

デンプンの高温水素発酵細菌群の構造解析

堆 洋平・李 玉友*・久保田健吾・原田 秀樹

(2007年11月19日受付 2008年2月21日受理)

Analysis of Microbial Community Structures in Thermophilic Hydrogen Fermentation of Starch

Yohei Akutsu, Yu-You Li*, Kengo Kubota, and Hideki Harada (*Department of Civil and Environmental Engineering, Tohoku University, 6-6-06 Aoba, Sendai, Miyagi 980-8579*) *Seibutsu-kogaku* **86**: 157-163, 2008.

Microbial community structures in thermophilic hydrogen fermentation (55°C) were analyzed by molecular methods, including polymerase chain reaction-denatured gel gradient electrophoresis (PCR-DGGE), real-time PCR, and cloning methods. Samples used for analyses were obtained from five identical completely stirred tank reactors (CSTRs) of thermophilic hydrogen fermentation from starch, which were seeded with five different types of inoculum. The closest relatives of the genus *Thermoanaerobacterium*, which is known to be a typical hydrogen producer, predominated in all reactors. However, microbial community structures abundant in each reactor were different, indicating that the type of inoculum is one of the important factors for thermophilic hydrogen fermentation.

[**Key words:** thermophilic hydrogen fermentation, inocula, microbial community structure, *Thermoanaerobacterium*]

今日、化石燃料に替わる持続可能なエネルギーとしてバイオエネルギーの積極的導入が期待されている。バイオマスから微生物により水素を生産する水素発酵法は、未来型水素エネルギー社会における省エネルギー型の水素の生産方法として期待されている^{1,2)}。水素発酵の研究は、混合細菌群を植種源とした連続実験が行われるようになった1990年代後半から急速に発展し^{3,4)}、現在実用化を目指した研究が活発に進められている。

混合細菌群による水素発酵のメカニズムは、それぞれの菌の代謝特性に加えて、細菌間で生じる相互作用により複雑になると考えられる^{5,6)}。したがって、混合細菌群を用いた水素発酵において、細菌叢を制御し水素発酵の効率、安定性を向上させるためには、細菌群の構造を定性的・定量的に把握することが重要だと考えられる。

水素発酵は中温水素発酵(30～40°C)と高温水素発酵(50～60°C)に分けることができる。これらの温度による効果に加えてHRT(水理学的滞留時間)、pHなどのパラメータにより細菌群がスクリーニングされる。高温水素発酵は、中温水素発酵と比較して水素収率が高くなる

と報告されており、近年注目されている^{7,8)}。Uenoら⁶⁾は、セルロースパウダーの高温水素発酵において、pHおよびHRTを変化させることで細菌群構造および水素発酵特性が異なることを明らかにした。また、水素発酵槽の運転条件以外にも、利用する植種源も細菌群構造に影響を与えることが考えられる。筆者らは前報⁹⁾において、5つの異なる植種源を用いて、同一の運転条件(55°C, HRT 24 h)で連続実験を行ったところ、それぞれの実験系は異なる水素発酵特性を示したことを報告した。

本研究は、前報⁹⁾の続きとして、それぞれの植種源により構築された高温水素発酵系の細菌群構造を明らかにし、細菌群構造が水素発酵特性に及ぼす影響を検討することを目的とした。細菌群構造の解析にはPCR-DGGE法、リアルタイムPCR法およびクローニング法を用いた。

実験方法

培養条件と植種源 培養はそれぞれ異なる植種源を5つの完全混合型高温水素発酵槽(R1～R5)により、

*連絡先 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 (〒980-8579 仙台市青葉区青葉6-6-06)
TEL. 022-795-7464 FAX. 022-795-7465 E-mail: yyli@ep11.civil.tohoku.ac.jp

Table 1. Primers used in this study.

