

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570014

研究課題名(和文) 浅い湖沼におけるメタンの底生生物食物網への寄与

研究課題名(英文) Contribution of methane to benthic food web in a shallow lake

研究代表者

鹿野 秀一 (SHIKANO SHUICHI)

東北大学・東北アジア研究センター・准教授

研究者番号：70154185

研究成果の概要(和文)：成層しない浅い湖伊豆沼においても堆積物中に生息するユスリカ幼虫は、餌資源のマーカーとして使える炭素の安定同位体比がきわめて低い値を取ることが確認できた。巣穴のある深さのメタン濃度が高くなる季節に安定同位体比の値が低下することから、生物的に生成されたメタンを酸化する細菌が餌資源として寄与していることが示唆された。餌資源のもう一つマーカーである脂肪酸組成の分析結果も細菌の寄与が高いことを示した。

研究成果の概要(英文)：In a shallow lake, the larval chironomids showed dramatically low values of carbon stable isotope ratios, which indicate the marker for dietary components. Since carbon stable isotope ratios were decreased while methane concentrations at the depth of larval chironomids burrow were high, some larvae were considered to assimilate carbon derived from biogenic methane by feeding on methane oxidizing bacteria. The results of fatty acid composition, which is another dietary marker, indicated bacteria are important food source for the larval chironomids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生態学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生態・環境

キーワード：湖沼、安定同位体比、メタン、ユスリカ、メタン酸化細菌、脂肪酸分析

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、食物網における動物の餌資源解析に炭素・窒素安定同位体比を用いる手法が多く採用されるようになってきている。食物連鎖の餌とそれを食べる動物の安定同位体比は、動物の炭素安定同位体比は餌のそれとほぼ同じ値を取るが、動物の窒素安定同位体比は餌よりも一定の率で重い同位体が増えることが知られている。このため炭素・窒素安定同位体比を調べることによって餌候補と栄養段階を推定できる。

(2) 我々は、伊豆沼において、底生生物のオオユスリカ幼虫 (*Chironomus plumosus*) の炭素・窒素安定同位体比を予備的に測定したところ、堆積物中の有機物の炭素安定同位体比 $\delta^{13}\text{C}$ の値が $-28\text{‰}$ なのに対して、ユスリカ幼虫のそれは $-30\sim-50\text{‰}$ の範囲の値を示し、非常に低い値の個体がいることが分かり、これらの個体は堆積物中の有機物以外を食べている可能性が高いと考えられた。

(3) このような現象は、琵琶湖におけるユスリカ (*Stictochironomus* sp.) で初めて確

認され(Kiyashko et al. 2001)、その後ヨーロッパの水深の深い湖におけるユスリカ幼虫 (*C. plumosus* と *Chironomus anthracinus*) でも観察されている (Grey et al. 2004)。しかし、今までの報告からは、 $\delta^{13}\text{C}$  が  $-50\text{‰}$  近くの低い値を示すユスリカ幼虫は、水深が深い所に生息する個体に限られていて、最大水深が 2~3m の浅い湖では見つかっていなかった。一方、伊豆沼は最深部でも水深が 1.6 m と非常に浅い湖であるにもかかわらず、炭素安定同位体比が非常に低い値を示す初めての事例となる。

(4) このような低い炭素安定同位体比を示すユスリカ幼虫の個体は、メタン生成細菌からの低い炭素安定同位体比をとるメタンガス ( $-60\text{‰}$ ~ $-80\text{‰}$ ) 由来の有機物を摂食している可能性がある。メタンが好気的環境に出てきたところでメタンを利用するメタン酸化細菌が増殖し、細菌自体も同じような低い炭素安定同位体比をとる。低い炭素安定同位体比をとるメタン酸化細菌を主に食べているユスリカ幼虫の個体は低い値 ( $-50\text{‰}$ 以下) をとり、このような深い湖の堆積物中では、メタンからメタン酸化細菌を経由し、メタン酸化細菌を餌とする底生生物へのメタン由来の炭素の寄与が指摘されている (Grey et al. 2004)。

