

大阪湾圏域の海域環境再生・創造に関する 研究助成制度（令和元年度実施）成果発表会

大阪湾広域臨海環境整備センター

事務局：特定非営利活動法人 瀬戸内海研究会議

令和2年4月

目 次

1. 流域圏の土地利用変遷および洪水流出を考慮した大阪湾への長期栄養塩流出量の推定
齋藤 光代 岡山大学大学院環境生命科学研究科 1
2. 大阪湾圏域における COD 濃度上昇と貧栄養化との関係性の把握
鈴木 元治 公益財団法人ひょうご環境創造協会 兵庫県環境研究センター 5
3. 生理学的基盤を指標としたイカナゴの新しい資源管理法の確立
阿見彌 典子 北里大学 海洋生命科学部 9
4. DNAメタバーコーディングによる大阪湾の動物プランクトンモニタリング手法の開発
梅原 亮 広島大学 環境安全センター 13
5. 赤潮形成を促進する海洋細菌の単離同定と、赤潮動態予測法の開発
植木 尚子 岡山大学 資源植物科学研究所 17
6. 大阪湾湿地帯における有機物分解システムの解明
一湿地帯生物の難分解性有機物分解能の把握と湿地帯健康度評価の試み
劉 文 京都大学 地球環境学堂 21
7. 埋立てに伴う地形改変が大阪湾内部生産有機物の堆積過程に与える影響評価（その3）
秋山 諭 地方独立行政法人大阪府立環境農林水産総合研究所 25

流域圏の土地利用変遷および洪水流出を考慮した 大阪湾への長期栄養塩流出量の推定

代表者：齋藤光代（岡山大学大学院環境生命科学研究科・准教授）

共同研究者：岩田 徹（岡山大学大学院環境生命科学研究科・准教授）

王 崑陽（広島大学大学院総合科学研究科・博士後期課程）

〔研究目的〕

大阪湾の環境の将来予測および水質保全対策にあたっては、陸域からの栄養塩負荷量の現状把握だけでなく、過去から現在に至る長期の変遷を含めた定量的評価が重要である。これに対し、従来原単位法による発生負荷量の推定¹⁾や公共用水域調査結果を用いた流入負荷量の推定²⁾が行われてきたが、過去50年間以上の長期にわたる栄養塩流入負荷量の変遷は不明確であり、特に、最も汚濁が顕著であったと考えられる1960～70年代にかけて、洪水時を含めてどの程度の栄養塩が大阪湾に流出したかはこれまで明らかにされていない。また、大阪湾流入河川においては、懸濁態栄養塩の起源や供給域に関する解析や定量的評価はこれまで十分に行われていない。

そこで本研究では、大阪湾に流入する一級河川の大和川流域を対象とし、準分布型水文水質モデル（SWAT）を用いて実測データの整備が不十分な1970年代以前の栄養塩流出量を復元し、過去50年間を超える長期的な変化を推定することを目的とした。そのため、（1）1980年代以降の国交省の観測データの収集に加えてそれを補完する

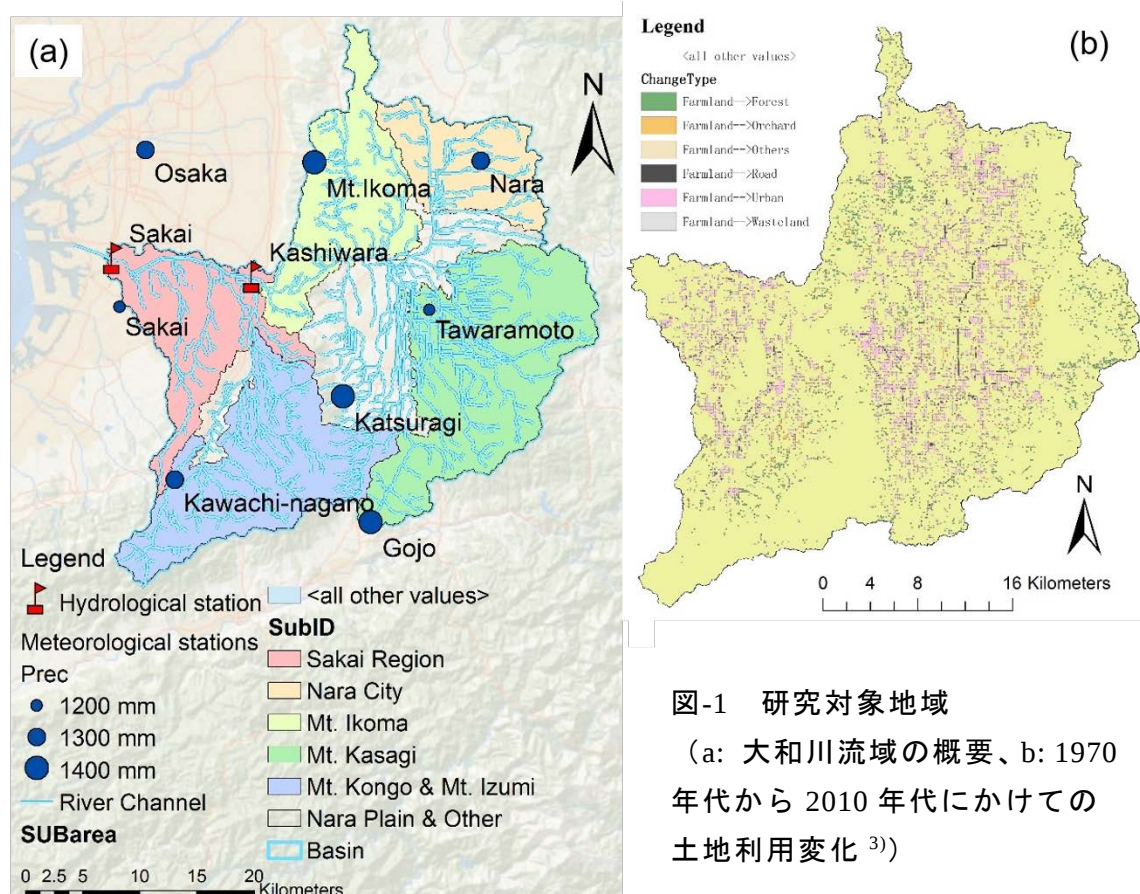


図-1 研究対象地域

（a：大和川流域の概要、b：1970年代から2010年代にかけての土地利用変化³⁾）

高頻度水質データを取得するとともに、洪水時に負荷量が増加する懸濁態栄養塩の起源となる河床堆積物や表層土壌の調査を行い、(2) 流域の土地利用変化、特に都市域の拡大やインフラ状況の変化および森林域における樹木の成長が水文流出過程・栄養塩流出量に及ぼす影響を定量的に評価した上で栄養塩流出量の長期変化の推定を行い、(3) 洪水時の流出量評価を念頭に置き、日単位から時間単位での解析を試みた。

[研究方法]

1. **対象地域**: 大和川は奈良盆地および大阪府南部を集水域とし、流域面積は 1,077km²、本流の流下距離は 68km、流域の年平均降水量は 1,300mm である (図-1(a))。大和川では 1970 年代に最も汚濁が深刻であったとされているが、近年は環境基準値を下回るまで回復してきている。大和川流域の土地利用は最近数十年間で大きく変化しており、特に堺市および奈良市を中心に農地 (主に水田) から都市への変化が最も著しい (図-1(b))³⁾。一方で、主要な土地利用の一つが森林であり、流域の約 40%を占めている。

2. **現地調査および試料分析**: 国土交通省により 1980 年代以降整備されている水質データ (概ね月 1 回の頻度) を補完するため、大和川本流下流部の堺、大和川流域北部の支流で奈良市を経由する佐保川および秋篠川の 3 地点において、週 1 回の頻度で採水を実施した。また、洪水時に河川経由の負荷量が増加すると想定される懸濁態栄養塩について明らかにするため、その起源となりうる河床堆積物および表層土壌をそれぞれ流路沿いの 8 地点および河道近傍の異なる土地利用 (森林、水田および放棄地) の 6 地点で採取した。

水試料については溶存無機態窒素 (硝酸態窒素: NO₃-N、亜硝酸態窒素: NO₂-N、アンモニア態窒素: NH₄-N) および溶存無機態リン (PO₄-P) の定量分析を行い、河床堆積物および表層土壌試料については、有機態窒素・炭素量および窒素安定同位体比 (δ¹⁵N)、炭素安定同位体比 (δ¹³C) の分析を行った。

3. **水文水質モデル解析**: 大和川流域から大阪湾への長期栄養塩流入量を推定するにあたり、準分布型流域水文水質モデルである SWAT (Soil Water Assessment Tool)⁴⁾ の version2012Rev635 を使用した。大和川流域全体における水文応答単位 (Hydrologic Response Units: HRU) は 3,300 個に設定し、小流域は 51 個に分割し計算した。地表流量および蒸発散の推定法には、それぞれ Daily Curve Number 法および Penman-Monteith 法を選択した。各種パラメータのキャリブレーションは SWAT-CUP version5.1.6.2 を使用して SUFI2 法によって行い、キャリブレーションの可否は Nash-Sutcliffe efficiency (NSE)、Percent bias (PBIAS)、および RMSE-observations standard deviation ratio (RSR) の指標を用いて評価した⁵⁾。

解析に用いるデータとして、国土交通省の水文水質データベースより大和川の堺および柏原観測所における最近約 40 年間の流量・水質データを収集し、同期間の気象観測データは気象庁のデータベースより収集した。また、都市部のインフラ情報として、大阪府および奈良県における下水道普及率、下水処理区・処理量に関する情報を収集し解析に用いた。森林域においては、詳細な植生の情報を取得するため、生駒山地エリア、笠置山地エリア、および金剛山地ー和泉山地エリアの 3 つの森林流域を対象に

UAV による空撮を各エリアで 50 ショットずつ実施し、得られた画像データを基に植生構造のタイプ分けを行った。また、森林の植生の分布状況や活性度を示す指標として、正規化差植生指数 (Normalized Difference Vegetation Index: NDVI)、葉面積指数 (Leaf Area Index: LAI) などを用いた評価を行った。

[結果と考察]

- (1) 大和川本流および支川における高頻度栄養塩濃度変化：大和川本流下流部の堺、奈良市を經由する支川の佐保川および秋篠川の 3 地点における約 1 週間間隔での栄養塩濃度の変化から、全体的に本流の下流部で最も高濃度を、支川の佐保川で最も低濃度を示す傾向が確認できた。一方で、支川の秋篠川では $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度が比較的高く、本流下流部では濃度の変動幅が比較的大きい ($\text{NO}_3\text{-N}$ については 1.5~4.5mg/L) ことも明らかになった。今回観測された従来の月 1 回頻度の測定では捉えられない濃度の変動は、栄養塩流出量の推定精度向上に寄与するものと考えられる。
- (2) 河川中の懸濁態栄養塩の起源：河床堆積物および河川近傍の表層土壌中の有機物の $\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$ 、窒素含有量、および C/N 比の結果から、河床堆積物の一部は洪水時に河川へ流入した表層土壌に由来していると考えられるが、その大部分が土壌試料よりも高い $\delta^{15}\text{N}$ を示したことから、河川へ流入する下水処理排水の影響を強く受けていることが明らかになった。
- (3) 長期栄養塩流入量の変遷：大阪湾への長期栄養塩流入量の解析期間として、窒素流出量に大きな影響を及ぼす下水道の整備状況を考慮し、大阪府および奈良県における下水道普及率の変遷などを基に次の 4 つの期間(①未整備期間：1960~1974 年、②整備初期：1975~1984 年、③整備中期：1985~2008 年、④整備後期：2009~2016 年)に分けて SWAT を用いた窒素流出量の推定を実施し、4 種類の信頼性指標に基づき比較的精度良く推定ができていることを確認した。図-2 に堺観測所における窒素濃度および窒素流出量の推定結果の長期変遷を示す。この結果から、窒素流出量は濃度の変化に概ね対応しており、1965~1975 年あたりをピークにそれ以降は減少傾向を示すことが明らかになった。これは、既存の発生負荷量の推定結果¹⁾とは異