Primer	Specificity	Sequence (5'→3')	Purpose	Reference
EUB341f	bacteria	CCTACGGGAGGCAGCAG	Real-Time PCR	10)
EUB341f-GC	bacteria	GC clamp-CCTACGGGAGGCAGCAG	DGGE	10)
UNI518r	universal	ATTACCGCGGCTGCTGG	PCR-DGGE & Real-Time PCR	10)
27f	bacteria	AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG	Cloning (ligation)	11)
1492r	bacteria	GGTTACCTTGTACGACTT	Cloning (ligation)	11)
M13 f	vector	GTAACACGACGGCCAG	Cloning (sequence)	invitrogen
M13 r	vector	CAGGAACAGCTATGAC	Cloning (sequence)	invitrogen
ThermoH2F	<i>Thermoanaerobacterium</i>	GCGTGGAACAATCTACCTGT	Real-Time PCR	this study
ThermoH2R	<i>Thermoanaerobacterium</i>	TATAGCCGCCTACGTGCTCT	Real-Time PCR	this study
GC clamp	—	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG	PCR-DGGE	10)

55°C, HRT 24時間の条件で行った。解析はガス生成速度およびガス組成がそれぞれ安定した44日目のサンプルを用いた⁹⁾。実験に使用した培地1 lあたりの組成は、デンプン, 10,000 mg; ペプトン, 500 mg; yeast extract, 500 mg; NH₄HCO₃, 500 mg; Na₂CO₃, 2000 mg; K₂HPO₄, 250 mg; MgSO₄・7H₂O, 120 mg; FeSO₄・7H₂O, 25 mg; KI, 2.5 mg; MnSO₄・4H₂O, 2.5 mg; CoCl₂・6H₂O, 2.5 mg; ZnSO₄・7H₂O, 0.5 mg; NiCl₂・6H₂O, 0.5 mg; Na₂MoO₄・2H₂O, 0.5 mg; H₃BO₃, 0.5 mgである⁹⁾。

それぞれの実験系で使用した植種源は、余剰活性汚泥の高温消化汚泥 (R1), 乳牛糞の高温消化汚泥 (R2), 下水汚泥と生ごみのコンポスト (R3), じゃがいもの高温酸発酵汚泥 (R4), 下水汚泥と生ごみの高温消化汚泥 (R5) である⁹⁾。

PCR-DGGE法 DNAの抽出は、Ultra Clean Soil DNA kit (MO BIO) を用い、添付の説明書に記された手順で行った。抽出したDNAをテンプレートとし、EUB341f-GCとUNI518rのプライマーセット (Table 1) で16S rDNAのV3領域を含む範囲を全細菌についてPCR増幅した。

PCR溶液の組成は、それぞれのプライマー, 0.5 μM; dNTP mixtures, 0.2 mM; Ex Taq PCR Buffer (最終Mg²⁺濃度, 1.5 mM); DNAポリメラーゼ TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ), 2.5 U/100 μlとした。サーマルサイクラーは、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (Model TP600) (タカラバイオ) を用いた。PCRの条件は、94°C × 5分 + (94°C × 30秒 + 53°C × 30秒 + 72°C × 1分) × 35サイクル + 72°C × 5分とした。

DGGEには核酸電気泳動装置 DCode (BIO RAD) を用いた。アクリルアミドゲルは、変性剤の濃度勾配が15–55%となるように調製した (変性剤濃度が100%の時: 尿素 7 M, ホルムアミド 40% (v/v))。電気泳動は、0.5 × TAE Buffer を用いて58°C, 130 Vの条件で300分間行っ

た。電気泳動後のゲル中のDNAの検出にはエチジウムブロマイドを用い、UV照射および画像の取り込みには ChemiDoc XRS (BIO RAD) を用いた。得られたバンドを切り出し、QIAEX II (QIAGEN) によりDNAを抽出した。PCRで増幅したDNAをMicroSpin S-300 HR Columns (GE Healthcare) により精製し、塩基配列を解読した。

