干潟堆積物における脱窒・アナモックス速度に影響を及ぼす要因

Factors affecting denitrification and anammox rates in tidal flat sediments

篠崎知美¹・梅田悠輔²・村上和男³・桑江朝比呂⁴・中瀬浩太⁵

Tomomi SHINOZAKI, Yusuke UMEDA, Kazuo MURAKAMI, Tomohiro KUWAE and Kouta NAKASE

Our previous studies show that the tidal flat of the Tokyo Port Wild Bird Park is a sink of nitrogen. Denitrification and anammox can be cited as one of the factors. In the present study, we measured denitrification and anammox rates in tidal flat sediments and investigated about the factors affecting its rates. Results from the study show that (1) the rates of denitrification and anammox affected by DIN concentration and DO concentration, (2) the anammox rates affected by the number of anammox bacteria.

1. はじめに

干潟には多種多様な生物が生息しており、窒素・リン等の栄養塩類の循環が活発な場であると考えられている。脱窒・アナモックスによる窒素の大気への放出は、干潟の栄養塩除去を考える上で重要な過程であると考えられる。これまで、Trimmerら(2003)のテムズ川河口での調査や、Rysgaardら(2004)の北極海での調査等、自然環境において脱窒・アナモックスによる窒素除去が確認されてきた。また、秦野ら(2010)、石射ら(2010)、佐々木ら(2011)による東京港野鳥公園の造成干潟における調査では、干潟における栄養塩循環に関する調査として、干潟-隣接海域間、堆積物-直上水間の栄養塩フラックス、ベントス・水鳥等の生物による栄養塩取込み量の算定が行われ、その結果、干潟堆積物における窒素除去の傾向が見られ、野鳥公園干潟は隣接海域に対して窒素の吸収源であることが示唆された。この要因の一つとして脱窒・アナモックスが挙げられる。梅田ら(2012)の調査では、2010年と2011年の夏季と冬季に脱窒・アナモックス速度の測定が行われ、結果として脱窒・アナモックスによる窒素除去能力は高いことが確認された。また、Trimmerら(2003)、Rysgaardら(2004)の調査結果と比較して、野鳥公園干潟において脱窒・アナモックスによる窒素除去のアナモックスの寄与は大きかった。しかし、各調査で得られた脱窒・アナモックス速度から季節的な要因や底質との明確な関係は見られず、野鳥公園干潟において脱窒・アナモックス速度が高い値で示される要因は不明であった。

以上の観点から、干潟堆積物における脱窒・アナモ

ックス速度の測定と、その速度に及ぼす要因に関する検討を行った。脱窒・アナモックス速度の測定において、不攪乱採泥によるベントスやその巣穴の存在が、脱窒・アナモックスの活性に影響を及ぼしていることが示唆された。そこで、篩い分け採泥によるベントス除去を行い、DIN濃度やDO濃度による影響を調査した。また、アナモックス細菌数と脱窒・アナモックス速度との関係も考えられるため、底泥中のアナモックス細菌の分析を行った。

2. 調査対象干潟

調査は2つの造成干潟にて実施した。東京港野鳥公園・潮入りの池の概要を図-1に、横浜港湾空港技術調査事務所・潮彩の渚の概要を図-2に示す。

図-1 東京港野鳥公園・潮入りの池の概要

図-2 横浜港湾空港技術調査事務所・潮彩の渚の概要

1 学生会員	東京都市大学工学研究科都市工学専攻
2 正会員	修(工) 株式会社大林組
3 フェロー	博(工) 東京都市大学教授工学部都市工学科
4 正会員	博(農) (独法) 港湾空港技術研究所
5 正会員	五洋建設株式会社

表-1 採泥地点の堆積物粒度組成

地点		礫分 (%)	砂分 (%)	シルト・粘土分 (%)
野鳥公園干潟	潮間帯	0	68	32
	潮下帯	0	52	48
横浜港内干潟	上段	2	95	3
	中段	3	95	2

