

農業に由来した硝酸態窒素の硫黄脱窒による除去

○東京大学 長谷川 聖
同上 花木 啓祐
同上 松尾 友矩

1.はじめに

亜酸化窒素（N₂O）は、温室効果ガスのひとつであり、対流圏寿命が120年と長く、二酸化炭素の280倍もの温室効果をもつことから注目される。N₂Oは、燃焼により化学的にも生成されるが、主要な生成源は生物学的な硝化脱窒反応と考えられ、硝化においては副生成物として、脱窒においては中間生成物として生成される。また、N₂Oは脱窒反応によりN₂へと分解される。

現在、地下水の硝酸態窒素汚染は世界的な問題となっている。さらに、こうした自然環境中への窒素負荷の増大は、自然土壌水系から発生するN₂Oの増加を引き起こすのではないかと懸念される。そこで、我々は、埼玉県西北部の硝酸態窒素汚染を受けた農地水系を対象として、N₂O及び窒素の動態に関して調査を行ってきた。この地域では、肥料及び畜産廃棄物に起因した硝酸態窒素が高濃度（20-30mgN/L）で低地湧水中に流出し、さらに有機物に富んだ灌漑用小河川や水田に流入することで、脱窒反応が起き、多量のN₂Oが生成されていた。

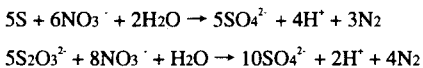
近年、水田等のもつ自然の脱窒能を利用し、硝酸態窒素を除去しようといった試みが盛んとなっているが、その際、多量のN₂Oが放出される危険性が考えられ、いかに脱窒能を高く保ちつつN₂Oを低く抑えるかが重要となる。土壌水系の脱窒能を高めるには、有機物の添加が考えられるが、これまでの埼玉県での調査において、有機物量が多い場合に、脱窒反応が促進される一方、N₂Oの発生割合が高くなる傾向が見られた。そこで、有機物とは別に無機物による独立栄養的脱窒により緩速な反応を進めた場合に、N₂Oの発生割合を減らしうるのではないかと考え、農業面での実用性を考慮した上で、肥料としても用いられる元素硫黄を電子供与体としてオンサイトで投与する場合を対象とした。

本研究では、硫黄脱窒の有効性を、硝酸態窒素除去能及びN₂O発生 の両面から評価することを目的とし、まず、硫黄源としてチオ硫酸塩を用い、*Thiobacillus denitrificans* の純菌によるバッチ実験を行なった。

2. 実験方法

2.1 純菌の培養

T. denitrificans の純菌は理化学研究所より入手（No.3869）し、Table1にある培地により、30℃で培養した。*T. denitrificans* は硫黄酸化細菌であり、元素硫黄、チオ硫酸塩、硫化物等を電子供与体として生育する。酸素下でも生育可能であるが、無酸素条件下では、下式のように硝酸態窒素を電子受容体として生育することが出来る。



本研究では、硝酸態窒素除去に主眼をおくことから、培養の際には、培養瓶の気相部分を窒素ガス置換することにより、無酸素下で生育させた。

Table 1 Medium for *T. denitrificans*

KH ₂ PO ₄	1.8 g
Na ₂ HPO ₄	1.2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g
FeCl ₃ · 6H ₂ O	30.0 mg
MnSO ₄ · xH ₂ O	30.0 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	40.0 mg
10%Na ₂ S ₂ O ₃ solution	100.0 mL
Distilled water	900.0 mL
KNO ₃	5.0 g
NaHCO ₃	0.5 g

2.2 実験方法

バッチ実験は68mLバイアル瓶を用い、あらかじめ、測定回数分の瓶を用意して行なった。上述通り培養した純菌は培養液中のN₂Oを除去するため、培養液相を窒素ガスバージして用いた。純菌と培地の混合液を、30mLずつ各バイアル瓶に分注し、気相を窒素ガス置換した後、ブチルゴムセプタム及びアルミシールにより密栓（→Fig.1）。一定時間ごとに、気相のN₂Oを測定した後開栓し、液相に関して各項目の測定を行なった。