リアルタイムPCR法を用いた *Thermoanaerobacterium* 属細菌の定量

プライマーの設計 *Thermoanaerobacterium* 属細菌の定量に使用したプライマーセット (ThermoH2F and ThermoH2R) の設計にはPrimer3を用いた¹²⁾。設計したプライマーの特異性は以下の(1)～(4)をもって有効と判定した。(1) RDPI¹³⁾の提供するツール“Probe Match”によれば *Thermoanaerobacterium* 属細菌およびそれらに近縁なクローンに特異的であったこと、(2) LightCyclerによる融解曲線分析により、プライマーダイマーおよび非特異的産物の生成がないこと、(3) LightCyclerにより増幅したPCR産物のアガロースゲル電気泳動による分画を行い、目的としたサイズと等しいバンドのみが観察されたこと、および(4) LightCyclerにより増幅したPCR産物を鋳型としてEUB341f-GCとUNI518rにより得られたPCR産物を用いて (nested PCR法)、DGGE法を行い得られたすべてのバンドの塩基配列を解読した結果、解読できたすべての塩基配列と最も近縁であったのが、*Thermoanaerobacterium* 属細菌であったこと、である。設計したプライマーにGC-clampを付加してDGGEを行わずに nested PCR法を用いたのは、前者ではバンドがよく分離せずに切り出しができなかったためである¹⁴⁾。

リアルタイムPCR法を用いた16S rDNAの定量

リアルタイムPCR法には、LightCycler DNA Master SYBR Green I (Roche) およびLightCycler (Roche) を用いた。真正細菌の定量には、EUB341fおよびUNI518r

を用いた。リアルタイム PCR 法の反応溶液 20 μ l 中の組成は、次のように決定した：Mg²⁺（実験により濃度を決定した）；各プライマー、10 pmol；抽出した DNA 溶液、2 μ l；SYBR Green I、2 μ l。リアルタイム PCR 法の PCR 条件は、95°C × 30 秒 + (95°C × 0 秒 + アニール温度 [°C] × 10 秒 + 72°C × (PCR 産物のサイズ [bp]/25) 秒) × 30 サイクルとした。ThermoH₂F と ThermoH₂R および EUB341f と UNI518r それぞれのプライマーセットに用いた（アニール温度、Mg²⁺ 濃度）は、(60°C, 3 mM), (55°C, 4 mM) とした。

真正細菌および *Thermoanaerobacterium* 属細菌の 16S rDNA 定量用の標準 DNA には、R1 から採取した培養液中の 16S rDNA をそれぞれに特異的なプライマーで増幅し、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) により精製したものを使用した。この DNA 溶液を超純水により段階希釈し、検量線の作製に使用した。

クローニング法 クローニング法は TA Cloning kit (Invitrogen) を使用した。まず、核酸を PCR-DGGE 法の時と同様にして抽出して、真正細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とする 27f と 1492r プライマーセットで PCR を行った。添付の説明書の手順に従ってクローンを作製し、塩基配列を解読するため M13F と M13R のプライマーセットを用いて PCR (94°C: 10 分 + {94°C: 1 分 + 50°C: 1 分 + 72°C: 2 分} × 30 サイクル + 72°C: 10 分) を行った。この PCR 産物に対して MspI を用いた RFLP (restriction fragment length polymorphism) 反応を行った。電気泳動は 3% アガロースゲルで 50 V, 40 分間行った。バンドプロファイルからクローンを各 OTU (operational taxonomic unit) に分類し、それぞれの OTU について EUB341f および UNI518r により 350 ~ 900 bp の塩基配列を解読した。さらに解読した塩基を RDP (<http://rdp8.cme.msu.edu>) が提供する CHIMERA CHECK によりキメラでないことを確認し¹³⁾、greengenes (<http://greengenes.lbl.gov>) が提供する検索プログラムを用いて近縁種を調べた¹⁵⁾。本研究により得られたクローンの塩基配列は DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) に登録済みである（アクセッション番号：AB355968-AB355979）。

塩基配列の解読および系統樹の作製 塩基配列の解読には CEQ 8000 (Beckman Coulter) を用いた。系統樹作成ソフトは MEGA 3.1 を使用した¹⁶⁾。系統樹の描画の際に使用する塩基置換推定法には、“p-distance” を使用し、近隣結合法を用いて系統樹を描画した。bootstrap の実行回数は 500 回とした。

