

学 位 論 文 要 旨

氏 名 シーラ・ミィ・サラダ・サンタンダ

題 目 養殖による有機物汚染底泥とその改善過程における微生物群集の解析
(BACTERIAL COMMUNITY DYNAMICS IN ORGANICALLY POLLUTED AND
BIOSTIMULATED SEDIMENTS INFLUENCED BY AQUACULTURE)

本学位論文は、養殖漁場の残餌や養殖魚介類の排泄物が底泥環境に与える影響について、物理化学的に、また微生物学的に検討するとともに、酸素発生剤を用いた汚染底質の改善効果を検証したものである。

まず、カキ養殖が盛んな汽水湖である白石湖（三重県）の底泥を調査した結果、養殖に起因する有機物負荷によって、とくに湾奥で底質の貧酸素化が顕著であることを明らかにした。変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（DGGE）による微生物群集解析の結果、汚濁の進行により底泥中の細菌群集の遷移が見られ、とくに硫酸還元菌の増加が顕著であった。また、フィリピンのミルクフィッシュ養殖場底泥についても同様に検討を行い、養殖生け簀設置区が顕著な貧酸素・還元状態にあり、かつ硫化物濃度も高く、汚濁の進行が確認された。それに伴って、細菌群集組成も生け簀非設置区とは大きく異なっており、とくに生け簀設置区では硫酸還元菌に加え鉄還元細菌、硝酸還元細菌などの嫌気性還元細菌が検出された。

次に、白石湖や鹿児島県山川湾の底泥を用い、養殖用飼料の添加により有機物汚濁を再現したマイクロコスム実験において、酸素発生剤である過酸化マグネシウム MgO_2 の添加が底泥環境に与える効果を調べた。その結果、 MgO_2 の添加により酸化還元電位や硫化物濃度が飼料添加前の水準に回復するとともに、硫酸還元菌数の顕著な減少が認められた。一方、細菌群集組成の同一性について、DGGE バンドパターン of Sørensen Similarity Index を指標に比較したところ、 MgO_2 の添加による細菌群集の遷移が認められ、その群集組成は飼料投与前とは異なるものであった。このことから、有機物負荷により擾乱を受けた底泥では、酸素の供給による物理化学的環境の改善に伴って好気性細菌群が増加するものの、必ずしも擾乱前の細菌群集組成に回復しないことが示唆された。

以上の結果から、養殖魚介類の排泄物や残餌の沈降に起因する有機物負荷によって底質が嫌气的かつ還元的な状態になり、それに伴って細菌群集も硫酸還元菌に代表される嫌气的還元細菌が卓越すること、一方酸素発生剤により底質の物理化学的環境が改善し、好気性細菌群を中心とした細菌群集へと回復することが示された。

とくに、本学位論文は、海水の移入が顕著でかつ養殖による有機物負荷の影響が大きい汽水湖において、微生物群集も含めた底質の特徴付けを行った点、また、酸素発生剤による底質改善効果を物理化学的要因に加え細菌群集組成からも確認した点で新奇性が高く、有機物汚濁が進行した海洋環境での底生微生物の生態の解明に大きく寄与するものと思われる。

