

# 光合成細菌を用いた 廃水処理・有価物生産における 紅色非硫黄細菌群の選択的増殖の促進

小野(伊津) 恭子<sup>1</sup>・山本 和夫<sup>2</sup>

<sup>1</sup>正会員 工博 産業技術総合研究所 化学物質リスク管理研究センター  
(〒305-8569 茨城県つくば市小野川 16-1)

<sup>2</sup>正会員 工博 東京大学教授 環境安全研究センター (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

光合成細菌による廃水処理および有価物回収を行うには、これらの細菌群が系内で優占する運転方法を確立することが不可欠である。本研究では、赤外線フィルターを通した白熱灯の光を照射することによって、シアノバクテリアの増殖が抑制され、かつ、光合成細菌の一種である紅色非硫黄細菌の優占が起こることを定量的に示した。FISH(fluorescence in situ hybridization)法により、最終的に得られた細菌群における紅色非硫黄細菌の存在比率は、赤外線フィルターのある場合が 40-50%、ない場合は 20%と求められた。PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)法を適用し、DGGE バンドの塩基配列を解読した結果、紅色非硫黄細菌 *Rhodospseudomonas palustris* が最終的に優占しやすいことが示された。

**Key Words :** purple nonsulfur bacteria, wastewater treatment, cyanobacteria, FISH, PCR-DGGE

## 1. はじめに

光合成細菌の一種である紅色非硫黄細菌は、廃水処理に適しており、さまざまな廃水を処理できることが報告されている<sup>1)</sup>。特に高濃度の有機性廃水 (BOD が数千から数万 ppm) を無希釈で処理できるという特長があり、1970 年代から 80 年代にかけて実処理プラントで稼働していた実績がある<sup>2)</sup>。この処理法では、紅色非硫黄細菌を別に大量培養しておき、バッチ的に廃水に投入する方式が採られている。紅色非硫黄細菌の増殖が速いという理由から実処理では処理槽で曝気を行っている事例が多い。さらに、紅色非硫黄細菌は餌・飼料として適していることが報告されている<sup>3)</sup>。したがって、この細菌を廃水処理に用いることによって処理と同時に生じた菌体を有価物として利用することが可能となる。すなわち、菌体を有効利用できることが紅色非硫黄細菌を用いる処理のもう一つの大きな特長と言える。

しかしながら、実際の廃水処理系で生成した紅

色非硫黄細菌を中心とする細菌群について回収・再利用まで行われることは非常に稀である。その理由は、これらの微生物群においては紅色非硫黄細菌の比率ができるだけ高い方が望ましいと考えられるのに対し、処理槽内で紅色非硫黄細菌を選択的に優占させる運転方法が十分に検討されていないからである。したがって、これらの微生物群を餌・飼料として利用する観点からは、その品質を議論するための知見が不足していると言える。

紅色非硫黄細菌が廃水処理微生物群の中で優占する条件を取り扱った既存の研究には、有機酸の種類および濃度に着目したもの<sup>4)</sup>、溶存酸素 (DO) 濃度に着目したもの<sup>5), 6)</sup>がある。特に、Izu ら<sup>6)</sup>は、嫌気条件の場合に紅色非硫黄細菌の比率が高くなるが、それと同時に、シアノバクテリアが出現した場合は、紅色非硫黄細菌の比率が低くなることを示している。その理由はシアノバクテリアが発生する酸素によって系内が嫌気でなくなるからである。したがって、シアノバクテリアの増殖を抑制する条件を示すことが必要となる。本研究は、シアノバクテリアの増殖を抑制し、かつ紅色非硫黄細菌

菌を選択的に優占化させる運転条件を明らかにすることを目的としたものである。ここでは、赤外線フィルターの有無によって紅色非硫黄細菌の存在比率に差が生じるのかを示した。

光合成微生物が持つ集光色素はクロロフィルもしくはバクテリオクロロフィルであるが、その集光波長はそれぞれ異なっている<sup>7)</sup>。そのため、ある特定の波長をカットする光源フィルターは光合成細菌の単離と集積培養のために積極的に利用されている<sup>8)</sup>。しかしながら、この手法が連続培養系においても同様に、特定微生物を優占化させることが可能かについては過去に実証された例はない。

また、本研究では、微生物群における紅色非硫黄細菌の存在比率を定量する方法として PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)法および FISH (fluorescence in situ hybridization)法を適用した。従来用いられてきた培養法では、紅色非硫黄細菌自体は定量できるが、廃水処理系に存在する微生物群全体に対する比率を正しく評価できない<sup>9)</sup>ためである。また、FISH法では適切なプローブが設計されていれば特定の細菌の消長を簡便に追うことができる<sup>10)</sup>。このことを利用して、本研究では出現した紅色非硫黄細菌を種レベルで時系列的に定量した。

