実証規模下水処理UASB-DHSシステムにおける 後段DHSリアクターの微生物群集構造解析と 脱窒細菌群の定量

井口晃徳^{1,2*}・大久保努³・立花真⁴・永井寛之²
上村繁樹³・山口隆司⁵・久保田健吾²・原田秀樹²

¹新潟県大学応用生命科学部応用生命学科 (〒956-8603 新潟県新潟市秋葉区東島265-1)

²東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06)

³木更津工業高等専門学校環境都市工学科 (〒292-0041 千葉県木更津市清見台東2-11-1)

⁴東北大学工学部建築・社会環境工学科 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06)

⁵長岡技術科学大学環境・建設系 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1)

* E-mail: a_iguchi@nupals.ac.jp

下水処理システムとして導入が検討されているUASB-DHSシステムにおける、第三世代型 (G3) と第六世代型 (G6) 担体を充填した実証規模下水処理DHSリアクターの微生物群集構造を、rRNA遺伝子クローニング法およびリアルタイムPCR法を用いて解析した。クローン解析による結果は、流入水温の異なる期間において微生物群集構造が異なっていることを示しており、高水温時において微生物多様性は高く、低水温時において多様性は低かった。リアルタイムPCR法による*nirS*、*nirK*遺伝子を標的とした脱窒細菌群の定量的結果、多くの場合においてリアクターの高さ方向における脱窒細菌群の存在割合は、ほぼ一定で推移していた。またその存在率から、活性汚泥プロセスと同程度の脱窒細菌群を保持している可能性が示された。

Key Words : Down-flow hanging sponge (DHS) reactor, Microbial community structure, Denitrifier

1. はじめに

Down-flow Hanging Sponge (DHS) 法は、スポンジを微生物固定化担体として利用した好気性の生物学的廃水処理法である。本法は人為的な曝気操作を不要としながらも好氣的に廃水処理を行えることから、省エネルギーな水処理プロセスとして注目されている。中でも、嫌気性処理プロセスのUp-flow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) 法と本法を組み合わせたUASB-DHSシステムによる下水処理は、メタンを主成分とするバイオガスを回収しながら省エネルギーで下水を処理できることから、新たな省エネルギー・創エネルギー型下水処理法として期待されている¹⁾。

現在までに、処理性能の向上や実規模リアクターの施工を容易にさせることを目的に、DHS担体形状の最適化が行われてきた。様々な形状のDHS担体の中でも、円柱状のポリウレタン製スポンジをポリプロピレン製ネットリングに埋め込んだ第三世代型 (G3) 担体²⁾ と、ポリエチ

レン多孔質にエポキシ樹脂を施し硬質化させたスポンジを利用した第六世代型 (G6) 担体³⁾ は、リアクター施工が容易になるという利点から将来的な普及が見込まれている。現在、下水処理におけるUASB-DHSシステムの実証を目的に、G3担体およびG6担体を用いた処理水量500～1,000 m³/d規模のDHSリアクターをインドの下水処理場に建設し、現地の気候や下水性状等、実践的な条件下で比較同時実験を行なっている。

G3担体およびG6担体を用いたDHSリアクターは、スポンジ担体をランダムに充填する方式の散水ろ床型リアクターであり、リアクター上部から供給されるUASB処理水は、スポンジ担体を通過しながらスポンジの保持微生物によって処理が行われる^{2,3)}。処理水がスポンジからスポンジに滴下する間や、リアクターのスポンジ充填層間を通過する間に空気に接触し、人為的な曝気なしでも好気性処理が可能となる。一方でスポンジ内部は無酸素環境

