細菌による溶存態有機物分解に及ぼす繊毛虫の影響

Influence of Ciliated Protozoa on Dissolved Organic Carbon Degradation by Bacteria

田中伸幸¹、国安祐子¹、稲森悠平²、板山朋聡¹

¹(独)国立環境研究所／〒305-8506 つくば市小野川16-2

²(独)国立環境研究所／〒305-8506 つくば市小野川16-2

(現、福島大学／〒960-1296 福島市金谷川1番地)

NOBUYUKI TANAKA¹, YUKO KUNIYASU¹, YUHEI INAMORI², and TOMOAKI ITAYAMA¹

¹National Institute for Environmental Studies/16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki, 305-8506, Japan

²National Institute for Environmental Studies/16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki, 305-8506, Japan
(current; Fukushima University/1 Kanayagawa, Fukushima, Fukushima, 960-1296, Japan)

Abstract

In this study, ciliated protozoa *Colpidium* sp. and bacterium *Enterobacter ludwigii* isolated from a Johkaso were used to demonstrate the effect of protozoa for degradation of dissolved organic carbon in the biological wastewater treatment system. We examined changes of total organic carbon (TOC), dissolved organic carbon (DOC) and particulate organic carbon (POC) in concentration between the monoculture (*E. ludwigii*) and the mixed culture (*E. ludwigii* and *Colpidium* sp.) using modified Taub's culture medium including peptone (200mg·l⁻¹). In the monoculture system, 22.3mg·C·l⁻¹ of DOC decreased for 2 days from the beginning of the culture. In this period, the average cell density of *E. ludwigii* was 3.9×10⁸ CFU·ml⁻¹. On the other hand, in the mixed culture system, 32.7mg·C·l⁻¹ of DOC decreased in 2 days from the beginning of the culture. In this period, the average density of *E. ludwigii* was 2.9×10⁸ CFU·ml⁻¹. Consequently, the larger amount of DOC decreased in the mixed culture system than the monoculture system, though the cell density of bacteria in the mixed culture system is lower than that in monoculture system. Moreover, it was estimated that the rate in decrease of DOC per POC in the mixed culture system was 130 times of the rate in the monoculture system. From these results, it was strongly suggested that protozoa enhanced the activity of DOC degradation in the microbial ecosystem in the biological wastewater treatment system.

Key words: DOC, degradation, Predation, Protozoa, Wastewater treatment system

1. はじめに

活性汚泥法や生物膜法などの生物学的排水処理法においては処理槽内に存在する生物によって処理が行われ、その中でも様々な細菌による直接的な有機物の資化、分解が処理の中心を担っていると考えられている¹⁾。しかしながらそれらの生物処理システム内には細菌以外にも原生動物等の細菌を捕食して増殖する生物も存在し、と

りわけ繊毛虫類は活性汚泥でMLVSSの9%、回転円盤法では生物膜のVSSの12-19%を占めているという報告がある²⁾。これらの原生動物によって細菌が捕食されるのであれば、溶存態有機炭素(DOC)はおもに細菌により分解されると考えられるので、細菌を捕食する原生動物の存在は水質の悪化をもたらす可能性がある。実際、活性汚泥法が開発された当初は、原生動物が増殖すると処理効率が低下するのではないかと考えられ、これを殺

減させる方法が検討されたという報告もある³⁾。そこで Curdsらは原生動物の存在が水質に与える影響を検討するため、ベンチスケールの生物処理システム実験によって原生動物の存在する系と存在しない系の処理水質を比較した。その結果、原生動物が存在している場合、BOD、COD、全有機性窒素などの項目が低下するだけでなく、溶存態BOD、溶存態有機炭素（DOC）についても低下したことを見出した⁴⁾。細菌は懸濁態有機炭素（POC）を構成するため、原生動物が細菌を捕食することで原生動物の内生呼吸によりこのPOCが分解され、その結果TOCが減少するということは容易に考えられる¹⁾。しかしながらCurdsらの実験結果では細菌単独の系よりも原生動物の存在する系の方がDOCもより減少するということから、原生動物は細菌を捕食するだけでなく、原生動物の存在によってDOCの減少を促進させる生態学的機構の存在が推察できる。Ratsakらは過去の研究例から原生動物による有機物分解への寄与について総括し、原生動物は有機物分解に多様な機構が関与する可能性を指摘している⁵⁾。その機構の中に、原生動物が存在することで細菌の活性が上昇し、有機物分解が進行するという可能性もあげられている^{3, 5)}。しかしながら、有機物分解への原生動物の影響に関する既往の定量的研究としては、絨毛虫類*Tetrahymena pyriformis*や鞭毛虫を用いた研究例はあるものの⁶⁻⁸⁾、これらの研究は生物処理システムを想定し、細菌および有機物分解への原生動物の影響の解明を狙ったものではない。生物処理システムを想定した近年の研究としては、小浜らによる有機物分解への高次捕食者である肉食性原生動物の影響の研究⁹⁾や、李らによる有殻アメーバの硝化活性への影響についての研究¹⁰⁾があるが、生物処理システム由来の原生動物と細菌を用いた2者混合培養系による定量的研究を行うことも、生物処理システム内の基本要素プロセスとしての原生動物-細菌間の相互作用と有機物分解の関係を明らかにする上で極めて重要である。これらの研究成果は、生物相からみた処理機能の診断^{11, 12)}における原生動物に新たな位置づけを与え、原生動物相と処理水質との関連付けの基盤とでき、さらに、水処理システムにおける処理能の管理、予測¹³⁾などに役立てるための数値モデルの構築においても重要な知見となる。

