

平成21年度

霧多布湿原学術研究助成果報告書

石丸 夏海

(北海道大学大学院 環境科学院)

平成22年 3月

1 研究テーマ

火散布沼における底生低次生産に及ぼすバクテリア群集の寄与

2 研究の目的

海洋環境の中でも環境変動が最も大きい沿岸域は、外洋域とは異なり栄養段階数は小さく、生物生産性は非常に高い。近年、このような沿岸浅海域における基礎生産過程や、それに続く食物網のダイナミクスについての様々な素過程に関する知見が集積されつつある。Yamaguchi et al. (2007)は瀬戸内海における研究により、浅海域の物質循環過程における底生微細藻類の重要性について述べている。また、底生微細藻類は合成した有機物の一部を溶存有機物(DOM)として細胞外に排出し、それを微生物が栄養源として利用しているという報告もある(伊藤ら,2008)。微生物群集は溶存有機物(DOM)を基質として利用し増殖することで、溶存態有機物を捕食に耐える大きいサイズの粒子に作り変えることから、エネルギーフローの起点となる生産者として重要な役割を担っていることが知られている(例えばParsons and Seki, 1970; Pomeroy, 1974)。このような微生物群集を介した海底泥中の低次生産過程の解明が求められている一方で、上述したようなプロセスを定量的に評価した報告例はいまだほぼ無い。そこで本報告書では底生バクテリアによる物質代謝と底生微細藻類増殖の関係について明らかにし、火散布沼における底生低次生産に及ぼすバクテリア群集の寄与について考察を行う。私(助成対象者)は2003年度より火散布沼における物質循環過程に関する研究を行っており、現在も継続中である。本報告書では、本年度の研究成果(本助成の対象)に、これまでの研究結果を併せて報告する。

3 調査・研究の方法

3. 1. 底生バクテリア・底生微細藻類現存量調査

本研究では 2008 年 11、12、及び 2009 年 1、2、4、6、9 月に浜中町火散布沼の中央トランセクトに設置した観測定点、4 地点(Stn.6,10,14,15)にて底生バクテリア現存量、底生微細藻類現存量の調査を行った(Fig.1)。各月の調査は大潮の上げ潮時に行った。沼奥部の Stn.6,15 は冬季に結

氷するため、12月、2月において数回欠測となった。海底堆積物は20cm方形のエクマンバージ採泥器を用いて採取し、堆積物表面から0~0.5cmを分析用に分取した。試料を約10g精秤し、5°Cで24時間乾燥した際の重量減少割合から水分含量を求めた。また、堆積物試料を0.1mg秤量し、滅菌海水に懸濁させた後、超音波発生機にて堆積物とバクテリアを遊離させ、バイアル管に分取し400倍に希釈した。希釈した試料1.9mlをDAPI染色後、黒色メンブレンフィルターにろ過捕集し、落射型蛍光顕微鏡にて直接計数し、底生バクテリア現存量(cells/ml)を算出した。次に底生微細藻類現存量の指標として堆積物中クロロフィルa(Chl-a)現存量を測定するため、試料を約1g精秤し、それをサンプル管に分取した後、ただちに90%アセトン6mlに抽出し、約24時間後に蛍光光度計(ターナーデザイン、10-AU)を用いてChl-a濃度を測定した。単位面積当りの各現存量の算出は湿泥1gあたりの現存量と水分含有量に、堆積物密度2.5g/cm³、間隙水密度1.0g/cm³を仮定して算出した。

3.2. 底生バクテリア・底生微細藻類共生実験

2010年2月にStn.14にて海底堆積物を採取した。採取した堆積物を滅菌海水に懸濁させ、超音波発生器にて堆積物粒子から遊離させた後、上澄みを分取し底生バクテリア+底生微細藻懸濁液を作成した。次にこの懸濁液をヌクレポアフィルター(孔径2μm)にてろ過し、そのろ液をバクテリア懸濁液、ろ紙上に残ったものを滅菌ろ過海水に懸濁させたものを底生微細藻懸濁液とした。スピッツ管にオートクレーブ滅菌したろ過海水を9mlずつ満たし、実験区に合わせバクテリア+微細藻類懸濁液、バクテリア懸濁液、微細藻懸濁液を1ml添加した(実験区a:コントロール、実験区b:底生微細藻懸濁液のみ、実験区c:底生バクテリア懸濁液のみ、実験区d:底生バクテリア+底生微細藻懸濁液)。培養は5°C, 130 μM photons/m²/s (12:12 LD)の条件下で7日間行った(Fig.2)。スピッツ管試料は各実験区とも5本ずつ作成し、2月16~23日の間、実験開始から1,2,3,5,8日後に1本ずつ取り出し、スピッツ管内のバクテリア・微細藻現存量・Chl-a・フェオ色素濃度を測定した。バクテリア現存量(cells/ml)は試料1.9mlをDAPI染色後、黒色メンブレンフィルターにろ過捕集し、落射型蛍光顕微鏡にて計数し算出した。微細藻類現存量は試料1mlをスライドに分取し、光学顕微鏡にて直接計数し求めた。また計数中に適宜、微細藻類のサイズ・形状を確認した。Chl-a・フェオ色素濃度は試料7mlをろ過捕集したGFFフィルターを90%アセトンに抽出