になっており⁴⁾、有機物除去および硝化に加えて、脱窒も同時に行えるプロセスとしての利用可能性が示唆されている⁴⁾。久保田らは16S rRNA遺伝子情報を基に、G3担体を利用したパイロットスケールDHSリアクターの微生物群集構造を解析しており⁹⁾、下水処理を担うDHS汚泥内の微生物の実体は徐々に明らかにされつつある。しかしながら、今後、実際に導入される途上国等現地の気候や下水性状といった実践的な条件でDHSリアクターを運転した場合の微生物叢や、G3もしくはG6といった異なる形状のDHS担体による生物叢の違いは全く明らかにされておらず、これらを明らかにすることはDHSリアクターの生物学的処理メカニズムを解明する上で重要な情報になると考えられる。そこで本研究では、インド・カルナール市下水処理場で稼働中のDHSリアクターの保持汚泥内微生物群集構造を、16S rRNA遺伝子を標的としたクローン解析により明らかにした。また実証規模下水処理DHSリアクターの脱窒ポテンシャルを微生物学的側面から評価するため、リアルタイムPCR法により脱窒細菌の有する*nirS*、*nirK*遺伝子の定量を行った。

2. 実験方法

(1) DHSリアクター

本研究で使用したDHSリアクターは、インド・カルナール市下水処理場内に設置されており、DHS反応部は直径5.5 m、高さ5.31 m、有効容積126 m³の円筒型コンクリート製で下部には沈殿池が設置されている。DHS反応部は、高さ方向に6段のDHS担体充填層を設置しており、また各段の間に酸素を供給するための空間が設けられている。DHS反応部縦方向に間仕切り板を設置し、板を隔てG3とG6のDHSスポンジ担体をそれぞれ充填した。当該下水処理場のUASB処理水の一部をDHSリアクターに流入させ、運転開始直後から111日目までのPhase 1期間では処理水量500 m³/d (スポンジ容積基準のHRT 2時間) による運転を行い、本研究でサンプリングを行った Phase 2期間 (運転開始112日以降) は、処理水量1,000 m³/d (スポンジ容積基準のHRT 1時間) の条件で運転を行った。DHSリアクター流入水温が20℃以下を低水温期間 (運転開始66日～116日)、30℃超を高水温期間 (運転開始213日～351日) と定義したときのDHSリアクター流入廃水の組成およびDHSリアクターによる除去率を表-1に示した。分析項目の全BODは下水試験方法⁶⁾ に従い、アンモニア性窒素はサリチル酸法、全窒素はNチューブ法による測定を行った²⁾。

(2) DHS汚泥のサンプリングとDNA抽出

DHS担体の汚泥試料は、DHSリアクター反応部の最上段 (1段目)、中段 (3段目)、下段 (5段目) からDHS担体を採取し、これらのスポンジから搾汁した汚泥を使用した。サン

プリングはG3担体・G6担体それぞれについて、Phase 2期間 (運転開始112日以降) である118日目 (低水温時) と227日目 (高水温時) の2回に分けて行い、計12サンプルのDHS汚泥を実験に供した。サンプリング時またはサンプリングを行った直近のDHSリアクター流入水温はそれぞれ20.0℃ (運転開始116日)、31.1℃ (運転開始227日) であった。採取した汚泥はPBSによる洗浄を行い、DNA抽出に供した。DNA抽出には、ISOIL for Beads Beating (ニッポン・ジーン) を用い、付属のマニュアルに従い抽出を行った。

(3) 16S rRNA遺伝子クローン解析

採取した各種汚泥試料の微生物群集構造を把握するため、抽出DNAを使用し16S rRNA遺伝子を標的としたクローン解析を行った。PCRにはEUB338mixF-UNI1492r⁷⁾ プライマーセットを使用し、真正細菌の16S rRNA遺伝子のおよそ1,100 bp を特異的に増幅させた。得られたPCR産物は、MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製を行い、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) によってクローン化した。クローン化した単一の16S rRNA遺伝子断片を回収後、ドラゴンジェノミクスセンター (TaKaRa Bio) にシーケンス解析を委託した。得られた塩基配列 (ca. 500 bp) はArb software package⁸⁾ にインポートした。インポートした16S rRNA遺伝子の相同性>97%をMothur program v.1.7.2を利用し同一phylogroupと定義してグループ化した⁹⁾。各試料における推定phylogroup数 (Chao1, ACE) は統計解析ソフトEstimateS¹⁰⁾ を利用して求めた。各試料におけるphylogroup数の均等性はEvenness indexとして示した。

