

図4 水温の変動

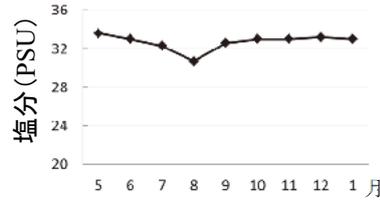


図5 塩分の変動

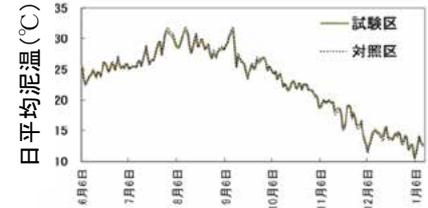


図6 泥温の変動

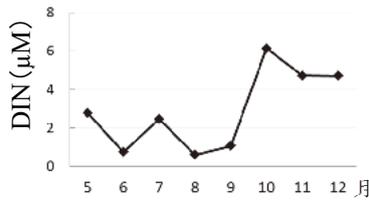


図7 DINの変動

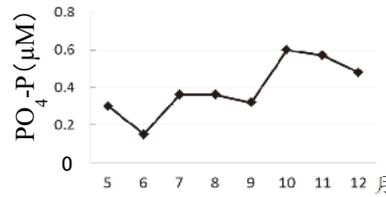


図8 PO<sub>4</sub>-Pの変動

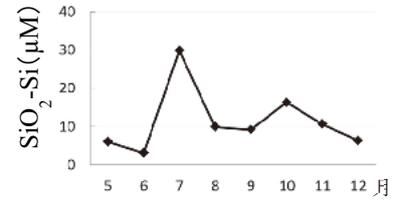


図9 SiO<sub>2</sub>-Siの変動

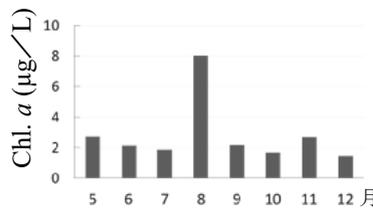


図10 海水中 Chl. a 濃度の変動

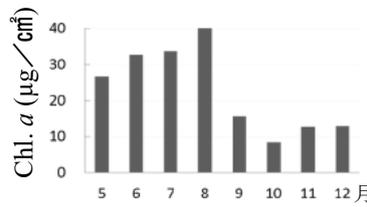


図11 干潟堆積物中 Chl. a 濃度の変動 (試験区)

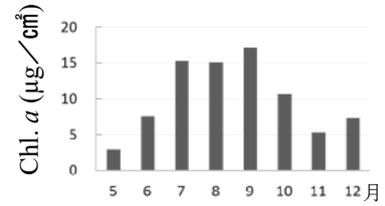


図12 干潟堆積物中 Chl. a 濃度の変動 (対照区)

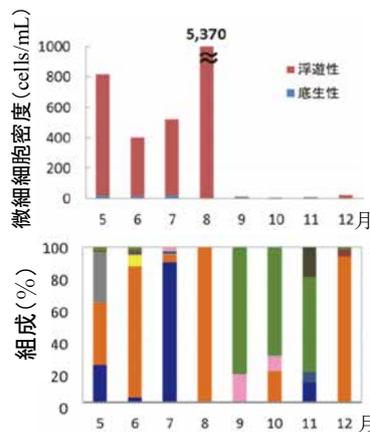


図13 海水中の微細藻類細胞密度の変動および組成

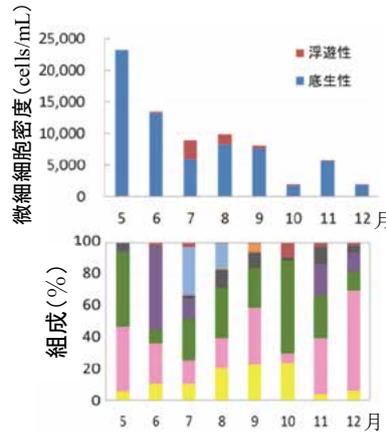


図14 干潟堆積物上清の微細藻類細胞密度の変動および組成 (試験区)

