

機関番号：82107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580368

研究課題名(和文) 地下水圏における脱窒ホットスポットの分子生態学的解析に基づく活性発現因子の解明

研究課題名(英文) Analysis of denitrification activity expression factor of denitrification hotspot at groundwater environment based on molecular ecology

研究代表者

中島 泰弘 (NAKAJIMA YASUHIRO)

独立行政法人農業環境技術研究所・物質循環研究領域・主任研究員

研究者番号：10354086

研究成果の概要(和文)：高い硝酸態窒素除去能を有する脱窒ホットスポットを特定するために、硝酸イオンの窒素および酸素安定同位体を用いて地下水中の脱窒活性を評価する手法を確立した。また、高い硝酸態窒素除去能を有する脱窒ホットスポットを探索し、深層土壌を掘削により採取した。

採取した土壌についてDNAを抽出し、PCR-DGGEによって微生物群集のプロファイリングを行った。さらに、硝酸態窒素に富んだ現場地下水と炭素源としてセルロースを添加し、嫌氣的に培養を行った結果、2週間程度で硝酸イオン濃度の低下が見られた。

研究成果の概要(英文)：We developed a method of evaluating denitrification activity by analysis of nitrogen and oxygen stable isotope ratio of nitrate to search denitrification hotspot which has nitrate reduction activity.

We searched out denitrification hotspot from alluvium-diluvium interface and took subsoils. DNA was extracted from subsoil and PCR-DGGE profiles were made for analysis of denitrification hotspot-specific bacterial ecosystems. Subsoils near denitrification hotspot were incubated with nitrate-rich groundwater, results showed that nitrate was reduced within two weeks.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：土壌学、陸水生態学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：硝酸態窒素、脱窒

1. 研究開始当初の背景

水田や湿地等、湛水条件下の嫌氣的土層内における微生物による脱窒反応が、過剰な施肥等に起因する集水域内の窒素負荷を軽減し、水圏の富栄養化を防ぐ役割を担うことは良く知られている。しかし、負荷された窒素のうち水田や湿地の表面水中を通過するのはごく一部に過ぎず、大部分は地下水圏へ流入するはずである。恒川ら¹⁾は、窒素負荷

の大きい地下水が洪積土壌から沖積土壌へ流入する際に、水田表層土壌に匹敵する脱窒活性を有することを明らかにした。さらに、そのようなホットスポットにおいて地下水中の N_2O が除去されることも確認された(中島ら、発表準備中)。このような脱窒ホットスポットの発現要因としては、土壌の有機態炭素含量の違いなどが考えられるが、同様の性質を持つホットスポット周辺の洪積土壌で

も脱窒活性を有しない地点が存在するなど、脱窒ホットスポットにおける代謝および活性発現メカニズムは未だ明らかになっていない。また、その反応を担う微生物群集構造の空間的・時間的変化までも考慮して解明した報告はない。一般に深層土壌－地下水圏は表層土壌と異なり、有機物に乏しい環境にあるため、深層土壌－地下水圏では、低濃度有機体炭素や硫化物等を基質とした、表層土壌のものとは大きく異なる窒素代謝系の存在が指摘されている^{2,3)}。深層土壌－地下水圏で局所的に発現する脱窒反応の制限要因を解明し、その反応を担う微生物群集構造を把握することは、脱窒ホットスポットの空間的分布や脱窒活性の持続性を予測し、この反応が土壌－水圏における窒素循環においてどの程度量的な意義があるのかを評価するためにきわめて重要である。

2. 研究の目的

本研究では、深層土壌－地下水圏における脱窒ホットスポットの活性発現要因を解明するため、台地上の農地における窒素負荷が大きく、それに隣接する低地の深層土壌－地下水圏で脱窒が行われていると考えられる小集水域を対象とし、以下の点について明らかにすることを目的とする。

(1) 脱窒ホットスポットの探索

地下水中で脱窒反応が行われていると考えられる小集水域において、ボーリング調査あるいは地下水中の硝酸イオンの濃度分布および安定同位体分析から、脱窒ホットスポットの探索を行う。

(2) 深層土壌－地下水圏における脱窒活性の推定手法の確立

一般的に深層土壌－地下水圏において硝酸態窒素の動態を解析し、脱窒反応の量的な推定を行うのは、深層土壌および地下水サンプル採取の困難さおよび水移動の複雑さから表層のそれよりもはるかに困難であり、研究事例は限られている。そこで、脱窒ホットスポットを効率よく探索し、また簡便に脱窒活性を評価するため、代替指標として比較的簡単に採取可能な地下水を用いて深層土壌－地下水圏の脱窒活性を評価する方法を確立する。

