

環形動物貧毛類 *Dero limosa* の増殖に及ぼす環境因子の影響

林 紀 男¹⁾・大内山高広²⁾・水 落 元 之³⁾・稲森悠平³⁾

¹⁾ 千葉県立中央博物館

〒260-8682 千葉市中央区青葉町 955-2

E-mail: hayashin@chiba-muse.or.jp

²⁾ 日本環境クリエイト(株)

〒300-3261 茨城県つくば市花畑 2-10-19

³⁾ 国立環境研究所

〒305-0053 茨城県つくば市小野川 16-2

要 旨 環形動物貧毛類に属する微小な水生ミミズ類は、排水の生物処理施設において主に生物膜法にしばしば大量に出現する凝集体摂食者である。ここでは貧毛類 *Dero limosa* に着目し、その増殖に及ぼす環境因子の影響を検討した。得られた知見は以下のように要約される。1) 水温の至適条件は 30℃、この時の最大の比増殖速度は $0.33 \cdot \text{day}^{-1}$ 、活性化エネルギーは $44,800 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。夏期の高水温時に増殖活性が高まるが、冬の 5℃ 程度の低水温時にも十分増殖が可能であることが示唆された。2) pH は、5.2 以下および 9.7 以上において増殖に影響が認められ、pH 5.7~9.2 の間では大きな影響は認められず、通常的生活排水を処理する生物膜法で認められる pH においては、*D. limosa* の増殖は大きな影響をうけない。3) リン酸緩衝液濃度 $0.0005 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上で *D. limosa* の増殖速度は半減し、同 $0.0007 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上で *D. limosa* の増殖が完全に阻害される。*D. limosa* は塩濃度感受性が高く、増殖に及ぼす重要な環境因子である。4) 食物源としての細菌の種類は、*Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoasceticus*, *Flavobacterium luteus*, *F. suaveolens*, *Streptococcus acidominus* の 6 種の単独細菌を用いた培養で増殖可能であり、*Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Achromobacter cycloclastus* らの 5 種の細菌は、*D. limosa* の食物源となり得ない。これらの選択食性は食物源としての細菌類の凝集性や菌体成分などによるものと推定された。5) 食物源としての汚泥濃度の影響から μ_{max} は 0.19 day^{-1} 、 K_s は $110 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、食物濃度が増殖に大きく影響を及ぼす。6) 振盪強度の影響は、最大加速度で $100 \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-2}$ を超えると増殖に影響が認められ、 $250 \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-2}$ を超えると増殖が完全に阻害される。振盪強度は *D. limosa* の増殖活性に大きな影響を及ぼす重要な環境因子である。

キーワード：環形動物、貧毛類、*Dero*、環境因子、増殖速度。

環形動物貧毛類に属する微小な水生ミミズ類は、排水の生物処理施設において主に生物膜法にしばしば大量に出現する(須藤, 1983)。凝集体摂食者である環形動物貧毛類は、ろ過摂食者である袋形動物輪虫類等との共存条件において水質浄化能および発生汚泥量の減量化に大きな役割を果たしている(稲森ほか, 1994; Inamori *et al.*, 1990) ことが知られる有用微小動物である。環形動物貧毛類としては、*Aeolosoma*, *Pristina*, *Nais*, *Dero*, *Paranais*, *Chaetogaster*, *Limnodrilus*, *Tubifex* などの属の出現頻度が高い(須藤・稲森, 1983)。これまでに、*Aeolosoma hemprichi*, *Pristina longiseta*, *Nais variabilis* など特に出現頻度の高い貧網類については、増殖に及ぼす各種の環境因子の影響に関する検討結果が報告(国安ほか, 1997)されている。しかしながら、これらの貧毛類に次いで出現頻度の高い貧毛類である *Dero* については、Krall(1968, 1969) が *D. obtusa* を対象にした細胞生理の報告を

行った後、いくつかの報告(Lewis and Suprenant, 1983; Xiao and Desser, 1988; Lin *et al.*, 1999; Vale and Sampayo, 1999; Trivinho *et al.*, 2000; Tsytsugina and Polikarpov, 2000)があるのみで、その生態に関する報告は全くなされていないのが現状である。

本研究では、生物膜法の処理施設において出現頻度の高い貧毛類として *Dero limosa* に着目し、その生理・生態学的諸特性にかかわる基礎的知見、すなわち水温、pH、塩濃度、食物源としての細菌の種類、汚泥濃度、振とう強度などの環境因子が増殖特性に及ぼす影響を明らかにすることを目的として実験的検討を行った。

