

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：53101  
 研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22360217  
 研究課題名（和文） 原生動物の高濃度培養による都市下水処理UASBの安定化および高機能化  
 研究課題名（英文） High efficiency and stability in the UASB fed with domestic sewage by high abundance of anaerobic protozoa  
 研究代表者  
 荒木 信夫 (ARAKI, Nobuo)  
 長岡工業高等専門学校・環境都市工学科・教授  
 研究者番号：30193072

研究成果の概要（和文）：都市下水処理UASB内に生息する嫌気性原生動物種ごとの季節変動を把握するため、顕微鏡観察による原生動物の計測と18S rRNA遺伝子を標的としたクローニング解析及びダイレクトシーケンス解析による同定を行った。原生動物は水温の変化によって増減し、最大 $11 \times 10^3$  cells/mL（秋期）、最低で0 cells/mL（春期）となった。UASB内には*Metopus contortus*が優占していた。*Metopus sp*の一細胞をマイクロマニピュレーターを用いて捕獲し、古細菌の16S rRNA遺伝子クローニングやFISH解析を行ったところ、酢酸資化性メタン生成古細菌が $10^4$  cellsレベルで共生していた。原生動物の有無による連続実験の結果*Metopus sp*はUASB内のバクテリア細胞を含む浮遊性成分を捕食していた。

研究成果の概要（英文）：Identification of anaerobic protozoa in an UASB pilot plant treating domestic municipal sewage was carried out by 18S rRNA gene cloning to clear how many species existed in. Abundances according to each species were measured by microscopic direct counts throughout three years. *Metopus contortus*, *Metopus palaeformis*, *Trimyema compressum* were predominance as a protozoan in the UASB when present in large numbers. Total cell number of the protozoa shifted with changes in temperature of the sewage, and up to  $11 \times 10^3$  cells/mL (fall) and became 0 cells/mL (spring). FISH analysis to *Metopus contortus* revealed that hydrogen utilizing methanogen present at a level of  $10^4$  cells in one protozoan cell as their symbiotic bacteria. *Metopus sp* played a important role to reduce MLSS in the UASB by their predation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
平成 23 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
平成 24 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野： 工学  
 科研費の分科・細目： 土木工学・土木環境システム  
 キーワード： 都市下水処理，嫌気性処理，原生動物，メタン生成古細菌

1. 研究開始当初の背景
- |                     |                             |
|---------------------|-----------------------------|
| 都市下水の処理は、標準活性汚泥法に代表 | される好気性処理法と、Upflow Anaerobic |
|---------------------|-----------------------------|

Sludge Blanket (UASB)法に代表される嫌気性処理法に大別される。活性汚泥法は処理水質が良好であるが、曝気と汚泥処理のためにエネルギー消費が膨大であるといった問題を有する。UASB法は、エアレーション不要で省エネルギーであるばかりでなく、余剰汚泥の発生量が少ない、メタン回収が可能などの利点を有している。これにより、産業廃水処理の分野ではすでに国内外で広く普及している。さらに、発展途上国では運転コストが安価であり、不安定な電力供給であっても比較的プロセスの処理性能の維持が可能であることから、都市下水処理への適用が進められている。また、日本国内においても次世代の低炭素技術となりうるUASB法の下水処理への適用実験が行われている。

都市下水の初沈越流水を連続処理するUASBパイロットプラントの保持汚泥を顕微鏡により観察したところ、嫌気性原生動物は保持汚泥1mL中に約 $10^3 \sim 10^4$ cellsと自然環境中に比べ高密度に存在していることが判明した。

これまでに、産業廃水を処理するUASBの保持汚泥を用いて連続攪拌槽とバイアル瓶での培養実験を行い、嫌気性原生動物は有機物除去、特に非溶解性有機物除去に直接的に関与し、系内の汚泥量を低下させ、メタン生成量が増加するとしている。さらに、嫌気性原生動物の活動がメタン生成古細菌の活性を向上させ、メタン生成率の上昇に貢献すると報告されている。このことから嫌気性原生動物はUASBの処理能力の向上に寄与していると考えられる。しかし、都市下水を処理するUASB内に嫌気性原生動物に関する報告はこれまでに数件に留まり、そのプロセスへの影響は全く判明していないのが実態である。

## 2. 研究の目的

処理槽内に生息する嫌気性原生動物の基礎的知見を集めることを目的とし、都市下水の初沈越流水を連続処理するUASBパイロットプラント内に生息する嫌気性原生動物の種の同定をするとともに、優占種と細胞数の年間を通じての変化を追跡し、UASB内に生息する嫌気性原生動物の挙動を把握した。

