

# 多摩川河口干潟における硝化・脱窒に 関する研究

2007年

浦川 秀敏

東京大学海洋研究所 先端海洋システム研究センター  
助教授

## 目次

第1章 緒言	1
第2章 既往研究	2
第3章 多摩川河口水の連続モニタリング	9
第4章 多摩川河口水の動態と水質	19
第5章 干潟の堆積物性状	24
第6章 アンモニア酸化細菌を中心とした細菌の群集動態	32
第7章 干潟地下水	46
第8章 脱窒過程における嫌氣的アンモニア酸化反応	52
謝辞	58
参考文献	60

とうきゅう環境浄化財団, 多摩川およびその流域の環境浄化に関する調査・試験研究成果報告書

題名「多摩川河口干潟における硝化・脱窒に関する研究」

A study on nitrification and denitrification in Tama tidal flat

発行責任者：浦川秀敏

発表年：2007年（平成19年）

## 第1章 緒言

干潟は河川の流れ込む湾や河口部に砂や泥が堆積し、波や潮の満ち引きによって浸食されてできた平地である。干潮時には陸地として現れ、満潮時には水面の下に沈む。一日に二回繰り返されるこの潮汐が、海からの豊富な栄養分を干潟にもたらす。また、河口に広がる干潟は、河川によって上流の森や、中流の平地からさまざまな栄養分が運びこまれるために、その恵みも受けている。干潟は、淡水や海水がもたらす豊富な栄養分、大気中の酸素、そして太陽の光が集まる空間であり、付着藻類やバクテリアのような微小な生物から、甲殻類や貝類などのさまざまな底生生物に至るまで、無数の生命に生活空間と生きるための糧を提供している。また、幼少の頃に干潟を利用する魚類も多く、藻場と並んで「海のゆりかご」としての役割を果たしている。さらに、このような干潟に生息する海洋生物を摂食する鳥や、漁獲物として干潟に住む生物を収穫する人間の営みを支えている。このように干潟はそこに生息する生き物たちだけでなく、沿岸環境や鳥、そして人の生活をも支える掛け替えのない自然環境である。しかし日本の干潟は、その役割と大切さについて広く認識されることなく、干拓や埋め立て、開発などにより、戦後急速に失われてきた。

東京湾には昔、自然の海岸が続いており、東京湾奥部を囲むように広い干潟が広がっていた。その後、昭和40年代から50年代にかけての大規模な埋め立てにより明治後期の1/8程度になってしまった。近年、干潟が持つ水質浄化能力が見直され、干潟保全の観点から科学的な根拠に基づく学術的な知見が必要とされている。

幸運にも東京の人々に愛される多摩川の河口には東京湾を代表し、多くの生物を育む豊かな河口干潟が残されている。しかしこの干潟がもつ浄化能力についての研究はまだ不十分であり、干潟の価値を再認識する上でも、さらなる研究が望まれている。

2005年から2年間、とうきゅう環境浄化財団の研究助成を受けて多摩川河口干潟の調査を行う機会を得た。東京大学海洋研究所の学生や研究員を中心に干潟に通い、そこから多くのことを学びながら研究を行い、そしてここにその成果をまとめた。本成果報告書は8章から構成されている。第1章の緒言では、研究の狙いと本成果報告書の概要について述べた。第2章では、既往研究についてまとめた。第3章では、多摩川河口水の連続モニタリングで得られた成果をまとめた。続く第4章では、多摩川河口水の動態と水質に関して調査を行なった。また第5章では干潟の堆積物性状に関して調査を行なった。さらに第6章では、干潟の重要な浄化機能の一つである硝化反応と、それを担う硝化細菌に着目し、多摩川河口干潟における窒素循環に寄与する硝化細菌の生態解析を目的とした。続く第7章では、干潟の地下水の動態についての解明を試みた。また第8章では、脱窒作用に焦点をあて、近年注目されるようになってきたが、国内からはまだ報告例がなかった嫌氣的アンモニア酸化反応による脱窒反応(anammox; anaerobic ammonium oxidation)を担うanammox菌の多摩川河口干潟への寄与について研究を行なった。

## 第2章 既往研究

### 2.1 干潟とは

一般に、干潟は河川や沿岸流によって運ばれてきた土砂が、海岸や河口部、ラグーン（潟湖）に堆積することで形成される。干潟の大きさは様々であり、河口付近だけにできる小規模なものもあれば、幅数キロメートルに及ぶ大規模なものまである。その大きさは、河川や沿岸流による土砂の供給・運搬能力および堆積する海岸部の地形、潮汐による海水面の変動量に影響される。干潟は、河川や沿岸流などからによる土砂の供給と、波浪・潮流などによる土砂の侵食との微妙なバランスの上に成り立っている地形であり、そのバランスが崩れた場合は、乾燥した陸地となるか海面と化してしまう。

干潟はその地理的特徴から、河口干潟、潟湖干潟、前浜干潟の3つに分類され、この地形的分類が干潟環境の特徴を示す基礎となっている（国土交通省港湾局/環境省自然環境局、2004）。

潟湖干潟は平野部の砂嘴や砂丘で囲まれた河口跡で、洪水時でも直接的な底質攪乱を受けにくいことから底質環境の安定性が比較的高い。しかし恒常的に河川水の影響を受けるため汽水性の生物が多く、閉鎖性が強いことから、都市排水などの人為的影響を受けやすい。また河口干潟や潟湖干潟の陸域寄りにはヨシ群落の発達する塩水湿地（salt marsh）が形成されることがある。塩水湿地は海と陸の移行帯であり、内部に感潮池や小規模な干潟があり、地形的にも多様である。河口干潟は主に平野の河口部内で形成されるもので、河川水の影響を強く受けるため塩分が低く、洪水時の攪乱作用が大きい。そのため環境としては比較的不安定であるものの、汽水域にしか生息できない生物が多く、単調ながらも独特な生物群集が形成されている。前浜干潟は有明海や三河湾、東京湾のような内湾の海岸線に沿って広く形成される干潟で、大規模なものが多い。波の影響を受けやすいため砂質になりやすいが、干潟面積が広い場合は岸辺が有明海のように泥質となる場合もある。面積的に広いことから、洪水や波浪による被害は部分的にとどまり、全体的には安定した環境が維持され、生物相が最も豊富な干潟である。また前述の3つの干潟以外にも入江干潟が4つ目の干潟として分類されることがある。入江干潟は埋もれ谷によりつくられた入江奥部の河口部に形成される。一般に面積は小さいが、河口部から海までの環境勾配がすべてそろっており、生物相は多様である。しかし河口沖に形成されることから、洪水による淡水化や、底質攪乱、土砂堆積などの大規模な攪乱を受けやすい。

干潟の底質は河口部や内湾に形成される泥や砂の堆積物から成り、平面的な潮間帯である。底質の強い保水力により、干潮時でも湿潤な環境が維持される点で砂浜とは大きく環境が異なる。かつてはその価値について深く議論されることなく、干拓や埋め立てが盛んに行われてきた。

しかしながら、潮間帯の中でも、磯や砂浜などに比べ干潟は底質の安定性や柔軟性、高い保水力による乾燥ストレスの緩和能力を持っていることから、種類・量ともに豊富な生

物が生息している。そして干潟で見られる生物活動が、海域の水質浄化に大きく貢献していることが明らかになりつつある。従って、近年、干潟保全の重要性が叫ばれており、科学的な根拠に基づく基礎データが必要とされている（風呂田, 2003）。

## 2.2 多摩川河口干潟

### 2.2.1 多摩川と河口干潟

多摩川は急峻な山に囲まれた源流から上流にかけて、深い渓谷をつくりながら蛇行を繰り返し、勾配の緩やかな平地へと続いている。平地では人々の生活空間を縦断することから、昔より水遊びや釣り、お花見などに利用され親しまれてきた。下流は調布堰が潮止め堰として機能しており、ここまで東京湾から海水が遡上する。また下流は地形的に勾配が緩やかで土砂の堆積が進み水深が浅くなっている。特に河口部には東京湾を代表する干潟が広がっている。この干潟は、さまざまな甲殻類や、魚類、野鳥などの摂餌場であり繁殖場ともなっていることから、多様な生物相が認められる。さらに微生物やゴカイなどの小型の生き物によって水質の汚濁物である有機物が分解されることから水質の改善効果も高い場所となっている。また、広い水面や湿地のヨシ原など干潟は上流や中流の景観とは全く異なった自然の景観をもっている。多摩川河口には、連続するヨシ原に囲まれるようにして東京都側（左岸）と神奈川県側（右岸）に干潟が存在する。東京都側の干潟は、河口より約 3 km 上流、大師橋の上流に位置し、神奈川県側の干潟は、東京都側よりも下流に位置し、河口より約 2.5 km 遡り、大師橋よりもやや下流の地点に位置する（図 2-1）。上流、下流のどちらの干潟も、砂泥干潟であり、背後にヨシ原が存在し（図 2-2）、干潟奥部（陸側）粘性の高い泥部には、トビハゼが生息してい



図 2-1 多摩川河口干潟の位置 (京浜河川事務所 HP より)

図下方の楕円で囲んだ部分が神奈川県側の干潟で図右上の楕円で囲んだ部分が東京都側の干潟（大師干潟）。



図 2-2 干潮時の干潟とヨシ原 (2004 年 9 月 28 日撮影)

干潟の後背地はヨシ原で囲まれる。このヨシ原がヒヌマイトソンボをはじめとする貴重な生物群の生物多様性の維持に貢献している。

る(図 2-3)。ヨシ原の面積は、両都県合わせて、14.3 ha とされる。神奈川県側干潟は、その泥干潟やヨシ原の典型的な生物相が良好な状態で保たれていることが報告されており(西・田中, 2006), その特徴については、2002 年度のとうきゅう環境浄化財団の一般研究に採択された「多摩川河口干潟におけるトビハゼの生息環境に関する調査研究 - 泥質干潟形成との関連性について - 」において、トビハゼを中心に調べてられている。干潟の面積は約 1.0 ha (神奈川県側) で、干潟前面に干潟と同程度の面積をもつ浮島が存在する(図 2-1)。後背地には、広大なヨシ原が存在する(図 2-2)。地盤高は約 140 cm (A.P.) であり、干潟の勾配は 1/1800 であると報告されている(玉上ら, 2004)。

## 2.2.2 多摩川河口干潟の生物

干潟には、さまざまな底生生物が見られる(川崎市環境局, 2006; 西・田中, 2006)。特に春から秋にかけては干潟の表面が、活発に活動するカニ類(コメツキガニ、ヤマトオサガニ、チゴガニ等)やトビハゼによって覆われ、生物の多さに驚かされる。また、砂を掘ると、さまざまな多毛類が生息し、干潟の表面には多くの大小さまざまな巣穴が見られる。優占する甲殻類とトビハゼの干潟上での分布は、玉上ら(2004)によって調べられている。干潟の上で認められるカニ類は主にスナガニ科に属するもので、泥質部分にはヤマトオサガニが、若干砂成分が混じる部分にはチゴガニが生息している(図 2-4)。またさらに下流部の干潟にはコメツキガニが広く生息している。イワガニ科のカニの中で、唯一干潟上で活動しているのがアシハラガニである。

干潟を取り巻くヨシ原とさらにその後背地にあたる草地には、イワガニ科に属する多くのカニが見られる。報告されている種類だけでも、カクベンケイガニ、ケフサイソガニ、アシハラガニ、クロベンケイガニ、ベンケイガニの 5 種に及ぶ。またフナムシやカワサンショウガイなどもヨシ原



図 2-3 多摩川河口干潟で見られたトビハゼ (2006 年 6 月 20 日撮影) 多摩川河口干潟の中でトビハゼが生息する場所は極めて小さく、泥の含水率が高く後背地を囲むヨシ原が近くに存在することが生息の条件となっているようである。



図 2-4 多摩川河口干潟で見られたチゴガニ (2006 年 6 月 20 日撮影) 多摩川河口干潟の中でチゴガニが生息する場所は岸側の含水率が高い場所である。このような場所では、細菌の現存量も多く、デトリタス食者であるチゴガニにとって好都合なのだろう。体のわりに大きなはさみを振り上げダンスをする姿が人の目をひく。

の生物相の一部となっている。

## 2.3 干潟における物質循環

### 2.3.1 物質循環

生物は、生態系の中で共存し、栄養塩類は生物群の間を循環している。無機物であった栄養塩類は生産者によって有機物となる。有機物は生産者から、生産者を餌とする一次消費者へ、一次消費者を餌とする高次消費者へ、また各栄養段階での排泄物、死骸を摂食する分解者のバクテリアへと移り、呼吸、発酵などの分解作用により再び無機物へ戻る。この炭素や栄養塩類などの循環を物質循環という。

干潟では、底生藻類により現地で生産された有機物と河川、海域から供給された有機物をエネルギーとする消費者、分解者へと続く物質循環が形成されている。その結果として、干潟・浅海域の物質循環速度は高く、干潟・浅海域内での物質は形態を変化させ多くの生物群集を通して移動している。

物質循環を支配する要因は、潮流に代表される物質を輸送する物理的要因、酸化還元反応、硝化、脱窒、溶存態と無機態の相互変換などの化学的要因、食物連鎖を中心とした生物的要因がある。限定された海域で物質循環のメカニズムを担う中心は生物であり、干潟・浅海域ではさらにその役割は大きくなる。

干潟・浅海域には、一次生産者として植物プランクトンや底生藻類、海藻類が存在する。底質中では堆積物を摂食するベントスが消費者であり、バクテリアが分解者である。このさまざまな生物群集の活動が干潟・浅海域の物質循環の重要な要素となっている。

干潟・浅海域の浄化能力を評価するためには、干潟・浅海域内の物質循環と、陸域から干潟・浅海域へ、またそこから海域への大きな物質の流れを解明する必要がある。

### 2.3.2 泥質干潟と砂質干潟

多摩川河口干潟の特徴のひとつは、東京湾の干潟としては珍しい砂泥質であることである。Kuwae and Hosokawa (1999) により、泥質干潟と砂質干潟の細菌現存量の比較が行われた。木更津北西に位置する砂質干潟と三浦半島・三崎に位置する泥質干潟で調査が行われた。砂質干潟の含水率、全菌数は、それぞれ  $25.3 \pm 0.4\%$ 、 $0.81 \times 10^9 \pm 0.3 \times 10^9$  cells  $g^{-1}$  であり、泥質干潟の含水率、全菌数は、それぞれ  $45.3 \pm 0.4\%$ 、 $2.47 \times 10^9 \pm 0.2 \times 10^9$  cells  $g^{-1}$  であった。このことから、含水率の高い泥質干潟の方が、砂質干潟よりも細菌現存量は約 3 倍大きかった。これは、砂粒子に比べ、泥粒子の粒径のほうが小さく、有機物などを吸着する能力が高いために、細菌数も多くなると考えられる (Deflaun et al., 1983)。

### 2.3.3 浄化能力としての窒素循環

干潟が持つ重要な浄化機能の一つが硝化・脱窒反応である。水深が浅く、活発な生物活動と海水交換が起こる干潟では、硝化細菌には十分なアンモニア（電子供与体）と酸素（電

子受容体)が、脱窒細菌には十分な有機物(電子供与体)と硝酸(電子受容体)が供給されるために、他の沿岸域と比べても、高い硝化・脱窒速度が期待される。

干潟の底質の特徴として、底泥表層と底泥内部で環境は大きく異なる。底泥表層では、酸素が十分に供給されるために、好気的な環境が形成されている。こうした好気的な環境下において、アンモニア酸化細菌はアンモニアを亜硝酸へ、また亜硝酸酸化細菌は亜硝酸を硝酸へと変換させる硝化反応を担っている。一方、底泥内部では、酸素が十分に供給されないために、嫌気的な環境が形成されている。こうした嫌気的な環境下において、脱窒細菌は硝酸を亜硝酸、亜酸化窒素、窒素へと脱窒する反応を担っている。河川、海水に溶存する無機態窒素が最終的には窒素ガスや亜酸化窒素などの気体として大気中へ放出される、この一連の硝化・脱窒反応は水質浄化を考える上で極めて重要な過程である。本研究ではこの硝化・脱窒反応に着目し、それに関与する微生物の生態や活性を中心に研究を行った。

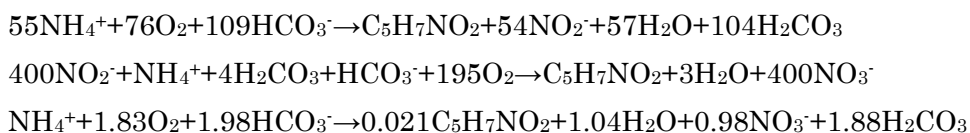
## 2.4 硝化細菌に関する一般的背景

### 2.4.1 硝化反応

硝化における化学両論的關係は次の通りである。



これに微生物の菌体合成を加味させた場合、次のような機構で反応が進むことになる。



(I)の反応を行うのはアンモニア酸化細菌(ammonia-oxidizing bacteria)、(II)の反応を行うのは亜硝酸酸化細菌(nitrite-oxidizing bacteria)である。この2種類の好気性細菌を合わせて硝化細菌(nitrifying bacteria)と呼ぶ(III)。硝化細菌は無機物(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)を酸化して得られるエネルギーを用いて、炭素源としてCO<sub>2</sub>からのみ細胞成分を合成し生育、増殖する独立栄養細菌(autotrophic bacteria)である。

### 2.4.2 アンモニア酸化細菌

アンモニア酸化細菌はアンモニア(NH<sub>3</sub>)をヒドロキシルアミン(NH<sub>2</sub>OH)を経て亜硝酸(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)に酸化する細菌であるが、*Betaproteobacteria*として2属16種、*Gammaproteobacteria*として1属2種(*Nitrosococcus oceani*, *Nitrosococcus halophilus*)、そして近年報告された古細菌として1属1種の計19種が知られている。まずアンモニアは



アンモニアモノオキシゲナーゼ (ammonia monooxygenase ,AMO) の働きによってヒドロキシルアミンに酸化される (McTavish et al., 1993)。また生成したヒドロキシルアミンはヒドロキシルアミンオキシドレダクターゼ (hydroxylamine oxidoreductase , HAO) によってさらに酸化され亜硝酸に変換される (Sayavedra-Soto et al., 1994)。

アンモニア酸化細菌のアンモニアモノオキシゲナーゼは菌体を破壊するとすぐに失活するため、この酵素は精製が進まず、その分子的性質には不明な点も多い。アリルチオ尿素やジエチルジオカルバミン酸塩 (DDC) のような銅キレートで阻害される。この酵素は分子量 27 kDa と 43 kDa のたんぱく質 (サブユニット A および B) から構成されている (McTavish et al., 1993) 。アンモニアモノオキシゲナーゼをコードした遺伝子 (*amoA* および *amoB*) の配列は比較的多種類のアンモニア酸化細菌から同定されており、DNA データバンク上に公開されている。ヒドロキシルアミンオキシドレダクターゼは分子量 190 kDa からなるタンパク質で 63 kDa の同じサブユニットの 3 分子から構成されている。ヒドロキシルアミンを中間物質 (NOH) に変換し、亜硝酸に変換する (Sayavedra-Soto et al., 1994)。

## 2.5 干潟の堆積物中に存在する微生物の多様性

### 2.5.1 全細菌群集の多様性

Kim et al. (2004) は、干潟の堆積物中に存在する微生物の多様性について報告している。16S rRNA 遺伝子を標的としたクローンライブラリーを作成し、得られた 103 個のクローンから系統解析が行われた。干潟には、*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) group, *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* 等の細菌群が存在し、特に *Gammaproteobacteria* と *Deltaproteobacteria* に属するクローンが全体の 46.7% を占めていたと報告している。

また、Wilms et al (2006) は、干潟の堆積物中における、細菌、古細菌、真核生物の垂直プロファイルについて報告している。細菌に関しては、砂質成分が卓越した上層部 (地下 0 ~ 1.8 m) では、*Gammaproteobacteria* に属する細菌が優占していた。一方、泥質成分が卓越した地下 2.2 m ~ 3.6 m のあたりでは、*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi* に属する細菌が多いことが確認された。古細菌に関しては、*Methanosarcinales* に属するグループがどの層にも広く分布しており、*Methanomicrobiales* に属するグループが砂質成分の豊富な上層部で、*Methanobacteriales*, *Thermococcales* に属するグループが泥質成分の豊富な下層部で確認された。真核生物に関しては、*Ciliophora*, *Gastrotricha*, *Euglenozoa*, *Platyhelminthes* などの植食性の微生物や、*Arthropoda*, *Nematoda* などの堆積物を摂食する微生物の存在が確認され、これらの多くは、砂質成分が豊富な上層部に生息していたと報告している。このように 16S rRNA 遺伝子に基づく細菌群集構造解析から、干潟の堆積物中の細菌群集は多様であり、好気性細菌と嫌気性細菌が共存する環境であることが確認

されている。

### 2.5.2 アンモニア酸化細菌の多様性

一般に、河口域では塩分勾配が形成され、その勾配に従って生物相が変化する。Bernhard et al. (2005) によると、塩分は干潟生態系におけるアンモニア酸化細菌の多様性に大きな影響を及ぼす環境因子である。塩分が高い干潟（塩分 20.5～31.7 PSU）では、アンモニア酸化細菌の多様性が低く *Nitrosospira* に近縁な細菌種が多く存在していることが明らかにされた。一方、塩分が低い地点（塩分 6.3～24.7 PSU 及び 0.5～8.7 PSU）では、多様性が高く *N. ureae*, *N. oligotropha*, *Nitrosomonas* sp. Nm143 に近縁なアンモニア酸化細菌が多く存在していることが明らかにされた。また、Caffrey et al. (2003) は、酸素濃度が低く、塩分が高い干潟では、*Nitrosomonas marina* に属するアンモニア酸化細菌グループが豊富であったと報告している。Urakawa et al. (2006) により、荒川河口域の堆積物中のアンモニア酸化細菌群集が調べられたが、*Nitrosomonas* sp. Nm143 に近縁なクローンと Cluster 5 と呼ばれるグループが優占していたと報告している。また新井 (2006) によると、東京湾で優占化するアンモニア酸化細菌は *Nitrosospira* 属ではなく *Nitrosomonas* 属であり、そのうち、*Nitrosomonas* sp. Nm143 に近縁なクローンが多く検出され、逆に有明海では *Nitrosospira* 属が多く検出されたとしている。このようにアンモニア酸化細菌は、環境によってその種組成が異なることから、将来環境の指標種として利用されるかも知れない。

## 第3章 多摩川河口水の連続モニタリング

### 3.1 緒言

干潟は潮汐の影響を受け、干潟に供給される水の性質が常に変動する。特に、潮汐変動により、河川水と海水の混合比率の変動によって、日単位だけでなく、季節的にも、干潟に供給される水の性質は変化する。干潟上での浄化能を評価し、さらに、河口域の物質循環との関係を明らかにするためには、干潟の物理的特徴を押さえておく必要がある。具体的には、干潟の流入・流出水量の日単位、1 潮汐（大潮～大潮）単位、あるいは季節単位で変化を調べることが必要である。また、本干潟は、前面に干潟とほぼ同面積の浮島が存在するため、干潟の流入・流出水の時間変動は、一般的な潮汐変動に必ずしも従っていないものと予測される。また、前面に浮島という遮蔽物を有することで、干潟に流入する水の流速も、河川水に比べれば遅いと予想され、これによって、干潟上に供給された水が干潟内部に滞留している時間が、遮蔽物のない干潟に比べて長いとも予想される。またこのような環境特性が干潟の形成、維持に強く関わっていることも考えられる。そこで、こうした干潟上の流入・流出水の基本的な変動特徴を明らかにすることを目的として、干潟境界部に流速計を設置し、1 潮汐についての流入・流出水の変動を調べた。

