

ポリアクリル管をそのまま実験室へ持ち帰った。底質試料は各地点から2箇所ずつ採り、アイスボックスに入れて持ち帰り、直ちに窒素分析、窒素固定能、脱窒能を2連制で測定した。

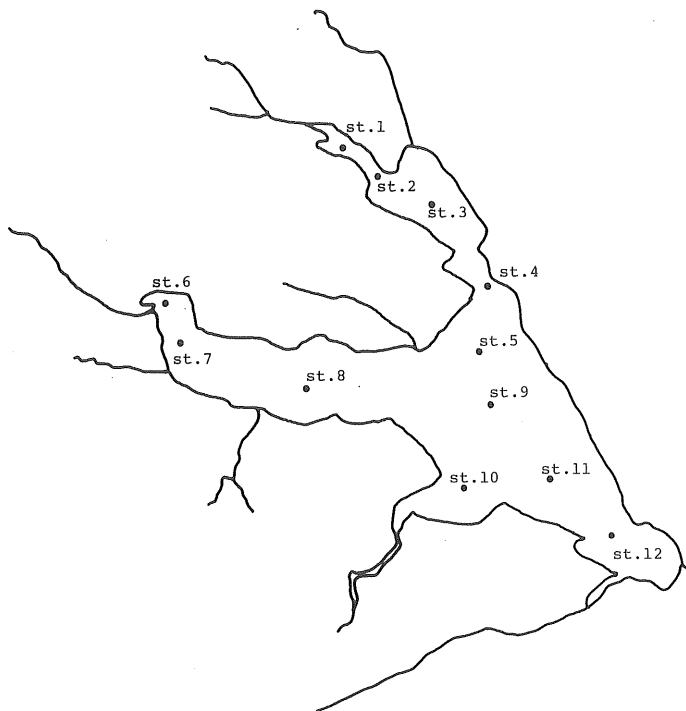


Figure 1. Sampling sites of surface water and sediment in Lake Kasumigaura.

無機態窒素量および細菌数の測定

無機態窒素の定量は、原則的にはBremnerの方法³⁾によって行なった。底質約15gを300cc容BOD瓶にとり、2N-KCL 100mlで1時間、往復式振とう機で振とう濾過したのち、それぞれ、アンモニア態窒素、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素の定量を行なった。なお、7月28日と8月25日の底質試料については、表層約20cmまでをよく混合し、その一部を、12月9日の試料については表層5cmをガラス管で抜きとったものについて無機態窒素の分析を行なった。

脱窒菌の測定は硝酸肉エキス培地 (Difco)を用い、菌数算出は最確値法 (MPN法)で行なった。

試験管培地中に挿入したダラム管（倒立管）内にガスがたまつた場合を、脱窒菌が存在するものとした。また、この培地に生育し得る細菌数を同様に、最確法によって計測して全細菌数を算出した。

窒素固定能の測定

生物的窒素固定能を測定する方法のうち、自然条件下での活性を迅速に測定しうるものはない。現時点では、窒素固定酵素がアセチレンをエチレンに還元することを応用して用いられている、アセチレン還元法⁴⁾ももっとも *in situ* に近い条件で窒素固定能が測定できる方法である。底質を乾物当りで約15gをすみやかに300cc容BOD瓶にとり、注射針用二重ゴム栓をし、ゴム栓には25ゲージの注射針を挿入しておいて真空用デシケータ内に入れた。デシケータはガス交換装置に接続し、BOD瓶内の気相をヘリウムガスと置換した。この操作を3回繰り返したのち、デシケータの蓋をとり去ると同時に、ゴム栓に挿入した注射針を直ちに抜きとった。容器内の気相はさらに、注射筒を用いて10%容のアセチレンガスと置換した。気相調整後、BOD瓶は30℃に24及至48時間保存したのち、気相1mlをガスタイトシリンジでとり、エチレンガス濃度をガスクロマトグラフ法によって行なった。

脱窒能の測定

脱窒能の測定は従来、同位元素N-15を用いるほかは、大氣中に多量に分布する窒素ガスのため、きわめて困難であった。最近、脱窒反応による最終生成物質に少量含まれている亜酸化窒素ガス(N₂O)が、アセチレンガスの存在下では、硝酸(NO₃⁻)から脱窒作用によって定量時に生成されることが報告された⁶⁾。この原理を用いて、亜酸化窒素ガスの測定によって脱窒能を測定した。

