

(34) 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

高橋 良太¹・大嶋 義章¹・関 由里絵¹
小野 心也²・山口 隆司²・荒木 信夫^{1*}

¹長岡工業高等専門学校 環境都市工学科 (〒940-8532新潟県長岡市西片貝888)

²長岡技術科学大学大学院工学研究科 環境システム工学専攻 (〒940-2141新潟県長岡市上富岡町1603-1)

* E-mail: araki@nagaoka-ct.ac.jp

都市下水処理UASB内に生息する嫌気性原生動物種ごとの季節変動を把握するため、顕微鏡観察による原生動物の計測と18S rRNA遺伝子を標的としたクローニング解析及びダイレクトシーケンス解析による同定を行った。原生動物は水温の変化によって増減し、最大 1.1×10^4 cells/mL (秋期)、最低で0.0 cells/mL (春期)となった。UASB内には*Metopus contortus*が優占していた。

*Metopus contortus*の一細胞をマイクロマニピュレーターを用いて捕獲し、そこから回収したDNAに対して古細菌の16S rRNA遺伝子を増幅して標的としたクローニング解析を行ったところ、*Methanoregula*属や*Methanosaeta*属といったメタン生成古細菌が細胞内に共生していた。

Key Words : UASB, municipal sewage treatment, protozoa, symbiotic bacteria

1. はじめに

Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB: 上昇流嫌気性汚泥床) 法は、エアレーション不要で省エネルギーであるばかりでなく、余剰汚泥の発生量が少ない、メタン回収が可能などの利点を有している。これにより、産業廃水処理の分野ではすでに国内外で広く普及している¹⁾。さらに、発展途上国では運転コストが安価であり、不安定な電力供給であっても比較的過程の処理性能の維持が可能であることから、都市下水処理への適用が進められている²⁾。また、日本国内においても次世代の低炭素技術となりうるUASB法の下水処理への適用実験が行われている³⁾。

都市下水の初沈越流水を連続処理するUASBパイロットプラントの保持汚泥を顕微鏡により観察したところ、我々は国内で初めてUASB内に嫌気性原生動物を発見した。嫌気性原生動物は保持汚泥1mL中に約 $10^3 \sim 10^4$ cellsと自然環境中に比べ高密度に存在しており、エアレーションタンク内の活性汚泥の原生動物と同様にUASB内の汚泥性状などに影響を与えているものと考えられる。

Proyaら⁴⁾は植物性廃水処理するUASBの保持汚泥を用いて連続攪拌槽とバイアル瓶での培養実験を行い、嫌気性原生動物は有機物除去、特に非溶解性有機物除去に直接的に関与するとしている。また、原生動物が生息することでMLSSは低下し、メタン生成量が増加するとも報告している。さらに、Biaginiら⁵⁾も嫌気性原生動物の活動がメタン生成古細菌の活性を向上させ、メタン生成率の上昇に貢献すると報告している。このことから嫌気性原生動物はUASBの処理能力の向上に寄与していると考えられる。

しかし、1996年に都市下水を処理するUASB内に嫌気性原生動物が存在するとの報告があった⁶⁾にも関わらず、今日に至るまで都市下水を処理するUASBの処理能力と嫌気性原生動物の関連性についての報告はない。

そこで本研究は、都市下水の初沈越流水を連続処理するUASBパイロットプラント内に生息する嫌気性原生動物の種の同定をするとともに、優占種と細胞数の年間を通じての変化を追跡し、UASB内に生息する嫌気性原生動物の挙動を把握した。

2. 実験方法

(1) 都市下水処理UASB

都市下水処理UASBパイロットプラントは長岡中央浄化センターに設置し、HRTを8時間に設定して初沈越流水を長期にわたって連続通水している。UASBの全容積は1148L、高さは5.1mである。装置は無加温であり、年間を通して流入水温下で運転した。2006年8月19日を運転0日目とし、UASBを稼働し始めた。運転期間を通じて全COD除去率、SS除去率とメタン回収率を定期的に測定した。また、2010年3月に改修工事のため約1ヶ月間、下水の供給を停止した。

(2) 原生動物の定量試験

UASB内に生息する原生動物の計測は顕微鏡観察下で実施した。スライドガラスに汚泥サンプル10 μ Lを滴下し、蛍光顕微鏡下（OLYMPUS社製 IX71）でカバーガラス全視野を観察し、原生動物の個体数をカウントした。汚泥濃度が高く観察が困難な場合は、適量の蒸留水をスライドガラス上加えた。同一の汚泥サンプルに対して上記の操作を3回以上行い、平均値と標準偏差を算出した。なお、本実験は目視による形態判別が可能である体長20 μ m以上の原生動物を測定対象とした。

