

(6) 肉食性原生動物 *Dileptus anser* による有機物分解機能強化の
機構に関する基礎的研究

**Basic Study on the Mechanism of Enhancement of Organic Matter Degradation in the
Presence of Carnivorous Protozoa *Dileptus anser***

小浜暁子*, 李先寧*, 金主鉉**, 西村修*, 稲森悠平***, 須藤隆一**
Akiko KOHAMA*, Xian-Ning LI*, Ju-Hyun KIM**, Osamu NISHIMURA*,
Yuhei INAMORI***, and Ryuichi SUDO**

ABSTRACT; The role of *Dileptus anser* on the detritus chain was studied in batch culture experiments carried out in three 500-ml Erlenmeyer flasks. Culture solutions of bacteria and *Tetrahymena pyriformis* were suspended in 500-ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of sterilized CE medium. 0, 1 and 8 cells·ml⁻¹ of *D. anser* were added to each flask on day 0. Three series of experiments were performed using the control system (No. 1) and the systems with *D. anser* added (No. 2, No. 3). The batch experiments were carried out over a 7-day period at 20°C. Eight ml of the culture solution was collected from each flask on day 0, 3 and 7. The amount of bacteria was assessed by the plate culture method and direct method, and protozoan species were examined. The concentration of DOC and that of ATP containing one cell of bacteria were measured.

It was shown that the presence of *D. anser* led to a decrease in density of bacteria when there was not enough *T. pyriformis* as prey for *D. anser*. The clearance rate of DOC in each system on day 7 was 14, 26 and 49% respectively. The concentration of ATP contained in one cell of bacteria of each system on day 3 was 5.3×10^{-13} , 6.1×10^{-13} and 8.2×10^{-13} mg-ATP·mg-cell⁻¹ respectively. It was found that a high concentration of ATP contained in one cell of bacteria led to a high rate of degradation of DOC. The study confirmed that *D. anser* greatly influences the population of other microorganisms, and the concentration of ATP contained in one cell of bacteria could enhance the degradation of dissolved organic carbon.

KEYWORDS; *Dileptus anser*, *Tetrahymena pyriformis*, bacteria, DOC, ATP

1. はじめに

生物処理施設の反応槽内では、流入した有機物は栄養段階の異なるさまざまな微生物(細菌・細菌捕食性原生動物・肉食性原生動物・微小後生動物)から構成される腐生連鎖¹⁾が円滑に進行することによって分解される。これまで、排水処理施設に出現する微生物について、生物相は処理水質を反映すること²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾、原生動物の存在は細菌の有機物分解を促進すること²⁾⁷⁾は経験的に知られていたが、近年の研

* 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 (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)

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

究により、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⁸⁾、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⁹⁾、といった役割が明らかになるに伴い、ますます原生動物の重要性が明らかになってきている¹⁰⁾。また、腐生連鎖では、連鎖が長くなるほどエネルギーの系外への放出が大きくなり、発生汚泥量の減量化と有機物分解の強化が可能であると考えられる。しかし、これまで細菌捕食性原生動物に関する研究は多くなされてきた¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾が、それらを捕食する、すなわち腐生連鎖のさらに上位に位置する肉食性原生動物の役割についてはほとんど明らかにされていない。排水処理施設に出現する肉食性原生動物としては、*Dileptus* sp., *Didinium* sp., *Coleps* sp., *Podophrya* sp.等が知られており、これらが出現している施設の処理水質はBODが $10\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以下と良好な場合が多い²⁾。しかし、排水処理施設における出現率が原生動物の総個体数に対し0-15%と低いことから、その重要性に対する認識が低く、また培養方法が煩雑であるといったことから研究がなされていないと考えられる。著者らは肉食性原生動物の腐生連鎖における役割を明らかにし、腐生連鎖を効果的に実排水処理に組み込むための基礎的知見を得ることを目的として研究を行い¹⁵⁾、*Dileptus anser*の増殖特性および*Dileptus anser*の有無が腐生連鎖による有機物分解機能に及ぼす影響に関して報告した。すなわち、細菌・細菌捕食性原生動物*Colpidium* sp.からなる*Dileptus anser*非接種系と、さらに*Dileptus anser*を接種した系の2系について、DOCの減少率を比較した結果、*Dileptus anser*が存在すると培養液のDOC減少率が向上するという事を明らかにした。しかし、この要因は明らかにすることができず、以下のような仮説をたてた。① *Dileptus anser*の*Colpidium* sp.捕食により*Colpidium* sp.が減少し、*Colpidium* sp.の捕食圧減少により細菌の数が増加した、② *Dileptus anser*の*Colpidium* sp.捕食により*Colpidium* sp.が減少し、*Colpidium* sp.の食物源である細菌相が有機物分解機能の高いものに変化した、③*Dileptus anser*の代謝物質により細菌の活性が向上した。

