

県内未利用資源を活用した脱窒に関する研究

溝添 暁子*¹, 里岡 嘉宏*¹, 地頭所 眞美子*², 中田 一則*¹

The Research on the Denitrification which Utilized Prefecture Unused Resources

Akiko MIZOZOE, Yoshihiro SATOOKA, Mamiko JITOUSYO and Kazunori NAKATA

県内未利用資源について、脱窒能の調査を行った。その中で脱窒能の高かった竹粉についてさらに詳細な検討を行った結果、脱窒は竹粉由来の微生物群によるものであることが明らかになった。竹粉および微生物群を利用して土壌中の硝酸態窒素の分解試験を行い、その効果を確認し、実証試験を行った。また、竹粉による硝酸分解の菌叢をPCR-DGGE法により解析した。

キーワード：脱窒，竹，微生物

1 はじめに

県内には、木炭、竹炭のようにその特性が解析され、すでに利用されているものもあるが、杉、竹等そのものの機能性はほとんど研究されていない。なかでも竹は、全国的に放置竹林が問題になっており、県内にも多数存在する。しかし、竹は、成長が早いことから注目される資源でもあり、その有効利用が求められている現状がある。一方、農業の過剰施肥、家畜排泄物の不適正な処理により硝酸態窒素等が土壌、地下水を汚染し問題となっている。

この研究は、県内未利用資源について調査を行い、それを活用して脱窒処理剤等を開発することにより、土壌および地下水の汚染防止ならびに林産業における竹等の付加価値の向上、消費量の増加に寄与することを目的とする。

2 実験方法

2-1 試料の選択

2-1-1 未利用資源

県内において利用が可能と思われる試料として、シラス、コットンリントー、土壌、活性炭、

生杉おがくずおよび竹粉を用意した。

2-1-2 硝酸除去（脱窒）試験

上記未利用資源を用いて、硝酸除去（脱窒）試験を行った。硝酸カリウム溶液（30mg/l）50mlにサンプルを1g浸漬させ、経時的にイオンクロマトグラフ（ダイオネクス社製：DX-500）で硝酸イオン、亜硝酸イオン濃度を測定した。

なお、これより先の試験については、硝酸カリウム溶液の濃度を、適宜調製した。

2-2 微生物による硝酸分解確認

2-2-1 硝酸塩還元試験

竹粉による硝酸分解試験を行い、その培養液を1ml取り、新たな硝酸溶液の入った試験管に加え、硝酸分解試験を行った。処理後の試験管に α -ナフチルアミン溶液とスルファニル酸溶液を添加し、その反応の確認を行った。

2-2-2 滅菌試験

滅菌した竹粉と通常の竹粉を用いて、硝酸分解試験を行った。

2-3 添加物試験

硝酸カリウム溶液（100mg/l）100mlに対し、1%量の炭酸カルシウムを添加し、その有無による硝酸分解試験を行った。サンプルには、伐採時期、竹齢、製造方法の異なる孟宗竹21種類を用いた。

* 1 資源環境部

* 2 資源環境部（現 産業技術総合研究所関西センター）

2-4 びん培養試験

土壤中における硝酸態窒素分解試験の検討を行った。250mlのポリ瓶に過剰濃度の硝酸イオン(25mg/100g)を含む滅菌土壌を取り、0.5%重にあたる竹粉を上乗せし、経時的に土壌中の硝酸イオン濃度をイオンクロマトグラフにて測定した。土壌と竹粉を混合したものについても、同様に試験を行った。

2-5 土壌改良材の試作

竹粉を土壌脱窒剤として応用するために土壌改良材としての試作を行った。バインダーには、ゼオライトを用いた。

2-6 圃場試験

土壤中における硝酸態窒素分解を確認するために圃場試験を行った。対照作物は、人参とし、収穫3週間まえに散布を行った。人参畑を①対照区、②竹粉混合区、③土壌改良材混合区、④土壌改良材上乗せ区(×1倍量区)、⑤土壌改良材上乗せ区(×5倍量区)の5区画に区切った。収穫後、収量、人参中の硝酸イオン濃度等の調査を行った。

