

有機酸を炭素源として水素を生産する光合成細菌の集積・馴養に関する基礎研究

熊本大学工学部 学生会員 ○岡崎 優子
熊本大学工学部 正会員 川越 保徳

熊本大学大学院 非会員 高橋 弘和
熊本大学工学部 正会員 古川 憲治

1. はじめに

二酸化炭素の増加による地球温暖化が問題となっている今日、化石燃料の代替的なエネルギーとして水素が注目されている。水素は燃焼時に二酸化炭素を生じないという利点を持ち、次世代の有力なエネルギー源の一つである。他方、これまでの廃水処理技術は処理に主眼が置かれていたが、現在は処理にとどまらずそれを有効利用する技術の確立が望まれており、微生物を利用した有機性廃水からの水素生成もその一つとして高い関心が寄せられている。

本研究では、嫌気性水素発酵の最終産物である有機酸を基質に水素を生成できる光合成細菌の集積・馴養と効率的な水素の回収を目指すことを目的とした。今回は種々の植種源を用いて光合成細菌による水素生成を試み結果を得たので報告する。

2. 実験方法

2.1 培地組成

本研究では、リンゴ酸と酢酸の二種類の炭素源を用いた。表-1、表-2にそれぞれの培地組成、表-3に実験条件を示す。

2.2 回分実験

図-1に本実験で用いた装置の概要を示す。植種源としては、有明海の干潟、熊本城二の丸公園のお堀、上江津湖及び下江津湖の各所から採取した底泥試料、および下水消化汚泥、下水返送汚泥、海水希釈し尿処理汚泥（以下、干潟、二の丸、上江津、下江津、消化、返送、海水希釈と略す）など計6種類を用いた。また対照実験のために、水素生成光合成細菌として報告されている *Rhodobacter sphaeroides* S（以下S株と略す）を用いた。

実験方法は、100ml容の三角フラスコ内に上記の植種源と培地（リンゴ酸培地、酢酸培地）を100mlになるように調製し、窒素源としてグルタミン酸ナトリウム0.17g/Lを添加した。また、海水を含む試料からの植種源を用いる場合には、2%の塩化ナトリウムを添加した。フラスコ内をリンゴ酸培地ではpH7.2、酢酸培地ではpH5.5に各々調整し、気相部をArガスで置換して嫌気状態にした。装置をインキュベーター内に設置し温度を一定に保った状態で試料を攪拌し、光（タングステンランプ、150W）を照射して光合成細菌による水素生成反応を行った。

ガス生成量は、水上置換法によりガスを捕集し、シリンジの目盛で計測した。生成ガス中の水素濃度は、ガスクロマトグラフ(SHIMADZU GC-14B)を用い測定した。また細菌の濃度はOD₆₆₀で測定した。

表-1 培地の組成 (リンゴ酸培地)

成分	濃度 (mg/L)
C ₄ H ₆ O ₅	4000
KH ₂ PO ₄	500
K ₂ HPO ₄	500
MgSO ₄ · 7H ₂ O	200
CaCl · 2H ₂ O	53
Thiamine-HCl	1.0
Nicotinic acid	1.0
Biotin	0.01
MnSO ₄ · 5H ₂ O	1.2
Ferric citrate	2.45
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.95
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1.0

表-2 培地の組成 (酢酸培地)

成分	濃度(mg/L)
CH ₃ COONa · 3H ₂ O	5500
KH ₂ PO ₄	1500
K ₂ HPO ₄	1000
MgSO ₄ · 7H ₂ O	200
CaCl ₂	70
MnSO ₄ · 4H ₂ O	2.0
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1.0
EDTA (disodium salt)	20
FeSO ₄ · 7H ₂ O	20
H ₃ BO ₃	3.0
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.95
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.24
Cu(NO ₃) ₂ · 3H ₂ O	0.04
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.02
biotin	0.01
thiamine-HCl	1.0
nicotinic acid	1.0
酵母エキス	20

表-3 実験条件

	リンゴ酸培地	酢酸培地
pH	7.2	6.0
温度 (°C)	35.0 ± 1.0	
照度 (Lux)	6000	10000

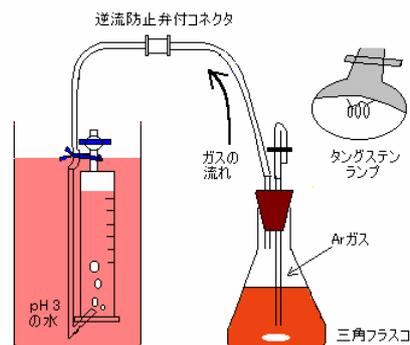


図-1 装置概要

3. 実験結果および考察

図-2 に、リンゴ酸培地における各植種源での最終累積ガス生成量を示す。植種の違いによって発生ガス量に差異が見られ、全ガス量、水素ガス量ともに干潟底泥を植種したものが最も高かった。しかし干潟サンプルでは、全ガス量中の水素ガス量の割合が 44%程度と低い結果となった。比較対照として用いた S 株は、干潟サンプル、消化サンプル、二の丸サンプルの全ガス量より低かった。しかし、全ガス量中の水素ガスの割合は最も高い値を示した。