そこで、本研究では

- ① *Dileptus anser*の個体数がDOC有機物分解機能に及ぼす影響
- ② *Dileptus anser*の存在が微生物個体群(*Dileptus anser*, *Tetrahymena pyriformis*, 細菌群)の動態に及ぼす影響
- ③ *Dileptus anser*の存在が細菌の活性に及ぼす影響

に着目して、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機構を明らかにすることを目的として検討を行った。

2. 方法

2.1 供試微生物

(1) *Dileptus anser*

*Dileptus anser*は原生動物繊毛虫門リトストマ綱に属し、おもに湖沼、排水処理の活性汚泥や生物膜に出現する。本研究で用いた*Dileptus anser*は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¹⁶⁾で分離した。体長は $250\text{--}800\ \mu\text{m}$ であり、胴体部と長く伸びたやや扁平なproboscisから構成され、収縮胞はproboscis内および背中側に列をなして存在している。*Dileptus anser*は他の原生動物を捕食する肉食性として知られており⁹⁾¹⁷⁾、捕食の際は餌生物に毒胞を発射し、被食者の動きが鈍くなったり、またある種の生物は溶解され滴状になったところでproboscisの根元に有する細胞口から摂取するという特徴がある¹⁸⁾。*Dileptus anser*の継代培養は、6日間前培養した*Tetrahymena pyriformis*を直径10mmのディスポーザブルシャーレに15ml分注し、これに*Dileptus anser*を接種し、20℃の好気暗条件下で静置培養を行った。

(2) *Tetrahymena pyriformis*

本研究では餌生物として *Tetrahymena pyriformis* を供試した。*Dileptus anser* は *Colpidium* sp.と同様に *Tetrahymena pyriformis* を餌生物として良好に増殖することが明らかになっている¹⁵⁾。*Tetrahymena pyriformis* は国立環境研究所より譲渡を受けた。培養に用いた CE 培地は、Cereal leaves Dehydrated (SIGMA) $1\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ と EGG YOLKS 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、TOC は約 $110\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であった。滅菌後の pH が 7.0 になるように調整し、5 種類以上の混合細菌を与えて継代培養を行った。

Dileptus anser および *Tetrahymena pyriformis* の計数は、試料 0.05ml を界線入りのスライドガラスに滴下し、 $18\times 24\text{mm}$ のカバーガラスで覆い、40 倍の顕微鏡下で行った。各試料 2 回ずつ行い、平均値を求め、1ml 当たりの個体密度として示した。

(3) 細菌数および細菌相

有機物の分解に直接的に関与するのは細菌であるため、その数および種の動態の把握は重要である。

本研究ではコロニー形成細菌数および全菌数の測定を行った。コロニー形成細菌の計数に用いた普通寒天培地 (Nutrient agar) による平板培養法は、非選択的に多くの細菌群を検出し、また出現したコロニーの観察により細菌群の把握を行うことができるという利点があるが、一方、嫌気性細菌や有機物濃度が高い条件下では増殖できない細菌が存在するという報告¹⁹⁾があることから、DAPI 法による全菌数の測定も行った。試料全液について全菌数とコロニー形成細菌数を測定し、さらに全菌数に占めるコロニー形成細菌数の割合を求めた。また、遠心分離後の上層液については、DAPI 法による全菌数の測定を行った。

1)コロニー形成細菌数

Nutrient agar (KYOKUTO) を用い、平板培養法により行った。培地は段階希釈を行った希釈菌液 0.05ml を培地に接種後コンラツジ棒で塗抹し、 37°C のインキュベーター内に静置培養した。48 時間後に出現したコロニーの形、色調によって 3 群に分類し、計数した。各試料 2 連で行い、平均値を求めた。さらにコロニーを採取し、グラム染色 (Hucker 法) を行い、1,000 倍の顕微鏡 (ZEISS Axiolab) 下において細菌の染色性および形態を調べた。各細菌群の特徴は Table 1 に示した。

2)全菌数

段階希釈を行った希釈菌液 1ml を DAPI(4'-6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride,f)で染色し、ヌクレオポアフィルター ($0.2\mu\text{m}$, CORNING) でろ過後、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS) 下において 1,000 倍で計数を行った。

2.2 DOC(溶存態炭素)

培養液中の有機物の動態を把握するために、溶存態有機物の指標となる DOC を測定した。すなわち、試料は超純水により希釈を行った後メンブランフィルター ($0.45\mu\text{m}$, Millipore) でろ過し、TOC-5000(SHIMADZU)により分析した。

2.3 ATP 濃度

細菌の活性を評価するために、培養液中の ATP の濃度を測定した。このとき、原生動物が含有する ATP の影響を除くために、採取した試料は遠心分離を行い($2,000\text{rpm}$, 5 分間)原生動物を沈降させ、上

Table 1 出現した細菌群の特徴

細菌群	コロニー性状		グラム染色	
	形	色調	グラム	菌形態
a	波状, 凸状隆起	乳白色	-	長桿菌
b	正円, ドーム型	白色	-	桿菌
c	正円, ドーム型	透明	-	長桿菌
	正円, 扁平	黄色	+	桿菌
	不定形, 扁平	黄白色	-	短桿菌