計測は奇数月の15日に行った。なお、2010年3月の計測はUASB運転停止後に計測したものである。

(3) 18S rRNA遺伝子を標的としたクローニング解析

18S rRNA遺伝子を標的としたクローニング解析は、運転1062日目、リアクター高さ0.5mより採取した保持汚泥に対して行った。また、同じ都市下水を処理するエアレーションタンクの活性汚泥に対しても行った。DNA抽出にはPowerSoil DNA kit (MO BIO)を用いた。抽出したDNAをテンプレートに、原生動物を含む真核生物の18S rRNA遺伝子をPCR増幅した。この際、プライマーペアは表-1に示すEukAとMedlinB、PSSU-342fとMedlinBの2種のプライマーセットを使用した。PCR反応はプレヒーティング;95 $^{\circ}$ C,10分に続き、第1段階;95 $^{\circ}$ C,45秒、第2段階;56 $^{\circ}$ C,45秒、第3段階;72 $^{\circ}$ C,2分を35サイクル繰り返し、ポストエクステンション;72 $^{\circ}$ C,10分を行った。得られた

増幅産物はGene Clean Turbo kit (BIO101)を用いて精製を行い、TOPO Cloning Kit (Invitrogen)によってクローニング化した。抗生物質を含むLB培地上で形成したコロニーからランダムにクローンを回収した後、シーケンス解析 (Takara BIO)を行った。

(4) 原生動物一細胞からの遺伝子増幅によるシーケンス解析

スライドガラスに汚泥サンプル10 μ Lを滴下し、顕微鏡下（OLYMPUS社製 IX71）でマイクロマニピュレーター（NARISHIGE GROUP社製 MM-89JM-9B）を用いて原生動物を捕獲した。捕獲した原生動物をスライドガラスに10 μ L滴下した蒸留滅菌水内で放出し、適度に自由泳動させた後に再び捕獲することにより汚泥からの分離洗浄を実施した。この洗浄操作を3回以上繰り返し、あらかじめ3 μ Lの蒸留滅菌水を入れたPCRチューブ内に原生動物を入れた。-80 $^{\circ}$ Cと60 $^{\circ}$ Cの凍結融解を3回以上繰り返し、原生動物の細胞質を破壊し、PCR反応のテンプレートとした。PCR増幅には表-1に示す、Euk82fとMedlinBのプライマーセットを用いた。PCR反応はプレヒーティング;95 $^{\circ}$ C,10分に続き、第1段階;95 $^{\circ}$ C,45秒、第2段階;56 $^{\circ}$ C,45秒、第3段階;72 $^{\circ}$ C,2分を50サイクル繰り返し、ポストエクステンション;72 $^{\circ}$ C,10分を行った。得られた増幅産物はGene Clean Turbo kit (BIO101)を用いて精製し、ダイレクトシーケンス解析(Takara BIO)を行った。

(5) 細胞内共生細菌のクローニング解析

マイクロマニピュレーターを用いて2(4)と同じ操作で原生動物の優占種を捕獲し、洗浄操作と凍結融解による細胞質の破壊を行った後にDNAを回収した。この原生動物一細胞から回収したDNAをテンプレートに、表-1に示す、A109f-mとUNIV907Rのプライマーセットを用いて古細菌の16S rRNA遺伝子をPCR増幅した。PCR反応はプレヒーティング;95 $^{\circ}$ C,10分に続き、第1段階;95 $^{\circ}$ C,45秒、第2段階;60 $^{\circ}$ C,45秒、第3段階;72 $^{\circ}$ C,2分を35サイクル繰り返し、ポストエクステンション;72 $^{\circ}$ C,10分を行った。クローニング解析は2(3)と同様の操作で行った。

表-1 本研究で使用したプライマー

Primer Name	*Sequence(5' to 3')	Specificity	Reference
EukA	AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT	Eukarya	7)
PSSU-324F	CTT TCG ATG GTA GTG TAT TGG ACT AC	Protozoan	8)
Euk-82F	AAA CTG CGA ATG GCT C	Eukarya	9)
Medlin B	TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC	Eukarya	7)
A109f-m	AMD GCT CAG TAA CAC GT	Archaea	10)を一部変更
UNIV907R	CCG TCA ATT CCT TTA AGT TT	Universal	11)

