

## 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 7日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21360249

研究課題名（和文）底生微細藻類の浅海域物質循環に果たす役割の解明と環境保全への応用

研究課題名（英文）Effect of Benthic Microalgae on Microbial Loop in Intertidal Flat Ecosystem

研究代表者

西村 修（NISHIMURA OSAMU）

東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：80208214

研究成果の概要（和文）：本研究では、底生微細藻類の働きがバクテリア群集および浅海域堆積有機物に及ぼす影響について検討した。脂肪酸とその安定同位体比を用いて食物連鎖を解析したところ、底生微細藻類の光合成は脂肪酸のうち難分解成分である長鎖脂肪酸の分解を促進させることが確認された。長鎖脂肪酸は比較的難分解性である陸上植物のバイオマーカーであり、底生微細藻類の光合成によって分解成分の分解が促進され、微生物ループを介した腐食連鎖の強化がもたらされることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Laboratory incubation experiments were carried out to evaluate the effect of benthic microalgal photosynthesis on microbial loop in intertidal flat ecosystems. The results showed that the decomposition of long chain fatty acids, which are comparatively refractory components in sediment organic matter, was promoted resulting from benthic microalgal photosynthesis. Furthermore, the stable isotope ratios of not only bacterial fatty acid but also diatom fatty acid were decreased clearly. Therefore, it was considered that benthic microalgal photosynthesis enhanced detritus food chain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：底生微細藻類，浅海域，物質循環，安定同位体，脂肪酸

## 1. 研究開始当初の背景

環境省が行った自然環境保全基礎調査では、昭和20年代から全国の約4割の干潟が消滅したことが報告されている1)。しかし近年、地球温暖化問題、生物多様性の危機などを背景に現代社会の持続可能性が問題視されており、干潟を含めた自然生態系の持つ多面的

な機能の活用による低炭素化、生物多様性保全に注目が集まっている。そして、1999年に環境影響評価法、2003年に自然再生促進法が施行されたことを契機に、干潟生態系機能の定量的な把握を目的としての研究や、干潟の保全・再生・創出の取り組みが全国でより一層活発に行われている。

水域において有機物は生物の餌源として重要であるとともに、過剰な有機物は汚濁の原因となることや貧酸素化を招くことから、干潟域を含めた沿岸域全体の環境保全にあたって、干潟生態系の有機物フローを把握することは重要である。干潟生態系は、物理・生物・化学的プロセスが物質循環に複雑に影響する場所であり、浮遊系と底生系が密接に関係した複雑な有機物の流れが存在している。なかでも、生物の密度が高く物質の同化・異化が活発に行われていることから、生物を介した有機物フローは干潟の浄化機能にも関わる重要な過程である。生物を介した有機物フローには、生食食物連鎖、腐食食物連鎖の他に、溶存態有機物を細菌群集が利用することを起点とした連鎖系として、1980年代に確立された概念である微生物ループ2)が存在する。一般的に干潟底泥には珪藻類が高密度に優占3)し、粘液質の細胞外有機物を生産する。Middelburg et al.4)はMolenplaat干潟において13Cによるパルス・チェイス実験を行い、底生微細藻類により固定された炭素の行方を追跡した結果、バクテリアに移送される炭素量が底生動物より5倍多いことを指摘している。また、Aller and Aller5)は、干潟底生系における有機物の分解に果たす役割は、バクテリアによるものがマクロベントスと比較して大きいと報告している。このように、干潟では、3つの食物連鎖網が互いに作用する中で、物質・エネルギーフローの量的な面において、生食食物連鎖よりも腐食食物連鎖と微生物ループが重要な経路になっている。しかし、底生微細藻類による微生物ループを介した有機物フローが、底質環境へどのような影響をもたらしているのか十分にわかっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、脂肪酸とその安定同位体比というツールを用いて、底生微細藻類の働きがバクテリア群集に与える影響、さらに、それが底質環境に及ぼす影響について検討した。

