

海底泥の硫酸還元活性に関する一実験

浅川 末三

(広島大学水畜産学部水産学科)

An Experiment on the Sulfate Reducing Activity of Sea Bottom Mud

Suezo ASAKAWA

*Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Animal Husbandry,
Hiroshima University, Fukuyama*

(Fig. 1; Tables 1-3)

浅海養殖業における漁場の老化は、その産業に対する打撃の一つである。漁場の老化とは、底質が硬化し還元層が発達して水産生物の増養殖場に不適になることを古くより指している。一たん漁場が老化すると、そこでの養殖事業は成績が低下し、他に漁場を移すか廃業せねばならない事態が生じる。

瀬戸内海では近年海水の汚濁、汚染などによる漁場の悪質化により、海苔類、貝類、エビ類あるいは魚類の養殖業は甚大な悪影響を受けているが、一方漁場の老化による影響も既に処々で徐々にではあるが現われている。白石¹⁾も浅海漁場の老化による使用不適も時間の問題と述べている。

漁場の老化防止は内海の増養殖にとって重要な研究課題であり、前川(主任研究者)らは、昭和42・43・44年度にわたり農林水産特別試験研究費補助金を得て「還元層発生による増養殖漁場の老化防止に関する研究」を行なった。この内「増養殖場底質の還元層発生と細菌との相関について」筆者ら²⁾は分担し調査研究を行なった。その結果、硫酸還元菌群は季節で多少の相違はあるが漁場の中央部、周辺部次に漁場近くの場外の順に少なく分布していた。又泥層別には表層部には分布していないが、浅層部により多く分布していた。これらの菌分布状態と硫化物量との関係を見ると、両者間には有意の相関が認め難かった。

自然界における無機硫化物の生成には(1)有機硫黄化合物の分解、(2)硫酸塩の還元、(3)コロイド硫黄の還元の3経路が知られている。(1)の経路は海洋においては、例外はある³⁾としても甚だ小さいと信じられている。(3)は(2)の特殊な細菌による場合である。既に、海洋における硫化物の生成経路は多くが(2)であるといわれている⁴⁾。硫酸塩還元経路の主役である硫酸還元細菌については、純細菌学的立場あるいは金属腐食、稲の秋落現象などの応用的立場より多くの研究がなされている。海水域におけるこの細菌の分布と活性につき木保ら⁵⁾は、広島湾底泥にて硫酸還元菌数と硫化物量とは明瞭な相関関係が存在したと報告している。又、内田ら⁶⁾畑⁷⁾は有機物の培地濃度が高いほどこの菌の活性は著しく促進されると述べている。しかし、養殖場のように泥中の物質組成が多様の上にコロイド的不均一系であり、共存生物群は多相的で又粒度組成も短距離間で相違している環境下における、ある限定された微生物の活性を現場的に把握することは方法論的に甚だ困難である。たまたま、古坂⁸⁾によりワールブルグ検圧計を使用しての水田土壌における硫酸還元菌群の化学的活性を定量する方法が報告された。海底泥における場合を検討した所、海中に常在する硫酸根を除去するならば、古坂の方法が海泥にも応用できることを知ったので、瀬戸内海の1養殖場の海泥につき表題の実験を行なった。ここにその概要を報告する。

実験の部

1. 硫酸還元活性の定義

海底泥の懸濁液をワールブルグ検圧計容器内に入れ、水素気相中で振盪をすると水素の吸収が起きる。これは泥の水素吸収能 (Hydrogenase activity, 以下HAと略す) で、泥中微生物のヒドロゲナーゼ作用の総和とした。このとき容器内に硫酸塩などの基質を添加するとHAの増大が認められる。この増大分を海底泥の硫酸還元能 (Sulfate reducing activity, 以下SRAと略す) とし、硫酸還元活性を示すものとした。

