

都市環境整備研究報告 8 - (2)

藻類および光合成細菌による
有機性廃水の処理ならびに資
源化に関する基礎的研究

北 村 博

東京都立大学
都市研究委員会
1971・3

目 次

はじめに	1
I <i>Chlorella pyrenoidosa</i> の代謝産物について	5
II <i>Rhodopseudomonas capsulatus</i> の代謝産物	11
III 各種光合成細菌の生育度の比較	20
文 献	25

はじめに

現在、都市下水や各種有機性産業廃水の微生物による処理法として、活性汚泥法が最も効果的な方法として広く普及している。これは同法が、微生物群の混合培養という自然界の特色を生かし、複雑な廃水の変化に対し、強い適応力を示すすぐれた処理法であるからである。

しかしながらこの方法も必ずしも最善の処理法とは云えず、次のような欠点もっている。

- (1) この方法によって生ずる膨大な余剰汚泥の処分、現在は海洋投棄、焼却などを行って、多大の費用をこれにかけている。
- (2) 窒素、燐その他の無機塩類や、ある種のCOD源物質に対して、あまり除去効果がよくない。
- (3) この方法はBOD数百ppmという、比較的低濃度の廃水の処理に適した方法である。従って高濃度の廃水を同法で処理する場合には、数十倍に希釈しなければならないので、それだけ処理容量が増加する。

以上の理由から、この方法の改善のためには、活性汚泥法に関する微生物学、生化学的諸問題について解決を要することは論を待たないが、資源の乏しいわが国の場合には、尙次のような方法を考慮する必要があるのではないだろうか。即ち、

- (1) 活性汚泥法によって生じた余剰汚泥の有効利用法
- (2) 廃水処理と同時に、家畜の飼料、魚類の餌料に役立つ微生物菌体の収穫を目的とした処理法

従来著者は、クロレラによるし尿処理に関する研究を行って、廃水を藻類によって浄化すると同時に、藻体を収穫するという方法を開発してきたが、近年小林⁽¹⁾らが微生物によるし尿処理について系統的な考察を行った結果、汚水の汚染程度により、段階的に増殖する微生物群が異り、腐水度の高い段階では有機栄養微生物群が増殖し、次いで光合成細菌が増殖し、腐水度が低くなった状態では緑藻類が増殖するという事実を見出した。これらの結果から、夫々の段階で最もよく増

殖し、且利用度の高いある菌株を選択して、し尿中で培養すれば、汚水の高速度浄化と同時に有用な副産物獲得の可能なし尿処理を行うことができることを知った。

現在この原理を適用して、桐生市で光合成細菌の一種 Rhodospseudomonas capsulatus とクロレラを用いたし尿処理法⁽²⁾⁽³⁾⁽²⁾を行っている。この方法は、まず BOD 1 万 ppm 以上のし尿性廃液を希釈せずに、曝気槽に入れて通気し、有機栄養細菌を繁殖させて、ある程度 BOD を下げてから、光合成細菌を嫌気、明条件下で培養し、次いでクロレラ処理により、約 1 週間の処理時間を経て、BOD が約 30 ~ 50 ppm 程度まで浄化させることに成功している。この際同時に収穫した光合成細菌、クロレラは副産物として有効な用途に向けられている。現在し尿 1 l 当り、光合成細菌約 5 ~ 7 g、クロレラ約 2 ~ 3 g (いずれも未乾燥状態) の収量がある。因みに桐生市で培養している光合成細菌 (Rhodospseudomonas capsulatus)⁽³⁾ ならびにクロレラの成分は次の第 1 表の如くである。参考のために、米、大豆の分析値も表示した。

第 1 表 光合成細菌体、クロレラその他の一般成分組成

試料	粗タン白質 %	粗脂肪 %	可溶性糖類 %	粗繊維 %	灰分 %
光合成細菌	57.95	7.91	20.83	2.92	4.40
クロレラ	53.76	6.31	19.28	10.33	1.52
米	7.48	0.94	90.60	0.35	0.72
大豆	38.99	19.33	30.93	5.11	5.68

第 2 表 光合成細菌、クロレラ、酵母中のメチオニン含量
(g/100g 乾燥重)

	光合成細菌	クロレラ	酵母
メチオニン	1.58	0.27	0.51

尙この光合成細菌は各種のビタミンB群をかなり多量に含んでいるので、その含有量を酵母と比較して第3表⁽²⁾に示した。

第3表 ビタミンB群の含量

B-group	R. capsultus (r/g)	Brewers yeast (r/g)
B ₁	12	50~ 360
B ₂	50	36~ 42
B ₆	5	25~ 100
B ₁₂	21	—
Nicotinic acid	1.25	310~1000
Pantothenic acid	30	100
Folic acid	60	3
Biotin	65	—

これらの表からわかるように、光合成細菌は蛋白含量としてクロレラに劣らずに含まれていること、しかも蛋白質のアミノ酸組成の特徴はクロレラ、酵母に比較してメチオニン含量が多いことがわかったので、この蛋白質の利用方法を検討することは、わが国における農産資源の活用法として意義あるものと思われる。又ビタミンB₁₂の含量が極めて高いこと、動物に対して全く毒性がないことから、飼料、餌料への添加物としてすぐれた供給源であることがわかる。

以上光合成細菌、クロレラ利用による廃水処理の概要を述べたが、この研究は未だその緒についたばかりで、これが実際化にあたっては、これらの微生物の生理学的、生化学的な面で、数々の基礎的な問題の解決をはからねばならない。従って著者は次に述べるいくつかのテーマについて、星野八州雄、森田晃、相崎守弘、船川和夫らの協力をえて昭和44、45年度における特定研究費の援助のもとに研究を行ってきた。

これらの研究のうち一部は次に示す昭和44, 45年度日本農芸化学大会にて発表した。

1. 北村 博, 星野八州雄: Chlorella pyrenoidosa の代謝産物について; 日本農芸化学会講演要旨集, 44, 196 (1969)
2. 北村 博, 相崎守弘, 船川和夫: 光合成細菌 Rhodospseudomonas capsulatus の低級脂肪酸の除去機構; 日本農芸化学会講演要旨集, 45, 83 (1970)

I Chlorella pyrenoidosaの代謝産物について

クロレラは有機培地において、他養的な増殖を行い、し尿性廃液のような有機物を含む培地で培養した場合に、良好な生育をすることが知られ、この原理を利用して廃液中の有機汚染物質を除去すると同時に、クロレラを収穫しようとする云々は、一石二鳥の利点を考えた幾多の研究が行われてきた。⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾

このように廃液中の有機物が分解し、同化されるのは、し尿のような廃液中には腸内細菌群を含めた幾多の微生物群が混在するために、それらの共同作業の結果、汚水が浄化されるのであろうと推定されてきた。

しかしながらこのようら廃水でクロレラを培養した場合に、クロレラの汚水浄化に果たす役割は期待したほど大きいものでなく、クロレラ以外の他の微生物群による浄化作用の方がより大きいものであることがわかり、汚水の浄化は両者の共同作業によって最も顕著に現われることが明確となった。⁽⁷⁾

一般に藻類と他の微生物群との共同作業による汚水の浄化機構はGottas⁽⁸⁾らの酸化池、安定池において行った実験結果から指摘されるように、藻類の同化作用で発生する酸素が水にとけて、好気性菌の働きを助け、好気性菌の働きで有機物が酸化分解されて、汚泥として沈殿する一方、炭酸ガス、アンモニアが藻類に利用されて汚水が浄化されていくと云われているが、著者は汚水浄化のメカニズムを考えると、たんにGottasらの云うような、酸素、炭酸ガス、アンモニアなどのガス交換による、夫々の微生物群の共生による繁殖の促進効果によって、汚水が浄化されていくという、簡単なものではなく、中村が⁽⁹⁾指摘しているように、これらの微生物群の生育に対して、相互に何らかの影響を及ぼしあっているような、他の因子が存在するものと考えて、この研究を開始した。

