

24

助成番号 0024

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—夜間操作をめざした光源の選定—

助成研究者：小西 康裕 (大阪府大学大学院工学研究科)

共同研究者：野村 俊之 (大阪府大学大学院工学研究科)

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しており、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独立栄養細菌 *Chlorobium limicola* を利用する硫黄回収型光バイオリクターの夜間操作をめざして、バイオ変換速度に及ぼす光源の影響について実験的に検討した。具体的には、緑色硫黄細菌 *C. limicola* の連続培養実験 (23°C, pH6.5±0.3) を嫌気条件下で行い、各種光源の照射下において硫化水素の液相酸化速度を測定した。光源に白色蛍光灯 (波長域 300~800 nm、吸光極大波長 580 nm 付近、光強度 5000 lx) と近赤外色発光ダイオード (ピーク波長 735±25 nm、光強度 10 lx) を併用して測定された酸化速度は、白色蛍光灯だけの場合に比べて30%増加した。また、10 lx の近赤外色発光ダイオードと5000 lx の白色蛍光灯とでは酸化速度に大差ないことから、両光源において近赤外色域 (波長 735±25 nm) の光エネルギーが同程度であると推測された。*C. limicola* の光合成色素が最大吸光度を示す近赤外線光の照射は、溶存硫化水素の酸化を促進させるうえで有効な手段であることが示唆された。

24

助成番号 0024

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—夜間操作をめざした光源の選定—

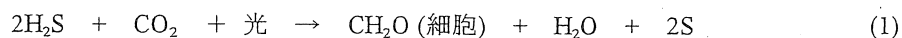
助成研究者：小西 康裕（大阪府大学大学院工学研究科）

共同研究者：野村 俊之（大阪府大学大学院工学研究科）

1. 研究目的

河口域や内湾において海水の富栄養化が進行するに伴い、青潮が頻発すると懸念されている。Fig.1 は、青潮発生のメカニズムの概略を示したものである。海水の富栄養化は、底層部に多量の有機物質を沈積させ、有機物質の分解によって溶存酸素を消費させる。その結果、貧酸素水が海底を覆うようになり、底質に棲息する嫌気性細菌は硫酸塩を還元して硫化水素を発生させる。この硫化水素を含んだ貧酸素水が底層部から浮上すると、表層付近では硫化水素の酸化 ($\text{H}_2\text{S} + 1/2\text{O}_2 \rightarrow \text{S} + \text{H}_2\text{O}$) によって溶存酸素が完全に消費されて無酸素水塊が現れるとともに、余剰の硫化水素が海面を通して放散するようになる。このような青潮の発生は、無酸素水塊が表層に出現するとともに、余剰の硫化水素が生物に有害であることから、魚介類に深刻な被害を与える。したがって、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、海水面に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。

このような状況のなかで、著者ら¹⁾は光と微生物を利用した低環境負荷・低コスト型の光バイオ脱硫法の開発を目指し、光独立栄養細菌 *Chlorobium limicola* による溶存硫化水素の元素硫黄への酸化処理に着目した。*C. limicola* は、緑色硫黄細菌とも呼ばれており、光をエネルギー源、炭酸ガスを炭素源として、溶存硫化水素を元素硫黄に酸化する能力を持っている^{2,3)}。



既報¹⁾では、光独立栄養細菌 *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、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操作因子（供給液硫化水素濃度、溶液供給速度、白色蛍光灯による光強度）の影響を定量的に把握した。そこで本研究では、光バイオ脱硫法の夜間操作の実現に向けて、各種光源からの光照射下