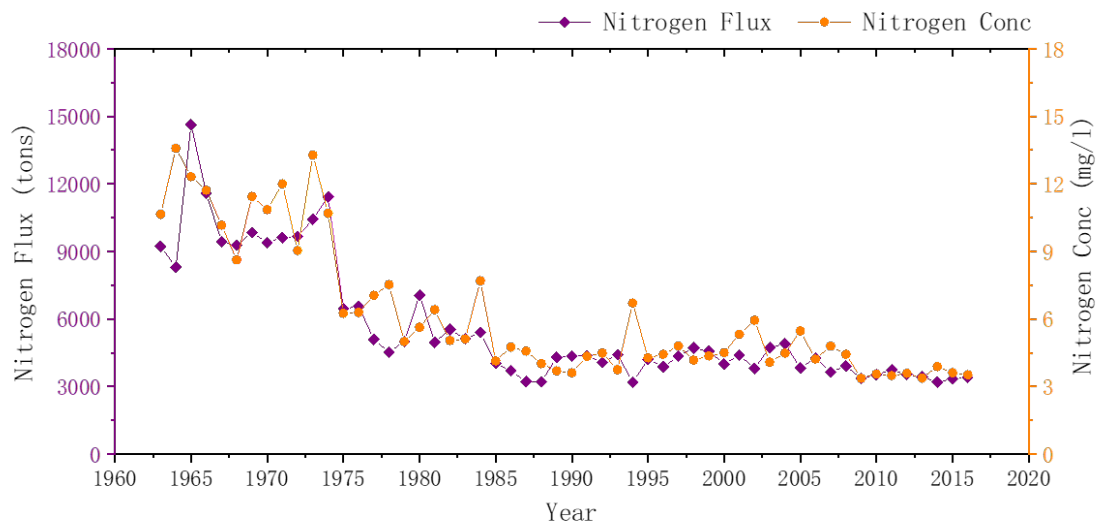


図-2 堺観測所における窒素濃度および窒素流出量の推定結果の長期経年変化

なる傾向であり、本研究において、大阪湾への過去 50 年間を超える長期での窒素流入量変化を再現できた意義は大きいと考えられる。また、トータルの窒素流出量（図-2）と同様に、点源以外からの流出量（下水道処理区以外において農地などから排出される窒素量：面源由来など）は減少しているが、対照的に点源由来（下水道処理区において処理排水として排出される窒素量）の流出量は増加傾向にあり、最近ではトータルの窒素流出量の約 6 割を占めていることが明らかになった（表-1）。この結果から、流域内の下水道整備により窒素の流出形態が面源から点源にシフトしてきたことが分かる。さらに、一人当たりの年間窒素排出量を推定した結果減少傾向にあることが明らかとなった。流域人口は増加傾向にあることを考えれば、流域下水道の整備は、トータルの窒素流出量の低減には大きく貢献してきたといえる。

表-1 窒素流出量とその形態の内訳および一人当たりの年間窒素排出量の変遷

	Total non-point source (Tons/yr)	Total point source (Tons/yr)	Total point source ratio (%)	Total Non-point & point sources (Tons/yr)	Total N discharge of each person (kg/yr)
1960-1974	10230	0	0	10230	8.56
1975-1984	5141	427	8	5568	3.04
1985-2008	2932	1570	35	4502	2.04
2009-2016	1314	2123	62	3437	1.56

- (4) 森林の成長が水文流出過程に及ぼす影響：大和川流域の主要な土地利用である森林にも着目し、3 つの森林流域を対象に、従来の長期流出モデル解析では考慮されてこなかった森林の成長にともなう蒸発散や浸透特性の変化を最近約 40 年間について推定した。その結果、SWAT における森林上層部（林冠）のモデルパラメータ値が増加し、森林の成長を反映していることが明らかになった。また、森林流域における蒸発散量は森林の成長にともない長期的な増加傾向を示し、特に夏季においてその傾向が顕著に確認された。
- (5) 日単位および時間単位での流出量推定：洪水時を含めた大和川から大阪湾への栄養塩流入量を高精度で評価することを念頭に置き、大規模な降雨イベントが発生した 2014 年 8 月、2016 年 9 月、および 2018 年 7 月を対象に SWAT を用いて従来の日単位に加えて時間単位での流出解析を実施した。その結果、4 種類の信頼性指標に基づき比較的精度良く推定ができていることを確認し、そのうえで実測データが整備されていない 2018 年 7 月の流出量変化を時間単位で推定することに成功した。今後は、懸濁物質および栄養塩を含めた流出量の評価を実施することが課題である。

引用文献

- 1) 中辻啓二・韓 銅珍・山根伸之（2003）大阪湾における汚濁負荷量の総量規制施策が水質保全に与えた効果の科学的評価．土木学会論文集，741，VII-28，69-87．
- 2) 中谷祐介・川住亮太・西田修三（2011）大阪湾に流入する陸域負荷の実態・変遷と海域環境の変化．土木学会論文集 B2（海岸工学），67(2)，I_886-I_890．
- 3) 王 崑陽・齋藤光代・小野寺真一・岩田 徹（2019）SWAT モデルによる都市化流域での地下水涵養量の長期的な変動評価－森林の成長及び都市化段階を考慮した大和川流域での例－．Kansai Geo-Symposium 2019 論文集．
- 4) SWAT (Soil & Water Assessment tool) (<https://swat.tamu.edu/>) （2020.2.26 閲覧）
- 5) Moriasi, D., Arnold, J. G., Van Liew, M., Bingner, R., Harmel, R., Veith, T. (2007) Model evaluation guidelines for systematic quantification of accuracy in watershed simulations. Transactions of the ASABE, 50, 3, 885–900.

大阪湾圏域における COD 濃度上昇と貧栄養化との関係性の把握

鈴木元治¹⁾, 古賀佑太郎¹⁾, 藤原建紀²⁾

1) (公財) ひょうご環境創造協会兵庫県環境研究センター

2) いであ株式会社大阪支社

1. はじめに

播磨灘や大阪湾西部では、瀬戸内海の多くの海域と同様に、有機物指標である化学的酸素要求量 (COD) の海水中濃度が上昇しているが、その原因は明らかになっていない。

貧栄養化が進む播磨灘等の海域では、微生物の栄養塩不足によって有機物分解速度が低下している可能性が考えられる。海域の有機物濃度は、有機物の生成と分解の速度で決まる。有機物分解に微生物が栄養塩 (無機態窒素・りん) を必要とすることは、排水処理の活性汚泥法等でよく知られている。

海水中の微生物は、炭素/窒素モル比 (C/N 比) 10.2 を上回る窒素含有割合の少ない溶存有機物を分解するには、海水中から溶存無機態窒素 (DIN) を取り込む必要があるといわれている¹⁾ (分解の窒素制限)。我々はこれまでに、瀬戸内海の貧栄養海域では溶存有機物の C/N 比が大きく、この閾値を超えて分解の窒素制限レベルにあることを確認している²⁾。このため、貧栄養海域において、実際に栄養塩不足によって分解の制限が起きているのかどうかを検証する必要がある。

本研究では、COD 濃度上昇のメカニズムの解明に必要な知見を得ることを目的として、第 1 に、貧栄養海水に栄養塩を添加した海水を用いて、栄養塩不足による分解の制限の有無を確認する分解実験を行った。第 2 に、貧栄養海水に一定の割合で高栄養海水を加えた海水を用いて有機物生成・分解実験を実施し、有機物の生成と分解過程における有機物の質と濃度の変化を調査した。

これらの実験は、海の有機物の分解速度を求めるものであり、また、分解速度に及ぼす有機物の C/N 比の影響と海水中の栄養塩濃度の影響を調べる初めての試みである。

2. 研究方法

2. 1 貧栄養海水に栄養塩を添加する分解実験 (実験 1)

播磨灘及び大阪湾西部の貧栄養の 3 海域 (Stn.A1, A2 及び A3) から表層海水を採取した。Stn.A1 の海水は、アオサを用いて予め栄養塩濃度を減少させた。これらの海水を 250 μ m メッシュのステンレス製ふるいによりろ過し、「栄養塩添加なし」の海水とした。また、Stn.A1 には塩化アンモニウム及びりん酸水素二ナ



Fig. 1 実験 1 の実験装置.

トリウムを添加し、Stn.A2 及び Stn.A3 には硝酸及びりん酸を添加したものを「栄養塩添加あり」の海水とした。栄養塩添加なしとありの海水それぞれ 600 mL を 1 L デュラン瓶に入れ、暗所、20 °C 及び 60 rpm の条件下におき、分解実験を実施した (Fig. 1)。実験期間は、Stn.A1 は 100 日間、Stn.A2 及び Stn.A3 は 30 日間とした。

実験開始後、数日おきに海水及びろ液の有機物、窒素及びりん各態濃度を測定した。なお、ろ液の作成には GF/C ろ紙 (粒子保持能 1.2 μm) を用いた。また、有機物の質の変化をみるため、3次元蛍光スペクトル解析 (3D-EEMS) 等を実施した。

2. 2 貧栄養海水に高栄養海水を加える有機物の生成・分解実験 (実験 2)

神戸市内の高栄養海域及び貧栄養海域の表層海水を採水し、100 μm メッシュのプランクトンネットによりろ過した。

Fig. 2 に示すように、貧栄養海水 20 L を入れた水槽を No.1 とし、貧栄養海水に高栄養海水の割合が 25%、75%となるように混合した海水 (計 20 L) を入れた水槽を、それぞれ No.2 及び No.3 とした。高栄養海水 100%は、No.4 及び No.5 の 2 つ作成した。

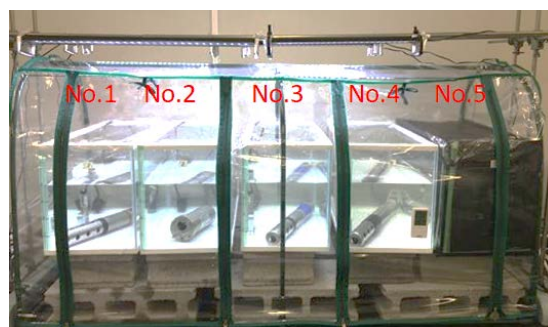


Fig. 2 実験 2 の実験装置.

実験期間は計 50 日間とした。No.1~No.4 の初めの 14 日間は有機物生成を促す期間とし、12 時間毎に明暗を繰り返した。15 日目以降は、遮光布で水槽を覆い、暗条件下にして微生物による有機物分解の期間とした。No.5 は、実験 0 日目から遮光板により暗条件とした。実験中は、循環装置により海水を攪拌し、室内空調により水温を 25°C 程度に保った。また、多項目水質計 WQC-24 又は DO 計 RINKO-DOW により、水温、溶存酸素 (DO) 濃度及び pH (多項目水質計のみ) を 30 分間隔で連続測定した。水質測定用のろ液の作成には GF-75 ろ紙 (粒子保持能 0.3 μm) を用い、その他は実験 1 と同様に水質を測定した。

3. 結果と考察

実験 1 の結果、Stn.A1 及び Stn.A3 の海水は、30 日目には栄養塩添加した全有機炭素 (TOC) 濃度が添加なしよりも 3~4%低くなった (Fig. 3)。また、蛍光特性をもつ有機物は、栄養塩添加によって Stn.A1 の腐植物質様有機物 (励起波長/蛍光波長 (Ex/Em) =230 nm/400 nm) と Stn.A2 及び Stn.A3 のタンパク質様有機物 (Ex/Em=280/340) の相対蛍光強度 (QSU) がやや小さくなった (Fig. 4)。これらは、いずれも栄養塩添加によって有機物分解が促進された可能性を示唆している。

実験 2 の結果、初めの 14 日間の有機物生成期間では、No.1~No.4 の DO 濃度や pH の明暗に同期した増減と無機態窒素・りん濃度の減少が確認されたことから、微細藻 (付着藻や植物プランクトン) による光合成が起きていたと考えられる。なお、増殖した微細藻を均一に採取できなかったため、TOC 濃度での評価は省き、ろ過 COD

(DCOD) 濃度及び溶存有機炭素 (DOC) 濃度について考察した。Fig. 5 のとおり、DCOD 濃度及び DOC 濃度には増加傾向がみられ、特に No.2 の濃度上昇が大きかった。No.2 の溶存有機物の C/N 比は有機物生成期間中に 12 から 35 となり、最も増加した。有機物生成期間で作られた有機物は、3D-EEMS 結果から易分解性と難分解性の両方であったことが確認された。

No.2 の海水の混合条件は、貧栄養の海水に河川や事業場からの低塩分の高栄養水が流入する状況に似ている。そのため、No.2 では実際の貧栄養海域の C/N 比の上昇が再現されたと考えることができる。このことから、貧栄養海域のほうが多くの溶存有機

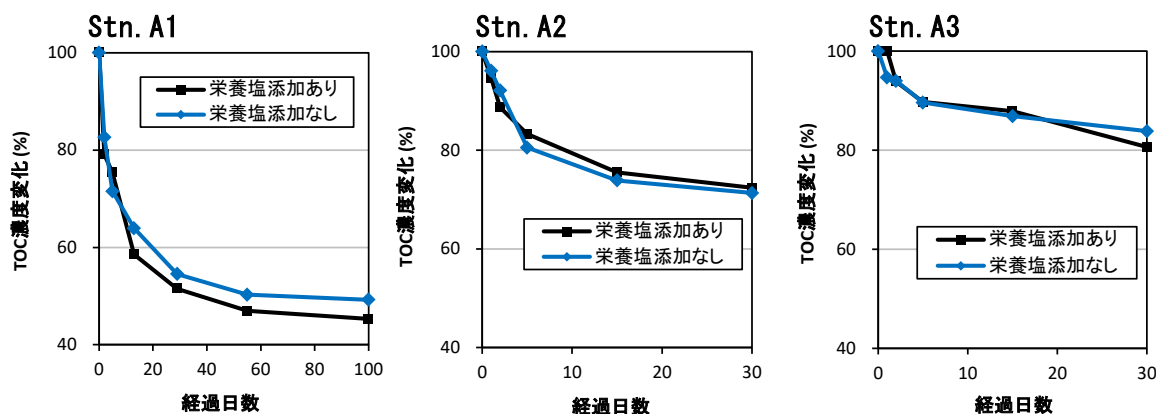


Fig. 3 TOC の初期濃度に対する比率の変化.