* M: A or C

3. 結果と考察

(1) UASB下水処理性能と全原生動物細胞数

UASBの下水処理運転における水温、全COD除去率、SS除去率、メタン回収率およびUASB高さ0.5mから採取した保持汚泥内の全原生動物細胞数の経日変化を図-1に示す。UASB内の水温は、最高で28.0℃（375日目）、最低で9.6℃（1624日目）となった。全COD除去率は58±16%，SS除去率は64±23%，メタン転換率は35±14%であった。実験期間を通じて安定した処理水質を維持していた。

全原生動物細胞数は、水温の変化に対応して増減し、最高で $(1.1 \pm 0.6) \times 10^4$ cells/mL（2009年11月）、最低で 0.0 ± 0.0 cells/mL（2010年1・3月）となった。いずれの年も7月頃に細胞数が増加し始め、11月にその年の最大値を取り、その後は細胞数が減少した。嫌気性原生動物である *Metopus es* は30-35℃が至適温度との報告があり¹²⁾、UASB内の原生動物にも同様に至適温度があると考えられる。

また、2008年、2009年、2010年と年により、各季節ごとの水温が同じであっても、全原生動物細胞数とその出現種の多様性に著しい違いが見られた。2008年は全原生動物細胞数は 2.0×10^3 cells/mLレベルに達し、顕微鏡観察で細胞を形態的に判断すると13種が確認できた。2009年は 1.1×10^4 cells/mLと細胞数が増大し、形態的には7種が確認できた。一方、2010年は、 5.6×10^2 cells/mLレベルまでしか細胞数は増大せず、出現した種も4種のみであった。その原因として2010年3月から約1ヶ月間のUASB停止が考えられる。原生動物は、溶解性基質と非溶性基質のどちらも利用できると報告されている⁹⁾。本UASB内の原生動物が何を基質として利用していたかは不明であるが、下水の流入停止によって原生動物の基質となりうるバクテリアの増殖が抑制されたことや溶解性基質の供給が途絶えたことが原生動物細胞数の減少を招いたと考えられる。しかし、嫌気性原生動物の増減条件に関してはまだ未解明部分が多く、UASB停止以降、約1年に渡って嫌気性原生動物が増加しなかった理由は不明である。

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

リアクターの高さ方向における原生動物の分布を明らかにするため、UASBの高さ0.5m、1.75m、3.75mより保持汚泥を採取し、全原生動物細胞数を測定した。リアクター高さ方向の全原生動物細胞数とMLSSの値を図-2に示す。リアクター底部（0.5m）、中部（1.75m）では全原生動物細胞数に大きな変化は見られないが、リアクター上部（3.75m）ではどの時期においても全原生動物細胞