実験結果

各実験系の水素発酵特性 各実験系の定常状態における pH は水素発酵に適切な範囲である 5 前後に収束した。実験系間で水素発酵特性が異なり、水素収率は 1.38 ~ 2.32 mol H₂/mol glucose であった。デンプンの分解で主に生成したのは酪酸、酢酸および乳酸であったが、それらの分解生成物の濃度には実験系間で差異が見られた⁹⁾。本研究では植種源の異なる 5 つの反応槽を同じ運転条件 (55°C, HRT 24 h) で並列して行ったので、水素発酵特性の違いは使用した植種源の影響によるものであると考えられた。

PCR-DGGE 法による高温水素発酵細菌群の構造解析
解析に使用したサンプル Fig. 1 に R1 における DGGE バンドプロファイルの経時変化を例示した。連続実験を開始してから最初の 10 日間に細菌群の構造が植種源から大きく変化し、ガス生成が概ね安定した 34 日以降にはバンドプロファイルが安定した。

PCR-DGGE 法により観察された近縁種 培養開始から 44 日目の各系の細菌群の構造を PCR-DGGE 法により解析した。Fig. 2 に得られたバンドプロファイルを、Table 2 にバンドの塩基配列の解析結果に基づく同定結果をそれぞれ示した。Fig. 2 から明らかなように、各実験系でバンドプロファイルが異なっている。これは、各系列で構築された細菌群の構造が異なることを示している。Table 2 に示すように PCR-DGGE 法により主に観察されたのは、*Flavobacterium* 属細菌 (R1 ~ R4)、*Clostridium* 属細菌 (R2) および *Thermoanaerobacterium* 属細菌 (R1 ~ R5) に近縁な細菌であった。

リアルタイム PCR 法を用いた細菌群中の *Thermoanaerobacterium* 属細菌の定量的検討 PCR-DGGE 法により、全実験系において、*Thermoanaerobacterium* 属細菌に近縁な菌が優占的に存在していたことが確認された。

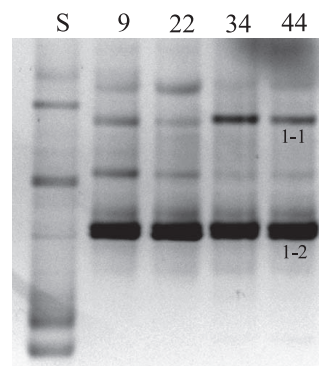


Fig. 1. Time course of DGGE band profile in reactor 1. S, seed sludge; numbers above the image, elapsed days.

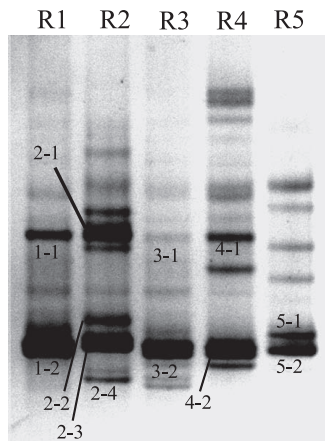


Fig. 2. DGGE band profile in each reactor in stable state (on the 44th day).

そこで、各実験系において *Thermoanaerobacterium* 属細菌をリアルタイム PCR 法により定量的に検討した。Fig. 3 にリアルタイム PCR 法により求めた真正細菌のコピー数に対する *Thermoanaerobacterim* 属細菌のコピー数の割合を示した。16S rRNA 遺伝子は、細菌により保有している量が異なるために、16S rDNA のコピー数の割合は実際の細菌数の割合と等しいわけではないが¹⁷⁾、本研究では *Thermoanaerobacterim* 属細菌の全細菌に占める割合を 16S rDNA のコピー数を基準で見ると、40～95% であり、*Thermoanaerobacterim* 属細菌が優占していたことが明らかである。

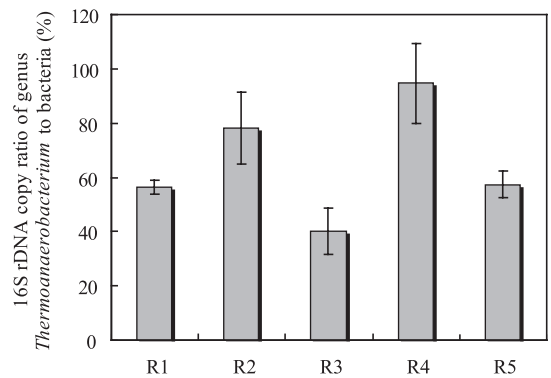


Fig. 3. Quantitative analysis of the ratio of *Thermoanaerobacterium* to bacteria based on copy numbers of 16S rDNA. Results were the average of three measurements. Scale bars represent standard deviations.

