

4. 流出源評価

山川英治（沖縄県環境科学センター）

4-1. 目的

オニヒトデ総合対策事業では、幼生生き残り仮説を検証するために、海域の栄養塩類の変動を把握する水質調査を実施している。沿岸海域で変動する栄養塩類の濃度は、生活排水や事業場排水など陸から海に流れこむ物質に関係していると予想される。そのため、陸域から沿岸海域に流れ込む負荷量を、沖縄県内の土地利用データ、統計データを用いて BOD 換算値として広い範囲で比較することを目的とした。負荷量は、実際の栄養塩類濃度やオニヒトデの発生量等との関係を解析できるように、GIS データとして整理し、陸域から海域へ流入する負荷量（BOD 換算）を推定した。平成 26 年度は土地利用現況図と統計資料を元に、流域ごとの負荷量を算出した。今年度は、統計資料には反映されていなかった特定事業場の負荷量を、昨年度作成した陸域海域区分毎の BOD 負荷量に追加した。

4-2. 調査方法

原単位法を用いた流域毎の負荷量の算出は、平成 26 年度の手法を用いた（沖縄県 2015）。特定事業場の負荷量は、沖縄県が平成 20 年 12 月に行った上乘せ排水基準の見直しの時の、特定事業場排水の推定負荷量を用いた。リストにある事業場の大まかな位置を GIS 上で整理し、属性に負荷量を加えた。整理した事業場の負荷量を、流域ごとに集計し平成 26 年度の陸域海域区分毎の BOD 負荷量に追加した。特定事業場以外の流域毎の負荷量の算出は昨年度の算出結果を用いた。

4-3. 結果と考察

表3-4-1に昨年算出した地目分類ごとの負荷量と今年度追加した産業分類毎の負荷量を示す。今回算出した結果では、畜産からの負荷量の割合が最も高く50%以上を占め、家庭排水は水道業を含めると30%近い割合を占めている。

流域界と海域界が統合された陸域海域区分（沖縄県 2011）毎のBOD負荷量を図3-4-1から図3-4-7に示す。昨年度と同様に、沖縄島では那覇市や沖縄市、宮古島では平良市（現宮古島市）、石垣島では石垣市など各地域の人口が集中している地域で負荷量が高い傾向があった。栄養塩類の流出に関係していると考えられる下水処理施設などの特定排出施設の負荷が考慮されたことで、宜野湾市や那覇市周辺の負荷量が増加している。今回算出したBOD負荷量とオニヒトデ大量発生の関係を考える際には、以下の点に注意が必要である。

- ・BODの負荷量と栄養塩負荷は違う。
- ・原単位に関する調査は主に温帯域で行われており、沖縄とは天候や季節などの条件が違う。そのため、自然浄化率や到達率などがことなり、原単位や除去率が異なる可能性がある。
- ・降雨時と晴天時など流量と負荷は変化する。

オニヒトデの大量発生が陸から海に流入する栄養塩類と関係する場合、対策を行うためには栄養塩負荷の高い地域や負荷の原因を特定することが必要である。一方で、栄養塩濃度調査などの研究事業から、オニヒトデ幼生が粒子態または溶存態の有機物を利用している可能性が指摘されており、そのような場合はBOD原単位に基づいた推定は有効だと考えられる。

今回行ったBOD原単位法による負荷量の推定は、栄養塩負荷でないことや情報が不十分な点や平成20年以前（古いものは平成5年）の情報を用いている点など、注意すべき点が多いが、広い範囲を把握できることが大きな利点である。

表3-4-1. 地目分類及び産業分類毎の負荷量の割合。

	分類	負荷量(%)
地目分類	家庭排水	25.4
	畜産排水	50.8
	商業	6.8
	工業	0.0
	田	0.1
	畑	4.4
	山林	4.9
	原野	0.3
	その他	0.0
	産業分類	農業
水産養殖業		0.0
総合工事業		0.0
糖類製造業		0.1
食料品製造業		0.0
印刷・同関連業		0.0
化学工業		0.0
非鉄金属製造業		0.0
金属製品製造業		0.0
電気業		0.0
水道業		4.4
各種商品小売業		0.4
その他小売業		0.3
一般飲食店		0.0
宿泊業		1.3
医療業		0.3
学校教育		0.0
学術・開発研究機関		0.0
娯楽業		0.3
廃棄物処理業		0.0
その他のサービス業	0.0	
国家公務	0.0	

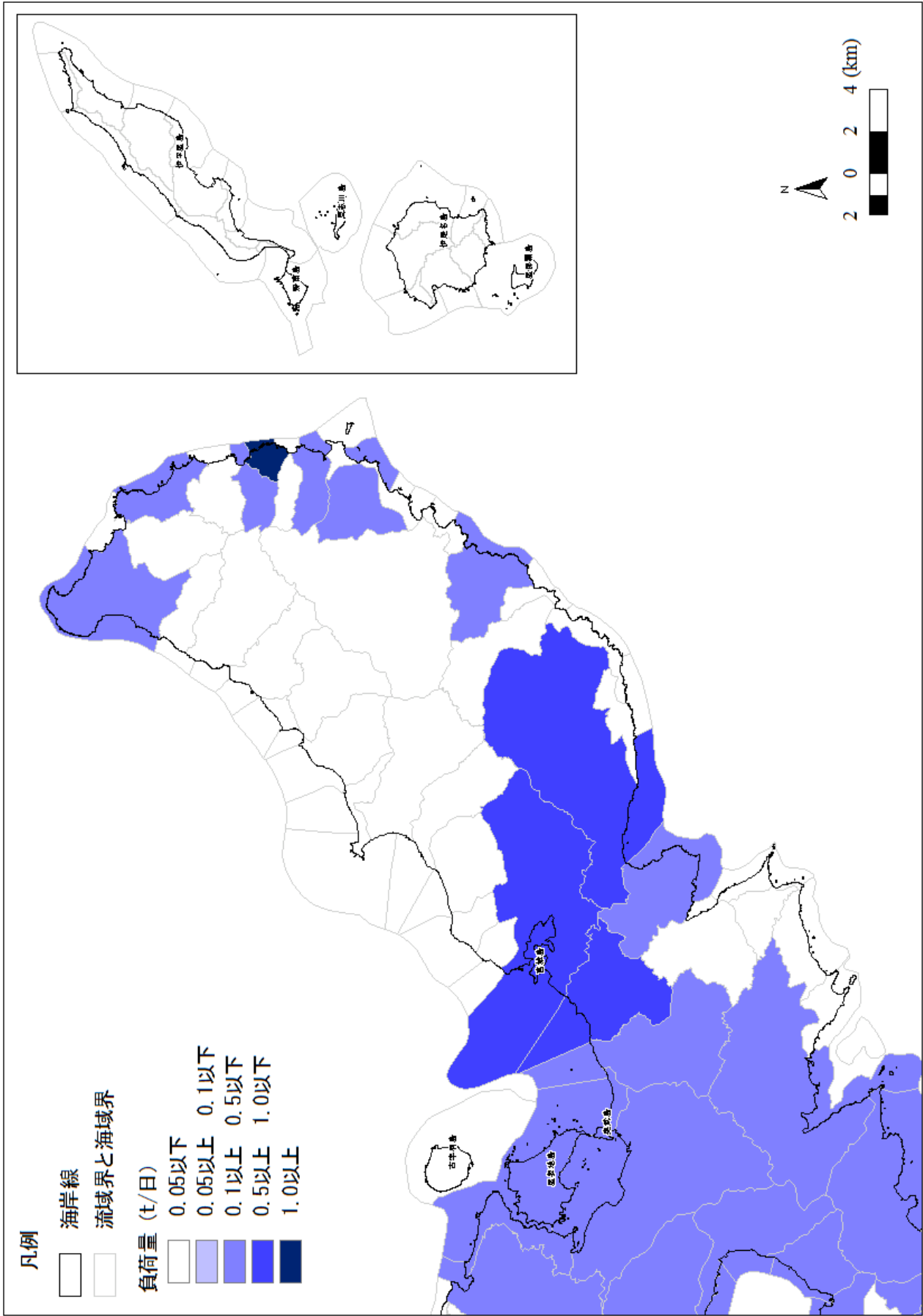


図3-4-4-1. 陸域海域区分毎のBOD負荷量(沖縄島北部).

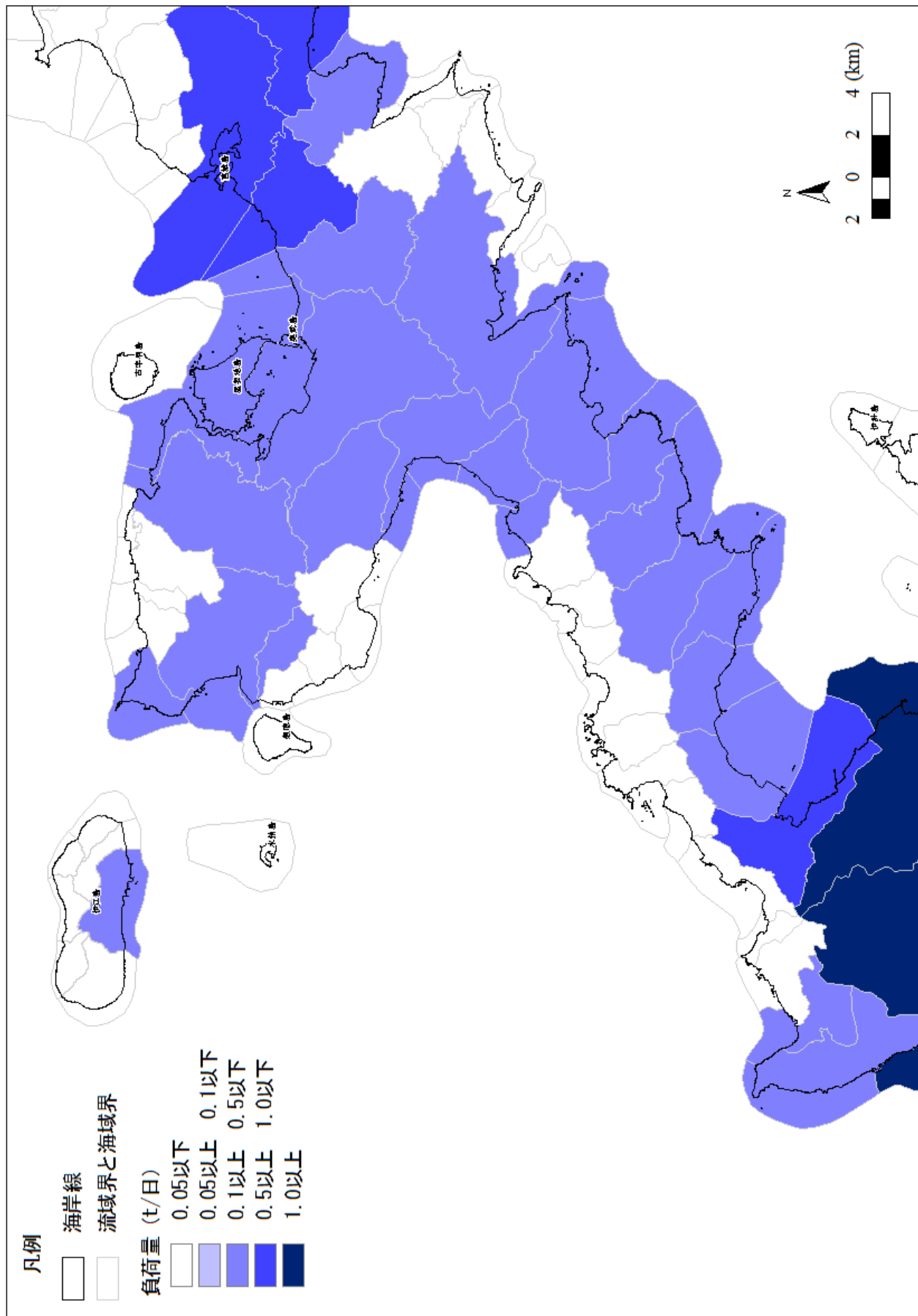


図3-4-4-2. 陸域海域区分毎のBOD負荷量(沖縄島中部).