底質5gを100cc容BOD瓶にとり、1μgの硝酸態窒素を含んだ硝酸加里溶液10mlを加えたのち、直ちに注射針用二重ゴム栓をし、前述の方法で容器内の気相をヘリウムと置換した。容器内の気相はさらに、注射筒を用いて1%をアセチレンガスと置換し、30℃に保った。この条件では、硝酸から亜酸化窒素ガスが経時的に生成され、17時間で定量的に回収されることが予備実験で確かめられた。BOD瓶内の気相は、3及至5時間後にガスクロマトグラフ法によって亜酸化窒素ガスについて定量された。

実 験 結 果

底質中の無機態窒素は殆んどがアンモニア態で、7月28日の底質中のアンモニア濃度は乾物当り143及至208μmの範囲に分布し（第1表）、8月25日には無機態窒素濃度は減少を示し、とくにSt. 1およびSt. 2のアンモニア態窒素濃度は、著しく低下した（第2表）。しかし、St. 1およびSt. 2での硝酸および亜硝酸態窒素濃度はかなり増加した。12月9日には、著しく無機態窒素濃度は減少した（第3表）。

Table 1. Concentrations of inorganic nitrogen in the sediments and the biological N_2 -fixation and denitrification activities in Lake Kasumigaura (Samples of July 28, 1977).

Sampling sites	Concentration of nitrogen		N_2 -fixing activity (ngN/g/day)	Denitrifying activity (μ gN/g/day)
	NH_4 -N (ppm)	NO_3 -N + NO_2 -N (ppm)		
St. 1	204.4	2.3	5.9	2.8
St. 2	208.2	2.2	26.3	1.7
St. 3	143.8	0.1	23.5	5.9
St. 4	204.1	0.1	37.0	3.4
St. 5	159.2	3.2	19.0	5.6
St. 8	208.0	0.1	15.7	4.5
St. 9	195.5	1.0	28.6	5.9
St. 10	178.2	0.2	21.3	5.0
St. 11	183.1	1.1	27.4	4.5
St. 12	176.7	2.3	8.3	1.7
Mean value	186.8	1.3	21.3	4.1

Table 2. Concentrations of inorganic nitrogen in the sediments and the biological N_2 -fixation and denitrification activities in Lake Kasumigaura (Samples of August 25, 1977).

Sampling sites	Concentration of inorganic nitrogen		N_2 -fixing activity (ngN/g/day)	Denitrifying activity (μ g N/g/day)
	NH_4 -N (ppm)	NO_3 -N + NO_2 -N (ppm)		
St. 1	96.4	3.3	129.4	5.8
St. 2	83.8	5.2	213.1	3.4
St. 3	115.3	0.2	29.1	11.5
St. 4	179.6	0.7	96.9	10.4
St. 5	123.5	1.4	93.2	12.3
Mean value	119.7	2.2	112.3	8.7

Table 3. Concentrations of inorganic nitrogen in the sediments and the biological N_2 -fixation and denitrification activities in Lake Kasumigaura (Samples of December 9).

Sampling sites	Concentration of inorganic nitrogen		N_2 -fixing activity (ng N/g/day)	Denitrifying activity (μ g N/g/day)
	NH_4 -N (ppm)	NO_3 -N + NO_2 -N (ppm)		
St. 1	37.0	< 0.1	69.7	81.7
St. 2	59.2	< 0.1	161.7	165.0
St. 3	98.5	< 0.1	154.2	-
St. 4	74.4	< 0.1	181.1	-
St. 5	79.2	< 0.1	117.6	-
Mean value	69.7	< 0.1	136.9	93.4

