

## 第2章 既往の研究

### 2-1 はじめに

前章では汚水処理の原理とそのプロセスの中に含まれる細菌類、原生動物、微小後生動物の役割について述べた。本章では本研究で着目した輪虫類の生態と特徴、さらに廃水処理における役割と製剤化の為に行なうべき課題・問題点を既往の研究を基に解析することとした。

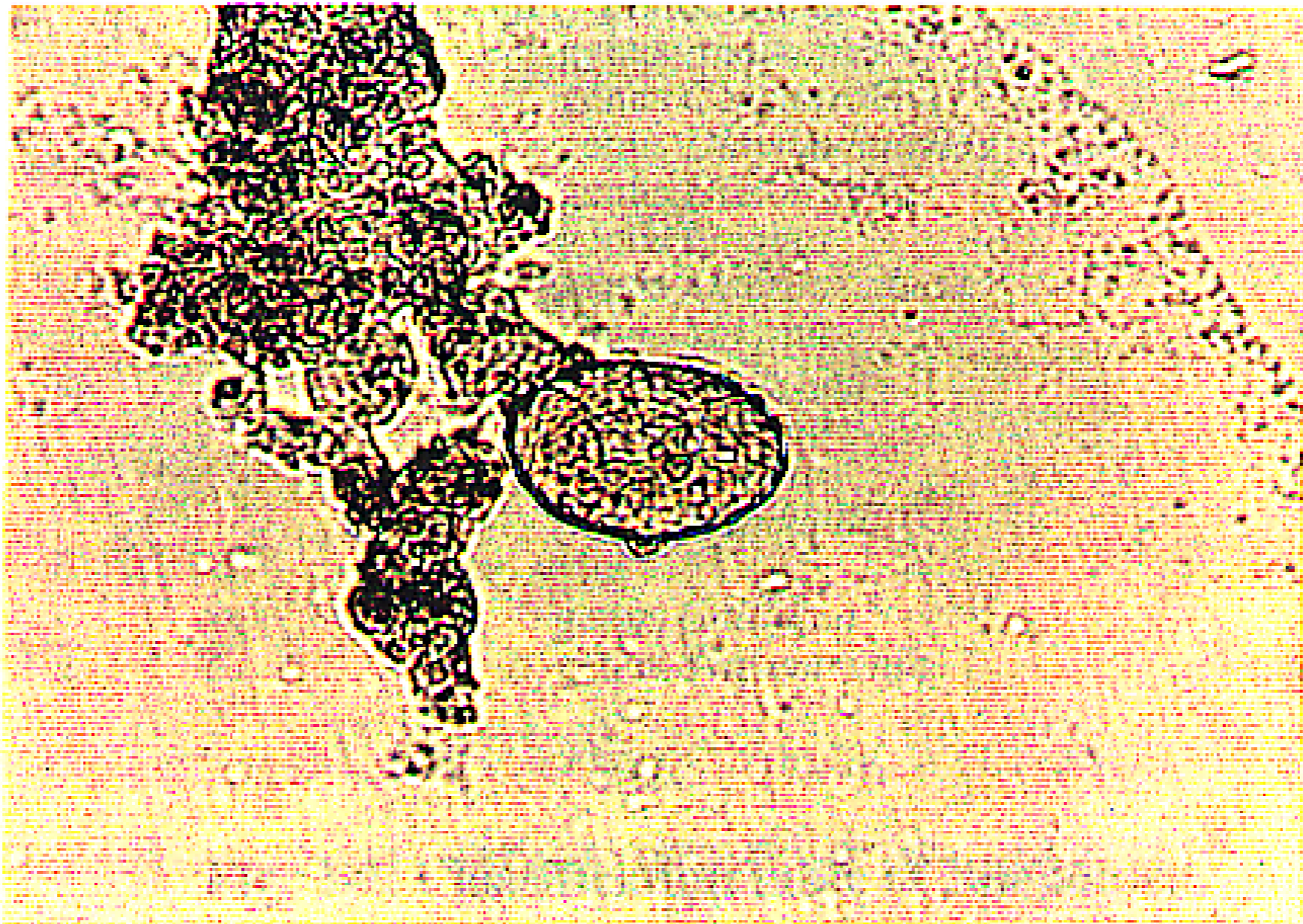
### 2-2 輪虫類の生態および特徴

#### 2-2-1 輪虫類の種類および分類

輪虫類は約1,500種類以上が知られているが、このうちヒルガタワムシ綱は363種類が知られており、そのうち146種類（40%）はヨーロッパでのみ確認されている<sup>23)</sup>。確認されている全ての種が顕微鏡で形態を確認できる大きさである<sup>24)</sup>。棲息場所はほとんどが湖沼、河川、海洋等の水棲性であり、淡水性の種については木や石等に付着した苔の中に棲んでいるところもしばしば観察される<sup>25)</sup>。本研究で用いている*P.erythrophthalma* (Fig.2-1) は輪形動物門 (Phylum Rotifera)、ヒルガタワムシ綱 (Class Bdelloidea) に属する (Fig.2-2)。綱名であるヒルガタワムシ (英名 bdelloid) はヒルや尺取り虫のような運動をすることからつけられている (bdelloidはギリシア語のヒルの意味である)<sup>26)</sup>。