### 3.2 調査地点・調査方法

#### 3.2.1. 連続観測における調査地点と流速計、多項目水質センサーの設置

多摩川河口干潟前面において流速計と多項目水質センサーを用いた調査を行った。調査日程は 2005 年 6 月 22 日から 7 月 6 日までの 2 週間とした。流速計のデータは 5 分おきに、水質センサーによるデータは 15 分おきに獲得し、流速・流向として合計 4020 点、水質として合計 1340 点のデータを集めた。多項目水質センサー（W-22XD; HORIBA）で得られた水質項目は、水深（m）、水温（°C）、pH、電気伝導度（COND[S m<sup>-1</sup>]）、濁度（TURB [NTU]）、塩分（‰）、全溶存固形物量（TDS[g l<sup>-1</sup>]）、海水比重（σ<sub>t</sub>）である。流速計（Compact-EM, アレック電子工業）で東西方向と南北

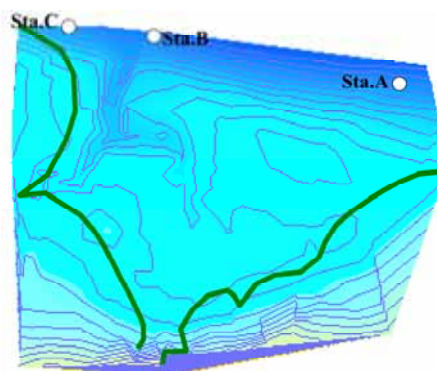


図 3-1 流速計設置点

下流側から、St. A, B, C とした。

方向の流向、流速データと水温データを得た。干潟への水の出入りについて知見を得るために水質センサーと共に 3 本の流速計を設置した。それぞれの設置点を、下流側から上流側に向かって、St. A（下流・140 号機）、B（中流・476 号機）、C（上流・475 号機）とした。流速および流向のデータの取得間隔は 5 分ごとに行なった。水質センサーと流速計の設置状況を図 3-1 に示す。水質センサーは、河床から 50 cm の高さに設置した。

### 3.3 結果と考察

#### 3.3.1. 流向・流速

流速系の設置場所の違いにより，潮汐によるそれぞれの流向の違いを捕らえることができた（図 3-2）。St. A(下流) に設置した流速計では，東西（上流-下流）方向の流れが南北方向の流れを圧倒していた（図 3-2A）。また南北方向への流れはかなり弱く東西（上下）と南北（左右）の流れが逆行していた。また上げ潮よりも引き潮時の潮の流れのほうが強かった。St. B(中流) に設置した流速計では，東西（上下）と南北（左右）の流れが逆行していた（図 3-2B）。また東西と南北の流速はあまり変わらなかった。さらに南北への流れの強さが上流・下流と比べて強かったことから，干潟への水の出入りがもっとも活発だったことを示していた。特に北側への流れ（干潟から島方向）がその逆よりも強くなっていることから干潟の排水にとって重要な場所であることが確認された。また干潟上にはみおすじが発達していることもこの結果を裏付ける。St. C(上流) に設置した流速計では，東西（上下）方向の流れが圧倒していた（図 3-2C）。また南北方向への流れはかなり弱く東西（上下）と南北（左右）の流れが逆行していた。どちらかというところ、引き潮時のほうが流れは強かった。

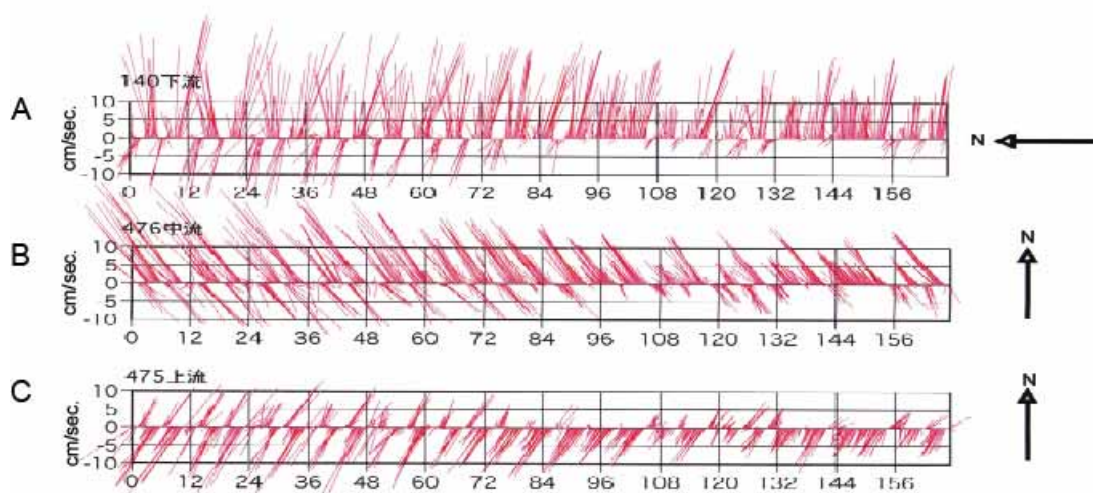


図 3-2 調査地点での流速と流向

#### 3.3.2. 多項目水質センサーによる連続観測

調査の初期には晴天の日が続き，後半には梅雨の影響で天気が崩れ曇天と降雨が続いた。そのため調査の前半と後半で水質が大きく変化した。6月22日から28日までの最初の7日間を調査前半（Data no. 1~624），29日から7月6日までを調査後半（Data no. 625~1340）と定義した。

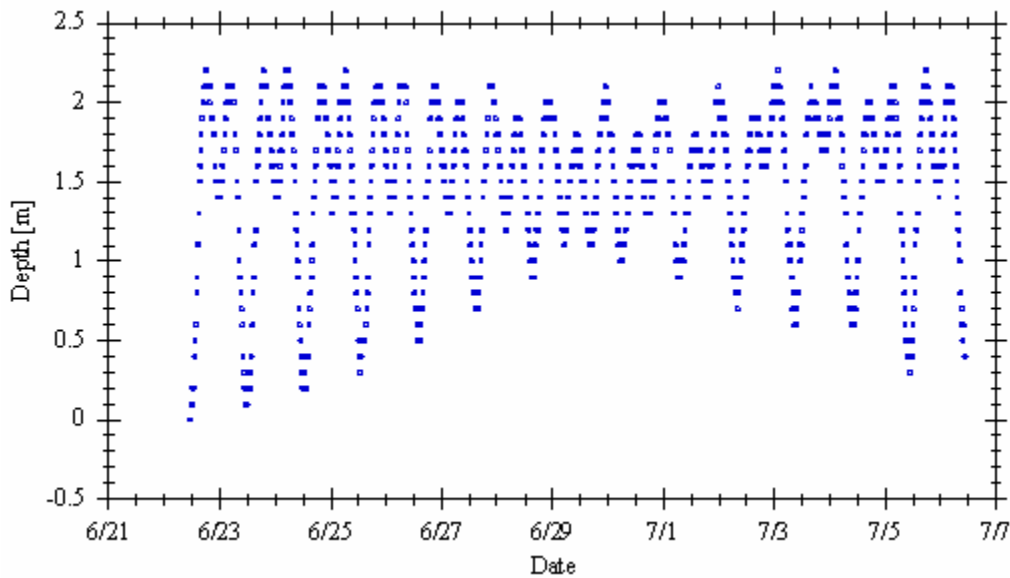


図 3-3 調査期間中の水深の変化

水質センサーを設置した地点 (St. B) の水深は、最も潮が満ちたときで約 280 cm と見積もられた (図 3-3)。調査日程の後半は雨天に見舞われたが、最大水深は、平常時と変化がなかった。このことから、今回の調査時の雨量は軽微であったと判断された。しかし、以下に述べるように様々な要素に影響を与えていた。濁度 (turbidity) は、潮汐 (あるいは深度) の変動を反映し、上げ潮時に高くなる傾向を示した。また、観測の前半と後半で、変動パターンに大きな違いを示した (図 3-4)。

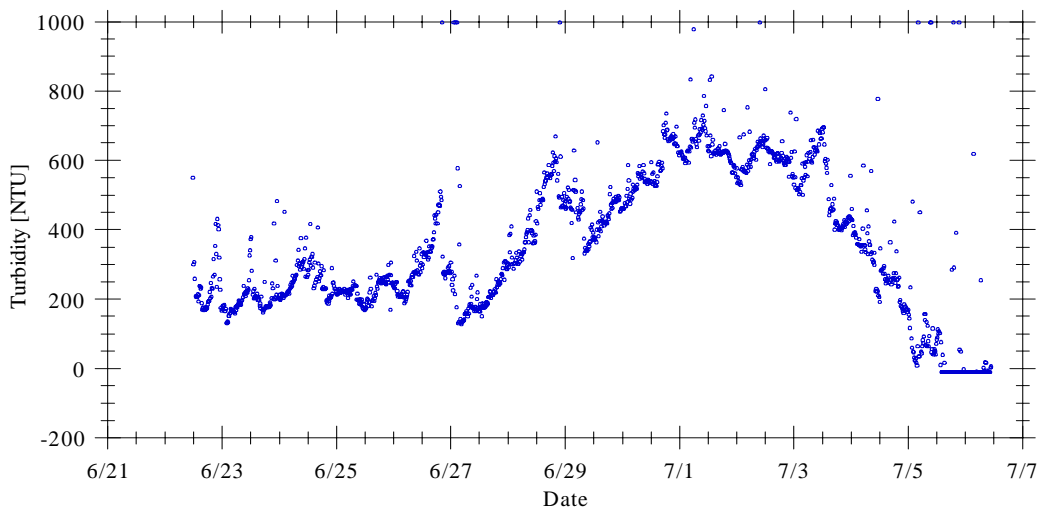


図 3-4 調査期間中の濁度の変化

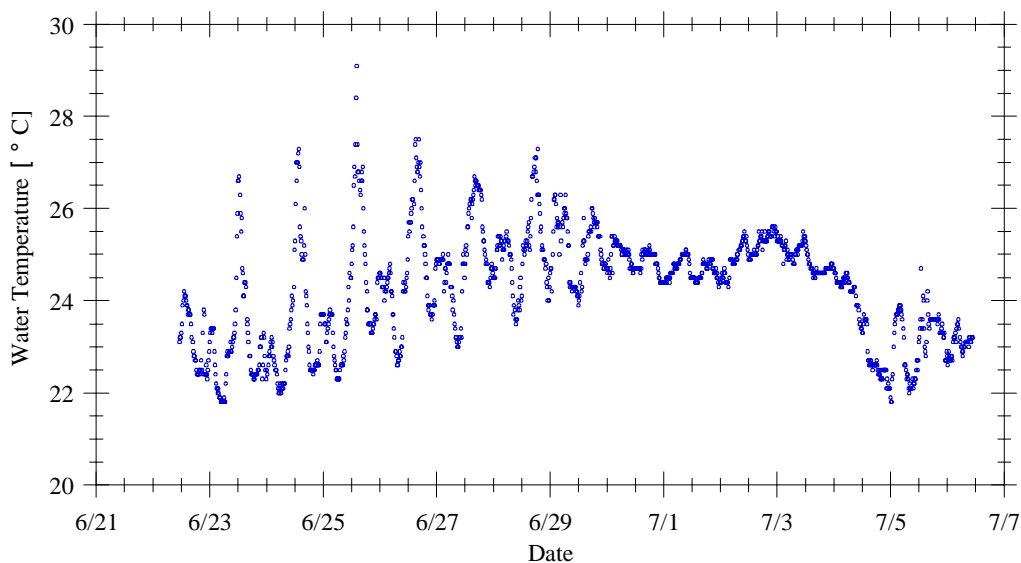


図 3-5 調査期間中の水温の日周変化

電気伝導度 (conductivity) も同様に、潮汐変動に対応した変動を示し、上げ潮時に高く、下げ潮時に低くなった。また、濁度と同様に、観測の前半部と後半部で、変動傾向が異なり、前半部のほうが後半部に比べて値は高く、前半の平均値は、 $3.77 \pm 0.73 \text{ S m}^{-1}$  ( $n = 624$ )、後半の平均値は、 $2.71 \pm 1.15 \text{ S m}^{-1}$  ( $n = 714$ ) であった。水温についても、明らかな日変動が観測された (図 3-5)。特に晴れた日が続いた前半は明瞭な日変化が認められたが、雨天が続いた後半は日変化が不明瞭に変化した。水温と気温の変動よりも水温は潮汐と強い関係を示した。このことから、この調査地点の水温は、一般的な河川水や海水で見られるような日周的な水温変化ではなく、主に水温が異なっている海水と淡水の混合割合などによっ

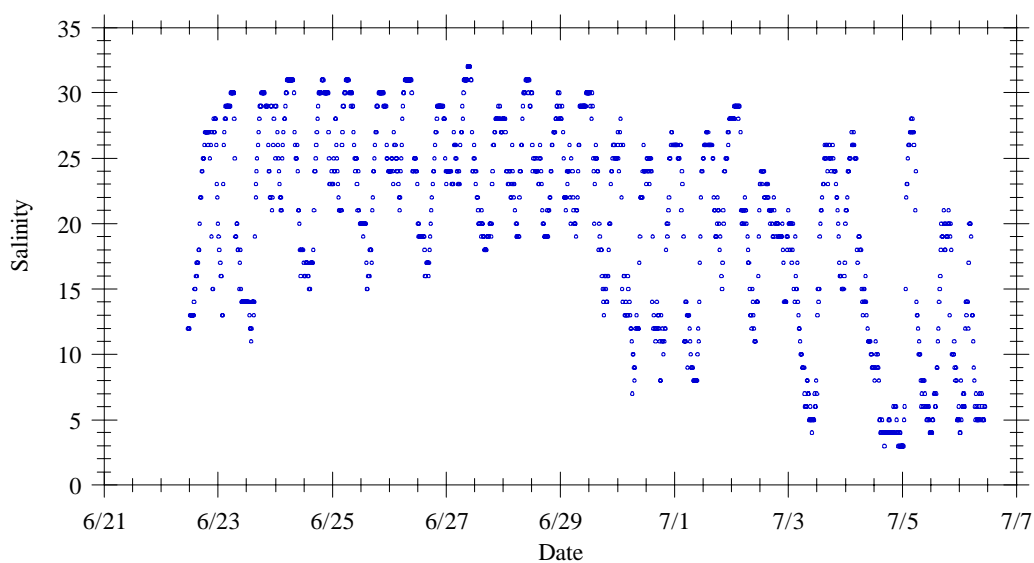


図 3-6 観測期間中の塩分の変化

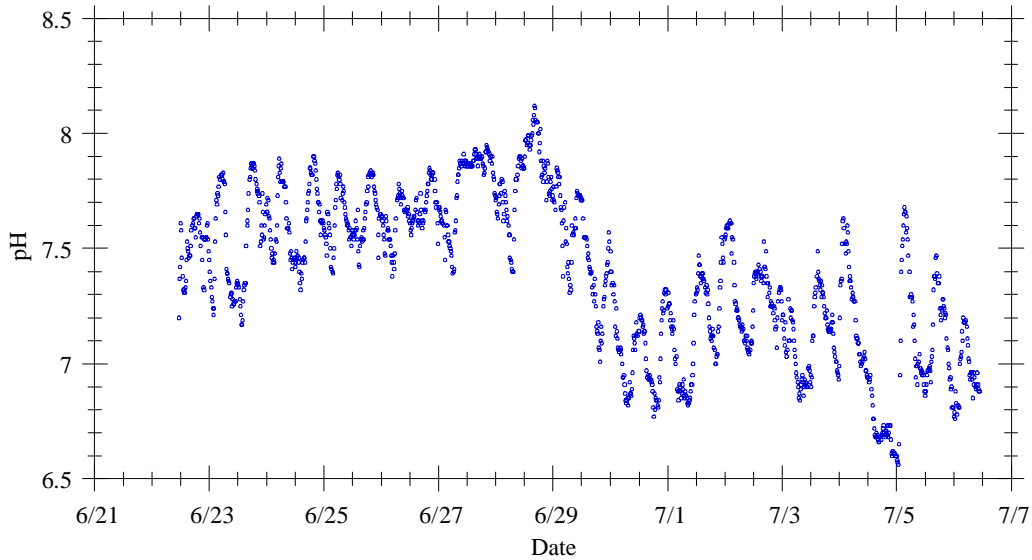


図 3-7 観測期間中の pH の変化

て変動すると考えられた。塩分も潮汐に対応した変動を示し、水質計設置点の水深が深くなると、塩分は高くなった（図 3-6）。この関係は、密度（ $\sigma_t$ ）でも同様であり、河道から干潟への斜面部では、水の鉛直的な密度勾配が形成されており、潮位が高くなると、深いところに海水起源の比重の重い水が、表面近くに河川水由来の軽い水が存在していることを示す。河口水の水質は、河川水の影響を最も強く受ける満ち潮が始まる間際においても約 18%程度にまでしか低下しないことが、明らかになった。つまり、調査地点は、ごく表層

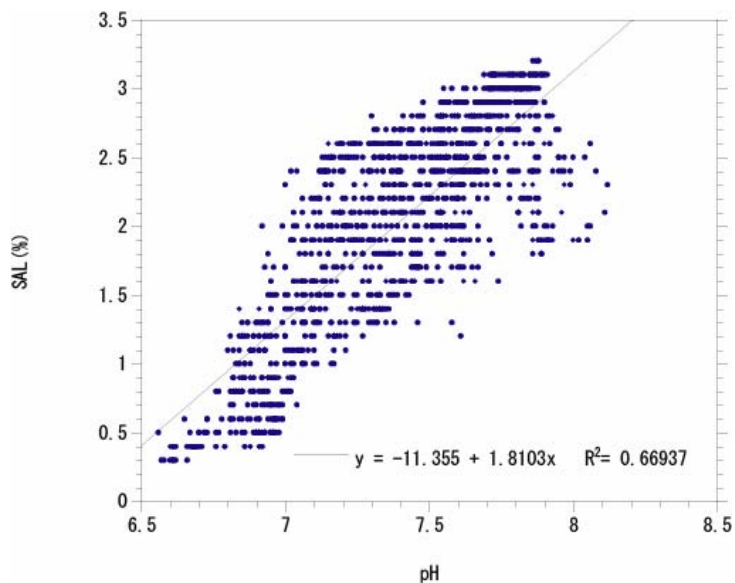


図 3-8 観測期間中の塩分と pH の関係

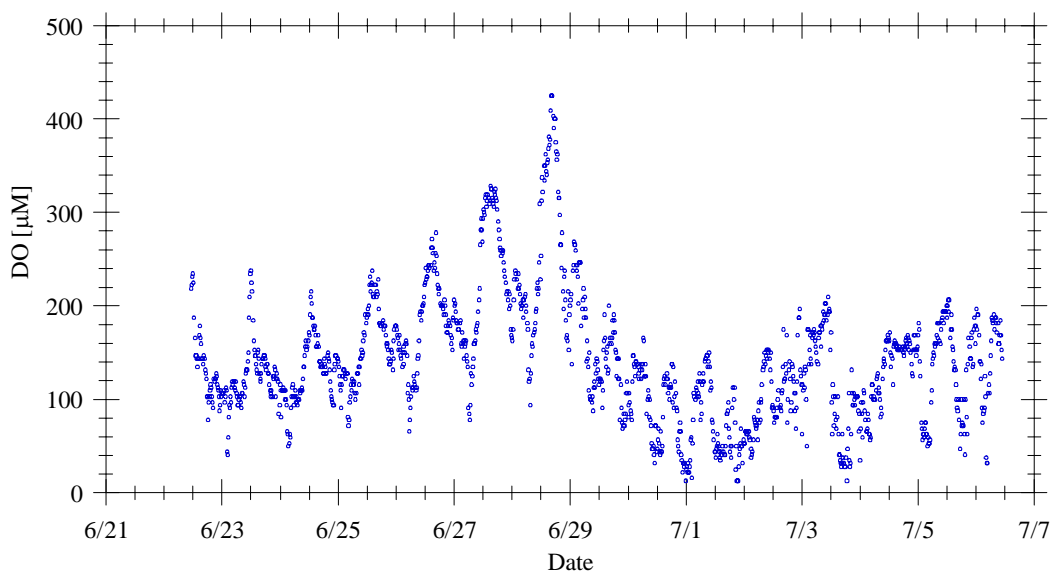


図 3-9 観測期間中の溶存酸素濃度の変化

水を除いて完全に真水になることはないことを意味している。このことが、ヤマトシジミの棲息をはじめとして、この周囲での汽水環境に適応した生物相を決定付けているのだろう。また最も海水の影響を強く受ける潮汐状態では、塩分は 32 ‰程度にまで到達することから、河底は海水と同程度の塩分に保たれる時間が存在することが示された。また雨天が続くと河川水は降雨の影響を受け、塩分は平常時と比較して低下した。今回の調査中に記録された最も低い塩分は約 3 ‰であった。また潮が最も高くなる時間においても塩分は平常時よりも低いままである。このように連続する降雨はこの場所での塩分環境に強く影響を与えるのだろう。また、pHの変化についても同様で、河川水や降水のpHは海水に比べて低く、特に降水のpHは酸性雨の影響により低い。このため、後半部では降水の影響を強く受けたことにより、前半部に比べてpHが低くなったと考えられる(図 3-7)。調査期間全体を通してpHと塩分間に強い正の相関が認められた ( $r^2 = 0.67$ ,  $p < 0.0001$ ,  $n = 1340$ ) (図 3-8)。潮汐に対応した変動を示し、水深が深く、海水の影響が強いときほど、pHは高くなった。降雨の影響を強く受けた調査後半部分のpHの低下は、雨水のpHが河川水よりもさらに低いことに由来しているのだろう。

調査前半の晴天の日には溶存酸素濃度は規則正しい日周期を示した(図 3-9)。午前中から溶存酸素量は上昇し、午後に最大値を示し、その後、夕方から深夜・明け方に向かって規則正しく減少するパターンが観察された。特に明け方は水中の溶存酸素が極端に減少することが連続観測によって明らかになった(図 3-10)。現地観測で得られたデータから多摩川河口での光合成速度(表 3-1)と、酸素消費速度を求めた(表 3-2)。データは溶存酸



