

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2016

課題番号：24681007

研究課題名(和文)窒素-硫黄-炭素同位体システマティクスを用いた脱窒メカニズム解明法の確立

研究課題名(英文) Development of N-S-C multiple isotope tractability method as a new evaluation technique of denitrification mechanism

研究代表者

細野 高啓 (Hosono, Takahiro)

熊本大学・大学院先導機構・准教授

研究者番号：30367065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：地下水の硝酸性窒素水質汚染が世界中で大きな環境問題となっている。こうした問題の改善には、自然浄化の鍵を握る脱窒現象について現地帯水層中におけるその種類や浄化能力を評価する手法の確立が急務となっている。本研究の目的は窒素、硫黄、炭素の安定同位体比をマルチに扱うことで、脱窒メカニズムを総合的に評価するための新しい手法を開発し、その有用性を実証することであった。5年間の研究によりこのことを成し遂げた。

研究成果の概要(英文)：Deterioration of groundwater quality due to nitrate-nitrogen is becoming serious environmental problem worldwide. In order to improve this problem, new methods for evaluating type and process of denitrification reaction, a key factor of in situ natural purification, are needed to be developed. This study was aimed to develop new methodology for investigating denitrification mechanism and to show its purification ability using stable isotope ratios (for nitrogen, sulfur, and carbon) in multiple ways. We conducted our proposed plan and achieved our goal in 5 years during 2012-2016.

研究分野：地下水環境学

キーワード：地下水 安定同位体比 硝酸汚染 脱窒 熊本 沖縄本島南 スペイン・オソナ地域

1. 研究開始当初の背景

世界的に問題視されている地下水硝酸汚染を食い止める対策として、窒素負荷源を高精度で特定し、汚染源からの地下への流出を軽減させる、脱窒壁など人工的な対策により、一度汚染された地下水の浄化を試みるの2点が挙げられる。この問題は改善されつつある。しかし、この問題は場所が限定されるため、広範に分布する汚染の浄化は現実的に難しい。一方、“脱窒”(硝酸が分解される反応)は帯水層にて普遍的かつ広範にて起こっている現象である。この脱窒による『自然の浄化効果』のしくみを正しく評価し、対策へとつなげることが近年大きく注目されてきている。

由来が様々で、かつ、面的に広がる硝酸汚染源の特定は困難を極める。また、帯水層中の菌種は複雑かつ変化に富む。自然界で起こる脱窒の有無、種類、強度は菌種の同定や濃度からは知ることができない。この目に見えない硝酸(NO_3^-)の起源と挙動を追跡できる唯一有効な化学トレーサーが硝酸同位体比である。硝酸同位体トレーサー法は、地下水硝酸中の窒素の同位体比(^{15}N)と酸素の同位体比(^{18}O)を測定し、起源物質の組成と比較することで汚染源を推定し、同時に、生物化学反応の結果生じる同位体組成の変化傾向から脱窒の有無と程度を推測する方法である。

世界では、また、申請者自身も最先端研究をリードする中、上記方法には二つの決定的な問題が存在することが明らかになってきた。一点目は、 ^{15}N - ^{18}O 同位体ダイアグラムにおいて、地下水試料や起源物質自体の同位体組成が重なることが多く、汚染起源をはっきり特定できないという問題である。この問題は申請者の科研費若手A研究(H20-23年度)を進める中、硫酸の同位体比を上手く組み合わせることで解消できることが明らかとなった。

二つ目の問題として、 ^{15}N - ^{18}O 同位体ダイアグラムからは、どのような脱窒メカニズムが働いているかまでは全く分からないという問題があった。実際、アジア温暖湿潤気候における帯水層では、大陸基盤岩系帯水層とは異なり、自然脱窒による浄化効果が極めて大きい事実が分かかってきており、帯水層脱窒機構の深層理解がいよいよ重要となってきた。帯水層中でどのような脱窒反応が生じているか、同位体的手法を用いて解明する方法を提案することが重要であった。

2. 研究の目的

自然界では主としてアナモックス脱窒、従属栄養的脱窒、独立栄養的脱窒の三つの脱窒反応系が存在する。また前述の通り、脱窒の分布や強度は菌同定からでは困難である。目

に見えない主たる脱窒反応系を特定するポイントは、脱窒に伴い、アナモックス脱窒ではアンモニアと亜硝酸が、従属もしくは独立栄養的脱窒ではそれぞれ重炭酸と硫酸が、といった様に、反応に応じて異なる生成物が発生する事実に注目することである。この生成物(重炭酸や硫酸)の同位体比を生物反応の履歴を記録するレコーダーとして上手く利用し、実際に生じた反応系の特定を目指すのが本研究アイデアの根幹である。