2. 硫酸根除去の予備実験

硫酸還元菌群の呼吸基質 (水素受容体) としては硫酸塩、亜硫酸塩、チオ硫酸塩、テトラチオン酸塩あるいはメタ重亜硫酸塩などが知られている。海中で特に問題となるのは多量に存在する硫酸塩である。例えば、総塩分34.325%の海水 1 l 中には硫酸根2.713 g を含んでいる⁹⁾。従って、海泥中にも多く存在するであろう硫酸塩を除去しておかなければ、上記の定義による活性は測定できない。

後記養殖場の海泥を用い、3,500 rpm 5分間遠心分離して脱水し、遠沈管内で残泥に約10倍容の無酸素3%食塩水を加え、軽く攪拌してから同様10分間遠心分離することを数回続けた。毎回の上澄液中の硫酸根量を比濁分析法¹⁰⁾で測定した。上澄液中の硫酸根が泥中に存在したものとみなして、2回の実験の平均値が洗滌1回では0.355 mg/g、洗滌2回では0.062 mg/g、洗滌3回では本法での測定限界外の極微量であった。即ち、脱水した海泥を約10倍容の水で3回洗滌することによって泥中の硫酸根は殆んど除去できることを知った。

3. 活性測定方法の概要

木俣ら¹¹⁾考案のコアサンプリャーで採取した海泥柱の所要部分を、空気との接触をできる限りさけながら (以下の諸操作も全て可及的に嫌氣的に取扱う) 遠沈管に分取して脱水後、無酸素3%食塩水にて3回洗滌する。洗滌泥を2倍容の上記食塩水に懸濁してワールブルグ容器主室に3.0 ml 分注する。副室にアリカリ性ピロガロール溶液0.3 ml、側室にM/10 亜硫酸ソーダ溶液0.2 ml (但し、対照区には上記食塩水) を注入する。常法¹²⁾に従ってマノメーター及び容器内を水素ガスで置換する。30°C 水槽中で振盪し水素ガスを吸収させる。1時間後に側室液を主室へ添加する。以降10分毎にマノメーターを読み取り乾泥1 gの1時間における水素吸収量を求める。ここに側室の亜硫酸ソーダは硫酸塩よりも水素の受容速度が速いので実験の便宜上これを用いた。測定結果の1例を Fig. 1 に示す。

Fig. 1 では対照の食塩水添加後の水素吸収量が、(200-100) $\mu\text{l/g/hr}$ = 100 $\mu\text{l/g/hr}$ なので、この様なHA値を100と表示することにした。又、硫酸還元菌群による、即ち亜硫酸ソーダ添加区の対照区よりも増加した水素吸収量が、(240-200) $\mu\text{l/g/hr}$ = 40 $\mu\text{l/g/hr}$ なので、この様なSRA値を40と表示することにした。

4. 測定地点と測定時期

測定地点は岡山県笠岡市沖にある高島養殖場の入口付近 (St. A)、養殖場の中央部 (St. B) 及び養殖場内の周辺部 (St. C) の3定点とした。各定点の海泥0~2 cm 層 (以下1 cm 層という) と9~11 cm 層 (以下10 cm 層という) とを分取して供試海泥とした。

測定時期は夏季として昭和44年8月26日 (満潮時)、秋季として同年11月4日 (干潮前2時間) 及び冬季として翌年1月13日 (干潮後2時間) であった。春季は都合により実測しなかった。なお、高島養殖場は昭和44年春より養殖事業 (ハマチが主であった) を中止したため、海底面への投餌残渣などの新しい堆積物はいずれも全く見られなかった。

5. 測定結果

各地点における季節別HA値を Table 1 に示す。

Table 1 に見るように、各地点ともHAは夏季に弱く秋季に強かった。弱い夏季は各地点とも10 cm 層の方が1 cm 層よりもより強いが、秋季になると有機物の多く堆積している養殖場内は逆に1 cm 層の方が強くなった。

各地点における季節別SRA値を Table 2 に示す。

Table 2 で特徴的な点は、1 cm 層は各地点ともSRAが認められないこと、冬季は10 cm 層でも認められないことである。10 cm 層でSRAが認められた夏季は、St. B の例外はあるが、秋季よりも活性が弱かったことである。