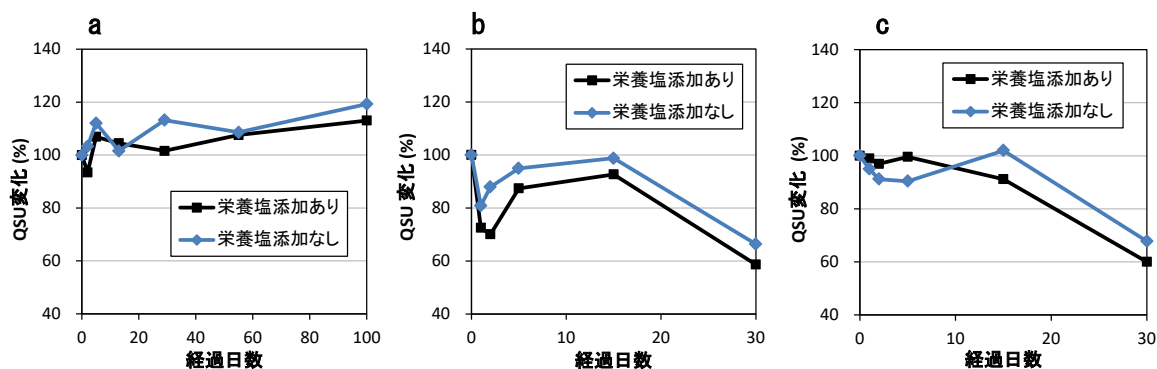


Fig. 4 (a) Stn. A1 の腐植物質様ピーク (Ex/Em=230/400) 及び (b) Stn. A2 と (c) Stn. A3 のタンパク質様ピーク (Ex/Em=280/340) の相対蛍光強度 (QSU) の初期値に対する比率の変化.

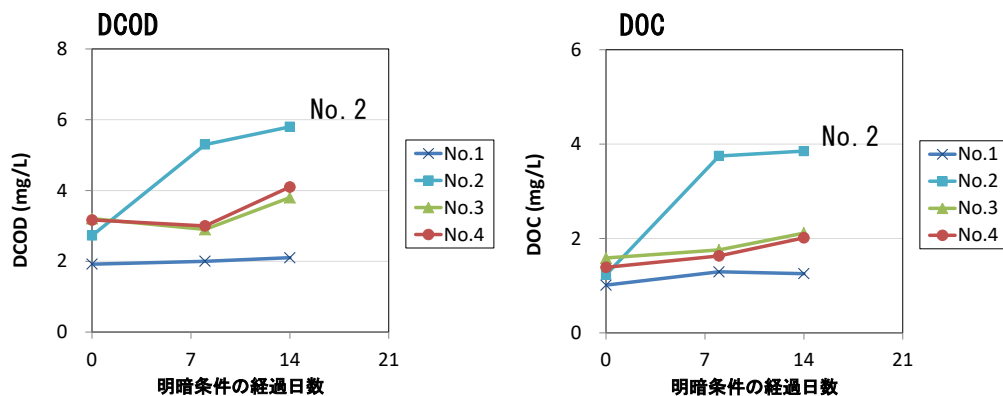


Fig. 5 有機物生成期間 (明暗条件) の DCOD 及び DOC 濃度変化.

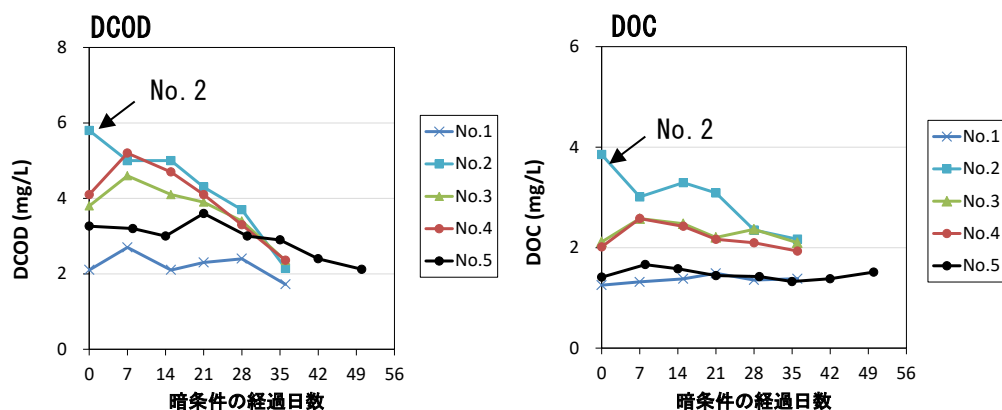


Fig. 6 有機物分解期間（暗条件）の DCOD 及び DOC 濃度変化.

物が作られる可能性があることが示唆される。

有機物分解期間の DCOD 濃度及び DOC 濃度の変化を Fig. 6 に示す。なお、No.1～No.4 は実験開始から 14 日目の暗条件開始日を 0 日目とした。No.2～No.4 は、DCOD 濃度及び DOC 濃度の減少速度が大きかったが、生成された DOC の一部は 36 日目にも残存した。No.2 の溶存有機物の C/N 比は 35 から 16 に減少したが、初期値の 12 よりも高かった。

4. 結論

海の栄養状態の変化が有機物の「分解」と「生成」に及ぼす影響を調査した結果、下記の 2 つの知見が得られた。今後は、様々な水質の海水を用いて同様の実験を繰り返し実施し、今回得られた可能性を検証する予定である。

(1) 貧栄養海水に栄養塩を添加した有機物の分解実験の結果、栄養塩添加によって有機物濃度が減少し、タンパク質様と腐植物質様の蛍光特性をもつ有機物が減少するケースがみられた。

(2) 貧栄養海水に高栄養海水を加えた有機物の生成・分解実験の結果、貧栄養海水に低塩分の高栄養海水を加えると、DCOD 濃度と DOC 濃度が増大し、C/N 比が著しく大きくなる現象が 1 例確認された。このことから、貧栄養海水に河川や事業場等から低塩分の高栄養水が流入する状況が、沿岸域の COD 濃度上昇を引き起こしている可能性が新たに示唆された。

参考文献

- 1) Anderson, R. T., 1992. Modeling the influence of food C:N ratio, and respiration on growth and nitrogen excretion in marine zooplankton and bacteria. J. Plankton Research, 14, 1645-1671.
- 2) 鈴木元治 他, 2020. 瀬戸内海における溶存有機物の難分解化状況の把握（地環研等 13 機関による合同調査結果）. 第 54 回日本水環境学会年会併設研究集会要旨集.

生理学的基盤を指標としたイカナゴの新しい資源管理法の確立

阿見 彌 典子

北里大学海洋生命科学部 講師

【研究目的】

イカナゴは、くぎ煮や生しらすとして親しまれているだけではなく、高次捕食者の餌生物として沿岸生態系を支える重要な魚種である。しかし、瀬戸内海におけるイカナゴの資源量は減少の一途にある。この直接的な要因として、再生産に貢献する、すなわち繁殖する個体が減っている可能性が挙げられる。繁殖するか否かは、個体の生理状態に依存している。近年、栄養状態が悪く、仮に産んでも次世代が生残する可能性が低いと見込まれる時には、その年の繁殖を見送り、自身の生存のためにエネルギーを維持する現象が報告されている。これは“繁殖スキップ”と呼ばれ、個体の繁殖成功度を高めるための生活史戦略である。そこで本研究では、イカナゴにおいて繁殖スキップが生じる過程を生理学的基盤を指標として明らかにし、資源変動を引き起こす要因の特定と動態を予測する方法の確立を目指した。

【研究方法】

＜実験 1＞夏眠中のイカナゴは数ヶ月にわたって摂餌しないことから、肥満度の低下は生存のみならず産卵親魚の生理状態にも影響を及ぼす。そこで、肥満度の違いがイカナゴの性成熟過程に与える影響を明らかにすることを目的として飼育実験を行った。まず、給餌の条件を変えて低肥満度および高肥満度の個体群を作出し、成熟状態を組織切片の観察により比較した。また、性成熟を促進するホルモン（生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン；以下、GnRH と略す）について、脳内におけるホルモン量を時間分解蛍光免疫測定法により測定した。サンプリングは成熟期を網羅して、成熟期直前（11月7日）、初期（11月26日）、中盤（12月9日）、終盤（12月23日）にそれぞれ行った。

＜実験 2＞高い水温は、イカナゴの斃死率を増大させる（赤井・内海，2012）。近年は夏季の水温が 28℃まで達する日数が増加しており、生残への影響が懸念されている。一方、高水温は肥満度が減少する夏眠期の終盤に強く影響し、斃死に加えて繁殖スキップを生じさせている可能性もある。そこで夏眠期において、高水温（28℃）にさらされる時期の違いが、斃死率および性成熟に及ぼす影響を調べることを目的とした。イカナゴを自然水温および日長条件下で飼育し、夏眠を開始する初期（7月）および夏眠期の終盤（11月）に、それぞれ水温を 28℃に上昇させて 24 時間にわたって維持する処理を行った。生存した個体を成熟期（11-12月）にサンプリングし、生殖腺の発達度合を観察した。

【結果と考察】

イカナゴのメスは、栄養状態が悪いと繁殖しないことが明らかとなった（繁殖スキップ）。また、繁殖スキップが決定する時期は、瀬戸内海（愛媛県斎灘での採集個体）においては11月末であることが示唆された。さらに、大阪湾のイカナゴを含む瀬戸内海に生息するイカナゴでは、産卵に至るかどうかを支配する脳ホルモン量の閾値が存在することが示唆された。すなわち、生理学的指標により成熟個体群の規模を推定できる可能性が見出された。

＜実験1＞肥満度が低いメスにおいては、GnRHの刺激を生殖腺に伝える内分泌系において何らかの抑制がかかり、これにより繁殖スキップが生じることが分かった。これは、イカナゴにおいて実際に繁殖スキップが起こることを証明した初の事例である。

成熟期の中盤まで高肥満度群の肥満度は有意に高かったものの、終盤では同等となった。体重あたりの生殖腺の重量比（GSI）は、成熟期の中盤以降において高肥満度群の方が高くなっていた（図1）。成熟期の中盤において、高肥満度群のメスの生殖腺は核移動期であったのに対し、低肥満度群では染色仁期と核移動期であった。一方、オスでは両群に共通して精子形成の後期から排精期への移行期まで達していた。成熟期の終盤では、高肥満度群はメスの標本が得られず不明であったが、低肥満度群では周辺仁期と核移動期であった。また、オスでは両群ともに排精期まで達していた。なお、同様の環境条件にて別の実験で飼育していたイカナゴのメス（肥満度は高肥満度群と同等）の卵は完熟期であった。脳内のGnRH量は、成熟期の前から初期にかけては両群ともに増加した。一方、高肥満度群ではその後も有意に上昇したのに対し、低肥満度群ではほぼ一定の値に留まっていた（図2）。

