

(72) 連続水素発酵における炭素-窒素バランスの変化に対する細菌叢と水素生成能の応答

川越 保徳^{1*}・日野 なおえ²・中尾 雅治¹・藤本 綾¹・古川 憲治¹

¹熊本大学大学院自然科学研究科 (〒860-8555 熊本市黒髪二丁目39-1)

²日立造船株式会社 技術研究所 (〒551-0022 大阪市大正区船町2丁目2-11)

* E-mail: goshi@kumamoto-u.ac.jp

混合細菌系を用いた連続中温水素発酵において、水素生成能と発酵槽内細菌叢に及ぼす炭素-窒素バランスの影響を調べた。C/N比が36の条件下で、最も高い水素収率が得られ、*Clostridium*属と推定される水素発酵細菌の優占化が認められた。C/N比が高く窒素不足の条件下では、水素発酵細菌に代わって乳酸菌が優占化し、水素収率の著しい低下と乳酸濃度の上昇がみられた。しかし、C/N比を戻して最適化することで細菌叢と水素収率をともに回復させることができ、これらの変化は可逆的であることが分かった。一方、C/N比を低くした窒素過剰の条件下では、*Clostridium*属内での細菌種の変化と水素収率の低下がみられ、C/N比を再度最適化してもその回復速度は遅いことが明らかになった。

Key Words :hydrogen fermentation, carbon-nitrogen balance, bacterial community, PCR-DGGE, hydrogen fermentating bacteria, lactic acid bacteria

1. はじめに

国土面積が小さく資源に乏しいわが国において、エネルギーの安定確保とその維持は重要な課題の一つである。特に近年は、産業発展の著しいアジア諸国をはじめ、世界的規模で化石燃料の消費量が急増し、それに伴うコストの上昇や将来的な不足・枯渇が懸念される。

一方、産業活動によって排出される種々の廃棄物や廃水に関しては、これまでその殆どを不要物として扱い、それらの適切な処理・処分が対策の主目的であった。しかし近年、焼却処理にて副生成されるダイオキシン類などの有害化学物質や将来予想される埋立処分場の逼迫¹⁾など、廃棄物処理に関わる諸問題が危惧されている。現在、このような背景から資源循環型社会の構築が模索され、循環型社会形成基本法をはじめとする法整備がなされている^{2,3)}。これを受けて、廃棄物処理も大きな転機を迎え、従来の「処理・処分対策」から、「廃棄物の有効利用」に主眼が置かれるようになった。

ここで、食品廃棄物等の有機性廃棄物や余剰木材といったバイオマスは、エタノールやバイオガス等の燃料資源として注目されており、中でも燃料電池の原料となる水素ガスは、燃焼しても温室効果ガスを発生せず、高い

エネルギー転換効率を有することから、次世代の有望なエネルギーとして大きな期待が寄せられている⁴⁾。現在、水素ガスは主に天然ガス等から精製・生産されているが、生物学的手法を用いた有機物からの水素生成技術も知られている⁵⁾。生物学的水素生成方法は、嫌気性水素発酵と光合成水素生成の二つに大別される。この内、嫌気性水素発酵は、糖分を含む生ごみ等から容易に水素を回収できるため、単一基質・単一細菌による基礎研究から、生ごみと混合細菌を用いた実用的研究まで、多くの報告例がある^{6,13)}。しかし、混合細菌を用いた場合には、細菌種の構成が水素発酵能に大きく影響するにも関わらず水素発酵における細菌構成やその変動などの細菌叢に関する知見は少なく^{14,15)}、水素発酵条件と水素生成能、および細菌叢との関係についてはさらに知見に乏しい。筆者らは、前報において水素発酵能に及ぼす接種源とpHの影響を明らかにするとともに、細菌叢との関係を明らかにした¹⁶⁾。さらに、本研究では、水素発酵能に影響することが報告されている^{17,18)} 窒素-炭素バランスについて、水素発酵能と細菌叢への影響、および各々の相互関係を明らかにし、その作用機構に関する知見を得たので報告する。

2. 実験材料と方法

(1) 接種源と使用培地

接種源には、下水処理場の嫌気性消化汚泥を用いた。消化汚泥は1 mmのふるいを通して用い、加熱処理や低pH処理など、他細菌の不活化処理¹⁰⁾は施さなかった。培地は基礎合成培地 (K_2HPO_4 : 125 mg/l, Na_2CO_3 : 2g/l, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 5mg/l, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$: 100mg/l, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$: 15mg/l, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$: 0.125mg/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 25mg/l) に、炭素源としてグルコースを、窒素源には NH_4HCO_3 を所定条件に則って添加し、調製した。培地はあらかじめオートクレーブにて滅菌し、アルゴンガス曝気にて溶存酸素を除いた。

