

—平成20・21年度 持続的養殖を可能にする環境モニタリングシステムの構築—
 養殖場水域底泥の有機物負荷に対する環境容量(自浄能力)を決定する細胞外酵素活性への環境の溶存酸素と硫化物量の影響

江口 充¹, 村田 修², 宮下 盛², 家戸敬太郎², 中川至純²

(環境グループ・種苗量産グループ・養成グループ)

¹近畿大学大学院農学研究科・²近畿大学・水産研究所

eguchi@nara.kindai.ac.jp

持続的養殖生産確保法により規制されるまでもなく、天然環境に配慮した持続性の高いイクス養殖技術を確立ことは、養殖に携わる人間にとって、いまや至上の命題の一つとなっている。様々な要因が複雑に影響する天然環境の問題解決には、養殖にかかわる様々な分野の人間がかかわる必要がある。本研究課題では、環境容量(自浄能力)をキーワードに、グループ横断的に養魚場水域の環境容量の評価を行った。

近畿大学水産研究所がある和歌山県田辺湾は、黒潮の影響から湾口部の水質は良好だが、湾奥の支湾では、河川や養殖業、生活排水の負荷によって水質が悪化し、貧酸素水塊の発生や赤潮の頻発によって湾内における漁業への被害が度々起きている。海の浄化能力(環境容量)を超えた養殖漁業は、漁場環境を悪化させる。安心・安全な養殖生産を持続的に行うには、環境を悪化させないレベルに養殖漁業の規模を保つこと、水域の自浄能力を把握することが大切である。

2005年、近畿大学水産研究所が管理する養殖イクス周辺の環境を調査した結果、成層が発達し底層に酸素の供給が抑制され、溶存酸素濃度が低い8月と比べ、鉛直混合によって底層まで酸素が十分に供給される12月の方が、底泥堆積物に

おける分解・無機化能力が一様に活性化されるといふ仮説が生まれた(Fig. 1)。これは現場の状況証拠であり、検証を必要とする。そこで、溶存酸素濃度が本当に細菌の細胞外酵素活性に影響を与えているのかを検証するために、現場の底泥堆積物と海水を使用し室内実験を行い、それらに与える負荷や環境を人為的に制御することにより、再現性を確認した。

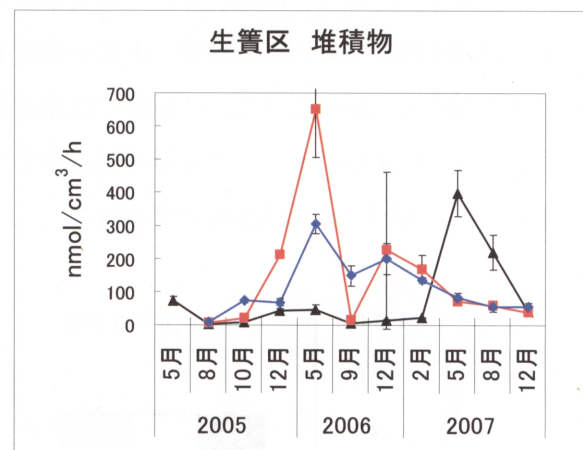


Fig. 1 2005～2007年の調査による養殖場水域(和歌山県白浜町地先)の自浄作用(環境容量)の指標となる底泥の酵素活性の季節変化(●, β-グルコシダーゼ; ◆, アミノペプチダーゼ; ▲, キモトリプシン)

材料と方法

試料の採集 2008年11月4日、和歌山県田辺湾の湾奥部にある近畿大学水産研究所が管理する魚類養殖生簀架橋の先端の水域で底泥堆積物をK-K式柱状採泥器を用いて採集した。海水は、陸上養殖に使用するために、現場海水をろ過したものを採集した。底泥堆積物と海水は研究室に持ち帰った後、速やかに暗所・4℃で保管した。底泥堆積物は、室内実験に使用する前に、底泥内の物質・微生物を均等にするために、底泥をよく混合した。底泥堆積物の体積は、あらかじめ水を入れておいたメスシリンダーに湿泥を量りとり、湿泥の重量と水の容積から堆積物の体積を算出した。