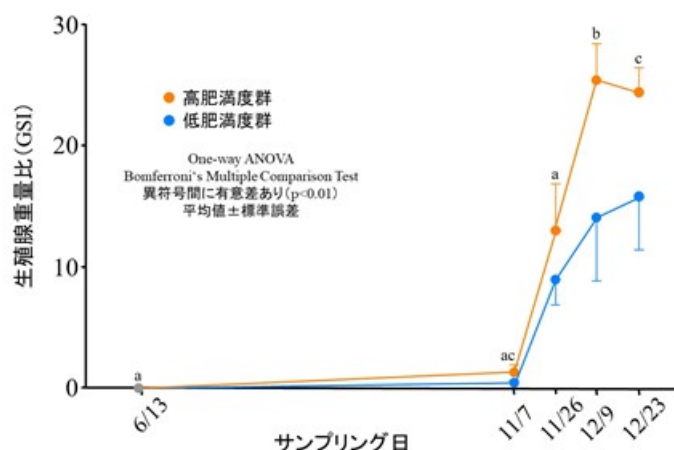


図1. 肥満度の異なる個体群における生殖腺重量比 (GSI) の変化

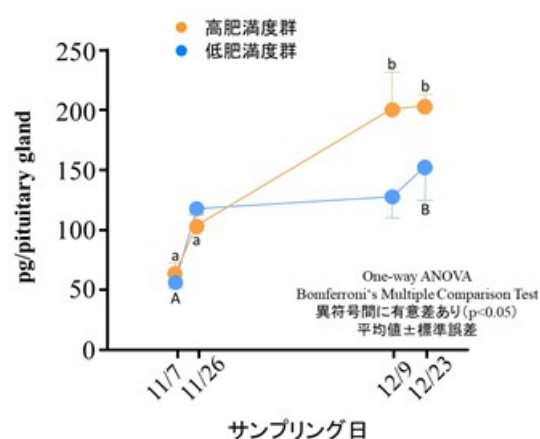


図2. 肥満度の異なる個体群における脳内GnRH量の変化

続いて、北里大学で飼育したイカナゴと、大阪湾で採集した天然個体群の脳内 GnRH 量を雌雄ごとに比較した (図 3)。その結果、肥満度が成熟にあまり影響しないオスでは、飼育と天然の個体群に差はなくいずれも高い値を示した (天然個体：平均肥満度 2.8)。一方、低肥満度群のメスでは脳内 GnRH 量は上昇せず、天然個体 (肥満度 2.5, GSI 21.6) のメスの GnRH 量は飼育個体群における低肥満度群の値に近かった。

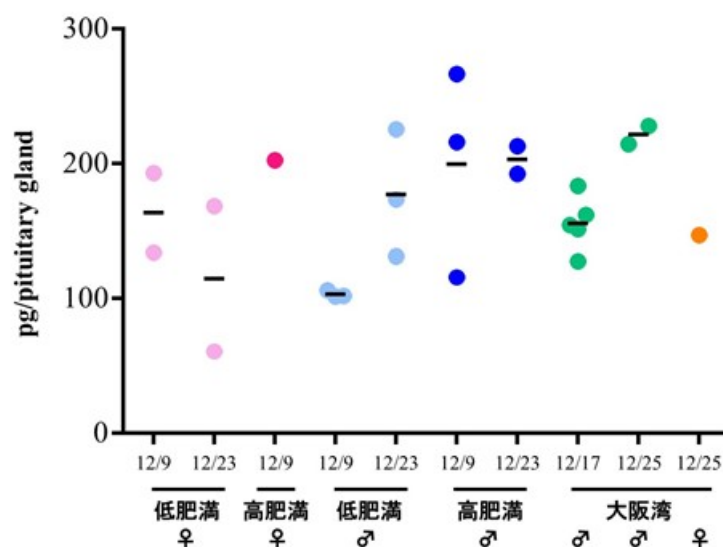


図3. 肥満度の異なる飼育個体群および大阪湾の天然個体群における脳内GnRH量の変化

すなわちイカナゴのメスでは、成熟期中盤以降に生殖腺の発達が停滞して繁殖スキップが生じることが分かった。ただし、天然の個体が実際に繁殖スキップを行っているかどうかに関しては、観察例数を増やして検証する必要がある。

<実験 2> イカナゴを高い水温 (28℃) にさらすと、さらされた時期に関係なく斃死率を著しく増大させることが明らかとなった。その斃死率は7割にも及んだことから、夏眠期における減耗の主要因となり得る可能性がある。

7月と11月に高水温で処理をした場合、累積斃死率はそれぞれ74%および67%であった (図4)。

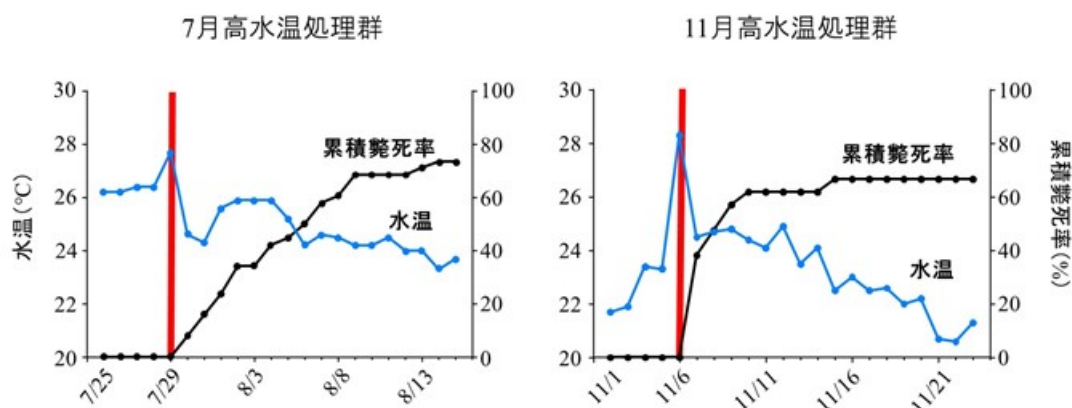


図4. 夏眠期間中の異なる時期に高水温処理を施した場合の累積斃死率

各処理群の生殖腺の発達度合いを、自然水温条件で飼育した個体の生殖腺の発達度合と比較した。成熟の初期(11月)における生殖腺の発達度合いは、自然水温群では、メスは核移動期、オスは精子形成初期であった。7月に高水温処理したメスは染色仁期、オスでは精子形成初期であった。また、11月に高水温処理したメスは同様に染色仁期であったのに対し、オスは全て未成熟であった。また12月においては、自然水温群のメスでは完熟期、オスでは排精期直前までの個体が確認された。7月に高水温処理したメスでは第三次卵黄球期、オスでは排精期直前まで進行していた。11月に高水温処理したメスの標本は得られなかったものの、オスでは精子形成後期までの成熟が確認された。以上のことから、夏季と秋季のいずれにおいても高水温処理は高い割合でイカナゴを斃死させることが分かった。また、メスの生殖腺の発達は自然条件群と比較して遅れている可能性が示唆された。7割以上が高水温により斃死したため、個体数を増やして検討する必要があるが、実験1の結果を考慮すると、メスは繁殖スキップを行っていた可能性が高い。

【結論】

本研究の結果より、イカナゴにおいて繁殖スキップが生じるかどうかが決まる時期は、成熟期の初期に相当する11月末であることが示唆された。また、瀬戸内海(愛媛県斎灘)のイカナゴの分析より、12月初旬に脳内のGnRH量が一定量(200 pg)に達していることが、雌雄に共通して最終成熟まで進行する条件であることが示唆された。こうして特定された繁殖するか否かを決定する時期と生理学的指標(GnRHの基準値)により、成熟個体群の規模を予測できる可能性が見出された。

成熟期の初期において、肥満度3.0前後を境として繁殖スキップの有無が決まるものと考えられた。また、繁殖スキップの発現条件には雌雄により差があり、低肥満度でもオスは最終成熟まで進行するものの、メスでは繁殖スキップが生じることが示唆された。繁殖スキップはいくつかの魚種で知られているものの、その詳細は明らかにされていない。本研究では、(1)繁殖スキップは性成熟の初期以降で生じること、また(2)性成熟の進行に必須である「脳-下垂体-生殖腺系」の内分泌経路が中断されることにより生じている可能性を初めて見出した。こうした知見は、イカナゴのみならず、他の水産重要魚種における加入量予測および資源管理にも応用できると期待される。

【引用文献】

赤井 紀子, 内海 範子(2012): 瀬戸内海産イカナゴの死亡と再生産に及ぼす夏眠期における高水温飼育の影響. 日本水産学会誌, 78: 99-404.

DNA メタバーコーディングによる 大阪湾の動物プランクトンモニタリング手法の開発

梅原亮¹⁾ 西嶋渉²⁾ 山本圭吾³⁾

¹⁾ 広島大学環境安全センター 助教

²⁾ 広島大学環境安全センター 教授

³⁾ (地独)大阪府立環境農林水産総合研究所水産技術センター 主幹研究員

1. 研究目的

総量規制により水質改善が進む大阪湾において、低次生態系構造解明の鍵を握る動物プランクトンについて、分子生物学的手法を用いた群集評価を試みた。動物プランクトンは、クロロフィル *a* 等の代替指標がある植物プランクトンに比べて存在量の把握が難しく、いまだに専門家による同定計数が主流であり調査データが非常に少ない現状にある。そこで本研究では、近年開発された簡易かつ迅速な分析手法であり、一度の解析で群集全体の種同定が可能である DNA メタバーコーディングに着目した。大阪湾で採集された動物プランクトンサンプルの顕微鏡観察結果と DNA メタバーコーディングの結果を比較することで、検鏡では得られない多くの種を DNA により検出し、湾の生態系における構成者とそれらの時間変動を明らかにした。さらには、主要動物プランクトンであるカイアシ類についてバイオマス推定の可能性についても検討し、今後の課題を交え考察した。

2. 研究方法

DNA メタバーコーディングでは、特定の遺伝子に着目してその塩基配列を分析すれば、対象とする個体の塩基配列を予め作成しておいたデータベースと照合することで、対象とする生物種を特定することが可能になるというものである¹⁾ (図 1)。まずはじめに、参照するデータベースに大阪湾の動物プランクトン種がどれほど記載されているのかを明らかにするために、2013 年の公共用水域調査データを用いて塩基配列の登録状況を整理した。

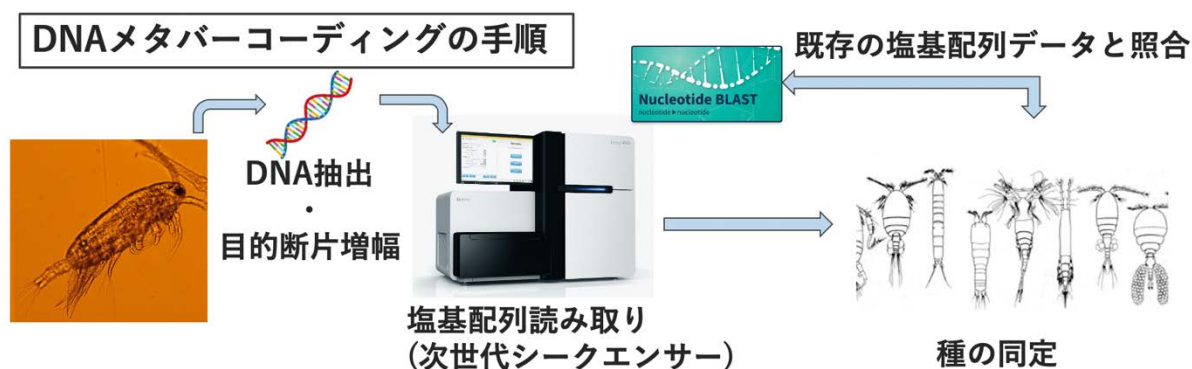


図 1. DNA メタバーコーディングの手順の概要

実際の動物プランクトンサンプルの採集については、大阪湾東部海域 3 地点 (St. 1, 12, 18) において、2018 年 7~10 月および 2019 年 6~11 月の各月に北原式プランクトンネット (100 μm) を用いて鉛直曳きで採集した (図 2)。サンプルは DNA メタバーコーディング用と検鏡用にプランクトン標本分割器を用いて分割し、それぞれ船上で固定した。検鏡用サンプルについては、大阪水技の方で動物プランクトンの同定計数を実施し、顕微鏡下でカイアシ類の体長と個体数を計測して体長-バイオマス相関式²⁾によって炭素量で表されるバイオマスを推算した。DNA メタバーコーディング用サンプルについては、原則的に Clarke et al., (2017)³⁾の方法に準じて前処理を実施したが、動物プランクトンの DNA 抽出に関しては未だ確立された方法がないため、抽出効率のさらなる向上のために最適な抽出方法を検討し、その抽出方法により大阪湾サンプルの DNA 分析を行った。生物種名の決定については、精製 DNA に対し COI 領域の一部を PCR 増幅した DNA サンプルを生物技研へ送付し、次世代シーケンサーで塩基配列を読み取り、読み取られた塩基配列 (リード) は配列同士を operational taxonomic unit (OTU) クラスタリングした。また、各 OTU に属するリードの中から代表的な配列を選び、既存の塩基配列データである NCBI “nt” データベースと照合することによって、最も類似性の高い生物種へ割当てた。

