

## DGGE法による嫌気消化液中のメタン生成細菌フローラ解析

岡本英竜

酪農学園大学酪農学部酪農学科 農業微生物学

### 1. いま何故家畜ふん尿のメタン発酵処理か

畜産業から排泄される家畜・家禽の排泄物は、飼養規模に見合うだけの施設の不備などから、水質汚濁や悪臭などの環境汚染問題を引き起こしてきた。このような状況を抑止するために、家畜排泄物を資源とし、資源循環型の社会への移行を目指すことを目的とした「環境三法」が施行された。今後は排泄物を有用な生物資源として利用し、さらに、施設面でも汚染物質の地下浸透、空気中への揮散の防止など施設的改善を行っていかなければならない。家畜排泄物も貴重な生物資源（バイオマス）であり、肥料化、燃料化など様々な分野での有効利用が可能である。これらの問題を解決し、さらに、エネルギーを得ることの出来るメタン発酵は、今後注目される技術である。

### 2. メタン発酵の安定化に向けて

メタン発酵は、有機物を様々な微生物の発酵過程を経て、最終的にメタン生成細菌の作用によって、メタンガスを生産する方法である。

この発酵は、肥料効率の向上、有害種子の死滅、温室効果の低減など多くの有用性を生み出すことから、各地で家畜ふん尿処理のためのメタン発酵プラントが稼働および予定されている。しかし、バイオガスプラントが、稼働不能に陥ると、再び安定な状態を保つまでにかなりの月日がかかるため、その間に排泄されたふん尿処理などの2次被害を引き起こし、すべての工程に影響が生じてしまう。安定的にメタン発酵を行うためにHillらは、物質代謝のモデルを作成し、そこから*iso*-酪酸と*iso*-吉草酸の各濃度が15mg/l以上、酢酸濃度が800

mg/l以上または酢酸に対するプロピオン酸の割合が1.4以上となると、メタン発酵が抑制的に働くなどの指標を提言している。しかし、それらは発酵材料や環境によって指標とした数値が当てはまらないこともあった。指標となる物質は主に微生物が生み出していることを考えると、微生物学的な解明を行うことにより、より効果的にこれらの指標を利用し、メタン発酵の安定化につなげる事が出来ると思われる。しかし、メタン発酵における微生物学的な解明は、ほとんど行われてこなかった。その理由として、従来の培養法ではメタン発酵の最終段階を担うメタン生成細菌の増殖速度が非常に遅いなど、その生態を暴くには多くの時間を費やすなどの問題も関係していると思われる。

### 3. DGGE法

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 法は、元来染色体DNAの点変異検出に用いられた技法である。この原理は、GCクランプ (GCに富む配列) 付きプライマーセットを用いたPCRにより増幅された2本鎖DNAを、DNA変性剤 (尿素とホルムアミド) で濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲル中でDNA電気泳動を行うことにより、塩基配列の違いによる変性剤に対する変性が、移動度に影響することを利用したものである。この方法は、環境中の微生物から直接抽出したDNAをPCR増幅し利用するため、微量の試料からその環境中に存在する微生物の遺伝子を培養過程を経ずに検出できる。この点、クローニングと似ているが、DGGE法は可視化できるため、その環境中の微生物構成を容易に判断でき、環境

サンプルのモニタリングなどにも適している。

#### 4. 発酵温度の異なるバイオガスパラントのメタン生成細菌群の解析

乳牛ふん尿を材料にしている発酵温度の異なるメタン発酵消化液中のメタン生成細菌群の構成にどのような違いが認められるのかをDGGE法を用いて検討した。

試料Aが低温発酵、試料BおよびCは中温発酵であり、試料Dが高温発酵の消化液試料である。DGGE法から見たメタン生成細菌群構成は、低温発酵のAでは、最もシンプルなメタン生成細菌構成であり、検出された最も高濃度なバンドの塩基配列を確認したところ、*Methanobrevibacter smithii*と100%の相同性であった。中温発酵BおよびCでは、低温発酵Aで検出された以外にバンドが検出され、Bでは、原虫内共生メタン生成