2-7 PCR-DGGE法による菌叢解析

硝酸分解パターンの異なる2つの竹粉を用いて、硝酸分解試験を行い、経時的に硝酸イオンおよび亜硝酸イオンをイオンクロマトグラフにて測定し、その際にサンプリングをし、PCR-DGGE法により、菌叢解析を行った。

すなわち、タカラバイオ社製DNA抽出キットにて、DNA抽出を行った。それを鋳型としてPrimer 5F, 531Rを用いてPCRにより遺伝子断片の増幅を行った。

アクリルアミド濃度は8%, 変性剤濃度40~70%(変性剤100%は7M尿素, 40%ホルムアミドに相当)に調製した。PCR-DGGEには、D CODE SYSTEM (Bio Rad社)を用い、泳動条件は、電圧120V, 泳動槽温度60°C, 泳動用緩衝液1×TAEで2時間半行い、菌叢の経時変化を調査した。

3 結果および考察

3-1 試料の選択

硝酸除去能の結果を図1に示す。活性炭は、硝酸イオン吸着能を示すものの、頭打ちになりそれ

以上の吸着は見られなかった。シラス, 農試土壌, コットンリントーおよび杉おがくずについては、硝酸イオン除去能は見られなかった。しかし、竹粉については、2日で硝酸イオンが消失した。これらの結果より、手に入り易く、また取り扱いの便利などを考慮し、竹粉を研究の資料として選択することにした。

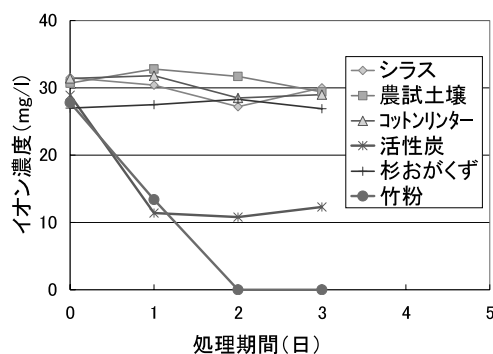


図1 未利用資源による硝酸分解試験

竹粉は、伐採後、枝等を切り落とし割ったものをおがくず製造機にかけ、乾燥したものを試料とした。また、竹粉は、宮崎県林業技術センターにより提供していただいた。

3-2 竹粉による硝酸分解経日変化

硝酸カリウム溶液濃度を100mg/lに調整し、竹粉による分解試験を行った。その結果、硝酸イオンは2日で消失し、硝酸イオンの減少とともに亜硝酸イオンが発生するものの、これも試験開始から3日で消失した(図2)。これより、硝酸除去は硝酸吸着ではなく、微生物による脱窒ではないかと推察された。

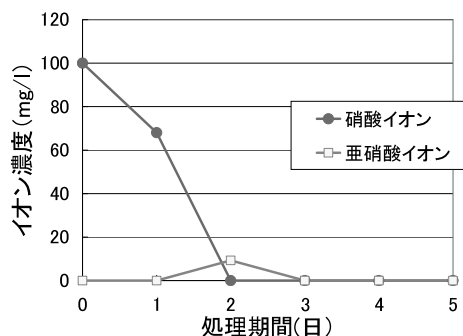


図2 竹粉による硝酸分解経日変化

3-3 微生物による硝酸分解確認試験結果

3-3-1 硝酸塩還元試験結果

硝酸塩還元試験は、硝酸塩が亜硝酸塩に還元されたとき、 α -ナフチルアミン溶液とスルファニル酸溶液を添加することにより、赤変し、その還元を示す。滅菌した硝酸溶液に竹粉の培養液を濃度を変えて添加することにより、微生物による硝酸塩還元を確認した。その結果、薄黄透明であった硝酸溶液が所定の試薬の添加により、赤変した。(図3)