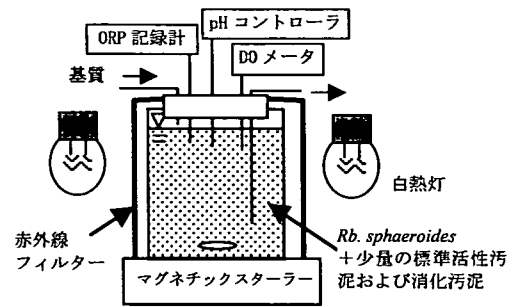


図-1 実験装置

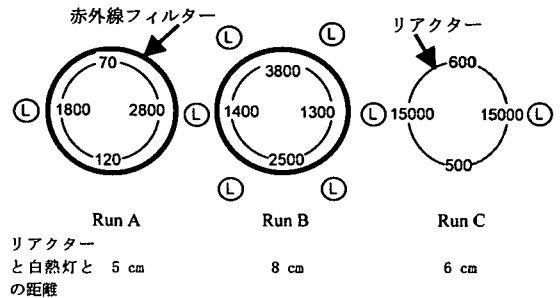


図-2 リアクターと光源の配置、照度

表-1 運転条件

Run		照度 [lux]*	白熱灯 の数	DO [mgO/L]
A	赤外線 フィルター	750 (6800)	2	0.0
B	赤外線 フィルター	1150 (18000)	6	0.0
C	(対照)	5800	2	0.0

\*リアクター表面の平均照度。()内はフィルターがない場合の照度。

すいたためである。

## 2. 実験方法

### (1) 植種に用いた細菌

植種に用いた細菌は紅色非硫黄細菌 *Rhodobacter sphaeroides* IFO 12203 (財団法人発酵研究所所蔵 (Institute for Fermentation, Osaka)) である。植種の前に光合成細菌用培地<sup>11)</sup>に炭素源として酢酸ナトリウム3水和物を 200 mgC/L となるよう加えた培地で継代培養した。この種を選択した理由は既存の研究が豊富であり、結果を比較しやすいことである。

初めに紅色非硫黄細菌 *Rb. sphaeroides* IFO 12203 のみを植種して 10 日間連続運転し、馴致期間とした。定常状態に達したことを確認した後、他の微生物群を *Rb. sphaeroides* に比して極少量 (SS 比で 180 (*Rb. sphaeroides*):1 (活性汚泥と消化汚泥(55°C)の混合物)) 混合した。この操作を以下スパイクと呼び、混合した汚泥をスパイク源と呼ぶことにする。スパイク源は標準活性汚泥法で運転している系列の余剰汚泥と消化汚泥とを混合した微生物群とした。この理由は、廃水処理過程で出現する微生物を幅広く包含しており、なおかつ手に入りや

### (2) リアクターの概要

本研究に用いられた光バイオリアクター (以下、リアクターと呼ぶ) を図-1 に示す。リアクター本体はガラス製であり、有効容積は 3L である。滞留時間は 3 日とし、菌体懸濁物は一定の速度で攪拌した。また、リアクター内壁の付着物は定期的に剥離した。リアクターと光源の位置関係を図-2 に示す。運転条件を表-1 に示す。光源は 60W 白熱灯を用い、Run A および Run C は 2 個、Run B は 6 個で照射した。Run A および Run B は、リアクターを赤外線フィルター (テクナライト IR2880, (株)筒中プラスチ

ック製)で被った。この赤外線フィルターを通して照射した光の波長分布を図-3に示す。

リアクター内の菌体懸濁液の pH, 溶存酸素(DO), 酸化還元電位(ORP)については, リアクターに直接差し込まれた pH 電極, DO 電極, ORP 電極によって連続的に測定した。pH は 7.0 から 8.0 の範囲となるよう pH コントローラを用いて調整した。

基質は光合成細菌用培地に炭素源として酢酸ナトリウム 3 水和物を 500mgC/L となるよう加えたものである。これを高圧蒸気滅菌(121°C, 20 分)して流入基質とした。

スパイクした日を day 0 とし, この日から約 3 日おきにリアクター内の菌体懸濁液をサンプリングした。

### (3) 分析手法

#### a) PCR-DGGE 法

ベンジルクロライド法<sup>12)</sup>にて核酸抽出を行った。以下, PCR および DGGE については Muzer ら<sup>13)</sup>の方法に従った。核酸をテンプレートとし, 16S rDNA の V3 region (*E. coli* No. 341-534)を PCR で増幅した。用いたプライマーの配列を表-2 に示す。DNA ポリメラーゼは AmpliTaq Gold (Perkin Elmer 社)を, サーマルサイクラーは GeneAmp 9600 (Perkin Elmer 社)を用いた。PCR の条件は Izu ら<sup>9)</sup>に従った。得られた PCR 産物を DGGE 用のサンプルとした。DGGE は D code system (Bio-Rad 社)を用いて行った。ゲルの変性剤は尿素+ホルムアミドであり, 35%-55%の変性剤の濃度勾配を持つ 8%ポリアクリルアミドゲルで 130V, 5 時間泳動を行った。ゲル中の核酸染色には Vistra Green (Amersham Pharmacia 社)を用い, 蛍光イメージアナライザー-Fluorimager 595 (Molecular Dynamics 社)によって染色されたゲルの画像を取得した。

