研究論文

水素発酵微生物群の集積と菌相解析

黄 笑宇*・松本明子**・大西章博**
坂本 勝***・藤本尚志**・鈴木昌治**

要 旨

本研究では、生ごみを発酵基質として安定的に水素を生産する微生物群の探索を試みた。下水汚泥コンポスト中の微生物群を用いることで、安定した生ごみの水素発酵が可能であることが確認された。集積培養過程の微生物相を FISH 法と PCR-DGGE 法により解析した結果、*Clostridium* 属の菌種が水素発酵の主役を担っているものと考えられた。また、この他に *Bacillus* 属グループの菌種の存在が確認された。*Bacillus* 属グループの菌種は生ごみの水素発酵過程において *Clostridium* 属の水素発酵能の安定化に寄与するものと考えられた。また、集積した微生物群を用い、pH6.0に制御して生ごみの水素発酵を行った場合の水素収率は $2.03\text{mol-H}_2/\text{mol-hexose}$ であった。下水汚泥コンポスト中の複合微生物群は生ごみを基質とした水素発酵システムの植種微生物源として有効であるものと考えられた。

キーワード：水素発酵，バイオマス，下水汚泥コンポスト，PCR-DGGE，FISH

1. はじめに

石油や天然ガスなどの一次エネルギー源は、数十年後の将来には資源枯渇することが懸念されており、長期持続型社会の構築を可能とする代替エネルギーの開発が望まれている。水素は、環境中に無尽蔵に存在するため、化石燃料のように枯渇する心配がなく、また燃焼に際して大気汚染物質を発生しない利点を持っている。このため、水素は将来のエネルギー問題解決の担い手として脚光を浴びており、燃料電池や水素燃焼エンジンのように水素をエネルギーとして利用するためのシステム開発が積極的に進められている。しかしながら、生産費用の低い水素を安定して生産するシステムは確立されていないのが現状であり、水素生産手法に関する新たな技術開発が望まれている。

微生物を用いた水素発酵は、食品廃棄物などの廃棄物系バイオマスから水素を回収できるため、持続可能なエネルギー開発に向けた最も期待される研究分野の一つである¹⁾。水素発酵能を有する微生物種は自然界に数多く存在することが知られているが、中でも水素発酵能が高いものは嫌気性光合成細菌および嫌気性非光合成細菌である^{2, 3)}。特に、嫌気性非光合成細菌の *Clostridium* 属菌種は増殖速度が速く、また増殖に光を必要としないため連続的な水素発酵が可能であると考えられており、バイオマスからの水素発酵の研究に広く用いられている²⁾。また、近年では水素発酵システムの実用化を考慮して、複合微生物系による実排水や有機性廃棄物からの水素発酵が試みられており、醸造排水⁴⁾や食品系廃棄物⁵⁾などの廃棄物系バイオマスから水素の回収が可能であることが報告されてい

* 東京農工大学大学院農学研究科醸造学専攻 Xiaoyu HUANG

** 東京農工大学応用生物科学部醸造科学科 Akiko MATSUMOTO, Akihiro OHNISHI,
Naoshi FUJIMOTO, Masaharu SUZUKI

*** 三機工業㈱環境システム事業部エンジニアリング部 Masaru SAKAMOTO

2006年12月1日受付

2007年3月12日受理

る。しかしながら、廃棄物系バイオマスの水素発酵では、発酵原料の成分組成の違いや発酵条件の変化により水素の発生量が著しく低下することがしばしば確認されている。廃棄物系バイオマスからの水素発酵システムの構築には、複合微生物系による水素発酵メカニズムの解明と、高効率かつ安定的に水素を生産する微生物群の獲得が重要課題となる。

そこで本報では、代表的な廃棄物系バイオマスである生ごみに対して安定的に水素発酵を維持する微生物群を環境中の複合微生物系から獲得することを狙いとしました。まず、既往の報告から水素発酵が可能な植種微生物源としての事例が多かった活性汚泥、生ごみ、下水汚泥コンポストを植種微生物源とし、生ごみを発酵基質とした回分式培養により水素発酵微生物群の集積を試みた。ついで、安定した水素発酵能を維持した回分式培養系の微生物相を fluorescence *in situ* hybridization (FISH法)とPCR-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE 法)を用いて解析した結果について報告する。

