

## 9830 光合成硫黄細菌を利用した青潮発生レベル底層海水からの硫化水素の除去に関する研究

助成研究者：小西 康裕 (大阪府立大学 工学部)  
共同研究者：浅井 悟 (大阪府立大学 工学部)

都市近くの内湾、河口域では、海水の富栄養化現象が進行して低層部への有機物質の供給が増大すれば、青潮が頻発すると懸念されている。青潮の発生は、無酸素水塊が表層に出現する上に、余剰の硫化水素自体が生物にとって有害であることから、魚介類等に深刻な被害を与える。このような状況のなかで、青潮の発生レベルにある水圏において底層環境中の硫化水素を強制的に除去し、無酸素層が出現する要因を完全に絶って底層海水の改善を図ることは、汽水域、沿岸域の水圏環境を保全する上で意義深いことである。

本研究では、硫化水素を元素硫黄に変換できる光合成硫黄細菌 *Chlorobium limicola* を用いた硫黄回収型光バイオリアクターの開発をめざして、その基礎的知見を得るためにバイオ変換速度の定量化を図った。具体的には、槽型反応器で溶存硫化水素 ( $0.6 \sim 5.0 \text{ mol/m}^3$ ) を基質として用いて、温度  $23^\circ\text{C}$ 、溶液  $\text{pH } 6.5 \pm 0.3$  の嫌気条件下で光合成細菌 *C. limicola* の連続培養実験を行った。その結果、*C. limicola* は光合成反応によって溶存硫化水素を元素硫黄に転換できることが確認できた。引き続き、供給液の硫化水素濃度、希釈率、反応器に照射する光強度を変化させて硫化水素のバイオ変換速度を測定し、これら操作因子の影響について定量的に検討した。*C. limicola* の比増殖速度の実測値に及ぼす液相硫化水素濃度の影響は Monod 式により合理的に説明できることがわかった。光強度  $2600 \sim 16000 \text{ lx}$  の範囲内で比増殖速度はほぼ一定値を示したが、光強度が  $2600 \text{ lx}$  から  $10 \text{ lx}$  に低下するに伴って比増殖速度も半減した。比増殖速度の実測値を Monod 式に基づいて解析し、増殖速度パラメータ (最大比増殖速度、飽和定数) を各光強度ごとに推定した。一方、菌体収率は、液相硫化水素濃度や光強度の影響をそれほど顕著に受けなかった。

*C. limicola* の増殖速度式および増殖パラメータの推定値を用いて反応器内の硫化水素濃度および硫化水素の転換速度を計算し、計算値と実測値が良好に一致することを示した。シミュレーション計算から、単一連続槽型反応器内での溶存硫化水素濃度のバイオ転換速度に及ぼす各種操作因子(供給液中の硫化水素濃度、溶液供給速度、光強度)の影響を広範な操作条件下で明らかにした。



## 9830 光合成硫黄細菌を利用した青潮発生レベル底層海水からの硫化水素の除去に関する研究

助成研究者：小西 康裕 (大阪府立大学 工学部)

共同研究者：浅井 悟 (大阪府立大学 工学部)

## 1. 研究目的

都市近くの内湾、河口域で青潮の発生が報じられるようになった。ここで重要な点は、貧酸素水塊が湧昇するだけでなく、その中に含まれる硫化水素が上層部の溶存酸素と化学反応し、水中生物の呼吸に必要な酸素が表層部で急激に欠乏することである。青潮の発生は、無酸素水塊が表層に出現する上に、余剰の硫化水素自体が生物にとって有害であることから、魚介類等に深刻な被害を与える。今後、海水の富栄養化現象が進行して低層部への有機物質の供給が増大すれば、青潮が頻発すると懸念されている。このような状況のなかで、青潮の発生レベルにある水圏において底層環境中の硫化水素を強制的に除去し、無酸素層が出現する要因を完全に絶って底層海水の改善を図ることは、汽水域、沿岸域の水圏環境を保全する上で意義深いことである。