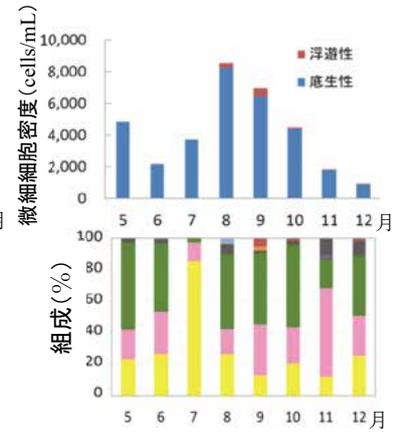
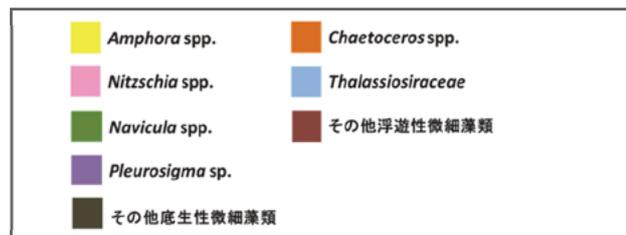
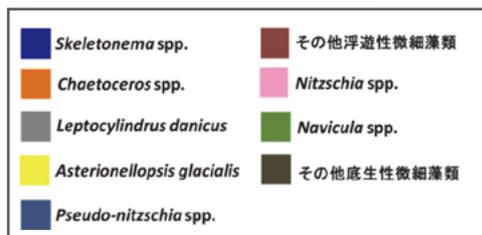


図15 干潟堆積物上清の微細藻類細胞密度の変動および組成 (対照区)



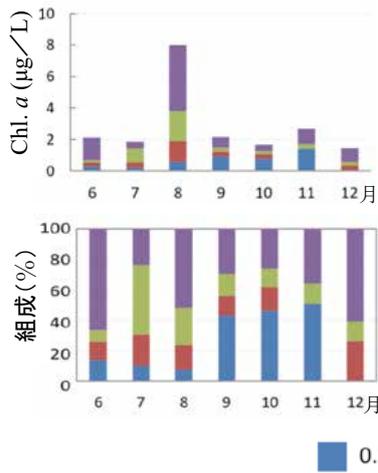


図 16 海水中の微細藻類の細胞サイズ別 Chl. a 濃度および組成

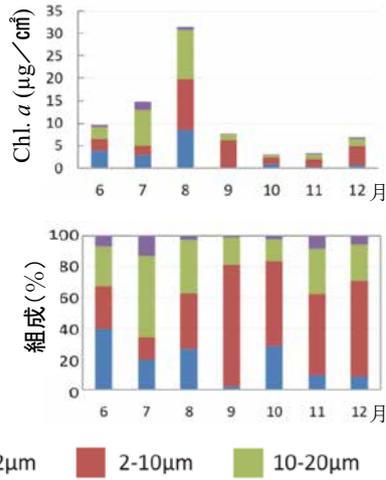


図 17 干潟堆積物上清の微細藻類の細胞サイズ別 Chl. a 濃度および組成 (試験区)

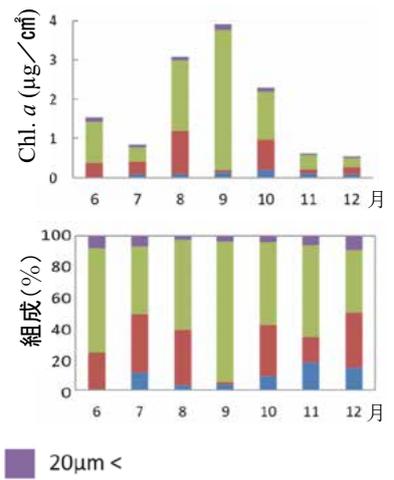


図 18 干潟堆積物上清の微細藻類の細胞サイズ別 Chl. a 濃度および組成 (対照区)