層液のみをATP濃度の測定に供した。
明電舎 ATP 測定用試薬キットルシフェール AS を用い、各試料につき 2 連で測定を行った。

2.4 実験条件

500ml の三角フラスコに CE 培地を 100ml 分注しオートクレーブで滅菌後 (121℃, 15 分), *Tetrahymena* *pyriformis* が 100cells・ml⁻¹ になるように

Tetrahymena pyriformis 培養液を接種し, 20℃, 暗条件下において 6 日間前培養を行った。培養 6 日目の *Tetrahymena pyriformis* 濃度はすべての三角フラスコにおいて 1.0×10⁴cells・ml⁻¹ であった。ここに, *Tetrahymena pyriformis* を餌生物として前培養した *Dileptus anser* をリン酸緩衝液で洗浄した後, 接種した。実験系の初期条件は Table 2 に示した。すなわち, *Dileptus anser* の初期個体数の影響を検討するために, 初期個体数が異なる 3 系を設定した。実験系は 20℃のインキュベーター内で静置培養を行った。

実験開始後 0, 3 および 7 日目に試料を 8ml 採取し, 4ml は全液として微生物 (コロニー形成細菌, 全菌, *Tetrahymena pyriformis*, *Dileptus anser*) および DOC の測定に, また残りの 4ml は細菌のみの ATP 活性を求めるために遠心分離を行い (2,000rpm, 5 分間), 上層液を全菌数および ATP 濃度の測定に供した。実験は 2 連で行い, 平均値を求めた。

Table 2 実験初期条件

系 No.	全菌数 (×10 ⁸ cells・ml ⁻¹)	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (×10 ⁴ cells・ml ⁻¹)	<i>Dileptus anser</i> (cells・ml ⁻¹)
1	2.6	1.0	0
2	2.6	1.0	1
3	2.6	1.0	8

3. 実験結果

3.1 微生物の動態

Dileptus anser および *Tetrahymena pyriformis* のそれぞれの動態を Fig.1, Fig.2 に示した。

(1) *Dileptus anser*

Dileptus anser の比増殖速度と *Tetrahymena pyriformis* 濃度の関係は以下に示した Monod の式で近似できることが明らかになっている¹⁵⁾。

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \quad (1)$$

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 (cells・ml⁻¹)

20℃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 6.5×10³ cells・ml⁻¹ であった。

本実験初期の *Tetrahymena pyriformis* 濃度は 1.0×10⁴cells・ml⁻¹ であった。式(1)に代入すると 0.43day⁻¹ であるが, 系 2, 系 3 において, 0-3 日目の比増殖速度(μ)はそれぞれ 0.46, 0.44day⁻¹ であり, ほぼ合致していた。

(2) *Tetrahymena pyriformis*

0 日目における *Tetrahymena pyriformis* の密度

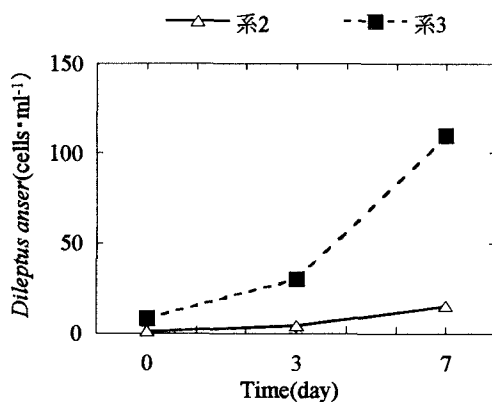


Fig.1 各系における*Dileptus anser*の動態

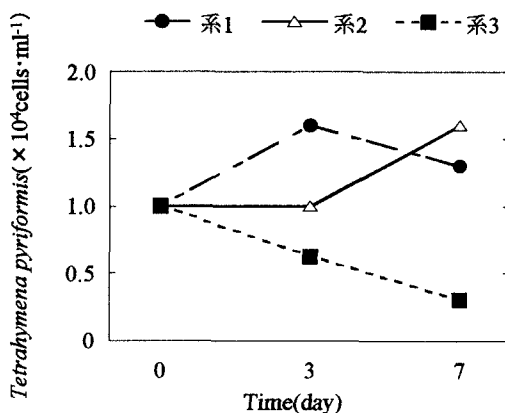


Fig.2 各系における*Tetrahymena pyriformis*の動態

は $1.0 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ であったが、系 1 において 3 日目に $1.6 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、7 日目に $1.3 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ と変動した。系 2 では、3 日目まではほとんど変化が見られなかったが、7 日目に増加した。系 3 では時間の経過に伴い、減少傾向が見られた。

