農地における微生物機能を用いた硝酸性窒素の分解

長野高専　環境都市工学科　非 会 員　細尾　誠
同上　正 会 員　畠　俊郎

１．はじめに

近年，農業分野において過剰な施肥や農薬の使用に由来する土壌汚染（残留農薬起源）や硝酸性窒素等による地下水の汚染が問題化している．硝酸性窒素による地下水の汚染が人の健康へ深刻な悪影響を及ぼす事例も報告されており，早急な対策が求められている．本研究では，微生物機能を用いて硝酸性窒素に汚染された地下水を原位置で効率的かつ安全に分解する技術について検討している．処理技術の確立は，土地の価値回復および農業生産物の価値向上も期待できる．同様の技術として，すでに土壌表層部に固体水素供与体を混合するもの[1)] 分解性有機物を栄養源として微生物を活性化させるもの[2)] が開発されるとともに，実務に用いられている．本研究では，特に硫黄脱窒菌の働きに着目し，有機物を含まない固体硫黄とカルシウム源を用いる技術の有効性について検討した．

２．着目した分解メカニズムと培養試験の概要

本研究で着目した微生物機能による硝酸・亜硝酸の分解メカニズムを**式―１**に示す．

$$NO^-_3 \cdot NO^-_2 + S = SO^{2-}_4 \cdot N$$

$$\rightarrow SO^{2-}_4 + Ca^+ = CaSO_4 \qquad (式―１)$$

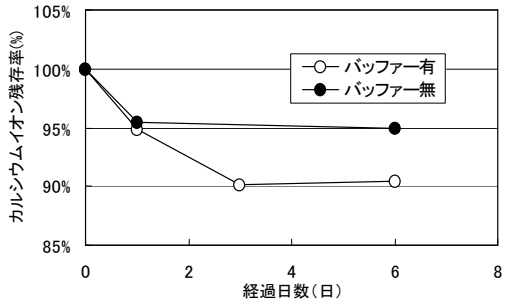
表－１　培地組成

バッファー有		バッファー無	
溶液量	50ml	溶液量	50ml
Tris	0.606g	Tris	-
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.74g	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.74g
固体硫黄	0.1g	固体硫黄	0.1g
pH	8 HClで調整	pH	-

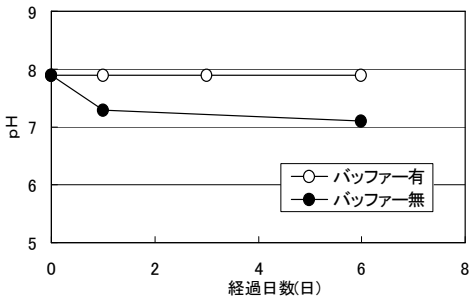
本技術の特徴は，有機物を含まないカルシウム源，固体硫黄を添加することで汚染物質の分解と硫酸カルシウム（石膏）の生成を行う微生物機能に着目している点にある．本文では，土壌試験に先立ち実汚染水を用いた確認試験を行った結果について報告する．なお，試験には学校近隣の農地で採取した硝酸性窒素を50ppm 含む農業排水を用いた．確認試験で用いた培地の組成を**表－１**に示す．安価に入手できるカルシウム源として選択した塩化カルシウムと固体硫黄を添加するとともに，微生物機能による pH 変化の影響緩和を目的としたバッファー（トリスバッファー）の有効性について検証した．バッファー有は計５本，バッファー無は計２本作成した．それぞれのサンプルを 37℃の条件で６日間培養した．サンプリング間隔は，バッファー有について培養０(スタート)，１，３，６日目，バッファー無について１，６日目とした．それぞれのサンプルについて標準寒天培地を用いた一般細菌数，pH およびカルシウムイオン濃度について分析を行い，提案技術の有効性について検討した．

３．分析結果

図 - １にカルシウムイオン残存率，**図 - ２**に pH の推移および**図 - ３**に一般細菌数の経過を示す．



図―１　カルシウムイオン残存率の推移



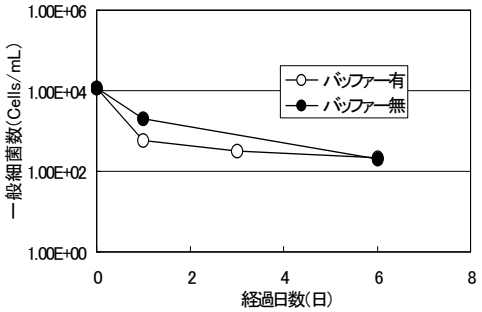
図―２　ｐＨの推移

４．考察

以下，分析項目ごとに考察する．**図－１**に示すカルシウムイオンの残存率変化では，pH バッファーの添加がカルシウムイオンの消費を促進することが明らかとなった．

