

淡水二枚貝タテボシガイの藍藻資化能の評価と
環境 DNA を用いた湖沼におけるモニタリング手法に関する研究
Assimilation of cyanobacteria by the freshwater bivalve *Nodularia
nipponensis* and its monitoring in lakes using environmental DNA.

2022 年 3 月

菅原 巧太朗

Kotaro Sugawara

目次

第1章 緒論.....	3
第1節 アオコ問題の現状と解決への取り組み.....	3
第2節 アオコ防除のためのバイオマニピュレーション手法.....	5
第3節 環境 DNA 手法と淡水二枚貝調査への適用.....	11
第4節 研究目的及び研究内容.....	14
第2章 タテボシガイの藍藻資化能力の評価.....	18
第1節 はじめに.....	18
第2節 実験方法.....	20
2-2-1 タテボシガイの維持と餌料藻類の前培養.....	20
2-2-2 異なる水温及び餌料濃度におけるタテボシガイの藍藻資化速度の定量.....	24
2-2-3 80 日間におけるタテボシガイの持続的な藍藻資化効率の評価.....	27
2-2-4 タテボシガイの排泄物中の藍藻細胞活性の評価.....	31
2-2-5 データ解析.....	35
第3節 結果及び考察.....	36
2-3-1 異なる水温及び餌料濃度におけるタテボシガイの藍藻資化速度の定量.....	36
2-3-2 80 日間におけるタテボシガイの持続的な藍藻資化効率の評価.....	40
2-3-3 タテボシガイの排泄物中の藍藻細胞活性の評価.....	46
第4節 要約.....	49
第3章 八郎湖におけるタテボシガイの藍藻資化の実態調査.....	50
第1節 はじめに.....	50
第2節 実験方法.....	52
3-2-1 調査地の選定と概要.....	52
3-2-2 八郎湖沿岸部における藻類モニタリング.....	55
3-2-3 八郎湖沿岸部におけるタテボシガイの飼育実験.....	55
3-2-4 データ解析.....	56
第3節 結果及び考察.....	59
3-3-1 八郎湖沿岸部における藻類モニタリング.....	59
3-3-2 八郎湖沿岸部におけるタテボシガイの飼育実験.....	69
第4節 要約.....	76
第4章 タテボシガイの環境 DNA 検出のためのプライマー設計と DNA 放出特性の評価.....	77
第1節 はじめに.....	77
第2節 実験方法.....	78
4-2-1 オリゴヌクレオチドプライマーの作製.....	78

4-2-2	水槽実験	78
4-2-3	DNA 抽出と qPCR の条件	80
第 3 節	結果及び考察	83
第 4 節	要約	89
第 5 章	富栄養化湖沼八郎湖における環境 DNA 手法の適用	90
第 1 節	はじめに	90
第 2 節	実験方法	92
5-2-1	湖水試料を対象としたタテボシガイ eDNA の検出	92
5-2-2	紐状担体を用いた幼生捕集試料を対象としたタテボシガイ eDNA の検出	94
5-2-3	八郎湖全域における紐状担体を用いた幼生捕集試料を対象としたタテボシガイ eDNA の検出	97
5-2-4	タテボシガイ成員の密度調査及びその他環境因子の測定	97
第 3 節	結果及び考察	101
5-3-1	湖水試料を対象としたタテボシガイ eDNA の検出(2019 年)	101
5-3-2	湖水試料と紐状担体試料から得られた eDNA 濃度の比較(2020 年)	101
5-3-3	グロキディウム幼生由来 eDNA 検出系の八郎湖への適用	105
5-3-4	タテボシガイ成員の密度調査地点における各環境因子	110
第 4 節	要約	113
第 6 章	総合考察及び展望	114
第 1 節	総合考察	114
第 2 節	展望	117
謝辞	118
本研究に関連する成果発表(報文)	120
参考文献	121

第1章 緒論

第1節 アオコ問題の現状と解決への取り組み

淡水環境における藍藻類の異常増殖の発生は、世界的な問題である。藍藻類のうちのいくつかの種は、ミクロシスチンやアナトキシン等の毒素[1]及びジェオスミンや2-メチルイソボルネオール等の異臭味物質[2]を産生し、水質の悪化を引き起こす。藍藻類の発生は、北アメリカ、南アメリカ、ヨーロッパ、アフリカ、アジア、ニュージーランドを含むオーストラリア地域など、世界中の広範な地域で報告されている[3]。特に、藍藻毒に注目した文献だけでも2018年までに世界66カ国869カ所の淡水生態系で1118件の研究事例が報告されており[3]、水鳥[4]、ウシ[5]やヒツジ[6]などの家畜、魚類[7]などの中毒死事例も報告されている。藍藻類の異常増殖は、野生生物だけでなく人間活動にも深刻な影響を与えている。2014年にはアメリカのエリー湖で藍藻類の異常増殖が発生し、近隣の浄水場からWHO（世界保健機関）の暫定基準値を超える $1.0\ \mu\text{g L}^{-1}$ 以上のミクロシスチンが検出され、オハイオ州の住民40万人が取水制限の被害を受けたことが報告されている[8]。

藍藻類は増殖に適さない低水温となる冬季から春季にかけては、栄養細胞[9-16]や休眠細胞[13-18]の状態では底質中で越冬し、初夏に底質中から水柱へ回帰する[18-20]。回帰後夏季に異常増殖し、その後晩秋になり増殖に適さない低水温条件になると、湖底へ沈降し再び越冬するという生活史を持つ[18-20]。藍藻の回帰のトリガーになっている環境因子については、水温上昇[10, 12, 14, 16]、光条件[13]、長期的に低水温を経験すること[9, 16]及び底質の攪乱[13]など様々な側面から研究が行われており、複合的な要因が関わっていると推察される。

回帰後の増殖のために最も重要な因子の一つとして夏季の水温上昇が特に注目されており[21]、今後、地球温暖化が進行することによって世界的に藍藻の異常増殖が拡大することが予想されている[21, 22]。Mullinらは、1971-2000年の温帯域の6つのアメリカの湖沼のデータに基づいて、今後10年ごとに湖沼の水温が平均 0.3°C ずつ上昇し、藍藻の異常増殖に有利な湖沼の熱成層化が約50年で2-4週間長期化することを予測している[22]。これに伴い、2041-2070年までに水温が 25°C を超える日数が年間 48 ± 8 日増加することも予想されている[22]。同様な中国の温帯の湖沼である太湖では、Yangらは水温 $20-30^{\circ}\text{C}$ において藍藻 *Microcystis* 属が活発に増殖することを示した[12]。したがって、水温が 25°C を超える日数が年間で約50日増加すると、より大規模な藍藻の異常増殖が懸念される。さらに、日本の温帯の湖沼である八郎湖においてArakiらは 15°C であっても $0.17\ \text{day}^{-1}$ の比増殖速度（倍化時間1.8日）で増殖可能な低温耐性 *Microcystis* 株の存在を報告している[23]。このような低温耐性の藍藻の存在も考慮すると、藍藻の異常増殖に規模はより広範囲に拡大することが懸念される。したがって、藍藻の異常増殖は、世界中の淡水環境において普遍的な問題であり、解決が急がれる喫緊の課題である。

日本では、藍藻類の異常増殖は俗にアオコと呼ばれ、八郎湖[23, 24]、霞ヶ浦[25, 26, 27]、琵琶湖[28, 29, 30, 31]、及び宍道湖[32, 33, 34]など主要な湖沼での発生が確認され

ている。これらの湖沼を含めた11の湖沼（八郎湖 [秋田県, 35–37]、釜房ダム貯水池 [宮城県, 38]、霞ヶ浦 [茨城県、栃木県、千葉県, 39]、手賀沼 [千葉県, 40]、印旛沼 [千葉県, 41]、野尻湖 [長野県, 42]、諏訪湖 [長野県, 43]、琵琶湖 [滋賀県及び京都府, 44]、中海 [島根県及び鳥取県, 45]、宍道湖 [島根県, 46]、児島湖 [岡山県, 47]）は、湖沼水質保全特別措置法に基づく指定湖沼として国からの指定を受けており、水質改善が急務な湖沼として位置づけられている。このうち、八郎湖[23, 24]、霞ヶ浦[25, 26, 27]、手賀沼[48, 49]、印旛沼[50, 51]、野尻湖[52]、諏訪湖[53, 54]、琵琶湖[28, 29, 30, 31]、中海[32, 33]、宍道湖[32, 33, 34]、児島湖[55, 56]では、過去にアオコの発生が報告されている。また、釜房ダム貯水池では、非アオコ形成藍藻種である *Phormidium* 属の増殖が報告されており、カビ臭の産生が問題となっている[38, 57]。以上のように、日本国内各地の湖沼においてもアオコの発生が確認されている。

一般的にアオコを防除するための対策として、環境中への栄養塩の負荷を削減させるために集水域での下水道整備や無代掻き・不耕起栽培の促進、各家庭における生活雑排水対策が施される[35–47]。しかし、アオコが発生する多くの水系では、このような対策だけではアオコを抑制することはできず、化学・物理・地球工学的様々な処理が併用される場合が多い。化学的アオコ防除対策として銅イオンによるアオコの増殖抑制を目的とした硫酸銅散布が挙げられる[58]。藍藻 *Microcystis* 属及び *Anabaena* 属は銅に対する50%比増殖速度阻害濃度が約20 nMなのに対し、緑藻 *Chlorella* 属は580 nMであり、藍藻の方が銅による増殖阻害の感受性が高い[59]。この感受性の差を利用して硫酸銅を用いたアオコの防除が行われるが、流域での希釈のために連続的な投与が必要になることが課題である。物理的アオコ防除対策では、機械を用いて物理的にアオコを破壊する方法がいくつか提案されている。例えば、水中に約10 MPaを超える超高压水中衝撃波を発生させる装置を用いてアオコを死滅処理する方法[50]やオゾン発生器を用いてオゾンの強力な酸化作用を用いてアオコを分解する方法[60]などが挙げられる。また、別の物理的処理として、アオコ及び栄養塩を蓄積した底泥を物理的に除去する浚渫も行われる[61, 62]。しかしながら、浚渫は生態系を大幅に改変する。フィンランドでは浚渫後に重金属流出が原因による魚類の大量斃死が予期せず発生したことが報告されており[63]、施工の際は十分な事前調査が必須である。地球工学的処理では、アルミニウムや化学的に修飾したランタン及びゼオライトなどにリンを吸着させる方法[64]が適用されている。また、物理的処理と地球工学的処理を併用したハイブリット処理も提案されており、加圧浮上分離装置（加圧条件下（7 kPa）で空気を水に溶解させ、その後圧力を開放させ微細気泡を生成し、底泥中の有機物を浮上分離させる方法）に続く、酸化マグネシウム添加によるリン溶出抑制を行いアオコの増殖を抑制する方法[48]が検討されている。しかしながら、これらの上記の方法は、薬剤の連続投与、機器の維持管理コスト、限定的な有効範囲の観点から流域面積の広い湖沼において持続的な水質浄化効果の維持が課題となっている。

第2節 アオコ防除のためのバイオマニピュレーション手法

近年、安価且つ持続的なアオコ防除のための手法としてバイオマニピュレーション（生物操作）が検討されている[65, 66]。バイオマニピュレーション手法とは、生物相を人為的に操作することで人間にとって望ましい状態に生態系を修復する環境管理手法のことである[65, 66]。藍藻防除のためのバイオマニピュレーションには、藍藻に対して捕食圧をかけて直接的に除去するトップダウン制御と藍藻の増殖源となる窒素及びリンなどの栄養塩を削減して増殖を抑制するボトムアップ制御がある[67, 68]（図 1-1）。トップダウン制御では二枚貝[69]、動物プランクトン[70]、及び植物プランクトン食性魚[65]等のろ過摂食生物が藍藻に捕食圧をかけるために、ボトムアップ制御では抽水植物[67]や沈水植物[68]が栄養塩を制御するために、バイオマニピュレーションのための生物として用いられる。

ろ過摂食生物を用いたトップダウン制御では、ろ過摂食生物の利用可能な粒子径の範囲と除去対象となる懸濁物質の粒子径の範囲が一致する必要がある。アオコを形成する藍藻類は単一細胞のほか、コロニー状、フィラメント状など様々な形態の群体として存在している。中国の太湖で発生した藍藻 *Microcystis* spp. のコロニーのサイズは 30~800 μm [71] であり、京都府広沢池で発生した *Planktothrix* spp. のトリコームのサイズは 10~600 μm [72] であったことが報告されている。このため、ろ過摂食生物を用いた藍藻の防除では、アオコを形成している幅広い粒子径の群体をろ過できる生物が効果的であると言える。

ろ過摂食生物の利用可能な粒子径の範囲は、既往研究で検討されている。動物プランクトンでは、比較的大型の枝角類である *Daphnia magna* は 50 μm までの粒子をろ過可能であるが、他の多くは約 2~20 μm の粒子しか利用できないことが示されている[73]。したがって、動物プランクトンは単一の藍藻細胞や分散した小サイズの群体の防除には効果的であるが、100 μm 以上に及ぶサイズの大きな群体の防除には不向きである。植物プランクトンを摂食する魚類では、ハクレン (*Hypophthalmichthys molitrix*)、コクレン (*Aristichthys nobilis*)、及びティラピア (ナイルティラピア *Oreochromis niloticus* やコンゴティラピア *Tilapia rendalli* など) によるバイオマニピュレーションが検討されている。ハクレンは、選択的に植物プランクトンを摂食することが知られているが[65, 74]、特徴的なエラの構造により[33]、利用可能な粒子サイズの範囲は 4~85 μm と[74, 75]、動物プランクトンと同様に大型のサイズの藍藻類の群体の摂食は困難である。コクレンは、藍藻類を摂食することが知られているが、藍藻類よりも動物プランクトンやデトリタスを選択的に摂食する[74]。ナイルティラピアは、ハクレンよりも利用可能な粒子のサイズ範囲が小さいことが知られており[76]、コンゴティラピアは 100 μm の藍藻 *Cylindrospermopsis raciborskii* 及び 15 μm 以上の藍藻 *Oscillatoria* 属をほとんど摂食しない[77]。したがって、ろ過摂食魚は動物プランクトンと同様に、100 μm 以上に及ぶサイズの大きな群体の防除には不向きである。

一方で、淡水二枚貝のカワヒバリガイ (*Limnoperna fortunei*) の胃内容物分析では 2~1,200 μm の粒子が観察されており[78]、幅広い粒子サイズを摂食できることが示さ

れている。さらに、イシガイ科[79–81]、シジミ科[80, 81]、カワホトトギスガイ科[82–85]、及びカワヒバリガイ科[86, 87]の淡水二枚貝では、単一細胞[79, 80, 82, 84, 85, 87]、コロニー状[79, 82–84]、及びフィラメント状[79, 81, 83]の藍藻に対するろ過も確認されている（表 1–1）。したがって、ろ過摂食生物の利用可能な粒子径の範囲と藍藻類の粒子径の範囲の観点から、淡水二枚貝は藍藻防除のためのバイオマニピュレーションへの適用が期待される。

また、ろ過摂食動物を用いたバイオマニピュレーションでは、藍藻類の産生する毒素への耐性[1, 3]も課題となる。動物プランクトンでは、室内実験において *Daphnia* spp. に毒素を有する *M. aeruginosa* を摂食させた結果、より多量の有毒 *M. aeruginosa* 細胞を摂食した系で死亡率が高いことが示されている[88]。植物プランクトン食性魚であるハクレンでは、藍藻毒の蓄積が報告されているが[89, 90]、藍藻毒ミクロシスチン-LR に対する半数致死量は高く ($270 \mu\text{g kg}^{-1}$ [90])、大量死の事例[91]は稀である。一方で、淡水二枚貝は藍藻毒を蓄積するが、それらの影響をほとんど受けないことが知られている。Bontes らは、淡水ドブガイ (*Anodonta anatina*) に藍藻 *M. aeruginosa* 及び *Planktothrix agardhii* の有毒株と無毒株を与えてろ過速度を比較したところ、藻類種や細胞形状でろ過速度に有意差が検出されたが、毒素の有無による影響は認められなかったことを示した[79]。同様に Liu らは、イシガイ (*Nodularia douglasiae*) とタイワンシジミ (*Corbicula fluminea*) において、藍藻 *M. aeruginosa* の有毒株と無毒株に対するろ過速度に差異はなかったことを報告している[80]。淡水二枚貝の藍藻毒に対する解毒作用として、藍藻毒ミクロシスチンに対しては生体成分であるグルタチオン（グルタミン酸、システイン、グリシンからなるトリペプチド）で抱合した後、ミクロシスチン-システインに分解され、水溶性を増加させることで体内から排泄する機構がある[92]。ゼブラ二枚貝 (*Dreissena polymorpha*) では、実際にこの機構による解毒作用が示されている[93]。

上記のように毒素を産生する点に加え、藍藻類は動物の必須脂肪酸であるエイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸（DHA）などの不飽和脂肪酸を欠き、栄養品質が低い[94–97]ことから、餌料として不適であるとの指摘もある。したがって、ろ過摂食生物が体内に取り込んだ藍藻類が消化されて体の構成成分となる資化性及び排泄物中における消化しきれなかった藍藻細胞の活性もろ過摂食生物を用いたバイオマニピュレーションでは重要である。プランクトン食性魚では、消化管内及び排泄物の顕微鏡観察によって藍藻類の消化が調査されている。ワカサギ (*Hypomesus nipponensis*) の消化管内では、クロロフィル *a*（Chl.*a*）を含み活性を持つと推察される未消化の緑色の藍藻細胞が検出されている[98]。さらに、ハクレンの消化管を通過した藍藻細胞は、光合成活性があり、細胞が損傷されることなく排泄されたことが報告されている[99]。淡水二枚貝では、いくつかの研究においてろ過摂食後の糞及び偽糞中に藍藻細胞が残存していることが報告されているが[80, 83–85]、これらの藍藻細胞が活性を有するかについては検討されていない。しかし、西尾らは、イケチョウガイ (*Hyriopsis schlegeli*) の糞及び偽糞を含む排泄物が水中に容易に再懸濁することを

指摘しており[100]、ろ過摂食生物の腸通過後の藍藻細胞の水中回帰が懸念される[101]。淡水二枚貝は利用可能な粒子径の範囲と藍藻類の粒子径の範囲の観点では、比較的藍藻防除に適したろ過摂食生物と考えられるが、資化性及び排泄物中の藍藻細胞の活性については不明な点が多い。したがって、淡水二枚貝を用いたバイオマニピュレーションを推進するには、藍藻に対する資化性と排泄物中の藍藻細胞の活性を明らかにすることが課題である。

上述したように、ろ過摂食生物を用いたバイオマニピュレーションを推進するには、それらの藍藻に対する資化性を明らかにすることが課題である。しかしながら、淡水二枚貝に対して藍藻を給餌させる既往研究[79-87]では、水中の Chl.*a* 濃度の減少量や細胞密度の減少量に基づいて藍藻に対するろ過速度が算出されており、資化の重要性についてはほとんど検討されていない。いくつかのろ過摂食生物の藍藻摂食に関する既往研究では、それらの資化性について安定同位体比や脂肪酸などのバイオマーカーを用いて餌料に対する資化性について検討している。動物プランクトンでは、ゾウミジンコ (*Bosmina* sp.) とタイリクミジンコ (*Daphnia similis*) において、安定同位体比と脂肪酸分析によって藍藻 *Microcystis* 細胞をほとんど同化しないことが示されている[102]。また、植物プランクトン食性魚であるハクレンとナイルティラピアを用いた囲い込み実験では、¹⁵N 標識した藍藻 *Microcystis* spp. に対してそれぞれ 3.6% 及び 11.1% の資化効率を示したが、資化効率があまり高くないことからアオコを制御することは困難なことが示されている[103]。一方で、淡水二枚貝の藍藻資化に関する研究では、淡水性のシジミ (*Corbicula* sp.) に放射性炭素同位体 (¹⁴C) で標識された藍藻 *Anabaena oscillarioides* を 1 時間摂食させ、軟体部組織中の ¹⁴C の蓄積に基づく資化効率が 61% であったことが報告されている[104]。さらに、淡水ドブガイ (*Anodonta woodiana*) では、単細胞の *M. aeruginosa* を 4 時間摂食させた室内実験において、SFG (Scope for growth; 餌料の摂取エネルギーから排泄及び呼吸エネルギーを差し引いて算出される余剰エネルギー[105]) が正の値になったことから、藍藻が資化されたことが報告されている[106]。また、ヒレイケチョウガイ (*Hyriopsis cumingii*) に *M. aeruginosa* を 2 週間摂食させた同様の実験でも正の SFG が示されたことが報告されている[107]。したがって、淡水二枚貝は藍藻類に対する高い資化能力を持つ可能性がある。淡水二枚貝の藍藻資化に関する多くの研究は数時間から 2 週間の室内実験で検討されたが[104, 106, 107]、Kim らは、藍藻が発生している人工池に ¹³C 標識炭酸水素ナトリウムと ¹⁵N 標識硫酸アンモニウムを投入してイシガイ及び 2 種の淡水ドブガイ (*Sinanodonta arcaiformis* 及び *Sinanodonta woodiana*) の餌源解析を 2-3 週間にわたって行った[108, 109]。水中の藍藻が投入された ¹³C 及び ¹⁵N で標識されたことが確認され、同時にイシガイ及び淡水ドブガイの筋肉、外套膜、鰓、胃、腸への標識元素の蓄積が示され、3 種のイシガイ科二枚貝の藍藻資化が示された[108, 109]。しかしながら、標識元素を添加後、藍藻を含む水中懸濁物質の安定同位体含有率が時間経過とともに減少したのに対して、イシガイ及び淡水ドブガイの安定同位体含有率はその後も増加し続けたことから直接の餌源として資化されていたかは不明であった。したがって、数時間から

2 週間の室内実験において淡水性シジミと 2 種のイシガイ科二枚貝（淡水ドブガイ及びヒレイケチョウガイ）で藍藻の資化が確認されており[104, 106, 107]、2-3 週間の現場実験において 3 種のイシガイ科二枚貝（イシガイ及び 2 種の淡水ドブガイ）の藍藻資化が示唆されている[108, 109]。しかしながら、アオコは数ヵ月間持続的に発生する場合が多く[21-24, 110]、持続的な資化性を検討することは淡水二枚貝をバイオマニピュレーションに適用する上で重要な課題である。

淡水二枚貝の藍藻の資化性に付随して、排泄物中の藍藻細胞の活性については評価方法に課題がある。西尾らは、イケチョウガイの排泄物を培地に再懸濁し、増殖能力を評価したが、排泄物中の別の細菌が優占し、藍藻細胞の増殖能力を評価することが困難であったことを報告している。したがって、排泄物中の藍藻細胞の活性を評価する新規手法の開発が求められている。

以上より、淡水二枚貝は藍藻防除のためのバイオマニピュレーションへの適用が期待されるが、長期的な藍藻資化能力が明らかでない点、環境中での藍藻資化の実態が不明である点、及び排泄物中の藍藻細胞の活性が評価されていない点が課題として挙げられる。これらの課題を明らかにすることにより、淡水二枚貝を用いたバイオマニピュレーションを強力に推進できる契機となり、国内外の淡水二枚貝を用いた富栄養化湖沼の水質改善対策への波及効果が期待できる。

表 1-1 ビーカーもしくは水槽を用いた室内実験において淡水二枚貝による藍藻ろ過が確認された既往研究

二枚貝種	藍藻の種 (形状・サイズ※ ²)	実験方法
イシガイ科 ドブガイ [79]※ ¹ (<i>Anodonta anatina</i>)	<i>Microcystis aeruginosa</i> (単一細胞及びコロニー・6.5–15.1 μm) <i>Planktothrix agardhii</i> (フィラメント・426–831 μm)	Chl. <i>a</i> 濃度の減少量でろ過 摂食を評価
イシガイ科 イシガイ [80] (<i>Nodularia douglasiae</i>)	<i>M. aeruginosa</i> (単一細胞)	計数した細胞密度の減少 量でろ過摂食を評価
シジミ科 タイワンシジミ [80] (<i>Corbicula fluminea</i>)		
イシガイ科 和名無し [81] (<i>Diplodon parallelopipedon</i>)	<i>P. agardhii</i> (フィラメント)	Chl. <i>a</i> 濃度の減少量でろ過 摂食を評価
シジミ科 タイワンシジミ [81]		
カワホトギスガイ科 [82] カワホトギスガイ (<i>Dreissena polymorpha</i>)	<i>M. aeruginosa</i> (単一細胞及びコロニー・4.8–87.7 μm)	計数した細胞密度の減少 量でろ過摂食を評価
カワホトギスガイ科 [83] カワホトギスガイ	<i>M. aeruginosa</i> (コロニー・41–722 μm) <i>P. agardhii</i> (フィラメント・29–2,163 μm)	Chl. <i>a</i> 濃度の減少量でろ過 摂食を評価
カワホトギスガイ科 [84] カワホトギスガイ	<i>Microcystis</i> spp. (単一細胞及びコロニー)	計数した細胞密度の減少 量でろ過摂食を評価
カワホトギスガイ科 [85] カワホトギスガイ	<i>M. aeruginosa</i> (単一細胞・3.8 μm)	Chl. <i>a</i> 濃度の減少量でろ過 摂食を評価
イガイ科 カワヒバリガイ [86] (<i>Limnoperna fortunei</i>)	天然水中の藍藻 12 種の混合物	計数した細胞密度の減少 量でろ過摂食を評価
イガイ科 カワヒバリガイ [87]	<i>M. aeruginosa</i> (単一細胞)	計数した細胞密度の減少 量でろ過摂食を評価

※1 参照した引用文献

※2 サイズは論文内に記載があった場合にのみ記載した

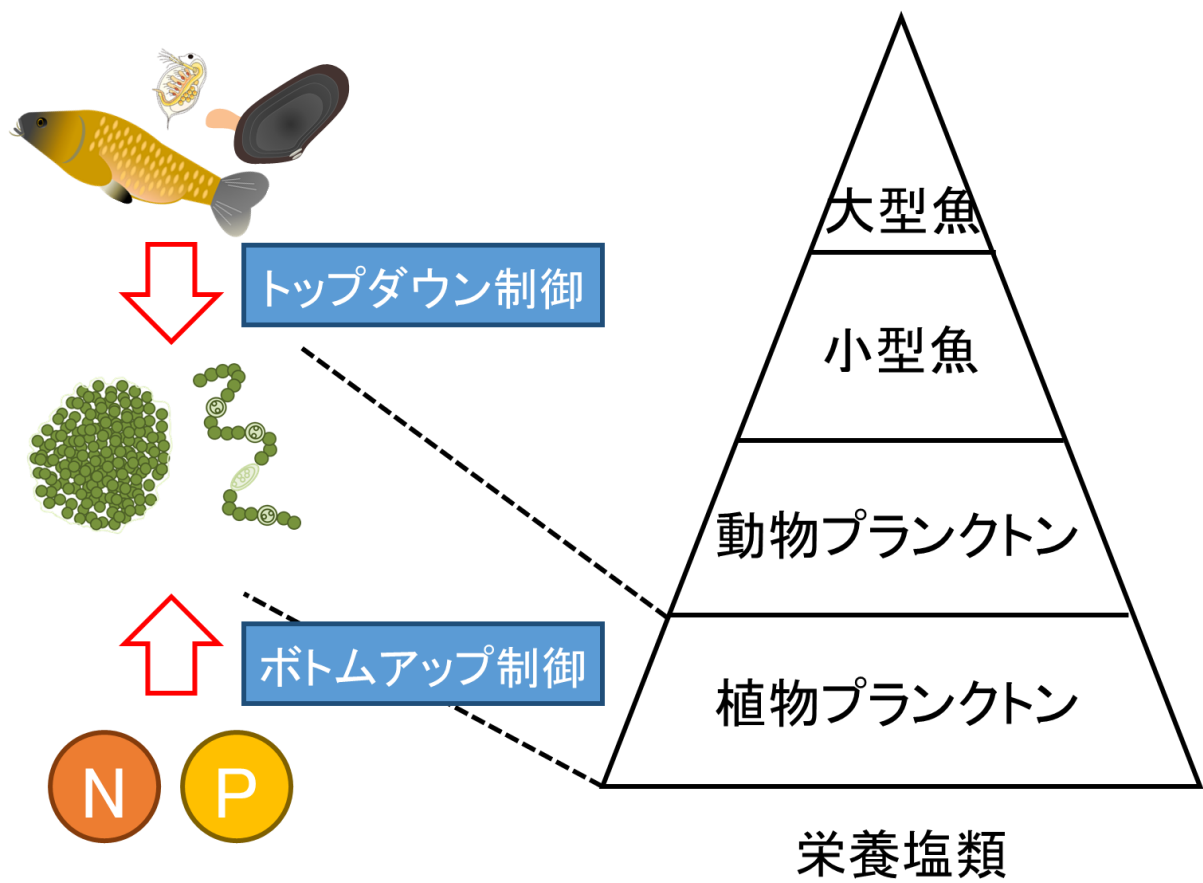


図 1-1 水界生態系構造とアオコに対する 2 方向からのバイオマニピュレーション手法

第3節 環境 DNA 手法と淡水二枚貝調査への適用

近年、環境中に生息する生物種から放出された上皮組織や粘液、排泄物、配偶子細胞等から DNA を回収後、リアルタイム PCR を用いた種特異的な検出定量[111]やメタバーコーディングによる多種同時検出[112]により、生物種の特定や生物量の推定を行うモニタリング手法が普及している[113–116]。このような環境 DNA (eDNA) 手法は、特に水界生態系の調査解析で盛んに用いられており、河川、湖沼、及び海洋などで数十 mL から数 L の環境水を採水し、フィルター（ガラス繊維ろ紙やカートリッジ型のメンブレンフィルター）でろ過することで環境中に存在する DNA 源を濃縮し、DNA 抽出に供する[113–116]。従来の採捕調査とは異なり現場での作業は採水のみであり、調査のための人員及び時間コストが大幅に削減され、生息地のかく乱もほとんどない非侵襲的な調査方法である[113–116]。

以前より、湖底堆積物[117]や湖水中の微生物群集[118]など、微生物を標的とした eDNA 分析は盛んに行われてきた。大型の生物に対する eDNA 分析の応用では、Ficetola らが世界で初めてウシガエル (*Rana catesbeiana*) のオタマジャクシを標的として、個体から放出された生体外 DNA を検出可能であることを示した[119]。その後、希少生物の検出や外来種の検出に eDNA 手法が適用されてきた。Sakata らは秋田県雄物川流域 99 地点で河川水を採取し、絶滅危惧種 IA 類のゼニタナゴ (*Acheilognathus typus*) の eDNA を検出し、さらに周辺での採捕調査を行ってゼニタナゴの生息を確認した[120]。また、Takahara らは、西日本の 70 カ所のため池で採水し、侵略的外来種であるブルーギル (*Lepomis macrochirus*) の分布状況を明らかにした[121]。さらに最近では、定量された eDNA 濃度に基づいたバイオマス量や個体数密度の推定も検討されている[122, 123]。Fukaya らは、得られた eDNA の定量値と流体力学モデルを組み合わせることで、京都府舞鶴湾における音響測深機で得られたマアジ (*Trachurus japonicus*) の個体数密度を再現することに成功しており[124]、今後他の生物種への適用も期待されている。

二枚貝における eDNA 研究では、淡水二枚貝の最も主要な分類群であるイシガイ科において、Deiner らは、河川水中の *Unio tumidus* の eDNA の検出に世界で初めて成功した[125]。この研究に続いて、淡水環境では、絶滅が危惧されているイシガイ科の淡水真珠二枚貝 (*Margaritifera falcata* [126]、*Margaritifera margaritifera* [127–130]、及び *Margaritifera monodonta* [131]) や侵略的外来種であるカワヒバリガイ (*Limnoperna fortunei* [132–134])、ゼブラ二枚貝 (*Dreissena polymorpha* [135–140]) 及びクアッガ二枚貝 (*Dreissena rostriformis* [140]) への適用が行われてきた。また、淡水環境での eDNA 手法の適用に伴い、汽水性二枚貝のヤマトシジミ (*Corbicula japonica*, [141]) や海水性二枚貝のイタヤガイ科マゼランツキヒ (*Placopecten magellanicus*, [142])、バカガイ科の一種 (*Rangia cuneata*, [143])、ネコゼフネガイ (*Crepidula fornicata*, [144]) など汽水性及び海水性二枚貝の検出定量にも適用されている。これらの eDNA 手法の適用は、eDNA 手法のいくつかの課題を明らかにした。

Stoeckle らは、800~20,000 個体（目視計数）の *Margaritifera margaritifera* 個体群の

下流 25 m で河川水を採水し eDNA を検出したが、下流 500 m 及び 1000 m の地点では eDNA を検出できなかったことを報告し、eDNA の減衰や放出に関する基礎的なデータの重要性について指摘した[127]。しかし、世界で初めて eDNA 研究の対象となったウシガエルを含む両生類（ウシガエル[145]、サンショウウオ[*Dicamptodon aterrimus*, 146]）や海産魚（2 種のカタクチイワシ[*Engraulis mordax* 及び *Sardinops sagax*, 147]、マサバ[*Scomber japonicas*, 147]、マアジ[148–152]）、淡水魚（ブルーギル[*Lepomis macrochirus*, 153]、アユ[*Plecoglossus altivelis altivelis*, 154]、コイ[*Cyprinus carpio*, 154, 155]）に関する eDNA 減衰や放出を検討した研究については豊富にあるが、二枚貝の eDNA の減衰や放出を検討した研究は少ない。唯一、イシガイ科二枚貝では、Sansom らが 56 及び 111 個体 m^{-2} の密度になるように *Lampsilis siliquoidea* を 40 L の水槽に投入し、eDNA 放出速度を測定した[156]。この実験では、56 及び 111 個体 m^{-2} の密度の水槽で、eDNA 放出速度がそれぞれ $2.4 \times 10^7 \text{ copies h}^{-1} \text{ tank}^{-1}$ 及び $5.6 \times 10^6 \text{ copies h}^{-1} \text{ tank}^{-1}$ であり、半分の密度の水槽で 4.3 倍高い eDNA 放出速度を観測した[156]。したがって、環境中で検出された eDNA 濃度は淡水二枚貝のバイオマスや密度を反映していない可能性があり、淡水二枚貝の eDNA の放出源の特定が課題であることが示された。

室内実験において二枚貝の密度と eDNA 放出速度の不一致が示されたが[156]、環境中では 10 倍単位の個体数密度については、ある程度 eDNA 濃度で説明できることが示されている。Carlsson らは、河川 5 地点において eDNA 濃度の定量と目視による *Margaritifera margaritifera* の個体数の計数を行った。目視計数の結果が 0 個体、0 個体、60 個体、530 個体、1710 個体の地点において、定量された eDNA 濃度が 0.57 pg L^{-1} 、 8.81 pg L^{-1} 、 3.66 pg L^{-1} 、 33.82 pg L^{-1} 、 30.56 pg L^{-1} であり、eDNA 濃度に基づいて高密度の地点を区別することは困難であるが、数十個体と数百個体の個体群を概ね区別できることを示した [128]。また、Takahara らは、汽水の湖沼である宍道湖沿岸部の 6 地点において eDNA 濃度を定量し、eDNA 濃度が過去に報告されているヤマトシジミの密度と概ね一致したことを報告した[141]。一方で、個体数密度が低い場合には、eDNA 濃度に基づいて個体数密度を推定することは困難なことが報告されている。Currier らは、河川に生息する 4 種のイシガイ科二枚貝 *Lampsilis fasciola*、*Ligumia nasuta*、*Ptychobrancus fasciolaris*、及び *Quadrula quadrula* の eDNA 濃度とそれらの密度の非線形の関係から低密度 ($0.01\text{--}2 \text{ 個体 } m^{-2}$) で生息する二枚貝の密度を eDNA 濃度に基づいて推定することは困難であると結論付けた[157]。また、Togaki らは 10 分間の採捕調査により 0.5 個体の密度でドブガイ (*Sinanodontia* sp.) が生息する池においては eDNA を検出できなかったことを報告している[158]。したがって、低密度で生息する二枚貝の eDNA の検出定量には課題があると言える。

一方で、環境中における eDNA の検出では、採水方法を工夫することによって検出率や濃度を改善できることが示されている。通常、eDNA 試料の採水は表層水が対象となるが[113–116]、いくつかの研究では二枚貝が水域の底層部に生息していることを考慮し、底層水が採水され、表層水との検出率[131, 133]や定量濃度[139]の比較が行われている。これらの研究では、表層水よりも底層水の方が検出率[131, 133]及び定量濃

度[139]が高くなる結果が得られている。さらに、試料を採水する時期も重要である。Lorらはアメリカの河川において淡水真珠二枚貝の幼生放出期である5月と幼生放出期が終わった8月のeDNAの検出率を比較し、幼生放出時期である5月(73.3~93.1%)の方が8月(55.6~70.8%)よりも検出率が高いことを示した[131]。また、Wackerらは、冷水期(5月)、温水期(6月)、繁殖期(8月)において20,000個体淡水真珠二枚貝の個体群(目視計数)のすぐ下流の河川水中のeDNA濃度をモニタリングした[130]。その結果、各時期のeDNA濃度は、それぞれ1 copies mL⁻¹(5月)、6 copies mL⁻¹(6月)、21 copies mL⁻¹(8月)であり、繁殖期に冷水期の約20倍のeDNA濃度が定量されたことを報告した[130]。二枚貝以外にも、繁殖期に比較的高いeDNA濃度が得られることは、両生類(ホクオウクシイモリ [*Triturus cristatus*, 159]、アメリカオオサンショウウオ [*Cryptobranchus alleganiensis*, 160]) や魚類(アユ[123])で既に明らかにされている。したがって、採水方法や時期を考慮することで低密度であっても二枚貝のeDNAを検出できる可能性が示されている。

淡水二枚貝を用いたバイオモニタリングでは、淡水二枚貝をその環境に定着させる必要があり、生息密度や分布域を定期的にモニタリングすることが求められる。湖沼環境において淡水二枚貝の定着をモニタリングする方法には、時限探索調査[161, 162]、コドラート調査[161, 163, 164]、シュノーケリング調査[161, 164]等があるが、調査地が広域である場合や水深が深い場合には調査が困難である。また、これらの方法は淡水二枚貝を直接採捕するため、生息地のかく乱のリスクがあり、より簡便で非侵襲的な調査手法の開発が求められる[163]。したがって、淡水二枚貝のeDNAの放出源の特定及び低密度で生息する淡水二枚貝のeDNAの検出定量の課題はあるが、淡水二枚貝調査へのeDNA手法の適用は有用であると考えられる。

第4節 研究目的及び研究内容

本研究では淡水二枚貝を用いたバイオマニピュレーションによるアオコ抑制技術を開発することを最終目的とした。日本には現在2亜科13属26種のイシガイ科二枚貝が生息しているが、イシガイ科イシガイ属タテボシガイ (*Nodularia nipponensis*, 写真1-1) 及びその近縁種イシガイ (*N. douglasiae*) は、国内で最も広域に生息する淡水二枚貝の1種である(図1-2) [165]。したがって、研究対象をタテボシガイとして藍藻資化能力を評価するとともに、バイオマニピュレーション適用のためのモニタリング手法として環境DNA (eDNA) を用いた湖沼におけるモニタリング手法の確立を目的とした。

淡水二枚貝の藍藻資化能力については、1) 長期的な藍藻資化能力が明らかでない点、2) 環境中での藍藻資化の実態が不明である点、及び3) 排泄物中の藍藻細胞の活性が評価されていない点が課題であった。したがって、第2章では、室内実験により1) と3) の課題に取り組んだ。はじめに、アオコの増殖が確認されている15°C [23] 及び25°C [12] の条件でタテボシガイに異なる餌料濃度条件で藍藻 *Microcystis aeruginosa* を24時間摂食させ、異なる水温及び餌料濃度条件での基礎的な藍藻資化能力を短期的な実験で評価した。続いて、長期的な藍藻資化能力を明らかにするため、¹⁵N 標識した藍藻 *M. aeruginosa* をタテボシガイを飼育している水槽に80日間1日おきに投与し、タテボシガイの筋肉組織中の¹⁵N含量をモニタリングすることでアオコ発生を想定した数か月にわたる藍藻資化能力を長期的な実験で評価した。なお、短期的な室内実験及び長期的な室内実験では、淡水二枚貝セタシジミ (*Corbicula sandai*) の稚貝適切餌料 [166] として知られる緑藻 *Chlorella vulgaris* を比較のための餌料として与える実験系を用意した。最後に、タテボシガイの排泄物中の藍藻細胞の活性を評価するために、藍藻 *M. aeruginosa* を摂食させて排泄物を回収し、フルオレセインジアセテート (FDA) を排泄物に添加して蛍光染色を行い、顕微鏡観察により活性を示す藍藻細胞を計数した。第3章では、現場実験により2) の課題に取り組んだ。富栄養化湖沼におけるタテボシガイの藍藻資化の実態を明らかにするため、秋田県八郎湖の沿岸部で現場調査を行った。はじめに、アオコを形成する藍藻類がタテボシガイの生息域である底層部に移動しているか、藍藻類の鉛直移動を調査した。続いて、沿岸域での夏季の飼育試験として、タテボシガイを八郎湖に設置したフェンスによる区画内に放流し、その後2週間おきにタテボシガイを採取し、タテボシガイの筋肉組織中に含まれる藍藻由来脂肪酸(リノール酸及び α -リノレン酸)をモニタリングすることによって、アオコ発生期間における湖沼環境中におけるタテボシガイの藍藻資化能力を評価した。

eDNA を用いた湖沼におけるモニタリング手法の確立については、4) 淡水二枚貝のeDNAの放出源が不明である点、5) 低密度で生息する淡水二枚貝のeDNAの検出定量が困難である点が課題であった。したがって、第4章では、室内実験により4) の課題に取り組んだ。はじめに、eDNA を用いた湖沼におけるモニタリング手法を確立するため、ミトコンドリアシトクロムc酸化酵素サブユニットI遺伝子領域を標的

として、種特異的オリゴヌクレオチドプライマーを作製した。続いて、タテボシガイを水槽で1週間飼育し、その後タテボシガイを水槽から取り除き、水槽内のeDNA濃度の減衰をモニタリングし、減衰速度や放出速度を算出し、eDNAの放出源の特定を行った。第5章では、はじめに第4章で確立したタテボシガイのeDNA検出系をタテボシガイの生息が確認されている秋田県八郎湖[167-169]に適用し、八郎湖全域の8地点におけるタテボシガイeDNAの定量を試みた。続いて、eDNAの定量性を向上するために、タテボシガイが繁殖期に大量に放出するグロキディウム幼生に着目し[165, 169]、このグロキディウム幼生を排水処理で生物膜付着担体として用いられる紐状ろ材（紐状担体）を用いて捕集し、グロキディウム幼生のeDNAを回収する新規手法を考案し、八郎湖への適用を検討した。最後に新規手法により得られたeDNA濃度とタテボシガイの成貝密度の関係性について八郎湖沿岸全域へ新規手法を適用して得られたeDNA濃度と貝けた網を使用して得られたタテボシガイ成貝の密度を比較することで5)の課題に取り組んだ。

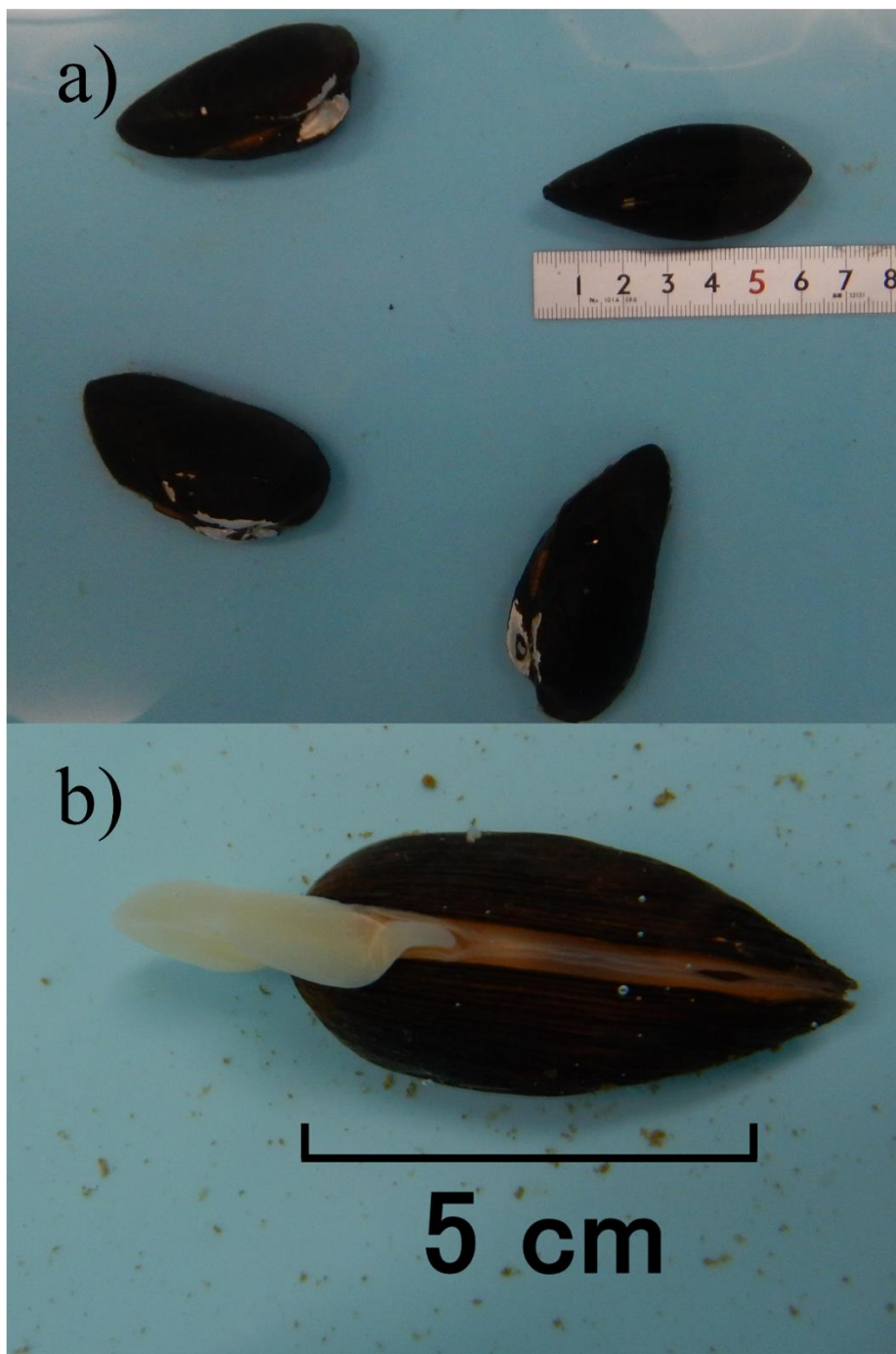


写真 1-1 秋田県八郎湖で採捕されたタテボシガイ(a)と足を出して活発に活動しているタテボシガイ(b)



図 1-2 日本国内におけるタテボシガイ及びイシガイの分布(近藤 2008 より引用[164])

第2章 タテボシガイの藍藻資化能力の評価

第1節 はじめに

淡水二枚貝が様々な形状や幅広い群体サイズ範囲及び形状を有する藍藻類をろ過可能であることが多くの室内実験によって示されている[79–87]。一方で、二枚貝の糞及び偽糞中から未消化の藍藻細胞が検出されていることから[80, 83–85, 100]、摂食したとしても排泄後に再回帰することが危惧される[100, 101]。したがって、淡水二枚貝を用いたバイオマニピュレーションによる藍藻防除では、二枚貝がろ過した藍藻類が消化され身体の構成成分として取り込まれる、すなわち、資化されるか否かが重要である。本研究において「資化」とは、餌料藻類の炭素や窒素などの構成元素が消費者であるタテボシガイの体内に取り込まれることとして定義した。

本研究の研究対象としたタテボシガイでは藍藻類に対するろ過能力及び資化性については検討されていない。タテボシガイの近縁種であるイシガイについては、藍藻 *Microcystis aeruginosa* をろ過可能であることが既に示されている[80]。しかしながら、藍藻に対する資化性についての検討はタテボシガイと同様に行われていない。したがって、始めに、基礎的な検討として、アオコの増殖が確認されている 15°C[23]及び 25°C[12]の異なる温度条件と低濃度及びアオコ発生を想定した高濃度の異なる餌料濃度条件における藍藻資化速度を評価した。海水二枚貝では、水温が異なった場合に二枚貝の資化速度が変化することが報告されている。ムラサキイガイ (*Mytilus galloprovincialis*) は水温が低いときに、ミドリイガイ (*Perna viridis*) は水温が高いときに餌料の資化速度が最大になり、異なる二枚貝種では活動的な水温が異なることが示されている[170]。したがって、アオコの増殖が確認されている 15°C[23]及び 25°C[12]の異なる温度条件を設定し、資化速度に影響を与えるかどうか評価した。また、海水二枚貝クロイガイ (*Choromytilus meridionalis*) は給餌する緑藻餌料の濃度を徐々に増加させると資化効率が低下し、 2×10^4 cells mL⁻¹ を超えた時点で資化効率が 0%になったことが報告されている[171]。したがって、アオコ発生を想定した高濃度条件で一定の資化速度を発揮できるか検討することとした。