(4) リアルタイムPCR法による脱窒細菌群および真正細菌の定量

脱窒細菌群および真正細菌の定量は、亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirS*, *nirK*)、真正細菌の16S rRNA遺伝子を標的としたQuenching probeおよびQuenching primerを用いたreal-time PCR法¹¹⁾ による遺伝子コピー数による定量で行った。各種遺伝子定量はJ-BIO21の微生物分析受託サービス (J-Bio21) を利用した。*nirS*、*nirK*遺伝子の定量には*nirK1F-nirK5R*および*nirS1F-nirS6R*プライマーセット¹²⁾ を、真正細菌の16S rRNA遺伝子の定量にはBac1055YF-Bac1392RプライマーセットとBac1115 Probeを用いた¹³⁾。全真正細菌の16S rRNA遺伝子の定量結果から全真正細菌に対する各脱窒細菌群の割合を求めた。

表-1. 低水温期間および高水温期間における DHS リアクター流入廃水組成と除去率

分析項目	低水温期間 (≤20℃)		高水温期間 (>30℃)	
全BOD, mg/L	64 (13)		60 (19)	
アンモニア性窒素, mg/L	35 (6)		22 (4)	
全窒素, mg/L	41 (6)		35 (8)	
水温, °C	18 (1)		31 (1)	
pH	7.2 (1)		7.2 (1)	
溶存酸素, mg/L	N.D.		N.D.	
除去率	DHS (G3) 単独	DHS (G6) 単独	DHS (G3) 単独	DHS (G6) 単独
全BOD, %	92 (6)	91 (5)	87 (6)	86 (8)
アンモニア性窒素, %	85 (17)	83 (21)	83 (12)	81 (21)
全窒素, %	42 (16)	31 (11)	11 (16)	11 (14)

(): 標準偏差, N.D.: 検出限界以下

3. 結果および考察

(1) DHSリアクターの処理性能

低水温期間 (DHS流入水温≤20℃) と高水温期間 (DHS流入水温>30℃) におけるDHS流入廃水組成および各DHS担体による除去率を表-1に示した。DHS流入廃水は全BODおよびアンモニア性窒素でそれぞれ平均60～64 mg/L, 平均22～35 mg/Lとなっており, DHSリアクター通過後には全BODで平均86%～92%, アンモニア性窒素で平均81～85%の除去が確認され, 良好な処理が行われていた。全窒素は多少ばらつきがあるものの, 平均11%～42%の除去が確認されたことから, DHS流入水中の窒素成分の一部は硝化・脱窒反応により系外に放出されていると考えられた。

(2) DHSリアクター汚泥の微生物群集構造

計12サンプルのDHS汚泥試料に対して, 総数1339クローンの16S rRNA遺伝子の部分配列を決定した。Bacteriaの門, 綱レベルの分類結果並びに推定phylogroup数 (Chao1, ACE) を図-1 (高水温時) および図-2 (低水温時) に示す。

(3) 高水温時試料における微生物群集構造

高水温時の微生物群集構造解析の結果, 担体の種類や流下方向に依らずすべての試料においてバクテリアの多様な門, 綱に属するクローンが検出された。G3担体, G6担体ともに上段 (1段目) の微生物群のおよそ6割はProteobacteria門に属するクローンが優占していた。流下方向に進むにつれてProteobacteria門に属するクローンの検出頻度は下がり, 一方でFirmicutes門やActinobacteria門, Bacteroidetes門の検出頻度が増加した。種の均等性を示すEvenness indexは, G3担体 (およびG6担体) の上段で0.87 (0.84), 中段で0.94 (0.88), 下段で0.93 (0.89) と増加し一層に複雑な微生物群集構造を構成するように変化した。本DHSリアクターの流下方向の有機物濃度プロファイルを見ると, 流下方向に向かうにつれて有機物濃度は下がり, 中段および下段のスポンジは上段と比較して低い有機物負荷となっており (データ非表示), これはラボスケール下水