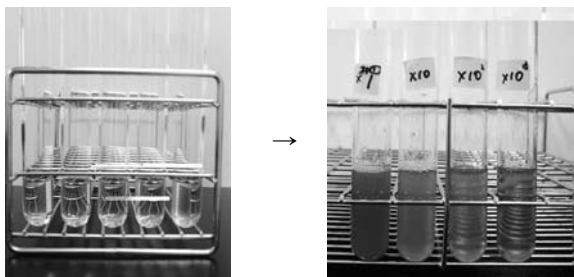


図3 硝酸塩還元試験

3-3-2 滅菌試験の結果

次にオートクレーブ(121°C, 15分)にて滅菌した竹粉と通常の竹粉を用いて硝酸分解試験を行った。その結果を図4に示す。通常の竹粉は、硝酸を分解するが、滅菌した竹粉はまったく硝酸分解が見られなかった。この結果と上記硝酸塩還元試験の結果より、竹粉による硝酸分解は竹粉由来の微生物によるものであることが明らかになった。

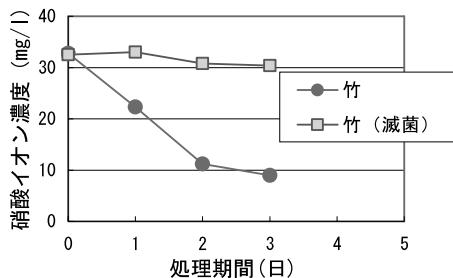


図4 滅菌確認試験

3-4 条件の異なる竹粉による硝酸分解の傾向

竹粉由来の微生物による硝酸分解の処理速度、培養等の様々な検討を行った結果、石灰を添加することにより処理速度が向上することが明らかになった。

図5-1から5-4は、伐採時期、竹齢、製造法の異なる孟宗竹21種類の竹粉を用いて、それぞれについて石灰添加の有無による硝酸分解試験を行った結果であり、4つの傾向に区別することができた。すなわち、①石灰を添加することにより、勝利能が大きく向上するもの、②硝酸と亜硝酸を同時に分解するもの(石灰添加は関係なし)、③石灰添加の有無にかかわらず、処理能に変化がないもの、④石灰を添加することにより、処理能が若干向上するもの、であった。この原因としては、竹齢、伐採時期の違いによる竹に含まれる成分の差、さらには、そのことに起因する微生物叢の違いによるものと推測されたが、はっきりとした相関関係は得られなかった。