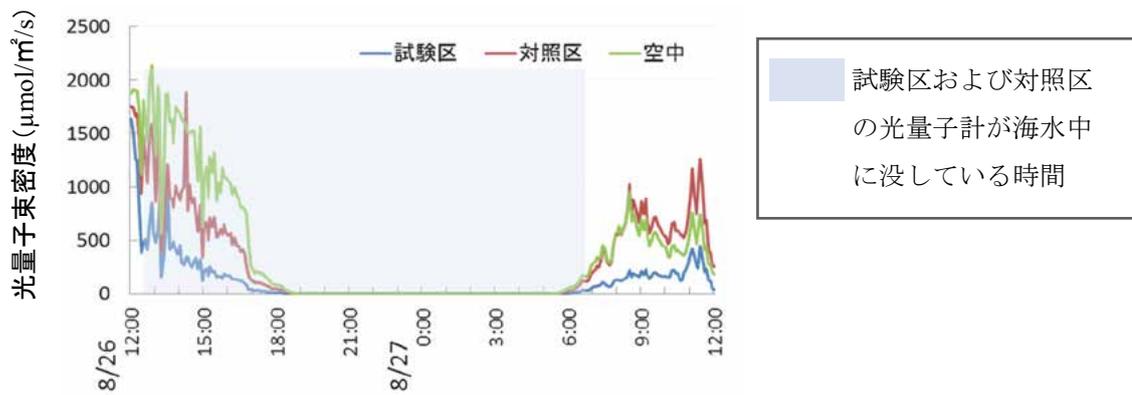


図 19 和歌浦干潟における試験区, 対照区, 空中の光子束密度

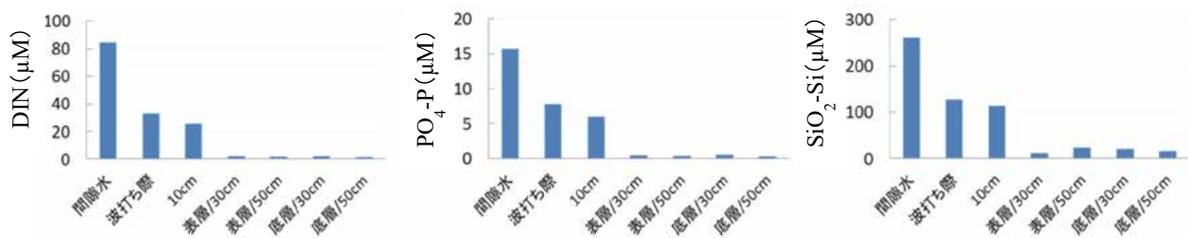


図 20 上げ潮時の潮位別の栄養塩濃度 (DIN, PO<sub>4</sub>-P, SiO<sub>2</sub>-Si) の経時変化 (8月)

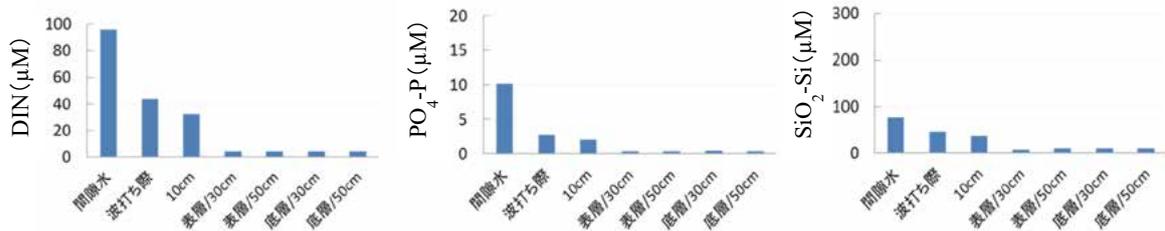
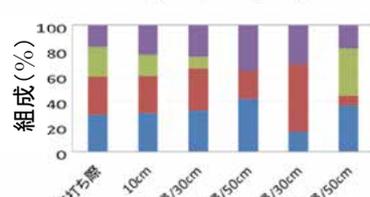
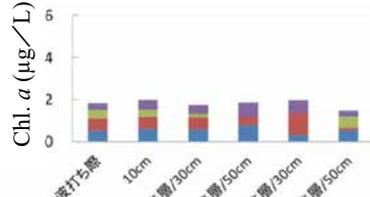
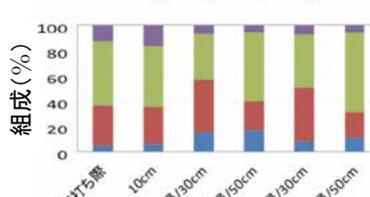
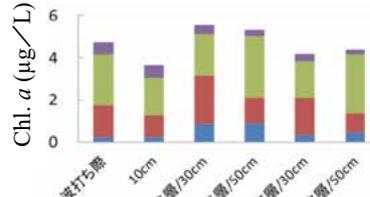
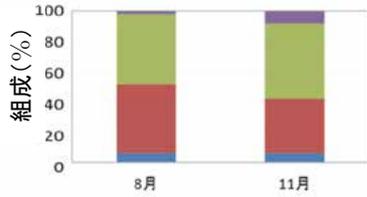
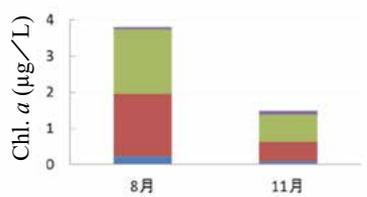


図 21 上げ潮時の潮位別の栄養塩濃度 (DIN, PO<sub>4</sub>-P, SiO<sub>2</sub>-Si) の経時変化 (11月)



