

[研究論文]

# 土壤浸出水中の水素産生菌 ——材料分析室利用研究成果、その XXVIII(5)——

蓮井瑞尚<sup>2</sup>・大津来夢<sup>1</sup>・椎屋圭敦<sup>1</sup>・斎藤貴<sup>1</sup>

1 工学部応用化学科

2 工学研究科博士前期課程応用化学・バイオサイエンス専攻

Hydrogen producing organism in Soil exudation underwater

-- Research works accomplished by using materials analysis facilities: XXVIII(5) --

Mizunao HASUI<sup>2</sup>, Raimu OUTSU<sup>1</sup>, Kiyonobu SHIYA<sup>1</sup>, Takashi SAITO<sup>1</sup>

## Abstract

In recently, development of new energy in stead of the fossil fuel is demanded. Hydrogen produces only water when it combusted which is attracted attention as a clean energy that is kind to the global environment. The soil is interesting for slight biodiversity in the earth, and it is considered that hydrogen producing organism exists in the soil. So, we have been searched the hydrogen producing organism in soil exudation water. 2 samples of soil exudation water in Kanagawa, 7 samples in Shizuoka and 1 sample in chiba were analyzed for hydrogen-producing bacteria. As a result, 4 hydrogen-producing bacteria were detected in the soil exudation water.

Keywords: hydrogen producing organism, soil exudation water, metagenomic analysis

## 1. まえがき

近年、化石燃料に代わる新エネルギーの早期開発が求められている。中でも水素は燃焼時に水のみを生成することから、温暖化抑制に対して貢献することができ、また化石燃料に比べ高い熱エネルギーを有するなど、地球環境にやさしいクリーンエネルギーとして注目されている。水素の生産方法には微生物を利用したバイオマスの生分解がある。現在、バイオマスで利用できる新たな微生物の探索が行われている。その探索地の1つである土壤は地球の中で微生物の多様性に富んだ環境であると言われている<sup>1)2)</sup>。そのため、本研究では探索源を一般都市廃棄物の埋め立て地の土壤浸出水とした。

本研究では、探索源の一つである土壤浸出水中の微生物群を遺伝子解析によって分析を行い、水素産生微生物の探索を行った。また、単離・培養を行い、水素産生微生物の単離および水素産生能の評価を行った。

## 2. 実験装置および測定方法

土壤浸出水中に生育している菌群の中から水素産生微生物を得るために集積培養方法を用いて、嫌気性条件下で目的の水素産生菌が生育しやすい培地環境で培養を行った<sup>3)</sup>。土壤浸出水源を Table 1 に示した。始めに、土壤浸出水中に生息する微生物群の遺伝子解析を網羅的手法により行い、かつ水素産生菌の存在を知るために、遺伝子解析を行った。さらに、集積培養により土壤浸出水中の水素産生菌による水素の産生を確認するため、GC-TCD を用いて水素の測定を行った。そして、水素産生が認められた場合、単離することで水素産生菌の取得を試みた。その後、単離したコロニーを再度培養し、16S rRNA 遺伝子的同定を行うことで、水素産生菌の定性を行った。

さらに、淘汰培養を行い水素産生菌の単離後、水素産生能の評価を行うため、回分培養による連続培養を行い、水

素の発生量、pH、菌体濃度および、波長 660 nm での光学的濃度(OD<sub>660</sub>)の経時的挙動を測定した<sup>4,5)</sup>。

Table 1 Soil exudation underwater

	Sampling area	Sampling place
A	片倉うさぎ山プレイパーク	神奈川県横浜市
B	広町公園	神奈川県厚木市
C	長津川調節池	千葉県船橋市
D	乗運寺	静岡県沼津市
E	門池公園	静岡県沼津市
F	大原公園	静岡県御前崎市
G	見高神社	静岡県河津町
H	八幡野小学校	静岡県伊東市
I	松崎高校	静岡県松崎市
J	松月院	静岡県伊東市

