

(47) 紅色非硫黄細菌を用いた排水再資源化における
微生物共生系を用いた硫化物阻害の緩和に関する検討

Bacterial co-existence system to alleviate sulfide inhibition of growth
of purple nonsulfur bacteria in a resource-recovery process from wastewater

伊津 恭子*、中島 典之*、山本 和夫**

IZU Kyoko*, NAKAJIMA Fumiyuki*, YAMAMOTO Kazuo**

ABSTRACT; Wastewater treatment and biomass production system under illumination and anaerobic condition by purple nonsulfur bacteria, *Rhodobacter sphaeroides*, is expected to be an effective system from the points of less green-house gas emission and production of valuable materials. However, purple nonsulfur bacteria are sensitive to sulfide which can be produced by sulfate reducing bacteria under anaerobic conditions. In this paper, we quantified the growth inhibition by sulfide and investigated the bacterial co-existence system to alleviate this inhibition. The results are obtained as follows;

- Purple nonsulfur bacteria could not grow under the presence of more than 20mgS/L of total sulfide.
- Purple nonsulfur bacteria could alleviate the sulfide growth inhibition, and purple nonsulfur bacteria could grow even under the presence of 60mgS/L of initial sulfide concentration.

KEYWORDS; wastewater treatment, biomass production, purple nonsulfur bacteria, *Rhodobacter sphaeroides*, sulfide, growth inhibition, purple sulfur bacteria

1. はじめに

筆者らは、光合成細菌の一つである紅色非硫黄細菌を用いて有機性排水を嫌気・光照射下で処理し、生じた菌体を回収・有効利用するという、排水再資源化システムの開発を目的とした研究を行っている。このシステムは活性汚泥法による処理と異なり、有機物を二酸化炭素として放出せずに、できるだけ多くの汚泥（菌体=資源）に変換するものである。図1に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を示す。この方法の利点としては、排水処理により放出される二酸化炭素の量を抑制できること、排水中の有機物を飼料や生分解性プラスチックの原料などの資源と

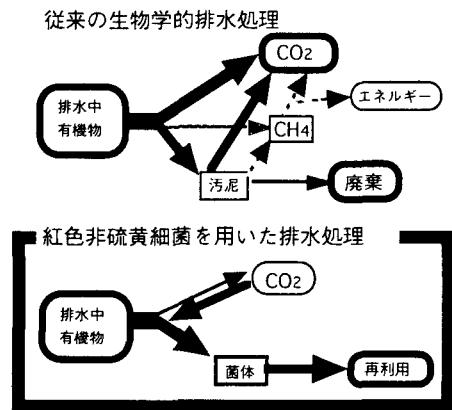


図1 従来の生物学的排水処理（上図）と紅色非硫黄細菌を用いた排水処理（下図）における炭素の流れ¹⁾

* 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻

(Department of Urban Engineering, Faculty of Engineering, the University of Tokyo)

** 東京大学環境安全研究センター (Environmental Science Center, the University of Tokyo)

して再利用できること、嫌気条件下での処理のため曝気が不要であること、光エネルギーとして太陽光を用いるなどすればエネルギー消費の少ない排水処理法となることなどが挙げられる。

紅色非硫黄細菌は、自然界中に卓越することはないが、たいていの水域に存在して有機物分解に関与している²⁾。この細菌は嫌気条件下で低級脂肪酸などを炭素源に利用すると同時に光合成反応の電子供与体として用い、光従属栄養的に生育する。そこで同化した有機物をPHB (poly-3-hydroxybutyrate) などの有価物の形で蓄積することができる。紅色非硫黄細菌の一つの種である *Rhodobacter sphaeroides* の場合、窒素制限下でPHBを乾燥重量で最大90%程度蓄積できると報告されている³⁾。また、その菌体成分はタンパク質の含有量が多く、良質の栄養素も多く含み、肥料や動物の餌に適している⁴⁾。この細菌は、嫌気条件下で有機炭素源の乏しい場合には二酸化炭素を固定することもある。

