

有明海、八代海における干潟微生物による環境浄化機能の解析

助成研究者 大和田 紘一 (熊本県立大学環境共生学部)
共同研究者 芝田 久士 (熊本県立大学環境共生学部)
篠崎 貴史 (熊本県立大学環境共生学部)
安達 真由美 (熊本県立大学環境共生学部)
村山 泰明 (熊本県立大学環境共生学部)

有明海、八代海は古くから豊饒の海といわれ、その高い生産力により二枚貝類、海苔の養殖、魚類の養殖など多種の水産資源を支えてきた。しかし、2000年秋から2001年冬にかけての珪藻赤潮による養殖海苔への大きな被害に関連して、この海域全体の環境に多くの関心が持たれるようになってきた。私どもは、八代海を広域的に環境のモニタリングをすること、有明海に流入する緑川河口域干潟の調査を熊本県水産研究センターの協力の下にスタートさせた。その中で、有明海の緑川河口域の砂質干潟の3点と泥質干潟の3点において干潟微生物による環境浄化機能を知るための手がかりとして、微生物の細胞外酵素としてアルカリフォスファターゼ活性を測定し、環境要因や微生物としてバクテリアや付着微細藻類との関係を調べようとした。同酵素は干潟堆積物中の付着微細藻類や微生物が体外に分泌され、有機態リン酸化合物が無機態リンとし加水分解を受けている。調査は2002年7月から2003年6月まで月1回の間隔で行った。付着微細藻類の指標としての光合成色素量は、季節的な変動はあるが、砂質干潟の3点においては平均値は 15.9 mg/m^2 、泥干潟の住吉干潟では平均値は 139.5 mg/m^2 と約10倍の差が認められた。全リンの平均値は、緑川河口の砂質干潟では $0.11 \mu\text{g atP/g}$ 、住吉干潟では $0.67 \mu\text{g atP/g}$ と約6倍の差が認められた。アルカリ・フォスファターゼ活性は緑川河口干潟では 0.40 ng atP/g/hr 、住吉干潟においては 1.61 ng atP/g/hr と平均値で約4倍の差が認められた。今後は付着微細藻類の光合成活性や種類組成、また微生物の量的分布やその活性、またその他の有機物分解酵素活性についても検討をしていきたい。

20

助成番号 0220

有明海、八代海における干潟微生物による環境浄化機能の解析

助成研究者 大和田 紘一(熊本県立大学環境共生学部)
共同研究者 芝田 久士(熊本県立大学環境共生学部)
篠崎 貴史(熊本県立大学環境共生学部)
安達 真由美(熊本県立大学環境共生学部)
村山 泰明(熊本県立大学環境共生学部)

1 研究目的

有明海、八代海は古くから豊饒の海といわれ、その高い生産力により二枚貝類、海苔の養殖、魚類の養殖など多種の水産資源を支えてきた¹⁾。しかし、2000年秋から2001年冬にかけての珪藻赤潮による養殖海苔への大きな被害に関連して、この海域全体の環境に多くの関心が持たれるようになってきた²⁾。干潟域は、潮の干満によって露出と水没を繰り返す砂や泥の遠浅海岸で、波の穏やかな入江、湾内で河川からの土砂の供給により発達している。このような干潟は自然環境としてだけでなく、採貝のような漁業環境、魚釣りや潮干狩りのようなレジャー、河口域に発達しているアシ原から干潟の美しい景観を含めてさまざまな利益を我々にもたらしている^{3,4)}、一方干潟の高い水質浄化機能が注目されている⁵⁾。干潟は物質循環、水質浄化の場であり、また水質保全の観点から、干潟域は赤潮などや富栄養化現象を引き起こす原因である汚濁物質を沈降・分解・固定する高い能力を有しており、これにより内湾域の水質浄化に大きく貢献している^{6,7)}。この水質浄化には、二枚貝などの生物による懸濁粒子の濾過、またノリ養殖などを含めて水産生物の収穫や野鳥などによる捕食、また干潟に生息する微生物による浄化機能が考えられるが、現在までのところ、ボックスモデルや干潟生態系モデル^{8,9)}による研究はあるが、浄化に関係する微生物による有機物の分解などに関してはまだ十分な研究が行われていない。