水圏環境における硫化水素の除去には幾つかの化学的処理法が考えられるが、従来法はランニングコストが高い上に、環境負荷が大きい等の問題点も多い。そこで本研究では、太陽光と微生物を利用した低コスト・低環境負荷型の光バイオ脱硫法の開発をめざし、光合成硫黄細菌 *Chlorobium limicola* による硫化水素の微生物的処理に着目した。硫化水素を元素硫黄に変換できる *C. limicola* は、嫌気性の中性条件下で還元型硫黄化合物を酸化して増殖エネルギーを獲得できる光独立栄養細菌であり、自然界における硫黄の循環において重要な役割を果たしている。硫化水素の微生物酸化の機構についてはこれまでに数多くの研究が行われ、それらの成果は優れたレビュー<sup>1)</sup>で紹介されている。しかしながら、*C. limicola* の微生物機能を活用した硫黄回収型バイオ脱硫法の開発を目的として、硫化水素のバイオ変換について反応工学的観点からのアプローチは行われていないのが現状である。

本研究では、光合成硫黄細菌 *C. limicola* による硫化水素のバイオ変換に対する量論および速度論を明らかにし、効果的な微生物反応器の操作・設計に必要な基礎的知見を得ることを目的としている。具体的には、*C. limicola* による硫化水素の液相酸化実験を嫌気的明条件下で行い、変換速度に及ぼす各種操作因子の影響を定量的に説明できる微生物反応速度論を確立し、モデルシミュレーションによって光合成硫黄細菌の脱硫能力が最大限に発揮される操作条件を明らかにする。

## 2. 研究方法

### 2.1 実験試料

本実験に用いた光合成細菌は、DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) より分譲された緑色硫黄細菌 *Chlorobium limicola* (DSMZ 245 株) である。液体培地としては、DSMZ により指定された PFENNIG'S MEDIUM II (DSMZ Catalogue of Strains, 281(1998)) を使用した。液体培地には純 N<sub>2</sub> ガスを吹込んだ後、純 CO<sub>2</sub> ガスをバブリングさせて、嫌気性雰囲気にした。培地の pH 値は、2 kmol/m<sup>3</sup> の HCl および Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を用いて pH6.5 に調節した。基質として培地に添加した硫化ナトリウムは、液体培地中では分子状 H<sub>2</sub>S として存在する (Na<sub>2</sub>S + H<sub>2</sub>O → H<sub>2</sub>S + 2NaOH)。

### 2.2 実験装置および実験方法

光合成硫黄細菌の連続培養実験には、容量 50cm<sup>3</sup> の攪拌槽を用いた。反応器本体はガラス製であり、その上部は培地供給・排出用のガラス管(内径 0.2 mm)を取り付けたシリコン栓で密閉されている。反応器内の攪拌はマグネチックスターラーを用いて行った。供給用の液体培地はテドラーバッグ(フッ化ビニール樹脂製の袋)に充填し、培地の連続供給に伴ってバッグ体積が減少し空間ができないようにすることで、培地から硫化水素が放散しないように工夫した。各装置間はシリコンチューブで連結し、マイクロチューブポンプを用いてテドラーバッグから液体培地を反応器内に連続的に供給した。なお、培養実験系は光源付き恒温器内に設置されており、反応器には実験中ほぼ一定の光が照射されている。

連続培養実験に先立ち、反応器に液体培地を供給せずに回分培養を 5~7 時間程度行い、光合成硫黄細菌が増殖を始めて液相菌体濃度が増加してから液体培地を連続的に供給した。連続培養開始後、反応液の pH, 硫化水素濃度, 菌体濃度が時間に無関係に一定となる定常状態に達するまで、約 25~50 時間にわたって連続培養を続けた。培養実験は、嫌気的条件下 (CO<sub>2</sub> 雰囲気) で、希釈率 (培地供給速度/反応器体積) D=0.2~2.8 1/h, 供給液 H<sub>2</sub>S 濃度 C<sub>so</sub>=0.6~5.0 mol/m<sup>3</sup> に変化させて行われた。培養温度は 23°C, 培地 pH は 6.5±0.3 の一定条件とし、実験中の光強度は 10~16000 lx の範囲内で変化させた。光源としては、白色蛍光灯を用いた。

液相菌体濃度はヘマトメータ法により計測し、液相 H<sub>2</sub>S 濃度はメチレンブルー法<sup>3)</sup>に基づく吸光光度法を用いて測定した。光強度は照度計により直接測定した。生成物である元素硫黄は、n-ヘキサンに抽出後、吸光光度法で定量した。<sup>4)</sup>

## 3. 研究結果および考察

### 3.1 溶存硫化水素のバイオ変換に対する化学量論

Fig.1 は、*C. limicola* による硫化水素の酸化量に対して元素硫黄の生成量をプロットしたものである。測定値は±20%の誤差範囲内(図中の点線)で、ほぼ勾配 1.0 の直線周辺に分布