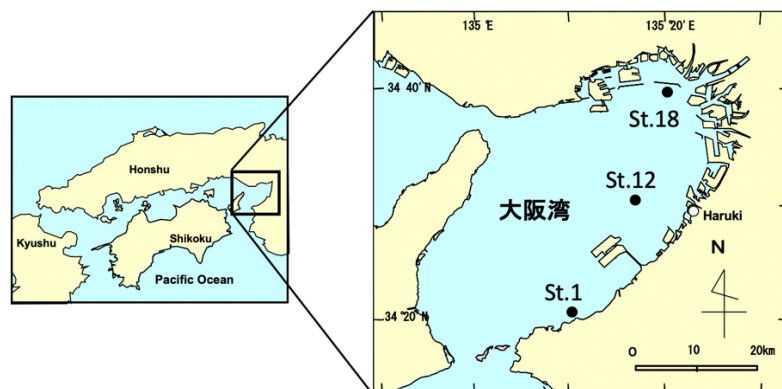


図 2. 本研究における大阪湾のサンプリング地点

3. 結果と考察

データベースへの登録状況に関して、過去の大阪湾における動物プランクトン種を既存の塩基配列データベースで照合した結果、大阪湾で出現数が最も多いカイアシ類を含む節足動物門では、種レベルで 40%が DNA メタバーコーディングで同定でき、科レベルだと 100%までカバーしていることが分かった。データベースは急速に拡充されており、モニタリングのためのプロトコルを確立することの価値は高いと考えられた。

DNA メタバーコーディングにおける抽出方法では、Proteinase K の量、抽出回数、および処理時間の検討や、DNA の抽出効率を向上するための物理破碎におけるビーズの種類 (ガラスビーズおよびジルコニアビーズ) と回数について検討を行った結果、最適な DNA 抽出方法が明らかとなった。

2018 年および 2019 年に大阪湾東部海域 3 地点において採集された動物プランクトンサンプルについて、2018 年については St. 1、18 の 7、8 月のサンプルを除いて DNA 分析が終了した。2019 年については、現在までに、St. 1、18 の 7～10 月のサンプルの分析を終えた。2018 年のサンプルについては、検鏡についてはカイアシ亜綱（カイアシ類）のみ同定計数を実施ため、カイアシ類のみの結果で DNA メタバーコーディングの結果と比較した検鏡では 11 科 11 属 14 種のカイアシ類が同定され、一方 DNA メタバーコーディングでは 13 科 14 属 23 種が検出され、生物種数では 2 倍近くの分類群を検出した。2019 年では、検鏡についてもすべての動物プランクトンについて同定計数を実施したため、それらの検出種を比較したところ、検鏡では 13 門 27 科 44 属 24 種が同定され、一方 DNA 分析では 10 門 59 科 70 属 84 種が検出され、種数では 4 倍近くの分類群を検出した。カイアシ類に絞った場合は、検鏡では 13 科 13 属 14 種のカイアシ類が同定され、一方 DNA メタバーコーディングでは 12 科 12 属 18 種が検出され、2018 年同様により多くの分類群を検出した。多様性の評価として最もシンプルな指標は生物種数であるが、大阪湾生態系の構成者として重要な動物プランクトンの種類数を測定するためには、これまでは検鏡による種の同定が必須であった。そこで、本研究では DNA メタバーコーディングを用いた評価を試みたが、大阪湾における動物プランクトン種の検出率において DNA 分析は検鏡より優れていることがわかった。また、本研究期間におけるノープリウス幼生のバイオマスとしての優占度は低かったが、これまで検鏡にて発育段階のため同定できなかったものが DNA 分析ではすべて同定可能であった。

図 3 には、2018 年および 2019 年におけるカイアシ類の科レベルでのリード数割合と検鏡バイオマス割合の関係を示す。ハルパクチクス目などの検鏡のみで検出された種は、そもそも PCR による増幅がかかっておらず、DNA 分析と検鏡の間の精度比較ができないため計算から除外した。

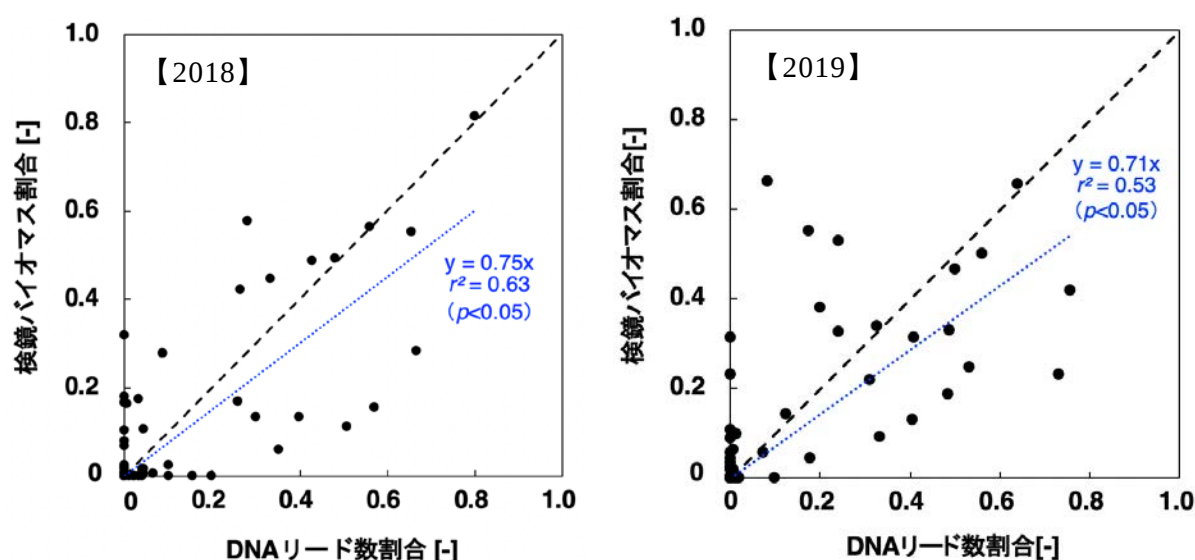


図 3. カイアシ類のリード数割合と検鏡バイオマス割合の関係（科）

2018 年においては、原点を通る回帰直線の傾きは 0.75 であり、寄与率は $r^2 = 0.63$ ($p < 0.05$) と高い相関を示し、DNA リード割合がやや過大評価となる傾向にあった。同解析を属レベルで評価した場合は $r^2 = 0.25$ ($p < 0.05$)、種レベルでは有意な関係性はみられなかった。一方 2019 年では、原点を通る回帰直線の傾きは 0.71 であり、2018 年同様に高い相関を示し ($r^2 = 0.53$ 、 $p < 0.05$)、DNA リード割合がやや過大評価となる傾向にあった。同解析を属レベルで評価した場合は $r^2 = 0.65$ ($p < 0.05$)、種レベルでは相関解析で比較可能な種の減少により関係性をみることができなかった。2019 年では属レベルでも寄与率が高かったことから、カイアシ類の科や属レベルでのバイオマス推定が今後できるようになる可能性が示唆された。

大阪湾サンプルの解析では、検鏡にてバイオマスとして優占することがあったハルパクチクス目を DNA では全く検出することができなかった。そのため、異なるプライマー (18S 領域) を用いてハルパクチクス目を検出できるか検討したところ、ハルパクチクス目は検出できたが、現状のデータベース登録状況における照合では優占していたフネガタソコミジンコおよびカワリソコミジンコには照合されず、対象領域の塩基配列情報の拡充による改善の可能性の検討も重要になると考えられた。

4. 結論

本研究では、総量規制により水質改善が進む大阪湾において、低次生態系構造解明の鍵を握る動物プランクトンについて、分子生物学的手法を用いた群集評価を試みた。先に DNA メタバーコーディングにおける最適な DNA 抽出方法についての検討を行い、目的の DNA 断片の増幅を確認した後、本手法を用いて大阪湾サンプルを分析した。湾で採集された 2018 年および 2019 年の動物プランクトンサンプルの検鏡結果と DNA 分析結果を比較することで、検鏡では得られない多くの種を DNA 分析により検出できることを明らかにし、湾の生態系における主な群集組成とそれらの時間変動を明らかにした。これまで検鏡にて発育段階のため同定できなかったノープリウス幼生についても DNA 分析で全て同定を行うことができたが、検鏡にてバイオマスとして優占することがあったハルパクチクス目を検出することができなかったため、本種の検出についてはさらなる検討が必要である。また、主要動物プランクトンであるカイアシ類については、ハルパクチクス目を除けば現段階においても DNA メタバーコーディングを用いて科や属レベルでのおおまかなバイオマス推定が可能であることがわかった。今後、照会する DNA データベースの充足に加え、PCR バイアス等に対する補正手法を組み合わせることで更なる定量性の改善が見込まれる。

- 1) Kress, W. J., Erickson, D. L. (2012) DNA Barcodes: Methods and Protocols, Humana Press, New York. pp 470.
- 2) Uye, S. (1982) Length-weight relationships of important zooplankton from the inland Sea of Japan. J. Oceanogr. Soc. Jpn, 38, 149-158.
- 3) Clarke, L.J., Beard, J.M., Swadling, K.M., Deagle, B.E. (2017) Effect of marker choice and thermal cycling protocol on zooplankton DNA metabarcoding studies. Ecol. Evol., 1-11.

赤潮形成を促進する海洋細菌の単離同定と、赤潮動態予測法の開発

植木 尚子

岡山大学 資源植物科学研究所 准教授

1. 本研究の背景

『赤潮』は、真核性単細胞藻である赤潮原因藻が形成した群集である。赤潮原因藻には多くの種が知られ、赤潮構成種により、魚類弊死を惹起したり、産生する毒性物質が食用二枚貝に生体濃縮され、食中毒の原因となるなど、生態系及び水産業に影響をもたらす。通常時には、赤潮原因藻は低い細胞密度で他の様々な藻類と共存するが、何らかの原因により一種～少数種という限定された赤潮原因藻が増殖し、集積・優占する。

現在までの生態学的研究により、水温・塩度・栄養塩濃度などの物理化学的因子が赤潮動態に与える影響について知見が蓄積されており、自然界における赤潮発生頻度は、高栄養塩環境や水温上昇とよく相関することが明らかになっている。一方で、環境で赤潮が形成された場合、その条件を実験室で人工的に再現して赤潮原因藻を培養しても、観察されるような高密度での増殖は観察されない場合が多い。つまり、上述の物理化学的環境因子以外に、未だに特定されていない異常増殖の誘発因子が存在するのでは？と推測される。

珪藻や緑藻の増殖を、環境細菌が促進するという研究は多く知られる。例えば、珪藻と海洋細菌である *Sulfitobacter* の一種が結合し二種間でチロシン代謝物を交換・利用することで相利的に共生するという例が知られている。また、藻類の多くはビタミン B12 を生合成する能力を持たない。これらの藻類は、ビタミン B12 を生合成する細菌により種非特異的に増殖が促進される。さらに、鉄イオンは、多くの場合藻類の増殖を律速する因子となるが、鉄イオンの藻類への取り込みは、ある種の細菌が作るシデロフォアという低分子化合物に促進される。これらの例に見られるような細菌類が赤潮原因藻増殖の自然環境における促進因子として作用する可能性があるものの、このような観点に立った赤潮原因藻と環境細菌の相互作用についての研究は、ほとんど例がない。

私たちのグループは海洋細菌の一種 *Altererythrobacter ishigakiensis* の赤潮原因藻の一種であるヘテロシグマ（学名 *Heterosigma akashiwo*）に対する増殖促進作用を見出した（*Harmful Algae*, 2016, Higashi *et al*）。ヘテロシグマと *A. ishigakiensis* の共培養により、ヘテロシグマ増殖は加速し、最高培養密度が増加した。一方、この

細菌はヘテロシグマの近縁種シャトネラの増殖には影響しなかった。つまり、既に報告がある海洋細菌のビタミン合成能を介した非特異的増速促進とは異なり、*A. ishigakiensis* は種特異的な増殖促進作用を持つといえる。この結果は、海洋細菌の増殖促進作用が、特定の赤潮原因藻種の増殖を惹起する要因（赤潮発生の外的要因）の一つである可能性を示唆する。赤潮発生における海洋細菌・赤潮原因藻間の相互作用に着目した研究例は非常に少ない。そこで、この点を追求するために本研究を計画した。

