

メタン発酵消化液を利用した植物栽培及び養液の微生物解析

長岡技科大院・工（学）○檜木淑恵, (正)幡本将史, (正)山口隆司, (非)牧慎也, 新居浜高専（非）中村啓人

1. はじめに

微生物を用いた有機性廃棄物処理の方法の一つに、メタンガスをエネルギー源として回収できるメタン発酵法が挙げられる。このメタン発酵法では、メタン発酵後に高濃度の窒素などを含むメタン発酵消化液が発生し、これを処理する必要がある。一方で、メタン発酵消化液は植物生育に不可欠な窒素等の栄養素を多く含んでいることから、肥料として農地還元する事例が広まっている。メタン発酵消化液中に含まれる窒素形態はその多くがアンモニア態窒素である。アンモニア態窒素は他の無機態窒素と比べると植物による吸収が速いため、即効性のある肥料として用いることができる。その反面、好アンモニア性植物ではない野菜、果実等に対しては、高濃度のアンモニアによる生育阻害（アンモニア障害）を起こすことが知られている。そのため、メタン発酵消化液は好アンモニア性植物ではない農作物に対して化学肥料の代替品として用いることができない。

そこで本研究では、DHS (Down-flow Hanging Sponge) リアクターを用いて、メタン発酵消化液中のアンモニアを硝化反応により硝酸へ転換することで、アンモニア濃度を低減させたメタン発酵消化液（以下、DHS 消化液）を作成した。アンモニア濃度を低減させた消化液および市販液肥を用いて植物の水耕栽培を行った。各養液の比較を行うため、植物の生育測定及び微生物群集構造解析を行い、消化液の肥料としての効果を検討した。

2. 実験方法

2.1 植物栽培条件

植物栽培には好アンモニア性植物ではない農作物としてハウレンソウを用いた。ハウレンソウは露地水耕栽培を行い、雨や空気中のホコリなどを防ぐために透明なビニルで覆いをした。実験期間はハウレンソウが苗から成長し、薹が立つまでの49日間とした。液肥には、図1に示すDHS リアクターにより硝化を行ったDHS 消化液と市販液体肥料のハイポニカ(協和株式会社)を用いた。DHS 消化液は20倍希釈したものと、20倍希釈をしたものに植物の成長促進を目的として硝酸マグネシウム七水和物、硝酸カルシウム四水和物、リン酸二水素カリウムをハイポニカの2.5倍量になるように添加したもの（調整消化液）を用意した。栽培に用いたDHS 消化液及び調整消化液は、フミン酸の蓄積を防ぐため2週間に1回、養液の交換を行った。葉色は葉緑素計 (SPAD-502Plus, コニカミノルタ) を用いて測定した。

2.2 微生物群集構造解析

栽培後のハイポニカ、DHS 消化液、調整消化液を採取し、DNA抽出を行った。DNA抽出にはFastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedical 社) を用いた。得られたDNAを鋳型として16S rRNA 遺伝子のV4領域を含む部分を対象としたUniv515F-Univ806Rプライマーセットを用いてPCR増幅反応を行った。得られたPCR増幅産物はQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社) で精製を行った。超並列次世代シーケンシングには、

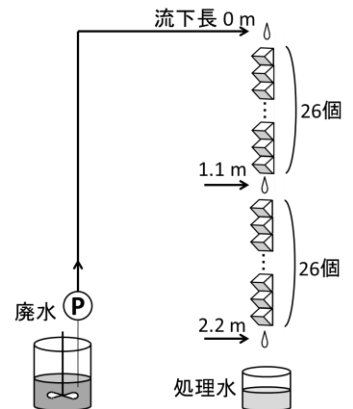


図1 DHS リアクターの概要

キーワード メタン発酵消化液 DHS リアクター 水耕栽培 微生物

〒940-2136 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学 工学研究科 環境社会基盤工学専攻 水圏土壌環境研究室 TEL: 0258-47-1611 (内線 6646) E-mail: s133282@stn.nagaokaut.ac.jp

DNA シークエンサーMiseq システム (Illumina 社) を用いた。得られた 16S rRNA 遺伝子配列情報は、QIIME ソフトウェアを用いて解析した。系統分類には、Greengenes ver. 13_8 のデータベースを用いた。