また、ラボスケールのリアクターを使用して原生動物の共生する系、共生しない系を作製して培養を行い、それぞれの系での処理性能の違いや、リアクター内の原生動物

の優占種、細胞数を比較することで原生動物の共存がプロセスに与える影響を明らかにした。さらに、分子生物学的手法を適用して原生動物内に共生している細菌叢の解析を行い、その食物環を明らかにした。

## 3. 研究の方法

### (1) パイロットスケール実験

UASBパイロットプラントの全容積は1148L、高さは5.1mであり、長岡中央浄化センターに設置し、HRTを8時間に設定して初沈越流水を連続通水した。装置は無加温であり、年間を通して流入水温下で運転した。実験期間中はCOD除去率、メタン回収率、流出SS濃度、槽内MLSSを定期的に測定した。



図1 都市下水処理UASBリアクター

### (2) ラボスケールUASB実験

ラボスケールリアクターは500mL容積であり、基質としてはグルコース、酢酸、実都市下水を用いて有機物容積負荷 $1 \sim 4$ g-COD/L/dayで連続運転した。この実験ではCOD除去率といった処理性能や槽内のMLSSを定期的に測定した。また、実験は $25^{\circ}\text{C}$ で実施した。また、原生動物の共生しない系の作製においては、真核生物の抗生物質であるシクロヘキシミド(1000mg/L)を添加後、 $4^{\circ}\text{C}$ 下で12時間放置し、さらに $5^{\circ}\text{C}$ の低温条件で12時間放置することによって原生動物のみを死滅させた。

### (2) 原生動物の計測と18S rRNA遺伝子クローニング解析

パイロットおよびラボスケールUASB内に生息する原生動物の計測は顕微鏡観察下で実施した。スライドガラスに汚泥サンプル $10 \mu\text{L}$ を滴下し、蛍光顕微鏡下でカバーガラス全視野を観察し、原生動物の個体数をカウントした。

原生動物の種を特定するために、18S rRNA遺伝子を標的としたクローニング解析を実

施した。パイロットプラント、ラボスケールリアクターで採取した汚泥、またはマイクロマニピュレーターで採取した一細胞についてDNAを回収し、真核生物の18S rRNA遺伝子をPCR増幅した。プライマーペアはEukAとMedlinB, PSSU-342fとMedlinBの2種のプライマーセットを使用した。得られた増幅産物はTOPO Cloning Kitによってクローン化し、シーケンス解析を行った。

原生動物内に生息しているメタン生成古細菌のFISH解析を行った。使用したプローブは、古細菌の16SrRNAに特異的なARCH915, *Metanosaeta* 属に特異的なMX825, *Microbiales*目に特異的なMG1200bとした。

#### 4. 研究成果

##### (1) パイロットスケールUASB

パイロットスケールUASB内の水温は、最高で28.0°C (375日目)、最低で9.6°C (1624日目)となった。全COD除去率は58±16%, SS除去率は64±23%, メタン転換率は35±14%であった。実験期間を通じて安定した処理水質を維持していた。

全原生動物細胞数は、水温の変化に対応して増減し、最高で $(1.1 \pm 0.6) \times 10^4$  cells/mL (2010年11月)、最低で $0.0 \pm 0.0$  cells/mL (2012年1・3月)となった。いずれの年も7月頃に細胞数が増加し始め、11月にその年の最大値を取り、その後は細胞数が減少した。嫌気性原生動物である *Metopus* spは30-35°Cが至適温度との報告があり、UASB内の原生動物にも同様に至適温度があると考えられる。

また、季節ごとの水温が同じであっても、全原生動物細胞数とその出現種の多様性に著しい違いが見られた。2010年は全原生動物細胞数は $2.0 \times 10^3$  cells/mLレベルに達し、顕微鏡観察で細胞を形態的に判断すると13種が確認できた。2011年は $1.1 \times 10^4$  cells/mLと細胞数が増大し、形態的には7種が確認できた。一方、2012年は、 $5.6 \times 10^2$  cells/mLレベルまでしか細胞数は増大せず、出現した種も4種のみであった。その原因として2010年3月から約1ヶ月間のUASB停止が考えられる。原生動物は、溶解性基質と不溶性基質のどちらも利用できると報告されている。本UASB内の原生動物が何を基質として利用していたかは不明であるが、下水の流入停止によって原

生動物の基質となりうるバクテリアの増殖が抑制されたことや溶解性基質の供給が途絶えたことが原生動物細胞数の減少を招いたと考えられる。しかし、嫌気性原生動物の増減条件に関してはまだ未解明な部分が多く、UASB停止以降、約1年に渡って嫌気性原生動物が増加しなかった理由は不明である。