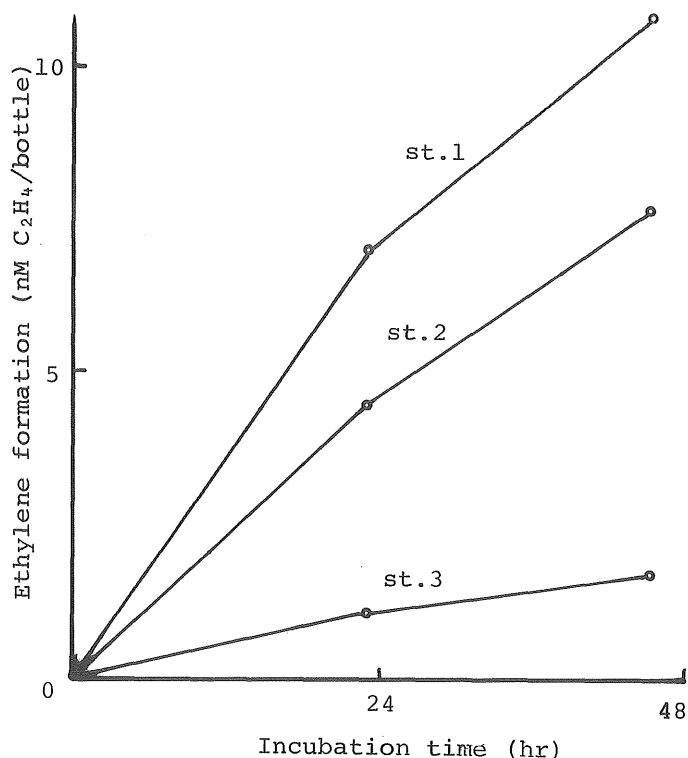


Figure 2. Time course of acetylene-reducing activity of sediments of Lake Kasumigaura.

4月14日採取した底質試料についてアセチレン還元能測定の予備実験を行なった。その結果、底質の窒素固定能は2日間の測定期間、活性はほぼ直線的に上昇した(第2図)。また、その活性はSt. 1, St. 2, St. 3の順に湖岸に近い程高い値を示した。7月28日の底質試料について測定した結果では、湖岸に近いSt. 1およびSt. 12において低い値を示したが、それ以外の箇所では15及至37ngN g⁻¹ day⁻¹の活性を示した(第1表)。底質中の無機態窒素濃度が低下した8月25日には、窒素固定能は著しく増加して、とくに無機態窒素濃度の低かったSt. 1およびSt. 2において著しく高い活性を示した(第2表)。12月9日にはさらに底質中の無機態窒素濃度は低下したが、St.1およびSt. 2での活性はむしろ減少した。しかしそれ以外の地点では窒素固定能もさらに増加した(第3表)。

底質試料の脱窒能測定について、予備実験として、硝酸から亜酸化窒素ガスの回収率を測定した。その結果、第4表に示したように、測定容器当り1 μgの硝酸態窒素を添加した場合には、30℃で17時間後にはそのほぼ100%の窒素が亜酸化窒素として回収された。測定容器当り5 μgの硝酸態窒素を添加した場合には、47時間後に92.3%の窒素が亜酸化窒素として回収された。

底質の脱窒能も、7月28日の試料については、湖岸に近いSt. 1, 2およびSt. 12で低い値を示し、それ以外の地点ではかなり高い値を示した(第2表)。8月25日にはその脱窒活性は倍加し(第3表)、さらに12月9日にはSt. 1とSt. 2の試料についてしか測定しなかったが、いずれも極めて高い活性を示した(第4表)。

次に底質表層について、表面から5cm毎の深さに採り、各部位の無機態窒素現存量、窒素固定能ならびに脱窒能の測定を行なった。その結果は第5表に示したように、底質表層の採取部位によってかなりの相違があることがわかった。アンモニア態窒素濃度は、表層5cmの深さには低く、下方に行くに従ってその濃度は増加する。その反面、硝酸態窒素濃度は表層5cmのところでも最も高く、10及至15cmの部位には検出されなかった。

Table 4. Nitrogen recovery of nitrate and nitrous oxide during denitrification in the presence of acetylene.

Nitrate nitrogen added ($\mu\text{g N/bottle}$)	Nitrous oxide evolution after incubation ($\mu\text{l N}_2\text{O/bottle}$)		
	2-hour	17-hour	47-hour
1	0.10 (11.6 [*])	0.89 (103.7)	0.45 (52.5)
5	0.47 (11.0)	3.15 (73.4)	3.96 (92.3)

^{*} The numbers in parentheses indicate recovery percentage.

Table 5. Biological N_2 -fixation and denitrification activities of the sediments at various depths^{*}

Sediment depths (cm)	Concentration of inorganic nitrogen (ppm N)		N_2 -fixing activity (ng N/g/day)	Denitrifying activity ($\mu\text{g N/g/day}$)
	$\text{NH}_4\text{-N}$	$\text{NO}_3\text{-N} + \text{NO}_2\text{-N}$		
0 to 5	9.52	6.16	87.8	104.3
5 to 10	48.72	1.68	133.1	14.8
10 to 15	78.40	0.00	66.3	4.3

^{*} Samples of December 9, 1977 at St. 1

Table 6. Counts of total bacteria and denitrifying bacteria in the sediments of Lake Kasumigaura (Samples of December 9, 1977).