表 3-1 多摩川河口での光合成速度

CODE	NUMBER	DATE	TIME	n	pH	COND (S m <sup>-1</sup> )	TURB (NTU)	DO (mg l <sup>-1</sup> )	TEMP (C)	DEPTH (m)	SAL (%)	ORP (mV)	COR R <sup>2</sup>	SLOPE a	RATE (mg l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	RATE (μmole l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
P1	85	2005/6/23	9:00:22	13	7.30	2.72	238	3.7	22.9	0.9	1.7	341	0.8122	0.3143	1.26	39.3
	97	2005/6/23	12:00:22		7.35	2.34	373	7.6	26.6	0.1	1.4	368				
P2	168	2005/6/24	5:45:22	32	7.79	4.68	249	3.0	22.2	2.1	3.1	332	0.8828	0.1234	0.49	15.4
	199	2005/6/24	13:30:22		7.46	2.73	323	6.0	27.2	0.4	1.7	368				
P3	270	2005/6/25	7:15:22	25	7.72	4.67	252	3.2	22.5	2.0	3.0	328	0.9466	0.149	0.60	18.6
	294	2005/6/25	13:15:22		7.62	3.13	197	7.4	26.9	0.4	2.0	343				
P4	362	2005/6/26	6:15:22	35	7.63	4.63	251	3.3	23.2	2.1	3.0	342	0.9452	0.1665	0.67	20.8
	396	2005/6/26	14:45:22		7.72	2.96	353	8.7	27.4	0.6	1.8	350				
P5	460	2005/6/27	6:45:22	27	7.57	4.51	156	3.0	23.8	1.9	2.9	329	0.9544	0.2853	1.14	35.7
	486	2005/6/27	13:15:22		7.87	3.49	187	10.2	25.6	0.9	2.2	343				
P6	562	2005/6/28	8:15:22	35	7.75	4.45	399	5.1	24.1	1.9	2.9	336	0.9464	0.2677	1.07	33.5
	596	2005/6/28	16:45:22		8.06	3.23	552	13.6	26.7	1.1	2.0	335				
P7	667	2005/6/29	10:30:22	33	7.73	4.49	367	4.4	24.3	1.8	2.9	330	0.4594	0.0601	0.24	7.50
	699	2005/6/29	18:30:22		7.14	2.42	447	5.5	25.7	1.3	1.5	343				
P8	766	2005/6/30	11:15:22	29	7.13	3.74	537	2.3	24.6	1.7	2.4	307	0.6607	0.1045	0.42	13.1
	794	2005/6/30	18:15:22		6.77	1.40	710	4.4	25.1	1.3	0.8	370				
P9	1010	2005/7/3	0:15:22	46	7.21	3.12	625	3.7	25.4	2.0	2.0	330	0.6163	0.0592	0.24	7.40
	1055	2005/7/3	11:30:22		6.97	1.06	664	6.2	25.3	1.1	0.6	364				
P10	1135	2005/7/4	7:30:22	29	7.11	2.48	367	3.4	24.2	1.0	1.5	345	0.4781	0.0709	0.28	8.90
	1163	2005/7/4	14:30:22		6.72	0.84	246	5.1	22.7	1.7	0.5	346				

P11	1224	2005/7/5	5:45:22	30	7.29	2.25	64	4.4	22.6	1.7	1.4	337	0.8595	0.0662	0.26	8.3
	1253	2005/7/5	13:00:22		6.97	0.912	109	6.6	24.7	1.1	0.5	323				

COR; 相関係数 (coefficient of correlation)

表 3-2 多摩川河口での酸素消費速度

CODE	NUMBER	DATE	TIME	n	pH	COND (S m <sup>-1</sup> )	TURB (NTU)	DO (mg l <sup>-1</sup> )	TEMP (°C)	DEP (m)	SAL (%)	ORP (mV)	COR R <sup>2</sup>	SLOPE a	RATE (mg l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	RATE (μmole l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
C1	3	2005/6/22	12:30:22	46	7.46	2.16	259	6.0	23.9	0.2	1.3	357	0.5841	-0.0461	-0.18	-5.8
	48	2005/6/22	23:45:22		7.49	3.47	167	3.3	22.9	1.5	2.2	339				
C2	98	2005/6/23	12:15:22	15	7.34	2.36	378	7.2	26.6	0.2	1.4	366	0.6502	-0.1771	-0.71	-22.1
	112	2005/6/23	15:45:22		7.60	3.52	182	3.9	23.6	1.2	2.2	336				
C3	121	2005/6/23	18:00:22	24	7.85	4.51	174	4.3	22.4	2.1	2.9	334	0.2194	-0.0305	-0.12	-3.8
	144	2005/6/23	23:45:22		7.69	4.49	200	3.0	22.3	1.4	2.9	327				
C4	196	2005/6/24	12:45:22	39	7.46	2.73	315	6.9	26.6	0.3	1.7	369	0.8328	-0.0754	-0.30	-9.4
	234	2005/6/24	22:15:22		7.69	4.63	216	3.0	22.6	1.9	3.0	324				
C5	295	2005/6/25	13:30:22	37	7.58	3.12	182	6.9	26.7	0.4	2.0	344	0.8986	-0.0844	-0.34	-10.6
	331	2005/6/25	22:30:22		7.67	4.45	169	4.2	23.6	1.9	2.9	340				
C6	405	2005/6/26	17:00:22	52	7.62	2.88	393	7.5	26.7	1.2	1.8	351	0.6538	-0.0381	-0.15	-4.8
	456	2005/6/27	5:45:22		7.42	3.60	142	4.3	24.8	1.7	2.3	345				
C7	498	2005/6/27	16:15:22	30	7.89	2.88	208	9.9	26.6	0.9	1.8	345	0.9527	-0.1548	-0.62	-19.4
	527	2005/6/27	23:30:22		7.74	4.25	287	5.6	24.7	1.9	2.7	336				
C8	597	2005/6/28	17:00:22	27	8.05	3.11	586	12.9	26.8	1.2	2.0	335	0.9414	-0.3263	-1.31	-40.8

	623	2005/6/28	23:30:22		7.76	4.57	506	4.9	24	1.9	3	330				
C9	634	2005/6/29	2:15:22	33	7.81	3.34	465	8.3	26.3	1.5	2.1	345	0.8707	-0.1774	-0.71	-22.2
	666	2005/6/29	10:15:22		7.74	4.46	364	3.6	24.3	1.8	2.9	332				
C10	743	2005/6/30	5:30:22	23	6.94	2.06	517	4.4	25.2	1	1.2	347	0.8786	-0.1782	-0.71	-22.3
	765	2005/6/30	11:00:22		7.18	3.99	541	1	24.6	1.6	2.6	301				
C11	791	2005/6/30	17:30:22	31	6.91	1.99	676	3.7	25.1	1.3	1.2	343	0.8476	-0.1304	-0.52	-16.3
	821	2005/7/1	1:00:22		7.19	3.97	617	0.7	24.5	1.9	2.6	294				
C12	1047	2005/7/3	9:30:22	29	6.93	0.854	636	6.5	25.2	0.7	0.5	332	0.8718	-0.2271	-0.91	-28.4
	1075	2005/7/3	16:30:22		7.29	3.83	457	1	24.6	2	2.4	317				
C13	1251	2005/7/5	12:30:22	26	6.91	0.809	112	6.6	23.4	0.9	0.4	328	0.9003	-0.1925	-0.77	-24.1
	1276	2005/7/5	18:45:22		7.24	3.02	-10	2.3	23.6	2	1.9	318				

---

COR; 相関係数 (coefficient of correlation)

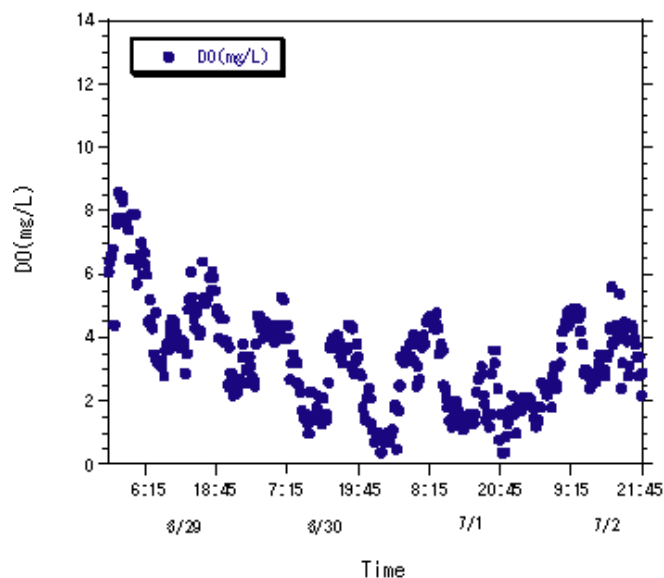


図 3-10 調査後半の溶存酸素濃度の日周変化

素の増減が直線関係にある部分をもとにして計算し、酸素の増加を光合成、減少を酸素消費と見なした。光合成速度は  $0.24 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  から  $1.26 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  の範囲で推移し、平均値は  $0.61 \pm 0.38 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (平均値  $\pm$  標準偏差) となった。多くの場合で酸化還元電位の増加を伴った(表 3-1)。また、酸素消費速度は  $0.12 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  から  $1.31 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  の範囲で推移し、平均値は  $0.57 \pm 0.34 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (平均値  $\pm$  標準偏差) となった。多くの場合で酸化還元電位の減少を伴った(表 3-2)。

今回の調査では溶存酸素濃度は  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  程度から  $14 \text{ mg l}^{-1}$  の範囲で変化したことから、多摩川の河口付近では溶存酸素濃度は非常に大きな変化を示すことが確認された。夜間の酸素減少は、特に降雨の影響が強かった調査後半に顕著に認められた(図 3-10)。これには水中の濁度の増加に伴う有機物量の増加と、それに伴う微生物の酸素消費量の増加が関連しているものと推察される。また調査後半は曇天と降雨の繰り返しで、昼間に行われる光合成が弱く、日最高値も低かった。このことも夜間の酸素減少に影響を与えていると考えられる。観測を行った時期は、梅雨にあたり、特に、観測期間後半において、雨が多かった。雨が多いときには、日射量が低下するために、1日の気温の変化が小さくなる。これにより、水温の変動も小さくなったのだろう。

## 第4章 多摩川河口水の動態と水質

### 4.1 緒言

昨今,多摩川河口において羽田空港沖から多摩川河口域にかかる滑走路島(最大幅 524 m, 最大長 3120 m)の建設事業が進んでいる。また,多摩川下流域の都市化に伴い,土面が道路などに舗装され,雨水が地下へ浸透することなく河川へ流入するために,東京湾への淡水流入量が増加している(汽水域セミナー実行委員会, 2007)。このため,多摩川河口域の生態系に現段階では把握しきれない影響が出る可能性が指摘されている。従って,本章では,多摩川河口を流れる河川水の水質及び動態,河川水に含まれる有機物を分解する細菌数を調査することを目的とした。

### 4.2 調査地点・調査方法

#### 4.2.1 水質の季節変動

多項目水質センサー(W-22XD; HORIBA)を用いて,干潟前面を流れる多摩川の水質を測定した。調査日程,及び,データ獲得における時間間隔とデータ数を示す(表 4-1)。測定項目は,pH,COND(電気伝導度),TURB(濁度),DO(溶存酸素濃度),水温,深度,塩分,TDS(全溶存固形物量),ORP(酸化還元電位)とした。

表 4-1 センサーによる観測時間の間隔とデータ数

日付	間隔	観測数
5月26日	5分	22点
6月20日	2分	16点
7月26日	5分	11点
8月14日	-	3点
9月8日	5分	24点
10月26日	1分	68点
11月20日	5分	16点
4月20日	2分	65点

8月14日の観測は,マニュアル測定で行った。

調査は2005年度に行った。4月20日は2006年のデータ。

また,栄養塩測定用として,多摩川河口を流れる河口水を0.2 μmのシリンジフィルターで濾過し,100 mlポリビンに採取し,保存した(-20°Cで凍結保存)。携帯用多項目迅速水質分析計DR/2400(Hach)を用いて無機態窒素濃度(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)の測定を行った。NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Nの測定に関しては,水試料を10倍希釈し,アンモニアサリチル酸試薬パウダーピロー(Hach)とアンモニアシアヌール酸試薬パウダーピロー(Hach)を用いたサリ

チル酸法により測定した。また、 $\text{NO}_2^-$ -Nの測定に関してはNitriVer3 亜硝酸塩試薬パウダーピロー (Hach) を用いたジアゾ化法、 $\text{NO}_3^-$ -Nの測定に関してはNitraVer5 硝酸塩試薬パウダーピロー (Hach) を用いたカドミウム還元法で測定した。

#### 4.2.2 河口水の全菌数

全菌数測定用に、あらかじめホルマリン 5 ml を入れた 50 ml ポリビンに 45 ml の河口水を採取し、ホルマリンで固定し、保冷状態で実験室へ運んだ。1 ml の試料に核酸染色剤 (DAPI; 4',6-diamidino-2-phenylindole) を 1  $\mu\text{l}$  入れ、5 分間反応後、全量を 0.2  $\mu\text{m}$  のブラックフィルター (ISOPORE membrane filters; 0.2  $\mu\text{m}$  GTTP; Millipore) でろ過し、スライドガラスにマウントした。落射型蛍光顕微鏡 (BX51; Olympus) を用いて U 励起下で観察した。計数は 3 連で、それぞれ 10 視野について行なった。

#### 4.2.3 河口水の生菌数

生菌数測定用として、河口水を 100 ml ポリビンに採取し、保冷状態で実験室へ運んだ。2  $\mu\text{l}$  の試料に 1%の NaCl 水溶液を 48  $\mu\text{l}$  混合し、全量を 50  $\mu\text{l}$  とした。希釈した試料 50  $\mu\text{l}$  を Marine Agar 培地 (従属栄養海洋性細菌の培養に適したもの)、Nutrient Agar 培地 (従属栄養細菌の培養に適したもの) にそれぞれ接種し、2 週間、20°C、暗条件で静置培養した。

#### 4.2.4 硝酸性窒素の安定同位体比

東京大学海洋研究所生元素動態分野の宮島利宏博士を通して京都大学生態学研究所の由水氏に測定を依頼した。繰り返し測定による測定誤差は窒素が 0.18‰、酸素が 0.76‰であった。

### 4.3 結果と考察

#### 4.3.1 河口水の水質

河口水の水質データを示す (表 4-2)。pHは、7.00~7.47 の値を示した。DOは、5.8~16.7  $\text{mg l}^{-1}$ の値を示した。水温は 11 月に最も低い値で、15.0°Cを示し、7 月に最も高い値で、30.3°Cを示した。塩分は、0.46~1.25%を示した。8月、11月に低い値を示したのは、サンプリング当日と前日の降水によるものであると考えられる。ORPは、500 mV前後の値を示した。CONDは、0.86~2.10  $\text{S m}^{-1}$ の値を示した。TDSは、5.45~13.1  $\text{g l}^{-1}$ の値を示した。

表 4-2 河口水の水質データ

月	pH	DO ( $\text{mg l}^{-1}$ )	水温 ( $^{\circ}\text{C}$ )	塩分 (%)	ORP (mV)
5月	7.37 ± 0.04	8.1 ± 0.4	20.9 ± 0.1	0.86 ± 0.13	570 ± 22
6月	7.31 ± 0.05	No data	27.4 ± 0.1	0.50 ± 0.00	578 ± 8
7月	7.30 ± 0.08	16.7 ± 2.1	30.3 ± 1.8	0.75 ± 0.08	549 ± 10

8月	7.22 ± 0.01	5.8 ± 0.3	28.7 ± 0.1	0.50 ± 0.00	558 ± 3
9月	7.47 ± 0.02	16.6 ± 1.6	26.3 ± 0.1	1.13 ± 0.00	602 ± 10
10月	7.16 ± 0.04	6.6 ± 0.5	21.3 ± 0.3	1.07 ± 0.13	302 ± 5
11月	7.00 ± 0.01	No data	15.0 ± 0.2	0.46 ± 0.14	454 ± 19
4月	7.40 ± 0.07	8.2 ± 0.2	16.7 ± 0.31	1.25 ± 0.12	332 ± 12

表 4-2 続き

月	COND (S m <sup>-1</sup> )	TDS (g l <sup>-1</sup> )
5月	1.48 ± 0.21	9.36 ± 1.47
6月	0.89 ± 0.01	5.62 ± 0.04
7月	1.33 ± 0.10	8.09 ± 0.54
8月	0.95 ± 0.01	5.97 ± 0.06
9月	1.91 ± 0.03	12.0 ± 0.0
10月	1.78 ± 0.20	10.9 ± 1.3
11月	0.86 ± 0.22	5.45 ± 1.39
4月	2.10 ± 0.19	13.1 ± 1.23

#### 4.3.2 河口水の全菌数

河口水中の全菌数は、5月に  $1.6 \times 10^7 \pm 0.00 \times 10^7$  cells ml<sup>-1</sup> と最も高い値を示し、9月に  $2.7 \times 10^6 \pm 0.15 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup> と最小値を示し、平均値は  $7.3 \times 10^6 \pm 5.16 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup> を示した (図 4-1)。

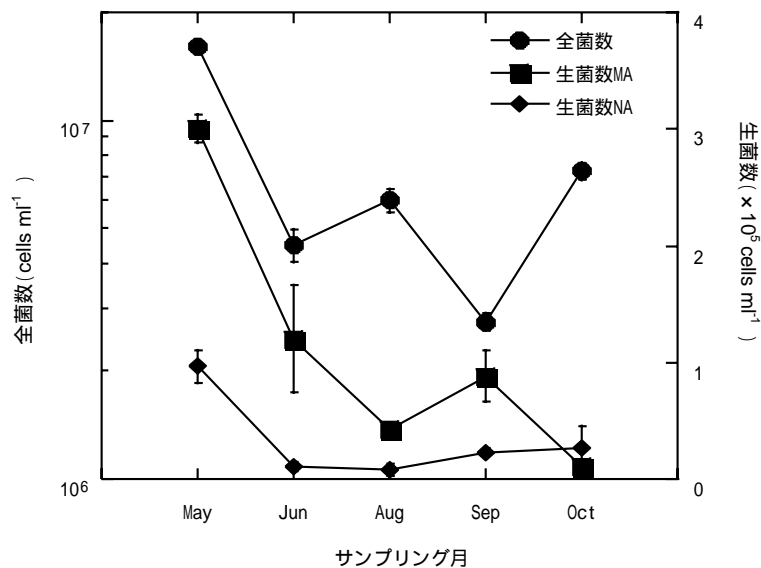


図 4-1 各月の全菌数と生菌数

#### 4.3.3 河口水の生菌数

河口水の生菌数をMarine Agar培地とNutrient Agar培地で培養した(図4-1)。Marine Agar培地で培養した場合、5月に $3.0 (\pm 0.12) \times 10^5 \text{ cells ml}^{-1}$ と最も高い値を示し、10月に $1.1 (\pm 0.34) \times 10^4 \text{ cells ml}^{-1}$ と最小値を示した(図4-1)。Nutrient Agar培地で培養した場合、5月に $9.7 (\pm 1.4) \times 10^4 \text{ cells ml}^{-1}$ と最も高い値を示し、6月と10月に $1.1 \pm 0.34 \times 10^4 \text{ cells ml}^{-1}$ と $1.1 (\pm 0.34) \times 10^4 \text{ cells ml}^{-1}$ と最小値を示した(図4-1)。多摩川は、表4-2で示したように塩分が0.46~1.25%の汽水であり、海水成分を含んだMarine Agar培地で培養した場合の方が、Nutrient Agar培地で培養した場合と比べ細菌が増殖しやすいことが明らかになった。

#### 4.3.4 無機態窒素の動態

無機態窒素濃度( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ )の測定結果を示す(図4-2)。 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ は、各月において $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ 前後の値を示し、季節を通じて安定していた。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ については、月ごとの変動が大きく $\text{NH}_4^+\text{-N}$ は、5月に $1.37 \text{ mg l}^{-1}$ で最も高い値を示し、10月に $0.13 \text{ mg l}^{-1}$ で最も低い値を示した。 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ は、8月に $3.13 \text{ mg l}^{-1}$ で最も高い値を示し、6月に $0.67 \text{ mg l}^{-1}$ で最も低い値を示した。このように無機態窒素の動態については、明瞭な季節変動は認められなかった。アンモニア、亜硝酸、硝酸性窒素比が毎月大きく変化す

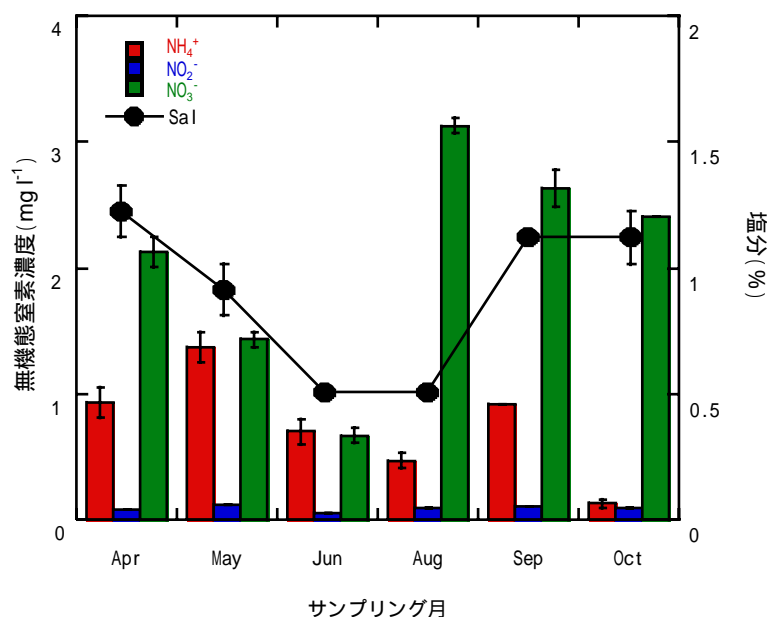


図4-2 各月における河川水の無機態窒素濃度と塩分

値は平均値 ± 標準偏差を示す。

ることから、多摩川河口域に見られる無機態窒素は硝化反応や植物プランクトン、または付着藻類などの栄養塩取り込みを十分に受けた水ではなく、河川が本来もつ水質浄化能力を



十分に受けていない水が、東京湾に直接注いでいると考えられた。これらのことは、多摩川の水質を制御しているのは自然が作り出す本来の四季の変化ではなく、流域にある下水処理場からの放流水などの人間活動であることを示唆している。

#### 4.3.5 硝酸性窒素の安定同位体比

硝酸の窒素同位体比、及び酸素同位体比の分析結果を示す（表 4-3）。各月において、窒素同位体比の平均値は、 $10.7 \pm 1.46$  ( $n = 9$ )を示し、安定していることから、窒素の起源は同じものであると考えられる。一方、酸素同位体比は、5月の試料だけ 12.6 と高い値を示し、起源の異なる硝酸が存在していることが示唆された。平均値は、 $1.53 \pm 1.51$ であった ( $n = 8$ )。

表 4-3 河口水の同位体データ

月	d15N/14N	d18O/16O
2月	8.5	3.3
3月	13.0	0.1
4月	10.0	2.2
5月	9.5	12.6
6月	11.4	1.0
8月	11.0	1.2
9月	12.7	3.9
10月	10.0	-0.5
11月	10.6	1.0

