

9019 汽水域における塩類濃度と生物に対する作用

高井 康雄(東京農業大学)

地球環境問題の中で解決がもっとも困難とされる地球温暖化に寄与する温室効果ガスは二酸化炭素、メタン、クロロフルオロカーボン(CFC)、亜酸化窒素などであるが、近年大気中の濃度が年間に1%以上という急速な割合で増加しており、温室効果に対するポテンシャルが二酸化炭素の32倍であり、しかも生物作用の寄与が大きいメタンは、温暖化の原因物質として最近急に注目を浴びつつある。IPCC(気候変化の政府間パネル)の1990年6月の報告によると、水田・湖沼・沼沢地・沿岸域などの湿地帯が発生源の45%を占めると計算している。これらの湿地帯の中で、沿岸域の海水・汽水の影響を受けている地帯は、アニオンとして塩素イオンとともに硫酸イオンが豊富に存在している。高井の既往の研究(1960年)は、水面下のメタン発酵は硝酸還元、マンガン還元、鉄還元、硫酸還元などが行われた後に生起することを明らかにしている。この理論から推測すると、海水・汽水の影響を受けている沿岸域では、有機物が供給された場合、還元状態下、硫酸イオンを微生物の電子受容体とする硫酸還元が卓越することが予想され、そのことによりとにより、メタン発酵が抑制されるとの仮説を立てることができる。

本研究においては、河川水から有機物が供給されるとともに河口から海水が供給されることで淡水と混合する汽水域を対象として、硫酸還元細菌とメタン生成細菌の相互作用を研究し、上記の仮説を検証しようとするものである。

第1年度は、干潟から採取した堆積物と各種濃度に海水を薄めた溶液を入れた注射筒をインキュベートし、経時的にpH、酸化還元電位、硫化物生成量を追跡し、インキュベーション最終日のメタン生成量を測定した。

Ehを指標とした酸化還元変化は、各処理区ともに1週間前後で 0 ± 100 mVの低電位に達し、硫化物生成は2-3週間後開始され、硫化物生成量は海水区で最大量で、海水1/2希釈区>海水1/4希釈区の順で、脱イオン水区で最小であった。硫化物生成量の大小は各区の硫酸イオン含量の多少と対応していた。インキュベーション最終日の各区のメタン生成量は、硫化物生成量の大小と逆比例の関係にあった。

9019 汽水域における塩類濃度と生物に対する作用

高井 康雄（東京農業大学）

1. 研究目的

近年、大気中のメタンの濃度が年間に1%以上という急速な割合で増加していることが明らかになり、温室効果など地球規模での環境変動を引き起こす原因物質として関心が持たれている。この大気中のメタンのかなりの部分が水田土壌、沼沢地、湖沼などの湛水土壌の嫌気的な場所で微生物活動によって生成されたメタンに由来すると考えられている。硫酸還元とメタン発酵の関係については、水田土壌系以外の陸水の底質、海洋の底質、嫌気発酵槽などについても関心もたれ、研究が進められている。しかしながら海水と淡水とが混ざり合う汽水域における各種有機物、塩類成分および生物代謝ならびに生物間相互作用における役割についての研究は少なく、これらの過程と機構について明らかにすることは汽水環境を理解する上で重要であると思われる。汽水域は流入してくる有機物を基質とした微生物による還元状態が発達し、強還元状態下、硫酸還元細菌による硫化水素の発生ならびにメタン生成細菌による酢酸の脱メチル基反応および二酸化炭素還元によるメタン生成などの偏性嫌気性細菌が代謝する場と考えられるが、汽水域におけるこの両細菌の相互作用についてはほとんど研究されていない。

