

	フントゥック ルック
<b>氏 名</b>	<b>PHUNG DUC LUC</b>
本籍（国籍）	ベトナム社会主義共和国
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研 795 号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 2 3 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 地域環境創生学
<b>学位論文題目</b>	<b>Reuse of treated wastewater for rice cultivation through continuous sub-irrigation: Assessment on greenhouse gas emissions and heavy metal contamination in the plant-soil （水稻栽培のための連続地下灌漑による下水処理水の再利用：温室効果ガス排出と植物－土壌システムの重金属汚染の評価）</b>
学位審査委員	主査 山形大学教授 渡部 徹 副査 濱上 邦彦(岩手 准教授),坂元 君年(弘前 准教授),佐々木 由佳(山形 准教授)

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

Rice paddy fields are among the most important anthropogenic sources of CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O, two of the most potent greenhouse gasses (GHGs) in the atmosphere, due to their traditional flooding irrigation and the increasing use of mineral fertilizers in paddy soils. In the shade of water shortages, the reuse of treated wastewater (TWW) for irrigation in rice paddy fields has become a reliable practice that could free up large amounts of fresh water currently used for agricultural irrigation and make this resource available for other purposes. However, it was argued that irrigation with wastewater would increase GHG emissions from rice paddy fields. In addition, irrigation with wastewater has raised concerns about heavy metal contamination in rice plant-soil systems, which could potentially lead to risks to human health. It is therefore necessary to develop a sustainable wastewater irrigation practice that can reduce GHG emissions from rice paddy fields and reduce the use of mineral fertilizers while improving rice productivity without any potential risks to human health.

An innovative rice cultivation system, namely continuous sub-irrigation with TWW (hereinafter, referred to as CSI), has recently been developed to promote the recycling of resources from municipal wastewater treatment plants (WWTPs) and the cost-effective production of forage rice in Japan. This continuous sub-irrigation system has been shown to have attractive advantages in terms of rice productivity and the nutritional quality of rice grains. However, in order to ensure the sustainability of the novel cultivation system, its environmental footprint need to be thoroughly investigated. This dissertation therefore acts as a follow-up study based on the body of recent findings, to provide further insight into the practice of CSI with respect to the performance of rice

plants, GHG emissions from paddy fields and heavy metal contamination in the plant-soil system.

A microcosm experiment was conducted in 2018 to investigate emissions of CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O and yield capacity of a local forage rice, Bekoaoba, between a conventional cultivation fertilized with high doses of mineral fertilizers (Control) and three CSI systems using different water regimes with zero fertilizer use. The examined water regimes included a constant supply rate of 25 L m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup> throughout the crop season (R1), a supply rate of either 25 (R2) or 36 L m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup> (R3) from 31 to 114 days after transplantation (DAT) combined with a lower rate of 8.3 L m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup> for the other growing periods. The results showed that CSI systems produced higher yields (10.4 – 11.0 t ha<sup>-1</sup>) with higher rice protein contents (11.3 – 12.8%) than Control (8.6 t ha<sup>-1</sup> and 9.2%, respectively). All CSI systems markedly reduced CH<sub>4</sub> emissions but the higher supply rates in R1 and R3 significantly increased N<sub>2</sub>O emissions compared with Control. The regime R2, which used the appropriate supply rates at the suitable timeframes to meet the N demand of rice plants, was identified as the optimal regime to effectively reduce both CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions by 84% and 28%, respectively. Furthermore, no adverse effects of TWW irrigation on the accumulation of possible toxic heavy metals, including As, Cr, Cu, Cd, Pb and Zn, was detected in rice grains.

The next phase of this study was to investigate changes in the community structure of CH<sub>4</sub>- and N<sub>2</sub>O-related soil microorganisms affected by CSI and to link these changes to the gas emissions in order to understand the underlying mechanisms for the GHG mitigation identified in the first experiment. A further experiment was conducted in 2019 to examine two treatments: the CSI system using the optimized water regime R2 and the Control system. The results showed that CSI reduced CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions by 80% and 66%, respectively, compared with Control. The microbial composition of the methanogenic archaea, methanotrophic, nitrifying and denitrifying bacteria was not significantly affected by the treatments. However, during the reproductive stage, CSI not only markedly inhibited the growth of methanogens in the lower soil layer, but also vastly reduced the abundance of methanotrophs in the upper soil layer, which corresponded significantly to the effective mitigation of CH<sub>4</sub>. On the other hand, compared with Control, CSI stimulated a higher abundance of nitrifying and denitrifying bacteria, but this difference did not lead to a marked variation in N<sub>2</sub>O emissions between the two treatments, suggesting that the N<sub>2</sub>O emission gap between CSI and Control was probably not due to the changes in nitrifying and denitrifying communities, but more likely due to the availability of N in soils and N uptake of rice plants. In addition, soil analysis results showed that CSI significantly increased soil pH, SOM, and SOC ( $p < 0.05$ ) while maintaining soil EC, CEC, N, K and other macro- and micronutrients at comparable levels ( $p > 0.05$ ) relative to Control. This indicated that CSI was able to effectively fertilize paddy soils despite the elimination of mineral fertilizers. However, a slight decrease in P content in paddy soils under CSI suggested, if necessary, regular supplementation of P fertilizers. Importantly, the contents of the heavy metals examined in paddy soils were