実験方法

1. 供試動物

1) 特徴

供試動物の *Dero limosa* Leidy, 1880 は、環形動物

門 (Annelida) 貧毛綱 (Oligochaeta) に属する水生ミズ (Sperber, 1948; Brinkhurst, 1971) である。原始貧毛目 (Archiloligochaeta) ミズミズ科 (Naididae) に分類される。通常横分裂法で無性的に増殖し、生物膜に巣穴を形成して生息している (林, 1995)。凝集体摂食者として主に凝集状の細菌フロックを摂食し、ペレット状の糞塊を排泄する。体長は 6~12 mm で、体節数 42~48。体の後端部は扁平な鰓溝板となり拡大しうね状を呈する。口前葉は短く、眼点はない。背腹両面に剛毛を有し、背側剛毛束は 1 本の毛状剛毛と 1 本の針状剛毛からなり、第 6 体節からはじまる。腹側剛毛束は 3 本から 5 本の鉤状剛毛からなり、第 2 体節からはじまる。

2) 分離法

供試動物の *D. limosa* は、生活排水を処理している生物膜法の処理施設から分離したものをを用いた。分離は、倍率 7.5~64 倍の実体顕微鏡下で菌類、他の微小動物が存在しなくなるまで滅菌水で繰り返し洗浄するピペット洗浄法 (須藤, 1989) で行なった。なお、分離した *D. limosa* は $0.0013 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ リン酸緩衝液に食物源として滅菌活性汚泥を添加した汚泥懸濁液中で継代培養を行ない実験に供した。

2. 増殖特性の評価法

環境因子の微小貧毛類の増殖に及ぼす影響に関しては、*D. limosa* の比増殖速度 (μ) から評価した。なお、 μ は次式より算出した (須藤, 1989)。

$$\mu = 2.303 \log (N - N_0) / (t - t_0)$$

ここで、 N : t 日目の個体数 (N/ml)

N_0 : 0 日目の個体数 (N/ml)

3. 培養条件

D. limosa の増殖特性について、実際の生物処理施設において増殖に影響を及ぼす重要な環境因子である

温度、pH、塩濃度、食物源としての細菌の種類、汚泥濃度、振盪強度に着目して実験を行なった。なお、*D. limosa* の培養は直径 5.6 cm のペトリ皿を使用し、そこに食物源とリン酸緩衝液とをあわせて 12 ml になるようにして 20°C、静置条件下、初期餌密度 $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ で培養することを基本とした。各実験系では対象となる環境因子のみを変化させ、それぞれの設定条件において実験を行なった。培養初期の *D. limosa* の接種数は 1 ml あたり 3 個体とし、継代培養中のものから体長が $5 \pm 0.2 \text{ mm}$ の増殖期にある個体を用いた。全ての培養実験は 3 系列で行なった。

1) 環境因子としての温度

培養温度を 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 および 40°C の 8 段階に設定した恒温培養器を用いて培養した。

2) 環境因子としての pH

培養液の pH を、 Na_2HPO_4 と K_2HPO_4 の混合比を変化させることにより、pH 5.5~8.3 の範囲に設定して培養した。また、この他に水の電気分解法により電解槽 (日本インテックアクアケミカル製: TK732) を用いて pH 4.2~9.7 の範囲の水を生成し培養に供した。

3) 環境因子としての塩濃度

pH 6.5 に調整したリン酸緩衝液の濃度を 0~1/25 M の範囲に調整し培養に供した。なお、pH の初期設定を pH 6.5 としたのは、培養期間中に供試生物の代謝産物等により pH がアルカリ側に変化することを考慮して、培養期間中の pH を中性の 7 前後に維持するためである。また、供試塩濃度を 0~1/25 M の範囲としたのは、原生動物纖毛虫類 *Vorticella microstoma* は塩濃度 1/25 M 以上では増殖不能との知見 (林・大内山ほか, 1999) および輪虫類 (林ほか, 1998) その他の貧毛類 (国安ほか, 1997) の既存試験データと比較検討するためである。

表 1. 供試細菌

細菌名	株名*	グラム染色	形 状	酸素要求性
<i>Pseudomonas putida</i>	IAM1002	陰 性	桿 菌	好気性
<i>Bacillus cereus</i>	IAM1029	陽 性	桿 菌	好気性
<i>B. subtilis</i>	IAM1069	陽 性	桿 菌	好気性
<i>Escherichia coli</i>	IAM1239	陰 性	桿 菌	通性嫌気性
<i>Acinetobacter calcoasceticus</i>	IAM1517	陰 性	桿 菌	好気性
<i>Micrococcus luteus</i>	IAM1313	陽 性	球 菌	好気性
<i>Klebsiera pneumoniae</i>	IAM1102	陰 性	桿 菌	通性嫌気性
<i>Achromobacter cycloclastus</i>	IAM1013	陰 性	桿 菌	好気性
<i>Flavobacterium luteus</i>	IAM1667	陰 性	桿 菌	好気性
<i>F. suaveolens</i>	IFO3752	陰 性	桿 菌	好気性
<i>Streptococcus acidominus</i>	—	陽 性	球 菌	通性嫌気性

* IAM: 東京大学分子細胞生物学研究所 (Institute of Molecular and Cellular Bioscience); IFO, 財団法人発酵研究所 (Institute for Fermentation).