この図は次の出典を参考に作成した。
 国土交通省, 国土数値情報(平成22年度行政区域データ)
 <<http://nftp.mlit.go.jp/ksj/>>
 沖縄県土地対策課, 土地利用現況図 GISデータ。
 沖縄県自然保護課, 平成23年度サンゴ礁資源情報整備事業報告書

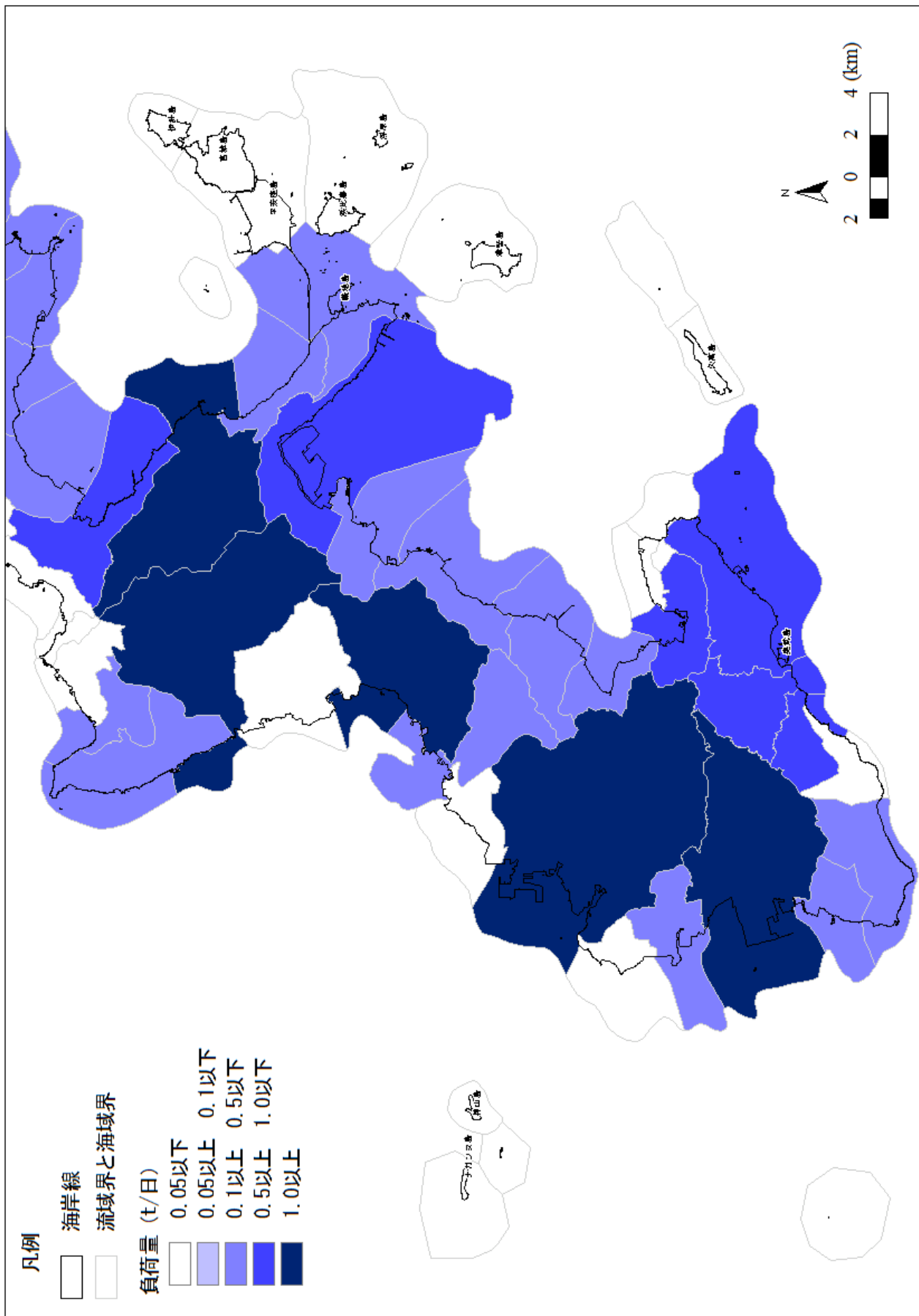


図3-4-3. 陸域海域区分毎のBOD負荷量(沖縄島南部).

この図は次の出典を参考に作成した。
 国土交通省、国土数値情報(平成22年度行政区域データ)
 <<http://nfto.mlit.go.jp/ksj>>
 沖縄県土地対策課、土地利用現況図GISデータ。
 沖縄県自然保護課、平成23年度サンゴ礁資源情報整備事業報告書。

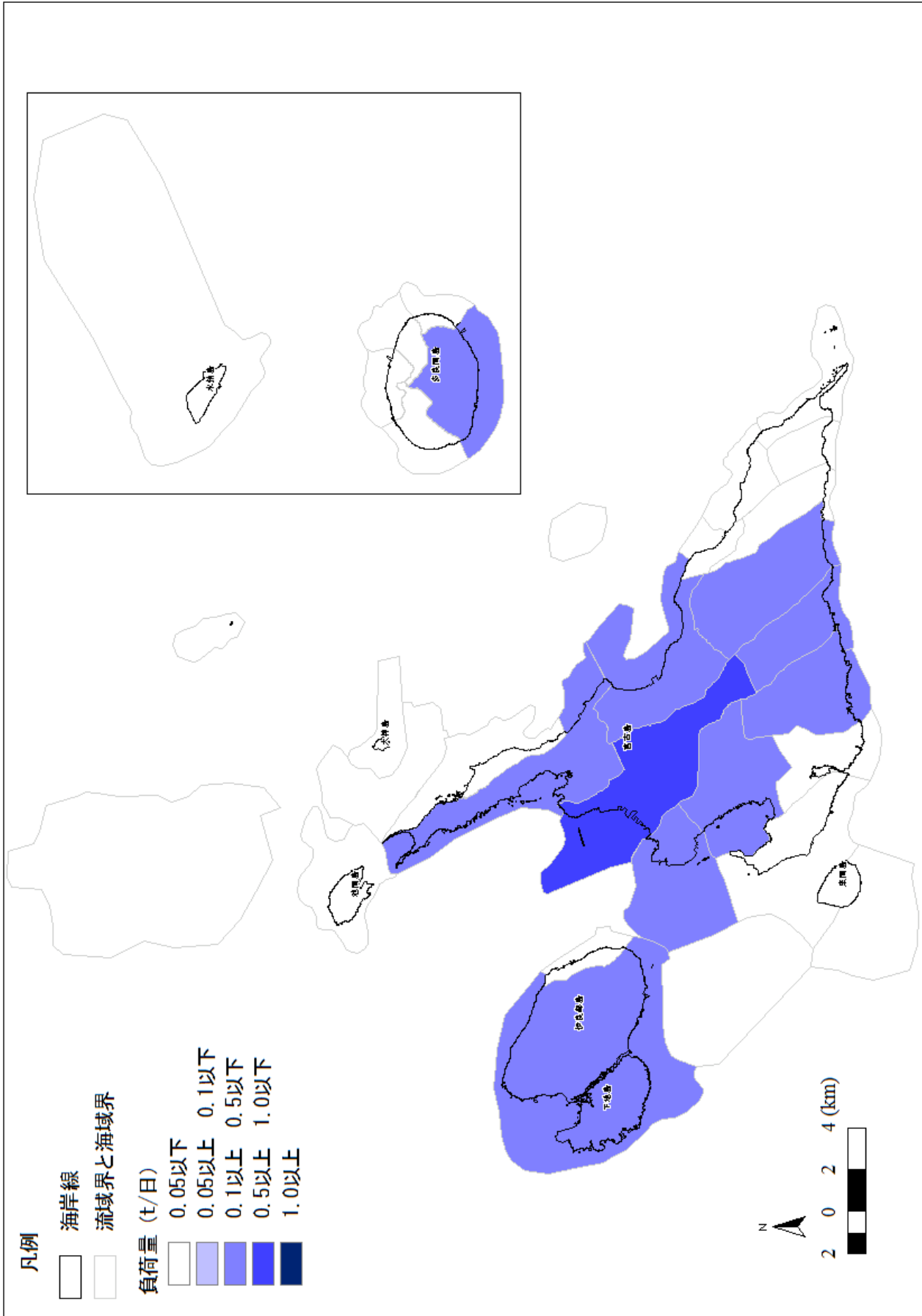
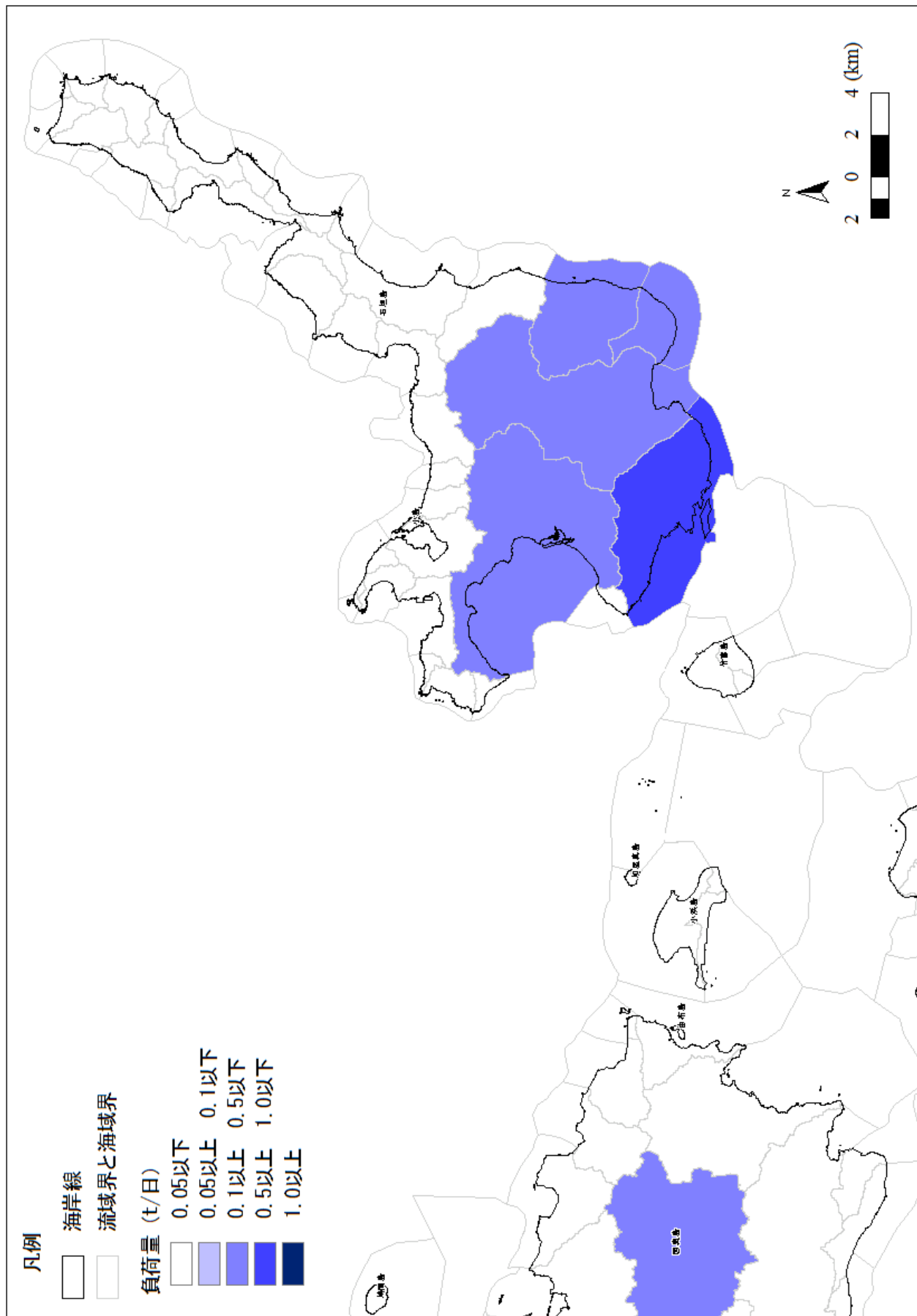



図3-4-4. 陸域海域区分毎のBOD負荷量(宮古).




