

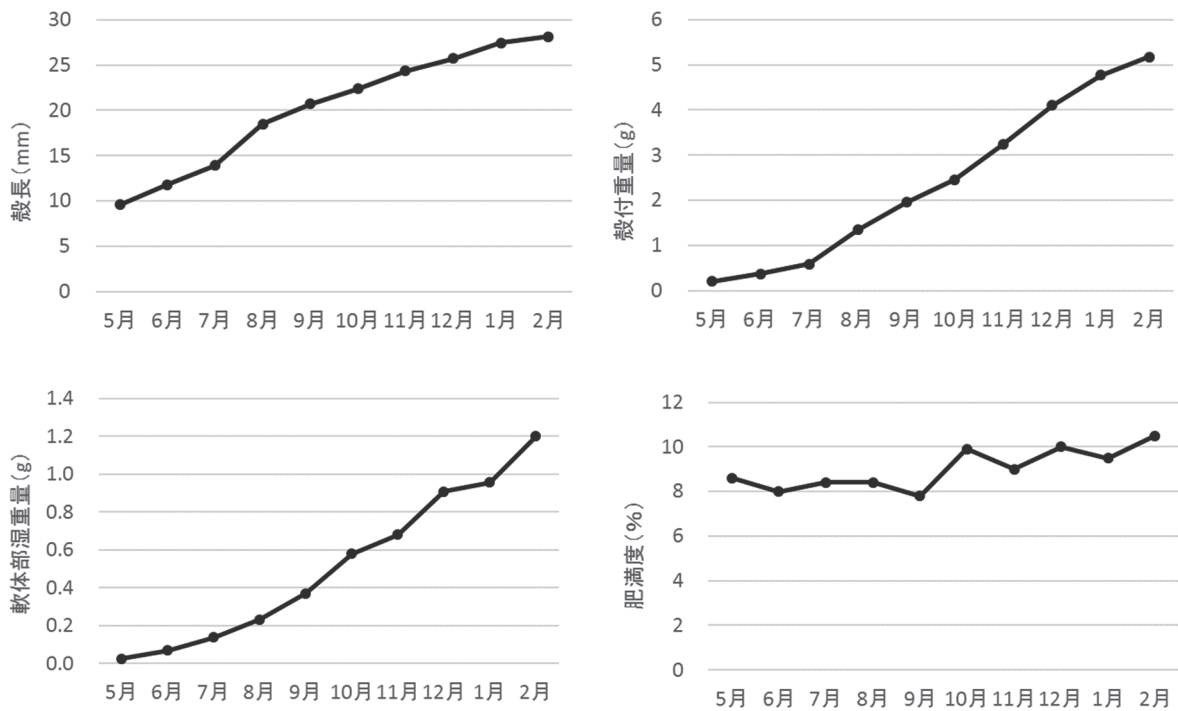


図 18 1 年目アサリ飼育試験結果（左上図：殻長，右上図：殻付重量，左下図：軟体部湿重量，右下図：肥満度）

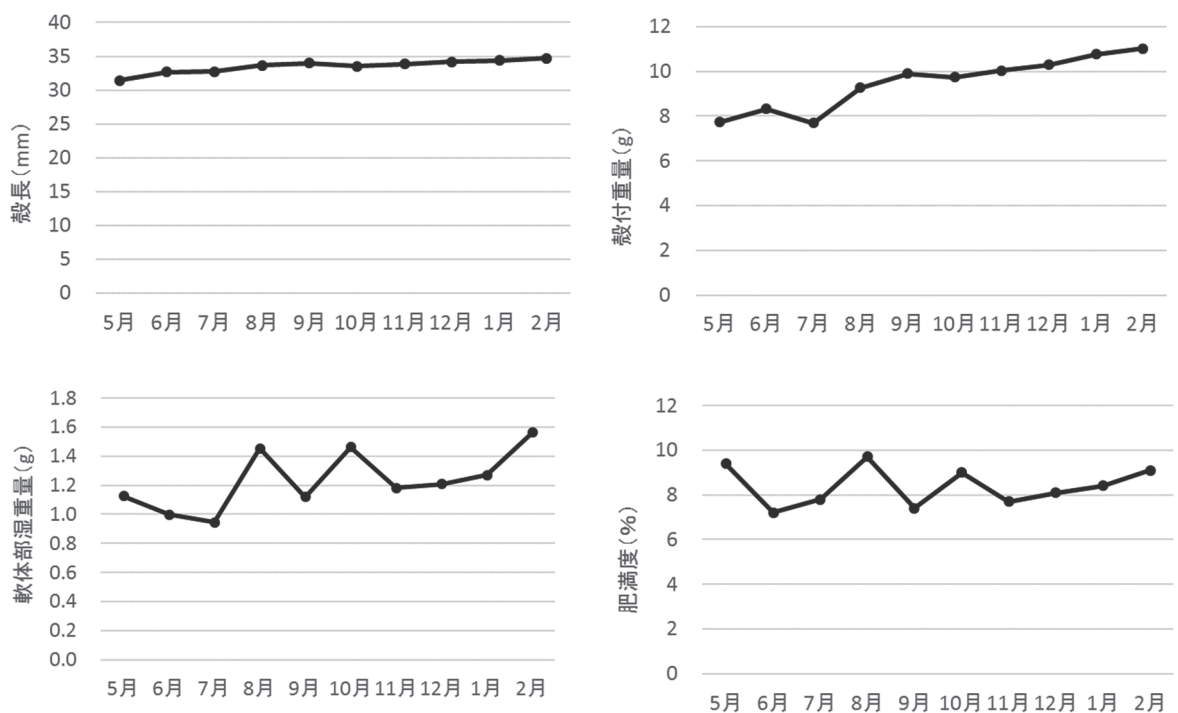


図 19 2 年目アサリ飼育試験結果（左上図：殻長，右上図：殻付重量，左下図：軟体部湿重量，右下図：肥満度）