#### b) DGGE バンドの塩基配列決定と最近縁種の検索

DGGE により得られたバンドをゲルから切り出し滅菌水を加えて凍結融解法により DNA を回収した。この DNA に対し, プライマーに 357fGC と 518r を用いて再 PCR を行った。この PCR 産物の塩基配列をオートシーケンサー-SQ-5500 (日立製作所)で解読した。方法はマニュアルに従った。BLAST (WU-BLAST2.0a, DNA Data Bank of Japan [DDBJ])を用い, 解読した塩基配列について既知種の中から近縁種を 20 種検索した。これら既知種の塩基配列と, DGGE バンドより得られた配列とを CLUSTAL W (DDBJ)によって多重整列を行い, 相同塩基数を求めた。このように得られた相同塩基数の数が最も大きい種を最近縁種とした。なお, 本研究にお

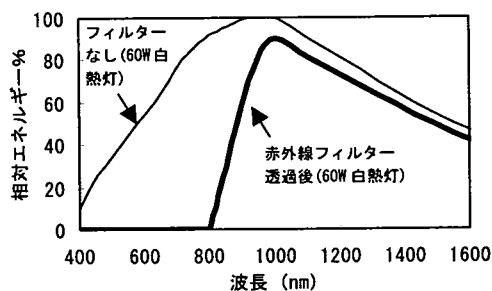


図-3 照射した光源の波長範囲。本図は(株)東芝ライテック, (株)筒中プラスチックの資料より筆者が作成した。

表-2 用いた PCR プライマー

Forward primer; 357fGC	5'-CGCCCGCCGCGCGGGGGCGG GGCGGGGACGCGGGGGCTACGG GAGGCAGCAG-3'
Reverse primer; 518r	5'-ATTAACCGCGCTGCTGG-3'

表-3 FISH 法に用いた遺伝子プローブと標的細菌群

プローブ	略号	標的細菌群	参考文献
EUB338	EUB	Most of domain Bacteria	10
Arch915	ARC	Archaea	15
CF319a	CF	<i>Cytophaga-Flavobacterium</i>	16
Rbsp84	RS	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> , <i>Rhodobacter Azotoformans</i>	6
Rpal686	RP	<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	6

いて得られた塩基配列は塩基配列データベース DDBJ/EMBL/GenBank に登録済みである(accession number: AB072397~AB072410)。

#### c) FISH 法

Amann<sup>14)</sup>の方法に従った。本研究で用いた FISH 用プローブを表-3 に示す。各プローブのハイブリダイズ条件は表-3 に示された参考文献にそれぞれ従った。各標的細菌群の全細菌に対する比率を求めめるため, プローブ EUB338 (XRITC 標識)と CF319a または Rbsp84 または Rpal686 (全て FITC 標識)との二重染色を行った。顕微鏡観察には共焦点レーザースキャン顕微鏡(CLSM)TCS-NT (Ar/Kr laser, Leica 社)を用いた。一つのサンプルにつき 10 視野の画像を RGB 画像カラーファイルとして取得し, Bitmap 形式で保存した。以下のように特異的プローブで検出された面積の値 (*T*) と EUB338 で

検出された面積の値 (E) とを定量した。面積の定量には画像解析システム QUIPS(Leica 社)を用いた。CLSMにより取得した画像ファイルのある閾値に基づいて二値化し、選択された部分の面積 (=ピクセル数) を測定した。二値化する際には画像の選択範囲を目で確認し、プローブで標識された部分が過不足なく選択される閾値を採択した。自家蛍光由来の面積 (A) を定量化するために取得した画像については、自家蛍光の部分のみが選択される閾値であることを確認した。このようにして得た面積は以下の計算式によって比率に置き換えられた。

$$\text{Ratio} = (T - A) / (E - A)$$

この操作を取得した各画像について行い、各試料について比の平均を取ったもの (n=10) を当該群の存在比率とした。

別に Bloem<sup>17)</sup> の方法に従って DAPI 染色を行い、同じ試料を EUB338 プローブによっても同時染色し、染色された細菌の個数を数えることによって EUB/DAPI 比を求めた。

#### d) シアノバクテリアの計数とバイオマス換算

シアノバクテリアの増殖が観察された場合には渡辺・渡部<sup>18)</sup>に従って種を同定し、容量 8.4 μL のウェルをもつ血清計数用のスライドグラス((株)積水化学製)を用いて、単位液量当たりの個数を計数した。個数から炭素量への換算方法は Izu ら<sup>6)</sup>に従った。