(3) 脱窒反応に関連する微生物群集構造の同定

本研究が対象とする深層土壌については微生物数が極めて少なく、通常の DNA 抽出方法では PCR-DGGE 解析を行うために十分な量の DNA を確保できない可能性がある。そのため、まず効率的な DNA の抽出条件を検討する。

脱窒反応を担う微生物群集構造の解析については、環境から抽出した DNA や RNA を用いた分子生態学的な解析により明らかにされてきているが、それらの研究は主に水田等の有機物に富む表層土壌を対象とした

ものである。それに対して、深層土壌－地下水圏では一般に有機物が乏しく、硫化物を電子供与体とする独立栄養型脱窒反応が同時進行するとの報告も少なくない。地下水中の脱窒ホットスポットにおける微生物群集構造は、表層土壌のそれとは質的に大きく異なる可能性があるが、これまでそれを同定した報告はない。そこで、帯水層土壌および地下水から環境 DNA を抽出し、PCR-DGGE 解析に基づき、微生物群集構造の同定とその空間的分布を明らかにする。

(4) 深層土壌の基質添加培養試験

帯水層内で脱窒活性の低い領域、脱窒活性の高い領域、脱窒反応の電子供与体を多く含むが活性の低い領域（潜在的脱窒能が高い領域）の土壌を採取し、硝酸態窒素濃度の高い地下水を添加する培養実験等を行い、脱窒活性、微生物群集構造及び水質の変化を明らかにして、現場で得られた知見を検証する。

さらに、採取した土壌に基質を添加し、現地と同様の帯水層環境下で培養することにより、脱窒活性発現の環境要因を検証する。

3. 研究の方法

本研究では、深層土壌－地下水中で脱窒が行われているとみられる小集水域を調査地に選定し、地下水位、土層構造などの水文地質学的調査および地下水中の硝酸イオンの安定同位体分析等に基づき、局所的に脱窒活性の高いホットスポットの位置を特定すると共に、脱窒活性の発現条件を明らかにする。また、地下水および帯水層土壌より環境 DNA を抽出し、脱窒ホットスポットに存在する特徴的な微生物群を同定する。

[調査地の概要]

本研究は、農耕地を主体とする窒素負荷が大きく、かつ地下水中で脱窒反応が行われていると考えられる茨城県石岡市の台地畑－水田地形連鎖系および愛知県矢作川流域の洪積台地と沖積低地に存在する茶園と水田からなる地形連鎖系小集水域を対象とする。

(1) 脱窒ホットスポットの探索

地下水サンプルを採取し、地下水および帯水層土壌の地下水位、土層構造などの水文学的調査から現場地下水の流向・流速を推定する。また硝酸態窒素や亜酸化窒素等の濃度分布および同位体分析から採取試料が脱窒を受けたかどうかの推定を行う。これらの調査結果の井戸－井戸間の比較から脱窒ホットスポットの水平分布の推定を、また深度間の比較から垂直分布の推定を行う。この推定結果をもとにボーリング調査を行い、採取した土壌試料の脱窒活性を測定することにより、最終的に脱窒ホットスポットを特定する。

(2) 深層土壌－地下水圏における脱窒活性の

推定手法の確立

①アセチレンブロック法および LAMP 法による地下水中の脱窒活性と土壌中の脱窒活性の比較

土壌の脱窒活性が認められている井戸の地下水を供試水として、アセチレンブロック法による脱窒活性測定法を確立するため、培養条件（基質濃度、培養時間）を検討する。また、供試水の凍結保存による脱窒活性への影響を測定する。得られた培養条件により、ホットスポットが存在する地下水の深さ別の脱窒活性を測定し、土壌の脱窒活性と比較する。さらに、地下水及び培養した地下水から DNA を抽出し、水田下層土の脱窒活性と相関が得られている脱窒酵素遺伝子 *nosZ* 特異的プライマーによる real time LAMP 反応分析を行い、地下水の脱窒活性と比較する。

②硝酸イオンの安定同位体を用いた地下水中の脱窒活性と土壌中の脱窒活性の比較

地下水中の硝酸イオンが大きく変化している地点およびその周辺の地下水を採取し、 NO_3^- 濃度、 $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ 、 $\delta^{18}\text{O}\text{-NO}_3^-$ を脱窒菌法により、硝酸イオン濃度を測定する。

