

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：53101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25289174

研究課題名(和文) 都市下水処理UASB内への嫌気性原生動物の高濃度培養技術の開発

研究課題名(英文) High density cultivation of anaerobic protists in UASB reactors fed with domestic sewage

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：都市下水処理UASBリアクターにおける原生動物の役割を明らかにするため、原生動物を共存させた汚泥系と死滅させた汚泥系の2系列を作成し、171日間の比較運転を行った。共存系ではメタン生成量の増加が確認され、原核生物の系統学的多様性が共存系の方が高かった。また、原生動物Metopus細胞内の微生物に対して分子生物学的解析を行った結果、メタン生成古細菌であるMethanoregula boonei、真正細菌であるClostridium aminobutyricumが高頻度で共生していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to investigate influences of anaerobic protozoa on treatment efficiencies of UASB reactor including COD removal, methane production and sludge volume and on bacterial and archaeal community structures in anaerobic sludge. Two UASB reactors fed with domestic sewage were operated for 171 days at COD loading rates of 0.5 to 4 gCOD L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>, and protozoa in one UASB reactor was killed by addition of cycloheximide. Methane production by the sludge with protozoa was higher than the sludge without protozoa. Phylogenetic diversity was higher in the sludge with protozoa, where syntrophic bacteria affiliated with the class Deltaproteobacteria were more abundant. And this present study illuminates prokaryotic community structure in Metopus ciliates, identifying M. boonei- and C. aminobutyricum-like prokaryotes as endosymbionts.

研究分野：工学

キーワード：都市下水処理 嫌気性処理 メタン生成 原生動物 共生微生物

## 1. 研究開始当初の背景

Upflow anaerobic sludge blanket(UASB：上昇流嫌気性汚泥床)法は、エアレーションが不要で余剰汚泥の発生量が少なく、メタン回収が可能などの利点を有しており、産業排水処理の分野において国内外で広く普及している。さらに、運転コストが安価であり、不安定な電力供給であってもプロセスの処理性能を維持する事が可能であることから、開発途上国において都市下水処理への適用が進められている。また、日本においても次世代の低炭素技術として注目され、UASB法の下水処理への適用実験が行われている。

都市下水処理UASBリアクター内には処理性能に直接関与する真性細菌、古細菌のみならず、原生動物が生息する。我々の以前の研究では、都市下水を連続処理するUASBパイロットプラントにおいて、原生動物は $10^3 \sim 10^4$  cells mL<sup>-1</sup>と高密度に存在しており、汚泥性状や処理性能に影響を与えていたと考えられる。Priyaらは嫌気性連続攪拌槽を用いた試験によって、原生動物の存在量が高いほど、反応槽内のMLSS濃度は低下し、COD除去率、メタン生成量は増加することを報告している。また、Fenchelらは原生動物の捕食作用により、嫌気性汚泥における真性細菌、古細菌の存在量が制御されることを明らかにしている。これらのことから、UASBリアクター内に生息する原生動物は処理性能に影響を及ぼすと考えられるが、都市下水処理UASBリアクターにおける原生動物の役割は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

嫌気性原生動物の役割を明らかにすることを目的に、都市下水を用いてラボスケールUASBリアクターを運転し、原生動物が生息する汚泥(以後共存系と呼ぶ)および抗生物質を用いて原生動物を死滅させた汚泥(以後死滅系と呼ぶ)を用意し、それぞれを植種汚泥としたUASBリアクター2基を並列して運転した。各UASBリアクターの処理性能および形成された微生物叢を比較し、原生動物が及ぼす影響を調査した。さらに分子生物学的手法を用いて、嫌気性原生動物細胞内の微生物叢を解析し、共生微生物を特定した。

## 3. 研究の方法

### (1) ラボスケールUASBリアクター実験

長岡中央浄化センターに設置された都市下水処理UASBリアクター(全容積1148L、塔長4m、外気温10-28°C)の槽高さ0.5mの汚泥採取ポートより汚泥混合液を採取し、植種汚泥とした。死滅系の作製は、植種汚泥に真核生物の抗生物質であるシクロヘキシミドを1g L<sup>-1</sup>の濃度で添加し、原生動物を死滅させた。

