

B-29 未利用バイオマス混合土壌層を用いた窒素除去における硫酸塩還元細菌の役割

○天倉 和也¹・高井 淑恵²・池本 良子^{1*}・高野 典礼³

¹金沢大学大学院自然科学研究科 (〒920-1192 石川県金沢市角間町)

²燐化学工業株式会社 (〒934-8534 富山県射水市新堀34番地)

³石川工業高等専門学校 環境都市工学科 (〒929-0392 石川県河北郡津幡町北中条1)

* E-mail: rikemoto@t.kanazawa-u.ac.jp

1. はじめに

現在、硝酸性窒素の流出による湖沼や貯水池の富栄養化、地下水・表層水などの汚染が広範囲で起こっている。硝酸性窒素は、過度の施肥により農耕地や水田などから流出し、発生源が広範囲なために、制御が困難であることが問題となっている。

筆者らは、畑地からの施肥由来の窒素の流出抑制方法として、畑地の土壌下層部に微生物付着担体として木炭を、有機物として間伐材を充填する方法が有効であることを報告している¹⁾。さらに、本方式では、土壌中に増殖した硫酸塩還元細菌と硫酸脱窒細菌が重要な役割を果たしていることを示した。しかし、この方法では、農地を掘り起こして整備する必要があることから、大規模な改修工事を伴うこととなる。これを解決する手法として、農地と河川又は排水路の間に、人工的に浄化用の田畑や湿地を設置して、土壌や植物を利用した水質浄化を行う方法が有効であると考えられる。そこで、筆者らは、既存の農地から排水路に流出した窒素を除去する方法として、間伐材と木炭を混合した土壌層を用いる方法を提案し、実験的検討を行うことにより、杉間伐材よりも広葉

樹間伐材が有効であること²⁾、間伐材を脱窒条件で事前培養した間伐材を用いることにより、除去速度が向上されることを報告した³⁾。しかし、脱窒機構については不明な点が多いことから、明確にする必要がある。本研究では、間伐材を充てんした土壌カラム内の土壌層各部位について、微生物活性を測定するとともに、各部位に生育する硫酸塩還元細菌を群集解析により明らかにし、窒素除去のメカニズムを検討した。

2. 実験方法

(1) 実験に用いた土壌カラム

実験に用いた土壌層は、窒素除去の検討を行った実験装置を使用した。窒素除去実験には図1に示す土壌カラム4本を用いた。各カラムに、赤玉土400gと腐葉土80g、および木炭15gを混合したものを充填した。さらに、カラム2には広葉樹の間伐材を約1Lの純水に一晩浸し、その後ザルで水分を切ったものを混合し充填した。カラム3には、同じ間伐材を脱窒細菌を増殖させた後、ザルで水分を切って充填した。カラム4には、同じ間伐材を硫酸塩還元細菌を増殖させた後、ザルで水分を切って充填

表1 人工排水路水の組成

成分	濃度(mg/L)
KNO ₃	5
NaNO ₃	20
Mg(NO ₃) ₂ ・6H ₂ O	200
CaCl ₂	150
K ₂ SO ₄	30
Na ₂ SO ₄	150
MgSO ₄	50
Na ₂ HPO ₄ ・12H ₂ O	1.5

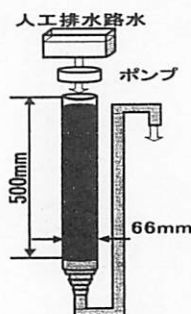


図1 実験装置

表2 土壌カラムの条件

カラムNo.	赤玉土(g)	腐葉土(g)	木炭(g)	間伐材
1				
2	400	80	15	約1L
3				約1L(注1)
4				約1L(注2)

(注1) 脱窒細菌を三角フラスコ内で

予め6ヶ月間増殖させた間伐材チップ約1L

注2) 硫酸塩還元細菌を三角フラスコ内で

予め6ヶ月間増殖させた間伐材チップ約1L

した。これらのカラムを20℃の恒温室内に設置し、カラム上部から人工水路水（表1）を滴下した。

(2) 微生物活性の測定

実験終了後、カラム2~4を解体し、カラム内に存在した間伐材を用いて以下のように回分実験を行った。耐熱ビンに間伐材を湿潤重量で約25g詰め、基質を窒素パージした後90ml注入した。耐熱ビン中を嫌気状態に保つために気相を窒素パージし、密栓した後20℃の恒温室内に静置培養した。24時間毎に耐熱ビンから水層を約10ml採取し、0.2μmろ液についてイオンクロマトグラフによって硫酸塩、硝酸塩、亜硝酸塩、塩化物と重炭酸塩、酢酸、プロピオン酸濃度の分析を行った。回分実験終了後に、残った木質を乾燥炉で乾燥し、乾燥重量を測定した。

