

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月6日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21560572

研究課題名（和文） 有明海異変透明度増加の生化学的原因解明に関する研究

研究課題名（英文） Research on the biochemical cause elucidation of the increase in the Ariake sea transparency

研究代表者

原田 浩幸 (HARADA HIROYUKI)

県立広島大学・生命環境学部・教授

研究者番号：20222234

研究成果の概要（和文）：有明海干潟底泥から回収した水溶性細胞外多糖類様物質（EPS）を有機物分解処理した底泥の懸濁液に添加した。回転粘度計のスリーブの中で人工海水懸濁液では非ニュートン挙動を示して、ずり速度に比例してずり応力が増加した。底泥の粒子径は約 1.3 倍に増加した。これは底泥に吸着した EPS が海水のカチオンにより、ネットワークを形成するためと考えられた。

付着藻類を起源とする細胞外物質の底泥粒子の凝集や安定に関する影響を実験室的に検討した。この多糖類は水溶性であり、凝集や安定化に関する影響を流動特性実験で調べた。抽出多糖溶液とその底泥懸濁液やカルシウム共存状態での流動は、ずり速度可変の粘度計を用いて測定した。抽出溶液はビンガム挙動を示し、粘度は経過時間とともに増加した。これは水和反応によるものと考えられた。抽出多糖が共存する懸濁液では非ビンガム挙動を示し、チキソトロピー性を示した。抽出多糖は底泥の安定化に関係して、その効果はカルシウムによって増すことがわかった。

研究成果の概要（英文）：The water-soluble extracellular polysaccharide substance (EPS) collected from the Ariake sea tidal flat sediment was added to the suspension of sediment which carried out organic-matter-decomposition processing. Artificial-sea-water suspension showed the non-Newton action in the sleeve of a rotation viscometer and shear stress increased with shear speed in proportion. The diameter of a particle of sediment increased by about 1.3 times. This is because of form of network between adsorbed EPS and cation of sea water.

Influence of Extracellular Polymeric Substances originated from benthic algae on particle aggregation and sedimentary stabilization in Ariake Sea was investigated through laboratory experiment. Extracellular polymeric substances in the lyophilized sediment were isolated as colloidal carbohydrate fraction. The influence of the polymeric substances on particle aggregation and sedimentary stabilization was experimentally examined through rheological measurement. Evaluate of rheological properties of polymeric substances solution and sediment slurry with polymeric substances, calcium ion were carried out using a shear rate changeable rehometer. Evaluate of rheological properties of polymeric substances solution and sediment slurry with polymeric substances, calcium ion were carried out using a shear rate changeable rehometer. This aqueous solution of polymeric substances solution behave as Bingham fluids, the shear stress increase with elapsed time. It would be most like due to hydration. The sea sediment slurry with polymeric substances behave as non-Bingham fluids. The stress-strain hysteresis loop width predicts the interaction of sediment and polymeric substances. Polymeric substances enhance of sediment stabilization, the effect is greatly improve by calcium ion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：土木環境システム

科研費の分科・細目：土木環境システム

キーワード：細胞外様高分子物質 (EPS)、レオロジー、安定化、吸着

1. 研究開始当初の背景

有明海異変は水産漁業者が漁獲量の減少に対して提案した言葉であり、それが広く定着して現在では色々な環境質変化の影響までを示すようになった。

佐賀大学の有明海研究総合プロジェクトではその異変の定義の一つに透明度の増加をあげて研究対象とし、佐賀大学有明海総合研究プロジェクト成果報告集において Hayami ら (2009) が透明度上昇の原因と潮流相関の関係を追及してきた。透明度の変化は第一的に潮流の変化が考えられるが、それ以外の要因もある。それは海外での研究報告 Brower ら (2005, 2006) では、藻類がマット状になっている生物膜の分泌する多糖類の一種である細胞外ポリマー (Extracellular Polymeric Substances, EPS) EPS により干潟の安定性が強められているとの報告がある。安定化することにより巻き上がる底泥が少なくなり洗掘が抑えられるが、反面において透明度があがる。