後、約24時間後に蛍光光度計(ターナーデザイン、10-AU)を用いて測定した。

4. 結果

4. 1. 底生バクテリア・底生微細藻類現存量

底生バクテリア現存量は $0.7 \sim 2.2 \times 10^9 \text{ cells/g}$ の範囲で変動し、最高値は11月に沼中央のStn.10にて、最高値は6月に沼口のStn.14にて記録された。また単位面積当たりの現存量は $2.0 \sim 11 \times 10^{12} \text{ cells/m}^2$ であった(Fig.3)。底生バクテリア現存量は夏季に高く冬季に低い傾向が認められ、沼中央・沼口のStn.10,14にて高い値を示した。堆積物中 Chl-a の濃度及び現存量はそれぞれ $21 \sim 94 \mu \text{g/g}$ 、 $75 \sim 206 \text{ mg/m}^2$ の範囲であった(Fig.4)。堆積物中 Chl-a の濃度は夏季に高く冬季に低い季節変化を示したが、現存量で見てみると明瞭な季節変化は認識できなかった(Fig.4)。Chl-a 現存量の空間変動をみると、バクテリア現存量と同様に沼奥のStn.6,15に比較して沼中央・沼口のStn.10,14にて高い値を示す傾向が確認された。

4. 2 底生バクテリア・底生微細藻類共生実験

底生バクテリア現存量:

実験区aにおいては $0.01 \times 10^9 \text{ cells/ml}$ 程度で底生バクテリア現存量の変化は認められなかつたのに対し、実験期間中で実験区b, cにおいて、それぞれ0.04から0.44、0.17から0.40 $\times 10^9 \text{ cells/ml}$ へ増加していた(Fig.5)。一方、実験区dにおいては、実験開始2日後に1.60から1.98 $\times 10^9 \text{ cells/ml}$ に増加した後、実験終了時(8日後)には $1.28 \times 10^9 \text{ cells/ml}$ にまで減少した。(Fig.5)。

底生微細藻現存量:

実験区a,cにおいて、底生微細藻現存量は0 cells/mlを保ったのに対し、実験区dにおいては8日間の培養により402から1598 cells/mlへと急激な増加を示した。また、実験区bにおいては実験初期(3日間)に123から276 cells/mlへと増加した後、191 cells/mlへと減少し、その後は低い現存量のまま推移し、増加を示さなかった(Fig.5)。

Chl-a 濃度:

実験区 a,c において Chl-a 濃度は培養期間中約 $2 \mu\text{g/l}$ から約 $0.5 \mu\text{g/l}$ へとおおよそ $1.5 \mu\text{g/l}$ 低下する傾向を示した。実験区 d においては実験初期に $1.5 \mu\text{g/l}$ 程度の減少を示したが、その後増加に転じ、実験 8 日後には $4.9 \mu\text{g/l}$ の値を記録した。また、実験区 b においては実験 2 日後に $3.5 \mu\text{g/l}$ 程度の顕著な減少を示したが、その後、 $2 \mu\text{g/l}$ 程度の濃度で明確な濃度変化を示さなかつた(Fig.5)。

フェオ色素濃度:

実験区 a,c において緩やかな減少傾向を示したのに対し、実験区 d においては 31 から $12 \mu\text{g/l}$ へと一定の速度で顕著に減少した。一方、実験区 b においては実験 2 日後に 21 から $9 \mu\text{g/l}$ へと急激な減少を示したのち、 $11 \mu\text{g/l}$ 程度の濃度で推移し、明確な濃度変化を示さなかつた(Fig.5)。

底生微細藻種組成:

顕微鏡下では常に珪藻類羽状目の *Navicula* sp. 及び、*Nitzschia* sp. が確認され、本実験に用いた底生微細藻類の優占種はこれらの 2 種であった(Fig.6)。また、実験の初期には珪藻種中心目である *Chaetoceros* sp.(Fig.7)、実験の後期には珪藻種羽状目 *Thalassiothrix* sp.(Fig.8)と判断できる種も多く確認された。

5. 考察

5. 1. 底生バクテリア・底生微細藻類現存量の多寡を決定する要因

底生バクテリア現存量と底生微細藻類の指標である堆積物中 Chl-a 現存量は類似した時空間変動を示していた(Fig.3,4)。底生バクテリア現存量及び堆積物中 Chl-a 濃度の相関関係を Fig.9 に示す。底生バクテリアと底生 Chl-a 濃度は有意な正の相関関係($R=0.7, p=0.002$)にあったことから、堆積物中でバクテリアと微細藻類は同様の最適環境をもち、かつ共生関係にある可能性が示唆された。バクテリア現存量の多寡は温度に依存していることが報告されており(Hoch and Kirchman, 1993)、川西(2006)によると火散布沼の底生微細藻類の *Navicula* sp. 及び、*Nitzschia* sp.)はそれぞれ水温 $15^{\circ}\text{C}, 20^{\circ}\text{C}$ で最大増殖速度となるとしている。これらの報告はバクテリア及び底生微細藻類が夏季に増殖しやすいことを示しており、本研究結果にて底生バクテリアと堆積物中 Chl-a 濃度が夏季に高く、冬季に低い季節変動を示したことと整合的である(Fig.3,4)。以上のこ

とから、底生バクテリアと底生微細藻類は同様の最適環境を持つと考えられるが、これらが生理的に密接な相利的な共生関係にあることについては言及できなかった。そこで次に実験結果により共生関係についてさらに検討する。

5. 2. 底生バクテリアと底生微細藻類の共生関係

底生バクテリア及び底生微細藻類の比増殖速度(μ)を下記の式にて求め、Fig.10 にまとめた。

$$\mu t_2 = ((N_2 - N_1) / (t_2 - t_1) + N_1) / N_1$$

t =実験開始からの時間(日)