淡水二枚貝の藍藻類に対する資化性については一部検討されているものの、数時間から最大3週間での室内及び現場実験であり[104, 106–109]、数か月にわたるアオコ発生を想定した長期的な藍藻資化の実態は明らかになっておらず、課題となっている。消費者の餌料資化を評価する方法として、伝統的には胃内容物分析及び糞便分析が行われてきた[78, 172]。しかしながら、この方法は胃内容物や排泄物に細胞や構造物が残存していることが前提で、資化されてしまった餌料を同定することはできず、直近の摂食活動を調査することしかできない[173]。短期的な餌料の資化状況を調べる方法としては、数時間から数週間における二枚貝の SFG (Scope for growth; 餌料の摂取エネルギーから排泄及び呼吸エネルギーを差し引いて算出される余剰エネルギー[105]) を測定する方法が用いられている[105–107]。一方で、比較的長期的な消費者の餌料資化の追跡には、炭素や窒素の安定同位体分析が広く使われており[173–177]、二枚貝の

食餌分析にも用いられている[173, 178–180]。安定同位体比に加えて、近年では生物体に含まれる脂肪酸に着目して餌源を明らかにしようとする手法も利用され、二枚貝への適用も行われている[181–184]。水界生態系において一次生産者となる植物プランクトンが種ごとに異なる特定の脂肪酸を有すること、さらに、それらの脂肪酸は食物連鎖を通して高次の消費者にまで伝達されることから、植物プランクトンに含まれる特定の脂肪酸をバイオマーカーとして利用可能である[181]。すなわち、安定同位体比用いた手法に加えて、この手法を用いることで、二枚貝の藍藻資化を評価することが可能であると考えた。

また、淡水二枚貝の排泄物中に藍藻細胞が含まれていたことも複数の研究で報告されており[80, 83–85, 100]、藍藻細胞の水中への再回帰が懸念されているが[100, 101]、排泄物中の藍藻細胞の活性を評価する手法は確立されていない。例えば、西尾らは、藍藻 *Microcystis* 属を含む都市公園池の水をろ過摂食させたイケチョウガイ (*Hyriopsis schlegeli*) の偽糞を回収後、培地に再懸濁させ、*Microcystis* 属細胞の増殖をクロロフィル *a* (Chl.*a*) 濃度でモニタリングしようとした[100]。しかし、偽糞中の *Microcystis* 属の増殖は試験初期において確認できたものの、途中で偽糞中に多量に存在する細菌が培養中に増殖して培養液が白濁してしまうため、偽糞中の藍藻細胞の増殖能力を定量評価することは困難であったと報告している[100]。一方で、藻類の細胞活性を評価する方法の一つにフルオレセインジアセテート (FDA) 染色生存率カウント法がある[185, 186]。無色透明なフルオレセイン二酢酸が細胞内に取り込まれると細胞内のエステラーゼによってフルオレセインに変換され、紫外光下で蛍光を発するようになる[185, 186]。FDA 染色生存率カウント法では、蛍光顕微鏡観察によって可視光で計数された細胞のうち、紫外光下で発光する細胞を計数し、細胞の生存率を算出する。この手法を二枚貝の排泄物に適用することによって、排泄物中の藍藻生細胞の数、すなわち、活性を持つ細胞を評価できると考えた。

本章では、タテボシガイの藍藻に対する資化能力を明らかにするため、単細胞性の藍藻 *M. aeruginosa* と比較のために稚貝の適切餌料とされている緑藻 *Chlorella vulgaris* [166]を餌料として 1) 異なる水温及び餌料濃度条件下における 24 時間の摂食実験と 9 時間の排泄実験で構成された短期的な室内実験による藍藻資化速度の定量を行った。この実験では摂食実験において摂食速度を算出し、排泄実験により排泄速度を算出し、その差分を資化速度として定義した。これらの速度は水中の藻類由来の不揮発性有機態炭素 (NPOC) の減少及び増加量の傾きから求め、藻類由来の炭素の資化を評価した。続いて、数ヵ月にわたる長期的な二枚貝の藍藻資化能力を評価するため、2) ¹⁵N 標識した藍藻 *M. aeruginosa* を 80 日間タテボシガイに給餌し、同位体濃縮及び脂肪酸組成を分析し、長期的な藍藻資化能力のモニタリングを行った。この実験では、同位体濃縮では窒素、脂肪酸組成では炭素の資化を評価した。最後に、タテボシガイの排泄物中の藍藻細胞の活性を評価するため、3) 藍藻 *M. aeruginosa* を摂食させたタテボシガイの排泄物に FDA を添加し、生細胞の生残性を調べた。

第 2 節 実験方法

2-2-1 タテボシガイの維持と餌料藻類の前培養

タテボシガイは秋田県八郎湖において 2020 年 7 月 19 日に貝けた網を用いて採捕した (写真 2-1)。採捕したタテボシガイは、20°C の恒温室において秋田県立大学圃場の井戸水を充填した 30 L 水槽で維持した。水槽内の水替えは週に一度行った。各実験の前には実験条件の水温で 1 週間以上維持し、実験使用直前に脱塩素水道水中で 1 日維持して排泄が見られなくなった個体を実験に用いた。

餌料藻類の藍藻 *M. aeruginosa* NIES-44 株 (国立環境研究所微生物系統保存施設より分譲された茨城県霞ヶ浦産の株) 及び緑藻 *C. vulgaris* (クロレラ工業) は、15 L 容のポリカーボネート製培養瓶 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) を用いて純粋培養した (写真 2-2a)。12 L の C 培地 (表 2-1) を培養瓶に入れた後、110°C で 35 分間オートクレーブ滅菌した。冷却後、1 L の同じ培地で定常期まで前培養した各藻類の培養液を添加し、フィルター滅菌した空気をエアープンプで穏やかに曝気しながら、20°C で定常期に達するまで培養した (写真 2-2a)。この培養液のうち、1 L を継代培養用に使用し、残りはタテボシガイの餌料に供するまで 4°C、暗条件で保存した。必要に応じて保存用の餌料藻類は 2000 ×g で 5 分間遠心分離して濃縮した。

藍藻 *M. aeruginosa* NIES-44 株は毒素を産生しない球形の単細胞株であり、細胞粒子径範囲は 3.5~18.5 μm、最頻粒子径は 7.8 μm (15.4%) であった (写真 2-2b)。緑藻 *C. vulgaris* は、粒子径範囲 1.5~6.5 μm、最頻粒子径 2.75 μm (16.9%) の球形の単細胞株であった (写真 2-2c)。

表 2-1 C 培地の培地組成 (pH 7.5)

成分	L ⁻¹
硝酸カルシウム・四水和物	150 mg
硝酸カリウム ^{※1}	100 mg
β -グリセロリン酸二ナトリウム・五水和物	50 mg
硫酸マグネシウム・四水和物	40 mg
ビタミン B ₁₂	0.1 μ g
ビオチン	0.1 μ g
チアミン塩酸塩	10 μ g
トリスヒドロキシメチルアミノメタン	500 mg
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム・二水和物	30 mg
塩化鉄(III)・六水和物	6 mg
塩化マンガン(II)・四水和物	1 mg
塩化亜鉛	0.3 mg
塩化コバルト(II)・六水和物	0.1 mg
モリブデン(IV)酸ナトリウム・二水和物	0.1 mg

※1 80 日間におけるタテボシガイの持続的な藍藻資化効率の評価では、¹⁵N 標識硝酸カリウムを用いた。



写真 2-1 タテボシガイを採捕するための貝けた網(a)と貝けた網によって 2020 年 7 月 19 日に採捕されたタテボシガイ(b)

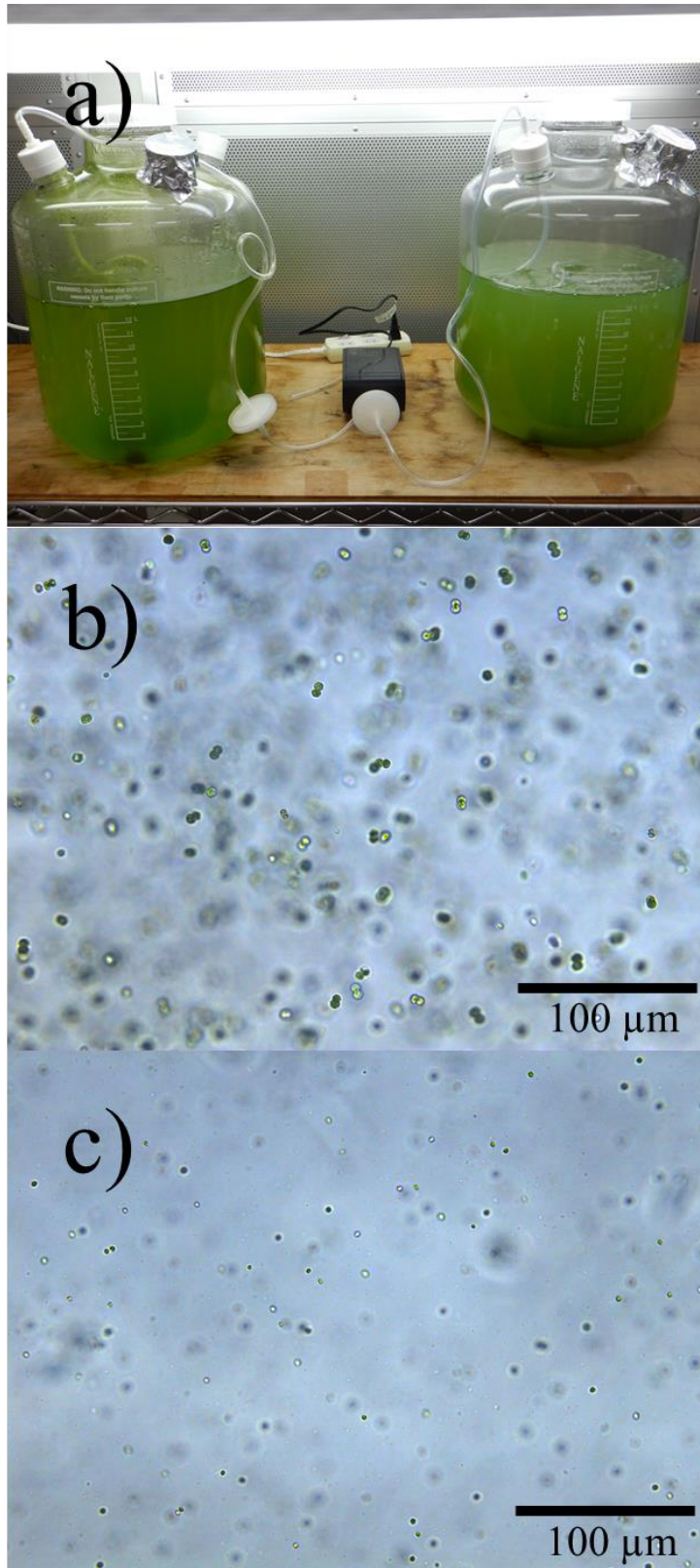


写真 2-2 餌料藻類の大量培養(a)及び実験に用いた *M. aeruginosa* NIES-44(b)株及び *C. vulgaris*(c)の顕微鏡写真

2-2-2 異なる水温及び餌料濃度におけるタテボシガイの藍藻資化速度の定量

餌料となる藍藻 *M. aeruginosa* NIES-44 及び *C. vulgaris* を凍結乾燥した。比較のために国立環境研究所微生物系統保存施設より分譲された藍藻 *M. aeruginosa* の NIES-843 (茨城県霞ヶ浦産)、NIES-2613 (秋田県八郎湖産)、秋田県立大学の鈴木英治博士より分譲された藍藻 *M. aeruginosa* の 0824 (秋田県八郎湖産)、秋田県立大学の岡野邦宏博士より分譲された藍藻 *M. aeruginosa* の N7 (秋田県八郎湖産)、5B (秋田県八郎湖産)、フィラメント状藍藻 *Pseudoanabaena* sp. の N3 (秋田県八郎湖産)、N2A (秋田県八郎湖産) のそれぞれの株も大量培養し、凍結乾燥した。それぞれの粉末試料を燃研式自動ボンベ熱量計 CA-4AJ (島津製作所) 及び CHN 有機元素分析装置 CHN628 (Leco) で分析し、餌料の熱量 (J mg^{-1}) と炭素・窒素・水素含有率 (%) を測定した。

1.5 L 容のガラス瓶に 1.2 L の脱塩素水道水を充填し、1 個体のタテボシガイを入れた袋状のプランクトンネット (目合い $40 \mu\text{m}$; NXXX25, Rigo) を吊るした (写真 2-3a)。プランクトンネットは排泄物の再懸濁を防ぐために用いた。供試したタテボシガイ成貝の殻長は $53\sim 67 \text{ mm}$ であった。瓶内をスターラーで緩やかに攪拌し、大量培養後に $2000 \times g$ で 5 分間の条件による遠心分離で濃縮した *M. aeruginosa* 及び *C. vulgaris* を餌料として用いた。ガラス瓶には、1 種類の餌料藻類のみ (*M. aeruginosa* もしくは *C. vulgaris*) を添加して摂食実験を行った (写真 2-3a)。餌料添加後、24 時間までの瓶内の水をプランクトンネットの外側で採水し、全有機態炭素分析装置 TOC-L (島津製作所) を用いて不揮発性有機炭素濃度 (NPOC, mg L^{-1}) を測定した。NPOC が減少している勾配が最も大きくなる 2 点間の減少量から摂食速度 ($\text{mg C g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) を算出した。

摂食実験終了後、タテボシガイを取り出し脱塩素水道水で洗浄後、0.3 L の脱塩素水道水が入った別のガラス瓶に移し、排泄実験を開始した (写真 2-3b)。その後、3 時間毎にタテボシガイを新しい瓶に移し替え、その都度水中の NPOC を測定した。NPOC が増加している勾配が最も大きくなる 2 点間の増加量から排泄速度 ($\text{mg C g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) を算出した。

資化速度 ($\text{J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) は摂食速度から排泄速度を差し引き、餌料藻類の熱量及び炭素含有率に基づいて算出した。

摂食実験及び排泄実験は、アオコの増殖が確認されている 15°C [23] 及び 25°C [12] の異なる 2 つの温度条件で行った (表 2-2)。また、餌料有機態炭素濃度 $2\sim 5 \text{ mg C L}^{-1}$ ($4 \pm 1 \text{ mg C L}^{-1}$, 平均 \pm 標準偏差; SS 濃度 $4\sim 13 \text{ mg L}^{-1}$, $8 \pm 3 \text{ mg L}^{-1}$ に相当) の低濃度及びアオコを想定した $10\sim 21 \text{ mg C L}^{-1}$ ($15 \pm 3 \text{ mg C L}^{-1}$, 平均 \pm 標準偏差; SS 濃度 $20\sim 56 \text{ mg L}^{-1}$, $36 \pm 9 \text{ mg L}^{-1}$ に相当) の高濃度の 2 つの餌料濃度条件で行った (表 2-2)。実験の全ての処理区は 6 連で行われたが、水温 25°C の高濃度 *C. vulgaris* 給餌系でのみ、実験中のタテボシガイの死亡が確認されたため、5 連の実験とした (表 2-2)。

表 2-2 異なる水温及び餌料濃度におけるタテボシガイの藍藻資化速度の定量実験における各処理区の条件

処理区	水温 (°C)	餌料藻類種	餌料濃度 ^{※1}	連数
1	15	<i>C. vulgaris</i>	低濃度	6
2	15	<i>C. vulgaris</i>	高濃度	6
3	15	<i>C. vulgaris</i>	低濃度	6
4	15	<i>C. vulgaris</i>	高濃度	6
5	25	<i>M. aeruginosa</i>	低濃度	6
6	25	<i>M. aeruginosa</i>	高濃度	5
7	25	<i>M. aeruginosa</i>	低濃度	6
8	25	<i>M. aeruginosa</i>	高濃度	6

※1 低濃度における有機態炭素濃度は、 $2\sim 5\text{ mg C L}^{-1}$ ($4 \pm 1\text{ mg C L}^{-1}$, 平均 \pm 標準偏差; SS 濃度 $4\sim 13\text{ mg L}^{-1}$, $8 \pm 3\text{ mg L}^{-1}$ に相当)であり、高濃度における有機態炭素濃度は、 $10\sim 21\text{ mg C L}^{-1}$ ($15 \pm 3\text{ mg C L}^{-1}$, 平均 \pm 標準偏差; SS 濃度 $20\sim 56\text{ mg L}^{-1}$, $36 \pm 9\text{ mg L}^{-1}$ に相当)であった



写真 2-3 異なる水温及び餌料濃度におけるタテボシガイの藍藻資化速度の定量のための
摂食実験(a)及び排泄実験(b)

2-2-3 80 日間におけるタテボシガイの持続的な藍藻資化効率の評価

2 種の餌料藻類として藍藻 *M. aeruginosa* NIES-44 株及び緑藻 *C. vulgaris* は、 $K^{15}NO_3$ を含む 12 L の C 培地で 2-2-1 で説明した方法と同様の方法で純粋培養した (表 2-1、写真 2-2a)。

脱塩素水道水 10 L を充填した水槽に八郎湖で採取した殻長 52–63 mm のタテボシガイ成貝を 8 個体投入し、定常期に達した 2 種の藻類培養液 500 mL を単一餌料として 2 日おきに添加し、室温 20°C で穏やかに曝気しながら 80 日間飼育した (写真 2-4)。水槽内の水は 1 週間おきに替えた。培養藻類細胞の濃度は $17\text{--}88\text{ mg L}^{-1}$ の範囲であった。水槽内のタテボシガイを 1 個体ずつ引き抜いたため、1 個体当たりの餌料負荷量は徐々に増加した。*M. aeruginosa* を添加した試験、*C. vulgaris* を添加した試験をそれぞれ 3 連で行った。対照系には藻類を未植種の培地のみを与えた (1 連)。この対照系は、水中またはタテボシガイの体内の細菌等が培地中の ^{15}N を同化し、それをタテボシガイが摂取することで同位体濃縮してしまう可能性を考慮するために設けた。タテボシガイは、0、12、20、22、48、60、及び 80 日目に 1 つの水槽から 1 個体ずつ回収した。回収したタテボシガイは、殻から軟体部を引き剥がして -80°C で保存した。

飼育実験中に、いくつかの水槽で死貝が生じて生存個体が減少した。これらの死貝はデータ分析から除外した。*C. vulgaris* が給餌された 3 連の水槽のうちの 1 つでは、60 日以上生存した個体がいなかった。したがって、*C. vulgaris* を給餌した水槽の 60 日以降のデータは 2 連となった。飼育実験の最終日 (80 日目) において、死貝が生じなかった水槽では、2 個体のタテボシガイが残っていたため、各々を分析して、平均値を求めた。

定常期に達した藻類培養液の懸濁物 (SS) 濃度を測定するために、事前に洗浄し乾燥させたガラス繊維ろ紙 (GF/F, Whatman) でろ過し、24 時間 105°C で乾燥させた。別途、クロロフィル *a* (Chl.*a*) 濃度、安定同位体比、及び脂肪酸を測定するために、同様に 3 枚のガラス繊維ろ紙で定常期に達した培養液をろ過し、 -80°C で保存した。また、水槽内の Chl.*a* 濃度を測定するため、餌料添加直後は 200 mL、餌料添加前では 500 mL をガラス繊維ろ紙でろ過して同様に保存した。Chl.*a* 濃度は、JIS K 0400-80-10 に従い測定した [187]。餌料または飼育水をろ過し、 -80°C で保存したガラス繊維ろ紙を 25 mL 容共栓付試験管の中に入れ、90% エタノールを 20 mL 入れた。共栓を閉めろ紙に付着した懸濁物を再懸濁させた後、 70°C のウォーターバス中で、5 分間 Chl.*a* を抽出した。その後、15 分間放冷させた後、2 本の褐色ガラス試験管に抽出液を 5 mL ずつ分取した。片方の褐色ガラス試験管に 3 M HCl を 5 μL 添加し、 $1,500 \times g$ で 10 分間遠心した。それぞれの褐色ガラス試験管の上澄みを取り、分光光度計で 750 nm と 665 nm の波長の吸光度を測定した。そして、式 (2-1) [187] より Chl.*a* 濃度を算出した。

$$\text{Chl.}a \text{ 濃度 } (\mu\text{g L}^{-1}) = \frac{C - C_0}{K_c} \times \frac{R}{R - 1} \times \frac{V_e \times 1000}{V_s \times d} \dots \text{式 (2-1)}$$

C : (665 nm の吸光度) - (750 nm の吸光度)
 Co : (HCl 酸性化後の 665 nm の吸光度) - (HCl 酸性化後の 750 nm の吸光度)
 Kc : Chl.a の吸光計数 (82 L μg^{-1} cm⁻¹, [188])
 R : 酸性条件でフェオフィチンに変換された純 Chl.a 溶液の C/Co 比 (1.7, [188])
 Ve : 抽出液量 (20 mL)
 Vs : 濾過した試料の体積 (L)
 d : 吸収セルの光路長 (1 cm)

また、飼育水中の SS 濃度は、予め藻類の培養液の SS と Chl.a 濃度を測定して比を求めておき、測定された飼育水中の Chl.a 濃度を基に算出した。タテボシガイが取り込んだ藻類バイオマス量は、餌料藻類添加直後の飼育水中の SS 濃度から次の餌料藻類添加直前の SS 濃度を差し引くことにより算出した。

-80°Cで保存したタテボシガイの軟体部及び定常期に達した培養液をろ過した後のガラス繊維ろ紙を凍結乾燥し、乾燥重量を測定した。タテボシガイ軟体部の足の筋肉部分をハサミで切り取り、ピンセットを用いて約 1 mg 測りとり、錫製のホイルカップ ($\phi 5 \times 9$ mm, Ludiswiss) で包んだ。また、培養液をろ過したガラス繊維ろ紙は、サンプルトラップ部分を薄く剥ぎ取ってからホイルカップに包んだ。その後、安定同位体比質量分析計 (FLASH EA, Thermo Fisher Scientific) を用いて全窒素及び窒素安定同位体比を測定した。なお、窒素安定同位体比は式 (2-2) の通り大気中の窒素に対する相対千分偏差 δ 値 (%) として表した。標準物質には L-アラニン (昭光サイエンス) を用い、この標品の $\delta^{15}\text{N}$ 値は $8.7 \pm 0.2\%$ であった。

$$\delta\text{N} (\%) = \frac{R_{\text{sample}} - R_{\text{std}}}{R_{\text{std}}} \times 1000 \dots \text{式 (2-2)}$$

R_{sample} : サンプルの $\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}}$ 値

R_{std} : 標準物質の $\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}}$ 値

また、タテボシガイが飼育水中から除去した藻類に含まれる ^{15}N 量 (mg) とタテボシガイ体内に蓄積された ^{15}N 量 (mg) をそれぞれ算出し、藍藻 *M. aeruginosa* NIES-44 株及び緑藻 *C. vulgaris* に対する資化効率を求めた。

さらに、安定同位体比に加えて、タテボシガイ個体の脂肪酸組成を測定して餌料藻類の資化能力を評価した。凍結乾燥後のタテボシガイ軟体部の足の筋肉部分をハサミで切り取り、約 20~60 mg を量りとった。また、培養液をろ過したガラス繊維ろ紙は、

凍結乾燥後サンプルトラップ部分を薄く剥ぎ取り、脂肪酸抽出に供試した。これらの試料をガラス試験管にとり、Abdulkadir らの方法[189]を改変した方法で脂肪酸抽出を行った。上記のガラス試験管に、ヘキサン 1.0 mL、内部標準液 1.0 mL (100 mg L⁻¹ トリコサン酸-ヘキサン溶液)、12%三フッ化ホウ素メタノール溶液 0.8 mL を順次添加し、ヘッドスペースを窒素で満たして密栓した。この後 103°Cで 2 時間加熱し、脂質の抽出と脂肪酸メチルエステル化を行った。その後室温まで冷却してから、ヘキサン 0.5 mL、蒸留水 1 mL を添加し、激しく攪拌した。脂肪酸メチルエステルを含む上澄みのヘキサン層を 1,000 ×g で 3 分間遠心分離して回収し、ガスクロマトグラフィー用バイアル瓶に移した。

脂肪酸メチルエステルの分析はガスクロマトグラフィーにより行った。試料 1 μL をキャピラリーカラム (Select FAME; 100 m×0.25 mm, Agilent Technologies) を備えたガスクロマトグラフに注入した。注入口とフレームイオン検出器(FID)の温度は270°Cと280°Cとした。カラム温度は4°C min⁻¹の速度で150°Cから230°Cまで上昇させ、10分間保持させた。その後、230°Cから4°C min⁻¹の速度で250°Cまで上げ、10分間保持した。ヘリウムガスをキャリアガスとして用い、クロマトグラム上の脂肪酸のピークは市販の標準物質 (Supelco) の保持時間と比較することによって同定した。標準物質と一致しなかったピークはそれ以上解析しなかった。なお本研究では、タテボシガイ体内及び藻体中で検出されたリノール酸(LA, 18:2 ω 6)と α -リノレン酸(ALA, 18:3 ω 3)を藍藻及び緑藻由来バイオマーカー脂肪酸として[184]、エイコサペンタエン酸(EPA, 20:5 ω 3)を珪藻由来バイオマーカー脂肪酸と見なして解析した[184]。

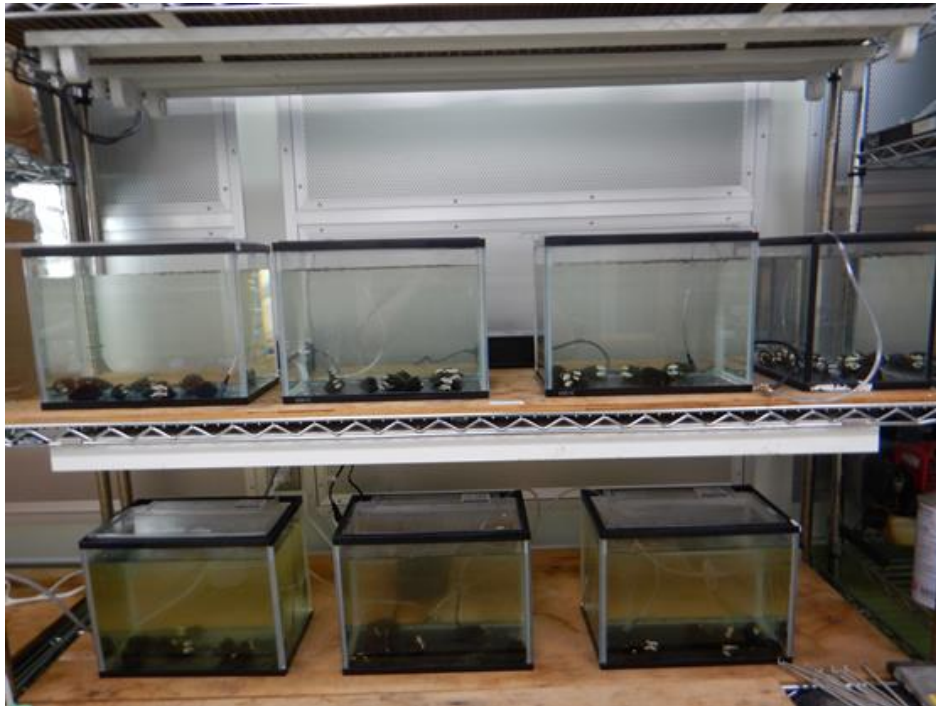


写真 2-4 80 日間におけるタテボシガイの藍藻資化能力の評価のための室内実験

2-2-4 タテボシガイの排泄物中の藍藻細胞活性の評価

餌料藻類として藍藻 *M. aeruginosa* NIES-44 株を 2-2-1 で説明した方法と同様の方法で純粋培養した (表 2-1)。培養液は 1,500 ×g で 10 分間遠心分離して濃縮液餌料とした。

脱塩素水道水 1 L を充填したガラス瓶 (内径 9 cm × 高さ 18 cm) に八郎湖で採取した殻長 58–65 mm のタテボシガイ成貝を 1 個体投入し、ガラス瓶内の Chl.*a* 濃度が 9 μg L⁻¹ (SS 濃度 3 mg L⁻¹ に相当) になるように *M. aeruginosa* NIES-44 株の濃縮液餌料を添加した (写真 2-5a)。実験は室温 20°C で行い、ガラス瓶内はエアープンプを用いて穏やかに曝気した (写真 2-5a)。試験は 9 連で行い、またタテボシガイを投入していない対照系は 3 連で行った。0、1、2、4、8、12 時間後に採水し、Chl.*a* 濃度の測定に用いた。

Chl.*a* 濃度の定量は Srisuksomwong らの方法に従った [190]。この方法は、2-2-3 で用いた Chl.*a* 濃度の定量方法とは異なる。Srisuksomwong らの方法は、藍藻の Chl.*a* 濃度をより感度よく定量するための方法であり [190]、測定対象が藍藻のみである本実験においてはこの方法を採用した。ガラス繊維ろ紙で試料水をろ過後、9 mL の 90%メタノールに浸漬して 70°C で 30 分間抽出した。その後、10 分間 1,500 ×g で遠心して得た上清について、分光光度計で 750 nm、665 nm、645 nm 及び 630 nm の吸光度を測定した。これらの測定値を用いて、式 (2-3) [189]により Chl.*a* 濃度を算出した。

$$\text{Chl.}a \text{ 濃度 } (\mu\text{g L}^{-1}) = (11.6 \times D_{665} - 1.31 \times D_{645} - 0.14 \times D_{630}) \times \left(\frac{V_e}{V} \times \frac{1}{l} \right) \cdots \text{式 (2-3)}$$

D₆₆₅ : 665 nm の吸光度

D₆₄₅ : 645 nm の吸光度

D₆₃₀ : 630 nm の吸光度

V_e : メタノール抽出液の液量

V : 濾紙に通水した試料量

l : セルの光路長 (1 cm)

9 連で行ったろ過摂食試験終了後、Chl.*a* 濃度の減少が確認された系を 4 つ選び (2-3-3 図 2-1 参照)、その系からタテボシガイを取り出し、脱塩素水道水で洗浄後、脱塩素水道水 1 L を充填した別のガラス瓶に投入して 12 時間放置し、糞及び偽糞を排泄させた (写真 2-5b)。タテボシガイが排泄した糞及び偽糞は区別せずまとめて排泄物とみなし、パスツールピペットで 15 mL 容の遠沈管に回収して FDA 試験 [185, 186] のための試料とした。対照系からは 50 mL の試料水を採取し、同様に FDA 試験に供した。

フルオレセインジアセテート (FDA) 0.1 g を 100%アセトン 20 mL に溶解し、1.5 mL チューブに 0.5 mL ずつ分注した。これをストック染色液として -30°C で保存した。

タテボシガイの排泄物懸濁液を 1,500 ×g で 10 分間遠心分離し、上澄みを取り除いた。沈殿物に C 培地を 490 μL 添加し、再懸濁させた。さらにストック染色液を 10 μL 添加し、室温で 20 分間静置した。その後、40 μL を採取してスライドガラス上に滴下し、カバーガラスをかけた。落射蛍光顕微鏡 (Olympus BX50、Olympus) を用いて、可視光及びブルー励起の NIBA フィルターを用いた蛍光下で観察し、藍藻細胞を計数した。ここで、活性を有する藻類細胞は蛍光下緑色を発するため、可視光で細胞が見られても蛍光下緑色を発しない細胞は失活した細胞とみなした (写真 2-6)。すなわち、可視光で総細胞数 (生細胞及び死細胞、 C_{t+d}) を、蛍光下で生細胞数 (C_i) を次の式 (2-4) を用いて算出した。

$$C_{t+d} \text{ または } C_i (\text{cells } 500 \mu\text{L}^{-1}) = C_{10} \times \frac{C_g}{V_a} \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{V_1}{V_3} \cdot \cdot \cdot \text{式 (2-4)}$$

C_{10} : 10 視野の平均細胞数

C_g : カバーガラスの面積(3.24 cm²)

V_a : 視野面積(9.4985×10^{-3} cm²)

V_1 : 懸濁液の容積(500 μL)

V_2 : スライドガラスに供試した懸濁液の体積(40 μL)

V_3 : 懸濁液のうちストック染色液を除いた体積(490 μL)

また、タテボシガイに与えた餌料中の藍藻細胞数と Chl.*a* 濃度で検量線を作成し、Chl.*a* の減少量からタテボシガイが取り込んだ細胞数を算出した。さらに、排泄物懸濁液中の生細胞数と死細胞数 (総細胞数と生細胞数の差に相当) を求め、タテボシガイに取り込まれた藍藻細胞に対する各細胞数の割合を算出した。

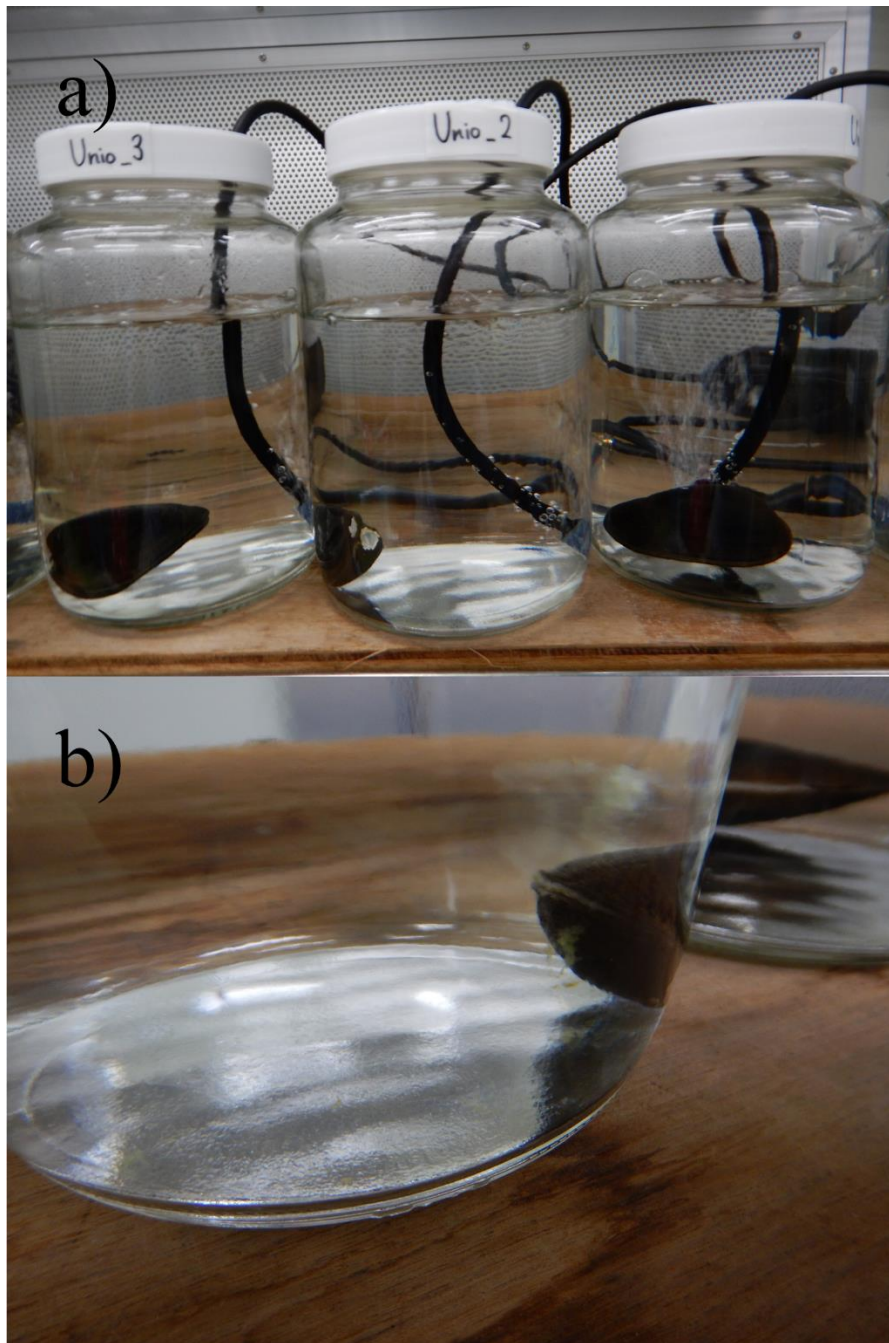


写真 2-5 タテボシガイによる藍藻摂食(a)と排泄実験での排泄(b)

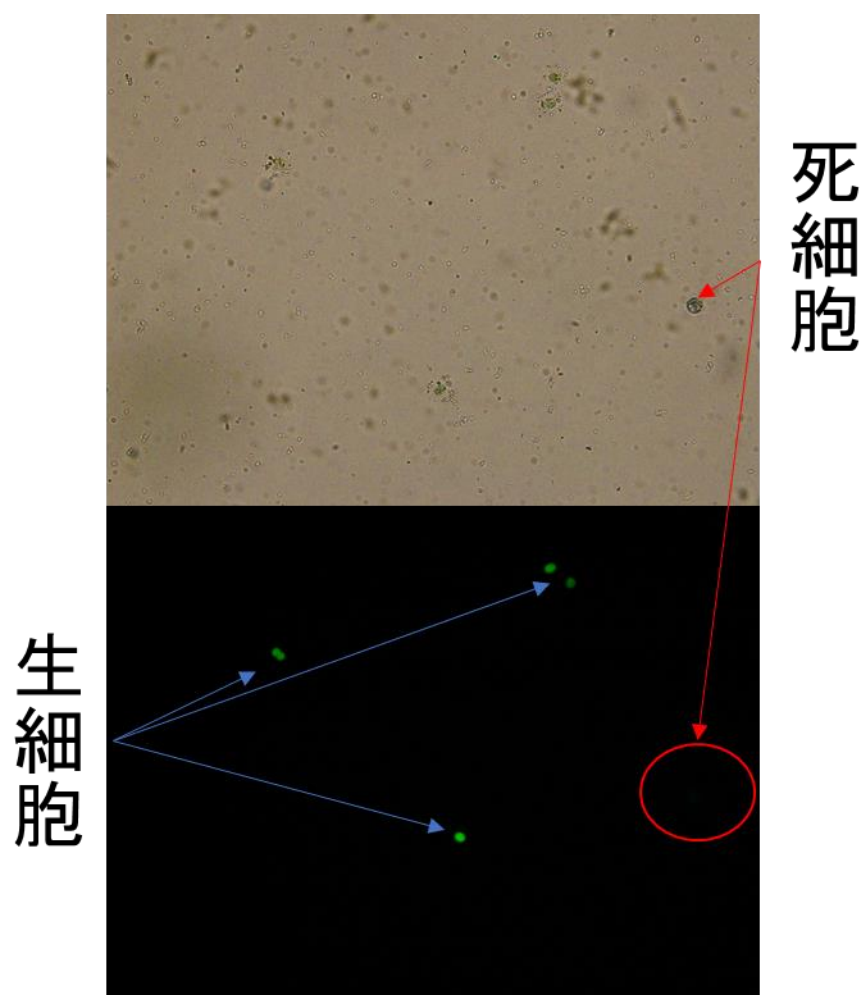


写真 2-6 FDA 実験によって得られたタテボシガイ排泄物中の藍藻細胞の顕微鏡写真
(上:可視光下、下:蛍光下)

2-2-5 データ解析

三元配置の分散分析、Student の t 検定及びピアソンの積率相関係数を用いた相関解析は R package ver. 3.6.3 を用いて行った[191]。

第3節 結果及び考察

2-3-1 異なる水温及び餌料濃度におけるタテボシガイの藍藻資化速度の定量

藍藻 *M. aeruginosa* NIES-44 株及び緑藻 *C. vulgaris* の藻体の熱量は、それぞれ $17.0 \pm 0.1 \text{ J mg}^{-1}$ 及び $22.6 \pm 0.2 \text{ J mg}^{-1}$ であり、*M. aeruginosa* 方が有意に低かった (表 2-3)。既往研究で報告されている *C. vulgaris* の藻体の熱量は、 $18 \sim 21 \text{ J mg}^{-1}$ であり [192, 193]、本研究で測定された熱量と同等であった。一方で、藍藻類の藻体の熱量は、これまで報告されていないため、比較することができなかった。そこで、得られた藍藻 *M. aeruginosa* NIES-44 株の藻体の熱量が、他の株と比較して一般的であるかどうかを評価するために、他の 7 株の藍藻の藻体の熱量と比較した。他の 7 株の藍藻の藻体の熱量は、 $15.6 \sim 17.6 \text{ J mg}^{-1}$ であったことから、*M. aeruginosa* NIES-44 株は他の藍藻株と同等の熱量を有することが示された (表 2-3)。また、炭素含有率の比較では、*M. aeruginosa* NIES-44 株及び *C. vulgaris* で $36.9 \pm 0.1\%$ 及び $49.6 \pm 0.2\%$ であり、熱量と同様に *M. aeruginosa* NIES-44 株の方が低い傾向を示した (表 2-3)。*M. aeruginosa* NIES-44 株と他の 7 株の藍藻の炭素含有率を比較しても、熱量と同様他の藍藻株と同等の熱量を有することが示された (表 2-3)。藻体の熱量は炭素含有率と有意に相関し ($r = 0.997, P = 4.0 \times 10^{-12}$)、窒素 ($r = -0.329, P = 0.297$) や水素 ($r = 0.507, P = 0.0927$) の他の元素とは相関関係を示さなかった。したがって、*C. vulgaris* の炭素含有率が高いため、*C. vulgaris* の藻体の熱量が *M. aeruginosa* NIES-44 株の藻体の熱量よりも高かったと考えられた。

資化速度を定量するための摂食実験では、餌料添加後、水中の不揮発性有機態炭素 (NPOC) が低下し、タテボシガイによる藻類の取り込みが観察された (図 2-1a, b)。また、排泄実験では水中の NPOC の増加が観察され、9 時間後には水中の累積 NPOC が定常状態に達し、消化管内の排泄物のほとんどが排泄されたことが示唆された (図 2-1c, d)。

摂食速度と排泄速度について、水温、餌料藻類、及び餌料濃度の三元配置の分散分析を行った結果、摂食速度と餌料濃度でのみ有意差が検出された (図 2-2)。したがって、 25°C と 15°C の異なる水温条件によって、また、*M. aeruginosa* と *C. vulgaris* の異なる餌料藻類によって、摂食速度は影響を受けないことが示された (図 2-2a)。有意差が見られた餌料濃度に注目すると、高濃度餌料条件における摂食速度の平均値は、 $2.2 \sim 2.7 \text{ mg C g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ であり (図 2-2a)、排泄速度の平均値は $0.09 \sim 0.28 \text{ mg C g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ であった (図 2-2b)。 25°C の *C. vulgaris* 高濃度条件で比較的高い排泄速度の平均値が観測されたが、この系は 5 連で実験しており、この 5 連の内訳の中に 0.42 及び $0.60 \text{ mg C g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ の高い排泄速度を記録した個体がいたため平均値が引っ張られていた (図 2-2b)。5 連のうち他の 3 つは他の系でも見られる $0.2 \text{ mg C g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 以下の値を示していた (図 2-2b)。餌料低濃度条件における摂食速度の平均値は $0.13 \sim 0.24 \text{ mg C g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ であり (図 2-2a)、排泄速度の平均値は $0.08 \sim 0.13 \text{ mg C g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ であった (図 2-2b)。したがって、餌料濃度が高いと摂食速度は有意に高かったが (図 2-2a)、排泄速度は

餌料濃度に依存せず一定であった (図 2-2b)。すなわち、高濃度条件では摂食分が増加しているのに対して排泄している分が変わらないため、資化効率が低濃度条件に比べて増加している (図 2-3a)。高濃度餌料条件で資化効率が増加した点について、Guらは、淡水二枚貝イシガイ科ヒレイケチョウガイ (*Hyriopsis cumingii*) に与える *M. aeruginosa* の濃度を増加させると消化管内のアミラーゼ、セルラーゼ、及びリパーゼなどの消化酵素群の活性が増加することを示しており[194]、高濃度の餌料によって消化酵素群の活性が増加した可能性がある。しかし、一方で、海水二枚貝の餌料資化に関する研究では、餌料濃度の増加が資化効率を低下させること報告されている。Thompsonらは、ムラサキイガイ (*Mytilus edulis*) に海産緑藻 *Tetraselmis suecica* を 1×10^3 cells mL⁻¹ 及び 2.5×10^3 cells mL⁻¹ の2つの異なる濃度で与えた時、濃度差はわずか2.5倍であるが資化効率は85%と0%であったと報告した[195]。Griffithsも同様に海産二枚貝クロイガイ (*Choromytilus meridionalis*) に海産緑藻 *Dunaliella primolecta* を $8 \times 10^2 \sim 10^3$ cells mL⁻¹ の範囲の濃度で与えた時、餌料藻類の濃度の増加とともに資化効率が低下し、 2×10^4 cells mL⁻¹ を超えた時、資化効率が0%になったことを報告した[171]。したがって、餌料濃度が資化速度に影響を与えるメカニズムについては更なる検討が必要である。また、総じて摂食速度は排泄速度の約10倍の値を示したことから (図 2-2)、摂食速度から排泄速度を差し引いて算出される資化速度は、摂食速度の影響を強く受けることが示された。

高濃度餌料条件における資化速度の平均値は、 $96 \sim 109 \text{ J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ であり、餌料低濃度条件における資化速度の平均値は、 $-0.1 \sim 6.9 \text{ J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ であった (図 2-5b)。一部の系では排泄速度が摂食速度を上回ったため資化速度が負になった系が存在した (図 2-5b)。異なる水温が資化速度に与える影響については、15°Cと25°Cではタテボシガイの資化速度に影響を及ぼさないことが示された (図 2-3b)。Tatedaらの研究では、低水温(11°C)で資化速度が増加する低水温型二枚貝(ムラサキイガイ)と高水温(27°C)で資化速度が増加する高水温型二枚貝(ミドリイガイ)の存在が示されたが[170]、タテボシガイは15°Cと25°Cではほぼ同等の資化速度を示し (図 2-3b)、アオコの発生が予想される夏季及び秋季の水温範囲で一定の資化能力を発揮することが可能であると考えられた。また、異なる餌料濃度が資化速度に与える影響については、高濃度餌料条件において低濃度餌料条件よりも有意に高い資化速度を示し、アオコを想定した高濃度餌料条件でアオコを資化可能であることが示された。

以上より、これまでタテボシガイの藍藻類に対するろ過能力及び資化性については検討されていなかったが、本実験により短期的には藍藻 *M. aeruginosa* をろ過及び資化可能であることが示された。アオコの増殖が確認されている15°C[23]及び25°C[12]の異なる水温条件では、どちらの水温条件でも同等の資化速度を示すことが明らかになった。さらに、アオコ発生を想定した高濃度餌料条件では低濃度餌料条件よりも高い資化速度を発揮することも明らかとなった。したがって、短期的な室内実験における評価ではあるが、藍藻防除のためのバイオマニピュレーションに有用であることが示された。

表 2-3 各藻類株の藻体の熱量及び炭素・窒素・水素含有率

藻類種	株	熱量 (J mg ⁻¹)	炭素 含有率(%)	窒素 含有率(%)	水素 含有率(%)
<i>Chlorella vulgaris</i>	クロレラ工業	22.6 ± 0.2	49.6 ± 0.2	9.4 ± 0.0	7.5 ± 0.4
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NIES-44	17.0 ± 0.1	36.9 ± 0.1	8.7 ± 0.0	6.8 ± 0.7
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NIES-843	15.8 ± 0.3	32.6 ± 0.0	9.8 ± 0.0	6.9 ± 0.1
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NIES-2613	16.1 ± 0.0	34.0 ± 0.0	10.2 ± 0.0	6.7 ± 0.7
<i>Microcystis aeruginosa</i>	0824	16.3 ± 0.1	33.7 ± 0.1	10.4 ± 0.0	6.4 ± 0.6
<i>Microcystis aeruginosa</i>	N7	15.6 ± 0.1	32.9 ± 0.2	10.0 ± 0.0	6.8 ± 0.1
<i>Microcystis aeruginosa</i>	5B	17.6 ± 0.1	37.7 ± 0.2	10.9 ± 0.0	8.0 ± 0.1
<i>Pseudoanabaena</i> sp.	N3	15.8 ± 0.3	32.6 ± 0.0	10.7 ± 0.0	7.3 ± 0.0
<i>Pseudoanabaena</i> sp.	N2A	16.2 ± 0.4	33.6 ± 0.0	10.4 ± 0.0	6.1 ± 0.0

