

VII-51

PCR-DGGE 法を用いた水素発酵微生物群集の構造解析

東北大学 学生員 ○登坂充博

東北大学 正 員 李玉友

東北大学 フェロー 野池達也

1. はじめに

近年、有機性廃棄物からの水素生産が注目されており、本研究はそれを担う細菌種についての知見を得ることを目的としている。細菌群がどの程度多様性に富むのかを調べ、細菌種と水素生成能との関連について考察するために、同一条件の下、異なる植種微生物源を用いて水素発酵を行った。

2. 実験方法

本研究では5つの異なる植種微生物源（消化汚泥、活性汚泥、サイロ爆発を起こした大豆粕、コンポスト、熱処理消化汚泥）を用意し、5つの反応槽に投入した。基質としてグルコースと無機塩から成る最小培地を用いた。ケモスタット型反応槽（有効容量 480ml）を用い、培養温度 35.0℃、pH5.5、HRT12h に制御して連続実験を行った。微生物群集構造解析は 16SrDNA (*E. coli* position 341-534) を標的とした PCR-DGGE 法¹⁾によりを行った。

3. 結果および考察

3. 1 水素生成量と発酵パターン

各反応槽の時間変化を図1に示す。水素生成量は大豆の系で 3.5L/d と継続的な水素生成量としては5系列の中で最も大きな値を示した。他にコンポストの系でもばらつきが見られるが 2.2L/d の水素生成量が観察された。熱処理を行った消化汚泥の系は期間の終盤で水素生成量が低下したが、前半部では 5L/d と最も高い値を示した。消化汚泥および活性汚泥の系は終始水素生成量は少ないという結果になった。水素収率は大豆で 1.4mol/mol-glucose であり、一時的には熱処理消化汚泥で最大水素収率 2.0 mol/mol-glucose を記録した。代謝産物として生成した有機酸、アルコールの内訳をみると、酪酸と酢酸の割合が多く、乳酸、プロピオン酸、ギ酸、エタノールはあまり生成されなかった。安定

3. 2 微生物群集構造の解析

62 日目の反応槽内の細菌を電子顕微鏡により観察した（図2）。5系列とも長桿菌が大部分を占めていた。差異はあまり見られないが、消化汚泥および活性汚泥の系は長さの異なる菌体が多く観察され、活性汚泥では短桿菌も観察された。細菌の種類を把握するために行った

