環境新時代におけるバイオガスプラント

酪農学園大学の物質循環システムをケーススタディーとして

宮川栄一，岡本英竜*

20 世紀における自然環境破壊の反省から，21 世紀は物質循環型社会への転換が望まれている。バイオガスプラントは，メタンガスエネルギーの生産が可能であり，処理後の消化液は肥効の高い液肥として利用でき，密閉系の反応であるため温室効果ガスの放散がない，地球環境に優しい有機物処理法として再び注目を浴びている。

温暖化，オゾン層の破壊，酸性雨，熱帯林破壊，海洋・大気・土壌の汚染など，地球あるいは地域の生態系破壊の問題が顕在化してきた。21 世紀は大量生産，大量消費，大量廃棄から，地球環境および資源・エネルギーの有限性を視野に入れた持続的・環境調和型の物質循環型社会を実現することが望まれている。最近我が国においても，種々の環境関連法案が制定・改正されている（表 1）。家畜排せつ物法では，糞尿の放置または垂れ流しを禁止するとともに，堆肥としての利用の促進を図るように，また食品リサイクル法では，大企業を対象に食品ゴミの一定割合以上を肥料や家畜飼料にするよう義務づけている。「ロンドンダンプング条約」（現 ロンドン条

約）により，自然起源以外の廃棄物の海洋投棄は 1966 年から禁止され，ほとんどの廃棄物は海洋投棄ができなくなった。

厚生省は 1997 年度に“汚泥再生処理センター”構想を発表し，従来のし尿・浄化槽汚泥の他に生ゴミや畜産廃棄物などを一緒に処理し，メタン発酵・発電によるエネルギー回収とコンポストなどを製造することを目指している⁽¹⁾。1999 年には 10 省庁・15 団体による“有機性資源循環利用推進協議会”が設置され，生ゴミ，食品産業廃棄物，家畜排せつ物，下水汚泥などの有機性資源の循環利用を促進するための基本方針を策定した⁽²⁾。このような状況下で，バイオガスプラントは環境に優しく，省エネルギー，省資源の有機性廃棄物の処理施設として注目を浴びている。

有機性廃棄物の現状と処理法

1. 有機性廃棄物の現状

家庭から出る生ゴミなどは一般廃棄物，産業活動に伴って出るゴミは産業廃棄物と呼ばれる。厚生省の調査⁽³⁾では，1997 年度における全国の一般廃棄物（し尿を除く）の排出量は 5,120 万トン，し尿が約 4,000 万トン，産業

Biogas Plant for Preservation of Environment in a New Epoch

*Eiichi MIYAGAWA, Eiryu OKAMOTO, 酪農学園大学酪農学部

表 1 ■ 最近我が国で制定・改正された主な環境関連法案

廃棄物の処理及び清掃に関する法律(廃棄物処理法)	1991 年大改正 2000 年改正
再生資源の利用の促進に関する法律(再生資源利用促進法)	1991 年制定 1993 年改正
エネルギー等の利用の合理化及び再生資源の利用に関する事業活動の促進に関する法律(省エネ、リサイクル法)	1993 年制定
容器包装に係る分別収集及び再商品化の促進等に関する法律(容器包装リサイクル法)	1995 年制定
環境影響評価(環境アセスメント)法	1997 年制定
特定家庭用機器再商品化法(家電リサイクル法)	1998 年制定
食料・農業・農村基本法	1999 年制定
家畜排せつ物の管理の適正化及び利用の促進法(家畜排せつ物法)	1999 年制定
肥料取締法の一部を改正する法律	1999 年制定
持続性の高い農業生産方式の導入の促進に関する法律	1999 年制定
循環型社会形成推進基本法	2000 年制定
資源の有効な利用の促進に関する法律(資源有効利用促進法)	2000 年制定
建築工事に係る資材の再資源化等に関する法律(建設リサイクル法)	2000 年制定
食品循環資源の再利用等の促進に関する法律(食品リサイクル法)	2000 年制定
水質汚濁防止法施行令	2001 年改正