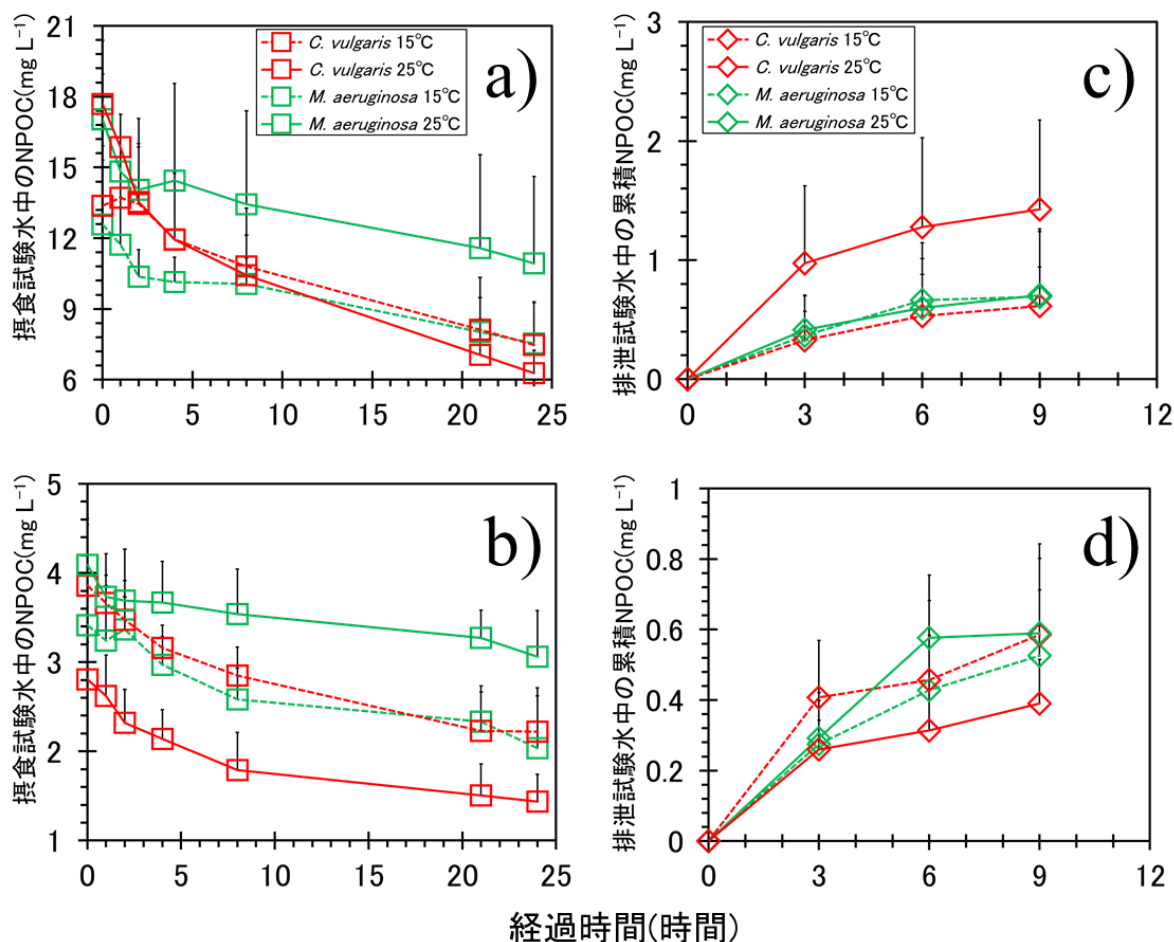


図 2-1 摂食実験における高濃度(a)・低濃度(b)条件での水中の不揮発性有機態炭素濃度(NPOC)の経時変化及び排泄実験における高濃度(c)・低濃度(d)条件での水中の累積のNPOCの経時変化

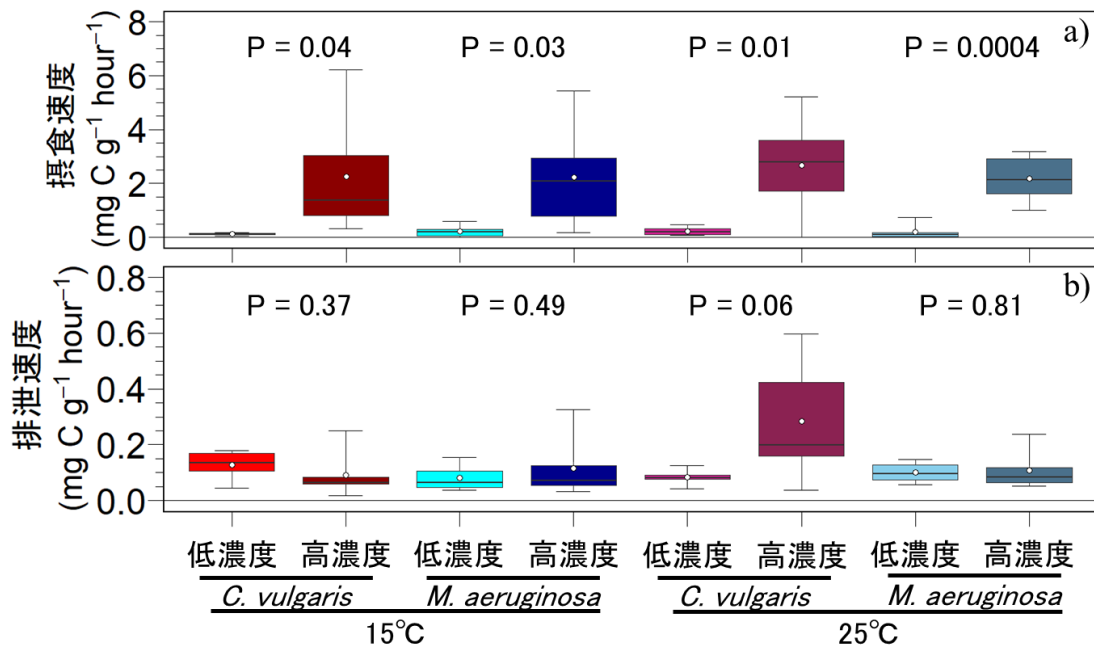


図 2-2 異なる水温・餌料藻類・餌料濃度におけるタテボシガイの摂食速度(a)と排泄速度(b)

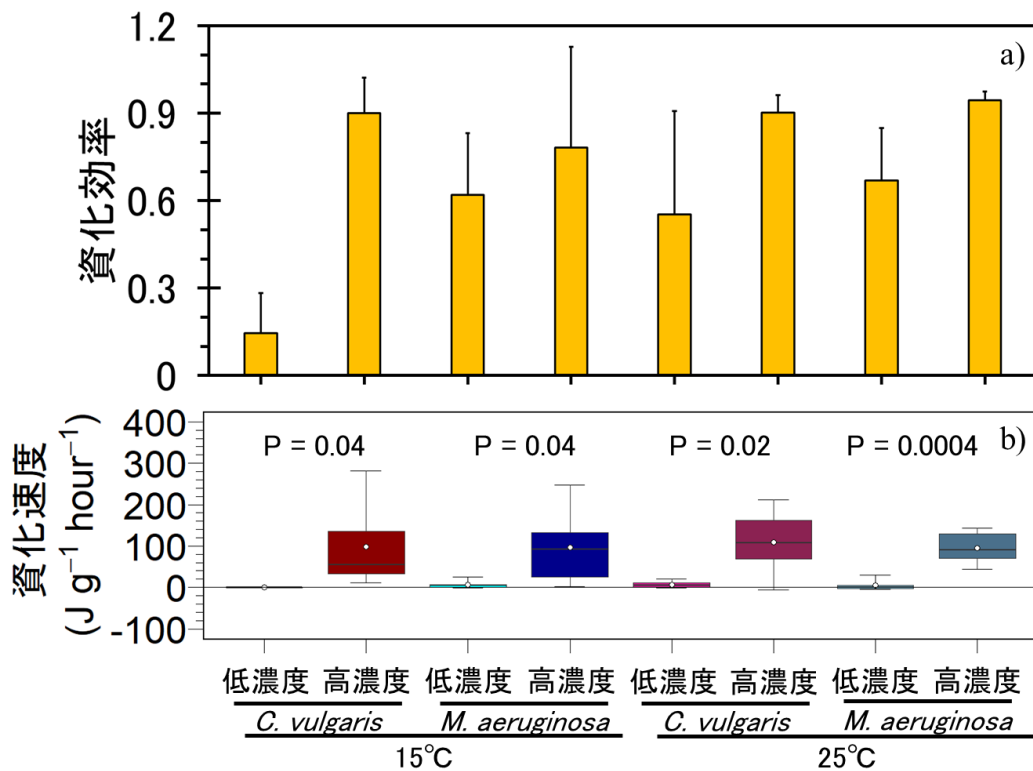


図 2-3 異なる水温・餌料藻類・餌料濃度におけるタテボシガイの資化効率(a)と資化速度(b)

2-3-2 80 日間におけるタテボシガイの持続的な藍藻資化効率の評価

80 日間の飼育実験において、分析のために水槽からタテボシガイを 1 個体ずつ引き抜いたため、1 個体あたりの藻類負荷量は徐々に増加した (図 2-4a)。*M. aeruginosa* の負荷量は、0~11 日の間は $8 \pm 1 \text{ mg 個体}^{-1}$ ($n=3$) であったが、実験後半の 60~80 日の間は $27 \pm 11 \text{ mg 個体}^{-1}$ ($n=3$) であった (図 2-4a)。一方で、*C. vulgaris* の負荷量は、0~11 日の間は $3 \pm 1 \text{ mg 個体}^{-1}$ ($n=3$) であったが、実験後半の 60~80 日の間は $26 \pm 4 \text{ mg 個体}^{-1}$ ($n=2$) であった (図 2-4a)。80 日目における負荷量は、*M. aeruginosa* では $516 \pm 38 \text{ mg 個体}^{-1}$ であり、*C. vulgaris* では $451 \pm 46 \text{ mg 個体}^{-1}$ であった。各藻類の除去率に基づいて 80 日間で摂食した藻類バイオマスを算出すると (図 2-4b)、*M. aeruginosa* は $332 \pm 20 \text{ mg 個体}^{-1}$ であり、*C. vulgaris* は $300 \pm 36 \text{ mg 個体}^{-1}$ となった。

タテボシガイ筋組織中の窒素安定同位体比は、試験開始時に $8.1 \pm 0.2\text{‰}$ であった (図 2-5)。また、餌料藻類の窒素安定同位体比は、*M. aeruginosa* では $3,350 \pm 60\text{‰}$ であり、*C. vulgaris* では $3,350 \pm 40\text{‰}$ であった。80 日間の飼育によって *M. aeruginosa* を与えた場合は $150.7 \pm 85.7\text{‰}$ に、*C. vulgaris* では $152.8 \pm 34.6\text{‰}$ まで増加した (図 2-5)。対照系のタテボシガイでは窒素安定同位体比が上昇しなかったことから、観察された窒素安定同位体比の増加はタテボシガイによる藻体の資化であることが示された (図 2-5)。48 日目では、*M. aeruginosa* と *C. vulgaris* を与えたタテボシガイの筋組織中の窒素安定同位体比に差が生じた (図 2-5)。この原因は不明であったが、48 日時点では *M. aeruginosa* を与えた系で 1 個体のみ死亡が確認されており、*C. vulgaris* では死亡個体が確認されていないことから、栄養状態の差はほとんど無いようであった。

タテボシガイの藍藻 *M. aeruginosa* に対する資化効率を算出するため、 ^{15}N の積算摂取量に対するタテボシガイ筋組織の ^{15}N の蓄積量を比較した (図 2-6)。藍藻 *M. aeruginosa* ($r = 0.86, P = 0.03$) 及び緑藻 *C. vulgaris* ($r = 0.81, P = 0.03$) の両方においてタテボシガイ筋組織に資化された ^{15}N 量と摂取された ^{15}N 量の間に関係が見られ、2 ヶ月以上にわたってほぼ同等の効率でこれらの藻類を資化していたことが示された (図 2-6)。ただし、摂取された ^{15}N の累積量が 0.4 mg 個体^{-1} を超えた時、*M. aeruginosa* の資化効率は大幅に下がった (図 2-6)。この時点でタテボシガイは餌料として不適とされる藍藻[94-97]を 80 日間摂取し続けていたため、資化能力が低下したと考えられた。80 日目ではタテボシガイは 54% の *M. aeruginosa* 細胞を摂取したが (図 2-6)、これらは擬糞として排泄された可能性がある[80, 83-85, 100]。したがって、 ^{15}N の累積量が 0.4 mg 個体^{-1} を超えた 80 日目のデータを除いて、得られた直線の傾きを平均資化効率と見なしたところ、*M. aeruginosa* では 47%、*C. vulgaris* では 37% の値が算出された (図 2-6)。

80 日間にわたる飼育実験の後半において *M. aeruginosa* の資化効率が低下した要因は不明であった。2-3-1 では、タテボシガイは高濃度餌料条件 ($20 \sim 56 \text{ mg L}^{-1}$) において低濃度餌料条件 ($4 \sim 13 \text{ mg L}^{-1}$) よりも高い資化速度を示した。2-3-1 における高濃度餌料条件の餌料濃度 ($20 \sim 56 \text{ mg L}^{-1}$) は、ガラス瓶内に 1 個体のタテボシガイを

入れているため、20~56 mg 個体⁻¹と同義である。この負荷量は、本実験後半の *M. aeruginosa* の負荷量である 27±11 mg 個体⁻¹と一致している。しかしながら、本実験では、1 個体あたりの餌料負荷量の増加に伴って、資化効率の傾きは *M. aeruginosa* 及びともに *C. vulgaris* 緩やかになった (図 2-6)。したがって、本実験では餌料負荷量が少ない方で資化効率が高くなっており、高濃度餌料条件で藻類に対する資化効率が高くなる 2-3-1 の結果 (図 2-3a) とは相反する結果となっている。この矛盾について、2-3-1 の実験ではタテボシガイの短期的な藍藻資化を特徴づけ、本実験では長期的な藍藻資化を特徴づけたことが考えられた。本実験では、飼育水槽内のタテボシガイが長期的に 1 種類の餌料藻類のみで飼育し続けたため弱ってしまった可能性がある。実際、80 日間の飼育実験では、いくつかの水槽で死貝が生じた (実験に供試したタテボシガイの 12% [59 匹のうちの 7 匹])。原因は不明であるが、1 種類の餌料藻類によりタテボシガイの栄養状態に悪影響を及ぼした可能性がある。*M. aeruginosa* では顕著な資化効率の低下が見られたが、*C. vulgaris* でも ¹⁵N の累積量が 0.08 mg 個体⁻¹を超えたときに資化効率の低下が見られた (図 2-6)。*C. vulgaris* において ¹⁵N の累積量が 0.08 mg 個体⁻¹を超えたのは 48 日目であるが、この時 *M. aeruginosa* と *C. vulgaris* を与えたタテボシガイの筋組織中の窒素安定同位体比にも差が生じており (図 2-5)、*C. vulgaris* でも資化効率が低下する傾向が観察された。既往研究では、Pirini らは、ムラサキイガイ (*Mytilus galloprovincialis*) に対して 30 日間餌料を与えずに飼育する系と珪藻 *Thalassiosira weissflogii* を与えて飼育する系での栄養状態を比較した[196]。30 日間の飼育実験では、餌料を与えない系と珪藻を与えた系において肥満度、含水率、全脂質含有率、リン脂質含有率、高度不飽和脂肪酸含有率 (PUFA) に有意な差が見られなかったことが報告されている[196]。したがって、1 か月程度の飼育では 1 種類の藻類を与え続けても餌料を与えなくても影響は小さいかもしれないが、本実験では 80 日間という長い期間 1 種類の餌料を与え続けたため資化効率に悪影響が出た可能性が考えられた。

藍藻の資化効率は様々なる過摂食生物で評価されている。動物プランクトンではほとんど資化が見られず[102]、ろ過摂食魚においても 10%程度である[103]ことが報告されている。対照的に、1 時間の摂食実験において淡水シジミ (*Corbicula* sp.) は、藍藻 *Anabaena oscillarioides* に対して 61%という高い資化効率を示した[104]。本研究では、タテボシガイの筋組織への ¹⁵N の蓄積に基づいて資化効率を 47%と算出したが、図 2-6 の傾きは徐々に緩やかになった。したがって、この研究で得られた資化効率は、短期間の実験で得られる資化効率よりも低い。報告例は少ないものの、本研究において観測されたタテボシガイの藍藻に対する 47%の資化効率は、報告されている動物プランクトンやろ過摂食魚と比較して高いと考えられた。

また、実際の湖沼環境で藍藻の資化を追跡することを想定した場合、湖沼環境中の藍藻のみを同位体標識するのは困難である。そこで、藍藻及び緑藻に特有の脂肪酸を分析することでタテボシガイの資化を評価できるか検討した。藍藻 *M. aeruginosa* 及び緑藻 *C. vulgaris* に共通なバイオマーカー脂肪酸としてリノール酸 (LA) と α -リノ

レン酸 (ALA) モニタリングした (図 2-7a, d, g)。また、両種に由来しないエイコサペンタエン酸 (EPA) もモニタリングした (図 2-7b, e, h)。*M. aeruginosa* を給餌したタテボシガイの LA 及び ALA の含有率は最初の 28 日間はほとんど変化しなかったが、その後わずかに増加した (図 2-7a)。*C. vulgaris* を給餌したタテボシガイの LA 及び ALA の含有率も同様の傾向であった (図 2-7d)。対照的に、餌料藻類が供給されていないタテボシガイでは、LA 及び ALA の含有率の増加は確認されなかった (図 2-7g)。また、タテボシガイには、80 日間の飼育実験において EPA が供給されなかったため、EPA に対する LA 及び ALA の比率を求めて、タテボシガイによる *M. aeruginosa* 及び *C. vulgaris* の資化を評価した (図 2-7c, f, i)。この比率は、80 日間で大幅に変化した (図 2-7c, f, i)。実験開始時の比率は 0.52~0.57 の範囲であった (図 2-7c, f, i)。*M. aeruginosa* を給餌したタテボシガイでは実験開始から 28 日間は変化しなかったが、その後 0.75~0.82 に増加した (図 2-7c)。同様の傾向が *C. vulgaris* でも観察され、60 日以降で 1 を超えた (図 2-7f)。80 日間の飼育実験における *M. aeruginosa* を給餌したタテボシガイ筋組織中の $\delta^{15}\text{N}$ 値と EPA に対する LA 及び ALA の比率の間には、正の関係が観測され ($r = 0.355, P = 0.088$)、この比率を用いて湖沼環境中で藍藻の資化を推定できると考えられた。

ところで、*M. aeruginosa* 及び *C. vulgaris* に含まれていない EPA と DHA は、動物の必須脂肪酸で [45-48]、体細胞の成長と繁殖に不可欠であると考えられている[197]。本研究では、80 日間の飼育実験においていくつかの水槽で死貝が生じた (実験に供試したタテボシガイの 12% [59 匹のうちの 7 匹]) が、ほとんどのタテボシガイは EPA と DHA を摂取できない状況でも 80 日間生存した。細菌からの EPA 供給も想定されるが、対照系のタテボシガイの EPA 含有率が減少していることから (図 2-7h)、細菌由来の EPA はほとんど供給されていないと推察された。したがって、EPA 及び DHA は少なくとも 80 日間はタテボシガイ成貝が新たに摂取しなくても生存可能であることが示された。Pirini ら 30 日間餌料を与えなかったムラサキイガイと EPA を含む珪藻が与えられたムラサキイガイで EPA と DHA 含有率に差が見られなかったことを報告している[196]。

以上より、これまでは最大 3 週間での淡水二枚貝の藍藻資化は検討されていたが [108]、初めて淡水二枚貝タテボシガイが 60 日間平均資化効率 47%を維持したことが示された。また、同位体標識に加え、EPA に対する LA 及び ALA の比率を使用して二枚貝の藍藻資化を評価できることが明らかとなり、湖沼環境中での藍藻資化の実態に関する調査への適用が期待された。

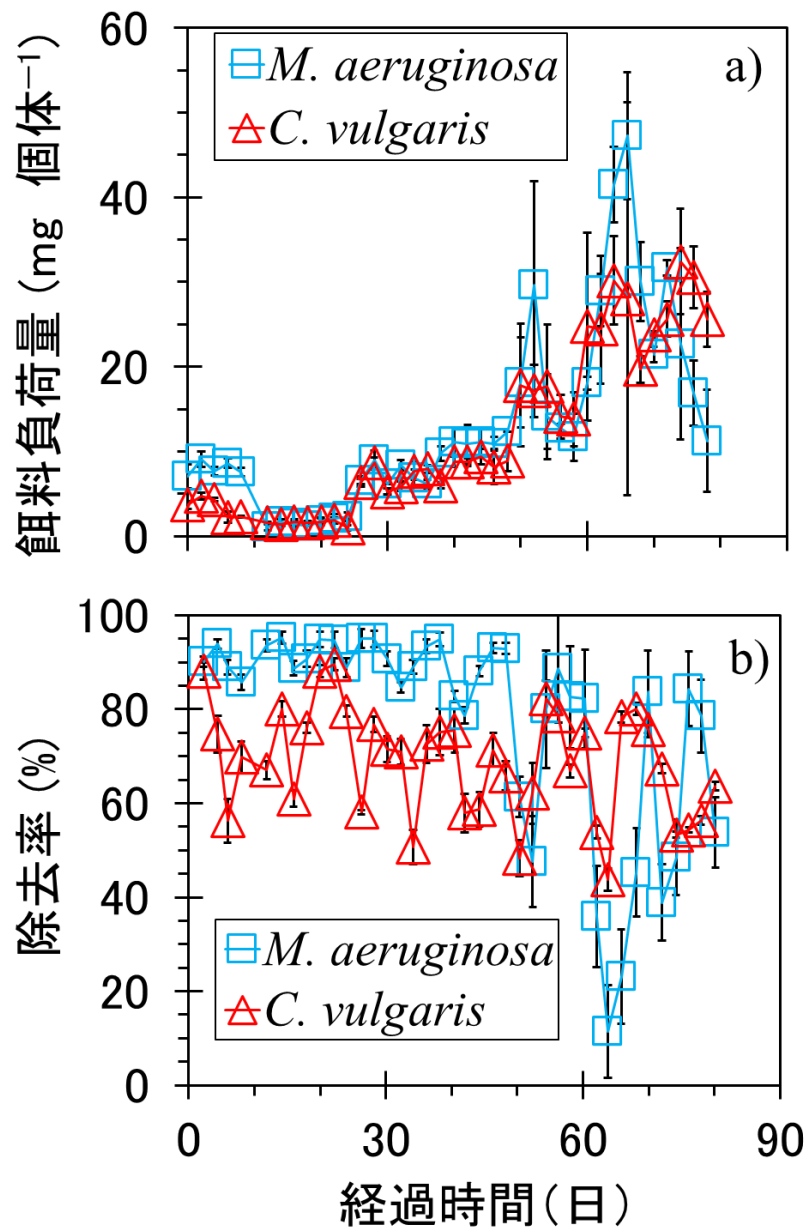


図 2-4 80 日間の飼育実験におけるタテボシガイ 1 個体当たりの餌料負荷(a)と各水槽における藻類除去率(b)

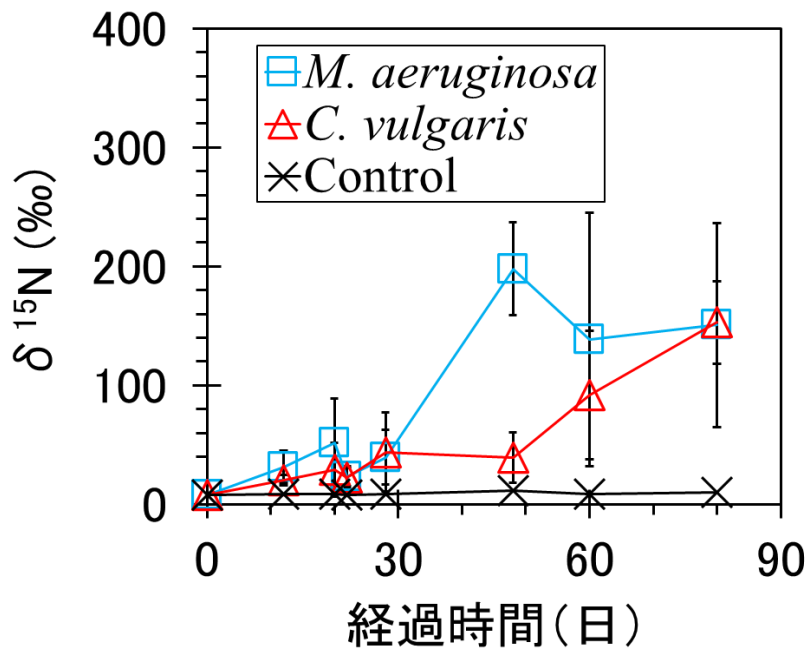


図 2-5 80 日間の飼育実験におけるタテボシガイ筋組織中の $\delta^{15}\text{N}$ 値

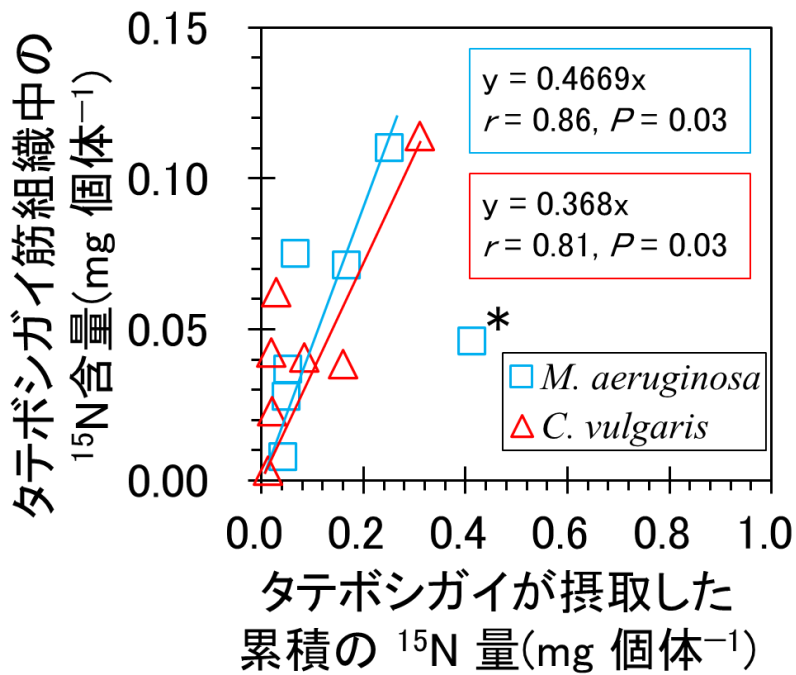


図 2-6 80 日間の飼育実験におけるタテボシガイの藍藻 *M. aeruginosa* 及び緑藻 *C. vulgaris* に対する資化効率

*で示したデータは図中の線形回帰解析から除外した

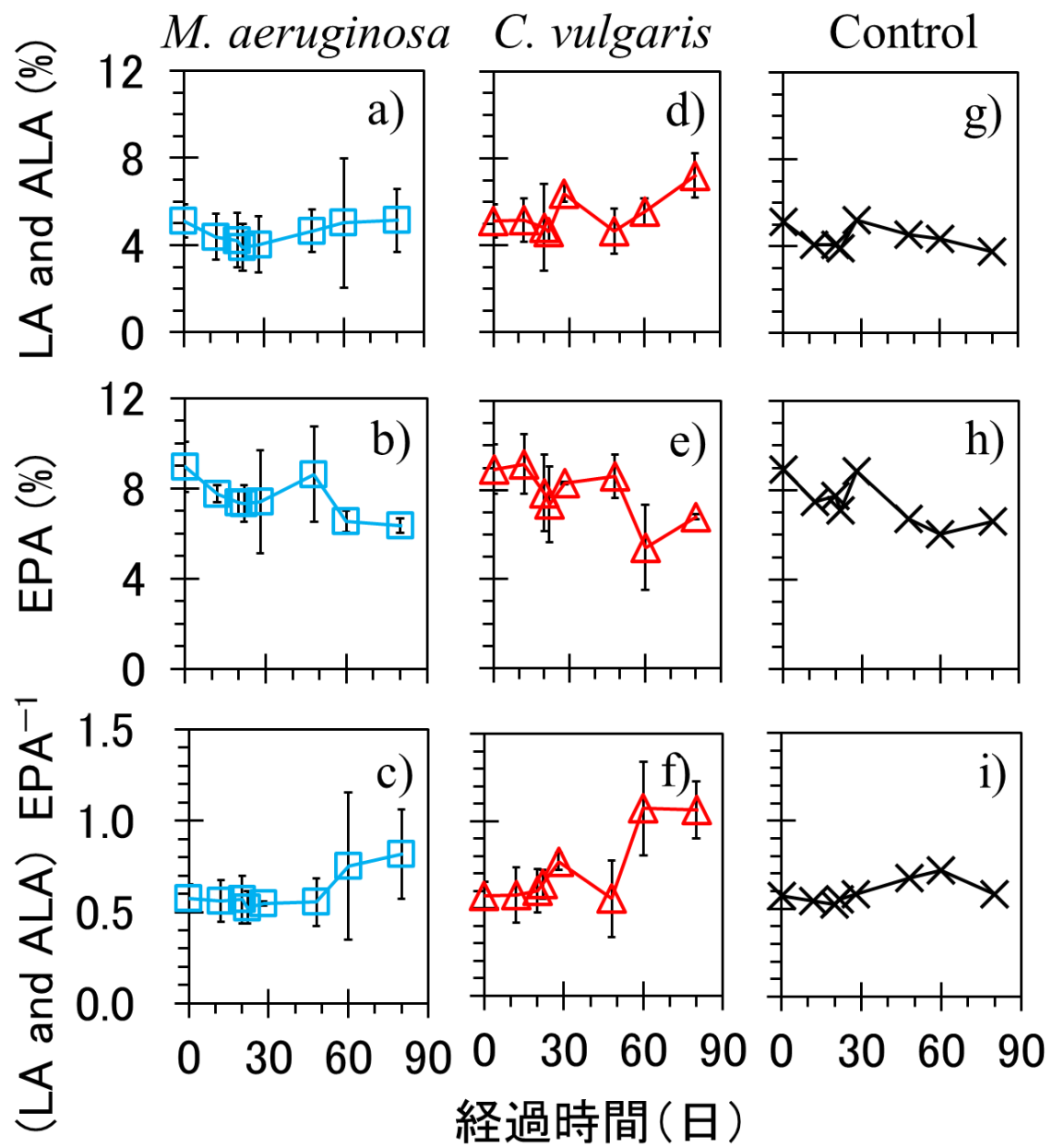


図 2-7 80 日間の飼育実験におけるタテボシガイ筋組織中の藍藻・緑藻由来脂肪酸 (LA 及び ALA)、珪藻由来脂肪酸 (EPA)、及び藍藻・緑藻 / 珪藻由来脂肪酸比

2-3-3 タテボシガイの排泄物中の藍藻細胞活性の評価

藍藻を摂食させた9個体のタテボシガイのうち、Chl.*a*濃度の減少が見られた4個体をFDA試験のための排泄実験に用いた(図2-8)。FDA試験の結果、餌料として投入した藍藻 *M. aeruginosa* 培養液では90%が活性を有する生細胞であった(表2-4、図2-9)。タテボシガイを投入しなかった対照系でも *M. aeruginosa* の生細胞の割合は低下しなかった(表2-4、図2-9)。一方で、タテボシガイの排泄物中の *M. aeruginosa* の生細胞の割合は67%と有意に減少していた($P < 0.05$)。

飼育試験のはじめに投入した *M. aeruginosa* の細胞数を100%とすると、そのうちタテボシガイに取り込まれた *M. aeruginosa* 細胞は74%、未摂取の *M. aeruginosa* 細胞は26%に相当していた(表2-4、図2-9)。摂取された *M. aeruginosa* 細胞数を100%とすると、そのうち3%が12時間で排泄されたと推算された(表2-4、図2-9)。摂取された *M. aeruginosa* 細胞数のうち生細胞は僅か2%と算出され(表2-4、図2-9)、タテボシガイは *M. aeruginosa* を取り込んだ後、少なくとも12時間では生細胞をほとんど排出しないことが明らかになった。一方で、摂取された細胞の97%が不明分としてカウントされた(表2-4、図2-9)。この不明分は消化されて形態観察ができなかった細胞分であると推察された。ただし、12時間の試験時間で排出されず、まだ生細胞として体内に残っている可能性もあった。しかし、2-3-1で行った摂食及び排泄実験では24時間の摂食期間に続く、9時間の排泄期間で水中の累積のNPOCがほぼ定常に達しており、12時間は消化管内の全ての *M. aeruginosa* 細胞を排泄するのに十分な時間であった推察された。また、排泄された藍藻細胞の約30%が死細胞であったことから、タテボシガイの体内を通過することで一部の藍藻細胞は消化されなくても活性を失うことが示された。一方で、本実験で排泄された藍藻生細胞の絶対量は 2.9×10^4 細胞であり、これらの生細胞が再回帰し、増殖に寄与するかどうかについてはさらなる検討が必要である。

以上より、タテボシガイは摂取した藍藻細胞のうち2%の藍藻生細胞を排泄するが、97%を資化及び消化によって除去し、1%を死細胞として不活化することが明らかとなった。また、これまで排泄物中の藍藻細胞の活性を評価することは困難とされてきたが[100]、FDAを用いることで評価可能になることが示された。FDAを用いた排泄物中の藍藻細胞の活性を評価する方法は、他の二枚貝やその他ろ過摂食動物にも適用可能と考えられ、本評価方法の波及効果が期待された。

表 2-4 タテボシガイに摂取された藍藻 *M. aeruginosa* の排泄物中の生残量 (n = 4)

		細胞数 (cells 個体 ⁻¹ 12 時間 ⁻¹)	相対量 (%)
投入細胞数 (100%)	摂取	$(1.3 \pm 0.2) \times 10^6$	74
	未摂取	$(5.0 \pm 0.2) \times 10^5$	26
摂取細胞数 (100%)	生細胞	$(2.9 \pm 0.7) \times 10^4$	2
	死細胞	$(1.3 \pm 0.2) \times 10^4$	1
	不明分*	1.3×10^6	97

*消化・資化された細胞及び未排泄の細胞

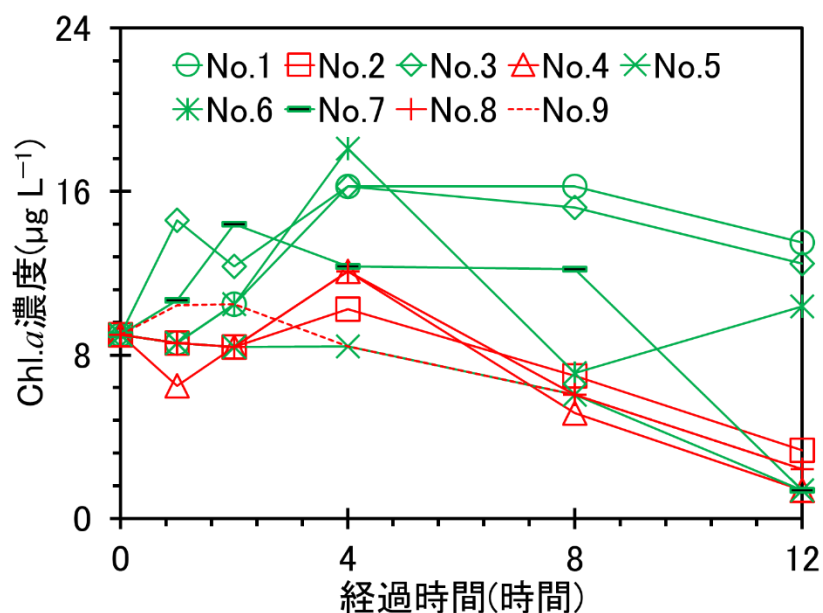


図 2-8 タテボシガイの藍藻摂食による Chl.a 濃度の経時変化 (Chl.a 濃度の減少が見られた赤いプロットの個体のみ排泄実験に移行し、緑のプロットの実験系は以降の排泄実験には用いられなかった)

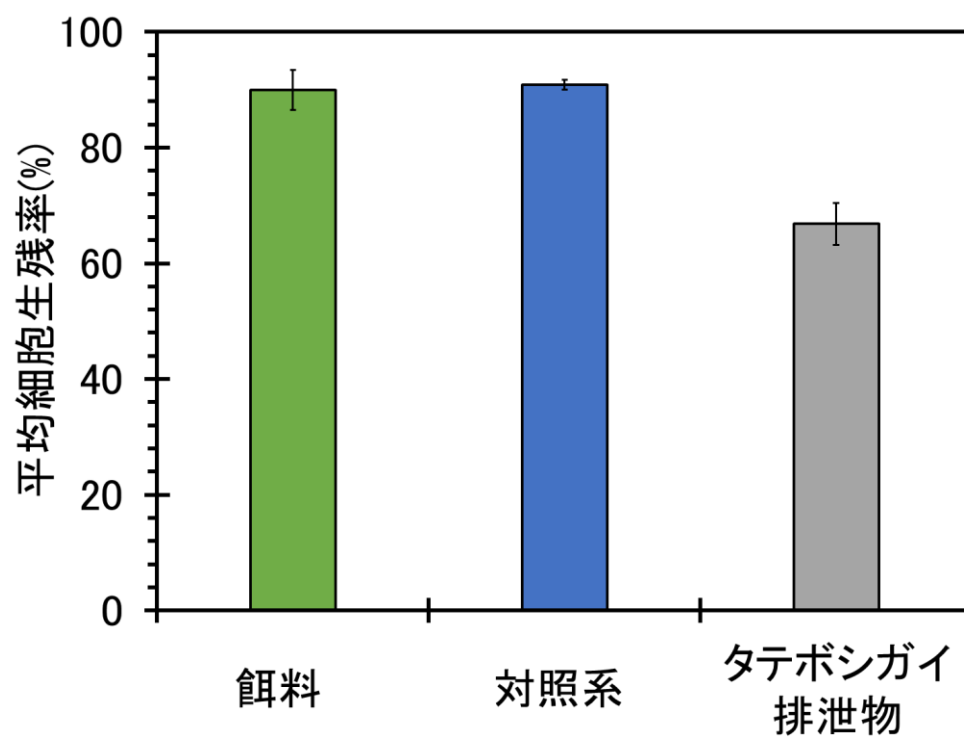


図 2-9 FDA 試験における平均細胞生残率(餌料及び対照系は $n = 3$ 、タテボシガイ排泄物は $n = 4$ 、エラーバーは標準偏差を示す)

第4節 要約

本章では、タテボシガイの藍藻に対する資化能力を明らかにするため、はじめに、1) 異なる水温及び餌料濃度条件下における24時間の摂食実験と9時間の排泄実験で構成された短期的な室内実験による藍藻資化速度の定量を行った。続いて、2) ^{15}N 標識した藍藻 *M. aeruginosa* を80日間タテボシガイに給餌し、同位体濃縮及び脂肪酸組成を分析し、長期的な藍藻資化能力のモニタリングを行った。最後に3) 藍藻 *M. aeruginosa* を摂食させたタテボシガイの排泄物にFDAを添加し、生細胞の生残性を評価した。

1) 異なる水温及び餌料濃度条件下における短期的な室内実験による藍藻資化速度の定量では、タテボシガイが藍藻 *M. aeruginosa* をろ過及び資化可能であることが初めて示された。また、アオコの増殖が確認されている15°C[23]及び25°C[12]の異なる水温条件において同等の資化速度を示すことが明らかになった。さらに、アオコ発生を想定した高濃度餌料条件では低濃度餌料条件よりも高い資化速度を発揮することも明らかとなり、短期的な室内実験における評価ではあるが、藍藻防除のためのバイオマニピュレーションに有用であることが示された。

2) ^{15}N 標識した藍藻 *M. aeruginosa* を80日間タテボシガイに給餌した長期的な藍藻資化能力のモニタリングでは、これまで最大3週間での淡水二枚貝の藍藻資化は検討されていたが[108]、初めて淡水二枚貝タテボシガイが60日間平均資化効率47%を維持したことが示された。さらに、EPAに対するLA及びALAの比率を使用して二枚貝の藍藻資化を評価できることが明らかとなり、湖沼環境中での藍藻資化の実態に関する調査への適用が期待された。

3) タテボシガイの排泄物中の藍藻生細胞の生残性の評価では、摂取した藍藻細胞のうち2%の藍藻生細胞を排泄するが、97%を資化及び消化によって除去し、1%を死細胞として不活化することが明らかとなった。また、これまで排泄物中の藍藻細胞の活性を評価することは困難とされてきたが[100]、FDAを用いることで評価可能になることが示された。

本章での室内実験によるタテボシガイの藍藻資化能力の評価方法や排泄物中の藍藻生細胞の評価方法は、他のイシガイ科二枚貝にも適用可能であり、淡水二枚貝を用いたバイオマニピュレーションによる藍藻防除における研究への波及効果が見込まれ、バイオマニピュレーションを推進する上で重要な知見となる。

第3章 八郎湖におけるタテボシガイの藍藻資化の実態調査

第1節 はじめに

第2章においてタテボシガイの藍藻資化能力が認められたが、湖沼環境中で藍藻の資化を検討した事例は少ない。Kimらは標識元素をアオコが発生した人工池に投入し、3週間イシガイ及び2種のドブガイの同位体濃縮をモニタリングしたが、水中のアオコが減少しているのに対して二枚貝の同位体濃縮は一定の速度で持続していたため直接的な餌源になっていたか不明確であった[108]。また、3週間以上湖沼環境中で藍藻を資化し続けるのかについても報告例がなく、淡水二枚貝をバイオマニピュレーションに用いる上で知見が不十分である。

藍藻類は、水域の表層部でアオコを形成し、タテボシガイは水域の底層部に生息するため、両者は鉛直方向における位置関係が異なっている。タテボシガイが藍藻類を湖沼環境中で摂取するには、底層部に藍藻類が移動する必要がある。藍藻類は湖沼環境中において日周鉛直移動することが知られている。すなわち、午後に沈降し始めて日没後に底層部に移動し、夜明け前に再度表層に向けて浮上する[198]。この鉛直移動の生態学的意義として、動物プランクトンによる捕食からの回避[199]や、底層部での栄養塩補給[200]が考えられている。しかしながら、実際の湖沼において藍藻類の日周鉛直移動を直接観測した事例は数少ない。藍藻類が日周鉛直移動により栄養塩を補給しているとすれば[201]、底層部の栄養塩濃度にも影響を及ぼしている可能性があるが、栄養塩類の消長との関係を解析した事例も少ない。特に浅い水域を対象とした藍藻類の鉛直移動に関する報告は1m以深の地点に限られている。例えば、石川らは、琵琶湖南湖にある漁港の栈橋でモニタリング調査を行い、水深約2.8mでアオコ形成藍藻類が日周鉛直移動することを示している[29]。また、中国の富栄養化湖沼である滇池で水深1.5mで同様の現象が観測されている[201]。浅い水域では波浪によって水塊の鉛直混合が起きやすいが、これらの観測結果は、そのような水域であってもアオコ形成藍藻類が水塊の混合とは異なる鉛直移動を行うことを示している。

湖沼に生息する淡水二枚貝類は植物プランクトンをろ過摂食するが[202]、タテボシガイ (*Nodularia nipponensis*) の近縁種であるイシガイ (*Nodularia douglasiae*) は沿岸部に分布する傾向がある[203]。一方で、アオコは波浪により沿岸部に集積することがあり、この領域で藍藻類が時空間的にどのように分布しているか解明することは、湖沼沿岸域で二枚貝を用いたバイオマニピュレーションを実施する上で重要である。また、第2章の室内飼育実験では、淡水二枚貝の藍藻の摂食能力や資化能力が明らかにされてきたが、実際の湖沼環境での藍藻摂食・資化についてはほとんど検討されていない。

本章では、湖沼環境におけるタテボシガイの藍藻資化の実態を明らかにするため、はじめに、1) 富栄養化湖沼での藍藻類の鉛直移動を調査した。この調査では、アオコが発生している富栄養化湖沼八郎湖の沿岸域を対象として経時的に湖水を採水し、藻類を計数することによってタテボシガイの生息域である湖沼底層部に藍藻類が鉛

直移動しているか評価した。次に、2) 富栄養化湖沼八郎湖沿岸部でタテボシガイの藍藻資化の有無を飼育実験により調査した。1) と同様の調査地点にフェンスによる長方形の区画を設置してタテボシガイを放流し、2年間タテボシガイの筋肉組織中の脂肪酸組成を分析し、湖沼環境中における藍藻資化を評価した。

第2節 実験方法

3-2-1 調査地の選定と概要

調査地として日本国内において水質改善が急務とされている指定湖沼の八郎湖を選定した。秋田県の八郎湖は国内最北の指定湖沼であり、富栄養化湖沼として知られている。過去には、アオコが流入河川の1つである馬場目の上流の上水取水口まで遡上し、近隣地域での取水制限を引き起こした(写真3-1)。直近3年間においてアオコの発生が確認されており(写真3-2)、タテボシガイの生息も報告されているため[167-169]、調査地として適していると考えられた。

秋田県の八郎湖は、1997年に干拓工事が終了する以前までは八郎潟と呼ばれる東西12 km、南北27 km、面積22,024 haの琵琶湖に次いで国内2位の湖面積を誇る汽水湖であった[35-37]。第二次世界大戦後、食糧不足解消のために1957年に国営八郎潟干拓事業に着手し、1977年3月に干拓事業が完了した[35-37]。干拓後、船越水道に設置された防潮水門によって日本海と遮断され、干拓水田地である大潟村の貯水池として淡水化された干拓残存湖が現在の八郎湖である[35-37]。現在は、湖面積4,732 ha、総容量132.6百万 m^3 、湖水滞留時間約1ヶ月となっている[35-37]。

アオコを形成する藍藻類は水中の窒素及びリンを栄養源に増殖するが[204]、干拓終了の翌年から大潟村で大規模な農業が行われ農繁期に大量の水田濁水が流入するようになった。2006年の観測では、灌漑期に 2 mg L^{-1} 以上の懸濁物質を含む干拓地排水が排出され、全窒素の排出負荷量は7月に最大で約 13 t day^{-1} に達した[205]。代掻き田植え時期にも 10 t day^{-1} を超える全窒素の排出負荷量を記録し、八郎湖に流入した負荷量の約7割を占めた[205]。また、1980年代以降、南部排水機場南東側の残存湖と隣接する限られた地域で数～数十 mg L^{-1} の高濃度リンを含む湧出水の発生が観察されている[206]。このような背景から八郎湖の富栄養化は年々深刻化しており、秋田県では、2008年に「八郎湖に係る湖沼水質保全計画(第1期)」[35]、2014年に「八郎湖に係る湖沼水質保全計画(第2期)」[36]、2020年に「八郎湖に係る湖沼水質保全計画(第3期)」[37]を策定し、農地や集水域からの面源負荷の削減や湖内の浄化など総合的な対策事業を推進している。しかしながら、環境省の水・大気環境局による公共用水域水質測定結果において2006年にCOD値ワースト3位(8.8 mg L^{-1})を記録して以降[207]、その後も2012年にワースト4位(8.5 mg L^{-1})、2016年にワースト5位(8.0 mg L^{-1})、令和2019年にワースト4位(8.6 mg L^{-1})となっており[207]、COD値を基準とした水質改善は見られず、近年も初夏(写真3-2a,c)から秋季(写真3-2b)にかけて様々な規模のアオコの発生が続いている(写真3-2)。

アオコ被害

ダム水放流、県に要請

八郎潟町 給水車で飲料水提供
対策本部

大発生したアオコで、水道水の供給に影響が出ている八郎潟町は十日、「県民に伴う上水道給水対策本部」(本部長・土橋多喜夫町長)を設け、水放流を要請した。この日は、ある程度ダムからの水の放流を要請した。この日も雨が降らなかったためアオコは消えず、町はさらに異が懸る水道水の給水時間を区切り、停止し、住民に対して給水車による飲料水の供給を続けていく。

町はアオコ被害による建設部は、馬場目川の八郎潟町水場の取水口上流の、高坂、浦大町、下流にオルフエンス四三倉庫の三地区計三百八十四戸を除去し、三倉庫の三地区計三百八十四戸が断水の影響を受けている水道水は依然カビ臭が消えず、町は断水と給水車を振り回している。十日は午前六時から三時給水し、午後九時から三時給水し、再び九時間の断水措置を取った。