(2) 連続水素発酵実験方法

図-1に、連続水素発酵実験装置概要図を示す。発酵槽および pH、温度の制御には2 L容の培養装置 (丸菱バイオエンジニア) を用いた。発酵槽は攪拌翼にて200 rpmで回転攪拌した。pH6.0、温度35℃に設定し、pHは3 mol/lの水酸化ナトリウム溶液にて一定制御した。実験開始時は、グルコース濃度を20g/l、 NH_4HCO_3 濃度を44mg/lになるように調製した培地に接種源汚泥を汚泥濃度が3g/L (乾燥重量) になるように投入して培養し、水素の発生が認められた後、連続培養に切り替えた。連続培養は送液ポンプで培地を連続流入・流出させて行い、滞留時間は24時間とした。その後、適宜グルコースおよび NH_4HCO_3 の添加量を変えて炭素—窒素バランス (C/N比) を変化させた。実験条件を表-1に示す。発生ガスは、培養槽上部の気相部から連続的にサンプリングバッグに捕集した。適宜、培養液を採取し、グルコース濃度、揮発性浮遊物質 (MLVSS) 濃度、揮発性有機酸 (VFAs; n-酪酸、酢酸、乳酸、プロピオン酸、n-吉草酸) 濃度の測定と細菌叢解析に供した。

(3) 分析方法

発生ガス量はガスフローメーターにて計測し、ガス組成は H_2 、 CO_2 、 CH_4 、 N_2 、 O_2 を、熱伝導度検出器付ガスクロマトグラフ (GC-TCD) で分析定量した。分析条件

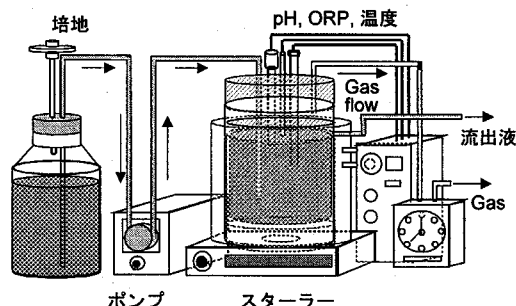


図-1 連続水素発酵実験装置概要

を表-2に示す。VFAs濃度は、UV検出器付液体クロマトグラフを用いて分析定量した。分析条件を表-3に示す。培養液中の残留グルコース濃度は硫酸フェノール法にて測定し、MLVSS濃度の測定は下水試験方法に従った。また、グルコース消費率は、消費グルコース量を投入グルコース量で除したものを%で表し、水素収率は1molグルコース当たりの水素生産量 (mol- H_2 / mol-glucose) として算出した

(4) PCR (Polymerase Chain Reaction) -DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) による細菌叢解析

1.0mlの培養液試料を遠心分離 (12,000 rpm×5 min) して沈殿物を回収し、UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MoBio) にてDNAを抽出、精製した。これをテンプレートとして、GCクランプを付加した16S-rRNA用ユニバーサルプライマー対¹⁹⁾ (フォワード: U341fGC、リバーズ: U907r) を用い、PCRにてV3領域を含む約560bpsのDNA断片を増幅した。PCR条件は、前報に準じた¹⁰⁾。PCR産物はアガロース電気泳動で確認後DGGEに供した。電気泳動はAE-6290E system (ATTO) にて、温度60℃、220V 6時間の条件で行った。泳動後のゲルはSYBR GREEN Iで染色し、UVトランスイルミネーター上で確認されたDNA

表-1 実験条件

条件	Glucose濃度 (g/l)	NH_4HCO_3 濃度 (mg/l)	C/N比
C-I	20	44	180
C-II	40	44	360
C-III	40	680	24
C-IV	40	440	36
C-V	40	220	72
C-VI	40	880	18

表-2 ガスクロマトグラフ (GC) 条件

カラム	SHINCARBON ST (Shimadzu) (50/80 mesh, 4m x 3mm I.D)
キャリアガス	アルゴン
キャリアガス流量	50ml/min
注入口温度	200℃
検出器	TCD (熱伝導度検出器)
検出器温度	150℃
カラム温度	60℃(4.5min) - 20℃/min - 210℃(3min)
試料注入量	0.5ml

表-3 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 条件

カラム	Shimpack SCR-120H (Shimadzu) (300mm x 8mm I.D)
移動相	4mM 過塩素酸
移動相流量	1.0ml/min
カラム温度	40℃
検出器	UV検出器 (210nm)
試料注入量	30μl

