

都市下水処理UASB槽内に生息する原生動物Cyclidium sp.の細菌捕食速度と代謝物の調査

長岡技科大院・工 学生会員 ○平片悠河 正会員 渡利高大 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 UASB 槽内には細菌・古細菌だけでなく、原生動物が 10^3 - 10^4 cells/mL の密度で、自然環境中と比較して高密度に存在している。原生動物は、活性汚泥法などの好気性処理においては、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することが知られている¹⁾。嫌気性処理においても、同様に、原生動物の捕食作用が細菌・古細菌の存在数を制御されることが報告されている。また、原生動物が排出する代謝産物が微生物叢の多様性や微生物活性に影響を及ぼすことも明らかとなっている^{2,3)}。特に嫌気性環境では、原生動物は唯一の捕食者であり、細菌の捕食とその代謝産物は生態系に影響を及ぼす重要な因子である。しかし、UASB 槽内に生息する原生動物が細菌・古細菌をどの程度捕食し、何を代謝産物として排出しているかは完全には明らかにされていない。そこで本研究では、原生動物の代謝産物を特定するため、都市下水処理 UASB 槽から分離した、細菌捕食性の嫌気性原生動物である *Cyclidium* sp.を用いた培養実験を行った。原生動物の基質として *E.coli* を使用し、*Cyclidium* sp.の細菌捕食速度とそれによって発生する代謝産物の調査を行った。

2. 実験方法

本実験では、無機塩培地に *Cyclidium* sp.と基質となる *E.coli*を接種した培養系と、*E.coli*のみを接種したcontrol系を、pH 7.2、温度は25℃とし、嫌気性条件下で培養を行った。また、本実験に供した*E.coli* は、LB培地を用いて37℃で24時間静置培養した。培養した菌体はリン酸緩衝液(PBS)で2回洗浄した後、実験に供した。

原生動物の個体数は、顕微鏡を用いて目視で計測した。計測は各試料につき、3回以上行った。培地内の全細菌数計測は、採取した培養液を孔径0.2 μmのフィルターでろ過した後、そのフィルターにDAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)による全菌染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

また、培地内の物質収支を確認する目的で、一定期間ごとに培養液を採取し、全COD、溶解性COD、有機酸の測定を行った。溶解性COD及び有機酸の分析試料には、培養液を孔径0.2 μmのフィルターでろ過したものを供した。全COD及び溶解性CODの測定は重クロム酸カリウム法に従い、測定には、

HACH社製の吸光光度方式水質測定器 (DR-2800)を用いて測定した。培地中の有機酸の分析には、キャピラリー電気泳動装置(Agilent 7100)を用いた。バイアル瓶内のメタン生成量はGC/FIDを用いて測定した。

3. 結果と考察

図1に培養実験における *Cyclidium* sp.の個体数と培地中の全細菌数の推移を示す。*Cyclidium* sp.は、培養6日目から増殖し、培養11日目に 3.0×10^2 cells/mL まで増殖した。培地中の全細菌数は、培養初日は 6.4×10^7 cells/mL だったが、培養6日目より減少し始め、培養11日目には 3.1×10^7 cells/mL まで減少した。それに対し、*E.coli* のみの control 系では、培養期間中に全細菌数の変化は見られなかった。このため、*Cyclidium* sp.の捕食によって *E.coli* が減少したものと考えられる。また、全細菌数の減少量より、培養6日目から培養11日目の *Cyclidium* sp.が増殖した期間における細菌捕食速度を算出すると、*Cyclidium* sp.一個体当たり、1時間に 1.2×10^3 cells の *E.coli* を捕食していたことが明らかとなった。

また、原生動物の代謝物を特定するため、培養期間中の *Cyclidium* sp.の個体数、メタン生成量及び有機酸の推移を調査した(図2)。実験期間中、*Cyclidium* sp.は培養10日目までに 2.3×10^2 cells/mL まで増殖した。*Cyclidium* sp.が増殖するに従って、培養2日目以降にメタン生成量も増加し、10日目に $15.7 \mu\text{L}/\text{vial}$ となった。嫌気性原生動物の細胞内には水素資化

