

紅色非硫黄細菌 *Rhodobacter sphaeroides* を用いた排水処理・有価物生産における二酸化炭素の発生および摂取量の定量

中島典之¹・山本和夫²

¹正会員 工博 東京大学助手 大学院工学系研究科都市工学専攻 (〒113 東京都文京区本郷7-3-1)

²正会員 工博 東京大学教授 環境安全研究センター (同上)

嫌気・光照射下で運転する紅色非硫黄細菌を用いた排水処理・有価物生産システムは、その光合成従属栄養的増殖により、より多くの有価物(菌体)を生産すると同時に温暖化ガスの排出を抑制するシステムになると考えられる。本論文においては、紅色非硫黄細菌 *Rhodobacter sphaeroides* の脂肪酸基質での無機化率を定量し、酪酸より炭素鎖の長い基質では二酸化炭素の発生がなく逆に摂取することを示した。また、菌体内 PHB (poly-3-hydroxybutyrate) が他の菌体内成分に変換される際の二酸化炭素の発生、摂取がほとんどないことを明らかにした。さらに、菌体転換率と比増殖速度から、菌体生産、排水処理に適した廃水原水の前処理について検討した。

Key Words : purple bacteria, photosynthetic bacteria, wastewater treatment, biomass production, green-house gas, poly-3-hydroxybutyrate, *Rhodobacter sphaeroides*

1. はじめに

生物学的排水処理法において、廃水中の有機物は最終的に汚泥(生物体)およびCO₂やCH₄といった温暖化ガスに変換される(図-1)。余剰汚泥の生成は生物学的排水処理法における大きな問題の一つであり、余剰汚泥を少なくするために数多くの研究がなされてきているが、それらは最終的にできるだけ多くのCO₂またはCH₄へと変換する試みであると言える。廃棄汚泥量を減らす別の方策として汚泥の有効利用、有用物への変換が考えられる。これは、資源の有効利用とともに廃水中有機物の温暖化ガスへの変換の抑制を意味する。地球温暖化が問題とされる現在では、このような廃水中有機物の有用物への変換という方策が重要性を増してくるのではないだろうか。

光合成細菌の一つの科である紅色非硫黄細菌は、嫌気条件下で光エネルギーを利用して光合成従属栄養的増殖を行う。菌体は、飼肥料として¹⁾、また生分解性プラスチックとして近年注目されている PHA (polyhydroxyalkanoate) の抽出源として²⁾ 利用可能で

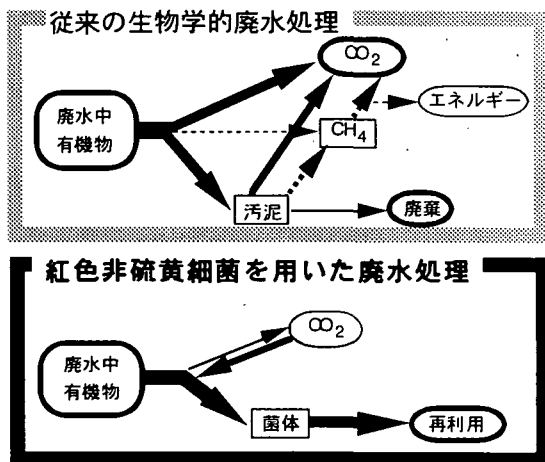


図-1 従来(の)生物学的排水処理と紅色非硫黄細菌を用いた排水処理における炭素の流れ

ある。著者らは、紅色非硫黄細菌を用いた排水処理・有価物生産プロセスの運転条件として、嫌気・光照射を想定している。これは、より多くの有価物(菌体)を回収し、同時に温暖化ガスの排出を抑制するということを意味する。

この細菌を用いた廃水処理法は1960年代から研究されているが、実際に適用する場合には好気条件で処理を行っている事例⁹⁾が多い。そのため、光照射を行っていても、光合成従属栄養的増殖ではなく化学合成従属栄養的増殖をしていると考えられる。化学合成従属栄養的増殖においてはエネルギー獲得のために有機物の酸化を行い二酸化炭素を生成するが、光合成従属栄養的増殖においてはエネルギー源として光を用いた有機物は菌体合成の原料と電子供与体として使われるため、二酸化炭素の発生は菌体と炭素源との酸化還元レベルの相違に基づくと考えられる。つまり、菌体より酸化された状態にある炭素源を使う場合には、炭素源は一方で還元され、もう一方で電子供与体として消費されてより酸化された物質を生じる。この結果、菌体合成と共に二酸化炭素が発生する。逆に菌体より還元された状態にある炭素源を使う場合には、還元力を処理する物質が必要になると考えられる。今までの著者らの研究から酪酸より長いと二酸化炭素の摂取により見かけ上の収率（生成菌体量/除去溶存有機物量；炭素ベース）が1を超えることが分かっている^{9),10)}。しかし、このような無機炭素源の取込に関して定量的に検討した報告は少ない。