#### e) その他の分析方法

菌体濃度および溶存態有機炭素(DOC)は全有機炭素計 TOC-500 (島津製作所) により炭素量換算で求めた。DOC 測定の前処理としてセルロースアセテート製メンブレンカートリッジ(膜孔径: 0.45 μm, ADVANTEC)を用いて濾過し、その濾過水について有機炭素濃度を測定した。硫化物は 1% (W/V) 酢酸亜鉛溶液で溶存している硫化物を固定し、4°C で保存した試料について、下水試験方法<sup>19)</sup>に従ってメチレンブルー吸光光度法で求めた。

### 3. 結果

#### (1) 微生物群集の変遷

図-4にPCR-DGGE法によるDGGEゲル電気泳動結果を示す。いくつかの濃いバンドからなる、単純なプロファイルであった。バンドが褶曲しているために同じ位置に止まるバンドを比較しづらいがこの3系列は非常に似通った微生物相であることが分かる。図中\*と\*\*で示したバンドはそれぞれ*Rh.*

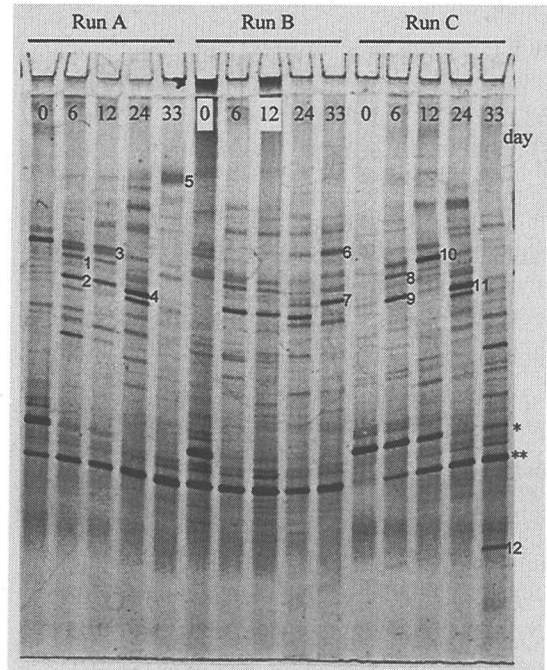


図-4 PCR-DGGE 法による電気泳動結果のゲル写真。変性剤濃度勾配は 35~55%。切り出したバンドは、その右側に番号を付した。\*, \*\*: それぞれ *Rh. sphaeroides*, *Rps. palustris* に由来するバンド(それぞれ当該部位の塩基配列が既知種に完全に一致したもの)。

表-4 図-4で番号を付したバンドの塩基配列より推定される細菌の最近縁種とその相同塩基数。

図-4の番号	最近縁種	相同塩基数(割合%)
1	<i>Pseudomonas putida</i>	194/194 (100%)
2	<i>Pseudomonas putida</i>	194/194 (100%)
3	<i>Flavobacterium aquatile</i>	181/189 (95%)
4	<i>Acinetobacter</i> sp.	189/195 (96%)
5	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	169/169 (100%)
6	<i>Hippea maritima</i> (delta subdivision)	154/190 (81%)
7	<i>Prevotella ruminicola</i> (CFB) <sup>a</sup>	171/190 (90%)
8	<i>Pseudomonas putida</i>	194/194 (100%)
9	<i>Pseudomonas putida</i>	194/194 (100%)
10	<i>Flavobacterium aquatile</i>	181/189 (95%)
11	<i>Acinetobacter</i> sp.	190/195 (97%)
12	uncultured bacterium <sup>b</sup>	153/170 (90%)
*	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	169/169 (100%)
**	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	169/169 (100%)

<sup>a</sup>CFB: Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides group

<sup>b</sup>塩基配列は解読できているが近縁種の特定ができなかった

*sphaeroides*, *Rps. palustris* である。いずれの系においても *Rb. sphaeroides* の衰退と *Rps. palustris* の増殖が確認され、最終的に *Rps. palustris* が顕著なバンドとなっている。その他の顕著なバンドのシーケンシング結果は表-4 に示す。シーケンシングができたバンドに限って言えば、紅色非硫黄細菌以外で現れた細菌の属するグループは各系列で類似していた。かつ、それらの細菌で運転期間中常に顕著なバンドとして表れているものがなかったことから、それらの存在量は大きく変化していたことが示される。興味深いバンドの挙動としてはバンド 1, 2, 8, 9 で表される *Pseudomonas putida* に由来するバンドである。これらのバンドは day 6 までは濃いバンドであるが、最終的には見えなくなっている。この現象は 3 系列共に見られ、しかも、バンドの消える時期が *Rb. sphaeroides* のそれと類似している。