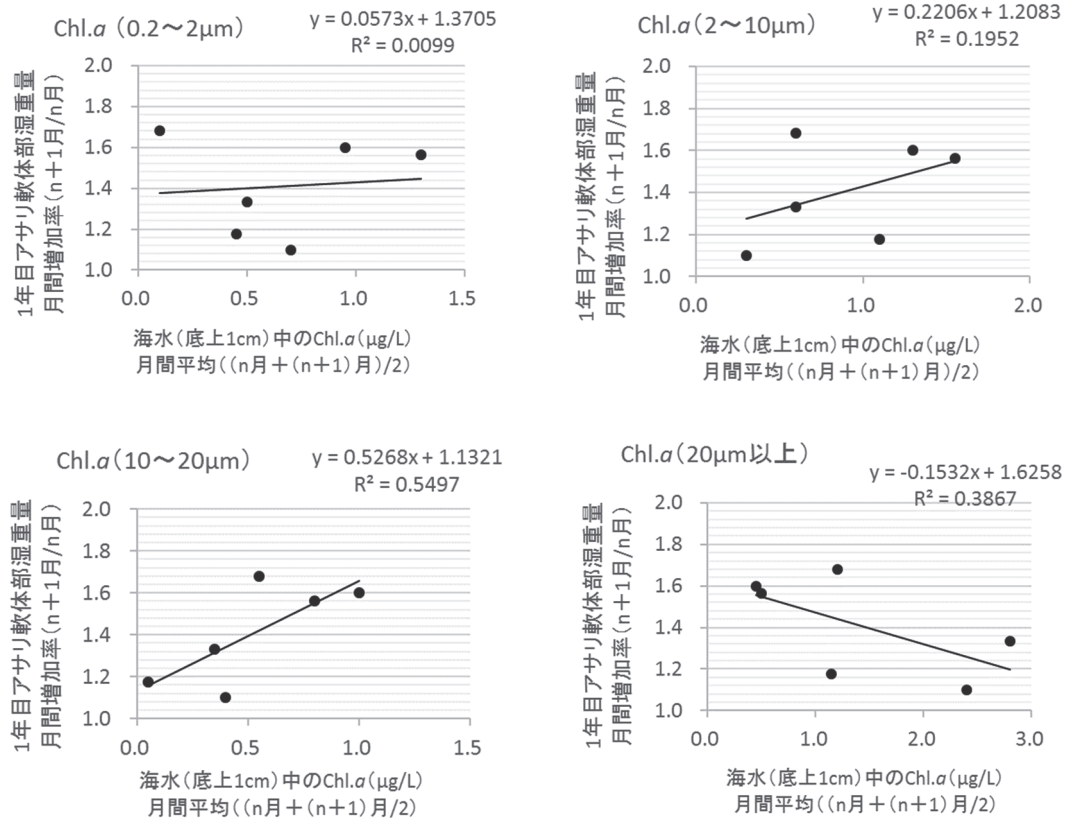


図 20 海水の分画別クロロフィル *a* とアサリ軟体部湿重量の関係

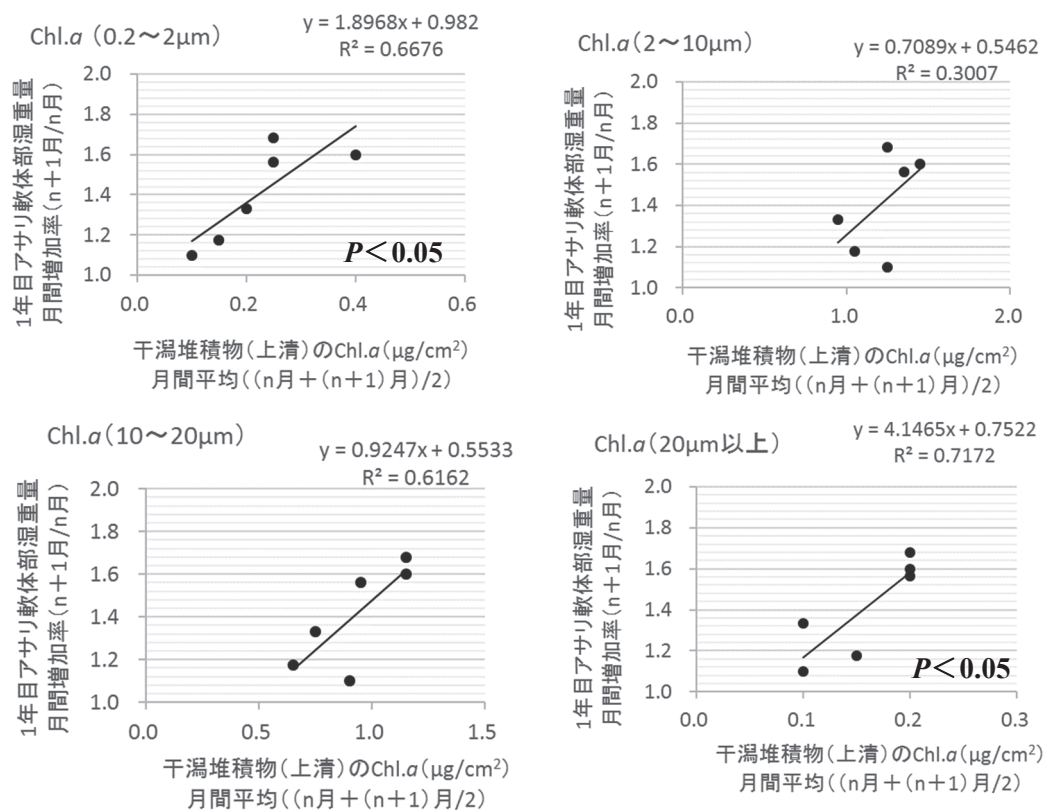


図 21 干潟堆積物（上清）の分画別クロロフィル *a* とアサリ軟体部湿重量の関係

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 水産技術研究所

浜口昌巳・阿保勝之・松原 賢

【背景・目的】

本研究課題ではまず、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ことになっていたが、これについては前年度までに終了した。そのため、本年度からは、二枚貝の生産と栄養塩類の関係を詳細に調べるための調査・研究に特化した。

