

# 紅色非硫黄細菌をもちいた開放的培養条件における 連続水素生成プロセスに関する研究

尾形 晋治<sup>1</sup>・佐藤 弘和<sup>2</sup>・野池 達也<sup>3</sup>

<sup>1</sup>工修 仙台市水道局給水部(〒982-0015 宮城県仙台市太白区南大野田 29-1)

<sup>2</sup>工修 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻(〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻宇青葉 06)

<sup>3</sup>フェロー会員 工博 東北大学大学院教授 工学研究科土木工学専攻(〒980-8579 同上)

紅色非硫黄細菌による混合有機酸廃液からの水素回収プロセスの確立を目的に、水素生成の基質として L-乳酸を用いて連続培養を行った。純菌単独の培養系では 16ml/hour/l-reactor の安定した水素生成を示したのに対して、純菌で培養を開始し滅菌操作を省いた培地を供給した培養系では 400hours 以降急速に水素生成能が低下し、その原因は緑藻類の発生による阻害と考えられた。また市販の混合光合成培養体を接種源に用いた培養系では、硫酸塩還元細菌によると思われる硫化水素の生成にあわせて水素の生成は著しく阻害を受けた。本研究では観察された現象から水素生成に及ぼす微生物間の競合について基礎的な考察を行ったものである。

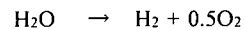
**Key Words :** *non-axenic culture, photosynthetic bacteria, hydrogen production, microbial competition*

## 1. 序論

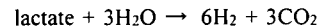
人間活動に伴う多量の二酸化炭素放出による地球温暖化現象が起きて通れない問題となっている今、化石燃料に変わる新たなエネルギー媒体として水素ガス:  $H_2$  が注目されている。水素は現在でも工業的に種々の方法で生産されているが、理論的には都市の有機性廃棄物から微生物を利用して回収することができ、廃棄物処理と同時に水素としてエネルギーを得ることが可能である。廃棄物中の有機成分から水素を回収する方法として現在知られているのは、嫌気性条件下で *Clostridium* 属細菌による混合有機酸発酵に伴う水素生成と、それに続く光合成細菌による有機酸からの水素生成とを組み合わせた二段階プロセスである。*Clostridium* 属などの酸生成細菌は炭水化物を分解する過程で水素を生成するが、数種類の有機酸やアルコール類を同時に代謝するなどの理由で、一般に水素の収率はあまり高くなく最大理論水素収率は  $4\text{mol } H_2/\text{hexose}$  となっている。また酸生成細菌により生成した有機酸類をさらに分解する必要があり、有機酸を利用して水素を生成する能力を持つ微生物として光合成細菌の一種である紅色非硫黄細菌類が知られている。

光合成細菌を含めた光合成微生物による水素生成は一般に次の二つに大別される。すなわち嫌気条件

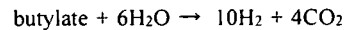
での緑藻類や藍藻類が行う水を電子供与体として酸素の発生を伴って生成するもの、そして紅色非硫黄細菌による有機酸を電子供与体としたものである。前者は無尽蔵である  $H_2O$  を利用するという特徴があるが、式(1)に示すように水素への転換に要するエネルギーが大きいことや、 $O_2$  生成により嫌気条件を維持することが困難であるなど課題も多い。一方、式(2)や式(3)のように有機酸を利用する紅色非硫黄細菌プロセスは、エネルギー論的にみても有利である。



$$\Delta G^0 = +242\text{kJ/reaction} \quad (1)$$



$$\Delta G^0 = +51.2\text{kJ/reaction} \quad (2)$$



$$\Delta G^0 = +223.2\text{kJ/reaction} \quad (3)$$

これらの式から明らかなように生成水素1分子当たりのギブスの自由エネルギー変化は、有機酸と水とでは大きな差がみられ、有機酸を基質とした方が1分子の水素を生成するのに要する光エネルギーは大幅に小さい。一般には他にも acetate や propionate, malate などを水素生成の基質として利用できる菌種が多く、デンプンや芳香族化合物を利用できるものも見いだされている<sup>1)</sup>。これまでの研究では lactate や butylate が用いられることが多く、中でも lactate

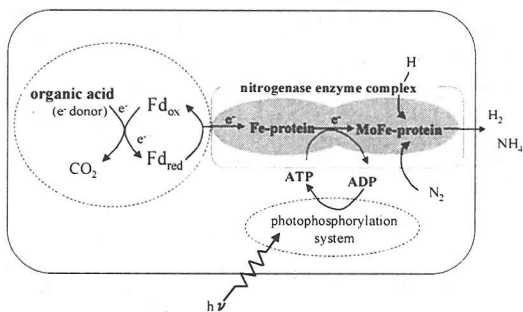


図-1 ニトロゲナーゼによる水素生成反応模式図

が水素の生成速度や効率の点で優れた基質といえることができる。実廃棄物からの水素生成では、乳酸菌培養廃液やヨーグルト工場廃液<sup>2)</sup>、糖蜜工場廃液<sup>3)</sup>、都市ゴミ乳酸発酵廃液<sup>4)</sup>などが検討されている。

光合成細菌の水素生成機構<sup>5)</sup>は図-1に示すように大きく3要素に区別される。すなわち光エネルギーを電子の励起エネルギーに変換し、ATP合成を行う光合成系、基質となる有機酸から電子を引抜く還元力獲得系、そして両者を併せてプロトンH<sup>+</sup>を還元するニトロゲナーゼ酵素系である。このいずれかが活性を失ってもH<sub>2</sub>生成は起こらないと考えられる。補足すると紅色非硫黄細菌は水素の生成とは別に、水素取込みヒドロゲナーゼと呼ばれる水素を消費する酵素系も備えており、環境条件によってその発現が制御されると考えられている。ヒドロゲナーゼは、機能などの面で一般的な嫌気性細菌のものと類似であるが、そのはたらきは不可逆的反応を触媒することができるものの、H<sub>2</sub>の酸化に特化していると考えられる。このように光合成細菌による水素生成原理は、光エネルギーを用いて有機酸等から得た還元力によりプロトンを還元するものであり、有機物質中の水素原子を直接水素に転換するものではないことに注意したい。

これまでの研究は、光の供給源として自然光と人工光源を用いたものが行われているが、光合成細菌の水素生成に関する研究では、単一の菌株を用いたもの、すなわち純粋培養系によるものが殆ど全てである。これには研究が基礎的段階にあったことや、Miyamoto and Miura<sup>6)</sup>が指摘するように、有機性廃水は栄養塩が豊富なために他の微生物による妨害が生じる可能性があるが、その解決への鍵を握る混合培養条件での菌相の安定に関する研究は長い間なされていないという背景がある。理想的な条件で水素の回収効率のみを主眼におくと仮定した場合、純粋培養が最も優れているといえることができるだろう。しかしエネルギー回収を兼ねた廃水処理プロセスと