小林ら⁵⁾は、光合成細菌を利用した排水処理および資源化は、ビール、酒、抗生物質などの各種微生物工業廃液や食料品工業廃液などにおいて有効としている。また、小林らの想定している処理工程における光合成細菌槽では好気性有機栄養細菌も増殖してしまう可能性があるため、排水の種類によっては有価物としての質が低下することが指摘されている。紅色非硫黄細菌を用いた排水処理に関する基礎的な研究は中島ら^{6), 7)}によって行われてきており、菌体を有価物として利用する際の最適条件の検討がなされている。この場合に想定されている光合成細菌を用いた処理フローの例を図2に示す。ここでは、光合成細菌処理槽の前段に酸生成槽を設け溶存有機物を低分子化させた後、膜分離によって無菌化した排水を光合成細菌に処理させるといふ、純菌系での処理を想定している。しかし、嫌気条件下では硫酸塩還元細菌が存在し、前段に設けた酸生成槽において硫化物濃度が高い排水となる可能性があり、紅色非硫黄細菌の増殖が抑制されてしまうと考えられる。処理系内、または前段階までに生成した硫化物を酸化させるために反応槽内を微好気状態に保つことも方法として考えられるが、その状態ではPHB含有率が5~10%と低く、資源としての質が低下してしまうことが報告されている⁸⁾。

本論文では、硫化物の溶存している処理系を想定し、その影響を軽減するために紅色硫黄細菌を加えた場合の紅色非硫黄細菌の増殖と、その混合菌体の資源としての質について報告する。はじめに紅色非硫黄細菌 *Rhodobacter sphaeroides* の硫化物による増殖阻害をバッチ実験により定量的に調べた。次に、バッチ実験の結果から、硫化物による阻害を緩和するために硫化物を電子供与体として利用することのできる硫黄細菌を処理系に加えることを考えた。ここでは、紅色非硫黄細菌、紅色硫黄細菌のほかに、硫化物の供給源としての硫酸塩還元細菌にも着目した。図3に示すように、この3種類の細菌は炭素源、硫化物、硫酸、光などにおいてお互いに影響しあっていると考えられる。様々な基質の条件でこの三者の微生物共生系を用いたバツ

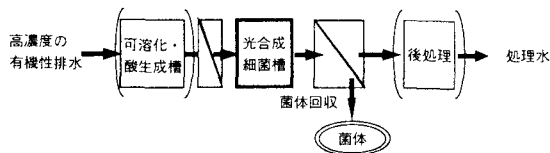


図2 光合成細菌を用いた処理プロセス⁷⁾より改変

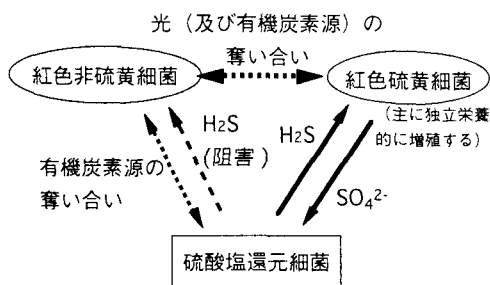


図3 紅色非硫黄細菌、紅色硫黄細菌および硫酸塩還元細菌の関係

チ実験を行い、これらの微生物が混在した場合の紅色非硫黄細菌の硫化物阻害の緩和と有価物組成について検討した。後述するように、硫酸塩還元細菌に関しては増殖が認められず、事実上紅色非硫黄細菌と紅色硫黄細菌の二者の関係について考察した。

2. 実験装置と実験方法

紅色非硫黄細菌の硫化物による増殖阻害を調べる実験に用いた培養容器はジーエル・サイエンス社製標準蛍光セルF15（スクリュウキャップ付、バイレックスガラス製、全面透明、容量約5 mL）である。これに紅色非硫黄細菌 *Rhodobacter sphaeroides* IFO12203を接種し、硫化物濃度の異なる基質をできるだけセルの内部に気泡が入らないように加えて密閉し、図4 a) のようにライトボード（三菱レーヨン社製、光源はハロゲンランプ、照度約5000 lux）上で培養した。また、微量に残存している酸素を消費させるため、はじめに25時間ほど暗条件で（好氣的に）増殖させ、その後明条件で増殖させた。適宜（8～12時間ごと）に波長770nmの吸光度を測定し、吸光度の変化により比増殖速度を算出した。

