywords: Synthetic soy-sauce production wastewater; Biological wastewater treatment; UASB-DHS system; Microbial community analysis based on 16S rRNA gene sequence

1. はじめに

醤油は日本を代表する調味料の一つであり、日本国内の1,330工場において年間793,363 KL (2013年現在)生産されている¹⁾。醤油の主な製造方法の約8割以上は伝統的な製法である本醸造方式である。醤油製造では、副産物として醤油粕と醤油油、また、製造工程全体から廃

水が発生する(総合廃水)。醤油粕、醤油油については、飼料化、肥料化や重油の代替燃料などとしてほぼ100%再利用がされている。しかし、醤油製造過程の珪藻土ろ過から排出される廃水(以下、醤油製造廃水)は透明度が低く、有機物濃度および塩濃度が高い、特有の臭いを発する有機性廃水であり、再利用は殆ど行われていない。一般的に総合廃水は、活性汚泥法によって処理されてい

1) 国立高等専門学校機構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) 国立高等専門学校機構北九州工業高等専門学校生産デザイン工学科 〒802-0985 福岡県北九州市小倉南区志井 5-20-1

3) 長岡技術科学大学大学院エネルギー・環境工学専攻 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1

4) 長岡技術科学大学産学融合トップランナー養成センター 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1

5) 長岡技術科学大学大学院技術科学イノベーション専攻 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1

6) 株式会社ベネアス 〒791-8061 愛媛県松山市三津 3-2-37

†) 連絡先: m-yamada@kagoshima-ct.ac.jp

るが²⁾、醤油製造廃水は高濃度有機性廃水（約 100,000 mgCOD L⁻¹）であることや、活性汚泥法で処理するには曝気動力にかかるエネルギーの観点からも非効率であるため、効率的な処理方法が求められている。

Up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) 法に代表される嫌気性廃水処理法は様々な高濃度有機性廃水に適用可能、且つ、その処理過程でメタンガスをエネルギーとして回収可能な優れた技術である³⁾。加えて、嫌気性廃水処理法は低温から高温までの幅広い温度条件下で、高カチオン濃度含有廃水や生物毒性含有廃水にも適用されており、使用実績を確実に伸ばしている⁴⁻⁷⁾。しかしながら、嫌気性廃水処理のみでは排水処理基準を十分に満たすことができない。そのため、嫌気性処理により有機物濃度が低減された廃水を曝気不要・省エネルギー型の好気性処理が可能な Down-flow hanging sponge (DHS) 反応器⁸⁾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と考えられる。

醤油製造工場では原料の大豆や小麦の洗浄に地下水を利用することが多い。地下水は年間を通して 16~20 °C 前後（平均約 18 °C）と水温の変化が少ないため⁹⁾、UASB 反応器の温度維持に地下水を利用することができれば、反応器内の温度維持に使用する電力消費量を抑え、且つ、安定した温度管理下で醤油製造廃水のメタン発酵処理が可能となる。一般的なメタン発酵を用いた廃水の生物処理プロセスでは、中温（30-40 °C）条件下での運転が使用されているが、産業廃水は低温で排出されることが多いため、その加温にはエネルギーが必要である⁵⁾。近年、低温（17-19 °C）条件下での Expanded granular sludge bed (EGSB) 反応器を用いた飲料系工場排水の高負荷（15 kgCOD m⁻³ d⁻¹）メタン発酵処理にも成功するなど、低温処理プロセスの実現可能性が示されている¹⁰⁾。そこで本研究では、醤油製造廃水を処理可能な低温（20 °C）UASB 反応器と常温 DHS 反応器を組み合わせた高効率廃水処理システムの開発を目的として、模擬醤油製造廃水の連続処理実験を行い、その処理性能の評価を行った。加えて、反応器内保持汚泥の微生物叢を評価することで本システム内の微生物学的知見の収集を試みた。

2. 実験方法

2.1 UASB-DHS システムと供給廃水

図 1 は本研究で用いた UASB-DHS システムの概要図を示す。Gas Solids Separator (GSS) を含めた UASB 反応器の液容積および DHS 反応器のスポンジ容積はそれぞれ 10 L、20.8 L とした。UASB 反応器の槽内は 20 °C に制御し、DHS 反応器は無加温（10.4-31.1 °C）とした。UASB 反応器の植種汚泥は中温条件（35 °C）で模擬醤油製造廃水を COD 容積負荷 30 kgCOD m⁻³ d⁻¹、COD 除去率 82% で処理していた UASB 反応器のグラニュー汚泥を用い、DHS 反応器には下水処理場の返送汚泥を用いた。本実験で対象とした醤油製造廃水とは、醤油製造の最終工程で排出される廃水であり、市販の醤油とはほぼ同等の組成である。そこで実験では、市販の醤油を水道水で希釈することで供給 COD 濃度を調整し使用した。また、供給廃水の COD の約 40% は揮発性有機酸（VFA、COD あたり：酢酸 48.3%、プロピオン酸 23.6%、*n*-酪酸

