

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12224

研究課題名（和文）富栄養化に起因する干潟のレジームシフトにともなう微生物的窒素除去・貯留過程の解明

研究課題名（英文）Influences of regime shifts on microbial nitrogen removal and retention in hypereutrophic intertidal ecosystems

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） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、富栄養化水域谷津干潟における硝化過程を時空間的に把握するために、硝化によって生成されるヒドロキシルアミンのモニタリングを行った。2021年から2022年における海水と堆積物間隙水のモニタリングの結果、ヒドロキシルアミン濃度は間隙水の方が海水よりも高かったことから、硝化が活発に起こるサイトは堆積物表層であると考えられた。また統計解析により、堆積物表層における硝化は、温度と海水および間隙水のNH<sub>4</sub><sup>+</sup>基質の供給に依存しており、還元環境の形成によって阻害されることが示された。谷津干潟内の水の滞留による嫌気環境の形成が硝化を阻害し、その後の窒素除去過程である脱窒も抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の当初の目的は、<sup>15</sup>Nトレーサー法を用いて微生物的窒素除去過程（硝化-脱窒、硝化-アナモックス）と貯留過程（硝化-DNRA）を追跡する予定であったが、コロナ感染対策により同位体測定装置を使用する予定であった研究機関への出入りが禁止され、計画通りに研究を遂行することができなかった。しかしながら、本研究で用いたヒドロキシルアミンの測定によって、硝化過程の進行を十分に明らかにすることができることがわかった。ヒドロキシルアミン測定法は、<sup>15</sup>Nトレーサー法よりも短時間かつ低コストで行うことができる。またこの方法は測定操作も簡便であるため、今後様々な環境下で硝化を評価する際に応用できると考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, to explore the site of active nitrification and elucidate the factors controlling nitrification, hydroxylamine concentrations in the seawater and porewater of the hypereutrophic Yatsu tidal flat, eastern Japan, were measured. The concentrations from 2021 to 2022 indicated that nitrification was more active in the surface sediment than in seawater. In addition, multiple linear regression analysis indicated that nitrification in the surface sediment increases with higher temperature and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> supply from seawater and porewater, as well as under oxic conditions. Sediment denitrification by which N is removed is controlled by the occurrence of nitrification. Therefore, nitrification in the sub-aerobic surface sediment is crucial for N removal. Especially in the hypereutrophic tidal flat, the sub-aerobic surface sediment needs to be protected so as not to inhibit nitrification when seawater is stagnant.

研究分野：生物地球化学

キーワード：硝化 ヒドロキシルアミン 富栄養化 干潟

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

千葉県習志野市に位置する谷津干潟では、2012年から2017年にかけて富栄養化の影響によって大型海藻アオサの異常増殖（グリーンタイド）が観測されてきた。しかしながら、2018年ごろから干潟内に出現するアオサのバイオマスは減少し、突然ラン藻の異常増殖が発生した。このような一次生産者の突発的な入れ替わりは世界中の富栄養化した干潟で観測されている。このレジームシフトが起こる要因として、海水温の上昇や淡水の流入などが推測されているが詳細は不明瞭なままである。研究代表者は、谷津干潟における窒素量は僅かではあるが増加傾向にあることから、窒素栄養塩の微生物的除去過程である脱窒と貯留過程であるDNRAの変化が干潟のレジームシフトを引き起こす要因の1つではないかと予測した。さらに、谷津干潟の高い $\text{NH}_4^+$ 濃度（平均約 $300 \mu\text{gN/L}$ ）から、窒素栄養塩の除去・貯留過程を正確に把握するにはこれらの過程に繋がる硝化を含めて再評価する必要があると考え、本課題「富栄養化に起因する干潟のレジームシフトにともなう微生物的窒素除去・貯留過程の解明」の着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、 $^{15}\text{N}$ トレーサー法を用いて微生物的窒素除去過程(硝化-脱窒、硝化-アナモックス)と貯留過程(硝化-DNRA)を追跡する予定であったが、コロナ感染対策により同位体測定装置を使用する予定であった研究機関への出入りが禁止され、計画通りに研究を遂行することができなかった。そのため代替策として、谷津干潟の海水および堆積物間隙水中のヒドロキシルアミン( $\text{NH}_2\text{OH}$ )濃度を東邦大学で測定し、硝化の進行を評価することとした。ヒドロキシルアミンは、微生物的窒素過程の中でも硝化においてのみ中間体として生成され、消費されるといわれている。また、ヒドロキシルアミンは、環境中で不安定な物質であり、他の環境に輸送されることはほとんどないため、その濃度は現場の硝化の進行の程度を反映すると考えられている。本研究では、まず谷津干潟において硝化によってヒドロキシルアミンが生成されるか確認した。つぎに、谷津干潟における微生物的窒素除去過程と貯留過程を支配する硝化が時空間的にどのように変動するか理解するために、海水および堆積物間隙水中のヒドロキシルアミン濃度を追跡し、環境因子と重回帰分析を行った。さらに、本研究の研究成果により、富栄養化した干潟における硝化-脱窒による窒素除去の進行をモデル化した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 研究地点とサンプリング

