

(5) 有殻葉状仮足虫類 *Arcella vulgaris* の硝化指標性およびその機構

Testacealobosia *Arcella vulgaris* as an Indicator
in Nitrification Process

李 先寧*、小浜暁子*、金主鉉**、千葉信男*、西村修*、須藤隆一**

Xian-Ning LI*, Akiko KOHAMA*, Ju-Hyun KIM**, Nobuo CHIBA*

Osamu NISHIMURA* and Ryuichi SUDO**

ABSTRACT; In order to evaluate Testacealobosia *Arcella vulgaris* as an indicator in nitrification process, the feeding habits on nitrifying bacteria and the effect of nitrogen compounds on the growth characteristics were examined comparing with those of *Vorticella microstoma* and *Opercularia* sp.. In batch culture experiments, it was clear that *A. vulgaris* could grow well with *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* as food bacteria, whereas the growth of *V. microstoma* and *Opercularia* sp. was not observed. In addition, the inhibition effects of $\text{NH}_4\text{-N}$ and $\text{NO}_2\text{-N}$ on the growth of *A. vulgaris* were observed significantly. In continuous culture experiments, the strong relation between the concentration of *A. vulgaris* and nitrification ratio were found due to the close prey-predator relation with nitrifying bacteria and its high sensitivity to $\text{NH}_4\text{-N}$ concentration. It is suggested that *A. vulgaris* is a good indicator for nitrifying process.

KEYWORDS; *Arcella vulgaris*, indicator of nitrification process, inhibition effects of $\text{NH}_4\text{-N}$, *Nitrosomonas europaea*, *Nitrobacter winogradskyi*

1. はじめに

排水の生物処理は、混合培養された細菌、原生動物、後生動物などの栄養段階が異なる微生物群集によって混合基質を除去するプロセスである。このうち活性汚泥や生物膜中に出現する原生動物や微小後生動物は、流入水の性状、処理水質や運転操作条件によってその種構成と現存量が異なり、また顕微鏡で判別できる利点があるために、古くから生物処理における指標生物として用いられている^{1) - 3)}。しかしこれまでの研究は有機物除去を対象とした実施設での検討が多いため³⁾、様々な環境因子や処理方式、運転条件といった現場の特性が細菌および微小動物の消長に与える影響を含み、解析が困難で定量的な評価をしにくいという問題点がある。また、排水処理が有機物除去から窒素・リンなどの栄養塩類の除去も可能な高度処理型となり、生物学的な窒素除去法が下水処理や浄化槽でも一般的に行われるようになった現在でも、それに係わる微小動物の指標性に関する研究は少ない。特に小規模排水処理施設を管理する場合には維持管理における省力化、低コスト化が必須であり、生物相、あるいは特定の指標生物による処理機能の評価、それに基づく管理手法の開発は有効な方法になり得ると考えられる。

既往の調査研究においては、硝化が進行した場合に有殻葉状仮足虫類の出現率が高く、優占化すると報告されている^{4) - 9)}。このような原生動物の出現は硝化の進んだ環境条件と密接な関係にあるのではないかと推測できるが、個体密度と硝化率にどの程度相関があり、なぜそのような相関が得られるのかといった指標性の信頼度に関する検討は少ない。

そこで本研究では、硝化環境に最も出現率が高く、優占化する^{4) - 9)}とされている肉質鞭毛虫門、有殻

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

**埼玉県環境科学国際センター (Center for Environmental Science in Saitama,)

葉状仮足類の *Arcella vulgaris* に着目し、生物学的環境因子としての硝化細菌の存在が *A.vulgaris* の増殖に及ぼす影響を被食・捕食関係の観点から検討した。すなわち、他の原生動物種と比較しながら硝化細菌捕食特性を回分培養実験によって検討した。また、化学的な因子である環境中の窒素形態・濃度が *A.vulgaris* の増殖に及ぼす影響を検討した。さらに連続混合培養実験を行い、硝化の進行に伴う微生物生態系の変化をとらえ、*A.vulgaris* および他の原生動物の消長と硝化の関係を把握し、*A.vulgaris* の硝化指標性及びその機構について検討を行った。

2. 実験方法

2.1 *A.vulgaris* の分離および培養

供試動物の *A.vulgaris* (Photo 1) は排水の生物処理施設で最もよく観察される原生動物の一つである^{4)・6)}。細胞全体はキチン質の殻に覆われ、ドーム状を呈している。核が2個で、殻内に気泡が観察される場合がある。殻表面は滑らかであるが、顕微鏡下ではメッシュ状の模様が見える。若齢期の殻は薄黄色であり、古くなると濃褐色になる。口孔は中央にあり、その部分から運動時や摂食時には指状の仮足を出す。細胞の直径は約 $100\ \mu\text{m}$ ~ $150\ \mu\text{m}$ 、高さは直径の約 $1/2$ である^{10)・11)}。1細胞あたりの平均乾燥重量を測定した結果 $1.94 \times 10^{-5}\text{mg} \cdot \text{cell}^{-1}$ である¹²⁾。