2. 研究の目的

透明度が上昇すると、日光の透過が多くなり、光合成によって植物プランクトンが発生しやすくなり、赤潮発生の一因ともなる。

透明度の上昇に関して、有明海で同じように生物マットの状態が存在するわけではないので、同じメカニズムで透明度が上昇したとは考えにくい。しかしながら、有明海底泥の中の糖などの有機物量をはかった Matsubara ら (2002) の報告をみると、ある程度の量の糖が含まれているので、海底の底泥に付着している藻類、海苔に起因する有機物 (多糖類) が、底質粒子の安定化させる役割の一端を担っていることは、十分に考えられる。

このことを、現地の状況を反映しながらその可能性を証明することは困難であるので、本研究では基礎的な検討として実験室的な

促進実験において分泌有機物の特性とそれによる底泥の凝集性を検討し、有明海異変の解明のアプローチの一提案とする。

3. 研究の方法

EPS 抽出に対して本研究で検討して提案した方法を以下に示す。

凍結乾燥させた有明海底質 25 g を蒸留水 100 ml に懸濁させ、マグネティックスターラーを用いて、室温で 1 時間攪拌した。その後、超遠心分離機 MX-301 (TOMY) によって 25℃, 10,000×g で遠心分離を行い、上澄み液を回収した。この液をガラス繊維ろ紙 (GF/F) を用いて吸引ろ過し、ろ液を EPS 水溶液とした。得られた溶液に対して 4 倍量のエタノールを添加し、冷凍庫内で 24 時間放置した。得られた白色沈澱をガラス繊維ろ紙 (GF/F) を用いて吸引ろ過し、残渣を風乾させ、粉末 EPS として回収した。

サンプルは有明海湾奥部の干潟域において、底質付着藻類が多く分布していると考えられる表層 5 mm の底質を採取し、2 mm 目のふるいを通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。

この試料が有明海の底泥を代表しているかについては、底泥性状によっても異なるが、粒度分布や泥分量から泥質干潟底泥のサンプルとして扱うことが可能であると考えている。

Brower and Stal (2001) の方法を参考にし、凍結乾燥汚泥 0.1 g を蒸留水 0.8 cm³ に懸濁させ、回転型攪拌器を用いて 30℃ で 1h 攪拌した。後で述べるが、結果として高分子の多糖類が文献 (Brower and Stal, 2001) で報告される EPS より小さいのでここでは EPS ではなく多糖抽出溶液と記述する。その後 6000g, 5min の遠心分離を行い底質から多糖類を抽出した。抽出した多糖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

子量布の分析が行われる (Brower and Stal, 2001)。分子量分布は Amicon Ultra-4 (MILIPORE) で分子量 10,000, 30,000, 50,000 および 100,000 の膜を用いて分子量分画をおこなうとともに HPLC の RI 検出器でのゲルクロマトをおこなって推定した。本研究ではポリマーを構成する単糖分析を 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-硫酸法およびカルバゾール-硫酸法によって行った (Dubois et.al., 1956), (Bitter and Muin, 1962)。

構成単糖更分析の都合上、抽出液から多糖類を粉末として回収する。方法は、多糖類抽出溶液に対して4倍量の特級アセトンを追加することで、溶解度小さくして沈殿を生成させる。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 mg に $2\text{mol}/\text{dm}^3$ のトリフルオロ酢酸 0.2 cm^3 を添加し、 100°C で 6h 加水分解した後、減圧乾固を行った。残渣を蒸留水 0.2 cm^3 に溶解させ、 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ のフィルターでろ過後、希釈し、 0.05 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 $0.5\text{mol}/\text{dm}^3$ ホウ酸カリウム緩衝液を用い、中性糖の検出波長は Ex (励起光波長) $.320\text{ nm}$ Em (蛍光波長) $.430\text{ nm}$ とし、ウロン酸は Ex. 360 nm Em. 430 nm とした。カラム温度は 70°C で一定とした。