この図は次の出典を参考に作成した。
 国土交通省 国土数値情報(平成22年度行政区域データ)
<http://nftp.mlit.go.jp/ksj/>
 沖縄県土地対策課 土地利用現況図 GISデータ。
 沖縄県自然保護課 平成23年度サンゴ礁資源情報整備事業報告書

図3-4-5. 陸域海域区分毎のBOD負荷量(石垣).

凡例

-  海岸線
-  流域界と海域界

- 負荷量 (t/日)
-  0.05以下
 -  0.05以上 0.1以下
 -  0.1以上 0.5以下
 -  0.5以上 1.0以下
 -  1.0以上

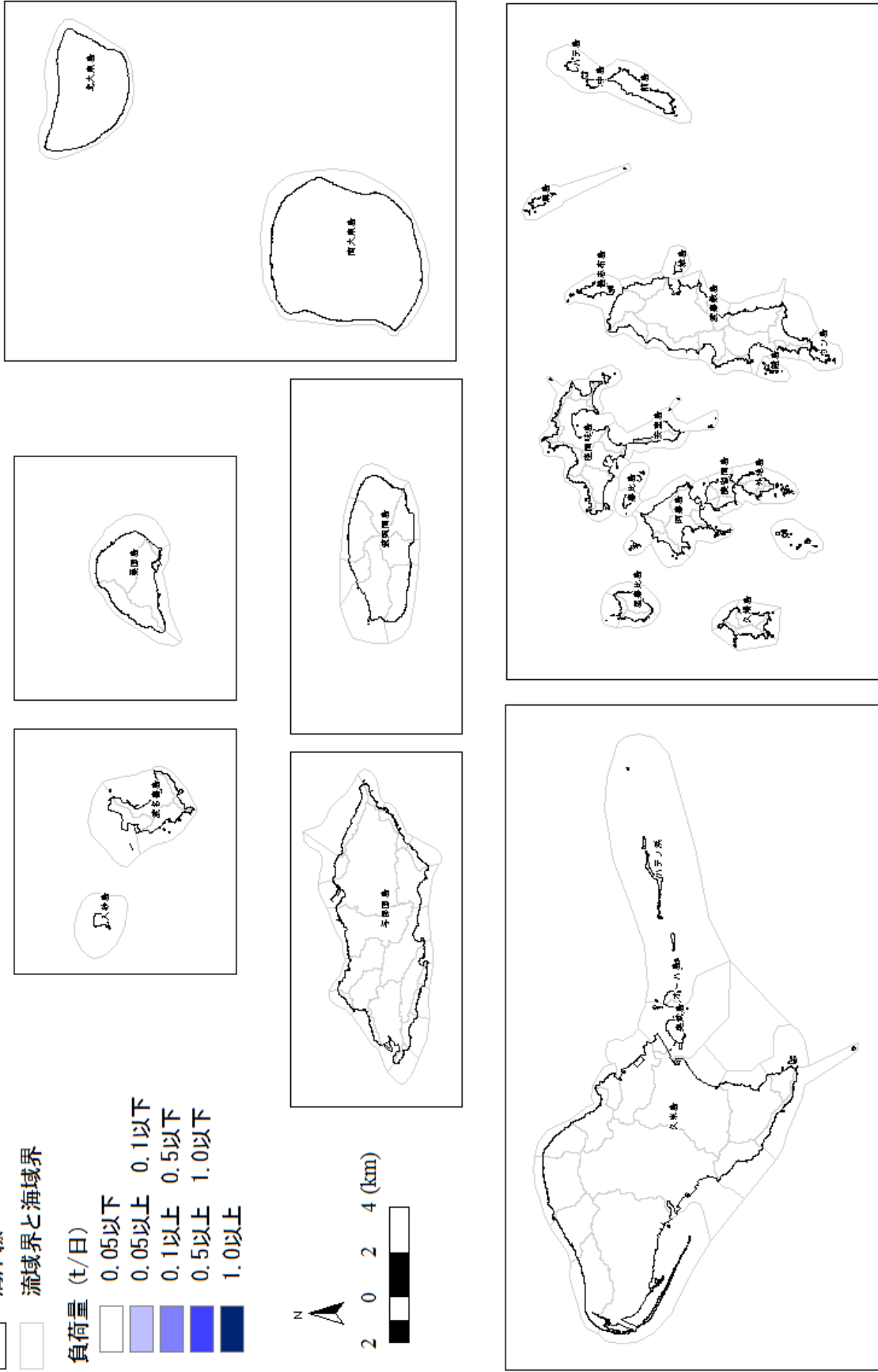
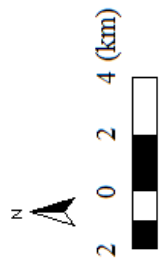


図3-4-4-7. 陸域海域区分毎のBOD負荷量(その他).

この図は次の出典を参考に作成した。
 国土交通省、国土数値情報(平成22年度行政区域データ)
 <<http://nlftp.mlit.go.jp/ksj/>>
 沖縄県土地利用現況図GISデータ
 沖縄県自然保護課、平成23年度サンゴ礁資源情報整備事業報告書。

<参考文献等>

沖縄県環境保全課 河川汚濁負荷量調査

沖縄県土地対策課 土地利用現況図

沖縄県 沖縄県統計年鑑

市町村別地目別民有地面積（平成 11、14、17、18 年度）

市町村別人口、人口密度及び世帯数（平成 13、16 年）

家畜家禽の市町村別・種類別飼養頭羽数（平成 7 年～平成 14、17、18 年）

市町村別の産業別事業所数及び従業上の地位別従業者数（平成 13、17、18 年）

種別・地域別の宿泊施設数（市町村別）

宿泊施設の利用状況（地区別稼働率の推移）

環境省 一般廃棄物処理実態調査結果

http://www.env.go.jp/recycle/waste_tech/ippan/stats.html

社団法人日本下水道協会 流域別下水道整備操業計画調査指針と解説

沖縄県下水道管理事務所 下水道維持管理年報

国松 孝男・村岡 浩爾（1989）河川の汚濁モデル解析

国土交通省国土政策局国土情報課 国土数値情報（行政区域）<http://nlftp.mlit.go.jp/ksj/>

国土交通省国土地理院地図 空中写真閲覧サービス <http://mapps.gsi.go.jp/maplibSearch.do>

沖縄県（2011）平成 23 年度サンゴ礁資源情報整備事業 サンゴ礁資源調査事業「沖縄島周辺離島地域」「宮古地域」「大東地域」「波照間地域」報告書.

沖縄県（2015）平成 26 年度オニヒトデ総合対策事業報告書.

5. 幼生分散

北村誠・小笠原 敬（沖縄県環境科学センター）

5-1. 目的

オニヒトデ大量発生幼生生き残り仮説を検証するためには、水質や海流、着底後の稚ヒトデ分布に関する研究のみならず、どの場所に幼生が多いのかを実際に野外で調べる研究も必要となる。しかしながら、オニヒトデの幼生は分布密度が低く、また他のヒトデ幼生と形態が似ていることから浮遊幼生期における野外での研究は極めて困難であった。池原ら（2012）によってプランクトンネットで採取した一定のサンプルからオニヒトデ幼生を検出するための簡易スクリーニング法（PCR・電気泳動）が報告された。平成26年度、我々も同様な手法を使って、沖縄島西海岸におけるプランクトンネットのサンプルを解析したところ、63サンプル中2つのサンプルにオニヒトデ特異的なバンドが得られた（恩納海域のムーンビーチと長浜グチ）。さらにそれら2サンプルを25mLずつ実体顕微鏡によって観察したところ表3-5-1に示す結果を得た。

表3-5-1. H26年度の検鏡結果(特異的バンドを検出した2サンプル)。

日付	地点	サンプル密度	発生段階(大きさ)	受精後の推定経過時間
H26 7/11	ムーンビーチ	2個体/25mL	繊毛幼生(400 μ m) 初期ビピンナリア幼生(500 μ m)	1日 3-4日
H26 7/11	長浜グチ	—	—	—

本年度は、発生段階の異なる幼生を頻度よく捕獲することを目的に、サンプリング期間をオニヒトデの産卵時期周辺に絞り、サンプリング回数を増やす工夫をした。また、さらにサンプリング間隔を縮小するため、2地点（「北谷 P25cm」と「名嘉真（南） P25cm」）で7/1から7/21の間、毎日幼生サンプリングを行った。さらに船では入りにくい浅瀬海域（礁地）の採集地点も新たに追加し、浅瀬海域におけるオニヒトデ幼生の分布状況の把握も目的とした。

5-2. 方法

5-2-1. 幼生採集

沖縄島西海岸に設定した22地点（図3-5-1）において、6月から8月にかけてオニヒトデ幼生を211サンプル採集した（表3-5-2）。オニヒトデ幼生は、ろ水計を装着した北太平洋標準プランクトンネット（目合60 μ m、口径45cm、側長180cm）を用いて、水深7m以浅において水平曳きによって採集した。得られたサンプルはエタノールで速やかに固定した後、静置した。その後、上清を除き100mlのサンプル量とし、冷蔵保管した。また浅瀬海域は、スケールダウンした北太平洋標準プランクトンネット（目合60 μ m、口径25cm、側長70cm）を主に表層において、泳ぎ曳きと船曳きの2つの方法を、海域状況を見ながら選択し、採集を行った。

表3-5-2. 幼生サンプリングの概要.