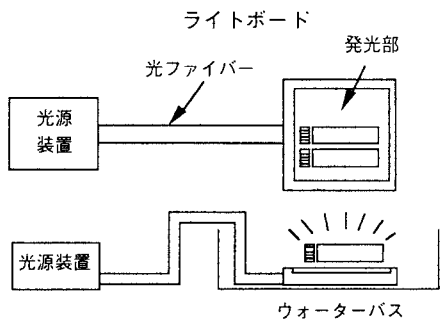
微生物共生系を用いたバッチ実験には以下の3種類の細菌を接種した。

紅色非硫黄細菌 *Rhodobacter sphaeroides* IFO12203

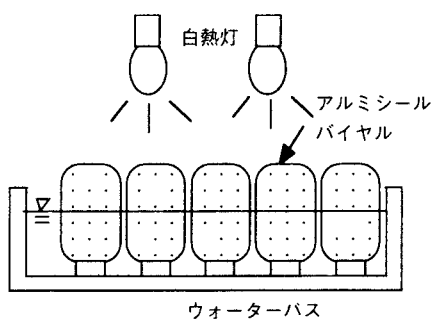
紅色硫黄細菌 *Chromatium vinosum* ATCC 17899

硫酸塩還元細菌 *Desulfovibrio baarsii* ATCC 33931

これらの細菌を選択した理由は *Ch. vinosum* についてはこの種を用いた既存の研究が豊富なため、そのデータとの比較が容易であることである。*D. baarsii* についてはこの種は酪酸を有機炭素源として利用することができ、*Rb. sphaeroides* と有機物の競合の可能性があり、かつ増殖に適した塩分濃度が0.2%程度と低く、*Rb. sphaeroides* や *Ch. vinosum* のそれと差がないことである。また、これらの細菌は形状が異なるため、明視野顕微鏡観察による同定、計数が可能である。培養容器はアルミシールバイヤル（容量約70 mL）を用いた。これにATCC所定の培地で1週間



a) 硫化物による増殖阻害を調べるバッチ実験



b) 微生物共生系を用いたバッチ実験

図4 実験装置の概要

表1 微生物共生系バッチ実験における基質の条件

	初期硫化物濃度 (mgS/L)	有機炭素源 (mgC/L)		溶存二酸化炭素濃度 (mgC/L)	硫酸イオン濃度 (mgS/L)
		酢酸*	酪酸*		
Run1	0	500	0	643	268
Run2	63	500	0	643	268
Run3	0	250	250	100	268
Run4	26	250	250	100	268

* 酢酸、酪酸は、ナトリウム塩の形で投入した。

ごと (*D. baarsii* については6週間ごと)に継代培養した紅色非硫黄細菌、紅色硫黄細菌および硫酸塩還元細菌を0.5 ml ずつ植種し、酸素による硫化物の酸化を防ぐため気泡が入らないように培地を加えて密栓した。表1に示したように、硫化物濃度、炭素源の種類と量、二酸化炭素濃度が異なる4つのRunについて実験を行った。一つのRunにつきバイアルをそれぞれ5本または6本用意し、図4b)に示すように温度及び照度一定の条件(30℃、3500 lux)で培養した。培養期間中に適当な間隔でバイアルを1本ずつ開封し、菌体数の計数と菌体成分の分析を行った。分析は、TOCはShimadzu TOC-500で、酢酸及び酪酸はHPLCで、硫酸はイオンクロマトグラフで、PHBは佐藤ら⁹⁾の方法でそれぞれ行った。PHB含有率は以下の式により求めた。

$$\text{PHB含有率(mgC/mgC)} = \frac{\text{混合菌体中のPHB(mgC/L)}}{\text{混合菌体のバイオマス(mgC/L)}}$$

菌体数の計数は明視野顕微鏡観察(1000倍)により行い、以下に述べるように菌体数をバイオマス量に換算した。1サンプルあたり3枚の明視野顕微鏡写真を撮影し、写真1枚に写っていた細菌数を数え、平均を求めた。別に、バイオマスのTOC濃度がわかっているそれぞれの純菌についても同様の操作を行い、細菌1個あたりのTOCを以下のように求め、表2のような数値を得た。

$$\text{細菌1個あたりのTOC[mgC]} = \frac{\text{純菌懸濁液TOC[mgC/L]}}{\text{写真範囲内の細菌の個数} \div \text{写真範囲内液量(V) [L]}}$$

