

平成21年度

「有明海再生に関する研究等助成事業」実績報告書

アントラキノンによる硫化水素発生抑制作用と火山
灰土壌によるリン吸着作用を組み合わせた沿岸環境
保全技術の効果と安全性の評価

長崎大学大学院生産科学研究科

和田 実

目次

| | |
|---|----|
| 緒言 | 2 |
| 〈実験 1〉 アントラキノンを嫌気的な海底泥に投与した際の硫化物濃度の変化 | 4 |
| 〈実験 2〉 アントラキノンを添加したときの堆積物中の細菌群集組成の変化 | 8 |
| 〈実験 3〉 堆積物の保存方法(温度)の違いによる堆積物中の細菌群集組成の変化 | 10 |
| 〈実験 4〉 火山灰土型リン吸着材を海水に添加した際のリン吸着効果 1 | 12 |
| 〈実験 5〉 火山灰土型リン吸着材を海水に添加した際のリン吸着効果 2 | 14 |
| 総括 | 15 |
| 引用文献 | 16 |
| 図表 | 17 |

【緒言】

有明海沿岸環境の劣化には、嫌気的な海底堆積物からの硫化水素発生や栄養元素の溶出が関わっている。硫化水素は、下水や汚泥の嫌気化が進むにつれ硫酸還元細菌 (Sulfate Reducing Bacteria, 以下 SRB と略す) の活動が活発化し、下水や汚泥中の硫酸イオンが還元されて生成する。この対策として、アントラキノン製剤を用いる方法がある。SRB は硫酸イオンを硫化水素に還元する硫酸呼吸と、有機物を分解し、有機酸を生成する酸生成分解の二つの代謝経路を持つことが知られている(堀越, 2006)。アントラキノン製剤は硫酸呼吸のみに作用し、SRB を殺すことなく硫化物の発生を抑制することができる。寺澤ら(1999)は、汚泥処理工程や下水圧送管にアントラキノン製剤を投与することによって硫化水素発生が抑制されることを明らかにした。

底泥から溶出する代表的な栄養元素として窒素とリンが考えられるが、リンは植物プランクトン増殖の制限因子になっており、植物プランクトンの異常発生を抑制するためには海底堆積中のリン削減がより重要であると言われている(柳田ら, 1998)。水中のリンを効果的に除去する方法として吸着法が知られおり、操作が簡便で、除去されたリンを吸着剤より回収することができ、同時に吸着剤自体も再生して再利用できる等の利点がある(江ら, 2005)。近年、火山灰土と硫酸第一鉄を原料とする吸着剤を下水処理水や河川水に用いたところリン吸着の効果が見られた(柳田ら, 1998)。

これらの化学的な環境保全技法は淡水域において優れた効果を発揮しているので、海洋環境下においても同様の効果が得られるならば、有明海の海底環境保全に貢献できると期待される。しかし、アントラキノンやリン吸着剤を海洋環境下で用いた例はなく、その効果も未知である。そこで本研究では、アントラキノン嫌気的な海底泥に投与した際の効果、またリン吸着剤として市販されている火山灰土型リン吸着材(ピーキャッチ®)をリン酸イオンを含む海水に添加した際のリンの除去効果の検証を行い、将来的な海底保全技術の確立に向けた基礎知見を得ることを目的とした。

〈実験 1〉アントラキノンに嫌氣的な海底泥に投与した際の硫化物濃度の変化

【方法】

1. 堆積物の採取および保存方法

実験に用いた試料は二種類あり、イトゴカイの飼育に使用している泥を目合い 500 μ m のふるいにかけてのもの(イトゴカイ飼育泥)および、2009年8月31日に諫早湾小長井(図1)で採取した干潟表層堆積物を研究室に持ち帰った後マイナス 20 度で保存し、実験開始時に解凍したもの(干潟表層堆積物)である。イトゴカイ飼育泥、干潟表層堆積物の有機物含量はそれぞれ 15mgC/g sediment, 13mgC/g sediment である。

2. 堆積物の嫌気培養

イトゴカイ飼育泥または干潟表層堆積物 5g と滅菌海水 5ml を 30ml のガラスバイアルに入れ、バイアル内を嫌氣的な状態に保つために亜硫酸ナトリウム(2mM)、レザズリン(2mg/L)を加えた。

使用したアントラキノン製剤は三種類あり、1.9 アントラキノン(和光純工業株式会社)、1.8-ジヒドロキシ-アントラキノン(SIGMA-ALDRICH)およびサルフコントロール(川崎化成工業株式会社)である(図2)。1.9 アントラキノン、1.8-ヒドロキシ-アントラキノンは粉末状であり、水に溶けないが有機溶媒には溶けるためアセトンに溶かしてから実験に使用した。海水と堆積物試料、亜硫酸ナトリウムとレザズリンが入ったバイアルに、試験区には最終濃度が 10 μ M になるようにアントラキノン製剤を加え、対照区にはアセトンを 25 μ l(試験区と同じアセトン量)加えた。その後直ちに、バイアル内の酸素を出来るだけなくすために窒素ガスを注入し、ブチルゴムで密栓後、常温(約 25 度)、暗所で 2 日間~5 日間保存した。しかし、サルフコントロールを用いて実験を行ったときには、亜硫酸ナトリウム、レザズリンさらに窒素ガスを添加せず、バイアル内を嫌氣的な状態にしなかった。

なお、実験で用いた堆積物試料と薬品の種類を表 1 に示し、それぞれの実験を①~⑥とした。実験①~⑤では、試験区と対照区においてそれぞれ 3 本のバイアル内の硫化物イオン量を測定した。また、実験④では上記の実験の他に、干潟表層堆積物を嫌氣的に保つことによって硫化物が生成されるかどうか確認するために、干潟表層堆積物のみを入れたサンプルについて 3 連で硫化物イオン量の測定を行った。実験⑥では、1.8-ジヒドロキシ-アントラキノンを加えた試験区およびアセトンのみを加えた対照区、アントラキノンとアセトンを加えない無添加区を設け、各 5 本で培養を行った。0 日目に無添加区を、2 日目に試験区と対照区のバイアル内の硫化物イオン量を測定した。

3. 堆積物から発生する硫化物イオン(S²⁻)の測定

堆積物試料に 1ml のシリンジで 1N-HCl を 1ml 注入し攪拌後 20 分静置した。その

後、バイアルの気相を 2ml ガスタイトシリンジで採集し 10ml の 1MTris-HCl(pH=8.0) に注入した。1MTris-HCl に溶存した硫化物イオンを、硫化物イオン測定キット(HACH 社)を使用し、メチレンブルー法により 665nm の吸光度を吸光光度計(DR-2800 HACH 社)で測定した。

【結果】

実験①: サルフコントロールを添加したときのイトゴカイ飼育泥の硫化物イオン量の変化(図 3)

イトゴカイ飼育泥にサルフトコントロールを添加したところ、試験区は薬品を添加したにもかかわらず日が経つにつれて硫化物イオン量は減少した。さらに対照区は 2 日目の時点で硫化物イオン量はほとんど 0 になっていた。

実験②: 1.9 アントラキノン添加したときのイトゴカイ飼育泥の硫化物イオン量の変化(図 4)

イトゴカイ飼育泥に 1.9 アントラキノン添加したところ、0 日目の時点では試験区と対照区の泥中の硫化物イオン量にほとんど差は見られなかった。しかし、1 日目以降は対照区より試験区のほうが硫化物イオン量は少なくなっていた。また、3 日目については二つの実験区間において有意な差が見られた(t 検定, $p < 0.01$)。

同様の実験は他に 3 回行っているが、そのうち 2 回は対照区より試験区のほうが硫化物イオン量は少なくなっていた。しかし、残りの 1 回は、0 日目、1 日目は両区間における硫化物イオン量に差は見られなかったが、2 日目以降は対照区よりも試験区のほうが硫化物イオン量が多くなっていた。

実験③: 1.8-ジヒドロキシ-アントラキノン添加したときのイトゴカイ飼育泥の硫化物イオン量の変化(図 5)

イトゴカイ飼育泥に 1.8-ジヒドロキシ-アントラキノン添加したところ、0 日目の時点では試験区と対照区の泥中の硫化物イオン量にほとんど差は見られず、1 日目は対照区より試験区の方が硫化物イオン量は少なくなっていた。しかし、2 日目は対照区よりも試験区のほうが硫化物イオン量が多くなっていた。

実験④: 1.9 アントラキノン添加したときの干潟表層堆積物の硫化物イオン量の変化(図 6-1, 6-2)

まず、干潟表層堆積物を嫌氣的に保つことによって硫化物が生成されるかどうか確認したところ、図 6-1 のように硫化物が生成され、さらに日を追うごとに硫化物イオン量が増加した。しかし、干潟表層堆積物に 1.9 アントラキノン添加したところ、図 6-2 のように 0 日目、1 日目において試験区よりも対照区のほうが硫化物イオン量の量が多く

なっていた。

実験⑤:1.8-ジヒドロキシ-アントラキノン添加時の干潟表層堆積物の硫化物の変化(図 7-1, 7-2)

干潟表層堆積物に 1.8-ジヒドロキシ-アントラキノン添加したところ、図 7-1 のように対照区よりも試験区のほうが硫化物イオンの量が少なくなった、つまりアントラキノンの添加によって硫化物発生が抑制された場合と、図 7-2 のように抑制されなかった場合が見られた。このとき、堆積物試料の保存方法が両者で異なっており、前者は-20℃で保存していたものを解凍してすぐに使用したのに対し、後者はマイナス 20 度で保存していたものを取り出し 4 度で 1~7 日間保存していたものを使用していた。

実験⑥:1.8-ジヒドロキシ-アントラキノン添加時の干潟表層堆積物の硫化物の変化(図 8)

実験⑤の結果を踏まえ、マイナス 20 度で保存していた堆積物試料を実験開始時に解凍したものに 1.8-ジヒドロキシ-アントラキノン添加した。試験区と対照区を比較したところ、対照区よりも試験区のほうが硫化物イオンの量が少なくなっていた。

【考察】

実験①より、イトゴカイ飼育泥にサルフコントロールを添加したところ、薬品を加えたにもかかわらず試験区の硫化物イオン量が増加していることから、硫化物イオン発生を抑制する効果が見られなかったことがわかった。さらに、さらに対照区は 2 日目の時点で硫化物イオン量はほとんど 0 になっていたが、これらの現象として、バイアル内を嫌氣的な状態にせず、好氣的な条件で実験を行ったことが一因であると考えられる。