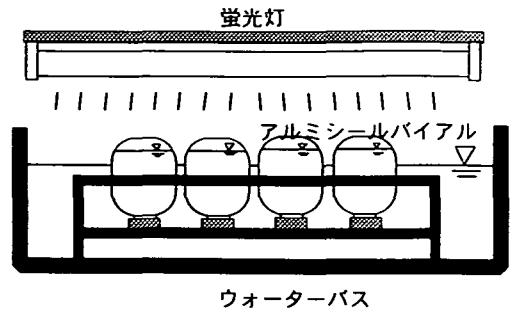
ここでは、酸化還元レベルの異なる8種類の基質（炭素数2～9の直鎖飽和脂肪酸）を用い、紅色非硫黄細菌 *Rhodobacter sphaeroides* IFO 12203 による無機化率（二酸化炭素増加量/基質減少量；炭素ベース）を定量的に示した。また、目的とする有価物を蛋白とする場合とPHA（ここではPHB, poly-3-hydroxybutyrate）抽出源とする場合との両方を考えて、菌体内組成の変化と無機化との関係も議論した。さらに、炭素数2～9の直鎖飽和脂肪酸を用いたときの菌体転換率（菌体増加量/基質減少量；炭素ベース）と比増殖速度から、廃水処理や菌体生産に適した廃水中有機物組成を示し、廃水原水の前処理について検討した。

2. 実験方法

本研究に用いた細菌は紅色非硫黄細菌 *Rhodobacter sphaeroides* IFO 12203 である。

前培養は、30mlの試験管を培養容器とし、6000lx, 25～30℃で行った。培地は光合成細菌用基本培地⁶⁾を用い、炭素源として1.13g/lの酢酸ナトリウム（3水和物）を投与した。植種前に121℃、15分間のオートクレーブ滅菌をした。この培地を用いて継代培養をし植種後1週間程度のもを本実験の植種用菌体懸

菌体転換率、無機化率測定実験



最大比増殖速度測定実験

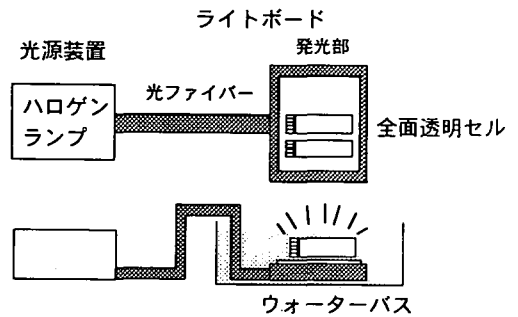
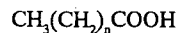


図-2 実験装置

濁液とした。

・本実験においては炭素源として炭素数2～9の直鎖飽和脂肪酸を用いた。本論文ではこれらを全て慣用名で記した。



n=0；炭素数2；酢酸

n=1；炭素数3；プロピオン酸（プロパン酸）

n=2；炭素数4；酪酸（ブタン酸）

n=3；炭素数5；吉草酸（ペンタン酸）

n=4；炭素数6；カプロン酸（ヘキサン酸）

n=5；炭素数7；エナント酸（ヘプタン酸）

n=6；炭素数8；カプリル酸（オクタン酸）

n=7；炭素数9；ペラルゴン酸（ノナン酸）

(1) 無機化率、菌体転換率測定実験

アルミシールバイアル（ガラス製、プチルゴムセプタム付き、容量約70ml）を培養容器とした。光合成細菌用基本培地⁶⁾からバクト・イーストエキス（Difco）を除いたものを培地として用い、炭素源として炭素数2～9の直鎖飽和脂肪酸のナトリウム塩を200mgC/lの濃度になるように投与した。培地およびアルミシールバイアル内を窒素ガスで曝気したのち

50ml ずつアルミシールバイアルに分注し、121℃、15分間のオートクレーブ滅菌をした。室温まで冷却後、0.5ml の前培養菌体懸濁液を接種した。実験は、蛍光灯（照度 2500~3000lx）照射下で、ウォーターバスで温度を 25℃ に制御して行った（図-2）。各炭素源につき 5 本以上のバイアルを用意し、増殖にともなって 1 本ずつ開封し培養液を分析した。分析項目は気相中の CO_2 と CH_4 （ただし実験中に CH_4 は検出されなかった）、培養液の TOC、IC、投与炭素源の濃度である。TOC に関しては、培養液を超音波でホモジナイズしたものと 0.45 μm セルロースアセテート膜で濾過したものに対してそれぞれ分析し、その差を菌体の濃度とした。

菌体内成分に関して、上記の収率を求める実験と同様の方法で、酢酸ナトリウム（3水和物）を炭素源としたときについて分析を行った。蛋白と糖に関しては、超音波でホモジナイズしたものと 0.45 μm セルロースアセテート膜で濾過したものに対してそれぞれ分析し、その差から菌体中の濃度を計算した。PHB に関しては遠心分離によって回収した菌体について分析を行った。

