



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Controlling the Process of Denitrification in
Flooded Rice Soils by Using Microbial Fuel Cell
Applications

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2018-11-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Ranatunga Arachchige Tharangika Ranatunga メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/75242

氏 名 (本 国 籍)	Ranatunga Arachchige Tharangika Ranatunga (スリランカ民主社会主義共和国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 6 8 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 3 0 年 3 月 1 3 日
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物環境科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Controlling the Process of Denitrification in Flooded Rice Soils by Using Microbial Fuel Cell Applications (微生物燃料電池を援用した湛水水田土壌における 脱窒過程の制御)
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 准教授 大西 健夫 副査 岐阜大学 教授 平松 研 副査 静岡大学 准教授 今泉 文寿

論 文 の 内 容 の 要 旨

本研究は、施肥後の窒素肥料の損失や温暖化ガスの一種である一酸化二窒素 (N_2O) の発生などを引き起こす水田における脱窒作用を明らかにし、微生物燃料電池の考え方を援用することで、脱窒作用を制御しようと試みたものである。

学位論文は 7 つの章と付録からなり、第 1 章では序論として研究の背景、第 2 章では脱窒原理の詳細と既往の研究紹介、第 3 章では微生物燃料電池に相当する回路設置による脱窒作用の抑制効果、第 4 章では外部電源に接続した回路設置の条件下での土壌中酸化還元電位の分布と分析、第 5 章では亜硝酸還元酵素遺伝子により推定した回路設置の有無による脱窒菌量の変化、第 6 章ではすべての研究のまとめと今後の研究展開について示している。

土壌中窒素を窒素ガスへと変換する脱窒により多くの窒素肥料が損失しており、この脱窒を制御することが出来れば圃場に施肥された窒素肥料の損失を減少させることが可能となる。本研究では酸化還元電位の変動を考慮した微生物燃料電池理論を基に、水田土壌における脱窒制御に微生物燃料電池(MFC)が適用可能であるかの調査を行っている。湛水層から 10~20cm 下部にある土壌と、湛水層との境界にある土壌はそれぞれ嫌気と好気の状態になっているため、電気回路とした場合、両者の間には電位差が生じる。微生物の代謝において有機物の酸化を通じて放出された電子はこの仕組みにより利用され、電気を発生する。その結果、硝酸の還元半反応で利用可能な電子が減少し、脱窒が抑制されることになる。このことを確かめるために、ガスチャンバーを設置した植栽ポットを用いて、1)MFC を設置する (MFC)、2)外部電源を接

続した MFC を設置する(MFC-extV), 対照として MFC を設置しないという(non-MFC), 3 つの条件下で窒素の動態の検討がなされている。各条件に対して, 窒素肥料を同量施肥し, 自動灌水機で湛水状態を維持した実験では土壌の酸化還元電位, N_2O フラックス, 土壌間隙水中の無機窒素濃度を定期的に測定した結果, MFC, MFC-extV における酸化還元電位は明確に non-MFC の電位よりも大きく, 一方で N_2O フラックスについては MFC, MFC-extV からの放出は non-MFC の放出よりも明確に小さくなること, N_2O のフラックスを最も効果的に抑制したのは生育段階であったことを明らかにしている。ただし, 今回の実験を通じて, 外部電源の効果は明確にはならなかったとされている。間隙水中の無機窒素保持効率は MFC が高く, N_2O のフラックスの差と合致するものであること, MFC において脱窒されたと推定される窒素の割合が 2.3%であったのに対して, non-MFC では 6.6%に上り, MFC が土壌酸化還元電位を制御し, それによって湛水した水田での脱窒を抑制することが出来ることが確認されている。

外部電源は MFC 効率を上昇させ, 土壌酸化還元電位をよりよく制御するために導入されたものであったが, 酸化還元の制御と脱窒の抑制効率は MFC よりも低いことが明らかとなっている。筆者は外部電源の効果が接続した電極付近にのみで有効となっているのではないかという仮説を立て, 深度方向 3 カ所の断面における酸化還元電位分布を調査している。MFC-extV では, 電極から近い場所にある中間層の土壌が高い酸化還元電位を示しているにもかかわらず, 電極から離れた土壌中の酸化還元電位の制御は MFC により低下しているということ, さらに異なる電位の土壌領域が不規則に形成され, 電極へと電子が自由に移動できなくなっていたことを明らかにし, その原因として, 外部電源の結果, 土壌中で電気分解反応が生じ, システムの中で非自律的な酸化還元反応が生じさせている可能性, 電位勾配の形成により離れた場所では電気力線の広がりにより電子が分散してしまう可能性を示唆している。