4) 環境因子としての食物源（細菌）の種類

表 1 に示す菌株系統保存施設から分譲を受けた細菌および排水の生物処理施設から単離した細菌を培養に供した。細菌は各々 30℃ 条件下、48 時間肉汁液体培地で培養し、リン酸緩衝液で 3 回洗浄し Resting Cell (須藤, 1989) としたものをを用いた。

5) 環境因子としての食物濃度

生活排水を処理する施設から採取した活性汚泥を高圧蒸気滅菌したものを滅菌活性汚泥として食物源とした。一般的に微生物の増殖において、食物濃度と増殖速度の関係が Monod 式で表されることから最大の汚泥濃度を膜分離活性汚泥等で観察される 20,000 mg・l⁻¹ に調整し、0~20,000 mg・l⁻¹ の範囲になるように培養に供した。

6) 環境因子としての振盪強度

微小貧毛類は、一般的に活性汚泥よりも振盪強度の小さい生物膜に数多く出現することが知られている。ここでは、振盪強度の微小貧毛類の増殖に及ぼす影響を明らかにするために、通常用いられる回転振盪培養および往復振盪培養を用いて最大加速度に着目した検討を行なった。回転振盪機における振盪強度を 0~200 rpm 及び往復振盪機での振盪強度を振幅 2.6 cm・周期 0~3 往復・秒⁻¹ の範囲に調整し培養を行なった。なお、振盪強度に関する培養実験は全て腰高ペトリ皿を用いて実験を行なった。なお、回転振盪と往復振盪の両者を用いたのは、*D. limosa* に加わる加速度が一定の場合と連続的に変化する場合を比較検討するためである。

回転振盪機による振盪では回転数を一定にした場合、速度の大きさは変わらなくてもその方向（円の接線方向）が絶えず変化するため加速度が存在する。この向心加速度 (α) は次式から算出される。

$$\alpha = r\omega^2 = 4\pi^2 n^2 r / T^2$$

ここで、 r : 円運動の半径、 ω : 角速度、 n : 回転数、 T : 周期とする。すなわち、2.6 cm の直径で等速円運動を行なう回転振盪の場合、0~200 rpm の加速度 α は、0~570 cm・sec⁻² (重力加速度 980 cm・sec⁻² を 1 g とすると 0~0.6 g) となる。

また、往復振盪機の場合には単振動であり、加速度が常に変化する環境である。この振動を正弦曲線としてとらえると、次式のように示される。

$$s = A \sin(\omega t + \theta_0)$$

ここで、 s : 変位、 A : 振幅、 ω : 角振動数、 θ : 位相、 θ_0 : 初位相とする。この場合の加速度 (α) は次式より算出される。

$$\alpha = -\omega^2 s$$

本研究の振幅 2.6 cm、3 往復・秒⁻¹ の往復振盪の場合、変位量 2.6 cm の地点、すなわち速度が 0 となる地点の加速度が最大となり、この最大加速度 ($\alpha_{\max}$) は、920 cm・sec⁻² (0.9 g) となる。

結 果

1. 温度の増殖に及ぼす影響

生物活性に及ぼす影響の大きい環境因子としての温度が、*D. limosa* の増殖速度に及ぼす影響を及ぼすかについて、水温を 5℃~40℃ の範囲に設定し比増殖速度の測定を行なった。なお、ここで使用した *D. limosa* は、各培養温度で前培養したものである。図 1 は *D. limosa* の増殖に及ぼす温度の影響をアレニウス