廃棄物が 4 億 1,500 万トンである。そして、最終処分場の埋立地が満杯になるまでの全国平均年数は、一般廃棄物が 8.5 年、産業廃棄物が 3.1 年である。一般廃棄物としての厨芥(生ゴミ)は湿ベースで 3~4 割の重量を占めている⁽⁴⁾。産業廃棄物の中では汚泥の量が最も多く、全排出量の約 40 %を占める。外食産業やホテル、食品メーカーが出す生ゴミや残飯は年間で 1,900 万トンにものぼる⁽⁵⁾。また、日本で 1 年間に排出される家畜の糞尿は、9,000 万~1 億トンといわれている⁽⁴⁾。北海道における家畜糞尿の発生量は約 2,000 万トンと推定され、我が国の家畜糞尿の 2 割以上を占めている。また、それは北海道の産業廃棄物の 53 %を占める⁽⁵⁾。

2. 有機性廃棄物のバイオガスプラントによる処理

我が国では、し尿や下水汚泥は一般的には活性汚泥法で処理されているが、バイオガスプラントによる処理技術は、1930 年代から開発・実用化されてきた。1980 年代頃からは、ビール工場、砂糖工場などで製造廃水の浄化に上向流嫌気性汚泥床(UASB)法など新しい嫌気性リアクターを用いた方法が普及し、バイオガスを取得しているところが多い⁽⁶⁾。

家畜糞尿処理については、固形物は堆肥化、液体部分は活性汚泥中での曝気というのが一般的であるが、これも 1980 年代以後のヨーロッパで盛んになったバイオガスプラントによる処理法が、我が国においても新たに注目を集めている⁽⁷⁾。

生ゴミ、残飯などは、その中間処理の一つとして焼却が行なわれているが、ダイオキシンの生成が問題となっている。ゴミのメタン発酵処理は比較的新しいテーマで、実用プラントは 1985 年に米国ウェストマネジメント社がフロリダ州に建設したのが始まりである⁽⁸⁾。日本では、固形有機性廃棄物(主に家庭生ゴミ)に関して“サンシャイン計画”において取り上げられたが、今日まで本格的な実用化には至っていない。最近は前述のように、家庭生ゴミ、し尿、家畜糞尿、種々の有機性廃棄物を混合処理する発酵施設が建設されている⁽¹⁾。

筆者らは、家畜→糞尿の排出→糞尿(食堂、寮などの生ゴミなども含む)のバイオガスプラントによる処理→消化液の圃場への散布→牧草の収穫→家畜への投与と、酪農学園大学内における物質循環システムの構築を目指しており、その一環として、バイオガスプラントを建設し、実用レベルでの研究を開始した⁽⁷⁾。

バイオガスプラントの特性

1. メタン発酵処理の特徴

有機物のメタン発酵による処理法には以下の特徴がある^(4,9)。

①環境負荷が少ない：二酸化炭素、亜酸化窒素などの温室効果ガス、酸性雨の原因の一つであるアンモニアの揮散が非常に少ない。

②省エネルギー、省資源である：活性汚泥法のように曝気を必要とせず、余剰汚泥の発生も少ない。高カロリーのバイオガス(一般に容積割合で、メタンが 60 %、二酸化炭素が 40 %で、ごく微量の硫化水素、水素、窒素などを含む)が得られる。メタンガスは 1 m³ 当たり 9,500 kcal の発熱量をもつので、メタン濃度が 60 %であればバイオガス 1 m³ 当たりの熱量は約 5,700 kcal と都市ガスなみであり、化石エネルギーの使用量を削減できる。

③消化液は悪臭が少なく肥効の高い液肥になる：N、P、K がほとんど消失せず、化学肥料の使用を低減できる。また、糞尿中の雑草種子、有害微生物が死滅する(特に高温発酵)。