バンドを切り取り、再度PCRにて増幅・精製した後、DNA配列を決定した。DNA配列解析はCEQ8000 DNAシーケンサー (Beckman) を用い、前報にしたがって行った¹⁶⁾。シーケンサで得られたクロマトグラムと配列データとの整合性をBioEditプログラム²⁰⁾により確認し、FASTAデータベース²¹⁾および Clustal W プログラム²²⁾ を利用して相溶性検索・解析を行った。

3. 結果および考察

(1) 全実験期間 (炭素-窒素バランス条件) を通じての水素生成量とその他分析結果の推移

図-2に、全実験期間における、水素収率、グルコース消費率、VSS 濃度、VFAs 濃度の推移を示す。また、図-3に全実験期間でのPCR-DGGEによるDNAバンドパターンの推移を示す。ここで、PCR-DGGEに供したバイオマス試料番号は、図-2中に示したMLVSSグラフ上の矢印番号

号である。

今回の連続水素発酵期間内では、炭素-窒素バランスがC/N比36の条件 (C-IV) で最も高い水素収率 (最高値: $1.7 \text{ mol-H}_2/\text{mol-glucose}$) が得られた。スタートアップ時には、極度に低い窒素添加量 (C-I, C-II) でも若干の水素発生が認められたが、連続実験中に窒素添加量を下げた際 (C-V) には、水素発生が停止した。一方、C/N比を18に下げて窒素添加量を増加させた場合にも水素発生の減少が認められ (C-VI)、DGGEでのバンドパターンにも変化がみられたことから、水素発酵能や細菌叢は窒素量の変動に対して敏感に応答することが分かった。

表-4に、DGGEで検出されたDNAバンドの中で 90%以上の配列一致が得られたものについて結果を示した。本結果から、発酵槽内細菌は主に水素発酵細菌として知られる *Clostridium* 属と乳酸菌である *Lactobacillus* 属の細菌から構成されていることが推定された。登坂らは、消化汚泥やコンポストなど種々種源を変えて行った連続水素発酵において、いずれの種源を用いた場合にも、