2. 研究目的

上述のように、私たちのグループは、ヘテロシグマの増殖を種特異的に促進する海洋細菌 *A. ishigakiensis* を単離した。この結果は、物理化学的環境要因に加えて、環境中の海洋細菌が赤潮発生の一因として重要な役割を担うことを示唆する。そこで、本研究では、特に大阪湾圏で発生が問題となっている魚類弊死を引き起こすヘテロシグマと、二枚貝への毒性物質蓄積の原因となるアレキサンドリウム タマレンセ（学名 *Alexandrium tamarense*）に注目し、この2種の生理生態に影響を与える海洋細菌の単離同定を行うことを計画した。特に、これら2種の増殖を促進する細菌は、ヘテロシグマ赤潮およびアレキサンドリウム タマレンセ赤潮を誘発する因子である可能性がある。この可能性に着目し、ヘテロシグマおよびアレキサンドリウムに随伴する細菌を単離し、特に、この2種に対する増殖促進作用を有する細菌を特定する。さらに、これらの細菌のゲノム配列を解読し、種特異的なマーカー配列を決定することができれば、赤潮を予見する分子マーカーとしての応用が可能となる。そこで、このようなマーカー配列の開発を視野に入れた研究を計画した。

また、すでに私たちが単離した *A. ishigakiensis* がヘテロシグマ増殖を促進する作用機序を検討した。新たな赤潮原因藻と環境細菌の相利的相互作用についての知見を得ることで、赤潮原因藻と環境細菌間の相互作用のより普遍的な理解に繋がると考えたためである。

3. 研究方法

まず、ヘテロシグマおよびアレキサンドリウム タマレンセの生理生態への影響を有する海洋細菌を単離することを目標として、1)・2)の研究を計画した。

1) ヘテロシグマおよびアレキサンドリウム タマレンセに随伴する細菌の単離

一般的に、ヘテロシグマ赤潮は5月より7月初旬に、アレキサンドリウム タマレンセによる赤潮は1月下旬～3月上旬に観察される。ヘテロシグマおよびアレキサンドリウム タマレンセ赤潮形成期に海水を採取し、その海水より両藻細胞を単離し、随伴細菌を単離することで赤潮形成を促進する細菌を探索すること

を計画した。

2) 貧栄養状態のヘテロシグマおよびアレキサンドリウム タマレンセの増殖を促進する海洋細菌の選択的単離及び同定

1) のアプローチは、環境中で赤潮形成時に随伴する細菌を単離することから、実際に赤潮発生の原因となる細菌の単離に繋がる可能性が高い。一方で、赤潮が発生しなければ、上述の実験を行うことができない点が致命的である。そこで、赤潮が発生していない状態の海水から、ヘテロシグマおよびアレキサンドリウム タマレンセの増殖を促進する細菌をスクリーニングすることとした。

研究背景に述べたように、珪藻や緑藻などの増殖を促進する細菌として、藻類が合成能を持たないビタミン類を生合成する細菌や、あるいは藻類への鉄イオンの取り込みを補助する因子であるシデロフォアを生合成する細菌が知られている。ヘテロシグマやアレキサンドリウムに同様の作用を有する海洋細菌が海水中に存在する可能性を検討するために、無菌化したヘテロシグマやアレキサンドリウムに天然海水をごく少量添加し、貧栄養状態で培養したにも関わらず藻類の増殖が促進された場合に、海水中に存在する細菌のうち藻類の増殖に寄与する細菌を選択的に単離できる可能性が高い。そこで、これらの藻類に付着している海洋細菌の単離同定を試みた。

[具体的な細菌単離方法]

1)・2)ともに、キャピラリーを用いて藻細胞をピックアップし、滅菌した人工海水で穏やかに洗浄した。その藻細胞を水槽式超音波処理器にて破碎後、海洋細菌用寒天培地 (Difco Marine Broth 2216) に塗抹し、摂氏 25℃にて数日培養した。海洋細菌のコロニーをピックアップし、数回寒天培地に塗抹することで、シングルコロニーにクローニング (単離) したのち、バクテリア 16S rRNA 配列をユニバーサルプライマーにて増幅し、サンガー法にてシーケンスを行うことで種同定を行った。

3) ヘテロシグマ増殖促進能を有する海洋細菌 *A. ishigakiensis* のヘテロシグマ生理生態への影響についての検討

A. ishigakiensis がヘテロシグマ増殖を促進する機構についての知見を得ることを目標として、いくつか予備的な実験を行なった。*A. ishigakiensis* の特徴として、高い抗酸化作用を有するカロテノイドであるアスタキサンチン (以下 AST) を蓄積することがあげられる。さらに、AST の生合成過程では、葉緑体の光障害を軽減するカロテノイドであるゼアキサチンを生成する。この点に着目して、ヘテロシグマの光合成活性に *A. ishigakiensis* が及ぼす影響をパルス変調蛍光光度計 (PAM) にて解析した。

4. 結果と考察

1) 赤潮原因藻からの随伴細菌の単離・同定

本研究でフィールドとしている海域では、2019 年～2020 年に、ヘテロシグマおよびアレキサンドリウム タマレンセ赤潮は報告されなかった。一方、2020 年 2 月下旬になって、高知県浦ノ内湾にてヘテロシグマが 20,000 cell/ml まで増殖が見られたため、サンプルを取得し、ヘテロシグマに付着している細菌を単離した。3 月 27 日現在、24 株を得て種同定中である。

2) 貧栄養状態のヘテロシグマおよびアレキサンドリウム タマレンセの増殖を促進する海洋細菌の選択的単離及び同定

ヘテロシグマについては、6 月・7 月に播磨灘より採取した海水を用いて実験を行なった。鉄欠乏培地、ビタミン B12 欠乏培地を作成し、当グループで保有する無菌化ヘテロシグマ株 H93616 に上述の海水を添加して培養を行なった。ともに、海水非添加区に比べて優位にヘテロシグマ増殖が促進されたサンプルが見られたため、その実験区よりヘテロシグマをピックアップし、含有細菌を単離同定した。

鉄欠乏状態ヘテロシグマより 47 株、ビタミン B12 欠乏ヘテロシグマより 37 株（1 株は同定できなかった）、合計 84 株の細菌を得た。それぞれの栄養欠乏状態で異なる種の細菌がヘテロシグマに随伴していたことが明らかとなった。この結果は、同じ藻類であっても、栄養状態によって選好する海洋細菌が異なることを示している。

3) ヘテロシグマ光合成機構に対する *A. ishigakiensis* が与える影響の評価

赤潮形成時のヘテロシグマは、海表面に集積する。真夏の晴天時の海表面の日光照度は $\sim 2000 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ と非常に強く、赤潮形成時のヘテロシグマが、葉緑体に対する光損傷に高い抵抗性を持つことを示す。無菌化したヘテロシグマに *A. ishigakiensis* を添加して 2 日間培養したのち、葉緑体の光特性を PAM にて解析したところ、葉緑体が過剰な光を熱として逃す機構である非光化学的消光が著しく活性化することを見出した。

5. 結論と今後の展望

本年度の研究により、ヘテロシグマが環境中で随伴する細菌を合計 108 株単離し、それぞれの種について、無菌化したヘテロシグマの増殖速度に影響を与える可能性について検討を行なっている。また、単離されたそれぞれの種の全ゲノムを解読・解析するための準備を進めている。さらに、過去に単離したヘテロシグマ増殖を促進する随伴細菌 *A. ishigakiensis* は、ヘテロシグマの光合成機構の強光耐性を増強することが明らかとなった。この知見は、赤潮動態予見にカロテノイド産生海洋細菌の分子マーカーとして利用できる可能性を示している。この点をさらに追求する。

大阪湾湿地帯における有機物分解システムの解明

—湿地帯生物の難分解性有機物分解能の把握と湿地帯健康度評価の試み

劉 文

京都大学 地球環境学助教

1. 研究の背景および目的

湿地帯には陸上で生産された高分子有機物を低分子栄養分まで分解する能力を持つ多種多様な生物が生息しており、そこは古くから「天然の浄化槽」として知られている。本研究では近年注目されはじめた湿地帯に生息する水生無脊椎動物とこれまでに高分子有機物分解能の存否を見落としていた微細藻類を対象にして、これらの生物がもつセルラーゼ活性の有無を網羅的に調査し、湿地帯の浄化機能への関わり（分解能力）を解明すること、また、安定同位体比に基づいて湿地帯で優占する生物が担う陸上由来有機物を分解する能力の確認とその機能の割合（全食糧に対するセルロースの比率）を調べることを目的とした。

2. 研究手法

生物多様性が高い湿地帯として、男里川河口域干潟（泉南市）および十三干潟（大阪市）を選定し、マクロベントスおよびメイオベントスを採取した（図1）。微細藻類については、男里川河口域干潟の堆積物と海水を採取し、Ishii（2018）の方法で分離・無菌培養株を作成した。

セルラーゼ活性測定では、内臓の摘出が可能なマクロベントスについては摘出した内臓を CMC Agar Plate Assay で活性評価を行った。内臓を摘出できないマクロベントスは個体を試料として同様の方法で評価した。微細藻類無菌株は培養液に CMC を加え、Somogyi-Nelson 法で活性を評価した。

安定同位体分析では、筋肉が分離できるマクロベントスでは筋肉のみを分析に供した。分離が難しい生物では全個体を分析に供した。海水サンプルはガラス繊維フィルター（GF/F、45mm）を用いて 5 L 程度をろ過した。その後、ガラスフィルターを生物サンプルと同様に乾燥し、分析用サンプルとした。土壌サンプルはそのまま乾燥し、分析用サンプルとした。

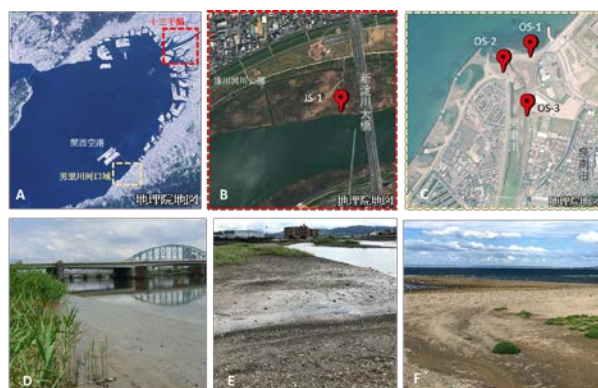


図1：サンプリング地点および干潟の様子。A：十三干潟および男里川河口域干潟が大阪湾にあたる位置；B：十三干潟におけるサンプリング地点；C：男里川河口域干潟におけるサンプリング地点；D：十三干潟（JS-1）の様子；E：男里川河口域干潟（OS-1）における様子；F：男里川河口域干潟（OS-2）における様子

3. 研究結果

サンプル採取からみる生物多様性

表1に示した通り、十三干潟からは4種マクロベントスが採集された（節足動物2種、環形動物1種、軟体動物1種）。男里川河口域干潟からは17種のマクロベントスが採集された（節足動物5種、軟体動物11種、刺胞動物1種、近隣の市場で購入した試料を含む）。採取したマクロベントスの種数は男里川河口域干潟が十三干潟より多かった。これは十三干潟が河口近くに位置し、干潮時には淡水域になることから海産マクロベントスが生息しにくい環境であることに起因すると言える。

一方、十三干潟および男里川河口域干潟からメイオベントスの存在は確認できなかった。メイオベントスの生息は溶存酸素（DO）、栄養塩、水温、底泥の粒度組成などさまざまな環境要因に支配されると考えられるが、大阪湾全体にメイオベントスが生息していないことはありえず、今後はさらに広範囲（大阪湾外域の底泥も含む）に探索する必要がある。

また、男里川河口域干潟の底泥および海水中の枯れ葉から、浮遊性珪藻3種、底生性珪藻3種を単離し、それらの無菌株を確立した。

セルラーゼ活性

マクロベントスでは十三干潟から採取した4種、および男里川河口域干潟から採取した17種の計21種すべてにセルラーゼ活性が認められた。

1997年にヤマトシロアリに内源性セルラーゼが発見されて以来、陸生・水生無脊椎動物がセルラーゼを所有していることが明らかになってきた。本研究で大阪湾沿岸部干潟で採取したマクロベントス全種がセルラーゼ活性を持っている事実は、これらの生物が大阪湾の干潟の「浄化機能」に寄与する能力を持っていることを示唆している。

