

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月11日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00525

研究課題名(和文) 干潟における嫌氣的硝酸還元過程に溶存有機物の質と量が与える影響

研究課題名(英文) Denitrification, anammox, and DNRA in the hypereutrophic tidal flat: Influences of the dissolved organic matter (DOM) quantity and quality

研究代表者

千賀 有希子 (SENGA, Yukiko)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：30434210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、干潟においてNO<sub>3</sub>-負荷の増加によって富栄養化が誘発され、大型海藻が異常繁殖する現象が問題となっている。NO<sub>3</sub>-は、微生物による脱窒とアナモックス(窒素除去)、DNRA(窒素貯留)によって消失する。本研究では、富栄養化の進行が著しく年間通して大型海藻類アオサの被覆がみられる谷津干潟を対象に、1) NO<sub>3</sub>-の除去に対する脱窒とアナモックスの寄与、2) 脱窒、アナモックス、DNRAの速度の同時測定法の確立、3) 脱窒、アナモックス、DNRAに大型海藻が与える影響について検討を行った。本研究によって、富栄養化にともなう大型海藻の出現が窒素除去に大きく影響することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、脱窒、アナモックス、DNRAの同時測定法の確立に成功し、これまで不明とされていた富栄養化が著しい干潟におけるNO<sub>3</sub>-の動態が明らかになった点である。本研究により、富栄養化した干潟においてNO<sub>3</sub>-は主に脱窒を介して除去されること、大型藻類の出現はNO<sub>3</sub>-除去過程を大きく左右することといった2点の新知見を提示することができた。近年、世界中の沿岸域において富栄養化が問題となっており、水質を改善するための対策や窒素浄化の技術開発の確立が喫緊の課題となっている。本研究の成果は、そのような対策や技術開発に基礎的知見を提供するものであり、これが本研究の社会的意義である。

研究成果の概要(英文)：An increase in available nitrogen (NO<sub>3</sub>-) loading in intertidal ecosystems causes eutrophication and macroalgae blooms. In intertidal ecosystems subjected to excessive loading of NO<sub>3</sub>-, it is necessary to understand denitrification and anammox which are microbially mediated N removal processes as N<sub>2</sub>, and DNRA which conserves nitrogen in the sediment as NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. However, detailed information regarding these processes is not fully available. In the present study, we investigated 1) the contributions of denitrification and anammox for NO<sub>3</sub>- removal, 2) the development of sequential method to measure denitrification, anammox and DNRA, 3) the influences of macroalgae on denitrification, anammox and DNRA. Field investigation and sampling were performed in the hypereutrophic Yatsu tidal flat (Chiba Prefecture). The results suggest that the occurrence of macroalgae changes the progress of NO<sub>3</sub>- removal processes in intertidal ecosystems.

研究分野：生物地球化学

キーワード：嫌氣的硝酸還元過程 脱窒 アナモックス DNRA 大型海藻 干潟

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19, CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、干潟の富栄養化にともないアオサなどの大型海藻が異常繁殖するグリーンタイド現象が問題となっている。干潟堆積物への大型海藻類の被覆は、特に干潮時に堆積物表面の酸素の拡散を阻害し還元環境を形成することによって、水生生物の死滅や景観の悪化を招く。富栄養化を引き起こす要因として、人間活動に由来する  $\text{NO}_3^-$  負荷の増加が報告されている。

干潟において  $\text{NO}_3^-$  は、脱窒、アナモックス、DNRA の微生物による 3 つの嫌氣的硝酸還元過程によって消失する。脱窒とアナモックスは  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{NO}_2^-$ ) を  $\text{N}_2$  へと還元し窒素を系外へ放出する除去過程であるのに対し、DNRA は  $\text{NH}_4^+$  を生成し窒素をその場にとどめる貯留過程である。これらの過程は干潟の窒素除去を決定する重要な過程であるが詳細は明らかとなっていない。その原因として 3 つの過程が同時に検討されていない、海藻などに由来する溶有機物 (DOM) の質の影響が考慮されていないことが考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、富栄養化の進行が著しく年間通して大型海藻類アオサの被覆がみられる谷津干潟を対象に、(1)  $\text{NO}_3^-$  の除去に対する脱窒とアナモックスの寄与、(2) 脱窒、アナモックス、DNRA の速度の同時測定法の確立、(3) 脱窒、アナモックス、DNRA の嫌氣的硝酸還元過程にアオサが与える影響について検討を行った。