(1) 東京港野鳥公園・潮入りの池

野鳥公園干潟は、隣接している東京湾と2本の水路でのみ海水交換が行われている閉鎖性の高い潟湖型の造成干潟である。干潟の総面積は約57000m²、潮間帯面積は約35000m²、潮下帯面積は約22000m²となっており、干潟内の水深は1~2mである。

(2) 横浜港湾空港技術調査事務所・潮彩の渚

横浜港内干潟は干潟・磯場等環境実験施設である。特徴として、上・中・下段の3段からなる柵式構造となっている。各段の高低差は約0.5mとなっており、上段・中段は満潮時には水没し干潮時には干出す潮間帯である。下段は年に数回干出す程度である。磯場を除いた干潟面積は上段約170m²、中段約260m²、下段約90m²である。

3. 脱窒・アナモックス速度の測定

調査は野鳥公園干潟にて2010年~2012年の夏季と冬季に、横浜港内干潟にて2012年の夏季と冬季に実施した。表-1に野鳥公園干潟及び横浜港内干潟における採泥地点の堆積物粒度組成を示す。野鳥公園干潟は泥質干潟、横浜港内干潟は砂質干潟であり、堆積物の構成が大きく異なる。本研究ではこれらを比較することで堆積物特性等の干潟の環境が脱窒・アナモックス反応に及ぼす影響を調査する。脱窒速度及びアナモックス速度の測定はNielsen (1992) が開発したIPT法の改良であるRisgaardら (2003) の安定同位体を用いたr-IPT法を用いた。

(1) 現地における堆積物の採取

調査では干潟堆積物の培養実験に用いる堆積物のコアサンプリングを行った。コアサンプリングはアクリルコア (内径82mm, 長さ30cm) を用いた。サンプリング地点は図-1に示す野鳥公園干潟の潮間帯・潮下帯の2地点、及び図-2に示す横浜港内干潟の上段・中段の2地点にて行った。アクリルコアを堆積物に挿入し、堆積物表面から10cmの深さを不撓乱で採取した。

(2) 堆積物の培養実験

コアサンプルを実験室に持ち帰り、水温を現場と同じ条件に保ち、約半日間の静置を行った。その後、コア内直上水の窒素安定同位体の濃度が¹⁵100μmol N/l, 200μmol N/lになるようにNa¹⁵NO₃ 200mmol N/l 溶液を添加した (μmol N/l はN原子のモル濃度を表す)。各濃度につきコ

アサンプル3本を設定し、1地点につき6本を用いた。検体数に関しては所有しているアクリルコアの本数、調査人員の関係から、脱窒速度の測定に必要な最低限度の数で設定している。従って、1地点につき脱窒・アナモックス速度は各々1つの値しか得られない。添加後は直上水中の濃度を均一にするため、堆積物を巻き上げないように攪拌を行った。コアサンプルの培養時間は、窒素安定同位体の添加直後を t_0 、安定同位体の添加から培養3時間後を t_1 、培養6時間後を t_2 と設定した。また、培養時間毎にコア内のDO濃度、水温を測定し、直上水を採取した。直上水はシリンジを用いて10ml 採取し、DIN濃度の測定を行った。測定には栄養塩分析装置 (TRAACS-800) を用いて行った。採水後、コア内部にサブコア (内径24mm) 3本を挿入し、直上水10cmと堆積物5cmを採取した。スラリー状にかき混ぜた後、約1分間の静置を行い、上澄み液をバイアル瓶 (20.1ml) に導入した。バイアル瓶には予めZnCl₂を1ml 入れて微生物の働きを抑え、脱窒・アナモックス反応が起こらないようにした。また、サブコアによる堆積物の採取の際、間隙水中のDIN濃度測定用として堆積物を採取した。間隙水中のDIN濃度測定には直上水同様、TRAACS-800を使用して分析した。