μt_2 = t_2 の時の比増殖速度

$N_1=t_1$ の時の底生バクテリア数もしくは微細藻類数

$N_2=t_2$ の時の底生バクテリア数もしくは微細藻類数

底生バクテリアの比増殖速度は実験区 a(コントロール)及びd(底生バクテリア+底生微細藻添加区)では減少傾向を意味する 1 以下の値を示す場合が多かったのに対し、実験区 b(底生微細藻添加区)及び c(底生バクテリア添加区)において 1 以上の値を示した(Fig.10)。実験区 b は底生微細藻懸濁液のみを添加した区である懸濁液を添加した際に少量の底生バクテリアが混入したものと考えられ、それらが時間経過とともに増殖したものと考えられる(Fig.5)。実験区 bの方が実験区 c よりも顕著に高い値を示していた(Fig.10)ことから、底生バクテリアは底生微細藻存在下で増殖速度が上昇すると判断される。しかし、実験区 d(底生バクテリア+底生微細藻添加区)において比増殖速度が低かったことから、底生微細藻が合成した溶存有機物(DOM)を底生バクテリアが栄養源として利用して増殖するというプロセスには疑問が残った。

底生微細藻類の比増殖速度は実験区 a(コントロール)及びc(底生バクテリア添加区)においては底生微細藻が存在しないため 0 であったが、実験区 b(底生微細藻添加区),d(底生バクテリア+底生微細藻添加区)において実験 1 日目に 1.8 と最高値をとり、その後、1.1 程度まで低下した(Fig.10)。実験区 b,d において実験開始 3 日後まで比増殖速度の差は見られなかったが、実験開始 5 日後には実験区 b の比増殖速度が顕著に低下した。このことから、底生微細藻は底生バクテ

リア存在下の方が高い増殖速度を保つことが可能であると考えられた。

実験期間中、微細藻類の現存量の指標である Chl-a 濃度の変化は実際に計数された微細藻数の変化と一致しなかった。その要因として、珪藻種組成、及び体サイズの変化が挙げられる。顕微鏡観察の結果、実験の初期と後期では見られる種が異なっていた(Fig.7,8)。顕微鏡下では体サイズが小さく Chl-a 含有量が小さい微細藻もカウントされることから、微細藻類数が増加した場合でも、Chl-a 濃度としては減少を示すと考えられる。このことは実験開始 8 日目には Chl-a 濃度が増加に転じたことからも支持される。

5. 3. 他海域の底生微細藻類現存量

オランダ及び国内(有明海、瀬戸内海、道内 2 箇所)における水柱 Chl-a 濃度および堆積物中 Chl-a 現存量(微細藻類現存量の指標)の報告例を Table.1 にまとめた。数値は月ごとの平均値の年最大値と年最小値、もしくは年平均値である。火散布沼の堆積物中 Chl-a 濃度は他の海域と比較して低濃度範囲で変動し、底生微細藻類現存量は他海域と比較して低いことが確認された。(Table.1)。

火散布沼の面積は比較をおこなったどの海域よりも極小であるが、その生産性(単位面積あたりの漁獲量)は、世界有数の生産力を誇る瀬戸内海の生産性、 $13 \text{ t/km}^2/\text{年}$ の 1.4 倍程度($18 \text{ t/km}^2/\text{年}$)であった。このことから、火散布沼は非常に小さな海域であるが生産性が高い海域であるといえる。サロマ湖の生産性は火散布沼の 3 倍程度の値を示したが、これは養殖漁業が活発であるためと考えられる。Chl-a は食物連鎖の基礎となる基礎生産者(微細藻類)の多寡を示す指標である。生産性と Chl-a 濃度を相互に確認すると、有明海は基礎生産量(Chl-a 濃度)が瀬戸内海を上回っているにもかかわらず、生産性は瀬戸内海と同程度に過ぎず、基礎生産量に対応していない。一方、サロマ湖の最大基礎生産量は火散布沼と比較して水柱で 5.6 倍、堆積物中で 4.4 倍の値を示し、このことはサロマ湖の生産性が火散布沼の 3 倍であるという結果と整合的であった。火散布沼の水柱及び堆積物中 Chl-a 濃度は瀬戸内海と同程度であったが、瀬戸内海は 1987 年をピークに漁獲量の減少が確認されている。このことから、火散布沼における現在の漁獲量は適正な範囲の上限である可能性が高いと考えられる。

6.まとめ

- 底生バクテリアと底生微細藻類は相利的な共生関係にある可能性が高い。
- 火散布沼の底生微細藻類現存量は他海域よりも低い。

参考文献

Yamaguchi et al. (2007): Dynamics of microphytobenthic biomass in a coastal area of western Seto Inland Sea, Japan. *Estuarine coastal and shelf science*, 75, 423–432, 2007

伊藤ら(2008)：河口・汽水域生態系における底生微細藻の果たす役割. 日本海洋学会秋季大会,A7,2008.

Parsons and Seki (1970): Importance and implications of organic matter in aquatic environments. *Organic Matter in Natural Waters*, ed. by D. Hood, University of Alaska, Alaska, pp. 1-27.

Pomeroy (1974) : The oceans food web, a changing paradigm. *Bioscience*, 24, 499-504, 1974

Hoch and Kirchman (1993): Seasonal and inter-annual variability in bacterial production and biomass in a temperate estuary. *Marine ecology progress series*, 98, 283-295, 1993

川西 (2006): 亜寒帯干潟域における底生珪藻の動態と環境諸因子の関係. 北海道大学大学院、環境科学院、平成17年度修士論文.

