

第3章 輪虫類*Philodina erythrophthalma*の大量培養における増殖最適条件

3-1 はじめに

第1章で述べた様に、微小動物が処理水の浮遊懸濁物質の捕食による処理水の透明化、透視度の向上に対して有効であることを示した。これらの微小動物を反応槽内に優占させることによって、処理能の低下が起こっているような処理システムに関して、迅速な機能回復が望めるものと考えられる。そのためには微小動物を大量に反応槽内へ接種することが簡易かつ確実な方法と考えられるが、この場合微生物を大量に培養できる手法を確立することが必須である。大量培養の方法としては、回分培養法と連続培養法があるが、それぞれの培養法には長所、短所がある。前者では代謝物質等の蓄積によって最大個体数の低下がみられることがあるものの、培養槽内で増殖した微生物が系外へ流出することは無く増殖した全ての微生物を回収することが可能である。これに対し、後者では流入基質による代謝物の希釈はなされるものの、培養した微生物の集積の適正技術が必要なことと回収プロセスが複雑になり管理に技術を要する。これらの点に鑑み操作法の容易な回分培養法に着目し検討を行なうこととした。

3-2 実験方法

3-2-1 *P. erythrophthalma*の適正食物源のためのスクリーニング

供試培地として、シオミズツボウムシ (*Brachionous* sp.) の培養で良く用いられている、クロレラ、粉末酵母、油脂酵母を用いた⁴⁹⁾。クロレラ、粉末酵母については人工軟水で洗浄後実験に用いた。これらの培地以外に米のとぎ汁を培地として*P. erythrophthalma*を培養したときに、数万個体まで個体数密度が高まる知見が得られている^{32,37)}ことから、米を研いだ後の研ぎ汁（洗米排水）についても検討を行なうこととした。これらの培地は洗米排水培地を除き人工軟水（Table3-1）に懸濁させた。ガラスシャーレに培地を30mlずつTOC濃度を100から1,600mg・l⁻¹となるように調製し、121℃、15分のオートクレーヴ滅菌後、*P. erythrophthalma*を初期個体数16N・ml⁻¹となるよ

Table 3-1. Composition of artificial soft water.

| | |
|---|------|
| NaHCO_3 | 96mg |
| $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 60mg |
| MgSO_4 | 60mg |
| KCl | 4mg |
| distilled H_2O | 1L |

うに接種した。ここで、基質濃度の上限値を $1,600\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ としたのは、洗米排水の濃度が $1,600\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であったためである。なお、供試微小動物である*P. erythrophthalma*は、あらかじめそれぞれの培地を用いて数回継代培養を行ない馴養したものをを用いた。培養は 25°C 、暗所にてロータリー振とうを行ない、経日的に倒立顕微鏡下で観察を行なった。また、各餌の大きさについて画像解析装置（OLYMPUS COLOR CAMERA HCC-3600）を用い顕微鏡の画像をパーソナルコンピュータ上に取り込み、各餌の粒子の大きさについて測定を行なった。

3-2-2 *P. erythrophthalma*の最大個体数および増殖速度に及ぼす各種米成分の効果

供試培地として、米の構成成分である上新粉、破碎した米、米糠を用いた。500ml三角フラスコに、培地をTOC濃度で100から $7,000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ となるように200mlずつ調製し、人工軟水に懸濁させ 121°C 、15分で滅菌を行なった。3-2-1と同様に各培地にて馴養した*P. erythrophthalma*を初期個体数 $8\text{N}\cdot\text{ml}^{-1}$ となるように接種した。培養は 25°C 、暗所にてロータリー振とう培養し、経日的にサンプリングを無菌的に行ない顕微鏡下で計数を行なった。

3-2-3 クーロメーターを用いた大量培養時の通気量の算定

微生物の量産を目的として大量を行う場合、使用する容器は室内実験でよく用いられる数リットルの小規模培養槽ではなく、数百リットル以上の大型の培養槽が必要となる。本研究における*P. erythrophthalma*の大量培養の検討は、小規模の培養実験から得られたデータをベースに展開させることとするが、小規模培養槽から大規模培養槽へ相似的なスケールアップを図った場合、気相に接する培養液の液面と培養液の容積との比率が小さくなり、液面でのガス交換のみでは槽内の溶存酸素の欠乏が予想される。とくに、好気性微生物である*P. erythrophthalma*の増殖には、供給される酸素量が律速因子の一つとなる。したがって、大量培養に際しては、酸素供給をばっ気により強制的に行うこととした。そこで、北開式酸素消費量測定装置（クーロメーター）を用いて大量培

養時の概算の通気量を求めた。酸素消費量の測定装置をFig.3-1に示した。培養びん①に添加した試料はマグネチックスターラー②で攪拌され、酸素が消費され炭酸ガスが発生する。発生した炭酸ガスはソーダライム③によって吸収され、培養びん側（Fig.3-1中の点線内）の容器内の圧力は減少する。圧力の減少はマノメータ④によって感知され、電気的信号に変換され増幅器⑤や継電気回路⑥を通しモーター⑧が作動する。同時に電解びん⑦の硫酸銅溶液から酸素が発生する。圧力が回復するとモーターは停止する。酸素の発生量は電圧に変換され、酸素の消費量が測定される。すなわち、溶液中のDO（溶存酸素）が測定されるのではなく、圧変化によって流れた電流値を示す。本装置を用いて、供試培地として米糠を用い、初期培地濃度1,000、3,500、7,000mg・l⁻¹で調製し、輪虫接種密度を8N・ml⁻¹、回転速度を100～540rpmに設定し、培養時の呼吸速度について測定を行なった。

3-2-4 ミニスケール、パイロットスケール培養槽を用いた*P. erythrophthalma*の 大量培養

米の構成成分のうち、最も増殖速度および最大個体数密度の高かった米糠について10Lの培養ビンおよび500Lの大型（パイロットスケール）培養槽を用いて大量培養を行なった。供試培地として米糠を用い、それぞれのスケールにおいて、初期培地濃度をTOC濃度として1,000mg・l⁻¹となるように調製を行なった。培養装置としては、10L培養についてはガラス製ロット瓶を用いた。本装置は、コンプレッサーおよびフローメータを用いることによって無菌・定量的に通気、また、底部にマグネチックスターラーを用いて攪拌を行なえるようになっている。培養は温度25℃、暗所にて行なった。500L培養については国立環境研究所内に設置してある微生物大型培養装置を用いた（Fig.3-2、Fig.3-3）。本装置は培養槽内が蒸気滅菌でき、ばっ気用の空気を除菌フィルターを通し供給できるので、無菌培養が可能である。装置外部には温調用のジャケットが付設されており、一定温度に設定可能である。また、攪拌方式としては2種類あり、培養槽底部よりばっ気を行なうとともにインペラにより攪拌を行なう標準方式と、培養槽底部中心よ

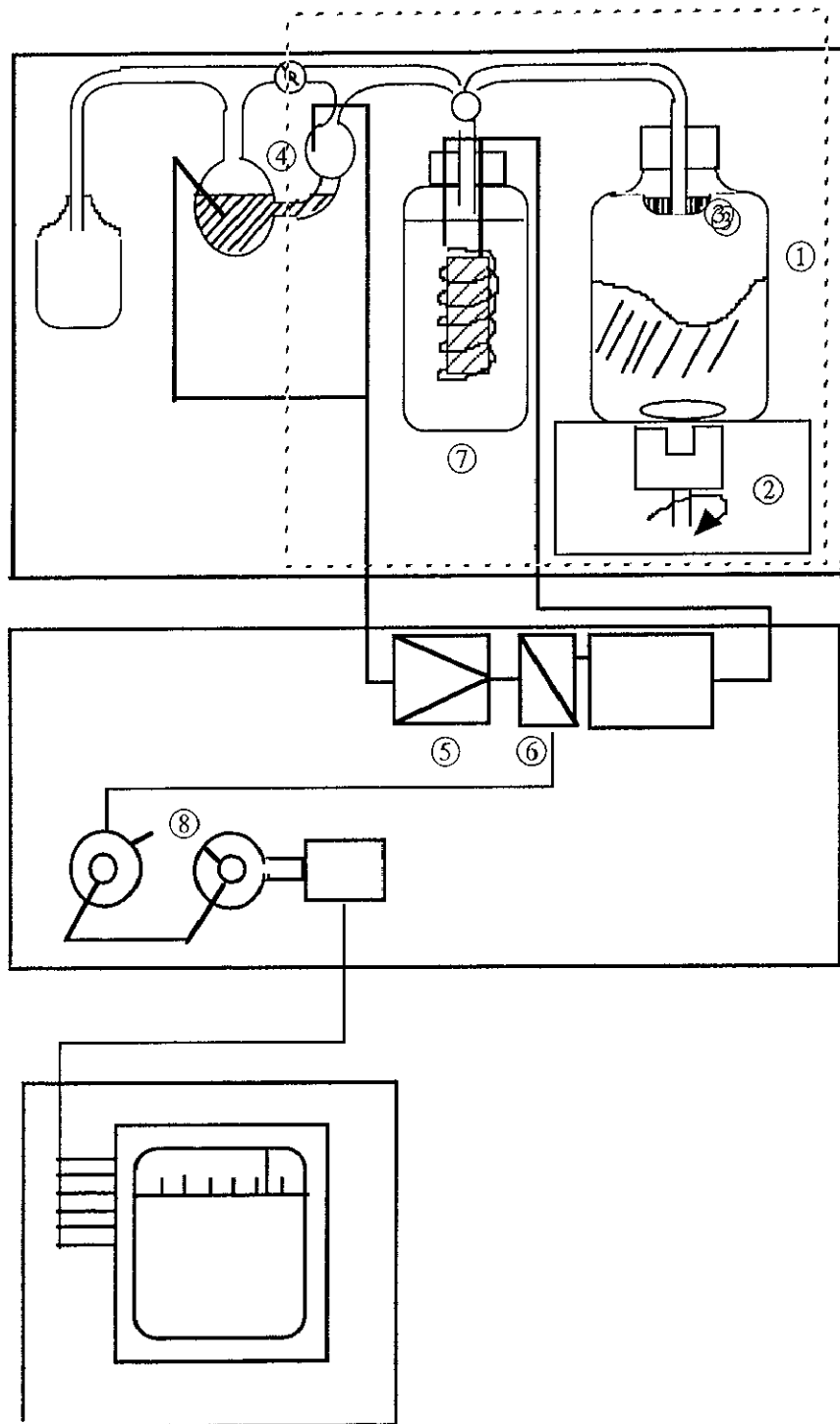


Fig.3-1. Structure of coulo meter.

