

令和元年5月18日現在

機関番号：82124

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：16K21616

研究課題名（和文）底生生態系におけるMicrocystisの分解過程と餌資源としての役割

研究課題名（英文）The role and decomposition process of Microcystis in benthic ecosystems

研究代表者

名尾 祐美（長濱祐美）（Yumi, Nao）

茨城県霞ヶ浦環境科学センター（湖沼環境研究室、大気・化学物質研究室）・湖沼環境研究室・技師

研究者番号：00618506

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,400,000円

研究成果の概要（和文）：霞ヶ浦では藍藻類の植物プランクトンであるMicrocystisを主とするアオコが夏季に発生することがあるが、生態系に与える影響については不明である。本研究では、湖底表層に堆積したMicrocystisの分解と、底生動物による同化に着目して研究を行った。その結果、底泥とともに沈降したMicrocystisは生物的分解を受けて減少したが、Microcystisに含まれていた炭素と窒素は底泥中にとどまっていると示唆された。また、ユスリカ幼虫、ドブガイ、マシジミを対象にした摂食実験も行った。今後はこれらの分析を進め、底生生物によるMicrocystis由来有機物の取り込みについて明らかにしていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、湖水中で増殖したMicrocystisが底泥中に堆積していること、また速やかに生物的分解を受けるが、Microcystis由来有機物が底泥中へとどまることが明らかになった。気候変動に伴う藻類の異常増殖は全国の湖沼やダム湖で懸念されており、本研究結果はそれらの湖沼におけるアオコの発生が底泥中に影響を与えている可能性もまた示唆している。今後、一次消費者である二枚貝や堆積物食者であるユスリカに対するMicrocystis由来有機物の移行明らかにすることで、Microcystisの発生が魚類を中心とした湖沼生態系に与える影響を検討する際の有効な知見を提供できるだろう。

研究成果の概要（英文）：Cyanobacterial blooms, especially Microcystis spp., cause problems such as deteriorating visual appearance or bad smells at Lake Kasumigaura. Moreover, previous research suggested that cyanobacteria blooms occur more frequently because water temperature and solar radiation rise with time due to climate change. In this study, we focused on decomposition process and role to benthic food webs of Microcystis cells in lake sediments. Our results suggested that Microcystis cells in the water settled with suspended solid and that Microcystis cells in sediments decomposed anaerobically 26 days after. Furthermore, we feeding experimented of benthos, Chironomidae, Sinanodonta spp. and Corbicula leana to clarify the role of organic matter of Microcystis. We will more analyzed these benthos sample and we more clarify to the role of organic matter of Microcystis as food of these benthos.

研究分野：水環境

キーワード：Microcystis 藍藻類 アオコ 底泥 分解 食物網 ベントス 二枚貝

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

茨城県南部に位置する霞ヶ浦は、西浦、北浦、外浪逆浦などの水域から構成され、湖面積 220 km²、平均水深 4m の浅くて広い湖である。1970 年代より植物プランクトンの *Microcystis* が大量に増殖し、アオコを形成することがある。アオコの発生は、景観の悪化や悪臭の発生をもたらすことから問題視されている。茨城県では栄養塩流入負荷の削減に向けて努力してきたが、市街地と農地に面する霞ヶ浦では、排水処理の困難な面源汚濁負荷が大きく、削減が難しい。現在も、アオコを形成するには至らないものの、夏季には *Microcystis* が増殖しており、その増殖要因として気温の影響が大きいことが明らかとなっている（大内ら, 2013）。日射量と気温の上昇がダム湖水質へ与える影響を検討した梅田ら（2012）の研究を鑑みれば、今後の気候変動に伴い、霞ヶ浦でも *Microcystis* の増殖が拡大する可能性が考えられる。