(3)脱窒反応に関連する微生物群集構造の同定

①深層土壌からの効率的な DNA 抽出方法の検討

ボーリング調査などにより採取した深層土壌サンプルを用い、より効率的に DNA 抽出するために、試薬の添加など、抽出方法の検討を行う。

②微生物群集構造の同定

各地点から採取した深層土壌サンプルより DNA を直接抽出し、細菌 16S rDNA を標的とする PCR-DGGE によって微生物群集のプロファイリングを行う。

(4)深層土壌の基質添加培養試験

選定したホットスポットについて、それぞれホットスポットおよび上流、下流に位置する脱窒活性が高い土壌、脱窒活性が低い土壌、潜在的脱窒能が高いにもかかわらず硝酸態窒素等の基質濃度が低いために脱窒活性が低いと思われる土壌を掘削により採取し、硝酸態窒素に富んだ現場地下水を添加することにより培養を行い、溶存酸素濃度、硝酸態窒素濃度、硫酸イオン濃度、(溶存)有機態炭素濃度等の分析を行い、脱窒環境が再現されるかどうかを確認するとともに、微生物群集の時間変化を観察し、が実際の脱窒環境にみられた微生物群集が実験的に再現されるかどうかを確認する。

4. 研究成果

(1)脱窒ホットスポットの探索

高い硝酸態窒素除去能を有する脱窒ホット

スポットを特定するために、茨城県石岡市の台地畑—水田地形連鎖系に設置した調査用井戸から地下水サンプルを採取した。採取地下水サンプルの硝酸態窒素や亜酸化窒素等の濃度分布および同位体分析の結果、畑地上のW2地点において硝酸

表 1 茨城県石岡市の台地畑—水田地形連鎖系の NO_3^- 濃度、 $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ 、 $\delta^{18}\text{O}\text{-NO}_3^-$

Site	$\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ (‰)	$\delta^{18}\text{O}\text{-NO}_3^-$ (‰)	NO_3^- conc (mgN/L)
W1	4.3	-3.5	8.29
W2	8.5	-3.1	24.54
W3	5.1	-2.8	22.25
W4	15.7	-2.5	82.10
W5a	9.1	-1.3	79.81
W5b	8.6	2.1	18.98
W6a	11.8	7.6	0.04
W6b	7.1	-1.9	1.28
W7	3.2	-4.1	9.28
W8	5.3	-2.0	0.63
W9	9.2	3.3	0.56
W10	8.3	-0.2	9.11
W11a	18.8	8.8	0.53
W11b	22.2	11.9	0.36
W12	-	-	-
C1	7.1	0.6	0.50
C2	4.0	-1.4	17.57
S1	4.1	-3.0	17.54
S2	5.3	-1.8	14.81

W1-12は調査用井戸、C1-2は用水路、S1-2は湧水

および酸素安定同位体の値が上昇しており、また硝酸イオンの濃度が高いことから、その地点において脱窒反応が起こっていることが示唆された(表1)。この結果をもとに、該当地点にて地表面から約200cm深さの地下水面を経て250cmの深さまでボーリング調査を行い、採取した土壌試料の脱窒活性を測定したが、表層土壌を除けば、いかなる深度においても高い脱窒活性は見られなかった。

次に、愛知県西尾市の茶園—水田地形連鎖系に設置した調査用井戸から地下水サンプルを採取した。採取地下水サンプルの硝酸態窒素や亜酸化窒素等の濃度分布および同位体分析の結果、茶園と水田の境界地点、深さ200cmの地下水サンプルにおいて硝酸態窒素の窒素および酸素安定同位体の値が上昇しており、その地点において脱窒反応が起こっていることが示唆された。この結果をもとに、該当地点にて地表面から約300cmの深さまでボーリング調査を行い、採取した土壌試料の脱窒活性を測定し、深さ160~220cmの深度で高い脱窒活性が見いだされた。

(2)深層土壌—地下水圏における脱窒活性の推定手法の確立

①アセチレンブロック法およびLAMP法による地下水中の脱窒活性と土壌中の脱窒活性の比較

地下水の脱窒活性は、基質として炭素源を添加した場合のみに12時間以上経過すると急速に高まることから、24~48時間培養することが適当であると考えられた。また、地下水試料を凍結すると脱窒活性は著しく低下する