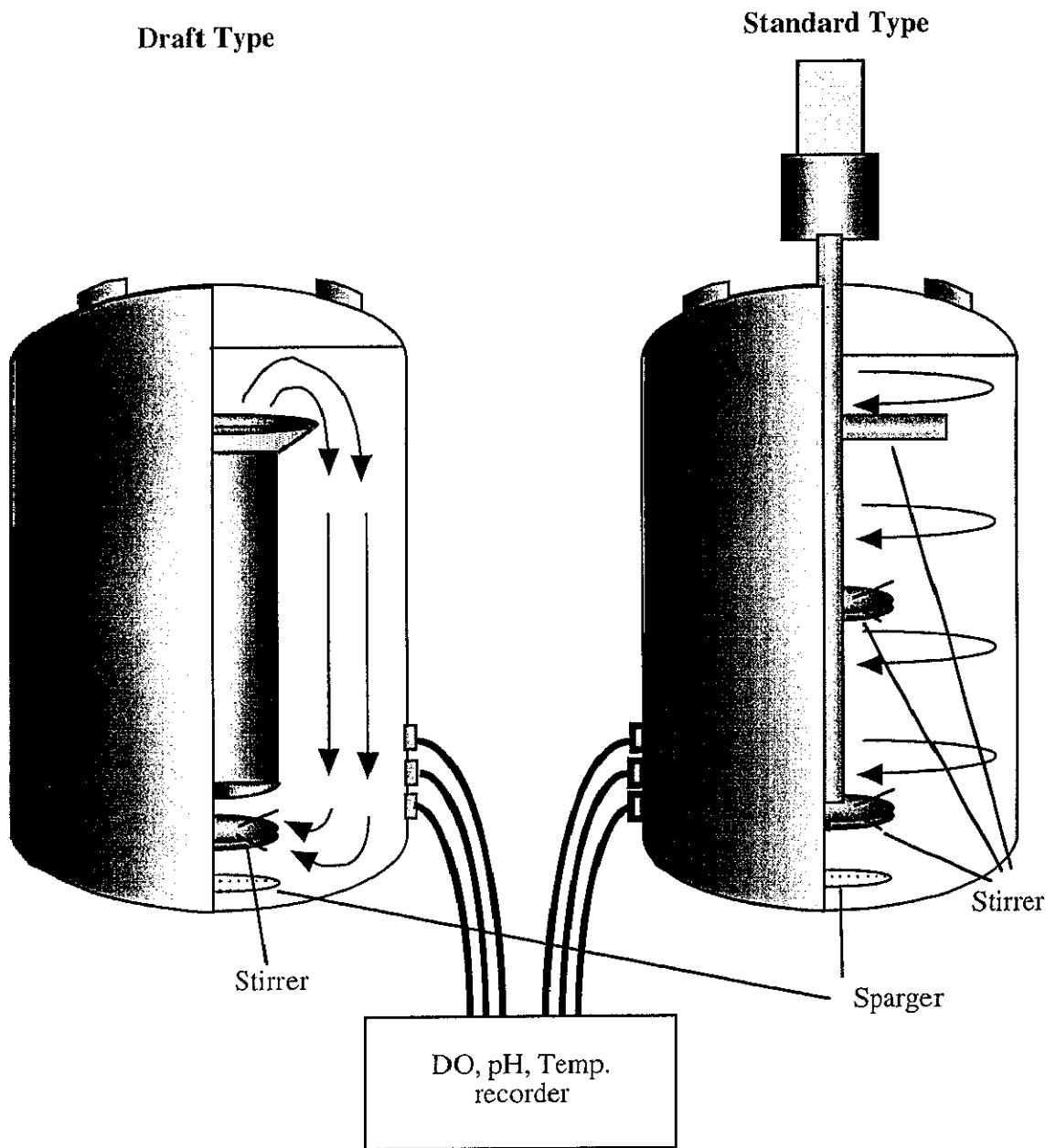
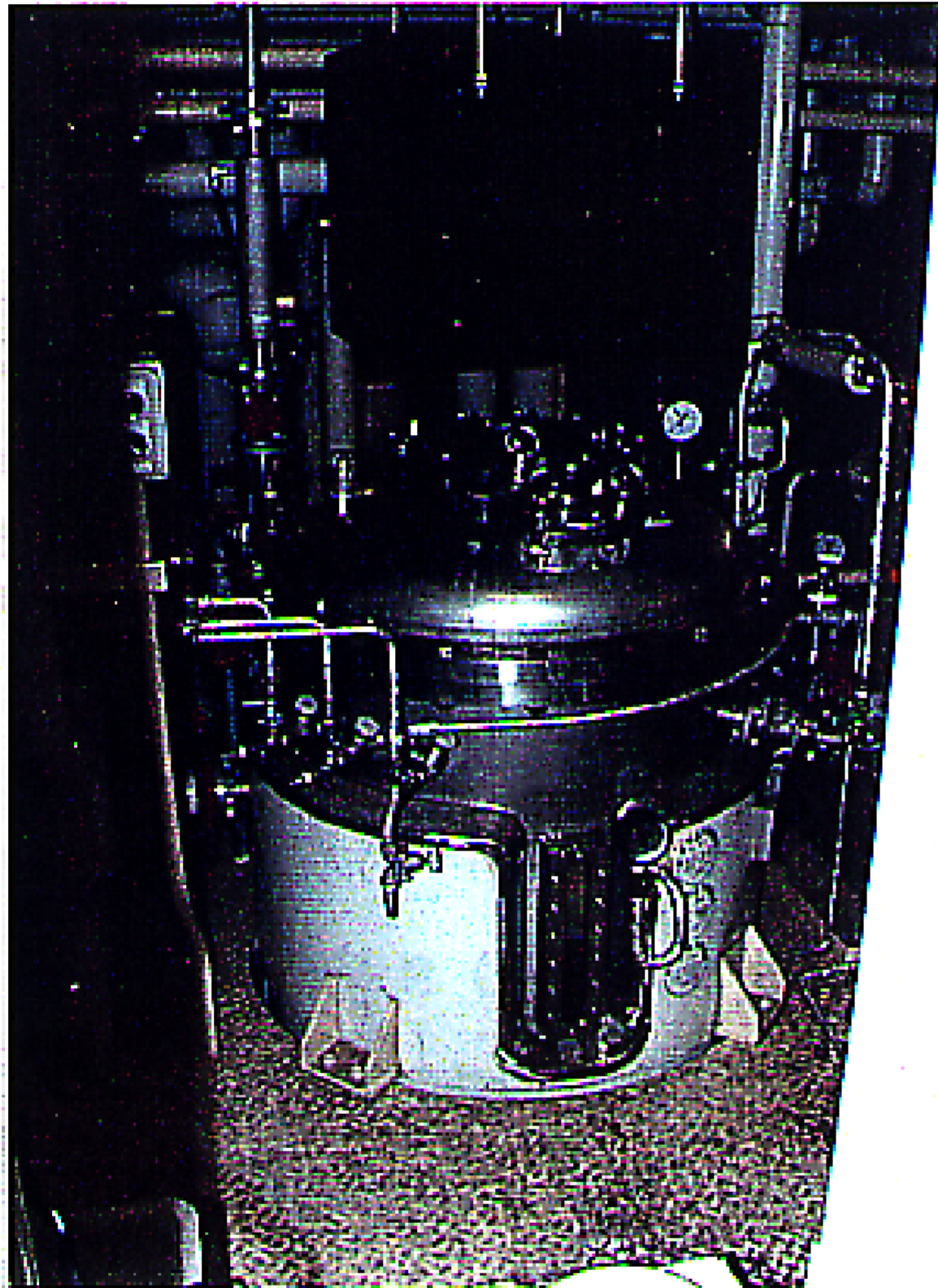
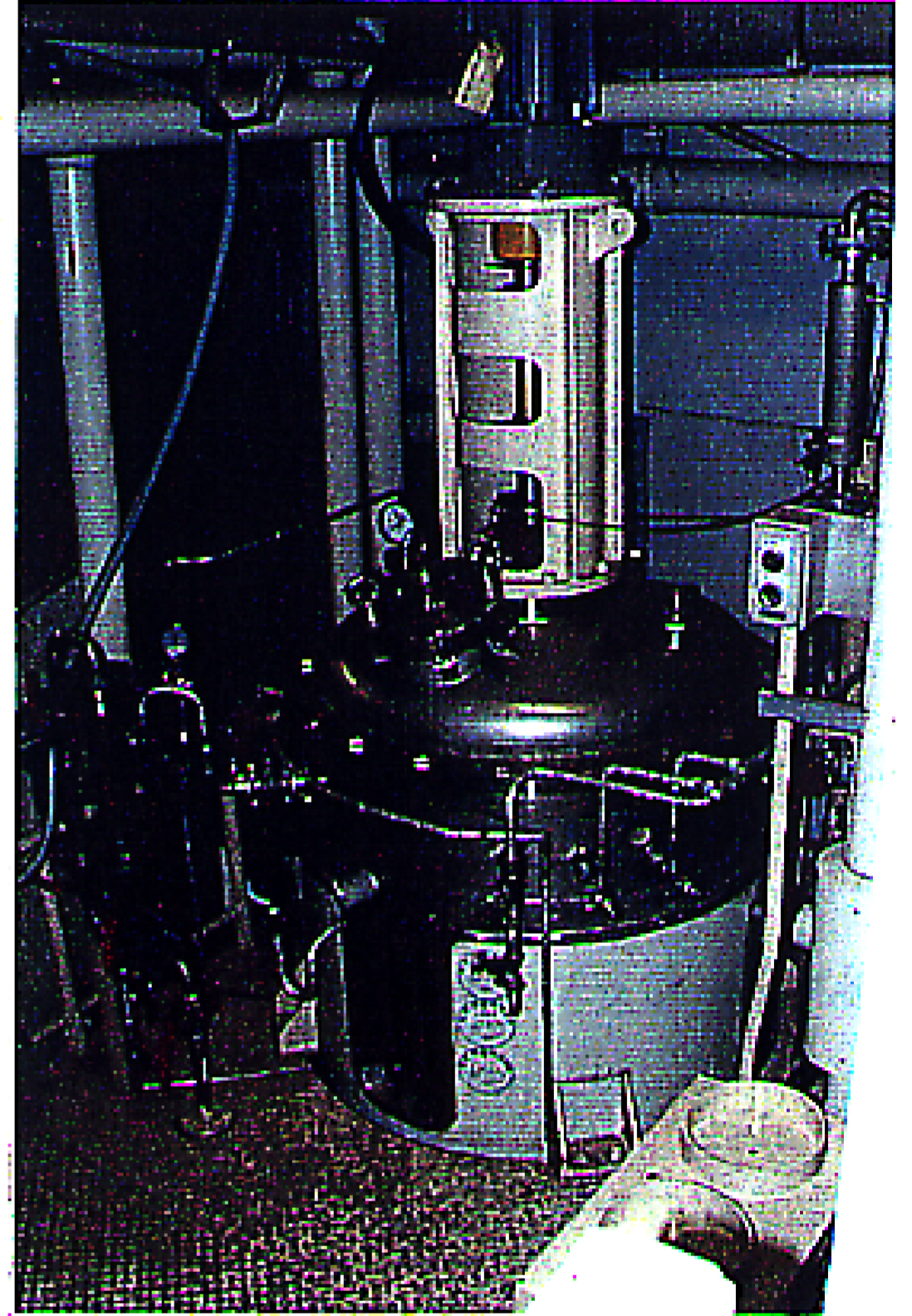


Fig.3-2. Structure of mass cultivation systems of *P.erythrophthalma*.



Draft Type



Standard Type

Fig. 3-3. Photos of mass cultivation systems of *P. erythropthalma*.

りばっ気を行ない、じゃま板を槽内に設置して上向旋回流を行わせるドラフト方式であるが、本研究では両者を用いて検討を行なうこととした。培地調製後滅菌を行ない、別に培養した*P. erythrophthalma*を $50\text{N}\cdot\text{ml}^{-1}$ となるように接種した。培養温度 25°C 、暗所にて培養を行ない、経日的にサンプリングをして、顕微鏡下で個体数の計数および水質(DOC、DT-N、DT-P、SS)、吸光度を測定した。なお、現場での汎用性を考えた場合、培養槽と簡単な周辺設備だけで滅菌設備が無くても大量培養を行なうことが可能か否かを検討するために、500L培養槽にて非滅菌系についても行なった。すなわち、この場合大型培養槽に培地を調製し滅菌せずに*P.erythrophthalma*を接種し培養を開始した。水質の分析項目および測定方法は以下に示す通りである。溶存態有機物の測定に際してはサンプリング後、ガラスフィルターろ紙(Whatman GF/C)でろ過し、そのろ過水を試料とした。DOC(溶存有機性炭素)については有機炭素分析計(島津製作所TOC-500)を用いて測定した。DT-N(溶存性全窒素)、DT-P(溶存性)はペルオキシ二硫酸カリウムによる同時分解法で NO_3^- -N、 PO_4^- -Pの形に分解・酸化し、以下の方法で測定した¹⁹⁾。アンモニア性窒素(NH_4^- -N)はインドフェノール青吸光度法、硝酸および硝酸性窒素(NO_3^- -N)は1-ナフチルエチレンジアミン吸光度法、リン酸態リン(PO_4^- -P)はモリブデン青(アスコルビン酸)吸光度法、またこれらの項目は、ブランルーベ社製TRAACS 800による自動分析にて測定を行なった。SSについては、ガラスフィルター濾紙(Whatman GF/C)を用いて、下水試験法に準じて測定した。吸光度については、サンプルを三角フラスコに採取後、3分間攪拌した後に30分間静置し、その上澄みの吸光度を波長550nmで測定した。

3-3 結果および考察

3-3-1 *P. erythrophthalma*の適正食物源のためのスクリーニング

*P.erythrophthalma*の培養における最大個体数の違いについて、餌の種類を5種類(クロレラ、粉末酵母、超音波破碎した粉末酵母、油脂酵母、および洗米排水を、濃度を5段階($\text{TOC}=100, 200, 400, 800, 1600\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)とし全25系について検討を行なった。この