Sampling siter	Sediment depth (cm)	log number/ g /dry sediment	
		Total bacteria	Denitrifying bacteria
St. 1	0 to 2	7.580	6.785 (2.813)
St. 2	0 to 2	6.623	5.748 (1.544)
St. 3	0 to 2	6.823	5.944 (4.041)
St. 4	0 to 2	7.230	5.079 (4.740)
" "	2 to 4	5.708	5.516
St. 5	0 to 2	5.982	3.833 (1.929)
" "	2 to 4	5.176	3.000
" "	4 to 6	5.556	3.590
" "	6 to 8	5.447	3.748

* The numbers were counted by the method of MPN after 16days incubation at 20C. The medium used was the Nitrate Broth Medium (Difco). The numbers in parenthesis indicate data of July 28.

底質の窒素固定能は、最上層部よりもむしろ、5ないし10cmのところでも高く、10ないし15cmの部位での活性は半減している。底質の脱窒能は最上層部でも高く、その下方5cm以下の活性は極端に低くなっていた。

底質の極く表面に近い2cm部位の全細菌数および脱窒菌数の測定結果は、第6表に示したようにいずれの場合も湖岸に近い地点程菌数が多い傾向を示した。この傾向は脱窒菌数でとくに強くみられ、高浜入湖岸から最も離れたSt. 5では脱窒菌数はかなり低い値を示した。

Table 7. Changes of inorganic nitrogen concentration in the sediments(Site 1.)at various depths after aerobic or anaerobic incubation for 2 weeks at 30°C.

Sediment depth (cm)	Concentration of inorganic nitrogen (ppm N)			
	Water extract		Potassium extract after water extract	
	NH ₄ -N	NO ₃ -N + NO ₂ -N	NH ₄ -N	NO ₃ -N + NO ₂ -N
	At start			
0 to 5	15.9	10.8	0.0	0.2
5 to 10	19.6	3.6	71.6	0.1
10 to 15	14.0	0.2	116.7	0.0
15 to 20	25.2	0.3	112.2	0.0
	After 2-week aerobic incubation			
0 to 5	4.6	63.8	2.8	7.4
5 to 10	15.8	2.3	41.7	0.0
10 to 15	27.3	5.5	60.2	5.6
15 to 20	27.7	9.7	64.9	0.0
	After 2-week anaerobic incubation			
0 to 5	16.2	1.4	73.1	0.0
5 to 10	25.4	3.7	68.6	4.6
10 to 15	4.6	9.3	71.3	0.0
15 to 20	6.5	6.0	88.0	3.7

底質において脱窒作用がおこる必須要因の一つとして、底質環境における硝酸態窒素の供給がある。硝酸態窒素は湖水に常時低濃度含まれているが、底質表面での硝酸化作用による硝酸の供給が考えられる。また、硝酸化作用の基質としてのアンモニア態窒素の供給についても同様、湖水

のほかに底質の有機物分解によるアンモニア化成作用がアンモニアの供給となる。これらの点について検討を加えた結果、第7表に示した結果のように、底質表層5cmの硝酸化成は極めて著しく、2週間の好気培養で約60ppmの硝酸態窒素が生成された。それ以下の部位においては、それ程顕著な硝酸生成はみられなかった。

Table 8. Water temperature and dissolved oxygen concentration in hypolimnion water at each sampling sites.

Sampling sites	28, Jul		25, Aug		9, Dec	
	Temp.	DO	Temp.	DO	Temp.	DO
St. 1	27.4 °C	1.3 ppm	20.9 °C	- ppm	9.0 °C	8.0 ppm
St. 2	27.8	0.8	21.5	-	9.5	8.0
St. 3	27.7	0.8	22.1	1.5	10.0	9.2
St. 4	27.4	1.1	22.2	0.2	10.4	7.0
St. 5	27.8	0.8	22.3	9.4	10.5	6.3
St. 8	25.7	2.1	-	-	-	-
St. 9	26.6	5.2	-	-	-	-
St.10	25.8	2.2	-	-	-	-
St.11	21.4	4.7	-	-	-	-
St.12	26.2	4.4	-	-	-	-

塩化加里浸出による置換性アンモニア量の減少が、この好気培養試料においては、5cm以下の部位でみられた。しかし対照として行なった、嫌氣的培養試料においては、表層5cm部位で当初存在していた硝酸態窒素の脱窒によるものと考えられる減少があったが、置換性アンモニアの量は増加した。10及至20cmの部位では無機態窒素量の著しい減少がみられたが、これは恐らく無機態窒素の有機化現象によるものと思われる。

