

[特 集]

土壌フォスファターゼ活性値とATPバイオマス値に基づく干潟土壤環境類型化式の応用

中村健一¹・高谷知恵子²・斎藤博²・網谷貴彰³・陸田秀実⁴

¹ 理博 県立広島女子大学教授 生活科学部健康科学科 (〒734-8558 広島市中区宇品東 1-1-71)
E-mail: nakamura@hirojo-u.ac.jp

² 法人会員 (財) 広島県環境保健協会 環境科学センター (〒730-8631 広島市中区広瀬北町 9-1)

³ 工修 (株) 海洋開発技術研究所 (〒160-0004 佐賀県伊万里市瀬戸町 2269 番地 53)
E-mail: amitani@felco.ne.jp

⁴ 正会員 工博 広島大学助教授 大学院工学研究科社会環境システム専攻 (〒739-8527 東広島市鏡山 1-4-1)
E-mail: mitsuda@naoe.hiroshima-u.ac.jp

我々は既に、干潟土壤のフォスファターゼ活性値とアデノシントリフォスフェイト (ATP) バイオマス値を説明変数とした回帰式、すなわち干潟環境類型化式を作成した。さらにその類型化式を用いることによって干潟の環境が4種類に分類され、定量的に環境状態を評価できることを報告した。

本研究はこの類型化式を、広島湾、安芸灘にそれぞれ開口する御手洗川、及び賀茂川の各河口干潟に適用し、干潟環境の平面的、立体的構造及び環境的特長を可視化ソフトを併用して解析することを目的としてなされた。併せて、干潟から採取した土壤に有機物を負荷し、干潟土壤環境の変質が、類型化式でどのように把握できるかについても検討を行った。

Key Words: *tideland, sediments, ATP biomass, phosphatase, cluster analysis*

1. はじめに

干潟は、魚介類・藻類等の生育の場としての水産資源的機能、自然との触れ合いを提供する親水機能、さらには海洋に対する水質浄化作用等、自然界や我々の生活に幅広い機能を提供している。このような干潟の多機能性を、現代社会の中でより有効に維持、活用するためには、干潟における物質循環や物質収支等に関する基礎的研究が重要となる。しかしながら、干潟を対象とした環境調査や研究は、主として干潟海水・底土質の化学分析と生息する生物調査に限定され、この二つの乖離したデータのもとに干潟環境についての考察がなされてきたのが現状である。

近年、干潟における海水浄化作用や食物連鎖の基盤を形成する上で、干潟土壤に生息する細菌、菌類、原生動物および線虫等のいわゆる微生物が重要な役割を果たしていることが次第に明らかになってきた^{1)~3)}。したがって干潟土壤に生息する微生物代謝活性の定量は、干潟環境を検討する上での有効なモニタリングに繋がることと期待される。特にフォスファターゼ、すなわちモノエステルリン酸化合物

を加水分解する酵素は、微生物に普遍的に存在することに併せ、生成物である無機リン酸が植物の重要な栄養成分として必須であることや、重金属等の環境汚染物質に対して敏感に活性低下を示すことから、畑土や山林土壤における植物生育環境を検討するための有効な土壌品質指標として近年注目されている^{4)~8)}。

一方、海洋においても無機リン酸は、藻類や植物プランクトンの生育等、一次生産における限定要因とされている^{9)~10)}。また干潟には河川から負荷される有機物と共に、数多くのベントスや魚介類の生息に由来する有機物が堆積し、その加水分解活性は物質循環を形成する上での基本的な反応の一つである。したがって干潟土壤のリン酸化合物の加水分解を行うフォスファターゼは、干潟機能の基盤を支える酵素活性の一つとして重要な役割を果たしていることが予想される。我々は以上の観点から干潟土壤のフォスファターゼ活性について、その測定法の開発と酵素活性の性質に関する研究を行ってきた。その結果、干潟土壤を対象とした簡易で高感度に測定できるフォスファターゼ活性測定法の開発に成功した¹¹⁾。