しての応用を考えると、必ずしも適当とはいえない。微生物の工業的純粋培養は有用物質の生産などのために用いられ、長い歴史を持ち、同時に近年膜分離技術の進歩により溶液中の細菌性やウイルス性の懸濁物質を除去する技術が確立されつつある。しかしながら、コンタミネーションの攪乱作用の有無や、無菌化運転に要するエネルギーバランス、コスト等に関しては殆ど検討されていない。このように純粋培養を前提とした議論では不十分であり、夾雑微生物群による水素生成プロセスへの影響などについての知見を得る必要があると考えられる。

本研究では連続水素生成プロセスにおける、純粋培養系と滅菌操作を省き外部微生物の混入に対して開放された系との比較を通して、光合成細菌の水素生成プロセスに与える夾雑微生物混入の影響についての基礎的な考察を行ったものである。

## 2. 実験材料および方法

### (1) 供試光合成細菌

先に述べたように連続培養における夾雑微生物の影響について検討するために、単一の紅色非硫黄細菌を接種して純粋培養した系と、単一細菌の純粋状態から滅菌操作を行わずに培養した系、そして工業的に培養された市販の東日本ジーラント社製混合紅色非硫黄細菌懸濁液を接種源として培養した系の三系統を同時並行で運転した。紅色非硫黄細菌の純菌は、旧通産省工業技術院生命工学技術研究所の三宅氏より分譲を受けた *Rhodobacter sphaeroides* RV株を用いた。また市販光合成細菌懸濁液中には *Rhodobacter sphaeroides* 種を始め *Rhodobacter capsulata*, *Rhodospseudomonas palustris*, *Rhodospirillum rubrum* などの主要な紅色非硫黄細菌が優占した状態になったものである。表-1に示した基本培地に対して炭素源として D,L-リンゴ酸、ピルビン酸ナトリウム、コハク酸2ナトリウム、窒素源として塩化アンモニウムを各 5mM、加えて yeast extract を 0.1%添加した培地(pH6.8)を滅菌後、それぞれを無菌的に接種し、気相部をアルゴンガスで置換した後、光合成条件で一週間振とう培養器で攪拌しながら培養したものを継代培養し、炭素源として lactate30mM のみを加え塩化アンモニウム 5mM と 0.2% yeast extract を省いた培地で一週間培養したものを連続水素生成実験の接種源として用いた。

### (2) 連続水素生成培養条件

連続水素生成培養実験には、図-2に示したルー瓶

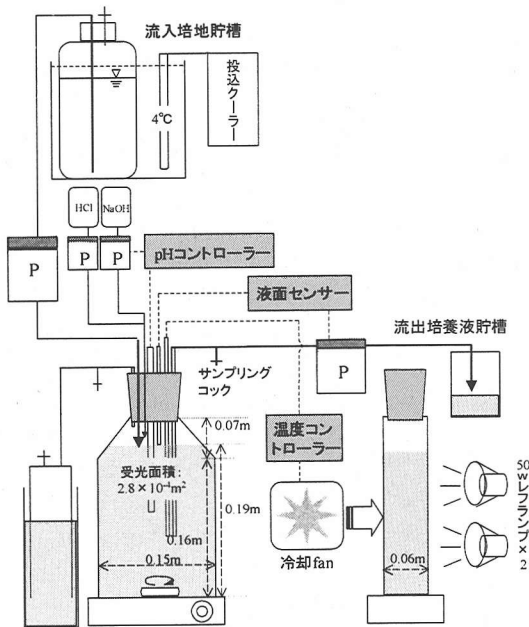


図-2 連続水素生成実験装置

を用いたガラス容器と補機類からなる装置を用いた。本装置は有効容量 1500ml で磁気攪拌子により培養液を完全混合とし、ペリスタリックポンプにより一定速度で培地を供給し、液面センサーと引抜き用ポンプを連動することにより培養容積を一定に保ち、連続運転とした。発生ガスは硫酸酸性の飽和食塩水による水上置換法で収集しシリンダーの目盛りから容積を定量した。これら反応槽本体およびガス捕集装置は温度一定のインキュベータ内に設置し、反応槽片面からレフランプ(松下電器製, 50W) 2個により約  $2.8 \times 10^{-4} \text{m}^2$  の受光面に対して平均  $0.4 \text{kW/m}^2$  (約 6klux に相当) で光エネルギーを常時供給した。水理的滞留時間(以下 HRT)は 72 時間, pH は  $7.0 \pm 0.1$  に、温度は  $30 \pm 1.0 \text{ }^\circ\text{C}$  にそれぞれ制御して培養を行った。

滅菌条件などの運転条件は表-2に示したとおりである。すなわち、単一の紅色非硫黄細菌を接種して

表-1 基本培地の組成

Components	Concentration
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1.4g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.95g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10mg/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	120mg/l
$\text{EDTA}2\text{Na}$	20mg/l
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2.8mg/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	752 $\mu\text{g/l}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10mg/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	240 $\mu\text{g/l}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.36mg/l
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	40 $\mu\text{g/l}$
Thiamine-HCl	1mg/l
p-Aminobenzoic acid	15 $\mu\text{g/l}$
Nicotinamide	15 $\mu\text{g/l}$
Biotin	15 $\mu\text{g/l}$
Nicotinic acid	15 $\mu\text{g/l}$

純粋培養した系(以下、純粋系)と、単一細菌の純粋状態から滅菌操作を行わずに培養した系(以下、開放系)、市販混合光合成細菌を滅菌操作無しで培養した系(以下、混合培養系)とを設定し、比較検討した。

廃水を模した人工培地は先の基本培地に対して炭素源および水素生成基質として L-乳酸ナトリウム 30mM(乳酸として 2700mg/l)、唯一の窒素源として塩化アンモニウム 5mM(アンモニウムとして 70mg/l)を加えたものを用いた。

予備実験から、これらの条件では模擬廃水の窒素(アンモニウム)負荷は、 $\text{H}_2$  生成の必須条件とされる窒素制限、すなわち  $\text{NH}_4\text{-N}=\text{N.D.}$  を達成すること

表-2 連続水素生成の設定条件

系列	接種微生物	流入培地
閉鎖系	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> RV	0.22 $\mu\text{mM}$ 濾過滅菌
開放系	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> RV	滅菌処理無し
混合培養	ジーラント社製混合光合成細菌	滅菌処理無し

が確認されており、培養期間中も常にアンモニア性窒素は検出されなかった。

### (3) 分析方法

ガス生成量はガス捕集装置のシリンダー目盛りから標準状態(0 °C, 1atm)の体積に換算した。生成ガスの組成は H<sub>2</sub> および CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub> に関してそれぞれ以下に示すように分析した。H<sub>2</sub> はガスクロマトグラフィー(Shimadzu GC-8A, TCD)に, Unibead C を充填した 2m のステンレス製カラムを装着し, N<sub>2</sub> ガスをキャリアガス(50ml/min)として検出器温度 100 °C, カラム温度 70 °C の条件で分析した。CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub> はガスクロマトグラフィー(Shimadzu GC-8A, TCD)に Porapak T を充填した 2m のステンレス製カラムを装着し, He ガスをキャリアガス(30ml/min)としてその他は H<sub>2</sub> と同一条件として分析した。H<sub>2</sub>S 濃度はガステック製硫化水素検知管とガス採取器を用いて, 定期的に捕集装置から 100ml のガスサンプルを吸引採取し測定した。