時の各培地の種類および濃度および最大個体数についての結果をFig.3-4に示す。*P. erythrophthalma*の最大個体数は洗米排水では約 $4,000\text{N}\cdot\text{ml}^{-1}$ および油脂酵母では約 $3,000\text{N}\cdot\text{ml}^{-1}$ であり、いずれも高い増殖能が見られた。しかし、油脂酵母では多数の収縮した個体が観察され、*P. erythrophthalma*の特徴である繊毛環を用いて捕食している個体はほとんど見られなかった。このことから、油脂酵母では増殖阻害を起こす代謝産物が蓄積されやすく、回分培養の食物源としては適切ではないと考えられた。クロレラでは約 $400\text{N}\cdot\text{ml}^{-1}$ となり、ほとんど増殖が見られず、また、粉末酵母を用いた場合も大きな増殖は見られず約 $1,000\text{N}\cdot\text{ml}^{-1}$ であった。通常*Brachionous* sp.の大量培養に用いられている粉末酵母、クロレラにおいて増殖が見られなかったのは、餌自身の大きさによるものと考えられたため、つぎに、各餌の大きさについて測定を行なった。各餌の大きさはクロレラ、粉末酵母、油脂酵母でそれぞれ 10 、 6.5 、 $2.4\mu\text{m}$ であった。さらに、*P. erythrophthalma*の咀嚼器の直径を測定したところ、約 $6\mu\text{m}$ であった。このことから、クロレラ、粉末酵母では咀嚼器よりも粒子が大きく、餌を破碎することが不可能である、すなわち捕食することが出来ないと考えられた。このことは油脂酵母に対して、クロレラ、粉末酵母で最大個体数が低かったことと一致する。また、洗米排水に関しては 2 から $10\mu\text{m}$ 程度の粒子が混在しており、このうち小さい粒子のみを選択的に捕食したものと考えられる。また、最大個体数について、餌の濃度、種類を要因とした繰り返しのある二元配置分散分析により統計解析を行なったところ、餌の濃度、種類ともに有意差が認められた (Table3-2)。さらに、濃度、種類における交互作用が見られたことから、種類、濃度を合わせ一元配置分散分析を行なった (Table3-3)。その結果、特に油脂酵母および洗米排水での個体数が有意に高いことが示された。しかしながら、先に述べたように油脂酵母を餌とした場合、*P. erythrophthalma*は個体数としては多いものの、収縮した個体が多く、活性低くなっていることが考えられた。したがって、*P. erythrophthalma*の大量培養法の検討を行なう場合、洗米排水もしくは米に関連した物質を用いることが適切であると考えられた。

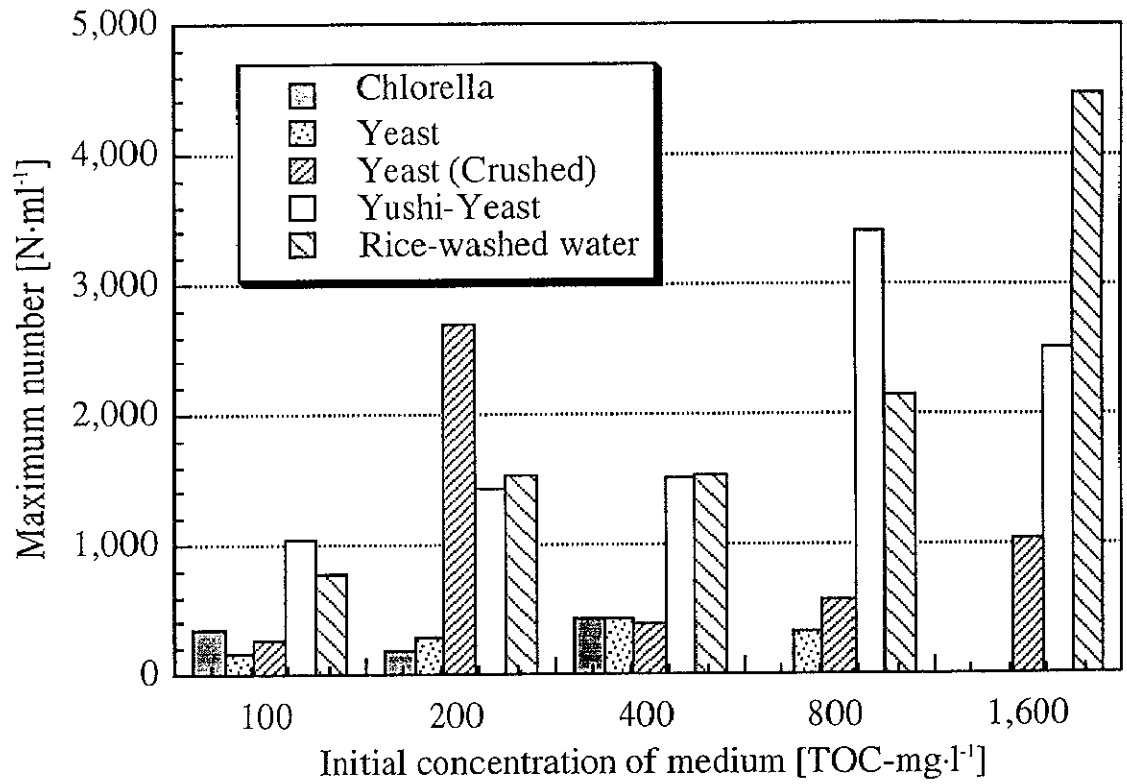


Fig.3-4. Effect of the medium on the maximum number of rotifers.

Table3-2. Two-factor factorial ANOVA.

Type III Sums of Squares

| Source | df | Sum of Square | Mean Square | F-Value | P-Value |
|-----------------------|----|---------------|-------------|---------|---------|
| Kind of Food | 4 | 5.0E7 | 1.2E7 | 50.3 | .0001 |
| Concentration of Food | 4 | 8542465.3 | 2135616.3 | 8.6 | .0001 |
| Kind of Food * Conc. | 16 | 40276358 | 2517272.4 | 10.1 | .0001 |
| Residual | 50 | 1.2E7 | 248418.7 | | |

Dependent: Number of rotifer

Factor1: kind of food
Factor2: concentration of food
Dependent: number of rotifer

Table 3-3. One-factor factorial ANOVA and Post-Hoc test.

Type III Sums of Squares

| Source | df | Sum of Square | Mean Square | F-Value | P-Value |
|------------------------|----|---------------|-------------|---------|---------|
| Kind and Concentration | 24 | 9.9E7 | 4115228.7 | 16.6 | .0001 |
| Residual | 50 | 1.2E7 | | | |

Dependent: Number of rotifer

Fisher's Protected LSD

Effect: Kind and Concentration of Food

Dependent: Number of rotifer

Significance level: 0.05

| | Count | Mean | |
|---|-------|--------|-------|
| Yeast 1,600mg·l ⁻¹ | 3 | 0.0 | a |
| Chlorella 1,600mg·l ⁻¹ | 3 | 0.0 | a |
| Chlorella 800mg·l ⁻¹ | 3 | 0.0 | a |
| Yeast 100mg·l ⁻¹ | 3 | 170.0 | a |
| Chlorella 200mg·l ⁻¹ | 3 | 181.7 | a |
| Yeast(crushed) 100mg·l ⁻¹ | 3 | 245.0 | a b |
| Yeast(crushed) 1,600mg·l ⁻¹ | 3 | 276.7 | a b |
| Yeast 200mg·l ⁻¹ | 3 | 276.7 | a b |
| Yeast 800mg·l ⁻¹ | 3 | 326.7 | a b |
| Chlorella 100mg·l ⁻¹ | 3 | 348.3 | a b |
| Chlorella 400mg·l ⁻¹ | 3 | 363.3 | a b |
| Yeast(crushed) 400mg·l ⁻¹ | 3 | 376.7 | a b |
| Yeast 400mg·l ⁻¹ | 3 | 393.3 | a b |
| Yeast(crushed) 800mg·l ⁻¹ | 3 | 503.3 | a b |
| Rice washed water 100mg·l ⁻¹ | 3 | 700.0 | a b c |
| Yushi-yeast 100mg·l ⁻¹ | 3 | 1040.0 | b c d |
| Yushi-yeast 200mg·l ⁻¹ | 3 | 1406.7 | c d e |
| Rice washed water 200mg·l ⁻¹ | 3 | 1483.3 | c d e |
| Yushi-yeast 400mg·l ⁻¹ | 3 | 1503.3 | c d e |
| Rice washed water 400mg·l ⁻¹ | 3 | 1540.0 | d e |
| Rice washed water 800mg·l ⁻¹ | 3 | 2150.0 | e f |
| Yushi-yeast 1,600mg·l ⁻¹ | 3 | 2483.3 | f |
| Yeast(crushed) 200mg·l ⁻¹ | 3 | 2686.7 | f g |
| Yushi-yeast 800mg·l ⁻¹ | 3 | 3400.0 | g |
| Rice washed water 1,600mg·l ⁻¹ | 3 | 4400.0 | h |

Factor: kind and concentration of food
Dependent: number of rotifer

As a result of post-hoc, number of rotifer at rice washed water 1,600mg·l⁻¹ is the highest in these group.

3-3-2 *P. erythrophthalma*の最大個体数に及ぼす各種米成分の効果

前項では洗米排水を用いることにより、同じ餌の量に対してより多くの個体数を得ることの可能なことが明らかとなった。そこで、米関連成分中より上新粉、米の破碎液、米糠を用い各培地および濃度と、増殖速度および最大個体数との関係を明らかにするために検討を行なった。それぞれの培地および濃度における個体数密度の経日変化をFigs.3-5、3-6、3-7に示す。なお、本グラフより最大個体数および増殖速度を評価するに当たり、マルサス型増殖モデルを変形させたPearlの式⁵⁰⁾を用いることとした。すなわち、マルサス型モデルである、

$$\frac{dN}{dt} = rN \quad \dots (3-1)$$

を変形し、

$$\frac{dN}{dt} = r\left(1 - \frac{N}{K}\right)N \quad \dots (3-2)$$

とし、用いることとした。ここでNは個体数密度、tは時間、rは内的自然増加率、Kは環境収容力である。本式では個体数NがKに達することにより増殖が停止することを示している。本式を用いて各プロットについてフィットさせたものが実線で示してある。実際には本式は二分裂を行なう生物についての式であり、*P. erythrophthalma*の様に成体が卵を生み増殖していく生物ではその完全な増殖過程を表わしてはならず、本来なら年齢構成による生命表を作成しなくてはならない。しかしながら、本モデル式のあてはめによる相関係数Rの値は0.85から0.99を示していることから、本式が*P. erythrophthalma*の増殖過程を良く再現しているものと考えられた。そこで、本モデル式の適用によって各初期培地濃度におけるr,Kを算出した。各培地における初期TOC濃度と環境収容能力Kについて示したものがFig.3-8、内的自然増加率rと各培地の初期濃度との関係を示したものがFig.3-9である。ところで、(3-2)式は基質の項を含んでいない。式のあてはめの結果、増殖過程自体は良く表わしているものの、厳密な意味あいとは異なってくる。そこで、基質の項を入れ増殖過程を仮定すると、

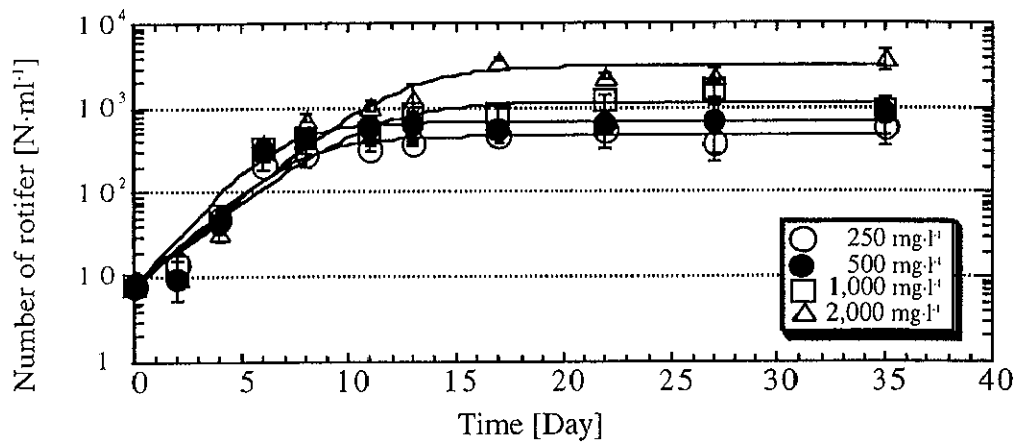


Fig.3-5. Time course of number of rotifers culturing with crushed rice.

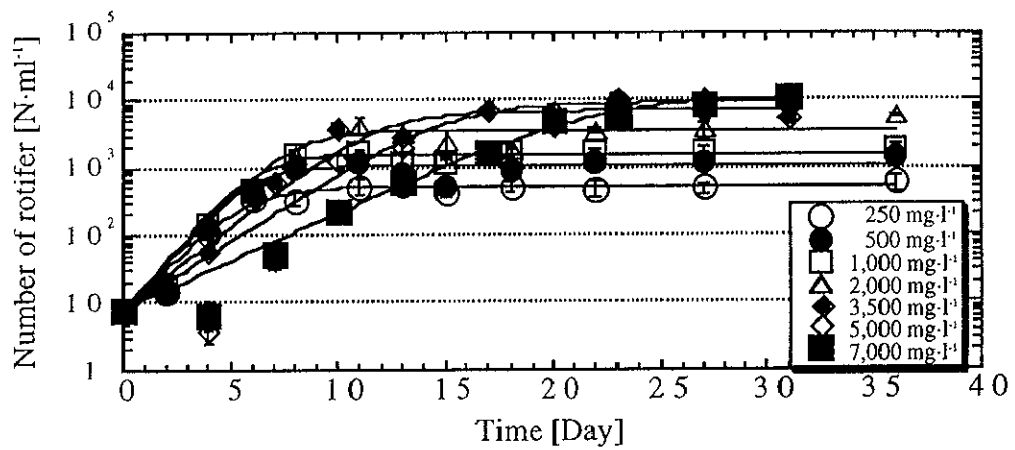


Fig.3-6. Time course of number of rotifers culturing with rice bran.

