

第4章 輪虫類*Philodina erythropthalma*の乾燥・凍結による長期保存と再生効率化 のための環境条件

4-1 はじめに

第3章では輪虫類*P.erythropthalma*の効率的な高密度大量培養法について検討したが、汎用性を高め*P.erythropthalma*を微生物製剤として実際の現場に提供していくためには、現場の都合に応じて必要時に直ちに使用でき、しかも、その効果が短期間で発揮されなければ意味を持たない。そこで、*P.erythropthalma*の活性を低下させることなく大量に保持し、浄化能の低下時に生物反応槽に接種した後迅速に効果を発揮させることを考慮に入れ、微生物製剤化の工程で要になると考えられる乾燥、保存の適正条件を明らかにするための検討を行なった。なお、微生物保存法については、微生物利用の研究が盛んになった1890年代の終わり頃からその取り扱い方法と共に目を向けられるようになり、実際の微生物保存手法としては、細菌や藻類についてこれまでに乾燥法、凍結保存法、凍結乾燥法等が開発されてきている。しかしながら、輪虫類については活動を停止させた状態で長期的に保存する技術は開発されておらず、継代培養により行なわれているのが現状である。なお、乾燥、凍結、凍結乾燥法のうち、輪虫類の乾燥耐性については1900年代初頭より報告がなされている³⁹⁾。また、藻類等で比較的多く行なわれている凍結法については、輪虫類を用いた検討も行なわれているが、凍結に対する耐性はシオミズツボウムシのケースは2%、ヒルガタ輪虫のケースでは50%程度と、属種によりかなり異なることが報告されている^{40,41)}。しかしながら、これらの研究は、全てが生物学的な基礎的研究の立場からの検討であり、保存する微生物の量は10ml程度の少量であり、大量保存という観点からは検討されていない。したがって、ヒルガタ輪虫類を排水処理で活用するためには新たに大量保存法を確立することが必須と考えられる。本章では大量培養後の輪虫類の長期保存法の開発を行なうことを目的とし、*P.erythropthalma*の凍結法および乾燥法について実験的検討を行なった。

4-2 実験方法

4-2-1 供試培地

LE培地：鮮度の高いレタスの葉を90℃で16～18時間乾燥し、乾燥させた葉3gを1Lの沸騰水（蒸留水：水道水=1：9）中で攪拌しながら抽出した。別に30分間ポイルした鶏卵の黄身3gを同様に1Lの沸騰水中で攪拌しながら抽出した。それぞれの抽出液を脱脂綿を用い濾過し、等量のろ液を混合し、NaOHまたはHCl溶液を用いてpHを6.8に合わせた。溶液はオートクレーブ滅菌をかけ保存した。本培地は*P. erythrophthalma*の培養に用いた。

米糠培地：LE培地は作成法が複雑であり、コストがかかることから大量培養を考慮した場合培地としては適正とはいえない。そこで前章で用いた培地のうち、*P. erythrophthalma*の最も増殖速度、個体数密度共に高かった米糠を初期培地濃度をTOC換算で1,000mg・l⁻¹で用いることとした。培養法は3-2-2に従った。

4-2-2 乾燥保存方法

Ricci⁽⁴⁾によると乾燥時に保持担体を用いることにより輪虫の生存率が上がることがわかっている。そこで長期保存のための担体として、微生物製剤化における汎用性、コストなどの面から米糠、小麦のふすま、米のもみ殻を用いた。直径37mmのガラスシャーレに各種担体を0.3g計り取り、別にLE培地または米糠を用いて培養した輪虫をプランクトンネットで回収後、人工軟水で洗浄し、350N・ml⁻¹の個体数密度に調整し、それを担体を入れたシャーレに2ml（700個体）添加し、30℃にて乾燥した。乾燥においては、経時的にシャーレの重量を測定し、乾燥速度を計算した。対照として担体を入れない系についても検討した。なお、乾燥後は湿度20%、温度30℃に保ち、一定期間後、シャーレに1/750Mリン酸緩衝液を入れ、25℃にて静置し、経時的に観察し、再生率、活動を開始するまでの時間、再生後の活動状態より保存担体の有意性を評価した。