0.2-2µm    2-10µm    10-20µm    20µm <

図 22 干潟堆積物上清の微細藻類の細胞サイズ別 Chl. a 濃度および組成

図 23 上げ潮時における潮位別の海水中の微細藻類の細胞サイズ別 Chl. a 濃度および組成 (8月)

図 24 上げ潮時における潮位別の海水中の微細藻類の細胞サイズ別 Chl. a 濃度および組成 (11月)

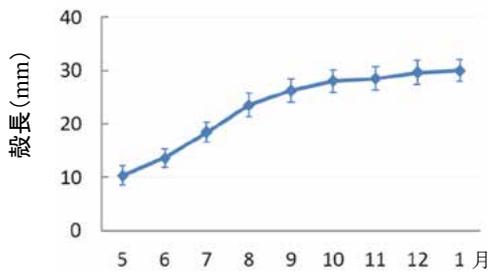


図 25 アサリの殻長の推移 (エラーバーは標準偏差)

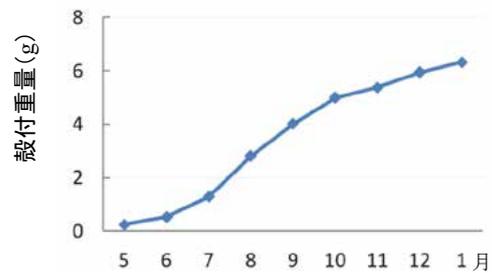


図 26 アサリの殻付重量の推移

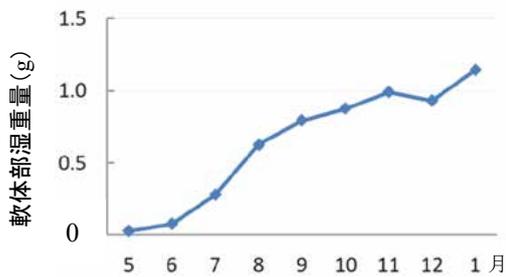


図 27 アサリの軟体部湿重量の推移

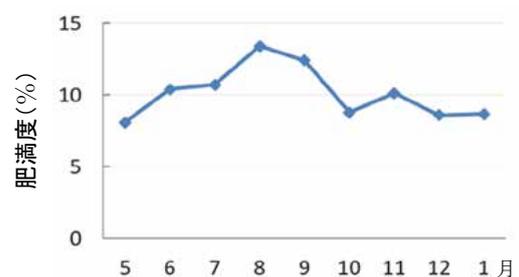


図 28 アサリの肥満度の推移

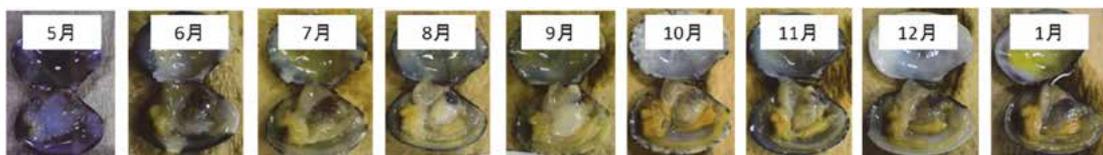


写真 1 (参考) 各月のアサリ軟体部の変化

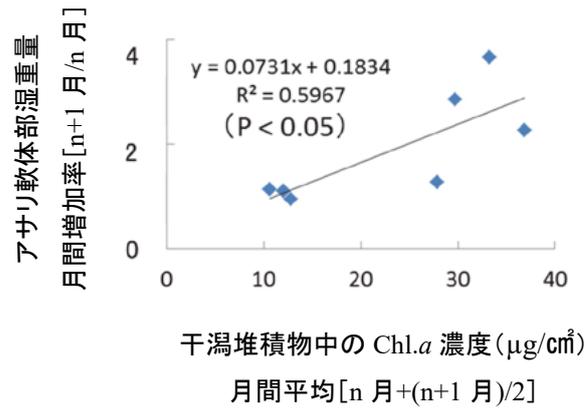


図 29 干潟堆積物中の Chl.a 濃度（試験区）とアサリ軟体部湿重量との関係

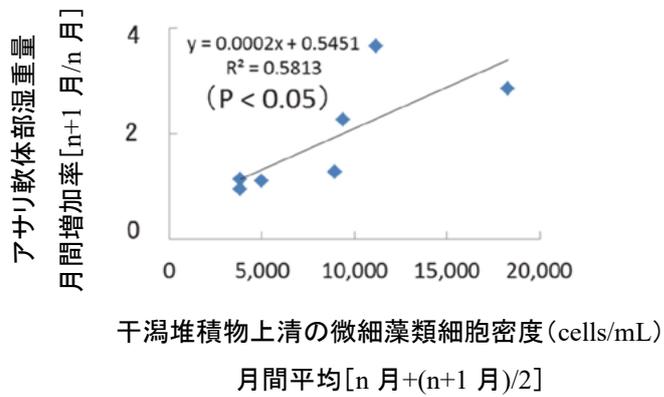


図 30 干潟堆積物上清の微細藻類細胞密度（試験区）とアサリ軟体部湿重量との関係

## 課題番号：1) -イ-③

### 瀬戸内海の栄養塩環境が二枚貝生産に及ぼす影響の評価

水産研究・教育機構 瀬戸内海区水産研究所  
浜口昌巳，阿保勝之，松原 賢

**【背景・目的】**本研究課題では最新の浅海定線のデータを加え，既存のデータを用いて瀬戸内海全体でアサリ・ハマグリ等の二枚貝の生産と海洋や栄養塩環境との関係を解析する。また，二枚貝の餌となる微細藻類の特定を行うために，まず，サイズ分画等により，二枚貝類の浮遊幼生や成貝の餌生物の絞込みを行うとともに，次世代シーケンサー（以下，NGS と略する）等の最新の遺伝子解析技術を用いた種の特定技術の開発を行う。

これらの知見を活用して瀬戸内海の栄養塩環境が二枚貝生産に及ぼす影響の評価を行う。加えて，近年，多発する傾向があるカキ類の採苗不良についても栄養塩類等海洋環境との関係を検討するための予備的な解析を行う。