2. 材料と方法

2.1 植種微生物源と植種微生物の調製法

植種微生物源には、下水活性汚泥、生ごみ、下水汚泥コンポストの3種類の試料を用いた。下水活性汚泥は東京都芝浦水再生センターより恵与された下水活性汚泥を供試し、生ごみは東京農業大学の生協食堂から排出される厨芥および残飯を用いた。下水汚泥コンポストは、スクープ式発酵装置を用いた下水汚泥のコンポスト化過程における一次発酵槽から採取して用いた。生ごみと下水汚泥コンポストは、各々5gを45mlの滅菌精製水に懸濁し、強撹拌により菌体剥離懸濁液を調製し、その上澄み液を回収して植種微生物とした。なお、植種微生物は熱処理などによる水素消費微生物の不活化処理は施さなかった。また、水素発酵能の比較対照菌として既知の嫌気性水素発酵細菌である *Clostridium butyricum* IAM 14194^T 株を用いた。*C. butyricum* は強化クロストリジウム培地（肉エキス1%, ペプトン1%, 酵母エキス0.3%, 溶性澱粉0.1%, ブドウ糖0.5%, L-システイン塩酸塩0.05%, 塩化ナトリウム0.5%, 酢酸ナトリウム三水合物0.3%, pH6.8）を用いて37℃で24時間前培養後、滅菌生理食塩水にて菌体を集菌し、細胞懸濁液を調製して実験に用いた。

2.2 供試発酵基質

水素発酵試験用の発酵基質は生ごみ乾燥物を用いて調製した。生ごみ乾燥物は、本学の生協食堂より排出された厨芥および残飯を含水率16%となるように蒸気乾燥し、これを粉碎して均質化した後、室温で保存した。蒸気乾燥物の成分組成を表1に示した。本研究で用いた蒸気乾燥物の組成は模擬廃棄物として汎用されているドックフード⁶⁾に比べ、蛋白質、脂質の含量が低いものの、炭水化物量はほぼ同等であったことから、水素発酵試験用の基質として適しているものと考えられた。実験開始時にこの生ごみ乾燥破砕物100gを水道水900mlに懸濁し、2MのNaOHでpH7.0に調整したものを発酵基質とした。なお、調製した発酵基質の全糖量は約4.5%であった。

2.3 回分式集積培養法と水素発酵能の評価法

供試植種微生物源からの水素発酵に関与する微生物群の集積培養はバイアル実験により行った。125ml容バイアルに発酵基質50mlを充填し、N₂ガスにより気相部を置換してブチルゴム栓とアルミシールにて密栓後、121℃で20分間オートクレーブ滅菌して実験に用いた。注射器を用いて下水活性汚泥、生ごみ、下水汚泥コンポストから調製した植種微生物をそれぞれ0.5ml接種した。また、比較対照菌とした *C. butyricum* は細胞懸濁液を OD₆₆₀ ≈ 0.1（終濃度）となるように接種した。培養はウォーターバスシェーカー MM-80（TAITEC 社製）を用いて37℃、90rpmで24時間行った。また、ガス発生量を測定後、発酵物の液部を回収し、再度新たなバイアルに0.1ml接種した。この操作を繰り返すことで水素発酵に関与する微生物群を集積するとともに、集積した微生物群の生ごみに対する水素発酵能と安定性について評価した。

また、バイアル実験により安定的な水素発酵が確認された系についてはジャーファーマンタにより pH6.0 に制御して水素発酵効率を測定した。すなわち、1.25ℓ容ジャーファーマンタに1ℓの発酵基質を充填して滅菌後、0.22μmのフィルターを通したN₂ガスで5分間気相部を置換した。バイアル実験による回分式集積

表1 生ごみ乾燥物の成分組成

水分:	16.0%
炭水化物:	49.6%
蛋白質:	7.8%
脂質:	3.4%
その他:	3.4%

培養後の発酵物を接種し、37℃、200rpm で24時間培養した。なお、pH の制御は6M の水酸化ナトリウムにより行った。

2.4 分析方法

水素発生量はガス発生量とガス組成から求め、標準状態 (0℃, 1 atm) に換算した。バイアル実験のガス発生量はガラスシリンジによるガス平衡、ジャーファーメンタによる実験では10ℓ 容アルミニウムバック (GL Sciences Inc.) により回収後、容積を測定した。発生ガス中の水素濃度は TCD- ガスクロマトグラフ GC323 (GL Sciences Inc.) を用いて定量した。測定用カラムは Unibeads C60/80 を用いた。キャリアガスにはアルゴンガスをを用い、流速30ml/min, 160℃で測定した。全糖量はフェノール硫酸法により測定した。発酵過程の微生物相の推移は FISH 法と PCR-DGGE 法により解析した。

