土木学会論文集B2（海岸工学）
Vol. B2-65，No.1，2009，1001-1005

有明海における海苔の分泌する粘性有機物が透明度および底質の安定化に与える影響

Influence of Carbohydrate Secreted by Cultivated Laver on Transparency and Sedimentary Stabilization in Ariake Sea

天野佳正[1]・原田浩幸[2]・大石明広[3]・川喜田英孝[4]・大渡啓介[5]

Yoshimasa AMANO, Hiroyuki HARADA, Akihiro OISHI, Hidetaka KAWAKITA and Keisuke OHTO

Influence of extracellular polymeric substances (EPS) secreted by cultivated laver on both transparency and sedimentary stabilization in Ariake Sea was experimentally examined. The laver culture experiment showed a production of EPS (evaluated by total sugar concentration, viscosity and molecular distribution) and showed an increase in dissolved organic carbon (DOC). The powdered EPS recovered from laver increased transparency of the suspension prepared using particles of Ariake sediment and increased a stability of the sediment based on rheological measurement. The results in this study would suggest a contribution of laver to the increase in transparency and in stability of the sediment in Ariake Sea.

1. はじめに

1997年に諫早湾潮受け堤防が建設されて以降，有明海の水環境は著しく変化し，これは有明海異変（古川・米本，2003）として知られている．有明海異変によって変化した環境要因として，透明度の上昇・赤潮の発生（清本ら，2008），CODの増加（有明海・八代海総合調査評価委員会，2006），底層における貧酸素化（濱田ら，2008）などが挙げられる．また，この環境変化に伴い，漁獲量が減少したという報告例（有明海・八代海総合調査評価委員会，2006）も存在する．このことから，有明海における多くの環境変化を引き起こした要因を明らかにすることは，有明海の水環境を健全な状態に戻すために重要な研究課題といえる．

本研究では有明海異変によって引き起こされた問題の中で，透明度の上昇に関与する要因について明らかにすることを目的とする．透明度は主に海水中のプランクトンの光受容量に関わる因子であり，赤潮発生の引き金となる．また，赤潮の発生に伴うCODの増加を招き，赤潮の発生後には底層の貧酸素化を招くこととなる．さらに，海苔の色落ち現象は赤潮による栄養塩・微量金属の消費が原因ともいわれている（飯盛・磯部，2006）．

有明海における透明度上昇の原因については多数の報告があり，例えば宇野木（2002，2003）は潮汐・潮流の影響を，また程木（2005）は流入河川水の輸送経路の変化を指摘している．他方，大石ら（2008）は生物的な観点に基づき，底質付着藻類由来の粘性有機物が底質を安定化させ，潮汐などによる底質の巻き上げの抑制に関与していることを実験的に示し，底質付着藻類が有明海の透明度上昇に寄与していることを指摘している．しかしながら，有明海における透明度上昇の原因解明に関する生物的なアプローチは，これまでのところ底質付着藻類に着目した報告例しか見当たらない．海産生物の宝庫といわれている有明海においては底質付着藻類のみならず，他の生物由来の粘性有機物の影響も透明度の上昇に大きく関与しているものと考えられる．

本研究では，有明海において大規模に養殖されている海苔（ナラワスサビノリ，*Porphyra yezoennsis* f. *narawaensis*）に着目し，懸濁物質の凝集と底質の安定化に影響を与える粘性有機物（炭水化物），特に炭水化物中の高分子物質である細胞外ポリマー（Extracellular Polymeric Substances, EPS）を海苔が分泌するか否かについて調べた．EPSは海水中の懸濁物質を凝集させ，そして底泥に堆積後，底質の安定化を引き起こすことで有明海の透明度上昇に寄与していると推測される．この仮説を海苔の培養実験により検証した．なお，EPSは底質付着藻類（大石ら，2008），付着珪藻（de Brouwer・Stal, 2002），バクテリア（Dadeら, 1990）によって分泌されていることが知られているが，海苔とEPSの関係についての報告例はこれまでない．

