

18S rRNA 遺伝子情報を用いた都市下水を処理する UASB 槽及び活性汚泥における原生動物群集解析

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⁾。好気性処理法において原生動物は、捕食作用によって余剰汚泥の削減や処理水質の向上に寄与しているとされている。特に活性汚泥法においては、処理水質の変化と関連して優占する原生動物種が異なることが報告されており、処理の指標生物として使用されている²⁾。嫌気性処理においても同様に、原生動物を処理の指標として使用できる可能性が考えられるが、嫌気性処理における原生動物の知見は少なく、特に UASB 槽内に存在する種の多くは未だ不明なままである。これらの原生動物の役割を解明するためには、まず UASB 槽内に存在する原生動物群集を明らかにする必要がある。

原生動物種を同定する手法としては主に顕微鏡による観察が用いられているが、この手法は使用者の主観が入り易いといった問題がある。そのため、顕微鏡観察だけでは、詳細な原生動物群集を解析することが難しい。また、観察された原生動物が嫌気性の種であるか否かを判別することも困難であり、UASB 槽内で多く検出されても、都市下水中に存在し、単に流入してきた原生動物種である可能性もある。そこで本研究では、主観によらない客観的な指標である原生動物を含む真核生物が共通して保有する 18S rRNA 遺伝子を標的とした系統解析を行った。都市下水を処理する UASB 槽内、活性汚泥、都市下水中に存在する原生動物群集の系統解析を行い、それぞれを比較することで、嫌気性環境である UASB 槽内に存在する原生動物群集を調査した。

2. 実験方法

2.1 汚泥サンプル

UASB法の汚泥サンプルとして、長岡中央浄化センターに設置された都市下水を処理するUASBパイロットプラント(容量1,148L)から嫌気性グラニューール汚泥を採取した。活性汚泥法の汚泥サンプルとしては、同施設で稼働している活性汚泥法(分流式、処理流量 68,400 m³/day)の曝気槽より採取し、都市下水サンプルとして、スクリーン通過後の都市下水を採取し、実験に供した。

2.2 18S rRNA遺伝子に基づく微生物叢解析

汚泥サンプルのDNA抽出には、FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals)を用いた。抽出DNAを鋳型として、真核生物が持つ18S rRNA遺伝子を対象としたPCRプライマーペア V4_1F/TarEukREV3³⁾を用いてPCR増幅を行った。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。得られた18S rRNA遺伝子データの解析には、QIIMEソフトウェアを用いて解析した⁴⁾。遺伝子配列の系統分類にはSILVAのデータベースを参照した⁵⁾。また、NCBIのBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)により既知種から相同性の高い種を検索した。

3. 結果と考察

図1に UASB 槽、都市下水、活性汚泥よりそれぞれ得られた原生動物由来の 18S rRNA 遺伝子配列を門・綱レベルに分類した結果を示す。解析の結果、好気性環境である活性汚泥と都市下水中における優占原生動物群は共通して検出されるものが多かった。*Cercozoa* 門は、活性汚泥中では45.5%と最も多く検出されており、その内43.9%は *Rhogostoma* 属に近縁な遺伝子配列であった。都市下水中でも *Rhogostoma* 属は、2.2%と共通して検出されていた。また、繊毛虫類として知られる *Ciliophora* 門に属する *Oligohymenophorea* 綱は、活性汚泥と都市下水中からそれぞれ33.2%、46.2%と非常に多く検出されていた。*Oligohymenophorea* 綱の中では、特に *Telotrochidium* 属が活性汚泥では20.1%、都市下水からは16.2%と非常に高頻度かつ共通して検出されていた。同様に、未培養である RT5iin25 グループも、活性汚泥からは17.7%、都市下水からは20.4%と共通して検出された。これらの原生動物群は都市下水中から活性汚泥に流入した種であった可能性が考えられた。都市下水中に存在した原生動物群は、多くが好気性の種であり、活性汚泥法の曝気槽内においても増殖が可能であったと考えられる。そのため、活性汚泥における原生動物群集は、流入する都市下水中の原生動物群集の影響を強く受けていたと考えられる。

一方で、UASB槽内から検出された18S rRNA 遺伝子配列の内、最も優占していたのは *Ciliphora* 門であり、35.6%検出され

キーワード 嫌気性原生動物, UASB 槽, 都市下水処理

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

ていた。そのうち、18.5%は *Ciliophora* 門に属する *Armophorea* 網であった。また、検出された *Armophorea* 網の遺伝子配列は、全て *Metopus* 属に近縁であり、これまでに顕微鏡観察でも確認された種であった¹⁾。この他にも *Ciliophora* 門に属する *Colpodea* 網と *Karyorelictea* 網が3.7%、2.7%と UASB 槽内のサンプルでのみ検出されており、UASB 槽内で生息していた可能性が高い。しかし、活性汚泥や都市下水中で優占していた *Oligohymenophorea* 網の存在割合は3.6%と低く、*Telotrochidium* 属もわずかしこ検出されなかった。これらの種は、都市下水中から UASB 槽内に流入していたと考えられるが、嫌気性環境では増殖できなかつた可能性が高い。*Ciliophora* 門は、嫌気性、好気性のどちらの環境でも高頻度に確認される原生動物群であり、嫌気性原生動物種を特定するためには、門・網レベルの分類ではなく、属・種レベルなどの詳細な分類を確認する必要があると考えられる。この他にも、*Cercozoa* 門が都市下水中と共通して検出されたが、属レベルで共通した種の割合は都市下水と比較してわずかであった。よって、この種も同様に UASB 槽内では増殖できなかつたと思われる。この結果より、活性汚泥と比較して、UASB 槽内の原生動物群集は、流入する都市下水の原生動物群集の影響は少ないと考えられる。

