

2008 年度 修 士 論 文

二相処理法による汚泥生成率の低減と
原生動物相の分生物学的な解析
Reduction of Sludge Production by Two-stage Process
for Wastewater Treatment
and Molecular Analysis of the Protozoan Community

東 友子
Azuma, Tomoko

東京大学大学院新領域創成科学研究科
社会文化環境学専攻

目次

第一章 序章	1
1.1 研究背景	
1.2 研究目的	
1.3 本論文の構成	
第二章 既往の知見	5
2.1 活性汚泥法	
2.1.1 活性汚泥法の歴史	
2.1.2 活性汚泥法	
2.1.3 二相処理法	
2.2 分子生物学的な生物群集構造解析	
2.2.1 PCR 法	
2.2.2 T-RFLP 法	
第三章 実験方法	9
3.1 概論	
3.2 リアクターの運転	
3.2.1 概要	
3.2.2 構造	
3.2.3 基質	
3.2.4 運転	
3.2.5 種汚泥	
3.2.6 分散細菌槽および活性汚泥槽の HRT	
3.3 リアクターのモニタリング	
3.3.1 概要	
3.3.2 項目と測定方法	
3.4 生物群集構造解析	
3.4.1 概要	
3.4.2 分子生物学的解析(PCR/T-RFLP)	
3.4.3 顕微鏡による観察	

第四章 実験条件の検討.....23

4.1 概要

4.2 リアクターの運転条件

4.2.1 リアクター構造

4.2.2 基質

4.3 リタクターのモニタリング

4.3.1 汚泥サンプル

4.4 PCR/T-RFLP 法

4.4.1 概要

4.4.2 PCR 鋳型(DNA 抽出法)

4.4.3 PCR 条件

4.4.5 制限酵素処理

第五章 HRT と汚泥生成率.....33

5.1 概要

5.2 各槽の観察記録

5.2.1 分散細菌槽

5.2.2 活性汚泥槽 HRT24

5.2.3 活性汚泥槽 HRT 3

5.2.4 活性汚泥槽 HRT 6

5.2.4 HRT24 HRT 3 HRT 6 共通の特筆すべき点

5.3 結果と考察;分散細菌槽の挙動

5.3.1 分散細菌槽の処理性能

5.3.2 分散細菌槽の汚泥生成率

5.3.3 TOC 測定値と MLSS 値の関係について

5.4 結果と考察;HRT24, 3, 6 での活性汚泥槽の処理性能

5.4.1 各 HRT での処理性能について

5.4.2 処理水に含まれる溶存有機物

5.4.3 処理水中の SS 成分量

5.4.4 活性汚泥槽の処理性能 まとめ

5.5 HRT とリアクターの汚泥生成率

5.5.1 各 HRT における汚泥生成率

5.5.2 HRT の影響

第六章 結果と考察;分子生物学的手法による生物相の解析……………48

6.1 概要

6.2 データの分析方法

6.3 細菌を対象とした解析

6.3.1 T-RFLP 電気泳動図

6.3.2 対象とするフラグメント

6.3.3 グループA

6.3.4 グループB

6.3.5 グループC

6.3.6 細菌を対象とした解析のまとめ

6.4 原生動物等(真核生物)を対象とした解析

6.4.1 分散細菌槽に存在する真核生物

6.4.2 活性汚泥槽に存在する真核生物

6.4.3 グループD

6.4.4 グループE

6.4.5 グループF

6.4.6 原生動物等(真核生物)を対象とした解析のまとめ

第七章 総括……………62

7.1 概論

7.2 二相処理法の汚泥減量効果

7.3 生物相の分子生物学的な解析

謝辞

参考文献

付録

第一章 序章

1.1 研究背景

排水の処理方法として古くから用いられている活性汚泥法は、微生物や原生動物等（原生動物や微小な後生動物）を利用した生物化学的な排水処理方法であり、現代においてもごく一般的に用いられている。およそ 2 世紀にわたる研究と実践によって培われた処理施設運転の知識と技術は広く普及し、世界中の都市下水や工業排水などが安定的に処理されている。

一方、生物化学的排水処理において、安定した運転のノウハウはある程度確立されているものの、生物がどのように排水処理に働いているのか等、処理過程の全貌を捉えたメカニズムの詳細はほとんど解明されていない。その理由として、定常的な運転にメカニズムの解明は必ずしも必要ではないこと、また多種多様な微生物・原生動物等が複雑に関係している処理過程を明らかにするのは困難であること、などがあげられる。

しかし、実下水処理場で微生物・微小生物のバランスが崩れ排水処理に支障をきたすこともあり、その原因は不明である場合も多く、確実な予防策や対処方法が確立しているとはいえない。また、反応槽の曝気や余剰汚泥の処分には多くのエネルギーを必要とし、その費用は処理場の運営費を圧迫している。より確実で効率的な排水処理のために必要な知見の一つとして、処理過程に関わる生物群集の構造解析が挙げられる。

活性汚泥に存在する生物については、以前から研究されてきた。処理性能は汚泥の生物相（微生物・原生動物等）によって左右される面あり、特定の原生動物（指標生物）の存在によって汚泥の状態を把握し、運転条件が調整されている。しかし指標生物とされる原生動物等には、形態的・生態的に判別の難しい種も多く、顕微鏡観察による汚泥状態の判定には知識と経験が必要である。それほど訓練を必要とせず、観測者による誤差の少ない新しい手法があるとよいだろう。

他方、多種多様な生物が混在する活性汚泥の様なサンプルに対し、その生物群集構造を解析する方法として分子生物学的な手法が発展を続けている。PCR/T-RFLP など生物間の遺伝子配列の相違を利用した分析法が開発され、顕微鏡観察等の従来の方法では把握できなかった情報を比較的手軽に読み取ることができるようになった。しかし、手法の活用についてはまだまだ研究が必要である。T-RFLP 法で得られた情報と実際の生物を繋げるデータベースは、その一端しか構築されていない状況である。データベースの増築は、生物の異なる性質に合わせ、千差万別の手法で得られた情報を一つ一つリンクさせるしかない。小さな一石でも無駄にはならないデータとなる。

生物化学的排水処理のより確実で効率的な運転に向けて解明が求められる知見の一つに、処理を担う生物の群集構造解析が挙げられる。そしてその生物群集構造解析のための手法の一つとして、遺伝子情報を読み取る分子生物学的な手法が考えられる。原生動物等、微小な真核生物に対する遺伝子情報は近年積極的に解明され始めた。活性汚泥の生物群集構造解析における新たな手法として、分子生物学的生物群集構造解析の将来的な有用性・可能性について検討する時期にあるのではないか。

1.2 研究目的

多種多様な性質をもつ微生物群集を利用する活性汚泥法の汎用性は高く、特殊な排水に対しても変法が開発され適用されている。たとえば乳製品加工や醤油製造の工場から排出される排水は、除去すべき成分の大部分が溶解性有機物であり、過剰な栄養塩や難分解性成分を含まない。これは生物化学的排水処理においてきわめて処理しやすい排水だといえる。この様な排水をより効率良く処理する方法として、二相処理法というプロセスが生み出された。標準活性汚泥法から波及したプロセスであり、最大の特徴は反応槽を2段階に分け、2種類の生物相を作り出す点にある。1段階では増殖速度の早い微生物を優占させ排水中の汚れ成分（溶解性有機物）を微生物体に変換する。2段階目の反応槽で増殖した微生物を捕食させ固液分離を図る。これにより、高濃度の溶解性有機物を短時間で処理できるだけでなく、食物連鎖の高次化による発生汚泥量の減量をも期待できるプロセスである。

この二相処理法は実際の現場で採用されており、理論に沿った処理性能をみせている。しかし多くの生物化学的排水処理法と同様に、処理過程における生物の役割について解明されていない点も多い。しかしながら、溶解性有機物を摂取する原生動物も存在し、かつ有機物の摂取と生物体間での捕食が同時に行われる標準活性汚泥とは異なり、そのプロセスの構造上、溶解性有機物を摂取する細菌と、細菌を捕食する原生動物等を明確に分けて動向を追うことができる二相処理法は、食物連鎖の一部をとらえることのできるプロセスである。また、排水処理の処理性能や汚泥発生率を左右する生物相を追いややすいプロセスであるとも言える。

二相処理法を利用した研究によって、以下の2点に着目した知見を得ることを目的とした。

◇二相処理法の、排水処理プロセスとしての有用性

◇排水の処理に影響を与える生物群集の、分子生物学的手法による解析

上記の目的に対し、本研究における具体的な研究目標を以下に定めた。

①二相処理法の汚泥減量効果の証明

②汚泥の挙動と、分子生物学的手法による汚泥中の
生物群集構造解析の相関調査

1.3 本論文の構成

本論文の構成を以下に示す。本章では研究の背景と目的を、第二章では本研究に関連する既往の知見をまとめた。第三章では本研究に用いた実験手法を説明し、第四章で実験条件の検討を示した。第五章から第七章までに実験結果および考察を述べ、第八章で本研究の成果をまとめた上で今後の展望を記述した。

第一章 序論 本研究の背景と目的および論文の構成を述べた

第二章 既往の知見 本研究に関わる既往の研究をまとめ、知見を整理した

第三章 実験方法 本研究で行った実験の手法についてまとめた

第四章 実験条件の検討 本研究で用いた実験手法の条件を検討した

第五章 実験結果と考察 本研究で得られた結果と、その考察を記した
； HRT と生成汚泥量

第六章 実験結果と考察 本研究で得られた結果と、その考察を記した
； 分子生物学的手法による生物相の解析

第七章 総論 第五章・第六章を踏まえ総合的な考察をまとめた

第二章 既往の知見

2.1 活性汚泥法

2.1.1 活性汚泥法の歴史

微生物を利用して下水を処理する活性汚泥法は、19 世紀後半ごろから欧州で始まった。元々は微生物に下水を処理させるという発想ではなく、下水の悪臭対策として曝気を始めたのがきっかけであった。下水の放つ悪臭は嫌気的な環境からくるものであり、空気を送り込んで好気的な環境にすることで、臭いは改善される。下水を曝気する中で生じる浮遊性物質が、下水を浄化する効果があると分かり、1914 年のイギリス化学会で活性汚泥法の誕生宣言が行われた。

現在、下水の生物処理には活性汚泥法の他にも様々な方法が存在する。それらの多くは、砂の多い土壌に下水を散布する間欠砂濾過や、下水を長時間貯留して分解する腐敗槽などから改良が重ねられ、確立していったものである。間欠砂濾過法は、酸素が行き渡る隙間のある砂相に下水を流すことで、下水中に含まれる物体を砂で濾過しながら、更に砂の表面に付着した微生物が下水に含まれる有機物や栄養塩を好気条件で摂取し増殖することで、砂相を通り抜けた下水を浄化する方法であり、好気性処理法と呼ばれる下水処理法のはしりであるとされる。微生物を砂や膜に付着させ、そこに下水を通す生物膜法と、浮遊性の微生物が多く存在する水槽に下水を流し入れる浮遊生物法に大別できる。一方腐敗槽は下水を静置し浮遊物質を沈殿させる発想から生じた処理法であり、下水を長時間静置すると汚泥成分が底に溜まり、そこから腐敗によるガスが発生する。それは嫌気的な環境で増殖した嫌気性細菌の働きによるものであり、嫌気性消化法のはしりであるとされる。その後尿尿浄化槽や嫌気性消化法などに発展した。

2.1.2 活性汚泥法

活性汚泥法の基本的な処理過程を表した模式図である(図 2-1)。

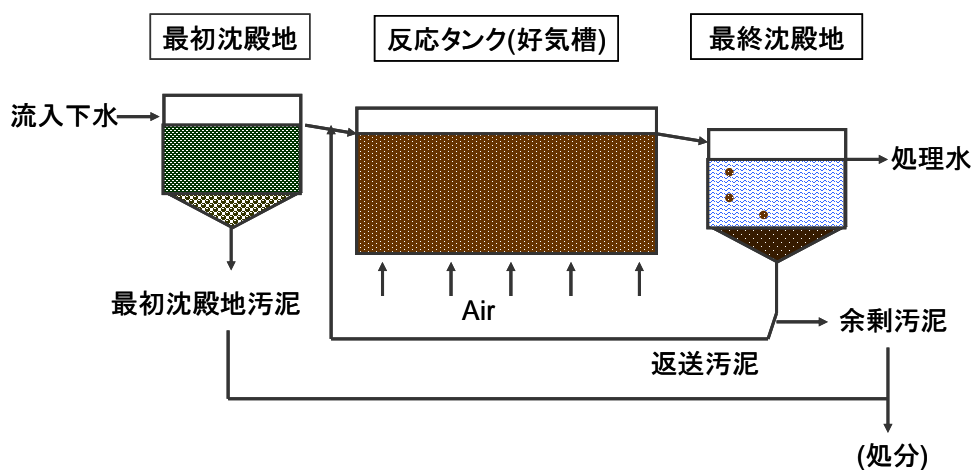


図 2-1 標準活性汚泥法 模式図

流入下水は最初沈殿池で砂や大き目の物質が沈殿除去され、反応タンクへ移る。反応タンクではポンプで空気が送り込まれており、汚泥(微生物や原生動物等、その他の物質)が混合されている。流入してきた下水の有機物・栄養塩・その他成分は加水分解を行いながら汚泥中の微生物・微小生物の増殖に使われる。処理水と汚泥が混ざった汚泥混合液は最終沈殿池に入り、上澄みは処理水として環境に放流される。汚泥の一部は再び反応槽に戻って更に下水を処理するが、その他の汚泥は余剰汚泥として排出される。最初沈殿地に沈殿した砂や大き目の有機物と一緒に処分される。

2.1.3 二相処理法

本研究の研究対象である二相処理法は、1987 年の中村和憲の研究に基づいている。活性汚泥法において、溶解性有機物を下水中から固体(菌体)へと変換するのは細菌であり、細菌の倍化速度は数十分程度である。一方で標準活性汚泥法の汚泥滞留時間(SRT)は 5 日程度に設定されている場合が多い。処理対象を溶解性有機物に限定した場合、標準活性汚泥法では細菌の処理能力が抑えられてしまっている。二相処理法の発想の原点である。

都市下水に含まれる成分は様々であるが、有機物と栄養塩がその中心である。特に、洗剤由来や人体から排出されたリンや窒素が多く、これらが川や湖、内湾等の閉鎖性水域に放流されると富栄養化にともなう貧酸素化等の環境問題に結びつく。標準活性汚泥法で優占する好気性の細菌は積極的に栄養塩を摂取するわけではない。あくまで、増殖の際に必要な量だけを摂取するのである。有機物の豊富な好气的環境に強い細菌だけに有機物を摂取させていたのでは、都市下水に含まれる過剰な栄養塩を除去しきることが難しい。

しかし、乳製品の加工工場や醤油製造工場からの工場排水には過剰な栄養塩・難分解性の成分は含まれない。細菌の処理能力を最大限に生かせる排水であると言える。

しかし細菌は沈殿しにくい。下水中から溶解性有機物を除去しても、水と細菌の固液分離が成されなければ処理とは言えない。そこで登場するのが原生動物や微小な後生動物である。細菌よりも大きいこれらの生物が細菌を捕食することで、沈降性が増し、固液分離がはかれるのである。そして、溶解性有機物→細菌→原生動物の明確な食物連鎖が、汚泥の発生率を抑えられている。

二相処理法の模式図を示す(図 2-2)。

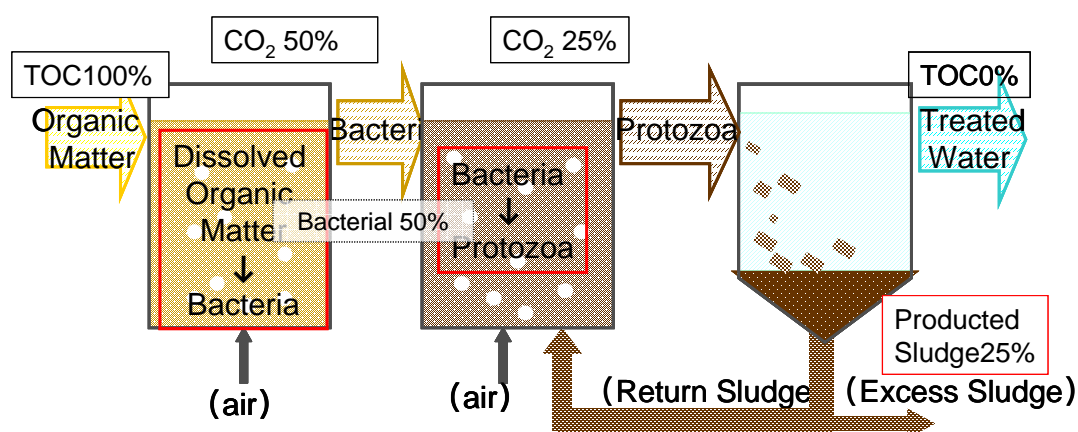


図 2-2 二相処理法 模式図

2.2 分子生物学的な生物群集構造解析

2.2.1 PCR 法

PCR(Polymerase Chain Reaction)法は 1985 年に開発された DNA を人工的に増幅する方法である。本法は微量な DNA の特定領域を各種解析手法によって検出可能な濃度にまで増幅する手法であり、今日の遺伝子工学の発展に大きく寄与している。PCR 法には様々な変法が存在するが、ここでは最も基本的な PCR 法の原理について説明する。

- ①2 本鎖の鋳型 DNA を加熱し、変性(解離)させ 1 本鎖 DNA にする(Denaturation)
- ②温度を下げ、増幅させたい特定部位両端の DNA 塩基配列に相補的なプライマー(オリゴヌクレオチド短鎖)と鋳型 DNA を結合させる(Annealing)
- ③DNA 合成酵素(DNA polymerase)と DNA 合成基質(dNTP)を基にプライマー結合部分より不足している先の DNA が合成され、標的にした DNA の完全な 2 本鎖が得られる(Extention)
- ④以上①～③の工程を 1 サイクルとし、これを n 回繰り返すことで、1 つの鋳型 2 本鎖 DNA から 2^n の DNA 鎖を得ることができる。

2.2.2 T-RFLP 法

T-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)法は末端に蛍光標識したプライマーを用いた PCR 産物を、制限酵素で処理し、蛍光色素が付加された側の断片長によって異なる塩基配列をもつ DNA 同士を分離する方法である。Liu et al.(1997)によって環境微生物の群集解析を目的として開発され、微生物種の差違を簡単に識別する方法として用いられる。時間がかからず簡便であるため、多量のサンプルを解析することに向いており、長期モニタリングや PCR のバイアスの影響をみるための DNA 濃度比較およびアニーリング温度比較と併用されることもある。T-RFLP 法はどの制限酵素を選ぶかが非常に重要である。

第三章 実験方法

3.1 概論

本研究の目的は、活性汚泥法の一つである二相処理法について、運転条件の違いによる生成汚泥量の変化、および汚泥の挙動に影響を与える生物相を調べることである。今回は運転条件の中でも水理的滞留時間 HRT(Hydraulic Retention Time)に着目した。食物連鎖において高次に位置する生物種の存在は汚泥の生成率に影響すると考えられ、これらの種は成長速度の大小や沈降性の高低がそれぞれで大きく異なる。例えば、増殖速度は速いが遊泳性の *Uronema* sp.(図 3-1)は、HRT の短い環境では処理水とともに流れ出てしまい増殖が追いつかない。逆に増殖速度は遅いが汚泥フロックに付着する *Epistylis* sp.(図 3-2)の場合、HRT よりもずっと長い時間反応槽に留まるので個体数を増やすことができる。

ゆえに HRT を変えることで、異なる生物相を作り上げると同時に、リアクターのパフォーマンスも変化すると考えた。更にモニタリングの際に汚泥を保存し、分子生物学的な手法で生物群集構造を解析することで、リアクターのパフォーマンスと、分子生物学的な生物相の動向をリンクさせることができると予想した。

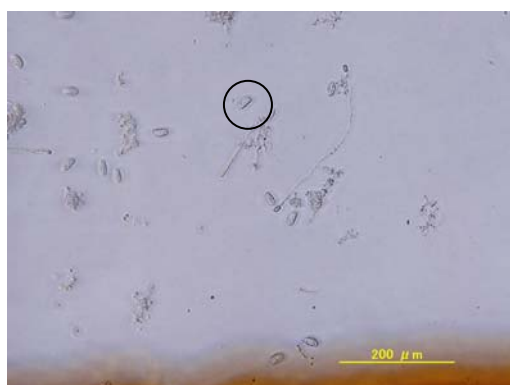


図 3-1 *Uronema* sp.(○内)



図 3-2 *Epistylis* sp.

本研究で行う実験作業は大きく 3 つに分けられる。それぞれの実験条件を述べた。

- ①HRT の異なるリアクター運転
- ②リアクターのモニタリング
- ③リアクター汚泥サンプルの群集構造解析

なお、ここで述べた実験条件は、第四章 実験条件の検討 を経て決定した条件であり、第五章・第六章の実験結果および考察 に記載したデータは全てこの条件の基に得たものである。

3.2 リアクターの運転

3.2.1 概要

排水を処理する水槽を反応槽またはリアクターと呼ぶ。本研究で取り上げた二相処理法は、基質の添加、分散細菌槽から活性汚泥槽への送水、活性汚泥槽から沈殿槽への送水、沈殿槽から活性汚泥槽への汚泥返送、および沈殿槽から処理水の排出までを連続して行うことが望ましい。しかし第四章 実験条件の検討にて述べた通り、この理想系を実験室サイズの小さなリアクターで実現することは難しく、一部を回分式にしたり、送水を間欠式にしたりと改造を加えざるを得なかった。大きく形状を変えた項目を以下に記す。

- ①基質；連続投与から、間欠投与に変更した。(水量が少ないため)
- ②分散細菌槽からの送水；連続送水から、回分送水に変更した。(菌塊が送られないため)
- ③活性汚泥槽からの送水；連続送水から、回分送水に変更した。(沈殿槽撤去のため)
- ④沈殿槽からの排水；沈殿槽を撤去し、活性汚泥槽を回分式にして処理水を排水した。
- ⑤余剰汚泥の扱い；汚泥引拔を止め、流出する汚泥を貯留槽に受け止めた。

上記の変更をして完成したリアクターの写真を図 3-3、図 3-4 に示す。構造の詳細については次項に述べた。

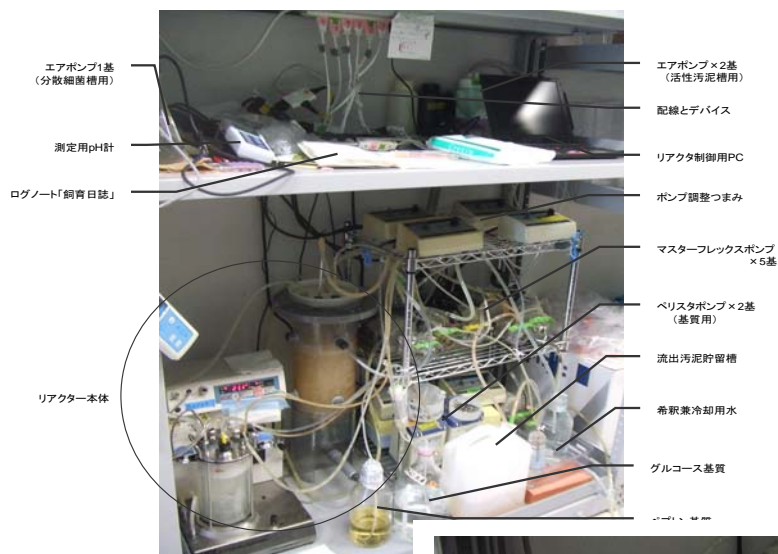


図 3-3 リアクター全体

図 3-4 リアクター本体



3.2.2 構造

本研究で用いたリアクターの模式図を示す（図 3-5）。

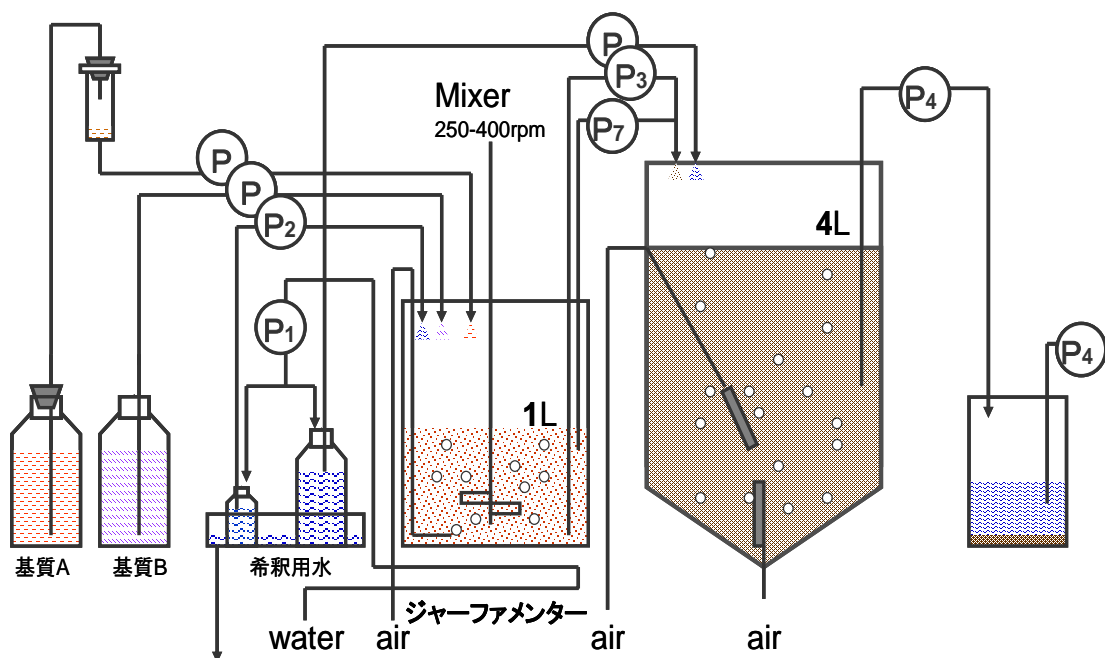


図 3-5 リアクター模式図

リアクターは2つの好気槽を繋いでおり、本論文では上流を分散細菌槽、下流を活性汚泥槽とよぶ。活性汚泥槽からの排水（処理水）は流出汚泥貯留タンクに入り、上澄みが放流される。分散細菌槽にはジャーファメンター（MDL200 型 2L 株式会社 丸菱バイオエンジニアリング、株式会社 日鉄環境エンジニアリングより借用）を使用した。活性汚泥槽にはプラスチック製のリアクター容器を使用した。底部と壁面の 2 箇所から曝気用のストーンを差し込んだ。エアポンプは Iwaki Air Pump APN-085V-1 を使用し、活性汚泥槽では先端にエアストーンを取り付けた。送水はポンプでおこない、基質流入にはペリスタポンプ(SJ-1211H・SJ-1211L)を、その他送水にはマスターフレックスポンプ(PA-21A・PA-21B)を用いた。