欠点としては、施設の建設など初期投資が大きいこと、容量がほとんど減少せず、液肥を利用できる圃場(草地・畑地など)が必要であること、などの点が挙げられる。

2. バイオガスプラントの構成

酪農学園大学のバイオガスプラントを図 1 に示す。原

3. バイオガスの発生量

バイオガスは成分からみると、脂肪からのガス発生量が最も多く (1,250 ml/g)、かつメタン濃度も高い (68%)。タンパク質から発生するガスもメタン濃度が高い

図2 ■脱硫バイオフィルターの模式図

図3 ■有機物の嫌氣的分解

①酸生成細菌、②水素生産性酢酸生成細菌（嫌気共生細菌を含む）、③水素資化性メタン生成細菌あるいは水素資化性硫酸還元細菌、④酢酸分解性メタン生成細菌あるいは酢酸酸化硫酸還元細菌

が (71%)、ガス発生量は少ない (704 ml/g)。炭水化物はガス発生量 (790 ml/g) もメタン濃度も少ない (50%)^(1,15)。廃棄物トン当たりのバイオガス発生量は、牛糞尿 10~30 m³、豚糞尿 32~48 m³、鶏糞 66~110 m³、し尿 8~10 m³、下水汚泥 5~7 m³、残飯 176 m³ という報告がある⁽¹⁾。本学の発酵槽は混合攪拌方式であり、容量は 250 m³、乳牛糞尿が連続式で毎日約 10 m³ ずつ投入されており、約 25 日間の滞留時間である。36~38℃の中温発酵で、1 日当たりメタン濃度約 55% のバイオガスがおよそ 250 m³ 得られている。また、バイオガスからの発電では約 400 kWh/日の電力が得られ、付属農場の使用電力を上回り、余剰の電力は大学内で使用している。今後は、本学で発生する他の家畜糞尿（豚、鶏）、食用廃油、生ゴミなどを混入して発酵させた際のバイオガス発生量やメタン濃度の推移を調査する計画である。

メタン発酵と微生物

1. メタン発酵は種々の微生物の共同作業^(16~19)

嫌気発酵槽において微生物は複雑な生態系を形成しており、有機物の嫌気分解は微生物の共同作用によって可能となる(図3)。炭水化物、タンパク質や脂質などの高分子物質は酸生成細菌（通性および偏性嫌気性細菌）による加水分解によって低分子化し、その後、酢酸、プロ

表 2 ■ メタン生成細菌の分類 (5 目 11 科 26 属 79 種)

