

(29)

肉食性原生動物 *Dileptus anser* の増殖特性

The Growth Characters of Carnivorous Protozoa *Dileptus anser*

小浜暁子*, 金主鉉*, 山田一裕*, 西村修*, 稲森悠平**, 須藤隆一*

Akiko KOHAMA*, Ju-Hyun KIM*, Kazuhiro YAMADA*, Osamu NISHIMURA*,

Yuhei INAMORI**, and Ryuichi SUDO*

Abstract; Positive effects of protozoa on mineralization of the organic compounds were clarified in the wastewater treatment process. In particular, bacterivorous protozoa are known to be the most important grazers and predators of bacteria and cause a decrease of biomass in wastewater. However, the role of carnivorous protozoa in a wastewater treatment process has so far not been reported. In order to know the role of carnivorous protozoa in micro-ecosystem, the effect of protozoan species as prey organisms, concentration of prey organisms, and temperature on the growth characters of carnivorous protozoa, *Dileptus anser* were investigated. The results can be drawn.

Dileptus anser was found to be a wide ranging polyphags. The calculated predation rate for *Tetrahymena pyriformis* was $140 \text{ cells} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$. The maximum specific growth rate of *Dileptus anser* using *Tetrahymena pyriformis* was 1.22 day^{-1} at 30°C and ΔE was $74.0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Removal rate of DOC (Dissolved Organic Carbon) in batch culture experiment by adding *Dileptus anser* was 40.2% and biodegradability was higher than that of no addition (23.3%). The presence of *Dileptus anser* enhanced the degradation activities of DOC in the detritus food web.

Key words; *Dileptus anser*, growth characters, predation, organic compounds, detritus food web

1.はじめに

地域から地球規模に至るさまざまな環境問題の中でも、水質汚濁問題はとくに緊急な改善を要する問題である。その汚濁源として挙げられる家庭や工場などからの有機排水は、主に生物学的手法によって処理が行われているが、難分解性有機物や微生物量有害化学物のような排水水質の多様化に伴い、より高度な処理水質を達成するための技術が求められている。この一方法として、遺伝子工学の導入による有用微生物の開発が注目されているが、排水処理は多成分系であり定着化が困難であることや、自然界での挙動が未知であることから、ほとんど応用に至っていない。

一方、生物処理施設の反応槽内では、栄養段階の異なるさまざまな微生物(細菌・原生動物・微小後生動物)から構成される微生物生態系が水質変換、すなわち処理を司っている。これら微生物の腐生連鎖により、排水処理過程に

* 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 (Graduate School of Engineering, Tohoku university)

** 国立環境研究所 (National Institute for Environmental Studies)

において有機物が分解される。腐生連鎖の上位を占める原生動物の役割は、(1)無機態窒素、リンの化合物といった原生動物の排泄物が、細菌の炭素同化を促進する¹⁾ (2)原生動物が、細菌の活性を上昇させる増殖促進物質を分泌する²⁾ (3)細菌のプロキユレーションを促進して、細菌の沈殿効率を高める³⁾ (4)細菌からの原生動物の転換収率はおよそ0.5であるので、細菌を捕食することによりバイオマスが減少する、などが挙げられ、処理過程に及ぼす影響は大きいと考えられる。したがって、微生物間相互作用を最大限に利用することにより、デトリタスおよび有機物などの分解能を強化することが可能になる。しかし、微生物生態系は非常に複雑であり、研究方法が煩雑であることから、腐生連鎖における微生物間の共生、競争、捕食などの生態学的相互関係は未だに明らかになっておらず、さらに生態工学的手法、すなわち高い機能を持つ微生物群集の構築方法は確立されていない。