2. 実験方法

（1）海苔の培養

海苔の分泌する炭水化物の濃度を明らかにするため，また粉末として炭水化物中のEPSを回収するため海苔の培養実験を行った．

1 非会員 博（工） 佐賀大学 有明海総合研究プロジェクト
2 正会員 博（学） 佐賀大学 准教授 理工学部 機能物質化学科
3 非会員 修（工） 佐賀大学大学院 工学系研究科 循環物質工学専攻
4 非会員 博（工） 佐賀大学 助教 理工学部 機能物質化学科
5 非会員 博（工） 佐賀大学 教授 理工学部 機能物質化学科

オートクレーブを施した1LのASP$_6$培地（須藤，1961）を二口丸底フラスコに充填し，海苔網に着生した状態の海苔（乾燥重量として0.25g）を培地に投入して培養を行った．培養には-20℃で冷凍保存した海苔を4℃，暗所，24時間の条件で解凍したものを用いた．培養照度および温度はそれぞれ5000lux（12L/12D）および18℃であり，培養槽内を0.2μmのエアーフィルターを通した空気により攪拌した．予備実験において，海苔の葉長と葉幅に基づく増殖量を調べたところ，増殖は5日から6日で最大値を示したことから，海苔の培養期間は6日間とした．

培養実験後，培養後の培地を0.45μmのメンブレンフィルターにて濾過し，濾液を対象に海苔の分泌した炭水化物濃度を，全糖濃度（Duboisら,1956）および溶存態有機物濃度（DOC）の分析によって，またゲル浸透クロマトグラフィーによる分子量測定およびレオロジー（粘度測定）によって評価した．

培養実験は合計2回行い，各々の水質項目の分析は1回の培養実験に対して3回行った．特に明記しない限り結果を平均値（n=6）で示した．

（2）EPSの回収方法

炭水化物中のEPSが懸濁物質の凝集と底質の安定化に及ぼす影響を明らかにするため，海苔のEPSを粉末として回収することを試みた．

-20℃で冷凍保存後，4℃，暗所，24時間の条件で解凍した海苔を80℃，1時間の条件で熱水処理し，海苔の表面に付着している炭水化物を外した．その後，処理水にエタノールを加え（エタノール最終濃度：75%[v/v]）（de Brouwer・Stal，2002），高分子状の炭水化物，すなわちEPSを-20℃の条件下で1昼夜沈殿させた．6000G，5分間の遠心分離を施した後，上澄み液を除去し，残渣を30℃にて乾燥させた．乾燥させたEPSを乳鉢で均一にすり潰し，粉末EPSとして回収した．

（3）懸濁物質の凝集および底質の安定化に及ぼすEPSの影響

a）実験に用いた底質

2007年12月，有明海湾奥部の干潟域において底質の表層5mmを採取し，夾雑物を取り除くため2mm目のふるいを通過したものを回収した．その後，底質を凍結乾燥させ，これを底質試料とした．

b）EPS添加による懸濁物質の凝集実験

凍結乾燥させた底質をふるいにて45μm以下の粒径に調製した．過酸化水素処理（土質試験法，1984）を施して底質中の有機物分を除去した後，この底質粒子を用いて100mg/Lの底質懸濁液を作製した．この懸濁液の濁度（82度）は，有明海湾奥部における濁度の変動幅（1978年から2007年の平均値として）の上限値を反映している（（独法）水資源機構（2009-06-20 参照））．この懸濁液にEPSを底質1gに対して0から10mgの割合で添加した．EPS添加後，100rpm，5分間の条件にて急速攪拌を，そして30rpm，15分間の条件にて緩速攪拌を行った．60分間静置した後，上澄み液の吸光度（660nm）を測定した．この結果を，カオリンを用いた濁度－吸光度の検量線に基づいて，濁度にて示すこととした．

c）EPS添加による底質の安定性の評価

凝集実験と同様の処理を施した底質粒子2.7gを純水8mLに懸濁させ，底質の粘度変化を測定するための懸濁液を作製した．この懸濁液の底質濃度は有明海干潟部の含水比を反映している（大石ら，2008）．この懸濁液にEPSを底質粒子1gに対して0から3mgの割合で加え，任意のずり速度に対するずり応力の値を，粘度計（LVDV-II+Pro，Brookfield）にて計測した．

