

長岡技術科学大学大学院 工学研究科 博士学位論文

下降流懸垂型スポンジ反応器における真核生物の群集構造と
下水処理特性との関連性に関する研究

2017年3月

宮岡佑馬

主査：長岡技術科学大学	山口隆司	教授
副査：国立環境研究所	珠坪一晃	室長
木更津工業高等専門学校	上村繁樹	教授
長岡技術科学大学	小笠原渉	教授
長岡技術科学大学	幡本将史	准教授

予備審査： 2016年 11月 19日

本審査： 2017年 2月 11日

目次

第 1 章 序章

1.1 研究の背景と目的	2
1.2 本論文の構成	4

第 2 章 既往の知見

2.1 はじめに	9
2.2 下水・排水処理汚泥における真核生物の種類と群集構造の特徴	9
2.3 真核生物の捕食が処理性能に与える影響	
2.3.1 原核生物の活性向上（処理性能の向上）に寄与する真核生物	11
2.3.2 余剰汚泥発生抑制に寄与する真核生物	12
2.3.3 真核生物の捕食から逃れる原核生物の特性	14
2.4 反応器運転操作因子と真核生物群集構造の関連性	14
2.5 下水・排水処理反応器における処理性能を診断するうえでの指標生物としての真核生物	14
2.6 DHS 反応器における下水処理特性	
2.6.1 下水処理 UASB-DHS システムの性能評価	15
2.6.2 低濃度下水処理 DHS 反応器の性能評価	15
2.7 DHS 反応器における処理機構解明の試み	
2.7.1 有機物除去およびアンモニア性窒素除去（硝化反応）	15
2.7.2 大腸菌除去	16
2.7.3 余剰汚泥発生の抑制	16
2.8 真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析	
2.8.1 下水・排水処理汚泥の真核生物群集構造解析	21
2.9 遺伝子解析ツールを用いた真核生物の機能解析	
2.9.1 下水・排水処理汚泥において捕食を行う真核生物の同定	23
2.9.2 脱窒反応を担う真核生物	23
2.10 分子生物学的手法による真核生物群集構造解析時の特徴	
2.10.1 真菌に特異的なプライマーを用いた解析	25
2.10.2 DNA 抽出方法	25
2.10.3 検鏡と 18S rRNA 遺伝子を標的とした解析手法の比較	26
2.11 小括	27

第 3 章 下水処理 UASB 反応器後段に設置した DHS 反応器における真核生物群集構造の季節変動および

18S rRNA 遺伝子配列に基づく真核生物群集構造解析手法の検討

3.1 研究背景	35
----------	----

3.2 実験方法	
3.2.1 DHS 反応器	36
3.2.2 DHS 反応器の水質プロフィールと検鏡	36
3.2.3 水質分析方法	37
3.2.4 プライマー配列の特異性評価	37
3.2.5 マイクロマニピュレーターを用いた真核生物 1 個体の回収方法	38
3.2.6 真核生物 1 個体からの遺伝子抽出および塩基配列の決定 (PCR-シーケンス解析)	39
3.3 実験結果および考察	
3.3.1 DHS 反応器による下水処理特性の季節変動	40
3.3.2 検鏡による真核生物群集構造解析	43
3.3.3 プライマー配列の特異性評価	46
3.3.4 真核生物 1 個体からの 18S rRNA 遺伝子断片の PCR とシーケンス解析	47
3.4 小括	49
第 4 章 固形性有機物濃度の変化が DHS 反応器における真核生物群集構造に与える影響の解析	
4.1 研究背景	57
4.2 実験方法	
4.2.1 DHS 反応器と連続処理実験	58
4.2.2 水質分析方法	60
4.2.3 水質プロフィール試験	60
4.2.4 保持汚泥の検鏡 (原生動物および後生動物の同定と定量)	60
4.2.5 真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析	61
4.3 実験結果	
4.3.1 DHS 反応器の処理性能	62
4.3.2 保持汚泥の検鏡結果 (原生動物と後生動物の存在割合)	65
4.3.3 真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析	68
4.4 考察	
4.4.1 DHS 反応器の処理性能	72
4.4.2 検鏡で解析した原生動物と後生動物の存在割合	75
4.4.3 真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析	79
4.5 小括	81
第 5 章 HRT の能動的な変化が DHS 反応器における真核生物群集構造に与える影響の解析	
5.1 研究背景と目的	94
5.2 実験方法	

5.2.1 DHS 反応器と人工排水	94
5.2.2 運転方法（一定負荷運転および負荷変動運転）	96
5.2.3 水質分析方法	97
5.2.4 保持汚泥性状分析（汚泥濃度、内生呼吸活性、検鏡）	97
5.3 実験結果および考察	
5.3.1 一定負荷運転および負荷変動運転による連続処理実験	98
5.3.2 DHS 反応器の流下方向における水質プロフィール	99
5.3.3 DHS 反応器の流下方向における保持汚泥性状	101
5.3.4 DHS 反応器の流下方向における真核生物の細胞密度	103
5.3.5 DHS 反応器における物質収支	104
5.4 小括	106
第 6 章 バンコクに設置した実証規模 DHS 反応器による下水の連続処理実験および真核生物群集構造解析	
6.1 研究背景	111
6.2 実験方法	
6.2.1 Bang Na 処理場（バンコク、タイ）	112
6.2.2 DHS 反応器	112
6.2.3 DHS 反応器の運転条件	112
6.2.4 DHS 反応器の流下方向における水質プロフィールおよび保持汚泥濃度プロフィール	114
6.2.5 水質分析方法	115
6.2.6 余剰汚泥発生量の算出方法	115
6.2.7 真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析	115
6.3 実験結果と考察	
6.3.1 一定負荷運転による連続処理実験（Phase-1、Phase-2、Phase-3）	117
6.3.2 保持汚泥濃度の推移	122
6.3.3 余剰汚泥の発生量	123
6.3.4 真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析	124
6.3.5 HRT の能動的制御による負荷変動運転が水質プロフィールや保持汚泥性状に与える影響	126
6.4 小括	129
第 7 章 総括	
7.1 はじめに	138
7.2 DHS 反応器における真核生物群集の機能推定（真核生物群集構造と下水処理特性との関連性）	138
7.3 処理水質や保持汚泥の馴致の程度を推定するための指標生物の提案	140
7.4 真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析によって得られた新しい知見	142

7.5 クローン解析と検鏡による真核生物群集構造解析結果の比較	145
7.6 DHS 反応器の分散型下水処理技術としての適用可能性	146
7.7 処理の安定化・効率化を目的とした DHS 反応器の運転方法の提案	147
7.8 まとめと今後の展望	151

第 1 章

序章

1.1 研究の背景と目的

微生物の機能を活用した下水・排水処理反応器において、その微生物群集構造を把握することは非常に意義があることである。これは、反応器内の微生物が主に汚濁物質(有機物、窒素など)の分解を担っているためである。生物学的排水処理法で中核技術である標準活性汚泥法は、好気処理に必要な酸素を供給するため、曝気(エアレーション)動力が必要であるが、安定して良好な処理水質を得ることができることから、先進国では広く採用されている。このような排水処理反応器内の保持汚泥の中には、原核生物(細菌、古細菌)に加え、真核生物(原生動物、後生動物、真菌)が存在しており(須藤, 1978)、真核生物は処理状況を簡易的に推し量るうえでの指標生物として扱われている(Canals *et al.*, 2013)。また、これらの原核生物と真核生物は、保持汚泥のなかで、互いに捕食・被捕食関係にある。具体的には、保持汚泥中の原核生物を真核生物が捕食する。その逆もあり、死滅した真核生物を原核生物が分解しエネルギーを得ることもある。さらに、真核生物は、大腸菌などの水環境汚染の衛生学的な指標生物も捕食可能である(千種, 1996; Curds and Fey, 1969)。加えて、近年では、脱窒反応(祥雲, 2004; Hayatsu *et al.*, 2004)やセルロース分解(Baldrian *et al.*, 2008)を行う真核生物の存在が報告されており、排水処理反応器内においても、直接、処理に関与している可能性も十分に考えられる。このように真核生物は排水処理反応器内で重要な役割を担っていることが推測されているが、それらの機能や生態に関する知見は少なく、真核生物に係わる炭素・窒素の物質循環は十分に理解されていない(真核生物の制御に至っていない)。そのため、これらを正しく理解するための初期段階として、まず、真核生物群集構造の特徴やその推移を把握する必要がある。

真核生物の群集構造を評価するうえで、種の同定や計測を行う必要がある。真核生物の種を同定する手段は検鏡(顕微鏡で観察すること)による手法が最も一般的である。これは、原核生物と比較すると、真核生物は体長が大きく、顕微鏡(倍率 100–400 倍)による観察であっても、比較的容易に形態学的特徴を判断することが可能であるためである。しかしながら、検鏡は観察者の主観的な評価が入りやすいため、体長の小さい微生物の同定を誤ることや見過ごすことにより、観察者間で同定結果が異なる可能性が示唆されている。また、真菌のような、種間で形態学的特徴が少ないものは種の同定が困難である。以上のような理由から、客観的に評価可能な分子生物学手法による解析手法の導入が検討されているが、現在のところ、排水処理反応器内の保持汚泥を対象として、分子生物学的手法による解析を適用した研究事例は極めて少ない(Matsunaga *et al.*, 2014)。

現在、日本国内の下水道普及率は 77.6%であり、浄化槽や農業等集落排水施設を含めた污水处理人口普及率は 89.5%にまで達している(環境白書, 2016)。下水道事業で発生する余剰汚泥は産業廃棄物として処理されており、その発生量は約 7,000–8,000 (10,000 ton/year) で、産業廃棄物の約 2 割を占める(環境白書, 2016)。また、下水道事業は国内年間消費電力量の 0.7%を占め、そのうち、48%は処理場内の水処理過程で使用されている。以上より、日本国内で広く採用されている標準活性汚泥法は、膨大な曝気電力が必要であること、発生する余剰汚泥を処理する必要があると言える。そのため、急速な都市化に伴う水環境汚染が深刻な途上国だけでなく、過疎化による財政力低下や技術者不足が顕著な日本国内の地方自治体においても、その技術移転や維持管理は難しいことが知られている。このような背景から、大規模な下水道の新設や改修が必要でない分散型下水処理技術の開発が望まれている。

本論文では、分散型下水処理技術として、下降流懸垂型スポンジ(down-flow hanging sponge (DHS))反応器に着目した。DHS 反応器は、途上国(例えばインド)の下水を処理する upflow anaerobic sludge blanket (UASB) 反応器(Syutsubo *et al.*, 2011)の後段処理技術として開発された経緯があり(Uemura and Harada, 2010)、スポンジ担体を微生

物保持担体として使用している点が特徴的な点である。このスポンジ担体は、空气中に曝しており、好気処理に必要な酸素は空气中から供給されるため、標準活性汚泥法において問題となっていた曝気(エアレーション)動力は不要である(Fig.1-1)。さらに、スポンジ担体の内外に微生物(汚泥)を保持可能であることから、DHS 反応器内の保持汚泥濃度は標準活性汚泥法よりも 10–20 倍程度高い特徴を有している。このことにより、DHS 反応器の有機物汚泥負荷が低く維持され、DHS 反応器内における汚泥増殖量と汚泥分解量が拮抗するため、余剰汚泥の発生量は極めて少ないことが報告されている(松永ら, 2009; Onodera *et al.*, 2013)。加えて、保持汚泥中に存在する真核生物は、標準活性汚泥法よりも多様でかつ高密度に存在していることが報告されており、それらも余剰汚泥発生量が少ない要因のひとつであると推測されている。しかしながら、下水処理 DHS 反応器における真核生物群集構造を経日的に解析した研究はあまり行われておらず、真核生物群集の推移に関する知見は少なく、それらの制御手法は開発されていない。

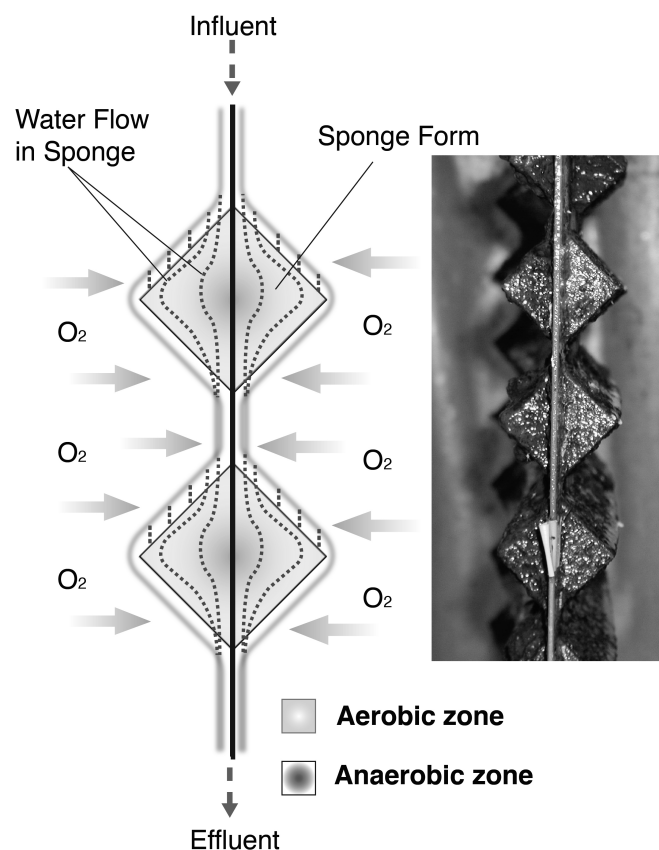


Fig.1-1 The principle of wastewater treatment by the DHS reactor. Modified after 高山, 2007.

途上国のなかでも東南アジア地域(例えばタイ)では、下水の有機物濃度が低いため(BOD 濃度 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 程度であり、UASB-DHS システムの UASB 処理水と同程度)、前段に UASB 反応器を用いずに DHS 反応器単独による処理を試みた報告もある(Yoochatchaval *et al.*, 2014; Onodera *et al.*, 2014)。その結果、DHS 反応器単独によるシステムにおいても、下水処理性能は高く、かつ、余剰汚泥の発生量が少ないことを実証している。しかしながら、BOD 濃度 $90\text{--}300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 程度の下水を対象とした、DHS 反応器単独によるシステムの下処理特性に関する知見は少ない。

本論文では、DHS 反応器における真核生物群集構造と下水処理特性との関連性を解析することを主目的として、特に、DHS 反応器へと供給する下水の固形性有機物濃度および水理学的滞留時間 (hydraulic retention time:HRT) に着目した有機物負荷が、処理特性、保持汚泥性状、真核生物群集構造に与える影響について実験的解析を行った。また、流入下水の水質の変動が生じやすい条件での真核生物群集構造の特徴を把握することを主目的として、バンコク(タイ)に設置した実証規模 DHS 反応器を用いた連続処理実験を行い、その処理特性、真核生物群集構造、余剰汚泥発生量について実験的解析を行った。さらに、DHS 反応器における真核生物の群集構造解析に関しては、その特徴や推移を明らかにするために、真核生物が共通して保有している 18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析および従来法である検鏡を併用して詳細に解析を行った。

1.2 本論文の構成

本論文は全 7 章から構成されており、Fig.1-2 に本論文の概要図を示す。

第 2 章では、既往の知見として、下水・排水処理汚泥における真核生物の特徴やその重要性、下降流懸垂型スポンジ(DHS)反応器による下水処理特性やその処理機構、真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析の特徴やその問題点を取りまとめることで、本研究の特徴と目的を明確に示した。

第 3 章では、下水処理 UASB 後段の DHS 反応器における真核生物群集構造に関して、基礎的知見を収集すること、および、季節変動による影響を把握することを目的として、季節ごとに変化する DHS 反応器の真核生物群集構造と下水処理特性の解析を行った。また、真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析に使用するプライマー対の検討を行うために、DHS 反応器において優占的に存在する数種類の真核生物 1 個体を対象として、既存プライマーを用いて、標的とする 18S rRNA 遺伝子断片の増幅を試みた。加えて、既存プライマーは、データベースに登録されている塩基配列情報を使用して、その特異性を評価した。

第 4 章では、下水処理 DHS 反応器に関して、流入下水の固形性有機物濃度(有機物負荷)が真核生物群集構造に与える影響を把握することを目的として、固形性有機物濃度(有機物負荷)の上昇前後における真核生物群集構造(18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析および検鏡)と下水処理特性の解析を行った。また、下水処理 DHS 反応器の真核生物群集構造の特徴および優占種の推移を把握することを目的として、同一 DHS 反応器の保持汚泥を対象として、真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析を経目的に実施した。

第 5 章では、人工排水処理 DHS 反応器に関して、1 日の中で数倍に変化する有機物負荷に対する真核生物群集の挙動を把握するために、HRT を能動的に変化させる運転方法(短い HRT(高負荷)及び長い HRT(低負荷)を交互に繰り返す運転方法)である負荷変動運転が、DHS 反応器の処理特性、真核生物の細胞密度、他の汚泥性状(保持汚泥濃度、保持汚泥の内生呼吸活性)に与える影響について解析した。

第 6 章では、バンコク(タイ)の下水を処理する実証規模 DHS 反応器に関して、流入下水の水質の変動(有機物負荷の変動)が生じやすい条件における真核生物群集構造の特徴を把握するために、実証規模 DHS 反応器による BOD 濃度 $60\text{--}90\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度の下水の直接処理を行い、真核生物群集構造と下水処理特性(1. 一定負荷で運転した場合の処理特性、2. 負荷変動を与えた場合の処理特性)を解析した。また、電力消費量や余剰汚泥発生量について、既存処理プロセスとの比較を行った。さらに、実証規模 DHS 反応器における真核生物群集の機能を推定するうえ

で、その一助となるような知見収集のため、DHS 反応器の保持汚泥における真核生物群集の系統学的多様性を、18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析によって明らかにした。

第 7 章では、得られた知見を総括し、「DHS 反応器における真核生物群集の機能推定 (真核生物群集構造と下水処理特性との関連性)」、「処理水質や保持汚泥の馴致の程度を推定するための指標生物の提案」、「真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析によって得られた新しい知見」、「クローン解析と検鏡による真核生物群集構造解析結果の比較」、「DHS 反応器の分散型下水処理技術としての適用可能性」、「DHS 反応器における運転方法の提案」、としてまとめた。

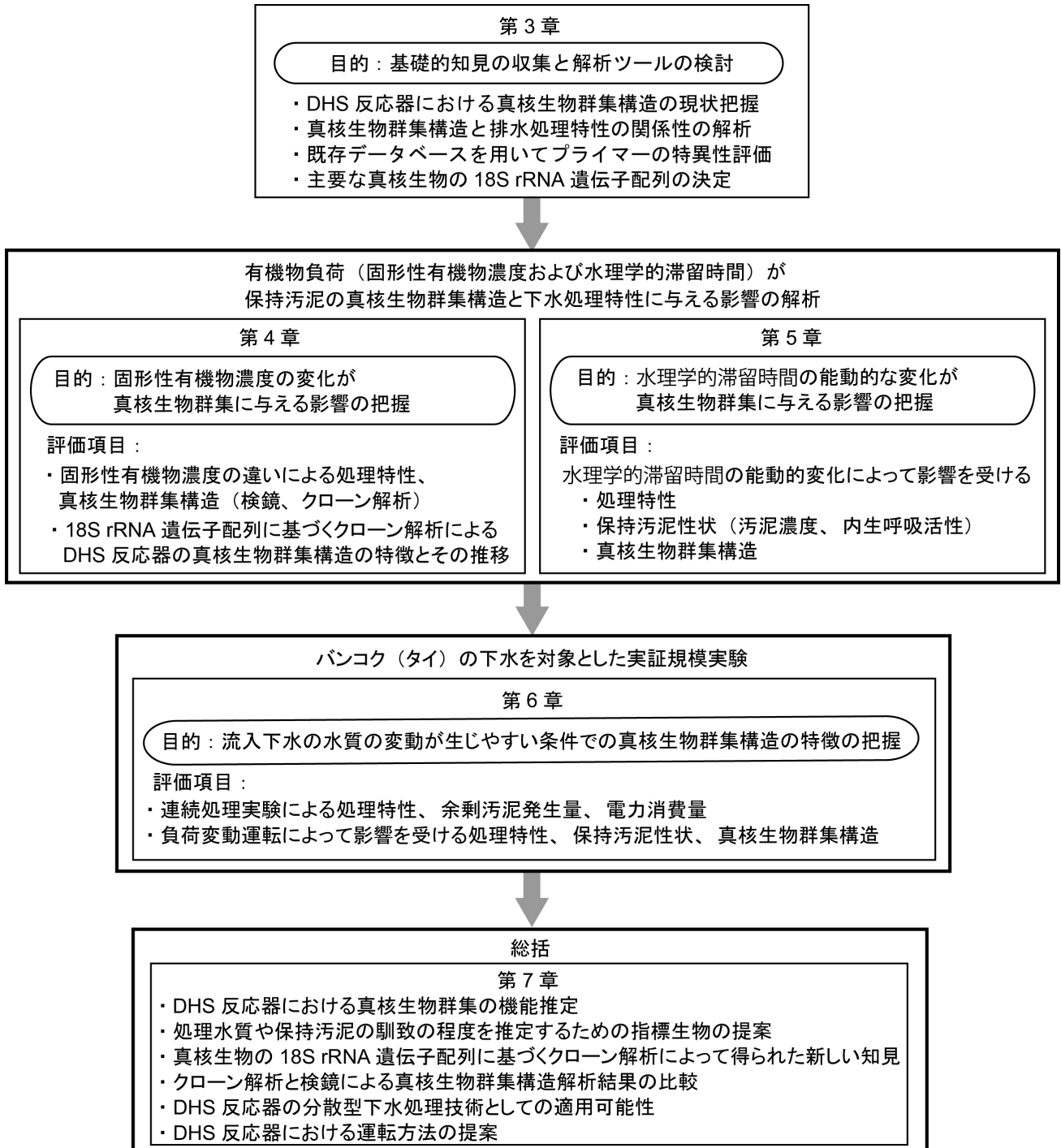


Fig.1-2 Schematic diagram of this study and research constitution in this doctoral thesis.

参考文献

- Baldrian P and Valášková V (2008) Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi, *FEMS Microbiology Reviews* 32: 501-521.
- Canals O, Salvadó H, Auset M, Hernández C, Malfeito JJ (2013) Microfauna communities as performance indicators for A/O shortcut biological nitrogen removal moving-bed biofilm reactor, *Water Research* 47: 3141-3150.
- Curds CR and Fey GJ (1969) The effect of ciliated protozoa on the fate of *Escherichia coli* in the activated-sludge process, *Water Research* 3: 853-867.
- Hayatsu M, Tago K, and Saito M (2008) Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification, *Soil Science Plant Nutrition* 54: 33-45.
- Matsunaga K, Kubota K and Harada H (2014) Molecular diversity of eukaryotes in municipal wastewater treatment processes as revealed by 18S rRNA gene analysis, *Microbes and Environment* 29 (4): 401-407.
- Okubo T, Onodera T, Uemura S, Yamaguchi T, Ohashi A and Harada H (2015) On-site evaluation of the performance of a full-scale down-flow hanging sponge reactor as a post-treatment process of an up-flow anaerobic sludge blanket reactor for treating sewage in India, *Biorecourse Technology* 194: 156-164.
- Onodera T, Matsunaga K, Kubota K, Taniguchi R, Harada H, Syutsubo K, Okubo T, Uemura S, Araki N, Yamada M, Yamauchi M, and Yamaguchi T (2013) Characterization of the retained sludge in a down-flow hanging sponge (DHS) reactor with emphasis on its low excess sludge production, *Bioresource Technology* 136: 136-175.
- Onodera T, Yoochatchaval W, Sumino H, Mizuochi M, Okadera T, Fujita T, Banjongproo P, and Syutsubo K (2014) Pilot-scale experiment of down-flow hanging sponge for direct treatment of low-strength municipal wastewater in Bangkok, Thailand, *Bioprocess and Biosystems Engineering* 37 (11): 2281-2287.
- Syutsubo K, Yoochatchaval W, Tsushima I, Araki N, Kubota K, Onodera T, Takahashi M, Yamaguchi T and Yoneyama Y (2011) Evaluation of sludge properties in a pilot-scale UASB reactor for sewage treatment in a temperature region, *Water Science and Technology* 64 (10): 1959-1966.
- Uemura S and Harada H (2010) Application of UASB technology for sewage treatment with a novel post-treatment process. In: Fang HHP (ed) *Environmental anaerobic technology*. Imperial College Press, London, pp 91-112.
- Yoochatchaval W, Onodera T, Sumino H, Yamaguchi T, Mizuochi M, Okadera T and Syutsubo K (2014) Development of a down-flow hanging sponge reactor for the treatment of low-strength sewage, *Water Science and Technology* 70 (4): 656-663.
- 環境省 (2016) 平成 28 年度版 環境白書・循環型社会白書・生物多様性白書.
- 千種薫(1996) 図説 微生物による水質管理, 産業用水調査会.
- 須藤隆一(1978) 廃水の生物処理に出現する微小動物について(1) 活性汚泥および生物膜の微小動物相, *日本農芸化学会誌* 52 (2): 57-67.
- 祥雲弘文(2004) 微生物の新規窒素代謝の発見とその解明, *日本農芸化学会誌* 78 (8): 724-729.
- 高山大輔(2007) インドにおける新規下水処理システム(UASB+DHS)のO/M評価, 長岡技術科学大学大学院工学研究科修士論文.

松永健吾, 小野寺 崇, 上村繁樹, 山田真義, 山内正仁, 高橋優信, 久保田健吾, 原田秀樹, 山口隆司(2009) 下水処理 UASB 後段の DHS における余剰汚泥量の抑制要因の評価, 環境工学研究論文集 46: 623-628.

第 2 章

既往の知見

2.1 はじめに

本章では、これまで報告されている、下水・排水処理汚泥における真核生物の特徴やその重要性、下降流懸垂型スポンジ (down-flow hanging sponge (DHS)) 反応器による下水処理特性やその処理機構、真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析の特徴やその問題点を取りまとめることで、本研究の特徴を明確にすることを目的とした。以下にその概要を示す。

- ・ 下水・排水処理汚泥における真核生物の種類と群集構造の特徴
- ・ 真核生物の捕食が処理性能に与える影響
- ・ 反応器運転操作因子と真核生物群集構造の関連性
- ・ 下水・排水処理反応器における処理性能を診断するうでの指標生物としての真核生物
- ・ DHS 反応器における下水処理特性
- ・ DHS 反応器における処理機構解明の試み
- ・ 真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析
- ・ 遺伝子解析ツールを用いた真核生物の機能解析
- ・ 分子生物学的手法による真核生物群集構造解析時の特徴

2.2 下水・排水処理汚泥における真核生物の種類と群集構造の特徴

真核生物 (*Eukarya*) とは、膜で覆われた細胞内小器官 (核、ミトコンドリア、葉緑体、小胞体など) を持つ生物のことを指す。この真核生物は rRNA の塩基配列による分類手法においては、原核生物の *Bacteria* と *Archaea* にならぶドメインとして提唱されており (Woese and Fox, 1977; Woese *et al.*, 1990)、原生動物 (Protozoa)、後生動物 (Metazoa)、真菌 (*Fungi*) を含む。原生動物とは単細胞の真核生物の総称であり、後生動物は多数の細胞から構成されている真核生物のことを指す。また、真菌は酵母、キノコ、カビのことを指す。下水処理反応器に出現する原生動物は、さらに、鞭毛虫 (*flagellate*)、繊毛虫 (*ciliate*)、肉質虫 (*amoebozoa*) に分類することができる (盛下, 2004)。また、後生動物は、さらに扁形動物、袋形動物、軟体動物、環形動物、緩歩動物、節足動物に分類することができる (下水試験方法下巻, 2012)。これらの真核生物の大きさは概ね 10–300 μm 程度 (後生動物であれば大きいもので 1,000 μm 程度) であり、検鏡時は倍率 100–400 倍で観察する必要がある (千種, 1996) (Table 2-1)。

一般的に真核生物 (原生動物や後生動物) は下水・排水処理反応器の中で、固形性成分 (固形性有機物、原核生物、保持汚泥など) を捕食することで、下水・排水処理に関与している。Curds and Fey は、滅菌下水 (培養した大腸菌 *E. coli* を設定濃度になるように添加したもの) を処理する活性汚泥に、別途、培養していた原生動物 (繊毛虫の *Opercularia coarctata*, *Hypotrichidium conicum*, *Tetrahymena pyriformis*, *Vorticella microstoma*) を植種し、連続処理を実施したところ、処理水の BOD 濃度、COD 濃度、*E. coli* 濃度が、繊毛虫を植種しなかった対照系よりも大幅に低かったことから (対照系の処理水: BOD 濃度 58 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、COD 濃度 258 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、TSS 濃度 80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 原生動物植種系の処理水: BOD 濃度 18 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、COD 濃度 163 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、TSS 濃度 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、繊毛虫は処理水の清澄化に貢献していると結論付けている (Curds and Fey, 1969)。

活性汚泥法や散水ろ床法において、処理水質と出現する真核生物群集構造を評価する試みは古くから実施されて

いる。Curds and Cockburn は、イギリス内の実規模下水処理プラント(活性汚泥および散水ろ床汚泥)の検鏡を実施しており、原生動物のなかでも繊毛虫が最も優占していたこと(なお鞭毛虫やアメーバは時々検出された程度であった)、活性汚泥法と散水ろ床法では特定のいくつかの真核生物グループを除き、真核生物群集構造が似通っていること、処理水質が良くない活性汚泥には繊毛虫が殆ど存在しないこと(もしくは全く存在しないこと)、活性汚泥では有機物汚泥負荷によって優占化する繊毛虫が異なることを報告している(Curds and Cockburn, 1970a; Curds and Cockburn, 1970b)。上記のような研究成果により、下水処理を処理する活性汚泥法や散水ろ床法では、真核生物、特に原生動物の繊毛虫は、時々刻々と変化する反応器内の環境条件に合わせて群集構造を変化させ、浮遊物質を捕食することによって、処理水の水質の高度化(BOD 濃度や TSS 濃度の減少)に寄与していると考えられる。

Table 2-1 The physiology of eukaryote present in the wastewater treatment sludge.

(Ref.; 千種, 図説 微生物による水質管理; 盛下, 応用原生動物学; 盛下, 下水処理と原生動物)

		μ (day ⁻¹)	td (hours)	Temp. (°C)	Cell size (μ m)									
					<50	50	100	150	200	250	300	400	>400	
Protozoa	(10 ³ -10 ⁵ cell·mL ⁻¹)													
Ciliate	Aspidisca	1.2	13.6	20										
	Trachelophyllum													
	Opercularia													
	Euplotes													
	Chilodonella													
	Trithigmostoma													
	Colpoda	5.5	---	30										
	Litonotus													
	Colpidium	3.6	4.7	20										
	Vorticella	3.3	5	20										
	Zoothamrium													
	Carchesium	1.8	9.3	20										
	Epistylis	1.6	10.2	20										
	Blepharisma													
	Paramecium	1.4	12	20										
	Amphileptus													
	Spirostomum													
Thuricola														
Flagellate	Bodo													
	Synura													
	Oicomonas	3.9	4.3	20										
	Monas													
	Potalomonas													
	Petalomonas													
	Euglena													
Amoebozoa	Trinema													
	Vampyrella													
	Euglypha													
	Diffugia													
	Amoeba													
	Arcella	1.08		20										
	Centropyxis													
Metazoa	(10 ¹ -10 ⁵ cell·mL ⁻¹)													
	Rotaria	0.28	59.1	20										
	Philodina	0.23	72	20										
	Aeolosoma	0.07	237	20										
	Nais	0.12	139	20										

2.3 真核生物の捕食が処理性能に与える影響

2.3.1 原核生物の活性向上(処理性能の向上)に寄与する真核生物(Table 2-2)

真核生物の捕食による処理水質の高度化は、真核生物が増殖しすぎた原核生物を捕食すること(間引き効果)によって、原核生物の活性向上が上昇するためだと考えられている(盛下, 2004)。また、Fried and Lemmer は、繊毛虫の *Epitylis* は、捕食するときに繊毛を使い水流を起こし、これまで基質が行き渡っていなかったフロック内部にまで基質を供給できていると報告している(Fried and Lemmer, 2003)。Mattison and Harayama は、鞭毛虫である *Heteromita globosa* の捕食により、好気性トルエン分解菌である *Pseudomonas* sp. のトルエン分解活性が最大で 7.5 倍向上すること (*Heteromita globosa* が対数増殖期にある間)を報告している(Mattison and Harayama, 2001)。さらに、この鞭毛虫である *Heteromita globosa* の捕食は、ベンゼンを好気分解する原核生物の活性向上にも貢献していること(捕食により溶存酸素濃度の上昇および細胞外多糖質による影響)が報告されている(Mattison *et al.*, 2005)。好気性処理だけでなく、嫌気性処理においても、嫌気性原生動物がメタン生成活性向上に寄与することが報告されている。Biagini *et al.* はバイアルを用いた回分試験を通して、嫌気性原生動物 (*Metopus palaeformis*) を添加することで、系内のバクテリアの存在量が低下するがメタン生成活性と硫酸塩還元活性が向上すること、*Metopus palaeformis* の植種量が多いほどメタン生成活性値が高い、ことを報告している(Biagini *et al.*, 1998)。また Priya *et al.* は、オレイン酸ナトリウム(コロイド状基質)もしくは酢酸ナトリウム(溶解性基質)を処理する continuous stirred tank reactor (CSTR) では(HRT 5–10 days、負荷 1–2 gCOD·L⁻¹·day⁻¹)、どちらの基質においても繊毛虫の数と COD 除去率が正の相関系にあること、コロイド状基質を処理する反応器の方が繊毛虫の多様性が高い、繊毛虫が存在することで保持汚泥濃度が減少するが保持汚泥の活性が向上する(COD 除去率に変化がないため)、コロイド状基質および溶解性基質の分解に直接寄与する繊毛虫と鞭毛虫が存在する、ことを報告している(Priya *et al.*, 2007)。その一方で、真核生物が存在することで処理性能が低下する報告もある。生物膜法においてはワムシ(*Rotifer*)が優占した場合、硝化能力が低下することも報告されている(Lee and Welander, 1994)。これらの研究成果は、原核生物だけでは十分な処理性能を確保できないことを示唆しており、真核生物は原核生物を捕食することで、原核生物の細胞数や活性を制御する役割を担っていると予想することができる。

Table 2-2 Summary of eukaryotes related to increase prokaryote activity.

No.	Condition	Substrate	Reactor	Prokaryote	Eukaryote	Effect
1)	Aerobic	Toluene (1mM)	Batch	<i>Pseudomonas</i> sp. strain PS+ (approx. 0.1-1x10 ⁸ cell·mL ⁻¹)	Flagellate; <i>Heteromita globosa</i> (approx. 7.5-12x10 ⁴ cell·mL ⁻¹)	Increase the biodegradation activity of toluene (max. 7.5 fold increase)
2)	Aerobic	Benzene (<1mM)	Batch	<i>Pseudomonas</i> sp. strain PS+ (approx. 2x10 ⁸ cell·mL ⁻¹)	Flagellate; <i>Heteromita globosa</i> (approx. 0.2-1x10 ⁵ cell·mL ⁻¹)	Increase the biodegradation activity of benzene (max. 3 fold increase)
3) a	Anaerobic	Oleate or Acetate (1-2 g·L ⁻¹ ·d ⁻¹) as COD	CSTR (HRT 5-10 d)	Retained sludge in reactor (approx. 0.12-0.16 gTSS·L ⁻¹)	Anaerobic ciliate community (approx. 1.5-9.5x10 ⁴ cell·mL ⁻¹)	COD removal increased linearly with ciliate number (Ciliate grazing activity reduced MLSS)
3) b	Anaerobic	Oleate (1 g·gVSS ⁻¹) as COD	Batch	Retained sludge in vial	Anaerobic ciliate community (approx. 0.5-9.0x10 ⁴ cell·mL ⁻¹)	Increase initial methane production rate (Methane production increased linearly with ciliate number)
4)	Anaerobic	Powdered cereal leaves	Batch	Prokaryote in vial by DAPI (approx. 4x10 ⁷ cell·mL ⁻¹)	Anaerobic ciliate; <i>Metopus palaeformis</i> (approx. 200 cell·mL ⁻¹)	Increase methane and sulfide production rate (Methane producing activity increased with inoculated ciliate)

Reference: (1) Mattison and Harayama, 2001, (2) Mattison *et al.*, 2005, (3) Priya *et al.*, 2007, (4) Biagini *et al.*, 1998

2.3.2 余剰汚泥発生抑制に寄与する真核生物 (Table 2-3)

好気性処理では、発生する余剰汚泥の発生が問題になる。これは、発生する余剰汚泥の処理にかかる費用は処理場運営にかかる費用の60%に相当するとの試算もあるためである (Low and Chase, 1999)。Low and Chaseらは、人工排水を処理する反応器内の汚泥濃度を増加させる、すなわち、有機物汚泥負荷を低下させることで、余剰汚泥の発生が抑制されることを報告している (有機物除去性能には殆ど影響は無く、保持汚泥濃度を $3 \text{ gTSS}\cdot\text{L}^{-1}$ から $6 \text{ gTSS}\cdot\text{L}^{-1}$ に増加させることで 余剰汚泥発生量が12%の抑制、保持汚泥濃度を $1.7 \text{ gTSS}\cdot\text{L}^{-1}$ から $10.3 \text{ gTSS}\cdot\text{L}^{-1}$ に増加させることで余剰汚泥発生量が44%の抑制) (Low and Chase, 1999)。

Lee and Welander は、2相式の処理システムを提案しており (1つ目の反応器で、分散状の原核生物の増殖を促し、2つ目の反応器で、原生動物や後生動物が生育しやすい長い汚泥滞留時間を設定する手法: Lee and Welander, 1996 a)、パルプペーパー産業排水 (COD 濃度 $410\text{--}8,820 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、TSS 濃度 $20\text{--}1,960 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) を処理するシステムにおいて (全システムで HRT 20–27 hours)、余剰汚泥発生を $0.01\text{--}0.23 \text{ kgTSS}\cdot\text{kgCOD}_{\text{removed}}^{-1}$ に抑制できることを実証している (Lee and Welander, 1996 b)。また、Ghyoot and Verstraete は、人工下水 (主な成分はスキムミルク、COD 濃度 $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) を用いて、2相式の活性汚泥と MBR 反応器の余剰汚泥削減効果を比較している。反応器の運転条件がそれぞれ異なるため一概に比較することは難しいが、2相目の SRT が同じ条件で比較すると、活性汚泥+活性汚泥の系では、HRT 32 hours (1相目: 15 hours、2相目: 17 hours) および SRT 12.6 days (1相目: 15 hours、2相目: 12 days) の条件のもと、余剰汚泥の発生率は $0.28 \text{ gTSS}\cdot\text{gCOD}_{\text{removed}}^{-1}$ であった。その一方で、活性汚泥+MBR の系では、HRT 53 hours (1相目: 16 hours、2相目: 37 hours) および SRT 12.7 days (1相目: 16 hours、2相目: 12 days) の条件のもと、余剰汚泥発生率は $0.22 \text{ gTSS}\cdot\text{gCOD}_{\text{removed}}^{-1}$ であった (Ghyoot and Verstraete, 1999)。このように、MBR 系の方が、汚泥滞留時間 (SRT) を長くできるため、余剰汚泥の発生量は、活性汚泥系よりも20–30%程度に抑制されていることを報告している (Ghyoot and Verstraete, 1999)。

Rodriguez-Perez and Feroso は、標準活性汚泥法における汚泥の返送ラインに無酸素反応器を設置することで、真核生物の多様性と細胞密度は低下するが、余剰汚泥の発生量が53%低下したことを報告している (Rodriguez-Perez and Feroso, 2016)。Masse *et al.* は、スクリーンおよび最初沈殿池後の下水を処理する活性汚泥法と浸漬型 MBR を比較しており (どちらも間欠曝気、 20°C)、反応器内の保持汚泥濃度を高く維持すること、すなわち、有機物汚泥負荷を低く維持することで余剰汚泥発生量が抑制されていることを報告している (Masse *et al.*, 2006)。

真核生物のうち、原生動物だけでなく後生動物に関しても、その捕食による影響の解析が行われている。実証規模の標準活性汚泥法において、微小後生動物の密度が高くなるほど、余剰汚泥の発生量は低下する傾向にあることを報告している (Wei *et al.*, 2003)。Lapinski and Tunnacliffe は、後生動物のなかでも Bdelloid rotifers の捕食特性を評価しており、活性汚泥に Rotifer を添加した系の方が系内の OD600 が低下すること、植種する Rotifer の数が多いほど系内の OD600 は低下することを報告している (Lapinski and Tunnacliffe, 2003)。また Song and Chen は、活性汚泥での頻出度が高い *Aeolosoma hemprichi* の汚泥削減効果を解析しており、その結果、捕食可能な汚泥濃度と *Aeolosoma hemprichi* 細胞密度が相関関係にあること、SRT を制御することで汚泥内の *Aeolosoma hemprichi* 細胞密度を調整可能であること、を報告している (Song and Chen, 2009)。Liang *et al.* は、*Tubifex tubifex* の捕食特性の解析を、バッチ試験 (基質は滅菌した活性汚泥) にて行っており、*Tubifex tubifex* 植種量が増えることで汚泥分解量が増加していることを報告している (Liang *et al.*, 2006a)。また、*Aeolosoma hemprichi* 細胞密度が増加しても処理性能 (COD 除去、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除

去)に影響がないこと、*Aeolosoma hemprichi* 細胞密度が増加すると汚泥収率が低下することが報告されている (Liang *et al.*, 2006b)。一般的に後生動物は原生動物よりも体長が大きいいため、捕食による影響も大きく、余剰汚泥削減には後生動物の捕食が大きく寄与していると予想することができるため、これらの後生動物の生態を正しく理解し制御する必要があると考えられた。

Table 2-3 Summary of the operational condition and excess sludge production.

No.	Reactor type	Temp. (°C)	Substrate	OLR as COD (kg·m ⁻³ ·d ⁻¹)	SLR as COD (kg·kgVSS ⁻¹ ·d ⁻¹)	SRT (days)	HRT (hours)	Influent		Effluent		Retained sludge conc. (mg·L ⁻¹)	Excess sludge production (kgTSS·kgCOD ⁻¹ _{removed})									
								COD (mg·L ⁻¹)	TSS (mg·L ⁻¹)	COD (mg·L ⁻¹)	TSS (mg·L ⁻¹)											
1)	CAS+CAS	1 st : 20-27,	Synthetic			12.6	32	1000		36**	12	514 and 2301	0.28									
		2 nd : 18-30																				
CAS+MBR	Synthetic	1 st : 20-27,				12.7	53	1000		165**	0	299 and 2327	0.22									
		2 nd : 18-30																				
2)	CAS	21.4	Municipal ww		0.26	38.3	6.69	88 - 1096	36 - 878			6070	0.17									
		20.4												Municipal ww	0.13	33.3	8.47	341	155	4840	0.4	
3)	CAS	25	Synthetic		0.6	4.0	23	282		90	31		0.42									
		25												Synthetic	14.0	25.5	282	99	30	0.2		
4) a	CAS*	20	Municipal ww	0.6	0.37	9.2	16	395	153	34.3	1600		0.302***									
														0.6	0.15	32.0	16	377	160	46.2	3200	0.244***
														0.6	0.27	14.3	16	335	212	41.2	2100	0.276***
4) b	MBR*	20	Municipal ww	0.6	0.35	10	16	395	153	22	1900		0.310***									
														0.6	0.13	37.2	16	377	160	36.8	3700	0.220***
														0.6	0.08	110.3	16	335	212	27.8	7200	0.130***
5)	CAS with <i>Aeolosoma hemprichi</i>	20 - 25	Municipal ww + synthetic	0.6	0.11	53	16	361	182	24	6000		0.206***									
														0.16 - 0.30	15 - 34	1560 - 4670	0.10-0.27*****					
																	0.25-0.49*****					

Reference: (1) Ghyyoot and Verstraete, 1999, (2) Wei *et al.*, 2003, (3) Rodriguez-Perez and Ferrero, 2016, (4) Masse *et al.*, 2006, (5) I

Abbreviation:

conventional activated sludge: CAS
 membrane bioreactor: MBR
 submerged MBR: S-MBR
 oxic settling anoxic: OSA
 wastewater: ww

* intermittent aeration ** soluble COD *** unit: kgVSS·kgCOD⁻¹_{removed}
 **** *Aeolosoma hemprichi* > 50 cell·mgVSS⁻¹ ***** *Aeolosoma hemprichi* < 50 cell·mgVSS

2.3.3 真核生物の捕食から逃れる原核生物の特性

原核生物は、真核生物の捕食から逃れることができることが報告されており (Matz and Kjelleberg, 2005)、それらをまとめると次のようになる: (1) 糸状性の原核生物の方が捕食されにくい、(2) 速い速度で動く原核生物は捕食されにくい、(3) 真核生物の捕食可能なサイズよりも大きなフロックを形成する、(4) 捕食される前後で、真核生物にとって毒性のある物質を分泌する、(5) 捕食されにくい細胞壁構造や組成を有する。実際の下水・排水処理汚泥においても、原核生物が真核生物の捕食から逃れていることが報告されている。Pajdak-Stós *et al.* は、活性汚泥のスタートアップ期間における、真核生物群集構造 (特に原生動物の群集構造) と硝化細菌 (ammonia oxidation bacteria: AOB、nitrite oxidation bacteria: NOB) のフロックサイズを解析している (Pajdak-Stós *et al.*, 2010)。その結果、解析を初めてから、硝化性能が悪化することはない ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去率 80%以上)、硝化細菌のフロックサイズが大きくなったと報告しており、これにより、原生動物などの捕食から逃れることができたのではないかと報告している (Pajdak-Stós *et al.*, 2010)。

2.4 反応器運転操作因子と真核生物群集構造の関連性

Curds and Cockburn は、活性汚泥法における処理水質と真核生物群集構造 (特に繊毛虫の群集構造) との関係性を、有機物汚泥負荷を指標として用いることで整理可能であることを報告している (Curds and Cockburn, 1970b)。また、Salvadó and Gracia は、活性汚泥法 (容積負荷 $0.8 \text{ kgBOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ 以下、保持汚泥濃度が $4,000 \text{ mgVSS} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下の条件) において、有機物汚泥負荷 (有機物負荷) と真核生物の多様性は負の相関関係にあったことを報告している (Salvadó and Gracia, 1993)。有機物だけでなくアンモニア性窒素についても影響が調査されている。Puigagut *et al.* は、流入水の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度が sequencing batch reactor (SBR) の活性汚泥の真核生物群集構造に与える影響を解析しており、流入水の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度が上昇するに従い、真核生物の存在量および多様性が低下することを報告している (Puigagut *et al.*, 2005)。また、保持汚泥濃度との関係性についても解析が行われている。Madoni は、スタートアップから定常状態に至るまでの (約 100 日間)、活性汚泥法と回転円盤法における原生動物の存在量の定量を行っている (Madoni, 1994)。その結果、活性汚泥法および回転円盤法の両者とも、保持汚泥 VS あたりに占める繊毛虫の存在量 (既往の知見をもとに、同じ係数を乗じて、体積から重量を算出している) が $R^2=0.85\text{--}0.93$ で正の相関関係にあることを明らかにしている。また、両者で、スタートアップ時から定常時に至るまでの、繊毛虫の群集構造の変化は異なっていたと報告している (Madoni, 1994)。

2.5 下水・排水処理反応器における処理性能を診断するうえでの指標生物としての真核生物

原生動物のうち特に繊毛虫は、流入水の組成や反応器の運転条件に対して、素早く反応することが知られているため、代表的な指標生物として扱われている。Dubber and Gray は、活性汚泥中の原生動物 (特に繊毛虫) の多様性を検鏡により評価するうえで、最適なサンプル量、検鏡回数、解析までの時間を検討し、その結果、8 時間以内にサンプル量 $25 \mu\text{L}$ で 6 回検鏡すれば、そのサンプルに存在している原生動物の 90–95% (3 種類ほどの希少なものは検出できない) は網羅することができる結論付けている (Dubber and Gray, 2009)。Ntougias *et al.* は、間欠曝気供給反応器 (好気/無酸素条件) では、有機物負荷を段階的に増加させた結果 ($0.26, 0.40, 0.77 \text{ kgBOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$)、繊毛虫のなかでも Sessile ciliate (*Vorticella microstoma*, *Vorticella convallaria*, *Carchesium spp.*, *Epistylis spp.*, *Opercularia spp.*) のみが著しく増加していたこと、また特に、*Vorticella convallaria* と *Epistylis spp.* は容積負荷、F/M 比、BOD 濃度、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$

濃度、TSS 濃度と相関関係にあることを統計解析の結果から報告している(Ntougias *et al.*, 2011)。Canal *et al.*は、高い $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度である埋め立て浸出水(平均 $588 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$)を処理する担体付着型の無酸素好気流動床の群集構造を検鏡により解析しており、好気反応器における $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度の変動の仕方から、*Epitylis cf. rotans* の細胞密度の変動を予測すること($\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度が減少すると *Epitylis cf. rotans* の細胞密度が上昇する)ができることを報告している(Canal *et al.*, 2013)。

2.6 DHS 反応器における下水処理特性

2.6.1 下水処理 upflow anaerobic sludge blanket(UASB)- DHS システムの性能評価 (Table 2-4)

途上国向けの下水処理システムとして、下水処理 UASB 反応器と DHS 反応器を組み合わせたシステムの開発が行われている。Okubo *et al.*は、インドの下水処理システムとして、UASB-DHS システムの評価を UASB-FPU と比較して行っている。約 1,800 日間、HRT 1.5 時間、COD 負荷 $2.84 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$ (BOD 負荷 $0.91 \text{ kgBOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$) の条件のもと運転を行い、その結果、UASB-DHS システムの最終処理水の水質は、COD 濃度 $37 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (除去率 91%)、BOD 濃度 $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (除去率 95%)、TSS 濃度 $19 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (除去率 90%) であったと報告している(Okubo *et al.*, 2015)。この間の余剰汚泥の発生率は $0.04 \text{ kgTSS}\cdot\text{kgCOD}_{\text{removed}}^{-1}$ 、 $0.12 \text{ kgTSS}\cdot\text{kgBOD}_{\text{removed}}^{-1}$ であり、従来法よりもかなり低い値であり、UASB-DHS システムの性能の高さを実証している(Okubo *et al.*, 2015)。日本国内の下水を対象とした UASB-DHS システム(HRT:UASB 6 時間、DHS 2.5 時間)は、活性汚泥システム(最初沈殿池-曝気槽-最後沈殿池:HRT 12 時間)と同等の処理性能を有していることが報告されている(Tandukar *et al.*, 2007)。また、スポンジ担体をランダムに充填する DHS 反応器では、設計 HRT 2 時間に対して、実測 HRT は 20 分程度であり、有機物処理に殆ど影響がないことが報告されている(高橋ら, 2004)。以上のことから、UASB-DHS システムは発展途上国における下水処理システムとして適した技術のひとつであると言える。

2.6.2 低濃度下水処理 DHS 反応器の性能評価 (Table 2-4)

前述したように、DHS 反応器は、下水処理を行う UASB 反応器の後段処理として開発されたため、DHS 反応器単独による下水処理性能評価はあまり行われていなかった。Yoochatchaval *et al.* 及び Onodera *et al.*は、バンコクにおける低濃度下水(TSS $30\text{--}40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、BOD $20\text{--}30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ $7 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$)の適切な処理技術として、DHS 反応器単独の性能評価を行った(Yoochatchaval *et al.*, 2014; Onodera *et al.*, 2014)。BOD $20\text{--}30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度の低濃度下水であったが、HRT 4 時間から HRT 1 時間まで短縮していき、最終的に HRT 1 時間の条件で 140 日間の連続運転を行った。その結果、DHS 処理水は良好な水質を示したことを報告している(TSS $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、BOD $2.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ は検出限界以下)(Onodera *et al.*, 2014)。また、試験期間中の流入する下水の全窒素濃度は $5\text{--}10 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度であり、HRT 1 時間の高負荷条件においても、処理水の全窒素濃度 $5 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下を達成している(Yoochatchaval *et al.*, 2014)。

2.7 DHS 反応器における処理機構解明の試み

2.7.1 有機物除去およびアンモニア性窒素除去(硝化反応)

下水処理 UASB-DHS システムの DHS 反応器における有機物およびアンモニア性窒素除去機構解明のため、Kubota *et al.*は rRNA アプローチにより微生物群集構造解析を行っている。その結果、DHS 反応器の高さ方向および

季節で微生物群集構造(*Bacteria* の 16Sr RNA 遺伝子配列に基づくクローン解析: Eub 338 mix と Univ 1500 のプライマー対で PCR)は大きく異なっており、ammonia-oxidizing bacteria(AOB) (定量 PCR 法により *amoA* 遺伝子を定量し、活性汚泥と同程度の存在率であった)の存在数が DHS 反応器中部から下部で増加していること、有機物除去に関わっていきそうなファイロタイプ(*Dechloromonas* 属)が多数得られたことを報告している(Kubota *et al.*, 2014)。通性嫌気性微生物である *Dechloromonas* 属に近縁な微生物は、スポンジ担体に形成された生物膜内部の溶存酸素濃度が $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ に近いことから(Araki *et al.*, 1999; Machdar *et al.*, 2000)、嫌気的環境下において有機物分解に係わっていることを推定している。このように DHS 反応器では、流下方向に異なる微生物群を保持していることは、高塩分・アンモニア性窒素含有排水(塩分濃度 1.76%、フェノール $1,400 \text{ mgCOD}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ $500 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$)を処理する DHS 反応器においても確認されている(Uemura *et al.*, 2010)。Uemura *et al.*は、スポンジ担体への水の流れと酸素供給能を解析しており、DHS 反応器の酸素供給能(K_{La})は人為的な曝気を行っている反応器(活性汚泥法、回転円盤法)と同等の値を有していること、流入 SS はスポンジ担体の空隙に蓄積することで処理性能の悪化を引き起こす可能性があることを報告している(Uemura *et al.*, 2016)。

2.7.2 大腸菌除去

下水処理を行う DHS 反応器では、卓越した大腸菌除去性能が実証されている。Tawfik *et al.*は DHS 反応槽における大腸菌の除去能力を最適化するための基礎的知見収集のため、どのような因子が大腸菌除去に影響を及ぼすのかを調査している。その結果、スポンジ担体への吸着の方が、真核生物による捕食よりも、主要な大腸菌除去機構であると報告している(Tawfik *et al.*, 2006)。また、大腸菌除去率は、スポンジ担体の孔径が小さく、スポンジ担体に保持されている時間が長いほど、高くなることを報告している(Tawfik *et al.*, 2006)。以上より、スポンジ担体の形状は基質となる細菌(大腸菌)の吸着が行なわれ易いため、優れた大腸菌除去能力を有しているのだと考えられた。また Uemura *et al.*は、第二世代 DHS 反応器のスポンジ担体の大きさが、日本国内の沈殿下水の Fecal coliform 除去性能に与える影響を評価しており、その結果、スポンジ担体が小さい方が設計 HRT と実 HRT の差が少なく(トレーサー試験に評価: 差が少ない方が基質と保持汚泥の接触効率が良い)、かつ DO 供給能が高いため(素早く DO 濃度が飽和濃度に近づく)、処理性能(Fecal coliform、COD、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去性能)が良いことを報告している(Uemura *et al.*, 2012)。

2.7.3 余剰汚泥発生の抑制(Table 2-5)

下水処理を行うUASB-DHSシステムのDHS反応器では、様々なスポンジ担体形状において、好気性処理にも関わらず、余剰汚泥発生量が少ないことが実証されている(Machdar *et al.*, 1997; Tandukar M *et al.*, 2006)。Onodera *et al.*は、下水処理を行うUASB反応器とDHS反応器を組み合わせたシステムの性能評価(処理性能、余剰汚泥発生量)を行っている。その結果、DHS反応器において余剰汚泥発生量が抑制される要因は、保持汚泥量が高く有機物汚泥負荷(F/M比)が低く維持されていることに加え、保持汚泥の酸素消費活性が高いため、汚泥生成量と汚泥分解量が拮抗するためであると報告している(Onodera *et al.*, 2013)。加えて、保持汚泥1mLあたりの原生動物・後生動物の生息数が活性汚泥法よりも1から2桁高いことから、原生動物・後生動物による細菌や汚泥の捕食分解によって、余剰汚泥発生が抑制されている可能性もあると報告している(Onodera *et al.*, 2013)。

Table 2-4 Summary of the treatment performance of the DHS reactor under various conditions.

No.	Wastewater	Country	Temp. (°C)	HRT (hours)	OLR as COD ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$)	Volume (L)	Sponge type	Influent				Effluent			
								TSS ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	COD ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Total coliform (MPN·100mL ⁻¹)	TSS ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	COD ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Total coliform (MPN·100mL ⁻¹)
1)	UASB effluent	Japan	25	1.3	2.66	0.30	G1	75	144	32	n.a.	N.D.	40	6	n.a.
2) a	UASB effluent	Indonesia	27-30	2.3	0.72	0.35	G1	n.a.	69	27	n.a.	n.a.	18	6	n.a.
2) b	Sewage	Indonesia	27-30	8	0.67	0.16	G1	n.a.	224	26	n.a.	n.a.	15	0.7	n.a.
3)	UASB effluent	India	15-30	1.5	2.84	31100	G2	53	177	26	4.87×10^6 **	19	37	6	$1.57\times 10^{3**}$
4) a	Sewage	Japan	25	2	1.27	0.24	G2 (60)	---	106.2	18.6	3.00×10^6 ***	n.a.	14.1	1.2	3.22×10^2 ***
4) b	Sewage	Japan	25	2	1.27	0.24	G2 (38)	---	106.2	18.6	3.00×10^6 ***	n.a.	16.5	1.8	5.22×10^2 ***
4) c	Sewage	Japan	25	2	1.27	0.24	G2 (27)	---	106.2	18.6	3.00×10^6 ***	n.a.	17.5	2.2	1.74×10^2 ***
5)	UASB effluent	Japan	12-21	2.7	1.6	51.6	G3	47	178	n.a.	n.a.	12	43	3	n.a.
6)	UASB effluent	Japan	10-28	3.2	0.85	454	G3	33	113	27	n.a.	12	36	3	n.a.
7) a	UASB effluent	Japan	17-28	3.1	1.37	454	G3	40	177	26	n.a.	20	48	8	n.a.
7) b	UASB effluent	Japan	9-17	3.1	1.39	454	G3	35	180	21	n.a.	23	65	11	n.a.
8) a	Sewage	Thailand	28-30	4	0.40	101	G3	36.3	66.8	7	1.13×10^6 *	0.9	22	0.1	8.5×10^1 *
8) b	Sewage	Thailand	28-30	2	0.75	101	G3	33.4	62.6	6.9	1.29×10^6 *	1.3	25.4	0.1	7.3×10^1 *
8) c	Sewage	Thailand	28-30	1.5	0.74	101	G3	27	46	5.7	0.94×10^6 *	1	18	0	1.8×10^2 *
8) d	Sewage	Thailand	28-30	1	1.45	101	G3	29.4	60.5	7.3	0.72×10^6 *	5.1	21.1	0.2	1.6×10^2 *
9)	UASB effluent	Japan	20-25	2	2.4	375	G4	66	195	25	5.8×10^6	17	46	18	3.4×10^4
10)	UASB effluent	Japan	9-32	2.5	2.18	480	G5	40.9	226.8	22.8	$5.3\times 10^{6**}$	17.5	62	8.8	$3.8\times 10^{4**}$
11)	UASB effluent	Japan	12-27	2	2.03	46	G6	44	169	24.6	7.27×10^6	17	48	4.1	2.21×10^4

* unit: CFU·100mL⁻¹** unit: Fecal coliform (MPN·100mL⁻¹)*** unit: Fecal coliform (CFU·100mL⁻¹)

N.D.: not detected

n.a.: not analyzed

Reference: (1) Araki et al., 1999, (2) Machdar et al., 2014, (3) Okubo et al., 2015; Onodera et al., 2016, (4) Uemura et al., 2012, (5) Tawfik et al., 2006, (6) Onodear et al., 2013, (7) Hatamoto et al., 2016, (8) Onodera et al., 2014; Yoochatchaval et al., 2014, (9) Tandukar et al., 2005; Tandukar et al., 2006, (10) Tandukar et al., 2007, (11) Onodera et al., 2014.

Table 2-5 Summary of the excess sludge production of the DHS reactor under various conditions.

No.	Wastewater	Country	Temp. (°C)	HRT (hours)	OLR as COD (kg·m ⁻³ ·day ⁻¹)	Volume (L)	Sponge type	Retained sludge conc. (gVSS·L ⁻¹)	Excess sludge production (gTSS·gCOD ⁻¹ _{removed})	Influent		Effluent	
										TSS (mg·L ⁻¹)	COD (mg·L ⁻¹)	TSS (mg·L ⁻¹)	COD (mg·L ⁻¹)
1)	UASB effluent	India	15 - 30	1.5	2.84	31100	G2	28-36	0.04	53	177	19	37
2)	UASB effluent	Japan	10 - 28	3.2	0.85	454	G3	27	0.09	33	113	12	36
3) a	UASB effluent	Japan	17 - 28	3.1	1.37	454	G3	11	0.218**	40	177	20	48
3) b	UASB effluent	Japan	9 - 17	3.1	1.39	454	G3	11	0.218**	35	180	23	65
4) a	Sewage	Thailand	28 - 30	4	0.40	101	G3	0-12		36.3	66.8	0.9	22
4) b	Sewage	Thailand	28 - 30	2	0.75	101	G3	3-15		33.4	62.6	1.3	25.4
4) c	Sewage	Thailand	28 - 30	1.5	0.74	101	G3	5-22		27	46	1	18
4) d	Sewage	Thailand	28 - 30	1	1.45	101	G3	15.3-24.6	0.051 (0.11*)	29.4	60.5	5.1	21.1
5)	UASB effluent	Japan	20 - 25	2	2.40	375	G4	26	0.12*	66	195	17	46
6)	UASB effluent	Japan	9 - 32	2.5	2.18	480	G5	26.7	0.02	40.9	226.8	17.5	62
7)	UASB effluent	Japan	12 - 27	2	2.03	46	G6	12-19	0.08 (0.12*)	44	169	17	48

* unit: gTSS·gBOD⁻¹_{removed} n.a.: not analyzed** unit: gVSS·gCOD⁻¹_{removed}

Reference: (1) Okubo et al., 2015; Onodera et al., 2016, (2) Onodera et al., 2013, (3) Hatamoto et al., 2016, (4) Onodera et al., 2014; Yoochatchaval et al., 2014, (5) Tandukar et al., 2005; Tandukar et al., 2006, (6) Tandukar et al., 2007, (7) Onodera et al., 2014.