流入下水中の原生動物細胞数も同様の計測方法で定量したが、下水中からは極めて低量の細胞数しか確認できなかった。つまり、UASB内の原生動物は流入下水から混入するのではなくUASB内で増殖していると判断できる。

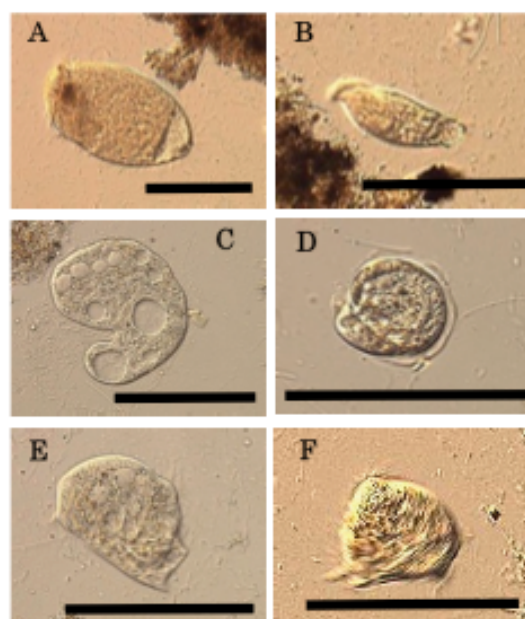


図 UASBに生息している原生動物  
(スケールバーは100 $\mu$ m)

リアクターの高さ方向における原生動物の分布を明らかにするため、UASBの高さ0.5m, 1.75m, 3.75mより保持汚泥を採取し、全原生動物細胞数を測定した。リアクター底部(0.5m)、中部(1.75m)では全原生動物細胞数に大きな変化は見られないが、リアクター上部(3.75m)ではどの時期においても全原生動物細胞数が低下した。また、MLSSも同様にいずれの時期においてもリアクター底部、中部は上部より高い値となった。原生動物は顕微鏡で観察すると汚泥フロックを縫うように遊泳する様子が常に観察された。リアクター底部に多くの原生動物が出現するのは、基質が豊富であることが原因であると考え

られる。

## (2) 出現原生動物のシーケンス解析

UASB内の原生動物種を明らかにするために、UASBの保持汚泥から抽出したDNAに対して18S rRNA遺伝子を標的としてクローニング解析を行った。EukAとMedlinBのプライマーペアを用いて得られたクローンの内、原生動物のクローンは全体の40%であった。残りの60%のクローンは真菌や藻類が占めていた。

また、*Metopus palaeformis*と相同性が100%のクローンと93%のクローンが多く得られた。

一方、PSSU-324FとMedlinBのプライマーセットを用いて得られた全クローンにおいて、原生動物の占める割合は全体の98%であり、5種の原生動物を同定した。その内、もっとも多く得られたクローンは*Metopus palaeformis*の73%であった。また*Metopus contortus*のクローンは全体の19%を占めた。しかし、2種のプライマーペアで得られた原生動物のクローンに*Metopus palaeformis*の他に共通するものがない。原因として、種によってゲノム中の18S rRNA遺伝子の数に違いがあり、また、PCRによる遺伝子増幅の際にプライマーと生物種ごとに増幅効率の違いが生じたためと考えられる。

同じ下水を処理するUASBとエアレーションタンクからEukAとMedlinBのプライマーペアを用いて得られたクローンの解析を行った。どちらからもAlveolate門、Ciliophora亜門のクローンが多く得られたがRhizaria門はエアレーションタンク汚泥からしか得られなかった。さらに、同一のCiliophora亜門であってもUASBとエアレーションタンクの違いにより得られたクローンの相同性に10%程度の違いが見られた。

嫌気性廃水処理装置内の原生動物に関する知見は乏しく、既往の知見を用いて嫌気性原生動物の形態や行動様式から種を同定することは困難であった。そこで顕微鏡下で確認できる原生動物の一細胞をマイクロマニピレーターで捕獲し、DNAを回収して18S rRNA遺伝子のシーケンス解析を行い、UASB内に確認できる原生動物の形態と18S rRNA遺伝子情報を統合した。その結果、*Metopus contortus*、*Metopus palaeformis*は顕微鏡観察とクローニング解析のどちらからでも得ら