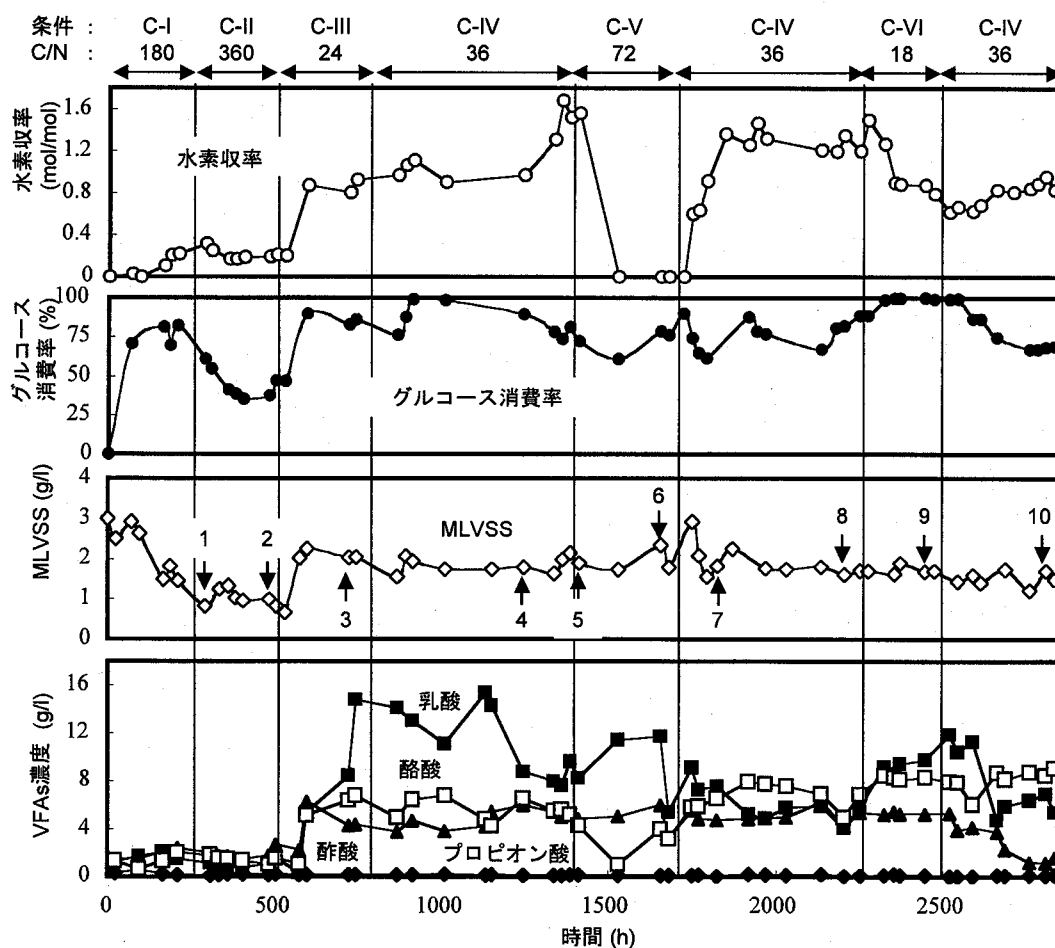


図-2 連続水素発酵にて C/N 比を変えた場合の水素収率・グルコース消費率・MLVSS・VFAs 濃度変化
(注: MLVSS グラフ内の矢印と数字は PCR-DGGE 分析用の試料を採取したポイントを示す)

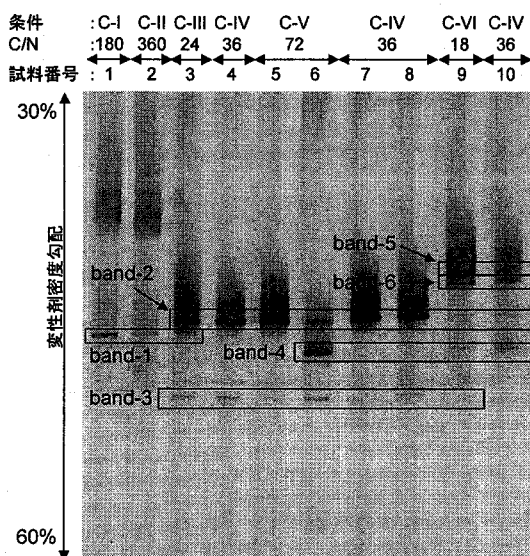


図-3 DGGE 結果 (試料番号は図-2 の MLVSS グラフ内に示した番号を示す)

表-4 DGGE 上 DNA バンドの配列相同性検索結果

No.*	最も相同性の高い既知細菌**	相同性 (%)
1	<i>Clostridium</i> sp. FRB1 (AY925092)	98.3
2	<i>Clostridium pasteurianum</i> (M23930)	99.0
3	<i>Lactobacillus paracasei</i> isolate 4C (AY773954)	92.4
4	<i>Sporolactobacillus terrae</i> (AJ634662)	99.8
5	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> (M59113)	99.1
6	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> (M59113)	98.9

* 各番号は図-3 中に示したDNAの番号に対応

** カッコ内は Accession number

Clostridium pasteurianum や *Clostridium acetobutylicum* などの *Clostridium* 属細菌由来と考えられる DNA バンドが DGGE にて検出され、水素発酵への *Clostridium* 属細菌の関与を示しており¹⁵⁾、本研究結果も同様の結果が得られた。

MLVSS は、スタートアップ時 (C-I) と窒素添加量の極度に低い条件 (C-II) 以外の実験期間を通じて、約 2g/l の濃度で一定しており、細菌叢の炭素-窒素バランスへの応答とは異なる結果となった。

VFAs に関しては、実験期間を通じて吉草酸は検出されず (<1.0mg/l)、プロピオン酸に関しても 5 mg/l 未満の濃度で推移した。プロピオン酸が生成される代謝経路は水素生成に競合し、嫌気性水素発酵能の低下につながる²³⁾ことが報告されているが、本実験では炭素-窒素バランスとプロピオン酸生成および水素収率等との関係はみられなかった。他方、乳酸、酪酸、酢酸は、実験期間を通じて 1g/l を超える濃度レベルで推移した。

次に、これら炭素-窒素バランスと水素収率、VSS、VFAs 濃度、細菌叢との関係の詳細について考察する。

(2) スタートアップ時の水素発酵と細菌叢との関係

著者等は前報にて種源の検討を行い、消化汚泥、湖沼底泥、およびコンポスト等が水素発酵の種源として有望であること、また、コンポスト等の混在細菌種の多い試料では、あらかじめ試料を加熱したり低 pH に晒して水素発酵の競合細菌を不活化することで、良好な水素発酵能が得られることを報告した¹⁶⁾。本研究では、これらの結果を踏まえ、前処理の有無に関わらず比較的安定して良好な水素生成能が得られる消化汚泥を種源として連続実験を行った。