2.8 真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析

従来、真核生物の種の同定手法には、形態的な特徴を指標とした形態学的分類手法が用いられてきた。近年、分子生物学的手法の導入により、遺伝子の塩基配列による分類体系が構築され始めている。なかでも、最も広く研究が行われているのは、ribosomal ribonucleic acid (rRNA) 遺伝子配列に基づく同定方法である。この手法では、塩基配列に基づいて種の同定を行うため、主観が入る可能性は限りなく少ない。rRNA はあらゆる生物に必要なタンパク質の合成器官であるリボソームに含有される RNA である。真核生物のリボソームは、沈降定数 25S と 8S からなる large subunit (LSU)、18S からなる small subunit (SSU) があり、解析の対象として用いられるものは SSU rRNA (18S rRNA) である(なお、原核生物の場合は 16S rRNA である)。真核生物の群集構造解析には、この 18S rRNA をコードしている遺伝子である 18S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析が適用されている。Fig. 2-1 に、下水・排水処理汚泥において検出されるファイロタイプの代表的なものを示す。分類体系は、目まぐるしく改変されているものの(2002 年に Cavalier-Smith, 2012、2005 年に Adl *et al.*, 2005、2012 年に Adl *et al.*, 2012)、現在は、Adl *et al.*, 2012 で提唱されているものが公式的である(この分類体系は国際原生生物学会および silva(分子系統解析ソフトウェア ARB で使用する rRNA のデータベースを提供しているウェブサイト)で採用されている)。しかしながら、この分類体系であっても不確実性が指摘されている(Parfrey *et al.*, 2006)。

Liu *et al.* は、河川の表層水の試料(試料を、200 μm のフィルターを用いて前処理を行った後、10 μm のフィルター上に残ったもの)を対象として、繊毛虫のなかでも *Peritrich* の 18S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析を行っている(*Peritrich* は顕微鏡による観察では多様性が過小評価されている)(Liu and Gong, 2012)。この論文では、*Peritrich* に特異的なプライマーをいくつか作成しており、それらを使用してクローン解析を行うことで、塩分濃度が高くなると多様性が低くなること、検鏡では見逃されていた種が存在する可能性があること、*Peritrich* の群集構造の定性的定量的な解析が可能であること、が報告されている(Liu and Gong, 2012)。Kok *et al.* は、海水サンプルに対して同様に前処理を行った後、NCBI の塩基配列データをもとに設計したプライマー二つを使用してクローン解析を行っている(Kok *et al.*, 2012)。結果として、Nested PCR を行うことでユニバーサルプライマーである EukA と EukB のプライマー対を使用したクローン解析よりも、Candidate グループを含む多くの真核生物の検出に成功(全体のクローンの 74%は dinoflagellate が占める)している(Kok *et al.*, 2012)。

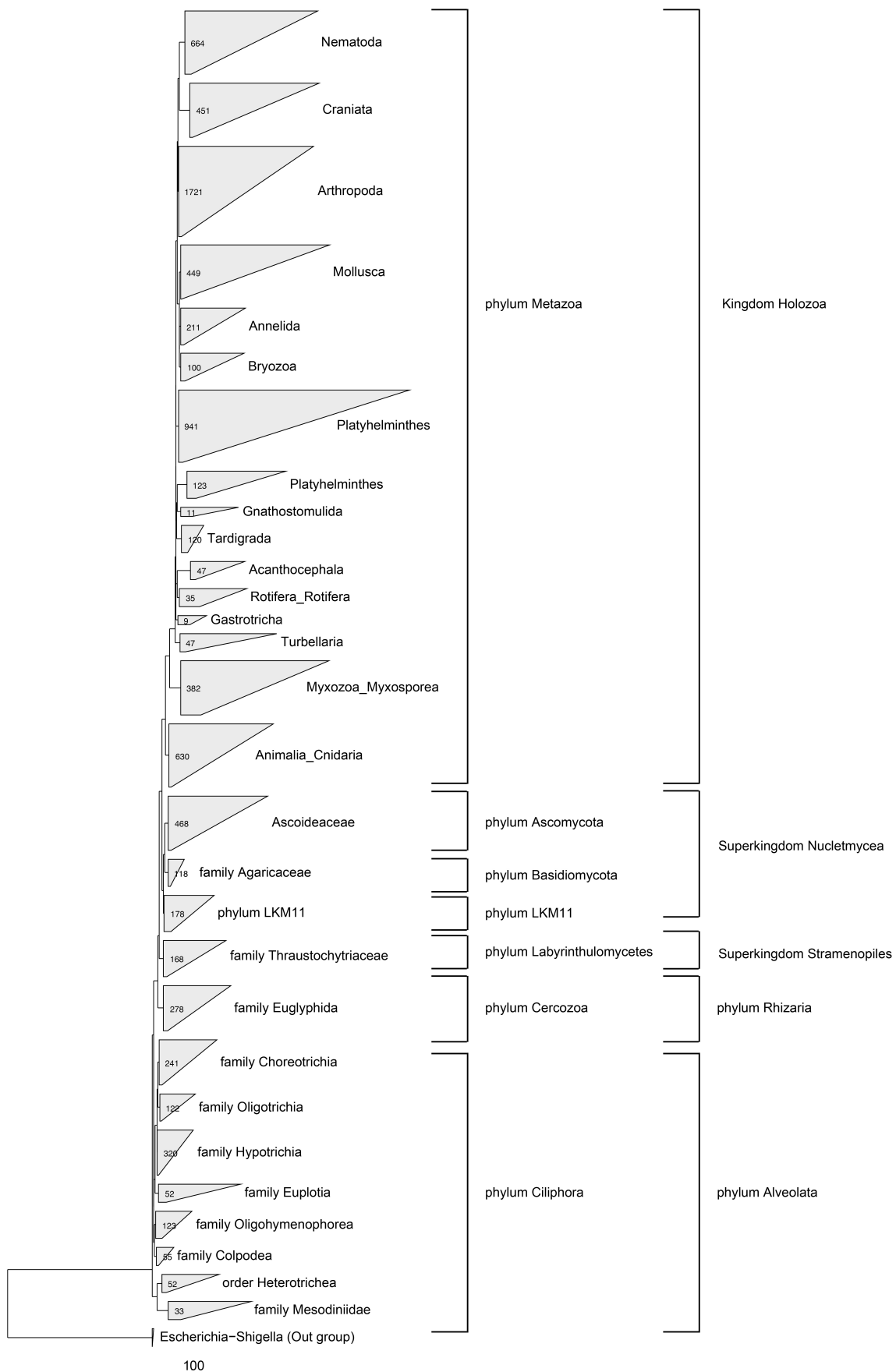


Fig. 2-1 The phylogenetic positions of representative eukaryotes within the domain *Eukaryota*.

2.8.1 下水・排水処理汚泥の真核生物群集構造解析

下水・排水処理汚泥を対象として真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析を適用した報告のうち (Table 2-6)、ユニバーサルプライマーとして使用されるプライマー対は、EukA と EukB の組み合わせである。このプライマー対 (EukA と EukB) は、真核生物のうち、algae、fungi、protozoa の 18S rRNA 遺伝子配列領域を標的とするものである (Medlin *et al.*, 1988)。また、protozoa の 18S rRNA 遺伝子配列領域を標的とするプライマー対についても提案が行われている (この論文では特に牛の胃の中の原生動物 (嫌気性原生動物) を標的: Karnati *et al.*, 2003)。これらのプライマー対を用いて、下水・排水処理汚泥の真核生物群集構造解析を行った報告がある。Marsh *et al.* は、実下水処理を行う活性汚泥を対象として、18S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析を行っており、600–700 塩基の決定を行い、11 クローン中全てが Ciliophora に属していることを明らかにしている。また、この活性汚泥を植種として、グルコースとペプトンからなる人工基質で 5 週間培養を行い、DGGE と TRFLP で群集構造の推移を評価している。その結果、DGGE よりも TRFLP のほうが、より多くの phylotype を検出することに成功しており、両者とも 5 週間の培養期間中、真核生物の多様性は低下する方向にあること (phylotype が減少する) を報告している (それぞれのバンドやピークに関して、塩基配列の決定は行っていない) (Marsh *et al.*, 1998)。Matsunaga *et al.* は、日本国内の下水処理を行う活性汚泥法、オキシデーションディッチ法、無酸素・酸素活性汚泥法の保持汚泥を対象として、18S rRNA 遺伝子に基づいた群集構造解析を行った。その結果、クローニング法により得られた塩基配列のうち 60% が、NCBI のデータベースにある既知の真核生物の塩基配列との相同生が 97% 以下であり、下水処理装置内の保持汚泥には未知な真核生物が存在していることを明らかにしている (Matsunaga *et al.*, 2014)。また、未培養系統群 LKM11 に近縁なクローンが、Fungi のなかで優占化しており (Fungi のなかの 78% が該当)、解析を行った保持汚泥 9 つうち、4–5 つで共通して存在していることが分かった。8 つの保持汚泥で共通して存在している真核生物は、*Epistylis chrysemydis* に近縁 (相同生は 97–100%) であり、解析を行った 834 クローンのうち 302 クローン (全クローンのうち 36%) であることが分かった (Matsunaga *et al.*, 2014)。また、松永らは、下水処理を行う嫌気好気活性汚泥法および DHS 反応器の保持汚泥を対象として 18S rRNA 遺伝子に基づいた群集構造解析を行い、処理方式によって構成される真核生物群集構造が大きく異なっていること (嫌気好気活性汚泥: 原生動物繊毛虫を主体、DHS リアクター: 後生動物を主体) を報告している (松永ら, 2012)。また、分子系統解析では、顕微鏡観察では評価し難い菌類についても同定可能であるが、多細胞生物である後生動物の生息数が高い場合、後生動物由来の DNA 量が相対的に多くなるため、検鏡結果と大きく異なる結果になることを指摘している (松永ら, 2012)。活性汚泥を解析対象とした場合は、このような現象は確認されていないため、網羅的に真核生物群集構造解析を行う場合、フィルターなどを用いて試料から、細胞数の多い後生動物と細胞数の少ない原生動物を分離させる必要があると言える。Ntougias *et al.* は、間欠曝気供給反応器 (好気/無酸素条件) における有機物負荷が $0.77 \text{ kgBOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ の時に、繊毛虫の 18S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析を行っており (384f/1147r のプライマー対で PCR)、その結果、別途行った検鏡による解析結果と同様であり、かつ、繊毛虫を種レベルで解析可能であったことから、分子生物学的手法は有用な解析手法だと結論付けている (Ntougias *et al.*, 2011)。

嫌気性処理汚泥 (UASB 反応器) を対象としたクローン解析も行われている。高橋らは、日本国内の初沈後の下水を処理する UASB 反応器の保持汚泥を対象として、18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析 (EukA と EukB、PSSU-342f と EukB の二つのプライマー対) を実施している (高橋ら, 2011)。その結果、EukA と EukB のプライマー対では、

解析したクローンの約40%が原生動物に属するファイロタイプ(約60%は藻類や真菌に属するファイロタイプ)が占めており、PSSU-342fとEukBの二つのプライマー対では、98%が原生動物であったと報告している(高橋ら, 2011)。

非特異的な産物が生成されてしまうことが報告されている(Villegas-Rivera *et al.*, 2012)。

Table 2-6 Summary of the primer pair for clone library of 18S rRNA gene-sequence.

No.	Primer	Sequence (5'-3')	Sample	Target affiliation	Reference
1)	Euk A	AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT	Isolated eukaryote	Eukaryote	Medlin et al., 1988
	Euk B	TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC			
2)	18S-42F	CTC AAR GAY TAA GCC ATG CA	Sediment core and sea water	Eukaryote	López-García et al., 2003
	18S-82F	GAA ACT GCG AAT GGC TC			
	18S-1498R	CAC CTA CGG AAA CCT TGT TA			
	18S-1520R	CYG CAG GTT CACCTA C			
3)	PSSU-342F	CTT TCG ATG GTA GTG TAT TGG ACT AC	Ruminal fluid	Protozoa	Karnati et al., 2002
4)	FR1	ANC CAT TCA ATC GGT ANT	Wood fragment	Fungi	Vainio et al., 2000
	FF390	CGA TAA CGA ACG AGA CCT			
	FF700	GAT ACC GTN GTA GTC T			
	FF1100	CCA GCT CCA ATA GCG TAT AIT A			
5)	nu-SSU-0817-5'	TTA GCA TGG AAT AAT RRA ATA GGA	Isolated fungi and fallen leaves	Fungi	Borneman et al., 2000
	nu-SSU-1196-3'	TCT GGA CCT GGT GAG TTT CC			
	nu-SSU-1536-3'	ATT GCA ATG CYC TAT CCC CA			
6)	s12.2	GAT YAG ATA CCG TCG TAG TC	Isolated testate amoeba	Amoebozoa	Nikolaev et al., 2005
	sB	TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC			
	sA	ACC TGG TTG ATC CTG CCA GT			
	s6	CNG CGG TAA TTC CAG CTC			

2.9 遺伝子解析ツールを用いた真核生物の機能解析

2.9.1 下水・排水処理汚泥において捕食を行う真核生物の同定

下水・排水処理汚泥において、捕食を行う真核生物の同定を行った報告がある。Moreno *et al.* は、RNA-stable isotope probing 法を活用して、活性汚泥にて細菌を捕食する原生動物の同定を行っている (Moreno *et al.*, 2010)。具体的には、硫酸アンモニウムと ^{13}C で標識した重炭酸ナトリウムを基質として、活性汚泥を数時間培養し、その真核生物群集構造の推移を、経時的に採取した汚泥試料の complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) (汚泥試料から RNA を抽出し、逆転写 polymerase chain reaction (PCR) を行うことで cDNA を合成) を鋳型として denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) で評価した結果、*Epistylis galea* と 95% の相同性を持つバンドと同位置にあると考えられるバンドの蛍光がコントロール系 (^{13}C で標識した重炭酸ナトリウムのみを基質とした系) と比較して強かったことから、*Epistylis galea* がアンモニア酸化細菌 (重炭酸ナトリウムを同化する) を捕食していたと報告している (Moreno *et al.*, 2010)。

2.9.2 脱窒反応を担う真核生物

真核生物は脱窒活性を有しており、下水・処理反応器内においても活躍している可能性がある。Risgaard-Petersen *et al.* は、窒素の安定同位体 ^{15}N で標識した硝酸塩を基質として利用して、*Globobulimina pseudospinescens*、*Nonionella cf. stella* が細胞内に硝酸塩を蓄積し、それを電子受容体として窒素まで還元することが報告されている (Risgaard-Petersen *et al.*, 2006)。海底堆積物では、上記のような性質を持つ真核生物による脱窒速度は、原核生物と同程度であることが報告されている (Piña-Ochoa *et al.*, 2010)。下水・排水処理反応器内において、真核生物による脱窒反応の寄与度評価を試みた報告がある。Laurin *et al.* は、メタノールを炭素源として脱窒反応を行う担体投入型の反応器 (流入 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度 50 mgN/L) において、保持汚泥の真核生物による脱窒活性を真核生物代謝阻害剤 (cycloheximide および nystain) を用いて評価したところ、真核生物の有無は脱窒活性には影響しないと報告している (Laurin *et al.*, 2008) (真核生物の代謝阻害剤を添加することで、Bacteria community に変化がないこと、脱窒活性試験の前後で保持汚泥量に変化がないことを確認しており、また、真核生物代謝阻害剤を添加した系は、捕食者 (真核生物) が存在せず分散状の細菌が増殖していることを検鏡によって確認している)。

祥雲の報告によれば、*Fusarium oxysporum* は、嫌氣的環境下では硝酸塩を電子受容体、エタノールを電子供与体として酢酸とアンモニア性窒素を生成し、好氣的条件下では硝酸塩を電子受容体として亜酸化窒素を生成する (祥雲、2006, Fig. 2-2)。このことは、このような真核生物を下水・排水処理反応器に保持することができれば、好氣的条件を維持したまま脱窒反応を期待することができる (通常、原核生物による脱窒は無酸素条件で行われる)。通常、原核生物による脱窒では、硝酸塩還元酵素、亜硝酸塩還元酵素、一酸化窒素還元酵素、亜酸化窒素還元酵素が触媒として働き、最終的に窒素が生成される。しかしながら、*Fusarium oxysporum* は亜酸化窒素還元酵素を持っていないため、最終的に亜酸化窒素が生成されることになる (祥雲、2006, Fig. 2-2)。また、このとき、電子受容体の種類によって最終産物が異なり、電子受容体が硝酸塩のみであれば、亜酸化窒素が生成するが、亜硝酸塩と有機体窒素があれば、窒素が生成する (祥雲、2004, Fig. 2-2)。

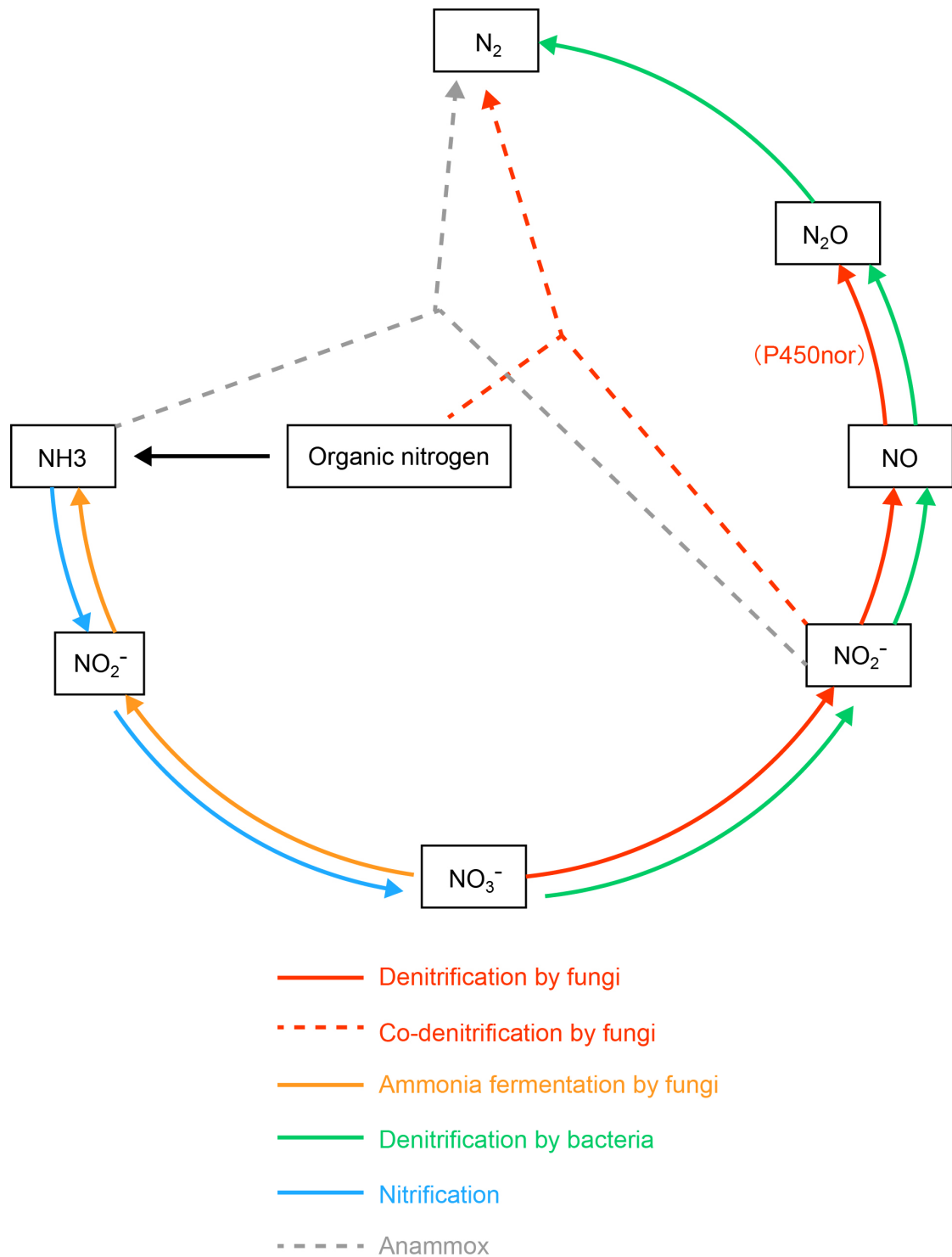


Fig. 2-2 Nitrogen cycle including fungi not only but also bacteria (Reference: 祥雲, 2004; 祥雲, 2006)

2.10 分子生物学的手法による真核生物群集構造解析時の特徴

2.10.1 真菌に特異的なプライマーを用いた解析

標準活性汚泥法のような一般的な下水・排水処理反応器では、真核生物は処理に直接関与しないことから、解析の対象外であった。しかしながら、分子生物学的手法を用いた解析を適用することで、真核生物のうち、真菌（一般的にはカビに分類されるもの）が生物膜形成に寄与することが示唆されている。特に、sequence batch reactor (SBR) では、真核生物が好気性グラニュール（球状生物膜）形成に寄与することを、18S rRNA 遺伝子配列および ITS 領域の遺伝子配列に基づくクローン解析によって明らかにしている (Weber *et al.*, 2009)。また、真核生物のうち真菌は、セルロース分解酵素を有していることが報告されていること (Baldrian *et al.*, 2008) から、下水中の固形性有機物（例：セルロース）分解に寄与している可能性がある。その一方で、活性汚泥法の曝気槽の環境条件によっては、一部の真菌がバルキング現象に関与する報告もあり、それらの動態等を正しく理解する必要がある。Zheng *et al.* は、高濃度の硫酸塩を含む有機性産業排水 (pH 3.9–4.7, COD 約 30 g·L⁻¹, 硫酸塩約 2 g·L⁻¹) を HRT 60 hrs 条件下で処理する活性汚泥において、曝気量を変化させることで、溶存酸素濃度 (DO) を < 0.5、> 2.0 mg·L⁻¹ に調整したところ、DO < 0.5 mg·L⁻¹ では問題なかったが、DO > 2.0 mg·L⁻¹ では汚泥がバルキングしたと報告しており、そのバルキング汚泥から DNA 抽出を行い真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析を行うことで、バルキングに関与する真核生物群集の同定を行っている (Zheng *et al.*, 2011)。この報告では、同時に FISH とフローサイトメトリーを組み合わせた解析を行っており、*Bacteria* の細胞数は大きく変化していないが、*Trichosporon asahii* の細胞数が DO > 2 mg·L⁻¹ の条件で急激に増加していることから、この論文で報告のあったバルキング現象は真核生物によるものと結論付けている (Zheng *et al.*, 2011)。このように、真核生物は環境条件（反応器の運転条件）によって急激に増殖することもあり、時にはバルキング問題を引き起こすこともあるため、真核生物の動態や生理学的特性を解析することは非常に重要であると言える。

2.10.2 DNA 抽出方法

真菌の DNA 抽出は、その細胞壁構造や化学組成が異なるため、共通した方法が今のところない。Evans and Seviour は、活性汚泥の真核生物群集構造解析（特に *fungi* に着目）を行っており、DNA 抽出方法はビーズビーディングによる方法が一番良く（5 つの DNA 抽出の商品を使って、純菌および活性汚泥試料から DNA 抽出を行い、DGGE により群集構造解析を行った結果、ビーズビーディングによる方法が最も検出できるファイロタイプが多かったため）、抽出した DNA を鋳型として 18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析を行ったところ（プライマー対は、EF4/EF3、約 1,500 塩基の増幅）得られたファイロタイプの殆どが近年提唱された分類群である Cryptomycota に属しており、また、培養法では良く検出される真核生物がクローン解析では検出できなかったと報告している (Evans and Seviour, 2012)。Weber *et al.* は、酵素処理と物理的破碎（ビーズビーディング）を組み合わせた方法が最適である（DNA の純度は高くその後の PCR での遺伝子断片増幅が上手くいくため）と結論付けている (Weber *et al.*, 2009)。その一方で、Villegas-Rivera *et al.* は、ビーズビーディングによる物理的破碎による DNA 抽出は、純度は高く収率はやや低いが、PCR での増幅時に非特異的な産物が生成されてしまうことが報告されている (Villegas-Rivera *et al.*, 2012)。以上より、真核生物全体の群集構造を評価するにあたり、現在のところ、ビーズビーディングによる物理的な破碎方法が最適であると考えられる（但し、PCR 時に非特異的な増幅がないことを確認する必要がある）。

2.10.3 検鏡と 18S rRNA 遺伝子を標的とした解析手法の比較

真核生物の 18S rRNA 遺伝子を対象とした系統分類と従来までの形態による分類を比較する研究も行われている。これは形態による分類では、困難であったわずかな違いによる種同士の同定および種レベルでの詳細な解析を行うために行われている。検鏡による解析は、煩雑で時間がかかり過ぎ、ルーティン分析に適していないことが指摘されており、標的とするグループの同定に FISH 解析が検討されており、海洋サンプルを対象として、属や種に特異的なオリゴヌクレオチドプローブ（真核生物に特異的なプローブ：Euk1209R、Euk502R、Euk309R、EukB）の提案が行われている（Lim *et al.*, 1993）。Shimano *et al.* は、長期間培養が困難な繊毛虫の同定を行う場合、試料中から一細胞ずつ取り出して、その 18S rRNA 遺伝子配列を決定する方法が、客観的な指標で同定可能である、属や種などの詳細な分類で解析可能である、などの点から有力であると報告している（Shimano *et al.*, 2008）。また、Shimano *et al.* は、繊毛虫は環境中のストレスによって細胞形態を変化させる種もあり、信頼性のある解析を行うため、土壌試料中の繊毛虫類を標的としたユニバーサルプライマーと Ciliate-specific プライマーによる解析手法（ビーズビーディング DNA 抽出の前に凍結融解と超音波処理を行うことで DGGE 解析時のバンドが増える）を提案している（Shimano *et al.*, 2012）。Bass and Cavalier-Smith は、41 つの環境サンプルを対象に 18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析（ユニバーサルプライマーと Cercozoan-specific プライマーの組み合わせ）を実施しており、phylum Cercozoa（門全体で形態学的な特徴が少ない）のなかでも少なくとも 9 つの新しいクレード（order level、目レベル）が存在すると報告している（Bass and Cavalier-Smith, 2004）。Zhu *et al.* は植物性のプランクトンは体長と 18S rRNA 遺伝子量は高い相関関係にあることを報告している（Zhu *et al.*, 2005）。したがって遺伝子量の定量値から汚泥中に占める体長を推定することも可能であると考えられる。

2.11 小括

本章では、既往の知見として、下水・排水処理汚泥における真核生物の特徴やその重要性、下降流懸垂型スポンジ(DHS)反応器による下水処理特性やその処理機構、真核生物の18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析の特徴やその問題点を取りまとめた。それらを要約すると次のようになる。

1. 下水・排水処理汚泥では、原核生物だけでは十分な処理水質を得ることができず、真核生物が存在することで処理水質が改善される。また、固形物分解および脱窒反応に関与する真核生物に関する報告もなされている。このように、真核生物に関する研究報告は少ないものの、その下水・排水処理汚泥において重要な役割を担っている可能性がある。そのため、真核生物の群集構造を解析し、下水・排水処理汚泥内での機能を明らかにすることは、処理性能の向上や安定化のために重要な知見になりうると言える。
2. UASB 反応器と DHS 反応器を組み合わせたシステムは、途上国の下水処理に適した省エネルギー型の下水処理技術であると言える。しかしながら、DHS 反応器単独に下水処理に適用した報告は少なく、それは $\text{BOD } 30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 前後の低濃度下水を対象としたものである。さらには、実際の処理現場で問題となってくる有機物負荷の変動(有機物濃度や水理的滞留時間)に対する評価について十分に評価されていない。そのため、基本的な運転操作因子である有機物負荷の変化が、DHS 反応器の処理特性に与える影響について解析することは、DHS 反応器単独による下水処理を試みるうえで非常に重要な知見になりうると言える。
3. 真核生物の18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析では、機能未知な真核生物の存在が、標準活性汚泥法において確認された。また、他の解析ツールと併用して解析を行うことで、捕食を行う真核生物の同定もなされてきている。その一方で、真核生物の18S rRNA 遺伝子配列情報は、原核生物の16S rRNA 遺伝子配列情報と比較すると少なく、十分なデータベースの構築に至っていない。このことは、特定の系統分類群を標的とする PCR 用のプライマーの設計が網羅的に十分にできない可能性を示唆するものである。そのため、クローン解析により、18S rRNA 遺伝子配列の全長を決定することは、今後の真核生物群集の解析を進めていくうえで、重要な知見になりうると言える。

参考文献

- Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, Mccourt RM, Mendoza L, Moestrup Ø, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, and Taylor MFJR (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 52 (5): 399-451
- Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Gall LL, Lynn DH, Mcmanus H, Mitchell EAD, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, and Spiegel FW (2012) The revised classification of eukaryotes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 59 (5): 429-493
- Araki N, Ohashi A, Machdar I, and Harada H (1999) Behaviors of nitrifiers in a novel biofilm reactor employing hanging sponge-cubes as attachment site. *Water Science and Technology* 39 (7): 23-31
- Baldrian P and Valášková V (2008) Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Review* 32: 501-521.
- Bass D and Cavalier-Smith T (2004) Phylum-specific environmental DNA analysis reveals remarkably high global biodiversity of Cercozoa (Protozoa). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 2393-2404
- Biagini GA, Finlay BJ, and Lloyd D (1998) Protozoan stimulation of anaerobic microbial activity: enhancement of the rate of terminal decomposition of organic matter. *FEMS Microbiology Ecology* 27: 1-8
- Canals O, Salvadó H, Auset M, Hernández C, and Malfeito JJ (2013) Microfauna communities as performance indicators for an A/O shortcut biological nitrogen removal moving-bed biofilm reactor. *Water Research* 47: 3141-3150
- Cavalier-Smith T (2002) The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 297-354
- Curds CR and Fey J (1969) The effect of ciliated protozoa on the fate of *Escherichia coli* in the activated-sludge process. *Water Research* 3: 853-867
- Curds CR and Cockburn A (1970a) Protozoa in biological sewage-treatment process- I . A survey of the protozoan fauna of British percolation filters and activated-sludge plants. *Water Research* 4: 225-236
- Curds CR and Cockburn A (1970b) Protozoa in biological sewage-treatment process- II . Protozoa as indicators in the activated-sludge process. *Water Research* 4: 237-249
- Dubber D and Gray NF (2009) Enumeration of protozoan ciliates in activated sludge: Determination of replicate number using probability. *Water Research* 43: 3443-3452
- Evans TN and Seviour RJ (2012) Estimating biodiversity of fungi in activated sludge communities using culture-independent methods. *Microbial Ecology* 63: 773-786
- Fried J and Lemmer H (2003) On the dynamics and function of ciliates in sequencing batch biofilm reactors. *Water Science and Technology* 47 (5): 189-196.

- Ghyoot W and Verstraete W (1999) Reduced sludge production in a two-stage membrane-assisted bioreactor. *Water Research* 34 (1): 205-215.
- Hatamoto M, Ohtsuki K, Maharjan N, Ono S, Dehama K, Sakamoto K, Takahashi M, and Yamaguchi T (2016) Performance evaluation of the sulfur-redox-reaction-activated up-flow anaerobic sludge blanket and down-flow hanging sponge anaerobic/anoxic sequencing batch reactor system for municipal sewage treatment. *Bioresource Technology* 204: 171-176
- Karnati SKR, Yu Z, Sylvester JT, Dehority BA, Morrison M, and Firkins JL (2003) Technical note: Specific PCR amplification of protozoal 18S rDNA sequences from DNA extracted from ruminal samples of cows. *Journal of Animal Science* 81: 812-815
- Kok SP, Kikuchi T, Toda T, and Kurosawa N (2012) Diversity analysis of protistan microplankton in Sagami Bay by 18S rRNA gene clone analysis using newly designed PCR primers. *J Oceanogr* doi: 10.1007/s10872-012-0121-0
- Kubota K, Hayashi M, Matsunaga K, Iguchi A, Ohashi A, Li YY, Yamaguchi T, and 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
- Lapinski J and Tunnacliffe A (2003) Reduction of suspended biomass in municipal wastewater using bdelloid rotifers. *Water Research* 37: 2027-2034
- Laurin V, Labbé N, Parent S, Juteau P, Villemur R (2008) Microeukaryote diversity in a marine methanol-fed fluidized denitrification system. *Microbial Ecology* 56: 637-648
- Lee NM and Welander T (1994) Influence of predators on nitrification in aerobic biofilm process. *Water Science and Technology* 29 (7): 355-363.
- Lee NM and Welander (1996) Use of protozoa and metazoa for decreasing sludge production in aerobic wastewater treatment. *Biotechnology Letters* 18 (4): 429-434.
- Lee NM and Welander T (1996 b) Reducing sludge production in aerobic wastewater treatment through manipulation of the ecosystem. *Water Research* 30 (8): 1781-1790.
- Liang P, Huang X, Qian Y, Wei Y, and Ding G (2006a) Determination and comparison of sludge reduction rates caused by microfauna's predation. *Bioresource Technology* 97: 854-861
- Liang P, Huang X, Qian Y (2006b) Excess sludge reduction in activated sludge process through predation of *Aeolosoma hemprichi*. *Biochemical Engineering Journal* 28: 117-122
- Lim EL, Amaral LA, Caron DA, and Delong EF (1993) Application of rRNA-based probes for observing marine nanoplanktonic protists. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (5): 1647-1655
- Liu X and Gong J (2012) Revealing the diversity and quantity of Peritrich ciliates in environmental samples using specific primer-based PCR and quantitative PCR. *Microbes and Environments* 27 (4): 497-503
- Low EW and Chase HA (1999) The effect of maintenance energy requirements on biomass production during wastewater treatment. *Water Research* 33: 847-853

- Machdar I, Harada H, Ohashi A, Sekiguchi Y, Okui H, and Ueki K (1997) A novel and cost-effective sewage treatment system consisting of UASB pre-treatment and aerobic post-treatment units for developing countries. *Water Science and Technology* 36 (12): 189-197
- Machdar I, Sekiguchi Y, Sumino H, Ohashi A, and Harada H (2000) Combination of a UASB reactor and a curtain type DHS (downflow hanging sponge) reactor as a cost-effective sewage treatment system for developing countries. *Water Science and Technology* 42 (3-4): 83-88
- Machdar I, Matsuura N, Koderia H, and Ohashi A (2014) Prospective combined system of UASB and DHS reactor for the treatment of domestic wastewater in Jakarta. *Journal of Water and Environment Technology* 12 (6): 459-468
- Madoni P (1994) Estimates of ciliated protozoa biomass in activated sludge and biofilm. *Bioresour Technol* 48: 245-249
- March TL, Liu WT, Forney LJ and Cheng H (1998) Beginning a molecular analysis of the eukaryal community in activated sludge. *Wat Sci Tech* 37 (4-5): 455-460
- Massé A, Spérandio M, and Cabassud C (2006) Comparison of sludge characteristics and performance of a submerged membrane bioreactor and an activated sludge process at high solids retention time. *Water Research* 40: 2405-2415.
- Matsunaga K, Kubota K and Harada H (2014) Molecular diversity of eukaryotes in municipal wastewater treatment process as revealed by 18S rRNA gene analysis. *Microbes Environ* 29 (4): 401-407
- Mattison RG, and Harayama S (2001) The predatory soil flagellates *Heteromita globosa* stimulates toluene biodegradation by a *Pseudomonas* sp. *FEMS Microbiology Letters* 194: 39-45
- Mattison RG, Taki H, and Harayama S (2005) The soil flagellate *Heteromita globosa* accelerates bacterial degradation of alkylbenzenes through grazing and acetate excretion in batch culture. *Microbial Ecology* 49: 142-150
- Matz C and Kjelleberg S (2005) Off the hook - how bacteria survive protozoan grazing. *Trends in Microbiology* 13 (7): 302-307
- Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, and Sogin ML (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* 71: 491-499
- Moreno AM, Matz C, Kjelleberg S and Manefield M (2010) Identification of ciliate grazers of autotrophic bacteria in ammonia-oxidizing activated sludge by RNA Stable Isotope Probing. *Appl Environ Microbiol* 76 (2): 2203-2211
- Ntougias S, Tanasidis S, Melidis P (2011) Microfaunal indicators, Ciliophora phylogeny and protozoan population shifts in an intermittently aerated and fed bioreactor. *Journal of Hazardous Materials* 186: 1862-1869
- Onodera T, Matsunaga K, Kubota K, Taniguchi R, Harada H, Syutsubo K, Okubo T, Uemura S, Araki N, Yamada M, Yamauchi M and Yamaguchi T (2013) Characterization of the retained sludge in a down-flow hanging sponge (DHS) reactor with emphasis on its low excess sludge production. *Bioresour Technol* 136:169-175
- Onodera T, Yoochatchaval W, Sumino H, Mizuochi M, Okadera T, Fujita T, Banjongproo P and Syutsubo K (2014) Pilot scale experiment of down-flow hanging sponge for direct treatment of low-strength municipal wastewater in Bangkok, Thailand. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 37 (11): 2281-2287

- Onodera T, Tandukar M, Sugiyama D, Uemura S, Ohashi A, and 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
- Onodera T, Okubo T, Uemura S, Yamaguchi T, Ohashi A, Harada H (2016) Long-term performance evaluation of down-flow hanging sponge reactor regarding nitrification in a full-scale experiment in India. *Bioresource Technology* 204: 177-184
- Okubo T, Onodera T, Uemura S, Yamaguchi T, Ohashi A and Harada H (2015) On-site evaluation of the performance of a full-scale down-flow hanging sponge reactor as a post-treatment process of an up-flow anaerobic sludge blanket reactor for treating sewage in India. *Bioresource Technology* 194: 156-164.
- Pajdak-Stós A, Fiałkowska E, Fyda J, and Babko R (2010) Resistance of nitrifiers inhabiting activated sludge to ciliate grazing. *Water Science and Technology* 61 (3): 573-580
- Parfrey LW, Barbero E, Lasser E, Dunthorn M, Bhattacharya D, Patterson DJ, and Katz LA (2006) Evaluation support for the current classification of eukaryotic diversity. *PLoS Genetics* 2 (12): e220
- Piña-Ochoa E, Høgslund S, Geslin E, Cedhagen T, Revsbech NP, Nielsen LP, Schweizer M, Jorissen F, Rysgaard S, and Risgaard-Petersen N (2010) Widespread occurrence of nitrate storage and denitrification among *Foraminifera* and *Gromiida*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (3): 1148-1153
- Priya M, Haridas A, and Manilal VB (2007) Involvement of protozoa in anaerobic wastewater treatment process. *Water Research* 41: 4639-4645
- Puigagut J, Salvadó H, and García J (2005) Short-term harmful effects of ammonia nitrogen on activated sludge microfauna. *Water Research* 39: 4397-4404.
- Rodriguez-Perez S and Feroso FG (2016) Influence of an oxic settling anoxic system on biomass yield, protozoa and filamentous bacteria. *Bioresource Technology* 200: 170-177.
- Salvadó H and Gracia MP (1993) Determination of organic loading rate of activated sludge plants based on protozoan analysis. *Water Research* 27 (5): 891-895
- Shimano S, Sambe M, and Kasahara Y (2008) Linkage between light microscopic observations and molecular analysis by single-cell PCR for ciliates. *Microbes and Environments* 23 (4): 356-359
- Shimano S, Sambe M, Kasahara Y (2012) Application of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) for the analysis of ciliate communities in soils. *Microbes and Environments* 27 (2): 136-141
- Song B, Chen X (2009) Effect of *Aeolosoma hemprichi* on excess activated sludge reduction. *Journal of Hazardous Materials* 162: 300-304.
- Tandukar M, Uemura S, Machdar I, Ohashi A, and Harada H (2005) A low-cost municipal sewage treatment system with a combination of UASB and the "fourth-generation" downflow hanging sponge reactors. *Water Science and Technology* 52 (12): 323-329
- Tandukar M, Uemura S, Ohashi A, and Harada H (2006) Combination UASB and the "fourth generation" down-flow hanging sponge reactor for municipal wastewater treatment. *Water Science and Technology* 53 (3): 209-218

- Tandukar M, Ohashi A, and Harada H (2007) Performance comparison of a pilot-scale UASB and DHS system and activated sludge process for the treatment of municipal wastewater. *Water Research* 41: 2697-2705
- Tawfik A, El-Gohary F, Ohashi A, and Harada H (2006) The influence of physical-chemical and biological factors on the removal of faecal coliform through down-flow hanging sponge (DHS) system treating UASB reactor effluent. *Water Research* 40: 1877-1883
- Tawfik A, Ohashi A, and Harada H (2006) Sewage treatment in a combined up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) - down-flow hanging sponge (DHS) system. *Biochemical Engineering Journal* 29: 210-219
- Uemura S, Suzuki S, Abe K, Kubota K, Yamaguchi T, Ohashi A, Takemura Y, and Harada H (2010) Removal of organic substances and oxidation of ammonium nitrogen by a down-flow hanging sponge (DHS) reactor under high salinity conditions. *Bioresource Technology* 101: 5180-5185
- Uemura S, Suzuki S, Maruyama Y, and Harada H (2012) Direct treatment of settled sewage by DHS reactors with different sizes of sponge support media. *Int. J. Environ. Res.* 6 (1): 25-32
- Uemura S, Okubo T, Maeno K, Takahashi M, Kubota K, and Harada H (2016) Evaluation of water distribution and oxygen mass transfer in sponge support media for a down-flow hanging sponge reactor. *Int. J. Environ. Res.* 10 (2): 265-272
- Villegas-Rivera G, Vargas-Cabrera Y, González-Silva N, Aguilera-García F, Gutiérrez-Vázquez E, Bravo-Patiño A, Cajero-Juárez M, Baizabal-Aquirre VM, and Valdez-Alarcón JJ (2012) Evaluation of DNA extraction methods of rumen microbial population. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* doi: 10.1007/s11274-012-1183-2
- Weber SD, Hofmann A, Pilhofer M, Wanner G, Agerer R, Ludwig W, Schleifer KH, Fried J (2009) The diversity of fungi in aerobic sewage granules assessed by 18S rRNA gene and ITS sequence analyses. *FEMS Microbiol Ecol* 68:246-254
- Wei Y, Van Houten RT, Borger AR, Eikelboom DH, and Fan Y (2003) Comparison performances of membrane bioreactor and conventional activated sludge processes on sludge reduction induced by *Oligochaete*. *Environmental Science and Technology* 37: 3171-3180.
- Woese CR and Fox GE (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74 (11), 5088-5090.
- Woese CR, Kandler O, and Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 4576-4579.
- Yoochatchaval W, Onodera T, Sumino H, Yamaguchi T, Mizuochi M, Okadera T and Syutsubo K (2014) Development of a down-flow hanging sponge reactor for the treatment of low strength sewage. *Water Sci Technol* 70 (4): 656-663
- Zheng S, Sun J, Han H (2011) Effect of dissolved oxygen changes on activated sludge fungal bulking during lab-scale treatment of acidic industrial wastewater. *Environmental Science and Technology* 45: 8928-8934
- Zhu F, Massana R, Not F, Marie D, and Vaultot D (2005) Mapping of picoeucaryotes in marine ecosystem with quantitative PCR of the 18S rRNA gene, *FEM Microbiology* 52: 79-92.

- 公益社団法人 日本下水道協会(2012)下水試験方法下巻 2012年版.
- 祥雲弘文(2004)微生物の新規窒素代謝の発見とその解明. 日本農芸化学会誌 78 (8): 724-729.
- 祥雲弘文(2006)ミトコンドリア嫌気呼吸とカビの通性嫌気性. 蛋白質 核酸 酵素 51 (5): 419-429.
- 千種薫(1996)図説 微生物による水質管理、産業用水調査会.
- 高橋優信、山口隆司、上村繁樹、大橋晶良、原田秀樹(2004)発展途上国に適用可能なエネルギー最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 41: 175-186.
- 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)67 (7): III_285-III_292.
- 松永健吾、久保田健吾、Erica Vonasek、原田秀樹(2012)18S rRNA 遺伝子情報を用いた排水処理汚泥の真核生物群集構造解析. 土木学会論文集 G(環境)68 (7): III_13-III_19.
- 盛下勇(2004)下水処理と原生動物. 山海堂.
- 盛下勇(2004)応用原生動物学. 山海堂.
- 須藤隆一(1978a)廃水の生物処理に出現する微小動物について(1)活性汚泥および生物膜の微小動物相, 日本農芸化学会誌、52 (2): 57-67.
- 須藤隆一(1978b)廃水の生物処理に出現する微小動物について(2)微小動物の役割, 日本農芸化学会誌、52 (3): 51-57.

第3章

下水処理 UASB 反応器後段に設置した
DHS 反応器における真核生物群集構造の季節変動および
18S rRNA 遺伝子配列に基づく真核生物群集構造解析手法の検討

Originally published:

宮岡佑馬、幡本将史、珠坪一晃、小野寺崇、多川正、上村繁樹、荒木信夫、山口隆司(2013) 下水処理UASB後段のDHSリアクターにおける排水処理特性と真核生物群集構造の季節変動, 土木学会論文集 G(環境), 69 (7): III257-III264.

3.1 研究背景

下水処理反応器の保持汚泥には、原核生物(細菌、古細菌)および真核生物(原生動物、後生動物、真菌)が存在しており、極めて複雑な生物生態系が形成されている。このうち、真核生物は生物生態系の上位に位置し、原核生物等を捕食することで余剰汚泥の減容化に寄与していることが推定されている(須藤, 1978a; 須藤, 1978b; 稲森ら, 1987)。下降流懸垂型スポンジ(down-flow hanging sponge: DHS)反応器は、スポンジ担体を微生物保持担体として使用した散水ろ床法である(Machdar *et al.*, 1997; Uemura and Harada, 2010)。このDHS反応器は標準活性汚泥法と比較して余剰汚泥の発生量が抑制される特徴を持つ。その理由は、DHS反応器では、保持汚泥濃度が標準活性汚泥法よりも10–20倍高く、有機物汚泥負荷(F/M比)を低く維持され、その結果、汚泥増殖量と汚泥分解量が拮抗するためであると報告されている(松永ら, 2009; Onodera *et al.*, 2013)。また、これらの報告では保持汚泥中の真核生物(原生動物や後生動物)の定量を行っており、その結果、捕食による余剰汚泥抑制効果についても同程度のポテンシャルを有していることを示している(松永ら, 2009; Onodera *et al.*, 2013)。しかしながら、これらの報告で提示されている真核生物の定量結果は、ある一時期に採取し解析されたものであり、下水水温変化(季節変動)による影響が明らかにされていない。そのため、流入水温が変化すること(季節変動)によるDHS反応器における真核生物群集構造の推移に関して、現状を把握することは、真核生物群集の捕食による余剰汚泥発生量の抑制機構を評価するうえで重要であると考えられる。

真核生物の種の同定は、検鏡による手法が主流であるが、観察者の主観が入り易く、同定結果に客観性や再現性がないことが問題として指摘されている。そのため、近年では、検鏡よりも客観的な解析手法として、真核生物の18S ribosomal ribonucleic acid (rRNA) 遺伝子配列に基づいた群集構造解析手法(例えばクローン解析)が適用されている(松永ら, 2012; Matsunaga *et al.*, 2014)。この解析手法では、18S rRNA遺伝子配列に基づいて同定を行うため、主観が入る余地は限りなく少ない。また、微生物の属や種までの詳細な同定が可能なることに加えて、形態的特徴が酷似している微生物や、環境条件によって形態を変化させる微生物の同定も可能になるなど、解析の客観性や再現性を高めることができる。しかしながら、下水処理汚泥に生息する真核生物の18S rRNA遺伝子に関する情報は少なく(Berney *et al.*, 2004)、分子生物学的な解析手法を適用可能かどうかの検討(プライマー対の選定や標的遺伝子断片増幅(polymerase chain reaction: PCR)条件の検討)を行う必要がある。

本章では、DHS反応器における真核生物群集構造に関する基礎的知見の収集(現状の把握)を目的として、季節変動による流入水温の変化が、上昇流嫌気性汚泥床(upflow anaerobic sludge blanket: UASB)–DHSシステムのDHS反応器における下水処理特性や真核生物群集構造に与える影響の解析を行った(流入水温の異なる時期にDHS反応器の流下方向の水質変化と保持汚泥の検鏡)。また、プライマー配列の特異性を評価するために、DHS反応器の保持汚泥中において優占する真核生物の18S rRNA遺伝子配列(既存のデータベースから情報を取得した)とプライマー配列を比較した。さらに、これらの真核生物の18S rRNA遺伝子配列を決定するために、マイクロマンニピュレーターを使用して、真核生物を1個体ずつ単離し解析に供した。

3.2 実験方法

3.2.1 DHS反応器

実験に用いたDHS反応器の概要をFig.3-1に示す。DHS反応器は、都市下水を無加温で処理しているUASB反応器 (Hatamoto *et al.*, 2016) の後段に設置しており、DHS反応器にはUASB処理水を流入させた。流入水 (UASB処理水) はDHS反応器上部より散水し、DHS反応器下部より処理水として流出させた。このとき、DHS反応器に供給された流入水は重力によって下降し、スポンジ担体に保持された汚泥 (微生物) と接触することで処理が行われ、流下方向において水質の変化が生じる。このDHS反応器には、直径3.3 cm、容積28.2 mLの円筒形状のスポンジ担体 (圧密防止のためネットリングを挿入) を無作為に充填した (大久保ら, 2010; Okubo *et al.*, 2016)。DHS反応器はスポンジ担体を充填しているboxを10段積み上げたもので構成されており、UASB処理水が流入する部分をbox1とし、処理水が流出する部分をbox10とした (Fig.3-1)。それぞれのboxにおける流下長はFig.3-1に示した通りである。また、充填しているスポンジ担体の総容積は454 L (DHS反応器容積に対するスポンジ担体充填率は53 %) であり、充填したスポンジ担体の容積に対してHRTは3.2時間 (流量は3,444 L \cdot d⁻¹) に設定し、温度制御は行わずに運転を行った。

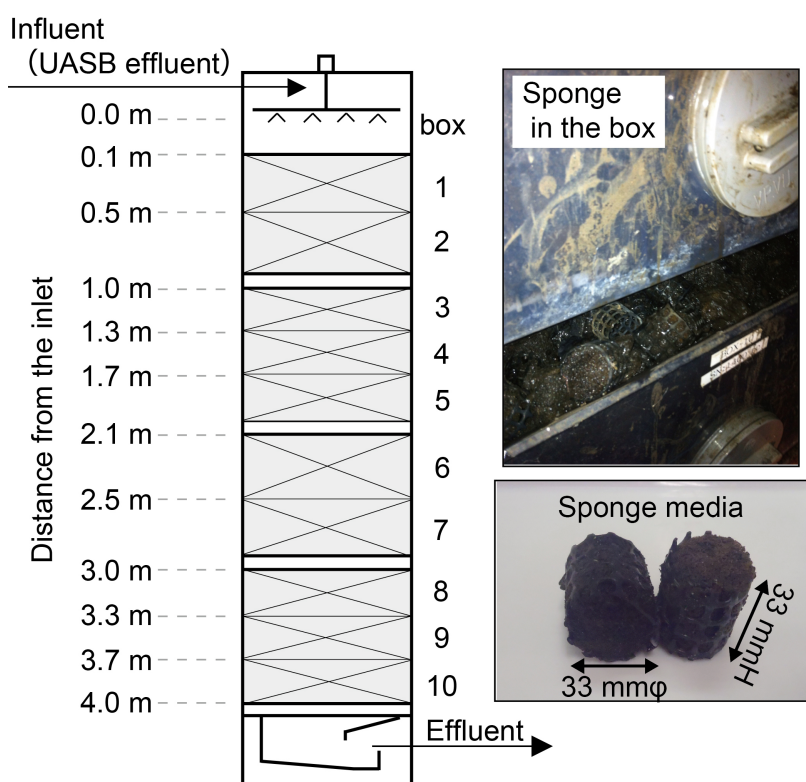


Fig.3-1 Schematic diagram and photographs of the DHS reactor used in this study.

3.2.2 DHS反応器の水質プロフィールと検鏡

DHS 反応器では、流下方向に従って処理が進行するため、流下方向における処理水質の変化を把握することは、DHS 反応器内の下水処理特性を把握するうえで非常に意義がある。原生動物や後生動物は、生息している場の水質環境に影響を受けて優占する種が変化するため、反応器内の処理状況を示す指標生物として扱われている (Ntougias *et al.*, 2011; Canals *et al.*, 2013)。そのため季節変化による流入水温の違いが、DHS 反応器の処理特性および真核生

物群集構造に与える影響を把握するために、流入水温が 15°C (4 月 19 日、春)、22°C (6 月 14 日、初夏)、26°C (7 月 31 日、夏)の時期に、流下方向における処理水の水質分析および保持汚泥の検鏡を行った。また、この期間中における流入水および処理水の水質分析については定期的に分析した。

それぞれの box (Fig.3-1) に流入する水試料はスポットサンプリングで採取した。また、検鏡した汚泥試料は、各 box より汚泥付着量の先入観なく無作為に選択したスポンジ担体 3 個もしくは 4 個を、蒸留水によって圧搾・採取した汚泥とした。この時、スポンジ担体から汚泥が無くなるまで圧搾した。また、汚泥濃度測定に供する試料も同様の方法で採取した。真核生物種の存在割合は、スライドガラス上に汚泥試料を 25 μ l 滴下した後、カバーガラス 24×24 mm を被せて、光学顕微鏡 (倍率 200–400 倍) を用いて真核生物種の同定および個体数の計測を行うことで算出した。個体数を計測する作業は 2 回もしくは 3 回繰り返して行い、データの算出には、これらの平均値を用いた。形態学的特徴に基づいた同定基準は既報を参考にした (下水試験方法下巻, 2012; 千種ら, 1996)。なお、真菌 (カビ、酵母) に関しては、形態学的な特徴に基づいた同定や定量的な解析が難しいため、本論文の検鏡による解析では対象外とした。

3.2.3 水質分析方法

定期的に水質分析に供した試料の採取は、下水濃度の日変動を考慮して、水質分析の前日から 24 時間かけて冷却しながら採取した。水質プロフィール用の試料の採取はスポットサンプリングで行った。DO の測定は DO メーター (Model 58, YSI/Nanotec, Kanagawa, Japan) を使用した。TSS と VSS の分析には、孔径 0.4 μ m のガラス繊維ろ紙 (GB-140, Advantec, Tokyo, Japan) を用いた。TSS は 105°C で乾燥させたもの、VSS は 600°C で強熱減量したものととして、ろ紙が燃焼して減量したものはブランクで補正した。この時、ろ紙通過後の試料を溶解性試料とした。COD の分析には、多項目水質分析計 (DR-2800, Hach, Loveland, CO, USA) を用いた。アンモニア性窒素、硝酸性窒素、亜硝酸性窒素は溶解性試料を対象にして、イオンクロマトグラフ (LC 20-ADsp, Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて分析した。このとき、アンモニア性窒素、硝酸性窒素、亜硝酸性窒素の濃度が既知の試料から検量線を作成し、分析した試料の各濃度を算出した。その他の分析項目に関しては下水試験方法 (下水試験方法上下巻, 2012) に準拠して行った。

3.2.4 プライマー配列の特異性評価

プライマーの特異性評価は分子系統解析ソフトウェア ARB (Ludwig *et al.*, 2004) を使用して行った。ARB に、Silva のウェブサイトから取得したデータベース (SSURef_111_SILVA_NR_98_04_08_12_opt_v2.arb) を取り込み、ARB 内のプログラム (Match Probes) を使用してプライマーの特異性の評価を行った。プライマーの特異性の評価は、Table 3-1 に示したプライマーについて行った。Table 3-1 には、既報の真核生物群集構造解析に用いられているプライマーのうち、真核生物全体 (domain *Eukaryota*) を標的とするプライマー、および、原生動物 (kingdom *Stramenopiles* (一般的に鞭毛虫のグループ)、kingdom *Alveolata* (一般的に繊毛虫のグループ)、kingdom *Rhizaria* (一般的にアメーバのグループ)) を標的とするプライマーを列挙した。特異性は、プライマー配列がデータベースに登録されている 18S rRNA 遺伝子配列とどの程度一致しているのかを百分率で算出し、(登録されている真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列数を 100% とした)、それぞれ 0 塩基、1 塩基、2 塩基、3 塩基ミスマッチごとに算出した。また、データベースから、DHS 反応器において優占していた真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列を取得し、プライマー配列とどの程度一致しているのかを確認した。

Table 3-1 Primer sequence for PCR used in this study.

	Target	Primer sequence (5'-3')	E.coli position	Reference
EukA	forward eukaryota	AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT	26	Medlin <i>et al.</i> , 1988
Euk82	forward eukaryota	AAA CTG CGA ATG GCT C	115	López-García <i>et al.</i> , 2003
PSSU	forward protozoa	CTT TCG ATG GTA GTG TAT TGG ACT AC	271	Karnati <i>et al.</i> , 2003
Euk300	forward eukaryota	AGG GTT CGA TTC CGG AG	314	Angela <i>et al.</i> , 1998
Euk555	forward eukaryota	AGT CTG GTG CCA GCA GCC GC	528	López-García <i>et al.</i> , 2003
Euk555	reverse eukaryota	GCG GCT GCT GGC ACC AGA CT	510	López-García <i>et al.</i> , 2003
EukB	reverse eukaryota	TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC	1511	Medlin <i>et al.</i> , 1988

3.2.5 マイクロマニピュレーターを用いた真核生物1個体の回収方法

DHS反応器の保持汚泥から真核生物1個体をマイクロマニピュレーターにより回収した。その概要をFig. 3-2に示す。回収の標的とした真核生物は、DHS反応器の保持汚泥に優占して存在している真菌(カビ、酵母)以外の真核生物(原生動物、後生動物)とした。

真核生物を回収する作業を行う前に、マイクロマニピュレーターに装着するガラス管の作成を行った。ガラス管は、縦引き型プラーを用いて、熱を与えながら重力によって引っ張ることで、その先端が細長くなるように加工した。その後、マイクロフォージを用いて、細長く引き伸ばしたガラス管の先端を折ることで、体長数十～数百 μm 程度の真核生物が通過する穴を開けた(Fig. 3-2 (c))。このガラス管をマイクロマニピュレーター(オイルインジェクター)に装着し、下記に示す真核生物の回収作業を行った。

3.2.2と同じ方法で回収した汚泥試料を、スライドガラス上に滴下し、倒立型顕微鏡(IX71、Olympus、Tokyo、Japan)観察下で、マイクロマニピュレーター(MM-89、Narishige、Tokyo、Japan)および先端に穴を開けたガラス管を使用して、体長数十～数百 μm 程度の真核生物を標的として、1個体ずつ3-5 μL の超純水を入れたPCRチューブに回収した。この際、真核生物の体に付着した汚泥(他の真核生物)を回収しないようにするために、超純水内で自由遊泳させる作業をさらに3回行った。真核生物の形態学的な特徴による同定基準は既報を参考にした(下水試験方法下巻、2012; 千種ら、1996)。また、本章末のSupplementary materialsにPCR-Sequence解析可能であった真核生物の写真の例を掲載した。

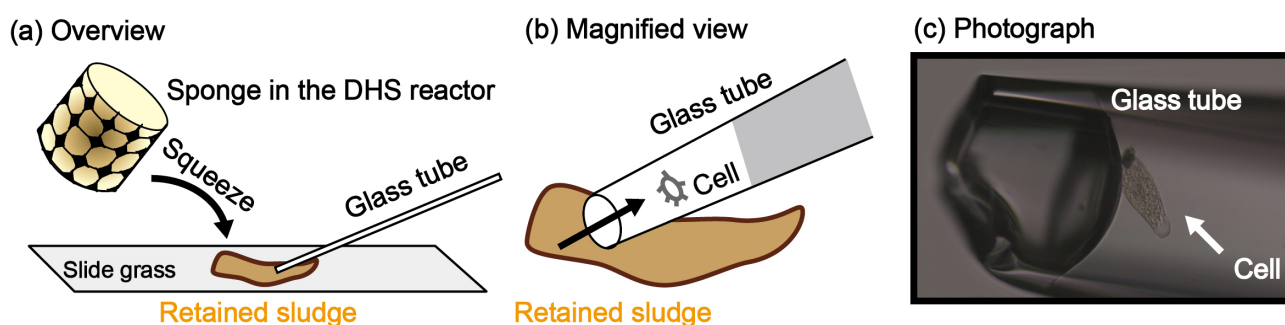


Fig. 3-2 Overview of the collection method for the eukaryotic cell from the retained sludge in the DHS reactor.

3.2.6 真核生物1個体からの遺伝子抽出および塩基配列の決定(PCR-シーケンス解析)

回収した真核生物からの遺伝子(deoxyribonucleic acid:DNA)抽出は、凍結融解(-80℃で10分、60℃で1分のサイクルを3回以上)を繰り返し、真核生物の細胞壁を物理的に破碎させることで行った。その後、抽出したDNAを鋳型として、真核生物の18S rRNA 遺伝子配列を標的とする EukA (Medlin *et al.*, 1988) と 18S-82F (gAg ACT gCg AAT ggC TC; López-García *et al.*, 2003 の一部を変更)、および、EukB (Medlin *et al.*, 1988) のプライマーを用いて PCR を行った (Table 3-1)。

PCR 試薬(DNA ポリメラーゼ)は One Shot LA PCR™ Mix Ver. 2.0 (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) および *Premix EX Taq*™ Hot Start Version (Takara Bio Inc.)、PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase (Takara Bio Inc.) を用いた。One Shot LA PCR™ Mix Ver. 2.0 を用いた場合は、初期変性 94℃で2分を行った後、94℃で30秒、55℃で1分、72℃で2分のサイクルを35サイクル行った後、最後に72℃で4分間反応させた。*Premix EX Taq*™ Hot Start Version と PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase を用いた場合、初期変性 98℃で1分を行った後、98℃で10秒、60℃で15分、72℃で2分のサイクルを35-50サイクル行った後、最後に72℃で4分間反応させた。鋳型 DNA 量や DNA ポリメラーゼの種類、プライマーの種類や濃度、PCR 時の温度条件やサイクル数の組み合わせは、回収した真核生物に応じて調整し、良好な産物が得られた試料について塩基配列の決定を行った。PCR 産物は精製した後、ダイレクトシーケンス解析に供した。ダイレクトシーケンス解析には、EukA や Euk82f、EukB のプライマーを使用し、18S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定した。得られた遺伝子配列は 4peaks ソフトウェアを使用して、正確に解析できていない部分(波形が乱れている、もしくは波長の蛍光強度が極端に低い)を除外した。その後、Genetyx-mac/ATSQ ソフトウェアを用いて配列を繋ぎ合せた。繋ぎ合わせた後の塩基配列は国際塩基配列データベース national center for biotechnology information (NCBI) の basic local alignment search tool (BLAST) 相同性検索プログラムを使用して、近縁種の検索およびそれらの既知 18S rRNA 遺伝子配列との相同性を調査した。

3.3 実験結果および考察

3.3.1 DHS反応器による下水処理特性の季節変動

Table 3-2 に本研究期間中(2011年11月から2013年4月まで)における下水、UASB 処理水、DHS 処理水の水質分析結果の平均値を示す。Table 3-3 に平均水温 15°Cを示す冬期と春期における水質分析結果の平均値を示す。

Fig.3-3 に各水温時における DHS 反応器の流下方向における水質プロファイル(COD、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$)を示す。

水質分析の結果、DHS 反応器の下水処理特性は、流入水温(季節)によって大きく異なっていた。水温 15°Cの時期(春)では、流入 COD 濃度は $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度と高く、処理水でも $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上と高濃度であった(Fig.3-3 (a))。また、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度は流入から流出まで $15 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 濃度は流入から流出まで検出限界以下であり、硝化反応($\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去)は殆ど生じていなかった(Fig.3-3 (b), (c))。ここで、DHS 反応器の前段に設置している UASB 反応器は、水温 20°C以下の条件で微生物活性(加水分解活性、メタン生成活性)が低下し、固形性有機物(例:セルロース)の分解が律速となり装置内に蓄積することが報告されている(大矢ら, 2009; Syutsubo *et al.*, 2011)。蓄積した固形性有機物は、春先の水温上昇とともに、分解されるようになるため、過負荷状態になった UASB 反応器では、バイオガス生成量が増加するために保持汚泥の一部が流出するようになる(UASB 処理水質の著しく悪化)(大矢ら, 2009; Syutsubo *et al.*, 2011)。このように UASB 処理水質が悪化することで、DHS 反応器の有機物負荷が上昇し、有機物処理能力が低下したと考えられた。具体的には、水温 15°C時における DHS 反応器の有機物負荷 organic loading rate (OLR) は、 $1.96 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$ (DHS 反応器の box1 に供給される流入水の COD 濃度を基準に算出; Table 3-4)であった。また、DHS 反応器においても、同様に、冬季にスポンジ担体に蓄積した固形性有機物が、春期の水温上昇とともに分解されるようになることで、更に有機物負荷が上昇し、処理性能が低下したと考えられた(Fig.3-4 の保持汚泥濃度参照)。

その一方で、水温 22°Cの時期(初夏)では、流入 COD 濃度は $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度であり、DHS 反応器の上段付近で $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下にまで速やかに減少し、処理水で $13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ であった(Fig.3-3 (a))。流入 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度は $27 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ であり、処理水ではほぼ検出されず、完全に硝化されていた(Fig.3-3 (b), (c))。このとき、UASB 処理水質(DHS 流入水質)は安定しており、流入水温の上昇に伴う微生物活性の増加により、COD や $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の除去が進行したと考えられる。また、水温 26°C(夏)の時期においても、同様に卓越した有機物除去および硝化反応が進行した。このときの水質プロファイルは、DHS 反応器上段で有機物除去、DHS 反応器中段で硝化反応が生じるなど、既報の水質プロファイルと同様の傾向を示した(Onodera *et al.*, 2013)。また、水温 22°Cと 26°Cの時期における DHS 反応器の OLR は、それぞれ 1.37 、 $1.11 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$ (DHS 反応器の box1 に供給される流入水の COD 濃度を基準に算出; Table 3-4)であり、春期の OLR よりも低い値であった。

以上のように、DHS 反応器の下水処理特性は、運転季節によって大きく異なっていた。特に、春期の水温上昇時における DHS 反応器の処理性能の悪化は、UASB 処理水(DHS 流入水)の水質悪化による一時的な過負荷状態(OLR は $1.96 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$)にあることに加え、水温 15°C程度と低い水温のため、硝化反応に関わる微生物群の活性が低下していたこと(保持汚泥の微生物活性は冬期に大きく低下し、回復に至っておらず、夏期と比較して低かったこと)が原因であると考えられた。なお、冬季(11月から1月まで)の水温 15°Cの時期には、UASB 反応器の処理性能は安定しており、DHS 反応器においても比較的良好に処理が行われていたことを確認した(Table 3-3) (UASB 処理水の COD 濃度から算出した OLR は、冬期で 1.24 、春期で $1.75 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$ であった)。

Table 3-2 The average of water quality data of sewage, UASB effluent and DHS effluent (November 2011–April 2013).

Units	Average water quality		
	Sewage	UASB effluent	DHS effluent
Temperature (°C)	17.9 ± 6	18.2 ± 6	18.0 ± 6
DO (mg·L ⁻¹)	0.4 ± 0	0.4 ± 0	5.7 ± 1
pH (-)	7.0 ± 0	7.0 ± 0	7.1 ± 0
ORP (mV)	-224.5 ± 54	-278.7 ± 52	94.9 ± 64
TSS (mg·L ⁻¹)	89.9 ± 38	38.0 ± 24	19.9 ± 22
VSS (mg·L ⁻¹)	78.4 ± 33	31.0 ± 21	14.1 ± 14
Total COD (mg·L ⁻¹)	328.4 ± 105	196.5 ± 64	46.4 ± 35
Soluble COD (mg·L ⁻¹)	148.5 ± 53	109.8 ± 33	26.5 ± 17
Total BOD (mg·L ⁻¹)	240.6 ± 129	117.2 ± 44	8.7 ± 8
Soluble BOD (mg·L ⁻¹)	99.4 ± 45	67.5 ± 28	4.1 ± 4
TKN (mgN·L ⁻¹)	35.4 ± 22	32.7 ± 19	9.8 ± 11
NH ₄ ⁺ -N (mgN·L ⁻¹)	27.0 ± 30	21.9 ± 7	9.4 ± 12
NO ₂ ⁻ -N (mgN·L ⁻¹)	0.0 ± 0	0.0 ± 0	0.3 ± 1
NO ₃ ⁻ -N (mgN·L ⁻¹)	0.2 ± 1	0.1 ± 0	11.7 ± 8

Table 3-3 The average of analysis of water quality during winter term and spring term.