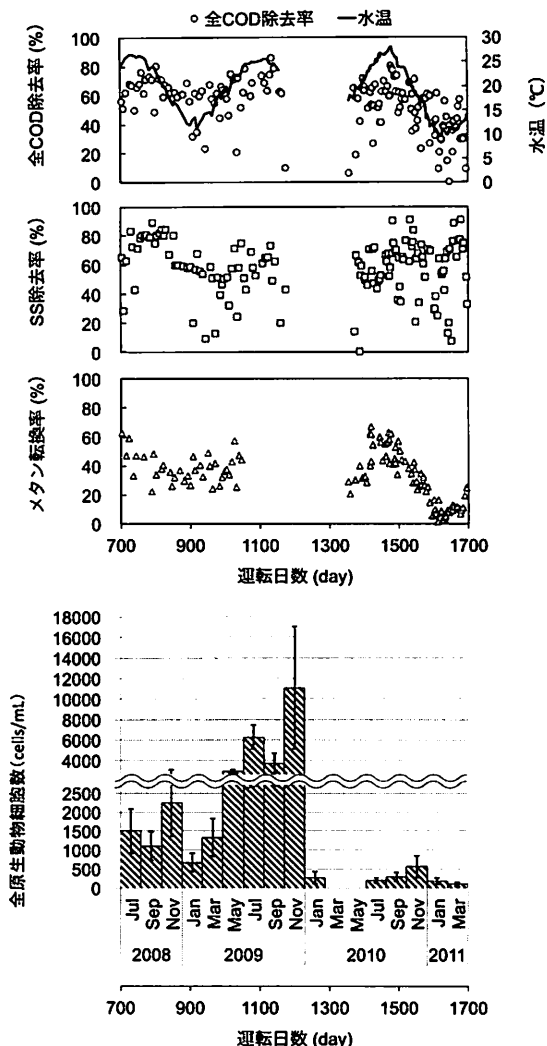


図-1 UASB 処理性能及び全原生動物細胞数の経日変化

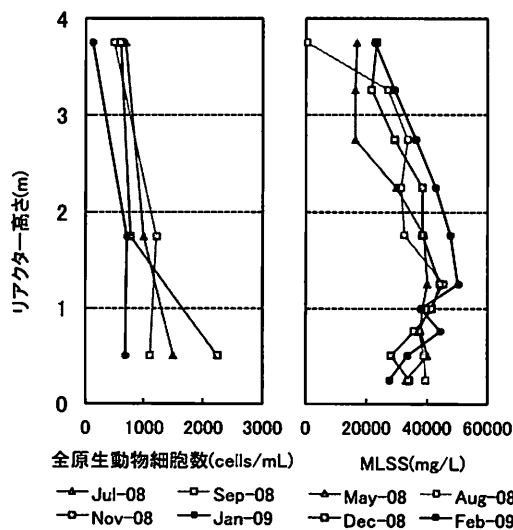


図-2 リアクター高さ方向における原生動物細胞数と MLSS

胞数が低下した。また、MLSSも同様にいずれの時期においてもリアクター底部、中部は上部より高い値となった。原生動物は顕微鏡で観察すると汚泥フロックを縫うように遊泳する様子が常に観察された。リアクター底部に多くの原生動物が出現するのは、基質が豊富であることが原因であると考えられる。

顕微鏡観察による原生動物の計測には多くの問題点がある。UASB 内は汚泥濃度が高く、グラニューや汚泥フロックが多く存在するため顕微鏡下で遊泳する大小様々な原生動物を計測することは困難を極める。また、UASB 内の原生動物には個体同士が集まる習性があり、スライド毎での測定値に大きな差が生じてしまった。なお、原生動物の運動を弱めるため、メチルセルロースや塩化ニッケル溶液¹⁹⁾を添加し、計測を行ったが UASB 内の原生動物は細胞質が脆く、細胞の形を保持できないものが多かった。そのため、本計測試験ではメチルセルロースや塩化ニッケル溶液を用いていない。

(2) 18S rRNA遺伝子を標的としたクローニング解析

UASB内の原生動物種を明らかにするために、UASBの保持汚泥から抽出したDNAに対して18S rRNA遺伝子を標的としてクローニング解析を行った。また、好気・嫌氣的環境の違いで原生動物種にどの程度違いが生じるかを確認するため同じ下水を処理するエアレーションタンクの活性汚泥にもクローニング解析を行った。

UASBの保持汚泥から得られた18S rRNA遺伝子クローンの解析結果を表-2に示す。なお、原生動物ではないクローンの解析結果は記載していない。EukAとMedlinBのプライマーペアを用いて得られたクローンの内、原生動物のクローンは全体の40%であった。残りの60%のクローンは真菌や藻類が占めていた。また、*Metopus palaeformis*と相同性が100%のクローンと93%のクローンが多く得られた。

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

同じ下水を処理するUASBとエアレーションタンクからEukAとMedlinBのプライマーペアを用いて得られたクローンで作製した系統樹を図-3に示す。どちらからも*Aheolate*門、*Ciliophora*亜門のクローンが多く得られたが、

*Rhizaria*門はエアレーションタンク汚泥からしか得られなかった。さらに、同一の*Ciliophora*亜門であってもUASBとエアレーションタンクの違いにより得られたクローンの相同性に10%程度の違いが見られた。

(3) 原生動物一細胞からの遺伝子増幅によるシーケンス解析

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

増幅した遺伝子の解析結果を表-3に、対応する形態を図-4に示す。本実験によりUASB内に生息する4種の原生動物を同定した。これにより、顕微鏡観察によって各原生動物種それぞれの推移を確認することが可能となった。また、本実験と3.(2)のクローニング解析の結果を比較すると*Metopus contortus*、*Metopus palaeformis*はどちらの実験からも得られたが、*Trimyema compressum*はクローニング解析の結果からは得られなかった。