Run A においては最終的に濃くなっているバンドは *Rps. palustris* のみであるが、Run B ではその他にバンド 6, 7 (最近縁種とされたのはそれぞれ *Hippea maritima*, *Prevotella ruminicola*) も濃くなっていた。*H. maritima* は proteobacteria delta subclass に属しており、これは主として硫酸塩還元細菌からなる subclass である。Run C は、顕著であったバンドが day 33 に見えなくなっており、その代わりにいくつかのバンドが新たに濃くなった。しかしながら、それらのバンドのほとんどについては塩基配列を読むことができなかった。

Run A および Run B では、*Rps. palustris* のバンドが day 0 ですでに現れていたが、この理由については、スパイク源にごく少量含まれていた *Rps. palustris* が何らかの原因によって PCR の段階で特異的に増幅されたため (Run C では増幅されにくかった)、と説明できる。

## (2) FISH 法による存在比の定量

まず、EUB/DAPI 比を求めることよって、EUB338 プロンプで全細菌数を表すことが適当かを評価した。Run A, B, C から採取した試料の EUB/DAPI 比はいずれも 0.95 以上であり、かつ系列間の差が見られなかった。したがって、以下、全細菌数はすべて EUB338 プロンプによって検出されたもの、とした。

図-5 に FISH 法による各種/グループの EUB338 に対する存在比率の定量結果を示す。Run A および Run B では、*Rb. sphaeroides* の比率が day 6 までに急激に減少した。それに対して Run C では *Rb. sphaeroides* の減少は緩やかであった。いずれの系

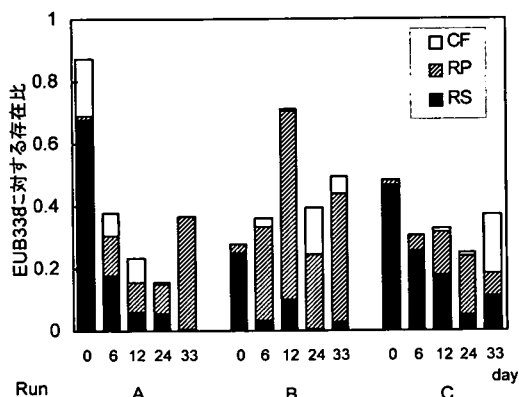


図-5 FISH 法による各種/グループの EUB338 に対する存在比率。凡例の略号は表-3 を参照。Archaea は全ての Run において検出されなかった。

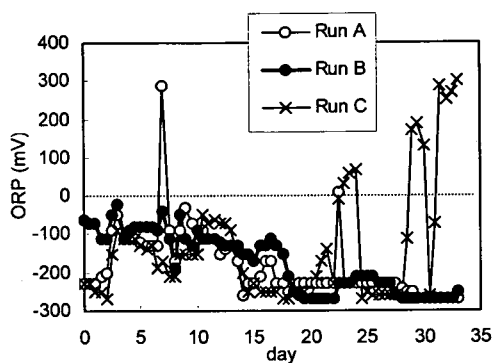


図-6 ORP の経時変化。

でも *Rps. palustris* のみが最終的に増殖し、このことは DGGE プロファイルの結果を裏付けるものであった。

*Rps. palustris* の比率には差があり、フィルターのある Run A および Run B は、ともに最終的な紅色非硫黄細菌の比率は 40% に保たれ、Run C よりも高かった。特に照射光量を増した Run B では *Rps. palustris* の増殖が顕著に見られ、day 12 には *Rps. palustris* だけで約 50% に達した。対して、フィルターなしの場合 (Run C) は紅色非硫黄細菌の比率が徐々に減少し、day 33 には 20% であった。*Rps. palustris* だけの比率を比較してみると Run B が最も高かった。CF319a で検出される CFB グループも、その比率に変動が見られた。Run A では減少傾向にあり、バンド 3 (最近縁種は *Flavobacterium aquatile*. CF319a で検出されると予想される) は day 33 に薄くなっており、FISH で CF319a による検出がされなくなっていることとも一致する。Run B では増加傾向にあったが、バンド 7 (最近縁種は *Prevotella*

*ruminicola*. CF319a で検出されると予想される) との関係は、これらのデータからは明らかにすることができない。Run Cでも day 33にCF319aでの検出分が15%であったが、シーケンシングのできたバンドがほとんどないため、関係については不明のままである。

### (3) ORPの変化とシアノバクテリアの出現

図-6にORPの変遷を示す。ORPはday 15までの系列においても-100 mV前後で推移していたが、その後徐々に低下した。Run AおよびRun Bでは20以降-200 から-300mVと安定していたのに対し、Run Cでは不安定であり、day 30を過ぎた頃からORPが急激に上昇した。

Run Cにおいて1種類のシアノバクテリアの増殖が顕著に観察された。その形状とサイズから、観察されたシアノバクテリアを *Aphanocapsa litoralis* と推定した。 *Aphanocapsa litoralis* は day 30から増殖しているのが観察された。図-7に *Aphanocapsa litoralis* の数の経時変化を示す。この図から明らかなように、ORPの上昇はシアノバクテリアの増殖によるものと説明できる。