4-2-3 凍結保存方法

*P. erythrophthalma*を25℃、暗所、ロータリー振とうにて培養を行なった。培養後に乾熱滅菌済みの200ml容三角フラスコに分注し、凍結保護剤として0-20%のジメチルスルホキシド溶液と0-30%のグリセロール溶液をそれぞれ培養液と等量を加え、最終的に0-10%、0-15%の濃度となるようにした。凍結保護剤添加後、30分静置し、顕微鏡下で計数を行ない、それぞれのフラスコより1mlの培養液をセラムチューブ（住友ベークライト（株）製）に移し、密栓後、縦置きにして凍結した。輪虫を凍結する方法として以下の2つの方法を用いた。一つはセルフリーザー（PLANER Products社製）を用いる方法であり、これは液体窒素をチャンバー内に注入することで任意の冷却速度を得るというものである。もう一つの方法は、ディープフリーザーを用いて急速に冷却する方法であり、-80℃のものと-20℃のものを用いて行なった（以降、前者を緩速冷却、後者を急速冷却と称する）。緩速冷却は、冷却速度を-30℃まで-1℃・min⁻¹または-10℃・min⁻¹で冷却を行ない、その後、液体窒素で、-196℃まで冷却を行なった。急速冷却ではチューブを直接ディープフリーザーに投入することにより、-20℃、-80℃まで急速に冷却を行なった。それぞれの凍結後の培養液は12時間後に、-80℃冷却に関しては1年2ヶ月後における融解実験を行なった。融解操作は、その過程において再結晶化による細胞へのダメージが大きく生存率が減少するために特に注意する必要がある。一般的には出来るだけ高い温度ですばやく行なうことが必要であるとされるが、本実験での融解温度は*P. erythrophthalma*の生存できる限界の温度である35℃で湯浴を用いて振とうしつつ行なった。融解後、1mlの新鮮なLE培地をチューブに添加し、ピペットマンを用いてよく懸濁させ、さらに懸濁液より1mlを取り出し、顕微鏡下で融解後生存していた個体数を計数した。凍結前後において、活動している輪虫を生存個体とみなし、その個体数から生存率を算出した。

4-3 結果および考察

4-3-1 *P. erythrophthalma*の保持担体からの水分蒸発速度

保持担体の違いによる水分蒸発速度を調べたところ、小麦ふすまおよび米糠ではほぼ

同様の水分蒸発速度 $0.17\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$ を示した (Fig.4-1)。これに対して、もみ殻、担体非添加系では蒸発速度は $0.15\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$ であった。各保持担体の粒径を測定し比表面積を求めたところ、ふすまでは $11\text{mm}^2(\pm 13\text{S.D.})$ 、もみ殻では $20\text{mm}^2(\pm 1.8\text{S.D.})$ 、米糠では $7.3\times 10^4\text{mm}^2(\pm 2.6\times 10^3\text{S.D.})$ であった。また、ふすまでは米糠と同程度の粒径の粒子も多く含まれていた。これらのことから、ふすまおよび米糠では、小さい粒子によって比表面積に差が生じ、蒸散がされやすくなり水分蒸発速度に差が生じたと考えられた。

4-3-2 *P. erythrophthalma*の各種保持担体での乾燥後の輪虫類のふ化再生率

乾燥直後のふ化再生率について検討したところ、緩衝液添加後15分程度で乾燥に耐えた個体の活動が認められた。この時のふ化再生率は米ぬかでは5%、ふすまでは54%、もみ殻では52%であった (Fig.4-2)。また、乾燥後7日目に同様に緩衝液を入れ、再生状態を観察したところ、もみ殻の系でのみ添加後30分以内に活動が観察され、ふ化再生率は49%であり、他のふすま、米ぬか、非添加系では10個体程度のみが生残りふ化再生率は0.1%以下であった (Fig.4-3)。なお、7日目における再生状況を見ると、もみ殻の系は復水後に活動を開始した個体は成体が多かったのに対し、ふすま、米ぬか、担体非添加系では、再生した個体は $100\mu\text{m}$ 程度と小さい個体が多く、また、卵の中で動いている個体が認められた。このことから、輪虫は悪条件下では卵の状態でも乾燥に耐え復水後ふ化するが、環境条件が適正であれば卵同様に、成体も乾燥に耐えることが考えられた。また、7日目において、もみ殻では再生率が49%であったのに対し、ふすま、米糠、非添加系では0.1%以下と低かった。その原因としては検鏡の結果より次のように考えられた。すなわち、米糠およびふすまを用いた場合、保持担体が塊状になったのに対して、もみ殻を用いた系では培養液添加後もその構造を保ち、塊状になることはなかった。このことから水分を含むことで塊状になりやすい担体を用いた場合、それが輪虫の体に付着することによって呼吸阻害等が起こり、死滅した可能性が考えられ、ふ化再生率を高めるためには、水分を含んでも構造が変化しない担体を用いることが必要であると考えられた。このことを明らかにするために、ミキサーおよびふるいを用いてもみ殻を破碎