細菌と98%の相同性を示したバンドが検出され、Cでは、牛ルーメンから分離された報告のある未同定メタン生成細菌と100%の相同性であるバンドが検出された。このことから発酵温度が同じでもプラントにより異なった細菌群構成をしていることが明らかとなった。高温発酵のDでは、他の温度処理を行っているプラントとは、かなり異なったバンドパターンを示し、特有のバンドの塩基配列を決定したところ、*Methanobacterium thermoautotrophicum*と高い相同性を示した。

以上の結果から、乳牛ふん尿メタン発酵は、発酵槽によって特有のメタン生成細菌が構成れることが明らかとなった。また、今回、酢酸利用メタン生成細菌が検出されなかったことについては、分析感度を高めるなど、方法の改善が課題として残る結果となった。

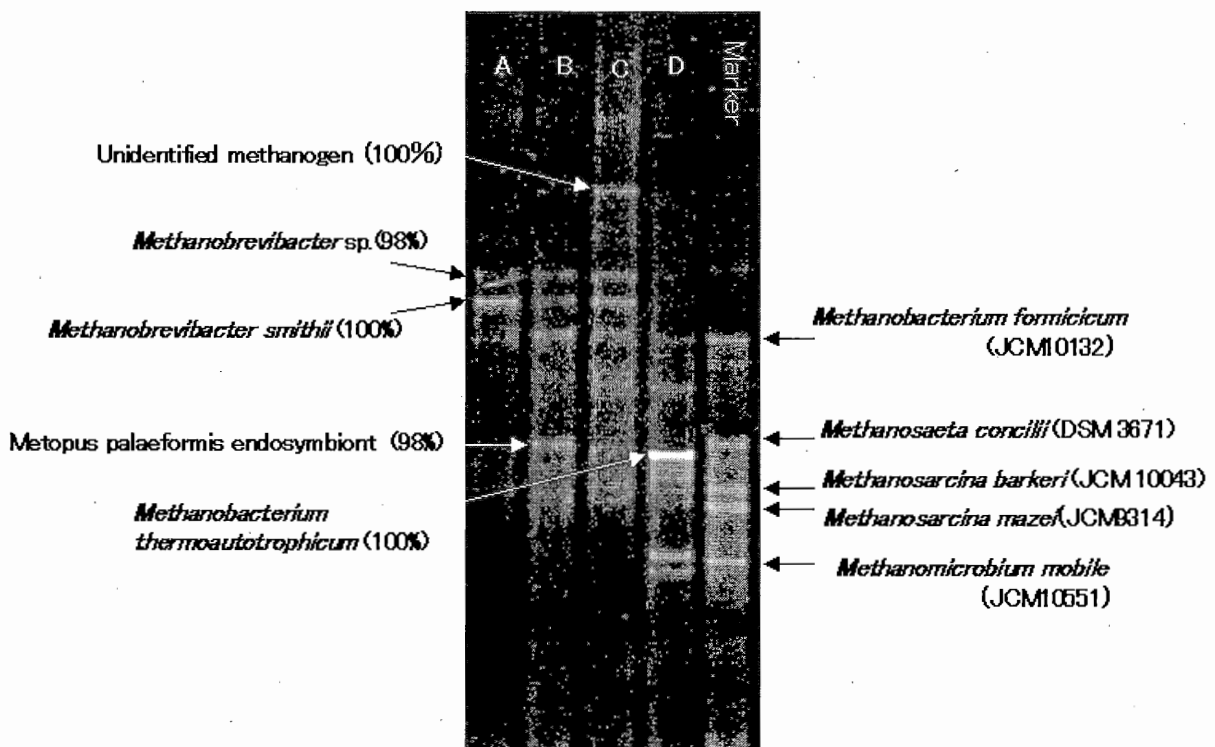


Fig. DGGE profile (*Archaea*)