著者はクロレラを無機培地で無菌的に培養した所、第1図に示したように、培養液中にCOD値を高めるような物質が排出され、次第にその値を高めていく傾向を見出した。これはクロレラが培養液中に何らかの有機物を排出し、いわば培養液を有機物で汚染している結果となっている。

そこで、著者はクロレラが培養中に液中に排出するCOD値を高める代謝産物(extracellular products)の中に、何か微生物の生育に影響を及ぼすもの(例えばある発育因子など)が存在するのではないかと考え、クロレラを第4表に示すような無機培地に培養し、菌体外に代謝排出する有機物をイオン交換樹脂を用いたクロマトグラフィーによって、系統的に分離し、各成分についてその性質を明らかにするとともに、他の微生物の生育に及ぼす影響を検討した。

実験方法

菌株はChlorella pyrenoidosa C-28 (Bacteria free 東大応微研供与)を用い、Modified Bristol培地(第4表)1500mlをカブ型フラスコ(2000ml容)にいれ、人工光線下(5000lux)、23~25°Cで、約50日間静置培養した。その間1日1回手で振盪して培養液を攪拌した。時々雑菌の混入の有無をテストした。

第4表 Modified Bristol 培地

KN ₃	0.25 g	蒸 溜 水	1.0 l
CaCl ₂ · 6H ₂ O	0.01 g	A ₅ sol	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.075 g	H ₃ BO ₃	2.9 g
K ₂ HPO ₄	0.075 g	MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.81 g
KH ₂ PO ₄	0.175 g	ZnCl ₂	0.11 g
NaCl	0.025 g	CuSO ₄	0.08 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.02 g	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.018 g
A ₅ sol	1.0 ml	蒸 溜 水	1.0 l

培養濾液のCOD値(過マンガン酸カリを用いたアルカリ高温法)が40~50mg/lに達した頃、培養を中止した。藻体をミリポア・フィルター(HA 0.45 μ)で濾別し、濾液を第2図で示したイオン交換樹脂によるクロマトグ

ラフィーで酸性、中性、塩基性、アミノ酸の各成分区に分別した。

まず酸性成分区については、有機酸のペーパークロマトグラフィーによって分離確認を行い、中性成分区については、還元糖、ケト糖のすぐれた検出法として用いられている次に示す下降法によるペーパークロマトグラフィーにより、中性成分区そのもの並びに希硫酸による加水分解生成物について、糖の検出を試みた。

糖検出のペーパークロマトグラフィー（下降法）

展開剤；酢酸：プロピルアルコール：水＝1：6：3

発色試薬；(1)還元糖 1.23% p-anisidine

1.66% phthalic acid

を96%エタノールにとかす。

(2)ケト糖 0.5% resorcin を含む

5% trichloroacetic acid

還元糖、ケト糖は夫々発色試薬を噴霧後、100℃で乾燥すると、褐色、赤褐色を呈する。

アミノ酸区についてはBender-Hobein 製アミノ酸分析計を用いて分析した。次に、クロレラ培養液中の代謝産物のうち、酸性成分区、中性成分区について、Bacillus subtilisの生育に及ぼす影響を検討するために次の実験方法を用いた。即ち、クロレラ培養濾液からえた中性、酸性成分区分及び濾液そのものを、1ml づつL字管(20ml 容)に入れ、第5表に示す培地を加え、総量を10ml とする。本培地を滅菌後、B. subtilisの菌体懸濁液1ml を無菌的に各々のL字管に加え、30℃のモノ式振盪培養装置で培養した。

尚、使用菌株は第5表に示した液体培地に30℃、24時間前培養した菌体懸濁液を用いた。培養中の菌体増殖は比色(660mμ)によって継時的に測定した。

第5表 基礎培地

NH ₄ Cl	1	g	
K ₂ HPO ₄	1	g	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	g	※
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	g	glucose 0.3 %
CaCl ₂	0.1	g	pH 7.2
蒸溜水	1	l	

※ glucose はL字管中の培養液総量が10 ml になった時0.3 %になるように夫々のサンプルごとに調製した。

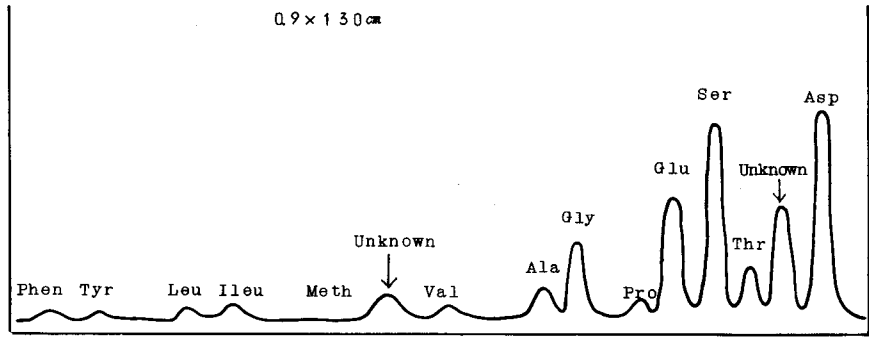
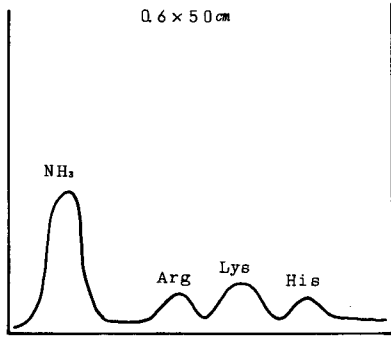
結果

Chlorella pyrenoidosaは50日間、静置培養後第1図でわかるように、細胞数は $2 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 、濾液のCOD値は全体として40～45 mg/lで、酸性、中性、塩基性、アミノ酸の各成分区は夫々、1, 3, 1, 2, 5, 10 mg/lの値を示した。酸性成分区については、有機酸のペーパークロマトグラフィーにより検討した結果、揮発性低級脂肪酸は検出されず、不揮発酸として、リンゴ酸、コハク酸、乳酸のスポットとその他にRf値の低い部分に未確認の酸のスポット2個を認めた。中性成分区について糖類のペーパークロマトグラフィー（下降法）によって検討した結果、単糖類を確認できず、又希硫酸によって加水分解した分解成績物についても、同様な方法で糖類を確認することができなかつた。⁽¹⁰⁾ Merz らの報告によれば、多糖類加水分解成績物として、ガラクトース、フコースその他未確認の糖のスポットを検出している。

アミノ酸区については、アミノ酸分析計を用いた結果を第3図に示す。アスパラギン酸、スレオニン、セリン、グルタミン酸、プロリン、グリシン、アラニン、バリン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、チロシン、フェニルアラニン、ヒスチジン、リジン、アルギニンを分離確認した。参考までにクロレ