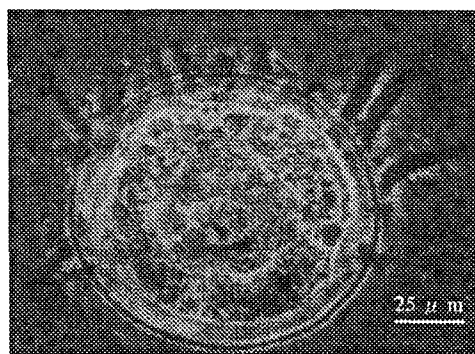


Photo 1 *Arcella vulgaris*

供試原生動物の *A.vulgaris* は、生活排水処理施設の活性汚泥から分離した。分離は、実体顕微鏡の下でペット洗浄法を用いて行った。

培養は、汚泥細菌懸濁液を 32mm のシャーレに 2ml 入れ、分離した *A.vulgaris* を 5~10 個となるように接種し、20℃で静置培養で行った。

汚泥混合細菌懸濁液は以下のように作成した。*A.vulgaris* が優占化した生物反応槽から活性汚泥 1ml を試験管にとり、超音波 (25W、30s) で処理したものを栄養寒天培地に塗抹し、20℃で、5 日間培養後、シャーレに形成されたコロニーを Neff's amoeba saline 液¹³⁾ を用いて洗い取った。そして、洗い取った細菌混合液を 3500rpm で 30 分間遠心分離し、Neff's amoeba saline 液を用いて 3 回洗浄した後、再懸濁させて汚泥混合細菌懸濁液を作成し、実験に用いた。

2.2 *A.vulgaris*、*Vorticella microstoma* および *Opercularia* sp. の硝化細菌捕食特性

硝化が良好に進行する排水処理施設において *A.vulgaris* とともに運動特性が異なる原生動物である繊毛虫類、縁毛目の *V.microstoma* および *Opercularia* sp. が出現すると報告されている^{5)・6)}。この 3 種の原生動物を (財) 発酵研究所から分譲を受けたアンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas europaea* および亜硝酸酸化細菌 *Nitrobacter winogradskyi* の細菌懸濁液を用いて二者培養実験を行い、硝化細菌の捕食特性について検討を行った。

硝化細菌懸濁液の作成については、まず硝化細菌を 10l の培養容器で硝化細菌培地¹⁴⁾を用いて細菌濃度が $10^6 \sim 10^7 \text{cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ になるまで大量培養を行った。そして菌体を含む培養液は無菌条件において $0.2\ \mu\text{m}$ の滅菌フィルターを用いてろ過集菌すると同時に 3 回洗浄を行った。洗浄された菌体を Neff's amoeba saline 液に再懸濁させ、濃度が $2.2 \times 10^8 \text{cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ となるように調整し、実験に用いた。細菌濃度の測定は DAPI 法¹⁵⁾を用いた。

二者培養実験は直径 32mm のシャーレに細菌懸濁液を 2ml 入れ、継代培養した供試原生動物を 5~10 個

となるように接種し、20℃、暗条件で静置培養を行った。実験は全て5系列で行った。なお前培養条件の影響を無くすために増殖が認められた系においては1回植継ぎした後、実験を行った。原生動物の増殖が認められなかった系においては3回以上の接種を行った。

2.3 窒素の形態および濃度が *A. vulgaris* の増殖に及ぼす影響

窒素の形態および濃度が *A. vulgaris* の増殖に与える影響を検討するため、培養液中の $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度を变化させて、*A. vulgaris* の増殖特性について検討した。

Escherichia coli、*Bacillus cereus*、*Pseudomonas putida* の3種の細菌を等濃度に Neff's amoeba saline 液に混合懸濁させ、細菌濃度が $2.2 \times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、pH7.0の細菌懸濁液を作成した。それにろ過滅菌した NH_4Cl 、 NaNO_2 、 NaNO_3 溶液をそれぞれ添加し、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度が $0 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ の間の6～8段階の3系列の細菌懸濁液を作成し、実験を行った。培養は2.2の方法に準じた。

2.4 連続混合培養系における *Arcella* sp. の消長特性

原生動物、特に *A. vulgaris* の消長と硝化進行状況との関係を明らかにするため、連続混合培養を行った。

予備実験においてA下水処理場から採取した活性汚泥を用いて実験したところ、硝化が早い段階で進行し（硝化率95%以上）、微小動物相の変化が見られなかった。そこで本実験では硝化に伴う微小動物相の遷移を明らかにするために、活性汚泥を45℃、15分間加温して微小動物を死滅させ¹⁰⁾、その活性汚泥をFig.1に示した培養リアクターの曝気槽に入れ、Table 1に示した運転条件において実験を開始した。なお滅菌した人工排水には微小動物が存在しないため、実験開始時において加温処理を行わない活性汚泥を4lの曝気槽に対して200ml種汚泥として接種した。種汚泥の主な微小動物種はTable 2に示した。流入排水はTable 3に示したペプトン・肉エキスを主成分とした人工排水を用いた。また、反応槽内のpHを7～8の範囲内に制御するためにアルカリ成分として NaHCO_3 溶液を人工排水に添加した。