なお、顕微鏡の倍率が等しい場合、写真範囲内液量(V)も一定であると仮定した。

表2 サンプルの菌体数をバイオマス量に換算する際に用いた各純菌の純菌懸濁液TOC、写真範囲内の細菌の個数、細菌1個あたりのTOCおよび細菌1個あたりのTOCの比

	純菌懸濁液 TOC[mgC/L]	写真範囲内の 細菌の個数	細菌1個あたり のTOC[mgC]	細菌1個あたり のTOCの比
紅色非硫黄細菌	143.7	1665	0.086V	1
紅色硫黄細菌	15.4	37	0.41V	4.82
硫酸塩還元細菌	112.5	300.4	0.37V	4.34

この細菌1個あたりのTOCの比と実測細菌数と全体のバイオマスTOCから3種類の細菌のTOCがそれぞれ求められることになる。

3. 実験結果

3.1 紅色非硫黄細菌の増殖に対する硫化物の影響

図5に様々な硫化物濃度のもとで紅色非硫黄細菌 *Rhodobacter sphaeroides* を増殖させた実験によって得られた、初期硫化物濃度と比増殖速度の関係を示す。この実験では初期硫化物濃度 8mgS/L 以下では全てにおいて増殖が認められたが、逆に、初期硫化物濃度 20mgS/L 以上では増殖が認められなかった。増殖阻害に関与すると言われている遊離硫化物濃度は、中性

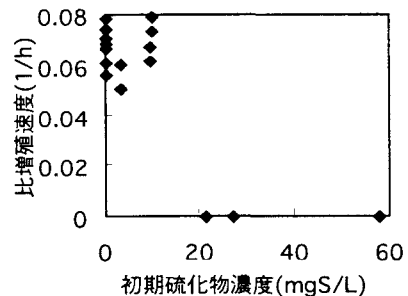


図5 初期硫化物濃度と紅色非硫黄細菌 *Rhodobacter sphaeroides* の比増殖速度の関係

付近においてはpHによって大きく変化する。pHの変化を基質である酢酸ナトリウムの消費量によって推定し、それから増殖開始時の遊離硫化水素濃度を計算した。図6に増殖を開始した時点での遊離硫化水素濃度と比増殖速度の関係を示す。紅色非硫黄細菌が増殖を始める遊離硫化水素濃度は、最高で約4 mgS/L程度であった。

3. 2 微生物共生系のバッチ実験

Run 1、Run 2 では硫化物の有無による増殖の影響を、有機炭素源に酢酸を用いた場合における比較を行った。Run 3、Run 4 では硫化物の有無による増殖の影響を有機炭素源に酢酸および酪酸を用いた場合について比較した。

図7、8に酢酸500 mgC/Lを有機炭素源とし、初期硫化物濃度0mgS/Lと63mgS/Lとした場合(Run 1、Run 2)の微生物種構成と硫化物濃度の経時変化を示す。硫化物を加えていないRun 1では紅色非硫黄細菌

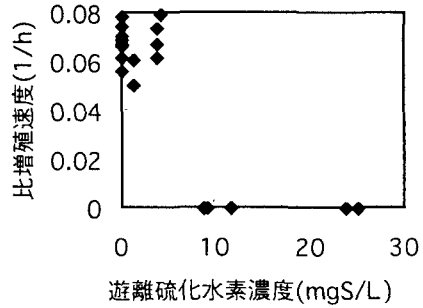


図6 増殖を開始した時点での遊離硫化水素濃度 (pHから求めた計算値) と比増殖速度の関係

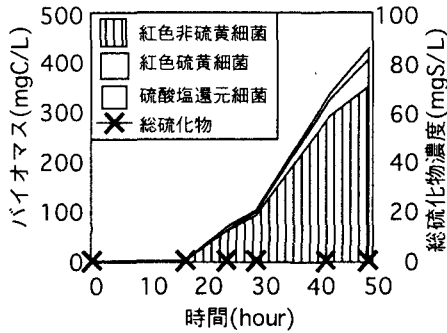


図7 微生物種構成と硫化物濃度の経時変化 (Run1:炭素源;酢酸、初期硫化物濃度0 mgS/L)