アイデアを具体的に整理する。まず、大前提としてアナモックス以外の脱窒が起こると ^{15}N は高くなる。次に、それが従属栄養的脱窒によるものであれば地下水中重炭酸の炭素同位体比(^{13}C)は生物起源の低い値に変化する。逆に、独立栄養的脱窒であれば硫酸の硫黄同位体比(^{34}S)が硫化物起源の低い値に変化するはずだ。そして、アナモックス脱窒では ^{15}N が低くなり、他の同位体比は変化しないはずだ。この仮説を基に、世界でこれまで明らかにする手立てさえも存在しなかった、自然界における脱窒メカニズムの解明とその方法論を、実験と野外での実証により構築するのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究の最終的なゴールは窒素(N)-硫黄(S)-炭素(C)同位体比を組み合わせることで、帯水層で起こっている主たる脱窒反応系の特定と、それぞれの脱窒能力の程度を見極めることのできる、これまでに無い新しい方法を確立することである。下記の2つのサブテーマをクリアすることにより、この最終ゴールの達成に挑んだ。

【室内実験】各脱窒菌(従属栄養的脱窒および独立栄養的脱窒)の室内培養を通じて、それぞれの反応系におけるN-S-C同位体応答を確認する。これにより室内レベルでの理論と方法論の信憑性の裏付けを行う。また、アナモックス脱窒反応による同位体応答について、バルセロナ大学と共同で研究を行う。

【現地調査】菌種や既存の情報により各脱窒系が卓越していることが予想される帯水層において地下水を採取し、自然界で起こっている脱窒系の特定と自然浄化の程度を明らかにする。同時に、自然界における本方法の有効性を実証する。熊本地下水地域および沖縄本島南部地域を研究対象地域に選定し研究を行った。

年度ごとの研究の流れは下記のように計画し、実際研究はこの流れに沿って問題なく進行した。

平成 24 年度：野外調査、微生物培養実験開始、および分析。

平成 25 年度：野外調査、微生物培養実験、分析、学会での成果発表、バルセロナ大学での共同研究。

平成 26 年度：野外調査の補足，微生物培養実験完了，分析，学会での成果発表，論文執筆．

平成 27 年度：論文執筆，データ総括，成果のまとめと発信．

*平成 28 年度：前年度繰越金を用いて，機器の復旧と分析を完了させた．

4．研究成果

研究の成果について，先般述べた研究背景，目的，ならびに研究計画に照らし合わせ，その内容を，時系を追って年度ごとに以下に報告する．

初年度（平成24年度）：

【室内実験】従属および独立栄養脱窒の室内培養実験を通じ，各反応系におけるN-S-C同位体応答を予察的に捉えることに成功した．中でも従属栄養脱窒反応における酸素同位体変動，独立栄養脱窒反応における炭素同位体変動では予想しなかった同位体分別法則が確認され，セオリーの確認に加え，重要な学術的知見を得るに至った．アナモックス反応については古川教授の退官に伴い熊大での実施が不便になったが，バルセロナ大学の研究室で同様の実験を共同で行うことができそうなため，引き続き計画を進める方針に至った．

【現地調査】熊本地域における採水調査ならびに試料分析を行い，それに基づき，熊本地下水研究では予想以上の内容の成果を挙げ，予想よりも早期に第一報国際誌論文をWater Research誌に掲載することができた（論文番号15）．ここでは，熊本地域における硝酸性窒素の起源がこれまでになく詳細に突き止められ（主たる窒素源は過去に施肥された化学肥料であることを指摘），特に，広域流動系に沿った浄化プロセスには希釈と脱窒の2つが存在し，なおかつ，それらの能力を比較すると脱窒の方が有益であり，さらにはそれら異なる2つの浄化プロセスが働いている地理的特性が明らかにされた．さらに，水環境学会誌の特集号「水環境評価に向けた安定同位体研究の最前線」にも，「地下水研究における種々の安定同位体比を用いた新たな取り組み」と題した論文を執筆し（論文番号17），本研究の先進性を紹介した．

加えて，スペイン北東部オソナ盆地と沖縄本島南部での現場視察を行った．

2年目（平成25年度）：

【室内実験】従属および独立栄養脱窒の室内培養実験を通じ，各反応系におけるN-S-C同位体応答をより細かく捉えることに成功した．アナモックス反応については，バルセロナ大学で行っている培養実験研究に参画することができ，今後も引き続き実験を進める方向で話し合いがもたれた．