図 1 UASB-DHS システムの概要図

表 1 UASB 反応器の運転条件

Phase	運転期間 (day)	UASB 反応器の HRT (hr)	流入 COD 濃度 (mgCOD L ⁻¹)	COD 容積負荷 (kgCOD m ⁻³ d ⁻¹)	塩濃度 (mgNa L ⁻¹)
1	1-85	8	1,600±300*	4.7±0.9	870
2	86-131	6	1,300±400	5.0±1.6	700
3	132-244	6	2,200±600	9.0±2.4	1,190
4	245-377	6	2,900±500	12±2.2	1,570
5	378-455	6	4,200±800	17±3.2	2,280
6	456-656	6	6,500±900	26±3.6	3,520

*±は標準偏差を示す。

11.7%, *i*-酪酸 4.1%, *n*-吉草酸 3.0%, *i*-吉草酸 9.0%, *i*-カプロン酸 0.3%) であった。供給廃水の pH は NaOH を用いて UASB 反応器内の pH が 6.8-7.5 に維持されるように調整した。

2.2 運転条件

表 1 は全運転 656 日間における UASB 反応器の運転条件を示す。本研究では、UASB 反応器の最大許容 COD 容積負荷 (OLR) を調査するために、供給廃水の COD 濃度の上昇および HRT の短縮を行い、3.6-24 kgCOD m⁻³ d⁻¹ に設定し、運転を行った。模擬醤油製造廃水の調整等による人為的誤差のため、設定 OLR と実際の OLR に差が見られたため、以下の OLR は実際の OLR の値を用いた。発生したバイオガスによる UASB 反応器内保持汚泥の流出を防ぐために運転 620 日目 (Phase 6) から原水槽に高級アルコール系の消泡剤 (アンチフロス M-8, ゲンブ) を添加した。消泡剤は原水を作製する際に、作製原水量に対し 0.02% で添加した。

2.3 分析方法

水質分析は原水、UASB 処理水、および DHS 処理水について行った。溶解性試料の分析にはガラス繊維ろ紙 (0.45 μm, GB140, ADVANTEC) でろ過した後の試料を用いた。pH は、ポータブル pH 計 (HM-30P, TOA-DKK) を用い、測定した。全 COD (以下、COD とする) およ

び溶解性 COD は重クロム酸カリウムによる酸素要求量 (DR4000U, HACH) により測定した。また, COD 濃度が 150 mgCOD L⁻¹ 以下は LR (HACH メソッド 2710), 1,500 mgCOD L⁻¹ 以下は HR (HACH メソッド 2720) を使用した。SS, VSS, MLSS, および MLVSS の測定は下水試験方法に準拠した¹¹⁾。溶解性試料に含まれる VFA (酢酸, プロピオン酸, 酪酸, 吉草酸, カブロン酸) は FID 型ガスクロマトグラフ (GC-8A, 島津製作所) により測定した。測定条件はキャリアガスを高純度窒素 (99.995%), 充填剤にサーモン 3000, カラム温度 125 °C, 注入口および検出器温度 200 °C とした。発生バイオガスは脱硫処理を行った後に湿式ガスメーター (W-NK-0.5B, シナガワ) で生成ガス量を測定した。バイオガス中の組成 (CH₄, CO₂, H₂, N₂) は TCD 型ガスクロマトグラフ (GC-8A IT, 島津製作所) で測定した。測定条件はキャリアガスを高純度アルゴン (99.998%), 充填剤にユニビス C, カラム温度 145 °C, 注入口および検出器温度 150 °C とした。

2.4 16S rRNA 遺伝子解析

UASB 反応器内保持汚泥のサンプリングは port 1 (高さ 5 cm), 3 (35 cm), 5 (65 cm) から運転 248 日目および 397 日目に行った。DHS 反応器内保持汚泥は運転 397 日目に box 1 (反応器上部) および box 2 (反応器下部) から採取した。サンプリングした汚泥はニッポンジーンの 10×PBS を滅菌水で 10 倍希釈したリン酸バッファー (1,370 mmol L⁻¹ NaCl, 81 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄, 26.8 mmol L⁻¹ KCl, 14.7 mmol L⁻¹ KH₂PO₄) で洗浄後, DNA 抽出まで -20 °C で保存した。DNA 抽出には FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) を使用した。PCR に用いるプライマーセットは原核生物 16S rRNA 遺伝子を対象とした Univ515F-Univ806R を使用し, PCR 条件は既報に従った¹²⁾。増幅産物は MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN) で精製後, MiSeq (Illumina) を用いて DNA シークエンシングを行った。得られた 16S rRNA 遺伝子配列データの解析は Kuroda *et al.* の方法に従った¹³⁾。Operational taxonomic unit (OTU) の分類は 97 % 以上の相同性を持つ DNA シークエンスを同じグループとした。16S rRNA 遺伝子配列に基づいた系統樹の作成は ARB program package を用い, Greengenes のデータベースを使用した^{14, 15)}。系統樹に用いた長さ 1,000 bp 以上の遺伝子配列は PyNast でアライメントを行った後に, 近隣結合法を用いて樹形を推定した¹⁶⁾。系統樹の樹形の確からしさは 1,000 回の bootstrap 解析により検証した¹⁷⁾。本研究で優占していた OTU は PyNast でアライメントを行った後に ARB の Parsimony Insertion tool を用いて系統的な位置を推定した。優占している OTU はそれぞれの反応器で平均約 2% 以上存在しているものを選択した。Weighted UniFrac tree は得られた全ての OTU の検出率を用い, 樹形の確からしさは QIIME software package を用いて 100 回の Jackknife 解析により検証した¹⁸⁾。代表 OTU の 16S rRNA 遺伝子配列は DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録した (LC094360-LC094383)。

