

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名

古賀 あかね

題 目

有明海奥部干潟域における脱窒菌群数の分布性と脱窒活性に関する研究  
(Studies on habitat distribution of denitrifier and denitrification activity in the tidal flat of the interior parts of the Ariake Sea)

干潟は優れた環境浄化機能を有し、その中でも脱窒作用は有明海における総窒素除去量の約 20% を占める重要な生化学的現象である。本研究は、干潟域底質の窒素循環の解明を前提に、有明海奥部の広域的な脱窒菌群数の分布性や泥質干潟の脱窒活性と環境因子を明らかにしようとしたものである。ここで得られた研究成果を要約すると、以下のようになる。

1. 有明海奥部干潟域における底質表層の脱窒菌群数は、干潟底質の特性や季節により大きく異なった。特に夏季における最奥部の泥質干潟の脱窒菌群数は多く、東岸域や西岸域の砂質及び砂泥質の脱窒菌群数は少なかった。また、満潮時の干潟・浅海域底質の脱窒菌群数は、干潮時の干潟域底質のそれより 1 オーダー高かった。底質中の脱窒菌群数と含泥率との間には、高い正の相関性が見られ、特に夏季においては、含泥率は脱窒菌群数を左右する重要な要素であると考えられた。これは、含泥率が底質中の Eh に直接的に影響すると同時に、含泥率が脱窒菌群の代謝の際に電子供与体となる有機物量と密接に関係するためと推察された。
2. 泥質干潟域底質中の脱窒菌群数の鉛直分布性及び脱窒菌群数と脱窒速度の季節変化が明らかにされた。底質における脱窒速度と脱窒菌群数との間には、必ずしも一義的な関係が認められなかった。これは、脱窒菌群が通性嫌気性細菌のため、底質が好気的環境の場合にはエネルギー効率の高い好気呼吸を行い、また嫌気的環境の場合には嫌気呼吸（脱窒）を行うため、脱窒菌群数と脱窒速度との間に差異が生じたものと推察された。
3. 泥質干潟において、底質間隙水中の  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  濃度は春季から夏季にかけて増加し、冬季に減少した。また、 $\text{NO}_3^+\text{+NO}_2^+\text{-N}$  濃度は、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  のような明確な季節変化を示さなかったが、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  に比して、年間を通して全般的に低かった。このような無機態窒素濃度の季節変化は、それぞれ底質中の有機物の分解、無機化及び脱窒作用の季節に伴う増減が大きく影響していると推察された。
4. 有明海奥部の泥質干潟における脱窒速度は、国内外の沿岸域や干潟域におけるそれとほぼオーダ一的に等しかった。泥質干潟の底質における脱窒速度と主な環境因子との相関性は、各季節において大きく異なった。すなわち、生化学的現象である脱窒活性には、底質中の種々の環境因子が複雑に関与し、またその度合いは季節によって異なっていると考えられた。しかし、この底質の脱窒速度は、概して四季を通し、 $\text{Org.-C}$  や  $\text{C/N}$  比、さらには底質-直上水間の  $\text{NO}_3^+\text{+NO}_2^+\text{-N}$  フラックス速度に大きく左右されていると推察された。

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名

Akane KOGA

題 目

Studies on habitat distribution of denitrifier and denitrification activity in the tidal flat of the interior parts of the Ariake Sea  
(有明海奥部干潟域における脱窒菌群数の分布性と脱窒活性に関する研究)

The denitrification is an important biochemical phenomenon in the excellent environmental purification functions of the tidal flat, and accounts for about 20% of the total amount of nitrogen elimination in the Ariake Sea. In order to elucidate the mechanism of nitrogen cycle in the tidal flat sediment, the objective of study is to clarify the habitat distribution of the denitrifiers in the interior parts of the Ariake Sea and the relation between the denitrification activity and its environmental factors in the muddy tidal flat. The results in this study are summarized as follows.