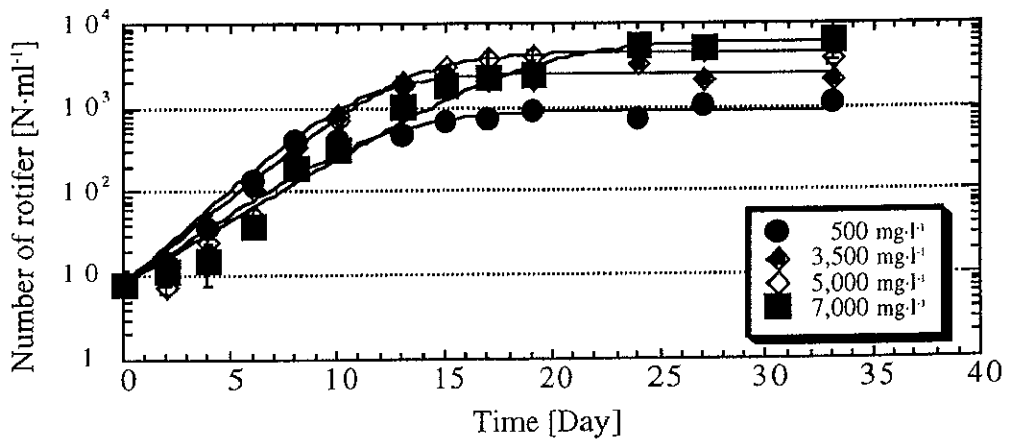


Fig.3-7. Time course of number of rotifers culturing with zyoshinko.

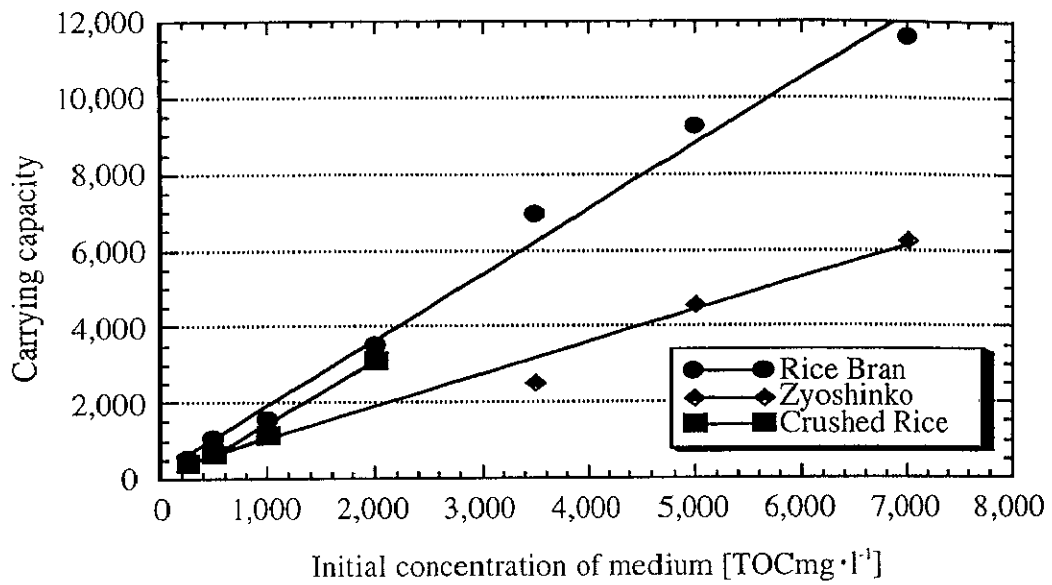


Fig.3-8. Correlation between initial medium concentration and carrying capacity.

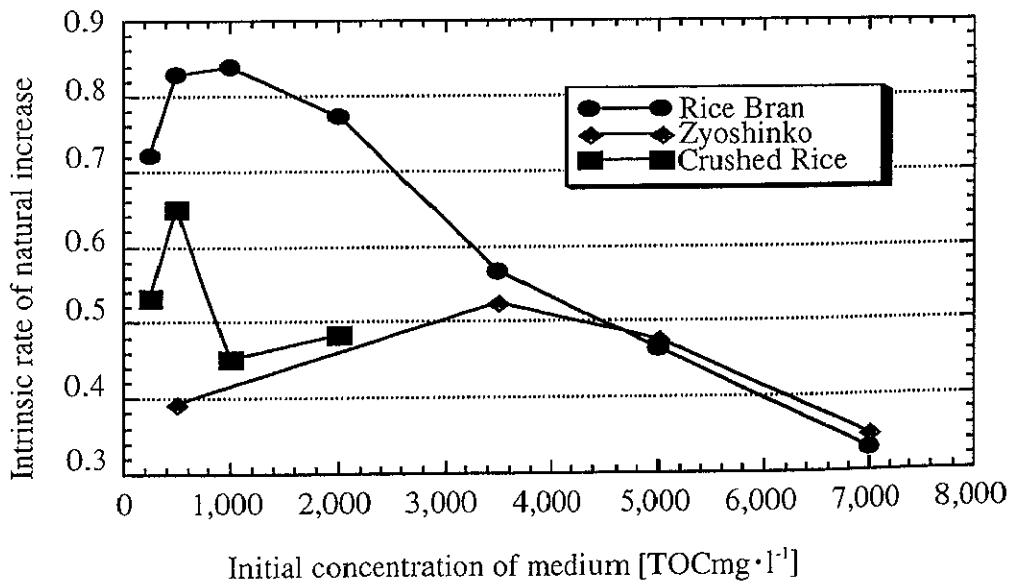


Fig.3-9. Correlation between initial medium concentration and intrinsic rate of natural increase.

$$\frac{dN}{dt} = k \cdot S \cdot N \quad \dots (3-3)$$

となる。ここで、kは増殖速度、Sは基質濃度を示す。また、培養系内で基質の系外排出が無いとすると、次の式が成り立つ。

$$S_0 = S + \frac{N}{Y} \quad \dots (3-4)$$

ここで、 S_0 は初期基質濃度、Yは収率である。(3-4)式を(3-3)式へ代入して、

$$\frac{dN}{dt} = k \cdot \left(S_0 - \frac{N}{Y} \right) \cdot N \quad \dots (3-5)$$

項を整理すると、

$$\frac{dN}{dt} = k \cdot S_0 \cdot \left(1 - \frac{N}{S_0 Y} \right) \cdot N \quad \dots (3-6)$$

(3-6)式を(3-2)式と比較すると、

$$k \cdot S_0 = r \quad \dots (3-7)$$

$$S_0 \cdot Y = K \quad \dots (3-8)$$

となる。各初期基質濃度 S_0 を代入し、米糠、上新粉、破碎米それぞれに対し式(3-6)によるあてはめを行なった。Fig.3-10は各初期基質濃度に対する収率Yを示している。このことから、Fig.3-8同様に米糠において収率が最も高いが、初期基質濃度の上昇とともに最大個体数密度は頭打ちになり、基質の初期投入のみの培養では約 $10,000 N \cdot ml^{-1}$ 程度が限界であることがわかった。また、Fig.3-11より、各初期基質濃度に対する、基質あたりの増殖速度は初期基質濃度の上昇とともに減少することが明かとなり、これは用いた基質全てにおいて共通する現象であった。さらに、増殖速度の点においても同量の基質濃度では米糠において高いことがわかった。

3-3-3 クーロメーターを用いた大量培養時の通気量の算定

クーロメーターを用いて、輪虫類の培養時に必要な空気の供給量について検討を行なった。初期TOC濃度 $1,000 mg \cdot l^{-1}$ で培養を行なった場合、酸素消費量は開始6時間目で極大となった。Figs.3-12、3-14、3-16は $1,000$ 、 $3,500$ 、 $7,000 mg \cdot l^{-1}$ で培養を行なった

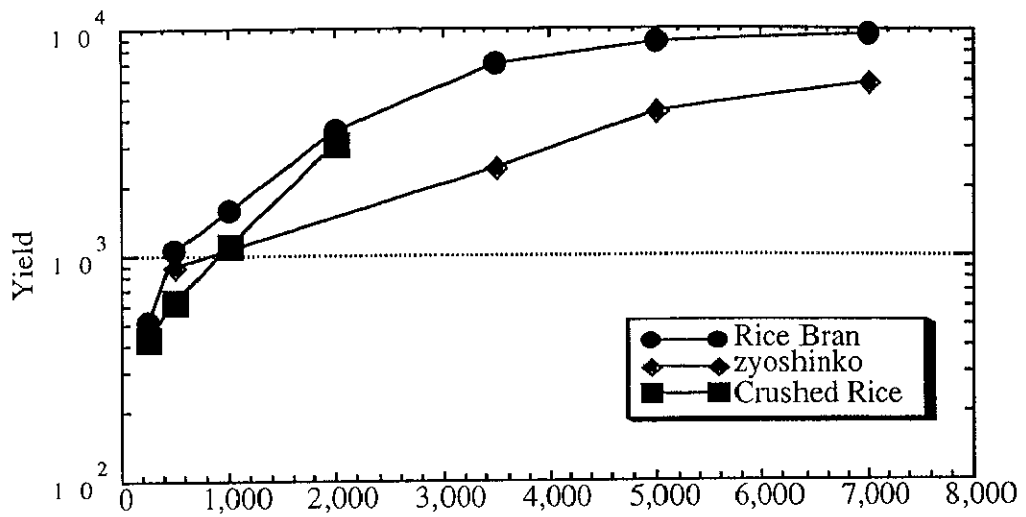


Fig.3-10. Correlation between initial medium concentration and yield.

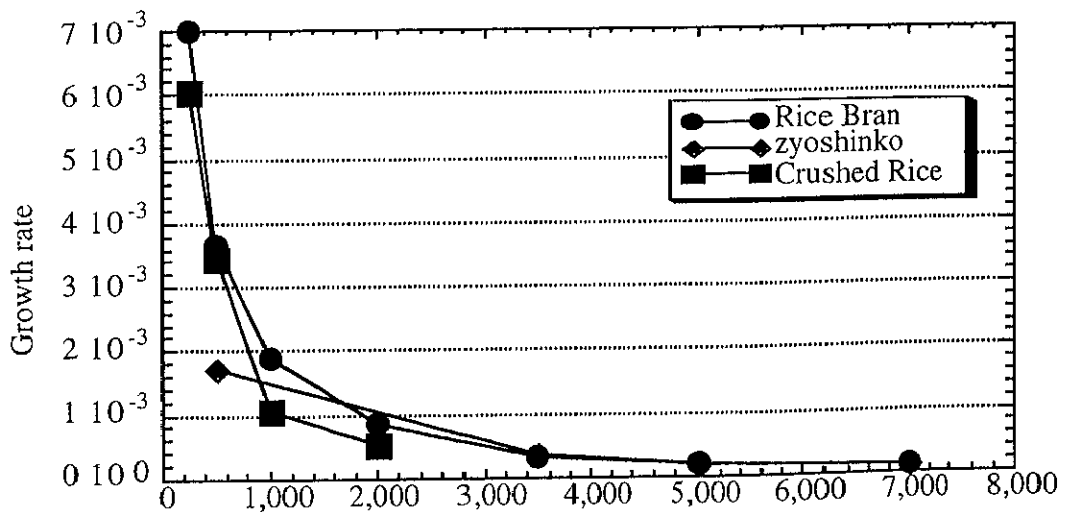


Fig.3-11. Correlation between initial medium concentration and growth rate of *P.erythroptalma*.

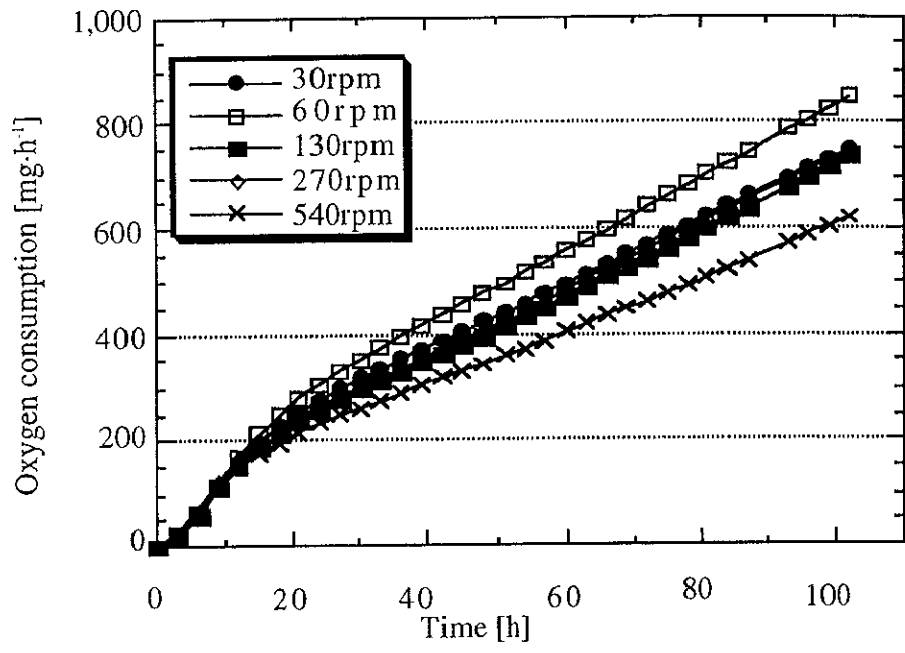


Fig.3-12. Oxygen consumption under various agitation speeds at initial medium concentration of TOC1,000mg·l⁻¹.