本研究では生活系の排水処理システムである浄化槽から分離した細菌*Enterobacter ludwigii*および原生動物絨毛虫類*Colpidium* sp.を用い、原生動物の存在が細菌による有機物、特に溶存態有機炭素の分解速度に対して与える影響を定量化するための実験および解析を行った。

2. 実験方法

2.1 供試細菌および原生動物

実験に用いた細菌は家庭用浄化槽から採取した担体の生物膜から単離した*Enterobacter ludwigii*を使用した。*E. ludwigii*はグラム陰性桿菌、運動性、カタラーゼ陽性、オキシダーゼおよびDNAアーゼ陰性、色素非産生の細菌である¹⁴⁾。本単離細菌の単離方法は以下の方法で行った。浄化槽好気槽から担体を槽内の汚水ごと採取し、超音波破砕機により数秒超音波処理した後、改変Taub培地^{15, 16)}で適宜希釈し、あらかじめ作製したLB寒天培地（Bacto Tryptone 10g、Yeast extract 5g、NaCl 10g、蒸留水 1l、寒天15g、pH7.5）をいれた平板にコーンラージ棒で塗抹した。25℃で数日間培養し、生育してきたコロニーをその形態や色調ごとに白金耳で釣菌してLB寒天平板に塗抹した。この操作を5回以上繰り返し、コロニー形状や光学顕微鏡による検鏡で混在細菌がないことを確認後、単離細菌の同定を行った。本細菌の同定は16SrRNAの配列から、BLASTを用いて分子系統解析により行った。なお、家庭用浄化槽からは他にも*Bacillus cereus*、*Acinetobacter* sp.、*Microbacterium lacticum*等12種類の細菌が単離されたが、*E. ludwigii*は予備実験から*Colpidium* sp.によく捕食される細菌であることが明らかになっており、今回の供試細菌とした。

本細菌の前培養はLB寒天培地で継代培養している株をLB液体培地（Bacto Tryptone 10g、Yeast extract 5g、NaCl 10g、蒸留水 1l、pH7.5）にて20℃、60rpmで3日間振とうして行った。この培養液を8000rpm、20分で遠心分離を行い改変Taub培地の培養液50mlに懸濁させ、再度8000rpm、20分で遠心分離して20mlの改変Taub培地に懸濁させた*E. ludwigii*を本試験に供試した。

一方供試原生動物は、浄化槽から分離された絨毛虫類*Colpidium* sp.を用いた。当該絨毛虫は排水の生物処理システムにおいて広範に出現することが確認されており¹¹⁾、各種の細菌に対する捕食選好性実験¹⁷⁾、連続培養による被食捕食実験等¹⁸⁾にも広く用いられることから、本研究に適用した。*Colpidium* sp.は改変Taub培地に上述の方法で遠心洗浄した*E. ludwigii*懸濁液を約 10^8 CFU・ml⁻¹となるように接種して継代培養を行った。本研究で用いた*Colpidium* sp.は無菌株ではないため、*E. ludwigii*以外の土着細菌の持ち込みを抑える必要がある。そのため本株を実験に用いる場合、*E. ludwigii*による継代培養を5回以上繰り返したものについて試験に供した。試験時の調整には改変Taub培地に上述の方法で遠

