

혐기성 수소생산 시 운전 pH 변화에 따른 미생물의 군집 변화

전운선 · 이관용 · 조운아 · 이태진[†]

서울산업대학교 환경공학과

(2008년 6월 5일 접수, 2008년 12월 19일 채택)

Change of Microbial Communities in Fermentative Hydrogen Production at Difference Cultivation pHs

Yoon-Sun Jun · Kwan-Yong Lee · Yoon-A Cho · Tae-Jin Lee[†]

Department of Environmental Engineering, Seoul National University of Technology

ABSTRACT : In this study, PCR-DGGE was conducted to investigate the variations of microbial community according to pH conditions from pH 3 to pH 10 during anaerobic fermentation process of hydrogen production. Maximum hydrogen yield was 1.8 mol H₂/mol substrate at pH 5. The microbial growth rate was not proportional to the hydrogen production rate at each pH. Variations of microbial community was observed at each condition from PCR-DGGE experiment of 16S rDNA. *Klebsiella* was main species of the microbial community. *Streptococcus* and *Clostridium* were mainly contributed for hydrogen production.

Key Words : Anaerobic Fermentation, Hydrogen Production, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Streptococcus*, PCR-DGGE

요약 : 본 연구는 혐기성 발효에 의한 수소 생산 시 pH가 3에서 10까지 단계적으로 변화되는 조건에서 미생물의 군집 변화를 살펴보기 위해 PCR-DGGE를 실시하였다. 최대 수소생산 수율은 pH 5에서 1.8 mol H₂/mol substrate로 측정 되었으며, 각 pH에서 미생물의 성장량과 수소생산효율의 비례적 상관관계가 나타나지 않았다. 각 pH에서 채취된 미생물의 16S rDNA를 target으로 한 PCR-DGGE를 수행한 결과, pH 조건에 따라 미생물의 군집 조성에 변화가 있음을 확인할 수 있었다. 미생물 중의 대부분은 *Klebsiella* 속으로 규명되었으며 *Streptococcus* 속과 *Clostridium* 속 미생물이 수소생산 효율에 많은 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

주제어 : 혐기성 발효, 수소생산, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Streptococcus*, PCR-DGGE

1. 서론

현재 필요한 에너지의 대부분은 화석연료에 의하여 충적되고 있으나 이런 화석연료의 과다사용은 지구기후 변화에 주요 요인이 되고 있으며, 더욱이 NO_x, SO_x, 탄화수소, 타르 또는 다른 유기물질의 방출과 같은 유해물질을 배출하게 된다. 이러한 화석연료의 대체 에너지로 수소에너지는 청정에너지로서 큰 주목을 받고 있다. 수소를 생산하는 방법 중 혐기 발효에 의한 수소생산은 암발효 공정으로 운전이 가능하고, 다양한 형태의 유기물로부터 수소를 생산할 수 있어 친환경적이며, 현재 적용 가능성이 가장 앞선 기술로 평가 받고 있다.^{1~3)}

혐기 발효에 의한 수소생산에 영향을 미치는 환경요인으로는 pH, 온도, 체류시간, 기질 농도, 수소생산균 등이 있다. 그 중 pH는 혐기 발효 중 배양기간 동안 생성되는 유기산에 의해 강하되어 반응기 내 미생물의 대사 경로 전환으로 발효산물 분포가 변화되거나 미생물 군집에 영향

을 주어 결과적으로 수소 생산에 주요한 영향을 미치는 것으로 판단된다.^{4,5)}

혐기 발효에 의한 수소생산에 관여하는 미생물을 살펴 보면, 산소 노출 민감도에 따라 절대 혐기성균(strict anaerobe)과 통성 혐기성균(facultative anaerobe)으로 나눌 수 있으며 각각 *Clostridium* 속과 *Klebsiella* 속 미생물이 이에 해당되며 현재 수소생산에서 가장 많이 연구되고 있다. *Clostridium* 속의 hydrogenase(수소화 효소)은 glucose 1 mol 당 4 mol의 수소 발생이 가능하며, 실제 최대 수소 수율은 3.24 mol H₂/mol glucose으로 알려져 있다. *Klebsiella* 속의 nitrogenase 효소는 N₂를 NH₃로 질소를 고정시키는 기능을 가지고 있으며, 질소원이 없는 경우에는 양성자를 환원시켜 수소를 생산한다. 이 속의 실제 최대 수소 수율은 2.86 mol H₂/mol glucose이며, *Clostridium* 속에 비해 적은 양의 수소를 생산한다고 보고된 바 있다.⁶⁾