さらに我々はこの活性測定法を用い、広島湾及び諫早湾を含む20箇所の干潟土壤においてフォスファターゼ活性測定を行い、干潟フォスファターゼの干潟環境評価への適用について幅広く考察を行った。その結果、フォスファターゼ活性値と土壤中の総窒素量、及び総無機リン酸との相関係数はそれぞれ0.89 (n=7), 0.75 (n=7)と高い値を示す一方、微生物が保有するアデノシン三リン酸(ATP)の総量、すなわちATPバイオマス値との相関係数は低い(r=0.55, n=20)という興味ある結果が得られた。そこで次に、フォスファターゼ活性値とATPバイオマス値を変数としたクラスター解析を行った。その結果、前記20箇所の干潟が4つのグループに明確に類別されることが明らかになった¹²⁾。特に注目すべきことは、類別された4種類の干潟の特徴は、化学分析測定と生物調査から海域を栄養階級区分し、現在多くの海洋環境調査の指標として用いられている吉田の提案した海域環境類型分類¹³⁾と極めて良い対応を示した。すなわち生物種に乏しく清澄な海水を抱いた(1)貧栄養域から、(2)富栄養域、(3)過栄養域、そして硫化物等が堆積して甲殻類やベントスの生息が希薄な(4)腐水域に至る4分類がフォスファターゼ活性とATPバイオマスという2種の測定結果によって類別されることが示された。さらに我々はこれらの成果を踏まえ、このクラスター分析結果の4類別整数番号1~4を目的関数として数値化し、分析測定して得られるフォスファターゼ活性とATPバイオマス2種の測定値を説明変数とした重回帰式すなわち干潟環境類型化式を作成した。その結果、各干潟の類型が高い相関性(r=0.95)のもとに容易に得られることが明らかになった¹²⁾。この高い相関性は、干潟環境の遷移が極めて階層的に変化するという興味ある現象を示唆するとともに、類型化式の適用が干潟環境を定量的にモニタリングする上で、有用な手法になる可能性を示している。

本研究は安芸灘及び広島湾に臨む2箇所の河口干潟を対象に、類型化式の適用により干潟環境の特性がどの程度把握できるかについて検討を行うことを意図して行われた。さらに有機物負荷による干潟土壤の変化を類型化式で解析を行った。

2. 観測方法及び分析方法

(1) 観測干潟と土壤の採取及び土壤の処理

安芸灘に臨み、大潮時に約8.5haの潮間帯が干出する賀茂川河口干潟を対象とし、図-1aで示された

40箇所の土壤採取地点を設定し、表層から1~3cmの土壤を採取した。採取後24時間以内にフォスファターゼ活性及びATPバイオマス測定^{11), 14)}を行い、干潟環境類型化数値(Tn)を求めて干潟土壤環境の2次元的な分布を表示した。

一方、干潟土壤環境の3次元的分布の解析は、広島湾御手洗川河口干潟約4haに、図-3aで示された6箇所の地点を設定し、それぞれ表層から下層に10cm間隔で3分画、合わせて18箇所の土壤を採取した。また土壤有機物負荷実験に用いた土壤は、賀茂川河口干潟⑤地点から採取し、等量の人工海水(0.4 M NaCl, 0.15 M KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH8.0))に最終濃度0.2%の牛血清アルブミンを開口、及び密閉した容器にそれぞれ加えて23℃下で振盪を行った。試料は1, 3, 5日後に取り出し、フォスファターゼ活性とATPバイオマスの測定を行った。

各干潟土壤の粒度分析はJISA-1204に基づいて行った。

(2) フォスファターゼ活性測定とATPバイオマスの測定

反応停止及び発色を兼ねたリン酸緩衝液(pH10.7)の濃度を0.5 M、フォスファターゼ活性測定に終濃度0.5 mMのフェノールフタレインモノフォスフェイト(ジ-サイクロヘキシルアンモニウム塩)を基質とした以外は、前法¹¹⁾に従って行われた。ATPバイオマス値は既報^{11), 14)}に基づいて測定がなされた。また土壤測定は各地点において3検体測定し、その平均値を求めた。