#### 2-2-2 輪虫類の特徴

輪虫類の特徴としては、1) 水棲で、大部分が自由生活性である、2) 体に体節構造はなく左右対称である、3) 体は球形あるいは円筒形で、後端には二叉状の足がある、4) 体の前端部は繊毛を持った器官である繊毛環、すなわち輪盤となっている、5) 咽頭には顎すなわち咀嚼器が備わっている、6) クチクラが良く発達している、7) 原腎管をもつ、および8) 単為生殖のみが確認されている、等があげられる。



**Fig. 2-1.** Photos of Bdelloid rotifer *P.erythrophthalma*.  
(Upper:adult; Lower:egg)

phylum Rotifera  
class Bdelloidea  
  order Adinetida  
    family Adinetidae  
      genus *Adineta*  
      genus *Bradyscela*  
  order Philodinavida  
    family Philodinavidae  
      genus *Abrochtha*  
      genus *Henoceros*  
      genus *Philodinavus*  
  order Philodinida  
    family Habrotrochidae  
      genus *Habrotrocha*  
      genus *Otostephanos*  
      genus *Scepanotrocha*  
    family Philodinidae  
      genus *Anomopus*  
      genus *Ceratotrocha*  
      genus *Didymodactylos*  
      genus *Dissotrocha*  
      genus *Embata*  
      genus *Macrotracheta*  
      genus *Mniobia*  
      genus *Philodina*  
      genus *Pleuretra*  
      genus *Rotaria*  
      genus *Zelinkiella*  
  Incertae sedis  
    genus *Callidina*  
    genus *Synkentronia*

**Fig. 2-2. Classification table of Bdelloidea.**

### 2-2-3 運動および捕食形態

ヒルガタワムシで最も特徴的なのは、そのほとんどが匍匐運動を行なうことである。すなわち、体の前部（口）および後部（足指）を使うことによって、尺取り虫やヒルの様に匍匐したり、繊毛環によって活発に遊泳することも可能である。自由生活性であるので、巣は作らずに、集団での行動もしない。また、走光性もみられない。

輪虫類の捕食形態は3タイプの様式がある。すなわち、1) 繊毛環により水流を起こし、それにより粒子状の食物を口に運ぶ、2) 顎で餌をとらえる、3) 繊毛環、口、咽頭でわなあるいは漏斗を形成し、摂食を行なうという様式をなしている。このなかで、*P. erythrophthalma*は1の方式によって懸濁物質の捕食を行なう (Fig.2-3)。また、時に繊毛環でフロックにかじりつく動作もしばしば観察される。

### 2-2-4 生殖

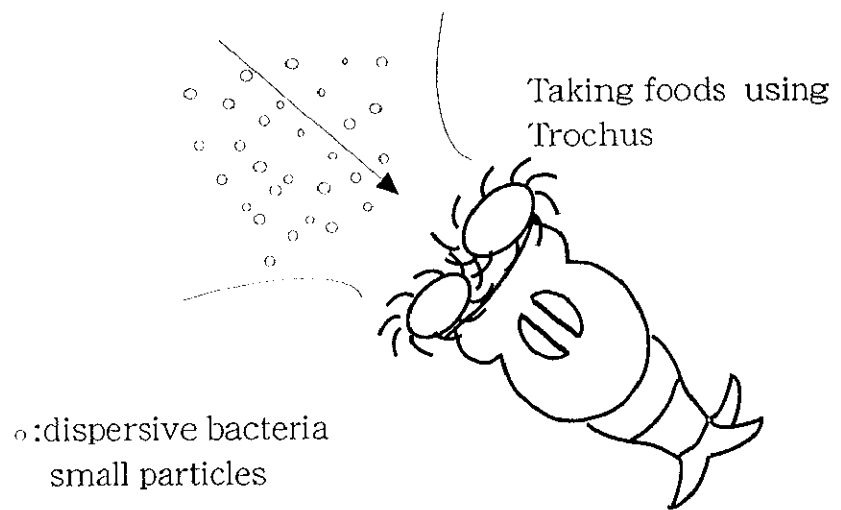
通常、輪虫類はFig.2-4に示した3つのタイプの生殖法のうちの1つによって生殖を行なうが、ヒルガタワムシ綱は全て単為生殖によって行なわれる (Fig.2-4,A)。雄は現在のところ確認されていない<sup>29)</sup>。生殖法のタイプによらず、全ての輪虫類は細胞分裂による増殖は行わず、全て卵を生む事によって増殖する。幼生は存在せずに完成した成体としてふ化し、ふ化直後より運動、捕食活動を行ない摂食を行なう。*P. erythrophthalma*の場合、卵は2日以内にふ化する。