### (4) バイオマス生成と有機物除去

図-8に、バイオマスとDOCの経時変化を示した。どの系列もバイオマスはday 12までは200mgC/L程度と低かったが、その後は違いが見られた。Run Aでは運転期間中を通じて菌体への変換率は50%以下であった。それに対しRun BおよびRun Cではバイオマスはday 33には増加した。バイオマスでもDOCでも説明されない部分は二酸化炭素として系外に排出されたと説明できる。

Run AとRun Bの差が生じた理由としては、Run Bの方が照度が大きいことから、有機炭素の菌体への転換率(増殖収率)が非常に高い紅色非硫黄細菌が有利に増殖したことが考えられる。

Run Cではday 33にバイオマスが増加している。このとき、シアノバクテリアの寄与分は60 mgC/L程度であり、これはバイオマス全体の約10%に相当している。FISH法の結果よりEUB338で検出されるうちの80%が紅色非硫黄細菌以外の寄与分であることを考慮すると、このバイオマスのうち7割強が紅色非硫黄細菌以外の従属栄養細菌と考えることができる。

### (5) 硫化物濃度および水温

表-5に硫化物と水温を示す。運転期間中、硫化物

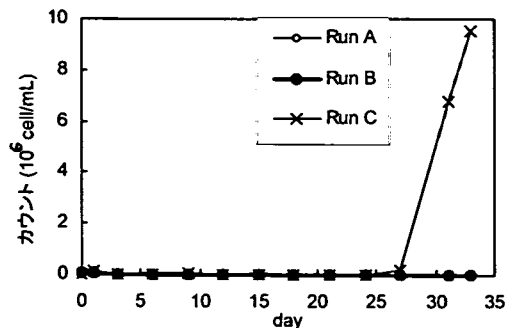


図-7 シアノバクテリア *Aphanocapsa litoralis* の数の経時変化。

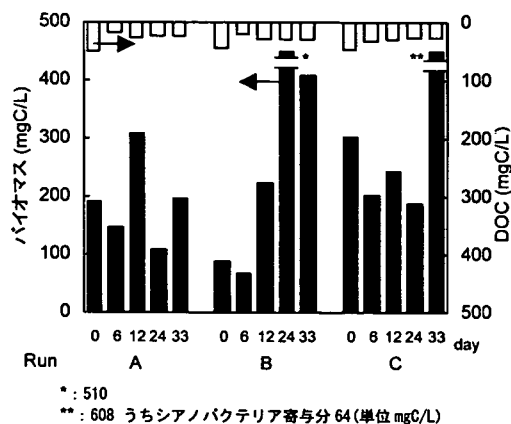


図-8 バイオマスとDOCの経時変化。0はスパイク前の平均値。Run Cについてはシアノバクテリア *Aphanocapsa litoralis* の寄与分も合わせて示した。バイオマスとDOCの合計が500mgC/Lを超過した試料についてはグラフに収まらないため、\*を付し、欄外にそのバイオマス量を記した。  
\*: 510  
\*\*: 608 うちシアノバクテリア寄与分64(単位mgC/L)

表-5 硫化物、水温。

Run	硫化物	水温[°C]
A	検出されなかった	27~36
B	検出されなかった	36~40
C	検出されなかった	27~33

はどの系列からも検出されなかった。水温はRun BでRun A, Run Cより平均で6°C上昇した。これは光源に用いた白熱灯の数の差異による。

## 4. 考察

### (1) 赤外線フィルターの有無と紅色非硫黄細菌の存在比率

図-7より、赤外線フィルターを通した白熱灯の光を照射した場合、シアノバクテリアの増殖が抑制されたことが示された。また、図-4や図-5から明らかなように、赤外線フィルターがあっても紅色非硫黄細菌の増殖が抑制されることはなく、*Rps. palustris*の増殖が見られた。これらの結果から、赤外線フィルターを導入することが紅色非硫黄細菌を選択的に増殖させるために効果的な手段となることが示された。

紅色非硫黄細菌の存在比率が赤外線フィルターの有無により異なった理由について以下のように考えられる。図-4のDGGEプロファイルを見ると、Run C (フィルターなし)のday 33ではそれまでとバンドパターンが明らかに異なっていることが分かる。また、day 33にシアノバクテリアが増殖し(図-7)、また、ORPが急激に上昇している(図-6)ことがわかる。これらの結果から判断して、Run Cのday 30以降では酸素を最終電子受容体として利用しやすい環境に急変し、その結果、紅色非硫黄細菌以外の従属栄養細菌も増殖したと推察される。このような理由から、シアノバクテリアが増殖すると従属栄養細菌の増殖が起こるため、相対的に紅色非硫黄細菌の存在比率が低下してしまうと言える。したがって、シアノバクテリアの増殖を抑制することは紅色非硫黄細菌を中心とした微生物群による廃水処理を行う際に重要であると結論づけることができる。