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	Sheila Mae Salarda Santander
題 目	BACTERIAL COMMUNITY DYNAMICS IN ORGANICALLY POLLUTED AND BIOSTIMULATED SEDIMENTS INFLUENCED BY AQUACULTURE (養殖による有機物汚染底泥とその改善過程における微生物群集の解析)
<p>This study investigated an influence of pollution caused by aquaculture farming and its remediation with an oxygen-releasing compound (ORC) on the dynamics of the bacterial community in the sediment by <i>in situ</i> sampling and microcosm experiments. First, brackish oyster farms and marine milkfish farms were chosen, and changes of the composition of the bacterial populations in the sediment were studied in the presence of fish feeds and aquacultured fish excreta. Then, sedimentation of the fish feeds was simulated in the microcosm experiment to investigate the effect of fish feeds on the microbial community. Finally, a biostimulation experiment using an ORC, magnesium peroxide was conducted in order to follow the shift of the microbial communities between unperturbed and organically perturbed conditions and their recovery after application of the biostimulant.</p> <p>The changes of the bacterial communities were measured by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA along with physicochemical variables to estimate their relationships under the influence of aquaculture and biostimulation. Total viable counts of sulfate-reducing bacteria (SRB) were obtained by the most probable number (MPN) method to understand their relationship to the anaerobic environments and presence of sulfides. Physicochemical variables such as nutrients, redox potential, and sulfide concentrations were measured to reveal their links to the microbial community.</p> <p>Similarities of the bacterial population compositions in a brackish water lake, Lake Shiraishi, where oyster was aquacultured, decreased in proportion to the positions from the lake mouth towards the oyster farms. SRB was found in the vicinities of the oyster farms, while sulfur-oxidizing bacteria (SOB) were found all over the lake. Physicochemical analyses suggested marine origin of the sediment at the lake mouth, while higher organic matter load and resultant anaerobic, reductive condition of the sediment in the oyster-farming area were observed.</p> <p>Composition of the bacterial populations in the sediment beneath marine milkfish cages revealed species related to complex heterotrophic processes under the anaerobic conditions. Unique PCR-DGGE bands present in the fish cage area were related to the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides group. The results suggest that fish feeds created new niches in which reductive microorganisms like SRB were included. Ingredients of the feed and quantity of its leftover may be key factors that influence the structure of the bacterial community in the sediments of the milkfish farms.</p> <p>Shifts of the bacterial population compositions in fish feed-applied sediment were observed with increasing amounts of the fish feeds in the microcosm experiment using the sediment of Lake Shiraishi. The bacterial compositions were revealed to be affected by the reductive environments caused by the organic matter loading. The results suggest the negative impact of organic matters on the microbial community in the sediment.</p> <p>The effect of MgO₂ on the changes in the bacterial community was tested in a microcosm experiment which simulated organically polluted sediment of aquaculture farms. A significant reduction of total sulfides, increase of redox potential, and consequent disappearance of SRB were observed. In addition, the bacterial community in the sediment was affected mainly by the redox potential and resultant sulfides produced by SRB.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	Sheila Mae Salarda Santander
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 前田 広人
	副査 鹿児島 大学 教授 野呂 忠秀
	副査 鹿児島 大学 准教授 吉川 毅
	副査 鹿児島 大学 教授 門脇 秀策
	副査 鹿児島 大学 教授 境 雅夫
審査協力者	
題目	BACTERIAL COMMUNITY DYNAMICS IN ORGANICALLY POLLUTED AND BIOSTIMULATED SEDIMENTS INFLUENCED BY AQUACULTURE (養殖による有機物汚染底泥とその改善過程における微生物群集の解析)
<p>本学位論文は、養殖漁場の残餌や養殖魚介類の排泄物が底泥環境に与える影響について、物理化学的かつ微生物学的に検討するとともに、酸素発生剤を用いた汚染底質の改善効果を検証したものである。</p> <p>まず、カキ養殖が盛んな汽水湖である白石湖（三重県）の底泥を調査した結果、養殖に起因する有機物負荷によって、とくに湾奥で底質の貧酸素化が顕著であることを明らかにした。変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（DGGE）による微生物群集解析の結果、汚濁の進行により底泥中の細菌群集の遷移が見られ、とくに硫酸還元菌の増加が顕著であった。また、フィリピンのミルクフィッシュ養殖場底泥についても同様に検討を行い、養殖生け簀設置区が顕著な貧酸素・還元状態にあり、かつ硫化物濃度も高く、汚濁の進行が確認された。それに伴って、細菌群集組成も生け簀非設置区とは大きく異なっており、とくに生け簀設置区では硫酸還元菌に加え鉄還元細菌、硝酸還元細菌などの嫌気性還元細菌が検出された。</p>	

次に、白石湖や鹿児島県山川湾の底泥を用い、養殖用飼料の添加により有機物汚濁を再現したマイクロコスム実験において、酸素発生剤である過酸化マグネシウム MgO_2 の添加が底泥環境に与える効果を調べた。その結果、 MgO_2 の添加により酸化還元電位や硫化物濃度が飼料添加前の水準に回復するとともに、硫酸還元菌数の顕著な減少が認められた。一方、細菌群集組成の同一性について、DGGE バンドパターンの Sørensen Similarity Index を指標に比較したところ、 MgO_2 の添加による細菌群集の遷移が認められ、その群集組成は飼料投与前とは異なるものであった。このことから、有機物負荷により擾乱を受けた底泥では、酸素の供給による物理化学的環境の改善に伴って好気性細菌群が増加するものの、必ずしも擾乱前の細菌群集組成に回復しないことが示唆された。

以上の結果から、養殖魚介類の排泄物や残餌の沈降に起因する有機物負荷によって底質が嫌氣的かつ還元的な状態になり、それに伴って細菌群集も硫酸還元菌に代表される嫌氣的還元細菌が卓越すること、一方酸素発生剤により底質の物理化学的環境が改善し、好気性細菌群を中心とした細菌群集へと回復することが示された。

