

富栄養化した干潟における微生物的窒素除去・貯留過程

千賀 有希子*

1. はじめに

近年、様々な人間活動が活発化するのにもない、陸や大気から沿岸域へ負荷する窒素やリンなどの栄養塩が増え、沿岸域の富栄養化が加速している (Howarth et al. 2011). 沿岸域の富栄養化は、大型海藻の成長を促し、最終的に大型海藻の異常増殖を招く (図 1, Valiela et al. 1997, Ye et al. 2011). 大型海藻の異常増殖は、堆積物表層への酸素の拡散を妨害し、嫌気環境を発達させ、底生生物の死滅させる (Senga et al. 2021). また大量の海藻の枯死は、非常な悪臭を放ち、衛生面でも問題となる.

このような大型海藻の異常増殖を引き起こす栄養塩にアンモニア (NH_4^+) と硝酸 (NO_3^-) があげられる. NH_4^+ と NO_3^- は、藻類の窒素源として利用される以外に、主に堆積物において脱窒、アナモックス、DNRA と呼ばれる異化型硝酸還元

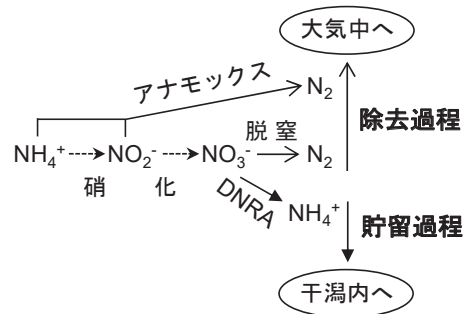


図 2. 硝化, 脱窒, アナモックス, DNRA 過程の略図.

過程によって微生物代謝される (図 2). 脱窒とは、 NO_3^- を窒素ガス (N_2) へ還元する過程である (Payne 1973). 脱窒細菌の多くは、電子供与体として有機物を使う従属栄養性の微生物代謝を持つが、一部の脱窒細菌は独立栄養性の代謝を持ち、硫化水素 (H_2S) などの還元型硫黄を用いることができる (Kumar et al. 2018). またアナモックスとは、 NH_4^+ 酸化と NO_3^- あるいは NO_2^- 還元が

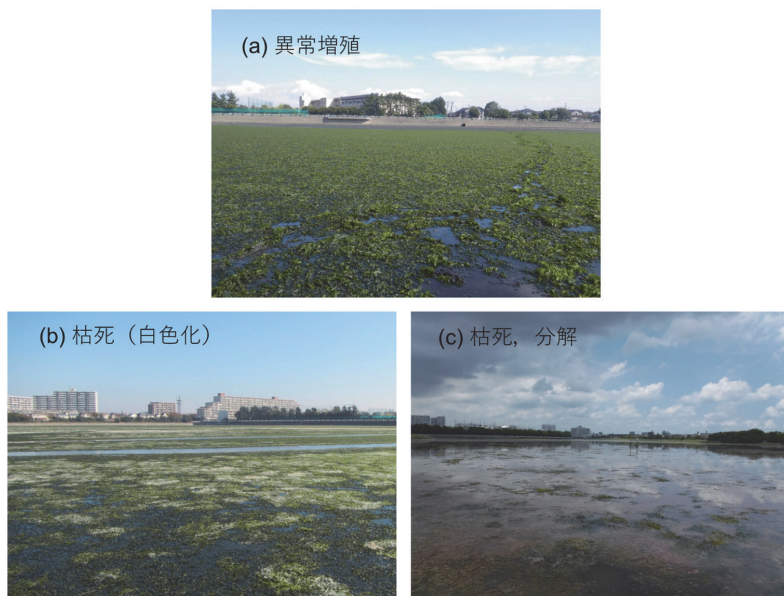


図 1. 谷津干潟に出現する大型海藻アオサの様子.
(a) 異常増殖時, (b) 初期枯死時 (白色化), (c) 枯死・分解時.