花里（1989）は、藍藻類は動物プランクトンの餌として適していないと記しているが、一方で、いくつかの研究ではミクロキスティス属の由来物質が食物連鎖に取り込まれていることが示されている。その経路については不明であったが、Kluijver et al. (2012) の調査・実験によって、*Microcystis* は分解されることで動物プランクトンへ与える影響が大きくなることが示された。また、申請者らのこれまでの研究で、霞ヶ浦全域の底泥に *Microcystis* が堆積していることが示唆された（長濱ら, 2016）。このことは、*Microcystis* を主とするアオコの発生が将来にわたり継続、または高頻度化することによって、底生生態系へ与える影響が増大する可能性を示している。しかしながら、湖底に堆積した *Microcystis* の分解特性や、生態系への影響については不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、底泥中に堆積した *Microcystis* の分解特性と、生態系への影響を明らかにすることである。本研究では 2 つの実験によって、分解特性と生態系への影響を検討した。一つ目は *Microcystis* の分解特性解明のための実験である。炭素・窒素安定同位体比と残存 DNA 量から分解特性を明らかにした。さらに、水質分析を行うことで、湖水へ与える影響についても推定した。二つ目は、*Microcystis* 由来有機物が底生生態系へ与える影響解明のための実験である。底泥の摂餌が想定される堆積物食および懸濁物食の底生動物を対象に、*Microcystis* 分解物を餌源として供した摂餌実験を行い、底生動物体組織の炭素・窒素安定同位体比や脂肪酸組成の変化から、底生動物における *Microcystis* 由来有機物の同化を検討した。

3. 研究の方法

(1) *Microcystis* のラベリング

分解試験ならびに摂食試験の際に *Microcystis* 由来有機物をトレースするため、Kluijver et al. (2012) の研究を参考に *Microcystis* を ¹³C と ¹⁵N で標識した。実験に用いた *Microcystis* 群集は、2017 年 7 月に霞ヶ浦（北浦）で表層水ごと採取したものを扱い、4℃で実験まで 4 ヶ月間保管した。この群集が *Microcystis* を主とする群集であることは、顕微鏡を用いて目視確認した。標識のための培地には ¹³C と ¹⁵N を含む MA 培地を用いた。MA 培地構成成分の KNO₃ の代わりに ¹⁵N-KNO₃ を用い 10 mg / mL になるように添加した。普通、MA 培地には炭素源を添加しないが、本研究では ¹³C-NaCO₂ を終濃度 200 mg / L になるように添加した。MA 培地の pH は、1N の HCl と NaOH を用いて 8.6 に調整した。

保管した *Microcystis* 群集は 3000 × g で 10 分間遠心分離を行い、湖水と分離した。得られた 500 mL の高濃度群集を ¹³C と ¹⁵N を含む MA 培地 2 L に添加して培養した。培養条件は 25 °C、1500 lux とし、60 rpm で弱く攪拌して、24 時間培養した。培養後の溶液は、3000 × g で 10 分間遠心分離して、MA 培地と *Microcystis* 群集とを分離し、¹³C と ¹⁵N で標識された高濃度 *Microcystis* 群集を 500 mL 得た。この標識された *Microcystis* 高濃度群集は、速やかに実験に用いた。

(2) *Microcystis* の分解実験

分解実験のため、標識された *Microcystis* 高濃度群集を霞ヶ浦で採取した湖水 4L と混合した。なお、得られた混合液の *Microcystis* 細胞濃度は 2.0 × 10⁷ Cells / mL であった。この混合液を、100 mL の三角フラスコに 100 mL 入れ、さらに霞ヶ浦で採取した底泥 20 mL を添加して、15℃の暗条件で培養した（以降 Case 1 と示す）。底泥の影響を検討するため、底泥を入れない系（以降 Case 2）を作成し、同条件で培養した。その後、定期的に水と泥を採取し、水温と溶存酸素濃度を測定した。採取ならびに測定は、実験開始直後、1 日目、2 日目、5 日目、12 日目、26 日目、54 日目に行った。採取された水と泥は -70℃で分析または利用まで、凍結保存した。

(3) *Microcystis* 泥の摂餌実験

実験に用いた底生動物は、ユスリカ幼虫 (*Chironomidae* larvae)、ドブガイ類 (*Sinanodonta* spp.)、マシジミ (*Corbicula leana*) であった。ユスリカ幼虫の採取は、霞ヶ浦の掛馬沖で 2018 年 6 月に行った。エクマンバージ採泥器で底泥を採取したのち、1mm 目のネットで篩って残ったユスリカ幼虫をピンセットでつまんで採取した。その後、霞ヶ浦で採取した底泥をおよそ 20 mL、

湖水を 80 mL 入れた 100 mL のトールビーカーに 10 匹ずつ投入し、1 週間に 2 度、およそ 0.4 g-dry の *Microcystis* 分解物を含む底泥を添加した。その後、2 週間、3 週間、4 週間後に生物および底泥を採取し、ユスリカ類幼虫は胃内容物を吐き出させる目的で 24 時間湖水のみを入れたビーカーで飼育した。採取された底泥と生物は、凍結乾燥させた後、 -70°C で分析まで保管した。