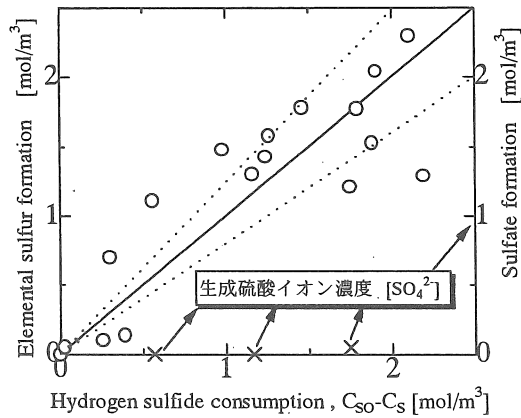


Fig.1 Elemental sulfur formation based on hydrogen sulfide consumption

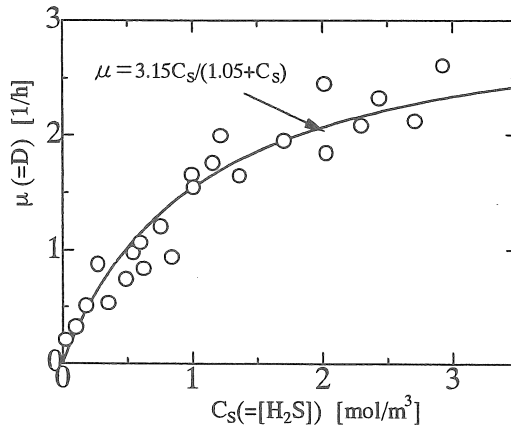
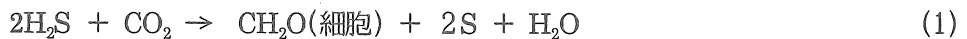


Fig.2 Specific growth rate  $\mu$  of *C. limicola* as a function of liquid-phase  $H_2S$  concentration  $C_S$  at 5000 lx.

しており、酸化された硫化水素はすべて元素硫黄に変換されたと考えられる。また、液相の硫酸イオン濃度をイオンクロマトグラフ法で測定したところ、硫酸イオンの生成は検出されなかった。したがって、元素硫黄の硫酸イオンへの酸化反応は起こらず、*C. limicola* による溶存硫化水素のバイオ変換は、次式



で示す化学量論関係に従うことが明らかになった。

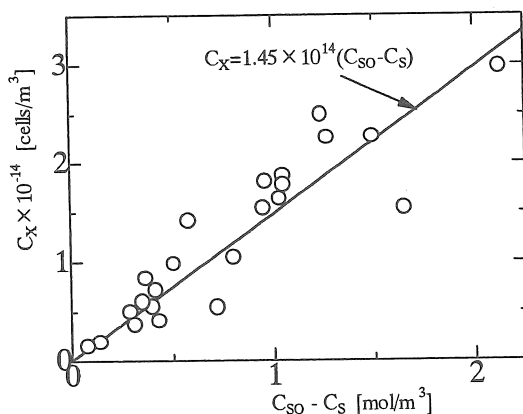


Fig.3 Estimation of growth yield  $Y_{XS}$  of *C. limicola* on  $H_2S$  consumption at 5000 lx.

### 3.2 増殖パラメータの推定

Fig.2 は、光強度 5000 lx のときの反応器出口における液相硫化水素濃度  $C_s$  に対して、比増殖速度  $\mu$  (=希釈率 D) の測定値をプロットしたものである。 $\mu$  対  $C_s$  の関係が飽和型の曲線を示したことから、Monod の式

$$\mu = \mu_{\max} C_s / (K_s + C_s) \quad (2)$$

が適用できると考えられる。そこで、(2)式に含まれている増殖パラメータ  $\mu_{\max}$  および  $K_s$  を決定するために、比増殖速度  $\mu$  の実測値を Hanes プロットに基づいて図式的解析した。すなわち、 $C_s/\mu$  対  $C_s$  のプロットが直線関係 (相関係数 0.94) を示したので、得られた直線の勾配および切片から  $\mu_{\max}$ 、 $K_s$  の値は  $\mu_{\max} = 3.15 \text{ 1/h}$ 、 $K_s = 1.05 \text{ mol/m}^3$  と決定された。Fig.2 に示した実線は、増殖速度パラメータ  $\mu_{\max}$  および  $K_s$  の推定値と Monod の式から計算されたものである。