谷津干潟は、千葉県習志野市に位置する約40haの干潟である。谷津干潟の周辺のほとんどはコンクリートで囲まれ、都市化が進んでいる。谷津干潟は、ラムサール条約登録湿地に認定され、国指定鳥獣保護区にも指定されているが、海水の栄養塩レベルは非常に高い状態を維持しており、過栄養水域に区分されている(千賀と山内, 2015, Senga et al. 2019, 2021, 2022)。本研究では、谷津干潟の中央部であるSt. SC (N 35°40'35", E 140°00'20")と潮が引いた時に形成される海水の水路であるタイダルリークのSt. T (N 35°40'33", E 140°00'26")において、ヒドロキシルアミン濃度と環境因子の測定を2021年1月から2022年12月にかけて月に1回行った。

ヒドロキシルアミン濃度を測定するための海水は、ゴム手袋をした手で直接海水を30-mLバイアル瓶に採水し、ゴム栓で密栓した。ヒドロキシルアミンの酸化を防ぐために、採水後直ちに3.5 M 氷酢酸を0.5 mL加えた。また、間隙水のヒドロキシルアミンを測定するために、採土管を用いて堆積物表層(5 cm)を採取し、チャック付きビニール袋に入れて空気が入らないように密閉した。海水および堆積物とも、冷却しながら実験室に持ち帰った。

#### (2) 硝化によるヒドロキシルアミン生成

200-mL三角フラスコに、ろ過した海水150 mL、堆積物30 gを加えスラリーを調製後、 $\text{NH}_4^+$ 濃度が7 mgN/Lとなるように $\text{NH}_4\text{Cl}$ を添加し、シリコセンを用いて蓋をした。スラリーをスターラーで攪拌しながら20°C、暗条件、好気条件下で26日間培養を行った。0(1時間攪拌後)、7, 12, 17, 22, 26日目のスラリーを回収し、ヒドロキシルアミン濃度およびアンモニア( $\text{NH}_4^+$ )、亜硝酸( $\text{NO}_2^-$ )、硝酸( $\text{NO}_3^-$ )濃度の測定を行った。

#### (3) ヒドロキシルアミンの測定

海水のヒドロキシルアミン濃度を測定するために、バイアル瓶に保存して持ち帰った海水を25 mLはかりとり、ヒドロキシルアミンが酸化されないように静かに共栓付き試験管に加えた。また、間隙水のヒドロキシルアミン濃度を測定するために、ポーラスカップ(多孔質チューブ)を用いて堆積物から間隙水を回収した。間隙水の回収は、4°C下で一晩静置して行った。なお、

