

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450365

研究課題名(和文) 微生物活動による硝化・脱窒動態の把握と水質形成機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of groundwater quality formation mechanism through nitrification and denitrification processes by microbe activity

研究代表者

中野 拓治 (NAKANO, TAKUJI)

琉球大学・農学部・教授

研究者番号：30595202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、農業生産活動による地下水の硝酸汚染問題に対応するため、沖縄本島南部地域の地下ダム流域等を対象に、現地観測と室内カラム試験等を通じて地下水の物質輸送現象を把握するとともに、安定同位体比分析やPCR-DGGE等の分子生物学的手法を用いて硝化・脱窒過程に関与する微生物の同定と硝化・脱窒の生物代謝に係る物理環境条件を検証した。地下水中の微生物代謝に伴う硝化・脱窒メカニズムとともに、地下水の水質形成機構への関与を裏付けることができた。本研究の成果は、水質管理を含めた適切な地下水利用への活用を通じて、畑地農業地域等の農業用水利用技術や環境保全型農業生産活動技術の進展に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：For the basement dam irrigation basins in the southern part of Okinawa Main Island, it was grasped a material transportation phenomenon of the groundwater through field observation and column examination to cope with the issue of nitric acid pollution of the groundwater by the agricultural production activity in this study. It was also inspected physics environment condition to modify creature metabolism of the identification of the microbe which participated in nitrification and denitrification process using stable isotope ratio analysis and molecular biologic technique. As for the result of this study, it is expected through utilization to the appropriate groundwater use including water quality management that we contribute to the progress of an agriculture water use technology and the environmental conservation type agricultural production activity technologies of farm agriculture areas.

研究分野：農村計画

キーワード：地下水 硝酸性窒素 琉球石灰岩分布地域 硝化・脱窒 農業用水 水質形成 微生物活動

1. 研究開始当初の背景

(1) 農地や地下水等の自然界における窒素代謝とそれに関わる微生物群の働きに係る研究は古くから土壤微生物学の研究領域であり、硝酸化成と脱窒過程に関与する微生物が有する代謝経路の生化学・分子生物学的な観点からの解明に向けた調査・解析が行われている。しかしながら、琉球石灰岩のように不均一性の高い帯水層と地表土壌を一体として捉えた窒素循環を巡る知見として窒素の物質代謝作用へのアンモニアから亜硝酸・硝酸化成過程と琉球石灰岩地下水中の微生物の窒素循環への定量的な関与は明らかになっていないとともに(渡久山ら, 2000), 地下水帯水層は表層土壌に比べ嫌気的環境にあるため、脱窒作用が期待されているものの(李ら, 2007), フィールドレベルでの実証的な研究は進展していないのが現状である。その一方で、我が国を含め世界各国では、化学肥料の施用に起因する土壤生態系から地下水系への硝酸性窒素の流出が地下水の硝酸汚染を起こしており、地域環境へ様々な負荷を与える結果となっている。この地下水の硝酸汚染はアメリカや EU 諸国では 1970 年代、我が国でも 1990 年代から各地で汚染の実態が明らかになり、地下水水質保全 対策は実施されているものの農業を含めた社会経済活動の多様化に伴って、硝酸汚染問題は深刻化しており、解消されていない。

(2) 近年、遺伝子解析技術の進歩は目覚ましく、菌相解析技術の進展で特定の環境に生育する微生物の系統分類学的な位置を明らかにすることが可能になってきた。16SrDNA 遺伝子の塩基配列を利用し、複合微生物系から抽出した DNA をもとに、PCR-DGG 法等の分析手法を用いて、微生物による硝酸化成と脱窒過程に関わる新たな発見や知見が得られているが、琉球石灰岩地帯での脱窒過程に関わる菌相解析を行った報告はない(楠井ら, 2007)。土壤生態系と地下水系を一体的に捉え、硝化脱窒に係る物質代謝作用について分子生物学的手法を用いて優先化している微生物の特定とプロセスの把握を通じて、地下水の水質形成メカニズムを解明し、水質環境に配慮した畑地灌漑水の持続可能な利用を図ることにより、環境に負荷を与えない農業生産活動を展開することが求められている(藪崎, 2010)。