令和元年度も引き続き瀬戸内海全体の浅海定線の調査データを収集して様々な解析のためのデータベース化を進める。本年は瀬戸内海中央部の環境調査やアサリ，ハマグリ，マガキ等二枚貝類の生産量・出荷量のデータを集める。これに加えて，調査船による広島湾調査や干潟域の調査で餌となる微細藻類試料を採取して量的変化を調べるとともに，遺伝子解析による質的評価を行う。なお，しらふじ丸による海洋環境調査（水温，塩分，クロロフィル，栄養塩類量等）は6～11月の間に行う。さらに，二枚貝養殖漁場の栄養塩動態に関する数値シミュレーションに取り組み，陸域および隣接海域からの栄養塩供給が漁場の栄養塩動態に与える影響を解析する。

#### 【方法】

##### 1) 浅海定線調査データ等を活用した栄養塩環境が二枚貝生産に及ぼす影響評価の検証

瀬戸内海区水産研究所が瀬戸内海の沿岸府県と協力して浅海定線調査データやアサリ等二枚貝類の生産統計のデータを活用して栄養塩等海洋環境が二枚貝生産に及ぼす影響を，昨年度報告した解析方法により検討した。

##### 2) 広島湾の海洋環境観測と干潟域での二枚貝餌料調査

広島湾の海洋環境調査は6月11～14日，6月25～28日，7月9～12日，7月25～30日，8月26～29日に実施し，AAQによる海洋観測，採水して植物プランクトンのサイズ組成，アサリ・マガキの浮遊幼生調査を行った。これに加えて，海水中の微細藻類の metabarcoding 解析に用いるため広島市水産振興センターの定期調査でも採水した。なお，広島湾の調査は広島県立総合技術研究所水産海洋技術センター水産研究部水野健一郎氏と共同で行った。さらに，広島県廿日市市の干潟において定期的に干潟堆積物を採取するとともに，瀬戸内海区水産研究所のポンツーンで海水を採取して微細藻類分析用の試料とした。干潟堆積物試料は，アサリは懸濁物食者であるのでろ過海水を加えて混合してしばらく静置した後，懸濁物を 20  $\mu\text{m}$  のナイロンネットフィルターでろ過し，通過した画分をさらに 0.2  $\mu\text{m}$  のポアサイズの Nucleopore (Millipore) フィルターでろ過してフィルター上の懸濁物を試料とした（図1）。海水試料についても同様に 0.2～20  $\mu\text{m}$  のサイズ分画を行い，フィルターは遺伝子解析まで凍結