2.5 FISH 法

回分式集積培養過程の菌相を FISH 法により解析した。解析用試料は、発酵物を 8% パラホルムアルデヒド溶液にて固定後、エタノールに浸漬して -20℃ で保存したものを用いた。FISH 法は Amann らの手法^{7,8)} に概ね準拠して行った。なお、グラム陽性細菌は細胞壁構造が強固であることから、FISH probe の透過性を向上させるために細胞壁処理を施した⁹⁾。細胞壁処理を施したスライドガラスを 50%, 80%, 96% (v/v) 濃度のエタノール溶液に順次浸漬し、菌体細胞を脱水した。Formamide 濃度を調製した Hybridization buffer 8 μ ℓ (0.9M NaCl, 20mM Tris-HCl, 0.01% Sodium Dodecyl Sulfate, X% Formamide, pH 7.2) を滴下し、これに FISH probe を 1 μ ℓ (50ng の FISH Probe を含む) 加えて、46℃ で 3 時間ハイブリダイズした。未結合 Probe の洗浄は Hybridization buffer を用いて 48℃ で行った。その後、DAPI 染色によるカウンター染色を施し、細胞の蛍光状態を蛍光顕微鏡 (KEYENCE 社製 BZ-8000) を用いて観察した。なお、コンポスト中には自家蛍光を有する無機塩類などの夾雑物が多いため、本実験では FISH probe による蛍光をフィルターセット OP-66837 (TMRITC 修飾用) で取得するとともに、夾雑物からの自家蛍光をフィルターセット OP-66835 により取得し、夾雑物からの自家蛍光と FISH probe による菌体細胞からの蛍光を識別した⁹⁾。

2.6 PCR-DGGE 法

回分式集積培養過程の細菌相の推移を PCR-DGGE 法により解析した。PCR-DGGE 法による解析には発酵物を -20℃ で凍結保存したものを用いた。ベンジクロライド法¹⁰⁾ により発酵物中の DNA を抽出し、16S rDNA の V3 領域を含む部分塩基配列を増幅した。プライマーは 5' 末端に GC clamp を付加した 341F と 518R¹¹⁾ を用いた。PCR は EX TaqTM Hot Start Version (TaKaRa BIOMEDICALS) を用いて次の反応液量で行った。10× PCR buffer (100mM Tris-HCl (pH8.3), 500mM KCl, 150mM MgCl₂) 10 μ ℓ, dNTP 混合液 (dATP, dTTP, dCTP, dGTP 各 2.5mM) 8 μ ℓ, Primer (10pM μ ℓ⁻¹) 各 10 μ ℓ, ddH₂O 50.5 μ ℓ, EX TaqTM Hot Start Version 2.5U を調製し、精製した DNA を鋳型として 1 μ ℓ 加えた。PCR 反応は PTC-200 DNA Engine (MJ Japan) を用いたタッチダウン PCR により増幅した。サイクルは 95℃ で 3 分間保った後、熱変性は 95℃ で 30 秒間、アニーリングは 65℃ で 30 秒間とし、2 サイクル毎に 1℃ 下がるように設定した。伸長反応は 72℃ で 1 分間行った。このサイクルを 20 回行った後、アニーリングを 55℃ にしたサイクルを 10 回行った。最終伸長は 72℃ で 10 分間行った。PCR 産物は DCode system (Bio-Rad) を用いて分画した。電気泳動は泳動槽を 60℃ に保ち、PCR 産物をアプライした後 130V で 360 分間行った。泳動後のゲルを SYBR GREEN I (TaKaRa) で 30 分間染色して UV トランスイルミネーターで DNA を検出した。試料間のバンドプロファイルと比較後、蛍光輝度の高い DNA バンドを医療用メスで切り出し、50 μ ℓ の滅菌精製水中で凍結融解を 3 回くり返して DNA をゲルから浸出した。DNA 浸出液 1 μ ℓ を Primer GC-341F と Primer 518R を用いて増幅して再度 PCR-DGGE に供し、単一バンドであることを確認して遺伝子配列を決定した。複数の DNA バンドが存在する産物は目的の DNA バンドを切り出して単一になるまで前述の操作を繰り返した。遺伝子配列は Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied BioSystems) を用いたサイクルシーケンスと ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied BioSystems) により決定した。解読した塩基配列と高い相同性をもつ既知菌種の塩基配列を BLAST サーチ (DNA Data Bank of Japan [DDBJ], <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) により検索した。