町内二千四百七十八戸と推定した。町内は断水の被害を受けた。町内は断水の被害を受けた。町内は断水の被害を受けた。



日中は町内を給水車が巡回、飲料水を提供している八郎潟町一日市地区

給水車による給水に、今後も岡上市や三種町、秋田川、能代市、井野町市も断水の意向を示している。

写真 3-1 八郎潟町における取水制限に関する報道資料(秋田魁新報 2006年8月11日)

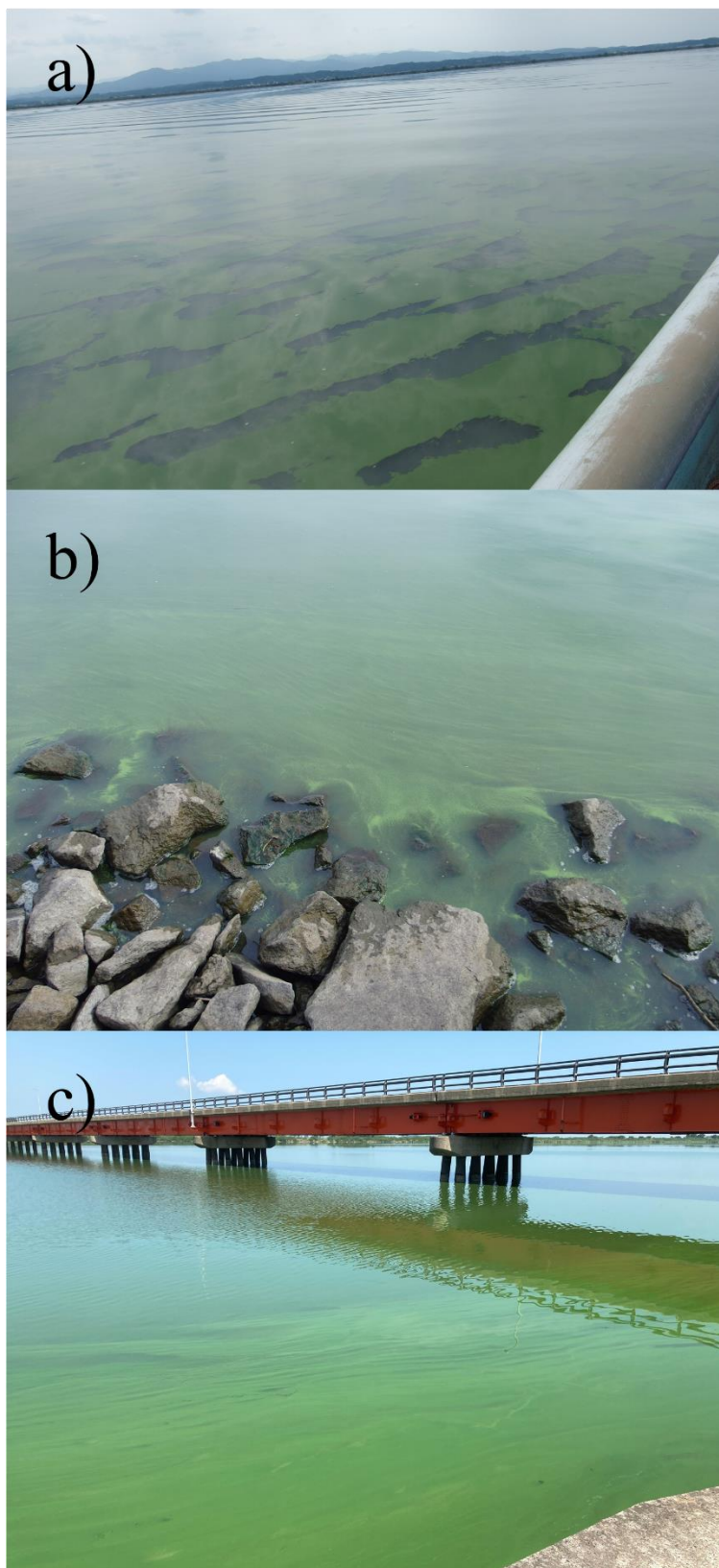


写真 3-2 八郎湖における直近 3 年間のアオコの観察状況 (a. 2019 年 6 月 19 日南岸沿岸域、b. 2020 年 9 月 30 日塩口港、c. 2021 年 8 月 6 日大瀧橋)

3-2-2 八郎湖沿岸部における藻類モニタリング

湖水試料の採取は、八郎湖内の大崎（N39°54'27”，E140°01'06”）において岸から約 10 m 離れた水深約 60 cm の沿岸部で行った（図 3-1）。2016 年 9 月 29 日午前 5 時 40 分から翌日午前 5 時 40 分まで、採水定点で 2 時間おきに多項目水質計（WQC-22, 東亜 DKK）による水質測定（水温、溶存酸素濃度）と採水を行った。なお、これらの作業は水塊の攪乱を避けるためゴムボートを使用して行った。また、水質測定及び採水は表層 0 cm と底質直上 5 cm を含む鉛直方向 6 点で行い、当日の水位変動に合わせて中間 4 地点の採水深度は適宜変更した。採水はピストン式採水器（ミズテッポ, 笠原理化学工業）を用いて行った。また、採水直後に 0.45 μm 孔径のメンブレンフィルター（Millex-HA, Merck Millipore）でろ過した試料を栄養塩測定用とした。また、藻類検鏡用に約 1%濃度になるようにルゴール液を添加し、藻類を固定した。なお、全ての試料は保冷しながら研究室に持ち帰り、分析まで 4°C で保存した。

NO₃-N、NO₂-N、NH₄-N、PO₄-P の栄養塩類は、オートアナライザーQuAAtro 2-HR（BLTEC）により分析した。また、藻類の同定及び計数は光学顕微鏡下で計数板（プランクトン計数板, 松浪硝子工業）を用いて行った。計数は、*Microcystis* 属はコロニー内の細胞についてカウンターを用いて計数し、*Oscillatoria* 属は、長径 500 μm を 1 単位として 1 単位当たり 100 細胞として計数した[207]。さらに、植物プランクトンのサイズは、顕微鏡画像から計測ソフト（LAS v.4.4, Leica, Wetzlar, Germany）を用いて計測した。計数及びサイズの測定は、サンプル採取後 2 週間以内に行った。Hawkins らが *Microcystis* 属の生物体積は、ルゴール液添加後 161 日において有意に変化しないことを示しているため[209]、本研究において分析期間中の植物プランクトンのサイズの変化は無視できると仮定した。

3-2-3 八郎湖沿岸部におけるタテボシガイの飼育実験

八郎湖において 51~73 mm のタテボシガイを採捕し、試験に使用する前に脱塩素水中で糞の排泄が見られなくなるまで放置し、その後実験現場である八郎湖の大崎へ移送した。

タテボシガイの藍藻資化のモニタリングは、毎年アオコの発生が確認されている秋田県八郎湖の大崎地区で行われた（図 3-1）。タテボシガイは岸から約 10 m 離れた粗朶消波堤内の水深約 60 cm の地点の 0.36 m² の区画内に投入した（写真 3-3）。2017 年は 7 月 24 日にタテボシガイを 50 個体投入し、その後 11 月 28 日まで調査した。2018 年は、7 月 22 日に 34 個体を投入し、9 月 27 日まで調査を行った。

上記の期間中、試料採取及び調査は午前 9~10 時の間に行われた。2 週間おきにタテボシガイを 3~5 個体ずつ採集した。採集したタテボシガイは実験室に持ち帰り、殻から軟体部を分離して-80°Cで保存した。

また、水中懸濁物質の藻類組成、Chl.*a* 濃度、及び脂肪酸組成を分析するために、湖水の採水を行った。湖水の採水では採水地点の底質の攪乱を避けるためゴムボートを使用し、ゴムボート上からピストン式採水器を用いて底層水を採水した。水試料はク

ーラーボックスに入れて実験室に持ち帰り、一部を 2 枚のガラス繊維ろ紙 (GF/F, Whatman) でろ過した。ろ過後のろ紙は -80°C で保存した。また、湖水中の藻類組成を調べるため、湖水試料 0.3 mL をマイクロピペットを用いてプランクトン計数板にとり、光学顕微鏡を用いて計数を行った。

Chl.*a* 濃度の分析及び脂肪酸の抽出と分析は、第 2 章の 2-2-3 と同一の方法で行った。

3-2-4 データ解析

24 時間の藻類モニタリングでは、調査時間、水深ごとにおける水温、溶存酸素、各藍藻種の細胞数、並びに *Microcystis* 属コロニー直径の中央値、*Oscillatoria* 属細胞の長径の中央値を計測し、Graph-R (株式会社エスネクスト) を用いてコンター図を作成した。調査開始時、現場の水深は 60 cm であったが、9 月 29 日午後 3 時 40 分に水深 55 cm に、午後 5 時 40 分に水深 50 cm に低下した。最深部のデータは底質直上 5 cm から採取していることから、午後 3 時 40 分の 50 cm 以深、午後 5 時 40 分以降の 45 cm 以深のコンター図上の領域は実測値外であり、過去の時間帯や鉛直方向のデータをもとに外挿によって描かれている。そのため、信頼性が低い領域となっていることから、本研究では該当する領域を点線で囲い、考察の対象からは除外した。

また、各藍藻類と栄養塩類の関係を調べるために計測値について多変量解析を行った。始めに、DCA (除歪対応分析; Detrended Correspondence Analysis) により、変数間の関係が直線型か山型かを判定した。これにより、本研究で扱うデータでは変数間の関係が直線型であったため、RDA (冗長性分析; Redundancy Analysis) によって変数間の関係を二次元化した。多変量解析は、R package ver. 3.6.3 を用いて行った[191]。

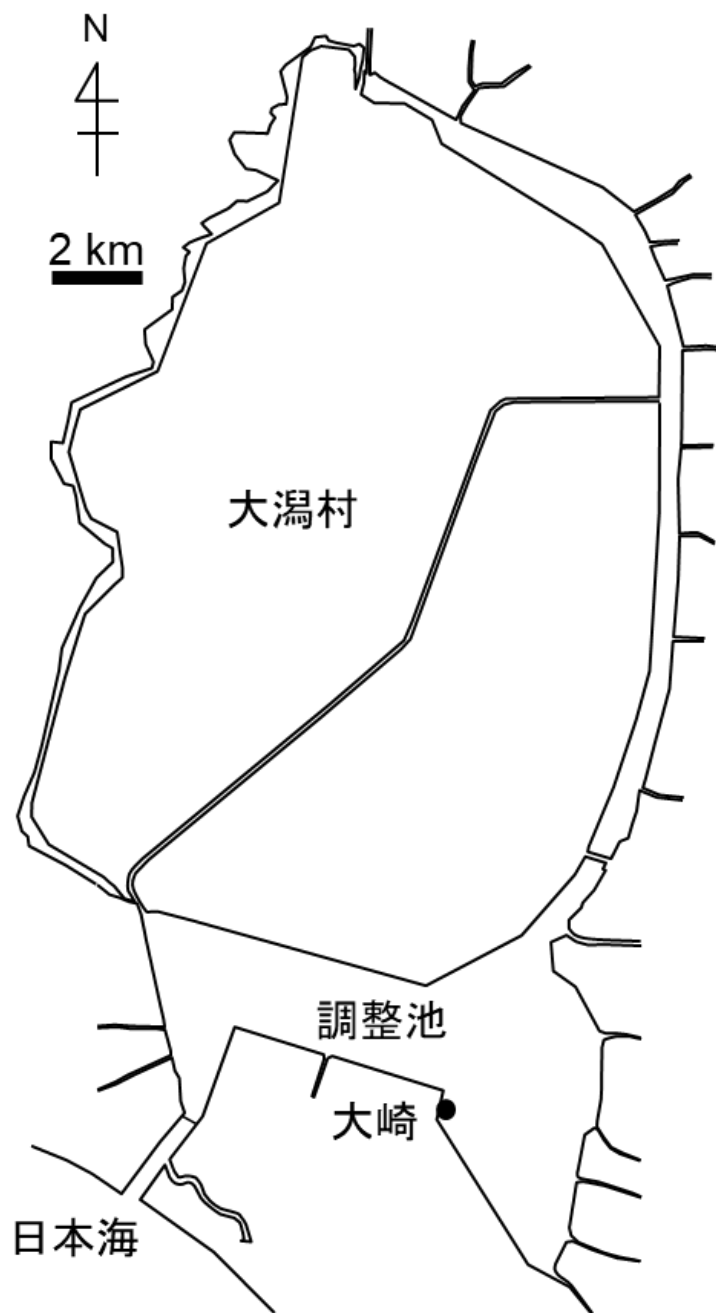


図 3-1 藻類モニタリング及びタテボシガイ放流地点



写真 3-3 八郎湖沿岸域でのタテボシガイ飼育実験

第 3 節 結果及び考察

3-3-1 八郎湖沿岸部における藻類モニタリング

調査地点において水温は、日の出過ぎの午前 5 時 40 分から徐々に上昇し、南中過ぎにピークを迎え、その後徐々に減少する傾向が見られた (図 3-2a)。ピーク時の水温 (21.8°C) は午後 1 時 40 分の表層 (0, 10 cm) で観測され、最低水温 (19.3°C) は調査開始から 24 時間後の底層 (40, 45 cm) で観測された (図 3-2a)。溶存酸素濃度はモニタリング開始時に最も低い値を観測し (< 6.5 mg L⁻¹)、徐々に上昇していき午後 1 時 40 分及び午後 3 時 40 分の全層で最も高い値を観測した (> 10 mg L⁻¹) (図 3-2b)。その後、溶存酸素濃度は減少し、翌朝の午前 5 時 40 分の全層で再び低い値を観測した (< 7.1 mg L⁻¹) (図 3-2b)。日中に水温や溶存酸素のピークが観測されたことから、水温は日射による昇温によって、溶存酸素は植物プランクトンの光合成によって増加したと考えられた。鉛直分布に注目すると、水温、溶存酸素とも、同一時刻においては鉛直方向でほぼ均一であったことから (図 3-2)、調査中、水塊は鉛直方向によく混合された状態であることが示された。

本調査で観察された *Microcystis* 属及び *Anabaena* 属の 1 細胞の大きさは 7-9 µm、*Oscillatoria* 属は 1 細胞当たり 5 µm であった。各藍藻の細胞のサイズに大きな差異が見られなかったことから本研究では細胞数を基準として優占割合を算出した。全層において、藻類の細胞数の少なくとも 92%を藍藻類が占め、残りは珪藻が占めていた。藍藻類では、*Microcystis* 属、*Anabaena* 属、*Oscillatoria* 属が検出され、珪藻類では *Aulacoseira* 属、*Cyclotella* 属、*Melosira* 属が検出された。*Anabaena* 属は細胞数が最も多いときでも 18%であり、ほとんどの時刻、水深で *Oscillatoria* 属及び *Microcystis* 属が優占していた (図 3-3)。しかし、*Microcystis* 属及び *Oscillatoria* 属の細胞数は経時的に大きく変動していた (図 3-4)。

細胞数の時間経過に伴う急激な変動は水平移流の影響を受けている可能性が高い。沿岸部のような浅い場所では、水塊は鉛直方向によく混合しているため水平移流が生じる際にはある特定的水深のみで水平移流が発生するのではなく、全層にわたって水塊が移流していると仮定される。本研究においても水温と溶存酸素濃度の鉛直プロファイルから全層にわたる循環が想定される。そのため、水平移流によって各時間帯における鉛直方向の積算藍藻細胞数は大きく変動するが、もし規則的な日周鉛直移動を藍藻が行っていた場合、各水深における藍藻の相対的な細胞数に明確な日周パターンが検出されるはずである。

そこで、本研究では各時間帯の鉛直方向における全 *Microcystis* 属細胞数に占める各水深での *Microcystis* 属細胞数の割合及び各時間帯の鉛直方向における全 *Oscillatoria* 属細胞数に占める各水深での *Oscillatoria* 属細胞数の割合を算出し、*Microcystis* 属及び *Oscillatoria* 属の鉛直方向の分布の偏りを評価した (図 3-5)。*Microcystis* 属は午前中では多くの細胞が表層に存在していたが、日没前から夜間にかけては多くが中層から底層にかけて分布していた。この分布のパターンは Takamura らが霞ヶ浦の水深 2 m 付

近で観測した *Microcystis* 属の分布とよく一致していた[210]。本研究の観測結果から、*Microcystis* 属は水深 60 cm 程度で水塊がよく混合している状況でも鉛直移動する能力を有していることが示された。これまで報告されている藍藻類の日周鉛直移動が観測された水深はほとんどが 1.5 m までであり[201]、それよりさらに浅い水深でも *Microcystis* 属が日周鉛直移動することが判明した。また、*Microcystis* 属のコロニーサイズの分布を見ると、比較的サイズの大きなコロニーが午前 9 時 40 分から午後 3 時 40 分にかけて下層へ分布域が移行していた (図 3-6)。さらに、日没後の午後 7 時 40 分以降しばらくはコロニーサイズに大きな変動は見られなかったが、翌朝午前 3 時 40 分に再び表層付近にピークが出現した (図 3-6)。この観測結果は、大きいサイズのコロニーが鉛直方向に高い移動性を持つことを示した既往研究とも一致する[200, 211, 212]。ところで、後述の通り、栄養塩濃度は鉛直方向にほぼ一様であった (図 3-7)。*Microcystis* 属の日周鉛直移動は底層の栄養塩を獲得するためとの見解があるが[200]、本調査では、*Microcystis* 属の日周鉛直移動は栄養塩の獲得とは関連していないと推察された。

一方で、*Oscillatoria* 属は室内実験では鉛直移動能が確認されているものの[213]、本研究では鉛直方向に *Oscillatoria* 属はランダムに分布しており、鉛直移動の傾向は見られなかった (図 3-4b, 3-5b, 3-6b)。Takamura らは *Anabaena* 属や *Aphanizomenon* 属のようなフィラメント状の藍藻類と比較して *Microcystis* 属が高い鉛直移動性を有することを報告している[210]。さらに石川らは、*M. aeruginosa* が高い鉛直移動能力を有する一方で、フィラメント状の *Anabaena smithii* は波浪の影響を受けて均一に分布することを報告している[29]。本調査で観測された *Oscillatoria* 属はフィラメント状の藍藻であることから、波浪の影響が大きい沿岸部では、混合攪拌された状態で一様に分布していたと推察された。

水温や溶存酸素濃度 (図 3-2) と同様に栄養塩類でも経時的な濃度変動が観測されたが、どの時間帯でも鉛直方向ではほぼ均一に分布していた (図 3-7)。栄養塩類の分布からも水柱が鉛直方向によく混合されている様子が捉えられた。さらに、全ての栄養塩類において、初日の日の出直後の午前 5 時 40 分に高い値で検出されたがその後減少し、各窒素化合物では翌朝に再び高い濃度で検出された。日中の栄養塩濃度が低かったのは植物プランクトンによって活発に消費されていたためと推察された。植物プランクトンの栄養塩の利用には日周期性があることが知られている。淡水性の藍藻に関する報告はないが、珪藻[214]、渦鞭毛藻[215]及びハプト藻[214, 216]において夜間の窒素及びリンの取り込み速度の低下が報告されている。

藍藻類の優占種と各種栄養塩類の関係を明らかにするために RDA を行った (図 3-8)。その結果、*Microcystis* 属細胞数と $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度、*Anabaena* 属細胞数と $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度、*Oscillatoria* 属細胞数と $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度、及び *Oscillatoria* 属細胞数と $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度に有意な負の関係が見出された (図 3-9)。しかしこれらの内、*Oscillatoria* 属細胞数と $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度以外の関係においては、当該細胞や栄養塩が検出されなかった時のデータプロットが多く (図 3-9a, b, d)、統計的な有意性は認められたものの実態に即しているか

は不明であった。そのためここでは栄養塩が残存し、且つ常に細胞が観測されていた *Oscillatoria* 属細胞数と $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度の関係に注目した (図 3-9c)。先述の通り、*Oscillatoria* 属細胞数と $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度との間には有意な負の相関関係が認められたのは、*Oscillatoria* 属が $\text{NO}_3\text{-N}$ を消費していたためと推察される。一般的に植物プランクトンは $\text{NO}_3\text{-N}$ と $\text{NH}_4\text{-N}$ の両方が利用可能な場合は、 $\text{NO}_3\text{-N}$ よりも $\text{NH}_4\text{-N}$ を優先的に利用することが知られている[204]。しかし、Shingh と Dhar は、BG-11 培地中で *Oscillatoria princeps* による栄養塩の取り込みを比較検討し、 $\text{NH}_4\text{-N}$ よりも $\text{NO}_3\text{-N}$ に対して高い吸収能をもつことを報告している[217]。本調査では *Oscillatoria* 属を種まで同定することはできなかったが、同属の *O. princeps* が $\text{NO}_3\text{-N}$ を優先的に利用することから、*Oscillatoria* 属細胞数と $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度に負の相関が見られたのは、*Oscillatoria* 属が高い $\text{NO}_3\text{-N}$ 吸収能力を有するためと考えられる。上述した通り、鉛直移動性の低い *Oscillatoria* 属は波浪によって攪乱された水塊とともに移動している可能性が高い。水塊とともに移動しながら $\text{NO}_3\text{-N}$ を利用したため、*Oscillatoria* 属細胞が多く検出された湖水試料で $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度が低くなったと推測された。他方、*Microcystis* 属のような鉛直移動性の高い種は、水塊の移動と異なる鉛直移動ができるため、同一の湖水試料から検出・測定した *Microcystis* 属細胞数と栄養塩濃度の比較からは、*Microcystis* 属が栄養塩に与える影響を捉えることができなかったと考えられる。

本研究の調査結果より、極端に浅い水域でも *Microcystis* 属は鉛直移動能を示すこと、一方で *Oscillatoria* 属は移動性が低く水塊とともに移動していることが示された。したがって、湖沼沿岸部では、*Microcystis* 属は鉛直移動により、*Oscillatoria* 属は水塊混合によりタテボシガイの生息域である底層部に移動していることが明らかとなった。

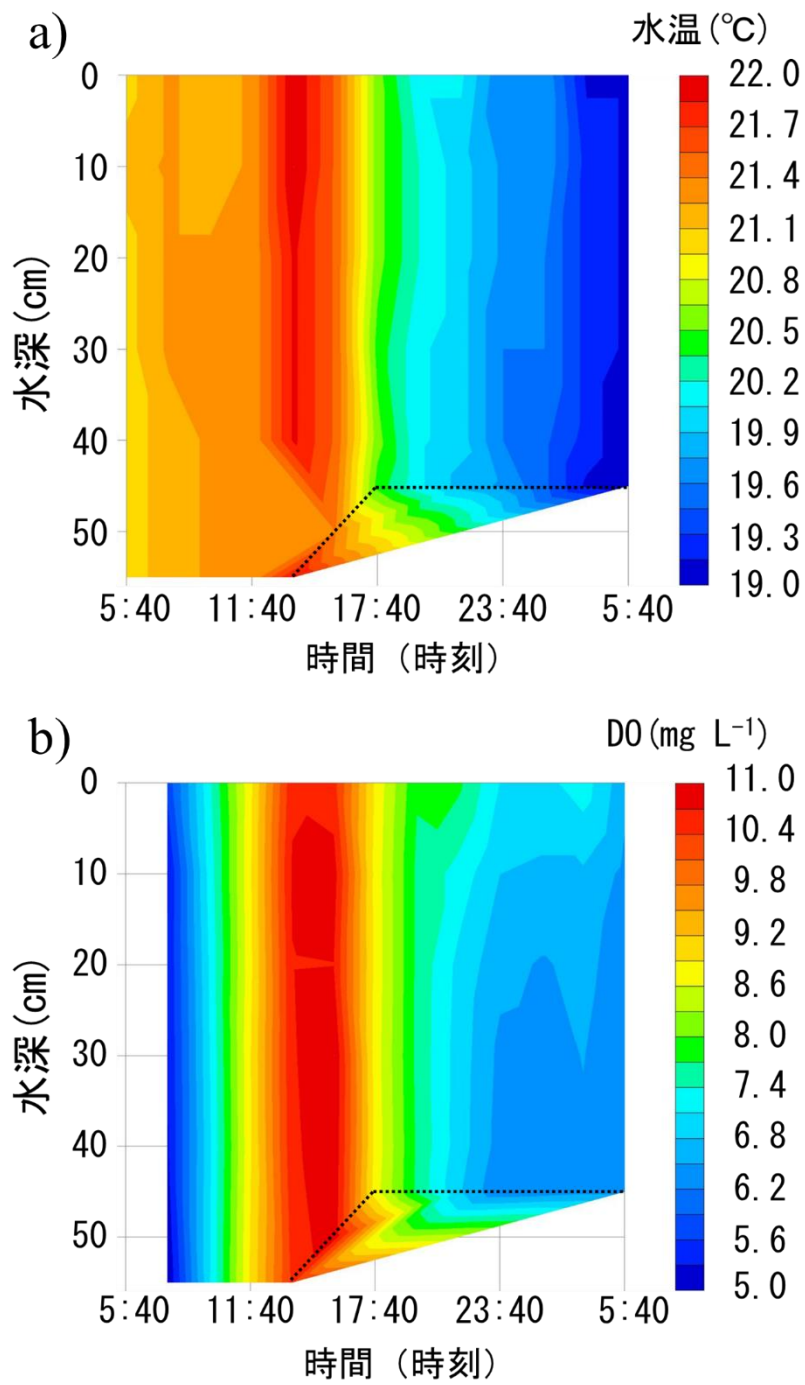


図 3-2 水温(a)と溶存酸素(b)の日周変化

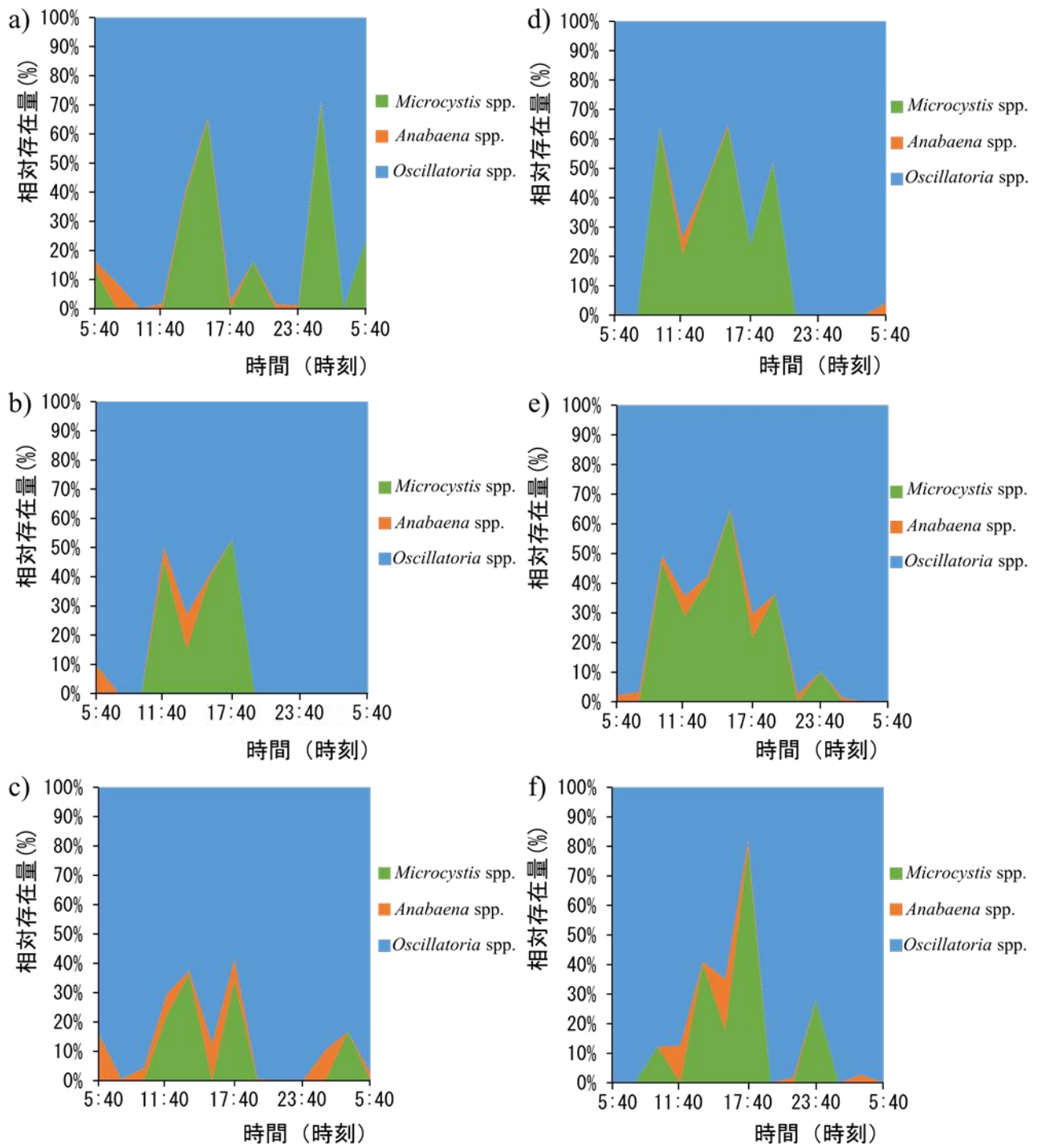


図 3-3 藍藻類の各水深 0(a), 10(b), 20(c), 30(d), 40(e), 45-55(f) cm の日周変化

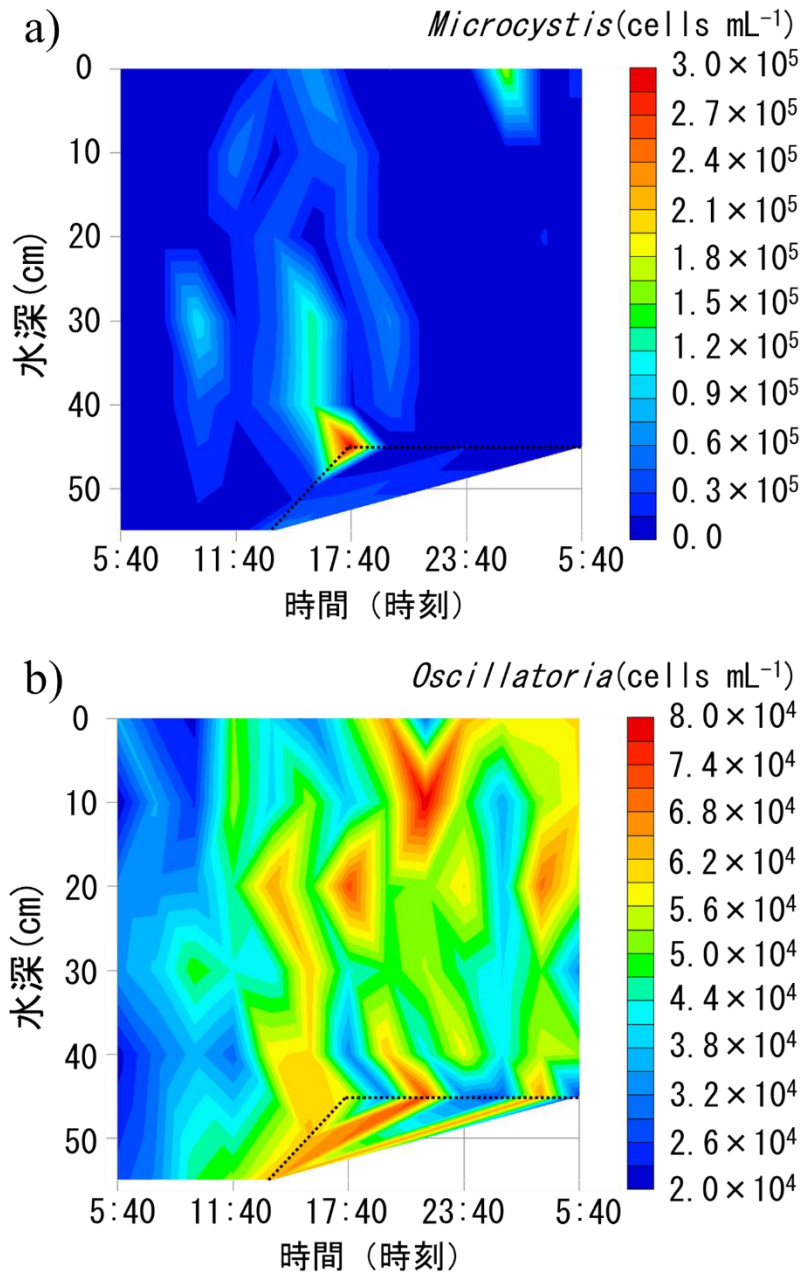


図 3-4 *Microcystis* 属(a)及び *Oscillatoria* 属(b)の藍藻細胞数の日周変化

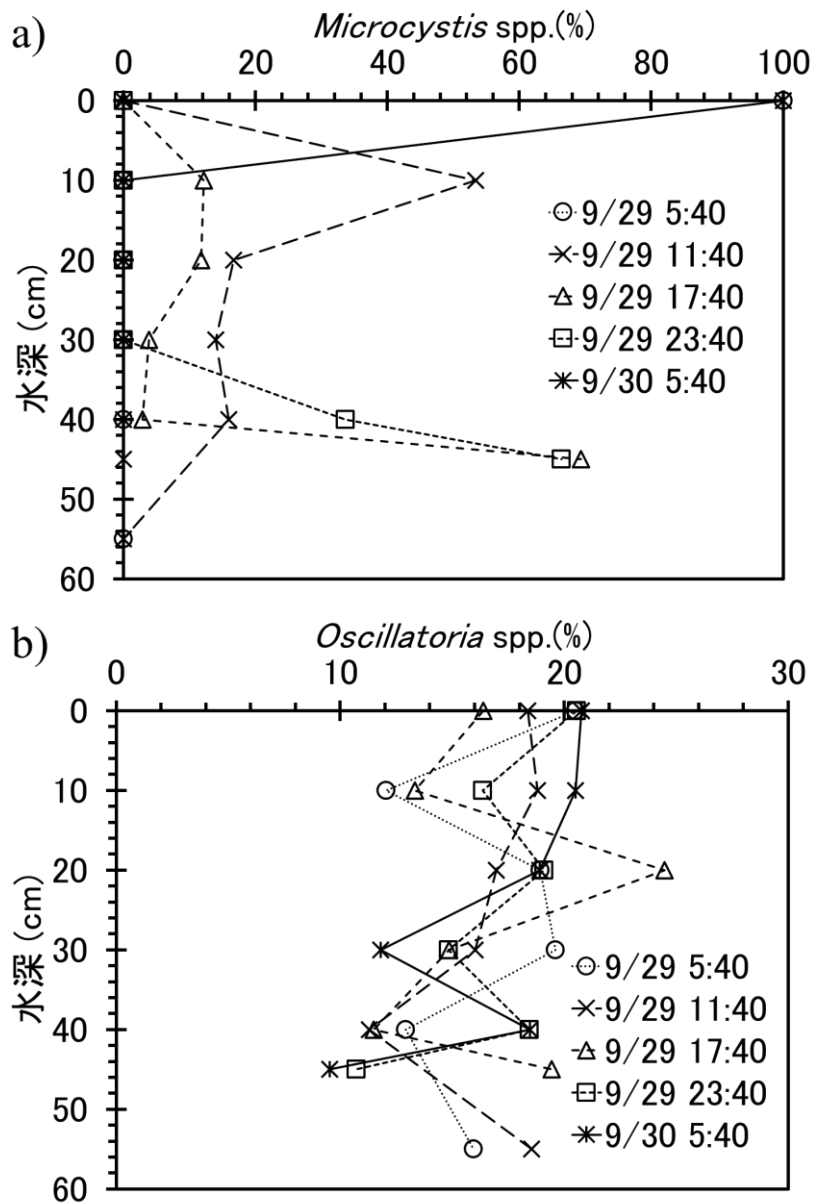


図 3-5 *Microcystis* 属(a)及び *Oscillatoria* 属(b)のみを鉛直方向に 100%としたときの相対存在量

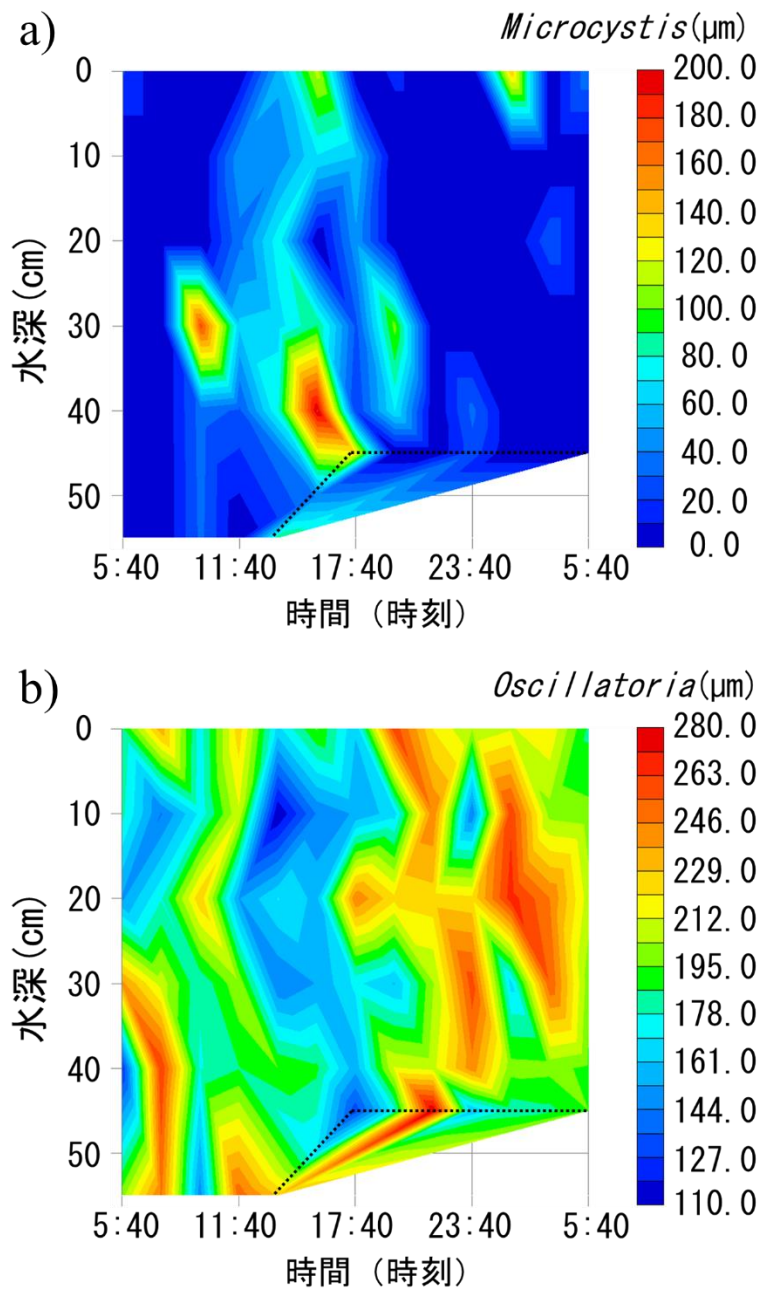


図 3-6 *Microcystis* 属コロニーの中央粒径(a)及び *Oscillatoria* 属フィラメントの中央トリコーム径(b)の日周変化

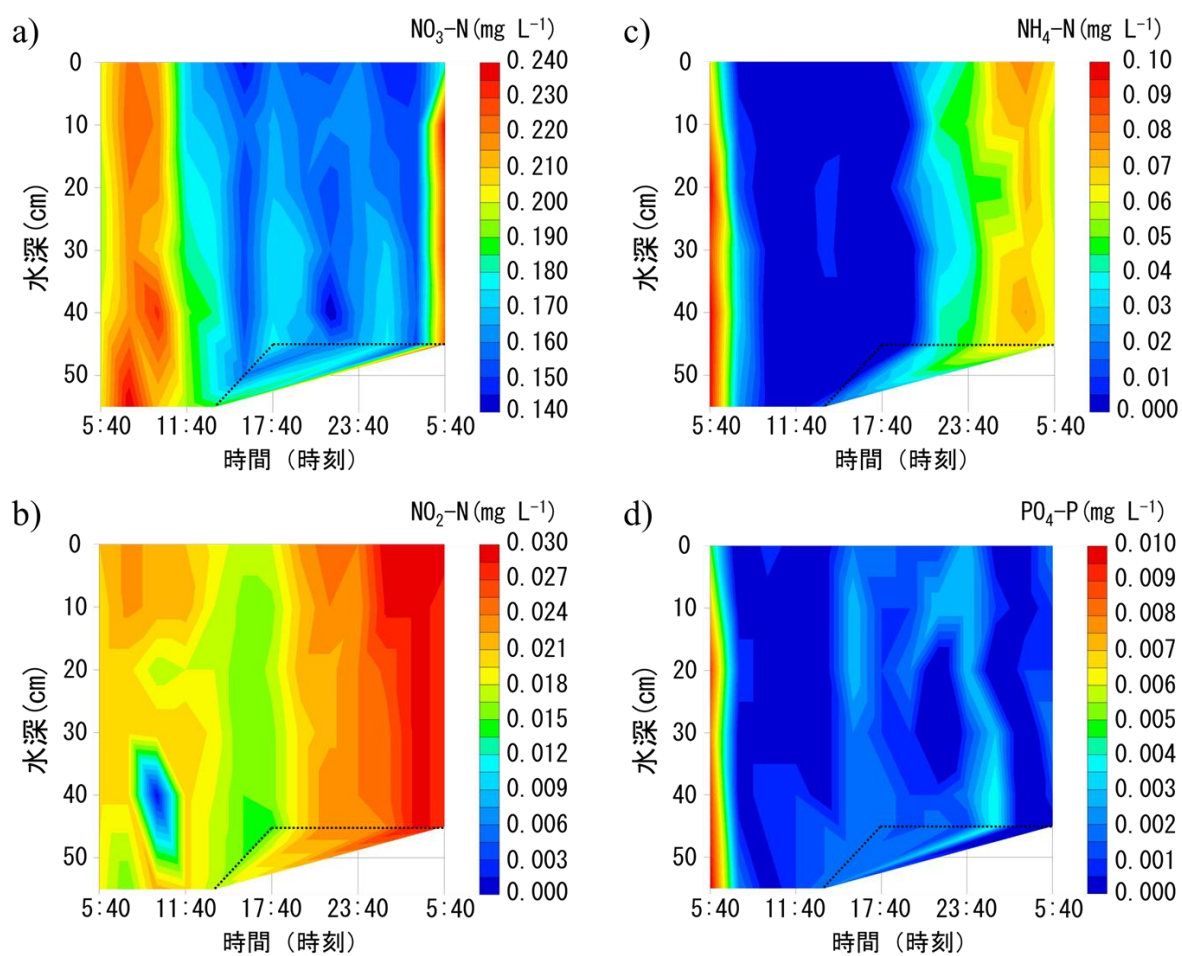


図 3-7 $\text{NO}_3\text{-N}$ (a)、 $\text{NO}_2\text{-N}$ (b)、 $\text{NH}_4\text{-N}$ (c)、及び $\text{PO}_4\text{-P}$ (d) の日周変化

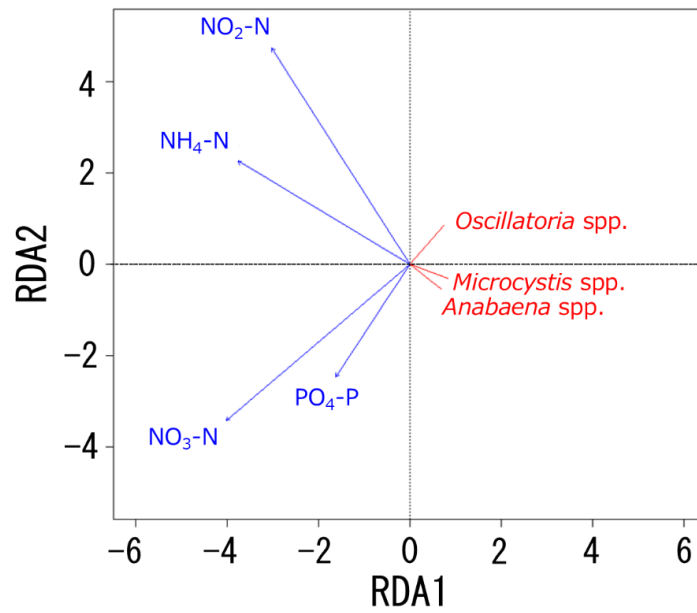


図 3-8 栄養塩類及び優占藍藻種における冗長性分析(RDA)の結果
 青い線は説明変数として用いた湖水中の栄養塩類、赤い線は従属変数として用いた湖水中の藻類細胞密度

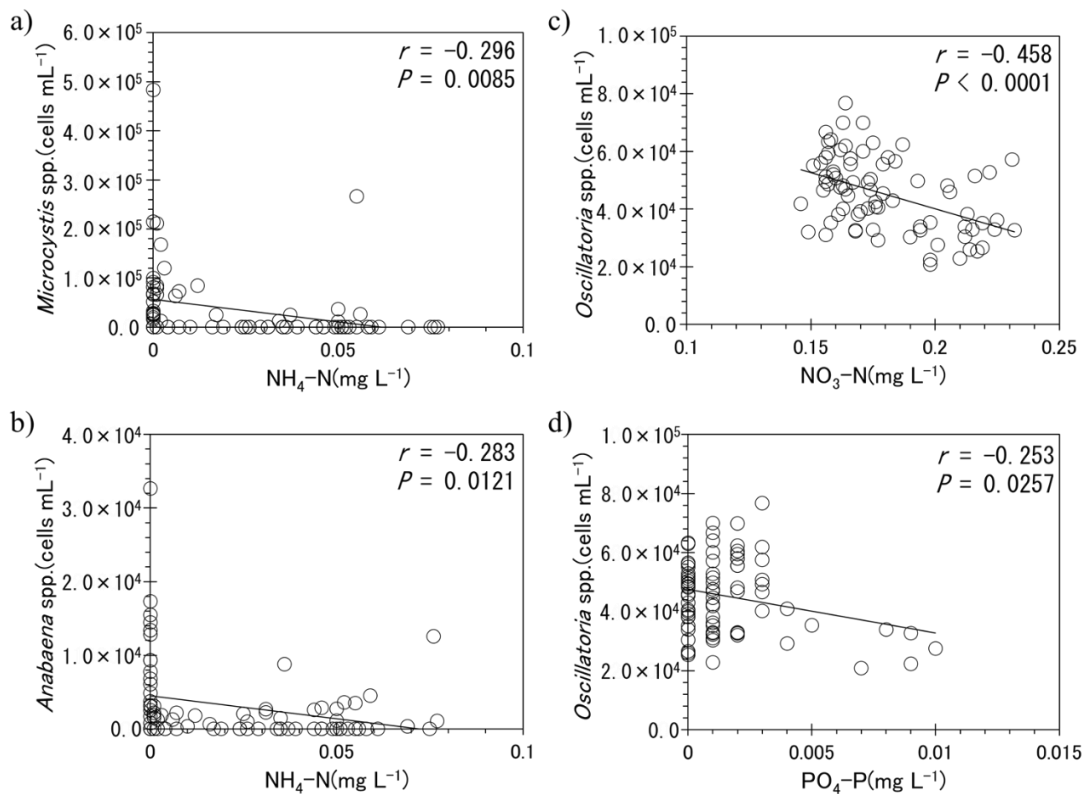


図 3-9 NH_4-N 濃度及び *Microcystis* 属細胞数(a)、*Anabaena* 属細胞数(b)、 NO_3-N 濃度及び *Oscillatoria* 属細胞数(c)、 PO_4-P 濃度及び *Oscillatoria* 属細胞数(d) の関係

3-3-2 八郎湖沿岸部におけるタテボシガイの飼育実験

八郎湖沿岸底層水の2年間のモニタリングで観察された優占的な藻類は、藍藻と珪藻であった(表 3-1)。緑藻の相対存在量は研究期間を通して低かった(表 3-1)。主に *Microcystis* 属と *Anabaena* 属から構成されるアオコは、2017年及び2018年の8~9月に発生した(表 3-1)。他の藍藻には、*Aphanizomenon* spp., *Chroococcus* spp., *Coelosphaerium* spp., *Gomphosphaeria* spp., *Lyngbya* spp., *Merismopedia* spp., *Oscillatoria* spp., *Phormidium* spp.も観察されたが、優占種に比べると存在比がかなり少なかった(表 3-1)。2年間のモニタリングにおいて藍藻細胞密度の最大値は、2017年の8月に観測された(図 3-10)。2017年10月31日以降、優占種は徐々に藍藻から珪藻に移行した(表 3-1)。

