

## タマミジンコによる焼酎廃液細菌の捕食量

山下博史, ジェフリー F. モコレンサン, 山崎繁久, 尾上義夫

### Predation of Bacteria by *Moina macrocopa* Straus in *Shochu* Distillery Wastewater

Hirofumi Yamashita, Jeffrie F. Mokolensang, Shigehisa Yamasaki, and Yoshio Onoue

**Keywords :** *Shochu* distillery wastewater, *Moina macrocopa*, *Acinetobacter-Moraxella*, *Flavobacterium*

#### Abstract

Bacterial predation by a zooplankton *Moina macrocopa* Straus was investigated on 3 strains of bacteria, a white strain of *Acinetobacter-Moraxella* group I and yellow and pink strains of *Flavobacterium* group I, which were separated from *shochu* distillery wastewater (SDW). This plankton (1 individual mL<sup>-1</sup>) was inoculated into a SDW medium of each strain at stationary phase, and the number of bacteria was counted every 3 hours for 30 hours. The total organic carbon contents (TOC, ppm) in culture media were changed from 0 to 250 ppm at a fixed temperature of 30°C to observe the bacterial consumption by *M. macrocopa*.

The bacterial consumption by *M. macrocopa* was highest in the white strain of *Acinetobacter-Moraxella* group I (11.1 × 10<sup>5</sup> cells mL<sup>-1</sup>; TOC 100 ppm) followed by the yellow strain (5.1 × 10<sup>5</sup> cells mL<sup>-1</sup>; TOC 150 ppm) and pink strain (3.5 × 10<sup>5</sup> cells mL<sup>-1</sup>; TOC 200 ppm) of *Flavobacterium* group I.

サツマイモ焼酎の副産物である焼酎蒸留廃液（以下、焼酎廃液と略記）は蒸留過程で含有ビタミンが破壊されるなどの問題があるにしても、各種栄養素を豊富に含み、細菌培地として有望視されている。

これまで、焼酎廃液を家畜飼料や農耕肥料などに利用する試みがなされた<sup>1)</sup>。また、ナノクロロプシス *Nannochloropsis* sp. やアナアオサ *Ulva pertusa* Kjellman など水産生物への利用も試みられている<sup>2)</sup>。

一方、タマミジンコ *Moina macrocopa* Straus は魚類の初期餌料としてナノクロロプシスなどを用いて大量培養される<sup>3)</sup>。また、タマミジンコの培養には、光合成細菌と酵母を併用した培地も用いられる<sup>4)</sup>。

前報<sup>5)</sup>では焼酎廃液中に優占的に増殖する3菌株、非色素形成株 *Acinetobacter-Moraxella* group I（白色株と

略記）、*Flavobacterium* group I の黄色株および同属のピンク株を分離し、それぞれの増殖特性を調べた。

本研究においては、各菌株を焼酎廃液中で培養し、タマミジンコを接種して、経時的に細菌捕食量を調べた。

#### 材料および方法

##### 材料

試料には鹿児島県大口市のサツマイモ焼酎工場から入手した焼酎廃液を使用した。細菌の捕食実験には鹿児島県水産試験場指宿内水面分場のコイ飼育池から採取したタマミジンコ *Moina macrocopa* Straus を実験室内で30℃でドライイーストを餌料として継代培養したものを用いた。

### 細菌の前培養

既報の方法<sup>5)</sup>に準じて分離した、*Acinetobacter-Moraxella* group I (白色株) と *Flavobacterium* group I の黄色株およびピンク株の前培養を行った。まず、通気水道水を濾過装置 (ポアサイズ  $0.45\mu\text{m}$ ) を用い減圧濾過した。この濾過通気水道水に焼酎廃液を全有機炭素濃度 150ppm、液量が 100mL になるように調整後、125 mL の三角フラスコに入れ  $30^\circ\text{C}$  で 12 時間培養を行った。

### タマミジンコによる焼酎廃液細菌の消費量

上記と同様に調製した液体培地を試験管に 15mL ずつ分注し、オートクレーブ ( $121^\circ\text{C}$ , 15 分間) にかけた。冷却後、各試験管に前培養した細菌をキャピラリーで 1 滴加え、 $30^\circ\text{C}$  で 12 時間培養を行った。次に、各試験管にタマミジンコ (1 個体  $\text{mL}^{-1}$ ) を接種し、さらに 30 時間培養した。また、細菌消費量の経時変化を見るために分光光度計 (Hitachi U-1500) を用いて、波長 660nm における吸光度を 42 時間目まで 3 時間毎に測定した。

