

ヒドリドイオン水から水素生成菌の増殖度と水素生成能

呉工業高等専門学校 正会員 ○及川 栄作
株式会社 TAANE 非会員 及川 胤昭

1. はじめに

ヒドリドイオン水とは、水素の陰イオンである(H⁻)を含む水のことである。ヒドリドイオン水は、既製の水素化カルシウム CaH₂ などの水素化金属、化石化した珊瑚を水素雰囲気下で高温焼成することによって、水素を吸蔵させたセラミックボール(CCHC)、および本研究のある種の微生物を水に投入することによって、人工的に作ることができる。一方で、ヒドリドイオン水は、健康に良い水として親しまれている天然水にも多数存在すると考えられており、これらの多くは微生物が作り出していると考えている。また、ヒドリドイオン水は、イオン結合性の水素分子がイオン化した水素水であることから、電離水素水と呼ぶこともある。

ヒドリドイオン水は、水に溶けない共有結合性の水素分子と違い、水に溶けるイオン結合性の水素分子を用いており、また、ヒドリドイオン水から水素分子を生成されることも可能であることから、水素の液化保存や燃料電池の開発を目指した研究が進められている。

これまで、当研究室では、天然のヒドリドイオン水である山形県の蔵王山中腹の湧き水に注目し、この水は微生物によってヒドリドイオン水が生成されたのではないかと考え、微生物の単離を試みた。その結果、29株の微生物を分離し、この内の21株の微生物を16SrRNA 遺伝子による分類を行った。その結果、5グループの微生物群に分けられた。これらの微生物の蒸留水に対する酸化還元電位の低下作用(還元力)の分析を行ったところ、根粒菌のグループに強い酸化還元電位の低下作用が示された。

水中のヒドリドの分析法は、定量法が未だ知られていないが、酢酸や塩酸を添加した際に、水素濃度の検出により、定性的に分析できる¹⁾。そこで、単離した *Mesorhizobium* sp. GN1 株を用いて作製したヒドリドイオン水に、酢酸を添加したところ、溶存水素が検出され、電離水素水生成菌であると同定した。また、*Novosphingobium* sp. G 株など根粒菌以外にもヒドリドイオン水生成菌が見つかり、G 株を用いて作製したヒドリドイオン水へ根粒菌を添加すると、溶存水素が検出された。さらに、CaH₂ などの水素化金属および珊瑚に水素を吸蔵させたセラミックボール CCHC で作製した、ヒドリドイオン水へ根粒菌を添加した場合も水素濃度が検出された。根粒菌による水素生成は、窒素がない場合のニトロゲナーゼによる反応であると考えている。

さらに、ヒドリドイオン水の生成に関わる遺伝子を同定するために、大腸菌の2種類のヒドロゲナーゼ酵素遺伝子に対する、それぞれの遺伝子破壊株3株を用いて、ヒドリドイオン水を作製し、同様に根粒菌を添加して、水素濃度の生成量を比較した。この結果、野生株と up-take(分解のみ; H₂→H⁺+H⁻)型ヒドロゲナーゼ I および II 破壊株では、いずれも低い溶存水素濃度が検出されたが、双方向性(合成と分解の両方; H₂↔H⁺+H⁻)型ヒドロゲナーゼ破壊株は、高い溶存水素濃度が検出された。この結果より、up-take 型ヒドロゲナーゼが働くことにより電離水素水が生成され、双方向性ヒドロゲナーゼが働く条件では、水素発生が示されなかったことから、up-take 型ヒドロゲナーゼがヒドリドイオン水生成酵素であると同定した²⁾。