次いで, MFC による脱窒率変化の理解を深めるために土壌脱窒菌の定量化を試みている。脱窒菌存在量はチトクローム *cd-1-type* の酵素を含む亜硝酸還元酵素遺伝子である *nirS* により推定し, リアルタイム PCR により推定を行っている。*nirS* 遺伝子は 6, 7, 8 月の期間, すべての処理において増加し, 脱窒の条件が整っていることがまず確認されており, さらには 8 月期の MFC と non-MFC では顕著な差がみられたことを明らかにしている。*nirS* が多い non-MFC では N_2O のフラックスも多く, 酸化還元電位も大きくなることが確認しており, 稲の生育段階後期において MFC は *nirS* 遺伝子を一定量制御できていると考えられる結果となっている。一方で MFC と MFC-extV との間には明確な差異は見られず, また, *nirS* の影響も小さかったことから, 脱窒に関連するもう一つの *nirK* 遺伝子についても検討が必要であると示唆している。

以上の結果より, 微生物燃料電池を援用した回路は脱窒菌量の増減と酸化還元で二の向上に効果を持ち, 水田からの脱窒抑制の可能性を示している。また, 外部電源が機能しないなど, 仕組みとしてはさらなる改善が必要であるものとの結論を得た。

本論文で得られた知見は, 計 3 報の基礎論文に公表されており, 水田において窒素肥料の量を低減できる可能性, 温暖化ガスの一種である一酸化二窒素を抑制する可能性を示したものであり, 将来的にアジアを中心とする水田地域の発展に貢献するものとして評価できる。

審査結果の要旨

本論文は、施肥後の窒素肥料の損失や温暖化ガスの一種である一酸化二窒素 (N_2O) の発生などを引き起こす水田における脱窒作用を明らかにし、微生物燃料電池の考え方を援用することで、脱窒作用を制御しようとして試みたものである。

本論文で得られた成果は、次の3点に要約される。

1. 湛水層から 10~20cm 下部にある土壌と、湛水層との境界にある土壌はそれぞれ嫌気と好気の条件になっているため、電気回路とした場合、両者の間には電位差が生じる。微生物の代謝において有機物の酸化を通じて放出された電子はこの仕組みにより利用され、電気を発生する。その結果、硝酸の還元半反応で利用可能な電子が減少し、脱窒が抑制されることになる。このことを確かめるためにガスチャンバーを設置した水田を模した植栽ポットを用いて、1)微生物燃料電池に相当する回路を設置する、2)外部電源を接続した同回路を設置する、対照として回路を設置しないという、3つの条件下で窒素の動態を検討している。各条件に対しては、窒素肥料を同量施肥し、自動灌水機で湛水状態を維持し、土壌の酸化還元電位、アセチレン阻害下での N_2O フラックス、土壌間隙水中の無機窒素濃度を測定しており、稲の生育期間では特に、回路を設置した条件において明確に酸化還元電位が大きくなり、土壌からの N_2O フラックスも減少したことが示されている。土壌間隙水中の無機窒素濃度も回路設置条件のものが大きくなり、 N_2O フラックスの減少を支持する結果となっている。回路設置の条件において脱窒されたと推定される窒素の割合が 2.3%であったのに対して、非設置の条件では 6.6%に上り、回路が土壌酸化還元電位を制御し、それにより水田での脱窒を抑制することが出来る可能性が示された。
2. 外部電源は同回路の効果をあげ、土壌酸化還元電位をより制御するために導入されたものであるが、現実的には、酸化還元の制御の効果が低いということが確認されている。それに対し、鉛直方向の酸化還元電位分布を調査し、電極から近い土壌の酸化還元電位が高い一方、電極から離れた土壌中では低いままであること、領域で不規則に酸化還元電位が形成されていることを明らかにしている。その原因として、電気力線の広がりによる電子の希薄化、部分的な水の電気分解による非自律的な酸化還元反応の可能性を推察している。
3. 脱窒の量的な把握に次いで、微生物学的アプローチとしてチトクローム cd-1-type の酵素を含む亜硝酸還元酵素遺伝子である *nirS* より脱窒菌量を推定している。6月、7月9月の電極近傍の土壌からの採取したサンプルを対象にリアルタイム PCR において SYBR グリーン の蛍光量により推定したものである。すべてのサンプルで脱窒菌が存在していることを確認し、8月期において、回路を設置したものは、設置しないものに比べて明確に脱窒菌量が減少していることを明らかにしている。この結果は、 N_2O フラックスの減少や酸化還元電位の向上なども合致する内容となっている。

以上の結果から本論文は、微生物燃料電池を模した回路を設置することで、土壌の酸化還元電位の制御が可能となり、その結果、水田からの脱窒を制御する効果があるもの結論づけている。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

基礎となる学術論文

1. Tharangika Ranatunga, Takeo Onishi, Ken Hiramatsu, Yasushi Ishiguro Redox Distribution Profiles of Flooded Paddy Soils with Microbial Fuel Cell Applications, International Journal of GEOMATE (accepted)
2. Tharangika Ranatunga, Ken Hiramatsu, Takeo Onishi, Yasushi Ishiguro : Process of denitrification in flooded rice soils: A review, Reviews in Agricultural Science, Vol.6 (accepted)