*東邦大学理学部化学科准教授

共役して N_2 を生じる過程である (Mulder et al. 1995). アナモックス細菌は、有機物を利用しない独立栄養性の代謝過程を持つ。脱窒とアナモックスによって生成する N_2 は大気へ拡散するため、脱窒とアナモックスが進行することで水域から窒素が取り除かれることになる。したがって、脱窒とアナモックスは窒素除去過程と認識されている。

脱窒とアナモックスとは逆に、DNRA (Dissimilatory nitrate reduction to ammonium) と呼ばれる窒素貯留過程も存在する。DNRA とは、 NO_3^- を NH_4^+ に還元する過程である (Koike et al. 1978, Jørgensen et al. 1989)。DNRA は、脱窒細菌と同様に従属栄養性細菌と還元型硫黄を利用する独立栄養性細菌によって進行することが知られている (Giblin et al. 2013)。脱窒、アナモックス、DNRA は同じ嫌気環境下で競合して複雑に進行するため、これらの異化型硝酸還元過程の進行については不明瞭な部分が多い。これらの異化型硝酸還元過程は、栄養塩である NH_4^+ と NO_3^- の動態を決定する過程である。したがって、特に富栄養化した沿岸域におけるこれらの過程の進行を把握することは極めて重要であると考えられる。

本研究では、富栄養化した干潟における脱窒、アナモックス、DNRA の進行を明らかにするために、 ^{15}N トレーサー法を用いて脱窒、アナモックス、DNRA 速度を測定した。特に大型海藻の異常増殖がこれらの異化型硝酸還元過程に与える影響を明確にするために、室内実験にてアオサを

加えた系と加えていない系を調製し、アオサの変化にともなう脱窒、アナモックス、DNRA 速度の変化を測定した (アオサ添加実験)。また大型海藻の異常増殖下で発生する H_2S が脱窒に与える影響を明らかにするために、異なる H_2S 濃度下における脱窒活性を測定した (H_2S 添加実験)。これらの結果から、谷津干潟におけるアオサの発生前、異常増殖時、枯死・分解時の異化型硝酸還元過程の進行を考察した。

2. 方法

研究対象地とサンプリング

谷津干潟 (千葉県習志野市) は、東京湾の埋め立てによって取り残された約 40 ha の干潟である (図 3)。谷津干潟と東京湾の潮汐による海水の交換は高瀬川と谷津川の 2 本の水路でのみ行われている。谷津干潟は、半人工的な干潟であるが渡り鳥の経由地として重要視されており、1983 年には鳥獣保護区に、1993 年にはラムサール条約登録湿地に登録されている。2012 年 6 月～2018 年 1 月において月に 1 回の頻度で測定した海水の栄養塩 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、 PO_4^{3-} 濃度は、それぞれ $28 \sim 4609 \mu g N l^{-1}$ 、 $nd \sim 67 \mu g N l^{-1}$ 、 $nd \sim 662 \mu g N l^{-1}$ 、 $12 \sim 142 \mu g P l^{-1}$ の範囲で変動した (Senga et al. 2019, 2021)。吉田 (1983) によると腐水域、過栄養域、富栄養域、貧栄養域の無機窒素濃度はそれぞれ > 1400 、 $140 \sim 1400$ 、 $28 \sim 140$ 、 $< 28 \mu g N l^{-1}$ で、無機リン濃度はそれぞれ > 310 、

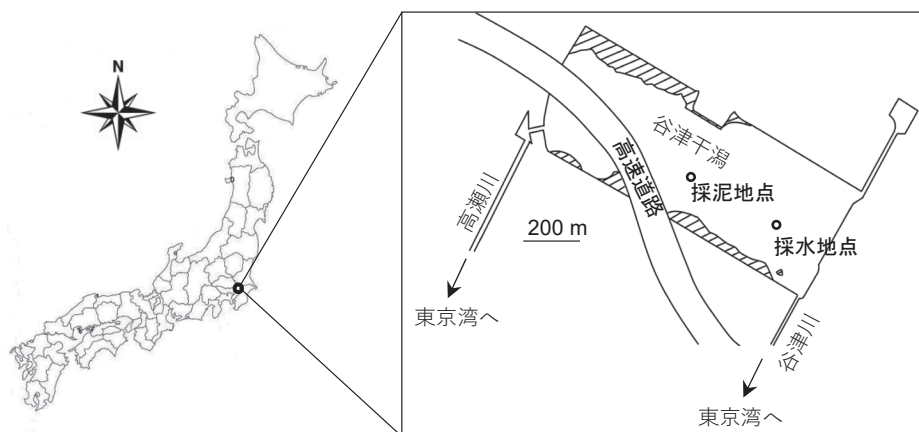


図 3. 谷津干潟の位置と谷津干潟における採泥地点と採水地点。

31~310, 6.2~31, < 6.2 μgPI^{-1} と区分される。谷津干潟のほとんどの月の栄養塩濃度は過栄養域に区分され、非常に高いことがわかる。谷津干潟では、このような高い栄養塩濃度にもない、海藻アオサ (*Ulva pertusa* および *Ulva ohnoi*) の異常増殖が1995年頃から確認され (Yabe et al. 2009), 2017年まで観察されていた。