分析方法は以下の通りである。

CO_2 、 CH_4 は GC-TCD（活性炭カラム）で分析した。

TOC、IC は TOC-500（島津製作所）で分析した。

投与炭素源である低級脂肪酸（酢酸～エノ酸）の濃度は HPLC（カラム：島津 SCR-101H, 検出器：UV）で分析した。

蛋白はローリー法で分析した。標準物質として牛血清アルブミン（BSA）を用い、その炭素量を測定し（0.469mgC/mgBSA）、サンプル中の蛋白量を炭素濃度で表した。

糖はアントロン法で分析した。標準物質としてグルコースを用い、理論的な炭素量（0.4mgC/mgグルコース）から、サンプル中の糖量を炭素濃度で表した。

PHB は、佐藤ら⁷⁾の方法に従い、凍結乾燥菌体をメタノール分解・クロロホルム抽出し、GC-FID で定量した。

(2) 最大比増殖速度測定実験

蛍光光度計用の全面透明セル（パイレックスガラス製、スクリューキャップ付き、容量約 5ml）を培養容器とした。培養容器ごと吸光度を測定することができるため、開封・サンプリングすることなく増殖の経時変化が測定できた。光合成細菌用基本培地からイースト・エキストラを除いたものを培地として用い、炭素源として炭素数 2~9 の直鎖飽和脂肪酸のナトリウム塩を 200mgC/l の濃度になるように投与し

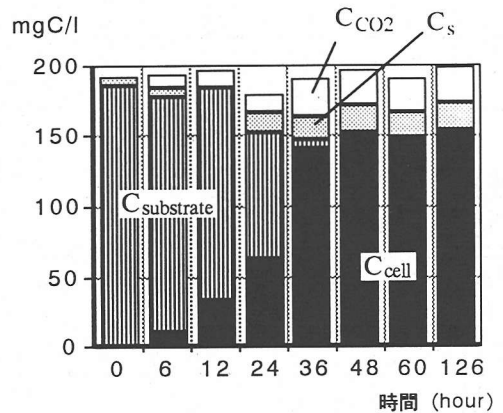


図-3 増殖過程での炭素収支 (Run2-2; 基質 酢酸)

た。培地を窒素ガスで曝気したのち 4 ml ずつ全面透明セルに分注し、121℃、15分間のオートクレーブ滅菌をした。室温まで冷却後、0.1ml の前培養菌体懸濁液を接種した。実験は、ハロゲンランプを光源として接続したライトボード（三菱レーヨン社製）に全面透明セルをのせて行った（図-2）。照度は 6000lx、温度は 30℃ とした。数時間ごとに吸光度を測定しその変化から最大比増殖速度を求めた。吸光度は波長 770nm の値を用いたが、これは、菌体中の色素成分による吸収ピークに重ならず、かつ十分吸光の低い波長であるため、菌体の成育状況（色素の含有率など）の影響を受けにくく、さらに比較的高い濃度まで測定できると考えられたからである。

3. 結果と考察

(1) 無機化率、菌体転換率測定実験

図-3 に無機化率、菌体転換率測定実験の一例として酢酸 (Run2-2) を基質にした際の炭素バランスを示した。サンプル中の炭素を次の 4 つの分画で表した。

- $C_{\text{substrate}}$: 投与炭素源の濃度 (mgC/l) (HPLC で定量した有機酸濃度の炭素濃度換算値)
- C_{cell} : 菌体濃度 (mgC/l) (ホモジナイズしたサンプルと濾過したサンプルの TOC の差)
- C_{CO_2} : 無機態炭素濃度 (mgC/l) (バイアル瓶気相中の CO_2 が培養液中にすべて溶解したときの濃度 + 濾過したサンプルの実測 IC)
- C_s : 投与炭素源以外の溶存有機物濃度 (mgC/l) (濾過したサンプルの TOC - $C_{\text{substrate}}$)