サンプリングは24時間ごとに1回を行い、

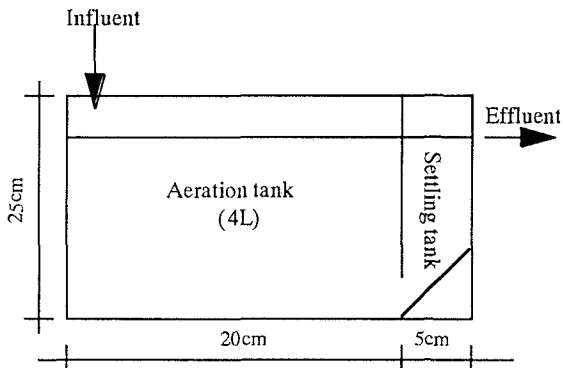


Fig.1 Scheme of continuous culture reactor

Table 1 Operating condition of continuous culture experiment

Item	
Organic matter loading ($\text{kg-BOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$)	0.5
Nitrogen loading ($\text{kg-T-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$)	0.086
HRT(hour)	24
MLSS($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	1500～2000
DO($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	4.0～5.5
pH	7.4～8.0
Temperature($^{\circ}\text{C}$)	20

Table 2 The inoculum of protozoa and metazoa

Mastigophora	
<i>Monas</i> sp.	540
<i>Peranema</i> sp.	180
Ciliata	
<i>Vorticella</i> sp.	1000
<i>Opercularia</i> sp.	810
<i>Trachelophyllum</i> sp.	630
<i>Prorodon</i> sp.	410
<i>Aspidisca</i> sp.	240
<i>Arcella</i> sp.	230
<i>Epistylis</i> sp.	200
<i>Zoothamnium</i> sp.	200
Metazoa	
<i>Phyllodina</i> sp.	180
<i>Lecane</i> sp.	45

Unit: $\text{cells} \cdot \text{ml}^{-1}$

水質の測定と生物相の観察および計数を行った。分析項目は T-N、NO₃-N、NO₂-N、NH₄-N、TOC、DO、pH、MLSS とした。T-N は TECHHICON-AA II、NO₃-N、NO₂-N、NH₄-N は TRAACS-800、TOC は TOC-5000(SHIMADZU)を用いて測定した。DO および pH の測定はそれぞれ pH メータ (TOA-HM-14P)、DO メータ(TOA-DO-14P)を用いた。MLSS の測定は下水試験法¹⁵⁾に準じた。生物相の観察および計数は微小動物相については光学顕微鏡を用いて検水を 0.05ml 取り、微小動物の同定と計数を行った。一つのサンプルにつき 3 回検鏡し、その平均数を微小動物数とした。硝化細菌数については、抗体法 (硝化細菌測定キット、株式会社ヤクルト製) を用いて測定した。

Table 3 Composition and water quality of synthetic wastewater

Composition	(mg·l ⁻¹)	Water quality	(mg·l ⁻¹)
Peptone	150	TOC	135
Meat extract	100	BOD	250
Urea	25	T-N	43.45
NaCl	7.5	T-P	13.50
KH ₂ PO ₄	25	NO ₃ -N	0.07
KCl	3.5	NO ₂ -N	0.02
CaCl ₂	3.5	NH ₄ -N	3.45
MgSO ₄	2.5		

3. 結果および考察

3.1 *A.vulgaris*、*Vorticella microstoma* および *Opercularia* sp. の硝化細菌捕食特性

2 種の硝化細菌と *A.vulgaris*、*V.microstoma* および *Opercularia* sp. との培養実験を行った結果を Fig.2 に示す。*N.europaea*、*N.winogradskyi* の懸濁液に接種した *V.microstoma* および *Opercularia* sp. は、24 時間後には全て孢子状の休眠細胞となり、硝化細菌での増殖はできなかった。そこで 5 日間培養を続けた後、*V.microstoma* 系には *V.microstoma* の餌細菌となる *Bacillus subtilis* を、*Opercularia* sp. 系には *Alcaligenes faecalis* を $2.2 \times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ の細菌濃度で添加し観察したところ 12 時間後には正常な栄養細胞がみられ、その後原生動物の増殖が確認された。これらの結果に対し、2 種の硝化細菌を用いた場合、*A.vulgaris* の活発な増殖が見られた。したがって、2 種類の硝化細菌 *N.europaea*、*N.winogradskyi* とともに

