

<報 文>

従属栄養細菌の活動を利用した有明海の栄養塩類調査*

秦 弘一郎**・柏原 学***

キーワード ①有明海 ②豊かな海 ③栄養塩類 ④従属栄養細菌 ⑤MBOD

要 旨

近年、有明海をはじめとする海域において、環境基準だけでなく生物の多様性や生産性を考慮した「豊かな海」の概念が注目されている。豊かな海を実現するためには生物と栄養塩類の関係を明らかにする必要がある。本研究では、従属栄養細菌の活動から生物利用可能な栄養塩類を間接的に評価することができるMBOD法を用いて、有明海の栄養塩類を調査した。その結果、以下の知見が得られた。①従属栄養細菌の活動は窒素成分によって制限されている。②窒素成分とリン成分のバランスを考慮する必要がある。③窒素成分の制限はアンモニア性窒素によっても解消が可能である。

1. はじめに

近年、環境基準を順守しながら、生物多様性や生物生産性を向上させる「豊かな海」の概念が注目されている¹⁾。福岡県・佐賀県・長崎県・熊本県の4県が面する有明海においても、経済活動・生物・環境に配慮した「豊かな海」を実現するために、実情の把握が求められている。有明海においてはノリの養殖を始めとする漁業が盛んにおこなわれており、平成12年度(2000~2001年)のノリの大不作等があるものの、長期的にはノリの生産量は増加の傾向が続いている²⁾。一方で、近年のアサリやタイラギ等の二枚貝の漁獲量は壊滅的な状況となっている。その原因の一つとして、貝類の餌となる植物プランクトンの増殖に必要な栄養塩類をノリと競合していることが指摘されている³⁻⁵⁾。また、植物プランクトンの大規模な増殖は赤潮等の問題とも直結し、貧酸素水塊の発生につながる可能性も指摘されている⁶⁾。このように栄養塩類と生物の関係は非常に複雑であり、経済活動と生物に配慮した環境創生には、様々なバランスを考慮した管理が求められる。

有明海においては、海域の基礎生産力を向上させるための取り組みとして、施肥や下水処理施設の硝化抑制運転によって窒素成分の負荷量を増加する試みが実施・検討されている^{7,8)}。その効果範囲などについては近年報告されてきているが⁹⁻¹²⁾、生物影響についての報告は少ない。窒素成分がノリの色落ち改善に効果的であることなどが

室内実験等によって明らかにされているものの¹³⁾、現場海域での定量的な評価やその他の水産生物への影響については不明な点が多い状況である。そのため、海水中の栄養塩類と生物影響の関係を明らかにしていく必要がある。

海域の基礎生産は光合成を行う独立栄養生物の増殖として捉えられ、独立栄養生物が生産した栄養塩類を含む有機物が、食物連鎖に従って従属栄養細菌を含む従属栄養生物へと移行していく。従属栄養生物へ移行した有機物は呼吸等によって無機化されることで海中の栄養塩類が循環している。この時、バクテリアなどの従属栄養細菌の活動は、栄養塩循環に対して重要な働きを担っている。栄養塩類は独立栄養生物のみならず、従属栄養細菌の増殖過程においても必須であり、両方で競合すると考えられる。そのため、栄養塩不足で従属栄養細菌の活動が制限される場合には、一次生産を担う植物プランクトンやノリ等の大型藻類の成長も制限されることが予想される。豊かな海を実現するためには、生物の活動を制限する要因となる栄養塩の種類を明らかにすることが重要な知見となる。

MBODは中本が提唱した「Modifyされた生物化学的酸素要求量(BOD)」の意味であり、バイオアッセイ手法の一つである¹⁴⁾。有機汚濁指標として用いられる生物化学的酸素要求量(BOD)は、栄養塩類が枯渇しないように栄養塩を含む培地を添加し検水中の有機物量によって酸

*Survey of Nutrient Salts in the Ariake Sea Using Activity of Heterotrophic Bacteria

**Koichiro HATA (福岡県保健環境研究所) Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences

***Manabu KASHIWABARA (福岡県リサイクル総合研究事業化センター) Fukuoka Research Commercialization Center for Recycling Systems

素消費量に制限をかける。それに対してMBODは、有機物を十分量添加し検水中に含まれる栄養塩類によって有機物分解に利用される酸素消費量に制限をかける手法である。また、中本はMBODの原理を利用することで、任意の栄養塩類を添加することによって有機物分解の制限要因となる栄養塩を操作することが可能であることも示している。本研究においては、MBODの原理を利用した栄養塩類と有機物分解量の関連を評価する一連の手法をMBOD法と表記する。MBOD法では種々の生物利用可能栄養塩量に制限された有機物分解量が酸素要求量として一元的に表される。この酸素要求量は従属栄養細菌の呼吸に起因するものであるため、従属栄養細菌の活動と栄養塩類の関係性についての知見を得ることが可能になると考えた。