実験②より、イトゴカイ飼育泥に 1.9 アントラキノン添加したところ対照区よりも試験区のほうが硫化物イオンの量が少なかったことから、アントラキノンの効果が見られたことがわかった。しかし実験③より、イトゴカイ飼育泥に 1.8-ジヒドロキシ-アントラキノン添加したところアントラキノンの効果が見られなかったことがわかった。実験④より、干潟表層堆積物に 1.9 アントラキノン添加したところアントラキノンの効果がなかったが、干潟表層堆積物を嫌氣的に保つことによって硫化物が発生するかどうか調べたところ日が経つにつれて硫化物イオンが発生したことから、実際に試料堆積物中から硫化物は発生しているがアントラキノンによって抑制されていないことが示唆された。

実験⑤より、干潟表層堆積物に 1.8-ジヒドロキシ-アントラキノン添加したところ、アントラキノンの効果が見られる場合(図 7-1)と見られない場合(図 7-2)があった。前者はマイナス 20 度で保存していたものを解凍してすぐに使用したのに対し、後者はマイナス 20 度で保存していたものを取り出し 4 度で数日間保存していたものを使用してい

たことから、堆積物試料の保存方法がアントラキノンの効果に影響を及ぼしていることが示唆された。また実験⑥においても、マイナス 20 度で保存していた干潟表層堆積物を解凍してすぐに実験に用いたところアントラキノンの効果が見られたことから、解凍後 4 度に保存することでアントラキノンの効果が薄れることがわかった。この現象の説明として、干潟表層堆積物を 4 度で保存することによって細菌群集が変化し、アントラキノンが効かない SRB 群集が増加した可能性が考えられる。

実験①～⑥の結果より、アントラキノンの効果は実験に使用した試料堆積物に大きく影響を受けていると考えられる。また、グラフの標準偏差を見ると、試料によって硫化物イオン量の値が大きくばらついている場合が見られた。これは、元は同じ堆積物試料であってもガラスバイアルに入れた泥の細菌群集はそれぞれ異なっており、その群集の違いがアントラキノンの効果に影響を及ぼした可能性があると考えられる。

〈実験 2〉 アントラキノンを追加したときの堆積物中の細菌群集組成の変化

【方法】

1. 堆積物試料の DNA 抽出

実験 1 でアントラキノンによる硫化物イオン抑制効果が見られた実験②の 0 日目, 1 日目のそれぞれ試験区, 対照区の計 4 つの堆積物試料を用いた。硫化物イオン測定後, マイナス 20 度で保存していたものを解凍し, バイアル内の堆積物 0.5g から DNA 抽出を行った。なお, 硫化物イオン量を測定した際に 1N-HCl を加えたことを考慮して, 堆積物の pH を中和するため 1MTris-HCl(pH=8.0)を追加したものについても DNA 抽出を行った。DNA の抽出には土壤 DNA 抽出キット ISOIL(株式会社ニッポンジーン)を用いた。抽出した堆積物の DNA は-20°Cで保存した。また, シャットネラアンティカ培養液中の細菌群集由来の DNA サンプルをアウトグループとして群集構造の比較を行った。

2. 細菌群集 DNA のフラグメント解析, フラグメントパターンの解析

抽出したDNAから, 齊藤ら(2007)の方法を若干変更してRISA法のフラグメント産物を調節した。PCR反応にはITSF/ITSReubプライマーを用いた。PCR増幅プログラムは 94°C2 分を 1 サイクル, 94°C1 分, 60°C1 分, 72°C2 分を 30 サイクル, 72°C1 分を 1 サイクルとし, DNA Engine™ PTC-200(MJ-Research)を用いてPCR反応を行った。PCR反応後の処理として, 増幅した産物 0.75 μ l, Gene Scan™-600LIZ Size Standard0.75 μ l, HDF13.5 μ lをPCRチューブに入れ, DNA Engine™ PTC-200 を用いて 95°Cで 2 分間加熱した。その後, 氷上で急冷しABI-3130 シーケンサーによって電気泳動を行った。泳動後のフラグメントの同定はPeak Scanner V1.0(ABI)で行った。サンプルごとに得られたデータのうち, 全フラグメントピークの高さ(height)に対する割合が 1%以上のものを選んだ。各サンプルで得られたフラグメントパターンの非類似度の解析はXLSTAT-Pro2009(マインドウェア総研)を用いた。8 つのサンプルを 1MTris-HCl(pH=8.0)で洗浄したもの, していないものの 4 つずつに分け, それぞれサンプル間に共通するフラグメントの有無を, 二進法(0 or 1)の行列式に変換し, その行列式から距離(非類似度)を算出した後, 近隣結合法によってデンドログラムを作成した(図 9・10)。

【結果】

図 9 は, DNA 抽出前に洗浄のため 1MTris-HCl(pH=8.0)を追加した堆積物のデンドログラム, 図 10 は添加しなかった堆積物のデンドログラムである。

これを見ると, 図 9, 図 10 のどちらにおいても堆積物の細菌群集構造はアウトグループであるシャットネラアンティカ培養液中のものと大きく異なっていた。しかし, 堆

積物の各サンプル間の非類似度は比較的小さく互いに同程度だったことから、アントラキノンの有無や一日程度の培養時間の経過によって、堆積物中の細菌群集構造はほとんど影響を受けないことがわかった。

【考察】

図 9・10 から、アントラキノンの有無、短期間の培養時間の経過は堆積物中の細菌群集構造にほとんど影響を及ぼしていないことが示唆された。この理由として、アントラキノンはSRBの硫酸呼吸のみに作用することでSRBを殺すことなく硫化物イオン発生を抑制し、SRBの現存量が減少することはないためであると考えられる。

〈実験 3〉 堆積物の保存方法(温度)の違いによる堆積物中の細菌群集組成の変化

【方法】

1. 堆積物の DNA 抽出

実験には、2009年11月に佐賀県鹿島で採集した干潟表層堆積物を用いた。その堆積物は採集後、1ヶ月間室温で保存していた。堆積物を乳鉢で攪拌・混合した後、5gずつ15mlの滅菌済み遠心管12本にそれぞれ移し入れた。その直後に無作為に選んだ3本の遠心管について、試料からDNA抽出し、0日目のDNA試料とした。その際には土壌用のDNA抽出キットISOIL(株式会社ニッポンジーン)を用いた。残りの試料を3つずつまとめて、それぞれ、4度、マイナス20度、室温(20~23度)で一週間暗所に静置保存した後、同様にDNA抽出した。また、2009年8月に採集した大村湾の表層堆積物についても、同様にDNAを抽出し、細菌群集構造解析に用いた。

2. 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) による細菌群集解析

まず、各堆積物から抽出した各DNAを鋳型とし、27Fと1492Rのプライマーセットで最初のPCR反応を行った。次に、そのPCR増幅産物を鋳型とし、341Fと907Rのプライマーセットを用いて2回目のPCR反応を行った。最後に2回目のPCR増幅産物を鋳型とし、786FGC1(CgC CCg CCg CgC gCg ggC ggg gCg ggg gCA Cgg ggg ggA TTA AAT ACC CTA g)と907R(CCg TCA ATT CCT TTR AgT TT)のプライマーセットを用いて3回目のPCR反応を行った。この3回目のPCR増幅産物について石井ら(2000)の方法に準拠して、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE)を行った。使用したゲルの変性剤濃度は0%~80%であり、電気泳動は100V、400mAnの状態では16時間行った。その後、SYBR-Greenによって染色を行い、FLA-5000(Fuji)を用いて、励起波長473nmでバンドパターンを読み取った。サンプル間に共通するバンドパターンの有無を、二進法(0 or 1)の行列式をもとにXLSTAT-Pro2009(マインドウェア総研)を用いて距離(非類似度)を算出した後、近隣結合法によってデンドログラムを作成した(図11)。

【結果】

図11は、0日目の細菌群集と4度、マイナス20度、室温の細菌群集および大村湾の表層堆積物の細菌群集のDGGEパターンである。0日目の細菌群集は、3つの試料のうち2つの試料しかバンドパターンが得られなかった。このバンドパターンをもとにサンプル間の非類似度をデンドログラムに表したものが図12である。これを見ると、佐賀県鹿島干潟で採集した堆積物と大村湾で採集した堆積物の細菌群集の組成は、大きく異なっていることがわかった。また、鹿島干潟で採集した堆積物に注目すると、マイナ

ス 20 度で保存したものと室温で保存したものは群集構造が似ているが、4 度で保存したものはこの二つと異なる群集組成を持つことが示唆された。さらに、同じ状態で保存したものでもサンプル間で、群集組成が大きく異なっているものも見られた。

【考察】

図 12 から明らかのように、鹿島干潟で採集した堆積物の保存方法(温度)による細菌群集の違いに注目すると、マイナス 20 度で保存したものと室温で保存したものは群集構造が似ているが、4 度で保存したものはそれ以外と比較して異なる群集構造を持つことがわかった。このことから、干潟表層堆積物を 4 度で数日間保存することにより、細菌群集構造が変化することが明らかとなった。実験 1 の実験⑤より、4 度で数日間保存した堆積物にアントラキノンを追加してもアントラキノンの効果が得られなかったことと合わせて考えると、堆積物を 4 度で保存することによって堆積物中の SRB 群集構造が変化し、アントラキノンが効かない SRB 群集が増加した可能性があると考えられる。しかし、どのような細菌が変化しているかどうかについては解析しておらず、今後さらなる分析を行う必要があると考える。

また、堆積物を同じ 4 度で保存した場合でも、4 度①と 4 度②、③では堆積物の群集構造が大きく異なっていたことが読み取れた。これは、実験①～⑥において、同じ堆積物試料を同じ条件下で試験しても、アントラキノンによる硫化物の発生抑制効果が安定して得られなかったこと的有力な説明になると考えられる。すなわち、実験開始前には、堆積物試料を攪拌・混合しているが、堆積物試料間で依然として細菌群集が不均一に分布しており、アントラキノンの感受性の異なる細菌群集も、試料間で均等に存在していなかった可能性が高い。

以上のことから、細菌群集構造の違いがアントラキノンの硫化物イオン発生抑制効果に大きく影響を及ぼしている可能性が示唆された。このことから、アントラキノンを実際に現場の堆積物で用いるためには、現場の堆積物の SRB 群集がどの程度アントラキノンに耐性を持つかどうかをあらかじめ調べる必要があると考える。また、堆積物中の SRB 群集に効果があるアントラキノンの適切な濃度を検討することや、堆積物中に生息する水生生物に対する安全性なども考慮していく必要がある。