IRC-50

Amberlite CG-120 Type III

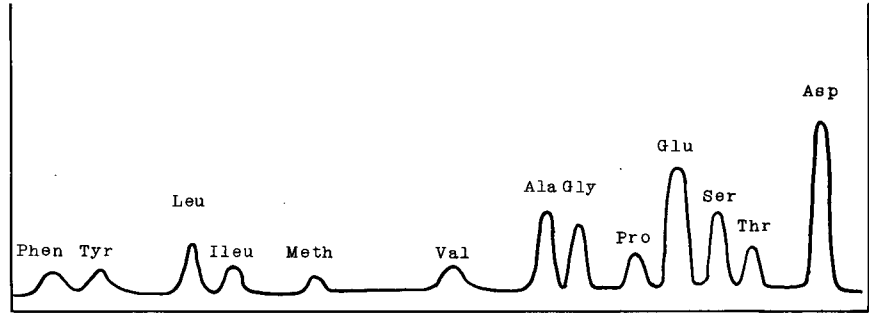
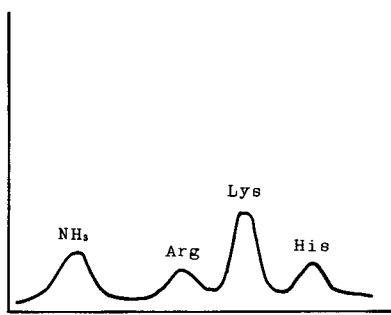


pH 7.0 Buffer

pH 5.1 Buffer

pH 3.1 Buffer

第3図 クロレラの培養液中のアミノ酸



pH 7.0 Buffer

pH 5.1 Buffer

pH 3.1

第4図 クロレラの加水分解物中のアミノ酸

30ml/hr
Filter 578 μ
436 μ

ラを加水分解したものについてアミノ酸を分析した結果を第4図に示す。

次にクロレラ培養液中の代謝産物のうち、中性成分区、酸性成分区が B. subtilis の生育に及ぼす影響を検討した結果を第5図に示す。

この図からわかるように、中性区分の添加は B. subtilis の生育に大きな影響を及ぼす。又酸性区分、培養濾液そのものも、それらの添加によって B. subtilis の生育を促進するようである。しかしこれらの成分を炭素源として、単独に用いた場合には、B. subtilis が生育できないから、これらの成分はこの細菌に対して炭素源となるような成分ではない。又中性成分については、第6図で示すようにその濃度を変えて、B. subtilis の生育に及ぼす影響をしらべた結果、濃度を高めるに従って生育が良好となる。培養後50時間の最終菌体収量を測定した結果、中性成分添加区では対照(第5表の基礎培地として)と比較して、Packed Volume (3000 rpm, 10分)で5倍強の増量を示した例もあった。

これと同じような実験を Escherichia coli について行ったが、ほぼ同様な生育促進作用を認めた。このような中性成分、酸性成分の B. subtilis, E. coli の生育に及ぼす生理作用については、いかなる機作に基づくものなるか、現在検討中であるが、yeast extract などと異った生理作用があることが、その生長曲線から明らかにされた。

考 察

すでに Pratt⁽¹⁾ は Chlorella vulgaris, pyrenoidosa を無機培地で培養して、antibacterial substance として chlorellin と名づけた物質の存在を認め、グラム陽性、陰性の細菌、Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis. に対して抗菌力があると述べている。又 1966 Vela⁽²⁾ の報告でも Chlorella pyrenoidosa Tx 71105 の培養液で種々の病原細菌の生育に及ぼす影響について検討し、Shigella flexneri, Proteus vulgaris は軽度に Strept-

ococcus pyogenes, Staphylococcus aureus, Corynebacterium diphtheriaeは比較的強く発育を阻止されたと述べている。

しかるに、代田、武智らは⁽¹³⁾1960年クロレラの菌体の希塩酸抽出液中に乳酸菌の発育を促進する物質が含まれていることを発見している。著者がクロレラ培養液中から抽出した中性成分はクロレラの正常な代謝産物であるのか、或はautolysisの結果菌体外に排出されたものであるのか、現在の所未だはつきりわからないが、B. subtilis, E. coliの生育に対して、炭素源として用いられる有機成分ではなく、微量で生育を促進するのに有効なはたらきを示すある生育因子が、これらの成分中に含まれているのではないかと考えている。又現在までの研究では、クロレラの生育が定常期になった時に、これらの微生物群の生育促進に有効にはたらく物質が排出されるのではないかと推定している。これに対し、Pratt, Velaらの報告した生育抑制物質はクロレラの生長の対数期に排出され、他の微生物群の発育を抑えているのではないかと考え、現在これらの点について検討中である。このように自然界では、各微生物群は相互に或は共生的に、或は抗生的に作用しあい、夫々の微生物の発育に適応する環境を自らつくり出す性質をそなえているようである。汚水中の有機物の分解に際しても、この実験で明らかにされたように、夫々の代謝産物が他の微生物の代謝活性に、ひいては汚水の浄化作用に影響を与えているものと考えらる。

II Rhodospseudomonas capsulatusの代謝産物

光合成細菌の一菌株であるR. capsulatusは他の光合成細菌と同様に、自然界に広く分布し、河川、湖沼、下水処理場など湛水状態の所には、かなり濃密に存在しており、他の微生物群との共存において、より有効に窒素固定、水界における有機物分解など、自然界における物質循環に大きな役割を果している。⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾他方この光合成細菌は生育中にアミノ酸、核酸その他生理活性物質を菌体外に若干排出しているのではないかと⁽²⁾の報告がある。著者はこれらの代謝

産物の一部の性質を明らかにすると共に、これが他の微生物の生育に如何なる影響を及ぼすかを検討するため、この研究を行った。

方 法

供試菌株は京大農学部農芸化学教室より分与をうけた、Rhodospseudomonas capsulatus (以下紅菌という) を Burri 氏管法により、再度純粋分離したものをを用いた。

培養は三角コルベン (2 l 容) に第 6 表に示す組成の培養液を一杯に入れ、上層を流動パラフィンでシールして嫌気状態に保った。

第 6 表 紅菌の培地組成⁽¹⁹⁾ (M-H 培地と名づける)

1. Potassium phosphate	pH 7.0	1	M/l
2. Sodium propionate	pH 7.0	1.5	M/l
3. 基礎培地			
Nitritotriacetic acid		10.0	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O		14.45	g
CaCl ₂ ·2H ₂ O		3.335	g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O		9.25	mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O		99.0	mg
Nicotinic acid		50.0	mg
Thiamine·HCl		25.0	mg
Biotin		0.5	mg
Metall "44"		50	ml
蒸 溜 水		1	l

このうち Nitritotriacetic acid は KOH で中和して用いる、全体として pH 6.6 ~ 6.8 とする。

Metall " 44 "

EDTA	250 mg	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1005.0 mg	(250mg Zn)
FeSO ₄ ·7H ₂ O	500.0 mg	(100" Fe)
MnSO ₄ ·2H ₂ O	154.0 mg	(50" Mn)
CuSO ₄ ·5H ₂ O	39.2 mg	(10" Cu)
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	24.8 mg	(5" Co)
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	17.7 mg	(2" B)