多糖抽出溶液のレオロジーを次のようにして測定した。抽出した多糖溶液を遠心濃縮機を用いて、遠心濃縮した。得られた濃縮液は粘度測定の前に 30°C 中で 1h 静置させ、その後、DV-II +Pro (BROOKFIELD) を用いて粘度測定を行った。回転粘度計には共軸二重円筒型やコーン型があるが、再現性に高い共軸二重円筒型を選択した。これを用いて 30°C において $0.396\text{-}100[\text{s}^{-1}]$ のずり速度とずり応力の関係を調べた。以降の速度条件も同様である。また、濃縮液に含まれる全糖量をフェノール硫酸法によって、グルコース換算により測定した。同時に調製した濃縮液 3 本を 4°C で 5d, 7d, 10d 静置し、それぞれ同様の条件で時間経過後の粘度測定および全糖量の測定を行った。

多糖抽出溶液に凍結乾燥底泥を懸濁した系のレオロジーは次のように測定した。全糖濃度 $14\text{mg}/\text{L}$ の抽出液 10ml 、および抽蒸留水 10 ml にそれぞれ乾燥底泥 3.3 g を加え、攪拌式ホモジナイザーを 20s あてて十分に懸濁させた。また、これらの溶液に Ca 濃度で 3.3 mM になるように添加した溶液も調整した。その後、DV-II+Pro (BROOKFIELD) を用いて粘度測定を行った。

カチオンの影響を海中では Mg と Ca を合わせて濃度がほぼ $55\text{mmol}/\text{L}$ なる考慮して、2価カチオンを代表して Ca だけで

$2640\text{mg}/\text{L}$ ($66\text{mmol}/\text{L}$) になるようにした。

上記は EPS が底泥に吸着して影響を発現するのに吸着を仮定した。これを確認するために COD として評価した。これはフェノール硫酸法の感度のため、また塩分の影響もあるので、海域の有機物に適用されている項目を適用することに意味がある。Figure 7 に示すように、遠心分離管に過酸化水素で有機物を除去した底泥を入れ、そこに蒸留水や人工海水または EPS を投入し、混合する (攪拌前)。その後、振とうきで振とする (攪拌後)。攪拌前後で、サンプルをろ別して COD を測定する。人工海水のときには処理する硫酸銀の量を考慮する。

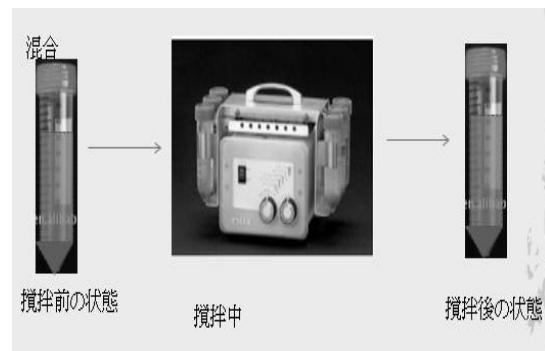


Figure 7 adsorption experimental procedure

4. 研究成果

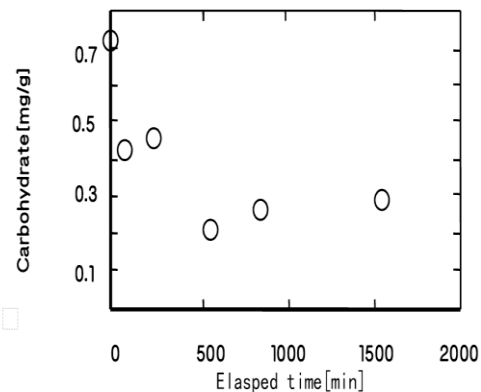


Figure 1 Carbohydrate desorption and adsorption on sediment particle.