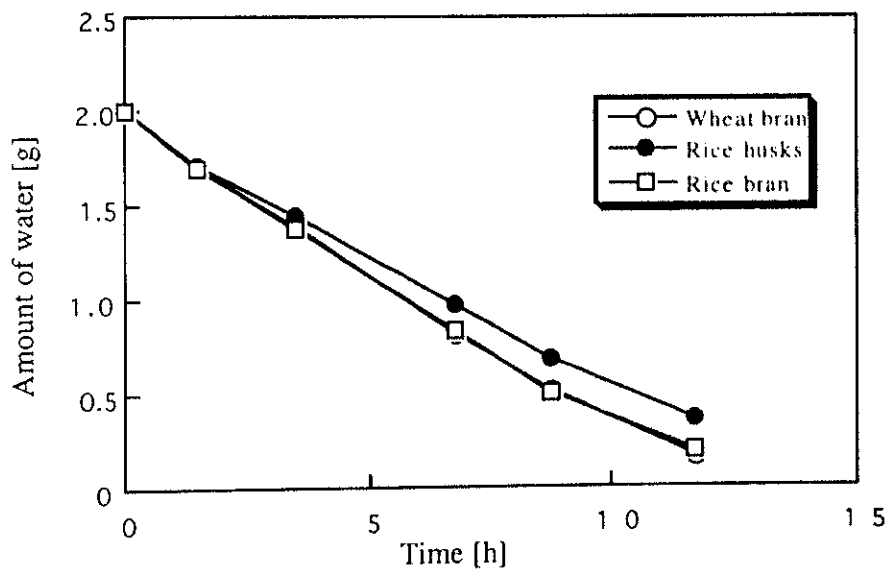


Fig.4-1. Vaporizing rate of water from media.

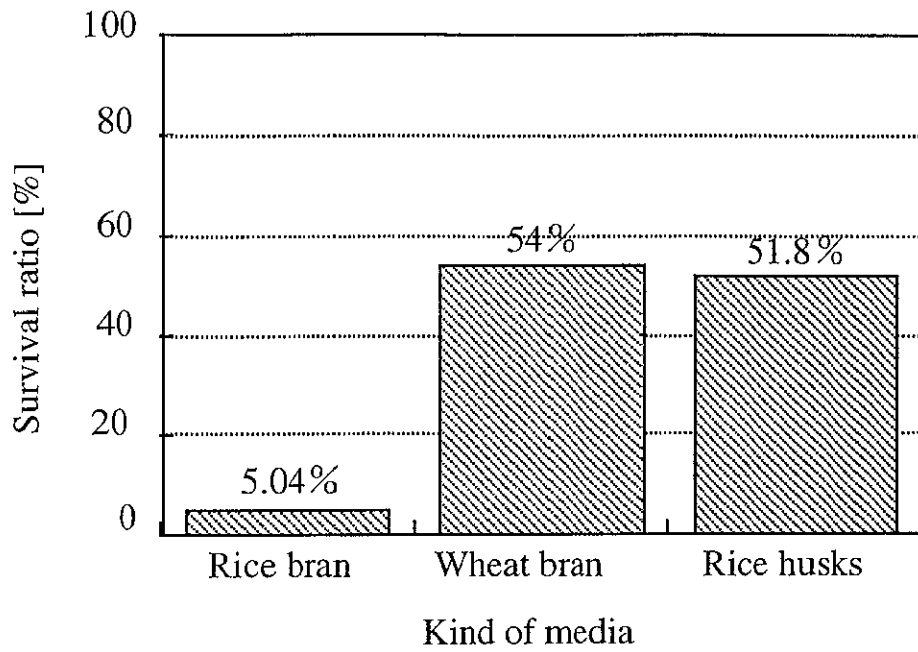


Fig.4-2. Survival ratio of rotifers after desiccation using various media.