人間の生活環境から排出される有機物の河川への流入によって河口域は還元状態が発達している。本研究はこのような河口域において硫酸還元菌及びメタン生成菌などの嫌気性細菌の代謝が海水と淡水との混合割合の違いによって、どのような影響をうけるかを解明することを目的として室内モデル実験を行った。河口域の堆積物と各種濃度に海水を薄めた溶液を入れた注射筒をインキュベートし、経時的にpH、酸化還元電位、硫酸還元およびメタン生成を追跡した。

2. 研究方法

2. 1 供試土壌の調整及び供試海水

東京都葛西臨海公園内の西なぎさ海岸で採取した湿潤土を室内で通風乾燥し、これを風乾土とした。風乾後磁製乳鉢を用いて粉碎し、孔直径2.0 mmの円孔ふるいでし別した風乾細土を主として以下の実験に使用した。特に、土壌の全炭素および全窒素の測定には孔直径0.5 mmの円孔ふるいでし別したものを使用した。風乾細土はビニール袋またはポリ瓶に入れて低温（4℃）保存した。なお、供試海水は神奈川県藤沢市片瀬江ノ島海岸で採水したものをを使用した。

2. 2 インキュベーション実験の処理区設計

- i. 対照区（脱イオン水だけ） ii. 海水1／4区（海水1：水3）
- iii. 海水1／2区（海水1：水1） iv. 海水区（海水だけ）

2. 3 供試土壌の分析・測定方法

2. 3. 1 水分量

風乾細土を秤量瓶に約5 gを正確に取り、恒温乾燥器内で105℃、5時間乾燥し減少した重量を水分量とした。

2. 3. 2 pH（ガラス電極法）

脱イオン水を風乾細土の重量の2.5倍量加えて5分間攪拌を行い、懸濁状態の時にガラス電極を用いpHメーター（東亜電波KK HM-26S）で測定した。

2. 3. 3 Eh（酸化還元電位）

容量200 mlの広ビンに風乾細土を3 cmの厚さになるように入れ、脱イオン水を加えて水深1 cmに調節して湛水状態にする。ゴム栓に装着した白金電極を湛水状態の土壌に挿入する。定期的に自動滴定装置（京都電子KK AT-117）で電位を測定した。

2. 3. 4 全炭素量（T-C）

風乾微細土（0.5 mm円孔ふるい全通）を試料として用いチューリン法に準じて測定した。

2. 3. 5 全窒素量（T-N）

風乾微細土（0.5 mm円孔ふるい全通）を試料として用いケルダール法に準じて測定した。

2. 3. 6 硫化物量（S²⁻イオン）

湛水前として風乾細土を三角フラスコに5.0 gを入れたものを、また注射筒内に風乾

細土5.0gをいれて湛水状態でインキュベートした土壌を供試土壌として用いた。恒温槽の温水（30℃）中においた100mlの三角フラスコに2gの亜鉛を入れ、さらに供試土壌を投入した後、注射筒で硫酸液（1：2）を20ml注入し、土壌中の硫化物を H_2S にガス化する。

次に、真空ポンプを用いて通気（700ml/min）を60分行い、土壌中から発生した H_2S ガスを1N-NaOH溶液10mlに吸収させ、さらに、1N-NaOH溶液で洗浄し、全量を20mlとした。この液中の S^{2-} イオンをイオン濃度計（東亜電波KKイオン濃度計1M-40S）を用いて測定した。

2.3.7 硫酸量（ SO_4^{2-} イオン）

風乾細土10.00gを200ml容三角フラスコに入れ、脱イオン水を50ml加え1時間振とう後、乾燥ろ紙を用いてろ過をした。さらに、ろ液を0.45 μ mミリポアフィルターを用いて再度ろ過をし、一定量をイオンクロマトアナライザー（Yokokawa Hokusin Electric IC 100）を用いて測定した。

