

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23241016

研究課題名(和文) 地下圏脱窒ファクトリー

研究課題名(英文) denitrifying factory

研究代表者

加藤 憲二 (Kato, Kenji)

静岡大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70169499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,300,000円、(間接経費) 11,490,000円

研究成果の概要(和文)：わが国においても重要性が増している地下水資源が抱える問題に硝酸汚染がある。富士山を対象に考えれば、茶栽培などの農耕によって用いられる施肥にはすでに制限がかけられているものの、地下水の滞留時間が15年から30年と考えられることから一部ではなお水道基準を超える汚染が認められる。良質の地下水を確保し続けるためには、現場での微生物活性による脱窒機能を効率よく発揮させることが必要である。実際に現場地下水中にはどの程度の脱窒機能を有する原核生物が存在し、どの程度の活性を発揮しているのか、またそれらはどのような環境因子に強く制御されているのかを明らかにして地下水の有効活用へ資する基礎研究を展開した。

研究成果の概要(英文)：Adequate management of groundwater is strongly required against increasing threat of water shortage. Nitrate contamination is remained problems for groundwater. To minimize nitrate contamination we surveyed nitrate concentration and estimated in situ denitrification activity of groundwater by stable isotope tracer experiment. And we revealed corresponding microbial populations using gene analysis with qPCR targeting denitrification functional genes. Constraints of denitrification are also elucidated. Acetate showed the highest concentration among the measured organic compounds dissolved in the groundwater. And when the groundwater was incubated with  $15\text{NO}_3^-$  by adding acetate denitrification activity increased about twice compared with the incubation under the in situ condition. And soil microbes around the wells enhanced denitrification about three times. Basic understandings were thus obtained to construct in situ highly active denitrification system for the groundwater.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：陸圏・水圏・大気圏影響評価 地下水硝酸汚染

## 1. 研究開始当初の背景

わが国でも、人口が稠密する都市圏では特に夏季の渇水期には浄水の確保はすでに問題となっており、国際的な水需要の増大へ世界がどのように立ち向かうかは、21世紀最大の資源環境問題のひとつであるといえる。わが国の国土の7割を占める山岳地帯が涵養する地下水は、ミネラルウォーターとして大きな市場を確保していることが示すとおり付加価値の高い巨大な水資源である。この地下水を管理し活用していく上で、硝酸汚染の問題を見逃すわけにはいかない。森林そのものが硝酸の負荷源である可能性(Ohte *et al.* Hydrol. Processes 17:237,2003)に加え、施肥による硝酸負荷が大きな地下水の汚染源となっている。環境省はすでに平成16年にヒ素などと並んで地下水の硝酸汚染が人体への影響もある物質として環境基準(健康項目)を指定している。また、これに先行して同省が汚染対策マニュアルを策定して対策にも取り組んできたが、滞留時間が10~30年といわれる富士山地下水では、硝酸汚染はなお現在進行形の問題である。

地下水の硝酸汚染に対しては、水文学的には帯水層に人工遮蔽壁を設けて地下水の硝酸濃度を下げることなども試みられている(李他、第13回地下水・土壤汚染とその防止対策に関する研究会;2007)が、硝酸消失のメカニズムについての考究が欠けており、経験則に基づく対応に終始している感がある。

富士山麓をはじめとして静岡県は全国有数の茶の栽培地である。茶の質、つまり茶の価格と茶葉の含有アミノ酸濃度、ひいては窒素量とは強い正の関係があるため茶の栽培には特に多量の施肥が行われている。茶栽培による地下圏への無機態窒素の負荷がおおきいことは想像に難くない。

施肥に対する技術指導が行われているにしても今なお富士山地下圏、とりわけ茶畑周辺の地下水中の硝酸濃度は明らかに高い。茶畑における脱窒活性についてはすでに先行研究もあり(Tokuda & Hayatsu, Soil Sci Plant Nutr, 2000, 2001, 2004)また最近の研究では、硝酸汚染地下水から新規な脱窒機能であるアナモクス活性も検出されている(Suwa *et al.*, ISME Asia 2007, ISSB, 2008)。しかし、これらは脱窒ポテンシャルの測定にとどまっており、機能を担う微生物群集に関する研究が欠けている。何故それだけの脱窒活性があるのか(それだけしかないのか)どのようにしたら活性を高め、これを活用することが出来るのかを議論する基礎研究はまだない。