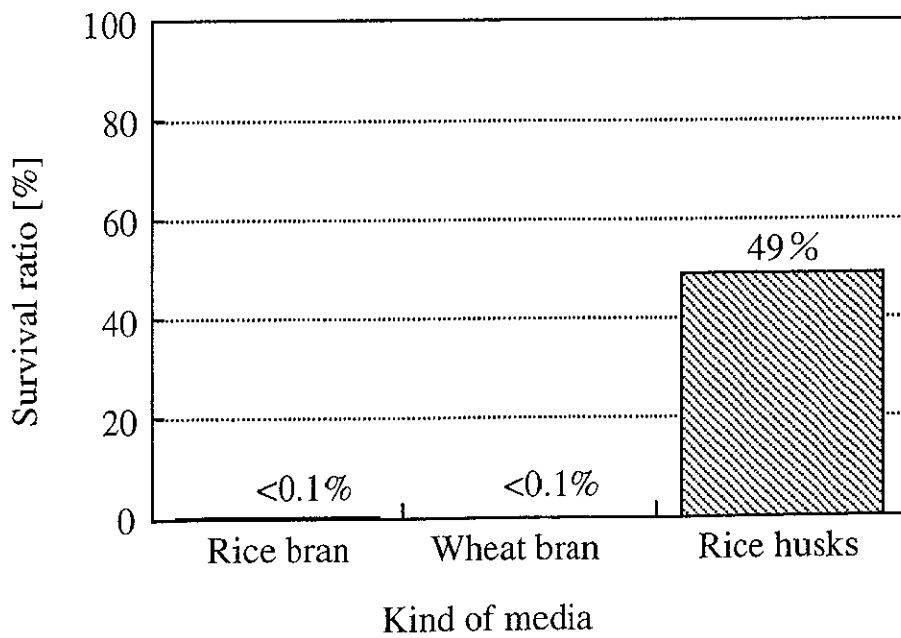


Fig.4-3. Survival ratio of rotifers after 7 days desiccating using various media.

し、サイズを分けて同様に乾燥、復水しふ化再生率を測定した (Fig.4-4) 。その結果、30-50%程度のばらつきは認められたものの、大きな差は認められなかった。特に、75 μ m以下の微小な粒子を用いた場合にも、もみ殻を破碎しなかった場合と比較し、大きな差はみられなかった。このことと、もみ殻と担体非添加系では、乾燥速度が等しいにもかかわらず、ふ化再生率に大きな差が認められたことから、乾燥時の適正条件の因子として保持担体が必要であり、かつその性状が生存率に大きく影響することがわかった。

4-3-3 *P. erythrophthalma*の凍結保存後の生存率および凍結保存の為の最適条件

凍結保存した*P. erythrophthalma*の融解操作後、特徴的な2つの動きが観察された。一つは咀嚼器がまったく動きを見せず、繊毛環と足を虫体に収縮させ、わずかに体を動かす運動を示した。これらの輪虫は数時間の内に死亡した。もう一つは個体は融解後直ちに活発に活動し、繊毛環を用いて細菌や懸濁物を捕食し、また繊毛環を用いて遊泳を行なうものが認められた。凍結に耐えた輪虫として後者のみを計数した。

1) 緩速冷却(-1 $^{\circ}$ C \cdot min $^{-1}$)の*P. erythrophthalma*の生存率

-1 $^{\circ}$ C \cdot min $^{-1}$ の凍結速度において凍結-融解を行なった後の生存率をFig.4-5に示した。この速度での凍結の場合にはDMSOを凍結保護物質として用いたときが、グリセロールを用いて凍結を行なった場合と比較し生存率が高く、DMSO濃度4%から6%の濃度で添加したときに高い生存率を示し4%濃度では平均41.1%、6%濃度では37.6%の生存率が得られ、それ以上またはそれ以下の濃度では生存率が低くなる傾向が認められた。これに対し、グリセロールでは2%の時に最も生存率が高く、それ以上の濃度では生存率は低下し、0.1%程度であった。

2) 緩速冷却(-10 $^{\circ}$ C \cdot min $^{-1}$)の*P. erythrophthalma*の生存率

-10 $^{\circ}$ C \cdot min $^{-1}$ の凍結速度で行なった場合の生存率をFig.4-6に示した。この場合、-1 $^{\circ}$ C \cdot min $^{-1}$ で行なったときと同様にDMSOを用いた方がグリセロールを用いた場合と比較し生存率が高かったが、全体的に生存率は低下する傾向にあった。しかしながら、生存