私ども2002年から、八代海を広域的に環境のモニタリングをすることと有明海に流入する緑川河口域干潟の調査を熊本県水産研究センターの協力の下にスタートさせた。八代海においては図1のごとく、St1からSt8の測点において海洋環境と、食物連鎖の初期過程の生物群集の調査を毎月1回、また中央部の竜ヶ岳町地先の調査点では夏から秋にかけて、週2回の調査を行ってきた。一方、緑川河口域の干潟においては砂質干潟の3点と泥質干潟の3点において干潟微生物による環境浄化機能を知るための手がかりとして、微生物の細胞外酵素としてアルカリフォスファターゼ活性を測定し、環境要因や微生物としてバクテリアや付着微細藻類との関係を調べようとした。

微生物による有機物の分解活性の指標としては、まず有機態リンの加水分解酵素であるアルカリフォスファターゼ活性を検討した。同酵素は海水中では、植物プランクトンや微生物

が体外に分泌し、有機態リン酸化合物を加水分解して無機態リンとし、利用している¹⁰⁾。従って本研究では、堆積物中のアルカリフォスファターゼ活性を測定して、堆積物中からどの程度有機態リン化合物が無機化されているのかを推定し、堆積物中の全リン、光合成色素量など他の要素との関係の有無を調べた。

2 研究方法

2-1 サンプリング

図1には緑川河口域の砂質干潟とその南側に位置する泥質な住吉干潟のサンプリング場所を示した。緑川河口の砂質干潟は盛砂漁場のH7、H10および対照区の3地点である。住吉干潟も同様に海床路沿いに沖から3点の調査を行った。調査は2002年7月から2003年6月まで、月1回の割合で行った。

採泥はステンレス製のヘラ(約10 cm×10 cm)を用いて、表層から深さ0.5 cmまでを水平的に層を乱さないように採取し、角形シャーレ(縦10 cm×横14 cm)にそのまま移した。またプラスチック製の円柱コア(直径5 cm×高さ25 cm)を突き刺して、深さ10 cm程度まで垂直的に採泥した。角形シャーレに採取した表層堆積物は、1 cm×1 cm×0.5 cmの直方体状に分取し、光合成色素、全リンの分析、堆積物中の含水率(乾重量)測定に用いた。また同サンプルを注射筒で1 ml分取し、アルカリフォスファターゼ活性の測定に用いた。

2-2 測定法

光合成色素はLorenzenの方法に従い、ターナー蛍光光度計(Turner Designs, 10-AU)を用いて測定したが、ここではchl-aとphaeo pigmentを合わせた値を光合成色素量(phytopigment)として示した¹¹⁾。

全リンは乾燥した堆積物を試験管に移し、過硫酸カリウム2 mlを加えて120℃、30分間オートクレーブ中で湿式分解後、モリブデンブルー法¹²⁾で分析を行った。

堆積物中のアルカリフォスファターゼ活性の測定は、Perryの方法¹²⁾をもとに、Sigma社の3-O-Methylfluorescein Phosphateを基質として用い、多少改変して図2および表1の如く測定を行った。

3 結果および考察

3-1 表層堆積物の温度と含泥率

緑川河口干潟と住吉干潟共に夏季には30℃を越すが、一方冬季には5℃以下にもなる厳しい条件であった。調査は干潮時の潮の引き具合から7月から10月までと3月から6月までは昼間に行い11月から2月にかけては、夜間に行った。緑川河口干潟の含泥率は、平均値で2.5%で、堆積物の97%が砂質であった。一方、住吉干潟の含泥率はSt.1で68.2%、他の2点で80%以上であった。St.1は沖に面していて、潮汐や波浪の影響を他の2点より受けているため、含泥率が多少低くなっていたと考えられる。

3-2 表層堆積物の光合成色素量

干潟堆積物の中には珪藻を中心とした、底生微細藻類が生息していて、光合成を行いなが

ら増殖し、干潟の底生生物の餌料となっている。その指標として、クロロフィル a およびフェオ色素の測定を行ったが、ここではその和を光合成色素量として示した。

図 3 に緑川河口の砂質干潟の各調査域における、表層堆積物中の光合成色素量の季節変化を示した。光合成色素量は H 7 の 7 月で $55\text{mg}/\text{m}^2$ と高かったが、H10 と対照区で $15\text{--}16\text{mg}/\text{m}^2$ であった。その後は全体的には低い値であった。この間の平均値は、H 7 で $16.8\text{mg}/\text{m}^2$ 、H 10 で $17.0\text{mg}/\text{m}^2$ 、対照区で $14.0\text{mg}/\text{m}^2$ と同程度であった。その後 2 月に多少増加が見られたが、さらに 5 月から 6 月に再び増加し、 $30\text{--}60\text{mg}/\text{m}^2$ と高い値を示した。