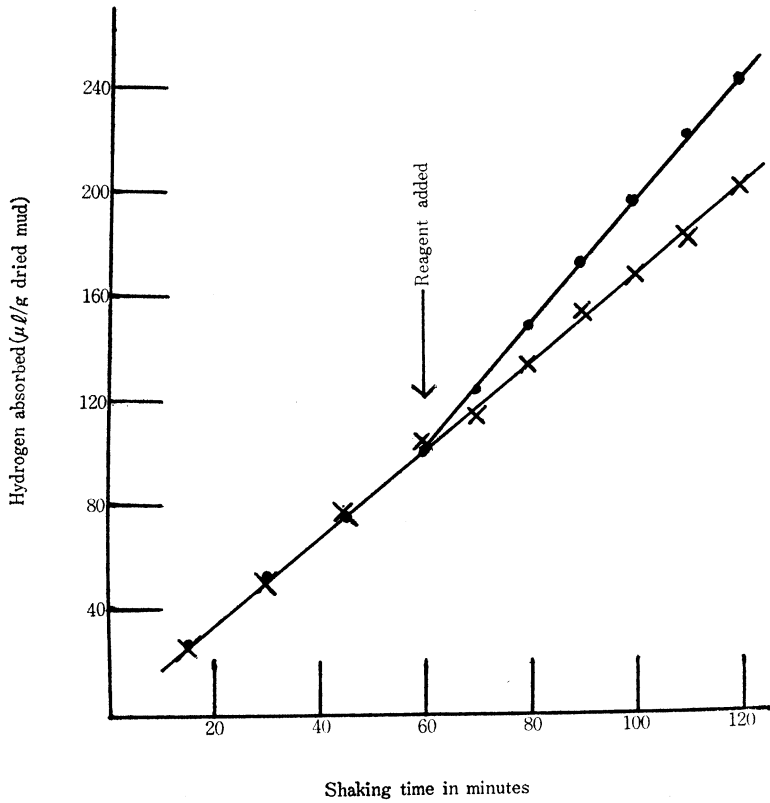


Fig. 1. Hydrogen absorption curve of sea bottom mud by the Warburg's manometric method.

- Sodium sulfite solution addition.
- ×—× Sodium chloride solution addition.

Table 1. Seasonal hydrogenase activity measured at each station. (HA value)

St.	Mud depth (cm)	Summer	Autumn	Winter
A	1	35	152	84
	10	75	192	100
B	1	39	151	107
	10	48	118	58
C	1	35	165	130
	10	49	112	76

Table 2. Seasonal sulfate reducing activity measured at each station.
(SRA value)

St. Mud depth (cm)		Summer	Autumn	Winter
A	1	0	0	0
	10	45	60	0
B	1	0	0	0
	10	44	30	0
C	1	0	0	0
	10	40	72	0

論 議

はじめにも記したように、多相系である養殖場のある一つの現象を取り出していかに精密に解析しても、場の全体像を正しく把握することは不可能に近いと思われる。例えば、硫酸還元菌数と硫化物量との関係を調べる場合にも、時と所によって両者間の相関が相違する現象が出ることはあり得ることと考える。しかし、ある時点において人工を加えてある状態を極度に働かしたならば、そこに現われる現象は仮定のものといえ一つの法則性を示すものと考えすることはできよう。

古坂の考案によるワールブルグ検圧計を用いての硫酸還元菌群の活性測定法は、彼も述べるように菌類の増殖の殆んど生じない短時間内に他菌類共存のままに極限を測定できるので、相対的に活性を把握できる良法の一つである。しかし、実施した操作上に問題点がある。その一つは、硫酸還元菌群は偏性嫌気性菌を含み、これは一度好气的条件下におかれるとその活性を著しく低下する特性を有するので、前記のように全ての操作を可及的に嫌气的に行なっても絶対的な嫌气的条件下で行なったのではないので、得られた数値は自然状態のものを正確に示したとはい切れないことである。もう一つは、海泥の洗滌である。即ち、洗滌によって泥中の微生物の流失が生じないか。土壌粒子中の硫酸還元菌群は、石坂の報告⁸⁾によれば粒子に付着した状態で存在するので、洗滌により粒子の流失がないならば菌の流失も殆んどないと考えられる。しかし、間隙水中に浮遊している菌がもし存在するならば、その菌の流失は当然生じる。従って、粒子並びに浮遊菌の流失の有無の検討がなされていないことである。しかし、石坂⁸⁾は水田土壌を用いて洗滌によるHA、SRAの変化を調べた結果、HAは洗滌1回で4.2%、4回で22%の低下を認めたが、SRAの低下は全く認めなかった。このことは、SRAは対照区と試験区のHAの差として示されるものであるから、多少の流失があっても得られる数値には大なる影響が及ばないと解した。従って、Table 1のHAの数値は非洗滌のものより15~16%は低値に出ている可能性がある。しかし、測定操作を一定にしているので相対的比較はできるであろう。