2.4 供試海水の分析

2.4.1 化学的酸素消費量（COD）

化学的酸素消費量の測定には、高温（100℃）酸性過マンガン酸カリウム法を用いた。試料を硫酸酸性とした後、海水中には高濃度の塩素イオンを含んでいるため、塩素イオンの遊離塩素への酸化を防止するため塩素イオン227mg当たり1gの硫酸銀と、酸化剤としての過マンガン酸カリウムを加え沸騰水浴中で30分加熱反応させ、その際消費した過マンガン酸カリウムの量から相当する酸素量の消費量を求めた。

2.4.2 海水の化学成分

供試海水の前処理として、Milli-Q Water Reagent System（日本ミリポア・りみてっと社製）で精製した後、さらに脱気したものを試料とし、各種無機イオンの分析には、Shimadzuイオンクロマトグラフ HIC-6A型（島津製作所製）を使用し、常法にて分析を実施した。分析用カラムとして、1価及び2価の陽イオンの分析にはShimpak IC-C1をまた、陰イオンの分析にはShimpak IC-A1を使用した。

2.5 インキュベーション実験方法および成分測定法

2.5.1 pH

先端を切断した50mlの注射筒に風乾細土5.0gと各種濃度の海水をそれぞれ入れてよく攪拌し、空気が入らないようにゴム栓で密栓してインキュベートした。2連の注射筒内の湛水土壌について、次の日程でpHを測定した。測定日は0、3、7、14、21

28、35、42、72日目。

2. 5. 2 Eh

容量200mlの広口瓶に風乾細土を詰めて土層の厚さ3cm、表面水の厚さを1.5cmとした。土層の上部から1.5cmの位置に白金電極を2本挿入して恒温器内（30℃）でインキュベートした。2連の広口瓶内の湛水土壌について、次の日程でEhを測定した。測定日は0、1、3、5、7、9、11、13、14、21、28、35、42、72日目。

2. 5. 3 硫化物量（S²⁻）

先端を切断した50mlの注射筒に風乾細土5.0gと各種濃度の海水20mlを入れて、空気が入らないようにゴム栓で密栓をしてインキュベートした。3連の注射筒内湛水土壌について、次の日程で硫化物量を測定した。測定日は0、7、17、21、28、35、42、72日目。

2. 5. 4 メタン量（CH₄）

先端を切断した20mlの注射筒に風乾細土5.0gと各種濃度の海水をそれぞれ20mlを入れ、空気が入らないようにゴム栓で密栓してインキュベートした。各測定日に発生した気体の体積を測定した後、注射筒のゴム栓部分からマイクロシリンジ（イトーマイクロシリンジ MS-GAN100）を挿入し、気体0.2mlを採取し、気体中のメタン量を水素炎イオン化検出器付きガスクロマトグラフ（島津製作所 GC-6A）で測定した。メタンはモレキュラーシーブ5Aを充填したステンレスカラム（内径3mm、長さ2m）を用いて分離した。キャリアーガスHeの流量は50ml/min、カラムおよび検出器の温度はそれぞれ50℃、150℃の測定条件で行った。2連の注射筒内湛水土壌について、次の日程でメタン発生量を測定した。測定日は0、7、14、28、35、42、72日目。

3. 研究結果

3. 1 供試土壌の理化学性（TABLE 1）

供試土壌（風乾土）の土性が砂壤土SLで粗粒質であるため、水分量は2.13%と低く、pHは海水の影響下にあるために微アルカリ性である。全炭素量は1.05%、全窒素量は0.11%で、人工なぎさにある表土層のため有機物がある程度集積していることを示唆している。またSO₄量は0.073%で海水中の硫酸根の影響を受けていることがわかる。

3. 2 インキュベーション実験

3. 2. 1 インキュベーション実験に用いられた海水溶液中の硫酸根濃度、pHおよび

C O D

T A B L E 2によると、海水そのままと、海水を脱イオン水で2分の1及び4分の1に希釈した各溶液の SO_4 濃度は、それぞれ0.227%、0.113%及び0.62%でほぼ希釈割合に比例していた。