반응기 내 미생물을 확인하기 위해 배양이나 현미경 관찰 등을 통한 전통적 방법을 많이 이용하였지만, 최근에는 분자생물학적인 분석 기법의 사용이 증가하는 추세이다. 이러한 분자생물학적 기법의 미생물 군집변화 해석은 DNA (deoxyribonucleic acid), RNA (ribonucleic acid)를 분석하는

[†] Corresponding author
E-mail: leetj@snut.ac.kr
Tel: 02-970-6614

Fax: 02-971-5776

것으로 이는 미생물의 생태학적 연구에 있어 세부적인 유전자 상관관계를 해석할 수 있다. 특히 bacteria의 16S rDNA (ribosomal DNA)의 특정 부위는 진화속도가 매우 느려 많은 생명체가 공통으로 보존된 염기서열과 이차구조를 나타내 다양한 분류군의 상호 비교를 가능케 한다. 따라서 분자생물학적으로 염기서열을 분석해 원핵생물의 계통분류학적 연구에 유용하게 이용할 수 있다.^{7~10)}

최근 생물학적 수소생산에 있어서 각 pH에 따른 생산율의 변화에 대한 연구는 많이 진행되었지만 미생물의 군집 해석이나 또는 미생물의 동적 변화 특성에 대한 연구는 상대적으로 미미하였다. 또한 pH와 수소생산 효율에 대한 관계를 단순히 기질 이용 및 유기산 생성 특성에 따라 규명하였기 때문에 수소 생산율에 미치는 미생물 군집에 관한 정보가 매우 열악하였다. 따라서 본 연구에서는 분자생물학적 기법의 하나인 PCR-DGGE (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis)를 이용하여 pH를 3에서 10까지 단계적으로 변화시킨 상태에서 수소 생산과 미생물 군집변화를 해석하고자 하였으며 이를 통하여 수소생산 공정에서 미생물의 활용에 기본적 정보를 제공하고자 하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 실험 장치 및 운전 방법

Fig. 1은 본 연구에 사용된 회분식 반응기로 배지¹¹⁾와 탄소원으로 sucrose 1% (v/v)을 첨가한 후 N₂ 가스로 purging 시켜 혐기성 상태로 만들고 가스의 유출입이 없도록 완전 밀폐 시켰다. 균주로는 E하수처리장 활성 슬러지의 반송 슬러지를 접종하여 단계 배양시킨 배양액을 실험 전 24시간 동안 배양시켜 균의 활성화를 도모한 후 주입하였다.^{12,13)} 실험은 30±3°C의 온도 조건에서 수행되었으며 미생물의 배양기간 동안 반응기 내 pH는 온도 센서가 연

결된 pH 자동조절장치에 의해 일정하게 유지하였다. pH는 3에서 10까지 pH를 1만큼 변화시키면서 반응기 내 미생물의 군집변화를 살펴보았다. 반응조의 유효 용적은 1.5 L이며 배양액을 완전혼합하기 위한 교반속도는 200 rpm으로 유지 하였다. 이 때 주입된 초기 배양액은 반응기 유효 용적의 1% (v/v)이었으며, 접종된 반응기 내 초기 생체량은 약 6 mg VSS/L이었다.

2.2. 분석방법

2.2.1. 반응기 성능 분석

반응기의 총 가스는 2%(v/v) H₂SO₄을 담은 포화식염수에 포집하며 그 중 수소함량 측정은 열전도도 검출기를 장착한 가스 크로마토그래피(GOW-MAC series 350)를 이용하여 측정하였다. 사용된 칼럼은 6×1/8" stainless steel SS 350A (Molesieve 13X(80/100 mesh))이었으며 GC의 운전조건은 칼럼온도 80°C, injector 온도 100°C, 그리고 detector 온도는 100°C였으며, carrier gas는 질소이고 flow rate는 30 mL/min로 유지하였다. 누적수소생산량 곡선은 일정시간마다 측정된 head space의 수소함량과 발생된 총 가스량으로부터 계산되었다.