### 3. 結果及び考察

土壌浸出水 A~J を用いて集積培養を行い、水素を発生が見られた培地から水素産生微生物の単離を行ったところ、地点 C、D、E、F から水素産生微生物を得られた。今回、得られた水素産生微生物と判別された菌株を 16S rRNA における塩基配列を用い、それぞれの菌株の遺伝子学的同定を行った。C 株、D 株、E 株、F 株はそれぞれ *Clostridium sardiniense*、*Clostridium beijerinckii*、*Staphylococcus warneri*、*Clostridium beijerinckii* であることが明らかとなった。今回の同定された菌は土壌での生息が報告されている菌であった<sup>6)</sup>。また、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて D 株及び F 株について形態観察を行った。Fig.1 は D 株について Fig.2 は F 株に関する SEM 像である。Fig.1 より、長径 3.39  $\mu\text{m}$  で短径 603 nm の桿菌が観察された。Fig.2 より、長径 3.20  $\mu\text{m}$  で短径 781 nm の桿菌が観察された。遺伝子学的同定と合わせて *Clostridium beijerinckii* の特徴との一致が見られた。

また、水素産生微生物である C、D、E、F 株について、水素産生能の評価を行った。その結果を Fig.3~Fig.6 に示した。

C 株では、培養 64 時間後に水素の発生が確認された。水素の累計発生量は 39  $\text{cm}^3$  であり、水素産生能は 0.12  $\text{mol-H}_2/\text{mol-glucose}$  であった。D 株では、培養 94 時間後に水素の発生が確認された。水素の累計発生量は 34  $\text{cm}^3$  であり、水素産生能は 0.15  $\text{mol-H}_2/\text{mol-glucose}$  であつ

た。E 株では、培養 50 時間後に水素の発生が確認された。水素の累計発生量は 136  $\text{cm}^3$  であり、水素産生能は 0.40  $\text{mol-H}_2/\text{mol-glucose}$  であった。F 株では、培養 94 時間後に水素の発生が確認された。水素の累計発生量は 57  $\text{cm}^3$  であり、水素産生能は 0.56  $\text{mol-H}_2/\text{mol-glucose}$  であった。今回の水素産生能はグルコースを基準に算出した場合の理論値である 4mol には達していないことが認められた<sup>7)</sup>。

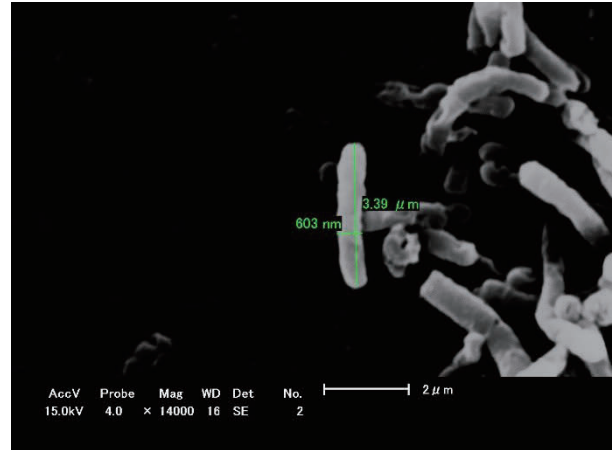


Fig.1 SEM for D strain

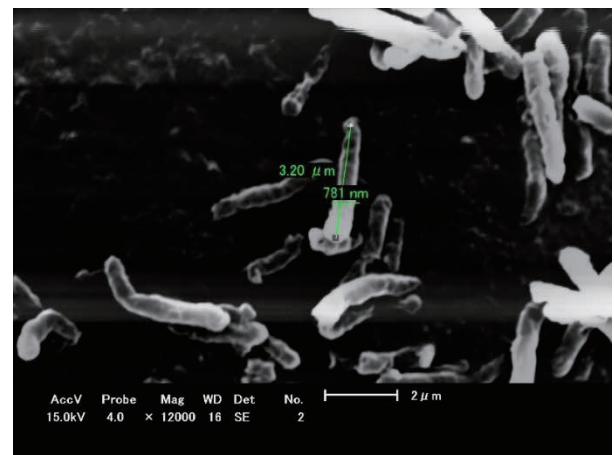


Fig.2 SEM for F strain

まとめ

今回、土壤浸出水より4種類の水素産生微生物を取得することに成功した。遺伝子的同定より、C株は *Clostridium sardiniense*、D株は *Clostridium beijerinckii*、E株は *Staphylococcus warneri*、F株は *Clostridium beijerinckii* であることが分かった。また、水素産生能の評価をしたところ、それぞれ0.12、0.15、0.40及び0.56mol-H<sub>2</sub>/mol-glucoseとなった。