間隙水を採取した 50-mL プラスチックシリンジには、あらかじめ 3.5 M 氷酢酸を 1.2 mL 加えた。採取した間隙水は、25 mL はかりとり静かに共栓付き試験管に加えた。

ヒドロキシルアミンの測定は、固相抽出法(福森ら, 2003)を改変して行った。試料水 25 mL に対して、0.3 mL スルファニル酸溶液(スルファニル酸 1.05 g, 酢酸ナトリウム 0.68 g を氷酢酸 30 mL 及び純水 70 mL に加熱溶解), 0.6 mL 氷酢酸, 0.6 mL ナフチルエチレンジアミン溶液(N-1 ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩 0.2 g を純水 200 mL に溶解)を順に加え、試料水中の  $\text{NO}_2^-$  をアズカップリングさせ、生成するアズ色素を Sep-pak C<sub>18</sub> カートリッジ(Waters)で吸着除去した。その後、ヒドロキシルアミンを  $\text{NO}_2^-$  に酸化するために、0.3 mL スルファニル酸溶液, 0.5 mL ヨウ素溶液(ヨウ素 0.0181 g を氷酢酸 25 mL に溶解)を添加し、35°C で 30 分間反応させた。反応後、余剰のヨウ素を除去するために、試料水を Sep-pak C<sub>18</sub> を用いて通水した。この溶液に 0.5 mL ナフチルエチレンジアミン溶液を加え、分光光度計(V-730, JASCO)を用いて 545 nm の吸光度を測定した。

検量線は、500 mgN/L ヒドロキシルアミン標準溶液を用いて数段階に希釈した溶液を、上述した同様の方法で発色させ、545 nm の吸光度を測定した。標準溶液は、 $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$  をアルゴン置換した約 11 psu 人工海水を用いて溶解した。人工海水は Lyman and Fleming (1940)の方法に準じて 34.5 psu に調製し、これを純水で 3 倍に希釈し用いた。本研究で用いた方法の検出限界は 1  $\mu\text{gN/L}$  であった。

#### 4. 研究成果

##### (1) 硝化によるヒドロキシルアミン生成

$\text{NH}_4^+$ 濃度は時間とともに減少し、17 日目には検出できなかった。 $\text{NH}_4^+$ の減少にともなって  $\text{NO}_2^-$ が増加し、 $\text{NO}_2^-$ 濃度は 12 日目に最も濃度が高かった。 $\text{NO}_2^-$ は 17 日目以降減少し、22 日目には検出できなかった。17 日目までは硝化のアンモニア酸化過程が進行したと考えられた。17 日目以降は、 $\text{NO}_3^-$ 濃度が増加し、硝化の亜硝酸酸化過程が開始したことが示された。ヒドロキシルアミンは、7 日目と 12 日目に検出され、 $\text{NO}_2^-$ 濃度が最も高かった 12 日目の方が濃度が高かった(2.0  $\mu\text{gN/L}$ )。したがって、ヒドロキシルアミンは、硝化のアンモニア酸化過程で生成され、その過程の進行にともなって消費されることがわかった。また 17 日目以降は、ヒドロキシルアミンは検出されなかったことから、亜硝酸酸化過程の進行時には、生成されないことが示された。

さらに、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NH}_2\text{OH}$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ の合計濃度は、時間を追って減少傾向にあった。この結果は、実験期間中にフラスコから窒素が消失したことを示している。好気条件下で培養を行ったものの、堆積物に形成されるミクロな嫌気環境下で脱窒が進行したと推察された。

##### (2) 海水と堆積物におけるヒドロキシルアミンの動態

海水におけるヒドロキシルアミン濃度は低く、ほとんどの月で検出できなかった。一方、間隙水におけるヒドロキシルアミン濃度は、海水よりも高かった(平均 1.5  $\mu\text{gN/L}$ )。したがって、ヒドロキシルアミンは主に堆積物表層で生成され、海水に拡散すると考えられた。すなわち、谷津干潟において硝化が活発に進行するサイトは堆積物表層であり、窒素除去過程である脱窒を促進していると推察された。谷津干潟の堆積物表層における速い脱窒速度が報告されている(Senga et al. 2019)。