배양액 내에 잔존하는 탄수화물을 정량하기 위하여 페놀-황산법¹⁴⁾으로 발색시킨 후 UV-Visible spectrophotometer (UV-1601, SHIMADZU)로 흡광도 파장 490 nm에서 측정하였다. 균체량(volatile suspended solids)의 측정은 일정량의 배양액을 취하여 600 nm에서 흡수된 광량을 기준에 건조중량으로 검량된 곡선에 대입하여 환산 측정하였다.^{15,16)}

2.2.2. DNA 추출

수소생산 최대의 시점에서 채취된 각 시료를 11,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제외한 침전물을 약 0.25 g이 되도록 한 후, Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.)를 사용하여 DNA 추출을 하였다. DNA

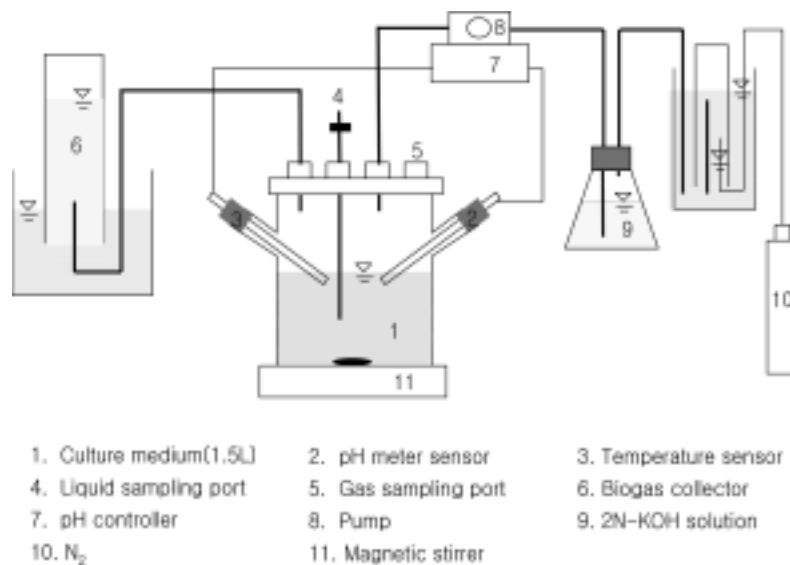


Fig. 1. Schematic diagram of the batch reactor for anaerobic fermentative hydrogen production.

Table 1. PCR primers used in this study

primer pair (Target)	nucleotide sequence (5'- 3')	size of PCR product (bp)	reference
EUB10f EUB1400r (bacteria 16S rDNA)	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG ACG GGC GGT GTG TAC AAG	1408	14
341f 518r (V3 region)	CCT ACG GGA GGC AGC AG ATT ACC GCG GCT GCT GG	193	15,16
GC clamp	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G	233	15,16

* f : forward primer r : reverse primer

추출여부는 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

2.2.3. PCR (Polymerase Chain Reaction)을 통한 16S rDNA 증폭

추출한 DNA template에서 16S rDNA의 가변 부위인 V3 region 증폭을 위해 서로 다른 2개의 primer sets을 사용하여 nested PCR을 실시하였다.⁸⁾ 실험에 사용된 primer (Bionics, Korea)의 sequence은 Table 1과 같다. 먼저 Bacteria의 16S rDNA 증폭을 위하여 EUB10f와 EUB1400r primer를 사용하여 1차 PCR을 수행하였으며, 이때 생성된 PCR product를 이용하여 V3 region을 증폭하고자 341f와 518r primer로 2차 PCR을 수행하였다. 또한 DGGE 수행을 위해 341f에 GC clamp를 부착하여 2차 PCR을 다시 수행하였다.

