

# 有明海底質細胞外ポリマーの性状と底質安定化への効果

The Characterization of Extracellular Polymeric Substances in Ariake Sediment and Its effects of Stabilization of Sediment

大石明広<sup>1</sup>・原田浩幸<sup>2</sup>・河野泰訓<sup>3</sup>・志岐昌彦<sup>3</sup>・山本浩一<sup>4</sup>・速水祐一<sup>5</sup>・

井上勝利<sup>6</sup>・川喜多英孝<sup>7</sup>・大渡啓介<sup>8</sup>

Akihiro OISHI, Hiroyuki HARADA, Yasukuni KAWANO, Masahiko SHIKI, Kouichi YAMAMOTO, Yuichi HAYAMI, Katutoshi INOUE, Hidetaka KAWAKITA and Keisuke OHTO

The extracellular polymeric substances (EPS) of Ariake Sea sediment were isolated from Ariake Sea sediment. Distribution of monosaccharide and uronic acid determined. The soluble EPS fraction showed distribution of monosaccharides with Galactose, Glucose, Xylose, Rhamnose, Fucose and size distribution showed polymer of around  $10^3$ - $10^7$ , and monomer of  $10^3$  Da. The relationship water content, the ratio of chlorophyll-a/feo pigment and carbohydrate were maintained in summer to winter. Result of rheological experiment that EPS, Slurry with EPS and sediment behave as viscose, non-Newtonian fluids. Flow curve for the slurry were unidentical and effects of the addition of EPS in the presence or absence of  $Ca^{2+}$ .

## 1. はじめに

有明海では透明度および海水中の COD が近年増加している。前者は赤潮の発生を助長するために問題視されている（後藤ら，2001；有明海・八代海総合調査評価委員会，2006）。我々は有明海の透明度上昇および COD 増加の要因のひとつとして，底質付着生物や人的生産（養殖海苔）などが生産する細胞外ポリマー（EPS）が底質に影響を及ぼし，底質の再懸濁を抑制し，またこの EPS が海水中に溶出することで COD を上昇させていると考えた。よって本研究では有明海底質から抽出した EPS の化学的評価と底質の凝集・安定化に及ぼす効果を明らかにすることを目的とした。

干潟の安定化に関して，付着系藻類が分泌する細胞外ポリマー（Extracellular Polymeric Substances, EPS）が関与しているとの報告がある（Brouwer J.F.C.de ら，2005）。有明海の透明度増加の原因としては様々な要因が考えられるが，その要因の一つとして EPS について考察することは，底質では区別されない底質中の全糖としての評価（松原ら，2004）しかなくない重要であると

考えられる。

## 2. 実験方法

### (1) 底質からの EPS 抽出操作の検討

EPS の抽出方法には次のような方法が提案されている。凍結乾燥した底泥を  $30^{\circ}\text{C}$  で 1 時間蒸留水と接触し，その後 3500g，15 分間の遠心分離を行う方法（Brouwer ら，2005）。

底質 500 mg に対して蒸留水  $1\text{ cm}^3$  を加え， $30^{\circ}\text{C}$  で 1 時間接触させ，2800g，10 分間の遠心分離を行う方法（Winder B.de ら，1999）。

凍結乾燥底質 5~55 mg に蒸留水  $0.4\text{ cm}^3$  を加えて  $30^{\circ}\text{C}$  で 1 時間接触させ，6000g，5 分間の遠心分離を行う方法（Brouwer J.F.C.de ら，2001）。