〈実験 4〉 火山灰土型リン吸着材を海水に添加した際のリン吸着効果 1

【方法】

ミリQ水もしくは濾過滅菌海水に $10\mu\text{MPO}_4^{3-}$ となるようにリン酸標準液を加えた。この標準液 100ml に対して、火山灰土型リン吸着材として市販されているピーチャッチ®(株式会社クレアテラより提供)をそれぞれ 0mg, 40mg, 400mg, 4000mg 添加した。室温に静置し、翌日と翌々日に、GF/Fフィルター(25mmφ)でろ過した試水中のリン酸イオン量を、リン酸イオン測定キット(HACH社)を用いて、モリブデン酸法により吸光度 665nm を吸光光度計(DR-2800 HACH社)で測定した。また、リン酸を添加しないミリQ水、および 3%の食塩水の測定値を用いてゼロ校正を行った。

翌日(1日目)、翌々日(2日目)に測定した、リン酸を添加したミリQ水内のリン酸イオン量の変化を図 13、リン酸を加えた海水内のリン酸イオン量の変化を図 14 に表した。また、リン吸着材を添加しなかった(0mg)ときのリン酸イオン量を 100(%)としたときの残存割合の変化を図 15・16 に表した。これらのグラフの横軸は試水 10ml 中に添加したリン吸着材の量を示している。

【結果】

図 13・15 を見ると、リン吸着材を 0.4~4g/L 加えたとき、リン吸着材の量、時間の経過に伴ってミリQ水中のリン酸イオン量が減少していた。しかし、リン吸着材を 40g/L 加えたとき、4g/L 加えたときと比較して、また 1日目から 2日目にかけてミリQ水中のリン酸イオン量は増加していた。

図 14・16 を見ると、1日目はリン吸着材を 0.4g/L から 40g/L 加えたとき、リン吸着材の量に比例して海水中のリン酸イオン量が減少した。しかし、2日目はリン吸着材を 40g/L 加えたとき、4g/L 加えたときと比較して海水中のリン酸イオン量が増加した。

【考察】

図 13・15 より、リン吸着材を 0.4~4g/L 加えたとき、リン吸着材の量、時間の経過に伴ってミリQ水中のリン酸イオン量が減少していたことから、リン吸着効果が見られたことがわかった。しかし、リン吸着材を 40g/L 加えたとき、4g/L 加えたときと比較して、また 1日目から 2日目にかけてミリQ水中のリン酸イオン量は増加していたことから、リン吸着効果が見られなかった。

図 14・16 より、1日目はリン吸着材を 0.4g/L から 40g/L 加えたとき、リン吸着材の量に比例して海水中のリン酸イオン量が減少したことから、リン吸着効果が見られた。しかし、2日目はリン吸着材を 40g/L 加えたとき、4g/L 加えたときと比較して海水中

のリン酸イオン量が増加したことから、リン吸着効果が見られなかった。

以上のことから、ミリ Q 水もしくは海水に添加するリン吸着材の適切な濃度は 0.4～4g/L であることがわかった。今回は 2 日間という短期間のリン吸着効果に着目しており、長期的な変化がどのように起こっているかについては検証していないため、添加するリン吸着材の適切な量をさらに検証していく必要があると考えられる。また、リン吸着材ミリ Q 水もしくは海水に 4g/L 以上添加し 2 日間静置したところ、リン吸着効果が見られなかった。この現象の詳しい原因はわからないが、リン酸イオン量を測定する前にサンプルをフィルターでろ過しているものの、時間の経過に伴って微細化したリン吸着材の粒子がろ液に混入した可能性があると考えられる。

〈実験 5〉 火山灰土型リン吸着材を海水に添加した際のリン吸着効果 2

【方法】

濾過滅菌海水に $10 \mu\text{M PO}_4^{3-}$ となるようにリン酸標準液を加えた。この標準液 100ml に対して、火山灰土型リン吸着材として市販されているピーチャッチ®(株式会社クレアテラより提供)を 400mg 添加した。同様の海水を 2 セット用意して、室温に一週間静置し、GF/F フィルター(25mm ϕ)でろ過した試水中のリン酸イオン量を、リン酸イオン測定キット(HACH社)を用いて、モリブデン酸法により吸光度 665nm を吸光光度計(DR-2800 HACH社)で毎日測定した。このときリン酸を添加しない 3%の食塩水の測定値を用いてゼロ校正を行った。

【結果】

図 17 に示すように、リン吸着材 4g/L の存在下で、海水中のリン酸イオン量は一週間で、 $1.9 \text{ mg PO}_4^{3-}/\text{L}$ から $0.2 \text{ mg PO}_4^{3-}/\text{L}$ まで減少し、リンの除去率は初期濃度の 90% に達した。リン酸イオンの減少率は、0 日目から 1 日目までがもっとも大きく、初期値のおよそ 1/2 となった。

【考察】

本実験により、静置した海水中でも火山灰土型吸着材の施用によって 1 週間で溶存リンの 9 割を除去できることが示された。これは、淡水環境において同吸着剤が示すリン除去能力(柳田ら, 1998) と同等であった。実験 4 では、2 日間という短期間のリン除去効果を確認したが、本実験の結果により、火山灰土型リン吸着材を長期間施用することによって、より効率的にリンを除去できることが示された。

【総括】

本研究により、室内実験の条件下ではあるが、1,9-アントラキノンもしくは1,8-ジヒドロキシアントラキノン $10\mu\text{M}$ という極低濃度添加することによって沿岸堆積物から硫化物発生が抑制されることを確認した。また、近年開発された火山灰土型リン吸着材（ピーキャッチ®、クレアテラ（株））による海水の溶存リン除去効果も確認できた。したがって、これらの化学的手法は原理的に有明海の底質環境の保全に実施できると考えられる。しかし、実際に現場で使用するためには、まだ多くの課題を検討する必要がある。特にアントラキノンについては、堆積物の硫酸還元細菌群集がアントラキノンに対して感受性を示すかどうかを調べる必要がある。アントラキノン自体は食品にも含まれる化合物であり、元来毒性は低いと考えられるが、 μM オーダーという低濃度であっても、添加した際の水生生物に対する安全性は、今後詳細に検討する必要がある。火山灰土型リン吸着材については、施用する海域や立地などを考慮して、リン除去の効果が現れるリン吸着材の最適な量や、添加する期間、通水方法などを検討していく必要がある。

【引用文献】

- 寺澤 克夫, 沼田 繁明 1999. アントラキノン製剤による硫化水素発生の抑制機構と抑制効果. 月刊下水道 Vol.22 No.6,70-75
- 柳田 友隆, 江 耀宗, 佐藤 正路, 安達 栄一, 原田 昭勇, 1998. リン酸除去材による河川水の水質浄化. 環境技術, Vol.27. No.3, pp.231-236,
- 堀越 弘毅, 2006. ベーシックマスター 微生物学(オーム社) pp223-225
- 江 耀宗, 柳田 友隆, 三谷 知世, 2005. カラム実験を用いた硫酸第一鉄混合・加熱処理火山灰土壌による水中のリン除去. 水環境学会誌 Vol.28, No.5,pp327-332
- 齋藤 朝美, 池田 成志, 則武 ちあき, 赤坂 真理子, 藤城 圭輔, 安藤 勝彦, 南澤 究, 2007. RISA 法による微生物多様性評価. 日本微生物生態学会誌 Vol.22,59-71
- 石井 浩介, 中川 達功, 福井 学. 2000. 微生物生態学への変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の応用. 日本微生物生態学会誌 Vol.15, No.1, pp59-73

【図表】

表1. 実験で用いた泥と薬品の種類

| 薬品 \ 泥 | イトゴカイ飼育泥 | 干潟表層堆積物 |
|------------------------|----------|----------|
| サルフコントロール | 実験① | |
| 1.9アントラキノン | 実験② | 実験④ |
| 1.8-ジヒドロキシ- アントラキノン | 実験③ | 実験⑤, 実験⑥ |