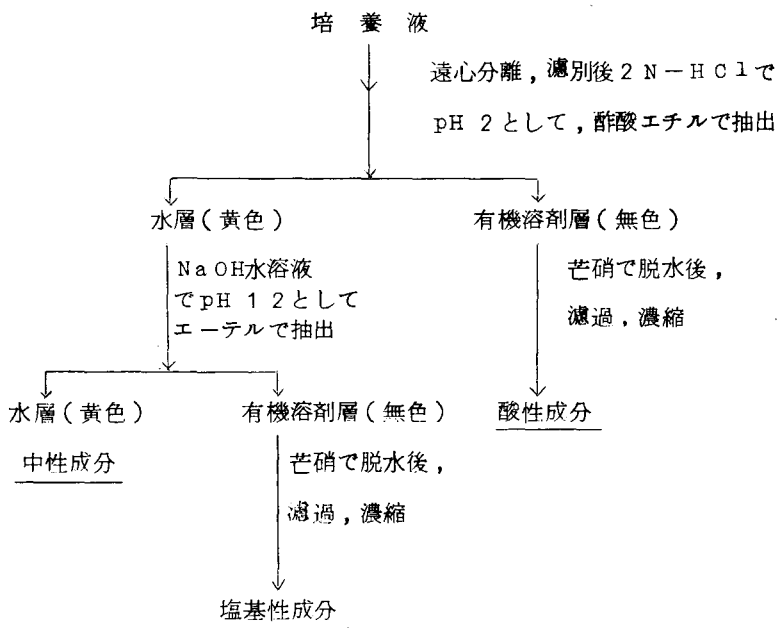
これに数滴の希硫酸を加えて沈澱をおこさせないようにする。

紅菌の培養液は蒸留水に1, 2, 3の液を夫々20mlずつ加えて1ℓとし、その後硫酸アンモニア0.3gとcasamino acid 1.0gを加えてつくる。

前培養でえた菌体懸濁液(10~30ml)を加えて、人工照明下(約5000 lux), 26~27℃, 2週間培養を行った。培養終了後、菌体を速心分離し、(10,000rpm, 15分)更にミリポアフィルター(HA0.45μ)で濾別し、濾液を第7図の方法に従って溶媒抽出法で、酸性、中性、塩基性の各成分に分離した。酸性成分は有機酸のペーパークロマトグラフィーにより、塩基性成分は紫外外部吸収スペクトルによりその成分の性質を検討した。

次に、紅菌の培養濾液が他の微生物(B. subtilis, E. coli.)の生育に及ぼす影響をしらべる目的で、前項I Chlorella pyrenoidosaの代謝産物に関する研究のところで行ったと同じ方法でL字管に培養濾液、酸性成分、塩基性成分の1000倍溶液1mlをIに示した基礎培地(0.3%グルコースを含む)9mlに加えて10mlとなし、モノ式振盪培養装置(振盪回数毎分90回)30℃で30時間培養した。

B. subtilis, E. coliの生育は比色(660mμ)によって測定した。



第7図 紅菌濾液の溶媒抽出

又クロレラの生育に及ぼす影響を検討するため，クロレラの生育の基礎培地として，田宮培地を用いた。その組成を第7表に示す。

第7表 田宮培地

KNO_3	5.0	g
KH_2PO_4	1.25	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.5	g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.003	g
$\text{A}_5 \text{ sol}$	1	ml

$\text{A}_5 \text{ sol}$ は I で示した Modified Bristol 培地と同じである。

B. subtilis, E. coli の培養のときと同じく、L字管に田宮培地を9 ml いれ、これに酸性、塩基性成分を夫々、紅菌培養時の原濃度、1/10, 1/100 濃度となるように加え、全体を10 ml とし、オートクレーブで滅菌し、供試培地とした。更にこの培地に前培養したクロレラ懸濁液(10日間、田宮培地人工光線 5000 lux の下で静置培養したもの)を1 ml ずつ加えて、25℃、人工照明下(5000 lux)、モノ式振盪培養装置(振盪回数毎分60回)で培養した。クロレラの生育は660 mμの比色によって、継時的に測定した。

結果及び考察

2週間培養した紅菌培養液を遠心分離(10,000 rpm, 15分)し、更にミリポアフィルターで濾別して、えた濾液は僅かに淡黄色を帯びている。有機溶剤抽出法によってえた酸性物質(165.7 mg/l)、塩基性物質(92 mg/l)はともに油状物質で、結晶としてうるることができなかった。酸性成分は常法に従って、ペーパークロマトグラフィーにより有機酸を検索した。その結果は次の通りである。

第8表 紅菌濾液中の不揮発酸

	展 開 溶 剤		
	BuA*	BuP**	EtAm***
コハク酸	82	50	25
フマル酸	83	36	30
紅菌濾液	80	50	22
紅菌濾液	82	35	30

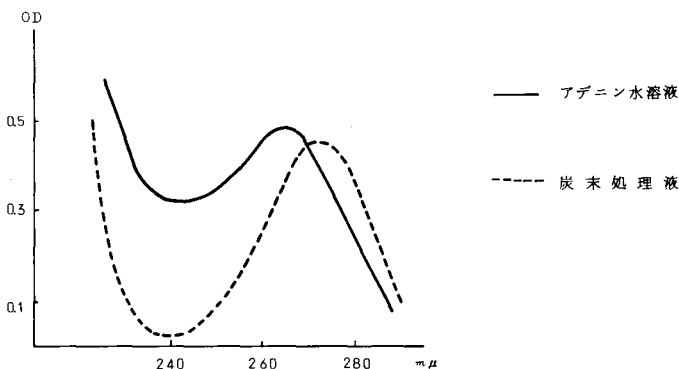
* ブタノール：酢酸：水=120：30：50

** ブタノール：ピリジン：水=65：65：65

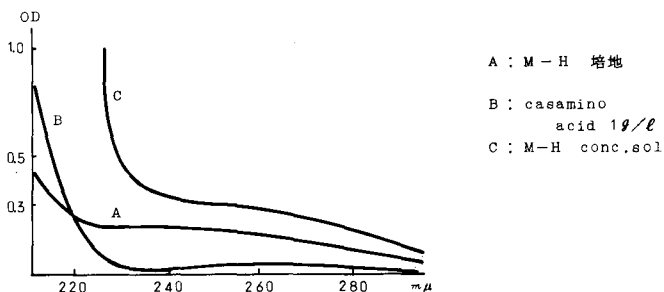
*** エタノール：アンモニア：水=160：10：30

発色剤 アニリン-キシロース溶液⁽²⁰⁾

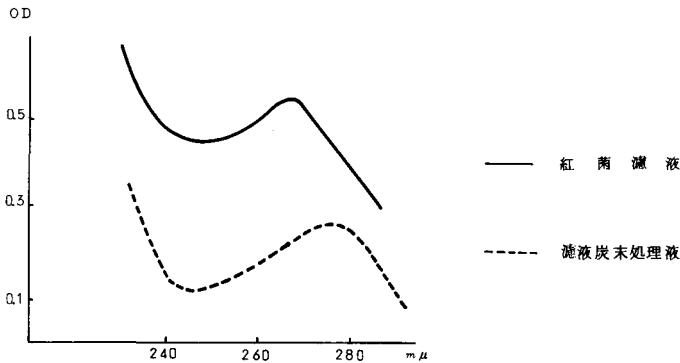
この結果から、酸性成分の不揮発酸はコハク酸、フマル酸と確認された。又揮発酸としては培地として用いた残存プロピオン酸以外の低級脂肪酸の存在は確認できなかった。培養濾液中の塩基性成分の検討には次の考慮が払われた。即ち培地として用いたM-H培地は、紫外部吸収を含まない培地である。(第8図)、従って培養濾液の紫外部吸収スペクトル(260m μ 附近)を測定することによって、濾液中に核酸関連物質が存在するか否かを検討するのに都合がよかった。紅菌濾液について紫外部吸収スペクトルを測定した結果、第9図の結果をえた。この図からわかるように培養濾液から酸性成分を除いた。中、塩基性成分を含む濾液の吸収は261m μ 、243m μ に極大、極小のある特異吸収を示す。これはアデニン水溶液の吸収スペクトルに酷似している。(第10図)



