

B-11 廃水処理汚泥内における 真核生物の多様性解析と特異的検出

○松林 未理^{1*}・久保田 健吾¹・原田 秀樹¹

¹東北大学大学院工学研究科土木工学専攻（〒980-8579宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06）

* E-mail: miri.matsubayashi@water.civil.tohokuac.jp

1. はじめに

生物処理の反応槽内には原核生物、原生生物、微小後生動物など多様な生物が存在し、複雑な生態系を構築している。生態系の高次に位置する真核生物は、直接・間接的に排水処理に寄与しており、原核生物だけでは十分な排水処理ができないことが知られている。真核生物のコミュニティ評価では、高度な装置や技術を必要とせず、サンプル中における生物群を直接評価することができる顕微鏡観察による検出・同定が行われてきたが、顕微鏡観察のみでは、判断しにくい真核生物や微小真核生物も存在する。さらに、分類上の形態的特徴に関する情報がない場合、分類することができない。そこで客観的な指標で真核生物のコミュニティを評価する方法として、18S rRNA 遺伝子配列を用いて、真核生物の群集構造を解析する技術が発展してきている^{1,2)}。

我々の研究グループでは、活性汚泥法、オキシデーションディッチ法、散水ろ床法、Down-flow Hanging Sponge (DHS) リアクタなどの好気性廃水汚泥内における真核生物群集構造解析を行い、どのような真核生物が汚泥内で優占しているのかについて明らかにし、活性汚泥内における真核生物の重要性を示唆した³⁾。そこで本研究では、余剰汚泥の減量やエネルギー回収を担う嫌気性消化槽における真核生物の重要性に着目し、18S rRNA 遺伝子を用いて真核生物群集構造を明らかにすることを試みた。

2. 実験方法

(1) 供試汚泥、DNA抽出

供試汚泥には、N処理場（2012年12月）、K処理場（2013年1月）、M処理場（2013年3月）、S処理場（2013年12月、2014年2月）の嫌気性消化槽から採取したものをを用いた（括弧内は、採取月を示す）。汚泥サンプルは、PBS (Phosphate-buffered saline; 137 mM NaCl, 8.10 mM Na₂HPO₄,

2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄ [pH 7.4]) を用いて洗浄後、ISOIL for Beads Beating (NIPPON GENE) を用いてDNAを抽出した。

(2) 18S rRNA遺伝子解析

18S rRNA遺伝子の増幅には、EukA (5'-AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT-3') とEukB (5'-TAG TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC-3') のプライマーセットを用いた。PCRは、TaKaRa ExTaq Hot Start Version (TaKaRa) を用いて、98°C 10秒、55°C 30秒、72°C 150秒のサイクルを25サイクル行った後、72°Cで10分間反応させた。増幅PCR産物は、MicroSpin S-400 HR (GE Healthcare)で精製した後、TaKaRa Taq (TaKaRa)を用いて、A-Tailを付加した。それをMinElute PCR Purification Kit (Qiagen)で精製した後、TOPO 2.1 TA Cloning Kit (Invitrogen)を用いてクローニングを行った。N処理場、K処理場、M処理場、S処理場（2013年採取）、S処理場（2014年採取）の嫌気性消化槽の汚泥サンプルからそれぞれ58, 57, 59, 57, 57クローンを採取し、それらの塩基配列をタカラバイオ株式会社 (<http://catalog.takara-bio.co.jp/jutaku/>) に委託し、決定した。シーケンスデータは、mothurを用いて、98%を閾値としたOperational Taxonomic Unit (OTU) に分類した。Chao1は、Estimate S ver. 8.2.0, CoverageおよびEvennessは既報の算出方法から導いた^{4,5)}。

3. 実験結果および考察

(1) 嫌気性消化槽の真核生物群集構造

シーケンス解析に供した288クローンの内、信頼性のあるシーケンスデータが得られ、かつM13fおよびM13rで解読した塩基配列が結合し、18S rRNA遺伝子のほぼ全長が得られたクローン数は、245であった。そのうち3クローンはsilvaデータベースのクオリティチェックにて除外され、さらに14クローンは古細菌に属したため解析から

除いた（古細菌のクローン数の内訳：N処理場、1; K処理場：2, M処理場：7, S処理場：4）。真核生物に属したクローンの塩基配列情報から作成したクローンライブラリを表1に示す。18S rRNA遺伝子相対性98%を閾値としたOTU数は、N処理場、K処理場、M処理場、S処理場（2013年採取）、S処理場（2014年採取）でそれぞれ17, 14, 24, 25, 21となった。Evennessは、全サンプルが0.75以上であったことから、汚泥内における真核生物の均等性が高いことが示された。一方Coverageは最大でも0.68であったことから、クローン数をさらに増やして、解析を行う必要がある。特にM処理場では、7クローンが古細菌に分類され、最終的な真核生物のクローン数が38クローンと少なくなった。