ただし、Run 8, 9 (カプリル酸、ペラルゴン酸) については、投与炭素源の濃度を定量していないため、

- C_s (Run 8, 9): 投与炭素源も含めた溶存有機

表-1 投与炭素源の種類と菌体転換率、無機化率

	炭素源	初期IC* (mgC/l)	$\Delta C_{\text{substrate}}$ (mgC/l)	ΔC_{cell} (mgC/l)	ΔC_{CO_2} (mgC/l)	ΔC_s (mgC/l)	菌体転換率 R_c ***	無機化率 R_m ***	$\Delta C_s / (-\Delta C_{\text{substrate}})$	回収率****
Run2-1	酢酸	0.0	-181	139	19	18	0.77	0.10	0.10	0.97
Run2-2		0.3	-160	130	18	10	0.81	0.11	0.06	0.98
Run2-3		2.0	-177	137	22	24	0.77	0.12	0.13	1.03
Run2-4		93.4	-81	67	3	21	0.83	0.03	0.25	1.12
Run2-5		106.4	-159	141	11	23	0.89	0.07	0.14	1.10
Run3-1	プロピオン酸	0.1	-111	104	-0	6	0.94	-0.00	0.05	0.99
Run3-2		28.7	-214	196	1	16	0.92	0.01	0.08	1.00
Run3-3		95.5	-198	166	13	22	0.84	0.06	0.11	1.01
Run3-4		98.5	-178	172	-16	29	0.97	-0.09	0.16	1.04
Run4-1	酪酸	38.2	-171	193	-14	-5	1.13	-0.08	-0.03	1.01
Run4-2		93.9	-179	186	-24	26	1.04	-0.13	0.15	1.05
Run4-3		97.2	-194	172	-0	22	0.89	-0.00	0.11	1.00
Run5-1	吉草酸	92.5	-133	125	-27	41	0.94	-0.20	0.30	1.04
Run5-2		219.6	-147	191	-21	-25	1.30	-0.14	-0.17	0.99
Run6-1	カブロン酸	87.8	-167	182	-27	18	1.09	-0.16	0.11	1.04
Run6-2		102.9	-195	182	-31	24	0.93	-0.16	0.12	0.90
Run7	エナント酸	95.6	-151	194	-23	-9	1.28	-0.15	-0.06	1.07
Run8	カプリル酸	72.7	ND**	173	-29	-132	1.31***	-0.22***		1.09
Run9	ベラルゴン酸	91.1	ND**	189	-22	-166	1.14***	-0.13***		1.00

* 初期 IC は各 Run の最初のサンプル中に含まれていた無機態炭素量の実測値である。

** ND : not determined

*** 菌体転換率、無機化率は以下の式によって計算した。ただし Run8、9 については投与炭素源濃度を測定していないため、菌体転換率および無機化率は $\Delta C_{\text{cell}} / (-\Delta C_s)$ 、 $\Delta C_{\text{CO}_2} / (-\Delta C_s)$ として計算した。

$$\text{菌体転換率 } R_c = \Delta C_{\text{cell}} / (-\Delta C_{\text{substrate}}), \quad \text{無機化率 } R_m = \Delta C_{\text{CO}_2} / (-\Delta C_{\text{substrate}})$$

**** 回収率 = $(\Delta C_{\text{cell}} + \Delta C_{\text{CO}_2} + \Delta C_s) / (-\Delta C_{\text{substrate}})$

物濃度 (mgC/l) (濾過したサンプルの TOC) とした。

複数のサンプル中から増殖初期と増殖停滞期の 2 サンプルをとり、上記の 4 分画について増減を計算した (表-1 中の $\Delta C_{\text{substrate}}$ 、 ΔC_{cell} 、 ΔC_{CO_2} 、 ΔC_s)。サンプルを選ぶ際には、その間の投与炭素源の消費が多いこと、回収率が 1 に近い (炭素の行方が把握できている) ことを重視した。Run2-2 (図-3) の場合には、12 時間と 48 時間のサンプルから計算をした。

さらに、 ΔC_{cell} 、 ΔC_{CO_2} 、 ΔC_s の三者を $(-\Delta C_{\text{substrate}})$ で除すことにより、各投与炭素源の各画分への変換率を計算した。

菌体転換率 R_c (mgC-cell / mgC-substrate)

$$= \Delta C_{\text{cell}} / (-\Delta C_{\text{substrate}})$$

無機化率 R_m (mgC-CO₂ / mgC-substrate)

$$= \Delta C_{\text{CO}_2} / (-\Delta C_{\text{substrate}})$$

ここで、 R_m が負値になるということは、投与炭素源をこの細菌が消費する際に同時に無機態炭素を摂取するという意味している。これらの数値を表-1 にまとめた。 R_c を図-4 に、 R_m を図-5 に示した。

投与炭素源の炭素数が多くなるに従って、 R_c は高

くなり R_m は低くなる傾向が認められた。酢酸を用いたときは $R_m = 0.09$ (mgC-CO₂ / mgC-substrate) (5 回の平均値) と正の値を取り、酢酸の同化とともに CO₂ の放出が認められた。しかし、炭素数 4 (酪酸) 以上では負の R_m が得られ、また、 R_c も 1 以上の値が得られた。カプリル酸を用いたときに -0.22 (mgC-CO₂ / mgC-substrate) と最小の R_m (最大の無機炭素摂取率) を示した。また、今回の結果からは、共存する無機態炭素源濃度 (表中の初期 IC) が R_m に与える影響は明確ではなかった。

温暖化ガス排出抑制という観点では、嫌気・光照射条件で紅色非硫黄細菌を用いるという点で大きな効果がまず考えられるが、さらに廃水原水中の有機物全体が酪酸よりも還元された状態であれば、廃水中の有機物を全く無機化しない、あるいは逆に無機態炭素を摂取するということと言える。

画分 C_s の成分に関しては不明であるが、代謝産物や死滅菌体からの溶出物などが考えられる。濾液を HPLC で分析したところ数多くのピークが検出されたことから、特定の代謝産物が生成されるというよりは、死滅菌体からの溶出物の方が主たる成分ではな