3. 実験結果と考察

3.1 回分式集積培養法による水素発酵微生物群の集積

各植種微生物および比較対照菌 *C. butyricum* を用い、バイアルによる回分式集積培養を各々4回繰り返して生ごみの水素発酵に関与する微生物群の集積を試みた。回分式集積培養過程における水素発酵能と安定性について評価した結果を表2に示した。*C. butyricum* の培養菌体を用いた系では、回分式培養1回目に91.7mℓの水素ガスの発生が確認された。しかしながら、2回目以降の水素発生量は20mℓ程度まで減少し、4回の平均水素発生量は36mℓ程度であった。下水活性汚泥および生ごみ中の複合微生物を植種微生物として用いた系では、回分実験過程で水素発生はほとんど確認されず、4回の平均水素発生量は各々2.5mℓ、0.4mℓであった。これらに比べ、下水汚泥コンポスト中の複合微生物を用いた系では、回分式培養1回目の水素発生量は36.0mℓ程度であったが、2回目以降に増加する傾向を示し、最大47.8mℓの水素発生量が得られた。また、平均水素発生量は44.3mℓと比較対照菌の約1.2倍であった。またこの時の消費糖に対する最大水素収率は $1.14\text{mol-H}_2/\text{mol-hexose}$ であった。

C. butyricum を植種微生物とした回分式培養の2回目以降に水素発生量が大きく低下したことは、*C. butyricum* が実験に用いた実廃棄生ごみから調製した発酵基質に適さなかったことに起因するものと考えられた。また、下水活性汚泥や生ごみを植種源とした回分式培養法では初回から水素発生はほとんど確認されなかった。このことは、植種源とした試料中に水素発酵を担う微生物が存在しなかったことや、水素消費に関わる微生物群の存在により生産された水素が消費さ

れたことに起因することが推察された。これらに対し、下水汚泥コンポスト中の複合微生物を用いた回分式培養法では、生ごみ中の有機物からの水素生産に適した微生物群が安定して定着し、それらの働きにより安定した水素発酵が行われているものと考えられた。また、今回の実験では植種微生物の熱処理などによる水素消費微生物の不活化処理は施さなかった。このことから、下水汚泥コンポストは生ごみの水素発酵システムの植種微生物源として有効であるものと考えられた。

3.2 FISH 法による微生物相の推定

生ごみの水素発酵の植種微生物源として有効と考えられたことから、下水汚泥コンポスト中の複合微生物を用いた回分式集積培養過程の微生物相をFISH法により解析した。まず、回分式培養1回目の発酵物中の微生物相をFISH法により解析した。FISH probe は真正細菌群を検出するFISH probe EUB338と古細菌群を検出するFISH probe ARC918を用いた。各々のFISH probe は5'末端をTMRITC修飾して実験に用いた。また、DAPI染色を併用することで全細胞に対する各系統群の存在割合を算出した。FISH probe EUB338を用いて回分式培養法1回目の発酵物をFISH法に供した結果を写真1に示した。

FISH法による解析の結果、DAPI染色で検出された細胞の99%以上がFISH probe EUB338により検出され、FISH probe ARC918からの蛍光は確認されなかった。また、検出された微生物の細胞は全て長さ約5~10μm程度の桿状形態であることが確認された。このことから、回分式集積培養過程における発酵物中の微生物相は真正細菌群により構成されており、古細菌群やその他の糸状菌、酵母などの細胞は存在しないものと考えられた。また、この結果は4回の回分式培

表2 回分式集積培養過程における生ごみからの水素発生量の推移

植種微生物源	水素発生量 (mℓ)				平均水素発生量 (mℓ)
	1回目	2回目	3回目	4回目	
下水活性汚泥	1.5	1.7	1.6	5.2	2.5
生ごみ	0.6	0.3	0.0	0.8	0.4
下水汚泥コンポスト	36.0	45.7	47.8	47.6	44.3
比較対照菌*	91.7	18.7	20.4	12.7	35.9