ことから、試料は未凍結のまま培養に供することが最善と考えられた。脱窒ホットスポットが存在する地下水の脱窒活性を深さ別に測定したところ、土壌の脱窒活性が高い深さ2.0mの地下水で特異的に高くなった。そのため、地下水培養によるアセチレンブロック法で農耕地下層土の脱窒活性を簡易的に評価できる可能性があると考えられた。

一方、地下水を24時間及び48時間培養し、その試料液からDNAを抽出して地下水及び培養した地下水のLAMP反応分析の結果、濁度上昇と脱窒活性の間に相関は認められなかった。*nosZ*遺伝子特異的プライマーによるreal time LAMP反応を行った結果、濁度上昇と実際の脱窒活性の間に相関は認められなかった。

②硝酸イオンの安定同位体を用いた地下水中の脱窒活性と土壌中の脱窒活性の比較

脱窒ホットスポットにおいて深さ別に $\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3^-$ および $\delta^{18}\text{O}-\text{NO}_3^-$ を求めたところ、2.0mで最も高い値を示した(図1)。これは脱窒活性の分布と一致する。

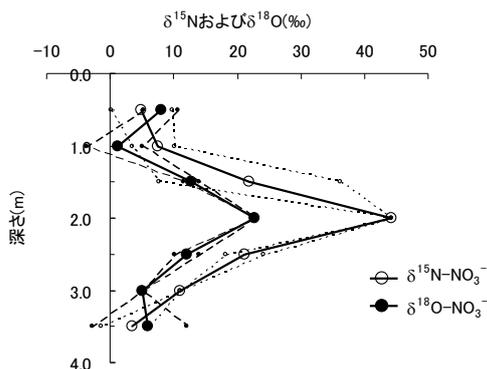


図1 高い脱窒活性が見られた地点における地下水中の硝酸イオンの $\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3^-$ および $\delta^{18}\text{O}-\text{NO}_3^-$

(3)脱窒反応に関連する微生物群集構造の同定

茨城県石岡市の台地畑—水田地形連鎖系のボーリング調査によって得られた土壌試料より微生物群集のプロファイリングを行うためにDNAの抽出を試みたが、採取された土壌が黒ボク土であり、また深層土壌については微生物数が極めて少なく、十分な量のDNAを抽出することは困難であった。そのため、DNAの抽出条件を検討した結果、スキムミルク溶液バッファを加えることにより深層土壌でもPCRが可能な程度のDNA量を抽出することが可能となった(図2)。

次に、愛知県西尾市の茶園—水田地形連鎖系のボーリング調査によって得られた土壌試

DNA溶液濃度

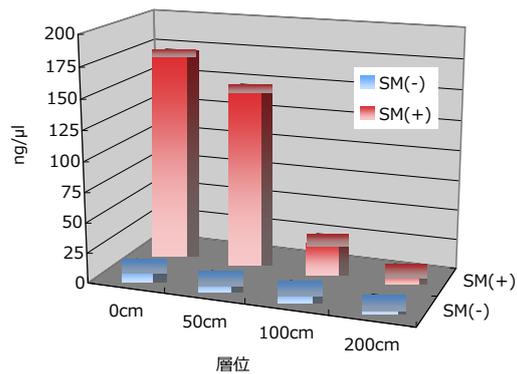


図2 土壌からのDNA抽出効率のスキムミルクの影響

料よりDNAの抽出を行った結果、PCR-DGGE解析に必要なDNA量を抽出することができた。抽出したDNAについて16S rDNAのPCR-DGGE解析を行った結果、土壌各層においてそれぞれ異なる細菌群集プロファイルが得られた(図3)。