below the maximum permissible levels in agricultural soils recommended by WHO, demonstrating that there was no concern for heavy metal build-up in paddy soils under CSI.

Afterwards, this study expanded its framework to include potential contamination of CuO nanoparticles (NPs) in TWW that could harm rice plants and paddy soils and subsequently pose risks to human health through the food chain. A follow-up experiment was conducted in 2020 to evaluate the effects of CuO NPs contained in TWW on the rice plant-soil system under CSI. Four hypothetical scenarios of CuO NP contamination in TWW, including 0, 0.02, 0.2, and 2 mg Cu L<sup>-1</sup> (T1-Control, T2, T3, and T4, respectively) were examined. Another CSI system using TWW contaminated with CuSO<sub>4</sub> at 0.2 mg Cu L<sup>-1</sup> (T5) was also tested for comparison with T3. The results showed that the contamination of Cu in TWW did not adversely affect rice growth and yield capacity, probably due to the low levels tested. However, a significant accumulation of Cu in paddy soils, roots and rice grains under T4 compared with the rest of the treatments indicated the concern that Cu could build up in the plant-soil system under higher levels of CuO NP contamination. The health risk assessment using Hazard Quotient (HQ) revealed that adults who consume the rice grains harvested in all treatments have a negligible risk of non-cancer health problems caused by Cu.

Overall, this study focused on a number of key scientific issues, such as the efficient use of wastewater for irrigation, the reduced use of mineral fertilizers, the mitigation of GHG emissions and the contamination of heavy metals in rice and paddy soils. The application of CSI in rice paddy fields has been shown to be an innovative solution for the cost-effective recovery of valuable resources from effluents, i.e. plant nutrients and irrigation water, which certainly promotes the transition of WWTPs from pure wastewater treatment facilities to an important part of a circular economic model focusing on sustainable agricultural production and consumption, resilient management of water and sanitation, and climate change adaptation.

#### 【和訳】

水田は、伝統的な湛水灌漑と無機肥料使用の増加のために、大気中における最も有力な温室効果ガス (GHGs) である CH<sub>4</sub>と N<sub>2</sub>O の最も重要な人為的排出源となっている。水不足の陰で、水田灌漑のための下水処理水の再利用が、農業用灌漑のために現在利用されている淡水の量を大きく減らし、他の目的で利用する資源を生み出すことができる、一つの信頼できる技術となっている。しかしながら、下水の灌漑は水田からの GHG 排出を増加すると主張されてきた。さらに、下水の灌漑は、ヒトの健康リスクにつながる、植物-土壌システムの重金属汚染に関する不安を引き起こしてきた。それゆえ、ヒトの健康に対するリスクなしで米の生産性を改善しながら、水田からの GHG 排出と無機肥料の使用を減らすことができる、持続可能な下水灌漑技術を開発することが求められている。

日本での都市下水処理場からの資源リサイクルの推進と費用対効果の高い飼料用米生産のために、革新的な水稻栽培システム、すなわち下水処理水の連続的な地下灌漑 (以下、CSI と呼ぶ) が近年開発された。この連続地下灌漑システムは、米の生産性とその栄養の点において

魅力的な優位性を有していることが示されてきた。しかしながら、新たな栽培システムの持続可能性を保証するためには、その環境フットプリントに関する徹底的な調査が必要である。この学位論文は、それゆえ、近年の知見の実質にもとづいたフォローアップ研究として、水稻のパフォーマンス、水田からの GHG 排出、そして、植物—土壌システムの重金属汚染に関して、CSI 技術にさらなる洞察を与える役割を果たす。