このような中、本研究では、特にヒドリドイオン水から水素生成菌の増殖度の違いや、溶存水素生成能の違いなどの特徴を調べた結果について報告する。

2. 研究方法

2-1. 供試菌株とヒドリドイオン水生成材料

キーワード 水素貯蔵, ヒドリド, 湧き水, 微生物, 発電

連絡先 〒737-8506 広島県呉市阿賀南 2-2-11 呉工業高等専門学校 TEL 0823-73-8951

使用した菌株は、蔵王山の湧き水から分離した株の他に、対照として、*Bradyrhizobium japonicum* NBRC-14792 株, *Mesorhizobium loti* NBRC-14779 株を用いた。大腸菌ヒドロゲナーゼ破壊株は、国立遺伝学研究所より、譲与された 1 遺伝子破壊株を用いた。ヒドリドイオン水は、水素化金属 CaH_2 、および TiH_2 などを用いる方法、珊瑚焼成水素吸蔵セラミックボール(TAANE)を用いる方法、およびヒドリドイオン水生成菌 *Novosphingobium* sp. G 株を用いる方法により、それぞれ作製した。

2-2. 菌株の培養と保存

環境中から分離した微生物の培養は、ペプトンと酵母エキスを含む培地を用いて、30°Cで振とう培養した。根粒菌などは、7日間培養した後に、遠心分離して集菌し、スキムミルク保存液に懸濁した。大腸菌は、LB培地を用いて、30°Cで2日間培養した後に、集菌し、スキムミルク保存液に懸濁した。懸濁液は、その後、500 μL ~ 1mLに小分けし、マイクロチューブへ移し、-85°Cで一旦凍結保存した。

2-3. 増殖度の測定

増殖度の測定は、増殖の速い微生物に対しては、振とうおよび恒温機能を有したマイクロプレートリーダーを用いて30分から1時間置きに吸光度 OD600nm を測定した。増殖度の遅い微生物に対しては、100mL容の三角フラスコに20mLの培地を加えて、振とう培養を行い、1日置きに培養液を分取して、マイクロプレートリーダーにより吸光度 OD600nm を測定する方法で行った。

2-4. ヒドリドイオン水から溶存水素の発生と溶存水素の測定

ヒドリドイオン水生成菌および各大腸菌は、氷中で解凍し、分画分子量 3500 または 6000~8000 の透析チューブへ移し、菌体が外へ漏れ出ないようにクローサーで留めた。透析膜へ移した菌体溶液は、予め400mL超純水を加えておいた、ビーカーへ投入し、浮いてこないように、ガラス棒などでおさえて沈めた。このビーカーを30°Cのウォーターバスで一晩静置し、ヒドリドイオン水を作製した。翌日に、根粒菌を同様に透析膜へ移して、添加し、その後、1時間おきに2日~4日間溶存水素濃度を測定した。

一方、水素化金属や CCHC を用いたヒドリドイオン水は、前日に超純水に添加して調整し、一晩室温で静置して作製した。

3. 実験結果および考察

ヒドリドイオン水から水素生成菌の増殖度は、属種の違いもあるが、大腸菌と比べ、やや遅い菌株、定常期までに1週間程度かかる菌株、1週間の培養でもあまり増殖が認められない菌株など様々であった。ヒドリドイオン水から水素生成菌の水素生成能は、本研究の条件で、溶存水素濃度が数十 ppb~200ppb/400mL 程度までの範囲が検出された。水素生成時間は、持続的でなく、最大の発生量が検出された後に、速やかに消失した。持続性のない理由は、ヒドリドイオンの消費が考えられた。また、更に生成菌の添加量を増やすと、水素生成量の増加が検出された。

4. おわりに

ヒドリドイオン水中のヒドリドイオン濃度を測定する方法は、未だ知られておらず、測定法の開発が必要である。今後は、市販のミネラルウォーターや各地の天然水のヒドリドイオン水の有無の調査、これらの健康との関連性解析および微生物によるヒドリドイオン水を応用した燃料電池などの開発を目指して行きたいと考えている。

参考文献

- 1) J. D. Lee 著, 浜口博訳:基礎無機化学(改訂版), 東京化学同人(1979)
- 2) 及川栄作他、微生物によるヒドリドイオン水を生成する酵素: 第 67 回日本生物工学会大会講演要旨集, p. 221, (2015年10月)