

VII-16

水素生成細菌の増殖特性

東北大学工学部

中村純治

東北大学工学研究科 正会員 ○宮原高志

東北大学工学研究科 正会員 野池達也

1. はじめに

近年、市民社会の環境問題に対する関心は非常に高まりつつあり、なかでも化石燃料による炭酸ガス排出を原因とする大気温暖化の問題が顕在化していることは、我々が十分よく知るところである。したがって、炭酸ガスの排出総量を削減していくためには、従来の化石燃料に依存したエネルギー獲得体系から脱却をはかりながら、これに代替する炭酸ガス発生量の少ない新しいエネルギー変換プロセスの早期開発とその早期実現を目指していかなければならない。

現在、この目的にかなうものの一つとして、偏性嫌気性細菌である水素生成細菌を利用した水素発酵があげられる。水素ガスは燃焼した際、理論的には水蒸気の発生のみで化石燃料のような炭酸ガスの発生はともなわないという利点があり、下水汚泥などの廃棄物を利用した水素発酵でのエネルギー回収は、炭酸ガス対策としてきわめて有効であると考えられる。本研究では、1989年に水素爆発事故を起こした大豆貯蔵庫内の大豆粕汚泥からの水素生成細菌の純粋分離とその同定を行ない、この菌株を用いた回分実験による基礎的な水素生成特性と増殖特性について検討した。

2. 実験試料および方法

(1) 大豆粕汚泥からの純粋分離

実験試料として上記大豆粕汚泥を本研究室で長期間、嫌気培養保存していたものを用いた。この培養液を嫌気ボックス内で GAM 寒天プレートに植菌し 35℃ で培養した。形成される種々のコロニーを新規寒天プレートに次々と植菌し継体培養した。各寒天プレートのコロニーの形状が一樣となるまでこの操作を繰り返し、本研究

では特に GAM 寒天プレート上で生育可能な全菌株の純粋分離を行なった。

(2) 回分実験による水素生成細菌の同定

純粋分離できた GAM 寒天プレート上のアイソレートしたシングルコロニーを PY 液体培地に植菌し、菌株の overnight による前培養を行なった。120 mL 容バイアルビ内に基質として MPN 液体培地を 40 mL 加えて窒素ガスで置換し、前培養できた PY 培地を植種菌とし 20 mL 注入した。その後、60 stokes/min で恒温振盪培養した。

本研究では回分実験による菌体の増殖量とこれにともない産生される全ガス量と水素ガス量、および主な基質である残存グルコース濃度の経時変化を測定した。全ガス量はガラスシリンジのガス平衡により測定した。全ガス中の水素ガス量は、ガスクロシリンジでバイアルビン内の気相部からガスを 0.4 mL 採取し、TCD ガスクロマトグラフで測定した。また、菌体量はバイアルビン内の液相部からプラスチックシリンジで 1.0 mL を採取し、吸光度計を用い、波長 600 nm での optical density（以後、O.D.と略）を測定した。また、菌体増殖にともない消費されるグルコース濃度は、グルコース B-テストワコーを用いて GOD 法で測定した。

3. 実験結果および考察

GAM 寒天プレートで純粋分離を行なった結果、約 4 回ほどの継体分離で最終的に 26 種類の菌株を得ることができた。このうち、回分実験の結果から水素生成能のある菌株は 10 種類確認することができた。この中で水素生成能の比較的高かった菌株（S IID 283）の 16S

rRNA 遺伝子配列の解析結果, *Clostridium* 属の *cadaveris* と最も近縁の菌株であることが確認された (株式会社 NCIMB Japan 実施). この菌株 (*S IID 283*) の近縁と考えられる 10 菌株の系統樹を図-1 に示した.

また, 培養温度を 35℃ と 20℃ で行なった回分実験による増殖特性の経時変化は図-2 に示したとおりである. それぞれ対数増殖末期から O.D. の減少が観察され, 栄養枯渇による菌体の死滅および自己溶菌化が起こっているものと考えられる.

次に, このときの全ガスおよび水素ガスの累積ガス生成特性をそれぞれ図-3, 4 に示した. 図-2 の増殖特性と合わせ, 菌体の増殖とともにガス生成量が増加していることが分かる. また, この菌株は 20℃ の比較的低温条件下でも 35℃ と比べ対数増殖末期に至るのに約 40 時間の大幅な遅滞があるが, 十分生育可能で水素生成能があることが確認された.

4. 今後の検討課題

水素発酵の実用化を検討している実際の嫌気性消化汚泥中には, メタン生成細菌などの水素資性細菌が存在しているため, 効率よく水素ガスを回収する妨げとなっている. そこで, *Clostridium* 属などの細菌は栄養枯渇などの外的環境が悪化すると, 対数増殖末期にかけて胞子を形成することが知られており, 非胞子形成細菌であるメタン生成細菌などを選択的に不活化するための前処理として加熱処理が行なわれている.

しかしながら, 本研究で検討した菌株は, 対数増殖末期で自己溶菌化を起こしており, 本研究での培養条件は胞子形成に不適切, もしくは, この菌株がもともと胞子を形成しにくい種類のものであったことが推測される.

今後, 10℃ や 15℃ でのさらに低温条件下での水素生成特性やグルコース (炭水化物系) やペプトン (タンパク質, アミノ酸系) などの基質濃度の変化が水素発酵に与える影響について検討する予定である.

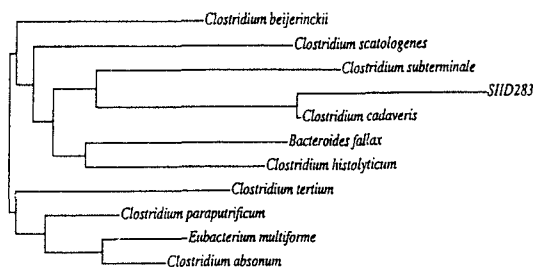


図-1 *S IID 283* の近縁と考えられる 10 菌株の系統樹

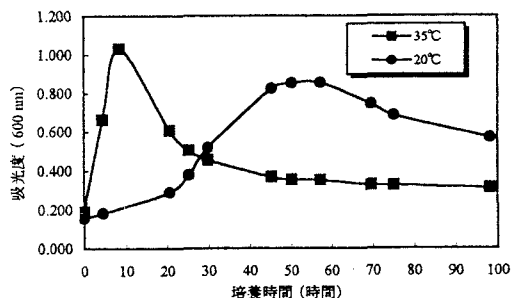


図-2 35℃, 20℃での増殖特性

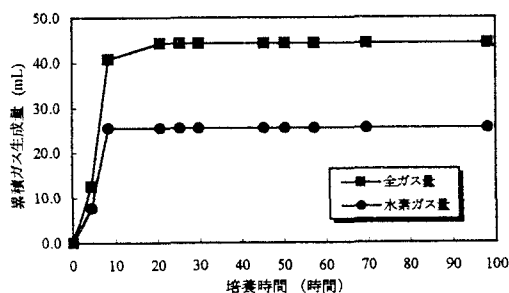


図-3 35℃での累積ガス生成特性

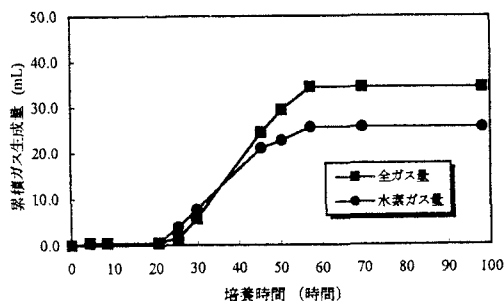


図-4 20℃での累積ガス生成特性