

下水処理 UASB 槽内に生息する嫌気性原生動物の共生微生物の分子生物学的解析

長岡技科大院・工 学生会員 ○平片悠河 正会員 幡本将史 山口隆司
長岡高専 正会員 押木守 荒木信夫

1. はじめに

都市下水を処理する up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) 槽の保持汚泥中には、汚泥 1 mL 当たり $10^2 \sim 10^3$ cells 程度の嫌気性原生動物が生息している¹⁾。嫌気性原生動物は発酵的な代謝によってエネルギーを生産する。その際、副産物として水素が発生するが、嫌気性原生動物体内には水素資化性メタン生成古細菌が共生しており、体内の水素をメタンに転換する共生関係が報告されている²⁾。従って、水素資化性メタン生成古細菌を共生させた嫌気性原生動物は、単体で有機物をメタンへと分解可能であり、UASB 槽内において有機物分解及びメタン生成に寄与していると考えられる。また、Priya らは嫌気性連続攪拌槽実験と回分試験を行った結果、嫌気性原生動物の存在量と MLSS の低下、COD 除去率とメタン生成量の増加に相関関係があると報告している³⁾。

本研究グループでは都市下水を処理する UASB 槽の保持汚泥中に原生動物が生息していることを以前報告した¹⁾。この嫌気性原生動物も上述の報告と同様に共生微生物を保有し、UASB 槽の処理性能に影響を及ぼしている可能性がある。そこで本研究では、都市下水処理 UASB 槽内に生息する嫌気性原生動物 *Metopus sp.* 体内の共生微生物叢を明らかにするため、16S rRNA 遺伝子に基づく遺伝子解析及び FISH 法を行い、*Metopus sp.* 体内の共生微生物種を特定した。

2. 実験方法

2.1 嫌気性原生動物の培養

原生動物の植種源としては、都市下水を通水する UASB バイロットプラント (容積 1,148 L) より採取した嫌気性グラニュール汚泥を用いた。培養には 50 mL バイアル瓶を使用した。培地は CMV medium²⁾ を使用し、pH は 7.0 に調整した。原生動物体外の微生物を除くため、培地に抗生物質としてストレプトマイシン硫酸塩 50 mg/L 及びバンコマイシン塩酸塩 50 mg/L を添加した。原生動物は植種汚泥を目開き 100 μm のメッシュを用いて簡易濾過した後、注射器を用いて 30-50 cells を培地に植種した。基質にはグルコース 0.1 g/L を添加した。培養は室温 (20 ± 2 °C)、暗所で行った。

2.2 16S rRNA 遺伝子に基づく微生物叢解析

培養3日目, 5日目, 7日目にマイクロマニピュレーター

(NARISHIGE) を用いて原生動物を捕獲した。捕獲した原生動物は、スライドガラスに 10 μL 滴下した蒸留滅菌水内に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分離洗浄した。その後、原生動物を PCR チューブに投入し、 -80°C と 60°C の凍結融解を 5 回以上繰り返すことにより DNA 抽出を行った。

16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅には、515F と 806R のプライマーペアを用いた⁴⁾。得られた PCR 産物は Gene Clean Turbo kit (BIO101) を用いて精製した。ライブラリーの調整には MiSeq V2 Reagent kit nano (Illumina) を使用し、次世代シーケンサー MiSeq (Illumina) を用いて塩基配列を決定した。塩基配列の系統分類には Greengenes データベース ver. 13_5 を参照した。

2.3 FISH 法

原生動物の固定には 2% パラホルムアルデヒドを用い、固定時間は 8 時間とした。FISH 法は Amman らの方法に従った⁵⁾。蛍光プローブは、*Methanomicrobials* 目に特異的な Mg1200b⁶⁾ 及び、本研究で作製した *Clostridium aminobutyricum* に特異的な Cla568 (5'-ACCTACGCACTCTTTACG-3') を用いた。Cla568 の特異性は、1 塩基のミスマッチを持つ *Clostridium cylindrosporium* (NBRC13695) と *Stenotrophomonas maltophilia* (JCM3805) をネガティブコントロールとして用いることで確認した。ハイブリダイゼーション温度及びホルムアミド濃度は、Mg1200b では 40°C 、20%、Cla568 では 46°C 、20% とした。ハイブリダイゼーション後に、4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) による全菌染色を施した後、蛍光顕微鏡 BX60 (OLYMPUS) を用いて観察した。

3. 結果と考察

3.1 16S rRNA 遺伝子解析結果

図 1 に 16S rRNA 遺伝子に基づく原生動物体内の微生物叢解析結果を示す。培養日数が経過するにつれて、水素資化性メタン生成古細菌である *Methanoregula boonei* の割合が 30% から 66% と増加し、最も優占して検出された。次いで多く検出されたのは *C. aminobutyricum* に同定される配列であり、21% から 15% 程度検出された。M. boonei, C. aminobutyricum 以外の配列は、培養期間が長くなるにつれて減少する傾向にあった。特に *Desulfovibrio desulfuricans* の存在割合は 3 日目で

キーワード 嫌気性原生動物, 水素資化性メタン生成古細菌, UASB

連絡先 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学大学院 環境システム工学専攻 TEL 0258-47-1611-6646

は7.4%であったものの、5日目では1.1%まで減少し、7日目には検出されなかった。これより、*D. desulfuricans*などの細菌は、*Metopus sp.*の細胞外に存在していたため、培地に添加した抗生物質によって減少・死滅したものと思われる。それに対し、抗生物質を添加した培養でも残存した *M. boonei*, *C. aminobutyricum* は原生動物 *Metopus sp.*の細胞内で保護されていたことが示唆された。