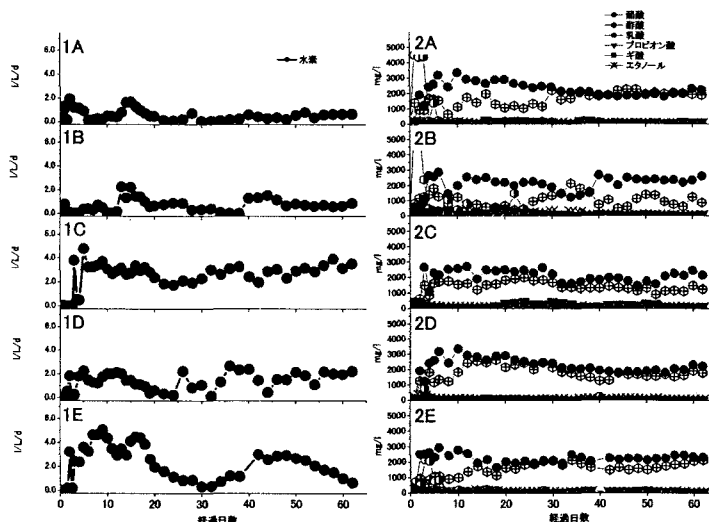


図1 代謝産物の経時変化 1:水素生成量, 2:主要代謝産物,

A:消化汚泥 B:活性汚泥 C:大豆 D:コンポスト E:熱処理消化汚泥

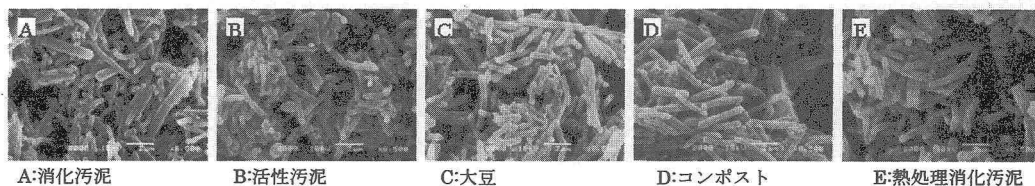


図2 電子顕微鏡写真

DGGE の結果を図3に示す。大豆および熱処理消化汚泥で群集構造が単純化しており、消化汚泥、活性汚泥ではそれに比べ複雑であった。切り出したバンドの塩基配列から予想される細菌種を表1に示す。多くの水素生成量が観察された大豆およびそれに次ぐ生成量であったコンポストから切り出したバンド11と13からは *Clostridium acetobutylicum* かそれに遺伝的に近い種が挙げられた。水素生成の継続した2つの系からこのバンドが検出されたことから、この種が水素生成を行っていた細菌であることがわかる。また、一時的に最も高い水素生成量を記録した熱処理消化汚泥の系では水素生成量の差に比べ、バンドパターンの変化は観察されなく、終始検出されたバンド16は *C. pasteurianum* と推測された。水素生成量の増減はこの細菌の代謝パターンの変化によるものであり、この細菌は適した環境条件下では高い水素生成能をもつと考えられる。上記2種の細菌は水素生成を触媒する[Fe]ヒドロゲナーゼの研究における酵素の抽出源として以前から用いられている細菌である。以前から知られていた細菌が実際の混合系においても優占していたといえる。これらのことからグルコースからの連続的水素生産では多種の細菌群の中でこの2種もしくはそれに近い種という限られた細菌が主な水素生成を担っていることが明らかとなった。

4. 結論

グルコースを基質とする同一条件の培養系で5つの異なる植種微生物源を投入して培養したところ、水素生成および代謝産物に違いが見られ、大豆および熱処理消化汚泥で多くの水素生成が観察された。DGGEのバンドパターンから水素生成を担っていたのは大豆では *C. acetobutylicum*、熱処理消化汚泥では *C. pasteurianum* の2つの細菌種もしくはそれに遺伝的に非常に近い種であることが明らかとなった。

参考文献

1) Muyzer, G. et al., Appl. Environ. Microbiol., 59, p695-700, 1993

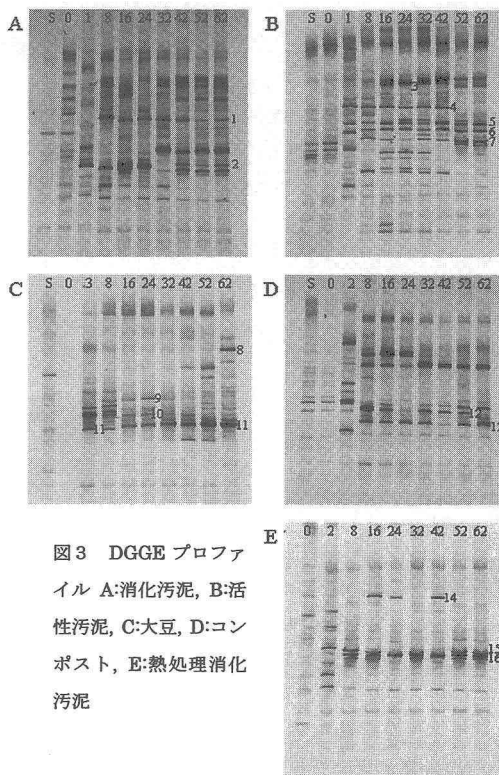


図3 DGGE プロファイル A:消化汚泥, B:活性汚泥, C:大豆, D:コンポスト, E:熱処理消化汚泥

表1 バンドの塩基配列と相同性の高い種

Band	Sequence determined (bp)	Affiliation	Similarity (%)
1	195	<i>Streptococcus bovis</i>	100
2	169	<i>Clostridium botulinum</i>	100
3	189	<i>Prevotella culora</i>	92
4	195	<i>Streptococcus bovis</i>	98
5	170	<i>Clostridium polysaccharolyticum</i>	99
6	115	<i>Clostridium polysaccharolyticum</i>	98
7	105	<i>Clostridium acidisoli</i>	99
8	195	<i>Bacillus circulans</i>	99
9	171	<i>Oxalispora guillemondii</i>	96
10	195	<i>Propionispora hippel</i>	91
11	169	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	100
12	75	<i>Clostridium sp.</i>	100
13	169	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	100
14	194	<i>Clostridium ramosum</i>	100
15	170	<i>Clostridium proteolyticum</i>	97
16	169	<i>Clostridium pasteurianum</i>	100