### 3. 研究の方法

実験に用いる堆積物は、干潟中心部でアオサの被覆がみられる地点、干潟南西部のアオサの被覆がみられない地点で干潮時に採取した。海水はタイダルクリークで採水した。

#### (1) $\text{NO}_3^-$ の除去に対する脱窒とアナモックスの寄与

脱窒とアナモックス活性は、2015 年および 2016 年の 9 月と 11 月に  $^{15}\text{N}$  トレーサー法で測定を行なった。10% 堆積物スラリーが入ったバイアル瓶に、 $\text{NO}_3^-$  を 2 mM、 $\text{NH}_4^+$  を 0.4 mM となるように、3 つの系を作成した；  $\text{NO}_3^-+^{15}\text{NH}_4^+$ 、 $^{15}\text{NO}_3^-+\text{NH}_4^+$ 、 $^{15}\text{NH}_4^+$ 。20℃ 暗条件下で嫌気培養し、気相に蓄積した  $^{14}\text{N}-^{15}\text{N}$  ( $^{29}\text{N}_2$ ) と  $^{15}\text{N}-^{15}\text{N}$  ( $^{30}\text{N}_2$ ) をガスクロマトグラフ付き質量分析計 (GC-MS, GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu) で時間を追って測定した。脱窒速度は  $^{30}\text{N}_2$ 、アナモックス速度は  $^{29}\text{N}_2$  から算出した。

また、長期間 (3 ヶ月) にわたる集積培養を行い、脱窒とアナモックス活性の変化をみた。堆積物 0.5 L、海水 1.5 L を 2 L メスシリンダーに加えた。 $\text{NO}_3^-$  と  $\text{NH}_4^+$  濃度を常に約 5 mgN l<sup>-1</sup> となるように保ち、攪拌しながら培養を行った。

さらに、谷津干潟における窒素除去を特徴づけるために、アセチレン阻害法によって測定した 2012 年から 2017 年までの脱窒活性を環境因子と重回帰分析した。アセチレン阻害法は、堆積物スラリーが入ったバイアル瓶に  $\text{NO}_3^-$  を 5 mgN/L、 $\text{C}_2\text{H}_2$  を 6 kPa となるように添加し、20℃ の暗条件下で 5 時間嫌気培養し、生成・蓄積した  $\text{N}_2\text{O}$  を電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフ (6890, Agilent) で測定することによって行なった。

#### (2) 脱窒、アナモックス、DNRA の活性の同時測定法の確立

$^{15}\text{N}$  トレーサー法による脱窒とアナモックス活性を測定後、連続して DNRA 速度を測定するために、スラリーからの水サンプル回収法を検討した。次に、DNRA によって生成した  $^{15}\text{NH}_4^+$  を測定するために、 $\text{NH}_4^+$  拡散法について検討した。この方法は、塩基性条件下で振とうしながら  $^{15}\text{NH}_4^+$  を揮発させ、硫酸を滴下したフィルター上に  $^{15}\text{NH}_4^+$  を回収する方法である。 $\text{NH}_4^+$  拡散法の条件として振とう時間、振とう温度、塩分濃度の検討を行った。 $^{15}\text{NH}_4^+$  を回収後、過硫酸酸化法により  $^{15}\text{NH}_4^+$  を  $^{15}\text{NO}_3^-$  に酸化させ、脱窒菌法により  $^{15}\text{NO}_3^-$  を  $^{14}\text{N}-^{15}\text{NO}$  ( $^{29}\text{N}_2\text{O}$ ) および  $^{15}\text{N}-^{15}\text{NO}$  ( $^{30}\text{N}_2\text{O}$ ) に還元し、GC-MS で測定した。 $\text{N}_2\text{O}$  の回収率および同位体比の変化についても確認した。

#### (3) 脱窒、アナモックス、DNRA にアオサが与える影響

堆積物 0.2 L、海水 0.25 L を三角フラスコに加え、アオサを約 35 g 加えた系と加えない系を用意し、明暗条件下 (12 h) で 21 日間培養した。確立した同時測定法により 0, 7, 21 日目における脱窒、アナモックス、DNRA 活性を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) $\text{NO}_3^-$ の除去に対する脱窒とアナモックスの寄与