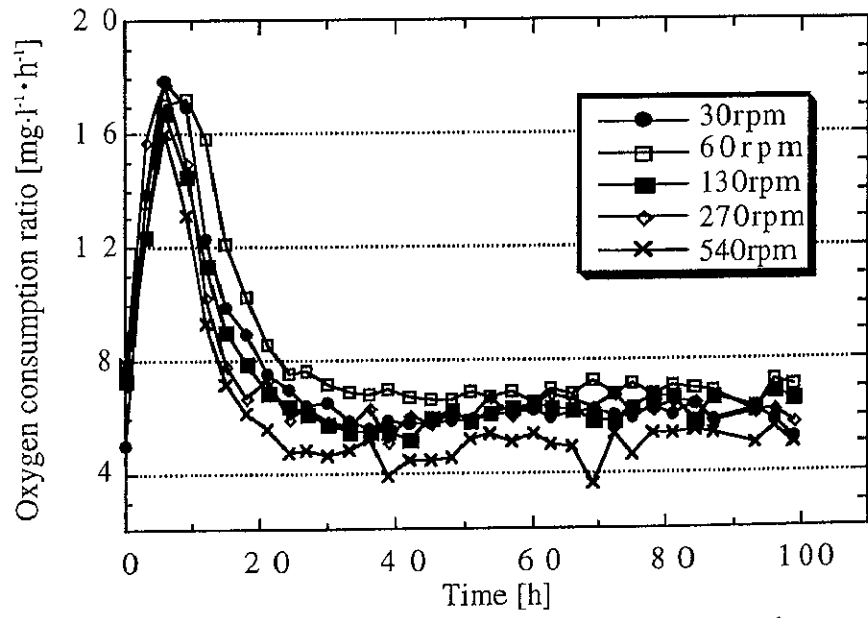


Fig.3-13. Oxygen consumption rate under various agitation speeds at initial medium concentration of TOC1,000mg·l⁻¹.

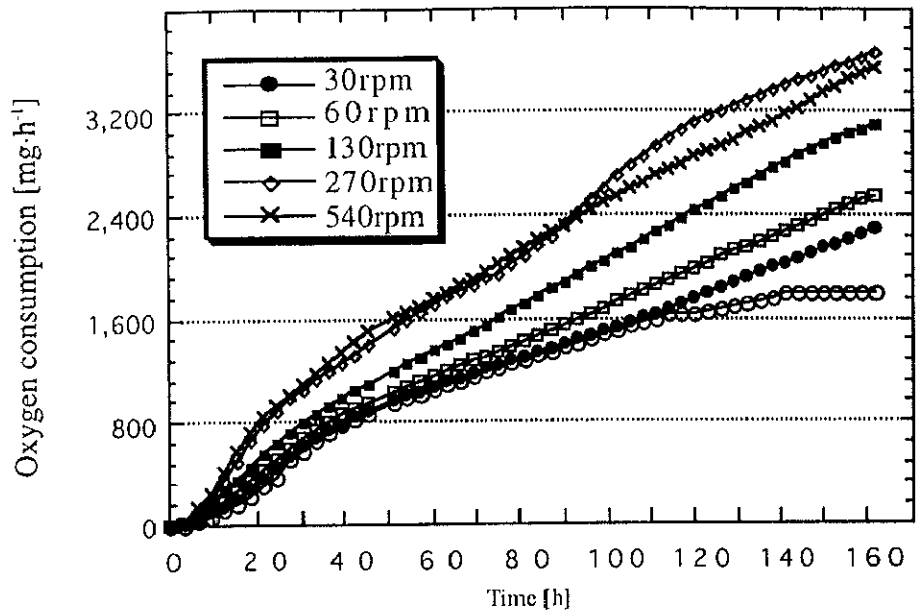


Fig.3-14. Oxygen consumption under various agitation speeds at initial medium concentration of $\text{TOC}3,500\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

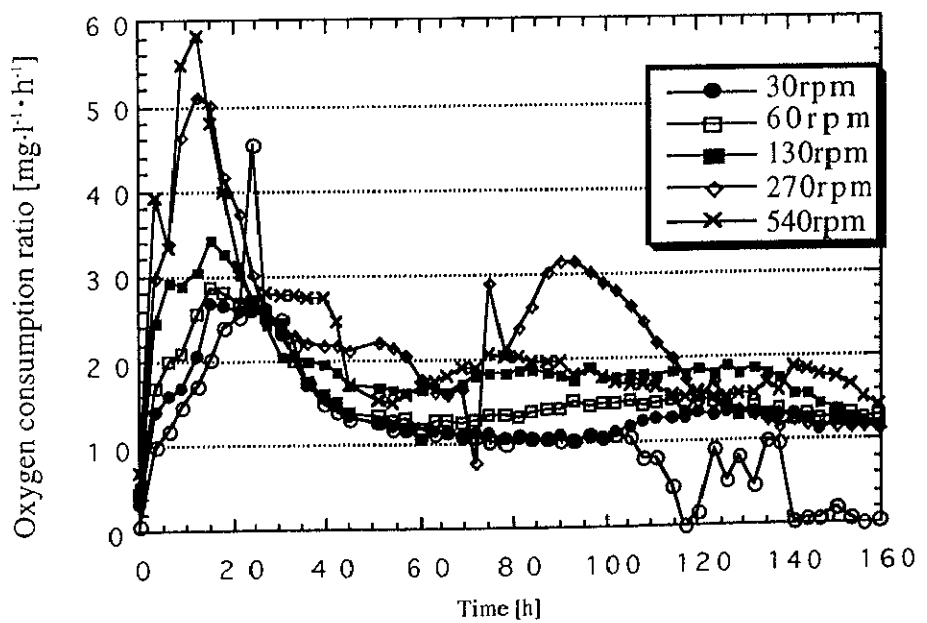


Fig.3-15. Oxygen consumption rate under various agitation speeds at initial medium concentration of $\text{TOC}3,500\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

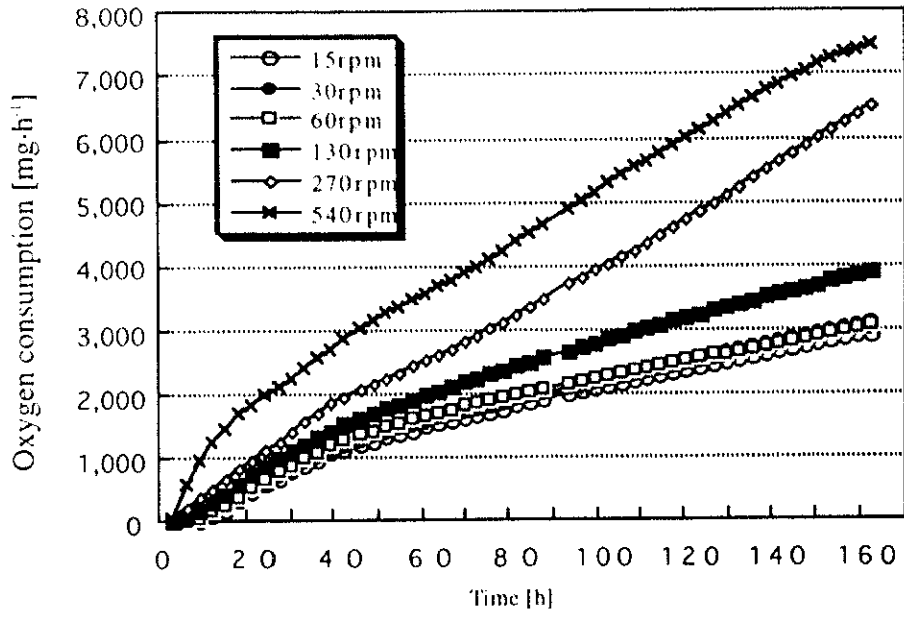


Fig.3-16. Oxygen consumption under various agitation speeds at initial medium concentration of TOC7,000mg·l⁻¹.

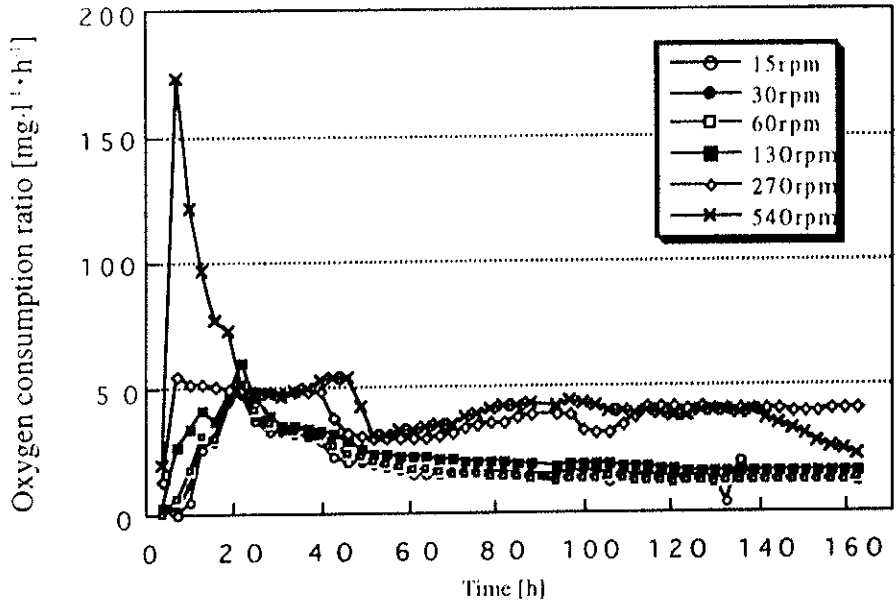


Fig.3-17. Oxygen consumption rate under various agitation speeds at initial medium concentration of TOC7,000mg·l⁻¹.

ときの酸素消費量の積算値を示しており、また、この値を単位時間当たりの消費量に換算したものがFigs.3-13、3-15、3-17である。この時、30rpmの系において最も高い消費速度が得られ、そのときの値は $18.0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ であった。また、実験開始後から6時間では輪虫類の増殖が十分ではないことから、この酸素消費速度に最も多く関与しているのは細菌類といえる。その後、酸素消費速度は減少し、数日間は5から $7\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の間ではほぼ一定値を保った。このことより、培養初期において通気量を3倍程度にあげることが必要であることが考えられた。そこで、この時の酸素消費量の極大値から、最終的な目的である500Lのパイロットスケールの大型培養槽における必要な通気量を算出した。TOC $1,000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ において、培養槽1L当たりの酸素消費量は $180\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 、標準状態において空気中に含まれる酸素は $0.277\text{kg}\cdot\text{O}_2\cdot\text{m}^{-3}$ であるから、これを空気量に換算すると $6.45\times 10^{-5}\text{m}^3\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 、酸素の利用率を5%とすると必要な空気供給量は $1.30\times 10^{-3}\text{m}^3\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ となる。以上のことから、500L培養槽では $0.65\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$ ($108\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)の通気が必要であると考えられた。同様にTOC $3,500\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ において $1.84\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$ ($184\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)、 $7,000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ において $6.25\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$ ($1,040\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)の通気が必要であることがわかった (Fig.3-18)。

3-3-4 ミニスケール、パイロットスケール培養槽を用いた*P.erythrophthalma*の

大量培養

大量培養法をプロセスとして確立するためには、フラスコレベルで得られた知見がスケールアップした系においても再現されるか否かについて確認を行ない、期待通りの成果が得られないようであれば、その改善法について検討する必要がある。そこで本実験ではミニスケール (10L)、パイロットスケール (500L) へのスケールアップが最大個体数密度および増殖速度に及ぼす影響について、比較検討を行なった。3-3-2のフラスコ実験と同様に増殖曲線 (Fig.3-19) に対し (3-2) 式によるフィッティングを行なったところ、フラスコスケールの時より若干小さく200ml、10L、500Lスケールでそれぞれ、内的自然増加率で0.84、0.74、 $0.70(\text{day}^{-1})$ 、環境収容力では1,580、1,900、

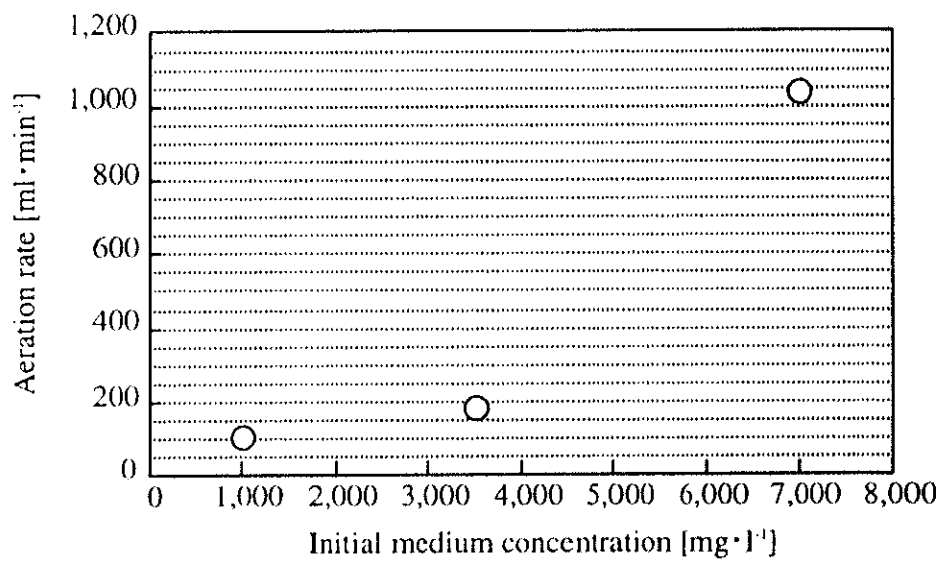


Fig.3-18. Aeration rate on initial medium concentration.