Methanobacteriales	大部分グラム陽性，細胞壁：擬ムレイン構造		
Methanobacteriaceae			
<i>Methanobacterium</i>	桿菌	8 種	H ₂ , (for, iP, iB)
<i>Methanobrevibacter</i>	桿菌	7 種	H ₂ , (for)
<i>Methanosphaera</i>	球菌	2 種	H ₂ +メタノール
<i>Methanothermobacter</i>	桿菌，55～65℃で速く生育	6 種	H ₂ , (for)
Methanothermaceae			
<i>Methanothermus</i>	桿菌，80～88℃の至適温度	2 種	H ₂
Methanococcales	グラム陽あるいは陰性，細胞壁：タンパク質構造，海洋性		
Methanococcaceae			
<i>Methanococcus</i>	球菌	4 種	H ₂ , for
<i>Methanothermococcus</i>	球菌，60～65℃の至適温度	1 種	H ₂ , for
Methanocaldococcaceae			
<i>Methanocaldococcus</i>	球菌，80～85℃の至適温度	4 種	H ₂
<i>Methanotorris</i>	球菌，88℃で生育	1 種	H ₂
Methanomicrobiales	グラム陰性，細胞壁：大部分タンパク質構造		
Methanomicrobiaceae			
<i>Methanomicrobium</i>	桿菌	1 種	H ₂ , for
<i>Methanoculleus</i>	球菌	6 種	H ₂ , for, (iP, iB, cPe)
<i>Methanofolius</i>	球菌	2 種	H ₂ , for, (iP, iB, cPe)
<i>Methanogenium</i>	球菌	4 種	H ₂ , (for, iP, iB, cPe)
<i>Methanolacinia</i>	桿菌	1 種	H ₂ , (iP, iB, cPe)
<i>Methanoplanus</i>	プレート状	3 種	H ₂ , for
Methanocorpusculaceae			
<i>Methanocorpusculum</i>	球菌	4 種	H ₂ , for, (iP, iB)
Methanospirillaceae			
<i>Methanospirillum</i>	ラセン状	1 種	H ₂ , for
不 明			
<i>Methanocalculus</i>	球菌，耐塩性	1 種	H ₂ , for
Methanosarcinales			
Methanosarcinaceae			
<i>Methanosarcina</i>	小荷物状球菌	6 種	Me, (ac, H ₂)
<i>Methanococcoides</i>	球菌	2 種	Me
<i>Methanohalobium</i>	球菌，中度好塩性	1 種	Me
<i>Methanohalophilus</i>	グラム陰性球菌，中度好塩性	3 種	Me
<i>Methanolobus</i>	グラム陰性球菌	5 種	Me, (MeS)
<i>Methanosalsum</i>	グラム陰性球菌	1 種	Me, MeS
Methanosaetaceae			
<i>Methanosaeta</i>	グラム陰性糸状	2 種	ac
Methanopyrales	グラム陽性，細胞表層：擬ムレイン構造		
Methanopyraceae			
<i>Methanopyrus</i>	桿菌，100℃以上で生育	1 種	H ₂

『Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd ed.』(2001 年)の記載をもとに作成した。基質: H₂(水素ガス), for(蟻酸), iP(イソプロパノール), iB(イソブタノール), cPe(シクロペンタノール), Me(メタノール, メチルアミン, ジメチルアミン, トリメチルアミンのようなメチル化 C₁ 化合物), ac(酢酸), MeS(ジメチルサルファイドあるいはメタンチオール)

ピオン酸, 酪酸, 吉草酸などの低級脂肪酸やアルコール類に分解され, 水素や二酸化炭素が生成する。生成した酢酸以外の有機酸やアルコール類は, 水素生産性酢酸生成細菌により酢酸と水素に分解される。一部の水素生産性酢酸生成細菌は, H₂ を利用する他の細菌(メタン生成細菌や硫酸還元細菌)と共存することなしには生育できない嫌気共生細菌である。いずれにせよ, 水素は最後に水素資化性メタン生成細菌や水素資化性硫酸還元細菌によってメタンや硫化水素に変換される。また, 酢酸は主に酢酸分解性のメタン生成細菌によって, メタンと二

酸化炭素に分解される。嫌気発酵槽では生成メタンの 60~80 % は酢酸に由来するとされている。

メタン生成細菌は Archaea (古細菌) に属し, 『Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1989 年)』では 3 目 6 科 13 属 45 種が記載されていたが, 改訂版(2001 年)では 5 目 11 科 26 属 79 種が記載されている(表 2)⁽²⁰⁾。この表からわかるように, メタン生成細菌は蟻酸, 酢酸, メタノール, メチルアミン, 硫化メチルや水素ガスと二酸化炭素などからメタンガスを生成する細菌である。純培養のメタン生成細菌の至適 pH は一

般に6.5~7.8の範囲にあり、メタン菌が生育するには-0.33 V以下の酸化還元電位を必要とする。酢酸分解性のメタン生成細菌は*Methanosarcina*属および*Methanosaeta*属に属する菌種に限られる。

