

DHS リアクターのスポンジ担体保持汚泥に生息する真核生物の解析

長岡技術科学大学 学生会員 ○宮岡佑馬, 正会員 幡本将史, 正会員 山口隆司
 長岡工業高等専門学校 正会員 荒木信夫, 香川高等専門学校 正会員 多川 正
 国立環境研究所 正会員 小野寺崇, 正会員 珠坪一晃

1. はじめに

下水処理で発生する余剰汚泥量の抑制は、汚泥処分地の確保が困難となっている現在、重要な課題であると言える。本研究室で開発している、Down-flow Hanging Sponge (DHS) リアクターは、曝気を必要としない低コスト型処理システムであるが、汚泥発生量が少ないという特徴もある。DHS リアクターはスポンジ担体を用いた散水ろ床型の処理技術である。特徴として、汚泥を高濃度に保持できることから、F/M 比を低く維持し、余剰汚泥発生量を抑えることが可能である¹⁾。この DHS リアクターにおける汚泥減容化メカニズムは、正確には解明されておらず、原生動物や後生動物による捕食作用が重要な要因であると推定されている。そのため、DHS リアクターにおける原生動物や後生動物などの真核生物の優占種や生物叢の情報を把握することは、汚泥減容化メカニズム解明に向けて重要な知見と成り得ると考えられる。

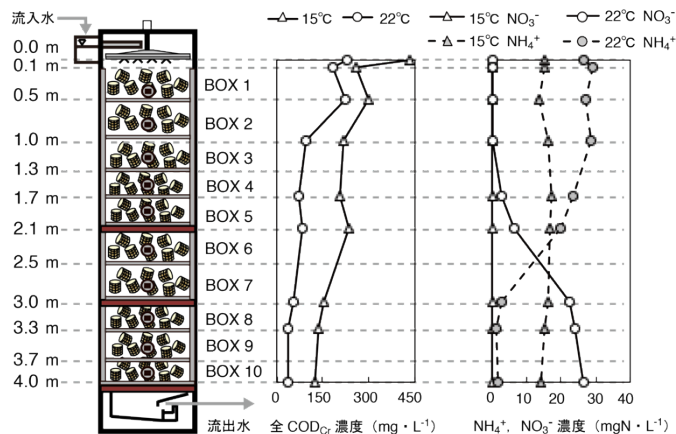
そこで本研究では、DHS リアクターにおける水質と真核生物叢の流下長や運転期間における変化を把握した。また、DHS リアクター内に優占して出現する真核生物種の遺伝子情報を把握するために、18S rRNA 遺伝子を対象としたシーケンス解析を行った。

2. 実験方法

2.1. 水質プロファイルと保持汚泥の真核生物叢解析

実験に用いた DHS リアクターの概要を図 1 に示す。DHS リアクターの流入水には嫌気性処理後の下水を用いた。DHS の流入水はリアクター上部より散水され、流入水が重力によって下降する間に、スポンジ担体に保持された汚泥により処理された後、リアクター下部より処理水として排出される。

流入水温が 15℃ (春)、22℃ (夏) の時期に、リアクターの各流下長での水質測定および汚泥の顕微鏡観察による真核生物叢解析を行った。水質測定に供したサンプルは、各 BOX へと供給される流下水とした。また、汚泥サンプルは、各 BOX のスポンジ担体を圧搾した汚泥とした。真核生物種の存在割合は、スライドガラス上に汚泥サンプルを 20 μL 滴下した後、光学顕微鏡 (倍率 200~400 倍) を用いて真核生



高さ 4.0 m, 担体 454 L, HRT 3.2 hr

図 1 DHS リアクターの概要

図 2 水質プロファイル結果 (水温 15℃, 22℃)

物種の同定および数の計測を行うことで算出した。

2.2. 18S rRNA 遺伝子を対象としたシーケンス解析

スポンジ担体圧搾汚泥からマニピュレーターを用いて、真核生物を 1 個体ずつ単離した。DNA 抽出は、真核生物を単離した後、凍結融解 (-80℃×10 分, 60℃×1 分) を 3 回以上繰り返すことで行った。その後、真核生物に特異的な Euk A /Medlin B のプライマー対²⁾を用いて PCR 反応 (約 1,800 bp 増幅) を行った後、シーケンス解析に供した (シーケンスプライマーは Euk A を使用し、約 150~500 bp を解析)。

3. 実験結果および考察

3.1. 水質プロファイル

図 2 に DHS リアクターの各流下長における水質分析結果を示す。DHS リアクターの流下長における水質は流入水温 (季節) によって大きく異なった。水温 15℃ の時期では、COD_{Cr} 濃度は流入から流出まで 100 mg・L⁻¹ 以上で高濃度であった。NH₄⁺ 濃度は流入から流出まで 15 mgN・L⁻¹ 程度であり、硝化がほとんど生じていなかった。一方、水温 22℃ の時期では、COD_{Cr} 濃度は上段付近で 100 mg・L⁻¹ 以下まで減少し、処理水で 13 mg・L⁻¹ であった。NH₄⁺ 濃度は処理水ではほぼ検出されず、硝化が進行しており、処理水の NO₃⁻ 濃度は 26 mgN・L⁻¹ であった。

キーワード：真核生物, 18S rRNA 遺伝子, PCR, シーケンス解析, DHS リアクター

連絡先：〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学 環境・建設系 Tel : 0258-47-1611 (内線 6646)