(4) 顕微鏡観察による原生動物種別の計測

原生動物種別に計測した季節ごとの原生動物細胞数を図-5に示す。図-5に示した他にもUASBの保持汚泥からは数種類の原生動物が確認されたが、出現頻度が極めて低い種は記載していない。また、原生動物種は3.(3)で記述した一細胞からの遺伝子増幅によるシーケンスで得られた形態を元に判断した。2009年7月、2010年9月においてUASB内では*Metopus contortus*が極めて高い割合で優占していた。しかし、3.(2)で述べた、18S rRNA遺伝子クローニング解析では*Metopus contortus*に比べ*Metopus palaeformis*が優占する結果となっており、顕微鏡観察下における計測結果と矛盾が生じた。今後、原生動物数の計測に18S rRNA遺伝子のReal-time PCR定量を適用する場合、その計測値の妥当性の検討は必要不可欠である。

また2010年1月において*Metopus contortus*は消滅し、*Tetrahymena*-“like” sp.が優占した。*Tetrahymena*-“like” sp.は2009年6月、2010年9月に出現しなかったことから、比較的低温度の環境条件を好む原生動物であると推測される。

(5) 原生動物細胞内の共生古細菌の解析

*Metopus contortus*はミトコンドリアの代わりにヒドロゲノソームと呼ばれる酸素を最終電子受容体としないエネルギー獲得器官を所持している¹⁰⁾。ヒドロゲノソームは水素イオンを電子受容体とし、最終的に酢酸、水素、二酸化炭素を生産する細胞小器官であることが知られてい

表-2 18S rRNA 遺伝子を標的としたクローニング解析結果

プライマーペア	全クローンに 対する割合(%)	NCBI最近縁種 Accession No	大分類	最近縁種名	相同性 (%)	クローン 番号
EukA - Medlin B	14.6	FJ153651.1	Ciliophora	<i>Metopus palaeformis</i>	93	C02
	12.5	AY007452.1	Ciliophora	<i>Metopus palaeformis</i>	100	G03
	6.3	FJ459739.1	Apicomplexa	<i>Geneiorhynchus manifestus</i>	100	G01
	2.1	AJ009664.1	Ciliophora	<i>Brachonella</i> sp.	100	C05
	2.1	EF024723.1	Apicomplexa	<i>Gregarina blattarum</i>	96	B04
	2.1	DQ244032.1	Ciliophora	<i>Cryptocaryon irritans</i>	93	D04
PSSU-324F - Medlin B	72.9	AY007452.1	Ciliophora	<i>Metopus palaeformis</i>	100	
	18.8	Z29516.1	Ciliophora	<i>Metopus contortus</i>	100	
	2.1	Z29517.1	Ciliophora	<i>Cyclidium porcatum</i>	100	
	2.1	EF024295.1	Ciliophora	<i>Prorodontidae environmental</i>	100	
	2.1	EF417834.1	Ciliophora	<i>Opisthonecta minima</i>	100	