(3) 窒素ガスの質量分析

質量分析法を用い、バイアル瓶内のガス中に含まれる窒素安定同位体対比を測定した。バイアル瓶内のスラリーに溶けている窒素を追い出すため、シリンジを2本用いて、バイアル瓶にHeを4ml 打ち込むと同時にバイアル瓶内の上層水4ml を抜き、ヘッドスペースを作った。バイアル瓶をよく振り、ヘッドスペースに窒素が混ざるようにした。その後、バイアル瓶内の圧力が変わらないようにHeで満たされた蒸留水をバイアル瓶に流しながら、ヘッドスペースからシリンジを用いて1.5ml のガスサンプルを採取した。大気の影響を防ぐためシリンジを押し出し続け、ガスサンプルが1ml になったところで分析計に打った。窒素ガスの分析は元素分析計 (Thermo Finnigan製 Flash EA1112) 及び質量分析計 (Thermo Finnigan製 DELTA plus Advantage) を用いて行った。

(4) 脱窒・アナモックス速度の算定

大気中には窒素が78%存在しているため、底泥中で脱窒・アナモックス反応により生成された窒素と大気中の窒素との識別が困難である。そこで、窒素の安定同位体を用いる。窒素には¹⁴Nと¹⁵Nの2つの安定同位体が存在し、N₂として質量数の異なる²⁸N₂, ²⁹N₂, ³⁰N₂が存在する。その大気中での存在比は各々99.3%, 0.67%, 0.03%である。そこで、¹⁵Nをトレーサーとして添加し、存在比の小さい²⁹N₂, ³⁰N₂の生成量を測定して脱窒・アナモックス速度の算定を行った。脱窒・アナモックス反応による窒素ガスの生成速度は式 (1) で表され、アナモック

ス速度は式(2)で表される。脱窒速度はこれらの差によって求められる。ここで $p^{29}N_2$ 、 $p^{30}N_2$ は $^{29}N_2$ 、 $^{30}N_2$ の生成速度を表す。また r_{14} は底泥中の $^{14}NO_3^-$ と $^{15}NO_3^-$ の濃度比を表し、式(3)で与えられる。また V は $^{15}NO_3^-$ の異なる濃度の比であり、式(4)によって求められる。

$$r-IPTp_{14}=2 \cdot r_{14} \left\{ p^{29}N_2^{(1)} + p^{30}N_2^{(1)} (1-r_{14}) \right\} \cdots \cdots (1)$$

$$Anammox=2 \cdot r_{14} (p^{29}N_2^{(1)} - 2 \cdot r_{14} \cdot p^{30}N_2^{(1)}) \cdots (2)$$

$$r_{14} = \frac{p^{29}N_2^{(1)} - V \cdot p^{29}N_2^{(2)}}{2(p^{30}N_2^{(1)} - V^2 \cdot p^{30}N_2^{(2)})} \cdots \cdots (3)$$

$$V = \frac{p^{29}N_2^{(1)} + 2 \cdot p^{30}N_2^{(1)}}{p^{29}N_2^{(2)} + 2 \cdot p^{30}N_2^{(2)}} \cdots \cdots (4)$$

2011年12月の野鳥公園干潟の調査における潮間帯及び潮下帯の $^{29}N_2$ 、 $^{30}N_2$ の生成量の測定結果を図-3、4に示す。縦軸を $^{29}N_2$ 、 $^{30}N_2$ の生成量、横軸を培養時間として関係式を求め、その傾きを $^{29}N_2$ 、 $^{30}N_2$ の生成速度 $p^{29}N_2$ 、 $p^{30}N_2$ ($\mu\text{mol } N_2/\text{m}^2/\text{h}$) とした。Na $^{15}NO_3$ 溶液を100 $\mu\text{mol } N/\ell$ 添加した場合の $^{29}N_2$ 、 $^{30}N_2$ の生成速度を各々 $p^{29}N_2$ (1)、 $p^{30}N_2$ (1) とし、200 $\mu\text{mol } N/\ell$ 添加した場合の $^{29}N_2$ 、 $^{30}N_2$ の生成速度を各々 $p^{29}N_2$ (2)、 $p^{30}N_2$ (2) とした。