### 2-2-5 遺伝子含量

輪虫類の遺伝子解析に関しては、Meselson<sup>30)</sup>らによって、種による細胞周期や、多糸性における倍数性の違いを比較検討することを目的として精力的に行なわれている。これまでにヒルガタワムシ綱と単為生殖綱ではDNA含量が異なることが知られており<sup>27)</sup>

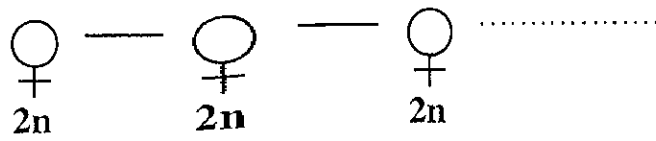
<sup>28)</sup>、個体あたり0.7~2.2pgのDNAが含まれることが明らかになっている (Table 2-1)

<sup>29)</sup>。

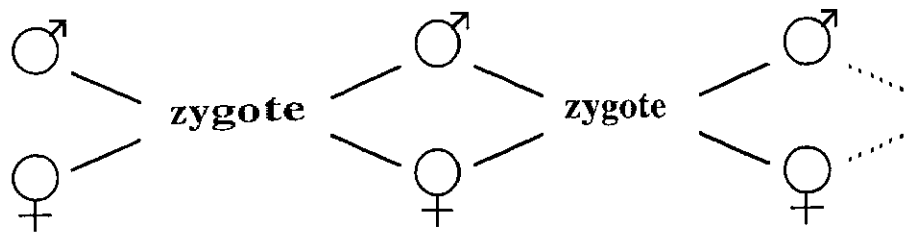


**Fig. 2-3. Predating behavior of *P. erythrophthalma*.**

A. Class Bdelloidea



B. Class Seisonidea



C. Class Monogononta

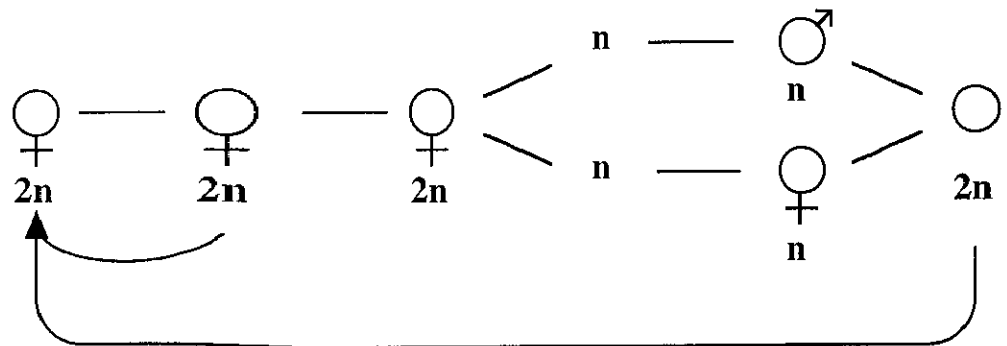


Fig. 2-4. Difference of reproduction in rotifer.

Table 2-1. Total nuclear DNA content of Rotifer.

Taxson	Total nuclear DNA content [pg]
<b>Monogononta</b>	
<i>Brachionus plicatilis</i>	0.7
<b>Bdelloidea</b>	
<b>Philodinidae</b>	
<i>Philodina roseola</i>	2.2
<i>Macrotrachela quadricornifera</i>	1.5
<b>Habrotrochidae</b>	
<i>Habrotrocha constirica</i>	1.0