* : *Clostridium butyricum* IAM 14194^T

写真1 FISH法による水素発酵過程の微生物群の直接検出

養実験を通して同様であった。以上のことから、下水汚泥コンポスト中の微生物群のうち、桿状形態を示す真正細菌群が生ごみの水素発酵を担っているものと推察した。

3.3 PCR-DGGE 法による細菌相の解析

下水汚泥コンポスト中の複合微生物を用いた回分式集積培養過程の細菌相を PCR-DGGE 法により解析した。PCR-DGGE 法では細菌相を構成する主要菌種を DNA バンドとして検出することから、得られた DNA バンドプロファイルの推移から 4 回の回分式集積培養における細菌相の多様性と推移を評価した。結果を写真 2 に示した。

回分式集積培養過程の DNA バンドプロファイルは比較的単調であったが、複数の DNA バンドが検出されたことから水素発酵は複数種の細菌群により担われているものと考えられた。また、4 回の回分式培養を通して安定的に存在する菌種 (DNA バンド A) と回分式培養 2 回目以降に衰退した菌種 (DNA バンド B,C)、および回分式培養 2 回目以降に増加したと考えられる菌種 (DNA バンド D,E,F,G,H) が確認された。このことから、回分培養を繰り返すことで生ごみの水素発酵に適した微生物相が形成されたものと考えられた。

次に、検出された DNA バンドの遺伝子配列を決定

し、BLAST サーチにより個々の菌種の分類学的位置を推定した。結果を表 3 に示した。回分式培養 1 回目の発酵物から検出された菌種 (DNA バンド A および DNA バンド B,C) はいずれも *Clostridiales* 目に属する *Clostridium* 属に近縁の菌種であることが明らかになった。また、既知種との相同性検索でもっとも相関性の高かったものは、DNA バンド A は *Clostridium perfringens* (100%)、DNA バンド B は *Clostridium butyricum* (100%)、DNA バンド C は *Clostridium bifermentans* (99%) であった。*Clostridium* 属は真正細菌群のグラム陽性低 GC 含量グループに位置する偏性嫌気性の桿菌である。このことから、FISH 法で検出された真正細菌群は *Clostridiales* 目に近縁な 3 種の菌種により構成されており、これらが回分式培養 1 回目において生ごみからの水素発酵を担っているものと考えられた。

また、回分式培養 1 回目から検出された *C. perfringens* に近縁の菌種 (DNA バンド A) は 4 回の回分式培養を通して安定的に検出されたことから、生ごみからの水素発酵において重要な役割を担っている菌種であるものと考えられた。しかし、*C. butyricum* および *C. bifermentans* に近縁な菌種 (DNA バンド B,C) は 2 回目以降の回分式培養では検出されなかった。本菌種は、バイアル実験において比較対照菌として用いた *C. butyricum* と同様に発酵基質とした生ごみの栄養成分に適応できず、衰退したものと考えられた。これらのことは、*Clostridium* 属菌種²⁾ は水素発酵能が高いことで知られているものの、種によっては生ごみなどの栄養成分が粗雑な廃棄物系バイオマスを発酵基質とした水素発酵システムでは上手く機能しない可能性を示しており、発酵基質の成分に適応可能な菌種を選択する必要性を示唆している。

これに対して、回分式培養 2 回目以降に検出されるようになった DNA バンド D,E,F,G,H は *Bacillales* 目に属する *Bacillus* 属に近縁の菌種であるものと考えられた。また、既知種との相同性検索で最も相関性の高かったものは、*Bacillus coagulans* (100%) であった。*Bacillus* 属菌種は、*Clostridium* 属と同じくグラム陽性低 GC 含量グループに位置する桿菌であるが、通性嫌気性から好気性の菌種であり、単独で高い水素発酵能を示すことは知られていない。このことから、本菌種は有機物からの水素生産に直接的には関与していないものと考えられた。しかしながら、複合微生物群を