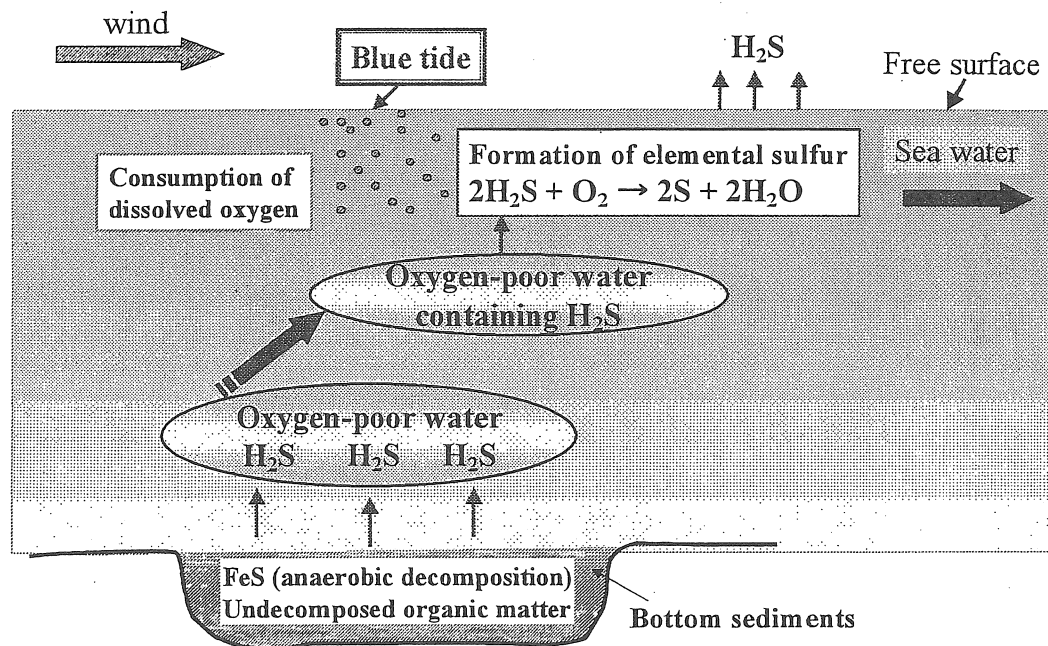


Fig.1 Appearance of blue tide (blue colored anoxic sea water)

において *C. limicola* による硫化水素の液相酸化実験を行い、バイオ変換速度に及ぼす光源の影響について検討した。

2. 研究方法

2.1 実験試料

本研究で使用した光独立栄養細菌は、既報¹⁾で用いた緑色硫黄細菌 *C. limicola* (DSMZ 245 株)である。液体培地は、DSMZ のカタログ (1998 年版) に記載された Pfennig's II 培地 (DSMZ Catalogue of Strains, 308(1998)) である。嫌気性培養を行うために、まず液体培地に純 N₂ ガスを吹込み、次に炭素源として 98%CO₂ ガスをバブリングさせた。液体培地中の硫化水素濃度が 0.77~2.30 mol・m⁻³ になるように Na₂S・9H₂O を加え、培地 pH を 2 mol・m⁻³ の HCl または Na₂CO₃ を用いて pH6.5±0.3 に調節した。本実験条件下では、液体培地中の Na₂S の大部分が分子状硫化水素として存在することが、溶存硫化水素の解離定数²⁾に基づく推算から確認された。*C. limicola* の植え継ぎ培養は、回転式振盪機を用いて温度 23℃、白色蛍光灯 (Mitsubishi 製) で 5000 lx の照射下で行われた。