2基のラボスケールUASBリアクター(容積500mL、塔長0.3m)へ植種汚泥を400mLずつ充填し、運転を開始した。ラボスケールUASBリアクターにはスクリーン通過後の都市下水をストレーナー(目開き350μm)で簡易濾過し、腐敗を防ぐため冷蔵保存(4°C)しながら供給した。運転は171日間行い、HRTを短縮することでCOD負荷を以下の通り段階的に上昇させた; Run1(0-37d) HRT 10h, 0.5gCOD L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>, Run2(83-138d) HRT 6h, 1.0gCOD L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>, Run3(138-160d) HRT 3-4h, 2.5gCOD L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>, Run4(160-171d) HRT 1-2h, 4.0gCOD L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>。UASB槽の温度は20 ± 2°Cに調整し、pH調整は行わなかった。

また、Run1'では、死滅系において原生動物の増殖が確認されたため、40-70日目の間、シクロヘキシミドを再添加し、原生動物を死滅させた。共存系については、Run1'はRun1と同様、0.5gCOD L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>で運転した。

水質分析項目として、COD、SS、MLSS、メタン生成量を分析した。CODは二クロム酸カリウム法で測定を行い、吸光度測定には水質分析器DR-2000(HACH)を用いた。SSおよびMLSSは下水試験方法に基づき測定した。ガス生成量および組成については、UASB槽上部に設置したガスサンプリングバックに捕集されたガス量を計測し、組成はガスクロマトグラフ(SHIMADZU GC-2014、検出器TCD)で分析した。

原生動物の定量には、スライドガラスに汚泥混合液30μLを滴下し、顕微鏡(IX-71, OLYMPUS)を用いて行った。定量は各汚泥試料につき5回行った。

### (2) 原生動物の培養

原生動物を雑多な微生物から分離するため、都市下水を通水するUASBリアクターの嫌気性グラニュー汚泥を植種源とし、抗生物質を添加して培養を行った。培養には50mLバイアル瓶を使用した。培地はCMV mediumを使用しpHは7.0に調整した。原生動物体外の微生物を除くため、培地に抗生物質としてストレプトマイシン硫酸塩 50mg L<sup>-1</sup>及びバン

コマイシン塩酸塩 50 mg L<sup>-1</sup>を添加した。原生動物は植種汚泥を目開き100 μmのメッシュを用いて簡易濾過した後、注射器を用いて30-50 cellsを培地に添加した。基質にはグルコース0.1 g/Lを添加した。培養は室温 (20±2 °C) で行った。培養3日目, 5日目, 7日目にマイクロマニピュレーター (NARISHIGE) を用いて原生動物一細胞を捕獲した。

### (3) 16S rRNA遺伝子に基づく微生物叢解析

ラボスケールUASBリアクターから採取した汚泥試料とマイクロマニピュレーター(NARISHIGE)を用いて捕獲した原生動物一細胞に対して、16S rRNA遺伝子を対象とした微生物叢解析を行った。運転171日目(Run4)に採取したUASBリアクターの汚泥試料は、ISOIL for Beads Beading (NIPPONGENE)を用いてゲノムDNAを抽出した。原生動物に対しては、マイクロマニピュレーター (NARISHIGE) を用いて原生動物一細胞を汚泥から分離した後、PCRチューブに投入し、-80°Cと60°Cの凍結融解を5回以上繰り返すことによりゲノムDNAの抽出を行った。

抽出したゲノムDNAをテンプレートとして、全真性細菌および古細菌を標的としたPCRプライマー(515F/806R)を用いて16S rRNA遺伝子を増幅した。PCR産物はGene Clean Turbo kit (BIO101)を用いて精製し、次世代シーケンサーMiSeq(illumina)を用いて解析した。16S rRNA遺伝子配列のデータ解析には、QIIMEソフトウェアを用いた。