##### (3) ヒドロキシルアミン動態による谷津干潟における硝化特性

谷津干潟の堆積物表層における硝化がどのような環境因子に支配されているか明らかにするために、間隙水のヒドロキシルアミン濃度と海水および堆積物の環境因子のそれぞれと重回帰分析を行なった。ヒドロキシルアミン濃度は、海水の  $\text{NO}_3^-$ と  $\text{NH}_4^+$ 濃度および水温と正の相関を示した。また、ヒドロキシルアミン濃度は、間隙水の  $\text{NH}_4^+$ 濃度と正の相関、 $\text{PO}_4^{3-}$ 濃度と負の相関を示した。これらの結果は、堆積物表層における硝化は、間隙水だけでなく海水の  $\text{NH}_4^+$ 基質にも依存し、温度の上昇とともに活発化し、脱窒の基質となる  $\text{NO}_3^-$ を生成することを示している。さらに、間隙水における  $\text{PO}_4^{3-}$ の蓄積は、堆積物の還元環境の形成を示している(McManus et al., 1997)。ヒドロキシルアミン濃度と  $\text{PO}_4^{3-}$ 濃度との負の相関は、堆積物表層における硝化が還元環境の発達で阻害されることを示している。また、重回帰分析ではヒドロキシルアミン濃度と水位の相関はみられなかったが、検出限界以下のヒドロキシルアミン濃度を除いて単回帰分析を行ったところ、両者は負の相関を示した。この結果もまた嫌気環境下における硝化の進行の阻害を示していると考えられる。

図 1 にヒドロキシルアミン動態から明らかとなった谷津干潟における硝化-脱窒による窒素除去の進行過程を記載したモデル図を示した。谷津干潟における硝化の活発なサイトは堆積物表層であり、温度と  $\text{NH}_4^+$ 基質の供給に依存性を示した。また、硝化にとって、潮汐による水位の低下(引き潮)にともなう大気からの酸素の供給は重要であると考えられた。谷津干潟は、周辺

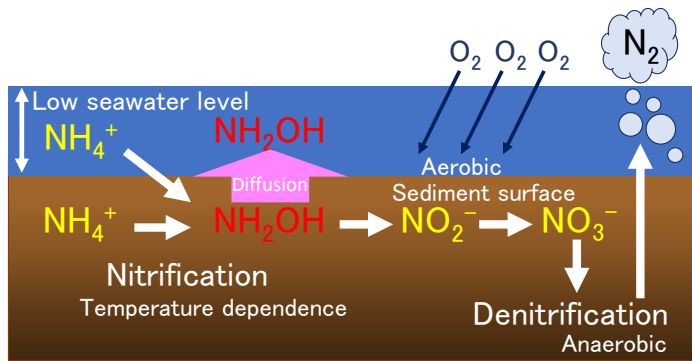


図1. ヒドロキシルアミン動態から明らかとなった富栄養化した干潟における硝化-脱窒による窒素除去の進行過程

がコンクリートで囲まれた半閉鎖的な干潟であり、潮汐によって水位は定期的に低下するものの、特に干潟東部において海水が滞留しやすい。海水の滞留時による嫌気環境の発達により硝化が阻害されることで脱窒が進行せず、窒素が干潟内に貯留される可能性が示された。