2.2 実験装置および実験方法

C. limicola の連続培養における反応器ならびに実験手順は、既報¹⁾とほぼ同様である。

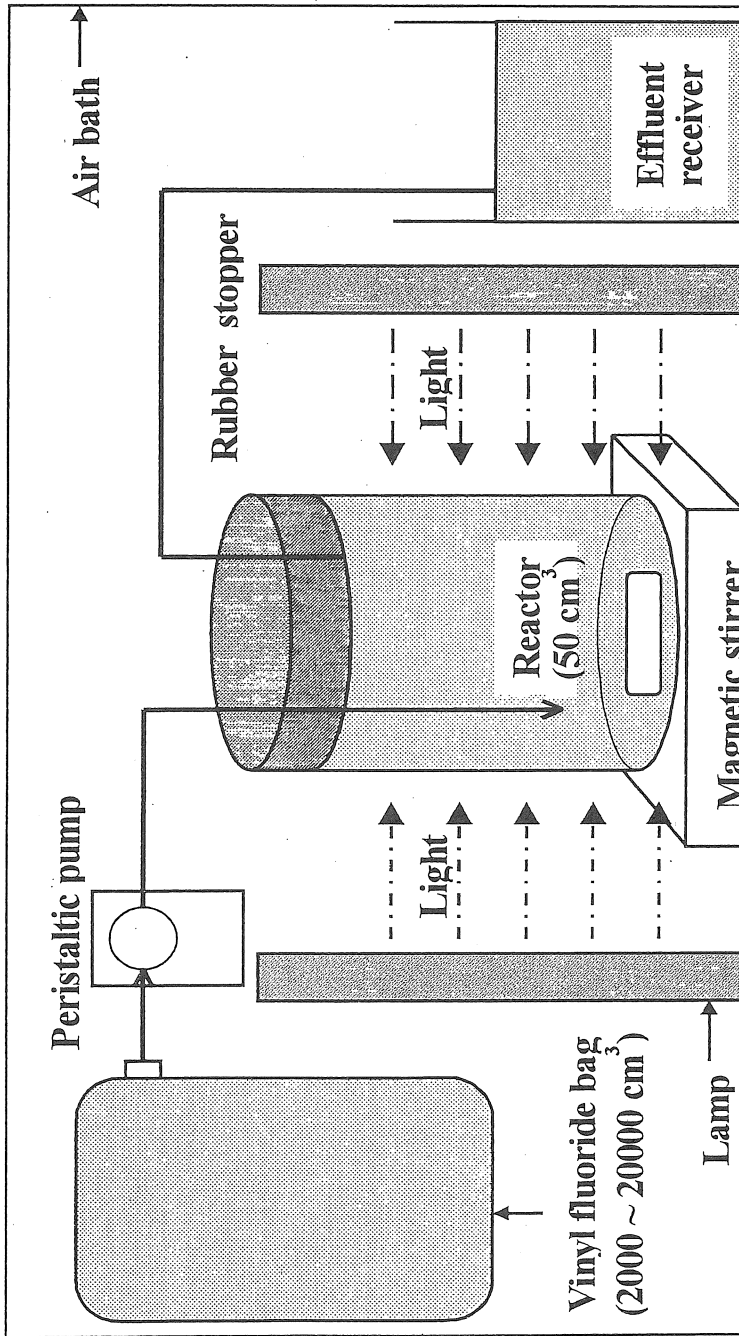


Fig.2 Schematic diagram of the continuous reactor system for anaerobic oxidation of dissolved H₂S by phototroph.

Fig.2 に、実験装置の概略を示す。反応器本体は容量 50 cm³ のガラス製円筒容器であり、液体培地の攪拌にはマグネチックスターラー (攪拌子 2.5cm) を用いた。連続培養を開始して 25~50 時間後に、反応器内の液相硫化水素濃度、液相菌体濃度が時間に無関係に一定となる定常状態に到達した。定常状態での連続培養では、細菌の比増殖速度は希釈率 (培地供給速度/反応器体積) に等しくなる。連続培養実験は、温度 23°C, 溶液 pH 6.5±0.3 の一定条件下で、希釈率を 0.22 ~ 2.68 h⁻¹, 供給液硫化水素濃度を 0.77 ~ 2.30 mol·m⁻³ の範囲で変化させて行った。ガラス製反応器への光照射は、その側面から行った。光源としては、白色蛍光灯 (波長域 300 ~ 800 nm、吸光極大波長 580 nm 付近) を使用した。また、放射スペクトル幅の狭い近赤外色光の光源として、ピーク波長 735±25 nm の近赤外色発光ダイオード (LED-FR、東京理化工械) を使用した。

液相菌体濃度は、細菌計算盤を用いてビデオ装置付き光学顕微鏡下 (400 倍) で計測した。液相硫化水素濃度は、メチレンブルー法⁵⁾に基づく吸光度法を用いて測定した。反応器外表面での光強度は、照度計 (IM-5M, TOPCO) を用いて計測した。なお、液体培地を満たした反応器内に検光部 (直径 2cm) を挿入して光強度を測定したが、反応器外表面と比較し、その減衰は 5%以下であった。また、細菌懸濁液の吸光スペクトルは、紫外可視分光光度計 (UV-1600、島津製作所) によって測定した。