優占種の移行に伴い湖水中の EPA の濃度は増加し、LA と ALA の濃度は $10 \mu\text{g L}^{-1}$ を下回った(図 3-11)。2018年には、9月1日を除いて $63\sim 76 \mu\text{g L}^{-1}$ の濃度の LA 及び ALA が観察され(図 3-11)、同時に藍藻細胞密度と Chl.a 濃度の増加も観測され(図 3-10, 3-12a)、アオコの再発生が観察された。2年間のモニタリングにおいて底層水中の懸濁物から定量された LA 及び ALA 濃度は藍藻細胞密度と相関し($r=0.828$, $P=0.0005$; 図 3-13)、また、調査期間中緑藻細胞がほとんど検出されなかったことからこれらの脂肪酸が藍藻に由来すると見なした。

タテボシガイ筋組織中の LA と ALA の含有率は、2017年と2018年の両方でアオコが発生した8~9月にかけて増加する傾向があった(図 3-12a, b)。さらに、湖水中の LA と ALA が $10 \mu\text{g L}^{-1}$ を下回った2017年10月31日以降、タテボシガイの LA と ALA の含有率は減少傾向を示した(図 3-12a, b)。また、 $63\sim 76 \mu\text{g L}^{-1}$ と高い濃度の LA 及び ALA が検出された2018年には、アオコ発生時期の後半にタテボシガイの LA 及び ALA 含有率が増加していた(図 3-12b)。

第2章において EPA に対する LA 及び ALA の比率を使用して二枚貝の藍藻資化を評価できることを明らかにした。この評価方法を八郎湖沿岸域でのタテボシガイの飼育実験に適用すると、その比率は2017年8月7日に最も高い細胞密度に達したアオコが観察された後に増加し、2017年10月3日以降徐々に減少していた。これらの観察結果は、アオコの減衰に伴ってタテボシガイの主要な食糧源が藍藻類から珪藻類に変化したことを示していると推察された。2018年の8~9月にアオコが発生した時期には、タテボシガイ中の本脂肪酸比は一貫して増加し、2017年は0.70、2018年は0.77まで達した。第2章における80日間の飼育実験では、*M. aeruginosa* のみを給餌したタテボシガイの最終的な本脂肪酸比は0.75~0.82であり、2ヵ月間アオコが発生していた湖沼環境中で飼育したタテボシガイの比率と一致していた。この結果から、湖沼環境中においてタテボシガイが藍藻を資化していることが示された。

アオコが発生した湖沼において二枚貝中の EPA に対する LA 及び ALA の比率が増加する現象は、他の研究でも観測されている。Larson らは、イシガイ科二枚貝 *Lampsilis siliquoidea* の本脂肪酸比がアオコ発生後に0.68から0.88に増加したことを報告した[110]。一方で、Fujibayashi らは、アオコが発生していない初冬に人工池や河川から採

集されたイシガイ科二枚貝でこの比率が高く、0.80~1.45 の範囲であったことを報告している[184]。Fujibayashi らの研究では水中の藻類組成が測定されていないが[184]、この高い脂肪酸比は、藍藻と同様に LA 及び ALA を含む緑藻を摂取していたことに起因する可能性がある[218]。

二枚貝はろ過摂食の他に、ペダル摂食と呼ばれる底質を軟体部で巻き上げて底質有機物や付着藻類を摂食することができる[81]。したがって、アオコ発生期間であっても、緑藻や珪藻などの他の植物プランクトンやデトリタスを摂取することも可能である。しかし、このような可能性がある中で、藍藻のみを給餌した室内実験の脂肪酸比と同等であったことは、他の餌源を選択的に利用可能な場合でもアオコ発生時期には藍藻を資化していたことを示す。

本章の調査結果から、湖沼環境中でタテボシガイが藍藻を資化していたことが明らかになった。ところで、直近 3 年間のアオコが発生していた 7~9 月の八郎湖湖心部表層の SS 中の炭素濃度は、 11.4 mg L^{-1} である。本章の現場調査において表層以深の植物プランクトンの密度は約 20% であり、これを考慮して SS の全てをアオコと仮定すると、八郎湖の総容積当たりの炭素量は 317 t と試算される。第 2 章において 25°C 高濃度条件の藍藻に対する平均資化速度は $2.1 \text{ mg C g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ であり、アオコの倍加時間は本調査の結果から約 5 日であることから、5 日以内に八郎湖の総容積当たりの炭素量の半量の藍藻を資化するのに必要なタテボシガイの密度は 24 個体 m^{-2} と試算される。タテボシガイは秋田県八郎湖において最大密度 0.56 個体 m^{-2} の密度で生息することが報告されている[167]。タテボシガイの近縁種であるイシガイでは、京都嵐山の用水路に 4 個体 m^{-2} [219]、淀川ワンド域において $6\sim 10 \text{ 個体 m}^{-2}$ [220]、愛媛県国近川水系において 0.05 個体 m^{-2} [221]の密度での生息が報告されている。これらの密度は、アオコ防除のために試算した 24 個体 m^{-2} よりもかなり低い値である。しかし、愛媛県国近川水系では 0.05 個体 m^{-2} の密度を観測する 25 年前に同様の調査を行っており、その時はイシガイの密度が 92 個体 m^{-2} であったことが報告されている[221]。国近川水系では他の二枚貝も同様に減少傾向にあり、1988 年~1991 年から 25 年間でマツカサガイが 58 個体 m^{-2} から 2.7 個体 m^{-2} に減少し、ドブガイが最大 5 個体 m^{-2} から 0.02 個体 m^{-2} に減少している[221]。また、同じイシガイ目のカワシンジュガイ (*Margaritifera laevis*) は、北海道朱太川水系において最大 300 個体 m^{-2} の密度で生息していたことが報告されている[222]。したがって、淡水二枚貝は、生息地が好適である場合には、1 平米当たり数百個体の密度で生息可能であることが推察される。湖沼環境を淡水二枚貝の好適な生息地に改善して密度を増強することができれば、湖沼の水質改善に資することが期待された。

以上より、第 2 章の成果に基づき EPA に対する LA 及び ALA の比率を使用して、湖沼環境中においてタテボシガイが藍藻を資化していることを示した。また、本脂肪酸比を使用して初めて 2 ヶ月間アオコが発生している湖沼でタテボシガイが藍藻を資化し続けたことを明らかにした。本脂肪酸比を用いることで、淡水二枚貝をバイオマニピュレーションに使用する際に、アオコが発生している湖沼において淡水二枚貝

が藍藻を資化しているかを評価可能なことが示された。したがって、二枚貝を用いたバイオマニピュレーション研究への本手法の波及が期待された。

表 3-1 八郎湖沿岸底層水における 2017 年及び 2018 年のモニタリングで観察された藻類の相対存在量(%)

藻類種	2017									2018					
	7/24	8/7	8/21	9/4	10/3	10/17	10/31	11/14	11/28	7/22	8/5	8/18	9/1	9/16	9/27
<i>Microcystis</i> spp.	20.1	38.4	66.8	66.6	55.8	59.4	0.0	-	0.0	63.3	-	43.4	57.8	50.7	50.6
<i>Anabaena</i> spp.	39.1	40.7	31.1	7.9	10.0	6.6	0.0	-	0.0	0.0	-	51.8	24.4	29.1	18.6
Other cyanobacteria	7.1	20.6	1.8	22.8	28.1	21.0	24.6	-	31.0	6.1	-	4.4	0.0	16.9	27.0
Diatom	27.4	0.4	0.1	2.2	5.5	13.1	74.2	-	67.0	17.9	-	0.4	15.7	2.3	1.4
Green algae	6.3	0.0	0.2	0.3	0.5	0.0	1.2	-	2.0	12.7	-	0.0	2.1	1.0	2.4

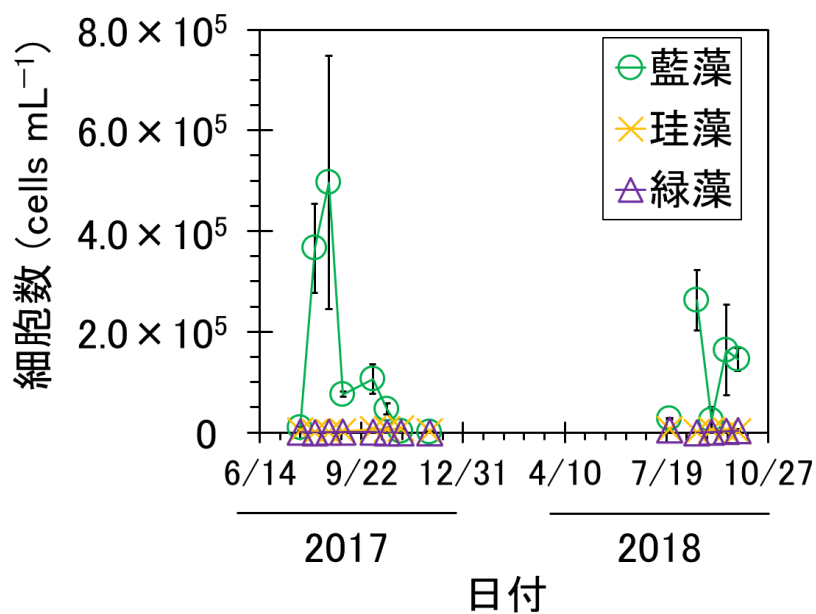


図 3-10 八郎湖沿岸底層水における藻類細胞数の経時変化

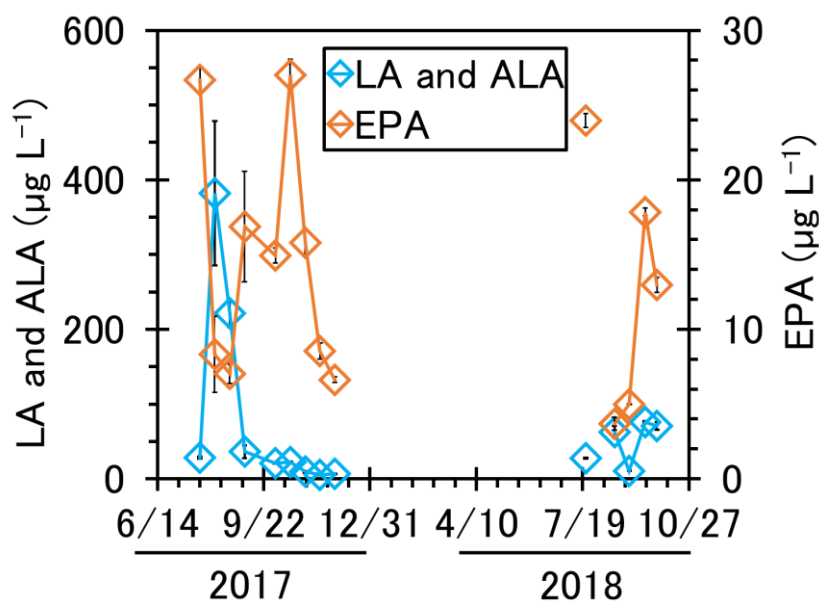


図 3-11 八郎湖沿岸底層水におけるリノール酸(LA)と α -リノレン酸(ALA)の合計値及びエイコサペンタエン酸(EPA)の濃度の経時変化

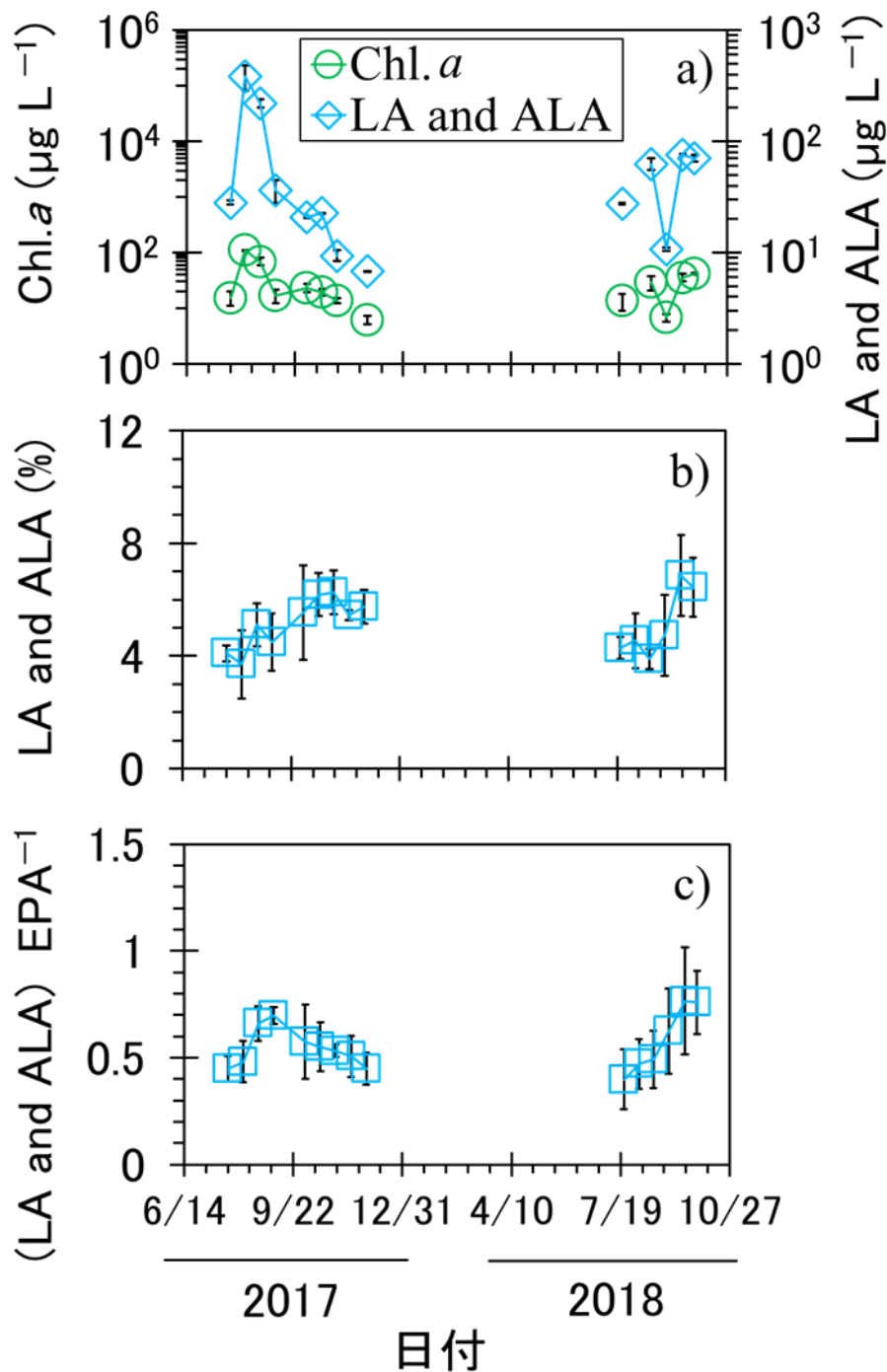


図 3-12 八郎湖沿岸底層水中の Chl. *a* 濃度とリノール酸(LA)及び α -リノレン酸(ALA)の濃度(a)、タテボシガイ中のリノール酸(LA)及び α -リノレン酸(ALA)の総脂肪酸に対する含有率(b)、及びタテボシガイ中のエイコサペンタエン酸(EPA)に対するリノール酸(LA)及び α -リノレン酸(ALA)の存在比(c)の経時変化

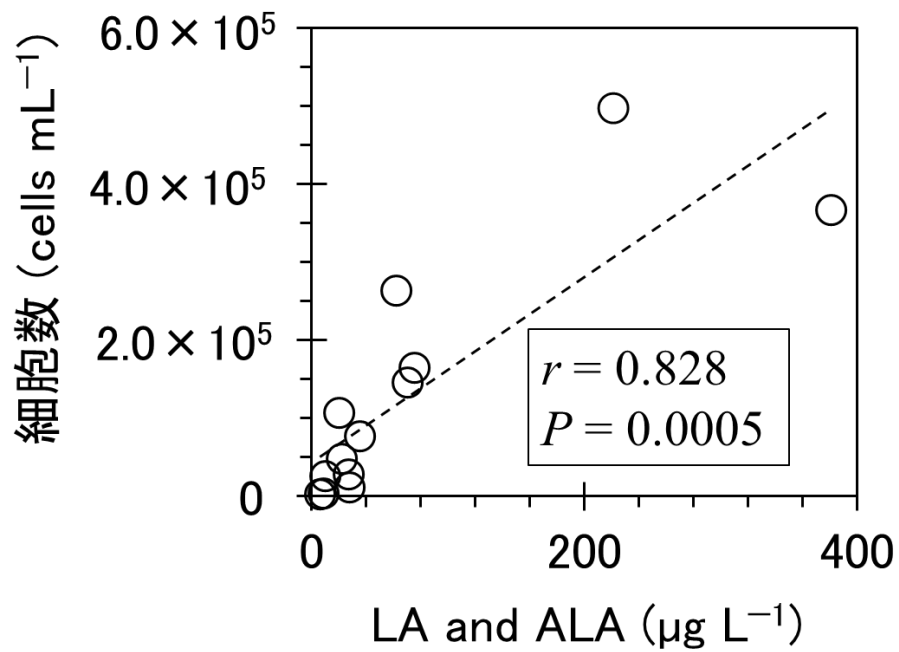


図 3-13 八郎湖沿岸底層水における 2017 年及び 2018 年の藍藻細胞数とリノール酸(LA) 及び α -リノレン酸(ALA)濃度の合計値の関係

第4節 要約

本章では、湖沼環境におけるタテボシガイの藍藻資化の実態を明らかにするため、はじめに、1) 富栄養化湖沼での藍藻類の鉛直移動を調査した。続いて、2) 富栄養化湖沼沿岸部でタテボシガイの藍藻資化の有無を飼育実験により調査した。

1) 富栄養化湖沼での藍藻類の鉛直移動の調査では、これまで湖沼沿岸部の水深1 m以浅の浅い水域における藍藻類の鉛直移動の実態は不明であったが、フィラメント状の藍藻 *Oscillatoria* 属は混合する水塊とともに移動し、コロニー状の藍藻 *Microcystis* 属は日周鉛直移動によってタテボシガイが生息する底層部へ移動することが明らかになった。

2) 富栄養化湖沼沿岸部でのタテボシガイの飼育実験では、第2章の成果に基づき二枚貝中の EPA に対する LA 及び ALA の比率を使用して、湖沼環境中においてタテボシガイが藍藻を資化していることを示した。また、本脂肪酸比を使用して初めて2ヵ月間アオコが発生している湖沼でタテボシガイが藍藻を資化し続けたことを明らかにした。さらに、本脂肪酸比を用いることで、淡水二枚貝をバイオマニピュレーションに使用する際に、アオコが発生している湖沼において淡水二枚貝が藍藻を資化しているかを評価可能なことが示され、二枚貝を用いたバイオマニピュレーション研究への本手法の波及が期待された。

第4章 タテボシガイの環境 DNA 検出のためのプライマー設計と DNA 放出特性の評価

第1節 はじめに

淡水二枚貝を用いたバイオマニピュレーションでは、淡水二枚貝をその環境に定着させる必要があり、生息密度や分布域を定期的にモニタリングすることが求められる。湖沼環境において淡水二枚貝の定着をモニタリングする方法には、時限探索調査[161, 162]、コドラート調査[161, 163, 164]、シュノーケリング調査[161, 164]等があるが、調査地が広域である場合や水深が深い場合には調査が困難である。また、これらの方法は淡水二枚貝を直接採捕するため、生息地のかく乱のリスクがあり、より簡便で非侵襲的な調査手法の開発が求められる[163]。

最近、淡水二枚貝の保全を目的とした新たなモニタリング手法として環境 DNA (eDNA) 手法の適用が検討されており、イシガイ科二枚貝[125–131, 156–158]、カワヒバリガイ[132–134]、ゼブラ二枚貝[135–140]、クアッガ二枚貝[140]などの検出に用いられている。標的種の検出には種特異的オリゴヌクレオチドプライマーが必要だが、タテボシガイの種特異的オリゴヌクレオチドプライマーはこれまで報告がないため、新たに作製する必要がある。

いくつかの研究は、eDNA 手法を適用してイシガイ科二枚貝の密度推定に取り組んだ[127, 128, 156–158]。Stoeckle らは、800~20,000 個体（目視計数）のイシガイ科 *Margaritifera margaritifera* 個体群の下流 25 m で河川水を採水し eDNA を検出したが、下流 500 m 及び 1000 m の地点では eDNA を検出できなかったことを報告し、eDNA の減衰や放出に関する基礎的なデータの重要性について指摘した[127]。しかし、二枚貝の eDNA の減衰や放出を検討した研究は少なく、イシガイ科二枚貝では Sansom らが 56 及び 111 個体 m^{-2} の密度になるように *Lampsilis siliquoidea* を 40 L の水槽に投入し、eDNA 放出速度を測定した[156]。この実験では、56 及び 111 個体 m^{-2} の密度の水槽で、eDNA 放出速度がそれぞれ $2.4 \times 10^7 \text{ copies h}^{-1} \text{ tank}^{-1}$ 及び $5.6 \times 10^6 \text{ copies h}^{-1} \text{ tank}^{-1}$ であり、半分の密度の水槽で 4.3 倍高い eDNA 放出速度を観測した[156]。したがって、環境中で検出された eDNA 濃度は淡水二枚貝のバイオマスや密度を反映していない可能性があり、淡水二枚貝の eDNA の放出源の特定が課題であることが示された。

本章では、淡水二枚貝の eDNA の減衰速度や放出速度、並びに DNA 放出源を明らかにするため、はじめに、1) ミトコンドリアシトクロム c 酸化酵素サブユニット I 遺伝子領域を標的として、タテボシガイ種特異的オリゴヌクレオチドプライマーの設計を行った。この実験では、設計したプライマーを日本国内に生息する二枚貝及び巻貝に適用し、プライマーの特異性を評価した。続いて、2) 水槽実験により、タテボシガイの eDNA 放出特性の評価を行った。この実験ではタテボシガイを水槽で 1 週間飼育し、その後タテボシガイを水槽から取り除き、水槽内の eDNA 濃度の減衰をモニタリングして eDNA の減衰速度や放出速度を求めた。

第2節 実験方法

4-2-1 オリゴヌクレオチドプライマーの作製

種特異的オリゴヌクレオチドプライマーは標的種であるタテボシガイ (Genbank アクセッション番号 KJ434522 及び GQ451863) と八郎湖に生息する他の4種の二枚貝 (カラスガイ [EU698950]、ドブガイ [GQ451867]、セタシジミ [KC211280]、ヤマトシジミ [AB498808]) のミトコンドリアシトクロム *c* オキシダーゼサブユニット I (COI) 遺伝子配列に基づいて設計した。各二枚貝種の COI 遺伝子配列を MEGA ver.6 [223] を用いて比較検討し、タテボシガイの配列に特異的になるようにオリゴヌクレオチドプライマーを設計した。作製したオリゴヌクレオチドプライマーは以下のとおりである。

NN_F: 5'-GTTACTTGTTTCCTGCTTTG-3' (フォワードプライマー)

NN_R: 5'-CAAAACAGCAGTTACTGTA-3' (リバースプライマー)

NN_probe: (FAM)_AATGTCGCTCATTCTGG_(TAMRA) (Taq-man プローブ)

フォワード及びリバースプライマーを用いてタテボシガイから増幅されるアンプリコンのサイズは 274 bp であった。

オリゴヌクレオチドプライマーの特異性を調べるために、淡水及び汽水域に生息する種々の二枚貝から DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出した (表 4-1)。なお、八郎湖、八郎湖周辺の水田、並びに吉田川で採取した貝類は、直接現場で採集し、雄物川で採集したキタノタガイは杉山秀樹博士から分譲していただき、琵琶湖で採集した二枚貝は古田世子博士より分譲していただき、小川原湖及び熊本県で採集された二枚貝は市販のものを購入した。抽出した二枚貝の DNA 8.7~19.4 ng、1×Buffer 5 µL、2 mM MgCl₂、0.2 mM dNTPs、0.8 µM の各プライマー、及び 0.5 U TaKaRa Ex Taq HS (Takara Bio) を含む 20 µL の反応液で PCR を行った。PCR の反応条件として、94°C で 5 分間の初期変性に続き、94°C で 30 秒間の変性、56°C で 30 秒間のアニーリング、72°C で 25 秒間の伸長を 30 サイクル行い、最後に 72°C で 7 分間最終伸長させた。PCR 増幅産物の確認は、MultiNA (Shimadzu) を用いたマイクロチップ電気泳動で行い、274 bp のバンドが得られた試料を PCR 陽性と判定した (表 4-1)。

4-2-2 水槽実験

八郎湖において 51~66 mm のタテボシガイを貝けた網を用いて採捕し、20°C 一定の恒温室において秋田県立大学圃場の井戸水が充填された 30 L の水槽で維持した。水槽内の水替えは週に一度行った。実験直前に脱塩素水道水中で排泄が見られなくなった個体を実験に採用した。

タテボシガイの eDNA の放出特性を調べるための水槽実験は、20°C の暗室で行った。15 個の水槽 (32×19×23 cm) を準備し、水槽の内側を 0.1% (w/v) 次亜塩素酸ナトリウム溶液で一晩滅菌し、使用前に脱塩素水道水ですすいだ。水槽に 10 L の脱

塩素水道水を入れ、3 個体もしくは 10 個体のタテボシガイを各水槽に配置し (n=5)、残りの 5 つの水槽はタテボシガイを加えない対照実験に使用した。水槽内のタテボシガイの密度は 49 個体 m^{-2} (3 個体 水槽 $^{-1}$) と 164 個体 m^{-2} (10 個体 水槽 $^{-1}$) と比較的高い値となったが、これらの密度は eDNA 放出特性を調査解析するため十分量の DNA を確保するために選定された。タテボシガイは、始めに水槽内で 1 週間餌料を与えずに維持し、1 週間後に全て水槽から取り除いた。なお、タテボシガイを水槽から取り除く 24 時間前に水槽水を 500 mL 採取しておいた (-24 時間目の試料と表記)。タテボシガイを取り除いた後、0~168 時間の間で水槽水を 500 mL 採取した。ただし、採水時には、滅菌済みのプラスチック製の棒で水槽水を穏やかに撹拌した。

採水した水試料は、eDNA 濃度、溶存無機態窒素濃度 (DIN)、溶存無機態リン (DIP) 濃度の測定に使用した。採水直後の水試料には、eDNA の分解を防ぐために、500 μL の陽イオン界面活性剤 (10%塩化ベンザルコニウム) を添加した[224]。その後、水試料はガラス繊維ろ紙 (GF/F, Whatman) でろ過し、ろ紙は eDNA 抽出まで -80°C で保存した。また、オートアナライザー QuAAtro2-HR (BLTEC) を用いて DIN 及び DIP を分析するためにろ液を 50 mL 分取し、 4°C で保存した。DIN 及び DIP は、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ の総含有量及び $\text{PO}_4\text{-P}$ の含有量から算出した。10%塩化ベンザルコニウムには、低濃度の $\text{NH}_4\text{-N}$ が含まれていたが、添加量が終濃度 0.1% (v/v) と低かったため、試料中では無視できる濃度であった ($<10 \text{ ng L}^{-1}$)。

全ての実験操作において使い捨てのニトリル手袋を使用し、試料ごとに交換するなど、DNA 汚染が最小限となるようにした。また、全ての実験器具は、分析前に 0.1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液を使用して消毒した。

水槽内で放出された eDNA の減衰は、既往研究で用いられている一次反応速度式を用いて解析した。水槽からタテボシガイを除去した後の eDNA 濃度の減少に基づいて評価した。減衰速度定数は、既往研究[156]で用いられている指数関数的減衰モデルを用いて算出した。

$$C_t = C_0 \times e^{-k \times t} \dots \text{式 (4-1)}$$

C_t : 時間 t での eDNA 濃度 (copies mL^{-1})

C_0 : 時間 0 での eDNA 濃度 (copies mL^{-1})

k : 減衰速度定数 (h^{-1})

本研究では、水槽内でタテボシガイを維持していた最初の 7 日間で水槽内の eDNA 濃度が平衡状態に達したと仮定した[156]。この 7 日間という期間は、他のイシガイ科二枚貝を用いた同様の水槽実験で採用された期間 (20 時間) よりも十分に長い期間であった。タテボシガイからの eDNA 放出速度は、時間 0 における eDNA 濃度 (C_0) と減衰速度定数 (k) から、次式を用いて算出した[156]。

$$S = C_0 \times V \times k \dots \text{式 (4-2)}$$

S : eDNA 放出速度 ($\text{copies h}^{-1} \text{ tank}^{-1}$)

V : 水槽の水量 (mL)

4-2-3 DNA 抽出と qPCR の条件

500 mL の水槽水をろ過したろ紙は次亜塩素酸ナトリウムで処理したハサミで半分になり、さらにその半分を細断して、eDNA 抽出に供した。細断したろ紙を 2 mL のスクリーキャップチューブに入れ、80 μL の proteinase K (Qiagen) と 800 μL の Buffer AL (Qiagen) を加えて、ろ紙を液内に浸した。このチューブを 56°C で 1 時間加温して eDNA を抽出した後、底部を殺菌処理したハサミで切り、サリベットチューブ (Sarstedt) に入れた。このサリベットチューブを 3,000 $\times g$ で 3 分間遠心した後、スクリーキャップチューブを取り出し、440 μL の TE バッファー (10 mM Tris-HCl 及び 1 mM EDTA、pH : 8.0) を添加してからサリベットチューブに戻し、さらに 3,000 $\times g$ で 3 分間遠心分離した。サリベットチューブの底に溜まった DNA を含む溶出液に 800 μL のエタノールを加え、DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen) を製造元のプロトコルに従って使用して精製した。最終的に DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen) 付属の 200 μL の Buffer AE で溶出した。

リアルタイム定量 PCR (qPCR) は、LIGHTCYCLER® 96 (Roche) を用いて行った。反応液量は 20 μL で、10 μL の 2 \times マスターミックス、0.1 μL の 500 nM 各プライマー、0.02 μL の 100 nM TaqMan プローブ、5 μL の DNA テンプレート、PCR グレードの超純水で構成され、FastStart Essential DNA ProbesMaster を用いて調製した (Roche)。qPCR の温度条件は、95°C、600 秒間のプレインキュベーションの後、95°C で 10 秒間、56°C で 10 秒間、72°C で 28 秒間の 3 ステップ増幅を 45 サイクル繰り返した。

また、DNA 標準液を調製するため、タテボシガイから抽出した DNA を用いて作製したプライマーセットによる PCR を行い、274 bp の標的領域の PCR 産物を得た。プラスミド DNA の調製は、TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen) を使用し、製造元のプロトコルに従ってコンピテントセル (*Escherichia coli*) を含む PCR 4-TOPO ベクターを用いて行った。バクテリアコロニーを ImMedia™ Amp Blue (Invitrogen) を用いて寒天培地で増殖させ、白色コロニーを 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ のアンピシリンを含む 40 mL の LB 液体培地に接種した。その後、QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用いてプラスミドを分離し、PCR を行ってミトコンドリアシトクロム *c* オキシダーゼサブユニット I 標的遺伝子配列がプラスミドに組み込まれていることを確認した[225]。プラスミド DNA 標準液中のコピー数は、DNA 濃度と塩基対の長さに基づいて算出した[226]。

$10^1 \sim 10^7 \text{ copies } \mu\text{L}^{-1}$ のプラスミド DNA を使用して qPCR を行った。標準試料は、各 96 穴プレート上で試料と同時に分析した。最小濃度 ($10^1 \text{ copies } \mu\text{L}^{-1}$) の標準液において、 34.9 ± 0.7 (平均 \pm SD) のサイクル数で増幅することを確認した。したがって、35 サイクルを超えて初めて増幅が確認される試料の eDNA 濃度は、定量下限を

下回ると見なし、eDNA 濃度は 0 として扱った。また、本研究では DNA テンプレートを段階希釈して PCR を行うことで、PCR 阻害の有無について検討したが[227]、本研究ではこの操作において PCR 増幅の効率に影響は見られなかった。

表 4-1 開発したプライマーセットの特異性

科	種名	学名	PCR 増幅*	採集地点
イシガイ科	タテボシガイ	<i>Nodularia nipponensis</i>	+	八郎湖
	カラスガイ	<i>Cristaria plicata</i>	-	八郎湖
	ドブガイ	<i>Sinanodonta</i> sp.	-	八郎湖
	タテボシガイ	<i>Nodularia nipponensis</i>	+	琵琶湖
	オバエボシガイ	<i>Inversidens brandtii</i>	-	琵琶湖
	マルドブガイ	<i>Sinanodonta calipygos</i>	-	琵琶湖
	ササノハガイ	<i>Lanceolaria oxyrhyncha</i>	-	琵琶湖
	マツカサガイ	<i>Pronodularia japonensis</i>	-	琵琶湖
	ヨコハマシジラ	<i>Inversiunio jokohamensis</i>	-	吉田川
	キタノタガイ	<i>Beringiana gosannensis</i>	-	雄物川
シジミ科	タイワンシジミ	<i>Corbicula fluminea</i>	-	琵琶湖
	セタシジミ	<i>Corbicula sandai</i>	-	八郎湖
	ヤマトシジミ	<i>Corbicula japonica</i>	-	小川原湖
マルスダレガイ科	アサリ	<i>Ruditapes philppinarum</i>	-	熊本県
タニシ科	マルタニシ	<i>Cipangopaludina chinensis</i>	-	八郎湖周辺の水田
	オオタニシ	<i>Cipangopaludina japonica</i>	-	八郎湖周辺の水田
	ヒメタニシ	<i>Sinotaia quadrata</i>	-	八郎湖周辺の水田
カワニナ科	カワニナ	<i>Semisulcospira</i> sp.	-	八郎湖周辺の水田

*+, PCR 産物検出; -, PCR 産物非検出.

第3節 結果及び考察

本研究で新たに作製したプライマーセットは、異なる場所（八郎湖と琵琶湖）で採集された2つのタテボシガイから標的とするDNA領域を増幅することができた（表4-1）。他のイシガイ科二枚貝、シジミ類、汽水域に生息する二枚貝、巻貝類では、増幅が認められなかったことから（表4-1）、設計したプライマーはタテボシガイに特異的であり、タテボシガイのeDNA検出に適用可能であることが示された。

このプライマーセットを用いたqPCRにおいて既知の濃度のDNAに対する検量線の決定係数は、 >0.98 であり、また、傾きから算出されるPCR効率は $100 \pm 5.6\%$ と良好であった。タテボシガイのDNAを含まない対照実験ではPCR増幅は認められなかった。本研究のqPCRの定量下限は、 10^1 copies μL^{-1} であり、これは水槽水において8.0 copies mL^{-1} に相当した。

水槽実験では、タテボシガイが水槽から除去された0時間でのeDNA濃度を見かけの定常状態のeDNA濃度とみなした（図4-1）。時間経過に伴い、その後48時間目までにeDNA濃度は指数関数的に減少し（図4-1）、0時間から48時間目までの区間を一次反応速度式に適合し、減衰速度を算出した。3個体及び10個体の水槽では、時間0でのeDNA濃度はそれぞれ $(2.9 \pm 2.3) \times 10^2$ copies mL^{-1} 及び $(4.1 \pm 8.2) \times 10^4$ copies mL^{-1} で、個々の水槽間で大きくばらついていた（図4-1）。3個体及び10個体の水槽の定常状態のeDNA濃度の平均値（ $(2.9 \pm 2.3) \times 10^2$ copies mL^{-1} 及び $(4.1 \pm 8.2) \times 10^4$ copies mL^{-1} ）をそれぞれの水槽の密度（49個体 m^{-2} 及び164個体 m^{-2} ）で割ると、1個体 m^{-2} の密度で得られると推定されるeDNA濃度がそれぞれ6.1 copies mL^{-1} 及び250 copies mL^{-1} と推算された。3個体の水槽で推算された6.1 copies mL^{-1} という濃度は、本実験におけるqPCRの定量下限である8.0 copies mL^{-1} を下回っており、定量化のためには少なくとも1.3個体 m^{-2} 以上の密度が必要であることが試算された。しかしながら、この試算結果はeDNAの水中への拡散が制限される10L水槽での実験の結果であり、実際の湖沼環境中では、eDNAは水柱に広く分散することが予想される。したがって、湖沼環境中で少なくとも1.3個体 m^{-2} よりも高密度にタテボシガイが生息している区域でないとeDNAを検出定量することは困難と考えられた。ただし、qPCRの定量下限はろ紙に通水する懸濁液量を増やす、または、複数の抽出カラムを使用してDNAの回収量を増やすことで低下させることが可能である。しかし、富栄養化湖沼での適用を想定するところ水量を増やすのは困難であり、複数のカラムの使用も経済的ではないと考えられた。

3個体と10個体の水槽のeDNAの分解速度は、それぞれ $0.074 \pm 0.022 \text{ h}^{-1}$ 及び $0.147 \pm 0.125 \text{ h}^{-1}$ であり、3個体の水槽よりも10個体の水槽の方が速度が大きい傾向にあったが、有意差は無かった（ $P > 0.1$ ）。既往研究では、淡水に生息するゼブラ二枚貝とクワガ二枚貝においてより高い個体密度の状態ではeDNAの減衰速度が大きくなることが報告されている[228]。同様の現象は魚類であるマアジでも確認されている[149–151]。高密度条件でのより高いeDNAの減衰速度は、飼育水中の微生物量とエキソヌクレアーゼ活性を反映している可能性が指摘されている[149–151, 154]。本研究で得ら

れたタテボシガイ eDNA の減衰速度は、同じイシガイ科二枚貝 *Lampsilis siliquoidea* を 40 L の水槽に 2、10、及び 20 個体入れたときに得られた減衰速度 ($0.0097\sim 0.053\text{ h}^{-1}$) や 15 L の水槽にゼブラ二枚貝及びクワツガ二枚貝を 2、6、12、24、及び 48 個体入れたときに得られた減衰速度 ($0.008\sim 0.115\text{ h}^{-1}$) よりも大きかった。分解速度に大きな差異が見られた要因として、水温[145, 146, 149, 151, 154, 155]、バイオマス量[149, 151, 153]、微生物量[145, 149, 151, 154]、紫外線[145, 146]、プライマーによって増幅されるアンプリコンのサイズ[148]、水量 (微生物濃度に影響)、及び pH[145]等の飼育時の条件が異なっていたことが挙げられる。

前述の定常状態の eDNA 濃度と eDNA 減衰速度から算出される eDNA 放出速度は、3 個体及び 10 個体の水槽でそれぞれ $(2.4\pm 2.1)\times 10^5\text{ copies h}^{-1}\text{ tank}^{-1}$ 及び $(1.8\pm 2.2)\times 10^7\text{ copies h}^{-1}\text{ tank}^{-1}$ であった (図 4-2)。これらの放出速度は、水槽内のバイオマスと概ね相関していた ($r=0.72, P=0.02$; 図 4-2a)。この水槽実験では、同様にタテボシガイによって排泄された DIN 及び DIP を定量していたが、DIN 及び DIP の放出速度は、同じ数のタテボシガイが入った水槽ごとに大きく異なっていることが判明した (図 4-2b,c, 4-3a, b)。特に、図 4-3a, b に示されているように、例えば、いくつかの 3 個体と 10 個体の水槽では、水槽内のバイオマスが約 3 倍異なるのに対して同等量の DIN と DIP が放出されていた。したがって、DIN 及び DIP の放出に個体差があることが示された (図 4-3a, b)。次に、DIN 及び DIP 放出速度と eDNA 放出速度の関係を調べた結果、eDNA の放出速度は DIN 及び DIP 放出速度の両方と有意に相関しており、相関係数はそれぞれ 0.81 ($P=0.004$) 及び 0.86 ($P=0.001$) であった (図 4-2b, c)。したがって、3 個体及び 10 個体の水槽の eDNA 放出速度のばらつきの要因は DIN 及び DIP 放出速度、すなわちタテボシガイの排泄に由来していることを特定した。既往研究では、イシガイ科二枚貝 *Lampsilis siliquoidea* の水槽内の密度が 56 個体 m^{-2} 及び 111 個体 m^{-2} の時の eDNA 放出速度は $2.4\times 10^7\text{ copies h}^{-1}\text{ tank}^{-1}$ 及び $5.6\times 10^6\text{ copies h}^{-1}\text{ tank}^{-1}$ と推定され、密度が半分の水槽で 4.3 倍大きい eDNA 放出速度が得られている [156]。したがって、水槽中の eDNA 濃度は水槽内の二枚貝のバイオマスを概ね反映するものの、排泄物に由来することから個体の活性が低い場合に二枚貝の現存量が過小評価される可能性があるだろう。

本研究で作製したプライマーによる eDNA 検出手法は、eDNA を環境中で検出する場合には、本水槽実験の条件において少なくとも 1.3 個体 m^{-2} よりも高い個体密度で生息するタテボシガイをモニタリングする際に有効であることが示された。しかし、湖沼環境では eDNA は水柱大きく拡散するため、実際にはより高い個体密度の生息地でないと適用は困難であると推察された。一方で、Currier らは、1.0 個体 m^{-2} 以下の個体密度で河川に生息するイシガイ科二枚貝の eDNA の検出定量に成功している [157]。標的種の現存量に加えて、プライマーによって増幅されるアンプリコンのサイズも eDNA の定量に影響を与えることが報告されており、サイズの大きい DNA 断片の方が分解速度が大きく定量化が困難であるとされている [148]。本研究で開発されたオリゴヌクレオチドプライマーで増幅されるアンプリコンのサイズは 274 bp であり、

Currier らの研究で増幅されたものよりも大きい (99~129 bp [157])。したがって、本研究の qPCR はタテボシガイから放出されてすぐの新鮮な DNA の定量化には適しているが、サイズの小さな DNA 断片を増幅する qPCR と比較すると検出感度が低い可能性がある。

以上より、これまで報告が無かったタテボシガイの種特異的オリゴヌクレオチドプライマーを作製し、水槽実験によりタテボシガイの eDNA 検出に適用可能であることが示された。今後、このオリゴヌクレオチドプライマーを用いた湖沼環境中でのタテボシガイのモニタリングへの適用が期待された。さらに、これまで淡水二枚貝の eDNA の放出源は明らかにされていなかったが、eDNA 放出速度と DIN 並びに DIP 放出速度の間に線形な関係があることを示し、eDNA の放出源が排泄物であることを初めて明らかにした。

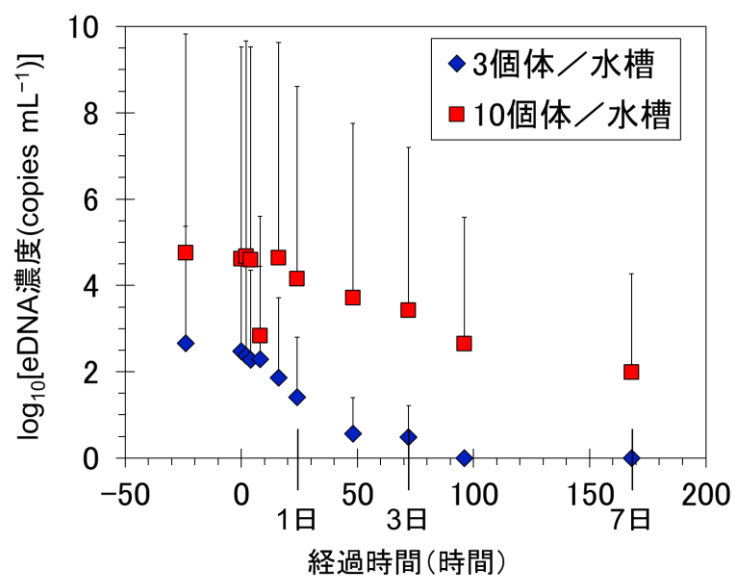


図 4-1 水槽実験におけるタテボシガイの eDNA 濃度の経時変化
エラーバーは標準偏差 (n = 5) を示す

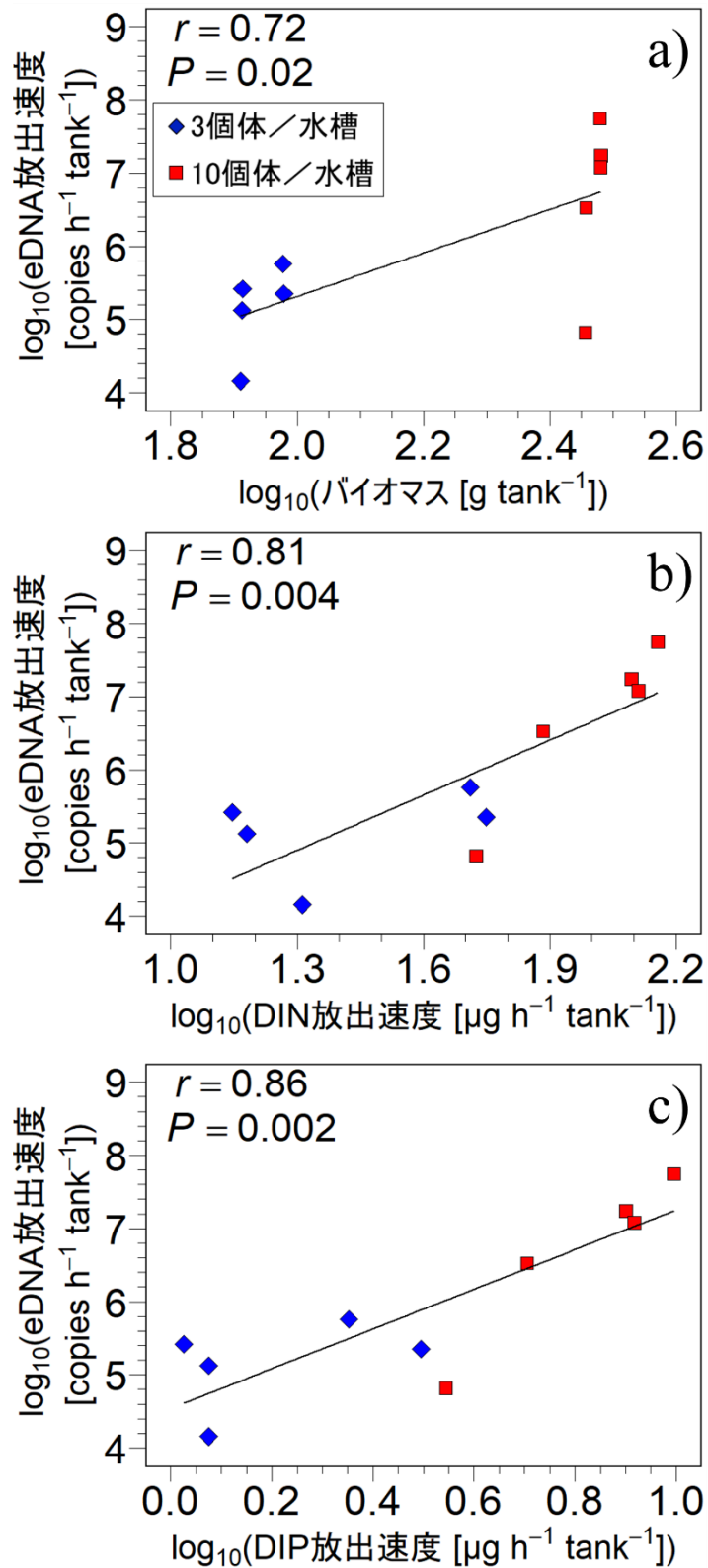


図 4-2 タテボンガイの水槽内のバイオマス(a)、溶存無機態窒素(DIN)放出速度(b)、溶存無機態リン(DIP)放出速度(c)に対する eDNA 放出速度の関係

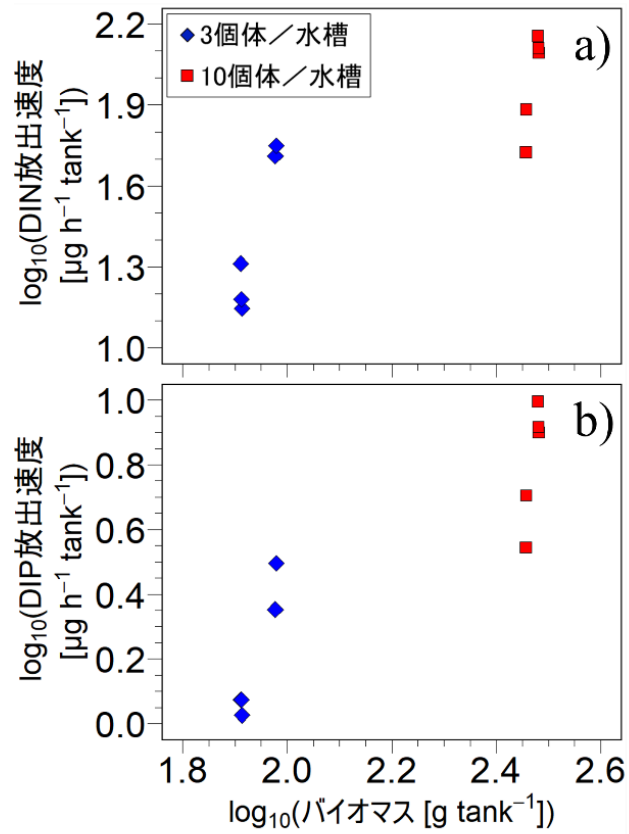


図 4-3 タテボシガイの水槽内のバイオマスに対する溶存無機態窒素(DIN)放出速度(a)及び溶存無機態リン(DIP)放出速度(b)の関係

第4節 要約

本章では、淡水二枚貝の eDNA の減衰速度や放出速度、並びに DNA 放出源を明らかにするため、はじめに、1) ミトコンドリアシトクロム *c* 酸化酵素サブユニット I 遺伝子領域を標的として、タテボシガイ種特異的オリゴヌクレオチドプライマーの設計を行った。続いて、2) 水槽実験により、タテボシガイ eDNA の放出特性の評価を行った。