処理DHSリアクターにおいても同様の挙動を示している^{5,14)}。廃水処理プロセスといった高い有機物負荷環境の微生物群集構造と比較して, 土壌のような貧栄養環境の微生物群集構造は, 多様な貧栄養細菌群によって構成されることで多様性が高くなることが知られており¹⁵⁻¹⁶⁾, 中段・下段のスポンジ保持汚泥は, 有機物濃度の低い状態で増殖に有利な貧栄養細菌群によって多様性があがったことが考えられる。また後述する低水温時と比較し, 夏季のような高水温時のDHSリアクター保持汚泥は微生物多様性が高いことから, 多様な有機物分解経路を有することが考えられ, 有機物負荷変動や, 外部から受ける環境要因に強いことが示唆される。

(4) 高水温時における有機物分解に関わる微生物群

G3担体およびG6担体ともに高水温時のDHSリアクターの1段目において多様なAlphaproteobacteria綱, Betaproteobacteria綱, Gammaproteobacteria綱に属するクローンが高頻度に検出されていることから, これらの綱に属する好気性細菌が主要な有機物分解を担うと予想される。一方で活性汚泥プロセスでは殆ど検出されることのないPropionicicella属, Clostridium属, Smithella属, Syntrophobacter属といったメタン発酵プロセス等の嫌気環境において比較的高い頻度で検出される微生物に近縁なクローンも多数検出された。これらの嫌気環境で高頻度に検出されるクローンは, リアクターの3段目および5段目のスポンジにおいても検出されたことから, DHSリアクターの有機物分解には, 好気性細菌だけでなく嫌気性細菌も関与していることが示唆された。プロピオン酸生成細菌であるPropionicicella属, Clostridium属といった酸生成細菌をはじめ, Methanobacterium formicumなどの水素資化性メタン生成古細菌と共生し高級脂肪酸や揮発性脂肪酸といった有機酸を分解するSyntrophobacter属や, Smithella属が検出されたことは, 下水処理DHSリアクターにおいてメタン生成を伴う嫌気的な有機物分解反応が進んでいる可能性を示唆するものであった。

図-1. 高水温時における G3 担体, G6 担体汚泥内の真正細菌の門・綱レベルによる分類と推定 phylotype 数

久保田らは、ラボスケール下水処理DHSリアクターの微生物学的有機物除去メカニズムとして、スポンジ表層の溶存酸素存在下で、有機物は好氣的分解により二酸化炭素まで無機化される他に、スポンジ内部の嫌気条件下における発酵により有機酸にまで分解され、それをスポンジ表層に近い好気条件下や、UASB処理水持ち込みの硫酸イオンを電子受容体として有機物分解が進行していると予想している⁹⁾。実証規模下水処理DHSリアクターにおいても基本的な有機物分解メカニズムはラボスケール下水処理DHSリアクターと同様と考えられるが、ラボスケール下水処理DHSリアクターでの処理メカニズムに加え、実証規模下水処理DHSリアクターでは、メタン生成を伴う嫌氣的分解も進行し、生成したメタンはスポンジ表層に近いメタン酸化細菌によって無機化されるか、そのまま系外に放出されていることが考えられる。今後はDHSリアクターにおける有機物分解を明らかにするため、メタン生成古細菌についても解析を行う必要がある。

(5)低水温時における微生物群集構造

低水温時試料の微生物群集構造は、高水温時の微生物群集構造と比較して門・綱レベルまた種レベルにおいても多様性が低い結果となった。とりわけGammaproteobacteria綱が高い頻度で検出されており、多いところでは解析したクローンの77.6% (G3担体・上段)、少ない場合でも35.3% (G3担体・下段)と優占していた。Gammaproteobacteria綱における内訳はPseudomonas属が95