1. The denitrifier numbers near the surface sediment of tidal flat changed greatly by the sediment characteristics such as sandy / mud-sandy / muddy tidal flat and the seasons. In particularly, the denitrifier numbers in the muddy tidal flat were highest in summer. The denitrifier numbers of the muddy tidal flat at low tide had higher one order than that of the tidal sediment in the shallow sea and tidal flat at high tide. There was a high positive correlation between mud content (clay and silt) and denitrifier numbers. It was considered that the mud content was an important factor that controlled denitrifier numbers in summer, because the mud content was closely related to Eh and the amount of the organism in the tidal sediment.
2. The vertical profiles of denitrifier numbers and the seasonal variations of denitrifier numbers and denitrification rate in the muddy tidal flat were clarified. It was found that the denitrifier numbers did not necessarily uniquely relate to the denitrification rate because the denitrifiers were facultative anaerobic bacteria. That is, the respiration of denitrifiers is the aerobic respiration under the oxic condition in the tidal sediment, and is the anaerobic respiration (denitrification) under the anoxic condition.
3.  $\text{NH}_4^+$ -N concentration in the pore water of sediment in the muddy tidal flat increased in summer and decreased in winter.  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ -N concentrations in the pore water did not have remarkable seasonal variations. It was considered that the seasonal variations of inorganic nitrogen concentration were influenced significantly by the seasonal variations of the decomposition of organic matter and the denitrification rate in the tidal sediment.
4. The denitrification rate of the muddy tidal flat in the interior parts of the Ariake Sea was almost the same order as the denitrification rate that obtained in the domestic and foreign tidal flats and coastal area. The seasonal variations of the correlations between the denitrification rate and the environmental factors of the muddy tidal flat were large. It was supported that various environmental factors in the tidal sediment are complexly related to the denitrification activity, and the availability was different by seasons. However, it was assumed that the denitrification rate in the muddy tidal flat was greatly influenced by C/N ratio, Org.-C content and  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ -N flux rate in the sediment-water interface.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	古賀 あかね
審査委員	主査 佐賀大学 教授 瀬口 昌洋
	副査 鹿児島大学 教授 梶井 和朗
	副査 佐賀大学 教授 田中 明
	副査 琉球大学 教授 吉永 安俊
	副査 鹿児島大学 准教授 中川 啓
審査協力者	
題目	有明海奥部干潟域における脱窒菌群数の分布性と脱窒活性に関する研究 (Studies on habitat distribution of denitrifier and denitrification activity in the tidal flat of the interior parts of the Ariake Sea)
<p>一般に干潟は環境浄化、生物生産、生物育成、景観、防災などの多面的機能を有する。特に近年、富栄養化などに伴う水質悪化が進行している内湾沿岸域では、干潟の有する脱窒過程に伴う窒素除去作用が注目されている。わが国の総干潟面積約400km<sup>2</sup>の40%ほどを有する有明海では、この内湾の総窒素除去量の約20%を占めている。しかし、有明海干潟域における窒素除去作用を支える脱窒菌群数の分布状況や脱窒活性と底質環境との関連性などについては、ほとんど解明されていない。</p> <p>本研究では、特にわが国では他に類を見ない広大な泥質干潟が形成されている有明海奥部干潟域の脱窒特性を解明するために、奥部干潟域における広域的な脱窒菌群数の分布性や脱窒活性と底質の環境因子との関連性について、長期間にわたる詳細な現地調査や室内実験の膨大なデータを基に、検討、考察した。本研究により得られた研究成果は、以下のように要約される。</p> <p>奥部干潟域における脱窒活性の高い底質表層(干潟表面から深さ4cm)の脱窒菌群数は、干潟の特性や季節により大きく異なった。特に夏季における最奥部の泥</p>	

質干潟の脱窒菌群数は多く、平均約 18,000MPN/g-dry であった。しかし、東岸域や西岸域の砂質及び砂泥質干潟の脱窒菌群数は平均約 1,700MPN/g-dry と少なかった。底質中の脱窒菌群数と含泥率との間には、高い正の相関性が見られた。特に夏季においては、含泥率は脱窒菌群数を左右する重要な環境因子であることが明らかにされた。このことは、含泥率が底質中の酸化還元電位に直接的に影響すると同時に、脱窒菌の代謝の際に電子供与体となる有機物量と密接な関係にあるためと推察された。

泥質干潟の干潟表面から深さ 10cm までの底質における脱窒菌群数の鉛直分布性及び脱窒菌群数と脱窒速度の季節変化が明らかにされた。ここでの脱窒速度と脱窒菌群数との間には、必ずしも一意的な関係が認められなかった。これは、脱窒菌が通性嫌気性菌のため、底質が好氣的環境の場合にはエネルギー効率の高い好気呼吸を行い、また嫌氣的環境の場合には嫌気呼吸（脱窒）を行うため、脱窒菌群数と脱窒速度との間に差異が生じたものと考えられた。

泥質干潟において、干潟表面から深さ 10cm までの底質間隙水中のアンモニア態窒素は春季から夏季にかけて増加し、冬季に減少した。一方、硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素は、アンモニア態窒素のような明確な季節変化を示さなく、またアンモニア態窒素に比べ、年間を通して全般的に低かった。このような無機態窒素濃度の季節変化には、底質中の有機物の分解、無機化の他に、脱窒作用の季節に伴う増減が大きく影響していることが明らかにされた。