クローニング法による細菌群の構造解析と系統解析

細菌群の詳細な構造を比較することを目的として、水素生成の差が大きかった R1 と R5 においてクローニング法による解析を行い、結果を Table 3 に示した。クローンを科レベルで分類すると、R1 では *Thermoanaerobacteriaceae* 細菌 (79/89)、*Flavobacteriaceae* 細菌 (7/89)、*Oxalobacteraceae* 細菌 (3/89) であった（括弧内の分数は全クローンに対する割合）。一方 R5 では *Thermoanaerobacteriaceae* 細菌 (71/85)、*Clostridiaceae* 細菌 (14/85) であった。*Thermoanaerobacteriaceae* に属する細菌が両方の系列において大部分を占めたが、両者の細菌群の構造は明らかに異なっていた。塩基配列の解読の結果

Table 2. Closest relatives determined by PCR-DGGE.

Reactor	Band no.	Family	Closest relative	Accession no.	Length (bp)	Identity (%)
R1	1-1	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i> sp.	AJ319015	160	100
R1	1-2	Thermoanaerobacteriaceae	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	AF247003	130	100
R2	2-1	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i> sp.	AJ319015	163	97
R2	2-2*	Thermoanaerobacteriaceae	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	M59119	134	98
		Clostridiaceae	<i>Clostridium</i> sp. C41-3	AB059479		
		Desulfotomaculum	<i>Desulfotomaculum</i> sp.	AB059478		
R2	2-3	Thermoanaerobacteriaceae	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	M59119	134	98
R2	2-4	Clostridiaceae	<i>Clostridium</i> sp. C41-3	AB059474	130	99
R3	3-1	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i> sp.	AJ319015	160	96
R3	3-2	Thermoanaerobacteriaceae	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	AF247003	130	97
R4	4-1	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i> sp.	AJ319015	159	96
R4	4-2	Thermoanaerobacteriaceae	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	AF247003	130	99
R5	5-1	Thermoanaerobacteriaceae	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	M59119	130	95
R5	5-2	Thermoanaerobacteriaceae	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	M59119	93	95

*Three types of bacterium were considered as candidates of band 2-2.

Table 3. Clone library of 16S rDNA obtained from R1 and R5.

Clone	Family	Closest relative	Accession no.	Length (bp)	Identity (%)	No. of clones
R1-1	Thermoanaerobacteriaceae	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	M59119	839	97	79
R1-2	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i> sp.	DQ778310	834	99	7
R1-3	Oxalobacteraceae	<i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i>	Y08845	382	97	3
R5-1	Thermoanaerobacteriaceae	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	M59119	743	95	62
R5-2	Thermoanaerobacteriaceae	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	M59119	854	90	6
R5-3	Thermoanaerobacteriaceae	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	M59119	350	93	3
R5-4	Clostridiaceae	<i>Clostridium diolis</i>	AJ458417	712	94	5
R5-5	Clostridiaceae	<i>Clostridium cellulosi</i>	L09177	782	92	4
R5-6	Clostridiaceae	<i>Clostridium</i> sp.	AY188846	712	97	2
R5-7	Clostridiaceae	<i>Clostridium</i> sp.	AY188848	673	95	1
R5-8	Clostridiaceae	<i>Clostridium</i> sp.	AY949859	679	92	1
R5-9	Clostridiaceae	<i>Anaerobacter polyendosporus</i>	Y18189	785	96	1

Thermoanaerobacteriaceae および Clostridiaceae に分類されたクローンおよびそれに近縁な細菌の塩基配列を用いて系統解析を行った結果を Fig. 4 に示した. 本研究の系統解析の結果得られた系統樹をもとに, Collins ら¹⁸⁾の方法に従い, 各 DNA クラスターを分類した. R1 および R5 で得られたクローンの大部分は, *Thermoanaerobacterium* 属細菌の属する Cluster VII で得られたが, R5 から得られたクローン R5-2 および R5-3 は既存の Cluster VII に属する菌とは異なる系統の菌であった. R5 で観察された *Clostridium* 属に近縁なクローンは Cluster I および Cluster IV に属していた.