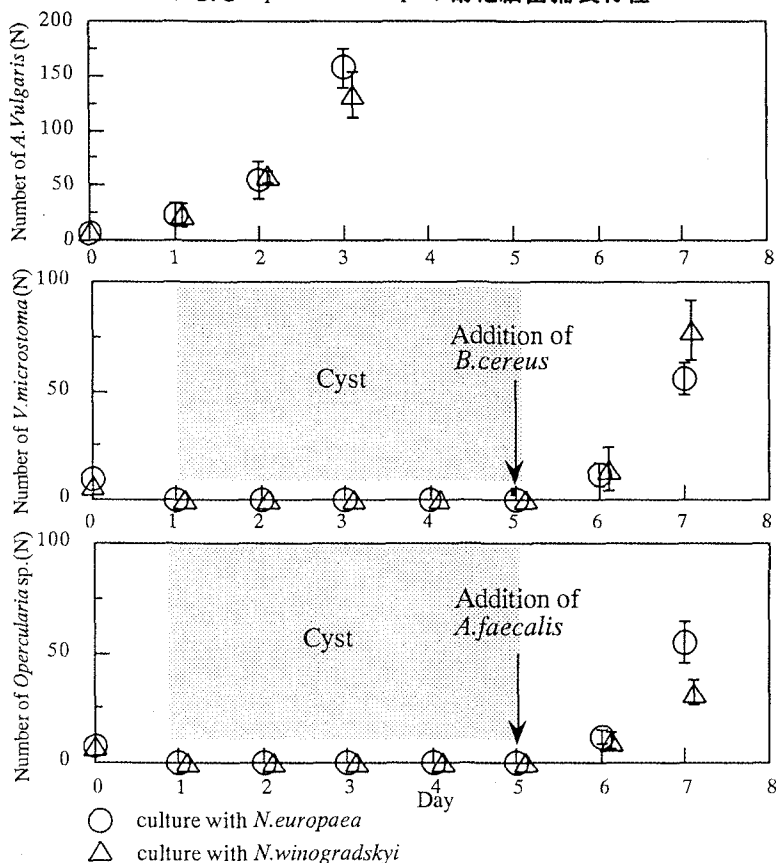


Fig.2 Growth characteristics of *A. Vulgaris*, *V. microstoma* and *Opercularia* sp. in feeding of nitrifying bacterica

V.microstoma および *Opercularia* sp. の餌細菌にならないことは明らかであり、硝化細菌に対する原生動物の捕食特性は種によって大きく異なることが示された。

著者らの実験¹⁷⁾では2種の硝化細菌 *N.europaea*、*N.winogradskyi* を餌細菌とした場合と7種の単一の従属栄養細菌を餌細菌とした場合を比較した結果、前者では高い最大比増殖速度 μ_{max} と小さい半飽和常数 K_s が得られた。このことは硝化細菌が従属栄養細菌に比べ *A.vulgaris* の増殖に極めて適し、栄養度が高く、硝化細菌濃度が比較的低い場合でも *A.vulgaris* が活発に増殖することを意味する。

一方、*V.microstoma* および *Opercularia* sp. は硝化細菌を捕食しないことから硝化細菌の存在はそれらの増殖に直接的な影響がないと考えられる。*V.microstoma* および *Opercularia* sp. は従属栄養細菌を捕食し、高い μ (*V.microstoma* : $3.3d^{-1}$ 、*Opercularia* sp. : $3.3d^{-1}$)¹⁶⁾ を有している。したがって硝化の進行した環境が *V.microstoma* や *Opercularia* sp. の出現に有利に働く可能性は生物学的環境因子では説明できない。硝化が進行した環境において出現する理由としては *V.microstoma* の増殖の最適 pH は 6.5 から 7.5 であり¹⁸⁾、一般に曝気槽で硝酸型の硝化を維持するためには pH が 6.8~7.8 にコントロールされることが多く¹⁹⁾、*V.microstoma* の最適な増殖 pH 範囲はそれと一致していることが原因の一つであると考えられる。

硝化が進行した環境は硝化細菌の増殖にとって有利であり、硝化細菌は硝化によりエネルギーを獲得し、活発な増殖を行う。このときの細菌相は硝化細菌の優占化または従属栄養細菌に対する硝化細菌の割合が高くなることが報告されている⁸⁾。硝化細菌は *A.vulgaris* にとって良い餌になるため、硝化が進行した環境では *A.vulgaris* の増殖速度を高め、結果として高密度に出現すると考えられる。

3.2 窒素栄養塩類の形態および濃度の影響

窒素形態および濃度変化による *A.vulgaris* の比増殖速度変化を Fig. 3 に示した。図に示したように NH_4-N 、 NO_2-N 濃度の増加に伴い、増殖速度 μ の低下が認められた。特に NH_4-N の場合その減少傾向が著しく、 $60mg \cdot l^{-1}$ 以上になると *A.vulgaris* は増殖できなかった。 NH_4-N 濃度が $0mg \cdot l^{-1}$ の時と $10mg \cdot l^{-1}$ の時の μ の間には 5% の危険率で有意な差が認められた。したがって $10mg \cdot l^{-1}$ 以上の NH_4-N は *A.vulgaris* の増殖を阻害することがわかった。それに対し、 NO_3-N の濃度が変化した場合、*A.vulgaris* の比増殖速度 μ はほぼ一定であり、実験濃度範囲内で *A.vulgaris* に対する阻害性はないことが分かった。