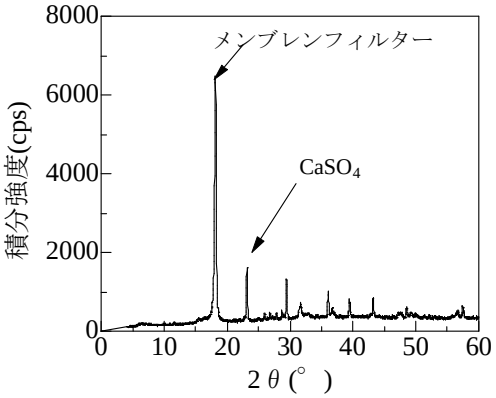
このことは，より多くの水溶性カルシウムが結晶化したことを示していると考えられる．しかしながら，3 日から 6 日にかけてはほとんど変化が認められなかった．この原因としては硝酸・亜硝酸の不足が考えられる．**図－２**に示す pH の変動では，バッファー有が初期の pH を維持するのに対してバッファー無は培養日数の経過とともに pH がわずかずつ低下する傾向が確認された．

以上より，長期にわたる硝酸・亜硝酸の分解を期待する場合には pH バッファーの添加が不可欠であると考えられる．



図－３　一般細菌数の推移

図－３に示す一般細菌数の推移では，バッファー無と比較してバッファー有のほうが若干ではあるが微生物数が少ない傾向が確認された．カルシウムの消費量が多いにも関わらず微生物数が少ないことから，培養に伴い生成された結晶のX線回折による同定を行った．分析においては，培養液を 0.45μm のメンブレンフィルターで濾過し，105℃で一晩乾燥させた蒸発残留物をX線回折分析試料として用いた．バッファー有について X 線回折を行った結果を**図―４**に示す．分析の結果から $CaSO_4$ の結晶を確認することができ，（**式―１**）に示す反応を間接的に確認することができた．以上より，本技術の基本的有効性を確認することができた．なお，$CaSO_4$ の析出に関する詳細なメカニズムについては今後検討を進めていきたい．



図－４　X線回折結果（バッファー有）

５．まとめ及び今後の課題

地下水中に含まれる硝酸性窒素の分解を目的とし，カルシウム源と固体硫黄を添加する技術の有効性について検討した．今回の試験で得られた主な知見は以下の通りである．

① 硝酸性窒素を含む農業排水に塩化カルシウムおよび固体硫黄を添加することで硝酸・亜硝酸を分解することができる．

② カルシウムイオンの消費および pH の維持にトリスバッファーの添加は有効である．

③ 溶液中に含まれるカルシウム類を微生物機能により $CaSO_4$ として析出させることができる．

今回の試験ではカルシウム源として塩化カルシウムを選択している．塩化カルシウムは一般資材として安価に入手できる利点を持つが，培養液中に高濃度の塩化物イオンを供給することとなり，硝酸・亜硝酸の詳細な濃度変化を把握することができなかった．そのため，X線回折による $CaSO_4$ の検出を通じた間接的な分解の確認にとどまった．高濃度の塩化物イオンを含む条件での硝酸・亜硝酸の分析方法については今後検討する必要がある．また，カルシウムイオンの消費量が多いバッファー添加区において，無添加区と比較して一般細菌数が少ない傾向が確認された．バッファー添加区では pH の調整に用いた HCl により，一般細菌数になんらかの影響を及ぼした可能性が考えられる．詳細については今後検討していく予定である．また，標準寒天培地を用いた計測では本研究で対象としている硫黄脱窒菌のみを追跡することが困難である，そのため，遺伝子工学的手法を用いて培養期間中の目的微生物の推移について検討する必要があると考えている．

＜参考文献＞

1）．硝酸性窒素浄化技術開発普及等検討会；平成１６度硝酸性窒素浄化技術開発普及等調査実証技術評価報告書，平成１７年６月

2）．硝酸性窒素浄化技術開発普及等検討会；平成１７度硝酸性窒素浄化技術開発普及等調査実証技術評価報告書，平成１８年３月