Unit	Average water quality					
	Winter (Nov. 2011–Jan. 2012)			Spring (Mar. 2012–May 2012)		
	Sewage	UASB effluent	DHS effluent	Sewage	UASB effluent	DHS effluent
Temperature (°C)	15.5 ± 4	15.7 ± 4	15.7 ± 4	14.6 ± 4	15.0 ± 4	14.7 ± 4
DO (mg·L ⁻¹)	N.D	N.D	4.4 ± 2	N.D	N.D	4.2 ± 1
COD (mg·L ⁻¹)	354 ± 184	163 ± 103	39 ± 31	346 ± 92	231 ± 59	84 ± 31
BOD (mg·L ⁻¹)	130 ± 71	102 ± 52	6 ± 4	190 ± 115	111 ± 38	19 ± 9
TSS (mg·L ⁻¹)	68 ± 49	27 ± 24	12 ± 6	99 ± 29	50 ± 20	36 ± 21
NH ₄ ⁺ -N (mgN·L ⁻¹)	21.0 ± 7	20.3 ± 6.9	6.6 ± 5	24.5 ± 8	23.3 ± 6	18.6 ± 6
NO ₂ ⁻ -N (mgN·L ⁻¹)	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
NO ₃ ⁻ -N (mgN·L ⁻¹)	N.D	N.D	11.6 ± 7	N.D	N.D	3.4 ± 3

N.D. : Not Detected

Table 3-4 The operational condition of profile experiment at each influent temperature.

		Influent temperature (°C)		
		15	22	26
COD: box1 influent	(mg·L ⁻¹)	258	181	146
COD loading	(kgCOD·m ⁻³ ·day ⁻¹)	1.96	1.37	1.11
Average sludge concentration	(mgVSS·L ⁻¹)	31,700	13,343	16,014
Total amount of retained sludge	(kgVSS)	14.4	6.1	7.3
Sludge loading	(kgCOD·kgVSS ⁻¹ ·day ⁻¹)	0.062	0.103	0.069

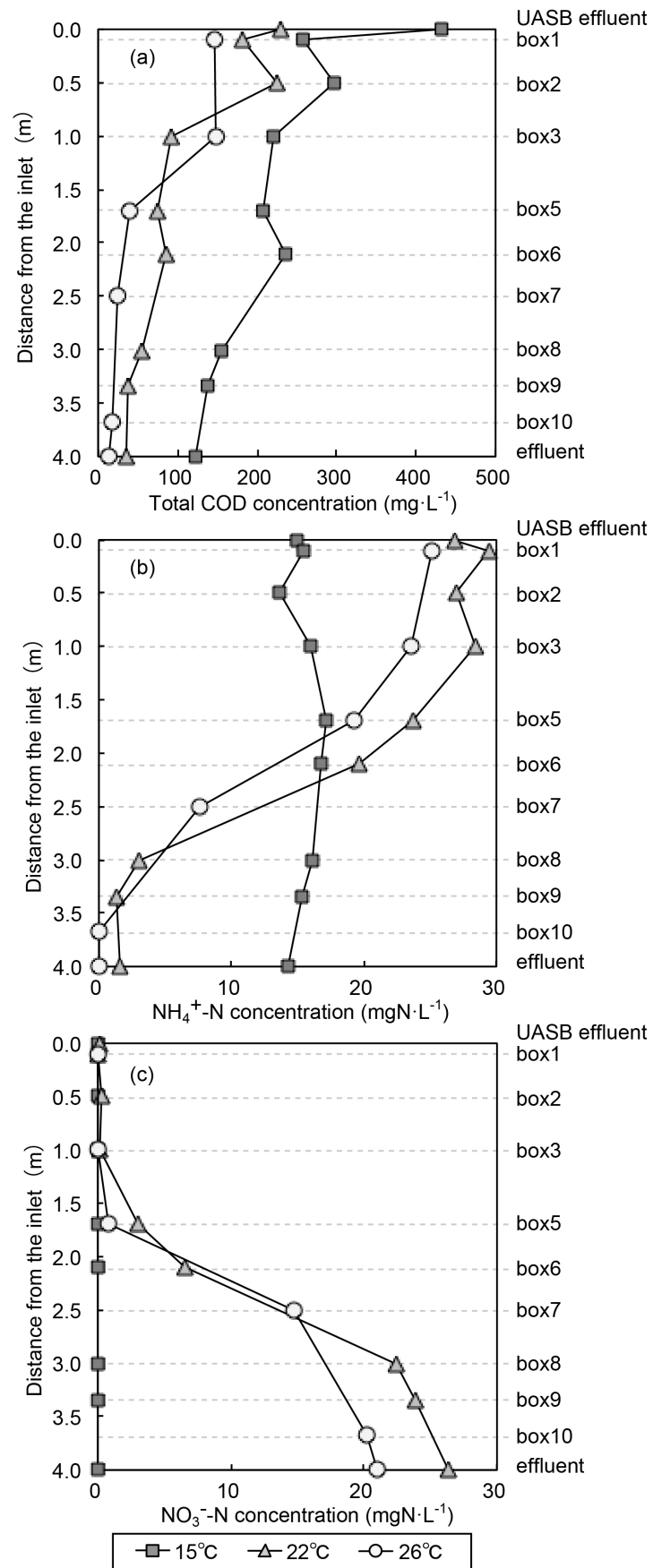


Fig.3-3 Profile of water quality along with distance from the inlet of the DHS reactor; (a) Total COD_{Cr} concentration, (b) NH₄⁺-N concentration and (c) NO₃⁻-N concentration.

3.3.2 検鏡による真核生物群集構造解析

Fig.3-4 (a), (b), (c) に検鏡による真核生物群集構造解析の結果を示す。DHS 反応器での流下方向において検出された真核生物を、門や亜門レベルで分類したもの(棒グラフ)および保持汚泥濃度 TSS (折れ線グラフ)の変化を示した。真核生物群集構造は観察された真核生物の全個体数(Fig.3-4 中、cellの数字が観察された真核生物の全個体数を示す)から、各門に分類される個体数をもとに割合を算出した。

Fig.3-4 より、スポンジ担体保持汚泥の真核生物群集構造は、流入水温(季節)によって変化していた。真核生物のなかでも原生動物(Fig3-4、Protozoa)に着目すると、水温 15°C(春)の時期における原生動物は、DHS 反応器全体で繊毛虫門に属する種が60%以上と最も優占していた。この繊毛虫門(Fig.3-4、Ciliate)には、溶存酸素濃度の低い環境に生息する genus *Paramecium* や有機物負荷の高い環境に生息する genus *Colpidium* が分類される。DHS 反応器上部では、嫌気性反応器で出現することが知られている genus *Metopus* の真核生物の存在が確認されており、UASB 処理水流入の影響から嫌気環境が形成されていることが示唆された。また、genus *Metopus* の真核生物は下水処理 UASB 反応器内に存在することが確認されているため(高橋ら, 2011)、UASB 反応器から流出して DHS 反応器上部に定着している可能性も考えられた。一方、水温 22°C(初夏)、26°C(夏)の時期(Fig.3-4 (b), (c))は、DHS 反応器上部の保持汚泥で、繊毛虫門に属する種がそれぞれ全体の 50%、80%程度と優占していた。また、流下方向に従って、肉質虫亜門(Fig.3-4、Amoebozoa)の genus *Arcella* や genus *Centropyxis* といった比較的高い NO₃-N 濃度を好む真核生物の存在割合がそれぞれ 20%、30%程度にまで増加する傾向にあった(Fig.3-4 (b), (c))。

これらの結果から、スポンジ担体保持汚泥の水分中の水質環境に応じて、優占する真核生物種が変化していることがわかった。既往の知見では、下水を処理する活性汚泥において、溶存酸素濃度が低い環境には genus *Paramecium*、有機物濃度が高い環境には genus *Colpidium*、硝酸性窒素濃度が高い環境には genus *Arcella* や genus *Centropyxis* が優占することが報告されている(千種ら, 1996)。本研究においても、水質プロフィールおよび真核生物群集構造より、同様な傾向が観察され(Fig.3-3, Fig.3-4)、スポンジ担体保持汚泥における原生動物の分布傾向は、既往の原生動物の生息環境の情報と大きな相違はなかったと言える。また、他の生物膜処理法においても、下水を処理する回転円板法では、前段では繊毛虫門(Ciliate)に属する種が優占することが多く、硝化反応が進行した後段では、肉質虫亜門(Amoebozoa)に属する種が優占することが多いことが報告されており、これらの真核生物は処理水質の状況を図る指標としている(須藤, 1979)。なお、鞭毛虫亜門(Fig.3-4、Flagellate)に属する種に関しては、季節変動や流下方向の傾向を見つけることは出来なかった。

真核生物のうち後生動物(Fig3-4、Metazoa)のほうが原生動物よりも体長が大きく、余剰汚泥抑制効果が高いため、個体数が少なくても、余剰汚泥抑制に重要な役割を果たしている。本研究では、水温 15°C(春)の時期の後生動物は、溶存酸素濃度が低い環境を好む袋形動物門線虫類(Fig.3-4、Nematoda) genus *Diplogaster* が 10–15%と流下方向に関係なく優占していた。その他の後生動物に関しては、合計で数%程度しか出現していなかった。一方、水温 22°C(初夏)、26°C(夏)の時期において、線虫以外の種類である袋形動物門輪虫類(Fig.3-4、Rotifera) genus *Rotaria*、環形動物門(Fig.3-4、Annelia) genus *Aeolosoma*、節足動物門(Fig.3-4、Arthropoda) genus *Cyclops* は反応器下段で存在割合が増加する傾向にあった。これは DHS 保持汚泥の滞留時間が長いことから、増殖速度の遅い後生動物でも反応器下段付近で生息可能になるためであると考えられる。DHS 反応器のスポンジ担体内では、流入水温や水質環境の変動があっても、genus *Diplogaster* のような後生動物を流下方向に関係なく保持できていた。

松永らおよび Onodera *et al.*も、同様に、DHS 反応器における真核生物群集構造を調査しており、DHS 反応器下段に向かうに従って硝化反応が卓越し、肉質虫亜門に属する種の存在割合が増加することに加え、繊毛虫門に属する種の存在割合が低下することを報告している(松永ら, 2009; Onodera *et al.*, 2013)。この傾向は、本研究の観察結果と概ね一致している。一部に松永ら, 2009 および Onodera *et al.*, 2013 の知見とは異なる傾向を示す箇所 (Fig.3-4 (c), box 9)があったが、これはスポンジ担体間における保持汚泥の付着量や水の浸透具合にばらつきがあったためであると考えられる。今後は、採取するスポンジ担体数の増加などにより、精度のある解析が必要であると考えられる。一方で、松永らの研究成果における後生動物の群集構造は、本研究と同種類のものが検出されているが、流下方向における挙動は同様ではなく、後生動物の存在割合は、DHS 反応器下部に向かうに従って低下する傾向にあった。これは、松永らの報告では DHS 反応器下段付近での各 box における有機物汚泥負荷が $0.1 \text{ kgCOD} \cdot \text{kgVSS}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ 以下と極端に低い条件にあり、後生動物が生育できなかったためだと考えられる(松永ら, 2009)。

低水温時の保持汚泥濃度 TSS は流下方向において殆ど変化はなく、 $40 \text{ gTSS} \cdot \text{L}^{-1}$ 程度であった。また、水温が上昇すると、保持汚泥濃度 TSS は $10\text{--}30 \text{ gTSS} \cdot \text{L}^{-1}$ 程度まで減少していた。既往の知見では、後生動物である *Rotaria* 属は、培地中の水温を 30°C から 5°C に変化させた場合、比増殖速度は $1/30$ 程度にまで低下することが報告されている(国安ら, 1997)。そのため、水温 15°C (春)の時期は、捕食者である真核生物の増殖活性が著しく低下して、スポンジ担体の保持汚泥があまり捕食されなかったため、水温 22°C (初夏)や 26°C (夏)の時期と比較して、保持汚泥濃度 TSS が高かったと考えられる。

DHS 反応器における下水処理特性や機構を評価するうえで、*Bacteria* や *Archaea* などの原核生物の 16S rRNA 遺伝子を標的とした解析がいくつか報告されている。硝化性能が良好な時期(水温 20°C 程度の時期)では、DHS 反応器上段から下段にいくにつれて、全抽出 DNA 中に占める硝化細菌群の 16S rRNA 遺伝子コピー数が増加し、保持汚泥中の微生物群集構造も変化することが報告されている(久保田ら, 2010; Kubota *et al.*, 2014)。このような原核生物群集構造と真核生物群集構造との間にどのような関連性があるかは不明であるが、季節によって変化する有機物負荷に対応して真核生物群集構造が変化していることがわかった。

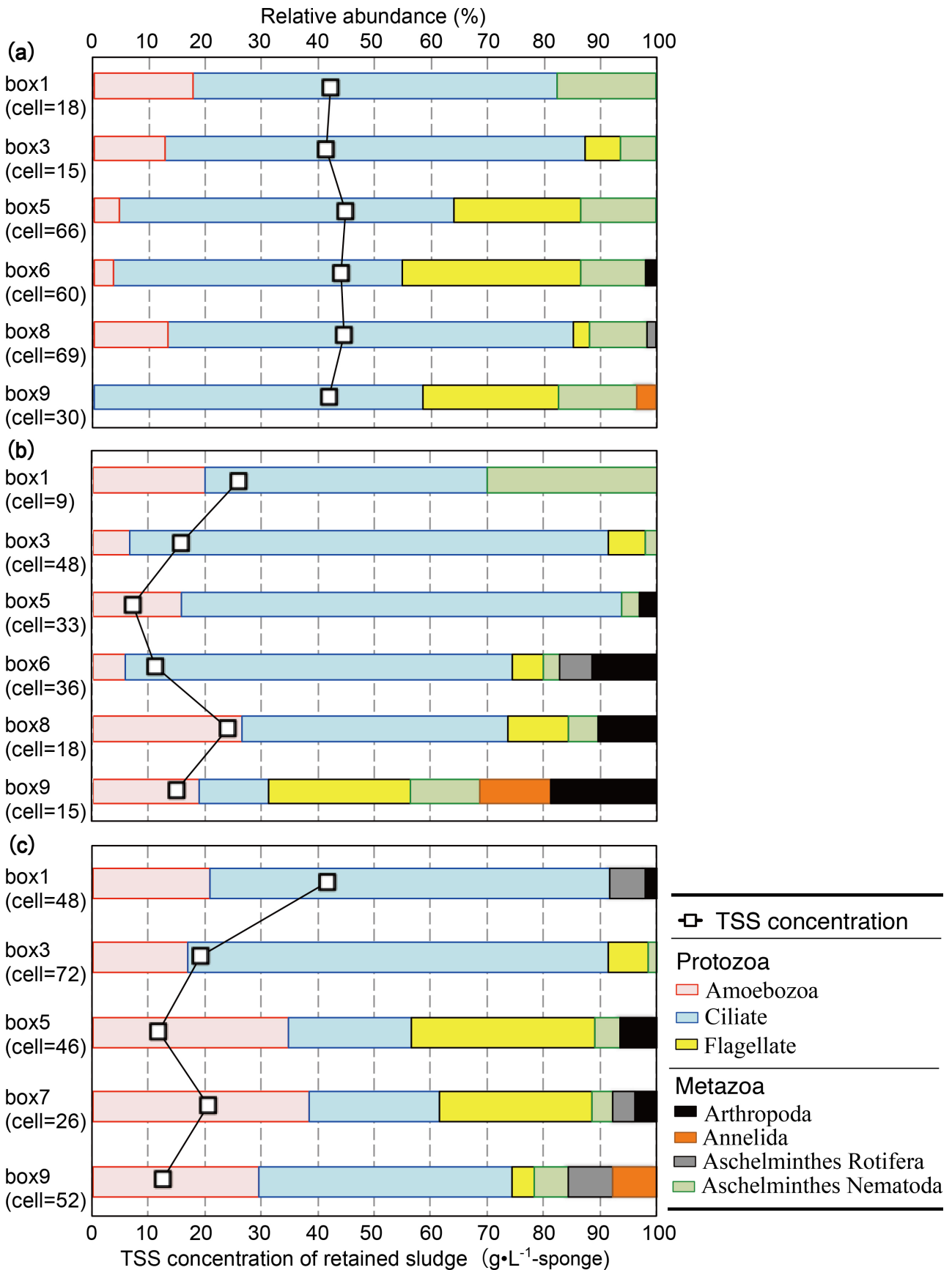


Fig.3-4 Eukaryotic community composition (phylum level) shown by microscopic analysis and TSS concentration of retained sludge; (a) water temperature 15°C, (b) water temperature 22°C, (c) water temperature 26°C.

3.3.3 プライマー配列の特異性評価

Fig.3-5 にプライマーの特異性を評価した結果(それぞれのプライマーに対して0塩基、1塩基、2塩基、3塩基ミスマッチ)を示す。その結果、18S rRNA 遺伝子の全長を解析可能なプライマー (EukA および EukB) の coverage が極端に低いことが分かった (EukA、EukBともに3塩基ミスマッチで20%以下の coverage)。また、原生動物の群集構造解析時に使用されるプライマーである PSSU についても coverage が低かった。考えられるひとつの要因として、これらのプライマーで解析可能な18S rRNA 遺伝子領域の情報が少ないことが挙げられる(通常、塩基配列を登録する際は、プライマー配列部位を削除するため)。すなわち、プライマー配列と真核生物の18S rRNA 遺伝子配列が異なっているだけでなく、これらのプライマーで解析可能な遺伝子領域の情報(塩基配列)がないため、極端に coverage が低かったのだと考えられた。

そこで分子系統解析ソフト ARB 内に取り込んだデータベースの18S rRNA 遺伝子配列を確認した。具体的には、データベースから、DHS 保持汚泥中において優占していた真核生物の18S rRNA 遺伝子配列情報を取得しプライマー配列と比較した (Supplementary materials, Fig.S3-1 から Fig.S3-3)。その結果、DHS 保持汚泥にて優占していた真核生物の18S rRNA 遺伝子配列の多くは、EukA および EukB のプライマー配列と、3塩基ミスマッチ以内であることが分かった(但し、18S rRNA 遺伝子配列情報がないものは除く)。これらの結果から、DHS 反応器において優占する真核生物に関しては、EukA および EukB のプライマーの組み合わせで標的とする遺伝子領域を増幅可能であると考えられた。その一方で、PSSUプライマーは、原生動物(なかでも特に繊毛虫)の18S rRNA 遺伝子配列とは3塩基ミスマッチ以内であるが、後生動物の18S rRNA 遺伝子配列とは3塩基ミスマッチ以上であった。これらのことから、PSSU と EukB のプライマー対では、真核生物のなかでも特に繊毛虫の群集構造を解析できると判断した。

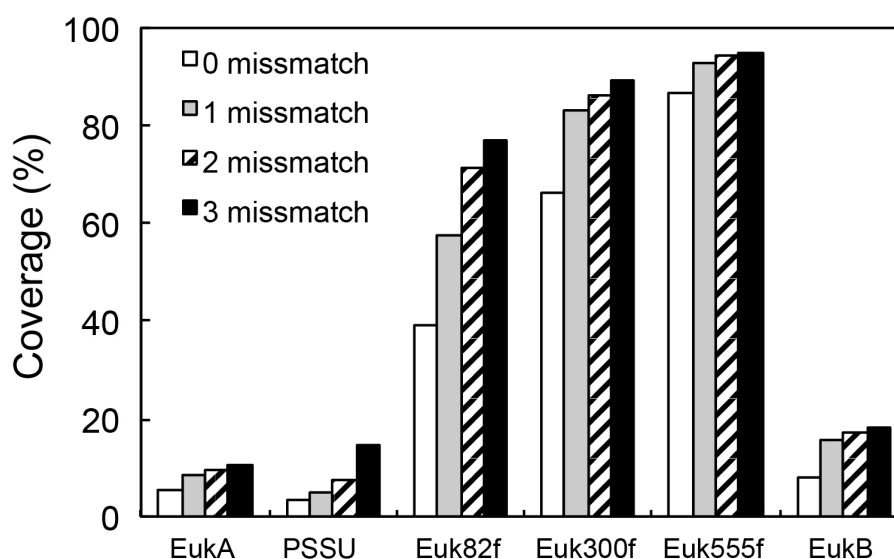


Fig.3-5 The 18S rRNA gene-sequence coverage of the primer used in this study.

3.3.4 真核生物1個体からの18S rRNA遺伝子断片のPCRとシーケンス解析

Table 3-5 に検鏡による形態学的特徴に基づいた同定結果と真核生物1個体からの18S rRNA 遺伝子配列に基づいた同定結果を示す。18S rRNA 遺伝子のシーケンス解析の結果、DHS 反応器において優占する真核生物種はNCBI のデータベースに登録されている既知の真核生物種と85–100%の18S rRNA 遺伝子配列の相同性を有していた。松永らの研究では、検鏡では確認されているものの、繊毛虫門(Table 3-5、Ciliate)のgenus *Paramecium* やgenus *Colpidium* などの原生動物は、EukAとEukBのプライマー対を用いたクローン解析では検出されていなかった(松永ら, 2012)。その一方で、本研究において、これらの真核生物種に関して、保持汚泥から1個体ずつ取り出してPCRを行うことで18S rRNA 遺伝子配列によって同定することが可能であった。これらのことから、クローン解析では、PCR 効率の違いや真核生物1個体のDNA保有量の違いなどの理由から、検鏡とは異なる群集構造解析結果となることが予想された。そのため、現状では、検鏡とクローン解析を併用する必要があることが示唆された。また、データベースに登録されている既知の真核生物種と18S rRNA 遺伝子の相同性が85–96%程度のもは、これまで検鏡による解析では捉えきれなかった未知真核生物である可能性が考えられた。もしくは、形態学的特徴に基づく同定では認知されているものの、18S rRNA 遺伝子配列情報がなかった真核生物であった可能性も考えられる。

また、真核生物種の形態学的特徴による門レベルの同定結果と18S rRNA 遺伝子配列による同定結果は、概ね一致していたが、属レベルでの判定では一部に差異が生じていた。これは、検鏡の際、原生動物が素早く動いていたこと等により、細かな形態による区別を誤ったためだと考えられた。また、今回特に、活性汚泥法にはあまり出現しない種に関しては、図鑑等に記載されていないなどの情報不足によって同定を誤ったのだと考えられた(例えば、Table 3-5 繊毛虫門(Ciliate)genus *Hemiphrys* や節足動物門(Arthropoda)genus *Ectocyclops*、genus *Eucyclops* など)。さらに、袋形動物門輪虫類(Rotifera)については、既知情報と明らかに形態が同じであるが、塩基配列による同定が形態学的特徴に基づく同定結果と大きく異なるものがあつた。これは、genus *Rotaria* が体長の小さいgenus *Colpidium* の原生動物を捕食したため、genus *Rotaria* とgenus *Colpidium* のDNA が混在したためであると考えられた。したがって、他の真核生物を捕食するような体長の大きな生物に関しては、解析する回数を増やす等して正確な遺伝子配列情報を取得する必要があると考えられた。

検鏡でよく報告されているgenus *Arcella* やgenus *Centropyxis* といった硝化特性を評価するうえで重要とされている種の18S rRNA 遺伝子配列は未だ報告されていなかった。本研究で1個体ずつ回収して解析を行っても18S rRNA 遺伝子配列の全長を決定することができなかった(DNA抽出後のDNA濃度はPCRの下限值以上であったことは確認している)。この原因は解明できていないが、これらの種が検鏡で優占していた汚泥を対象としてクローン解析を行った報告においても本研究と同じ傾向にあることから、既に死滅しDNAが無い状態の細胞を回収していた、もしくは1個体が持つDNA量が少ない、といった可能性が高いのではないかと考えている。そのため、EukA およびEukBのプライマー対を使用している既報においても、これらの真核生物の群集構造に関する評価を誤って行っている可能性が示唆された。

Table 3-5 The closest relatives of 18S rRNA gene-sequences of eukaryotes presented in the DHS reactor.

Microscopic analysis			Sequence of 18S rRNA gene			
Taxonomy (Phylum level)	Taxonomy (Genus level)	Cell number	Primer pair for PCR	Taxonomy (Phylum level)	Clothest isolate by NCBI search (Genus and species level)	Accession No. Similarity (%)
Protozoa						
Ciliate	<i>Metopus spp.</i>	2	Euk A/Medlin B	Ciliate	<i>Metopus palaeformis</i>	AY007452 528/566(93%)
Ciliate	<i>Colpidium spp.</i>	2	Euk A/Medlin B	Ciliate	<i>Metopus palaeformis</i>	AY007452 528/566(93%)
Ciliate	<i>Paramecium spp.</i>	2	Euk A/Medlin B	Ciliate	<i>Metopus palaeformis</i>	AY007452 528/566(93%)
Ciliate	<i>Paramecium spp.</i>	1	Euk A/Medlin B	Ciliate	<i>Paramecium multimicronucleatum</i>	AB252007 630/630(100%)
Ciliate	<i>Paramecium spp.</i>	1	Euk A/Medlin B	Ciliate	<i>Paramecium caudatum</i>	AB252005 1134/1167(97%)
Ciliate	<i>Paramecium spp.</i>	1	Euk A/Medlin B	Ciliate	<i>Paramecium jenningsi</i>	HE662760 235/277(85%)
Ciliate	<i>Colpoda spp.</i>	1	Euk A/Medlin B	Ciliate	<i>Trithigmostoma steini</i>	X71134 622/633(98%)
Ciliate	<i>Anteholosticha spp.</i>	4	Euk A/Medlin B	Ciliate	<i>Anteholosticha monilata</i>	GU942567 602/633(95%)
Ciliate	<i>Anteholosticha spp.</i>	1	Euk A/Medlin B	Ciliate	<i>Hemiophrys procera</i>	AY102175 1164/1206(97%)
Ciliate	<i>Vorticella spp.</i>	1	Euk A/Medlin B	Ciliate	<i>Epistylis urceolata</i>	AF335516 598/619(97%)
Ciliate	<i>Vorticella spp.</i>	1	Euk A/Medlin B	Ciliate	<i>Carchesium polypinum</i>	HM852982 1100/1138(97%)
Ciliate	<i>Vorticella spp.</i>	1	Euk A/Medlin B	Flagellate	<i>Exuviaella pusilla</i>	DQ388459 583/618(94%)
Sarcodimian	<i>Arcella spp.</i>	1	18S-82F/Medlin B	—	<i>Uncultured eukaryote clone</i>	GQ462780 560/573(98%)
Sarcodimian	<i>Centropyxis spp.</i>	1	18S-82F/Medlin B	—	<i>Uncultured alveolate clone</i>	AY179987 1056/1162(91%)
Viridiplantae	<i>Volvox spp.</i>	1	18S-82F/Medlin B	Sarcodimian	<i>Pterocystis sp.</i>	AY749607 1020/1155(88%)
Metazoa						
Aschelminthes	<i>Rotaria spp.</i>	1	18S-82F/Medlin B	Aschelminthes	<i>Adineta vaga</i>	GQ398061 629/637(99%)
Aschelminthes	<i>Rotaria spp.</i>	1	Euk A/Medlin B	Ciliate	<i>Colpidium striatum</i>	HM030739 606/617(98%)
Aschelminthes	<i>Rotaria spp.</i>	3	Euk A/Medlin B	Annelida	<i>Chaetopterus pugaporcinus</i>	DQ209224 587/603(97%)
Aschelminthes	<i>Diplogaster spp.</i>	1	Euk A/Medlin B	Annelida	<i>Rheomorpha neiswestonovae</i>	AY527049 622/649(96%)
Aschelminthes	<i>Diplogaster spp.</i>	1	18S-82F/Medlin B	—	<i>Uncultured alveolate clone</i>	DQ244038 646/652(99%)
Arthropoda	<i>Cyclops spp.</i>	1	18S-82F/Medlin B	Arthropoda	<i>Ectocyclops polypinosus</i>	AJ746336 622/642(97%)
Arthropoda	<i>Cyclops spp.</i>	1	Euk A/Medlin B	Arthropoda	<i>Eucyclops macruroides</i>	AJ746329 618/632(98%)

3.4 小括

本章では、基礎的知見の収集を目的として、季節変動(下水水温の変動)が、下水処理UASB後段に設置したDHS反応器の処理特性と保持汚泥中の真核生物群集構造に与える影響について解析した。その結果、以下の知見が得られた。

1. 下水処理UASB-DHSシステムでは、冬期から春期への水温上昇時に、著しく処理水質が悪化することがわかった。これは、UASB処理水(DHS流入水)の水質悪化による一時的な過負荷状態(OLRは $1.96 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$)にあることに加え、水温 15°C 程度と低い水温のため、硝化反応に関わる微生物群の活性が低下していたことが原因であると考えられた。
2. UASB処理水の有機物濃度の変動、すなわち、有機物負荷の変動および下水水温の変動の影響を受けて、DHS反応器の保持汚泥中における真核生物群集構造は変化していた。この時の、DHS反応器の流下方向における水質と保持汚泥にて優占していた真核生物種の関係は、標準活性汚泥法における既往の知見と相違がなかった。なお、本章では、有機物負荷と水温の変化が同時に起きる条件で解析を行ったため、有機物負荷と水温のそれぞれの因子と真核生物群集構造との関連性に関して、今後、実験的解析を行う必要があると考えられた。
3. DHS反応器の保持汚泥中にて、優占して出現していた真核生物を1個体ずつ回収して、その18S rRNA遺伝子配列を決定することで、体長が小さく形態学的特徴に基づく同定が困難な真核生物に関しても同定が可能であった。そのため、検鏡と遺伝子解析を相補的に用いることで、真核生物群集構造を詳細に評価できる可能性があると考えられた。
4. 18S rRNA遺伝子配列に基づく同定では、未知の真核生物の可能性のある種も確認された(国際塩基配列データベースに登録されている18S rRNA遺伝子配列との相同性が97%以下のもの)。そのため、下水処理汚泥内に存在する真核生物の詳細(下水処理汚泥内での生態や機能)を明らかにしていくうえで、真核生物の形態情報と18S rRNA遺伝子配列情報を統合する必要があると考えられた。
5. データベースに登録されている18S rRNA遺伝子配列情報を用いて、クローン解析時に使用するプライマーの検討を行った。その結果、EukA、EukB、PSSUのプライマー配列と、DHS反応器の保持汚泥中に優占して存在する真核生物の18S rRNA遺伝子配列は、最大でも3塩基ミスマッチ以内であることがわかった(遺伝子配列情報がないものは除く)。そのため、これらのプライマー対(EukAとEukBの組み合わせ、および、PSSUとEukBの組み合わせ)を用いて、DHS反応器における真核生物群集構造を解析することが可能であると判断した。

参考文献

- Berney C, Fahrni J, and Pawlowski J (2004) How many novel eukaryotic ‘kingdoms’? Pitfalls and limitations of environmental DNA surveys, *BMC Biology*, 2, 1-13.
- Canals O, Salvadó H, Auset M, Hernández C, and Malfeito JJ (2013) Microfauna communities as performance indicators for A/O shortcut biological nitrogen removal moving-bed biofilm reactor, *Water Research*, 47, 3141-3150.
- Hatamoto M, Ohtsuki K, Maharjan N, Ono S, Dehama K, Sakamoto K, Takahashi M, and Yamaguchi T (2016) Performance evaluation of the sulfur-redox-reaction-activated up-flow anaerobic sludge blanket and down-flow hanging sponge anaerobic/anoxic sequencing batch reactor system for municipal sewage treatment, *Bioresource Technology*, 204, 171-176.
- Kubota K, Hayashi M, Matsunaga K, Iguchi A, Ohashi A, Li YY, Yamaguchi T, and Harada H (2014) Microbial community composition of a down-flow hanging sponge (DHS) reactor combined with an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) for the treatment of municipal sewage, *Bioresource Technology*, 151, 144-150.
- Lopez-Garcia P, Philippe H, Gail F, and Moreira D (2003) Autochthonous eukaryotic diversity in hydrothermal sediment and experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge, *PNAS*, 100 (2), 697-702.
- 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 AW, Gross O, Grumann S, Hermann S, Jost R, Konig A, Liss T, Lubmann 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 (2004) ARB: a software environment for sequence data, *Nucleic Acids Research*, 32 (4), 1363-1371.
- Machdar I, Harada H, Ohashi A, Sekiguchi Y, Okui H, and Ueki K (1997) A novel and cost-effective sewage treatment system consisting of UASB pre-treatment and aerobic post-treatment units for developing countries, *Water Science and Technology*, 36 (12), 189-197.
- Matsunaga K, Kubota K, and Harada H (2014) Molecular diversity of eukaryotes in municipal wastewater treatment processes as revealed by 18S rRNA gene analysis, *Microbes and Environments*, 29 (4), 401-407.
- Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, and Sogin ML (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions, *Gene*, 71, 491-499.
- Ntougias, S., Tanasidis, S. and Melidis, P. (2011) Microfaunal indicators, Ciliophora phylogeny and protozoan population shifts in an intermittently aerated and fed bioreactor, *Journal of Hazardous Materials*, 186 (2), 1862-1869.
- Onodera T, Matsunaga K, Kubota K, Taniguchi R, Harada H, Syutsubo K, Okubo T, Uemura S, Araki N, Yamada M, Yamauchi M, and Yamaguchi T (2013) Characterization of the retained sludge in a down-flow hanging sponge (DHS) reactor with emphasis on its low excess sludge production, *Bioresource Technology*, 136, 136-175.
- Okubo T, Kubota K, Yamaguchi T, Uemura S, and Harada H (2016) Development of a new non-aeration-based sewage treatment technology: Performance evaluation of a full-scale down-flow hanging sponge reactor employing third-generation sponge carriers, *Bioresource Technology*, 102, 138-146.
- Syutsubo K, Yoochatchaval W, Tsushima I, Araki N, Kubota K, Onodera T, Takahashi M, Yamaguchi T, and Yoneyama Y (2011) Evaluation of sludge properties in a pilot-scale UASB reactor for sewage treatment in a temperature region,

Water Science and Technology, 64 (10), 1959-1966.

- Uemura S and Harada H (2010) Application of UASB technology for sewage treatment with a novel post-treatment process, In: Fang HHP (ed) *Environmental anaerobic technology*, Imperial College Press, London, 91-112.
- Van Hoek AHAM, Van Alen TA, Sprakel VSI, Hackstein JHPH, and Vogels GD (1998) Evolution of anaerobic ciliates from the gastrointestinal tract: phylogenetic analysis of the ribosomal repeat from *Nyctotherus ovalis* and its relatives, *Molecular Biology and Evolution*, 15 (9): 1195-1206.
- 稲森悠平, 国安裕子, 須藤隆一(1987) 生物処理における微小後生動物の役割に関する研究, *日本水処理生物学会誌*, 23 (2), 15-23.
- 大久保努, 山口隆司, 久保田健吾, 原田秀樹(2010) 無曝気方式の新規下水処理技術の開発—第三世代型担体を適用した実規模DHSリアクターの処理性能評価—, *土木学会論文集G*, 66 (3), 149-158.
- 大矢明子, 小野寺崇, 山口隆司, 珠坪一晃, 荒木信夫, 多川正, 山崎慎一, 米山豊, 大橋晶良, 原田秀樹(2009) 下水処理UASBリアクターの処理特性および保持汚泥性状評価, *環境工学研究論文集*, 46, 629-635.
- 国安克彦, 林紀男, 稲森悠平, 須藤隆一(1997) 環形動物貧毛類の増殖に及ぼす環境因子の影響, *日本水処理生物学会誌*, 33 (4), 207-214.
- 久保田健吾, 林幹大, 松永健吾, 大橋晶良, 李玉友, 山口隆司, 原田秀樹(2010) 都市下水処理UASB-DHSシステムにおけるG3型DHSリアクターの微生物群集構造解析, *土木学会論文集G*, 66 (1), 55-64.
- 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)*, 67 (7), III_285-III_292.
- 須藤隆一(1978a) 廃水の生物処理に出現する微小動物について(1) 活性汚泥および生物膜の微小動物相, *日本農芸化学会誌*, 52 (2), 9-20.
- 須藤隆一(1978b) 廃水の生物処理に出現する微小動物について(2) 微小動物の役割, *日本農芸化学会誌*, 52 (3), 51-57.
- 須藤隆一(1979) 回転円盤法による硝化・脱窒, *環境技術*, 8 (9), 70-77.
- 千種薫(1996) 図説 微生物による水質管理, 産業用水調査会.
- 松永健吾, 小野寺崇, 上村繁樹, 山田真義, 山内正仁, 高橋優信, 久保田健吾, 原田秀樹, 山口隆司(2009) 下水処理UASB後段のDHSにおける余剰汚泥量の抑制要因の評価, *環境工学研究論文集*, 46, 623-628.
- 松永健吾, 久保田健吾, Erica Vonasek, 竹村泰幸, 原田秀樹(2012) 18S rRNA遺伝子情報を用いた排水処理汚泥の真核生物群集構造解析, *土木学会論文集G (環境)*, 67 (7), III_13-III_19.
- (社)日本下水道協会(2012) 下水試験方法上下巻.

Supplementary materials

		E. coli K-12 16S rRNA gene position																					
		Euk A (5'-AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT-3')																					
Accession	Phylogenetic affiliation	Species	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
U97111	Ciliophora	<i>Parodon viridis</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
M97908	Ciliophora	<i>Colpoda inflata</i>	T	A	T	C	T	G	G	T	T	G	A	T	T	C	T	G	C	C	A	G	T
AB252009	Ciliophora	<i>Paramecium tetraurelia</i>	T	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
AB252007	Ciliophora	<i>Paramecium multimicro nucleatum</i>	T	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
X03772	Ciliophora	<i>Paramecium tetraurelia</i>	A	A	T	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
AF335514	Ciliophora	<i>Epistylis chrysemydis</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
AF335516	Ciliophora	<i>Epistylis urceolata</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
AF335515	Ciliophora	<i>Epistylis wenrichi</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
AF335513	Ciliophora	<i>Epistylis hentscheli</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
AF335517	Ciliophora	<i>Epistylis plicatilis</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
AF401522	Ciliophora	<i>Carexhium polytipium</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
AF184665	Ciliophora	<i>Tetrahymena farleyi</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
EF428128	Ciliophora	<i>Tetrahymena tropicalis</i>	A	A	T	A	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
GQ351698	Ciliophora	<i>Litonotus paracynus</i>	-	-	T	C	T	G	G	T	T	G	A	T	T	C	T	G	C	C	A	G	T
GQ351701	Ciliophora	<i>Litonotus pictus</i>	-	-	T	C	T	G	G	T	T	G	A	T	T	C	T	G	C	C	A	G	T
HM581673	Ciliophora	<i>Trachelius ovum</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
AF305625	Ciliophora	<i>Aspidisca steini</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
EF123704	Ciliophora	<i>Aspidisca aculeata</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
JX899420	Ciliophora	<i>Oxytricha longigranulosa</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
JX899421	Ciliophora	<i>Oxytricha granulifera</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
AJ418788	Cercozoa	<i>Euglypha acanthophora</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
AJ418785	Cercozoa	<i>Euglypha filifera</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
AJ418783	Cercozoa	<i>Euglypha rotunda</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
AJ418787	Cercozoa	<i>Euglypha tuberculata</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
AJ418792	Cercozoa	<i>Trinema enchelys</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
AY848965	Tubulinea	<i>Centropyxis laevigata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
AY425017	Kinetoplastida	<i>Bodo rostratus</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
AY490234	Kinetoplastida	<i>Bodo saltans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
AF492705	Ciliophora	<i>Euplotes charon</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
FJ423449	Ciliophora	<i>Euplotes rariseta</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
AM231774	Metazoa	<i>Chaetomonas neptuni</i>	T	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
HM187580	Metazoa	<i>Macrobrotus polonicus</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
AJ746336	Metazoa	<i>Ectocyclops polyspinosus</i>	T	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
HM746725	Metazoa	<i>Euzonus ezoensis</i>	T	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
AJ746334	Metazoa	<i>Macrocyclops albidus</i>	T	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
AY618510	Fungi	<i>Candida ghanaensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
AY055856	Fungi	<i>Candida parapsilosis</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T
NG_017172	Fungi	<i>Hyaloraphidium curvatum</i>	A	A	C	C	T	G	G	T	T	G	A	T	C	C	T	G	C	C	A	G	T

Fig.S3-1 The 18S rRNA gene-sequence of predominant eukaryote with sequence of EukA primer.

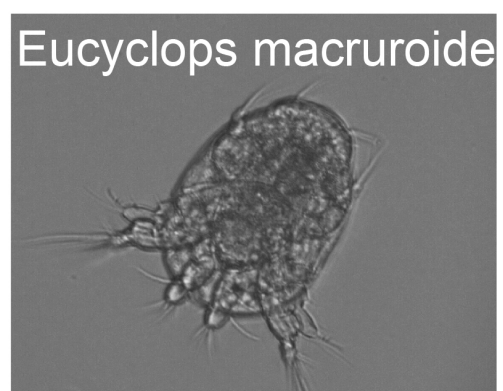
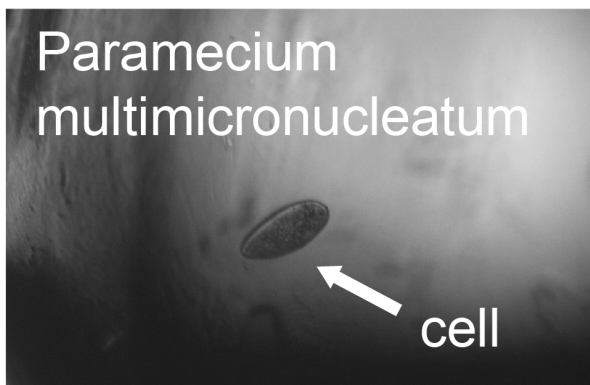
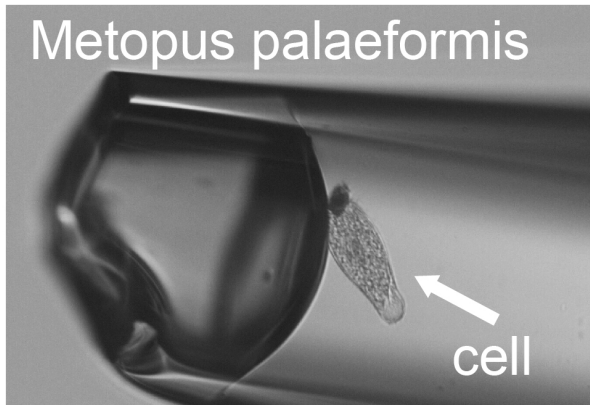
Accession	Phylogenetic affiliation	Species	E. coli K-12 16S rRNA gene position																													
			1511	1534	EukB (5'-TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC-3')																											
U97111	Ciliophora	<i>Prorodon viridis</i>	G	T	A	G	G	T	G	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	G	A	T	G	G	A	T	C	A				
M97908	Ciliophora	<i>Colpoda inflata</i>	G	T	A	G	G	T	G	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	G	A	T	G	G	A	T	C	A				
AB252009	Ciliophora	<i>Paramecium tetraurelia</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	G	A	G	A	G	G	-	-	-	-	-	-					
AB252007	Ciliophora	<i>Paramecium multimicronucleatum</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	G	A	G	A	G	G	-	-	-	-	-						
X03772	Ciliophora	<i>Paramecium tetraurelia</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	G	A	G	A	G	A	T	G	G	A	T	C	A				
AF335514	Ciliophora	<i>Epistylis chrysemydis</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	G	A	-	-	-	-	-	-						
AF335516	Ciliophora	<i>Epistylis urceolata</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	G	A	-	-	-	-	-	-						
AF335515	Ciliophora	<i>Epistylis wernrichi</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	G	A	-	-	-	-	-	-						
AF335513	Ciliophora	<i>Epistylis henscheli</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	G	A	-	-	-	-	-	-						
AF335517	Ciliophora	<i>Epistylis plicatilis</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	G	A	-	-	-	-	-	-						
AF401522	Ciliophora	<i>Carchesium polypinum</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	G	A	-	-	-	-	-	-						
AF184665	Ciliophora	<i>Tetrahymena farleyi</i>	A	T	C	T	A	G	T	G	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	T	G	G	A	T	C	A					
EF428128	Ciliophora	<i>Tetrahymena tropicalis</i>	A	T	C	T	A	G	T	G	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	A	G	G	A	T	C	A					
GQ351698	Ciliophora	<i>Litonotus paracynus</i>	A	T	C	T	A	G	T	G	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	W	G	G	A	T	C	-					
GQ351701	Ciliophora	<i>Litonotus pictus</i>	A	T	C	T	A	G	T	G	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	A	G	G	A	T	C	A					
HM581673	Ciliophora	<i>Trachelius ovum</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	G	A	G	A	A	G	G	A	T	C	A						
AF305625	Ciliophora	<i>Aspidisca steini</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	G	A	A	G	G	A	T	C	A					
EF123704	Ciliophora	<i>Aspidisca aculeata</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	G	A	A	G	G	A	T	C	A					
JX899420	Ciliophora	<i>Oxytricha longigranulosa</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	G	A	A	G	G	A	T	C	A					
JX899421	Ciliophora	<i>Oxytricha granulifera</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	G	A	A	G	G	A	T	C	A					
AJ418788	Cercozoa	<i>Euglypha acanthophora</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	G	A	A	G	G	A	T	C	A					
AJ418785	Cercozoa	<i>Euglypha filifera</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	G	A	A	G	G	A	T	C	A					
AJ418783	Cercozoa	<i>Euglypha rotunda</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	G	A	-	-	-	-	-	-						
AJ418787	Cercozoa	<i>Euglypha tuberculata</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	G	G	A	A	G	A	A	G	A	T	C	A					
AJ418792	Cercozoa	<i>Trinema enchebys</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	G	G	A	A	G	A	A	G	A	T	C	A					
AY848965	Tubulinea	<i>Centropixis laevigata</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	G	A	A	G	A	T	C	A						
AY425017	Kinetoplastida	<i>Bodo rostratus</i>	A	G	C	T	A	G	T	G	A	A	C	C	T	G	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-						
AY490234	Kinetoplastida	<i>Bodo saltans</i>	A	G	C	T	A	G	T	G	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	A	G	A	T	C	-						
AF492705	Ciliophora	<i>Euplotes charon</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	A	G	A	A	G	A	T	C	A					
FJ423449	Ciliophora	<i>Euplotes rariseta</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	A	G	A	A	G	A	T	C	A					
AM231774	Metazoa	<i>Chaetomonas neptuni</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	A	G	A	T	G	G	A	T	C	A				
HM187580	Metazoa	<i>Macrobrotius polonicus</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	A	G	A	A	G	A	T	C	A					
AJ746336	Metazoa	<i>Ectocyclops polyspinosus</i>	T	A	C	T	A	G	T	G	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	A	G	A	T	C	A						
HM746725	Metazoa	<i>Euzoonis ezoensis</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	A	G	A	A	G	A	T	C	A					
AJ746334	Metazoa	<i>Macrocyclops albidus</i>	T	A	C	T	A	G	T	G	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	A	G	A	T	C	A						
AY618510	Fungi	<i>Candida ghanaensis</i>	A	T	C	T	A	G	T	G	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	T	G	G	A	T	C	A					
AY055856	Fungi	<i>Candida parapsilosis</i>	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	A	G	A	A	G	A	T	C	A					
NG_017172	Fungi	<i>Hyaloraphidium curvatum</i>	A	T	C	C	G	T	A	A	C	C	T	G	C	A	G	A	A	G	A	T	G	G	A	T	C	A				

Fig.S3-2 The 18S rRNA gene-sequence of predominant eukaryote with sequence of EukB primer.

Accession	Phylogenetic affiliation	Species	E. coli K-12 16S rRNA gene position																														
			248	271																													
U97111	Ciliophora	<i>Protonotus viridis</i>	C	C	T	T	C	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
M97908	Ciliophora	<i>Colpoda inflata</i>	C	C	T	T	C	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
AB252009	Ciliophora	<i>Paramecium tetraurelia</i>	C	C	T	T	C	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
AB252007	Ciliophora	<i>Paramecium multimicronucleatum</i>	C	C	T	T	C	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
X03772	Ciliophora	<i>Paramecium tetraurelia</i>	C	C	T	T	C	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
AF335514	Ciliophora	<i>Epistylis chrysemydis</i>	C	C	T	T	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C		
AF335516	Ciliophora	<i>Epistylis urceolata</i>	C	C	T	T	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C		
AF335515	Ciliophora	<i>Epistylis wenrichi</i>	C	C	T	T	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C		
AF335513	Ciliophora	<i>Epistylis hentscheli</i>	C	C	T	T	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C		
AF335517	Ciliophora	<i>Epistylis plicatilis</i>	C	C	T	T	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C		
AF401522	Ciliophora	<i>Carchesium polypinum</i>	C	C	T	T	T	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
AF184665	Ciliophora	<i>Tetrahymena farseyi</i>	C	C	T	T	C	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
EF428128	Ciliophora	<i>Tetrahymena tropicalis</i>	C	C	T	T	C	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
GQ351698	Ciliophora	<i>Litonotus pictus</i>	C	C	T	T	C	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
GQ351701	Ciliophora	<i>Trachelius ovum</i>	C	C	T	T	C	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
HM581673	Ciliophora	<i>Aspidisca steini</i>	C	C	T	T	-	T	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
AF305625	Ciliophora	<i>Aspidisca aculeata</i>	C	C	T	T	-	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
EF123704	Ciliophora	<i>Aspidisca aculeata</i>	C	C	T	T	-	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
JX899420	Ciliophora	<i>Oxytricha longigranulosa</i>	C	C	T	T	C	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
JX899421	Ciliophora	<i>Oxytricha granulifera</i>	C	C	T	T	C	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
AJ418788	Cercozoa	<i>Euglypha acanthophora</i>	C	C	T	T	C	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
AJ418785	Cercozoa	<i>Euglypha filifera</i>	C	C	T	T	C	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
AJ418783	Cercozoa	<i>Euglypha rotunda</i>	C	C	T	T	C	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
AJ418787	Cercozoa	<i>Euglypha tuberculata</i>	C	C	T	T	C	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
AJ418792	Cercozoa	<i>Trinema encephaly</i>	C	C	T	T	C	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
AY848965	Tubulinea	<i>Centropyxis laevigata</i>	C	C	T	T	-	G	T	C	G	T	G	T	T	C	A	G	T	A	T	A	A	G	G	C	C	T	A	C	A	C	
AF492705	Ciliophora	<i>Euploetes charon</i>	C	C	T	T	-	A	C	G	T	G	T	T	C	A	G	T	A	T	A	A	A	G	G	C	C	T	A	C	A	C	
F1423449	Ciliophora	<i>Euploetes rarisseta</i>	C	C	T	T	-	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
AM231774	Metazoa	<i>Chaetonotus neptuni</i>	C	C	T	T	C	G	A	T	G	G	T	A	G	T	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
HM187580	Metazoa	<i>Macrobotis polonicus</i>	C	C	T	T	-	G	T	T	G	T	A	G	T	T	A	T	T	T	G	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C		
AJ746336	Metazoa	<i>Ectocyclops polyspinus</i>	C	C	T	T	A	T	C	A	C	T	G	T	G	G	C	A	T	A	T	T	T	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C
HM746725	Metazoa	<i>Euzoos ezoensis</i>	C	C	T	T	C	G	A	T	G	G	T	A	C	G	T	G	A	T	T	T	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
AJ746334	Metazoa	<i>Macrocyclops albidus</i>	C	C	T	T	C	G	A	T	G	G	T	A	C	G	T	G	A	T	T	T	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
AY618510	Fungi	<i>Candida ghanaensis</i>	T	C	T	A	T	C	A	T	C	A	T	C	A	A	G	G	T	A	T	T	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
AY055856	Fungi	<i>Candida parapsilosis</i>	C	C	T	T	C	G	A	T	G	G	T	A	G	A	T	A	T	T	T	T	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	
NG_017172	Fungi	<i>Hyaloraphidium curvatum</i>	C	C	T	T	C	G	A	T	G	G	T	A	G	A	T	A	T	T	T	T	T	A	T	T	G	A	C	T	A	C	

Fig.S3-3 The 18S rRNA gene-sequence of predominant eukaryote with sequence of PSSU primer.

・マイクロマニピュレーターにより回収した真核生物の写真の例



第 4 章

固形性有機物濃度の変化が DHS 反応器における 真核生物群集構造に与える影響の解析

Originally published:

Yuma Miyaoka, Masashi Hatamoto, Takashi Yamaguchi, and Kazuaki Syutsubo
(2016) Eukaryotic community shift in response to organic loading rate of an aerobic
trickling filter (down-flow hanging sponge reactor) treating domestic sewage,
Microbial Ecology, doi: 10.1007/s00248-016-0871-0.

4.1 研究背景

真核生物(真菌、原生動物、後生動物)は生物学的下水・排水処理反応器の中で重要な役割を担っている。特に、標準活性汚泥法のような完全混合型の反応器では、水質と対応した真核生物群集構造が形成されることが数多くの知見から分かっており、真核生物は反応器の処理性能を診断するための指標として扱われている(Canals *et al.*, 2013)。真核生物は分散状の細菌を捕食することが可能であり、その結果、処理水のBOD濃度やTSS濃度の低減に関わっていることが報告されている(Curds and Fey, 1969; Lapinski and Tunnacliffe, 2003)。最近の研究では、細菌を捕食する真核生物の同定が、緑色蛍光色素(green fluorescent protein:GFP)で標識した基質を用いた方法(Ravva *et al.*, 2010)や安定同位体比で標識した基質を用いた方法(RNA-Stable Isotope Probing)によって行われている(Moreno *et al.*, 2010)。しかしながら、有機物負荷などの基本的な運転操作因子の違いによって、これらの捕食機能を持つ真核生物がどのように推移するのかを定量的に把握した報告はない。そのため、下水・排水処理反応器における真核生物の生態学的特性は不明な点が多く、それらの制御に至っていない。

真核生物のうち真菌は形態学的な特徴が種間で少ないため、形態学的な特徴に基づく種の同定は非常に難しい。このような問題を避けるため、真菌の多様性を解析するうえで、微生物の培養に依存しない分子生物学的な解析手法を適用した報告がある(Evans and Seviour, 2012; Matsunaga *et al.*, 2014)。これらの報告では、活性汚泥法に存在する主要な未培養真核生物群である phylum Cryptomycota が多数検出されていることから、下水処理に何らかの形で関与している可能性がある結論付けている。加えて、いくつかの真菌は脱窒能やセルロース分解能を持つことを明らかにした報告もある(Hayatsu *et al.*, 2008)。そのため、下水処理反応器における炭素・窒素の物質循環を明らかにするためには、検鏡では解析しにくい真菌を含めた真核生物の群集構造を、把握することが極めて重要であると言える。

真核生物のうち原生動物に分類される繊毛虫は、環境条件によって増殖速度や形態学的特徴を変化させる特徴がある(Drake and Tsuchiya, 1977; Taylor, 1978)。そのため、検鏡による繊毛虫の形態学的特徴に基づいた同定では、間違いが生じやすい。真菌の群集構造解析と同様に、このような問題を避けるため、真核生物のうち原生動物の群集構造を解析するうえで、分子生物的手法を適用した報告がある(Marsh *et al.*, 1988; Shimano *et al.*, 2008; Shimano *et al.*, 2012)。しかしながら、1細胞あたりのrRNA遺伝子量が異なることに加え(Zhu *et al.*, 2005)、検鏡では評価しにくい真核生物を遺伝子解析では検出可能であるなどの理由から、クローン解析と検鏡による群集構造は異なることが予想される。そのため、現状では、遺伝子解析と検鏡を併せて行う必要があると言える(第3章の知見)。また、後生動物など体長が大きくDNA量が多い生物から、原生動物など体長が小さくDNA量が少ない生物にいたるまでの多種多様な真核生物が生息している下降流懸垂型スポンジ(DHS)保持汚泥のようなサンプルを解析する場合には、遺伝子解析と検鏡を相補的に用いる方が良いと考えられる(第3章の知見)。

DHS反応器は、ポリウレタン製のスポンジ担体を微生物保持担体として利用した散水ろ床法の一つであり、上昇流嫌気性汚泥床(UASB)反応器と組み合わせて省エネルギー型下水処理システム(UASB+DHSシステム)として提案されている(Machdar *et al.*, 1997; Uemura and Harada, 2010)。DHS反応器は標準活性汚泥法と比較して高い保持汚泥濃度および長い汚泥滞留時間を有しているため、有機物分解やアンモニア性窒素の酸化分解に関して十分な処理能力を示している(Agrawal *et al.*, 1997)。最近では、平均気温30℃の地域において、DHS反応器をBOD濃度20 mg·L⁻¹程度の低濃度下水の直接処理に適用した研究が行われている(Yoochatchaval *et al.*, 2014)。その結果、DHS反応器から流出する処理水のBOD濃度やNH₄⁺-N濃度は低く、高い処理能力を有していることが実証されている。さらに、既

報では、大腸菌の主な処理機構はスポンジ担体の空隙に吸着すること(Tawfik *et al.*, 2006)、微生物群集は有機物除去や硝化に対応して変化すること(Kubota *et al.*, 2014)、真核生物(原生動物や後生動物)の多様性や密度の高さが余剰汚泥量抑制に寄与していること(Onodera *et al.*, 2013)が明らかになっている。しかしながら、長期的な連続処理運転や基本的な運転操作因子(例:有機物負荷など)によって変化する真核生物群集構造の特徴やその推移は明らかにされていない。

本章では、2 台の下水処理 DHS 反応器(DHS 反応器 A および DHS 反応器 B)に関して、流入下水の固形性有機物濃度(有機物負荷)が真核生物群集構造に与える影響を把握することを目的として、固形性有機物濃度(有機物負荷)の上昇前後における真核生物群集構造(18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析および検鏡)と下水処理特性の解析を行った。このとき、水理的滞留時間 HRT は、DHS 反応器 A において 7.2 時間、DHS 反応器 B において 3.6 時間で運転を行い、有機物負荷は DHS 反応器 B の方が DHS 反応器 A よりも約 2 倍高くなるように設計した。また、流入下水の固形性有機物濃度は、下水貯留槽を緩やかに攪拌させることで変化させた。さらに、真核生物の群集構造解析では、同一 DHS 反応器の保持汚泥を対象として、経目的に真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析および検鏡を実施し、その特徴および優占種の推移を解析した。

4.2 実験方法

4.2.1 DHS 反応器と連続処理実験

スポンジ担体を垂直に 40 個連結させたものを DHS 反応器とした(スポンジ担体の総容積は 1.13 L:スポンジ担体 1 個の容積は 28.2 mL として計算)(Fig.4-1)。使用したスポンジ担体はポリウレタン製であり、プラスチック製のネットリングに入れた(直径 3.3 cm、横 3.3 cm)。このネットリングを互いに結束バンドで結合させた。また、プロフィール試験において、サンプリングを実施する箇所のスポンジ担体については 8 個に分割した(DHS 反応器の最上部から 7 個、21 個、35 個目のスポンジ担体)。これは、これの位置のスポンジ担体を経目的に解析に供するためである。DHS 反応器は 20–23°C に設定した室内に設置した。

連続処理実験において速やかな立ち上がりを期待して、長岡中央浄化センター(新潟県長岡市)で稼働している DHS 反応器(スクリーン通過後の下水を処理する UASB 反応器の後段に設置している DHS 反応器:Hatamoto *et al.*, 2016、第 3 章の DHS 反応器)から採取したスポンジ担体をそのまま使用した。さらに、霞ヶ浦浄化センター(茨城県土浦市)で稼働している嫌気-無酸素-好気法(anaerobic-anoxic-oxic: A₂O)の曝気槽から採取した活性汚泥およびスクリーン通過後の下水を採取し(採取した時期:2013 年 6 月)、それらを混合したものを DHS 反応器に供給した(day 0 から day 2 まで:連続処理実験開始時を day 0 と定義した。以降の第四章中の文章に関しても同様に定義した。)。霞ヶ浦浄化センターは霞ヶ浦湖北流域下水道における終末処理場である。既報(柏, 2007)を参考にすると、流入水の水質は、最初沈殿池前で BOD 157 mg·L⁻¹、COD 82.9 mg·L⁻¹、TSS 173 mg·L⁻¹、T-N 22.4 mg·L⁻¹、最初沈殿池後で BOD 82.2 mg·L⁻¹、COD 45.1 mg·L⁻¹、TSS 43.1 mg·L⁻¹、T-N 19.8 mg·L⁻¹である。また、A₂O 法の処理水の水質は、BOD 1.5 mg·L⁻¹(除去率 99%)、COD 7.1 mg·L⁻¹(除去率 92%)、TSS 2 mg·L⁻¹(除去率 99%)、T-N 5.9 mg·L⁻¹(除去率 90%)であり、高い有機物処理能力および脱窒能力を発揮している。

連続処理実験期間中、DHS 反応器にはスクリーン通過後の下水を供給した(前述した霞ヶ浦浄化センターのスクリーン通過後の下水)。この下水は、貯留槽の中での腐敗を防ぐために 13°C に冷却しており、基本的に一週間に一度の頻

度で新しく採取したものと全量交換した。連続処理実験では、この貯留槽の中の下水を DHS 反応器の最上部にポンプを使用して供給し、最下部より処理水として流出させた (Fig.4-1)。この時、供給された下水は重力によって下降する間に、スポンジ担体に保持された微生物によって処理が行われる。好気的な処理に必要な酸素は、人為的な曝気なしに空気中から自然に供給される機構になっている。

まず、DHS 反応器 A と DHS 反応器 B は、それぞれ HRT 7.2 時間 (スポンジ担体の総容積基準にして算出) で運転を開始した (day 3 から day 30 まで)。その後、Phase-1 (day 31 から day 168 まで) では、DHS 反応器 A は HRT 7.2 時間を維持したまま運転を継続し、DHS 反応器 B は HRT を 3.6 時間にまで短縮させて運転を行った。続く Phase-2 (day 169 から day 238 まで) では、下水貯留槽の攪拌を開始し、流入水の有機物および固形物濃度を増加させることで有機物負荷の上昇を図った。Phase-3 (day 239 から day 352 まで) では、運転条件は変化させずに (Phase-2 と同じ)、長期間の運転が、処理性能や真核生物群集構造に与える影響を解析した。

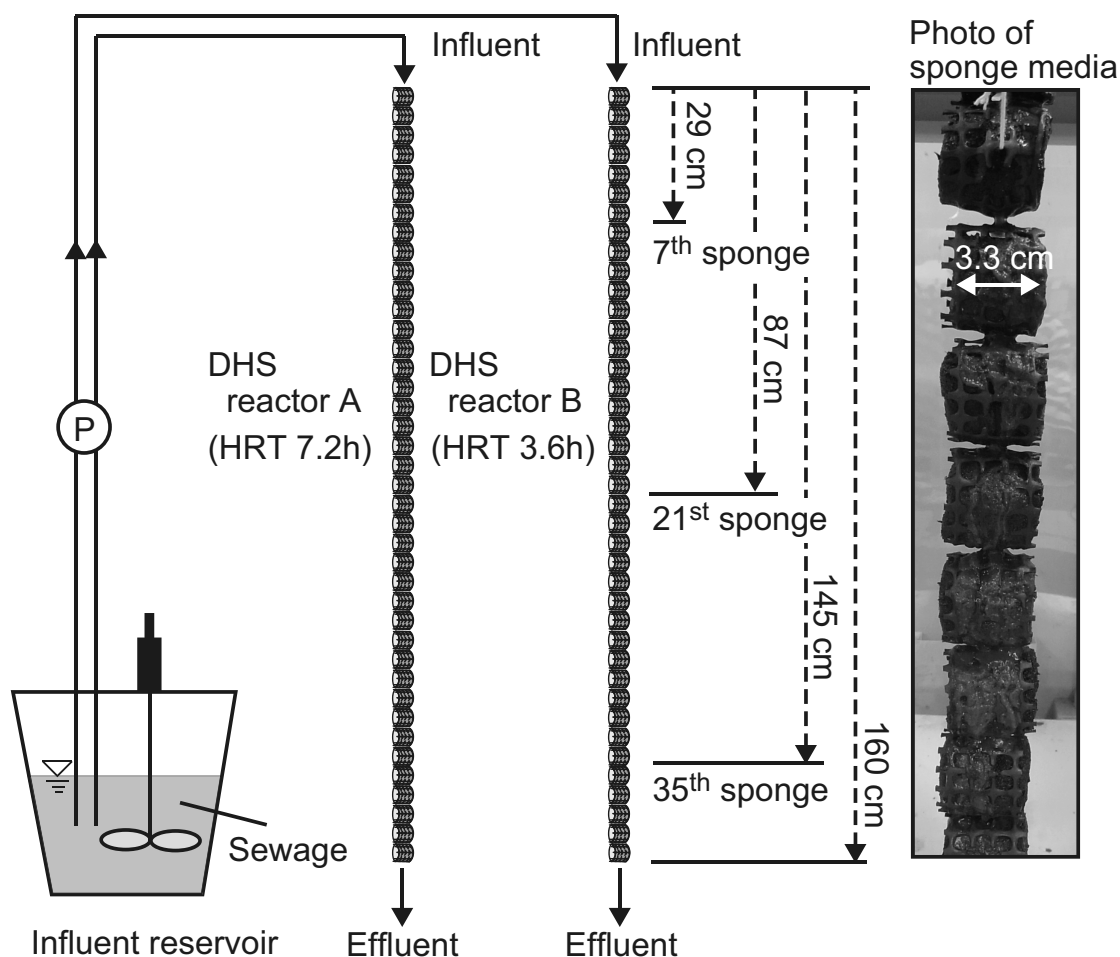


Fig.4-1 Schematic diagram of DHS reactor in this study.