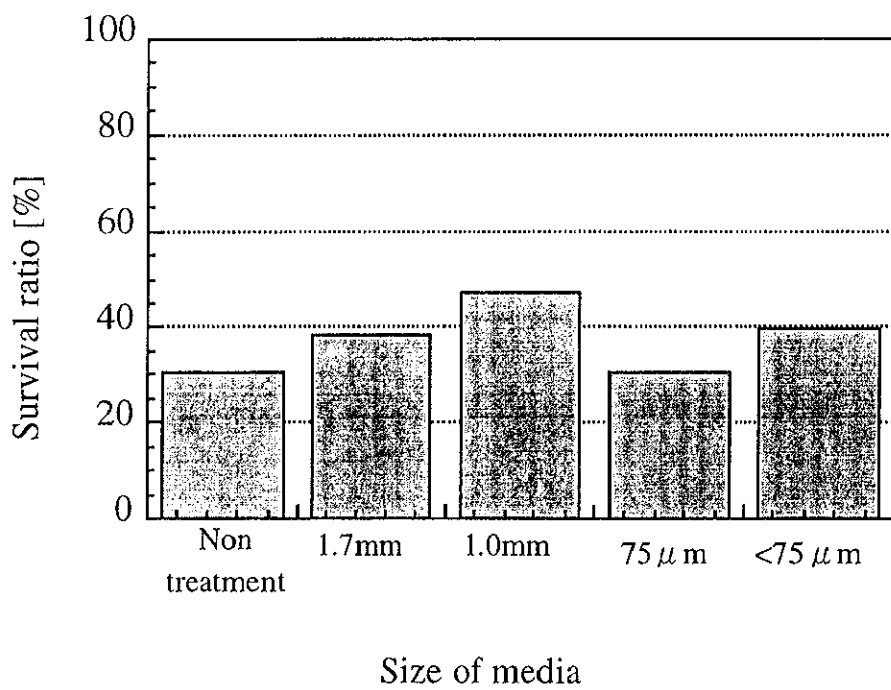


Fig.4-4. Survival ratio of rotifer using rice husks with various size.

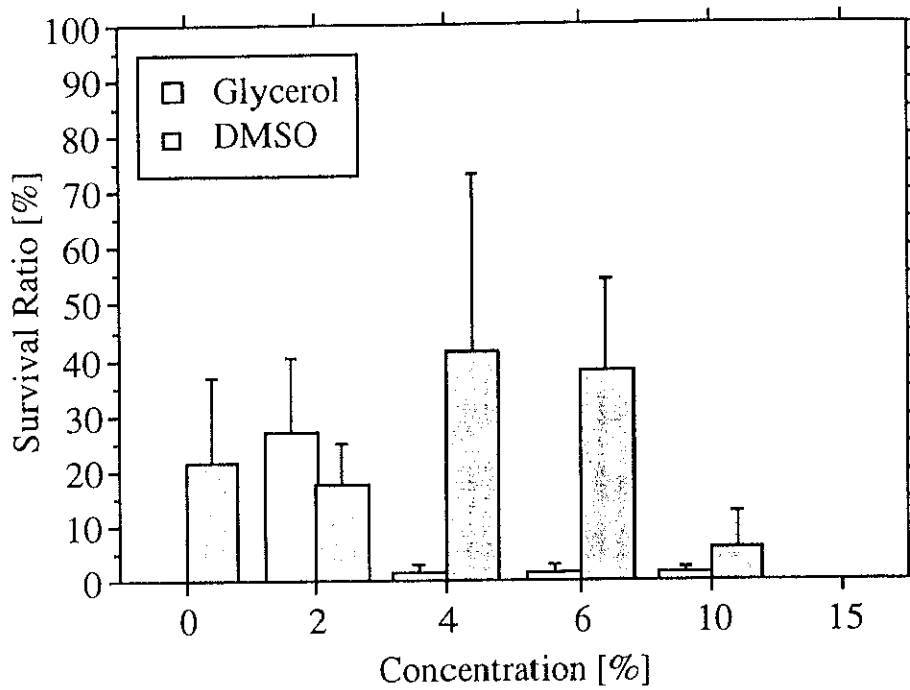


Fig.4-5. Survival ratio of frozen rotifer (frozen at $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$).