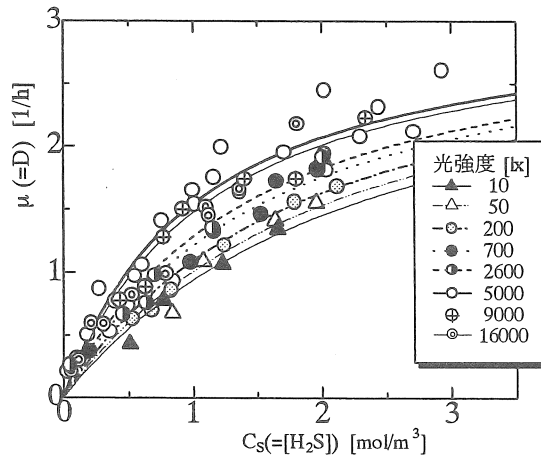
Fig.3 は、光強度 5000 lx における菌体収率  $Y_{XS}$  を求めるために、菌体の増殖数  $C_x$  を硫化水素の消費量 ( $C_{so} - C_s$ ) に対してプロットしたものである。測定値には多少のばらつきはあるが、ほぼ原点を通る直線で相関できることがわかる (相関係数 0.91)。相関線の勾配より、硫化水素を基質とする *C. limicola* の菌体収率として  $Y_{XS} = 1.45 \times 10^{14} \text{ cells/mol}$  が得られた。

### 3.3 増殖パラメータに及ぼす光強度の影響

以上の実験結果は、光源に白色蛍光灯を用いて光強度 5000 lx の一定条件下で得られたものである。*C. limicola* の増殖速度が、光の強さの変化によってどの程度影響されるかを調べ

Table 1 Microbial stoichiometric and kinetic parameters for the growth of *C. limicola* on hydrogen sulfide in liquid phase at different light intensities.

Light intensity	Maximum specific		
	growth rate $\mu_{\max}$ [1/h]	Saturation constant $K_s$ [mol/m <sup>3</sup> ]	Growth yield $Y_{XS} \times 10^{-14}$ [cells/mol-H <sub>2</sub> S]
10	3.15	2.35	0.64
50	3.15	2.12	0.77
200	3.15	1.88	0.68
700	3.15	1.60	0.76
2600	3.15	1.44	1.20
5000	3.15	1.05	1.45
16000	3.15	1.14	1.22

Fig.4 Specific growth rate  $\mu$  of *C. limicola* as a function of liquid-phase H<sub>2</sub>S consumption  $C_s$  at different light intensities.

るために、10 lx から 16000 lx まで光強度を変化させて連続培養実験を行った。

Fig.4 は、*C. limicola* の比増殖速度  $\mu$  に及ぼす光強度の影響を示したものである。光強度が 2600 lx から低下するに伴い、比増殖速度の値も徐々に減少することがわかる。一方、2600 lx 以上の光強度では、比増殖速度はほぼ一定値を示した。各光強度ごとに比増殖速度の実測値を(2)式に基づいて速度解析し、最大比増殖速度  $\mu_{\max}$ 、飽和定数  $K_s$  を推定した。これら増殖パラメータの推定値を Table1 に示す。また、Fig. 4 に示した曲線はそれぞれの光強度

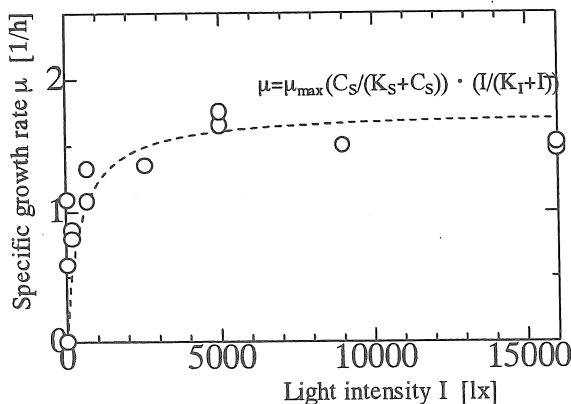


Fig.5 Specific growth rate  $\mu$  of *C. limicola* as a function of light intensity.  
(Liquid-phase  $H_2S$  concentration  $C_S=1.0 \text{ mol/m}^3$ )