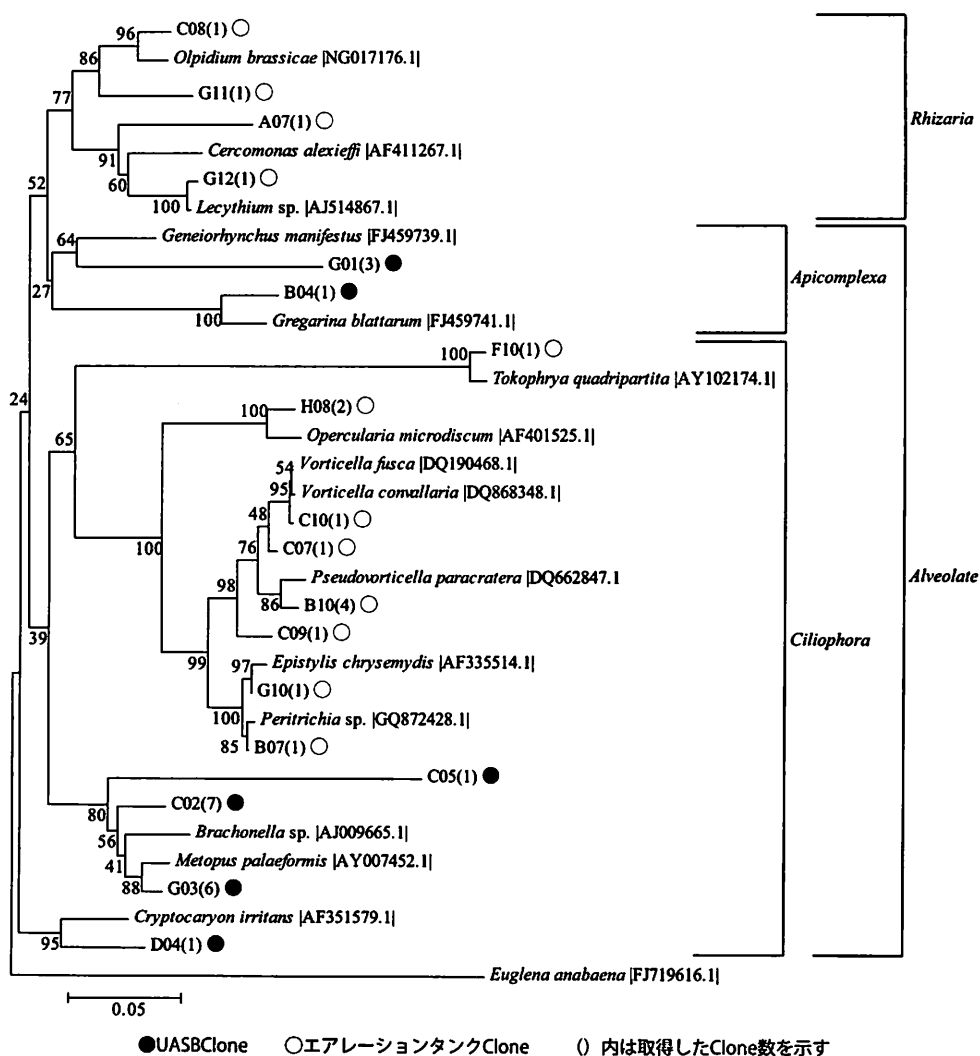


図-3 UASB 及びエアレーションタンクから得られたクローンにより作製した系統樹

る¹⁵⁾。そして、その代謝産物を資化するメタン生成古細菌が*Metopus contortus*の細胞内に共生していると報告もある¹⁶⁾。そこで、都市下水処理する本UASB内の*Metopus contortus*も同様にメタン生成古細菌を共生させているか確認するため、*Metopus contortus* 一細胞から回収したDNAをテンプレートにし、16S rRNA遺伝子を標的としたクローニング解析を行った。

そのクローニング解析の結果を図-6に示す。*Metopus contortus*の細胞内には水素酸化性メタン生成古細菌である*Methanoregula*属(51%)が優占しており、酢酸酸化性メタン生成古細菌である*Methanosaeta*属(40%)も多く検出された。本UASBの保持汚泥内には*Methanosaeta*属が優占しているが³⁾、*Metopus contortus*の細胞内には水素・酢酸酸化性メタン生成古細菌がほぼ同比率で存在しており、原生動物の細胞外と細胞内で菌相に相違が生じた。ただし、本実験手法では単に原生動物が捕食したメタン生成菌のDNAも検出した可能性がある。より正確に共生メタン生成菌を特定するためには原生動物の単離培養を行い、細胞内に捕食されたメタン生成菌のいない状態でクローニング解析を行う必要がある。

表-3 単一細胞から得られた遺伝子解析結果
形態のアルファベットは図-4の写真にそれぞれ対応している。

NCBI最近縁種 Accession No	大分類	最近縁種名	相同性 (%)	形態
Z29516.1	Ciliophora	<i>Metopus contortus</i>	97	A
AY007452.1	Ciliophora	<i>Metopus palaeformis</i>	94	B
AY179985.1	Ciliophora	<i>Metopus palaeformis</i>	88	C
AB285526.1	Ciliophora	<i>Trimyema compressum</i>	99	D

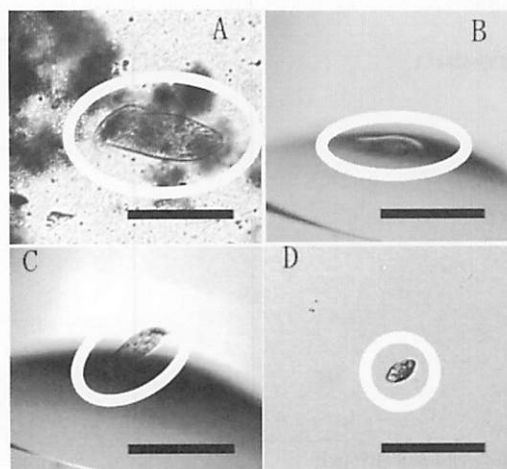


図-4 単一細胞から遺伝子増幅を行った原生動物の形態
(A,B,C)細胞は長卵形で前後にねじれている。前端に大核がある。細胞長A:130μm B:80μm C:90μm。(D)細胞は卵形。細胞長D:25μm (スケールバー100μm)