4.2.2 水質分析方法

DHS 反応器の処理性能は、流入水と処理水を水質分析に供することで評価した。pH、溶存酸素 (DO)、酸化還元電位 (ORP) を pH 計 (D-52、Horiba、Kyoto、Japan)、DO 計 (DO-31P、TOA DKK、Tokyo、Japan)、ORP 計 (TPX-90i、TOKO、Saitama、Japan) を使用して分析した。TSS および VSS の測定にはガラス繊維ろ紙 (0.4 μm 、GB140、Advantec、Tokyo、Japan) を使用した。亜硝酸性窒素および硝酸性窒素 (NO_2^- -N および NO_3^- -N) の分析には高速イオンクロマトグラフィー (LC 20-ADsp、Shimadzu、Kyoto、Japan) を使用した。COD およびアンモニア性窒素 (NH_4^+ -N) の分析には分光光度計 (DR-3900、Hach、Loveland、CO、USA) を使用した。全窒素 (T-N) の分析は、下水試験方法に参考し、ペルオキシ二硫酸カリウムと水酸化ナトリウムを用いて全ての窒素化合物を硝酸性窒素に変換させた後、分光光度計 (UVmini-1240、Shimadzu) を使用して、硝酸性窒素を分析し、それを全窒素とした。

4.2.3 水質プロフィール試験

DHS 反応器の排水流下長における水質変化を把握するために (微生物学的な反応が生じている箇所の特定)、各 Phase において水質プロフィール試験を行った。水質プロフィール試験は、Phase-1 は days 85 から day 119 までの間、Phase-2 は days 198 から day 238 までの間、Phase-3 は days 328 から day 352 までの間に実施した。それぞれの水質プロフィール試験に日数がかかっているのは、検鏡に要する時間がかかり過ぎたためである (Lim *et al.*, 1993)。水質分析に供する試料は、排水流下 29 cm (上部から 7 個目のスポンジ担体)、87 cm (上部から 21 個目のスポンジ担体)、145 cm (上部から 35 個目のスポンジ担体) から採取したものとした。この試料は採取直後に冷却するとともにフィルター (孔径: 0.2 から 0.45 μm) を使用してろ過し、微生物学的な反応が生じることを防いだ。ろ過後の試料を対象として、COD、T-N、 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N、 NO_3^- -N を測定した。

4.2.4 保持汚泥の検鏡 (原生動物および後生動物の同定と定量)

DHS 保持汚泥中の原生動物と後生動物を同定および計測するために、排水流下長 29 cm (最上部から 7 個目)、87 cm (最上部から 21 個目)、145 cm (最上部から 35 個目) のスポンジ担体の保持汚泥を検鏡した。分割したスポンジ担体は 10 mM リン酸緩衝液 (K_2HPO_4 : 4 mM および KH_2PO_4 : 6 mM) を使用して、スポンジ担体が白くなるまで圧搾した。この時、圧搾し回収したものを汚泥試料とした。回収した汚泥試料はホモジナイザーと超音波発生器を用いて分散処理を行った。分散した汚泥は 10 mM リン酸緩衝液を用いて希釈を行った。

汚泥試料 50 μL をスライドガラス上に滴下し、24 mm \times 24 mm のカバーガラスをかけた。位相差顕微鏡 (BX-51、Olympus、Tokyo、Japan) を用いて真核生物の種の同定と計測を行った。検鏡は 2 回もしくは 3 回繰り返し、その平均値を使用して、スポンジ担体容積基準および保持汚泥基準の細胞密度を算出した。DHS 保持汚泥と比較するために、 A_2O 法の活性汚泥についても 3 回検鏡した。

検鏡による真核生物の種の同定は形態学的な特徴により次のグループに分類した: 1. 鞭毛虫および繊毛虫グループ (Free swimming protozoa; protozoa with flagella or cilia could swim freely in the sludge. eg; flagellates, *Paramecium* spp., etc. Carnivorous protozoa; protozoa could feed upon another protozoa. eg; *Litonotus* spp., etc)、Crawling protozoa (eg; *Aspidisca* spp, *Euploteus* spp., etc)、Stalked protozoa (protozoa has hair-like organelles. eg; *Epistylis* spp. and *Vorticella* spp., etc))。2. アメーバグループ: 有殻アメーバ (汚泥中を自由に遊泳することができない。例: *Arcella* spp.

and *Centropyxis* spp., etc), Rhizaria (eg: *Euglypha* spp.). 後生動物グループ: Gastrotrichea (eg: *Chaetonotus* spp.), Rotifera (eg: *Rotifer* spp.), Nematoda (eg: *Diplogaster* spp.), Oligochaeta (eg: *Aeolosoma* spp.), Macrobiotus (eg: *Macrobiotus* spp.), Arthropoda (ex: *Cyclops* spp.). なお、真菌(カビ、酵母)に関しては、形態学的な特徴に基づいた同定や定量的な解析が難しいため、本論文の検鏡による解析では対象外とした。

4.2.5 真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析

真核生物群集構造を把握するために、18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析を行った。クローン解析に用いた汚泥試料は、1. 活性汚泥(霞ヶ浦浄化センターの A₂O 法の曝気槽から採取)、2. 植種汚泥として使用したスポンジ担体に付着した汚泥(長岡中央浄化センターで稼働している UASB-DHS システムから採取)、3. HRT 6 時間で運転を行った DHS 反応器 A から採取した汚泥、4. HRT 3 時間で運転を行った DHS 反応器 B から採取した汚泥、の 4 サンプルとした。汚泥試料からの DNA 抽出は、ISOIL for Beads Beating Kit(Nippon Gene Co. Ltd., Tokyo, Japan)に付属のプロトコルを参考に行った。標的とする遺伝子領域の増幅は、EukA(5'- AAC CTg gTT gAT CCT gCC AgT -3')と EukB(5'- TgA TCC TTC TgC Agg TTC ACC TAC -3')のプライマー対(藻類、真菌、原生動物を標的とし、18S rRNA 遺伝子のほぼ全長である 1,800 塩基を増幅可能なプライマー対)を用いて行った(Medlin *et al.*, 1988)。また、原生動物の 18S rRNA 遺伝子配列に特異的であるとされる PSSU(5'- CTT TCg ATg gTA gTg TAT Tgg ACT AC -3')と EukB の組み合わせについても PCR を行った(PCR 産物は約 1,300 塩基)(Karnati *et al.*, 2003)。DNA ポリメラーゼには *Ex taq* DNA polymerase (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)を用いた。

EukA および EukB のプライマー対を使用した PCR は次の条件で行った。初期変性 95°C-10 分を行った後、95°C-1 分、58-56°C-1 分(1-3 回 58°C、3-6 回 57°C、7-36 回 56°C)、72°C-2 分のサイクルを 36 回繰り返した後、最後に 72°C で 10 分間反応させた。PSSU および EukB のプライマー対を使用した PCR は次の条件で行った。初期変性 95°C-10 分を行った後、95°C-1 分、60°C-1 分、72°C-2 分のサイクルを 35 回繰り返した後、最後に 72°C で 10 分間反応させた。PCR 産物は Sephacryl S-300 HR (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England)を用いて精製した後(プライマーの除去)、ライゲーション効率を向上させるために PCR 産物の 3'末端に A を付加した。

PCR 産物は再度精製した後、TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, CA, USA)を使用してクローン化した。解析に供したクローンの塩基配列の決定は EukA、PSSU、Ek-555f(5'- AgT CTg gTg CCA gCA gCC gC -3') (López-García *et al.*, 2001)、EukB を用いて行った。塩基配列の決定は 3130 genetic analyser (Applied Biosystem, CA, USA)により行った。得られた塩基配列は Sequencher™ DNA sequencing software (Hitachi, Tokyo, Japan)を使用して、97%の相同性を持つものを operational taxonomic units (OTU)として、1 つのファイロタイプと定義した。また、キメラ配列を含む可能性があるものは解析から除外した。それぞれのファイロタイプの代表配列は BLASTN プログラムを使用して近縁種とその相同性を検索した (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。代表配列はアライメントを行った後、分子系統解析ソフトウェア ARB (データベース SILVA database, release 115)に取り入れた(Pruesse *et al.*, 2007)。得られた配列は、DDBJ/NCBI/EMBL database に登録した (Accession Numbers LC150048-LC150199)。Chao 1 は EstimateS software version 8.2 (<http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates/>)を使用して算出した。Coverage は、 $C = (1 - (n_1/N)) \times 100$ (n_1 : クローンライブラリーの中で 1 クローンのみ検出されたファイロタイプの数、 N : クローンライブラリーの総クローン数)の式を用いて算出した (Good, 1953)。レアファクションカーブの作成は、Analytic Rarefaction software version 2.0 によ

り行った (<http://www.huntmountainsoftware.com>)。

4.3 実験結果

4.3.1 DHS 反応器の処理性能

(a) DHS 反応器 A (HRT 7.2 時間)

スタートアップ期間 (day 3 から day 30 まで) では、DHS 反応器 A は HRT 7.2 時間で運転を行った。この期間中の、スポンジ担体の総容積基準にして算出した有機物負荷 OLR は $0.50 \pm 0.2 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ であった。Phase-1 期間中 (day 31 から day 168 まで)、DHS 反応器 A は HRT を変化させず 7.2 時間で運転を行った。この期間中の OLR は $0.52 \pm 0.1 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ であり、水質プロフィール試験は day 85 から day 119 に行った。その結果、排水流下長 87 cm 以降では、微生物学的な反応 (COD 除去や $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去) は基質濃度が低いとため、殆ど行われていないことが分かった。この結果は、OLR $0.52 \pm 0.1 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ と十分に低い有機物負荷で運転を行ったためだと考えられた。次に day 169 から (Phase-2)、下水貯留槽の攪拌を開始し、下水中の固形物を同時に供給することで OLR の上昇を図った。貯留槽攪拌開始により、流入水の TSS と COD はそれぞれ $123 \text{ mgTSS} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $290 \text{ mgCOD} \cdot \text{L}^{-1}$ にまで上昇し、その結果、Phase-2 期間中の OLR は $0.99 \pm 0.3 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ にまで上昇した (Table 4-1)。水質プロフィール試験は day 198 から day 238 に行った。その結果、水質プロフィールに明確な違いはなく、わずかに処理性能に影響が出た程度であった (Fig. 4-2)。Phase-3 では、Phase-2 と運転条件を変化させず、OLR $1.00 \pm 0.3 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ の条件のもと連続処理実験を継続して行った。水質プロフィール試験は day 328 から day 352 に行った。その結果、OLR は Phase-2 とほぼ同様であるにも関わらず、水質プロフィールは Phase-1 と殆ど同じであった (Fig. 4-2)。

(b) DHS 反応器 B (HRT 3.6 時間)

スタートアップ期間 (day 3 から day 30 まで) では、DHS 反応器 B は HRT 7.2 時間で運転を行った。この期間中の、スポンジ担体の総容積基準にして算出した有機物負荷 OLR は $0.50 \pm 0.2 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ であった。水質分析結果から処理性能が安定したと判断した後、day 31 (Phase-1) から、DHS 反応器 B は HRT を 3.6 時間に短縮させて運転を行った。この期間中の OLR は $1.05 \pm 0.2 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ であった。水質プロフィール試験は day 85 から day 119 に行った。その結果、COD 除去の大部分は排水流下長 87 cm より上部で行われており、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の除去は排水流下長 160 cm の地点 (最終処理水) でようやく終了していた (Fig. 4-2)。この結果は、OLR $1.05 \pm 0.2 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ に DHS 反応器 B に保持された汚泥が素早く馴致したことを示している。次に day 169 から (Phase-2)、下水貯留槽の攪拌を開始し、OLR を $1.97 \pm 0.6 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ にまで上昇させた (Table 4-1)。水質プロフィール試験は day 198 から day 238 に行った。その結果、水質プロフィールは他の Phase とは明らかに異なる結果を示した。これは、OLR が 1.05 から $1.97 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ にまで大幅に上昇したためであると考えられる。この時、COD 除去と $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去の両方も処理性能は低下していた (COD と $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度は DHS 反応器上部から中部にかけて変化しなかった) (Fig. 4-2)。Phase-3 では、Phase-2 と運転条件を変化させず、OLR $2.01 \pm 0.6 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ の条件のもと連続処理実験を継続して行った。水質プロフィール試験は day 328 から day 352 に行った。その結果、OLR は Phase-2 とほぼ同様であるにも関わらず、水質プロフィールは Phase-1 と殆ど同じであることが分かった (Fig. 4-2)。この結果は、DHS 反応器 B の保持汚泥が OLR $2.01 \pm 0.6 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ に長時間かけて馴致したことを示している。

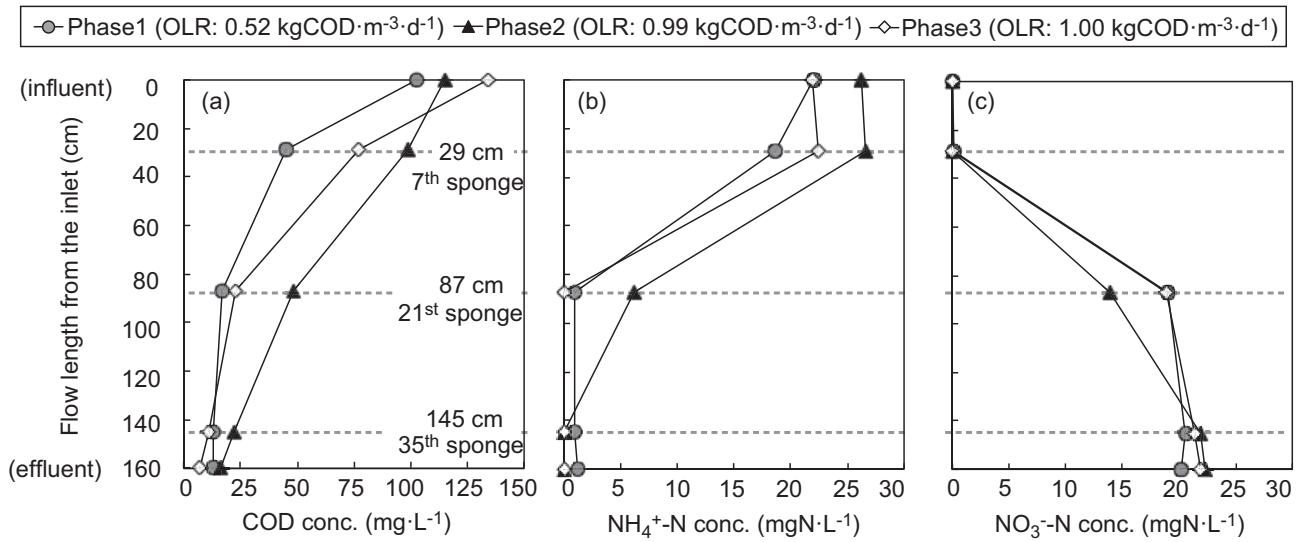
Table 4-1 DHS reactor influent and effluent water quality.

	Phase-1 (Routine: day 31 - 168) (Profile: day 85 - 119)		Phase-2 (Routine: day 169 - 238) (Profile: day 198 - 238)		Phase-3 (Routine: day 239 - 352) (Profile: day 328 - 352)				
	Inf.	DHS A eff. (HRT 7.2 h)	DHS B eff. (HRT 3.6 h)	Inf.	DHS A eff. (HRT 7.2 h)	DHS B eff. (HRT 3.6 h)	Inf.	DHS A eff. (HRT 7.2 h)	DHS B eff. (HRT 3.6 h)
Organic loading rate (kgCOD·m ⁻³ ·d ⁻¹)	---	0.52	1.05	---	0.99	1.97	---	1.00	2.01
Sludge loading rate (kgCOD·kgVSS ⁻³ ·d ⁻¹)	---	0.05	0.06	---	0.03	0.06	---	0.06	0.15
Temperature (°C)	---	21	20.7	---	18.4	17.6	---	18.7	19.1
pH (-)	7.3	7.5	7.5	7.8	7.8	7.5	7.5	7.2	7.1
ORP (mV)	-194	100	101	-57	149	181	-259	214	212
DO (mg·L ⁻¹)	1.0	7.9	7.1	2.1	8.1	6.5	3.1	6.6	8.0
TSS (mg·L ⁻¹)	33	4	5	123	13	31	---	---	---
Total COD (mg·L ⁻¹)	158	30	24	290	44	61	295	---	---
Soluble COD (mg·L ⁻¹)	111	15	15	112	27	34	110	7	14
T-N (mgN·L ⁻¹)	22	17	17	32	23	19	26.5	22.5	16.7
NH ₄ ⁺ -N (mgN·L ⁻¹)	19	N.D.	N.D.	21.3	1.2	5.8	20.5	N.D.	N.D.
NO ₂ ⁻ -N (mgN·L ⁻¹)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.4	1.1	N.D.	N.D.	N.D.
NO ₃ ⁻ -N (mgN·L ⁻¹)	N.D.	15.7	15.8	N.D.	20.0	9.9	N.D.	21.9	15.2

* N.D.; Not Detected

** ---; No Data

DHS reactor A (HRT 7.2 hours)



DHS reactor B (HRT 3.6 hours)

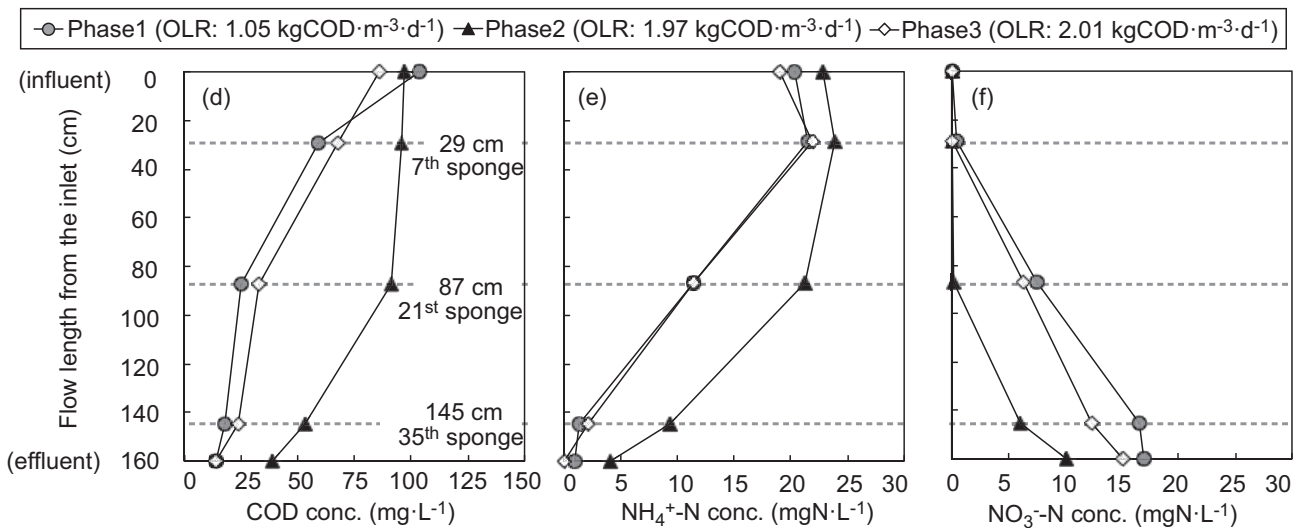


Fig.4-2 The water quality profiles and DHS reactor flow lengths at each phase. DHS reactor A at HRT of 7.2 hours; (a) COD, (b) NH₄⁺-N, and (c) NO₃⁻-N. DHS reactor B at HRT of 3.6 hours, (d) COD, (e) NH₄⁺-N and (f) NO₃⁻-N.

4.3.2 保持汚泥の検鏡結果(原生動物と後生動物の存在割合)

(a) DHS 反応器 A(HRT 7.2 時間)

Phase-1 では、DHS 反応器 A は HRT 7.2 時間で運転を行った(OLR $0.52 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$)。鞭毛虫や繊毛虫グループの存在割合は、DHS 反応器の上部から下部にかけて(排水流下長 29 cm、87 cm、145 cm)、減少する傾向にあった(それぞれ全体の 24%、2%、0%)。アメーバグループの存在割合が最も高く、全体の 73–99%を占めていた。また、後生動物グループの存在割合は最も少なく、全体の 1-7%程度であった。

Phase-2 では、DHS 反応器 A の OLR は $0.99 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$ にまで上昇した。その結果、鞭毛虫や繊毛虫グループの存在割合が増加する傾向にあった。鞭毛虫や繊毛虫グループの存在割合はそれぞれ 58%、21%、9%であった。また、鞭毛虫と繊毛虫グループは存在割合だけでなく細胞密度もわずかに上昇していた。このとき、アメーバグループの存在割合は全体の 16%、61%、86%であり、後生動物グループの存在割合は全体の 25%、18%、4%であった。

Phase-3 では、DHS 反応器 A の OLR は $1.00 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$ のまま運転を継続した。その結果、鞭毛虫や繊毛虫グループの存在割合は高いまま維持されており、それぞれ 73%、31%、10%であった。また、鞭毛虫と繊毛虫のグループは存在割合だけでなく細胞密度も上昇していた。このとき、アメーバグループの存在割合は全体の 9%、66%、80%であり、後生動物グループの存在割合は全体の 18%、3%、10%であった。

(b) DHS 反応器 B(HRT 3.6 時間)

Phase-1 では、DHS 反応器 B は HRT 3.6 時間で運転を行った(OLR $1.05 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$)。鞭毛虫や繊毛虫グループの存在割合は DHS 反応器の上部から下部にかけて(排水流下長 29 cm、87 cm、145 cm)、減少する傾向にあった(全体の 47%、9%、2%)。アメーバグループの存在割合は最も高く、全体の 35%、84%、90 を占めていた。後生動物グループの存在割合は最も少なく、全体の 16%、8%、7%であった。

Phase-2 では、DHS 反応器 B の OLR は $1.97 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$ に大幅に上昇した。その結果、鞭毛虫や繊毛虫グループの存在割合は排水流下 29 cm で 20%と低下していたが、排水流下 87 cm および 145 cm では 64%および 51%と大幅に上昇していた。このとき、アメーバグループの存在割合は全体の 78%、34%、42%であり、後生動物グループの存在割合は全体の 3%、1%、7%であった。さらに、排水流下長 87 cm と 145 cm では、鞭毛虫と繊毛虫のグループは存在割合だけでなく細胞密度も大きく上昇していた。

Phase-3 では、DHS 反応器 A の OLR は $2.01 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$ のまま運転を継続した。その結果、鞭毛虫や繊毛虫グループの存在割合はそれぞれ 63%、47%、15%であった。このとき、アメーバグループの存在割合は全体の 38%、40%、78%であり、後生動物グループの存在割合は全体の 0%、12%、7%であった。鞭毛虫と繊毛虫のグループの細胞密度はわずかに減少していた。

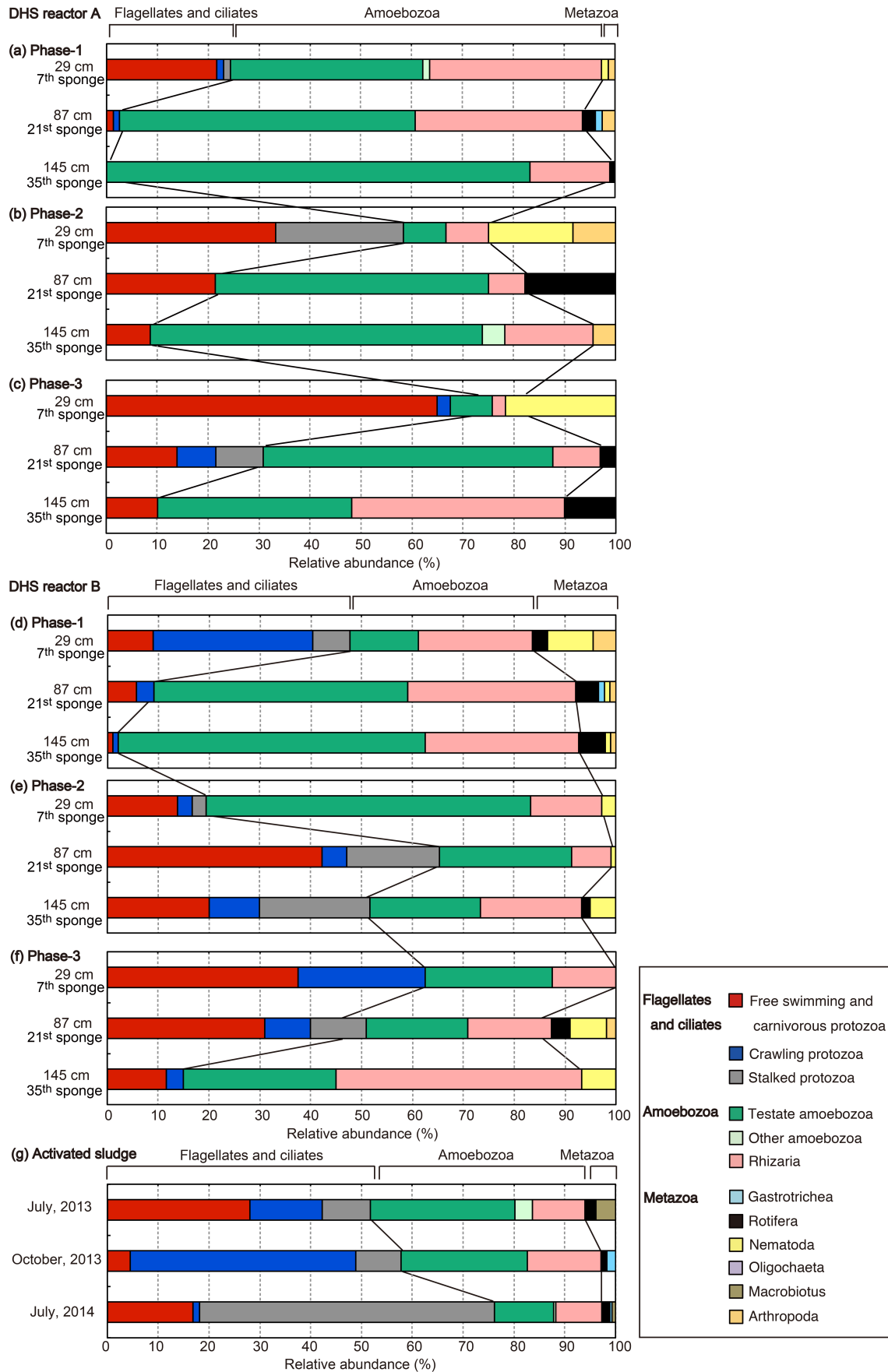


Fig.4-3 The relative eukaryote abundances enumerated by microscopy. DHS reactor A at HRT of 7.2 hours; (a) Phase-1, (b) Phase-2, (c) Phase-3. DHS reactor B at HRT of 3.6 hours; (d) Phase-1, (e) Phase-2, (f) Phase-3. (g) Activated sludge.

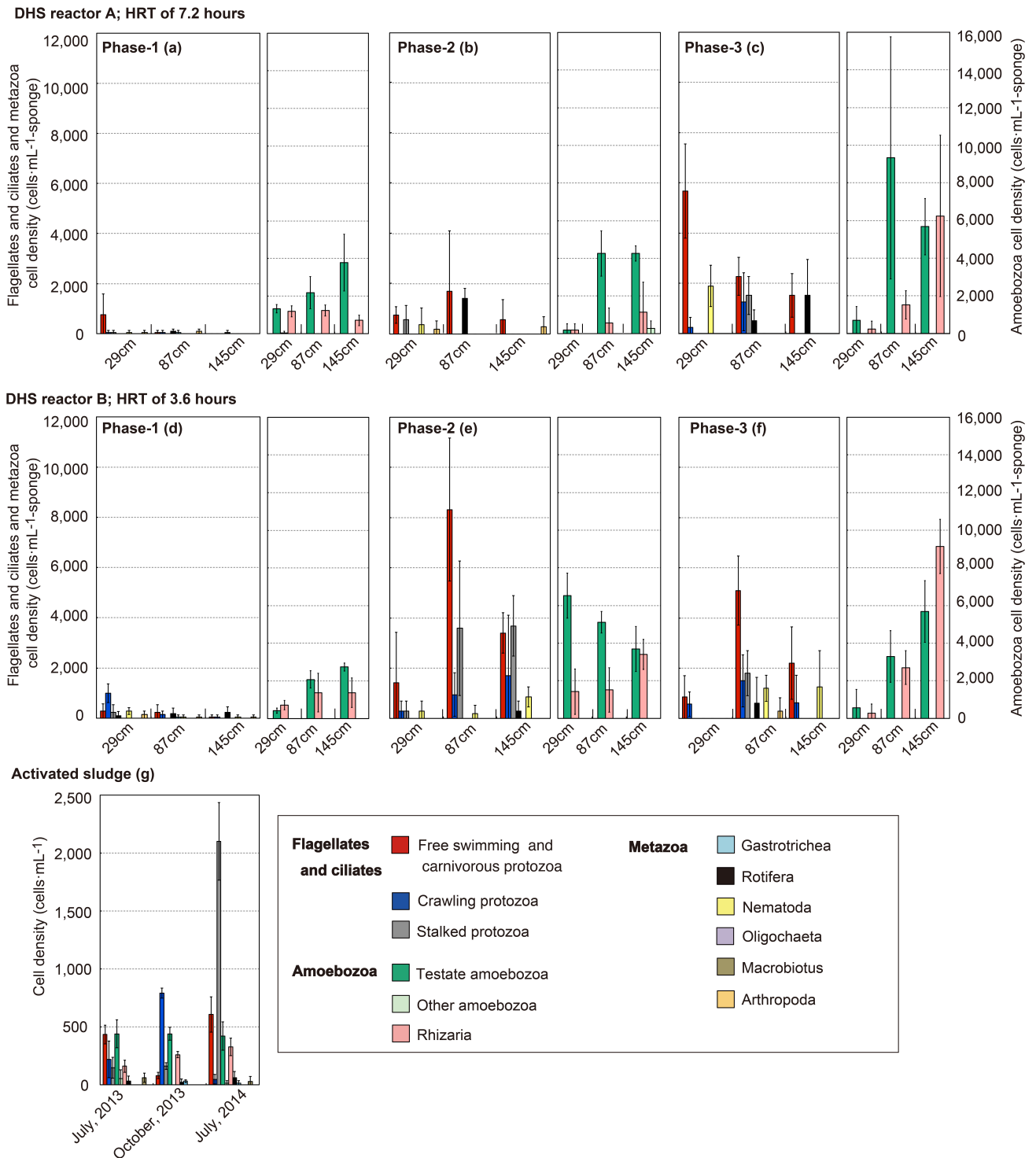


Fig.4-4 The eukaryote cell densities enumerated by the microscopy. DHS reactor A at HRT of 7.2 hours; (a) Phase-1, (b) Phase-2, (c) Phase-3. DHS reactor B at HRT of 3.6 hours; (d) Phase-1, (e) Phase-2, (f) Phase-3. (g) Activated sludge. (The error bars indicate standard deviations)

4.3.3 真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析

DHS 反応器における真核生物群集構造を詳細に解析するために、保持汚泥を対象として、真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析を行った。クローン解析は次に示す 4 つの汚泥試料に関して行った。

1. A₂O 法の活性汚泥
2. 植種汚泥に用いたスポンジ担体付着汚泥
3. HRT 7.2 時間で運転を行った DHS 保持汚泥
4. HRT 3.6 時間で運転を行った DHS 保持汚泥

DHS 反応器の保持汚泥(上記 2、3、4)のクローンライブラリーでは、kingdom/superkingdom レベルで分類した結果、ファイロタイプの大部分は *Alveolata*、*Rhizaria*、*Stramenopiles*、*Holozoa*、*Nucleomycea* のいずれかに属することが分かった(Fig.4-5)。そのなかでも kingdom *Nucleomycea* に属するファイロタイプがクローンライブラリーのなかでも最も優占しており、それらは塩基配列を決定したクローンのなかで 30–50%を占めていた(Fig.4-5)。また、kingdom *Holozoa*、kingdom *Alveolata*、kingdom *Rhizaria* に属するファイロタイプはそれぞれ全体の 20–24%、5–20%、10–15%を占めていた(Fig.4-5)。その一方で、活性汚泥(上記 1)のクローンライブラリーでは、kingdom *Alveolata* に属するファイロタイプが最も優占しており、それらは全クローンのなかで 55%を占めていた(Fig.4-5)。その他のファイロタイプは kingdom *Holozoa* および kingdom *Rhizaria* に属しており、それぞれ全クローンのなかで 15%および 20%を占めていた(Fig.4-5)。DHS 反応器 A および DHS 反応器 B の保持汚泥を対象としてクローン解析を行った結果、両者のクローンライブラリーの違いに大きな違いが無かった。これは、異なる HRT 条件下で連続処理実験を行ったが、汚泥試料を採取した Phase-3 の水質プロフィールが殆ど同じであったためだと考えられた。

(a) superkingdom *Nucleomycea*

DHS 保持汚泥を対象としたクローンライブラリーでは、superkingdom *Nucleomycea* に属するファイロタイプが最も優占していた(存在割合は全体の 29-56%) (Fig.4-5)。これらをさらに門レベルに分類した結果、superkingdom *Nucleomycea* に属するファイロタイプは phylum *Ascomycota*、phylum *LKM11* (Lara *et al.*, 2010)、phylum *Fonticulida* (Brown *et al.*, 2009)、phylum *Basidiomycota* に属することが分かった (Fig.4-6)。ここで、phylum *Ascomycota* や phylum *Basidiomycota* は、下水処理反応器内にて検出される真菌のなかでも主要なものである (Weber *et al.*, 2009)。植種汚泥のクローンライブラリー(上記 2)では、phylum *Ascomycota* および phylum *LKM11* に属するファイロタイプが優占しており、それぞれ全クローンのなかで 13%および 15%を占めていた(Fig.4-6)。DHS 反応器 A(上記 3)では、phylum *Ascomycota*、phylum *LKM11*、phylum *Fonticulida*、phylum *Basidiomycota* に属するファイロタイプが優占しており、それぞれ全体の 2%、4%、31%、15%であった(Fig.4-6)。DHS 反応器 B(上記 4)においても、phylum *Ascomycota*、phylum *LKM11*、phylum *Fonticulida*、phylum *Basidiomycota* に属するファイロタイプが優占しており、それぞれ全体の 2%、5%、20%、14%であった(Fig.4-6)。その一方で、活性汚泥(上記 1)のクローンライブラリーでは、superkingdom *Nucleomycea* に属するファイロタイプは検出されず、その存在割合は全クローンの中で 2%以下であった(Fig.4-5)。

(b) kingdom *Holozoa*

DHS 保持汚泥を対象としたクローンライブラリーでは、kingdom *Holozoa* に属するファイロタイプは全体の 20–46%を占めていた (Fig.4-5)。これらをさらに分類した結果、kingdom *Holozoa* に属するファイロタイプは lineage Nematoda、lineage Arthropoda、lineage Annelida、lineage Tardigrada、lineage Rotifera に属することが分かった (Fig.4-6)。植種汚泥のクローンライブラリーでは、lineage Arthropoda、lineage Nematoda、lineage Annelida が検出され、それぞれの存在割合は 15%、10%、17%であった (Fig.4-6)。DHS 反応器 A では、lineage Arthropoda および lineage Nematoda が検出され、それぞれの存在割合は 2%および 19%であった (Fig.4-6)。DHS 反応器 B では、lineage Arthropoda および lineage Nematoda が検出され、それぞれの存在割合は 5%および 16%であった (Fig.4-6)。その一方で、活性汚泥のクローンライブラリーでは、DHS 保持汚泥とは異なった系統群が優占化しており、lineage Tardigrada および lineage Rotifera が検出された (それぞれの存在割合は 9%および 2%であった) (Fig.4-6)。

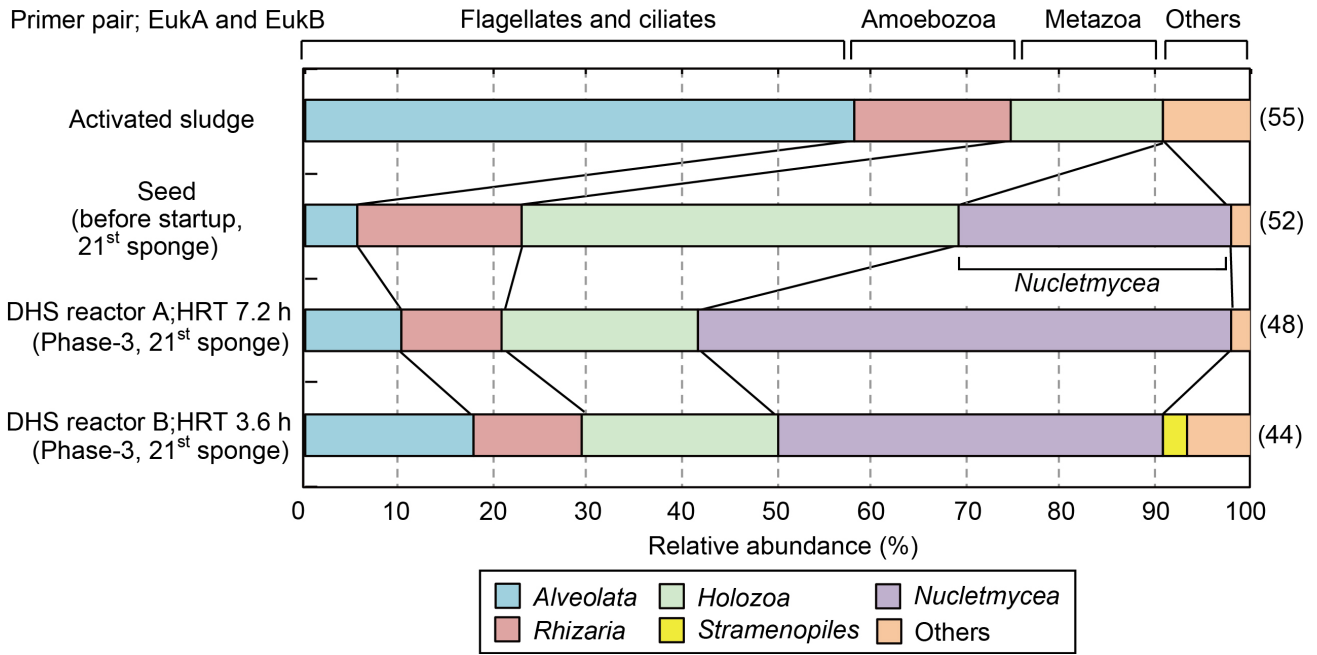


Fig.4-5 The eukaryotic community structure based on the 18S rRNA gene constructed at the kingdom/superkingdom level (SILVA database release 115) with the EukA and EukB primers. The numbers in parentheses are the total number of clones sequenced.

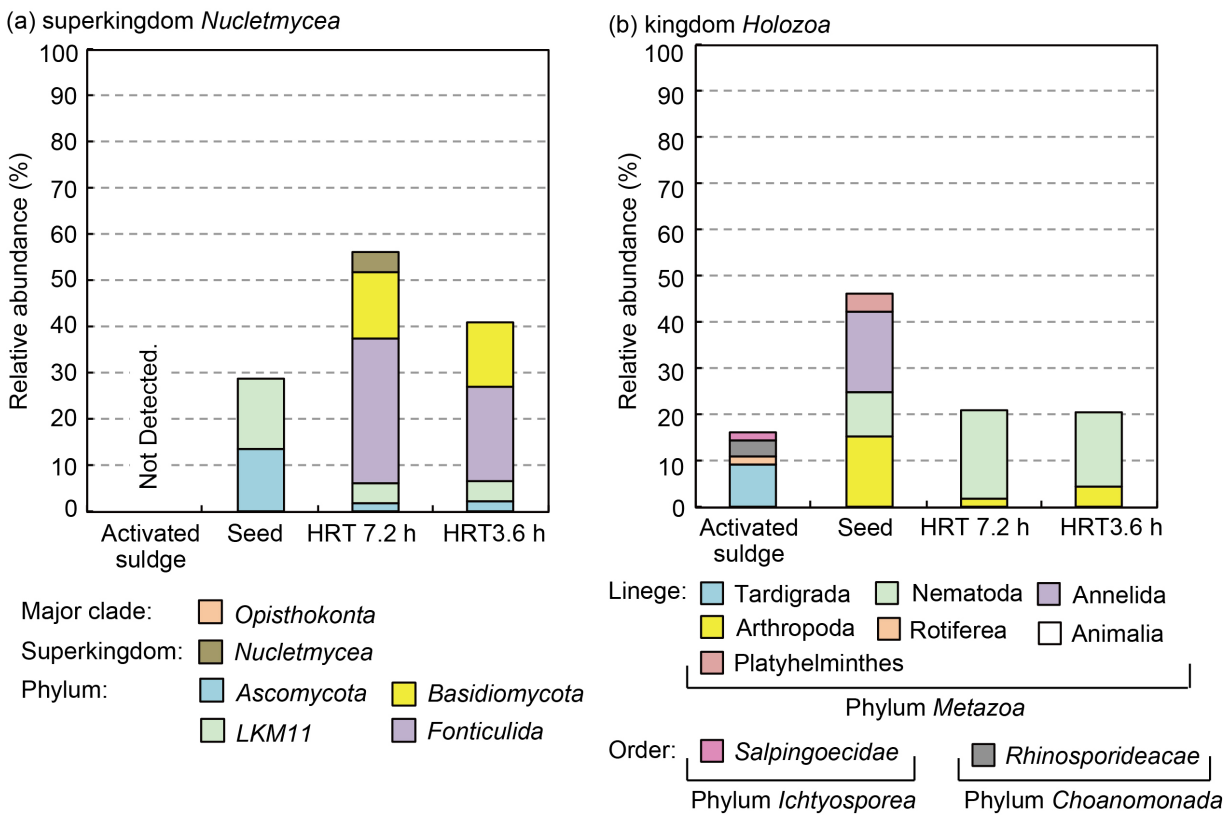


Fig.4-6 Eukaryotic community based on the 18S rRNA gene amplified with the EukA and EukB primers (SILVA database release 115); (a) superkingdom *Nucleletmycea* and (b) kingdom *Holozoa*.

(c) kingdom *Alveolata* および kingdom *Rhizaria*

DHS 保持汚泥のクローンライブラリーでは、kingdom *Alveolata* および kingdom *Rhizaria* に属するファイロタイプは、それぞれ全体の6-18%および10-17%であった (Fig.4-5)。その一方で、活性汚泥のクローンライブラリーでは、kingdom *Alveolata* および kingdom *Rhizaria* に属するファイロタイプは、それぞれ58%および16%であった (Fig.4-5)。このように、EukA/EukB のプライマー対 (真核生物の全体を対象) で PCR を行った DHS 保持汚泥試料のクローンライブラリーでは、kingdom *Alveolata* と kingdom *Rhizaria* に属するファイロタイプは最も少ないグループであり、原生動物の群集構造を詳細に解析できている可能性が低いと考えられた。

そこで、原生動物の群集構造を詳細に解析するために、同じ汚泥試料 (上記 3 および 4) を対象として、PSSU/EukB のプライマー対 (kingdom *Alveolata* と kingdom *Rhizaria* を含む原生動物に特異的) を用いて PCR を行い、クローン解析を行った (Fig.4-7)。PSSU/EukB プライマー対で PCR を行った DHS 保持汚泥試料のクローンライブラリーでは、科レベルで分類し結果、family *Hypotrichia*、subfamily *Peritrichia*、family *Platyophryida*、family *Rhizaspidae*、family *Euglyphida*、family *Thraustochytriaceae* に属するファイロタイプが検出された (これらのファイロタイプは kingdom *Alveolata*、kingdom *Rhizaria*、kingdom *Stramenopiles* のいずれかに属する) (Fig.4-7)。得られた塩基配列の殆どは NCBI のデータベース内の 18S rRNA 遺伝子配列と97%以上の相同性を有していた。DHS 反応器 A のクローンライブラリーでは、family *Hypotrichia*、subfamily *Peritrichia*、family *Rhizaspidae* に属するファイロタイプが検出され、それぞれの存在割合は40%、25%、31%であった (Fig.4-7)。DHS 反応器 B のクローンライブラリーにおいても同じグループが検出されており、それぞれの存在割合は、49%、13%、25%であった (Fig.4-7)。

Primer pair; PSSU and EukB

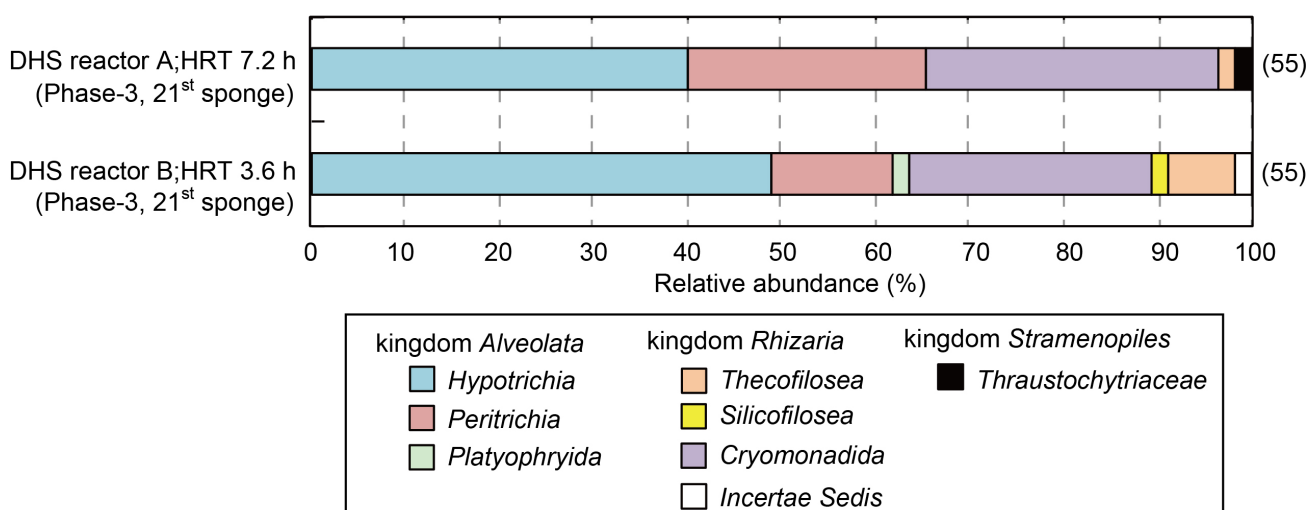


Fig.4-7 The eukaryotic community structure based on the 18S rRNA gene in kingdoms *Alveolata* and *Rhizaria* (SILVA database release 115) with the PSSU and EukB primers. The numbers in parentheses are the total number of clones sequenced.

4.4 考察

4.4.1 DHS 反応器の処理性能

連続処理実験期間中、HRT 7.2 時間で運転を行った DHS 反応器 A の処理性能 (COD 除去および $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去) は低下することはなかった (最大 OLR $0.99 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$)。その一方で、HRT 3.6 時間で運転を行った DHS 反応器 B では、Phase-2 において、処理性能 (COD 除去および $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去) の深刻な悪化が確認された。Phase-2 では、下水貯留槽を攪拌することで、OLR を $1.97\pm 0.6 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$ にまで大幅に上昇させており、その結果、COD 除去性能および $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去性能はともに著しく低下した (言い換えると、DHS 反応器の排水流下方向における COD 濃度および $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度は減少していなかった)。ここで、COD と $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の除去量を計算すると次のようになる; Phase-1: $1,005 \text{ mg COD}\cdot\text{day}^{-1}$ と $143 \text{ mg N}\cdot\text{day}^{-1}$; Phase-2: $1,718 \text{ mg COD}\cdot\text{day}^{-1}$ と $116 \text{ mg N}\cdot\text{day}^{-1}$ 。このように 1.7 倍に増加した COD 除去量は、DHS 反応器の上部から中部において酸素供給律速を生じさせている (溶存酸素濃度が低く、嫌気性条件下である) 可能性がある。また、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去量が増加していないことから、保持汚泥中において、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 酸化細菌 (硝化細菌) の馴致が十分に進んでいないことが示唆された。しかしながら、Phase-3 では、Phase-2 と同程度の OLR である $2.01\pm 0.6 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$ のもと、連続処理実験を継続して行ったにも関わらず、水質プロフィールは Phase-1 と似た傾向を示した。この結果は、DHS 反応器 B の保持汚泥が OLR $2.01\pm 0.6 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$ に馴致したことを示している。また、DHS 反応器 B 保持汚泥の内生呼吸活性に対する従属栄養呼吸活性の比を算出したところ、Phase-2 から Phase-3 にかけて上昇していたことが分かった (Fig.4-8)。このことから Phase-2 から Phase-3 にかけて、有機物処理に関わる微生物群の集積化が確認され、これによって Phase-3 で良好な処理水質を得ることができたのだと考えられた。

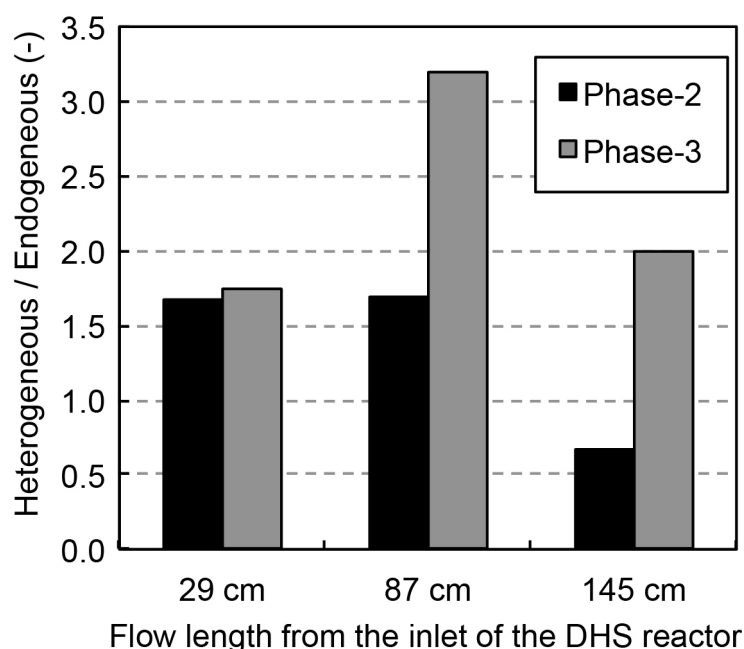


Fig.4-8 The ratio of heterotrophic to endogenous respiration rate in DHS reactor B retained sludge in Phase-2 and Phase-3. Both respiration rates were calculated according to Yoochatchaval *et al.*, 2014.

日本国内に設置した都市下水処理 UASB-DHS システムでは、冬季から春季にかけて、水温が上昇する時期に処理性能が低下することが確認されている(Onodera *et al.*, 2013)。この原因は次のように説明することができる。まず、はじめに、冬季の水温 20°C 以下の時期に、UASB 反応器のなかに固形性有機物(例:セルロースなど)が蓄積する。これは、水温 20°C 以下の条件では、UASB 反応器の保持汚泥の下水中の固形性有機物に対する加水分解速度やメタン生成速度が低下するためである(大矢ら, 2009)。次に、春季の水温が上昇する時期に、UASB 反応器内の保持汚泥の活性が上昇するため、蓄積した固形性有機物の分解が生じる。これにより、UASB 反応器の保持汚泥が過負荷状態になり処理水質が著しく悪化するとともに、バイオガス生成量が増加するために保持汚泥の一部がウォッシュアウトするようになる。最終的に、COD 濃度の高い UASB 処理水が DHS 反応器に流入するようになるため、有機物負荷が上昇し、DHS 反応器の処理水質も同様に悪化するようになる(Syutsubo *et al.*, 2011)。このように DHS 反応器は、固形性有機物を多く含む下水・排水の処理に課題を抱えていると言える。以上のことより、本研究で実施した連続処理実験においても、Phase-2 では、下水貯留槽攪拌により下水の固形性有機物が流入するようになったため、DHS 反応器の処理性能(COD 除去および $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去)が悪化したのだと考えられた。

DHS 反応器に使用したスポンジ担体は、保持汚泥濃度が高く(標準活性汚泥法よりも 10-20 倍高い値)、有機物汚泥負荷を低く維持できるため、十分に高い処理性能を発揮することができたと考えられた。保持汚泥濃度は 5-40 $\text{gVSS}\cdot\text{L}\cdot\text{sponge}^{-1}$ (VSS/TSS は 0.56-0.74) の範囲内ではばらついてしたが、既往の知見と大きく相違は無かった(Onodera *et al.*, 2013) (Fig.4-9 および Fig.4-10)。このように保持汚泥量が多いため、OLR が $2\text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$ と比較的高い条件下においても、保持汚泥の馴致を進めること(有機物を基質とする従属栄養細菌の集積化)が可能であったのだと考えられた。今回、保持汚泥濃度がばらついていた原因は、スポンジ担体から採取する汚泥量が少量であったためではないかと考えている。

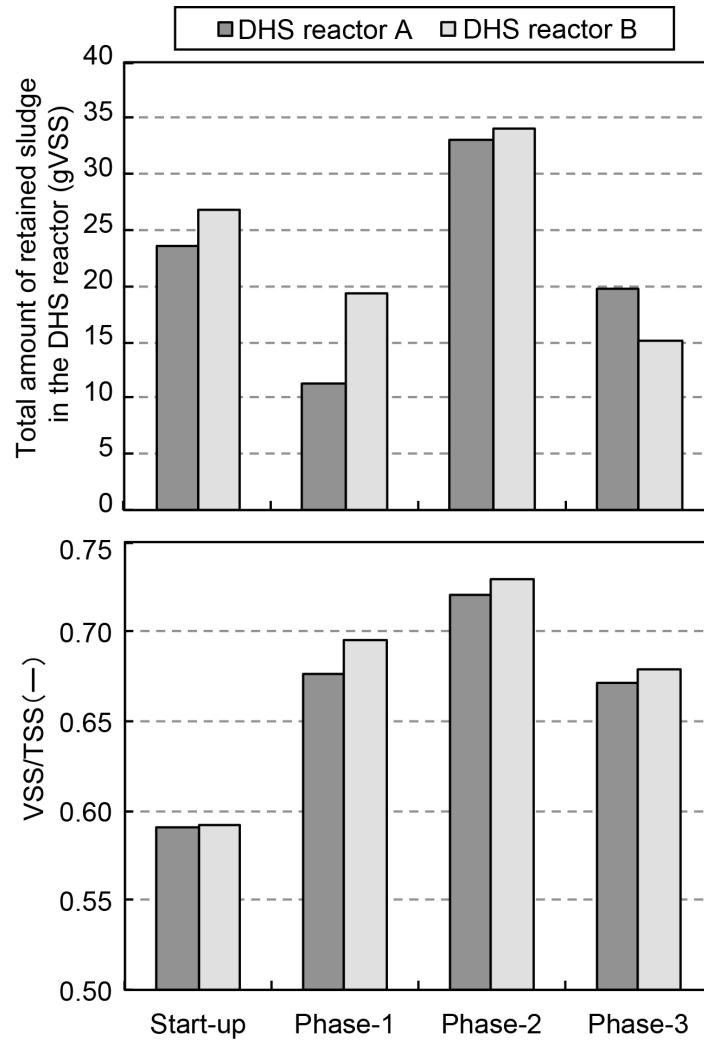


Fig.4-9 Total volume of sludge retained in the DHS reactor and ratio of VSS/TSS at each phase.

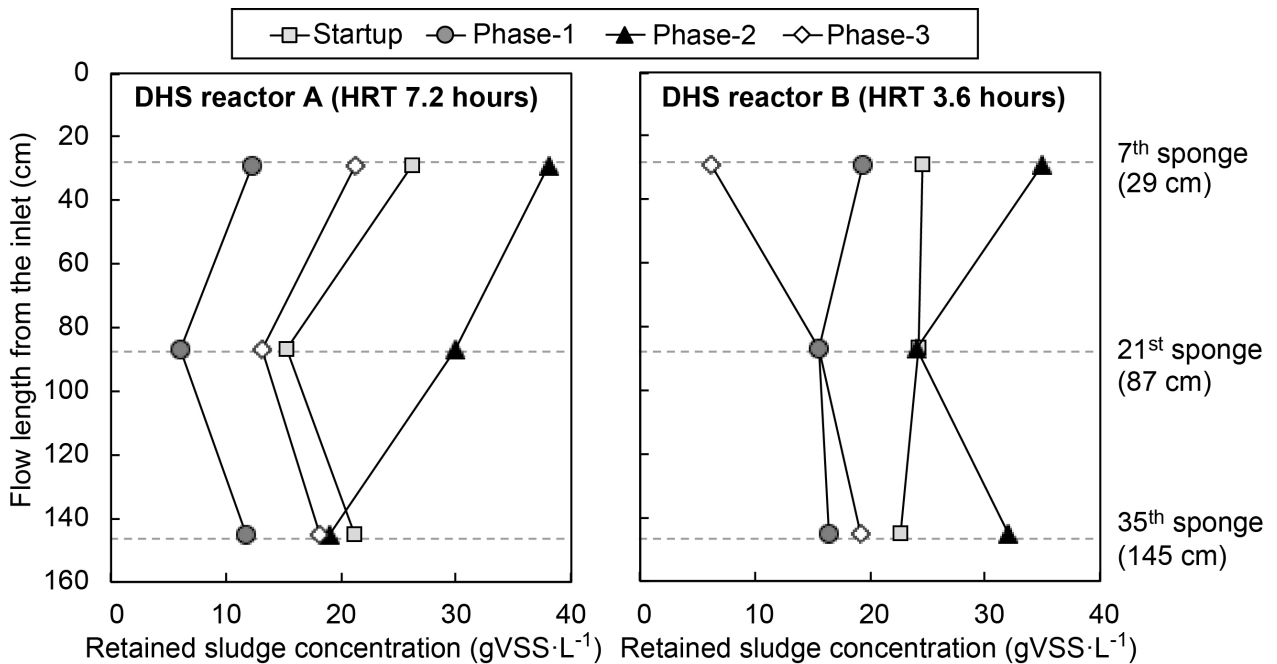


Fig.4-10 Retained sludge concentration in both DHS reactors at each phase.

4.4.2 検鏡で解析した原生動物と後生動物の存在割合

(a) DHS 反応器の真核生物群集構造の特徴(真核生物群集構造と下水処理特性との関連性)

鞭毛虫と繊毛虫のグループは、下水を処理する活性汚泥において主要なグループであり、分散状の細菌を捕食することで処理水の清澄化に貢献している(Curds and Fey, 1969; Lapinski and Tunnacliffe, 2003)。この鞭毛虫と繊毛虫のグループに着目すると、DHS 反応器 A と DHS 反応器 B の両方において、その存在割合は全体の 0–20%程度と低かった。それらの存在割合は、活性汚泥では全体の 50–70%、回転円板法では 70–90%にまで達するという報告がある(Madoni, 1994)。このように鞭毛虫と繊毛虫グループの存在割合が低い原因は、DHS 反応器では、スポンジ担体の空隙に原核生物(真核生物の基質)が捕捉されやすく(Tawfik *et al.*, 2006)、原生動物や後生動物が増殖できるほどの基質濃度(細菌や浮遊物質濃度)を確保できていないためだと考えられた。原核生物は生物膜やフロックを形成することで、真核生物の捕食から逃れることができると考えられている(Matze and Kjelleberg, 2005; Pajdak-Stóse *et al.*, 2010)。さらに DHS 反応器では、保持汚泥量が多く、低い有機物汚泥負荷で運転することが可能であるため(Table 4-1、 $0.02\text{--}0.15\text{ kgCOD}\cdot\text{kgVSS}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$)、DHS 反応器中部および下部では基質濃度(COD濃度や $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度)が低く維持され、分散状細菌が十分に増殖できないことが予想される。このように流入水の基質濃度が十分でなければ、真核生物の基質となる分散状細菌(原核生物)の増殖が生じにくく、その結果、保持汚泥中の真核生物も増殖することはできないため、溶解性 COD 濃度や $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度は、真核生物群集構造を決定するうえで重要な要因だと考えられる。加えて、スポンジ担体の保持汚泥では、表面付近は好気条件であるが、内部は溶存酸素の無い嫌気条件下であることが報告されている(Machdar *et al.*, 2000)。無酸素/嫌気条件で運転したシークエンスバッチ反応器では、繊毛虫グループの多様性や細胞数が低下することが報告されている(Dubber and Gray, 2011)。これらの理由から、DHS 反応器の保持汚泥中に生息し、捕食機能を持つ真核生物(主に原生動物および後生動物)は捕食可能な分散状細菌の濃度が低いため、それらを捕食し増殖することができず、他の処理法と比較して存在割合が低くなったのだと考えられた。

DHS 保持汚泥では、原核生物数は原生動物数や後生動物数よりも約 10^5 倍高かった(Table 4-2)。DHS 保持汚泥における細菌や原生動物の細胞密度(単位: $\text{cell}\cdot\text{mL}^{-1}\text{-sponge}$)は、活性汚泥の値と同程度であった(Madoni, 1994; Snaidr *et al.*, 1997)(Table 4-2)。しかしながら、原生動物の細胞密度(単位: $\text{cell}\cdot\text{mgTSS}^{-1}$)は活性汚泥の値と比較して 10 倍程度低いことが分かった(Table 4-2)。これらの結果から、既報と同じく、DHS 反応器では保持汚泥濃度が多いため、原生動物の絶対量が活性汚泥法と同程度であることが分かった(Onodera *et al.*, 2013)。

OLR は、下水処理を行う活性汚泥の繊毛虫の多様性を変化させる(Salvadó and Grancia, 1993)。本研究で得られた知見においても、OLR はスポンジ担体間隙水の水質および鞭毛虫と繊毛虫グループの存在割合に影響を与えていた。鞭毛虫と繊毛虫のグループと OLR は正の相関関係にあることが分かった(Fig.4-11、回帰曲線 $R^2=0.44\text{--}0.54$)。さらに、活性汚泥法や回転円盤法では、繊毛虫の存在量と保持汚泥量が正の相関関係(回帰曲線 $R^2=0.85\text{--}0.93$)にあることが報告されている(Madoni, 1994)。なお、鞭毛虫や繊毛虫グループの細胞密度と、有機物汚泥負荷(単位: $\text{kgCOD}\cdot\text{kgVSS}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$)および保持汚泥濃度(単位: $\text{mgTSS}\cdot\text{L}^{-1}$)との間に関連性はなかった(データ無掲載)。

既往の研究では、下水処理を行う DHS 反応器では HRT 短縮にしたがい、TSS 除去率が低下する傾向にあることが報告されている(Yoochatchaval *et al.*, 2014)。これは、HRT を短縮することで、スポンジ担体を通過する水の線流速が高まり、それによりスポンジ担体からの保持汚泥の剥離が促進されるためだと考えられる。そのため、スポンジ担体を通

過する水の TSS(分散状の原核生物、剥離した保持汚泥)濃度は、HRT を短縮させて運転した DHS 反応器 B(HRT 3.6 時間)のほうが DHS 反応器 A(HRT 7.2 時間)よりも高いと考えられた。DHS 反応器 B の Phase-2 の OLR は $1.97 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$ であり、COD 除去と $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去の両方に関して、処理性能が悪化し、鞭毛虫と繊毛虫のグループの存在割合が上昇していた(特に DHS 反応器下部において全体の 2%から 51%に増加していた)。加えて、鞭毛虫や繊毛虫のグループの細胞密度も同時に増加していた。続く Phase-3 では、Phase-2 と同程度の OLR である $2.01\pm 0.6 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$ で運転を行ったにも関わらず、水質プロフィールは Phase-1 と似た傾向を示し、鞭毛虫と繊毛虫のグループの存在割合は減少していた(存在割合は全体の 15%)。さらに鞭毛虫や繊毛虫のグループの細胞密度も低下していた。これらの結果は、DHS 反応器において、鞭毛虫や繊毛虫のグループが処理水の水質向上に寄与していることを示唆するものであり、DHS 反応器における真核生物群集構造やその動態を理解するうえで重要な現象であると言える。

アメーバのグループは、DHS 反応器において、最も存在割合が高いグループであった(Fig.4-3、Fig.4-4)。これは、DHS 反応器の汚泥滞留時間が長く F/M 比が低い等、アメーバグループの増殖に適した条件であったためだと考えられた。このグループは処理水質を押し量るうえでの指標生物として扱われている(Liu *et al.*, 2008; Madoni *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 2006)。具体的には、硝化が進行した場合に、アメーバグループの *Arcella vulgaris* が優占する報告がある(千種, 1996)。本研究で得られた結果から、このアメーバのグループとスポンジ担体間隙水の COD 濃度の関連性を調べたところ、これらは負の相関関係にあることが分かった(Fig.4-12)。アメーバのグループの存在割合は、DHS 反応器の上部から下部にかけて増加する傾向にあった(下水処理性能が著しく悪化した DHS 反応器 B の Phase-2 以外)(Fig.4-3)。さらに、既報では、アメーバに似た原生動物が生物膜の奥まで(250 μm まで)捕食可能であることを報告している(Suarez *et al.*, 2015)。そのため、DHS 反応器においても捕食に関わっている可能性が考えられた。なお、アメーバグループの細胞密度と保持汚泥濃度との間に関連性はなかった(データ無掲載)。

後生動物のグループに関して、その保持汚泥中における細胞密度と有機物負荷、水質、保持汚泥濃度との間に関連性はなかった(データ無掲載)。そのため、DHS 反応器において、後生動物グループの動態を、有機物負荷、水質、保持汚泥濃度などのパラメーターによって制御することは難しいことが示唆された。

DHS 反応器上部(7th sponge、排水流下 29 cm)の保持汚泥では、ろ床ハエ(Fly larvae, *Clogmia albipunctata*)とミミズ(Oligochaete, *Aeolozoma hemprichi*)が多く確認された。ろ床ハエは保持汚泥のなかでも最も大きい生物である(Fig.S4-1)。これらの生物の細胞は大きく、保持汚泥中に占める体積の割合は最も大きい(Fig.S4-2、Fig.S4-3)。また、これらの生物は汚泥捕食量が多く、過剰な汚泥捕食による処理性能悪化が懸念される。現状では、DHS 反応器において、過剰な汚泥捕食による深刻な処理性能悪化は確認されていないが、保持汚泥濃度や有機物汚泥負荷(F/M 比)を管理することは、安定した下水処理を行ううえで重要であるため、これらの生物の増殖(もしくは捕食)を制御する技術開発が必要であると言える。

(b) DHS 保持汚泥と活性汚泥の真核生物群集構造の比較

検鏡した結果、真核生物の群集構造は、DHS 保持汚泥と活性汚泥で明確に異なっていた。活性汚泥では、鞭毛虫や繊毛虫グループが主要なグループであり(全体の 52–76%)、アメーバグループ(全体の 21–42%)や後生動物グループ(全体の 3–6%)はマイナーなグループであった。さらに、DHS 反応器と活性汚泥では優占する後生動物の種類が異なっていた。DHS 保持汚泥では、Nematoda(線虫)や Arthropoda(ミジンコ)が優占していたが、これらの後生動物は活性汚泥では確認されなかった。18S rRNA 遺伝子配列のクローンライブラリーにおいても同様なことが確認された。一般的に後生動物の増殖速度が原生動物よりも遅く、汚泥滞留時間が長く必要である(Table S4-2)。DHS 反応器の汚泥滞留時間(sludge retention time:SRT)は 69 日間であり(Okubo *et al.*, 2015)、活性汚泥では 5–7 日間であること(Tyagi *et al.*, 2008)が報告されている。この SRT の差が、DHS 反応器と活性汚泥の間で、優占する後生動物を変化させたのだと考えられた。このような特徴的な真核生物群集構造が DHS 反応器における余剰汚泥抑制に寄与している可能性も考えられた。

Table 4-2 Comparison of cell density of eukaryotes in the DHS reactor and activated sludge.