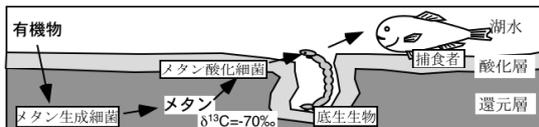


図 1. メタン由来底生食物連鎖系

## 2. 研究の目的

(1) 成層する深い湖の湖底堆積物中では、メタンからメタン酸化細菌が増殖し、そのメタン酸化細菌を餌とする底生生物の生産によるメタンの寄与が報告されている。これは底生生物の炭素安定同位体比が非常に低く、メタンの値に近いことが根拠になっているが、浅い湖沼ではこの現象は見られていなかった (Deines et al. 2007)。

(2) 一方、宮城県に位置する最大水深 1.6 m の伊豆沼 ( $38^{\circ} 43' 16'' \text{ N}$ ,  $141^{\circ} 05' 12'' \text{ E}$ ) において炭素安定同位体比の極端に低い値をとるユスリカ幼虫の存在が我々の予備調査で確認された。そこで、浅い湖沼である伊豆沼においてメタン由来の底生生物食物連鎖への寄与を検討するために、メタン濃度、メタン酸化細菌群集構造、底生生物の炭素・窒素安定同位体比の季節変化を明らかにすることをこの研究は目的とした。

(3) さらに、メタン酸化細菌が特有に持つ脂肪酸がユスリカ幼虫から検出されると、ユスリカがメタン酸化細菌を摂食していると考えられるので、安定同位体比と脂肪酸組成

を解析することも目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 宮城県栗原市と登米市に位置する伊豆沼において定点 (最深部水深約 1.6 m) を設置して、毎月 1 回ユスリカ幼虫、浮遊懸濁有機物 (POM; Particulate Organic Matter) と堆積物の採集および堆積物中のメタン濃度を測定した。

(2) 堆積物中のメタンの現存量

① 直径 5 cm のコアサンプラーによって堆積物のコアを深さ約 30 cm まで複数本採集した。現場においてコア中の堆積物中の Eh の測定を深度別に行った。

② 残りのコアサンプルは、伊豆沼湖畔において、コアサンプルより直径 15 mm、長さ 25 mm のサブコアを表層から 0-1 cm、5-6 cm、10-11 cm、20-21 cm の深さ毎に採取して、25 ml の蒸留水を入れたガスタイトなバイアルビン (50 ml) に入れた。

③ 堆積物のサブコアを入れたバイアルビンを実験室に持ち帰り、ヘッドスペース法によって、メタンガス濃度を測定した。バイアルビンをよく振って堆積物中のメタンガスを気相に追い出した後、バイアルビンのヘッドスペースにあるガスを 300 ml のガラスシリンジに移す。シリンジ内の体積をチェックして、ガスクロマトグラフィー GC FID にインジェクトして、メタン濃度を測定した。

(3) 安定同位体比の測定

① 採集したオオユスリカ幼虫は実験室において水道水中でフンを出させた後、凍結乾燥をした。POM は、湖水を予め  $500^{\circ}\text{C}$  で 2 時間加熱処理をして有機物を除去したグラスフィルター (Whatman GF/F) を用いてろ過した。フィルター上に残った懸濁物をフィルターごと凍結乾燥し、POM の安定同位体比測定の試料とした。また、現場で採集した堆積物の少量を、乾燥して保存した。

② これらのサンプルは、元素分析計と直結した質量分析計 (Finnigan 社製 DELTA plus) を用いて、炭素同位体比を測定した。なお、堆積物は酸処理により無機炭素を除き、またユスリカ幼虫はメタノールとクロロホルム混液処理で脂肪を除き、凍結乾燥後粉末にして測定した。なお、炭素安定同位体比は、定法に従い次の式で表される  $\delta$  値で表記した。

$$\delta^{13}\text{C} = (R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}} - 1) \times 1000 (\text{‰})$$

ただし、 $R = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$  であり、 $R_{\text{standard}}$  は炭素同位体比の国際標準物質である、VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite) の  ${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$  比である。