DNA 증폭을 위한 PCR 기기(UVigene™ State of art Thermal Cycler)의 온도조건은 95℃에 9 min 동안 pre-denaturation 한 후, 95℃에서 1min denaturation, 53℃에서 1 min annealing, 72℃에서 2 min extension을 35 cycles 반복 수행한 후, 마지막으로 72℃에서 10 min final-extension 하였다.^{8,10)}

2.2.4. DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 및 Gel Elution

DGGE는 40~60%의 변성제 농도 구배(변성제 농도 100%

는 7 M Urea, 40% Formaide)를 가지는 8% Polyacrylamide Gel을 만든 후(Bio-Rad Ltd. Co., Model 475 Gradient delivery system) 실시하였다. Polyacrylamide Gel을 1X TAE buffer를 채운 DGGE 전기영동 기기(Bio-Rad D-code system, Hercules, CA, USA)에 부착시킨 후 GC clamp를 부착한 primer로 PCR을 실시하여 얻은 약 200 bp의 동일한 크기의 PCR product를 gel에 Loading 한 후 200 V, 300 min (runing time)¹⁰⁾으로 전기영동을 실시하였다. UV transilluminator에서 DGGE 밴드 확인 후 원하는 band 부위를 잘라 낸 뒤 30 µL의 1X TAE Buffer 첨가하여 gel에서 DNA가 분리되도록 하였다.¹⁷⁾ 분리된 DNA를 341f와 518r를 primer로 하여 PCR을 재실시하고 이때 생성된 PCR product를 이용하여 sequence하였다.

2.2.5. 염기서열 분석 및 Phylogenetic Tree 작성

염기서열 분석은 염기서열 분석 전문기관(Bionics, Korea)에서 수행되었으며, 계통분류학적 확인을 위한 16S rDNA의 염기서열 결과는 NCBI BLAST Search Database에서 검색된 염기서열 정보를 이용하였다. phylogenetic tree의 작성 작업은 Mega 4.0 software의 neighbor-joining method을 이용하였으며 균주들의 진화과정을 추적하는 작업은 Kimura 2-parameter Model을 이용하였다. 또한 신뢰성 확보를 위해 1,000회의 bootstrap을 시행하였다.^{17~21)}

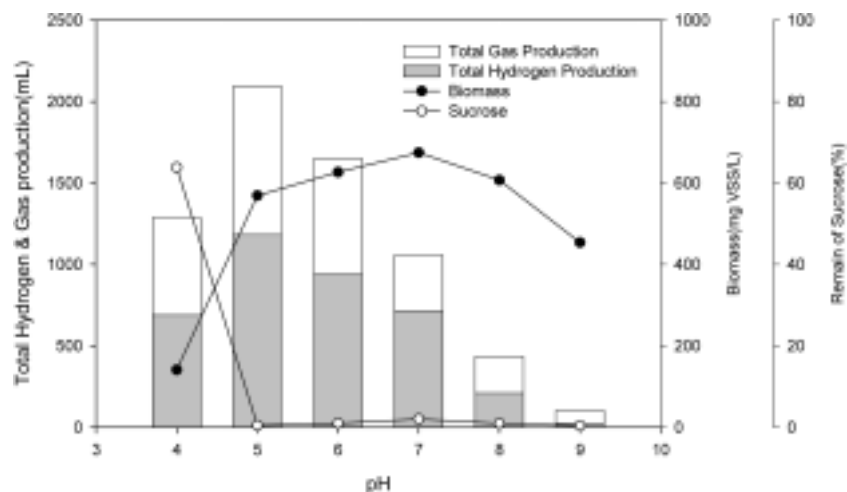


Fig. 2. Biomass growth according to hydrogen production rate under various pH condition of in anaerobic batch reactor.

3. 결과 및 고찰

3.1. 반응기 성능에 따른 미생물 성장 특성

Fig. 2는 pH를 3에서부터 10까지 각 단계별로 약 80 시간 정도 반응기를 운전하면서 가스 및 수소 발생량, 기질 이용 및 미생물의 성장 특성을 관찰한 그래프이다. 본 실험 동안 pH 3과 pH 10에서 미생물의 성장과 가스의 발생이 전혀 관찰되지 않았으며, 그러한 이유로 Fig. 2에 도식되지 않았다. pH 5와 6에서 비교적 왕성한 수소 발생 양상을 보였으며, 그 중 pH 5에서 최대 수소 생산을 보여 누적 수소 발생량은 총 1,182 mL로 나타났다.