して保存した。なお、比較対照には和歌浦干潟で和歌山県水産試験場、北村章博研究員が採取した底泥および海水試料を用いた。

### 3) 次世代シーケンサー (NGS) による微細藻類の種組成の解析

今年度はまず、干潟に生息するアサリの餌として重要であるが、これまで研究が進んでいなかった底性の微細藻類の種を同定するために、干潟で採取した試料の次世代シーケンサーを用いた **metabarcoding** 解析を検討した。**Metabarcoding** 解析による微細藻類の種の同定は用いる遺伝子領域によって異なるが、昨年度の研究により、**Bradley et al (2016)**で報告されている4組のPCRプライマーのうち18SsRNAのV8-V9領域を標的としたPCRプライマーV8fと1510rを用いて解析した。試料は2)の方法で採取した干潟のものを用いた。得られた結果はBLASTサーチを行って可能な限り種レベルまで同定した。得られたリストから採取した場所間の種の多様度や類似度を計算するとともに、微細藻類の出現リストを作成した。また、本年度は2)で採取した試料を用いて海水中の微細藻類のNGSによる**metabarcoding**解析の手法について検討した。

### 4) 二枚貝養殖漁場の栄養塩動態に関する数値シミュレーション

課題1)-イ-①を担当する兵庫県と共同で播磨灘北西部の二枚貝養殖漁場における栄養塩動態に関する数値シミュレーションによる解析を行い、陸域および隣接海域からの栄養塩供給が漁場の栄養塩動態に与える影響を解析する。今年度は昨年度に作成した三次元物理-低次生態系結合モデルを改良するとともに、当該海域における河川の水質データを再整理して陸域からの負荷量の推定精度を向上させ、海域の栄養塩濃度や餌料濃度の計算を行った。

## 【結果】

### 1) これまでの瀬戸内海区水産研究所生産環境部の栄養塩環境が二枚貝生産に及ぼす影響評価の検証

今年度までの瀬戸内海の海洋環境並びに各地の浅海定線調査結果を取り纏めた概要を下記に示す。

- ①瀬戸内海の西部海域は1990年初頭から、中部、東部はそれよりも遅れて栄養塩類の低下、クロロフィル量の減少が見られる。
- ②冬季水温の上昇はいずれも1980年代半ば
- ③ハマグリ漁獲量は1960年代後半から減少、アサリは1990年代から減少している。マガキは養殖で生産されるので、判断が難しいが、近年生産量は減少している。
- ④海洋環境のデータ類は比較的残されているが、植物プランクトンの種組成を長期に詳細に調べたデータはほとんどない。

近年の温暖化による水温上昇や貧栄養化などによる海洋環境の変化に伴う一次生産者の構成種の変化を調べる必要があるが、④のように植物プランクトンの種組成の変化を調べるための基礎的な情報が少ない。そのためにも、以下の3)で説明する新しい技術開発は必要と考えられた。

### 2) 広島湾の海洋環境観測と干潟域での二枚貝餌料調査

広島湾の海洋環境調査は6月11~14日、6月25~28日、7月9~12日、7月25~30日、8月26~29日に実施した。今年度は6月までは広島湾の水温は高めに推移し、マガキの産卵が

早くなるのではないかと予想されたが、6月中旬以降水温上昇が遅れ、マガキの大規模産卵は7月後半となった。それ以前に7月中旬から後半に広島地方ではまとまった降雨があり、その後、広島湾のクロロフィル濃度は急増し、水温も5m水深でも25°C以上となり、8月上旬からマガキの採苗が好調となった。このことから昨年度と同様、降雨による陸域からの栄養塩類の供給が、瀬戸内海の沿岸の生物生産には重要であることが明らかとなった。また、本年の降雨の状況から広島湾では降雨量50mm程度では必要な栄養塩類が供給されないのではないか、ということが考えられた。これについては、次年度も観測を続け、量的な把握を進めたいと考えている。

### 3) 次世代シーケンサー (NGS) による微細藻類の種組成の解析

干潟試料のNGSによる解析の結果、各試料とも8~24万リードの配列情報が得られ、そのうちBLASTサーチによって3000~5000程度のoperational taxonomic unit (以下、OTUと略する)が確認された(図2)。そのうち、微細藻類に分類されたOTUの構成は図3に示すが、ほとんどが珪藻類であり、次いで、渦鞭毛藻、緑藻、灰色藻、ハプト藻、紅藻、クリプト藻であった。珪藻類では*Chaetoceros* や *Skeletonema* 属など海水中を浮遊している種類が多く、底生性のもものでは *Navicula* や *Nitzschia* が見られた。微細藻類以外ではピストコンタ、ツボカビ、ミズカビ、アオサやシオグサ類などの糸状藻類の遊走子などが検出された(図4)。干潟間の比較では類似度を求めたが、広島湾内の丸石と浜毛保は類似性が高かったが、和歌浦では低く、海域間の差が見られた。また、生物多様度は季節性が見られ、夏に低下した(図5)。海水の微細藻類の分析は干潟微細藻類と同様の方法で可能であることが判ったので、現在も解析中である。