1) ミトコンドリアシトクロム *c* 酸化酵素サブユニット I 遺伝子領域を標的としたタテボシガイ種特異的オリゴヌクレオチドプライマーの設計では、タテボシガイ、他のイシガイ科 8 種、シジミ科 3 種、アサリ、並びに巻貝 4 種の DNA を作製したプライマーとともに PCR し、タテボシガイへの種特異性が示された。

2) 水槽実験による eDNA の放出特性の評価では、タテボシガイの eDNA 放出速度は、水槽内のバイオマスと概ね相関するが ($r=0.72, P=0.02$; 図 4-3a)、DIN ($r=0.81, P=0.004$; 図 4-3b) 並びに DIP ($r=0.86, P=0.001$; 図 4-3c) 放出速度とより強い相関関係にあることを明らかにした。したがって、これまで淡水二枚貝の eDNA の放出源は明らかにされていなかったが、eDNA の放出源が排泄物であることを初めて明らかにした。

本章で新たに作製されたオリゴヌクレオチドプライマーでは、水槽内のタテボシガイの eDNA を検出定量できることが確かめられ、今後、湖沼環境中でのタテボシガイのモニタリングへの適用が期待された。また、タテボシガイの eDNA の放出源を排泄物と特定した本研究の成果は、今後、湖沼環境中で得られた二枚貝の eDNA を解釈する上で重要な知見となる。

第5章 富栄養化湖沼八郎湖における環境 DNA 手法の適用

第1節 はじめに

第4章で調製したオリゴヌクレオチドプライマーを用いて湖沼等水環境においてタテボシガイをモニタリングするためには eDNA の検出感度を考慮すると、生息域の個体密度が少なくとも 1.3 個体 m^{-2} 以上必要であることが示された。例えば、秋田県八郎湖では、以前報告されたタテボシガイの個体密度は最大でも 0.56 個体 m^{-2} 程度であり[167]、そのような環境では、湖水からの eDNA の検出は困難であると推察された。したがって、標的種が低密度な場合での eDNA 検出は課題である。

そのような場合、採水方法や採水時期を検討することで、二枚貝の eDNA の検出率[131, 133]や濃度[130, 139]を改善できることが示されている。通常 eDNA 用いた生物モニタリング調査では表層水を採水するが[113–116]、いくつかの淡水二枚貝を対象とした研究では、表層水よりも底層水の方が検出率[131, 133]及び定量濃度[139]が高くなる結果が得られている。また、淡水二枚貝イシガイ科においては、幼生放出時期に比較的高い eDNA の検出率[131]及び定量濃度[130]が得られることも報告されている。Lor らはアメリカの河川において淡水真珠二枚貝の幼生放出期である 5 月と幼生放出期が終わった 8 月の eDNA の検出率を比較し、幼生放出時期である 5 月 (73.3~93.1%) の方が 8 月 (55.6~70.8%) よりも検出率が高いことを示した[131]。さらに、Wacker らは、冷水期 (5 月)、温水期 (6 月)、繁殖期 (8 月) において 20,000 個体淡水真珠二枚貝の個体群 (目視計数) のすぐ下流の河川水中の eDNA 濃度をモニタリングし、各時期の eDNA 濃度は、それぞれ 1 copies mL^{-1} (5 月)、 6 copies mL^{-1} (6 月)、 21 copies mL^{-1} (8 月) であり、繁殖期に冷水期の約 20 倍の eDNA 濃度が定量されたことを報告した[130]。したがって、底層水の採水や幼生放出時期で調査することによって標的の二枚貝が低密度であっても eDNA を検出できる可能性が示されている。

タテボシガイなどのイシガイ科の二枚貝は、独自の繁殖サイクルを有している[165, 229]。イシガイ科二枚貝は雌雄異体であり[165, 229]、雄が精子球と呼ばれる精子を含む粘液状の塊を水中に放出し[230]、メスは精子球を取り込み受精する。母貝 1 個体は $10^4 \sim 10^6$ 個の卵を産生するが[165]、受精卵は育児嚢と呼ばれる器官でグロキディウム幼生となるまで保持される[165, 229]。成長後、グロキディウム幼生は、段階的に放出され[229, 231]、水中を漂い特定の宿主魚類のエラやヒレに寄生する[165, 229, 232]。魚類への付着は、グロキディウム幼生の幼生糸と呼ばれる部位が物理的的刺激を受けることで、弁が急速に閉じて完了する[165, 229, 233, 234]。したがって、宿主である魚類でなくとも物理的的刺激を受けると弁が閉じて付着し、再び弁が開くことはない[233, 234]。宿主となる適切な魚類に付着できた場合は、稚貝へと変態して最終的に宿主から離脱して底質に着底する[235]。母貝から放出される大量のグロキディウム幼生を eDNA を担持した細胞塊と見なし、これを水中で捕集することができれば、標的のイシガイ科二枚貝の成貝が低密度で生息する場合でも eDNA 手法でモニタリングできる可能性がある。

本章では、富栄養化湖沼において eDNA 手法を適用してタテボシガイをモニタリングするため、はじめに 1) 富栄養化湖沼八郎湖においてタテボシガイの eDNA の検出を試みた。この調査では、第 4 章で調製したオリゴヌクレオチドプライマーを用いて八郎湖全域 8 地点において、底層水を採水し、eDNA の検出定量を試みた。次に、2) グロキディウム幼生由来の eDNA を回収する新規手法を考案し、八郎湖への適用を検討した。この調査では、タテボシガイが繁殖期 (6~7 月) に大量に放出するグロキディウム幼生に着目し[165, 169]、このグロキディウム幼生を排水処理で生物膜付着担体として用いられる紐状ろ材 (紐状担体) を用いて捕集し、eDNA の定量性を向上できるか検討した。最後に 3) 新規手法によって回収された eDNA 量とタテボシガイ成員の密度の関係性を調べた。この調査では、八郎湖沿岸全域へ新規手法を適用して得られた eDNA 量と貝けた網を使用して得られたタテボシガイ成員の密度を比較した。

第 2 節 実験方法

5-2-1 湖水試料を対象としたタテボシガイ eDNA の検出

調査地は、タテボシガイの生息が報告されている秋田県八郎湖とした[167–169]。調査地点は、八郎湖の全域の 8 地点とした (図 5-1)。八郎湖では 6~7 月にタテボシガイのグロキディウム幼生が放出されるので[169]、2019 年 6 月 19 日にバンドーン採水器 (Rigo) を用いて湖水試料を採水した (写真 5-1a)。二枚貝の eDNA は表層よりも底層部で検出率が高くなるという報告があったため[131, 133, 139]、表層水ではなく底質直上水を採水した。採水した湖水試料は、事前に次亜塩素酸ナトリウムで処理された 1 L のポリ瓶に採水し、採水直後に 1 mL の 10%塩化ベンザルコニウムを添加した (終濃度 0.1% (v/v))。また、現場調査における全ての操作において使い捨てのニトリル手袋を使用し、試料ごとに交換するなど、DNA 汚染が最小限となるようにした。

実験室に戻った後、湖水試料は速やかにガラス繊維ろ紙 (GF/F, Whatman) で 200 mL ろ過した。ろ紙は eDNA 抽出まで -80°C で保存した。

eDNA の抽出及び qPCR は、第 4 章の第 2 節、4-2-3 と同様の方法で行った。

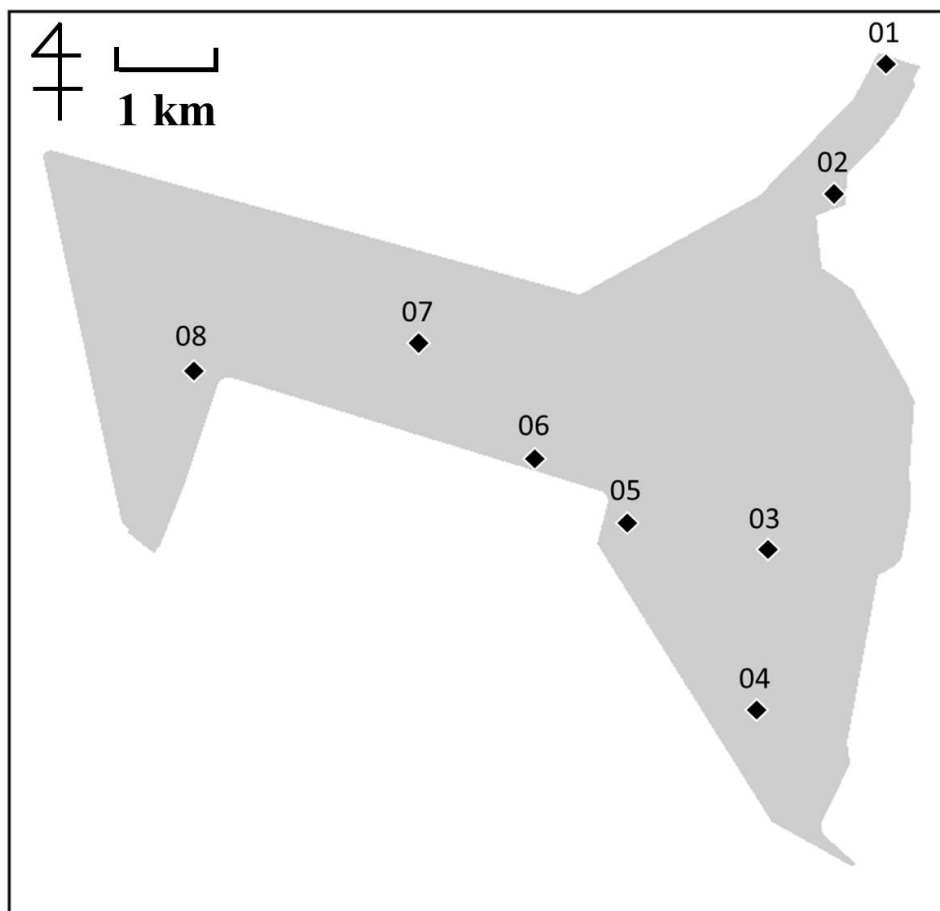


図 5-1 八郎湖全域 8 地点における湖水試料を対象としたタテボシガイ eDNA 調査の試料採取地点 (2019 年 6 月 19 日)

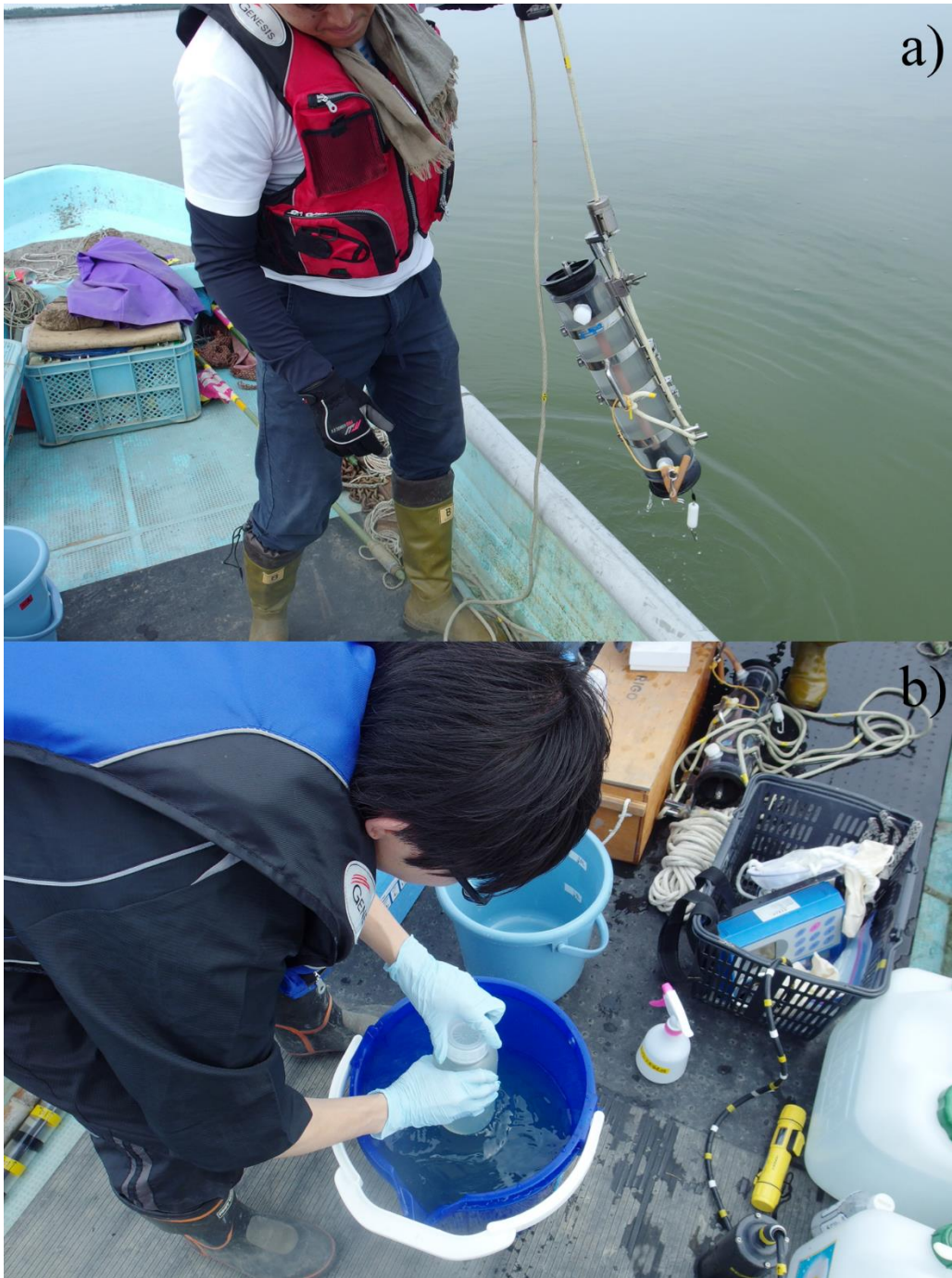


写真 5-1 バンドーン採水器による湖水試料の採水(a)とポリ瓶への湖水試料の回収(b)

5-2-2 紐状担体を用いた幼生捕集試料を対象としたタテボシガイ eDNA の検出

タテボシガイのグロキディウム幼生の捕集を目的としたため、調査地は八郎湖においてタテボシガイの生息が確認されている南岸部[166]10 地点で行った (図 5-2)。調査は八郎湖の幼生放出時期[169]を跨ぐように 2020 年の 5~8 月に実施した。ただし、悪天候のためにいくつかの調査日において、適宜サンプリング地点を減らした。

タテボシガイのグロキディウム幼生を捕集するために比表面積が $1.2 \text{ m}^2 \text{ m}^{-1}$ のポリ塩化ビニリデン製の紐状ろ材 (バイオコード PV-45、TBR 社、写真 5-2、以下、紐状担体) を 1 m に切断して、浮きと鉛をロープで括り (写真 5-3a)、調査日の午前 7 時に各地点の湖底に沈めた (図 5-2)。8 時間後の午後 15 時に湖底に 1 L の脱イオン水と 0.1%塩化ベンザルコニウムを含む事前に次亜塩素酸ナトリウムで処理された 2 L のポリ瓶に紐状担体を回収した (写真 5-3b, c)。現場調査での DNA 汚染を確認するために、調査中に脱イオン水と 0.1%塩化ベンザルコニウムを含む事前に漂白された 2 L のポリ瓶の蓋を開けたままにして、調査の終わりに新品の紐状担体をそのポリ瓶に入れ、得られた試料と同様に eDNA 抽出及び qPCR を行うことで現場調査での DNA 汚染をモニタリングするための試料 (本研究において「フィールドブランク」として定義する) を得た。また、この現場調査時に比較のため、5-2-1 と同様の方法で湖水試料も採水した。

6 月 21 日の調査では、いくつかの調査地点において紐状担体を 2 本湖底に沈めた。このサンプルは、紐状担体に実際に幼生が付着しているかどうかを確認するための顕微鏡観察用サンプルとして 2 L のポリ瓶にその場の湖水を 1 L 入れ、そこに紐状担体を回収した。

実験室に戻った後、紐状担体の入ったポリ瓶を激しく攪拌し、紐状担体試料は速やかにグロキディウム幼生を紐状担体から引き剥した後、全量ガラス繊維ろ紙を用いてろ過した。これらのろ紙は eDNA 抽出まで -80°C で保存した。比較のために採水された湖水試料は、5-2-1 と同様の方法でろ過処理し、紐状担体試料及び湖水試料ともに第 4 章の第 2 節、4-2-3 と同様の方法で eDNA の抽出及び qPCR に供した。なお、定量化された値は、湖水及び紐状担体サンプルを比較するために、qPCR に供した際の $5 \mu\text{L}$ の DNA テンプレート当たりのコピー数 (copies [$5 \mu\text{L}$ template DNA] $^{-1}$) として算出した。

顕微鏡用の紐状担体試料は、紐状担体の繊維からグロキディウム幼生を引き剥すために 1 mL の塩化ベンザルコニウムを添加し、激しく攪拌したのち、プランクトンネット (63 μm の目合い, Rigo) に注ぎ、30 mL まで濃縮した。濃縮液は 10 mL のガラス試験管に分取し、 $1,500 \times g$ で 10 分間遠心分離した。その後、上澄みを除去し、沈殿物を再懸濁させた後光学顕微鏡でグロキディウム幼生を観察した。観察後の個体は、パストールピペットで単離し、2 mL のスクリーキャップチューブに地点ごとに移され、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) の組織 DNA 抽出用の説明書に従って、グロキディウム幼生の DNA を抽出し、qPCR に供した。

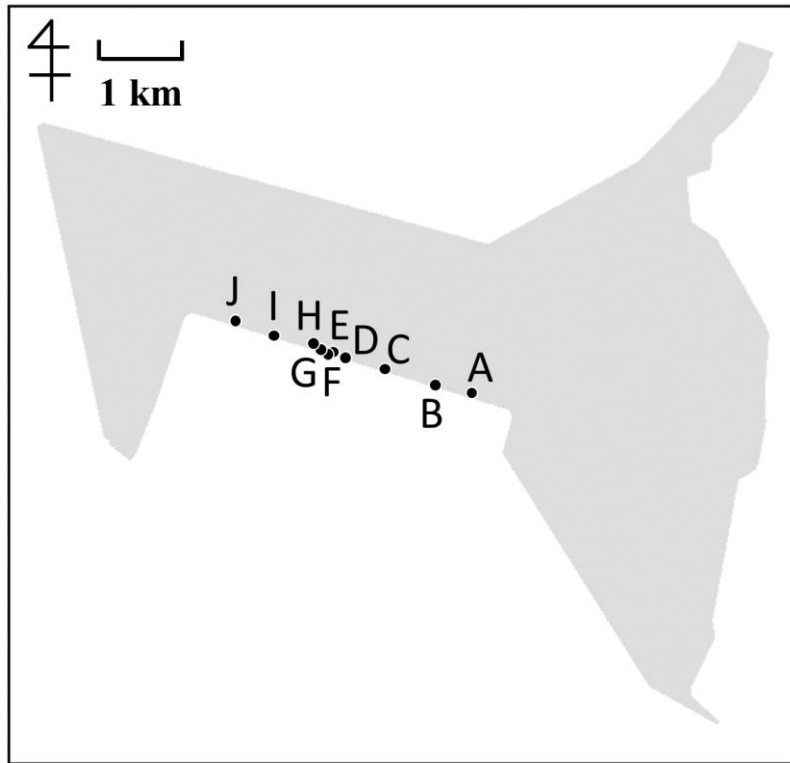


図 5-2 八郎湖南岸部 10 地点における紐状担体試料を対象としたグロキディウム幼生由来 eDNA 調査の試料採取地点(2020 年 5~8 月)

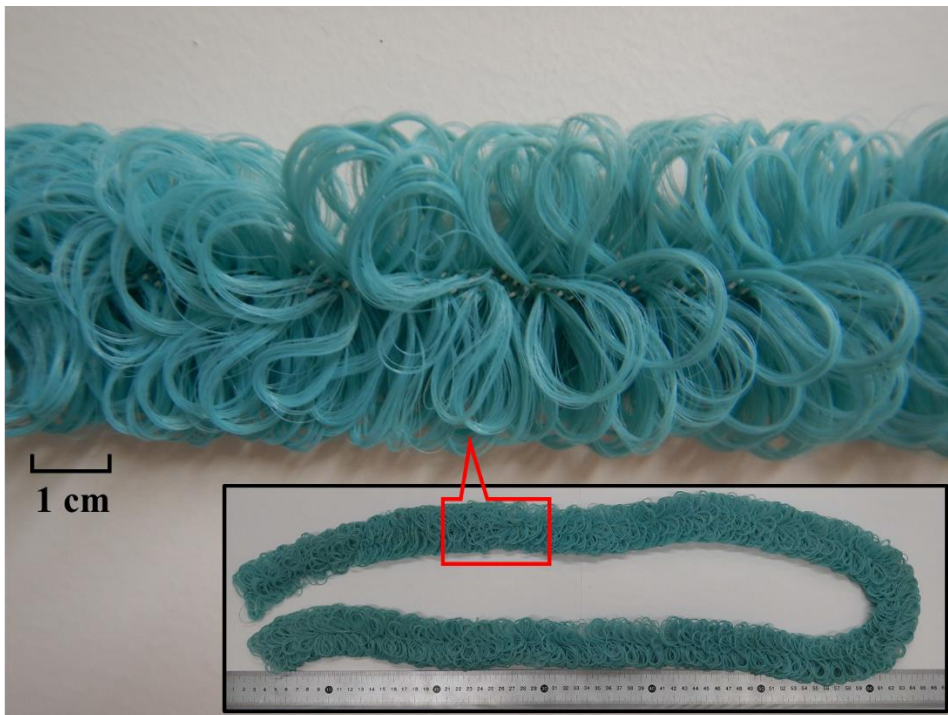


写真 5-2 タテボシガイのグロキディウム幼生を捕集するための紐状担体

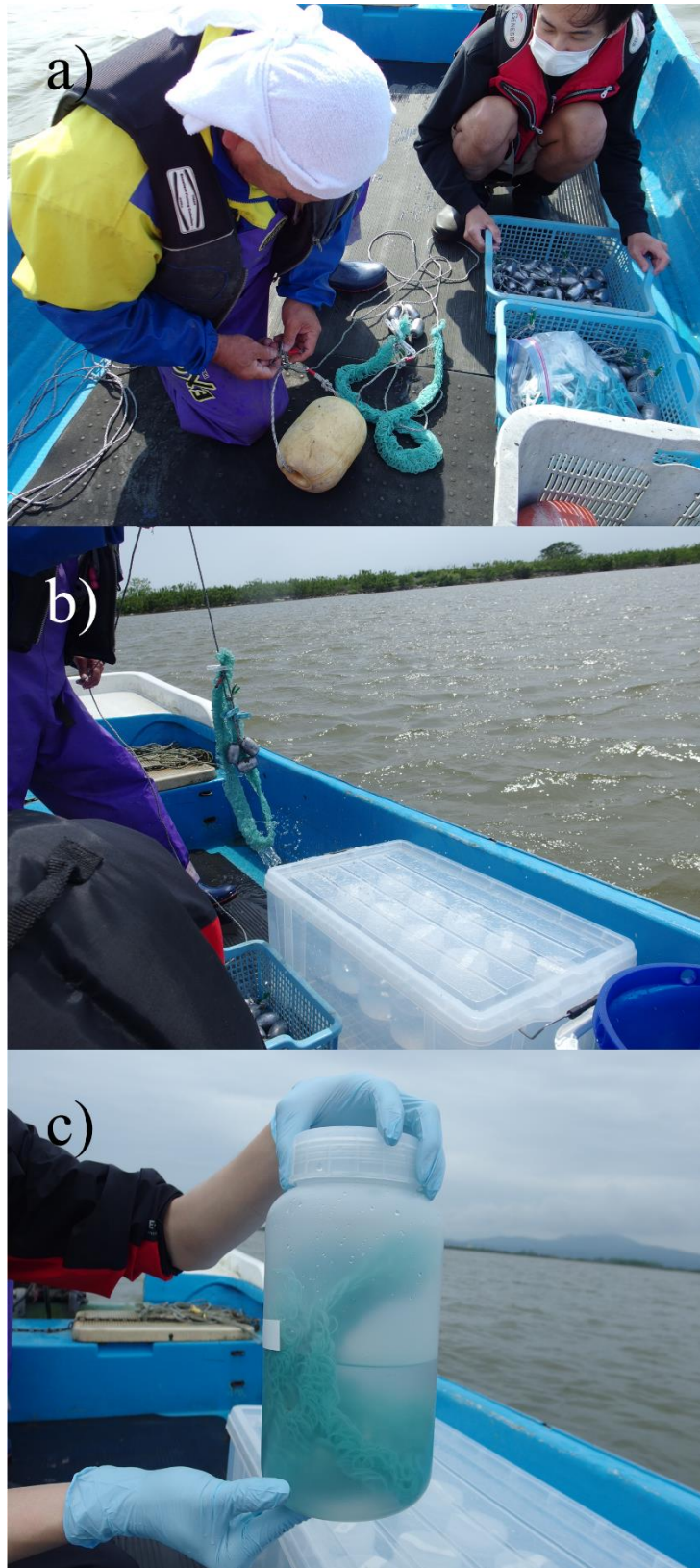


写真 5-3 紐状担体への浮きと鉛の取り付け(a)及び湖底からの紐状担体の回収(b,c)

5-2-3 八郎湖全域における紐状担体を用いた幼生捕集試料を対象としたタテボシガイ eDNA の検出

5-2-2 と同様の方法で、タテボシガイの幼生放出時期[168]である 2021 年 7 月 2 日に八郎湖調整池沿岸部全域 22 地点において、紐状担体を設置してグロキディウム幼生由来 eDNA を回収した (図 5-3a)。

eDNA の抽出及び qPCR は、第 4 章の第 2 節、4-2-3 と同様の方法で行った。

5-2-4 タテボシガイ成員の密度調査及びその他環境因子の測定

紐状担体試料によって得られたグロキディウム幼生由来 eDNA とタテボシガイ成員の密度を比較するために、2021 年 9 月 5 日に貝けた網を用いてタテボシガイ成員の密度調査を行った (図 5-3b)。貝けた網調査は、貝けた網が埋まってしまう泥質地帯では実施できない (写真 5-4a)。砂質の地点は、南岸部以外にはまばらに点在するのみで (写真 5-4b)、ほとんど泥質の地点であった[236]。したがって、南岸部を中心に 13 地点において密度調査を行った。なお、X'の地点は泥質であったため、けた網ではなくエクマンパーズ採泥器 (Rigo) を用いて 1 地点のみタテボシガイ成員の密度を調べた (図 5-3b)。

また、密度調査と同時に底質直上水試料と底質試料を採取した。

底質直上水試料では、水温、溶存酸素、Chl.a 濃度、全窒素 (TN) 濃度、並びに全リン (TP) 濃度を分析した。水温及び溶存酸素はハンディ溶存酸素メーター ID-150 (飯島電子) を用いて測定した。Chl.a 濃度は、第 2 章、第 2 節 2-2-3 と同様の方法で測定した。TN 濃度及び TP 濃度は、オートアナライザー QuAAtro 2-HR (BLTEC) により分析した。

底質試料では、含水率、強熱減量、Chl.a 濃度、有機態炭素含有率、並びに底質粒子の中央粒径を測定した。含水率は、秤量瓶に底質試料を約 20 g 測り取り、 $105 \pm 5^{\circ}\text{C}$ で 24 時間乾燥させ乾燥重量を測定し、以下の式 (5-1) より算出した。

$$\text{含水率 (\%)} = \left(\frac{W1 - W2}{W1 - W0} \right) \times 100 \cdots \text{式 (5-1)}$$

W0: 秤量瓶の重量 (g)

W1: 湿潤土及び秤量瓶の重量 (g)

W2: 乾燥土及び秤量瓶の重量 (g)

強熱減量は、含水率の測定に供試した乾燥試料をるつぼに約 2 g 測り取り、マッフル炉中で $750 \pm 5^{\circ}\text{C}$ で 1 時間強熱し、放冷後、質量を測定し、式 (5-2) より算出した。

$$\text{強熱減量 (\%)} = \left(\frac{W_a - W_b}{W_a - W_c} \right) \times 100 \cdots \text{式 (5-2)}$$

Wa: 105°Cによる乾燥土及びるつぼの重量 (g)

Wb: 750°Cによる乾燥土及びるつぼの重量 (g)

Wc: るつぼの重量 (g)

Chl.a 濃度は、JIS K 0400-80-10[187]を一部修正した方法で測定した。底質試料約 5 g を蓋付き試験管に分取し、90%エタノール 20 mL を添加し、75°Cで 15 分湯煎した。その後、室温で 15 分間放冷し、抽出液 10 mL を 10 mL 試験管に移し、1500 ×g で 10 分間遠心分離した。抽出液を別の 10 mL 試験管に 5 mL 移し、さらに別の試験管に 5 mL 移した。片方の 10 mL 試験管に 3 μM 塩酸を 5 μL 添加し、よく混合させて酸性化した。その後、分光光度計 UV1240 (島津製作所) で 665 nm、750 nm の吸光度を測定し、式 (5-3) より Chl.a 濃度を算出した。

$$\text{Chl.a 濃度 } (\mu\text{g g}^{-1}) = \frac{C - C_0}{K_c} \times \frac{R}{R - 1} \times \frac{V_e \times 1000}{(W_w \times W_d) \times d} \quad \dots \text{式 (5-3)}$$

C : (665 nm の吸光度) - (750 nm の吸光度)

C₀ : (HCl 酸性化後の 665 nm の吸光度) - (HCl 酸性化後の 750 nm の吸光度)

K_c : Chl.a の吸光計数 (82 L μg⁻¹ cm⁻¹, [188])

R : 酸性条件でフェオフィチンに変換された純 Chl.a 溶液の C / C₀ 比 (1.7, [188])

V_e : 抽出液量 (20 mL)

W_w : 底質試料の湿重量 (g)

W_d : 底質試料の乾土率 (%)

d : 吸収セルの光路長 (1 cm)

有機態炭素含有率は、CHN 有機元素分析装置 CHN628 (Leco) により分析した底質試料を凍結乾燥させた後、底質粒子の中央粒径は、マイクロトラック MT3300EXII (日機装) により分析した。

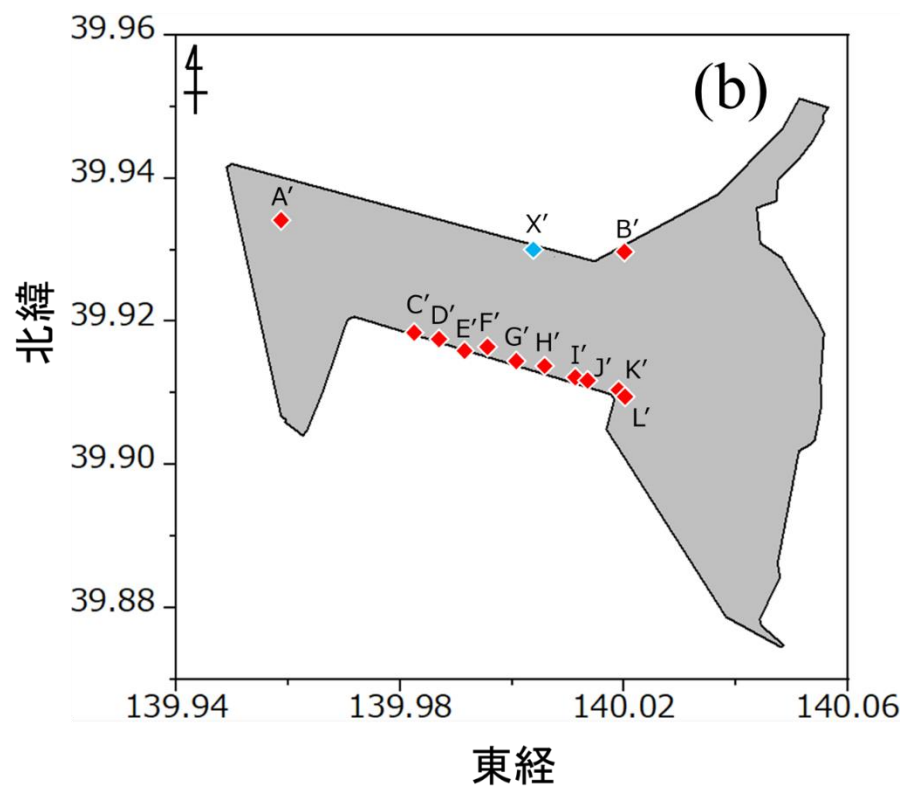
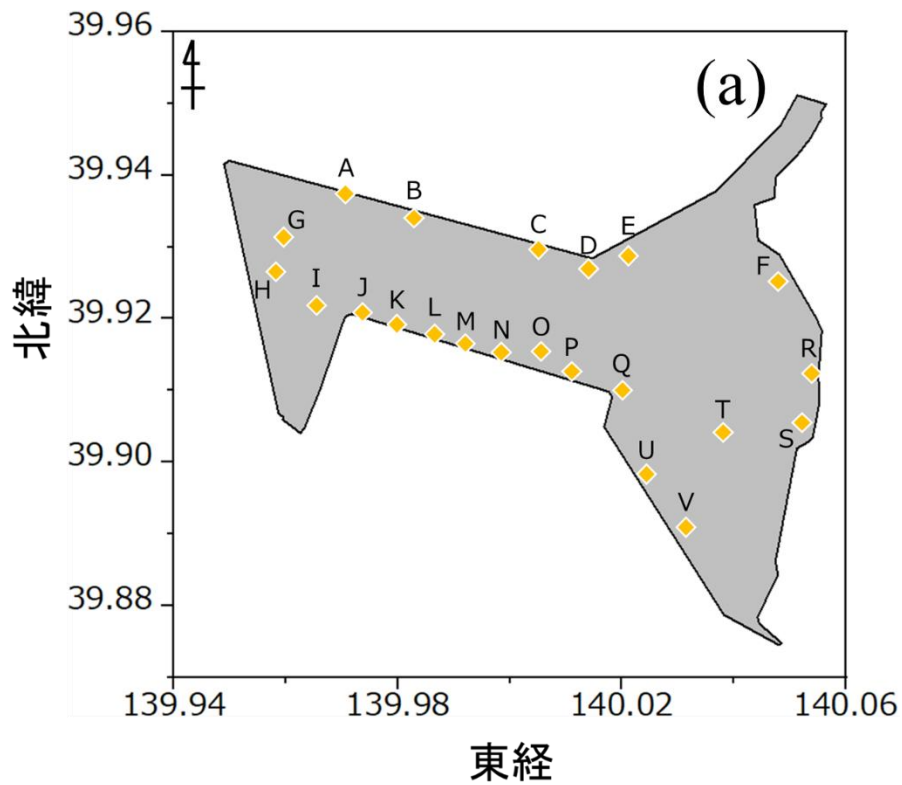


図 5-3 八郎湖沿岸部全域 22 地点における紐状担体を用いた eDNA 調査の試料採取地点(2021 年 7 月 2 日)及び八郎湖における貝けた網を用いたタテボシガイ成員の密度調査地点(2021 年 9 月 5 日)

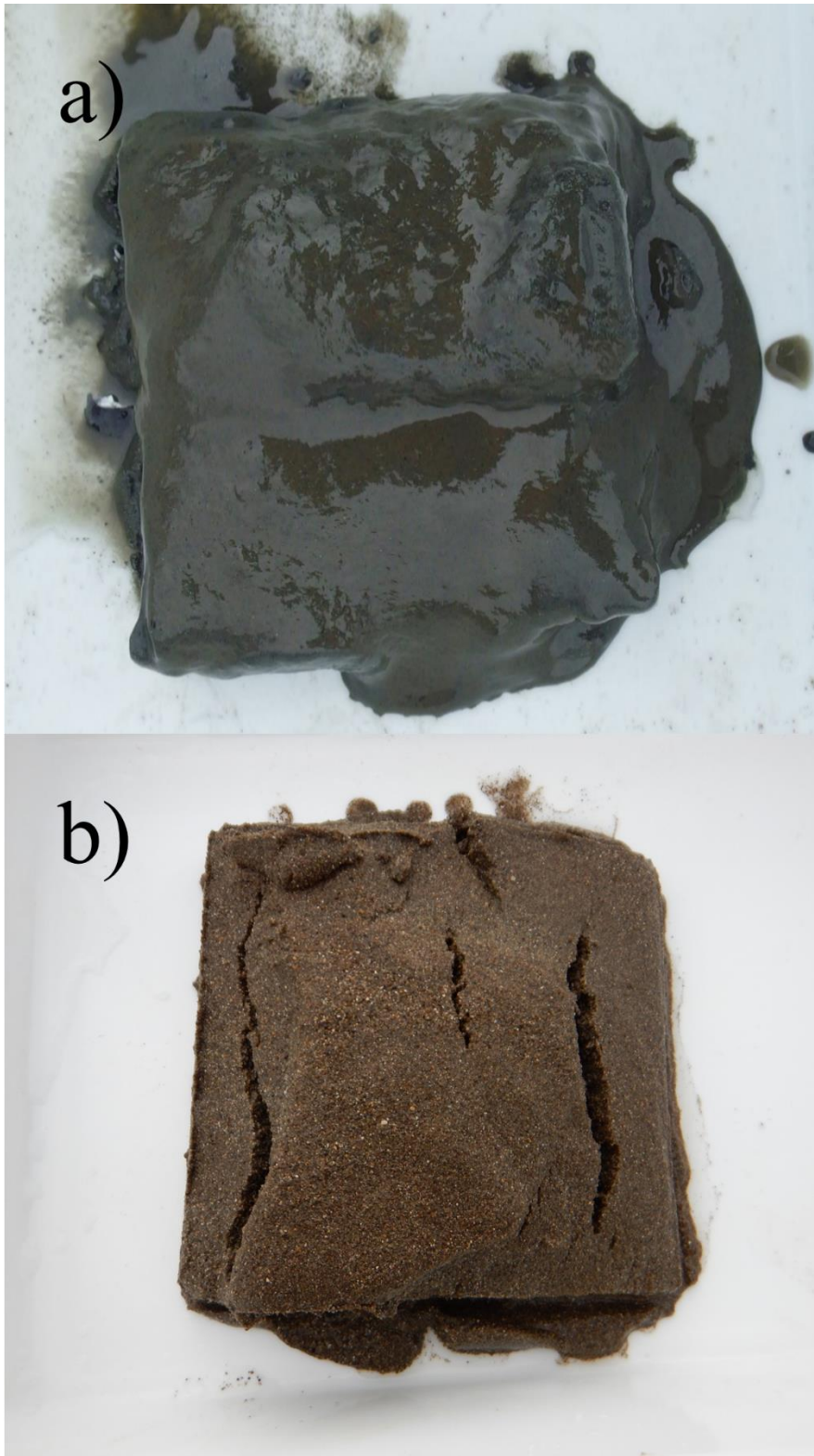


写真 5-4 八郎湖で見られる泥質状(a)及び砂質状(b)の底質

第3節 結果及び考察

5-3-1 湖水試料を対象としたタテボシガイ eDNA の検出(2019 年)

八郎湖全域 8 地点を対象とした本調査では、全ての地点でタテボシガイの eDNA を定量することができなかった。八郎湖ではタテボシガイの生息密度は最大 0.56 個体 m^{-2} と報告されている[167]。第 4 章の水槽実験において eDNA の検出定量に必要な最低のタテボシガイの密度は 1.3 個体 m^{-2} と推算されていたが、おそらく、個体密度が低い場合、eDNA を検出定量できなかったと考えられた。

既往研究では、底層水の採水[131, 133, 139]やグロキディウム幼生放出時期の採水[130, 131]によって、eDNA の検出定量が改善されるという報告があったが、両方の条件を満たしている本調査において eDNA を定量できなかったため、調査方法にさらなる改良が必要であることが明らかとなった。

5-3-2 湖水試料と紐状担体試料から得られた eDNA 濃度の比較(2020 年)

湖水試料中のタテボシガイの eDNA は、いくつかの調査地点で $(0.017-1.1) \times 10^3$ copies $[5 \mu L \text{ template DNA}]^{-1}$ の幅広い濃度範囲であった(図 5-4a~e)。湖水試料では、グロキディウム幼生の放出時期である 6~7 月[169]にのみ eDNA が検出された(図 5-4a~e)。eDNA の検出地点数は、7 月 5 日が最も多く(10 地点のうち 4 地点)、次いで 7 月 26 日(5 地点のうち 3 地点)、6 月 21 日(9 地点のうち 2 地点)の順であった(図 5-4b~d)。eDNA の検出地点は試料採取日で大きく異なったが、地点 B では常に eDNA が検出された(図 5-4b~d)。一方で、幼生放出期間外とされる 5 月と 8 月では、eDNA を定量することはできなかった(図 5-4a,e)。2019 年の八郎湖全域での調査では、幼生放出時期とされる 6 月に調査したにも関わらず eDNA を検出できなかった。しかし、本調査では 6 月に eDNA を検出できた(図 5-4b)。この理由はおそらく、幼生放出の時期が前後したか、もしくは、同じ南岸域の調査地点が 2019 年の全域調査では 1 地点のみであったため(図 5-1、No.06)、検出できなかった可能性が考えられた。

グロキディウム幼生の捕集を目的とした紐状担体サンプル中のタテボシガイの eDNA は、5 月 31 日、6 月 21 日、7 月 5 日、7 月 26 日に検出された(図 5-4f~j)。ただし、5 月 31 日に検出されたのは、地点 A のみであった $(5.6 \times 10^3 \text{ copies } [5 \mu L \text{ template DNA}]^{-1})$ (図 5-4f)。6 月 21 日、7 月 5 日、7 月 26 日には、紐状担体を設置した全地点で eDNA が検出された(図 5-4g~i)。それぞれの濃度範囲は、6 月 21 日では、 $(0.013 \sim 1.9) \times 10^4 \text{ copies } [5 \mu L \text{ template DNA}]^{-1}$ 、7 月 5 日では、 $(0.076 \sim 7.8) \times 10^3 \text{ copies } [5 \mu L \text{ template DNA}]^{-1}$ 、7 月 26 日では $(0.092 \sim 1.1) \times 10^4 \text{ copies } [5 \mu L \text{ template DNA}]^{-1}$ であった(図 5-4g~i)。8 月 26 日には、全ての地点で eDNA を検出することはできなかった(図 5-4j)。したがって、幼生放出時期から外れている 5 月と 8 月では、湖水試料(図 5-4a, e)と紐状担体試料(図 5-2f, j、5 月の A 地点を除く)で eDNA を検出できなかったことから、グロキディウム幼生が eDNA の検出に影響を与えていることが示された。

6 月 21 日に行った 4 地点(A、B、F、及び J 地点)での顕微鏡検査では、実際に紐

状担体に付着する幼生を観察した（図 5-5）。それぞれの地点において、10、1、10、及び2個体のグロキディウム幼生が得られた（図 5-5）。それらのグロキディウム幼生のサイズは 171~198 μm であり（図 5-5）、これまでに報告されているタテボシガイのグロキディウム幼生の大きさと一致していた[165]。これらがタテボシガイのグロキディウム幼生か確かめるために、地点ごとに回収された幼生をまとめて qPCR を行った結果、それぞれの地点から得られた DNA 濃度は 5.3×10^4 、0、 4.2×10^4 、及び 3.8×10^3 copies [5 μL template DNA] $^{-1}$ であった（図 5-5）。A、F、並びに J 地点の試料から DNA を検出し、グロキディウム幼生はタテボシガイであることが確かめられた（図 5-5）。1 個体のグロキディウム幼生が観察された B 地点でのみ、DNA を定量できなかったが、個体数が少なかったために qPCR で DNA が増幅されなかった可能性があった（図 5-5）。紐状担体試料から得られた eDNA 濃度は、紐状担体から幼生を単離してから qPCR を行った場合に得られた濃度と比較して、やや低い傾向にあった（図 5-4f~j, 5-5）。この理由は抽出方法の違いによるものと考えられる。紐状担体試料は、湖水試料との比較のために eDNA の抽出方法に従ったため、抽出のための加温時間が 1 時間であった。一方で、単離されたグロキディウム幼生は組織 DNA の抽出方法に従ったため、抽出のための加温時間は 3 時間であった。

第 4 章の水槽実験による予想では、eDNA の定量化には少なくともその場のタテボシガイの密度が 1.3 個体 m^{-2} 以上必要であった。しかし、本調査で 6~7 月に湖水試料で見出されたタテボシガイの eDNA 濃度を湖水 1 mL 当たりに換算すると、(0.030~7.8) copies mL^{-1} となり、第 4 章の水槽実験の結果を基に計算すると、0.56~35 個体 m^{-2} のタテボシガイから放出された DNA の量に相当していた。したがって、本調査で観測された eDNA は、八郎湖で報告されているタテボシガイの密度 0.56 個体 m^{-2} [165]を考慮するとかなり高い値であった。堆積物が湖水中に巻き上がった場合に二枚貝の糞や偽糞が eDNA 源になる可能性があったが[131]、5 月と 8 月には湖水試料からタテボシガイの eDNA は得られなかったため、湖水中の eDNA の存在は一過的なものであった（図 5-2a~e）。したがって、6~7 月に湖水及び紐状担体試料から回収された eDNA は、グロキディウム幼生由来であると推察された。

以上より、湖水試料から検出定量が困難であったタテボシガイの eDNA をグロキディウム幼生放出時期に紐状担体を用いてグロキディウム幼生を捕集することで検出定量を可能とした。今後、本手法が淡水二枚貝を用いたバイオマニピュレーションの適用において、生息密度や分布域を定期的にモニタリングするため手法として湖沼環境に適用されることが期待された。また、タテボシガイを含むイシガイ科は、河川改修、栄養塩及び重金属などによる汚染、乱獲、食害、外来種による侵略、並びに気候変動によって世界中で減少しており[221, 237, 238]、愛媛県国近川水系では、25 年間でイシガイの個体密度が 100 分の 1 以下になったことが報告されている[221]。したがって、イシガイ科二枚貝の保全を目的としたモニタリング調査への波及効果も期待された。