HAを有する微生物は、その種類も多くその上水素受容体が何であるかも明確には未だ判明していない。又、Table 1の数値は、Table 2の数値を求めるためのものであるからここでは論議しないことにする。

さて、SRAを示したTable 2を見ると、いずれの地点とも表層には活性が認められなかった。このことは、硫酸還元菌群の殆んどが偏性嫌気性菌に属するもので、酸化層である表層には分布しないか、存在しても不活性化しているためであろう。一方、同時に定量をした硫化物量は、Table 3に示されるように各地点とも表層部に相当量が認められた。これは恐らく深層部で生成された硫化水素が浮上し表層部に捕捉蓄積された結果であろう。佐藤ら¹³⁾によると水底における硫化水素の捕捉量は、微生物による非分解性有機物(有機膠質物)の多少に左右され多い場合の例としてT-Cが約14%、T-Nが約1%の数字が記載されている。本実験の供試泥では表層部がSt. AでT-C約11%、T-N約1.5%、St. BでT-C約14%、T-N約

Table 3. Seasonal sulfide content measured at each station.
(sulfide-S mg/g dried mud)

St.	Mud depth (cm)	Summer	Autumn	Winter
A	1	0.36	0.35	0.31
	10	0.17	0.17	0.19
B	1	0.56	0.45	0.50
	10	0.27	0.30	0.34
C	1	0.49	0.47	0.59
	10	0.18	0.11	0.15

Sulfide-S was determined by the Tomiyama's method.

1.5%および St. C で T-C 約13%, T-N 約1.5%であったので, 硫化水素が不溶性硫化物としてこれ以上には捕捉され難い状態にあったものと推察される. なお, 養殖場の内外で硫化物量に多少の相違が見られ, 場内の方が場外よりもやや多量の点については, 浮上硫化水素の不溶性硫化物に, はじめに記述した(1)の有機硫黄化合物の直接分解によるものが加算されたためではないかと思われる.

深層部の活性を Table 2 で見ると, 3地点とも冬季には活性が認められない. 木俣ら¹⁴⁾は海泥より純粋分離した硫酸還元菌の硫化物生成活性を調べ35°Cが最高で, 15.5°C以下では不活性であったことを報告している. 本実験の冬季の海泥温は10°C以下であったので, 低温による菌の不活性化が示されたものと考えられる. Table 3 の冬季に硫化物が定量されたことは, 不溶性硫化物の既に蓄積されたものであろう. 夏季は3地点とも殆んど同様な活性を示し, St. B を除くと秋季には更に活性が強くなった.

夏季よりも秋季に活性が強い傾向については, 泥温が夏季に26°C前後, 秋季に17~18°Cであったので温度による活性の影響とは考えられない. Table 1 を見るとHAも秋季に高いことより夏季の方が水素供与体を生成する微生物群の活性が秋に強く, 従って硫酸還元菌群の活性も強くなったのかも判らない. なお, St. B の例外も測定の誤差によるものか, 他の理由によるものか理解に苦しむ点である. このような結果を以て直ちに測定方法が無意味とはいえないが, 更に検討すべき問題を含んでいるように思われる.