そこで本研究では、微生物生態系を理解し、制御手法を確立するための第一段階として、腐生連鎖の最上位に位置する肉食性原生動物 *Dileptus anser* に着目した。排水処理施設に出現する肉食性原生動物としては、繊毛虫類 *Dileptus* sp., *Didinium* sp., *Coleps* sp., 吸管虫類 *Podophrya* sp.等が知られている³⁾。出現率は原生動物の総個体数に対し0~15%と低い⁴⁾が、これらが出現している施設の処理水質はBODが10mg・l⁻¹以下と良好な場合が多い³⁾。これは、肉食性原生動物が細菌捕食性原生動物の現存量や活性に対する直接的な制御因子となり、さらに細菌の有機物分解能に影響を及ぼすためと考えられる。とくに、*Dileptus anser* は他の生物と比較して運動性が高く、また大型であるため大きな捕食量が期待できる、さらに生理特性に関する知見⁴⁾⁵⁾はいくつか得られている、という点から、肉食性原生動物の役割を明らかにするために有用である。しかし、これまで *Dileptus anser* に対する環境因子の影響や *Dileptus anser* が下位の生物や周囲の環境にどのような影響を与えるかという、生態学的意義に関する研究はほとんど行われていない。そこで、*Dileptus anser* の増殖特性として餌生物の種、濃度、温度の影響について検討するとともに、肉食性原生動物の有無が腐生連鎖による有機物分解機能に及ぼす影響を検討した。

2. 研究方法

2.1 供試動物 *Dileptus anser* の特徴

Dileptus anser は原生動物繊毛虫類に属し、おもに湖沼、排水処理の活性汚泥や生物膜に出現する。*Dileptus anser* は他の原生動物を捕食する肉食性として知られている⁵⁾。体長は250~800 μm と原生動物の中でも大型であり⁶⁾、形態は写真-1に示したように、細胞の先端部が長く伸び、その基部に細胞口を有している。捕食の際は餌生物に毒胞を発射し、動きが鈍くなったところで細胞口から餌生物を取り込むという特徴がある⁷⁾。

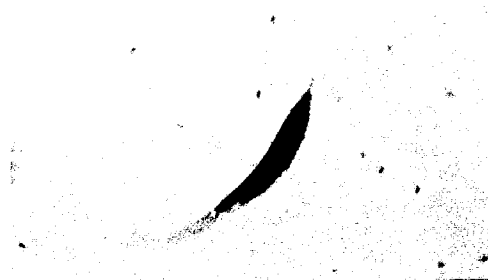


写真-1 *Dileptus anser* の形態

2.2 *Dileptus anser* の分離、継代培養

湖沼において採取された試料から *Dileptus anser* をピペット洗浄法⁸⁾で分離した。6日間前培養した餌生物を直径60mmのディスポーザブルシャーレに5ml分注し、これに *Dileptus anser* を接種し、20℃の好気暗条件下で静置した。また増殖した *Dileptus anser* の植え継ぎは、新しい餌生物の培養液に5~10cellsになるように接種して行った。

2.3 *Dileptus anser* の比増殖速度の算出方法

Dileptus anser の比増殖速度は以下の式を用いて算出した。

$$\mu = \frac{1}{t} \ln \frac{N_t}{N_0} \quad (1)$$

ここで、 μ : 比増殖速度 (day⁻¹)、 t : 時間 (day)、 N_0 , N_t : $t=t_0$, t における *Dileptus anser* の個体数(cells)である。

2.4 餌生物の影響

湖沼で採取した試料中において、*Uronema* sp., *Aspidisca* sp.等の繊毛虫類が *Dileptus anser* に捕食されているのが観察された。また既往の知見から、原生動物のみでなくさらに大型の扁形動物 *Planarian* も捕食するなど、広食性であることが明らかになっている⁴⁾⁵⁾。しかしどの生物をどのくらい捕食するかという点については定量的には明らかになって

いない。そこで、原生動物 7 種類および後生動物 1 種類を *Dileptus anser* の餌生物として供試し、嗜好性を調べ、さらに *Tetrahymena pyriformis*, *Colpidium* sp., *Uronema* sp. を餌生物とした場合の増殖特性を検討した。