揮発性脂肪酸(VFA)濃度の測定はガスクロマトグラフィー(Shimadzu GC-14B, FID)に Unisole F-200 を充填したガラス製カラムを装着し, N<sub>2</sub> をキャリアガス(34ml/min)として検出器温度 200 °C, カラム温度 140 °C, 注入孔温度 190 °C で分析した。試料は 0.22 $\mu$ m のメンブレンフィルタで濾過後希釈し, 0.1N-HCl を等量添加(pH は 1 以下となる)することで含まれる脂肪酸を遊離態とし, その 1 $\mu$ l を分析した。

乳酸濃度はキャピラリー電気泳動分析器(Photal, CAPI-3200)を用いて測定した。2,6-ピリジンジカルボン酸 0.2506g, セチルトリメチルアンモニウムブROMAイド(CTAB) 3.64mg を蒸留水に溶かし, 100mM トリスアミノメタンを用いて pH を 5.8 に調整後, 蒸留水で全量を 100ml としたものを泳動液に用いた。ID75 $\mu$ m $\times$ 805mm(有効長 680mm)のキャピラリーカラムに落差法で試料を注入し, 温度 25.0 °C, 電圧-18.0kV で泳動し 220nm(インダイレクト UV 検出)で検出した。

アンモニウムイオン濃度はキャピラリー電気泳動分析器(Photal, CAPI-3200)を用いて測定した。イミダゾール 0.068g, ヒドロキシイン酪酸 0.052g, 18-クラウン 6-エーテル 0.0264g を蒸留水に溶かし酢酸 0.10ml を加え, 蒸留水で全量を 100ml としたものを泳動液に用いた。ID75 $\mu$ m $\times$ 500mm(有効長 375mm)のキャピラリーカラムに落差法で試料を注入し, 温度 25.0 °C, 電圧+15.0kV で泳動し 210nm(インダイレクト UV 検出)で検出した。

COD<sub>Cr</sub>(以下 COD) は standard method<sup>3)</sup>に準じ, 採

取した試料について全 COD を, 遠心分離後の試料について溶解性 COD を, それぞれ測定した。

タンパク質はローリー法<sup>8)</sup>に準じて, 全タンパク質と, 遠心分離上澄水について溶解性タンパク質をそれぞれ測定した。

ニトロゲナーゼ活性は生菌に対するアセチレン還元活性法により, Meyer ら<sup>9)</sup>と佐々木<sup>10)</sup>の方法に準じて測定した。20ml の加圧培養ネジ口試験管に 20mM D,L-リンゴ酸と 20 $\mu$ M クロラムフェニコールを含む反応溶液(pH6.8)を 100 $\mu$ l 入れ, フンゲート噴射管から還元銅カラムを通したアルゴンガスを試験管内に噴射し無酸素状態を保持したまま, 酸素との接触を避けながら採取した培養液 2.0ml を注入後, ブチルゴム栓とネジロキャップで密栓した。レフランプ 50W  $\times$  4 個により光強度約 0.4kW/m<sup>2</sup> で光照射を行っている振とう培養器にセットし 30 °C, 10min 培養した。さらにアセチレンガスを正確に 1.0ml 注入した後(=0h)再び光照射を継続し, 0.5 ~ 3.0h の間 0.5h ごとに気相部を 0.2ml 採取しアセチレンの還元により生じるエチレン生成量が直線的に増加する間のアセチレンとエチレンの濃度を, ガスクロマトグラフィー(Shimadzu GC-8A, FID)で Unibeads C を充填した 2m ステンレス製カラムに窒素キャリアガス(190ml/min), カラム温度 160 °C, 検出器温度 180 °C の条件で分析した。生成エチレン(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) mol は注入したアセチレン(C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) mol に, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> のエリアと C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> と C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> のエリア合計との比を掛けて算出<sup>9)</sup>し, 同時に 2 系統測定した平均値をもって活性値とした。

水素消費ヒドロゲナーゼ(以下, 取込みヒドロゲナーゼ)の活性はメチレンブルー(以下, MB)還元法を用い, Colbeau ら<sup>11)</sup>の方法を参考に測定した。10ml 容のバイアルに 20mM Tris-HCl(pH8.0)と 0.08mM MB を含む反応溶液(pH8.3)を 7.0ml 注入しブチルゴム栓とアルミシールで密栓後, アルゴンガスで激しく脱気操作を行い, さらに 100%水素ガスを 30sec 吹込み水素を飽和させた。これを 32 °C の湯浴で測定直前まで加温し, 空気との接触を断ちながら採取した培養液 1.0ml を注入後素早く混合し, バイアルごと吸光度計(Hach DR-4000)にセットし経時変化モードで 570nm の吸光度変化を 15min 計測した。吸光度が直線的に減少する部分の傾きの最大値を抽出し, 既知濃度の MB 溶液から求めた係数をかけ, 得られた濃度変化から単位時間の MB 還元量を算出し, もって活性値とした。測定は二度行い平均値を用いた。この測定法には問題点があることが指摘されており, 本研究においても定性的データとして扱った。

培養液の吸光スペクトルは、事前に線形性を確認の上、無希釈の培養液を吸光光度計(Hach DR-4000)を用いて 300 ~ 1100nm にわたり 2nm ステップで計測した。

### 3. 実験結果

#### (1) 夾雑微生物混入による水素生成能への影響

図-3に純粋系、開放系、混合培養系それぞれの水素生成の経時変化を示した。 *Rb. sphaeroides* は紅色非硫黄細菌の中でも水素生成能が高いことが報告<sup>12)</sup>されている菌株である。これに対して市販光合成細菌は複数種類の紅色非硫黄細菌が混合されたものであり、両者の水素生成能を直接比較することにはあまり意味がないといえる。*Rb. sphaeroides* の純粋系・開放系との比較から明らかのように、両系は同条件で水素生成を開始させたにも関わらず、培養前期から中期にかけて水素生成能に明らかな差が認められる。純粋系においては培養期間約 35 日までの間、平均して 16.6ml/l/h の水素ガス生成速度を示した。その後培養の長期化によるコンタミネーションの発生が確認された後、水素生成速度のゆっくりとした低下が観察された。

それに対して開放系では、約 16 日間は純粋系に近い 15.0ml/l/h の平均水素生成速度を示した。その後急激に水素生成能が低下し、これに対応するように培養液中には、その形態から *Chlorella* sp. と推定される緑藻が増殖しているのが観察された(図-7)。これに対応するように、容存無機炭素の同化によるとみられる発生ガス中の CO<sub>2</sub> 濃度の微減傾向(データは示していない)も観察された。これらの変化から水素生成低下がこの緑藻の増加に起因するものと

仮定し、この緑藻を反応槽内に類似の条件(炭素源に 0.1%NaHCO<sub>3</sub>, 窒素源に塩化アンモニウム 5mM, H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 気相部)で集積培養したところ、多量の酸素ガスを放出しながら旺盛な増殖を示し、無酸素(嫌気)条件が容易に崩されることが確かめられた。ま