考 察

霞ヶ浦底質の無機態窒素現存量は、試料の採取時期や採取箇所によって著しい相異がある。しかし、一般的に底質中のアンモニア態窒素濃度は極めて高い値を示した。普通陸地土壌の置換性アンモニア態窒素は10数ppm以下で、底質では粘土含量が高いことや微生物遺体の湖底堆積などが原因していよう。また、7月、8月、12月と採取時期につれて底質中の無機態窒素濃度は減少した。8月25日の試料でとくにSt. 1とSt. 2で無機態窒素濃度が減少し、同時に硝酸態および亜硝酸態窒素が3.5 ppm, 5.2 ppmとこれらの箇所によく、この時期に底質表面でかなりの硝酸化成作用があったことが推定される。

アセチレン還元法による窒素固定能の測定は、間接的測定法なので、必ずしも真の固定活性を

示しているとはいえないにしても、霞ヶ浦底質の窒素固定能は明らかに7月、8月、12月の測定時の順に高まっている。これらの活性から、霞ヶ浦底質表層20cmで、平均底質水分50%として計算して、7月、8月、12月の各々の全採取地点の平均窒素固定量は1ヘクタール当り年間約8, 41, 50 kg Nに相当する。Torrey and Lee⁵⁾は、アセチレン還元法を用いて、アメリカ、ウイスコンシン州 Mendota湖の底質による窒素固定能は最高 $2 \text{ nM C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1}\text{day}^{-1}$ であったが、湖全体の窒素固定量の4%しか底質において窒素固定がみられなかった。

本研究の結果では、霞ヶ浦底質5ないし10cmの部位で最大の活性がみられ、7月28日の表層20cmの底質試料の平均活性は $2.28 \text{ nM C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1}\text{day}^{-1}$ となり、その後漸次活性は増加した。

一方、底質の脱窒活性は窒素固定能に比べて高く、7月、8月、12月の表層20cmの底質試料の脱窒能はヘクタール当り、1.4, 2.9, 34.1tの窒素量に相当する。しかし、実際、底質の脱窒能は底質のごく表面に近い薄い層にとくに高いので、この値はもっと低く見積られるべきである。その上、脱窒作用には基質としての硝酸塩の存在が必須条件であり、実際、霞ヶ浦底質間隙水中の硝酸態窒素含量は5cm以下では極めて少ない。この点からもさらに脱窒能からの脱窒推定量は低く見積られるべきである。正確な脱窒量の測定には、霞ヶ浦での in situ 条件下での脱窒能の測定が可能にならなければならない。

Kaplan²⁾らは沼沢地底質の脱窒能は、 $7.2 \sim 36.0 \mu\text{g N g}^{-1}\text{day}^{-1}$ と報告しており、本研究で得られた霞ヶ浦底質の7月、8月、12月の脱窒能の平均値に近い値を示している点は興味深い。また、Kaplan らの結果は、本研究の結果と同様、底質の脱窒活性が窒素固定の活性の2ないし3桁のオーダーで高かった点でも一致している。

底質表面での、アンモニア化成能や硝酸化成能が極めて高かったこと、脱窒菌数が高かったことなどの結果から、とくに高浜入りの湖岸に近いSt. 1およびSt.2地点での底質における窒素浄化能は極めて高いことが推定される。今後はさらに、霞ヶ浦底質における、in situ条件下での窒素浄化量、あるいはアンモニア化作用や硝化作用などの霞ヶ浦生態系における意義について検討を加える必要がある。

文 献

- 1) 茨城大学農学部霞ヶ浦研究会編 (1977) : 霞ヶ浦, 茨城大学
- 2) Kaplan, W., Teal, J.M. and I. Valiela (1977) : Denitrification in salt marsh sediments: Evidence for seasonal temperature selection among populations of denitrifiers. *Microbial Ecology* 3 : 193-204.
- 3) 農林省農林水産技術会議事務局監修 (1975) : 土壤養分分析法, pp197-200, 養賢堂
- 4) 鈴木達彦篇 (1975) : 土壤微生物実験法, pp302-307, 土壤微生物研究会, 養賢堂
- 5) Torrey, M.S. and G.F. Lee (1976) : Nitrogen fixation in Lake Mendota. *Limnology and Oceanography*, 21 : 365-378.
- 6) Yoshinori, T., Hynes, R., and R. Knowles (1977) : Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction and measurement of denitrification and nitrogen fixation in soil. *Soil Biol. and Biochem.* 9:177-183.