第10図 アデニン水溶液の紫外部吸収スペクトル



第8図 各種培地の紫外部吸収スペクトル



第11図 紅菌濾液炭末処理液の紫外外部吸収スペクトル

次に紅菌濾液を活性炭で吸着処理を行い、1.4%アンモニア性エタノールで溶出した溶液の紫外外部吸収スペクトルを第11図に示す。この結果はアデニン水溶液を炭末処理後、アンモニア性エタノール溶出によってえた溶液の紫外外部吸収の挙動（吸収極大が長波長にシフトする）と全く一致する。従って紅菌濾液中に存在する核酸関連物質は主としてアデニンを塩基とするヌクレオチドではないかと考えられる。次に紅菌培養液について、核酸中のデオキシペントースに対する特異的な反応である Disches reaction を試みた。その結果は、濾液は青色を呈し、培地そのものは呈色もしないので、これは紅菌の培養濾液には核酸関連物質が排出されていることを更に支持するものであると思われる。この反応は、被検液に2倍容のジフェニルアミン試薬（精製ジフェニルアミン1gを100mlの水酢酸にとかし、これに濃硫酸を2.75ml加える）を加え、100℃で10分加熱する。対照として蒸留水に試薬を加えて同じ処理を行う。50~100rのDNAで青色（595mμ）に呈色する鋭敏な反応である。この呈色反応は安定で、その特異性はかなり作用範囲が狭く、他の糖類のうち同じ波長に吸収をもつものは少ない。発色するのはプリンデオキリボヌクレオチドでピリミジン系は発色しない。

さて次に紅菌培養濾液が他の微生物 B. subtilis, E. coli の生育に及ぼす影響を検討した結果は、Iの項で報告したような、クロレラの代謝産物のごとく、上記の細菌の生育に促進的に影響を及ぼす結果はえられず、対照と

殆んど同じ程度の生育度を示した。

第9表 紅菌培養濾液のクロレラの生育に及ぼす
影響*

	植付時	1	2	3	4	5	7	8日
M-H培地のみ	0.072	0.067	0.073	0.068	0.070	0.045	0.056	0.059
	0.64	0.67	0.73	0.74	0.92	0.90	0.72	0.67
田宮培地のみ	0.74	0.64	1.50	3.07	5.79	7.20	9.10	9.50
	0.73	0.72	1.95	2.68	5.80	7.50	8.95	9.50
紅菌濾液のみ	1.43	1.76	1.90	1.98	2.05	2.10	2.10	
	1.44	1.78	2.14	2.15	2.22	2.20	2.25	
田宮培地+酸性成分 培養液と 同濃度	1.30	1.29	1.42	1.41	1.42	0.94	0.75	
	0.90	1.04	1.12	0.95	1.18	1.41	0.75	
" 1/10濃度	0.72	0.73	0.92	0.95	1.22	2.83	5.80	6.90
	0.82	0.65	0.92	1.35	2.56	3.73	5.10	5.90
" 1/100濃度	0.80	0.65	1.50	2.90	4.77	6.58	8.10	8.60
	0.70	0.67	1.45	3.00	4.85	6.90	8.30	8.80
田宮培地+塩基性成分 培養液と 同濃度	1.06	1.17	1.08	1.04	1.24	2.36	2.90	
	0.73	1.39	1.30	1.15	1.36	2.50	3.06	
" 1/10濃度	1.00	0.75	1.48	2.78	5.04	6.90	8.70	9.00
	1.23	1.16	1.48	2.73	5.02	6.60	8.50	9.00
" 1/100濃度	0.78	0.79	1.39	2.78	5.47	7.00	8.85	9.40
	0.54	0.78	1.53	2.99	5.45	7.19	9.20	9.60

* 数値は660mμの吸光度

又紅菌の培養濾液がクロレラの生育に及ぼす影響についての結果は第9表に示す。

この表からわかるように、紅菌濾液だけでクロレラを培養したものは、田宮培地のように急速に生育することはないが、僅かに生育することが認められる。しかし田宮培地に酸性成分を添加して培養濾液と同じ濃度にした培地では、紅菌濾液のみの場合にくらべて生育が抑制される傾向を示す。これは培養濾液中に残存するプロピオン酸のために、クロレラの生育が抑えられるのではないかと考えられる。このことは次の実験によって明らかにされた。

即ち、Modified Bristol培地を基礎培地にして、これにプロピオン酸を加えて夫々0.3, 0.15, 0.03, 0.003, 0.00003%濃度の培養液として、クロレラをL字管で振盪培養した所、第12図に示す結果を得た。

この結果からわかるように、プロピオン酸の濃度が希薄なときには、クロレラの生育に炭素源として利用されるが、濃度が濃い場合即ち0.03%以上含まれるとクロレラの生育が抑制される。第9表に示した紅菌濾液の酸性成分を培養液と同濃度にした場合には、残存するプロピオン酸のためにクロレラの生育が抑えられたとみなすことができる。(培養濾液中に残存するプロピオン酸の濃度は0.1%であった)、塩基性成分を添加した場合には酸性成分を加えた場合にくらべて、クロレラの生育に抑制的にはたらくよりも、促進的に作用するようである。たゞこの実験では希釈濃度が最低1/100のように比較的濃い状態なので、その影響ははっきりわからない。一般に生理活性物質は、その濃度が比較的濃い場合にはむしろ生育に対し阻害的にはたらく、うすい場合に希釈の度合に比例して、促進的にはたらく場合が多いと云われている。前述のように紅菌濾液中には、塩基性成分として核酸関連物質の存在を示唆したが、このような物質は生物の生長に欠くことができないものなので、このような核酸関連物質の微量の存在が、クロレラの生長促進に役立つものと考えられる。従って尿管中で紅菌を培養した場合、尿管中のプロピオン酸が消費されてその濃度がクロレラの生育に適するようになると、紅菌が生育中に代謝生産する微量の

核酸関連物質の存在によってクロレラの生育が促進されるのではないかと考えられる。

* し尿中の主要な有機性汚濁源物質は低級脂肪酸(約6,000ppm)である,そのうちわけは酢酸60~70%,プロピオン酸10~15%,酪酸5~10%その他となっている。

III 各種光合成細菌の生育度の比較

著者は従来、微生物によるし尿性廃液の浄化と資源化とを併せた処理法の開発に関する研究を行ってきた。⁽¹⁾小林らの研究による自然界の污水浄化のサイクルに注目し、検討した結果、光合成細菌が污水の浄化に大きなはたらきをしていることが明らかとなった。著者らの用いている光合成細菌、Athiorhodaceae は通称 Purple non-sulfur bacteria (紅色無硫黄細菌) と呼ばれるものである。この細菌は低級脂肪酸のような有機酸、アミノ酸、糖類などを水素供与体として、又基質として利用し、嫌気、明条件下で生育する。このような基質利用性を応用して、し尿性廃液の浄化を行うことができる。この紅色無硫黄細菌(Ⅱにおける俗称紅菌)は嫌気明条件下で発育する一方、好気条件である種の生育因子(ビタミンB群)を加えれば暗条件下でも、好氣的呼吸によって発育する性質を有することが明らか⁽¹⁶⁾にされているので、この性質を利用して、より有効なし尿性廃液の浄化方法の向上をはかるために、まず各種の紅色無硫黄細菌の中から浄化能力のすぐれた菌株をえらびだそうと考えた。そこで、嫌気・明、好気・暗両条件下で各種の光合成細菌の生育の優劣を比較し、その際有機化合物の生物学的酸化における最も重要な酵素の一つである脱水素酵素の活性についても比較検討を行った。