(4) 脂肪酸分析

① 脂肪酸分析に用いるオオユスリカ幼虫については、炭素安定同位体比を測定後、異なる同位体比を持つ 4 個体を選び、試料とした。脂質の抽出方法については、Harvey et al. (1987) の方法を参考に一部改変した。

② 脂肪酸は、サンプルをヘキサンに溶かし、FID 検出器を備えたガスクロマトグラフ（島津製作所製 GC-17A）を用いて分析した。無極性カラムである GL Science 社製 TC-1（内径 0.25mm, 膜厚 0.25 $\mu$ m, 長さ 30m）と、極性カラムである Restek 社製 RTX-2330（同上）を用い、ヘリウムをキャリアーガスに用いた。

③ 各脂肪酸の同定については、市販のスペルコ社製 FAME37mix、bacterial FA 等を用いてリテンションタイムを比較することにより行なった。

#### (5) オオユスリカ幼虫の巣穴形成実験

幅 5 mm の薄いアクリル製水層に伊豆沼から採取し、予めフルイで夾雑物を除いた堆積物を詰め、安定化させる。その後、オオユスリカ幼虫を 1 匹ずつ導入した後、暗条件下で飼育し、巣穴の形状や深さを観察した。

#### (6) メタン酸化細菌の群集組成

① 堆積物のコアサンプルより表層から深度別に 4 層の堆積物約 0.5 g を採取して、土壌 DNA 抽出キットを用いて、環境 DNA を抽出した。この抽出した DNA を鋳型にしてメタンモノオキシゲナーゼ遺伝子（MMO 遺伝子）に特異的なプライマーセット（2 本の内 1 本は GC クランプ付き）を用いて、PCR 増幅を行った。

② PCR 産物を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE 法）して、個々のメタン酸化細菌由来のバンドを形成させた。バンドパターンの違いより群集構造の違いを特定し、それぞれのバンドより切り出した DNA からシーケンス反応を行い、MMO 遺伝子の配列をもとめ、遺伝子データベースから近縁種を検索し、群集構造の解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 湖水の水質の季節変化

伊豆沼湖心における水深は、2008 年の夏を除いて約 150 cm 以下の浅い状態だった。水温と溶存酸素濃度は、表層から湖底までほぼ同じ値を示し、湖水の混合がよい状態を示した。一方、2008 年 8 月には、大雨のため水深が 240 cm になり、一時的な成層が形成され、湖底直上においては貧酸素状態が観察された。

### (2) 堆積物中のメタン濃度

堆積物中のメタン濃度は、季節変化を示し、深層部の堆積物ほど高い傾向が見られた。0-1cm, 5-6cm の層のメタン濃度は 8 月や 9 月に（3~9  $\mu$ g/g）、10-11cm, 20-21cm では 11 月または 12 月に（9~12  $\mu$ g/g）それぞれ最大値を示した。特に、5-6cm の層のメタン濃度は、季節変化が大きく、水温が高い夏期に高濃度になり、冬期に非常に低い値を示した。

### (3) 炭素同位体比の季節変化

① 堆積物と POM の炭素安定同位体比  $\delta^{13}\text{C}$  は、

それぞれ -28.1‰ ~ -27.0‰ と -33.4‰ ~ -29.0‰ の範囲の値をとり、明確な季節変化はなかった。

② 一方、オオユスリカ幼虫の炭素安定同位体比  $\delta^{13}\text{C}$  は、同じサンプリング月においても個体間のばらつきが大きく、-50.9‰ ~ -27.5‰ の範囲の値をとった。また、毎月の  $\delta^{13}\text{C}$  の平均値も、春期に -29.8‰ と夏期に -40.4‰ の範囲で季節変化がみられた。

③ ユスリカ幼虫の  $\delta^{13}\text{C}$  は、ユスリカが摂食している堆積物のそれより低い値で、特に夏期には堆積物の値と比べて、11~13‰ 低い値を示した。また、多くのユスリカ幼虫の  $\delta^{13}\text{C}$  は、POM のそれよりも低い値を示した。