(5) 脱窒・アナモックス速度の測定結果

図-5に2010年～2012年の野鳥公園干潟における、脱窒・アナモックス速度の測定結果、コアサンプル直上水と間隙水のDIN濃度測定結果を示す。また、図-6に2012年の横浜港内干潟における脱窒・アナモックス速度の測定結果を示す。野鳥公園干潟における脱窒速度は42-1035 $\mu\text{mol } N/\text{m}^2/\text{h}$ 、アナモックス速度は71-783 $\mu\text{mol } N/\text{m}^2/\text{h}$ となった。横浜港内干潟における脱窒速度は27-278 $\mu\text{mol } N/\text{m}^2/\text{h}$ 、アナモックス速度は12-114 $\mu\text{mol } N/\text{m}^2/\text{h}$ となった。野鳥公園干潟では、脱窒速度はアナモックス速度より大きいこと、また潮下帯の方が潮間帯よりもその速度が大きいという傾向が見られた。横浜港内干潟では、同様に脱窒速度がアナモックス速度より大きく、また上段の方が中段よりも大きくなった。しかし、これらの結果から脱窒・アナモックス速度と、直上水及び間隙水のDIN濃度との相関は得られなかった。

4. 脱窒・アナモックス速度に及ぼす要因の検討

(1) DIN濃度、DO濃度の影響

a) 現地における堆積物の採取

脱窒・アナモックス速度に及ぼす要因を解明するため、培養実験時の堆積物コアの海水中のDIN濃度、DO濃度をコントロールして条件を4つに分け、各々を比較することで検討した。本研究の脱窒・アナモックス速度の測定にお

図-3 $^{29}N_2$ 生成量の測定結果 (2011年12月野鳥公園干潟)

図-4 $^{30}N_2$ 生成量の測定結果 (2011年12月野鳥公園干潟)

図-5 野鳥公園干潟の脱窒・アナモックス速度の測定結果

図-6 横浜港内干潟の脱窒・アナモックス速度の測定結果

表-2 篩い分け堆積物の培養実験の設定条件

設定条件	栄養塩濃度 ($\mu\text{mol N}/\ell$)			バブリング
	$\text{NO}_3\text{-N}$	$\text{NO}_2\text{-N}$	$\text{NH}_4\text{-N}$	
CASE 1	100	5	10	N_2 ガス
CASE 2	100	5	10	空気
CASE 3	200	10	10	空気
CASE 4	200	10	30	空気

図-7 篩い分け採泥による堆積物のコアサンプリング

図-8 篩い分けした場合の脱窒・アナモックス速度の測定結果

いて、不攪乱採泥では堆積物コアサンプル内に底生生物やその巣穴をそのままの状態に残すため、これらによる影響が懸念されてきた。そこで、本実験では採泥時に1mm目篩で篩い分け採泥を行い、底生生物を取り除いた。採泥は図-1に示す野鳥公園干潟の星印の地点で行った。

b) 堆積物の培養実験

採取した堆積物は篩い分けにより堆積物中の酸化・還元層の構造を破壊したため、堆積物をサンボックスに入れ蓋をし、干潟実験水槽に沈めて約2週間静置して堆積物中の酸化還元環境を回復させた。培養実験に使用した海水は神奈川県三浦市の三崎港付近の海域で採取し、この海水を条件通りのDIN濃度にするため KNO_3 、 NaNO_2 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加した。また、この海水中のDIN濃度は $\text{NO}_3\text{-N}$: $0.37\mu\text{mol}/\ell$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$: $0.37\mu\text{mol}/\ell$ 、 $\text{NH}_4\text{-N}$: $0.08\mu\text{mol}/\ell$ と低濃度であり、これによる影響は少ないと考え、濃度調整の際に考慮しなかった。作成した海水中のDO濃度を調整するため N_2 あるいは空気をバブリングした。 N_2 のバブリングによりDOを $0\text{mg}/\ell$ にし、空気のバブリングによりDOを飽和状態にした。以上の作業を表-2に示す4つの設定条件通りに行った。この条件分けはCase