3. 結果および考察

3.1 模擬醬油製造廃水の連続処理実験

図 2 は UASB-DHS システムにおける模擬醬油製造廃水の連続処理実験結果を示す。Phase 1-3 では, 流入 COD 濃度を上昇もしくは HRT を短縮することで UASB 反応器の OLR を 4.7 ± 0.9 kgCOD m⁻³ d⁻¹ から 9.0 ± 2.4 kgCOD m⁻³ d⁻¹ まで上昇させた (図 2A, 以下, $\pm$ は標準偏差を示す)。Phase 1 において, UASB 反応器およびシステム全体の COD 除去率は 21-80% および 24-84% と大きく変動し, UASB 反応器では VFA の突発的な蓄積 (運転 69 日目: 735 mgCOD L⁻¹) が検出され, その組成のほとんどは酢酸 572 mgCOD L⁻¹, プロピオン酸 77 mgCOD L⁻¹ であった (図 2B, C)。全システムとしては Phase 2 から 3 にかけて $87 \pm 7\%$ と, Phase 1 と比較して高い COD 除去率を示した (図 2B)。この要因としては, 1) DHS 反応器保持汚泥の模擬醬油製造廃水への馴養, 2) UASB 反応器の COD 除去性能の向上が考えられる。実際, Phase 1 の UASB 反応器の COD 除去率は $54 \pm 15\%$ であったのに対し, Phase 2-3 では $68 \pm 15\%$ であった。また, Phase 3 では, 分析不可能な時期が 78 日間 (運転 150-227 日目) あったが, 運転 228-244 日目 (Phase 3 の後半) において UASB 反応器および全システムの COD 除去率がそれぞれ $82 \pm 3\%$ および $90 \pm 7\%$ と, Phase 3 前半 (運転 132-149 日目, UASB: $65 \pm 19\%$, 全システム: $84 \pm 6\%$) と比較して高い値を示し, VFA の蓄積も観測されなかった。UASB 反応器および DHS 反応器内保持汚泥の模擬醬油製造廃水への馴養が十分に行われたと考え, Phase 4-6 (運転 245-656 日目) では流入 COD 濃度を $2,900 \pm 600$ mgCOD L⁻¹ から $6,500 \pm 900$ mgCOD L⁻¹ まで変化させることで UASB 反応器の OLR を 9.0 ± 2.4

図 2 UASB-DHS システムの連続処理実験結果
(A) COD 濃度, (B) COD 除去率, (C) 全 VFA 濃度
Inf. は流入廃水, eff. は処理水を示す

kgCOD m⁻³ d⁻¹ から 26±3.6 kgCOD m⁻³ d⁻¹ まで上昇させた (図 2B)。Phase 5 では、Phase 1-3 と比較して短期間で OLR を 17±3.2 kgCOD m⁻³ d⁻¹ (流入 COD 濃度: 4,200±800 mgCOD L⁻¹) まで上昇させたにもかかわらず、COD 除去率は UASB 反応器で 74±5%、システム全体で 85±4% を示した。Phase 6 (OLR: 26±3.6 kgCOD m⁻³ d⁻¹) では、UASB 反応器内で発泡による保持汚泥の槽外への流出および VFA の蓄積が発生し、COD 除去率が 62±10% まで低下したため (図 2B)、運転 620 日目から消泡剤を UASB 反応器に添加し発泡を抑制した。UASB 反応器の COD 除去率が低下した一方で、Phase 6 におけるシステム全体の COD 除去率は 87±7% を示した。そのため、本システムは前段の UASB 反応器の COD 除去性能が低下した場合においても、後段の DHS 反応器が残存有機物を処理することで UASB 反応器における OLR 26±3.6 kgCOD m⁻³ d⁻¹ (流入 COD 濃度: 6,500±900 mgCOD L⁻¹) を許容することが可能であった。また、全運転期間を通じて UASB 反応器における発生バイオガス中の平均メタン濃度は約 80% であった。

図 3 は Phase 5 と 6 (運転 378-656 日目, Phase 5: 17±3.2 kgCOD m⁻³ d⁻¹, Phase 6: 26±3.6 kgCOD m⁻³ d⁻¹) における UASB 反応器の COD 除去速度とメタン生成速度の関係を示す。COD 除去速度とメタン生成速度は比較

