

海産光合成水素生成細菌の集積と単離に関する研究

熊本大学工学部 学生会員 沖 幸憲
熊本大学工学部 非会員 長谷川 仁
熊本大学工学部 非会員 藤本 綾
熊本大学工学部 正会員 川越 保徳
熊本大学工学部 正会員 古川 憲治

1. はじめに

廃棄物の処理・処分は、健全な環境を維持する上で重要な課題である。さらに現在は、廃棄物を処理するという観点ではなく、廃棄物を有用資源として、できる限り有効利用しようとする資源循環型社会の構築が模索されている。このような背景を踏まえ、我々の研究室では有機性廃棄物を処理すると同時に水素ガスを回収するための生物処理技術を確立すべく研究を進めている。水素ガスは、その高いエネルギー効率から将来有望な次世代エネルギーとされている。有機性廃棄物や廃水からの水素生成には、大きく嫌気性水素発酵と光合成水素生成が知られており、前者では主に糖質等の有機物から比較的安定に水素を回収できる反面、揮発性有機酸(VFAs)等の副産物が残存するためその処理が必要となる。また、後者の光合成水素生成技術では多種多様な有機物を無機化でき、かつ水素が回収可能な反面、光源に要するコストや光エネルギー転換効率の低さ等、実用化の面では未だ解決すべき課題も多い。そこで現在、我々は水素発酵廃液中の副産物を基質として、水素を生成できる海産光合成水素生成細菌を用いた省エネ、低コスト型の水素生成技術に関して研究を行なっている。

本報では嫌気性水素発酵の主要副産物である乳酸、酢酸、酪酸を基質として水素を生成する海産光合成水素生成細菌の集積とその単離に成功し、基礎的な知見を得たので報告する。

2. 実験方法

2.1 植種源

植種源として、有明海の干潟から採取した海水・底泥試料を 2.5 分間、超音波処理し、孔径 1mm の樹脂製フィルターに通したものをを用いた。

2.2 培地組成

炭素源には、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、酪酸ナトリウムを各々 3g/L となるように混成したものを使用し、窒素源に L-グルタミン酸を用いた。これに、鉄やマグネシウム等の無機成分を添加した。また、海産光合成水素生成細菌の集積のため、塩化ナトリウムを 2%(w/v)となるように添加し、pH を 7.0 に調整した。また、細菌の単離や単離細菌を用いた実験の際にはオートクレーブによる培地を滅菌した。

2.3 回分実験

200ml 容の三角フラスコ内の気相部をアルゴンガスで置換して嫌気状態にした。フラスコを 30°C の恒温水槽内に設置し、スターラーにて試料の攪拌を行い、水槽側面からタングステンランプをフラスコ表面部で 6000lx となるように照射して培養を行った。培養後、培養液を新鮮な同培地に植え継ぎ、回分培養を繰り返して海産光合成水素生成細菌を集積した。

2.4 海産光合成水素生成細菌の単離

光合成水素生成細菌の集積が確認された培養液を種種に、寒天平板培地にて塗抹培養を繰り返し、コロニーを得た。任意のコロニーについて上記 3 種の VFAs の資化能および水素生成能を確認し、細菌の単離を図った。

2.5 分析方法

生成ガスは、シリンジにて水上置換法で捕集し生成量を計測した。水素濃度はガスクロマトグラフを用い、VFAs の定量は高速液体クロマトグラフにて測定した。培養液については、pH、菌体濃度(OD₆₆₀)を測定した。また、集積細菌の菌叢を解析するために、16S-rDNA に関する PCR-DGGE と DNA 配列の相同性検索を行った。

3. 実験結果および考察

3.1 海産光合成水素生成細菌の馴養と水素の生成

集積を目的として馴養を繰り返したところ、2回目の培養では、ガスの生成はないものの、光合成細菌の生育が認められ、さらに培養3回目以降からガス生成が見られるようになった。図-1にpHとOD₆₆₀、図-2に累積水素ガス生成量とVFAs濃度の経時変化を示す。

pHは50時間経過後まで若干上昇し、一旦減少した後、再度pH8.0まで上昇して安定した。細菌の増殖は25時間経過後から始まり100時間後に一度止まった後、180時間経過後から再度増殖が認められた。ガスの生成は約40時間経過後から始まり、約180時間経過後に終了した。最終的な水素の累計量は130mLであった。VFAs濃度については、乳酸、酢酸がほぼ消費され、ガスの生成が止まった後、酪酸が減少しはじめた。