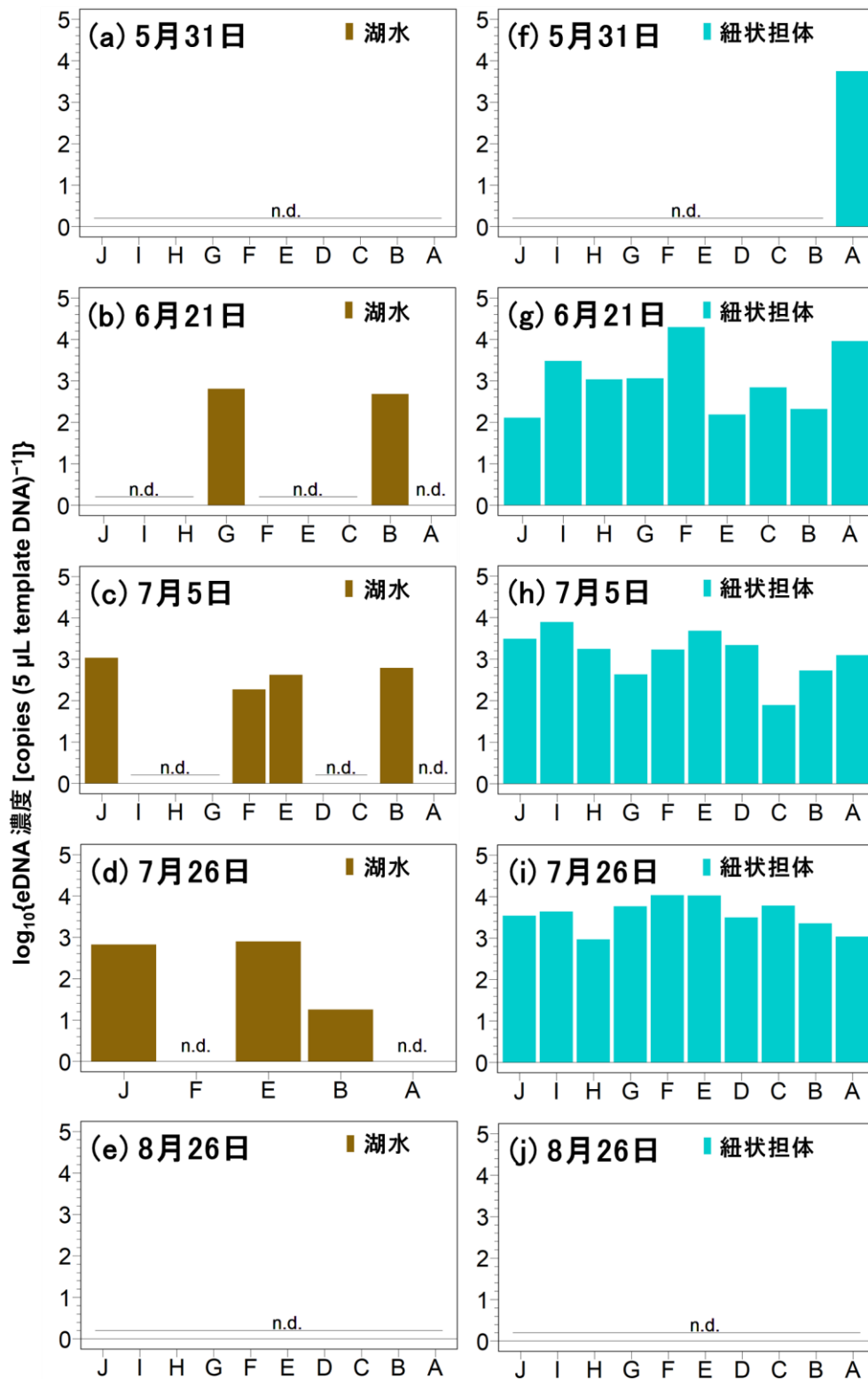


図 5-4 湖水試料(a~e)及び紐状サンプル(f~j)から定量されたタテボシガイ eDNA(n.d.は非検出を表す)

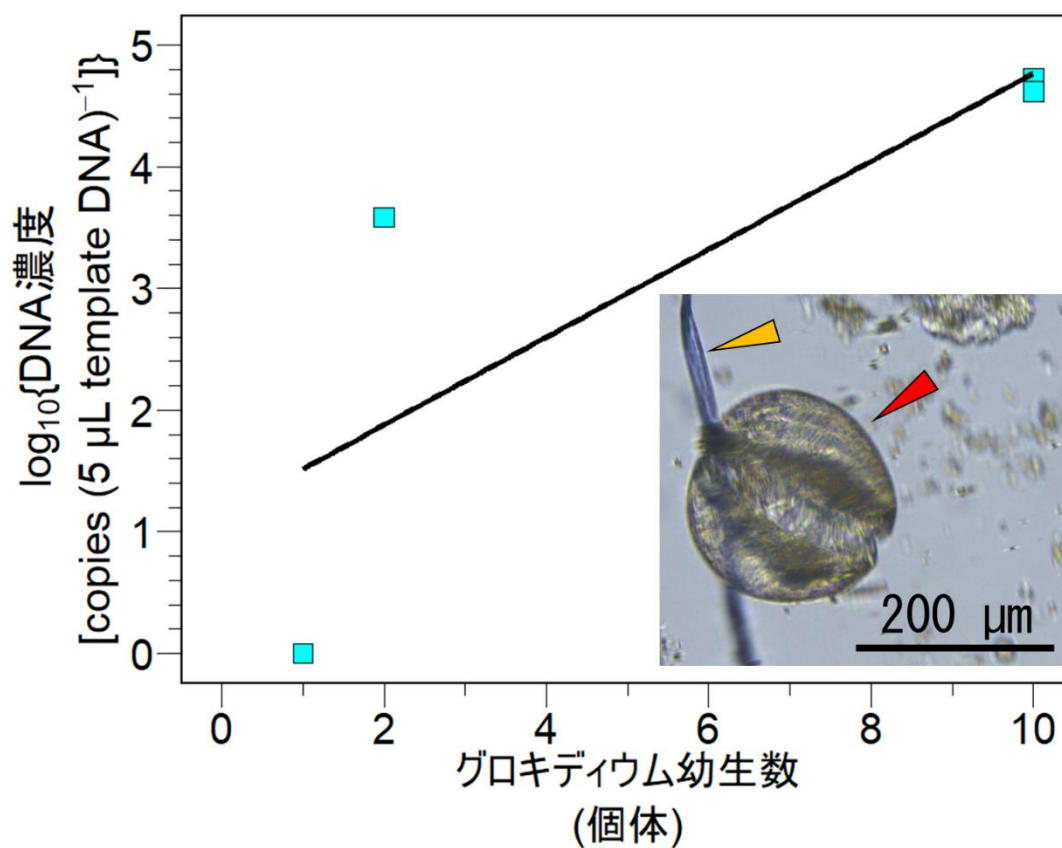


図 5-5 単離したグロキディウム幼生の個体数とそれらから得られた DNA 量の関係及び紐状担体繊維(黄色の矢印)に付着するグロキディウム幼生(赤色の矢印)の顕微鏡写真

5-3-3 グロキディウム幼生由来 eDNA 検出系の八郎湖への適用

八郎湖沿岸部の 22 地点において紐状担体を設置し、グロキディウム幼生由来 eDNA の検出定量を試みた。その結果、22 地点のうち 8 地点でタテボシガイの eDNA を検出できた (図 5-6)。5-3-1 で得られた結果と同様に、八郎湖の南岸部において高い eDNA が得られた (図 5-6)。ただし、5-3-1 で得られた結果では、南岸部であれば幼生放出時期に常に全ての地点で eDNA を得られていたが (図 5-4g~i)、本調査では南岸部の一部の地点で eDNA を得られなかった地点があった (図 5-6)。また、八郎湖の西側の 2 地点において eDNA が検出されたが、それ以外の北側や東側の地点では eDNA は得られなかった (図 5-6)。定量された eDNA 濃度の範囲は、 $(0.014\sim 3.4) \times 10^5$ copies 担体 m^{-1} ($(0.069\sim 1.7) \times 10^4$ copies $[5 \mu L \text{ template DNA}]^{-1}$ に相当) であり、5-3-1 で得られた結果と同等であった (図 5-4, 5-6)。したがって、幼生の放出状況は昨年とほとんど変わっていないと推察された。

また、貝けた網を用いた密度調査は 12 地点で行った (図 5-7)。12 地点のうち 7 地点でタテボシガイの生息が確認された (図 5-7)。南岸東部と南岸中央部においてタテボシガイが確認された他、北部の 1 地点でも 0.56 個体 m^{-2} の比較的高い密度で生息する地点が見つかった (図 5-7)。南岸東部と南岸中央部では、比較的高い eDNA が得られたが、北部ではタテボシガイの存在が確認されたのに対し、eDNA は定量されなかった (図 5-6, 5-7)。成貝の密度調査は行われていないが、eDNA が得られた八郎湖の西側の 2 地点については、潜在的な生息域の候補として今後生息状況を調査する必要がある。

紐状担体を用いて得られた eDNA と採捕調査で得られた密度は、調査地点の位置が一致していないため、相関解析などで直接関係を見ることはできなかった。しかし、生息が認められた地点では高い eDNA が得られており、この南岸部一帯 (図 5-2Q~K、図 5-3C'~L') に注目すると、得られた eDNA と個体密度のピークが一致しており、概ね eDNA によって生息域を推定できることが示された。南岸域以外では、eDNA と個体数密度は一致していないが、タテボシガイの生息域が局所的であることから eDNA が検出できなかった可能性が考えられた。グロキディウム幼生は自己遊泳機能を有していないため、水流により分散する。Benedict らは、グロキディウム幼生の生存期間は水温が高いほど短くなることを明らかにしており、*Unio crassus* では $20^{\circ}C$ において 3 日目に生存率が 50%以下になり、5 日目に 0%になったことを報告している [239]。この報告によれば、八郎湖でグロキディウム幼生は放出後、数日は生存していると推察され、この間分散している可能性がある。しかし、図 5-8 を見るとグロキディウム幼生由来の eDNA には明らかな濃度勾配が見られ、八郎湖でのグロキディウム幼生の分散性はそれほど高くないと考えられた。

以上より、これまでいくつかの研究で低密度で生息する淡水二枚貝の eDNA 検出 [158]や eDNA による密度推定 [157]は困難であるとされ、eDNA を用いた淡水二枚貝のモニタリングの課題であったが、紐状担体を用いてグロキディウム幼生由来の eDNA を捕集することで生息域を概ね推定できることを示した。また、底質が泥質の

ために採捕調査が困難であった地点において eDNA を検出したことから、これまで調査が困難とされてきた区域で eDNA を用いたモニタリング調査が実施できる可能性が示された。したがって、本手法を用いた淡水二枚貝イシガイ科の網羅的な密度調査への適用が期待された。

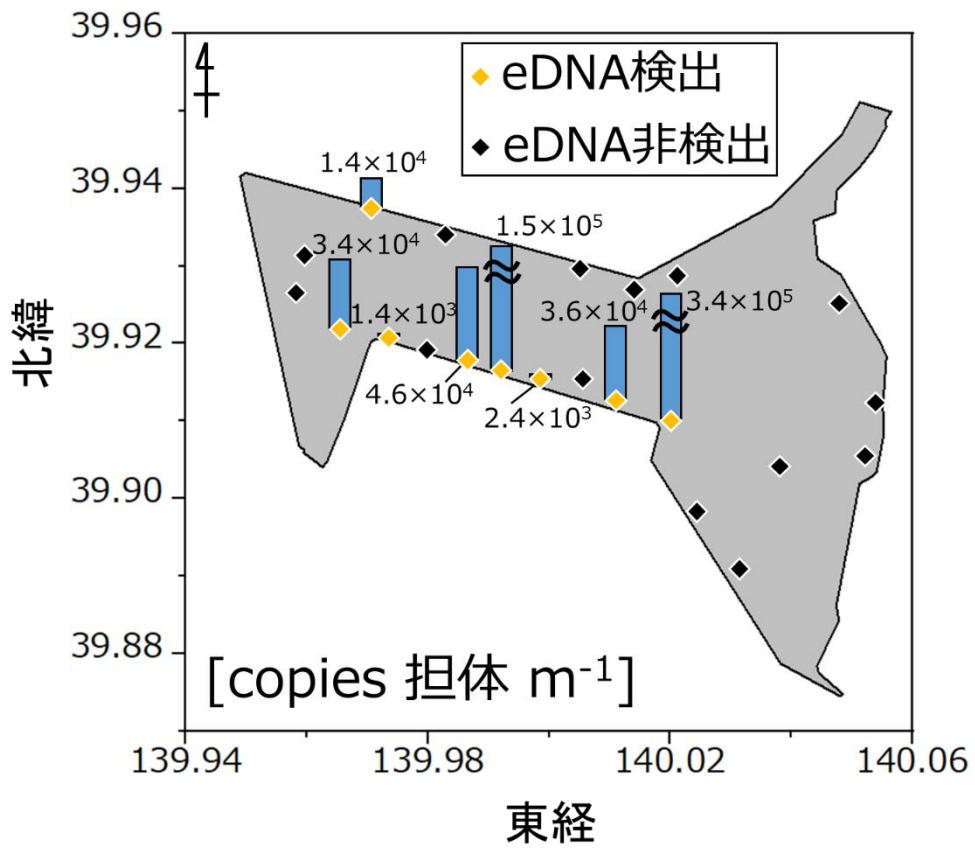


図 5-6 紐状担体から得られた八郎湖沿岸部 22 地点における eDNA 濃度

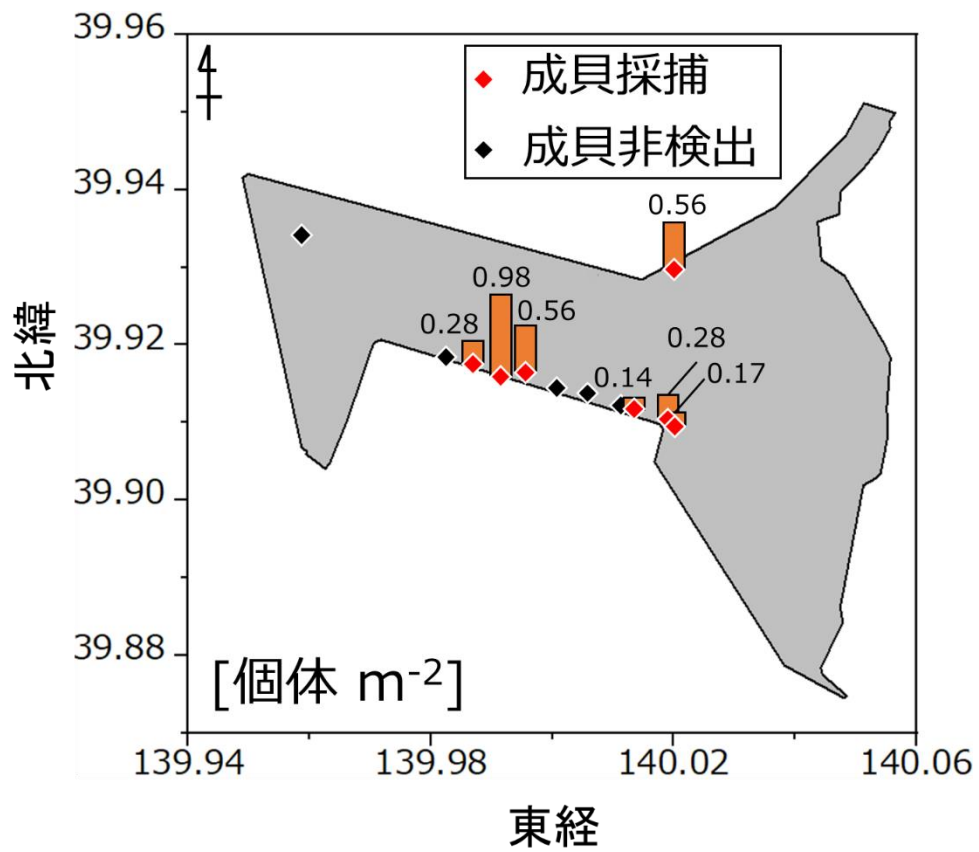


図 5-7 貝けた網によるタテボシガイ成員調査から得られた八郎湖 12 地点における個体密度

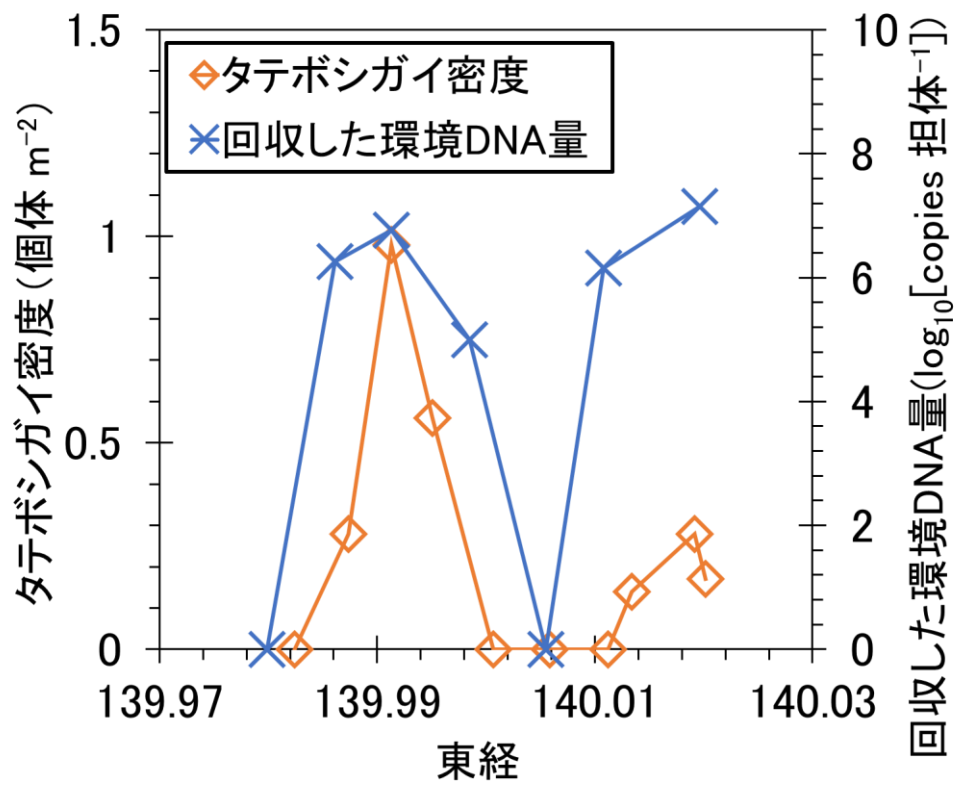


図 5-8 南岸部に着目した得られた eDNA とタテボシガイ成貝密度の関係

5-3-4 タテボシガイ成貝の密度調査地点における各環境因子

タテボシガイ成貝の個体密度調査と同時に湖水試料や底質試料も採取し、個体密度に影響を及ぼす因子について調べた(表 5-1)。測定した各環境因子に対して主成分分析を行ったところ、個体密度を示すプロットが PC2 軸方向に発散していた(図 5-9)。したがって、水温、水中の溶存酸素、水中の全窒素濃度、水中の全リン濃度は、個体密度に影響しないことが示唆された(図 5-9)。一方で、PC1 軸方向に注目すると、個体密度を示すプロットは底質の中央粒径にやや偏って分布していた(図 5-9)。そこで、個体数密度と底質の中央粒径に着目すると、有意な正の相関関係にあることが示された($\rho = 0.627$, $P = 0.021$; 図 5-10)。したがって、底質の中央粒径が大きいほど、個体密度が高い傾向にあることが示された。イシガイ科二枚貝では、細かい粒子を含む泥質は自重で沈みやすく、位置や姿勢を維持するために多くのエネルギーを消費することが報告されている[240-242]。また、アサリの幼生は、0.11~2.00 mm の粒径の底質環境において、比較的粒径の大きい 0.85~2.00 mm の画分で着底にピークが見られたことが報告されており[243]、ヤマトシジミの稚貝についてもシルト含有率が 5% 以下、すなわち細かい粒子が少ない場所で密度が高かったことが報告されている[244]。したがって、底質の粒径は二枚貝の個体密度に影響することが示唆される。さらに、海水二枚貝コタマガイは斜面を好むことが知られており、底質地形も密度に影響を与えると考えられる[245]。したがって、今後、タテボシガイに好適な粒径を特定することや好適な地形を解析することで、再生産と定着及び個体密度の増強などの課題克服のためのデータが得られると考えられた。

表 5-1 タテボンガイの成貝密度の調査地点における環境因子

地点	密度 (個体 m ⁻²)	水質					底質				
		水温 (°C)	溶存酸素 (mg L ⁻¹)	Chl. <i>a</i> 濃度 (µg L ⁻¹)	全窒素 (mg L ⁻¹)	全リン (mg L ⁻¹)	含水率 (%)	強熱減量 (%)	Chl. <i>a</i> 濃度 (µg L ⁻¹)	有機態炭素 含有率(%)	中央粒径 (µm)
A'	0	23.8	7.2	74	1.136	0.088	29.7	2.1	0.5	0.15	276.9
B'	0.56	23.6	5.6	88.9	1.169	0.105	29.7	1.6	0	0.09	361.7
C'	0	23.9	6.1	59.2	0.989	0.081	33	2	0.1	0.18	248.4
D'	0.28	23.7	7.3	71.1	1.014	0.088	36.2	2.3	0	0.19	216.0
E'	0.98	23.8	7.1	75	0.98	0.089	33.3	2.1	0.2	0.2	329.2
F'	0.56	23.4	7.6	67.1	1.073	0.088	30.1	2	0.3	0.13	359.0
G'	0	23.1	6.4	82.9	1.107	0.095	30.9	2.1	0	0.13	287.4
H'	0	23.1	7	59.5	1.014	0.097	30.7	2	0.1	0.16	310.3
I'	0	23	1	98.7	1.163	0.112	29.9	1.6	0	0.72	217.2
J'	0.14	23.2	6.5	79	1.062	0.105	30.4	1.8	0.3	0.15	293.3
K'	0.28	23.5	7.5	71.1	1.026	0.097	29.6	1.7	0	0.2	315.4
L'	0.17	23.6	7	75	1.059	0.099	29.9	1.7	0.2	0.18	273.9
X'	0	23.9	5	50.1	1.094	0.104	56.3	5.4	1.9	1.44	21.0

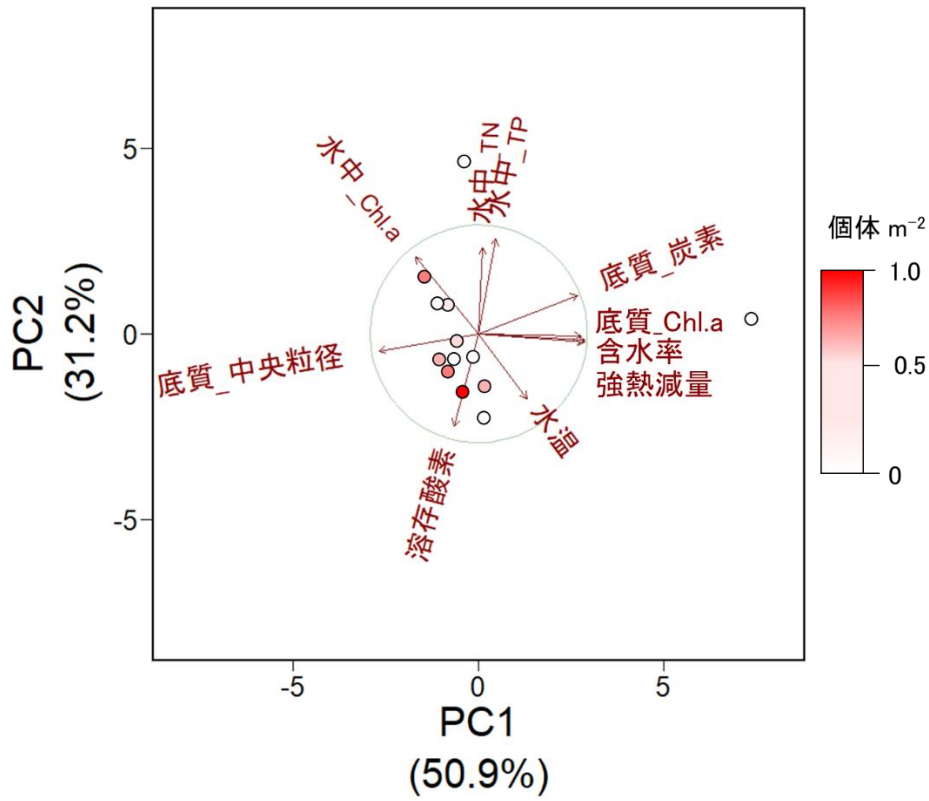


図 5-9 タテボシガイの密度と環境因子に関する主成分分析の結果

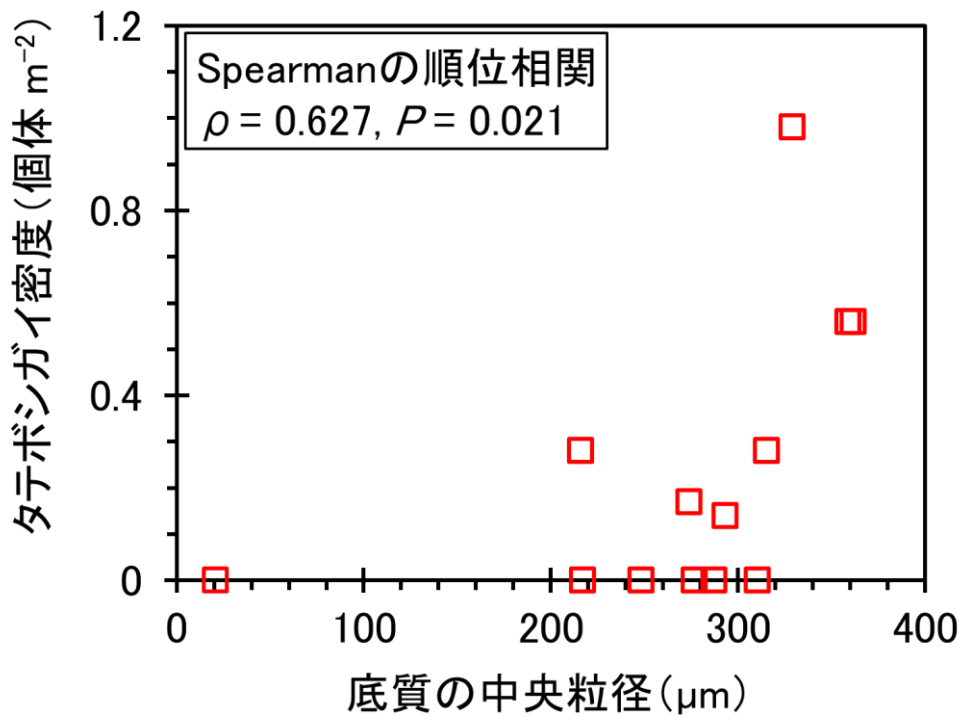


図 5-10 タテボシガイ成員の個体密度と底質の中央粒径の関係

第4節 要約

本章では、富栄養化湖沼において eDNA 手法を適用してタテボシガイをモニタリングするため、はじめに 1) 富栄養化湖沼八郎湖においてタテボシガイの eDNA の検出を試みた。しかし、調査した全ての地点で eDNA を検出できなかったため、次に 2) グロキディウム幼生由来の eDNA を回収する新規手法(紐状担体を用いたグロキディウム幼生回収手法)を考案し、八郎湖への適用を検討した。これにより、グロキディウム幼生由来の eDNA を検出できたため、最後に 3) 紐状担体によって回収された eDNA 量とタテボシガイ成員の密度の関係性を調べた。

1) 富栄養化湖沼八郎湖におけるタテボシガイの eDNA の検出では、湖水試料を対象として八郎湖全域 8 地点において eDNA の検出定量を試みた。しかしながら、既往研究で eDNA の検出率や定量濃度の改善が見られた底層水の採水[131, 133, 139]及びグロキディウム幼生放出時期での採水[130, 131]にもかかわらず、調査した全ての地点で eDNA を検出定量することはできなかった。したがって、調査方法にさらなる改良が必要であることが明らかになった。

2) グロキディウム幼生由来の eDNA を回収する新規手法の八郎湖への適用では、タテボシガイが繁殖期(6~7月)に大量に放出するグロキディウム幼生に着目し[164, 168]、このグロキディウム幼生を排水処理で生物膜付着担体として用いられる紐状ろ材(紐状担体)を用いて捕集し、eDNA の定量性を向上できるか検討した。湖水試料から検出定量が困難であったタテボシガイの eDNA をグロキディウム幼生放出時期に紐状担体を用いてグロキディウム幼生を捕集することで検出定量が可能となった。さらに、顕微鏡観察と qPCR によって、紐状担体に付着したグロキディウム幼生がタテボシガイであったことも確かめた。

3) 紐状担体によって回収された eDNA 量とタテボシガイ成員の密度の関係性では、八郎湖沿岸全域に紐状担体を設置して得られた eDNA 量と貝けた網を使用して得られたタテボシガイの成員密度を比較した。これまで低密度で生息する淡水二枚貝の eDNA 検出[239]や eDNA による密度推定[157]は困難であるとされ、eDNA を用いた淡水二枚貝のモニタリングの課題であった。しかし、本研究では、紐状担体を用いてグロキディウム幼生由来の eDNA を捕集することで生息域を概ね推定できることを示した。

本章で確立した eDNA を用いた湖沼におけるモニタリング手法は、低密度で生息する淡水二枚貝の eDNA の検出定量が困難であるという課題を克服しており、淡水二枚貝を用いたバイオマニピュレーションを目的とした生息密度や分布域のモニタリング調査及び個体密度の減少が著しい淡水二枚貝の保全を目的としたモニタリング調査への波及効果が見込まれ、水質保全及び保全生態学分野横断した学術的インパクトが期待された。

第6章 総合考察及び展望

第1節 総合考察

淡水環境におけるアオコの発生は世界的な問題であり、今後温暖化の進行とともにその被害は拡大していく恐れがある[21, 22]。アオコ防除のための手法として淡水二枚貝を用いたバイオマニピュレーションが検討されている。しかしながら、数か月におわたる長期的なアオコ発生時の藍藻資化能力、湖沼環境中での藍藻資化能力、及び排泄物中の藍藻の細胞活性が評価されていないことが淡水二枚貝を用いたバイオマニピュレーションを推進する上での課題であった。さらに、淡水二枚貝を用いたバイオマニピュレーションでは、淡水二枚貝をその環境に定着させる必要があり、生息密度や分布域を定期的にモニタリングすることが求められる。時限探索調査[161, 162]、コドラート調査[161, 163, 164]、及びシュノーケリング調査[161, 164]等の既存のモニタリング手法は、調査地が広域である場合や水深が深い場合には調査が困難であり、淡水二枚貝を直接採捕するため生息地のかく乱のリスクがあることから、より簡便で非侵襲的な調査手法の開発が求められる[163]。そこで、環境DNA (eDNA) を用いた湖沼におけるモニタリング手法の確立を試みた。淡水二枚貝における eDNA 手法の適用では、淡水二枚貝の eDNA の放出源が不明であること、低密度で生息する淡水二枚貝の eDNA の検出定量が困難であることなどの課題があった。したがって、本研究では、これらの課題解決に取り組んだ。課題解決に当たって、日本に生息する淡水二枚貝のうち、国内で最も広域に生息する淡水二枚貝の1種であるタテボシガイ[165]を研究対象とした。

第2章では、はじめに、短期的な室内実験による藍藻資化速度の定量を行い、タテボシガイに藍藻資化能力があるかを検討した。その後、室内実験によって淡水二枚貝を用いたバイオマニピュレーションを推進する上での課題となっている長期的な藍藻資化能力と排泄物中の藍藻の細胞活性を評価した。

その結果、短期的な室内実験による藍藻資化速度の定量では、タテボシガイが藍藻 *M. aeruginosa* をろ過及び資化可能であることが初めて示された。さらに、¹⁵N 標識した藍藻 *M. aeruginosa* を 80 日間タテボシガイに給餌した長期的な藍藻資化能力のモニタリングでもタテボシガイ筋組織中への ¹⁵N の蓄積が認められた。これまで最大3週間での淡水二枚貝の藍藻資化は検討されていたが[108]、本研究によって初めて淡水二枚貝タテボシガイが 60 日間平均藍藻資化効率 47%を維持したことが示された。さらに、脂肪酸組成によって藍藻資化を評価した結果、EPA に対する LA 及び ALA の比率を使用して二枚貝の藍藻資化を評価できることが明らかとなり、湖沼環境中での藍藻資化の実態に関する調査への適用が期待された。また、排泄物中の藍藻の細胞活性の評価では、タテボシガイの排泄物にフルオレセインジアセテート (FDA) を添加し、活性細胞を染色することによって評価した。その結果、摂取した藍藻細胞のうち 2% の藍藻生細胞を排泄するが、97%を資化及び消化によって除去し、1%を死細胞として不活化することが明らかとなった。また、これまで排泄物中の藍藻細胞の活性を評価

することは困難とされてきたが[100]、FDA を用いることで評価可能になることが示された。

第3章では、はじめに、湖沼環境におけるタテボシガイの藍藻資化の実態を明らかにするため、富栄養化湖沼八郎湖における藍藻類の鉛直移動を調査し、タテボシガイの生息域である湖沼底層部に藍藻類が移動するかを検討した。その後、富栄養化湖沼八郎湖沿岸部で飼育試験を行い、課題である湖沼環境中での藍藻資化能力について評価した。

その結果、富栄養化湖沼八郎湖における藍藻類の鉛直移動の調査では、これまで湖沼沿岸部の水深 1 m 以浅の浅い水域における藍藻類の鉛直移動の実態は不明であったが、フィラメント状の藍藻 *Oscillatoria* 属は混合する水塊とともに移動し、コロニー状の藍藻 *Microcystis* 属は日周鉛直移動によってタテボシガイが生息する底層部へ移動することが明らかになった。富栄養化湖沼沿岸部でのタテボシガイの飼育実験では、第2章の成果に基づき二枚貝中の EPA に対する LA 及び ALA の比率を使用して、湖沼環境中においてタテボシガイが藍藻を資化していることを示した。また、本脂肪酸比を使用して初めて約 2 ヶ月間アオコが発生している湖沼でタテボシガイが藍藻を資化し続けたことを明らかにした。

第4章では、eDNA を用いた湖沼におけるモニタリング手法の確立のため、はじめに、タテボシガイの eDNA を種特異的に検出するためにミトコンドリアシトクロム c 酸化酵素サブユニット I 遺伝子領域を標的としたオリゴヌクレオチドプライマーの設計を行った。その後、水槽実験により、タテボシガイ eDNA の放出特性の評価を行い課題である eDNA 源の放出源を特定した。

その結果、タテボシガイ種特異的オリゴヌクレオチドプライマーの設計では、タテボシガイ、他のイシガイ科 8 種、シジミ科 3 種、アサリ、並びに巻貝 4 種の DNA を作製したプライマーとともに PCR し、タテボシガイへの種特異性が示された。水槽実験による eDNA の放出特性の評価では、タテボシガイの eDNA 放出速度は、水槽内のバイオマスと概ね相関するが ($r=0.72, P=0.02$)、DIN ($r=0.81, P=0.004$) 並びに DIP ($r=0.86, P=0.001$) 放出速度とより強い相関関係にあることを明らかにした。したがって、これまで淡水二枚貝の eDNA の放出源は明らかにされていなかったが、eDNA の放出源が排泄物であることを初めて明らかにした。

第5章では、タテボシガイが低密度で生息する富栄養化湖沼八郎湖において、課題である低密度で生息する淡水二枚貝の eDNA の検出定量に取り組んだ。はじめに富栄養化湖沼八郎湖において湖水試料を対象としてタテボシガイ eDNA の検出定量を試みた。次に、グロキディウム幼生由来の eDNA を回収する新規手法（紐状担体を用いたグロキディウム幼生回収手法）を考案し、八郎湖への適用を検討した。最後に、紐状担体によって回収された eDNA 量とタテボシガイ成貝の密度を比較した。

その結果、湖水試料を対象としてタテボシガイ eDNA の検出定量では、調査した全ての地点で eDNA を検出できなかった。既往研究で eDNA の検出率や定量濃度の改善が見られた底層水の採水[131, 133, 139]及びグロキディウム幼生放出時期での採水

[130, 131]にもかかわらず、調査した全ての地点で eDNA を検出定量することはできなかったことから、調査方法にさらなる改良が必要であることが明らかになった。グロキディウム幼生由来の eDNA を回収する新規手法の八郎湖への適用では、タテボシガイが繁殖期（6～7月）に大量に放出するグロキディウム幼生に着目し[165, 169]、このグロキディウム幼生を排水処理で生物膜付着担体として用いられる紐状ろ材（紐状担体）を用いて捕集し、eDNA の定量性を向上できるか検討した。湖水試料から検出定量が困難であったタテボシガイの eDNA をグロキディウム幼生放出時期に紐状担体を用いてグロキディウム幼生を捕集することで検出定量が可能となった。紐状担体によって回収された eDNA 量とタテボシガイ成貝の密度の比較では、紐状担体を用いてグロキディウム幼生由来の eDNA を捕集することで生息域を概ね推定できることを示した。

以上より課題とそれに対する本研究の成果をまとめると、以下のようになる。

課題 1) 長期的な藍藻資化能力が明らかでない

タテボシガイは 60 日間平均藍藻資化効率 47%を維持できた。

課題 2) 環境中での藍藻資化の実態が不明

二枚貝中の EPA に対する LA 及び ALA の比率から約 2 ヶ月間アオコが発生している湖沼でタテボシガイが藍藻を資化し続けた。

課題 3) 排泄物中の藍藻細胞の活性が評価されていない

排泄物にフルオレセインジアセテート (FDA) を適用することにより評価可能となり、摂取した藍藻細胞のうち 2%の藍藻生細胞を排泄するが、97%を資化及び消化によって除去し、1%を死細胞として不活化した。

課題 4) 淡水二枚貝の eDNA の放出源が不明

淡水二枚貝の eDNA の放出源は排泄物であった。

課題 5) 低密度で生息する淡水二枚貝の eDNA の検出定量が困難

紐状担体を用いてグロキディウム幼生由来の eDNA を捕集することで生息域を概ね推定できた。

第2節 展望

本研究では、淡水二枚貝の藍藻資化能力についてタテボシガイに着目し、資化速度の定量、標識元素の蓄積、EPA に対する LA 及び ALA の比率、及び FDA による藍藻細胞の活性評価など様々な側面からタテボシガイの藍藻資化能力を評価した。本研究で使用した様々な評価手法は他の淡水二枚貝にも適用可能であり、淡水二枚貝を用いたバイオマニピュレーションによる藍藻防除における研究への波及効果が見込まれ、バイオマニピュレーションを推進する上で重要な知見となることが期待された。ただし、本研究ではタテボシガイの排泄物中の藍藻生細胞を定量したが、それらの増殖能力については不明なままであるため、今後の課題である。

さらに、環境 DNA (eDNA) を用いた湖沼におけるモニタリング手法の確立では、eDNA の検出定量が困難とされてきた低密度で生息する淡水二枚貝に対して、紐状担体を用いてグロキディウム幼生由来 eDNA を回収する手法を新たに確立し、回収した eDNA が湖沼環境中のタテボシガイ成員の個体密度を概ね反映していたことを示した。本手法は、淡水二枚貝を用いたバイオマニピュレーションを目的とした生息密度や分布域のモニタリング調査並びに個体密度の減少が著しい淡水二枚貝の保全を目的としたモニタリング調査への波及効果が見込まれ、水質保全及び保全生態学分野横断した学術的インパクトが期待された。今後、本研究の対象とした富栄養化湖沼八郎湖では、沿岸域だけでなく、湖内全体に紐状担体を設置してグロキディウム幼生由来 eDNA の分布を明らかにすることで、八郎湖内に生息するタテボシガイの分布域の解明に資することが期待された。

本研究の調査対象地とした秋田県八郎湖では、タテボシガイの藍藻資化能力が明らかにされ、タテボシガイのモニタリング手法も確立されたため、今後は、タテボシガイの湖内での再生産と定着及び個体密度の増強が課題となる。第5章では、タテボシガイ成員の個体密度調査と同時に湖水試料や底質試料も採取し、個体密度に影響を及ぼす因子を調べた。その結果、タテボシガイの成員は底質の中央粒径が大きいほど、個体密度が高い傾向にあることが示された。しかしながら、今後、再生産と定着及び個体密度の増強などの課題克服のためには成員だけでなく、稚貝の好適環境条件の解明が必要であると考えられた。

謝辞

本研究の遂行と本論文の執筆に当たり、多くの方々のご指導とご支援を頂きました。

はじめに、本論文の査読並びに御校閲を頂いた秋田県立大学 生物資源科学部 生物環境科学科 環境管理修復グループ 生態工学研究室 教授 宮田 直幸 博士、並びに、同大学 同グループ 同研究室 准教授 岡野 邦宏 博士、同大学 同グループ 教授 高橋 正 博士、北里大学 医療衛生学部 保健衛生学科 教授 清 和成 博士には、貴重なご助言を賜りました。謹んで感謝の意を表します。

秋田県立大学 生物資源科学部 生物環境科学科 環境管理修復グループ 生態工学研究室 教授 宮田 直幸 博士には、研究計画当初から終始懇切なご指導と現場調査における斬新なアイデアを賜り、そして、何より研究の意義を常に意識して目的から外れない研究プロセスと何時いかなる時も自身の研究に真摯に向き合う姿勢を学ばせて頂きました。博士後期課程だけでなく、学部時代からの御指導、本当に心から感謝致します。

九州大学 工学研究院 助教 藤林 恵 博士には、学部 3 年次に自由に研究テーマを設定する機会を与えていただき、自身の設定した研究したテーマを学部 4 年次から博士後期課程に至るまで育てていくという本当に貴重な経験をさせて頂きました。英文誌の読み合わせ、室内実験、現場実験、脂肪酸及び安定同位体比の分析、和文誌及び英文誌の執筆など、博士論文を完成させるための基礎を学ばせて頂きました。また、初めての学会発表から研究の目的設定やデータの見せ方など懇切丁寧な御指導を賜り、ポスター及び口頭発表、質疑応答を通じた議論の楽しさを学ばせて頂きました。学部時代からの御指導、本当に心から感謝致します。

秋田県立大学 生物資源科学部 生物環境科学科 環境管理修復グループ 生態工学研究室 准教授 岡野 邦宏 博士には、環境 DNA を始めるにあたり、プライマーの設計、DNA 抽出系の確立、PCR の条件検討、機器の定量性の検証についてきめ細かな御指導を賜りました。さらに、グロキディウム幼生を捕集するための現場調査では、早朝にもかかわらず毎回引率して頂きました。学部時代からの御指導、本当に心から感謝致します。

秋田県立大学 生物資源科学部 名誉教授 尾崎保夫 博士には、学部 1 年次及び 2 年次の自主研究指導において生態工学分野の楽しさを学ばせて頂きました。学部 1 年次には沈水植物、動植物プランクトン、小型魚を用いたメソコスム実験を行い、生態系構造について学ばせて頂きました。学部 2 年次には、シジミ類の水質浄化能に係る研究に取り組みせて頂き、二枚貝を用いた水質浄化の面白さを知るきっかけとなりました。博士後期課程まで楽しく研究を続けられたのは、最初に体験した尾崎先生との研究活動の楽しさがあったからだと感じています。退官後も卒業論文発表会、修士論文発表会、博士論文発表会などイベントの際は、激励のメッセージを賜り、研究活動の支えとなっていました。本当に心から感謝いたします。

秋田県立大学 生物資源科学部 生物環境科学科 環境管理修復グループ 生態工学研究室 助教 渡邊 美穂 博士には、学術誌への投稿論文の英文添削、査読対応の指導

について懇切丁寧な御指導を賜りました。Environmental DNA 誌の論文受理は、渡邊美穂 博士の力添えが無ければ叶わなかったと感じています。本当に心から感謝致します。

秋田県産業技術センター 素形材開発部 遠田 幸生 博士には、学部4年次から博士後期課程に至るまで、粒度分布、発熱量、元素分析に係る機器の提供と原理及び操作の御指導を賜りました。学部4年次には、ほとんど知識が無い工学系機器について懇切丁寧にご教授頂きました。また、専門分野外にもかかわらず、学会発表の要旨へのコメントや投稿論文へのコメントも賜りました。学部時代からの御指導、本当に心から感謝致します。

秋田県立大学 生物資源科学部 生物環境科学科 環境管理修復グループ 生態工学研究室 客員研究員兼 NPO 法人 秋田水生生物保全協会 代表理事 杉山 秀樹 博士には、淡水二枚貝の標本提供、八郎湖や県内における生息状況の情報提供、形態同定に関する御指導などを賜りました。本当に心から感謝致します。

また、本研究では多くの方々から研究協力を賜りました。八郎湖の漁師 桜庭 氏には、本稿の全ての章に関わるタテボシガイの採捕及び船上調査に御協力いただきました。秋田県立大学 生物資源科学部 生物環境科学科 環境管理修復グループ 生態工学研究室 佐々木 勇太 氏には、第2章の一部の実験の遂行と分析、データ解析について御助力頂きました。秋田県立大学 生物資源科学部 生物環境科学科 陸域生物圏グループ 土壤環境学研究室 准教授 高階 史章 博士には、本稿第2章における全有機炭素分析に係る機器の提供と原理及び操作の御指導を賜りました。秋田県産業技術センター 素形材開発部 沓名 潤子 氏、小林 久美 氏には、本稿第2章及び第5章における粒度分布、発熱量、元素分析に係る機器分析の御協力を賜りました。滋賀県琵琶湖環境科学研究センター 環境監視部門 古田 世子 博士には、本稿第4章におけるタテボシガイ種特異的プライマー／プローブの作成のための淡水二枚貝標本を提供頂きました。神戸大学 内海域環境教育研究センター 助教 堀江 好文 博士、並びに秋田県立大学 生物資源科学部附属バイオテクノロジーセンター センター長 福島 淳 博士には、本稿第4章及び第5章におけるリアルタイム PCR に係る機器の提供と原理及び操作の御指導を賜りました。ここに記して、心より感謝申し上げます。

公私にわたりまして相談を受けてくださり、またフィールド調査の協力やサンプル処理に大きな助力を頂きました秋田県立大学生態工学研究室の実験助手 大石 綾子 氏、佐澤 恵美 氏、後輩諸氏に厚く感謝致します。

最後に、今日まで精神的に、経済的に支えて下さった母に格別の感謝を申し上げます。

本研究に関連する成果発表（報文）

1. 菅原巧太朗, 藤林恵, 遠田幸生, 荒木美穂, 岡野邦宏, 宮田直幸: 富栄養化湖沼の浅い沿岸域における藍藻類の日周鉛直移動と栄養塩動態の関係. *日本水処理生物学会誌*, Vol.55, No.2, p.p.49-57, 2019. (本稿第3章の一部に相当)
2. Kotaro Sugawara, Megumu Fujibayashi, Kunihiro Okano, Yukio Enda, Shintaro Ichinoseki, Yoshimitsu Taniguchi, Naoyuki Miyata: Assimilation of Cyanobacteria by the Freshwater Bivalve *Nodularia douglasiae*: Insights from Long-Term Laboratory and Field Feeding Experiments. *Journal of Water and Environment Technology*, Vol.19, No.2, p.p.74-84, 2021. (本稿第2章及び第3章の一部に相当)
3. Kotaro Sugawara, Yudai Sasaki, Kunihiro Okano, Miho Watanabe, Naoyuki Miyata: Application of eDNA for monitoring freshwater bivalve *Nodularia nipponensis* and its glochidium larvae. *Environmental DNA*, in press. (本稿第4章及び第5章の一部に相当)

参考文献

- [1] Wiegand C, & Pflugmacher S: Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203(3), 201–218, 2005.
- [2] Watson SB, Monis P, Baker P, & Giglio S: Biochemistry and genetics of taste- and odor-producing cyanobacteria. *Harmful Algae*, 54, 112–127, 2016.
- [3] Svirčev Z, Lalić D, Bojadžija Savić G, Tokodi N, Drobac Backović D, Chen L, Meriluoto J, & Codd GA: Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings. *Archives of Toxicology*, 93(9), 2429–2481, 2019.
- [4] Matsunaga H, Harada KI, Senma M, Ito Y, Yasuda N, Ushida S, & Kimura Y: Possible cause of unnatural mass death of wild birds in a pond in Nishinomiya, Japan: Sudden appearance of Toxic Cyanobacteria. *Natural Toxins*, 7, 81–84, 1999.
- [5] Frazier K, Colvin B, Styer E, Hullinger G, & Garcia R: Microcystin toxicosis in cattle due to overgrowth of blue-green algae. *Veterinary and Human Toxicology*, 40(1), 23–24, 1998.
- [6] Negri AP, Jones GJ, & Hindmarsh M: Sheep mortality associated with paralytic shellfish poisons from the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Toxicon*, 33(10), 1321–1329, 1995.
- [7] Moustaka-Gouni M, Hiskia A, Genitsaris S, Katsiapi M, Manolidi K, Zervou SK, Christophoridis C, Triantis TM, Kaloudis T, & Orfanidis S: First report of *Aphanizomenon favaloroi* occurrence in Europe associated with saxitoxins and a massive fish kill in Lake Vistonis, Greece. *Marine and Freshwater Research*, 68(4), 793–800, 2017.
- [8] Smith DR, King KW, & Williams MR: What is causing the harmful algal blooms in lake Erie? *Journal of Soil and Water Conservation*, 70(2), 27–29, 2015.
- [9] Tsujimura S, Tsukada H, Nakahara H, Nakajima T, & Nishino M: Seasonal variations of *Microcystis* populations in sediments of Lake Biwa, Japan. *Hydrobiologia*, 434, 183–192, 2000.
- [10] Cao H-S, Tao Y, Kong F-X, & Yang Z: Relationship between Temperature and Cyanobacterial Recruitment from Sediments in Laboratory and Field Studies. *Journal of Freshwater Ecology*, 23(3), 405–412, 2008.
- [11] Kitchens CM, Johengen TH, & Davis TW: Establishing spatial and temporal patterns in *Microcystis* sediment seed stock viability and their relationship to subsequent bloom development in Western Lake Erie. *PLoS ONE*, 13(11), e0206821, 2018.
- [12] Yang Z, Zhang M, Yu Y, & Shi X: Temperature triggers the annual cycle of *Microcystis*, comparable results from the laboratory and a large shallow lake. *Chemosphere*, 260, 127543, 2020.
- [13] Rengefors K, Gustafsson A, & Ståhl-Delbanco A: Factors regulating the recruitment of cyanobacterial and eukaryotic phytoplankton from littoral and profundal sediments. *Aquatic Microbial Ecology*, 36, 213–226, 2004.
- [14] Yamamoto Y: Effect of temperature on recruitment of cyanobacteria from the sediment and bloom formation in a shallow pond. *Plankton and Benthos Research*, 4(3), 95–103, 2009.