まず、実験開始条件として、特定細菌の急激な優占化を避けるために細菌の生育に対して窒素量が制限因子になる様に窒素濃度を低く設定 (CN : 180, C-I 条件) した。実験開始時には、消化汚泥を VSS 濃度換算で 3g/l となるように添加したが、MLVSS 濃度の減少が続き、約 1g/l にまで低下した (図-2, C-I 条件)。一方、水素収率は低いながらも上昇傾向を示し、グルコース消費率も約 80% となった。また VFAs は、酪酸、酢酸、乳酸ともに 2 g/l 程度の低い濃度で推移した。水素収率が 0.2 に達した時のバイオマス試料について DGGE を行ったら、図-3 に示すように (試料番号 1)、約 3 本の DNA バンドが認められ、中でも特に明瞭な band-1 の DNA 配列は *Clostridium* 属細菌に高い相同性を示した (表-4)。すでに述べたように *Clostridium* 属細菌には水素発酵細菌として報告されているものが多く^{14,15,24,25)}、本条件での水素生成についても *Clostridium* 属細菌によるものと推定された。

窒素不足によるバイオマスの減少および水素生成能の抑制が示されたが、これを確認し、かつ糖分の増加による水素生成能向上の可能性を調べるため、グルコース濃度を 2 倍にして、さらに極端な糖分過剰の条件を設定した (CN : 360, C-II 条件)。その結果、図-2 に明らかなように、VSS は 1g/l 程度の低い濃度で推移したままで、糖の消費率は 40% 以下にまで急激に減少、水素収率も同様に減少した。また DGGE では、前条件では明瞭に見られた band-1 が減衰した (図-3, 試料番号 2)。これらの結果から、CN 比が 180 を超えるような極端な窒素不足条件下では、MLVSS の低下にみられるように、水素発酵細菌を含む総バイオマスが減少し、水素生成能の低下につながることを確認された。

(3) 炭素-窒素バランス条件の変化に伴う水素発酵と細菌叢の変化

ここでは文献値等²⁶⁾を参考に炭素-窒素バランスを変化させて水素生成能や細菌叢の変化を追跡し、それらの関係を調べた。

はじめに、窒素添加量を前条件 (CN : 360, C-II) の 15

倍に設定した (CN : 24, C-III)。その結果、VSS は即時に増加し、それに伴ってグルコース消費率と水素収率の顕著な上昇が認められ、グルコース消費率は 80%以上、水素収率は約 1.0 mol-H₂/mol-glucose に達した。VFAs についても、酪酸、乳酸、酢酸の濃度が急激に上昇し、特に乳酸濃度は 10 g/l 以上になった (図-2)。ここで、バイオマス内の細菌叢変化が推定されたため、MLVSS 濃度と水素収率が安定した時点で発酵液試料を採取 (図-2, sample 3) し、細菌叢解析を行った。図-3 (試料番号 3) から明らかなように、明確な DNA バンド (band-2) と、その他 2 本の薄いバンド (band-1, band-3)、それ以外に、非常に薄いバンドからなるシンプルなパターンが得られた。band-2 は、DNA 配列の相同性から *Clostridium Pasteurianum* に近縁な細菌と推定された。*Clostridium Pasteurianum* は、非常に高い糖濃度 (スクロース濃度 35.6 g/l) と短い HRT (0.5 時間) による高負荷条件下で良好な成績が得られた水素発酵槽内で確認されている²⁵⁾。すなわち本研究においても、40 g/l の高いグルコース濃度に対応する同様の水素発酵細菌が優占化したのではないかと考えられる。この結果は、槽内の炭素—窒素バランスの変化によって、水素発酵に関わる同属細菌内での変化が起きたことを示すものである。一方、band-3 は、DNA 配列の相同性は 92.4 % と低いながら *Lactobacillus* 属細菌と推定された (表-4)。DGGE 上で乳酸菌由来と考えられる明確な DNA バンドが確認されたことは、細菌叢内での乳酸菌の相対的な増加を示しており、これが乳酸濃度の急激な上昇 (図-2) につながったものと推定される。

上記条件で比較的良好な水素発酵が確認されたが、発酵液中の残存窒素濃度を測定したところ、200mg-N/l 以上で推移しており、窒素過剰状態が推定された。そこで、窒素濃度を下げ (CN : 36, C-IV)、水素発酵能および細菌叢の変化をみた。その結果、水素収率は 1.7 mol-H₂/mol-glucose にまで上昇し、グルコース消費率も 90% 程度で安定した。またこの時、発酵液中の残存窒素濃度は 10 mg-N/l 以下で安定推移したことから、炭素と窒素がバランスしていることが示唆された。これらの結果から、リアクタ内の糖分と窒素分が過不足無い状態の時、良好な水素発酵状態が保たれることが分かった。これについては、CN 比と水素発酵能との関係を調べた Lin らの研究においても CN 比が 47 の条件下で最も高い水素生成能が得られており¹⁸⁾、本研究においても同様の結果となった。