Nayanaranら¹⁷⁾は分離培養した*Metopus es*の共生古細菌に対しFISHを行ったところ、*Methanosaeta* sp.の共生を確認した。また、*Metopus es*は一細胞当たり0.85pmol/hのメタン生成を行うとしており、*Metopus contortus*も同程度のメタン生成能力を有している可能性は十分にある。

UASB内に最大で 1.1×10^4 cells/mLまで優占していた*Metopus contortus*がUASB内のバクテリアを捕食していたのであれば、捕食されたバクテリアは原生動物細胞内でメタンへ転換されていたことになる。これは余剰汚泥生成の抑制やメタン回収率の増大に繋がるものと考えられる。しかし、現段階ではUASBに影響を与える因子が多く、処理性能と原生動物の関係性を明確にすることはできなかった。今後は嫌気性原生動物の共生がUASBのメタン生成にどの程度寄与しているか、汚泥性状や余剰汚泥生成量に及ぼす影響を評価する必要がある。

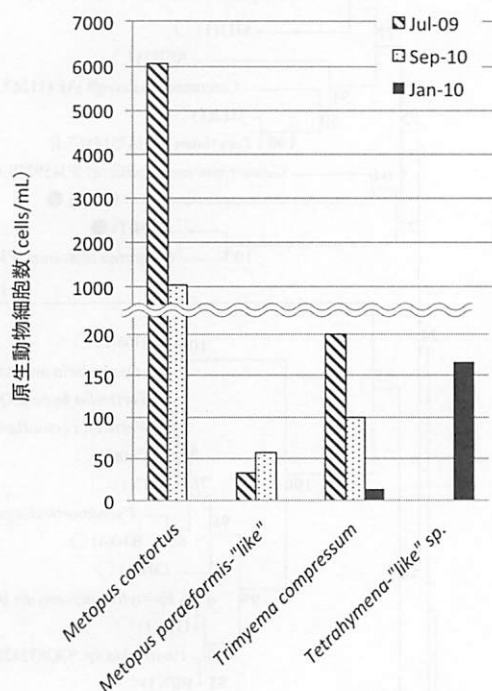


図-5 種別に計測した季節ごとの原生動物細胞数

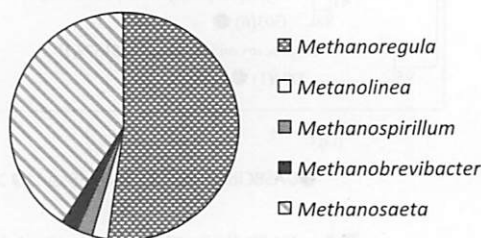


図-6 *Metopus contortus*に共生する古細菌群

4. まとめ

本研究では都市下水の初沈越流水を連続通水するUASB内に生息する嫌気性原生動物の挙動を把握するため、顕微鏡観察による原生動物細胞数の計測及び18S rRNA遺伝子を標的としたクローニング解析及びダイレクトシーケンス解析を実施した。原生動物種としては*Metopus contortus*, *Metopus palaeformis*, *Trimyema compressum*が優占して生息していた。原生動物細胞数は水温変化と共に増減し、夏から秋期に最大となり、冬から春期に減少することが判明した。三年間の計測の結果、UASB内に出現する原生動物種の数や細胞数が年によって大きく異なった。また、優占種である*Metopus contortus*の単一細胞から回収したDNA に対して古細菌の16S rRNA遺伝子を標的としたクローニング解析を行ったところ、細胞内に*Methanoregula*属と*Methanosaeta*属の古細菌が共生していることを確認した。