pH 4를 제외한 모든 pH 조건(pH 5~pH 9)에서 거의 같은 양의 기질(sucrose) 소비 및 균체 성장을 보였음에도 불구하고 수소생산 효율은 pH 5와 6에서 두드러지게 높게 나타났다. 이는 각 pH 조건에서 미생물의 군집에 변화가 있어 수소생산 효율도 영향을 미친 것으로 사료되며, 이러한 상관관계를 파악하기 위해서 미생물의 군집 해석을 실시하였다.

3.2. DGGE의 band pattern 및 sequencing 분석

Fig. 3은 각 pH 조건에서 운전된 수소생산 반응기에서 채취 한 미생물의 DNA를 증폭한 후 얻은 16S rDNA의 V3 region의 DGGE 수행을 통한 미생물의 군집변화를 나타낸 결과이다. 선명도가 각기 다른 여러 band가 다양하게 분포되어 나타났으며 이러한 다양한 DGGE band의 양상은 각각의 pH에 따라 미생물의 군집이 다양하다는 것을 나타낸다.

다른 조건의 pH에 비해 수소생산 효율이 높았던 pH 5와 6의 DGGE band에서 다른 pH의 band pattern과는 뚜렷하게 구분되는 band A와 H가 관찰 되었다. 이 band는 pH 4에서는 관찰되지 않았으며, 수소생산 효율이 점점 떨어지는 pH 6 이후부터는 선명도가 점점 떨어지는 것으로 나타났다. 또한 band B, F, 그리고 I의 선명도도 많이 약해지는 것을 알 수 있었다.

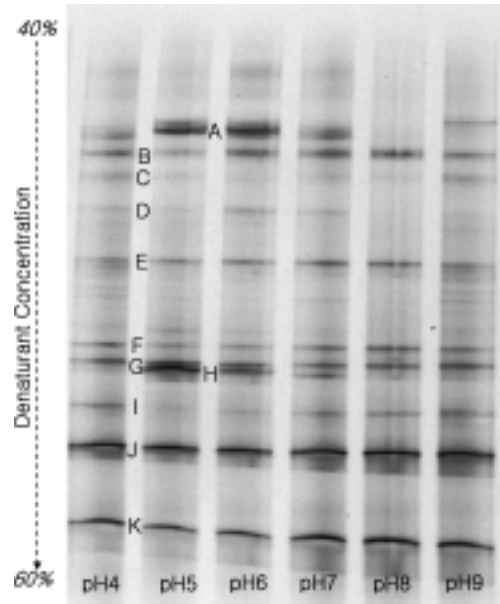


Fig. 3. DGGE profiles of 16S rDNA fragment at various.

다양하게 분포되어 가시화된 DGGE band의 미생물 군집을 파악하기 위해 선명도가 높은 11개의 band를 sequence 하여 NCBI BLAST을 이용하여 GenBank database와 비교 분석하여 가장 유사도가 높은 종을 검색한 결과 DGGE band로부터 얻은 clone 대부분은 *Klebsiella* 속(B, C, E, F, G, I, J 그리고 K) 미생물로 규명되었으며, 그 외 *Escherichia coli* (D) 미생물도 관찰되었으며 검색 결과를 Table 2에 요약 정리하였다. pH 5와 6에서 뚜렷하게 관찰되었던 A와 H band는 각각 *Streptococcus* 속과 *Clostridium* 속 미생물로 규명되었다. *Streptococcus* 속은 통성 혐기성 균으로서 기존의 수소생산 연구에서는 보고되지 않았던 미생물이며, *Klebsiella* 속과 *Clostridium* 속은 기존 수소생산 연구에서 많이 보고되고 있는 통성 혐기성균과 절대 혐기성균으로서 *Klebsiella* 속은 *Clostridium* 속보다 기질 당 수소생산량이 적은 것으로 보고된 바 있다.⁶⁾