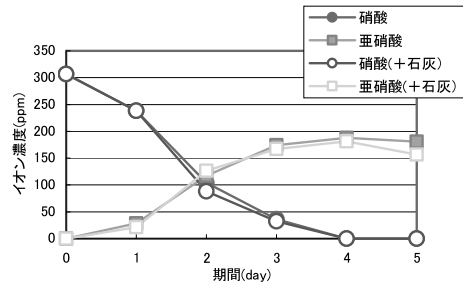


図5-1

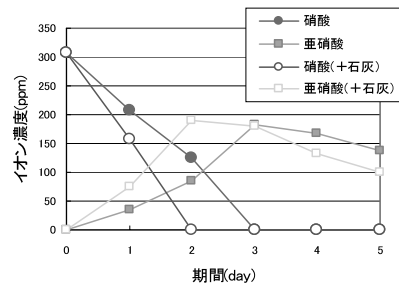


図5-2

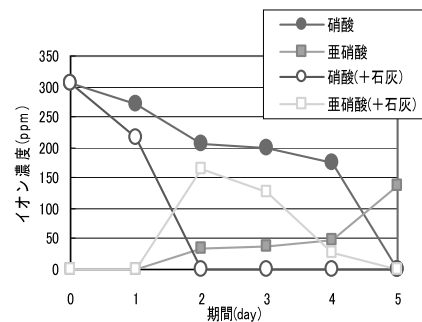


図5-3

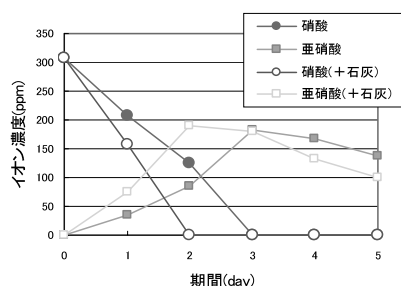


図5-4

図5 硝酸分解の4つの傾向（孟宗竹21種）

3-5 びん培養試験結果

土壌中の硝酸分解試験を行うのに、びん培養試験法を用いた。その結果、土壌に竹粉を上乗せしたもの、土壌と竹粉を混合したもの、ともに3週間程度で土壌中の硝酸を分解した。また、処理能に差はほとんど見られなかった。この試験より、土壌中硝酸分解が可能であることが確認された。

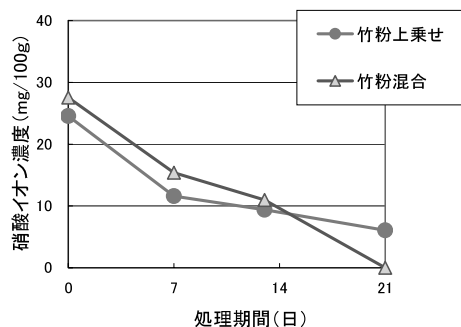


図6 びん培養試験結果

3-6 圃場試験

圃場試験に先立ち、竹粉を簡便に扱うために土壌改良材の試作を行った。種々の検討の結果、竹粉とバインダーを1対1で混合するのが最も良かったので、この割合を採用した。(図7)



図7 試作した土壌改良材

人参畑を対照区、竹粉混合区、試料混合区、試料上乗せ区（×1倍区）、試料上乗せ区（×5倍区）に区切り、試験を行った。(図8)



図8 圃場風景

その結果を表1に示す。収穫後、収量に差はなく、また、人参中の硝酸イオン濃度等についても大きな差は見られなかった。原因としては、当初、過剰であった土壌中の硝酸イオンが天候-雨などにより流出してしまったためではないかと考えられた。このことにより、圃場試験の試験法は、再検討が必要であると考えられた。

表1 圃場試験結果

Sample	NO ₃ ⁻ (ppm)	タンパク質 (%)	N (%)	水分 (%)
対照区	31.8	2.0	0.33	89.4
竹粉混合	39.5	2.8	0.46	89.7
試料混合	45.2	3.7	0.60	90.2
試料上乗せ×1	33.5	4.0	0.60	88.4
〃 ×5	27.9	2.9	0.47	89.6

3-7 PCR-DGGE法による菌叢解析

試験に用いた竹Aおよび竹Bの硝酸分解経日変化のグラフを図9に示す。また、竹Aおよび竹BのPCR-DGGEによる菌叢パターン写真を図10に示す。竹Aの①、②および竹Bの⑦、⑧は、硝酸分解の途中であり、亜硝酸イオンがまだ発生していない地点である。竹Bの⑨は、硝酸イオンと亜硝酸イオンが混在する地点であり、その他の③~⑥、⑩~⑬は亜硝酸イオンが存在し、その分解過程であることが分かる。それぞれの地点は、図10の番号①~⑬に対応し、その地点の菌叢を示している。図10の①の下部に2本の濃いバンドが見え、②に至るとその上部にさらに2~3本のバンドが出現する。これは、硝酸分解を行う菌が増えたことを示しており、そのうちの1つは、⑦、⑧においても同レベルに確認できることから、同じ菌であると推定される。竹Aの③は、上部バンドと下