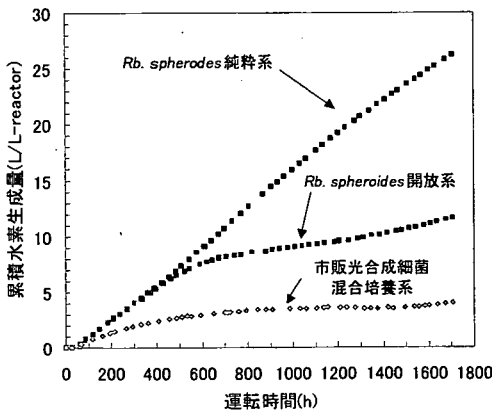


図-3 各培養系の累積水素生成

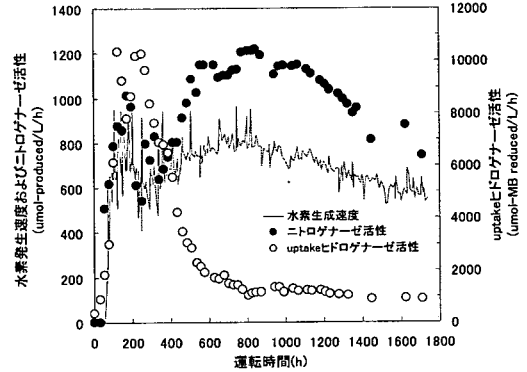


図-4 純粋系の水素生成活性

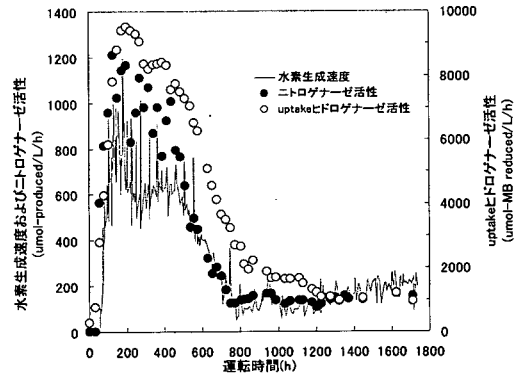


図-5 開放系の水素生成活性

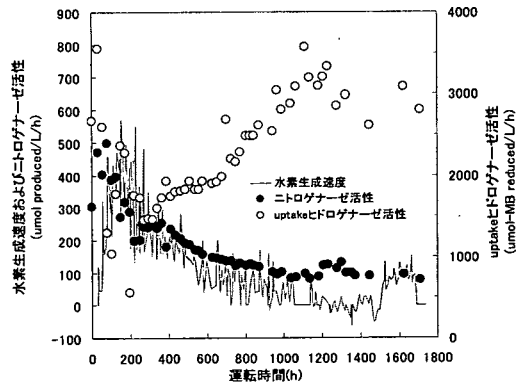


図-6 混合培養系の水素生成活性

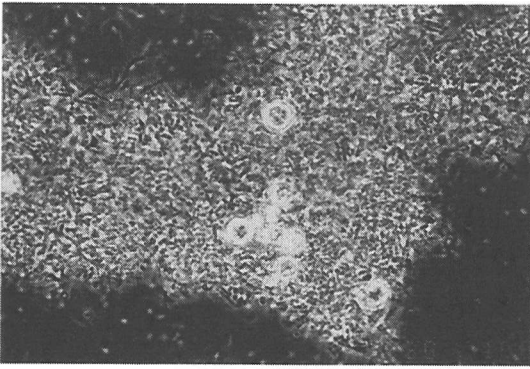


図-7 開放系培養液中の *Chlorella* と推定される緑藻。運転 650 時間の培養液を位相差顕微鏡 (× 1,500) にて撮影。細菌群の集塊にトラップされるように存在している。

た、植物型 (=酸素発生型) 光合成の阻害剤として知られるクロロクソン<sup>13), 14)</sup> を添加した培養試験において増殖が大きく阻害されたことから、酸素発生 (植物) 型の光合成を行うことが確認された。開放系における水素生成能低下の直接的原因は現段階ではこの緑藻の増加によるものと考えられ、これについては考察で言及する。

純粋系と開放系におけるニトロゲナーゼ活性 (図-4, 5) を比較すると、両者の水素生成能の変化がニトロゲナーゼ活性に裏付けられているのが分かる。ただし、測定された活性値は光合成細菌単位量に対してのものではなく、培養液単位量に対してのものであり、雑菌数が多い開放系においては活性値の低下が直接的に酵素の失活を反映したものとは考えにくい。実際、窒素制限条件の反応槽内においては、一般的な組成式 ( $C_3H_7O_2N$ ) で表される微生物量は一定の範囲に制限されると考えられることから、活性値の低下が紅色非硫黄細菌の優占度自体が低下したことを反映しているものとみることが出来る。実際、固形物のタンパク質量 (全タンパク質量 - 溶解性タンパク質量で得られる。菌体タンパク質量に等しいと考えられる) の測定値は培養液が安定した後は 3 系とも  $350 \pm 50\text{mg/l}$  程度で推移し、有意な変化はみられなかった。培養液の吸光スペクトルのモニタリングからは、紅色非硫黄細菌に特異な 860nm 付近の吸収極大が連続的に減少し、対照的に緑藻生体のクロロフィル a に特異な 680nm 付近の極大が増大したことから優占度の低下が示唆される。

一方、混合培養系では水素生成能は培養時間の経過と共に徐々に低下していった。この系はある程度雑菌が混在した状態を想定した系であり、水素発生は最も良好だった 100 ~ 200 時間の間でも平均

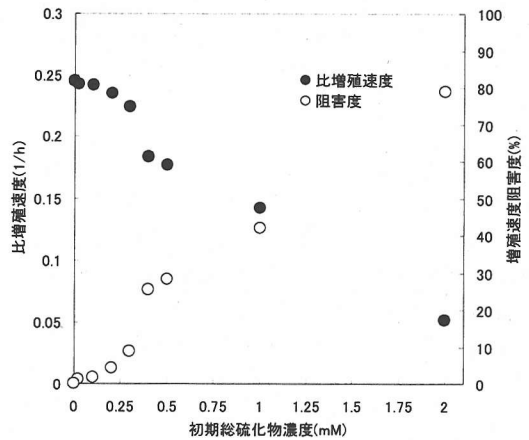


図-8 *R. spaeroides* RV の増殖速度に及ぼす硫化物の影響。純菌の回分培養系における 12 時間までの比増殖速度を示した。阻害度は総硫化物濃度 0mM での値に対する百分率で表現した。