(3) 細菌数の動態

各系における実験期間中の全液中の全菌数、コロニー形成細菌数、および全菌数に対するコロニー形成細菌数の割合を Table 3-1、3-2、3-3 に示した。

1) 全菌数の動態

実験開始後 7 日目において、系 2、系 3 の全菌数は $2.1 \times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ であり、系 1 の $3.0 \times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ に対し、およそ 70% であった。*Dileptus anser* が存在は系の全菌数を減少させることが明らかになった。

また、全液中と遠心分離後の上層液中の全菌数に関しては、高い相関関係 ($R = 0.89$) が得られたこと、またデータには示さなかったが、平板培養により出現したコロニーの観察から、全液と上層液中の細菌数および細菌種はほぼ同じとみなした。

2) コロニー形成細菌数の動態

系 1 の実験期間におけるコロニー形成細菌数は $1.5\text{--}1.7 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ であり、ほとんど変化しなかった。一方、*Dileptus anser* を接種した系 2、系 3 では、実験開始後 7 日目にそれぞれで 9.0×10^6 、 $8.5 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ と、0 日目のおよそ 6% まで減少した。*Dileptus anser* の存在はコロニー形成細菌数に大きな影響を及ぼすことが明らかになった。

3) コロニー形成細菌数と全菌数の関係

Table 3 で示したように、コロニー形成細菌数と全菌数の割合から、培養法では検出できない細菌の存在が明らかであった。この細菌が死菌であるか、普通寒天培地において増殖しない細菌なのかは明らかではないが、いずれの系においても、培養日数の長期化に伴い、全菌数に占めるコロニー形成細菌数の割合は減少し、とくに *Dileptus anser* が存在する系 2、系 3 における 7 日目の割合はおよそ 4% と、細菌相の変化が著しかった。

(4) 細菌相の変化

実験期間中の細菌相の動態を Fig. 3-1、3-2、3-3 に示した。系 2 の 7 日目はデータが得られなかった。実験開始時において、a、b、c の割合はそれぞれ 39、56、5% であった。系 1 において、実験期間中、優占種の変化は見られなかった。一方、系 2、系 3 において 3 日目には a の割合が 50、60%、b の割合が 43、29% となり、a が優占種となった。また、7 日目において、系 3 では a、b が明らかに減少し、c が全体の 89% を占め、優占種が交代した。

Table 3 各系における全菌数、コロニー形成細菌、全菌数に対するコロニー形成細菌の割合

Table 3-1 系1

		0	3	7 (day)
全菌数	($\times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$)	2.6	2.8	3.0
コロニー形成細菌	($\times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$)	1.6	1.7	1.5
コロニー形成細菌/全菌数	(%)	62	61	50

Table 3-2 系2

		0	3	7 (day)
全菌数	($\times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$)	2.6	3.1	2.1
コロニー形成細菌	($\times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$)	1.6	1.5	0.090
コロニー形成細菌/全菌数	(%)	62	48	4.3

Table 3-3 系3

		0	3	7 (day)
全菌数	($\times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$)	2.6	2.5	2.1
コロニー形成細菌	($\times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$)	1.6	0.9	0.085
コロニー形成細菌/全菌数	(%)	62	30	4.0

以上のことから、*Dileptus anser* が存在すると細菌の種構成が a, b から c へ変遷することが明らかであった。

3.2 DOC の動態

DOC の動態を Fig.4 に示した。0 日目の DOC 濃度は $31\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であった。CE 培地の DOC はおよそ $110\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であるが、*Tetrahymena pyriformis* の 6 日間の前培養により、DOC は全ての系で同様に減少していた。0 日目の DOC の成分は、CE 培地のほか細菌および *Tetrahymena pyriformis* の代謝産物等であつたと考えられる。実験期間中、いずれの系においても DOC は減少傾向が見られたが、とくに系 3 では 3-7 日目間における減少が著しかった。実験期間中の各系の DOC 減少率は 13, 29, 48% であり、*Dileptus anser* が存在すると、DOC の減少率が向上することが明らかになった。

3.3 ATP 濃度

遠心分離後の培養液上層部の ATP 濃度を Fig.5 に示した。

3 日目において、系 2、系 3 の ATP 濃度は上昇し、系 1 の 1.3, 1.2 倍であった。しかし、7 日目には *Dileptus anser* が存在しない系 1 において、系 2、系 3 よりも高かった。いずれにしても、*Dileptus anser* の存在が培養液中の細菌の活性に影響を及ぼすことが明らかになった。

4. 考察

4.1 微生物間相互作用

系 1 は実験期間中、細菌相の変化は他の系と比較して小さかったが、全菌数、コロニー形成細菌数および *Tetrahymena pyriformis* の密度が変動した。全菌数は、*Tetrahymena pyriformis* の増減に伴い変動していることから、*Tetrahymena pyriformis* の変動に伴う捕食圧の変化が影響したと考えられる。また、原生動物は食物源である細菌種によって比増殖速度が大きく変動する、すなわち細菌嗜好性を有していることが知られているが¹²⁾²⁰⁾、前培養においてすでに *Tetrahymena pyriformis* の良好な食物源となる細菌はほとんど捕食され、栄養源とはなりにくい細菌のみが残存していたため、細菌相の優占種の変化は起こらなかったと考えられる。