れたが、*Trimyema compressum*はクローニング解析の結果からは得られなかった。

## (3) ラボスケールUASB実験

ラボスケールUASBを2つ用意し、原生動物を死滅させた系とバクテリアと共生させた系を構築し、グルコースを基質とし、有機物負荷1g-COD/L/dayから4g-COD/L/dayまで段階的に上昇させて連続運転を行った。有機物負荷が低いときは共生しない系のCOD除去率が高くなっているが、有機物負荷を上げていく毎に共生する系のCOD除去率が高くなり、最終的に有機物負荷4g-COD/L/day時点で共生する系が73%、共生しない系が66%となり、共生する系のCOD除去率が高くなった。

原生動物を死滅させた系では培養5日目よりパイロットUASBで優占している*Metopus sp*とは明らかに形態の異なる原生動物が出現し、その形態と一細胞からのクローニング解析結果から*Trimyema sp*であると判断した。*Trimyema sp*は、シクロヘキシミド添加でも死滅せず、有機物負荷が上がる毎に増殖し、有機物負荷4g-COD/L/dayで $4.0 \times 10^4$  cells/mL程度に達した。原生動物が共生する系では、*Metopus sp*は有機物負荷1g-COD/L/day時点で最大 $5.0 \times 10^3$  cells/mLまで増殖したが、有機物負荷が上がる毎に少しずつ減少し、4g-COD/L/dayで平均 $3.6 \times 10^2$  cells/mLまで減少した。共生する系においても*Trimyema sp*が出現したが、最大 $4.0 \times 10^3$  cells/mL程度までしか増殖せず、有機物負荷4g-COD/L/day時点で平均 $2.0 \times 10^3$  cells/mLだった。

この両系の基質をグルコースから酢酸に変化させて連続実験を継続した。嫌気性原生動物は基質を発酵的にしか利用できないため酢酸は資化できないとされている。

*Trimyema sp*系が優占した系では基質を酢酸に変化させた後、急激に個体数を減少させた。一方、*Metopus sp*と*Trimyema sp*の両方が出現した共存系では*Metopus sp*の数はほとんど変化しなかった。これは、*Trimyema sp*がグルコースを直接資化して増殖しているのに対し、*Metopus sp*はバクテリアや固形性有機物を捕食していることを示唆している。

基質として都市下水を用いて同様の実験を行った。原生動物を死滅させた無共生系では有機物負荷2g-COD/L/dayでもいかなる原生動物も出現しなかった。一方、共生系では

*Metopus sp*が $10^3$ cells/mLレベルで出現した。都市下水を基質とした場合、処理性能や系内に構築される微生物叢には大きな変化は生じさせないが、共生させた系では MLSS 濃度が8割ほど小さな値であった。やはりこれも *Metopus sp* が系内の MLSS (浮遊成分) を捕食していることを示している。

#### (4) 原生動物細胞内の共生古細菌の解析

*Metopus contortus*はミトコンドリアの代わりにヒドロゲノソームと呼ばれる酸素を最終電子受容体としないエネルギー獲得器官を所持している。ヒドロゲノソームは水素イオンを電子受容体とし、最終的に酢酸、水素、二酸化炭素を生産する細胞小器官であることが知られている。そこで、都市下水処理する本 UASB 内の *Metopus contortus*も同様にメタン生成古細菌を共生させているか確認するため、*Metopus contortus* 一細胞から回収したDNAをテンプレートにし、16S rRNA遺伝子を標的としたクローニング解析を行った。その結果、*Metopus contortus*の細胞内には水素資化性メタン生成古細菌である *Methanoregula* 属 (51%) が優占しており、酢酸資化性メタン生成古細菌である *Methanosaeta* 属 (40%) も多く検出された。

一方、*Metopus contortus* の細胞内に共生しているメタン生成古細菌を標的に FISH 解析を行ったところ、酢酸資化性メタン菌は全く検出されず、水素資化性メタン菌が *Metopus* 一細胞あたり  $10^4$ cells レベルで生息していることが判明した。これは、原生動物が系内の水素分圧を下げるための役割を担っていると判断できる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1) M.Takahashi, T.Yamaguchi, Y.Kuramoto, A. Nagano, S.Shimozaki, H. Sumino, N. Araki, S.Yamazaki, S.Kawakami and H.Harada (2011) 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 . *Bioresource Technology*, **102**, pp.753-757. [査読有]

2) 高橋良太, 大嶋義章, 関由里絵, 小野心也, 山口隆司, 荒木信夫 (2011) 都市下水処理 UASB 内に生息する嫌気性原生動物の定量および同定, 土木学会論文集 G (環境), Vol. 67(7), pp. 285- 292. [査読有]

3) M. Takahashi, A. Ohya, S. Kawakami, Y. Yoneyama, T. Onodera, K. Sytsubo, S. Yamazaki, N. Araki, H. Harada and T. Yamaguchi (2011) Evaluation of treatment characteristics and sludge properties in a UASB reactor treating municipal sewage at ambient temperature, *International Journal of Environmental Research*, Vol.5(4), pp.821-826. [査読有]

[学会発表] (計 15 件)

1) 高橋良太, 荒木信夫, 小野心也, 山口隆司 (2011). UASB 槽内に生息する嫌気性原生動物に関する研究. 第 45 回日本水環境学会 年会講演集, p.279.