2.4.1 餌生物の選定・培養方法

培養に用いた CE 培地は、Cereal leaves Dehydrated (SIGMA) $1\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ と EGG YORKS Chicken Dried (SIGMA) $1\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ をそれぞれ 10 分間煮沸後ろ過し (東洋 No.5)、等量混合したものであり、滅菌後の pH が 7.0 になるように調整した。TOC は約 $110\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であった。*Dileptus anser* の餌生物である繊毛虫類の食物源である細菌は、排水処理施設で検出される *Alcaligenes faecalis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* 等を混合して用いた。餌生物種の影響に関する実験では、原生動物 7 種 (*Tetrahymena pyriformis*, *Colpidium* sp., *Uronema* sp., *Vorticella* sp., *Paramecium* sp., *Blepharisma* sp.)、および後生動物 1 種 (*Colurella* sp.) を、増殖特性に関する実験では *Tetrahymena pyriformis* を、有機物分解機能に及ぼす影響に関する実験では *Colpidium* sp. を用いた。これらを CE 培地を三角フラスコに分注後、各生物を接種し、 20°C において 6 日間培養し、餌生物として供した。すなわち増殖した餌生物培養液を 60mm ディスポーザブルシャーレに 5ml 分注し、継代培養した *Dileptus anser* を 10 個接種し、比増殖速度を求めた。

2.4.2 餌生物濃度の影響

一般に、微生物細胞の比増殖速度と制限基質濃度の関係は Monod の式によって示すことができる³⁾。一定の基質濃度以下では、比増殖速度と基質濃度は比例関係にあり、最大比増殖速度 ($\mu_{\max}$) と飽和定数 (K_s) が求められる。そこで、*Tetrahymena pyriformis* を餌生物とした場合、餌生物濃度が *Dileptus anser* の増殖に与える影響を検討した。前培養した *Tetrahymena pyriformis* を、pH7.2 の 1/150M リン酸緩衝液を用いて 2,000rpm で 5 分間遠心分離を 2 回くりかえし、洗浄および集積した。これを滅菌水に希釈して 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , $1\times 10^5\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ になるよう調整後、ディスポーザブルシャーレに 5ml 分注し、pH7.2 の 1/150M リン酸緩衝液で洗浄した *Dileptus anser* を 10cells 接種した。 20°C の恒温室内に静置し 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 日目に計数を行った。実験は各 3 連で行った。

2.4.3 捕食個体数の算出

対数増殖期にある *Dileptus anser* と、餌生物として供与した *Tetrahymena pyriformis* の個体数の変化から、*Dileptus anser* の比増殖速度および 1 日あたりの捕食個体数を求めた。

t 日目の *Dileptus anser* の個体数は、

$$N_t = N_0 \cdot e^{\mu t} \quad (2)$$

と表される。ここで、 $N_{0,t}$: 0, t 日目 *Dileptus anser* の個体数 (cells), μ : 比増殖速度 (day^{-1})

また、 t 日目の *Tetrahymena pyriformis* の個体数は、この期間に *Tetrahymena pyriformis* が増加せず、さらに捕食以外では減少しないことが確認されていることから、

$$C_t = C_0 - \int_0^t \alpha \cdot N_x dx \quad (3)$$

と表される。ここで、 $C_{0,t}$: 0, t 日目 ($t \geq 0$) の *Tetrahymena pyriformis* の個体数 (cells), α : *Dileptus anser* 1 個体 1 日あたりの *Tetrahymena pyriformis* 捕食個体数 (cells)。

式 (3) に式 (2) を代入して、

$$C_t = C_0 - \int_0^t \alpha \cdot N_0 \cdot e^{\mu x} dx \quad (4)$$

$$C_t = C_0 - \alpha \cdot N_0 \cdot \frac{e^{\mu t} - 1}{\mu} \quad (5)$$

ここに、実験より得られた値を代入し、1 日あたりの捕食個体数 α を算出した。

2.5 *Dileptus anser* の増殖に及ぼす温度の影響

Dileptus anser の生理的特性の把握および維持管理のために、温度の検討は重要である。そこで、 11°C , 15°C , 20°C , 25°C , 30°C , 35°C , 40°C において培養を行った。実験には *Tetrahymena pyriformis* を CE 培地において 6 日間

前培養し、 $20,000\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ まで増殖させたものを培養液とした。ディスポーザブルシャーレに *Tetrahymena pyriformis* 培養液を 5ml 分注し、継代培養した *Dileptus anser* を pH7.2 の 1/150M リン酸緩衝液で洗浄後、10cells となるように接種した。各温度に設定したインキュベーター内に静置し、0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 日目に計数を行った。実験は各 3 連で行った。