アンモニウムイオン添加による塩濃度の増加が *A.vulgaris* の増殖を阻害する可能性も考えら

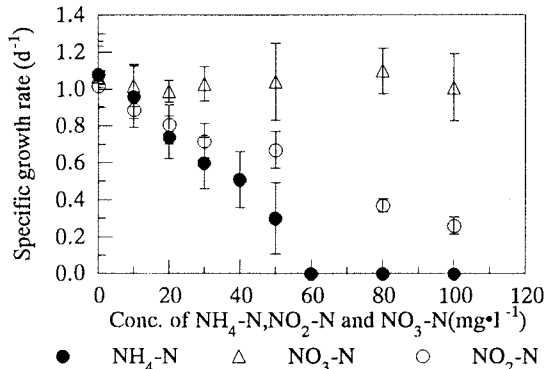


Fig.3. Effect of NH_4-N , NO_2-N and NO_3-N concentration on the growth of *A.vulgaris*

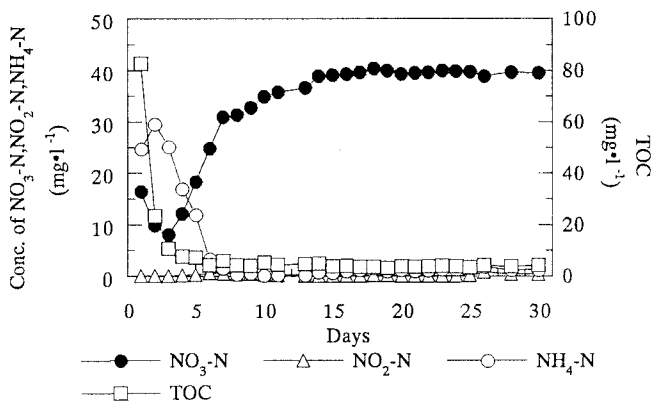


Fig.4 Time course of NO_3-N , NO_2-N , NH_4-N and TOC in continuous experiments

れたが、本実験では *A.vulgaris* の増殖が完全に阻害された $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度 $60\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の場合であっても塩濃度に換算して $1/233\text{M}$ であり、予備実験でわかった *A.vulgaris* の増殖を阻害する塩濃度である $1/75\text{M}$ よりかなり小さい。したがって本実験では *A.vulgaris* の増殖阻害において塩濃度の影響は小さいと判断できる。

原生動物は一般に金属イオンや塩濃度によって増殖が阻害され、金属イオンの阻害の強さは Hofmeister の系列 ($\text{K} < \text{Na} < \text{NH}_4 < \text{Li} < \text{Sr} \cdots$) の逆順に従うと言われている。金属イオン Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{7+} などによる原生動物の増殖阻害に関する検討は須藤ら¹⁶⁾ や Cairns²⁰⁾ により行われ、原生動物種と阻害物質の相違によって毒性が著しく異なり、特定の物質に対して極度に感受性の高い原生動物が存在し、他の原生動物に影響が現れないほどの低濃度であっても、特定の原生動物を阻害することがあると報告されている。安田ら²¹⁾ は活性汚泥中の生物相に対するアンモニウム塩の影響を調べた結果、縁毛目 *Opercularia* sp. および *Epistylis* sp. は $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度 $250\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ まで増殖可能と報告した。本研究で対象とした *A.vulgaris* はそれに比べて NH_4 イオンに感受性が高く、 NH_4 イオンが特異的に *A.vulgaris* の増殖を阻害する。

A.vulgaris は硝化が進行した環境、すなわち $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度が低い場合に出現、優占化することがよく知られている。Madoni ら²²⁾ は 17 カ所の排水処理施設を調査し、主成分分析を行い、*Arcella* sp. の出現は硝化の進行状態と非常に強い相関があると報告した。中島ら²³⁾ は 37 の小規模排水処理施設の硝化と活性汚泥生物相の関連性を調べた結果、*Arcella* sp. の出現頻度と $\text{NO}_3\text{-N/T-N}$ 比の間に高い正の相関を認めた。 $\text{NO}_3\text{-N/T-N}$ 比が 100% の時、*Arcella* sp. の出現頻度は 83% であった。また須藤ら⁸⁾ は回転円板の後段、硝化用回転円板に *Arcella* sp. が多く出現し、優占化すると報告した。これらの研究結果は *A.vulgaris* の増殖に対して $\text{NH}_4\text{-N}$ が強い阻害性を示すという本実験の結果と合致する。

硝化の進行による $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度の低下は *A.vulgaris* の出現環境として有利に働く。さらに *A.vulgaris* が硝化細菌を捕食し、低い細菌濃度でも高い増殖速度で増殖する特性を有していることを加え、*A.vulgaris* の出現は硝化の進行状況をよく反映し、硝化指標性を発揮すると考えられる。一方、縁毛目の原生動物 *V.microstoma*、*Opercularia* sp. は硝化細菌の存在や $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度の変化などの直接的な影響が少ないため、その出現と硝化の進行状況との相関が小さいと考えられる。