心洗浄した*E. ludwigii*懸濁液を約 10^8 CFU $\cdot$ ml $^{-1}$ となるように接種し、20℃、静置条件で5日間行った。なお本条件下で*Colpidium* sp.を培養した場合、平板培養法で出現するコロニーの色調や形状で判断した*Colpidium* sp.の持ち込み細菌群は3日目までは検出されず、5日目までには20%程度であった。これ以上の期間では*Colpidium* sp.の持ち込み細菌群が指数的に増加し、*E. ludwigii*を優先種とすることが困難であったため、実験期間を5日間とした。

2. 2 実験条件および測定方法

試験のための培地は、改変Taub培地1lに有機物としてポリペプトン200mg添加したTP₂₀₀培地を用いた。8本の300ml容三角フラスコに200mlのTP₂₀₀培地を入れ、この中のうち4本の三角フラスコに*E. ludwigii*のみを、別の4本の三角フラスコに*E. ludwigii*および*Colpidium* sp.を接種し、前者を単独培養、後者を混合培養とした。なお、*E. ludwigii*の初期個体数密度は単独培養系で 3.5×10^8 CFU $\cdot$ ml $^{-1}$ 、混合培養系で 3.1×10^8 CFU $\cdot$ ml $^{-1}$ であり、*Colpidium* sp.の初期個体密度は 2.3×10^2 N $\cdot$ ml $^{-1}$ であった。各フラスコは実験開始時（0日目）と実験終了時（5日目）に生物の個体数密度および全有機炭素濃度（TOC、mg $\cdot$ C $\cdot$ l $^{-1}$ ）と溶存態有機炭素（DOC、mg $\cdot$ C $\cdot$ l $^{-1}$ ）を測定した。単独培養および混合培養のうちそれぞれ1本のフラスコについて経日的に個体数密度と各態の有機炭素濃度を測定した。培養温度は20℃とし、静置条件で培養を行った。上述したすべての培地は作製後121℃、20分のオートクレーブ滅菌を行った。

繊毛虫*Colpidium* sp.は光学顕微鏡にて計数し、細菌*E. ludwigii*は改変Taub培地で10段階希釈後、LB寒天培地を用いて混積平板法により25℃、5日間で平板に出現したコロニー数を計測した。有機炭素濃度についてはTOC5000（島津製作所製）を用いて培養液中の全有機炭素（TOC）および溶存態有機炭素（DOC）を測定した。DOCについては培養液10mlを注射筒に装着したポアサイズ0.2 μ mの滅菌済みPTFEメンブレンフィルターユニット（Millipore社製、マイレックス-FG[®]）でろ過を行った後に測定を行った。懸濁態有機炭素（POC、mg $\cdot$ C $\cdot$ l $^{-1}$ ）はTOCとDOCとの差により算出した。なお、今回のろ過操作においては本フィルターからの有機炭素の溶出は最大でも0.012mg $\cdot$ C $\cdot$ l $^{-1}$ であり、無視できる量であることをあらかじめ確認した。

各実験データの統計解析はMicrosoft[®] Excel 2004（for

Mac OS 8.5）およびStatView 4.5 for Mac OS 8.5（Abacus Concepts, Inc.）を用いて行った。

3. 結果および考察

高度処理合併浄化槽好気槽から分離された*Colpidium* sp.を対象として、TP₂₀₀培地中での個体群動態とそれに伴う有機炭素濃度の経日変化についてそれぞれFig. 1、Fig. 2に示した。*E. ludwigii*単独培養における*E. ludwigii*の個体数密度は、実験開始時 3.3×10^8 CFU $\cdot$ ml $^{-1}$ であったものが2日目までに 4.1×10^8 CFU $\cdot$ ml $^{-1}$ まで増殖したものの、再び減少し、5日目までに 3.7×10^8 CFU $\cdot$ ml $^{-1}$ となった。また、実験開始時から2日目までに22.3 mg $\cdot$ C $\cdot$ l $^{-1}$ のDOCが、さらに5日目までに24.5mg $\cdot$ C $\cdot$ l $^{-1}$ のDOCが減少した。一方*E. ludwigii*と*Colpidium* sp.との混合培養系では、*E. ludwigii*は実験開始時から3日目にかけて 3.1×10^8 CFU $\cdot$ ml $^{-1}$ から 5.5×10^6 CFU $\cdot$ ml $^{-1}$ まで急速に減少し、この間に*Colpidium* sp.は 2.3×10^2 N $\cdot$ ml $^{-1}$ から 1.2×10^4 N $\cdot$ ml $^{-1}$ まで増殖した。また実験開始時から2日目までに32.7 mg $\cdot$ C $\cdot$ l $^{-1}$ のDOCが、さらに5日目までに55.2mg $\cdot$ C $\cdot$ l $^{-1}$ のDOCが減少した。Fig. 3に