T A B L E 3にpH及びCODが示されるが、海水のpHは8.1、CODは41mg/lで、人工なぎさのためにある程度の有機物汚染を受けていることがうかがわれる。

3. 2. 2 pHの変化

T A B L E 4に示されるように、pHの経時的変化は7.1~7.8の範囲で、塩類の緩衝性により大きな変化が認められなかった。

3. 2. 3 Ehの変化

F I G U R E 1に示されるように、Ehは各区ともに湛水後3日ないし7日頃まで急速に低下し、その後は大きな変動がなく0mV±100mV台にあった。

3. 2. 4 硫化物生成

F I G U R E 2に示されるように、硫化物生成は、各区ともに2週間目まではほとんど認められず、海水区、海水1/2区では3週間目から、海水1/4区及び脱イオン水区では4週間目からそれぞれ開始された。インキュベーション終了時の72日目では、硫化物生成量の大小は海水区>海水1/2区>海水1/4区>脱イオン水区の順で、硫酸根を多量に含む海水区で最大で、硫酸根含量のもっとも少ない脱イオン水区で最小となった。本実験条件下では、インキュベート土壌中の硫酸根含量と硫化物生成量がよく比例する結果を示した。

3. 2. 5 メタン生成

本年度の実験では、インキュベーション終了時の72日目のメタンの生成量のみを測定した。その結果をF I G U R E 3に示したが、メタン生成量は海水のみの区では皆無であり、海水1/2区で14mg/100g、海水1/4区で29mg、脱イオン水区で54mgであった。この結果は、3.2.4で示される各区の硫化物生成量の大小と逆の順序であり、硫酸還元反応が活発に行われた区ではメタン生成が皆無であるか、ある程度抑制されることを示している。

4. 考察

本研究は、海水の塩分が河川の淡水で薄められる沿岸の汽水域における硫酸還元細菌とメタン生成細菌の相互作用を解明し、沿岸域の有機物汚染とメタン放出の関係を理解することを最終目的としている。

本研究には、耐塩性のこれら偏性嫌気性菌を含有する堆積物を使用する必要がありまた易分解性有機物量を含むことも一つの要件となる。これらの条件を勘案して、葛西臨海公

園のなぎさの泥土を供試することとした。

汽水の塩分濃度を3段階に分け、海水そのものの区、海水を脱イオン水で2分の1にうすめた区及び海水を脱イオン水で4分の1にうすめた区に、対照として脱イオン水のみを設けた。

Ehを指標とした酸化還元変化は、各区とも一週間前後で 0 ± 100 mVの低電位に達し、インキュベーション終了時までこの低電位を保った。

硫化物生成は、硫酸根含量の多い海水区でもっとも急速に大量に起こったが、硫酸根含量の少ない脱イオン水区で緩慢に起こり、また生成量のもっとも少なかった。インキュベーション終了時の72日目のメタン生成量は硫化物生成量の最大の海水区で皆無であり、硫化物生成量の最小の脱イオン水区で最大であった。この成績は、汽水域では海水に由来する硫酸根の硫酸還元細菌による還元反応がメタン生成細菌の活動を抑制することを示唆しているものと考えられる。

5. 今後の課題

本年度の実験では、汽水域堆積物と海水各種濃度溶液のインキュベーション実験におけるpH、Eh及び硫化物量の測定に重点をおいており、メタンの測定はインキュベーション最終日に予備的に行ったのみである。第2年度（平成3年度）にはメタンの発生を経時的に追跡することを計画しており、これにより本年度の結果を確認したいと考えている。

供試したなぎさ堆積物自体の中に海水の影響による硫酸根が含まれている。そこで第2年度には水洗によりできるかぎり硫酸根を除去した試料を調整し、硫酸還元細菌とメタン生成細菌の相互作用についての実験を進め、両者の関係をさらに明確にしたいと計画している。