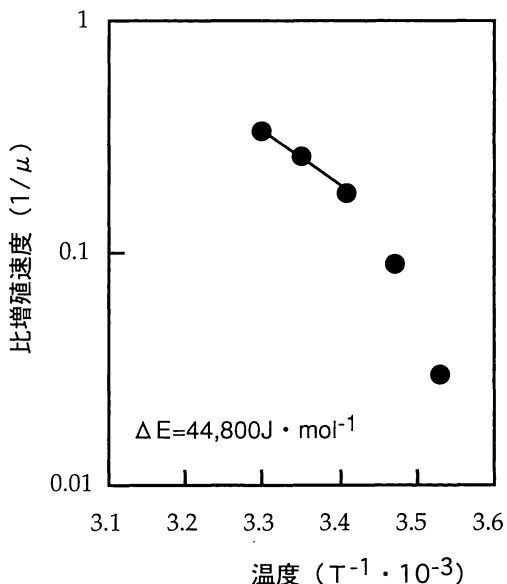


図 1. *Dero limosa* の増殖に及ぼす温度の影響。

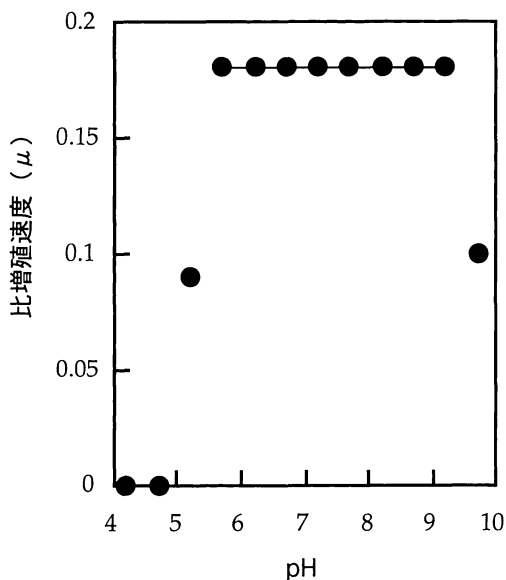


図 2. *Dero limosa* の増殖に及ぼす pH の影響。

プロット (須藤, 1989) したものである。 *D. limosa* の μ は 30°C で最大の $0.33\cdot\text{day}^{-1}$ となり, 10°C で $0.03\cdot\text{day}^{-1}$ と増殖活性が急激に低下した。 35°C 以上および 5°C の温度条件では増殖が完全に阻害された。

2. pH の増殖に及ぼす影響

生物の生存および増殖には pH が大きな影響を及ぼす重要な因子であることが知られている。ここでは pH を Na_2HPO_4 と K_2HPO_4 の混合比を変化させることおよび電解槽を用いた電気分解法により変化させ *D. limosa* の増殖に及ぼす影響を検討した。図 2 は、電解槽を用いた電気分解法により得られた初期培養液 pH 4.7 から pH 9.7 による実験結果を示したものである。pH が 4.7 以下の酸性条件下では *D. limosa* の増殖が完全に阻害された。また、pH 5.2 の弱酸性条件および pH 9.7 弱アルカリ条件において *D. limosa* の増殖活性が著しく制限された。 *D. limosa* の増殖に影響を及ぼさない pH 範囲は pH 5.7~9.2 の範囲であることが明らかとなった。

3. 塩濃度の増殖に及ぼす影響

塩濃度も pH と同様に生物の生存および増殖に大きな影響を及ぼす重要な因子であることが知られている。ここではリン酸緩衝液の濃度を $0\sim 0.0067\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ の範囲に調整し培養した。結果は図 3 に示すとおりである。すなわち、 $0.0003\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 以下の塩濃度では *D. limosa* の増殖に影響が認められなかったが、リン酸緩衝液濃度 $0.0005\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ において増殖速度が半減し、 $0.0007\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上の濃度では増殖が完全に阻害されることが明らかとなった。

4. 食物源としての細菌種の増殖に及ぼす影響

食物源として得た細菌種の増殖に及ぼす影響の結果は図 4 に示すとおりである。すなわち、*Pseudomonas*

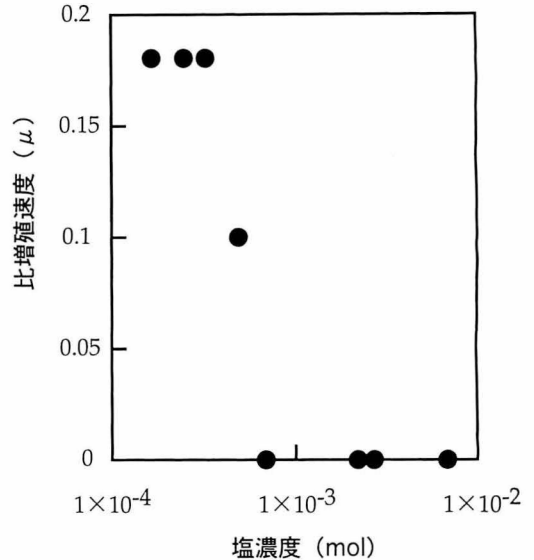


図 3. *Dero limosa* の増殖に及ぼす塩濃度の影響。

putida, *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoasceticus*, *Flavobacterium luteus*, *F. suaveolens*, *Streptococcus acidominus* の 6 種の単独細菌を用いた培養で増殖可能であり, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Klebsiera pneumoniae*, *Achromobacter cycloclastus* らの 5 種の細菌は, *D. limosa* の食物源となり得ないことが明らかとなった。比増殖速度は, *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoasceticus* の 2 種において最大の $0.18\cdot\text{day}^{-1}$ を記録し, その他の食物源となり得た細菌の中では *Flavobacterium suaveolens* が最も低い比増殖速度で $0.12\cdot\text{day}^{-1}$ であった。