Fig. 1 Population dynamics of bacteria (*E. ludwigii*) and ciliate (*Colpidium* sp.) in the monoculture and the mixed culture. The each error bar in the plot at 0day and 5day represents the standard deviation calculated from the data of 4 flasks respectively. For mid 4 days in the each culture, we selected a flask to observe bacteria and ciliate. The each error bar in the plot at mid 4 days represents standard deviation calculated from the data of the selected flask respectively. Symbols: □, *E. ludwigii* (monoculture); ■, *E. ludwigii* (mixed culture); ●, *Colpidium* sp. (mixed culture).

Fig. 2 Changes of the TOC, the DOC and the POC in the monoculture and the mixed culture. Symbols: ○, DOC (monoculture); □, TOC (monoculture); △, POC (monoculture); ●, DOC (mixed culture); ■, TOC (mixed culture); ▲, POC (mixed culture).

Fig. 3 The TOC, the DOC and the POC at initial condition (0day) and these after 5 days in the monoculture and the mixed culture. Each error bar on the top of each bar graph represents the standard deviation of the TOC and the error bar on the shadow bar graph represents the standard deviation of the DOC.

示したように *E. ludwigii* 単独、および *E. ludwigii* と *Colpidium* sp. との混合培養との間では5日目のDOCおよびTOCの減少量の間に明らかな差異が生じた (t 検定, $p < 0.01$)。また、DOCは主に細菌によって分解されと考えられるため、実験開始後の2日間で平均の細菌密度に対するDOC減少量を比較した。その結果、単独培養系では *E. ludwigii* の平均個体数は 3.9×10^8 CFU $\cdot$ ml $^{-1}$ 、DOCの減少量は 22.3 mg-C $\cdot$ l $^{-1}$ であった。一方混合培養系では *E. ludwigii* の平均個体数密度は 2.9×10^8 CFU $\cdot$ ml $^{-1}$ 、DOCの減少量は 32.7 mg-C $\cdot$ l $^{-1}$ であった。このように培養初期においても、繊毛虫の捕食が作用している

混合培養系の方が、単独培養系と比べて細菌個体数密度が低いにも関わらずDOC減少量が高くなるという結果となった。

POCは単独培養系において実験開始時点で 25.9 mg-C $\cdot$ l $^{-1}$ であったものが *E. ludwigii* の増殖の結果2日目には 38.1 mg-C $\cdot$ l $^{-1}$ まで増加し、5日目には 35.1 mg-C $\cdot$ l $^{-1}$ となった。混合培養系においては2日目まで変化せず、2日目から3日目にかけて 20.9 mg-C $\cdot$ l $^{-1}$ から 2.7 mg-C $\cdot$ l $^{-1}$ まで急激に減少したが、5日目には若干増加し 4.1 mg-C $\cdot$ l $^{-1}$ となった。

単独および混合培養系におけるDOC、POCおよびTOC (= DOC + POC) の初期値および5日目の値について比較を行った (Fig. 3)。*E. ludwigii* 単独培養系において、TOCおよびDOCはそれぞれ実験開始時から5日間で0.87倍、0.64倍に減少したが、POCは初期値の1.6倍に増加した。一方、混合培養系では、TOC、DOC、POCはすべて減少し、それぞれ実験開始時の0.22倍、0.23倍、0.21倍となった。したがって混合培養ではDOC、POCのいずれも5日で単独培養より効率よく分解されることがわかった。なかでも混合培養系においてPOCが単独培養系よりも減少したということは、食物連鎖が1段階増加したことで全体としての収率が低下したことによるものと考えられる¹⁾。この繊毛虫類によるPOC低減効果は、生物処理で発生する汚泥の減量化、および処理水の清澄度の向上にも寄与していることが推察される^{6, 12)}。