(4) メタン濃度とオオユスリカ幼虫の  $\delta^{13}\text{C}$  深度が 5-6cm と 10-11cm の層の堆積物中のメタン濃度とオオユスリカ個体群の  $\delta^{13}\text{C}$  の平均値の間に有意な負の相関がみられた（5-6 cm:  $r = -0.776$ ,  $p < 0.01$ ; 10-11 cm:  $r_s = -0.636$ ,  $p < 0.05$ ; 図 2 (a), (b)）。この結果は、これらの層においてメタン濃度が高い時期にオオユスリカ幼虫の炭素安定同位体比が低下していることを示す。

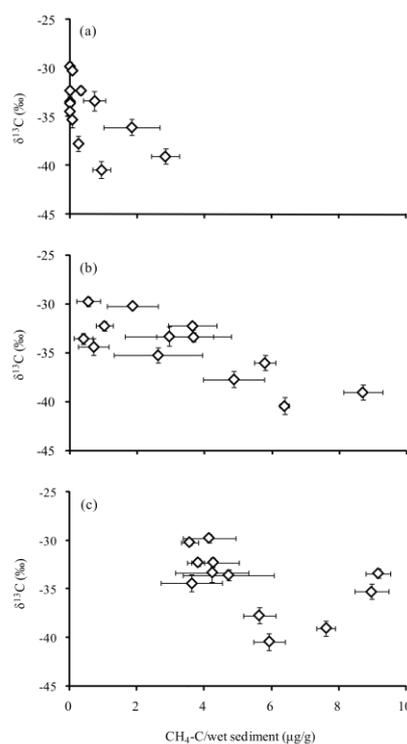


図 2. メタン濃度とユスリカ幼虫の  $\delta^{13}\text{C}$  の関係 (a) 0-1cm、(b) 5-6cm、(c) 10-11cm

### (5) 餌資源としてのメタン酸化細菌

① 堆積物や POM の  $\delta^{13}\text{C}$  の値より低いオオユスリカ幼虫は、堆積物や POM 中の有機物以外のものも餌資源としていることが考えられる。堆積物中で生物的に発生するメタンの  $\delta^{13}\text{C}$  は、-80 ~ -50‰ と非常に低い値をもつことが知られている。

② このメタンを資化するメタン酸化細菌は、同様に低い $\delta^{13}\text{C}$ の値を有する。したがって、低い $\delta^{13}\text{C}$ の値をもつユスリカ幼虫は、メタン酸化細菌を餌資源として利用している可能性が高い。

#### (6) ユスリカの脂肪酸組成

①  $\delta^{13}\text{C}$ の異なる4個体のオオユスリカ幼虫について脂肪酸組成の分析を行ったところ、いずれの個体も細菌起源の脂肪酸 i17:0 の含有率は、緑藻、珪藻起源の脂肪酸と比べて高く、しかも $\delta^{13}\text{C}$ の値と細菌起源の脂肪酸の含有率との間に負の相関がみられた ( $r=-0.973$ ,  $p<0.05$ )。

② 上の結果は、細菌の餌資源としての重要性が示唆される。 $\delta^{13}\text{C}$ の低下した個体が細菌起源の脂肪酸含有量が高かったことは、メタン酸化細菌と密接に関連した細菌群に由来するものであることを示唆している。

#### (7) オオユスリカ幼虫の巣穴

オオユスリカ幼虫の飼育実験の観察から、オオユスリカ幼虫は深さ10 cmほどのU字型の巣穴を形成することが分かった。また、巣穴の表面は厚さ数 mmの酸化層が発達することも観察された。これは巣穴がU字型のため、ユスリカ幼虫の運動によって酸素を含む水が循環するためと考えられる。

#### (8) メタン酸化細菌群集組成

メタン酸化細菌が特有に持つMMO遺伝子のPCR産物を、DGGE法によって群集解析を行った結果、DGGEのバンドパターンには深さの違いや季節的な変化はみられなかった。このことは堆積物中のメタン酸化細菌の組成は、温度やメタン濃度が異なってもあまり変化しないことが示された。また、MMO遺伝子の配列解析から、優占するメタン酸化細菌は、相同性が85%と低いものの *Methylococcus capsulatus* と近縁種であった。