純菌と培地の混合液に関しては、予備実験において、Table 1に示した培地の20倍希釈液に、純菌培養液を加えたものを用いたところ、脱窒反応が殆ど見られなかった。これは培地濃度が低すぎるため、もしくは、初期菌体濃度が少量のためではないかと考えられた。そこで、以下の2条件を設定して再度実験を行なった。（条件1）Table 1培地を無希釈で使用、（条件2）Table 1 培地の内NO₃⁻-N、S₂O₃²⁻-Sのみを20倍希釈することにより、微量金属等の因子の影響を取り除き、さらに初期菌体濃度を高めるため、純菌培養液の上澄みを取去った残渣を前述希釈培地と混合した。

2.3 測定方法

N₂Oに関してはヘッドスペース法を適用し、気相濃度を測定することにより、液相中で生成されたN₂O濃度を算出した。分析に関しては、ECD（電子捕獲検出器）を検出器とするGC（ガスクロマトグラフ）により行なった。運転条件をTable 2に示した。

液相はO.D.として460nm吸光度を測定後、0.45μmフィルターにて濾過し、CIA（キャピラリー電気泳動）にてNO₃⁻-N、NO₂⁻-N、S₂O₃²⁻-S、SO₄²⁻-Sの測定を行なった。

3. 実験結果

3.1 条件1

Fig. 2、3に結果を示す。14日後において、急激なS₂O₃²⁻、NO₃⁻の減少及びそれに伴うSO₄²⁻の増加が見受けられた。また、O.D.の値は12日後までは0.085前後に保たれていたが14日後に0.53へと急激に増加し、液相の白濁が観察された。Fig.3に示したようにN₂O濃度は、各瓶ごとの若干の個別差はあるものの、9日間ほぼ一定速度で増加し、数日間ほぼ増減が見られなくなった後、14日後にNO₃⁻の減少に伴い、N₂Oも急激に減少した。また、12日後までは18mgN/L前後のNO₂⁻の蓄積が見られたが、14日後には0に減少していた。

14日間でのNO₃⁻の減少分112mgN/Lに対するN₂O最大発生量393μgN/Lの割合を求めると、0.35%となる。

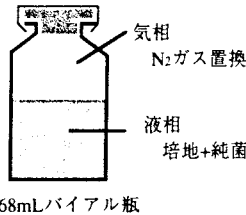


Fig. 1 Batch Experiment

Table 2 Operating Conditions

GC	GC-8AJE (Shimadzu)
Column	glass column (2.6mm × 3.0mm) Polapak Q
Carrier Gas	N ₂ (30ml · min ⁻¹)
Temp.	Detector : 340℃ Column : 70℃

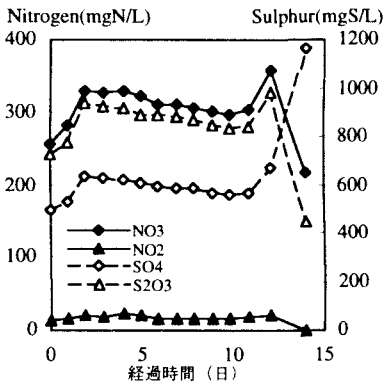


Fig. 2 Experiment (1) (NO₃, NO₂, S₂O₃, SO₄)

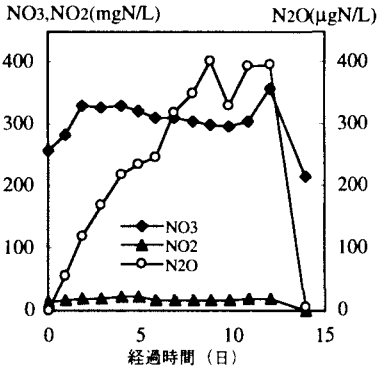


Fig. 3 Experiment (1) (NO₃, NO₂, N₂O)

3.2 条件2

Fig. 4、5 に結果を示す。7日後において、急激な $S_2O_3^{2-}$ 、 NO_3^- の減少及びそれに伴う SO_4^{2-} の増加が見受けられる。 $S_2O_3^{2-}$ 、 NO_3^- はそれぞれ、7日後、8日後には0に達した。また、O.D. の初期値は0.46と条件1に比べ、初期から高濃度に菌体量が含まれており、7日後にO.D.値も0.6に急激に増加し、11日後まではこのレベルを保っていた。