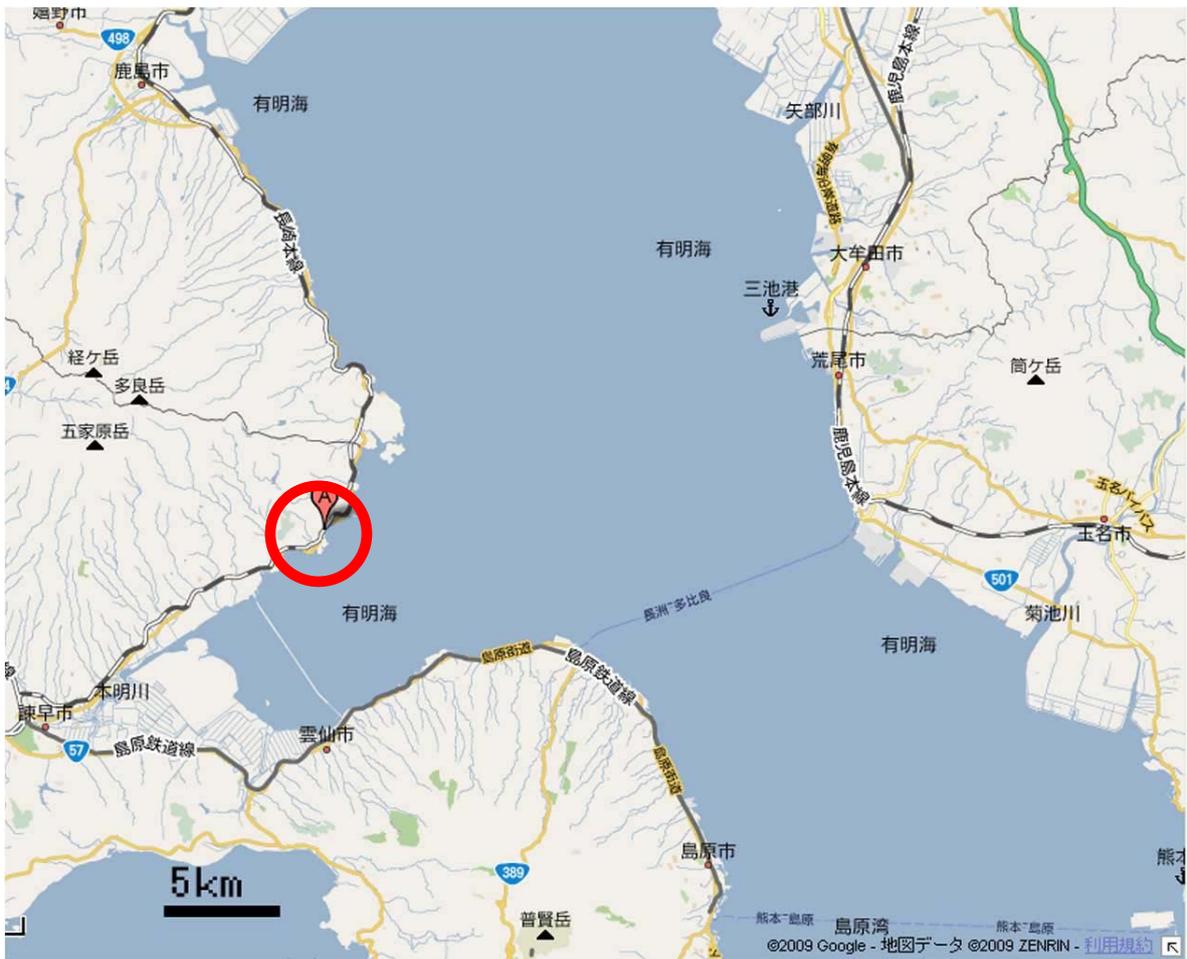


図 1. 干潟表層堆積物の採取地点

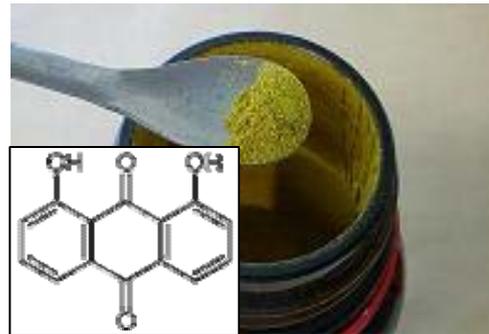
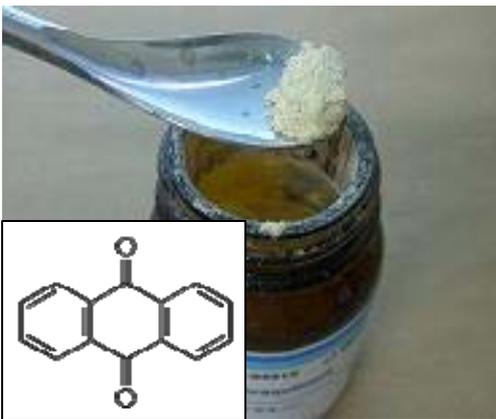


図 2. 実験に使用したアントラキノン製剤

(左上)1,9 アントラキノン(右), 1,8-ジヒドロキシ-アントラキノン(左)

(右上)サルフコントロール

(左下)1,9 アントラキノンと化学式

(右下)1,8-ジヒドロキシ-アントラキノンと化学式

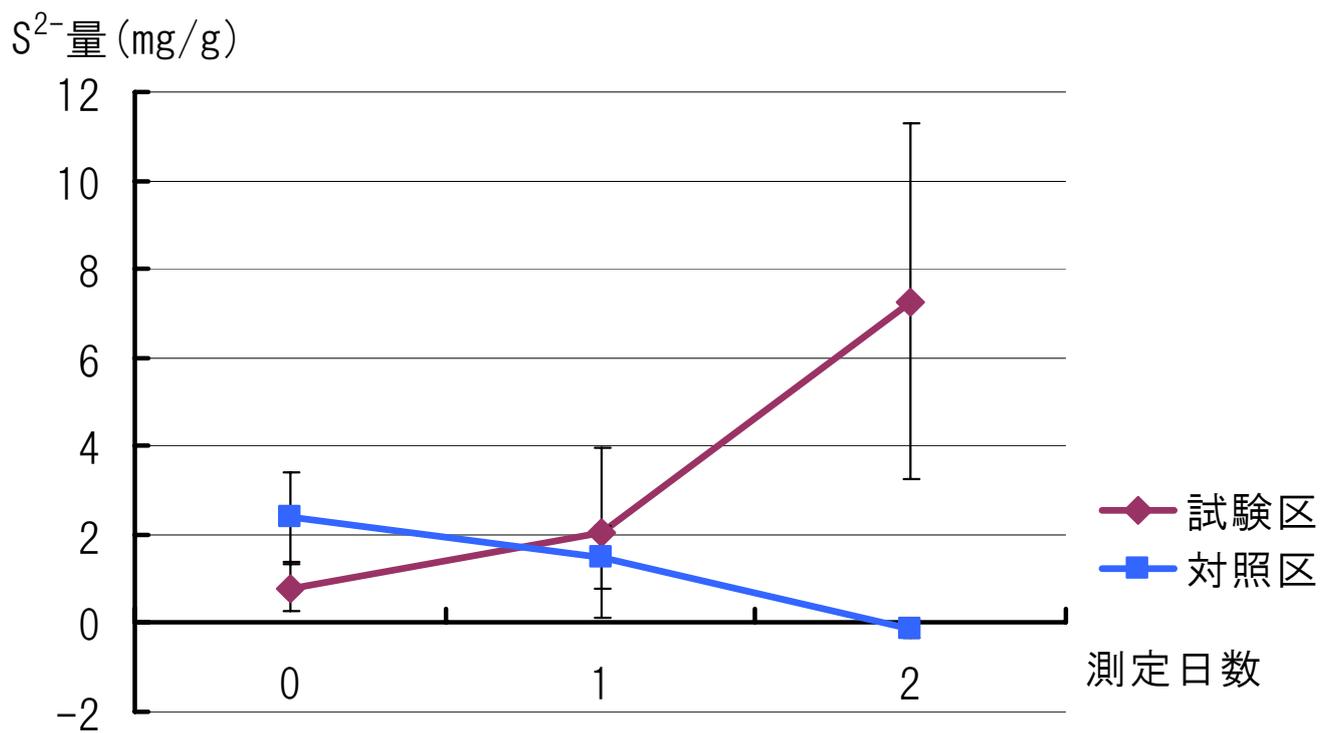


図3. 実験①におけるイトゴカイ飼育泥中の S^{2-} 量の変化
 エラーバーは標準偏差を表している (n=3)

試験区にはサルフコントロールを添加した

S²⁻量(mg/g)

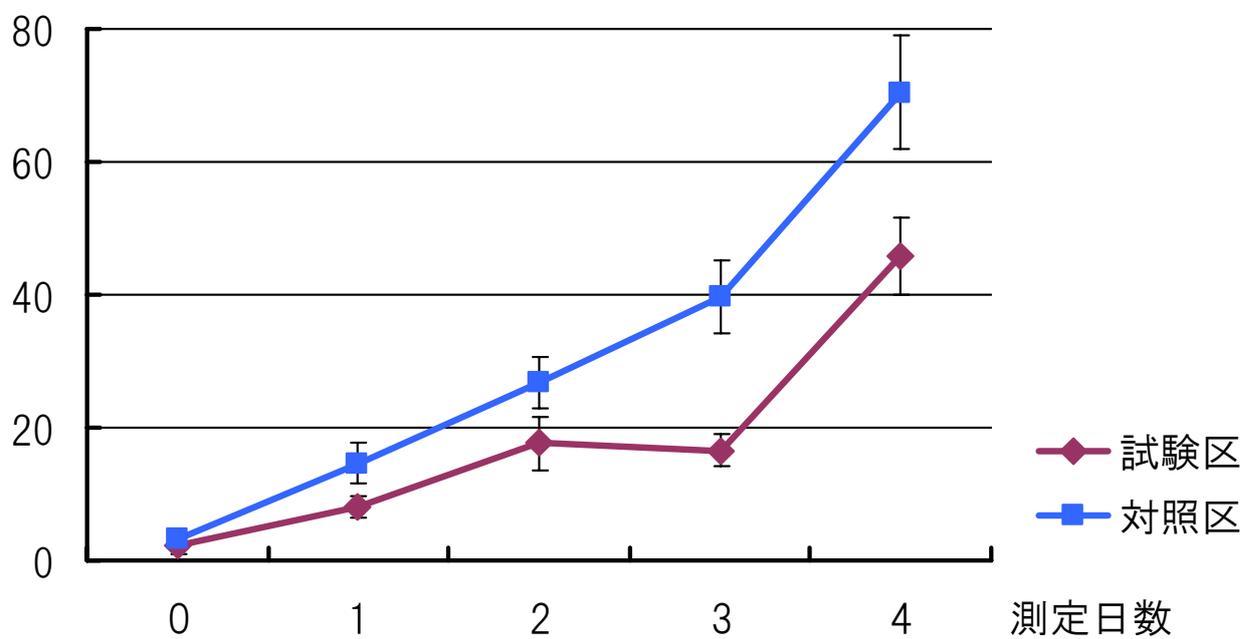


図4. 実験②におけるイトゴカイ飼育泥中のS²⁻量の変化
エラーバーは標準偏差を表している (n=3)

試験区には1.9-アントラキノンを追加した

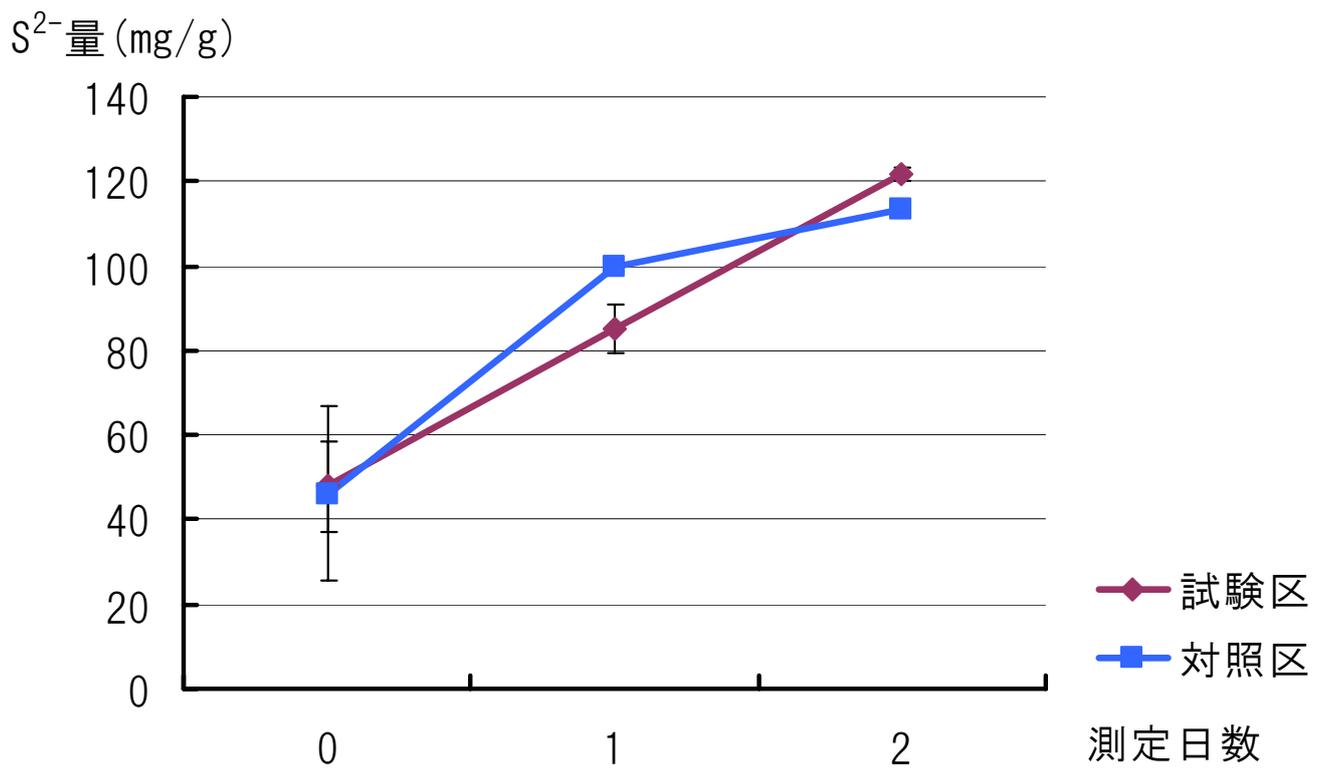


図5. 実験③におけるイトゴカイ飼育泥中のS²⁻量の変化
エラーバーは標準偏差を表している (n=3)