海域	地点数	プランクトンネット 口径(cm)	サンプリング頻度
全域	名護から那覇まで6地点	45	6月下旬~8月, 週1回
恩納	恩納6地点 恩納4地点	45 25	6月下旬~8月, 週1回
砂辺	砂辺周辺2地点 砂辺周辺4地点	45 25	6月下旬~8月, 週1回
恩納 砂辺	名嘉真(南)1地点 北谷1地点	25	7/1~7/21 毎日, 7/24, 7/27

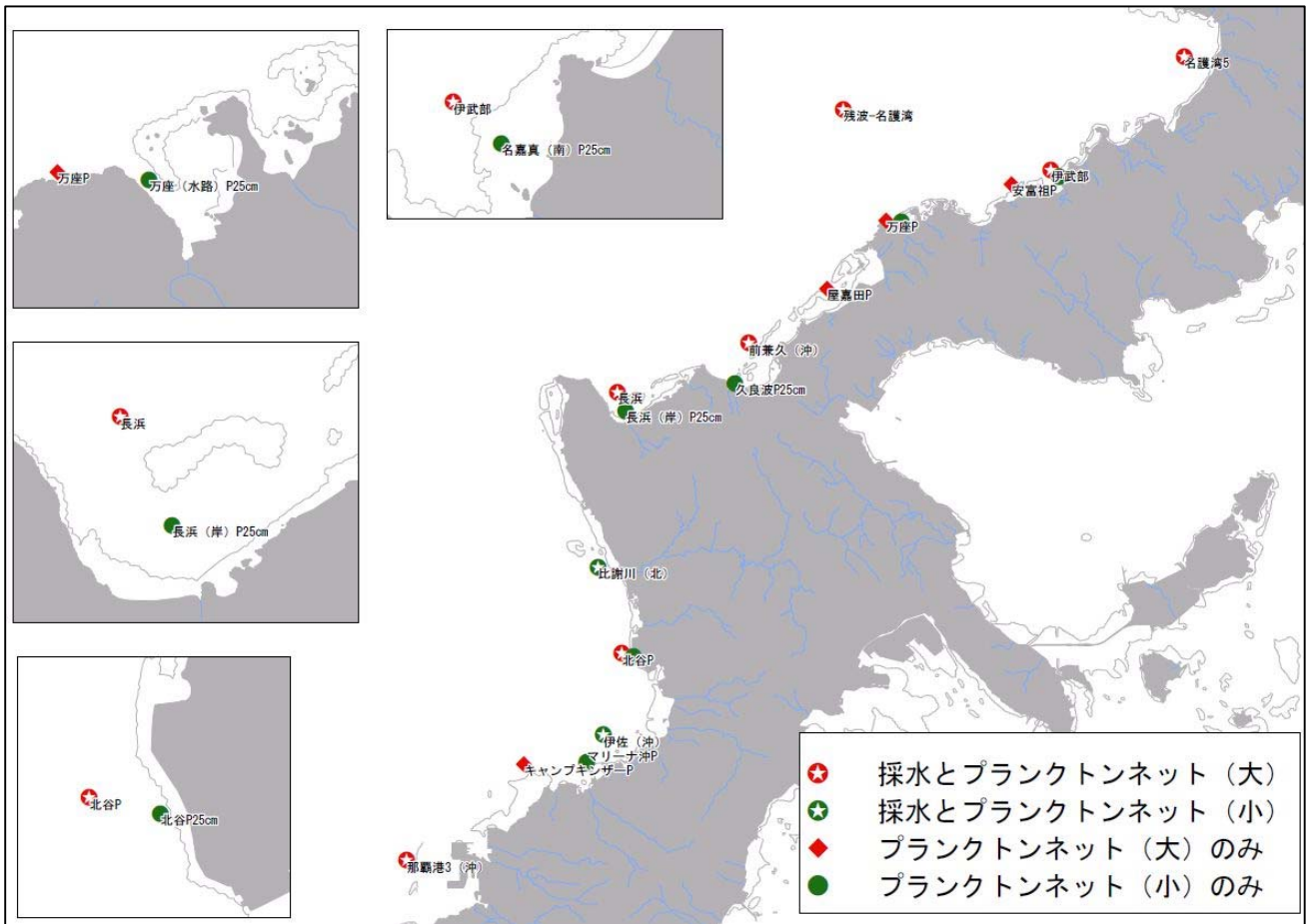


図3-5-1. 幼生サンプリング地点(大:口径 45cm, 小:口径 25cm).

5-2-1. 幼生の種同定

プランクトンネットによって得たサンプルの 1/20 量 (5ml) を用い、実体顕微鏡によるヒトデ幼生の判定を行った。観察されたヒトデ幼生の DNA 塩基配列のシーケンスを読取り、すでにある膨大なシーケンスデータベースとの相同性検索により種同定する。簡易スクリーニング法だけでは、オニヒトデ幼生の種同定が困難なことが本年度新たに報告された (小島ら, 2015)。よって本年度は、スクリーニング法を採用しない。

5-3. 結果および考察

実体顕微鏡による観察の結果、採集した 211 サンプル中 8 サンプルでヒトデ幼生が 9 個体確認された（表 3-5-3、表 3-5-4）。

表 3-6-3. 実体顕微鏡による観察結果 1.

	地点名	Jun.					Jul.					Aug.					Sep.							
		17	20	21	24	29	30	4	7	15	21	22	23	30	31	1	12	13	14	27	1	2	3	
全域	1 名護湾5			x								x			x		x							x"
	2 残波-名護湾			x								x			x		x							x"
	3 伊武部			x								x			x		x							x"
	4 前兼久(沖)			x								x			x		x							x"
	5 長浜		x				x					x			x		x							x"
	6 那覇港3(沖)		x				x						x		x		x							x"
恩納	1 伊武部	x			x		x	x	x					x				x, x"	x"					x"
	2 名嘉真(南)P25cm	x			x		x	x	x"				x"					x"	x"					x"
	3 安富祖P	x			x		x	x	x				x					x"	x"					x"
	4 万座P	x			x		x	x	x				x					x"	○"					○"
	5 万座(水路)P25cm	x			x		x	x	x"				x"					x"	x"					x"
	6 屋嘉田P	x			x		x	x	x				x					x"	x"					x"
	7 前兼久(沖)	x			x		x	x	x				x					○"	x"					x"
	前兼久表層																		x"					○"
	前兼久水深3m																		x"					
	8 久良波P25cm	x			x		x			x	x	x"			x"				x"	x"				
9 長浜	x			x		x			x	x	x			x				x, ○"	○"					x"
長浜表層																			○"					x"
10 長浜(岸)P25cm	x			x		x			x	x	x"			x"				x"	x"					x"
砂辺	1 比謝川(北)P25cm		x				x							x"				x"						x"
	2 北谷P		x				x							x				x						x"
	3 北谷 P25cm		x				x							x"				x"						x"
	4 伊佐(沖)P25cm		x				x							x"				x"						x"
	5 マリーナ沖 P25cm		x				x							x"				x"						○"
	6 キャンプキンザーP		x				x							x				x						x"

 : ネット直径25cm ○: 検出(目合60μm) *: 不検出(目合60μm)
 : ネット直径45cm ○": 検出(目合125μm) *": 不検出(目合125μm)

表 3-5-4. 実体顕微鏡による観察結果 2.

日付	地点	サンプル密度	発生段階(大きさ)
8/14	前兼久(沖)	1個体/5mL	中期ブラキオラリア幼生(800μm)
	長浜	1個体/5mL	中後期ブラキオラリア幼生(1100μm)
8/27	万座P	2個体/5mL	初期ブラキオラリア幼生(700μm)
			中期ブラキオラリア幼生(800μm)
	長浜 長浜表層	1個体/5mL 1個体/5mL	中期ブラキオラリア幼生(800μm) 中期ブラキオラリア幼生(750μm)
9/1	マリーナ沖	1個体/5mL	中期ブラキオラリア幼生(1050μm)
9/2	万座P	1個体/5mL	ビピンナリア幼生(400μm)
	前兼久表層	1個体/5mL	中期ブラキオラリア幼生(950μm)

表3-5-5. プランクtonネット(口径45cm)の1地点におけるろ水量.

[単位: m ³]	地点名	Jun.										Jul.				Aug.				Sep.													
		17	20	21	24	29	30	4	7	15	21	22	23	30	31	1	12	13	14	14	27	1	2	3									
全域	1 名護湾5			8.4				8.3				2.9				6.1	5.0							16.5									
	2 残波-名護湾			9.6				9.8				2.2				7.9	6.4							23.3									
	3 伊武部			15.7				2.9				3.1				8.7	4.1							17.0									
	4 前兼久(沖)			8.7				4.0				1.2				6.9	4.2							16.3									
	5 長浜			6.0				3.8				1.0					5.4							21.3									
	6 那覇港3(沖)			7.8			11.7				12.8					9.3						23.4											
恩納	1 伊武部	19.4		10.1			2.6			3.5	8.6	7.9							7.7	17.0	13.6			15.4									
	3 安富相P	0.2		9.2			9.6			8.3	8.0	3.7							19.1	25.1				15.6									
	4 万座P	15.6		8.8			3.4			4.4	3.7	3.7							18.5	20.0				11.1									
	6 屋嘉田P	9.8		8.8			1.6			9.3	0.7	5.2							21.2	19.1				17.6									
	7 前兼久(沖)	10.1		7.2			5.4			2.5	9.9	5.9							23.0	23.2				17.7									
	前兼久表層																							1.4									
	前兼久水深3m																																
	9 長浜	12.4		13.8			29.6			5.8	5.7	10.0							5.6	12.4	15.5			15.4									
砂辺	1 比謝川(北)P25cm																							13.4									
	2 北谷P			3.7			5.9					8.8												19.3									
	目合: 60μm	6月平均ろ水量値(±SD) = 9.4 (±5.9)																							7月平均ろ水量値(±SD) = 5.6 (±2.9)			8月平均ろ水量値(±SD) = 6.5 (±1.7)			16.5 (±5.0)		
	目合: 125μm	6月平均ろ水量値(±SD) = 3.7																							7月平均ろ水量値(±SD) = 8.8			8月平均ろ水量値(±SD) = 4.0			19.3		
全地点におけるろ水量平均値 : 目合(60μm) = 7.1m ³ 目合(125μm) = 18.1m ³ <100mあたりのろ水量計算値: 15.9m ³ >																																	

6/17 から 8/13 におけるプランクトンネット（以下、ネットとする）採集では、前年度と同様に目合 60 μm （口径 45cm）のろ布が用いられ、一匹のヒトデ幼生も捕獲できない結果となった。表 3-5-5 の月別平均ろ水量の比較から、6 月に比べ 7・8 月のろ水量が 3 から 4 割減少していることが判る。これはろ布の目詰まりが原因と考えられ、実体顕微鏡観察においても大量の懸濁物質がサンプル内に混入していた。この時期、沖縄県本島西海岸は、台風などによる海況の悪化の影響で、底質の巻上げ、河川から懸濁物質・赤土の流入など、ろ布の目詰まりが起こる要因が多くなると考えられる。したがって、オニヒトデの産卵期以降のサンプリングに目合 60 μm のろ布を使用することは不適當であることが判った。

一方、8/14 から目合 125 μm （口径 45cm）のろ布が用いられた。その結果、ヒトデ幼生が捕獲されはじめ、採集地点は「万座 P」、「前兼久（沖）」、「長浜」の 3 地点に捕獲が集中する結果となった（表 3-5-3、3-5-4）。ヒトデ幼生を捕獲した地点における平均ろ水量（18.1 m^3 、9/2「前兼久表層」を除く）と、その以外の地点の平均ろ水量の値（18.8 m^3 ）に有意差はなく、ヒトデ幼生捕獲に成功した地点だけ長くネットを曳いた訳ではないことが判る。また、125 μm メッシュにおける 8 月の平均ろ水量は、目合 60 μm メッシュに比べ 3 倍のろ水量を有した。このろ水量の差が 6/17-8/13 と 8/14-9/3 における幼生捕獲の差になった可能性が高い。ろ水量だけが幼生捕獲の差であれば、ろ水量に反比例させた検鏡量があれば、幼生が観察できると考えられたため、ヒトデ幼生の捕獲に成功した平均ろ水量（18.1 m^3 ）を基準とし、検鏡量を補正し再検鏡を行った（表 3-5-6）。

表3-5-6. 再検鏡地点の補正検鏡量と検鏡結果.