実験に用いたアオサ、堆積物、海水のサンプリングは、2017年11月の引潮時に行った。アオサと堆積物(深度0-5 cm)は干潟中央部(N35° 40' 34", E140° 00' 22")で、海水はタイダルクリーク(N35° 40' 29", E140° 00' 27")で採取した。

アオサ添加実験

堆積物0.2 L, 海水0.25 Lを加えた三角フラスコにアオサを約35 g添加した系(+U)と添加しない系(-U)を調製した。+U系のアオサ密度(0.6 kg DW m^{-2})は、谷津干潟で2016年5月に観測された密度に近い値であった。これらのフラスコを明暗条件下(12:12 h)で静置し、0, 7, 21日目の堆積物と海水を回収した。堆積物における脱窒、アナモックス、DNRAの速度は ^{15}N トレーサー法(Kuroiwa et al. 2020)を用いて測定を行った。海水中の NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , H_2S 濃度についても時間を追って測定を行った。

H_2S 添加実験

硫化ナトリウム溶液を約0~200 mg-S l^{-1} とな

るように堆積物5 gと海水15 mlが入ったバイヤル瓶に添加し、アセチレン阻害法を用いて脱窒活性の測定を行った(Senga et al. 2019, 2021)。また培養の前後で H_2S 濃度の測定を行った。

3. 結果と考察

アオサ添加実験

アオサを添加しなかった-U系における三角フラスコの堆積物表面は、時間を追って灰色から茶色に変化した(図4a)。フラスコ内の海水は好氣的環境であったと考えられた。一方、アオサを添加した+U系においては、7日目に若干海水が泡立ち、21日目にはアオサのほとんどが腐敗していた(図4b)。さらに、海水表面に紅色と白色の懸濁物が観察された。0~7日目のフラスコの環境はアオサの異常増殖時を、21日目は枯死・分解期と想定した。また、-U系がアオサの発生前の環境とした。

-U系の海水における NH_4^+ 濃度はほとんど検出されなかった(図5a)。 NO_2^- 濃度は7日目に増加し、21日目には検出されなかった。 NO_3^- 濃度は、7日目に減少し、21日目には検出されなかった。 H_2S が検出されなかったことから、-U系の海水は好氣的環境が保たれていたと考えられた。7日目の NO_2^- の増加は、好氣的環境下で進行する硝化($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$)によるものと推察された。 NO_3^- の増加はみられなかったことから、嫌氣的である堆積物において異化型硝酸還元