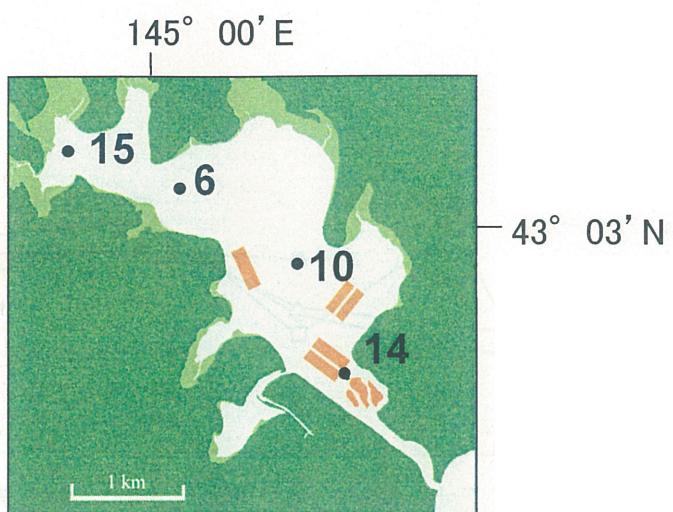


Fig.1. 火散布沼内の観測定点(Stn.6,10,14,15)



Fig.2. 底生バクテリア・底生微細藻類共生実験

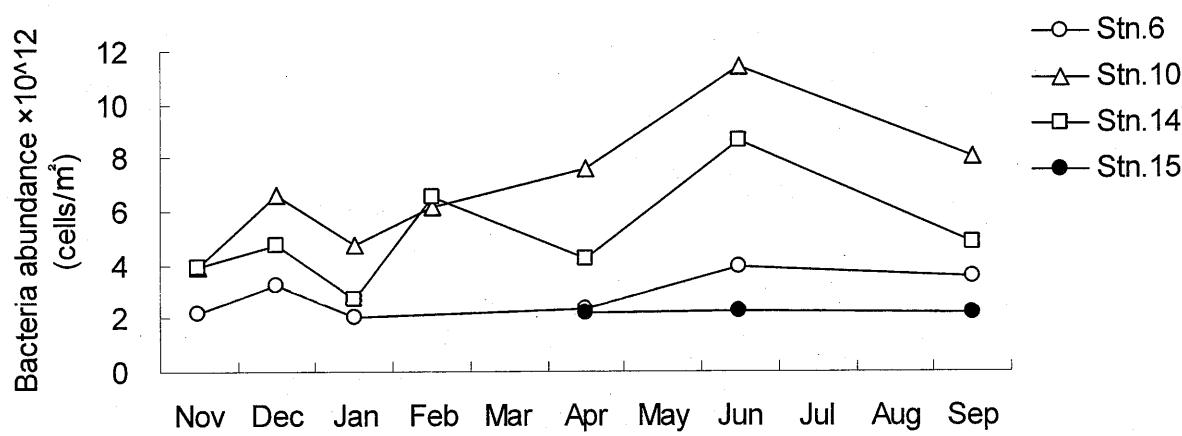
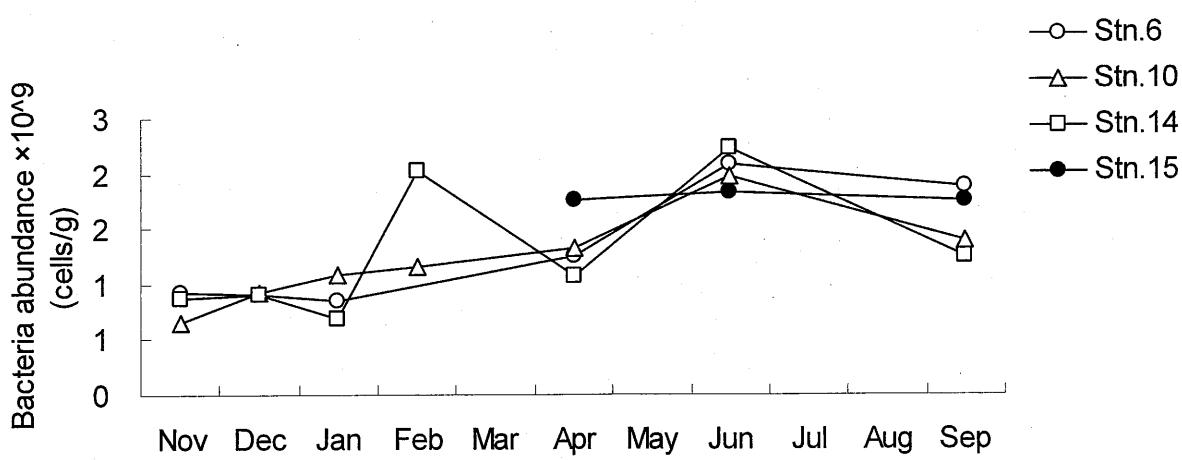