3.3 連続混合培養系における *Arcella* sp. の消長特性

Fig. 4 には曝気槽内の水質の経日変化を示した。実験開始後、有機物の除去が急速に進み、6 日目において TOC 濃度が $4.3\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ になり、97% の除去率が得られた。窒素については 2 日目までに汚泥の残留 $\text{NO}_3\text{-N}$ および希釈の影響で $\text{NO}_3\text{-N}$ が低下し、 $\text{NH}_4\text{-N}$ が上昇した

Table 4 The most predominant protozoa and metazoa found at aeration tank

Mastigophora	Maximum conc.
<i>Bodo</i> sp.	860
<i>Monas</i> sp.	1200000
<i>Entosiphon</i> sp.	600
Ciliata	
<i>Litonotus</i> sp.	100
<i>Euglypha</i> sp.	710
<i>Vorticella</i> sp.	1500
<i>Opercularia</i> sp.	3200
<i>Trachelophyllum</i> sp	1000
<i>Prorodon</i> sp.	100
<i>Aspidisca</i> sp.	500
<i>Arcella</i> sp.	1000
<i>Epistylis</i> sp.	800
<i>Zoothamnium</i> sp.	500
<i>Acineta</i> sp.	160
Metazoa	
<i>Phyllodina</i> sp.	40
<i>Lecane</i> sp.	1200

Unit: cells $\cdot\text{ml}^{-1}$

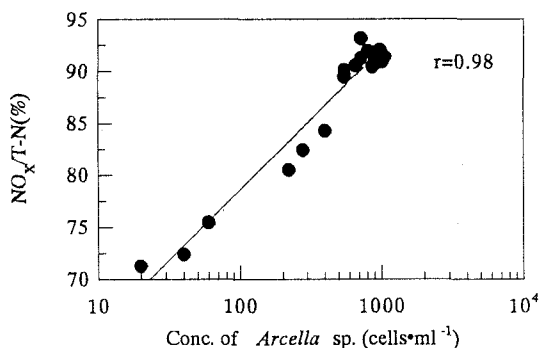


Fig.5 Relationship between concentration of *Arcella* sp. and nitrification ratio

が、その後の硝化の進行に伴い、 $\text{NH}_4\text{-N}$ が減少し、 $\text{NO}_3\text{-N}$ の蓄積が見られた。10日目に $\text{NO}_3\text{-N}$ が $35.1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ となり、硝化率が80%を上回った。18日目では $40.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、硝化率が最大の93.2%に達し、その後、90%以上の硝化率を維持した。

曝気槽内の生物相の変化については、4日目では動物性鞭毛虫類の*Bodo* sp.、*Monas* sp.が観察され、6日目に*Monas* sp.が $1\times 10^4\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ となり、全原生動物数に対する割合が95%以上と優占種になった。このような動物性鞭毛虫類の大量出現は有機物の処理が不十分であることを示し⁶⁾、曝気槽内に高濃度の有機物の残存が優占化を引き起こしたと考えられる。5日目では繊毛虫類、緑毛目の*Vorticella* sp.、*Epistylis* sp.、*Opercularia* sp.が観察され、7日目では有殻葉状仮足虫類の*Arcella* sp.、*Euglypha* sp.が少量ながら活性汚泥中に出現した。13日目では微小後生動物の*Phyllodina* sp.などが観察された。実験期間中に出現した主な微小動物種およびその最大密度をTable 4に示した。

硝化の進行に伴い、全原生動物数に対する割合が大きくなる傾向を示し、かつその割合が30%を超えた原生動物*Arcella* sp.、*Vorticella* sp.、*Opercularia* sp.について硝化との関連性を検討した。*Arcella* sp.は曝気槽内の $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度が $12\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以下になった1日後に $20\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ と観察されたが、その時*Vorticella* sp.、*Opercularia* sp.の個体密度はすでにそれぞれ $200\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ と $100\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ に達していた。 $\text{NH}_4\text{-N}$ の濃度が $10\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上では*Arcella* sp.の増殖を阻害するという3.2で得られた結果がその原因であると考えられる。

Fig.5には*Arcella* sp.の出現個体密度を対数軸に硝化率($\text{NO}_x\text{-N}/\text{T-N}$)との相関を示した。Fig.5に示したように*Arcella* sp.は硝化率71%を超える時出現し、その後増え続け、硝化率との間に相関係数 r が0.98で非常に高い正の相関関係が認められた。また、硝化率の増加に対応し、硝化細菌密度は亜硝酸酸化細菌では $2.4\times 10^6\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ から $9.6\times 10^6\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、硝酸酸化細菌では $3.2\times 10^5\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ から $6.5\times 10^5\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ に増加した。

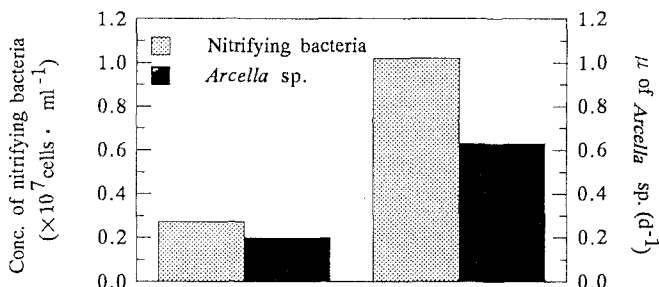


Fig.6 Relationship between conc. of nitrifying bacteria and specific growth rate of *Arcella* sp.