図-3 に、干潟サンプルにおける生成ガスおよび水素ガスの累積量と菌体濃度の経時変化を示す。時間経過に伴い、菌の増殖とガスの発生が見られた。ガスは、全ガス、水素ガスともに約 25 時間後から発生した。25~50 時間は、菌体濃度、ガス量ともに大幅に増加し、光合成細菌によって水素が生成していることが明らかとなった。50 時間後からは、菌体濃度がほぼ一定となり、それに伴い全ガス、水素ガスもほぼ一定となった。

図-4 には、酢酸培地における各植種源の最終累積ガス量を示す。酢酸培地では pH5.5 で 4 日間培養を行ったが、菌体の増殖およびガスの生成は見られなかった。そこで pH を 5.5 から 6.0 に調整したところ、24 時間後から菌体の増殖およびガスの生成が見られた。発生ガス量に関しては、干潟サンプル、二の丸サンプルにおいてリンゴ酸培地の場合に比べて高かった。全ガス中の水素ガスの割合は、海水希釈 31%、干潟 69%、二の丸 47%となった。全ガス中の水素ガスの割合は、リンゴ酸培地の場合よりも干潟サンプル、二の丸サンプルともに 25%以上増加するという結果が得られた。

4. まとめ

1. リンゴ酸培地、酢酸培地ともに植種の違いによって発生ガス量に差異が見られた。
2. リンゴ酸培地における光合成細菌からのガス生成量は、全ガス、水素ガスともに干潟サンプルが最も高かった。全ガス中の水素ガスの割合が最も高かったのは、対照用に用いた S 株であった。
3. 細菌の増殖に伴いガスが発生し、光合成細菌による水素生成反応が確認された。
4. 酢酸培地において pH5.5 では水素生成および菌体増殖は見られなかったが、pH6.0 に調整したところ 24 時間後から水素生成が確認された。
5. 酢酸培地における光合成細菌からのガス生成量は、リンゴ酸培地と比較すると高く、全ガス中の水素ガスの割合も高かった。

【謝辞】本研究で用いた *Rhodobacter sphaeroides* S は、広島国際学院大学佐々木 健先生から譲渡して頂きました。また佐々木 健先生には有益な助言とご指導を賜りました。記して深謝致します。

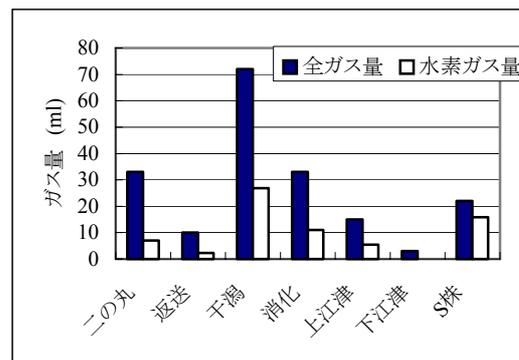


図-2 リンゴ酸培地における最終累積ガス量

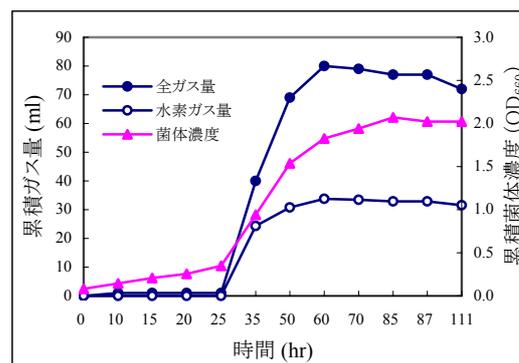


図-3 累計ガス量及び菌体濃度の経時変化 (干潟)

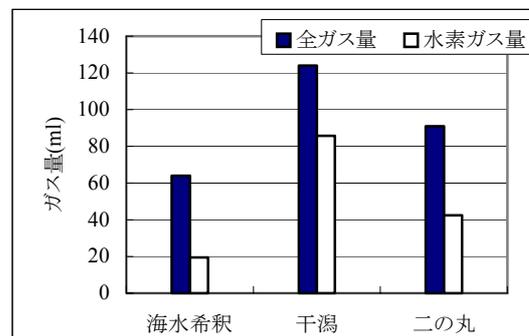


図-4 酢酸培地における最終累積ガス