菌体転換率 R_c

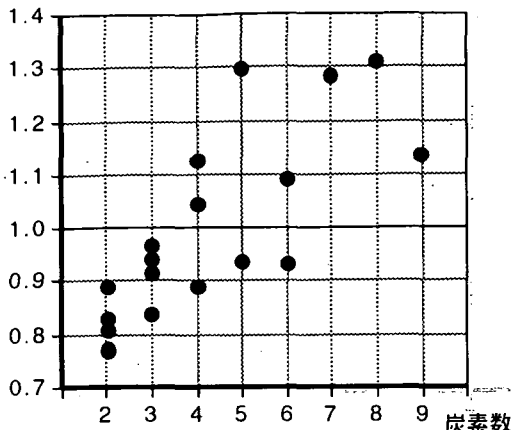


図-4 炭素源の種類と菌体転換率

いかと考えている。死滅菌体からの溶出が加水分解により起きるとすれば、画分 C_{cell} から画分 C_g への移行には画分 C_{CO_2} の増減は関与しないと予想される。図-4, 5において R_m の方がサンプルによるばらつきが小さいということが、このことの間接的な証明ではないだろうか。

(2) 無機化率 R_m に関する考察

負の R_m と 1 以上の R_c が得られたことは、投与炭素源を消費する際に同時に無機態炭素を摂取したことを示している。このことは、これらの脂肪酸が菌体よりも還元された状態にあり、基質として利用する際には、それらよりも酸化された状態の物質を必要とした、と理解できる。実際に、酪酸、吉草酸、カプロン酸を基質として用いたときには無機態炭素源の存在下でないと増殖が認められず⁹⁾、表-1には示していないがエナン酸、カプリル酸を用いたときも同様に無機態炭素源を必要とした。また、無機態炭素源がなくても酪酸とともに酢酸・プロピオン酸があるときは増殖が認められた⁹⁾。

これらの脂肪酸が β 酸化によってアセチル CoA およびプロピオン CoA になるという経路を考え、その際に生じる還元力の処理のために CO_2 を固定する(カルビン=ベンソン回路)と仮定したときの R_m を計算してみた。この仮定は、炭素数 4 (酪酸) 以上では無機態炭素源の存在下でないと増殖が認められなかった⁹⁾ という事実とも合致する。計算には酢酸、プロピオン酸のときの実験値(平均値)を用いた。計算結果を図-5中に示した(「無機化率(計算値)」)。この計算からは実験結果より多くの CO_2 を固定することになるが、これは固定された CO_2 が全て(収率=1

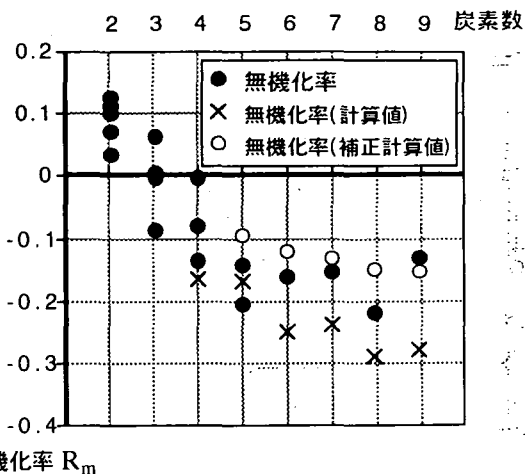


図-5 炭素源の種類と無機化率

で) 菌体になるとしたからであろう。 CO_2 固定により生じた有機物の無機化率を、酪酸のときの実験結果と計算値とのずれから計算すると、0.38 (mgC- CO_2 /mgC-生成有機物) となる。これにより補正計算した無機化率を図-5に示した(「無機化率(補正計算値)」)。これは実験結果とよく合っている。

(3) 菌体内組成の変化と CO_2

Run2-2に関しては菌体内組成として、蛋白、糖、PHBの濃度も測定した。その結果を図-6に示した。図-6aは、酢酸の消費と菌体の増殖、 CO_2 の発生を示し、図-6bは菌体中の蛋白、糖、PHBの量を培養液中の濃度として表現した。酢酸の消費とともに、蛋白を合成し、PHBを蓄積した。そして酢酸を消費し尽くした後に、PHBを分解して蛋白や糖を合成しているのが分かる。 CO_2 は酢酸から蛋白やPHBを合成する時期には発生しているが、酢酸を消費し尽くした後の CO_2 の発生は認められない。

PHBの分解によって菌体成分を合成する際に CO_2 が発生しなかったことを次のように説明できる(図-7)。PHBモノマーをアセチル CoA に分解してから利用すると考えると、PHBモノマー 1 mol (48gC/l) につきアセチル CoA 2 mol と NADH 1 mol が生ずる。前節と同様の考え方で還元力処理のために CO_2 を固定し固定後の無機化率が 0.38 であると仮定すれば、生じた還元力の処理のために 3.7gC/l の CO_2 が固定されることになる。一方、酢酸の無機化率は実験結果から 0.09 であるから、アセチル CoA からの菌体合成で CO_2 は 4.3gC/l 発生する。合計すると、PHBモノマー 1 mol (48gC/l) の利用で CO_2 が 0.6gC/l 発生することになり、無機化率は 0.01 と計算できる。この程度の CO_2 発生