一方、上記 3 菌株の 2 菌混合株 (白色・ピンク, 白色・黄色, 黄色・ピンク) を用いて、タマミジンコ接種時 [定常期] の増殖量が近い 100ppm 添加区について細菌捕食量を測定し、Kruskal-Willis 検定を行った。

### 細菌消費量の算定

タマミジンコによる焼酎廃液細菌の捕食量は上述の分光光度計による吸光度から算定した。なお、吸光度 0.010 の増加に対して、生菌数が  $3 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$  の割合で増加した。

## 実験結果

### タマミジンコによる焼酎廃液細菌の捕食量

*Acinetobacter-Moraxella* group I を含む液体培地中でタマミジンコを飼育したところ、捕食率は培地に添加した全有機炭素量によって変化した (Fig. 1)。タマミジンコ

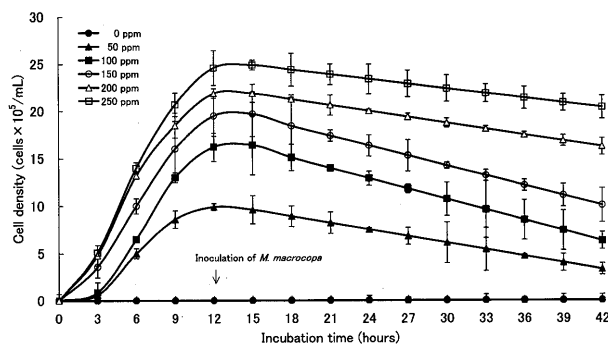


Fig. 1 Predation of *Acinetobacter-Moraxella* group I by *M. macrocopa* in shochu distillery wastewater.

コ接種時から終了時までの細胞数の減少から細菌捕食率を算定した。細菌の捕食は 3 時間目から始まり、捕食率は有機炭素濃度 50ppm で 60% ( $6.5 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ ), 100ppm で 68% ( $11.1 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ ) に達した。100ppm 以上になると捕食率は急激に減少に向かい、250ppm では 19% ( $4.8 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ ) まで低下した。

*Flavobacterium* group I の黄色株においては、有機炭素添加量によって捕食率に変化が見られ、タマミジンコ接種後 6 時間を経て消費が活発になった (Fig. 2)。捕食率は有機炭素濃度 50ppm で 27% ( $1.3 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ ), 100ppm で 30% ( $2.1 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ ) と漸次増加し、150ppm でピーク (44%;  $4.8 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ ) に達した。全有機炭素濃度を 200ppm に増加すると、細菌捕食率は 29% ( $3.9 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ ) まで急激に低下した。

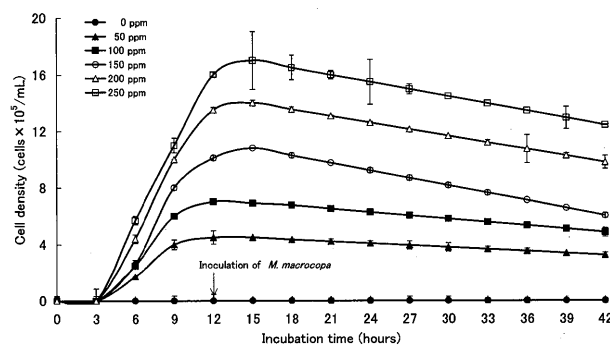


Fig. 2 Predation of *Flavobacterium* group I (yellow strain) by *M. macrocopa* in shochu distillery wastewater.

*Flavobacterium* group I のピンク株では、他の 2 株に比べて、タマミジンコによる捕食率は低く、有機炭素濃度 50ppm で 19% ( $6.0 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ ) にすぎなかった (Fig. 3)。しかし、細菌捕食率は 100ppm から徐々に増加し、200ppm でピーク (31%;  $3.5 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ ) に達した。

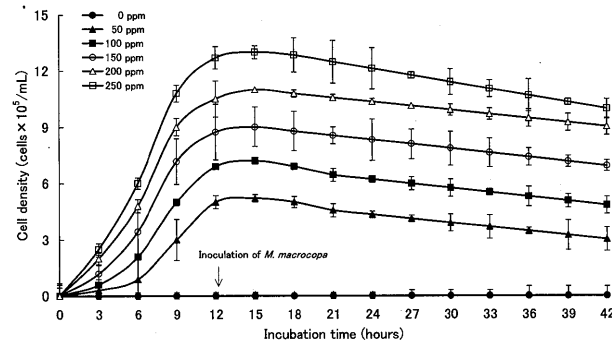


Fig. 3 Predation of *Flavobacterium* group I (pink strain) by *M. macrocopa* in shochu distillery wastewater.