二枚貝の生産性を考える際にはその生物の生活史等の生態を知るべきである。例えば、アサリの場合は天然で発生した幼生が約 3 週間海水中で成長した後、アサリに適した環境の干潟域等に着底し、殻長 5mm 以上となると親貝と同じような摂餌システムが完成し、約 2-3 年後に漁獲される。そのため、アサリ資源を健全に維持するためには、浮遊幼生期、着底稚貝期、成貝期に分けて考える必要がある。日本国内でアサリが大量に生産されていた 1970 年代から 1980 年代半ばまでの時期は、このサイクルが健全に廻っていたと推測される。しかし、その後、1990 年代以降アサリの生産量は激減し、現在は最盛期の 1/20 程度である。これまで、アサリの減少原因を解明するために、稚貝期以降の調査が国内各地で盛んに行われてきて様々な原因が指摘されてきた。しかしながら、それぞれの原因について然るべき対処方法等が検討されてきたが、アサリを生産量を回復させるには至っていない。

そもそも、栄養塩環境と二枚貝の生産性との関係は、二枚貝の餌となる植物プランクトンを介して成立するが、浮遊幼生期は 10 μm 以下の餌しか摂餌できないし、また、摂餌システムが完成していない殻長 0.3~5mm までの稚貝期は親とは異なる餌を摂食しているはずである。このため、栄養塩環境が二枚貝生産に及ぼす影響を評価する際には、この 3 つの成長段階に分けて検討すべきである。先に述べたように、アサリでは稚貝期以降の調査が盛んに行われてきたが、生産性を回復するには至っていない。その原因として、例えば、浮遊幼生期の餌が不足していたとしたらどうであろうか？アサリは r 戦略者であり、大量に加入することによって食害や病害等を乗り越えて資源を形成する生物種である。そのため、浮遊幼生期に問題があれば、r 戦略者としての生態戦略が成り立たない。一方、広島湾ではマガキ養殖が盛んであるが、日本国内で生産されるマガキの約 9 割以上は天然採苗に依存している。そのため、マガキの生産性もこの浮遊幼生期を健全に過ごせるか？が焦点となるが、マガキ幼生は孵化後 3 日以上は飢餓にさらされると生残率が低下する(His and Seaman 1992)など、発生直後の餌料環境はその後の成長・生残に大きな影響を与える。

そこで、本研究では、これまでほとんど研究されてこなかった二枚貝の浮遊幼生期等の餌環境を調べ、栄養塩との関係を評価することを目的に調査・研究を進めることとした。一般に、二枚貝の餌としてはナノ・ピコサイズの微細藻類が主体となるが、それらは光学顕微鏡では観察しにくいので、まず、その分類・同定特定を行うために、広島湾で採取した海水をサイズ分画して、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った。次いで、マガキおよびアサリの産卵期に広島湾でこれらの浮遊幼生の出現状況や海洋環境を調べるとともに、NGS 解析用の試料を採取した。これらの試料を NGS で解析し、広島湾の植物プランクトンの組成を調べた結果から餌候補を絞り、その定量 PCR（以下、qPCR とする）による特定技術を開発した。

さらに、マガキやアサリ等の二枚貝養殖が盛んな播磨灘北西部において、栄養塩動態や餌料環境に影響を及ぼす要因について数値シミュレーションを用いて解析する。

【方法】

1) 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5月26日、6月16～19日、6月30～7月3日、7月7～10日、7月27～30日、8月6日、8月25～29日、10月5日、10月27-30日、1月14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や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の調査試料を活用した。採取した海水試料は10 μm の Nucleopore (Millipore) でろ過し、通過した画分をさらに0.2 μm 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。今年度は同様な方法で採取した2019年度の海水試料についてNGSによる 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、昨年度までの研究により、Bradley et al (2016)で報告されている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。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。

2) マガキ幼生と餌密度の関係の検討

種苗生産によって得た孵化後2日以内のマガキ幼生を当所で培養している *Pavlova lutheri* を用いて様々な餌密度条件下で24時間飼育して摂餌成功率を算出した。