共通する点は  $30^{\circ}\text{C}$  で 1 時間接触させること，そして蒸留水を用いることの 2 点であり，底質に対する蒸留水の固液比，遠心分離の速度，時間ともに異なっている。本研究では参考文献（Brouwer J.F.C.de ら，2001）に基づき，凍結乾燥汚泥  $0.1\text{ g}$  を蒸留水  $0.8\text{ cm}^3$  に懸濁させ，回転型攪拌器を用いて  $30^{\circ}\text{C}$  で 1 時間攪拌した。その後 6000g，5 分間の遠心分離を行い底質から EPS を抽出した。抽出した EPS には構成が不明なポリマー状の炭水化物が含まれており，その評価には単糖，シアル酸，ウロン酸および分子量分布の分析が行われる（Brouwer J.F.C.de，2006）。本研究ではポリマーを構成する単糖と糖鎖のマトリックス構造に関与するウロン酸の分析を HPLC によって行った。また炭水化物としての評価には，全糖およびウロン酸の分析をそれぞれフェノール-硫酸法およ

- |         |                        |
|---------|------------------------|
| 1       | 佐賀大学大学院工学系研究科循環物質専攻    |
| 2 正 会 員 | 佐賀大学理工学部機能物質化学科 准教授    |
| 3       | 佐賀大学理工学部機能物質化学科        |
| 4       | 工博 佐賀大学有明海研究プロジェクト 講師  |
| 5       | 農博 佐賀大学有明海研究プロジェクト 准教授 |
| 6       | 工博 佐賀大学理工学部機能物質化学科 教授  |
| 7       | 工博 佐賀大学理工学部機能物質化学科 助教  |
| 8       | 工博 佐賀大学理工学部機能物質化学科 准教授 |

びカルバゾール-硫酸法(松田編, 1989)によって行った。更に EPS を粉末として回収するため, EPS 水溶液に対して4倍量の特級アセトンを追加することで, EPS を沈殿させ, その後吸引ろ過を行い, 残渣を回収し, 乾燥させる操作を行った。この操作によって得られた試料  $1.24 \text{ mg}$  に  $2 \text{ mol/dm}^3$  のトリフルオロ酢酸  $0.2 \text{ cm}^3$  を添加し,  $100^\circ\text{C}$  で6時間加水分解した後, 減圧乾固を行った。残渣を蒸留水  $0.2 \text{ cm}^3$  に溶解させ,  $0.22 \mu\text{m}$  のフィルターでろ過後, 希釈し,  $0.05 \text{ cm}^3$  をポストカラム HPLC システムによって分析した。移動相として  $0.5 \text{ mol/dm}^3$  のホウ酸カリウム緩衝液を用い, 中性糖の検出波長は Ex.  $320 \text{ nm}$  Em.  $430 \text{ nm}$  とし, ウロン酸は Ex.  $360 \text{ nm}$  Em.  $430 \text{ nm}$  とした。カラム温度は  $70^\circ\text{C}$  で一定とした。また, GPC によって EPS の分子量を推定した。なお供試底質は 2007 年 12 月 5 日における干出時の Sta.A (図-1) からコアで採取し, 表層  $0.5 \text{ cm}$  をカットし, 凍結乾燥したものである。