考 察

優占菌 *T. thermosaccharolyticum* の特徴 本研究では各実験系において *T. thermosaccharolyticum* に近縁な細菌が優占していたことが PCR-DGGE 法, リアルタイム PCR 法およびクローニング法により示された. このように, いずれの実験系においても *T. thermosaccharolyticum* に近縁な細菌が優占する細菌群構造となった理由として, 定着できる細菌が, デンプン資化性, 好熱性, 酸性条件 (pH 5 前後), 最小世代時間が 24 時間以下, などの条件に限定されたことが大きな理由であると考えられる. ただし, 中温水素発酵条件と高温水素発酵条件による細菌群のスクリーニング効果を比較すると, 中温水素発酵の場合には, 報告されている細菌は種レベルでは多く存在するのに対して^{19, 20)}, 高温水素発酵では種レベルにおいても限定されている点で異なることが示唆された.

Thermoanaerobacterium 属細菌は, グラム陽性, 好熱性嫌気性細菌である^{21, 22)}. *T. thermosaccharolyticum* に近縁な細菌は, グルコース, ジャガイモ, 生ごみ, セルロースなどさまざまな基質を利用した高温水素発酵槽において

観察されている²³⁻²⁶⁾. デンプンの高温水素発酵槽において *T. thermosaccharolyticum* に近縁な細菌が存在したことを報告するのは本研究が初めてである. *T. thermosaccharolyticum* は典型的な好熱性水素生成細菌として知られている. Ueno らは, 分離した *T. thermoanaerobacterium* は 2.39 mol H₂/mol glucose の水素を生産することを報告している²⁶⁾. 本研究で得られた最大水素収率はこれに匹敵する値である. *Thermoanaerobacterium* 属細菌に近縁な細菌が本研究の水素生成に重要な働きをしていたと考えられる.

植種源の細菌群構造に及ぼす影響 *Thermoanaerobacterium* 属細菌が主要な菌であることは, R1 ~ R5 に共通していたが, 実験系間で細菌群構造には明らかに差異があることが観察された. R1 と R5 を対象としたクローニング法では, *Clostridium* 属細菌に近縁な細菌は R5 においてのみ観察され, 全クローン中で約 16% を占めた. 高温水素発酵の既往研究では, *Clostridium* 属細菌の観察は報告により異なる^{23, 25, 26)}. *Clostridium* 属細菌は中温水素発酵槽における重要な水素生成細菌であるが, 高温水素発酵における役割は明らかではない. また, *Flavobacterium* 属細菌に近縁な細菌は, クローニング法では, R1 のみにおいて, DGGE 法では R1 ~ R4 において観察された. *Flavobacterium* 属細菌は, ペプトン濃度が低い時には, 炭水化物からのガスを生成しないと報告されている²⁷⁾. また, *Flavobacterium* 属は, *Thermoanaerobacterium* 属や *Clostridium* 属などとは異なり, 通性嫌気性の細菌である. Yokoi ら²⁸⁾ は, 絶対嫌気性細菌 *Clostridium butyricum* 単独の実験系と *C. butyricum* および通性嫌気性細菌 *Enterobacter aerogenes* の混合系とで水素収率を比較したところ, 混合系による水素収率の方が高かったと報告している. その理由として *E. aerogenes* が反応槽内の酸素を消費したためだと考察した. Hung ら²⁹⁾ もグルコースの中温水素発酵において