3. 結果および考察

（1）海苔が分泌する炭水化物およびDOC濃度

6日間の培養により海苔のバイオマスは乾燥重量として0.15g，全糖およびDOC濃度はそれぞれ2.81mg/Lおよび20.5mg/L増加し（**表-1**），海苔が炭水化物を分泌していること，また培養液中のDOC濃度を増加させていることが確認された．培養実験後の培養液を対象に分子量分析を行った結果を図-**1**に示す．図より，培養液中に10^2から10^6Daまでの幅広い分子量をもつ物質の存在が認められたことから，全糖中に高分子状の物質（EPS）が存在している可能性が示唆された．de Brouwerら（2005）および大石ら（2008）は，底質の粘度に対して微細藻類

表-1　海苔培養前後の全糖およびDOC濃度

	全糖±SD（mg/L）	n	DOC±SD（mg/L）	n
培養前	0.00	-	5.60±0.65	6
培養後	2.81±0.35	6	26.1±2.1	6

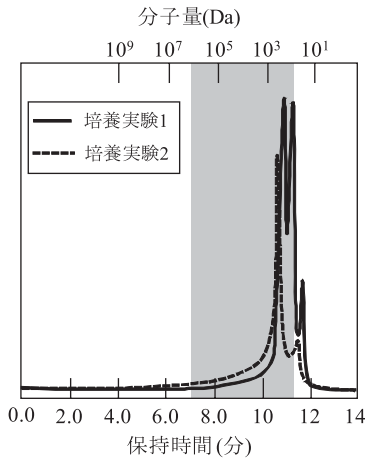

図-1　海苔培養後の培養液における分子量分析

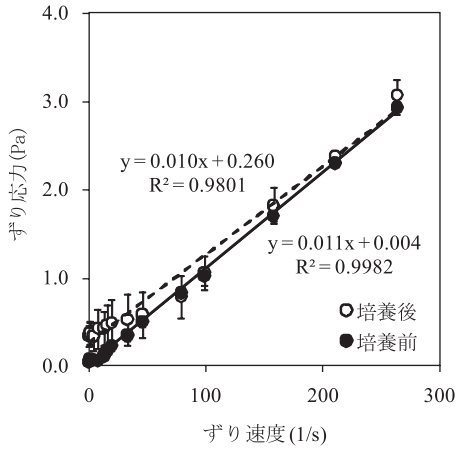

図-2　海苔培養前後の培養液におけるレオロジー

由来のEPSが大きく寄与していると報告している．したがって，培養液中にEPSが存在しているとすれば，培養液の粘度は海苔の培養前後で変化していると予想される．このため，培養液の粘度測定を行い，その結果を図-2に示した．図の縦軸は任意のずり速度に対するずり応力である．切片は降伏応力と定義され，安定性を示す指標として用いられている．図より，ずり応力は海苔の培養前後ともに切片を有するビンガム流体の挙動を示しており，その値は全体的に培養後のほうが培養前より大きくなっていることがわかる．また降伏応力の値は，培養前および培養後で，それぞれ0.004Paおよび0.260Paであり，培養後の培養液における粘度のほうがより高い値を示している．

以上の結果より，海苔は増殖過程において炭水化物を分泌し，その割合はDOCのうちおよそ14%（2.81mg/L）であることが示された．また，海苔培養後の培養液中に10^2から10^6Daまでの高分子状物質の存在が確認されたこと，海苔培養前後で培養液の降伏応力値が0.004Paから0.260Paに増加したことから，海苔によってEPSが分泌されていることが明らかとなった．

（2）EPSが懸濁物質の凝集に与える影響

海苔の増殖に伴いEPSが分泌されたことから，EPSが懸濁物質を凝集させ，透明度を増加させることが予想される．このため，EPSが懸濁物質の凝集に与える影響を凝集実験によって調べた．その結果を図-3に示す．

懸濁液の濁度はEPSの添加量の増加とともに減少し，底質1gに対するEPS添加量が0.5mgのときに最も低い39度を示した．一方，EPSの添加量を0.5mgより多くすると懸濁液の濁度低下はみられず，EPS無添加の場合とほぼ同じ濁度（51から55度の範囲）を示した．