図 3 Phase 5 と 6 における UASB 反応器の COD 除去速度とメタン生成速度の関係

的強い相関 ($R^2=0.63$) を示し、除去された COD の約 60% がメタンに転換されていた。本研究で得られた値は、低温 (17-19 °C) 条件下で飲料系工場排水を処理する EGSB 反応器を用いた高負荷 (15 kgCOD m⁻³ d⁻¹) メタン発酵処理において得られたメタン転換率 (約 64%) と近い値を示した¹⁰⁾。Phase 6 では、VFA のうち、主に酢酸、プロピオン酸、*i*-酪酸、*n*-酪酸および *i*-吉草酸が UASB 反応器内で蓄積していた。廃水中の高塩濃度は嫌気性メタン発酵を阻害することや、嫌気性グラニュール汚泥の崩壊を引き起こすことが報告されている^{19, 20)}。本研究では、OLR 26±3.6 kgCOD m⁻³ d⁻¹ まで有機物負荷を上昇させるにつれ、塩濃度が増加し、Phase 6 における流入廃水中の塩濃度は約 3.5 gNa L⁻¹ まで増加した。本研究で得られた最大 OLR での塩濃度は、既往の阻害濃度 (塩濃度阻害によってメタン生成量が通常の 50% まで低減する濃度, IC₅₀: 5.6-53 gNa L⁻¹)¹⁹⁾ と比較して低い値ではあるが、微生物群集への塩濃度の影響は廃水の組成、リアクターの運転条件、他のカチオン類の存在によって大きく変わってくること²¹⁾、Phase 6 において COD 除去率の低下が見られたことから (図 2B)、本研究で用いた UASB 反応器内保持汚泥にも塩濃度が影響を与えた可能性が考えられた。

3.2 UASB 反応器基軸高さ方向の水質プロファイル

高負荷条件下 (Phase 5: 17±3.2 kgCOD m⁻³ d⁻¹, Phase 6: 26±3.6 kgCOD m⁻³ d⁻¹) における UASB 反応器の廃水処理過程を調査するために、運転 437 日目 (Phase 5)、運転 468 日目 (Phase 6 前半) および運転 642 日目 (Phase 6 後半) での UASB 反応器基軸高さ方向の水質プロファイルを測定した (図 4)。

運転 437 日目 (Phase 5) および運転 468 日目 (Phase 6 前半) では、流入した溶解性 COD の 85% 以上が port 3 (高さ 35 cm) までで除去されていた (図 4A)。加えて、流入した VFA も ≤ 40 mgCOD L⁻¹ まで減少 (流出時) し、pH の低下 (全高さ方向で約 7.0) も見られなかったことから、UASB 反応器では溶解性 COD および VFA の除去が行われていた (図 4B, C)。また、Phase 5 および Phase 6 前半期間では、port 1-5 まで 20

図 4 UASB 基軸高さ方向における水質プロファイル結果
(A) 溶解性 COD 濃度, (B) VFA 濃度, (C) pH, (D) MLVSS 濃度
Inf. は流入廃水, eff. は処理水を示す

gMLVSS L⁻¹ の汚泥量を維持していた (図 4D)。

運転 642 日目 (Phase 6 後半) では, Phase 5 および Phase 6 前半と比較して低い有機物除去率を示した (図 4A, 流出時 1,460 mgCOD L⁻¹, 溶解性 COD 除去率約 76 %)。VFA は, 約 210 mgCOD L⁻¹ 程度残存しており (流出時), 特にプロピオン酸が約 100 mgCOD L⁻¹ 程度残存していた (図 4B)。これらの原因としては port 5 (65 cm) での保持汚泥量の減少が考えられ, 運転 468 日目 (Phase 6 前半) と比較すると約 30 gMLVSS L⁻¹ から 6 gMLVSS L⁻¹ まで減少していた (図 4D)。これは上述した UASB 反応器内での発泡により, UASB 反応器内で保持していた汚泥が流出し, 汚泥界面が減少することで, 残存 VFA を分解するための微生物量が保持できなかったためと考えられた。一方で, 消泡剤添加前 (運転 587–619 日) と添加後 (運転 620 日以降) の UASB 流出水中の VFA を比較すると, 消泡剤添加前が 326–884 mgCOD L⁻¹ であったのに対し, 消泡剤添加後は 0–383 mgCOD L⁻¹ であった (図 2C)。そのため, 実醬油製造廃水処理システムの

実現のためにも, 流入 COD 濃度 $6,500 \pm 900$ mgCOD L⁻¹, OLR 26 ± 3.6 kgCOD m⁻³ d⁻¹ 程度の高負荷条件下で UASB 反応器を運転する際には, 消泡剤の添加を行うなど, 発泡による汚泥の流出を防ぐ運転管理が重要になると考えられた。