いずれにしても, 海泥中の硫酸還元菌群の活性は表層部には見られず, 10cm ほどの深層部になると明らかに認められ, その活性は高温の夏季よりも中温の秋季に強くなる傾向があり, 低温の冬季にはまったく見られなかった. 又, この活性の強弱と存在する硫化物量とは相関がない. 従って, 硫酸還元菌群数と硫化物量との相関関係も直接的には認められないことが理解できるであろう.

摘 要

古坂が水田土壤中の硫酸還元菌群の活性度をワールブルグ検圧計を用いて測定する方法を考案した. それを養殖場の海泥に応用した. 即ち,

1. 海泥中に常在する呼吸基質を洗滌除去する前処理を加えるならば, 古坂の法が応用できることを知った.
2. 養殖場内外の海泥につき夏, 秋および冬季について測定した結果, 硫酸還元菌群の活性は2cm ぐらいいまでの表層部には全く認められず, 10cm ほどの深層部では夏季よりも秋季に強い傾向があり, 冬季は全く認められなかった.
3. 硫酸還元菌群の活性の強弱と硫化物量とは必ずしも相関しないことを論じた.

謝 辞

文献を贈与下さった東北大学農学研究所古坂澄石教授に深謝すると共に、採泥に測定に多大の協力を得た当水産化学教室の鹿山光助教授、井上晃男助手ならびに田中紀子嬢その他学生諸君に感謝の意を表す。

文 献

- 1) 白石良光：昭和46年度日水学会秋季大会講演要旨集，p. 71 (1971).
- 2) 浅川末三・田中紀子：“還元層発生による増養殖漁場の老化防止に関する研究”前川忠夫・井上裕雄編著，昭和42年度報告書，pp. 39-51 (1968).
- 3) 西島敏隆・河合 章：昭和43年5月日水学会中・四国例会講演 (1968).
- 4) 畑 幸彦：昭和43年度日水学会年会シンポ，“海洋微生物”講演要旨集，p. 13 (1968).
- 5) 木俣正夫・門田 元・畑 幸彦・田島卓明：日水誌，**21**，102-108 (1955).
- 6) 門田 元・三好英夫：京大食研報，**72**，9-29 (1964).
- 7) 畑 幸彦：水産大学校研報，**14**，37-83 (1965).
- 8) 古坂澄石：東北大農研報，**19**，101-184 (1968).
- 9) 小久保清治：水産学全集第11巻“海洋生物学”，p. 112，恒星社厚生閣，東京 (1962).
- 10) 三宅泰雄・北野 康：“水質化学分析法”，p. 134，地人書館，東京 (1963).
- 11) 木俣 正夫・河合 章・石田祐三郎：日水誌，**26**，1227-1230 (1960).
- 12) 吉川春寿・小倉安之・関根隆光・森田茂広・高橋 甫：化学の領域増刊13，“ワールブルグ検圧計”，p. 74，南江堂，東京 (1954).
- 13) 佐藤郁生・山根一郎：東北大農研彙，**11**，145-156 (1959).
- 14) 木俣正夫・門田 元・畑 幸彦・田島卓明：日水誌，**21**，109-112 (1955).

SUMMARY

A method of the Warburg's manometry was reported by C. FURUSAKA for the evaluation of the activity of a sulfate reducer in paddy field soil. It was found that this method could be applied for sea bottom mud, if the mud were washed thrice in advance with a non-oxygen 3% sodium chloride solution in order to remove the sulfate present in the sample.

According to his definition, the activity of hydrogen uptake was designated as a hydrogenase activity of mud (HA value in Table 1). In addition of a sulfite solution to the mud a significant increase in the rate of hydrogen uptake was further observed, the increment caused by the addition of the sulfite solution was designated as a sulfate reducing activity of mud (SRA value in Table 2), which is caused by the action of sulfate reducing bacteria in the mud.

The mud samples collected from a fish farm bottom in the Seto Inland Sea were determined by a modified method. Considering the results in Table 2, there was no activity (SRA) at the layer from 0 to 2 cm mud depth, but considerable activity at the 10 cm mud depth. Moreover, it was suggested that the activities varied seasonally, rather higher in autumn than in summer and null in winter.