3. 結果及び考察

3.1 養液栽培の生育評価

各養液で栽培したハウレンソウの栽培 49 日目の写真を図 2 に示す。ハイポニカ, DHS 消化液, 調整消化液で育てたハウレンソウを比べると, DHS 消化液で栽培したハウレンソウの成長が悪いことが分かる。表 1 に各養液で栽培したハウレンソウの生育状況を示す。調整消化液, ハイポニカで栽培したハウレンソウは葉丈, 葉数において有意差が出ていない。しかし, ハウレンソウの重量はハイポニカで 26.8 g, 調整消化液で 21.9 g とハイポニカで栽培したハウレンソウの方が 5 g 重い。さらに, 葉緑素含量はハイポニカで 42.3 SPAD, 調整消化液で 44.6 SPAD と調整消化液で栽培したハウレンソウの方が多く葉緑素が含まれている。また, DHS 消化液で栽培したハウレンソウの葉丈, 葉数, 重量のすべてにおいてハイポニカ, 調整消化液で栽培したハウレンソウよりも値が低かった。しかし既存の問題であったアンモニア障害の代表的な症状である葉の黄色化は見られなかった。したがって, DHS 消化液は, ハウレンソウのアンモニア障害を防ぐことができたことと示唆された。

3.2 微生物群集構造解析

図 3 に各養液における目レベルの微生物群集構造解析結果を示す。各養液を構成する優占微生物群は *Sphingobacteriales* 目 (ハイポニカ: 38.8%, DHS 消化液: 61.9%, 調整消化液: 55.8%), *Burkholderiales* 目 (ハイポニカ: 10.9%, DHS 消化液: 9.3%, 調整消化液: 12.2%), *Bdellovibrionales* 目 (ハイポニカ: 11.5%, DHS 消化液: 3.2%, 調整消化液: 4.3%), *Cytophagales* 目 (ハイポニカ: 9.7%, DHS 消化液: 4.4%, 調整消化液: 3.0%) であり, 各養液は同様の傾向を示した。ハイポニカと調整消化液は同一の優占微生物群の順で検出されたのに対し, 消化液は優占微生物群の順が前後した。しかし, *Bdellovibrionales* 目のようにハイポニカと調整消化液の優占微生物群は検出率が異なっており, 調整消化液と消化液の方が似た検出率の優占微生物群を持つ。一方, *Pseudomonadales* 目 (ハイポニカ: 0.3%, DHS 消化液: 3.1%, 調整消化液: 0.8%) のようにハイポニカと調整消化液で検出率が似た微生物群も検出された。今回, 調整消化液とハイポニカのハウレンソウの生育が良好であった。したがって, DHS 消化液と調整消化液, ハイポニカ間で検出率が大きく異なっているような微生物群がハウレンソウの成長を左右しているのではないかと示唆された。

4. まとめ

栽培 49 日目において調整消化液で栽培したハウレンソウの成長はハイポニカで栽培したものと葉丈, 葉数に有意差がなかった。また, 既存の問題であるアンモニア障害は回避できた。微生物群集構造解析を行った結果, 各養液を構成している優占微生物群はほぼ同一であったが, 16S rRNA 遺伝子検出率は養液により差が見られた。



(左からハイポニカ, DHS 消化液, 調整消化液)

表 1 ハウレンソウの生育状況

培養液	葉丈(cm)	葉数(枚)	重量(g)	葉緑素含量 (SPAD)
ハイポニカ	15.3±1.3	14±0	26.8±0.5	42.3
消化液	12.4±0.8	12±0	10.3±0.4	46.4
調整消化液	15.8±0.4	13.3±0.9	21.9±0.3	44.6

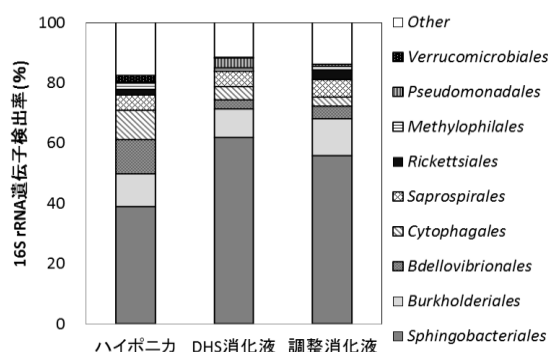


図 3 微生物群集構造解析結果