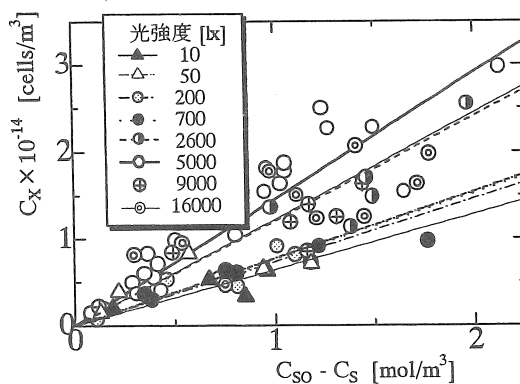


Fig.6 Growth yield  $Y_{X/S}$  of *C. limicola* as a function of light intensity.

において推定した増殖パラメータを用いて Monod 式 (2) 式) より計算された理論線である。自然界で光合成細菌が生育している環境では、光強度は数十～数百 lx(光源は太陽光)といわれており、わずかな光強度でも菌体が増殖可能であることが確認できた。

以上の結果より、ある程度の光強度があれば *C. limicola* が増殖できることがわかる。そこで、増殖速度に及ぼす光強度の影響を定量的に把握するために、液相  $H_2S$  濃度  $C_S=1.00 \text{ mol/m}^3$  付近における比増殖速度  $\mu$  の実測値を光強度  $I$  に対してプロットした。Fig.5 に示すように、光強度が小さい範囲 ( $I < 700 \text{ lx}$ ) では、光強度の増加とともに  $\mu$  の値も急激に増加するが、光強度  $I$  が  $700 \text{ lx}$  以上になると、 $\mu$  の値はほぼ一定となった。光強度を一種の基質とみなして Monod 型の依存性を仮定すれば、2 基質型の次式



$$\mu = \mu_{\max} [C_s / (K_s + C_s)] [I / (K_I + I)] \quad (3)$$

の適用が考えられる。Fig.5 のデータを (3) 式とフィッティングさせた結果、飽和定数として  $K_I$  として 450 lx が得られた。図中の破線は、(3) 式と増殖パラメータの推定値から求めた計算線を表す。

Fig.6 は各光強度における菌体収率  $Y_{XS}$  の図式的解析の結果を表したものであり、その推定値を Table 1 に示す。菌体収率は、測定値の変動が大きいものの、光強度 2600 lx~16000 lx の範囲内で  $Y_{XS} = 1.20 \sim 1.45 \times 10^{14}$  cells/mol- $H_2S$  のほぼ一定値となった。光強度を 2600 lx から 700 lx に低下させると、菌体収率の値も  $Y_{XS} = 1.20 \times 10^{14}$  から  $Y_{XS} = 0.76 \times 10^{14}$  cells/mol- $H_2S$  に減少した。しかし、光強度が 10~700 lx の範囲内では、菌体収率の値はほとんど変化しなかった。

### 3.4 単一連続槽における溶存硫化水素のバイオ変換速度

単一連続槽型反応器における溶存  $H_2S$  のバイオ変換速度  $R_s$  は、反応器入口、出口での液相硫化水素濃度の差 ( $C_{s0} - C_s$ ) と希釈率  $D$  の積

$$R_s = (C_{s0} - C_s) D \quad (4)$$

として与えられる。定常状態の連続培養では希釈率  $D$  と比増殖速度  $\mu$  が等しくなることを考慮すれば、(2)式は次式

$$C_s = K_s D / (\mu_{\max} - D) \quad (5)$$

のように変形される。(5)式を(4)式に代入すれば、次式

$$R_s = [C_{s0} - K_s D / (\mu_{\max} - D)] D \quad (6)$$

を得る。(6)式と増殖パラメータ  $\mu_{\max}$ 、 $K_s$  の推定値 (Table 1) を用いることによって、光強度  $I$  の一定条件下での溶存  $H_2S$  のバイオ変換速度  $R_s$  を計算することができる。

Fig.7 に、単一連続槽における溶存  $H_2S$  のバイオ変換速度  $(C_{s0} - C_s)D$  に及ぼす希釈率  $D$  および供給液  $H_2S$  濃度  $C_{s0}$  の影響を示す。変換速度の実測値は  $C_{s0}$  の増加に伴って著しく増加するとともに、ある希釈率で最大値を示すことがわかる。図中の曲線は、増殖パラメータ  $\mu_{\max}$ 、 $K_s$  の推定値 (Table 1) および(6)式から求められた硫化水素の変換速度の計算線である。実測値は、変換速度の計算線と良好に一致しており、*C. limicola* による溶存硫化水素の連続処理速度を定量的に説明することができた。

Table 2 Maximum conversion rate of hydrogen sulfide in continuous culture of *C. limicola* at different dilution rates.

