

光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* による 好気条件下でのリンの蓄積

藪 宏典・宮本圭子・青山康司・家花充紀

Phosphorus Accumulation within *Rhodobacter sphaeroides* Cells under Aerobic Conditions

Hironori YABU, Keiko MIYAMOTO, Yasushi AOYAMA and Mitsunori IEHANA

A denitrificative photosynthetic bacterium, *Rhodobacter sphaeroides* forma sp. *denitrificans*, was cultured in the liquid media containing 0 to 200 ppm of phosphorus (P) under aerobic conditions, and then the P levels accumulated within the cells of the bacterium during cultivation were determined. When the P amount added to the media was 100 ppm and above, the intracellular level of P increased during the logarithmic phase of growth, whereas that decreased when the P was 50 ppm and below. The maximum P level accumulated in the bacterial cells was 2% of dry cells. When the bacterium was cultured in the liquid medium without the added vitamins, P was scarcely accumulated within the bacterial cells. Even though the bacterium in P starvation was cultured in the presence of 200 ppm of P, no remarkable change was observed in the P levels accumulated in the bacterial cells.

水域の富栄養化の原因として窒素、リンが問題にされており、平成5年からは窒素、リンの排水規制も定められた。排水中の窒素は好気-嫌気工程によって微生物により硝化-脱窒作用を受けて窒素ガスとなって除去される。また、排水中のリンは嫌気-好気工程によって微生物によりリンの放出-過剰摂取がおり、リンを回収することができることが知られている¹⁾。

脱窒光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* forma sp. *denitrificans* は嫌気暗条件で脱窒能を持つことが確認されている²⁾。今回はこの菌を使用したリン除去についての基礎的な検討を行った。

実験方法

1. 供試菌株

Rhodobacter sphaeroides forma sp. *denitrificans* を使用した。

2. 培地

培養には Glucose-Basal salt medium (G-BS 培地)³⁾ を用い、必要に応じてビタミン類、リン酸の添加量を調節した。また緩衝能を高めるため、N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (pH 7.0) を20mM 添加した。

3. 培養条件

培養は500ml 坂口フラスコを用いて好気条件下で、100ml、30℃、120rpm で振とう培養を行った。

4. 菌体濃度の測定

菌体濃度は培養液の吸光度 (660nm)、または乾菌体濃度で表した。なお、乾菌体濃度は、培養終了後、遠心分離 (3,000rpm, 10min) により集菌し、脱イオン水による洗浄後、105℃で24時間乾燥して重量を測定し、吸光度 (660nm) との相関から求めた。

5. リンの定量

菌体の前処理はペルオキシ二硫酸カリウム分解法を用い、リンの定量は日本工業規格 (JISK0102の46.3)⁴⁾ に定めるモリブデン青吸光光度法 (660nm) に準じて行った。