## 3. 研究の方法

2011年7月に図-1に示した七北田川河口干潟の砂質地点から通常好気層が形成されていること、また底生微細藻類が光合成を行う層であることを考慮して底質の表層5mmを採取し、現地水も合わせて採取し持ち帰った。実験室で直ちに干潟堆積物をバケツのなかでよく攪拌し、内径105mm×高さ25mmのシャーレーに注入した。このとき堆積物の深さが5mm程度、水位が堆積物の直上5mmとなるように現地水を注入し、これを培養試料とした。

培養は明培養系と暗培養系の2系列(n=5)で行った。明培養系では培養期間中照度5,000luxの光を照射し続けた。暗培養系では

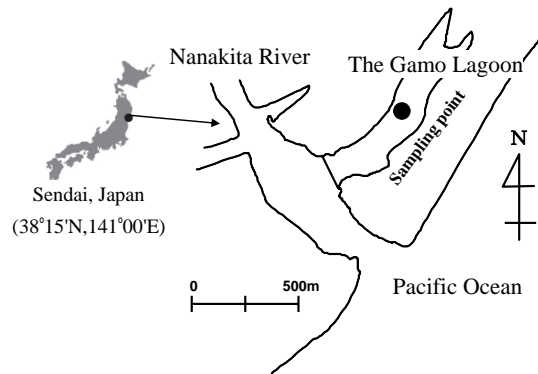


図-1 サンプルング地点

シャーレー周囲をアルミ箔で覆って遮光した。各系とも培養期間中インキュベーター内の温度を $20 \pm 1^\circ\text{C}$ に保ち、蒸発する直上水を補うために定期的に蒸留水を注入して水位を維持した。培養は48日間行い、開始以降0, 1, 3, 6, 12, 24, 48日後に明・暗各培養系から底質試料を回収し、TOC、クロロフィルa、脂肪酸組成、脂肪酸-安定同位体比を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) クロロフィルa量の経時変化

図-2に明・暗各培養系におけるクロロフィルa量の経時変化を示す。明・暗各培養系で時間の経過とともにクロロフィルa量が減少しており、特に暗培養系において減少量が特に大きかった。明培養系では光が照射されているにもかかわらず、底生微細藻類が減少したことが確認された。実験系を構築するにあたって、底生微細藻類のはたらくによる影響をよりわかりやすく比較するために、明培養系では48日後でも培養前と同程度の底生微細藻類量を維持するように実験条件を設定した。しかしながら、実際には明培養系と暗培養系のクロロフィルa量の差は小さく、底生微細藻類の影響を評価するには十分な実験系が構築できていなかった可能性もあり、データの解釈にはそのことを考慮する必要がある。なお、明培養系においてクロロフィルa量が減少した原因としては、底生微細藻類が干潟環境で受けていた光量と比較して実験系では十分でなかった可能性が考えられた。

### (2) TOCの経時変化

図-3に明・暗各培養系における底質中の全有機炭素量(TOC)の経時変化を示す。明・暗各培養系において培養開始から48日後まで、TOCはわずかに減少傾向がみられたものの、各系間に顕著な差はみられなかった。TOCは、バクテリア、底生微細藻類、デトリタスに由来する炭素に分けることができる。脂肪酸量の変化から(後述)、培養期間中にバクテリアの現存量は各系間で差がなかったものと仮定すると、藻類由来の炭素量をChl. a:C=1:306をもとに算出しTOCから藻類