【現地調査】スペイン・オソナ地域における脱窒メカニズムを吟味する機会を得たので，

ここでの知見を活かし，先般Water Research誌に掲載された論文の続編として，現場で起こっている脱窒反応が従属栄養型か独立栄養型かを同位体的に見極める方法論提案について，アイデアの根幹を練ることができた．次年度は論文作成に当たる予定である．

3年目（平成26年度）：

【室内実験】微生物培養実験結果の論文用原稿執筆が進められ，バルセロナ大学で得られた知見を生かし，投稿直前の段階にまで仕上げられた．

【現地調査】熊本地下水地域におけるマルチ同位体法適応ならびに本方法の有効性実証については投稿論文がWater Research誌に掲載され（論文番号14），これにより窒素、硫黄、炭素の安定同位体比をマルチに扱うことで，脱窒メカニズムを総合的に評価するための新しい手法が提案，確立されることとなった．具体的には，現場における脱窒反応に伴う同位体応答は，研究当初予想した仮説に沿ったものであるが，帯水層環境によっては硫黄や炭素の同位体比が，様々なプロセス（海水の混入の影響，硫酸還元反応，各種還元反応により生じる微生物呼吸起源炭素）によっても変化しうるため，条件を見極めながらの適応が可能であることが示された．

沖縄本島南部地下水を対象とした現地調査については，今年度までで月に1度の採水調査を終え，年間を通じた貴重な試料を得ることができた．また，硝酸同位体比と菌叢解析との結果をベースとして，両者の対応性を議論した論文を，研究協力者の琉球大学安元純助教がとりまとめ，受理・掲載待ちの状況にまで至った（論文番号12）．

4年目（平成27年度）：

【室内実験】昨年度まで準備してきた微生物培養実験結果を取りまとめた投稿論文をJournal of Contaminant Hydrology誌に掲載することができた（論文番号7）．内容としては，既に述べてきた仮説が実験レベルでも確認することができたと共に，特に独立栄養脱窒反応系において，これまで確認されてこなかった微生物による同位体分別現象が認められ，学術的に新たな知見を報告するに至った．すなわち，脱窒反応が進むにつれ残液の炭素同位体比は次第に重い同位体を持つように，また，生成される硫酸中の硫黄同位体比が反応物である黄鉄鉱（ FeS_2 ）の組成と比べて約2‰程度低くなる（微生物が選択的に軽い ^{34}S を）現象が認められた．

【現地調査】これまでの研究の取り組みにより，熊本地域地下水，沖縄本島南部地下水，スペイン・オソナ地域地下水における硝酸性窒素汚染実態調査を全て終了している．それぞれの知見を融合して国際雑誌にも掲載でき，当初の計画を遂行することができた．これら現地調査に加え，マルチ同位体比，

シミュレーションモデル，菌叢解析から得られた情報を統合し，これまでの最先端研究で明らかとなってきた事象をレビューし，かつ，これからの地下水硝酸汚染研究への提言について，日本地下水学会誌に総説としてまとめ上げると共に（論文番号9），同学会において地下水硝酸汚染問題にかかわるシンポジウム開催を発展させて企画した特集号の編集にあたり，2号にまたがる特集号の作成を完了させた。

最終年度（平成28年度）：

研究活動として当初の目的は達成できている状況であったが，H27年度11月に雇用していたポストドク研究員が11月に急に退職したため，分析機器の維持やメンテナンスに関わる作業が頓挫していた。加えて，沖縄本島南部地域の研究を発展させた内容の論文を執筆段階にあったが，その成果がまだ論文化できていなかったため，その進展を目指してきた。H28年度に一部基金分を繰り越しして新規補助員を雇用することでH28年度中には分析機器の維持やメンテナンスを完了させ，未受理だった投稿論文についてもほぼ完成する段階にまで至っている。

以上の説明の通り，H28年度で終了となった5年越しの研究活動により，当初計画の全てをクリアすることができた。国際的にも最先端と見なせる本研究の結果は，各地域研究について16件のインパクトファクター付き国際学術雑誌，6件の査読付き国内原著論文，3件の査読付き国内総説論文，4件の教科書にて掲載発表することとなり，予想をはるかに上回る結果となった。国際的に知名度の高い国際誌に本研究結果の成果が多数掲載され，反響も大きく，本研究が世界の研究者に与えたインパクトは大きく，客観的に見ても世界でも最先端の研究を推進してきたと評価できる。