部バンドが入り交じっていることから、硝酸イオン分解から亜硝酸分解へいたる菌叢であることが見てとれる。また、④～⑥、⑨～⑬においては、ほぼ上部のみのバンドで構成されることから、このあたりの菌叢が亜硝酸分解を行っている菌叢であると推測される。また、④～⑥には、やや中部に濃いバンドが見られるが、⑨～⑬には少々薄いのが確認できるものの、④～⑥のほどにははっきりとは見られない。このことは、竹Aの処理速度が高く、竹Bの処理速度が劣ることより、このバンドを示す菌に寄るものであると推察され、菌叢が異なることを示すものでもある。この試験により、竹粉由来の微生物は、大部分は、同じであるものの、その濃度、また、一部の菌叢の違いにより、処理速度に差が出ていることが確認された。

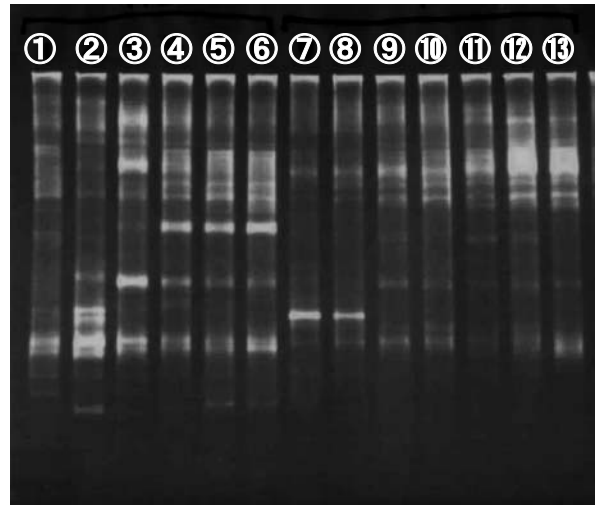
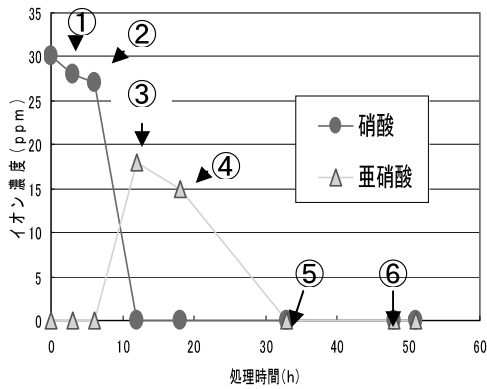
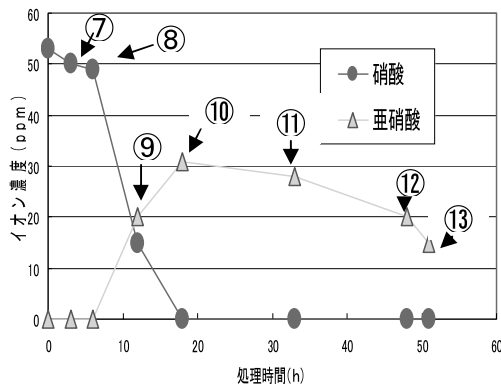


図10 PCR-DGGE法による菌叢解析



竹Aの硝酸分解経時的変化



竹Bの硝酸分解経時的変化

図9 竹粉A, Bの硝酸分解経時的変化

4 まとめ

- 1) 県内の未利用資源を調査した結果、竹粉においては、硝酸が2日で消失し、それは竹粉由来の微生物によるものであることが確認された。
- 2) 孟宗竹21種による硝酸分解は、種々の試験の結果、4つの傾向に分類できた。また、それは竹の伐採時期、竹齢の違いによる成分の差およびそれに伴う菌叢のちがいによるものと推察されたが、はっきりとした相関関係は得られなかった。
- 3) 竹粉由来の微生物により、土壌中の硝酸分解は可能であった。
- 4) 圃場試験の結果、人參中の硝酸イオンの減少は確認できず、試験法の再検討が必要であると考えられた。
- 5) PCR-DGGE法による菌叢解析の結果、硝酸イオン分解の菌叢と亜硝酸イオン分解の菌叢が確認できた。また、その処理能においても、菌叢に違いがあることが確認された。