一方図 4 には住吉干潟の泥干潟の各調査域における表層堆積物中の光合成色素量の季節変化を示した。調査期間中の光合成色素量の平均値は、St. 1 で $135.2\text{mg}/\text{m}^2$ 、St. 2 で $171.1\text{mg}/\text{m}^2$ 、St. 3 で $112.1\text{mg}/\text{m}^2$ と高い値を示した。特に St. 2 や St. 3 の 10 月、4 月には泥の表面に付着性の底生微細藻類がマット状に分布しているのが確認され、光合成色素量で 250 あるいは $300\text{mg}/\text{m}^2$ の非常に高い値を示した。

門谷¹³⁾は高松市の屋島西部に位置する河口干潟で、表層堆積物のクロロフィル a 量を 7 年間測定してきている。その値は $27.8\text{--}120.2\text{mg}/\text{m}^2$ （平均値 $74.0\text{mg}/\text{m}^2$ ）の範囲で変動しており、底生微細藻類は年間を通じて高いレベルで保たれていた。本報告では光合成色素量としてクロロフィル a とフェオ色素の合計を示しているが、クロロフィル a 濃度としては同程度であった。今回の調査で砂質干潟と泥質干潟の光合成色素量との間に、約 10 倍の差が認められ、これは粒度組成が異なることで、付着性の底生微細藻類の分布に差が生じるためだと考えられる。しかし、泥質干潟での一次生産能力に関する研究はあまりされておらず⁹⁾、今後は泥質干潟においての十分な調査が必要であると考えられる。また今回は、付着性の底生微細藻類のバイオマスの指標としてのクロロフィル a、フェオ色素の測定のみであったが、これらの細胞数、種類、および基礎生産量の測定も必要である。

3-3 表層堆積物中の全リン

図 5 と図 6 にそれぞれ緑川河口干潟と住吉干潟における表層堆積物中の全リン濃度の季節変化を示した。調査期間中の全リンの平均値は、緑川河口の砂質干潟では H 7 で $0.14\ \mu\text{g at P/g}$ 、H 10 で $0.10\ \mu\text{g at P/g}$ 、対照区で $0.09\ \mu\text{g at P/g}$ であった。一方、泥質の住吉干潟では St. 1 で $0.47\ \mu\text{g at P/g}$ 、St. 2 で $0.66\ \mu\text{g at P/g}$ 、St. 3 で $0.88\ \mu\text{g at P/g}$ で、両干潟の全リン濃度を比較すると、平均値で約 6 倍の差があった。

3-4 表層堆積物中のアルカリフォスファターゼ活性

図 7 と図 8 にはそれぞれ緑川河口干潟と住吉干潟における表層堆積物中のアルカリフォスファターゼ活性（Alkaline Phosphatase Activity: Al-P Activity）の季節変化を示した。これは現場の活性ではなく、基質が十分量供給されたときに 25°C での活性のポテンシャルと考えられる。調査期間中のアルカリフォスファターゼ活性の平均値は緑川河口干潟では、H 7 で $0.33\ \text{ng at P/g/hr}$ 、H 10 で $0.48\ \text{ng at P/g/hr}$ 、対照区で $0.40\ \text{ng at P/g/hr}$ であった。一方、住吉干潟においては St. 1 で $1.54\ \text{ng at P/g/hr}$ 、St. 2 で $1.29\ \text{ng at P/g/hr}$ 、St. 3 で $2.02\ \text{ng}$

at P/g/hr であった。両干潟の活性を比較すると平均値で約 4 倍の差が認められた。

これらの測定値をもとに、それぞれ緑川河口干潟と住吉干潟におけるアルカリフォスファターゼ活性と光合成色素量あるいは全リン濃度に関し、全てのサンプルを季節や堆積物の粒土組成などの因子に関係なくプロットしてみた。その結果は、これらの因子とアルカリフォスファターゼ活性には直接的には密接な関係は認められなかった。