3.3 低温 UASB- 常温 DHS システム内保持汚泥の微生物群集構造解析

3.3.1 優占して存在する OTU の分子系統解析

本研究では, 16S rRNA 遺伝子に基づき, 低温 UASB- 常温 DHS システム内保持汚泥の微生物叢解析を, 運転条件が異なる 248 日目 (Phase 4, 12 ± 2.2 kgCOD m⁻³ d⁻¹) と 397 日目 (Phase 5, 17 ± 3.2 kgCOD m⁻³ d⁻¹) に行なうことで, OLR 増加に伴う微生物群集構造変化を評価した。Phase 4 および Phase 5 において, *Euryarchaeota* 門, *Deltaproteobacteria* 綱, *Firmicutes* 門, *Synergistetes* 門, *Bacteroidetes* 門に属する OTU が優占して検出された (図 5)。Jackknife-supported weighted UniFrac 解析の結果, 運転 248 日目では UASB 反応器の port 1, 3, 5

図 5 UASB 反応器及び DHS 反応器内保持汚泥中の微生物叢解析結果
P1, P3, P5 は UASB 反応器の Port 1, 3, 5 を示す。B1 及び B2 は DHS 反応器の box 1, 2 を示す。

において優占して存在している微生物群に殆ど変化が無い一方で、運転 397 日目では port 5 のみが異なる微生物叢を示しており、全ての node で 95% 以上支持されていた (図 6)。DHS 反応器では *Clostridiaceae* 科に属する微生物群を除いて、上部 (box 1) と下部 (box 2) で異なる微生物群が優占して存在していた (図 5, 図 6)。

UASB 反応器内保持汚泥中の細菌では, *Syntrophaceae* 科, *Syntrophobacter* 属, *Syntrophomonas* 属に属する栄養共生菌が優占して検出 (平均 2% 以上) された (図 5)。これら微生物群は、水素資化性の微生物群と共生関係を担うことで VFA などを分解することが知られており^{22, 23)}, 廃水中の約 40% を占める VFA, および、模擬醤油製造廃水分解過程において生成される VFA の除去に関与していると考えられた。加えて、嫌気性廃水処理汚泥中で普遍的に存在する SA-8 (*Spirochaetes* 門) や *Bacteroidales* 目に属する未培養微生物群も存在割合 2% 以上と優占して検出された。これらのグループに属する分離株はアミノ酸分解や、タンパク質などの高分子化合物を加水分解することが知られている。加えて、メタゲノムおよびメタトランスクリプトム解析により、SA-8 に属する “*Ca. Arginisinisyntrpha thermophila*” はアルギニン分解する栄養共生細菌であることが示唆されている²⁵⁾。醤油はアミノ酸を豊富に含んでおり、これら微生物群が模擬醤油製造廃水中のタンパク質やアミノ酸分解を担っている可能性が示唆された。

DHS 反応器において、反応器上部 (box 1) では、デンプンなどの高分子化合物の加水分解や糖などを利用する *Sphingobacterium* 属²⁵⁾ や *Leadbetterella* 属²⁶⁾ に近縁な OTU7331 と OTU4741 が box 1 特異的に存在していた (図 5)。一方、反応器下部 (box 2) では、アンモニア酸化細菌として知られている *Nitrosospira* 属²⁷⁾ (OTU6684)、酢酸などを電子供与体として脱窒を行なう細菌を含む *Rhodanobacter* 属²⁸⁾ に近縁な OTU3463 と OTU12039 が box 2 特異的に検出された。本研究では、

有機物除去を目的としたために窒素濃度を測定していないが、微生物叢解析の結果から、DHS 反応器上部では *Sphingobacterium* 属, *Leadbetterella* 属や *Clostridiaceae* 科による高分子化合物の加水分解などによる有機物分解が、DHS 反応器下部では *Clostridiaceae* 科による残存有機物の分解や *Nitrosospira* 属および *Rhodanobacter* 属による窒素除去が行われている可能性が考えられた。DHS 反応器では、スポンジの表面に好気性細菌や硝化細菌が増殖し、その内側には嫌気性細菌もしくは脱窒細菌が保持されることが報告されており²⁹⁾, DHS 反応器下部におけるアンモニア酸化細菌および脱窒細菌の検出結果は、これまでの報告と同様に、DHS 反応器内で窒素除去が起こっていることを示唆するものであった。