真核生物に属した全228クローンの内、Fungiが約70%（157/228クローン）を占め、さらにCryptomycota門のLKM11系統群に属するクローンがFungiの77.0%（121/157クローン）を占め、優占していることが分かった。Cryptomycota門の次にFungi内において優占していたのはAscomycota門であったが、その割合は17.2%（27/157クローン）とLKM11の1/5程度であった。活性汚泥法においても、LKM11はFungiの70%以上を占めていた³⁾ことから、下水処理において何らかの役割を果たしている重要な真核生物であることが推察された。また、Fungi以外には、Alveolata, Chlorophyta, Metazoa, Cercozoaに属するクローンがそれぞれ、14.0%（32/228クローン）、7.9%（18/228クローン）、6.1%（14/228クローン）、0.8%（2/228クローン）を占めていた。

N処理場で最も優占していたOTUはLKM11系統群に属しており、N処理場の全クローン数の35.8%（19/53クローン）を占めていた。

K処理場、S処理場（2013年採取）、S処理場（2014年採取）では、Alveolata門 Protalveolata門 Perkinsidae科 A31が最も優占し、各サンプルの全クローン数における割合はそれぞれ、20.5%、18.8%、20.0%であった。N処理場とM処理場では、この系統群に属するOTUは検出されなかった。しかしながら、K処理場、S処理場のように異なる処理場で異なる余剰汚泥を消化する環境から共通して得られていることから、最も多く検出されたAlveolataは、嫌気性消化槽の中で重要な役割を果たしている可能性が考えられる。我々の研究グループでは、活性汚泥法においてAlveolataが多数検出されたが、その多くはCiliophora門であった³⁾ことからProtalveolata門は、嫌気条件下において優占する種であることが考えられる。次に優占していたOTUはLKM11系統群に属しており、K処理場、S処理場（2013年採取）、S処理場（2014年採取）における割合はそれぞれ18.2%（8/44クローン）、14.6%（7/48クローン）、15.6%（7/45クローン）であった。

M処理場で最も優占したOTUは、Animalia界 Arthropoda

表-1 各気性消化槽におけるクローンライブラリ

	N処理場	K処理場	M処理場	S処理場 (2013)	S処理場 (2014)	all
No. of sequences	53	44	38	48	45	228
No. of OTU	17	14	24	25	21	93
Chao1	53	46	53	61	33	180
Coverage	0.68	0.68	0.37	0.48	0.53	0.59
Evenness	0.75	0.85	0.93	0.89	0.89	0.87