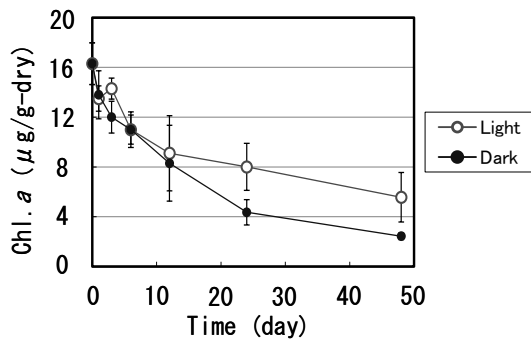


図 - 2 底質中のクロロフィル a 量の経時変化

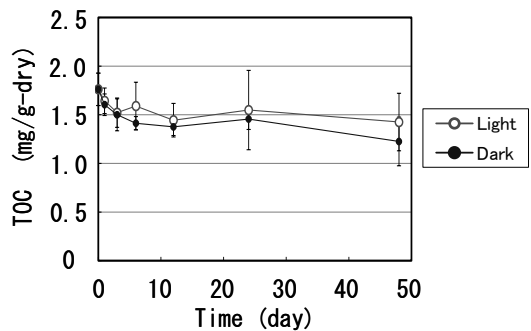


図 - 3 底質中の TOC の経時変化

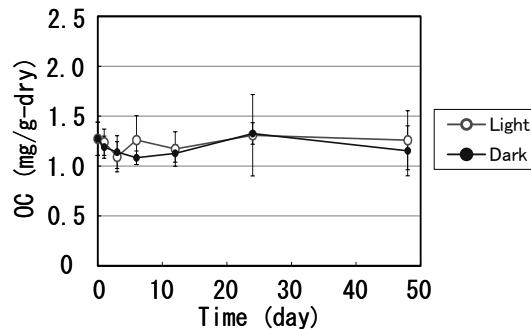


図 - 4 藻類由来炭素量を除いた有機炭素量の経時変化

炭素量を差し引くことで、堆積物中のデトリタス量の経時変化を把握できると考えられる。この結果を図 - 4 に示す。これより、デトリタスは培養期間中ほぼ減少していない可能性が示された。つまり、採取した砂質干潟の堆積有機物は、大部分が難分解性成分のデトリタスであるためにほとんど分解されず、量的にわずかな易分解性有機物である底生微細藻類由来有機物が分解されていたものと考えられる。

Dai et al. 7) は、暗条件の室内実験において、河口域生態系における海洋珪藻、塩性湿地植物、陸上植物の微生物による分解性を比較した。その結果、これらの有機物は分解速度や最終的な分解量に差はあるものの、新鮮なものであればどれも 50-70% 程度は分解されることを示した。これは本研究において、新鮮な有機物である底生微細藻類由来有機物のみが分解され、デトリタスが分解されな

かった結果と一致する。また、武地は 8)、干潟堆積有機物は酸素を供給しただけでは分解されない比較的難分解性の有機物であることを報告している。これもまた本研究において、干潟デトリタスがほぼ分解されなかった結果と一致する。

以上より、底生微細藻類由来有機物のみが分解されていたと考えられ、バクテリアの資化は底生微細藻類の生産に依存しており、底生微細藻類にはバクテリアの現存量を維持する役割があることが考えられた。そして、デトリタスの分解性の結果から、干潟底質には干潟生態系における生物による同化・異化過程の中で利用されずに残った残渣のような難分解性の有機物が主に蓄積していることが考えられた。また、底生微細藻類の光合成が、干潟デトリタスの分解に及ぼす量的影響はほとんどないことがわかった。しかしながら、底生微細藻類の光合成がバクテリアの活性に影響を与え、それにより堆積有機物の分解に及ぼされる影響は、一般的に、底生微細藻類およびバクテリアの現存量が多い環境ほど大きくなるものと考えられる。本研究では底質試料として砂質干潟のものを用いたが、泥質干潟の底生微細藻類およびバクテリアの現存量は、砂質干潟の数倍以上におよぶ 9)、10)。よって、泥質干潟における影響に関しては、更なる検討が必要である。