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 25 件のうち，代表 17 件のみ示す。全て査読有。）

1. Hossain, S.; Hosono, T.; Yang, H.; Shimada, J. Geochemical processes controlling fluoride enrichment in groundwater at the western part of Kumamoto area, Japan. *Water, Air and Soil Pollution*, 2016, 227:385 DOI 10.1007/s11270-016-3089-3.
2. Zeng, X.; Hosono, T.; Ohta, H.; Niidome, T.; Shimada, J.; Morimura, S. Comparison of microbial communities inside and outside of a denitrification hotspot in confined groundwater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2016, 114, 104-109.
3. 森康二，田原康博，多田和広，細野高啓，嶋田純，松永縁，登坂博行. 流域スケールにおける反応性窒素移動過程のモデル化と実流域への適用性検討. *地下水学会誌*, 2016, 58, 63-86.
4. Hosono, T.; Alvarez, K., Muwae, M. Lead isotope ratios in six lake sediments cores from Japan Archipelago: Historical record of trans-boundary pollution sources. *Science of the Total Environment*, 2016, 559, 24-37.
5. Mizota, C.; Hosono, T.; Matsunaga, M.; Yamanaka, T. Oxygen and nitrogen isotopic constraints to the origin of saltpetre in historic gunpowder prevailed during the 19th century in Japan. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 2016, 6, 547-556.
6. Hossain, S.; Hosono, T.; Ide, K.; Matsunaga, M.; Shimada, J. Redox processes and occurrence of arsenic in a volcanic aquifer system of Kumamoto Area, Japan. *Environmental Earth Sciences*, 2016, 75:740.
7. Hosono, T.; Alvarez, K., Lin, I-T.; Shimada, J. Nitrogen, carbon, and sulfur isotopic change during heterotrophic (*Pseudomonas aerofaciens*) and autotrophic (*Thiobacillus denitrificans*) denitrification reactions. *Journal of Contaminant Hydrology*, 2015, 183, 72-81.
8. 細野高啓，小野寺真一，吉本周平. 「特集」九州・沖縄地域における帯水層中での硝酸性窒素の動態. *地下水学会誌*, 2015, 57, 435-437.
9. 細野高啓，林殷田，アルバレス・ケリー，森村茂，曾祥勇，森康二，田原康博，松永縁，ホセイン・シャハダット，嶋田純. 地下水硝酸汚染研究における最新のトレンドと今後の方向性：熊本地域の事例を通して. *地下水学会誌*, 2015, 57, 439-465.
10. 松永縁，嶋田純，細野高啓，田原康博，岩佐耕次. 宮崎県都城盆地における観測結果を踏まえた3次元地下水シミュレーションで試みた硝酸性窒素の振る舞いの可視化. *地下水学会誌*, 2015, 57, 495-513.
11. 松永縁，嶋田純，三上久美子，細野高啓，利部慎，岩佐耕次. 宮崎県都城盆地における地下水中の硝酸イオンの分布特性とその自然浄化に関する考察. *地下水学会*

- 誌, 2015, 57, 277-293.
12. 安元純, 廣瀬(安元)美奈, 久手堅剛, 宮城雄次, 大城要平, 聖川健斗, 細野高啓, 嶋田純, 中野拓治. 琉球石灰岩帯水層における脱窒に係わる微生物相解析. 地下水学会誌, 2015, 57, 153-169.
 13. Hosono, T.; Lorphensriand, O.; Onodera, S.; Okawa, H.; Nakano, T.; Yamanaka, T.; Tsujimura, M.; Taniguchi, M. Different isotopic evolutionary trends of ^{34}S and ^{18}O compositions of dissolved sulfate in an anaerobic deltaic aquifer system. *Applied Geochemistry*, 2014, 46, 30-42.
 14. Hosono, T.; Tokunaga, T.; Tsushima, A.; Shimada, J. Combined use of ^{13}C , ^{15}N , and ^{34}S tracers to study anaerobic bacterial processes in groundwater flow systems. *Water Research*, 2014, 54, 284-296.
 15. Hosono, T.; Tokunaga, T.; Kagabu, M.; Nakata, H.; Orishikida, T.; Lin, I-T.; Shimada, J. The use of ^{15}N and ^{18}O tracers with an understanding of groundwater flow dynamics for evaluating the origins and attenuation mechanisms of nitrate pollution. *Water Research*, 2013, 47, 2661-2675.
 16. 松永緑, 三上久美子, 嶋田純, 細野高啓, 利部慎, 岩佐耕次. 宮崎県都城盆地における地下水流動を踏まえた地下水中の硝酸性窒素の起源とその挙動. 九州応用地質学会会報, 2013, 34, 2-11.
 17. 細野高啓. 地下水研究における種々の安定同位比を用いた新たな取り組み. In: 特集『水環境評価に向けた安定同位体研究の最前線』, 水環境学会誌, 36, 231-236, 2013.