本年度は干潟での研究のスタートの年であり、年間を通じて干潟に出てのサンプリングを行い、アルカリフォスファターゼ活性や堆積物中の付着性の底性微細藻類の指標として光合成色素量、またアルカリ・フォスファターゼ活性の基質の指標として全リン濃度などを測定した。今後はさらに環境浄化機能の指標になるような因子、例えばある種のペプチダーゼ活性、微生物の呼吸活性の指標としてのエステラーゼ活性なども加えると同時に、付着性の底性微細藻類の光合成速度や種類組成などを加えて、調査を継続させたい。

謝辞

サンプリングにご協力をいただいた熊本県水産研究センター資源研究部の研究員の皆様に感謝いたします。

引用文献

- 1) 佐藤正典編. 2000. 有明海のいきものたち 干潟河口域の生物多様性. 海游舎.
- 2) 有明海と長良川で何がおこっているのか?. 2001. 科学. 71, 869.
- 3) 栗原康. 1980. 干潟は生きている. 岩波新書.
- 4) 菊地泰二. 2000. 干潟は、いま：総論. 海洋と生物. 129, 306
- 5) 門谷茂. 2000. 瀬戸内海の現状と干潟域における物質循環. 海洋と生物. 129, 323.
- 6) 中村由行. 2001. 干潟の生態系と水質浄化について. 波となぎさ. 150, 40.
- 7) 青山裕晃, 甲斐正信, 鈴木輝明. 2001. 伊勢湾小鈴谷干潟の水質浄化機能. 水産海洋研究. 64, 1.
- 8) 中田喜三郎, 畑恭子, 鈴木輝明. 1997. 干潟生態系モデルによる窒素循環の定量化—三河湾一色干潟における事例—. J. Adv. Mar. Sci. Tech. Soc. 2, 63.
- 9) 中田喜三郎, 畑恭子. 1994. 沿岸環境における浄化機能の評価, 水環境学会誌. 17, 158.
- 10) 石田祐三郎. 2001. 海洋微生物の分子生態学入門 生態学の基礎から分子まで. 培風館.
- 11) Strickland, J. D. H. and T. R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis, 2nd Edition, Bull. Fish. Res. Bd. Can.
- 12) Perry, M. J. 1972. Alkaline phosphatase activity in subtropical Central North Pacific water using a sensitive fluorometric method. Marine Biology. 15, 113.
- 13) 門谷茂. 1999. 沿岸浅海域における物質循環, 水環境学会誌. 22, 533.