(3) 我が国唯一の亜熱帯性気候に位置する沖縄県では、慢性的な水不足に対応するため、地下ダムを含めた農業水利施設の整備を通じた水資源開発が行われており、今後、我が国の食料自給率の向上と力強い農業経営体の育成するためには、南西諸島嶼部においても基幹作物である「さとうきび」に加え、畑地灌漑による収益性の高い畑作物の導入が求められる(名和ら, 2006)。その一方で、南西諸島嶼部は、琉球石灰岩を表層地質とする

地形・地質特性から、硝酸性窒素等の地下水汚染も進行しやすく、安定した収量と高品質な作物栽培には不可欠な施肥量増加等に伴う水質汚濁を招くため、持続可能な農業用水利用と環境保全型農業等の実践を通じた環境負荷への対応が喫緊の課題となっている(渡久山, 1990)。

2. 研究の目的

(1) このような状況を踏まえ、本研究においては、農業生産活動による地下水の硝酸汚染問題に対応するため、「微生物活動による硝化・脱窒動態の把握と水質形成機構の解明」を研究目的とする。

(2) 南西諸島亜熱帯島嶼部の地下ダム灌漑流域を対象として、表層畑地土壌と不均一地下水帯水層を一体に捉え、() 生物窒素代謝機構を明らかにするとともに、() 硝酸同位体法等を用いて硝化脱窒動態を定量的に把握することにより、() 地下水の水質形成機構の解明を図る。

(3) 硝酸・脱窒に係る物質代謝作用の把握と農業用水の水源である地下水の硝化・脱窒機構の解明を通じて、水質環境に配慮した畑地灌漑水の持続可能な利用に寄与するものである。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、本島南部地域(以下、研究対象地域という)を調査フィールドとして選定し、概ね月 1 回の頻度で 33 地点の地下水位と地下水水質(水温、pH、酸化還元電位(ORP)、溶存酸素(DO)とアンモニア態窒素、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素を含めた主要陽・陰イオン(Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , SO_4^{2-} , Cl^- , HCO_3^-))に係る通年観測を実施した(図 1)。地下水流動場の可視化を図るため、地下ダム建設に伴って実施された約 200 本の観測井戸ボーリング資料の整理・デジタル化を通じて、研究対象地域の水理地質構造のデータベース化を試みた。地下水流動場の可視化を図るため、地下ダム建設に伴って実施された約 200 本の観測井戸ボーリング資料の整理・デジタル化を通じて、研究対象地域の水

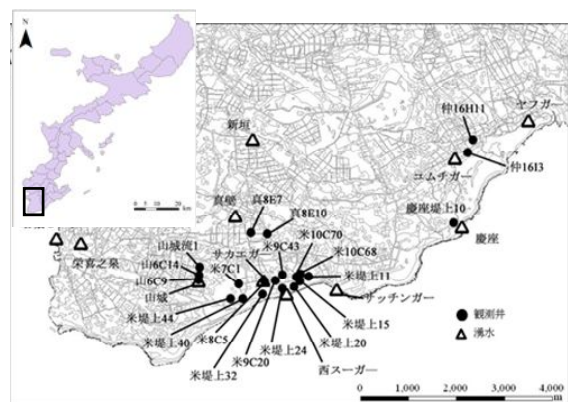


図 1 調査地域の概況及び観測地点

理地質構造のデータベース化を試みた。

(2) 地下水の硝化・脱窒過程を把握するため、観測地点において地下水中の溶存有機炭素(DOC)、全有機炭素(TOC)、C/N比等を測定するとともに、硝酸同位体法を用いた硝酸態窒素及び酸素の同位体比の分析(酸素同位体比と窒素同位体比のダイヤグラム)を実施した。

(3) 代表的な調査地点の地下水について、PCR-DGGE等の分子生物学的手法を用いて硝酸化・脱窒過程に関与する微生物の同定と硝化・脱窒の生物代謝速度に係る物理環境条件を検証した。現地観測・室内カラム試験結果に基づいて、現地観測調査・室内カラム試験等を通じて窒素成分を含めた地下水の物質輸送現象の定量的な把握を試みた。

(4) 不均一地盤帯水層を水源とする灌漑用水の水質管理対策に資する科学的な知見を得るため、表層畑地土壌から琉球石灰岩帯水層を一体的に捉えた地下水水質形成機構の解明を試みた。