3.3.2 UASB 反応器内保持汚泥中の VFA 分解微生物群

本研究で用いた模擬醤油製造廃水の COD の約 40% は VFA で構成されているため、UASB 反応器中の有機物分解のためには VFA 分解微生物群の存在が重要である。図 7 は運転 397 日目 (Phase 5, OLR 17 ± 3.2 kgCOD $m^{-3} d^{-1}$) における UASB 反応器の基軸高さ方向 VFA プロファイルと VFA 分解微生物群の検出パターンを示す。Phase 5 において、561 mgCOD L^{-1} で流入した酢酸は port 1 で速やかに 105 mgCOD L^{-1} まで分解され、port 3 以降では、41 mgCOD L^{-1} まで低下した (図 7A)。酢酸資化性メタン生成古細菌として知られる *Methanosaeta* 属に属する OTU5583 は酢酸分解が生じた port 1 と 3 で約 9.0% 存在しており、その後、port 5 では 4.4% まで低下した。加えて、近年のオミクスアプローチにより、水素資化性微生物と栄養共生関係を持ち酢酸酸化を行うことが推定された *Mesotoga* 属²⁴⁾ の OTU1342, microautoradiography-fluorescence *in situ* hybridization 法と RNA-stable isotope probing 法を組み合わせたアプローチにより酢酸利用性微生物として推定された系統分類に近縁な OTU5101 (HA73, *Synergistetes* 門)³⁰⁾ も OTU5583 (*Methanosaeta*) と同様の検出パターンを示した (図 7A)。この挙動は UASB 反応器内の酢酸の消費と一致しており、これら微生物群が廃水中の酢酸を分解していると考えられた。プロピオン酸においても約 400 mgCOD L^{-1} で流入し、port 1 で約 170 mgCOD L^{-1} , port 3 で 30 mgCOD L^{-1} まで減少した (図 7B)。プロピオン酸を分解する栄養共生細菌である *Syntrophobacter* 属, *Smithella* 属に属する OTU6056, OTU2527, OTU12213 は port 1, 3 で約 3-4% 程度存在し、プロピオン酸が殆ど消費された port 5 では約 1% の存在割合まで低下した。プロピオン酸分解反応の進行のためには、他の VFA と比較して極めて低い水素分圧が重要であることが報告されており²³⁾, Phase 5 における UASB 反応器内のプロピオン酸の挙動およびプロピオン酸分解微生物群の検出パターンから、OLR 17 ± 3.2 kgCOD $m^{-3} d^{-1}$ の高負荷条件下においても低水素分圧を維持出来ていたことが示唆された。酪酸および吉草酸では、*i*-酪酸と *n*-吉草酸の濃度は流入から port 1 にかけてそれぞれ 32 から 90 mgCOD L^{-1} , 12 から 21 mgCOD L^{-1} と増加したが、port 5 までで完全に消費された。*n*-酪酸 (流入 147 mgCOD L^{-1}) と *i*-吉草酸 (87 mgCOD L^{-1}) も同様に port 5 までで検出限界レベルまで減少した (図 7C)。そのため、phase 5 では、吉草酸および酪酸の蓄積は見られず、VFA 分解微生物群によって速やかに消費さ

図 6 運転 248 日目 (Phase 4) 及び 397 日目 (Phase 5) における各汚泥サンプル中の OTU 検出率に基づいた Jackknife-supported weighted UniFrac tree

図7 Phase 5におけるUASB反応器の基軸高さ方向のVFAプロファイルとVFA分解微生物群の検出パターン
(A) 酢酸分解微生物, (B) プロピオン酸酸化細菌, (C) 酪酸及び吉草酸分解細菌

れていると考えられた。しかしながら、吉草酸もしくは酪酸分解可能な *Syntrophomonas* 属²²⁾ に属する OTU7740 は port 1 および 3 で約 1% 程度しか検出されなかった (図 5, 図 7C)。一方で、OTU5584 が port 1 から 3 にかけて 5.6% と優占して検出された。この OTU は *S. propionica* strain LYP (NR_024989) に 93% (233/251 bp), *S. aciditrophicus* strain SB (NR_102776) に 92% (230/251 bp) と比較的近縁であるため、これら微生物と同様にプロピオン酸、酪酸もしくは安息香酸分解性栄養共生細菌である可能性が示唆された^{31, 32)}。以上の結果から、UASB 反応器内における模擬醤油製造廃水中の VFA は、酢酸：メタン生成古細菌および *Synergistetes* 門と *Mesotoga* 属に属する酢酸酸化細菌、プロピオン酸：*Deltaproteobacteria* 綱に属する栄養共生細菌と水素酸化性メタン生成古細菌、酪酸および吉草酸：*Deltaproteobacteria* 綱および *Firmicutes* 門に属する栄養共生細菌と水素酸化性メタン生成古細菌により分解されていることが示唆された。

4. まとめ

本研究では、実醤油製造廃水に適用可能な処理システムの開発を目的として、低温 UASB- 常温 DHS システムによる模擬醤油製造廃水の連続処理実験および保持汚泥の微生物叢解析を行った。本研究で得られた主な結論を以下に示す。

- 1) UASB-DHS システムは、塩濃度約 3.5 gNa L⁻¹, 流入 COD 濃度 6,500 ± 900 mgCOD L⁻¹ および UASB 反応器の OLR : 26 ± 3.6 kgCOD m⁻³ d⁻¹ の条件下で 87 ± 7% の COD 除去率を達成し、UASB 反応器の有機物除去能力が低下した場合においてもシステムとしては有機物除去能力を維持していた。
- 2) UASB 反応器の単独処理では、消泡剤を添加せずに有機物を除去可能な最大許容 OLR は、OLR : 17 ± 3.2 kgCOD m⁻³ d⁻¹ であり、UASB 反応器の COD 除去率は 74 ± 5% を示した。
- 3) UASB 基軸高さ方向の水質プロファイルの結果、高負荷 (OLR : 26 ± 3.6 kgCOD m⁻³ d⁻¹) 条件下で UASB 反応器の運転を行う際には、消泡剤の添加