文献により攪拌時間を 1h としているが、攪拌時間の検討もおこなった。結果を Figure 1 に示す。攪拌をおこなうときには 1h 以内に全糖量 $0.6\text{ }\mu\text{g}/\text{g}$ まで増加して、その後濃度が減少した。このことは全糖が溶出するが、再吸着されることを意味する。そのため抽出時間は 1h 時間の短いほうが好ましい。

Brouwer ら (2002) は抽出した EPS を底泥に加えて吸着することまで述べているが、抽出時での溶出と再吸着の現象の記述はしていない。

糖分析の結果を Table 1 および Table 2 に示す。

7 種の中性糖の存在を確認した。また限外濾過膜で透析したときの全糖量に対して、タンパク量はそのほぼ 1/3 , ウロン酸の量は約 1/5 であった。タンパクに比べて糖が多いことからこの EPS は藻類由来であると考えられる。抽出液の分子量分布を Table 2 示す。抽出溶液中の TOC はタンパクと多糖類から構成されているとして、計算すると糖類の 76% が分子量 10,000 以下であるが、分子量 30,000 以上もほぼ 12% 含まれている。Brower ら (2002) の干潟表層 1mm 以内の結果と比較すると、しかしながら分子量 30,000 以上の割合が 1/5 程度と低い。この高分子多糖類が少ない状況で、底泥が安定する可能性があるかどうか大きな評価となる。また単糖の種類や構成割合や底泥の安定性に深く関係するウロン酸の割合については、J.F.C. De Brouwer ら (2002) ほぼ報告と一致しているので実験結果の糖類は付着藻類起因と考えている。

実験の結果は、ずり速度とずり応力の関係の概念は流動特性として整理できる。なお図中には本研究に関連した図のみ表記している。そして Figure 2 には、多糖類抽出溶液の流動特性を示す。

Table 1 Mono saccharine distribution of extracted solution

	contents (μ g/mg)	(%)
Galactose	3.18	16.7
Mannose	3.14	16.5
Fucose	3.04	16.0
Xylose	3.02	15.9
Rhamnose	3	15.8
Glucose	2.59	13.6
Ribose	0.38	2.0

Table 2 Molecular distribution

Molecular	
~10,000	72.59%
10,000~30,000	14.20%
30,000~50,000	3.38%
50,000~100,000	5.60%
100,000~	4.23%
	100.00%

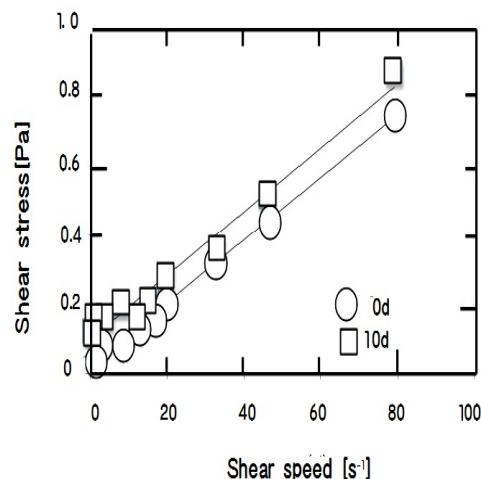
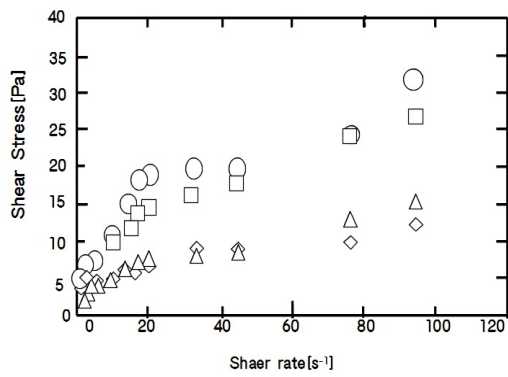