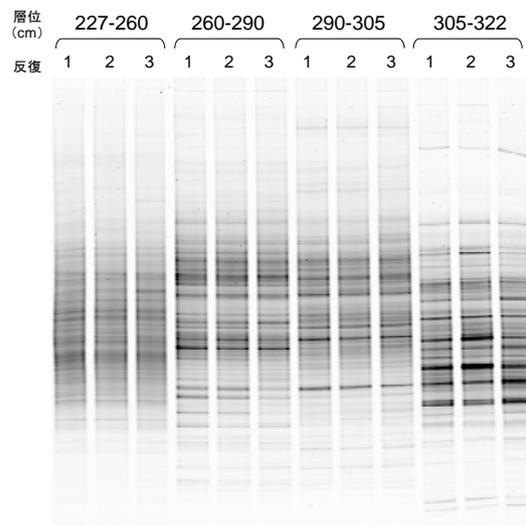


図3 西尾脱窒ホットスポット下層土細菌群集プロファイル

(4)深層土壌の基質添加培養試験

愛知県西尾市の茶園—水田地形連鎖系に設置した調査用井戸の深さ160~220cmの深度において見いだされた高い硝酸態窒素除去能を有する脱窒ホットスポットについて、深さ325cm深度まで、それぞれホットスポットおよび上流、下流に位置する脱窒活性が高い土壌、脱窒活性が低い土壌、潜在的脱窒能が高いにもかかわらず硝酸態窒素等の基質濃度が低いために脱窒活性が低いと思われる土壌を掘削により採取した。採取した土壌について硝酸態窒素に富んだ現場地下水を添加し、培養容器に封入した後、気相および液相を窒素で置換し、嫌氣的に培養を行った

。その結果、表層土壌を除いて、いずれの深さの土壌においても顕著な硝酸態窒素の低下は見られなかった。そこで炭素源としてセルロースを添加し、再度培養を行ったところ、95～105cm、240～255cm深度の土壌において、2週間程度で硝酸態窒素の低下が見られた。

参考文献

- 1) 恒川ら,土肥誌, 77:207-211(2006)
- 2) Bottcher J. *et al.* *J. Hydrol.*, 114,413-424(1990)
- 3) Hashimoto T. *et al.* *Biol. Fertil. Soil*, 42:179-185(2006)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① 高津文人、今井章雄、中島泰弘、小松一弘、川崎伸之、佐藤貴則、硝酸イオンの窒素・酸素安定同位体比測定のための安価な自動前処理ラインの開発, RADIOISOTOPES, 査読有, 印刷中
- ② Sadao Eguchi, Yasuhiro Nakajima, Shiho Yabusaki, Masahiro Kasuya, Hiroko Shibayama, Ayumi Tsunekawa, Katsuhiko Imai, Denitrification during vertical upwelling at an alluvium-diluvium interface below the upland perimeter of a riparian paddy, *J. Environ. Qual.*, 査読有, 38, 2009, 2198-2209
- ③ 江口定夫, モデルによる土壌, 農耕地, 流域における窒素動態の理解: 3. 地形連鎖系スケールの窒素動態: 調査技法とモデル化手法, 日本土壌肥料学雑誌, 査読有, 79, 2008, 213-227

[学会発表] (計15件)

- ① 中島泰弘, 地形連鎖系の浅層地下水帯を通じた脱窒に伴う硝酸性窒素濃度と窒素・酸素安定同位体比の変動(2), 日本土壌肥料学会, 2010, 北海道大学
- ② 中島泰弘, 地形連鎖系の浅層地下水帯を通じた脱窒に伴う硝酸性窒素濃度と窒素・酸素安定同位体比の変動, 日本土壌肥料学会, 2009, 京都大学
- ③ 中島泰弘, 脱窒菌を利用した硝酸態窒素の窒素および酸素安定同位体比の分析手法の簡易・迅速化および畑地-水田地形連鎖系における窒素動態解析への適用, 日本土壌肥料学会, 2008, 名古屋市立大

学

- ④ Sadao Eguchi, Denitrification in the shallow aquifer below the riparian paddy fields adjacent to the upland tea fields, *Proceedings of the International Workshop in NSFC-JST strategic China-Japan Joint Research Program on "Comparative Study of Nitrogen Cycling and Its Impact on Water Quality in Agricultural Watersheds in Japan and China"*, 2008
- ⑤ Sadao EGUCHI, Nitrate removal in the shallow aquifer below riparian paddy fields adjacent to upland tea fields, *Abstract of the XXXVI International Association of Hydrogeologic Congress*, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 泰弘 (NAKAJIMA YASUHIRO)
独立行政法人農業環境技術研究所・物質循環研究領域主任研究員
研究者番号: 10354086

(2) 研究分担者

江口 定夫 (EGUCHI SADAO)
独立行政法人農業環境技術研究所・物質循環研究領域主任研究員
研究者番号: 30354020
星野(高田) 裕子 (HOSHINO-TAKADA YUKO)
独立行政法人農業環境技術研究所・生物生態機能研究領域研究員
研究者番号: 40354104
森本 晶 (MORIMOTO SHO)
独立行政法人農業環境技術研究所・生物生態機能研究領域研究員
研究者番号: 00354118