ドブガイ類とマシジミは、2018 年 10 月に採取した。採取場所は霞ヶ浦流入河川とその近郊の農業用水路であり、ジョレンを使って必要量を採取した。ドブガイ類は、霞ヶ浦で採取した底泥をおよそ 500 mL、湖水を 500 mL 入れた 1000 mL のビーカーに 3 匹ずつ投入し、1 週間に 1 度、およそ 0.5 g-dry の *Microcystis* 分解物を含む底泥を添加した。マシジミは、霞ヶ浦で採取された底泥をおよそ 100 mL、湖水を 200 mL 入れた 300 mL のビーカーに、4 匹ずつ投入し、1 週間に 1 度、およそ 0.2 g-dry の *Microcystis* 分解物を含む底泥を添加した。その後、2 週間後、4 週間後、8 週間後に生物および底泥を採取した。二枚貝については、斧足部を切り取って、分析試料とした。これらの試料は凍結乾燥させた後、 -70°C で分析まで保存した。

なお、*Microcystis* 分解物を含む底泥は、分解試験で得られた底泥を 24 時間以上凍結乾燥して作成した。また、飼育には 25°C のインキュベーターを利用し、試験期間中は弱くばっ気を行った。

(4) 分析の方法

水中および底泥中の *Microcystis* 細胞濃度は、リアルタイム PCR (7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems) を用いて測定し、遺伝子量から推定した。抽出、増幅および細胞数の推定については既往研究 (長濱ら, 2017) と同様である。炭素・窒素安定同位体比の測定は全自動元素分析装置 (Flash2000, Thermo Fisher Scientific) と連結した安定同位体質量分析計 (DELTA V Advanage, Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。

4. 研究成果

Aizaki ら (1991) によって、*Microcystis* の分解に対し水温と溶存酸素量 (以下 DO) が影響することが示されている。そこで、実験期間中の水温と DO を図 1 に示す。水温は Case 1, 2 ともにおよそ 15°C で推移し、DO はいずれも $1\sim 3\text{ mg/L}$ で推移した。ビーカーは開放状態であったが、底面の DO は低かった。2017 年の 9 月から 12 月の霞ヶ浦湖心における平均水温は 16.5°C 、平均の底層 DO は 8.0 mg/L であった。これらのことから、実験期間中の水温は秋の霞ヶ浦と類似していたが、DO は湖水および底泥中の微生物等によって消費され、低く保たれていたことが明らかとなった。

次に実験中の水中の変化に着目した (図 2)。水中の *Microcystis* の濃度は、Case 2 では緩やかに減少し、56 日後に半減した。これは、沈降または水中での微生物分解に伴うものと推定された。一方で、泥と混合した Case 1 では速やかに減少し、その後、低濃度のまま安定して推移した。また、底泥中の変化に着目すると (図 3)、*Microcystis* 濃度は実験開始直後に増加したものの、5 日目には大きく減少し、26 日目には検出できなくなった。26 日目以降に検出できなくなった理由として、今回の研究で用いたプライマーセットがターゲット以外の増幅を行っていたことが溶解曲線から示されており、*Microcystis* が生物分解を受けたことを示唆した。一方で、泥中の炭素・窒素安定同位体比の推移を図 4 に示す。炭素・窒素安定同位体比は、1 日後に著しく上昇し、2 日後からはわずかに減少し、12 日以降はおおむね安定した。炭素・窒素含有量も同様の挙動を示した。図 3 に示すように、26 日以降は泥中で *Microcystis* 細胞数が検出できなかったにも関わらず、炭素・窒素安定同位体比が高い値のまま安定していたことは、*Microcystis* が生物的分解を受け、*Microcystis* に含まれていた炭素と窒素が、デトリタスまたは生物体として底泥中にとどまっていると示唆さ