試験区には1,8-ジヒドロキシ-アントラキノンを追加した

S²⁻量(mg/g)

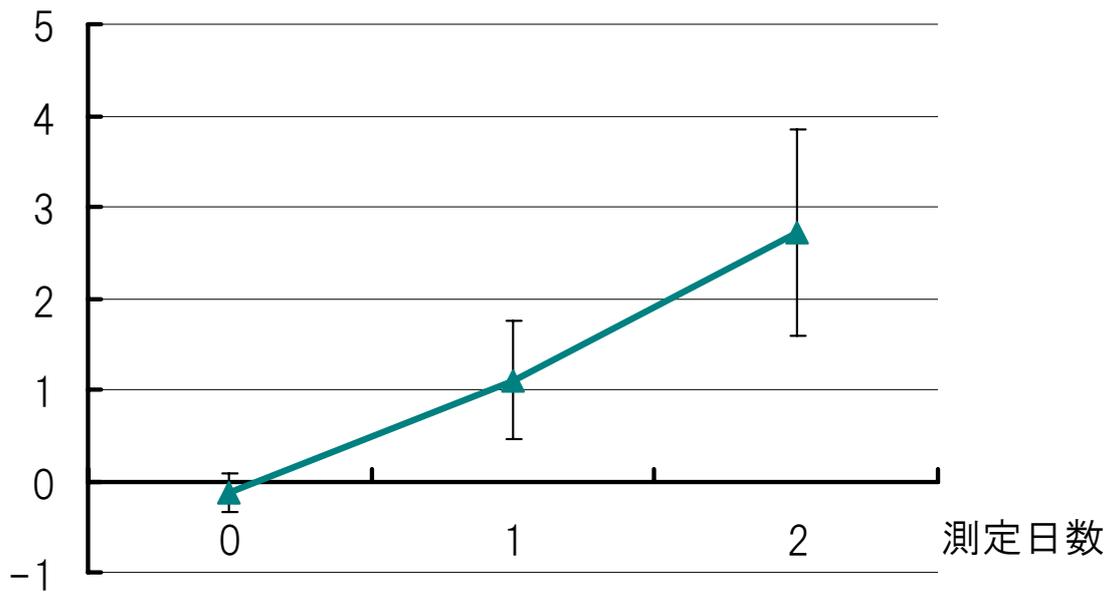


図. 6-1 実験④における干潟表層堆積物中のS²⁻量の変化
エラーバーは標準偏差を表している (n=3)

S²⁻量 (mg/g)

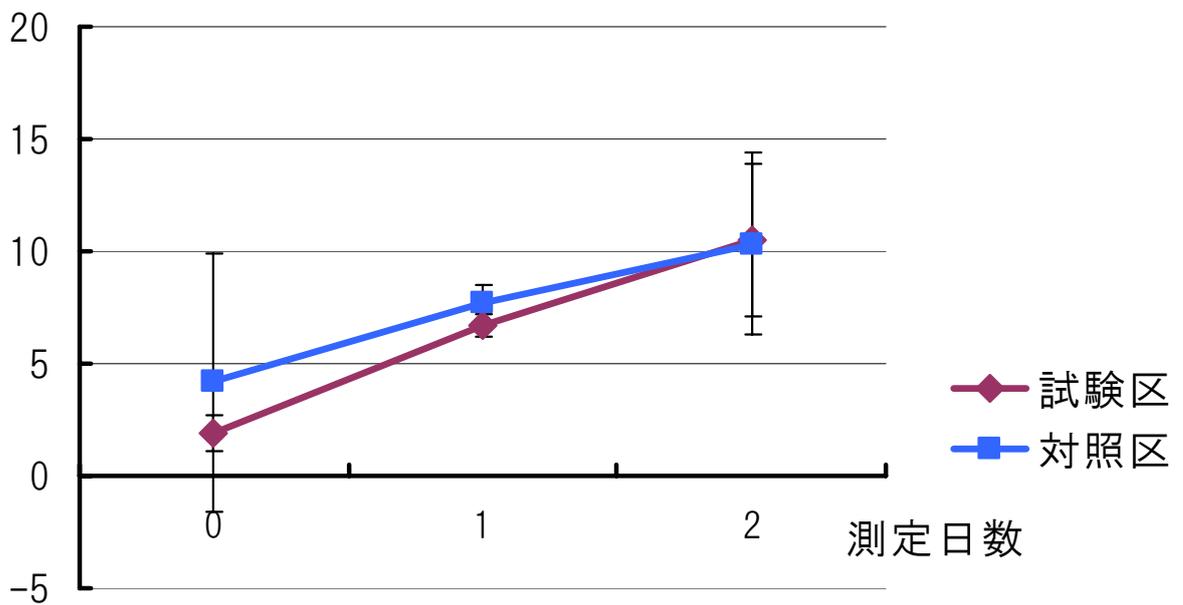


図6-2. 実験④における干潟表層堆積物中のS²⁻量の変化
エラーバーは標準偏差を表している (n=3)

試験区には1,9-アントラキノンを追加した

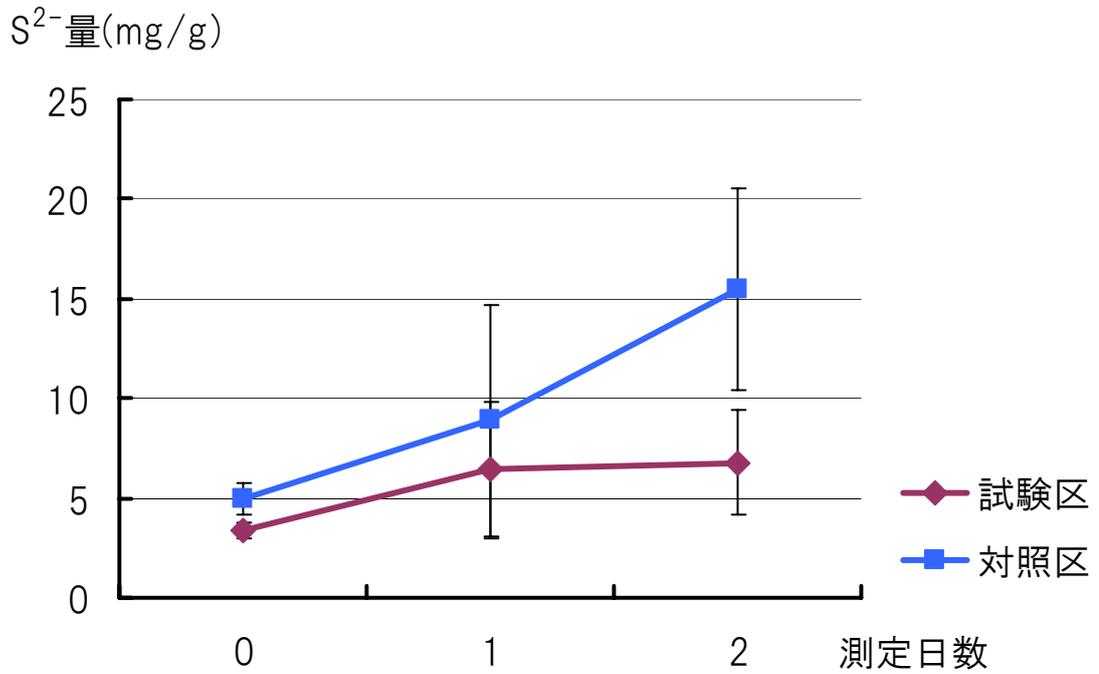


図7-1. 実験⑤における干潟表層堆積物の S^{2-} 量の変化
エラーバーは標準偏差を表している (n=3)

試験区には1.8-ジヒドロキシ-アントラキノンを追加した堆積物試料はマイナス20度から解凍して直ちに使用した

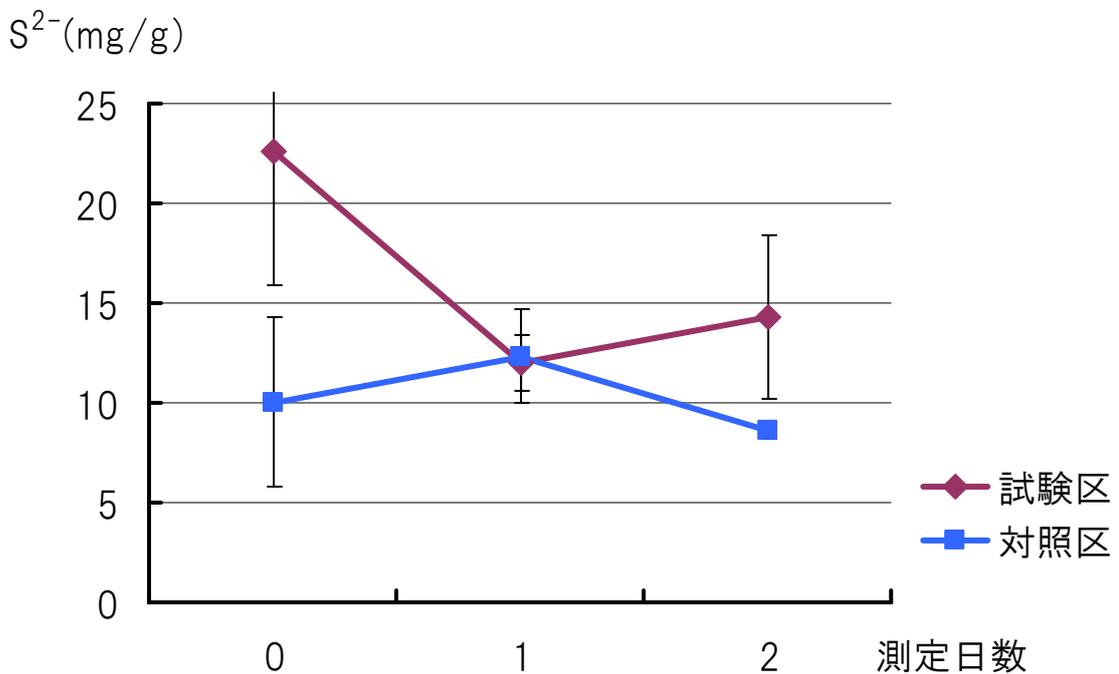


図7-2. 実験⑤における干潟表層堆積物 S^{2-} 量の変化
エラーバーは標準偏差を表している (n=3)