以上より、土壤浸出水について遺伝子解析による水素産生菌の探索を行い、取得した水素産生菌の遺伝子的同定と水素産生能の評価を行うことができ、水素産生菌を取得できた。

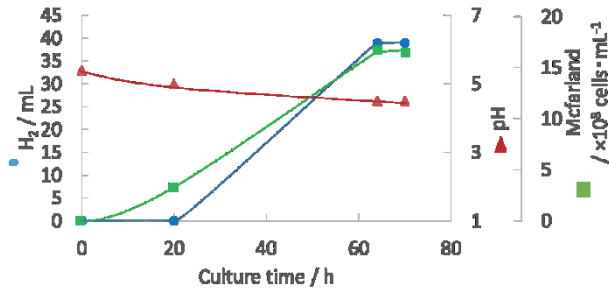


Fig. 3 Change of hydrogen amount in enrichment culture using C strain by static culture

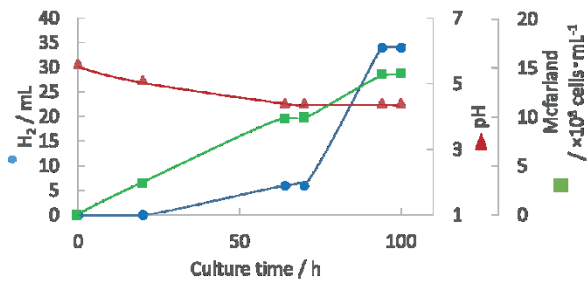


Fig. 4 Change of hydrogen amount in enrichment culture using D strain by static culture

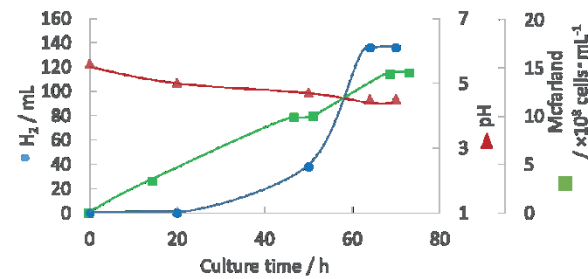


Fig. 5 Change of hydrogen amount in enrichment culture using E strain by static culture

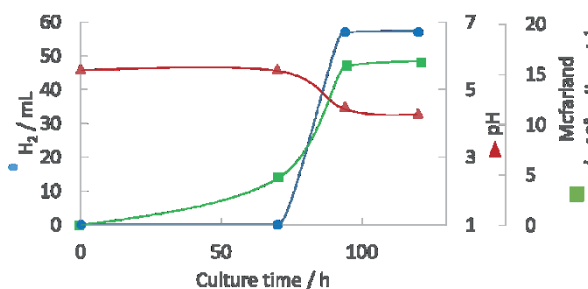


Fig. 6 Change of hydrogen amount in enrichment culture using F strain by static culture

参考文献

- [1] Noah Fierer : Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes, Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, Vol.109, No.52, 21390-21395 (2012)
- [2] 加藤広海, 小川なつみ, 津田雅孝 : メタゲノム情報を基盤とした土壌細菌コミュニティの解析, 日本微生物生態学会誌, Vol.30, No.2, 57-64 (2015)
- [3] 別府輝彦 : バイオテクノロジーテキストシリーズ新・微生物学, 講談社 (2004)
- [4] 河野孝志, 和田克士, 李玉友, 野池達也 : 有機性廃棄物からの嫌気性水素発酵に及ぼす有機酸濃度の影響, 水環境学会誌, Vol.28, No.2, 87-92 (2005)
- [5] 上村毅, 小西仁 : 微生物による水素製造法-水素発酵-, ENEOS, Technical Review, Vol.47, No.4, 167-174 (2005)
- [6] 小西忠司, 小原裕治, 鳴海明, 斎藤洋徳 : メタゲノム解析によるゴミ固形燃料の微生物分布の解明, Bulletin of Japan Association for Fire Science and Engineering, Vol.61, No.2, 25-35 (2011)
- [7] 浅田泰男, 石見勝洋, 神野英毅 : バイオ水素の現状と問題点-光合成微生物を中心に-, 水素エネルギーシステム, Vol.37, No.1, 20-24(2012)