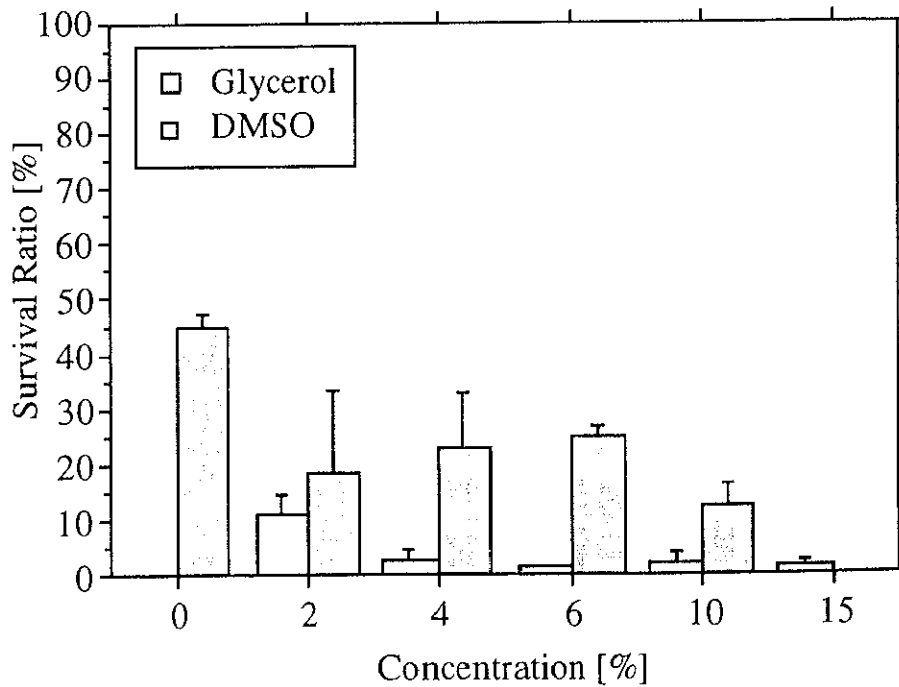


Fig.4-6. Survival ratio of frozen rotifer (frozen at $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$).

率が最も高かったのはDMSOを4%から6%で用いた場合であり、グリセロールを添加した場合にも2%添加系での生存率（10.6%）が最も高かった。

3) 急速冷却後（-20℃）の*P. erythrophthalma*の生存率

対照系、実験系共に融解後生存した個体はみられなかった。

4) 急速冷却後（-80℃）の*P. erythrophthalma*生存率

-80℃超低温槽内における冷却および解凍後の生存率をFig.4-7に示す。DMSO、グリセロール両保護物質を添加した全ての系において50%以上の生存率が得られた。また、両保護物質添加系において、それぞれ6%の添加濃度において最も生存率が高く、DMSO添加系では70.4%、グリセロール添加系では94.6%の生存率が得られた。また、本条件において最も高い生存率が得られたため、そのまま-80℃超低温槽内に保存し、1年3ヶ月後に再び35℃において解凍を行ない生存率を測定した（Fig.4-8）。その結果、凍結保護物質として、DMSOを用いた系では凍結直後と比較し、生存率の著しい低下が認められた。さらに保護物質濃度が高くなるにつれて、低下率は大きく、DMSO2%添加系で28.6%、10%添加系では1.2%のみが生存した。これに対し、グリセロール添加系ではDMSO添加系同様に生存率は低下したものの、その低下率はDMSO添加系と比較し小さく、グリセロール6%添加系では1年後でも依然として71%の再生率であった。また、1年間超低温下においたことと、凍結-融解による遺伝的ダメージ等による増殖不能や、懸濁物質のろ過能力の欠損等の可能性が考えられたため、1年3ヶ月間凍結保存した*P. erythrophthalma*とLE培地を用いて継代培養を行なっている*P. erythrophthalma*との増殖能の比較を行なった（Fig.4-9）。その結果、継代培養系と比較し、凍結保存したものの増殖能に大きな差はみられなかったが、凍結保存していた系では最大個体数密度が高かった。これは、*P. erythrophthalma*の継代培養液に共存している細菌叢が凍結により変化したものと考えられる。

以上のことから次のことが示唆される。凍結保護物質は輪虫を凍結保存する際に必須となるが、凍結保護剤として用いる試薬の種類と濃度が生存率に対し大きく影響する。本実験からゆっくり凍結を行なう場合にはDMSOが適切であり、その最適な濃度は4-6%