결론적으로 본 실험에서 나타난 미생물 군집의 대부분의

Table 2. Characteristic of DNA fragments obtained from DGGE gel

Band Name	Gen Bank Search Result			Taxonomic Description (class)
	Phylogenetically Closest Relative	Accession NO.	Similarity	
A	<i>Streptococcus gallolyticus subsp.</i>	DQ232525	97%	Bacilli
B	<i>Klebsiella sp. E5</i>	DQ303436	93%	γ-Proteobacteria
C	<i>Klebsiella variicola isolate GN-05-3a</i>	DQ872453	94%	γ-Proteobacteria
D	<i>Escherichia coli strain O157:H7</i>	EU118103	96%	γ-Proteobacteria
E	<i>Klebsiella singaporensis strain LX21</i>	AF250286	91%	γ-Proteobacteria
F	<i>Klebsiella sp. s30-5-u8f 1</i>	DQ305309	97%	γ-Proteobacteria
G	<i>Klebsiella sp. 093101 1</i>	EF522822	97%	γ-Proteobacteria
H	<i>Clostridium sp. B906-1</i>	AB114259	96%	Clostridia
I	<i>Klebsiella sp. HPC 554 1</i>	DQ131809	91%	γ-Proteobacteria
J	<i>Klebsiella pneumoniae strain NKU238</i>	DQ470487	97%	γ-Proteobacteria
K	<i>Klebsiella pneumoniae strain SWU-27</i>	EU128493	98%	γ-Proteobacteria