実験結果および考察

好気条件下において本菌が培地中のリンを菌体内に蓄積するかどうかを各種条件下で調べた。

1. 培地中のリン濃度の影響

培地中のリン濃度が菌体内のリンの蓄積にどのように

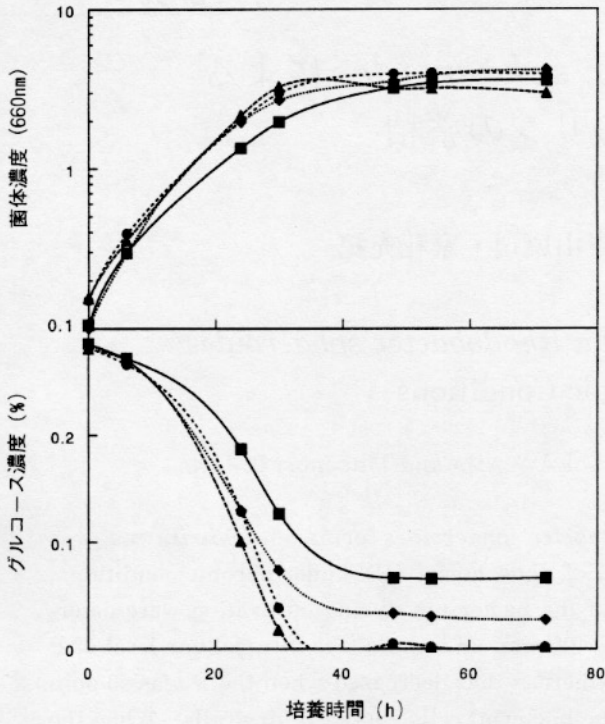


図1 *R. spheroides* 培養中の増殖曲線および培養中のグルコースの変化

培地中のリン濃度 —■—, 0 ppm ;◆....., 50ppm
 ---●---, 100ppm ; - - -▲- - -, 200ppm

影響するかを調べた。

添加するリン濃度を 0, 50, 100, 200ppm と変化させた G-BS 培地に、好気暗条件で一昼夜 G-BS 培地で前培養した菌を初発菌体濃度が吸光度 (660nm) で 0.1 となるように接種した。経時的にサンプリングを行い、菌体濃度、グルコース濃度、菌体中のリン含量、および培地中のリン濃度を調べた。

本菌の増殖曲線と培地中のグルコースの変化を図 1 に示した。菌の増殖は約 30 時間で静止期になった。

菌体中のリン含量の経時変化を図 2 に示した。菌体中の初発リン含量は 1% 程度であり、活性汚泥菌体のリン含量とほぼ同じであった⁵⁾。培地中のリン濃度が 50 ppm 以下では培養を続けるとリン含量が減少してゆくのに対して、100, 200ppm では 24 時間後には約 2% まで上昇していた。また、48 時間後には 100ppm では 1% まで減少しているが、200ppm では 2% のレベルを保っていた。

これらの結果から、本菌は環境中にリンが一定濃度以上存在している場合には対数増殖期で生育に伴ってリンを蓄積すると思われる。また、本菌はリンの吸収効率が環境中のリン濃度に比例していると思われる。

培地中に 200ppm 以上の高濃度のリンが存在する場合は、静止期でも菌体内のリン含量が維持されていることから、本菌はリンを吸収してリンの蓄積が起こると推察

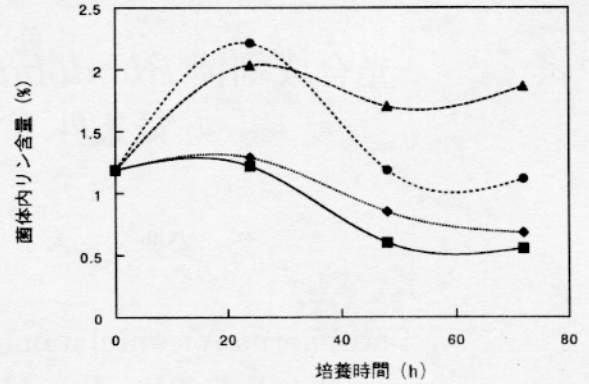


図2 *R. spheroides* 培養中の菌体内リン含有量の変化
 培地中のリン濃度 —■—, 0 ppm ;◆....., 50ppm
 ---●---, 100ppm ; - - -▲- - -, 200ppm

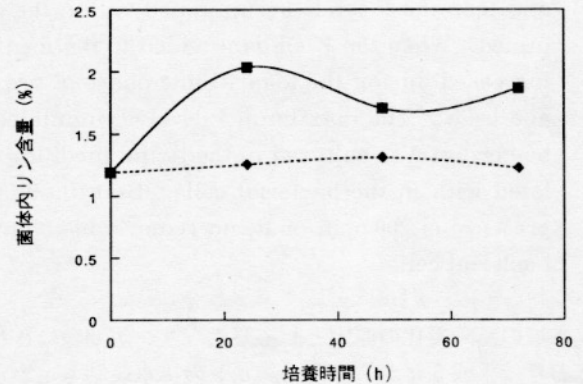


図3 *R. spheroides* 培養中の菌体内リン含量の変化
 培地中のリン濃度 200ppm
 —■—, ビタミン類添加 ;◆....., ビタミン類無添加