### (4) FISH法を用いた原生動物の共生微生物の検出

原生動物の固定には2%パラホルムアルデヒドを用い、固定時間は8時間とした。蛍光プローブは、*Methanomicrobials* 目に特異的な Mg1200b (Cy3)<sup>4)</sup>及び、本研究で作製した *Clostridium aminobutyricum* に特異的な Cla568 (5'-ACCTACGCACTCTTTACG-3', FITC)を用いた。Cla568の特異性は、1塩基のミスマッチを持つ *Clostridium cyclindrosporium* (NBRC13695) と *Stenotrophomonas maltophilia* (JCM3805) をネガティブコントロールとして用いることで確認した。ハイブリダイゼーション温度及びホルムアミド濃度は、それぞれ、Mg1200bでは40°C, 20%, Cla568では46°C, 20%とした。ハイブリダイゼーション後に、4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) による全菌染色を施した後、蛍光顕微鏡 BX60 (OLYMPUS) を用いて観察した。

## 4. 研究成果

### (1) ラボスケールUASBリアクター実験

原生動物の共存する共存系と原生動物を死滅させた死滅系を作製し、都市下水を基質として連続運転を行った。共存系では運転10日目から原生動物が増加し、平均個体数(±標準偏差)は、Run1では2.2 (±0.9) ×10<sup>2</sup> cells mL<sup>-1</sup>, Run2では7.2 (±2.7) ×10<sup>2</sup> cells mL<sup>-1</sup>, Run3では12.2 (±3.4) ×10<sup>2</sup> cells mL<sup>-1</sup>, Run4では8.0 (±2.4) ×10<sup>2</sup> cells mL<sup>-1</sup>であった。Run3では、最大の22.6 × 10<sup>2</sup> cells mL<sup>-1</sup>を確認し、有機物負荷が増加するほど原生動物は多く存在した。共存系で優占的に確認された原生動物は2種類の繊毛虫類であり、形態的に *Caenomorphia* 属, *Metopus* 属の原生動物であると推定された(図1)。既往の報告では、オレイン酸と酢酸を基質として運転された嫌気性攪拌槽には6種の繊毛虫類および5種の鞭毛虫類の原生動物が10<sup>4-6</sup> cells mL<sup>-1</sup>で存在しており、本研究で運転したUASBリアクター内の原生動物は存在量、多様性共に低かった。UASBリアクターへ供給した都市下水には硫酸イオンが約13 mgSO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>存在しており、出現した原生動物種に影響した可能性が考えられる。*Metopus*属と *Caenomorphia*属の原生動物は硫酸イオンの存在する環境下から多く検出されている。

また、Run1'では、死滅系において原生動物の増殖が確認されたため、55-70日目まで流入下水の供給を止め、シクロヘキシミドを再添加し、冷蔵処理を行うことによって原生動物を死滅させた。共存系については、Run1'はRun1と同様、0.5 gCOD L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>で運転した。

各ラボスケールUASBリアクターでの処理性能では、溶解性COD除去率については安定した除去率を維持し、運転期間全体での平均溶解性COD除去率は共存系が62%、死滅系が60%であり両系で大きな差は見られなかった。SS除去率については、平均SS除去率が共存系で95%、死滅系で93%と高い除去率を示した。Run3からRun4に移行した際、死滅系では汚泥の浮上が発生し(運転162日目)、SS除去率が50%まで低下した。共存系のSS除去率も80%まで低下したが、汚泥の浮上、流出は発生しなかった。これより、原生動物が汚泥の沈降性を増加させている可能性が考えられた。メタン生成量はCOD負荷の上昇に伴い増加し、最大で87 mL day<sup>-1</sup>(共存系)、72 mL day<sup>-1</sup>(死滅系)となった。運転期間を通して、共存系は死滅系よりも高いメタン生成量を示した(Student

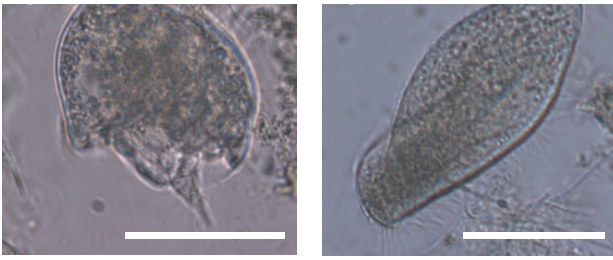


Fig.3 (Hirakata et al., 2016)