本報では、有明海における生物利用可能栄養塩類に関する知見を得ることを目的として、従属栄養細菌の活動に着目したMBOD法による検討を行ったので報告する。

2. 調査方法

2.1 調査年月日及び地点

検討には2020年10月19日の有明海の表層水を用いた。調査地点（東経130.4113，北緯33.0346；WGS84）を図1に示す。

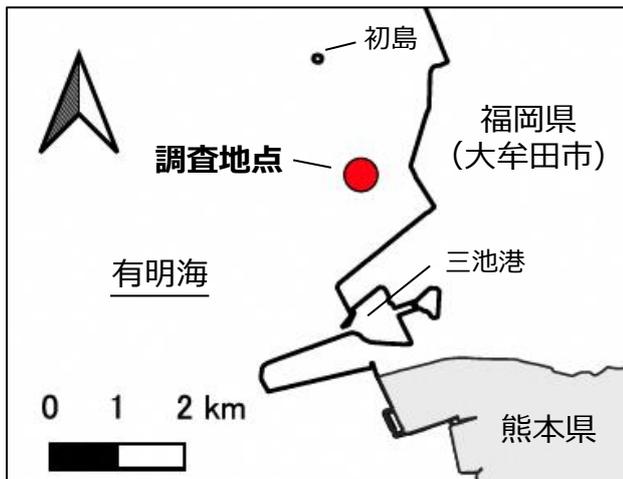


図1 調査地点（国土数値情報（海岸線データ）¹⁵⁾を加工して作成）

2.2 MBOD法による生物利用可能栄養塩類の検討

MBOD法による検討は中本の方法¹⁴⁾を、試験操作はJIS K0102 21. 生物化学的酸素要求量 (BOD)¹⁶⁾ (以下JIS)を参考にした。また、従属栄養細菌の活動に注目するために、種々の従属栄養細菌の試験方法^{17,18)}を参考に培養期間を7日として測定を行った。本研究において評価したMBODをMBOD₇と表記する。MBOD₇-Xの添え字 (X) は、酸素要求量の制限要因とした栄養塩の種類を示す。有機物量に制限された酸素要求量との比較のために、培養期間

を7日間とした無ろ過海水及び検水並びに栄養塩類のみを検水に添加した場合のBOD (BOD₇) を合わせて測定した。栄養塩類のみを検水に添加した場合は、有機物量が酸素要求量の制限因子となると考えられるため、表記をBOD₇-Cとする。

一部水域では鉄が植物プランクトン増殖の制限因子や磯焼けの原因の一つとして報告されているため^{19, 20)}、鉄についてもMBOD法による検討を行った。ただし、中本によると、特定の微量元素だけを除いたM-BOD法は、生物の種類や栄養状態によって微量元素の要求量が大きく異なるため、実用的ではないとされている。一方で、この試験結果は、検水中の生物成長妨害物質の有無の検討にもなる。本調査結果においても、生物の活動を妨害する物質の有無についてのみ言及することとする。

添加液の組成を表1に示す。添加液調製に用いた試薬は、Fe(III)EDTAは株式会社同仁化学研究所製、その他は富士フィルム和光純薬株式会社製特級試薬を用いた。添加液及び希釈水の調製には、イオン交換水を超純水製造装置 (RFU665DA, アドバンテック東洋株式会社製) によって精製した超純水を用いた。

MBOD法は、これまで主に富栄養化した湖沼（淡水）の評価に用いられてきた^{21, 22)}。検水が淡水の場合には、希釈水には蒸留水やイオン交換水を用いれば良い。一方で、検水が海水の場合には蒸留水やイオン交換水で希釈することは妥当ではない。柴田らは希釈の必要がないマノメーター方式のDO測定器を用いることで、海水に対してMBODを行った結果について報告している²³⁾。しかし、このDO測定方法はJISには記載がない上に機器が高価であるため一般的ではない。そこで、本研究ではJISに記載のあるDO測定方法でMBOD法による評価を行うために、海域の塩分濃度に近い3%塩化ナトリウム水溶液で検水を希釈することとした。