5. 食物濃度の増殖に及ぼす影響

食物源としての汚泥濃度を変化させた場合の *D.*

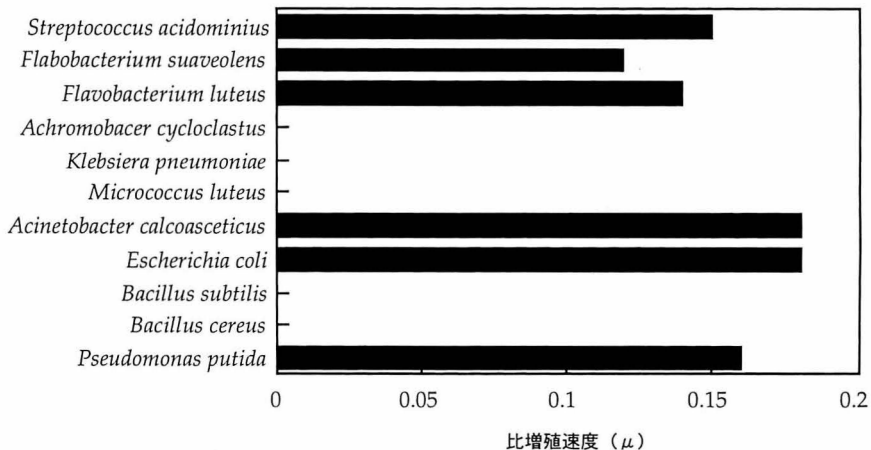


図 4. *Dero limosa* の増殖に及ぼす食物源としての細菌の種類の影響。

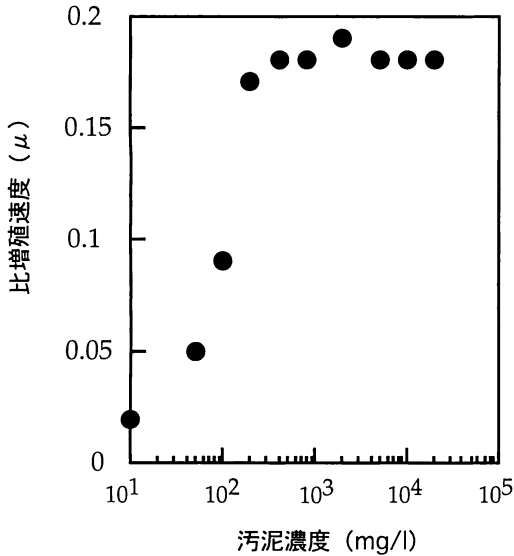


図 5. *Dero limosa* の増殖に及ぼす汚泥濃度の影響。

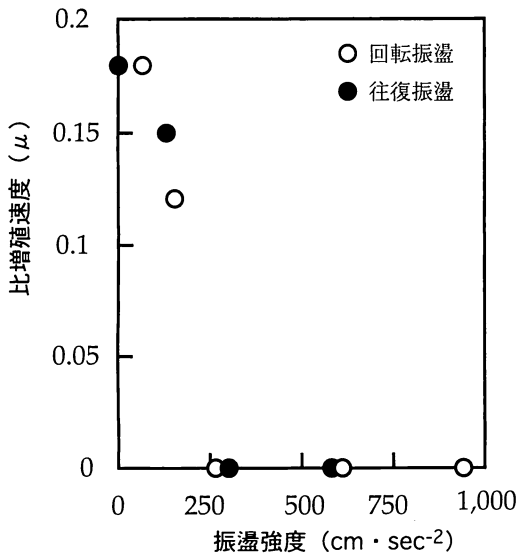


図 6. *Dero limosa* の増殖に及ぼす振盪強度の影響。

limosa の増殖特性は図 5 に示すとおりである。この図から *D. limosa* の増殖速度と汚泥濃度との間には双曲線関係が得られることが明らかである。この範囲において Monod 式を適用すると最大比増殖速度 (μ_{max}) は $0.19 \cdot \text{day}^{-1}$ 、食物源である汚泥に対する半飽和定数 (K_s) は $110 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ と算定された。

6. 振盪強度の増殖に及ぼす影響

本研究で得られた振盪強度を最大加速度に換算し、

D. limosa の比増殖速度との関係を図示すると図 6 のように示される。この図から *D. limosa* では振盪強度が高まり最大加速度が一定の回転振盪の場合でも、最大加速度が連続的に変化する往復振盪の場合でも最大加速度が $100 \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-2}$ を超えた段階で比増殖速度の低下が認められ、同じく最大加速度が $250 \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-2}$ を超えた段階で増殖が完全に阻害されることが明らかとなった。

考 察

1. 温度の増殖に及ぼす影響

図 1 において、直線関係の得られる 20°C から 30°C の間の直線の傾きから *D. limosa* の活性化エネルギー (須藤, 1989) を算出すると、 $44,800 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ であった。この結果は、これまでに明らかにされている微小貧毛類 *Aeolosoma hemprichi* で $52,300 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、*Pristina longiseta* で $77,400 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、*Nais variabilis* で $75,300 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ などの値 (国安ほか, 1997) と比較して *D. limosa* が 20°C から 30°C の間では温度の影響を受けにくいことを示唆するものである。また、これまでに明らかにされている原生動物の活性化エネルギー、*Paramecium caudatum* の $85,800 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、*Vorticella microstoma* の $76,600 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、*Tetrahymena pyriformis* の $77,000 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ など (稲森, 1993; Curd and Vandyke, 1966) と比較しても、*D. limosa* は 20°C から 30°C の間における増殖は、温度の影響を受けにくいことが明らかとなった。しかしながら、 35°C 以上の水温において増殖が完全に阻害された。これは溶存酸素濃度の不足に起因するものであると推定される。また、水温 5°C 以下の条件で増殖が完全に阻害されたことから、自然水域の低水温条件では増殖が困難であることが示唆された。しかしながら、排水処理施設では流入水が 5°C を下回することは稀 (林ほか, 2001) であり、通常の処理施設における運転条件では水温は *D. limosa* の増殖に大きな影響を及ぼさないことが明らかとなった。