- [15] Cirés S, Wörmer L, Agha R, & Quesada A: Overwintering populations of *Anabaena*, *Aphanizomenon* and *Microcystis* as potential inocula for summer blooms. *Journal of Plankton Research*, 35(6), 1254–1266, 2013.
- [16] 荒木美穂, 岡野邦宏, 藤林恵, 宮田直幸: 秋田県八郎湖で採取した底質からの藍藻回帰に及ぼす低温処理と培養温度の影響. *日本水処理生物学会誌*, 54(2), 55–63, 2018.
- [17] 矢島悠一, 野村宗弘, 一瀬諭, 鈴木有咲海, 西村修: *Anabaena* 休眠細胞の大量形成・回収及び発芽評価方法. *日本水処理生物学会誌*, 49(3), 103–108, 2013.
- [18] Yamamoto Y, & Nakahara H: Life cycle of cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *Taiwania*, 54(2), 113–117, 2009.
- [19] Preston T, & Stewart WDP: Bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* overwinters on the sediment surface. *Nature*, 288, 365–367, 1980.
- [20] Xiao T: Physiological and ecological characteristics in the life cycle of bloom-forming cyanobacteria. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 10(2), 929–934, 2012.
- [21] Joehnk KD, Huisman JEF, Sharples J, Sommeijer BEN, Visser PM, & Stroom JM: Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Global change biology*, 14(3), 495–512, 2008.
- [22] Mullin CA, Kirchhoff CJ, Wang G, & Vlahos P: Future projections of water temperature and thermal stratification in connecticut reservoirs and possible implications for cyanobacteria. *Water Resources Research*, 56(11), e2020WR027185, 2020.
- [23] Araki M, Okano K, Ohta S, Suzuki E, Fujibayashi M, & Miyata N: Characteristics of harmful algal blooms during a low water temperature season in Lake Hachiro. *Journal of Water Environment and Technology*, 16(4), 175–183, 2018.
- [24] 岡野邦宏, 鈴木英治, 太田栞, 宮田直幸, 谷幸則, 尾崎保夫: 秋田県八郎湖における藍藻毒ミクロシスチンと有毒藍藻の季節的変動. *日本水環境学会誌*, 38(1), 23–30, 2015.
- [25] Takamura N, & Yasuno M: Diurnal changes in the vertical distribution of phytoplankton in hypertrophic Lake Kasumigaura. Japan. *Hydrobiologia*, 112(1), 53–60, 1984.
- [26] 高村典子: アオコの発生と水質要因等との関係 (霞ヶ浦). *日本水産学会誌*, 64(2), 305–306, 1998.
- [27] 長濱祐美, 阿部真己, 松本俊一, 福島武彦: 生態系モデルを用いた霞ヶ浦土浦入におけるアオコ発生機構の検討. *土木学会論文集 G (環境)*, 73(7), III_115-III_123, 2017.
- [28] 吉田陽一, 中原紘之, 桑江朝比呂: 琵琶湖北湖諸港におけるアオコの異常発生機構. *日本水産学会誌*, 62(2), 230–235, 1996.
- [29] 石川可奈子, 辻村茂男, 中原紘之, 熊谷道夫: アオコの空間分布と集積特性—琵琶湖南湖北山田漁港での調査事例— . *陸水学雑誌*, 64(3), 171–183, 2003.
- [30] Ozawa K, Fujioka H, Muranaka M, Yokoyama A, Katagami Y, Homma T, & Park H D:

- Spatial distribution and temporal variation of *Microcystis* species composition and microcystin concentration in Lake Biwa. *Environmental Toxicology*, 20(3), 270–276, 2005.
- [31] Tsujimura, S, & Ichise S; Characteristics of the phytoplankton flora and long term changes in the phytoplankton community of Lake Biwa. *Lake Biwa: Interactions between nature and people*. Springer, Tokyo, 41–48. 2012
- [32] 橋谷博: 瀨水湖中海・宍道湖の水質変動や生物の盛衰に及ぼす気象 5 因子の影響. *日本水産学会誌*, 64(2), 311–312, 1998.
- [33] 作野裕司, 松永恒雄, 中山大介, 六川修一, 高安克己, 國井秀伸, 中村幹雄 & 山室真澄: SPOT/HRV データによるアオコ発生時の宍道湖表層クロロフィル a 濃度分布の推定. *日本リモートセンシング学会誌*, 19(2), 132–148, 1999.
- [34] 佐藤紗知子, 大城等, 馬庭章, 管原庄吾, 神谷宏, 大谷修司: 宍道湖におけるアオコ発生の環境要因とその事前判別. *陸水学雑誌*, 76(3), 217–223, 2015.
- [35] 秋田県 (2008) 八郎湖に係る湖沼水質保全計画 (第 1 期) . 16pp
- [36] 秋田県 (2014) 八郎湖に係る湖沼水質保全計画 (第 2 期) . 21pp
- [37] 秋田県 (2020) 八郎湖に係る湖沼水質保全計画 (第 3 期) . 26pp
- [38] 宮城県 (2013) 釜房ダム貯水池湖沼水質保全計画 (第 6 期) . 20pp
- [39] 茨城県・栃木県・千葉県 (2017) 霞ヶ浦に係る湖沼水質保全計画 (第 7 期) . 35pp
- [40] 千葉県 (2017) 手賀沼に係る湖沼水質保全計画 (第 7 期) . 17pp
- [41] 千葉県 (2017) 印旛沼に係る湖沼水質保全計画 (第 7 期) . 21pp
- [42] 長野県 (2020) 野尻湖に係る湖沼水質保全計画 (第 6 期) . 15pp
- [43] 長野県 (2018) 諏訪湖に係る第 7 期湖沼水質保全計画. 24pp
- [44] 滋賀県・京都府 (2017) 第 7 期琵琶湖に係る湖沼水質保全計画. 36pp
- [45] 鳥取県・島根県 (2020) 中海に係る湖沼水質保全計画 (第 7 期) . 30pp
- [46] 島根県 (2020) 宍道湖に係る湖沼水質保全計画 (第 7 期) . 26pp
- [47] 岡山県 (2017) 児島湖に係る第 7 期湖沼水質保全計画. 18pp
- [48] 立本英機, 天野佳正, 町田基, 相川正美, 藤村葉子, 瀧和夫: 底泥処理における湖水の栄養塩濃度比制御によるアオコの抑制. *環境技術*, 36(5), 357–364, 2007
- [49] Amano Y, Sakai Y, Sekiya T, Takeya K, Taki K, & Machida M: Effect of phosphorus fluctuation caused by river water dilution in eutrophic lake on competition between blue-green alga *Microcystis aeruginosa* and diatom *Cyclotella* sp. *Journal of Environmental Sciences*, 22(11), 1666–1673, 2010
- [50] 鈴木実, 安西竜也: 超高压水中衝撃波によるアオコの死滅処理 (水中衝撃波の発生法及び微生物への影響). *日本機械学会論文集 B 編*, 79(801), 799–803, 2013
- [51] 吉岡敏幸, 竹内求: 千葉県の水資源開発施設の歴史と課題. *農業農村工学会誌*, 81(6), 453–456, 2013
- [52] 落合照雄: 野尻湖にみられる数種のプランクトンについて. *清泉女学院短期大学研究紀要*, (17), 101–114, 1998
- [53] 吉田陽一, 沖野外輝夫: 諏訪湖におけるアオコの発生と DON:DIN 比等との関係.

日本水産学会誌, 62(4), 631–637, 1996

- [54] Saito Y, Takano K, Kobayashi F, Kobayashi K, & Park H. D.: Development of a UV laser-induced fluorescence lidar for monitoring blue-green algae in Lake Suwa. *Applied optics*, 53(30), 7030–7036, 2014
- [55] 村上和仁, 吉岡敏行, 鷹野洋, 荻野泰夫: 植物プランクトンを指標とした児島湖流域の水質評価. *全国公害研究会誌*, 23(2), 94–100, 1998
- [56] 村上和仁, 鷹野洋, 吉岡敏行, 荻野泰夫, 森忠繁: 児島湖における植物プランクトンの種構成と季節的消長. *水環境学会誌*, 22(9), 770–775, 1999
- [57] 木村文宣, 本間隆満, 前田充典, 松川正彦: 上流域からのカビ臭物質および原因藻類の流入がダム貯水池のカビ臭現象に及ぼす影響. *ダム工学*, 23(1), 39–49, 2013
- [58] 野見山倫太郎, 前田将輝, 加地祐毅, 田中俊夫, 笥秀美: 頓田貯水池における定期硫酸銅散布の藍藻類抑制効果. *水道協会雑誌*, 88(4), 2–8, 2019.
- [59] 富岡典子: 藻類の増殖に及ぼす銅の影響. 国立環境研究所ニュース, 9(5), 9, 1990.
- [60] 岡本嗣男, 高橋志郎, 加藤彰久: オゾンによる“アオコ”駆除に関する基礎的研究 水槽内でのオゾン濃度変化. *農業機械学会誌*, 58(Supplement), 135–136, 1996
- [61] Zhong JC, You BS, Fan CX, Li B, Zhang L, & Ding SM: Influence of sediment dredging on chemical forms and release of phosphorus. *Pedosphere*, 18(1), 34–44, 2008.
- [62] Björk S, Pokorný J, & Hauser V: Restoration of lakes through sediment removal, with case studies from Lakes Trummen, Sweden and Vajgar, Czech Republic. In Eiseltova M (ed). *Restoration of lakes, streams, floodplains, and bogs in Europe: principles and case studies*. Springer, 101–122, 2010.
- [63] Peltola P, & Åström M.: Concentrations and leachability of chemical elements in estuarine sulfur-rich sediments, W. Finland. *Science of the total environment*, 284(1-3), 109–122, 2002
- [64] Lüring M, Mackay E, Reitzel K, & Spears B. M.: Editorial—A critical perspective on geo-engineering for eutrophication management in lakes. *Water research*, 97, 1–10, 2016
- [65] Triest L, Stuers I, & Van Onsem S: Biomanipulation as a nature-based solution to reduce cyanobacterial blooms. *Aquatic Ecology*, 50(3): 461–483, 2016.
- [66] Brönmark C, & Hansson LA: *The Biology of Lakes and Ponds 湖と池の生物学 生物の適応から群集理論・保全まで*, 占部城太郎 (監訳), 255–259, 共立出版, 東京都, 2007.
- [67] 江成敬次郎, 黒坂広一, 李瓊雨, 伊崎和夫, 中山正与: 水生植物 (マコモ) の無機態窒素吸収特性に対する無機態窒素濃度及び $\text{NO}_3\text{-N}$ と $\text{NH}_4\text{-N}$ の濃度比率の影響. *水環境学会誌*, 24(5), 42–47, 2001.
- [68] 尾崎保夫, 林紀男, 片桐浩司: 水環境の保全をめざした沈水植物再生の取り組みと今後の課題. *日本水処理生物学会誌*. 53(3), 81–93, 2017.
- [69] Waajen GWAM, Van Bruggen NCB, Pires LMD, Lengkeek W, & Lüring M.: Biomanipulation with quagga mussels (*Dreissena rostriformis bugensis*) to control

- harmful algal blooms in eutrophic urban ponds. *Ecological Engineering*, 90, 141–150, 2016.
- [70] Burns CW, Schallenberg M, & Verburg P: Potential use of classical biomanipulation to improve water quality in New Zealand lakes: A re-evaluation. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 48(1), 127–138, 2014.
- [71] Zhu W, Li M, Dai X, & Xiao M: Differences in vertical distribution of *Microcystis* morphospecies composition in a shallow hypertrophic lake (Lake Taihu, China). *Environmental Earth Sciences*, 73(9), 5721–5730, 2015.
- [72] Yamamoto Y, & Nakahara H: Seasonal variations in the morphology of bloom-forming cyanobacteria in a eutrophic pond. *Limnology*, 10(3), 185–193, 2009.
- [73] Geller W, & Müller H: The filtration apparatus of cladocera: Filter mesh-sizes and their implications on food selectivity, *Oecologia*, 49, 316–321, 1981.
- [74] Cremer MC, & Smitherman RO: Food habits and growth of silver and bighead carp in cages and ponds. *Aquaculture*, 20(1), 57–64, 1980.
- [75] Cohen KE, Hernandez LP, Crawford CH, & Flammang BE: Channeling vorticity: modeling the filter-feeding mechanism in silver carp using μ CT and 3D PIV. *Journal of Experimental Biology*, 221(19), 183350, 2018.
- [76] Turker H, Eversole AG, & Brune DE: Comparative Nile tilapia and silver carp filtration rates of Partitioned Aquaculture System phytoplankton. *Aquaculture*, 220(1-4), 449–457, 2003
- [77] Starling FL, & Rocha AJ: Experimental study of the impacts of planktivorous fishes on plankton community and eutrophication of a tropical Brazilian reservoir. *Hydrobiologia*, 200(1), 581–591, 1990
- [78] Molina FR, Paggi, JC, & Devercelli M: Zooplanktophagy in the natural diet and selectivity of the invasive mollusk *Limnoperna fortunei*. *Biological Invasions*, 12(6), 1647–1659, 2010.
- [79] Bontes BM, Verschoor AM, Dionisio Pires LM, Van Donk E, & Ibelings BW: Functional response of *Anodonta anatina* feeding on a green alga and four strains of cyanobacteria, differing in shape, size and toxicity. *Hydrobiologia*, 584(1), 191–204, 2007.
- [80] Liu Y, Xie P, & Wu XP: Grazing on toxic and non-toxic *Microcystis aeruginosa* PCC7820 by *Unio douglasiae* and *Corbicula fluminea*. *Limnology*, 10(1), 1–5, 2009.
- [81] Marroni S, Iglesias C, Mazzeo N, Clemente J, Teixeira de Mello F, & Pacheco JP: Alternative food sources of native and non-native bivalves in a subtropical eutrophic. *Hydrobiologia*, 735, 263–276, 2014.
- [82] White JD, & Sarnelle O: Size-structured vulnerability of the colonial cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, to grazing by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Freshwater Biology*, 59(3), 514–525, 2014.
- [83] Dionisio Pires LM, Bontes BM, Van Donk E, Ibelings BW: Grazing on colonial and

- filamentous, toxic and non-toxic cyanobacteria by the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Journal of Plankton Research*, 27(4), 331–339, 2005.
- [84] Bykova O, Loursen A, Bostan V, Bautista J, & McCarthy L: Do zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) alter lake water chemistry in a way that favors *Microcystis* growth? *Science of the Total Environment*, 371(1-3) 362–372, 2006.
- [85] Dionisio Pires LM, Van Donk E: Comparing grazing by *Dreissena polymorpha* on phytoplankton in the presence of toxic and non-toxic cyanobacteria. *Freshwater Biology*, 47(10), 1855–1865, 2002.
- [86] Frau D, Molina FR, & Mayora G: Feeding selectivity of the invasive mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) on a natural phytoplankton assemblage: what really matters?. *Limnology*, 17(1), 47–57, 2016.
- [87] Silva FAE, & Giani A: Population dynamic of bloom-forming *Microcystis aeruginosa* in the presence of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei*. *Harmful Algae* 73, 148–156, 2018.
- [88] Rohrlack T, Dittmann E, Börner T, & Christoffersen K: Effects of cell-bound microcystins on survival and feeding of *Daphnia* spp. *Applied and environmental microbiology*, 67(8), 3523–3529, 2001
- [89] Chen J, Xie P, Zhang D, Ke Z, & Yang H: In situ studies on the bioaccumulation of microcystins in the phytoplanktivorous silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) stocked in Lake Taihu with dense toxic *Microcystis* blooms. *Aquaculture*, 261(3), 1026–1038, 2006
- [90] Shen Q, Hu J, Li DH, Wang GH, & Liu, YD: Investigation on intake, accumulation and toxicity of microcystins to silver carp. *Fresenius Environmental Bulletin*, 14(12), 1124–1128, 2005
- [91] Jewel MAS, Affan MA, & Khan S: Fish mortality due to cyanobacterial bloom in an aquaculture pond in Bangladesh. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6(2), 1046–1050, 2003
- [92] Kondo F, Ikai Y, Oka H, Okumura M, Ishikawa N, Harada KI, Matsuura K, Murata H, & Suzuki M: Formation, Characterization, and Toxicity of the Glutathione and Cysteine Conjugates of Toxic Heptapeptide Microcystins. *Chemical Research in Toxicology*, 5(5), 591–596, 1992.
- [93] Pflugmacher S, Wiegand C, Oberemm A, Beattie KA, Krause E, Codd GA, & Steinberg CEW: Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: The first step of detoxication. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1425(3), 527–533, 1998.
- [94] Ahlgren G, Lundstedt L, Brett M, & Forsberg C: Lipid composition and food quality of some freshwater phytoplankton for cladoceran zooplankters. *Journal of Plankton Research*, 12(4), 809–818, 1990.
- [95] Ahlgren G, Gustafsson IB, & Boberg M: Fatty acid content and chemical composition of

- freshwater microalgae. *Journal of Phycology*, 28(1), 37–50, 1992.
- [96] Schmidt K, & Jónasdóttir SH: Nutritional quality of two cyanobacteria: How rich is “poor” food. *Marine Ecology Progress Series*, 151(1-3), 1–10, 1997.
- [97] Von Elert E, Martin-Creuzburg D, & Le Coz JR: Absence of sterols constrains carbon transfer between cyanobacteria and a freshwater herbivore (*Daphnia galeata*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 207(1520), 1209–1214, 2003.
- [98] Yoshioka T, Wada E, & Hayashi H: A stable Isotope study on seasonal food web dynamics in a eutrophic lake. *Ecology* 75(3), 835–846, 1994.
- [99] Gavel B, Marsalek B, & Adamek Z: Viability of *Microcystis* colonies is not damaged by silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) digestion. *Algological Studies*, 113(1), 189–194, 2004.
- [100] 西尾孝之, 大島詔, 北野雅昭: 二枚貝を用いたアオコの繁殖した都市公園池の水質改善の試みにおける偽糞回収の有効性評価. *日本水処理生物学会誌*, 50(1), 7–14, 2014.
- [101] Kolmakov VI: Role of *Microcystis aeruginosa* passing through the digestive tracts of filter-feeding animals in eutrophic water reservoirs. *Contemporary problems of ecology*, 7(4), 455–464, 2014.
- [102] de Kluijver A, Yu J, Houtekamer M, Middelburg JJ, & Liu Z: Cyanobacteria as a carbon source for zooplankton in eutrophic Lake Taihu, China, measured by ¹³C labeling and fatty acid biomarkers. *Limnology and Oceanography*, 57(4), 1245–1254, 2012.
- [103] Wang Y, Gu X, Zeng Q, Mao Z, Gu X, & Li X: Fate of ¹⁵N-enriched cyanobacteria feed for planktivorous fish in an enclosure experiment: a stable isotope tracer study. *Fisheries Science*, 81(5), 821–830, 2015.
- [104] Lauritsen DD: Assimilation of radiolabelled algae by *Corbicula*. *American Malacological Bulletin*, 2, 219–222, 1986.
- [105] Widdows J, & Johnson D: Physiological energetic of *Mytilus edulis*: Scope for Growth. *Marine Ecology Progress Series*, 46, 113–121, 1988.
- [106] Liu Y, Hao A, Iseri Y, Kuba T, & Zhang Z: A comparison of the mussel *Anodonta woodiana*'s acute physiological responses to different algae diets. *Journal of Clean Energy Technologies*, 2(2), 126–131, 2014.
- [107] Hu M, Wu F, Yuan M, Liu Q, & Wang Y: Combined effects of toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and hypoxia on the physiological responses of triangle sail mussel *Hyriopsis cumingii*. *Journal of Hazardous Materials*, 306, 24–33, 2016.
- [108] Kim MS, Lee Y, Ha SY, Kim BH, Hwang SJ, Kwon JT, Choi JW, & Shin KH: Accumulation of microcystin (LR, RR and YR) in three freshwater bivalves in *Microcystis aeruginosa* bloom using dual isotope tracer. *Marine Drugs*, 15(7), 226, 2017.
- [109] Kim MS, Kwon JT, Lee Y, Ha SY, Hong S, Yoon SH, & Shin KH: Bio-control of *Microcystis aeruginosa* bloom using various aquatic organisms by dual stable isotope

- (^{13}C and ^{15}N) tracers. *Applied Ecology and Environmental Research*, 16(2), 931–953, 2018.
- [110] Larson JH, Richardson WB, Evans MA, Schaeffer J, Wynne T, Bartsch M, Bartsch L, Nelson JC, & Vallazza J: Measuring spatial variation in secondary production and food quality using a common consumer approach in Lake Erie. *Ecological Applications*, 26(3), 873–885, 2016.
- [111] 源利文: 種特異的な環境 DNA 検出によるマクロ生物の生態調査, *日本水環境学会誌*, 41(4), 123–127, 2018.
- [112] 宮正樹: 環境 DNA メタバーコーディング—魚類群集研究の革新的手法バケツ一杯の水で棲んでいる魚がわかる技術. *化学と生物*, 57(4), 242–250, 2019.
- [113] 高原輝彦, 山中裕樹, 源利文, 土居秀幸, 内井喜美子: 環境 DNA 分析の手法開発の現状～淡水域の研究事例を中心にして～. *日本生態学会誌*, 66, 583–599, 2016.
- [114] Rees HC, Maddison BC, Middleditch DJ, Patmore JRM, Gough KC, & Crispo E: The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51, 1450–1459, 2014.
- [115] Burns MA & Turner CR: The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17(1), 1–17. 2016.
- [116] Tsuji S, Takahara T, Doi H, Shibata N, & Yamanaka H: The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis – A review of methods for collection, extraction, and detection. *Environmental DNA*, 1(2), 99–108, 2019.
- [117] Ogram A, Sayler GS, & Barkay T: The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 7, 57–66, 1987.
- [118] Alfreider A, Pernthaler J, Amann R, Sattler B, Glockner F, Wille A, & Psenner R: Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2138–2144, 1996.
- [119] Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, & Taberlet P: Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4, 423–425, 2008.
- [120] Sakata MK, Maki N, Sugiyama H, & Minamoto T: Identifying a Breeding Habitat of a Critically Endangered Fish, *Acheilognathus typus*, in a natural river in Japan. *The Science of Nature*, 104, 100. 2017.
- [121] Takahara T, Minamoto T & Doi H: Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLoS ONE*, 8(2), e56584, 2013.
- [122] Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, Doi H, & Kawabata Z: Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS ONE*, 7(4), e35868, 2012.
- [123] Doi H, Inui R, Akamatsu Y, Kanno K, Yamanaka H, Takahara T, & Minamoto T: Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish.

- Freshwater Biology*, 62(1), 30–39, 2017.
- [124] Fukaya K, Murakami H, Yoon S, Minami K, Osada Y, Yamamoto S, Masuda R, Kasai A, Miyashita K, Minamoto T, & Kondoh M: Estimating fish population abundance by integrating quantitative data on environmental DNA and hydrodynamic modelling. *Molecular Ecology*, 30(13), 3057–3067, 2020.
- [125] Deiner K, & Altermatt F: Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PLoS ONE*, 9(2), e88786, 2014.
- [126] Dysthe JC, Rodgers T, Franklin TW, Carim KJ, Young MK, McKelvey KS, Mock KE, & Schwartz MK: Repurposing environmental DNA samples—detecting the western pearlshell (*Margaritifera falcata*) as a proof of concept. *Ecology and Evolution*, 8(5), 2659–2670, 2018.
- [127] Stoeckle BC, Kuehn R, & Geist J: Environmental DNA as a monitoring tool for the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.): a substitute for classical monitoring approaches? *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 26(6), 1120–1129, 2016.
- [128] Carlsson JEL, Egan D, Collins PC, Farrell ED, Igoe F, & Carlsson J: A qPCR MGB probe based eDNA assay for European freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 27(6), 1341–1344, 2017.
- [129] Mauvisseau Q, Burian A, Gibson C, Brys R, Ramsey A, & Sweet M: Influence of accuracy, repeatability and detection probability in the reliability of species-specific eDNA based approaches. *Scientific Reports*, 9(1), 580, 2019.
- [130] Wacker S, Fossøy F, Larsen BM, Brandsegg H, Sivertsgård R, & Karlsson S: Downstream transport and seasonal variation in freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) eDNA concentration. *Environmental DNA*, 1(1), 64–73, 2019.
- [131] Lor Y, Schreier TM, Waller DL, & Merkes CM: Using environmental DNA (eDNA) to detect the endangered Spectaclecase Mussel (*Margaritifera monodonta*). *Freshwater Science*, 39(4), 837–847, 2020.
- [132] Pie MR, Ströher PR, Agostinis AO, Lopes RB, Tadra-sfeir MZ, & Ostrensky: Development of a real-time PCR assay for the detection of the golden mussel (*Limnoperna fortunei*, Mytilidae) in environmental samples. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 89(2), 1041–1045, 2017.
- [133] Xia Z, Zhan A, Gao Y, Zhang L, Haffner GD, & Maclsaac HJ: Early detection of a highly invasive bivalve based on environmental DNA (eDNA). *Biological Invasions*, 20, 437–447, 2018.
- [134] Ito K, & Shibaike H: Use of environmental DNA to survey the distribution of the invasive mussel *Limnoperna fortunei* in farm ponds. *Plankton and Benthos Research*, 16(2), 100–108, 2021.
- [135] Penãrrubia L, Alcaraz C, Vaate ABD, Sanz N, Pla C, Vidal O, & Vinãs J: Validated

- methodology for quantifying infestation levels of dreissenid mussels in environmental DNA (eDNA) samples. *Scientific Reports*, 6, 39067, 2016.
- [136] Hosler DM: Where is the body? Dreissenid mussels, raw water testing, and the real value of environmental DNA. *Management of Biological Invasions*, 8(3), 335–341, 2017.
- [137] Gingera TD, Bajno R, Docker MF, & Reist JD: Environmental DNA as a detection tool for zebra mussels *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) at the forefront of an invasion event in Lake Winnipeg, Manitoba, Canada. *Management of Biological Invasions*, 8(3), 287–300, 2017.
- [138] Shogren AJ, Tank JL, Egan SP, Bolster D, & Riis T: Riverine distribution of mussel environmental DNA reflects a balance among density, transport, and removal processes. *Freshwater Biology*, 64(8), 1467–1479, 2018.
- [139] Amberg JJ, Merkes CM, Stott W, Rees CB, & Erickson RA: Environmental DNA as a tool to help inform zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, management in inland lakes. *Management of Biological Invasions*, 10(1), 96–110, 2019.
- [140] Marshall NT, & Stepien CA: Invasion genetics from eDNA and thousands of larvae: A targeted metabarcoding assay that distinguishes species and population variation of zebra and quagga mussels. *Ecology and Evolution*, 9(6), 3515–3538, 2019.
- [141] Takahara T, Ikebuchi T, Doi H, & Minamoto T: Using environmental DNA to estimate the seasonal distribution and habitat preferences of a Japanese basket clam in Lake Shinji, Japan. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 221, 15–20, 2019.
- [142] Bayer SR, Countway PD, & Wahle RA: Developing an eDNA toolkit to quantify broadcast spawning events of the sea scallop *Placopecten magellanicus*: moving beyond fertilization assays. *Marine Ecology Progress Series*, 621, 127–141, 2019.
- [143] Ardura A, Zaiko A, Martinez JL, Samuliiovienė A, Semenova A, & Garcia-Vazquez E: eDNA and specific primers for early detection of invasive species—A case study on the bivalve *Rangia cuneata*, currently spreading in Europe. *Marine Environmental Research*, 112, 48–55, 2015.
- [144] Miralles L, Parrondo M, de Rojas AH, Garcia-Vazquez E, & Borrell YJ: Development and validation of eDNA markers for the detection of *Crepidula fornicata* in environmental samples. *Marine pollution bulletin*, 146, 827–830, 2019.
- [145] Strickler KM, Fremier AK, & Goldberg CS: Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, 183, 85–92, 2015.
- [146] Pilliod DS, Goldberg CS, Arkle RS, & Waits LP: Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, 14(1), 109–116, 2014.
- [147] Sassoubre LM, Yamahara KM, Gardner LD, Block BA, & Boehm AB: Quantification of environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three marine fish. *Environmental science & technology*, 50(19), 10456–10464, 2016.

- [148] Jo T, Murakami H, Yamamoto S, Masuda R, & Minamoto T: Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 17(6), e25–e33, 2017.
- [149] Jo T, Murakami H, Yamamoto S, Masuda R, & Minamoto T: Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution. *Ecology and Evolution*, 9(3), 1135–1146, 2019.
- [150] Jo T, Arimoto M, Murakami H, Masuda R, & Minamoto T: Particle size distribution of environmental DNA from the nuclei of marine fish. *Environmental Science and Technology*, 53(16), 9947–9956, 2019.
- [151] Jo T, Arimoto M, Murakami H, Masuda R, & Minamoto T: Estimating shedding and decay rates of environmental nuclear DNA with relation to water temperature and biomass. *Environmental DNA*, 2(2), 140–151, 2019.
- [152] Jo T, Arimoto M, Murakami H, Masuda R, & Minamoto T: Selective collection of long fragments of environmental DNA using larger pore size filter. *Science of The Total Environment*, 735(15), 139462, 2020.
- [153] Maruyama A, Nakamura K, Yamanaka H, Kondoh M, & Minamoto T: The release rate of environmental DNA from juvenile and adult fish. *PLoS One*, 9(12), e114639, 2014.
- [154] Tsuji S, Ushio M, Sakurai S, Minamoto T, & Yamanaka H: Water temperature-dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance. *PLoS One*, 12(4), e0176608, 2017.
- [155] Eichmiller JJ, Best SE, & Sorensen PW: Effects of temperature and trophic state on degradation of environmental DNA in lake water. *Environmental science & technology*, 50(4), 1859–1867, 2016.
- [156] Sansom BJ, & Sassoubre LM: Environmental DNA (eDNA) Shedding and decay rates to model freshwater mussel eDNA transport in a river. *Environmental Science and Technology*, 51(24), 14244–14253, 2017.
- [157] Currier CA, Morris TJ, Wilson CC, & Freeland JR: Validation of environmental DNA (eDNA) as a detection tool for at-risk freshwater pearly mussel species (Bivalvia: Unionidae). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 28(3), 545–558, 2018.
- [158] Togaki D, Doi H, & Katano I: Detection of freshwater mussels (*Sinanodonta* spp.) in artificial ponds through environmental DNA a comparison with traditional hand collection methods. *Limnology*, 21(1), 59–65, 2020.
- [159] Buxton AS, Groombridge JJ, Zakaria NB, & Griffiths RA: Seasonal variation in environmental DNA in relation to population size and environmental factors. *Scientific reports*, 7(1), 1–9, 2017.
- [160] Spear SF, Groves JD, Williams LA, & Waits LP: Using environmental DNA methods to improve detectability in a hellbender (*Cryptobranchus alleganiensis*) monitoring

- program. *Biological Conservation*, 183, 38–45, 2015.
- [161] Obermeyer BK: A comparison of quadrats versus timed snorkel searches for assessing freshwater mussels. *American Midland Naturalist*, 139 (2), 331–339, 1998.
- [162] Reid SM: Search effort and imperfect detection: Influence on timed-search mussel (Bivalvia: Unionidae) surveys in Canadian rivers. *Knowledge and management of aquatic ecosystems*, 417, 17, 2016.
- [163] Lamand F, & Beisel JN: Comparison of visual observation and excavation to quantify density of the endangered bivalve *Unio crassus* in rivers of north-eastern France. *Knowledge and management of aquatic ecosystems*, 413, 11, 2014.
- [164] McGoldrick DJ, Metcalfe-Smith JL, Arts MT, Schloesser DW, Newton TJ, Mackie GL, Monroe EM, Biberhofer J, & Johnson K: Characteristics of a refuge for native freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae) in Lake St. Clair. *Journal of Great Lakes Research*, 35(1), 137–146, 2009.
- [165] 近藤高貴: 日本産イシガイ目貝類図譜, 日本貝類学会, 2008.
- [166] 幡野真隆, 石崎大介, 久米弘人, 崎山一孝: セタシジミの初期餌料と利用可能餌料サイズ. *日本水産学会誌*, 81(1), 62–67, 2015.
- [167] 高田芳博, 黒沢新: シジミなど湖沼河川の水産資源の維持、管理、活用に関する研究 (シジミ類生態調査), 平成 26 年度秋田県水産振興センター業務報告書, pp. 172–180, 2014.
- [168] 杉山秀樹: 八郎潟・八郎湖の魚 干拓から 60 年、何が起きたのか. さきがけブックレット, 2019.
- [169] 吉田亨, 藤林恵, 田中仁志, 岡野邦宏, 高田芳博, 宮田直幸: 富栄養湖沼における若年個体が少ないイシガイ個体群の再生産状況. *土木学会論文集 G (環境)*, 75 (7), III_265–III_272, 2019.
- [170] Tateda Y, Sakaguchi I, & Itani G: Scope for growth of *Mytilus galloprovincialis* and *Perna viridis* as a thermal stress index in the coastal waters of Japan: Field studies at the Uranouchi inlet and Yokohama. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 470, 55–63, 2015.
- [171] Griffiths RJ: Filtration, respiration and assimilation in the black mussel *Choromytilus meridionalis*. *Marine Ecology Progress Series*, 3, 63–70, 1980.
- [172] Lehane C, & Davenport J: Ingestion of bivalve larvae by *Mytilus edulis*: experimental and field demonstrations of larviphagy in farmed blue mussels. *Marine Biology*, 145(1), 101–107, 2004.
- [173] Kang CK, Sauriau PG, Richard P, & Blanchard GF: Food sources of the infaunal suspension-feeding bivalve *Cerastoderma edule* in a muddy sandflat of Marennes-Oléron Bay, as determined by analyses of carbon and nitrogen stable isotopes. *Marine Ecology Progress Series*, 187(1), 147–158, 1999.
- [174] DeNiro MJ & Epstein S: Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in

- animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42(3), 495–506, 1981.
- [175] Minagawa M, & Wada E: Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48(5), 1135–1140, 1984.
- [176] Peterson BJ, & Fry B: Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 18, 293–320, 1987.
- [177] Finlay JC & Kendall C: Stable isotope tracing of temporal and spatial variability in organic matter sources to freshwater ecosystems, in: *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*, 2nd edn., edited by: Michener R & Lajtha K, Blackwell Publishing, Oxford, UK, 283–333, 2008.
- [178] Kasai A, Horie H, & Sakamoto W: Selection of food sources by *Ruditapes philippinarum* and *Macra veneriformis* (Bivalva: Mollusca) determined from stable isotope analysis. *Fisheries Science*, 70(1), 11–20, 2004.
- [179] Kasai A, Ishizaki D, & Isoda T: Isotopic trophic-step fractionation of the freshwater clam *Corbicula sandai*. *Fisheries Science*, 82(3), 491–498, 2016.
- [180] Yokoyama H, & Ishihi Y: Feeding of the bivalve *Theora lubrica* on benthic microalgae: isotopic evidence. *Marine Ecology Progress Series*, 255, 303–309, 2003.
- [181] Shin PKS, Yip KM, Xu WZ, Wong WH, & Cheung SG: Fatty acid as markers to demonstrating trophic relationships among diatoms, rotifers and green-lipped mussels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 357(1), 75–84, 2008.
- [182] Kürten B, Frutos I, Struck U, Painting SJ, Polunin NVC, & Middelburg JJ: Trophodynamics and functional feeding groups of North Sea fauna: a combined stable isotope and fatty acid approach. *Biogeochemistry*, 113(1), 189–212, 2013.
- [183] Braeckman U, Provoost P, Sabbe K, Soetaert K, Middelburg JJ, Vincx M, & Vanaverbeke J: Temporal dynamics in a shallow coastal benthic food web: Insights from fatty acid biomarkers and their stable isotopes. *Marine Environmental Research*, 108, 55–68, 2015.
- [184] Fujibayashi M, Nishimura O, & Tanaka H: Evaluation of Food Sources Assimilated by Unionid Mussels Using Fatty Acid Trophic Markers in Japanese Freshwater Ecosystems. *Journal of Shellfish Research*, 35(1), 231–235, 2016.
- [185] Day JG, & DeVille MM: Cryopreservation of Algae (Chapter 9) In Day JG & McLellan MR (eds.) *Methods in Molecular Biology* vol. 38, Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, p.81–89, Humana Press, Totowa, USA, 1995.
- [186] Mori F, Erata M, & Watanabe MM: Cryopreservation of cyanobacteria and green algae in the NIES-Collection. *Microbiology and Culture Collections*, 18, 45–55, 2002.
- [187] JIS K 0400-80-10: 2000 水質-生化学的パラメータの測定-クロロフィル a 濃度の吸光度定量
- [188] Nusch EA: Comparison on different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Archiv für Hydrobiologie. Beihefte, Ergebnisse der Limnologie*, 14, 14–

- 36, 1980.
- [189] Abdulkadir S, & Tsuchiya M: One-step method for quantitative and qualitative analysis of fatty acids in marine animal samples. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 354(1), 1–8, 2008.
- [190] Srisuksomwong P, Whangchai N, Yagita Y, Okada K, Peerapornpisal Y, & Nomura N: Effects of ultrasonic irradiation on degradation of Microcystin in fish ponds. *International Journal of Agriculture and Biology*, 13(1), 67–70, 2011.
- [191] R Core Team: R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020.
- [192] Illman AM, Scragg AH, & Shales SW: Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 631–635, 2000.
- [193] Scragg AH, Illman AM, Carden A, & Shales SW: Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass and Bioenergy*, 23(1), 67–73, 2002.
- [194] Gu H, Hu M, Wei S, Kong H, Huang X, Bao Y, & Wang Y: Combined effects of toxic *Microcystis aeruginosa* and hypoxia on the digestive enzyme activities of the triangle sail mussel *Hyriopsis cumingii*. *Aquatic Toxicology*, 212, 241–246, 2019.
- [195] Thompson RJ, & Bayne BL: Active metabolism associated with feeding in the mussel *Mytilus edulis* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 9(1), 111–124, 1972.
- [196] Pirini M, Manuzzi MP, Pagliarani A, Trombetti F, Borgatti AR, & Ventrella V: Changes in fatty acid composition of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) fed on microalgal and wheat germ diets. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 147(4), 616–626, 2007.
- [197] Hendriks IE, van Duren LA, & Herman PMJ: Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 296(2), 199–213, 2003.
- [198] Reynolds CS, Oliver RL, & Walsby AE: Cyanobacterial dominance: the role of buoyancy regulation in dynamic lake environments, *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 21, 379–390, 1987.
- [199] Oliver RL, & Ganf GG: Freshwater blooms. In Whitton B.A. Potts M., (eds.), *The Ecology of Cyanobacteria*. Dordrecht, Germany: Kluwer Academic Publishers, New York, p. 149, 2000.
- [200] Reynolds, CS: Physical determinants of phytoplankton succession. In Sommer U. (ed.), *Plankton Ecology: Succession in Plankton Communities*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 9–56, 1989.
- [201] Ma X, Wang Y, Feng S, & Wang S: Vertical migration patterns of different phytoplankton species during a summer bloom in Dianchi Lake, China. *Environmental Earth Sciences*, 74, 3805–3814, 2015.

- [202] Kawase M, & Yagi A: Water purification abilities of eight Japanese Unionidae. *Research Report of the Research and Education Center for Inlandwater Environment, Shinshu University*, 6, 13–27, 2010.
- [203] 近藤高貴, 加納正子: イシガイ類 (淡水産二枚貝) 6種の移動行動, *陸水学報*, 8, 1–4, 1993.
- [204] Harris GP: *Phytoplankton ecology: structure, function and fluctuation*. Chapman and Hall, London, UK. 1986.
- [205] 近藤正, 三沢眞一, 豊田勝: 八郎湖の N 収支と中央干拓地の農業用水管理の影響. *農業農村工学会全国大会講演要旨集*, 674–675, 2007.
- [206] 川原谷浩, 石山大三, 世良耕一郎: 秋田県八郎潟干拓地に湧出する高濃度リン湧出水の地球化学的特徴. *NMCC 共同利用研究成果報文集*, 17, 89–95, 2010.
- [207] 環境省 水・大気環境局: 公共用水域水質測定結果:
<https://www.env.go.jp/water/suiiki/index.html>
- [208] 琵琶湖環境科学研究センター 環境監視部門 生物圏担当: プランクトンモニタリング調査マニュアル, 2015.
- [209] Hawkins PR, Holliday J, Kathuria A, & Bowling L: Change in cyanobacterial biovolume due to preservation by Lugol's Iodine, *Harmful algae*, 4, 1033–1043, 2005.
- [210] Takamura, N., Yasuno, M.: Diurnal changes in the vertical distribution of phytoplankton in hypertrophic Lake Kasumigaura, Japan. *Hydrobiologia*, 112, 53–60, 1984.
- [211] Chien YC, Wu SC, Chen WC, & Chou CC: Model simulation of diurnal vertical migration patterns of different-sized colonies of *Microcystis* employing a particle trajectory approach. *Environmental Engineering Science*, 30, 179–186, 2013.
- [212] Nakamura T, Adachi Y, & Suzuki M: Flotation and sedimentation of a single microcystis floc collected from surface bloom, *Water Research*, 27, 979–983, 1993.
- [213] Nadeau TL, Howard-Williams C, & Castenholz RW: Effects of solar UV and visible irradiance on photosynthesis and vertical migration of *Oscillatoria* sp. (Cyanobacteria) in an Antarctic microbial mat. *Aquatic Microbial Ecology*, 20, 231–243, 1999.
- [214] Eppley RW, Rogers JN, & McCarthy JJ, Sournia A: Light/dark periodicity in nitrogen assimilation of the marine phytoplankters *Skeletonema costatum* and *Coccolithus huxleyi* in N-limited chemostat culture. *Journal of Phycology*, 7, 150–154, 1971.
- [215] MacIsaac, JJ: Diel cycles of inorganic nitrogen uptake in a natural phytoplankton population dominated by *Gonyaulax polyedra*. *Limnology and Oceanography*, 23, 1–9, 1978.
- [216] Riegman R., Stolte W, Noordeloos AAM, & Slezak D: Nutrient uptake and alkaline phosphate (EC 3:1:3:1) activity of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) during growth under N and P limitation in continuous cultures, *Journal of Phycology*, 36, 87–96, 2000.
- [217] Singh NK, & Dhar DW: Nitrogen and phosphorous scavenging potential in microalgae, *Indian Journal of Biotechnology*, 6, 52–56, 2007.

- [218] Sahu A, Pancha I, Jain D, Paliwal C, Ghosh T, Patidar S, Bhattacharya S, & Mishra S: Fatty acids as biomarkers of microalgae. *Phytochemistry*, 89, 53–58, 2013.
- [219] 近藤高貴: イシガイとトンガリササノハガイの個体群密度と成長. *貝類学雑誌*, 51(3), 219-224, 1992.
- [220] 石田惣, 久加朋子, 金山敦, 木邑聡美, 内野透, 東真喜子, 波戸岡清峰: 外来魚の優占がイシガイ科二枚貝の繁殖に与える負の影響: 淀川ワンド域におけるイシガイ *Unio douglasiae nipponensis* での事例. *保全生態学研究*, 15(2), 265–280, 2010.
- [221] 桑原明大, 松葉成生, 井上幹生, 畑啓生: 愛媛県松山平野におけるイシガイ科貝類個体群の衰退. *保全生態学研究*, 22(1), 91–103, 2017.
- [222] 照井慧, 宮崎佑介, 松崎慎一郎, 鷲谷いつみ: 北海道朱太川水系におけるカワシシユガイ個体群の現況と局所密度に影響する要因. *保全生態学研究*, 16(2), 149–157, 2011.
- [223] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, & Kumar S: MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729, 2013.
- [224] Yamanaka H, Minamoto T, Matsuura J, Sakurai S, Tsuji S, Motozawa H, Hongo M, Sogo Y, Kakimi N, Teramura I, Sugita M, Baba M, & Kondo, A: A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant. *Limnology*, 18(2), 233–241, 2019.
- [225] Galluzzi L, Bertozzini E, Penna A, Perini F, Pigalarga A, Graneli E, & Magnani M: Detection and quantification of *Prymnesium parvum* (Haptophyceae) by real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 46(2), 261–266, 2008.
- [226] Lorenz TC: Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*, (63), e3998, 2012.
- [227] Cao Y, Griffith JF, Dorevitch S, & Weisberg SB: Effectiveness of qPCR permutations, internal controls and dilution as means for minimizing the impact of inhibition while measuring *Enterococcus* in environmental waters. *Journal of Applied Microbiology*, 113(1), 66–75, 2012.
- [228] Marshall NT, Vanderploeg HA, & Chaganti SR: Environmental (e)RNA advances the reliability of eDNA by predicting its age. *Scientific Reports*, 11(1), 2769, 2021.
- [229] Barnhart MC, Haag WR, & Roston WN: Adaptations to Host Infection and Larval Parasitism in Unionoida. *Journal of the North American Benthological Society*, 27(2), 370–394, 2008.
- [230] Ishibashi R, Komaru A, & Kondo T: Sperm sphere in unionid mussels (Bivalvia: Unionidae). *Zoological Science*, 17(7), 947–950, 2000.
- [231] Aldridge DC, & McIvor AL: Gill evacuation and release of glochidia by *Unio pictorum* and *Unio tumidus* (Bivalvia: Unionidae) under thermal and hypoxic stress. *Journal of*

- Molluscan Studies*, 69(1), 55–59, 2003.
- [232] Marshall NT, Banta JA, Williams LR, Williams MG, & Placyk JS: DNA Barcoding Permits Identification of Potential Fish Hosts of Unionid Freshwater Mussels. *American Malacological Bulletin*, 36(1), 42–56, 2018.
- [233] Jansen W, Bauer G, & Zahner-Meike E: Glochidial mortality in freshwater mussels. p.p. 185–212 in G. Bauer and K. Wächtler (eds). Ecology and evolution of the freshwater mussels Unionoida. Ecological Studies 145. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 2001.
- [234] Paling JE: A method of estimation the relative volume of water flowing over the different gills of a freshwater fish. *Journal of Experimental Biology*, 48(3), 533–544, 1968.
- [235] Neves RJ, Weaver LR, & Zale AV: An evaluation of host fish suitability for glochidia of *Villosa vanuxemi* and *V. nebulosa* (Pelecypoda: Unionidae). *American Midland Naturalist*, 113(1), 13–19, 1985.
- [236] Fujibayashi M, Ashino M, Okano K, Miyata N: Spatial and seasonal variability of sedimentary organic matter and its origin in an algal-blooming eutrophic lake. *Ecological Indicators*, 107, 105557, 2019.
- [237] Strayer DL (Ed.): *Freshwater Mussel Ecology: A Multifactor Approach to Distribution and Abundance*. Berkeley, CA, University of California Press, 2008.
- [238] Lopes-Lima M, Teixeira A, Froufe E, Lopes A, Varandas S, & Sousa R: Biology and conservation of freshwater bivalves: Past, present and future perspectives. *Hydrobiologia*, 735(1), 1–13, 2014.
- [239] Benedict A, & Geist J: Effects of water temperature on glochidium viability of *Unio crassus* and *Sinanodonta woodiana*: implications for conservation, management and captive breeding. *Journal of Molluscan Studies*, 87(2), eyab011, 2021.
- [240] Ellis MM: Erosion silt as a factor in aquatic environments. *Ecology*, 17, 29–42, 1936.
- [241] Strayer DL, & Ralley J: Microhabitat use by an assemblage of stream-dwelling unionaceans (Bivalvia), including two rare species of Alasmidonta. *Journal of the North American Benthological Society*, 12(3), 247–258. 1993.
- [242] 中野光議: 農業水路におけるイシガイ目二枚貝の生態と保全. *農業と園芸*, 94(12), 1048–1062, 2019.
- [243] 竹山佳奈, 上田正樹, 岩本裕之: アサリ幼生の着底時における底質粒径選択性について. *平成17年度日本水産工学会学術講演会講演論文集*, 83–86, 2005.
- [244] 山崎幸夫, 須能紀之, 根本隆夫: 潤沼におけるヤマトシジミ稚貝の分布と底質環境. *茨城内水試研報*, 41, 25–31, 2008.
- [245] 日向野純也, 安永義暢: 開放性砂浜域における海底地形変化と二枚貝の分布性について. *海岸工学講演会論文集*, 35, 767–771, 1988.