8ml/h と低いレベルであった。このことは他の 2 系と比べて、ニトロゲナーゼ活性がおおよそ 50 % ほど低いことから説明される。水素生成能の低下に対応して発生ガス中から常時硫化水素臭が認められ、最高約 700 ~ 800ppm のレベルまで上昇した。また培養期間を通してメタンが検出されることはなかった。図-6に見られるように 1000 時間以降見かけの水素生成は起こらなくなり、水素生成速度がゼロからマイナス (取込み) に転じた。この水素の取込みが卓越した状態でも、ニトロゲナーゼの活性は  $100\mu\text{mol-C}_2\text{H}_4/\text{h}$  程度で一定のまま推移した。これとは対照的に水素取込みヒドロゲナーゼ活性は増加した。従って見かけ上の水素生成が停止していてもニトロゲナーゼによる水素生成が継続していた可能性がある。本研究では、硫化物が紅色非硫黄細菌に与える影響についても検討した。その結果を図-8に示す。これによると総硫化物濃度が増加するにつれて紅色非硫黄細菌の比増殖速度が低下するのが分かる。硫化物の解離状態は中性域において pH により大きく異なるため、増殖阻害作用を持つ<sup>15)</sup>とされる遊離態硫化水素 ( $\text{H}_2\text{S}$ ) の存在比が反応槽内と阻害実験系とは異なっていること、菌種によって硫化物の耐性が異なること等が考えられるため、直接比較は避けるが、用いた模擬廃水中の総硫黄は硫酸塩の形で約 0.52mM であることから、そのほとんどが硫酸塩還元細菌などにより異化的硫酸塩還元を受けたとすれば、反応槽内の紅色非硫黄細菌群に対して、

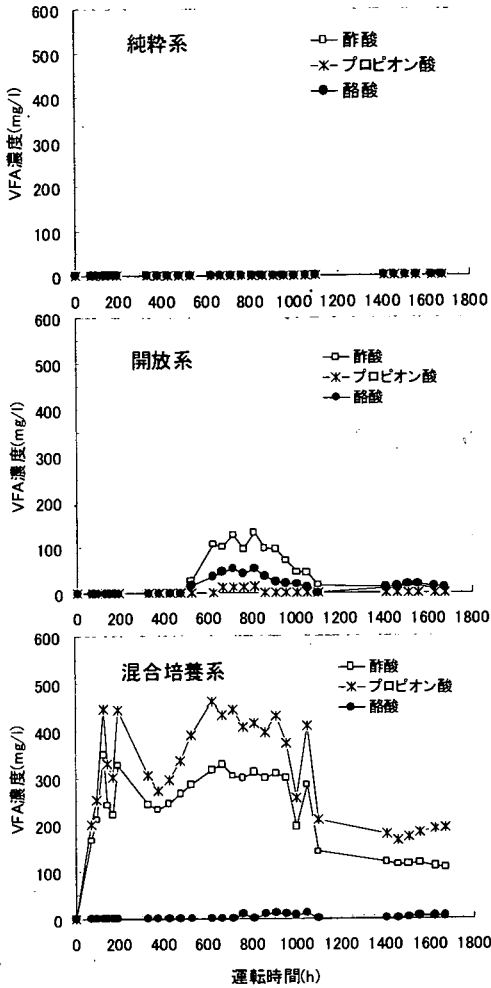


図-9 各系の VFA 濃度の経時変化

増殖阻害を引き起こすには十分な量といえる。すなわち、生成した遊離硫化水素の阻害により増殖速度が低下した紅色非硫黄細菌が、反応槽内から徐々に wash out されたと考えられることができる。また、硫化物の水素生成に対する直接的阻害についての知見はこれまでになく、今後詳細に検討される必要がある。

各系の水素取込みヒドロゲナーゼ活性の挙動については、純粋系と開放系では運転開始直後から急激に増加したが、この原因については明らかではない。純粋系では滞留時間の3倍程度の培養で、培養液の性状が安定したと考えられる頃から減少に転じ、その後低いレベルで推移した。この安定化が長期間の培養によるある種の馴化によるものなのか明らかではないが、興味深い挙動である。対して開放系ではその減少はゆっくりとしたものであり、緑藻が生成

した酸素が存在する環境で、紅色非硫黄細菌がこれを利用して水素酸化反応を行うためにヒドロゲナーゼ活性が高まるという機構<sup>11)</sup>も考えられ、詳細な検討を必要とする。

### (2) 乳酸および代謝生成物の挙動

夾雑微生物の増加による菌相遷移の影響は、VFA濃度や乳酸消費量の挙動の違いにも反映された。図-9に示すように各系の違いは明らかで、純粋系では紅色非硫黄細菌による乳酸の同化と無酸化が行われているのが分かる。これに対して、開放系では菌相の遷移が進むにつれて、一般的な嫌気性細菌群の代謝にみられるような酢酸や酪酸の代謝がみられた。既往の知見では、微生物学的にみても紅色非硫黄細菌が乳酸を、酢酸をはじめとしたVFAに変換するという報告はない。混合培養系では培養開始から酢酸とプロピオン酸の蓄積が顕著であった。この乳酸の異化代謝によるVFA類の蓄積と硫化水素の生成はよく対応しており、硫酸塩還元細菌の増加による影響が強いとみられる。開放系と混合培養系で優先した微生物が異なることには、前者が純菌条件から培養を開始したのに対し、市販光合成細菌液はその製造過程から他の細菌群が混在していたという性状の差異があげられる。培養開始から速やかにVFAが蓄積したことから、初期条件から存在していた雑菌群が増殖していたことが分かる。紅色非硫黄細菌は乳酸をはじめとした有機酸を水素生成の基質として利用することが知られているが、他の嫌気性細菌群が混入した場合に、最も優れた基質である乳酸が異化代謝されることによって、水素生成に対して負の影響を与えることも示唆された(図-10)。

### (3) COD成分の分配

図-11に流入乳酸のCODに対する溶解性COD、各VFA、生成水素量への分配率の経時変化を示す。分配率は、測定された水素ガス生成量、有機酸濃度に対してそれぞれ理論的完全酸化に必要な酸素当量を掛けたもの、そして全CODから溶解性CODを引いた固形CODを菌体CODとし、流入培地のCOD計算値を100としてそれぞれへの転換率を計算した。各系に共通して菌体すなわち非溶解性成分へ移行した割合は30%程度であった。

水素生産の観点から重要となる水素転換効率は、流入CODあたり純粋系において約30%であった。純菌状態から運転を開始した純粋系と開放系ではVFAや乳酸として定量されない溶解性のCOD成分が10~20%を占めていた。さらにこの2系の遠心分離後の上澄み液は、混合培養系のそれと比較して

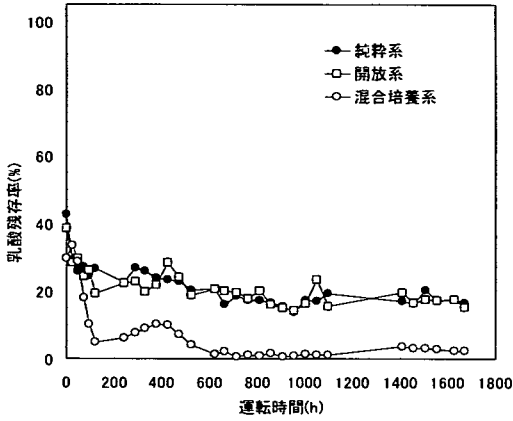


図-10 各系の乳酸残存率の経時変化

かなりの粘性が認められた。 *Rhodobacter capsulatus* において窒素固定の際に細胞外粘質物を大量に生産し、細胞近傍の酸化還元電位を低下させる現象が報告<sup>16)</sup>されており、基質の一部がこの粘質物生成に消費されることが示唆された。