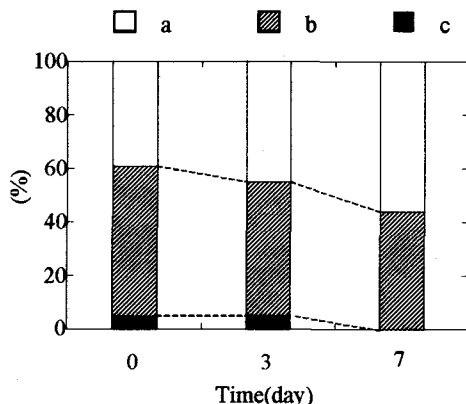


Fig.3-1 系1における細菌相の動態

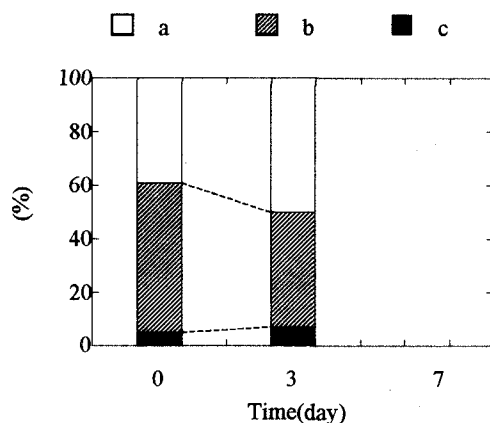


Fig.3-2 系2における細菌相の動態

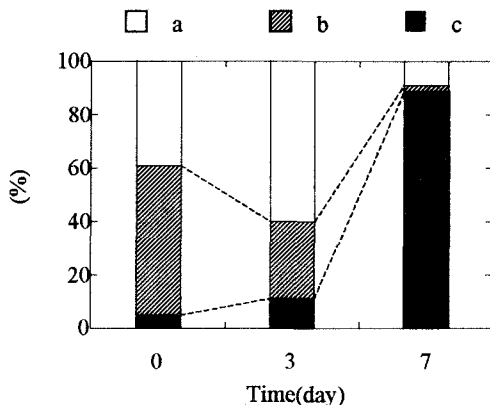


Fig.3-3 系3における細菌相の動態

系 2, 系 3 では, 全菌数およびコロニー形成細菌数が *Dileptus anser* の増加に伴い減少した。この要因として, *Dileptus anser* による細菌の捕食が考えられる。*Dileptus anser* は原生動物や微小後生動物等を捕食する肉食性の原生動物として知られており, 細菌を捕食するという知見はみられないが, 細胞口を開いて遊泳する際に細菌が体内取りこまれたり, フロックを捕食する様子が観察されることから細菌数への影響は大きいと考えられる。

Tetrahymena pyriformis は, 系 2 において 7 日目に増加した。これまでの知見¹⁵⁾から, *Dileptus anser* が 1 日に捕食する *Tetrahymena pyriformis* 数は 140cells であることが明らかになっている。したがって, *Dileptus anser* が $20\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ まで増加した 7 日目には *Tetrahymena pyriformis* は減少しているはずであるが, 実際には $1.6\times 10^4\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ と増加していたことから, *Dileptus anser* の存在下において, *Tetrahymena pyriformis* の増殖活性が向上したといえる。Berk ら²¹⁾の研究より, 原生動物に生菌を与えた場合, 死菌よりも原生動物濃度は 2 倍になるという知見が得られており, このことから原生動物の餌生物となる細菌の活性が高かったこと, さらに, 全菌数とコロニー形成細菌の割合および細菌相が異なることが明らかになっていることから, *Tetrahymena pyriformis* の細菌嗜好性が *Tetrahymena pyriformis* の増殖速度の上昇に影響を及ぼしたことが考えられる。細菌相が変化する要因としては, *Dileptus anser* がフロック形成菌を捕食すること, また *Tetrahymena pyriformis* を捕食することにより食べ残しや排泄物が生じたこと, また原生動物は, 多糖類やアミノ酸, ビタミンといった細菌の増殖促進物質を分泌することが知られているが²²⁾²³⁾²⁴⁾, *Dileptus anser* は大型であるためその排出量や分泌量が大きく, それらを資化する細菌が優占化した, ということが考えられる。

系 3 においては 7 日目に c が 89% を占め, 優占種となった。このとき *Tetrahymena pyriformis* 密度も非常に低下しているが, 優占種の変化に対しては, *Tetrahymena pyriformis* の細菌捕食の影響が減少したこと, また代謝産物等の蓄積によって培養液中の成分が変化したことが要因として考えられる。系 3 において *Tetrahymena pyriformis* の増加傾向が見られなかったのは, *Dileptus anser* の捕食速度が *Tetrahymena pyriformis* の増殖速度を上回ったためと考えられる。