赤外線フィルターを用いることで紅色非硫黄細菌以外の微生物群の増殖を制御することができるならば、他の微生物群の影響が無視できないと考えられる屋外でも、反応槽を設置することができ、また太陽光を光源に用いることが可能となる。したがって、エネルギー消費の少ない廃水処理・有機物生産システムが実現することが期待される。

### (2) 紅色非硫黄細菌以外の従属栄養細菌

本研究の実験結果では、シアノバクテリアの増殖が見られなかったRun A、Run Bにおいても、紅色非硫黄細菌の比率としては50%以下であり、また、CF319aによる検出で説明できる分はごくわずかであった(図-5)。運転期間中常に溶存有機物は90%以上除去できていた(図-8)ことを考慮すると、その他の従属栄養細菌の影響も無視できないと思

われる。シーケンシングの結果、*Acinetobacter*属やCF319aで検出される*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* groupに属する細菌が存在していたことが示された。これらを見る限り、ごく普通の機能を持った通性嫌気性細菌が光バイオリアクター内でも増殖すると言え、何らかの原因で系内に酸素が供給されれば、これらの細菌群が好氣的増殖を行い、紅色非硫黄細菌を駆逐してしまうことが予想される。

### (3) 水温に関する評価

赤外線フィルターは可視領域のエネルギーを吸収して熱に変化させてしまう。その結果Run Bでは水温が40℃まで上昇したことが観察されたが、このように高い水温でも*Rps. palustris*は優占しやすいことが示された。伊津<sup>20)</sup>は、別に、本研究でスパイクした標準活性汚泥からの紅色非硫黄細菌の単離を行ったが、存在が確認されたものは*Rb. sphaeroides*のみであった。この知見から、この場合出現した*Rps. palustris*は消化汚泥由来のものである可能性が高い。つまり、Run Bで優占種となった*Rps. palustris*は55℃の消化汚泥の中でも死滅することなく存在していたことになる。水温が変化すると*Rps. palustris*と競合する微生物の顔ぶれも変化することも考えられるため直接の比較はできないが、この種は適応できる温度範囲が広いことを示唆している。既存の研究では、下水処理場の汚泥<sup>21)</sup>から、食品工場の廃水処理プラント<sup>22)</sup>から、または消化汚泥<sup>23)</sup>から*Rps. palustris*が単離された例が報告されている。このこともこの種が多様な環境で増殖できることを裏付けるものである。40℃程度の水温でも生育可能であるという性質を生かして、熱帯地域などでもこの細菌による廃水処理が可能と考えられる。その場合、優占種となりうる*Rps. palustris*は餌料などのタンパク源として有効利用できるであろう。

## 5. まとめ

赤外線フィルターを通した光を照射した場合、シアノバクテリアの増殖が抑制され、また紅色非硫黄細菌を選択的に優占させることができた。紅色非硫黄細菌の存在比率はフィルターのある場合が40~50%、フィルターのない場合は20%であった。このような差が生じた理由として、シアノバクテリアが増殖すると、それらが生産する酸素を

使って好気性従属栄養細菌の増殖が起こるため、相対的に紅色非硫黄細菌の存在比率が低下してしまうためと推察された。このことから、紅色非硫黄細菌を中心とした微生物群を保つには、シアノバクテリアの増殖を抑制することが重要であるといえる。

紅色非硫黄細菌の優占種は *Rps. palustris* であった。この種を中心とした微生物群は餌料として有効利用が可能であり廃水処理と有価物生産を同時に行えると期待される。

謝辞：本研究の一部は文部科学省中核的研究拠点(COE)形成促進費ならびに(財)ヒューマンサイエンス振興財団の研究テーマである「循環型社会に対応した有機性廃棄物の資源化処理システムの開発」の支援を受けて行われたものである。