～100%となっており、Pseudomonas属が処理において主要な役割を果たしていることが強く示唆された。またFirmicutes門, Bacteroidetes門, Betaproteobacteria綱 (特にG6担体) も比較的高い頻度で検出されており、高水温時とは明らかに異なる微生物群集構造であった。

低水温時の各試料における微生物群集構造のEvenness indexを調べた結果、G3担体 (およびG6担体) の上段で0.32 (0.59)、中段で0.61 (0.50)、下段で0.69 (0.47)と低いことから、特定の微生物種が優占して存在している微生物群集構造であると考えられた。生態系において多様性が低いことから、ショックロードや流入有機物種の変動といった環境要因に対して脆弱であると考えられる。下水処理DHSリアクターの長期連続運転において、通年にわたって安定した処理性能は維持されているものの、夏季のような高水温時と比べて冬季のような低水温時は突発的に処理性能が低下する傾向も見られ¹⁷⁾、この原因は微生物活性の低下が招くものではなく、微生物多様性の低さが原因で引き起こされているのかもしれない。

低水温時の汚泥試料は、処理水量 1,000 m³/d のPhase 2期間 (運転開始112日以降) である118日目に採取しており、処理水量 500 m³/d のPhase 1期間 (運転開始～111日) の移行から7日程度と短く、処理水量の違いによる微生物叢の変化の可能性も考慮すべきであり、今後も引き続き検討していく必要がある。

図-2. 低水温時における G3 担体, G6 担体汚泥内の真正細菌の門・綱レベルによる分類と推定 phylotype 数

(6) 低水温時における有機物分解に関わる微生物群

G3担体, G6担体合わせて低水温時試料のなかで最も優占している phylotype 上位5位の相対優占度を表-2に示す。結果, *Pseudomonas fluorescens* に近縁なクローンが最も高い頻度で検出されていた。*Pseudomonas fluorescens* は自然環境中で比較的良好に検出される従属栄養性の環境微生物として知られているが, 生育可能温度が0℃から30℃と低温条件でも増殖可能な低温細菌であり¹⁸⁾, 他にも *Camobacterium mobile* や *Macellibacteroides fermentans* といった低温でも活性を有する細菌種と近縁なクローンが高い頻度で検出されていることが明らかとなった。

生物処理プロセスにおいて, プロセス内の温度が低下した場合, 一般的には水温の低下によって微生物の活性が低下し, 処理性能の悪化が引き起こされる。DHSプロセスは, 冬季の際に水温が低下し, 個々の微生物の活性が低くなったとしても, スポンジ担体の高い汚泥保持能により微生物を高濃度に蓄積することで, 通年にわたって処理性能を維持しているものと考えられていたが²¹⁷⁾, 低水温時における実証規模下水処理DHSリアクターは, 高い

汚泥保持能に加えて, *Pseudomonas* 属をはじめとする低温でも活性を有することのできる低温細菌が優占し, 低温細菌による有機物除去が処理性能の維持に寄与していると考えられる。微生物の代謝で見た場合, *Crostridium* 属や *Camobacterium* 属といった発酵により有機酸を生成する細菌群は多数検出されたものの, 低水温時では種間水素伝達により有機物分解を行う既知の共生細菌に近縁なクローンは検出されなかった。またメタン酸化細菌も高水温時と比べて検出割合が下がったことから, 冬季のような低水温時においてDHS担体ではメタン生成がほとんど行われず, メタン生成を伴う有機物分解経路による分解はほとんど起こっていないことが示唆された。

また *Betaproteobacteria* 綱における内訳は, G3担体, G6担体共に低温細菌としても知られる *Janthinobacterium* 属に近縁なクローンや *Thiomonas* 属, *Thiobacillus* 属といった硫黄酸化細菌に近縁なクローンを中心とした構成となっていた。今後は有機物だけではなく, 廃水中の硫黄化合物についても調査を行い, G3担体, G6担体における微生物群集構造の違いについて明らかにする必要がある。