EPSの主な構成物質と考えられる多糖類の表面には，負に帯電したカルボキシル基（de Brouwerら，2005）や

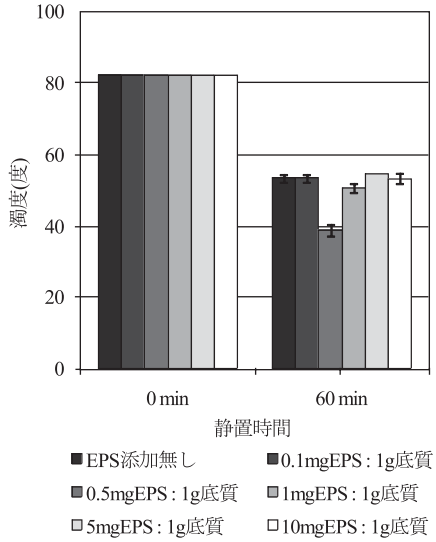

図-3　EPSが底質粒子の凝集に与える影響

アシル基（Decho，1990）が存在しているとの報告がある．EPSと懸濁物質は底質粒子上に，あるいはEPS構成成分として存在するカルシウムやマグネシウムなど正に帯電する2価の金属イオンの架橋作用（Tokita・Tanaka，1991；Decho，1990）によって凝集性を示すものと考えられる．本研究において，懸濁液中のEPSが高濃度（この研究で得られた結果では底質粒子1gに対して1mg以上）に存在することにより凝集効果が低下したが，これは負の電荷を帯びたEPSが底質粒子と金属イオンとの間の凝集を妨害し，底質粒子と金属イオンとの間に反発作用を与えたためと推察される．

以上のことから，懸濁液の濁度は，底質1gに対するEPS添加量を0.5mgとしたときに最も低い39度を示したことから，EPSは懸濁物質の凝集作用に影響を与えていることが明らかとなった．また，過度のEPSの存在は懸濁物質の凝集作用を低下させることがわかった．

（3）EPSが底質の安定化に及ぼす影響

海苔の分泌したEPSが水中の懸濁物質を凝集させていることが示されたことから，EPSが底質の安定化にも寄与することが予想される．このため，EPSの添加の有無による底質の粘度変化について調べた．その結果を図-4（a）～（d）に示す．

任意のずり速度における底質のずり応力はEPSの存在により増加し，底質1gに対するEPS添加量が0，1，2および3 mgのとき，ずり応力の平均値はそれぞれ11.6，12.7，14.2および19.6Pa，また降伏応力値は4.5，4.5，4.6および5.8Paとなった．また，同図に示されているずり応力とずり速度のヒステリシスループの面積はEPS添加量の増加に伴い大きくなっていることがわかる．このヒ