試験区には1.8-ジヒドロキシ-アントラキノンを追加した堆積物試料はマイナス20度から解凍後4度で保存したものをういた

S²⁻量(mg/g)

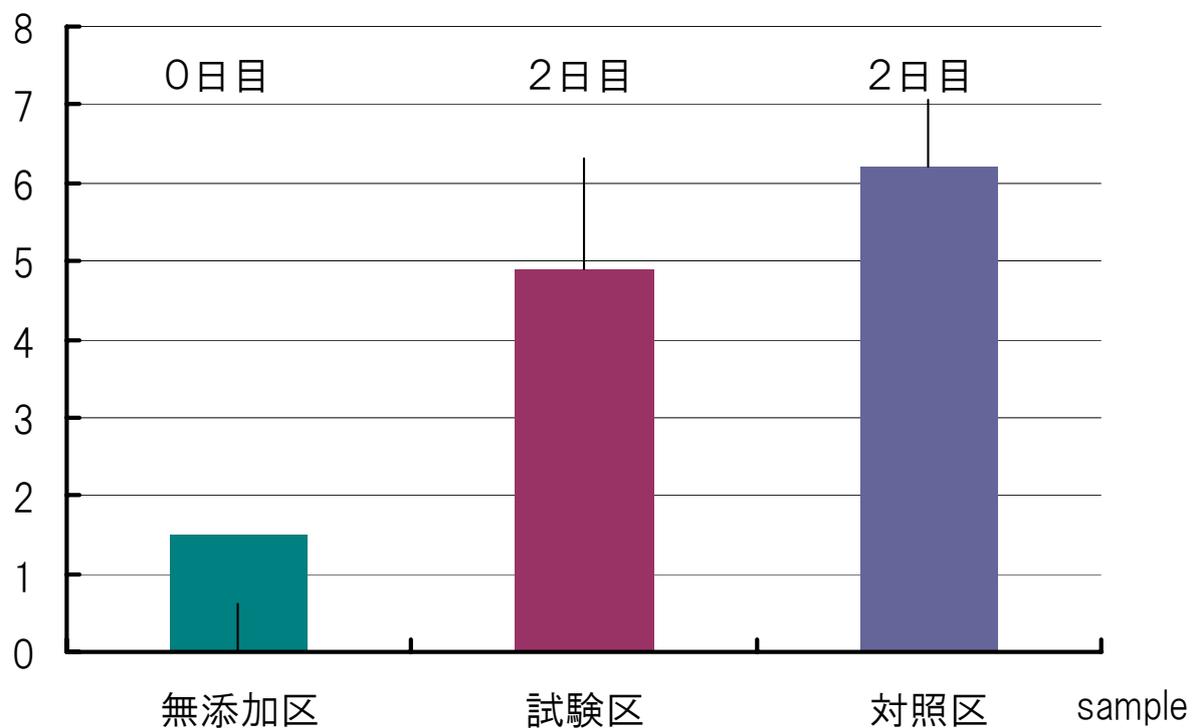


図8. 実験⑥における干潟表層堆積物中のS²⁻量の変化
(無試験区は0日目、試験区、対照区は2日目に測定した)
エラーバーは標準偏差を表している (n=5)

試験区には1.8-ジヒドロキシ-アントラキノンを追加した

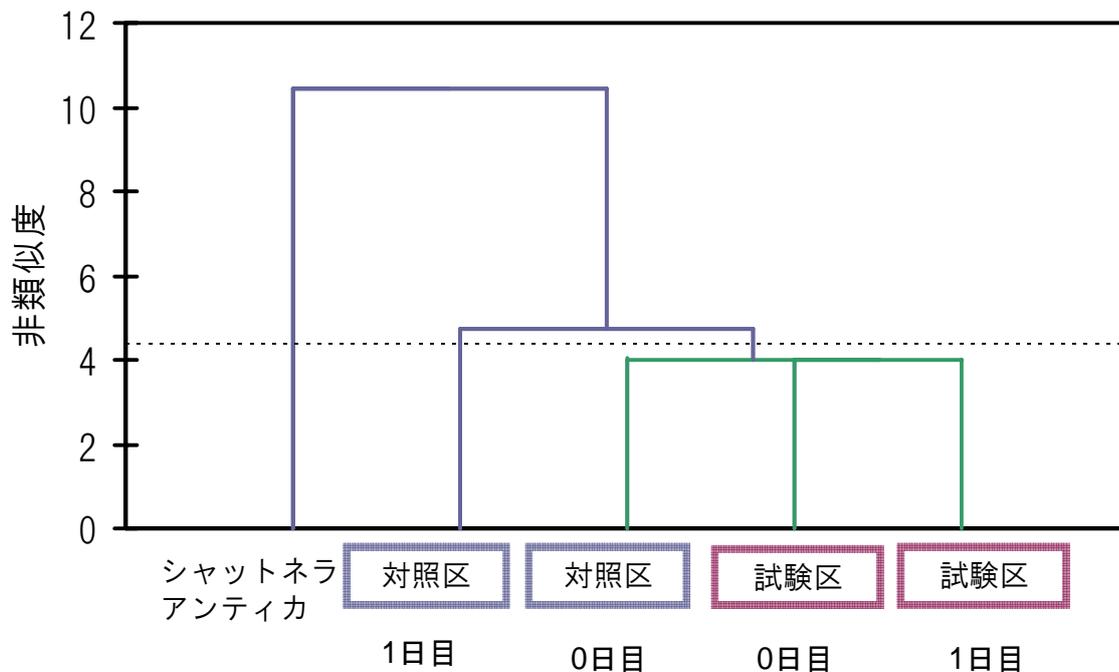


図9. アントラキノンの添加の有無による細菌群集構造の変化

試験区には1. 9-アントラキノンを添加した
シャットネラアンティカ培養液中の細菌群集をアウトグループとして
各試料間のRISAフラグメントパターンから非類似度を求めた

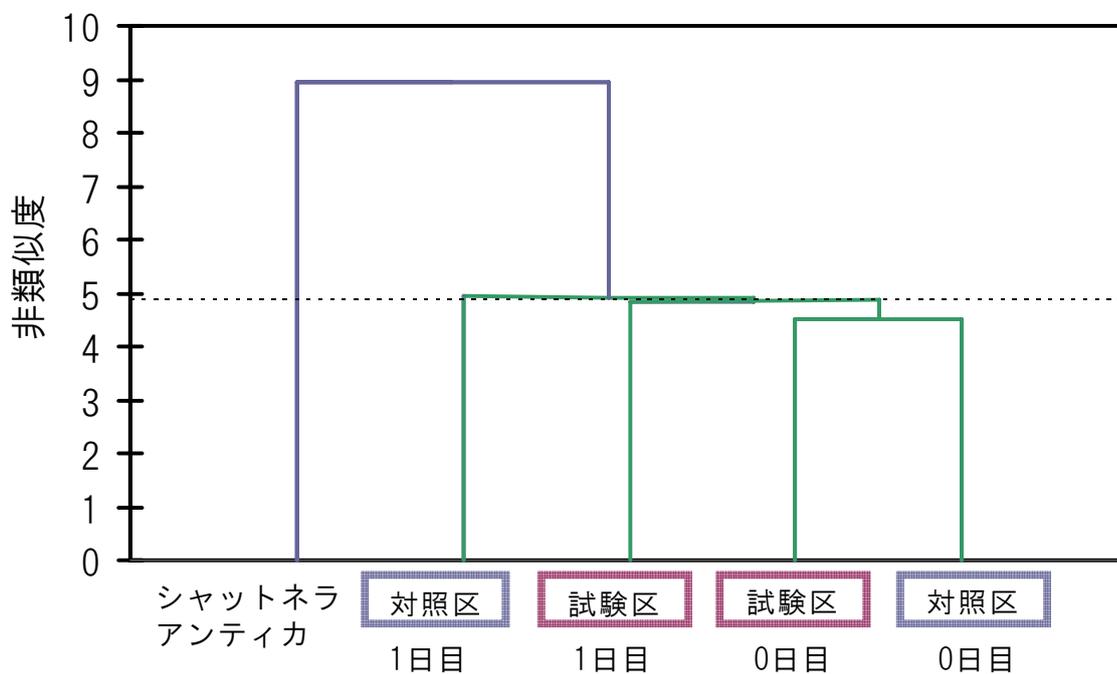


図10. アントラキノンの添加の有無による細菌群集構造の解析
(DNA抽出の際に堆積物試料にTris-HClを添加して中和した)

試験区には1. 9-アントラキノンを添加した
シャットネラアンティカ培養液中の細菌群集をアウトグループとして
各試料間のRISAフラグメントパターンから非類似度を求めた