上述の分解活性の比較は単独培養および混合培養における細菌および原生動物のそれぞれの増殖や捕食過程を考慮したものではない。細菌と原生動物のバイオマスの変化を別々に推定し、それぞれの細菌の増殖や捕食過程を組み入れたモデルによる解析を行えば物質フローやエネルギーフローの解析などもおこなえるが、それぞれの増殖速度や捕食速度等のモデル解析に必要な複数のパラメータ推定が必要になる。しかしながら、今回のバッチ実験のみで、これらの推定を精度よく行うことは困難である。そこで、混合培養系における解析を容易にするために、細菌と原生動物を合わせたバイオマスであるPOCを一つの変数として扱うこととした。実際に、複雑な混合培養系である活性汚泥においても混合バイオマスを表すVSS等を動力学変数として使われている実績がある¹⁹⁾。従って、本研究においてもPOCを変数として解析を行うことは妥当であると考えられる。すなわち、POC (mg-C $\cdot$ l $^{-1}$) 当たりのDOC (mg-C $\cdot$ l $^{-1}$) の分解過程を式(1)により近似的に表し¹⁹⁾、単位POCあたりの比分解速度定数 k (day $^{-1} \cdot$ (mg-C/l) $^{-1}$) を、単独培養系と混合培養系で

比較することとした。

$$\frac{dDOC}{dt} = -k \cdot DOC \cdot POC \dots\dots\dots (1)$$

式(1)を積分すると

$$\ln\left(\frac{DOC_{t_n}}{DOC_0}\right) = -k \int_0^{t_n} POC \cdot d\tau \dots\dots\dots (2)$$

となる。ここで DOC_0 、 DOC_{t_n} はそれぞれ実験開始後 0 日目、 t_n 日目の DOC 濃度である。式(2)を台形則で近似した場合、

$$\int_0^{t_n} POC \cdot d\tau \approx \sum_{i=1}^n (t_i - t_{i-1}) \cdot (POC_{t_i} + POC_{t_{i-1}}) / 2 \dots\dots (3)$$

となる。 POC_{t_i} は実験開始後 t_i 日目の POC 濃度であり、式(3)の右辺は t_i 日目までの POC 濃度の積算量である。今回の実験においては $n = 3$ で $t_0 = 0$ 、 $t_1 = 2$ 、 $t_2 = 3$ 、 $t_3 = 5$ day である。 k の推定値は、 t_0 日目および t_i 日目における DOC の比の対数に対して式(3)における POC の積算量をプロットし、その回帰係数により求めた (Fig. 4)。その結果、*E. ludwigii* 単独培養系では $3 \times 10^{-4} \text{ day}^{-1} \cdot (\text{mg-C/l})^{-1}$ 、*Colpidium* sp. との混合培養系では $4 \times 10^{-2} \text{ day}^{-1} \cdot (\text{mg-C/l})^{-1}$ となり、混合培養系における POC あたりの DOC 分解速度は単独培養系の約 130 倍に上昇した (Fig. 5)。このように混合培養系において、POC 当たりの DOC 分解速度が著しく高くなるという結果に対して、*Colpidium* sp. が単なる細菌の捕食者ではなく、以下で考察するような作用により DOC 減少に関与している可能性を検討する必要がある。

しかしながら、今回の実験では *Colpidium* sp. が完全に無菌株ではないので、持ち込み細菌群中に有機物分解活性が高い細菌が存在した可能性についても考えなければならない。5 日目での持ち込み細菌の割合は約 20% であることから、仮に、混合培養系では持ち込み細菌が常に 2 割を占め、130 倍の DOC 分解速度の増加分を担っていたとすれば、*E. ludwigii* に比べて持ち込み細菌は約 $130 / 0.2 = 650$ 倍の有機物分解活性を持っている必要があると考えられる。さらに、この計算に原生動物が POC に占める割合を考慮した場合、細菌の割合自体が減るので、持ち込み細菌はさらに高い有機物分解活性を持っている必要がある。また、Fig. 4 から明らかなように、3 日目までにおいても (Fig. 4 で左から 2 番目までの点)、5 日目まで (Fig. 4 で左から 3 番目までの点) と同様な DOC 分解の傾向を示しており、混合培養系と単独培養

Fig. 4 The plot of the accumulative POC versus the value of $\ln(DOC_{t_n}/DOC_0)$ in each culture. Symbols: ○, monoculture; ●, mixed culture.

Fig. 5 The specific DOC decrease rate per POC in the monoculture and the mixed culture. Each error bar represents the standard error from the regressions.