一方, タマミジンコによる上記3菌株の2菌混合株の捕食量を測定し, Kruskal-Wallis 検定を行ったところ, 有意の差が認められ, 細菌捕食量は白色・ピンク混合株, 白色・黄色混合株, 黄色・ピンク混合株の順で低下した。

## 考 察

タマミジンコによる細菌の捕食実験において, 捕食活動(接種後, 3時間までの摂餌)の低下は洗浄(培養液で2回)によるストレスに起因すると思われる。

タマミジンコによる捕食率が最も高い株は, 白色株で, 次いで黄色株, ピンク株の順になった。白色株については有機炭素 100ppm 添加区で捕食率が最も高くなった。しかし, 150ppm 添加区以上になると捕食率が急激に低下したが, これは培地中の細菌が過剰に増殖し, 培養環境を悪化させたことによるものと思われる。

また, 定常期(実験開始から12時間目)の細菌数が近似している3濃度区(白色株 50ppm, 黄色株 150ppm, ピンク株 200ppm)を Kruskal-Wallis 検定 ( $P < 0.05$ )<sup>6)</sup>を用いて比較すると細菌捕食量には有意差が認められ, 白色株, 黄色株, ピンク株の順で増加した。これは, 白色株が容易に細菌集塊を形成し<sup>7)</sup>, タマミジンコによる効率的な摂餌を可能にしたためと考えられる。

また, 白色株, 黄色株, ピンク株が混在する3菌混合株について見ると, タマミジンコによる捕食率は接種3時間経過後から漸次減少し, 細菌捕食率は有機炭素量が 150ppm で最大 ( $35\%$ ;  $8.1 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup>) となった (Fig. 4)。しかし, 有機炭素添加量が 200ppm 以上になると細菌捕食率が低下したが, これは前述の如く, 培地中の濃密な細菌の増殖に伴う環境悪化によってもたらされたものと考えられる。

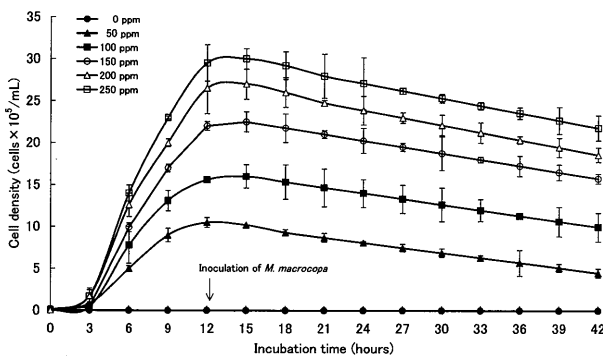


Fig. 4 Predation of bacteria by *M. macrocopa* in shochu distillery wastewater.

一方, 上記3菌株の2菌混合株についてタマミジンコによる細菌捕食量を比較したところ, 白色株を含む混合株において捕食量が高くなった。これは, 2菌混合条件下では白色株が優勢になるため, タマミジンコによる捕食量の増加を促した結果によると思われる。

## 謝 辞

焼酎蒸留廃液の入手にあたって, 鹿児島県酒造組合連合会の浜崎幸夫氏ならびに山元酒造株式会社の吉満功夫氏および大口酒造協同組合の上田和樹氏にご協力をいただいた。ここに厚くお礼申し上げる。

本研究は, 鹿児島大学学長裁量経費の援助を受けて行った。

## 参考文献

- 1) 鹿児島県本格焼酎技術研究会 (2000): 鹿児島県の本格焼酎. 春苑堂出版, 鹿児島, pp. 142-147.
- 2) 大森信, 池田勉 (1976): 動物プランクトンの摂餌, 動物プランクトン生態研究法. 共立出版, 東京, pp. 122-144
- 3) 平田郁夫 (1978): 動物プランクトンのフィードバック培養におけるバクテリア相の変化. 鹿児島大学大学院水産学研究科修士論文, pp. 1-15.
- 4) 木村剛 (1998): 細菌を介した焼酎蒸留廃液のタマミジンコ生産能. 鹿児島大学大学院水産学研究科修士論文, pp. 18-24.
- 5) 山下博史, 山崎繁久, 尾上義夫 (2002): 焼酎蒸留廃液に増殖する細菌の特性. 鹿児島大学水産学部紀要, 51, 35-40
- 6) 市原清志 (1990): バイオサイエンスの統計学—正しく活用するための実践理論. 南江堂, 東京, pp. 90-159.
- 7) 小島真男, 須藤隆一, 千原光雄 (1995): 環境微生物図鑑. 講談社, 東京, pp. 40-67.