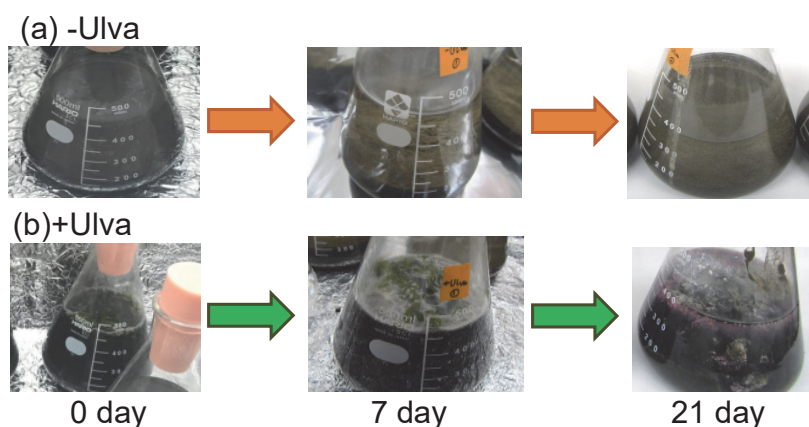


図4. アオサ添加実験における三角フラスコ内の様子。(a) -Ulva系, (b) +Ulva系。

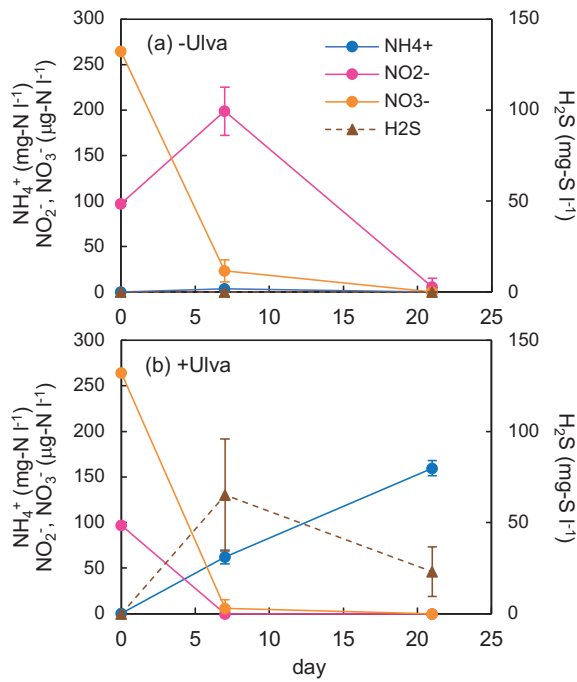


図5. アオサ添加実験における NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , H_2S 濃度変化. (a) -Ulva系, (b) +Ulva系. Senga et al. (2022) のデータをもとに作図.

過程が進行し、 NO_3^- が消失した可能性が考えられた。一方、+U系の海水における NH_4^+ 濃度は時間を追って増加し、 NO_2^- および NO_3^- 濃度は7日目以降検出されなかった(図5b)。 H_2S 濃度は、7日目で最大となり、21日目に若干減少した。高い NH_4^+ と H_2S 濃度から、+U系のフラスコ内は嫌気環境が形成され、硝化は進行しなかったと考えられた。

両系におけるアナモックスは、実験期間中検出されなかった。2015年9月と11月の堆積物における脱窒とアナモックスを測定した結果、アナモックスは圧倒的に低く、これらの過程に対する寄与率は<7%であった(Senga et al. 2019)。したがって、谷津干潟の堆積物におけるアナモックスの進行は無視できると考えられた。一方、脱窒およびDNRAは検出され、それらの速度の傾向は異なっていた(図6)。 $-U$ 系における脱窒速度は、7日目に増加し、21日目まで変化はみられなかった(図6a)。DNRA速度は、0~21日目でほぼ一定であった。脱窒速度は、DNRA速度より高かった。したがって、 $-U$ 系の海水における

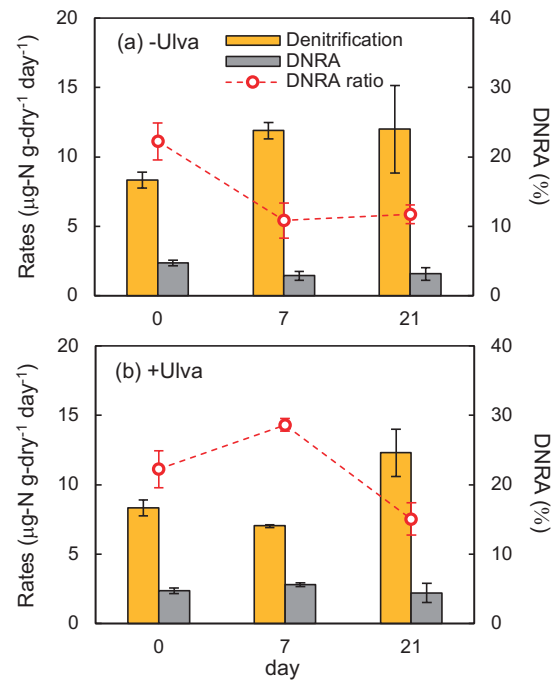


図6. 脱窒, DNRA速度およびDNRAの寄与率の変化. (a) -Ulva系, (b) +Ulva系. Senga et al. (2022) のデータをもとに作図.