#### 2-2-6 生活史

ヒルガタワムシ綱に属するいくつかの輪虫類についてはRicci<sup>30)</sup>によって調べられているが、平均寿命は*Adineta vaga*で17日、*Philodina roseola*で25日、*Macrotrachela insolita*で76日と種により大きく異なり、同じ属内においても*Macrotrachela inermis*では31日と異なる。また、卵産生パターンについても種により異なり、多くはふ化してから平均寿命の1/4程度の齢の時に最も多く卵産生を行ない、平均寿命の1/2をすぎた頃から生殖が行なわれなくなるが、*Otostephanos torquatus*の様に死亡する直前まで生殖活動を行なう種もいる。本研究で用いた*P. erythrophthalma*の平均寿命は約20日前後と考えられる。

#### 2-3 輪虫類の増殖に及ぼす環境因子

輪虫類の増殖に及ぼす環境因子としては、物理的、化学的、生物学的要因を含め様々な因子について検討が行なわれている。

##### 2-3-1 輪虫類の増殖に及ぼすpHの影響

Berzinsら<sup>31)</sup>によると、輪虫類225種の棲息していた自然水域のpHについて調べられているが、生息するpH領域は広く、pH3.5から10の領域において観測されている。また、種ごとにおいて最も頻繁に観測されたpH、すなわち至適pHも異なりpH5から9となっている。この中で*Philodina*属については観測例はpH3.5から9.5と広範囲にわたっているが、観測頻度が高かったpHは6から8.5の間である。このことは、林ら<sup>32)</sup>のpH6.5から9.8程度では増殖に影響がないといった知見とも一致する。このことから、*P. erythrophthalma*についての至適pHもこの範囲にあるものと考えられる。

##### 2-3-2 輪虫類の増殖に及ぼす塩濃度の影響

塩濃度が輪虫類の増殖に及ぼす影響に関して、*P. erythrophthalma*、*Rotaria rotatoria*、*Lecane luna*での検討が行なわれている<sup>32)</sup>。それによると、リン酸濃度として0から1/25mol・l<sup>-1</sup>の範囲では、比増殖速度に影響は現れず、増殖可能であった。同様



にリン酸を用いて他の生物で培養を行なった場合、原生動物縁毛類 *Vorticella microstoma*が $1/25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 濃度で<sup>30)</sup>、環形動物貧毛類の *Aeolosoma hemprichi*が $1/75 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ で、*Pristina longiseta*や*Nais variabilis*でも $1/25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ で増殖が阻害される<sup>30)</sup> ことと比較しても、輪虫類は塩濃度耐性の高いことが明らかとなっている。

### 2-3-3 輪虫類の増殖に及ぼす攪拌強度の影響

林ら<sup>32)</sup>は、攪拌強度に関して、*P. erythrophthalma*や*Rotaria rotatoria*のヒルガタワムシ類では、攪拌強度を回転振とう培養および往復振とう培養各々について最大加速度に換算<sup>33)</sup>した場合、0.9Gでの攪拌強度でも増殖可能であるが、*Lecane luna*では0.5G以上の攪拌強度では増殖できないことを明らかとしている。このことと、*Philodina*属および*Rotaria*属は活性汚泥にもしばしば出現する<sup>34,35)</sup> ことから*P. erythrophthalma*は攪拌強度に対する耐性が高いと考えられる。

### 2-3-4 輪虫類の増殖に及ぼす食物源の影響

*Philodina*属の培養における食物源として、林ら<sup>32)</sup>は11種の細菌を用いて*P. erythrophthalma*の培養を行なったところ、最大個体数および増殖速度に対し、影響が無いことを明らかにしている。また、Ricci<sup>36)</sup>はヒルガタワムシ属の餌は細菌類が最適であり、藻類は不適であることを指摘している。林ら<sup>37)</sup>は細菌類の濃度および培養液の影響について調べており、細菌濃度が $(4 \sim 8) \times 10^8 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以上の濃度では*Philodina*属の増殖活性が抑えられること、洗米溶液を培養に用いたときに $1 \times 10^4 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以上の個体数密度で培養可能であることを明らかにしている。また、国安<sup>16)</sup>は、米に含有される微量成分のうち、オリザノール、ジガラクトシルジアクリルグリセロール、フォスファチジルコリンを培養液に添加した時に、最大個体数密度が $1.5 \times 10^4 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ にまで高まることを明らかにし、さらにトコフェノールを加えることによって $3 \times 10^4 \text{ N} \cdot \text{ml}^{-1}$ まで最大個体数密度を高めることに成功している。また、James<sup>38)</sup>らはトコフェノールが*Philodina*属を

含むヒルガタワムシ類4種に及ぼす影響について検討を行っており、繁殖能力および寿命が有意に高まることを明らかにしている。これらのことから、*P.erythrophthalma*の大量培養を行なうためには、細菌類を餌とし、かつ米に含まれる微量成分を培養液に添加することが効果的と考えられる。