水素収率 1.7 mol-H₂/mol-glucose が得られた時点での DGGE の結果は、前条件での結果と同様に band-2 が明瞭に検出されており、本条件下でも水素発酵に大きく寄与しているものと推定された。VFAs については、酪酸と酢酸の濃度は横ばいで推移した一方で、乳酸濃度は急激

に上昇したのち減少に転じ、乳酸の減少に伴って水素収率が向上した。DGGE では、乳酸菌由来と考えられる band-3 が認められたが、前条件下よりも減衰し、乳酸濃度減少との関係を示唆した。筆者らは、前報にて乳酸濃度が高い時に水素発酵能が低く、乳酸濃度が低い時には水素発酵能が高いことを明らかにしており¹⁹⁾、本結果でも同様の傾向が確認された。すなわち今回の結果から、水素発酵能の向上には乳酸発酵の抑制が効果的であることが改めて示された。

前条件 (C-IV) 下で比較的良好な水素生成能が得られたことから、ここで再度窒素量を半減 (CN72, C-V) させ、水素発酵が十分進んだ場合における窒素不足の影響を調べた。その結果、VSS 量には大きな変化は無かったものの、グルコース消費率は若干低下した。一方、水素収率は急激に低下した後、殆ど検出されなくなった。本条件下では、発酵液中に溶存態窒素は検出されず、窒素不足が推定された。また、酪酸濃度は急激に低下し、乳酸濃度は再び上昇した。さらに DGGE では、水素発酵細菌と考えられる band-2 が減衰し、代わって新規な DNA バンド band-4 が確認された (図-3, 試料番号 6)。この band-4 の DNA 配列は、芽胞形成能を有する乳酸菌 *Sporolactobacillus* と高い相同性 (99.5%) を示した。これらの結果から、CN 比が高く、窒素が十分でない条件下では、*Sporolactobacillus* 等の乳酸菌が優占化し、一方で水素発酵細菌の生育が抑制されるといった細菌叢の変化によって、乳酸濃度の上昇と水素発酵能の急激な低下が引き起こされる可能性が明らかになった。

そこで、窒素条件と細菌叢の変化との関係を検証し、さらにこれら細菌叢と水素発酵能の変化が可逆的かどうかを確認するため、窒素条件を再び C-IV の条件に戻した。その結果、図-2 から明らかなように、水素収率と酪酸濃度はともに増加、回復し、乳酸濃度については緩やかな減少がみられた。また、DGGE においても、band-2 (水素発酵細菌) が再び濃く、band-4 (乳酸菌) が薄くなり、水素発酵細菌が優占化していることが分かった。

以上から、炭素—窒素バランスの変化は属間レベルでの細菌叢の構成を可逆的に変化させ、それに応じて水素発酵能も変動することが示された。さらに、条件変動によって水素発酵能が一時的に悪化しても、再度、条件を最適化することで回復可能であることが分かった。一方、Lin らは CN 比の水素発酵への影響について、発酵代謝経路の変化をその理由として推定している¹⁸⁾。ただし、Lin らの研究では、その根拠となるべき結果は得られておらず、CN 比と代謝経路との関係については今後検証する必要がある。

最後に窒素濃度を 880mg/l (CN : 18, C-VI) と、条件 C-IV の二倍濃度に設定し、水素発酵能と細菌叢への影響を

みた。グルコース消費率は95%以上で安定したが、水素収率は減少した。VFAsについては、酪酸濃度と酢酸濃度は殆ど変化せず、乳酸濃度に増加傾向がみられた。この時、DGGEのDNAバンドパターンは大きく変化した。すなわち、水素発酵能が良好なときに認められたband-2は非常に薄くなり、乳酸菌と推定されるband-4が再び明瞭になった。また、新たにband-5とband-6が出現した。ただし、これらのバンドは、DNA配列からともに水素発酵能を有する*Clostridium*属細菌と推定されたため、しばらく本条件での培養を続けた。