Feed H <sub>2</sub> S concentration C <sub>SO</sub> [mol/m <sup>3</sup> ]	Maximum conversion rate [(C <sub>SO</sub> - C <sub>S</sub> ) D] <sub>max</sub> [mol/m <sup>3</sup> h]	Dilution rate D <sub>max</sub> [1/h]
0.72	0.29	0.77
1.43	0.83	1.15
2.31	1.73	1.43
3.58	3.33	1.72

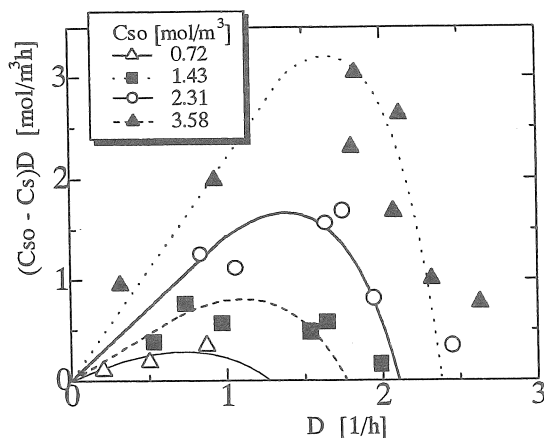


Fig. 7 Liquid-phase oxidation rate of H<sub>2</sub>S in continuous culture of *C. limicola* as a function of dilution rate D and liquid-phase H<sub>2</sub>S concentration C<sub>SO</sub> in feed stream. (5000 lx)

供給液 H<sub>2</sub>S 濃度 C<sub>SO</sub> = 3.58 mol/m<sup>3</sup> のとき、H<sub>2</sub>S の変換 (酸化) 速度は希釈率 D = 1.72 1/h で最大値を示し、反応器からの菌体の流出 (washout) が D > 2.38 1/h で起こることが明らかになった。各々の供給液 H<sub>2</sub>S 濃度 C<sub>SO</sub> における最大変換速度 [(C<sub>SO</sub> - C<sub>S</sub>) D]<sub>max</sub> とそのときの希釈率 D<sub>max</sub> の値を理論線より求め、これらの値を Table 2 に示す。供給液 H<sub>2</sub>S 濃度 C<sub>SO</sub> を 3.58 mol/m<sup>3</sup> から 0.72 mol/m<sup>3</sup> まで減少させるに伴って、最大変換速度は 3.33 mol/m<sup>3</sup>h から 0.29 mol/m<sup>3</sup>h まで著しく低下することが明らかになった。

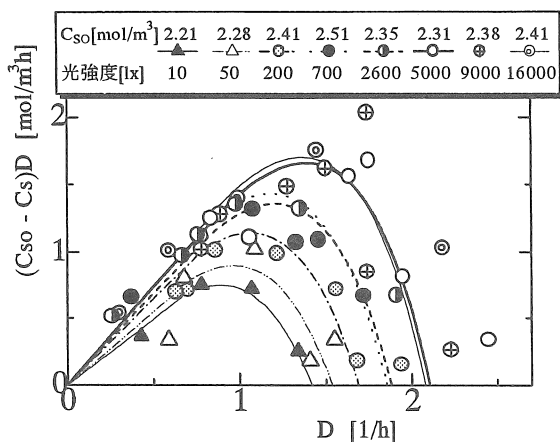


Fig. 8 Liquid-phase oxidation rate of  $H_2S$  in continuous culture of *C. limicola* as a function of dilution rate  $D$  and light intensities.