1とCase2を比較することでDO濃度による影響を検証、Case2とCase3の比較で $\text{NO}_3+\text{NO}_2\text{-N}$ による影響を検証、Case3とCase4の比較で $\text{NH}_4\text{-N}$ による影響を検証することを目的として設定した。また、設定濃度は野鳥公園干潟における過去の調査で観測された $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度とほぼ同じ範囲にした。条件別の海水の調整が終了したら、均質にした堆積物から堆積物コアサンプルを各ケース6本ずつ採取し、培養実験を行った。サンボックスからの堆積物コアサンプリングの様子を図-7に示す。培養実験の方法は不攪乱採泥時と同じ方法で行った。

c) 脱窒・アナモックス速度の測定結果

この結果から得られたCase1～Case4の脱窒・アナモックス速度の測定結果を図-8に示す。Case1とCase2を比較すると、DO濃度が低く嫌気的な環境で脱窒・アナモックス反応が活性される傾向が見られた。Case2とCase3の比較では脱窒・アナモックス速度は $\text{NO}_3+\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度が高い場合に値が大きくなり、DINの影響が認められた。また、Case3とCase4の比較でも $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度が高い場合に脱窒・アナモックス速度が大きいう結果が得られた。またCase4に関しては他の条件と比較して脱窒速度とアナモックス速度の間にあまり差がなかった。これは添加した $\text{NH}_4\text{-N}$ がアナモックス速度の増加に寄与していることが考えられる。

篩い分け採泥による脱窒・アナモックス速度は、図-5の不攪乱採泥による結果と比較すると小さい。また、間隙水のDIN濃度も不攪乱採泥による結果と比較して低かった。これは、底生生物やその巣穴の存在が影響を及ぼすことが示唆されたが、この差の要因は他の影響も考えられる。

(2) アナモックス細菌数の影響

a) アナモックス細菌数の分析

アナモックス反応は堆積物に生息するアナモックス細菌数が影響するものと考えられ、アナモックス細菌数の分析を行った。海洋アナモックス細菌のDNA分析としては、中島ら(2008)の英虞湾における調査事例がある。細菌分析用の採泥は、2012年6月に野鳥公園干潟の潮間帯及び潮下帯、2012年8月に横浜港内干潟の中段の、各々脱窒・アナモックス速度測定用の不攪乱コアサンプリングを実施した地点と同点にて行い、堆積物表層深さ10cm程度を筒状のプラスチック容器を用いて採取した。アナモックス細菌数の分析には、サンプル中のアナモックス細菌のDNAを増幅させ、リアルタイムで観測し、DNAの量を推定するリアルタイムPCR法を用いた。また、本調査では標的遺伝子にヒドラジン酸化還元酵素遺伝子(hzo)を用いた。

b) アナモックス細菌数の分析結果

野鳥公園干潟の潮間帯・潮下帯(2012年6月)及び横

浜港内干潟の中段 (2012年8月) から採泥した試料からのアナモックス細菌のPCR分析による標的遺伝子のコピー数、及び同時期に実施された同地点でのアナモックス速度の結果を図-9に示す。各調査地点の標的遺伝子のコピー数は、野鳥公園干潟の潮間帯と潮下帯は同程度であるが、横浜港内干潟の中段は野鳥公園干潟と比較して小さかった。この要因として、アナモックス細菌が嫌気的な環境を好むため、砂質の横浜港内干潟よりも泥質の野鳥公園干潟の方が堆積物中に嫌気層を形成しやすく、生息しやすい環境であったことが考えられる。本調査での潮間帯のアナモックス速度は小さいが、他の環境要因による影響が考えられ、図-5、6を比較すると全体的に野鳥公園干潟のアナモックス速度は横浜港内干潟より大きく、堆積物中のアナモックス細菌数がアナモックス速度に影響を与えていることが示唆された。なお、本調査で実施したアナモックス細菌の遺伝子情報は、公共データベース (DDBJ: 国立遺伝学研究所) に登録された。