4. 研究成果

本研究で得られる知見と成果は、以下のとおりである。

(1) 研究対象地域の米須地下ダム流域の地下水位と地下水水質に係る観測データについて、地下水流動場の可視化を図るとともに、硝酸態窒素濃度の時空間変化特性を把握することができた(図2)。研究対象地域地下水の水温、pH、ORP、DOとアンモニア態窒素、

亜硝酸態窒素、硝酸態窒素を含めた主要陽・陰イオンに係る観測データの多変量解析等を通じて、地下水水質特性の把握を図るとともに、地下水水質形成機構の解明を試みた。

(2) 現地観測調査と室内カラム試験等を通じて、窒素成分を含めた地下水の物質輸送現象の定量的な把握を試みた。硝酸性窒素の硝化・脱窒は22~26程度の水温変化では影響されないとともに、pHは7.1~7.6の範囲で周年変化しているが、pH(脱窒反応の最適pH値:7.0~8.0)変動による硝酸性窒素への影響は確認されなかった。硝酸性窒素は地下水流動に伴って上流から下流に移動する過程で、農地排水や生活排水による負荷源が加わるために濃度値が上昇するとともに、重回帰分析等を通じて営農活動や生活排水など地下水中の窒素成分に対する寄与を定量的に明らかにすることができた(図3及び図4)。

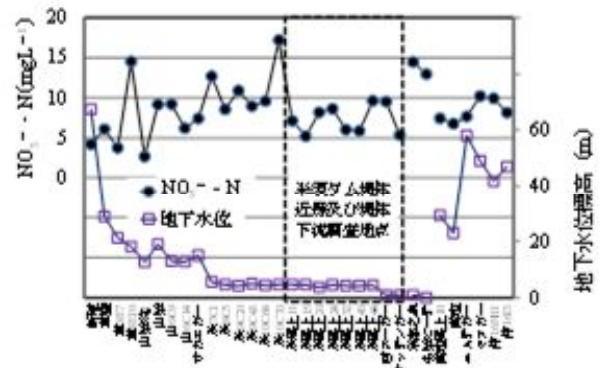


図3 硝酸性窒素と地下水位の関係

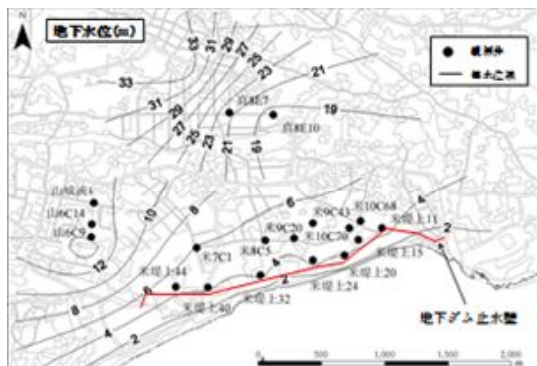
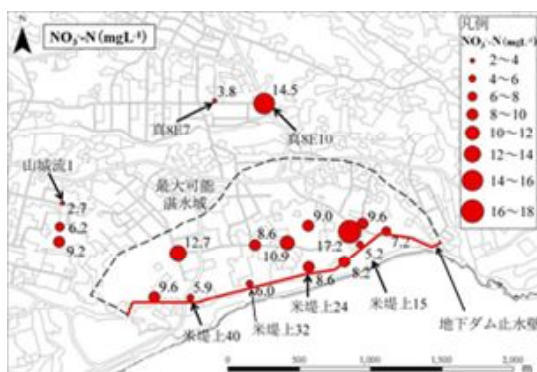