## 2. 研究の目的

将来、水資源としての重要性が一層増すと

考えられる地下水の水質を確保する上で残された課題である硝酸汚染に焦点を合わせ、土壌層を含む地下圏の微生物による硝酸除去(脱窒)活性並びに活性を支配する微生物群集の現場における生態の解明と、さらにはその機能の拡大活用に向けた研究を富士山地下圏を対象に展開することが本研究の目的である。この目的に向けて、研究は以下の3項目から構成された。

- (1) 地下水の硝酸汚染の面的広がり把握。特に茶畑との関連についての詳細な知見の取得。
- (2) 脱窒活性の測定並びに機能遺伝子による関連個体群の動態の把握。とくに茶畑下流域における硝酸汚染に対し微生物の脱窒作用による自然浄化機能の実態の把握。
- (3) 休耕田の活用による脱窒ファクトリー構築実験。

## 3. 研究の方法

用いた研究方法は以下の通りである。

イオンクロマトグラフィーによる地下水の硝酸濃度ならびに物理化学環境要因の測定。

安定同位体( $^{15}\text{NO}_3^-$ )を用いたトレーサー実験による脱窒とアナモクス活性の同時測定。

遺伝子解析による細菌群集構造の把握と機能遺伝子(*nirS*、*nirK*)を用いたReal-Time PCRによる機能細菌個体群の半定量。なお、

窒素・酸素安定同位体比を用いた硝酸起源の推定や

施肥アンモニア由来の硝酸負荷速度の解明については順調にデータを取得するに至らなかった。また、

脱窒ファクトリーの休耕田活用の実験については、予備的な実験を行い、これを元に考察を進めた。

## 4. 研究成果

- (1) 富士山麓の地下水汚染の面的な広がりを把握するためのデータの蓄積。

茶畑周辺で高い硝酸濃度が観測されていたが、とりわけ茶畑直下の井戸で、水道水の水質基準を超える硝酸汚染が確認された。ここは富士山西南溶岩流の末端に近く、豊富な地下水の供給が期待される場所であるが先行研究からこの付近で採取される地下水の地下圏での滞留時間が20~30年であること(Tosaki *et al.* 2011)から含窒素肥料の施肥制限が未だ効果を現していないと推察された。

「現場環境の物理化学的特性の把握」については、富士山麓における測定した地

点の中で茶畑の多い杉田地区における茶畑の直下地点で8.3~15.5 mg-N/L<sup>-1</sup>と硝酸濃度が高かった。高濃度は茶畑の影響であることが示唆された。また、脱窒反応の基質となる有機物組成についてイオンクロマトを用いた有機酸分析の結果、各井戸とも酢酸濃度が一番高く、溶存態有機炭素(DOC)の11~22%を占めた。次いで、ギ酸、クエン酸、シュウ酸が検出された。

さらに富士山麓の茶畑地区を中心に採水を行い、硝酸濃度の分布のデータを収集した。測定した地点の中で茶畑地区における茶畑の直下の井戸Bで最大15.5mg-N/Lと硝酸濃度が高かった。そこから50m離れた40年間使用されていない嫌気的な井戸Uでは1.5~2.6 mg-N/Lと低かった。この井戸は嫌気環境が深部で形成されており脱窒反応がすでに進行した可能性がある。

「フロンを用いた地下水滞留時間の測定」ならびに「水の同位体測定」については、異なった季節に取得したサンプルについて現在分析を進めている。

(2)富士山麓の中でも特に茶畑の多い南麓杉田地区(茶畑地区)において溶存酸素濃度が異なるふたつの井戸を対象に、現場に存在する原核生物が脱窒活性の大小と酸化還元電位や基質となる有機酸の影響について検証した。さらに脱窒が酸化還元電位に与える影響を調べた。これらの検証により、環境中に生息する原核生物による地下水の硝酸汚染に対する自然浄化の可能性に関して基礎的情報を得ることができた。具体的には、以下の成果が得られた。

「環境条件変動と脱窒活性」については、富士山麓の中でも特に茶畑の多い南麓の杉田地区において、茶畑の上部と下部に位置する井戸から採水したサンプルについて、有機物濃度、酸素濃度の培養条件を変え、<sup>15</sup>Nトレーサーを用いた脱窒活性測定を行った。どの条件でも<sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の添加により<sup>30</sup>N<sub>2</sub>と<sup>46</sup>N<sub>2</sub>Oの生成が認められ、脱窒活性が確認された。水中の溶存酸素を除去した絶対嫌気環境では、現場の有酸素濃度(微好気)環境に比べ有意に高い脱窒活性が得られた。