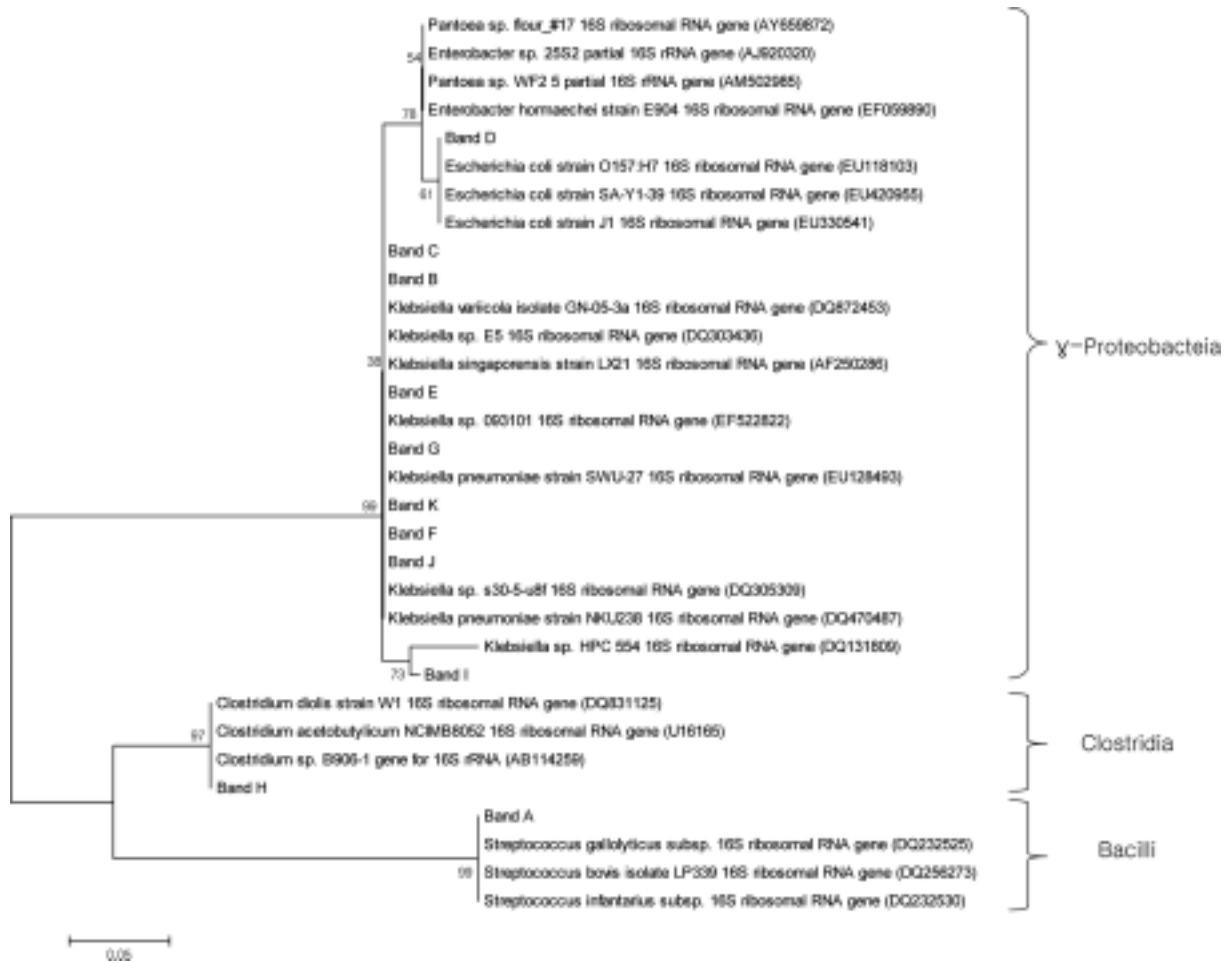


Fig. 4. Phylogenetic tree showing the relationship among the closest relatives in the GenBank databases and the isolates. The tree was produced using a neighbor-joining method. The bar indicates 5% sequence divergence. The numbers at the nodes of the branches refer to the Bootstrap values for 1000 replicates.

종류는 *Klebsiella* 속 미생물이었으며, 그 중 수소생산 수율에 중요한 역할을 담당하는 미생물은 *Clostridium* 속과 *Streptococcus* 속 미생물로 나타났다. Fig. 4는 DGGE 밴드로부터 판명된 미생물의 계통발생학적 유연관계를 도시한 결과이다. *Klebsiella* 속 미생물은 프로테오박테리아 (Proteobacteria)에 속하며, *Clostridium* 속 미생물과 *Streptococcus* 속 미생물은 피르미쿠트(Firmicutes)에 속하는 세균인 것으로 분석되었다.²²⁾

4. 결론

본 연구에서는 혐기성 발효에 의한 수소 생산 시 배양기간 동안의 pH를 3에서 10까지 변화시키면서 각 pH에 따른 수소생산 효율과 미생물의 군집 변화를 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1) 혐기성 발효에 의한 수소 생산 시 최대 수소 생산량은 pH 5에서 관찰되었으며 이 때 수소 가스 생성량은 약 1.8 mol H₂/mol substrate로 나타났다.

2) pH 3과 10에서 미생물의 성장은 관찰되지 않았으며 pH 5에서 pH 9까지는 기질의 소비 및 균체 성장이 비슷하게 진행되었음에도 불구하고 수소생산 효율은 pH 5와 6에서 두드러지게 높게 나타났다. 이는 각 pH 조건에서 미생물의 군집에 변화가 있음을 나타내는 것으로 판단되었다.

3) 16S rDNA의 PCR-DGGE 결과, 각 pH 조건에 따라 DGGE band pattern이 다양하게 나타났고 NCBI BLAST을 이용하여 분석한 결과 대부분 *Klebsiella* 속 미생물로 규명되었으며 pH 5와 6에서 독특하게 뚜렷하게 생성되었던 band는 *Clostridium* 속과 *Streptococcus* 속 미생물로 규명되었다.

4) 수소생산에 관여하고 있는 미생물로 *Klebsiella* 속 미생물과 *Clostridium* 속 미생물은 기존의 연구 결과에서 이미 보고되어 있었고 또 후속 연구가 진행되고 있으나 *Streptococcus* 속 미생물 또한 수소 생성에 미치는 영향이 크다는 것은 본 실험을 통하여 알 수 있었다. 따라서 수소의 생물학적 생산에 있어서 *Klebsiella* 속과 *Clostridium* 속 미생물과 더불어 *Streptococcus* 속 미생물에 후속 연구가 필요할 것으로 판단되었다.