2. メタン発酵プロセスのモニタリング

有機物の高負荷あるいは滞留時間の不足、無機あるいは有機物の毒性物質、温度変化および基質の変化などにより、発酵槽は発酵異常となる。嫌気発酵槽の発酵異常を検出するインジケータとしてガス産生量、メタン濃度、CO濃度、水素濃度、pH、VFA(揮発性脂肪酸)濃度、プロピオン酸/酢酸(正常は1.4以下)などの他、種々のものがある^(14,21)。理想的なインジケータは、測定が容易で、オンラインで測定でき、発酵槽における微生物代謝の悪化を早期に検出できるものが望ましい。発酵材料、発酵槽の違いなどによりインジケータの基準値はそれぞれ異なるので、個々の発酵槽について、これらの値を求める必要がある。

3. 嫌気発酵槽における微生物群集の研究動向

嫌気発酵槽の微生物については、ルーメン微生物の培養で最初に使用された嫌気性ロールチューブ法を用いて研究がなされ、多くの知見が得られている^(16,19)。しかし、土壌、水系、ルーメンなどの自然微生物系の場合と同様に、嫌気発酵槽においても多くの微生物が培養できていない。また、メタン生成細菌などを純粋分離し、微生物構成を明らかにするには、多くの時間と手間が必要である。そのため、1つの発酵槽での培養による細菌群集の系統的な研究は、ほとんどなされていない。

1990年代になって、分子生物学的手法による微生物生態研究(図4)が土、水系、腸内、ルーメン内など種々の系で成果を上げており^(22~24)、嫌気発酵槽における報告もみられる。Sekiguchiら⁽²⁵⁾は16S rDNA クローンライブラリーを構築し、中温性および高温性UASBリアクターの顆粒汚泥の微生物多様性について調べ、高温のほうが中温より単純であり、高温ではProteobacteria δサブクラス*1に関連するクローンは得られなかったが、中温では優勢なグループであることを報告している。Raskinら⁽²⁶⁾は、メタン生成細菌の複数の属または科を識別する7種類のプローブをデザインし、嫌気消化槽におけるメタン生成細菌のスロットプロットハイブリダイゼーション*2による定量を行ない、*Methanosaeta*属と*Methanosarcina*属が最も優勢な構成菌種であるという結果を得ている。

生物がもつDNAまたはRNA鎖のうち、その生物の

図4 ■ 微生物群集の構成および機能の解析 (Muyzer & Smalla (1998) の図を修正)

特異的な部分に対する相補的な塩基配列(プローブ)を用意して蛍光色素で標識し交雑させることで、その生物を検出する方法として、FISH (fluorescence in situ hybridization)法⁽²²⁾が知られている。この方法を用いて、固定床バイオリアクターにおける硫酸還元細菌の検出⁽²⁷⁾、UASB顆粒汚泥中においてプロピオン酸分解に働く嫌気共生細菌の検出⁽²⁸⁾、UASBの中温および高温顆粒(グラニュール)中のメタン生成細菌などの検出⁽²⁹⁾が行なわれており、当該菌の分布状況などが明らかにされている。

DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)法^(23,24)は、試料より抽出した微生物群集のDNAから16S rDNA断片をPCR増幅し、その増幅切片を変性剤の濃度勾配をもつポリアクリルアミドゲル中で電気泳動

*1Proteobacteria δサブクラス: 16S リボソーム DNA の塩基配列の違いにより分けられた細菌群の一つで、硫酸還元細菌、嫌気共生細菌が含まれる。

*2スロットプロットハイブリダイゼーション: DNA あるいは RNA をナイロン膜などにスロット状に吸着させた後、これに標識したプローブで反応させ、ハイブリッド形成をスポットの濃さにより観察、定量する方法。

図 5 ■ 発酵温度の異なる乳牛糞尿発酵槽におけるメタン生成菌の DGGE 法による解析

上は Archaea, 下は真正細菌のユニバーサルプライマーを用いて PCR 増幅した。A : 20°C 発酵, B : 37°C 発酵, C : 37°C 発酵で B とは別のプラント, D : 55°C 発酵。( ) 内は相同性を示す。