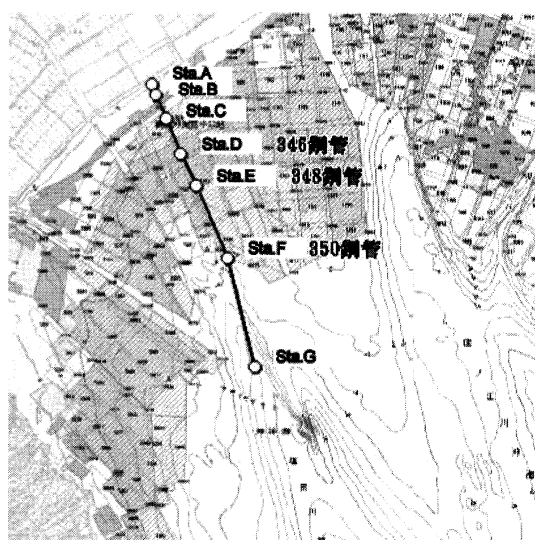


図-1 現地での採泥ポイント

## (2) 現地底質中の EPS 含有量

図-1 に示す有明海の調査測線において 2007 年 8 月～2008 年 2 月にかけて, 表層  $1 \text{ cm}$  の底質を採取し, (1) の操作によって EPS 含有量を測定した。クロロフィル-a は凍結した底質を, また含水率はコア採取底質を対象に測定した。EPS 含有量は全糖量(松田編, 1989)として, クロロフィル-a は 90% アセトンで抽出し, 測定した(中島ら, 1994; Brouwer J.F.C.de ら, 2005)。含水比は土質物性測定法(農林水産技術会議事務局監修, 1982)に従った。

## (3) EPS の粘性変化

底質から抽出した EPS 水溶液を遠心濃縮機で濃縮し,

粘度計で  $30^\circ\text{C}$  におけるずり速度とずり応力の関係を調べた。測定には(株)BROOKFIELD 社製, 回転粘度計 DV-II + Pro と共軸二重円筒を用いた。また, 同時に調整した EPS 水溶液 3 本を  $4^\circ\text{C}$  で保存し, それぞれ 5, 7, 10 日後に同様の測定を行った。

## (4) EPS 添加による底質の粘度への影響

凍結乾燥した底質に蒸留水を加えて試料とし, これに粉末 EPS の添加/無添加,  $\text{CaCl}_2$  の添加/無添加の組み合わせにより, ずり速度とずり応力の関係を(株)BROOKFIELD 社製, 回転粘度計 DV-II + Pro と共軸二重円筒を用いて  $30^\circ\text{C}$  の条件で測定した。EPS は  $10 \text{ cm}^3$  の試料に  $4 \text{ mg}$ , カルシウムは底質  $1 \text{ g}$  に対して  $300 \mu\text{g}$  になるように添加し, それぞれの対象系とブランクも考慮した。カルシウムの添加は 2 価金属の影響(Brouwer J.F.C.de ら, 2002)を調べるために行った。

## 3. 結果と考察

### (1) EPS の回収とその性状

回転攪拌時間に対する全糖溶出濃度の変化を図-2 に示す。全糖は速やかに溶出し, 1 時間で最大濃度に達した後濃度が減少した。これは底質間隙水中に含まれていた EPS が底質粒子に再吸着したことが示唆される。時間変化に対する EPS 量変化の報告は見あたらず, 1 時間での溶出で回収している(Brouwer J.F.C.de ら, 2005)。

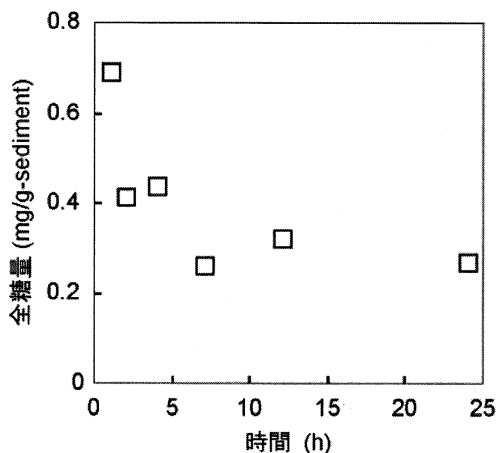


図-2 底質からの EPS 成分の溶出と再吸着

表層  $0.5 \text{ cm}$  の底質から抽出した粉末 EPS の全糖, ウロン酸, タンパク質の含有量はそれぞれ  $5.9\%$ ,  $1.2\%$ ,  $1.9\%$  であった。有明海底質中の有機物含有量に関して, 糖はタンパク質に比べて少ない(松原ら, 2004)が, 今回用いた EPS に含まれる糖の割合はその約 3 倍であった。また単糖としては, 表-1 に示すように 7 種類の中性糖と 2 種類のウロン酸から構成されていることが確認された。