NO_3^- 濃度の減少は(図5a)、堆積物で活発化した脱窒に利用されたためと考えられた。

+U系の脱窒は、7日目に減少した(図6b)。脱窒の進行は、高濃度の H_2S 存在下で抑制されると言われている(Brunet and Garcia-Gil 1996, Senga et al. 2006)。7日目の海水における H_2S 濃度は最も高い値であったことから(図5b)、7日目の脱窒速度の減少は H_2S に阻害されたためと考えられた。 H_2S の減少がみられた21日目において、脱窒速度は増加した。21日目における+U系のフラスコで紅色と白色の懸濁物が観察されたことから(図4b)、 H_2S を利用する紅色硫黄細菌が出現し、脱窒を行った可能性が示唆された。すなわち、 H_2S が発生する前において優占していた従属栄養性の脱窒細菌は、アオサの被覆によって発生する H_2S に阻害され、 H_2S を元素硫黄(白色 S^0)に酸化することで脱窒を行う独立栄養性の紅色硫黄細菌にシフトしたと推察された。脱窒の代謝機能を持つ紅色硫黄細菌はよく知られている(Dong et al. 2011, Kessler et al. 2019, Murphy et al. 2020)。一方、+U系のDNRA速度は、脱窒

速度よりも低く、実験期間中変化がみられなかった。H₂S 存在下において DNRA は、促進される、あるいはほとんど影響を受けないとの両方の報告がある (Senga et al. 2006, Bonaglia et al. 2016, Murphy et al. 2020, Wong et al. 2021)。谷津干潟の堆積物における DNRA の進行は、H₂S に影響を受けないことがわかった。しかしながら、+U 系の DNRA 速度は -U 系よりも高かったため、アオサの存在は DNRA を促進すると考えられた。アオサによって DNRA の基質である有機物が供給されるため、DNRA 速度が高まると推察された。

DNRA が異化型硝酸還元過程に占める寄与率は、-U 系においては約 10~20% で変動した。アオサが存在しない環境でも DNRA は進行することがわかった。谷津干潟のこの DNRA 寄与率は、他の沿岸域において測定された DNRA 寄与率の範囲以内であった (Dong et al. 2009, Marchant et al. 2014, Deng et al. 2015)。+U 系においては、7 日目に約 30% と DNRA 寄与率が最も高くなった。これは、アオサの枯死・分解時に生成する H₂S の脱窒抑制により、結果として DNRA 寄与率が高くなったためである。また、アオサの腐敗時には、脱窒速度が再び高くなり、DNRA の割合は約 15% に低下した。

H₂S 添加実験

脱窒に対する H₂S の影響をみるために、硫化ナトリウム溶液を 0, 5, 20, 50, 100, 200 mg-S l⁻¹ となるようにバイアル瓶に加え、C₂H₂ 雰囲気下で培養を行った。培養前に実際に測定された H₂S 濃度は、0, 4, 21, 55, 108, 212 mg-S l⁻¹ であった。脱窒活性は、H₂S 濃度とともに大きく減少し、>108 mg-S l⁻¹ 以上でほとんど検出されなかった (図 7)。したがって、谷津干潟の堆積物における脱窒は、H₂S 存在下で大きく抑制されると考えられる。アオサの枯死・分解時に生成される H₂S は、海水中の硫酸 (SO₄²⁻) に由来するだけでなく、アオサの中に含まれる硫黄にも由来し、

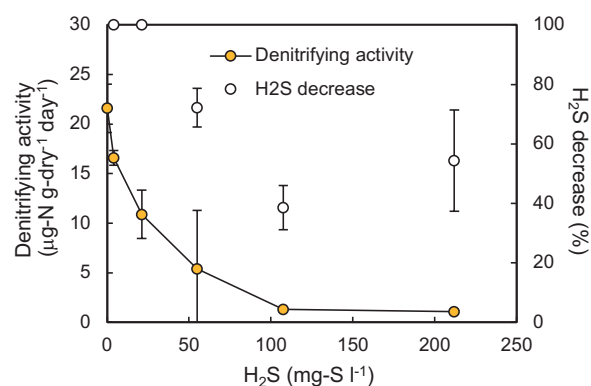


図 7. H₂S 濃度とともに脱窒活性と培養前後の H₂S 減少率の変化. Senga et al. (2022) のデータをもとに作図。

極めて高い濃度を示すことが知られている (Senga et al. 2021)。このような環境下においては、脱窒だけでなく硝化も抑制されるため、堆積物において窒素は除去されず貯留される傾向にあると予測される。