泥質干潟の干潟表面から深さ 10cm までの底質における脱窒速度は、国内外の沿岸域や干潟域におけるそれとほぼオーダー的に等しく、 $0.35 - 9.34 \text{mg-N/m}^2 \cdot \text{D}$  であった。干潟表面から深さ 10cm までの底質における脱窒速度と主な環境因子との相関性は、各季節において大きく異なった。すなわち、生化学現象である脱窒活性には、底質の種々の環境因子が複雑に関与し、またその度合いは季節によって異なった。しかし、ここでの脱窒は、四季を通して  $\text{Org.-C}$  や  $\text{C/N}$  比、さらには底質 - 直上海水間の硝酸態窒素と亜硝酸態窒素のフラックスに大きく左右されていることが確認された。

以上の結果は、現在、大きな社会的問題となっている有明海異変の原因究明と有明海の再生への取組みの礎となる貴重なデータとして高く評価される。よって、本研究は、博士（農学）の学位を与えるに十分な価値を有するものと認められる。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	古賀 あかね
審査委員	主査 佐賀大学 教授 瀬口 昌洋
	副査 鹿児島大学 教授 初井 和朗
	副査 佐賀大学 教授 田中 明
	副査 琉球大学 教授 吉永 安俊
	副査 鹿児島大学 准教授 中川 啓
審査協力者	
実施年月日	平成 22 年 1 月 8 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、平成22年1月8日の公開審査会において学位申請者に対して学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のように質疑がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに見識を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	古賀 あかね
<p>【質問1】この研究結果から有明海の環境の変化を調べるときに、特に何を環境指標にすれば良いと思いますか。例えば、脱窒菌数、脱窒速度、硝酸態や亜硝酸態窒素濃度とか…。</p> <p>【回答1】環境の変化は、様々な要因が複雑に関与していると考えられるため、一概に環境指標を定めることは難しいと考えます。ただ、広大な干潟を有する有明海では、干潟を代表する特定の底生生物、例えばアゲマキなどを総合的な環境指標の1つとすることが可能ではないかと思えます。</p> <p>【質問2】脱窒速度は硝酸態窒素や亜硝酸態窒素フラックスとは相関があるが、菌数とはあまり相関がないなどの説明がありました。脱窒速度はどのような要因によって決まるのか、まとめて説明して下さい。</p> <p>【回答2】脱窒菌群は通性嫌気性細菌であるため、好氣的環境では酸素呼吸を、また嫌氣的環境では硝酸呼吸（脱窒）を行います。そのため、脱窒速度と脱窒菌群の関連性は低いと言えます。本研究では、脱窒作用において電子供与体となる Org-C 及び電子受容体となる硝酸態・亜硝酸態窒素、また有機物の性状を表す C/N 比との関連性が見られました。Org-C は脱窒菌群の炭素源となるため、その量は脱窒菌群の生育に大きく関与します。また、脱窒の際には易分解性の有機物が用いられるため、有機物の分解の性状を示す C/N 比は脱窒活性に関与します。さらに、硝酸態・亜硝酸態窒素は、脱窒菌群が脱窒を行う際に電子受容体となるため、その底質-直上水間のフラックス速度は脱窒速度を大きく左右すると考えられます。</p> <p>【質問3】底質表層の脱窒速度は砂質において高いとありますが、最近の有明海の異変がこの砂質の変化と関係ありますか。</p> <p>【回答3】有明海の異変の一つに、底質の細粒化・汚泥化が挙げられます。しかし、今回の広域的な含泥率の調査では、各季節の砂質・砂泥質干潟における含泥率の変動が大きいという結果が得られましたが、底質の細粒化については明確な傾向を見ることはできませんでした。そのため、現段階では、有明海の異変が底質の変化に直接的に関係していると断定することはできないと考えます。また、底質表層の脱窒速度が砂質干潟において高くなったのは、好氣的環境が形成され易いことから、泥質干潟と比較して硝化作用によって生成される硝酸態・亜硝酸態窒素が豊富であると考えられるため、脱窒速度が高まったのではないかと推察されます。</p> <p>【質問4】P4-L1 において、「有明海における水質環境の悪化は、汚染負荷によるものではなく…」とあるが、文献を100%信頼してよいか。</p> <p>【回答4】汚染負荷による水質環境の悪化への影響が全くないとは言えないので、断定したような記述を修正しました。</p> <p>【質問5】P9-Fig.2-1 において、なぜSSを除去するか。実際では底質付近は、波浪等でSSが存在すると思えます。</p> <p>【回答5】実際の干潟、特に泥質干潟においてはSSが多量に存在します。しかし、今回の実験では、干出時の干潟域底質を対象とし、その脱窒能を測定するため、海水中のSSについては除去しました。</p> <p>【質問6】P9-Fig.2-1 において、なぜ、底質直上水量を100mlとするか。この量は水深にすると4.6mmになる。実際の脱窒現象を測定するにはこの程度の水深が最適なのでしょうか。</p> <p>【回答6】ここでの底質直上水量100mlは、実際の干潟における水深と関係するものではありません。実験上、底質内のアセチレン阻害を行うために必要な阻害剤となっています。底質表面における <math>N_2O \rightarrow N_2</math> の阻害のために、底質直上にも阻害剤を注入する必要があります。そのため、干潟底質が直上水によって冠水された状態となりますが、現場の干潟が冠水された状態を想定しているわけではありません。なお、100ml という値が予備実験から最も阻害効果の高い容量であったため、この水量を設定しました。</p>	