## 第5章 干潟の堆積物性状

### 5.1 緒言

干潟に生息する生物は、地盤高の変化、あるいは陸からの距離によって、河川や海との境界線に沿って帯状分布をなすことが知られている。本干潟においても、生物種によって、干潟上の分布域が異なっている（玉上ら, 2004; 川崎市環境局, 2006）。こうした生物の帯状分布は、堆積物の性状、冠水時間、塩分の影響の違いなどの物理的条件や、異種の生物間の競合関係などを反映している。一方、そこに生息する生物も、巣穴を形成することなどにより表層堆積物を攪乱し、化学成分の鉛直分布や酸化還元環境に影響を与えることが知られている（Kristensen, 1988）。また、多摩川河口干潟は後背地としてヨシ帯をもっていることから、ヨシ帯が干潟の物理化学環境をさらに複雑にし、トビハゼやアシハラガニなどの生物に多様な生息環境を提供していると考えられる。そこで本章では、生物分布域に影響を与える干潟堆積物の化学的特徴を明らかにすることを目的として、表層堆積物試料の採取並びに分析を行った。

### 5.2 調査地点・方法, 実験方法

#### 5.2.1 観測

2005年5月24日の大潮時にサンプリングを行った。サンプリング地点は、図5-1の12地点とし、個々の地理情報については、携帯型GPSにて、位置を記録した。St.1, 3, 4, 5に関してはヨシ原の内外での環境の比較を行なうためにそれぞれヨシ原内の調査地点としてSt.1', 3', 4', 5'を設定した。現場では、各地点の表層泥(0-1 cm)を採取し、pH/ORPメータ(TPX-90Si; TOKO Chemical Laboratories)を使用し、泥温、pH, ORP(酸化還元電位)を測定した。また、表層泥を採取後、実験室に持ち帰り、含水率、空隙率、比重、粒度、微生物数、全有機炭素量(TOC)と炭素同位体比( $\delta^{13}\text{C}$ )、全窒素(TN)と窒素同位体比( $\delta^{15}\text{N}$ )、硝酸濃度( $\text{NO}_3^-$ )、塩分の分析を行った。

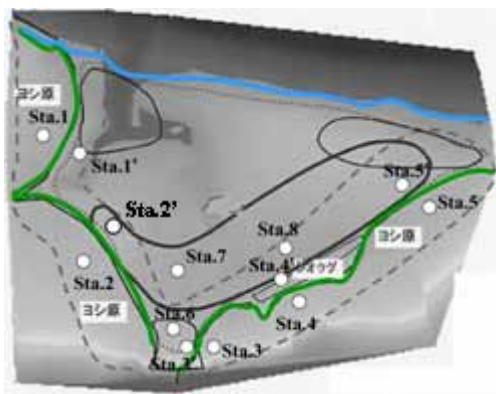


図5-1 表層堆積物サンプリング地点位置

#### 5.2.2 含水率・空隙率・比重

含水率、空隙率、比重は、採取した泥  $2\text{ cm}^3$  をガラス瓶に分取し、 $100^\circ\text{C}$  で 48 時間乾燥させ、その前後の重量変化から計算した。

### 5.2.3 粒度組成

粒度は、レーザ回折式粒度分布測定装置 (SALAD-3000; Shimadzu) を用いて測定した。測定は、堆積物少量 (耳掻き 1 杯程度) をあらかじめ水に懸濁させ、超音波洗浄器を用いて、粒子が均一になるようにした。その後、懸濁水を粒度分析計に投入し、吸光度から粒度を計算する。粒度は、2 mm-63  $\mu\text{m}$  を砂、63  $\mu\text{m}$  以下をシルトとした。

### 5.2.4 有機物とその同位体比

全有機炭素量 (TOC) とその炭素同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}$ )、全窒素 (TN) とその窒素同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}$ ) は、乾燥した堆積物約 100 mg をスクリー管に入れ精秤した後、6N 塩酸を数滴加え、ホットプレート上 (100-110°C) で蒸発乾固させた。その後、蒸留水を加えて塩酸を蒸発させ、再び乾燥させた後、精秤した。この試料を錫製の Tin Cup に 30-50 mg 梱包し、拡張型安定同位体比質量分析計 (Elemental analyzer-isotope ratio mass spectrometry; EA-IRMS) (Finnigan; DELTAplusXP) を用いて測定を行った。

### 5.2.5 蛍光顕微鏡による全菌数の測定

全菌数測定用として、1  $\text{cm}^3$  の泥を 1 ml のホルマリン (最終濃度 4%) と 8 ml の滅菌濾過海水の入った 10 ml 遠心管に採取した。堆積物試料を実験室へ持ち帰り、卓上型超音波洗浄器 (B1510J-MT; BRANSON) の中で 5 分間インキュベートすることで、泥粒子に付着した細菌を分散させた。その後、核酸染色剤 (DAPI; 4', 6-diamidino-2-phenylindole) で 5 分間反応させ、最終濃度を 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  とした。全量を 0.2  $\mu\text{m}$  のブラックフィルター (ISOPORE membrane filters; 0.2  $\mu\text{m}$  GTTP; Millipore) で濾過した試料をスライドガラスに載せ、落射型蛍光顕微鏡 (BX51; OLYMPUS) で観察した。計数は 3 連でそれぞれ 10 視野について行った。

### 5.2.6 硝酸濃度

間隙水中の  $\text{NO}_3^-$  は、50 ml の遠沈管に採取した泥を、実験室において遠心分離した後、その上澄みを 0.22  $\mu\text{m}$  のディスクフィルターでろ過し、10 ml のスピッツ管に採取し、分析まで冷凍保存した。濃度の測定は、イオンクロマトグラフィー (AS-50; DIONEX) を用いて行った。塩分測定用の試水は、上記の硝酸測定用の試料の一部を用いた。濾過した間隙水を屈折式塩分計 (IS/Mill-E; IUCHI) で測定した。

## 5.3 結果と考察

### 5.3.1 物理的特徴

干潟堆積物の含水率は 25.9% (St. 5') から 44.7% (St. 4) の範囲であった。またヨシ原の内外地点を比較すると、ヨシ原内の地点 (St.1, 3, 4, 5) のほうが、ヨシ原外の地点 (St. 1', 3', 4', 5') に比べて、含水率が高い傾向が認められた (図 5-2)。これはヨシにより直射日光が

遮られ、蒸発の効果が抑制されているためと考えられる。

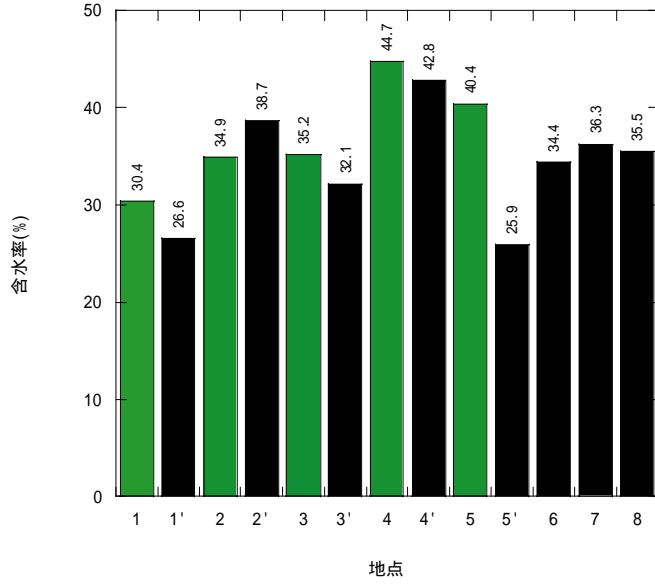


図 5-2 干潟堆積物の含水率

ヨシ帯の中の地点は緑の棒グラフで示した。

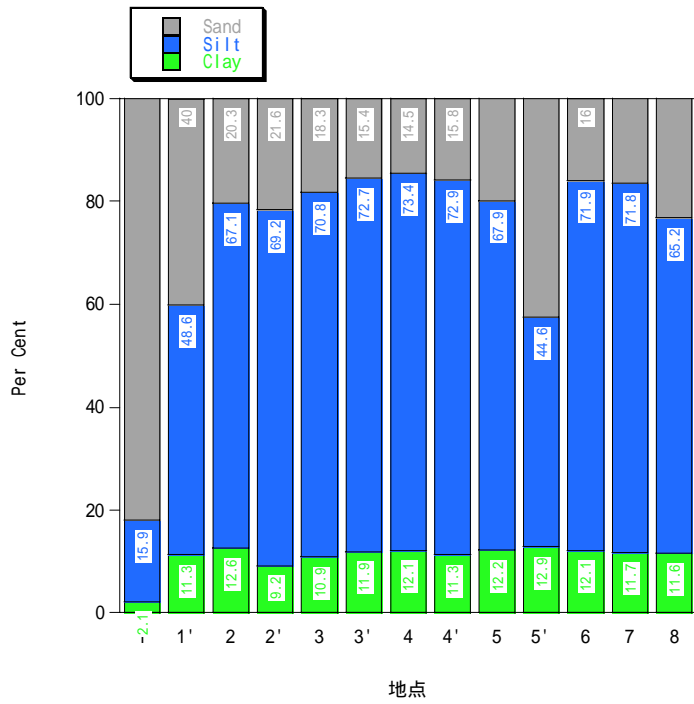


図 5-3 多摩川河口干潟堆積物の粒径組成

堆積物の粒径組成を分析した結果、干潟全体では、シルト成分 (0.0625-0.0039 mm) が砂 (サンド, 2-0.0625 mm) と粘土 (クレイ, < 0.0039 mm) 成分よりも豊富であることが示された (図 5-3)。また、堆積物の Ternary diagram に基づくと sandy silt に分類された (Shepard, 1954)。例外的に St. 1 では、砂成分が大部分を占めた。これは、この地点が最も河川の本流に近いためであると考えられる (図 5-1)。同様の傾向が、砂成分がシルト成分と同程度存在した St. 1 と St. 5 でも確認できる。これらのことから、干潟全体で、土手に近い干潟奥部から河川本流に近い地点に向けて、堆積物の物理的勾配が形成されていることが確かめられた。この堆積物の組成変化は 6 章での、南北方向のトランセクトに従った含水率の変化ともよく対応していた。また、この結果は干潟奥部でのトビハゼの局所的分布や、河川本流付近でのヤマトシジミの高密度分布などの生物分布ともよく一致している。

堆積物のシルト以下の割合は、干潟全体では 17.9% (St. 1) から 85.5% (St. 4) の範囲であった。河川に近い 3 地点 (St. 1, 1', 5') でのシルト以下の成分は  $45.1 \pm 23.6$  (標準偏差) % であった ( $n = 3$ )。これら河川側の地点では、標準偏差から読み取れるように地点間のシルト以下成分含有量のばらつきが大きかった。一方、それ以外の地点では  $81.8 \pm 3.0\%$  となり ( $n = 9$ ) 干潟奥部 (陸側) ほど、シルト以下成分の割合が高いこと、またその組成が極めて均一な堆積物で構成されていることが明らかになった。以上の結果から、河川に近い部分は砂泥質であり、干潟奥部は泥質であることが判明した。

間隙水中の塩分を測定したが、St. 1, 1', 5' といった含水率が低い地点では測定ができなかった (図 5-2)。調査日は日差しが強く快晴で、日中に行なわれたために、干潟表面からの水分の蒸散が盛んであったと思われる。特に St. 7 と St. 8 では塩分が 40PSU を超えていた。このことから、干潟の生物は海洋環境としては極めて高い塩分環境にさらされていることになる。大型の底生生物は、巣穴を作ることによってこの塩分ストレスから回避することが可能であるが、干潟に住む藻類やバクテリアなどの微生物は季節的に、この高塩分に暴露されると考えられる。このことは、干潟に生息する微生物相が高い塩分耐性を維持している可能性を示している。

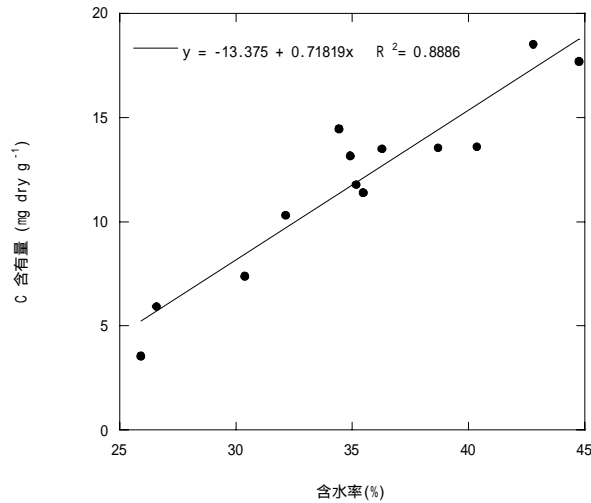


図 5-4 含水率と全有機炭素量の関係

### 5.3.2 化学的特徴

今回測定された全有機炭素量は  $3.6 \text{ mg dry g}^{-1}$  (St. 5') から  $18.5 \text{ mg dry g}^{-1}$  (St. 4') の範囲であった。含水率と全有機炭素量の間強い相関が認められた ( $p < 0.0001$ ) (図 5-4)。つまり、干潟奥部の泥質部分ほど、全有機炭素量が高くなることを示している。また、堆積物の全有機炭素量は炭素同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}$ ) と負の相関を示した ( $p = 0.00024$ ) (図 5-5)。

一方、含水率と堆積物の全窒素量の間には相関が認められなかった (図 5-6)。3つの地点 (St. 1, 2, 2') だけで含水率と比べて全窒素量が高い傾向が認められた。このすべての地点が干潟の西側に位置するという共通点をもっていたが、CN比や全有機炭素量など今回調べた他のすべての環境因子においても特徴が認められず、なぜこれらの地点だけが、他の地点と比較して全窒素量が高かったのかについては今回明らかにすることができなかった。これらの値を除いて含水率と堆積物の全窒素量を比較すると、相関が認められた ( $R^2 = 0.84$ ,  $p = 0.0002061$ )。また、全窒素量と窒素同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}$ ) の間にも相関が認められた ( $R^2 = 0.57$ ,  $p = 0.01155$ )。CN比と含水率の関係を図 5-7 に示した。CN比は含水率が増加するに従って上昇する傾向を示したが、含水率が 35%を超えるとCN比 12 から 14 で変化しなくなるという傾向を示した。また、CN比が 10 以下を示したのは含水率が低く、砂質成分が卓越していた St1, 1', 5' の堆積物だった。これらの地点では有機炭素量が低く、さらに窒素安定同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}$ ) も他の地点と比べて低い値を示した。このように砂質の地点の CN 比が低かった理由のひとつとして考えられるのは、これらの地点では付着藻類のバイオマスが最大であったことである (第 6 章参照)。海産もしくは汽水産のこれらの藻類が多く含まれている場合、CN 比は 6 に向って低下する (Redfield et al., 1963)。またこれらの場所では陸よりの干潟と比べて酸化環境が維持されており (第 6 章参照)、硝化細菌数も多かった。さらに有機炭素量が少ないことから、これらの場所では堆積物表面では主に

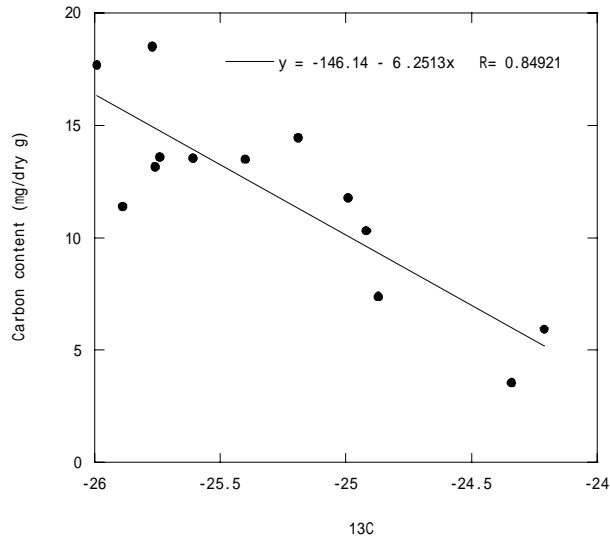


図 5-5 全有機炭素量と炭素同位体比 ( $^{13}C$ ) の関係

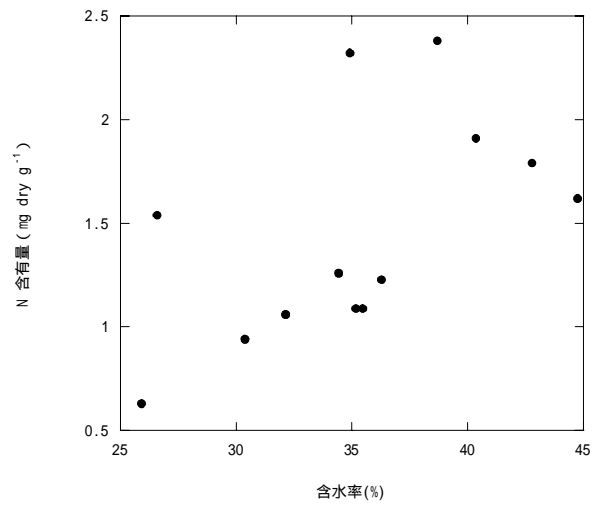


図 5-6 含水率と全窒素量の関係

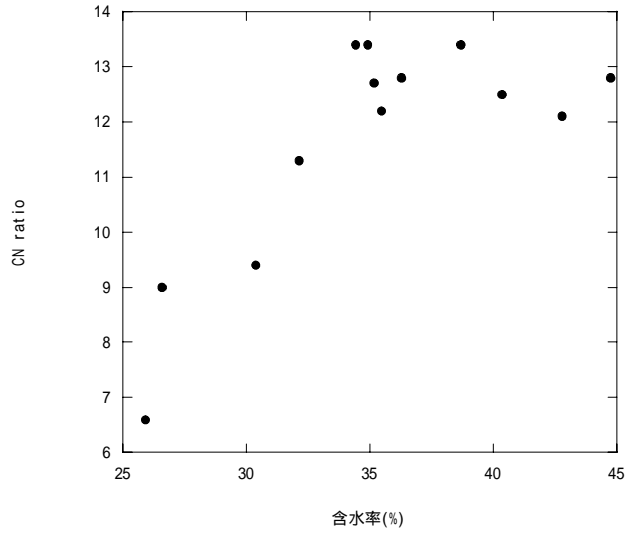


図 5-7 CN 比と含水率の関係

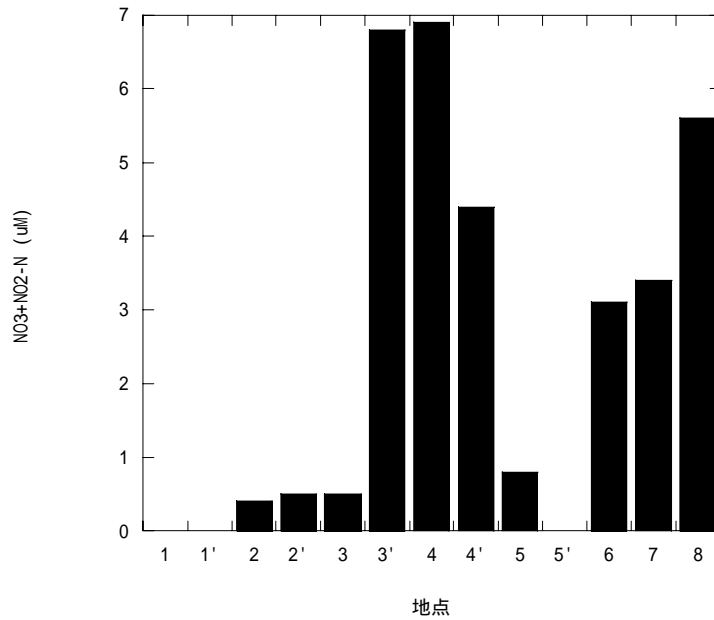


図 5-8 間隙水中の亜硝酸，硝酸濃度  
 値がない地点 (St. 1, 1', 5') は測定していない。



硝化が起こり、若干深い部分で脱窒が起こっていると考えられる。他方、干潟奥部では、堆積物表層で有機物量が多く、還元的であり、硝酸や亜硝酸が間隙水中に存在し（図5-8）、実際に堆積物からの脱窒活性が検出されていることから（第8章参照）、脱窒反応により窒素安定同位体比（ $\delta^{15}\text{N}$ ）が上昇することが予想される。よって、付着藻類や、脱窒といった生物学的プロセスがこれらの窒素安定同位体比に影響を与えていることが推察された。泥質部分は、干潟奥部のヨシ原に近いことから、枯死したヨシ由来の有機物が多く供給されると考えられるが、その場合、炭素安定同位体比の大幅な上昇が考えられる。しかしながら、炭素安定同位体比からは、特に植物体由来の有機物の影響を干潟表面の堆積物が強く受けている証拠は得られなかった。従って、毎年生産されるヨシのバイオマスの多くはヨシ原内で消費されるか干潟から河川により海に運ばれるのだろう。

## 第6章 アンモニア酸化細菌を中心とした細菌の群集動態

### 6.1 緒言

近年，干潟における生態系や水質浄化能力に対する関心の高まりから，多くの保全学的研究が行われており，科学的根拠に基づくデータが必要とされている。多摩川河口干潟は，その河口付近に羽田空港を有している。新滑走路や河口を横切る連絡道路の建設などを伴う空港の再拡張工事により，底質攪乱や水質の悪化が懸念されている。さらに埋立てにより海面積が減少し，閉鎖性水域が増加するとともに，橋脚下では，暗環境が形成されることから，貧酸素化が進行する可能性が指摘されている（汽水域セミナー実行委員会，2007）。したがって，今後干潟生態系が受ける環境影響は小さいとは言えず，干潟保全の観点から学術的な知見が必要である。

干潟が持つ浄化機能の一つとして硝化・脱窒反応が挙げられる。水深が浅く，活発な生物活動と海水交換が起こる干潟では，硝化細菌には十分なアンモニアが，脱窒細菌には十分な硝酸性窒素が供給されるために，他の海域と比べ，高い硝化・脱窒速度が期待される。

本研究では，水質浄化機能としての硝化反応に着目し，その硝化反応の最初の段階（ $\text{NH}_4^+$   $\text{NO}_2^-$ ）を担うアンモニア酸化細菌に焦点を当てることにした。多摩川河口干潟の泥質に関する環境因子の測定，硝化ポテンシャルの測定，アンモニア酸化細菌の定量・群集構造解析を通して，窒素循環に寄与するアンモニア酸化細菌群の解析を行うことを目的とした。

### 6.2 調査地点・方法，実験方法

#### 6.2.1 調査地点

調査地点は多摩川河口域で，背後にヨシ群落を持つ河口干潟である。面積は約 14.3 ha であり，東京都側と神奈川県側の 2 箇所に干潟が存在する。東京都側の干潟は，河口より約 3 km 上流，大師橋の上流に位置している。また神奈川県側の干潟は東京都側よりも下流に位置し，河口より約 2.5 km 上流，大師橋よりも下流に位置している。本研究では，干潟前面