(3) 微生物群集解析

1) DNAの抽出法

実験終了後にカラム内の間伐材、赤玉土、木炭、腐葉土を取り出し、それぞれ0.2gについて、UltraClean Soil DNA kit (Mo Bio Laboratories, Inc., USA)を用いたDNA抽出を行なった。手順は同キットのプロトコルに従い、DNAの抽出、精製を行なった。抽出したDNAは使用するまでの間、-20℃にて冷凍保存した。

2) Nested PCR-DGGE法⁹⁾

抽出したDNAを用い、土壌層内の微少な硫酸塩還元微生物群集を把握するため、Nested PCR-DGGE法を適用した。Nested PCR-DGGEはMilettoら⁹⁾の方法に準拠した。1回目のPCRでは、微生物の持つ異化型亜硫酸塩還元酵素（dsr AB）を標的とし、表3に示すDSRmixF及びDSRmixRを用いて、抽出したDNAを鋳型としてPCR反応を行なった。

温度条件は94℃1分、（94℃40秒、48℃40秒、72℃1分30秒）×35サイクル、72℃10分とした。得られたPCR産物を用いてさらに、dsr ABの内側をコードしたdsr Bを標的とし、表3に示すDSR206F-GC（GCクランプ付）及び

DSR4Rを用いてPCR反応を行なった。温度条件は94℃5分、（94℃40秒、55℃40秒、72℃1分）×30サイクル、72℃30分とした。PCR反応を2回行なって得られたPCR産物は、アガロースゲル電気泳動により目的の塩基長であることを確認し、D-Code システム（Bio-Rad Laboratories, Japan）によるDGGE解析に供した。8%のポリアクリルアミドには、35%~80%の変性剤（尿素・ホルムアミド）濃度勾配を設定した。8μlのPCR産物と2μlのLoading buffer（NIPPON GENE, Japan）の混合液を滴下し、150V、60℃、5分の後、75V、60℃、30時間の条件で電気泳動を行なった。泳動終了後、EtBr（泳動Buffer100mlにEtBr溶液（10mg/ml）を5μl添加したもの）によって30分間染色、20分間脱色後、UVトランスイルミネーター（UVP）とデジタルカメラ（Cyber-shot, SONY）により画像を撮影した。主要なバンドについてはゲルを切り出し、ゲルを100μl超純水で迅速に洗浄した後、超純水を20μl入れ、4℃で一晩置いてDNAを溶出させ、使用するまでの間、-20℃にて冷凍保存した。

3. 実験結果

(1) 間伐材内部の微生物活性

表4に、間伐材内微生物の脱窒速度、硫酸塩還元速度をまとめ示した。木質の前培養を行っていないカラム2では、他栄養性脱窒活性が最も高い値を示した。木質を硫酸塩還元条件であらかじめ培養したカラム4では、他栄養性脱窒活性は低く、硫黄脱窒活性、硫酸塩還元活性ともに高い値を示した。脱窒条件で培養したカラム3は、カラム2と比較して、他栄養性脱窒活性はやや高く、硫黄脱窒活性、硫酸塩還元活性が高い値を示した。以上のことから、カラム3では、他栄養性脱窒細菌、硫黄脱窒細菌が木質内に共存し、脱窒を促進していたために、最も脱窒率が高かったものと考えられる。

表3 本研究で用いた DSR のプライマー

Primer	Sequence (5' - 3')	Reference
DSRmixF	ACS CACT TGG AAG CAC G	Wagner <i>et al.</i> 1998
DSR1Fa	ACC CAY TGG AAA CAC G	Loy <i>et al.</i> 2004
DSR1Fb	GGC CAC TGG AAG CAC G	Loy <i>et al.</i> 2004
DSRmixR	GTG TAG CAG TTA CCG CA	Wagner <i>et al.</i> 1998
DSR4Ra	GTG TAA CAG TTT CCA CA	Loy <i>et al.</i> 2004
DSR4Rb	GTG TAA CAG TTA CCG CA	Loy <i>et al.</i> 2004
DSR4Rc	GTG TAG CAG TTK CCG CA	Loy <i>et al.</i> 2004
DSRp2060 ^b	CAA CAT CGT YCA YAC CCA GGG	Geets <i>et al.</i> 2006

^a Ambiguities: R (G or A); Y (C or T); K (G or T); M (A or C); S (G or C); W (A or T)

^b A 40-bp GC clamp was added to the 5' end (CGCCCCGCGCGCCCCGCGCCCCGCGCCCCGCGCCCCGCGCCCCG) when the PCR product was used for DGGE analysis (DSRp2060F-GC).