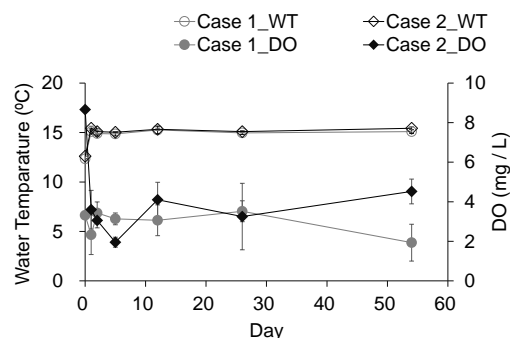


図 1 実験期間中の水温と DO の推移。

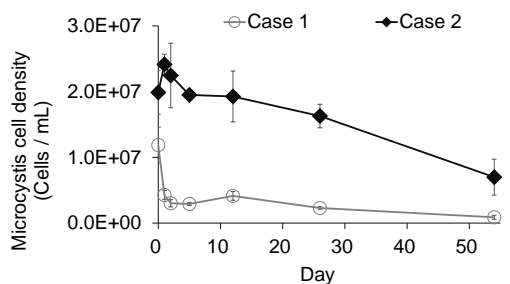


図 2 リアルタイム PCR で推定された、水中の *Microcystis* 細胞濃度の推移。エラーバーは標準偏差を示す ($N=3$)。

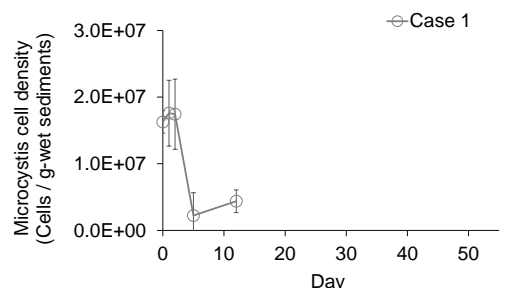


図 3 リアルタイム PCR で推定された、泥中の *Microcystis* 細胞濃度の推移。エラーバーは標準偏差を示す ($N=3$)。

れた。

次に摂餌実験について記す。実験中は、水温は25°Cに保たれていた。また、ばっ気を行ったため、ユスリカ幼虫、ドブガイ、マシジミいずれの系でもDOはおよそ8 mg/Lで推移した。実験期間中の平均生残率はユスリカ幼虫で40%、ドブガイ96%、マシジミ97%であった。しかしながら、炭素・窒素安定同位体比の測定は分析機器の故障のため期間内に終了しなかった。今後、これらの分析を行い、炭素・窒素安定同位体比をマーカーとして、これらの底生生物に対するMicrocystis由来有機物の影響を明らかにしていく予定である。

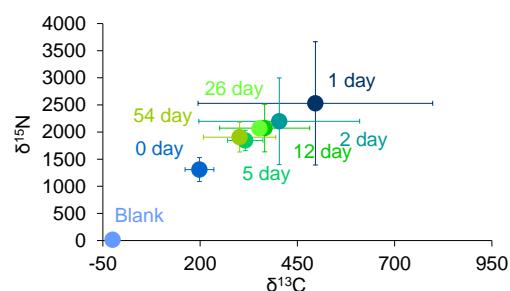


図4 実験期間中の底泥の $\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$ マップ。エラーバーは標準偏差を示す ($N=3$)。

<引用文献>

- ① 大内孝雄, 小日向寿夫, 中村剛也, 神谷航一 (2013): 2013年度の霞ヶ浦におけるフィコシアニン濃度の推移とアオコの発生要因との関係. 茨城県霞ヶ浦環境科学センター 年報, 9, 58-62.
- ② 梅田信, 落合雄太 (2012): 気候変動による国内のダム湖水質への影響評価. 土木学会論文集G (環境), 68, 5, I_127-I_135.
- ③ 花里孝幸 (1989): 富栄養湖におけるラン藻と動物プランクトンの相互関係. 水環境学会誌, 50, 1, 53-67.
- ④ Kluijver, de Anna, Jinlei Yu, Marco Houtekamer, Jack J. Middelburg, and Ahengwen Liu (2012): Cyanobacteria as a carbon source for zooplankton in eutrophic Lake Taihu, China, measured by ^{13}C labeling and fatty acid biomarkers. *Limnology and Oceanography*. 57, 4, 1245-1254.
- ⑤ 長濱祐美, 中川圭太, 菅谷和寿, 富岡典子, 相崎守弘 (2017): 霞ヶ浦底泥における Microcystis rDNA の分布と季節変動. 水環境学会誌, 40, 4, pp.183-188.
- ⑤ Aizaki M. and Takamura N. (1991): Regeneration of Nutrient and Detritus Formation from Aerobic Decomposition of Natural Phytoplankton, *Japanese Journal of Limnology*, 52, 2, 83-94.

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

- ① Yumi NAGAHAMA, Shunichi MATSUMOTO, Takehiko FUKUSHIMA, Seasonal Variation and Decomposition of Cyanobacteria (Microcystis spp.) at Lake Kasumigaura, 12th International Symposium on Ecohydraulics, 2018.08. 23, Tokyo

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。