(3) 類型化式の適用と結果の可視化

各土壤のフォスファターゼ活性値を単位干潟土壤体積(cm³)当たり、1分間に分解される基質量(n mol)として算出した数値(U)をVp、干潟土壤体積(cm³)に含まれるATP量(n mol) (U)をVbとして重回帰式

干潟環境類型化数値(Tn)

$$=Vp \times 0.52 + Vb \times 0.38 + 0.62$$

に代入して各土壤採取点における環境類型を数値化した。得られた値は必要に応じて、MicroAVS可視化ソフト(ver5, クボタグラフィックス社)を用いて、2次元および3次元レベルでの類型化数値分布の可視化を行った。吉田¹²⁾の栄養階級区分に対応して考察する場合は、Tn値が1.5未満、1.5以上2.5未満、2.5以上3.5未満、及び3.5以上を、それぞれ(1)貧栄養型、(2)富栄養型、(3)過栄養型、及び(4)腐水域型として類型化を行った。

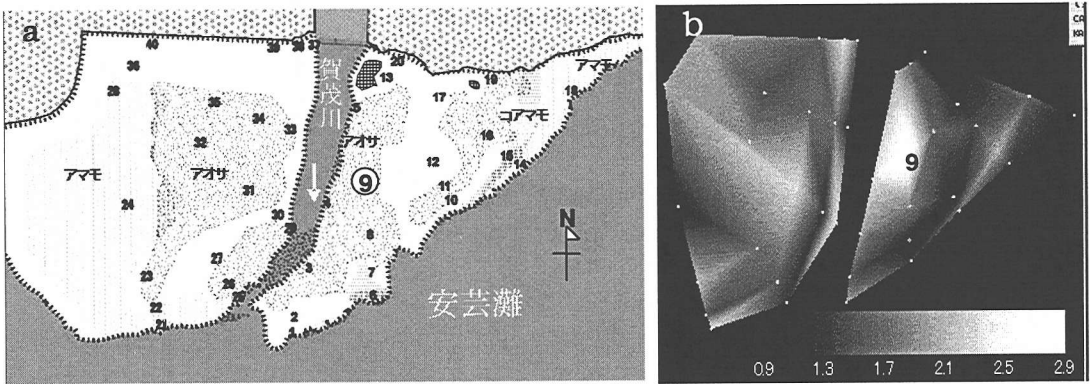


図-1 賀茂川河口干潟の土壌採取地点(a)及び二次元類型化数値マップ(b)
各採取地点を数字で示し、最も高い類型化数値を示した採取地点9を強調した。

3. 結果と考察

(1) 環境類型化式を用いた賀茂川河口干潟環境類型化二次元マップ

賀茂川河口干潟は、2級河川賀茂川と安芸灘からもたらされる砂やシルト（80μm以下、平均9.5%）が堆積して発達した天然干潟である。図-1a内地点5と13間の領域に希少種であるハクセンシオマネキが生息するとともに干潟の低潮位線域にはアマモの大群落を、そして夏季においては、河川に沿った潮間帯中央領域一帯に高密度に繁茂したアオサが広大な面積を占めている。また干潟（東部）の低潮位線中央部にはハチ岩と呼称される岩山が存在し、大潮時には高潮位線（陸側）に向かって礫を含んだ粒度の大きい砂地が干潟中央部に道路のように干出しているのが特徴である。

こうした多様な地形と生物分布を示す干潟を対象に、我々が提唱した類型化式を用いて干潟土壌環境類型化数値(Tn)を40箇所において計算した。その結果、賀茂川干潟全体の平均は $Tn = 1.8$ となり、吉田の分類化では(2)富栄養海域に相当する値が得られた。吉田の報告¹³⁾によると富栄養海域の特徴は貝類、甲殻類が特に豊かに生息している干潟であることが特徴とされている。結果を裏付けるように干潟全域にウミナヤアラムシロガイ等の巻貝、ハクセンシオマネキ、オサガ二等の多種類の甲殻類を観察することができた。図-1bは、各箇所でも得られた環境類型数値すなわちTnを、干潟全域に渡って2次元に表示した結果である。この結果、干潟中央部の賀茂川寄りの部分（採取点⑨付近）に、特異的にTnが高くなる領域が存在することが示された。特に採取点⑨の値は2.8となり、吉田¹³⁾の海域環境類型では過栄養型に属する値を示した。この値は広島市