N_2O は6日後まで増加傾向を示し、7日後の NO_3^- の減少に伴い、減少傾向を示すようになり、10日後には0となった。さらに、 N_2O は NO_2^- の増減と同様の挙動を示していることがわかる。脱窒速度が十分でない6日後の時点で、2～5日後までの NO_3^- の平均値95.3mgN/Lから6日後の88.6mgN/Lへの減少量に対し、 N_2O の生成量41.4 μ gN/Lの生成割合を算出すると、0.62%となる。一方、10日を通じての NO_3^- 除去量、95.3mgN/Lに対する、 N_2O の最大生成量41.4 μ gN/Lの生成割合を算出すると、0.04%となる。

4. 考察

どちらの条件においても、バッチ実験開始後、明らかな硫黄脱窒開始まで7-10日間以上のタイムラグが生じているが、その間、若干の NO_3^- の減少が見られ、 N_2O と NO_2^- の蓄積が起きていた。しかし、脱窒が急速に進行し始めるのに伴い、 N_2O と NO_2^- の還元も進行した。よって、十分な菌体量が得られず、脱窒速度が不十分な場合に、脱窒の中間体である N_2O や NO_2^- の蓄積が起こるものと考えられる。また、条件1と2において、硫黄脱窒が急速に始まるまでのタイムラグの長さの違いは、初期の菌体量に起因するのではないかと考えられる。

農地水系において、実施した調査において、水田、小河川といった各水系において、除去された NO_3^- に対して、フラックスとして大気中へ放出された N_2O の割合をTable 3に示した。

今回の実験では、生成した N_2O は、バイアル瓶中で気液平衡に達してしまうことから、ヘッドスペース法により、液相中で生成された総量として示してある。よって実際に大気中へ放出される N_2O の割合は、前述した値とは若干異なるものと思われる。しかし、特に十分な菌体量が得られ、脱窒が急速に進む場合には、還元される NO_3^- に対して、発生する N_2O 割合が小さく抑えられることが確認された。

実際に、農地施用を考えた場合にチオ硫酸塩は非現実的であり、今後、元素硫黄を用いた場合の評価を行なう必要がある。 また、今回はあくまで*T. denitrificans*の純菌のみの実験結果であり、実際の土壌中では従属栄養菌と共存していること、様々な環境条件が影響を与えることから、さらなる検討が必要である。

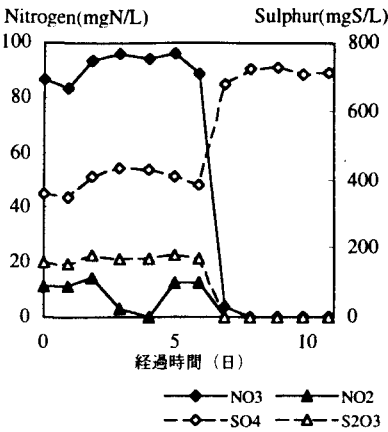


Fig. 4 Experiment (2) (NO_3^- , NO_2^- , $S_2O_3^{2-}$, SO_4^{2-})

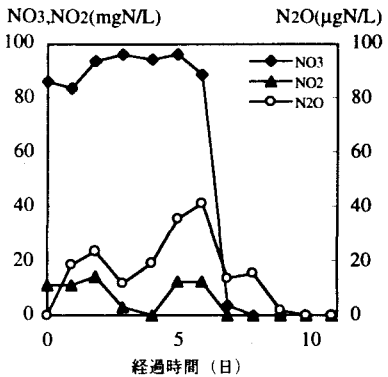


Fig. 5 Experiment (2) (NO_3^- , NO_2^- , N_2O)

Table 3 N_2O conversion from Removed nitrate-nitrogen

	Month	N_2O /Removed N (%)
Paddy Field	Jun.	0.06
	Jul.	0.53
	Aug.	0.78
	Sep.	0.38
Small river	Aug.	0.13
	Mar.	20.51