表-2. 低水温時における G3 担体, G6 担体汚泥内の真正細菌 phylotype の相対優占度

相対優占度	クローン数	アクセッション番号	近縁種	相同性 (%)
第1位	297	KC865280	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	507/508 (99%)
第2位	45	NR_040926	<i>Camobacterium mobile</i>	513/514 (99%)
第3位	26	HM856178	<i>Thiomonas perometabolis</i>	511/512 (99%)
第4位	22	HQ824848	<i>Janthinobacterium lividum</i>	506/507 (99%)
第5位	17	HQ020488	<i>Macellibacteroides fermentans</i>	504/505 (99%)

図-3. リアルタイム PCR 法による DHS 担体汚泥内の脱窒細菌群 (*nirS*, *nirK* 遺伝子) の定量結果

(7) リアルタイムPCRによる脱窒細菌群の定量

DHSスポンジ内部は無酸素環境になっており⁴⁾, 有機物除去および硝化に加えて, 脱窒も同時に行えるプロセスとしての利用可能性が示唆されている. 微生物群集構造解析の結果, *Propioniceella*属, *Smithella*属, *Syntrophobacter*属, *Clostridium*属に分類される多様な嫌気性細菌や, *Pseudomonas*属といった脱窒細菌も存在する属のクローンが数多く検出されたことから, 適切な有機物と硝酸イオンが存在すれば, 微生物学的には脱窒反応が進行する環境であると考えられる. そこで実証規模下水処理DHSリアクターの脱窒ポテンシャルを微生物学的に評価することを目的に, DHSリアクター高さ方向における脱窒細菌の存在率をリアルタイムPCR法により明らかにした.

脱窒細菌の定量には亜硝酸還元酵素をコードする*nirS*遺伝子および*nirK*遺伝子の定量を行った. 脱窒細菌群の存在率 (%) は, *nirS*遺伝子および*nirK*遺伝子それぞれのコピー数をdomain *Bacteria*の16S rRNA遺伝子コピー数で割ることで求めた.*nirS*, *nirK*遺伝子に基づく脱窒細菌群の定量結果を図-3に示す. *nirS*遺伝子由来の脱窒細菌群は0.79%から3.27%, *nirK*遺伝子由来の脱窒細菌群は<0.01%から0.19%程度の割合で存在していた. Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法およびリアルタイムPCR法に基づく活性汚泥プロセス内の真正細菌中の脱窒細菌の存在率は0.2%から15%程度^{19,20)}という報告があり, DHSシステムは, 活性汚泥プロセスと割合的に同等量の脱窒細菌群が存在していると考えられた. 本リアクターのPhase 2 全期間における全窒素除去率は34% (G3担体), 30% (G6担体) となっており, 脱窒細菌群による脱窒反応により窒素ガスとして系外に放出されたと考えられる. DHSリアクターにおける硝化反応は, リアクター流入上部においては有機物分解が進行し, 廃水中の有機物が分解された後, リアクター後半において硝化が進行することが明らかとされてい

る²¹⁾. 硝化が進行することで硝酸イオンの蓄積が確認されるが, リアクター後部においては硝酸イオンを還元するための有機物(電子供与体)はほとんど残っていないことから, 通常では脱窒まで反応を進めることが難しいと考えられる. 一方, 脱窒細菌群のプロファイル結果において, 脱窒細菌群は季節によらずDHSリアクターの高さ方向においてほぼ均等に存在していることから, 処理水の一部を再びDHS反応部に流入(処理水循環)することで脱窒反応を進めることができる可能性が示された.

G6担体において, *nirK*遺伝子がG3担体と比較して高い割合で検出されていた. また, ほとんどの場合において*nirS*, *nirK*遺伝子の高さ方向における存在割合はほぼ一定の推移を示していたものの, G6担体における高水温時の*nirS*遺伝子およびG3担体における高水温時の*nirK*遺伝子の割合が流下方向に向かって低下していた. これらの理由は現時点において明確ではないが, 今後は脱窒を担う個々の微生物種の詳細な解析も必要である.