CH<sub>4</sub>と N<sub>2</sub>O の排出と飼料用米（品種：べこあおば）の潜在的な収量を調べるために、無機肥料を多量に施用した慣行の栽培（Control）と無施肥で3つの異なる水管理を採用した CSI システムのそれぞれで、2018 年にマイクロコズム実験が行われた。試験された水管理のうち、R1 では栽培期間を通して下水処理水の供給量（25 L m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>）を一定に保った。R2 と R3 では、移植から 31～114 日目の供給量をそれぞれ 25 L m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> と 36 L m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> とし、それ以外の期間では供給量（8.3 L m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>）を少なくした。その結果、CSI システムにおける収量（10.4～11 t ha<sup>-1</sup>）とタンパク質含有率（11.3～12.8%）はともに、Control のそれら（それぞれ、8.6 t ha<sup>-1</sup> と 9.2%）よりも高かった。すべての CSI システムでは、CH<sub>4</sub>の排出が著しく削減されたが、下水処理水の供給量が多い R1 と R3 では Control に比べて N<sub>2</sub>O の排出が有意に増えた。水稻の窒素要求に合わせて好ましい時期に適当な量の供給を行った水管理 R2 が、CH<sub>4</sub>と N<sub>2</sub>O の排出をそれぞれ 84%、28%だけ削減できる、最適な管理として特定された。さらに、ヒ素、クロム、銅、カドミウム、鉛、そして、亜鉛を含む有害な重金属の米への蓄積には、下水処理水の灌漑による悪い影響は見られなかった。

この研究の次のフェーズは、最初の実験で確認された GHG の軽減の根底にあるメカニズムを理解するために、CH<sub>4</sub>と N<sub>2</sub>O に関連する土壌微生物の群集構造について CSI の影響による変化を調べ、これらの変化とガス排出を結びつけることであった。2つの処理区（最適化された水管理 R2 を用いた CSI システムと Control システム）を試験するために、さらなる実験が 2019 年に行われた。その結果、CSI は、Control に比べて CH<sub>4</sub>と N<sub>2</sub>O の排出をそれぞれ 80%、66%ずつ削減した。メタン生成古細菌、メタン酸化細菌、硝化菌、そして、脱窒菌の微生物構成は、処理区によって有意な影響を受けなかった。しかしながら、生殖生長期には、CSI は土壌下層でのメタン生成古細菌の成長を著しく阻害するだけでなく、土壌上層のメタン酸化細菌の存在量も大きく減らした。このことは、CH<sub>4</sub>の効果的な軽減に一致していた。その一方で、CSI は、Control と比較して硝化菌と脱窒菌の存在量が多いことに貢献していたが、この差は、2つの処理区間の N<sub>2</sub>O 排出の著しい変化につながっていなかった。CSI と Control の間の N<sub>2</sub>O 排出の格差は、おそらく、硝化菌と脱窒菌の群集の変化ではなく、土壌中の窒素の利用可能性と水稻による窒素の取り込みによるものであろう。さらに、土壌の分析は、CSI は、土壌の EC、陽イオン交換容量、窒素、カリウム、そして、他の主要栄養素や微量栄養素を Control と同程度に保つ一方で、土壌の pH、有機物、有機炭素を有意に増加させること（p<0.05）を明らかにした。このことは、CSI が無機肥料を使わないにも関わらず、水田土壌を効果的に肥沃化できることを示した。しかしながら、CSI のもとでは水田土壌のリン含有量が若干減少するため、必要に応じて、定期的なリン肥料の施用が勧められる。重要なこととして、水田土壌で調べられた重金属の含有量は、WHO によって推奨される農地土壌の許容最大レベルを下回っており、CSI で生まれる水田土壌中の重金属に関する心配がないことが示された。

その後、本研究では、水稻と水田土壌に悪影響を与え、結果的に、食物連鎖を通じてヒトの健康にリスクをもたらす可能性がある、下水処理水中の酸化銅ナノ粒子の潜在的な汚染を包含

するように、その枠組みを拡張した。CSI のもとで下水処理水に含まれる酸化銅ナノ粒子の水稻—土壌システムへの影響を評価するため、2020 年にフォローアップ実験が行われた。下水処理水に 0, 0.02, 0.2, 2 mg Cu L<sup>-1</sup>の酸化銅ナノ粒子が含まれる 4 つの仮想シナリオ（それぞれ T1-Control, T2, T3, T4 とする）が試験された。もう 1 つ、0.2 mg Cu L<sup>-1</sup>の硫酸銅で汚染された下水処理水を用いる CSI システム（T5）も、T3 との比較のために試験された。その結果、下水処理水の銅による汚染は、おそらく低レベルでの試験であったために、水稻の生長や潜在的な収量に悪影響を与えなかった。しかしながら、他の処理区に比べて T4 で水田土壌、水稻の茎、そして、米への銅の有意な蓄積が見られた。このことは、より高いレベルの酸化銅ナノ粒子による汚染のもとで、銅が植物—土壌システムにもたらす懸念を示している。ハザード比（HQ）を用いた健康リスク評価の結果、どの処理区で収穫された米を食べても、大人の銅による健康被害のリスクは無視できることが明らかとなった。