3. 研究結果および考察

溶存硫化水素の微生物酸化実験を行う前に、光独立栄養細菌 *C. limicola* 細胞の懸濁液 (液相菌体濃度 3×10^{14} cells·m⁻³) を試料として用いて、最大吸光度を示す波長域を調べた。Fig.3 に、光独立栄養細菌 *C. limicola* の吸収スペクトルの測定結果を示す。波長 750 nm 付近の近赤外域と 450 nm 付近の青緑色域に 2 つの吸収帯が観察された。これらの吸収帯は、緑色硫黄細菌が光エネルギーを吸収するための光合成色素によるもので、近赤外光はバクテリオクロロフィル、青緑色光はカロチノイドによる吸収を表していると考えられる⁶⁾。*C. limicola* の吸収スペクトルから判断すると、この細菌の生育に有効な波長域は光合成色素の吸光極大 (450 nm, 750 nm 周辺) であると推察される。既報¹⁾では光源に白色蛍光灯 (吸光極大波長 580 nm 付近) を使用したが、この光源では青緑色域 (450 nm 付近)、近赤外色域 (750 nm 付近) での相対光エネルギーが非常に小さく光合成には不利であると思われる。そこで本研究では、*C. limicola* の光合成色素が吸光極大を示す特定波長域が照射できる光源として、近赤外色発光ダイオードに着目した。なお、発光ダイオードは、排熱量が多い蛍光灯と異なり、熱線を含まない光源でもある。

Fig.4 は、異なる光源を用いて測定された *C. limicola* の比増殖速度 (= 希釈率) を反応器内硫化水素濃度に対してプロットしたものである。光源に白色蛍光灯だけを用いた場合のデータは、既報¹⁾から引用した。白色蛍光灯の照射下で測定された比増殖速度は、溶存硫化水素濃度の依存性に関してはモノ一型速度式で表現できたが、5000lx から 16000 lx

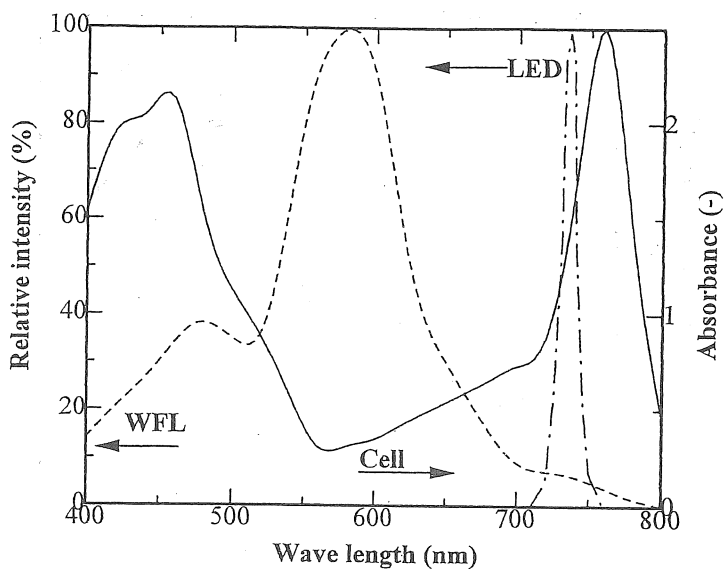


Fig.3 Absorption spectra of *C. limicola* cells and two different light sources: (—) *C. limicola* cells; (----) white fluorescent lamp (WFL); (-·-·-) near infrared light-emitting diode (LED).