系との間の DOC 分解速度の差は顕著である。実際には、3 日目ではほとんど持ち込み細菌は検出されていないことを考慮すれば、持ち込み細菌によって混合培養系における 130 倍の DOC 分解速度の増加を説明することは非常に困難であると考えられる。

次に、*Colpidium* sp. そのものの DOC 減少への関与について検討した。もっとも直接的な作用としては *Colpidium* sp. が DOC を取り込むことであると考えられる。飲作用により原生動物細胞が DOC を取り込む機構を持っていることについては以前より知られている²⁰⁾。実際、DOC を直接取り込む鞭毛虫^{21, 22)} も自然水域から見いだされている。また、繊毛虫類 *Tetrahymena pyriformis* は完全合成培地、あるいはプロテオースペプトン培地を用いて

無菌的に増殖できることが知られている^{23, 24)}。しかしながら、同じ繊毛虫類である *Colpidium* sp. が溶存態有機物を十分にに取り込むことができるかについては明確な知見はなく²⁰⁾、今後の研究課題である。もちろん、*Colpidium* sp. による DOC の取り込み作用のみで、130倍もの DOC 分解速度の増大を説明することは難しいと考えられるが、*Colpidium* sp. が DOC を取り込む場合には、次のような可能性にも着目する必要があると考えられる。すなわち、*E. ludwigii* 単独では分解困難な DOC 成分が *Colpidium* sp. によって取り込まれた後、アミノ酸などの代謝産物として分泌されることで、*E. ludwigii* が容易に分解できるようになり、混合培養系での DOC 分解速度が増加するという機構も検討に値する⁵⁾。今回の実験においても、単独培養系において *E. ludwigii* の個体数密度が低下しつつある 3 日目以降で DOC の減少がほぼ停止しているのに対し、混合培養系の DOC は 3 日目以降も減少が続いている。さらに 4 日目から 5 日目にかけてわずかながら *E. ludwigii* の再増殖が見られ、原生動物の代謝産物を利用した増殖の可能性を示唆していると考えられる。

また、原生動物が細菌を捕食することで有機物分解速度および分解量の上昇に寄与する可能性も存在する。*E. ludwigii* の個体群動態から判断して、*E. ludwigii* は 2 日目には本試験で与えた DOC 濃度に対して個体数密度が飽和状態となって細菌一個体あたりの分解量が低下するのに対し、混合培養系では *E. ludwigii* の個体数密度が *Colpidium* sp. の捕食により飽和状態になることが抑えられているために、混合培養系内の細菌数は増加しない場合でも、細菌は分裂し続けることが可能となり、常に増殖状態を維持することで有機物の分解量も多くなったということが考えられる。この場合、細菌の収率に比較し、原生動物の収率が著しく低い場合は、細菌と原生動物を合わせたバイオマス量 (POC) は著しく低下し、全バイオマス (POC) が減少しているにもかかわらず、DOC も速やかに減少することが可能になる。このことは、前述したように、食物連鎖段階の増加による DOC 分解の効率化と汚泥減量化の両立に結びつくことになる。

さらに原生動物が細菌に与える活性化作用として Glaser は他にも次のものがあると述べている³⁾。(1) 原生動物が、細菌に炭素源を利用させる窒素およびリンのような栄養塩を放出する²⁵⁻²⁷⁾。(2) 原生動物が分解酵素を放出する²⁸⁾。(3) 原生動物が細菌周囲に微小な攪乱を引き起こし、基質や酸素の供給を増大させる²⁹⁾。(4) 連続培養系では単に細菌を系から除去することが分解速度を増加させる³⁰⁾。(5) 優占しているが基質の分解者として非効率な

細菌を原生動物が除去する³¹⁾。(6) 原生動物が酢酸塩や酪酸塩、エタノールのような細菌の増殖を阻害する代謝産物を消費することにより細菌の増殖を促進する^{23, 32)}。さらに特殊な場合として、Cox と Deshusses はトルエン処理の生物分解実験を行い、原生動物 *Tetrahymena pyriformis*、*Vorticella microstoma* をリアクターに接種した系の方が接種しない系よりもトルエン処理速度が高かったことを報告している³³⁾。彼らが用いた繊毛虫類はトルエンを直接取り込むことは考えにくいので、これらの繊毛虫類が細菌の有機物分解活性を向上させる効果も考慮に入れる必要があると考察している。従って、本実験においても、繊毛虫 *Colpidium* sp. が細菌 *E. ludwigii* を活性化することで、有機物分解速度を増大させていることが十分考えられる。