Fig.8 に、溶存硫化水素のバイオ変換速度に及ぼす光強度の影響を示す。供給液  $H_2S$  濃度  $C_{so} \doteq 2.3 \text{ mol/m}^3$  の条件下で、光強度が  $5000 \text{ lx}$  から  $10 \text{ lx}$  に低下するに伴い、最大変換速度は  $1.69 \text{ mol/m}^3\text{h}$  から  $0.73 \text{ mol/m}^3\text{h}$  に減少することがわかる。バイオ変換速度に対する光強度の依存性はあまり大きくない。とくに、希釈率が  $D < 0.5 \text{ h}^{-1}$  の場合には、硫化水素のバイオ変換速度に及ぼす光強度の影響は事実上考えなくてよい。

## 5. 今後の課題

本研究では、光合成硫黄細菌 *C. limicola* による溶存硫化水素の元素硫黄への酸化実験を行い、得られた実験データを速度解析することにより、単一連続槽型反応器における溶存硫化水素のバイオ変換速度に及ぼす各種の操作因子（供給液  $H_2S$  濃度、希釈率、光強度）の影響を定量的に把握することができた。

光合成硫黄細菌 *C. limicola* の吸光スペクトル<sup>9)</sup>から判断すると、細菌の生育にとって有効な光の波長域は、 $450 \text{ nm}$  および  $750 \text{ nm}$  周辺であると推測できる。ところが、本研究で光源として用いた白色蛍光灯では  $750 \text{ nm}$  周辺の光波長は非常に微弱である。そこで今後は、光源としてピーク波長  $735 \text{ nm}$  の近赤外色発光ダイオードを用いて *C. limicola* による溶存硫化水素のバイオ変換速度を測定し、増殖パラメータに及ぼす光源の影響を明らかにし、*C. limicola* の増殖にとって有効な波長帯が存在するかどうかを検討したい。

## 6. 参考文献

- 1) Ehrlich, H.L., Geomicrobiology of Sulfur. In: *Geomicrobiology*, 2<sup>nd</sup> edn, Dekker, New York, pp. 449-513, 1990.

- 2) Truper, H.G., Photolithotrophic sulfur oxidation. In: *Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur*, H. Bothe and A. Trebst (ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 199-211, 1981.
- 3) Gustafsson, L., Determination of ultramicro amounts of sulphate as methylene blue : the color reaction. *Talanta*, **4**, 227-235 (1960).
- 4) Ono, A., Yamaguchi, N., Spectrophotometric determination of elemental sulfur in blast furnace slag. *J. Iron and Steel Inst. Japan*, **70**, 1377-1384 (1984).
- 5) Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, H., Schleifer, K.H., *The Prokaryotes*, Springer-Verlag, Berlin, 1991.

A fundamental study on microbial removal of hydrogen sulfide from anoxic sea water on sediments by using photosynthetic sulfur bacterium

Yasuhiro Konishi and Satoru Asai

Department of Chemical Engineering, College of Engineering  
Osaka Prefecture University

Summary

Because the presence of hydrogen sulfide in sea water on sediments poses serious problem of blue tide (blue colored anoxic sea water, so called Aoshio phenomenon), the removal of dissolved hydrogen sulfide is of importance in control of environmental pollution. Although physical and chemical processes have been extensively developed, another possible process is the removal of microbial means. One of microorganisms responsible for the sulfide removal is the photosynthetic bacterium *Chlorobium limicola*, which is associated with the sulfur cycle of aqueous environments.

In this report, the bioconversion of dissolved hydrogen sulfide to elemental sulfur by *C. limicola* was studied at 23°C and solution pH  $6.5 \pm 0.3$  in a continuous-flow stirred reactor. The specific growth rate  $\mu$  of *C. limicola* was measured under a wide variety of dilution rates (solution flow rate/reactor volume), liquid-phase sulfide concentrations and light intensities. The measured values of specific growth rate  $\mu$  were slightly dependent on the light intensities between 2600 and 16000 lx, whereas the measured  $\mu$  values markedly decreased as the light intensity was decreased from 2600 to 10 lx. For each light intensity, the dependence of the specific growth rate  $\mu$  on sulfide concentration in the liquid effluent could be modeled by the Monod equation, and the rate data were analyzed to determine the kinetic parameters (maximum specific growth rate and saturation constant) at each light intensity. On the other hand, the stoichiometric data for the microbial growth and sulfide conversion were graphically analyzed to determine the growth yield  $Y_{XS}$ . The light intensity had a slight effect on the measured  $Y_{XS}$  values. The conversion rate of dissolved hydrogen sulfide per unit reactor volume was a function of the dilution rate, the sulfide concentration in the feed, and the light intensity. The measured conversion rates were quantitatively described by using the Monod equation and the kinetic and stoichiometric parameters. The rate expression and the estimated parameter values allowed us to simulate quantitatively the microbial conversion rates as a function of the process parameters.