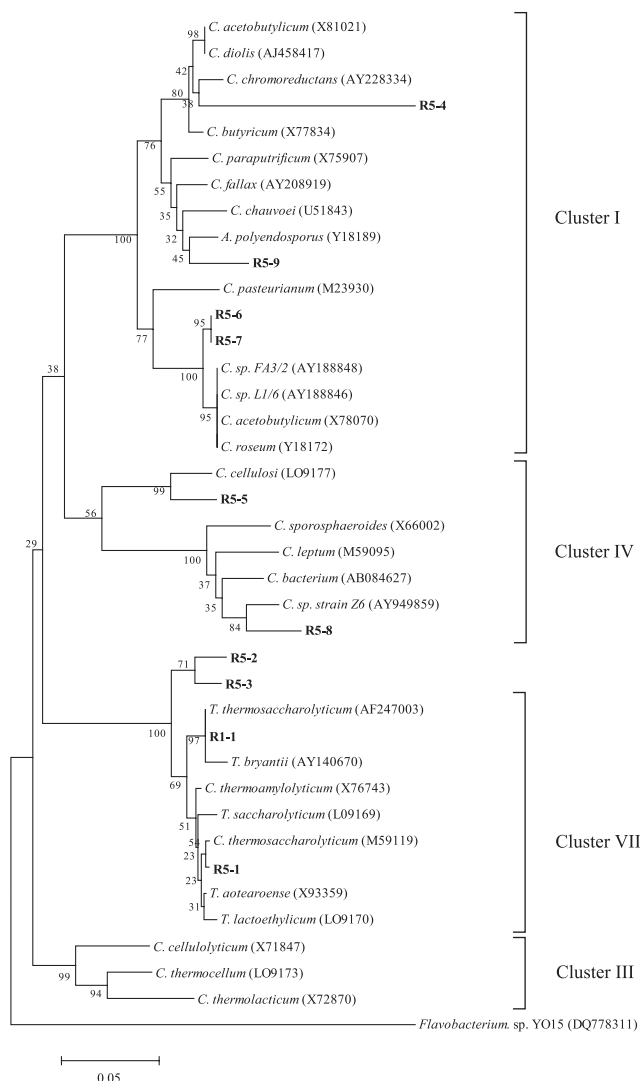


Fig. 4. Phylogenetic tree of OTUs and their close relatives in *Clostridia*. Clusters I, III, IV, and VII are DNA clusters of *Clostridium* (Collins et al., 1994). *Flavobacterium* sp. YO15 was selected as an outgroup species. The scale bar represents 0.05 substitutions per nucleotide position. Numbers at the nodes are bootstrap values (%).

通性嫌気性細菌の *Klebsiella* 属細菌は、発酵槽内で酸素を消費し水素発酵に寄与していると述べている。本研究でも R1 ~ R4 において観察された通性嫌気性細菌 *Flavobacterium* 属細菌は、嫌気性水素生成細菌の水素生成に寄与していた可能性がある。R5 においては、*Flavobacterium* 属細菌の存在は定かではないが、クローニング法において近縁なクローンが観察されなかったことからこの種の細菌による寄与は小さかったと考えられる。他に、R5 の水素生成能が低下した原因として *Thermoanaerobacterium* 属と共存していた *Clostridium* 属細菌の水素収率が小さく、これらの細菌との間に基質の競合が生じたことも考えられる。

本研究から、植種源が異なることにより同じ水素発酵

条件であっても構築される細菌群の構造が異なることが示された。水素発酵特性は細菌群の構造と密接な関係がある。効率的な水素発酵を実現するために植種源と収斂する細菌群の構造との関係を明らかにすることが、今後の研究課題である。

要 約

高温水素発酵細菌群の構造を PCR-DGGE 法、リアルタイム PCR 法およびクローニング法を用いて解析した。解析に使用したサンプルは、5 つの異なる植種源をデンプンを基質として完全混合型高温水素発酵槽 (55°C, HRT 24 h) により馴養したものである。実験の結果、すべての反応槽において典型的な水素生成細菌として知られている *Thermoanaerobacterium* 属細菌に近縁な細菌が優占していることが分かった。また、水素発酵の特性が異なっていたそれぞれの反応槽の細菌群構造には差異が見られた。本研究から植種源は高温水素発酵特性を決定するパラメータの 1 つであることが明らかになった。

本研究の一部は独立行政法人日本学術振興会科学研究費補助金 (受付番号 7264) および科学研究費補助金・萌芽研究 (課題番号 18651030) の補助を受けて行ったものである。ここに記して謝意を表する。