多糖を構成する単糖の種類は干潟域での既往の報告

表-1 EPSを構成する単糖およびウロン酸

| 中性糖   | 濃度 (μg/mg) | ウロン酸  | 濃度 (μg/mg) |
|-------|------------|-------|------------|
| Rha   | 3.11       | GalA  | 0.36       |
| Rib   | 0.38       | GlcA  | 0.32       |
| Man   | 3.09       |       |            |
| Fuc   | 4.03       |       |            |
| Gal   | 4.19       |       |            |
| Xyl   | 3.06       |       |            |
| Glc   | 3.57       |       |            |
| Total | 21.44      | Total | 0.68       |

(Brouwer J.F.C.de ら, 2002) とほぼ同様であった。

その多くが干潟における表層1 mm 以内の生物マット内での報告であるため (Winder B.de ら, 1999), 単純に結果を比較することはできないと考えられる。しかしながら, 生物マットと同様の種類の構成糖が低濃度ながら有明海底質に検出されたこと, および糖鎖のマトリックスを構成することが報告されている (Kristina Mojica ら, 2007) ウロン酸がこれも低濃度ながら有明海底質に存在することから, 構成糖がマトリックスを形成し底質を安定化させる可能性があることを示唆している。

図-3に分子量分布を示す。ポリマーとしては分子量  $10^3$ – $10^7$  Da の範囲において幅広い分布を示しているが, その多くが  $10^3$ – $10^5$  Da の範囲に存在していると考えられる。また,  $10^2$  Da にピークが検出されていることからモノマーの存在も確認された。既往の研究 (Brouwer J.F.C.de ら, 2002) とは分子量に大きな違いが見られることから, EPS を回収する対象によって EPS の性状も異なってくることが示唆される。

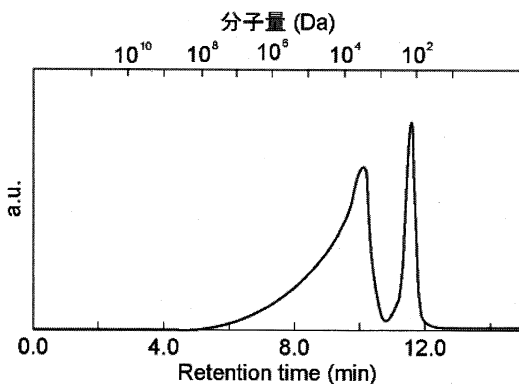


図-3 EPS の分子量分布

## (2) 現地での EPS の状況

全糖量と含水率の関係を図-4に示した。データは図-1に示した St.A~St.G の底質を用いて得られたものである。月別に全糖量と含水率の関係を見ると, 9月を除いて  $R^2=0.677\sim0.840$  と高い相関が取れており, EPS が底

質の保水状態に影響していることが示唆された。

図-5は2007年8月~2008年2月のクロロフィル-a/フェオ色素と全糖量の関係を示している。クロロフィル-aとフェオ色素の比は, 分解したクロロフィル-aに対する分解していないクロロフィル-aの割合を表している。月別にクロロフィル-a/フェオ色素と全糖量の関係を見ると, 10月 ( $R^2=0.372$ ), 1月 ( $R^2=0.677$ ) を除き,  $R^2=0.565\sim0.908$  と高い相関を示した。そのため, 底質付着藻類による光合成が増加することで EPS の生産が増加することが示唆された。また, クロロフィル-a/フェオ色素の値が0.5よりも小さなポイントにおいては全体的に低い全糖量を示していることから光合成と EPS の生産が関係していることが示唆される。既往の報告でもクロロフィル-aの増加により, 全糖量が増加することが確認されている (J.F.C.de Brouwer ら, 2006)。