具体的な操作方法を以下に示す。採取した海水は孔径0.45 μmのメンブレンフィルターを用いてろ過した。ろ液に1%の割合で無ろ過海水を植種したものを検水とした。塩化ナトリウム（残留農薬・PCB試験用，富士フィルム和光純薬株式会社製）を30g/Lとなるように超純水に溶かした水溶液を希釈水とした。検水を希釈水で適宜希釈（無希釈，2，5，10，25，50倍希釈）したもの100mLに対して，0.2mLの割合で添加液を添加したものを試料とした。溶存酸素量 (DO) はザイレムジャパン株式会社製YSI5000を用いて測定した。フラン瓶に封入した試料は，DO測定を行った後，20℃の暗所で7日間静置した。培養後のDO測定を行い，消費されたDOが40–70%の範囲であった希釈倍率の結果を用いて，それぞれの酸素要求量を算出した。

表1 添加液の組成

添加液	MBOD ₇ 添加液	BOD ₇ -C 添加液	MBOD ₇ -N 添加液	MBOD ₇ -P 添加液	MBOD ₇ -Fe 添加液	MBOD ₇ (NH ₄) 添加液
グルコース [g/L]	20.0	-	20.0	20.0	20.0	20.0
CaCl ₂ · 2H ₂ O [g/L]	-	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O [g/L]	-	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Fe(III)EDTA [mg/L]	-	100	100	100	-	100
KH ₂ PO ₄ [g/L]	-	3.3	3.3	-	3.3	3.3
KNO ₃ [g/L]	-	38.0	-	38.0	38.0	-
NH ₄ Cl [g/L]	-	-	-	-	-	19.1

2.3 アンモニア性窒素の生物利用可能性の検討

有明海で実施・検討されている窒素成分の負荷量増加は、主にアンモニア性窒素として海域に負荷されるものである^{7, 8)}。そこで、アンモニア性窒素の生物利用可能性について検討した。MBODに関する既報^{14, 21-23)}では、窒素源として硝酸カリウム（希釈後の試料濃度として硝酸性窒素が10mg/L）が用いられている。本検討では、硝酸カリウムに変えて塩化アンモニウムをアンモニア性窒素として試料濃度が10mg/Lとなるように添加し、MBOD法による試験を行った（MBOD₇(NH₄)と表記する）。試験操作方法及び添加液の組成は2.2（表1）に示した通りである。

3. 結果と考察

3.1 MBOD法による生物利用可能栄養塩類の評価

MBOD法による検討結果を図2に示す。無ろ過海水及び検水のBOD₇はそれぞれ1.1mg/L、0.6mg/Lであり、BOD₇-Cは0.4mg/Lであった。検水のBOD₇とBOD₇-Cが同程度の値を示したことから、検水の制限要因は栄養塩類ではなく有機物であることが確認された。

MBOD₇-Feは調製した最大希釈倍率（50倍）においても7日後のDOが枯渇した。そのため、有効な試験結果は得られず計算結果は400mg/L以上となった。しかしながら

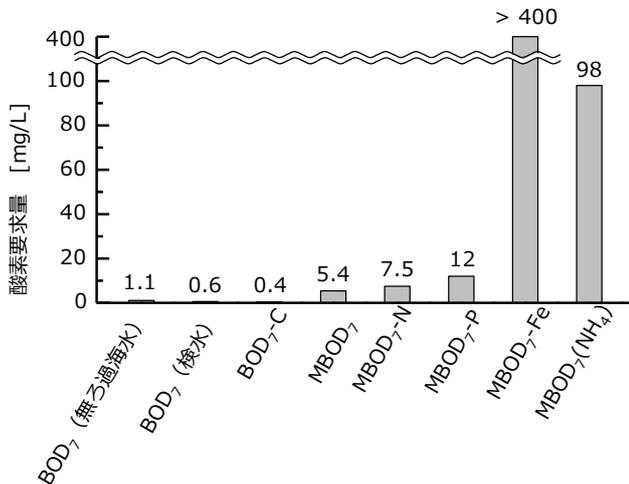


図2 BOD及びMBOD法による酸素要求量

ら、MBOD₇-Feは他と比べて非常に高い値であり、この結果は、栄養塩類の特に窒素及びリンによる栄養塩制限を取り扱った場合には、従属栄養細菌の有機物分解を阻害する化学物質や重金属等の因子が存在しなかったと考えられる。