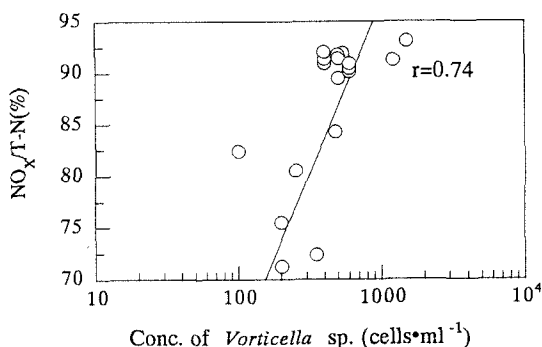


Fig.7 Relationship between concentration of *Vorticella* sp. and nitrification ratio

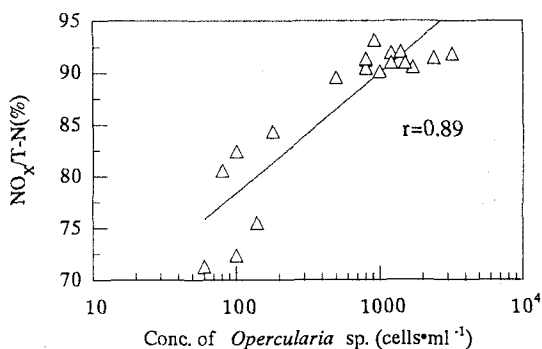


Fig.8 Relationship between concentration of *Opercularia* sp. and nitrification ratio

Fig.6 には硝化細菌密度変化による *Arcella* sp. の平均増殖速度 μ の変化を示した。図に示したように硝化細菌濃度は $0.3 \times 10^7 \text{cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ の場合、*Arcella* sp. の平均 μ は 0.20d^{-1} 、 $1.0 \times 10^7 \text{cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ に増加した場合 0.63d^{-1} となった。硝化細菌密度が高くなるに従い、*Arcella* sp. の μ は大きくなることが分かった。

一方、Fig.7、Fig.8 には *Vorticella* sp. および *Opercularia* sp. の個体密度と硝化率の相関関係を示した。*Vorticella* sp. の場合相関係数 r は 0.74、*Opercularia* sp. の場合は 0.89 であり、一定の相関が見られた。一般に *Vorticella* sp. および *Opercularia* sp. は処理水の有機物濃度が低い場合に出現すると言われている^{5)・6)・16)}。本実験においては、Fig.9 に示したように処理水の $\text{NO}_3\text{-N}$ と TOC の間に負の相関関係が認められた。これは有機物濃度の減少と硝化進行の関連性が非常に高いことを意味する。すなわち *Vorticella* sp. および *Opercularia* sp. は硝化細菌を捕食しないことや $\text{NH}_4\text{-N}$ の増殖阻害が小さいという回分培養実験の結果を考えれば、*Vorticella* sp. および *Opercularia* sp. の硝化に対する指標性は *Arcella* sp. のそれとは根本的に異なっており、*Vorticella* sp. および *Opercularia* sp. は硝化よりも有機物除去の進行と相関関係にあるのではないかと考えられる。

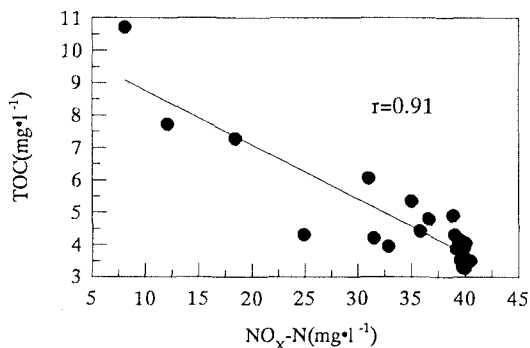


Fig.9 Relationship between concentration of $\text{NO}_x\text{-N}$ and TOC

4. まとめ

硝化環境における微生物生態系の化学的な要因である窒素形態・濃度が *A. vulgaris* の増殖に及ぼす影響、生物学的な要因としての原生動物種による硝化細菌捕食特性および連続混合培養における硝化の進行過程での *Arcella* sp. の消長について検討を行い、以下のような結果が得られた。