Ciliophora 門に次いで多く検出されたのは、*Apicomplexa* 門であり、全体の29.1%検出されていた。*Apicomplexa* 門は基本的に寄生性の種であるが、シストを形成することで様々な環境に存在する⁹⁾とされており、UASB 槽内においても同様であった可能性がある。また、これらは都市下水中でもわずかに検出されているため、UASB 槽内に流入し、蓄積した可能性が考えられる。この他にも、寄生性の原生動物群として報告されている *Ichthyospora* 門が UASB 槽内で、17.7%と優占して検出された⁷⁾。検出された *Ichthyospora* 門の遺伝子配列は未培養な種のもが多く、その役割は不明であったが、都市下水中では全く検出されなかつたため、UASB 槽内において増殖し、活動している可能性が示唆された。

また、*Amoebozoa* 門も UASB 槽内で11.6%と多く検出された。*Amoebozoa* 門は都市下水中でも検出されていたが、属レベルで共通して検出された種はいなかつたため、UASB 槽内で増殖した種であると考えられた。また、検出割合は少ないが *Bicosoecida* 門や *Sulcozoa* 門などの鞭毛虫類も、UASB 槽内でのみ、それぞれ3.5%、1.8%検出されていた。これらの種は、これまでの顕微鏡観察¹⁾では全く検出されなかつた。嫌気性原生動物は多くの種が未培養であり、形態的特徴などの情報が少ない。さらに、体長の小さい原生動物種は観察が難しく、見逃されていた可能性が高い。今回の遺伝子解析の結果より、UASB 槽内の原生動物群集は、活性汚泥内のものと比較して

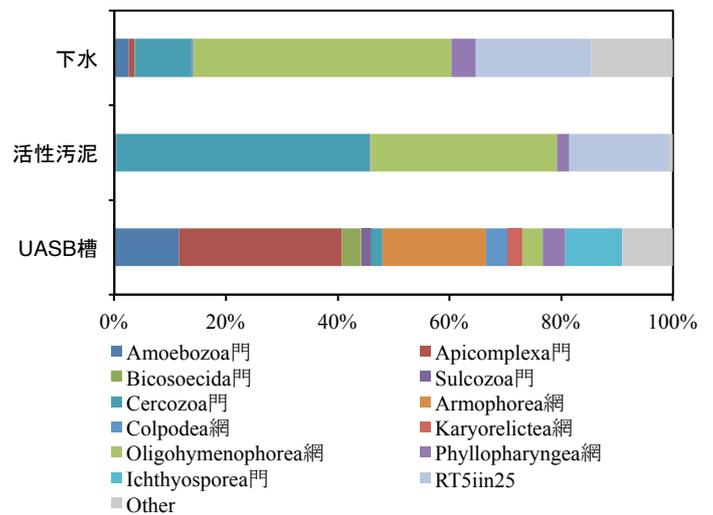


図1 18S rRNA 遺伝子配列の門・網レベルでの分類結果

大きな多様性を持っていた。さらに、顕微鏡観察で確認されなかつた原生動物種が大部分を占めていることが明らかとなった。そのため、これらの種が嫌気性処理において、重要な役割を担うことや、指標生物と成り得る可能性も十分に考えられる。今後は、18S rRNA 遺伝子に基づく原生動物群集解析の結果と季節変動や処理水質との関連性を明らかにする必要がある。また、形態的特徴と遺伝子情報をリンクさせ、遺伝子解析結果を顕微鏡観察に反映していくことも重要な課題であると考えられる。

4. 結論

本研究では、都市下水を処理する UASB 槽内、活性汚泥及び都市下水中存在する原生動物群集に対し、18S rRNA 遺伝子に基づく遺伝子解析を行った。その結果、都市下水中と UASB 槽内及び活性汚泥において共通して存在する原生動物種が検出され、外部から流入する原生動物種の存在が明らかとなった。また、顕微鏡観察では確認されなかつた原生動物種を多く検出することが可能であった。

今後は、原生動物群集解析の結果と処理水質との関連性を調査し、UASB 法において指標生物と成り得る原生動物種の知見を収集していく予定である。

参考文献

- 1) Hirakata, Y et al., (2016). M&E, 31, 279-287.
- 2) Madoni, P. 1994. Wat Res, 28, 67-75.
- 3) Bass, D et al., (2016). Environ Microbiol, 18, 1604-1619.
- 4) Caporaso JG et al., 2012. ISME J. 6, 1621-1624.
- 5) Quast C et al., 2012. Nucleic acids Res, 41,590-596
- 6) Rosales, MJ et al., (2005). Acta tropica, 95, 74-78.
- 7) Glockling SL et al., 2013. Fungal Ecol. 6, 237-247.