【質問7】P28において、攪拌状態で採取した泥を、2cm 間隔でスライスカットする理由を教えてください。攪拌泥土ですので間隙水の水質は、上から下まで同一になっていると思うのですが。

【回答7】攪拌状態ではなく未攪拌状態の記述ミスです。底質における水質の鉛直プロファイルを把握するために、未攪拌状態の試料を2cm 間隔でスライスカットしました。

【質問8】P51において、コアサンプルは攪乱試料ですか。不攪乱試料ですか。

【回答8】コアサンプルは、不攪乱試料です。

【質問9】ただオートアナライザと記述した場合、何をどのような原理で測定するものか分からないので、明らかにした方が良いでしょう。

【回答9】オートアナライザは、栄養塩 ( $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^- - \text{N}$ ,  $\text{NO}_2^- - \text{N}$ ,  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ ,  $\text{PO}_4 - \text{P}$  など) を吸光度分析によって測定するものです。 $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^- - \text{N}$  及び  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  はナフチルエチレンジアミン吸光光度法で、 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  はインドフェノールブルー吸光光度法、 $\text{PO}_4 - \text{P}$  はモリブデンブルー吸光光度法で測定されます。したがって、これらの分析方法について記述し、文面を修正します。

【質問10】P33において、底質間隙水について、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ を分析していますが、底質の方に吸着した成分は測定しなかったのか。測定する必要はなかったのか。

【回答10】自然環境下において、吸着陰イオン量は吸着陽イオン量よりはるかに小さいため、一般的に、物質循環の解析においては、リン酸イオンなどを除き陰イオン交換反応は考慮されることはあまりありません。また、粘土鉱物は非常に強い吸着力を持つため、吸着された成分は溶脱しにくいとされています。そのため、今回の実験においては、底質に吸着されている成分について考慮しておらず、測定していません。

【質問11】底質が火山灰土などで、陰イオン吸着能が高いといえないか。非晶質の粘土鉱物が多く含まれているとかは分かりませんか。

【回答11】有明海の干潟は、通称有明粘土と呼ばれており、その主要粘土鉱物は、低膨潤性のスメクタイトです。したがって、陽イオン交換容量が大きく、強い吸着力を持っています。しかし、陰イオン交換容量は小さいとされています。また、粘土鉱物は、通常、結晶質・非結晶質のケイ酸塩及び酸化・水酸化鉱物から構成されていますが、有明粘土におけるその構成比は分かりません。

【質問12】脱窒菌の数を調べたからといって、脱窒の可能性を明らかにできるとは限らないということですが、ではどうすればいいのでしょうか。泥温、Eh との関係で表せませんか。

【回答12】泥温及びEhは、脱窒菌群の生息環境要素として非常に重要なファクターです。しかし、脱窒作用は電子受容体である酸化態窒素の存在が不可欠であるため、泥温及びEhのみの関係式で表すことは難しいと考えます。

【質問13】P34において、シルト、粘土はどのような基準で分類したのか。土質力学と土壌学では異なるが、また、底質の分類はどのようになされたのか。泥の定義とは。

【回答13】今回の研究において用いた含泥率の泥は、土壌学の基準に基づき、 $2\mu\text{m}$  のふるいを通過した土粒子としました。

【質問14】図表の  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^- - \text{N}$  の表記は、一般的に認められているか。

【回答14】多数の文献中にも同じ表記があり、一般的に認められていると考えます。

【質問15】今後の課題ですが、窒素循環メカニズムの解明のための生化学的モデルとは、具体的にはどのようなものを考えているのか。

【回答15】干潟域底質中の窒素循環過程は、底質中での微生物の代謝過程とそれを大きく左右する環境要素によって多大な影響を受けていると考えられます。したがって、窒素循環メカニズムを究明するための生化学モデルとは、底質中の環境要因と微生物などによる生化学的過程を総合的に考慮したモデルを想定しています。