方 法

1) 菌 株

略記号

1. Rhodopseudomonas capsulatus (Rc)

2. Rhodopseudomonas spheroides (Rs) 大阪醸酵
 3. Rhodospirillum rubrum (Rr) 研究所分与
 4. 12-26株 (Rt) 東北大学農学部分与

2) 培養条件

培地 yeast extract (DIFCO) 0.3%
 casamino acid (DIFCO vitamin free) 0.2%
 pH 6.8

嫌気・明条件 (流動パラフィンで上層をシール)

照明(人工光線) 5000 lux

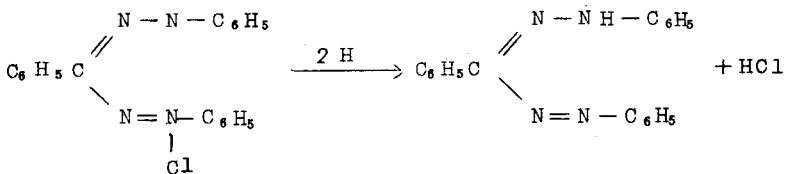
嫌気・暗条件 (孵卵器中にて静置, 1日1回手で振盪)

温度 30℃

3) 生育度 比色(660mμ)によって測定した。

4) 脱水素酵素活性

水素受容体として Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) を用いた。このものは還元により, 赤色の Formazan を生成し, この色素は空气中で比色定量するのに適している。



TTC

無色

TF (Triphenyl
Formazan)

赤色

(イ) 試薬 0.1% TTC

0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.4)

基質 1% 酢酸ソーダ水溶液

(ロ) 測定法⁽²⁾

ツンベルク管の主室に各種光合成細菌の培養液 2.0 ml, Tris-HCl

緩衝液 2.0 ml を入れ、側室に TTC 0.5 ml, 基質 0.5 ml を加えてから栓にグリースをぬる。減圧操作によって真空にしてから栓を廻して、外気を遮断する。次に 37°C, 10 分間保温してから、主室と側室の内容物を混合する。1 時間放置後 (37°C), 管を開いて 5 ml のアセトンを加える。攪拌した後、遠心分離して、その上澄液を 485 m μ の波長で吸光度を求める。他に蒸留水、植付前の培養液についてブランクテストを行う。

結果と考察

嫌気・明、好気・暗両条件下の各種光合成細菌の生育度は第 13, 14 図の如くである。これらの図からわかるように、いずれの条件下でも Rhodospseudomonas spheroides の生育がすぐれ、次いで Rhodospirillum rubrum, 12-26 株 (東北大株), R. capsulatus の順である。好気・暗条件下培養 7 日目の各種光合成細菌の脱水素酵素活性をしらべた結果は次の第 10 表のような測定値である。この測定値は第 15 図の検量線から求めた。

第 10 表 各種光合成細菌の脱水素酵素活性の比較

光合成細菌	吸光度	トリフェニル・ホルマザン (TF) μMol
R s	0.378	23
R r	0.043	3
R c	0.085	6
R t	0.318	20

この表からわかるように R. spheroides の脱水素酵素活性は最も高い値を示した。東北大から分与を受けた 12-26 株も (この菌株は桐生市で用いていた R. capsulatus の中から見出した変異株と考えられるものであ

る) R. spheroides に劣らない脱水素酵素活性を示した。又生育度のすぐれている Rhodospirillum rubrum は生育度の劣る R. capsulatus より脱水素酵素活性が低い値を示した。

以上の結果から R. spheroides が最も生育度がすぐれ、且つ有機物の生物学的酸化に重要な酵素である脱水素酵素活性が最も高い値を示すことがわかったので、この菌の汚水の浄化能力をしらべるために、グルコース、酢酸ソーダを基質として培養し、その生育度とグルコース、酢酸の除去効果を検討した。R. spheroides の培地組成は第11表に如くである。

第11表 培地組成

KH_2PO_4	0.5	g
K_2HPO_4	0.5	g
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.8	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	g
NaCl	0.1	g
Nicotinic acid	1	mg
Thiamine HCl	1	mg
Biotin	0.04	mg
EDTA	40	mg
グルコース	2	g
或は酢酸ソーダ	2	g
水道水	1	l
pH	6.8 ~ 7.0	

培養は第11表の組成の培養液150 ml を坂口コルベン(500 ml 容)に入れ、滅菌後、振盪培養(振幅7cm, 振盪回数 毎分120回)温度30℃, 30~40時間培養した。生長曲線(660 mμ の比色), グルコース(アン

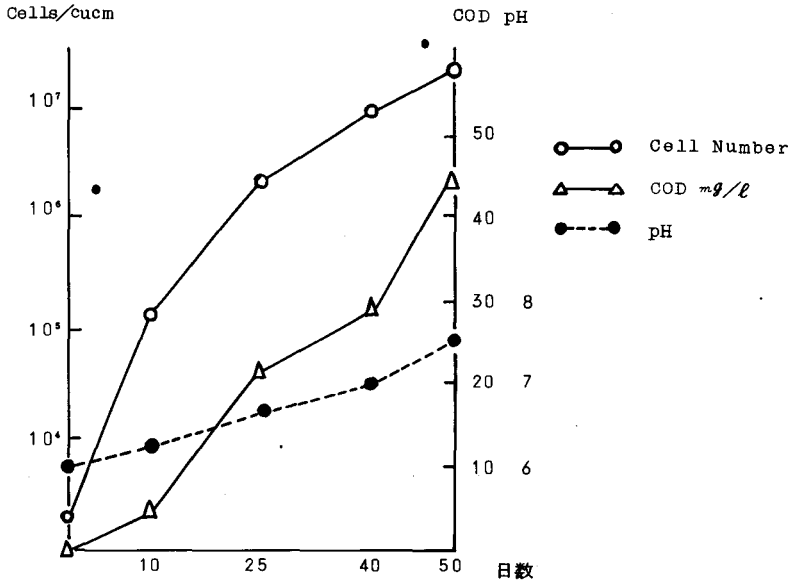
スロンによる測定)の消費を示した結果を第16図に示す。この図からわかるように、培養経過後30時間で、グルコースの消費が急激におこり、菌の生育が上昇する。pHは7.1から4.5に低下する。最終的にはグルコースの除去率は97%に達する。こゝで収穫したR.spheroidesの菌体は淡紅色で、乾燥重量は培養後50時間で0.3g/lであった、pHがかなり低い値を示したのは、培養中にこの菌が培養液中に酸性物質を代謝生産したものと考えられる。酢酸ソーダを基質とした場合も、培養経過は同様な状態を示すが、培養液は7.1から8.3に上昇する。これは酢酸ソーダを基質としたので酢酸を消費したために生じた現象であると考えられる。酢酸ソーダを基質とした場合には同じ培養時間(50時間)で菌体乾燥重量が0.6g/lを示し、グルコースを基質とした場合の2倍値であった。

以上の結果から、この実験で、優良菌株と認められたR.spheroides (R_S)を用いる方が、嫌気・明、好気・暗いいずれの条件下でも、現在桐生市で用いられている光合成細菌、R.capsulatus(R_C)より、その生育度、基質除去効率がすぐれていることが明らかにされた。たゞ現在の研究段階では、この細菌の菌体成分についてR.capsulatusとの比較が検討されていないので、汚水浄化処理法としての効果については今後の検討を要する課題である。