更に、汽水域においては淡水から供給される有機物、各種溶存イオンが海水との混合の後海水中の一部金属イオン等と化合し沈殿する。また特に有機物は還元状態下において硫酸還元及びメタン発酵の際の炭素供給源となる。そこで有機物含有量を異にする淡水と海水と混合することにより、海水中の化学成分特に塩素量の変化と混合希釈による有機物含有量の変化について合わせ検討する。

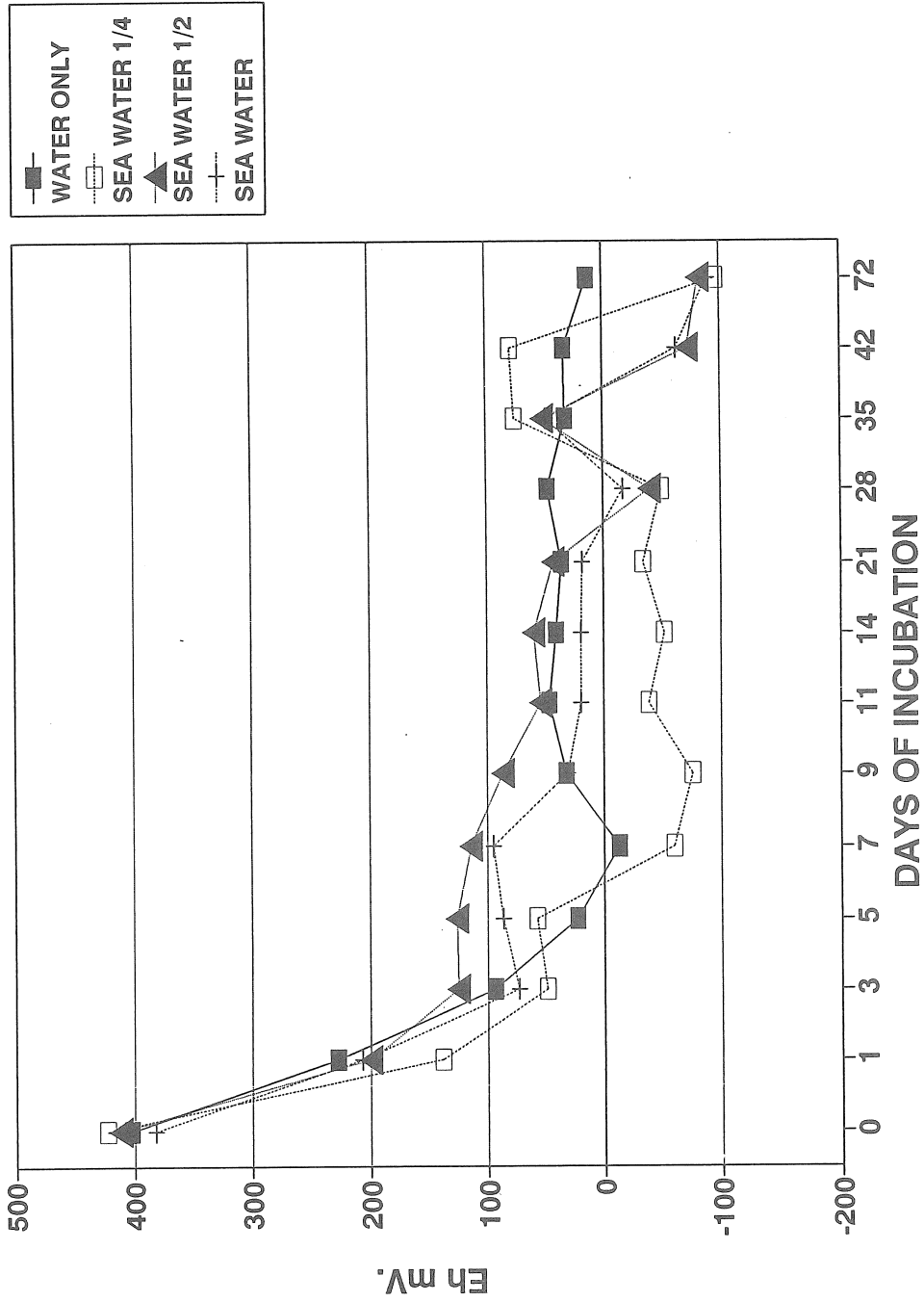
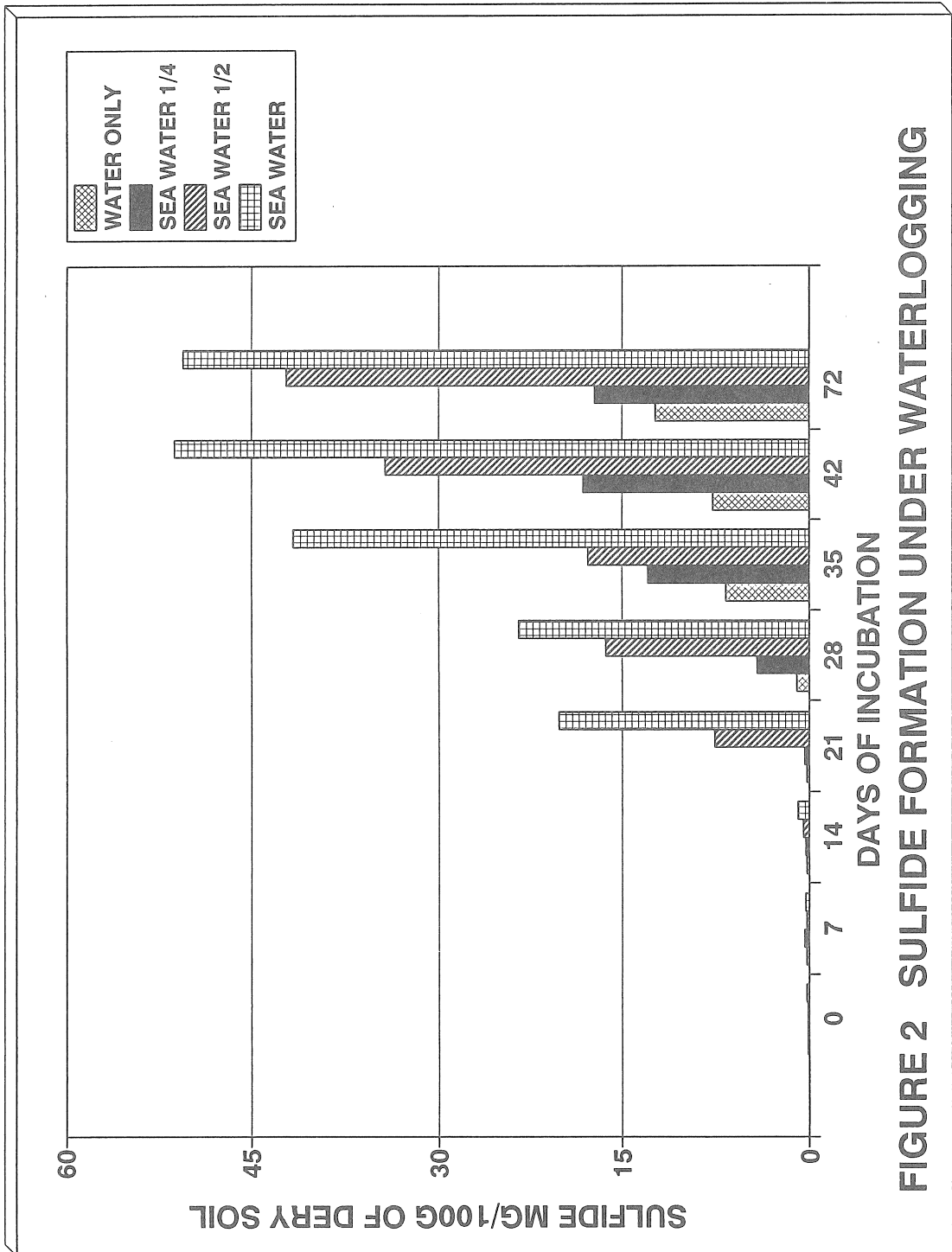