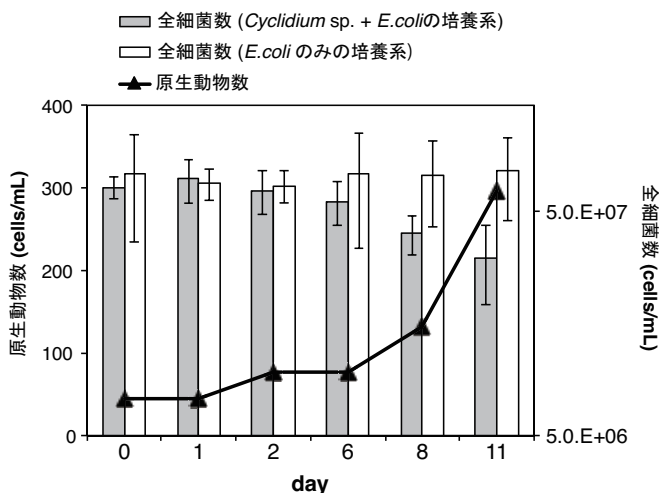


図1 培養実験における *Cyclidium* sp.の個体数と全細菌数の推移

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

性メタン生成古細菌が共生しており、原生動物細胞内で発生した水素をメタンへ転換していることが知られている²⁾。過去にも *Cyclidium* sp. の細胞内からメタン生成古細菌が確認されている⁴⁾。本実験に用いた *Cyclidium* sp. も同様に細胞内からメタン生成古細菌に特有の補酵素 F₄₂₀ 由来の自家蛍光が確認されている(データ非表示)。そのため、*Cyclidium* sp. の共生メタン生成古細菌によってメタンが生成されたと考えられた。

培地中の有機酸分析の結果、*Cyclidium* sp. と *E. coli* を接種した系では、*E. coli* のみの系と比べ、酢酸、プロピオン酸が増加していた。特にプロピオン酸は、*E. coli* のみの系では検出されなかった。そのため、*Cyclidium* sp. が *E. coli* を捕食し、これらの有機酸を生成したと考えられた。本実験では酢酸、プロピオン酸以外の有機酸は検出されなかった。

図3に、この培養実験期間中の全COD、溶解性COD、有機酸、メタンから算出したCOD物質収支を示す。*E. coli* のみの系と比較して *Cyclidium* sp. と *E. coli* を接種した系では、培養期間とともに固形性CODが減少し、溶解性CODが増加した。しかし、本実験で検出された酢酸及びプロピオン酸は溶解性CODに占める割合が低かった。*E. coli* のみの系では、有機酸以外の溶解性CODの増加は見られなかったため、*Cyclidium* sp. の捕食作用によって有機酸ではない溶解性有機物が排出されていることが示唆された。原生動物種の中には、有機酸だけでなくアミノ酸などの溶解性有機物を生成し、細菌に供給していることが知られている⁵⁾。*Cyclidium* sp. も同様にアミノ酸を生成している可能性があり、今後は有機酸だけでなく、アミノ酸などの溶解性有機物が原生動物の代謝物として生成されるかを詳細に調査する必要がある。

4. 結論

本研究では、*E. coli* を基質として、嫌気性原生動物 *Cyclidium* sp. の培養を行い、細菌捕食速度と代謝物を調査した。その結果、*Cyclidium* sp. は一個体当たり、1時間に 1.2×10^3 cells の *E. coli* を捕食していた。また、有機酸及びCOD物質収支の推移を調査した結果、*Cyclidium* sp. は代謝物として、プロピオン酸と酢酸だけでなく、溶解性有機物を生産していることが示唆された。

参考文献

- 1) Madoni, P. (1994). *Wat Res*, 28:67-75.
- 2) Fenchel, T. and Finlay, B.J. (1990). *FEMS Microbiol. Ecol*, 74:269-276.
- 3) Hirakata, Y *et al.*, (2016). *M&E*, 31:279-287.
- 4) Clarke, K. J. *et al.*, (1993). *Eur J Protistol*, 29: 262-270.
- 5) Nagata, T. and Kirchman, D.L. (1991). *Limnol Oceanogra*, 36:433-443.