4.2 ATP 濃度と微生物の関係

3 日目の系 1, 系 2, 系 3 における *Dileptus anser* の密度はそれぞれ 0, 4, $30\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ であり, 系 3 の *Dileptus anser* の密度は系 2 の 7.5 倍であった。一方, 系 2, 系 3 の培養液中の ATP 濃度は系 1 よりも 1.3, 1.2 倍高かったが, 系 2 と系 3 を比較するとその差は小さかった。また, 7 日目の系 1, 系 2, 系 3 における *Dileptus anser* の密度はそれぞれ 0, 20, $110\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ であり, 培養液中の ATP 濃度は系 1 の方が

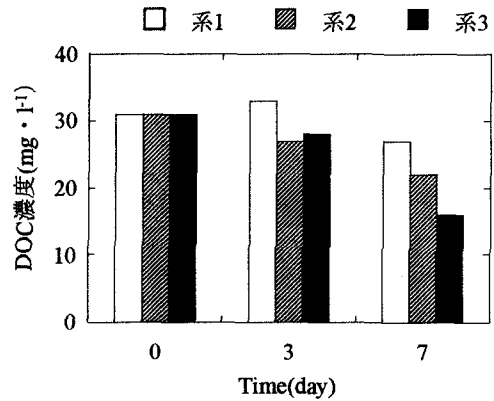


Fig.4 各系におけるDOCの動態

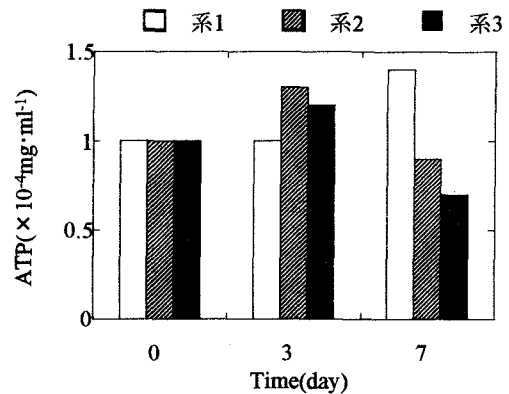


Fig.5 各系における培養液 (遠心分離後, 上層部) 中のATP濃度

系2, 系3よりも高かった。これは、試料中の細菌密度が高かったため ATP 濃度も高くなったと考えた。

そこで、細菌 1 細胞あたりの ATP 濃度を求めるために、各系における培養液中 ATP 濃度を全菌数で除した。その結果を Fig.6 に示した。

0 日目の細菌 1 細胞当たりの ATP 濃度は、 $4.8 \times 10^{-13} \text{mg} \cdot \text{cell}^{-1}$ であった。*Escherichia coli* K12 の ATP 濃度は、培養条件によっても異なるが $3.3\text{--}6.8 \text{mg} \cdot \text{mg}$ 乾燥重量 $^{-1}$ であることが知られている²⁵⁾。ここで *Escherichia coli* の乾燥重量を $2 \times 10^{-10} \text{mg} \cdot \text{cell}^{-1}$ ²⁶⁾ とすると、細菌 1 細胞当たりの ATP 濃度は $6.2\text{--}13.7 \times 10^{-13} \text{mg} \cdot \text{cell}^{-1}$ であり、実験で得られた値はこの範囲にあった。

実験期間中、系 1 において、細菌 1 細胞当たりの ATP 濃度の変動は小さかったが、一方、系 2, 系 3 において、*Dileptus anser* 密度の変化に伴い細菌 1 細胞当たりの ATP 濃度は変化した。すなわち、3 日目は系 2, 系 3 において、*Dileptus anser* の密度はそれぞれ $4, 30 \text{cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ であったが、細菌 1 細胞当たりの ATP 濃度はそれぞれ $6.1, 8.2 \times 10^{-13} \text{mg} \cdot \text{cell}^{-1}$ と系 1 の $5.3 \times 10^{-13} \text{mg} \cdot \text{cell}^{-1}$ の 1.2, 1.5 倍であり、*Dileptus anser* の存在は細菌の活性向上に寄与することが明らかであった。これまで、細菌捕食性原生動物の存在が細菌を活性化し、有機物分解を促進するという知見は多数あるが⁷⁾¹⁴⁾、肉食性原生動物が存在すればさらに細菌の活性を向上させることが明らかになった。したがって、細菌 1 細胞当たりの ATP 濃度が上昇すれば、一定の細菌数が保たれたとき系としての活性はより一層高まると考えられる。また、7 日目の、*Dileptus anser* 密度は $20, 110 \text{cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ であり、系 2 の ATP 濃度は系 1 の 1.3 倍であったが、一方、系 3 は系 1 よりも低下した。細菌の栄養源である DOC の枯渇、*Dileptus anser* の代謝産物の蓄積の影響が考えられるが、明らかではなかった。また、系 2 より系 3 の方が ATP 濃度が低いことから、*Dileptus anser* 密度が高すぎると系全体の活性を低下させてしまうことが示唆された。

