

牛糞堆肥の高温発酵過程に活動する主要好熱性メタン生成古細菌群の探索とメタン生成に関わる *mcr* 遺伝子の解析

生命分子化学講座 生態化学生物学研究室

守 次朗

(背景と目的) 牛糞堆肥は発酵温度が 60~70°C まで上昇し、大量のメタンを放出するが、その原因となるメタン生成微生物については殆ど解明されていない。牛糞堆肥中微生物の 65°C 培養と PCR-DGGE 法による培養物の遺伝子解析、および FISH 解析を試み、メタン生成に関わる古細菌の同定を目指した。

(方法) Wingoradsky 無機塩をベースに N 源として $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、C 源としてグルコース、酢酸ナトリウムおよび乳酸カリウム、さらに K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 塩を強化した 0.3% ジェランガムソフトゲル培地に、発酵 1 ヶ月目、切り返し直後の堆肥を接種し、65°C で培養した。培地気相中のメタン濃度を GC で定量した。堆肥およびその培養物はそれぞれ菌体 DNA 抽出に供し、16S rRNA 遺伝子およびメタン生成酵素 MCR α サブユニット (*mcrA*) 遺伝子を標的とした PCR-DGGE 解析により、メタン生成を担う微生物の同定を行った。加えて、特異的蛍光 DNA プロブを用いた FISH 法による目的微生物の検出を試みた。

(結果) 堆肥接種、65°C 培養では培養 10 日目までに約 500,000 ppmv のメタンが培地気相中に蓄積した。16S rRNA 遺伝子を標的とした DGGE 解析の結果、堆肥および堆肥培養物では酢酸資化性メタン生成古細菌 *Methanosarcina* 属が主要な古細菌であり、酢酸生成真正細菌がこれと共生していることが示唆された。ところが、*mcrA* 遺伝子を解析すると、活発なメタン生成が見られた培養物では *Methanothermobacter* 属由来のものが優占的であることが分かった。この *mcrA* 遺伝子の変動は、凍結保存堆肥をあらかじめ 3 時間以上 65°C 加熱処理することによって活発に起こることが示唆された。FISH 法による検鏡では、*Methanosarcina* 属と酢酸生成細菌の共存が確認されたが、*Methanothermobacter* 属は観察されなかった。また、*Methanosarcina* 属用培地中での堆肥 65°C 培養により、*Methanosarcina* 属と思われる特徴的な菌体凝集体を得ることに成功した。

(考察及び結論) 16S rRNA 遺伝子と *mcrA* 遺伝子からみた堆肥 65°C 培養物中の主要メタン生成古細菌叢の不一致は、好熱性古細菌 *Methanothermobacter* 属の *mcr* 遺伝子群が好中温古細菌 *Methanosarcina* 属へ水平伝播した可能性を示しており、堆肥高温発酵過程におけるメタン放出の鍵になっていると考えられる。ここでのメタン生成機構の全容解明は、メタン放出抑制技術の開発や、効率的な高温メタン発酵バイオリクター技術開発につながる可能性がある。