写真 2 下水汚泥コンポスト中の複合微生物を植種微生物源とした回分式集積培養過程における細菌相の推移

表 3 PCR-DGGE 法による集積培養過程の細菌相の推定

DNA バンド	Accession No.	塩基 鎖長	類縁菌種 (Accession No.)	相同性
A	AB297374	132bp	Bacterium SM7-19 (AY773139) Uncultured <i>Clostridium</i> sp. (DQ232861) <i>Clostridium perfringens</i> (DQ196142)	100%
B	AB297381	131bp	<i>Clostridium</i> sp. (AY188845) <i>Clostridium butyricum</i> (AJ458421) <i>Clostridium colicanis</i> (AJ420008) <i>Clostridium acetobutylicum</i> (X78073) <i>Clostridium saccharobutylicum</i> (U16147)	99%
C	AB297375	131bp	<i>Clostridium</i> sp. DF2C22 (DQ298113) <i>Clostridium bifermentans</i> (AY604562) <i>Clostridium irregulare</i> (X73447) Rumen bacterium R4-23 (DQ393033)	99%
D	AB297376	156bp	Bacterium Sko08 (AF213284) <i>Bacillus coagulans</i> (AY294324) Uncultured bacterium (AF252319)	100%
E	AB297377	159bp	Bacterium Sko08 (AF213284) <i>Bacillus coagulans</i> (AY294324) Uncultured bacterium (AF252319)	100%
F	AB297378	158bp	Bacterium Sko08 (AF213284) <i>Bacillus coagulans</i> (AY294324) Uncultured bacterium (AF252319)	100%
G	AB297379	151bp	Bacterium Sko08 (AF213284) <i>Bacillus coagulans</i> (AY294324) Uncultured bacterium (AF252319)	100%
H	AB297380	158bp	Bacterium Sko08 (AF213284) <i>Bacillus coagulans</i> (AY294324) Uncultured bacterium (AF252319)	100%

用いた水素発酵に関する既往の論文¹²⁾において、効率的な水素発酵を維持した系から *Bacillus* 属菌種が検出されていることや、*Bacillus* 属菌種の添加により複合微生物系での水素発酵能が増大することが報告されており¹³⁾、本報においても回分式培養過程で *Bacillus* 属菌種の出現に伴って水素発生量の安定した増加が確認されたことから、PCR-DGGE 法により検出された *Bacillus* 属の菌種は *Clostridium* 属の水素発酵能を助長し、水素発酵の安定化に寄与する菌種であるものと推察した。*Bacillus* 属はタンパク質やデンプンなどの有機物分解能の高い菌種であるが、本菌種の水素発酵過程における具体的な役割については不明であり、今後検討する必要がある。

以上のことから、下水汚泥コンポスト中の複合微生物を用いた生ごみの水素発酵過程では、*Clostridium* 属と *Bacillus* 属の菌種が主要構成菌となり、安定した水素発酵が維持されており、*Clostridium* 属の菌種は水素発酵の主役を担い、*Bacillus* 属の菌種は水素発酵の安定化に寄与しているものと考えられた。

3.4 pH 制御下における水素収率

下水汚泥コンポスト中の複合微生物から集積した水素発酵微生物群を用い、pH6.0制御下における生ごみからの水素収率を評価した。回分式培養4回目の発酵物5mlを、発酵基質1ℓを充填した1.25ℓ容ジャーファーマンタに添加して24時間培養後、水素発生量と全糖消費量を測定した。pH6.0に制御したジャーファーマンタでは24時間で2.472mlの水素が発生し、この時の全糖消費量は9.8gであった。このことから、本微生物群のpH6.0制御下における生ごみからの水素収率は2.03mol-H₂/mol-hexoseであることが示された。Uenoら¹²⁾は、下水汚泥コンポストを植種源として人工基質から水素発酵を行った場合に水素収率が2.0mol-H₂/mol-hexoseであったことを報告しており、また、河野ら⁶⁾はドックフードを発酵基質とした回分実験にて1.8mol-H₂/mol-hexose程度の収率で水素生産が可能であったことを報告している。これらのことから、本報にて集積した水素発酵微生物群は実廃棄物の生ごみを発酵基質として効率的に水素発酵可能で

あり、生ごみから水素を生産するための植種として有効であるものと考えられた。なお、今回の実験は水素発酵に関与する微生物群の集積を目的としたため、発酵基質を滅菌処理して実験に用いた。生ごみには乳酸菌などの雑菌が多数存在し、これらが水素発酵過程の微生物相や水素発酵能に影響を与えることが報告されている¹⁴⁾。これらのことから、本報にて集積した水素発酵微生物群に関しても実装置レベルでは十分に機能しない可能性が考えられる。今後、水素発酵微生物群を構成する個々の菌種を分離して分類学的位置と水素発酵過程における機能的役割を解明するとともに、開放系での動態について検討し、実装置への応用へ向けた展開が必要である。