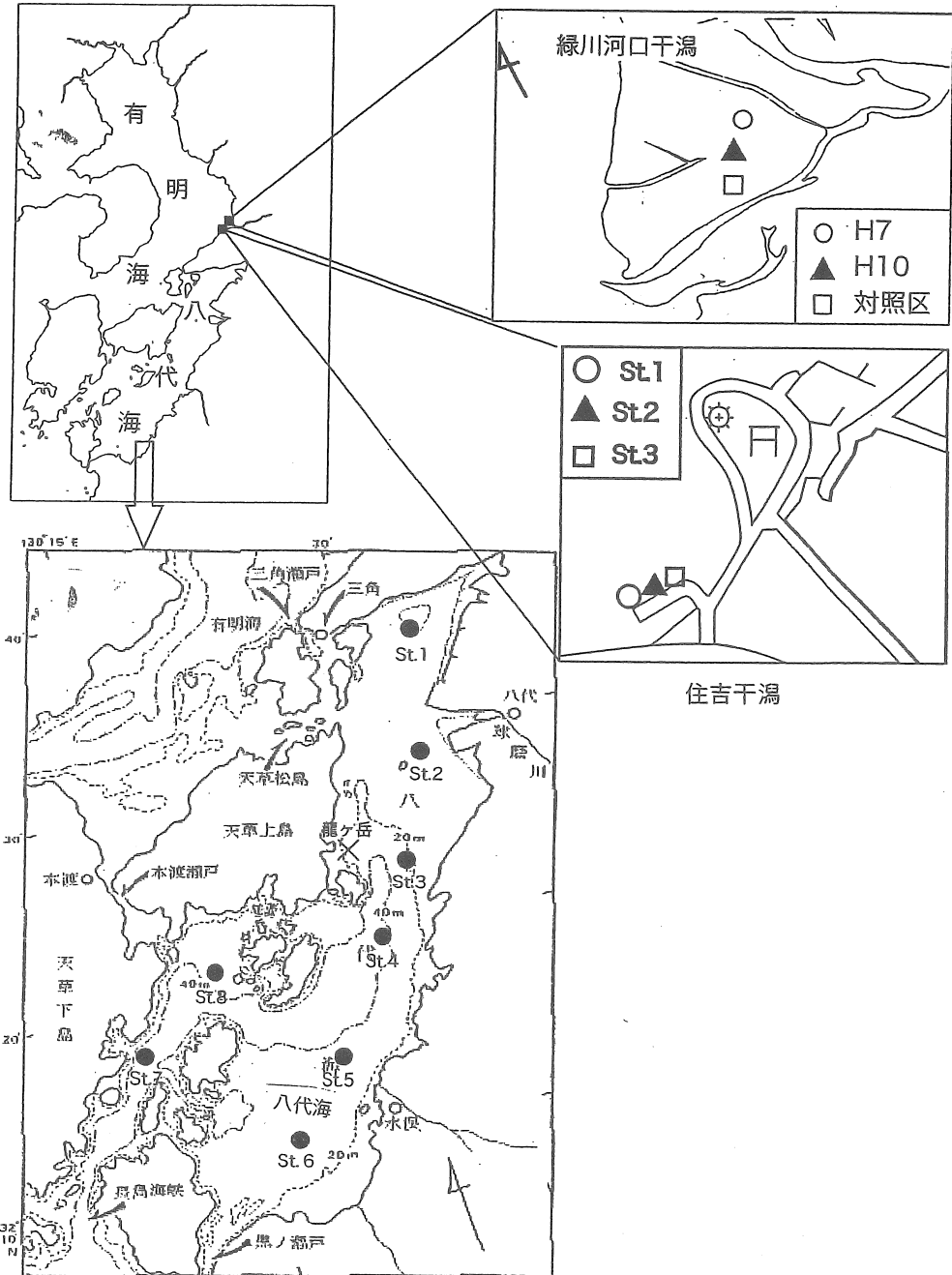
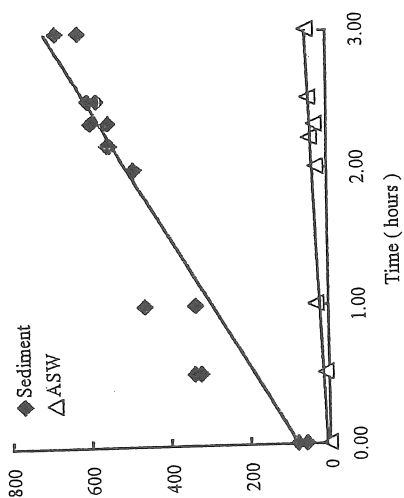
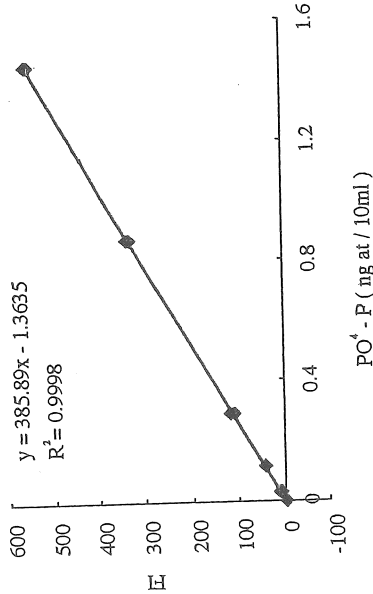


図1. 八代海および緑川河口干潟の調査点.

泥サンプル, ASW の 25℃ における培養結果.



MF 検量線



泥サンプル 1ml
人工海水 8ml (pH: 7.4)
0.1 M Tris Buffer 0.5 ml (pH: 8.2)
12.0 n M / 10 ml MFP 0.5 ml

25 °C, 2.5 hr
Incubation

低温処理, 遠心分離後, MFの蛍光値を測定.