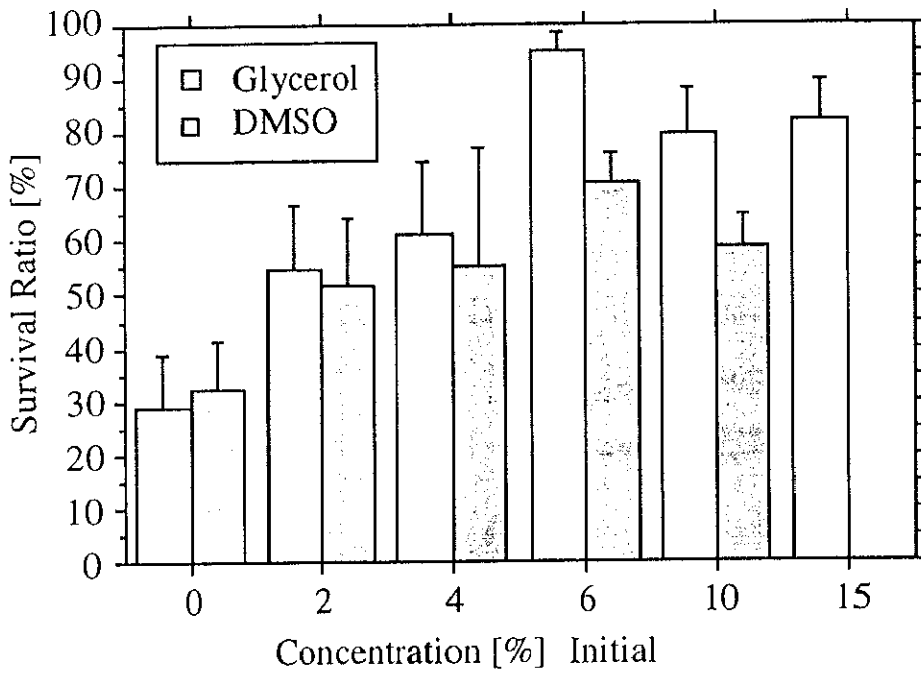


Fig.4-7. Survival ratio of frozen rotifer (frozen at -80°C).
 (The sample was defrosted after 12h from freezing.)

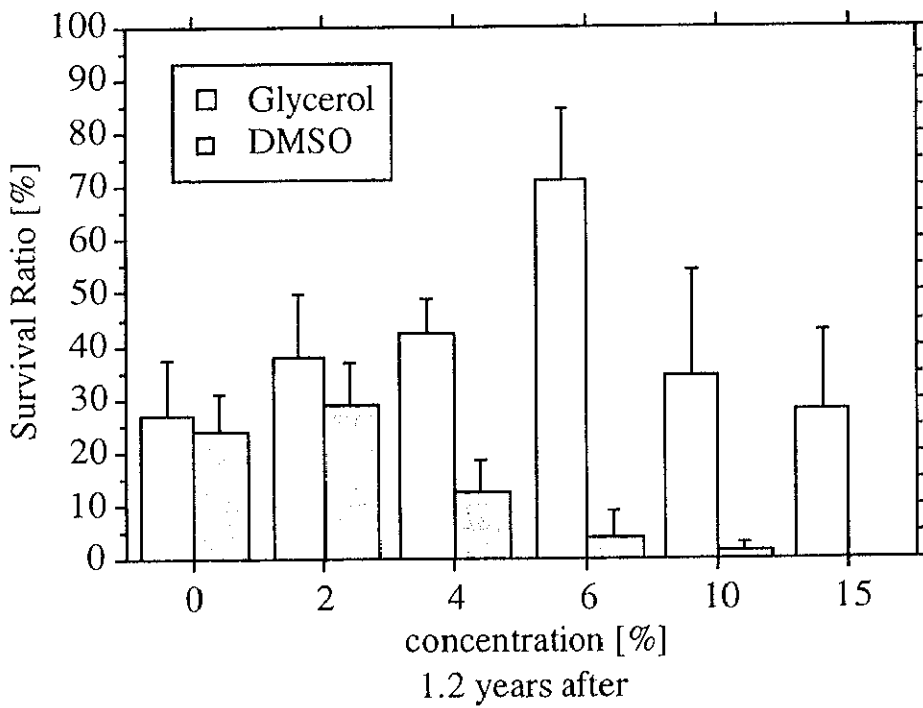


Fig.4-8. Survival ratio of frozen rotifer (frozen at -80°C).
 (The sample was defrosted after 1.2years from freezing.)