#### (4) 水素収率

紅色非硫黄細菌による乳酸からの理論水素収率は、式(2)に示すとおり 6mol/lactate である。本研究では純粋系で培養前半の安定期間の平均で求めた水素収率は、消費乳酸 1mol あたり 2.1mol で、理論値の 35% に相当する。開放系では最良時に約 30%、混合培養系では水素生成能の低さと、他の乳酸消費者による見かけの乳酸消費量の大きさの影響とによって、約 8% と低い値となった。水素生成の最適基質である乳酸が、他の細菌群によって酢酸・酪酸等の VFA に転換されることでも、実質的に水素収率が低下することが示唆された。

#### 4. 考察

緑藻の増殖した開放系反応槽内で、紅色非硫黄細菌に及ぼされた影響としては、1) 緑藻の放出した酸素が紅色非硫黄細菌に対して阻害的に作用した、2) 緑藻との間に窒素源をめぐる増殖競争の二つが考えられる。 *Chlorella* sp. は嫌気条件でも酸素生成を伴った光合成を行うことから、反応槽内においてもこれと同様の現象が起きていたと推定される。純粋系の ORP 値と比較しても有意差はみられなかったが、緑藻と紅色非硫黄細菌との間でマイクロレベルでの

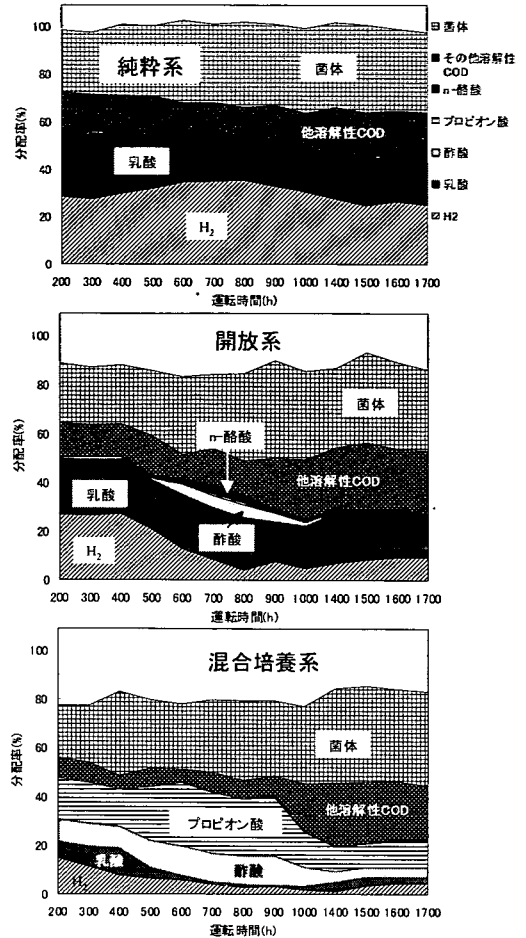


図-11 各系の COD 分配率の経過

$O_2$  受渡しが起こり、何らかの形で阻害作用を及ぼしていた可能性は極めて高いと考えられる。

光合成細菌は、明条件において極めて低分圧の  $O_2$  によっても、その光合成色素(バクテリオクロロフィル a, カロテノイド)の合成が強く抑制されると同時に分解も促進される<sup>17)</sup>。さらに、クロマトフォアなどの光合成膜系に対する阻害作用が、光と酸素の共存により強められる<sup>18)</sup>ことなどを考慮すると、紅色非硫黄細菌のエネルギー獲得に少なくとも何らかの部分的障害の発生が考えられる。水素生成条件では紅色非硫黄細菌が獲得できるエネルギー源は光のみであり、結果その増殖速度は獲得できる光エネルギーに支配される<sup>19), 20)</sup>ことになる。つまり緑藻が発生する  $O_2$  が常時紅色非硫黄細菌の周囲に存在することにより、その光合成活性が部分的であるにせよ阻害を受け、光合成による ATP 合成活性の低



下、ひいては増殖速度の低下に至り、増殖競争により徐々に優占状態が崩れていくという遷移機構が考えられる。また  $O_2$  によるニトロゲナーゼの活性への阻害は  $DO$  が数  $\mu M$  のレベルで引き起こされる<sup>21), 22)</sup>と報告されている。

これまでには緑藻など藻類の影響として報告されていた機構は、藻類が壁面に固着して反応槽内に入射する光を遮断するために、紅色非硫黄細菌が利用する光エネルギーを減少させるというもので、van Niel<sup>23)</sup>はフィルターにより藻類が利用する 680nm 付近を遮光する藻類増殖抑制法を提案した。しかし緑藻類の吸光極大域は紅色非硫黄細菌の 850 ~ 890nm とずれていること、本研究では壁面への緑藻の固着が全く発生しなかったにもかかわらず水素生成能が低下したことから、光エネルギー競争は主たる要素ではなかったものと考えられる。完全に緑藻へと遷移しなかったのは、事実上乳酸の分解によってしか得られない無機炭素分が律速になっていたことや、よく知られる緑藻の強光阻害が影響しているとみられる。Segers と Verstraete<sup>13)</sup>は乳酸 30mM と硫酸アンモニウム 3.8mM をそれぞれ炭素・窒素源とし、HRT72h で *Rb. capsulatus* の連続培養を行っている。純粋培養を行わなかった系では培養開始から 18 日経過時点でホモ酢酸生成細菌と水素資化性メタン生成細菌により水素生成速度が低下し、30 日経過時点で緑藻(*Chlamydomonas* sp.)が混入したことにより、速やかにかつ完全に停止し、紅色非硫黄細菌を凌いで反応槽内に優占したと報告している。彼らの報告と本研究の相違点は、光強度をはじめとした実験条件によるものと思われるが、緑藻がどのような機構で影響したかについての言及はみられない。また、小野(伊津)・山本<sup>24)</sup>は有価物としての紅色非硫黄細菌の選択的増殖を試み、細菌群の存在比率を定量し、反応槽を赤外線遮断フィルターで覆うことで藍藻類の増殖抑制に効果があることを報告している。それによると、フィルターを施さない場合には、30 日程度の培養継続後に培養液の ORP が +300mV まで急上昇し嫌気状態が崩れた。それにより好気性の従属栄養細菌の増殖が始まり、相対的に紅色非硫黄細菌が減少した(存在比としてフィルターの有/無により、それぞれ 40 ~ 50%, 20%) ことから、藍藻類の増殖を抑制することは、混合培養系において紅色非硫黄細菌を選択的に増殖させる上で重要であると指摘している。

緑藻や藍藻は紅色非硫黄細菌と比べ、その細胞サイズが大きく、沈降性がよいものが多いといえる。一時的に攪拌を停止し、沈降した緑藻を反応槽下部から引抜くなどの工夫により、緑藻の増加を制限す