全体的に見て、この研究は、灌漑のための下水の有効な利用、無機肥料の使用の削減、GHG 排出の緩和、そして、米と水田土壌の重金属汚染のような、多くの重要な科学的な問題に焦点を当てた。水田での CSI の適用は、排水からの有価資源（すなわち、植物の影響と灌漑用水）の費用対効果の高い回収のための革新的な解決策となることが示された。このことは、確実に、下水処理場が単なる下水処理施設から、持続可能な農業生産と消費、水と衛生の頑強なマネジメント、そして、気候変動への適応に着目した循環経済モデルの重要な要素へと移り変わることを促すだろう。

## 論文審査の結果の要旨

都市下水処理場からの資源リサイクルの推進と費用対効果の高い飼料用米生産のために、革新的な水稻栽培システム、すなわち下水処理水の連続的な地下灌漑（以下、CSI と呼ぶ）が近年開発された。この CSI は、米の生産性とその栄養の点において魅力的な優位性を有していることが示されてきた。本研究は、その知見にもとづいたフォローアップ研究として、水稻の栽培、水田からの温室効果ガス排出、そして、植物—土壌システムの重金属汚染に関して、CSI 技術にさらなる洞察を与えることを目的に行われた。本研究で得られた結果を以下にまとめる。

1. 無機肥料を多量に施用した慣行の栽培（Control）と無施肥で 3 つの異なる水管理（R1～R3）を採用した CSI システムのそれぞれで、飼料用米栽培の栽培実験が行われた。R1 では栽培期間を通して下水処理水の供給量（25 L m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>）を一定に保った。R2 と R3 では、移植から 31～114 日目の供給量をそれぞれ 25、36 L m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>とし、それ以外の期間では供給量（8.3 L m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>）を少なくした。その結果、CSI システムにおける収量（10.4～11 t ha<sup>-1</sup>）とタンパク質含有率（11.3～12.8%）はともに、Control を上回った。すべての CSI システムで CH<sub>4</sub>の排出が著しく削減されたが、下水処理水の供給量が多い R1 と R3 では Control に比べて N<sub>2</sub>O の排出が有意に増えた。一方、R2 は、CH<sub>4</sub>と N<sub>2</sub>O の排出をそれぞれ 84%、28%だけ削減できる最適な水管理として特定された。

2. 水管理 R2 を用いた CSI システムと Control システムを試験するために、さらなる栽培

実験を行った結果、CSIは、Controlに比べてCH<sub>4</sub>とN<sub>2</sub>Oの排出をそれぞれ80%、66%ずつ削減した。水田土壌の微生物構成は、処理区によって有意な影響を受けなかったが、生殖生長期には、CSIは土壌下層でのメタン生成古細菌と上層のメタン資化細菌の存在量を大きく減らした。このことは、CH<sub>4</sub>の軽減に一致していた。一方、2つの処理区の間、N<sub>2</sub>O排出の著しい変化は、おそらく、土壌中の窒素の利用可能性と水稲による窒素の取り込みによるものであることが示唆された。

3. 酸化銅ナノ粒子を0~2 mg Cu L<sup>-1</sup>で含む下水処理水を用いた栽培実験を行った。その結果、処理水の銅による汚染は水稲の生長や収量に悪影響を与えなかったが、濃度が最も高いケース(2 mg Cu L<sup>-1</sup>)では、水田土壌、水稲の茎、そして、米への銅の有意な蓄積が見られた。ハザード比を用いた健康リスク評価は、どの処理区で収穫された米を食べても、大人の銅による健康被害のリスクは無視できることを示した。

以上のように、本論文は、水田でのCSIの適用が、排水からの有価資源(すなわち、植物の影響と灌漑用水)の回収のための革新的な解決策となることを示した。このことは、下水処理場が単なる下水処理施設から、持続可能な農業生産と消費、水と衛生の頑強なマネジメント、そして、気候変動への適応に着目した循環経済の重要な要素へと移り変わることを促すだろう。よって、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士(農学)の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

1. Luc Duc Phung, Dung Viet Pham, Yuka Sasaki, Shuhei Masuda, Fumiaki Takakai, Nobuo Kaku, Toru Watanabe (2020)  
Continuous sub-irrigation with treated municipal wastewater for protein-rich rice production with reduced emissions of CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O  
Scientific Reports 10, 5485

参考論文

1. Luc Duc Phung, Megumi Ichikawa, Dung Viet Pham, Atsushi Sasaki, Toru Watanabe (2020)  
High yield of protein-rich forage rice achieved by soil amendment with composted sewage sludge and topdressing with treated wastewater  
Scientific Reports 10, 10155