し、得られるバンドパターンの解析を行なうものである。電気泳動後、検出されたバンドを切り出し、塩基配列を調べることで当該細菌を推定できる。小林⁽³⁰⁾は、北海道で稼働している、発酵温度の異なる乳牛糞尿嫌気発酵槽中の細菌群構成を DGGE 法で解析した。Archaea および真正細菌に対する 16S rDNA ユニバーサルプライマーを PCR 増幅させて電気泳動を行なった結果、共通するバンドの他に、バイオガスプラントごとに異なったバンドも検出され、微生物構成が相違することが示唆された。Archaea のバンドを切り取り、塩基配列を決定したところ、低温、中温発酵槽では *Methanobrevibacter smithii* と、また高温発酵槽では *Methano-*

bacterium thermoautotrophicum と高い相同性を示すバンドが検出された(図 5)。現在のところ、酢酸分解性メタン生成細菌のバンドは検出されておらず、嫌気発酵槽においてメタンの大部分が酢酸由来であるという報告と矛盾が生じている。マーカーに使用した酢酸分解性メタン生成細菌の *Methanosaeta concilii*, *Methanosarcina barkeri* の培養菌株ではバンドが検出されており、DNA 抽出法などに問題があったとは考えていない。

DGGE 法は、DNA 抽出からバンドの塩基配列決定まで、約 3 日間で調べられるので、発酵槽の主要な微生物構成を比較的迅速にモニターできると思われる。研究はまだ始まったばかりであり、今後は上記の方法以外に、

T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphisms) 法, 定量的 PCR 法などを組み合わせることが必要であろう。分子生物学的手法には, いくつかのバイアスが生じる可能性はある⁽²²⁻²⁴⁾が, FISH 法や培養法の結果と重ねることにより, 発酵槽の微生物構成をより反映した結果が得られるものと考え, 機能遺伝子(たとえば酢酸からのメタン生成過程の中心的酵素メチル-S-Co デヒドロゲナーゼ)の分子生物学的手法による応用⁽²⁴⁾, 培養法の改良とあいまって, 嫌気発酵槽における微生物の構成および動態が明らかとなれば, 発酵槽のバイオガス生産量の向上や発酵の安定性増強などに役立つであろう。

バイオガスプラントの今後

これまで述べてきたように, バイオガスプラントは環境保全と資源循環, さらにエネルギー対策も包括したシステムであるが, 我が国でバイオガスプラントを普及させるには, 施設の建設コストの低減, 回収したバイオガスの有効利用, 売電, 発酵消化液の積極的利用, さらに運搬・流通方法, 圃場への散布法など, 地域に合った循環システムの構築が必要になる⁽⁷⁾。前述のように, 現在, 畜産も含めた地域の廃有機資源を混合してメタン発酵を行なう集中型大規模施設が注目されている。ここの検討課題は, 投入する種々の有機性廃棄物が固形物であればどのように破碎するか, あるいは加熱消毒の必要性の有無など, 前処理についてである。また, どのくらいの混合比でメタン発酵槽に投入すればバイオガス発生量やメタン濃度が最大になるのか, さらに, 発酵消化液の肥料成分の情報提供も必要と思われる。大型施設では, 有機性廃棄物を発酵させてメタンを作り, 燃料電池で発電して電力を得るとともに, 同時に熱も冷暖房に利用するようなことも考えられる⁽³¹⁾。また, メタンガスから特殊な触媒を使って水素やベンゼンを生産する実証プラントも稼動し始めたと聞く。これらの技術が低価格で実現すれば, バイオガスプラントは将来的に地域における重要なインフラとなる可能性がある。しかし, バイオガスプラントの普及に際しての最も大きな隘路は, 消化液を還元できる圃場が確保できるかどうかであろう。

文献

- 1) 森田 昭, 竹野勝彦, 坂上正美: “生物系廃棄物資源化・リサイクル技術”, エヌ・ティー・エス, 2000, p.3, 13, 56.
- 2) 樋口太重: 農業および園芸, **76**, 437 (2001).
- 3) 石川禎昭: “新ごみ教養学なんでも Q&A”, 中央法規, 2000.
- 4) 芝崎 勲(監): “有害微生物管理技術II巻”, フジ・テクノシステム, 2000, p.667, 720, 797.