文 献

- 1) Levin, D. B., Pitt, L., and Love, M.: *Int. J. Hydrogen Energy*, **29**, 173–185 (2004).
- 2) 植田充美, 近藤昭彦: 地球環境シリーズ エコバイオエネルギーの最前線—ゼロエミッション型社会を目指して, シーエムシー出版, 東京 (2005).
- 3) Ueno, Y., Kawai, T., Sato, S., Otsuka, S., and Morimoto, M.: *J. Ferment. Bioeng.*, **79**, 395–397 (1995).
- 4) 沈 建権, 李 玉友, 野池達也: 環境工学研究論文集, **32**, 213–220 (1995).
- 5) Noike, T., Takabatake, H., Mizuno, O., and Ohba, M.: *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**, 1367–1371 (2002).
- 6) Ueno, Y., Sasaki, D., Fukui, H., Haruta, S., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *J. Appl. Microbiol.*, **101**, 331–343 (2006).
- 7) Gavala, H. N., Skiadas, I. V., and Ahring, B. K.: *Int. J. Hydrogen Energy*, **31**, 1164–1175 (2006).
- 8) Valdez-Vazquez, I., Ríos-Leal, E., Esparza-García, F., Cecchi, F., and Poggi-Varaldo, H. M.: *Int. J. Hydrogen Energy*, **30**, 1383–1391 (2005).
- 9) 堆 洋平, 李 玉友: 水環境学会誌, **29**, 627–633 (2006).
- 10) Muyzer, G., Waal, E. C. D., and Uitterlinden, A. G.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 695–700 (1993).
- 11) Suzuki, M. T. and Giovannoni, S. J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 625–630 (1996).
- 12) Rozen, S. and Skaletsky, H. J., *Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers*, In: Krawetz, S., Misener, S. (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press,

- Totowa, N. J., 365–386 (2000).
- 13) Cole J. R., Chai, B., Marsh, T. L., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., Chandra, S., McGarrell, D. M., and Schmidt, T. M.: *Nucleic Acids Res.*, **31**, 442–443 (2003).
 - 14) Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., and Wellington, E. M.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3233–3242 (1997).
 - 15) DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., and Andersen, G. L.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 5069–5072 (2006).
 - 16) Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M.: *Briefings in Bioinformatics*, **5**, 150–163 (2004).
 - 17) Farrelly, V., Rainey, F. A., and Stackebrandt, E.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2798–2801 (1995).
 - 18) Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., and Farrow, J. A. E. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44**, 812–826 (1994).
 - 19) 登坂充博, 李 玉友, 野池達也 : 土木学会論文集, **790**, VII, 1–10 (2005).
 - 20) Kim, S.-H., Han, S.-K., and Shin, H.-S.; *Process Biochem.*, **41**, 199–207 (2006).
 - 21) Lee, Y.-E., Jain, M. K., Lee, C., Lowe, S. E., and Zeikus, J. G.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **43**, 41–51 (1993).
 - 22) Liu, S.-Y., Rainey, F. A., Morgan, F. H., Mayer, W., and Wiegel, J.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 388–396 (1996).
 - 23) Ahn, Y., Park, E. J., Oh, Y. K., Park, S., Webster, G., and Weightman, A. J.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **249**, 31–38 (2005).
 - 24) 大羽美香, 李 玉友, 野池達也 : 水環境学会誌, **29**, 399–406 (2006).
 - 25) Shin, H.-S. and Youn, J.-H.: *Biodegradation*, **16**, 33–44 (2005).
 - 26) Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 397–400 (2001).
 - 27) Holt, H. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. I. and Williams, S. T.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth edition, Williams & Wilkins, Baltimore, USA (1994).
 - 28) Yokoi, H., Tokushige, T., Hirose, J., Hayashi, S., and Takasaki, Y.: *Biotechnol. Lett.*, **20**, 143–147 (1998).
 - 29) Hung, C.-H., Lee, K.-S., Cheng, L.-H. Huang, Y.-H, Lin, P.-J. and Chang, J.-S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 693–670 (2007).