MBOD₇とMBOD₇-Nに大きな差が無いため、MBOD₇は窒素成分によって制限を受けていたものと推察された。MBOD₇-Pは、MBOD₇及びMBOD₇-Nと比較してやや高い値を示し、窒素成分の添加によって従属栄養細菌の活動は制限が緩和された。このことから、有明海への窒素成分負荷量増加は、海域における従属栄養細菌の活動による円滑な栄養塩類循環に貢献する可能性が示唆された。

一方で、MBOD₇-NとMBOD₇-Pは1.6倍程度の差異であった。海域への十分な窒素成分供給が行われた場合には、すぐさまリン成分による制限を受ける可能性を示唆している。過剰な窒素成分の負荷量増加は環境負荷につながると予想され、環境基準順守を考慮した海域の基礎生産力向上のためには、栄養塩類供給のバランスを考慮した施策が求められるものと考えられる。

3.2 アンモニア性窒素の生物利用

MBOD₇(NH₄)は、アンモニア性窒素を窒素源として添加し、かつ、栄養塩類で制限がかからない状態の結果である。MBOD₇(NH₄)は98mg/Lであり、MBOD₇-N及びMBOD₇-Pと比較して高い値を示した。従属栄養細菌による有機物分解の制限はアンモニア性窒素によっても解消できることが示唆された。

一方で、栄養塩による制限を除外した条件であるにも関わらず、MBOD₇(NH₄)はMBOD₇-Feに比べて低い値を示した。アンモニアは水生生物に対する毒性を持つことが知られており²⁴⁻²⁶⁾、毒性はpHに大きく影響される。添加したアンモニア性窒素の一部は毒性の低いアンモニウムイオン態 (NH₄⁺) から毒性の強いアンモニア態 (NH₃) に変化した状態で存在し、従属栄養細菌の活動を妨害した可能性がある。しかしながら、本検討におけるアンモニア性窒素として10mg/Lという濃度は、有明海の湾奥部や福岡県地先において通常観測される濃度^{27, 28)}と比較して約10²のオーダーで高い濃度である。海洋にアンモニア性窒素成分を添加する場合には、希釈・拡散の効果によって高濃度で維持される時間は短いため、従属栄養細菌の活動を妨害する可能性は低いと考えられる。

また、一般的に硝化細菌の増殖には長期間かかることが知られている²⁹⁾。筆者らの事前検討においても、好気性条件において有明海海水に対してアンモニア性窒素の添加を行った結果、添加から21日後までアンモニア性窒素の8割以上が残存し硝酸性及び亜硝酸性窒素が検出されないこと、28日後に窒素添加量のほぼ100%が亜硝酸性

窒素として検出され、硝酸性及びアンモニア性窒素が検出されないことを確認している。そのため、硝化反応は21-28日後に観測されるものと推察し、本調査の培養期間（7日間）においては、アンモニア性窒素の硝化による酸素消費の影響はないものと考えた。

4. まとめ

MBOD法による検討を行った結果、有明海における従属栄養細菌の活動と栄養塩類の関係について、以下の3点が示唆された。

- ・ 従属栄養細菌の活動は窒素制限であり、窒素成分の負荷量増加が円滑な栄養塩類循環に貢献する。
- ・ 窒素成分及びリン成分の栄養塩類負荷は、バランスを考慮した管理が求められる。
- ・ 従属栄養細菌の活動を向上させる窒素負荷源として、硝酸性窒素だけでなくアンモニア性窒素も効果が期待できる。

今後、ノリ養殖や二枚貝等の生物のライフサイクルや赤潮の発生等に合わせた調査を行うことで、有明海を豊かな海とするための基礎生産力向上に必要な栄養塩管理に関する知見の収集につながる事が期待できる。