Fig.3. 底生バクテリア現存量

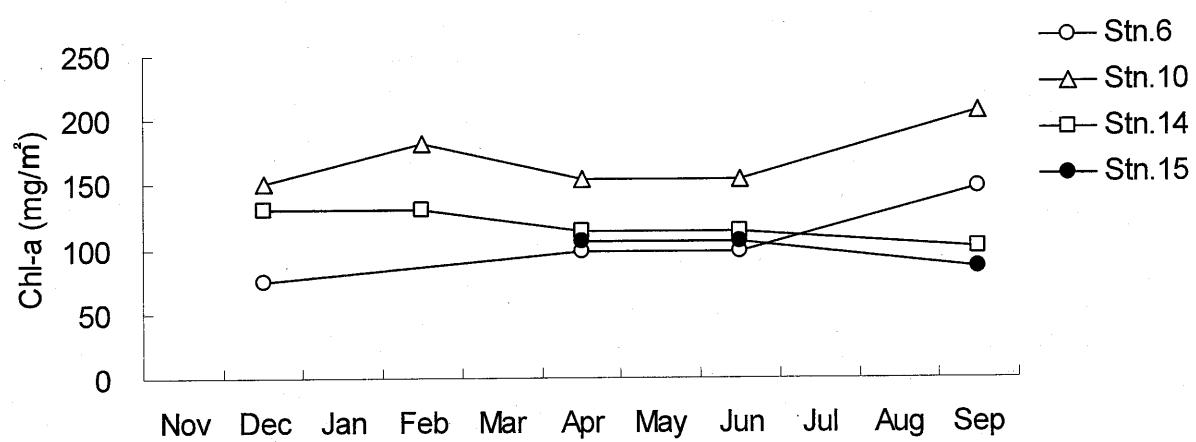
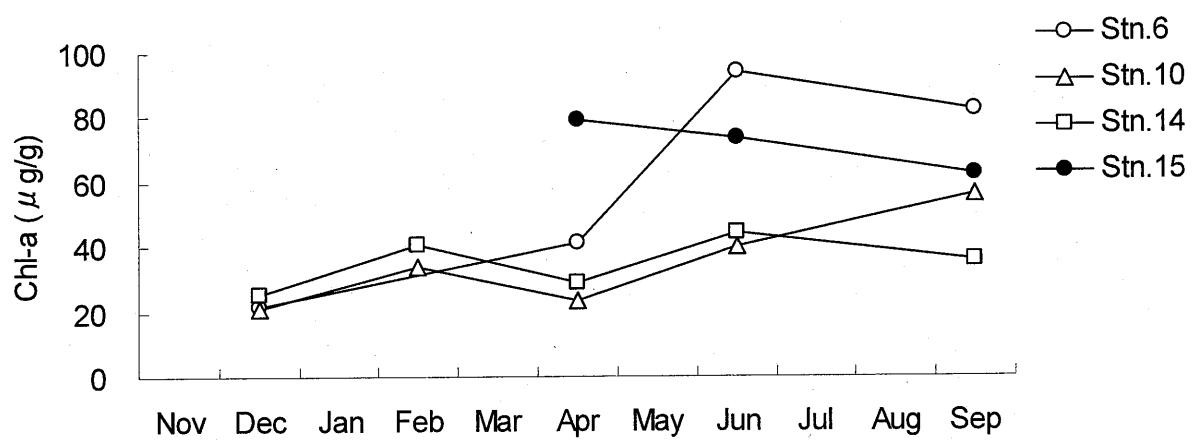