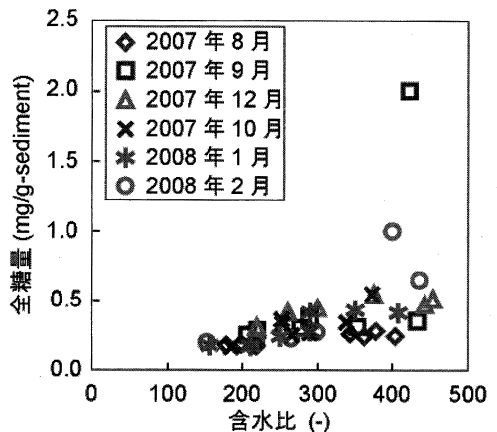


図-4 EPS (全糖量評価) と含水率の関係

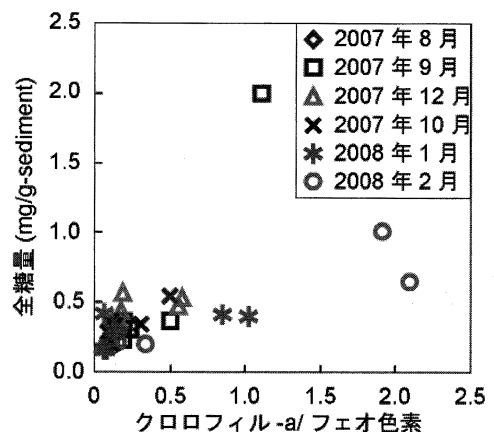


図-5 EPS (全糖量評価) とクロロフィル-a/フェオ色素の関係

## (3) EPS のレオロジーと底質安定化への影響

ずり速度とずり応力の関係より EPS 水溶液は非ニュートン流体の挙動を示すことが確認された (Wloka M. ら, 2004)。EPS 水溶液の測定結果は切片を有する直線関係

となっており(図-6),切片は降伏応力と定義される。これはEPS水溶液が降伏応力までは流動せず,降伏応力以上では応力とずり速度が比例することを示している。降伏値はEPS溶液の静置時間とともに増加し,静置時間1週間では約4倍の値となった。これはEPSが水分子によって水和された結果,安定化したためであると考えられる(Dade W.B.ら,1996)。

底質懸濁液においてはEPS単独の場合と異なり非ビンガム流体の挙動を示した(図-7)。底質のみの場合はずり速度によるずり応力の変化は小さく,わずかに増加した。これに対し,EPS添加系およびEPSおよび $\text{Ca}^{2+}$ 添加系の場合は,ずり速度 $20\text{ s}^{-1}$ まで速度の増加によって著しく応力が増加した後,増加の割合はやや減少して,直線的な比例関係になった。EPSは単独では効果を発現しない $\text{Ca}^{2+}$ と共存することによって底質の粘度を増加させた。