図 2. アルカリ・フォスファターゼ活性の測定法

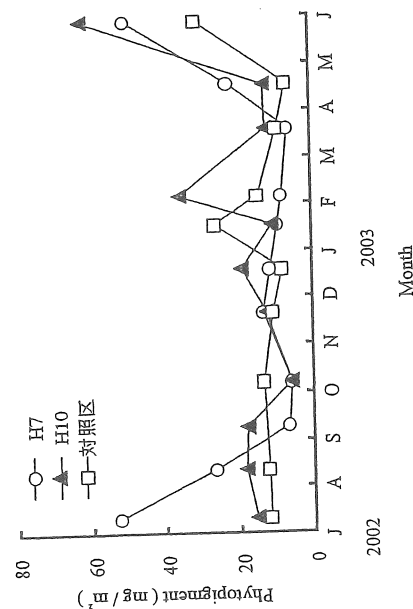


図 3. 砂質干潟堆積物中の光合成色素量

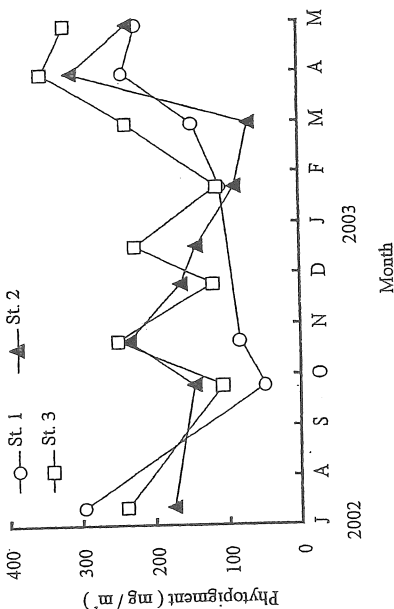


図 4. 泥質干潟堆積物中の光合成色素量

図 6. 泥質干潟堆積物中の全リン濃度

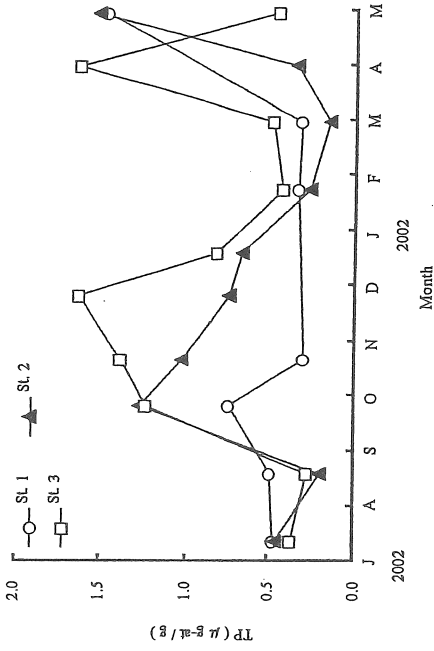


図 5. 砂質干潟堆積物中の全リン濃度

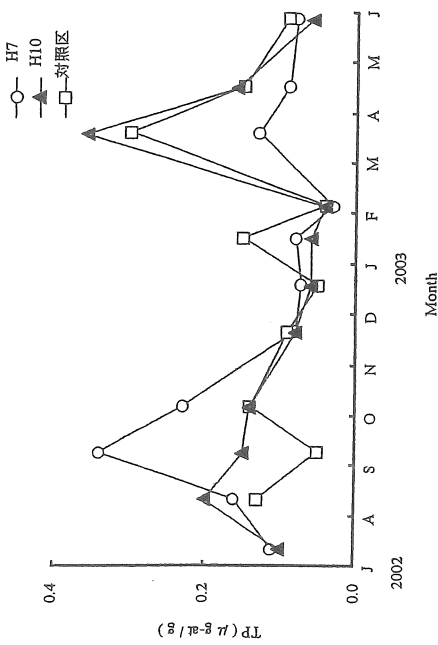


図 7. 砂質干潟堆積物中のアルカリ・フォスファターゼ活性

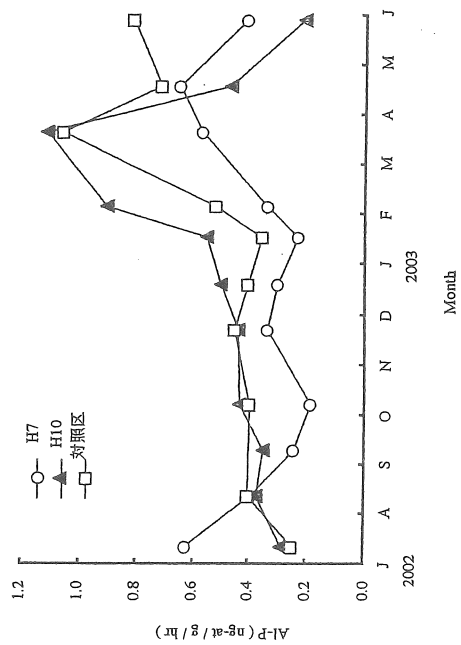


図 8. 泥質干潟堆積物中のアルカリ・フォスファターゼ活性

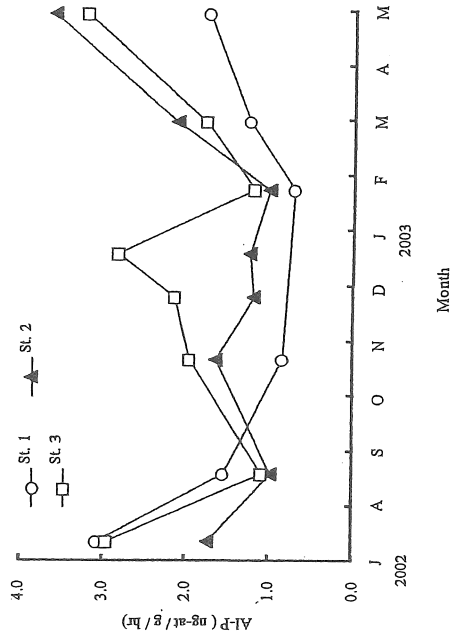
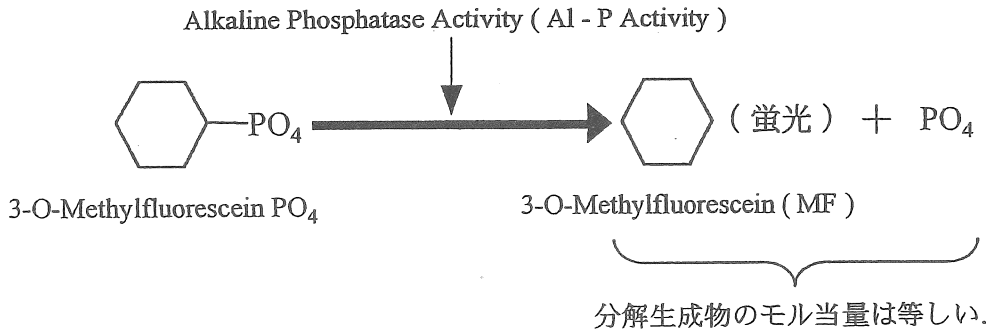


表 1. アルカリ・フォスファターゼ活性の反応様式

基質 : 3-O-Methylfluorescein PO_4 を使用.



MF の蛍光値を測定 (励起側 : 430 nm, 蛍光側 : 507 nm)

→ 加水分解された無機態リンの濃度に相当.

Microbial environmental cleaning activity in tidal flat sediments in Ariake and Yatsusiro Seas

Kouichi Ohwada, Hisasi Shibata, Takashi Shinozaki

Mayumi Adachi and Yasuaki Murayama

Faculty of Environmental and Symbiotic Sciences

Prefectural University of Kumamoto

As a first step to evaluate microbial environmental cleaning activity, or degradation of organic matter, alkaline phosphatase activity of tidal flat sediments along the Midorikawa River estuary were monthly observed from July, 2002, to June, 2003, and compared with the activities of some environmental and microbiological factors. Average values of alkaline phosphatase activities were 1.61 ng at P/g/hr in the muddy tidal flat sediments, compared with the 0.40 ng at P/g/hr in the sandy tidal flat sediments. Several related factor with phosphatase activities were also studied. Phytopigment concentrations including both chlorophyll a and phaeopigments were about 10 times higher in muddy tidal flat sediments than sandy sediments; average values 15.9mg/m² in the sandy sediments and 139.5mg/m² in the muddy tidal flat sediments. Total phosphorus concentrations in the sandy sediments were 0.11 μg at P/g in average compared with almost 6 fold higher concentrations 0.67 μg at P/g in the muddy sediments. Clear negative or positive relationships were not observed with alkaline phosphatase activities and phytopigments or total phosphorus concentrations. Further studies are needed to correlate the microbial cleaning activities of tidal flat land sediments with some other factors, such biomass of microorganisms, respiratory and enzymatic activities, photosynthetic rates and species composition of the sessile microalgae in the tidal flat lands in these areas.