日付	地点	ろ水量 (m^3)	補正検鏡量 (mL)	幼生のサンプル 密度	発生段階(大きさ)
7/21	万座P	3.7	19.5	—	—
7/21	前兼久(沖)	5.9	10.3	2個体/10.3mL	後期ビビンナリア幼生(700 μm) 初期ブラキオラリア幼生(900 μm)
7/21	長浜	10.0	4.1	—	—
7/22	北谷P	8.8	5.3	—	—
7/31	北谷P	5.0	13.1	1個体/13.1mL	中期ブラキオラリア幼生(950 μm)

目合(125 μm)プランクトンメッシュの全地点におけるろ水量平均値 : = 18.1 m^3

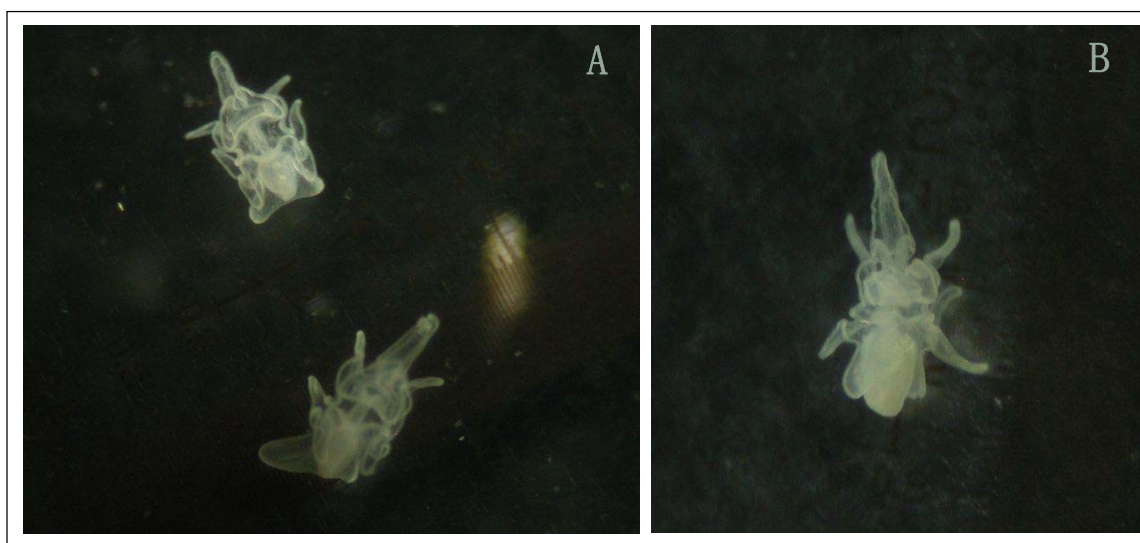


図3-5-2. 再検鏡によって観察されたヒトデ幼生. A) 7/21 前兼久(沖)、B)7/31 北谷 P.

この結果、採集地点「前兼久（沖）」と「北谷P」で、それぞれ2個体と1個体の幼生を観察した。オニヒトデ産卵期が7月初旬から中旬にかけて起こることを考慮すると、どちらの地点の幼生の発生段階もオニヒトデ幼生の発生段階とおおよそ一致する。

本年度新たに導入した口径25cmのプランクトンネット（目合60 μ mと125 μ m）によるサンプリングでは、ヒトデ幼生を確認することが出来なかった（表3-5-7、グレー塗潰し地点、表3-5-8）。

表3-5-7. 定点の連続採集サンプルの実体顕微鏡による観察結果.

	地点名	July																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	24	27	
1	名嘉真(南)P25cm	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x"	x"	x"	x"	x"	x"	x"	
2	北谷 P25cm				x	x	x	x	x	x				x	x	x	x	x"	x"	x"			x"	x"	

*: 不検出(目合60 μ m) *: 不検出(目合125 μ m)

表3-5-8. プランクトンネット(口径25cm)の1地点におけるろ水量.

				Jun.					Jul.					Aug.			[単位:m ³]
	地点名	17	20	24	29	30	7*	15*	21	22	30	31	12	14	27		
恩納	2 名嘉真(南)P25cm	2.2		4.4		1.4	-	-	22.4		19.4			4.6	12.4		
	5 万座(水路)P25cm	7.4		4.1		0.4			21.1		7.4			8.7	9.0		
	8 久良波P25cm	5.7		4.3		0.1	-	-	11.6		16.1			19.2	12.9		
	10 長浜(岸)P25cm	3.5		5.4		0.1	-	-	12.3		5.8			15.0	17.1		
砂辺	1 比謝川(北)P25cm		3.5		19.3					34.2		14.2	11.6				
	3 北谷 P25cm		0.0		0.1					8.4		3.0	2.3				
	4 伊佐(沖)P25cm		4.9		3.1					0.6		8.9	4.4				
	5 マリーナ沖 P25cm		0.0		-0.1					5.7		2.6	1.7				
開口:60 μ m		6月平均値(±SD) = 3.5 (±4.3)					7月平均値(±SD) = 12.1 (±8.6)					9.9 (±5.5)					
開口:125 μ m																	

全地点におけるろ水量平均値：開口(60 μ m) = 3.5m³, 開口(125 μ m) = 11.0m³

*: 測定不能

<100mあたりのろ水量計算値: 4.9m³>

目合60 μ mのろ水量は、口径45cmのプランクトンネット（目合60 μ m）と同様に、6月上旬から下旬にかけて減少していることが表8より判る。特に7月上旬は、ろ水計が全く回転していないため、プランクトンネットのろ布が完全に目詰まりをおこしたと考えられる。これは表6の連続採集を行った2地点（7月1日から16日）でも同様な結果であった。そのためこれらろ水量が極端に少ない地点での浅場海域におけるヒトデ幼生の分布は本年度の結果から判断できない可能性が高い。

7月17日以降から目合125 μ mのろ布を用いたことと、船舶によるネット水平曳きに変更（表6の2地点、表7の「北谷P25cm」、「マリーナ沖P25cm」を除く）したことで、ネットのろ水量は地点によるばらつきはあるものの、大きく増加した。その結果、恩納村周辺における浅瀬海域には、ヒトデ幼生がかなり低密度に分布している、もしくは分布しないことが判った。また、船舶によるネット水平曳きが出来ず、人力による水平曳きを7月17日以降も継続した「北谷P25cm」と「マリーナ沖P25cm」では、ろ水量に大きなばらつきが観察され、船舶によるネット曳航の手法の有効性が確認された。

今後、観察によって得られた全ヒトデ幼生を、アルカリ熱抽出法によってDNAを抽出し、PCRによるヒトデ特異的なDNA断片の増幅、シーケンスによる塩基配列の決定、BLASTによる相同性検索によりオニヒトデの種同定を行う。

プランクトンネット採集の地点における検鏡の量を、その地点におけるろ水量によって補正すれば、ヒトデ幼生を観察できることは判ったが、本年度の調査結果では、2匹/0.91m³が最高密度であった(7/21「前兼久(沖)」と8/27「万座P」)。これでは幼生確認はできても、本来の目的である幼生分布を把握するにはろ水量が不十分である可能性が高い。従って来年度は、1地点100m³(本年度125 μ m ネット平均ろ水量の5.5倍、60 μ m ネット平均ろ水量の14倍)のろ水量を目標に採集を行う予定である。来年度も一部浅瀬海域を除き、同一地点・同一時期におけるオニヒトデ幼生採集を行う。現在考えている改良点を以下に示す。

- ① ネットは曳航距離ではなく、ろ水量100m³を基準にする
- ② 浅瀬海域も含め、全地点で口径45cm・目合125 μ mのネットを用いる
- ③ ネット採集は、手曳き(20m・5回、合計100m)をやめ、船舶動力を用いる。
- ④ 表層におけるネット採集を基準水深とし、オニヒトデ産卵期(約1ヶ月)のみ表層と水平曳き(水深:-7~0m)を行う
- ⑤ 恩納村沿岸と砂辺沿岸の代表地点で、水深別の幼生採集を行う。

6. 幼生餌料制限

中富 伸幸（創価大学）・山本 修一（創価大学）

6-1. 目的

現在提唱されているオニヒトデ大量発生メカニズムの中で、オニヒトデの浮遊幼生期における生存率の増加が主要因である「幼生生き残り仮説」が最も有力視されている（e.g. Birkeland, 1982）。これまでナノサイズ（2-20 μm ）の植物プランクトンがオニヒトデ幼生の主要な餌資源であると報告されている（Lucas 1982; Ayukai 1994）が、自然環境下ではクロロフィル a 濃度は常時変動し、オニヒトデ幼生が生存できないと報告されている濃度（ $<0.25 \mu\text{g/L}$; Fabricius et al. 2010）にしばしば低下することが知られている。それでもなお、自然環境下でオニヒトデ幼生が生き残る理由として、植物プランクトン以外にも粒子状有機物（Particulate Organic Matter: POM、いわゆるデトリタスと呼ばれる懸濁有機物やバクテリア）、あるいは溶存有機物（Dissolved Organic Carbon: DOC）も餌として利用する可能性が指摘されている（Olson 1987）。そのため、オニヒトデ幼生が現場環境下において、どの有機物を餌として利用しているのかを明らかにすることは、大量発生メカニズムを理解し、効率の良いオニヒトデ対策を実施するうえで極めて重要である。

これまでオニヒトデ幼生の餌起源の推定は、主に染色法を用いて顕微鏡による胃内容物の観察によって行われてきた。しかし、サンゴ礁海域の POM の主成分であるデトリタスや染色されない有機物粒子が含まれる場合はその評価が困難である上、幼生が濾過捕食によって胃内に取り込んだ粒子全てがそのまま同化されて成長に利用されるとは限らないため、餌起源の議論は未だ結論を得ていない。そこで本研究では、これまでの直接観察的な方法ではなく、生物体内に蓄積される化学的情報を元に餌起源を推定する「全炭素・窒素安定同位体比分析（図 3-6-1）」を応用し、以下の 2 点を主な目的として、それぞれ異なる実験区を設けてオニヒトデ幼生の飼育実験を行った。

本研究の主な目的はつぎの 2 点である：

- ① 異なるサイズに分画した現場海水中的の POM を餌としてオニヒトデ幼生を飼育し、幼生による POM の同化の有無を明らかにすること（実験 A）
- ② 重炭素（ ^{13}C ）と重窒素（ ^{15}N ）で標識した微小生物（2 μm および 20 μm 以下の POM）が含まれる条件下でオニヒトデ幼生を飼育し、それらの同化の有無を明らかにすること（実験 B）

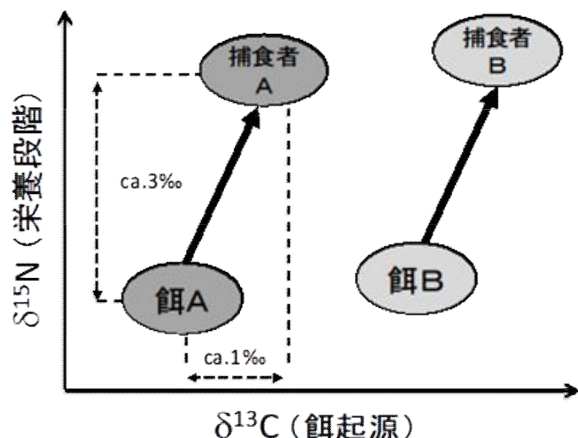


図3-6-1. 全炭素・窒素安定同位体比による解析の模式図. 炭素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$) は「餌起源」を、窒素安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$) は「栄養段階」を示す指標となる. 単純な捕食関係において、一般的には捕食者の体を構成する $\delta^{13}\text{C}$ は代謝（同化）を通じてその餌に近い値を示し、 $\delta^{15}\text{N}$ は餌と捕食者の補色関係に応じて上昇する性質がある.