谷津干潟中央部 (アオサの被覆有り) における脱窒活性は 11 月に高く、アナモックス活性は 9 月に高かった (表 1)。南西部 (アオサの被覆無し) の脱窒活性は 11 月と 9 月で差がみられず、アナモックス活性は 9 月のみ検出された。両地点とも脱窒活性は、アナモックス活性よりも圧倒的に高く、全  $\text{N}_2$  生成の >93% を占めた。

3 ヶ月の集積培養の結果、脱窒は低下し、アナモックス活性は増加した (図 1)。アナモックス活性は増加したものの、全  $\text{N}_2$  生成の 15% にしか達しなかった。これらの結果より、谷津干潟における  $\text{NO}_3^-$  は主に脱窒により消費され、除去されることが示された。

脱窒活性と環境因子の重回帰分析により、谷津干潟中央部の脱窒活性は、海水および間隙水中の栄養塩濃度に支配されることが示されたのに対して、南西部の脱窒活性は堆積物の有機物に支配されることがわかった。アオサの被覆がある中央部においては、脱窒とアオサが栄養塩をめぐって競争関係にあると考えられた。また、アオサの被覆の影響を受けない南西部の脱窒は、アオサ由来の有機物がそれほど供給されず、炭素制限を受けていると考えられた。この結果は、アオサの存在が干潟の窒素除去過程を多く左右することを示唆している。

表 1. 谷津干潟における脱窒とアナモックス活性

	脱窒活性 ( $\mu\text{g-N g-dry}^{-1} \text{ day}^{-1}$ )	アナモックス活性 ( $\mu\text{g-N g-dry}^{-1} \text{ day}^{-1}$ )
中央部 (アオサの被覆有り)		
2015年9月	2.9	0.22
2015年11月	131.0	0.13
南西部 (アオサの被覆無し)		
2016年9月	17.0	0.02
2016年11月	21.4	ND

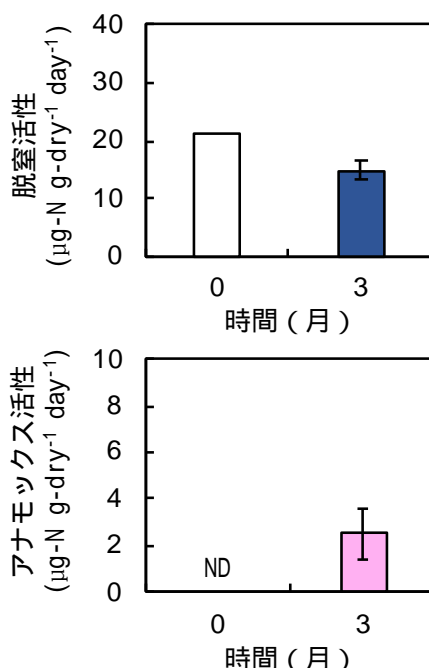


図 1. 集積培養における脱窒とアナモックス活性の変化

### (2) 脱窒，アナモックス，DNRA の速度の同時測定法の確立

DNRA 速度を測定するための水サンプルは、脱窒とアナモックス速度を測定した後、素早くスラリーを遠心分離し(3000 rpm, 4 ), 上澄みを滅菌ろ過し回収することとした。また、 $\text{NH}_4^+$  拡散法の振とう時間は3時間、振とう温度は4 , 塩分濃度は2 M KCl とした。これら一連の手順による  $^{29}\text{N}_2\text{O}$  および  $^{30}\text{N}_2\text{O}$  の回収率と同位体比の変化はなかった。

### (3) 脱窒，アナモックス，DNRA にアオサが与える影響

アナモックス活性は両系とも培養期間を通して検出されなかった。

アオサを加えた系における脱窒活性は、21 日目に有意な増加がみられた。アオサ無しの系の脱窒活性は7 日目において有意に増加し、その後大きな変化はみられなかった。アオサから供給される DOM により脱窒が高められると予測したが、両系に大きな差はみられなかった。