3.2.3 基質

実験室規模のリアクターを運転する際、人工下水のことを基質と呼ぶ。中村和憲の研究(1987)を参考に、高濃度の溶解性有機物を主成分とした人工下水を用いた。

1L の分散細菌槽に対し、500mgC/L の基質(ペプトンとグルコースの混合基質)を 1 日 4L 添加するにあたって、基質の腐敗防止としてペプトン基質とグルコース基質は別々に作成し、リアクター内で混合させた。その際、基質作成の頻度を抑える為に基質は 10 倍濃縮で作成し、リアクターに添加する際基質希釈用水を同時に加えることで、最終的に目標有機物濃度の基質を必要な流量だけ供給した。基質には、生物が増殖に必要な最低限の栄養塩を添加した。

$$\begin{aligned} & \text{基質 } 500\text{mgC/L} \times 4,000\text{mL/day} \\ &= \text{基質}(10,000\text{mgC/L の基質 A} \times 100\text{mL/day}) + (10,000\text{mgC/L の基質 B} \times 100\text{mL/day}) \\ &+ \text{基質希釈水 } 3,800\text{mL/day} \end{aligned}$$

◇基質 A (ペプトン) ; 10 倍濃縮で作成した。ペプトンの有機物含有量は測定によって求め、ペプトン粉末全体に対しおよそ 47% が有機炭素であった。作成方法はペプトン 22g とリン酸二水素カリウム 4g を 1L 用メジウム瓶に入れ、水道水 1L 強を加えて溶解させ、シリコンチューブを通し空気穴を開けたシリコン栓をはめ、アルミホイルで口部を覆った状態でオートクレーブにて加圧蒸気滅菌した。リアクターへ接続する際には腐敗防止のため基質ビンとリアクターの間に点滴を設けた(第四章参照)。点滴に接続するシリコンチューブ・シリコン栓も高圧蒸気滅菌装置(オートクレーブ)で滅菌した。点滴に用いたシリンジ内部から下流のポンプを挟む基質供給チューブ内で腐敗が確認されたが、供給有機物量の減少は無視した。

◇基質 B (グルコース) ; 10 倍濃縮で作成した。グルコースの炭素含有量は化学式から算出した。 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ より、全体の 40% が有機炭素である。作成方法はグルコース 25g を 2L 用メジウム瓶に入れ、超純水 (MilliQ 水) 2L を加えて溶解させ、滅菌せずに用いた。作成から使い切るまでの 20 日間に腐敗は見られなかった。

両基質とも、ビンの目盛りで添加量をチェックし、毎日決まった量が添加されていることを確認した。

◇基質用希釈水 ; 基質 A、基質 B と同時に分散細菌槽に投下し、基質を希釈した。分散細菌槽に用いたジャーファメンターの攪拌による水温上昇を防ぐための冷却水を兼ねており、水道から一度大きなタンクに溜められ塩素が抜けた水道水をジャーファメンター内部に通し、その後、希釈用水水量調整ビンに注がれ、プログラムに従って一定量が基質添加と同時に分散細菌槽へ投下した。

3.2.4 運転

リアクターは連続式ではなく、間欠送水を挟む半回分式である。そのため、送水ポンプやエアープンプを計画的に稼動・停止させる必要がある。おおまかな流れを以下に示す。

基質添加

- 分散細菌槽での培養
- 細菌懸濁液を活性汚泥槽へ移送
- 活性汚泥槽での培養
- 活性汚泥の沈殿
- 上澄みを処理水として排水

具体的なプログラミングにあたって、以下の点を盛り込んだ。

- ・ 基質添加は、2 回に分ける
- ・ 分散細菌槽の培養液（細菌懸濁液）の移送は、2 回に分ける。

最終的に作り上げた運転プログラム（1 サイクルのリアクターの挙動）を表 2-1 に示す。運転は佐藤弘泰准教授がプログラミングした電子機器類制御プログラム LabVIEW(NATIONAL INSTRUMENTS)を用いてコンピュータ制御した。1 サイクルを 120 分とし、1 日 12 サイクルで設定した。

表 3-1 リアクターの運転 1 サイクル

1サイクル[分]	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
第1槽の状態	5分 流入	35分 曝気			5分 排出	5分 流入	65分 曝気						5分 排出
第2槽の状態	40分 曝気				5分 流入	40分 曝気				20分 沈殿		10分 排出	5分 流入

基質の流入・排水は間欠的におこなった。

分散細菌槽；開始後曝気しながら 5 分間で基質流入、40 分後に曝気が止まって 5 分間活性汚泥槽に送水、再び曝気しながら 5 分で基質が流入、115 分後に曝気が止まり、2 度目の 5 分間送水で 120 分 1 サイクルとなる。曝気のために攪拌速度を上げると泡立ちによって細菌が壁面等に付着してしまう問題があり、適宜攪拌速度を 250~400rpm 調整した。週に 5~7 日、午前中に壁面等に付着した菌塊をヘラで落とし、攪拌速度を 1,000rpm にあげて 10 分間ほど攪拌し粉碎した。粉碎後は攪拌速度を定常運転用に戻した。分散細菌槽からの送水は、容器底部から吸引し、水量はポンプの調整および補助ポンプによって一定に保った。水温はジャーファメンター付属の冷却装置（容器底面に水を巡らして温度を下げる）を用いたが、性能に不備があったため 23℃程度の高めの水温となった。

活性汚泥槽；開始後 40 分間曝気、5 分で分散細菌槽からの流入、再び 40 分間曝気したあと 20 分間曝気を止めて汚泥を沈降させ、10 分で上澄みが処理水として流出汚泥貯留槽に排水され、曝気再開とともに分散細菌槽からの流入が 5 分で 120 分 1 サイクルとなる。排水は塩ビ管の差込長の調整によって一定に保った。汚泥の引抜きは行わなかった。水温調整は行わなかったが常時室温の 20℃前後を維持していた。HRT の調整は希釈水の量でおこない、HRT24hr で 0L/day、HRT3hr で 28L/day、HRT6hr で 12L/day の水道水をサイクルごとに添加した。

試運転の段階では活性汚泥槽の MLSS は 4,000mg/L 前後で安定していた。それを踏まえ、本運転では活性汚泥槽の MLSS を低い値から開始し、汚泥を流出させることなく MLSS4,000mg/L まで増やした場合の汚泥生成率を測定する予定であった。つまり SRT の概念のない運転である。しかし HRT24hr を運転し始めてから、MLSS が低い状態でも汚泥が流出することが分かり、流出汚泥貯留槽を設けた。処理水を全て貯留する構造が理想であったが、容量の関係で断念した。そのために確かな物質収支が求められなくなった。チューブの交換やその他のメンテナンスは、適宜必要に応じて行った。

3.2.5 種汚泥

リアクターを運転するにあたって、実下水処理場から汚泥を譲渡してもらいリアクターに殖種した。

- ・試運転には分散細菌槽・活性汚泥槽の両槽に M 下水処理場(標準活性汚泥法)の好気槽汚泥を入れた。
- ・HRT24 では汚泥の入れ替えをせず、試運転の汚泥をそのまま流用した。
- ・HRT 3 では、分散細菌槽はそのままに、活性汚泥槽に HRT24 の活性汚泥槽汚泥混合液 (MLSS;1,480mg/L)を 600mL と、N 下水処理場(嫌気好気法)の嫌気槽の汚泥混合液 (MLSS;およそ 4,000mg/L)を 300mL、水道水を 2,900mL 入れた。
- ・HRT 6 では、分散細菌槽はそのままに、活性汚泥槽に HRT 3 の活性汚泥槽汚泥混合液 (MLSS;1,440mg/L)を 600mL と、T 処理場(標準活性汚泥法・屎尿処理)好気槽反の汚泥混合液(MLSS;1,500mg/L)を 600mL、水道水を 2,400mL 入れた。

3.2.6 分散細菌槽および活性汚泥槽の HRT

分散細菌槽の HRT(=SRT)は 6 時間とした。活性汚泥に見られる細菌の倍化時間は数十分から 3 時間程度なのに対し、多くの原生動物の倍化時間は 6 時間以上とされている(2005. 産業用水質調査会「図説 微生物による水質管理」)。このことから、HRT を 6 時間とすれば、原生動物の増殖をさけつつ分散性細菌を優占させることができると考えた。

一方活性汚泥槽では、HRT と SRT は明確に異なる。HRT を短くする事で遊泳性の原生動物は流出し、生物相に変化が生まれると予想して 24 時間、3 時間、6 時間と設定した。

活性汚泥槽 HRT の調整には、HRT 用希釈水を用いた。1 サイクルについて 2 回分散細菌槽から細菌懸濁液が送られる際、同時に HRT 用希釈水を流入した。HRT 用希釈水の流量は、HRT24 の場合は 0L/day、HRT6 の場合は 12L/day、HRT3 の場合は 28L/day である(表 3-2)。

HRT 用希釈水については模式図(図 3-3)の通り、基質用希釈水と同じ扱いをし、分散細菌槽からの送水と同時に、常に一定量を添加した。

表 HRT 用希釈水の水量と、処理水の流量

HRT	分散細菌槽からの送水[L/day]	+	HRT用希釈水[L/day]	=	処理水量[L/day]
24時間	4	+	0	=	4
6時間	4	+	12	=	16
3時間	4	+	28	=	32

3.3 リアクターのモニタリング

3.3.1 概要

リアクターの運転状況やパ処理性能および物質収支を把握する事を目的として下図の要領でモニタリングを行った(図 3-6)。

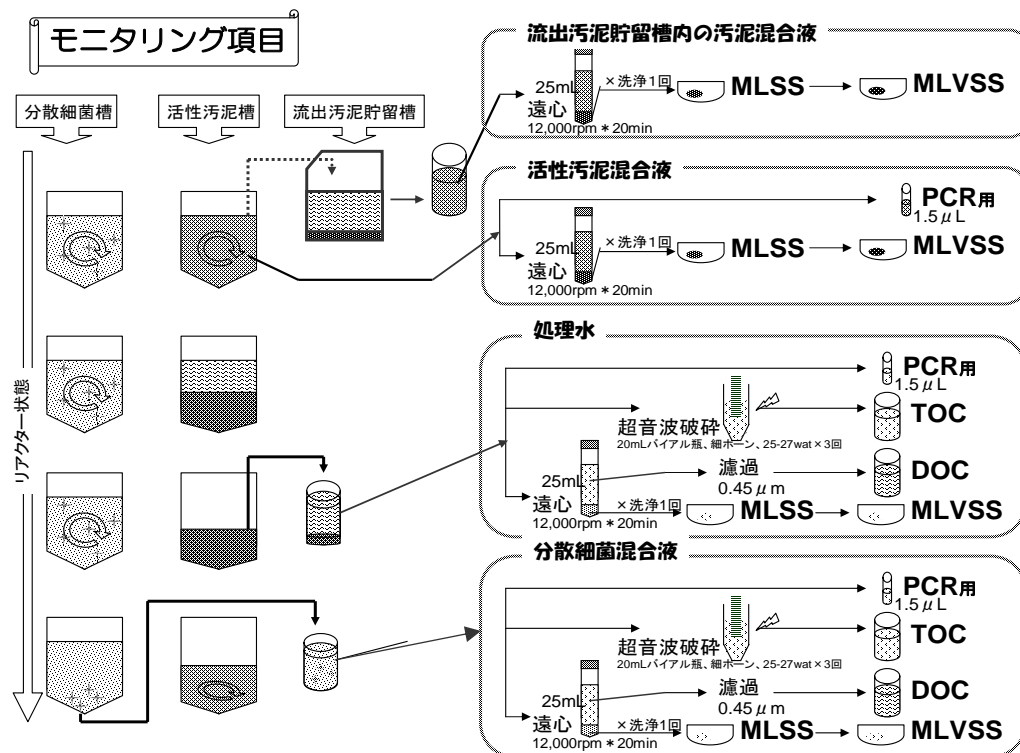


図 3-6 モニタリング項目

- ◇リアクター内の環境を知るため、定期的に流入基質の残量、分散細菌槽の水温・pH、活性汚泥槽の水温・pH を測定し実験ノートに記録した。
- ◇リアクター内の生物量を知るため、定期的にリアクターから採水し、MLSS・TOC などの測定を行った。測定は基本的に夕方に行い、測定日の午前中にリアクターの掃除をして分散細菌槽の壁面等に固着した菌塊を削ぎ落とし、高速攪拌で混濁させた。
- ◇その他リアクター全体のコンディションは、休日を除く登校日には毎日チェックし、重要な事象についてはノートに記録した。

流出汚泥貯留槽の汚泥混合液については、前回測定したサイクルの一つ後のサイクルから、今回の測定サイクル前までとなる。タンクに溜まった 2L 前後混合液を別の容器に移して測定にまわした。残った混合液は廃棄した。活性汚泥槽の混合液については、沈殿期に入る直前の曝気中の槽から直接採取した。処理水については、活性汚泥槽が沈殿期を経て上澄みを排出する際に容器に集めた。残ったサンプルは廃棄した。分散細菌槽の混合液については、活性汚泥槽が沈殿・排水を終えた後の活性汚泥槽への送水 1 回分 167mL を容器に溜めて測定に用いた。残った混合液はリアクターには戻さずに廃棄した。

3.3.2 項目と測定方法

3.3.2-1 MLSS・MLVSS

リアクター内のバイオマス量を知るため、(分散細菌槽)・活性汚泥槽・流出汚泥貯留槽水に対して MLSS を測定した。分散細菌槽は HRT6 でのみ測定した。手順を以下に記す。

- 1)各サンプルについて、先割れ 25mL ガラスホールピペットを用いて 25mL 採取し、50mL 遠心管に入れて遠心機にかけた。使用した遠心機は KUBOTA のマイクロ冷却遠心機 3740。運転設定は、常温設定、12,000rpm で、1 回について 20 分間に統一した。
- 2)1 回目の遠心後、上澄みを別の遠心管に移して超純水を入れ、管を振り沈殿した汚泥を混濁させ、更に超純水で壁面に付着した汚泥を落として 25mL にし、再び遠心機にかけて汚泥を洗浄した。
- 3)2 回目の遠心後、上澄みを捨て、沈殿した汚泥を予め強熱乾燥させ恒量を測定した蒸発皿に全て移した。蒸発皿の質量の測定には METTLER TOLEDO の PB303-S/FACT を用い、測定前に錘で精度の確認を行った。
- 4)サンプルを入れた蒸発皿を Yamato の Drying Oven DVS602 に入れ、108℃で一昼夜乾燥させた。その後ガラス製デシケータで冷却した蒸発皿の質量を測定し、汚泥の乾燥重量および MLSS を算出した。
- 5)更に蒸発皿を Yamato の電気炉 FO310 にうつし、600℃で 30 分熱して強熱乾燥重量および MLVSS を算出した。

3.3.2-2 TOC・DOC

リアクター内の生物量および溶存有機物濃度を知るために、分散細菌混合液・処理水に対して TOC・DOC の測定を行った。測定には SHIMADZU の全有機体炭素系 TOC-VCSN を用いた。測定方法は NPOC 法で、スタンダード 0・50・100mgC/L で毎回検量線を作成した。標準液はマニュアルに従って 1L 作成し、冷蔵庫で保存しておよそ半年間用いた。サンプルはレンジに収まるよう予め希釈した。

TOC 測定；サンプルを適宜希釈し、TOC 測定用バイアル瓶に 12mL 入れ、超音波によって汚泥を分散させた。超音波破碎機は BRANSON Digital Sonifier 250D を使用し、細いホーン 70%出力 (25~27wat であった) で 40 秒を 3 回かけた。サンプルが沸騰を防ぐため、破碎の度に室温で冷却時間を置いた。その後更に希釈し 20mL 前後にした後、マグネッт スターラー機能でサンプルを攪拌しながら有機炭素濃度(TOC)を測定した。

DOC 測定；MLSS の 1 回目の遠心後の上澄みを濾過して TOC 測定器にかけた。濾過には MILLIPORE のグラスファイバーフィルターAAWP02500(フィルタ直径 25mm)の 0.80 μ m と 0.45 μ m を組み合わせて用いた。

3.3.2-3 COD

リアクター内のバイオマス量および、他の測定法（MLSS・TOC）の精度を知るためにキットを用いたCODの測定を行った。キットはHACHのDigestion Solution for COD 0-1500 ppm Range pk 150を用いた。あらかじめ試薬の入ったアンプルにサンプルを2mL加えて混合し、150℃で2時間過熱した（THITECのDry Thermo Unit DTU-1C）。アンプルを冷ましたあとHACHのDR/2010 Portable Datalogging Spectrophotometerを用いて620nmの波長を測定した。ブランクは超純水をサンプルと同様に処理したものを使用した。

3.3.2-4 その他

水温；定期モニタリングに際し、採水直前に水温計で測定した。なお、分散細菌槽に用いたジャーファメンター付属の水温計は水温よりも4℃ほど低い値を示すため測定値としては使用しなかった。

pH；定期モニタリングに際し、採水直前に東亜ディーケーケーのポータブル電気伝導率・pH計WM-22EPで測定した。pH計は月に1度程度標準液による校正を行った。

3.4 生物群集構造解析

3.4.1 概要

活性汚泥中には多種多様な生物種が混在する。細菌群集の構造を把握するためには、近年はさまざまな分子生物学的な手法が用いられている。一方、原生動物については形態から詳細に分類することが可能なので、顕微鏡観察が多用されてきているが、分析の簡便さや定量化しやすいということで、分子生物学的手法を導入しようという検討もなされている。本研究では細菌・原生動物ともに分子生物学的な手法の一つである PCR/T-RFLP 法を用いて解析することとした。また、原生動物については顕微鏡観察を補足的に用いた。

3.4.2 分子生物学的解析(PCR/T-RFLP)

3.4.2-1 PCR鑄型の用意

PCR 反応に用いる鑄型 DNA 試料の作成は、一般的な DNA 抽出キットを用いた方法ではなく、より簡便な超音波破碎による汚泥サンプルからの DNA の溶出方法を行った。作業は 2 過程で、超音波によってサンプル中の生物の細胞壁・細胞膜を破壊し DNA を溶出させる過程と、不純物が DNA 増幅の阻害とならない程度までサンプルを希釈する過程である。その詳細を以下に記す。なお、使用した超音波破碎機は BRANSON の Digital Sonifer advance Model 250D である。

- 1)各サンプルを、MLSS の濃度が 1,000mg/L 以下となるよう滅菌した超純水で希釈をした。の 250 μ L を 1.5mL チューブに移した。
- 2)超音波破碎機に ϕ 1.8mm のホーンを取り付け、出力 70%(10~12wat)で 30sec \times 2 回超音波破碎した。このとき破碎の間隔を開け室温程度にまで十分に冷却することで、サンプルが沸騰しないよう留意した。
- 3)MLSS の 3%を DNA 濃度とし、鑄型 DNA 濃度が 2.5ngDNA/ μ L となるようさらに DDW(滅菌超純水)で希釈した。

なお、2)の超音波破碎を行なう時に MLSS の濃度が高すぎると、試料が発泡することがあった。1)において試料を希釈するのはその発泡を防ぐためである。

3.4.2-2 PCR

前項の方法で調整した鋳型 DNA 試料に対して細菌および原生動物等の DNA を増幅させることを目的に PCR を行った。

分散細菌槽の細菌懸濁液については細菌用 Universal プライマー 27f-907r を、活性汚泥混合液については細菌用 Universal 27f-907r プライマーおよび真核生物用 Eukaryotic プライマー Euk20f-1179r を用いた。その配列は次の通りである(表 3-2)。いずれのプライマーも、反応産物を T-RFLP 法に供するために 5'末端を FAM 蛍光標識したものをを用いた。

表 3-2 使用したプライマー

対象	Name	Position (E.coli)	Position(Y.Candida)	Sequence(5'-3')
細菌 (16s rRNA)	27f (FAM)	8-27		AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG
	907r	926-907		CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT
真核生物 (18s rRNA)	Euk 20f (FAM)	20-41	15-35	TGC CAG TAG TCA TAT GCT TG
	Euk 1179r	975-958	1185-1168	CCC GTG TTG AGT CRA ATT

※f:フォワードプライマー r:リバースプライマー FAM:蛍光標識

※複合塩基:M=C:A R=A:G

※Yeast Candida albicans:from LYDIA HENDRIKS at.all 1989 System. Appl. Microbiol. 12, 223-229

1)鋳型 DNA 試料を表 3-3 の組成の PCR mixture と混合した。PCR mixture には SHIMADZU の Ampdirect Plus と耐熱酵素 EMD Biosciences の Nova Taq TM Hot Start DNA Polymerase、Universal Primer 27f(5'-FAM)-907r および DDW を用いた。PCR Mix とサンプルは 200 μ L 用の PCR チューブで混合した。

2)Biometra のサーマルサイクラーT-gradient を用いて DNA の増幅を行った。Annealing の温度設定と Extension 時間は田崎の論文を参考にし、Denaturation の温度・時間、運転サイクル数は SHIMADZU の Ampdirect プロトコルを参考にし、検討を行った上で決定した。表 3-4 に示す。

表 3-3 PCR Mix 組成表

1サンプルにつき[μ L]	Final conc.
DDW	43.50 -
Ampdirect	50.00 1 \times
f-Primer	2.00 0.2 μ M
r-Primer	2.00 0.2 μ M
Taq (5U/ μ L)	0.50 2.5unit
Mix合計	98.00 -
鋳型DNA試料	2.00 10ng/5ng
計	100.00 -

表 3-4 PCR 条件

	抽出精製鋳型・細菌用 (27f-907r)			抽出精製鋳型・真核用 (20f-1179r)		
	温度[$^{\circ}$ C]	時間		温度[$^{\circ}$ C]	時間	
Initial Denaturation	95	10min		95	10min	
Denaturation	94	30sec		94	30sec	
Annealing	51	60sec		51	60sec	
Extention	72	60sec	\times 25cycle	72	60sec	\times 30cycle
Length of Extention Step	72	7min		72	7min	
(keep)	15	∞				

3.4.2-3 PCR産物の精製

PCR 産物をアガーロスゲル電気泳動にかけ、増幅を確認した PCR 産物を、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社) を用いて精製した。精製によって、PCR 産物中に含まれる塩類や未反応プライマーおよび dNTP を除去する。精製はメーカーのマニュアルに記載されている方法により行なった。その作業手順を以下に記す。使用した遠心機は KUBOTA のマイクロ冷却遠心機 3740 である。

- 1)PCR 反応後のサンプルおよそ 100 μ L を 1.5m チューブに移し、DNA を結合させるための Buffer PB 500mL を入れ軽く混和した。
- 2)2mL コレクションチューブにセットしたスピнкаラムに Buffer と混和させたサンプルを全て移し、遠心機にかけた(13,000rpm、1min、室温)。
- 3)コレクションチューブにたまった液を取り除き、再びスピнкаラムを装着し、そこに洗浄のための Buffer PE 750mL を添加した。
- 4)遠心機にかけ(13,000rpm、1min、室温)、コレクションチューブに溜まった液を取り除いた後、再び遠心機にかけた(13,000rpm、1min、室温)。
- 5)スピнкаラムを新しい 1.5mL チューブに移し、DNA を溶出させるために DDW 20 μ L をスピнкаラム内中央のメンブレンフィルターに加えた。
- 6)遠心機にかけ(13,000rpm、1min、室温)、1.5mL チューブに精製された PCR 産物を集めた。

3.4.2-4 制限酵素処理

制限酵素処理は PCR 反応の結果得られた DNA 断片を、特定の塩基配列を持つ箇所で切断する処理である。

精製した PCR 産物を制限酵素 *Hha* I (GCG/C) (TOYOBO) で消化した。サンプルと酵素、Buffer の混合比率を表 3-5 に示す。

表 3-5 制限酵素 混合比率

1 サンプルにつき	<i>Hha</i> I
Enzyme= <i>Hha</i> I	添加量[μ L]
DDW	1.420
10 \times TAE Buffer	0.500
10 \times BSA	0.500
<i>Hha</i> I (1.6U)	0.080
サンプル	2.500
合計	5.000

処理には PCR で用いたのと同じサーマルサイクラーを使い、運転設定は 37°C \times 5hr \rightarrow 65°C \times 15min とした。より確実に酵素処理するよう長めの時間設定となっている。