	Cell density of eukaryotes					
	DHS reactor A		DHS reactor B		Activated sludge	
	(cell·mL ⁻¹ -sponge)	(cell·mgVSS ⁻¹)	(cell·mL ⁻¹ -sponge)	(cell·mgVSS ⁻¹)	(cell·mL ⁻¹)	(cell·mgVSS ⁻¹)
Live-bacteria	4.4×10 ⁹	2.6×10 ⁸	5.8×10 ⁹	4.5×10 ⁸	3.4×10 ¹⁰	2.0×10 ¹⁰
Flagellates and ciliates	4.7×10 ³	2.7×10 ²	3.7×10 ³	2.7×10 ²	2.7×10 ³	1.7×10 ³
Amoebozoa	7.9×10 ³	5.1×10 ²	7.2×10 ³	4.3×10 ²	7.5×10 ²	4.5×10 ²
Metazoa	1.3×10 ³	7.0×10 ¹	1.1×10 ³	6.7×10 ¹	1.0×10 ²	6.0×10 ¹

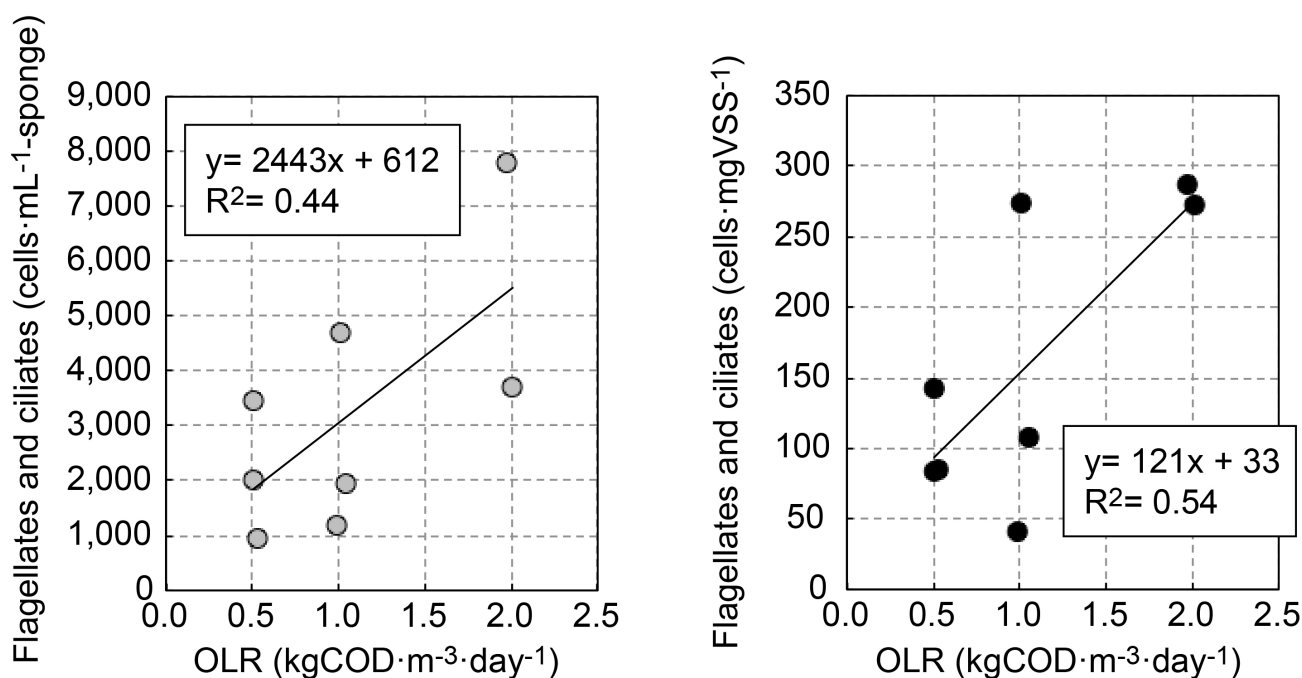


Fig.4-11 Relationship between average of flagellate and ciliate cell densities and organic loading rate (OLR). Flagellate and ciliate cell densities were calculated by the total amount of flagellates and ciliates in both DHS reactors at each phase and either total sponge volume or total retained sludge.

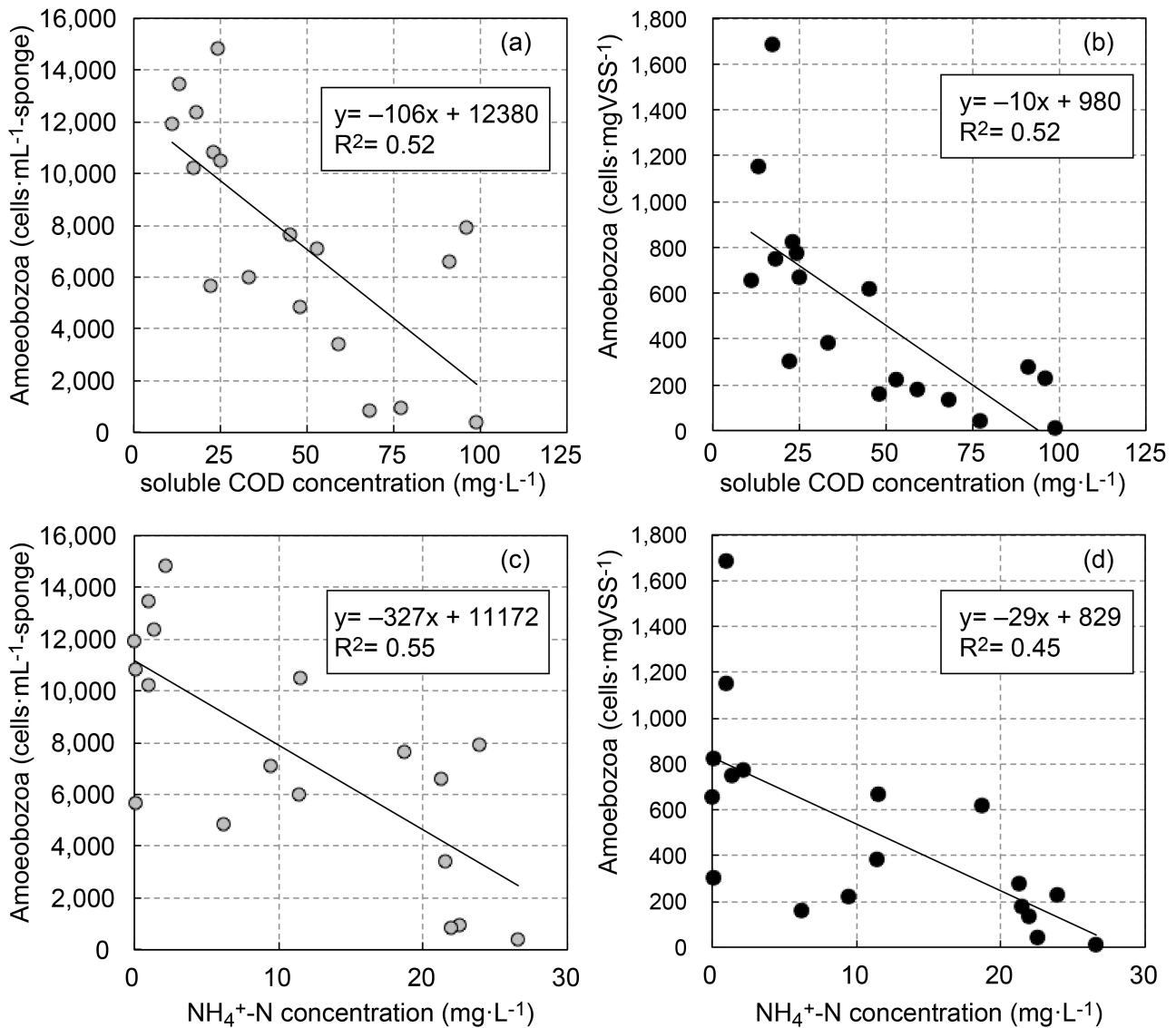


Fig.4-12 Relationship between amoebzoa cell density and water qualities; (a) and (b) soluble COD concentration, (c) and (d) NH₄⁺-N concentration. Amoebzoa cell density was plotted against profile values for both DHS reactors at each phase. Both soluble COD and NH₄⁺-N concentration was plotted against water profile values for both DHS reactors at each phase.

4.4.3 真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析

(a) superkingdom *Nucleomycea*

DHS 保持汚泥のクローンライブラリーでは、真核生物のなかでも真菌が優占していた (Fig.4-5)。その一方で、興味深いことに、活性汚泥のクローンライブラリーでは、真菌に属するファイロタイプは 1 クローンも検出されなかった (Fig.4-5)。これより、真菌は活性汚泥法のような完全浸漬型の反応器よりも、DHS 反応器のスポンジ担体のような半浸漬型の反応器のほうが増殖しやすいためではないかと考えられた。

本研究では、DHS 反応器による下水の連続処理実験を長期間継続することで、superkingdom *Nucleomycea* の中で phylum *Basidiomycota*, genus *Trichosporon* に近縁なファイロタイプの存在割合が全体の 0% から 11–15% に増加した (Fig.4-6)。その一方で、phylum *LKM11* や phylum *Ascomycota* に属するファイロタイプの存在割合は、それぞれ 15% から 4–5%、13% から 2% にまで低下した (Fig.4-6)。*Trichosporon cutaneum* は脱窒素に関与する可能性が報告されている (本研究では検出されなかった) (Tsuruta *et al.*, 1998; Hayatsu *et al.*, 2008)。本研究では *Trichosporon moniliiforme* と *Trichosporon mucoides* に近縁なファイロタイプが検出された。このように本研究では、genus *Trichosporon* に近縁な塩基配列が得られたことから、これらが DHS 反応器における脱窒反応に関与している可能性が示唆された。さらに genus *Funticula* に近縁なファイロタイプの存在割合も 20–31% にまで増加した (Fig.4-6)。しかしながら、これらの真核生物の機能や生理学的特性は不明である。連続処理実験によって優占する真核生物群集が変化したことから、これらの真核生物 (phylum *Basidiomycota*, genus *Trichosporon* に属するファイロタイプおよび genus *Funticula* に近縁なファイロタイプ) が下水処理の脱窒や固形物分解に寄与している可能性があるため、これらの真核生物の機能や生理学的特性を解析する必要があると考えられた。

(b) kingdom *Alveolata* および kingdom *Rhizaria*

PSSU と EukB で作成した DHS 反応器のクローンライブラリーでは、family/subfamily レベルで分類した結果、family *Hypotruchia*、subfamily *Peritrichia*、family *Platyophryida*、family *Rhizaspidae*、family *Euglyphida*、family *Thraustochytriaceae* が検出された (Fig.4-7)。DHS 反応器 A と DHS 反応器 B のふたつのクローンライブラリーを比較したところ明確な差は生じていなかった (Fig.4-7)。既報の活性汚泥を対象に 18S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析に関する報告と似通った真核生物が検出された (Moreno *et al.*, 2010; Matsunaga *et al.*, 2014)。subfamily *Peritrichia* に属する種は、活性汚泥において大腸菌や二酸化炭素同化細菌を捕食することが報告されている (Moreno *et al.*, 2010)。本研究では subfamily *Peritrichia*、genus *Sterliella* に属するクローンおよび family *Hypotruchia*、genus *Gonostomum* に属するクローンが検出され、それぞれの存在割合は全体の 15–29% および 18–24% であった。さらに kingdom *Rhizaria*、genus *Rogostoma* に近縁なクローンも検出された (存在割合は全体の 28–32%)。以上のことから、DHS 保持汚泥における捕食被捕食関係を明確に理解するうえで、クローンライブラリーのなかで検出された割合が多かった subfamily *Peritrichia*、family *Hypotruchia*、family *Rhizaspidae* に属するファイロタイプの機能を推定する必要があることが分かった。

(c) 検鏡および真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析による真核生物群集構造の比較

検鏡と真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析の間で、真核生物群集構造に違いが生じていた。

18S rRNA 遺伝配列に基づいたクローン解析では、検鏡では同定および解析できなかった真菌（真菌である superkingdom *Nucleotmycea* に属するファイトタイプの多くは、データベースに登録されている既知の真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列との相同性が 97%であり、それらの機能は不明である）に関しても、その群集構造を解析することが可能であった。そのため、検鏡とクローン解析の間で真核生物群集構造が異なっていた。また、統計学的な多様性評価を行うため、クローン解析結果から Chao 1 と Coverage、レアファクションカーブを算出した。その結果、EukA と EukB のプライマー対で解析を行ったサンプルの Coverage は 44–56%であり (Table 4-3)、レアファクションカーブはプラトーに達していなかった (Fig.4-13)。また、PSSU と EukB のプライマー対で解析を行ったサンプルの Coverage は 93%であり 100%に達していなかった (Table 4-3)。以上の解析結果から、解像度の高い真核生物群集構造を得るためには解析するクローン数を上げる必要があり、いくつかの真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列は検出できていないと考えられた。これらの結果からも、検鏡とクローン解析の間で真核生物群集構造が異なると判断することができた。さらに、1. PCR 効率、2. 遺伝子含有量の違い、3. EukA や EukB のプライマー対では検出できない真核生物が存在している可能性がある、4. アメーバ (Amoebozoa) や真菌 (Fungi) の DNA 抽出は細胞壁の構造や組成が異なるため決まった方法がなく難しい、などの理由のため、真核生物群集構造に差が生じたと考えられた。

Table 4-3 Statistical analysis of the clone libraries.

	Primer pair	Total clone number	Phylotype number	Chao 1 species richness	Shannon-Weaver diversity index	Coverage (%)
Activated sludge	EukA / EukB	55	34	220 (93 - 615)	3.2	49
Seed sponge	EukA / EukB	52	36	110 (62 - 245)	3.4	46
DHS reactor A_HRT 7.2hrs	EukA / EukB	48	25	87 (44 - 230)	2.7	58
DHS reactor A_HRT 7.2hrs	PSSU / EukB	55	14	16 (14 - 31)	2.3	91
DHS reactor B_HRT 3.6hrs	EukA / EukB	44	31	80 (48 - 178)	3.3	48
DHS reactor B_HRT 3.6hrs	PSSU / EukB	55	12	22 (14 - 63)	2.0	91

A phylotype was defined as over 97% sequence similarity.

Numbers in parentheses indicate the 95% confidence interval.

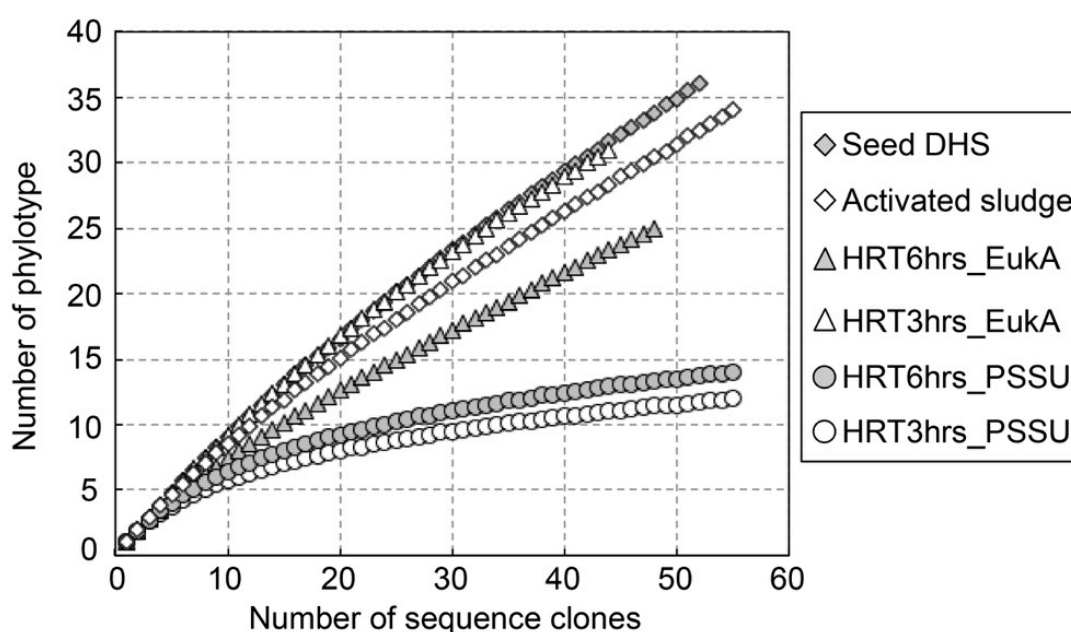


Fig.4-13 Rarefaction curves for the eukaryotic 18S rRNA gene.

(d) 分子生物学的手法を用いた DHS 反応器における真核生物群集構造解析の特徴

真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析を実施することで、DHS 保持汚泥の真核生物群集構造が門レベルで変化していたことを明らかにすることができた。このとき、存在割合が増加していたファイロタイプの多くは、データベースに登録されている 18S rRNA 遺伝子配列との相同性が 97%以下であることから、機能が未知な真核生物であった。この機能未知な真核生物がどれくらい下水処理に寄与しているのかは現在のところ明らかにできていない。下水処理汚泥を対象にして 18S rRNA 遺伝子を標的としたクローン解析の実施例は、極めて少ないのが現状である。そのため、本研究のように、下水処理性能とともに 18S rRNA 遺伝子配列の全長を決定した研究は、真核生物の生理学的特徴(真核生物の原核生物捕食機能、余剰汚泥抑制機構、固形物分解、脱窒など)を把握するうえで重要であると言える(例えば、定量 PCR、FISH、SIP を併用した動態解析)。このように分子生物学的手法を適用することで、下水処理を行う DHS 反応器における真核生物に関して新たな知見を得ることができた。

また、今後の課題として、このような真核生物がどのようにして DHS 反応器の保持汚泥中に定着したかを推定するために、流入下水中の TSS を対象としてクローン解析を実施する必要があると考えられた。仮に、流入下水中の TSS のクローンライブラリーから、保持汚泥中において優占していた真核生物に由来する塩基配列が得られない場合、真核生物は空気中などを漂って DHS 反応器に定着した可能性が高いことを示すことができる。

4.5 小括

本章では、下水の固形性有機物濃度によって変化する有機物負荷が、DHS 反応器の処理性能と保持汚泥の真核生物群集構造(18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析および検鏡)に与える影響について解析を行った。その結果、以下の知見が得られた。

1. 有機物負荷を約 2 倍に上昇させた後(1.05 から 1.97 kgCOD \cdot m⁻³ \cdot day⁻¹)、経日的に、処理性能と真核生物群集構造を解析したところ、DHS 反応器の保持汚泥中に存在する鞭毛虫と繊毛虫グループは、浮遊状の固形性有機物を捕食し、処理水質向上に寄与している可能性が高いことを示唆する結果を得ることができた。
2. DHS 保持汚泥を対象として、原生動物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析を行ったところ、subfamily *Peritrichia* および family *Hypotrichia* に属するファイロタイプが多く検出されたことから、これらの真核生物が優占的に分散状細菌を捕食していることが示唆された。そのため DHS 反応器における捕食-被捕食関係を解析する場合、これらの真核生物を標的とする必要があることがわかった。
3. DHS 保持汚泥中のアメーバのグループの細胞密度は、DHS 反応器の上部から下部にかけて増加する傾向にあり、スポンジ担体間隙水の COD 濃度および NH₄⁺-N 濃度と負の相関関係にあることが分かった(処理性能が著しく悪化した DHS 反応器 B の Phase-2 以外)。

4. DHS 保持汚泥中の後生動物のグループの細胞密度と、有機物負荷、水質、保持汚泥濃度との間に関連性はなかった。そのため、DHS 反応器において、後生動物グループの動態を、有機物負荷、水質、保持汚泥濃度などのパラメーターによって制御することは難しいことが示唆された。
5. 検鏡と真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析の間で、真核生物群集構造に違いが生じていた。これは、1. PCR 効率、2. 真核生物細胞の大きさによって遺伝子含有量が異なること、3. EukA や EukB のプライマー対では検出できない真核生物が存在している可能性があること、4. アメーバ (Amoebozoa) や真菌 (Fungi) の細胞壁の構造や組成が異なるため DNA 抽出効率に差が生じること、5. 18S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析では、検鏡では同定および解析できなかった真菌に関しても群集構造を解析可能であること、が原因であると考えられた。
6. DHS 保持汚泥を対象とした、真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析では、kingdom/ superkingdom レベルで分類を行ったクローンライブラリーの中で、superkingdom *Nucleomycea* に属するファイロタイプが、全クローン中 29–56% を占めていた。さらに、そのなかでも genus *Trichosporon* および genus *Funticula* に近縁なファイロタイプの存在割合が植種汚泥よりも増加していたことから、これらの真核生物が DHS 反応器による下水処理機構のいずれかに関与していることが示唆された。なお、興味深いことに、活性汚泥のクローンライブラリーでは、superkingdom *Nucleomycea* に属するファイロタイプは検出されなかった。
7. クローン解析により得られたファイロタイプの多くは、データベースに登録されている 18S rRNA 遺伝子配列との同一性が 97% 以下であった。これらのファイロタイプの殆どは機能が分かっていない真核生物であったため、DHS 反応器における下水処理機構 (炭素、窒素の分解) を理解するうえで、原核生物だけでなく、これらの真核生物の機能や生理学的特性を解析する必要があると考えられた。

参考文献

- Agrawal LK, Ohashi Y, Mochida E, Okui H, Ueki Y, Harada H and Ohashi A (1997) Treatment of raw sewage in a temperate climate using a UASB reactor and the hanging sponge cubes process. *Water Sci Technol* 36(6-7):433-440.
- Baldrian P and Valášková V (2008) Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol Rev* 32:501-521.
- Brown MW, Spiegel FW and Silberman JD (2009) Phylogeny of the "forgotten" cellular slime mold, *Fonticula alba*, reveals a key evolutionary branch within Opisthokonta. *Mol Biol Evol* 26(12):2699-2709.
- Canals O, Salvadó H, Auset M, Hernández C, Malfeito JJ (2013) Microfauna communities as performance indicators for A/O shortcut biological nitrogen removal moving-bed biofilm reactor. *Water Res* 47:3141-3150.
- Curds CR and Fey GJ (1969) The effect of ciliated protozoa on the fate of *Escherichia Coli* in the activated-sludge process. *Water Res* 3:853-867.
- Drake JF and Tsuchiya HM (1977) Growth kinetics of *Colpoda steinii* on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 34(1):18-22.
- Dubber D and Gray NF (2011) The effect of anoxia and anaerobia on ciliate community in biological nutrient removal system using laboratory-scale sequencing batch reactor. *Water Res* 45: 2213-2226.
- Evans TN and Seviour RJ (2012) Estimating biodiversity of fungi in activated sludge communities using culture-independent methods. *Microbiol Ecol* 63:773-786.
- Good IJ (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40:237-264.
- Hatamoto M, Ohtsuki K, Mahatjan N, Ono S, Dehama K, Sakamoto K, Takahashi M and Yamaguchi T (2016) Performance evaluation of the sulfur-redox-reaction-activated up-flow anaerobic sludge blanket and down-flow hanging sponge anaerobic/anoxic sequencing batch reactor system for municipal sewage treatment. *Bioresour Technol* 204:171-176.
- Hayatsu M, Tago K and Saito M (2008) Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Sci Plant Nutr* 54:33-45.
- Karnati SKR, Yu Z, Sylvester JT, Dehority BA, Morrison M and Firkins JL (2003) Technical note: Specific PCR amplification of protozoal 18S rDNA sequence from DNA extracted from ruminal samples of cows. *J Anim Sci* 81:812-815.
- Kubota K, Hayashi M, Matsunaga K, Iguchi A, Ohashi A, Li YY, Yamaguchi Y and 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. *Bioresour Technol* 151:144-150
- Lapinski J and Tunnacliffe A (2003) Reduction of suspended biomass in municipal wastewater using bdelloid rotifers. *Water Res* 37:2027-2034.
- Lara E, Moreira D and López-García P (2010) The environmental clade LKM11 and rozella form the deepest branching clade of fungi. *Protist* 161:116-121.

- Lim EL, Amaral LA, Caron DA and DeLong EF (1993) Application of rRNA-based probes for observing marine nanoplanktonic protists. *Appl Environ Microbiol* 59(5):1647-1655.
- Liu J, Yang M, Qi R, An W and Zhou J (2008) Comparative study of protozoan communities in full-scale MWTPs in Beijing related to treatment processes. *Water Res* 42: 1907-1918.
- López-García P, Rodríguez-Valera F, Pedrós-Alió C and Moreira D (2001) Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature* 409:603-607.
- Machdar I, Harada H, Ohashi A, Sekiguchi Y, Okui H and Ueki K (1997) A novel and cost-effective sewage treatment system consisting of UASB pre-treatment and aerobic post-treatment units for developing countries. *Water Sci Technol* 36(12):189-197.
- Machdar I, Sekiguchi Y, Sumino H, Ohashi A and Harada H (2000) Combination of a UASB reactor and a curtain type DHS (downflow hanging sponge) reactor as a cost-effective sewage treatment system for developing countries, *Water Science and Technology*, 42(3-4):83-88.
- Madoni P, Davoli D and Chierici E (1993) Comparative analysis of the activated sludge microfauna in several sewage treatment works. *Water Res* 27 (9): 1485-1491.
- Madoni P (1994) Estimates of ciliated protozoa biomass in activated sludge and biofilm. *Bioresour Technol* 48:245-249
- Marsh TL, Liu WT, Forney LJ and Cheng H (1988) Beginning a molecular analysis of the eukaryal community in activated sludge. *Water Sci Technol* 37(4-5):455-460.
- Martín-Cereceda M, Serrano S and Guinea A (2001) Biofilm communities and operational monitoring of a rotating biological contactor system. *Wat. Air and Soil Pollut* 126: 193-206.
- Matsunaga K, Kubota K and Harada H (2014) Molecular diversity of eukaryotes in municipal wastewater treatment processes as revealed by 18S rRNA gene analysis. *Microbes Environ* 29(4):401-407.
- Matz C and Kjelleberg S (2005) Off the hook - how bacteria survive protozoan grazing. *Trend Microbiol* 13(7):302-307.
- Medlin L, Elwood HJ, Stickel S and Sogin ML (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* 71:491-499.
- Moreno AM, Matz C, Kjelleberg S and Manefield M (2010) Identification of ciliate grazers of autotrophic bacteria in ammonia-oxidizing activated sludge by RNA isotope probing. *Appl Environ Microbiol* 76(7):2203-2211.
- Okubo T, Onodera T, Uemura S, Yamaguchi T, Ohashi A and Harada H (2015) On-site evaluation of the performance of a full-scale down-flow hanging sponge reactor as a post-treatment process of an up-flow anaerobic sludge blanket reactor for treating sewage in India. *Biorecour Technol* 194:156-164.
- Onodera T, Matsunaga K, Kubota K, Taniguchi R, Harada H, Syutsubo K, Okubo T, Uemura S, Araki N, Yamada M, Yamauchi M and Yamaguchi T (2013) Characterization of the retained sludge in a down-flow hanging sponge (DHS) reactor with emphasis on its low excess sludge production. *Bioresour Technol* 136:169-175.
- Pajdak-Stós A, Fiałkowska E, Fyda J and Babko R (2010) Resistance of nitrifiers inhabiting activated sludge to ciliate grazing. *Water Sci Technol* 61(3):573-580.
- Ravva SV, Sarreal CZ and Mandrell RE (2010) Identification of protozoa in dairy lagoon wastewater that consume

- Escherichia coli* O157: H7 preferentially. PLoS ONE 5(12):e15671.
- Salvadó H and Grancia MP (1993) Determination of organic loading rate of activated sludge plants based on protozoan analysis. Water Res 27(5):891-895.
- Shimano S, Sanbe M and Kasahara Y (2008) Linkage between light microscopic observations and molecular analysis by single-cell PCR for ciliates. Microbes Environ 23(4):356-359.
- Shimano S, Sambe M and Kasahara Y (2012) Application of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) for the analysis of ciliate communities in soils. Microbes Environ 27(2):136-141.
- Snaidr J, Amann R, Huber I, Ludwig W and Schleifer KH (1997) Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. Appl Environ Microbiol 63 (7): 2884-2896.
- Suarez C, Persson F and Hermansson M (2015) Predation of nitrification-anammox biofilms used for nitrogen removal from wastewater. FEMS Microbiol Ecol 91(11):1-9.
- Syutsubo K, Yoochatchaval W, Tsushima I, Araki N, Kubota K, Onodera T, Takahashi M, Yamaguchi T and Yoneyama Y (2011) Evaluation of sludge properties in a pilot-scale UASB reactor for sewage treatment in a temperature region. Water Sci Technol 64(10):1959-1966.
- Tawfik A, El-Gohary F, Ohashi A and Harada H (2006) The influence of physical-chemical and biological factors on the removal of faecal coliform through down-flow hanging sponge (DHS) system treating UASB reactor effluent. Water Res 40:1877-1883.
- Taylor WD (1978) Growth responses of ciliate protozoa to the abundance of their bacterial prey. Microb Ecol 4:207-214
- Tsuruta S, Takaya N, Zhang L, Shoun H, Kimura K, Hamamoto M and Nakase T (1998) Denitrification by yeast and occurrence of cytochrome P450nor in *Trichosporon cutanum*. FEMS Microbiol Lett 168:105-110.
- Tyagi VK, Subramaniyan S, Kazmi AA, Chopra AK (2008) Microbial community in conventional and extended aeration activated sludge plants in India. Ecol Ind 8(5):550-554.
- Uemura S and Harada H (2010) Application of UASB technology for sewage treatment with a novel post-treatment process. In: Fang HHP (ed) Environmental anaerobic technology. Imperial College Press, London, pp 91-112
- Weber SD, Hofmann A, Pilhofer M, Wanner G, Agerer R, Ludwig W, Schleifer KH, Fried J (2009) The diversity of fungi in aerobic sewage granules assessed by 18S rRNA gene and ITS sequence analyses. FEMS Microbiol Ecol 68:246-254.
- Yoochatchaval W, Onodera T, Sumino H, Yamaguchi T, Mizuochi M, Okadera T and Syutsubo K (2014) Development of a down-flow hanging sponge reactor for the treatment of low-strength sewage. Water Sci Technol 70(4):656-663
- Zhou K, Xu M, Dai J and Cao H (2006) The microfauna communities and operational monitoring of an activated sludge plant in China. Eur J Protistol 42: 291-295.
- Zhu F, Massana R, Not F, Marie D and Vault D (2005) Mapping of picoeukaryotes in marine ecosystem with quantitative PCR of the 18S rRNA gene. FEMS Microbiol Ecol 52:79-92.
- 大矢明子, 小野寺崇, 山口隆司, 珠坪一晃, 荒木信夫, 多川正, 山崎慎一, 米山豊, 大橋晶良, 原田秀樹 (2009) 下水処理UASBリアクターの処理特性および保持汚泥性状評価, 環境工学論文集, 46, 629-635.

柏純一(2007)霞ヶ浦流域における下水高度処理について、建設の施工企画:19-23.

千種薫(1996)図説 微生物による水質管理、産業用水調査会.

Supplementary materials

Table S4-1 Relative abundance and phylogenetic affiliation of eukaryotes in the retained sludge based on the operational taxonomic units 18S rRNA gene sequences.

(a) List of OTUs affiliating with superkingdom *Nucleomycea*; Primer pair of EukA and EukB

Relative abundance (%)		ARB software			BLAST serch		
		Kingdom	Phylum	Class	Close relatives	Accession	Similarity
Seed: Nagaoka DHS							
4/52	8	Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	<i>Candida ghanaensis</i>	AY618510	92 %
1/52	2	Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	<i>Candida ghanaensis</i>	AY618510	93 %
1/52	2	Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	<i>Candida ghanaensis</i>	AY618510	91 %
1/52	2	Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	<i>Candida naeodendra</i>	AB013548	87 %
2/52	4	---	LKM11	---	<i>Candida atmosphaerica</i>	AB013526	89 %
1/52	2	---	LKM11	---	<i>Issatchenkia scutulata</i>	EF550381	82 %
1/52	2	---	LKM11	---	<i>Spizellomyces acuminatus</i>	M59759	89 %
1/52	2	---	LKM11	---	<i>Candida blattariae</i>	AY640210	87 %
1/52	2	---	LKM11	---	<i>Hyaloraphidium curvatum</i>	NG_017172	87 %
1/52	2	---	LKM11	---	<i>Mortierella wolfii</i>	AF113425	89 %
1/52	2	---	LKM11	---	<i>Rozella allomycis</i>	NG_017174	88 %
DHS reactor A: Phase-3 (HRT 6 hours)							
12/48	25	Discicristoidea	Fonticulida	Fonticulidae	Uncultured eukaryote	AB901732	99 %
1/48	2	Discicristoidea	Fonticulida	Fonticulidae	Uncultured eukaryote	AB901732	98 %
1/48	2	Discicristoidea	Fonticulida	Fonticulidae	Uncultured eukaryote	AB901732	95 %
1/48	2	Discicristoidea	Fonticulida	Fonticulidae	Uncultured eukaryote	AB901732	95 %
6/48	13	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	<i>Trichosporon moniliiforme</i>	AB001761	100 %
1/48	2	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	<i>Trichosporon moniliiforme</i>	AB001761	95 %
1/48	2	Fungi	Dikarya	Ascomycota	<i>Candida sp</i>	AY242231	95 %
1/48	2	---	LKM11	---	Uncultured fungus	JN054655	95 %
1/48	2	---	LKM11	---	Uncultured eukaryote	AB901898	97 %
1/48	2	---	---	---	Uncultured eukaryote	AB902208	90 %
1/48	2	---	---	---	Uncultured eukaryote	AB902172	94 %
DHS reactor B:Phase-3 (HRT 3 hours)							
4/44	9	Discicristoidea	Fonticulida	Fonticulidae	Uncultured eukaryote	AB901732	99 %
2/44	5	Discicristoidea	Fonticulida	Fonticulidae	Uncultured eukaryote	AB901732	96 %
1/44	2	Discicristoidea	Fonticulida	Fonticulidae	Uncultured eukaryote	AB901732	95 %
1/44	2	Discicristoidea	Fonticulida	Fonticulidae	Uncultured eukaryote	AB901732	93 %
1/44	2	Discicristoidea	Fonticulida	Fonticulidae	Uncultured eukaryote	AB695512	85 %
2/44	5	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	<i>Trichosporon moniliiforme</i>	AB001761	99 %
1/44	2	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	<i>Trichosporon moniliiforme</i>	AB001761	99 %
1/44	2	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	<i>Trichosporon moniliiforme</i>	AB001761	88 %
1/44	2	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	<i>Trichosporon moniliiforme</i>	AB001761	98 %
1/44	2	Fungi	Basidiomycota	Tremellomycetes	<i>Cryptococcus muschi</i>	AB039378	94 %
1/44	2	Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	<i>Debaryomyces hansenii</i>	JQ698910	90 %
1/44	2	---	LKM11	---	Uncultured eukaryote	AB902294	97 %
1/44	2	---	LKM11	---	Uncultured eukaryote	AB902172	90 %

Table S4-1 continued.

(b) List of OTUs affiliating with kingdom *Holozoa*; Primer pair of EukA and EukB

Relative abundance (%)		ARB software				BLAST search		
		Phylum	Subphylum	Class / Lineage	Order / Lineage	Clothest relatives	Accession	Similarity
Activated sludge								
3/55	5	Metazoa	Animalia	Tardigrada	Hypsibiidae	<i>Isohypsibius granulifer</i>	EF620403	98 %
1/55	2	Metazoa	Animalia	Tardigrada	Hypsibiidae	<i>Isohypsibius granulifer</i>	EF620403	93 %
1/55	2	Metazoa	Animalia	Tardigrada	Hypsibiidae	<i>Thulinus stephania</i>	GQ925698	85 %
1/55	2	Metazoa	Animalia	Rotifera	---	<i>Lecane leontina</i>	DQ297700	99 %
2/55	4	Ichthyosporia	---	Dermocystida	Rhinosporideaceae	<i>Rhinosporidium seeberi</i>	AF118851	96 %
1/55	2	Choanomonada	---	Craspedida	Salpingoecidae	<i>Desmarella moniliformis</i>	AF084231	89 %
Seed: Nagaoka DHS								
6/52	12	Metazoa	Animalia	Arthropoda	Crustacea	<i>Ectocyclops polyspinosus</i>	AJ746336	98 %
2/52	4	Metazoa	Animalia	Arthropoda	Hexapoda	<i>Clogmia albipunctata</i>	KC177281	95 %
3/52	6	Metazoa	Animalia	Nematoda	Enoplea	<i>Dorylaimus stagnalis</i>	AY284776	99 %
2/52	4	Metazoa	Animalia	Nematoda	Enoplea	<i>Labronema vulvapapillatum</i>	AY284807	89 %
1/52	2	Metazoa	Annelida	Annelida	Annelida	<i>Bothrioneurum vej dovskyanum</i>	AF411908	99 %
1/52	2	Metazoa	Animalia	Annelida	Annelida	<i>Monopylephorus rubroniveus</i>	AF209459	97 %
1/52	2	Metazoa	Animalia	Annelida	Annelida	<i>Monopylephorus rubroniveus</i>	AF209459	96 %
1/52	2	Metazoa	Animalia	Annelida	Annelida	<i>Monopylephorus rubroniveus</i>	AF209459	95 %
1/52	2	Metazoa	Animalia	Annelida	Annelida	<i>Pristina aequisetata</i>	GQ355432	94 %
1/52	2	Metazoa	Animalia	Annelida	Annelida	<i>Monopylephorus rubroniveus</i>	AF209459	92 %
1/52	2	Metazoa	Animalia	Annelida	Annelida	<i>Bothrioneurum vej dovskyanum</i>	AF411908	90 %
1/52	2	Metazoa	Animalia	Annelida	Annelida	<i>Spirosperma ferox</i>	AY040699	89 %
1/52	2	Metazoa	Animalia	Annelida	Annelida	<i>Monopylephorus rubroniveus</i>	AF209459	99 %
1/52	2	Metazoa	Animalia	Platyheiminthes	Turbellaria	<i>Bothrioneurum vej dovskyanum</i>	AF411908	85 %
1/52	2	Metazoa	Animalia	Platyheiminthes	Turbellaria	<i>Geocentrophora sp</i>	AJ012509	98 %
DHS reactor A: Phase-3 (HRT 6 hours)								
1/48	2	Metazoa	Animalia	Arthropoda	Crustacea	<i>Ectocyclops polyspinosus</i>	AJ746336	98 %
6/48	13	Metazoa	Animalia	Nematoda	Chromadorea	<i>Eumonhystera filiformis</i>	KJ636238	94 %
1/48	2	Metazoa	Animalia	Nematoda	Chromadorea	<i>Eumonhystera filiformis</i>	KJ636238	91 %
1/48	2	Metazoa	Animalia	Nematoda	Chromadorea	<i>Eumonhystera filiformis</i>	KJ636238	91 %
1/48	2	Metazoa	Animalia	Nematoda	Chromadorea	<i>Eumonhystera filiformis</i>	KJ636238	90 %
DHS reactor B: Phase-3 (HRT 3 hours)								
1/44	2	Metazoa	Animalia	Arthropoda	Chelicerata	<i>Trhypochthoniellus crassus</i>	EF081300	96 %
1/44	2	Metazoa	Animalia	Arthropoda	Crustacea	<i>Ectocyclops polyspinosus</i>	AJ746336	92 %
3/44	7	Metazoa	Animalia	Nematoda	Chromadorea	<i>Eumonhystera filiformis</i>	KJ636238	94 %
2/44	5	Metazoa	Animalia	Nematoda	Chromadorea	<i>Tridentulus sp</i>	AJ966507	95 %
1/44	2	Metazoa	Animalia	Nematoda	Chromadorea	<i>Eumonhystera filiformis</i>	KJ636238	90 %
1/44	2	Metazoa	Animalia	Nematoda	Chromadorea	<i>Tridentulus sp</i>	AJ966507	90 %

Table S4-1 continued.

(c) List of OTUs affiliating with kingdom *Alveolata*, kingdom *Rhizaria* and kingdom *Stramenopiles*; Primer pair of EukA and EukB

Relative abundance (%)	ARB software					BLAST serch		
	Phylum	Class	Order	Family	Subfamily	Close relatives	Accession	Similarity
Activated sludge								
9/55	16	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	---	Bistichella variabilis	HQ699895 96 %
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	---	Orthamphisiella breviseries	AY498654 94 %
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	---	Gonostomum namibiense	AY498655 92 %
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Euplotia	---	Oxytricha longa	FJ577827 92 %
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Euplotia	---	Aspidisca aculeata	FJ577827 96 %
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Euplotia	---	Euplotes aediculatus	AJ305253 97 %
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Oxytrichidae	---	Oxytrichidae environmental sample	EF024472 93 %
6/55	11	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	Epistylis chrysemydis	AF335514 97 %
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	Epistylis galea	AF401527 95 %
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	Vaginicola crystallina	AF401521 93 %
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	Telotrochidium matiense	GQ872428 95 %
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	---	Pseudoplatynematum denticulatum	JX310020 90 %
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Phyllopharyngea	Cyrtophoria	Pseudochilodonopsis fluviatilis	JN867021 96 %
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Phyllopharyngea	Cyrtophoria	Pseudochilodonopsis fluviatilis	EF023157 95 %
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Phyllopharyngea	Cyrtophoria	Pseudochilodonopsis fluviatilis	EF023157 90 %
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Phyllopharyngea	---	Acineta flava	HM140400 89 %
1/55	2	Ciliophora	Postciliodesmatophora	Heterotrichia	Spirostomum	---	Spirostomum teres	AM398199 99 %
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Plagiopylea	Odontostomatida	Epalxella antiquorum	EF014286 88 %
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Prostomatea	Prorodon	Prorodon teres	X71140 93 %
3/55	5	Cercozoa	Imbricatea	Silicoflosea	Euglyphida	Euglyphidae	Euglypha acanthophora	AJ418788 99 %
1/55	2	Cercozoa	Imbricatea	Silicoflosea	Euglyphida	Euglyphidae	Euglypha acanthophora	AJ418788 94 %
1/55	2	Cercozoa	Imbricatea	Silicoflosea	Euglyphida	Euglyphidae	Euglypha acanthophora	AJ418788 95 %
1/55	2	Cercozoa	Thecofilosea	Cryomonadida	Rhizaspidae	Rhogostoma	Rhogostoma schuessleri	HQ121431 92 %
1/55	2	Cercozoa	Thecofilosea	Cryomonadida	Rhizaspidae	Rhogostoma	Rhogostoma schuessleri	HQ121431 94 %
1/55	2	Cercozoa	Thecofilosea	Uncultured	---	---	Uncultured eukaryote	EF024143 89 %
1/55	2	Cercozoa	---	---	---	---	Euglypha acanthophora	EF024169 93 %
Seed: Nagaoka DHS								
1/52	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	---	---	Oxytricha elegans	AM412767 92 %
1/52	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	---	---	Gonostomum namibiense	AY498655 90 %
1/52	2	Ciliophora	Postciliodesmatophora	Heterotrichia	Blepharisma	---	Invertebrate environmental sample	GU070880 91 %
3/52	6	Cercozoa	Thecofilosea	Cryomonadida	Rhizaspidae	---	Rhogostoma schuessleri	HQ121430 95 %
1/52	2	Cercozoa	Thecofilosea	Uncultured	---	---	Rhogostoma schuessleri	HQ121430 91 %
1/52	2	Cercozoa	Thecofilosea	Uncultured	---	---	Protaspis grandis	DQ303924 89 %
1/52	2	Cercozoa	imbricatea	Silicoflosea	Euglyphida	---	Cryothecomonas longipes	AF290540 90 %
2/52	4	Cercozoa	Cercomonadidae	Cercomonas	---	---	Cercomonas longicauda	AY496047 97 %
1/52	2	Cercozoa	Incertae Sedis	Gymnophrys	---	---	Gymnophrys cometa	AJ514866 91 %
DHS reactor A: Phase-3 (HRT 6 hours)								
2/48	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	---	Gonostomum strenuum	AJ310493 99 %
1/48	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	---	---	Gonostomum sp	JX946277 95 %
1/48	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	---	---	Oxytrichidae environmental sample	EF024827 93 %
1/48	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	Uncultured eukaryote	AB902409 95 %
2/48	4	Cercozoa	Thecofilosea	Cryomonadida	Rhizaspidae	---	Uncultured eukaryote	AB901847 97 %
1/48	2	Cercozoa	Thecofilosea	Cryomonadida	Rhizaspidae	---	Lecythium sp	AJ514867 99 %
1/48	2	Cercozoa	Thecofilosea	---	---	---	Uncultured cercozoan	AB520719 92 %
1/48	2	Cercozoa	Vampyrellidae	---	---	---	Uncultured eukaryote	AF372743 96 %
DHS reactor B: Phase-3 (HRT 3 hours)								
3/44	7	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	---	Sterkiella sp	KC182573 99 %
1/44	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	---	Gonostomum sp	JX946277 99 %
1/44	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	---	Oxytrichidae environmental sample	EF024652 90 %
2/44	5	Ciliophora	Intramacronucleata	---	---	---	Oxytrichidae environmental sample	EF024472 95 %
1/44	2	Ciliophora	Intramacronucleata	---	---	---	Uncultured eukaryote	AB695446 94 %
3/44	7	Cercozoa	Thecofilosea	Cryomonadida	Rhizaspidae	---	Lecythium sp	AJ514867 99 %
1/44	2	Cercozoa	Vampyrellidae	---	---	---	Penardia sp	KC779511 83 %
1/44	2	Cercozoa	---	---	---	---	Uncultured eukaryote	AB534320 74 %
1/44	2	Labyrinthulomy	---	---	Thraustochytriaceae	---	Oxytrichidae environmental sample	EF024797 85 %

Table S4-1 continued.

(d) List of OTUs affiliating with kingdom *Alveolata*, kingdom *Rhizaria* and kingdom *Stramenopiles*; Primer pair of PSSU and EukB

Relative abundance (%)	ARB software					BLAST serch			
	Phylum	Class	Order	Family	Subfamily	Close relatives	Accession	Similarity	
DHS reactor A: Phase-3 (HRT 6 hours)									
13/55	24	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	---	Gonostomum sp.	JX946277	99 %
8/55	15	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	---	Sterkiella sp.	KC182573	99 %
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	---	Oxytrichidae environmental	EF024903	97 %
4/55	7	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	Uncultured alveolata	JN020239	94 %
2/55	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	Uncultured alveolata	JN020239	93 %
4/55	7	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	Epistylis galea	AF401527	95 %
2/55	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	Vorticella convallaria	JQ723987	99 %
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	Opisthonecta minima	EF417834	97 %
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	Peritrichia sp.	GQ872428	97 %
8/55	15	Cercozoa	Thecofilosea	Cryomonadida	Rhizaspididae	---	Rhogostoma sp.	HQ121431	99 %
7/55	13	Cercozoa	Thecofilosea	Cryomonadida	Rhizaspididae	---	Rhogostoma sp.	HQ121431	97 %
2/55	4	Cercozoa	Thecofilosea	Cryomonadida	Rhizaspididae	---	Uncultured eukaryote	JN054690	97 %
1/55	2	Cercozoa	Thecofilosea	---	---	---	Cercozoa sp.	AB585966	99 %
1/55	2	Labyrinthulomycetes	---	---	Thraustochytriaceae	---	Uncultured stramenopile	GU823043	84 %
DHS reactor B: Phase-3 (HRT 3 hours)									
16/55	29	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	---	Sterkiella sp.	KC182573	99 %
10/55	18	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	---	Gonostomum strenuum	AJ310493	99 %
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	---	Bistichella variabilis	HQ699895	97 %
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Colpodea	---	Platyophrya vorax	AF060454	98 %
3/55	5	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	Uncultured alveolata	JN020239	94 %
3/55	5	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	Uncultured alveolata	JN020239	94 %
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	Telotrochidium matiense	EF417835	97 %
4/55	7	Cercozoa	Thecofilosea	Cryomonadida	Rhizaspididae	---	Rhogostoma sp.	HQ121431	99 %
4/55	7	Cercozoa	Thecofilosea	---	---	---	Rhogostoma schuessleri	HQ121430	98 %
10/55	18	Cercozoa	Thecofilosea	Cryomonadida	Rhizaspididae	---	Rhogostoma sp.	HQ121431	97 %
1/55	2	Cercozoa	Imbricatea	Silicofilosea	Euglyphida	---	Placocista sp.	GQ144680	89 %
1/55	2	Cercozoa	Incertae Sedis	---	---	---	Cercomonas sp.	HM536146	71 %

Table S4-2 The protozoa and metazoa growth rates.

	Culture temp. (°C)	Growth rate (day ⁻¹)	Generation time (h)	Ref
<i>Vorticella microstoma</i>	20	3.3	5	1
<i>Paramecium caudatum</i>	20	1.4	12	1
<i>Aspidisca costata</i>	20	1.2	13.6	1
<i>Philodina sp</i>	30	1	---	3
<i>Aeolosoma sp</i>	20	0.44	---	2
<i>Pristina sp</i>	20	0.12	---	2
<i>Nais sp</i>	20	0.11	---	2
<i>Dero sp</i>	20	0.07	---	2

1. Sudo R and Aiba S (1973) Growth rate of Aspidiscidae isolated from activated sludge.
Water Res 6: 137-144
2. Suzuki R, Shimizu Y, Ebie Y, Inamori Y and Sudo R (2005)
Growth characteristics of small aquatic oligochaetes contributing on
sludge reduction in biological wastewater treatment system.
Japanese J Wat Treat Biol 41 (3): 121-128
3. Fujimoto N, Hayashi N, Ouchiya T, Mizuochi M and Inamori Y (2003)
Comparison of effects of temperature on the growth of protozoa and
metazoa in Thailand and Japan.
Japanese J Wat Treat Biol 39 (2): 93-97

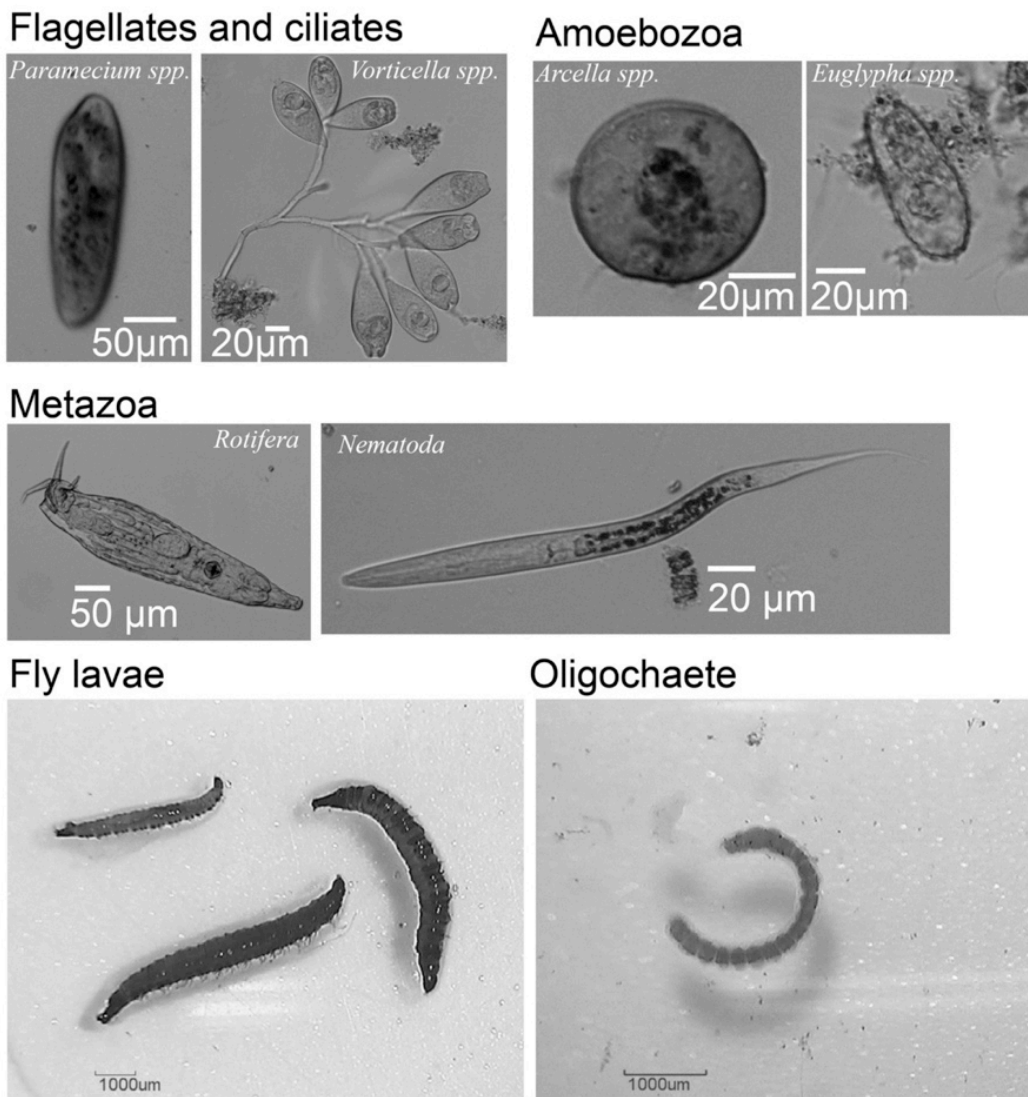


Fig.S4-1 Size comparisons of protozoa, metazoa, and macrofauna.

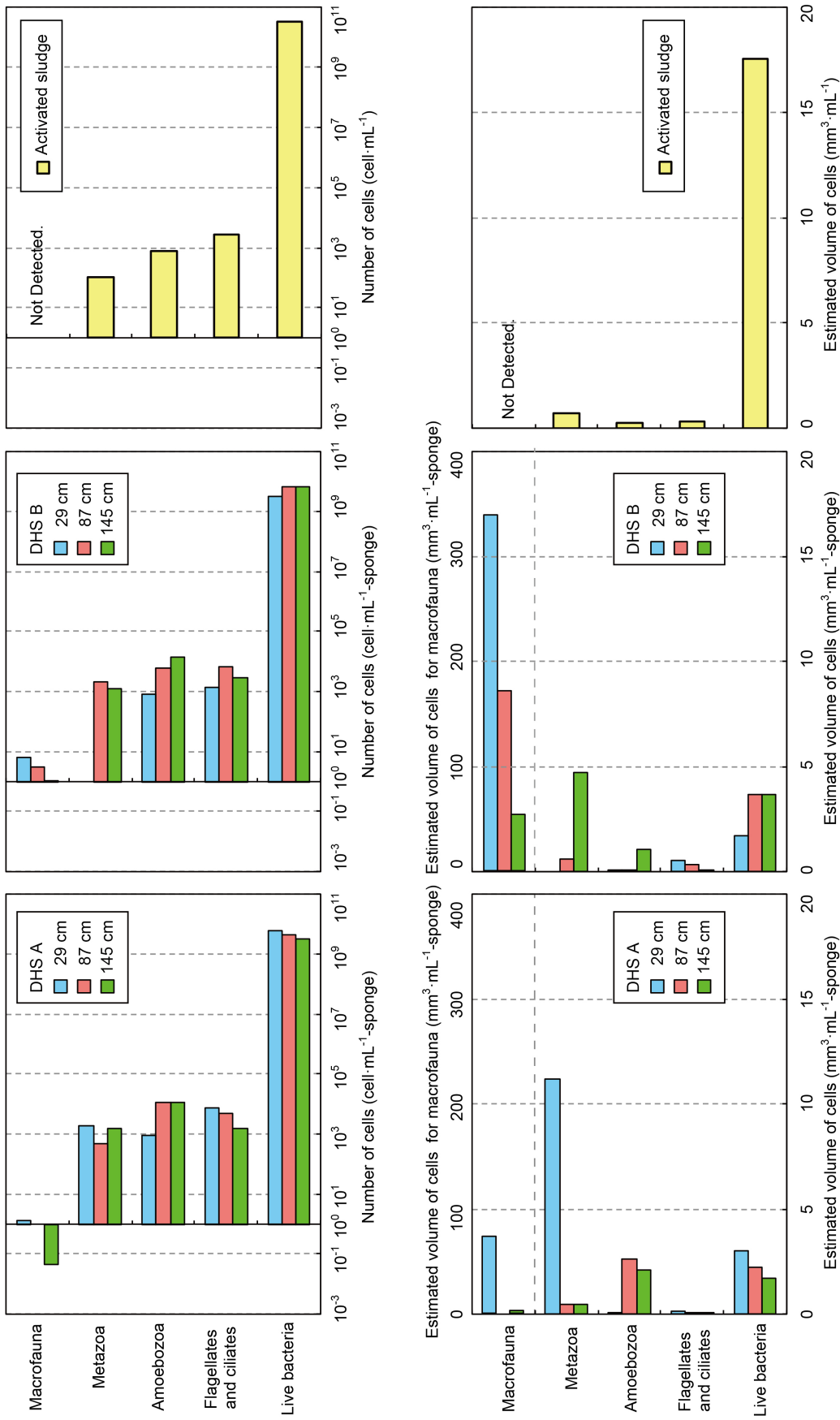


Fig.S4-2 The comparison about the cell number and the estimated cell volume of macrofauna, metazoa, amoebzoa, flagellates and ciliates, and live bacteria in retained sludge (unit: cells·mL⁻¹-sponge and mm³·mL⁻¹-sponge).

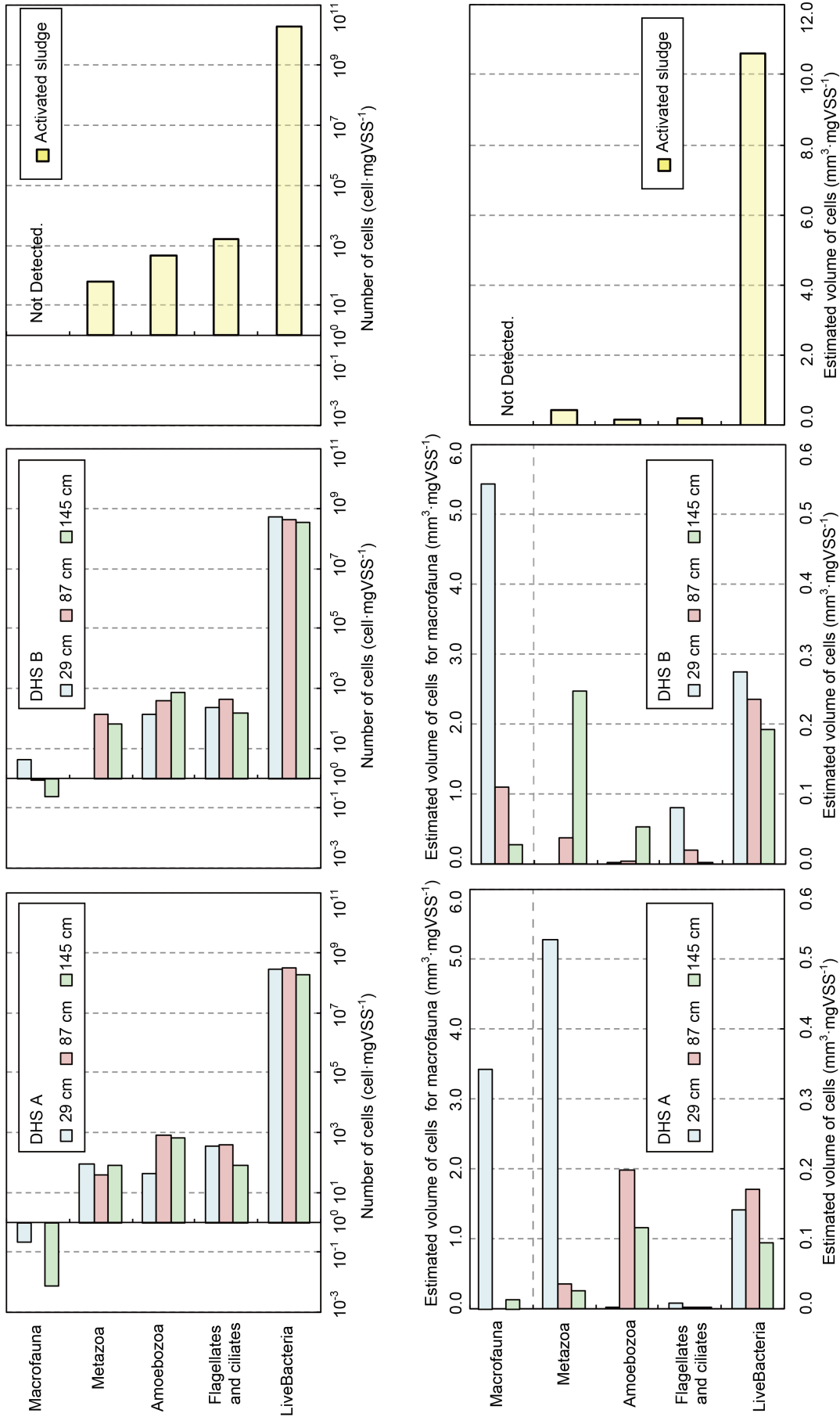


Fig.S4-3 The comparison about the cell number and the estimated cell volume of macrofauna, metazoa, amoebzoa, flagellates and ciliates, and live bacteria in retained sludge (unit: cells·mgVSS⁻¹ and mm³·mgVSS⁻¹).