図 1 共存系において確認された原生動物;  
(a) *Caenomorpha* sp., (b) *Metopus* sp. スケール  
バー: 50  $\mu$ m

*t*-test,  $p < 0.001$ ). これらの結果より、原生動物が共存することで、メタン生成量が増加することが明らかとなった。

さらに各ラボスケール UASB リアクターの保持汚泥中に形成された微生物叢を把握するため、全真性細菌および古細菌を標的とした 16S rRNA 遺伝子に基づく解析を行った。同一汚泥試料について 2 回解析を行った結果、顕著な群集構造の偏りは確認されなかった。両系で最も多く検出されたのは *Deltaproteobacteria* 網に帰属するものであり、共存系では 30%、死滅系では 25%であった。メタン生成古細菌が属する *Euryarchaeota* 門は両系共に全体の 4.0%であった。また、*Deltaproteobacteria* 網へ帰属された 16S rRNA 遺伝子配列を属レベルで分類した結果、*Syntrophus* 属、*Syntrophorhabdus* 属、*Syntrophobacter* 属が共存系では、それぞれ、8.1-8.4%、2.4-2.8%、1.6-1.9%、死滅系では、6.1-6.2%、1.6-1.8%、0.5-0.6%検出され、共存系において大きな割合を示した。これらの微生物群は低分子有機酸を利用する嫌気性共生細菌である。嫌気性原生動物の多くは最終代謝産物として主に酢酸と水素を生成するが、それ以外にも酪酸、エタノール、乳酸なども代謝物として報告されている。*Metopus* 属、*Caenomorpha* 属の原生動物の代謝産物は未同定であるが、酢酸、水素以外に有機酸を生成し、嫌気性共生細菌へ供給していた可能性が考えられた。

汚泥内の微生物叢の統計解析を行った結果、OTU 数は共存系では 2885 - 3190 種、死滅系は 2387 - 2426 種であり、共存系の方が多かった。また、推定種数の指標となる Chao1 についても、共存系が 8127 - 9498、死滅系が 4717 - 5052 と、共存系が高かった。生物多様性の尺度となる PD においても、共存系で 191 - 204、死滅系では 158 - 162 と、共存系が死滅系

を上回った。群集構造の均等度指数である Simpson は両系で 0.99 であり、種の偏りは小さかった、これらの結果より、真性細菌、古細菌の種多様性が、共存系では死滅系より高かったことが明らかとなった。共存系における種の多様性が高かった理由として、原生動物が産生する代謝産物による共生および原生動物による捕食作用が寄与したと考えられる。

## (2) 原生動物の共生微生物の特定

7日間の培養が可能であった *Metopus* 属の原生動物細胞内の微生物叢に対して、16S rRNA 遺伝子に基づく解析を行った結果、培養3日目から7日目まで、*Methanoregula boonei*、*C. aminobutyricum* に同定される配列が、それぞれ 33.8 - 66.1%、14.6 - 21.3% と、多くの割合を占めていた。また、*M. boonei*、*C. aminobutyricum* 以外の配列は、培養期間が長くなるにつれて減少する傾向にあった。特に *Desulfovibrio desulfuricans* の存在割合は3日目では 7.4%であったものの、5日目では 1.1%まで減少し、7日目には検出されなかった。これより、*D. desulfuricans* などの細菌は、*Metopus* sp. の細胞外に存在していたため、培地に添加した抗生物質によって減少・死滅したものと思われる。それに対し、抗生物質を添加した培養でも残存した *M. boonei*、*C. aminobutyricum* は原生動物 *Metopus* sp. の細胞内で保護されていたことが示唆された。

さらに、遺伝子解析で検出された *M. boonei* 及び *C. aminobutyricum* に対して FISH 法を行った。2 種類の蛍光プローブを用いて FISH 法を行い、*Metopus* sp. 細胞内の *M. boonei* 及び *C. aminobutyricum* の空間分布を調査した。10 cells の *Metopus* sp. に対して FISH 法を行った結果、全ての細胞から *M. boonei* 及び *C. aminobutyricum* が検出された。*M. boonei* の蛍光シグナルは、原生動物細胞全体から規則的に検出された (図 2b)。嫌気性原生動物は体内にハイドロジェノソームと呼ばれる ATP と共に水素を産出する器官が細胞質全体に存在している。このため水素資化性メタン生成古細菌である *M. boonei* はハイドロジェノソーム近傍に規則的に存在し、*Metopus* sp. が作り出した水素を利用していたと考えられる。また、*M. boonei* の FISH 法によるセルカウントを行った結果、*Metopus* sp. 体内には、平均  $4.1 \times 10^3$  cells の *M. boonei* が存在していることが明らかとなった。これより、UASB リアクターに生息する *Metopus* sp. は、細胞内