4. まとめ

実証規模下水処理UASB-DHSシステムのG3型, G6型DHSリアクターの微生物群集構造をrRNA遺伝子クローン解析, リアルタイムPCR法により解析を行った. 高水温時におけるDHS保持汚泥内において, バクテリアクローンの6割がAlpha-, Beta-, Gammaproteobacteria綱に近縁なクローンで構成されており, 主要な有機物分解はこれらの綱に属する好気性細菌であることが示唆された. また *Propioniceella*属, *Clostridium*属, *Smithella*属, *Syntrophobacter*属といった嫌気環境において高い頻度で検出される微生物に近縁なクローンも検出されたことから, DHSリアクターの有機物分解にはこれらの嫌気性細菌も関与している可能性が示唆された. 低水温時においては, 高水温時とは異なりphylogroup多様性は減少し, *Pseudomonas fluorescens*に近縁なクローンが高い頻度で検出されており,

*Pseudomonas*属が処理において主要な役割を果たしていることが示唆された。

リアルタイムPCR法による*nirS*, *nirK*遺伝子の定量結果,*nirS*遺伝子由来の脱窒細菌はバクテリア全体の0.79%から3.27%, *nirK*遺伝子由来の脱窒細菌は<0.01%から0.19%となっており, 活性汚泥プロセスと同等量の脱窒細菌群が存在していると考えられた。脱窒細菌群は季節によらずDHSの高さ方向においてほぼ均等に存在していることから, 処理水循環することで脱窒反応を進めることができる可能性が示された。

謝辞：本研究の一部は，科学技術振興調整費，科学技術戦略推進費補助金，JST-JICA地球規模課題対応国際科学技術協力事業，および科学研究費補助金による助成を頂きました。ここに記して謝辞とします。