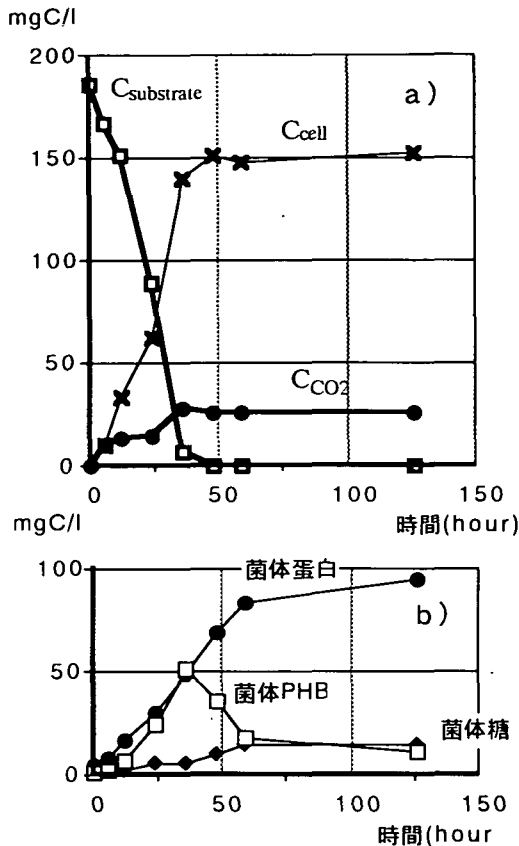


図-6 酢酸を基質とした際 (Run2-2) の
a) 炭素源の菌体及び無機態炭素への変換
b) 菌体内組成の変化

を議論できるほどに分析精度が高くなく、見かけ上、 CO_2 が発生しなかったと説明できよう。

このように PHB から菌体成分を合成する際の CO_2 発生が無視できる程度であったということは、菌体全体の平均的な酸化還元レベルが PHB の酸化還元レベルと近いということであろう。このことから、 CO_2 の発生・摂取は PHB の菌体内含有率の変動には影響されないとと言える。

菌体内蓄積物質として PHB (モノマーの組成は $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$) 以外にグリコーゲン (モノマーの組成は $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$) が考えられる。モノマーの組成から考えるとグリコーゲンは PHB よりも酸化された状態にある。よってグリコーゲンを多く蓄積するときは CO_2 の摂取量が多く (発生量が少なく) となると予想される。酢酸を基質とした Run2-2 では、菌体中の糖と蛋白の比が一定であることから、この糖はグリコーゲンではなく菌体を構成する必須の要素だと考えられる。しかし、グルコースなどを基質とした際にはグリコーゲンが蓄

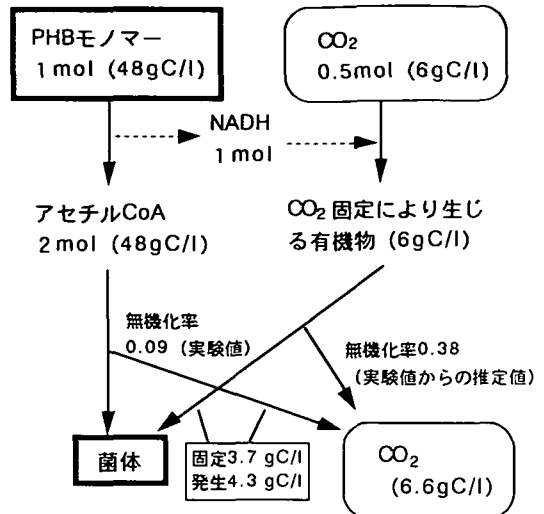


図-7 PHB から菌体合成をする際の CO_2 の発生

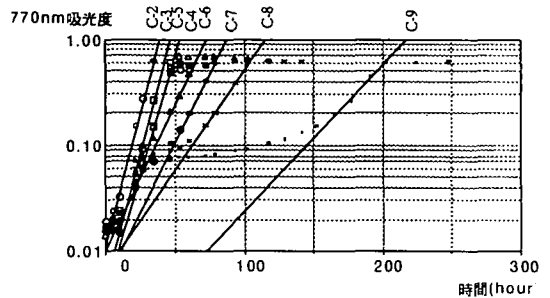


図-8 増殖の経時変化

積される可能性があり、その場合には菌体内組成の変化による CO_2 の発生・摂取量の変化が無視できなくなるかもしれない。

(4) 最大比増殖速度測定実験

各炭素源を用いたときの増殖の経時変化を図-8 に示した。図-8 中の直線は対数増殖期の吸光度変化を表しており、この傾きをそれぞれの脂肪酸に対する最大比増殖速度と見なした。この最大比増殖速度を図-9 にまとめた。酢酸を基質とした際に 0.117 (1/hour) と最大になった。炭素鎖が長くなると比増殖速度が小さくなる傾向が認められるが、炭素数 2~4 (酢酸~吉草酸) ではその差は顕著ではなかった。