3.4.2-5 DNA断片解析

制限酵素処理によって得られた DNA 断片の解析は、Applied Biosystems の ABI PRISM 310 Genetic Analyzer の Gene Scan モードを用いて行った。制限酵素処理を施した PCR 産物に HiDi ホルムアミドとサイズマーカを添加し、熱処理にかけた後すぐに氷冷することで安定化させた。HiDi ホルムアミドは PCR 産物を 1 本鎖 DNA にする作用を持つ。一方、サイズマーカ(GeneScan™ 500 ROXTM size Standard)は断片長を計測する際の定規の役割を果たす。どちらも Applied Biosystems の試薬を用いた。混合比率を表 3-6 に示す。

表 3-6 制限酵素 混合比率

1 サンプルにつき[μL]	
DNA size marker	0.5
HiDi ホルムアミド	42.0
サンプル	2.5

上記の比で混合した試料を 95℃×2min 加熱処理し、ただちに氷冷した。

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer の操作は付属のマニュアルに従った。キャピラリーは 47cm×50 μm を使用し、ポリマーは 310 POP-4 を用いた。測定データの解析には Applied Biosystems のソフトウェア GeneMapper を使用した。

3.4.3 顕微鏡による観察

汚泥のおおまかな状態を知るために顕微鏡による汚泥サンプルの観察をおこなった。生物種のカウントは行わず、×100 倍率で確認できる生物（原生動物や後生動物）を CCD カメラで撮影した。顕微鏡は OLYMPUS の BX60 を使用し、明視野もしくは位相差で観察した。

第四章 実験条件の検討

4.1 概要

本章では、第三章 実験方法に述べた実験条件に到るまでの検討について記した。使用する試薬等の選定だけではなく、理想的な実験条件が現実には実現し難く妥協案を採用した条件についても言及した。以下の条件についての経緯と検討を述べた。

- ・リアクターの運転に関し、最終的な形状や条件にいたるまでの経緯
- ・分子生物学的生物群集構造解析(PCR/T-RFLP)に関わる試薬等の検討

4.2 リアクターの運転条件

当初、二相式リアクターは、基質流入から処理水の排水まで連続式で運転する予定であった。しかし微少な流量をポンプで調整する事、小さな沈殿槽で返送汚泥を返送する事等、全てを連続式で行うのは困難であることが分かった。そこで、連続式では運転が難しい点については、間欠式や回分式に変更した。その他、HRT24、HRT 3、HRT 6 の運転にいたるまでの改良点についてなどを述べた。

4.2.1 リアクター構造

4.2.1-1 基質流入

当初、基質は連続式で添加していたが、基質の流量は微少なためポンプで調整することが困難であった。そこで間欠投入へと変更した。基質は、作成の頻度を抑えるために高濃度で作成し、リアクター投下時に基質用希釈水を同時に添加することで目標の濃度にすることにした。ペプトン基質は腐敗しやすく、リアクターに接続するチューブを伝って逆流した細菌が基質内で増殖してしまう。そこでペプトンの基質ビンとポンプの間に点滴を設け、細菌の逆流を防ぐことにした(図 4-1)。基質の希釈水に対しては、水を一度装置のそばに設置した小さなビンに溜め、そこから採水することで流量を安定化することができた(図 4-2)。

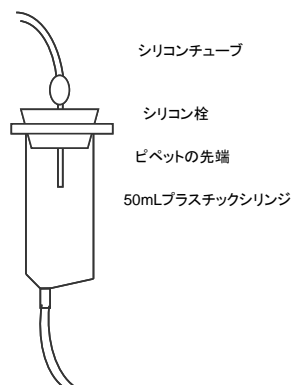


図 4-1 ペプトン基質用点滴

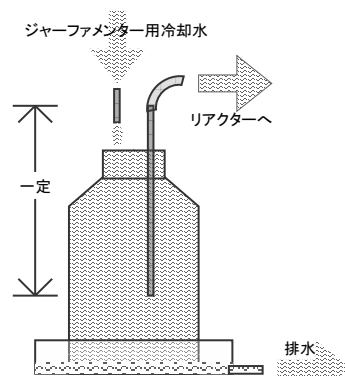


図 4-2 希釈用水一定量供給セット

4.2.1-2 分散細菌槽から活性汚泥槽への送水

当初連続式で送水していたが、ポンプによる吸引力が弱いと粗大な菌塊（図 4-3）を吸うことができず、分散細菌槽にフロックが増えて分散性細菌を優占させることができなかったため、間欠送水をすることにした。



図 4-3 分散細菌槽に発生する菌塊

4.2.1-3 活性汚泥槽からの排水

後段では当初、活性汚泥槽と沈殿槽の 2 槽を設けていたが、沈殿槽から活性汚泥槽への汚泥の返送にたびたびトラブルが生じた。すなわち、沈殿槽から活性汚泥槽への汚泥の返送が滞り、沈殿槽に多量の汚泥が蓄積する一方で活性汚泥槽に十分な汚泥が回らなくなってしまった。フロックの結合力が強く、返送ポンプに汚泥が吸引されなかったためである（図 4-4）。そこで、汚泥返送を要しない、回分式へと変更した。

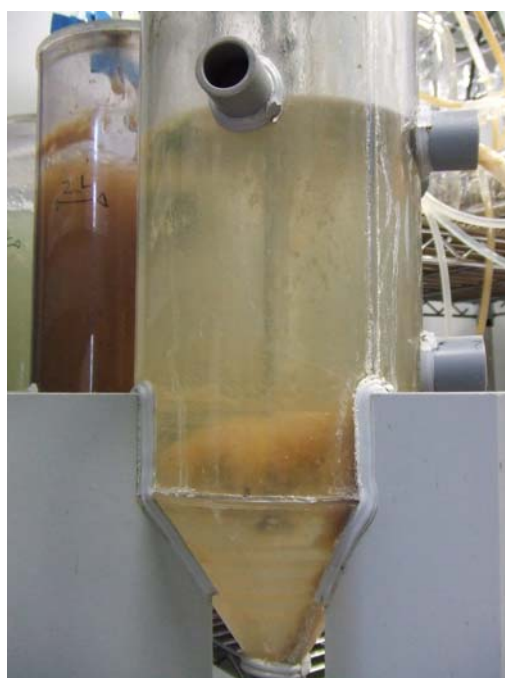


図 4-4 汚泥が返送されなかった沈殿

4.2.2 基質

4.2.2-1 基質主成分の決定

リアクター試運転の段階ではグルコースではなく、より扱いの楽な酢酸ナトリウムをペプトンと混合し滅菌して基質としていた。しかし糸状もしくは枝状に伸びる細菌もしくは真菌が優占的になり(図 4-5)意図した運転状況を作り出すことができなかった。同時に運転していたペプトンのみを基質とするリアクターにはこの様なことはなかった。最終的に酢酸ナトリウムの添加をやめ、代わりにグルコースを用いた。

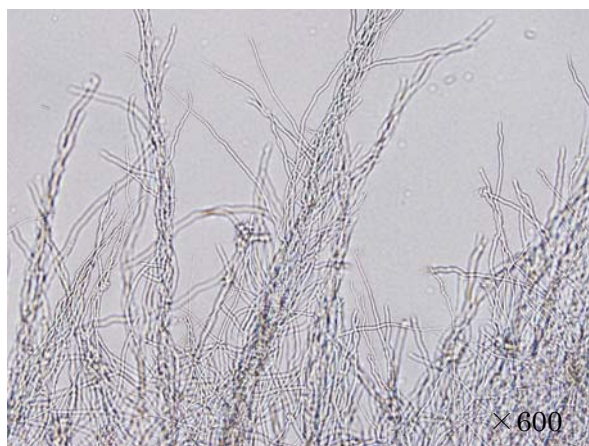


図 4-5 糸状・枝状の細菌もしくは真

4.2.2-2 ペプトン

ペプトンは組成が明確ではなく理論的な炭素含有量が不明であったため、測定によって有機物濃度を求めた。ペプトン 100g を 1,000mL の超純水に溶解させた水溶液を TOC 測定器にて測定した。測定の結果、全体量（粉末）の 47% が有機態炭素であった。

ペプトンとリン酸二水素カリウムを水道水で溶解させ、シリコンチューブおよびシリコン栓を取り付けた。点滴用のシリコンチューブ・シリコン栓とともに高圧蒸気滅菌にかけた後リアクターに接続したところ、10 日間は基質ビンの内部に腐敗は見られなかった。

4.2.2-3 グルコース

グルコースは高圧蒸気滅菌にかけられないため、グルコースのみを超純水に溶解した。基質ビンの口はほこりが入らない程度の蓋を被せた。およそ 20 日間、リアクター室に置いたが腐敗は見られなかった。

4.2.2-4 リン酸二水素カリウム

リン酸二水素カリウムは栄養塩であるリンの供給を目的に添加した。イオンクロマトによって処理水のリン酸濃度を測定し、微生物・微小生物の増殖に不足ないことを確認した。

4.3 リアクターのモニタリング

4.3.1 汚泥サンプル

4.3.1-1 分散細菌混合液

分散細菌槽内および流出液中のバイオマス濃度を測定するために、さまざまな方法を検討した。

濾過して濾紙上に捕捉された粒子の質量を測定しようと考えたが、すぐに濾紙が目詰まりし、かつ実験室の電子天秤の精度(解像度)が十分にならないため、信頼できる測定値を得るのは困難であった。

また遠心分離して沈殿させ、沈殿物の質量を測定しようと考えたが、3,000rpm 程度の遠心では汚泥が全く沈まなかった。

次いで、Itzhaki および Gill のマイクロビウレット法によるタンパク測定を試みたが、結果にばらつきが生じやすく断念した。

サンプルを超音波で分散させ TOC 測定し、濾液の DOC を差し引いてバイオマス濃度を求めた。TOC 測定と同時に、重クロム酸法による COD 値も測定し、超音波分散した細菌懸濁液 TOC 測定の安定性を確認した。その結果、汚泥によって懸濁したサンプルの TOC 測定値は、実際のバイオマス濃度よりも低い値が測定されているように思われた。詳しくは第 5 章にて報告する。

最終的には、12,000rpm で 20 分遠心機することで分散性の細菌を沈殿させることができたので、その質量を測定する事で分散細菌の濃度を求めることとした。

にかければ細菌も沈殿すると知り、MLSS の測定も開始し、同時に同サンプルに対して COD の測定も項目に加え、TOC 測定値の MLSS 値変換に用いる係数を求めた。

4.3.1-2 活性汚泥混合液

活性汚泥槽の汚泥混合液のバイオマス濃度については、標準活性汚泥法の活性汚泥と同様に遠心分離をして沈殿下汚泥の質量を測定することで求めた。

4.3.1-3 処理水

溶解性有機炭素濃度(DOC)を求める際には MILLIPORE のグラスファイバーフィルター AAWP02500(フィルタ直径 25mm)の $0.80\mu\text{m}$ と $0.45\mu\text{m}$ を組み合わせたフィルターをシリンジに装着して濾液を得た。多くの細菌は $0.45\mu\text{m}$ のフィルターを通り抜けないと言われる。この濾液を DAPI 染色し、顕微鏡で蛍光観察をした結果、濾液に微生物はほとんど存在しないことを確認した。

4.4 PCR/T-RFLP 法

4.4.1 概要

本研究では生物群集構造とその変化を把握するために、PCR/T-RFLP 法を用いた。本手法において、分析結果に影響を与える因子は多々あるが、操作性の観点(簡便であること)や結果の解像度(T-RFLP 法で解析したときに多くのピークが得られる=より広い範囲の生物をとらえる)といった視点から条件を絞り込んだ。具体的に検討した項目は以下の4つである。

- ①鋳型 DNA 試料の調製
- ②プライマーの選択
- ③PCR の運転条件
- ④制限酵素の選択

4.4.2 PCR 鋳型(DNA 抽出法)

4.4.2-1 概要

通常、鋳型 DNA 試料は、サンプルから細胞質内の成分を抽出する操作と、DNA 以外の不純物質を取り除き精製・濃縮する操作から成る。分子生物学的手法の中でも最も基本的な操作であるが、手間と時間がかかるのも事実である。例えば短時間で効率よく DNA を回収するとされる DNA 抽出キットを用いたとしても、細胞壁・細胞膜の破壊、試薬による DNA の溶解、不純物の除去等の過程を経て精製 DNA が得られる。しかし、生物濃度が極めて高い活性汚泥サンプル中の遺伝子を増幅させるのならば、PCR 反応を行うためには必ずしも DNA を精製する必要はないと考えた。そこで、市販の DNA 抽出キットを用いて得た DNA を鋳型とした場合と、超音波破碎によって細胞壁・細胞膜を破壊し希釈しただけで得た DNA を鋳型とした場合で、PCR/T-RFLP 法での分析結果にどの程度の差が出るのかを比較した。ここではその詳細を記す。

なお使用したサンプルは-80℃で冷凍保存していた試運転リアクターの分散細菌混合液;MLSS;340mg/L と、活性汚泥混合液;MLSS;3,400mg/L である。

4.4.2-2 キットを用いたDNA抽出

使用したのは FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) で、500mg までの土壌や活性汚泥などの環境サンプルから短時間で効率よく DNA を回収できるキットとして広く用いられている。大きく2つの操作からなり、1つはビーズビーティングによる物理的な細胞の破碎・DNA の可溶化・タンパク質の可溶化、もう1つは DNA の精製と濃縮である。具体的な作業を記す。使用した遠心機は KUBOTA のマイクロ冷却遠心機 3740 である。

- 1)遠心分離で 1.75 倍に濃縮した細菌懸濁液 200 μ L または活性汚泥混合液 200 μ L を Lysing Matrix E Tube に入れた。

- 2)Tube に Sodium Phosphate Buffer 978 μ L、MT Buffer 122 μ L を加えた。
 - 3)37°C で 15min でインキュベートした。その間 5min おきに手で上下に振盪した。
 - 4)チューブを FastPrep Instrument (MP Biomedicals)に設置し、Speed5.0 で 3.0sec×3 回細胞破碎処理を行った
 - 5)チューブを 15,000rpm、15min、室温で遠心分離した。
 - 6)上澄みを新しい 2mL チューブに移し、PPS250 μ L を加えてボルテックスした。
 - 7)遠心分離(15,000rpm、5min、室温)にかけ、上澄み 800 μ L を新しい 2mL チューブに移した。
 - 8)Binding Matrix 1mL を加えて 2min 手で反転振盪した後、3min 静置して Binding Matrix-DNA を沈殿させた。
 - 9)Binding Matrix を懸濁させないように上澄み液を除去し、底部に残った液 600 μ L で Binding Matrix を懸濁させた。
 - 10)懸濁液 600 μ L を Spin Filter に移し、遠心分離(15,000rpm、1min、室温)した後、Catch Tube 内の液を捨てた。
 - 11)SEWS-M 500 μ L を Spin Filter に加え、遠心分離(15,000rpm、1min、室温)し、Catch Tube 内の液を捨てた後、サイド遠心分離(15,000rpm、1min、室温)にかけ、残った SEWS-M を除去した。
 - 12)Spin Filter を新しい Catch Tube に移し、チューブの蓋を開けた状態で 5min、室温で乾燥させた。
 - 13)DES(DNase/Pyrogen Free Water) 100 μ L を加え、素早くボルテックスして 3min 静置した後、遠心分離(15,000rpm、1min、室温)にかけた。
- 以上で精製された DNA 溶液が得られる。更に Nano Drop の NanoDrop ND-1000 型分光光度計を用いて波長 260nm での吸光度を測定し、精製 DNA 溶液の DNA 濃度を求め、1.0ngDNA/ μ L となるよう DDW(滅菌超純水)で希釈した(表 4-1)。

4.4.2-3 超音波破碎によるDNAの溶出

作業手順は第三章の実験方法に準じる。

分散細菌槽の細菌懸濁液を用いた。超音波破碎後、サンプルについて算出した DNA 濃度が 2.5ng/ μ L となるよう DDW で希釈した(表 4-1)。このとき、細菌の DNA 含有率は 3%程度とされているので(2002. Madigan, M.T.)、MLSS の値を基に DNA 濃度を算出した。

表 4-1 PCR 抽出鋳型・超音波破碎鋳型 DNA濃度(推定)

	サンプル	MLSS[mg/L]	濃縮・希釈	処理前[mg/L]	各処	DNA濃度[ng/ μ L]	希釈	Mixと	鋳型濃度[ng/ μ L]
DNA抽出	分散細菌混合液	340	*1.75	595	処	9.1	*1	混合	0.182
超音波破碎	分散細菌混合液	340	*1	340	理	10.2	*1/4	(1/50)	0.051

表 ※MLSSの3%をDNA濃度として計算した

4.4.2-3 PCR、精製、制限酵素、T-RFLP

用意したサンプル×2 種類の鋳型×3 連の PCR 鋳型を PCR にかけた。

プライマーは細菌用 Universal プライマー 27f(FAM)-907r を用い、PCR サイクル数は第三章 実験方法と同様の条件で行った。PCR 産物を精製した後、制限酵素 Hha I を用いて制限酵素処理をしたサンプル中の標識された消化断片の組成をサイジングし、T-RFLP にかけた。詳細は実験方法と同様である。

4.4.2-4 T-RFLP電気泳動図の比較

解析結果を図 4-6 に示す。鋳型 DNA の違いによって、出現するピークが大きく変わることはないと分かった。どちらかで強く出たピークが、他方ではそれほど強く出ない等、図中の矢印部等に若干の差違は見られるものの、大きな問題ではないと判断した。よって、PCR 鋳型はより簡便な超音波破碎による方法を採用した。

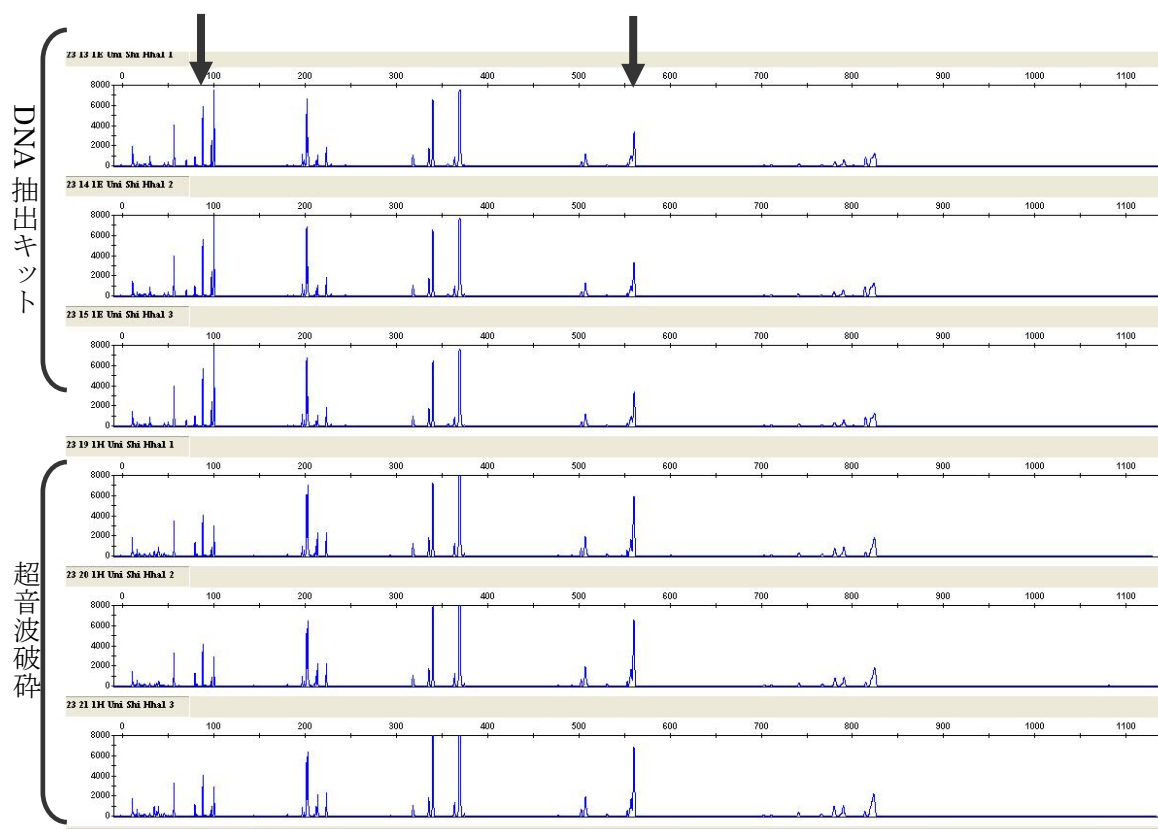


図 4-6 PCR 抽出鋳型・超音波破碎鋳型 T-RFLP 電気泳動図

4.4.3 PCR 条件

4.4.3-1 プライマー

使用するプライマーについては、文献調査および比較実験によって決定した。

細菌の解析には、Lane,D.J の研究(1991)を基に、広範囲の細菌を捕らえるとされるユニバーサルプライマー27f-907r を選択した。原生動物等の解析には真核生物用のプライマーを検討対象とした。文献調査より、原生動物を分子生物学的手法で解析する研究に使われた真核生物用プライマーの多くは、Linda Medlin(1988)の PrimerA および Primer-B の配列の一部を切り取ったものであることが分かった。その中の 1 セットとして、Euk1A-Euk516r-GCb(Beatriz Diez 2001)を候補とした。もう一つの候補には、前記の Primer A-Primer B と全く重ならない配列を持ち、より多くの真核生物を捕らえながらも古細菌・細菌を捕らえにくいとされる Euk20f-Euk1179r(Kathrin Euringer 2008)を取り上げた(表 4-2)。同文献では、Euk1A は古細菌をも捕らえたという実験結果を述べている。

表 4-2 真核用プライマーの検討 プライマーの配列

対象	Name	Position (E.coli)	Position(Y.Candida)	Sequence(5'-3')
真核生物 (18s rRNA)	Euk 1A (FAM)	4-20	3-20	CTG GTT GAT CCT GCC AG
	Euk 516r-GCb	563-548	562-547	ACC AGA CTT GCC CTC C
	Euk 20f (FAM)	20-41	15-35	TGC CAG TAG TCA TAT GCT TG
	Euk 1179r	975-958	1185-1168	CCC GTG TTG AGT CRA ATT

※f:フォワードプライマー r:リバースプライマー FAM:蛍光標識

※複合塩基:M=C:A R=A:G

※Yeast Candida albicans:from LYDIA HENDRIKS at.all 1989 System. Appl. Microbiol. 12, 223-229

そこで Euk1A-Euk516r と Euk20f-Euk1179r の 2 セットを用いて得られた PCR 反応産物を T-RFLP にて解析することで、いずれのプライマーセットを採用するか検討した。検討には HRT24 で運転したリアクターの活性汚泥槽汚泥混合液を(MLSS:1,400mg/L)使用し、はじめに 1/3 倍希釈した上で超音波破碎し、PCR Mix と混合後の DNA 濃度が 0.05ng/ μ L となるよう DDW で希釈した。PCR 条件について、サイクル数を表 4-3 に示す。制限酵素には Hha I を使用した。その他の条件は第三章の実験条件と同様である。解析結果の T-RFLP 電気泳動図を図 4-7 に示す。

表 4-3 真核用プライマーセットの検討 PCR の運転条

	Euk1A-516r			Euk20f-Euk1179r		
	温度[°C]	時間		温度[°C]	時間	
Initial Denaturation	95	10min		95	10min	
Denaturation	94	30sec		94	30sec	
Annealing	56	60sec		51	60sec	
Extention	72	60sec	× 30cycle	72	60sec	× 30cycle
Length of Extention Step	72	7min		72	7min	
(keep)	15	∞				

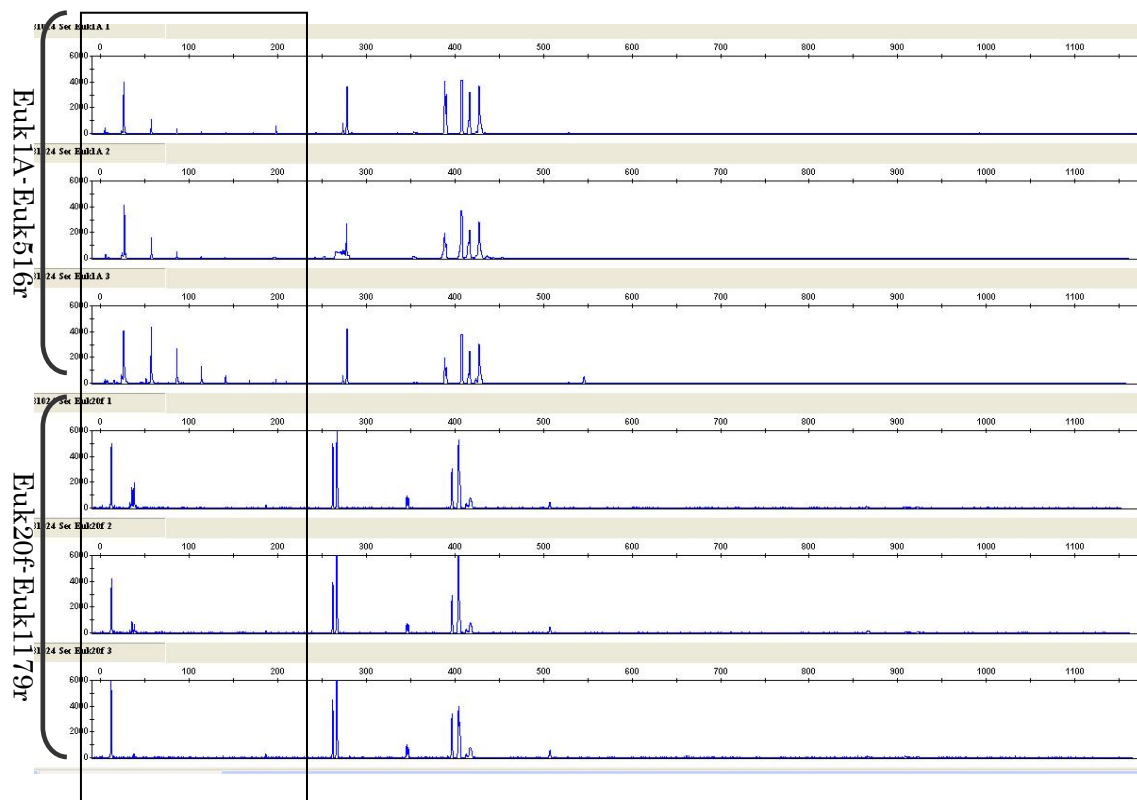


図 4-7 真核用プライマーの検討 T-RFLP 電気泳動図

両プライマーセットとも、試料由来と見られるピークが複数検出されることが分かった。かつ検出されるデータは異なることが分かった。ただ実際の生物相をどの程度反映させているのかは分からない。