室内実験の条件 200 ml ビーカーに、2-1 で採取した海水と底泥堆積物を約 2:1 となるように入れ、アルミホイルで蓋をし、20℃・暗所で培養した。酸素条件による有機物分解の違いをみるために、好気条件と嫌気条件の試験区を用意した。好気条件は、一日一回海水の半分をエアレーションした新しい海水(平均溶存酸素濃度:8.8 mgO₂/L)と交換した。嫌気条件は、水面を樹脂製ラップで覆い、空気中からの酸素の供給を一切遮断した。

負荷される有機物によって、分解の違いが表れるのかどうかみるために、植物プランクトンと、人工飼料、の有機物負荷区を用意した。コントロールには何も添加しない底泥を用いた。植物プランクトンを負荷した試験区では、遮光して弱らせておいた植物プランクトンの *Nannochloropsis* を底泥堆積物直上に添加した。添加後も *Nannochloropsis* に光合成活性を阻害するために、光が完全に遮断されるようにビーカー全体をアルミホイルで覆つ

た。人工飼料を負荷した試験区では、実際に近畿大学水産研究所で使用されている人工試料、「マダイ EP スーパー4号」(日清丸紅飼料株式会社)、4粒を砕いて底泥堆積物上に均等に添加した。これら試験区に嫌気条件と好気条件があるので、試験区は合計6種類である。各試験区は、それぞれ3本立てで行った。好気条件の海水交換は夕方に行い、次の日の午前中にサンプリングを行った。サンプリングはDay-0からDay-7まで毎日行った。溶存酸素は海水を、溶存酸素以外は全て底泥堆積物を分析した。

細胞外酵素活性 底泥堆積物における細胞外酵素活性の測定はDay-0からDay-7まで毎日行った。

細胞外酵素活性の測定には、96ウェルマイクロプレート(optiplate-96well, PerkinElmer)にオートクレーブした濾過滅菌3%NaCl溶液(以下、滅菌人工海水)190μLをあらかじめ添加しておき、量り取った底泥0.1g(湿重量)を懸濁させた。使用した基質は、ペプチターゼ活性用の

L-Leucine-methylcoumarin(Sigma)、β-グルコシターゼ活性用の

methylumbelliferyl-β-D-glucoside(Sigma)、キモトリプシン活性用の

Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-methylcoumarin(ペプチド研究所)、またアルカリフォスファターゼ活性用の4-Methylumbelliferyl phosphate Liquid Substrate System(Sigma)を用い、ペプチダーゼおよびβ-グルコシターゼ用の基質はメチルセロソルブ(和光純薬、特級)、またキモトリプシン用の気質はジメチルスルホキシド(和光純薬、特級)で溶解させた。これら基質を、底泥を懸濁させておいたマイクロプレートに終濃度が250μMとなるように添加した。このマイクロプレートを培養開始から30分毎に2時

間、蛍光マイクロプレートリーダー(Wallac 1420 ARVOsx, PerkinElmer)内で培養し、細菌の細胞外酵素の加水分解によって生じた分解産物である蛍光基質の吸光度を測定した。滅菌人工海水を同様の手順で測定したものをブランクとした。標準物質として、蛍光色素の 4-methylumbelliferone(Sigma)と 7-Amino-4-methylcoumarin(Sigma)をメチルセロソルブで溶解した標準溶液を終濃度 0.1、1、5、10、および 50 μM となるように調製し、蛍光量の変化から分解された基質の濃度を求めるための検量線を作成した。測定時間における蛍光濃度から、単位体積の 1 時間あたりの細胞外酵素活性 ($\text{nmol}/\text{cm}^3/\text{h}$)を算出した。

