

硝酸性窒素の分解に寄与する微生物群集構造の解析

長野高専 環境都市工学科 非会員 依田 ゆかり
同上 正会員 畠 俊郎

1. はじめに

近年、農用地などを中心に硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素（以下、硝酸性窒素とする）による地下水汚染が増加して大きな社会問題となっている。硝酸性窒素を分解する技術として微生物機能を活用する方法が開発され、実証試験によりその有効性が確認されている¹⁾。しかしながら、原位置において分解に関与している微生物については十分な知見が得られていないのが現状である。硝酸性窒素による地下水の汚染原因は多岐にのぼるが、なかでも高い割合を占める農地における施肥に着目した。本研究では、農地において硝酸・亜硝酸に汚染された地下水を微生物機能により安価に浄化する技術について検討している。本文では、研究の第一段階として実施した長野県内の農地で採取した土壌を微生物源とした液体培養試験の結果を報告する。具体的には、培養期間中の硝酸性窒素濃度変化および PCR-DGGE 法による微生物群集構造解析の結果について述べる。

2. 研究の概要

2-1. 培養試験の概要

硝酸性窒素を分解する微生物は数多く報告されているが、本研究では有機物の添加が不要であるとともに、固体硫黄とカルシウムを利用して硝酸性窒素の分解と硫酸カルシウム（石膏）の生成を同時に行う硫黄脱窒菌に着目した。農地で採取した土壌から硫黄脱窒菌を優先化させるために、下水処理場の返送汚泥から硫黄脱窒菌を優先化させた既存の研究²⁾を参考に表-1に示す培地を選定した。培養は125mL容のバイアル瓶に培地50mlおよび農地土壌0.5gを添加し、ブチルゴムにて密栓した。これらのサンプルを37℃の条件で21日間培養し、7日目と21日目でサンプリングを行った。分析項目としてイオンクロマトによる硝酸イオン分析およびV3領域を対象としたPCR-DGGE法を選定した。

2-2. DNA解析について

本実験で用いた遺伝子解析の流れを図-1に示す。

培養サンプルからのDNA抽出法は、対象に添加している土壌の影響を考慮し、3000rpmで30分間遠心分離を行って回収した沈殿物を用いたISOIL for Beads Beatingとした。なお、上澄はイオンクロマトによる硝酸イオンの分析に用いた。抽出後のDNAサンプルを対象に、16SrDNAをターゲットとしたPCRを行った。PCRの温度条件は、94℃4分、94℃15秒、53℃15秒、72℃30秒を33回サイクルし、72℃を10分の後、4℃維持とした。なお、プライマーはGC-341fと534rとした。PCR産物を2%アガロース、100V、25分の条件で泳動し、EtBrで15分間染色して確認した。PCR産物を確認できたものについて、DGGEによる群集構造解析を行った。泳動条件は、55V、120分とし、アクリルアミドゲルの濃度は30~60%にした。

表-1 培地組成

Composition of medium	
Na ₂ HPO ₄	0.6 g
KH ₂ PO ₄	0.9 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.05 g
CaCl ₂	0.015 g
FeCl ₃	0.017 g
MnSO ₄	0.011 g
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	5.00 g
NaHCO ₃	0.25 g
KNO ₃	2.5 g
Distilled Water	500.00ml



図-1 遺伝子解析の流れ

3. 実験結果および考察

3-1. 硝酸イオン分析結果

培養期間における硝酸イオン濃度の推移を図 - 2 に示す。培養開始から 7 日目にかけて硝酸イオンの顕著な減少が認められ微生物活動による分解が期待できる結果が得られた。その後、21 日にかけては若干の濃度減少にとどまっていることから、培養液中に含まれる微生物群集が変化していると考えられた。微生物群集構造の変化を詳細に検討するため、DNA 解析を実施した。