茶畑地区において、茶畑直下の好気的な井戸Bと嫌気的な井戸Uから採水したサンプルについて、有機物濃度、酸素濃度の培養条件を変え、<sup>15</sup>Nトレーサーを用いた脱窒活性測定を行った。好気的環境の井戸Bに比べ嫌気的環境の井戸Uにおける脱窒活性が高かった。またどちらの井戸においても、有機酸の中で現場に最も高い濃度で存在した酢酸を添加し嫌気的な培養系において最も高い脱窒活性が得られた。その値は無添加系の約2倍であった(V<sub>max</sub> = 0.196 nmol ml<sup>-1</sup>

h<sup>-1</sup>)。調べられた地下水に対する酢酸の添加がもたらす高い活性は、広く基質(電子供与体)として考えられるグルコースよりも高い活性を与えることが示された。また、現場環境中からは酢酸の数分の一から数十分の一程度しか検出されないが、現場群集による脱窒活性の促進効果は酢酸にほぼ匹敵するほどの値が示された。

酸化還元電位をモニタリングする脱窒活性測定を行った結果、嫌気環境で脱窒が進行すると酸化還元電位がさらに低下する傾向を見いだした。先行研究並びに本プロジェクトでの深い掘削井における研究から酸化還元電位のさらなる低下は、微生物反応系が脱窒から鉄やマンガンの還元、さらにはメタン生成へと移行することを示唆する(発表論文、Katsuyama *et al.* 2013)。

亜硝酸還元酵素をコードする機能遺伝子(*nirS*)を対象に脱窒活性を担う原核生物群集の特定を試みた結果、得られたクローンの近縁種の基質利用性から酢酸を電子供与体として用いることが推定された。

「脱窒活性の測定並びに機能遺伝子による関連個体群の動態の把握」について、機能遺伝子をターゲットとした脱窒活性菌群の定量に成功した。定量PCRにより検出された*nirS* 機能遺伝子については、安定同位体でラベルされた窒素(<sup>30</sup>N<sub>2</sub>)生成量が最も多かった系において多くの機能遺伝子を有する細菌が検出された。脱窒に関与する細菌数と活性との関係が嫌気環境が進んだ井戸において示唆された。活性が検出された培養系を対象とした機能遺伝子による定量PCR法による脱窒細菌数の見積もりから一細菌あたりの脱窒活性を推定することが可能となった(0.07~0.16 pmol <sup>30</sup>N<sub>2</sub> cell<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)。検出されたのは*nirS* 遺伝子であった。一方、嫌気状態が弱い井戸ではそれより一桁小さな活性が認められた。

「Gene-FISHによる脱窒活性細菌の定量」については、本手法における予備的な検討の結果から*nirK* 遺伝子をターゲットとする手法の確立を試みることにした。現場の環境中に優占していたクローンの遺伝子配列からデザインしたプローブを用い、*nirK* 遺伝子を組み込んだ大腸菌を用いた実験では、*nirK* 遺伝子の検出に成功した。環境サンプルへの応用に関しては検討の余地があることが示された。

(3)「休耕田の活用等による脱窒ファクトリー構築実験」に関連する予察的な情報取得を目指して研究対象とした井戸周辺の

土壌中の脱窒細菌群の脱窒活性の見積もりおよび遺伝子解析を進めた。

茶畑直下の好氣的な井戸 B と嫌氣的環境下にある井戸 U から採水したサンプルに周辺土壌および土壌と硝酸塩を添加し、安定同位体を用いた脱窒活性測定を行った結果、土壌と硝酸塩添加系における培養 8 時間における  $^{30}\text{N}_2$  と  $^{46}\text{N}_2\text{O}$  生成量は地下水の 3 倍ほど高い活性を示した。土壌と硝酸塩添加系において、好氣的井戸 B における  $^{30}\text{N}_2$  と  $^{46}\text{N}_2\text{O}$  生成量は  $0.160 \pm 0.032 \text{ nmol L}^{-1}$  であった。土壌を添加した場合も嫌氣的環境下にある井戸 U において脱窒活性が高いことが示された。