第 5 章

HRT の能動的な変化が DHS 反応器における
真核生物群集構造に与える影響の解析

in preparation for submission

5.1 研究背景と目的

発展途上国のように下水道普及率が低い地域では、即効的な水環境汚染対策として、大規模な土木工事が必要になる下水道のような集約型処理技術ではなく、小規模な分散型処理技術の導入が有効である。散水ろ床法の一つである下降流懸垂型スポンジ(DHS)反応器は、バンコク(タイ)の低有機物濃度である都市下水(BOD濃度 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 程度)の分散型処理技術としての適用性評価が行われている(Onodera *et al.*, 2014; Wilasinee *et al.*, 2014)。しかしながら、小規模処理場においては、1日の中で有機物負荷(水量や有機物濃度)の変動が顕著に発生することが知られている。特に、小越らの報告を参考にすると、日本国内の合併浄化槽が導入されている住宅団地では、1日の平均負荷に対して4から8倍の負荷変動が生じている(小越, 2010)。そのため、1日の中で数倍に変動する有機物負荷(OLR)に対する処理特性や保持汚泥性状への影響評価は行うことは重要である。

第4章では、流入下水の固形性有機物濃度の上昇による有機物負荷の上昇が、DHS反応器の真核生物群集構造と下水処理特性に与える影響の解析を行った。その結果、DHS反応器の保持汚泥中に存在する真核生物(特に、原生動物のなかの、鞭毛虫および繊毛虫のグループ)は、固形性有機物を捕食し、処理水質向上に寄与していることを示唆する結果を得ることができた。このように、流入水の濃度変化による有機物負荷の増加は、真核生物群集構造に影響を与えるが、その一方で、水理的滞留時間(HRT)短縮による有機物負荷の増加に対する影響は十分に解析することはできていない。

そこで、本章では、1日の中で数倍に変化する有機物負荷に対する真核生物群集の挙動を把握するために、HRTを能動的に変化させる運転方法(短いHRT(高負荷)及び長いHRT(低負荷)を交互に繰り返す運転方法(以降、負荷変動運転))である負荷変動運転が、DHS反応器の処理特性、真核生物群集構造、他の汚泥性状(保持汚泥濃度、保持汚泥の内生呼吸活性)に与える影響について解析した。

5.2 実験方法

5.2.1 DHS反応器と人工排水

DHS反応器は、第4章で記載したスポンジ担体(既に汚泥が付着しているもの)を20個垂直に連結した構造とした(全長80 cm、スポンジ担体総容積0.564 L、日本国内の下水を連続処理していたDHS反応器のスポンジ担体を4°Cで冷蔵保存していたもの)(Fig.5-1)。個々のスポンジ担体の連結方法は第4章と同じである。このとき、DHS反応器の最上部から4個、10個、17個目のスポンジ担体に関しては、保持汚泥特性を経時的に解析するために8個に分割した。DHS反応器の最上部から、第4章の実下水の溶解性画分を模擬した人工排水を連続的に供給した(Table 5-1)。この人工下水は、炭素源としてデキストリン、酢酸ナトリウム、タンパク源および窒素源として酵母抽出物、牛肉抽出物、ポリペプトン、尿素、塩化アンモニウムを使用しており(大久保ら, 1991; 滝沢ら, 1992; 砂庭ら, 2012)、その他に微生物の生育に必要な無機塩や微量元素を添加した(Syutsubo *et al.*, 2001)(Table 5-1)。この人工排水は、貯留槽内での腐敗を防止するために13°Cになるように冷却しており、一定の頻度(2、3日に一度の頻度)で新しく作成した。DHS反応器による処理機構は第4章と同じであるため省略する。DHS反応器に流入するものを流入水(Fig.5-1, influent)、DHS反応器最下部から流出するものを処理水(Fig.5-1, effluent)とした。DHS反応器を設置した部屋の温度は $20 \pm 3^\circ\text{C}$ に設定した。

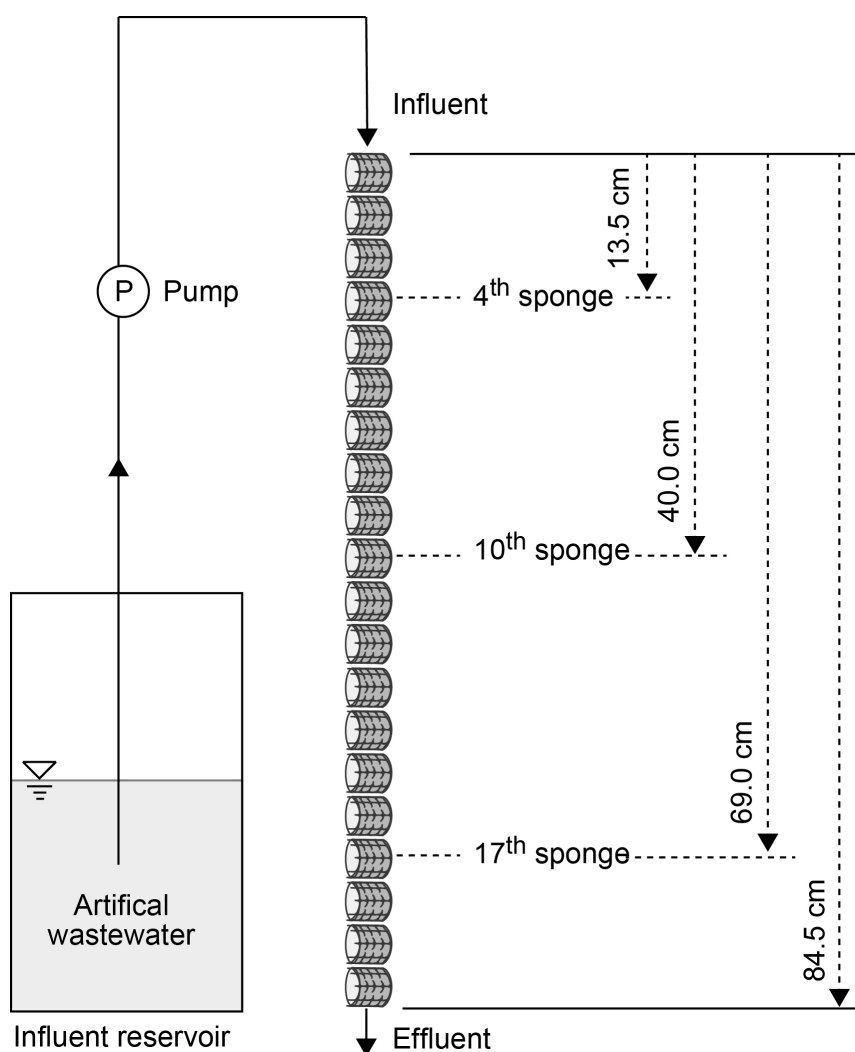


Fig.5-1 Schematic diagram of the DHS reactor used in this study.

Table 5-1 Composition of influent in the influent reservoir.

		Concentration ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)			Concentration ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
Carbon source	Dextrin	22.3	Trace element	$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7
	Sodium Acetate	19.2		$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.17
	NaHCO_3	100		$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.15
.....					
Protein and nitrogen source	Yeast Extract	34.2		H_3BO_3	0.06
	Polypepton	34.2		$\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.5
	Beef extract	39.0		$\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.04
	Urea	10.7		$\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.027
	NH_4Cl	20.0		$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025
.....					
			Basal mineral	KH_2PO_4	3.3
				$\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.3
				$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.3

5.2.2 運転方法(一定負荷運転および負荷変動運転)

まず初めに人工排水への馴致を行うため、運転開始から 28 日間をスタートアップ期間と定義した(運転条件は、一定負荷運転時と同じ)。その後、一定負荷運転 (Fig.5-2、control) を 43 日間行った後、負荷変動運転に切り替えた (Fig.5-2)。負荷変動運転は 29 日間続いた。この負荷変動運転では、高負荷 (Fig.5-2、high flow rate) と低負荷 (Fig.5-2、low flow rate) を能動的に繰り返しながら、人工排水を DHS 反応器に供給した。具体的には、高負荷 (HRT 0.8 時間) を 2 時間、低負荷 (HRT 15 時間) を 10 時間 (人工排水を全く供給しない 2 時間を含む) 継続させた。この 12 時間の運転を 1 サイクルとし、この 1 サイクル中における処理水の全量を 4°C で冷却しながらサンプリングした。このとき、負荷変動による影響をわかりやすくするために、一定負荷運転時の設定負荷よりも 5 倍高くなるように高負荷時の負荷を設計した (Fig.5-2)。その一方で、低負荷時の設定負荷は一定負荷運転における設定負荷の 4 分の 1 倍になるように設計した (Fig.5-2)。また、1 日の有機物負荷量 (人工排水供給量) の総和は、一定負荷運転および負荷変動運転ともに同じになるように設計した。それぞれの運転方法における設計条件を次に示す。

- ・一定負荷運転: HRT 3.8 時間、OLR $0.8 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$
- ・負荷変動運転: 高負荷 HRT 0.8 時間、OLR $3.8 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ 、低負荷 HRT 15 時間、OLR $0.2 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$

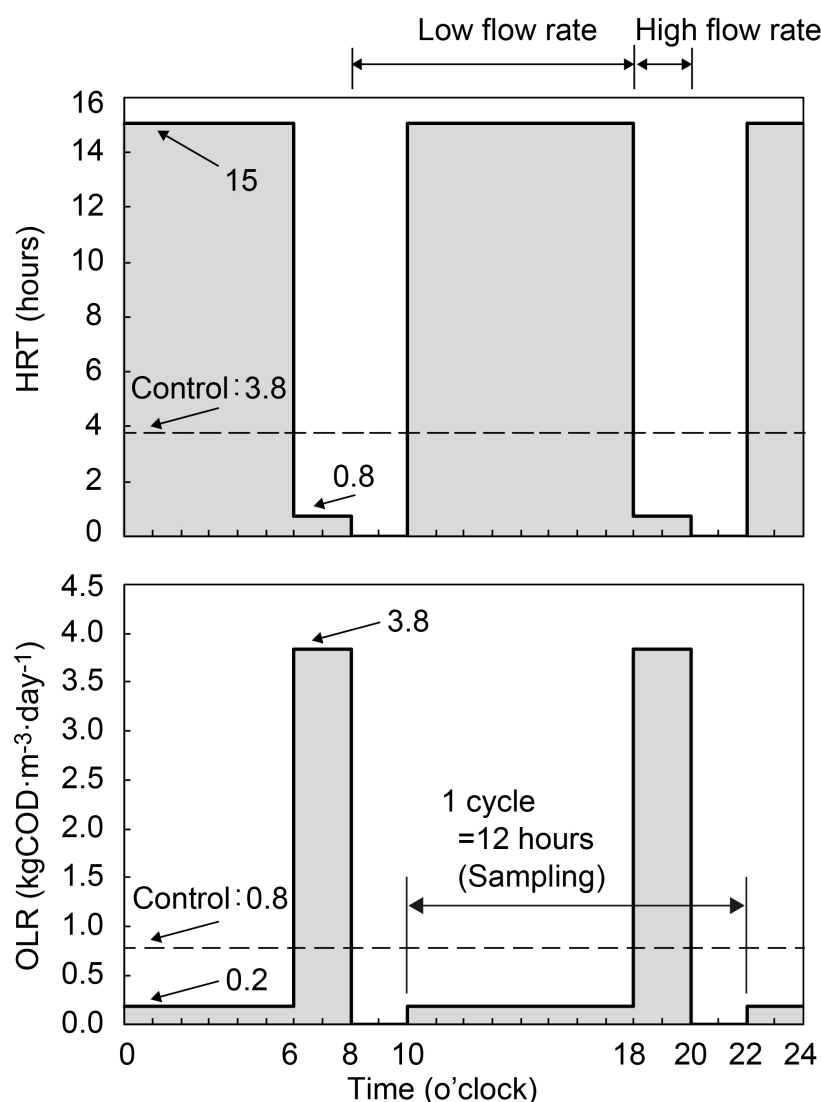


Fig.5-2 Operation condition of flow rate fluctuation both of HRT and OLR.

5.2.3 水質分析方法

一定負荷運転時の水質分析用試料(流入水および処理水)はスポットサンプリングした。負荷変動運転時の処理水についてはコンポジットサンプリングした(Fig.5-2、sampling、処理水の全量を4℃で冷却しながら12時間かけてサンプリングした)。pH、溶存酸素(DO)、酸化還元電位(ORP)をpH計(D-52、Horiba、Kyoto、Japan)、DO計(DO-31P、TOA DKK、Tokyo、Japan)、ORP計(TPX-90i、TOKO、Saitama、Japan)を使用して分析した。TSSおよびVSSの測定にはガラス繊維ろ紙(0.4 μm、GB140、Advantec、Tokyo、Japan)を使用した。TSS濃度は105℃で乾燥させたもの、VSS濃度は500℃で強熱減量したものとして、ろ紙が燃焼して減量したものはブランクで補正した。アンモニア性窒素、亜硝酸性窒素、硝酸性窒素(NH₄⁺-N、NO₂⁻-N、NO₃⁻-N)の分析には高速イオンクロマトグラフィー(LC 20-ADsp、Shimadzu、Kyoto、Japan)を使用した。CODの分析には分光光度計(DR-3900、Hach、Loveland、CA、USA)を使用した。全窒素(T-N)の分析は、下水試験方法に参考し、ペルオキシ二硫酸カリウムと水酸化ナトリウムを用いて、全ての窒素化合物を硝酸性窒素に変換させた後、分光光度計(UVmini-1240、Shimadzu)を使用して、硝酸性窒素(全窒素)を測定した。T-N、NH₄⁺-N、NO₂⁻-N、NO₃⁻-N濃度が既知の試料から検量線を作成し、それを用いて、分析した試料の各濃度を算出した。その他の分析項目に関しては下水試験方法に準拠して行った。

5.2.4 保持汚泥性状分析(汚泥濃度、内生呼吸活性、検鏡)

保持汚泥性状評価のための汚泥試料は、DHS反応器最上部から4、10、17個目のスポンジ担体(8個に分割したスポンジ担体のうち上部4つ)を、10 mMリン酸緩衝液(K₂HPO₄: 4 mM、KH₂PO₄: 6 mM)を使用して、圧搾する事で得た。この時、スポンジ担体から汚泥がなくなるまで(白くなるまで)操作を繰り返した。採取した汚泥試料は、前述した水質分析のTSSおよびVSSを測定する方法と同じ方法で保持汚泥濃度を分析した。このとき、保持汚泥濃度は圧搾したスポンジ担体の容積基準に換算した(gTSS・L⁻¹-sponge、gVSS・L⁻¹-sponge)。スポンジ担体は圧搾終了後、元の場所に戻し、上下を入れ替えた。

圧搾した後の汚泥試料を用いて内生呼吸活性試験を行った。汚泥試料は前述の10 mMリン酸緩衝液を用いて、遠心分離(15,000 rpmで15分間の遠心分離(20℃))を3回繰り返すことで基質洗浄を行った。その後、汚泥試料は6時間以上曝気を行うことで、持ち込みの有機物を消費させた。事前の検討で汚泥試料を曝気して6時間後にCOD濃度の変化が殆ど無くなったため、曝気時間を6時間に設定した。その後、活性試験開始前に、再度遠心分離を行い、10 mMリン酸緩衝液を用いて所定の汚泥濃度に調整した汚泥試料を、100 mlのフラン瓶に移し、溶存酸素濃度を定期的に測定した。活性試験時の温度は、DHS反応器の運転温度と同じ20±3℃に調整した。単位時間あたりの溶存酸素消費量及びフラン瓶中の汚泥濃度から汚泥単位重量当たりの内生呼吸活性値を算出した。

さらに、圧搾した後の汚泥試料はホモジナイザーにより分散処理した後に検鏡した。この時、汚泥試料25 μLをスライドガラス上に滴下して、カバーガラス全体を観察することで、原生動物、後生動物の種の同定と数の計測を行った(n=6回)。スポンジ担体容積1 mL中に生息する原生動物(アメーバを除く)と後生動物の総和を真核生物の細胞密度とした。また、保持汚泥1 mgTSS中に生息する原生動物(アメーバを除く)と後生動物の総和を真核生物の細胞密度とした。なお、真菌(カビ、酵母)に関しては、形態学的な特徴に基づいた同定や定量的な解析が難しいため、本論文の検鏡による解析では対象外とした。

5.3 実験結果および考察

5.3.1 一定負荷運転および負荷変動運転による連続処理実験

Table 5-2 に水質分析結果の平均値を示す。一定負荷運転は 43 日間継続し、7 回の水質分析を行った (Table 5-2、control)。負荷変動運転は 29 日間継続し、6 回の水質分析を行った (Table 5-2、flow rate fluctuation)。負荷変動運転時の処理水の水温、ORP、DO に関しては、4°C で冷却しながら 12 時間かけてサンプリングを行ったため、分析結果を記載していない (Table 5-2)。なお、本研究で実施した負荷変動運転では、流速上昇による短絡流の発生は目視で確認した限り発生しておらず、また、人工排水を供給しない時間帯において、保持汚泥が乾燥するようなことも確認されなかった。

それぞれの運転期間において、流入水の水質に大きな差異はなく、概ね COD 濃度 $120 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、T-N 濃度 $23 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度 $10 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ であった。処理水の水質は、一定負荷運転と負荷変動運転で大きな差が生じた。一定負荷運転時の処理水の水質は、COD 濃度 $7.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (COD 除去率 93%)、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度 $2.2 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去率 79%) であった。その一方で、負荷変動運転時の処理水の水質は、COD 濃度 $21.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (COD 除去率 82%)、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度 $7.9 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去率 20%) であった。また、処理水の TSS 濃度は $9.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ に上昇していた (一定負荷運転では $4.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ であった)。これは HRT の能動的変化 (流量の増減) で設定負荷の調整したことによって、負荷変動運転の高負荷時にスポンジ担体を通過する水の線流速が増加し、スポンジ担体に保持された汚泥が剥離しやすくなったためだと考えられた。このような HRT 短縮による処理水の TSS 濃度の上昇は、既往の知見 (タイ、バンコクの低濃度下水を直接処理する DHS 反応器に関する論文: Yoochatchaval *et al.*, 2014) においても確認されている現象である。以上の結果より、負荷変動運転 (HRT の能動的な増加や減少) は、特に TSS 除去および $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去に影響を及ぼす事が明らかになった。

Table 5-2 Summary of the water quality of influent and effluent.

	Control (n=7, 43days)				Flow rate fluctuation (n=6, 29days)			
	Influent		Effluent		Influent		Effluent	
	Average	Standard deviation	Average	Standard deviation	Average	Standard deviation	Average	Standard deviation
Temperature (°C)	14.8	1.0	19.6	1.3	13.6	0.9	---	---
pH (-)	7.3	0.1	7.1	0.1	7.3	0.2	7.4	0.2
ORP (mV)	-77.1	52.9	166.1	35.6	-12.4	99.7	---	---
DO ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	1.7	0.9	5.2	0.4	2.3	2.2	---	---
TSS ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	---	---	4.6	1.2	---	---	9.3	3.6
VSS ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	---	---	3.6	1.0	---	---	6.5	2.1
Total COD ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	117.8	19.2	7.9	3.1	121.7	18.4	21.9	3.5
Soluble COD ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	---	---	5.4	3.0	---	---	15.0	4.1
T-N ($\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$)	22.9	1.1	14.4	1.2	23.3	1.4	15.5	1.4
$\text{NH}_4^+\text{-N}$ ($\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$)	10.4	1.6	2.2	1.1	9.9	1.8	7.9	1.1
$\text{NO}_2^-\text{-N}$ ($\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.0	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1
$\text{NO}_3^-\text{-N}$ ($\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.0	0.0	10.3	0.6	0.1	0.2	5.4	0.6

* ---; No data.

5.3.2 DHS 反応器の流下方向における水質プロフィール

Fig.5-3 に DHS 反応器の排水流下方向における COD 濃度、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度、DO 濃度、ORP のプロフィールを示す。一定負荷運転では、排水流下長 50 cm までに殆どの有機物分解 (COD 除去率 93%) が行われ、排水流下長 50 cm 以降では硝化反応 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去) が生じていた (Fig.5-3, control)。その一方で、負荷変動運転では、最終処理水であっても COD 濃度は $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ であり (COD 除去率 77%)、一定負荷運転時よりも水質は悪くなった (Fig.5-3, flow rate fluctuation)。また、排水流下方向で、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度は殆ど減少しておらず硝化反応は全く生じていなかった (Fig.5-3, flow rate fluctuation)。この時、溶存酸素濃度プロフィールは流入から流出まで $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上確保されていることから (Fig.5-3, flow rate fluctuation)、処理性能の悪化は溶存酸素供給の律速によるものではないと考えられる。その一方で、ORP のプロフィールは、流入から流出まで負の値を示し最大でも 0 mV 付近であったことから (Fig.5-3, flow rate fluctuation)、DHS 反応器全体で嫌気的環境 (還元雰囲気) にあったと推測され、硝化反応に適した環境ではなかったと考えられた。ここで、アンモニア酸化細菌と従属栄養細菌は酸素の競合関係にあり、C/N 比が高くなると従属栄養細菌が優占する報告がある (佐藤ら, 1999)。そのため、負荷変動運転の高負荷条件 ($\text{OLR } 3.8 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$) では、DHS 反応器下部の COD 濃度が高まったため (Fig.5-3, flow rate fluctuation)、C/N 比が下がらず、COD 除去が優占的に進行することで、硝化反応が殆ど進行しなかったのだと考えられた。

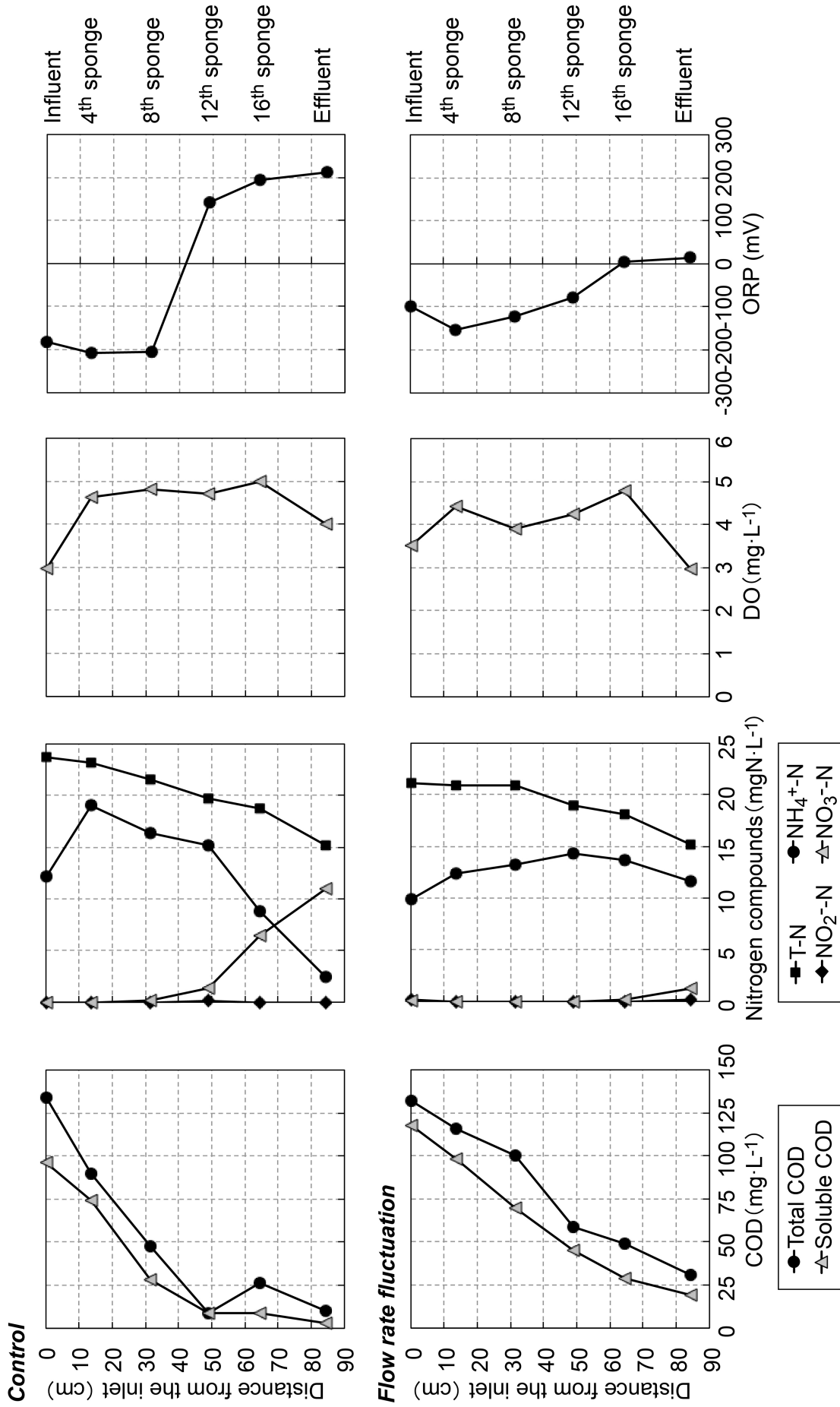


Fig.5-3 Profile of water quality along flow length of the DHS reactor.

5.3.3 DHS 反応器の流下方向における保持汚泥性状

Fig.5-4 に DHS 反応器の流下方向における保持汚泥濃度を示す。一定負荷運転から負荷変動運転に切り替えたことで、保持汚泥濃度のプロフィールに差が生じた。一定負荷運転時 (Fig.5-4, control) の保持汚泥濃度は 53、57、32 $\text{gTSS}\cdot\text{L}^{-1}\text{-sponge}$ (36、32、18 $\text{gVSS}^{-1}\cdot\text{L-sponge}$) であり、DHS 反応器上部と中部が同程度であり、下部が最も低かった。これは、水質プロフィールの結果から、DHS 反応器の上部から中部にかけて、微生物反応 (有機物分解および硝化反応) が生じていたためだと考えられた。その一方で、負荷変動運転時 (Fig.5-4, flow rate fluctuation) の保持汚泥濃度は 29、52、46 $\text{gTSS}\cdot\text{L}^{-1}\text{-sponge}$ (22、30、27 $\text{gVSS}\cdot\text{L}^{-1}\text{-sponge}$) であり、DHS 反応器の上部が最も低く、中部と下部が同程度であった。DHS 反応器の上部の保持汚泥濃度が低くなった理由は、HRT 短縮 (HRT 0.8 時間、高負荷時、Fig.5-2) によって、保持汚泥の剥離が促進され、DHS 反応器上部で剥離した汚泥が中部下部に移動したためだと考えられた。また、保持汚泥濃度のプロフィールから算出した総汚泥保持量は、一定負荷運転時は 26.6 gTSS (16.1 gVSS)、負荷変動運転時は 23.6 gTSS (14.6 gVSS) であり、総汚泥保持量は大きく減少していなかった。このとき、DHS 反応器下部においても捕捉しきれなかった汚泥が TSS として流出したため (Table 5-2、水質分析結果において負荷変動運転時の処理水の TSS 濃度は、一定流量運転時の 2 倍程度に上昇していた)、わずかに総汚泥保持量が減少したのだと考えられた。

Fig.5-5 に DHS 保持汚泥の流下方向の内生呼吸活性値を示す。一定負荷運転時の内生呼吸活性は、0.47、0.16、0.05 $\text{gO}_2\cdot\text{gVSS}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) であり、DHS 反応器の上部から下部にかけて低下する傾向にあった。その一方で、負荷変動運転時の内生呼吸活性は、DHS 反応器上部で 0.32 $\text{gO}_2\cdot\text{gVSS}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) と最も高く、中部と下部では 0.05 $\text{gO}_2\cdot\text{gVSS}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) と低い活性値であった。水質プロフィールの結果から、DHS 反応器下部にまで微生物反応が生じていることが確認されたため、それに対応して保持汚泥の内生呼吸活性値も増加していると予想されたが、負荷変動運転時の DHS 反応器中部と下部の内生呼吸活性値は、一定負荷運転時の内生呼吸活性値よりも減少していた。このように DHS 保持汚泥の内生呼吸活性値が低かった理由は、負荷変動運転へと切り替えることで COD 分解量が低下したため、および、負荷変動運転時の低負荷 (OLR 約 0.2 $\text{kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$) の継続時間を 24 時間中 20 時間に設定したためと考えられた。

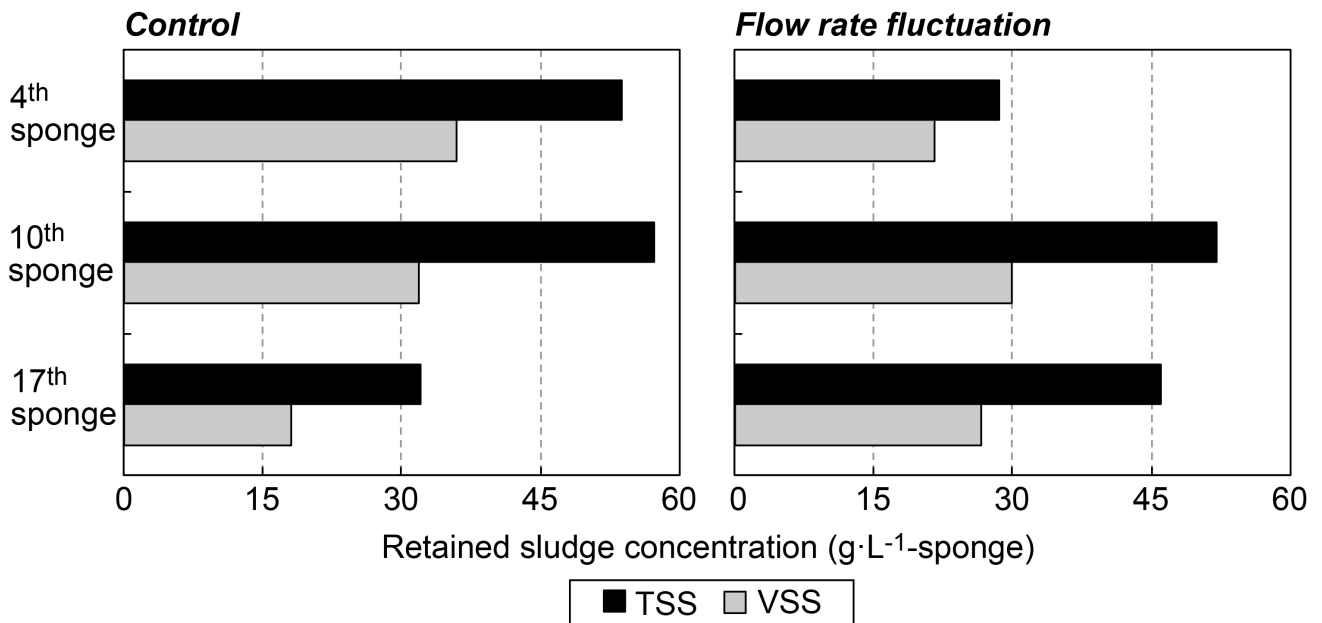


Fig.5-4 Profile of retained sludge concentration along flow length of the DHS reactor.

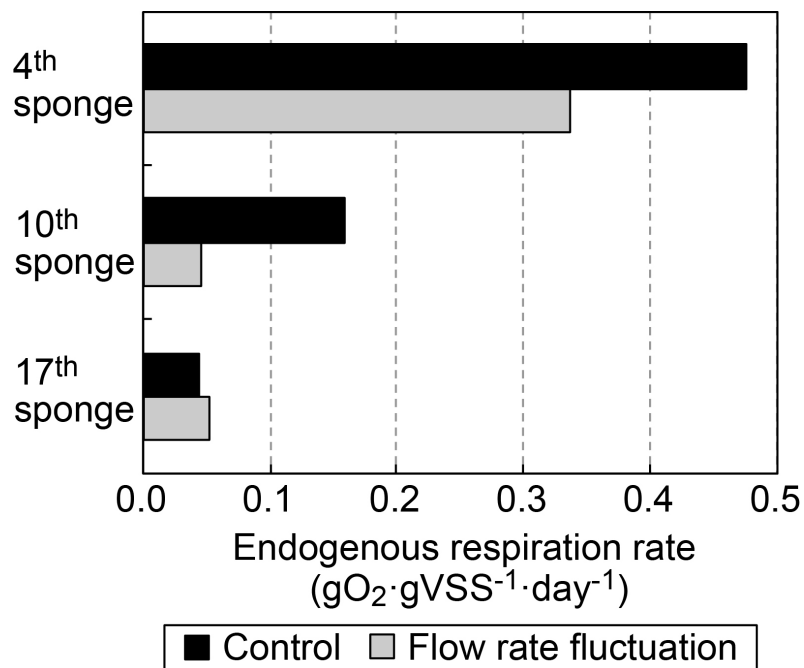


Fig.5-5 Profile of endogenous respiration rates both of control and flow rate fluctuation.

5.3.4 DHS 反応器の流下方向における真核生物の細胞密度

保持汚泥中の真核生物(アメーバを除く)の細胞密度を Fig.5-6 に示す。真核生物の群集構造を Fig.S5-1、真核生物の分類群毎の細胞密度を Fig.S5-2 に示す。負荷変動後の DHS 反応器の上部において、Sessile ciliate の存在割合が急激に増加しているが、それ以外は大きな差は無かった。真核生物の細胞密度は、一定負荷運転時では、DHS 反応器中部で最も高くなる傾向にあった。DHS 反応器上部において真核生物の細胞密度が低かった理由は、流入 COD 濃度が高く、嫌気的な環境であったためだと考えられた(Dubber and Gray, 2011)。その一方で、真核生物の細胞密度は、負荷変動運転時では、DHS 反応器中部で最も高くなる傾向に変わりはなかったが、下部においても中部と同程度の値を示していた。特に、負荷変動運転時の DHS 反応器下部の真核生物の細胞密度は、一定負荷運転時と比較して3倍高くなっていた(DHS 反応器中部では2倍高くなっていた)。これは、能動的な負荷変動を与える事で、スポンジ担体の保持汚泥濃度のプロファイルに変化が生じ(Fig.5-4、DHS 反応器下部の保持汚泥濃度が増加)、処理水の TSS 濃度が増加していたことから(Table 5-1、処理水の TSS 濃度:一定流量運転時 $4.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、負荷変動運転時 $9.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、スポンジ担体から剥離した汚泥もしくは分散状の原核生物を捕食する真核生物の細胞密度が増加したと考えられた。

また、真核生物の細胞密度と保持汚泥濃度、また保持汚泥の内生呼吸活性をプロットしたところ、両者に関係性は見られなかった(データ非掲載)。標準活性汚泥のような完全混合型の反応器では、有機物汚泥負荷と真核生物の細胞密度に正の相関関係があることが報告されているが、DHS 反応器のような押出流れ型の反応器では相関関係にないことが分かった。このような現象になる要因を正確に解析していないが、第 4 章で述べたように、真核生物が捕食可能な大きさの細菌の多くがスポンジ担体の空隙に補足されることが原因ではないかと考えている。そのため、DHS 反応器において真核生物群集を高密度に保持するためには、水理学的滞留時間の能動的な変動により、スポンジ担体から保持汚泥の剥離(真核生物群集の基質の供給)を促進させる必要があると言える。

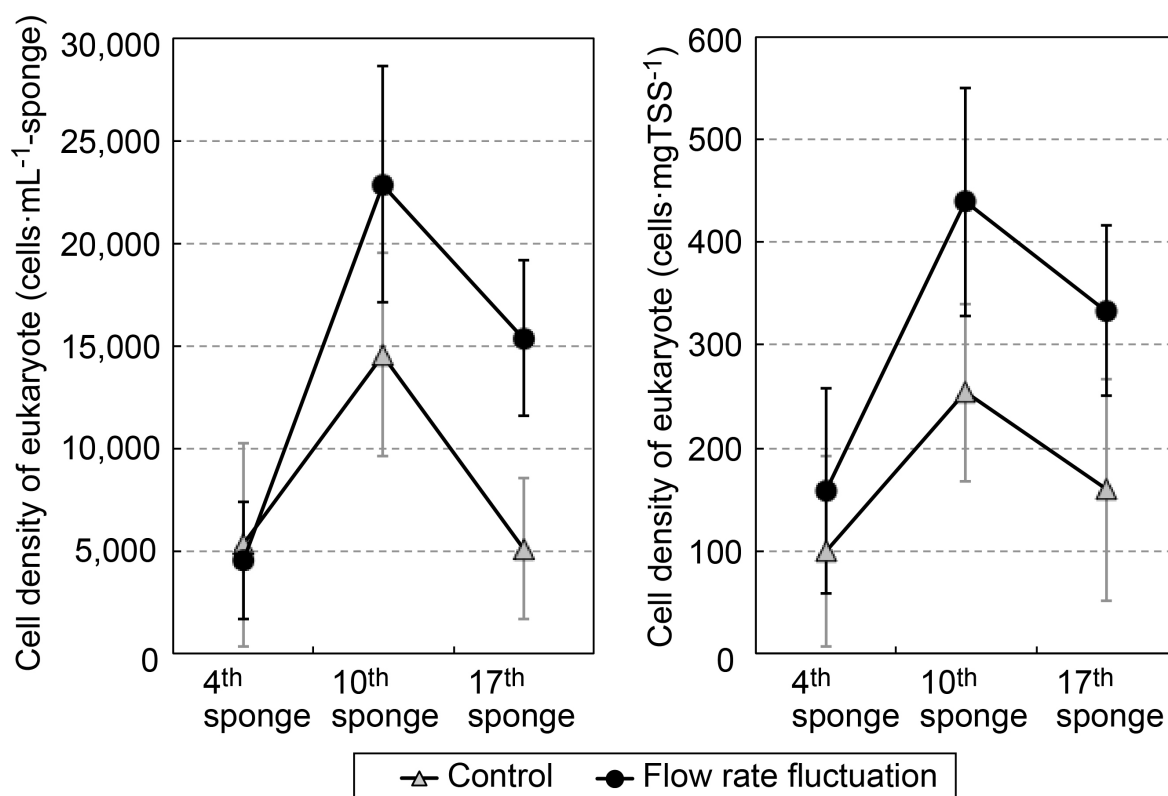


Fig.5-6 Cell density of total eukaryote (without amoebzoa) both of control and flow rate fluctuation.

(The error bars indicate standard deviations)

5.3.5 DHS 反応器における保持汚泥の物質収支

29 日間の負荷変動運転期間中に実施した水質分析結果から算出した (n=6 回)、DHS 反応器における保持汚泥の物質収支を Fig.5-7 に示す。負荷変動運転の前後で保持汚泥量は 1.47 gVSS 減少していた (5.3.3 参照)。その一方で、処理水の VSS として流出する汚泥量 (スポンジ担体から物理的に剥離した保持汚泥量) は、29 日間の合計で、0.71 gVSS であり、負荷変動運転を実施することにより実際に減少した保持汚泥量 1.47 gVSS の 47%であった。この結果は、負荷変動運転により、スポンジ担体から保持汚泥の剥離が促進されるが、それによる保持汚泥量の減容効果は 48%であり、残りの 52%は他の要因が作用していることを示している。そこで、これらの要因を特定するために、COD 分解による保持汚泥増殖および保持汚泥の内生呼吸活性について、2 つの運転条件の間で次に示すような考察を行った。

まず、一定負荷運転時および負荷変動運転時における、流入 COD 量から流出 COD 量を差し引いた COD 分解量 (単位: mgCOD·day⁻¹) を比較すると、一定負荷運転条件において 393 ± 75 mgCOD·day⁻¹、負荷変動運転条件において 357 ± 63 mgCOD·day⁻¹ であり、負荷変動運転を実施することにより 9.1%低下していた。その一方で、保持汚泥の内生呼吸活性値を比較すると、一定負荷運転条件において、0.47、0.16、0.05 gO₂·gVSS⁻¹·day⁻¹ (3 つの平均値は 0.23 gO₂·gVSS⁻¹·day⁻¹) であり、負荷変動運転条件において、0.32、0.05、0.05 gO₂·gVSS⁻¹·day⁻¹ (3 つの平均値は 0.14 gO₂·gVSS⁻¹·day⁻¹) であり、負荷変動運転を実施することにより平均値は 39%低下していた。この結果は、潜在的な保持汚泥の自己分解ポテンシャル (内生呼吸により自己分解するポテンシャル) が低下したことを意味している。このように、

COD 分解量は大きく減少していないのに対し(9%減)、内生呼吸活性は大きく減少していたことから(39%減)、負荷変動運転期間中は、一定負荷運転期間中と比較して、保持汚泥量は増加する傾向にあると推測された。そのため、他に保持汚泥減容化に関して考えられる要因の 1 つとして、保持汚泥中における真核生物の細胞密度の増加(高密度化)が推定された。これは、保持汚泥中において真核生物の高密度化および多様化が進むと、余剰汚泥発生量が減少する報告があるためである(須藤、1978)。しかしながら、未だ定量的な解析は実施できていないため、真核生物の有無によって保持汚泥量がどの程度にまで減少するのかを今後検証する必要がある。

なお、一定負荷運転条件および負荷変動運転条件における有機物負荷の平均値を比較すると、一定負荷運転条件の有機物負荷 $0.75 \pm 0.1 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ 、負荷変動運転条件の有機物負荷 $0.77 \pm 0.1 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ であり、2 つの運転条件の間で大きな差異はなく、負荷変動運転により確認された影響は人工排水の供給方法の違いによるものと判断することができた。また、プロフィール試験時の水質分析結果から算出した、一定負荷運転条件および負荷変動運転条件における有機物負荷および有機物汚泥負荷は、一定負荷運転条件の有機物負荷 $0.85 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ 、有機物汚泥負荷 $0.03 \text{ kgCOD} \cdot \text{kgVSS}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ 、負荷変動運転条件の有機物負荷 $0.84 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ 、有機物汚泥負荷 $0.03 \text{ kgCOD} \cdot \text{kgVSS}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ であり、前述のルーティーン分析結果と同様に、2 つの運転条件の間で大きな差異はなかったことを確認した。

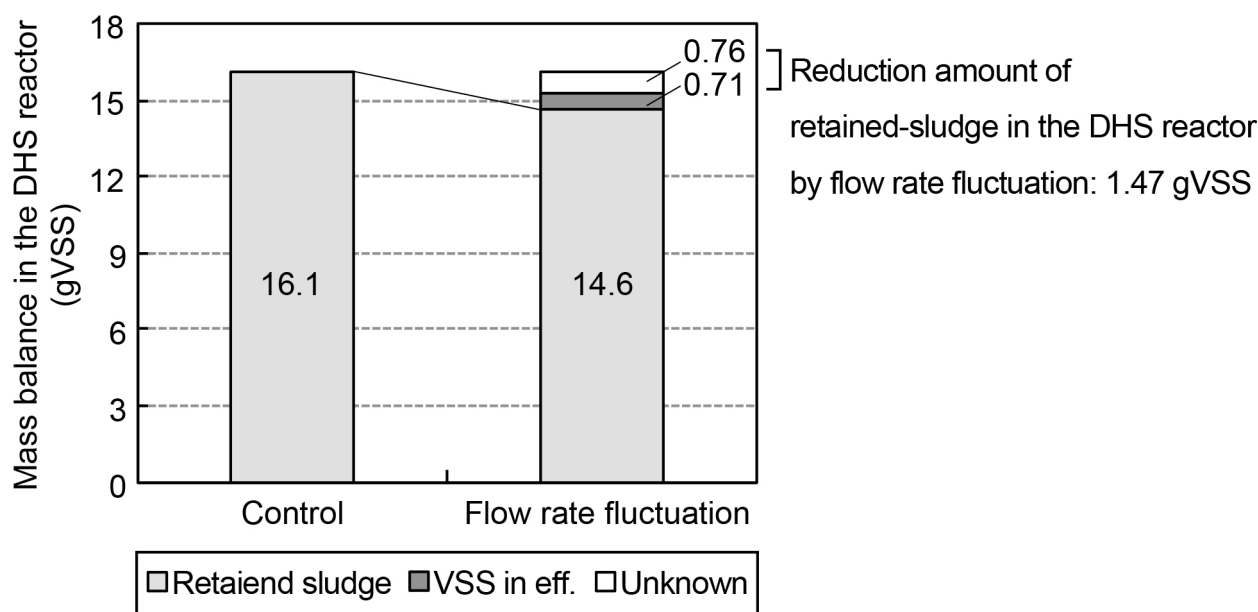


Fig.5-7 Mass balance in the DHS reactor during flow rate fluctuation.

5.4 小括

本章では、1 日の中で数倍に変動する有機物負荷に対する真核生物群集の挙動を把握するために、HRT の能動的な変動(負荷変動運転)が、DHS 反応器の真核生物群集構造、処理特性、保持汚泥性状(汚泥濃度、内生呼吸活性)に与える影響について解析を行った。その結果、以下の知見が得られた。

1. 高負荷と低負荷を交互に繰り返す負荷変動運転を適用したところ、スポンジ担体を通過する線流速の増加により、スポンジ担体から保持汚泥剥離が促進されるとともに、それらを捕食する真核生物の細胞密度が 2-3 倍に増加していたことを確認することができた。これらの結果から、DHS 反応器における余剰汚泥削減に寄与すると推定される真核生物の高密度化を目的とした制御手法として、HRT の能動的な変化による負荷変動運転が有効であることを示すことができた。
2. 負荷変動運転(最大負荷比 5 倍)を適用したところ、処理水の水質は著しく悪化した。具体的には、処理水の TSS 濃度および $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度が大幅に上昇していた。これは、一時的に、スポンジ担体を通過する線流速が増加するだけでなく、高有機物負荷条件 ($3.8 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$) になることから、流下方向における C/N 比が下がらず、それにより硝化細菌は従属栄養細菌との溶存酸素利用に関する競合に負けたためだと考えられた。そのため、負荷変動が生じやすい下水を、DHS 反応器にて処理する場合、良好な処理水質を維持するためには、最大負荷比が 5 倍以内になるように設計する必要があることが分かった。
3. 負荷変動運転(最大負荷比 5 倍)は、保持汚泥の汚泥濃度や内生呼吸活性に影響を与えることがわかった。具体的には、負荷変動を与えることで、スポンジ担体から保持汚泥の剥離が促され、保持汚泥濃度の分布傾向が変化していた(DHS 反応器上部の保持汚泥濃度が減少し、下部の保持汚泥濃度が増加した)。また、保持汚泥の内生呼吸活性は負荷変動運転を行うことで低下する傾向にあった。これは、負荷変動運転により COD 分解量が低下したため、および、低負荷で運転する時間を長く設定したためだと考えられた(24 時間中 20 時間、低負荷で運転)。

参考文献

- Dubber D and Gray NF (2011) The effect of anoxia and anaerobia on ciliate community in biological nutrient removal systems using laboratory-scale sequencing batch reactors (SBRs), *Water Research* 45: 2213-2226.
- Onodera T, Yoochatchaval W, Sumino H, Mizuochi M, Okadera T, Fujita T, Banjongproo P, and Syutsubo K (2014) Pilot-scale experiment of down-flow hanging sponge for direct treatment of low-strength municipal wastewater in Bangkok, Thailand. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 37 (11): 2281-2287.
- Syutsubo K, Sinthurat N, Ohashi A, and Harada H: Population dynamics of anaerobic microbial consortia in thermophilic granular sludge in response to feed composition change, *Water science and technology* 43 (1): 59-66.
- Yoochatchaval W, Onodera T, Sumino H, Yamaguchi T, Mizuochi M, Okadera T, and Syutsubo K (2014) Development of a down-flow hanging sponge reactor for the treatment of low-strength sewage. *Water Science and Technology* 70 (4): 656-663.
- 大久保卓也、下ヶ橋雅樹、大塚暢之、岡田光正、村上昭彦: 嫌気・好気炉床法の処理性能に及ぼす流量変動および懸濁物質の影響、*水質汚濁研究*、14 (4): 233-242、1991.
- 小越眞佐司: 水環境改善からみた個別処の水質の状況—浄化槽放流水排出先水路の水質調査結果—、*下水道協会誌*、47 (575): 44-45、2010.
- 佐藤久、岡部聡、渡辺義公: 微小電極および FISH 法を用いた生物膜内アンモニア酸化細菌菌体密度分布および活性分布に及ぼす流入基質 C/N 比の影響評価、*水環境学会誌*、22 (9): 763-769.
- 須藤隆一: 廃水の生物処理に出現する微小動物について(2)微小動物の役割、*日本農芸化学会誌* 52(3): 51-57.
- 砂庭崇之、高橋慎太郎、若原慎一郎、李玉友、原田秀樹: 浸漬型嫌気性膜分離法(SAMBR)を用いた人工下水の処理性能、*土木学会論文集 G(環境)*、68(7): III_409-III_417、2012.
- 滝沢智、高橋正宏、珠坪一晃: 生し尿受け入れ下水中の難分解性有機物除去に関する研究、*環境工学研究論文集*、29: 59-63、1992.

Supplementary materials

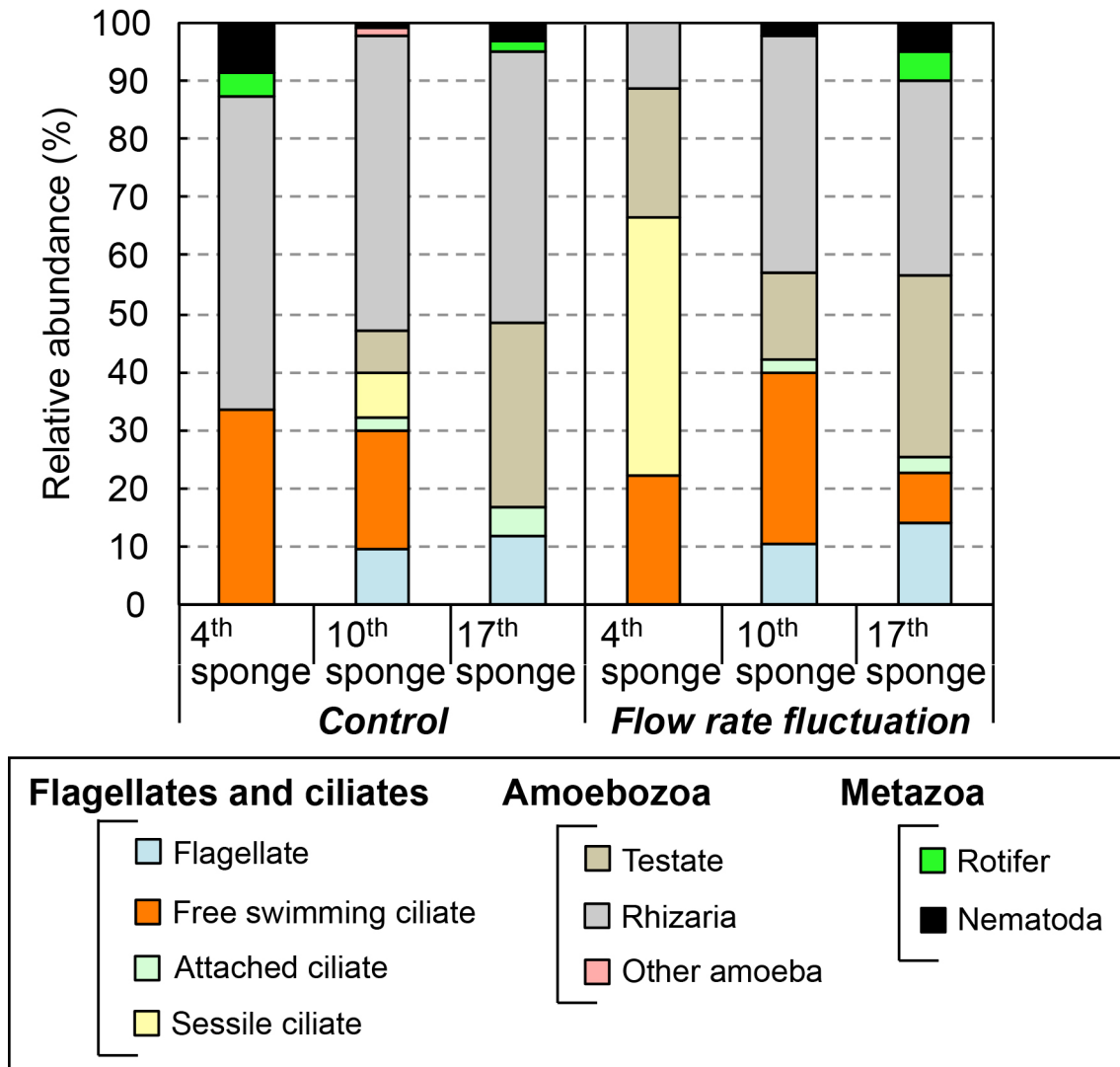


Fig.S5-1 Relative abundance of each eukaryotic cells both of control and flow rate fluctuation.

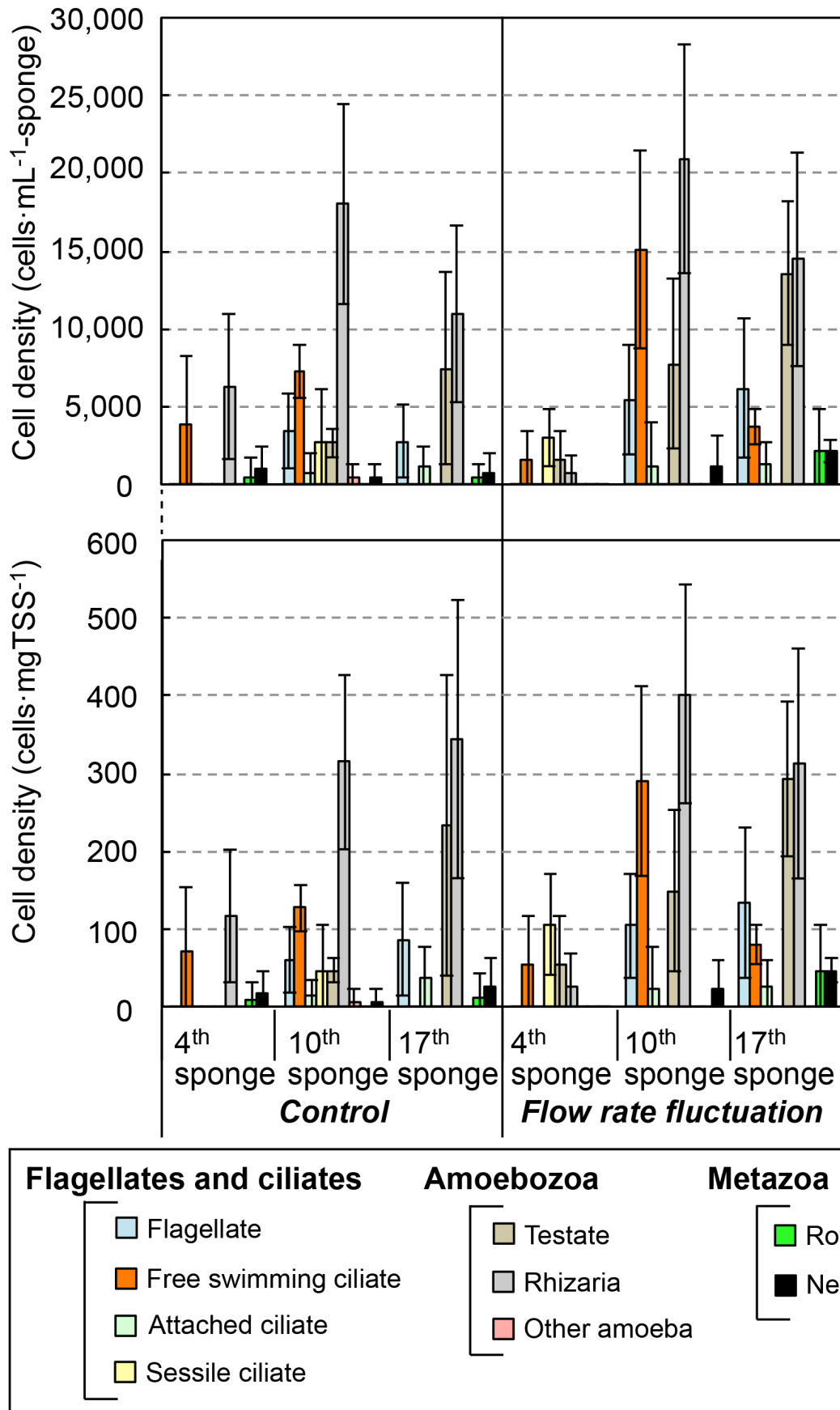


Fig.S5-2 Cell density of each eukaryotic cells both of control and flow rate fluctuation.

(The error bars indicate standard deviations)

第 6 章

バンコクに設置した実証規模 DHS 反応器による下水の連続処理実験および
真核生物群集構造解析

Submitted as:

Yuma Miyaoka, Yoochatchaval Wilasinee, Haruhiko Sumino, Pathan Banjongproo, Takashi Yamaguchi, Takashi Onodera, Tomohiro Okadera, Kazuaki Syutsubo (submitted) Evaluation of process performance of a down-flow hanging sponge for direct treatment of domestic wastewater in Bangkok, Thailand, *submitted to Journal of Environmental Science and Health, Part A*.

6.1 研究背景

バンコクでは大規模処理場が 8 施設(規模 30,000–350,000 $\text{m}^3\cdot\text{day}^{-1}$)、小規模処理場が 12 施設(規模 350–2,300 $\text{m}^3\cdot\text{day}^{-1}$)稼働しているが、下水道の普及率は 40%程度であり(Wilasinee *et al.*, 2014)、今後、都市化に伴う水環境汚染が深刻化することが予想される。日本のような下水道の整備は、経済的な制約や時間的な制約から現実的ではなく、即効的な水環境汚染対策には、大規模な土木工事(下水道への接続など)が不必要な分散型下水処理技術の適用が有効であると考えられる。現在、稼働中の大規模処理場に流入する下水は、BOD 濃度 12–60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度である(Tsuzuki *et al.*, 2013; Limphitakphong *et al.*, 2016)。下水の BOD 濃度が低い理由には、下水の収集方法が合流式であること、温暖な気候であり下水収集中に生分解が生じやすいこと、トイレトペーパーなどの固形物が入っていないこと、地下水などの不明水が流入することが挙げられる。その一方で、小規模処理場に流入する下水の BOD 濃度は 90–300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度である(事前に行った現地調査の結果)。このように小規模処理場における下水の有機物濃度が、大規模処理場よりも高い理由は、下水の収集方式が分流式であるためである。また、小規模処理場では、下水の有機物濃度や水量が大きく変動(=有機物負荷の変動)することが知られている(Boller, 1997)。そのため、分散型下水処理として適用する技術は、小規模処理場において問題となる有機物負荷の変動を許容可能でなければならないと言える。

このようななかで、バンコクの分散型下水処理技術として、DHS 反応器に着目した。DHS 反応器は、発展途上国の下水を処理する UASB 反応器の後段処理技術として開発され、これまでインドなどを中心に、その適用性評価が行われて来た経緯がある(Uemura and Harada, 2010; Okubo *et al.*, 2015; Okubo *et al.*, 2016)。また、バンコクの大規模処理場に流入する下水を、DHS 反応器を用いて直接処理した報告もある(Onodera *et al.*, 2014; Wilasinee *et al.*, 2014)。これらの報告では、BOD 濃度が約 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ の低濃度下水を対象としており、その処理特性、保持汚泥性状、電力消費量を解析・評価している。これらの知見から、DHS 反応器単独によるシステムは、バンコクの分散型下水処理技術として適用できる可能性を十分に有していると考えられる。しかしながら、小規模処理場に流入する下水(BOD 濃度 90–300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度)を対象として、下水処理 DHS 反応器の処理特性に関する知見は無い。また、有機物負荷の変動が、DHS 反応器の下水処理特性や保持汚泥性状に与える影響についても知見は無い。そのため、現地の小規模処理場に設置した実証実験 DHS 反応器を用いて、下水の連続処理実験を行い、その下水処理特性を解析・評価することは、分散型下水処理技術としての適用性を評価するうえで非常に意義がある。

DHS 反応器の特徴として、余剰汚泥の発生量が、標準活性汚泥法よりも少ないことが挙げられる(Tandukar *et al.*, 2007)。この余剰汚泥抑制には、有機物汚泥負荷(food to microorganism:F/M)を低く維持可能であることに加え、捕食機能を持つ真核生物の細胞密度が高いことも要因であると推測されている(Onodera *et al.*, 2013)。第 4 章の結果から、分子生物学的手法に基づいた真核生物群集構造解析が、DHS 反応器における真核生物の機能解析の一助になることを示すことができたが、実証規模の DHS 反応器における真核生物群集構造解析を行った報告はほとんどない(検鏡による真核生物の群集構造解析(Onodera *et al.*, 2013)および原核生物の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく群集構造解析(Kubota *et al.*, 2014)を実施した報告はある)。以上より、実証規模 DHS 反応器における真核生物の機能を理解するうえで、保持汚泥中に存在する真核生物群集に関して、その群集構造を詳細に解析する必要があると言える(例えば、18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析など)。

本章では、1 日の中で流入下水の水質の変動(有機物負荷の変動)が生じやすい条件での真核生物群集構造の特徴を把握するために、実証規模 DHS 反応器を用いて、BOD 濃度 60–90 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度の下水の直接処理を行い、

真核生物群集構造と下水処理特性(1.一定負荷運転期間中の処理特性、2.負荷変動期間中の処理特性)を解析・評価した。このとき、真核生物群集の機能を推定するうえで、その一助となるような知見収集のため、保持汚泥の真核生物群集構造を、真核生物の18S RNA 遺伝子配列に基づくクローン解析によって明らかにした。

6.2 実験方法

6.2.1 Bang Na処理場(バンコク、タイ)

DHS 反応器は、コミュニティプラントの下水を処理している Bang Na 処理場(バンコク、タイ)に設置した。このコミュニティプラントは設計人口約 8,600 人であり、 $1,000 \text{ m}^3 \cdot \text{day}^{-1}$ の下水を処理している(設計処理量は $1,200 \text{ m}^3 \cdot \text{day}^{-1}$)。この小規模処理場における下水の収集方法は分流式であり、不足している下水量を補うために、近くを流れているカナルの水を流入させている。

6.2.2 DHS反応器

Fig.6-1に本章で使用したDHS反応器を示す。2つのDHS反応器から構成されている(1st DHS反応器および2nd DHS反応器)。それぞれのDHS反応器は6つのセグメントがあり(1st DHS反応器:A1-A6、2nd DHS反応器:B1-B6)、最下部に沈殿槽(32.5 L)がある。このセグメントは空気穴を設けており、そこから好気処理に必要な酸素を供給している。また、セグメントのなかには、担体容積が100.9 L(1st DHS反応器:50.47 L、2nd DHS反応器:50.47 L)となるように、スポンジ担体(直径3.3 cmおよび高さ3.3 cm)を無作為に300個充填した。このスポンジ担体には、圧密を防止するために、保護材としてポリエチレン製のネットリングを装着させた。また、既報で使用していた、あらかじめ汚泥が付着した状態のスポンジ担体(4°C保存)をそのまま使用した(Onodera *et al.*, 2014)。

Bang Na処理場のスクリーン通過後の下水を、ポンプを使って貯留槽に流入させた。この下水は貯留槽内での腐敗を防ぐために、1時間に1度オーバーフローさせて新鮮なものを入替えを行った。貯留槽の下水(流入水)はポンプを使用して、1st DHS反応器へと流入させた。このとき、流入水は散水器を通してDHS反応器に供給され、その後、重力によって下降し、沈殿槽を通して処理水(1st DHS処理水)として流出させた。供給下水は下降する間に、スポンジ担体に保持された汚泥と接触することで処理される機構になっている。1st DHS処理水はポンプを使って2nd DHS反応器へと流入させた。2nd DHS反応器から流出するものを最終処理水とした。

6.2.3 DHS反応器の運転条件

(a) 一定負荷運転

DHS反応器は温度調節を行わずに運転を行った(バンコクの年平均気温は30°C前後)。実験期間中の運転条件をTable 6-1に示す。実験期間はPhase-1、Phase-2、Phase-3の3つに分けており、それぞれ水理的滞留時間(HRT、スポンジ担体容積を基準に算出)およびBOD負荷が異なる。Phase-1のHRTは6時間に設定した(day 0からday 92まで)。このときの下水処理量は $403 \text{ L} \cdot \text{day}^{-1}$ に相当する。Phase-2およびPhase-3のHRTを3時間に設定した。このときの下水処理量は $806 \text{ L} \cdot \text{day}^{-1}$ に相当する。また、各Phaseにおける下水のBOD濃度はそれぞれ、78、60、86 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ であり、BOD負荷はそれぞれ、0.3、0.5、0.7 $\text{kgBOD} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{day}^{-1}$ に相当する(Table 6-1)。

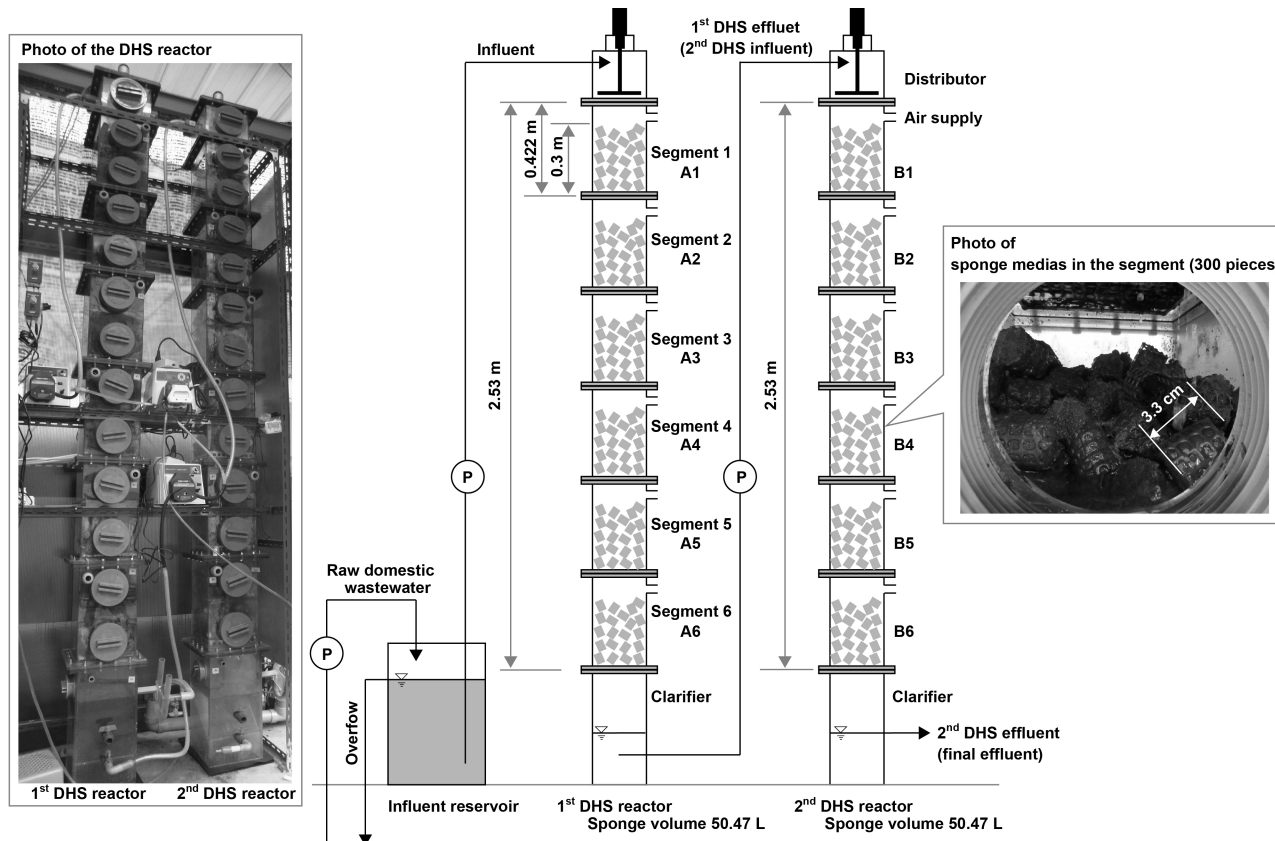


Fig.6-1 Schematic diagram of the DHS reactor in this study.

Table 6-1 Operation condition of the whole system regarding HRT, BOD loading and influent BOD.

	Phase-1	Phase-2	Phase-3
	92 days (day 0 - 92)	167 days (day 95 - 262)	259 days (day 290 - 549)
HRT (hours)	6.0	3.0	3.0
BOD loading ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$)	0.3 (0.1)	0.5 (0.1)	0.7 (0.3)
BOD loading ($\text{kg}\cdot\text{kgVSS}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$)	0.01 (0.01)	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)
BOD concentraion ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	78 (34)	60 (14)	86 (33)

BOD loading was based on total sponge volume.

