

メタン発酵消化液の長期的な連用が土壤微生物に与える影響
 Influence on soil microbes by long term continuous application of methane
 fermentation digested slurry

○折立文字*・中村真人*・山岡 賢*・柚山義人*

ORITATE Fumiko, NAKAMURA Masato, YAMAOKA Masaru and YUYAMA Yoshito

1. はじめに 家畜排せつ物等を原料とするメタン発酵消化液の液肥利用において、窒素やリン等に注目した消化液の肥料効果等に関する知見が蓄積されてきている一方、消化液の液肥利用に伴い土壤環境へ移行する消化液由来微生物の消長や、土壤中微生物に与える影響に関する知見は少ない。硝化や脱窒等、土壤中の様々な反応は微生物反応によるものが多く、肥料効果の発揮と環境負荷削減を念頭に置きつつ消化液の農業利用を今後さらに進めていく上で、上記の検討を行うことは非常に重要である。そこで、本研究では、消化液の土壤施用が土壤微生物に与える長期的な影響を把握することを目的として、消化液連用後の作物栽培土壤を対象に試験を行った。

2. 試験方法 過去5年間にわたり消化液もしくは化学肥料が試験作物（コマツナ（春・夏作）およびホウレンソウ（秋作）、5年間、計15作）の肥料として連用されてきた土壤（淡色黒ボク土）、および無施肥の土壤を対象とした¹⁾。消化液は千葉県下のメタン発酵プラント（乳牛ふん尿の中温メタン発酵処理（37℃）、殺菌槽なし^{*}）にて採取されたもので、消化液、化学肥料ともに窒素量を千葉県の施肥基準（コマツナ栽培時 N-P₂O₅-K₂O=12-12-12 g/m²、ホウレンソウ栽培時 N-P₂O₅-K₂O=25-25-25 g/m²）に合わせて施用されていた。消化液および上記の土壤試料の表層から0-10cmの深さの層について9倍量のリン酸緩衝液生理食塩水で浸とう抽出を行ったものについて、一般細菌および大腸菌群をそれぞれ、Lennox培地、およびLennox培地にVancomycineとX-Galを添加した大腸菌群選択培地(LVX培地)を用いた平板培養法により分析した。さらに、各土壤試料および消化液についてDNAを抽出し、T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 解析^{**}により微生物群集パターンの違いを、クローン解析^{***}により各試料における優先微生物種の推定を試みた。

3. 結果および考察 消化液および各土壤試料の一般細菌数および大腸菌群数の分析結果を図1、図2に示す。消化液において一般細菌数は 1.0×10^8 CFU/g (DM)^{****}、大腸菌群数は 1.0×10^5 CFU/g (DM)であった。各土壤試料では一般細菌数はいずれの試料においても約 1.0×10^7 CFU/g (DM)、大腸菌群数は 1.0×10^3 CFU/g (DM)程度という結果となり、一般細菌および大腸菌群については施用する肥料の種類や施用の有無による顕著な差は認められなかった。消化液および各土壤試料の微生物群集パターンは図3のようになった。消化液は比較的少数の細菌種によって集積された細菌相であるのに対し、土壤試料はいずれも類似した分布パターンを示し、多様性の高い細菌相である可能性が示唆された。また、消化液において最も高頻度に検出された断片長の真正細菌のクローンの近縁細菌は *Moorella* sp. CF4, *Moorella thermoacetica*, *Spirochaeta cellobiosiphila* であり、これらはいずれの土壤試料においても高頻度に検出されることはなかった。

以上のことから、微生物を含む資材である消化液を長期的に連用しても土壤の微生物相

(真正細菌)に与える影響は少ないことが示唆された。今後は施肥直後からの短い時間経過に伴う消化液の消長について、真正細菌以外の細菌も視野に入れつつ検討を行っていく。
 参考文献 1)中村真人, 藤川智紀, 柚山義人, 前田守弘, 山岡賢 (2009):メタン発酵消化液の施用が畑地土壌からの温室効果ガス発生と窒素溶脱に及ぼす影響, 農業農村工学会論文集, 第 264 号, pp.605-614
 脚注 *高温メタン発酵(55℃)や中温メタン発酵後に殺菌処理過程を経ることで大腸菌数は著しく減少することが報告されているが, こうした殺菌設備を有していない処理施設も数多く存在