- 5) 岩村清光: ぐらーす, **44**, 14 (2000).
- 6) 上木勝司, 永井志郎(編著): “嫌気微生物学”, 養賢堂, 1993, p.265.
- 7) 北海道バイオガス研究会: 北海道におけるバイオガスシステムを考える, 2000, p.1, 5, 9.
- 8) D. Riggle: *BioCycle*, November, 1996, p.77.
- 9) 高畑英彦: 畜産コンサルタント, **362**, 21 (1995).
- 10) 李 玉友: 水環境学会誌, **21**, 644 (1998).
- 11) J.A. Oleszkiewicz & H.M. Poggi-Varaldo: *J. Environ. Engr.*, **123**, 1087 (1997).
- 12) A.B. Jensen & C. Webb: *Enzyme Microb. Technol.*, **17**, 2 (1995).
- 13) 落合 綾: バイオガス中硫化水素を低減する細菌の分離, 酪農学園大学 2000 年度卒業論文.
- 14) 岡本英竜, 宮川栄一: “21 世紀の酪農を考える”, 酪農学園大学エクステンションセンター, 2001, p.18, 115.
- 15) 益田光信: タクマ技法, **7**, 68 (1999).
- 16) P.N. Hobson & A.D. Wheatley (ed.): “Anaerobic Digestion, Modern Theory and Practice”, Elsevier Applied Science, 1993, p.7.
- 17) 鎌形洋一, 中村和憲, 三上栄一: “微生物の共生学”, 微生物の生態 **21**, 学会出版センター, 1995, p.83.
- 18) J.M. Odom & R. Singleton Jr. (ed.): “The Sulfate-Reducing Bacteria: Contemporary Perspectives”, Springer-Verlag, 1993, p.131, 161.
- 19) J.G. Ferry (ed.): “Methanogenesis”, Chapman & Hall, 1993, p.128.
- 20) D.R. Boone, R.W. Castenholz & G.M. Garrity (ed.): “Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd ed., Vol.1”, Springer-Verlag, 2001, p.211, 353.
- 21) B.K. Ahring & I. Angelidaki: Proc. 8th International Conf. Anaerobic Digestion, Vol. 1, 1997, p.40.
- 22) R.L. Amann, W. Ludwig & K.-H. Schleifer: *Microbiol. Rev.*, **59**, 143 (1995).
- 23) G. Muyzer & K. Smalla: *Antonie van Leeuwenhoek*, **73**, 127 (1998).
- 24) 渡辺一哉, 二又裕之: 化学と生物, **38**, 230 (2000).
- 25) Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, K. Syutsubo, A. Ohashi, H. Harada & K. Nakamura: *Microbiology*, **144**, 2655 (1998).
- 26) L. Raskin, L.K. Poulsen, D.R. Noguera, B.E. Rittmann & D.A. Stahl: *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1241 (1994).
- 27) R.I. Amann, J. Stromley, R. Devereux, R. Key & D.A. Stahl: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 614 (1992).
- 28) H.J.M. Harmsen, H.M.P. Kengen, A.D.L. Akkermans, A. J.M. Stams & W.M. de Vos: *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1656 (1996).
- 29) Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, K. Nakamura, A. Ohashi & H. Harada: *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1280 (1999).
- 30) 小林功幸: 家畜ふん尿メタン発酵における細菌群構成の DGGE 法による解析, 酪農学園大学酪農学研究科 2000 年度修士論文.
- 31) 笛木和雄: 現代化学, No. 350, 16 (2000).