なお、Euk1A-Euk516r は fragment size 0~200bp(図中の枠内) には一定の間隔で徐々に大きさが小さくなる一連のピーク群が表れた。DDW をサンプル同様に処理した試料を分析して得た電気泳動図にも同様のピーク群が見られたので、プライマーダイマーであると考えられる。一方の Euk20f-Euk1179r ではプライマーダイマーと思われるフラグメントは 1 本しか見られなかった。この違いにより、サンプルによるフラグメントがより判断しやすい Euk20f-Euk1179r を採用することにした。

4.4.3-2 PCR 鋳型濃度と PCR 反応のサーマルサイクル数

PCR 鋳型の DNA 濃度と、PCR 反応のサーマルサイクル数の組み合わせについて、複数回に渡り検討を重ねた。詳細は省略する。検討の結果、汚泥混合液において超音波破碎による PCR 鋳型を用いた場合、PCR Mix と混合後の PCR 鋳型濃度は $0.5\text{ng}/\mu\text{L}$ 、PCR 運転サイクル数は細菌用 Universal 27f-907r では $\times 25\text{cycle}$ 、真核用 Eukaryotes Euk 20f-Euk1179r では $\times 30\text{cycle}$ が最適であると判断した。

4.4.4 制限酵素処理

細菌群集を解析する際に用いられる制限酵素としては、Lane,D.J(1991)、Beatriz Diez(2001)、Kathrin E.(2008)などの研究より、Hha I (GCG/C)、Msp I (C/CGG)、Rsa I (GT/AC)を候補としてあげた。Hha I と Rsa I、Hha I と Msp I で比較検討を行った(制限酵素はいずれも TOYOBO)。用いたサンプルは試運転リアクターの活性汚泥槽汚泥混合液である。プライマーは、真核用 Hha I・Rsa I 比較には Euk1A-Euk516r、Hha I・Msp I 比較には Euk20f-Euk1179r を使用した。その他の条件は実験方法に準じた。結果を図 4-8、図 4-9 に示す。Rsa I は真核用 Euk1A-Euk516r で増幅したサンプルに対し、処理があまりされていないと思われる電気泳動図となった(図中枠内)。また Msp I は Hha I に対し特筆できる長所がみられなかった。以上の結果より、本実験では Hha I を選択した。

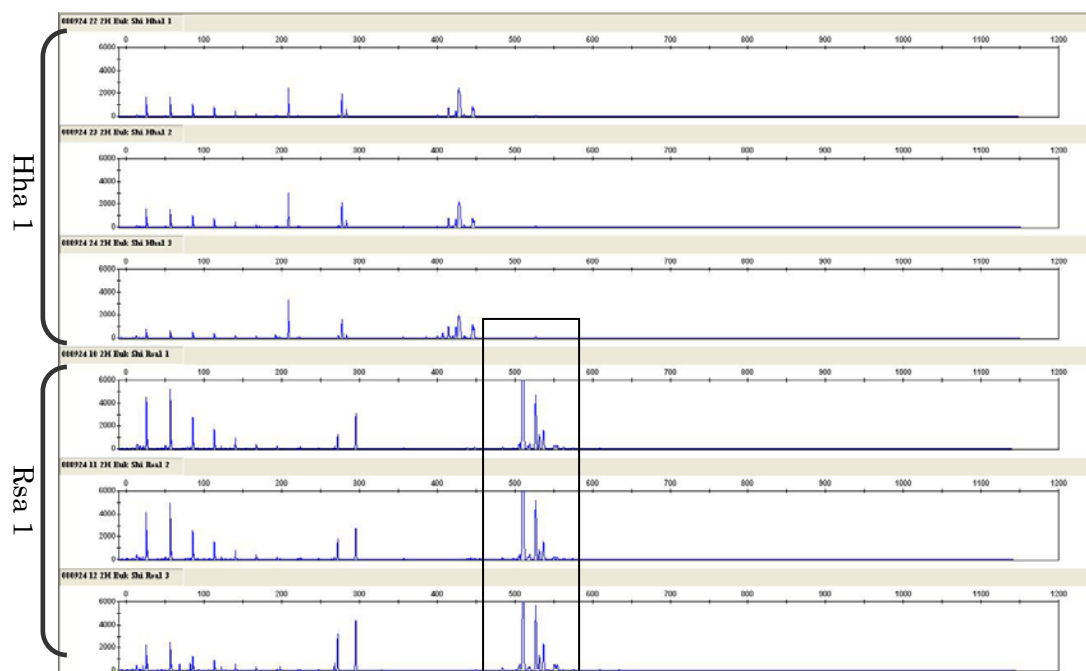


図 4-8 制限酵素の検討 Hha I と Rsa I T-RFLP 電気

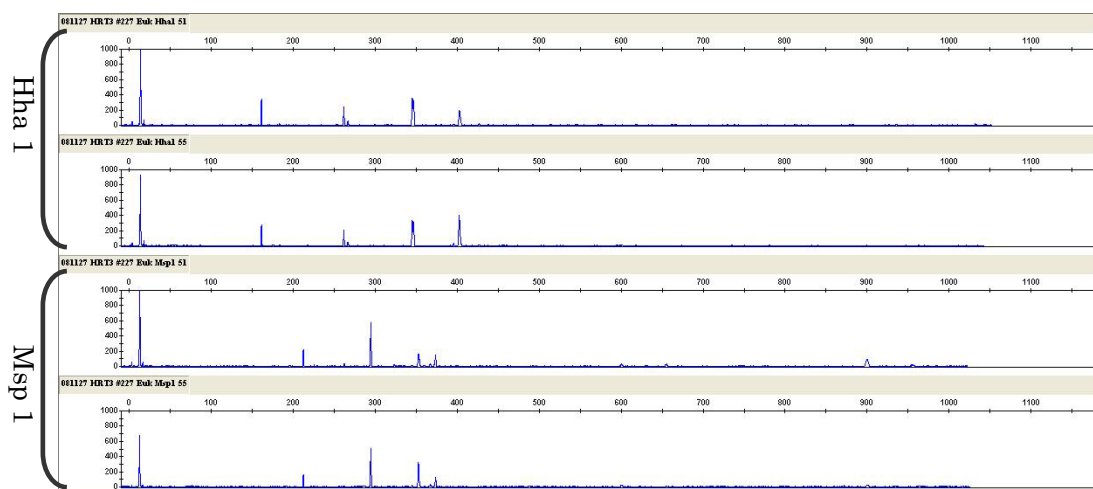


図 4-9 制限酵素の検討 Hha I と Msp I T-RFLP 電気

第五章 実験結果と考察

HRT と生成汚泥量

5.1 概要

リアクターのモニタリングによって得られたデータを解析し、考察した。本研究の題材である二相処理法は、活性汚泥中で有機物の処理の大半を担う細菌を、その捕食生物である原生動物等から隔離した点に特徴がある。この特徴によって、標準活性汚泥法に比べ、効率よく有機物を細菌体に変換し高濃度の人工下水（溶解性有機物）を処理することが可能であるとされる。また確実な食物連鎖を作り出すことで発生する余剰汚泥の量を減らすことができると考えられる。この理論を証明するため、モニタリングでは有機物がどのように形を変えていくのか、つまり溶解性有機物の除去率および流入有機物に対する汚泥の生成率（物質収支）を求めた。生物相を変化させるため、運転条件において活性汚泥槽の HRT のみを 24 時間、3 時間、6 時間と変えて運転した。

本章では以下について述べた。

- ◇観察記録；分散細菌槽、活性汚泥槽の HRT24・3・6 について、各槽の観察記録
- ◇データ解析；分散性細菌槽のモニタリング結果と考察
- ◇考察に用いる係数；TOC 測定値と MLSS の関係
- ◇データ解析；HRT24・3・6 でのリアクター全体のモニタリング結果と考察

考察に用いる数値変換とは、菌体性有機炭素濃度を MLSS に変換する際に用いる係数である。本研究では、分散細菌槽の菌体性有機炭素濃度および処理水の菌体性有機炭素濃度を MLSS 値に変換する係数が一般的に用いられている数値と異なるため、詳しく説明をした。

5.2 各槽の観察記録

5.2.1 分散細菌槽

分散細菌槽は HRT に問わず常に一定の条件で運転した（運転条件の詳細は第三章を参考のこと）。運転状況の目標は、基質の溶解性有機物の大半を細菌体に変換し、性質一定の細菌懸濁液を活性汚泥槽に供給することであった。

しかし実際には、予想以上に微生物の付着性が強く、12 時間もすると水槽の壁面や攪拌棒にびっしりと菌が付着した(図 5-1)。毎朝へらで菌を削ぎ落とし、攪拌機の回転速度を 10 分ほど 1,000rpm まで上げて菌塊を粉碎した。この菌塊の壁面からの剥離と攪拌による粉碎によって、細菌懸濁液の MLSS は格段に高まった(図 5-2)。特に土日を挟んだ月曜日の分散細菌槽は、掃除前と掃除後の懸濁の差違が特に激しく、土日に送られる分散細菌槽細菌懸濁液にはあまり細菌が含まれていないと予想された。

また、槽内では常に泡立ちがみられ、泡の様子は数日単位で緩やかに変化していた。この泡立ちについては詳細に記録しなかったため、考察の対象とはしない。泡立ちの原因も、細菌によるものなのか基質によるものなのか不明である。このような活性汚泥槽汚泥混合液の性質変動が、どれくらい活性汚泥槽の生物相に攪乱を招いたのかは、全く把握することができなかった。



↑ 図 5-1 分散細菌槽 掃除前
(菌が壁面に付着し、
あまり懸濁していない)



→ 図 5-2 分散細菌槽 掃除後
(付着していた菌によって
液が懸濁している)

5.2.2 活性汚泥槽 HRT24

HRT 24 時間というのは、標準活性汚泥法の HRT が 6~8 時間なのに対しおよそ 3 倍の時間であり、長時間曝気法の HRT と同等か、それよりもやや長い設定である。

HRT24 はリアクター設置後に微調整を行った試運転から、連続的に運転を開始した。運転期間は 2008 年 10 月 12 日から同年 10 月 27 日までの 15 日間である。MLSS は試運転でのある程度に増えた汚泥量からスタートし、その後予想外に MLSS が増加しなかったため、結果的に始終汚泥飽和状態となった。

HRT24 における処理水質は、良いとは言えない外観であった。処理水に常時汚泥が混ざっており、上澄みも濁っていた。汚泥の沈降性はすこぶる悪く、ほとんど沈殿していなかった。沈降性の指標である SVI は測定しなかった。槽内汚泥量の増加が期待できなかったため、15 日間のモニタリングで終了した。

5.2.3 活性汚泥槽 HRT3

HRT 3 時間と言うのは、本研究で用いたリアクターの分散細菌槽の HRT に等しく、有機物をも摂取できる最も小さいグループの原生動物の増殖速度よりも若干短い時間である。理論的に、この環境で遊泳性の小型原生動物(Bodo sp.等)は生存できないはずである。活性汚泥を通る HRT と考えると短い、リアクター全体では分散細菌槽の 6 時間と合わせて 9 時間となり、標準活性汚泥法にほぼ等しくなる。

HRT3 は HRT24 運転を終えた後、HRT24 の活性汚泥槽汚泥少しと実下水処理場の汚泥を少し入れ水道水で 4L まで希釈し、活性汚泥槽の希釈水量設定を変更してすぐに運転・モニタリングを開始した。運転期間は 2008 年 10 月 31 日から同年 12 月 01 日までの 30 日間である。MLSS はおよそ 500mg/L でスタートし、順調に汚泥量が増えてきたところで、15 日目(11 月 14 日)から 18 日目(11 月 17 日)にかけて分散細菌槽への基質停止トラブルがあり、その影響と思われる多量の汚泥流出が見られた。その後緩やかに汚泥量が増えたが、予想したよりも汚泥濃度は上がらずにモニタリング終了を迎えた。

HRT3 における処理水質は、基本的には良好であった。ある時に汚泥がまとまって流出し、その後しばらくは SS がほとんど含まれない澄んだ処理水を放流していた。しかし 2 日間のスパンで見た場合、槽内 MLSS 値の高低に関わらず汚泥の流出は常にあった。

5.2.4 活性汚泥槽 HRT6

HRT 6 時間というのは、最も無理のない時間であると考えた。活性汚泥槽だけでも標準活性汚泥法の HRT 範囲 6~8 時間に入り、分散細菌槽の 6 時間と合わせると 12 時間である。実際にリアクターの改造をしながら運転した試作品の活性汚泥槽 HRT は 6 時間であり、MLSS は 5,000mg/L 弱を保ったので、流出の少ない系を期待して運転開始した。

HRT3 運転を終えた後、HRT3 の活性汚泥槽汚泥少しと実下水処理場の汚泥を少し入れ水道水で 4L まで希釈し、活性汚泥槽の希釈水量設定を変更してすぐに運転・モニタリングを

開始した。運転期間は2008年12月3日から翌2009年1月5日までの3日間である。MLSSはおよそ500mg/Lでスタートし、1ヶ月のモニタリング期間においては増加減少が繰り返され、予想した高い濃度まで汚泥量が増えることはなかった。

HRT6における処理水質は、基本的には良好であった。HRT3と同様に、処理水そのものは濁りのほとんどない澄んだ水であったが、2日間のスパンでみると常に汚泥が流出されており、汚泥が平衡状態に到るまでの過渡期であることを思わせた。

5.2.5 HRT24 HRT 3 HRT 6 共通の特筆すべき点

試運転から本運転を通し、活性汚泥槽の水面上壁面にダニ(図5-3)が大量に観察された(図5-4)。一般的な活性汚泥ではあまり見られない生物である。水面上に存在するため、処理水および汚泥混合液の採取には(存在量に対して)わずかしかな含まれてこない。

肉眼での観察および顕微鏡観察をしたところ、以下のことが分かった。

- ・ダニは大きいもので1mm程度の大きさ
- ・全体はクリーム色から淡い茶色で、部分的に赤褐色を有す
- ・水面上の壁面に密集して生息する
- ・水に浮くので、水中ではおそらく足場がないと移動はできない
- ・ワムシを捕食していた。丸呑みである
- ・おそらくセンチウ等、ダニよりやや小さいサイズの原生動物は捕食可能と思われる
- ・水面上の壁面に付着する汚泥の中の原生動物(ワムシ等)を捕食していると思われる
- ・サイズの大きいものが一腹に5~8個ほどの卵を有す
- ・外殻は硬く、足の先は長い間残っている
- ・種類、成長速度、雌雄の有無等、専門的なことは一切不明
- ・リアクター内の生物相への影響力の大きさも不明

特に大きな問題を引き起こすことはないだろうと判断した。HRTを変更する際にはヘラで大半を間引いたが、試運転、HRT24、HRT 3、HRT 6いずれにおいても順調に増殖していた。分散細菌槽においては、菌の壁面付着がはげしい時期には出現した。菌塊に留まり、同様に菌塊に留まっていたセンチウを捕食していたものと思われる。



図5-3 ○内は全部ダニ

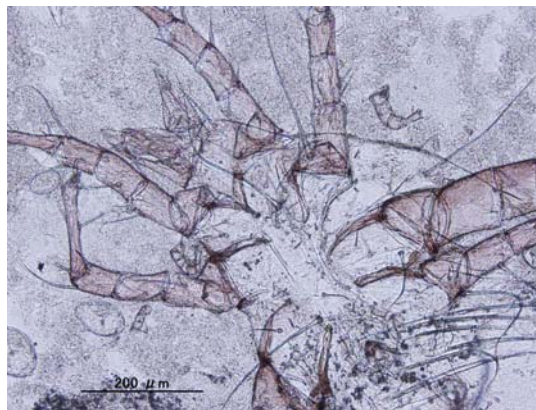


図5-4 大きめのダニ(×100)

5.3 結果と考察;分細菌槽の挙動

5.3.1 分散細菌槽の処理性能

分散細菌槽は一定条件化で運転したので、モニタリングで得られるデータがあまり変動しないことを期待したのだが、実際には変動が見られた。その理由は前述の観察記録に因るものと思われる。分散細菌槽細菌懸濁液の溶解性有機炭素濃度(DOC)と菌体性有機炭素濃度(BOC)の変動を図 5-5 に、分散細菌槽での溶解性有機物除去率を図 5-6 に示した。

溶解性有機物除去率は以下の式によって求めた。

$$\begin{aligned} \text{溶解性有機物除去率}[\%] &= \frac{(\text{流入基質有機炭素濃度}[\text{mgC/L}] - \text{溶存有機炭素濃度}[\text{mgC/L}])}{\text{流入基質有機炭素濃度}[\text{mgC/L}]} \times 100 \\ &= \frac{500[\text{mgC/L}] - \text{分散細菌槽細菌懸濁液のDOC}[\text{mgC/L}]}{500[\text{mgC/L}]} \times 100 \end{aligned}$$

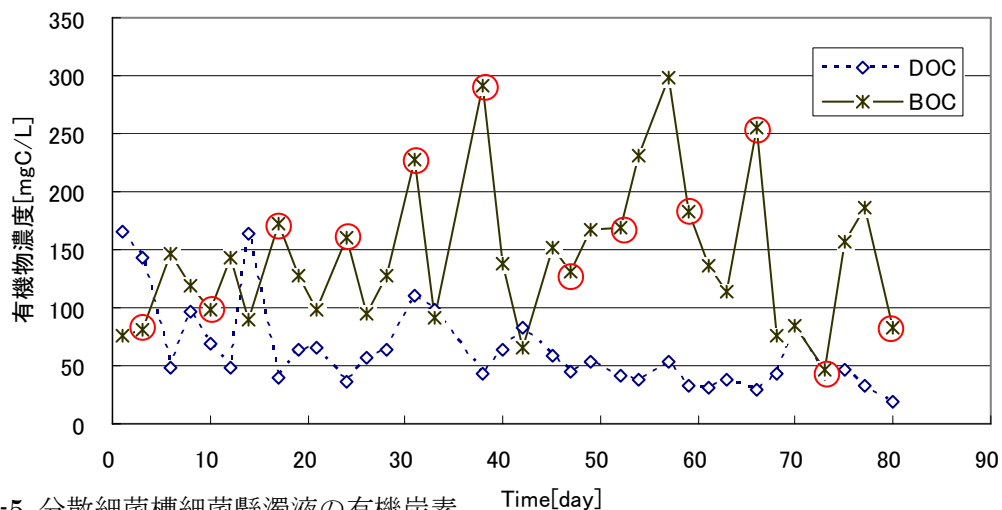


図 5-5 分散細菌槽細菌懸濁液の有機炭素

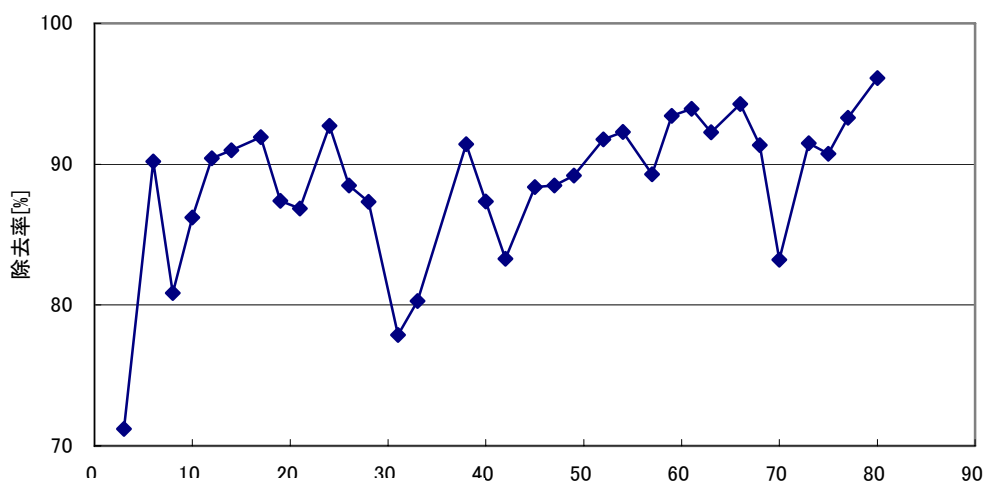


図 5-6 分散細菌槽での溶解性有機物の除去率

平均値は以下の通りである。

◇BOC 平均値 ; 142mgC/L (変動係数 44%)

◇DOC 平均値 ; 63mgC/L (変動係数 57%)

◇溶解性有機物の平均除去率 ; 89% (変動件数 6%)

前述の分散細菌槽の観察記録で述べた観察は数値にも表れている。図 5-5 の○で示したポイントは月曜日の値である。大きく突出したポイントは月曜日に多いことが分かる。必ずしも月曜日が高くなっていない理由は、土日に登校した際に掃除をしたからである。

この汚泥混合液の変動が、活性汚泥槽の生物相に与える影響については、全くの不明である。モニタリング終了後（本論文執筆中）に、分散細菌槽の水温を 35℃と高くして(本研究では 23℃)運転してみたところ、本研究とは明らかに異なる生物相（外観・付録 1）となり、壁面への菌の付着は全く見られなかった。有機物除去率等は測定していないので不明であるが、菌の壁面付着による汚泥混合液の変動については確実に改善されているものと思われる。追加実験をすることがあれば、検討したい。

5.3.2 分散細菌槽の汚泥生成率

分散細菌槽での汚泥生成率(基質の細菌体変換率)を以下の式で求めた(図 5-7)。

$$\begin{aligned}\text{汚泥生成率}[\%] &= \frac{\text{菌体性有機炭素濃度}[\text{mgC/L}]}{(\text{流入基質有機炭素濃度}[\text{mgC/L}] - \text{溶存有機炭素濃度}[\text{mgC/L}])} \times 100 \\ &= \frac{\text{菌体性有機炭素濃度(BOC)}[\text{mgC/L}]}{500[\text{mgC/L}] - \text{分散細菌槽細菌懸濁液のDOC}[\text{mgC/L}]} \times 100\end{aligned}$$

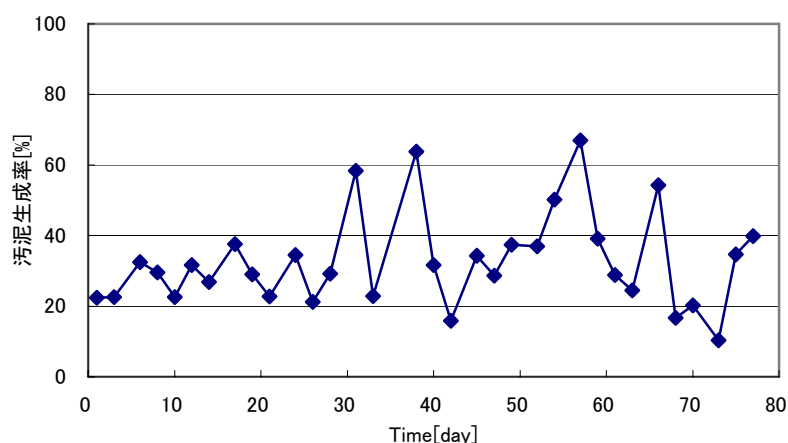


図5-7 分散細菌槽での汚泥生成率

平均汚泥生成率は 32[%]となった。細菌が溶解性有機物を摂取して倍加した(食物連鎖 1 段のみ)にしては、あまりに低い値である。計算式の中で、最も誤差が生じやすいのは TOC 測定機による菌体性有機炭素濃度(BOC)の測定であろう。BOC が正確に測定されているのか、確認をした結果について、次項で述べる。

5.3.3 TOC 測定値と MLSS 値の関係について

TOC 測定機で細菌懸濁液の炭素濃度を測定し、分散細菌槽の汚泥生成率を計算した結果、不自然な値が算出された。菌体性有機炭素濃度(BOC)が、真値よりも低いと思われた。そもそも本研究で扱う分散細菌槽の細菌懸濁液は、一般的な活性汚泥とは異なる性質を持つ。3,000rpm で遠心してもほとんど沈殿せず、固液分離をするには 12,000rpm で 20 分ほど遠心する必要があった。また処理水に含まれる SS(分散細菌)を測定するにあたり、SS 成分の低い澄んだ処理水の場合、下水道試験法に準じた MLSS の測定方法では正確な値を求めるのは困難であると判断した。

そこで分散細菌槽の細菌懸濁液に含まれるバイオマス量および処理水に含まれる SS 成分(分散細菌性バイオマス)の測定は TOC 測定機を用いることにした。超音波分散にかけた試料全体の TOC 値(試料全体の有機炭素濃度)から、試料の炉液の DOC 値(溶解性有機炭素濃度)を差し引いた値を菌体性有機炭素濃度(BOC)とした。しかし、この値がどれほど真値に近いのか、疑問を持った。