### (3) 脂肪酸組成

各バイオマーカー脂肪酸の量的な経時変化について図 - 5 に示す。これより、珪藻類のバイオマーカー脂肪酸 (20:5n3) は、48 日間の培養によって両培養系において減少が確認された。干潟底質には一年を通して珪藻が優占する 3) ことが知られており、20:5n3 は底生微細藻類の指標となる。両培養系において、48 日間の培養によって珪藻のバイオマーカー脂肪酸の減少が確認されたが、暗培養系でより減少量が多かった。このことから、両系において培養前から珪藻は減少したものの、明培養系では暗培養系に比べてわずかに増殖したものと考えられ、クロロフィル a のデータと一致する結果となった。バクテリアのバイオマーカー脂肪酸 (15:0, 18:1n7, a-15:0, i-15:0, a-17:0, i-17:0) は、48 日間の培養によって両培養系において減少が確認されたが、各系間で減少量に差はみられなかった。これより培養 48 日後においてバクテリアの現存量に、各系間の差はないものと考えられる。渦鞭毛藻類および緑藻類のバイオマーカー脂肪酸は、培養前後においてごく少量しか検出されなかった。陸上植物のバイオマーカー脂肪酸 (LCFAs) は、48 日間の培養によって両培養系において減少が確認された。また、明培養系で暗培養系と比較して有意な LCFAs の減少 ( $p < 0.01$ ) が確認された。陸上植物由来有機物は藻類由来有機物

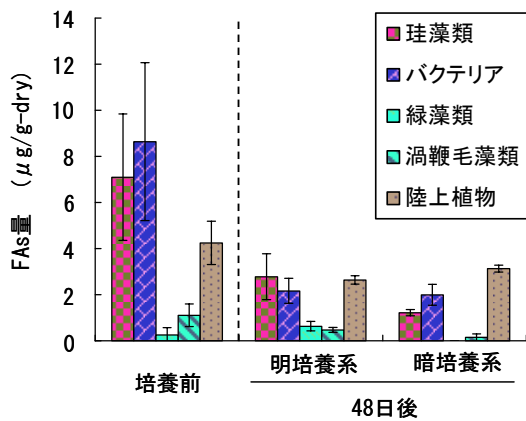


図 - 5 培養前後における各バイオマーカー脂肪酸量

と比較して分解速度が小さいことが知られており 11), 干潟に堆積する有機物の中で比較的難分解性のものと考えられる。つまり, 明培養系では底生微細藻類が光合成を行った結果, LCFAs のような比較的難分解成分の分解が促進されたものと考えられた。デトリタスの分解量に差がなかったにも関わらず LCFAs の分解量に差がみられたのは, LCFAs はデトリタスの中では比較的易分解性成分であったため, また, 底質乾燥重量当たりの LCFAs 量と TOC を比較すると, LCFAs は TOC の 500 分の 1 程度であるので, LCFAs の減少量の差がデトリタスの分解量の差に反映されなかったためと考えられた。

以上の各バイオマーカー脂肪酸とその他の脂肪酸を合わせた全脂肪酸の量的な変化を図 - 6 に示す。これより, 両培養系において 48 日間の培養における全脂肪酸量の減少が確認され, 暗培養系の方で減少量が多かった。培養前後における全脂肪酸量の減少と TOC の変化との関係について, 底質乾燥重量当たりの全脂肪酸量と TOC を比較すると, TOC に占める脂肪酸由来炭素量は 5%以下と考えられた。よって, 培養前後での全脂肪酸量の減少が TOC には反映されなかったものと考え

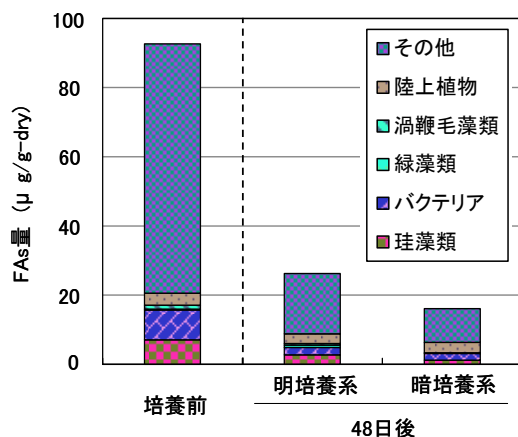


図 - 6 培養前後における底質中の全脂肪

られた。また, 培養後における各系間の減少量の差について, これは珪藻由来とその他脂肪酸による差が反映されているものであるが, 珪藻は光合成の過程で 20:5n3 だけでなくその他脂肪酸に分類される脂肪酸も多く合成する。よって, 珪藻の光合成による脂肪酸の生産が, 培養後における各系間の全脂肪酸量の差にあらわれたものと考えられた。