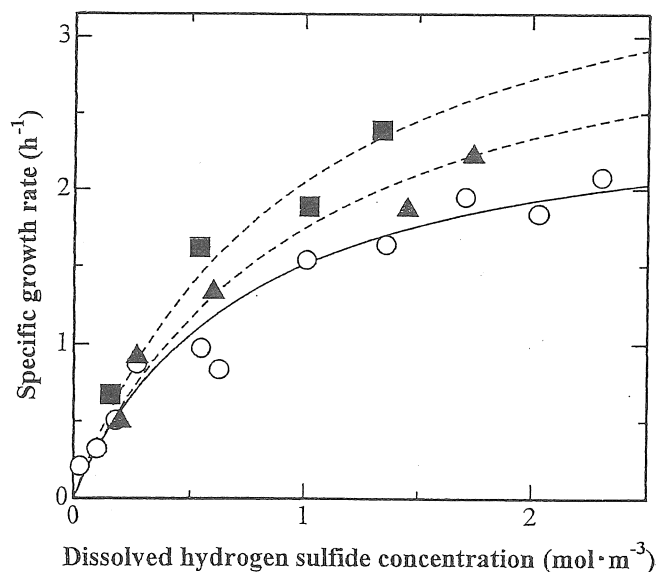


Fig.4 Specific growth rate of *C. limicola* as a function of effluent H_2S concentration at different light sources: (○) white fluorescent lamp (WFL) at 5000 lx; (▲) near infrared LED at 10 lx; (■) near infrared LED at 10 lx and WFL at 5000 lx. Solid line was calculated from previous kinetic expression¹⁾. Broken lines represent the data points under near infrared LED illumination.

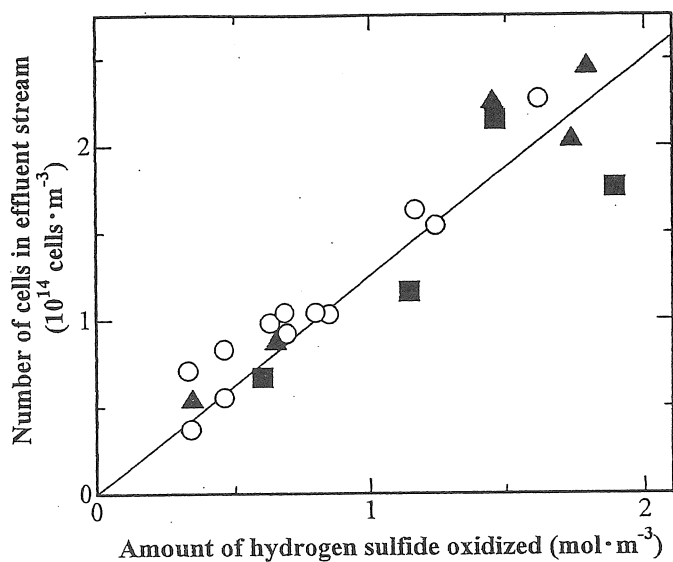


Fig.5 Estimation of growth yield of *C. limicola* on dissolved H₂S at different light sources: (○) white fluorescent lamp (WFL) at 5000 lx; (▲) near infrared LED at 10 lx; (■) near infrared LED at 10 lx and WFL at 5000 lx.

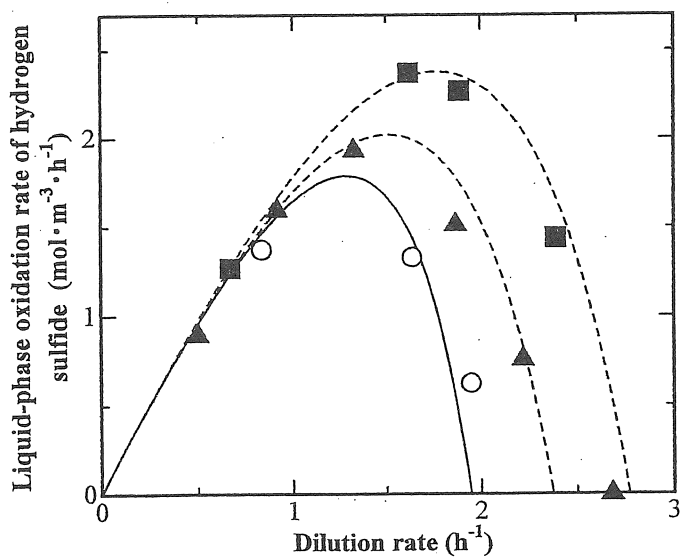


Fig.6 Liquid-phase oxidation rate of dissolved H₂S in continuous culture of *C. limicola* as a function of dilution rate at a feed H₂S concentration of 2.1 mol·m⁻³ and at different light sources: (○) white fluorescent lamp (WFL) at 5000 lx; (▲) near infrared LED at 10 lx; (■) near infrared LED at 10 lx and WFL at 5000 lx. Solid line was calculated from previous kinetic expression¹⁾. Broken lines represent the data points under near infrared LED illumination.