#### (9) メタンの食物網への寄与

① 成層しない浅い湖においても、メタン濃度が高くなると底生生物のオオユスリカ幼虫の $\delta^{13}\text{C}$ が大きく低下する現象がみられた。今までは成層する湖では成層期に同様の現象が観測されているが、浅い湖では確認されていなかったことから、新しい知見といえる。

② 浅い湖においても、ユスリカ幼虫の巣穴のある深さでメタン濃度が高くなると、メタン酸化細菌が増加し、これを主に餌資源とするユスリカ幼虫の個体が存在すると考えられる。このことは、脂肪酸分析の結果とも一致した。

③ メタンの $\delta^{13}\text{C}$ 値は、 $-80\sim-50\text{‰}$ と範囲が広いが、オオユスリカの餌としてのメタン酸化細菌の寄与率の計算値は、メタンの $\delta^{13}\text{C}$ 値を範囲内のどの値に設定するかにより変化する。 $\delta^{13}\text{C}$ の最も低い個体( $\delta^{13}\text{C}=-50.9\text{‰}$ )のメタン酸化細菌の寄与率は、メタンの $\delta^{13}\text{C}$ 値の範囲内最低値( $-80\text{‰}$ )に設定した場合

は35.2%、最大値( $-50\text{‰}$ )では63.2%であった。一方、同位体比の最も高い個体( $\delta^{13}\text{C}=-27.5\text{‰}$ )では、メタン酸化細菌の寄与率は1.1~1.9%であった。このように、オオユスリカの餌としてのメタン酸化細菌の寄与率は個体間で大きく異なった。

#### 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1件)

① 安野翔、山中寿朗、嶋田哲郎、鹿野秀一、菊地永祐、伊豆沼におけるオオユスリカ幼虫の餌資源推定：炭素安定同位体比と脂肪酸組成による解析、伊豆沼・内沼研究報告、査読有、5巻、2011(印刷中)

[学会発表] (計7件)

① 菊地永祐、安野翔、進東健太郎、高木優也、鹿野秀一、淡水二枚貝カラスガイの成長に伴う安定同位体比の変化、日本生態学会第58回全国大会、2011年3月9日、札幌コンベンションセンター

② 安野翔、山中寿朗、嶋田哲郎、鹿野秀一、菊地永祐、動物プランクトンより高いPOMの $\delta^{13}\text{C}$ はデトリタスの混入で説明可能か？日本陸水学会第74回大会、2009年9月15日、大分大学

③ 安野翔、鹿野秀一、嶋田哲郎、進東健太郎、菊地永祐、炭素・窒素安定同位体比を用いた浅い富栄養湖伊豆沼の底生動物の餌資源解析、第56回日本生態学会大会、2009年3月18日、岩手県立大学

④ 安野翔、山中寿朗、鹿野秀一、菊地永祐、炭素安定同位体比の異なるオオユスリカ幼虫個体間の脂肪酸組成の違い、第56回日本生態学会大会、2009年3月18日、岩手県立大学

⑤ 安野翔、千葉有紀、進東健太郎、藤本泰文、嶋田哲郎、鹿野秀一、菊地永祐、炭素・窒素安定同位体比を用いた浅い富栄養湖伊豆沼の食物網解析、日本陸水学会第73回大会、2008年10月13日、北海道大学

⑥ 鹿野秀一、菊地永祐、嶋田哲郎、進東健太郎、伊豆沼・内沼のハス群集の生育拡大状況、日本陸水学会第73回大会、2008年10月11日、北海道大学

⑦ 安野翔、鹿野秀一、村岡歩、嶋田哲郎、原浩太、佐藤洋介、菊地永祐、オオユスリカ幼虫へのメタン食物連鎖の寄与の季節変化、日本陸水学会第73回大会、2008年10月11日、北海道大学

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

鹿野 秀一 (SHIKANO SHUICHI)

東北大学・東北アジア研究センター・准教授  
研究者番号：70154185

(2)連携研究者

菊地 永祐 (KIKUCHI EISUKE)  
東北大学・東北アジア研究センター・名誉教授  
研究者番号：00004482