培養前後における底質の脂肪酸組成の変化を図 - 7 に示す。これより培養の結果, 明・暗各培養系において底質の脂肪酸組成が変化した。これは, すなわちさまざまな起源の有機物は分解性が異なることを示している。特に全脂肪酸に占める陸上植物のバイオマーカー脂肪酸の割合が大きくなっている。これは, 陸上植物由来有機物は藻類由来有機物などと比較して分解されにくい成分であるという既往の知見と一致する結果である。さらに全脂肪酸に占める LCFAs の割合の増加が暗培養系で明培養系より大きいことから, 脂肪酸組成の観点からも, 明培養系では底生微細藻類の光合成によって, 堆積有機物の難分解成分の分解が促進されたことが示された。

#### (4) 脂肪酸-安定同位体比の経時変化

脂肪酸-安定同位体比は, バクテリアのバイオマーカー脂肪酸である 15:0 と, 珪藻類のバイオマーカー脂肪酸である 20:5n3 について測定した。バクテリアのバイオマーカー脂肪酸には 15:0 だけではないが, GC/IRMS で脂肪酸を分離・同定し, 安定同位体比を測定する際に, 15:0 以外の脂肪酸を完全に分離することができなかった。そのため, 本研究では 15:0 のみをバクテリアのバイオマーカー脂肪酸として使用した。また, 珪藻類のバイオマーカー脂肪酸 20:5n3 は, 底生微細藻類の指標として用いた。

図 - 8, 9 に明・暗各培養系における底質中の脂肪酸 15:0 および 20:5n3 の安定同位体比の経時変化を示す。15:0 の安定同位体比は 12 日目まで両培養系において低下し, それ以後, 明培養系ではさらに低下したものの, 暗培養系では上昇が確認された。48 日後で明・暗培養系間の比較において, 安定同位体比が有意に

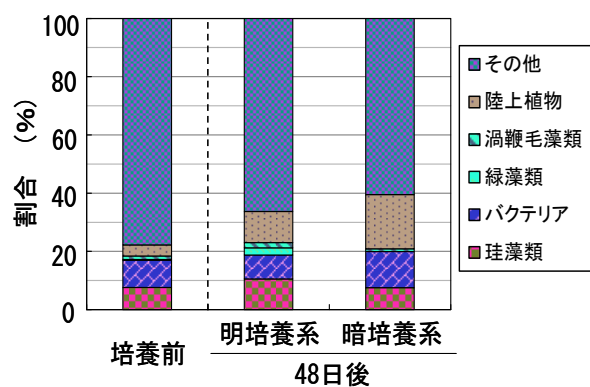


図 - 7 培養前後における底質の脂肪酸組成

異なることから、バクテリアの資化基質に差異があることがわかった。この原因の一つとして、明培養系における LCFAs の分解促進が考えられる。LCFAs は-30%以下の低い安定同位体比をとることが知られている 12)。明培養系でバクテリアが暗培養系と比較してより多くの LCFAs を資化基質として利用したために、各系間の同位体比の差が生じたものと考えられた。また、図-9 からわかるように、珪藻のバイオマーカー脂肪酸 20:5n3 も明培養系において同位体比の低下が確認された。藻類由来有機物もバクテリアの基質となっていると考えられるため、明培養系における 15:0 の同位体比の低下は 20:5n3 の同位体比を反映している可能性も考えられた。明培養系における 20:5n3 の同位体比の低下は、LCFAs 分解の促進によりバクテリアの異化作用によって低い同位体比の CO<sub>2</sub> が放出され、それを珪藻が利用したために生じた可能性が考えられた。