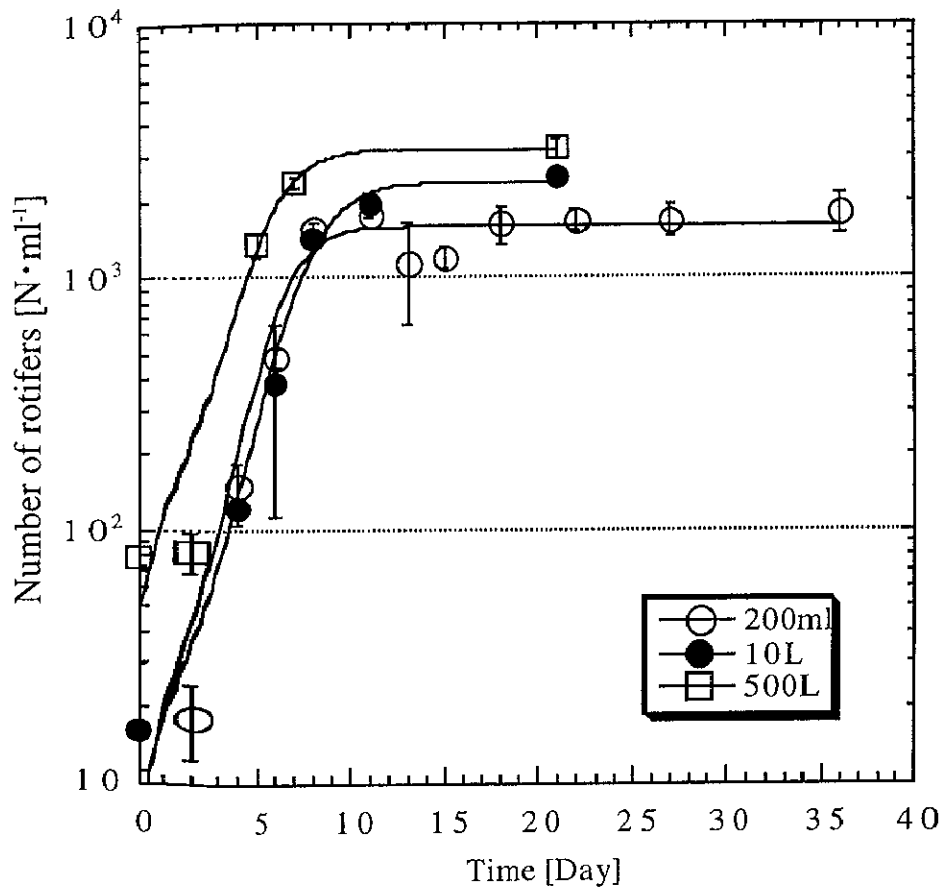


Fig.3-19. Time course of number of rotifers in various culture vessel.

2,580(N·ml⁻¹)であった (Figs.3-20,3-21)。これらのことから、*P.erythrophthalma*の培養を行なう場合、培養容積を大きくすることで増殖速度は小さくなるものの、最大個体数密度は高くなることがわかった。この原因を調べるため、フラスコ、10Lロット瓶、500L培養槽の各容積と壁の面積を測定した (Table3-4) ところ、培養器が大きくなるに従って (壁の面積) と (容積) の比が小さくなった。この結果と、*P.erythrophthalma*は他の物質に固着して餌を捕食することがしばしば観察されるという事実から、増殖速度が小さくなった原因としては、培養容積が大きくなるに従い付着できる壁面が減り、効率的に増殖できなくなったものと考えられ、最大個体数が高くなった原因としては通気による老廃物等の系外排出が行なわれるためと考えられた。

3-3-5 *P. erythrophthalma*の非滅菌培養系と滅菌培養系での個体数の相違

*P. erythrophthalma*の個体数の解析評価について、500L系に関しては滅菌系と非滅菌系についての比較を行なった。非滅菌系では培養開始後原生動物 *Cinetochilum* sp.等の繊毛虫類が24,000N·ml⁻¹出現したが、出現後3日程度で20N·ml⁻¹まで減少し、さらに輪虫類の最大個体数密度は2,200N·ml⁻¹および増殖速度は0.7day⁻¹と他の系と比較し大きな差はみられなかった。このことから、大型培養槽での輪虫類の大量培養には滅菌が必ずしも必要でないことが明らかとなった。また、非滅菌系では培養開始後個体数密度が最大になったところで再び米糠を1,000mg·l⁻¹ (1.25kg·500l⁻¹) となるように培養槽に投入したところ、再び *P.erythrophthalma*の増殖が始まり、最大個体数密度は18,000N·ml⁻¹まで増加した (Figs.3-22, Fig.3-23)。基質投入後の最大個体数密度に達した期間と開始より最大個体数密度に達した期間はほぼ同じであることから、輪虫類と細菌類による基質の分解や代謝産物による阻害を受けることなく個体数密度を高めることができたものと考えられる。さらに、培養開始時のような繊毛虫類の増殖も認められなかった。Fig.3-6より、2回目の米糠投入時の個体数密度18,000N·ml⁻¹を得るためには基質の初期濃度を10,000mg·l⁻¹ (500Lに対し12.5kg) となるように投入しなければならないのに対し、2.5kg (1.25kg×2回) と少量の米糠で培養できることが明らかとなった。このこと

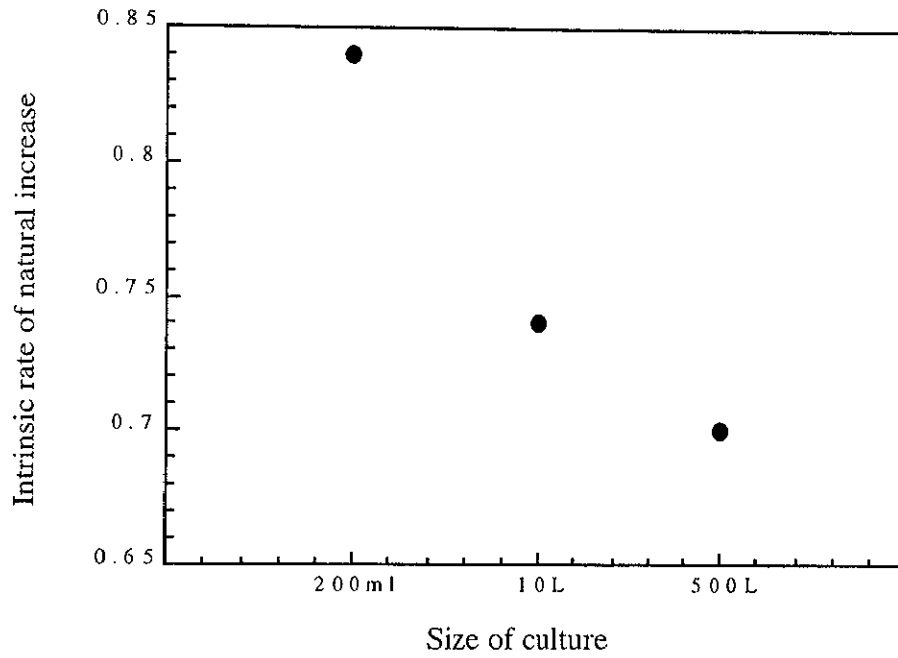


Fig.3-20. Growth rate comparison in size of culture.

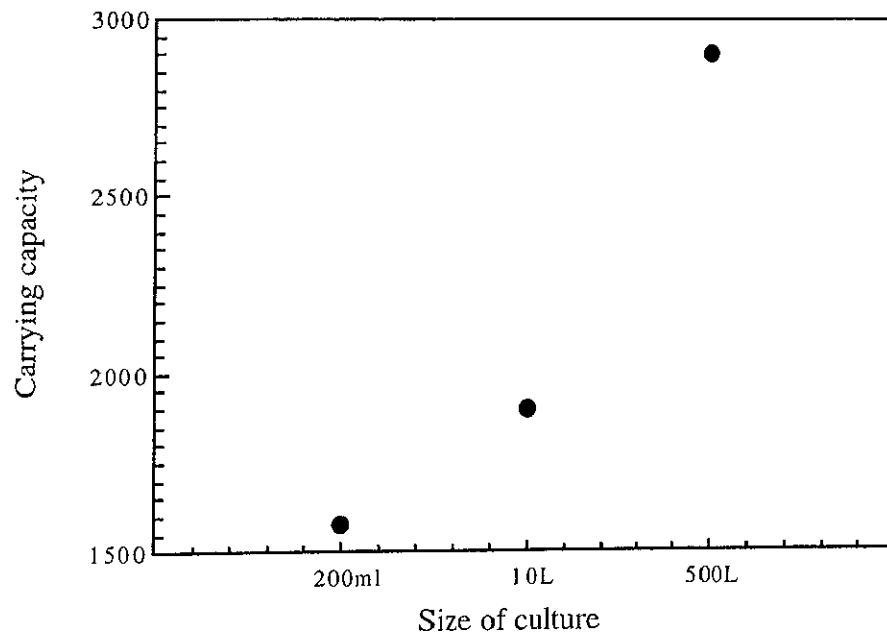
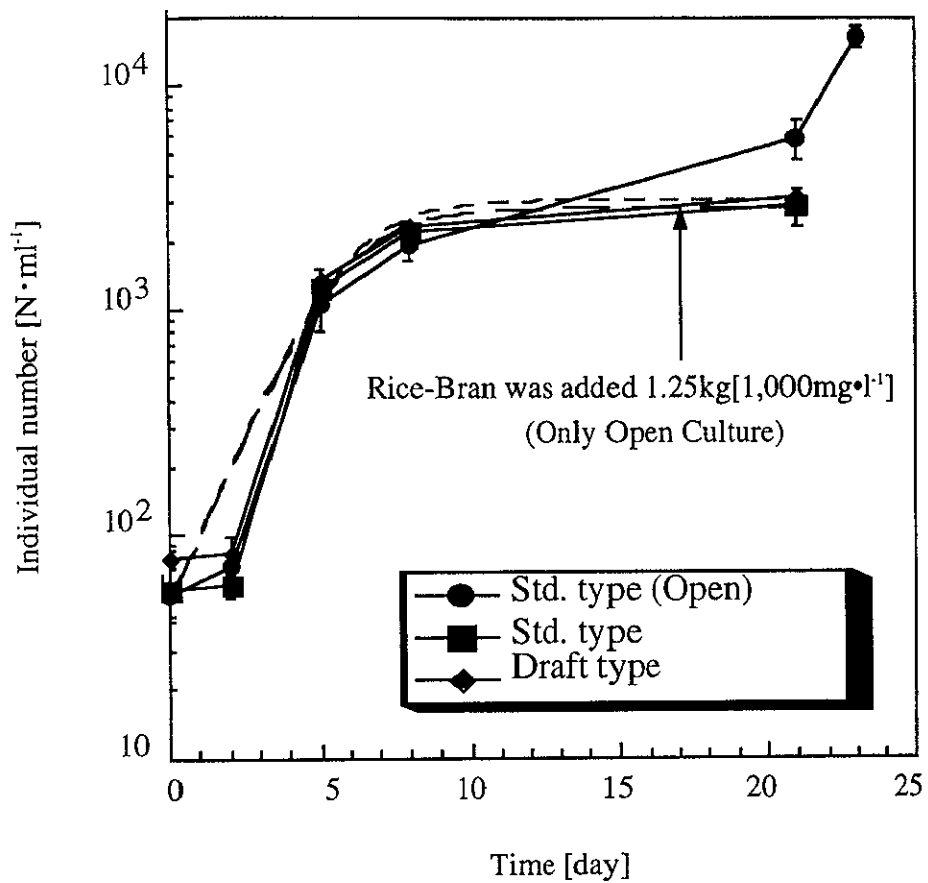


Fig.3-21. Carrying capacity comparison in size of culture.