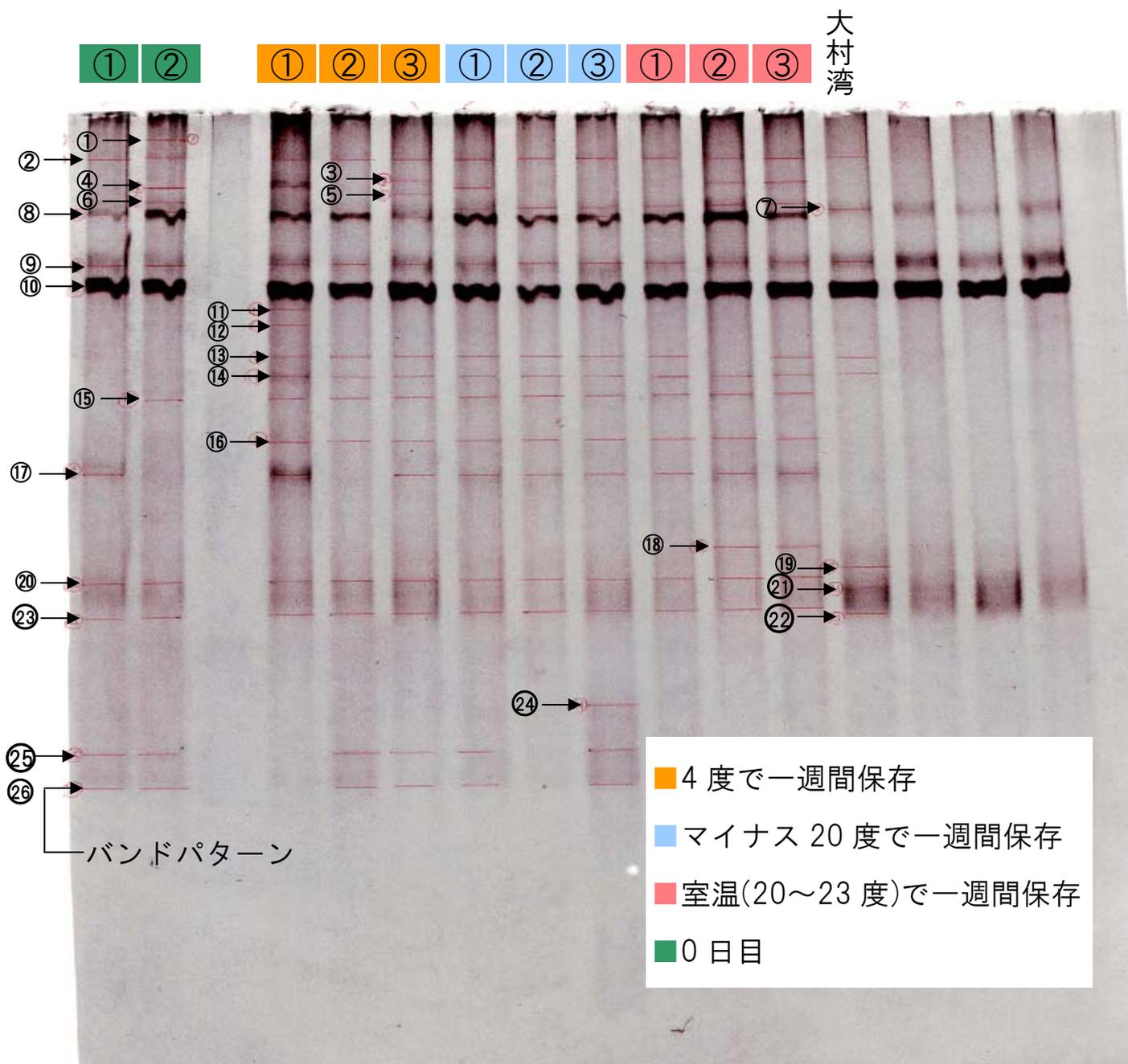


図 11. DGGE より得られたバンドパターン

番号①～②⑥の矢印(→)を付けたバンドのパターンに基づいて
微生物群集構造の解析を行った(図 12 参照)