3.2 FISH 法による原生動物細胞内の微生物の検出

2種類の蛍光プローブを用いて FISH 法を行い、*Metopus sp.* 細胞内の *M. boonei* 及び *C. aminobutyricum* の空間分布を調査した。10 cells の *Metopus sp.* に対して FISH 法を行った結果、全ての細胞から *M. boonei* 及び *C. aminobutyricum* が検出された。*M. boonei* の蛍光シグナルは、原生動物細胞全体から規則的に検出された (図 2b)。嫌気性原生動物は体内にハイドロジェノソームと呼ばれる ATP と共に水素を産出する器官が細胞質全体に存在している¹⁾。このため水素資化性メタン生成古細菌である *M. boonei* はハイドロジェノソーム近傍に存在し、*Metopus sp.*が作り出した水素を利用していたと考えられる。また、*M. boonei* の FISH によるセルカウントを行った結果、*Metopus sp.*体内には、平均 4.1×10^3 cells の *M. boonei* が存在していることが明らかとなった。

一方、*C. aminobutyricum* は細胞内の一ヶ所に集中していることが明らかとなった (図 2d、矢印部分)。また、*C. aminobutyricum* の菌体量は *Metopus sp.*1 個体当たり約 1.0×10^2 cells であった。これらの結果より、*C. aminobutyricum* はハイドロジェノソームではなく、食胞などの消化器官付近に存在しており、低級脂肪酸などの代謝物を分解しているのではないかと考えられる。また、*Clostridium* 属の細菌は、嫌気性原生動物と同様に発酵によって水素を代謝することが知られている⁷⁾。よって、*Metopus sp.* 細胞内において、*C. aminobutyricum* の代謝によって発生した水素は、原生動物の代謝で発生した水素とともに、*M. boonei* によって除去されるといった3者間による共生関係が成立している可能性が示唆された。

4. 結論

都市下水処理 UASB 槽内に生息する嫌気性原生動物 *Metopus sp.*の体内からは *M. boonei* 及び *C. aminobutyricum* に同定される塩基配列が検出された。FISH 法による解析では、*Metopus sp.* 1 cell の細胞内に *M. boonei* は約 4.1×10^3 cells, *C. aminobutyricum* は約 1.0×10^2 cells 検出された。また、*M. boonei* は原生動物体内全体に規則的に存在するのにに対し、*C. aminobutyricum* は一ヶ所に局在していることが明らかになった。しかし、これらの共生微生物は未だ未解明の部分が多く、

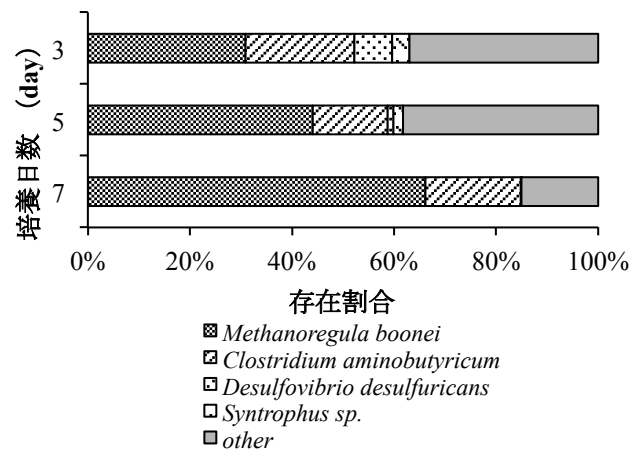


図1 16S rRNA 遺伝子解析結果

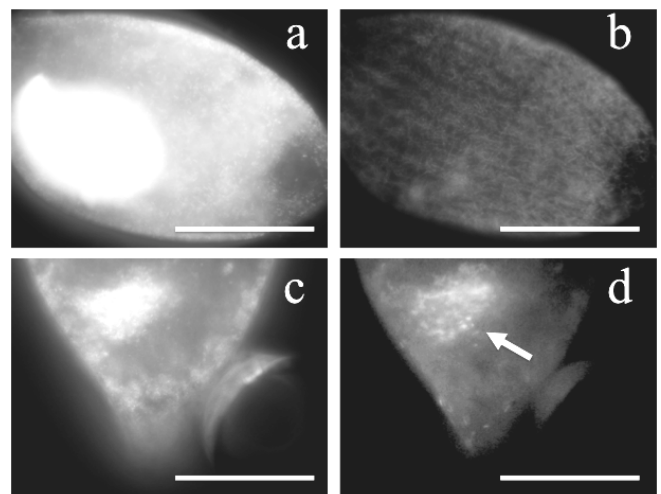


図2 FISH 法による微生物検出 ; (a, c) DAPI 視野, (b) Mg1200b (Cy3), (d) Cls568 (FITC), a と b, c と d は同一視野である。スケールバー : 50 μ m

今後はこれらの共生微生物の機能や活性を調査する必要がある。

参考文献

- 1) 高橋良太ら. 2011. 土木学会論文集 G, 67, 285-292
- 2) Finlay et al. 1994. FEMS Microbiology Letters, 117, 157-161.
- 3) Priya et al. 2007. Water research, 41, 4639-4645.
- 4) Caporaso et al. 2012. ISME J. 6, 1621-1624.
- 5) Amann, R. I. 1995. In Molecular microbial ecology manual. 331-345.
- 6) Crocetti et al. 2006. Journal of Microbiological Methods, 65, 194-201.
- 7) Stieb et al. 1985. Arch. Microbial. 140, 387-390.