2. pH の増殖に及ぼす影響

図 2 から *D. limosa* の至適 pH 条件は pH 5.7~9.2 の範囲であることが明らかである。これまでに、*A. hemprichi*、*P. longiseta*、*N. variabilis* などの貧毛類で pH 9.7 のアルカリ性条件下において増殖に影響が認められている (国安ほか, 1997)。また、pH 4.7 以下の条件でも *A. hemprichi*、*P. longiseta*、*N. variabilis* などの貧毛類に増殖阻害が生じている (国安ほか, 1997)。これらの結果から、*D. limosa* の増殖に及ぼす pH の影響は *A. hemprichi*、*P. longiseta*、*N. variabilis* などの貧毛類と類似しており、特に酸性条件への耐性が低い特徴があることが明らかとなった。ただし、培養中に *D. limosa* の代謝産物の蓄積等の影響により

pH の変動が生じ、初期設定 pH が 5.2 では培養後に 6.1、初期設定 pH が 9.7 では培養後に 8.5 となった。

リン酸塩の混合比率を変化させて得た pH による実験では、初期設定 pH が 5.7 の場合、培養後 pH が 6.6 となった。いずれの供試 pH においても、電解槽を用いた電気分解法により設定した pH と比較して、リン酸塩の混合比率を変化させて得た pH による実験で培養期間中の pH 変動幅を小さく抑えることが可能であった。これは培養液に緩衝能があるためであると考えられる。このリン酸塩の混合比率を変化させて行なった実験からも *D. limosa* の増殖に及ぼす pH の影響は、pH 5.7 から pH 9.2 の範囲では *D. limosa* の増殖に大きな影響は認められないという同様の結果が得られた。林・大内山ほか (1999) は、原生動物纖毛虫類 *Vorticella microstoma* における pH への感受性は、pH 6.5~7.5 が至適 pH であり、pH 8.0 以上では斃死することを報告している。すなわち、通常的生活排水を対象とした生物処理法において、出現頻度の高い原生動物纖毛虫類 *V. microstoma* と比較すると *D. limosa* の pH に対する耐性範囲が大きい。このことから生物膜法の処理施設において、pH は *D. limosa* の増殖に大きな影響を及ぼす環境因子にはならないことが明らかとなった。

3. 塩濃度の増殖に及ぼす影響

D. limosa の増殖速度は、リン酸緩衝液濃度 0.0005 mol 以上で半減し、0.0007 mol 以上で 0 になることが明らかとなった。国安ほか (1997) は、*A. hemprichi*, *P. longiseta*, *N. variabilis* などの貧毛類の塩濃度耐性 0.04 mol 以上で増殖が完全に阻害されることを報告している。この報告に比較して、*D. limosa* は著しく高い感受性、換言すれば低い耐性であることが明らかである。林・大内山ほか (1999) は、原生動物纖毛虫類の *V. microstoma* でも塩濃度が 0.04 mol 以上に高まるとほとんど増殖が認められないことを報告しており、*D. limosa* の塩濃度耐性は著しく低いことが明らかである。これらの結果から塩濃度に対する耐性が低い *D. limosa* は、通常的生活系排水を処理する生物処理施設において塩濃度が高まる条件下では生存できず出現しないことが明らかとなった。このことは、実際の処理施設の生物膜において、*A. hemprichi*, *P. longiseta*, *N. variabilis* などの貧毛類に比較して *D. limosa* の出現頻度が低いことを示唆するものであると考えられる。

4. 食物源としての細菌の種類の増殖に及ぼす影響

D. limosa の食物源となり得た細菌 6 種は、いずれも *A. hemprichi*, *P. longiseta*, *N. variabilis* らの貧毛類においても食物源となり得た種であった。*D. limosa* の食物源として不適当であった 5 種の内、*Bacillus*