FIGURE 1 CHANGE OF Eh UNDER WATERLOGGING



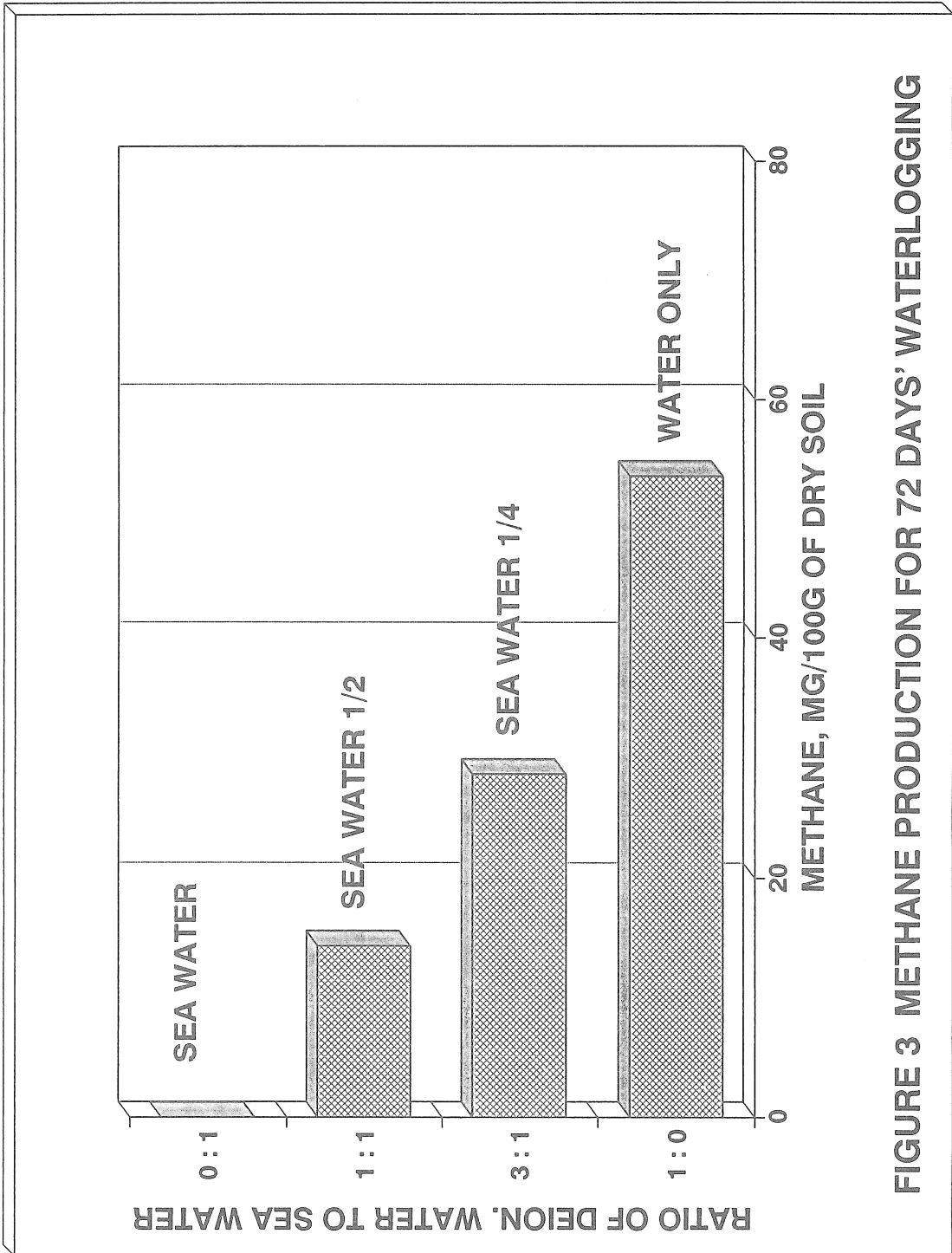


FIGURE 3 METHANE PRODUCTION FOR 72 DAYS' WATERLOGGING

TABLE 1. PROPERTIES OF THE AIR-DRIED SOIL SAMPLE

Amounts: Dry Soil Basis

Moisture	pH(H ₂ O)	pH(KCl)	Total C	Total N	C/N	SO ₄
2.13%	7.8	7.2	1.05%	0.11%	9.6	0.073%

TABLE 2. IONS' CONCENTRATIONS IN THE SOLUTIONS
USED FOR INCUBATION EXPERIMENTS

ppm basis

Solution	Na	K	Mg	Ca	Cl	SO ₄
Sea Water	9514	407	1311	362	19000	2267
Sea Water 1/2	4452	149	582	172	7648	1126
Sea water 1/4	2126	73	281	84	5970	618

TABLE 3. THE pH AND COD IN THE SOLUTIONS USED

Solution	pH	COD mg/l
Sea Water	8.08	41.0
Sea Water 1/2	8.03	36.1
Sea Water 1/4	7.79	12.7

TABLE 4. CHANGE OF THE pH UNDER WATERLOGGING

Days	Water Only	Sea Water1/4	Sea Water1/2	Sea Water
0	7.17	7.32	7.44	7.58
7	7.75	7.29	7.29	7.35
14	7.64	7.39	7.32	7.25
21	7.44	7.44	7.30	7.26
28	7.44	7.28	7.17	7.31
35	7.62	7.50	7.44	7.22
42	7.64	7.52	7.49	7.47
72	7.48	7.33	7.32	7.19

EFFECTS OF SALINITY ON BIOLOGICAL METABOLISM
IN BRACKISH WATER ECOSYSTEM

YASUO TAKAI*, AKIKUNI USHIKUBO* AND SEIJI TAKESHIMA**

* Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

** Faculty of Agriculture, Tamagawa University

SUMMARY

Concern on the global warming caused by the increment of greenhouse gases such as CO_2 , CH_4 and others has indeed become more and more pressing. The share of the anthropogenic greenhouse effect is 49% by CO_2 and 17% by CH_4 . As regards CH_4 , the greenhouse effect rising potential relative to CO_2 is 32 times, the increase per year 1.1%, and the most may originate from biological