Figure 3 Relationship between shear speed and shear stress

These fluids behave as Bingham fluids

結果は切片を有する直線関係となったので EPS 水溶液 (全糖濃度 13mg/L) はビンガム流動を示すことが分かる。この切片の応力は降伏応力と言い、この応力以上の力を加えたときに液が流動する。この限界剪断応力は、時間が経過した液ではその 0.088Pa (5 d 経過), 0.100 Pa (7 d 経過) と高くなり、10 d で濃縮直後の約 4 倍を示した。また全糖量は 14 mg/L であり、時間が経過しても、大きな変化はなかった。

Perkins ら (2004) がおこなった安定性の実験では、EPS が存在すると含水率の減少が少なくなることから水分子を保持することがわかる。したがって EPS 水溶液はウロン酸による網目の凝集構造を形成して水和されている。



◆ Sediment slurry ■ Sediment slurry with 14mg/L carbohydrate
 ▲ Sediment slurry with 2640mg/L Ca × Sediment slurry with 14mg/L carbohydrate and 2640mg/L Ca

Figure 4 Relationship between shear speed and shear stress

These fluids behave as Non-Bingham fluids

ずり速度とずり応力測定の結果を Figure 4 に示す。多糖類抽出溶液系と異なって直線にならず曲線を描くようになり擬塑性流体挙動を示すようになる。

そのため、次にずり速度を下げていくと、Figure 5 に示すように、その応力をあげて行く時と異なるチキソトロピーを示すことが分かった。蒸留水懸濁系あるいはそのカルシウム懸濁系ではずり速度にともなう粘度の増加は小さい。

なお調整した Ca 濃度では海水の濃度に比べて大きい。Tokita and Tanaka (1990) や Decho (1991) は底質に含有する 2 価の金属 (カルシウム) が、EPS 中の負の電荷を帯びた官能基と底質とを架橋させ粒子の凝集に大きく影響を与えていることを報告している。Wloka (2004) は培養系において直接的に流動特性に与えるカルシウムゲルの影響を調べた。

本研究でもカルシウムの影響を調べるために抽出液溶液に添加した系および蒸留水に添加した系を調整した。もちろんロータ回転時に多糖類が溶出してトータルとして糖類が増える可能性がある。しかし濃縮液に比べてその量は小さいものと考えられるので抽出多糖類とカルシウムの影響を把握することができる。

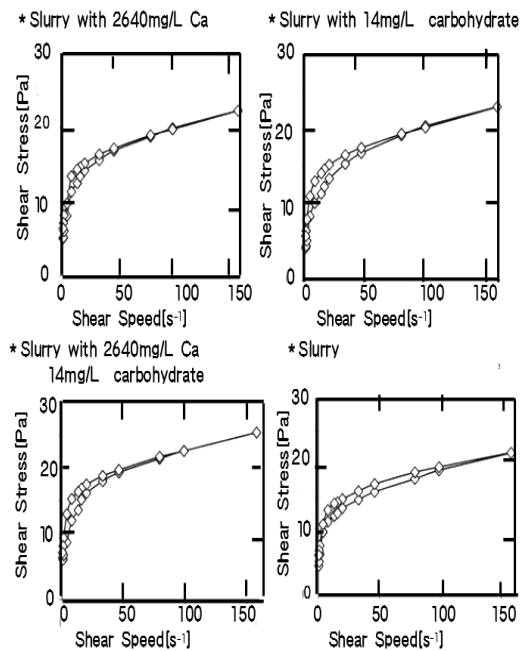


Figure 5 Hysteretic Behavior of sediments slurry in Ca and carbohydrate solution

結果として抽出糖類共存系ではずり応力が増加する。このことは安静性が増加することを意味している。多糖類共存系でのずり応力の変化は、Tolhurst (2004) の報告とも一致している。カルシウム共存系ではその応力が高くなった。以上のことから、高分子の多糖類の割合が少なくても凝集は起こり、それは 2 価カチオンの架橋により強くなる。