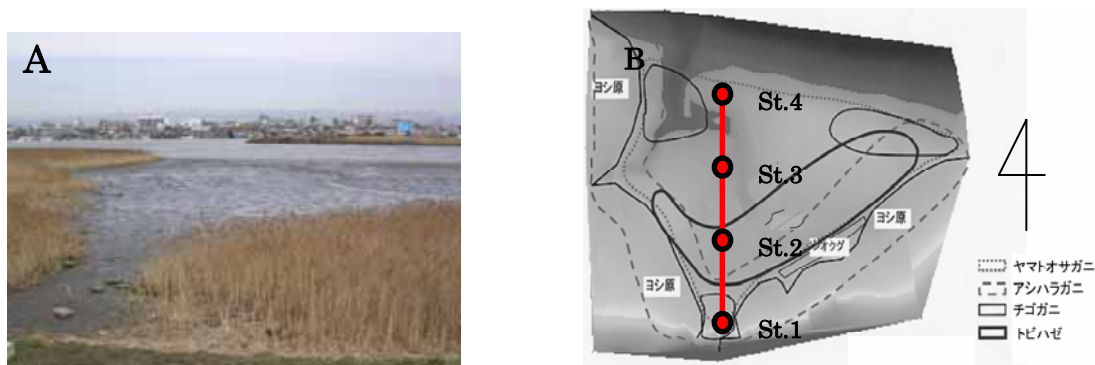


図 6-1 調査地点の写真 (A) と干潟上のトランセクト図 (B)

図 (B) は，玉上ら (2004) を一部改変。干潟上には，ヤマトオサガニ，アシハラガニ，チゴガニ，トビハゼ等が生息しており，干潟の周囲はヨシ群落で囲まれている。

に浮島が存在し、豊富な海洋生物が見られる神奈川県側の干潟を調査対象とした(図 6-1A)。2006 年 5 月 12 日の調査で、陸側から河川側に向けて南北方向に 20 m 間隔で 4 本の杭を打ち、St.1~4 として、水平分布を調査する上でのトランセクトを計画した(図 6-1B)。

### 6.2.2 泥質分析

St.1~4 において、含水率、強熱減量、生菌数、硝化活性ポテンシャル測定用として、表層 0-1 cm の泥をスパーテルで 25 ml の遠心管もしくは 50 ml の遠心管に詰め、冷蔵保存した。また、全菌数測定用として、1 ml の泥を 1 ml の中性ホルマリン(マイルドホルム 20 N)と 8 ml の滅菌濾過海水の入った 10 ml 遠心管に採取した。さらに核酸抽出用として、25 ml 遠心管に詰め、冷凍保存した。また、各地点の表層泥を採取し、pH/ORPメータ(TPX-90Si; TOKO Chemical Laboratories)を使用し、泥温、pH、ORP(酸化還元電位)を測定した。実験室では採取した泥を使用し、含水率と強熱減量を測定した。含水率を求めるためにガラスシャーレに 1 ml の泥を採取し、小型電気炉(AS ONE)で 110°C、48 時間乾燥させた。その後、泥の乾燥重量に含まれる有機物量を 550°C で 6 時間燃焼させることで、強熱減量(IL; ignition loss)を算出した。またキノンを測定するために、泥試料からクロロホルム・メタノール混合液(2:1, v/v)によりキノンを抽出した。抽出したキノンをヘキサンに再抽出した後、Sep-Pak plus silica(Waters)を用いて、UQ(ubiquinone)とMK(menaquinone)を分離、精製した。フォトダイオードアレイ検出器付きの高速液体クロマトグラフ(SPD-M10Avp, Shimadzu)を用い、逆相分配型のODSカラム(Capcell Pak C18 MG II φ4.6 mm×150 mm; Shiseido fine chemicals)、移動相メタノール・ジイソプロピルエーテル(9:1.5, v/v)、流量 1 ml min<sup>-1</sup>、カラム温度を 35°C とした。キノンの定量には定量用標準物質としてUQ-10を用いた。各キノンの定量にはピーク面積を用い、UQとMKでそれぞれ 275 nm・270 nm で検出した。分子種の同定は、種々の微生物から抽出した既知のUQ、MKなどの混合液の溶出時間との比較と、フォトダイオードアレイ検出器によるスペクトルの確認によって行った。微生物量をキノン量で表示する際に、UQとMKは従属栄養細菌が保有するキノンであり、PQ-9(plastoquinone 9)とVK1(vitamin K1)は藻類及び光合成細菌が保有するキノンであることから、従属栄養細菌の量をUQ+MK量、藻類及び光合成細菌の量をPQ-9+VK1量とみなした。異なるサンプル間や経時的なキノンプロファイルの変化を定量化する手法として非類似度*D*を算出した。

$$D(i, j) = \frac{1}{2} \sum_{k=1}^n |f_{ki} - f_{kj}| \quad (1)$$

$f_{ki}$ ,  $f_{kj}$  は、サンプル  $i$  と  $j$  のキノン種  $k$  のキノン存在割合を表し、非類似度を用いることで、2 つの微生物相のキノンプロファイルにおける相違を数値的に解析することが可能である。菌体キノンを分析した場合、キノンプロファイル間の非類似度が 0.1 以上であれば、97% の信頼区間で異なるキノンプロファイルであるとみなせる(Hu et al., 1999)。非類似度をもとに、クラスター分析を行うことで類別化を行った。クラスター分析には、統計解析ソフ

ト StatPartner/V4 フルパック for Excel (O-ha, Inc) を用いた (國弘ら, 2005)。

### 6.2.3 蛍光顕微鏡による全菌数の測定

現場で採取し 10 倍希釈した堆積物試料を実験室へ持ち帰り, 卓上型超音波洗浄器 (B1510J-MT; BRANSON) で 5 分間インキュベートすることで, 泥粒子に付着した細菌を分散させた。その後, 10  $\mu$ l の試料に超純水を 1 ml 加え (100 倍希釈), 核酸染色剤 (DAPI; 4', 6-diamidino-2-phenylindole) を 1  $\mu$ l 入れた。5 分間反応後, 全量を 0.2  $\mu$ m のブラックフィルター (ISOPORE membrane filters, 0.2  $\mu$ m GTTP, Millipore) で濾過し, 試料をスライドガラスにマウントした。落射型蛍光顕微鏡 (BX51; Olympus) を用いて U 励起下で観察した。計数は 3 連でそれぞれ 10 視野について行った。

### 6.2.4 MPN (most probable number) 法によるアンモニア酸化細菌生菌数の測定

分散処理した試料 1 ml に滅菌濾過海水 9 ml を加え希釈した。マイクロタイタープレートに ATCC1953 培地を 50  $\mu$ l ずつ注入し, アンモニア酸化細菌の培地とした。この培地に, 希釈試料を 50  $\mu$ l ずつ加え段階希釈し, 3 週間, 20°C, 暗条件で静置培養した。培養後, 亜硝酸検出試薬 (Lampe, 1981) を加え陽性反応が起こったウェルを確認した。最も陽性反応のある列を P1, P1 の隣の列を P2 (P1 の次に陽性反応が多い列), P2 の隣の列を P3 (一番陽性反応の少ない列) とし, MPN 表から MPN 値を求め, アンモニア酸化細菌の定量を行った (Rowe et al., 1977)。

### 6.2.5 硝化活性ポテンシャルの測定

500 ml の三角フラスコに多摩川底層水 (GF/F 濾過済み) 240 ml, St.1 と St.4 で採取した試料 (8 月サンプリング時) 60 cm<sup>3</sup> を添加したもの (溶媒 : 溶質 = 4 : 1) を用意し, 三角フラスコに攪拌子を入れ, ゴム栓でふたをし, 好気条件下で攪拌を開始した。15 分後に採水を行い 実験開始時のデータとした。その後 120 分間隔で, 栄養塩分析用試水 25 ml を採取した。試水は, 4°C, 2,000 g で 5 分間遠心分離し, 0.2  $\mu$ m のシリンジフィルターでろ過後, チューブに保存した (-20°C で凍結保存)。サンプリング終了後, 希釈し (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> は 10 倍希釈, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> は 2 倍希釈), 携帯用多項目迅速水質分析計 DR/2400 (HACH) を用いて無機態窒素濃度 (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) の測定を行った。

### 6.2.6 堆積物からの DNA 抽出

2006 年 8 月に St.1 ~ 4 で泥試料を採取した。DNA 抽出は, ISOIL for Beads Beating (ニッポンジーン) の標準プロトコールに従った。収集した約 0.6 g の泥試料を Beads tube に入れ, 950  $\mu$ l の Lysis Solution BB と 50  $\mu$ l の Lysis Solution 20S を添加した。ビーズ破砕を 4 ~ 6 m 秒<sup>-1</sup>, 30 秒 ~ 45 秒間行った。遠心分離を 12,000 g, 1 分, 室温の条件下で行った。600  $\mu$ l のクロロホルムを添加し, 15 秒間ボルテックスした後 遠心分離 (12,000 g, 15 分, 室

温)を行った。中間層を入れないように注意しながら,水層 800  $\mu$ lを新しいプラスチックチューブに移し,800  $\mu$ lのPrecipitation solutionを添加して,十分に混合し,遠心分離 (20,000 g, 15 分, 4°C) を行った。上澄み液を捨て, Wash Solutionを 1 ml加えて数回転倒混和し,遠心分離 (20,000 g, 10 分, 4°C) を行った。上澄み液を捨て, 1 mlの 70%エタノールと 2  $\mu$ lのEthachinmateを加えた後,遠心分離 (20,000 g, 5 分, 4°C) を行った。上澄み液を捨て,風乾した後,沈殿を 50  $\mu$ lの滅菌ミリQ水に溶解した。超微量分光光度計Nano Drop ND-1000 で抽出されたDNA濃度を測定した。抽出したDNAは, -20°Cで保存した。

### 6.2.7 *amoA* 遺伝子の PCR (polymerase chain reaction) 増幅

T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism analysis) 解析のため, *Betaproteobacteria* に属するアンモニア酸化細菌由来の *amoA* 遺伝子 (491 bp) を標的としたプライマー (Rotthauwe et al., 1997) , *amoA*-1F (5'-GGG GTT TCT ACT GGT GGT-3') (FAM で蛍光標識) , *amoA*-2R (5'-CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC-3') を使用し PCR 増幅を行った。PCR 増幅における反応液は, 10 $\times$ バッファー, 各プライマー (10  $\mu$ M) , 鋳型 DNA (20 ng) dNTPs , *EX Taq* DNA polymerase (TAKARA) , 全量が 20  $\mu$ l になるように調製した。PCR の反応条件は, (94°C, 3 分 : 熱変性) + (94°C, 30 秒 : 熱変性 + 52°C, 30 秒 : アニール + 72°C, 30 秒 : 伸長反応)  $\times$  35 サイクル + (72°C, 10 分 : 伸長反応) とし (Urakawa et al., 2006) , 1%のアガロースゲル電気泳動により PCR 産物の存在を確認した。同様にクローニングのため, 2006 年 8 月に St.4 で採取した泥試料から抽出した DNA を用いて, アンモニア酸化細菌由来の *amoA* 遺伝子 (491 bp) を *amoA*-1F, *amoA*-2R のプライマーを使用し PCR 増幅を行った。PCR 反応から電気泳動に夜バンドの確認までの作業は T-RFLP 解析の場合と同様に行った。

### 6.2.8 T-RFLP 解析

制限酵素である *Aci*I (New England Biolabs, Beverly, MA) を用いて (Bernhard et al., 2005) , 制限酵素処理 (37°C, 120 分) を行い, PCR 増幅産物を断片化した。その後, 0.4  $\mu$ l の GeneScan -500 の LIZ standard と, 12  $\mu$ l のホルムアミドを混合し, 94°C, 3 分間の条件で熱変性させ, 即座に冷却した。T-RFLP 法による解析は, シーケンサー (ABI PRISM 3100-Avant DNA Genetic Analyzer; Applied Biosystems) を用いて, Genescan モードで行った。Terminal-restriction fragments (T-RFs) の大きさを決定する際, 50 bp 以下の大きさのものは取り除き, T-RFs の大きさの割合は, 総ピークエリアにおける各ピークエリアから (1%以上) 算出した。また非類似度を算出する数値解析を BioCLUST によって行った (Iwasaki & Hiraishi, 1998) 。さらに Tree View を用いて, 近隣結合法 (NJ; neighbor-joining) により, 非類似度に基づくデンドログラムを作成した (Page, 1997) 。

### 6.2.9 クローニング及び塩基配列の決定

各々のPCR増幅産物を，TOPO-TA cloning kitに付属のcloning vector pCR2.1 にライゲーションした。インサートDNAを取り込んでいる白色コロニーは，LB培地（100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ のアンピシリンを含む）に移し，37°Cで一晩培養し，4°Cにて暗室保存した。白色コロニーを選択して，M13 ベクタープライマーを使って，コロニーPCR反応により，目的とするインサートDNAのスクリーニングを行い，増幅サイズと増幅産物の品質を確認した。コロニーPCR反応における反応液は，10×PCRバッファー，dNTPs，プライマー（10  $\mu\text{M}$ ），テンプレートDNA，*EX Taq* DNA polymerase (TAKARA)，全量が20  $\mu\text{l}$ になるように調製した。コロニーPCR反応におけるサーマルサイクル条件は，（95°C, 1分：熱変性）+（95°C, 10秒：熱変性 + 55°C, 10秒：アニーリング + 72°C, 30秒：伸長反応）×40 サイクル +（72°C, 1分：伸長反応）とした。次にM13 ベクタープライマーによって目的の増幅サイズが確認された増幅産物をExo SAP-ITにより精製した。精製した増幅産物に対して，Big Dye Terminal v3.1 を用いて，M13Fベクタープライマーを使用し，サイクルシーケンスを行った。続いてエタノール沈殿操作により，過剰なdye terminatorを除去した後，キャピラリーシーケンサー（ABI 3100; PE Applied Biosystems）によって，最終産物のシーケンスを行った。

#### 6.2.10 系統解析

*Betaproteobacteria* に属するアンモニア酸化細菌由来の *amoA* 遺伝子断片の系統学的類似性を調べるために，nucleotide-nucleotide BLAST を使用し，データベースと比較した (Altschul et al., 1990)。データベースと高い相同性があったクローンの塩基配列を目視で編集し，マルチプルアライメントを行った。アライメントした *Betaproteobacteria* に属するアンモニア酸化細菌由来の *amoA* 遺伝子の452 bp（150 アミノ酸に相当する）の領域においてMEGA ver3.1 を用いて系統解析を行なった。同試料から得たアミノ酸配列において，アミノ酸残基が完全に同一のものをグループ化した。遺伝的距離の計算にJTT アミノ酸置換モデルを使用し，アミノ酸配列に基づいた系統樹作成に近隣結合法を用いた。さらに樹形の確からしさの評価のためにブートストラップ確率を求めた。

### 6.3 実験結果

#### 6.3.1 各サンプリング地点間の環境勾配

##### 6.3.1.1 含水率

St.1～4における含水率を示す（図 6-3A）。陸側である St.1 では， $36.6 \pm 0.8\%$ で4地点において最も大きい値を示し，河川に近い St.4 では  $27.9 \pm 0.8\%$ で最も小さい値を示した。St.1 から St.4 へ向かうに従い，含水率は下がる傾向があり，この傾向は季節を問わず一定であった。また，各地点において，夏に近づくにつれ含水率の差は小さくなった。

##### 6.3.1.2 強熱減量

St.1～4における強熱減量(IL)を示す(図6-3A)。陸側であるSt.1では、 $5.2 \pm 0.2\%$ で4地点において最も大きい値を示し、河川側に近いSt.4では、 $3.3 \pm 0.2\%$ で最も小さい値を示した。St.1からSt.4へ向かうに従い、強熱減量は下がる傾向があり、この傾向は季節を問わず一定であった。4地点全てにおいて5月のサンプルで最も大きい値を示した。またSt.2, St.3, St.4では、6月のサンプルで最も小さい値を示し、St.1では、10月のサンプルで最も小さい値を示した。

### 6.3.1.3 pH

St.1～4におけるpHを示す(図6-3B)。陸側であるSt.1では、 $7.1 \pm 0.1$ で4地点において最も小さい値を示し、河川側に近いSt.4では、 $7.6 \pm 0.1$ で最も大きい値を示した。St.1からSt.4へ向かうに従い、pHは上昇する傾向があることが確認された。

### 6.3.1.4 ORP

St.1～4におけるORPを示す(図6-3B)。陸側であるSt.1では、 $22 \pm 40$  mVで4地点において最も小さい値を示し、河川側に近いSt.4では、 $159 \pm 9$  mVで最も大きい値を示した。St.1からSt.4へ向かうに従い、ORPは上昇する傾向があることが確認された。特にSt.1と他の3地点(St.2, St.3, St.4)の差が大きいことが分かった。

### 6.3.1.5 全菌数

St.1～4における全菌数を示す(図6-3C)。陸側であるSt.1では、 $1.4 \times 10^9 \pm 0.29 \times 10^9$  cells  $\text{cm}^{-3}$ で4地点において最も大きい値を示し、河川側に近いSt.4では、 $0.93 \times 10^9 \pm 0.20 \times 10^9$  cells  $\text{cm}^{-3}$ で最も小さい値を示した。St.1からSt.4へ向かうに従い、全菌数は下がる傾向があることが確認された。

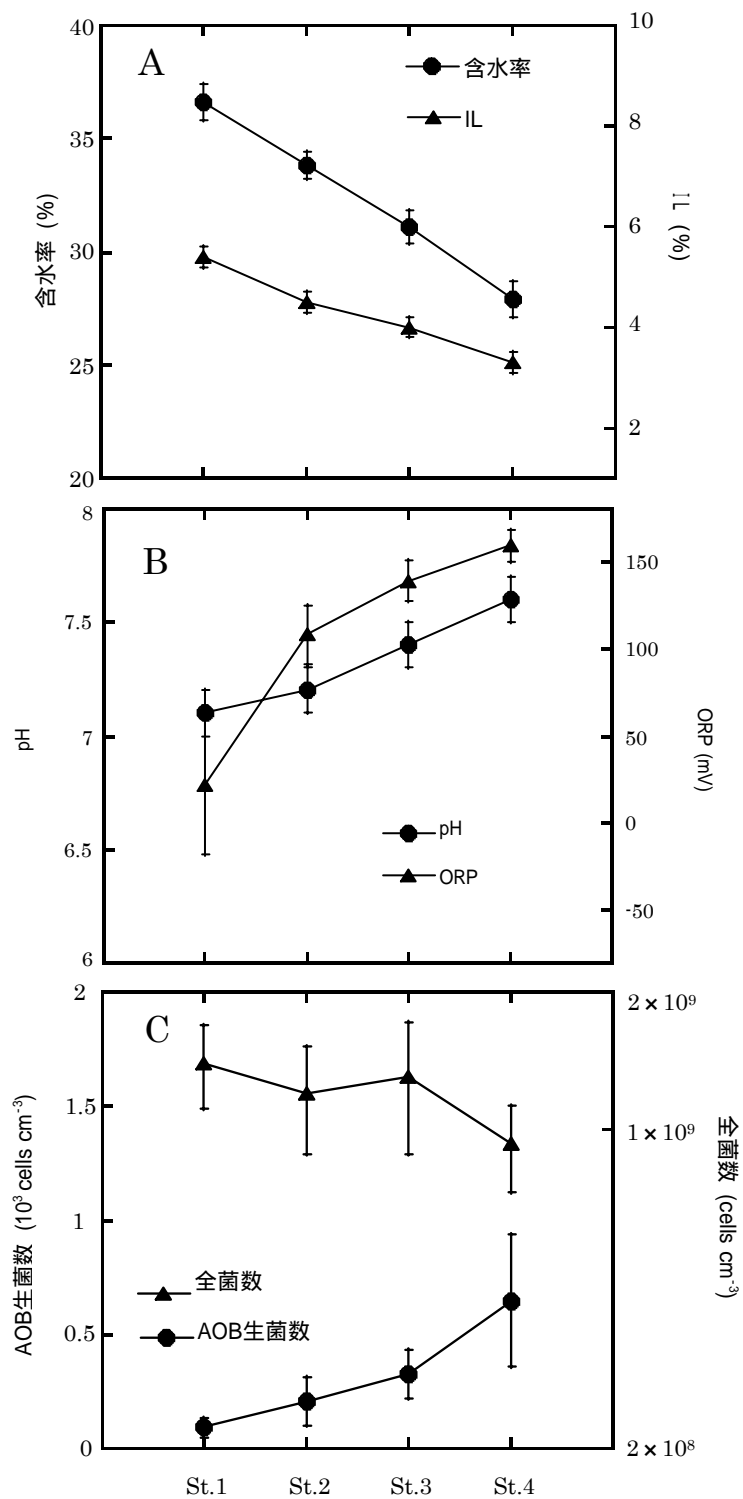
### 6.3.1.6 AOB生菌数

St.1～4におけるAOB生菌数を示す(図6-3C)。陸側であるSt.1では、 $0.91 \times 10^2 \pm 0.44 \times 10^2$  cells  $\text{cm}^{-3}$ で4地点において最も小さい値を示し、河川側に近いSt.4では、 $6.47 \times 10^2 \pm 2.9 \times 10^2$  cells  $\text{cm}^{-3}$ で最も大きい値を示した。St.1からSt.4へ向かうに従い、AOB生菌数は上昇する傾向があることが明らかになった。

### 6.3.1.7 キノン分析

St.1～4における、非類似度に基づく細菌(UQ+MK)及び、底生微細藻類(PQ-9)の群集構造の比較を示す(図6-3D)。St.1と4では非類似度が約0.2となり、群集構造に違いが認められた。St.1～4のキノンは、UQ+MKがそれぞれ、0.52, 0.41, 0.37, 0.36 nmol  $\text{g}^{-1}$ であり、St.1で多く、St.4で少ない値を示し、St.1では、St.4に比べ、細菌現存量が大きいことが確認された。またPQ-9はそれぞれ、0.36, 0.24, 0.34, 0.53 nmol  $\text{g}^{-1}$ であり、

St.4 で最も多くなり底生微細藻類の現存量が大きいことが確認された。さらに, St.1~4 におけるキノン存在比 (UQ/MK) は, それぞれ, 1.57, 1.17, 1.29, 1.28 であった。





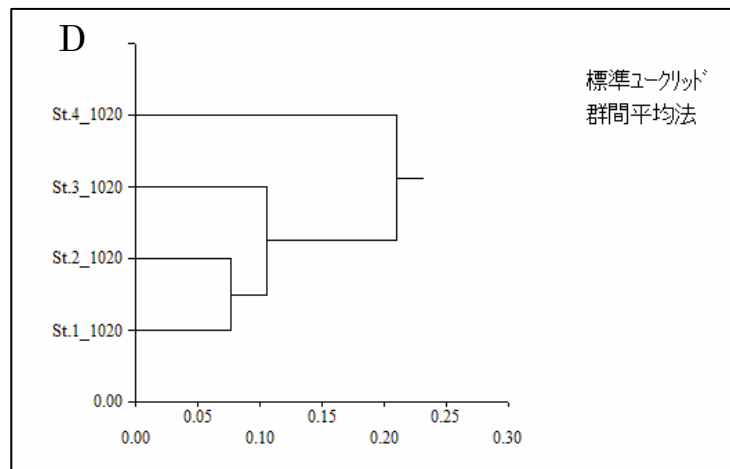


図 6-3 各地点における含水率と IL (A) , pH と ORP (B) , AOB 生菌数と全菌数 (C) , 非類似度に基づく細菌 (UQ+MK) 及び底生微細藻類 (PQ-9) の群集構造の比較 (D)

含水率, IL は  $n = 18$  , pH, ORP, 全菌数は  $n = 15$  , AOB 生菌数は  $n = 12$  , 値は年間平均値  $\pm$  標準誤差を示す。