6-2. 方法

6-2-1. 幼生飼育実験

オニヒトデ幼生の飼育実験は2015年7月に沖縄県瀬底島の琉球大学熱帯生物圏研究センターで行った。実験に用いた幼生は、同年6月末に恩納村沖で採集されたオニヒトデ (*Acanthaster planci*) の成体雌雄から媒精した受精卵を孵化させ、濾過海水で満たした水槽で1日馴化させた初期幼生のうち、細胞膜の張りが良い幼生を選別した。飼育実験用の海水は、飼育期間中は毎日午前7時に沖縄県本部町大浜の河口付近 (26° 39' 00" N, 127° 52' 48" E) で採集し、その後速やかに実験室に持ち帰って濾過作業を行った。なお、2015年7月10日は沖縄島北部に台風が上陸したため採水は行わなかった。この現場海水中に含まれるPOMを異なるサイズ画分に分別し、現場環境化に近いオニヒトデ幼生の餌として与えて飼育実験を行った。

(A) サイズ分画したPOMによる飼育実験 (実験A)

下記に示す実験系列ごとに2L広口瓶を5本ずつ用意し、1個体あたりの濾過速度を考慮して個体密度を1個体/10mlになるように調整して飼育した。比較実験区として、培養した植物プランクトン (*Dunaliella* sp.) を単一の餌として人工海水で幼生を飼育した。飼育期間は媒精2日後から後期ピピンナリアもしくは初期ブラキオラリアに成長するまで約2週間行った。実験期間中は、採水直後の現場海水を濾過して用意した飼育用海水を1日1回交換した。広口瓶は攪拌器によって常に振盪攪拌しながら、室温を至適生育温度 (28.0 ± 0.5°C) に調整して飼育した。

<実験条件>

- ① 孔径 20 μm のナイロンメッシュで濾過した海水 (POMあり、植物プランクトン)
- ② 孔径 2 μm のナイロンメッシュで濾過した海水 (POMあり、主にナノ鞭毛虫とバクテリア)
- ③ 孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターで濾過した海水 (POMなし、コントロール区)
- ④ 単離培養した藻類を添加 (2,000 cell/ml程度に調整) した人工海水 (比較実験区)

(B) 同位体標識したPOMによる飼育実験 (実験B)

下記に示す条件で前処理した現場海水を透明なポリカーボネート製広口瓶に分注し、同位体標識試薬 (重炭素: $\text{NaH}^{13}\text{CO}_2$ 、重窒素: $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$) を添加し、光合成と呼吸によって同位体標識を取り込ませるために、屋外の水槽にて十分な太陽光の下で係留培養 (48時間) を行った。各実験区の海水中に含まれる生物に同位体を取り込ませた後、実験Aと同様に2L広口瓶にオニヒトデ幼生を入れて飼育し、24時間後と48時間後に試料を採集した。

POMの比較対象として、サンゴ礁内においてPOM以外に豊富に存在する有機物であるサンゴが放出する粘液を同様に餌として与える実験を行った。まず水槽内で馴化させたサンゴ (*Acropora* spp.) を用意して水槽内に同位体標識試薬を添加し、48時間飼育してサンゴ自体を同位体標識させた後、サンゴを大気中に一時的に暴露させた時に放出される粘液を回収した。実験Aと同様に用意した容器にこの粘液を添加し、幼生を同位体標識された粘液が含まれた海水で24時間飼育し、その後分析用の試料として幼生を回収した。

<実験条件>

- ⑤ ②に重炭酸ナトリウム ($\text{NaH}^{13}\text{CO}_2$) と硝酸ナトリウム ($\text{Na}^{15}\text{NO}_3$) を添加し、20 μm以下の生

物（主に植物プランクトン）を同位体標識した海水

- ⑥ ③重炭酸ナトリウム ($\text{NaH}^{13}\text{CO}_2$) と硝酸ナトリウム ($\text{Na}^{15}\text{NO}_3$) を添加し、2 μm 以下の生物（主にナノ鞭毛虫と細菌）を同位体標識した海水
- ⑥ 炭酸ナトリウム ($\text{NaH}^{13}\text{CO}_2$) と硝酸ナトリウム ($\text{Na}^{15}\text{NO}_3$) を添加した水槽内で飼育したサンゴから放出された同位体標識したサンゴ粘液

6-2-2. 分析試料の採集および固定

安定同位体比分析用の試料は、各実験区の発生段階ごとに1検体当たりの個体数を100-250匹として個別にピペットで回収した後、ガラスファイバーフィルター (GF/F, 孔径 0.7 μm) 上に捕集した。同様に、実験条件ごとに準備したPOM試料は毎日1試料あたり3-10L程度を、単離培養した植物プランクトンは実験期間中4日おき計3回1試料あたり10-20ml程度をGF/Fに濾過捕集した。

飼育海水の環境指標として、採集現場で水温と塩分を測定し、細菌、ナノ鞭毛虫計測用の海水試料を採集した。実験室に海水を輸送した後、直ちにクロロフィル測定用の試料はメンブレンフィルター (孔径 0.22 μm) で捕集し、栄養塩はシリンジフィルターを通過した濾液を採集して測定直前まで冷凍保存した。細菌試料は1%ホルマリン、ナノ鞭毛虫は2%グルタールで固定した。

6-2-3. 全炭素・窒素安定同位体比測定

全炭素・窒素安定同位体比の測定は、元素分析/安定同位体比質量分析計 (EA/IRMS: FLASH 2000 CHN/O Analyzer / Delta VTM Isotopic Ratio Mass Spectrometer, Thermo Scientific 社) を用いて行った。フィルター上に採集した試料は、オーブンで乾燥 (60°C, 24h) 後に秤量し、試料採集前後の乾燥重量の差で得られた試料を計算した。試料はフィルターごとスズフィルムに封入し、元素分析ならびに安定同位体比分析を行った。各試料の同位体比の計算は、同位体比が既知の内部標準と試料との値の差を用いて行い、そのごくわずかな偏差を便宜上千分率 (‰) で表した。

同位体標識によるトレーサー分析の試料は、自然界には存在しえない炭素・窒素安定同位体を含むため、実験室の分析機器の同位体汚染を防ぐ必要がある。そのため、同位体トレーサー試料については委託分析 (SI サイエンス社) を依頼し、同様に EA/IRMS を用いて測定を行った。

6-2-4. クロロフィル a および栄養塩類の測定

現場海水中のクロロフィル a 濃度は、海水 (500~1000 ml) をフィルター上に濾過捕集して、Suzuki & Ishimaru (1990) に準じて DMF (ジメチルホルムアミド) を用いて抽出し、Welschmyer 法によってターナー蛍光光度計 (Turner 社) を用いてクロロフィル蛍光を測定する (Welschmyer 1994)。硝酸、亜硝酸、アンモニア、リン酸、ケイ酸の各種栄養塩類は、オートアナライザー (SWAAT、BLTEC 社) を用いて分析を行った。

6-2-5. 細菌およびナノ鞭毛虫の計数

固定された海水試料はメンブレンフィルター上に濾過捕集し、直ちに細菌は SYBR Gold (DNA 染色剤)、ナノ鞭毛虫は プリムリン (タンパク質染色剤) を用いて染色し、蛍光顕微鏡に

よる全菌数計数法で細胞数 (cell/ml) を計数した。なお、蛍光の違いにより、バクテリアは従属栄養バクテリアとシアノバクテリアを、ナノ鞭毛虫は従属栄養ナノ鞭毛虫 (HNF: Heterotrophic Nano-Flagellate) および独立栄養ナノ鞭毛虫 (ANF: Autotrophic Nano-Flagellate) を区別して計数した。

6-2-6. POM の各種成分の炭素量換算

POM (懸濁態有機物) の主な構成要素である植物プランクトン、ナノ鞭毛虫、バクテリアの生物態と、生物の死骸や糞などや分解残渣などの非生物態のデトリタスは、分析方法の違いから一次的にそれぞれ異なる単位で算出される。そこで、統一した単位で比較検討を行えるように既報の炭素量換算式 (下記詳細) を用いて生物態の炭素量をそれぞれ概算し、元素分析によって得られた POM の全有機炭素量 (TOC) から差し引いてデトリタスの炭素量を求めた。

$$OC_{\text{detritus}} \text{ (デトリタス中の有機炭素)} = TOC - OC_{\text{organism}} \text{ (生物態有機炭素)}$$

$$(OC_{\text{organism}} = B_{\text{phytoplankton}} + B_{\text{nanoflagellate}} + B_{\text{bacteria}})$$

$$B \text{ (生物量 ; mg C/m}^3\text{)} = A \text{ (存在密度 ; cell/m}^3\text{)} \times CW \text{ (炭素重量 ; } \mu\text{g C/cell)}$$

- ・植物プランクトン : クロロフィル a 濃度 (mg chl. a/m³) × C/Chl. a 比 (= 30/1; Persons et al. 1984)
- ・ナノ鞭毛虫 : 細胞密度 (cell/ml) × 細胞当たりの炭素量 (= 183 fg/μm³; Caron et al. 1995)
- ・バクテリア : 細胞密度 (cell/ml) × 細胞当たりの炭素量 (= 20 fg/cell; Caron et al. 1995)

クロロフィル a 濃度は便宜上単位を測定値の μg-chl. a/L から mg-chl. a/m³ に変換した。ナノ鞭毛虫 1 個体当たりの体積 (μm³) は細胞が紡錘体であると仮定して、顕微鏡下で各細胞の短長辺の平均体長を測定して計算に用いた。

6-3. 結果および考察

6-3-1. 各実験区における観察結果

2014年に行った予備実験では、POMを餌として10日間飼育した結果、ブラキオラリア期に移行する直前のビピンナリア後期まで成長することが確認されたため、2015年に行った本実験では飼育日数を最長18日間まで延長した。また、2014年の予備実験ではオニヒトデが濾過捕食できる粒子サイズを考慮して、餌として与えるPOMのサイズを20 μm 以下に設定し、コントロール区を孔径0.7 μm のGF/Fを通過した濾液を滅菌海水として使用したが、2015年の本実験ではさらにPOMのサイズ分画を細かくして、20 μm 以下と2 μm 以下のPOMを餌とする実験区と、孔径0.22 μm のメンブレンフィルターを通過した濾液を滅菌海水で飼育するコントロール区を設定した。

逐次行った顕微鏡による観察の結果、予備実験と本実験ともに植物プランクトンで飼育した実験区では、飼育7-10日目までにはブラキオラリア初期まで成長する幼生を確認した。また、20 μm 以下のPOMで飼育した実験区ではブラキオラリア幼生となる直前のビピンナリア後期までしか成長しなかったが、ブラキオラリア期への成長を定義づけるブラキオアームが発生し始める幼生が確認された。さらに、滅菌海水で飼育したコントロール区ではビピンナリア初期から中期まで成長した後、飼育日数に伴って幼生の体が顕著に収縮して小さくなっていく様子が観察されたが、2 μm 以下のPOMで飼育した実験区では収縮は見られず、ビピンナリア後期まで成長する個体も一部確認された。

