

ヒドリドイオン水から窒素固定菌による水素生成

呉工業高等専門学校 正会員 ○及川 栄作

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 CaH_2 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、水素を吸蔵させた珊瑚カルシウムを含有し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¹⁾。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²⁾。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。

窒素固定菌(根粒菌)のニトロゲナーゼ酵素は酸素に弱く、酸素濃度が認められる条件では、不活化することが知られている。また、ニトロゲナーゼは大気中の窒素 N_2 と水素陽イオン H^+ からアンモニア NH_3 を生成すると同時に、水素 H_2 を生成することができる。窒素 N_2 がいない条件では、 H^+ イオンから水素 H_2 のみを生成する。そこで、窒素固定菌は水素生成の観点から、燃料電池への応用が期待されている。馬越ら³⁾は、金属水素化物の CaH_2 や TiH_2 を溶かして作製した、水素陰イオン(ヒドリド H^-)水へ、予め培養した窒素固定菌を集菌した上で、菌体溶液を透析膜に入れたままで投入した場合に、水中に溶存水素 DH が生成されることを報告している。この度は、溶存酸素濃度が十分に含まれているヒドリド H^- イオン水から窒素固定菌の水素生成が確認されたことから、この際の溶存酸素濃度 DO の測定結果を報告する。

2. 実験方法

2-1. 供試菌株とヒドリドイオン水生成材料

使用した菌株は、蔵王山の湧き水から分離した窒素固定菌株 *Mesorhizobium* sp. GN1 株およびヒドリドイオン水生成菌 *Novosphingobium* sp. G 株と、対照として、*Bradyrhizobium japonicum* NBRC-14792 株、*Mesorhizobium loti* NBRC-14779 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有培地を用いて、 $30^\circ C$ 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、 $30^\circ C$ 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、 $500\mu L \sim 1mL$ に小分けし、マイクロチューブへ移し、 $-85^\circ C$ で一旦凍結保存した。

2-3. ヒドリドイオン水から溶存水素の発生と溶存水素および溶存水素の測定

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 3,500 または 6,000~8,000 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 $30^\circ C$ 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、氷中で解凍した窒素固

キーワード 水素, ヒドリド, アンモニア, 窒素固定, 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

定菌を透析膜へ移した上で、ヒドリドイオン水へ添加し、その後、1時間おきに2日～4日間溶存水素濃度 DH, 溶存酸素濃度 DO, 酸化還元電位 ORP, pH を測定した。一方、金属水素化物や水素吸蔵珊瑚カルシウム含有セラミックボール 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、一晚室温で静置して作製した (図1)。

3. 実験結果および考察

1) pH の変化

水素化カルシウムや水素吸蔵珊瑚カルシウム含有セラミックボールを用いて作製したヒドリドイオン水は pH 値が8～10程度のアルカリ性であったが、この水へ窒素固定菌を添加すると、徐々に下がり、水素生成が検出される際は7～6程度の中性になった。よって、pH 水素の生成条件は、これまでのニトロゲナーゼやヒドロゲナーゼによる水素生成の報告と一致した。

2) 酸化還元電位の変化

水素化カルシウムや水素吸蔵珊瑚カルシウム含有セラミックボールで作製したヒドリドイオン水の ORP 値 +150mV 程度であったが、この水へ窒素固定菌を添加すると、徐々に下がり、水素生成が検出される際は-500mV 程度まで低下した。よって、この ORP 値による水素の生成条件は、強い還元状態であり、これまでのニトロゲナーゼやヒドロゲナーゼによる水素生成の報告と一致した。

3) 溶存水素濃度の変化

水素化カルシウムや水素吸蔵珊瑚カルシウム含有セラミックボールを用いて作製したヒドリドイオン水の溶存水素濃度は、添加直後は水と激しく反応し、数 $\mu\text{g/L}$ の水素濃度が検出されたが、直ぐに検出されなくなった。この水へ窒素固定菌を添加すると、2日目に徐々に水素濃度が検出され、最大300 $\mu\text{g/L}$ 程度の水素濃度が検出され、その後徐々に減少した。

4) 溶存酸素濃度の変化

水素化カルシウムや水素吸蔵珊瑚カルシウム含有セラミックボールを用いて作製したヒドリドイオン水の溶存酸素濃度は6mg/L 程度検出されたが、この水へ窒素固定菌を添加すると、徐々に減少し、水素生成が検出されるようになる1晩後からは検出されなくなった。この嫌気状態は、水素濃度が検出されなくなった後も3日間に渡り維持された。

4. おわりに

これまで、窒素固定菌による水素生成はニトロゲナーゼ酵素が酸素に弱く、酸素がある条件で水素生成は行われにくいとされて来た。溶存水素濃度が十分に含まれる H⁺ イオンを含むヒドリドイオン水へ窒素固定菌を加えた場合の水素生成能は、自らが酸素を水に変えて無くすと考えられ、また pH 値を6程度まで下げ、ORP 値を-500mV 程度以下へ下げた後に生成されることが示された。最近、ニトロゲナーゼによるアンモニア合成に、窒素 N₂ の三重結合を還元的に切断する際にヒドリド H⁻ が関わっているとした報告がなされている。窒素固定菌による水素やアンモニア生成は、電子を2つ有したヒドリドの酸素や窒素の還元が重要であることが改めて示唆された。この後はこれらの知見を活かして酸素濃度存在下でも発電可能なバイオ燃料電池の開発等へ応用を考えて行きたい。

参考文献

- 1) 馬越唯斗, 及川栄作, 及川胤昭: 微生物を用いたヒドリドイオン水から水素の発生, 日本農芸化学会2015年度大会(2015年3月).
- 2) 及川栄作, 及川胤昭: 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, 土木学会全国大会第72回年次学術講演会(2017年9月).

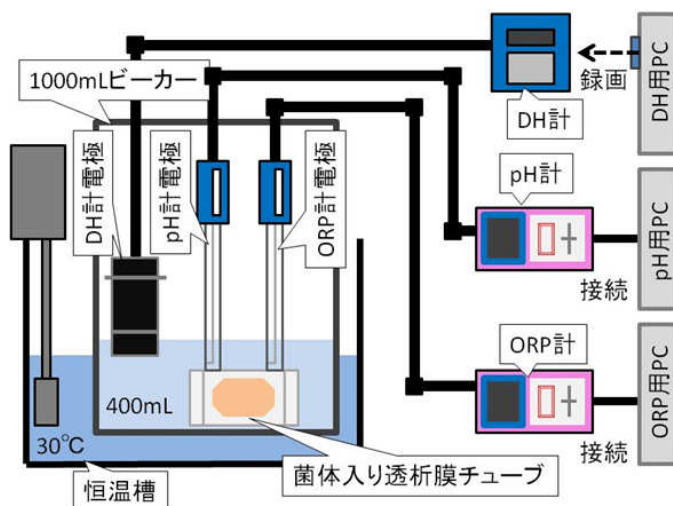


図1 実験装置