Fig.4. 堆積物中Chl-a濃度及び現存量

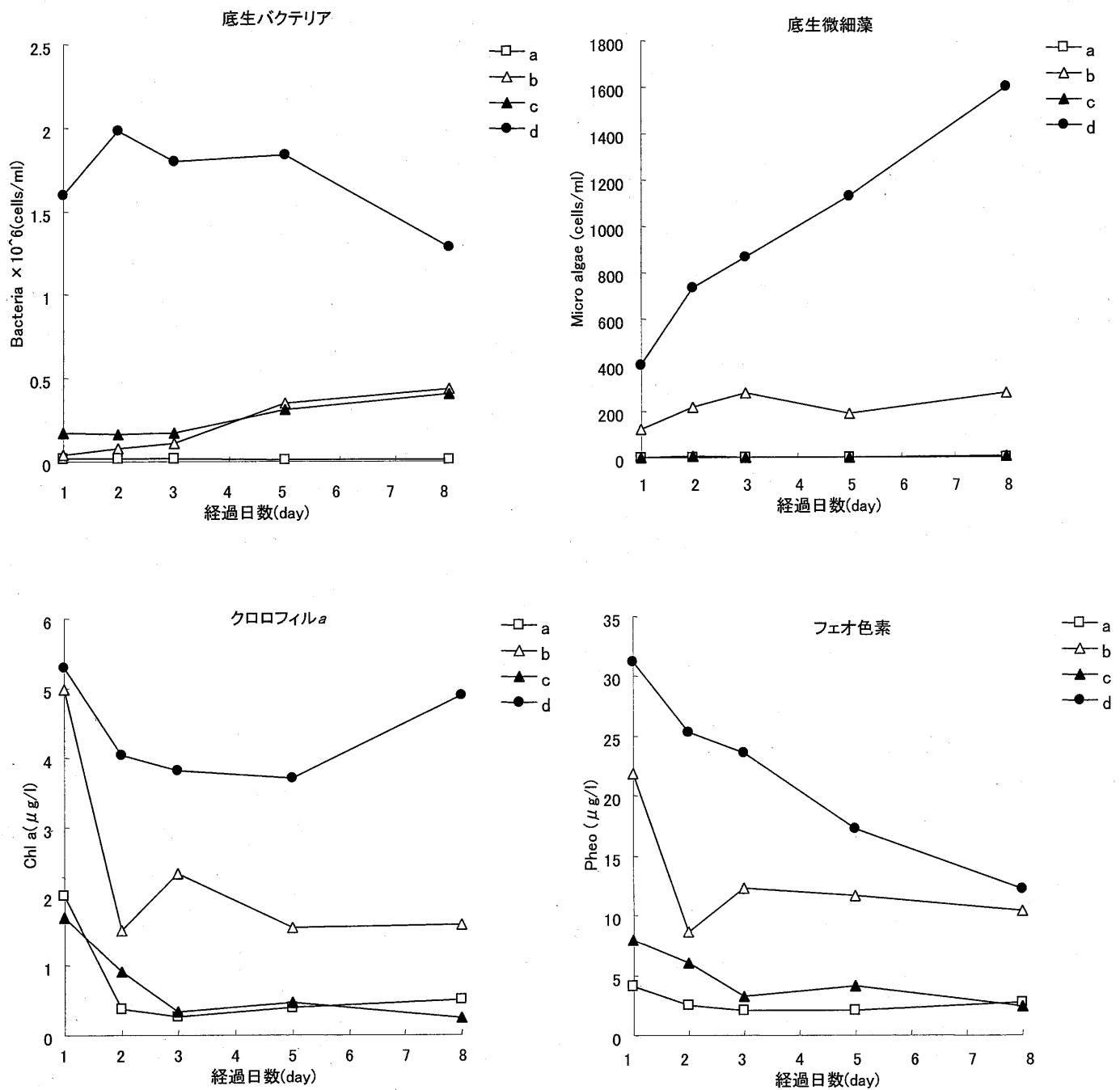


Fig.5. 底生バクテリア・底生微細藻類共生実験結果

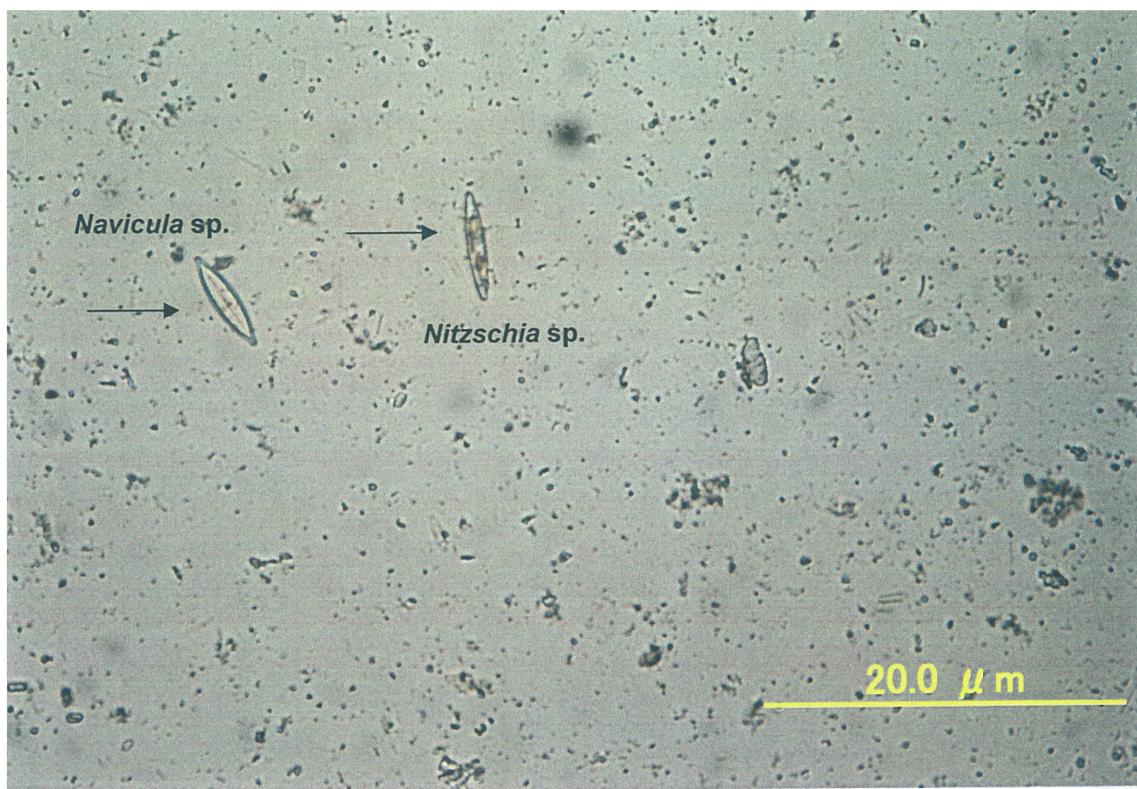


Fig.6. 実験中に観察された珪藻類2種

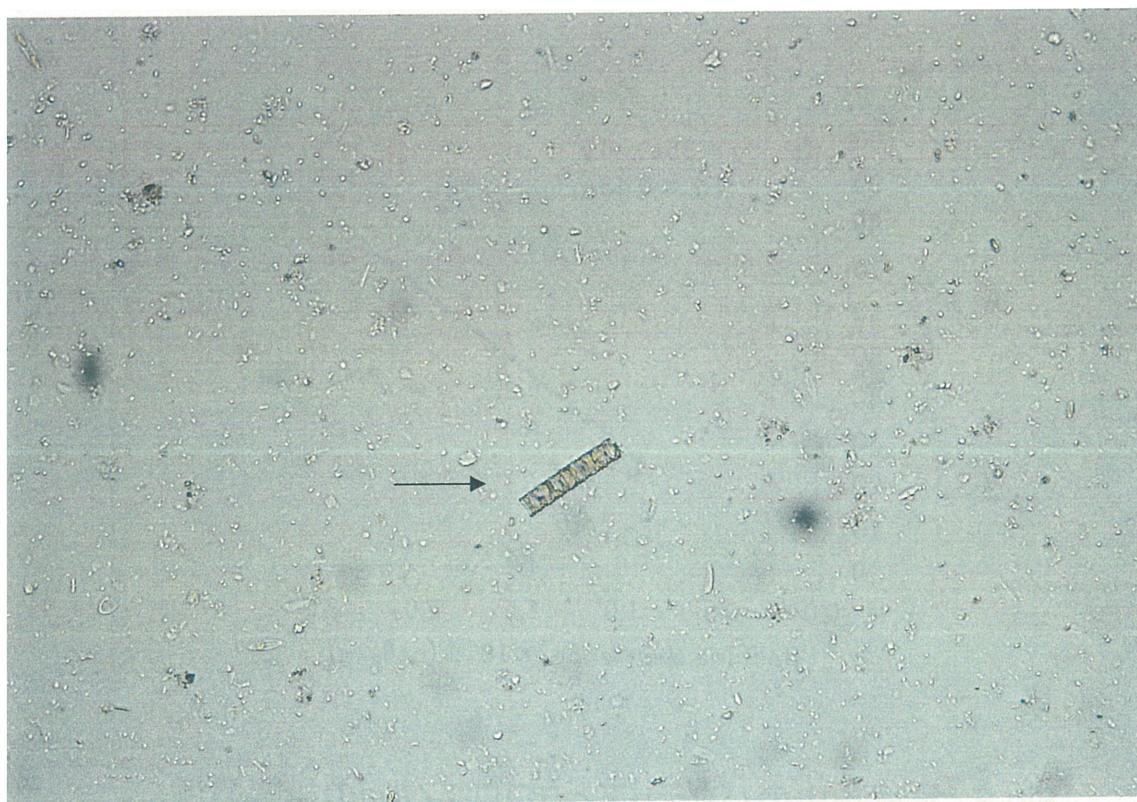


Fig.7. 実験初期に観察された珪藻類

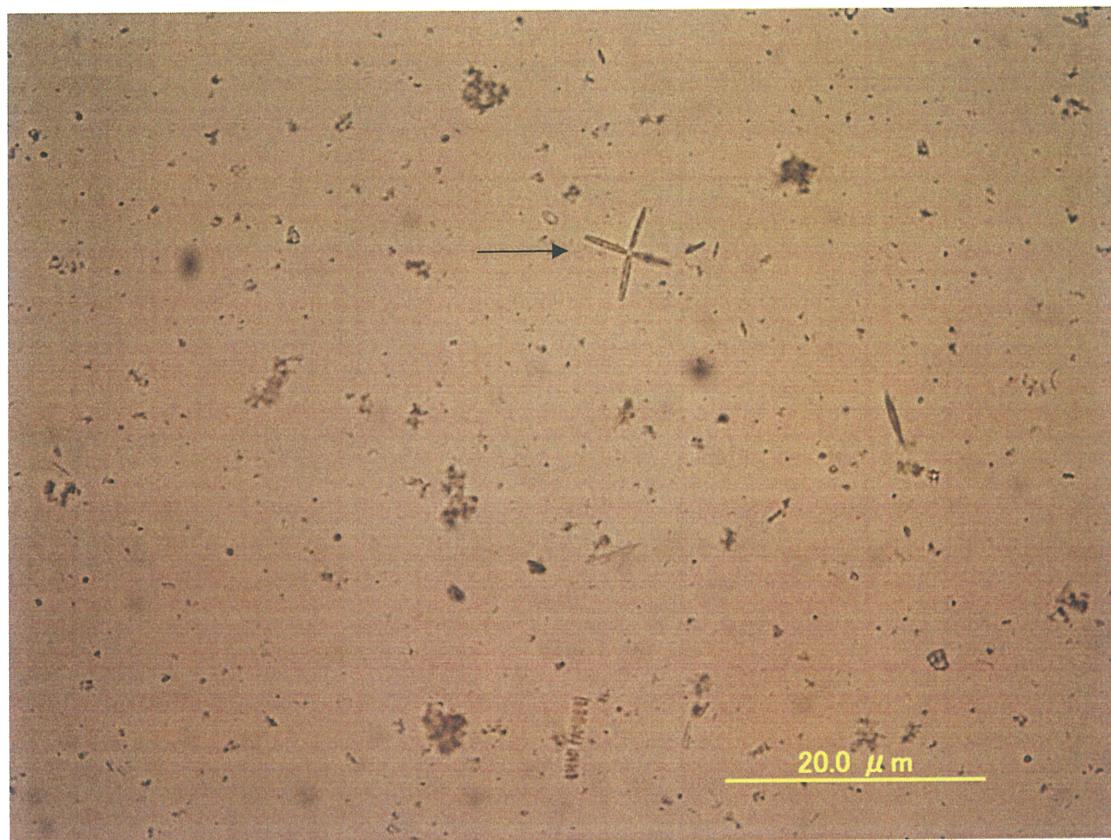


Fig.8. 実験後期に観察された珪藻類

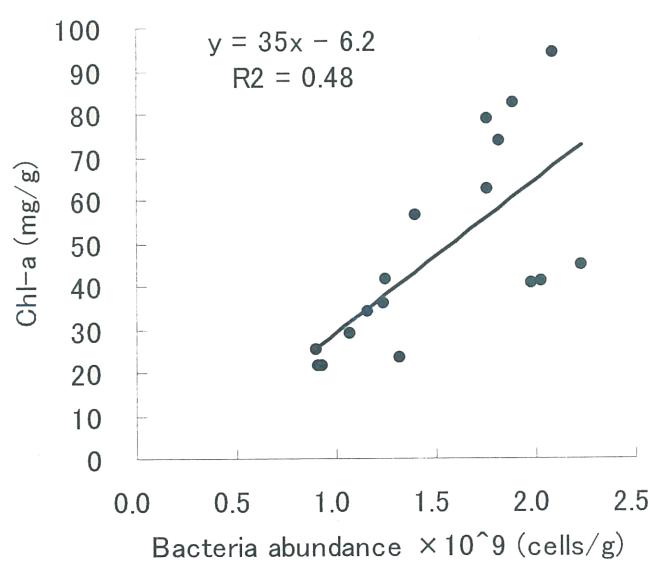


Fig.9. 堆積物中のバクテリアとクロロフィルaの相関関係

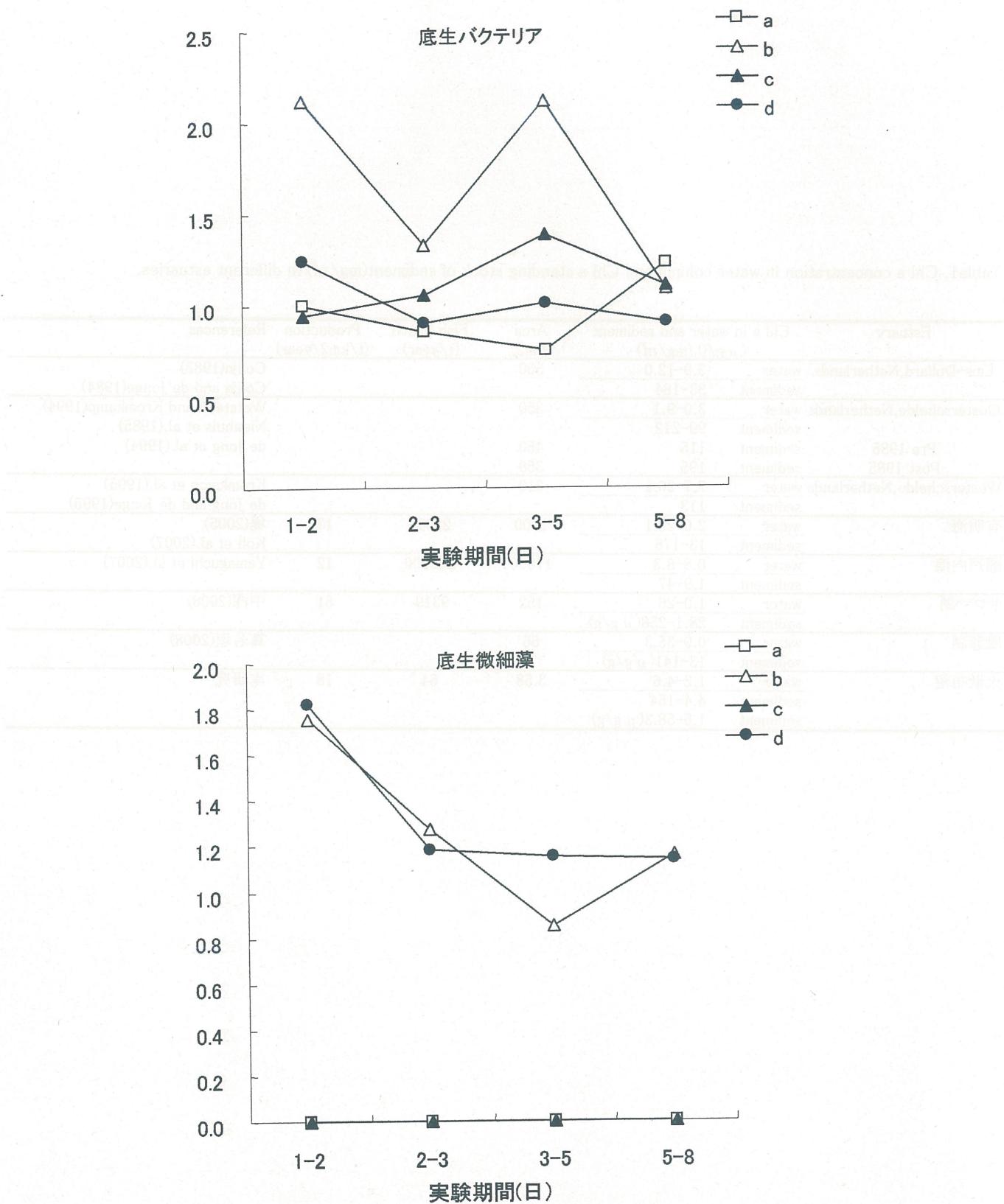


Fig.10. 底生バクテリア及び底生微細藻の比増殖速度

Table1. Chl a concentration in water column and Chl a standing stock of sediment(mg/m^3) in different estuaries.