図2 米須地下ダムの硝酸性窒素と地下水位

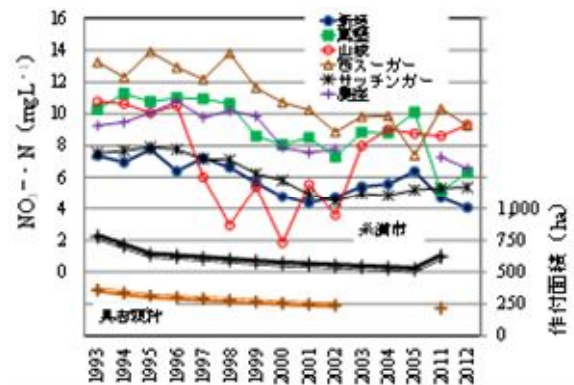


図4 硝酸性窒素濃度の経時変化と作付面積

(3) 琉球石灰岩帯水層断層背後地や地下ダム堤体直上流等における還元的環境条件の発生や降雨時の酸化環境への移行など地下水中の硝酸性窒素動態を把握した(図5)。また、地下ダム築造によって形成された地下水流動場に起因する流入・混合作用と希釈・脱窒作用が硝酸性窒素の空間濃度分布に関与しており、地下ダム止水壁近傍のように地下水が滞留しやすい場所では帯水層が還元的環境条件になった結果、脱窒現象が生じていることを解明することができた。

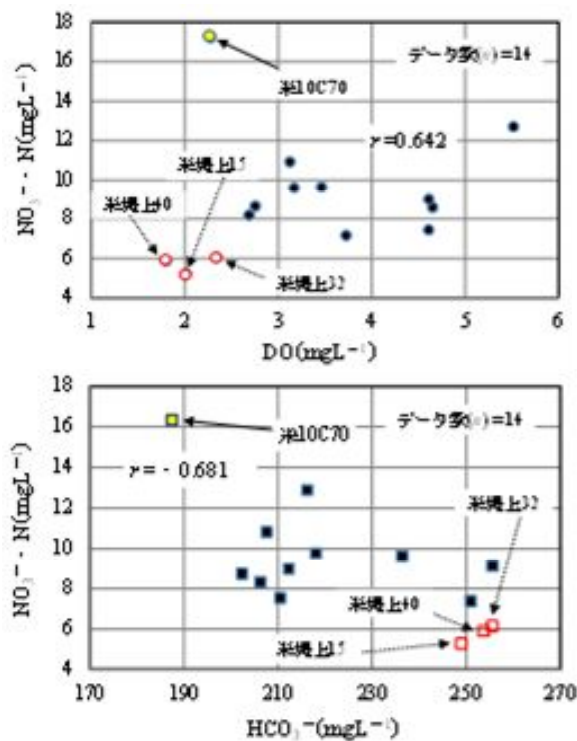


図5 地下ダム貯留域の硝酸性窒素とDO及びHCO₃⁻の関係

(4) 従属栄養型脱窒細菌の同定や常温性硫酸酸化細菌と相同性の高い細菌が検出され、地下水中の窒素安定同位体比と酸素安定同位体比等から従属栄養型の脱窒現象が生じていることを確認することができた(図6)。硝酸化・脱窒過程に関与する微生物相の同定や微生物活性等の把握を図るとともに、リアルタイムPCRで定量化された亜硝酸還元酵素遺伝子量は脱窒作用の有無の検証に活用できることが示唆された。このような解析を通じて、地下水中の微生物代謝に伴う硝化・脱窒メカニズムへの関与とともに、水質形成に係る影響について裏付けることができた。

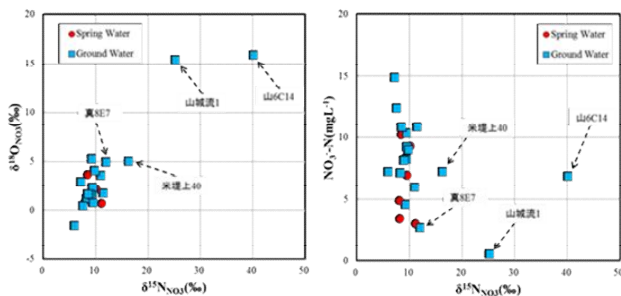


図6 硝酸イオン中の窒素安定同位体比¹⁵N_{NO₃}と酸素安定同位体比¹⁸O_{NO₃}の及び硝酸性窒素の関係

(5) 得られた知見に基づき、地下水水源水質保全手法や循環灌漑技術手法について検討するとともに、研究普及教材等を作成した。また、本研究で得られる知見と成果が畑地農

業地域における農業用水利用技術や環境保全型農業生産活動技術の進展に繋がり、今後の農業農村整備事業の発展に寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