謝辞：本研究は、科学研究費補助金（課題番号：22360217）の研究助成を受けて実施したものである。記して謝意を表します。

参考文献

- 1) Franklin, R. J.: Full-scale experiences with anaerobic treatment of industrial wastewater, *Wat. Sci. Technol.*, Vol.44, No.8, pp. 1-6, 2001
- 2) Monroy, O., Fama, G., Meraz, M., Montoya, L. and Macarie, H.: Anaerobic digestion for wastewater treatment in Mexico: state of the technology, *Wat. Sci. Technol.*, Vol. 34, No.6, pp. 803-1816, 2002
- 3) 大矢明子, 山口隆司, 原田秀樹: 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, Vol. 46, pp. 629-635, 2009.
- 4) M.Proya, Ajit Haridas, V.B.Manilal: Involvement of protozoa in anaerobic wastewater treatment process. *Water Research*, Vol. 41, pp. 4639-4645, 2007
- 5) Biagini, G.A., Finlay, B.J., Lloyd, D.: Protozoan stimulation of anaerobic microbial activity: enhancement of the rate of terminal decomposition of organic matter. *FEMS Microbiol. Ecol.*, Vol. 27, pp. 8, 1998
- 6) Agrawal, L.K., Harada, H., Tseng, I., Okui, H.: Treatment of dilute wastewater in a UASB reactor at a moderate temperature: microbiological aspects, *J. Ferment. Technol.*, Vol. 83, No. 2, pp. 185-190, 1997
- 7) Medlin, L., Elwood, H.J., Stickel, S., Sogin, M.L.: The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions, *Gene*, Vol. 71, pp. 491-499, 1988
- 8) E.C. Shin, K.M. Cho, H.D. Yun.: Phylogenetic analysis of protozoa in the rumen contents of cow based on the 18S rDNA sequences. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 97, pp. 378-383, 2004
- 9) López-García P., Philippe H., Gail F., et al.: Autochthonous eukaryotic diversity in hydrothermal sediment and experimental microcolonizers at the mid-Atlantic Ridge, *PNAS*, Vol.100, pp. 697-702, 2003
- 10) Großkopf, R., Janssen, P. H., Liesack, W.: Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.64 (3), pp.960-969, 1998
- 11) Lane, D. J.: 16S/23S rRNA sequencing, in "Nucleic acid techniques in bacterial systematics" (Ed. Stackebrandt, E., Goodfellow, M.), pp.115-175. 1991. John Wiley and Sons, New York.
- 12) Nimi Narayanan, M. Priya, Ajit Haridas, V.B Manilal: Isolation and culturing of a most common anaerobic ciliate, *Metopus* sp., *Anaerobe*, Vol.13, pp.14-20, 2006
- 13) 重中義信: 原生動物の観察と実験法, 共立出版株式会社, pp. 66-67, 1998
- 14) G.A. Biagini *et al.*: Hydrogenosomes of *Metopus contortus* physiologically resemble mitochondria, *Microbiology*, Vol. 143, pp. 1623-1629, 1997
- 15) Mikros Mülle.: The hydrogenosome, *General Microbiology*, Vol. 139, pp. 2879-2889, 1993
- 16) T.M. Embley, B.J. Finlay, S. Brown.: RNA sequence analysis shows that the symbionts in the ciliate *Metopus contortus* are polymorphs of a single methanogen species, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 97, pp. 57-61, 1992
- 17) Narayanan N, Krishnakumar B, Anupama VN, Manilal VB *Methanosaeta* sp., the major archaeal endosymbiont of *Metopus* es, *Research in Microbiol.*, Vol. 160, pp. 600-607, 2009

(2011. 5. 30 受付)

Identification and abundance of anaerobic protozoa
in an UASB pilot plant treating domestic municipal sewage

Ryota TAKAHASHI¹, Yoshiaki OSHIMA¹, Yurie SEKI¹,
Shinya ONO², Takashi YAMAGUCHI² and Nobuo ARAKI¹

¹Dept. of Civil Engineering, Nagaoka National College of Technology University

²Dept. of Environmental Engineering, Nagaoka University of Technology

Identification of anaerobic protozoa was carried out by phylogenic analysis of 18S rRNA gene sequences to sludge samples in a pilot plant UASB fed with domestic municipal sewage. Abundances of each protozoan species were measured by microscopic direct counts throughout three years. *Metopus contortus*, *Metopus palaeformis*, *Trimyema compressum* were consistently predominance as a protozoan in the UASB during the experimental period. Total cell number of the protozoa shifted from 1.1×10^4 cells/mL (fall) to 0.0 cells/mL (spring) with changes in temperature of the sewage. 16S rRNA gene cloning to DNA extracted from one cell of *Metopus contortus* picked up with a micro-manipulator revealed that *Methanoregula* and *Methanosaeta* were observed in the cell as a symbiotic bacteria.