よって、底生微細藻類の光合成により、LCFAs の分解が促進され、その結果放出された CO<sub>2</sub> を底生微細藻類が利用し、それをまたバクテリアが分解するというような炭素循環を生み出している可能性が考えられた。

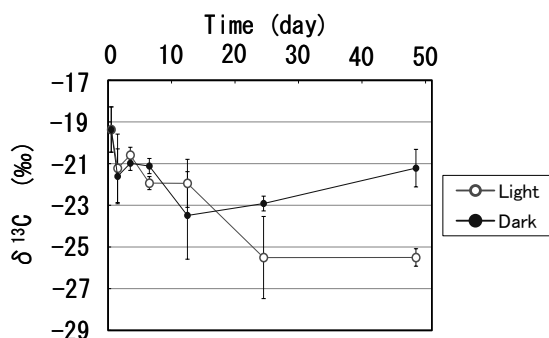


図-8 脂肪酸 15:0 の安定同位体比の経時変化

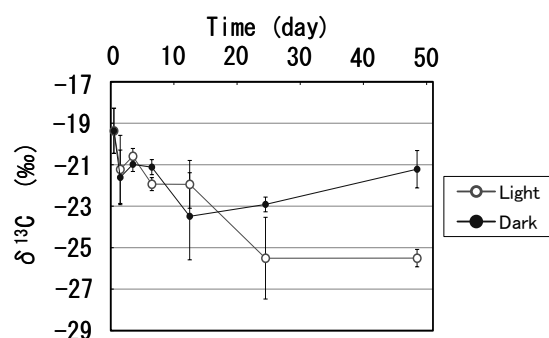


図-9 脂肪酸 20:5n3 の安定同位体比の経時変化

## 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 7 件)

1. Woo-Seok SHIN, 藤林 恵, 長濱祐美, 野村宗弘, 西村修, 干潟に堆積する有機物の起源およびバクテリアによる利用性、日本水処理生物学会誌、印刷中、2012。(査読有り)
2. Woo-Seok SHIN, Megumu FUJIBAYASHI, Munehiro NOMURA, Kazunori NAKANO, Osamu NISHIMURA, Fatty Acid Composition between *Nuttallia olivacea* and *Hediste* spp. in the Nanakita Estuary, Japan: Estimation of Food Sources, Journal of Water and Environment, 10(1), 11-22, 2012。(査読有り)
3. 阿久津正浩, 武地修一, SHIN Woo-Seok, 野村宗弘, 中野和典, 西村修 底生微細藻類の光合成が干潟堆積有機物の分解に及ぼす影響、環境工学研究論文集 47、237-242、2010。(査読有り)
4. SHIN Woo-Seok, 藤林恵, 長濱祐美, 野村宗弘, 中野和典, 西村修、河口干潟における二枚貝とゴカイの餌源の季節変動、環境工学研究論文集 47、223-228、2010。(査読有り)
5. W. S. Shin, Y. D. Lee, M. Fujibayashi, Y. Nagahama, M. Nomura and O. Nishimura, The Origin of Sediment Organic Matters at Tidal Flat in Estuary (in Korean), Journal of the Korean Society of Environmental Engineers, 32(1), 1177-1184, 2010。(査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

1. 阿久津正浩, 慎 祐爽, 野村宗弘, 中野和典, 西村修, 底生微細藻類の光合成が干潟好気性微生物の代謝に及ぼす影響、日本水処理生物学会誌、2011年11月17日、大津市。
2. 阿久津正浩, 武地修一, 慎 祐ソク, 野村宗弘, 中野和典, 西村修、底生微細藻類による細胞外有機物の生産が干潟堆積有機物分解に与える影響、日本水処理生物学会、2010年11月18日、つくば市

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 修 (NISHIMURA OSAMU)

東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：80208214

(2) 研究分担者

野村 宗弘 (NOMURA MUNEHIRO)

東北大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：70359537