### 4) 二枚貝養殖漁場の栄養塩動態に関する数値シミュレーション

播磨灘北西部における栄養塩動態や餌料環境を解析するため、昨年度に作成した三次元物理-低次生態系結合モデルの改良を行った。三次元物理-低次生態系結合モデルとしては中山(2011)が作成したモデルをベースとした。流動モデルとしてはPOM (Princeton Ocean Mode) を使用し、低次生態系の計算にはKKYSモデル (Kawamiya et. al, 1995) をベースにリンのコンパートメントを組み込んでいる。まず、瀬戸内海全域の計算を実施し、その計算結果(水温、塩分、水位、流速、水質濃度)を開境界の境界値として播磨灘北西部の計算を行った(図6)。

陸域からの流入負荷量の推定精度を向上させるため、播磨灘北西部に流入する河川および下水処理場の流量と水質濃度を整理した。今年度は、主要な2級河川の水質データを新たに入手して水質濃度の推定精度を向上させた。兵庫県の公共用水域水質等測定結果のうち、千種川(坂越橋)、夢前川(京見橋)および市川(工業用水取水点)における流量および水質濃度データ(2000~2018年度)を兵庫県水大気課より入手し、各2級河川における物質負荷量  $L$  (t/day) と流量  $Q$  ( $m^3/s$ ) の関係式(LQ式)を求めた(図7~9)。また、1級河川の揖保川については、国土交通省の水文水質データベースの流量・水質データ(上河原:2000~2018年)からLQ式を求めた(図10,表1)。2000年代(2000~2009年)と2010年代(2010~2018年)のLQ式を比較すると、河川の水質は改善傾向にあり、水質濃度が低下していることが分かる。

2010年代のLQ式を用いて河川水の年間の水質濃度を推定し、播磨灘北西部へ流入する陸域負荷量の年間平均値を求めた(図11)。なお、上記以外の2級河川の水質濃度については隣接する上記2級河川の水質濃度から推定した。また、下水処理場については、瀬戸内海環境保全協会(2011)を参考に排水流量と水質濃度を設定して負荷量を推定した。本海域における河川および下水処理場からの負荷量の割合は約2:1であった。なお、昨年度は2級河川の水質濃度を1級河川(揖保川)の水質濃度から推定し負荷量を過小評価していたため、今年度の推定値は昨年度の約1.5倍となった。

つぎに、三次元物理-低次生態系結合モデルの計算例を示す。図12には表層における塩分、DIN濃度およびChl.a濃度の計算例を示した。ここでは、課題1-4-①で兵庫県が昨年度に実施した播磨灘北西部沿岸域の水質調査の実施日に合わせて計算結果を示した。表層のDIN濃度は、千種川、揖保川、夢前川の河口付近や下水処理場周辺で高濃度となっているが、その影響範囲はあまり大きくない。Chl.a濃度もDINと同様に河口や下水処理場付近で高濃度となっているが、その影響範囲はDINより大きく、特に9月にはChl.a濃度が高く、より沖合域まで高濃度となっている。これらの濃度分布の傾向は、兵庫県が実施した調査結果と概ね一致していた。ただし、計算結果は沖合域のDIN濃度が低過ぎるなど、調査結果と一致しない部分もあった。今後は生態系パラメーターのチューニング等により調査結果の再現性を向上させるとともに、海域の物質収支を計算してカキ養殖場の餌料環境を評価する必要がある。

#### 【参考文献】

- Bradley, I. M., Pinto, A. J., Guest, J. S. Design and fvaluation of illumine Miseq-compatible, 18S rRNA gene-specific primers for improved characterization of mixed phototrophic communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(19):5878-5891, 2016.
- 中山哲巖. 瀬戸内海の流動と栄養塩に関するレビューと流動・低次生産モデルの開発. 水研センター 研報, 34, 49-70, 2011.
- Kawamiya, M., M. Kishi, Y.Yamanaka and N.Suginohara. An Ecological-Physical Coupled Model Applied to Station Papa. *Journal of Oceanography*, 51, 635-664, 1995.
- 瀬戸内海環境保全協会. 平成22年度海域の物質循環健全化計画検討(播磨灘北東部地域検討)とりまとめ. 平成22年度環境省請負業務結果報告書, 2011.
- 岡本繁好, 原田和弘, 宮原一隆. 平成30年度漁場環境改善推進事業「栄養塩の水産資源の及ぼす影響の調査」報告書. 水産研究・教育機構 瀬戸内海区水産研究所, 2019, 18-25.