これらのことから、ATP の細胞当たりの濃度を高めるためには、最適な *Dileptus anser* 密度があるということが示唆された。

4.3 微生物動態と DOC の関係

CE 培地の DOC は *Tetrahymena pyriformis* の 6 日間の前培養により減少し、実験 0 日目の DOC は $31 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ と低かった。その成分は CE 培地や細菌および *Tetrahymena* の代謝産物等であり、細菌に利用可能な溶存態有機物濃度がほとんど残存していなかったと考えられる。系 1 において、実験期間中の DOC 濃度の減少率は 13% と系 2, 系 3 の 29, 48% と比較して低かったのは、このためと考えられる。

系 2, 系 3 において、実験開始後 3 日間の DOC 濃度は 0 日目と比較してほとんど変化しなかった。しかし、細菌相が変化していたことから、培養液中の成分も変化していたと予測される。すなわち、*Dileptus anser* が *Tetrahymena pyriformis* を捕食する際 *Tetrahymena pyriformis* を溶解するため、*Tetrahymena pyriformis* の体内の成分が培養液中に溶出し、見かけ上の DOC 濃度は変化しなかったと考えられる。7 日目において、系 2, 3 では DOC 濃度の減少率が向上した。*Dileptus anser* の接種によって、細菌活性および細菌相が変化し、これまで分解されなかった成分も分解されたと考えられる。

4.4 ATP 濃度と DOC との関係

ATP は細菌が細胞内において基質を分解することにより、蓄積される²⁷⁾。したがって、DOC の分解活性

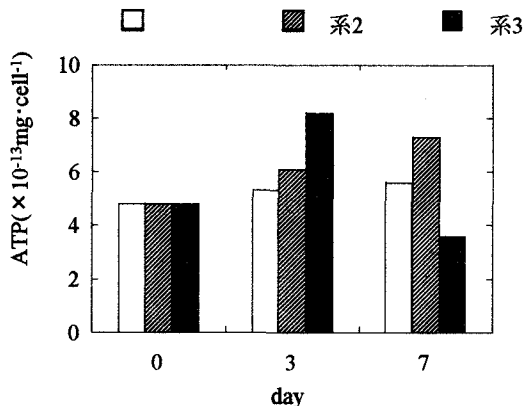


Fig.6 各系における細菌1細胞当たりのATP濃度

が高いとき、細菌の1細胞あたりのATP濃度も向上すると考えられる。そこで、ATP濃度とDOCとの関係を検討した。

3日目において、系2,3のATP濃度は上昇していたが、DOCは変化しなかった。しかし、これは見かけ上であり、*Dileptus anser*の代謝産物や食べ残しが細菌を活性化させていたと考えられる。7日目には系2のATP濃度は上昇したが、系3は低下した。系2は*Tetrahymena pyriformis*が十分に存在したため、*Dileptus anser*の増加にともない*Tetrahymena pyriformis*が捕食され細菌の新たな栄養源として利用されたが、一方、系3は*Tetrahymena pyriformis*がほとんど捕食されてしまい利用可能なDOCが供給されなかったこと、また*Dileptus anser*が大量に存在するため、排泄物等によりpHや塩濃度、DO濃度といった環境条件が悪化してしまったことにより細菌のATP濃度が低下したと考えられる。*Tetrahymena pyriformis*が存在しなければ餌生物が不足し、やがて*Dileptus anser*も死滅してしまう。したがって、DOC分解活性の向上のためには、適当な密度の*Tetrahymena pyriformis*と*Dileptus anser*が存在することが重要であることが明らかになった。

5. まとめ

腐生連鎖における*Dileptus anser*の有機物分解機能強化および機構解明を目的として、細菌、*Tetrahymena pyriformis*および*Dileptus anser*の初期個体数変化させた3系を作成し、7日間の回分実験における微生物、DOC、細菌のATP濃度の動態およびこれらの関係について検討を行った。その結果、以下の結果が得られた。

1. 細菌数および細菌相は*Dileptus anser*の存在によって著しく影響を受け変化することが明らかになった。また、*Dileptus anser*による細菌捕食の可能性が示唆された。
2. 実験期間中のDOC減少率は、系1,系2,系3でそれぞれ13,29,48%であり、*Dileptus anser*が存在するとDOCの分解活性が向上することが明らかになった。
3. *Dileptus anser*の存在により細菌の活性が向上することが明らかになった。しかし、細菌1細胞あたりのATP濃度を高めるためには、最適な*Dileptus anser*密度があることが示唆された。

以上のことから、腐生連鎖が高次化するほど細菌のATP濃度が向上し、これまでは分解されなかったDOC成分も利用され、減少率が向上することが明らかになった。*Dileptus anser*は低濃度の難分解性有機物の除去に非常に効果的であると考えられることから、*Dileptus anser*を組み込んだ腐生連鎖を構築し、この腐生連鎖を維持する制御手法の検討が今後の課題である。