ることも可能であると考えられる。

紅色非硫黄細菌に対して、Hansen<sup>25)</sup>や伊津<sup>15)</sup>により、総硫化物濃度 0.2 ~ 0.6mM のレベルでの増殖阻害が報告されている。混合培養系では硫化水素による水素生成への影響を緩和する目的で、培養開始後 1170h 時点から 24h おきに  $H_2:CO_2$  (80%:20%) 混合ガスの通気操作(1000ml/min × 30min)により培養液および気相部の硫化水素除去を試みた。これにより一時的には 10ppm 程度まで低減することができたが、次の操作開始時点では 100ppm 程度まで上昇していた。8 サイクルにわたって通気操作を行ったが、水素生成に回復はみられなかった。そのため硫酸塩還元細菌の硫酸塩還元反応の選択的阻害剤として知られる、モリブデン酸( $MoO_4^-$ )の連続添加を行った。1330h 時点で反応槽内で 500mg- $MoO_4$ /l に設定するとともに、先の通気操作により残留硫化物を除去し、それ以降の流入模擬廃水もモリブデン酸 500mg/l に調整して運転を継続した。モリブデン酸添加により硫化水素の発生は完全に抑制され、1500h 付近から水素生成に回復基調が見られた。しかし、ニトロゲナーゼ活性に有意な回復傾向は見られず、取込みヒドロゲナーゼ活性もほぼ横這いで推移し、活性値のうえではモリブデン酸添加の効果を認めることはできなかった。この結果から、硫酸塩還元細菌の *in situ* での取込みヒドロゲナーゼのはたらきが低下した、もしくは紅色非硫黄細菌のニトロゲナーゼが硫化物によって *in situ* で阻害を受けていた可能性が考えられる。長期間の硫化物による影響で紅色非硫黄細菌の存在比率が低下していたことは容易に推測され、菌数の経時的な追跡による確認を行う必要がある。

Segers and Verstraete<sup>13)</sup>はコンタミネーションした硫酸塩還元細菌やホモ酢酸生成細菌により、基質である乳酸が酢酸に異化代謝されてしまうために水素生成能が低下したと報告している。本研究ではモリブデン酸の添加後、乳酸の残存率(図-10)に微増傾向が見られたものの、それは僅かであり基質競争が水素生成に影響していたかは定かではないが、硫酸塩還元細菌に消費されなくなった分の乳酸を、紅色非硫黄細菌が水素生成に利用したことも考えられる。

硫酸塩還元細菌は増殖エネルギー獲得のために硫酸塩を利用するため、その量は他の細菌による同化量に比べ大きくなるといえる。従って硫酸塩含有量が微量な廃水処理する場合には、硫酸塩還元細菌と紅色非硫黄細菌の細胞物質合成のための還元的硫酸塩同化<sup>26)</sup>との間で、 $SO_4$ -競争という新たな問題が生じる可能性もある。

正味の水素回収量を議論する際に重要な要素は、水素取込ヒドロゲナーゼの存在である。本研究で採用したメチレンブルー還元法では、pH や酸化還元電位などの緒条件を培養系のそれと一致させることは事実上難しい。ヒドロゲナーゼはアルカリ側で活性が高まることが報告されており<sup>27)</sup>、活性測定時のpH8 から考えると、活性値はその時点でのヒドロゲナーゼのうち活性を持つものと持たないものとを合わせた潜在総量と考える方が妥当であるといえる。紅色非硫黄細菌におけるヒドロゲナーゼによる水素取込活性は、有機基質の減少<sup>28)</sup>、ニトロゲナーゼによる水素生成の活性化<sup>11)</sup>、気相部水素分圧の上昇<sup>29)</sup>などが引き金となり活性化することが報告されている。この考え方で図-4～図-6をみると、純粋系と開放系の両系では類似したヒドロゲナーゼ活性を示しているが、混合培養系では培養の長期化に伴い増大していることから、もはや水素を生成ではなく吸収する活性が卓越した培養系に変遷してしまったといえることができる。

以上の考察から、開放系においては、1) 緑藻の光合成により発生した酸素が紅色非硫黄細菌の光合成に阻害の影響を及ぼし、2) 光合成が阻害されることで唯一のエネルギー獲得法に支障を来し ATP の合成が不足した、3) 増殖速度の低下とニトロゲナーゼの合成が低下し、4) 窒素制限環境の中で増殖競争に淘汰されて wash out した、という機構が想定される。同様に混合培養系においては、1) 水素消費活性が卓越したこと、2) 反応槽内で光合成細菌と雑菌群との間で基質である乳酸の競争が起こっていたこと、3) 増殖競争により紅色非硫黄細菌群の優占度が徐々に低下し、それが硫化物阻害により加速された、という機構に加え、4) 硫化水素による水素生成の阻害が起きていた可能性、をあげることができる。勿論、いずれの場合でも他の競争因子、例えば菌体合成の基本要素である窒素源の競争が直接影響していた可能性も排除できないが、このことも含め、本研究から想定される微生物間の諸関係を図-12に模式的に表現した。

工学的にみて水素の生成量が培養期間の割に小さいと考えられるが、本研究においては、水素回収量の上昇を検討する以前に水素生成の継続に主眼をおいていることを付け加えたい。

## 5. 結論

これまで純粋培養で議論されてきた紅色非硫黄細菌による連続水素生成プロセスに対する、コンタミ

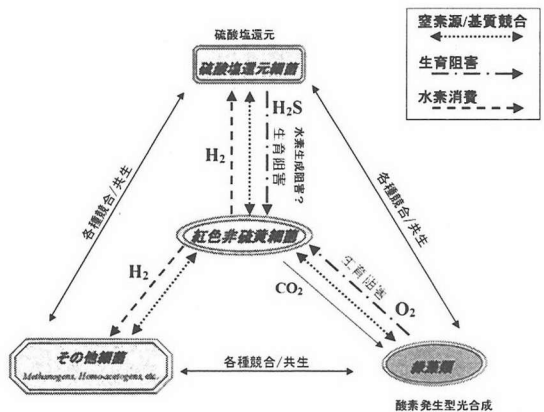


図-12 微生物間相互作用模式図

ネーションの影響についての基礎的知見を得るために行った3系統の連続培養実験の結果から得られた結論は以下の通りである；

1) 光合成反応槽内の窒素制限という特殊条件の中で、緑藻など植物性光合成生物の増殖により生成する O<sub>2</sub> により、紅色非硫黄細菌の光合成によるエネルギー獲得および増殖に強い阻害を及ぼす。

2) 硫酸塩還元細菌の増殖により生成する硫化物により、紅色非硫黄細菌の増殖阻害が起こり、増殖速度が低下することで窒素競争に淘汰されることで、水素生産者である紅色非硫黄細菌の優占度が低下する。

3) さらには、ニトロゲナーゼへの直接的阻害や、水素消費細菌群による水素消費の卓越、基質競争などの複数の機構が複雑に作用することによって、反応槽の水素生成活性を低下させる原因となる。

本研究の結果は単なる一例であり、今後数多くの検討を行い、知見を蓄積していく必要があると考えられる。実廃水における雑菌群の含有量そして種類の点で、実験室において調整された模擬廃水とは比較にならない程高いと考えられる。その意味で本結果は微生物混入による基礎的現象の一部分を捉えたに過ぎない。また、実廃水中の成分変動による影響や、照射エネルギーが変動する太陽光利用を想定した場合の、曇天時や夜間の光エネルギーが得られない期間の生物相の挙動などについても、反応槽内の微生物群の詳細な定量をも交えながら、検討を加えなければならない。