참고문헌

1. Zaborsky, O. R., "Biohydrogen," Plenum Press, Newyork, pp. 10~18(1998).
2. Levin, D. B., Pitt, L., and Love, M., "Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application," *Int. J. Hydrogen Energy*, **29**, 173~185(2004).
3. Okamoto, M., Miyahara, T., Mizuno, O., and Noike, T., "Biological hydrogen potential of materials characteristic of the organic fraction of municipal solid wastes," *Water Sci. Technol.*, **41**(3), 25~32(2000).
4. Heyndrix, M., De Vos, P., Thibau, B., Stevens, P., and JI De Ley, "Effect of various external factorson the fermentative production of hydrogen gas from glucoes by *Clostridium butyricum* strains in batch culture system," *Appl. Microbiol*, **9**, 163~168(1987).
5. Van Andel, J. G., Zoutberg, G. R., Crabbendam, P. M., and Breau, A. M., "Glucose fermentation by *Clostridium butyricum* grown under a self generated gas atmosphere in chemostat culture," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 21~26(1985).
6. Chen, X., Sun, Y., Xiu, Z., Li, X., Zhang, D., "Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria," *Int. J. Hydrogen Energy*, **31**, 539~549(2006).
7. Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M., and Igarashi, Y., "Characterization of a microorganism isolated from the effluent of hydrogen fermentation by microflora," *J. Bioscience and Bioengineering*, **92**(4), 397~400(2001).
8. Vreas, L., Forney, L., Daae, F. L., and Torsvik, V., "Distribution of bacterioplankton in meromictic lake selenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-Amplified gene fragments coding for 16S rRNA," *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(9), 3367~3373(1997).
9. Hollibaugh, J. T., Bano, N., and Ducklow, H., "Widespread distribution in polar oceans of a 16S rRNA gene sequence with affinity to *Nitrosospira*-like ammonia-oxidizing bacteria," *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**(3), 1478~1484(2002).
10. Mannix Salvador Pedro, Shin Haruta, Masaru Hazaka, Rumiko Shimada, Chie Yoshida, Koichiro Hiura, Masaharu Ishii, and Yasuo Igarashi, "Denaturing gradient gel electrophoresis analyses of microbial community from field-scale composter", *J. Bioscience and Bioengineering*, **91**(2), 159~165(2001).
11. Logan, B. E., OH, S. E., Kim, I. S., Ginkel, S. V., "Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers," *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 2530~2535(2002).
12. Fang, H. H. P., and H. Liu, "Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture," *Bioresour. Technol.*, **82**, 87~93(2002).
13. Chen, C.-C. and Lin, C.-Y., "Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor," *Adv. Environ. Res.*, **7**, 695~699(2003).
14. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F., "Colorimetric method for determination of sugars and related substances," *Anal. Chem.*, **28**(3), 350~356(1956).
15. Minnan, L., Jinli, H., Xuijuan, W., Jinzao, C., Chuannan, L., Fengzhang, Z., Liangshu, X., "Isolation and characterization of a high H₂-Producing strain *Klebsiella oxytoca* HP1 from a hot spring," *Res. Microbiol.*, **156**, 76~81(2005).
16. Nguyen, T. A. D., Kim, Y. P., Kim, M. S., Oh, Y. K., Sim, S. J., "Optimization of hydrogen production by hyperthermophilic eubacteria, *Thermotoga maritima* and *Thermotoga neapolitana* in batch fermentation," *Int. J. Hydrogen Energy* (accepted), (2007).
17. Hung, C. H., Cheng, C. H., Cheng, L. H., Liang, C. M., Lin, C. Y., "Application of *Clostridium*-specific PCR primers on the analysis of dark fermentation hydrogen-producing bacterial community," *Int. J. Hydrogen Energy* (2007).
18. Auch, A. F., Henz, S. R., Holland, B. R., and Goker, M., "Genome BLAST distance phylogenies inferred from whole plastid and whole mitochondrion genome sequences," BioMed Central Ltd.(2006).
19. Felgenstein, J., "Confidence limits on phylogenetics: an approach using the bootstrap," *Evolution*, **39**, 783~791(1985).
20. Kimura, M., "A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences," *J. Mol. Evol.*, **16**, 111~120(1980).
21. Saitou, N., Nei, M., "The neighbour-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees," *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406~425(1987).
22. Prescott, Harley, Klein, "Microbiology," Mc Graw Hill Higher Education, pp. 412~413(2003).