

環境微生物からの光合成細菌の単離・同定

およびその水素生成能の検討

日大生産工(院) ○小林 淳平

日大生産工 神野 英毅

緒言

水素は燃焼による炭酸ガスの発生が無く、クリーンエネルギーとして注目されている。また一部の光合成細菌は嫌気・明条件下で有機酸を基質とした水素発生を行うことで知られている。このような微生物を用いた水素発生の利点は環境調和性に優れている点である。太陽電池や風力発電などでのように大きな初期投資が不要であり、また活性を失った微生物は分解して自然の循環系に入るため、非生物的方法に比べて後始末は楽である。さらに、光合成細菌や嫌気発酵による水素生産では、有機廃棄物の処理を兼ねることもできるという大きな利点がある。

これまで Miyake らによる光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides*RV(以下 RV)と発酵菌による混合固定化を用いた水素発生実験で、7.0mol H₂/mol glucose と高い収率を得ることに成功している。しかし様々な発酵菌との混合固定化が検討されてきたにもかかわらず、この値は理論収率である 12.0mol H₂/mol glucose には及ばず、更に検討が必要であるそこで我々は RV に代わる新たな光合成細菌を環境微生物から単離し、更なる水素生産効率の向上を目的とする研究を実施した。

実験方法

1. 菌の単離

自然界における光合成細菌は湖、池、沼、下水、水田、沿岸水、温泉、灌水土壌といった富栄養化した水界に比較的多く存在する。

このような場所から採取してきた試料を酢酸基本培地で窒素ガス存在・光照射(1500~3000lux)・嫌気条件下で呈色するまで(約 10 日程度)培養する。次にその培養液を aSy 寒天培地(コハク酸)上に塗布し、30℃・好気・暗条件下で約 2 週間程度の培養を行う。上記の方法により形成されたコロニーを採取し、aSy 寒天培地上に塗布し、嫌気・明条件(1500~3000lux)で生育するものを選択し、水素発生用菌体として用いた。

2. 菌株の同定

光合成細菌は主に紅色硫黄細菌 (*Chromatiaceae*)、紅色非硫黄細菌 (*Rhodospirillaceae*)、緑色硫黄細菌 (*Chlorobiaceae*)、滑走性糸状緑色硫黄細菌 (*Chloroflexaceae*)の 4 科が存在する。本研究では一般に高い水素生成能を持つ紅色非硫黄細菌を分離することを目的としており、そのためには菌体色、主要バクテリオクロロフィル(Bchl)、有機酸培地および、(H₂S+CO₂)培地への生育能から Table1 を用いて簡易同定する。

また、Bchl の種類は分光光度計を用いた吸収スペクトル分析により決定している。遠心分離(10000g×2min)により集菌した菌体を 60%スクロース溶液に懸濁し、700~1050nm 領域の吸光度を測定する。Bchl a は 830~890nm, Bchl b は 1015~1035nm, Bchl c は 745~760nm, Bchl b は 725~745nm, Bchl e は 715~725nm に吸収ピークを示すことにより同定した。

Screening, identification and hydrogen evolution of purple nonsulfur bacteria from environmental bacteria

Jyumpei KOBAYASHI and Hideki KOHNO

Table1. Taxonomic character of photosynthetic bacteria family

| | color of bacteria | Bchl | growth activity | |
|--------------------------|--------------------|-----------|-----------------|--------------------------------------|
| | | | organic acid | (H ₂ S+ CO ₂) |
| <i>Rhodospirillaceae</i> | red, brown, purple | a or b | + | - |
| <i>Chromatiaceae</i> | red, purple | a or b | - | + |
| <i>Chlorobiaceae</i> | green, brown | c, d or e | - | + |
| <i>Chloroflexaceae</i> | green, brown | c or d | + | + |

3.水素発生実験

単離した菌体を3日ごとに順次拡大培養し、遠心分離にかけて集菌した(9000rpm × 15min)。その後上清を捨て、Basal mediumで再懸濁させ、分光光度計を用いて波長600nm時の吸光度からODを1.5、全量15mlに調製した。ルー型培養瓶に懸濁液と、寒天を4%溶解させたBasal medium15mlを加え、Fig1.のような状態にし、固まるまで約10分間静置する。その後、外液としてGL培地(乳酸、グルタミン酸)を加え、恒温水槽(30℃)に静置し、ハロゲンランプを用いた光照射下(10000lux)で発生した水素を時間ごとにプロットした。

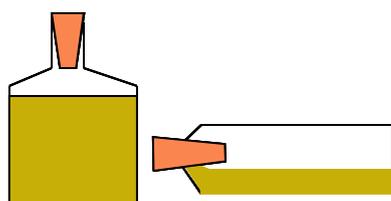


Fig1. Immobilization of the microorganisms in Roux bottle

結果及び考察

採取した試料を上述した手順で培養を行い、3株の光合成細菌を単離した。それらの菌株(K2-2, K2-4, K3-3)の同定結果をTable2.に示した。その結果3株ともに紅色非硫黄細菌であることが判った。次にこれ等の菌株と、比較のための*Rhodobacter sphaeroides*RVを用いて、有力な炭素源である乳酸を基質とした水素発生固定化実験を行った結果をFig2.とTable3.に示した。このFig2.では約1週間の発生実験の経過時間ごとの発生量をプロットしたものである。Table2.では最終発生量を、経過時間(h)と菌体重量(mg)で割った値を水素生成能として示してある。この表から三種の菌株中最も大きい生成能を示したK3-3株でRVの約14%程度であることが分かった。今回用いた菌株はいずれも高い水素生成能を示さなかったが、生育速度はRVと同等程度であったことから、有機酸の利用能自体は高いと言える。よって水素発生条件の検討次第では収率の伸びは期待できる。

Table2. Identification of screened bacteria

| | color of bacteria | Bchl | growth activity | |
|------|-------------------|------|-----------------|---------------------------------------|
| | | | organic acid | (H ₂ S + CO ₂) |
| K2-2 | brown | a | + | - |
| K2-4 | brown | a | + | - |
| K3-3 | brown | a | + | - |

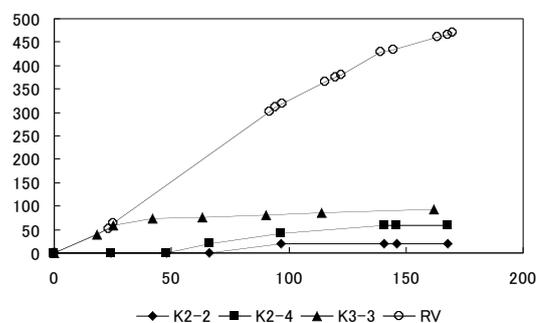


Fig2. Time course hydrogen production by the use of screened photosynthetic bacteria

Table3. Hydrogen evolution rate of screened bacteria

| | K2-2 | K2-4 | K3-3 | RV |
|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Hydrogen evolution(ml) | 20 | 60 | 90 | 471 |
| Time(h) | 168 | 168 | 157.5 | 169 |
| Dry weight(mg) | 15.17 | 15.59 | 21.89 | 15.13 |
| Hydrogen evolution rate(ml/h·mg) | 0.007 | 0.022 | 0.026 | 0.184 |

