

環境微生物からの紅色非硫黄光合成細菌の単離・同定およびその水素生成能に関する研究

日大生産工(院) ○小林 淳平

日大生産工 神野 英毅

1 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・明条件下で有機物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は環境調和性という点において優れている。太陽電池や風力発電などのような大きな初期投資が不要であり、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が楽である。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 Ichiishi¹⁾らによる光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV(以下 RV)と *Rhizopus oryzae* による混合固定化を用いた水素発生実験で、8.5mol 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 には及んでいない。そこで我々は更なる水素生産効率の向上を目的とし、高い水素生成能を持つ光合成細菌の分離を行った。

2 実験方法

①菌の分離

自然界における光合成細菌は湖、池、沼、下水、水田といったような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た。

②菌株の同定

光合成細菌は紅色硫黄細菌(*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 Table 1 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(9000rpm, 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 の種類によってそれぞれ吸収波長が異なっており、Bchl a は 830~890nm, Bchl b は 1015~1035nm, Bchl c は 745~760nm, Bchl d は 725~745nm, Bchl e は 715~725nm でピークを示す。

Screening and identification of hydrogen producing of photosynthetic bacteria from environmental resources

Jyumpei KOBAYASHI and Hideki KOHNO

3 水素発生実験

分離した菌体を3日ごとに計6日間順次拡大培養し、遠心分離にかけて集菌した(9000rpm, 15min)。その後上清を除いて、Basal mediumで再懸濁させ、分光光度計を用いて波長600nm時の吸光度から全量15mlでOD 1.5になるようにBasal mediumを加えた。ルー型培養瓶に懸濁液と寒天を4%溶解させたBasal medium 15mlを加え、Fig.1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)で水素発生を行った。発生した水素はチューブを通して水酸化ナトリウム水溶液中に水上置換にて採取した。

4 結果及び考察

①菌の分離・同定

採取した試料を上述した手順で培養を行い、84株の光合成細菌を分離した。それらの菌株をTable 1に示した項目ごとに判断した結果、紅色非硫黄細菌と認められた。

②水素生成能の検討

次にこれらの菌株と、比較のための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から、特に良い結果が得られたものについてTable 2に示した。Table 2では最終発生量(μ l)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。この表には固定化発生実験を行った84株の菌体中最も水素生成能の高かった菌体3種と、比較のためのRVについての値が示してある。菌株中最も高い生成能を示したI-2A-K株でRVの約125.05%程度であることが分かった。この他にも比較的高い生成能を示した菌体は数種類あったが、いずれの菌体についても一度のみの発生実験であったため、高い生性能が得られた菌体については、再現性の確認の為の追実験を行っていく予定である。

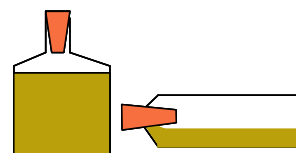


Fig.1 Immobilization of the microorganisms in Roux bottle

Table 1. Taxonomic character of photosynthetic bacteria

	color of bacteria	Bchl	growth activity	
			organic acid	(H ₂ S+C O 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	+	+

Table 2. Hydrogen evolution rate of screened bacteria

	I-2A-K	H-1A-J	I-2A-H	RV
Hydrogen evolution(ml)	640	490	613	630
Time(h)	168	168	168	168
Dry weight(mg)	12.364	10.765	13.845	15.130
evolution rate(μ l/h $\cdot$ mg)	308.114	270.94	263.547	246.39

5 参考文献

1) 市石卓, *Rhizopus oryzae* と *Rhodobacter sphaeroides* RV の混合培養による糖排液からの水素生産, 日本大学生産工学部修士論文, (2006)