cereus, *B. subtilis*, *Achromobacter cycloclastus* の 3 種は、*Aeolosoma hemprichi*, *P. longiseta*, *N. variabilis* らの貧毛類においても食物源となり得なかった種であった。これらの事実から、*D. limosa* の食物源としての細菌類に対する嗜好性は、*A. hemprichi*, *P. longiseta*, *N. variabilis* らの貧毛類と類似していることが明らかである。また、*A. hemprichi*, *P. longiseta*, *N. variabilis* らの貧毛類では食物源となり得た *Micrococcus luteus* および *Klebsiera pneumoniae* が *D. limosa* の食物源となり得ないことが明らかとなった。この事実は、*D. limosa* が *A. hemprichi*, *P. longiseta*, *N. variabilis* らの貧毛類に比較して狭食性であることを示唆するものである。生物処理槽内は混合培養系であり、多種の細菌類が生息し、かつその優占化比率も絶えず変化していることが知られている (Sudo and Aiba, 1973) が、多種の細菌類を食物源とすることは混合培養系である生物処理槽内に定着する上での必要条件であると考えられる。*D. limosa* が *A. hemprichi*, *P. longiseta*, *N. variabilis* らの貧毛類に比較して狭食性であることは、実規模の生物処理施設において出現頻度が低いことを示唆するものであると考えられる。本研究により明らかとなった食物源としての細菌に対する選択性は、食物源としての細菌類のグラム陽・陰性、毒性、凝集性および菌体成分等とのかかわり (林・藤本ほか, 1999) があると推定される。原生動物の *Vorticella microstoma* および *Histriculus vorax* に対しては好適な食物源とならないことが報告 (稲森, 1993) されている *Acinetobacter calcoasceticus* は、*D. limosa* では最も高い比増殖速度を示した。一方では、*D. limosa* をはじめ *Aeolosoma hemprichi*, *P. longiseta*, *N. variabilis* らの貧毛類では、いずれにおいても食物源とならなかった *Bacillus cereus* および *B. subtilis* が原生動物の *V. microstoma* および *H. vorax* に対しては好適な食物源となることが報告 (稲森, 1993) されている。微小動物の細菌類に対する選択食性の検討については今後更なる知見の集積が必要と考えられる。

5. 食物濃度の増殖に及ぼす影響

食物源としての汚泥濃度を変化させた場合の *D. limosa* の増殖特性に Monod 式 (須藤, 1977) を適用して算定した $\mu_{\max}$ は $0.19 \cdot \text{day}^{-1}$, K_s は $110 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ であった。これらの結果は、*A. hemprichi*, *P. longiseta*, *N. variabilis* らの貧毛類で報告 (国安ほか, 1997) されている値とほぼ同水準であった。すなわち、原生動物 (Sudo and Aiba, 1973) や輪虫類 (林ほか, 1998) で報告されている K_s 値 $20 \sim 40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ に比較すると食物親和力が小さく、食物濃度が *D. limosa* の増殖に大きく影響を及ぼすことを示唆している。また、高い汚泥濃度においても増殖が阻害される

ことはなく、十分に増殖可能であることが明らかとなった。このことは、生物膜のような圧密化した高濃度汚泥中でも *D. limosa* が生息していることから裏づけられる。また、*D. limosa* が生物膜に優占的に定着しやすいことを考慮すると、高い汚泥濃度において *D. limosa* の増殖活性が最大となることは、汚泥の捕食による汚泥減量化と生物膜の更新に寄与していることを示唆するものと考えられる。

6. 振盪強度の増殖に及ぼす影響

振盪強度を最大加速度に換算して検討した結果、図6に示されるとおり、*D. limosa* の比増殖速度は最大加速度が $100 \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-2}$ を超えた段階で影響を受け、最大加速度が $250 \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-2}$ を超えると増殖が完全に阻害された。これらの事実は *D. limosa* の振盪強度に対する耐性が低いことを意味するものである。*D. limosa* と同じ貧毛類である *A. hemprichi* は、最大加速度 $920 \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-2}$ 条件下においても増殖に全く影響が及ばないことが明らかにされている。実施設においては、*A. hemprichi*、*P. longiseta* および *N. variabilis* などの貧毛類に比較して *D. limosa* の出現頻度が低く、攪拌（振盪強度）が生じにくい生物膜には出現できるものの攪拌が伴う条件である特に活性汚泥においてはほとんど生息が認められないことが知られている。これらの事実は、*D. limosa* の振盪強度に対する耐性が低いことに起因するものであると考えられる。

引用文献

Brinkhurst, R. O. 1971. A Guide for The Identification of British Aquatic Oligochaeta. 55 pp. Freshwater biological association scientific publication, London.

Curds, C. R. and J. M. Vandyke. 1966. The feeding habits and growth rates of some fresh water ciliates found in activated sludge plant. J. Appl. Ecol. 3: 127-132.

林 紀男. 1995. “環形動物” In 小島貞夫・須藤隆一・千原光雄（編），環境微生物図鑑，pp. 672-673. 講談社サイエンティフィック，東京。

林 紀男・藤本尚志・西村 修・稲森悠平. 1999. 生物処理における有用微小動物の収率. 浄化槽研究 11(2): 57-66.

林 紀男・稲森悠平・水落元之・須藤隆一. 2001. 食物連鎖を活用した生物処理における魚類の収率. 浄化槽研究 13(1): 3-12.

林 紀男・国安克彦・稲森悠平・須藤隆一. 1998. 袋形動物輪虫類の増殖に及ぼす環境因子の影響. 日本水処理生物学会誌 34(3): 205-213.

林 紀男・大内山高広・藤本尚志・稲森悠平. 1999. 原生動物縁毛類の増殖に及ぼす環境因子の影響. 日本水処理生物学会誌 35(4): 271-278.