本研究により、細菌 *Enterobacter ludwigii* 単独の場合より細菌 *Enterobacter ludwigii* と繊毛虫 *Colpidium* sp. が共に存在する場合では、有機物の POC あたりの分解速度は約 130 倍に増加した。この 130 倍という著しい増大を説明するためには繊毛虫の有機物の直接取り込みと、原生動物が何らかの作用で細菌を活性化することによる有機物分解の亢進の両方を考慮する必要があると考えられる。その機構については今後の研究課題であるが、細菌捕食者である原生動物の存在が有機物分解速度の増大、すなわち有機物処理能向上に極めて重要な因子となることが明らかになった。そのため、生活系排水処理の機構解明のためには、原生動物の存在をこれまで以上に重視する必要があると考えられる。

4. まとめ

原生動物が微生物群集内で溶存態有機物の分解に与える影響について明らかにするために、浄化槽から分離された繊毛虫類 *Colpidium* sp. および細菌 *Enterobacter ludwigii* を用い、有機物源としてペプトン $200\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ を含む無機栄養塩培地で、*E. ludwigii* 単独培養実験、および *E. ludwigii* と *Colpidium* sp. との混合培養実験を行い、これらの個体群動態と全有機炭素 (TOC)、溶存態有機炭素 (DOC)、懸濁態有機炭素 (POC) の動態を比較、解析した。得られた知見は以下のとおりである。

- 1) 実験開始後の 2 日間においては単独培養系で *E. ludwigii* の平均個体数および DOC 減少量はそれぞれ $3.9 \times 10^8 \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $22.3\text{mg}\cdot\text{C}\cdot\text{l}^{-1}$ 、混合培養系では *E. ludwigii* の平均個体数密度および DOC 減少量はそれぞれ $2.9 \times 10^8 \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $32.7\text{mg}\cdot\text{C}\cdot\text{l}^{-1}$ と

なり、混合培養系は単独培養系に比べて細菌個体数密度が低いにも関わらずDOC減少量が高くなった。

- 2) 単独培養系では培養5日間でTOC、DOCおよびPOCはそれぞれ実験開始時の0.87倍、0.64倍、1.60倍（増加）であったが、混合培養系ではそれぞれ0.22倍、0.23倍、0.21倍となりDOCのみならずPOCも大きく低下し、繊毛虫類による細菌の捕食が汚泥減量化および処理水の清澄化につながることを示唆された。
- 3) 培養5日間のDOCおよびPOCの経日変化からPOC当たりのDOC減少速度を求めた場合、単独培養系では $3 \times 10^{-4} \text{ day}^{-1} \cdot (\text{mg-C/l})^{-1}$ 、混合培養系では $4 \times 10^{-2} \text{ day}^{-1} \cdot (\text{mg-C/l})^{-1}$ となり、混合培養系におけるPOC当たりのDOC減少速度は単独培養系の約130倍に上昇した。

