

硝酸還元を中心とした深部地下環境における窒素代謝に関する研究

A research of the metabolisms of nitrogen in deep subsurface environment - mainly about the nitrate reduction -

須甲 武志 [1]; 鈴木 庸平 [1]; 伊藤 一誠 [1]; 竹野 直人 [1]
Takeshi Suko[1]; Yohey Suzuki[1]; Kazumasa Ito[1]; Naoto Takeno[1]

[1] 産総研
[1] AIST

1. はじめに

昨年度の発表において、第三期の堆積岩地域の地下300m以深の凝灰質岩および泥質岩を用いた活性実験において、硝酸が消費され脱窒反応が起こっていることを示した。別の分析結果から、活性実験で用いたものと同じ岩石試料から圧縮法で搾り出した間隙水から、硝酸イオンおよび亜硝酸イオンの存在が確認され、さらに掘削時に孔内に溜まった水を毎日汲み出して濾過した残滓に関して16S rRNAを用いた解析により、脱窒活性が認められた深度では脱窒を行う*Pseudomonas* 族の微生物が優占していることが分かった。ただ、亜硝酸イオンが地下水中に残っていることは珍しく、凝灰質岩層には高濃度の水素ガスが、深部の泥質岩層にはメタンガスの存在が見られ、単純に脱窒のみの行われている環境であるとするには疑問が残った。そこで本研究では、種々の有機物および水素ガス、メタンガスを用いて脱窒活性実験を再度行い、深部地下に生息する微生物が何を基質として用いているのかを調べた。

2. 実験

脱窒速度の測定にはアセチレン阻害法を用いた。68ml容のバイアルビンを用い、その中にコア試料を7.5g、培養液を2.9ml嫌気チャンパー内で加え、プチルゴム栓で密栓し嫌気チャンパーから取り出した。そして、真空ポンプを用いてビン内部の気体を抜いて真空にした後、99.99%水素ガスを3ml(5%相当)と窒素をベースガスとしたアセチレン10%混合ガスを、系内がわずかに陽圧となるように添加した。ガスを添加したバイアルビンは25℃の恒温チャンパー内に静置した。培養後1、2、7、14日後に取り出し、ヘッドスペースのガスをガスタイトシリンジで1ml採取し、ECD検出器のついたガスクロマトグラフィで N_2O 濃度を計測した。その測定値を用い、気液平衡を考慮した計算を行った上で、バイアルビン内に発生した N_2O 濃度を計算して脱窒速度を求めた。

今回の実験では、深度293m、300m、302m、324m、340m、350mの計6深度のコアを用いて行った。培養液は、無菌無酸素掘削井の近くに掘った別の井戸から採取した地下水を限外濾過して用い、その水に10mMの硝酸ナトリウムと有機基質(酢酸、乳酸、グリセリン、コハク酸)とイースト抽出物などを加えた。複数種を混合した有機基質でまず脱窒活性を測定し、高い活性が得られた試料に関して個々の有機物で再度活性測定をし、何を基質としているのか確かめた。前述した水素ガスも基質物質の一つとして加えている。

3. 結果と考察

有機基質を混合した培養液による活性測定において、350m深度の試料を除いて、1日目~7日目までの間に脱窒速度は指数関数的に上がっており、ちょうどこの段階で脱窒に関与する微生物の指数的な増加が進行したものと考えられた。今回測定を行った6深度において、深度300m、302m、350mで高い脱窒活性が計測された。このうち深度300mおよび302mの試料は軟質な凝灰質岩であり、固結の度合いが弱かったため微生物の住む空間の確保や基質を含む地下水の流動が大きかった可能性が示唆された。しかし、今回脱窒活性を測定した区間でもっとも大きな活性を示したのは、最深部に当たる深度350mから採取した試料であった。これは同じ泥質岩でも、深度293mおよび深度324mの試料と比べ、深度350mの試料では大きい間隙径の間隙の存在割合が大きかったため間隙径の大きい深度350mの泥岩にのみ微生物が存在し、溶存イオン濃度やメタンなどの多い環境下で脱窒が優占的に行われたために生じたと考えられる。

比較的脱窒速度の高かった302mおよび350m深度のコア試料に関して、培養液中の有機物および水素の中で何が代謝基質として使われているのかを調べた。その結果302m試料では、水素ガスのみの代謝系で最も高い脱窒活性を示し、グリセリン、コハク酸、酢酸の順番で続いたが、大きな差はなかった。別の測定から、302mの部分では水素ガスが高濃度で検出されており、水素ガスを用いた代謝が行われていることと整合的であるが、地層中に水素ガスが残留していたことと併せると、高濃度の硝酸の流入により硝酸還元が行われる可能性が示唆できる。有機基質も発酵を行う微生物の用いる化合物で高い代謝速度が見られたが、別個にスラリー培養を行い、寒天培地に播種した培養実験においても発酵を行う微生物が検出され、地下における硝酸還元が発酵菌由来であることが分かった。対して、深度350mの試料に関しては、水素ガスとコハク酸を基質とした系で高い脱窒活性を示し、酢酸やメタンガスの系ではそれより少し低い活性であった。今後は嫌気的メタン酸化やアナモックスを含め、地下における窒素を中心とした代謝サイクルの解明を行う。