### 6.3.2 硝化活性実験

堆積物の硝化ポテンシャルを測定した。St.1 及び St.4 における栄養塩の経時変化をそれぞれ図 6-4 に示す。St.1 と St.4 とともに攪拌開始直後から 6 時間でアンモニアの消費と亜硝酸の生成が起こった。また、攪拌開始 2 時間後から 6 時間後にかけて、硝酸の生成が起こった。亜硝酸濃度の変化が最大の部分からアンモニア酸化速度を算出したところ、St.1 では  $0.38 \mu\text{g cm}^{-3} \text{h}^{-1}$  , St.4 では  $0.24 \mu\text{g cm}^{-3} \text{h}^{-1}$  という値を示した。また硝酸濃度の変化が最大の部分から亜硝酸酸化速度を算出したところ、St.1 では  $1.71 \mu\text{g cm}^{-3} \text{h}^{-1}$  , St.4 では  $0.62 \mu\text{g cm}^{-3} \text{h}^{-1}$  という値を示した。さらに亜硝酸濃度と硝酸濃度を加えたものを  $\text{NO}_x$  濃度とし、 $\text{NO}_x$  濃度の変化が最大のところから硝化速度を算出した。St.1 の試料では、攪拌開始 2 時間から 4 時間の間で最も傾きが最大となり、硝化速度は  $2.01 \mu\text{g cm}^{-3} \text{h}^{-1}$  であった。一方、St.4 の試料では、攪拌開始 4 時間から 6 時間の間で最も傾きが最大となり、硝化速度は  $0.63 \mu\text{g cm}^{-3} \text{h}^{-1}$  であった。したがって、St.1 の底泥の方が、St.4 のそれよりも硝化活性ポテンシャルは約 3 倍大きい結果となった。

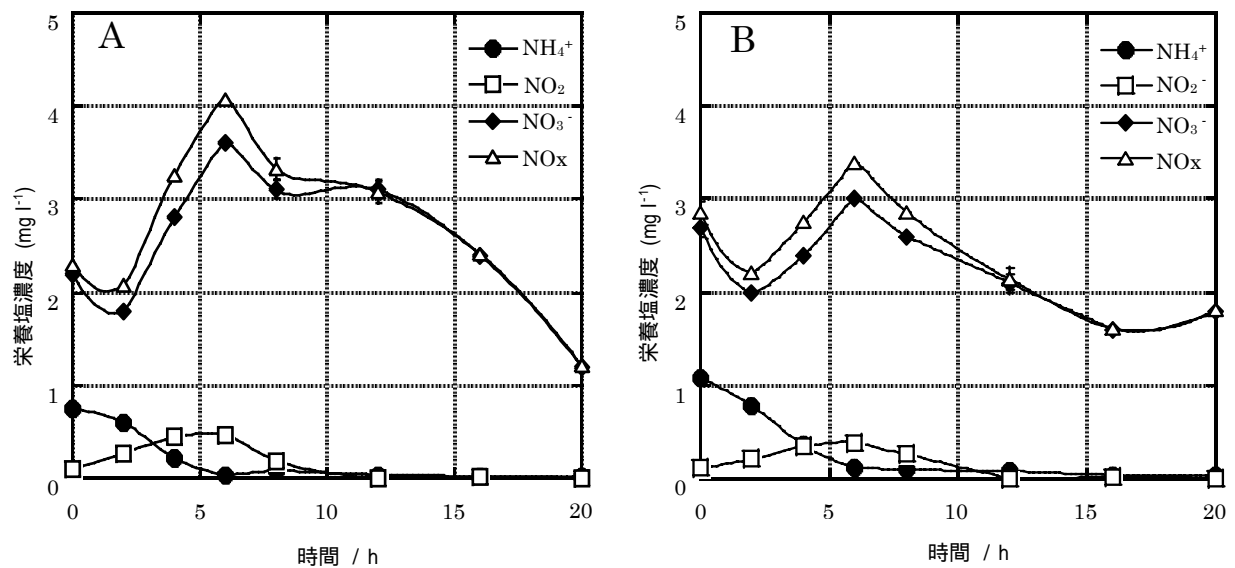


図 6-4 多摩川河口干潟で採集した堆積物の硝化ポテンシャル測定

(A) St.1, (B) St.4  $n = 3$ , 値は平均値  $\pm$  標準誤差を示す。

### 6.3.3 細菌群集構造解析

#### 6.3.3.1 T-RFLP 法による細菌種の比較

T-RFLP 解析により得られたピーク面積が, St.1~4 における細菌群集に占める割合を算出したものを図 6-5 に示す。St.1~4 において, 192 bp, 331 bp のピークに帰属する細菌種の割合が多く, 192 bp は約 60%, 331 bp は約 28%を占めていることがわかった。また St.4 では, 403 bp のピークを持つ細菌種の割合も多く, 約 16%を占めていた。このことから, St.4 においては, 他の地点より菌種が多いことが示唆される。また T-RFLP 解析により得られた各地点における, 非類似度に基づく細菌群集構造の比較を図 6-6 に示す。St.1 と St.2 で最も類似性が高く (29.0%), また St.3 は他の地点と比較し, 群集が異なることが確認された。

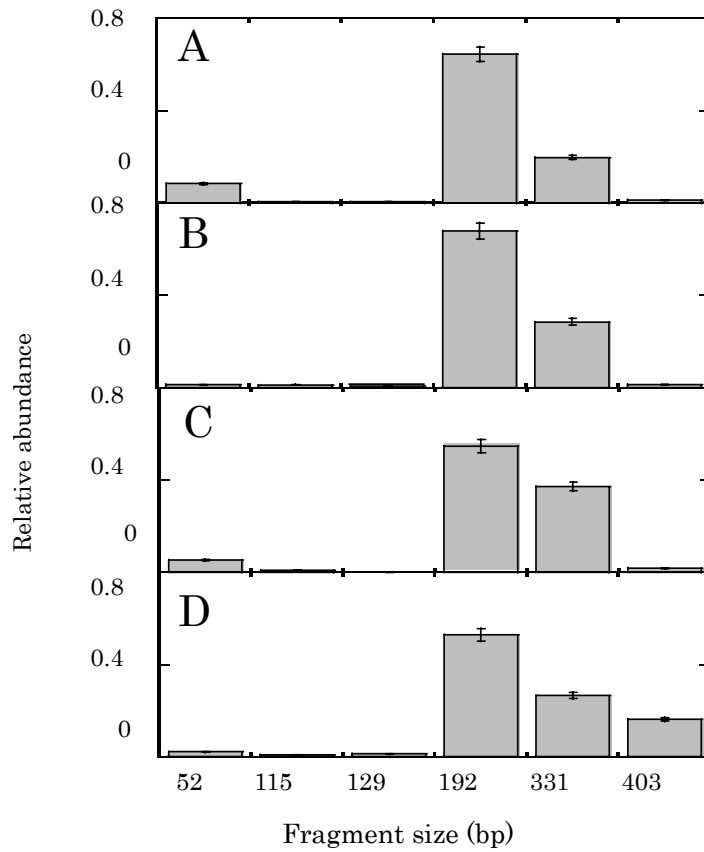


図 6-5 *amoA* 遺伝子の T-RFLP 解析に基づく AOB 群集プロフィール

(A) St.1, (B) St.2, (C) St.3, (D) St.4  $n = 4$ , 値は平均値  $\pm$  標準誤差を示す。

表 6-1 *amoA* 遺伝子の T-RFLP 解析に基づく AOB 群集の非類似度

サンプリング地点	St.1	St.2	St.3	St.4
St.1	-			
St.2	29.0	-		
St.3	51.6	61.3	-	
St.4	33.5	36.6	58.9	-

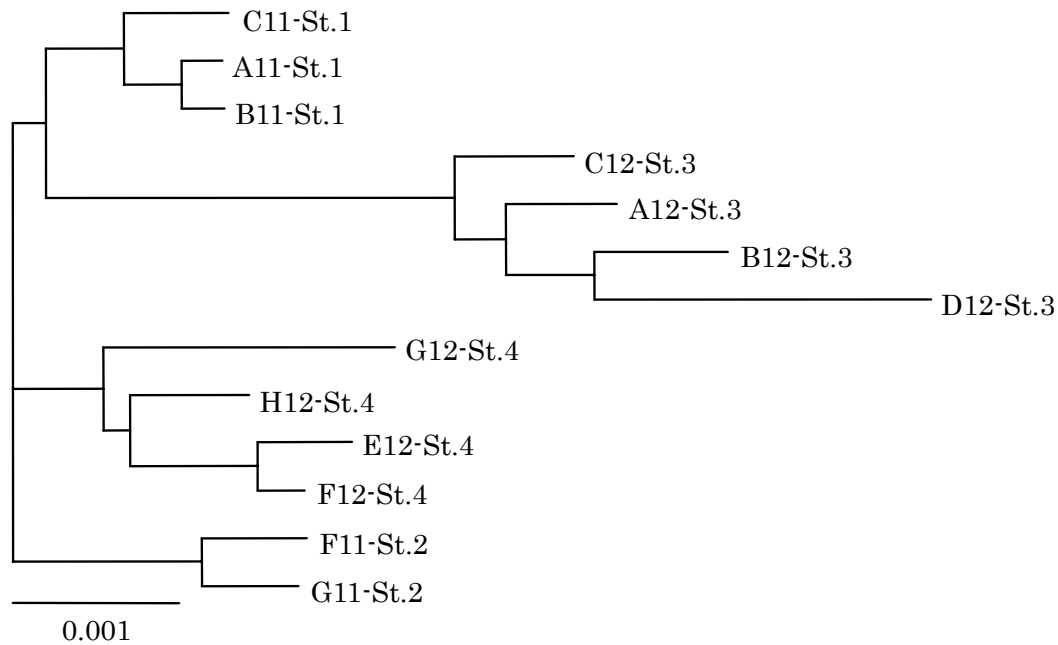


図 6-6 *amoA* 遺伝子の T-RFLP 解析に基づく AOB 群集のクラスター分析

### 6.3.3.2 クローニングによる細菌種の同定

T-RFLP の結果から、検出された T-RFs が多かった St.4 のサンプルを用いて遺伝子ライブラリーを作成し、塩基配列を決定後、系統解析を行った (図 6-7)。48 個のクローンが得られ、192 bp のピークに帰属する菌種のクローン 26 個のうち、23 個のクローンは、*Nitrosomonas*-like に属するものであり、3 個のクローンは *Nitrosomonas oligotropha*-like に属するものであると推定された。また、331 bp のピークに帰属する菌種のクローンは 5 個得られ、そのうちの 4 個のクローンは、*Nitrosomonas*-like に属するものであり、1 個のクローンは *Nitrosomonas oligotropha* に近いものであった。さらに St.4 で多く検出された 403 bp のピークを持つ細菌種のクローンは 3 個得られ、*Nitrosomonas*-like に属するものであると考えられる。TT-ST4-11 クローンや、TT-ST4-92 クローンは、*Nitrosomonas* sp.Nm143 のグループに属した。以上のことから多摩川河口干潟では、多様なアンモニア酸化細菌種がアンモニア酸化に関わっている可能性が示された。

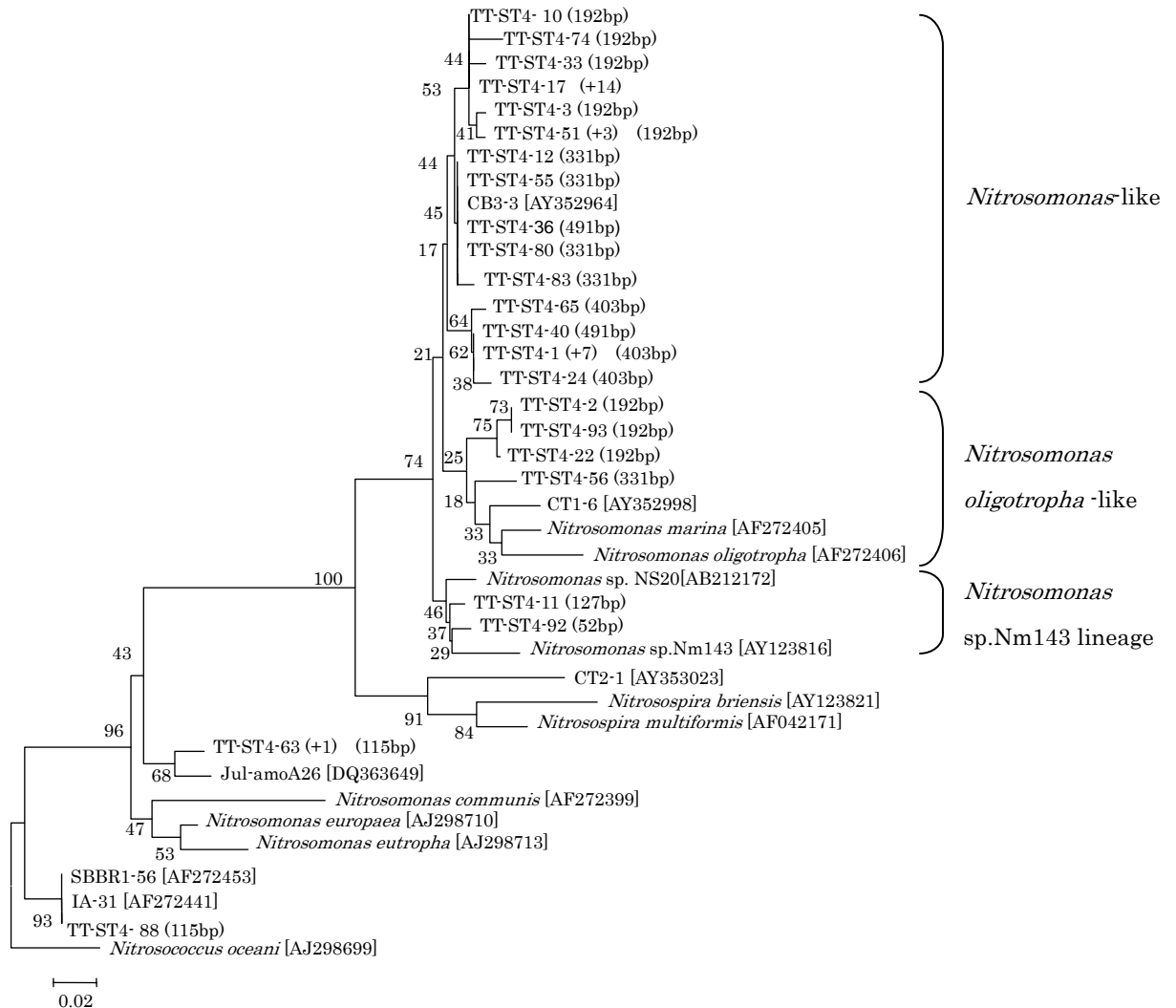


図 6-7 *amoA* 遺伝子 (452 bp) に基づく NJ 系統樹 (St. 4)

同一の塩基配列を示したクローン数と制限酵素切断パターン予測により得られた T-RFs を括弧内に示す。またブーツストラップ値を示す。

## 6.4 考察

### 6.4.1 各サンプリング地点間の環境勾配

多摩川河口干潟は、小さい面積であるにも関わらず砂質部分と泥質部分を兼ね備えた干潟であり、生息している生物も多様であるため、環境勾配の比較・検討を念頭に置いた調査に好都合である。

含水率、強熱減量、全菌数に関しては、St.1 で最も大きい値を示し、St.4 で最も小さい値を示した。これは、St.1 では泥質成分が卓越している一方で、St.4 では砂質成分が卓越していることと関係していると考えられる。泥は砂と比べ、粒形が小さく、間隙水を多く含んでおり、含水率は大きくなる傾向がある。さらに泥粒子に吸着している有機物が多くなると、それを利用する細菌数も増加することから、全菌数の値も高くなる。Kuwaie and Hosokawa (1999) により、三浦半島、三崎に位置する泥質干潟では、含水率が  $45.3 \pm 0.4\%$ 、全菌数が  $2.61 \times 10^9 \pm 0.15 \times 10^9 \text{ cells g}^{-1}$  であり、木更津北西に位置する砂質干潟（盤洲干潟）では、含水率が  $25.3 \pm 0.4\%$ 、全菌数が  $0.87 \times 10^9 \pm 0.03 \times 10^9 \text{ cells g}^{-1}$  であると報告されている。St.1 では、含水率が  $36.6 \pm 0.8\%$ 、全菌数が  $1.4 \times 10^9 \pm 0.29 \times 10^9 \text{ cells cm}^{-3}$  であり、St.4 では、含水率が  $27.9 \pm 0.8\%$ 、全菌数が  $0.93 \times 10^9 \pm 0.20 \times 10^9 \text{ cells cm}^{-3}$  であったことから、多摩川河口干潟は、泥質干潟と砂質干潟の中間的な性質を備えた砂泥質の干潟であるといえる。

また、pH、酸化還元電位に関しては、St.1 で最小値を示し、St.4 で最大値を示した。これは、St.1 では、St.4 に比べ菌数が多いため、好気呼吸による酸素消費量が多く、より還元的な環境を形成しやすく、二酸化炭素の排出量も多くなることから、それが水に溶けることで、pH の値も低下していると考えられた。キノン分析の結果からも UQ/MK のキノン存在比が St.1 で最も大きい値を示したことから細菌による好気呼吸が活発であることが示唆された。一方、St.4 では PQ-9 の値が最も大きい値を示したことから底生微細藻類の現存量が多く、光合成量も豊富であることが示唆され、酸化的な環境が形成されていると考えられる。また、St.1 では、St.4 に比べ、トビハゼやアシハラガニなどの干潟の生物が多数生息していることから、このようなベントスの生物活動も、pH と酸化還元電位の低下に関係していると思われる。したがって、St.1 は最も陸側に位置していることから、St.4 と比べ、干出時間が長く大気からの酸素の供給量が多いにも関わらず、生物による代謝活動の影響が大きく、還元的な環境が形成されやすいことが示された。

アンモニア酸化細菌(AOB) の生菌数 (MPN 値) に関しては、St.1 で最も小さい値を示し、St.4 で最も大きい値を示した。Montuelle et al. (2003) は、アンモニア酸化細菌数 (MPN 値) は有機物含有量と正の相関があると報告している。これは、アンモニウムイオンが泥粒子に吸着されやすく (Wyer, 1988)、有機物粒子の表面に留まりやすい性質を持っているためであると考えられる (Gresikowski et al., 1996)。しかし、本研究では、有機物を多く含んだ St.1 よりも、有機物量の少ない St.4 の方が AOB 生菌数の数が多いという結果を得た。したがって、AOB 生菌数に影響を及ぼす環境因子は、堆積物中の有機物含有量だけで決まるわけではなく、他の環境因子も関与していると言える。

#### 6.4.2 硝化活性ポテンシャルの測定

左山 (2005) は、有明海の表層泥 (0-5 mm) を用いた硝化ポテンシャル測定により、アンモニア酸化速度は  $1.10 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ 、亜硝酸酸化速度は、 $9.93 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ 、であると

報告している。本研究では、アンモニア酸化速度に関して、泥質成分が卓越したSt.1 が、 $27.2 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ 、砂質成分が卓越したSt.4 では、 $17.0 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ であった。また亜硝酸酸化速度に関しては、それぞれ、 $122.1 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ 、 $44.5 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ であった。多摩川河口干潟のアンモニア酸化速度は有明海のそれと比較し、約 20 倍大きい値を示し、亜硝酸酸化速度は、砂質成分が豊富なSt.4 では、約 5 倍大きい値を示し、泥質成分が豊富なSt.1 では、約 10 倍大きい値を示した。したがって、多摩川河口干潟は、有明海に比べ硝化活性が高いことが確認された。また亜硝酸酸化速度がアンモニア酸化速度を上回っていることも左山 (2005) の結果と一致していた。

硝化活性速度を決定付ける環境因子について、Montuelle et al. (2003) は、硝化活性ポテンシャルは有機物含有量と正の相関があり、有機物含有量が多いほど硝化活性ポテンシャルが高いが、硝化細菌の菌数とは相関が認められないと報告している。本研究では、泥質成分が卓越し、有機物含有量がより多い St.1 の方が、St.4 よりもアンモニア酸化速度と亜硝酸酸化速度は高い値を示したことから、Montuelle et al. (2003) の知見と同じ傾向を示した。また、アンモニア酸化細菌生菌数については、St.1 よりも St.4 の方が、約 7 倍大きい値となっており、多摩川河口干潟の堆積物において、アンモニア酸化細菌による亜硝酸生成速度が菌数に依存している可能性は低いと考えられる。したがって、硝化活性のポテンシャルに影響を及ぼす環境因子が他に存在し、今後それらについて調べていく必要がある。

#### 6.4.3 細菌群集構造解析

今回得られたクローンは主に、Francis et al. (2003) が定義する、*Nitrosomonas*-like と *Nitrosomonas oligotropha*-like に属するものであった。これらは Chesapeake 湾や Plum 島の干潟堆積物から得られたクローンと近縁で、干潟や浅海域の堆積物の代表的なアンモニア酸化細菌グループだと言える (Francis et al., 2003; Bernhard et al., 2005)。系統的に他とは異なる特徴をもっていた TT-ST4-88 クローンは排水処理汚泥から得られた SBBR1-56 クローン (Purkhold et al., 2000) とアミノ酸塩基配列の相同性が 100%であることが確認できた。また、有明海では、*Nitrospira* に近縁な種が多いことが報告されており (新井, 2006)、東京湾と同じ閉鎖性水域に属する泥質干潟である有明海と多摩川河口干潟では生息するアンモニア酸化細菌種は異なることが分かった。このように、干潟に生息するアンモニア酸化細菌は系統学的に多岐に渡っており、こうした細菌種の硝化反応によってアンモニアが亜硝酸へ変換されていると考えられる。

## 第7章 干潟地下水

### 7.1 緒言

これまでの研究調査から，干潟堆積物への地下水浸透が堆積物中の微生物の硝化活性を高めている可能性が示唆された (Sugiura, 2005)。しかしここまでの研究では，多摩川河口干潟に対する地下水の寄与を明らかにするところまで到達していない。

多摩川河口干潟は泥質であるために，基本的には潮汐変動による地下水流動や水位の変動，また季節変化が小さいことが予想されるが，現在までのところ，この仮説を支持するデータはとられていない。そこで本提案では，実際に地下水に関する物理データの取得を行うために観測井を設置し，上記の地下水流動が潮汐や季節によらず一定であることを証明することを目的として行なった。

### 7.2 調査地点・方法，実験方法

#### 7.2.1 小規模観測井の設置

地下水に関する物理データの取得を行うために，第5章の調査地点 St.3' (図 5-1) に小規模な観測井の設置を試みた(図 7-1)。観測井として2本の塩化ビニルのパイプを準備した。細いパイプは直径7 cm・長さ111 cmで地中が71.7 cmで39.3 cmが突出するように設置した。また，太いパイプは直径9 cm・長さ108 cmで地中が54.5 cmで53.5 cmが突出するように設置した。井戸に満潮時に海水がパイプの上部から入らないように密閉した。観測井を設置後，定期的に多項目水質センサー (W-22XD; Horiba) を用いて水質観測を行なった。また，干潟のやや下流に位置する土管から排水され，多摩川河口へ流入する地下水に関しても，同様のセンサーを用いて水質を調査した。土管の概要を図 7-2 に示した。調査日程，及び，データ獲得における時間間隔とデータ数を示す (表 7-1)。測定項目は，pH，電気伝導度 (COND)，溶存酸素 (DO)，水温，塩分，全溶存固形物量 (TDS)，酸化還元電位 (ORP) とした。また，栄養塩測定用として，観測井に溜まった干潟地下水と土管から排水される地下水を0.2 μmのシリンジフィルターで濾過し，100 ml ポリピンに採取し，保存した (-20°Cで凍結保存)。