参考文献

- 1) 原田秀樹：途上国に適用可能な下水処理技術の国際共同開発-インドでの実規模プラントによる実証試験-, 水環境学会誌, Vol.28, pp.429-434, 2005.
- 2) 大久保努, 山口隆司, 久保田健吾, 原田秀樹：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, Vol.66, No.3, pp.149-158, 2010.
- 3) 小野寺崇, Sugiyana, D., Tandukar, M., 上村繁樹, 長野晃弘, 大橋晶良, 原田秀樹：新型汚泥保持担体を適用した第6世代型DHS反応器における下水処理性能, 土木学会論文集, Vol.64, No.2, pp.78-87, 2008.
- 4) Araki, N., Ohashi, A., Machdar, I. and Harada, H.: Behaviors of nitrifiers in a novel biofilm reactor employing hanging sponge-cubes as attachment site, Wat. Sci. Tech., Vol.39, No.7, pp.23-31, 1999.
- 5) 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：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, Vol.66, No.1, pp.56-64, 2010.
- 6) 下水試験方法 1997年度版, 日本下水道協会, 1997.
- 7) Nanihiro, T., Takeshi Terada, T., Kikuchi, K., Iguchi, A., Ikeda, M., Yamauchi, T., Shiraiishi, K., Kamagata, K., Nakamura, K., Sekiguchi, Y.: Comparative Analysis of Bacterial and Archaeal Communities in Methanogenic Sludge Granules from Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactors Treating Various Food-Processing, High-Strength Organic Wastewaters, Microbes Environ., Vol. 24, No. 2 pp. 88-96, 2009.
- 8) Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, et al., ARB: a software environment for sequence data, Nucleic Acids Res., Vol. 32, No. 4 pp. 1363-1371, 2004.
- 9) Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al., Introducing mothur: open-source, platform-independent community-supported software for describing and comparing microbial communities, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 75: pp. 7537-7541, 2009.
- 10) Colwell, R. K., EstimateS: statistical estimation of species richness and shared species from samples. User's guide and application, version 8.2. Department of Ecology & Evolutionary Biology, University of Connecticut, Storrs, CT, 2006.
- 11) Kurata, S., Kanagawa, T., Yamada, K., Torimura, M., Yokomaku, T., Kamagata, Y., Kurane, R., Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY((R)) FL-labeled probe or primer. Nucleic Acids Res., Vol. 29, No. 6, pp. E34, 2001.
- 12) Braker, G., A Fesefeldt, A., Witzel, K. P.: Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples, Appl. Environ. Microbiol., Vol.64, No.10 pp. 3769-3775, 1998.
- 13) Ritalahti, M.K., Amos, B.K., Sung, Y., Wu, Q., Koenigsberg, S.S., Löffler, F.E., Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple Dehalococcoides strains. Appl. Environ. Microbiol., Vol. 72, No. 4, pp. 2765-74, 2006.
- 14) 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: 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, Vol. 46, pp. 623-628, 2009.
- 15) Roesch, Luiz F., Fulthorpe, Roberta R., Riva, Alberto, Casella, George, Hadwin, Alison K, Kent, Angela D, Daroub, Samira H, Camargo, Flavio A, Farmerie, William G, Triplett, Eric W., Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity, ISME J., Vol.1, No.4, pp. 283-290, 2007.
- 16) Youssef, Noha H, Elshahed, Mostafa S., Diversity rankings among bacterial lineages in soil, ISME J., Vol.3, No.3 pp. 305-313, 2009.
- 17) 大久保努, 原田秀樹, 小野寺崇, 上村繁樹, 山口隆司, 大橋晶良：開発途上国のためのエネルギー最小消費型下水処理技術の開発-実規模DHSリアクターの有機物処理特性評価-, 土木学会論文集, Vol.64, No.2, pp.187-195, 2008.
- 18) Palleroni, NJ., 2005. *Pseudomonas Migula* 1894, p. 323-379. In D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, and G. M. Garrity (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed., vol. 2, part B. Springer, New York, NY.
- 19) Araki, N., Tsukamoto, Y., Nagano, A., Yamaguchi, T., Harada, H., Real-time PCR quantification of nitrite reductase (*nirS*) genes in a nitrogen removing Fluidized Bed Reactor, Wat. Sci. Tech., Vol.53, No.6, pp.59-65, 2006.
- 20) Geets, J., de Cooman, M., Wittebolle, L., Heylen, K., Vanparrys, B., De Vos, P., Verstraete, W., Boon, N., Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.75, No.1, pp.211-221, 2007.
- 21) Tandukar, M., Uemura, S., Machdar, I., Ohashi, A. and Harada, H., A low-cost municipal sewage treatment system with a combination of

Bacterial Community Structure of Practical-scale DHS Reactor Treating Municipal Wastewater by UASB-DHS System and Quantification of Denitrifying Bacteria

Akinori IGUCHI^{1,2}, Tsutomu OKUBO³, Makoto TACHIBANA⁴,
Hiroyuki NAGAI², Shigeki UEMURA³, Takashi YAMAGUCHI⁵,
Kengo KUBOTA² and Hideki HARADA²

¹Fac. of Appl. Life Sci., Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences

²Dept. of Civil and Environmental Engineering, Tohoku University

³Dept. of Civil & Environmental Engineering, Kisarazu National College of Technology

⁴Dept. of Civil Engineering and Architecture, Tohoku University

⁵Dept. of Environmental Systems Engineering, Nagaoka University of Technology

Bacterial community structure in municipal wastewater treatment practical-scale 3rd generation (G3) and 6th generation (G6) type Down-flow Hanging sponge (DHS) reactor was investigated by rRNA clone analysis and real-time PCR analysis. 16S rRNA gene clone-based analysis revealed different microbial composition between high-water-temperature period and low-water-temperature period was observed. Clone-based bacterial diversity was increased in high-temperature period. By contrast in low-temperature period, those composition was dramatically changed to lower diversity. Denitrifying bacteria was quantified by real-time PCR, which indicated that denitrifying bacteria were present in a ratio almost the same amount regardless of the height of the reactor. PCR-based quantifying analysis also revealed that DHS sponge can be retained denitrifying bacteria as well as activated sludge process.