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) 須藤隆一編(1986) 微生物生態学 I, 205pp., 共立出版, 東京
- 2) Poole J.E.P. (1984) A Study of Relationship Between the Mixed Liquor Fauna and Plant Performance for a Variety of Activated Sludge Sewage Treatment, *Wat Res.*, Vol.18, No.3, pp.281-287
- 3) Madony P., Davoli D. and Chierici E (1993) Comparative Analysis of the Activated Sludge Microfauna in Several Sewage Treatment Works, *Wat.Res.*, Vol.27, No.9, pp.1485-1491

- 4) 須藤隆一 (1977) 廃水処理の生物学, 638pp.
- 5) Curds C.R. (1965) An Ecological Study of the Ciliated Protozoa in Activated Sludge. *Oikos*, Vol.15, pp.282-289
- 6) H.Salvado. and M.P.Gracia and J.M.Amigo (1993) Capability of Ciliated Protozoa as Indicators of Effluent Quality in Activated Sludge Plants, *Water Res.*, Vol.29, No.4, pp.1041-1050
- 7) Curds C.R. (1982) The Ecology and Role of Protozoa in Aerobic sewage Treatment Processes., *A.Rev.Microbiol.*, Vol.36, pp.27-46
- 8) 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.
- 9) Nibst B. (1984) Nutrient and Feeding Strategies in Protozoa, Croom Helm, London.
- 10) Ratsak C.H., Maarsen K.A., and Kooijman N S.A.L.M. (1996) Effects of Protozoa on Carbon Mineralization in Activated Sludge, *Water Res.*, Vol.30 No.1, pp.1-12
- 11) Curds C.R. and Cockburn A. (1971) Continuous Monoxenic Culture of *Tetrahymena pyriformis*., *J.Gen.Microbiol.*, Vol.66, pp.95-108
- 12) Ryuichi Sudo and Shuichi Aiba (1972) Growth Rate of Aspidisciae Isolated From Activated Sludge, *Water Res.*, Vol.6, pp.137-144
- 13) Ryuichi Sudo and Shuichi Aiba (1973) Mass and Monoxenic Culture of *Vorticella microstoma* Isolated from Activated Sludge, *Water Res.*, Vol.7, pp.615-621
- 14) Bloem J., Starink M., Bär-ilissen M.J.B. and Cappenberg T.E. (1988) Protozoan Grazing, Bacterial Activity, and Mineralization in Two-stage Continuous Culture, *Appl.Environ.Microbiology*, Vol.54, pp.3113-3121
- 15) 小浜暁子, 金主鉉, 山田一裕, 西村修, 稲森悠平, 須藤隆一 (1999) 肉食性原生動物の増殖特性, 環境工学研究論文集, Vol.36, pp.263-269
- 16) 重中義信監修 (1988) 原生動物の観察と実験法, 259pp., 共立出版, 東京
- 17) 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*, Vol.16, 3/4, pp.309-332.
- 18) Stephen Miller (1968) The Predatory Behavior of *Dileptus anser*, *J.Protozool.*, Vol.15, No.2, pp.313-319.
- 19) 芳倉太郎 (1992) 低栄養細菌とその生態特性, 水環境学会誌, Vol.15, No.7, pp.27-32
- 20) Curds C.R. and Vandyke J.M. (1966) The Feeding Habits and Growth Rates of Some Fresh-water Ciliated Protozoa Found in Activated-Sludge Plants., *J.Appl.Ecol.*, No.3, pp.127-137
- 21) Berk S.G. and Botts J.A. (1984) Indirect Effects of Chlorinated Wastewater on Bacteriovorous Protozoa., *Environ.Pollut.(series A)*, Vol.34, pp.237-49
- 22) Gottschalk G. (1979) Bacterial Metabolism., Springer-Verlag, New York.
- 23) Güde H (1979) Grazing by Protozoa as Selection Factor for Activated Sludge Bacteria., *Microb.Ecol.*, Vol.5, pp.225-237
- 24) Andersson A., Lee C., Azam F. and Hagstorm A. (1985) Release of Aminoacids and Inorganic Nutrients by Heterotrophic Marine microflagellates., *Mar.Eco.Prog.Ser.*, Vol.23, pp.99-106
- 25) H.A.Cole, J.W.T.Wimpenny and D.E.Hughes (1967) The ATP Pool in *Escherichia Coli*, *Bioch.Biophys.Acta*, Vol.143, pp.445-453
- 26) Sherr B.F. and Sherr E.B. (1984) Role of Heterotrophic Protozoa in Carbon and Energy Flow in Aquatic Ecosystems, In current Perspectives on microbial Ecology, pp.412-423
- 27) スタニエ, イングラム, ウィーリス, ペインター共著, 高橋甫, 斎藤日向, 手塚泰彦, 水島昭二, 山口英世共訳 (1994) 微生物学(上), 294 pp., 培風館, 東京