Estuary	Chl a in water and sediment ($\mu\text{g/l}$),(mg/m^3)		Area (km 2)	Fish Catch (t/year)	Production (t/km 2 /year)	References
Ems-Dollard,Netherlands	water	3.9-12.0	500			Colijn(1983)
	sediment	33-184				Colijn and de Jonge(1984)
Oosterschelde,Netherlands	water	3.0-9.1	350			Wetsteyn and Kromkamp(1994)
	sediment	99-212				Nienhuis et al.(1985)
Pre 1985	sediment	115	450			de Jong et al.(1994)
Post 1985	sediment	195	350			
Westerschelde,Netherlands	water	7.7-20.1	310			Kromkamp et al.(1995)
	sediment	113				de Jong and de Jonge(1995)
有明海	water	2.0-22.1	1700	22000	13	堤(2005)
	sediment	13-176				Koh et al.(2007)
瀬戸内海	water	0.8-8.3	17000	200000	12	Yamaguchi et al.(2007)
	sediment	1.9-47				
サロマ湖	water	1.0-26	152	9319	61	中澤(2008)
	sediment	28.1-258($\mu\text{g/g}$)				
風蓮湖	water	0.9-35.3	56			真名垣(2008)
	sediment	13-141($\mu\text{g/g}$)				
火散布沼	water	1.2-4.6	3.58	64	18	本研究
	sediment	4.4-154				
	sediment	1.5-58.3($\mu\text{g/g}$)				