#### 2-4 輪虫類の乾燥耐性

輪虫類の乾燥に対する検討は1900年初頭より検討が行なわれている。Östan<sup>35)</sup>はヒルガタワムシ綱のうち、42%が乾燥耐性があるとしている。Jacobs<sup>39)</sup>は*P.roseola*を用いて種々の検討を行ない、全ての齢の輪虫は乾燥耐性を持つが、その耐性を高めるためには、乾燥過程および乾燥後の保存状態が重要な因子であり、乾燥時の温度が高く乾燥速度が遅いこと、乾燥後は温度を低く、低湿度に保つことが必要であるとしている。また、砂のような保持担体が存在することによって、生存率が高まることも示している。Östan<sup>40)</sup>は *Adineta vaga* の卵の乾燥を行ない、成体に産み落とされたばかりの卵よりも、産み落とされてから時間の経過した卵の方が乾燥耐性が高いことを明らかにしている。Ricciら<sup>41)</sup>は、*Macrotrachela quadricornifera* について、卵およびふ化後の成体を齢ごとに分け乾燥を行なった結果から、8日齢のものを乾燥したときが最も再生率が高く、53%の生存率を示し、30日間でも13%が生存できたことを明らかにしている。また、この時の乾燥後の生殖能力と平均寿命を測定したところ、乾燥のストレスを与えていない対照系と比較し、生殖期間が終期にさしかかる14日齢で乾燥を行なった場合には寿命が縮まり、生殖を行なう前に乾燥を行なった場合には生殖期間が延びるということを明らかにしている。

#### 2-5 輪虫類の凍結保存

微生物の凍結による保存法について、細菌類、藻類についてはほぼ確立されてる<sup>42-44)</sup>と考えられる。また、原虫、すなわち原生動物についてもいくつかの報告がなされている<sup>45)</sup>。輪虫類を用いた検討も行なわれているが、報告件数はわずかである。シオミズツボ

ワムシを用いた例では2%<sup>40)</sup>、*Philodina*属を用いた場合50%程度<sup>41)</sup>と、属により凍結に対する耐性は異なることが報告されている。

## 2-6 本研究を推進していく上での課題および問題点

### 2-6-1 *P. erythrophthalma*の大量培養における問題点

これまでの研究により、pH、温度、攪拌強度については*P. erythrophthalma*はその環境耐性が強いことが明らかになっている。したがって、通常の室内で培養する場合、pH、温度、攪拌強度に対して、とくに考慮する必要はないと考えられる。しかし、これまでの研究は、全てがフラスコ規模の検討であるために、これらの知見が50L、100Lといった培養器で培養したときに同様の知見が得られるかについて検討を行なう必要がある。また、培養時に用いる培地に関しても、米含有微量成分を用いることによって高密度化が図れることが明らかとなってきたが、それらを活用し、かつ安価で操作の簡便な培地の開発については検討がなされていない。以上のことから、大型培養器でのスケールアップ効果、および適切な培地の開発を行なう必要があるものと考えられる。

### 2-6-2 *P. erythrophthalma*の保存時における問題点

*P. erythrophthalma*を乾燥し保存するためには、その乾燥時および乾燥後の保存期間中の温度、湿度、保持担体の有無といった環境条件が重要であることが明らかとなっているが、具体的にはどのような速度で乾燥を行ない、保持担体としてはどのような物を用いればよいのかということについては明らかにされていない。また、*P. erythrophthalma*を凍結により保存するためには、凍結保護物質の種類および濃度、さらに凍結時の速度が重要となる。*Philodina*属の場合、DMSOのみが凍結保護物質として検討されており、他によく使われる保護物質であるグリセロールについての検討はされていない。これらのことから、*P. erythrophthalma*類の乾燥保存における保持担体の選定、凍結保存における保護物質としてのグリセロールの効果について検討を行なう必要がある。

### 2-6-3 *P. erythrophthalma*の生物処理槽への定着手法における問題点

大量培養後に保存された*P. erythrophthalma*を生物処理槽に接種後、速やかに定着させ、増殖させる必要があるが、*P. erythrophthalma*を連続運転を行なっている装置に接種、定着させた報告はほとんどない。そこで、先ず接種された*P. erythrophthalma*が速やかに定着するための棲息場の条件、特に生物膜法では付着担体の物理的構造について検討を行なう必要がある。次に、生活排水を処理している処理槽へ*P. erythrophthalma*を接種、すなわち混合培養系へ外来種として進入した場合の定着性の違い、生物相に及ぼす影響について検討を行なう必要がある。