4. ま と め

本報では、下水活性汚泥、生ごみ、下水汚泥コンポストを植種微生物源として用い、生ごみを発酵基質とした回分式集積培養を行い、安定的に水素発酵を維持する微生物群の集積を試みた。また、既知の代表的な水素発酵微生物に比べて安定性が高かった系の集積培養過程の微生物相を解析するとともに pH 制御下における水素収率を評価し、以下の知見を得た。

- 1) 生ごみを発酵基質として安定的な水素発酵が可能な微生物群を下水汚泥コンポスト中の複合微生物から獲得した。本微生物群は pH6.0 制御下における回分式培養実験において、実生ごみから収率 $2.03\text{mol-H}_2/\text{mol-hexose}$ の効率的な水素発酵が可能であった。なお、本実験において集積培養に用いた植種微生物は、水素消費に関わる微生物を殺菌するための処理を施さなかったことから、下水汚泥コンポストは生ごみを原料とした水素発酵システムの植種微生物源として有効であるものと考えられた。
- 2) 回分式培養による集積培養初回では 3 種の *Clostridium* 属菌種が主要な細菌相を構成しており、*C. perfringens* に近縁の菌種は 4 回の回分培養過程を通して常に存在したことから、生ごみの水素発酵の主役を担っているものと考えられた。しかし、他の 2 菌種は回分式培養の途中で排除されることが確認された。*Clostridium* 属の菌種は水素発酵能が高いことで知られているものの、生ごみなどの栄養成分が粗雑な廃棄物系バイオマスを基質とした水素発酵システムでは、適切な菌種

を選択する必要があるものと考えられた。また、水素発酵微生物群の集積培養過程では、排除される菌種が存在した一方で、菌体数が増大する *Bacillus* 属菌種が確認された。本菌種は生ごみからの水素発酵過程において *Clostridium* 属菌種の水素発酵能を助長する菌種であるものと推察した。

参 考 文 献

- 1) Kaushik Nath, Debabrata Das; Biohydrogen production as a potential energy resource-Present state-of-art, Journal of Scientific Industrial Research, **63**, 729-738, 2004.
- 2) 田口文章, 長谷川勝重; シロアリから分離した水素生成菌による廃棄物処理と水素産生, 用水と廃水, **36**, (3), 225-232, 1994.
- 3) You-Kwan Oh, Eun-Hee Seol, Mi-Sun Kim, Sunghoon Park; Photoproduction of hydrogen from acetate by a chemoheterotrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*, International journal of hydrogen energy, **29**, 1115-1121, 2004.
- 4) Hanquing YU, Zhenhu Zhu, Wenrong Hu, Haisheng Zhang ;Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures, International journal of hydrogen energy, **27**,1359-1365, 2002.
- 5) 大下信子, 松本寿美, 土肥哲哉, 竹本裕, 品田司; 食品系廃棄物の水素発酵条件に関する研究, 用水と廃水, **46**, (12), pp.60-66, 2004.
- 6) 河野孝志, 和田克士, 李玉友, 野池達也; 複合基質からの嫌気性水素生成における回分発酵と連続発酵の比較, 廃棄物学会論文誌, **16**, (5), 350-359, 2005.
- 7) Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A.; Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol., **56**, 1919-1925, 1990.
- 8) Amann, R.I., Krumholz, L., Stahl, D.A.; Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol., **172**, (2), 762-770, 1990.
- 9) 大西章博, 長野晃弘, 藤本尚志, 高橋力也, 牛久保明邦, 鈴木昌治; FISH (fluorescence *in-situ* hybridization) 法を適用したコンポスト好熱性細菌の検出技術の開発, 環境技術, **32**, (12), 976-985, 2003.
- 10) Zhu, H., Qu, F., and Zhu, L.; Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. Nucleic Acids Research, **21**, (22), 5279-5280, 1993.
- 11) Muyzer, G., Dewaal, E. C., Uitterlinden, A. G.; Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16s rRNA. Appl. Environ. Microbiol., **59**, 695-700, 1993.
- 12) Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M., Igarashi, Y.; Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost. Appl. Microbiol. Biotechnol., **57**, 555-562, 2001.
- 13) Kumar, A., Jain, S.R., Sharma, C.B., Joshi, A.P., Kalia, V.C.; Increased H_2 production by immobilized microorganisms. World Journal of microbiology & Biotechnology, **11**,