そこで同一サンプルに対し、TOC 測定機にて算出した BOC 値と、12,000rpm×20 分間遠心にて求めた MLSS 値、さらに超音波分散をかけた試料全体の COD 値を比較して、それぞれの測定値の信頼性および変換係数を求めた(表 5-1)。

なお、分散細菌性バイオマス量を求める指標として、MLVSS ではなく無機物を含む MLSS を用いた理由は、細菌懸濁液の無機物含有量が低く、測定誤差が多く出たからである。

表 5-1 分散細菌槽の細菌懸濁液における各測定方法での測定値とそれらの変換係

	分散細菌槽 細菌懸濁液					比			
	MLSS	全COD	全TOC	DOC	BOC	全 COD/ 全TOC	MLSS/ BOC	MLSS/ 全TOC	全COD /MLSS
測定日	mg/L	mg/L	mgC/L	mgC/L	mgC/L				
081201	640	1185	210	58	152	5.65	4.22	3.05	1.85
081203	600	1020	175	44	131	5.84	4.59	3.43	1.70
～12サンプル中略～						～12サンプル中略～			
081226	1040	1109	219	34	186	5.06	5.60	4.74	1.07
081229	500	612	102	19	82	6.02	6.09	4.92	1.22
平均	734	1046	197	43	154	5.31	4.87	3.75	1.43
変動係数[%]	36	38	33	33	43	9	10	12	14
						MAX.MINは除外			

表より、MLSS,COD,TOCそれぞれの測定結果のばらつきは 30%強と大差がなく、それら各測定項目の変換係数のばらつきは 10%強と安定していることが分かる。一方でBOCとMLSSの関係が 1:4.87 と出ており、これは細胞組成式($C_5H_7NO_2$)から求められる炭素含有率(47.3%)に基づく変換係数TOC:MLVSS=1:2.11 と比較して倍以上の変換係数値となる。要因としては、TOC測定機は本来汚泥混合液の様な懸濁性の有機物を測定するようには作られておらず、試料全体のTOC値が真値より低く出たためにBOC値が小さく算出された事が考えられる。

以上より、TOC 測定機を用いて得た菌体性有機炭素濃度 BOC をバイオマス量に変換する場合には、今回算出した BOC:MLSS の比を当てた。

一方、活性汚泥槽汚泥混合液に対しては上記の係数を用いることはできない。MLSS 値から MLVSS を求め、細胞組成式に基づく変換係数 TOC:MLVSS=1:2.11 を用いて有機炭素濃度へと変換することとした。その際、MLSS を MLVSS に変換する係数は、活性汚泥槽の MLSS:MLVSS 比のモニタリング平均値 MLSS:MLVSS=100:92 を用いた。

以上をまとめると、本研究における測定値の変換に用いる係数は以下である。

◇分散細菌槽細菌懸濁液および処理水の菌体性有機炭素濃度について、
TOC 測定機を用いて求めた BOC を MLSS に変換する場合は

BOC:MLSS=1 : 4.87 を用いた

◇全試料について、

算出・測定で得た MLSS を MLVSS に変換する際には

MLSS:MLVSS=100:98 を用いた

◇全試料について、

算出した MLVSS を TOC に変換する際には

TOC:MLSS=1 : 2.11 を用いた。

この変換係数を用いて、分散細菌槽の汚泥生成率を再計算した。式は以下とした。

$$\begin{aligned} \text{汚泥生成率[\%]} &= \frac{\text{菌体性有機炭素濃度[mgC/L]}}{(\text{流入基質有機炭素濃度[mgC/L]} - \text{溶存有機炭素濃度[mgC/L]})} \times 100 \\ &= \frac{\text{菌体性有機炭素濃度(BOC)[mgC/L]} \times 4.87 \times 98 / 100 \div 2.11}{500[\text{mgC/L}] - \text{分散細菌槽細菌懸濁液のDOC[mgC/L]}} \times 100 \end{aligned}$$

その結果、分散細菌槽における汚泥生成率の平均は 73%となった。細胞組成式を基に考えられる、炭素が無機化される割合は一般的に 53%程度である。100 の炭素を摂取して 27%しか無機化されない、とは、考えにくい。

結局、分散細菌槽の汚泥生成率については確かな事が言えなかった。

しかしながら、後述のリアクター全体での汚泥生成率を求める際、分散細菌槽の採水による減量・処理水に含まれる SS 成分の MLSS 変換については、今回の測定で算出した変換係数を使用した。

5.4 結果と考察;HRT24,3,6 での活性汚泥槽の処理性能

5.4.1 各 HRT での処理性能について

本研究では処理性能を以下の 2 点で評価した。

- ・ 処理水の溶存有機物(溶解性有機炭素濃度 DOC)
- ・ 処理水中の SS 成分量(菌体性有機炭素濃度 BOC)

ここで、処理水と共に流出する溶解性・菌体性有機物の量を見ることは、HRT の変化による汚泥生成率の変化の仕組みを考察する際に、生物相の差違だけに起因するものなのか、HRT の物理的な影響をも関わるのかを判断する材料となる。仮に HRT 3 時間で無視できない量の有機物が流出していた場合、汚泥の生成率は、HRT の差違に由来する生物相の差違だけでなく、HRT の物理的な影響をも考慮しなければならない。

5.4.2 処理水に含まれる溶存有機物

処理水に含まれる溶解性有機炭素濃度、つまり処理されずに流出した溶存有機物についてである。処理水を遠心し SS 成分を沈殿させ、その上澄みを $0.45\mu\text{m}$ のフィルターで濾過した濾液を TOC 測定機にかけた。測定結果を図 5-8 に示す。

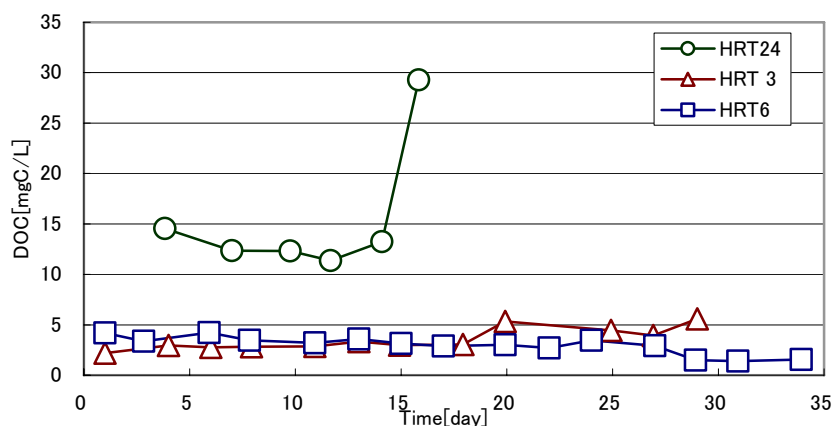


図5-8 処理水に含まれる溶解性有機炭素濃度

HRT 3 時間において、18 日目あたりから溶存炭素濃度が増加している。これは 15 日目~18 日目におきた基質供給停止トラブルの影響が出たと思われる。HRT 3 時間の溶存有機炭素は $3\sim5\text{mgC/L}$ であり、 500mgC/L の流入基質は全て処理されたと言える。

HRT 3 時間で処理できる流入有機物が、HRT24 で処理しきれずにより多く流出している。その理由は 2 つ考えられる。

- 1) HRT24 の生物相が、溶解性有機物の摂取に長けた生物をあまり多く有していない
 - 2) 生物の死亡・大型生物間の捕食の食べ残し によって、生物体から有機物が溶出した
- いずれにせよ、HRT 3、HRT 6 に比べ、HRT24 は溶解性有機物除去率は若干低いことが分かった。溶解性有機物除去率の各 HRT の平均は以下の通りである。

◇HRT24 96.9% ◇HRT 6 99.4% ◇HRT 3 99.3%

5.4.3 処理水中の SS 成分量

固液分離がうまくなされず処理水に SS が多く含まれる場合、処理したとは言えない。各 HRT での処理水中 SS 成分量を TOC 測定機によって菌体性有機炭素濃度：BOC として求めた。なお、処理水に含まれる SS 成分は流出汚泥とは別と考え、汚泥流出に伴うと思われる過度高い BOC 値(10mgC/L 以上)は算出の際に除外し、1 週間での平均値で補った(図 5-8)。

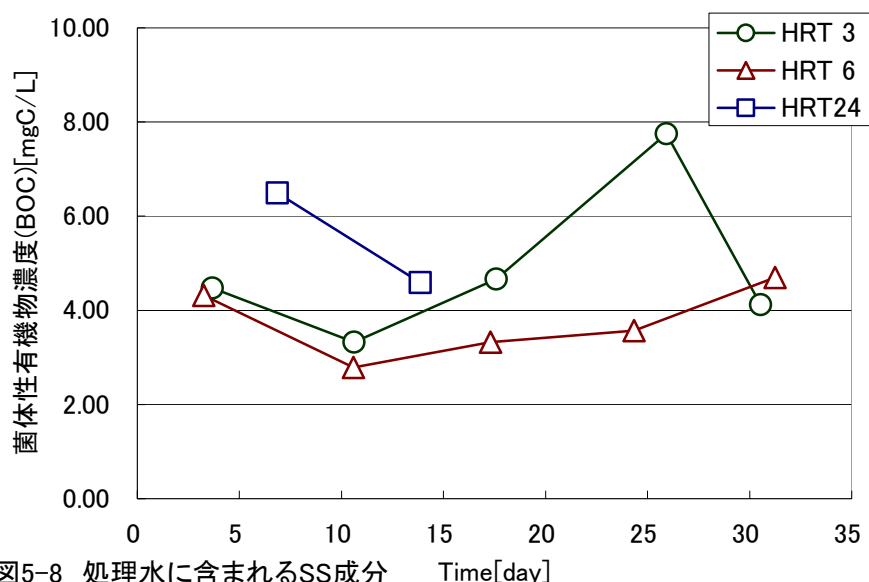


図5-8 処理水に含まれるSS成分 Time[day]

HRT3 において 10 日目から上昇しているのは、14 日目～17 日目の 63 時間におきた基質供給ポンプのトラブルが影響していると思われる。基質添加再開後、分散細菌槽はすぐに回復したが、活性汚泥槽の汚泥流出と汚泥濃度の低下はしばらく続いた。次項でも述べる。

溶解性有機物の除去率と同様、HRT24 の処理水中の SS 成分は、HRT 3、HRT 6 に比べ若干多いことが分かる。

5.4.4 活性汚泥槽の処理性能 まとめ

活性汚泥槽の HRT を 24 時間、3 時間、6 時間と変えた結果、HRT 3 時間・HRT 6 時間では、処理水に有機物をほとんど含まなかった。このことは、今回 HRT を変化させた結果に汚泥の生成率が変化した場合、生物の処理可能能力を超えて物理的な要因で汚泥生成率に差が出たわけではなく、各 HRT で存在する生物相の差が汚泥生成率を左右したのだと考えることができる。

本来 HRT 3 時間で処理可能な流入有機物に対し、HRT24 時間では処理水と共に流出する有機物が増加していた。これは HRT24 時間の培養時間におこる自家消費を推測させるデータであると言える。顕微鏡観察でも、死んで体液の流れ出た原生動物の周りに細菌が群がっていた。死んだ生物体から体液として溶解性有機物が流れ、それを摂取して分散細菌(SS 成分)が余剰に増えると考えられる。

5.5 HTR とリアクターの汚泥生成率

5.5.1 各 HRT における汚泥生成率

繰り返し述べた通り、本研究で扱っている二相処理法は汚泥の発生を抑えることが期待できるプロセスである。細胞全体の 47.3%が炭素であるとする細胞組成式によれば、溶解性有機物から菌体に変換される際におよそ 50%が無機化され、更に菌体が原生動物等の体に変換される際 50%（全体で 25%）が無機化されることになる。むしろ、より大きな生物になるほど内省呼吸率が高まり、生存に必要な有機物量は生物重量と比例しなくなるであろう。無機化される有機物(炭素)の割合は大きくなるのではないかと考えられる。

まずは活性汚泥槽の MLSS の増加および流出汚泥量について図 5-9 に示す。

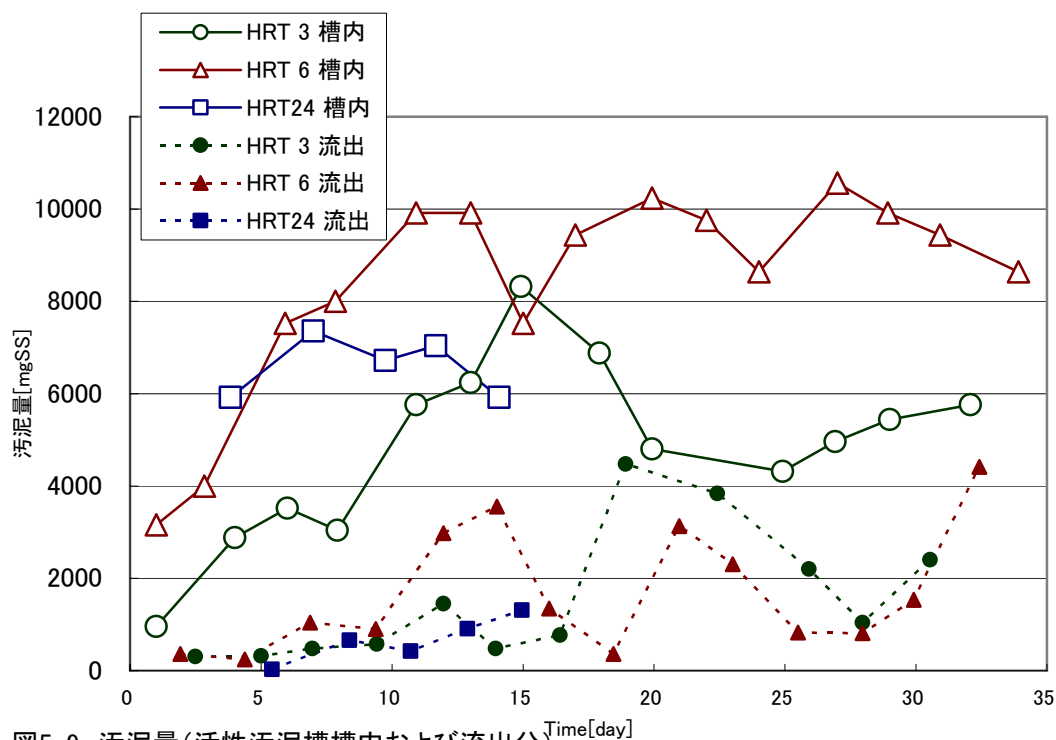


図5-9 汚泥量(活性汚泥槽槽内および流出分)

図中、槽内；活性汚泥槽の MLSS に容量 4L をかけた槽内汚泥量（測定日にプロット）

流出；前回測定から測定日までの流出汚泥量（測定日と測定日の間にプロット）

測定の流れの関係で、槽内汚泥量と流出汚泥量の動きが 1 サイクル分ずれている。

HRT 3 の 15 日目～18 日目で基質供給停止トラブルがあった。測定結果を見ると 15 日目から急激に流出汚泥量が増加し、槽内汚泥量が減少している。エサ(分散細菌)の供給が停止したことで、汚泥を沈降させるフロックを形成する生物が減少したと思われる。フロックの解体と同時に、フロックに付着し分散細菌を捕食するツリガネムシやワムシも数を減らし、エサ(分散細菌)の供給が復活してから増殖には時間を要したであろう。

事実、図 5-9 において HRT 3 の 17 日の SS 成分が急増しており、捕食者の不足によって分散細菌が SS 成分として処理水に混ざったと考えられる。

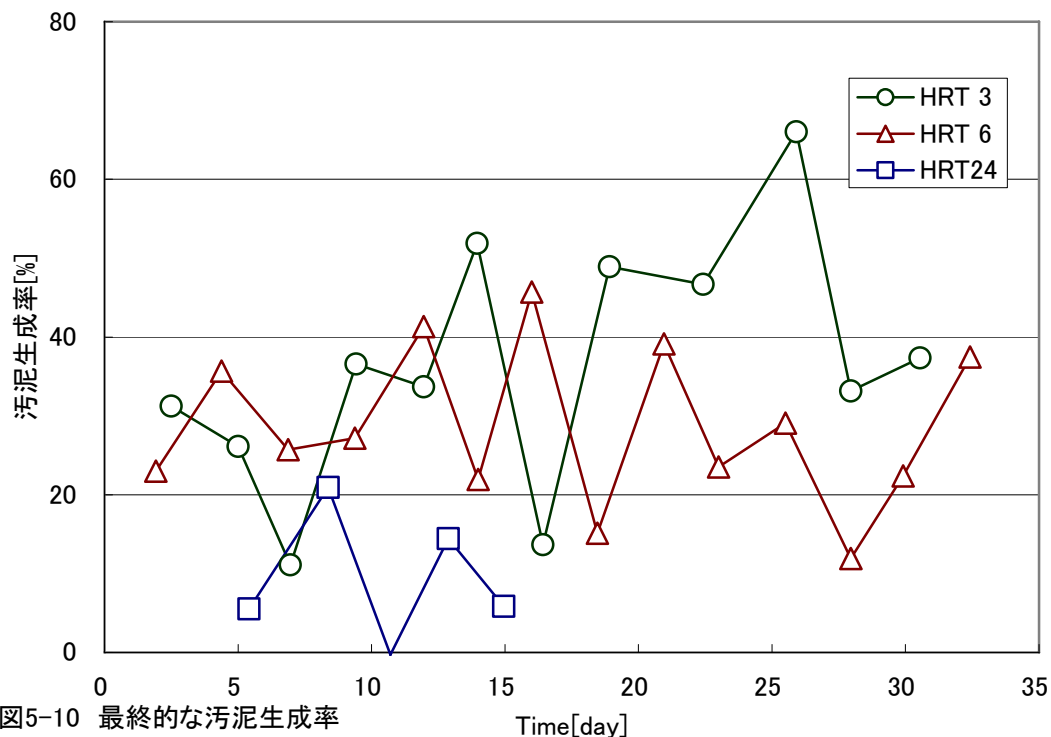
本研究の系は、一般的なリアクターと異なり、MLSS を一定に保つための汚泥の引抜きを行っていないので、明確な余剰汚泥が存在しない。そのため一般的な算出式は使えない。流入有機物量に対して何割が汚泥に変わり、何割が無機化して空中に逃げたのかを求めるオリジナルの式として以下を用いた。

$$\text{汚泥生成率}[\%] = \frac{\text{リアクター流入有機物量}[\text{mgC}]}{\text{生成バイオマス量}[\text{mgMLVSS}] \times \text{TOC変換係数}(1/2.11)} \times 100$$

$$\begin{aligned} \text{リアクター流入有機物量}[\text{mgC}] &= (\text{基質有機炭素濃度}[\text{mgC/L}] \times \text{基質流入量}[\text{L/day}] \\ &\quad \times \text{前回測定からの経過日数}[\text{day}]) \\ &\quad - \text{トラブル等による損失}[\text{mgC}] \\ \text{生成バイオマス量}[\text{mgMLVSS}] &= \text{生成汚泥量}[\text{mgMLSS}] \times \text{MLSS変換係数}(98/100) \\ \text{生成汚泥量}[\text{mgMLSS}] &= \text{活性汚泥槽における汚泥増量}[\text{mgMLSS}] \\ &\quad + \text{流出汚泥量}[\text{mgMLSS}] \\ &\quad + \text{処理水として排出したSS成分量}[\text{mgMLSS}] \\ &\quad + \text{採水による損失}[\text{mgMLSS}] \\ &= \text{活性汚泥槽容量} \times (\text{MLSS} - \text{前回測定のMLSS}) \\ &\quad + \text{流出汚泥貯留タンクのMLSS} \times \text{タンク内の水量} \\ &\quad + \text{処理水BOC} \times \text{BOC変換係数} \times \text{処理水量} \times \text{前回測定からの経過日数} \\ &\quad + \text{前回測定の処理水BOC} \times \text{BOC変換係数} \times 1\text{cycleでの処理水量} \\ &= 4[\text{L}] \times (\text{MLSS} - \text{前回測定MLSS})[\text{mgMLSS/L}] \\ &\quad + \text{流出汚泥貯留タンクのMLSS}[\text{mgMLSS/L}] \times \text{タンク内の水量}[\text{L}] \\ &\quad + \text{処理水BOC(週平均値)}[\text{mgC/L}] \times 4.87 \times (32\text{or}16\text{or}4)[\text{L}] \times \text{測定間隔}[\text{d}] \\ &\quad + \text{前回測定の処理水BOC}[\text{mgC/L}] \times 4.87 \times (2667\text{or}1333\text{or}333)/1000[\text{L}] \end{aligned}$$

ここで、生成汚泥量の算出に用いる「処理水 BOC(週平均)」とは、BOC 値 10[mgC/L]以上の測定結果を除いた週平均 BOC 値である。BOC 値 10[mgC/L]以上の場合、流出汚泥の混入により数値が高くなっていると考えられ、流出汚泥量と重なるからである。一方「前回測定の処理水 BOC」は前回の測定の際に採取してしまった、本来は流出汚泥貯留槽に溜まるはずだった汚泥量を考えるので、測定毎の BOC 測定値で算出する。

なお、上式で求める生成汚泥量は、真値よりもやや少ない値になるはずである。それは、流出汚泥貯留タンクに流出汚泥が入ってからその MLSS を測定するまでに、最大で 3 日間のタイムラグがある。この間に流出汚泥貯留槽内で嫌氣的に分解が起こっているのは間違いない。どの程度寄与しているのか不明であるが、ここでは無視する。結果を図 5-10 に示す。



各 HRT での平均汚泥生成率は以下の通り。

- ◇HRT24 9% (変動係数 81%)
- ◇HRT 6 29% (変動係数 34%)
- ◇HRT 3 36% (変動係数 41%)

HRT が長くなるにつれ汚泥生成率は低くなった。なお、HRT 3 の 27 日目の値が突出しているのは、18 日目で急減している事と関連して、15 日目～18 日目の流入基質供給停止トラブルの影響だと思われる。

いずれの HRT においても 50%を下回ったが、理論値である 25%を下回ったのは HRT24 のみであり、HRT3 では標準活性汚泥の生成率(45-60%)と大差ない値である。その理由として考えられるのは以下の 2 点である。

- 1)リアクター全体の HRT が 9 時間では溶解性有機物→細菌→細菌捕食性原生動物の 2 段階までしか食物連鎖が出来上がらず、また、実際の有機物が生物体に変換される効率(無機化される割合)は 50%を下回るので、2 段階で 40%程度となる。
- 2)処理水中の SS 成分を過大評価している (SS 分量は BOD 値[mgC/L]×32[L]となる。
TOC 測定機を用いた TOC 測定に際し、標準液 0,50,100[mgC/L]で検量線を得た。
この場合 10mgC/L 程度以下の濃度の測定値は信頼度が低い。微小の誤差が大きく影響する。

理由 2)に関連して、生成汚泥量の算出にあたり、処理水の SS 成分を除外する考え方もある。処理水中の BOD は図 5-8 の通り最大でも 8[mgC/L]であり、流入基質有機物濃度の 1.6%となる。十分に処理されたと考え、無視することも可能であると言える。この場合の汚泥生成率は以下となる。

- ◇' HRT24 9% （変動係数 83%）
- ◇' HRT 6 23% （変動係数 55%）
- ◇' HRT 3 21% （変動係数 44%）

処理水中 SS 成分を考慮した算出結果に対し、HRT3 の汚泥生成率が大幅に小さくなり、HRT 6 と HRT 3 の比率が逆転する。HRT 6 の値は理論値に近くなる。

この HRT の時間と汚泥生成率の逆転を説明する理由として、以下が考えられる。

- 1)やはり、処理水と共に流出する SS 成分を無視することはできない
- 2)HRT6 に比べ、HRT3 の方が汚泥生成率を抑える生物相を作り出すことができる

本研究では、処理水中に含まれる微量な SS 成分を無視するか否かで、HRT の時間と汚泥生成率の関係に関する結果が分かれてしまった。加えて、流出汚泥貯留槽内での 1~3 日間の自家消費分を算出することは難しい。HRT と汚泥生成率の関係を明確にすることはできなかった。

汚泥生成率に関する結果を以下にまとめる。

◇HRT24 の汚泥生成率は低い。これは HRT が長いほど、自家消費によって食物連鎖が繰り返され、その結果汚泥が減量されるからであると考えられる。

◇各 HRT で汚泥生成率は 40%を下回った。二相処理法は汚泥生成率を抑えられるプロセスであると言えた。

5.5.2 HRT の影響

本研究では、二相処理式リアクターの活性汚泥槽の HRT を変化させることによって、モニタリング結果に相違が見られた。各 HRT の特徴をまとめた。

◇HRT24

- ・汚泥生成率はとても低く、その理由は自己消費によるものと思われる
- ・ただし処理水に“食べ散らかし”と思われる溶解性有機物や SS 成分が入ってくる

◇HRT 6

- ・汚泥生成率は 23~29% となり、理論値(25%)に近い値である
- ・処理水質は良い
- ・汚泥の沈降性は良い（試運転では同条件で MLSS4,000[mg/L]まで増加した）

◇HRT 3

- ・汚泥生成率は、算出方法による。50%は上回らない
- ・処理水質は良い
- ・トラブルの影響が如実に現れる

HRT を長く設定すれば、生成汚泥量は削減できる。ただし処理水性能を落としては元の子もない。その対応は①処理性能を維持できる HRT に設定する②膜濾過と組み合わせて処理水の水質を向上させる等が考えられ、②については実際に開発が行われている(2004.ゼロエミッション型バイオリアクター)。