とくに、本学位論文は、海水の移入が顕著でかつ養殖による有機物負荷の影響が大きい汽水湖において、微生物群集も含めた底質の特徴付けを行った点、また、酸素発生剤による底質改善効果を物理化学的要因に加え細菌群集組成からも確認した点で新奇性が高く、有機物汚濁が進行した海洋環境での底生微生物の生態の解明に大きく寄与するものと思われる。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	Sheila Mae Salarda Santander
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 前田 広人
	副査 鹿児島 大学 教授 野呂 忠秀
	副査 鹿児島 大学 准教授 吉川 毅
	副査 鹿児島 大学 教授 門脇 秀策
	副査 鹿児島 大学 教授 境 雅夫
審査協力者	
実施年月日	平成 24 年 12 月 21 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input type="checkbox"/> 口答・筆答	
<p>主査及び副査は、平成 24 年 12 月 21 日の公開審査会において、学位申請者に対して学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は、申請者が博士(水産学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	Sheila Mae Salarda Santander
<p>[質問 1] 白石湖底泥サンプルに関する安定同位体比 $\delta^{15}\text{N}$、$\delta^{13}\text{C}$ の結果について、陸域起源の底泥と海域起源の底泥で同位体比が変化するのはなぜか。</p> <p>[回答 1] 白石湖の開口部 (S1) では海水由来の懸濁態有機物が沈降するため海域起源の有機物に富む。一方、河川水は湖水表層を湖奥部に向かって侵入し、奥部で河川水起源の有機物が沈降する。したがって、湖の開口部底泥中の有機物は陸域起源の、湖の奥部は陸域起源となると考えている。</p> <p>なお、自然界において、海洋域由来の有機物は、陸域由来のそれに比べて $\delta^{15}\text{N}/\delta^{13}\text{C}$ 比が高くなることが知られているが、そのメカニズムについては承知していない。</p> <p>[質問 2] 過酸化マグネシウムを海洋環境に投与したとき、その酸素発生の効果はどの程度継続するのか。実際に海洋環境に投与して底泥の改善効果が期待されるか。</p> <p>[回答 2] 4 ないし 8 ヶ月継続すると考えられる。すでに土壌改良材として市販されており、養殖環境での底泥改善効果も論文として報告されている。</p> <p>[質問 3] カキ養殖場とミルクフィッシュなどの魚類の養殖場とで、底泥中の微生物群集に違いはあるか。</p> <p>[回答 3] カキ養殖場の底泥中には、カキ由来の排泄物により Firmicutes が優占する傾向にあるのに対し、ミルクフィッシュ養殖場では、餌飼料に含まれるタンパク質などの高分子有機物の分解活性を持つ Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB) グループが多く認められる。</p> <p>[質問 4] 過酸化マグネシウムの投与によって底質の物理化学的因子が改善する一方、微生物群集はもとの組成には戻らないとのことだったが、過酸化マグネシウムの有効期間が過ぎたあとの微生物群集はいかがか。</p> <p>[回答 4] ミクロコスム実験は 1 ヶ月しか行っていないので、有効期間後 (4~8 ヶ月後) の微生物群集については検討していない。</p> <p>[質問 5] 過酸化マグネシウムの投与によって酸素が底質に透過する深さはどの程度か。鉛直方向のプロファイルの情報があれば教えてほしい。</p>	

[回答 5] ミクロコスム実験では底泥の深さが2~3 cm と浅いため細かな鉛直方向のプロファイルは得られていないが、ミクロコスム全体で溶存酸素濃度が上昇したと考えられる。養殖場で実際に投与した場合は、酸素が浸透する深度は1 cm 程度ではないかと思われる。浚渫などの底泥表層を混合するような操作を行うことにより、より深く浸透させることは可能と考える。

[質問 6] 底泥への過酸化マグネシウムの投与について、直上水の水流の影響は検討したか。

[回答 6] 水流については計測していない。ただ、ミルクフィッシュ養殖場での海水の滞留時間が15日と非常に高い値であるとする報告がある。

[質問 7] 白石湖は水深6~8 m と非常に浅い湖だが、温度躍層は形成されるか。

[回答 7] 春から初夏にかけて、中間層近辺に形成される。

[質問 8] 白石湖における塩分の水平分布から、河川水の流入の様子は観察されるか。

[回答 8] 河川水はおよそ表層からおよそ1 m の層を湖奥部に向かって侵入してきているという観察結果を得ている。

[質問 9] 実際に過酸化マグネシウムの現場での利用を考えたときに、どのような方法が考えられるか。

[回答 9] 養殖場直下の底泥は、残餌や養殖魚の排泄物の負荷により嫌気的な環境にあり、底泥の環境維持に機能する底生生物に多大な影響を与えている。このような環境を好気的条件下に転換し、環境を汚染することなく養殖を継続するための重要な方策と考える。

[質問 10] 現場に投与した不溶性の過酸化マグネシウムはその後にも養殖場底泥に残存するの
か。

[回答 10] 過酸化マグネシウムは酸素を放出したのちやはり不溶性の水酸化マグネシウムとなり底泥中に滞留すると考えられる。すでに、過酸化マグネシウムを袋状にパックしたものが市販されているので、これを利用すれば一定期間後に回収が可能と思われる。

[質問 11] ミクロコスム実験において、High Feed (HF) 実験区においてのみ硫黄還元菌 (SRB) と Firmicutes が検出されているが、その要因は何か。また、これらの細菌の出現が底泥環境汚染の指標となり得るか。

[回答 11] 添加した飼料の有機物成分が影響していると考えられる。確かに、SRB の出現は底泥環境の悪化の指標となり得ると考える。