resources. According to the report issued by IPCC in June of 1990, the 45% of methane emission may derive from paddy field, lake, marsh and coastal zone. In 1960, Takai elucidated that the reductive development under waterlogging occurred successively from aerobic oxygen respiration, via nitrate respiration, manganese, iron and sulfate reductions, to methane fermentation. Deduced from this theory, sulfate reducing reaction may predominate over methane forming reaction in the coastal zone where the supply of sulfate ion from sea or brackish water is abundant.

From the above idea, this study aims to make clear of the interaction between sulfate reducing bacteria and methane forming bacteria, and to contribute the progress of knowledges on the sources of methane emission to the atmosphere.

The first year, pH, Eh and sulfide have been periodically determined for the soil samples waterlogged with sea water, sea water diluted solutions or deionized water, which were incubated for 72 days at 30°C. The amount of methane was analyzed only for the samples at 72 days after incubated.

In brief, the amount of sulfide produced at each plot was in the following decreasing order: Sea water Plot>sea Water 1/2 Plot>Sea water 1/4>Deionized Water. The decreasing order coincided both with the decreasing order for the amount of sulfate ion contained in the solution and with the increasing order for the amount of methane produced for 72 days' incubation. The result suggests that the predominance of sulfate reducing reaction may suppress methane forming reaction in brackish water zone.