**図 7-1 観測井の設置の様子** 冠水を避けたためにパイプの先端を厚いビニルバッグで覆った。調査日によっては，干潟から水が引いた後も水面が干潟表面よりも上にあつたため，干潟の干満の周期とパイプ内の水位の変動の周期が同調していなかったと考えられる。





**図 7-2 土管からの排水の様子(A)とその管轄に関する掲示(B)** 調査目標としている干潟のやや下流に土管が配置されており、非恒常的に(日に数回程度)干潟に地下水が排水される。地下水が排水される付近のヨシは他の地点と比べて大きく育っており、地下水からの栄養塩の供給が予想されたが、本研究によって、供給される地下水は真水で、栄養塩として主に硝酸性窒素が含まれ、その濃度や窒素・酸素の安定同位体比は季節により増減することが明らかにされた。地下水の排水設備は東日本旅客鉄道株式会社が設置管理を行っているようだが、地下水の起源や流量に関しては依然不明である。

携帯用多項目迅速水質分析計DR/2400 (Hach) を用いて無機態窒素濃度 ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ ) の測定を行った。亜硝酸の測定に関してはNitriVer3 亜硝酸塩試薬パウダーピロー (Hach) を用いたジアゾ化法, 硝酸の測定に関してはNitroVer5 硝酸塩試薬パウダーピロー (Hach) を用いたカドミウム還元法で測定した。

**表 7-1 センサーによる観測時間の間隔とデータ数**

観測日	8月17日 ~29日	9月8日	10月26日	11月20日	4月20日 (2007年)
地下水	15分 1131点	5分 28点	1分 145点	5分 20点	2分 69点
土管からの放流水	-	-	1分 5点	5分 6点	2分 6点

上段は観測時間の間隔, 下段はデータ数を示す。

## 7.2.2 栄養塩測定と安定同位体比の測定

硝酸の窒素と酸素安定同位体比を測定し、地下水の起源や硝化・脱窒作用の寄与に関して検討を行った。

## 7.3 結果と考察

### 7.3.1 干潟地下水の水位変動

設置したセンサーは 10 cm 間隔での水位変動を捕らえることができる能力を備えていたが、今回の観測では潮汐に伴う水位変動は認められなかった。過去の研究から干潟に水盆が存在していることは確認されているが (Sugiura, 2005)、この水が潮汐によって上下しないことが今回の調査結果から示された。これは、多摩川の河口干潟がシルト成分を中心とした泥質であることから、水の浸透性が低いことが主要な原因と考えられる (図 5-3)。

### 7.3.2 干潟地下水と土管からの地下水の水質

干潟地下水と土管からの放流水を多項目水質センサーで測定した (表 7-2)。干潟地下水においては、pHは、6.9~8.6 の値を示した。溶存酸素は、8 月に最も低い  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$  の値を示し、10 月に最も高い  $12.4 \text{ mg l}^{-1}$  の値を示した。同様に酸化還元電位に関しても、8 月に最も低い  $-209 \text{ mV}$  の値を示し、10 月に最も高い  $628 \text{ mV}$  の値を示した。毎月、塩分が増減することからパイプ内の地下水に換水が起こっていたことは間違いないが、パイプ内の水位は本来想定される地下水位 ( $-80 \text{ cm}$ ) よりも高かったことから、干潟が冠水する際に周りの海水で押された水がパイプ内に一度堆積物を通して侵入し、干潮時に水位が本来の地下水位まで低下する前に再び次の冠水を迎えるというサイクルを繰り返していたことが予想される。このため、パイプ内の水は本来の水盆近くの干潟地下水だけでなく、潮汐ごとに入れ替わる海水を含んでいたと考えられる。

8 月に測定された地下水は、気温の影響で温度が上昇し、パイプ中での滞留時間が長いことも重なって微生物などの好気呼吸による酸素消費が激しく、酸素が失われ還元的な環境が形成された地下水であったと考えられる。また 10 月に測定された地下水は、パイプ内での滞留時間が短く酸化的な環境が維持されていた地下水であったと考えられる。水温は 11 月に最も低い値で  $15.2^{\circ}\text{C}$  を示し、8 月に最も高い値で、 $26.8^{\circ}\text{C}$  を示した。これらの値が示すように今回観測された干潟地下水の水温は気温の影響を強く受けており、通常の地下水に見られる季節に影響を受けにくい水温の恒常性は認められなかった。塩分は 1.8~2.4% で、常に河口水よりも高い一定の値を示した。このことから、地下水の起源の大部分は干潟に侵入した海水が地下に浸透したものであると考えられる。電気伝導度は、 $2.89 \sim 3.71 \text{ S m}^{-1}$  の値を示し、TDSは、 $18.0 \sim 22.9 \text{ g l}^{-1}$  の値を示した。

**表 7-2 地下水,土管からの放流水の水質データ**

	月	pH	DO (mg l <sup>-1</sup> )	水温 (°C)	塩分 (%)	ORP (mV)
地下水	8月	6.89 ± 0.05	0.2 ± 1.3	26.8 ± 0.5	2.1 ± 0.1	-209 ± 112
	9月	7.19 ± 0.01	0.6 ± 0.2	26.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	228 ± 15.8
	10月	7.86 ± 0.03	12.4 ± 0.8	20.1 ± 0.3	2.4 ± 0.1	628 ± 14.4
	11月	7.98 ± 0.01	5.6 ± 0.3	15.2 ± 0.7	1.8 ± 0.0	272 ± 1.8
	4月	8.59 ± 0.03	11.1 ± 0.23	20.8 ± 0.42	1.8 ± 0.0	337 ± 12.4
土管からの放流水	10月	8.0 ± 0.0	8.7 ± 0.1	21.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	364 ± 0.5
	11月	8.0 ± 0.0	9.9 ± 0.5	16.3 ± 0.1	0.0 ± 0.0	268 ± 2.4
	4月	8.7 ± 0.09	n.d.	16.3 ± 0.2	0.1 ± 0.0	260 ± 5.1

n.d. Not determined. 4月は2007年であり,その他の月は2006年である。

**表 7-2 地下水,土管からの放流水の水質データのつづき**

	月	電気伝導度 (S m <sup>-1</sup> )	TDS (g l <sup>-1</sup> )
地下水	8月	3.36 ± 0.13	20.7 ± 0.8
	9月	3.14 ± 0.05	19.0 ± 0.0
	10月	3.71 ± 0.14	22.9 ± 0.8
	11月	2.92 ± 0.04	18.0 ± 0.0
	4月	2.89 ± 0.02	18.0 ± 0.4
土管からの放流水	10月	0.23 ± 0.02	1.5 ± 0.1
	11月	0.10 ± 0.00	0.46 ± 0.0
	4月	0.16 ± 0.00	1.00 ± 0.0

土管からの放流水は, pHは8.0~8.7で一定の値を示し, 塩分は検出されなかった。電気伝導度は0.1~0.23 S m<sup>-1</sup>, TDSは0.46~1.5 g l<sup>-1</sup>の値を示し, 地下水や河口水よりも低い値となっている。これは, 塩分が検出されないことから推察できるように, 溶液中に溶けている溶存態物質が少ないことを意味している。

地下水の無機態窒素濃度 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N) と塩分の測定結果を示す (図 7-3)。NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-Nは, 8月に0.19 mg l<sup>-1</sup>という高い値を示したが, その他の月においては, 0.01~0.02 mg l<sup>-1</sup>の値で安定していた。NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Nについては, 8月に2.3 mg l<sup>-1</sup>で最も高い値を示し, その後, 濃度は直線的に低下し, 11月においては検出されない程度になった。

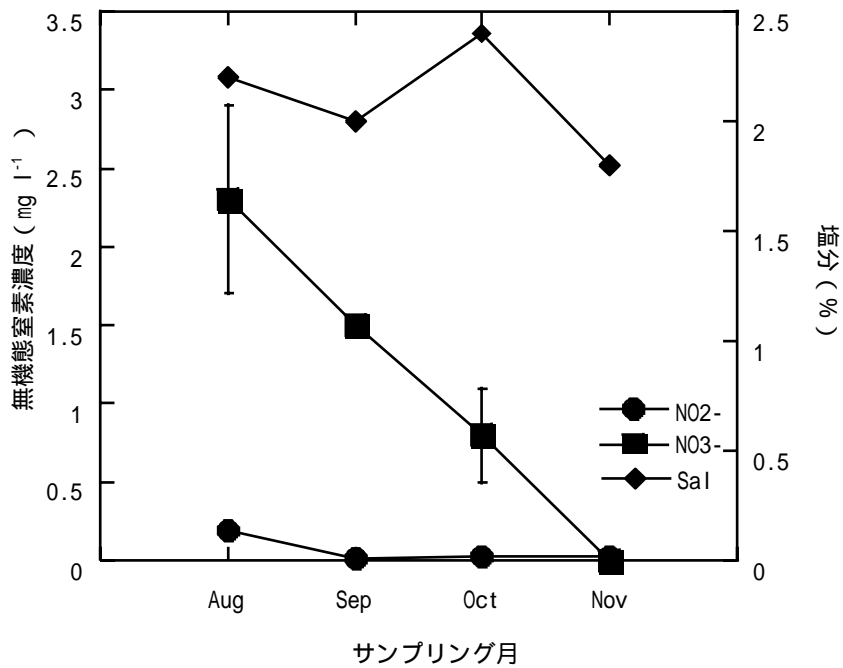


図 7-3 各月における干潟地下水の無機態窒素濃度と塩分

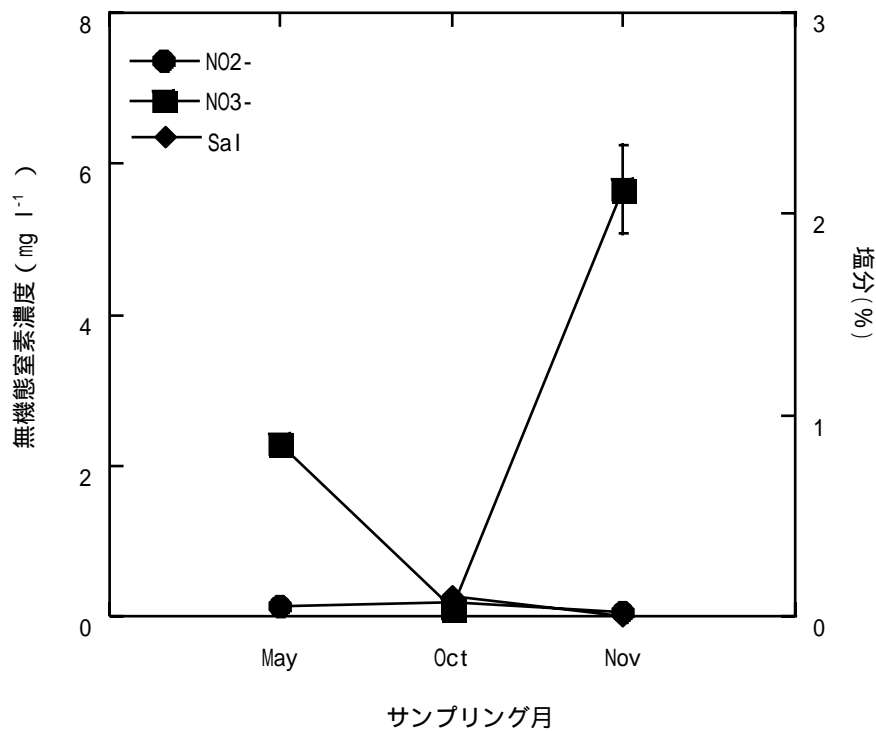


図 7-4 各月における土管からの放流水の無機態窒素濃度と塩分

また土管からの放流水の無機態窒素濃度 ( $\text{NO}_2^-$ -N,  $\text{NO}_3^-$ -N) と塩分の測定結果を示す (図 7-4)。 $\text{NO}_2^-$ -N は、各月において、 $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ 前後の値で安定していた。 $\text{NO}_3^-$ -Nは、月により値が大きく変動し、10 月では、 $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ を示し、11 月では  $5.67 \text{ mg l}^{-1}$ という高い値を示した。このことから土管から流れ出す地下水質は安定していないことが示された。

表 7-3 地下水,土管からの放流水の安定同位体比

試料	月	$\delta^{15}\text{N}/14\text{N}$	$\delta^{18}\text{O}/16\text{O}$
地下水	8月	6.1	1.6
	9月	10.1	- 2.5
	10月	10.7	3.2
土管からの放流水	5月	5.4	- 1.2
	11月	1.2	3.7

硝酸の窒素同位体比及び酸素同位体比の結果を示す (表 7-3)。8月から11月にかけて、干潟地下水の硝酸濃度が減少し(図 7-3),それに伴って窒素同位体比  $^{15}\text{N}$ の値が上昇している(表 7-3)。脱窒の進行により  $^{15}\text{N}$ の値は増大することが知られているので、これは、パイプ内で脱窒が進行したことを意味している。パイプ内の干潟地下水は溶存酸素を含んでいたが、10月以外は低く維持されていた( $0.2\text{-}5.6 \text{ mg l}^{-1}$ ) (表 7-2)。またパイプ内の溶存酸素の分布は上下で均一だとは考えにくいことから、ほとんど無酸素の状態に維持されている水がパイプ下部に存在していた可能性は高い。さらに脱窒が起こる環境として懸濁物内などの微小環境も候補として考えられる。9月の干潟地下水の酸素同位体比  $^{18}\text{O}$ は他の月と比べて低かった。一方、この月の塩分は他の月と比べて高かったことからより海水成分を多く含んだ水が地下水の起源になっていると考えられた。また $\delta^{18}\text{O}$ の値が  $20\text{‰}$ を大きく下回ることから干潟の地下水における降水由来の硝酸の貢献は小さいと考えられる(南川・吉岡, 2006)。一方、土管地下水の硝酸の窒素・酸素安定同位体比からは、地下水に含まれている硝酸の起源は土壌中の窒素であると推測できる(南川・吉岡, 2006)。

## 第8章 脱窒過程における嫌氣的アンモニア酸化反応

### 8.1 緒言

窒素循環において微生物は重要な役割を果たしている。最近になって、これまでに知られている微生物過程以外の経路として、嫌氣的な環境下でのアンモニア酸化，anaerobic ammonium oxidation (anammox) 反応の存在が明らかになった (Mulder et al., 1995)。anammox反応は、嫌氣的条件下において、亜硝酸とアンモニアから $N_2$ を生成する反応であり、 $NO_2^- + NH_4^+ \rightarrow N_2 + 2H_2O$ の反応式で表される。環境中に存在するアンモニア性窒素と亜硝酸性窒素から窒素ガスを生成する過程であることから、脱窒と同様に環境中の窒素コントロールにおいて極めて重要な役割を果たしていると言える。多摩川河口干潟の浄化能が東京湾の物質循環、特に窒素化合物の循環に与える影響を評価するためには、本干潟において、窒素循環に関わる個々の微生物活性を明らかにすることが必要であり、海外の干潟や塩性湿地などにおいてすでに存在が報告されている、anammox反応 (Thamdrup and Dalsgaard, 2002; Trimmer et al., 2003; Engström et al., 2004) が、本干潟においても起こっているか否かを調べる必要がある。

そこで、本干潟において、anammox 反応が実際に起こっているかどうかを検討することを目的として、安定同位体添加による培養実験を行った。

### 8.2 材料と方法

実験は Trimmer et al. (2003) をもとに行った。実験開始前日 (2005年10月30日) に、多摩川河口干潟上のSta. 3' (図5-1) より堆積物を採取し、常温のまま実験室に持ち帰った。実験室において、採取した堆積物5mlを容積70mlのバイアル瓶に移し、40 PSU人工海水を14ml添加した後、攪拌子を入れ、バイアル瓶の口をゴム栓とアルミキャップで密閉した。堆積物を入れたボトルは、以後の実験で使用する同位体ラベル溶液 (a) から (c) の3つの条件での比較実験を行うために、ラベル溶液 (a) 用に4本、(b) 用に4本、(c) 用に4本を作成した。また、バックグラウンドの $N_2$ 測定のために、ラベル希釈溶液を添加しないボトル2本を用意した。この2本は、プレ培養は行ったが、 $N_2$ によるバブリングの操作を行わず、スターラー上での培養から開始した。添加した人工海水は、その後の実験で加える栄養塩に影響を与えないように、塩化ナトリウムのみを使って調整後、オートクレーブを使って滅菌したものを用いた。密閉したバイアル瓶は、添加した堆積物と人工海水上部に酸素を含む空気が存在する。anammox反応は、嫌氣条件下での反応であるため、バイアル瓶内のヘッドスペース部分の酸素が培養直前に存在しないことが望ましい。そこで、ヘッドスペース中の酸素を消費させるためにプレ培養として、密閉したバイアル瓶を室温で12時間程度放置した。プレ培養後、バイアル瓶のゴム栓にシリンジ針を2本刺し、1本は $N_2$ ボンベにつなげてスラリー状の堆積物中に刺さるように固定し、もう1本のシリンジ針はヘッドスペース部分に刺して大気に開放するように固定した。スラリー部分を $N_2$ で約3時間

バブリングして、バイアル瓶内の酸素を完全に除去した。その後、あらかじめ作成しておいた同位体ラベル溶液 ([a] $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ , [b] $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$ , [c] $^{14}\text{NH}_4\text{Cl} + \text{Na}^{15}\text{NO}_3$ ; それぞれ 250  $\mu\text{M}$ ) を 11 ml 添加し、ボトル内の個々の濃度が約 90  $\mu\text{M}$  になるようにした。ラベル溶液 (a) を加えた 4 本を条件 (a), ラベル溶液 (b) を加えた 4 本を条件 (b), ラベル溶液 (c) を加えた 4 本を条件 (c) とする。その後、20°C の暗室内に備え付けたスターラー上で培養を行った。このときの時間を培養開始 ( $t = 0$ ) として、その後、1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 時間後に、ヘッドスペース気体あるいはスラリー中の試水をサンプリングした。ヘッドスペース気体は、3 ml のシリンジを用い、バイアル瓶口のゴム栓にシリンジ針のついたシリンジを刺し、ヘッドスペース気体 2.5 ml を採取し、あらかじめ真空引きした 5 ml の GC バイアルに回収した。ヘッドスペース気体サンプルは、3 本のボトルからそれぞれ回収した。また、残りの 1 本のボトルからは、スラリー中の試水 1 ml を針つきシリンジで採取後、0.22  $\mu\text{m}$  のディスクフィルターでろ過した後、スピッツ管に採取し、冷凍庫で保存した。

ヘッドスペース気体中の質量別  $\text{N}_2$  (28, 29, 30) の測定は、GC-CIII-IRMS (DELTA<sup>plus</sup>XP) を用いて行った。GC バイアル中の気体試料 50  $\mu\text{l}$  をガスタイトシリンジで GC に導入し測定を行った。試水中の硝酸濃度の測定は、イオンクロマトグラフィー (DIONEX) を用いて行った。今回の培養実験で得られる  $\text{N}_2$  気体は、anammox 反応と脱窒反応によって生成される。個々の過程によって生成された  $\text{N}_2$  気体の割合は、測定された質量別  $\text{N}_2$  気体 ( $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ ) を用いて計算を行った。計算方法は、Thumdrup and Dalsgaard (2002) に従い、以下の式により脱窒速度 ( $R_{\text{DNF}}$ ), anammox 速度 ( $R_{\text{ANM}}$ ) を計算した。

$$R_{\text{DNF}} = p^{30}\text{N}_2 \cdot F_{\text{N}}^{-2} \quad (1)$$

$$R_{\text{ANM}} = F_{\text{N}}^{-1} \cdot [p^{29}\text{N}_2 + 2 \cdot (1 - F_{\text{N}}^{-1}) \cdot p^{30}\text{N}_2] \quad (2)$$

ここで、 $p^{29}\text{N}_2$  および  $p^{30}\text{N}_2$  は  $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$  の生成速度、 $F_{\text{N}}$  は  $\text{NO}_3^-$  中の  $^{15}\text{N}$  の割合を示す。

## 8.3 結果と考察

### 8.3.1 栄養塩の時間変化

3 つの条件下でのスラリー中の硝酸、亜硝酸の濃度変化を図 8-1 に示す。条件 (a) の硝酸は培養開始から 4 時間後に約 5  $\mu\text{M}$  を示したが、それ以外では 1  $\mu\text{M}$  以下であり、採取した堆積物中に含まれていた硝酸はプレ培養により 1  $\mu\text{M}$  以下にまで消費されていることを示した (図 8-1A)。条件 (b) と (c) の硝酸の濃度は、時間とともに減少し、培養開始から 12 時間後には完全に枯渇した。また、条件 (b), (c) とともに、培養開始から 8 時間以降の硝酸の濃度変化は小さくなった。また、すべての条件における硝酸の濃度減少は、ボトル内で硝化による硝酸の生成がほとんど行われていないことを示した。このことは、培養開始前に行った  $\text{N}_2$  気体によるスラリーのバブリングが十分に行われていたことを示す。亜硝酸の濃度も、条件 (a) では検出されなかった。条件 (b) と (c) の亜硝酸濃度は、培養実験開始から 4 時間後に濃度のピークをむかえ、ボトル内の嫌気的条件下において、添加した硝

酸から亜硝酸が脱窒により生成されていることを示した。この亜硝酸の生成は、硝酸の濃度に対して 10%以下であった。その後、亜硝酸も硝酸と同様に時間とともに減少し、8 時間後には枯渇した。

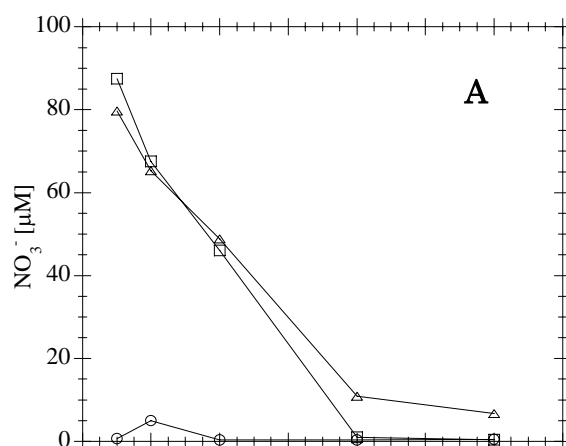
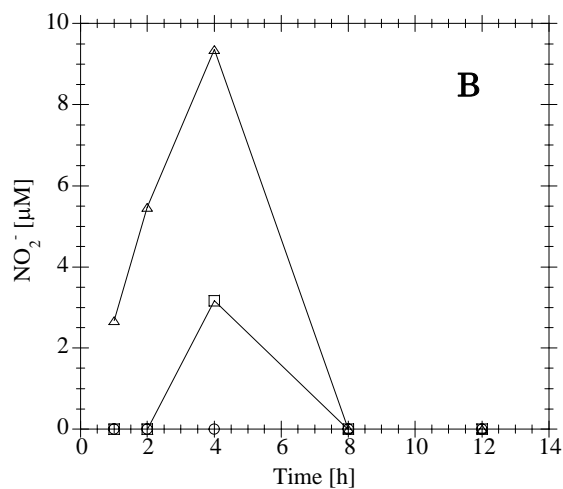