土壌添加の系における培養後試料の定量 PCR の結果、好氣的井戸 B において、*nirS* は検出限界以下であったが、*nirK* は、土壌添加系において  $8.2 \text{ copies g wet soil}^{-1}$ 、土壌と硝酸塩添加系においては  $2.1 \times 10^2 \pm 0.1 \times 10^2 \text{ copies g wet soil}^{-1}$  であった。一方、嫌氣的井戸 U において、土壌のみを添加した系では *nirK* は  $4.4 \times 10^2 \pm 0.6 \times 10^2 \text{ copies g wet soil}^{-1}$  であったが、*nirS* は検出限界以下であった。また、土壌と硝酸塩を添加した系においては、*nirK* は検出限界以下であったが *nirS* は  $1.1 \times 10 \text{ copies g wet soil}^{-1}$  検出された。土壌に硝酸塩を添加することによって、脱窒を担う群集が変化することが示唆された。

富士山西南麓の茶畑地帯での地下水中では *nirS* 遺伝子を持つ細菌群集による脱窒活性が卓越したが、同じ橋においても土壌中では活性を示した実験系でむしろ *nirK* 遺伝子を有する細菌群による脱窒が卓越することが示唆された。地下水中より高濃度で存在する土壌中のイオン濃度などがこれに影響していることが推察される。

#### まとめ

本研究で見いだされた、富士山西南麓地下水における酢酸添加系での最大活性は、世界の様々な環境から報告されている脱窒活性の中でも最高値に近く（図1 オリジナル）、実験を試みた土壌添加系ではさらに高い活性が得られることが明らかとなった。

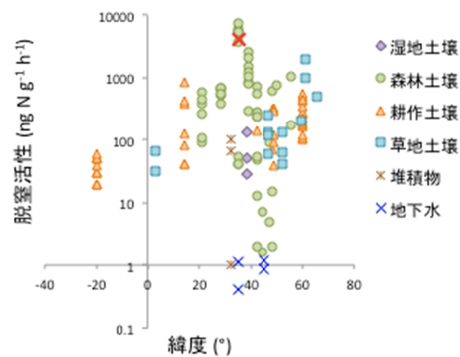


図 1 . 脱窒活性の世界分布 .

× は本研究でみられた最大脱窒活性 (最高値  $0.16 \text{ nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1} = 5600 \text{ ng N L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) .

このことから、地下水と周辺土壌に分布する現場の微生物群集に対して絶対嫌氣環境下で酢酸を添加する系を構築することにより湿地土壌に匹敵する脱窒機能を生み出すことが可能であると示唆された。システム稼働に際しては、酸化還元電位が脱窒反応の進行に伴って下がりすぎないようにシステム内の環境を制御する必要があることも本研究の成果から導き出された。システム構築の場としては提案通り休耕田が考えられる。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Chie Katsuyama, Hiroaki Nashimoto, Kazuyo Nagaosa, Tomotaka Ishibashi, Kazuki Furuta, Takeshi Kinoshita, Hideki Yoshikawa, Kazuhiro Aoki, Takahiro Asano, Yoshito Sasaki, Rumi Sohrin, Daisuke D. Komatsu, Urumu Tsunogai, Hiroyuki Kimura, Yuichi Suwa, Kenji Kato, Occurrence and potential activity of denitrifiers and methanogens in groundwater at 140 m depth in Pliocene diatomaceous mudstone of northern Japan. *FEMS Microbiology Ecology*, 86:532-543, doi: 10.1111/ 1574-6941.12179, 2013. 査読あり.

〔学会発表〕(計 14 件)

加藤憲二、「何が、どこに、どれくらいいて、何をしているか」から「それはどのような意味があるか」へ、日本地球惑星科学連合 連合大会 2014 年大会、Pacifico YOKOHAMA、神奈川県、2014 年 4 月 28 日～5 月 2 日 .  
Chie Katsuyama, Nobuhito Ohte, Yuichi Suwa and Kenji Kato.

Denitrification activity and relevant bacterial community composition in a forest ecosystem. 6th EAFES International Congress, HUANDAO TIDE Hotel, Haikou, China, April 9-11, 2014.