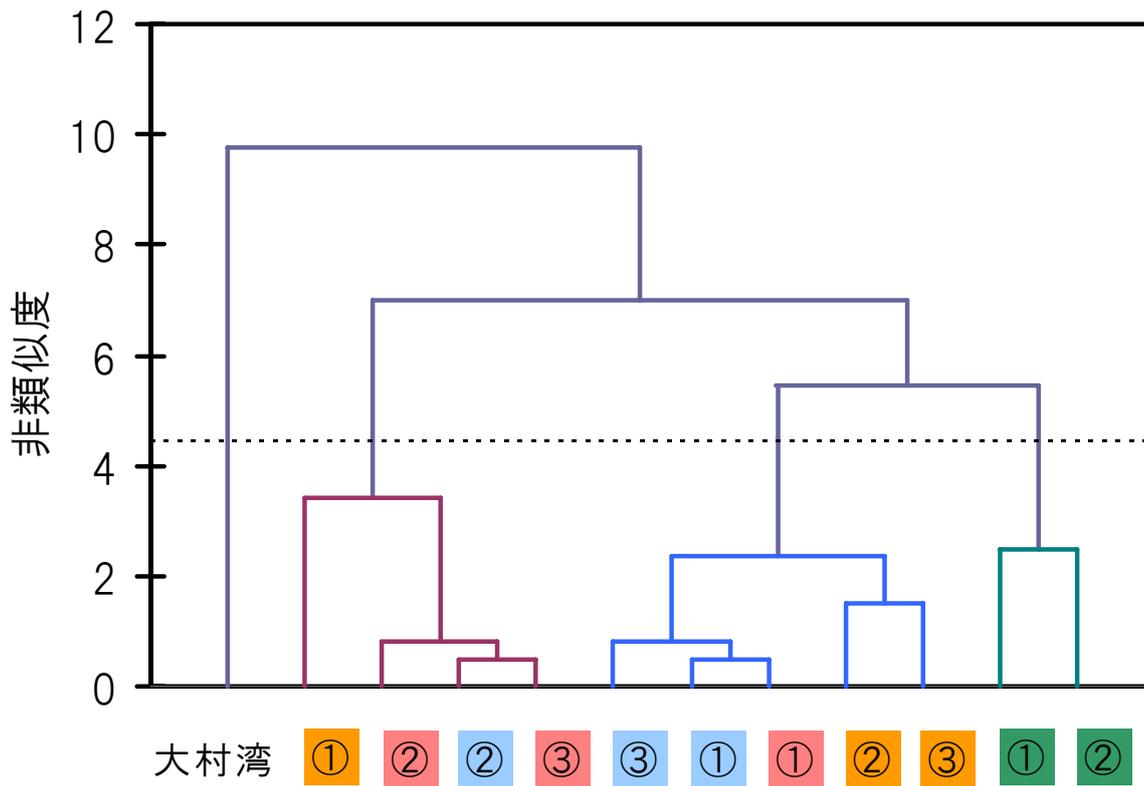


図12. 堆積物の保存方法(温度)による細菌群集構造の変化

大村湾の表層堆積物をアウトグループとして、
各堆積物試料間のDGGEバンドパターン(図11参照)の非類似度を表示した

- 4度で一週間保存
- マイナス20度で一週間保存
- 室温(20~23度)で一週間保存
- 0日目

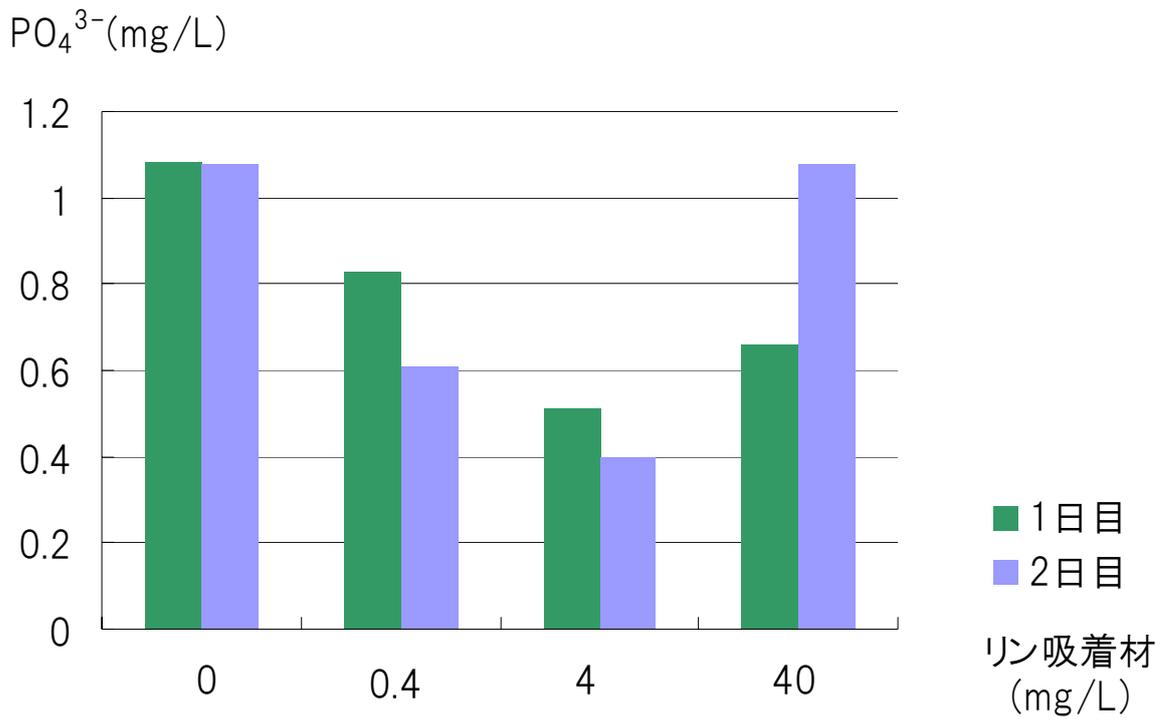


図13. ミリQ水にリン吸着材を添加したときのPO₄³⁻量の変化

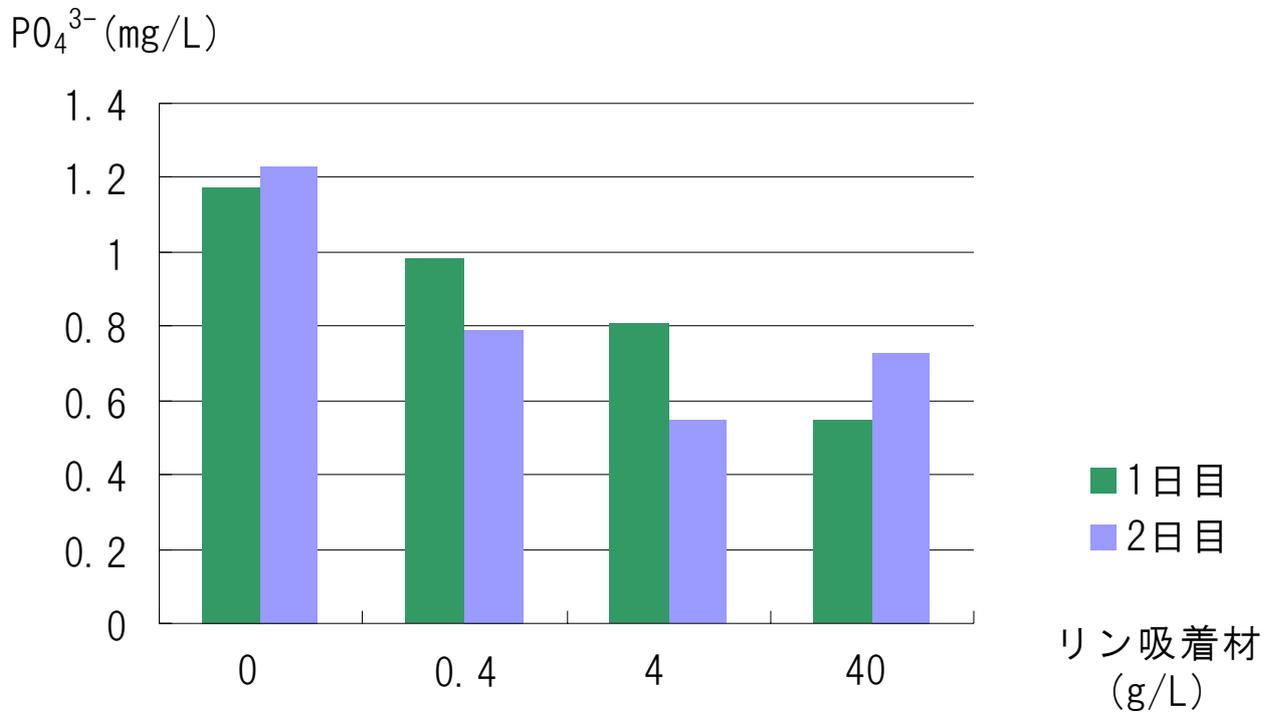


図14. 海水にリン吸着材を添加したときのPO₄³⁻量の変化

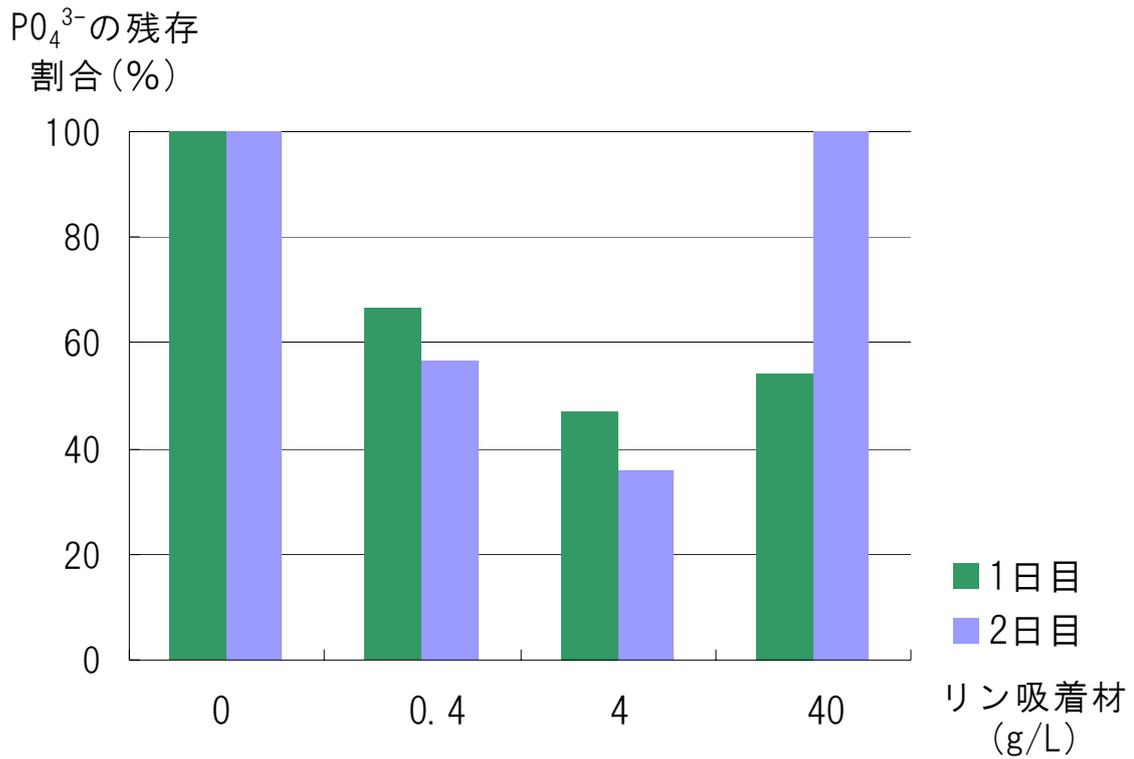


図15. リン吸着剤を添加したミリQ水中のPO₄³⁻の残存割合の変化

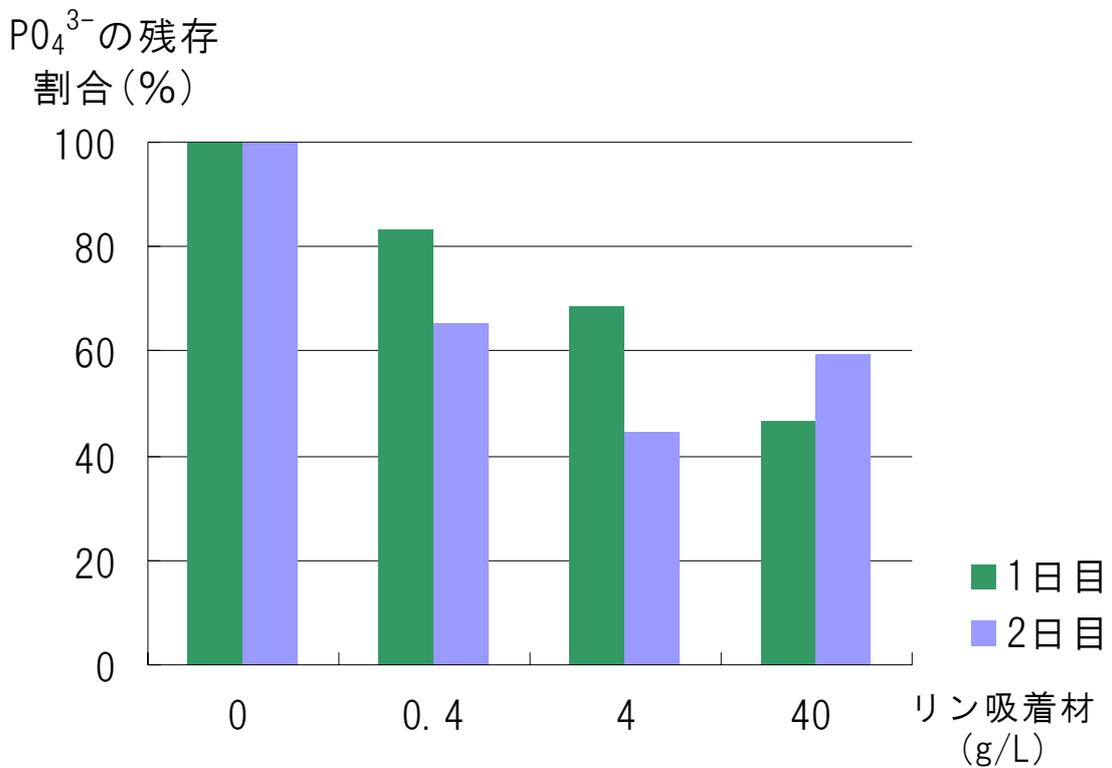


図16. リン吸着材を添加した海水中のPO₄³⁻の残存割合の変化

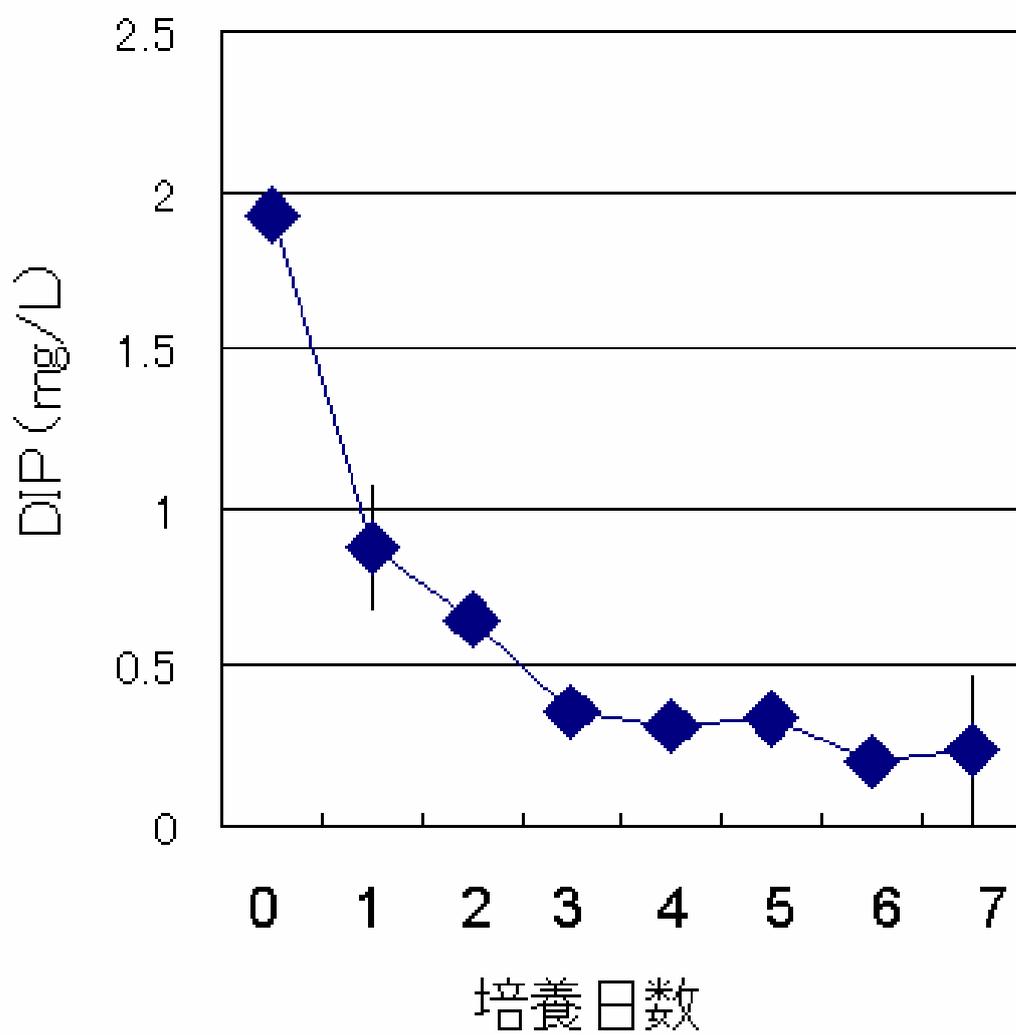


図 17. リン吸着剤を 4g/L添加した海水中の PO_4^{3-} 量の変化