Table 3-4. Relationship of the areas and the volumes in various culture vessels.

| | radius [cm] | height [cm] | area [cm ²] | volume [cm ³] | area / volume |
|------|----------------|----------------|----------------------------|------------------------------|------------------|
| 500L | 40 | 100 | 25120 | 502400 | 0.05 |
| 10L | 10.7 | 28 | 1881 | 10066 | 0.1869 |
| 0.2L | 5 | 2.5 | 78.5 | 196 | 0.4 |



**Fig.3-22. Rotifer culture with rice-bran
in 500L-tank [TOC 1,000mg · l⁻¹].**

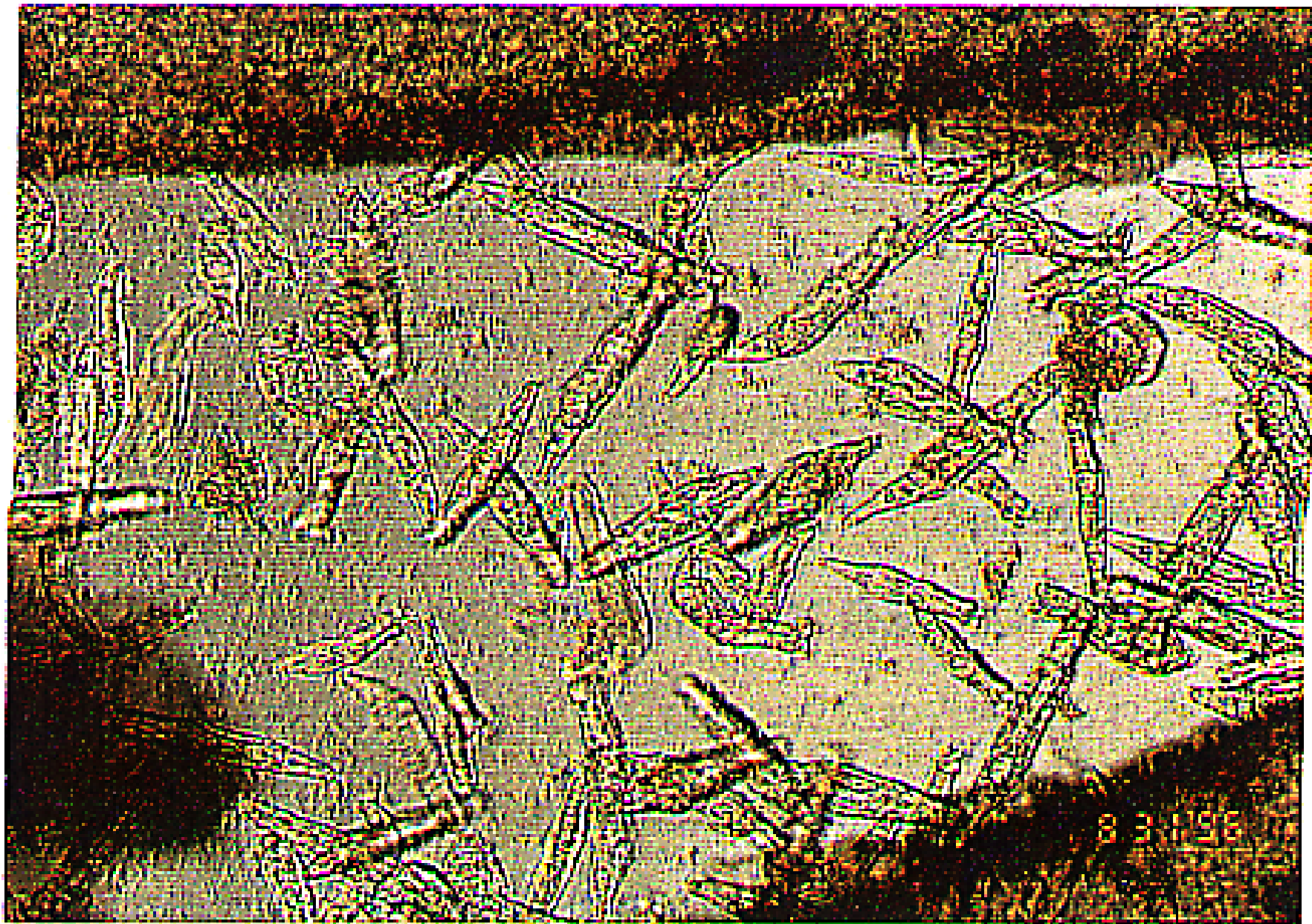


Fig.3-23. Mass cultivation of *P. erythropthalma*.

から、大量培養を行なうときは数段階に分けた基質の投入を行なうことでより効率的に培養ができることが明らかとなった。

3-3-6 パイロットスケール培養系における培養液の水質変化

大量培養された輪虫類はネットなどによって回収されるが、その際に大量の培養排液が生じる。そこで、排水中の吸光度、DOC、DT-N、DT-Pを測定した。

サンプリングした培養液を30分間静置し、上清の吸光度（550nm）を測定したところ、培養日数と共に吸光度値が増加した（Fig.3-24）。これは、増殖した輪虫類により細菌類を含む懸濁物質が捕食され、また*P. erythrophthalma*が放出する粘性物質により凝集性が高まり、透明度が増したためであると考えられた。この状況は肉眼でもはっきりと確認できた（Fig.3-25）。

培養開始直後のDOCは滅菌系では約270mg・l⁻¹、非滅菌系では80mg・l⁻¹であったが、いずれの系においても培養開始から5日間で40mg・l⁻¹まで減少し、以降、その濃度のまま横這いに推移した（Fig.3-26）。これは、輪虫類と共存する細菌類が増殖する過程で消費したものと考えられ、また、非滅菌系では初期DOC濃度が低かったが、これは滅菌系では滅菌時に生じたDOC成分の抽出が起こらなかったためと考えられる。しかし、Fig.3-22より*P. erythrophthalma*の増殖には非滅菌系と滅菌系では差がみられなかったことから、米糠は易分解性であり、細菌類の増殖には問題のないことが考えられた。次に溶存性全窒素(DT-N)を測定したところ、培養開始時には滅菌系では125mg・l⁻¹、非滅菌系では60mg・l⁻¹であったが、培養開始後2日間で7mg・l⁻¹まで減少し、以降、ほぼ横這いとなった（Fig.3-27）。溶存性全リン（DT-P）では、初期濃度は350～500mg・l⁻¹と非常に高濃度であったが、培養の経過と共に急激に減少し、8日目には約20mg・l⁻¹に達し、それ以降の大きな減少はみられなかった（Fig.3-27）。この急激な減少は細菌類や輪虫類により資化されたことが主な要因であると考えられた。なお、*P. erythrophthalma*の培養液は培養後には排水となるが、このままの窒素、リン濃度で下水道への放流を仮定すると、窒素に関しては生活排水の約50mg・l⁻¹と比較し十分に低いですが、リンに関しては

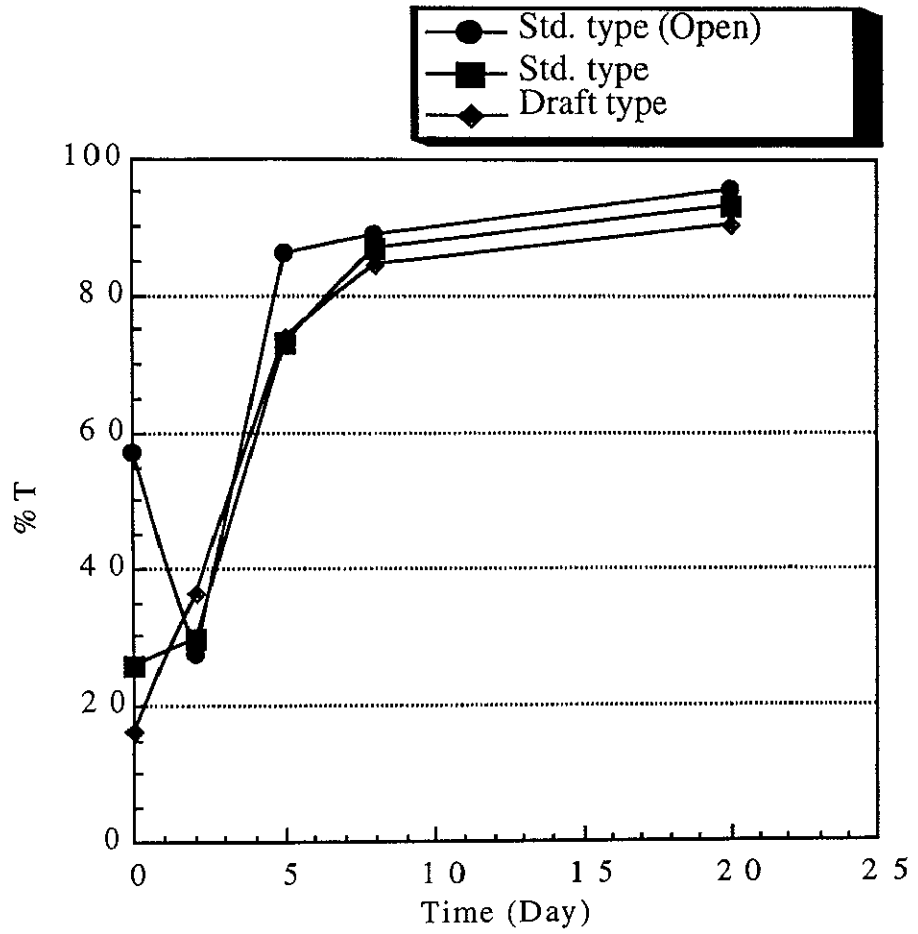


Fig.3-24. Time course of % T of medium (500L).