を行うなど、UASB 反応器保持汚泥の流出を防ぐための運転管理が重要であることが示唆された。

- 4) Phase 5 (OLR 17 ± 3.2 kgCOD m⁻³ d⁻¹) における UASB 反応器の基軸高さ方向の VFA プロファイルと VFA 分解微生物群の検出パターンを評価した結果、酢酸、プロピオン酸、酪酸および吉草酸は *Deltaproteobacteria* 綱, *Firmicutes* 門, *Thermotogae* 門に属する栄養共生細菌, *Synergistetes* 門細菌およびメタン生成古細菌によって分解されていることが示唆され、低温・高有機物負荷運転条件下においても、UASB 反応器内では栄養共生関係を維持できていると考えられた。

謝 辞

本研究実施にあたりメンテナンスや分析作業に尽力して頂いた鹿児島工業高等専門学校の有村圭右氏 (現：日特建設株式会社)、溝口直人氏 (現：通信土木コンサルタント株式会社) に深く感謝の意を表します。また、本研究の一部は JST マッチングプランナー (課題番号：MP27115663589) から助成を受け実施されました。ここに記して感謝の意を表します。

(原稿受付 2016 年 2 月 22 日)

(原稿受理 2016 年 11 月 17 日)

参 考 文 献

- 1) しょうゆ情報センター, 2015. 醤油の統計資料平成 27 年版. URL. <https://www.soyasauce.or.jp/arekore/> (2016 年 2 月時点).
- 2) 一般財団法人食品産業センター, 醤油製造工場 HACCP 手法導入マニュアル (醤油工場の一般衛生管理事項). URL. https://www.shokusan.or.jp/haccp/guide/pdf/3_2_5_syouyu_2.pdf (2016 年 2 月時点).
- 3) Kleerebezem, R., Macarie, H., 2003. Treating industrial wastewater: Anaerobic digestion comes of age. *Chemical Engineering* 110(4), 56-64.
- 4) Kuroda, K., Chosei, T., Nakahara, N., Hatamoto, M., Wakabayashi, T., Kawai, T., Araki, N., Syutsubo, K., Yamaguchi, T., 2015. High organic loading treatment for industrial molasses wastewater and microbial community shifts corresponding to system development. *Bioresource Technology* 196, 225-234.
- 5) Lettinga, G., Rebec, S., Zeeman, G., 2001. Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment. *Trends in*