なお、研究当初は顕微鏡観察によって“HRT の差違による生物相の違い”を確認する予定であった。しかし知識も経験も不十分な状態で、顕微鏡を使った目視による原生動物等の種の同定が困難であったため断念した。その代替として DNA を対象とした生物群集構造解析、分子生物学的手法に着目した。サンプルに存在する生物の DNA をまとめて増幅させ、塩基配列の違いによって種を分類する PCR/T-RFLP 法は、作業手順さえ覚えれば、技術による誤差の少ないデータを得ることができる。活性汚泥に存在する原生動物等(真核生物)に適応させた研究はまだほとんどなく、得られた DNA 分析データから実際の生物相を知る事は難しいが、将来的に導入される可能性が高い生物相解析手法であると考えた。

活性汚泥に存在する原生動物等(真核生物)の生物群集構造解析方法として、分子生物学的な解析手法 PCR/T-RFLP 法が導入される可能性があるのか、検討した結果を次章で述べる。

第六章 実験結果と考察

分子生物学的手法による生物相の解析

6.1 概要

第五章では活性汚泥槽の HRT の違いによって、汚泥生成率が変化することを確認した。その際、汚泥生成率の差違は活性汚泥槽の生物相の違いに起因するだろうと考察した。しかし従来の生物群集構造分析法である顕微鏡観察による生物種の同定と個体数の計上には知識と経験が必要であり、また分析者による誤差も大きいと考えられる。そこで、生物の形態・生態特性による分析ではなく、近年発展を続ける DNA 分析による生物相解析法に注目した。

PCR 法による細菌の DNA 解析は盛んに行われ、少しずつ情報が集められている。しかし原生動物等、真核生物についてはほとんどデータがなく、研究が始まったばかりである。PCR/T-RFLP 法による生物群集構造解析が、活性汚泥の実際の生物相を正確に読み取っているのか、まずはそこを明確にする必要があるだろう。

本章では、第五章で得られたリアクターのモニタリング結果を、同じサンプルについておこなった生物群集構造の分子生物学的な解析結果と照合し、相関の有無について調べた結果を述べる。

分散細菌槽および活性汚泥槽の細菌に対する PCR/T-RFLP 法の結果を、活性汚泥槽のモニタリング結果と重ねた。また、リアクター活性汚泥槽の原生動物等を対象とした生物群集構造解析の結果と、第五章で示したリアクターのパフォーマンスと合わせた考察を述べた。

6.2 データの分析方法

分散細菌槽および活性汚泥槽の細菌と原生動物等(真核生物)を対象とした PCR/T-RFLP 法による生物群集構造解析について、リアクター運転条件 HRT 3 時間の細菌濁液もしくは活性汚泥を解析した結果を示す。サンプル採取からデータ解析までの流れを以下に記す。

- 1)モニタリング時に汚泥 1.5mL ずつ採取し、2.0mL 用チューブに入れ-80℃で保存した
- 2)リアクター運転終了後、保存していた汚泥を解凍し、超音波破碎と希釈作業によって PCR 鋳型を用意した
- 3)鋳型を PCR にかき、DNA を増幅させた
- 4)PCR 産物の精製、制限酵素処理を経て、T-RFLP 解析をした
- 5)得られた T-RFs の数値データを抜き出し、各フラグメントの経時変化をグラフ化した

経時変化を追うフラグメントは、運転期間を通して平均的な蛍光強度値が 100 程度以上で、かつ蛍光強度値に特徴があるフラグメントサイズを対象とした。各サンプルにおける濃度の違いによる蛍光強度の差をなくすため、選出したフラグメントに対しては、各サンプルでの蛍光強度の合計で除し、相対蛍光強度を求めた。

6.3 細菌を対象とした解析

分散細菌槽および活性汚泥槽から採取したサンプルに対し、細菌用プライマーを用いてPCRを行い、T-RFLPで解析した。

6.3.1 T-RFLP 電気泳動図

HRT 3 時間の運転期間を通して、出現する T-RFs はある程度決まっていた。ただし時期によって特定の T-RFs の蛍光強度が強まったり、弱まったりといった変化は T-RFLP 電気泳動図で確認できた(図 6-1)。

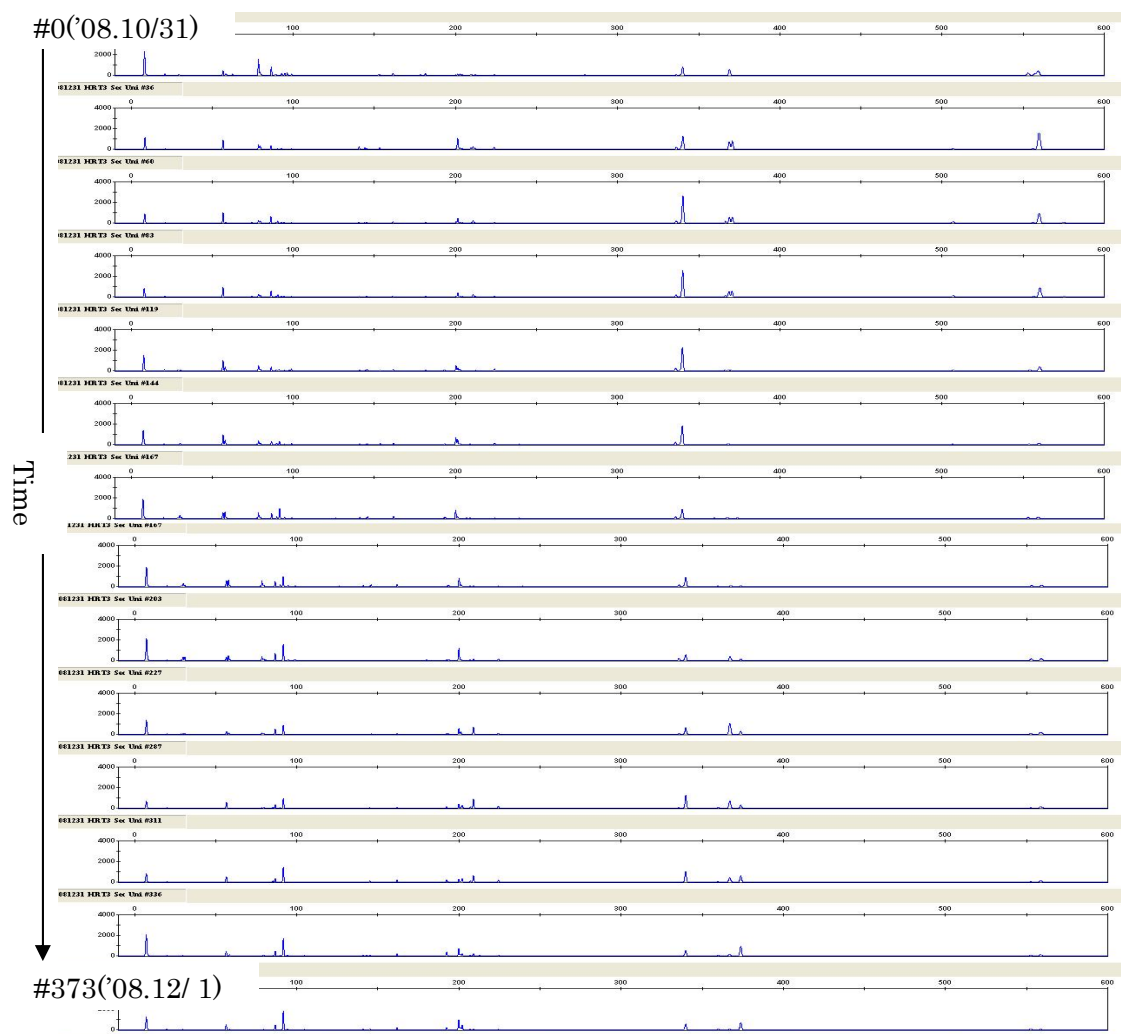


図 6-1 活性汚泥槽 細菌対象 蛍光強度の経時変化 T-RFLP 電気泳動図
(5' FAM-Euk20f/Euk907r、制限酵素 ; *Hha* I)

6.3.2 対象とするフラグメント

得られた T-RFLP のデータから、リアクターの処理水質やパフォーマンスに与える影響が大きいと思われる T-RFs を取り出し、更に詳細に分析をした。分析する対象は、以下の条件のいずれかを満たすものを選定した(図 6-2)(表 6-1)。

- ①分散細菌槽サンプルで特に強い蛍光強度を持つフラグメント
(分散細菌槽のサンプル中に占める割合の大きいフラグメント)
- ②活性汚泥槽サンプルで比較的強い蛍光強度を持つフラグメント
(分散細菌槽に微少に存在しつつ、活性汚泥槽で比較的強い蛍光強度をもつフラグメント)

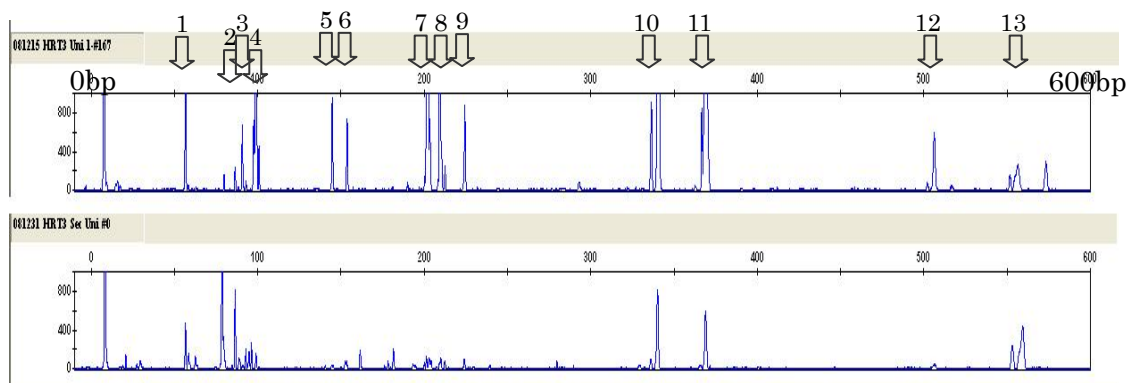


図 6-2 分散細菌槽・活性汚泥槽 細菌用 T-RFLP 電気泳

表 6-1 図における矢印に対応する断片長[bp]

矢印番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
断片長[bp]	57	86	91	99	145	154	202	203	209	340	369	506	558

更に、選定したフラグメントについて、分散細菌槽および活性汚泥槽での経時変化をグラフで表した。(図 6-3) グラフより、それぞれの槽で優先的なフラグメントが明確に分かる。また、各フラグメントの経時変化も明確に分かる。

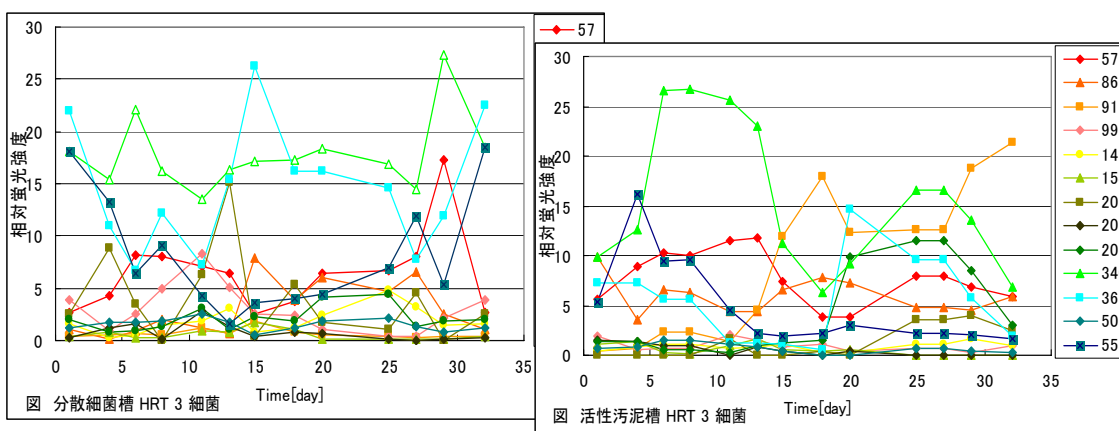


図 6-3 細菌 T-RFs の経時変化 分散細菌槽と活性汚泥槽

選定したフラグメントを、その特徴によってグループに分けた。なお、複数のグループにまたがるフラグメントもある。

◇分散細菌槽では強い相対蛍光強度を示しながら、活性汚泥槽では目立たない T-RFs

◇分散細菌槽では目立たないが、活性汚泥槽では強い相対蛍光強度を示す T-RFs

◇活性汚泥槽において、15日目～18日目で蛍光強度が大きくなる T-RFs

6.3.3 グループA

◇分散細菌槽では強い相対蛍光強度を示しながら、活性汚泥槽ではほとんどみられない T-RFs

このグループは、分散細菌槽で優占している細菌のうち、活性汚泥槽にはあまり存在しない細菌である。それはつまり、活性汚泥槽で捕食されている細菌であると考えられる。

断片長 99bp、144bp、202bp、203bp、506bp、が該当する中でも、分散細菌槽で比較的強い相対蛍光強度をもつ断片長 99bp と 202bp を取り上げた(図 6-4)。

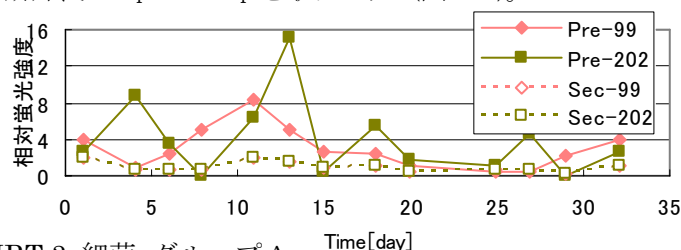


図 6-5 HRT 3 細菌 グループ A

分散細菌槽である程度存在していた断片長 99bp、202bp のフラグメントが、活性汚泥槽ではほとんど見られなくなったことが分かる。これは活性汚泥槽で原生動物等に捕食される細菌の中でも、特に捕食されやすい細菌種であることを推測させる結果である。

6.3.4 グループB

◇分散細菌槽では目立たないが、活性汚泥槽では強い相対蛍光強度を示す T-RFs

このグループは、分散細菌槽ではそれほど優占的ではなかった細菌のうち、活性汚泥槽で存在感を高めた細菌である。活性汚泥槽において原生動物等に捕食されにくい、もしくは溶解性有機物の濃度が低い環境で増殖しやすい細菌であると考えられる。

断片長 91bp が該当する(図 6-6)。

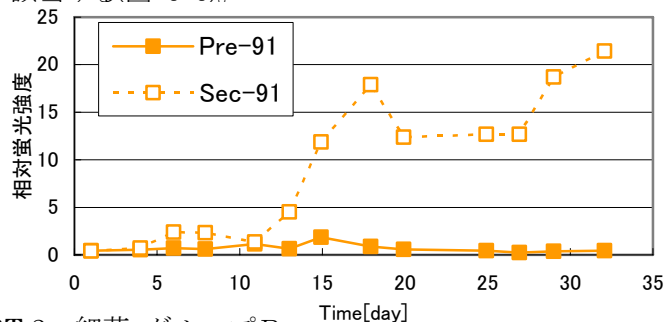


図 6-6 HRT 3 細菌 グループ B

6.3.5 グループC

◇活性汚泥槽において、15日目～18日目で蛍光強度が大きくなる T-RFs

HRT 3 の運転期間中、15日目～18日目で基質流入停止トラブルがあり、モニタリングの結果にもその影響が見て取れる。このグループは、活性汚泥槽において、そのトラブルの影響を受けていると思われる細菌、つまり、相対蛍光強度の傾向が15日目または18日目から大きく変化しているフラグメントである。

断片長 15日目 57bp(減)、91bp(増)、340bp(減)

18日目 209bp(増)、369bp(増)

が該当する

このグループに関しては、活性汚泥槽における T-RFs の挙動と、リアクターのモニタリング結果との関係を見た。フラグメントをその特徴ごとに分け、各モニタリング項目の結果と照らし合わせた。

(図 6-7、6-8、6-9 図中縦軸は無単位)

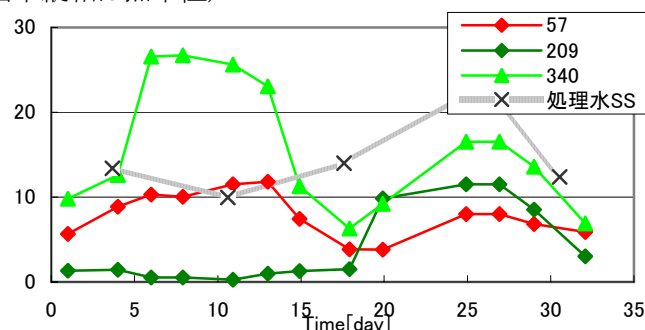


図6-7 活性汚泥槽 HRT 3 細菌 グループC①

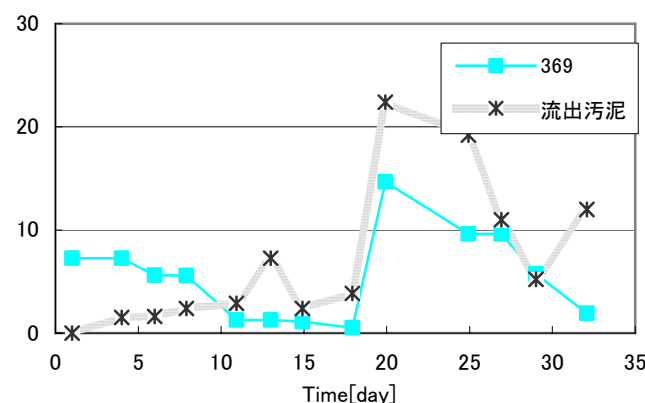


図6-8 活性汚泥槽 HRT 3 細菌 グループC②

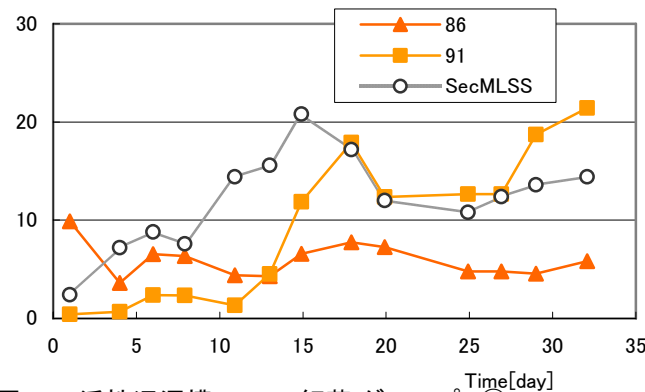


図6-9 活性汚泥槽 HRT 3 細菌 グループC③

グループCをまとめた。

①蛍光強度の変化が、処理水中のSS成分(BOC)の動向に対応するフラグメント

断片長 57bp、209bp、340bp

処理水中のSS成分の増加に関連する細菌である。

捕食者である原生動物等の減少によって生き残り、SS成分となった分散細菌だと考えられる

②蛍光強度の変化が、流出した汚泥量の動向に対応するフラグメント

断片長 369bp

流出汚泥の増加にともなって、活性汚泥槽内で存在が増す細菌だと考えられる。

優れた沈降性を作り出す細菌か、沈降性の良い捕食者から厭われる細菌だと推測される。

③蛍光強度の変化が、活性汚泥槽の汚泥濃度に対応するフラグメント

断片長 86bp、91bp

活性汚泥槽の汚泥濃度増加にともなって、活性汚泥槽で存在が増す細菌だと考えられる。

活性汚泥を構成する生物相と共存し得る細菌が存在する可能性がある。

6.3.6 細菌を対象とした解析のまとめ

細菌用プライマーを用いて、リアクターの細菌群集構造を分子生物学的に分析した結果、細菌群集構造の経時変化をみることができると分かった。更に各フラグメント(細菌種)の経時変化が、リアクターのモニタリング結果の特定の項目の動向と一致することが分かった。

細菌のDNA情報は、データ構築が進められている。本研究では着手することができなかったが、公開されているデータベースを参照することで、より詳細な考察が可能となるだろう。

6.4 原生動物等(真核生物)を対象とした解析

HRT 3 のモニタリングに際して採取した汚泥混合液に対し、原生動物や微小な後生動物の生物群集構造をみるために、真核生物用プライマーを用いて PCR/T-RFLP 法にて解析した。解析する過程で、GenBank に登録されている真核生物(動物界を除く)の rRNA 塩基配列情報を検索した。本研究で得た T-RFs データに該当する可能性のある情報は、僅かながら挙げた。検索で得た情報から生物種を同定することはできないが、考察の参考とした。

6.4.1 分散細菌槽に存在する真核生物

まず、分散細菌槽の細菌混合液に対し、活性汚泥槽汚泥混合液と同様に真核生物用プライマーで PCR を行い、制限酵素で DNA 断片を切断したサンプルを T-RFLP で断片長解析をした(図 6-10)。

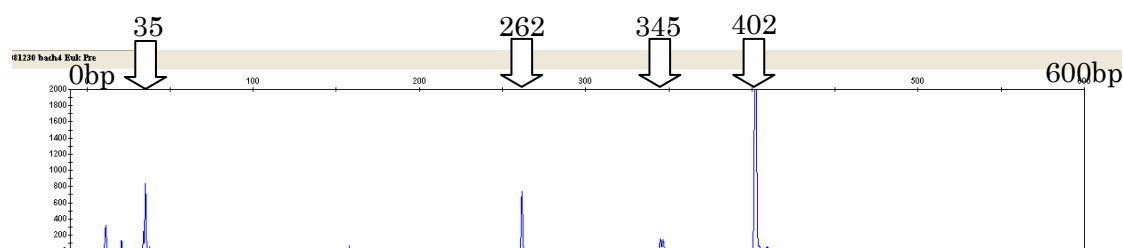


図 6-10 HRT 3 分散細菌槽 原生動物等
(5' FAM-Euk20f/Euk1179r、制限酵素 ; *Hha I*)

断片長 35bp、262bp、345bp、そして 402bp に強い蛍光強度を持つフラグメントが見られた。この 402bp は、細菌と同等の増殖速度を持ち溶解性有機物を摂取する真菌のカビだと思われる(図 6-11)。(2008.Euringer,K. and Lueders,T)(1991. Jun Murase, Matthias Noll, and Peter Frenzel)

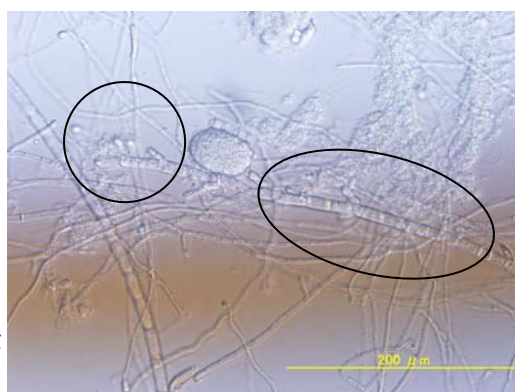


図 6-11 真菌だと思われる生物

顕微鏡で観察したところ、この様なちぐはぐに小枝を伸ばしながらボコボコと長く伸びる太い枝状の生物は、分散細菌槽にも活性汚泥槽にも共通して多く見られた。

262bp は特に多くなることはなかったが、402bp 同様、真菌の可能性はある。

6.4.2 活性汚泥槽に存在する真核生物

リアクターのモニタリングに際して活性汚泥槽から採水した 13 サンプルを PCR/T-RFLP 法で解析した T-RFLP 電気泳動図を図 6-12 に示す。

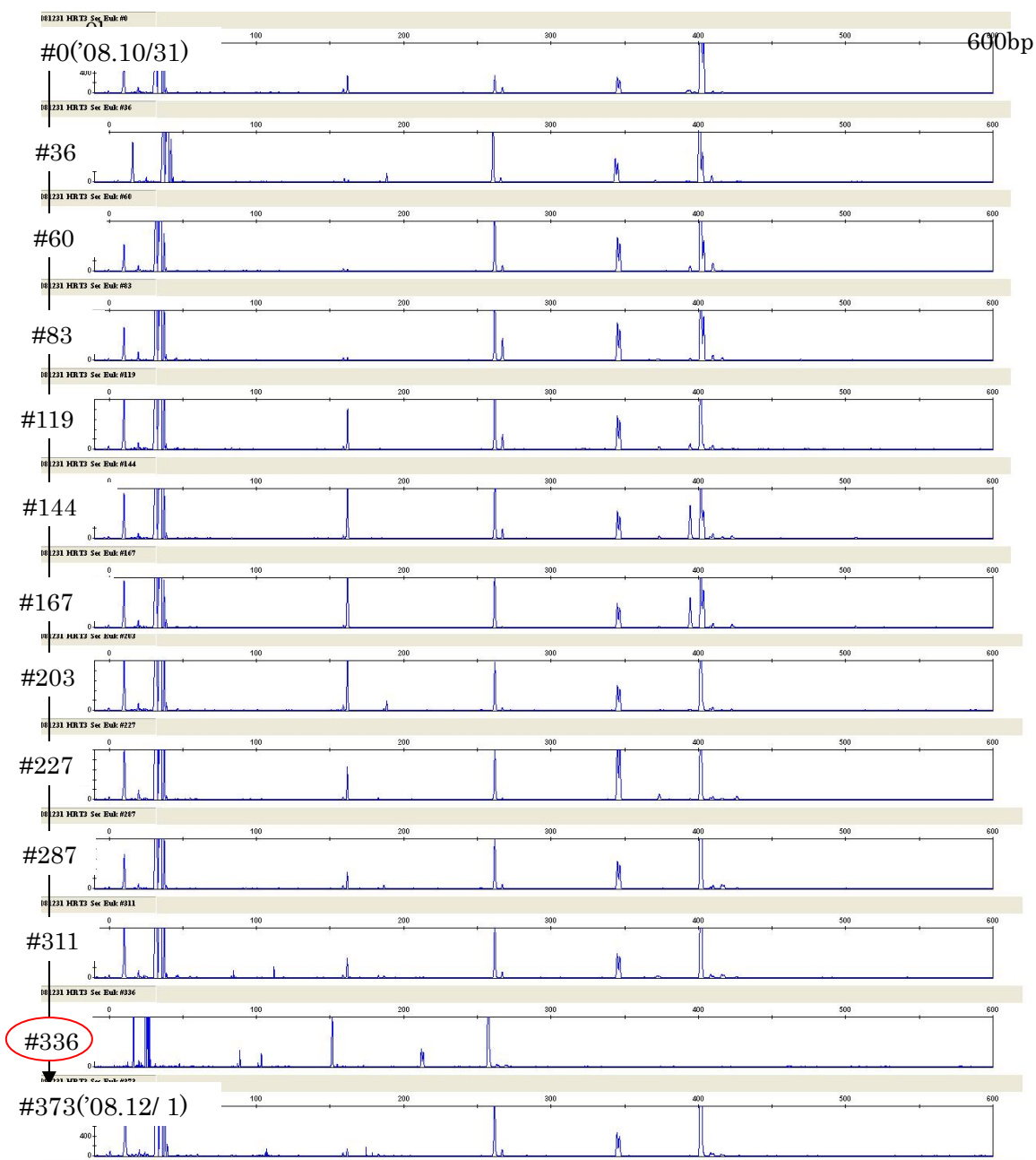


図 6-12 HRT 3 活性汚泥槽 原生動物等
(5' FAM-Euk20f/Euk1179r、制限酵素 ; *Hha* I)