6-3-2. オニヒトデ幼生によるPOMの同化

実験Aの安定同位体比測定の結果について、2014年に行った予備実験を図3-6-2に、2015年に行った本実験を図3-6-3に示した。実験Aで採集されたオニヒトデ幼生ならびにPOM試料の窒素安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$) については、ほとんどの試料中の含有窒素量が非常に少なく測定誤差範囲がやや大きかった ($1\sigma = 1.1\text{‰}$) が、炭素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$) については高精度 ($1\sigma = 0.2\text{‰}$) で分析された。

オニヒトデ成体は *Acropora* spp. や *Montipora* spp. などのサンゴ食性であるため、実験に用いたオニヒトデの雌雄成体および卵巣・精巣は (Adults) はサンゴ種が一般的に示す $\delta^{13}\text{C}$ (ca. $-16 \sim -12\text{‰}$) を反映した値を示した (図3-6-2と図3-6-3)。また、予備実験では受精卵 (Embryo) を採取・測定しており、 $\delta^{15}\text{N}$ は約 6‰ 、 $\delta^{13}\text{C}$ は約 -15‰ を示したことから、受精直後も親個体の同位体比に近い値を示すことが確認された。

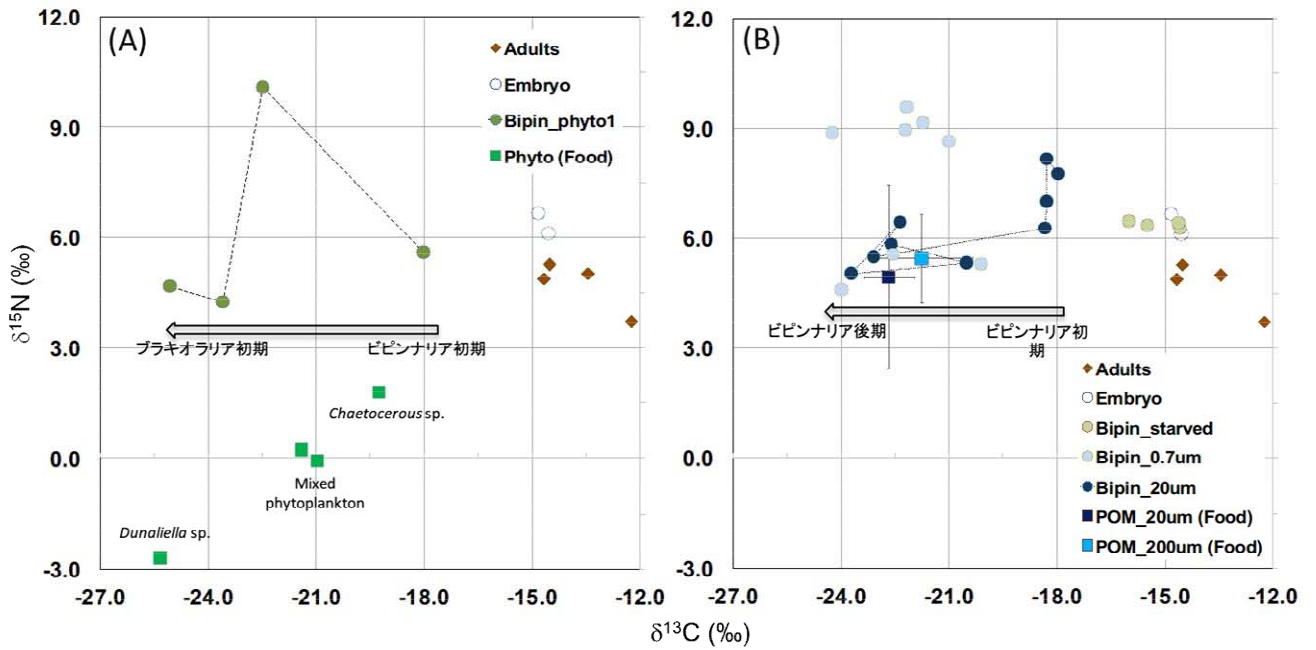


図3-6-2. 2014年に行った予備実験の(A)植物プランクトンを餌とした実験区と(B)POMを餌とした実験におけるオニヒトデ幼生(Bipin)および成体(Adult)と餌(Food)の炭素安定同位体比($\delta^{13}\text{C}$)と窒素安定同位体($\delta^{15}\text{N}$)。点線は各実験区における同位体比の継時変化を示す。

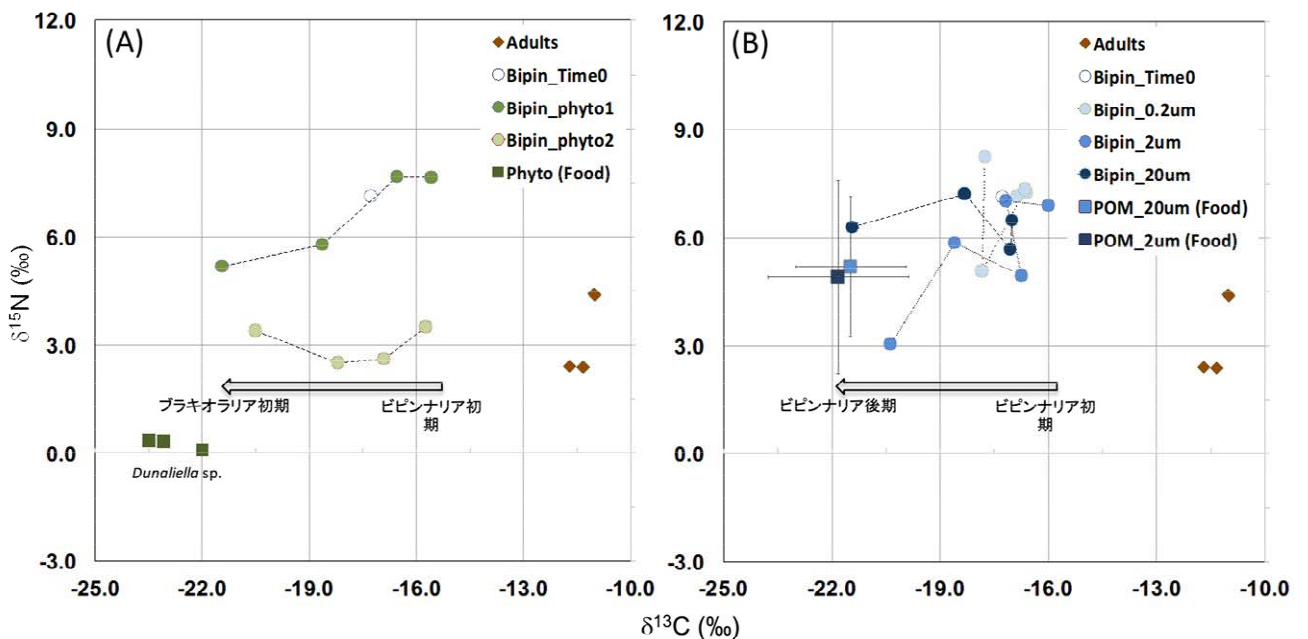


図3-6-3. 2015年に行った本実験の(A)植物プランクトンを餌とした実験区と(B)POMを餌とした実験におけるオニヒトデ幼生(Bipin)および成体(Adult)と餌(Food)の炭素安定同位体比($\delta^{13}\text{C}$)と窒素安定同位体($\delta^{15}\text{N}$)。点線は各実験区における同位体比の継時変化を示す。

まず植物プランクトンを餌として添加した実験区に注目すると、緑藻類の *Dunaliella* sp. ($\delta^{13}\text{C} = -25.3\text{‰}$) と珪藻類の *Chaetoceros* sp. ($\delta^{13}\text{C} = -19.2\text{‰}$) の混合液 (v/v = 1:1, $\delta^{13}\text{C} = -21.2\text{‰}$) を与えた 2014 年の予備実験では、飼育 8 日目までにブラキオラリア期に到達し、最終的に幼生の同位体比は *Dunaliella* sp. に近い値を示した (図 3-6-1A)。そこで、本実験では予備実験の結果を踏まえて *Dunaliella* sp. のみを人工海水に添加して単一の餌として与えた。その $\delta^{13}\text{C}$ の値は -24 ~ -22‰ を示し、予備実験と同様にオニヒトデ親個体や受精卵の値 (ca. -15 ~ -12‰) と顕著に異なることから、幼生による同化の指標となることが示された (図 3-6-3A)。幼生の同位体比は、飼育日数の経過とともにビピンナリア期の成長過程で徐々に $\delta^{13}\text{C}$ の値が小さくなり、実験終了時 (2014 年: 8 日間、2015 年: 10 日間) には *Dunaliella* sp. の値とほぼ同じ値を示したことから、成長過程で同化した餌の安定同位体比が継時的にオニヒトデ幼生の生体組織に反映されていることが確認された (図 3-6-3)。

各サイズの POM に注目すると、予備実験において (2014 年) 200 μm と 20 μm で分画した POM と、本実験 (2015) において、より細かく 20 μm と 2 μm で分画した POM (2015 年) の安定同位体比はサイズによる有意差はなく、概ね $\delta^{15}\text{N}$ は 5‰、 $\delta^{13}\text{C}$ は -22.0 ‰ 前後の値を示した (図 3-6-2B、図 3-6-3B)。それぞれ採水日によって $\delta^{15}\text{N}$ で $\pm 2 \sim 3\text{‰}$ 程度、 $\delta^{13}\text{C}$ では $\pm 1 \sim 2\text{‰}$ 程度の変動を示したが、より小さいサイズの POM の値の方がその変動幅は小さかった。炭素安定同位体比については、より大きな粒子 (>20 μm) に比較的低い炭素安定同位体比 (<-25‰) を有する C3 植物由来の粒子などの海洋微生物以外の有機物が混入し易く、天候や潮汐によってその混入比率が異なることが反映していると考えられた。窒素安定同位体比については、環境によって有機物粒子の窒素源 (e. g. アンモニアや大気中窒素) の同位体比自体が変動しやすく、分解作用によっても値が変化することに加え、POM 中の窒素含有量の少なさに起因する測定誤差がやや大きかったために、炭素に比べて大きな変動幅を示したと考えられた。

現場海水中の POM を与えて飼育した幼生の同位体比は、予備実験において徐々に $\delta^{13}\text{C} \cdot \delta^{15}\text{N}$ とともに低下し、ビピンナリア後期に達する飼育 7 日目には POM とほぼ同じ値に変化した。一方、一般的に GF/F フィルター (孔径 0.7 μm) に捕集される有機物粒子を POM として定義し、これを通過した溶存態画分にはオニヒトデ幼生が捕食できる粒子がほとんど存在しないことからコントロール区として設定したが、0.7-20 μm の POM を与えた実験区と同様に、POM を与えずに飼育したオニヒトデ幼生の $\delta^{13}\text{C}$ は低下していく傾向が示された (図 3-6-2B)。実験と並行して、全く餌となる粒子を与えずに、幼生を生かすために水を数日おきに交換した水槽で予備的に飼育していた幼生 (Bipin-starved) の同位体比は、孵化後から最低でも 7 日間はその同位体比が顕著に変化しなかったことから、0.7 μm 以下の濾過海水にも微小なバクテリアや有機粒子が混入しており、それらがオニヒトデ幼生の餌資源として利用された可能性が考えられた。