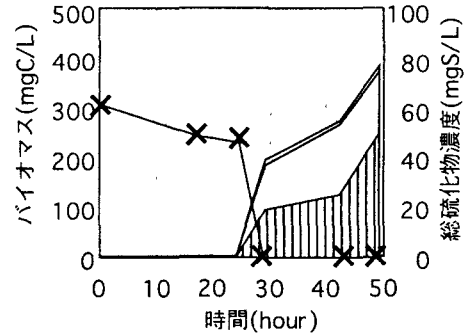


図8 微生物種構成と硫化物濃度の経時変化 (Run2:炭素源;酢酸、初期硫化物濃度63 mgS/L) (凡例は図7に同じ)

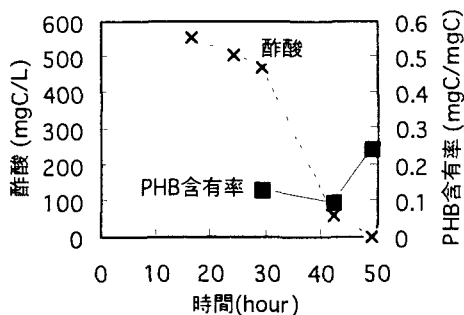


図9 酢酸とPHB含有率の経時変化 (Run1)

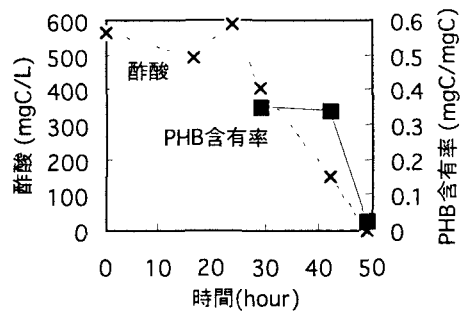


図10 酢酸とPHB含有率の経時変化 (Run2)

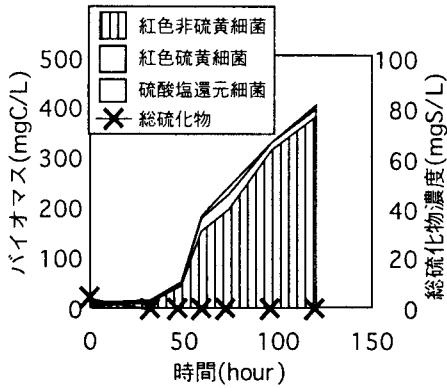


図11 微生物種構成と硫化物濃度の経時変化 (Run3:炭素源;酢酸と酪酸、初期硫化物濃度 0 mgS/L)

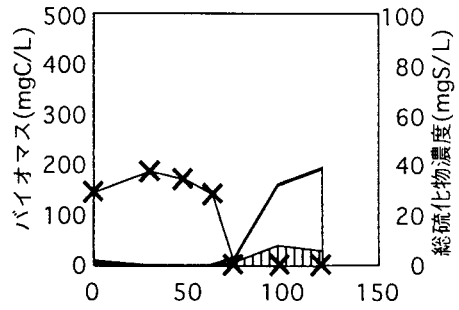


図12 微生物種構成と硫化物濃度の経時変化 (Run4:炭素源;酢酸と酪酸、初期硫化物濃度 26 mgS/L) (凡例は図11に同じ)

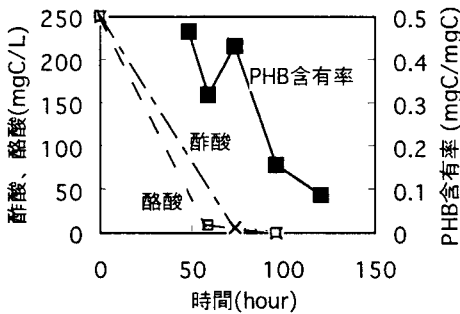


図13 酢酸及び酪酸とPHB含有率の経時変化 (Run3)

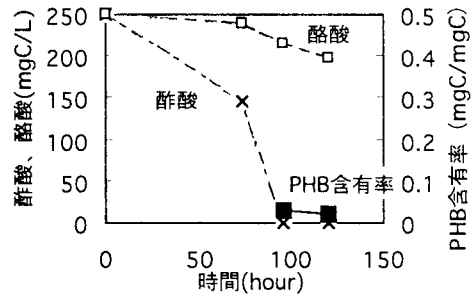


図14 酢酸及び酪酸とPHB含有率の経時変化 (Run4)