図 6-12 より、サイクル番号#336(採水日'08 年 11 月 28 日)の電気泳動図は他の泳動図とフラグメント出現位置が異なることが分かる。これは、サイズマーカーの一部の蛍光強度が弱く、GeneMapper で解析する際に正しくマーカー認識がされなかったためである。よって、#336 の結果は、数値解析では除外した。

その他、図より明確な経時変化が見て取れる。このような、各断片長における蛍光強度(ピークの高さ)の経時変化をより分かりやすくするために、各フラグメントの断片長[bp]と蛍光強度の数値を抜き出し、各フラグメントに対して、同サンプル全フラグメントの蛍光強度合計値で除した相対蛍光強度を求め、蛍光強度の強い 11 の T-RFs に対し、経時変化をみた(図 6-13)。

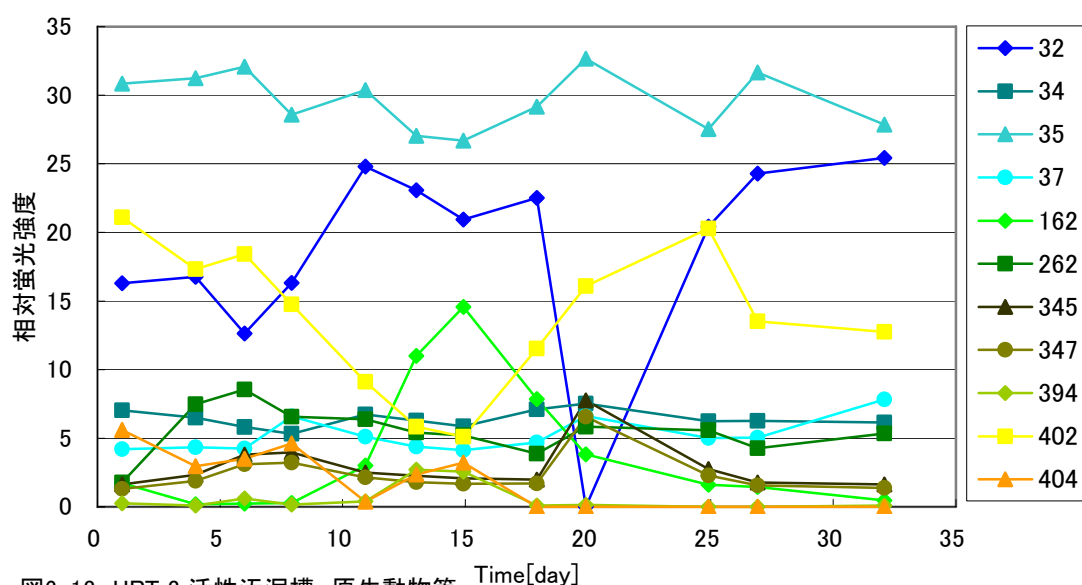


図6-13 HRT 3 活性汚泥槽 原生動物等 Time[day]

相対蛍光強度が特に強いフラグメントは 35bp、32bp、402bp の 3 つであった。402bp は、前項の分散細菌槽細菌懸濁液の分析から、真菌(カビ)である可能性が高い。

細菌の分析と同様、原生動物等に対しても HRT 3 の運転期間中、15 日目~18 日目に起きた基質供給停止トラブルの影響は大きいと思われる。しかし細菌と比較し、ライフサイクルが比較的長い生物が多く、またバイオマス量が多い活性汚泥の原生動物等の場合、直接的な影響はデータに表れにくい。また、リアクターの立ち上げから起こる生物相の遷移による経時変化が存在し、トラブルによる影響と区別することは難しい。基質供給停止トラブルの発生期間ではなく、トラブルによって引き起こったと思われるリアクターの汚泥の挙動と照らし合わせて考察した。各フラグメントの経時変化の特徴別にグループ分けをした。

- ◇相対蛍光強度に経時変化があまりみられない T-RFs
- ◇15 日目を弧の頂点にして相対蛍光強度に湾曲がみられる T-RFs
- ◇20 日目を境に相対蛍光強度の増減が変わる T-RFs

6.4.3 グループD

◇相対蛍光強度に経時変化があまりみられない T-RFs

このグループは、活性汚泥槽中の生物相に占める割合が大きく変化しない T-RFs である。リアクターの立ち上げの段階(生物遷移の初期)から、15 日目の汚泥の大量流出にともなうバイオマス濃度の低下の影響を受けない、非常に安定して存在する生物である。

断片長 34bp、35bp、37bp、262bp が該当する(図 6-14)

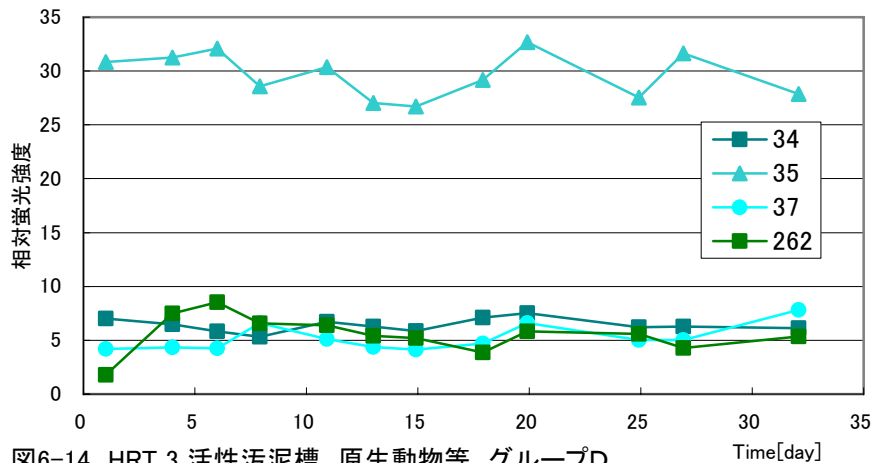


図6-14 HRT 3 活性汚泥槽 原生動物等 グループD

このうち、35bp は最も強い相対蛍光強度をもつフラグメントである。T-RFLP 電気泳動図(図 6-12)を見ると分かるように、断片長 30bp~40bp は入り乱れており、34bp・37bp は 35bp と同一生物あるいは近親種である可能性もある。

汚泥濃度の低い(MLSS;240mg/L)リアクター立ち上げ期から、10 倍にまでバイオマス量が増加した 15 日目付近、そして基質供給停止トラブルによる多量の汚泥流出を経て、生物相全体に占める割合が一定であるこのグループは、汚泥に均一に拡散している生物種であると考えられる。断片長 35bp 程度の真核生物は、GenBank には該当する情報が検索されなかった。可能性のある生物種を推測することはできなかった。

断片長262bpは分散細菌槽にもみられたフラグメントである。真菌、またはアメーバの可能性はある。(2008. Euringer,K. and Lueders,T.)(2004. Norris,C.D.,etc)

6.4.4 グループE

◇15 日目を弧の頂点にして湾曲がみられる T-RFs

このグループは、15 日前から相対蛍光強度に大きな変化が表れ、15 日を境に相対蛍光強度の増減が変わる T-RFs である。活性汚泥槽中のバイオマス量(MLSS)の増減に大きくされる(汚泥の増減に大きく寄与している)生物であると考えられる。

断片長 162bp、402bp、404bp が該当する(図 6-15)。

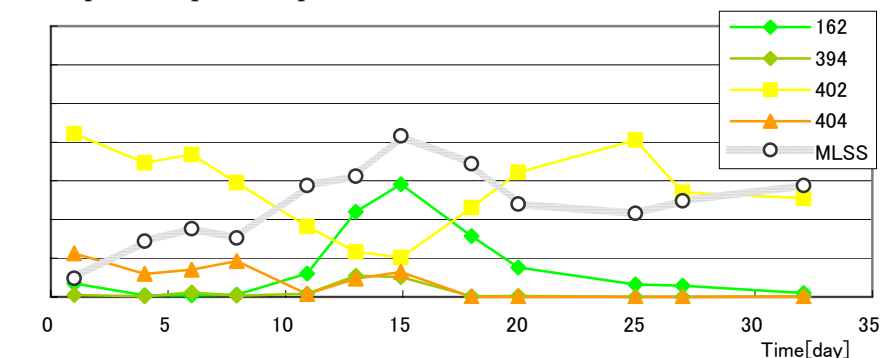


図6-15 HRT 3 活性汚泥槽 原生動物等 グループE

このうち、断片長 402bp は分散細菌槽でもみられたフラグメントであり、真菌である可能性が高い。同種同士、そしてより細い糸状菌細菌(と思われる生物、図 6-16)やフロックを絡め、沈降性は悪くない。しかし特に優れた沈降性を有するとは言えず、この生物が増えたリアクターの汚泥沈殿期を眺めるとフワフワとした汚泥であり、沈殿しきれずに処理水とともに流出していた。それでも活性汚泥槽の MLSS 急減にともない相対蛍光強度が増していることから、HRT 3 の汚泥の中では比較的沈降性が高い生物であると言える。

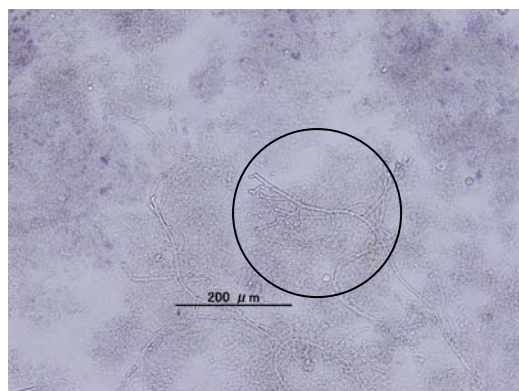


図 6-16 糸状細菌もしくは真菌

断片長 162bp の相対蛍光強度は比較的強く、その経時変化が活性汚泥槽の MLSS と同じ挙動を示していることが分かる。更にリアクター基質供給停止トラブルによる汚泥流出にともない存在が減少し、そのまま HRT3 運転修了時の 32 日目ではほとんどみられなくなっている。このことから、断片長 162bp は HRT3 の運転条件で優先する可能性をもちつつも、環境の変化に順応するまで長い時間を要する生物種であると推測される。また、真菌であ

ると予想される断片長 402bp と線対称の動向を示している。このことから、断片長 162bp の生物種は、断片長 402bp 生物を捕食する原生動物等であるか、断片長 402bp 生物と競合関係にある真核生物、もしくは断片長 402bp 生物と競合関係にある生物を捕食する原生動物であると考えられる。断片長 402bp 生物が真菌であった場合顕微鏡観察をした中で真菌を捕食可能だと思われる原生動物等はダニだけであった。ダニがこれほどまでの優占度を持つとは考えにくい。

断片長 394bp は断片長 162bp と同じ挙動をしていた。

断片長 404bp については、傾向を読み取ることができなかった。しかし GenBank で断片長 405bp に繊毛中門に属する *Uronema marinum*(2002.Shang,H. and Song,W.)が検索された。また、断片長 408bp で同繊毛中門に属する *Colpoda* sp. (2005.Zettler,L.A.,etc.)が検索された。両生物種とも活性汚泥で見られる生物であり、微小な遊泳性の原生動物である。HRT 3 時間の環境で生息できるのかとなると、ある程度の汚泥量があれば不可能ではないように思われる。15 日目以降の汚泥の流出とともにほとんど存在しなくなる点を見ると、遊泳性の生物である可能性は高い。

6.4.5 グループ F

◇20 日目を境に相対蛍光強度の増減が変わる T-RFs

このグループは汚泥の増加とはあまり強い関連がないが、汚泥の流出量とは関連する T-RFs である。

断片長 32bp、345bp、347bp、394bp が該当する(図 6-17)。

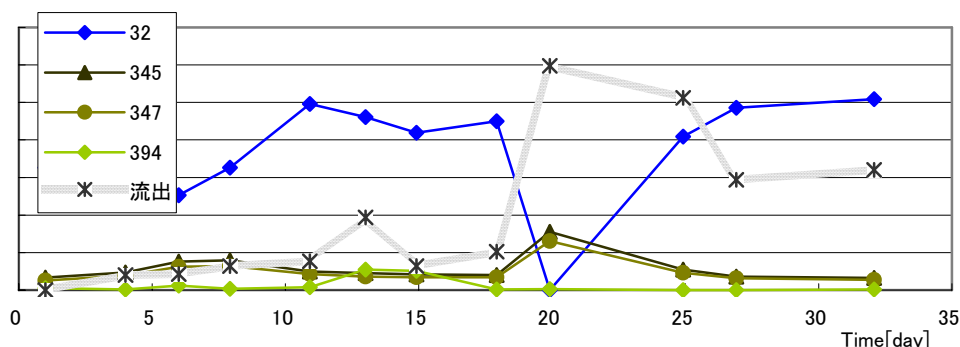


図6-17 HRT 3 活性汚泥槽 原生動物等 グループ F

断片長 32bp は、活性汚泥槽の中で 2 番目に強い相対蛍光強度を持つフラグメントである。汚泥の流出量の動向と一致しており、流出汚泥の主成分ではないかと推測される。しかし安定して高い存在感を示していながら、およそ 3 日間のエサ不足でこれ程までに優占度を下げるその理屈が、このデータだけでは想像できない。

断片長 345bp、347bp は、断片長 32bp と正反対の動向である。断片長 32bp 生物および他の生物の存在が薄くなった中で、相対的に優占度が上がったように思える。GenBank では、断片長 395~398bp にツリガネムシの仲間(*Peritrichia* sp.)の情報が検索された。

6.4.6 原生動物等(真核生物)を対象とした解析のまとめ

真核生物用プライマーを用いて、リアクター活性汚泥槽の原生動物等(真核生物)の群集構造を分子生物学的に分析した結果、真核生物群集構造の経時変化をみることができると分かった。更に各フラグメント(生物種)の経時変化が、リアクターのモニタリング結果の特定の項目の動向と一致することが分かった。

真核生物を対象とする T-RFLP 法による解析結果を考察する際、細菌を対象とした場合と大きく異なることがある。それは、真核生物の大きさの違いと、DNA の関係をどのように捉えるのか、ということである。細菌の場合、DNA 量の多さは、存在の多さと見て問題はないだろう。PCR 法による DNA 複製のしやすさも、さほど大差はないように思われる。一方、真核生物の場合、その対象を活性汚泥中に存在する原生動物・微小動物と限定しても、その大きさは $5\mu\text{m}$ ~ $5,000\mu\text{m}$ 、3 桁もの幅がある。例えば、大きさ $50\mu\text{m}$ の *Uromema* sp. (図 6-18)と、長さ $5,000\mu\text{m}$ の *Aeolosoma* sp. (図 6-19)を PCR/T-RFLP 法で解析し、相対蛍光強度が 1:1 であった場合、その比率をどのように解釈すればいいのか。今回の実験だけでは全く分からなかった。

この疑問を解決するには、顕微鏡観察による従来の分析方法による結果と、PCR/T-RFLP 法による分析結果を比較する必要がある。



図 6-18 *Uromema* sp.(○内)($\times 100$)

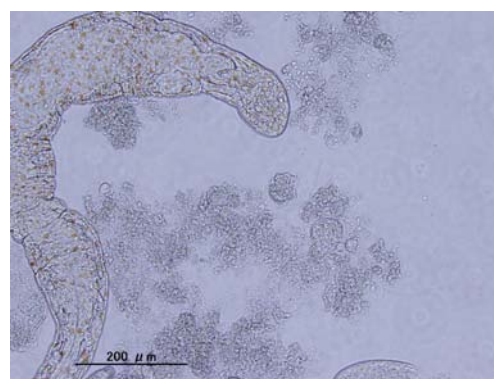


図 6-18 *Aeolosoma* sp. ($\times 100$)

今回の分析で、真菌の存在感の大きさを知った。活性汚泥槽の汚泥(フロック)を構成している生物で、真菌が占める割合は高いと推測された。本研究で運転したリアクターに特有の現象なのかは分からない。

原生動物等真核生物の DNA 情報は、データ構築が始められたばかりである。解明しなければならない情報はとても多いが、今後の進展によって、T-RFLP 法の活用が広まり、汚泥状態を知る指標生物の確認に用いられる手法として導入される可能性はあるだろう。

第七章 総括

7.1 概論

本研究では、活性汚泥法の変法である二相処理法について、その生成汚泥量の減量効果および、減量効果と生物相の関係を見出すことを目的とした。生物相の把握に関して、顕微鏡を使った従来の方法では知識と経験がないと難しく、原生動物等の研究の初心者でも生物相が把握できる方法はないか、という発想で分子生物学的な手法(PCR/T-RFLP)に着目した。本章では、本研究の結果と今後の展望について述べた。

7.2 二相処理法の汚泥減量効果

標準活性汚泥法と比べ、汚泥生成率を低く抑えられることが分かった。特に活性汚泥槽 HRT24 時間の系の場合、汚泥生成率は 10%を下回った。処理水の水質は HRT 3 時間・HRT 6 時間に比べやや劣るものの、最も処理が悪化した状態で溶解性有機物の除去率は 94%、SS 成分の流出はほとんどなかった。活性汚泥槽 HRT 3 時間の場合、分散細菌槽の HRT 6 時間と合わせても標準活性汚泥法の処理時間と大差がない設定で、一般的な流入下水 BOD 容積負荷の数倍の有機物を処理することができ、更に汚泥生成率は活性汚泥モデルから算出した値よりも小さい。

研究計画を立てた段階では、活性汚泥槽の HRT を変えることによって、処理水の水質は大きく変わるだろうと予測していた。特に HRT 3 時間は、活性汚泥法の反応タンク HRT(6~8 時間)に比べて短い時間であり、SS 成分(分散細菌)除去には時間的に不十分なのではないかと考えていた。しかしモニタリングの結果、活性汚泥槽の HRT 3 時間・MLSS 500mg/L の運転開始直後で分散細菌槽からの流入細菌懸濁液を処理できた。

今回の実験では、活性汚泥槽の HRT を固定して、低い MLSS から 1 ヶ月間しか運転せず、生物相(あるいは生物相の変動リズム)がある程度安定する前に運転を終えた。また、分散細菌槽の細菌は、壁面等に付着する細菌も多く、かならずしも分散細菌を優占させることができたとは言い難い。活性汚泥槽に安定した細菌懸濁液を送水できなかったことが悔やまれる。

二相処理法は、実際に採用されているプロセスである。現場では、パフォーマンスと同様、運転コストも非常に重要な要素であろう。二相処理法は汚泥の発生を抑えられる反面、曝気量が比較的多く必要である。また、排水を選ぶプロセスである。しかしこれは、特定の排水の処理に対しては安い運転コストで高いパフォーマンスを得られることを意味している。環境問題が騒がれる昨今、排水処理では、個々の排水に合わせて最適な処理を施す次代になっていると言えるだろう。二相処理法が多くの排水に広く普及することよりも、特定の排水に対してより良いコストパフォーマンスを目指すことが望まれる。

7.3 生物相の分子生物学的な解析

本来は汚泥生成率の低減に寄与する生物相を調べようとしていたのだが、原生動物等について勉強を始めたばかりの身には種の同定や個体数の判断が難しく、顕微鏡観察による生物相の把握を断念した。同じ研究室内では分子生物学的な手法を用いて活性汚泥中の細菌群集構造を解析している学生がおり、原生動物等も同様に解析できないか、と考えた。しかし原生動物や微小後生動物は大きさや体の造りが多種多様であり、細菌と同様に扱えるのか、まずそこが分からなかった。そこで、リアクターのモニタリング結果と比較し、汚泥や処理水の水質と、分子生物学的な手法を用いて解析したデータが連動するのかを調べることにした。

結果は、PCR/T-RFLP によって求めたデータが、リアクターの汚泥・処理水質の挙動に連動している、というものだった。MLSS の挙動と一致するものや処理水に含まれる SS 成分量に一致するものなど、断片長(分子生物学的な種の分類)によって、異なるモニタリング結果と連動していることが分かった。これは、汚泥の増加や SS 成分の捕食などを担う真核生物種がある程度ばらばらに動いていることを推測させる結果であった。もちろん、生物相全体を見る場合はそう単純な話ではないのだろう。しかし、活性汚泥における生物種の挙動を把握し、その役割を明確にする上で、分子生物学的な手法は充分有用である可能性が示された。

今回は HRT 3 時間の汚泥に対して解析した結果のみを示したが、HRT 24 時間、HRT 6 時間の汚泥に対しても同様の解析を行う予定である。特に HRT24 時間の汚泥は格段に低い汚泥生成率であったため、その生物相が HRT 3 時間、HRT 6 時間と大きく異なると思われる。

原生動物等、微小な真核生物についての分子生物学的な解析は、近年になって急速に研究が進んでいる分野である。本研究の期間でも、微小な真核生物を対象とした PCR 条件やシーケンシングの結果などが次々と発表されていた。しかし活性汚泥に存在する生物に関する研究報告はほとんどない。分子生物学での知見の収集に向けて、また生物化学的排水処理技術の充実に向けて、活性汚泥についての分子生物学的な生物相の解析が進んでくれることを願う。

謝辞

多くの方のご助力によって本論文を完成させることができました。この場を借りて感謝の意を表します。

まず、本論文の研究材料をくださいました日鉄環境エンジニアリング株式会社、および御社の顧問である中村和憲先生(独立行政法人産業技術総合研究所生物機能工学研究部門副研究部門長・筑波大学大学院教授)、技術研究室環境技術グループリーダーの小山修博士、同環境グループの岡本吉博様には、研究を超えて公私にわたり多大な御厚意を賜りました。厚く御礼を申し上げます。

指導教員である味埜俊教授には、要所での前向きなご助言もさることながら、私をこの味埜・佐藤研究室に受け入れてくださったことを何よりも感謝いたします。この研究室で研究をするまで私は、実験を敬遠しがちで研究意欲に燃えていたとは言い難い学生でした。それが恵まれた研究環境の中で、確かな知識と技術、そして高い志を持った先生方や先輩方から刺激と叱咤激励を受け、実験・研究の楽しさを知ることができました。期待していたデータを得たときの感動は、味埜先生の広く深い懐があったからこそ経験できた喜びです。心より感謝いたします。

副指導教員をしていただいた辻誠一郎先生は、排水処理の分野とは全く違った視点からの指摘をくださいました。また研究発表に際し、同じ分野の研究者ではない相手に向けて、どう表現すれば研究内容・結果が伝わるのかをご教授していただきました。ありがとうございました。

佐藤弘泰准教授には研究・実験のいろはを教えてくださいました。数字に弱く、すぐ勘を頼りに進めようとする私を叱咤し、根気よく“研究に必要なこと”を論してくださいました。また、実験やデータ分析で行き詰るたびに活路を見出してくださったのも佐藤先生でした。T-RFLP のデータ解析で電気泳動図だけを見て落胆していた時に、そんな私の為に佐藤先生が新たに組んでくださった解析ソフトを用いて数値解析した結果を見たときの高揚は強く記憶に残っています。大変な苦勞をおかけしたことを申し訳なく思う気持ちもありますが、それ以上に感謝と尊敬の気持ちが大きいです。ありがとうございました。

研究室の先輩方には、それぞれに大変お世話になりました。PD 研究員の庄司仁さんには、リアクターの運転で度々ご迷惑をおかけしたのに、いくつもの的確なワンポイントアドバイスを伝授していただきました。同じく PD 研究員の福島寿和さんには、測定機器の扱い方から社会の常識まで幅広く教えていただきました。博士課程の末岡一男さんには分子生物学的な知見を中心に、惜しみなく知識を分けていただきました。博士課程の押木守さんには、器具の置き場所から研究計画の立て方まで、学校にいる間ずっとお世話になりっ放しでした。修了生の田崎彩さんには分子生物学的手法を伝授していただき、本論文執筆の際には田崎さんの論文を参考にさせていただきました。同じく修了生の石川千佳さんはいつもお話が面白く、また温かい心配りのおかげで笑いの絶えない研究室でした。研究室内外の同期の人達には、遊んだり愚痴ったりしながら、日々の生活に潤いと励ましをもらいました。1 年後に入学してきた陳靈佳さんがとても頼もしかったお陰で、研究室の細々した運営に悩まされることなく論文執筆に没頭できました。その他にも様々な方に助けられ、無事に修士課程を経て修士論文を完成させることができました。ありがとうございました。

参考文献

■二相処理法、およびその他の活性汚泥法に関して

- 中村和憲 (1987) 細菌および原生動物を利用した二相処理法と原生動物ファウナの制御. *微生物の生態* **15**:71-85
- Qunhui Wang, Hengyu Ai, Xueson Li, Haitao Liu, Weimin Xie(2007) Pilot-Scale Study of Biomass Reduction in Wastewater Treatment. *ProQuest Agriculture Journals* **79**:521-527
- Pasztor H. Szentgyorgyi and B. Holenda () Comparison of Activated Sludge Flock Structure and Microbial Fauna of two Hungarian Wastewater Treatment Plants. HEJ: ENV-060531-A
- Suleyman Ovez and Derin Orhon (2005) Microbial Ecology of Bulking and Foaming Activated Sludge Treating Tannery Wastewater. *Journal of Environmental Science and Health* **40**:409-422
- Natuscka M. Lee, and Thomas Welander (1996) Reducing Sludge Production in Aerobic Wastewater Treatment Through Manipulation of the Ecosystem. *Wat. Res.* **30**:1781-1790
- 藤島繁樹 (2007) 微小動物を利用した汚泥発生抑制型排水処理装置. *環境技術* **36**:352-356
- 報告書;東レ株式会社 2002 ゼロエミッション対応型膜バイオリアクター (NEDO 基盤技術研究促進事業 平成 16 年度成果報告書)

■原生動物に関して

◆書籍

- 千草薫 (2005) 図説 微生物による水質管理 5 版 産業用水調査会
- 千草薫 (1979) 活性汚泥の生物相 初版 西原環境衛生研究所
- 盛下勇 (2004) 下水処理と原生動物 初版 (株)山海堂
- 盛下勇 (2004) 応用原生動物学 初版 (株)山海堂
- 猪木正三 監修 (1993) 原生動物図鑑 5 版 (株)講談社
- 野島博 編集 (2001) 無敵のバイオテクニカルシリーズ 顕微鏡の使い方ノート 5 版 (株)羊土社
- Streble Krauter (2006) Das Leben im Wassertropfen 5 版 KOSMOS
- 須藤隆一 (1977) 微生物の生態(2)-相互作用をめぐって. 1-18, 5 版 編集 微生物生態研究会 (株)学会出版センター

◆論文

- James B. Lackey() Oxygen Deficiency and Sewage Protozoa: with Description of some new Species.
- Colin R. Curds (1973) The Role of Protozoa in the Activated-Sludge Process. *Amer. Zool.* **13**:161-169

○浅井博 (2005) ツリガネムシ類とその Ca^{2+} 駆動収縮性スパズモネーム *Jpn.J. Protozool* **38**:133-152

○大内山高広, 稲森悠平 (2006) 原生動物・微小後生動物の生態と機能. *用水と廃水* **48**:88-94

■分子生物学に関して

◆Universal-Primer

Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, eds. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester. John Wiley & Sons:115-175

○佐藤弘泰 (2008) 活性汚泥中微生物群集構造解析のための超音波破碎と新規 DNA 抽出手法の開発

○田崎彩 (2007) PCR 法による細菌群集構造解析に用いられるユニバーサルプライマーの比較

○Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2002) *Brock Biology of Microorganisms*, Tenth Edition. Prentice Hall, USA.