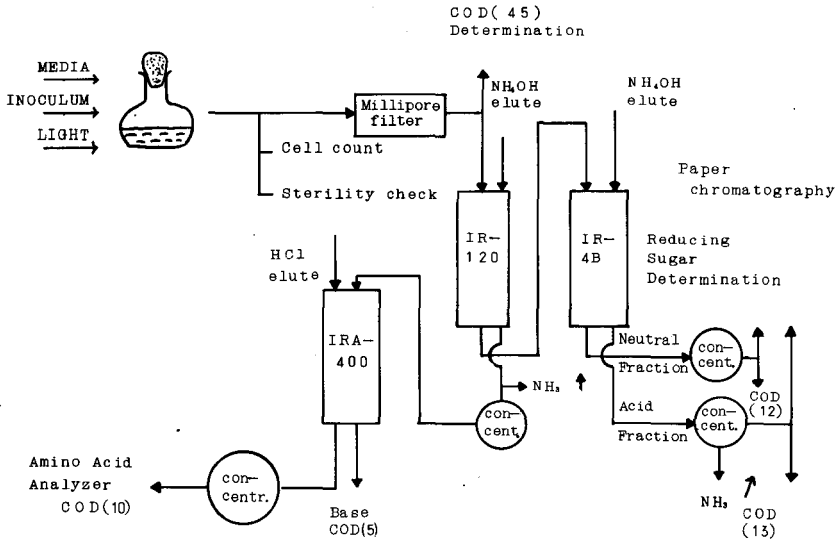
文 献

- (1) 小林達治：生物科学，20，63（1968）
- (2) 農林水産業特別試験研究報告，（1968）
- (3) 小林達治：化学と生物，8，604（1970）
- (4) 高橋和民，鈴木肇：水処理技術，3，30，56（1962）
- (5) 本多淳裕，伊藤尚夫，石井隆一郎，南重康：水処理技術，5，8，17
（1964）
- (6) 本多淳裕，伊藤尚夫，南重康：水処理技術6，37（1965）
- (7) 北村 博：醸酵協会誌，24，365（1966）
- (8) Gottas, H.B., Oswald, W.J. and Golueke, C.C.:
5 th Progress Report, University of
California, Berkeley, California, IER
Series 44（1957）
- (9) Nakamura, H.; Microalgae & Photosynthetic
Bacteria, 197（1963）
- (10) Merz, R.C., Zehnphennig, R.G. and Klima, J.R.:
J. Water Pollution Control Fedlration,
34, 103（1962）
- (11) Pratt, R. and Fong: Am. J. Botany, 27, 431
（1940）
- (12) Vella, G.R. and Guerra, C.N.: J. gen. Microbiol.,
42, 123（1966）
- (13) 代田 稔・武智芳郎：日本クロレラ研究所報告第1輯，40（1960）
- (14) Okuda, A. and Kobayashi, M.: Mikrobiologia,
32, 936（1963）
- (15) Katayama, T., Kobayashi, M. and Okuda, A.:
Soil Sci. Plant Nutri., 11, 171（1965）

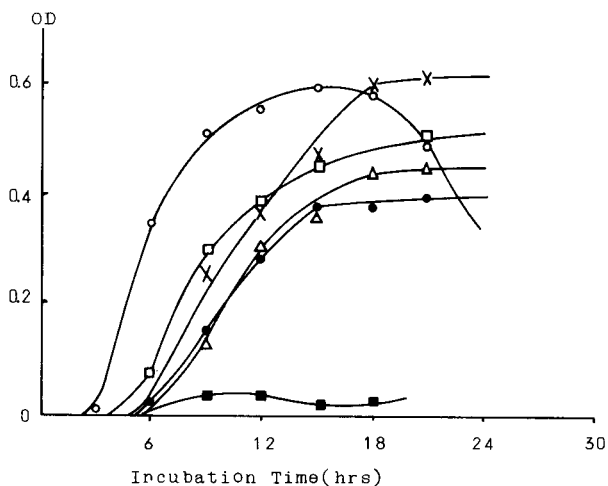
- (16) Kondrat'eva, E.N.: Photosynthetic Bacteria,
Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR, Moskva (1963)
- (17) 小林達治, 松本英明, 奥田東: 日土肥誌, 37, 447 (1966)
- (18) Kobayashi, M., Takahashi, E. and Kawaguchi,
K.: Soil Sci., 104, 113 (1967)
- (19) Cohen-Bazire, G., Strom, W.R. and Stanier, R.Y.:
J. Cellular Comp. Physiol 49, 25 (1957)
- (20) Smith, I.: Chromatographic Techniques (1958)
- (21) 須藤隆一, 吉野勲, 三橋孝子: 下水道協会誌, 5, (45), 1968/2, 9
- (22) 小林正泰: 水, 12, (11), 57 (1970)



第1図 クロレラの生育と有機物の排出



第2図 クロレラ培養液中の各成分の分離法



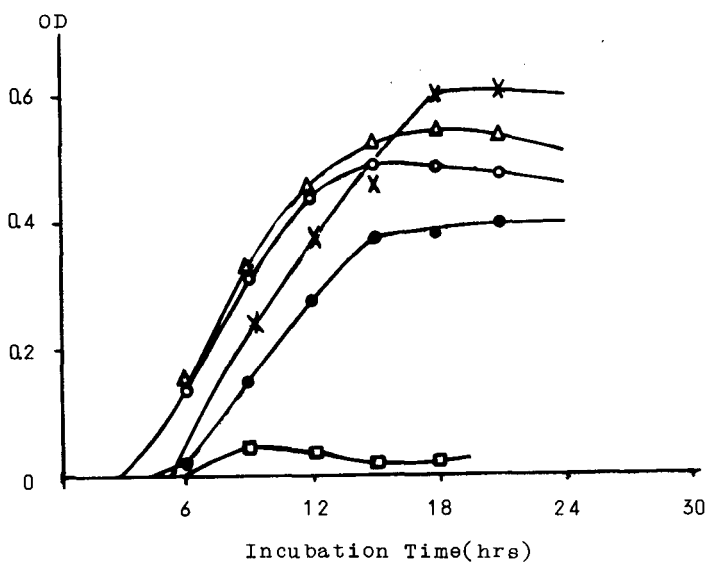
第5图 Bacillus subtilis 在各种培养基中的生长曲线

- 培养基 (葡萄糖培养基)
- X—X 培养基含有 1 ml 的中和分馏物 ※
- 培养基含有 1 ml 的酸性分馏物 ※※
- △—△ 培养基含有 1 ml 的培养物 ※※※
- 培养基含有 0.2% 酵母提取物
- 培养基不含葡萄糖但含有 1 ml 的中和分馏物; 类似的增长曲线在不含葡萄糖但含有 1 ml 的酸性分馏物、培养物及无物 (对照) 中分别观察到。

※ 15 ml 的中和分馏物是从 1500 ml 的培养物中获得的并使用的。

※※ 50 ml 的酸性分馏物是从相同的培养物中获得的并使用的。

※※※ 使用的培养物不是浓缩的。



第 6 图 The effect of a neutral fraction on the growth of Bacillus subtilis.

- Medium (glucose medium)
- ×—× Medium containing 1 ml of a neutral fraction.
- △—△ Medium containing 0.5 ml of a neutral fraction.
- Medium containing 0.1 ml of a neutral fraction.
- Medium without glucose but containing 1 ml of a neutral fraction.