表1：十三干潟および男里川河口域干潟に採取されたマクロベントスのセルラーゼ活性

門	綱	目	科	学名	和名	採取地点	食性	セルラーゼ活性	先行研究
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Varunidae	<i>Helic tridens</i>	モズクガニ	OS-1	unkonwn	○	なし
				<i>Hemigrapsus sanguineus</i>	イソガニ	JS-1	unkonwn	○	なし
			Sesamidae	<i>Chiromantes dehaani</i>	クロベンケイガニ	JS-1	carnivorous	○	なし
			Ocypodoidae	<i>Uca lacta lacta</i>	ハクセンシオマネキ	OS-1	sediment filter organic (bacteria) detritus	○	なし
				<i>Macrophthalmus japonicus</i>	ヤマトオサガニ	OS-1	sediment filter microbenthic algae	○	なし
			Paguridae	<i>Pagurus filholi</i>	ホンヤドカリ	OS-1	omnivorous detritus, algae, animals	○	なし
	Hexanauplia	Pedunculata	Pedunculata	<i>Capitulum mitella</i>	カメノテ	OS-1	water filter detritus, plankton	○	なし
Mollusca	Polyplocophora	Neoloricata	Acanthochitonidae	<i>Acanthopleura japonica</i>	ヒザラガイ	OS-1	scrapping diatom, algae, bacteria	○	なし
		Vetigastropoda	Turbinidae	<i>Turbo sazae</i>	サザエ	青空市場購入	scrapping algae	○	なし
		Sorbeoconcha	Babylonidae	<i>Babylonia japonica</i>	バイ	青空市場購入	carnivorous carrion feeder	○	なし
			Buccinidae	<i>Buccinum inclythum</i>	ヒモマキバイ	青空市場購入	carnivorous	○	なし
			Batillariidae	<i>Batillaria multiformis</i>	ウミニナ	OS-1	sediment filter detritus	○	あり
			Potamiidae	<i>Cerithdea moerchii</i>	フトヘナタリ	OS-1	sediment filter detritus	○	あり
			Teguridae	<i>Chlorostoma liskei</i>	クボガイ	OS-1	sediment filter	○	なし
	Pelecipoda	Mytiloidea	Mytilidae	<i>Xenostrobus atratus</i>	クログチ	OS-1	water filter	○	なし
			Pinnidae	<i>Atrina pectinata</i>	タイラギ	青空市場購入	water filter	○	なし
				<i>Tresus keenae</i>	ミルクイ	OS-2	water filter	○	あり
		Arcida	Arcidae	<i>Anadara broughtonii</i>	アカガイ	青空市場購入	water filter	○	なし
	Bivalve	Veneroidea	Corbiculidae	<i>Corbicula japonica</i>	ヤマトシジミ	JS-1	water filter	○	あり
Annelida	Polychaeta	Phyllodoidea	Nereididae	<i>Hediste japonica</i>	ゴカイ	JS-1	sediment filter	○	あり
Cnidaria	Anthozoa	Actiniaria	Haliphanellidae	<i>Haliphanella lineata</i>	タテジマイソギンチャク	OS-1	water filter	○	なし

男里川河口域干潟から単離した微細藻類計 6 種（すべて珪藻類）にはセルラーゼ活性が認められなかった。微細藻類のセルラーゼ活性に関する研究は、単離・培養の技術的問題によってこれまで皆無であった。今回大阪湾から単離した 6 種においてセルラーゼ活性は認められなかった。

表 2：十三干潟および男里川河口域干潟に採取されたマイクロベントスのセルラーゼ活性

門	綱	目	科	学名	採取地点	生活型	セルラーゼ活性	先行研究
Heterokonta	Coscinodiscophyceae	Biddulphiaceae	Chaetocerotaceae	<i>Chaetoceros debilis</i>	男里川OS-1	浮遊性	×	なし
				<i>Chaetoceros socialis</i>	男里川OS-1	浮遊性	×	なし
		Thalassiosirales	Skeletonemataceae	<i>Skeletonema</i> sp.	男里川OS-1	浮遊性	×	なし
	Bacillariophyceae		Bacillariaceae	<i>Nitzschia</i> sp.1	男里川OS-1	底生性	×	なし
				<i>Nitzschia</i> sp.2	男里川OS-1	底生性	×	なし
				<i>Nitzschia</i> sp.3	男里川OS-1	底生性	×	なし

安定同位体分析

生物が単にセルラーゼ活性を持っているだけで、実際にセルロースを分解しなければ、湿地帯の浄化機能に貢献していることは言えない。そのため、セルラーゼ活性評価以外に安定同位体分析を通してセルラーゼ活性を持つ「保有者」から「実行者」を見つけ出すことが重要である。本研究では安定同位体分析の結果、図 2 が示している通り、下記のことが明らかになった：①男里川河口域干潟の底泥は $\delta^{13}\text{C}$ の値が低いことから、陸上由来・湿原由来の植物を多く含んでいる、②男里川河口域干潟の干潮域や海域の水試料の低い $\delta^{13}\text{C}$ 値はそこに粒子状植物性有機物が多く含まれていることを示している、③ウミニナ、フトヘナタリ、クボガイ、クロベンケイガニの $\delta^{13}\text{C}$ 値は季節によって変動し、陸上由来有機物を利用する割合が季節によって異なることを示唆している、④フトヘナタリはウミニナやクボガイに比べ低い $\delta^{13}\text{C}$ 値を示し、植物由来有機物をより多く利用している、⑤貧毛類は最も低い $\delta^{13}\text{C}$ 値を示し、多量の植物由来有機物を利用していると考えられる、と共に高い栄養段階に位置する、⑥カメノテはフトヘナタリと同程度に植物由来有機物を利用しているが、栄養段階は一番高く、外海の動物由来有機物も多く利用していることが考えられる。

4. 考察および結論

ヤマトシロアリに内源性セルラーゼが発見されて以来、多くの無脊椎動物に内源性セルラーゼの存在が明らかになり、無脊椎動物も陸上由来難分解性有機物の利用能を有することがこれまでの調査研究から判明している。「森は海の恋人」という言葉は森と海の深い関係性を表していて、今では多くの人に知られている。その関係の本質は「陸上植物由来の有機物が海産生物に利用されやすい低分子に変換する機能が山～海のいずこかに存在すること」で、その候補の一つが干潟である。干潟などの湿地帯には陸上由来の難分解性有機物（セルロースなど）が多く堆積しているが、そこではそれらが直接海域に入る前に無機化されていることから古くより天然の浄化槽として知られ、炭素循環において重要な機能を有していることが論じられてきた。これまでも湿地帯に生息している内源性セルラーゼ等の難分解性有機物分解酵素を持っている

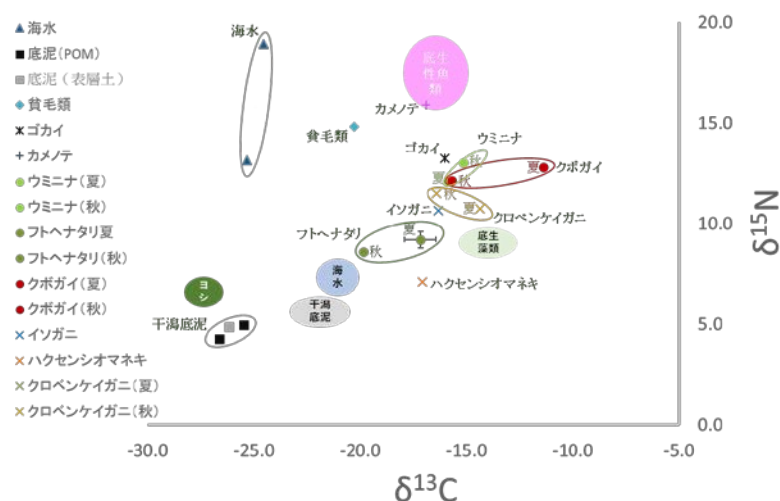


図2：安定同位体分析の結果。無色の楕円は本研究のデータであり、色付きの楕円は、先行研究等データを参考に作成している（土居内，2011；高井，2003）。

生物が上述の陸上由来難分解性有機物の分解（浄化作用）に大きく寄与していることが示唆されていた。しかし、どのような分類群の生物がこの過程にどの程度関わっているのか、不明な点が今もって多い。今回の調査で大阪湾沿岸にある2つの干潟（図1）に生息するマクロベントスのセルラーゼ活性を網羅的に調べた結果、採取した全種においてセルラーゼ活性が確認された。調査した種類にいままでセルラーゼ活性に関する報告がない種も多く含まれていた（表1、先行研究列参照）。また、両干潟に優先的に生息するマクロベントスの安定同位体分析を行った結果、これらの動物はセルラーゼ活性を持つだけの単なる「保有者」ではなく、陸上植物や干潟植物由来の有機物を実際に利用している「分解実行者」でもあることが明らかになった。今回の調査では採取したマクロベントス全種の安定同位体分析を行うことができなかったが、これらの動物の多くが大阪湾沿岸部の浄化機能（植物由来有機物の分解）に関わっている可能性が高いと考えられる。

一方、メイオベントスも干潟浄化機能の有力な貢献者であることが先行研究によって報告されている。しかし今回の調査では、両干潟の底泥にメイオベントスの存在が確認できなかった。この結果の意義を明らかにするためには今後大阪湾沿岸部の広域的な探索が必要である。

また、微細藻類では今回の調査で調べた6種の珪藻（うち3種は浮遊性、3種は底生性）にセルラーゼ活性が認められなかった。少なくとも大阪湾に生息する微細藻類にセルラーゼ活性が普遍的には存在しないことが明らかになった。今後は大阪湾に生息する他の微細藻類種にも注意を払うが、セルラーゼ活性（別地域を含む）が認められる種類が出現しない限り、大阪湾での網羅的な調査は不要と考える。

[参考文献]

- 高井則之、三島康史、星加章、吉原喜好。炭素・窒素安定同位体比分布から推察した安芸灘に生息する底生動物群集の炭素供給源. 水産海洋研究 67(3):148-162 (2003) .
- 土居内龍、安江尚孝、竹内照文、山内信、奥山芳生、諏訪剛、向野幹生、小久保友義、芳養晴雄。炭素・窒素安定同位体比に基づく紀伊水道におけるタチウオとその他の底生魚類の炭素源の比較. Nippon Suisan Gakkaishi 77(2):205-214 (2011).

埋立てに伴う地形改変が大阪湾内部生産有機物の堆積過程に与える影響評価(その3)

代表研究者：秋山諭

大阪府立環境農林水産総合研究所水産研究部・研究員

共同研究者：上田真由美¹⁾，田中咲絵¹⁾，横松宏幸¹⁾，中谷祐介²⁾，西田修三²⁾

¹⁾ 大阪府立環境農林水産総合研究所，²⁾ 大阪大学大学院

1. 研究目的

内湾の水質管理や持続的な水産資源の利用のためには，有機物動態の把握が重要である。大阪湾では，生産された有機物は湾内に堆積するとともに，海水流動で沖合，湾外へ輸送される。一方，海面埋立てによる地形改変は，流動を変化させることが指摘されており，湾内で生産された有機物や河川由来懸濁物の挙動や堆積分布の変化が予想される。過去2年にわたり，本助成事業により，大阪湾での広域および湾奥港湾域での調査を行い，表層堆積物の空間分布や鉛直変化を調査した。また，既往知見を整理し，高度経済成長期以後の有機物や重金属の堆積状況について解析を行った。

本年度は，埋立地造成のために浚渫された海底窪地を対象に，層状採取した底質の有機物および重金属の組成・分布を調べ，内部生産有機物の堆積分布を明らかにするとともに，数値シミュレーションによる堆積計算を実施する。

2. 研究方法

2. 1. 浚渫窪地における海底堆積物の分布特性

大阪湾に点在する浚渫窪地のうち9か所に調査地点を設け(図1)，夏季に船上から採泥器により採集した海底表層堆積物について，粒度組成項目(含水率，中央粒径値 $Md\phi$ ，淘汰度 σ_1 ，歪度 Sk_1)，有機物項目(TOC，TN，C/N比， $\delta^{13}C$ ， $\delta^{15}N$)，金属元素項目(Li，Cr，Mn，Ni，Cu，Zn，Mo，Cd，Pb)を測定した。また，阪南沖窪地内に位置する1地点について，堆積物表面から34 cm深までの試料について放射性鉛(^{210}Pb ， ^{214}Pb)による年代測定を行った。