カルシウムとの相互作用を確かめるために多糖類回収固形物に対して IR スペクトルを測定した。(FT/IR-410(JAS.CO)) 結果を Figure 6 に示す。C = 0 および 0-H のピークから EPS 中には単糖がもつヒドロキシメチル基がカルボキシル基に置き換わった構造をもつウロン酸を含むことが示唆された。このことから、カルボキシル基に 2 価カチオンの配位してバインダーの役目をして他の多糖類鎖のカルボキシル基へも配位するのではないかと考えている。

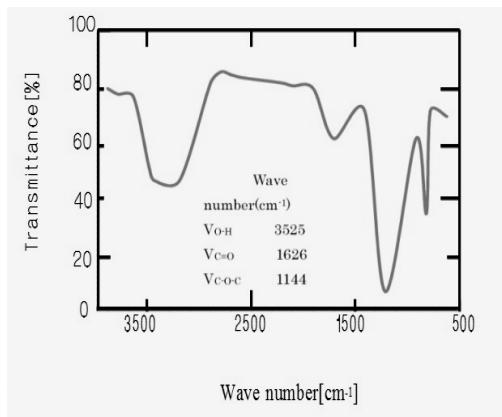


Figure 6 IR spectrum of extracted carbohydrate.

Table3 Results of adsorption experiment

系	EPS 添 加量 (mL)	泥 (g)	攪拌前 COD (mg/L)	攪拌後 COD (mg/L)	q (mg/g)
蒸留水	0.0	0.70	29.2	30.4	-
	0.7	0.70	23.4	23.2	0.180
	0.8	0.70	23.4	23.2	0.179
	1.0	0.70	24.6	19.2	0.521
	0.0	0.70	16.4	18.6	-
人工海 水	0.7	0.70	8.8	5.3	0.288
	0.8	0.70	10.1	5.9	0.337
	1.0	0.70	12.6	6.2	0.500

コントロールのときには蒸留水および人工海水とも吸着を示さないが、EPS の量の増加とともに吸着量は増加する。さらに人工海水のほうが吸着量が高いので、海水中的のカチオンが影響することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 有明海底泥への細胞外ポリマー吸着によるレオロジー特性変化
原田浩幸, 三村泰介, 横山勝英, 川喜田英孝, 大渡啓介, 天野佳正
 環境技術 Vol. 41(2012) No. 3, p. 153 ~p. 156

- ② 有明海底泥および筑後川底泥中の全糖量とその底泥安定化に及ぼす影響

原田 浩幸, 横山 勝英, 天野 佳正, 吉野 健児, 川喜田 英孝

土木学会論文集 B2(海岸工学)

Vol. 66 (2010) No. 1, p. 1226~p. 1230

発行日: 2010年11月09日

- ③ 有明海底泥から抽出した付着藻類起因多糖含有溶液の特性に関する研究 323-327

原田 浩幸, 天野 佳正, 志岐 昌彦, 吉野 健児, 山本 浩一, 横山 勝英, 川喜田 英孝, 大渡 啓介

化学工学論文集 Vol. 36 (2010) No. 3,

p. 323~p. 327

発行日: 2010年07月20日

- ④ 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 1001-1005

天野 佳正, 原田 浩幸, 大石 明広, 川喜田 英孝, 大渡 啓介

土木学会論文集 B2(海岸工学)

Vol. 65 (2009) No. 1, p. 1001~p. 1005

発行日: 2010年03月05日

[学会発表] (計 1 件)

有明海干潟底泥の細胞外様高分子の吸着挙動と物理的影響 p. 237

原田浩幸

第 46 回水環境学会年会講演集

2012年03月15日(東洋大学;東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 浩幸 (HARADA HIROYUKI)

県立広島大学・生命環境学部・教授

研究者番号: 20222234