表 4 回分実験で得られた脱窒速度, 硫酸塩還元速度

	他栄養性脱窒速度 (mg・COD/g・day)	硫酸脱窒速度 (mg・COD/g・day)	硫酸塩還元速度 (mg・COD/g・day)
カラム6	1.37	0.49	0.34
カラム7	1.47	0.84	0.52
カラム8	0.70	1.51	1.72

(2) 微生物群集解析

図 2, 3 に, 装置内から取り出した間伐材, 赤玉土, 木炭, 腐葉土から抽出した DNA の DSR 遺伝子をコードするプライマーを用いた PCR-DGGE 法による電気泳動写真を示す。いずれのカラムの間伐材および腐葉土, 赤玉土中にも, 亜硫酸塩還元酵素を有すると推定される細菌が多く検出された。これは, 間伐材内で高い硫酸塩還元活性を示したことを説明するものである。

間伐材を充填していないカラム 1 の腐葉土, 赤玉土, 木炭中の硫酸塩還元細菌群集は, 間伐材を充填したカラム 2 と異なっており, さらに, カラム 2 の間伐材中の群集とも異なっていることから, 腐葉土により供給された硫酸塩還元細菌の一部のみが, 間伐材中で増殖したものと推定される。一方, 木質を事前培養したカラム 3, 4 では, それぞれ, 間伐材の上下および腐葉土のバンドパターンに類似性が認められるが, カラム 3, 4 の間には大きな違いが認められた。これは, 間伐材の事前培養により増殖した硫酸塩還元細菌が異なっており, これらがカラムに供給されて腐葉土や赤玉土に付着して優先化したためと推定される。また, 脱窒素条件で事前培養したカラム 3 の硫酸塩還元細菌の多様性が高い傾向にあった。

4. まとめ

脱窒条件および硫酸塩還元条件であらかじめ培養した間伐材の微生物活性の測定, 土壌層内の微生物群集解析を行った結果, 以下のことが分かった。

- 1) 脱窒条件で事前に培養したカラム3では, 他栄養性脱窒細菌, 硫酸脱窒細菌が木質内に共存し, 脱窒を促進していたために, 最も脱窒率が高かったものと考えられる。
- 2) 間伐材および腐葉土中には多様な硫酸塩還元細菌が存在していると推定された。脱窒条件で培養したカラム3と硫酸塩還元条件で培養したカラム4では, 硫酸塩還元細菌群衆の構造が異なっていた。

<参考文献>

- 1) 高野典礼・池本良子, 第 11 回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会講演集 (2004)
- 2) 高井淑恵・高野典礼・池本良子, (2006) 第 43 回環境工学研究フォーラム講演集, pp. 239-241
- 3) 天倉和也・高井淑恵・高野典礼・池本良子, (2007) 第 44 回環境工学研究フォーラム講演集, pp. 113-115

- 4) GERARD MUNZER, ELLEN C. DE WAAL, AND ANDRE G. UITENDIEN 1993. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59: 695-700

カラムNo.1 2 3 4 1 2 3 4 コントロール
場所 中 中 中 中 中 中 中 中
種類 土 土 土 土 炭 炭 炭 炭



図 2 Nestied PCR-DGGE 法の電気泳動写真 1

カラムNo.1 2 3 4 2 3 4 2 3 4 コントロール
場所 下 下 下 下 下 下 上 上 上
種類 腐 腐 腐 腐 間 間 間 間 間

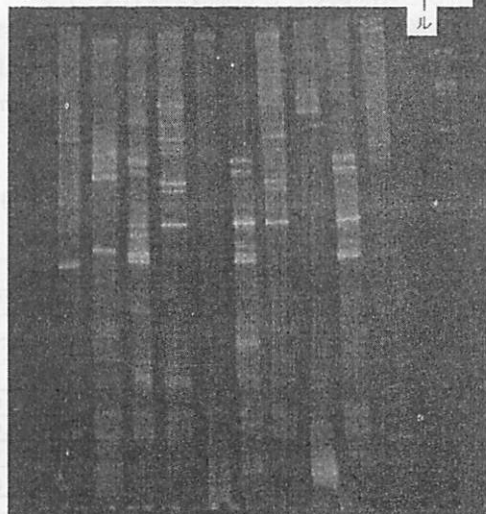


図 3 Nestied PCR-DGGE 法の電気泳動写真 2

注) 土: 赤玉土 炭: 木炭
腐: 腐葉土 間: 間伐材