2.6 *Dileptus anser* の腐生連鎖における有機物分解機能に及ぼす影響

Dileptus anser の増殖速度が最も高かった *Colpidium* sp. を餌生物として用いて、肉食性原生動物 *Dileptus anser* の腐生連鎖における有機物分解機能に及ぼす影響を検討した。すなわち、有機物を添加した細菌懸濁液に細菌捕食性原生動物 *Colpidium* sp. を接種した系、およびさらに *Dileptus anser* を接種した二つの系について比較し、*Dileptus anser* の存在が *Colpidium* sp. 培養液の DOC 減少に与える影響を調べた。200ml 三角フラスコに CE 培地を 100ml 分注し、オートクレーブで 121°C 、15 分間滅菌後、*Colpidium* sp. を接種して前培養を行い、 $13,000\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ に達したとき、*Dileptus anser* 接種系にはリン酸緩衝液で洗浄した *Dileptus anser* を 100cells 接種した。*Dileptus anser* の接種後 0, 6 日目に培養液 10ml を採取し、微生物数の測定および $0.45\mu\text{m}$ メンブランフィルターでろ過後、DOC(溶存態有機炭素)の測定に供した。

3. 結果および考察

3.1 餌生物種の影響

Dileptus anser に *Colpidium* sp., *Uronema* sp., *Tetrahymena pyriformis*, *Aspidisca* sp., *Paramecium* sp., *Blepharisma* sp., *Vorticella* sp., *Colurella* sp. を餌生物として与えたところ、すべての種に対して捕食が確認された。*Dileptus anser* は広食性であるといえ、食物源に関しては環境条件の変化に対する適応性が高いことが示唆された。一方、増殖速度は餌生物の種類によって異なり、*Tetrahymena pyriformis*, *Colpidium* sp. および *Uronema* sp. を用いた場合、 20°C における *Dileptus anser* の比増殖速度はそれぞれ 0.46day^{-1} , 0.50day^{-1} , 0.20day^{-1} と異なる結果が得られた。*Tetrahymena pyriformis* または *Colpidium* sp. が *Uronema* sp. よりも餌生物として適していることが明らかであった。*Uronema* sp. は培養期間中、個体濃度が高かったにも関わらず、*Tetrahymena pyriformis* を餌生物としたときの方が *Dileptus anser* の比増殖速度が高かった。これは *Uronema* sp. は体長が $30\sim 50\mu\text{m}$ と小さくて動きが速く、*Dileptus anser* による捕食を回避し易いのに対し、*Tetrahymena pyriformis* は体長 $50\sim 100\mu\text{m}$ で *Uronema* sp. と比較すると動きが緩慢で、捕食され易いことが原因である。以上のことから *Dileptus anser* の増殖因子に関わる餌生物の影響としてはその種類のみならず大きさや運動能力が重要であることが明らかであった。

3.2 餌生物初期濃度の影響

Tetrahymena pyriformis を食物源とした場合の *Dileptus anser* の比増殖速度 (μ) と *Tetrahymena pyriformis* 濃度の関係を図-1 に示した。本実験の範囲では、 μ と餌生物である *Tetrahymena pyriformis* の濃度の関係が Monod 式により近似できた。通常、基質-細菌あるいは細菌-原生動物の濃度関係はこの Monod 式により説明できるが、細菌捕食性原生動物とその捕食者である肉食性原生動物においても同様の関係が認められた。

Monod 式は以下の式によって示される。

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \quad (6)$$

ここで、 $\mu_{\max}$ =最大比増殖速度 (day^{-1})、 K_s =飽和定数、 S =餌生物濃度 ($\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$)