加藤憲二、地下圏で微生物が発揮する活性とバイオマス、そのコントロール、第28回日本微生物生態学会、鹿児島大学、鹿児島県、2013年11月22日～25日。

Tsuyumi Furuta, Ayumi Sugiyama, Takuya Segawa, Kazuyo Nagaosa and Kenji Kato, A comparative study on prokaryotic community constituents in volcanic mountains of Mt. Aso and Mt. Fuji, Japan. The 5th Taiwan-Korea-Japan International Symposium on Microbial Ecology, National Central University Jhongli, Taiwan, Oct.31-Nov.2, 2013.

Ayumi Sugiyama, Takuya Segawa, Kazuyo Nagaosa, Takanori Nakano, Yohei Tada and Kenji Kato, Chase the signature of direct impact of rainfall into groundwater in Mt. Fuji. The 5th Taiwan-Korea-Japan International Symposium on Microbial Ecology, National Central University Jhongli, Taiwan, Oct.31-Nov.2, 2013.

Kenji Kato, Chie Katsuyama, Takeshi Kinoshita, Kazuyo Nagaosa, and Yuichi Suwa, Denitrification in shallow and deep groundwater; activity, diversity of corresponding community and environmental factors. 13th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, Conference Palace of Stresa, Italy, September 8-13, 2013.

Kenji Kato, Chie Katsuyama and Kazuyo Nagaosa, Paradox of the plankton in denitrifiers. Gordon Research Conferences, Marine Molecular Ecology, Hong Kong University of Science and Technology, August 11-16, 2013.

加藤憲二、浅い地下圏と深い地下圏での脱窒：活性とプレイヤー、熊本大学、埼玉大学 CREST 合同ワークショップ、熊本大学、熊本市、2012年11月17日。(招待講演)

Takeshi Kinoshita, Mayu Shido, Takuya Segawa, Chie Katsuyama, Rumi Sohrin, Kazuyo Nagaosa, Yuichi Suwa and Kenji Kato, Denitrification activity and its controlling factor in nitrate polluted groundwater. 第28回日本微生物生態学会、豊橋科学技術大学、豊橋市、2012年9月19日～22日。

Kenji Kato, Kazuyo Nagaosa, Urumu Tsunoghai, Hiroaki Nashimoto, Hideki

Yoshikawa, Yoshito Sasaki, Takahiro Asano, Kazuhiro Aoki, Methanogenesis in deep warm groundwater. 14th International Symposium on Microbial Ecology, Bella Center Copenhagen, Denmark, 19-24 August 2012

木下岳士、瀬川琢也、紫藤真由、成瀬美樹、勝山千恵、宗林留美、諏訪裕二、永翁一代、加藤憲二、地下圏の脱窒ファクトリー：地下水の硝酸汚染と脱窒(硝酸還元) 第27回日本微生物生態学会、京都大学、京都市、2011年10月8日～10日。

勝山千恵、永翁一代、大手信人、山岸昂夫、諏訪裕二、加藤憲二、森林地下水における脱窒活性と脱窒機能遺伝子による脱窒細菌群集構成 第27回日本微生物生態学会 京都大学、京都市、2011年10月8日～10日。

瀬川琢也、木下岳士、紫藤真由、光谷大樹、永翁一代、宗林留美、木村浩之、加藤憲二富士山麓湧水群における岩石-水-微生物の相互作用 第27回日本微生物生態学会、京都大学、京都市、2011年10月8日～10日。

Kenji Kato, Kazuyo Nagaosa, Hiroaki Nashimoto, Chie Katsuyama, Yoshito Sasaki, Yuichi Suwa, Hideki Yoshikawa and Kazuhiro Aoki, Existence and Expression; from a study on denitrification and methanogenesis in deep subsurface. 8th International Symposium of Subsurface Microbiology, Garmisch-Partenkirchen, Germany, September 11-16, 2011.

加藤憲二、深部地下圏でのメタン生成と微生物の生態、地球惑星連合2011年大会、幕張メッセ国際会議場、千葉市、2011年5月22日～16日。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ipc.shizuoka.ac.jp/~skearth/fieldintro.html>

静岡大学理学部地球環境微生物学研究室ホームページにて、富士山麓各所の湧水および地下水の水質、原核生物数、原核生物の群集構成についての情報公開を始めた。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 憲二 (KATO, Kenji)  
静岡大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：70169499

### (2) 研究分担者

諏訪 裕一 (SUWA, Yuichi)

中央大学・理工学部・教授  
研究者番号：90154632

(3)連携研究者

辻村 真貴 (TSUJIMURA, Maki)  
筑波大学・生命環境科学研究科・教授  
研究者番号：10273301