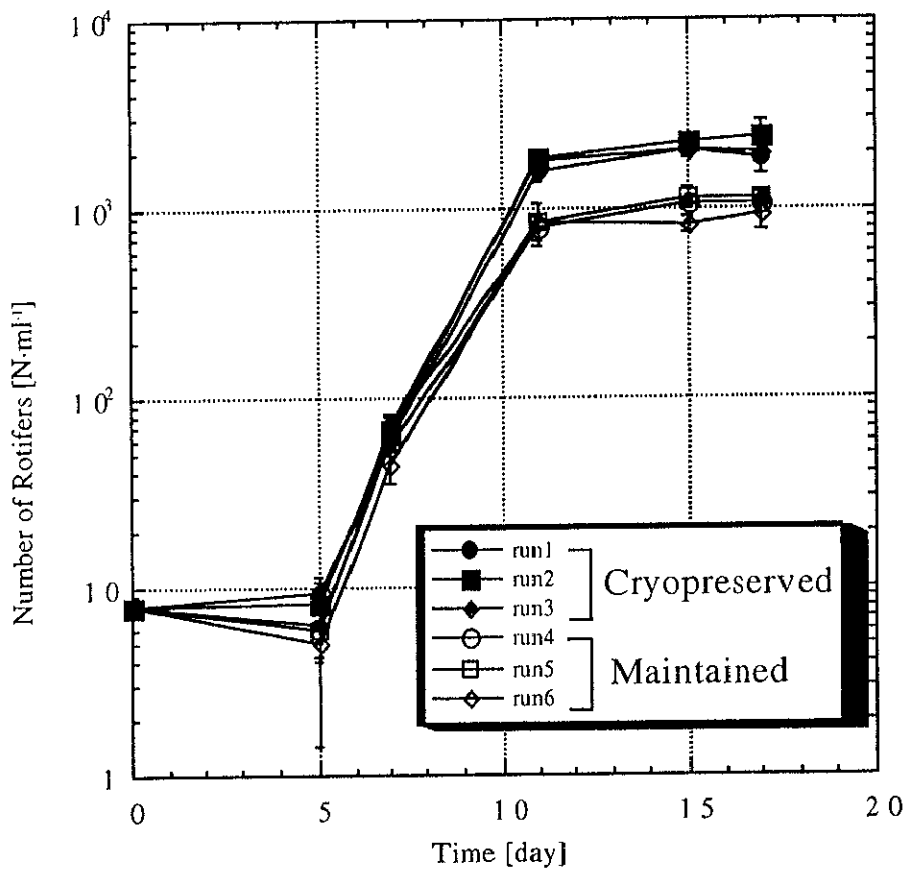


Fig.4-9. Comparison of growth curve between maintained and cryopreserved rotifer.

であることがわかった。これに対して、急速冷却を行なう場合、グリセロールを6%の濃度で用いるのが適切であると考えられた。この凍結保護剤の種類と濃度がそれぞれの条件によって異なるのは、保護剤により結晶形が異なるためと考えられた。細胞内外の結晶構造は凍結時の速度に大きく依存するものと考えられる。しかしながら、実用面では急速冷却の方が緩速冷却法と比較し、生存率が高かったことから、種の保存に用いるためには適切であると考えられる。また、 -20°C の保存において、輪虫類が全く生存できなかったという結果から次のことが考えられた。すなわち、急速冷却法と比較し緩速冷却で生存率が低かったのは、長時間凍結する際に細胞へのダメージを与えやすい -20°C に長時間曝露されたためである。凍結保存する際に -20°C 付近の温度では溶液が融解と再結晶化を繰り返すことによって結晶構造が非常に不安定であるためと考えられる（根井外,1977）。輪虫が -20°C の急速冷却において生存率が低いのは、この温度域において融解-再結晶化において輪虫の細胞が破壊されたためと考えられた。また、緩速冷却において -80°C の急速冷却と比較し、生存率が低いのも同様に -20°C 付近の温度に長期間曝露されるためと考えられる。

4-3-4 微生物製剤化のための乾燥法および凍結法の両者の相違と有用性

本研究の最終目的は長期保存をした微生物を汚水処理槽等に添加することにより処理性能の向上を図ることであるが、そのためには輪虫類を大量に保存することが必要不可欠である。両保存法を比較すると、生存率のみを考えた場合には明らかに凍結法の方が高いが、大量保存を考えた場合、凍結法では操作が複雑であり、大容量の培養液全体を均一な速度で凍結することはほぼ不可能であると考えられることから、現場へ適用するための手法としては乾燥法を用いることが適切であると考えられる。しかしながら、輪虫類の大量培養を継続的に行なうことを考えた場合、コンタミネーション等の不測の事故や突発的な死亡による継代種の死滅の可能性もさげられないことから、凍結法と乾燥法両方法の保存法の使い分けが必要であると考えられた。

4-4 まとめ

本章では、*P. erythrophthalma*を長期的に保存するための方法として、乾燥法と凍結法について検討を行なったが、得られた結果は以下のようにまとめられる。

1) 乾燥法の保持担体として、米糠、小麦のふすま、米のもみ殻を用いて乾燥を行なった。その結果、ふすま、もみ殻を用いたときに約50%のふ化再生率が得られたが、7日後ではもみ殻の系のみ50%のふ化再生率が得られることがわかった。

2) もみ殻を粉砕して担体の大きさによりふ化再生率の変化を測定したところ、粒径の違いによるふ化再生率の差は大きくなかったことから、ふ化再生率に關与するのは粒径ではなく、その物理的構造にあることが明らかとなった。

3) 凍結法による、輪虫類の保存を行ない、凍結保護物質としてDMSO、グリセロールを用いて、凍結保存を行なったところ、グリセロールを6%濃度で添加し、-80℃で凍結を行なった場合に最も生存率が高く95%が得られること、また、-80℃のまま、1年3ヶ月保存し、再び生存率を測定したところ、71%と高い生存率の得られることがわかった。

4) 凍結による細胞の損傷をみるために、継代培養、および凍結後の*P. erythrophthalma*をLE培地で培養したところ両系とも同様の増殖曲線を描いたことから、凍結による輪虫細胞の損傷はないものと考えられた。