図-8 において炭素数 6 以上の脂肪酸の際に、吸光度が 0.08 に達するくらいまでとそれ以降とで二段階の増殖が見られる。これは培養容器中に微量に含まれる酸素によりまず好気的な増殖をし、酸素がなくなった後に光合成従属栄養的な増殖をしたためと考えられ

最大比増殖速度
(1/hour)

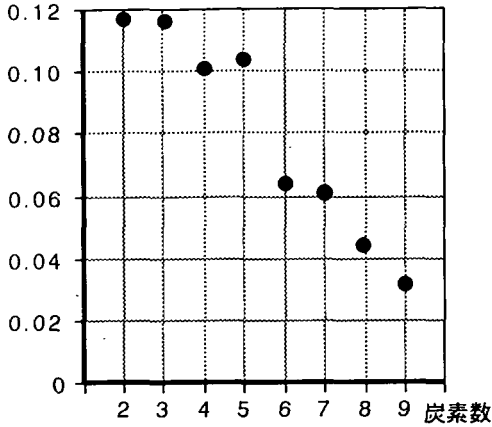


図-9 炭素源の種類と最大比増殖速度

最大比基質消費速度
(mgC-substrate / mgC-cell/hour)

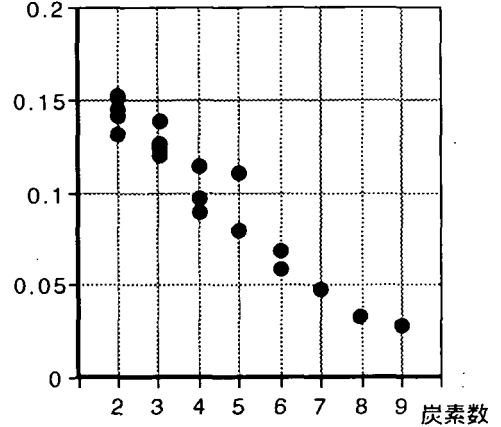


図-11 炭素源の種類と最大比基質消費速度

770nm
吸光度

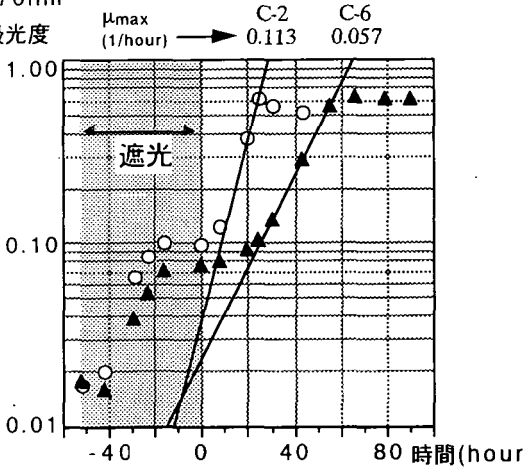


図-10 増殖の経時変化 (植種後2日間遮光)

る。このことは植種後2日間暗条件下においた追実験で確認した(図-10)。しかし、図-8と図-10において傾きに大きな差がなく、この方法での最大比増殖速度の計算においては酸素の影響は無視できると考えた。

(5) 廃水処理・菌体生産に対する最適な廃水組成

紅色非硫黄細菌による廃水処理の前段として嫌気的な可溶性酸生成を設置することが考えられる。この前処理を制御することにより廃水原水を廃水処理・菌体生産に最適な廃水組成に変換することが可

能ではないだろうか。ただし、このような前処理は二酸化炭素発生量に関しては影響は与えないであろう。なぜなら廃水処理全体での二酸化炭素発生量は、原料である廃水原水と最終生産物である菌体との酸化還元レベルの差によって決定されるものであり、途中の過程にはよらないと考えられるからである。表-1などでの議論は、どのような前処理が適当かを論ずるためではなく、紅色非硫黄細菌の増殖に伴う二酸化炭素の発生・固定量を定量的に評価するためのものである。

菌体生産に対しては最大比増殖速度(1/hour)がその指標となる。最大比増殖速度に関しては前節にまとめたとおりである。酢酸を基質とした際に0.117(1/hour)と最大になり、炭素鎖が長くなると比増殖速度が小さくなる傾向が認められるが、炭素数2~4(酢酸~吉草酸)ではその差は顕著ではなかった。

廃水処理に対しては各炭素源に対する最大比基質消費速度がその指標となる。最大比基質消費速度は次のように表せる。

$$\begin{aligned} \text{最大比基質消費速度 (mgC-substrate/mgC-cell/hour)} \\ = \text{最大比増殖速度} / \text{菌体転換率} \end{aligned}$$

図-11に最大比基質消費速度をまとめた。酢酸のときに0.152(mgC-substrate / mgC-cell / hour)と最大になり、炭素鎖が長くなるほど各基質に対する最大比基質消費速度は小さくなる傾向が認められた。この傾向は、最大比増殖速度と炭素鎖長との関係よりも顕著であった。