なお、アルカリフォスファターゼは今回の室内実験から新たに加えられた酵素であり、今までの現場調査には使用されていない。

硫化物量 硫化物の測定は、Day-0 コントロールと、Day-7 の全ての条件で測定した。

底泥堆積物試料における酸揮発性硫化物量(以下、硫化物量)を検知管法により市販の簡易型硫化物測定器(ヘドロテック-S、ガステック)を用いて測定した。

総細菌数 総細菌数は、Day-0、1、2、3、7 のコントロールと人工飼料のサンプルを計数した。

サンプリングした底泥堆積物 0.1 g(湿泥)を量りとり、滅菌人工海水で 10 倍希釈した 20 %ホルマリン PBS 溶液 1 ml に添加し、4 $^{\circ}\text{C}$ ・暗所で固定した。

細菌計数は、直接検鏡法により計数した。固定させた底泥堆積物を 0.1 g 量りとり、滅菌人工海水 10 ml に懸濁させ、界面活性剤である、ディスクフィルター(孔径 0.22 μm 、ADVANTEC 社)で濾過

除菌したトリトンXを終濃度が 0.1 %となるように添加した。超音波発生器(トミー工業)で出力 3 (13.7 W)で 7 分間処理をし、底泥堆積物に付着した細菌を剥離させた。超音波処理後、細菌と底泥に分離させるために試料を 2800 \times g で 30 秒間遠心分離をし、上清 1 ml をオートクレーブ滅菌した樹脂製容器に移し、ディスクフィルター(孔径 0.22 μm 、ADVANTEC 社)で濾過除菌した蛍光染色剤 4'6-diamino-2-phenylindole(DAPI)溶液を終濃度が 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように加え、さらに DAPI 以外の蛍光を抑えるために濾過除菌したアクリジンオレンジを終濃度が 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した。その後、2 時間・暗所・4 $^{\circ}\text{C}$ で染色した。染色した試料を、0.3~0.5 mL 量りとり、ヌクレオポアフィルター(孔径 0.2 μm 、Nucleopore 社)により濾過しフィルター上に細菌を集め、スライドガラスに移し、無蛍光グリセリンをフィルターに滴下し、カバーガラスで封入した。このスライドを落射型蛍光顕微鏡(OLYMPUS)で観察し、20 視野以上、300 細胞以上計数し、単位体積当たりの総細菌数を算出した。

溶存酸素 (DO) DO の測定は、好気条件の交換水、Day-0 コントロールと、Day-7 の全ての条件で測定した。

100 mL ビーカーに試料水を適量取り、マグネティックスターラーで試料水を攪拌しながら、DO メーター(OM-51 型 HORIBA)で DO 濃度を測定した。