が優占した。Run 2について、硫化物濃度が高いとき (0~24時間)には、赤色非硫黄細菌、赤色硫黄細菌ともに増殖が認められず、硫化物濃度が0mgS/L付近まで低下してから増殖を開始した。また、どちらのRunにおいても硫酸塩還元細菌の増殖は観察されなかった。図9、10にこのときの残存有機炭素源 (酢酸) 濃度およびバイオマス中のPHB含有率の変化を示す。これらの細菌は対数増殖期にPHBを蓄積するので、その時期にあたる29時間、42時間後のPHB含有率について比較すると赤色硫黄細菌の増殖が認められたRun 2の方が高いという結果が得られたが、これはRun 1におけるPHB含有率が、通常得られると予想される数値 (40%程度) より低かったためで、その原因は明らかではない。

図11、12に酢酸および酪酸 250 mgC/Lずつを有機炭素源とし、初期硫化物濃度 0 mgS/Lと 26 mgS/Lとした場合 (Run 3、Run 4)の微生物種構成と硫化物濃度を示す。硫化物を加えていないRun 3では赤色非硫黄細菌が優占したのに対し、初期硫化物濃度26mgS/L (Run 4)では赤色硫黄細菌が優占した。Run 4においても、Run 2の場合と同様に硫化物濃度が高いとき (0~69時間)には、赤色非硫黄細菌、赤色硫黄細菌ともに増殖が認められず、硫化物濃度が0付近まで低下してから増殖を開始した。また、これらのRunでも、硫酸塩還元細菌の増殖は観察されなかった。図13、14に残存有機炭素源 (酢酸、酪酸) 濃度及びPHB含有率の

変化を示す。Run4ではPHBの蓄積はほとんど観察されなかった。このとき、酢酸のみが枯渇しており、酪酸は枯渇していなかった。

4. 考察

この紅色非硫黄細菌*Rb. sphaeroides*が増殖できる培地中の硫化物濃度の限界は、8~20 mgS/Lの範囲にあることが示された(図5)。Hansenら¹⁰⁾が、紅色非硫黄細菌*Rb. sphaeroides* SMG 158の増殖可能な総硫化物濃度を、連続実験において基本培地で0.4mM (12.8mgS/L)と報告しているが、この値は本実験で得られた値とほぼ一致している。この細菌に対する硫化物の影響を緩和するためには、遊離硫化水素濃度を下げる目的でpHを8以上に保つように制御する、あるいは硫化物を消費させるため、少量の硫黄細菌を投与するなどの対策が有効と考えられる。

紅色非硫黄細菌とともに紅色硫黄細菌を植種した微生物共生系では、Run 2より、初期硫化物濃度60 mgS/Lの基質中でも紅色非硫黄細菌が増殖可能であり、紅色非硫黄細菌に対する硫化物の阻害が緩和されたことが示された。これは、紅色硫黄細菌が硫化物を電子供与体として利用し、硫化物濃度を下げたためと推測される。しかし、条件によっては、硫化物の阻害を緩和したが、紅色硫黄細菌の方が優占種となる場合もあった(Run 4)。Run 4において紅色硫黄細菌が優占したのは、紅色非硫黄細菌が70時間ほど高濃度の硫化物と接触していたため増殖活性が低下しており、増殖の開始が紅色硫黄細菌よりも遅れたためと考えられる。Run 2、4において酢酸の減少量とバイオマスの増加量から、紅色硫黄細菌が酢酸を炭素源として従属栄養的に増殖したことが示唆された。紅色非硫黄細菌の増殖活性が低下している場合に、紅色硫黄細菌に先に有機炭素源を利用されてしまうと紅色非硫黄細菌にとって不利な状況となる。今後は、紅色非硫黄細菌と有機物の競合を起こさないと考えられる光合成独立栄養の綠色硫黄細菌を系内に植種した場合も検討する必要がある。