3) マガキ幼生餌候補種の特異的 qPCR の構築

1) の結果からマガキ幼生の餌候補として *Cyclotella choctawhatcheeana* 近縁種と *Cyclotella striata* の18SrRNA から28SrRNA までの領域4.5KbpをPCR増幅して遺伝子情報を得て、Internally transcribed spacer 領域(以下、ITS とする)を標的としてqPCR用のPCRプライマーとdual-labeled probe（以下、DLP とする）を設計した。反応条件を検討したのち、検量線を作成した。

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用いて海域の栄養塩濃度や餌料濃度を計算するとともに、二枚貝養殖漁場における物質収支を計算し、二枚貝漁場への窒素供給源を明らかにした。

【結果および考察】

1) 広島湾の海洋環境観測と干潟域での二枚貝餌料調査

2019年はマガキの天然採苗は7月23日以降に好調となり、養殖に必要な量が確保できた

が、その前後の時期の NGS による解析結果を図 1 に示す。6～7 月にかけて途中、何度もマガキの大規模産卵があり、D 型幼生の大量出現が見られたが、採苗に繋がったのは 7 月 20 日前後に発生した D 型幼生のみであった。この際には、クロロフィル量が増加するとともに、*Cyclotella choctawhatcheeana* 近縁種の構成比率が急激に増加しており、本種がマガキ幼生の餌となっている可能性が示唆された。また、この解析により、例えば 7 月 15 日前後にもクロロフィル量は多かったがその際に発生したマガキ D 型幼生は着底まで至っていない。この時、優占していたのが *Prorocentrum triestinum* であり、本種はマガキ幼生の餌とはならないことが知られている。同様な現象は本年度も観察され、本年度は *Heterosigma akashiwo* と種が異なっていた。このように、以前から指摘されているが、クロロフィル量は二枚貝の生産性等の指標にはならないと考えられる。

2) マガキ幼生と餌密度の関係の検討

Pavlova lutheri を用いた実験によりマガキ D 型幼生の摂餌成功率は餌濃度依存的に上昇することが確認され、4200 cells/mL 以上の餌密度があれば、50%以上のマガキ幼生が摂餌に成功することが推定された（図 2）。それに対し、餌密度が 550 cells/mL 以下の場合、マガキ幼生は全く摂餌できない可能性が示された。このことから、マガキ D 型幼生では餌となる植物プランクトンの種だけでなく、その密度も摂餌に関係することが明らかとなった。このことは、特定の植物プランクトンがブルームを形成されないと二枚貝の生産には寄与しないということを示しており、栄養塩管理の点では重要であると推測される。今後は、特定の植物プランクトンについてクロロフィル量ではなく直接的に定量する手法が必要となるかもしれない。

3) マガキ幼生餌候補種の特異的 qPCR の構築

設計した qPCR の系は、これまでに広島湾で分離した *Chaetoceros* 属、*Skeletonema* 属、渦鞭毛藻類に反応しないことが確認されているが、暫時、特異性を検証しているところである。反応温度は 65℃で検量線は図 3 に示す。非常に高い定量性を示しており、今後、本種の野外での分布調査などの使用可能ではないかと考えられた。

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

播磨灘北西部の二枚貝養殖場における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を用いて海域の栄養塩濃度や餌料濃度を計算するとともに、二枚貝養殖漁場における物質収支を計算した。計算領域は、計算格子を 200m×200m（格子数 192×142）、鉛直 10 層とした（図 4）。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、水質濃度）を開境界の境界値として与えた。気象条件はメソ数値予報モデル（GPV-MSM）の地上データ（風向・風速、気温、相対湿度）および気象観測所データ（日射量）を与えた。陸域からの流入負荷としては、1 級 2 級河川とともに下水処理場について昨年度検討した負荷量を与えた。生態系モデルのパラメータは、沿岸海域における過去の事例を参考に調整した。

2018 年 8 月～12 月の表層における塩分、DIN 濃度および Chl.a 濃度の計算例を図 5 に示した。ここでは、課題 1-イ-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。表層塩分は、河川流量の変化に対応して揖保川、千種川の河口付近で低濃度となっており、兵庫県の調査結果と一致していた。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