また、培養後、H₂S 濃度を測定したところ、全てのバイアル瓶において H₂S 濃度の大きな減少が見られた (> 40%)。この結果は、谷津干潟の堆積物に H₂S を基質とする独立栄養性の脱窒細菌が存在することを示唆する。今後、分子生物学的解析によって、アオサ存在下における H₂S の発生が異化型硝酸還元過程に与える影響を詳細に検討していく必要がある。

4. まとめ

富栄養化が進行する谷津干潟において、大型海藻の発生前、異常増殖時、枯死・分解時における脱窒、アナモックス、DNRA の異化型硝酸還元過程の進行を明らかにした。大型海藻のどの段階においても、脱窒は主要な異化型硝酸還元過程であった。またアナモックスは検出されず、アナモックスの寄与は無視できることが示された。大型海藻の発生前において、異化型硝酸還元過程に対する DNRA の寄与は 10~20% であることが示され、アオサが存在しなくとも DNRA が進行し、ある程度 NO₃⁻ は NH₄⁺ に戻されることがわかった。大型海藻の異常増殖時に発生する H₂S は、脱窒を抑制するが、DNRA の進行には影響を与えな

いことが示された。この時、脱窒の抑制により、DNRAの寄与は30%と最も高くなった。また、嫌気的環境の形成により硝化の進行も抑制されることがわかった。谷津干潟に出現するアオサは、窒素源として NH_4^+ を NO_3^- より優先的に取り込む(Senga et al. 2021)。したがって、DNRAの寄与の増加や硝化の抑制は、アオサの増殖に有利に働き、さらなる異常増殖につながると考えられる。大型海藻の枯死・分解時には、脱窒を担う紅色硫黄細菌の出現により、脱窒が高まることが示された。結果として、脱窒およびDNRAの寄与はアオサ発生前とほぼ同程度であった。

謝辞

現地への立ち入り調査は、環境省の許可を受けて行ったものである。調査にあたり、習志野市都市環境部環境政策課および谷津干潟自然観察センターの関係各位に深く感謝いたします。また、東邦大学地球化学教室千賀研究室の全ての学生が、野外調査、サンプリング、化学分析、データ解析をサポートしてくれました。ここに心から感謝の意を表します。この調査研究は、科学研究費補助金(JP15K00525, JP21K1222, 研究代表者：千賀有希子)を用い行われた。

参考文献

- Bonaglia, S.; Klawonn, I.; De Brabandere, L.; Deutsch, B.; Thamdrup, B.; Brüchert, V.; Denitrification and DNRA at the Baltic Sea oxic-anoxic interface: substrate spectrum and kinetics. *Limnol. Oceanogr.* **2016**, 61, 1900-1915.
- Brunet, R.C.; Garcia-Gil, L.J. Sulfide-induced dissimilatory nitrate reduction to ammonia in anaerobic freshwater sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **1996**, 21, 131-138.
- Deng, F.Y.; Hou, L.J.; Liu, M.; Zheng, Y.L.; Yin, G.Y.; Li, X.F.; Lin, X.B.; Chen, F.; Gao, J.; Jiang, X.F. Dissimilatory nitrate reduction processes and associated contribution to nitrogen removal in sediments of the Yangtze Estuary. *J. Geophys. Res.-Biogeo.* **2015**, 120, 1521-1531.
- Dong, L.F.; Smith, C.J.; Papaspyrou, S.; Osborn, A.M.; Nedwell, D.B. Changes in benthic denitrification, nitrate ammonification, and anammox process rates and nitrate and nitrite reductase gene abundances along an estuarine nutrient gradient (the Colne Estuary, United Kingdom). *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, 75, 3171-3179.
- Dong, L.F.; Sobey, M.N.; Smith, C.J.; Rusmana, I.; Phillips, W.; Stott, A.; Osborn, A.M.; Nedwell, D.B. Dissimilatory reduction of nitrate to ammonium, not denitrification or anammox, dominates benthic nitrate reduction in tropical estuaries. *Limnol. Oceanogr.* **2011**, 56, 279-291.
- Giblin, A.E.; Tobias, C.R.; Song, B.; Weston, N.; Banta, G.T.; Rivera-Monroy, V.H. The importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) in the nitrogen cycle of coastal ecosystems. *Oceanography* **2013**, 26, 124-131.
- Howarth, R.; Chan, F.; Conley, D.J.; Garnier, J.; Doney, S.C.; Marino, R.; Billen, G. Coupled biogeochemical cycles: eutrophication and hypoxia in temperate estuaries and coastal marine ecosystems. *Front. Ecol. Environ.* **2011**, 9, 18-26.
- Jørgensen, K.S. Annual pattern of denitrification and nitrate ammonification in estuarine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, 55, 1841-1847.
- Kessler, A.J.; Wawryk, M.; Marzocchi, U.; Roberts, K.L.; Wong, W.W.; Risgaard-Petersen, N.; Meysman, F.J.; Glud, R.N.; Cook, P.L.M. Cable bacteria promote DNRA