図 8-1 条件 (a) - (c) の硝酸 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (A) と亜硝酸 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) 濃度 (B) の時間変化。

- :条件 (a) (+<sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ,
- :条件 (b) (+<sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ,
- :条件 (c) (+<sup>14</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>+<sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 。



### 8.3.2 N<sub>2</sub>の時間変化

次に、生成された<sup>29</sup>N<sub>2</sub>と<sup>30</sup>N<sub>2</sub>の濃度の時間変化を図 8-2 に示した。実験条件 (a) は<sup>28</sup>N<sub>2</sub>、<sup>29</sup>N<sub>2</sub>、<sup>30</sup>N<sub>2</sub>ともに、実験開始から終了まで濃度の変化がほとんどみられなかった。このことは、培養中のボトル内がほぼ完全な嫌気状態下であり、添加したアンモニアからanammoxや脱窒に必要な硝酸や亜硝酸が硝化経路で生成されていないことを示した。しかし、条件 (a) はアンモニアしか添加していないにもかかわらず、実験開始から終了まで<sup>29</sup>N<sub>2</sub>と<sup>30</sup>N<sub>2</sub>が存在した。堆積物 1 cm<sup>3</sup>に対するそれらの濃度は、<sup>29</sup>N<sub>2</sub>、<sup>30</sup>N<sub>2</sub>がそれぞれ、4025 ± 148 nmol·N



$\text{cm}^{-3}$ と  $206 \pm 17 \text{ nmol-N cm}^{-3}$ であった。 $^{15}\text{N}$ を添加していないにもかかわらず、 $^{15}\text{NO}_3^-$ から生成されると予想される $^{29}\text{N}_2$ や $^{30}\text{N}_2$ が存在したことは、培養実験開始時に、いまだ堆積物中に栄養塩が残っていた可能性が指摘される。先の栄養塩の議論では、プレ培養によって堆積物中に含まれていた栄養塩はほとんど消費されたと推測したが、実験開始時に含まれていた  $1 \mu\text{M}$ 以下の硝酸を使って、anammoxによって $^{29}\text{N}_2$ が生成された可能性が考えられる。しかし、 $^{30}\text{N}_2$ は生成されず、もし条件 (a) で $^{30}\text{N}_2$ が生成されるとすれば、添加した $^{15}\text{NH}_4^+$ から硝化によって $^{15}\text{NO}_3^-$ あるいは $^{15}\text{NO}_2^-$ が生成されなければならない。もし、この反応が起きているとすれば、 $^{29}\text{N}_2$ が脱窒によって生成されることも可能である。条件 (a) の $^{29}\text{N}_2$ と $^{30}\text{N}_2$ は、ラベル希釈溶液を添加しなかった 2 本のボトルに近い値を示した。ラベル希釈溶液を添加していないボトル中では、たとえ堆積物中に栄養塩が残っていたとしても、 $^{15}\text{NO}_3^-$ から生成される $^{29}\text{N}_2$ や $^{30}\text{N}_2$ の割合は低いと予想される。ここで、データとしては載せなかったが、条件 (a) の $^{28}\text{N}_2$ 、 $^{29}\text{N}_2$ 、 $^{30}\text{N}_2$ の全 $\text{N}_2$ に対する比率を大気中の比率と比較したところ、実験期間全体を通して、これらの比率は大気と同じとなった。このことは、培養実験開始直前に行った $\text{N}_2$ によるバブリングが完全ではなく、このときに空気のコンタミが起っていたことを意味するだろう。そこで、条件 (b) と (c) では、空気の分を測定結果から差し引いた (図 8-2)。条件 (b) と (c) のどちらの濃度変化も似たものとなった。 $^{29}\text{N}_2$ は培養開始から 2 時間まで急激に増加した後、一端減少し、その後、約 12 時間以降、なだらかに増加した。これに対し、 $^{30}\text{N}_2$ は培養期間全体を通して時間とともに濃度が増加した。 $^{29}\text{N}_2$ の 2 時間以降の濃度減少は、結果と考察の初めに記した、培養実験中のヘッドスペース気体のサンプリングによる影響であると考えられる。これは、ヘッドスペース気体のサンプリングによる容器内の圧力変化や、サンプリングによって回収された分の気体とその後の培養実験で生成されなかった、あるいは、ヘッドスペース気体の揚収時に針を刺した部分から気体が漏れた、などの原因が考えられる。

ラベル希釈溶液を添加しなかったボトルからも、 $^{29}\text{N}_2$ と $^{30}\text{N}_2$ の生成が確認された。この値も、培養開始時に、ボトル内に含まれていたと予想される空気分を差し引いた値であり、測定された $^{29}\text{N}_2$ 、 $^{30}\text{N}_2$ はともに正の値を示した。このことは、堆積物中にいまだ天然の栄養塩が残っていたことを示す。考えられる理由として、プレ培養の時間が十分でなかった、あるいは $\text{N}_2$ によるバブリングの時間が十分でなかった、という 2 つが挙げられるが、これらのボトルは、プレ培養後の $\text{N}_2$ バブリングの操作を省いており、この違いが条件 (a) との差として現れたものと予想される。つまり、ここで生成された $^{29}\text{N}_2$ 、 $^{30}\text{N}_2$ は $\text{N}_2$ バブリングの作業が省略されたことにより、堆積物中に残った栄養塩から生成されたものと推測される。

### 8.3.3 脱窒活性と anammox 活性

次に、条件 (b) および (c) で生成された $^{29}\text{N}_2$ 、 $^{30}\text{N}_2$ の生成速度から Thamdrup and Dalsgaard (2002) から脱窒活性 ( $R_{\text{DNF}}$ ) と anammox 活性 ( $R_{\text{ANM}}$ ) を計算する。 $^{29}\text{N}_2$ は通

常のラベル試薬添加による培養実験では、そのほとんどがanammoxにより生成されていると推定されるが、今回、 $^{29}\text{N}_2$ の明らかな濃度増加がみられた期間は大きく2つあり、1つ目は、実験開始直後の2時間までと、2つ目は、12時間以降であった。1つ目の濃度増加では、 $^{30}\text{N}_2$ も対応していたことから、2時間までの濃度増加速度を用いて、anammox活性と脱窒活性を計算した。その結果、計算されたanammox速度はこれまで報告されている値に比べて100倍以上高くなり、生成された全 $\text{N}_2$ に対するanammoxの寄与率も、90%以上となるなど、過去の報告値とかけ離れた値となった。ここで、2時間までの $^{29}\text{N}_2$ の急激な濃度増加の期間の $^{28}\text{N}_2$ の濃度変化にも注目したところ、 $^{28}\text{N}_2$ も $^{29}\text{N}_2$ と同様に、最初の2時間までに急激な濃度増加を示していた。このことから考えて、初期の濃度増加はおそらく堆積物中に残された $^{14}\text{NO}_3^-$ 由来の $\text{N}_2$ であると予想された。そこで、実験後半に観測された $^{29}\text{N}_2$ の穏やかな濃度増加部分に注目して、再度、脱窒活性 ( $R_{\text{DNF}}$ ) とanammox活性 ( $R_{\text{ANM}}$ )、生成された全 $\text{N}_2$ に対するanammoxの割合 ( $r_{\text{ANM}}$ ) を計算した (表 8-1)。

**表 8-1 培養実験から得られた脱窒活性 ( $R_{\text{DNF}}$ ) とanammox速度 ( $R_{\text{ANM}}$ ) と、生成された全窒素に対するanammoxの寄与率 ( $r_{\text{ANM}}$ )<sup>a</sup>**

条件	bottle No.	$R_{\text{DNF}}$ [nmol-N cm <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> ]	$R_{\text{ANM}}$ [nmol-N cm <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> ]	$r_{\text{ANM}}$ [%]
(b)	1	127	157	1.7
	2	344	983	6.5
	3	129	135	1.0
(c)	1	97	132	0.9
	2	641	59	1.7
	3	821	636	28.4
	平均	360 ± 321	350 ± 392	7 ± 11

<sup>a</sup>堆積物 1 cm<sup>3</sup>あたり、1日あたりの活性として表した。

計算されたanammox活性は、過去の報告値と比較して高い値であることがわかった。それに対して脱窒活性は、過去の報告値に比べて、低かった (Rysgaard et al., 2004; Dalsgaard et al., 2005)。これは、Usui et al. (2001) で明らかにされたように、本干潟の堆積物からの $\text{N}_2\text{O}$ 生成は、脱窒と硝化が半々であり、脱窒速度がそれほど高くないことと一致するかもしれない。anammox活性の、全 $\text{N}_2$ に対する寄与率は1%~28%の範囲で、平均値は7±11%であった。

本研究により多摩川河口干潟における anammox 活性が初めて測定されたが、環境との関わりについては研究を推し進めることができなかった。今後の研究によって、anammox

活性が多摩川河口干潟でどの程度，寄与しているのかについてさらなる知見が得られるものと思われる。

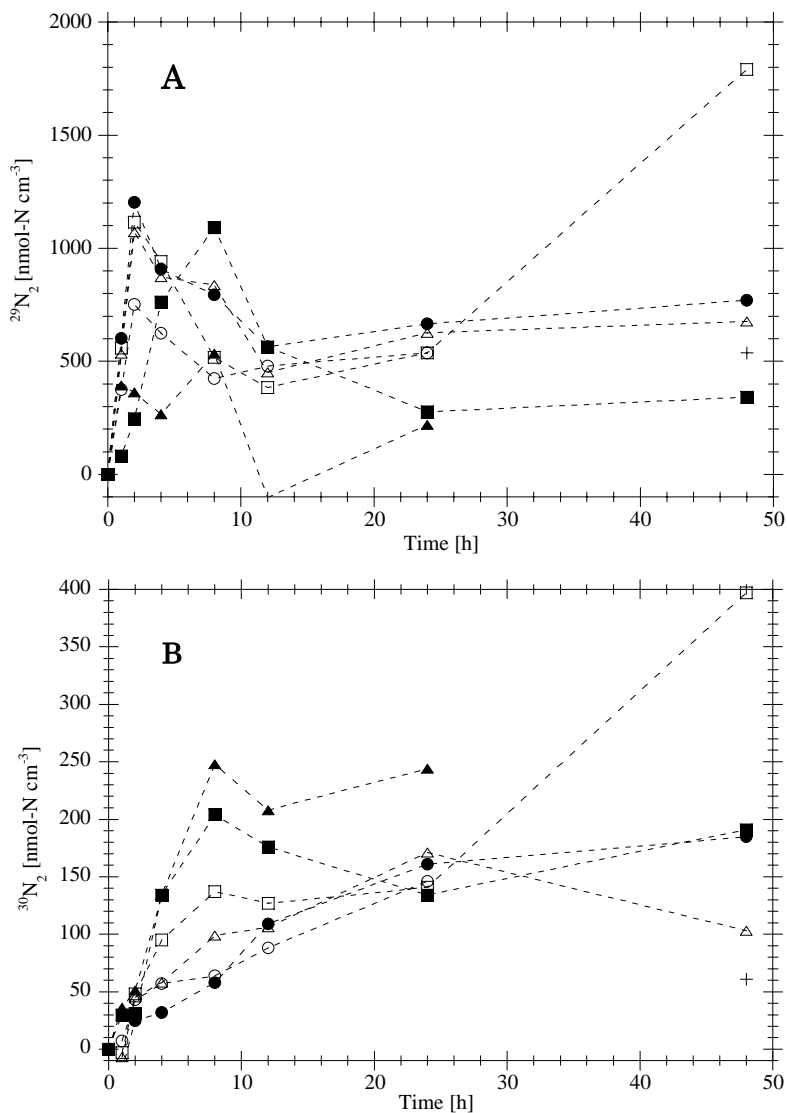


図 8-2 条件 (b) および (c) のボトル中 $^{29}\text{N}_2$  (A) と $^{30}\text{N}_2$ 濃度 (B) の時間変化 図中の印は中抜きしたものは条件 (b) ，黒塗りのものは条件 (c) の結果を， ， ， ， はそれぞれの条件下でのボトルNo.1～3を示す。+はラベル希釈溶液を添加しなかったボトルの値。

## 謝辞

本研究は東京大学海洋研究所先端海洋システム研究センター海洋システム解析分野に、在籍してくれた多くの学生・研究員諸氏の力において成し遂げられました。皆様の粘り強い研究に対する努力と情熱，献身的な協力がなければ本研究を遂行することはできませんでした。

まず研究員として研究室に在籍し，本研究が始まるきっかけを与え，研究分担者として研究を支えてくださった杉浦琴博士の存在なくしては，そもそもこの研究は成り立ちませんでした。就職することになり途中で本研究から外れましたが，ここでまとめた多くの研究成果が研究分担者として本研究に参加してくれた彼女の研究成果であります。博士課程の学生として東京工業大学に在籍中から本干潟において研究調査を始め，この干潟環境やそこに生息する生物に対して愛情を持って活動を行ってきました。その研究の幾分かがさらに発展して本研究課題の研究成果に結びつくことになりました。

また学生諸氏，藤谷拓嗣氏（早稲田大学理工学術院），石川大祐氏（早稲田大学理工学術院），田嶋良行氏（早稲田大学理工学術院），陶景倫女史（東京大学大学院農学生命科学研究科），小関祥子女史（東京大学大学院新領域創成科学研究科），松本純平氏（早稲田大学理工学術院）には調査を遂行するにあたり実際に現地に赴き，調査研究を行っただけでなく，調査後の研究試料の分析に至るまで多くの献身的な貢献がなされました。特に藤谷拓嗣氏は，本人の卒業論文の研究テーマとして多摩川河口干潟を選び，本研究においても中心的な役割を果たしてきました。また，本研究が成し遂げられるまで，杉浦琴博士の後を引き継いで粘り強く研究を展開してくれました。

また本研究は，わたしたちの研究グループ以外の多くの方々のご助言とご協力の下に行われてもきました。学生諸氏の指導教官であり，本研究を暖かく見守って下さった早稲田大学先進理工学部常田聡教授，東京大学海洋研究所木暮一啓教授，小島茂明准教授に感謝いたします。また熊本県立大学環境共生学部長・大和田紘一教授ならびに博士研究員・國弘忠生博士には，キノン分析を手伝って頂きました。さらに，東大海洋研究所宮島利宏助教には，安定同位体比分析においてお世話になり，多くのことを教えていただきました。また，千葉大学名誉教授であり，とうきゅう環境浄化財団の新藤静夫千葉大学名誉教授には地下水分析のための観測井戸設置について多くのご助言を頂きました。東大海洋研究所木村信吾教授には流速計の設置からデータ解析まで教えていただきました。皆様のご助言，ご協力がなければ本研究はなしえることができませんでした。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

小池勲夫東京大学海洋研究所元所長には，研究分担者として本研究の後見役となっただけではありませんでした。直接的に指導をいただく機会は必ずしも多くはありませんでしたが，話し合いの時間等をとってくださり，先生と何らかの形で一緒に研究ができて光栄でした。本当にありがとうございました。

最後になりましたが，長井弘道氏・，藤井知明氏をはじめ，とうきゅう環境浄化財団（会

長 清水仁氏，理事長 五島哲氏)の皆様のおかげで，このような研究を行うことができました。この研究を支持して下さったことに心から謝意を申し上げます。少しでもよい成果が残せるようにこの 2 年間努力してきたつもりです。またこれまでに得られていない多くの知見をもたらしたと思います。今後，この研究が何らかの形で多摩川を愛する人たちの間で役に立てば幸いです。

## 参考文献

- Altschul SF, Glish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- Bernhard AE, Donn T, Giblin AE & Stahl DA (2005) Loss of diversity of ammonia-oxidizing bacteria correlates with increasing salinity in an estuary. *Environmental Microbiology* **7**: 1289-1297.
- Caffrey JM, Harrington N, Solem I & Ward B (2003) Biochemical processes in a small California estuary. 2. nitrification activity, community structure and role in nitrogen budgets. *Marine Ecology Progress Series* **248**: 27-40.
- Deflaun MF & Mayer LM (1983) Relationships between bacteria and grain surfaces in intertidal sediments. *Limnology and Oceanography* **28**: 873-881.
- Engström P, Dalsgaard T, Hulth S & Aller RC (2004) Anaerobic ammonium oxidation by nitrite (anammox) : Implications for N<sub>2</sub> production in coastal marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **69**: 2057-2065.
- Francis CA, O'mullan GD & Ward BB (2003) Diversity of ammonia monooxygenase (*amoA*) genes across environmental gradients in Chesapeake Bay sediments. *Geobiology* **1**: 129-140.
- Gresikowski S, Greiser N & Harms H (1996) Distribution and activity of nitrifying bacteria at two stations in the Ems estuary. *Archives of Hydrobiology Special Issues in Advanced Limnology* **47**: 65-76.
- Hu HY, Fujie K, Nakagome H, Urano K & Katayama A (1999) Quantitative analyses of the change in microbial diversity in a bioreactor for wastewater treatment based on respiratory quinines. *Water Research* **33**: 3263-3270.
- Iwasaki M & Hiraishi A (1998) A new approach to numerical analysis of microbial quinone profiles in the environment. *Microbes and Environment* **13**: 67-76.
- Kim B, Oh H, Kang H & Park S (2004) Remarkable bacterial diversity in the tidal flat

- sediment as revealed by 16S rDNA analysis. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **14**: 205-211.
- Kristensen E (1988) Benthic fauna and biogeochemical processes in marine sediments: Microbial activities and fluxes. In *Nitrogen Cycling in Coastal Marine Environments. SCOPE 33*. (Blackburn, T. H. and Corencen, J., eds) . John Wiley and Sons, New York, 276-299 pp.
- Kuwae T & Hosokawa Y (1999) Determination of abundance and biovolume of bacteria in sediments by dual staining with 4', 6-diamidino-2-phenylindole and acridine orange: relationship to dispersion treatment and sediment characteristics. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3407-3412.
- Lampe AS (1981) Nonliquid reagent for detecting nitrate reduction. *Journal of Clinical Microbiology* **14**: 452-454.
- McTavish H, Fuchs JA & Hooper AB (1993) Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *Journal of Bacteriology* **175**: 2436-2444.
- Montuelle B, Balandras B, Volat B & Feray C (2003) Effect of wastewater treatment plant discharges on the functional nitrifying communities in river sediments. *Aquatic Ecosystem Health and Management Society* **6**: 381-390.
- Mulder A, van de Graaf, AA, Robertson LA & Kuenen JG (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology* **16**: 177-184.
- Purkhold U, Pommerening-Röser A, Juretschiko S, Schmid MC, Koops H & Wagner M (2000) Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 5368-5382.
- Rotthauwe JH, Witzel KP & Liesack W (1997) The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of

- natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4704-4712.
- Rowe R, Todd R & Waide J (1977) Microtechnique for most-probable-number analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **33**: 675-680.
- Sayavedra-Soto LA, Hommes NG & Arp DJ (1994) Characterization of the gene encoding hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas europaea*. *Journal of Bacteriology* **176**: 504-510.
- Shepard F (1954) Nomenclature based on sand-silt-clay rations. *Journal of Sediment Petrology* **24**: 151-158.
- Sugiura K (2005) Studies on the influence of oxic environment occurrence to nitrogen cycles in muddy intertidal sediment. 106 pp.
- Thamdrup B & Dalsgaard T (2002) Production of N<sub>2</sub> through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1312-1318.
- Trimmer M, Nicholls JC & Deflandre B (2003) Anaerobic ammonium oxidation measured in sediments along the Thames Estuary, United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 6447-6454.
- Urakawa H, Kurata S, Fujiwara T, Kuroiwa D, Maki H, Kawabata S, Hiwatari T, Ando H, Kawai T, Watanabe M & Kohata K (2006) Characterization and quantification of ammonia-oxidizing bacteria in eutrophic marine sediments using polyphasic molecular approaches and immunofluorescence staining. *Environmental Microbiology* **8**: 787-803.
- Usui et al. (2001) N<sub>2</sub>O production, nitrification and denitrification in an estuarine sediment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **52**: 769-781.
- Wilms R, Sass H, Köpke B, Köster J, Cypionka H & Engelen B (2006) Specific bacterial, archaeal, and eukaryotic communities in tidal-flat sediments along a vertical profile of several meters. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:



1312-1318.

Wyer MD (1988) Nitrification in Ontario stream sediments. *Water Research* **22**: 287-292.

新井俊介 (2006) 内湾底質環境を反映する微生物群集とその平面分布の把握, 東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学研究系 社会文化環境専攻 修士論文, 59 pp.

川崎市環境局 (2006) 多摩川河口干潟の生物と底質, 32pp.

汽水域セミナー実行委員会 (2007) 東京湾の汽水域環境復元の世紀 - これからの多摩川河口 -, 講演要旨集 34 pp.

國弘忠生, 宮崎智章, 木下今日子, 佐藤綾子, 井上晃宏, 濱大吾, 大和田紘一, 堤裕昭 (2005) イトゴカイ培養コロニーを散布した魚類養殖場底泥における微生物群集の動態. *日本海水学会誌* **59**: 343-353.

国土交通省港湾局 / 環境省自然環境局 (2004) 干潟ネットワークの再生に向けて - 東京湾の干潟等の生態系再生研究会報告書 -, 117 pp.

海辺つくり研究会 (2005) 多摩川河口干潟におけるトビハゼの生息環境に関する調査研究 - 泥質干潟形成との関連性について - とうきゅう環境浄化財団 助成研究報告書, 46 pp.

左山幹雄 (2005) 平成 17 年度干潟水質浄化計測調査検討委託事業報告書 - 有明海泥質干潟堆積物表層における現場脱窒活性の測定 -, 125 pp.

玉上和範, 五明美智男, 杉浦琴 (2004) 人工的な泥質干潟の創出技術に関する基礎的研究. *海洋開発論文集* **20**: 995-1000.

西栄二郎・田中克彦 (2006) 多摩川河口川崎市側の干潟における底生動物相. *神奈川自然誌資料* **27**: 77-80

風呂田利夫 (1981) 干潟のマクロベントスの群集構造. *沿岸海洋研究ノート*, **18**: 78-87.

風呂田利夫 (2003) 干潟, 地球環境調査計測事典 - 第 3 巻沿岸域編 -, フジテクノシステム, p29-37.

南川雅男・吉岡崇仁（2006）生物地球化学 ,生物地球化学講座 5 ,日本地球科化学界監修 ,  
培風館 , 215pp.

「<sup>た</sup>まがわ<sup>か</sup>こう<sup>ひ</sup>がた<sup>た</sup>における<sup>しょうか</sup>硝化・<sup>だつちつ</sup>脱窒<sup>かん</sup>に関する<sup>けんきゅう</sup>研究」

(研究助成・学術研究 VOL. 36-N0. 266)

著 者 <sup>うらかわ</sup>浦川 <sup>ひでとし</sup>秀敏

発行日 2008年3月31日

発行者 財団法人 とうきゅう環境浄化財団

〒150-0002

東京都渋谷区渋谷1-16-14 (渋谷地下鉄ビル内)

TEL (03) 3400-9142

FAX (03) 3400-9141