3-2. DNA 解析結果

ユニバーサルプライマーを用いた PCR の泳動結果を図 - 3 に示す。初期土壌から抽出した DNA を鋳型とした PCR では良好な増幅が認められ、抽出法の有効性を確認することができた。培養開始から 7 日後については初期土壌よりも PCR 産物が少ない傾向が認められた。この理由としては、培地に添加した土壌に由来する硫黄脱窒細菌が十分に増殖していないことが考えられる。さらに、21 日後については初期土壌と同量程度の PCR 産物を確認することができた。PCR 産物が増加しているにもかかわらず硝酸イオンの分解速度が低下していることから、DGGE による群集構造解析を行った。結果を図 - 4 に示す。培養初期には不検出であったバンドが 7 日目には検出可能となり 21 日目には再び不検出となった。以上より、硝酸イオン濃度の変化と同じ傾向を持つ微生物の存在を確認した。バンドについては、培養 7 日目から 21 日目にかけて顕著な増加が認められた。以上のことは培養日数の増加に伴い主要な微生物が変化することを表していると考えられる。また、培養初期には不検出であったバンドは培養日数の増加とともに増殖することが確認された。

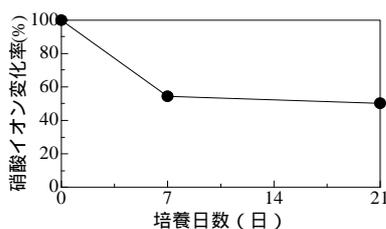


図 - 2 硝酸イオン濃度の推移

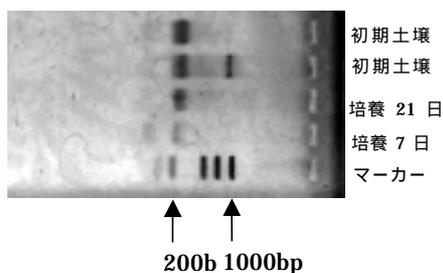


図 - 3 PCR 産物の確認

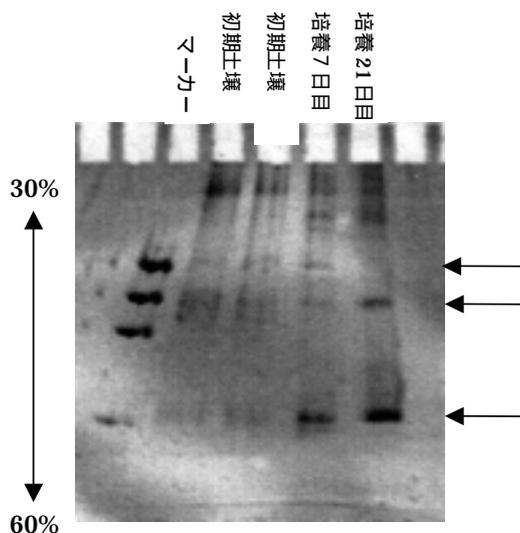


図 - 4 DGGE の泳動結果

4. まとめ

農地土壌を用いた硫黄脱窒細菌の培養試験を実施し、PCR-DGGE 法による微生物群集構造と硝酸イオン濃度の推移をモニタリングした。主要な結果を以下に示す。

農地土壌の環境を整えることで硝酸性窒素分解菌（硫黄脱窒細菌）の増殖を促進できる。

7 日間にかけて硝酸イオンの分解が顕著に起こるが、その後分解速度は低下する。

硝酸イオン濃度の変化と関連性を持つ微生物の存在を PCR-DGGE 法に確認した。

今後は、培養日数の増加とともに変化した主要な微生物の塩基配列決定による同定や土壌サンプルでの追加実験を行い農地における安価な処理技術として確立できるよう検討を進めていきたい。

(参考文献)

- 1) 硝酸性窒素浄化技術開発普及等検討会；平成 16 年度硝酸性窒素浄化技術開発普及等調査実証技術評価報告書，平成 17 年 6 月
- 2) 山田早恵香，末政直晃，長岡裕，野村栄治：硝酸性窒素による地下水汚染の原位置浄化に関する基礎的実験，第 32 回土木学会関東支部技術研究発表会