しかしながら、水素収率の回復傾向はみられなかったため、前回と同様に窒素濃度を440 mg/lに戻して水素発酵能の回復を試みた。これにより、水素収率は再び増加傾向には転じたものの、緩やかな変化にとどまった。また、VFAs濃度については、乳酸濃度の若干の減少と酢酸濃度の減少が認められ、酪酸濃度に特に変化はみられなかった。DGGEでは、*Clostridium*属細菌由来と推定されるband-5とband-6は薄くなり、優占化が期待されたband-2の速やかな増加も認められなかった。これらの結果は、前回と同じく炭素—窒素バランスの変化により水素発酵能と細菌叢の可逆的な変動を裏付けるものではあるが、その回復は遅く、変化速度は様でないことが示された。

この理由について、まず前回の条件では、微生物群集における*Clostridium pasteurianum*類縁細菌と*Sporolactobacillus*類縁細菌の競合関係での優劣により変化したのに対し、今回の場合は*Clostridium pasteurianum*類縁細菌のニッチを水素生成能の劣る*Clostridium tyrobutyricum*類縁細菌に取って代わられたといったニッチの奪い合いが一つの原因と考えられる。また、あくまで推論の域を脱し得ないが、前回の变化では、構成細菌の変化が*Clostridium*属 (band-2) と*Lactobacillus*属 (band-4) といった属間レベルで起こった。一方、今回は同じ*Clostridium*属内での細菌種の変化 (band-4 からband-5とband-6) がみられた。すなわち、生育条件などの諸性質の違いが大きであろう属間レベルでの細菌構成は、培養条件の変化に比較的鋭敏に反応、変動するのに対し、属内レベルでの細菌構成は培養条件変化への反応が鈍く、変化速度も小さくなるのではないかといった理由が推定される。

水素発酵に及ぼす窒素の影響については、堆らが、デンプンを単一炭素源に用いた連続式水素発酵に及ぼす窒素濃度の影響を調べ、C/N比が3~30の範囲で良好な水素生成能が得られたとしている¹⁷⁾。本実験でもC/N比が24と36の条件下で比較的良好な結果が得られた。しかし一方で、C/N比が18では、水素収率が悪化する傾向が見られ、堆らの報告とは異なる結果となった。堆らは、過剰量のアンモニア源が供給され、アンモニアが培地中に残存する場合には、遊離アンモニアの毒性により細菌の活

動が抑えられる可能性を挙げている¹⁷⁾。ただし、pHが6.0と低い本実験においては、遊離アンモニアとしての存在量は低く、その影響は小さいと考えられる。したがって、本実験でC/N比が18の条件で水素収率が低下した理由は、遊離アンモニアによる阻害というよりもむしろ、前述したように細菌叢の変化による影響が大きいものと考えられる。

以上、本研究では炭素—窒素バランスの変化と細菌叢との関係においてこのような結果を得たが、我々は、他の培養（発酵）条件と細菌叢および水素発酵能との関係についても同様の現象を推定しており、現在検討を進めているところである。

参考文献

- 1) 小林康彦: 埋立地再生を取りまく環境, 廃棄物学会誌, Vol.16, pp.123-131, 2005.
- 2) 環境省: 循環型社会形成推進基本計画, <http://www.env.go.jp/recycle/circul/keikaku.html>, 2003.
- 3) 染野憲治: 循環型社会形成推進基本計画の概要, 廃棄物学会誌, Vol.14, pp.236-241, 2003.
- 4) Boyles D.: Bioenergy technology-thermodynamics and costs, Wiley, New York, 1984.
- 5) Levin B.D., Pitt L. and Love M.: Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application, *Int. Journal Hydrogen Energy*, Vol.29, pp.173-185, 2004.
- 6) Kim S.H., Han S.K. and Shin H.S.: Performance comparison of a continuous-flow stirred-tank reactor and an anaerobic sequencing batch reactor for fermentative hydrogen production depending on substrate concentration, *Water Sci Technol*, Vol.52, pp.23-9, 2005.
- 7) Kotsopoulos T.A., Zeng R.J. and Angelidaki I.: Biohydrogen production in granular up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors with mixed cultures under hyper-thermophilic temperature (70 degrees C), *Biotechnol Bioeng*, Vol.94, pp.296-302, 2006.
- 8) Liu H. and Fang H.H.P.: Hydrogen production from wastewater by acidogenic granular sludge, *Water Sci Technol*, Vol.47, pp.153-158, 2003.
- 9) Yokoi H., Maki R., Hirose J. and Hayashi S.: Microbial production of hydrogen from starch-manufacturing wastes, *Biomass Bioenerg*, Vol.22, pp.389-395, 2002.
- 10) Yu H.Q., Zhu Z.H., Hu W.R. and Zhang H.S.: Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures, *Int. Journal Hydrogen Energy* Vol.27, pp.1359-1365, 2002.
- 11) Zhu H.G., Ueda S., Asada Y. and Miyake J.: Hydrogen production as a novel process of wastewater treatment - studies on tofu wastewater with entrapped R-sphaeroides and mutagenesis, *Int. Journal Hydrogen Energy*, Vol.27, pp.1349-1357, 2002.