5. まとめ

本研究で得られた主な結論を以下にまとめる。

- 1) 現地不攪乱採泥による脱窒・アナモックス速度は、アナモックス速度よりも脱窒速度の方が大きい、Trimmerら (2003)、Rysgaardら (2004) 等の調査よりアナモックスの寄与が大きかった。Rysgaardら (2004) ではアナモックス活性は脱窒活性に相関があることが示され、本研究においても脱窒速度とアナモックス速度との間に相関があった。野鳥公園干潟では潮間帯よりも潮下帯の方が、横浜港内干潟では中段よりも上段の方が脱窒・アナモックス速度は大きい傾向が見られた。横浜港内干潟は上段に比べ中段のアサリの現存量が圧倒的に多く、ベントスの影響が大きいと考えられる。また、不攪乱採泥による脱窒・アナモックス速度から、DIN濃度やORP等の底質との明確な関係が見られなかった要因に、底生生物やその巣穴の存在が挙げられる。
- 2) DIN濃度、DO濃度による影響の検討より、脱窒・アナモックス速度は嫌気性が高い条件、 $\text{NO}_2+\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度が高い条件、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度が高い条件で大きくなり、篩い分け採泥によるベントス除去によりDIN濃度、DO濃度による影響が明確に示された。しかし、その速度は不攪乱採泥による脱窒・アナモックス速度よりかなり小さい。この理由は、ベントス除去の影響が大きいと思われるが、他の要因も考えられ、定かではない。
- 3) アナモックス細菌数の分析では、泥質である野鳥公園干潟が砂質干潟である横浜港内干潟よりもアナモックス細菌数が多く、また調査全体として見ると野鳥公園干潟は横浜港内干潟よりアナモックス速度が大きいことが示され、堆積物中のアナモックス細菌数がアナ

図-9 PCR分析結果及びアナモックス速度の測定結果

モックス速度に影響を与えていることが示唆された。この要因として、泥質干潟の方が堆積物中に嫌気層を形成しやすく、アナモックス細菌の生息しやすい環境であったことが考えられる。

謝辞：本研究を進めるにあたって、調査に協力いただきました、水圏環境工学研究室の皆様、東京港野鳥公園の荻原様、(独法) 港湾空港技術研究所の三好様、五洋建設株式会社の竹山様、横浜港湾空港技術調査事務所の亀山様をはじめ、皆様方に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 石射弘嗣・村上和男・佐々木奈々・大浦 剛・桑江朝比呂 (2010)：季節間における干潟域の栄養塩フラックスと堆積物が直上水に及ぼす影響の検討, 土木学会論文集B2 (海岸工学), Vol. 66, No.1, pp. 1071 - 1075.
- 梅田悠輔・村上和男・篠崎知美・桑江朝比呂・中瀬浩太 (2012)：東京港野鳥公園干潟における窒素循環の脱窒・アナモックスと付着藻類の役割, 土木学会論文集B2 (海岸工学), Vol. 68, No.2, pp. 81 - 85.
- 佐々木奈々・村上和男・梅田悠輔・桑江朝比呂・中瀬浩太 (2011)：東京港野鳥公園の干潟における栄養塩循環の測定, 土木学会論文集B2 (海岸工学), Vol. 67, No.2, pp. 1116 - 1120.
- 中島 潤・栗冠真紀子・木村哲哉・栗冠和郎 (2008)：英虞湾における海洋性アナモックス細菌に関する研究, 三重大学大学院生物資源学研究科紀要, 35, pp. 27 - 37.
- 秦野拓見・村上和男・石射弘嗣・門脇麻人・桑江朝比呂・中瀬浩太 (2010)：東京港野鳥公園干潟における窒素・リン収支の特性, 土木学会論文集B, Vol. 66 (2010) No. 4, pp. 419 - 433.
- Nielsen, L. P. (1992)：Denitrification in sediments determined from nitrogen isotope pairing, FEMS Microbiology Ecology 86, pp. 357 - 362.
- Petersen, N. R., L. P. Nielsen, S. Rysgaard, T. Dalsgaard and R. L. Meyer (2003)：Application of the isotope pairing technique in sediments where anammox and denitrification coexist, Limnol. Oceanogr. Method 1, pp. 63 - 73.
- Rysgaard, S., R. N. Glud, N. R. Petersen and T. Dalsgaard (2004)：Denitrification and anammox activity in Arctic marine sediments, Limnol. Oceanogr. 49, pp. 1493 - 1502.
- Trimmer, M., J. C. Nicholls and B. Deflandre (2003)：Anarobic ammonium oxidation measured in sediments along the Thames Estuary, United Kingdom, Applied and Environmental Microbiology 69, pp. 6447 - 6454.