- 1) 硝化細菌は *A. vulgaris* にとって良い餌であるため、硝化が進行した環境では *A. vulgaris* が高密度に出現する。一方、*V. microstoma* および *Opercularia* sp. は硝化細菌を捕食しないことから硝化細菌の存在は増殖に直接的な影響がない。
- 2) *A. vulgaris* の増殖は $\text{NH}_4\text{-N}$ により阻害される。硝化の進行状況による $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度の変化は *A. vulgaris* の出現・消長の支配因子となる。
- 3) 連続混合培養実験の結果から *Arcella* sp. の密度変化と硝化率との間に高い正の相関関係が認められた。また $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度が $12 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 以下になると *Arcella* sp. が出現し、硝化細菌密度が高くなるにしたがい *Arcella* sp. の μ が大きくなることがわかり、これらの結果は回分実験の結果と一致した。
- 4) 硝化細菌および $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度の二つの因子に支配される *A. vulgaris* の出現、消長は硝化進行状況をうまく反映し、*A. vulgaris* は硝化指標原生動物としてきわめて有用である。*V. microstoma* および *Opercularia* sp. は、処理水質が良好で硝化が進行した環境においてよく観察されるが、2種の硝化細菌では培養できなかったことや高 $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度環境においても増殖することから硝化細菌に対する直接的な指標性が少ないと考えられる。

謝辞

本研究の一部は、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」の研究助成を受けた。ここに感謝の意を表する。

参考文献

- 1) Curds, C.R. and Cockburn, A. (1970) Protozoa in biological sewage treatment process. 2. protozoa as indicators in

the activated sludge process, *Wat.Res.*4, 237.

- 2) Curds, C.R. and Hawkes, H.A. (1975) Ecological aspects of used water treatment. Vol 1, Academic press, London and New York.
- 3) Ratsak, C.H., Maarsen, K.A. and Kooijman, S.L.M. (1996) Effects of protozoa on carbon mineralization in activated Sludge, *Wat.Res.*30, 1-12.
- 4) 日本下水道協会編 (1990) エアレーションタンクの微生物 (検鏡と培養の手引き) pp.126、東京.
- 5) 千種薫 (1996) 微生物による水質管理、234pp.、産業用水調査会、東京.
- 6) 須藤隆一、稲森悠平 (1989) 生物相からみた処理機能の診断、287pp.、産業用水調査会、東京.
- 7) Chung, J.-C. (1997) Filamentous bacteria and protozoa found in the rotating biological contactor, *Environ.Sci.Eng.*, **32** (3), 671-686.
- 8) 須藤隆一 (1979) 回転円板法による硝化・脱窒、環境技術、**8** (9)、954-961.
- 9) 須藤隆一、岡田光正、森忠洋 (1977) 回転円板法における微生物管理、用水と廃水、**19** (7)、855-864.
- 10) 水野寿彦、高橋永治編 (1991) 日本淡水動物プランクトン検査図説、301pp.、東海大学出版会、東京.
- 11) 小島貞男、須藤隆一、千原光雄 (1995) 環境微生物図鑑、758 pp.、講談社、東京.
- 12) 李先寧、金主鉉、西村修、山田一裕、千葉信男、丁国際、須藤隆一 (1999年) 活性汚泥から分離した有殻葉状仮足類 *Arcella vulgaris* の増殖に及ぼす環境因子の影響、水環境学会誌、**22** (7)、568-573.
- 13) Page, F.C (1967) Taxonomic Criteria for Limax Amoebae, *Protozool.*, **14**, 499-521.
- 14) Institute for Fermentation (1996) List of Cultures, 509, Osaka
- 15) 日本下水道協会 (1997) 下水試験方法、pp.807、東京.
- 16) 須藤隆一 (1977) 廃水処理の微生物学、638pp.、産業用水調査会、東京.
- 17) 李先寧、小浜暁子、金主鉉、西村修、千葉信男、須藤隆一、有殻葉状仮足類 *Arcella vulgaris* の硝化細菌捕食特性および硝化機能に及ぼす影響 (投稿中)
- 18) Sudo, R. and Aiba, S. (1973) Mass and monoxenic culture of *Vorticella microstoma* isolated from activated sludge, *Wat.Res.*7, 615-621.
- 19) 遠矢泰典 (1970) 生物学的脱窒素法に関する研究 (1)、下水道協会誌、**7** (74)、21-42.
- 20) Cairns, J. (1974) Protozoans in pollution ecology of freshwater invertebrates edited by C.W.hart Jr, and S.L.H.Fuller. Academic press, New York and London.
- 21) 安田正志、中村郁子 (1971) 活性汚泥の生物相に対するアンモニウム塩の影響 (II)、日本水処理生物学会誌、**7** (2)、41-48.
- 22) Madoni, P., Davoli, D. and Chierici, E. (1993) Comparative Analysis of The Activated Sludge Microfauna in Several Aewage Treatment Works、*Wat.Res.*、**27**、1485-1491.
- 23) 中島淳、小倉久子 (1984) 既存下水処理施設における窒素・リン除去の現状、水処理技術、**25** (11)、33-41.