内を流れる天満川や太田川放水路の河口干潟の値にほぼ相当した。この領域の特徴はアオサが高密度に繁茂し、さらに夏季においてはハチ岩の近傍にあるタイドプールから高温に熱せられた海水が流入する滞筋域にあたる。そのため、一部のアオサの枯死が観察され、生物的、物理的要因によってアオサから生じた有機物が直下の土壌に放出されることが予想された。さらに夏季において認められた高Tn領域は、アオサが完全に消滅した冬季(12月)には全く解消され、採取点⑨の高Tn値も1.4という賀茂川河口干潟の平均的な値に変化し、Tn値がアオサ由来する可能性をより高める結果が得られた。

(2) 有機物負荷による干潟土壌の変質

高Tn値を示した⑨地点及び近傍の地点4は、測定した40箇所地点内でフォスファターゼ活性値がそれぞれ1、及び2番目に高い値を示した。一方ATPバイオマス値は両地点とも干潟全体の平均的な値を示した。そこで次に、賀茂川河口干潟の採取地点⑤から土壌を採取し、予備実験としてグルコース、カゼイン、酵母エキス、アルブミンを負荷してフォスファターゼ活性の変化を調べた。その結果、カゼイン、アルブミン、酵母エキスとも有意な活性増加が認められた。この結果を踏まえ、溶解性の高さや成分の均一性からタンパク質の一種である牛血清アルブミンを選択し、各種条件下の容器内で人工海水と干潟土壌の等量混合液にアルブミンを0.2%加えた後、1~5日間にわたってフォスファターゼとATPバイオマス値を測定しTnの変化を調べた。その結果、図-2aから明らかな様に、開口した容器内で好氣的に振盪した場合においてのみ、Tnが添加前の数値1.8(図内の点線)から数値5へと著しく高くなり一過性的に吉田の分類にある腐水域に変質することが示さ

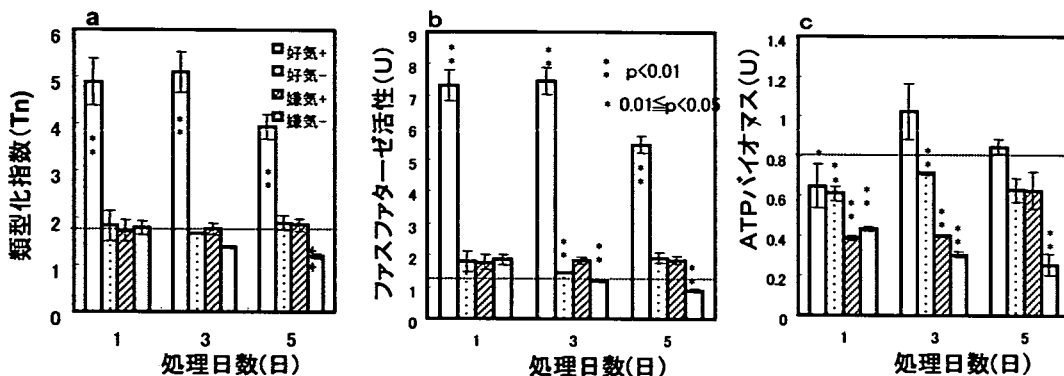


図-2 アルブミン負荷後の土壌類型化数値(a), フォスファターゼ(b), 及びATPバイオマス値(c)