に水素資化性メタン生成古細菌である *M. boonei* を共生させており、メタン生成に寄与していることが明らかとなった。また、ラボスケール UASB リアクターの実験において観察されたメタン生成量の増加は、この共生メタン生成古細菌が寄与した可能性が高い。

一方、*C. aminobutyricum* は細胞内の一ヶ所に集中していることが明らかとなった(図2d, 矢印部分)。また、*C. aminobutyricum* の菌体量は *Metopus sp.* 1 個体当たり約  $1.0 \times 10^2$  cells であった。これらの結果より、*C. aminobutyricum* はハイドロジェノソームではなく、食泡などの消化器官付近に存在しており、低級脂肪酸などの代謝物を分解しているのではないかと考えられる。また、*Clostridium* 属の細菌は、嫌気性原生動物と同様に発酵によって水素を代謝することが知られている。よって、*Metopus sp.* 細胞内において、*C. aminobutyricum* の代謝によって発生した水素は、原生動物の代謝で発生した水素とともに、*M. boonei* によって除去されるといった3者間による共生関係が成立している可能性が示唆された。

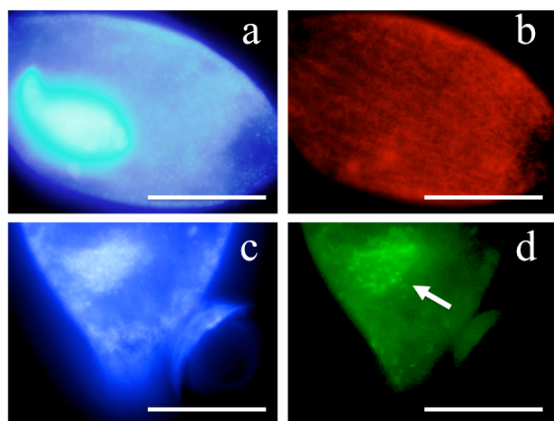


図 2 FISH 法による微生物検出 ; (a, c) DAPI 視野, (b) Mg1200b (Cy3), (d) Cla568 (FITC), a と b、c と d は同一視野である。スケールバー : 50  $\mu$ m

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2本)

- ① Yuga Hirakata, Mamoru Oshiki, Kyohei Kuroda, Masashi Hatamoto, Kengo Kubota, Takashi Yamaguchi, Hideki Harada and Nobuo Araki. Effects of predation by protists on prokaryotic community function, structure, and diversity in

anaerobic granular sludge, *Microbes & Environments*, accepted, 2016. [査読有]

- ② Yuga Hirakata, Mamoru Oshiki, Kyohei Kuroda, Masashi Hatamoto, Kengo Kubota, Takashi Yamaguchi, Hideki Harada and Nobuo Araki. Identification and Detection of Prokaryotic Symbionts in the Ciliate *Metopus* from Anaerobic Granular Sludge. *Microbes & Environments*, 30(4), pp.335-338. 2015. [査読有]  
Doi: 10.1264/jsme2.ME15154

[学会発表] (合計 13 件)