- 12) Fang H.H.P. and Liu H.: Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture, *Bioresour. Technol.*, Vol.82, pp.87-93, 2002.
- 13) Lee Y.J., Miyahara T. and Noike T.: Effect of pH on microbial hydrogen fermentation, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, Vol.77, pp.694-698, 2002.
- 14) Ueno Y., Sasaki D., Fukui H., Haruta S., Ishii M. and Igarashi Y.: Changes in bacterial community during fermentative hydrogen and acid production from organic waste by thermophilic anaerobic microflora, *J Appl Microbiol.*, Vol.101, pp.331-43, 2006.
- 15) 登坂充博, 李玉友, 野池達也: PCR-DGGE法を用いた水素発酵微生物群集の構造解析, 土木学会論文集, 790/VII-35, 1-10, 2005
- 16) Kawagoshi Y., Hino N., Fujimoto A., Nakao M., Fujita Y., Sugimura S. and Furukawa K.: Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production, *J Biosci Bioeng.*, Vol.100, pp.524-30, 2005
- 17) 堆洋平, 李玉友, 野池達也: でんぷんの連続式水素発酵に及ぼすpHと窒素濃度の影響, 環境工学研究論文集, Vol.42, pp.423-433, 2005
- 18) Lin C.Y. and Lay C.H.: Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora, *Int. Journal Hydrogen Energy*, Vol.29, pp.41-45, 2004.
- 19) Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. and Lane D.J.: 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study, *Journal of Bacteriology*, Vol.173, pp.697-703, 1991.
- 20) Hall T.A.: BioEdit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series*, Vol.41, pp.95-98, 1999.
- 21) PEARSON W.R. and LIPMAN D.J.: Improved tools for biological sequence comparison, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.85, pp.2444-2448, 1988.
- 22) Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J.: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Research*, Vol.22, pp.4673-4680, 1994.
- 23) Chang J.S., Lee K.S. and Lin P.J.: Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors, *Int. Journal Hydrogen Energy*, Vol.27, pp.1167-1174, 2002.
- 24) 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発酵に及ぼす基質濃度とpHの影響, 水環境学会誌, Vol.27, pp.473-479, 2004
- 25) Wu S.Y., Hung C.H., Lin C.N., Chen H.W., Lee A.S. and Chang J.S.: Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in high-rate anaerobic bioreactors containing silicone-immobilized and self-flocculated sludge, *Biotechnol Bioeng.*, Vol.93, pp.934-46, 2006.
- 26) Noike T., Takabatake H., Mizuno O. and Ohba M.: Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria, *Int. Journal Hydrogen Energy*, Vol.27, pp.1367-1371, 2002.

(2007.5.25 受付)

Response of bacterial community and hydrogen productivity to carbon-nitrogen balance in continuous methophilic hydrogen fermentation

Yasunori KAWAGOSHI¹, Naoe HINO², Masaharu NAKAO¹, Aya Fujimoto¹, and Kenji FURUKAWA¹

¹Graduate School of Science & Technology, Kumamoto University

²Technical research institute, Hitachi Zosen Corporation

Effect of a carbon-nitrogen balance on hydrogen (H₂) production and bacterial community in continuous mesophilic hydrogen fermentation was investigated. The highest H₂ production yield was obtained when the C/N ratio was 36, and it was indicated that *Clostridium* species mainly contributed to the H₂ production. The H₂ productivity was decreased and lactic acid bacteria became dominant at high C/N ratio (lack of nitrogen) condition, but H₂ productivity was rapidly recovered by a control of C/N balance through the bacterial community change. The H₂ production was also decreased when C/N ratio was lower than 36 (excess of nitrogen), and bacterial community shifted within genus *Clostridium*. In this case, the recovery of H₂ productivity and bacterial community were also possible, but these are slower than above case. These results indicated that 1) The carbon-nitrogen balance affects on both the H₂ productivity and bacterial community., 2) Change of bacterial community is reversible., 3) Hydrogen fermentating bacteria and lactic acid bacteria are competitive., 4) The competition within the bacteria of same genus *Clostridium*, which are hydrogen fermentating bacteria, are also competitive, and affects on hydrogen productivity.