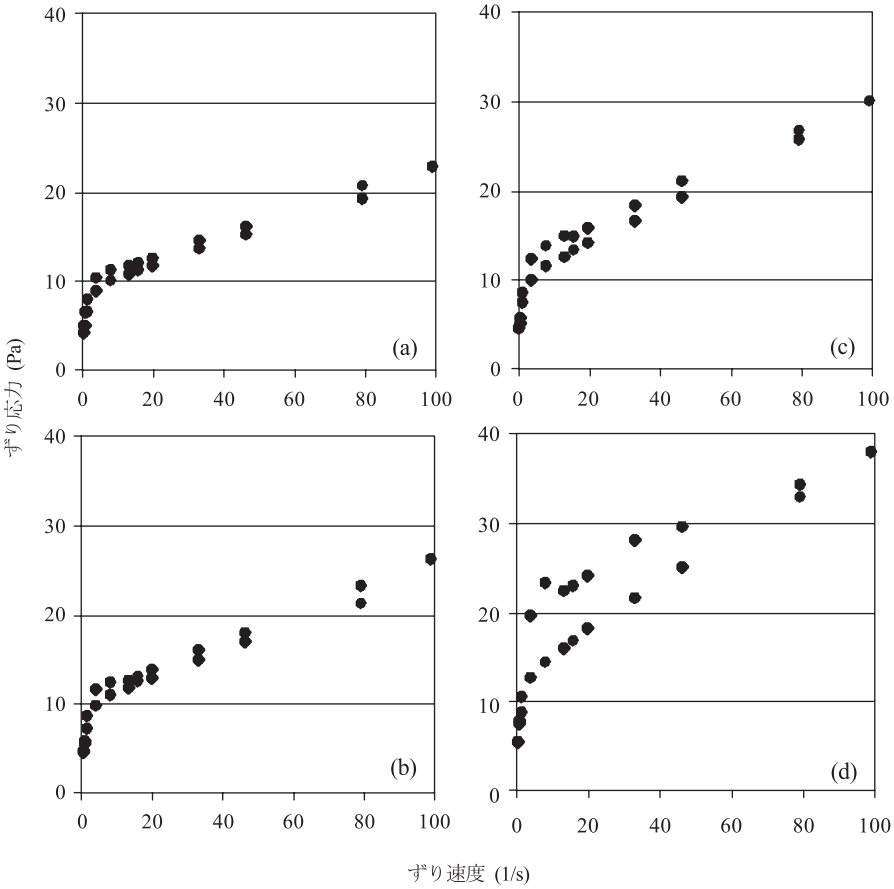

図-4　EPSが底質の安定化に与える影響．底質1gに対するEPSの添加量；
（a）EPS : 0mg（添加無し），（b）EPS : 1mg，（c）EPS : 2mg，（d）EPS : 3mg

ステリシスの面積の違いは，底質の粘度，すなわち安定度の違いによるものと考えられる．菅俣ら（2002）は粘性を低下させる減水剤添加の有無によるセメントペーストのずり応力とずり速度の関係について調べ，減水剤を添加したサンプルにおいてヒステリシスの面積が小さくなる傾向を示しており，本研究の結果と一致する．このようなヒステリシスは粒子間の凝集力により結合構造を形成することで現れることが知られており（種谷，1990），このことからもEPSの添加によって底質粒子の凝集が生じ，添加量の増加によって粒子の凝集性も増大したものと推察される．

また，懸濁物質の凝集実験とは対照的にEPS添加量の増加に伴ってずり応力の値が増加したが，これは次のように説明できる．EPSの構成成分として，あるいは元々底質に含有するカルシウムやマグネシウムなどの2価の金属が，負に帯電している底質粒子とEPS中の官能基を架橋させるのに十分に存在していたため，EPSの添加量の増加に伴ってずり応力が増加したものと考えられる．なお，このようなEPS添加量とずり応力の関係は，Tolhurstら（2002）の実験結果でも示されている．

これらの結果より，底質1gに対するEPS添加量が0，1，2および3mgのとき，底質のずり応力の平均値はそれぞれ11.6，12.7，14.2および19.6Pa，また降伏応力値は4.5，4.5，4.6および5.8Paと増加したことから，EPSは底質の安定化に寄与していること，またEPS量の増加に伴い底質の安定性が促進することが明らかとなった．

以上まとめると，有明海における海苔由来のEPSは海水中の懸濁物質を凝集させ，また底質の安定性を高めることで底質の巻き上がりを抑制する役割を担っているものと考えられる．したがって，海苔由来のEPSは，有明海における透明度の上昇に寄与している可能性がある．

4. まとめ

本研究は，有明海において大規模に養殖されている海苔に着目し，海苔がEPSを分泌するか否かについて調べるとともに，EPSが海水中の懸濁物質の凝集と底質の安定化に与える影響について海苔の培養実験を通じて検証した．得られた知見は，以下の通りである．

1）海苔は増殖過程において炭水化物を分泌し，その割合はDOCのうちおよそ14%（2.81mg/L）であることが示された．また，海苔培養後の培養液中に10^2から10^6 Daまでの高分子状物質の存在が確認されたこと，海苔培養前後で培養液の降伏応力値が0.004Paから0.260Paに増加したことから，海苔によってEPSが分泌されていることが明らかとなった．

2）懸濁液の濁度は，底質1gに対するEPS添加量を0.5mgとしたときに最も低い39度を示したことから，EPSは懸濁物質の凝集作用に影響を与えていることがわかった．また，水中における過度のEPSは粒子の凝集作用を低下させることが認められた．

3）底質1gに対するEPS添加量が0，1，2および3mgのとき，底質のずり応力の平均値はそれぞれ11.6，12.7，14.2および19.6Pa，また降伏応力値は4.5，4.5，4.6および5.8Paと増加したことから，EPSは底質の安定化に寄与していること，またEPSの増加に伴い底質の安定性が促進することが明らかとなった．

4）海苔由来のEPSは海水中の懸濁物質を凝集させ，また底質の安定性を高めたことから，有明海における透明度の上昇に寄与している可能性がある．

謝辞：本研究は文科省科学者（佐賀大学）特別研究教育費・有明海総合研究プロジェクトの分担研究として行った．また，海苔は佐賀県有明水産振興センターの三根崇幸氏から提供頂いた．ここに，感謝の意を表します．

参　考　文　献

有明海・八代海総合調査評価委員会（2006）：委員会報告書，環境省，83 p.