- through iron sulfide dissolution. *Limnol. Oceanogr.* **2019**, 64, 1228–1238.
- Koike, I.; Hattori, A. Denitrification and ammonia formation in anaerobic coastal sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **1978**, 35, 278–282.
- Kumar, S.; Herrmannl, M.; Blohm, A.; Hilke, I.; Frosch, T.; Trumbore, S.E.; Kusel, K. Thiosulfate- and hydrogen-driven autotrophic denitrification by a microbial consortium enriched from groundwater of an oligotrophic limestone aquifer. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2018**, 94, fyy141.
- Kuroiwa, M.; Fukushima, K.; Hashimoto, K.; Senga, Y.; Sato, T.; Katsuyama, C.; Suwa, Y. 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. *JoVE.* **2020**, e59562.
- Marchant, H.K.; Lavik, G.; Holtappels, M.; Kuypers, M.M.M. The fate of nitrate in intertidal permeable sediments. *Plos one.* **2014**, 9, e104517.
- Mulder, A.; Vandegraaf, A.A.; Robertson, L.A.; Kuenen, J.G. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized-bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* **1995**, 16, 177–183.
- Murphy, A.E.; Bulseco, A.N.; Ackerman, R.; Vineis, J.H.; Bowen, J.L. Sulphide addition favours respiratory ammonification (DNRA) over complete denitrification and alters the active microbial community in salt marsh sediments. *Environ. Microbiol.* **2020**, 22, 2124–2139.
- Payne, W. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriol. Rev.* **1973**, 37, 407–452.
- Senga, Y.; Mochida, K.; Fukumori, R.; Okamoto, N.; Seike, Y. N_2O accumulation in estuarine and coastal sediments: The influence of H_2S on dissimilatory nitrate reduction. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **2006**, 67, 231–238.
- Senga, Y.; Sato, T.; Kuroiwa, M.; Nohara, S.; Suwa, Y. Anammox and denitrification in the intertidal sediment of the hypereutrophic Yatsu tidal flat, Japan. *Estuar. Coasts* **2019**, 42, 665–674.
- Senga, Y.; Kobayashi, W.; Mikawa, K.; Kitazawa, T.; Lee, S.; Shiraki, Y. Influences of green macroalgae blooms on nutrients and sulfide dynamics in hypereutrophic intertidal ecosystems. *Limnology* **2021**, 22, 187–196.
- Valiela, I.; McLelland, J.; Hauxwell, J.; Behr, P.J.; Hersh, D.; Foreman, K. Macroalgal blooms in shallow estuaries: controls and ecophysiological and ecosystem consequences. *Limnol. Oceanogr.* **1997**, 42, 1105–1118.
- Wong, W.W.; Greening, C.; Shelley, G.; Lappan, R.; Leung, P.M.; Kessler, A.; Winfrey, B.; Poh, A.C.; Cook, P. Effects of drift algae accumulation and nitrate loading on nitrogen cycling in a eutrophic coastal sediment. *Sci. Total Environ.* **2021**, 790, 147749.
- Yabe, T.; Ishii, Y.; Amano, Y.; Koga, T.; Hayashi, S.; Nohara, S.; Tatsumoto, H. Green tide formed by free-floating *Ulva* spp. at Yatsu tidal flat, Japan. *Limnology* **2009**, 10, 239–245.
- Ye, N.H.; Zhang, X.W.; Mao, Y.Z.; Liang, C.W.; Xu, D.; Zou, J.; Zhuang, Z.M.; Wang, Q.Y. Green tides are overwhelming the coastline of our blue planet: taking the world's largest example. *Ecol. Res.* **2011**, 26, 477–485.
- 吉田陽一 生物指標法. 水産学シリーズ 48 漁業環境アセスメント, 吉田多摩夫 (編), **1983**, 25–46. 恒星社厚生閣, 東京.