#### 参考文献

- 1) 小林正泰：光合成細菌による高濃度有機廃水処理法 (PSB 処理法), 発酵と工業, Vol. 36, pp. 753-756, 1978.
- 2) 北村 博：光合成細菌による有機性廃水処理 (日本微生物生態学会編「微生物の生態 5 環境汚染をめぐって」), 学会出版センター, pp. 86-121, 1978.
- 3) Kobayashi, M. and Tchan, Y.T.: Treatment of industrial waste solutions and production of useful by-products using a photosynthetic bacterial method, *Wat. Res.*, Vol. 7, pp.1219-1224, 1973.
- 4) Hiraishi, A., Shi, J. L. and Kitamura, H.: Effects of organic nutrient strength on the purple nonsulfur bacterial content and metabolic activity of photosynthetic sludge for wastewater treatment. *J. Ferment. Bioeng.*, Vol. 68, pp. 269-276, 1989.
- 5) Sawada, H. and Rogers, P. L.: Photosynthetic bacteria in waste treatment - Mixed culture studies with *Rhodospseudomonas capsulata* - . *J. Fermentation Technol.* Vol. 55, pp. 311-325, 1977.
- 6) Izu, K., Nakajima, F., Kurisu, F. and Yamamoto, K.: Aeration conditions affecting growth of purple nonsulfur bacteria in an organic wastewater treatment process. *System. Applied Microbiol.* Vol. 24, pp. 294-302, 2001.
- 7) 小林達治:光合成細菌の基礎と応用 1 (基礎編), 日本土壤肥料科学雑誌, Vol. 46, pp. 101-109, 1975.
- 8) Pfennig, N. and Trüper, H. G.: The Family Chromatiaceae, *The Prokaryotes*, Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K-H. eds., Springer-Verlag, New York, pp. 3200-3221, 1991.
- 9) Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H. and Schleifer, K-H.: Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependant methods for microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 59, pp. 1520-1525, 1993.
- 10) Amann, R., Krumholz, L. and STAHL, D. A.: Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology, *J. Bacteriol.*, Vol. 172, pp. 762-770, 1990.
- 11) 佐藤敏生, 星野八洲雄: 光合成細菌基本培地 I (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, p. 840, 1986.
- 12) Zhu, H., Qu, F. and Zhu, L. H.: Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride, *Nucl. Acids Res.*, Vol. 21, No. 22, pp. 5279-5280, 1993.
- 13) Muyzer, G., Waal, E. C. and Uitterlinden, A. G.: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain-reaction amplified genes coding for 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 59, pp. 695-700, 1993.
- 14) Amann, R. I.: In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, *Molecular Microbial Ecology Manual*, 3.3.6, pp. 1-15, 1995.
- 15) Burggraf, S., Mayer, T., Amann, R. Schadhauer, S., Woese, C. and Stetter, K.: Identifying members of the domain *Archaea* with rRNA-targeted oligonucleotide probes, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 60, pp. 3112-3119, 1994.
- 16) Manz, W., Amann, R. I., Ludwig, W., Vancanneyt, M. and Schleifer, K. H.: Applications of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment, *Microbiology*, Vol.142, pp. 1097-1106, 1996.
- 17) Bloem, J.: Fluorescent staining of microbes for total direct counts, *Molecular microbial ecology manual*, Akkermans, A. D. I., van Elsas, J. D. and de Bruijn, F. J. eds., Kluwar, Dordrecht, The Netherlands, 4.1.8., pp. 1-12, 1995.
- 18) 渡辺信, 渡部真之: 緑藻類 (小島貞夫, 須藤隆一, 千原光男編「環境微生物図鑑」), 講談社サイエンティフィック, pp. 131-177, 1995.
- 19) 日本下水道協会: 第2編, 第2章, 第36節 硫化物 (「下水試験方法」上巻), 日本下水道協会, pp. 228-231, 1997.
- 20) 伊津恭子: 廃水処理における紅色非硫黄細菌の増殖に及ぼす諸因子の検討, 東京大学博士論文, 2001.



- 21) Kim, J. K., Lee, B. K., Kim, S.H. and Moon, J. H.: Characterization of denitrifying photosynthetic bacteria isolated from photosynthetic sludge, *Aquacultural Engineer.*, Vol. 19, No. 3, pp. 179-193, 1998.
- 22) Getha, K., Vikineswary, S. and Chong, V.C.: Isolation and growth of the phototrophic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* strain B1 in sago-starch- processing wastewater, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 14, No. 4, pp. 505-511 1998.
- 23) Jung, G.Y., Jung, H.O., Kim, J.R. and Ahn, Y.: Isolation and characterization of *Rhodopseudomonas palustris* P4 which utilizes CO with the production of H<sub>2</sub>, *Biotechnol. Letters*. Vol. 21, No. 6, pp. 525-529, 1999.

(2001. 4. 5 受付)

## PROMOTION OF SELECTIVE GROWTH OF PURPLE NONSULFUR BACTERIA ON A WASTEWATER TREATMENT AND SIMULTANEOUS MATERIAL PRODUCTION

Kyoko ONO-IZU and Kazuo YAMAMOTO

It is essential to know that which operation condition makes purple nonsulfur bacteria(PnSB) predominant among other bacteria in order to operate organic wastewater treatment and simultaneous material production system using those bacteria. In this study, we show that PnSB predominancy occurred and growth of cyanobacteria was inhibited by an irradiation of a light which wave length was selected by infrared filter (>800nm). FISH (fluorescence in situ hybridization) results revealed that ratio of PnSB against whole bacteria were 40-50% in a run with infrared filter. PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) was applied for microbial community analysis. Prominent DGGE bands were related to PnSB, *Rhodopseudomonas palustris*.