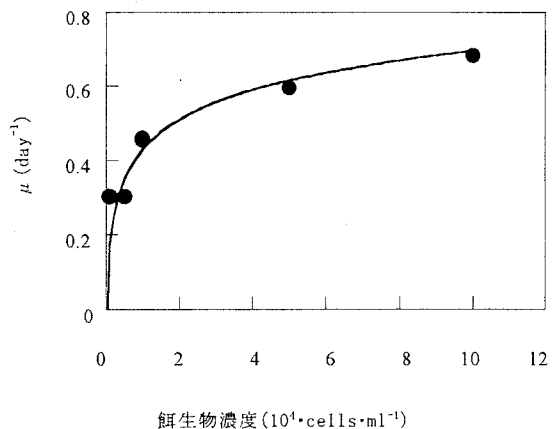


図-1 *Dileptus anser* の増殖に及ぼす餌生物濃度の影響

である。

式(6)から比増殖速度と基質濃度の逆数を取り、Lineweaver-Burkのプロット(図-2)によって、最大比増殖速度 $\mu_{\max}$ と最大比増殖速度の $1/2$ にあるときの基質濃度を示す飽和定数 K_s を算出した。その結果、 20°C において、*Tetrahymena pyriformis* を食物源とした場合の *Dileptus anser* の $\mu_{\max}$ は 0.71day^{-1} 、 K_s は $6.5 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ であった。

3.3 *Dileptus anser* の捕食個体数の算出

Tetrahymena pyriformis の初期個体数 $1.4 \times 10^5 \text{ cells}$ 、*Dileptus anser* の初期個体数 20 cells で実験を行ったとき、*Tetrahymena pyriformis* は 7.5 日間で捕食し尽くされ、このときの *Dileptus anser* の最大個体数は 640 cells であった。これから、比増殖速度 $0.46 (\text{day}^{-1})$ と計算された。これらの値を式(5)に代入すると、*Dileptus anser* が一日あたりに捕食する *Tetrahymena pyriformis* はおよそ 110 個体となる。他のデータを用いて検証した結果、 $110 \sim 150$ 個体とやや変動が見られたが、平均値 140 個体を用いると、いずれも適用できることがわかった。 t 日目に *Tetrahymena pyriformis* の個体数が 0 となると、初期個体数 N_0 の *Dileptus anser* を t 日間維持するのに必要な *Tetrahymena pyriformis* の初期個体数 C_0 を以下の式により予測することができた。

$$C_0 = 140 \cdot N_0 \cdot \frac{e^{\mu t} - 1}{\mu} \quad (7)$$

また、*Dileptus anser* の倍化時間 t_d は、

$$t_d = \frac{0.693}{\mu} \quad (8)^{3)}$$

より、*Dileptus anser* が倍化するのに 1.5 日を要し、およそ 210 個体の *Tetrahymena pyriformis* を必要とすることが明らかとなった。

3.4 温度の影響

微生物活性には温度が大きな影響を及ぼしている。図-3 は培養温度条件を $15 \sim 40^{\circ}\text{C}$ に変化させたときの *Dileptus anser* の比増殖速度と温度の関係を Arrhenius プロットしたものである。破線部 ($15 \sim 30^{\circ}\text{C}$) において、Arrhenius 式が成り立つとして、*Dileptus anser* の増殖に及ぼす温度の影響を検討した。

Arrhenius 式は以下のように示される。

$$\log \mu = -\frac{\Delta E}{2.303RT} + b \quad (9)$$

ここで、 ΔE = 活性化エネルギー ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)、 R = 気体定数 ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)、 T = 絶対温度 (K)、 b = 定数。