結果

細胞外酵素活性において、コントロール、植物プランクトンの試験区は、好気条件と嫌気条件で

差が見られなかった。

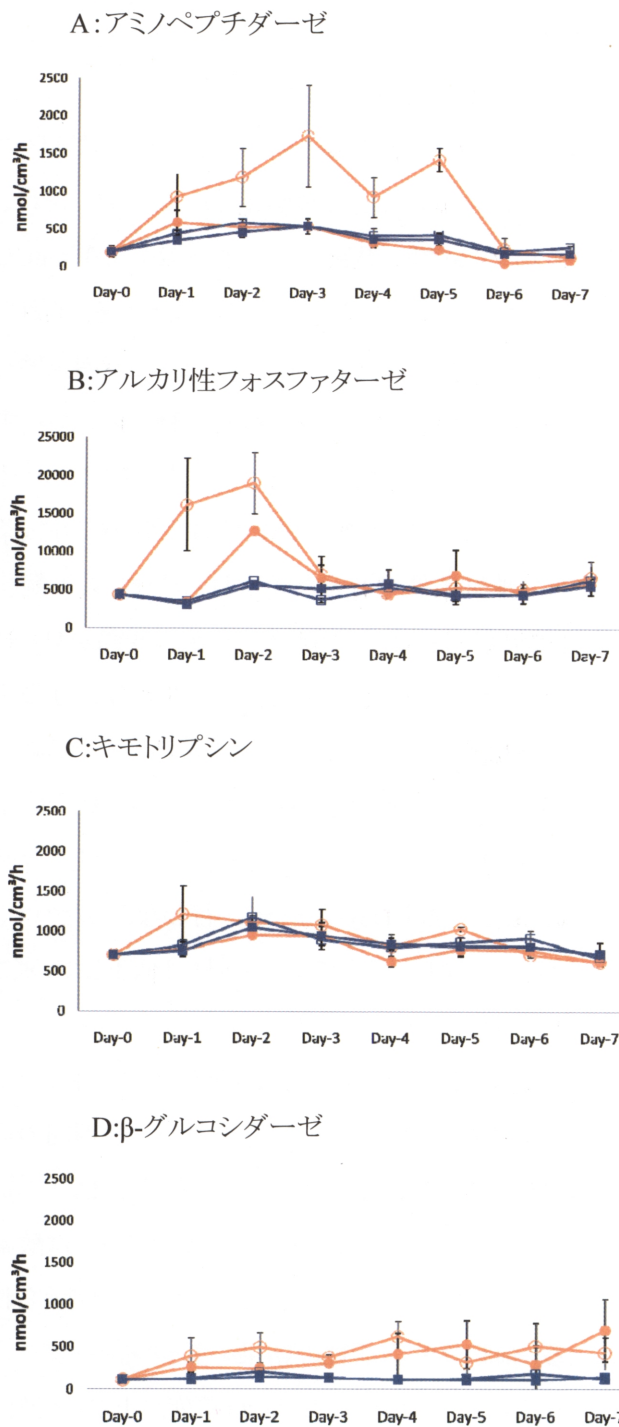


Fig. 2 酵素活性の経時変化。○と●, 人工飼料区; □と■, コントロール区, ○と□, 好気条件; ●と■, 嫌気条件。

それに対して、人工飼料を添加した試験区では、好気条件・嫌気条件で差が見られた (Fig. 2)。人工飼料試験区のペプチダーゼとフォスファターゼ活性は、嫌気条件に比べて好気条件が有意に高い値を示し、ペプチダーゼにおいて最大約 3.2 倍、フォスファターゼにおいて約 1.9 倍の活性値を示した (Fig. 2A と B)。ペプチダーゼ活性は全ての測定日において好気条件が嫌気条件より高い値を示した。好気条件は Day-0 から Day-3 まで活性が 197.9 nmol/cm³/h から 1753.1 nmol/cm³/h まで上昇し、ピークを示した後、Day-6、Day-7 にかけて 142.6 nmol/cm³/h まで急激に活性は低下した。嫌気条件は Day-1 においてピークで 593.0 nmol/cm³/h を示した後、ゆるやかに活性は低下した。フォスファターゼ活性は Day-0 から Day-2 まで好気条件は 4401.9 nmol/cm³/h から 19092.7 nmol/cm³/h、嫌気条件は 4401.9 nmol/cm³/h から 12809.0 nmol/cm³/h と、共に活性は上昇し Day-2 でピークを示した後、急激に活性が低下した。キモトリプシンとグルコシダーゼ活性は、嫌気条件と好気条件で有意な差は見られなかった (Fig. 2C と D)。

硫化物量は Fig. 3 が示すように、Day-7 コントロール、植物プランクトン、人工飼料試験区の順に上昇した。どの条件においても嫌気条件が好気条件よりも高い値を示した。それぞれの試験区で、嫌気条件は好気条件の、コントロール試験区では約 1.2 倍、植物プランクトン試験区では約 1.1 倍、人工飼料試験区では約 1.3 倍であった。