の範囲内では光強度の影響を受けなかった¹⁾。光源に近赤外色 LED を用いた場合にも、比増殖速度の実測値は溶存硫化水素濃度とともに増加した。近赤外色 LED の光強度は 10 lx 程度で非常に弱いものであるが、近赤外色 LED (波長 735±25 nm) を用いて測定された比増殖速度は 5000 lx の白色蛍光灯 (波長 300 ~ 800 nm) を用いた場合に比べてわずかに増大していることがわかる。この実験結果から、*C. limicola* の光合成色素が最大吸光度を示す近赤外線光の照射が、細菌の増殖速度を高めるうえで有効な手段であることが明らかになった。また、10 lx の近赤外色 LED と 5000 lx の白色蛍光灯とでは比増殖速度に大差ないことから、両光源において近赤外色域 (波長 735±25 nm) の光エネルギーが同程度であることも推測される。さらに、光源に白色蛍光灯 (5000 lx) と近赤外色発光ダイオード (10 lx) を併用した場合、溶存硫化水素 $C_s = 1.3 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ で測定された比増殖速度は、白色蛍光灯だけの場合に比べて 39% 増加した。

硫化水素の微生物酸化における菌体収率に及ぼす光源の影響を明らかにするために、Fig.5 に示すように、硫化水素の酸化量に対して *C. limicola* の増殖細胞数 (反応器出口での液相菌体濃度) をプロットした。なお、白色蛍光灯だけを用いた場合の実験データは既報¹⁾からの引用である。光源に近赤外色 LED を使用しても、微生物酸化の量論関係は変わらないことがわかる。図中の全データを光源には関係なく原点を通る直線で相関した結果 (相関係数 0.938)、相関線の勾配より硫化水素の酸化に基づく *C. limicola* の菌体収率 Y_s として $1.25 \times 10^{14} \text{ cells} \cdot \text{mol}^{-1}$ が得られた。この推定値は、白色蛍光灯だけを用いて推定された菌体収率¹⁾ ($1.04 \times 10^{14} \text{ cells} \cdot \text{mol}^{-1}$) とほぼ一致する。

単一連続槽型反応器において、溶存硫化水素の反応器単位体積当たりのバイオ変換速度は、反応器入口および出口における液相硫化水素濃度の差 ($C_{S0} - C_S$) と希釈率 D との積で与えられる。Fig.6 は、単一連続槽における溶存硫化水素のバイオ変換速度に及ぼす希釈率および光源の影響を示したものである。白色蛍光灯だけを用いた場合の変換速度に関する実験データ (図中の○印) および計算線 (図中の実線) は、既報¹⁾から引用されたものである。また、図中の破線は光源として近赤外色 LED を用いて実測された変換速度の代表線である。光源が白色蛍光灯 (5000 lx) だけの場合には最大変換速度が $1.84 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ であるが、近赤外色 LED (10 lx) を併用することによって最大変換速度は $2.38 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ に増加した。

4. 今後の課題

光独立栄養細菌 *C. limicola* による溶存硫化水素の酸化実験を 23°C, pH6.5±0.3 の嫌気条件下で行い、酸化速度に及ぼす光源の影響を実験的に検討した。その結果、光源に白色蛍光灯 (5000 lx) と近赤外色発光ダイオード (ピーク波長 735±25 nm, 光強度 10 lx) を併用して測定された最大酸化速度 ($2.38 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$) は、白色蛍光灯だけの場合 ($1.84 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$) に比べて 30% 増加した。*C. limicola* の光合成色素が最大吸光度を示す近赤外線光の照