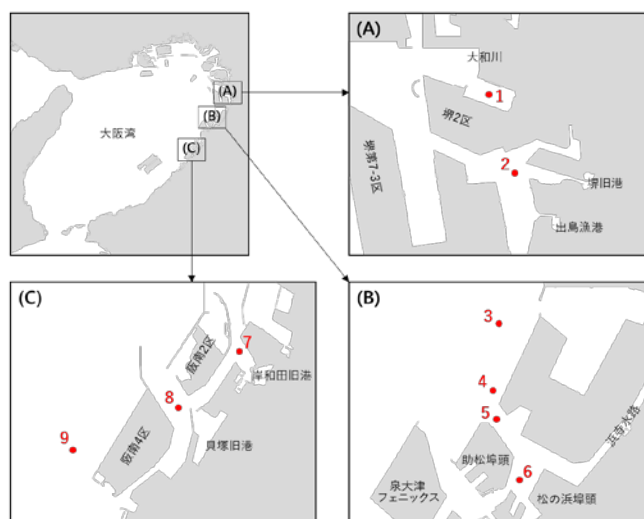


図1 堆積物採集地点

2. 2. 数値シミュレーションによる地形改変に伴う有機物堆積過程の変化推定

大阪湾全域を計算領域とし，流動モデル ECOMSED と物質循環モデル RCA により表層クロロフィル *a*，底層溶存酸素濃度，内部生産有機物の堆積過程を，現在地形および過去地形(1930年代)のそれぞれで計算した。懸濁態有機物の沈降速度を 0.5 m/日，1.0

m/日, 1.5 m/日の3パターンで設定し, 堆積フラックスの変化を解析した。

3. 結果と考察

3. 1. 海底窪地における海底堆積物の分布特性

堺泉北港周辺に位置する St. 1~6 では, 調査時には海底から周辺水深付近まで溶存酸素濃度が 0.1 mg/L を下回る無酸素状態であった。過去2年の調査結果と比較すると, 海底窪地内の堆積有機物量(TOC, TN)は多く(図2), 湾奥の強閉鎖性の海域よりも有機汚濁が進んでいた。大和川に近い St. 1 では, 陸域由来有機物の影響が見られ他地点と比較して $\delta^{13}\text{C}$ が小さく, C/N 比が大きかった。鉛直分布を見ると, 同地点の中層に有機物量や金属濃度の特徴的な層が見られ, 近傍にある生物共生型護岸や人工干潟の造成等の影響が示唆された。

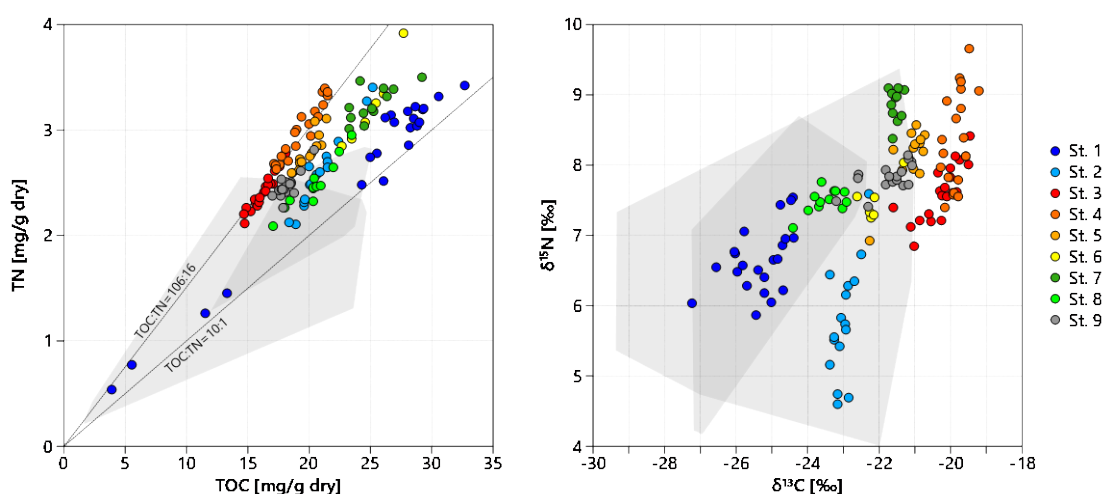


図2 表層堆積物中の TOC と TN の関係および $\delta^{13}\text{C}$ と $\delta^{15}\text{N}$ の関係。陰影部は過去2年の調査結果(大阪湾広域, 湾奥港湾部)の範囲

また, 阪南4区沖に位置する St. 9 は比較的開放度が高いことから, 有機物や金属の堆積量は少なかった。一方で, この地点での堆積速度は 4.44 cm/年と非常に大きく, 大阪に大規模な被害をもたらした台風第1821号等の影響が示唆された。

3. 2. 数値シミュレーションによる地形改変による有機物堆積過程の変化推定

過去地形と現在地形では表層クロロフィル *a* の水平分布に大きな違いが出ており, 地形改変による流動の変化が生物生産場を変化させていることが示された(図3)。過去地形では西宮~須磨海岸および神戸の南方にクロロフィル *a* の高濃度帯が形成され, 縁辺部が現在の関西空港付近から西部に伸びていたが, 現在地形では高濃度域は六甲アイランド周辺や堺港内などの強閉鎖性の海域にとどまった。一方で, 堆積フラックスではクロロフィル *a* の分布のような顕著な差は見られず, 沈降速度を変化させた場合でも概ね湾北東部の沿岸に集積する結果となった(図4)。これは, 沈降時間の長短による残差流輸送の差よりも, 下層を岸側に輸送されるエスチュアリー循環による輸送が堆積有機物の分布の支配要因となっていることが原因であると考えられる。

本研究の計算でも，平成 29 年度に実施した計算結果と同様，現地観測で得られた堆積有機物濃度の分布形状とは一致しなかった。堆積物中の有機物濃度は，鉱物粒子の他の粒子状物質との相対的な割合であることから，比重や供給源の異なる両者それぞれの堆積速度が現場での濃度に寄与する。平成 30 年度の港湾部，本年度の海底窪地での堆積速度測定から，ごく沿岸部では沖合と比べて堆積速度がかなり大きいことが推定された。埋立地や浚渫窪地という閉鎖的な海域の創出により，沿岸域での鉱物粒子の堆積速度が大きくなることで，相対的な堆積有機物量が減少し，計算結果とは異なる堆積有機物分布となった可能性が示唆された。

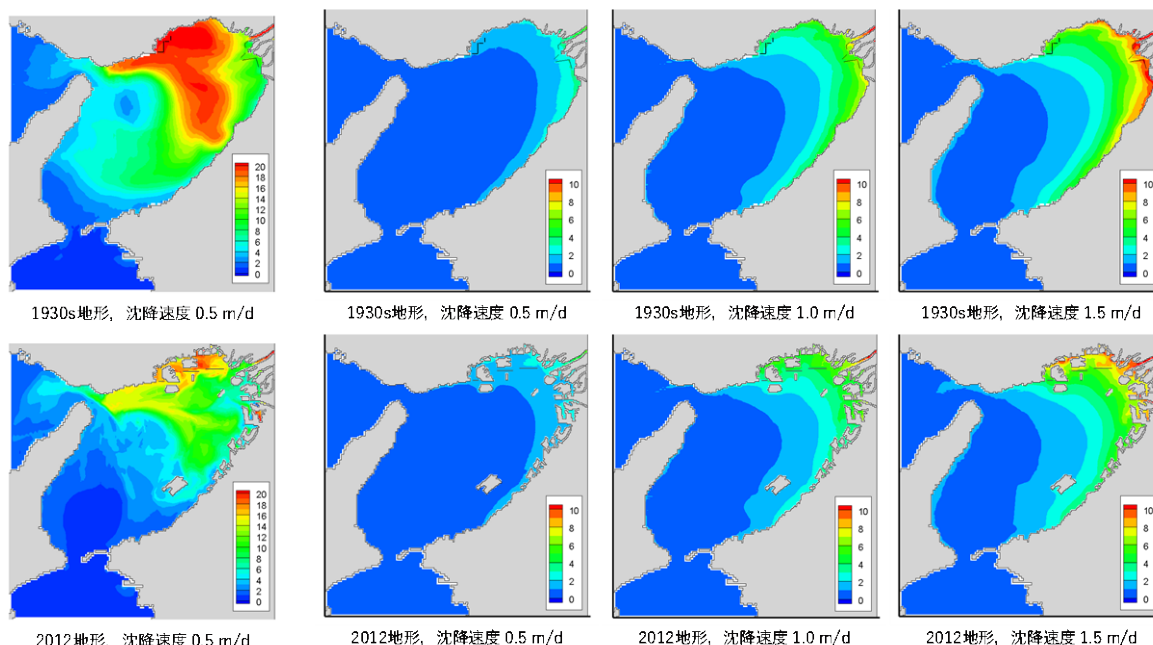


図 3 表層クロロフィル *a* ($\mu\text{g/L}$) の水平分布

図 4 地形および沈降速度を変化させた場合の POM の堆積フラックス ($\text{g/m}^2/30 \text{ 日}$) の水平分布

4. 結論

過去 2 年の大阪湾広域および湾奥港湾域調査に加える形で，大阪湾に点在する浚渫窪地で堆積物調査を行った。その結果，海底窪地には湾奥港湾部よりも有機物が多く堆積し，貧酸素・無酸素化の重要な要因となっていることが示唆された。3 か年で実施した本研究に基づき，海面埋立てとそれに伴う浚渫による有機物の堆積や海底環境の変化についてまとめる。

共同研究者の中谷らの先行研究により，埋立地の造成による地形改変が大阪湾の流動やクロロフィルの分布を変化させていることが推定されており，本研究でも出水イベント時の懸濁物の分布の変化などを指摘した。また，シミュレーションの結果，埋立地の造成により堆積分布には劇的な変化は見られなかったものの，流動と生物生産場の変化により強閉鎖性海域で堆積フラックスの増加，中南部海域でフラックスの減少が見られた。ただし，既往調査結果によると，現場サンプリングレベルでは一部海

域で粒度組成の変化などが指摘されているものの、1970年代降では広域的には明確な変化は見られなかった。有機物の高濃度分布域は、粒径の小さな泥底が広がっており、比較的軽量で流動の影響を受けやすい粒子が堆積していると考えられる。そのため、海水表層の流速の大きな流れの変化だけではなく、再懸濁・再堆積を踏まえた検討が今後求められる。ただし、これらの調査は汚濁が問題視され、改善策が施され始めてから実施されたもので、汚濁が進捗する様子や汚濁ピーク時の状況を把握するには至らなかった。また、埋立地によって形成された強閉鎖的な海域では、周辺と比較して有機物や河川由来の土砂を堆積しやすい環境が形成されていることを示唆した。一方、浚渫によってできた海底窪地では、流動の制限により、夏季には無酸素水に占められ、有機物の底生生物による消費や好気性微生物による活発な分解は期待できない。本調査結果でも、窪地内に堆積している有機物は湾奥港湾部や広域的な高濃度域よりも多く、汚濁が進んでいた1970年代の高濃度域に匹敵する濃度であった。これは生物生産場の中心である湾奥から離れた窪地でも同様であったことから、海底窪地は有機物の堆積を促進させるだけではなく、分解や再懸濁を阻害し、有機物の貯留地としての側面が強いことが示唆された。これらの結果をまとめると、埋立てとそれに伴う地形改変により、①物理的な流れの変化、②生物生産場の変化、③生産された有機物の堆積場所の変化、④堆積後の分解・輸送・拡散の変化、および本事業内では検証には至らなかったが、⑤栄養塩溶出・溶存酸素消費の変化がもたらされると考えられる。

近年、陸域負荷の減少に伴い海域の栄養塩濃度が低下したことにより、富栄養環境時には認識されてこなかった栄養塩類の分布の偏りが指摘されている。港湾部等の閉鎖的な海域には栄養塩が滞留するが、沖合に出るとすぐに植物プランクトンに消費され、大阪湾の南西部に十分に届かず、藻類養殖や魚類生産等への影響が指摘されている。本研究結果から、堆積有機物についても同様の問題が示唆され、地形改変によって生じた閉鎖性海域や浚渫窪地内に堆積した有機物が消費されることなくその場に留まる。その結果として、底生生態系の基礎となる堆積有機物の減少、また分解により再度水柱に供給される栄養塩の減少に繋がり、大阪湾全体の生物生産にとってはマイナスに働いている可能性が高い。

現在、国土交通省を中心に大阪湾の海底窪地の埋戻しが検討され、阪南2区沖の窪地では実際に埋戻しが実施されている。港湾整備の観点から、周囲の水深と全く同じになるまでの埋戻しはできないが、水深差が縮まることで、無酸素状態の解消しやすさが向上し、海底に堆積した有機物の除去、生物生息環境の改善につながることを期待される。