The numbers in parentheses shows the standard deviation.

(b) HRTの能動的制御による負荷変動運転

一定負荷運転条件下(常に HRT 3 時間)における連続処理実験が終了した後、day 850 に負荷変動運転を実施した。負荷変動運転の概略を Fig.6-2 に示す。負荷変動運転は、HRT を能動的に変動させることで行い、高負荷および低負荷となる時間帯をつくった。それぞれの時間帯の HRT を 1.7 時間(処理量 $1,452 \text{ L}\cdot\text{day}^{-1}$)および 7 時間(処理量 $346 \text{ L}\cdot\text{day}^{-1}$)に設定した。一定負荷運転における負荷の比は、それぞれ 1.8 倍および 0.4 倍に設定した。なお、一定負荷運転時と負荷変動運転時において、1 日に処理する下水量の総和は変化しないように設計した(1 日の有機物負荷量の総和は変化しない)。負荷変動試験開始時(day 855–863)および負荷変動運転開始 2 ヶ月後(day 919–924)に、DHS 反応器における流下方向の水質プロファイル(高負荷および低負荷の両方の時間帯)および保持汚泥濃度プロファイルを解析した。加えて、高負荷時および低負荷時の水質を平均化するために、コンポジットサンプリングした試料(流入水、1st DHS 処理水、2nd DHS 処理水)についても水質分析を行い、処理性能の解析・評価を行った。

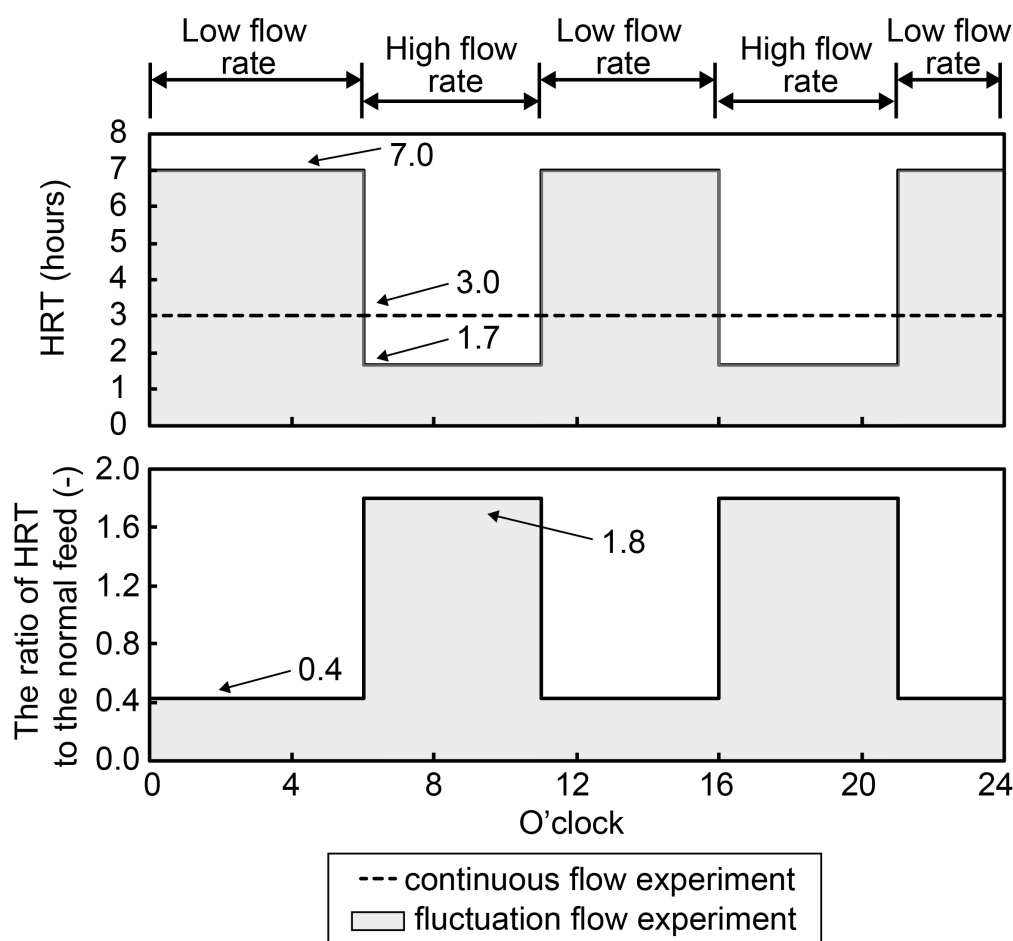


Fig.6-2 The HRT condition of flow rate fluctuation experiment.

6.2.4 DHS 反応器の流下方向における水質プロファイルおよび保持汚泥濃度プロファイル

DHS 反応器の流下長における水質変化を把握するために水質プロファイルを解析した。解析に供した水質試料は、DHS 反応器の流下長 0 m (A1)、0.8 m (A3)、1.6 m (A5)、2.4 m (B1)、3.2 m (B3)、4.0 m (B5)、4.8 m (final effluent) からスポットサンプリングした (Fig. 6-1)。それぞれの水質試料に関して、TSS、VSS、BOD、COD、T-N、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、

NO₃⁻-N を分析した。保持汚泥試料は、A1、A3、A5、B1、B3、B5 に充填したスポンジ担体から採取した。この時、各セグメントからスポンジ担体をランダムに 3–5 個採取し、イオン交換水もしくは 10 mM リン酸緩衝液 (K₂HPO₄: 4 mM、KH₂PO₄: 6 mM) を用いて、スポンジ担体を圧搾する事で得た。この時、スポンジ担体から汚泥がなくなるまで (白くなるまで) 操作を繰り返した。この採取した汚泥試料の total solid (TS) および volatile total solid (VTS) を測定した。

6.2.5 水質分析方法

DHS 反応器の処理性能は、流入水、1st DHS 処理水、2nd DHS 処理水を水質分析に供することで解析した。それぞれの試料は、流入水の日変動を抑えるためにコンポジットサンプリングした。pH、溶存酸素 (DO)、酸化還元電位 (ORP) は、pH 計、DO 計、ORP 計を使用して現場で分析した。TSS および VSS の測定にはガラス繊維ろ紙 (0.4–1.2 μm) を使用した。COD、アンモニア性窒素 (NH₄⁺-N)、亜硝酸性窒素 (NO₂⁻-N)、硝酸性窒素 (NO₃⁻-N) の分析には分光光度計 (DR-3900、Hach、Loveland、CO、USA) を使用した。全窒素 (T-N) の分析は、下水試験方法に参考し、ペルオキシニ硫酸カリウムと水酸化ナトリウムを用いて全ての窒素化合物を硝酸性窒素に変換させた後、分光光度計 (DR-3900、Hach) を使用して、硝酸性窒素 (全窒素) を算出した。

6.2.6 余剰汚泥発生量の算出方法

本章では、2nd DHS 反応器の沈殿槽に蓄積する汚泥を余剰汚泥と定義した。沈殿槽から引き抜いた汚泥試料の TS および VTS を測定し、次式を用いて DHS 反応器における余剰汚泥発生量を算出した。

$$\text{余剰汚泥発生量} = (V \times X) / ((Q \times t)(C_{in} - C_{eff}))$$

ここで、 V は沈殿槽の容量 (L)、 X は余剰汚泥の汚泥濃度 (gTS·L⁻¹)、 Q は沈殿槽に流入する水量 (L·day⁻¹)、 t は前回引き抜いてから今回引き抜くまでの日数 (day)、 C_{in} は流入水の全 COD および全 BOD 濃度 (g·L⁻¹)、 C_{eff} は 2nd DHS 処理水の全 COD および全 BOD 濃度 (g·L⁻¹) とした。

6.2.7 真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析

DHS 反応器の保持汚泥における真核生物の機能に関して、理解を深めるために、真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析を行った。クローン解析に用いた汚泥試料は 4 サンプルとした。汚泥試料からの DNA 抽出は、ISOIL for Beads Beating Kit (Nippon Gene Co. Ltd., Tokyo, Japan) に付属のプロトコールを参考に行った。標的とする遺伝子領域 (18S rRNA 遺伝子のほぼ全長である 1,800 塩基) の増幅は、EukA (5'- AAC CTg gTT gAT CCT gCC AgT -3') と EukB (5'- TgA TCC TTC TgC Agg TTC ACC TAC -3') を用いて行った (Medlin *et al.*, 1988)。DNA ポリメラーゼには *Ex taq* DNA polymerase (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) を用いた。

EukA および EukB のプライマー対を使用した PCR は次の条件で行った。初期変性 95°C–10 分を行った後、95°C–1 分、58–56°C–1 分 (1–3 回 58°C、3–6 回 57°C、7–36 回 56°C)、72°C–2 分のサイクルを 36 回繰り返した後、最後に 72°C で 10 分間反応させた。なお PCR 時のサイクルは汚泥試料ごとに応じて変化させた。PCR 産物は Sephacryl S-300 HR (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England) を用いて精製した後 (プライマーの除去)、ライゲーション効率を

向上させるために PCR 産物の 3'末端に A を付加した。その後 PCR 産物は再度精製した。

PCR 産物は精製した後、TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, CA, USA) を使用してクローン化した。解析に供したクローンの塩基配列の決定は EukA、PSSU、Ek-555f (5'- AgT CTg gTg CCA gCA gCC gC -3') (López-García *et al.*, 2001)、EukB を用いて行った。塩基配列の決定は 3130 genetic analyser (Applied Biosystem Japan Ltd., Japan) により行った。得られた塩基配列は Sequencher™ DNA sequencing software (Hitachi, Tokyo, Japan) を使用して、97%の相同性を持つものを OTU として、1つのファイロタイプと定義した。また、キメラ配列を含む可能性があるものは解析から除外した。それぞれのファイロタイプの代表配列は BLASTN プログラムを使用して近縁種とその相同性を検索した (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。代表配列はアライメントを行った後、分子系統解析ソフトウェア ARB (データベース SILVA database, release 115) に取り入れた (Pruesse *et al.*, 2007)。得られた配列は、DDBJ/NCBI/EMBL database に登録した (Accession Numbers LC222849–LC222998)。

6.3 実験結果と考察

6.3.1 一定負荷運転による連続処理実験 (Phase-1、Phase-2、Phase-3)

各 Phase における流入水、1st DHS 処理水、2nd DHS 処理水の水質分析結果をまとめたものを Table 6-2 に示す。流入水の TSS 濃度、COD 濃度、BOD 濃度は明らかに低く、日本国内の下水と比較して 2-3 分の 1 程度であった。下水の濃度が低い理由は、年平均気温が安定して高く、下水収集中に生分解されやすい状況にあったこと(連続処理実験期間中の平均気温は 27-30°C)に加え、カナルの水の流入によって希釈されているためだと考えられた。さらに、これに加えて、管渠の閉塞防止のため、タイ国内ではトイレトーパーを流さないことが原因だと考えられた。その一方で、T-N 濃度や NH₄⁺-N 濃度はそれぞれ 46-55 mgN·L⁻¹、28-32 mgN·L⁻¹ であり、BOD 濃度などの有機物濃度と比較すると高濃度であった。

流入水、1st DHS 処理水、2nd DHS 処理水の水質分析結果の経日変化を Fig.6-3 に示す。また、DHS 反応器の流下方向における COD 濃度および NH₄⁺-N 濃度の変化を Fig.6-4 に示す。Phase-1 では、DHS 反応器は HRT 6 時間で運転を行った。HRT 6 時間で運転を行った Phase-1 では、OLR 0.6 kgCOD·m⁻³·day⁻¹ および 0.3 kgBOD·m⁻³·day⁻¹ の条件のもと、良好な処理性能を示した。最終処理水である 2nd DHS 処理水の TSS 濃度、COD 濃度、BOD 濃度、NH₄⁺-N 濃度は、それぞれ、2 mg·L⁻¹、20 mg·L⁻¹、6 mg·L⁻¹、0.3 mgN·L⁻¹ であり、流入水の濃度に対する除去率はそれぞれ 93、85、91、99% であった (Table 6-2)。また、流下方向における COD 濃度と NH₄⁺-N 濃度のプロファイルの結果から、1st DHS 反応器において、その殆どが除去されており、2nd DHS 反応器の有機物負荷および窒素負荷は低い状況にあった (Fig.6-4)。

Phase-2 では、HRT を 3 時間にまで短縮させて運転を行った。HRT 3 時間で運転を行った Phase-2 では、OLR 1.3 kgCOD·m⁻³·day⁻¹ および 0.5 kgBOD·m⁻³·day⁻¹ の条件においても、良好な処理性能を示した。2nd DHS 処理水の TSS 濃度、COD 濃度、BOD 濃度、NH₄⁺-N 濃度は、それぞれ、7 mg·L⁻¹、31 mg·L⁻¹、5 mg·L⁻¹、0.6 mgN·L⁻¹ であり、流入水の濃度に対する除去率はそれぞれ 81、80、91、98% であった。TSS 除去率が悪化していた理由は、HRT 短縮によりスポンジ担体を通過する水のせん断力が増加することで、スポンジ担体に保持された汚泥が一時的に剥離しやすい状況にあったためだと考えられた。また、1st DHS 処理水の NH₄⁺-N 濃度が 6.2 mgN·L⁻¹ にまで上昇していた。これは OLR 上昇により、1st DHS 反応器において、従属栄養細菌と硝化細菌との間で溶存酸素の競合が生じたためだと考えられた。

Phase-3 では、HRT は変化させなかったが、流入水の BOD 濃度の一時的な上昇により BOD 負荷が高くなった。具体的には、Phase-3 初期の平均 OLR は 1.14 kgBOD·m⁻³·day⁻¹ にまで上昇しており、2nd DHS 処理水の NH₄⁺-N 濃度は 5 mgN·L⁻¹ であるなど、NH₄⁺-N 処理性能(硝化性能)に悪影響を及ぼしていた。その後、Phase-3 の後半では、流入水の BOD 濃度は 60-80 mg·L⁻¹ 程度にまで減少し、平均 OLR は 0.57 kgBOD·m⁻³·day⁻¹ にまで低下した。この OLR が低下した期間は、最終処理水の NH₄⁺-N 濃度は 2 mgN·L⁻¹ にまで低下し、ある程度、硝化性能が改善された。Phase-3 全体で値を平均すると、OLR は 0.7 kgBOD·m⁻³·day⁻¹ となり、2nd DHS 処理水の TSS 濃度、COD 濃度、BOD 濃度、NH₄⁺-N 濃度は、それぞれ、3 mg·L⁻¹、29 mg·L⁻¹、7 mg·L⁻¹、1.8 mgN·L⁻¹ であり、流入水の濃度に対する除去率はそれぞれ 92、83、91、95% であった。

T-N 除去率は、HRT 3 時間で運転を行った Phase-2 および Phase-3 において 45-56% であり、最終処理水の T-N 濃度は 27-30 mgN·L⁻¹ であった。スポンジ担体に生長した生物膜では、膜表面から 10 mm 内側の地点では、DO 濃度は 0 mg·L⁻¹ になることが報告されている (Araki *et al.*, 1999; Machdar *et al.*, 2000)。加えて、スポンジ担体の保持汚泥濃度

は35–40 mgVTS·L⁻¹と高濃度である(Fig. 6-6))。これらの結果から、スポンジ担体に生長した生物膜において、無酸素条件下にある場所では、保持汚泥の自己分解によって供給される炭素源を電子供与体として脱窒反応が起こっていることが推測された。そこで、DHS 保持汚泥の脱窒活性(基質として酢酸ナトリウムと硝酸カリウムを使用)を評価したところ、A3 保持汚泥で0.011 gN·gVTS⁻¹·day⁻¹、B1 保持汚泥で0.014 gN·gVTS⁻¹·day⁻¹であった。また、同保持汚泥の内生脱窒活性(基質として硝酸カリウムのみを使用)を評価したところ、両方とも、0.008 gN·gVTS⁻¹·day⁻¹であり、内生脱窒活性が高いことが明らかになった。加えて、流下方向のT-N濃度およびBOD濃度のプロファイルの結果から、BOD濃度が20 mg·L⁻¹以下と低濃度になったとしてT-N濃度は減少する傾向にあることから、内生呼吸による脱窒反応が進行していることが示唆された。

各 Phase の最終処理水の水質は Bangkok metropolitan administration (BMA) の排水基準を達成していた(pH 5–9、BOD < 20 mg·L⁻¹、TSS < 30 mg·L⁻¹、NH₄⁺-N < 5 mgN·L⁻¹、DO > 5 mg·L⁻¹)。また *E.coli* 除去率も3–4 log₁₀と高く、衛生学的知見からみても十分な処理性能を有していたと判断することができた(データ非掲載)。このように、DHS 反応器は、バンコクの小規模処理場に流入する下水を直接処理した場合でも、十分に高い処理性能を発揮できることが分かった。さらに、電力消費量を試算すると、DHS 反応器は曝気動力が必要でないため、既存のオキシデーションディッチ法よりも低い試算結果になった(ポンプヘッドは損失分を含めて10 mと試算)(DHS 反応器:0.06 kWh·m⁻³-wastewater、オキシデーションディッチ:0.394 kWh·m⁻³-wastewater)。

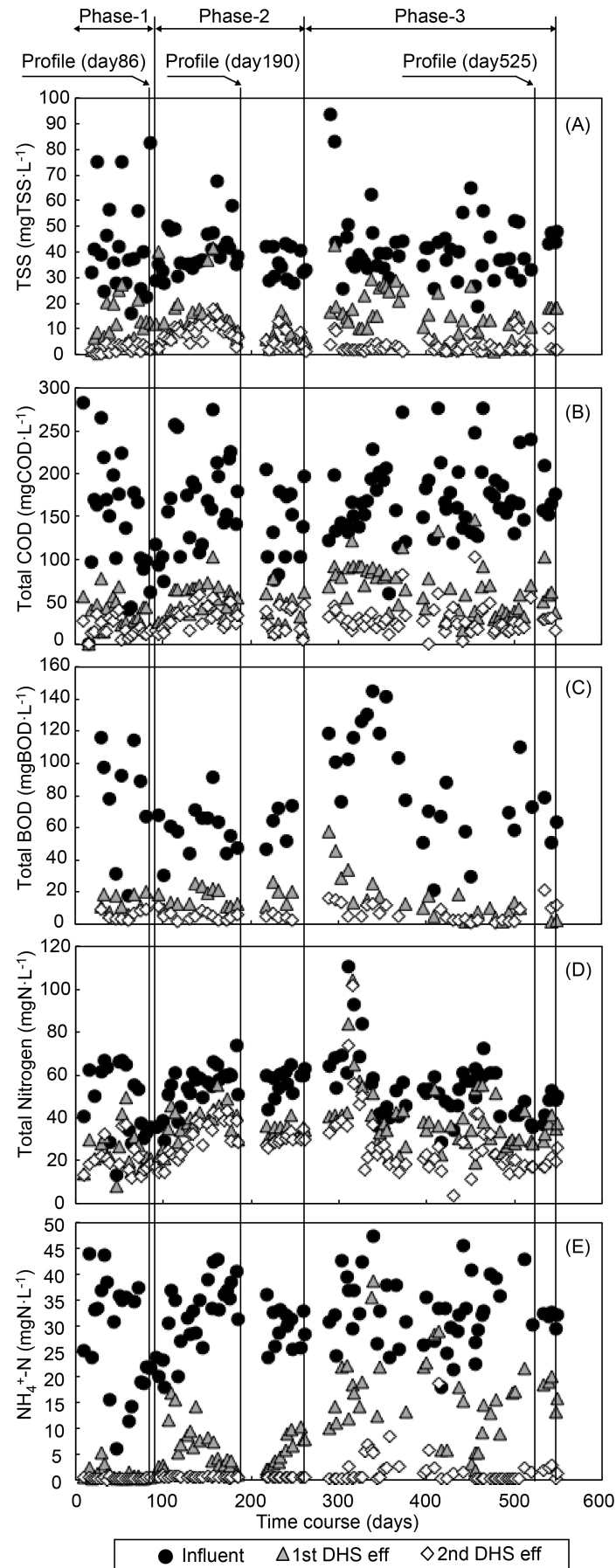


Fig.6-3 The time course of the routinely water quality (A) TSS, (B) COD, (C) BOD, (D) T-N and (E) $\text{NH}_4^+\text{-N}$.

Table 6-2 Summary of water quality of influent, 1st DHS effluent and 2nd DHS effluent.

Parameter	Phase-1: HRT 6 hours			Phase-2: HRT 3 hours			Phase-3: HRT 3 hours		
	92 days (day 0 - 92)			167 days (day 95 - 262)			259 days (day 290 - 549)		
	Influent	1 st DHS eff	2 nd DHS eff	Influent	1 st DHS eff	2 nd DHS eff	Influent	1 st DHS eff	2 nd DHS eff
Temperature (°C)	29 ± 1	29 ± 1	29 ± 1	28 ± 2	28 ± 2	27 ± 3	30 ± 2	30 ± 2	30 ± 3
pH (-)	7.5 ± 0.2	7.6 ± 0.5	8.1 ± 0.3	7.6 ± 0.1	7.4 ± 0.2	8.0 ± 0.2	7.4 ± 0.1	7.3 ± 0.3	7.3 ± 0.3
DO (mg·L ⁻¹)	0.8 ± 0.8	5.3 ± 0.6	6.2 ± 0.4	0.3 ± 0.2	4.2 ± 0.4	5.9 ± 0.3	0.4 ± 0.3	3.7 ± 0.9	5.0 ± 1.0
ORP (mV)	-234 ± 116	57 ± 45	54 ± 41	-287 ± 63	112 ± 13	104 ± 9	-274 ± 40	95 ± 41	122 ± 36
TSS (mg·L ⁻¹)	41 ± 18	11 ± 7	2 ± 2	39 ± 8	13 ± 9	7 ± 4	42 ± 13	15 ± 9	3 ± 13
VSS (mg·L ⁻¹)	30 ± 17	7 ± 5	2 ± 1	31 ± 6	8 ± 6	4 ± 2	33 ± 11	11 ± 8	2 ± 3
Total COD (mg·L ⁻¹)	147 ± 66	36 ± 18	20 ± 10	158 ± 52	48 ± 19	31 ± 14	170 ± 42	65 ± 29	29 ± 17
Total BOD (mg·L ⁻¹)	78 ± 34	13 ± 5	6 ± 3	60 ± 14	17 ± 6	5 ± 2	86 ± 33	15 ± 14	7 ± 6
T-N (mgN·L ⁻¹)	46 ± 16	24 ± 10	21 ± 7	55 ± 9	37 ± 7	30 ± 7	55 ± 19	39 ± 15	27 ± 16
NH ₄ ⁺ -N (mgN·L ⁻¹)	27.8 ± 10.5	1.0 ± 1.2	0.3 ± 0.2	31.2 ± 6.0	6.2 ± 3.6	0.6 ± 0.1	32.5 ± 6.5	16.2 ± 8.0	1.8 ± 3.1
NO ₃ ⁻ -N (mgN·L ⁻¹)	4.1 ± 1.7	13.0 ± 2.6	13.3 ± 3.1	2.9 ± 0.7	14.8 ± 2.6	16.0 ± 2.4	1.5 ± 1.2	6.0 ± 4.3	8.8 ± 3.2
NO ₂ ⁻ -N (mgN·L ⁻¹)	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.4	0.1 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.5	0.2 ± 0.2
Removal rate	Total system			Total system			Total system		
TSS %	93 ± 4			81 ± 9			92 ± 5		
Total COD %	85 ± 8			80 ± 8			83 ± 8		
Total BOD %	91 ± 4			91 ± 4			91 ± 6		
T-N %	56 ± 10			45 ± 8			51 ± 13		
NH ₄ ⁺ -N %	99 ± 1			98 ± 1			95 ± 10		

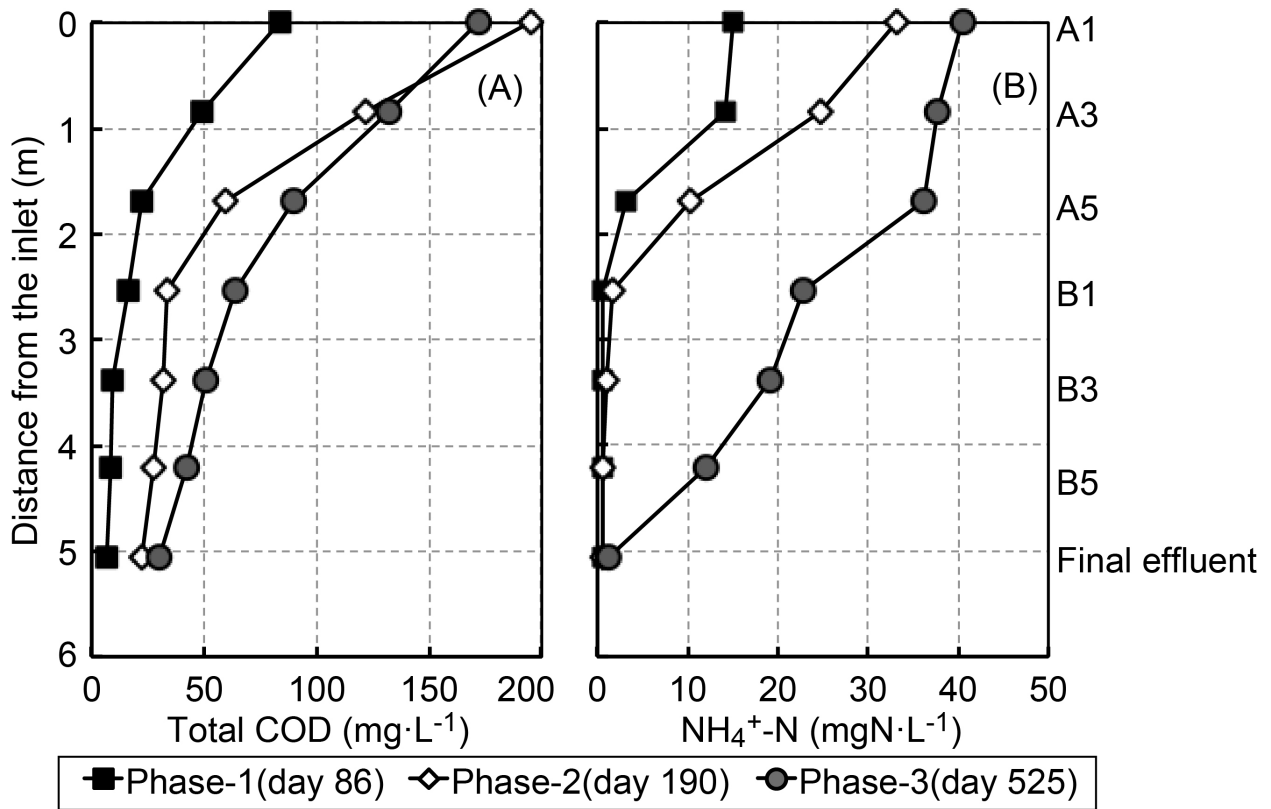


Fig.6-4 The profiles of water qualities along flow length of DHS reactor (A) Total COD and (B) NH₄⁺-N.

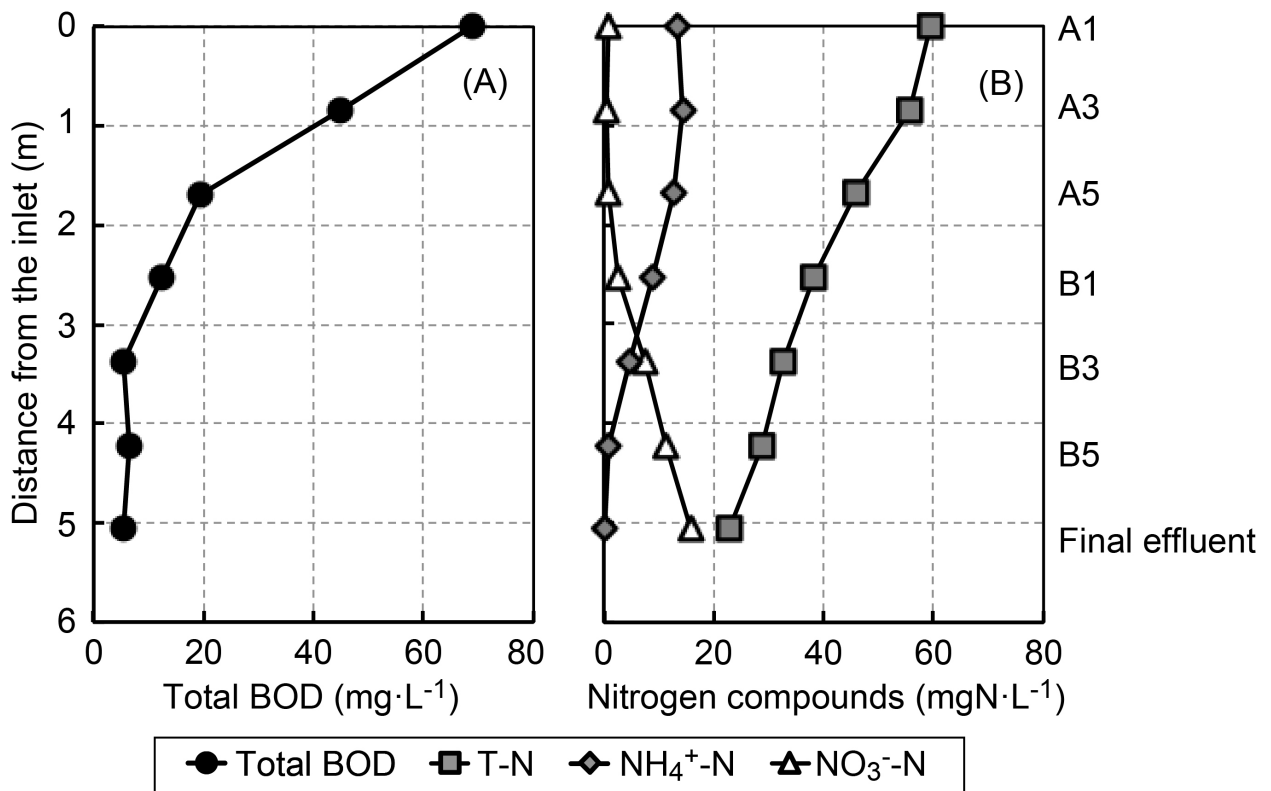


Fig.6-5 The profiles of water qualities of BOD and nitrogen compound along flow length of DHS reactor on day382 in Phase-3; (A) Total BOD concentration and (B) Nitrogen compound concentration.

6.3.2 保持汚泥濃度の推移

DHS 反応器全体の保持汚泥濃度の推移を Fig.6-6 に示す。この DHS 反応器全体の保持汚泥濃度は、DHS 反応器の流下方向における保持汚泥濃度を元に算出した (Fig.S6-1)。既に汚泥が付着したスポンジ担体を植種汚泥として使用したため、HRT 6 時間で運転を行った Phase-1 (day 86) では、OLR $0.3 \text{ kgBOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ の条件のもと、比較的早く、保持汚泥濃度は約 $20 \text{ gVTS} \cdot \text{L}^{-1}$ に達した。HRT 3 時間の条件で運転した Phase-2 (day 190) では、ほぼ横ばいであったが、Phase-3 (day 525) まで運転を継続すると、約 1.7 倍の $35 \text{ gVTS} \cdot \text{L}^{-1}$ にまで増加した。このように保持汚泥濃度が上昇した理由は、OLR が段階的に増加したためだと考えられ (平均 OLR は Phase-1 で 0.3、Phase-2 で 0.5、Phase-3 で $0.7 \text{ kgBOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$)、それと同時に、スポンジ担体の間隙に、未分解の固形性有機物が蓄積していったためだと考えられた。この蓄積した固形性有機物は徐々に分解されることで、前述した内生脱窒反応 (6.3.1 一定負荷運転による連続処理実験) に必要な炭素源になったと考えられた。また、DHS 反応器の保持汚泥濃度は、標準活性汚泥法と比較して 10–20 倍程度高く、既往の知見 (都市下水処理 UASB 反応器の処理水を流入させている DHS 反応器に関する論文。Onodera *et al.*, 2013) とほぼ同等であった。

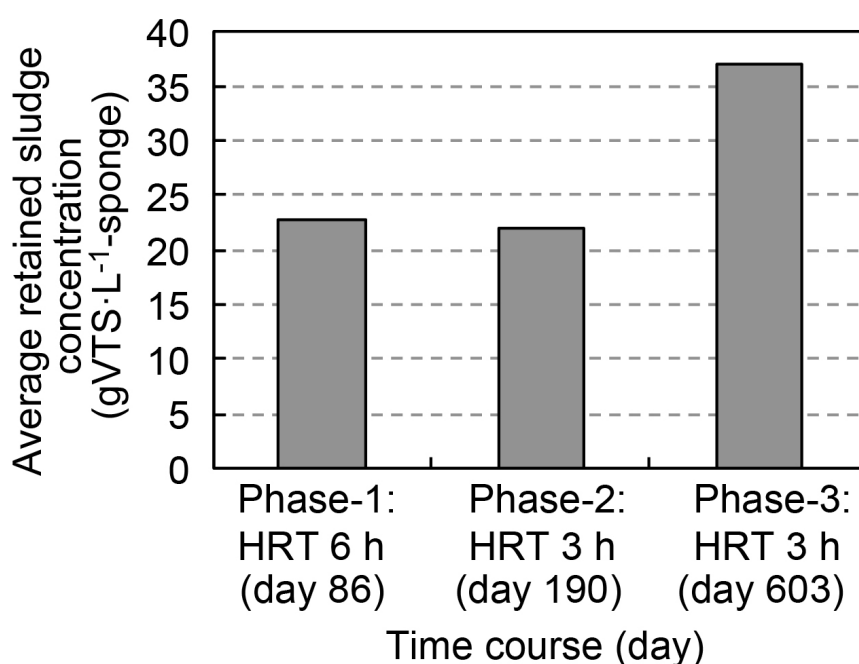


Fig.6-6 The time course of average retained sludge concentration in the DHS reactor

6.3.3 余剰汚泥の発生量

Table 6-3 に各 Phase における余剰汚泥の発生量をまとめたものを示す。HRT 6 時間で運転を行った Phase-1 では、余剰汚泥発生量は、 $0.003 \text{ gTS} \cdot \text{gCOD}_{\text{removed}}^{-1}$ および $0.004 \text{ gTS} \cdot \text{gBOD}_{\text{removed}}^{-1}$ であった。次に、HRT 3 時間で運転を行った Phase-2 では、余剰汚泥発生量は、 $0.08 \text{ gTS} \cdot \text{gCOD}_{\text{removed}}^{-1}$ および $0.15 \text{ gTS} \cdot \text{gBOD}_{\text{removed}}^{-1}$ であり、Phase-1 と比較して増加していた。これは、前述したように、HRT の短縮を行うことで、下降する水のせん断力が増し、スポンジ担体に付着した汚泥が剥離しやすい状況にあったためだと考えられた。続く Phase-3 では、余剰汚泥発生量は、 $0.04 \text{ gTS} \cdot \text{gCOD}_{\text{removed}}^{-1}$ および $0.07 \text{ gTS} \cdot \text{gBOD}_{\text{removed}}^{-1}$ であり、Phase-2 と比較して半分程度になった。これは、HRT 3 時間の条件におけるせん断力に耐え得る生物膜が新たに形成されたためだと考えられた。また、これらの値を下水処理量あたりの余剰汚泥発生量に換算すると、Phase-2 では $9.8 \text{ mgTS} \cdot \text{L}^{-1}\text{-wastewater}$ ($4.5 \text{ mgVTS} \cdot \text{L}^{-1}\text{-wastewater}$)、Phase-3 では $5.8 \text{ mgTS} \cdot \text{L}^{-1}\text{-wastewater}$ ($3.2 \text{ mgVTS} \cdot \text{L}^{-1}\text{-wastewater}$) であった。これらの値は既往の知見 (低濃度下水を直接処理した DHS 反応器に関する論文) と殆ど同等であった (Onodera *et al.*, 2014)。また、Bang Na 処理場に設置しているオキシデーションディッチ法の余剰汚泥発生量 ($58.2 \text{ mgTSS} \cdot \text{L}^{-1}\text{-wastewater}$) よりも 10 倍程度少なかった。

DHS 反応器において余剰汚泥発生量が少なかった要因は、既往の知見通り、有機物汚泥負荷を低く維持できたことによって、汚泥増殖量と汚泥分解量が拮抗したためだと考えられた。また、同時に、真核生物の捕食作用だけでなく、年平均気温が 30°C 前後と高く、保持汚泥中の微生物の自己消化が促進されやすい条件にあったことも一つの要因だと考えられた。これらの結果から、バンコクに設置したパイロットスケール DHS 反応器は、バンコクの下水を処理した場合でも、余剰汚泥発生量を低く抑えることが可能であったことを実証することができた。

Table 6-3 Summary of the excess sludge production rate from the DHS reactor.

Parameter	Unit	Phase-1: HRT 6 hours	Phase-2: HRT 3 hours	Phase-3: HRT 3 hours
		92 days (day 0 - 92)	167 days (day 95 - 262)	259 days (day 290 - 549)
		Total system	Total system	Total system
Excess sludge production rate	$(\text{kgTS} \cdot \text{kgBOD}_{\text{removed}}^{-1})$	0.004	0.15	0.07
	$(\text{kgTS} \cdot \text{kgCOD}_{\text{removed}}^{-1})$	0.003	0.08	0.04
	$(\text{kgVTS} \cdot \text{kgBOD}_{\text{removed}}^{-1})$	0.002	0.07	0.04
	$(\text{kgVTS} \cdot \text{kgCOD}_{\text{removed}}^{-1})$	0.001	0.04	0.02
	$(\text{mgTS} \cdot \text{L}^{-1}\text{-wastewater})$	0.3	9.8	5.8
	$(\text{mgVTS} \cdot \text{L}^{-1}\text{-wastewater})$	0.1	4.5	3.2

6.3.4 真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析

実証規模 DHS 反応器の保持汚泥における真核生物群集に関して、理解を深めるために、真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析を行った。DHS 保持汚泥およびオキシデーションディッチ汚泥のクローンライブラリーを Fig.6-7 に示す。クローンライブラリーは kingdom/superkingdom レベルで分類した。また、得られたファイロタイプの塩基配列の Blast 検索結果を Table S1 に示す。得られたファイロタイプは大きく分けて superkingdom *Nucleomycea*、kingdom *Holozoa*、kingdom *Alveolata* の 3 つに分類することができた。最も存在割合が高かったグループは、superkingdom *Nucleomycea* に属するファイロタイプであり、その存在割合は全体の 16–48%を占めていた。kingdom *Holozoa* と kingdom *Alveolata* に属するファイロタイプの存在割合は、それぞれ全体の 12–49%および 4–50%であった。その一方で、オキシデーションディッチ汚泥では、kingdom *Alveolata* に属する存在割合は全体の 78%と、kingdom/superkingdom レベルで分類したクローンライブラリーのなかで最も優占していた。

DHS 保持汚泥とオキシデーションディッチ汚泥のクローンライブラリーを比較した結果、kingdom *Holozoa* (後生動物) に属するファイロタイプに大きな違いがあることが分かった。DHS 保持汚泥の kingdom *Holozoa* に属するファイロタイプは、lineage *Nematoda* および lineage *Arthropoda* に分けられた。lineage *Nematoda* に属するファイロタイプの全体に対する存在割合は、HRT 6 時間の A1 で 0%、A5 で 24%、HRT 3 時間の A1 で 4%、A5 で 43%であった。その一方で、lineage *Arthropoda* に属するファイロタイプの全体に対する存在割合は、HRT 6 時間の A1 で 49%、A5 で 6%、HRT 3 時間の A1 で 8%、A5 で 0%であった。その一方でオキシデーションディッチ汚泥は、それぞれに属するファイロタイプの存在割合は全体の 0%および 7%であった。既報を参考にすると、保持汚泥中に *Nematoda* が存在することで、生物膜の厚さや密度が減少することが報告されている (Klein *et al.*, 2016)。前述した様に、DHS 反応器の余剰汚泥発生量は極めて低く、既存のオキシデーションディッチ法における余剰汚泥発生量の約 10 分の 1 に抑えられている (Table 6-3)。これらのことから、実証規模 DHS 反応器では、オキシデーションディッチよりも、系統学的に多様な真核生物 (後生動物) が存在していることを明らかにすることができた。また、これらの真核生物群集が、どれほど、余剰汚泥の発生量抑制に寄与しているかどうかは全く不明ではあるが、DHS 反応器の保持汚泥における真核生物群集の系統学的多様性を、18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析により明らかにすることができた。

DHS 保持汚泥とオキシデーションディッチ汚泥のクローンライブラリーにおいて、kingdom *Alveolata* (原生動物) に属するファイロタイプを比較したところ、検出される系統分類群は殆ど同じであった (order *Conthreep* および order *Spirotrichea*)。オキシデーションディッチ汚泥では、*Epistylis* に近縁なファイロタイプ (order *Conthreep* の subfamily *Peritrichia* の *Epistylis chrysemydis*、*Epistylis bentscheli*) が全体の 80%を占めており優占していた (Table S1)。その一方で、DHS 保持汚泥では、*Epistylis* に近縁なファイロタイプは検出されず、family *Colpodea* や family *Hypotrichia* に近縁なファイロタイプがクローンライブラリーのなかで優占化していた。PSSU/EukB のプライマー対 (真核生物のなかでも原生動物を解析可能なプライマー対) で作成したクローンライブラリーにおいても同様な傾向にあることを確認した (Fig.S6-2)。また、優占して検出されるファイロタイプの系統分類を比較すると、第4章で解析を行った日本国内の下水を処理する DHS 反応器とは異なっていた。これは、流入下水の固形性有機物濃度や反応器運転温度などが異なるためだと考えられた。これらの結果より、実証規模 DHS 反応器における、捕食被捕食に係わる真核生物群集の系統学的多様性を、18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析により明らかにすることができた。

DHS 保持汚泥のクローンライブラリーでは、phylum *LKM11* (superkingdom *Nucleomycea*) に属するファイロタイプが共

通して検出された(その存在割合は全体の 9-48%)。その一方で、オキシデーションディッチ汚泥のクローンライブラリーでは、この phylum *LKM11* に属するファイロタイプは検出されなかった(その存在割合は全体の 2%以下)。この phylum *LKM11* に属する真核生物は、日本国内の下水を処理する実験室規模 DHS 反応器においても、その存在が確認されている(第 4 章)。これらの結果から、phylum *LKM11* に属する真核生物は、実験室規模の管理された条件下だけではなく、温度や下水組成、その濃度が時事刻々と変化するような条件下においても、DHS 反応器による下水の処理機構を理解するうえで重要な真核生物である可能性が高いと考えられた。

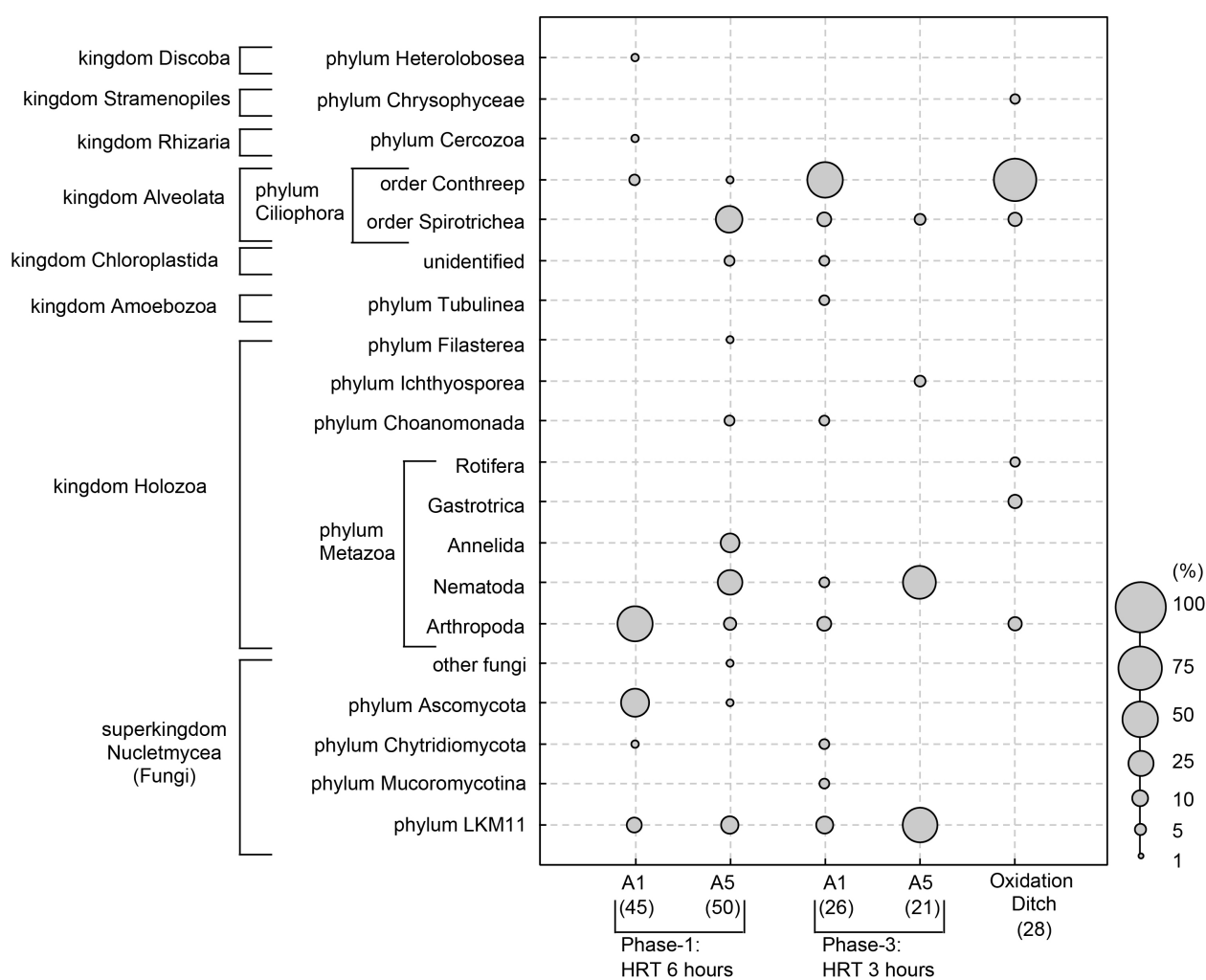


Fig.6-7 Eukaryotic community structures based on the 18S rRNA gene (EukA and EukB). The numbers in parentheses are the total number of clones sequenced. The size of each circle indicates the percentage of relative abundance.

6.3.5 HRT の能動的制御による負荷変動運転が水質プロフィールや保持汚泥性状に与える影響

(a) DHS 反応器の流下方向における水質プロフィール

負荷変動運転が、DHS 反応器における下水処理特性に及ぼす影響の解析を行った。負荷変動運転は Fig.6-2 に示した条件で約 2 ヶ月間行った。HRT 1.7 時間の高負荷時および HRT 7 時間の低負荷時の両方の時間帯において、DHS 反応器の流下方向における水質プロフィール(COD 濃度、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度、TSS 濃度)を解析した。この水質プロフィールは、負荷変動運転を開始した直後および負荷変動運転を 2 ヶ月間継続した後について解析を行い、継続的な負荷変動運転による影響を解析した(Fig.6-8)。

負荷変動運転の期間中、COD 除去と TSS 除去に関して、重大な処理性能悪化は認められず、一定負荷運転時(HRT 3 時間で一定)における、最終処理水の COD 濃度および TSS 濃度と比較しても遜色なかった。また、負荷変動運転を開始した初期段階(Fig.6-8, beginning, day 855–863)と 2 ヶ月後(Fig.6-8, 2 month later, day 919–924)の水質プロフィールを比較すると、2 ヶ月後の負荷変動運転の高負荷時において、処理水の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度が $22 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ にまで増加した(不完全な硝化反応)。これは、2 ヶ月後の流入水の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度が、低負荷時の $27 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ に対し、高負荷時では $43 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ と高まったためと考えられた。そこで、DHS 反応器の流下方向における $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度の変化量と保持汚泥量から、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 酸化速度を算出したところ、高負荷時では $9.0 \text{ gN}\cdot\text{kgVSS}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ あった。この算出した $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 酸化速度において、流入 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度を年平均値である $30 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度と仮定した場合、高負荷時の条件においても、処理水の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度を $10 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度にまで減少させることができる計算になる。実際に、高負荷時および低負荷時の水質を平均化するためにコンポジットサンプリングした処理水の日平均 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度は $5 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ であり、一定負荷運転時の処理水の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度 ($6 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$) と同程度であった (Table S-2)。

以上の結果から、実証規模 DHS 反応器は、最大負荷比 1.8 倍の負荷変動(HRT 1.7 時間および 7.0 時間の繰り返し)が生じる運転条件においても、COD 除去、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去、TSS 除去に関して、一定負荷運転時と比較しても遜色ない処理能力を有している(同程度の処理水質を得ることができる)ことを実証することができた。

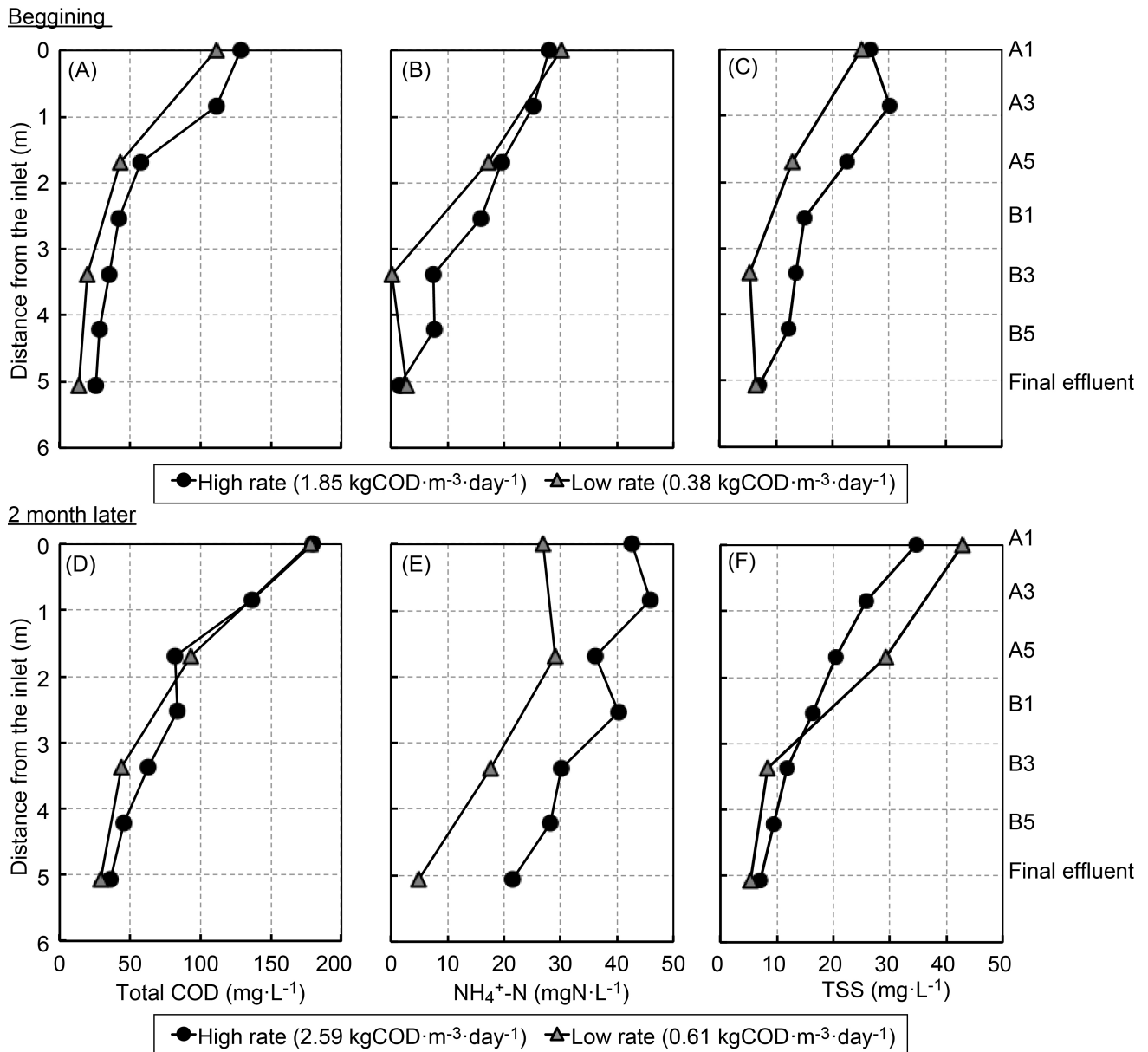


Fig.6-8 Profiles of water qualities of COD, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ along flow length of DHS reactor;

(A) Total COD, (B) $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and (C) TSS concentration at beginning of flow rate fluctuation on day 855–863,

(D) Total COD, (E) $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and (F) TSS concentration at 2 month later of flow rate fluctuation on day 919–924.

(b) 保持汚泥濃度プロフィール

Fig.6-9 に、DHS 反応器の流下方向の保持汚泥濃度のプロフィールを示す。保持汚泥濃度は、負荷変動運転開始前（一定負荷運転）で $30\text{--}43\text{ gVTS}\cdot\text{L}^{-1}$ であり、負荷変動運転開始約 2 ヶ月後のもので $26\text{--}45\text{ gVTS}\cdot\text{L}^{-1}$ であった。HRT の能動的な変動により、スポンジ担体から保持汚泥の剥離が促進されることが予想されたが（第 5 章の結果を参考）、本章では、B1 および B3 の保持汚泥濃度が若干低下していた程度であり、保持汚泥濃度のプロフィールに対して大きな影響は確認されなかった。また、この保持汚泥濃度のプロフィールから DHS 反応器内の全保持汚泥量を算出したところ、負荷変動運転開始前では 3.7 kgVTS であり、負荷変動運転開始約 2 ヶ月後では 3.4 kgVTS であった。このことから、保持汚泥量は多少減少していたことが確認されたが、処理性能悪化に直接つなげるものではなく、約 2 倍の負荷変動運転であれば、汚泥の保持性能に関して問題ないと判断することができた。

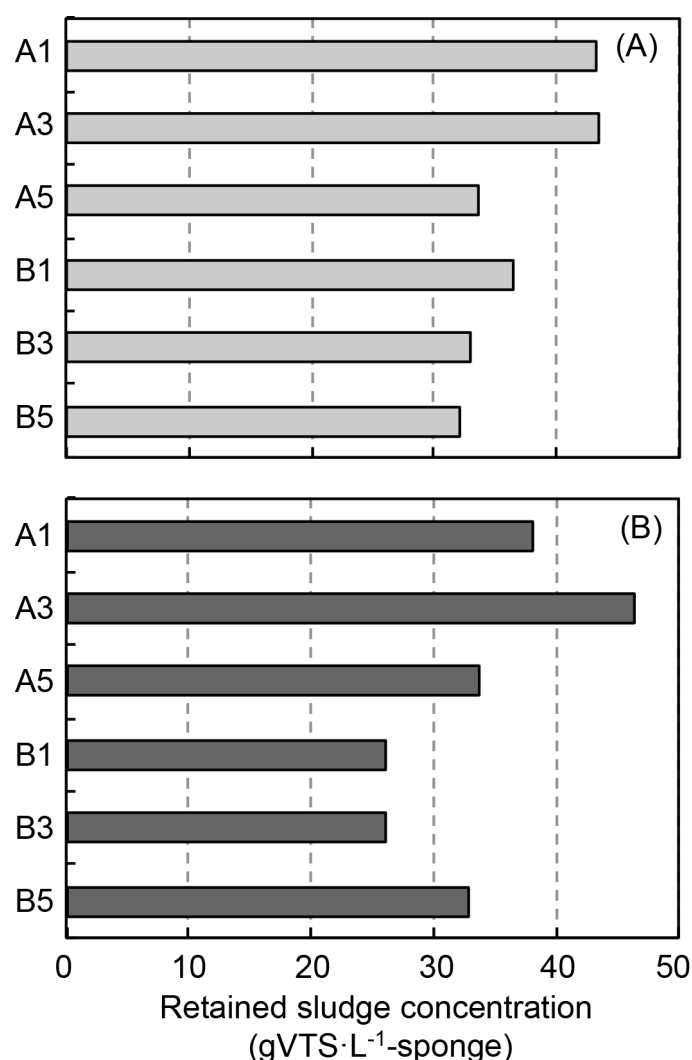


Fig.6-9 The retained sludge concentration along flow length of DHS reactor; (A) continuous flow experiment on day 848 and (B) flow rate fluctuation experiment on day 919.

6.4 小括

本章では、バンコクに設置した実証規模 DHS 反応器の真核生物群集構造と下水処理特性を評価するために、約 550 日間の連続処理実験を行った。その結果、以下の知見が得られた。

1. HRT 3 時間の条件 (OLR は $0.5\text{--}0.7 \text{ kgBOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{sponge}\cdot\text{day}^{-1}$) において、下水処理 DHS 反応器は高く安定した処理性能を示した (TSS 除去率 81–92%、COD 除去率 80–83%、BOD 除去率 91%、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去率 95–98%)。また、余剰汚泥発生量は $5.8 \text{ mgTS}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{wastewater}$ であり、既存処理技術 (オキシデーションディッチ法) の約 10 分の 1 に抑えることができた。さらに、電力消費量を試算したところ、 $0.06 \text{ kWh}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{wastewater}$ であり、これについても既存処理技術よりも少ない計算結果であった。
2. 高負荷と低負荷を交互に繰り返す負荷変動運転 (最大負荷比 1.8 倍) を行い、下水処理特性に与える影響を評価した。その結果、約 2 ヶ月の負荷変動運転の期間中、流入水の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度が異なることにより (流入水の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度は $30\text{--}40 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度で変動)、下水処理特性 (水質プロフィール) に影響を及ぼしていた。しかしながら、DHS 反応器の流下方向における $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度の変化量と保持汚泥量から、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 酸化速度を算出したところ、流入水の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度が平均値と同程度であれば ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度 $30 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$)、十分に完全硝化できる能力を有していることを確認した。また、総保持汚泥量には殆ど影響がなかったことを確認した。
3. 真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析を行ったところ、実証規模 DHS 反応器には、オキシデーションディッチよりも、系統的に多様な真核生物 (kingdom *Holozoa* および kingdom *Nucleomycea* に属する真核生物) が存在していることを確認することができた。また、phylum *LKM11* に属する機能未知な真核生物が高頻度に検出された (存在割合は全体の 9–48%)。この phylum *LKM11* に属する真核生物は、第 4 章の DHS 反応器においても、その存在が確認されており (存在割合は全体の 4–5%)、DHS 反応器による下水の処理機構を理解するうえで重要な系統分類群であると推測された。このように、実験室規模の管理された条件下だけでなく、温度や下水組成、その濃度が時事刻々と変化するような、より現実的な運転条件下においても、機能未知な真核生物群集が下水処理機構に係わっている可能性があることを示すことができた。

参考文献

- APHA. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 20th edition.; APHA/AWWA/WEF: Washington, DC, 1998.
- Araki N, Ohashi A, Machdar I, and Harada H (1999) Behaviors of nitrifiers in a novel biofilm reactor employing hanging sponge-cubes as attachment site. *Water Science and Technology* 39 (7): 23-31.
- Boller M (1997) Small wastewater treatment plants - A challenge to wastewater engineers. *Water Science and Technology* 35 (6): 1-12.
- Klein T, Zihlmann D, Derlon N, Isaacson C, Szivak I, Weissbrodt DG, and Pronk W (2016) Biological control of biofilms on membranes by metazoans. *Water Research* 88: 20-29.
- Kubota K, Hayashi M, Matsunaga K, Iguchi A, Ohashi A, Li YY, Yamaguchi Y, and 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.
- Limphitakphong N, Pharino C, and Kanchanapiya P (2016) Environmental impact assessment of centralized municipal wastewater management in Thailand. *The International Journal of Life Cycle Assessment* 21: 1789-1798.
- López-García P, Rodríguez-Valera F, Pedrós-Alió C, and Moreira D (2001) Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature* 409: 603-607.
- Machdar I, Sekiguchi Y, Sumino H, Ohashi A, Harada H (2000) Combination of a UASB reactor and curtain type DHS (downflow hanging sponge) reactor as a cost-effective sewage treatment system for developing countries. *Water Science and Technology* 42 (3-4): 83-88.
- Matsunaga K, Kubota K, and Harada H (2014) Molecular diversity of eukaryotes in municipal wastewater treatment process as revealed by 18S rRNA gene analysis. *Microbes and Environments* 29 (4): 401-407.
- Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, and Sogin ML (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* 71: 491-499.
- Okubo T, Onodera T, Uemura S, Yamaguchi T, Ohashi A, and Harada H (2015) On-site evaluation of the performance of a full-scale down-flow hanging sponge reactor as a post-treatment process of an up-flow anaerobic sludge blanket reactor for treating sewage in India. *Bioresource Technology* 194: 156-164.
- Okubo T, Kubota K, Yamaguchi T, Uemura S, and Harada H (2016) Development of a new non-aeration-based sewage treatment technology: Performance evaluation of a full-scale down-flow hanging sponge reactor employing third-generation sponge carriers. *Bioresource Technology* 102: 138-146.
- Onodera T, Matsunaga K, Kubota K, Taniguchi R, Harada H, Syutsubo K, Okubo T, Uemura S, Araki N, Yamada M, Yamauchi M, and Yamaguchi T (2013) Characterization of the retained sludge in a down-flow hanging sponge (DHS) reactor with emphasis on its low excess sludge production. *Bioresource Technology* 136: 169-175.
- Onodera T, Yoochatchaval W, Sumino H, Mizuochi M, Okadera T, Fujita T, Banjongproo P, and Syutsubo K (2014) Pilot-scale experiment of down-flow hanging sponge for direct treatment of low-strength municipal wastewater in

-
- Bangkok, Thailand. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 37 (11): 2281-2287.
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuch BM, Ludwig W, Peplies J, and Glöckner O (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* 35 (21): 7188-7196.
- Syutsubo K, Yoochatchaval W, Tsushima I, Araki N, Kubota K, Onodera T, Takahashi M, Yamaguchi T, and Yoneyama Y (2011) Evaluation of sludge properties in a pilot scale UASB reactor for sewage treatment in temperate region, *Water Sci. Technol.* 64 (10), 1959-1966.
- Tandukar M, Ohashi A, and Harada H (2007) Performance comparison of a pilot-scale UASB and DHS system and activated sludge process for the treatment of municipal wastewater. *Water Research* 41: 2697-2705.
- Tsuzuki Y, Koottatep T, Sinsupan T, Jiawkok S, Wongburana C, Wattanachira S, and Sarathai Y (2013) A concept for planning and management of on-site and centralised municipal wastewater treatment systems, a case study in Bangkok, Thailand. 2: Scenario-based pollutant load analysis. *Water Science and Technology* 67 (9): 1934-1944.
- Uemura S, and Harada H (2010) Application of UASB technology for sewage treatment with a novel post-treatment process. In: Fang HHP (ed) *Environmental anaerobic technology*. Imperial College Press, London, pp. 91-112.
- Yoochatchaval W, Onodera T, Sumino H, Yamaguchi T, Mizuochi M, Okadera T, and Syutsubo K (2014) Development of a down-flow hanging sponge reactor for the treatment of low-strength sewage. *Water Science and Technology* 70 (4): 656-663.

Supplementary materials

Table S1 Relative abundance and phylogenetic affiliation of eukaryotes in the retained sludge based on the operational taxonomic units 18S rRNA gene sequences.

(a) List of OTUs affiliating with superkingdom Nucleotmycea; Primer pair of EukA and EukB

Relative abundance (%)	ARB software			BLAST serch			
	Kingdom	Phylum	Class	Close relatives	Accession	Similarity	
A1: Phase-1 (HRT 6 hours)							
9/45	20	Fungi	Ascomycota	Candida	Candida ghanaensis	AY618510	91%
1/45	2	Fungi	Ascomycota	Candida	Candida ghanaensis	AY618510	88%
1/45	2	Fungi	Ascomycota	Candida	Candida ghanaensis	AY618510	91%
1/45	2	Fungi	Ascomycota	Candida	Candida ghanaensis	AY618510	91%
1/45	2	Fungi	Ascomycota	Candida	Candida ghanaensis	AY618510	90%
1/45	2	Fungi	Ascomycota	Candida	Candida ghanaensis	AY618510	86%
4/45	9	---	LKM11	---	Uncultured eukaryote	AB695466	99%
1/45	2	Opisthokonta	Nucleotmycea	Chytridiomycota	Hyaloraphidium curvatum	NG_017172	91%
A5: Phase-1 (HRT 6 hours)							
1/50	2	Fungi	Ascomycota	Candida	Candida ghanaensis	AY618510	91%
1/50	2	---	LKM11	---	Uncultured rhizosphere zygomycete	AJ506030	91%
1/50	2	---	LKM11	---	Uncultured eukaryote	AB695466	99%
1/50	2	---	LKM11	---	Uncultured eukaryote	AB695465	87%
1/50	2	---	LKM11	---	Uncultured eukaryote	KC315812	89%
1/50	2	---	LKM11	---	uncultured marine picoeukaryote	FR874399	94%
1/50	2	---	LKM11	---	Uncultured fungus	JN054679	97%
1/50	2	Fungi	Mortierellaceae	---	Mortierella chlamydospora	AF157143	96%
A1: Phase-3 (HRT 3 hours)							
1/26	4	Fungi	Mucoromycotina	Mucorales	Mucor racemosus	JF723685	84%
1/26	4	Fungi	Chytridiomycota	Monoblepharidales	Hyaloraphidium curvatum	NG_017172	97%
1/26	4	---	LKM11	---	Uncultured eukaryote	AB902294	92%
1/26	4	---	LKM11	---	Hyaloraphidium curvatum	NG_017172	89%
1/26	4	---	LKM11	---	Uncultured fungus clone	AF372713	98%
A5: Phase-3 (HRT 3 hours)							
2/21	10	---	LKM11	---	Uncultured eukaryote	AB901723	95%
2/21	10	---	LKM11	---	Uncultured eukaryote	AB901723	95%
1/21	5	---	LKM11	---	Uncultured eukaryote	AB901898	88%
1/21	5	---	LKM11	---	Uncultured eukaryote	AB901723	94%
1/21	5	---	LKM11	---	Uncultured eukaryote	AB901672	93%
1/21	5	---	LKM11	---	uncultured marine picoeukaryote	FR874399	93%
1/21	5	---	LKM11	---	Uncultured eukaryote	AB901795	88%
1/21	5	---	LKM11	---	Uncultured eukaryote	AB695466	98%

Table S1 Continued.