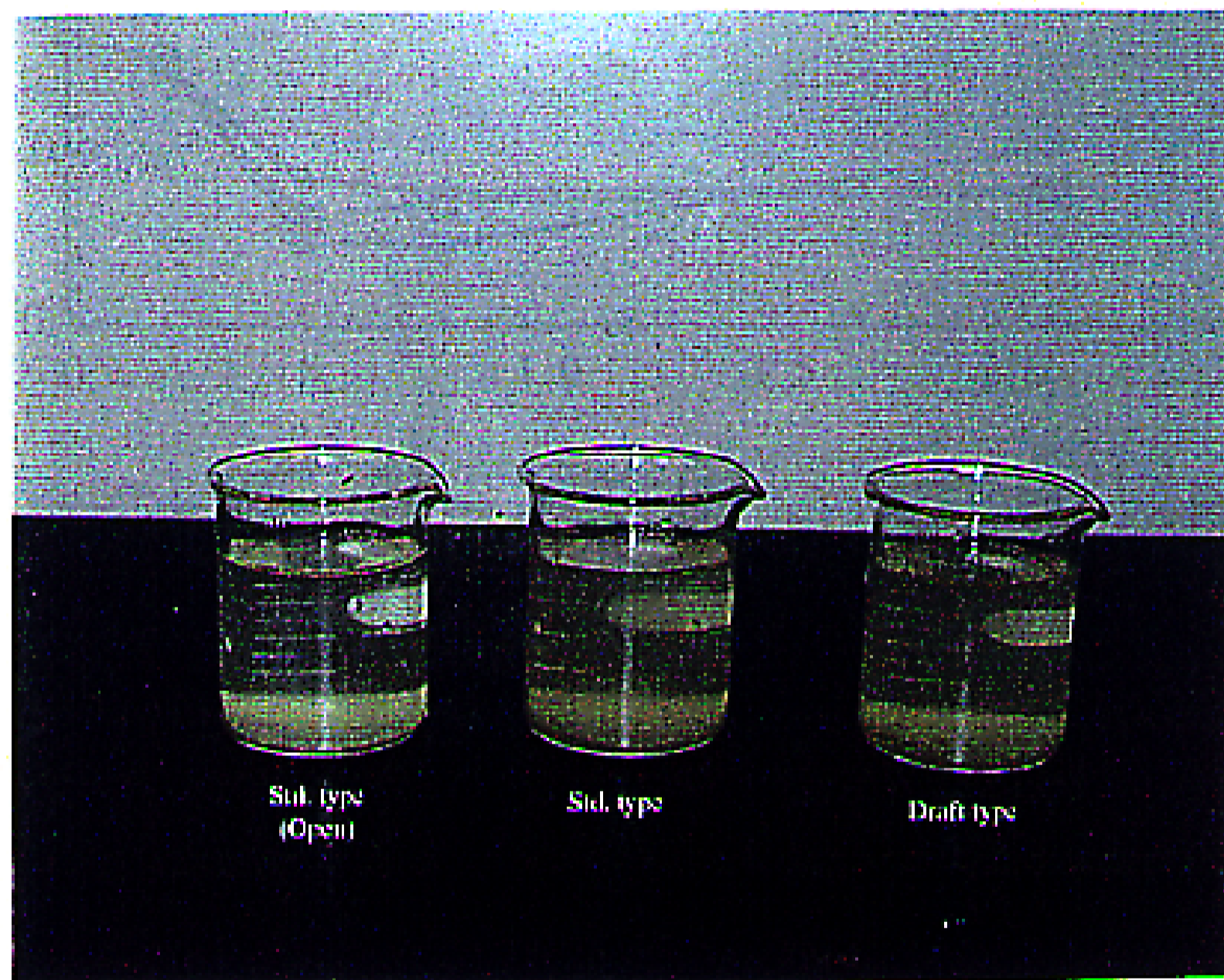
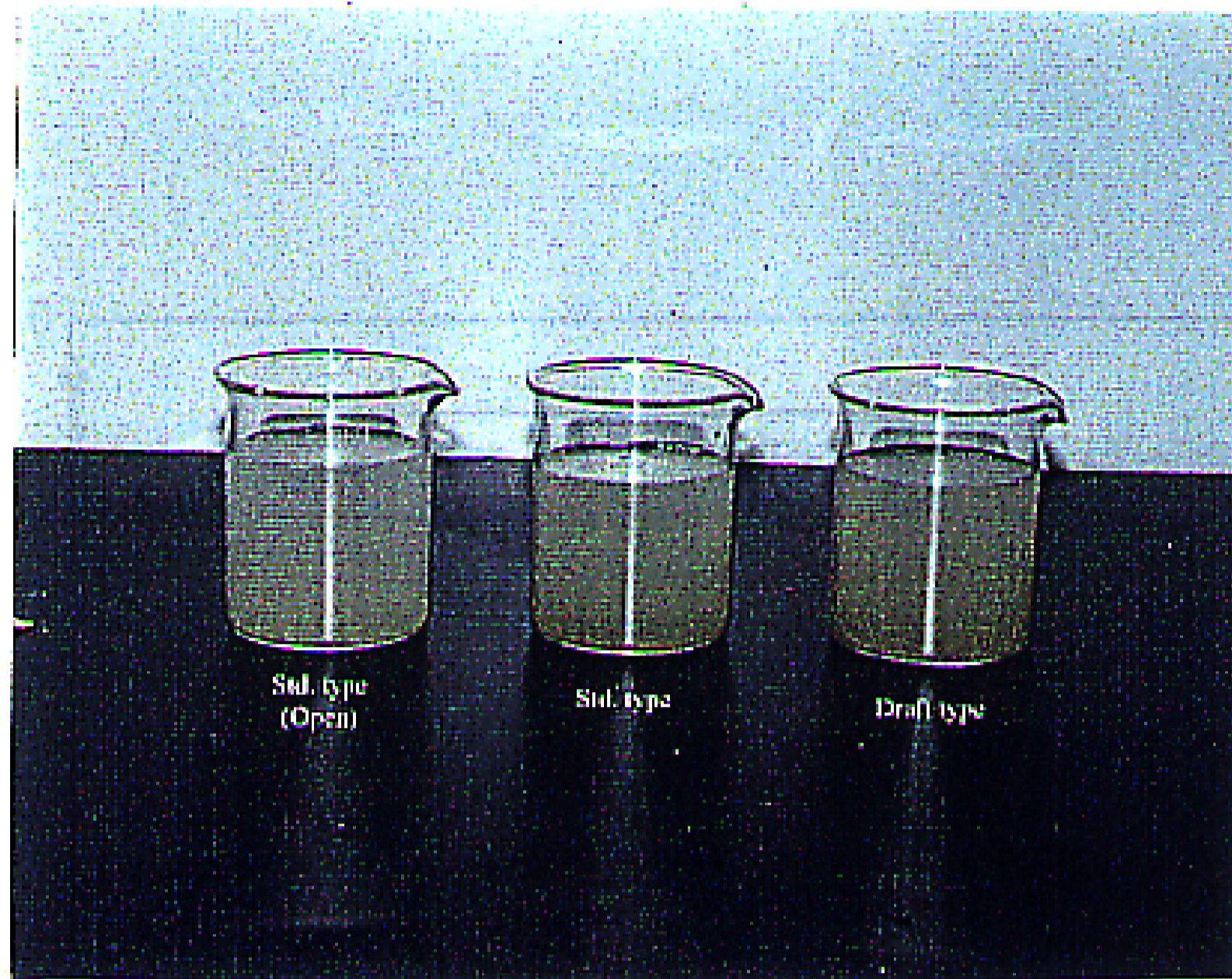


Fig.3-25. Culture medium of *P.erythrophthalma* at initial (upper) and final (lower) condition.

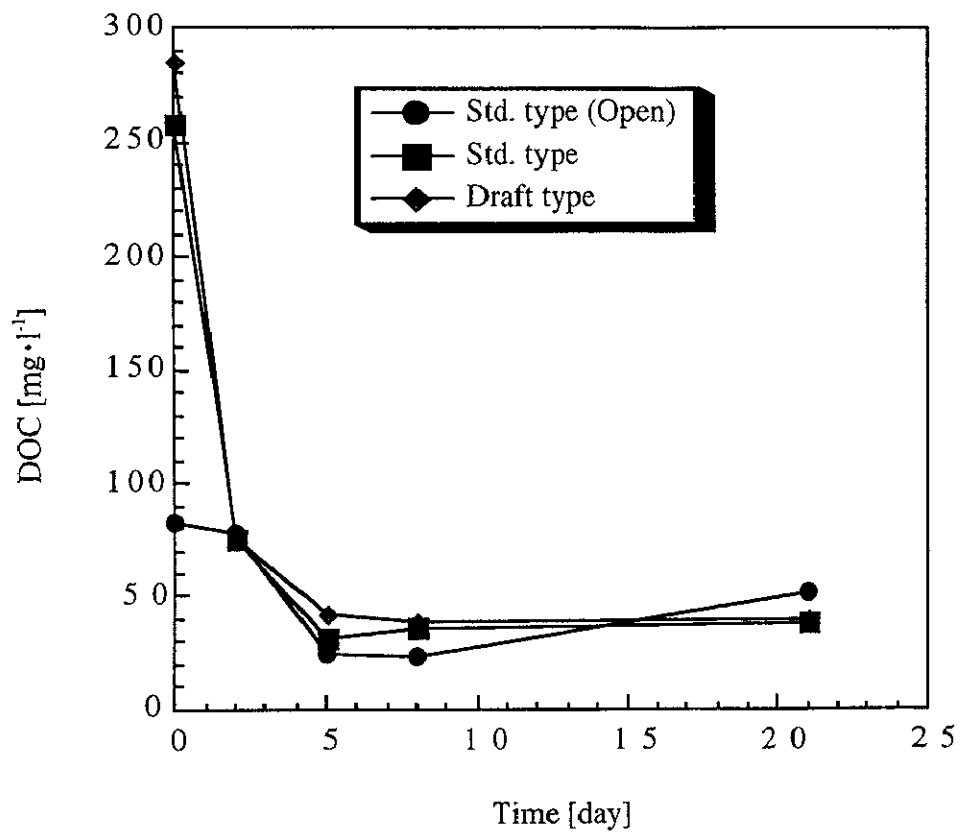


Fig.3-26. Time course of DOC in 500L culture.

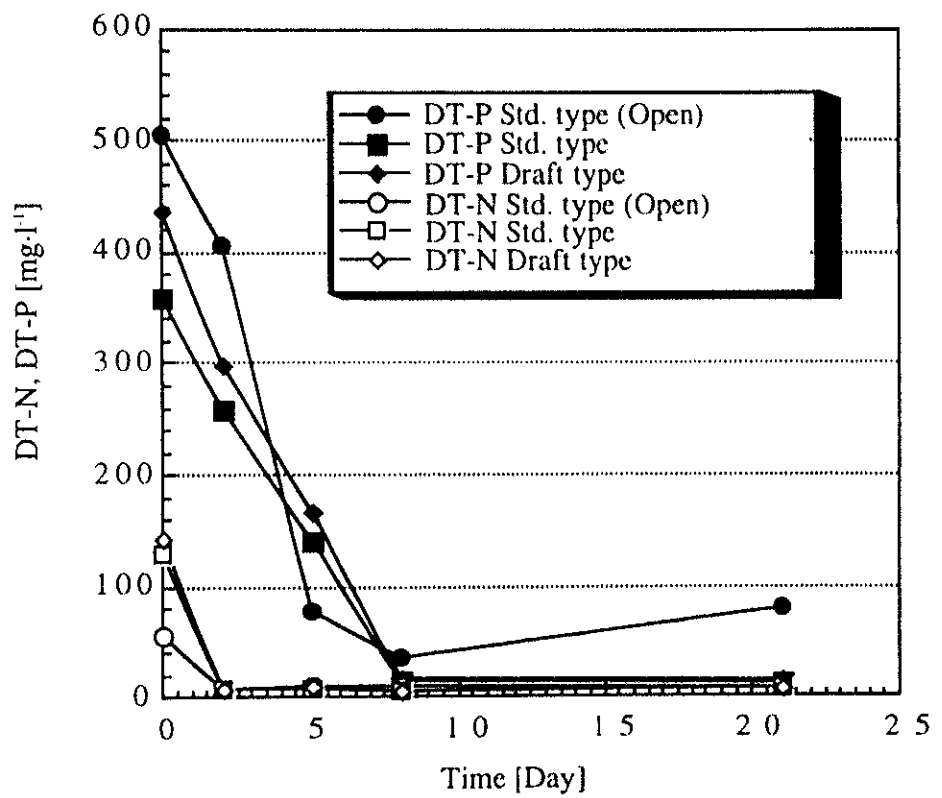


Fig.3-27. Time course of nutrient of culture.

20mg・l⁻¹と生活排水のそれと比較し4~5倍程度も高い。つまり、浄化槽等の浄化機能向上のために輪虫類の大量培養を行なっても、輪虫類の培養で発生する大量の排水が、逆に環境への汚濁負荷を増加させることになっては根本的な問題の解決にはならない。したがって、輪虫類の浄化機能向上への寄与と大量培養における汚濁負荷源の発生を総量として割り出し、評価していく必要がある。今後、これらの点をふまえ培養液の栄養塩濃度等を微生物の増殖にとって必要最小限に調製する必要があると考えられる。

3-4 まとめ

本章では輪虫類*P. erythrophthalma*の大量培養について、安価で効率的に培養可能な培地の選択と通気量の算定、大量培養槽で培養したときのスケールアップ効果について検討を行なった。得られた結果は以下のようにまとめられる。

1) *P. erythrophthalma*の高密度大量培養に際し、適正な食物源を選定するためにクロレラ、粉末酵母、油脂酵母、洗米排水を用いて培養実験を行なった結果、洗米排水を用いた場合、最も個体数密度が高まり、しかも活性が高いことも明らかとなり、米由来の基質を用いて培養を行なうことが適切であると考えられた。

2) 米由来の基質として、上新粉、破碎米、米糠を用いて培養を行なったところ、米糠において比増殖速度および最大個体数密度が共に高まることがわかり、さらに、適正な基質の初期濃度は1,000mg・l⁻¹であることが明らかとなった。

3) クーロメーターの測定データから大量培養における通気量を算定したところ、500L培養槽では初期基質濃度1,000、3,500、7,000mg・l⁻¹のそれぞれに対し108L・min⁻¹、184L・min⁻¹、1040L・min⁻¹が必要であることがわかった。

4) 培養系のスケールアップ効果をみるために初期基質濃度を1,000mg・l⁻¹とし、容積10L、500Lのスケールで培養を行なったところ、比増殖速度は培養槽のスケールアップによって減少したが、逆に最大個体数密度は高まる傾向にあることがわかった。

5) *P. erythrophthalma*の大量培養において、初期の基質濃度を低濃度に設定し、培養

の経過と共に段階的に基質を投入することが比増殖速度を高め、個体数密度を上げる上で効果的であることが明らかとなった。

6) 培養後の排液に関しては培養経過と共に有機物、窒素は生物体として回収されたが、リンに関しては過剰であることがわかり、培地の濃度を下げる等の対応が、大規模培養に伴う二次的な汚濁源の発生を低減させる上で必要であることがわかった。