****T-RFLP 解析**…Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism 解析。末端蛍光標識したプライマーで鋳型 DNA を PCR 増幅し, 制限酵素による消化後, フラグメント解析を行い, 塩基配列の違いから制限酵素切断部位が異なることを利用し, 検出ピークの強度, 位置, 数により微生物群集の構成パターンの比較や変遷を把握する手法。

*****クローン解析**…PCR 増幅した DNA 断片を 1 つずつにクローニングし, その中からランダムに選んだ 96 個の DNA 断片の塩基配列を解読し, 得られた塩基配列情報をデータベースと照合することにより, それぞれの DNA 配列の近縁種を推定する手法。今回は真正細菌について実施。

*****CFU**…Colony Forming Unit, DM…Dry Matter

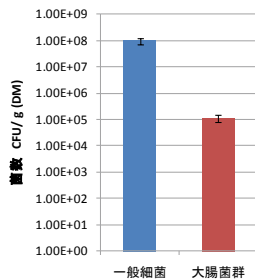


図 1 消化液中の一般細菌数および大腸菌群数
Fig.1 Number of viable bacterium and coliform bacterium in digested slurry

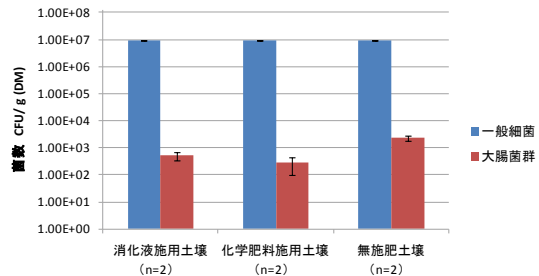


図 2 各土壌試料の一般細菌数および大腸菌群数
Fig.2 Number of viable bacterium and coliform bacterium in soil samples

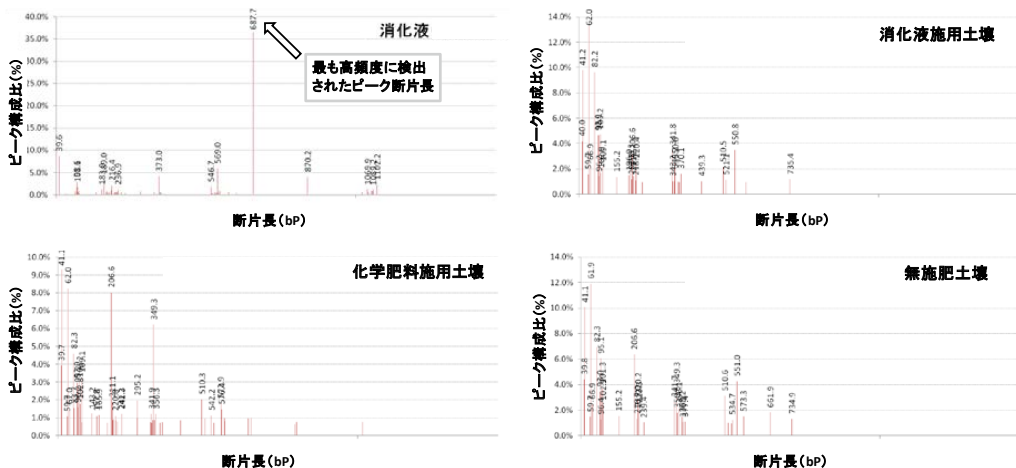


図 3 消化液および各土壌試料の微生物群集パターン
Fig.3 Microbial community pattern of methane fermentation digested slurry and soil samples