飯盛啓生・磯部敏幸（2006）：有明海における海苔の色落ち現象と海水中金属元素の影響，分析化学，55巻，pp. 999-1002.

宇野木早苗（2002）：有明海における潮汐と流れの変化－諫早湾干拓事業の影響を中心として－，海と空，78巻，pp. 19-30.

宇野木早苗（2003）：有明海の潮汐減少の原因に関する観測データの再解析結果，海の研究，12巻，pp. 307-313.

大石明広・原田浩幸・河野泰訓・志岐昌彦・山本浩一・速水祐一・井上勝利・川喜田英孝・大渡啓介（2008）：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，海岸工学論文集，55巻，pp. 1301-1305.

清本容子・山田一来・中田英昭・石坂丞二・田中勝久・岡村和麿・熊谷　香・梅田智樹・木野世紀（2008）：有明海における透明度の長期的上昇傾向及び赤潮発生との関連，海の研究，17巻，pp. 337-356.

菅俣　匠・杉山知巳・梅沢健一・岡沢　智（2002）：超高強度コンクリート用高性能減水剤のフレッシュ性状改善効果，コンクリート工学年次論文集，24巻，pp. 927-932.

須藤俊造（1961）：アサクサノリの大量培養について，農産加工技術研究会誌，8巻，pp. 52-59.

種谷真一（1990）：やさしいレオロジー工学－物質の変形と流動－，工業調査会，241 p.

土質工学会（1984）：土質試験法，土質工学会，757 p.

濱田孝治・速水祐一・山本浩一・大串浩一郎・吉野健児・平川隆一・山田裕樹（2008）：2006年夏季の有明海湾奥における大規模貧酸素化，海の研究，17巻，pp. 371-377.

古川清久・米本慎一（2003）：有明海異変：海と川と山の再生に向けて，不知火書房，199 p.

程木義邦（2005）：有明海浅海定点調査データでみられる表層低塩分水輸送パターンの変化，日本海洋学会編「有明海の生態系再生をめざして」，恒星社厚生閣，pp. 55-62.

（独法）水資源機構：筑後大堰管理所，環境情報（オンライン），http://www.water.go.jp/chikugo/coozeki/html/contents_2/environ_info_001/environ_info_001_5.html#1，参照 2009-06-20.

Dade, W. B., J. D. Davis, P. D. Nichols, A. R. M. Nowell, D. Thistle, M. B. Trexler and D. C. White (1990): Effects of bacterial exopolymer adhesion on the entrainment of sand, Geomicrob. J., Vol. 8, pp. 1-16.

de Brouwer, J. F. C. and L. J. Stal (2002): Daily fluctuations of exopolymers in cultures of the benthic diatoms *Cylindrotheca closterium and Nitzschia* sp. (bacillariophyceae), J. Phycol., Vol. 38, pp. 464-472.

de Brouwer, J. F. C., K. Wolfstein, G. K. Ruddy, T. E. R. Jones and L. J. Stal (2005): Biogenic stabilization of intertidal sediments: The importance of extracellular polymeric substances produced by benthic diatoms, Microb. Ecol., Vol. 49, pp. 501-512.

Decho, A. W. (1990): Microbial exopolymer secretions in ocean environments: Their role (s) in food webs and marine processes, Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev., Vol. 28, pp. 73-153.

Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith (1956): Colorimetric methods for determination of sugars and related substances, Anal Chem, Vol. 28, pp. 350-356.

Tokita, M. and T. Tanaka (1991): Friction coefficient of polymer networks of gels, J. Chem. Phys., Vol. 95, pp. 4613-4619.

Tolhurst, T. J., G. Gust and D. M. Paterson (2002): The influence of an extracellular polymeric substance (EPS) on cohesive sediment stability, Fine Sediment Dynamics in the Marine Environment, Proceedings in Marine Science, pp. 409-425.