- Biotechnology 19(9), 363–370.
- 6) Veeresh, G.S., Kumar, P., Mehrotra, I., 2005. Treatment of phenol and cresols in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) process: a review. *Water Research* 39(1), 154–170.
 - 7) Yamada, M., Harada, H., Yamauchi, M., Yamaguchi, T., Ohashi, A., 2013. Reduction of alkali supplement in a pilot-scale thermophilic multi-staged UASB reactor treating alcohol distillery wastewater. *International Journal of Environmental Research* 7(4), 823–830.
 - 8) Kubota, K., Hayashi, M., Matsunaga, K., Iguchi, A., Ohashi, A., Li, Y.Y., Yamaguchi, T., Harada, H., 2014. Microbial community composition of a down-flow hanging sponge (DHS) reactor combined with an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor for the treatment of municipal sewage. *Bioresource Technology* 151, 144–150.
 - 9) 有田明人, 松本源生, 石橋融子, 馬場義輝, 2013. 福岡県の地下水温について. 福岡県保健環境研究所年報 40, 133–134.
 - 10) 藤本典之, 稲葉英樹, 窪田恵一, 珠坪一晃, 2013. EGSB 法による飲料系工場排水の無加温メタン発酵処理技術の開発. 土木学会論文集 G (環境) 69(7), 623–630.
 - 11) 建設省都市局下水道部, 厚生省生活衛生局水道環境部監修, 1997. 下水試験方法 (上巻). 日本下水道協会, 東京.
 - 12) Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S. M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J.A., Smith, G., Knight, R., 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME Journal* 6(8), 1621–1624.
 - 13) Kuroda, K., Hatamoto, M., Nakahara, N., Abe, K., Takahashi, M., Araki, N., Yamaguchi, T., 2015. Community composition of known and uncultured archaeal lineages in anaerobic or anoxic wastewater treatment sludge. *Microbial Ecology* 69(3), 586–596.
 - 14) 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., Grumann, 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., Schleifer, K.H., 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* 32(4), 1363–1371.
 - 15) McDonald, D., Price, M.N., Goodrich, J., Nawrocki, E.P., DeSantis, T.Z., Probst, A., Andersen, G.L., Knight, R., Hugenholtz, P., 2012. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of *Bacteria* and *Archaea*. *ISME Journal* 6(3), 610–618.
 - 16) Caporaso, J.G., Bittinger, K., Bushman, F.D., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Knight, R.J., 2010. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 26(2), 266–267.
 - 17) Felsenstein, J., 1985. Confidence-limits on phylogenies — an approach using the bootstrap. *Evolution* 39(4), 783–791.
 - 18) Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Pena, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7(5), 335–336.
 - 19) Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technology* 99(10), 4044–4064.
 - 20) Vallero, M.V.G., Pol, L.W.H., Lettinga, G., Lens, P.N.L., 2003. Effect of NaCl on thermophilic (55 degrees C) methanol degradation in sulfate reducing granular sludge reactors. *Water Research* 37(10), 2269–2280.
 - 21) Kugelman, I.J., Chin, K.K., 1971. Toxicity, synergism, and antagonism in Anaerobic waste treatment processes. *Advances in Chemistry Series* 105, 55–90.
 - 22) Worm, P., Koehorst, J.J., Visser, M., Sedano-Nunez, V.T., Schaap, P.J., Plugge, C.M., Sousa, D.Z., Stams, A.J., 2014. A genomic view on syntrophic versus non-syntrophic lifestyle in anaerobic fatty acid degrading communities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1837(12), 2004–2016.
 - 23) Schink, B., Stams, A.J.M., 2006. Syntrophism among prokaryotes. Springer, New York, U.S.A.
 - 24) Nobu, M.K., Narihiro, T., Rinke, C., Kamagata, Y., Tringe, S.G., Woyke, T., Liu, W.T., 2015. Microbial dark matter ecogenomics reveals complex synergistic networks in a methanogenic bioreactor. *ISME Journal* 9(8), 1710–1722.
 - 25) Kim, K.H., Ten, L.N., Liu, Q.M., Im, W.T., Lee, S.T., 2006. *Sphingobacterium daejeonense* sp. nov., isolated from a compost sample. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56(9), 2031–2036.
 - 26) Weon, H.Y., Kim, B.Y., Kwon, S.W., Park, I.C., Cha, I.B., Tindall, B.J., Stackebrandt, E., Trüper, H.G., Go, S.J., 2005. *Leadbetterella byssophila* gen. nov., sp. nov., isolated from cotton-waste composts for the cultivation of oyster mushroom. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55(6), 2297–2302.
 - 27) Norton, J.M., Klotz, M.G., Stein, L.Y., Arp, D.J., Bottomley, P.J., Chain, P.S., Hauser, L.J., Land, M.L., Larimer, F.W., Shin, M.W., Starkenburg, S.R., 2008. Complete genome sequence of *Nitrosospora multiformis*, an ammonia-oxidizing bacterium from the soil environment. *Applied and Environmental Microbiology* 74(11), 3559–3572.
 - 28) Nalin, R., Simonet, P., Vogel, T.M., Normand, P., 1999. *Rhodanobacter lindaniclasticus* gen. nov., sp. nov., a lindane-degrading bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49(1), 19–23.
 - 29) Onodera, T., Tandukar, M., Sugiyana, D., Uemura, S., Ohashi, A., Harada, H., 2014. Development of a sixth-generation down-flow hanging sponge (DHS) reactor using rigid sponge media for post-treatment of UASB treating municipal sewage. *Bioresource Technology* 152, 93–100.
 - 30) Ito, T., Yoshiguchi, K., Ariesyady, H.D., Okabe, S., 2011. Identification of a novel acetate-utilizing bacterium belonging to *Synergistes* group 4 in anaerobic digester sludge. *ISME Journal* 5(12), 1844–1856.
 - 31) Liu, Y., Balkwill, D.L., Aldrich, H.C., Drake, G.R., Boone, D.R., 1999. Characterization of the anaerobic propionate-degrading syntrophs *Smithella propionica* gen. nov., sp. nov. and *Syntrophobacter wolinii*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49(1), 19–23.
 - 32) Jackson, B.E., Bhupathiraju, V.K., Tanner, R.S., Woese, C.R., McInerney, M., 1999. *Syntrophus aciditrophicus* sp. nov., a new anaerobic bacterium that degrades fatty acids and benzoate in syntrophic association with hydrogen-using microorganisms. *Archives of Microbiology* 171(2), 107–114.

[論 文 要 旨]

本研究では、醤油製造廃水に適用可能な処理システムの構築を最終目的として、地下水の加温利用を考慮した創エネルギー型である低温 UASB 反応器と省エネルギー型好気性処理である無加温 DHS 反応器を組み合わせたシステムにより模擬醤油製造廃水の連続処理実験を行った。その結果、UASB-DHS システムは、塩濃度約 3.5 gNa L^{-1} 、流入 COD 濃度 $6,500 \pm 900 \text{ mgCOD L}^{-1}$ および UASB 反応器における有機物負荷 $26 \pm 3.6 \text{ kgCOD m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ の条件下で $87 \pm 7\%$ の COD 除去率を達成した。また、16S rRNA 遺伝子解析に基づいた微生物叢解析の結果、廃水中の COD の約 40% を占める揮発性有機酸は *Deltaproteobacteria* 綱, *Firmicutes* 門, *Thermotogae* 門に属する栄養共生細菌, *Synergistetes* 門細菌とメタン生成古細菌により分解されていることを推定した。

キーワード：模擬醤油製造廃水；生物学的廃水処理；UASB-DHS システム；微生物群集構造解析