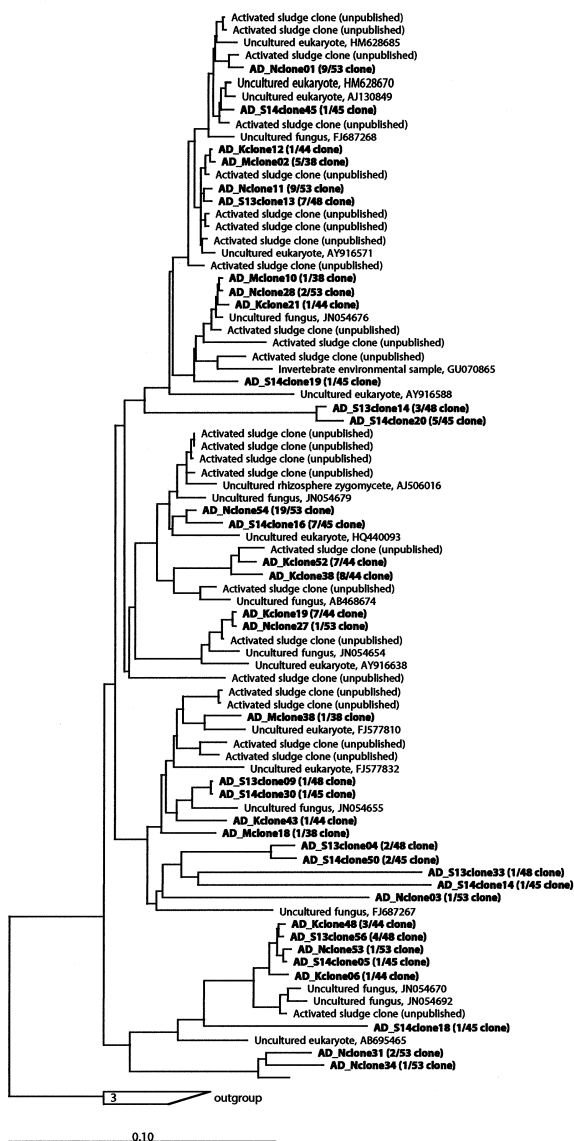


図-1 LKM11グループに属したクローン系統樹

門 Chelicerata 亜門 Arachnida 綱に属し、その割合は15.8%であった。次にLKM11に属するクローンが優占し、13.2% (5/38クローン) を占めていた。M処理場で最も多く検出されたArthropoda門は、DHSリアクタにおいても多く検出されている。DHSリアクタにおける真核生物群集構造は、Fungi (44%) およびMetazoa (45%) を主体とした構成であり、FungiではLKM11, MetazoaではArthropoda およびPlatyhelminthesに属すOTUが大半を占めている。さらに、Arthropodaの中では、Arachnida 綱に属する *Acotyledon paradoxa*, *Sarcassania nesbitti* が優占していた。M処理場においても、Arachnida綱が優占したが、DHSリアクタから得られたクローンと本研究で得られたクローンの遺伝子相性は高くないため、別のOTUであることがわかった。また、M処理場は、他の嫌気性消化槽と多少異なるOTUが見られた。この要因の一つとして、N処理場、K処理場、S処理場の嫌気性消化槽は、活性汚泥法の余剰汚泥処理をしているのに対して、M処理場では、散水ろ床法の余剰汚泥処理であることが考えられる。

図1に本研究で最も多くのクローンが属したLKM11系統群の系統樹を示す。系統樹中の太字が本研究で得られたクローン、Activated sludge cloneは、活性汚泥から検出されたLKM11を示す (Matsunaga et al., unpublished results)。嫌気性消化汚泥中に存在するLKM11系統群に属する真核生物は、分子系統学的に様々に分岐しており、多様性が高いと考えられる。

湖においてクロロフィルa 濃度が高いときにLKM11が多く検出されたという報告⁹⁾がある。例えば、M処理場では、クロロフィルaを備えたChlorophytaが40% (9/23クローン) 程度を占めていたことから、ChlorophytaとLKM11の関連性が示唆された。また、同一の報告⁹⁾からCercozoaが多いときには、LKM11が少なく、Cercozoaが少ないときには、LKM11が多く得られたという結果が書かれており、本研究では、Cercozoaは、M処理場とS処理場 (2014年採取) において、1クローンずつしか検出されなかったことからCercozoaとLKM11においても関連性がある可能性が考えられた。LKM11は1999年に初めて湖の堆積物から検出され、その後、土壌、海、活性汚泥法、DHSリアクタでも検出されている。また、本研究は嫌気性消化槽においてLKM11が優占することを明らかにした最初の報告である。未培養クラスターであり、未だに知見の乏しいLKM11が川や土壌などの自然環境中だけではなく、本研究においてN処理場、K処理場、M処理場、S処理場のすべてから検出されたことにより、好気的環境だけでなく、嫌気的環境においても重要な役割を担っている可能性がある。今後は、汚泥内にどのくらい生息し、実際にどのような働きを担っているのかについて明らかにする必要がある。そこで、本研究では全長を決定することができなかった43クローンに

おいても再度シーケンス解析に供し、288クローンすべての全長を決定後、プローブを作製し、FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) 法を用いて、嫌気性消化槽で検出されたLKM11の存在量や活性の特異的検出を行う。さらに、LKM11が活性汚泥内でどのような役割を果たしているのか、その生態について明らかにしていく。

謝辞：本研究はJST-JICA国際科学技術共同研究推進事業 (SATREPS)、および科学研究費補助金の支援を受けた。

参考文献

- 1) Marsh, T. et al. Beginning a molecular analysis of the eukaryal community in activated sludge, *Water Science & Technology*, 37 (4-5) 455-460, 1998.
- 2) Moreno, A. et al. Identification of ciliate grazers of autotrophic bacteria in ammonia-oxidizing activated sludge by RNA stable isotope probing, *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 2203-2211, 2010.
- 3) 松永健吾, 久保田健吾, Erica Vonasek, 竹村泰幸, 原田秀樹: 18S rRNA 遺伝子情報を用いた排水処理汚泥の真核生物群集構造解析, 土木学会論文集 G (環境), 68(7), III_13-III_19, 2012.
- 4) Good I.J. The population frequencies of species and the estimation of population parameters, *Biometrika*, 40, 237-264, 1953.
- 5) Magurran A. E. Measuring Biological Diversity, Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2004.
- 6) Cecile, L. et al. Succession and Regulation Factors of Small Eukaryote Community Composition in a Lacustrine Ecosystem (Lake Pavin), *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 2971-2981, 2006.