Dileptus anser の比増殖速度 (μ) は、 15°C から 30°C の間では温度の上昇に伴い次第に増

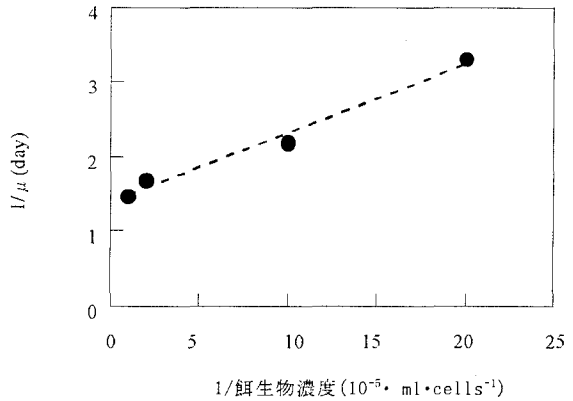


図-2 *Dileptus anser* の増殖に及ぼす餌生物濃度の影響

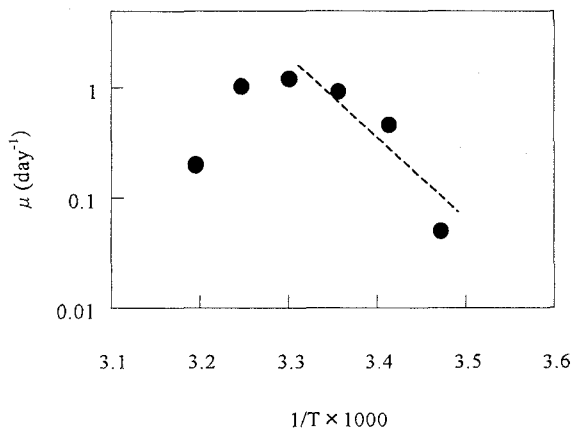


図-3 *Dileptus anser* の増殖に及ぼす温度の影響

加し、30℃において 1.22d⁻¹ と最大となり、35℃以上で低下が見られた。生物反応は酵素反応であるため、15℃以下および35℃以上では活性が低下したと考えられる。

Arrheniusプロットにおける直線の傾きから活性化エネルギー ΔE を算出すると、74.0kJ $\cdot$ mol⁻¹であった。この値は、これまで明らかにされている原生動物 ³⁾*Tetrahymena pyriformis* の 77.0kJ $\cdot$ mol⁻¹、*Vorticella microstoma* の 76.5kJ $\cdot$ mol⁻¹、*Aspidisca costata* の 57.7kJ $\cdot$ mol⁻¹ と比較して同程度かやや大きいことが明らかとなった。また、35℃、40℃でも生存が確認され、高温耐性であることがわかった。しかし、*Tetrahymena pyriformis* は 33℃以上になると死滅するという知見があり⁹⁾、実際 35℃、40℃において *Tetrahymena pyriformis* は観察されず、餌生物とはなり得ないことから、複数の餌生物が存在した場合、温度変化に伴い、*Dileptus anser* の餌生物は変化することが示唆された。

3.5 *Dileptus anser* の腐生連鎖における有機物分解機能に及ぼす影響

Dileptus anser の腐生連鎖における有機物分解機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、*Dileptus anser* 接種系および非接種系の培養液のDOC減少率、*Dileptus anser* 個体数変化、*Colpidium* sp. 個体数変化を調べた。餌生物としては *Dileptus anser* の比増殖速度が最も高かった *Colpidium* sp. を用いた。結果を図-4 に示した。

DOC減少率は *Dileptus anser* 接種系で 40.2%、非接種系で 23.3%であり、*Dileptus anser* を接種した方が減少率が高く得られるという結果が得られ、*Dileptus anser* が存在すると培養液のDOC減少率が向上することが明らかになった。この要因として、以下のような現象が予測される。(1) *Dileptus anser* が *Colpidium* sp. を捕食したため *Colpidium* sp. が減少し、*Colpidium* sp. の食物源である細菌の数が増加した。細菌はDOCを直接摂取するので、増加した分だけDOCが減少した。(2) *Dileptus anser* が *Colpidium* sp. を捕食したため *Colpidium* sp. が減少し、*Colpidium* sp. の食物源である細菌相が変化した。すなわちCE培地の成分を好む細菌が優占化した。(3) 細菌の活性が上がった。*Dileptus anser* の存在により何らかの細菌活性化物質が放出された。