谷津干潟の堆積物表層における脱窒は、その他の微生物的硝酸還元過程であるアナモックスや DNRA 速度と比較すると圧倒的に高いことから、主に脱窒が窒素除去を駆動

していると考えられる (Senga et al. 2018, 2022)。また、谷津干潟における脱窒は  $\text{NO}_3^-$  基質の供給に依存し、温度依存性がないことも示されている (Senga et al. 2018)。したがって、脱窒は、硝化の進行に強く支配されていると考えられる。このことは、硝化の進行が谷津干潟の窒素レベルを決定していることを示唆する。谷津干潟の窒素除去を進行させるには、干潟内の海水の滞留を改善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6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Natori A, Sanada Y, Sugahara S, Nohara S, Seike Y, Senga Y	4. 巻 259
2. 論文標題 Exploration of the nitrification process in surface sediment of a hypereutrophic intertidal zone via hydroxylamine monitoring	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Marine Chemistry	6. 最初と最後の頁 104353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.marchem.2024.104353	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Senga Y, Sato T, Shibaki K, Kuroiwa M, Nohara S, Suwa Y	4. 巻 14
2. 論文標題 Alteration of dissimilatory nitrate reduction pathways in the intertidal sediment during macroalgae blooms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Water	6. 最初と最後の頁 3022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/w14193022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 引野愛子, 加藤季晋, 菅原庄吾, 林昌平, 大谷修司, 千賀有希子, 神門利之, 江川美千子, 朴紫暎, 田中秀和, 清家泰	4. 巻 83
2. 論文標題 ダム湖表水層におけるヒドロキシルアミンの生成起源	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本陸水学会誌	6. 最初と最後の頁 131-140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3739/rikusui.83.131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 千賀有希子, 熊崎悠一, 成岡知佳, 福原晴夫, 野原精一	4. 巻 82
2. 論文標題 尾瀬ヶ原池漕の表層水における水系腐植物質動態	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本陸水学雑誌	6. 最初と最後の頁 227-238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3739/rikusui.82.227	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 野原精一, 村田智吉, 藤原英史, 福原晴夫, 千賀有希子	4. 巻 82
2. 論文標題 尾瀬ヶ原における湿原地形と河川・池塘環境の変遷	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本陸水学雑誌	6. 最初と最後の頁 151-169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3739/rikusui.82.151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 千賀有希子	4. 巻 36
2. 論文標題 富栄養化した干潟における微生物的窒素除去・貯留過程	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 海洋化学研究	6. 最初と最後の頁 34-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 竹下隼都, 千賀 有希子
2. 発表標題 湿原 - 河川 - 沿岸域における塩分の変化が溶存有機物に与える影響
3. 学会等名 日本腐植物質学会第39回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤元輝, 小林諒磨, 松原優士, 野原精一, 千賀有希子
2. 発表標題 谷津干潟における溶存態有機窒素(DON)の動態と分解性
3. 学会等名 日本腐植物質学会第39回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小島久明, 野原精一, 千賀 有希子
2. 発表標題 泥炭湿原における溶存有機物光分解に由来する温室効果ガス放出速度の比較
3. 学会等名 日本陸水学会第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林諒磨, 松原優士, 加藤元輝, 長谷川大輔, 深堀一霸, 千賀有希子
2. 発表標題 閉鎖性水域谷津干潟における底質環境の違いが栄養塩動態に与える影響
3. 学会等名 日本陸水学会第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤元輝, 小林諒磨, 松原優士, 野原精一, 千賀有希子
2. 発表標題 谷津干潟における溶存態有機窒素 (DON) の挙動
3. 学会等名 日本陸水学会第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 千賀有希子, 清水崇広, 柴木叶, 野原精一
2. 発表標題 尾瀬ヶ原池漕における溶存有機物の太陽光分解から発生する温室効果ガス
3. 学会等名 日本陸水学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林諒磨, 松原優士, 加藤元輝, 真田祐樹, 千賀有希子
2. 発表標題 谷津干潟における栄養塩収支
3. 学会等名 日本陸水学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松原優士, 小林諒磨, 千賀有希子
2. 発表標題 谷津干潟におけるレジームシフトが水質に与える影響
3. 学会等名 日本陸水学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 名取安海, 小林諒磨, 松原優士, 清家泰, 菅原庄吾, 千賀有希子
2. 発表標題 富栄養化した干潟におけるNH <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Hの季節変化
3. 学会等名 日本陸水学会第85回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------