2) 宮地賢一, 永岩拓馬, 山崎慎一, 山口隆司, 高橋優信, 荒木信夫, 原田秀樹 (2011) 省エネ型嫌気好気法 (UASB-DHS システム) による人工下水の処理性能, 第 66 回全国土木学会年次学術講演会, VII-047.

3) 関由里絵, 高橋良太, 荒木信夫, 小野心也, 山口隆司 (2011) UASB 槽内の嫌気性原生動物の共生が細菌叢に与える影響, 第 48 回環境工学研究フォーラム (大阪), pp.116-118.

4) 関由里絵, 高橋良太, 荒木信夫, 小野心也, 山口隆司 (2011) UASB リアクター内の嫌気性原生動物の補食特性, 第 29 回土木学会関東支部新潟会研究調査発表会 (長岡), pp.538-539.

5) 大嶋義章, 高橋良太, 高野靖大, 荒木信夫, 小野心也, 山口隆司 (2011) 原生動物が UASB 内でのメタン生成に与える影響の評価, 第 3 回メタン高度利用技術シンポジウム (長岡), 長岡商工会議所.

6) 関由里絵, 高橋良太, 荒木信夫, 小野心也, 山口隆司 (2011) UASB 内の原生動物の補食が細菌叢に及ぼす影響, 第 3 回メタン高度

利用技術シンポジウム（長岡），長岡商工会議所

- 7) 大嶋義章, 荒木信夫, 小野心也, 山口隆司 (2012) UASB 内に生息する嫌気性原生動物の食物環に関する研究, 第 46 回日本水環境学会年会 (東京), p.468.
- 8) 関由里絵, 高橋良太, 荒木信夫, 小野心也, 山口隆司 (2012) 嫌気性処理プロセス内の原生動物が細菌叢に及ぼす影響, 第 46 回日本水環境学会年会 (東京), p.469.
- 9) 平片悠河, 関由里絵, 荒木信夫, 山口隆司 (2012) UASB 槽内に生息する原生動物の食物環に関する研究, 第 30 回土木学会関東支部新潟会調査研究発表会, pp.464-465.
- 10) 大槻洗太, 出濱和也, 幡本将史, 山口隆司, 荒木信夫, 他 (2012) 低温環境下における UASB リアクターの都市下水処理性能と硫黄の酸化還元特性評価, 第 30 回土木学会関東支部新潟会調査研究発表会, pp.472-473.
- 11) 保坂恭平, 関由里絵, 荒木信夫, 高野靖大, 山口隆司 (2012) 嫌気性原生動物の細胞内に共生する細菌群の蛍光検出法による解析, 第 30 回土木学会関東支部新潟会調査研究発表会, pp.476-477.
- 12) 宮岡佑馬, 宮地賢一, 幡本将史, 山口隆司, 荒木信夫, 他 (2012) 嫌気下水処理水の好気性ろ床による処理特性と高次生物叢の構造解析, 第 30 回土木学会関東支部新潟会調査研究発表会, pp.484-485.

- 13) 宮岡佑馬, 宮地賢一, 幡本将史, 山口隆司, 荒木信夫, 多川正, 小野寺崇, 珠坪一晃 (2013) 嫌気性下水処理システム後段の DHS リアクター保持汚泥中の真核生物叢解析. 第 47 回日本水環境学会年会, p.419.
- 14) 大槻洗太, 出濱和弥, 幡本将史, 山口隆司, 上村繁樹, 大久保努, 高橋優信, 久保田健吾, 原田秀樹, 多川正 (2013) UASB-DHS-A2SBR システムによる都市下水の高度処理特性評価. 第 47 回日本水環境学会年会, p.420.
- 15) 平片悠河, 桜井大樹, 関由里絵, 荒木信夫, 出濱和弥, 山口隆司 (2013). 嫌気性原生動物の共存の有無が UASB 槽内の細菌叢に及ぼす影響. 第 47 回日本水環境学会年会, p.496.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荒木 信夫 (ARAKI, Nobuo)

長岡工業高等専門学校・環境都市工学科・教授

研究者番号：30193072

### (2) 研究分担者

山口 隆司 (YAMAGUCHI, Takashi)

長岡技術科学大学・工学部・教授

研究者番号：10280447