よって、後段となる光合成細菌槽での処理・生産の速度を考えると、紅色非硫黄細菌を用いて廃水処理・菌体生産を行う際には、前処理において廃水中有機物

を炭素鎖の短い脂肪酸に変換しておくことが有利であると言つてよい。この場合、紅色非硫黄細菌による基質の無機化は増加するが、前処理も含めた廃水処理全体での基質の無機化は廃水原水と生成される菌体との酸化還元レベルの差によって決定されると考えられるため、このような前処理が基質の二酸化炭素への変換の全体量を増加させることにはならないであろう。

4. 結論

炭素数 2～9 の直鎖飽和脂肪酸を基質とした際の、紅色非硫黄細菌 *Rhodobacter sphaeroides* の増殖における基質の菌体転換率 R_c および無機化率 R_m (CO_2 の発生量・固定量) を定量した。酢酸を基質とした際は $R_m = 0.09$ ($\text{mgC}\cdot\text{CO}_2 / \text{mgC}\cdot\text{substrate}$) (5 回の平均) であり基質の一部が二酸化炭素となって放出された。一方、炭素数 4 (酪酸) 以上の基質では R_m が負となり基質の同化とともに二酸化炭素を摂取することが定量的に示された (表 -1)。

菌体中の PHB から菌体成分を合成する際には二酸化炭素の発生が認められなかった。このことは、菌体全体の平均的な酸化還元レベルが PHB の酸化還元レベルと近いということであろう。つまり、 CO_2 の発生・摂取は PHB の菌体内含有率の変動には影響されないと言える。

β 酸化や PHB の分解で生じた還元力を CO_2 固定によって消費するという考え方をを用い、酢酸、プロピオン酸、酪酸の実験結果と合わせて、炭素数 5 以上の脂肪酸の際の R_m の値と PHB から菌体成分を合成する際に二酸化炭素の発生が認められなかったことを説明できた。

炭素数 2～9 の直鎖飽和脂肪酸を基質とした際の、最大比増殖速度を定量した。酢酸が最大の比増殖速度 0.117 (1/hour) を与えた。炭素鎖が長くなるほど各基質に対する最大比増殖速度は小さくなる傾向が認め

られたが、炭素数 2～4 ではその差は顕著ではなかった。また、最大比増殖速度と菌体転換率 R_c から各基質に対する比基質消費速度を計算した。この結果から、炭素鎖が短い基質ほど高い比基質消費速度を与え、酢酸のときに 0.152 ($\text{mgC}\cdot\text{substrate} / \text{mgC}\cdot\text{cell} / \text{hour}$) と最大になった。後段となる光合成細菌槽での処理・生産の速度を考えると、紅色非硫黄細菌を用いて廃水処理・菌体生産を行う際には、前処理において廃水中有機物を炭素鎖の短い脂肪酸に変換しておくことが有利であると考えられる。

参考文献

- 1) Kobayashi, M. and Tchan, Y.T.: Treatment of industrial waste solutions and production of useful by-products using a photosynthetic bacterial method, *Water Research*, Vol.7, pp.1219-1224, 1973.
- 2) Brandl, H., Knee Jr, E.J., Fuller, R.C., Gross, R.A. and Lenz, R.W.: Ability of the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly(β -hydroxyalkanoates): Potential sources for biodegradable polyesters, *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol.11, No.2, pp.49-55, 1989.
- 3) 北村 博: 光合成細菌による有機性廃水処理 (「微生物の生態 5」微生物生態研究会編), 学会出版センター, pp.85-121, 1978.
- 4) Nakajima, F., Kamiko, N. and Yamamoto, K.: Organic wastewater treatment without green-house gas emission by photosynthetic bacteria, *Proceedings of 5th I.A.W.Q. Asian Regional Conference on Water Quality and Pollution Control*, pp.440-446, 1995.
- 5) 山本和夫: 光合成細菌を利用した有機性排水の嫌気処理技術, *環境科学会誌*, 8 (2), pp.221-223, 1995.
- 6) 山里一英, 宇田川俊一, 児玉 徹, 森地敏樹編: 「微生物の分離法」, R & D プランニング, 1986.
- 7) 佐藤弘泰, 味埜 俊, 松尾友矩: 18.PHA の測定とその意味 (「環境微生物工学研究法」土木学会衛生工学委員会編), 技報堂出版, pp.71-74, 1993.

(1996.8.29 受付)

QUANTIFICATION OF CO₂ UPTAKE AT WASTEWATER TREATMENT AND
BIOMASS PRODUCTION BY PURPLE NONSULFUR BACTERIA,
RHODOBACTER SPHAEROIDES

Fumiyuki NAKAJIMA and Kazuo YAMAMOTO

Wastewater treatment and biomass production by purple nonsulfur bacteria under illumination and anaerobic condition is expected to be accompanied with less green-house gas emission than conventional biological wastewater treatment. In this paper, we quantified mineralization rates of 8 kinds of fatty acid by purple nonsulfur bacteria, *Rhodobacter sphaeroides*. Longer-chained substrate than n-butyrate gave negative mineralization rates which meant uptake of CO₂. No emission and no uptake of CO₂ was observed during decomposition of intracellular poly-3-hydroxybutyrate. Optimum pretreatment of wastewater was investigated.