- ① 平片悠河, 押木守, 荒木信夫, 幡本将史, 山口隆司. 嫌気性原生動物の体内に生息する共生バクテリア・アーキアの分子生物学的解析. 第33回土木学会新潟会調査研究発表会, 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市), pp.460-461. 2015. 11月13日.
- ② 平片悠河, 押木守, 黒田恭平, 幡本将史, 荒木信夫, 山口隆司, 都市下水処理 UASB 槽の処理性能および微生物叢に及ぼす嫌気性原生動物の影響. 第18回水環境シンポジウム, 信州大学 (長野県・長野市), pp.181-182. 2015. 9月14-16日.
- ③ Yuga Hirakata, Mamoru Oshiki, Kyohei Kuroda, Masashi Hatamoto, Kengo Kubota, Takashi Yamaguchi, Hideki Harada and Nobuo Araki. Impacts of protist bacterivory by anaerobic ciliates on prokaryotic community function and structure in anaerobic granular sludge of up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Water and Environment Technology (WET) Conference 2015*, p6, Nihon Uni.(Chiyoda, Tokyo), Japan. 2015. June 15-16<sup>th</sup>.
- ④ Yuga Hirakata, Kyohei Kuroda, Mamoru Oshiki, Nobuo Araki, Masashi Hatamoto, Takashi Yamaguchi. Influence of anaerobic protozoa on treatment efficiency and bacterial and archaeal community structures in uasb reactors fed with domestic sewage. *IGCN2015*, p.195, Nagaoka Univ. tech)(Nagaoka, Japan). 2015. June 19th-21st
- ⑤ 石塚充朗, 平片悠河, 荒木信夫, 押木守, 山口隆司, 幡本将史. 培地の酸化還元電位が嫌気性原生動物の優占種に及ぼす影響. 第49回水環境学会年会, 金沢大学 (石川県・金沢市), pp. 60. 2015. 3月16-18日.

- ⑥ Yuga Hirakata, Mamiko Tsuchida, Kyohei Kuroda, Mamoru Oshiki, Masashi Hatamoto, Takashi Yamaguchi, Nobuo Araki. Effects of anaerobic protozoa on treatment efficiency and microbial community structures in UASB reactors fed with domestic sewage, The 4<sup>th</sup> International Symposium on Technology for Sustainability, p. 32-33, Taipei, Taiwan. 2014. Nov.19<sup>th</sup>-21<sup>st</sup>. [査読有]
- ⑦ 平片悠河, 押木守, 荒木信夫, 黒田恭平, 幡本将史, 山口隆司. 嫌気性原生動物細胞内に共生する難培養性バクテリア・アーキアの分子生物学的解析. 環境微生物系学会合同大会2014, アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市), pp. 146. 2014. 10月21-24日.
- ⑧ 佐藤由佳, 平片悠河, 荒木信夫, 黒田恭平, 山口隆司, 幡本将史. 走電性を用いた嫌気性原生動物の分離とその解析. 第48回水環境学会年会, 東北大学 (宮城県・仙台市), pp. 289. 2014. 3月17-19日.
- ⑨ 土田真美子, 平片悠河, 荒木信夫, 山口隆司, 幡本将史. 嫌気性原生動物の共存が年下水処理UASBの処理性能に与える影響. 第48回水環境学会年会, 東北大学 (宮城県・仙台市), pp. 290. 2014. 3月17-19日..
- ⑩ 土田真美子, 平片悠河, 関由里絵, 荒木信夫, 山口隆司. 嫌気性原生動物の共生の有無がUASB槽内の細菌叢に与える影響. 第31回土木学会新潟会調査研究発表会, ハイブ長岡 (新潟県・長岡市), pp.468-469, 2013. 11月19日.
- ⑪ 佐藤由佳, 平片悠河, 荒木信夫, 山口隆司. UASB槽内に生息する嫌気性原生動物の群集構造解析. 第31回土木学会新潟会調査研究発表会, ハイブ長岡 (新潟県・長岡市), pp.470-471, 2013. 11月19日.
- ⑫ 宮島浩輔, 平片悠河, 島津美砂子, 荒木信夫, 山口隆司. 原生動物の走電性を用いた単離手法の開発. 第31回土木学会新潟会調査研究発表会, ハイブ長岡 (新潟県・長岡市), pp.472-475, 2013. 11月19日.
- ⑬ 平片悠河, 桜井大樹, 関由里絵, 荒木信夫, 出濱和弥, 山口隆司. 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回水環境学会年会, 大阪工業大学 (大阪府・大阪市), pp.496. 2013. 3月11-13日.

#### 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

##### (3) 研究分担者

押木 守 (OSHIKI, Mamoru)  
長岡工業高等専門学校・環境都市工学科・助教  
研究者番号：90540865