引用文献

- 1) 須藤隆一：廃水処理、須藤隆一編 環境浄化のための微生物学、講談社サイエンスフィック、東京（1983）
- 2) Madoni P.: Estimates of ciliated protozoa biomass in activated sludge and biofilm, *Biores. Technol.*, 48, 245-249 (1994)
- 3) 須藤隆一：微生物生態系における細菌・原生動物関係、微生物生態研究会編 微生物の生態 2 相互作用をめぐって、東京大学出版会、東京（1975）
- 4) Curds C. R.: The ecology and role of protozoa in aerobic sewage treatment processes, *Ann. Rev. Microbiol.*, 36, 27-46 (1982)
- 5) Ratsak C. H., Maarson K. A. and Kooijman S. A. L. M.: Effects of protozoan on carbon mineralization in activated sludge, *Wat. Res.*, 30, 1-12 (1996)
- 6) Ratsak C. H., Kooi B. W. and van Varseveld H. W.: Biomass reduction and mineralization increase due to the ciliate *Tetrahymena pyriformis* grazing on the bacterium *Pseudomonas fluorescens*, *Wat. Sci. Tech.*, 29, 119-128 (1994)
- 7) Bloem J., Starink M., Bar-Gilissen M.-J. B. and Cappenberg T. E.: Protozoan grazing, bacterial activity, and mineralization in two-stage continuous cultures, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 3113-3121 (1988)
- 8) Glaser D.: Simultaneous consumption of bacteria and dissolved organic matter by *Tetrahymena pyriformis*, *Microb. Ecol.*, 15, 189-201 (1988)
- 9) 小浜暁子、李先寧、金主鉉、西村修、稲森悠平、須藤隆一：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、環境工学研究論文集、37, 51-60 (2000)
- 10) 李先寧、小浜暁子、金主鉉、千葉信男、西村修、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、水環境学会誌、23, 661-667 (2000)
- 11) 須藤隆一、稲森悠平：図説生物相からみた処理機能の診断、産業用水調査会、東京（1983）
- 12) 盛下勇：応用原生動物学、山海堂、東京（2004）
- 13) 北尾高嶺：生物学的排水処理工学、コロナ社、東京（2003）
- 14) Hoffmann H., Stindl S., Stumpf A., Mehlen A., Monget D., Heesemann J., Schleifer K. H. and Roggenkamp A.: Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance, *Syst. Appl. Microbiol.*, 28, 206-212 (2005)
- 15) Taub F. B. and Dollar A. M.: A *Chlorella-Daphnia* food chain study: The design of a compatible chemically defined culture medium, *Limnol. Oceanogr.*, 9, 61-74 (1964)
- 16) Tanaka N., Inamori Y., Murakami K., Akamatu T. and Kurihara Y.: Effect of species composition on stability and reproductivity of a small-scale microcosm system, *Wat. Sci. Tech.*, 30, 125-131 (1994)
- 17) Taylor W. D. and Berger J.: Growth of responses of cohabiting ciliate protozoa to various prey bacteria, *Can. J. Zool.*, 54, 1111-1114 (1976)
- 18) Sudo R., Kobayashi K. and Aiba S.: Some experiments and analysis of a predator-prey model: Interaction between *Colpidium campylum* and *Alcaligenes faecalis* in continuous and mixed culture, *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 167-184 (1975)
- 19) Andrews J. F.: Kinetics and mathematical modeling, *In: Curds C. R. and Hawkes H. A. eds., Ecological aspects of used-water treatment Vol. 3 The processes and their ecology*, Academic Press, London (1983)
- 20) Kudo, R. R.: Protozoology, Fifth ed., Charles C Thomas · Publisher, Illinois (1966)
- 21) Porter, K. G., Sherr, E. B., Sherr, B. F., Pace, M. and Sanders, R. W.: Protozoa in Planktonic Food Webs, *J. Protozool.*, 32, 409-415
- 22) Pratt, J. R. and Cairns, Jr. J.: Functional Groups in the Protozoa: Roles in Differing Ecosystems, *J. Protozool.*, 32, 415-423 (1985)
- 23) Hill D. L.: The biochemistry and physiology of *Tetrahymena*, Academic Press, New York (1972)
- 24) Rasmussen L. and Kludt T. A.: Particulate material as a prerequisite for rapid cell multiplication in *Tetrahymena* cultures, *Exptl. Cell Res.*, 59, 457-463 (1970)
- 25) Barsdate R. J., Prentki R. T. and Fenchel T.: Phosphorus cycle of model ecosystems: significance for decomposer food chains and effect of bacterial grazers, *Oikos*, 25, 239-251 (1974)

- 26) Cole C. V., Elliott E. T., Hunt H. W. and Coleman D. C.: Trophic interactions in soils as they affect energy and nutrient dynamics. V. Phosphorus transformations, *Microb. Ecol.*, 4, 381-387 (1978)
- 27) Johannes R. E.: Influence of marine protozoa on nutrient regeneration, *Limnol. Oceanogr.*, 10, 434-442 (1965)
- 28) Banno Y., Yano K. and Nozawa Y.: Biochemical characterization of selected proteases during growth in *Tetrahymena pyriformis* WH-14: comparison of extracellular with intracellular proteases, *J. Protozool.*, 29, 91-98 (1982)
- 29) Fenchel T.: The significance of bacterivorous protozoa in the microbial community of detrital particles. *In*: Cairns J. ed., *Aquatic microbial communities*, 2nd ed. Garland Publishing, New York (1977)
- 30) Hunt H. W., Cole C. V., Klein D. A. and Coleman D. C.: A simulation model for the effect of predation on bacteria in continuous culture, *Microb. Ecol.*, 3, 259-278 (1977)
- 31) Güde H.: Grazing by protozoa as selection factor for activated sludge bacteria, *Microb. Ecol.*, 5, 225-237
- 32) Elliott A. M.: Life cycle and distribution of *Tetrahymena*, *In* Elliott A. M. ed., *Biology of Tetrahymena*, Dowden, Hutchinson and Ross, Stroudsburg, Pennsylvania (1973)
- 33) Cox H. H. J. and Deshusses M. A.: Biomass Control in Waste Air Biotrickling Filters by Protozoan Predation, *Biotechnol. Bioeng.*, 62, 216-224 (1999)
(受付 2007.6.11)
(受理 2007.9.3)