上記の仮説を検証し、腐生連鎖による有機物分解機能強化のメカニズムを明らかにすることが今後の検討課題である。

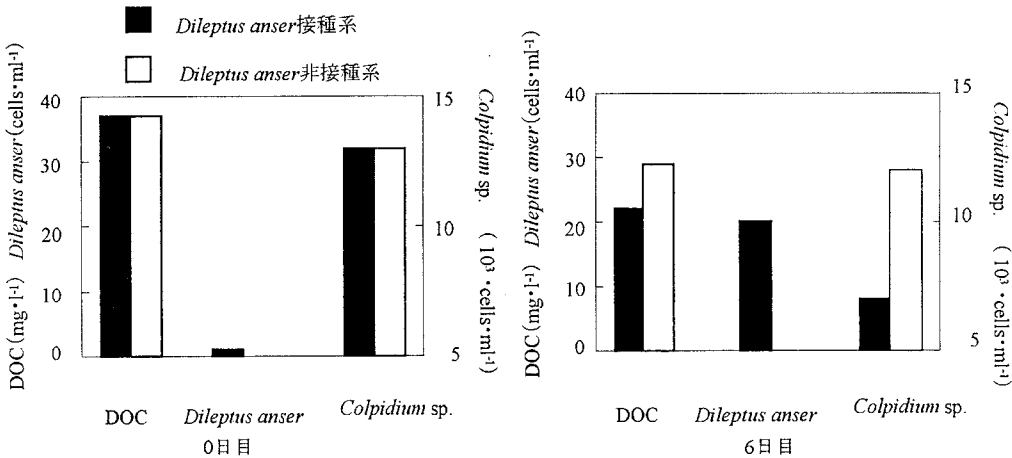


図-4 DOC濃度、*Dileptus anser* および *Colpidium* sp. 数の変化

4. まとめ

本研究より以下のことが明らかになった。

1. *Dileptus anser* は広食性であるが餌生物種によって比増殖速度は異なり、これは餌生物の動きによる捕食からの逃避能が一因であることが推察された。
2. *Dileptus anser* は 20℃において最大比増殖速度 0.71day^{-1} が得られることが明らかになった。
3. *Dileptus anser* は 20℃において 1 日あたり *Tetrahymena pyriformis* を 140cells 捕食し、倍化するのに 1.5day を要し、210cells 必要であることが明らかになった。
4. *Dileptus anser* は 30℃において比増殖速度が最も大きく、 1.22day^{-1} であり、このときの活性化エネルギー (ΔE) は $74.0\text{kJ}\cdot\text{mole}^{-1}$ であった。
5. *Colpidium* sp. 培養液の DOC 減少率は *Dileptus anser* 接種系で 40.2%、非接種系で 23.3% であり、*Dileptus anser* が存在すると培養液の DOC 減少率が向上する、すなわち有機物分解能が強化されることが明らかになった。

謝辞

本研究は、科学技術事業団の戦略的基礎的推進事業「微生物の機能強化による水環境修復技術の確立のための戦略的研究」の「腐生連鎖を組込んだ微生物群集の有機物分解機能強化」班として研究した成果の一部をまとめたものである。微生物培養において御協力をいただいた加藤明子氏他共同研究者の方に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Coleman D.C., Cole C.V., Hunt H.W. and Klein D.A. (1978) Trophic interactions in soils as they affect energy and nutrient dynamics. Introduction. *Microb. Ecol.* 345-349.
- 2) Nibst B. (1984) *Nutrient and Feeding Strategies in Protozoa*. Croom Helm, London.
- 3) 須藤隆一 (1977) 廃水処理の生物学, 638pp. 産業用水調査会, 東京
- 4) Harley P. Brown and Marie M. Jenkins (1962) A Protozoon (*Dileptus*; Ciliata) Predatory upon Metazoa, *Science*, 136, 710.
- 5) L.N. Seravin and E.E. Orlovskaja (1977) Feeding Behavior of Unicellular Animals. I. The Main Role of Chemoreception in the Food Choice of Carnivorous Protozoa. *ACTA PROTOZOOLOGICA*, 16, 3/4, 309-332.
- 6) 下水試験方法 (1997) p.458, 日本下水道協会, 東京
- 7) Stephen Miller (1968) The Predatory Behavior of *Dileptus anser*, *J. PROTOZOOL.* 15, 2, 313-319.
- 8) 重中義信 (1988) 原生動物の観察と実験法, 共立出版株式会社, 東京
- 9) Thormar, H. (1962) Effect of Temperature on the Reproduction Rate of *Tetrahymena pyriformis*, *Experimental Cell Research*, 28, 269-273.