謝辞：本研究は科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業(CREST)の研究プロジェクトの一部として行われたものである。記してここに謝意を表する。

## 参考文献

- 1) Sasikala, K., Ramana, Ch.V., Rao, P.R. and Kovacs, K.L.: Anoxygenic phototrophic bacteria: Physiology and advances in hydrogen production technology. *Advances in Applied Microbiology*, Vol.38. pp.211-295, 1993.
- 2) Zürrer, H. and Bachofen, R.: Hydrogen production by the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol.37. No.5. pp.789-793. 1979.
- 3) Thangaraj, A. and Kulandaivelu, G.: Biological hydrogen photoproduction using dairy and sugarcane waste waters. *Bioresource Technology*. 48, pp.9-12, 1994.
- 4) Fascetti, E., D'addario, E., Todoni, O., and Robertiello, A.: Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes. *International J. Hydrogen Energy*, Vol.23. No.9. pp.753-760. 1998.
- 5) 三宅 淳: 光合成細菌を利用した光水素生産, セラミックス, 25, No.7, pp.593-597, 1990.
- 6) Miyamoto, K. and Miura, Y.: Problems in photobiological production of hydrogen. *Process Biochemistry*. 15. pp.23-26. 1980.
- 7) American Public Health Association: *Standard method for the examination of water wastewater*, 18<sup>th</sup> ed. American Public Health Association, Washington D.C. 1992.
- 8) 岩永 貞昭: タンパク質の化学 I (生化学実験講座 I). 日本生化学会編, 東京化学同人, pp.45, 1976.
- 9) Meyer, J., Kelley, B.C. and Vignais, P.M.: Effect of light on nitrogenase function and synthesis in *Rhodospseudomonas capsulata*. *J. Bacteriology*, Vol.136. No.1. pp.201-208. 1978.
- 10) 佐々木健, 竹野健次, 江本美昭: 光合成細菌による有機酸, 揮発性脂肪酸の消費と水素生成. 水環境学会誌, 第19巻, 第1号. pp.63-70, 1996.
- 11) Colbeau, A., Kelley, B.C. and Vignais, P.M.: Hydrogenase activity in *Rhodospseudomonas capsulata*: relationship with nitrogenase activity. *J. Bacteriology*. Vol. 144, pp.141-148. 1980.
- 12) Nagamine, Y., Kawasugi, T., Miyake, M., Asada, Y. and Miyake, J.: Characterization of photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* RV for hydrogen production. *J. Marine Biotechnology*, 4, pp.34-37. 1996.
- 13) Segers, L. and Verstraete, W.: Selective inhibitors for continuous non-axenic hydrogen production by *Rhodobacter capsulatus*. *J. Applied Bacteriology*, 61, pp.547-557, 1986.
- 14) Segers, L. and Verstraete, W.: Chemical control of eucaryotic and blue-green algae in anaerobic photoreactors culturing *Rhodospirillaceae*. *Experientia*, 41, pp.99-101. 1985.
- 15) 伊津 恭子, 中島 典之, 山本 和夫: 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, 環境工学研究論文集, 第35巻, pp.439-446, 1998.
- 16) 小林 達治: 光合成細菌で環境保全. 社団法人 農山漁村文化協会. 1993.
- 17) 平山 修: 光合成細菌の色素およびユビキノン生成 特集シリーズ光合成細菌 I, 発酵と工業, Vol.36, No.7, pp.563-573, 1978.
- 18) Oelze, J. and Klein, G.: Control of nitrogen fixation by oxygen in purple nonsulfur bacteria. *Archives of Microbiology*. 165, pp.219-225, 1996.
- 19) Tsygankov, A.A. and Laurinavichene, T.V.: Influence of the degree and mode of light limitation on growth characteristics of the *Rhodobacter capsulatus* continuous cultures. *Biotéchnology and Bioengineering*, 51, pp.605-612, 1996.
- 20) Aiking, H. and Sojka, G.: Response of *Rhodospseudomonas capsulata* to illumination and growth rate in a light-limited continuous culture. *J. Bacteriology*, 139, pp.530-536. 1979.
- 21) Hochman, A. and Burris, R.H.: Effect of oxygen on acetylene reduction by photosynthetic bacteria. *J. Bacteriology*. 147, pp.492-499. 1981.
- 22) Klein, G., Jahn, A., Dörffler, M. and Oelze, J.: Activity and expression of nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* under aerobiosis in the dark and in the light. *Archives of Microbiology*, 159, pp.233-236, 1993.
- 23) van Niel CB: *Bact. Rev.* 8, pp.1. 1944.
- 24) 小野(伊津) 恭子, 山本 和夫: 光合成細菌を用いた廃水処理・有機物生産における紅色非硫黄細菌群の選択的増殖の促進. 土木学会論文集, No.699/VII-22, pp.23-31. 2002.
- 25) Hansen, T.A. and Gemerden, H.: Sulfide utilization by purple nonsulfur bacteria. *Archives of Mikrobiology*, 86, pp.49-56, 1972.
- 26) Trüper, H.G.: Sulfur metabolism. In *The photosynthetic bacteria*, ed. Clayton RK & Sistrom WR, pp.677-690, Plenum Press, New York. 1978.
- 27) Tsygankov, A.A. and Gogotov, I.N.: Influence of temperature and pH of the medium on the nitrogenase and hydrogenase activity of *Rhodospseudomonas capsulata* in nitrogen fixation. *Mikrobiologiya*, Vol.51, No.3, pp.396-401, 1982(translated in Plenum Publishing Corporation).
- 28) Kelley, B.C., Meyer, C.M., Gandy, C. and Vignais, P.M.: Hydrogen recycling by *Rhodospseudomonas capsulata*,

*FEBS Letters*, Vol.81, No.2, pp.281-285, 1977.

29) Tsygankov, A.A., Fedorov, A.S., Laurinavichene, T.V., Gogotov, I.N., Rao, K.K. and Hall, D.O.: Actual and potential rates of hydrogen photoproduction by continuous culture of the purple non-sulphur bacterium *Rhodobacter*

*capsulatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, pp.102-107, 1998.

(2002. 5. 9 受付)

## LONG-TERM CONTINUOUS HYDROGEN PRODUCTION BY *RHODOSPIRILLACEAE* UNDER NON-AXENIC CONDITIONS

Shinji OGATA, Hirokazu SATO and Tatsuya NOIKE

Continuous culturing for hydrogen production using L-lactate as substrate was investigated for the construction of hydrogen recovery process from mixed organic acid waste by *Rhodospirillaceae*. Reactor no.1 under axenic condition had produced hydrogen at the rate of 16ml/h/l-reactor steadily. In reactor no.2 to which non-sterile medium was supplied under axenic condition, hydrogen production rate dropped suddenly at after 400hour-cultivation. The drop of hydrogen production was due to the inhibitory affection of the growth of algae. In reactor no.3 in which the mixed culture was inoculated, hydrogen production was inhibited owing to hydrogen sulfide produced by sulfater reducing bacteria(SRB). The competition among microorganisms appearing in the reactor was discussed in this study.