される。

なお、リン濃度 50ppm 以下での菌体内のリン含量の減少の原因については今のところ不明であり、さらに詳細な検討が必要であろう。

2. ビタミン類の影響

微生物の増殖に必要な培地中のリン以外の必要栄養塩のバランスが崩れたときにリン酸が蓄積すると言われており¹⁾、今回は栄養素としてビタミンを取り上げ、本菌でも同様の効果があるか調べた。

培地中に 200ppm のリンを添加した G-BS 培地にビタミン無添加の条件で培養し、経時的にサンプリングを行い、菌体濃度、グルコース濃度、菌体中のリン含量、および培地中のリン濃度を調べた。菌体中のリン含量については図 3 に示した。ビタミン無添加の条件では菌体内のリン含量は培養当初から変化が無く、対数増殖期におけるリンの蓄積も認められなかった。

なお、増殖曲線やグルコースの消費はビタミンを添加

した場合と比べ変化は認められなかったのでここでは図示しなかった。

これらのことから、今回使用した菌においてはビタミン類が欠乏すると菌体内のリン蓄積が見られないことがわかった。また、ビタミン以外の培地中の栄養素についても、さらに検討する必要があると思われる。

3. リン飢餓前培養の影響

リン飢餓状態におかれた微生物にリンを十分に供給すると急速にリンを細胞内へ取り込むという報告がある¹⁾ことから、本菌でも同様の効果があるか調べ、その結果を表1に示した。

リン無添加のG-BS培地で48時間培養してリン飢餓状態におき、その後200ppmのリンを添加した。経時的にサンプリングして菌体内のリン含量を調べ、その結果を表1に示した。

表1 リン飢餓状態からの回復による菌体内リン含量の変化

培養時間 (h)	乾菌体濃度 (mg/l)	菌体内のリン濃度 (ppm)	菌体内リン含量 (%)
0	810	4.3	0.5
1	765	5	0.7
2	773	5.6	0.7
3	791	4.9	0.6
6	868	4.9	0.6
24	1011	7.6	0.8

リン飢餓状態にあったため、リンを添加する直前では菌体内のリン含量は0.5%まで低下していた。リン添加後のリン含量には急激な変化はなく、緩やかに増加するにとどまり、24時間後でも0.8%程度と低い水準であった。

このことから今回使用した菌においてはリン欠乏状態からのリンの添加によるリンの急激な蓄積は見られないことがわかった。

微生物による排水中のリン除去は、排水中のリンの濃縮をリンの放出と吸収という現象を利用して行うことに

特徴がある。脱窒光合成細菌*Rhodobacter sphaeroides* forma sp. *denitrificans* は、今回の条件下では培地中のリンを過剰には蓄積しないことが明らかとなった。今後はさらにリンの蓄積量の多い微生物を検索・育種し、その微生物を利用した排水処理方法を検討する必要があると思われる。

要 約

脱窒光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* forma sp. *denitrificans* を用い、好気条件下での菌体内のリンの蓄積を検討した。

(1) 好気条件下で培地中のリン濃度を変化させて培養すると、リン濃度が100ppm以上では対数増殖期で生育に伴ってリンを蓄積したが、50ppm以下ではリン含量が減少した。また菌体内のリン含量は最高で2%であった。

(2) 好気条件下でビタミン無添加の培地で培養すると、菌体内のリン蓄積はほとんど認められなかった。

(3) 好気条件下でリン欠乏状態からリンを添加しても、菌体内のリンの蓄積には顕著な変化は認められなかった。

本実験に用いた脱窒光合成細菌を提供していただいた、広島大学理学部生物科学科機能生化学講座 佐藤敏夫教授に感謝します。

文 献

- 1) 辻幸男：PPM, 21 (4), 30 (1990).
- 2) SATOH, T., HOSHINO, Y. and KITAMURA, H.: *Arch. Microbiol.*, 108, 265 (1976).
- 3) YOSHIDA, Y., TAKAI, M., SATOH, T. and TAKAMI, S.: *J. Bacteriol.*, 173, 3277 (1991).
- 4) 日本規格協会：工場排水試験方法 JISK0102, p. 162 (1986).
- 5) 辻幸男：PPM, 21 (5), 7 (1990).