れた。なお、この値は経時的には徐々に低下し、好気的条件が保証される場合は10日で3程度の値で安定化した。

図-2b, 及びcから明らかな様に好気的条件下に曝した場合であっても、ATPバイオマス値はほとんど増加せず、フォスファターゼ活性値のみが負荷後、約3倍以上高くなることが示された。この低ATPバイオマス値・高フォスファターゼ活性という傾向は、東部干潟における採取地点⑨付近のTnの高い領域と等しく、また広島市内の河口干潟の特徴とも一致した。すなわち、広島市内を流れる干潟天満川及び太田川放水路から採取した干潟土壌(Tn=3の過栄養型)のATPバイオマス値は、Tn値で2として示される富栄養型の干潟に比べてより低い値を示すのに対し、フォスファターゼ活性値は極めて高い活性を持つことが特徴として挙げられている¹²⁾。

タンパク質負荷によるフォスファターゼ活性増加は、図-2cの結果からATPバイオマス値、すなわち微生物総量の増加によるものではないことが示された。したがってこの活性増加は、フォスファターゼ活性が著しく高い一部の微生物数が優先種を占める変化が生じた可能性や、あるいは既に生息する微生物が有機物添加によってオペロン説¹⁶⁾に象徴されるような個体内に特定の酵素生産が促進され、活性誘導が生じることに基づくことが推定される。

図-2の結果は、有機物負荷が干潟土壌になされた場合少なくとも5日以内においては、好気的条件が保障されていない限り、有機物分解活性は低値に留まることを示している。なお本実験で負荷したタンパク質は0.2% (w/v)である。この値は通常、生アオサのタンパク質含有量が3% (w/w)程度(浜名湖アオサ利用協議会報告)であることを考慮すると100gのアオサが枯死した場合、約1.5lの海水に溶解した濃度に相当する。濃縮されたタイドプール海水下

の干潟土壌に、匹敵するような濃度環境が局所的に形成される可能性や、干潟土壌活性の地域差も含めた検証が今後必要と思われる。こうした野外での検討の必要があるものの、タンパク質の負荷によって、タンパク質代謝とは直接には関連のないフォスファターゼ活性が増加する事実や、好気的条件下においてのみ活性増加が引き起こされ、Tnが増大するというこれらの結果は、干潟の汚染や浄化機構を検討する上での有用な情報提供になることが期待される。

(3) 類型化式を用いた干潟土壌環境の空間的検討

次に、土壌環境の干潟環境類型化数値 (Tn) が、干潟土壌表層から30 cmの間にどのように空間的に変化するかを明らかにする目的で御手洗川河口干潟を対象とし、図-3aに示された6箇所の採取地点を設定し、それぞれ表層から下層に向かい10cm間隔で3分画の土壌を採取して類型化数値を測定した。図-3aの地図に示されている様にこの干潟は、広島市近郊の2級河川である御手洗川が、広島湾に開口する領域に発達している。シルト含有量1.9%、中央粒径を1.09 mmとする天然干潟であり、干潟中央から西側の低潮位線領域は牡蠣苗場としても機能している。

解析結果図-3bで示したように、低潮位線にあたるPl.2部分が最も高いTnを示した。この領域は牡蠣苗場に設置した牡蠣棚に由来する牡蠣の排泄物や付着生物のデトリタスが堆積する場所でもあり、有機物が豊富な環境にあることが考えられる。また河口に沿った流域部分(Pl.1~Pl.3)では、ATPバイオマス値やフォスファターゼ活性の低い値を反映し、Tnは低い状態にあることが示された。潮汐変動に伴う塩濃度の変化や、夏季における台風と干ばつ等に

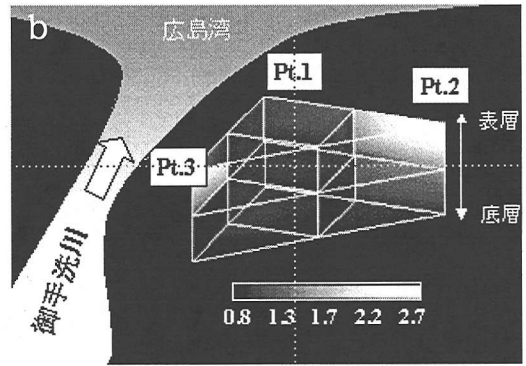
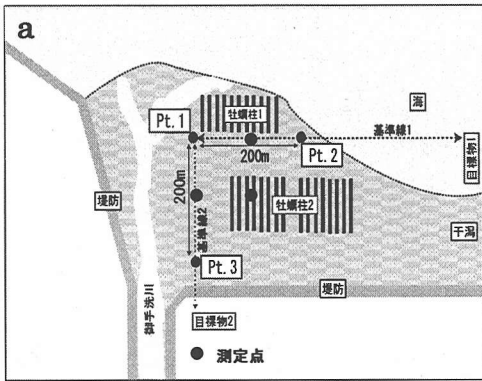