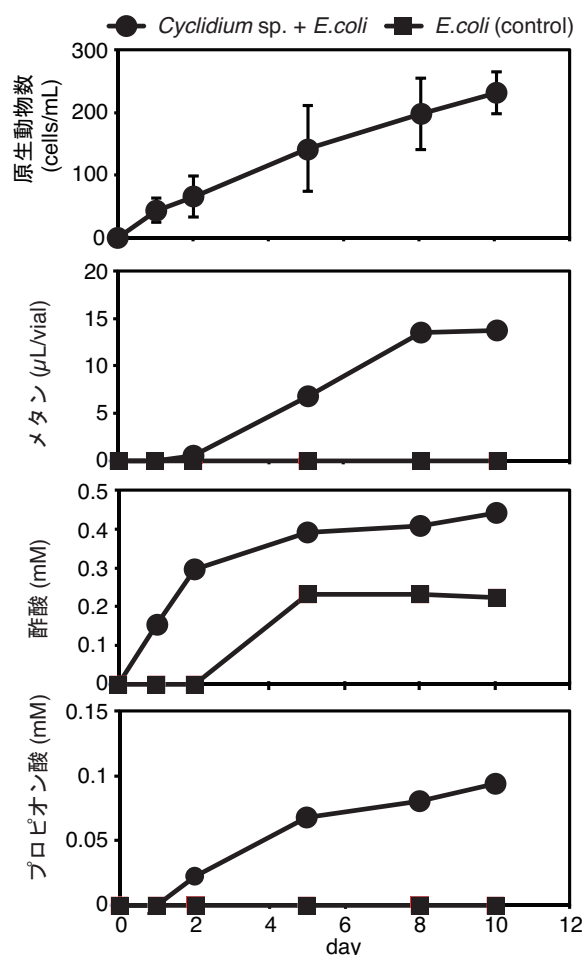


図2 培養実験における原生動物の個体数、メタン生成量、培地中の酢酸濃度、プロピオン酸濃度の推移

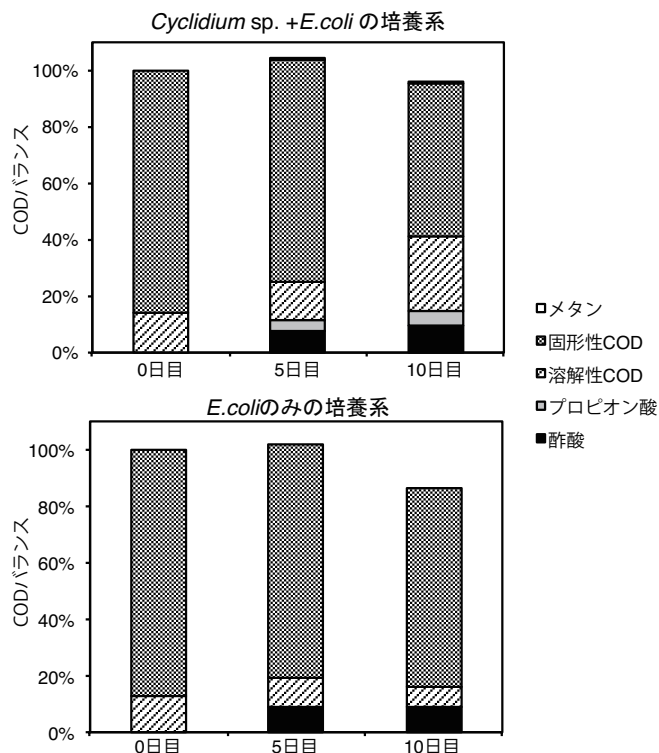


図3 培養実験期間のCOD物質収支