今回の実験で紅色硫黄細菌の増殖が認められたRunのPHB含有率は最大でも35%であり、この数値は資源回収を考慮すると低いものである。用いた紅色硫黄細菌 *Ch. vinosum* も条件次第では50%程度のPHB含有率を示すことが報告されており¹¹⁾ 今後、質に関する最適条件の検討が必要である。Run 4では、PHB含有率が低かったが、この原因としてはまず、紅色硫黄細菌のPHB蓄積のための条件が悪かったと考えられる。あるいはこの時(96時間後)酢酸が枯渇している(図14)ことを考慮すると、この時点までに紅色硫黄細菌が蓄積したPHBが消費されたため、という可能性もある。また、このRunでは酢酸のみが枯渇しており、酪酸は枯渇していなかったことから、まだ紅色非硫黄細菌が炭素源を使い切っておらず、紅色非硫黄細菌の増殖はこれから起こり、それに伴って有機物の質の変動が起こるとすることも考えられる。また、紅色硫黄細菌が増殖したRunでは菌体内への元素状硫黄の蓄積が顕微鏡観察により認められた。硫黄分の高い混合菌体となっていることが、回収時に不純物となる可能性がある一方で、土壌改良材などに適している可能性もある。

硫酸塩還元細菌*D. baarsii*の増殖はどのRunにおいても観察されなかった。その理由として、用いた純菌の増殖活性が弱かったことが推測される。今回は硫黄細菌による硫化物増殖阻害緩和が主たる目的であるので、硫酸塩還元細菌の増殖が認められなかったことに問題はない。しかし、より現実的に、硫酸塩還元細菌の混入により光合成細菌槽内部での硫化物生産を考慮しなければならない場合には、硫黄細菌との硫化物、硫酸のやりとり、紅色非硫黄細菌との有機物の競合などが大きな影響を与えたと考えられる。このような点では実際の処理系に存在すると考えられる硫酸塩還元細菌の種や株を用いるべきであったといえる。

5. 結論

- 1) 硫化物濃度と紅色非硫黄細菌 *Rhodobacter sphaeroides* の比増殖速度との関係を調べ、この細菌が増殖できる培地中の硫化物濃度の限界は、8~20 mgS/L の範囲（遊離硫化水素濃度では4~9 mgS/Lの範囲）にあることが分かった。
- 2) 硫化物による増殖阻害を緩和するために紅色硫黄細菌 *Chromatium vinosum* を添加したところ、その影響が緩和され、初期硫化物濃度 60 mgS/L の基質中でも紅色非硫黄細菌が増殖可能であった。

6. 参考文献

- 1) 中島典之, 山本和夫: 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, 土木学会論文集, VII-5, No.580, pp 9-17, 1997
- 2) 下水の嫌気性処理に関する調査, 建設省都市局下水道部, (社) 土木学会, 1989
- 3) Nakajima F. and Yamamoto K.: Polyhydroxyalkanoate and protein formation from wastewater by purple bacteria, the Proceedings of 6th IAWQ Asian Regional Conference on Water Quality and Pollution Control, Vol.I, pp 830-837, 1997
- 4) 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
- 5) 小林達治: 光合成細菌の基礎と応用 2 (応用編), 日本土壤肥料学会誌, 第46巻, 第4号, 1975
- 6) Nakajima F., Kamiko N. and Yamamoto K.: Organic Wastewater Treatment without Green-house Gas Emission by Photosynthetic Bacteria, *Water Science & Technology*, Vol.35, No 8, pp 285-291, 1997
- 7) 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
- 8) 中島典之, 山本和夫: 紅色非硫黄細菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) を用いた廃水再資源化における曝気と菌体組成の関係について, 第31回日本水環境学会年会講演集, pp.229, 1997
- 9) 佐藤弘泰, 味埜 俊, 松尾友矩: 18. PHA の測定とその意味, (土木学会衛生工学委員会編「環境微生物工学研究法」), 技報堂出版, pp. 71-74, 1993
- 10) Hansen T. A. and Gernerden H.: Sulfide utilization by purple nonsulfur bacteria, *Arch. Mikrobiol.* Vol.86, pp 49-56, 1972
- 11) Liebergesell M., Hustede E., Timm A., Steinbuchel A., Fuller R. C., Lenz R. W. and Schlegel H. G: Formation of poly(3-hydroxyalkanoates) by phototrophic and chemolithotrophic bacteria. *Arch Microbiol*, Vol.155(5), pp 415-421, 1991