図-3 御手洗川河口干潟外形と土壌採取箇所(a),及び3次元環境類型化数値マップ(b)

よる環境の急変が、微生物群の安定な定着・増殖を困難にしていることが示唆された¹⁵⁾。河川が直接流入する領域は、 $Tn < 1.5$ から吉田¹³⁾の貧栄養型に推定された事実を裏付けるかのように、ベントスや二枚貝類とも生息が少ない状況を認めることができた。

Pt. 2の領域では、表層下30cmレベルでも、同深度の平面内では、 Tn が最も高い等、表層の Tn パターンは、底部にほぼ反映されている。しかしながら、各地点の差異は一般に、表層部が高く、表層から30cmにかけて変化が乏しくなる傾向が示された。したがって干潟の局所的な差異や、干潟の環境的特性を捉える場合には表層部の土壌を対象にするのが望ましいことが明らかになった。

(4) 結論

竹原市の賀茂川河口干潟及び御手洗川河口干潟の環境特性を、我々が前に提起した土壌環境類型化式を用いることにより検討した。その結果、賀茂川干潟の表層部の土壌40箇所における土壌環境類型化値(Tn)の平均は1.8となり、甲殻類の多種・多数の生息を特徴とする吉田の海域栄養階級的区分の富栄養型に類型化された。この値は夏季の賀茂川河口干潟の生態的実体に合致する結果となった。

Tn 測定と可視化ソフトによって賀茂川河口干潟全域を2次元的にマッピングした結果、局所的に Tn の高い領域を見出すことができた。 Tn が高い値を示す要因として、アオサの枯死による有機物の負荷が推定された。有機物負荷実験及びアオサとアマモ生息領域におけるフォスファターゼ活性値の比較から、干潟土壌へのタンパク質等の有機物負荷は有意にフォスファターゼ活性値の増加を引き起こすことが明らかになった。

干潟内の Tn が3次元的にどのように変化するかについて、御手洗川河口干潟を対象として可視化ソフトを用いてグラフィック表示を行って検討した。その結果、図-3bに示されたように、表層部において示された土壌採取地点間の Tn パターンは、表層から30cm下のゾーンにおいてもある程度は反映されるものの、 Tn の差異は低くなる傾向が示された。したがって干潟の環境的特性を Tn で検討する場合には、表層部の土壌を対象にすることがより望ましいという結果が得られた。

以上の結果、類型化式と可視化ソフトを組み合わせることで解析することにより、干潟の環境状態が容易に把握できることが示された。今後の干潟環境モニタリングを行う上での有効な武器となることが期待される。

本研究に用いた類型化式は、主に広島湾近郊の20の干潟を対象として得られたものである。この類型化式を基盤にして広島近郊の限られた干潟ではあるが、干潟内の環境的差異や、干潟土壌の特性を考察する上での幾つかの興味ある有用な情報もたらされた。したがって今後は、全国的規模の干潟を対象とした類型化式の確立とその汎用性について検討したいと考えている。

謝辞：本研究は、平成12-14年度文部科学省科学研究費基盤(C)および平成11年度広島県立大学重点研究費助成、(財)河川環境管理財団からの平成14年度研究費助成によってなされた。

参考文献

- 1) Meyer-Reil, L-A.: Seasonal and spatial distribution of extracellular enzymatic