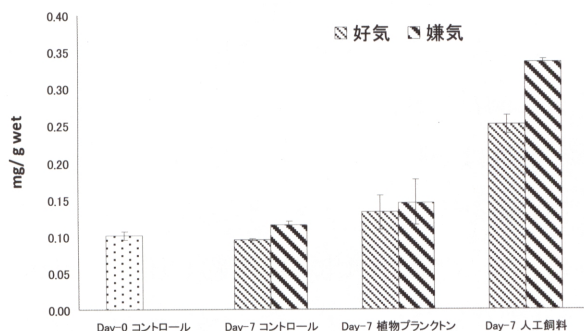


Fig. 3 室内実験における泥中の硫化物量

総細菌数には大きな変動は見られなかった。

DO は Fig. 4 が示すように、どの試験区においても嫌気条件が好気条件よりも低い値を示した。特に、人工飼料試験区は好気条件では 1.1 mgO₂/L、嫌気条件では 0.6 mgO₂/L と、他の試験区より著しく低く、両条件とも Day-7 コントロール試験区の好気条件 6.4 mgO₂/L、嫌気条件 3.4 mgO₂/L の約 1/6 という結果であった。

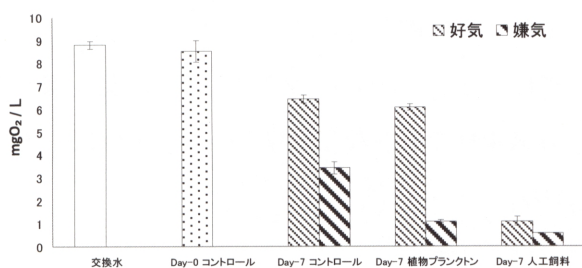


Fig. 4 室内実験における海水中の溶存酸素

考察

底泥 1 g に与えられる有機物の負荷は有機炭素量にすると、養殖場水域では通常は 20~30 mgC/g である(2)。今回の室内実験における底泥 1 g に与えた有機炭素負荷は、植物プランクトンを添加した試験区で、約 0.3 mg、人工飼料を添加した試験区で、約 50~60 mgC/g であった。植物プランクトン試験区としての負荷量はやや少ない可

能性があるが、人工飼料試験区の負荷量は、実際にイケス養殖水域で起こり得る範囲と言える。

硫化物量と DO の結果により、有機物負荷が大きい方が酸素は大量に消費され、硫化物が多く産生されることがわかった(Fig. 3 と 4)。

コントロール試験区と植物プランクトン試験区の酵素活性値に大きな差が見られなかったことは、植物プランクトン試験区の炭素負荷が 0.3 mgC/g と予想外に低かった事が原因であると考えられる。さらに植物プランクトンを多く添加した室内実験を行い、植物プランクトンの分解活性を明らかにする必要がある。また、コントロールと植物プランクトン試験区では、細胞外酵素活性において好気条件と嫌気条件で有意な差が見られず、人工飼料試験区で見られたような大きな値の変動が見られなかったことから、有機物負荷が少なければ細菌は有機物分解の為に大量の酸素消費をする必要がないので、DO 濃度は酵素活性の主要な限定要因とはならないことが推測される。ただし、今回の室内実験は Day-7 までしか行わなかったため、さらに実験日数を増やせば活性は低下していくことが考えられる(Fig. 2)。

人工飼料試験区の細胞外酵素活性において、ペプチダーゼとフォスファターゼの実験期間の後半になると、活性が低くなっている(Fig. 2A と B)。これは、硫化物の発生により、海水交換では酸素の供給が追い付かなかったためであると考えられる。細胞外酵素活性の結果をまとめるとペプチダーゼとフォスファターゼは DO 濃度が上がると敏感に反応し、酵素活性上がった。それに対して、キモトリプシンとグルコシダーゼは DO 濃度に影響されず、活性は変化しなかった。この結果は Fig. 5 が示すように、酸素供給が多い 12 月にペプチダーゼ活性が高くなり、キモトリプシン、グルコシダ

ーゼ活性はペプチダーゼと比較すると、高くないという結果と一致する(3)。これまでは、酸素が供給されると、底泥堆積物における分解・無機化が一様に活性化されるといわれてきた。今回の室内実験によって酸素に影響されやすい酵素と、されにくい酵素があることが明らかとなった。