(b) List of OTUs affiliating with kingdom Holozoa; Primer pair of EukA and EukB

Relative abundance (%)	ARB software			BLAST serch		
	Phylum	Subphylum	Class / Lineage	Close relatives	Accession	Similarity
A1: Phase-1 (HRT 6 hours)						
7/45	16	Metazoa	Animalia	Arthropoda	Boletoglyphus extremiorientalis	JQ000111 98%
4/45	9	Metazoa	Animalia	Arthropoda	Psychoda phalaenoides	JF718345 98%
3/45	7	Metazoa	Animalia	Arthropoda	Histiostoma inquilinum	JQ000058 98%
1/45	2	Metazoa	Animalia	Arthropoda	Histiostoma inquilinum	JQ000058 91%
1/45	2	Metazoa	Animalia	Arthropoda	Psychoda phalaenoides	JF718345 95%
1/45	2	Metazoa	Animalia	Arthropoda	Histiostoma feroniarum	GQ864328 89%
1/45	2	Metazoa	Animalia	Arthropoda	Psychoda phalaenoides	JF718345 97%
1/45	2	Metazoa	Animalia	Arthropoda	Boletoglyphus extremiorientalis	JQ000111 95%
1/45	2	Metazoa	Animalia	Arthropoda	Psychoda phalaenoides	JF718345 97%
1/45	2	Metazoa	Animalia	Arthropoda	Psychoda phalaenoides	JF718345 98%
1/45	2	Metazoa	Animalia	Arthropoda	Histiostoma feroniarum	GQ864328 96%
A5: Phase-1 (HRT 6 hours)						
6/50	12	Metazoa	Animalia	Annelida	Pristina longiseta	AF411875 99%
1/50	2	Metazoa	Animalia	Annelida	Pristina proboscidea	DQ459960 97%
1/50	2	Metazoa	Animalia	Arthropoda	Eucyclops serrulatus	AJ746328 90%
1/50	2	Metazoa	Animalia	Arthropoda	Clogmia albipunctata	KC177281 99%
1/50	2	Metazoa	Animalia	Arthropoda	Malaconothrus gracilis	JQ000044 99%
2/50	4	Metazoa	Animalia	Nematoda	Uncultured nematoda	EU910601 89%
2/50	4	Metazoa	Animalia	Nematoda	Aporcelaimellus cf. paraobtusicaudatus	AY284812 98%
1/50	2	Metazoa	Animalia	Nematoda	Uncultured nematode	AJ875122 87%
1/50	2	Metazoa	Animalia	Nematoda	Achromadora cf. terricola	AY593940 98%
1/50	2	Metazoa	Animalia	Nematoda	Achromadora cf. terricola	AY593940 95%
1/50	2	Metazoa	Animalia	Nematoda	Sironidae environmental sample	EF024214 93%
1/50	2	Metazoa	Animalia	Nematoda	Ecumenicus monohystera	AY284783 94%
1/50	2	Metazoa	Animalia	Nematoda	Ecumenicus monohystera	AY284784 93%
1/50	2	Metazoa	Animalia	Nematoda	Sironidae environmental sample	EF024214 89%
1/50	2	Metazoa	Animalia	Nematoda	Labronema ferox	AY552972 92%
1/50	2	Filasterea	Ministeriida	Capsasporidae	Capsaspora owczarzaki	AF349564 96%
1/50	2	Choanomonada	Craspedida	Monosigidae	Uncultured eukaryote	GU290066 90%
1/50	2	Choanomonada	Craspedida		Uncultured eukaryote	GU290066 94%
A1: Phase-3 (HRT 3 hours)						
2/26	8	Metazoa	Animalia	Arthropoda	Rhizoglyphus sp	HM070357 98%
1/26	4	Metazoa	Animalia	Nematoda	Mononchus tunbridgensis	AY593954 94%
1/26	4	Choanomonada	Craspedida	Monosigidae	Uncultured eukaryote	GU290066 94%
A5: Phase-3 (HRT 3 hours)						
2/21	10	Metazoa	Animalia	Nematoda	Uncultured nematode	AJ875138 96%
1/21	5	Metazoa	Animalia	Nematoda	Amblydorylaimus isokaryon	KM092519 85%
1/21	5	Metazoa	Animalia	Nematoda	Mesodorylaimus cf. nigrutilus	AJ966490 86%
1/21	5	Metazoa	Animalia	Nematoda	Aporcelaimellus cf. paraobtusicaudatus	AY284812 98%
1/21	5	Metazoa	Animalia	Nematoda	Mononchus aquaticus	AY297821 98%
1/21	5	Metazoa	Animalia	Nematoda	Anaplectus sp.	AJ966473 92%
1/21	5	Metazoa	Animalia	Nematoda	Aporcelaimellus sp.	AY284813 94%
1/21	5	Metazoa	Animalia	Nematoda	Mononchus truncatus	AJ966493 92%
1/21	5	Ichthyosporea	Ichthyophonae	Pseudoperkinsidae	Anurofeca sp.	AY363958 99%
Oxidation ditch						
2/28	7	Metazoa	Animalia	Gastrotrica	<i>Chaetonotus cf. hystrix</i>	JQ798603 99%
1/28	4	Metazoa	Animalia	Arthropoda	<i>Ectocyclops polyspinus</i>	AJ746336 98%
1/28	4	Metazoa	Animalia	Arthropoda	<i>Ectocyclops polyspinus</i>	AJ746336 96%
1/28	4	Metazoa	Animalia	Rotifera	<i>Lecane bulla</i>	DQ297698 95%

Table S1 Continued.

(c) List of OTUs affiliating with kingdom Alveolata, kingdom Rhizaria and kingdom Stramenopiles; Primer pair of EukA and EukB

Relative abundance (%)	ARB software					BLAST search			
	Phylum	Class	Order	Family	Subfamily/Genus	Close relatives	Accession	Similarity	
A1: Phase-1 (HRT 6 hours)									
2/45	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	Opisthonecta minima	EF417834	99%
2/45	2	Cercozoa	Imbricatea	Silicofilosea	Euglyphida	Trinematidae	Trinema lineare	EF456752	95%
A5: Phase-1 (HRT 6 hours)									
1/50	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Colpodea	Cyrtolophosidida	Cyrtolophosis minor	JQ723962	94%
3/50	6	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	Stylonychia	Paraparentocirrus sibilinensis	KF184655	99%
1/50	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	Stylonychia	Paraparentocirrus sibilinensis	KF184655	95%
1/50	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	Stylonychia	Sterkiella sp.	KC182573	99%
1/50	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	---	Kahliella sp.	EU079472	99%
1/50	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	---	Perisincirra paucicirrata	JX012184	98%
1/50	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	---	Sterkiella sp.	KC182573	93%
1/50	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Oxytrichidae	---	Sterkiella sp.	KC182573	99%
1/50	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Oxytrichidae	---	Uncultured eukaryote	AB695453	95%
1/50	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Oxytrichidae	---	Uncultured eukaryote	AB695446	94%
1/50	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Oxytrichidae	---	Uncultured eukaryote	EF024056	94%
1/50	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Oxytrichidae	---	Kahliella sp.	EU079472	90%
1/50	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	---	---	Perisincirra paucicirrata	JX012184	94%
A1: Phase-3 (HRT 3 hours)									
4/26	15	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Colpodea	Colpodida	Orchitophryidae environmental sample	EF024263	99%
1/26	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Colpodea	Colpodida	Orchitophryidae environmental sample	EF024263	95%
1/26	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Colpodea	Colpodida	Orchitophryidae environmental sample	EF024263	90%
2/26	8	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Colpodea	Colpodida	Colpoda inflata	KJ607918	99%
1/26	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Colpodea	Colpodida	Colpoda inflata	KJ607918	97%
1/26	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Colpodea	Colpodida	Colpoda inflata	KJ607918	94%
1/26	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Colpodea	Colpodida	Colpoda inflata	KJ607918	91%
1/26	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Colpodea	Colpodida	Colpoda aspera	KF111344	99%
1/26	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Colpodea	Platyophryida	Platophryidae sp	EU039906	88%
2/26	8	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	Stylonychia	Pattersoniella vitiphila	AJ310495	99%
A5: Phase-3 (HRT 3 hours)									
1/21	5	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Oxytrichidae	---	Oxytrichidae environmental sample	EF024797	97%
Oxidation ditch									
10/28	48	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	<i>Epistylis chrysemydis</i>	AF335514	97%
1/28	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	<i>Epistylis chrysemydis</i>	AF335514	99%
1/28	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	<i>Epistylis chrysemydis</i>	AF335514	97%
1/28	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	<i>Epistylis chrysemydis</i>	AF335514	97%
1/28	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	<i>Epistylis chrysemydis</i>	AF335514	97%
1/28	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	<i>Epistylis chrysemydis</i>	AF335514	95%
1/28	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	<i>Epistylis chrysemydis</i>	AF335514	95%
1/28	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	<i>Epistylis chrysemydis</i>	AF335514	94%
1/28	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	<i>Epistylis chrysemydis</i>	AF335514	91%
1/28	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	<i>Epistylis hentscheli</i>	AF335513	95%
1/28	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Euplotia	Euplotes	<i>Euplotes aediculatus</i>	M14590	99%
1/28	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Euplotia	Euplotes	<i>Euplotes aediculatus</i>	M14590	93%
1/28	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	---	<i>Levicolopsis biwae</i>	AB354737	93%
1/28	4	Chrysophyceae	Chromulinales	JBNA46	---	---	<i>Spumella-like flagellate</i>	DQ388542	99%

Table S1 Continued.

(d) List of OTUs affiliating with kingdom Alveolata, kingdom Rhizaria and kingdom Stramenopiles; Primer pair of PSSU and EukB

Relative abundance (%)	ARB software					BLAST serch			
	Phylum	Class	Order	Family	Subfamily/Genus	Close relatives	Accession	Similarity	
A1: Phase-1 (HRT 6 hours)									
40/50	80	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	Opisthnecta minima	EF417834	99%
7/50	14	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Colpodea	Platyophryida	Platyophrya vorax	AF060454	98%
1/50	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	Oxytricha	Oxytricha longa	AF164125	99%
1/50	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Litostomatea	Haptoria	---	Arcuospathidium cultriforme	DQ411860	99%
A5: Phase-1 (HRT 6 hours)									
3/55	5	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	Opisthnecta minima	EF417834	99%
2/55	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Colpodea	Colpodida	Colpoda inflata	KJ607918	99%
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Colpodea	Colpodida	Colpoda inflata	KJ607918	94%
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Colpodea	Cyrtolophosidida	Pseudocyrtolophosis alpestris	EU264564	99%
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Colpodea	Colpodida	Colpoda steinii	DQ388599	99%
28/55	51	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	Stylonychia	Sterkiella sp.	KC182573	99%
2/55	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	Gonostomum	Gastrostyla steinei	AF164133	96%
10/55	18	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	---	Perisincirra paucicirrata	JX012184	99%
2/55	4	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	---	Oxytrichidae environmental sample	EF024903	97%
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	---	Oxytrichidae environmental sample	EF024903	97%
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Litostomatea	Haptoria	---	Arcuospathidium namibiense	JF263442	99%
1/55	2	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	---	Uncultured marine eukaryote clone	KC771144	96%
1/55	2	Cercozoa	Thecofilosea	Cryomonadida	Rhizaspididae	Rhogostoma	Rhogostoma schuessleri	HQ121430	95%
A1: Phase-3 (HRT 3 hours)									
1/32	3	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	Opisthnecta minima	EF417834	99%
11/32	34	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Colpodea	Colpodida	Colpoda inflata	KJ607918	99%
10/32	31	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Colpodea	Colpodida	Orchitophryidae environmental sample	EF024263	99%
1/32	3	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Colpodea	Colpodida	Colpoda aspera	KF111344	99%
5/32	16	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	Stylonychia	Sterkiella sp.	KC193245	99%
4/32	13	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	Oxytricha	Oxytricha longa macronuclear	AF164125	99%
A5: Phase-3 (HRT 3 hours)									
3/29	10	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Oligohymenophorea	Peritrichia	Opisthnecta minima	EF417834	99%
1/29	3	Ciliophora	Intramacronucleata	Conthreep	Colpodea	Platyophryida	Platyophrya bromelicola	EU039905	99%
9/29	31	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	Gonostomum	Gonostomum sp.	JX946277	99%
9/29	31	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	Oxytricha	Oxytricha longa	AF164125	99%
4/29	14	Ciliophora	Intramacronucleata	Spirotrichea	Hypotrichia	Stylonychia	Sterkiella sp.	KF668619	99%

Table S2 Summary of water qualities of influent and 2nd DHS effluent during continuous flow experiment (day 757–844) and flow rate fluctuation experiment (day 855–955).

		Continuous flow (day 757–844)		Flow rate fluctuation (day 855–955)	
		Influent	2 nd DHS eff.	Influent	2 nd DHS eff.
Temperature	(°C)	31	32	31	31
pH	(-)	7.3	7.2	7.4	7.4
DO	(mg·L ⁻¹)	0.3	5.0	0.5	6.3
ORP	(mV)	-303	56	-288	58
TSS	(mg·L ⁻¹)	43	21	54	13
VSS	(mg·L ⁻¹)	32	14	48	12
Total COD	(mg·L ⁻¹)	143	61	135	29
Soluble COD	(mg·L ⁻¹)	97	27	71	16
Total BOD	(mg·L ⁻¹)	55	10	53	4
Soluble BOD	(mg·L ⁻¹)	30	4	24	3
NH ₄ ⁺ -N	(mgN·L ⁻¹)	34	6	37	5
NO ₂ ⁻ -N	(mgN·L ⁻¹)	0	0	0	1
NO ₃ ⁻ -N	(mgN·L ⁻¹)	4	8	7	22

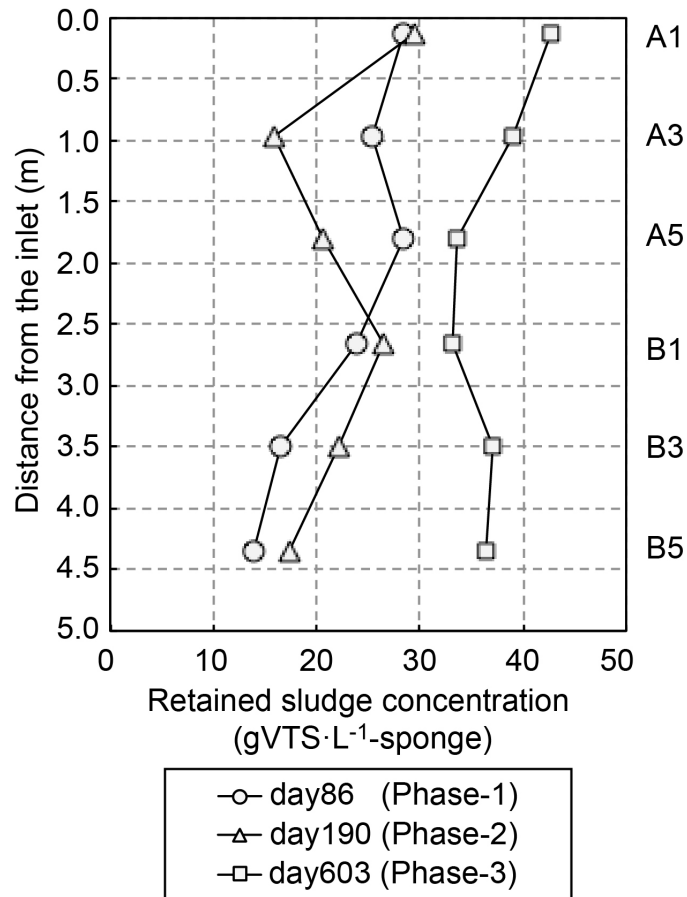


Fig.S1 The profiles of retained sludge concentration along flow length of DHS reactor.

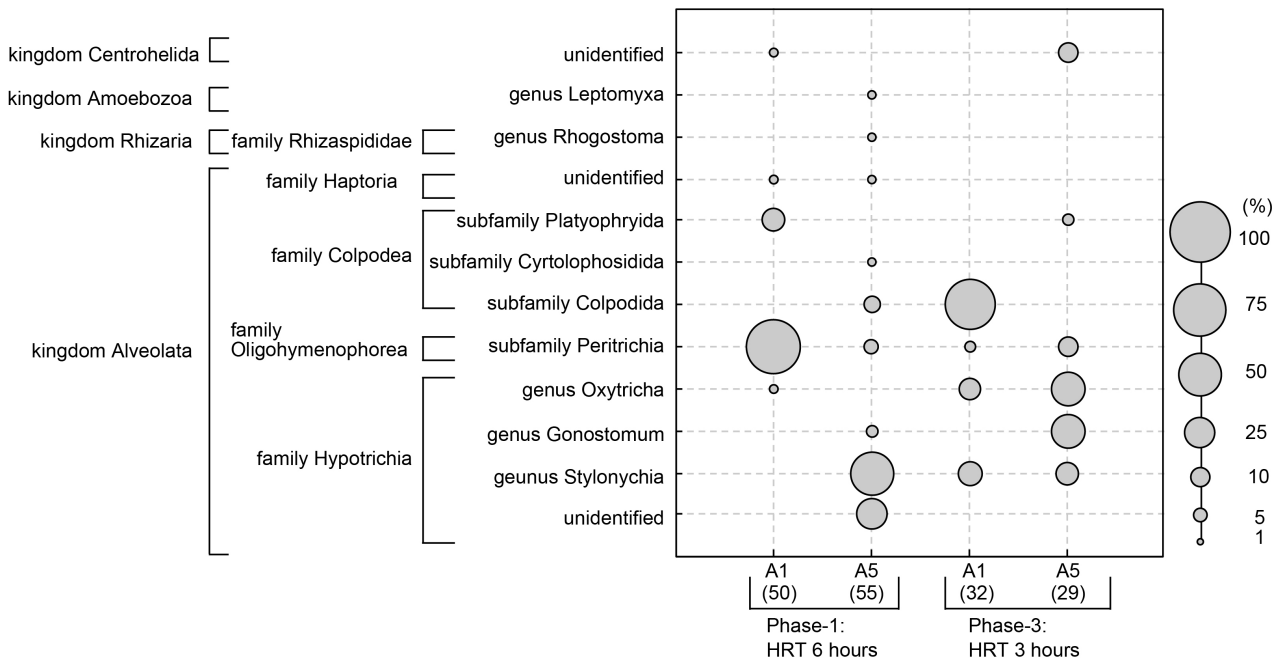


Fig.S2 Eukaryotic community structures based on the 18S rRNA gene (primer pair: PSSU/EukB). The numbers in parentheses are the total number of clones sequenced. The size of each circle indicates the percentage of relative abundance.

第7章

総括

7.1 はじめに

本論文では、下降流懸垂型スポンジ(DHS)反応器の真核生物群集構造と下水処理特性を、実験室規模および実証規模のDHS反応器を用いた連続処理実験により解析・評価した。そのなかでも特に、DHS反応器の基本的な運転操作因子である有機物負荷(OLR)によって変化する真核生物群集構造と下水処理特性との関連性を明らかにすることを目的とし、実験的解析を行った。DHS反応器単独による下水の処理特性に関する知見は少なく、また、能動的に負荷変動を与えた場合の知見についても殆ど無いため、本論文で示した知見は貴重なものである。また、このようなDHS反応器の保持汚泥中の真核生物群集構造を、分子生物学的手法である18S rRNA遺伝子配列に基づくクローン解析により明らかにすることで、検鏡では評価しきれなかった真核生物群集構造についても評価可能であったことを示した。ある特定の真核生物群集に関して、DHS反応器の下水処理運転後に、その存在割合の増減を確認することができ、下水処理機構(現段階で考えられるものは固形物分解もしくは脱窒反応)への寄与を推定することができた。また、設定した運転操作因子ごとに保持汚泥を検鏡することで、DHS反応器内における捕食被捕食に関わる真核生物群集に関して、その機能を推定し得るような有益な知見を得ることができた。

本章では、本論文にて得られた知見を総括し、「DHS反応器における真核生物群集の機能推定(真核生物群集構造と下水処理特性との関連性)」、「処理水質や保持汚泥の馴致の程度を推定するための指標生物の提案」、「真核生物の18S rRNA遺伝子配列に基づくクローン解析によって得られた新しい知見」、「クローン解析と検鏡による真核生物群集構造解析結果の比較」、「DHS反応器の分散型下水処理技術としての適用可能性」、「DHS反応器における運転方法の提案」、としてまとめた。

7.2 DHS反応器における真核生物群集の機能推定(真核生物群集構造と下水処理特性との関連性)

本論文では、DHS反応器の有機物負荷を変化させ(第4章では固形生有機物濃度、第5章では水理的滞留時間(HRT))、それに対応して変化する真核生物群集構造の解析を行った。第4章では、固形性有機物濃度を上昇させることでOLRを上昇させた。その結果、OLRを約1.0から約2.0 kgCOD \cdot m⁻³ \cdot day⁻¹にまで上昇させた直後に、処理水質の悪化と、鞭毛虫と繊毛虫グループの存在割合の増加が確認されたが、その後、同じOLRで運転を継続させると、処理水質の改善と、鞭毛虫と繊毛虫グループの存在割合の低下が確認された。第5章では、HRTを能動的に変化させることで、有機物負荷を変化させた。具体的には、短いHRT(高負荷)と長いHRT(低負荷)を1日のなかで交互に繰り返した。HRTを変化させない一定負荷運転と、HRTを能動的に変化させる負荷変動運転(最大負荷は一定負荷運転時における負荷の5倍)を行い、真核生物群集構造を比較した。その結果、負荷変動を与えることで、一時的にスポンジ担体を通過する線流速が速くなるため、スポンジ担体からの保持汚泥の剥離が促進され、それらを捕食する真核生物の細胞密度が2-3倍に増加したことが確認された。その、同じ有機物負荷であっても、DHS反応器の保持汚泥中の真核生物群集構造は似通ったものになるとは断定できないことが分かり、流入水の固形有機物濃度や水理的滞留時間の変動を考慮する必要があると考えられた。このように、DHS反応器における真核生物の高密度維持(保持)に関して、一定負荷で運転するよりも能動的に水理的滞留時間(有機物負荷)を変動させるほうが効果的であることを示すことができた。このとき、負荷変動運転により物理的に剥離した保持汚泥量は、実際に減少した保持汚泥量の48%であることに加え、負荷変動期間中は一定負荷運転期間中と比較して、保持汚泥量は増加する傾向にあることがルーティーン水質分析の結果から推測されたため、残りの52%は、保持汚泥中における真核生物の細胞密度を

高密度に維持可能であったことによる影響だと考えられた。

DHS 反応器として使用しているスポンジ担体は、第4章で述べたように、その空隙に固形物が捕捉されやすく、真核生物が捕食できる基質濃度が低くなってしまったため、その細胞密度は活性汚泥法と比較すると少ない傾向にある。第4章と第5章では、固形性有機物濃度の上昇とHRTの短縮により、一時的ではあるが、真核生物の細胞密度の増加が確認された。この結果から、DHS 反応器に存在する真核生物は、スポンジ担体から剥離した、もしくは、スポンジ担体で捕捉しなかった浮遊状の固形物(固形性有機物、保持汚泥、原核生物)を捕食することで、処理水質の改善に寄与していることが予想された。加えて、原生動物の18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析では(原生動物に特異的なプライマーを用いてPCR)、原生動物のなかでも、subfamily *Peritrichia* と family *Hypotrichia* に属するファイロタイプが高い割合で検出された。このことから、原生動物のなかでも、subfamily *Peritrichia* と family *Hypotrichia* に近縁な真核生物が、DHS 反応器内の捕食-被捕食に関わっていることを明らかにした。

また、第4章において、下水処理 DHS 反応器において、基本的な運転操作因子である有機物負荷(OLR)は、スポンジ担体間隙水の水質および鞭毛虫と繊毛虫グループの存在割合に影響を与えていた。鞭毛虫と繊毛虫のグループと OLR は正の相関関係にあることが分かった。なお、鞭毛虫や繊毛虫グループの細胞密度と、有機物汚泥負荷(単位: $\text{kgCOD}\cdot\text{kgVSS}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$)および保持汚泥濃度(単位: $\text{mgTSS}\cdot\text{L}^{-1}$)との間に関連性はなかった。また、アメーバグループは、DHS 反応器において、最も存在割合が高いグループであった。DHS 保持汚泥中のアメーバのグループの細胞密度は、DHS 反応器の上部から下部にかけて増加する傾向にあり、スポンジ担体間隙水の COD 濃度および $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度と負の相関関係にあることが分かった(第4章の下水処理性能が著しく悪化した DHS 反応器 B の Phase-2 以外)。なお、アメーバグループの細胞密度と保持汚泥濃度との間に関連性はなかった。さらに、DHS 保持汚泥中の後生動物のグループの細胞密度と、有機物負荷、水質、保持汚泥濃度との間に関連性はなかった。そのため、DHS 反応器において、後生動物グループの動態を、有機物負荷、水質、保持汚泥濃度などのパラメーターによって制御することは難しいことが示唆された。

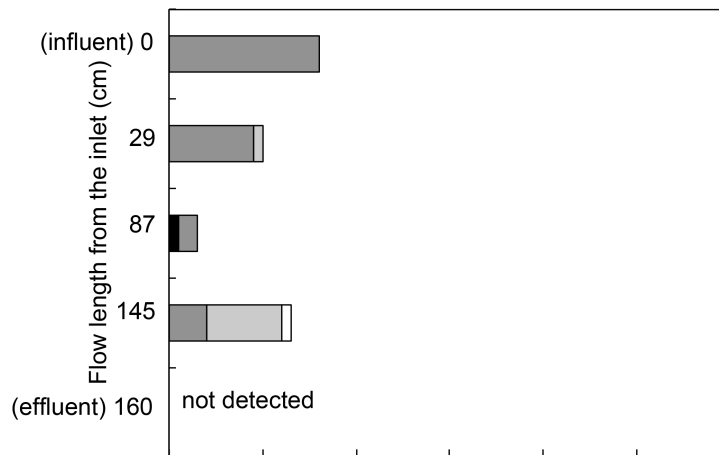
本論文の成果により、DHS 反応器内における捕食-被捕食関係を解析していくうえで、特に原生動物、繊毛虫のなかの subfamily *Peritrichia* と family *Hypotrichia* が重要な系統群であることを明らかにした。この結果を活用すれば、例えば、定量 PCR 用のプライマーや FISH 解析用のプローブを設計し、標的とする真核生物の活性度等を評価することが可能になる。また、同位体で標識した基質と上記の解析を組み合わせることで、標的とする真核生物の基質特異性についても明らかにすることができる(例:Moreno *et al.*, 2010)。このように、本論文の成果は、DHS 反応器における真核生物の捕食-被捕食に関する研究開発を推進していくうえで、重要な基礎知見と成り得るものである。

7.3 処理水質や保持汚泥の馴致の程度を推定するための指標生物の提案

Fig.7-1 に、DHS 反応器の流下方向における流下水中の真核生物の細胞密度を示す(第4章の Phase-2)。また、Fig.7-2 に、DHS 反応器 B の最終処理水において観察された真核生物の一例を示す(第4章の Phase-2)。第4章の Phase-2 における DHS 反応器 A は、HRT 7.2 時間、OLR $0.99 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$ の条件のもと運転を行い、COD 除去率および $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去率はそれぞれ 86%および 99%であった(第4章、Fig. 4-2)。その一方で、DHS 反応器 B は、HRT 3.6 時間、OLR $1.97 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$ の条件のもと運転を行い、COD 除去率および $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去率はそれぞれ 60%および 82%であった(第4章、Fig.4-2)。このように DHS 反応器 B は、DHS 反応器 A よりも約 2 倍高い有機物負荷条件で運転を行っているため、COD や $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の処理性能は悪い状況にあった。この時、それぞれの DHS 反応器の流下方向における流下水中の真核生物の細胞密度を比較すると、DHS 反応器 B の流下水の方が、DHS 反応器 A の流下水よりも、真核生物の細胞密度は高かった(Fig.7-1)。特に、Fig.7-2 に示したような、保持汚泥に付着して増殖する原生動物(stalked protozoa の代表例: *Vorticella*)は、DHS 反応器 A の最終処理水中において検出することはできなかったが、DHS 反応器 B の最終処理水中において高頻度で検出することができた(Fig.7-1、stalked protozoa)。この stalked protozoa は、DHS 反応器 B の保持汚泥中においても、全体の 10–20%と比較的高い存在割合であった(第4章の Phase-2、Fig.4-3)。これより、保持汚泥中において定着できなかった(または剥離した)stalked protozoa が最終処理水中に流出したと考えられた。すなわち、stalked protozoa は、良好な水質を示す最終処理水中には存在しないが、過負荷状態にある(この負荷に対応した保持汚泥の微生物群集構造が構築されており、馴致が進行している)時期の最終処理水中には高頻度に存在する傾向にあることを明らかにすることができた。

以上より、DHS 反応器における処理水質や保持汚泥の馴致の程度を、極めて簡便に評価するうえで、最終処理水中の原生動物(特に、保持汚泥に付着して増殖する原生動物(代表例: *Vorticella*))を指標生物として利用可能であると判断することができた。

Phase-2: DHS reactor A (HRT 7.2 hours)



Phase-2: DHS reactor B (HRT 3.6 hours)

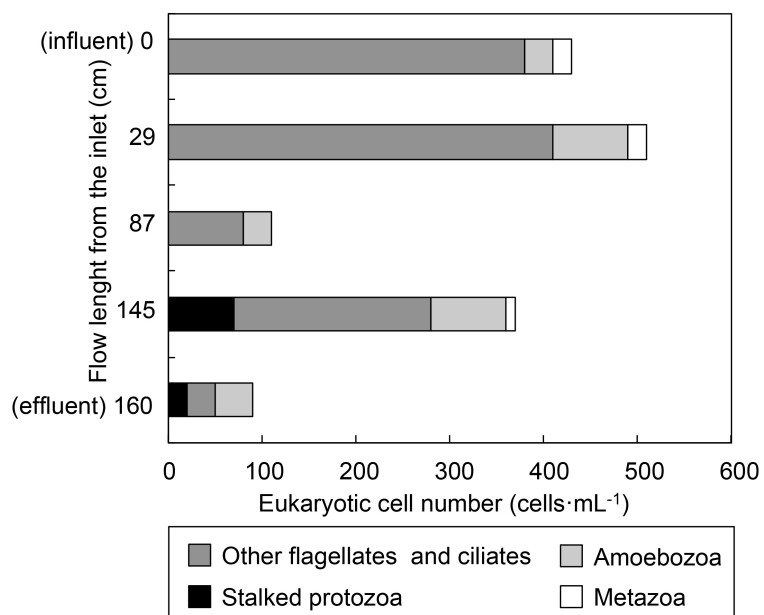


Fig.7-1 The eukaryotic cell number in the sponge pore water along flow length from the inlet of the DHS reactor (Chapter 4, Phase-2).

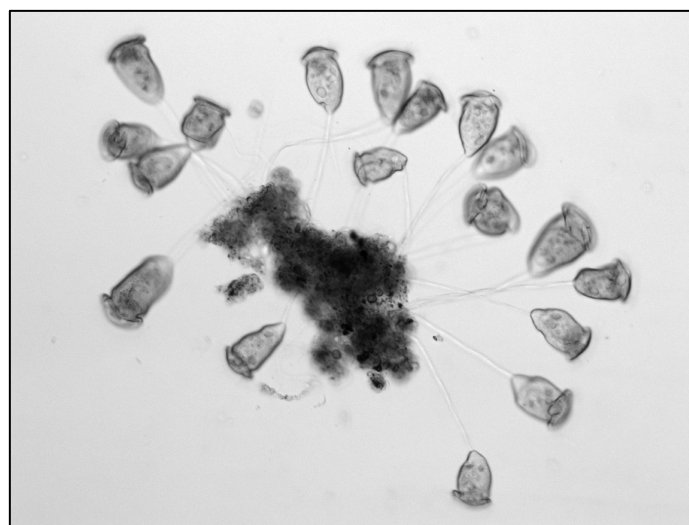


Fig.7-2 Photo of *Vorticella* with TSS in the effluent from the DHS reactor B (Chapter 2, Phase-2).

7.4 真核生物の 18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析によって得られた新しい知見

本論文では、(前段に UASB 反応器を用いずに) 下水処理を直接処理する DHS 反応器における真核生物群集構造を、18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析により明らかにした。このクローン解析は、第3章にて、DHS 反応器に存在する真核生物に対しても適用可能かどうかを検討した(データベースの情報の活用と、DHS 反応器に存在する真核生物 1 個体の PCR-Sequence 解析)。そして、実験室規模 DHS 反応器(第4章)だけでなく、バンコクに設置した実証規模 DHS 反応器(第6章)についても、第3章にて検討したクローン解析を行った。Fig. 7-3 に EukA/EukB で作成したクローンライブラリー、Fig. 7-4 に PSSU/EukB で作成したクローンライブラリーをまとめたものを示す。その結果、特に、検鏡では詳細に解析されて来なかった真菌(superkingdom *Nucleotmycea* に属する真核生物)に関して新しい知見を得ることができた。それらを以下に示す。

第4章では、superkingdom *Nucleotmycea* に属するファイロタイプが全クローン中 29–56%を占めており、kingdom/superkingdom レベルで分類を行ったクローンライブラリーの中で最も優占していた。さらに、そのなかでも genus *Trichosporon* および genus *Funticula* に近縁なファイロタイプの存在割合が植種汚泥よりも増加していた。genus *Funticula* に近縁な真核生物に関する知見は少なく、その下水処理汚泥内での機能を推定することは困難であったが、genus *Trichosporon* に近縁な真核生物のなかには脱窒反応に関与する真核生物が存在する。なお、第6章で実施したクローン解析においても superkingdom *Nucleotmycea* に属するファイロタイプが最も優占していたことを確認した(しかしながら、第4章で確認された genus *Trichosporon* に近縁なファイロタイプは検出されなかった)。さらに、興味深いことに、同じ下水を処理する汚泥(第4章では嫌気–無酸素–好気法の曝気槽内の汚泥、第6章ではオキシデーオンディッチ内の汚泥)のクローンライブラリーでは、superkingdom *Nucleotmycea* に属するファイロタイプは1クローンも検出されなかった(したがって全体での存在割合は2%以下)。このように下水の連続処理とともに、ある特定のファイロタイプの存在割合が増加する結果は、superkingdom *Nucleotmycea* に属する真核生物が DHS 反応器における下水処理機構の何れかに関与していることを示唆するものである。

また、第6章では、バンコク(タイ)の集合住宅排水処理設備に設置した実証規模 DHS 反応器に関して、18S rRNA 遺伝子配列に基づくクローン解析を行った。その結果、組成や濃度変動の生じる下水を処理する DHS 反応器の保持汚泥中から、phylum *LKM11* に属する機能未知な真核生物が高頻度に検出された(存在割合は全体の9–48%)。この phylum *LKM11* に属する真核生物は、第4章の DHS 反応器においても、その存在が確認されており(存在割合は全体の4–5%)、DHS 反応器による下水の処理機構を理解するうえで重要な系統分類群であると推測された。このように、第4章で示した実験室規模の DHS 反応器を解析した結果と同様に、系統的に多様な真核生物が存在していることを、実証規模の DHS 反応器においても確認することができた。この結果から、実験室規模の管理された条件下だけでなく、温度や下水組成、その濃度が時事刻々と変化するような、より現実的な条件下においても、機能未知な真核生物群集が下水処理機構に係わっていることが示唆された。

これらのファイロタイプの殆どは機能が分かっていない真核生物であったため、DHS 反応器における物質循環(炭素、窒素)を理解するうえで、原核生物だけでなく、これらの真核生物の機能や生理学的特性を解析する必要があると考えられた。このように、本研究の成果は、DHS 反応器における固形物分解もしくは脱窒反応に関して、真核生物が関与している可能性を示唆するものであり、重要な知見に成り得るものである。

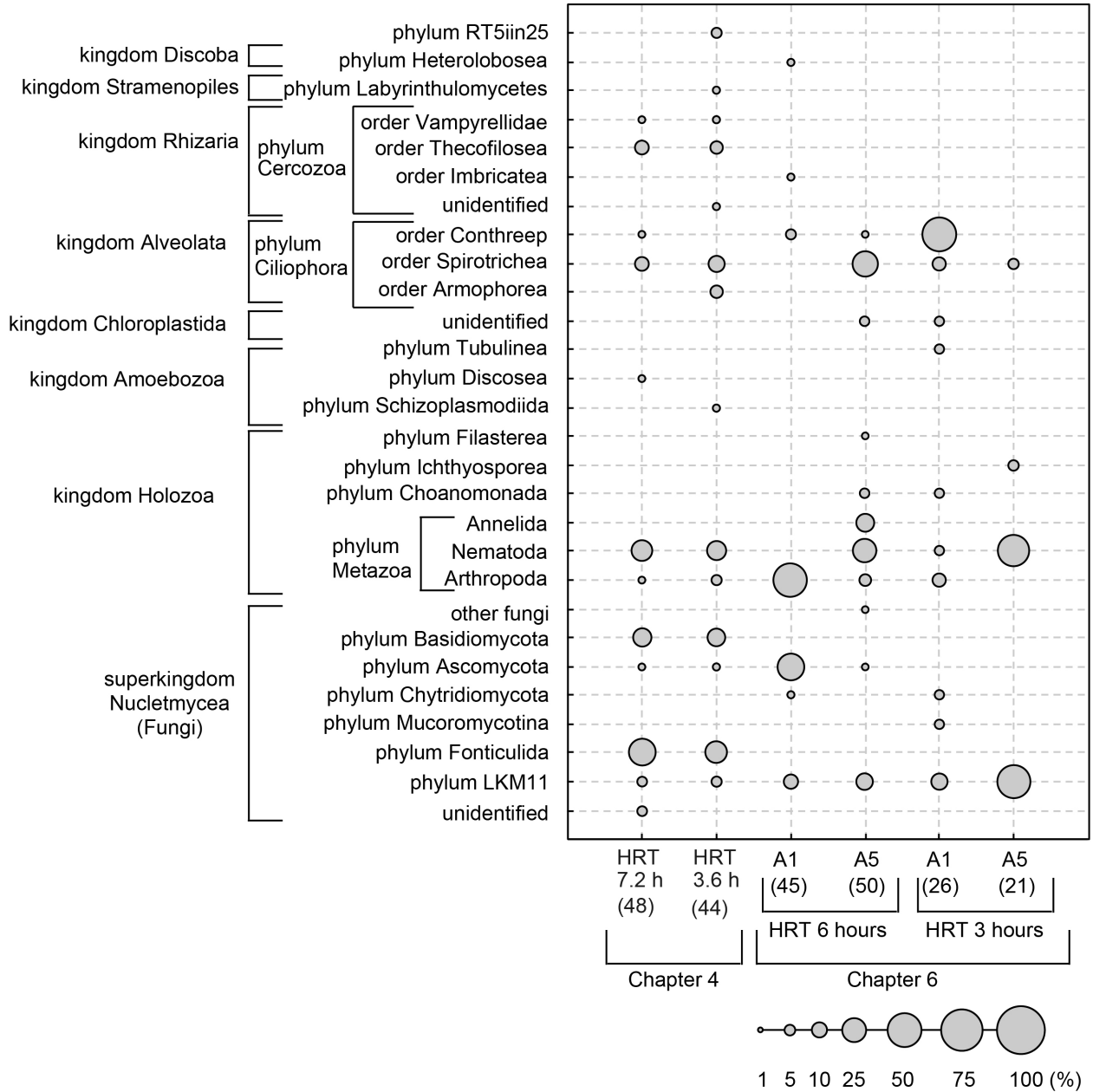


Fig.7-3 The eukaryotic community structure based on the 18S rRNA gene (EukA/EukB). The numbers in parentheses are the total number of clone sequenced (chapter 4 and 6).

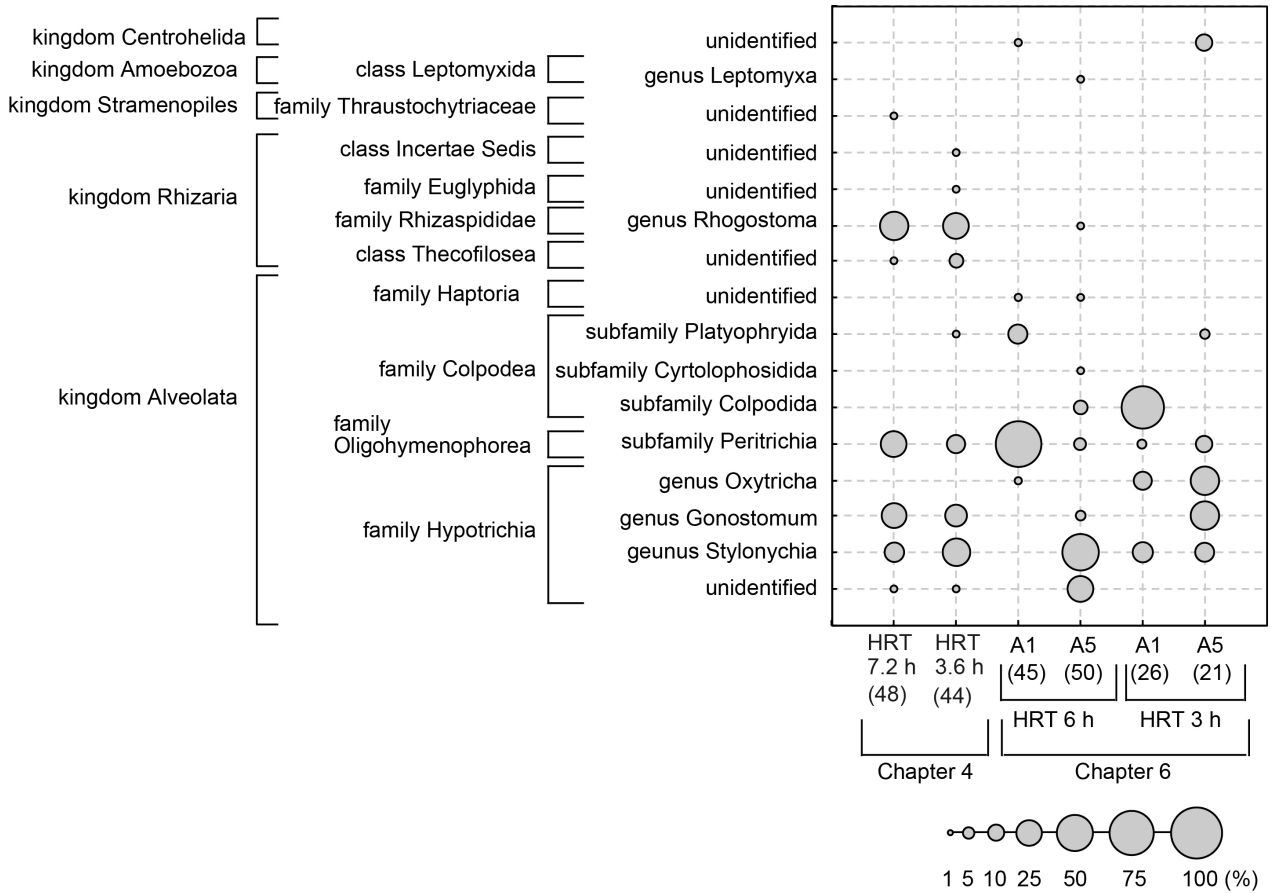


Fig.7-4 The eukaryotic community structure based on the 18S rRNA gene (PSSU/EukB). The numbers in parentheses are the total number of clone sequenced (chapter 4 and 6).

7.5 クローン解析と検鏡による真核生物群集構造解析結果の比較

Fig.7-5に、第4章において解析を行った、DHS反応器の保持汚泥中における真核生物群集構造(クローン解析と検鏡)を示す。7.4で述べたように、真核生物の18S rRNA遺伝子配列に基づく群集構造解析(EukA/EukBプライマー対のクローンライブラリー)では、検鏡による形態観察では同定が困難な真菌(Fig.7-5、Fungi)を検出可能であった。その一方で、検鏡において優占していたアメーバグループ(特に *Testate amoebzoa*)を検出することはできなかった。EukA/EukBプライマー対を使用して、アメーバグループのシーケンス解析を行っている報告があるが、本研究にて実施したクローン解析では、*Testate amoebzoa*(特に genus *Arcella*など)に近縁なクローンを得ることはできなかった(このアメーバグループは、第3章の真核生物1個体を対象としたPCR-Sequence解析においても解析できていなかった)。また、PSSU/EukBプライマー対のクローンライブラリーに着目すると、検鏡において検出された真核生物、特に、鞭毛虫と繊毛虫グループを概ね検出できていた。以上より、現状では、クローン解析と検鏡にそれぞれ長所と短所があるため、DHS反応器の保持汚泥中における真核生物群集構造を解析・評価する場合、クローン解析と検鏡を併用する必要がある。

活性汚泥試料(Fig.7-5、Activated sludge)に着目すると、*Testate amoebzoa*以外の真核生物を検出できていた。これは、活性汚泥ではDHS反応器の保持汚泥と異なり、真菌の割合が少ないためと考えられた。そのため、活性汚泥試料のような真菌の割合が少ない試料における、真核生物群集構造を解析する場合は、どちらかの解析手法だけでも、十分であると考えられる。

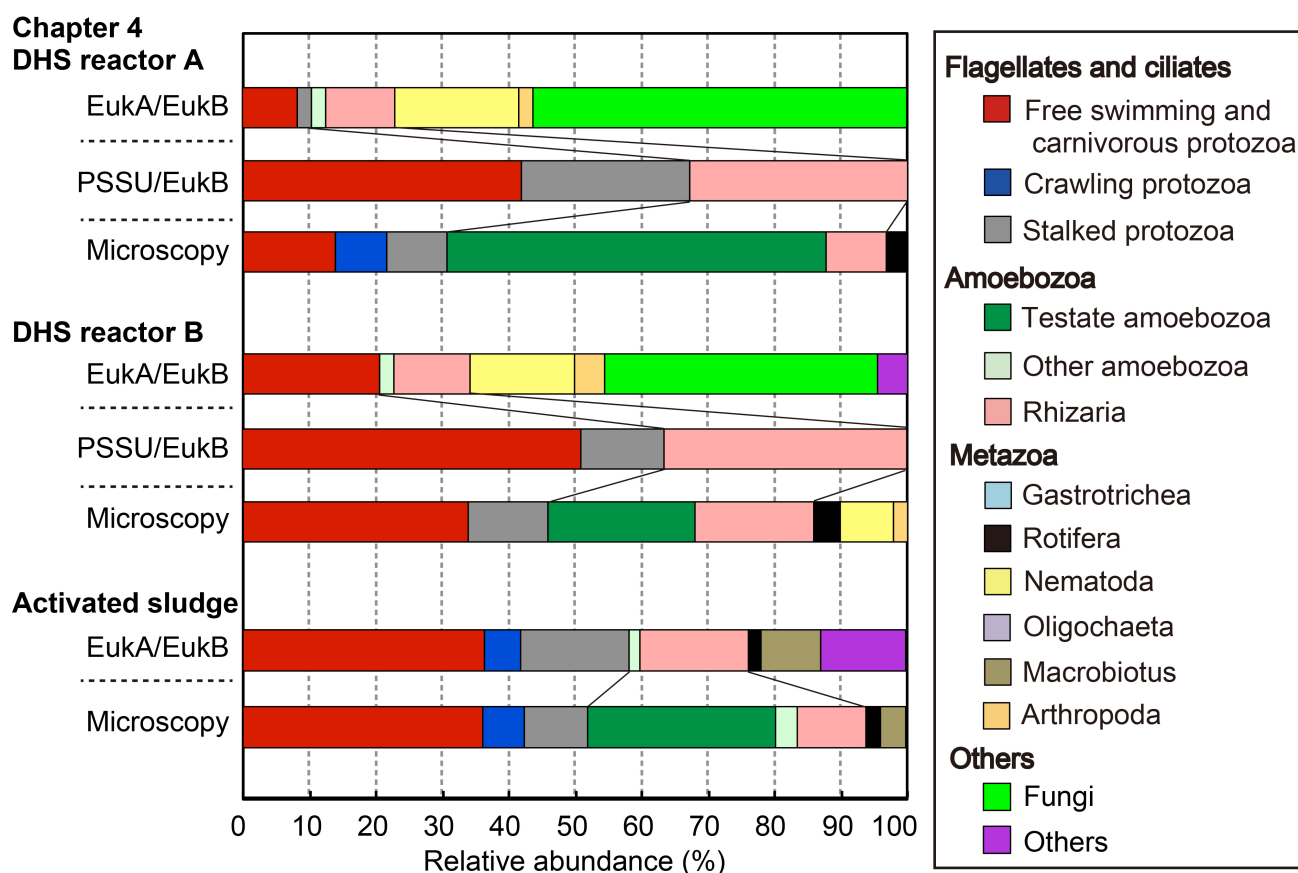


Fig.7-5 Comparison for the clone libraries based on 18S rRNA gene-sequences (EukA/EukB and PSSU/EukB primer pair) and microscopic enumeration (chapter 4).

7.6 DHS反応器の分散型下水処理技術としての適用可能性

第6章では、バンコクに実証規模のDHS反応器を設置し、下水処理特性の評価を行った。実証規模の実験では、実験室規模の実験とは異なり、1日の中で、有機物濃度および水理的滞留時間、すなわち有機物負荷が変動するため、安定した処理水質を得ることが難しい。具体的には、供給する下水の組成や濃度(有機物負荷)の変動が生じる運転条件において、DHS反応器による約550日間の連続処理運転(一定負荷運転)および約2ヶ月間の負荷変動運転を行い、その下水処理特性を評価した。一定負荷運転による連続処理実験は約550日間行った。HRT 3時間(OLR:0.6–1.4 kgCOD·m⁻³·sponge·day⁻¹、0.5–0.7 kgBOD·m⁻³·sponge·day⁻¹)の条件のもと、DHS反応器の処理性能は、それぞれ流入水に対して、TSS除去率81–92%、COD除去率80–83%、BOD除去率91%、NH₄⁺-N除去率95–98%と高く安定していた。この期間中の余剰汚泥発生量は5.8 mgTS·L⁻¹·wastewaterであり、既存処理プロセス(オキシデーションディッチ法では58.2 mgTSS·L⁻¹·wastewater)よりも低く抑えることができた。また、連続処理運転期間中の消費電力を試算すると、0.06 kWh·m⁻³·wastewaterであり、既存処理プロセス(オキシデーションディッチ法では0.394 kWh·m⁻³·wastewater)よりも省エネルギーな技術であることが証明された。

さらには、負荷変動運転を約2ヶ月間行い、負荷変動運転開始前後の、DHS反応器流下方向の水質プロフィールと保持汚泥濃度プロフィールを解析した。この期間中、COD除去とTSS除去に関して、顕著な処理性能悪化は認められず、一定負荷運転時(HRT 3時間で一定)における、最終処理水のCOD濃度およびTSS濃度と比較しても遜色なかった。その一方で、負荷変動運転の高負荷時において、処理水のNH₄⁺-N濃度が22 mgN·L⁻¹にまで増加した(不完全な硝化反応)。しかしながら、2ヶ月後の高負荷時は、流入水のNH₄⁺-N濃度が43 mgN·L⁻¹にまで上昇しており、一概に濃度だけで評価することは難しいと考えられた。そこで、DHS反応器の流下方向におけるNH₄⁺-N濃度の変化量と保持汚泥量から、NH₄⁺-N酸化速度を算出したところ、高負荷時では9.0 gN·kgVSS⁻¹·day⁻¹であった。この算出したNH₄⁺-N酸化速度において、流入NH₄⁺-N濃度を年平均値である30 mgN·L⁻¹程度と仮定した場合、高負荷時の条件においても、処理水のNH₄⁺-N濃度を10 mgN·L⁻¹程度にまで減少させることができる。実際に、コンポジットサンプリングした処理水の日平均NH₄⁺-N濃度は5 mgN/Lであり、一定負荷運転時の処理水のNH₄⁺-N濃度(6 mgN/L)と同程度であった。

以上の結果から、DHS反応器では、最大負荷比2倍程度の負荷変動であれば、固形物除去、有機物除去、硝化に関して、一定負荷運転時と同程度の下水処理性能を発揮できる(同程度の処理水質を得ることができる)ことを実証することができた。第5章では、最大負荷比5倍の負荷変動運転を実施したが、処理性能は極めて悪かった。そのため、2倍以上5倍以下の負荷変動のなかで、最適な運転条件を検討する必要があることが明らかになった。このように、DHS反応器は、1日の中で有機物負荷量が数倍に変化しやすい条件においても、十分に高い性能を発揮することができるため、分散型下水処理技術として適用できる可能性を有していると言える。

7.7 処理の安定化・効率化を目的とした DHS 反応器の運転方法の提案

第3章では、日本国内の下水処理 UASB-DHS システムでは、冬季から春季における有機物負荷変動、また、固形性有機物の蓄積によって、処理水質が極めて悪化することを報告した。第4章および第5章では、有機物負荷(固形性有機物濃度および HRT)は、DHS 反応器における真核生物群集構造を変化させる要因であることを報告した。また、第5章では、HRT の能動的な変動による運転(負荷変動運転:最大負荷比 5 倍)において、良好な処理性能(TSS、COD、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去)は得られなかったが、DHS 反応器中部および下部における真核生物の細胞密度を上昇可能であることを報告した。さらに続く第6章では、バンコクの下水を処理する実証規模 DHS 反応器において、負荷変動運転(最大負荷比 1.8 倍)を適用したところ、一定負荷運転時と遜色ない程度の処理性能(TSS、COD、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去)を維持可能であったことを報告した。また、DHS 反応器の保持汚泥濃度の上昇とともに(第6章の Fig.6-6)、COD 除去および $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 除去に遅れが生じていた(第6章の Fig.6-4)。加えて、DHS 反応器の流下方向における硝酸性窒素濃度および全窒素濃度が、BOD 濃度が減少した反応器中段以後においても、継続的に減少していた(第6章の Fig.6-5)。この結果は、DHS 反応器の中段以降において、脱窒反応に必要な炭素源が継続的に供給されており、かつ、無酸素条件が維持されていることを示唆している。これらのことから、スポンジ担体に過度に汚泥が付着し過ぎてしまい(もしくは未分解な固形性有機物が蓄積してしまい)(Fig. 7-6、矢印)、スポンジ担体に保持された汚泥への酸素供給律速が生じていることが推測された。これに加え、過度に生長した生物膜は、短絡流の発生や基質拡散の非効率化を招く可能性も考えられた。

第3章の知見から、DHS 反応器を下水処理技術として適用する場合、固形性有機物の処理が課題であると言える。また、第6章の知見から、過度な保持汚泥濃度の上昇によって、処理性能の悪化を招くことが懸念された。本章にて提案する運転方法では、DHS 反応器の保持汚泥(また、未分解な固形性有機物)の一部を、真核生物に捕食させることで、処理の安定化・効率化を図るものである。次項に提案する運転方法の概略を示す(Fig. 7-7、負荷変動運転と処理水循環を組み合わせた運転方法の案、運転条件の検討)。



Fig.7-6 Photos of sponge media with retained sludge in the pilot-scale DHS reactor (chapter 6). Left: sponge media with attached retained sludge in general, Right: sponge media with excessively attached retained sludge.

負荷変動運転と処理水循環を組み合わせた運転方法の案 (Fig. 7-7)

負荷変動運転とともに処理水循環を組み合わせて運転を行う。負荷変動では、最大負荷比2倍(1日の平均有機物負荷を基準として計算)の負荷変動を与え、過度に生長した保持汚泥の剥離、保持汚泥中の真核生物細胞密度の増加を図る。この負荷変動は、第5章および第6章で示したように、1日のなかで高負荷と低負荷が交互に繰り返す運転方法である。処理水循環では、DHS反応器上部の酸素不足を防ぐことで、さらに保持汚泥中の真核生物細胞密度の増加を図る。このとき、保持汚泥中における真核生物の細胞密度を高密度に維持することにより、保持汚泥量および固形性有機物の減容化をある程度期待することもできる。このように、過度に生長した保持汚泥、および、蓄積する固形性有機物を真核生物に捕食させることができれば、DHS反応器における処理の安定化・効率化への寄与が期待できる。そのため、従来のUASB-DHSシステムで問題になっていた冬季から春季にかけて生じる性能悪化や流入水の固形性有機物濃度上昇時(ショックロード)における性能悪化等を未然に防止する運転方法としての応用が考えられる。

運転条件の検討

本研究にて得られたDHS反応器における運転条件と処理性能を次に列挙する。

・第4章: 流入下水 (COD: 158–295 mgCOD·L⁻¹、NH₄⁺-N: 19–21 mgN·L⁻¹、TSS: 33–123 mgTSS·L⁻¹)、室温 20℃

・低負荷系 (DHS 反応器 A)

OLR: 0.52–1.00 kgCOD·m⁻³-sponge·day⁻¹

HRT: 7.2 時間

除去率: COD 81–85%、NH₄⁺-N 94–100%

・高負荷系 (DHS 反応器 B)

OLR: 1.05–2.01 kgCOD·m⁻³-sponge·day⁻¹

HRT: 3.6 時間

除去率: COD 79–85%、NH₄⁺-N 73–100%

・第5章: 人工排水 (COD: 118–122 mgCOD·L⁻¹、NH₄⁺-N: 10 mgN·L⁻¹)、室温 20℃

・一定負荷運転系

OLR: 0.8 kgCOD·m⁻³-sponge·day⁻¹

HRT: 3.8 時間

除去率: COD 93%、NH₄⁺-N 79%

・負荷変動運転系

最大負荷変動比: 5 倍

OLR: 低負荷時 0.2 kgCOD·m⁻³-sponge·day⁻¹、高負荷時 3.8 kgCOD·m⁻³-sponge·day⁻¹

HRT: 低負荷時 15 時間、高負荷時 0.8 時間

日平均除去率: COD 82%、NH₄⁺-N 20%

・第6章:流入下水(COD:147–170 mgCOD·L⁻¹、BOD:60–86 mgBOD·L⁻¹、NH₄⁺-N:28–33 mgN·L⁻¹、TSS:39–42 mgTSS·L⁻¹)、年平均気温 27–32°C

・一定負荷運転系

OLR:0.6–1.4 kgCOD·m⁻³-sponge·day⁻¹、0.3–0.7 kgBOD·m⁻³-sponge·day⁻¹

HRT:3.0–6.0 時間

除去率:COD 80–85%、BOD 91%、NH₄⁺-N 95–99%、TSS 81–93%

・負荷変動運転系

最大負荷変動比:1.8 倍

OLR:低負荷時 0.4–0.6 kgCOD·m⁻³-sponge·day⁻¹、高負荷時 1.9–2.6 kgCOD·m⁻³-sponge·day⁻¹

低負荷時 0.1–0.2 kgBOD·m⁻³-sponge·day⁻¹、高負荷時 0.6–1.0 kgBOD·m⁻³-sponge·day⁻¹

HRT:低負荷時 7.0 時間

高負荷時 1.7 時間

日平均除去率:COD 78%、BOD 92%、NH₄⁺-N 87%、TSS 72%

上記に示した、これまでの実験結果から検討した、下水処理 DHS 反応器の運転条件を以下に示す(処理性能は COD 80%、BOD 90%、NH₄⁺-N 90%、TSS 70%を目標とする)(Fig. 7-7)。

・想定する DHS 反応器設置場所:東南アジア地域(年平均気温 30°C程度)の分散型下水処理施設

・下水濃度: COD 160 mgCOD·L⁻¹、BOD 75 mgBOD·L⁻¹、NH₄⁺-N 30 mgN·L⁻¹、TSS 40 mgTSS·L⁻¹

・最大負荷変動比:2 倍

・OLR:低負荷時 0.6 kgCOD·m⁻³-sponge·day⁻¹、高負荷時 2.6 kgCOD·m⁻³-sponge·day⁻¹

低負荷時 0.3 kgBOD·m⁻³-sponge·day⁻¹、高負荷時 1.2 kgBOD·m⁻³-sponge·day⁻¹

#日平均 OLR:1.3 kgCOD·m⁻³-sponge·day⁻¹、0.6 kgBOD·m⁻³-sponge·day⁻¹

・HRT:低負荷時 6.0 時間

高負荷時 1.5 時間

#日平均 HRT:3 時間

7.8 まとめと今後の展望

本論文は、DHS 反応器の保持汚泥中における真核生物群集構造の特徴や推移を報告したものである。特に、DHS 反応器の保持汚泥中における真核生物群集構造と下水処理特性との関連性を、詳細に解析し、真核生物群集の制御手法を検討するうえで必要な基礎知見を多く得ることができた。さらに、DHS 反応器を分散型下水処理技術として適用できる可能性を示すことができた。これらの知見は、DHS 反応器における下水処理機構を理解するうえで有益な基礎知見である。具体的には、DHS 反応器に存在する真核生物群集が処理水質改善に寄与していることを、限定的ではあるが、確認することができた。また、DHS 反応器に存在する真核生物群集を、能動的に負荷変動(水理的滞留時間の変動)を与えることによって制御可能であることを明らかにした。さらに、DHS 反応器による下水の連続処理後に、機能未知な真核生物群集(特に、superkingdom *Nucleomycea* のなかでも genus *Trichosporon* および genus *Funticula* に近縁なファイロタイプ)の存在割合が増加していることを確認することができた。これらのことから、DHS 反応器の運転方法を最適化することで、真核生物群集の機能を最大限に活用することも不可能ではないと考えている。しかしながら本論文では、真核生物の個体数の計測結果および DNA に基づいた解析結果を主に提示しており、反応器内の微生物群集の制御方法を検討するにあたり重要な”活性”や”生態”について解析・評価できていない。本論文の成果により、重要だと判断できた真核生物群集に関しては、その活性について、RNA に基づいた解析を適用し評価する必要があると考える。また、それらの生態についても、分離培養に挑戦し、最適 pH、最適温度、基質の分解特性(代謝情報)、基質の分解活性、などを評価する必要がある。さらに、真菌(カビ、酵母)の細胞壁には、セルロースやキチンが含まれており、それに結合する染色剤(例えば、カルコフロールホワイト染色、SIGMA-ALDRICH、CAS 番号 4404-43-7、参考 URL: http://www.aandt.co.jp/jpn/tree/vol_8_2.htm)を使用すれば、保持汚泥中の原核生物と真核生物を区別し、DHS 保持汚泥中における細胞形態や空間的分布を解析可能であると考えられる。

このように本論文で取り組んだ課題は、今後も研究開発や検討が必要であるものである。以上、本論文で示した成果が、DHS 反応器における下水処理の更なる安定化・効率化、余剰汚泥発生量の更なる抑制につながることを期待して、本論文の結びとする。

本学位論文の基礎となる論文

1. 宮岡佑馬、幡本将史、珠坪一晃、小野寺崇、多川正、上村繁樹、荒木信夫、山口隆司(2013) 下水処理 UASB 後段の DHS リアクターにおける排水処理特性と真核生物群集構造の季節変動, 土木学会論文集 G (環境), 69 (7): III257-III264.
2. Yuma Miyaoka, Masashi Hatamoto, Takashi Yamaguchi, and Kazuaki Syutsubo (2016) Eukaryotic community shift in response to organic loading rate of an aerobic trickling filter (down-flow hanging sponge reactor) treating domestic sewage, *Microbial Ecology*, DOI: 10.1007/s00248-016-0871-0.
3. Yuma Miyaoka, Yoochatchaval Wilasinee, Haruhiko Sumino, Pathan Banjongproo, Takashi Yamaguchi, Takashi Onodera, Tomohiro Okadera, Kazuaki Syutsubo (submitted) Evaluation of wastewater treatment performance of the down-flow hanging sponge for direct treatment of domestic wastewater in Bangkok, Thailand, submitted to *Journal of Environmental Science and Health, Part A*.

参考となる論文

1. Namita Maharjan, Kazuya Dehama, Kota Ohtsuki, Yayoi Saito, Yuma Miyaoka, Tashi Tshering, Akinobu Nakamura, Masashi Hatamoto, Takashi Yamaguchi (2014) An integrated system of UASB-DHS-A2SBR for effective removal of organic matter and nutrients from municipal wastewater, *Journal of Water and Environment Technology* 12 (5): 421-429.
 2. Takashi Onodera, Gen Kanaya, Kazuaki Syutsubo, Yuma Miyaoka, Masashi Hatamoto, Takashi Yamaguchi (2015) Spatial changes in carbon and nitrogen stable isotope ratios of sludge and associated organisms in a biological sewage treatment system, *Water Research* 68: 387-393.
 3. Daisuke Tanikawa, Kazuaki Syutsubo, Takahiro Watari, Yuma Miyaoka, Masashi Hatamoto, Sou Iijima, Masao Fukuda, Ngoc Bich Nguyen, Takashi Yamaguchi (2016) Greenhouse gas emissions from open-type anaerobic wastewater treatment system in natural rubber processing factory, *Journal of Cleaner Production* 119: 32-37.
-