〔学会発表〕(計 62 件; 代表 9 件のみ示す)

1. 安元純, 高田遼吾, 廣瀬美奈, 細野高啓, 松永緑. 脱窒過程における亜硝酸還元酵素遺伝子 *nirS* の変動特性. 日本地球惑星科学連合大会 (JpGU 2016, 2016 年 5 月 22 ~ 26 日), 千葉県, 幕張メッセ, 国際会議場.
2. Okumura, A., Hosono, T., Shimada, J., Nitrate behaviors in unsaturated zone under farmlands with different fertilization log at Kumamoto region, Japan. European Geosciences Union General Assembly 2016 from 17-22 April 2016 in Austria Center Vienna in Vienna, Austria.
3. Hossain, S., Hosono, T., and Shimada, J., Geochemistry of Arsenic and Other Trace Elements in a Volcanic Aquifer System of

Kumamoto Area, Japan. Goldschmidt 2015 from 16/8-21/8 in Prague Congress Centre, 18 August 2015 in Prague, Czech Republic.

4. 細野高啓, Alvarez, K., 林殷田, 嶋田純. 脱窒菌培養実験に基づく、窒素・炭素・硫黄同位体比の変化傾向:地下水硝酸汚染研究への応用. 日本地球惑星科学連合大会 (JpGU 2015, 2015 年 5 月 24 ~ 28 日), 2015 年 5 月 28 日, 千葉県, 幕張メッセ, 国際会議場.
5. Hossain, S., 細野高啓, 井手浄, 梁熙俊, 嶋田純. 熊本地域西部の地下水における高フッ素濃度の要因評価. 日本地球惑星科学連合年大会 (JpGU 2015, 2015 年 5 月 24 ~ 28 日), 2015 年 5 月 24 日, 千葉県, 幕張メッセ, 国際会議場.
6. Zeng, X.Y., Hosono, T., Yoshida, C., Ohta, H., Niidome, T., Shimada, J. and Morimura, S. (2014) Phylogenetic analysis and distribution of bacterial community in groundwater in Kumamoto prefecture. The 66th Annual Meeting of the Society for Biotechnology, 11 September 2014 in Sapporo, Japan.
7. 安元純, 廣瀬(安元)美奈, 聖川健斗, 細野高啓, 松永緑, 嶋田純, 中野拓治. 微生物相解析からみる石灰岩帯水層における脱窒特性. 日本地下水学会 2014 年度春季学術大会, 東京大学, 2014 年 5 月 24
8. Hosono, T.; Tokunaga, T.; Tsushima, A.; Kagabu, M.; Nakata, H.; Shimada, J. Multiple use of stable isotope ratios to understand groundwater quality changes and attenuation processes in Kumamoto area, southern Japan. IAHS-IAPSO-IAPSEI, 22-26 July 2013 in Gothenburg, Sweden.
9. 細野高啓, 徳永貴大, 對馬あかね, 嶋田純. C-N-S 安定同位体システムティックスの帯水層嫌気性微生物還元プロセス研究への応用. 日本地球惑星科学連合 2013 年大会, 千葉幕張メッセ, HTT32-P16, 2013 年 5 月 23 日.

〔図書〕(計 4 件; 代表的な 2 件のみ示す)

1. 細野高啓, 森村 茂. 地下水硝酸汚染の現状と自然浄化の実態. In: 持続可能な地下水利用に向けた挑戦 (嶋田 純, 上野真也編), 2016, 成文堂, 77-99.
2. 河原正泰, 細野高啓. 地下水中の天然由来ヒ素汚染の実態とその対応策の提案. In: 持続可能な地下水利用に向けた挑戦 (嶋田 純, 上野真也編), 2016, 成文堂, 235-254.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

細野 高啓 (HOSONO TAKAHIRO)
熊本大学・大学院先導機構・准教授
研究者番号：30367065

(2)連携研究者

嶋田 純 (SHIMADA JUN)
熊本大学名誉教授
研究者番号：80206169