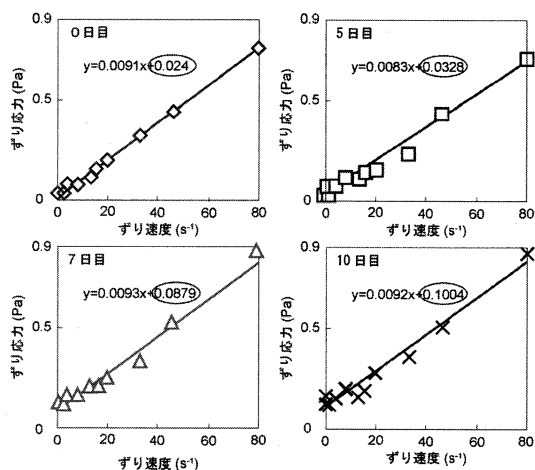


図-6 EPS水溶液の静置時間に対する粘度変化

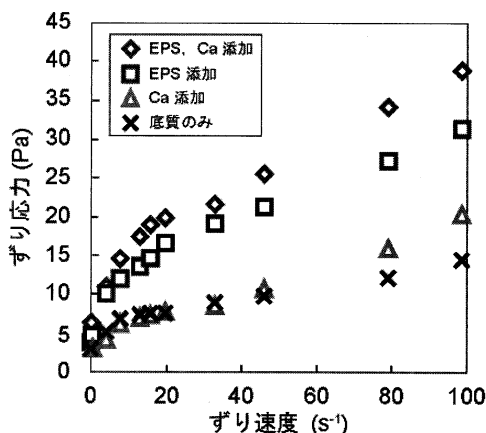


図-7 底質懸濁液の粘度に対するEPSと $\text{Ca}^{2+}$ の影響

これは $\text{Ca}^{2+}$ によってEPS中の負電荷を持つウロン酸

が架橋され,粘性を発現するためであると考えられる(Brouwer J.F.C.de.ら,2002)。

#### 4. まとめ

- (1) 有明海底質より抽出したEPSの性状を検討し,水に溶出しやすく懸濁物質に吸着され易いことを明らかにした。
- (2) 現地の底泥において,EPSの全糖濃度はほぼ含水比に比例し,季節や場所によって濃度が変化することを確認した。
- (3) EPSがビンガム挙動を示し,降伏値が時間とともに変化することを明らかにした。
- (4) EPSを添加した底質懸濁液は非ビンガム流体挙動を示し, $\text{Ca}^{2+}$ の共存系において著しく底質の粘度が上昇することを確認した。

#### 参考文献

- 有明海・八代海総合調査評価委員会報告書(2006),pp.13.  
 後藤健介・後藤恵之輔(2001):有明海異変を衛星データで読む,土木学会誌,Vol.86, No.8, pp.89-92.  
 中島重旗・加納正道・小島義博・金子好雄(1994):水環境工学の基礎,pp.180-181.  
 農林水産技術会議事務局監修(1982):土壌物性測定法,養賢堂出版,pp.47-49.  
 松原英隆・木村健・浦野紘平(2004):有明海と博多湾の干潟底質中の有機物に関する研究,水環境学会誌,Vol.27, No.5, pp.337-342.  
 農林水産技術会議事務局監修(1982):土壌物性測定法,養賢堂出版,pp.47-49.  
 松田和雄編(1989):生物化学実験法 20 多糖の分離・精製法,学会出版センター,pp.49-52.  
 Brouwer J. F. C. de, K. Wolfstein, G. K. Ruddy, T. E. R. Jones and L. J. Stal (2005): Biogenic stabilization of intertidal sediments, *Microbial Ecology*, pp.501-512.  
 Brouwer J. F. C. de, L. J. Stal (2001): Short-term dynamics in microphytobenthos distribution and associates in surface sediments of intertidal mudflats, *MARINE ECOLOGY PROGRESS*, 218, pp.33-44.  
 Brouwer J. F. C. de, T. R. Neu and L. J. Stal (2006): On the function of secretion of extracellular polymeric substances by benthic diatoms and their role in intertidal mudflats, *Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences*, pp.45-60.  
 Brouwer J. F. C. de, G. K. Ruddy, T. E. R. Jones and L. J. Stal (2002): Sorption of EPS to sediment and the effect on rheology of sediment slurries, *Biogeochemistry*, 61, pp.57-71.  
 Dade W. B., N. B. Pellerin, A. Moffet, P. A. Jumars and A. R. M. Nowell (1996): The Effects of bacteria on the flow behavior of clay-seawater suspension, *Journal of Sediment Research*, 66, 1, pp.39-42.  
 Kristina M., D. Elsey, M. J. Cooney (2007): Quantitative analysis of biofilm EPS uronic acid content, *Journal of Microbiological Methods*, 71, pp.61-65.  
 Winder B. de, N. Staales, L. J. Stal, D. M. Paterson (1999): Carbohydrate secretion by phototrophic microorganisms in tidal sediment, *Journal of sea research*, pp.131-146.  
 Wloka M., H. Rehage, H. C. Flemming (2004): Rheological properties of viscoelastic biofilm extracellular polymeric substances and comparison to the behavior of calcium alginate gels, *Colloidal Polymer Science*, 282, pp.1067-1076.