3.2 PCR-DGGEによる菌叢解析

馴養した試料からDNAを抽出し、PCR-DGGEによる菌叢解析を行った。得られた複数のDNAバンドの塩基配列を調べ、相同性解析を行ったところ、主に*Rhodobacter*属の細菌が集積されていることがわかった。*Rhodobacter*属については水素生成能を有する紅色非硫黄細菌であることが知られており、本実験においても、これらの細菌が主に水素の生成に貢献しているものと推定される。

3.3 海産光合成水素生成の単離

集積細菌より得られた単一コロニーから任意に7つを選択し、回分培養により、VFAs資化能と水素生成能を調べた。その結果、4つのコロニーでガスの生成が見られ、特に2つのコロニーでは顕著な水素の生成が見られた。図-3に、1コロニーを種源とした場合の累積水素ガス生成量とVFAs濃度の経時変化を示す。水素ガスの生成は50時間経過後から始まり、250時間まで続いた。最終的な水素累計量は140mlとなった。また、pH、細菌の増殖の経時変化は集積培養の実験結果と同様の傾向がみられた。また、16S-rDNAの配列から、単離細菌は*Rhodobacter*属であることが推定された。本細菌の生理学的諸性質や水素生成能については今後検討する予定である。

4. まとめ

- 1) 乳酸、酢酸、酪酸を資化して、水素生成能を有する海産光合成水素生成細菌が集積された。
- 2) 集積細菌の菌叢解析の結果、主に紅色非硫黄細菌の*Rhodobacter*属が優占していることが分かった。
- 3) 乳酸、酢酸、酪酸を資化して、水素生成能を有する海産光合成水素生成細菌が単離され、DNA配列から*Rhodobacter*属の細菌と推定された。

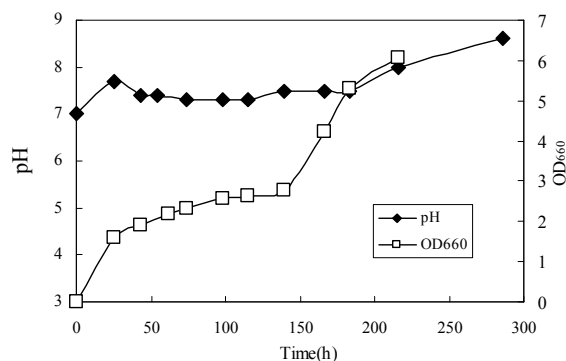


図-1 集積された光合成水素生成細菌による累積水素ガス量とVFAs濃度の経時変化

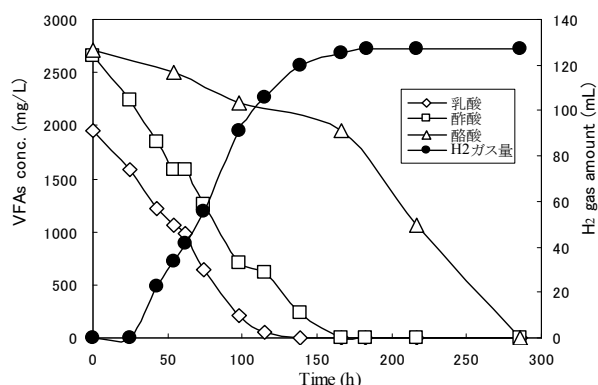


図-2 集積された光合成水素生成細菌の培養時におけるpHとOD₆₆₀の経時変化

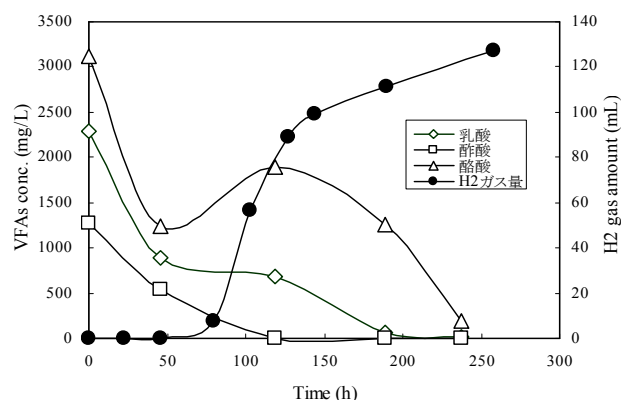


図-3 単離された光合成水素生成細菌による累計水素ガス量とVFAs濃度の経時変化