- activities and microbial incorporation of dissolved organic substrates in marine sediments, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 53, pp.1748-1755, 1987.
- 2) 栗原 康:「干潟は生きている」, pp.129-219, 岩波新書, 1980.
 - 3) 中田 喜三郎, 畑 恭子:沿岸干潟における浄化機能の評価, 水環境学会誌, 17, 158-166, 1994.
 - 4) Neal, J.L.: Influence of selected grasses and forbs on soil phosphatase activity, *Can. J. Soil Sci.*, Vol.53, pp.119-121, 1973.
 - 5) Tyler, G.: Heavy metal pollution, phosphatase activity, and mineralization of organic phosphorus in forest soils, *Soil Biol. Biochem.*, Vol.8, pp.327-332, 1976.
 - 6) Mathur, S.P. and Sanderson, R.B.: Relationships between copper content, rates of soil respiration and phosphatase activities of some histosols in an area of Southwestern Quebec in the summer and fall, *Can. J. Soil Sci.*, Vol.58, pp.125-134, 1978.
 - 7) Fabiano, M. and Danovaro, R.: Enzymatic activity, bacterial distribution, and organic matter composition in sediments of the Rosa Sea (Antarctica), *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 64, pp.3835-3845, 1998.
 - 8) Amador, J.A., Glucksman, A.M., Lyons, J.B. and Gorres, J.H.: Spatial distribution of soil phosphatase activity within a riparian forest, *Soil Science*, Vol.162, pp.808-825, 1997.
 - 9) Sanudo-Wilhelmy, S.A., Kustka, A.B., Glibler, C.J., Hutchins, D.A., Yang, M., Lwiza, K., Burns, J., Capone, F.G., Raven, J.A., and Carpenter, E.J.: Phosphorus limitation of nitrogen fixation by *Trichodesmium* in the central *Atlantic Ocean*, *Nature*, Vol.411, pp.66-69, 2001.
 - 10) Wu, J., Sunda, W. Boyle, E.A., and Karl, D. M.: Phosphate depletion in the Western North *Atlantic Ocean Science*, Vol.289, pp.759-762, 2000.
 - 11) Nakamura, K-I., Takaya, C. and Hiraoka, K.: A method for assay of phosphatase activity in tideland soils, *J. Environ. Chem.*, Vol.11, pp.827-834, 2001.
 - 12) Nakamura, K-I. and Takaya, C.: Assay of Phosphatase Activity and ATP biomass in tideland sediments and Classification of the Intertidal Area Using Chemical Values, *Marine Pollution Bulletin* Elsevier Science, UK Primary Production, Vol.47, pp.5-9, 2003.
 - 13) 吉田陽一:低次生産段階における生物生産の変化, 在水圏の富栄養化と水産増養殖, 水産生物学会編 恒星社厚生閣, pp.92-104, 1973.
 - 14) 陸田秀実, 土井康明, 中村健一, 網谷貴彰, 杉芳典, 石川博, 沢田和秀:現地観測に基づく広島湾の干潟の底生生物量と活性量の時空間分布. 海岸工学論文集, Vol.49, pp.1131-1135, 2002.
 - 15) C.M.ラーリー, T. R. パーソン (長沼毅訳):生物海洋学入門, pp.220, 講談社, 1996.
 - 16) Jacob, F. and Monod, J.: Genetic Regulatory mechanisms in the synthesis of proteins, *J. Mol. Biol.*, Vol. 3, pp.318-356, 1961.

(2003.1.8 受付)

APPLICATION OF AN REGRESSION EQUATION BASED ON THE VALUES, PHOSPHATASE ACTIVITY AND ATP BIOMASS.

Ken-ichi NAKAMURA, Chieko TAKAYA, Hiroshi SAITOH, Takaaki AMITANI,
and
Hidemi MUTSUDA

A regression equation, which quantitatively determines the class number of tidelands into four environmental groups was previously developed using the values of chemical assays, the phosphatase activity and ATP biomass of the tideland sediments.

In the present investigation, we applied the equation to Kamo and Mitarai estuary tidelands and analyzed two- and three-dimensional environment structures of these tidelands with a visualization software.

Furthermore, the changes of environmental characteristics of tideland were analyzed using the equation.