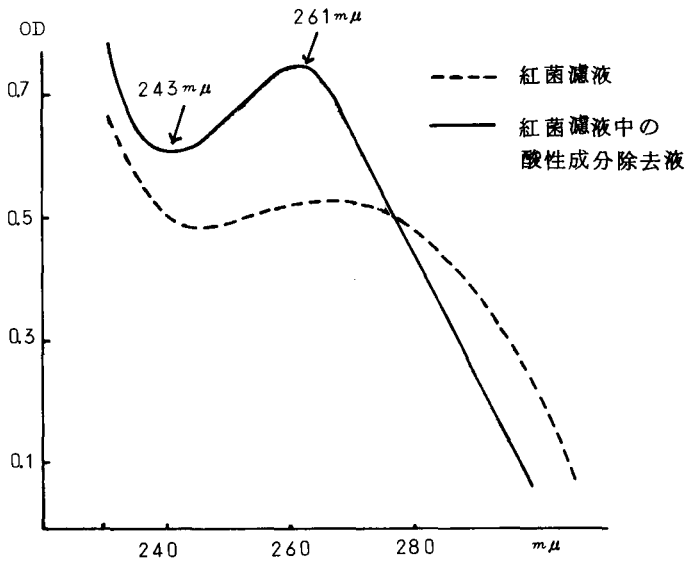
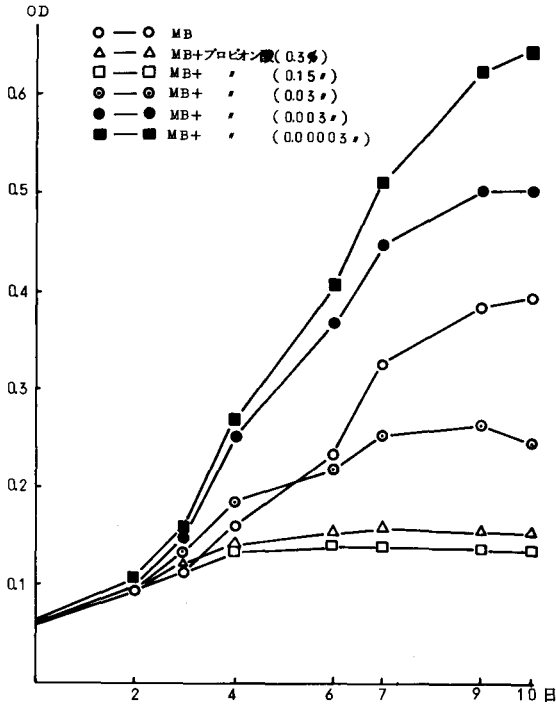
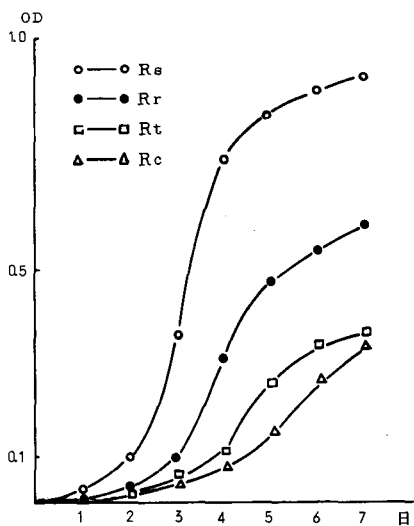


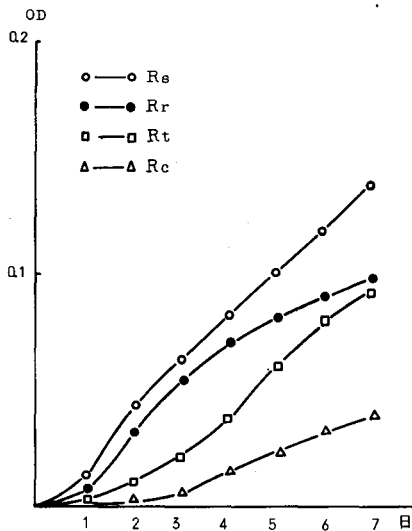
図9 紅菌濾液の紫外外部吸収スペクトル



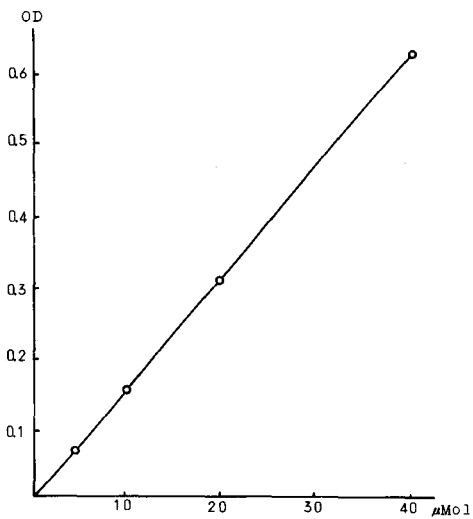
第12図 クロレラの生長に及ぼす各種濃度のプロピオン酸添加の影響



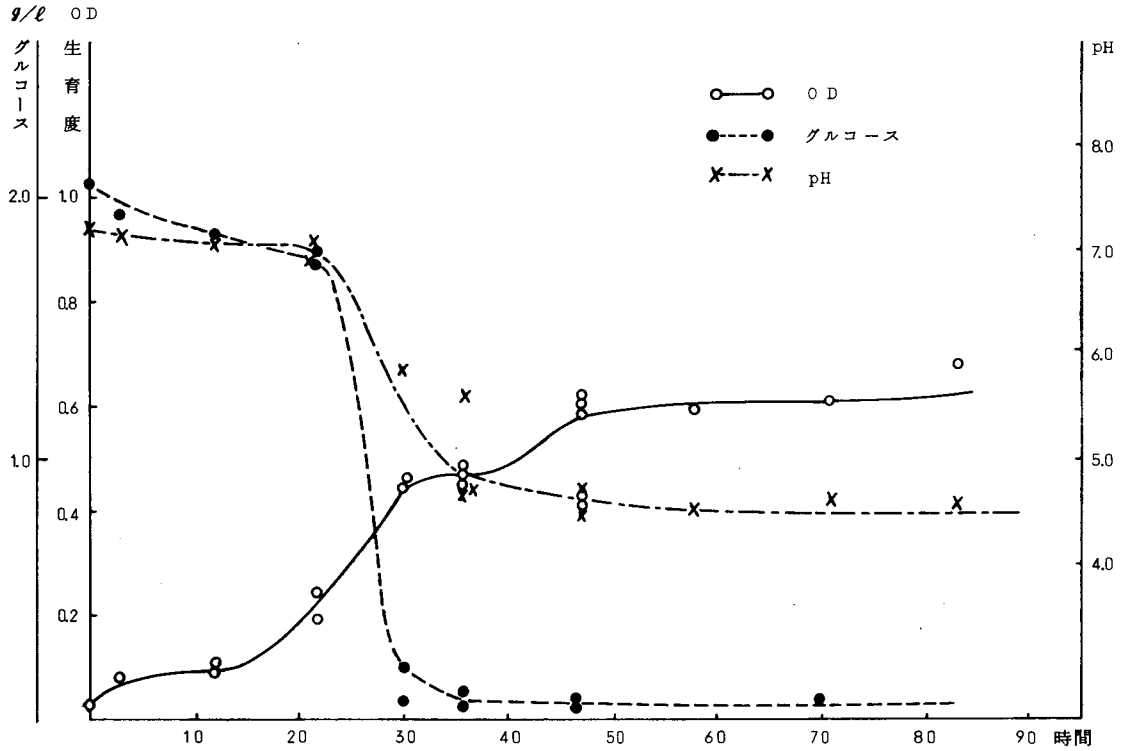
第 1 3 図 各種光合成細菌の生育度 (嫌気・明)



第 1 4 図 各種光合成細菌の生育度 (好気・暗)



第 1 5 図 Triphenyl Formazan の検量線



第16図 グルコースを基質とした *R. spheroides* の生長曲線 (好気・暗培養)

昭和46年3月10日 印刷

規格表第2類

昭和46年3月15日 発行

登録第168号

都市研究報告 第19号

編集・発行 東京都立大学都市研究委員会

代表者 中 野 尊 正

東京都目黒区八雲1-1-1