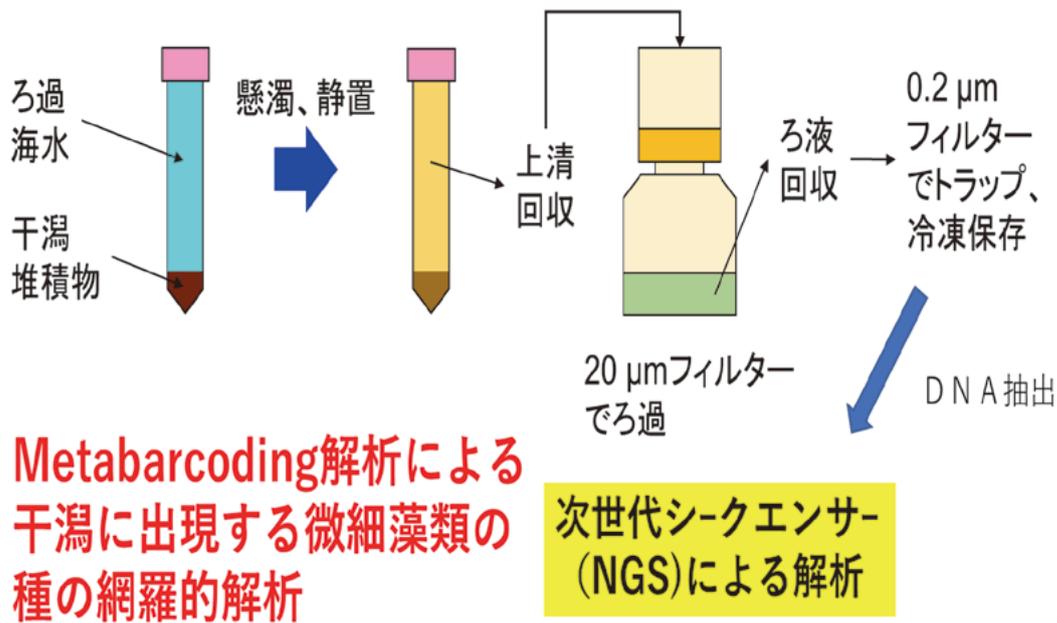
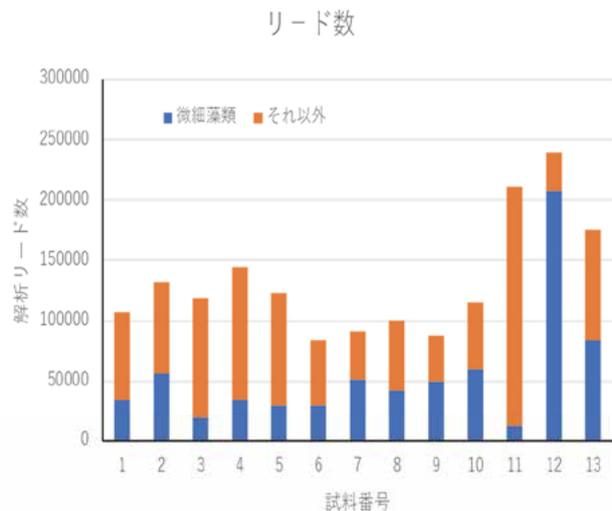


図1. 干潟試料の処理方法

## NGSによるmetabarcoding解析結果

サンプル番号	観測点	観測日	備考
1	広島湾・丸石	2018/6/28	<20 μmサイズ
2	広島湾・丸石	2018/7/27	<20 μmサイズ
3	広島湾・丸石	2018/8/27	<20 μmサイズ
4	広島湾・丸石	2018/9/25	<20 μmサイズ
5	広島湾・丸石	2018/10/29	<20 μmサイズ
6	広島湾・浜毛保	2018/6/28	<20 μmサイズ
7	広島湾・浜毛保	2018/7/27	<20 μmサイズ
8	広島湾・浜毛保	2018/8/27	<20 μmサイズ
9	広島湾・浜毛保	2018/9/25	<20 μmサイズ
10	広島湾・浜毛保	2018/10/29	<20 μmサイズ
11	和歌山市・和歌浦	2018/6/25	<20 μmサイズ
12	和歌山市・和歌浦	2018/8/28	<20 μmサイズ
13	和歌山市・和歌浦	2018/10/23	<20 μmサイズ



解析リード数は10万を超えており、BLASTサーチでも1万を超えるOUTが得られた。そのうち、微細藻類群30-80%程度

図2. metabarcoding 解析により得られたリード数