5. 引用文献

- 1) 柳哲雄：持続可能な沿岸海域管理法開発プロジェクトの概要. 沿岸海洋研究, **56**, 3-11, 2018
- 2) 環境省：有明海・八代海等総合調査評価委員会報告, 2017
- 3) 川口修, 山本民次, 松田治, 橋本俊也：有明海におけるノリと浮遊珪藻の栄養塩競合に及ぼす環境諸因子の影響評価. 海の研究, **14**, 411-427, 2005
- 4) 多田邦尚, 藤原宗弘, 本城凡夫：瀬戸内海の水質環境とノリ養殖. 分析化学, **59**, 945-955, 2010
- 5) 川口修, 山本民次, 松田治：有明海熊本沿岸におけるノリ不作年度の水質環境の特徴. 海の研究, **11**, 543-548, 2002
- 6) 田中昌宏, 小田切光典：有明海湾奥部の貧酸素水塊形成過程とそのモデル化. 土木学会論文集B2 (海岸工学), **B2-66**, 1011-1015, 2010
- 7) 川村嘉広, 久野勝利, 横尾一成：佐賀県有明海で実施されている栄養塩添加の現状. 佐賀県有明水産振興センター研究報告, **25**, 81-87, 2011
- 8) 国土交通省水管理・国土保全局下水道部：栄養塩類の循環バランスに配慮した運転管理ナレッジに関する事例集, 2014
- 9) 横山佳裕, 藤井暁彦, 後藤祐哉, 望月佑一, 内田唯史：冬季有明海における下水処理緩和運転によるノリ養殖場への栄養塩供給の効果検討. 土木学会論文集G (環境), **75**, II_239-II_246, 2019
- 10) 鈴木元治, 中谷祐介, 古賀佑太郎：下水処理場の窒素排出量増加運転が瀬戸内海播磨灘の有機物及び栄養塩の海水中濃度に与える影響評価. 水環境学会誌, **43**, 43-53, 2020
- 11) 浅川愛, 酒池遼, 管生伸矢, 中石明希：下水処理施設における栄養塩管理運転が今切川河口周辺海域の水質に及ぼす影響. 徳島県立保健製薬環境センター年報, **11**, 54-59, 2021
- 12) 一般社団法人佐賀県環境科学検査協会, 国立大学法人佐賀大学, 佐賀市上下水道局：下水処理施設の季節別運転管理によるノリ養殖海域への効果報告書, https://www.water.saga.saga.jp/site_files/file/%E7%94%A3%E5%AD%A6%E5%AE%98%E5%85%B1%E5%90%8C%E7%A0%94%E7%A9%B6/kyoudou_kenkyu20201228.pdf (2022. 4. 1アクセス)
- 13) 白石日出人：ノリ葉体の色調変化に関する研究. 福岡県水産海洋技術センター研究報告, **20**, 131-134, 2010
- 14) 中本信忠：バイオアッセイ法による水中の生物利用可能栄養物質の推定. 下水道協会誌, **15**, (172), 35-42, 1978
- 15) 国土交通省：国土数値情報, <https://nlftp.mlit.go.jp/ksj/gml/datalist/KsjTmplt-C23.html> (2022. 4. 1アクセス)
- 16) 日本規格協会：JIS K 0102 工場排水試験方法, 2019
- 17) 日本水道協会：上水試験方法, 2011
- 18) 日本下水道協会：下水試験方法 (下巻), 2012
- 19) 武田重信：鉄による海洋一次生産の制御機構. 日本水産学会誌, **73**, 429-432, 2007
- 20) 張経華, 佐藤友規, 丸山亮馬, 高尾雄二, 畝中佑, 藤田雄二, 山崎素直：有明海のノリの色落ちと微量元素欠乏-特に鉄欠乏について. 日本海水学会誌, **63**, 158-166, 2009
- 21) 山口慎一, 宇都宮高栄, 内田利勝, 田川専照：MBODによる湖沼の制限因子の調査について. 福井県公害センター年報, **16**, 151-156, 1986
- 22) 針谷さゆり, 若山正夫, 東島正哉, 五井邦宏：別所沼の水質浄化に関する調査. 埼玉県公害センター研究報告, **17**, 45-57, 1990
- 23) 柴田次郎, 東義仁：MBODによる大阪湾の富栄養化調査. 大阪府公害監視センター所報, **20**, 83-91, 2000
- 24) 菊池幹夫, 若林明子：アンモニア汚染の環境リスク評価. 東京都環境科学研究所年報, 143-148, 1997

- 25) 若林明子：化学物質の毒性や濃縮性に影響を与える因子．環境毒性学会誌，**1**，(2)，27-40，1998
- 26) USEPA：Toxicity Reduction Evaluation Guidance for Municipal Wastewater Treatment Plants，EPA/833B-99/002，1999
- 27) 石谷哲寛，郡山益実，荒木啓輔：有明海奥部における海水中の栄養塩濃度の季節変化について．佐賀大学農学部彙報，**97**，19-26，2012
- 28) 熊谷香，内藤剛：有明海福岡県地先への栄養塩供給量の動向．福岡県水産海洋技術センター研究報告，**17**，73-80，2007
- 29) 藤井滋穂，松澤正貴，永禮英明，清水芳久：硝化反応のBODに及ぼす影響の実験による評価検討．環境工学研究論文集，**40**，531-540，2003