DNRA 活性は、アオサを加えた系において0 日目から7 日目において有意に増加し、その後変化がみられなかった。一方アオサ無しの系では7 日目に減少し、その後変化がみられなかった。DNRA は両系で反対の傾向を示した。アオサを加えて系では、7 日目にアオサの腐敗に伴う  $\text{H}_2\text{S}$  の生成が確認された。 $\text{H}_2\text{S}$  の存在下で DNRA が促進するといわれている (Senga et al. 2006)。したがって、干潟における窒素貯留は  $\text{H}_2\text{S}$  によって左右されると推察された。アオサ被覆に伴う DOM や  $\text{H}_2\text{S}$  の生成が嫌氣的硝酸還元過程に与える影響は今後詳細に検討する必要があると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 5 件)

- 1) Senga Y, Sato T, Kuroiwa M, Nohara S, Suwa Y (2019) Anammox and denitrification in the intertidal sediment of the hypereutrophic Yatsu tidal flat, Japan. *Estuaries and Coasts* 42: 665-674. doi.org/10.1007/s12237-019-00520-6 (査読有)
- 2) Kuroiwa M, Fukushima K, Hashimoto K, Senga Y, Sato T, Katsuyama C, Suwa Y (2019) Measurement of the potential rates of dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) based on  $^{14}\text{NH}_4^+ / ^{15}\text{NH}_4^+$  analysis by sequential conversion and detection with quadrupole GC/MS. *Journal of Visualized Experiments* (査読有)
- 3) Senga Y, Yabe S, Nakamura T, Kagami M (2018) Influence of parasitic chytrids on the quantity and quality of algal dissolved organic matter (AOM). *Water Research* 145: 346-353. doi.org/10.1016/j.watres.2018.08.037 (査読有)
- 4) Senga Y, Naruoka C, Moriai S, Nohara S (2018) Characterizing the transformation of aquatic humic substances exposed to ultraviolet radiation using excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy and PARAFAC. *Inland Waters* 8: 505-511. https://doi.org/10.1080/20442041.2018.1506650 (査読有)
- 5) Shiraki Y, Kitazawa T, Lee S, Senga Y (2018) A method for determining *Batillaria attramentaria* distribution using aerial balloon photography and a vegetation index camera: Demonstration at the Yatsu Tidal Flat, Chiba Prefecture. *Advances in remote sensing* 7:15-24. doi:10. 4236/ars.2018.71002 (査読有)

### 〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) 千賀有希子, 北村 友佳, 王川 香澄, 柴木 叶, 小林 涉, 佐藤 翼, 成岡 知佳, 北沢俊幸, 李盛源, 白木洋平 (2017): 谷津干潟におけるグリーンタイドと微生物活性. 日本陸水学会第 82 回大会 (田沢湖)
- 2) 佐藤翼, 諏訪裕一, 黒岩恵, 千賀有希子 (2017): 谷津干潟堆積物における脱窒とアナモックスの集積培養. 日本陸水学会第 82 回大会 (田沢湖)
- 3) 佐藤翼, 諏訪裕一, 野原精一, 千賀有希子 (2016): 谷津干潟堆積物における脱窒とアナモックス過程. 日本陸水学会第 81 回大会 (沖縄).
- 4) 千賀有希子, 根立竜馬, 盛合哲史, 山内翔平, 和田憲昭, 近藤拓未, 宮田勉, 森朱音, 佐藤翼, 成岡知佳, 矢部詩織, 北沢俊幸, 李盛源, 白木洋平 (2015): 谷津干潟におけるグリーンタイド現象と水質. 日本陸水学会第 80 回大会 (函館).
- 5) 根立竜馬, 佐藤翼, 千賀有希子 (2015): 谷津干潟におけるグリーンタイド現象が微生物機能に与える影響. 日本陸水学会第 80 回大会 (函館).

### 〔図書〕(計 1 件)

- 1) 千賀有希子 (共著) 第 4 章. 陸水の酸性度, 第 9 章. 湖沼, 陸水環境化学, 第 10 章. 湿地, 沿岸域, 陸水環境化学, 藤永薫 [編] (2017), p. 35-44, 共立出版.

### 〔産業財産権〕

#### 出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

#### 取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年:  
国内外の別:

### 〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。