中野 拓治, 沖縄の農業農村と陸水環境の保全, 陸水学雑誌, 査読有, 77巻第1号, 2016, 171 - 176

中野 拓治, 安元 純, 聖川 健斗, 廣瀬 美奈, 細野 高啓, 琉球石灰岩分布地域地下水の硝化・脱窒メカニズムの解明 沖縄県本島南部米須地下ダム流域を例として, 用水と廃水, 査読有, 57巻第3号, 2015, 59 - 66

安元 純, 廣瀬 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, 査読有, 52巻第2号, 2015, 153 - 169

中野 拓治, 安元 純, 寺澤 春菜, 名和 則夫, 地下水中硝酸性窒素濃度の時空間分布と形成要因について, 農業農村工学会論文集, 査読有, 286巻, 2013, 283 - 291

〔学会発表〕(計18件)

安元 純, 地下ダム流域における石灰岩帯水層中の硝酸性窒素の季節変動特性, 平成27年度農業農村工学会大会講演会, 2015年9月1日, 岡山大学津島キャンパス

中野 拓治, 琉球石灰岩分布地域帯水層水質形成機構の解明について 沖縄県本島南部米須地下ダム流域を対象として, 第49回日本水環境学会年会講演会, 2015年3月16日, 金沢大学

Jun Yasumoto, Use of microbial community analysis to evaluate denitrification in the karstic aquifer Okinawa, Japan, H43BMultiscale Preferential Flow from Soil to Fissured/Karst Systems: Hydrologic, Geochemical, and Biological Implications Posters, AGU Fall Meeting, 2014年12月17日, San Francisco, United State of America

中野 拓治, 琉球石灰岩分布地域帯水層地下水の水質組成と形成メカニズム 沖縄県米須地下ダムを例として, 平成26年度農業農村工学会九州沖縄支部大会講演会, 2014年10月29日, 佐賀市グランデはがくれ

中野 拓治,琉球石灰岩分布地域帯水層水質形成機構解明の試み,第17回日本水環境学会シンポジウム,2014年9月9日,滋賀県立大学

廣瀬 美奈,微生物相解析からみる琉球石灰岩帯水層の脱窒特性,第17回日本水環境学会シンポジウム,2014年9月9日,滋賀県立大学

安元 純,石灰岩帯水層における脱窒に係わる微生物相解析,平成26年度農業農村工学会大会講演会,2014年8月28日,新潟コンベンションセンター朱鷺メッセ

中野 拓治,琉球石灰岩分布帯水層の水質形成機構に関する一考察 沖縄県本島南部米須地下ダム流域を例として,平成26年度農業農村工学会大会講演会,2014年8月27日,新潟コンベンションセンター朱鷺メッセ

安元 純,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年春季講演会,2014年5月24日,東京大学本郷キャンパス

中野 拓治,琉球石灰岩帯水層地下水の硝化・脱窒メカニズムの解明,第48回日本水環境学会年会講演会,2014年3月18日,東北大学

廣瀬 美奈,琉球石灰岩帯水層における地下水中の微生物解析,第16回日本水環境学会シンポジウム,2013年11月10日,琉球大学

中野 拓治,地下ダム流域地下水の硝酸性窒素濃度の動態 沖縄県米須地下ダムを例として,平成25年度農業農村工学会九州沖縄支部大会講演会,2013年11月6日,宮崎市宮崎観光ホテル

〔その他〕

研究成果の一部について「第22回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会(京都大学:2016年6月24日)」の特別講演『沖縄の自然・文化・環境と地下水・土壌保全に向けた研究と取組み』の演題のなかで紹介

6. 研究組織

(1)研究代表者

中野 拓治 (NAKANO, Takuji) 琉球大学・農学部・教授
研究者番号: 30595202

(2)研究分担者

安元 純 (YASUMOTO, Jun) 琉球大学・農学部・助教

研究者番号: 70432870

(3)連携研究者

広城 吉成 (HIROSIRO, Yosinari) 九州大学・工学部・准教授
研究者番号: 90218834

中川 啓 (NAKAGAWA, Kei) 長崎大学・その他の研究科・教授
研究者番号: 90315135

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

(4)研究協力者

廣瀬 美奈 (HIROSE, Mina) 一般社団法人トロピカルテクノプラス・研究員