稲森悠平. 1993. 水環境の基礎と応用. 219 pp. 産業用水

調査会，東京。

稲森悠平・林 紀男・西村 修・須藤隆一. 1994. 微小後生動物の水質浄化における役割. 水 36(8): 16-25.

Inamori, Y., Y. Kuniyasu, N. Hayashi, H. Ohtake and R. Sudo. 1990. Monoxenic and mixed cultures of small metazoa *Philodina erythrophthalma* and *Aeolosoma hemprichi* isolated from a wastewater treatment process, Applied Microbiology and Biotechnology. 34: 404-407.

Krall, J. F. 1968. The cuticle and epidermal cells of *Dero obtusa* (family Naididae). J. Ultrastruct. Res. 25 (1): 84-93.

Krall, J. F. 1969. Intracellular filament bundles in the intestinal epithelium of the oligochaete *Dero obtusa*. Z. Zellforsch Mikrosk Anat. 97(1): 45-49.

国安克彦・林 紀男・稲森悠平・須藤隆一. 1997. 環形動物貧毛類の増殖に及ぼす環境因子の影響. 日本水処理生物学会誌 33(4): 207-214.

Lewis, M. A. and D. Suprenant. 1983. Comparative acute toxicities of surfactants to aquatic invertebrates. Ecotoxicol Environ Saf. 7(3): 313-322.

Lin, D., L. A. Hanson and L. M. Pote. 1999. Small subunit ribosomal RNA sequence of *Henneguya exilis* (class Myxosporea) identifies the actinosporean stage from an oligochaete host. J. Eukaryot. Microbiol. 46(1): 66-68.

Sperber, C. 1948. A Guide for The Determination of European Naididae. Zoologiska Bidrag fran Uppsala. 296 pp. Academic Press, London.

Sudo, R. and S. Aiba. 1973. Mass and monoxenic culture of *Vorticella microstoma* isolated from activated sludge. Water Reserch 7: 615-619.

須藤隆一. 1977. 廃水処理の生物学. 639 pp. 産業用水調査会，東京。

須藤隆一. 1983. 環境浄化のための微生物学. 230 pp. 講談社サイエンティフィック，東京。

須藤隆一. 1989. 環境微生物実験法. 294 pp. 講談社サイエンティフィック，東京。

須藤隆一・稲森悠平. 1983. 図説生物相からみた処理機能の診断. 321 pp. 産業用水調査会，東京。

Trivinho-Strixino, S., L. C. Correia and K. Sonoda. 2000. *Phytophilous chironomidae* (Diptera) and other macroinvertebrates in the ox-bow Infernao Lake (Jatai Ecological Station, Luiz Antonio, SP, Brazil). Rev. Bras. Biol. 60(3): 527-535.

Tsytugina, V. G. and G. G. Polikarpov. 2000. Cytogenetic and population effects in oligochaeta from the Chernobyl zone. Radiat Biol Radioecol. 40(2): 226-230.

Vale, P. and M. A. Sampayo. 1999. Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. Toxicon 37(8): 1109-1121.

Xiao, C. and S. S. Desser. 1988. The oligochaetes and their actinosporean parasites in Lake Sasajewun, Algonquin Park, Ontario. J. Parasitol. 84(5): 1020-1026.

(2002年1月8日受理)

Effect of Environmental Factors on Growth Characteristics of Oligochaeta *Dero limosa*

Norio Hayashi¹⁾, Takahiro Ouchiyama²⁾,
Motoyuki Mizuochi³⁾ and
Yuhei Inamori³⁾

¹⁾ Natural History Museum and Institute, Chiba
955-2 Aoba-cho, Chuo-ku, Chiba 260-8682, Japan

E-mail: hayashin@chiba-muse.or.jp

²⁾ Japan Environmental Create Co. Ltd.
2-10-19 Hanabatake, Tsukuba 300-3261, Japan

³⁾ National Institute for Environmental Studies
16-2 Onogawa, Tsukuba 305-0053, Japan.

Small aquatic oligochaetes are the typical metazoa found frequently in the activated sludge and bio-film from wastewater treatment system. Effect of environmental factors on growth characteristics of aquatic oligochaetes, *Dero limosa* was in-

vestigated. Using a sterilized activated sludge as the metazoan food, the monoxenic growth rate of *D. limosa*, the effects of temperature, pH, phosphate buffer solution concentration, shake stress, food concentration were measured. Optimum temperature of *D. limosa* was 30°C. Energy for activation was 44,800 J·mol⁻¹. The optimum pH values in cultivating were ranged from 5.7 to 9.2. Phosphate buffer concentration which *D. limosa* could grow normally was 0.0003 M. Bacterial strain such as *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoasceticus*, *Flavobacterium luteus*, *F. suaveolens*, *Streptococcus acidominus* were able to become food for *D. limosa*. The other hand, bacterial strain such as *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Klebsiera pneumoniae*, *Achromobacter cycloclastus*, were not able to become food for *D. limosa*. The endurance against shake stress was lower than *A. hemprichi*, *P. longiseta* and *N. variabilis*. Shake stress was also important factor for the growth characteristics of *D. limosa*.