◆Eukaryotic-Primer

○Beatriz Diez, Carlos Pedos-Alio, Terence L. Marsh, and Romon Massana. (2001) Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) To Study the Diversity of Marine Picoeukaryotic Assemblages and Comparison of DGGE with Other Molecular Techniques. *Applied and Environmental Microbiology*:2942-2951

○Linda Medline, Hille J. Eiwood, Shawn Stickel and Mitchell L. Sogin (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* **71**:491-499

○Kathrin Euringer, Tillmann Lueders (2008) An optimised PCR/T-RFLP fingerprintings approach for the investigation of protistan communities in groundwater environments. *Journal of Microbiological Methods* **75**:262-268

○Lydia Hendriks, Anne Goris, Jean-Marc Neefs, Yves van de Peer, Gregoire Hennebert, and Rupert de Wachter (1989) The Nucleotide Sequence of the Small Ribosomal Subunit RNA of the Yeast *Candida albicans* and the Evolutionary Position of the Fungi among the Eukaryotes. *System. Appl. Microbiol.* **12**:223-229

○I. Kasuga, D. Shimazaki, and S. Munikane (2007) Influence of backwashing on the microbial community in a biofilm developed on biological activated carbon used in a drinking water treatment plant. *Water Science & Technology* **55**:173-180

○Patricia B. Brown and Gordon V. Wolfe (2006) Protist Genetic Diversity in the Acidic Hydrothermal Environments of Lassen Volcanic National Park, USA. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **53**:420-431

○Peter D. Countway, Rebecca J. Gast, Pratik Savai and David A. Caron (2005) Protistan Diversity Estimates Based on 18S rDNA from Seawater Incubations in the Western North

Atlantic. *J. Eukaryot. Microbiol.* **52**:95-106

○ **Seung Yeo Moon**–van der Staay, **Georg W. M. van der Staay**, **Laure Guillou**, and **Daniel Vaultot**.

○ **Herve Claustre**, **Linda K. Medlin** (2000) Advance and diversity of prymnesiophytes in the picoplankton community from the equatorial Pacific Ocean inferred from 18S rDNA sequences. *Limnol. Oceanogr.* **45**:98-109

○ **Anke Behnke**, **John Bunge**, **Kathryn Barger**, **Hans–Werner Breiner**, **Victoria Alla**, and **Thorsten Stoeck** (2006) Microeukaryote Community Patterns along an O₂/H₂S Gradient in a Supersulfidic Anoxic Fjord. *Applied and Environmental Microbiology*:3626-3636

○ **Jun Murase**, **Matthias Noll**, and **Peter Frenzel** (2006) Impact of Protists on the Activity and Structure of the Bacterial Community in a Rice Field Soil. *Applied and Environmental Microbiology*:5436-5444

○ **Angeles Aguilera**, **Felips Gomez**, **Eva Iospitao**, **Ricard Amils** (2006) *Systematic and Applied Microbiology* **29**:593-605

○ **S. K. R. Karnati**, **Z. Yu**, **J. T. Sylvester**, **B. A. Dehority**, **M. Morrison**, and **J. L. Firkins** (2003) Technical note: Specific PCR amplification of protozoal 18S rDNA sequences from DNA extended from ruminal samples of caws. *J. Anim. Sci.* **81**:812-815

○ **Samuel Ohene–Adjei**, **Ronald M. Teather**, **Michael Ivan**, and **J. Forster** (2007) Postinoculation Protozoan Establishment and Association Patterns of Methanogenic Archaea in the Ovine Rumen. *Applied and Environmental Microbiology*:4609-4618

○ **Birgita Winnepeninckx**, **Thierry Backeljan**, and **Rupert de Wachter** (1995) Phylogeny of Protostome Worms Derived from 18S rRNA Sequences. *Mol. Biol. Evol.* **12**:641-649

○ **Thorsten Stoeck**, **Brett Hayward**, **Gordon T. Taylor**, **Ramon Verela**, and **Slava S. Epstein** (2006) *Protist* **157**:31-43

○ **Ottoson, A. Hansen**, **B. Bjorlenius**, **H. Norder**, **T.A. Stenstrom** (___) Removal of viruses, parasitic protozoa and microbial indicators in conventional and membrane processes in a wastewater pilot plant.

○ **Hendriks,L.**, **Goris,A.**, **Van de Peer,Y.**, **Neefs,J.M.**, **Vancanneyt,M.**,**Kerstens,K.**, **Hennebert,G.L.** and **De Wachter,R.**(1991) Phylogenetic analysis of five medically important *Candida* species as deduced on the basis of small ribosomal subunit RNA sequences. *J. Gen. Microbiol.***137** (Pt 5):1223-1230

○ **Norris,C.D.**, **Chung,P.A.**, **Woods,K.M.**, **Upton,S.J.** and **McAllister,C.T.** (2004) Biology, Kansas State University

○ **Shang,H.** and **Song,W.** (2002) Laboratory of Protozoology, College of Fisheries, Ocean University of Qingdao,

○ **Zettler,L.A.**, **Laatsch,A.D.**, **Zettler,E.**, **Nerad,T.A.**, **Cole,J.**, **Diaz,F.C.**, **Diaz,J.**, **Janzen,D.H.**, **Sittenfeld,A.**, **Mason,O.** and **Reysenbach,A.L.**(2005) A microbial observatory of caterpillars:

isolation and molecular characterization of protists associated with the saturniid moth caterpillar *Rothschildia lebeau*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **52** (2):107-115

付録

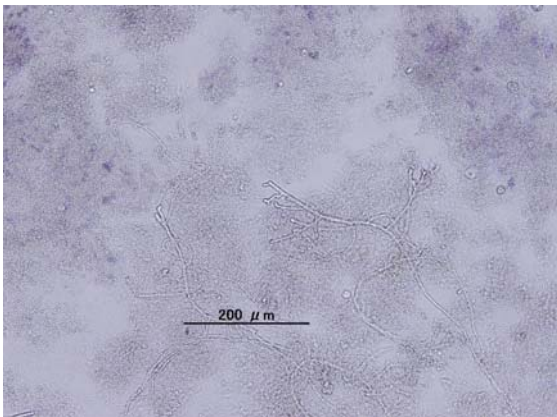
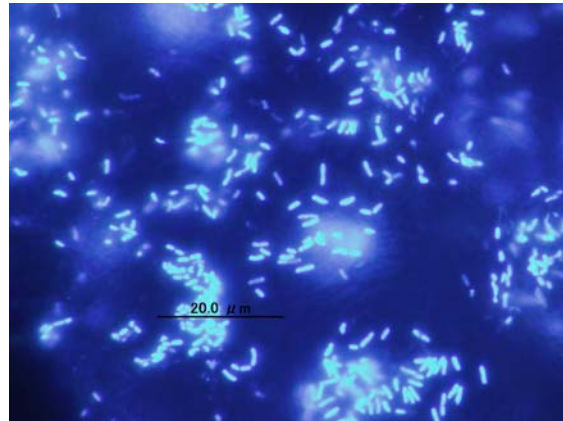
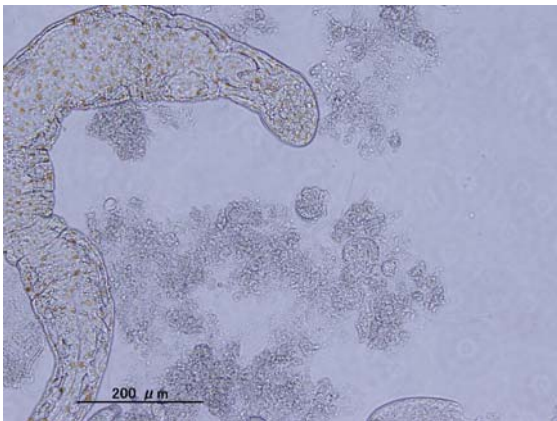
1.分散細菌槽の生物濃度安定化

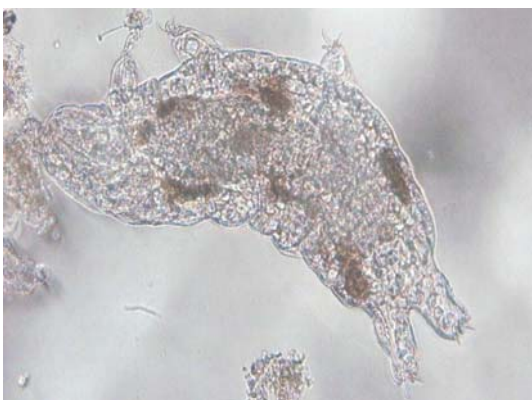
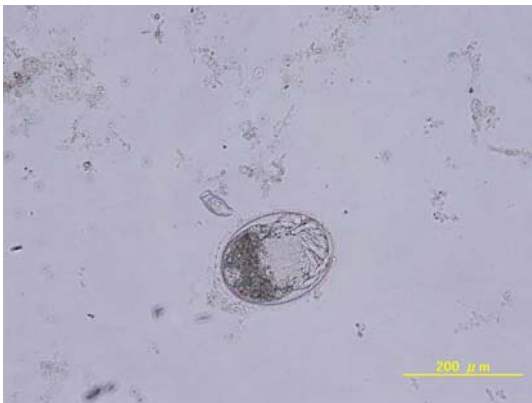
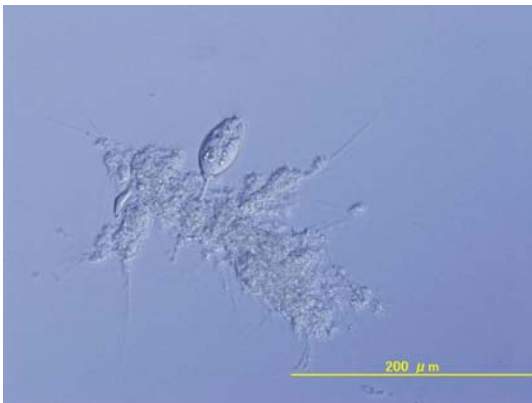


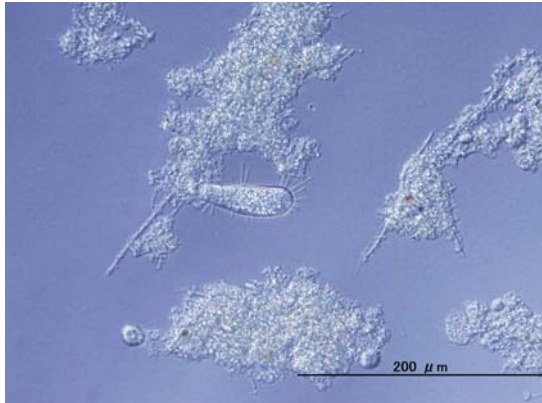
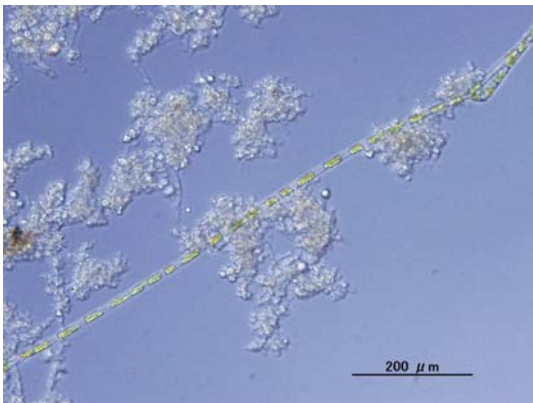
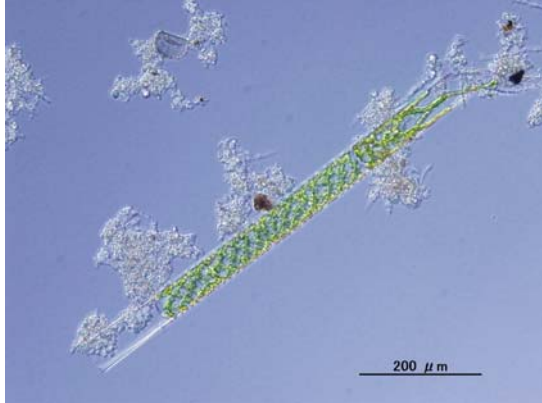
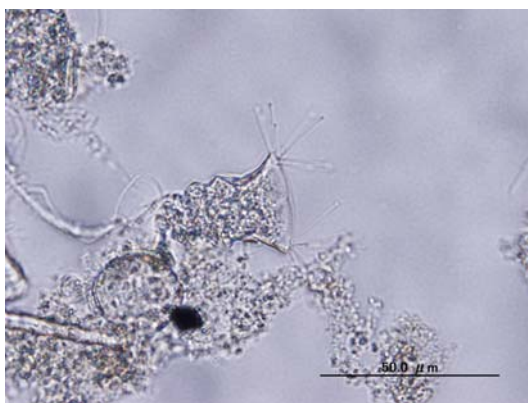
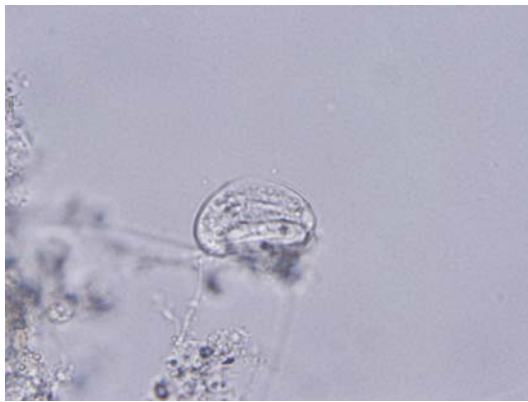
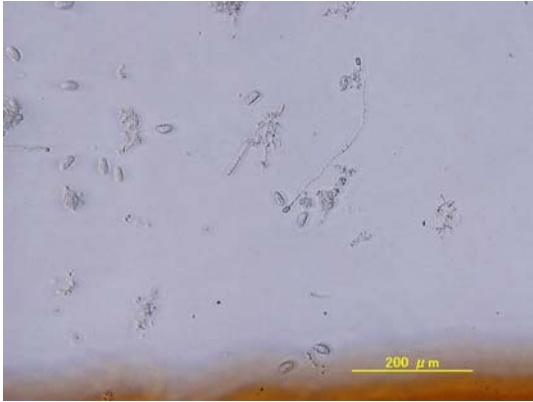
←補足図

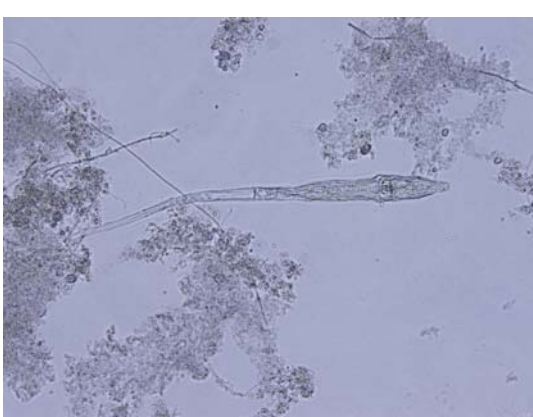
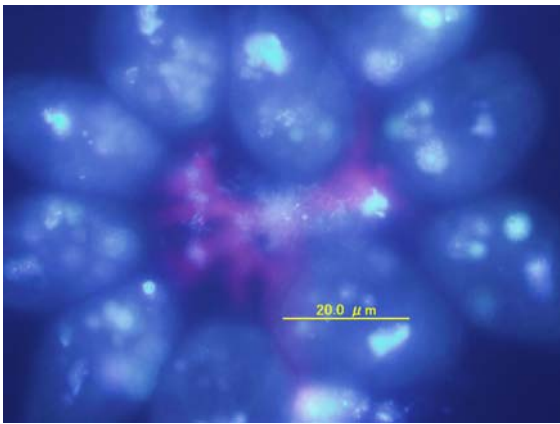
実験終了後に設定水温 35~37℃で運転したときの分散細菌槽の様子。数日間全く掃除をしなくても、菌塊は見られない。なぜこれほど鮮やかな蛍光緑を呈しているのか、有機物は処理されているのか等はモニタリングしていないので不明である。壁面への菌の付着はほとんどないので、生物相・処理性能等は安定すると思われる。

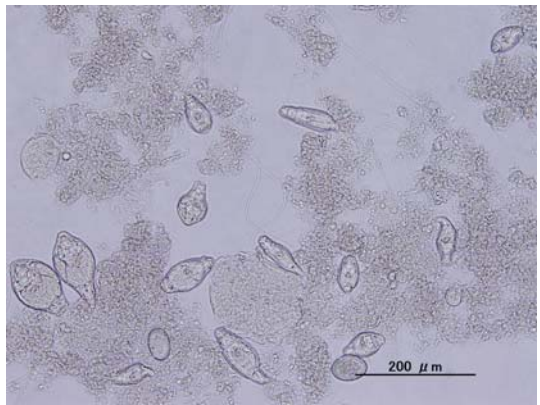
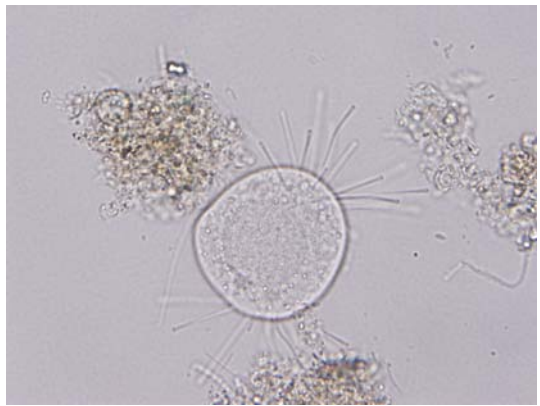
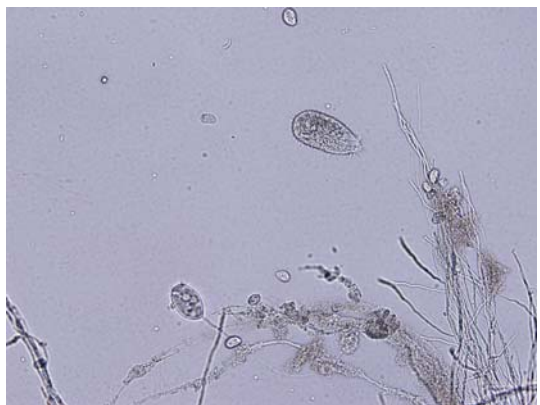
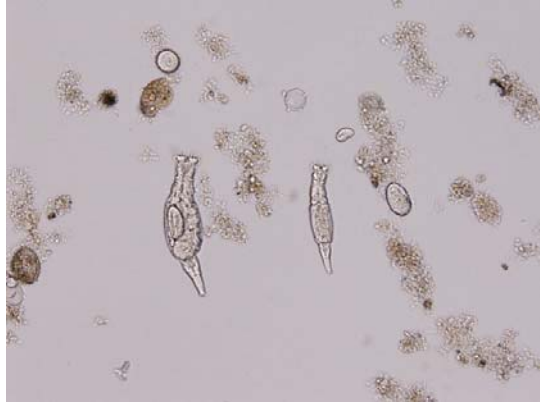
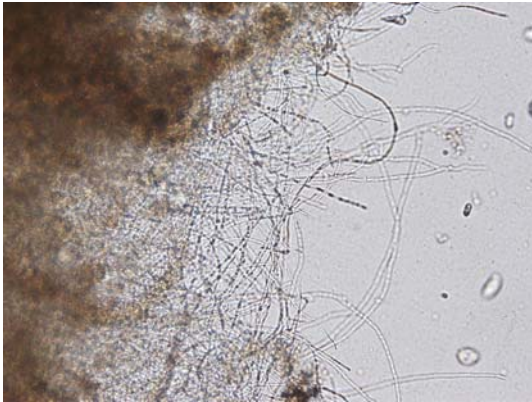
2.試運転も含め、運転したリアクター、または譲与された実下水に見られた生物たち(列举)

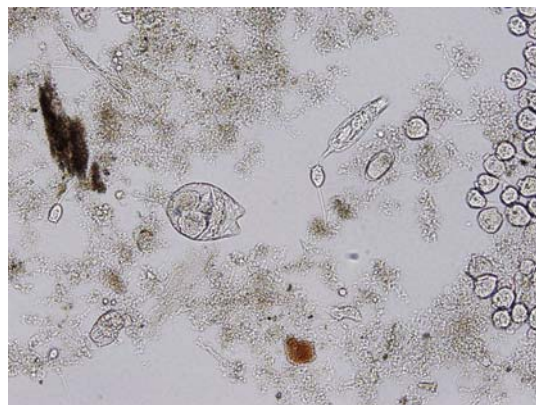
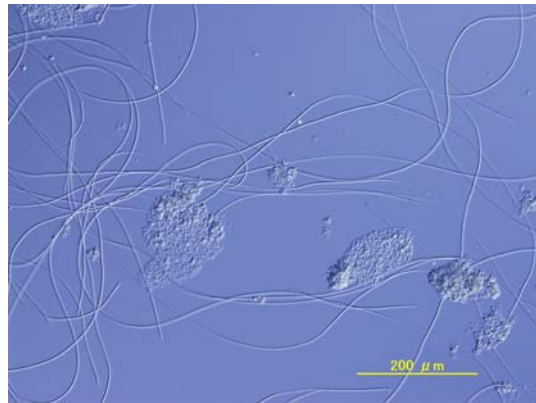
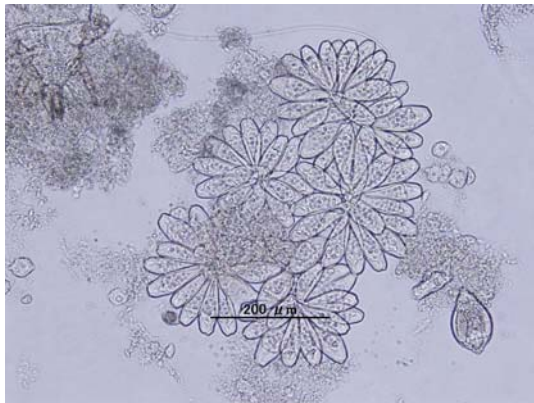












3.過去のリアクター写真(列举)



イロイロと面白かったです。