以上のように DHS リアクターは、運転期間と流下長において、極めて異なる水質環境を示していた。

3.2. 顕微鏡観察による保持汚泥の真核生物叢解析

表1に顕微鏡観察による真核生物叢解析結果を示す。担体保持汚泥の真核生物叢も流入水温によって異なっていた。水温 15℃の時期における原生動物は繊毛虫が 60%以上と最も優占していた。この繊毛虫には、酸素濃度の低い環境に生息する *Paramecium* 属や有機物負荷の高い環境に生息する *Colpidium* 属が分類される。一方、水温 22℃の時期は、DHS リアクター上部の汚泥で繊毛虫が 80%程度と優占しているが、流下するに従って、肉質虫の *Arcella* 属や *Centropyxis* 属といった高い NO₃ 濃度を好む真核生物が出現するようになった (20%程度)。これらの結果より、酸素濃度の低い環境には *Paramecium* 属、有機物負荷が高い環境には *Colpidium* 属、NO₃ 濃度が高い環境には *Arcella* 属や *Centropyxis* 属が優占するなど、担体汚泥の原生動物の分布傾向は、既往の原生動物の生息環境の情報と相違がなかった (下水を処理する活性汚泥中に出現する原生動物種と水質環境との関係に類似) ³⁾。鞭毛虫は運転期間や流下長によって有意な差がなかった。

一般に後生動物のほうが原生動物よりも体長が大きく、汚泥減容効果が高いため、生体数が少なくても重要に成り得る。水温 15℃の時期の後生動物は、酸素濃度の低い環境を好む線虫 *Nematoda* 門が 10~15%と流下長に関係なく優占していた。その他の種類 (ワムシ *Rotifer* 門、貧毛類 *Aelosoma* 属、*Dero* 属、ケンミジンコ *Nauplius* 目) は下段で存在割合が増加する傾向にあった。これは DHS リアクターの担体における汚泥令が長いことから、増殖速度の遅い後生動物でもリアクター下段付近で生息可能となるためだと考えられる。DHS リアクターの担体内では、このような高次な生態系が構築されているため、汚泥減容化が進行していると考えられた。

3.3. 18S rRNA 遺伝子を対象としたシーケンス解析

原生動物や後生動物は各個体が持つ細胞数が異なるため、汚泥全体を対象としたクローニング等の解析手法では、細胞数が少ない種を正確に解析することができない⁴⁾。また生物処理汚泥に生息する真核生物を単離し、シーケンス解析を行った報告は現在のところない。そのため、顕微鏡観察結果から、担体保持汚泥に優占する種をマニピュレーターで 1 細胞ずつ単離した後、PCR およびシーケンス解析を行った。

表 2 に解析対象とした真核生物種とシーケンス結果を示す。シーケンス解析の結果、今回の真核生物の形態による同定結果と遺伝子情報による同定結果には、あまり相違が無いことが判明した。また、優占種は既知の真核生物と 95%

表 1 顕微鏡観察による真核生物叢解析結果

BOX	水温 (°C)	真核生物種の存在割合 (%)						
		原生動物			後生動物			
		肉質虫	繊毛虫	鞭毛虫	線虫	ワムシ	貧毛類	ミジンコ
1	15	18	65	0	18	0	0	0
	22	20	50	0	30	0	0	0
3	15	13	75	6	6	0	0	0
	22	6	85	6	2	0	0	0
5	15	4	60	22	13	0	0	0
	22	16	78	0	3	0	0	3
6	15	3	52	32	12	0	0	2
	22	6	69	6	3	6	0	11
8	15	13	72	3	10	1	0	0
	22	26	47	11	5	0	0	11
9	15	0	59	24	14	0	3	0
	22	19	12	25	13	0	13	19

表 2 優占真核生物種のシーケンス解析結果

形態観察 優占有種	NCBI BLAST 検索による近縁種	相同性
<i>Paramecium</i> 属	<i>Paramecium tetraurelia</i> (EF502045)	312/315(99%)
<i>Paramecium</i> 属	<i>Paramecium multimicronucleatum</i> (AB252007)	442/458(97%)
<i>Paramecium</i> 属	<i>Paramecium multimicronucleatum</i> (AB252007)	529/530(99%)
<i>Colpoda</i> 属	<i>Colpidium striatum</i> (HM030739)	216/222(97%)
<i>Metopus</i> 属	<i>Metopus contortus</i> (Z29516)	139/146(95%)
<i>Dero</i> 属	<i>Aelosoma hemprichi</i> (AJ310500)	294/299(98%)
<i>Nematoda</i> 門	<i>Aelosoma hemprichi</i> (AJ310500)	199/207(96%)

以上の遺伝子の相同性を有しており、一般的な種の存在が確認された。また、形態観察による同定結果よりも種レベルでの同定が可能であり、より詳細に生物叢を把握することができると示唆された。しかしながら、一部の種に関しては、形態観察と遺伝子解析による同定結果が異なっており、18S rRNA 遺伝子による解析を適用させるために、さらに真核生物の形態と遺伝子情報をリンクさせていく必要性が伺えた。

4. まとめと今後の予定

DHS リアクターの担体保持汚泥では、運転期間によって異なる水質環境や真核生物叢が観察された。また、流下方向で異なる真核生物叢を形成していた。さらに、優占していた一部の真核生物種は、既知の NCBI のデータバンクに登録されている真核生物種と高い相同性を有していた。

ただし今回、真核生物のシーケンス解析が成功した種は優占種の一部であるため、今後は、シーケンス解析を行っていない種の解析を行っていく予定である。また、真核生物叢をより客観的かつ網羅的に解析することが可能な手法を検討していき、担体における汚泥減容化メカニズム解明のための知見収集を行っていく予定である。

参考文献

- 1) 松永ら (2009) 環境工学研究論文集, 46, 623-628
- 2) Medlin *et al.* (1988) *Gene*, 71, 491-499
- 3) 千種 (1996) 図説微生物による水質管理, 産業用水調査会
- 4) 松永ら (2012) 土木学会論文集 G (環境), 67 (7), III_13-III_19