今後の課題は、なぜ好気的環境で活性が高くなる酵素と、好気的環境でも嫌気的環境でも活性に大きな差がない酵素があるのかを解明することである。酵素の産生量の制限要因は大きく二つのタイプに分けられる。一つ目は水温、DO 濃度、硫化物量、pH、有機物負荷量、そして負荷された有機物の種類などの環境要因である。これらが単独で影響している場合と、複合的に作用して影響している場合が考えられる。細菌が酵素を産生するきっかけとなる様々な刺激が考えられ、酵素活性をコントロールする様々な要因を解明していく必要がある。二つ目は、酵素を産生している細菌自体の性質である。細菌にとって最適な環境に置かれた場合、最大限の努力をして酵素を産生し、有機物を取り込もうとする貪欲な細菌と、常に一定量の酵素しか産生しない、マイペースな細菌が存在するのかもしれない。或いは、細菌によって酵素産生の最大量が大きなものと小さなものがあるのかもしれない。

前者に対しては、様々な環境条件を想定した室内実験を行い、酵素活性をコントロールする環境要因を解明し、どの環境では活性が上昇し、減少するのかを明らかにする。後者に対しては、室内実験によって環境が変化した前後の細菌群集構造の変化を見ることである。例えば、好気的環境と嫌気的環境で細菌数が増加する細菌群の種類が異なるかもしれない。ただし、細菌数が増加したからというわけでその種類の細菌群が特定の

酵素を産生していると言い切ることはできない。他の水域における同様の研究を調べ、新たな実験を検討する必要がある。

また、赤潮プランクトンの中には無機態リン濃度が低下すると、アルカリフォスファターゼを産生し、有機態リンをリン源として利用する種があることが報告されている。このことから、赤潮プランクトンがアルカリフォスファターゼを産生し、有機態リンを増殖に利用している可能性は高いということが明らかとなっている。田辺湾におけるアルカリフォスファターゼと植物プランクトン、赤潮発生との関係を見ていけば、赤潮の予測が出来るかもしれない。

酵素活性をコントロールする環境要因と、細菌群集構造の解明をすることが、好気的環境で活性が高くなる酵素と、好気的環境でも嫌気的環境でも活性に大きな差がない酵素があるのかを明らかにする第一歩となるだろう。

浅海域を中心に行われる魚類養殖の場合、持続性の高いイケス養殖を実施するためには、海底泥の有機物分解能力(有機物に対する自浄能力或いは環境容量)を正確に把握することが重要になる。ただ、有機物の分解能力といっても、タンパク質の分解活性、脂質の分解活性、炭水化物の分解活性のそれぞれを担う酵素群が異なる。本研究では、溶存酸素や硫化物量といった環境要因が有機物の質的变化に応じて、変化することを確認した。これは、底泥の自浄能力を担う海洋細菌群が、自浄対象とする有機物の種類に応じて、それぞれ役割分担していることを示す。持続的に天然水域を利用するためには、この環境の変化に応じて様々に変化する自浄能力(環境容量)を把握することが極めて重要になる。海底泥の全有機炭素量などの環境因子の解析は、現在も継続し

で行っている。

参考文献

- 1) Bacterial biovolume and biomass estimation
Gunnar Batbak. Appl. Environ. Microbiol.
49:1488~1493(1985)
- 2)「浅海養殖と自家汚染」社会法人 日本水産学
会 編集(1977)
- 3) G.Caruso, L.Genovese, M.Mancuso and
A.Modica. Effects of farming on microbial
enzyme activities and densities: comparison
between three Mediterranean sites. Lett. Appl.
Microbiol. 37: 324-328(2003)
- 5) Haruo Yamaguchi, Toshitaka Nishijima, Ayako
Oda, Kimio Fukami and Masao Adachi.
Distribution and variation of alkaline
phosphatase activity and
phosphatase-hydrolyzable phosphorus in
coastal seawaters. Nippon Suisan Gakkai.
70(3): 333-342(2004)