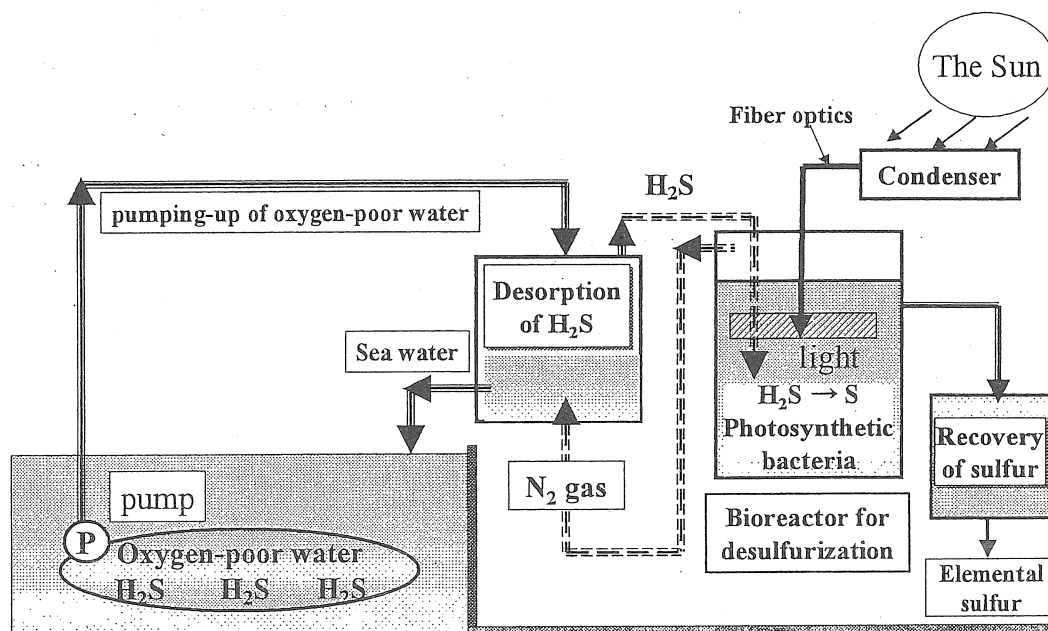


Fig.7 Prevention against blue tide using photosynthetic sulfur bacteria.

射が、硫化水素の酸化を促進させるうえで有効な手段であることが明らかになった。

以上の基礎的研究によって、溶存硫化水素に対する光独立栄養細菌 *C. limicola* の酸化能力を定量的に把握することができた。今後は、Fig.7 に示すような青潮防止プロセスの開発をめざして、光バイオ脱硫用微生物反応器の形式や操作方式について検討を行う必要がある。

5. 文 献

- 1) 高島正, 森田純輔, 西機忠昭, 小西康裕, 海水誌, 55, 31-38(2001)
- 2) H.G.Truper, "Biology of inorganic nitrogen and sulfur", Springer Verlag, Berlin.,(1981), pp.199-211.
- 3) H.L.Ehrlich, "Geomicrobiology", Dekker, New York(1990), pp.449-513
- 4) A.E.Martell and R.M.Smith, "Critical stability constants", Plenum Press, New York(1977), Vol.4, p.76
- 5) L.Gustafsson, Talanta,4, 227-235(1960).
- 6) N. Pfennig, "Autotrophic bacteria", Springer-Verlag, Berlin (1989), pp.97-116

A Fundamental Study on Microbial Removal of Hydrogen Sulfide
from Anoxic Sea Water on Sediments by Using Phototrophic
Green Sulfur Bacterium
- Selection of Light Source for a Night Operation -

Yasuhiro Konishi and Toshiyuki Nomura
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 phototrophic green sulfur bacterium *Chlorobium limicola*, which is associated with the sulfur cycle of aqueous environments.

In this report, the anaerobic oxidation of dissolved H_2S into elemental sulfur was studied at $23^\circ C$ and pH 6.5 ± 0.3 in a continuous culture of the phototrophic bacterium *C. limicola* at different light sources. The maximum H_2S oxidation rate measured using a near infrared LED (light-emitting diode with a peak emission at 735 ± 25 nm) at 10 lx was comparable to that for the white fluorescent lamps (wave length range of 300-800 nm) at 5000 lx. This suggests that both the light sources achieve nearly identical light energies in the long wavelength region of 735 ± 25 nm. Moreover, the combined use of the infrared LED and the white fluorescent lamps provided a 30% increase in the maximum oxidation rate per unit reactor volume.