このことを踏まえて、本実験では 0.22 μm のメンブレンフィルターを通過した濾過海水を用いてコントロール区を設定し、餌として与える POM のサイズを <2 μm と <20 μm の 2 種類用意して実験を行った結果、両条件ともに幼生の $\delta^{13}\text{C}$ は徐々に低下し、実験終了時前までに POM に近い値へと変化した。既報の研究では、オニヒトデ幼生は濾過捕食する際に機能する繊毛の間隔や口の大きさから 2 μm 以下の粒子 (シアノバクテリアなど) は捕食しづらく餌としての寄与は小さいと考えられていたが (Okaji et al. 1997)、本研究の結果はオニヒトデ幼生が 2 μm 以下の粒子も同化していることを示した (図 3-6-3B)。実際に、POM を与えていない条件では実験開始後一週間ほどで幼生の体が収縮を始め、死滅していく個体が観察されたのに対して、<2 μ

m の POM を与えた幼生は実験終了時までにはビピンナリア後期まで成長し、コントロール区のような体の萎縮は見られなかったことから、 $<2 \mu\text{m}$ の POM も幼生の餌資源としてある程度貢献していることが示された。しかしながら、 $<20 \mu\text{m}$ の POM を与えた幼生はブラキオラリア初期まで成長する個体が多数確認されたのに対して、 $<2 \mu\text{m}$ の POM ではブラキオラリア期へ成長した個体が見られなかったことから、幼生の健全な発生・成長には POM に含まれる有機物の質や量が関与していることが考えられた（詳細は 3-7-5. 「餌としての POM の量的・質的評価」）

6-3-3. 安定同位体標識による捕食・同化実験（実験 B）

オニヒトデ幼生による POM の同化についてより詳細な知見を得るために、重炭素 (^{13}C) と重窒素 (^{15}N) で標識した微小生物 ($2 \mu\text{m}$ および $20 \mu\text{m}$ 以下の POM) が含まれる条件下でオニヒトデ幼生を飼育し、それらの同化の有無を明らかにするために行った実験の結果を表 3-7-1 に示す。通常、自然界では生物が有する $\delta^{13}\text{C}$ の範囲は $-30 \sim -5\text{‰}$ 程度、 $\delta^{15}\text{N}$ は $0 \sim 15\text{‰}$ 程度であるため、標識された試料との区別が可能である。同位体標識の結果、餌資源として用いた POM (デトリタス) とサンゴ粘液の $\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$ はともに顕著に増加し、それらを餌として与えたオニヒトデ幼生の値も同様に増加したことから、幼生が POM に含まれている同位体標識された微小生物やサンゴ粘液を同化したことが明らかとなった。POM が含まれていない系列で飼育した幼生の同位体比も増加したのは、幼生は細胞膜を通して溶存態画分の有機物を取り込むことが知られているため、おそらく飼育海水中に溶存態として溶け込んだ標識試薬由来の炭素や窒素が取り込まれた可能性が考えられた。または、容器内に微量に存在していたバクテリア等が係留培養時に増殖し、その際に標識された有機粒子を餌として同化した可能性もある。いずれにせよ、本実験によって幼生による POM 中の微小生物も餌として寄与していることが明らかとなった。

6-3-4. POM 中の各栄養塩濃度と微小生物の現存量

実験期間中を通して、アンモニア態窒素は $0.85 \sim 1.41 \mu\text{mol/L}$ 、リン酸塩は $0.03 \sim 0.18 \mu\text{mol/L}$ 、硝酸・亜硝酸態窒素は $0.8 \mu\text{mol/L} \sim >10 \mu\text{mol/L}$ （検出上限を超えたため濃度不明）、ケイ酸塩は $1.6 \sim 22.5 \mu\text{mol/L}$ の値で推移し、台風が上陸した直後に降雨によって陸域から沿岸域に栄養塩が流れ込んだために一時的に急激な増加が見られた（図 3-6-4）。この栄養塩の増加に対応するように、まずバクテリアの細胞密度が増加した後にクロロフィル a 濃度が上昇する様子が確認された。また、バクテリアの細胞密度のピークが見られた直後に、それらを捕食する鞭毛虫の細胞密度が増加する傾向も見られた（図 3-6-5）。

既報の研究により、オニヒトデ幼生は周辺海水のクロロフィル a 濃度が $0.25 \mu\text{g/L}$ だと餌不足で大半が死滅し、 $0.25 \sim 0.80 \mu\text{g/L}$ だと生存率が半分程度まで低下することが知られている

(Okaji et al. 1996; Fabricius et al. 2010)。飼育実験の期間中、現場海水のクロロフィル a 濃度は POM の 2 画分 ($<20 \mu\text{m}$ と $<2 \mu\text{m}$) でそれぞれ $0.16 \sim 0.40$ 、 $0.08 \sim 0.22 \mu\text{g/L}$ の値で推移しており、どちらの画分にも幼生の生存率が十分に確保される濃度 ($>0.80 \mu\text{g/L}$) のクロロフィル a は含まれていなかった。とりわけ、 $<2 \mu\text{m}$ の画分には常に大半が死滅するとされる濃度 ($<0.25 \mu\text{g/L}$) を下回っていた（図 3-6-5A）。

また、バクテリア（従属栄養細菌とシアノバクテリア）とナノ鞭毛虫（従属栄養・独立栄養ナノ鞭毛虫）の細胞密度はそれぞれ $2.9 \sim 7.6 \times 10^8 \text{ cell/L}$ 、 $6.1 \sim 16.1 \times 10^5 \text{ cell/L}$ で推移しており、これは過去に宮古島沿岸域で報告されている値と同程度の範囲であった（図 3-6-5B、

Casareto et al. 2000)。クロロフィル a 濃度の挙動と比較してみると、植物プランクトンが少ない時にバクテリアや鞭毛虫の細胞密度が高い傾向があり、不足がちな植物プランクトンだけでなく、オニヒトデ幼生がこれらの微生物も捕食し、餌資源として補っている可能性が考えられた。

表3-6-1. 同位体標識をした POM およびサンゴ粘液で飼育した幼生(実験 B)と未標識の POM で飼育した幼生(実験 A)と餌となる有機物の炭素・窒素含有量、C/N 比および炭素・窒素安定同位体比(*は実験 A の分析結果)。

	<i>n</i>	TOC (%)	TN (%)	C/N	¹³ C (Atom%)	¹⁵ N (Atom%)	δ ¹³ C (‰)	δ ¹⁵ N (‰)
With isotope label (Exp. B)								
Late bipinnaria								
without POM (<0.2 mm)	2	n/d	n/d	n/d	1.133	0.641	25.5	756.0
with POM (<2 mm)	2	n/d	n/d	n/d	1.157	0.787	47.3	1162.4
with POM (<20 mm)	2	n/d	n/d	n/d	1.471	2.387	336.5	5734.2
with labeled-coral mucus	3	n/d	n/d	n/d	1.182	0.432	69.7	180.7
Food source								
Detritus (0.2-20 mm)	1	6.9	0.7	10.6	2.447	15.935	1243.4	50560.9
Coral mucus	3	0.2	0.0	7.2	1.496	0.977	358.5	1683.4
Without isotope label								
Late bipinnaria								
Control	2	n/d	n/d	n/d	1.091	0.381	-13.2	38.9
without POM (<0.2 mm)*	5	15.5	1.7	10.6	n/d	n/d	-17.1	7.0
with POM (<2 mm)*	5	10.3	1.8	7.4	n/d	n/d	-17.6	5.7
with POM (<20 mm)*	5	28.0	3.9	6.9	n/d	n/d	-18.4	6.5
Food source								
POM (<2 mm)*	10	25.9	3.6	6.9	n/d	n/d	-22.3	8.5
POM (<20 mm)*	10	12.4	1.7	7.0	n/d	n/d	-21.0	7.6

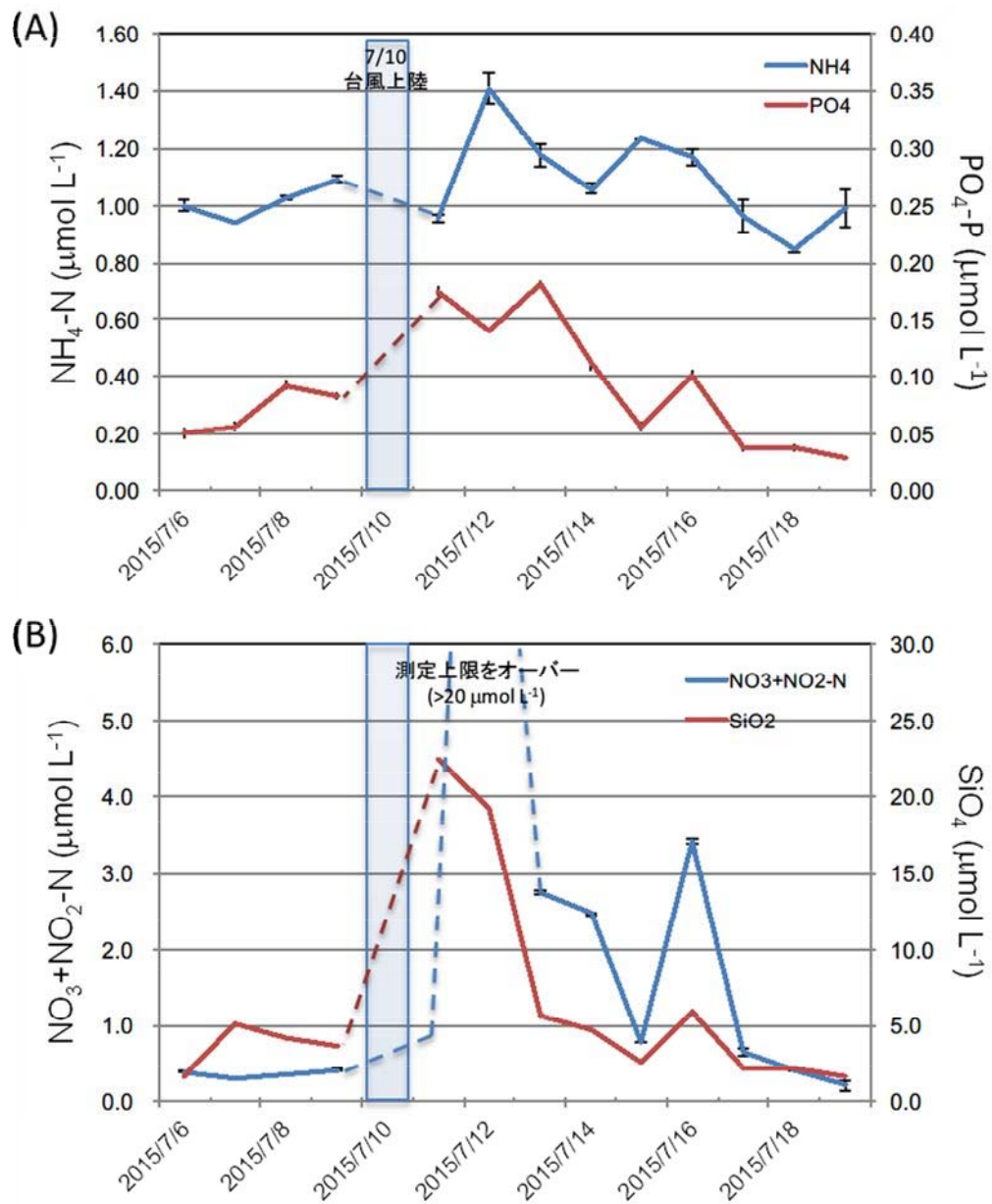


図3-6-4. 実験期間中の飼育培養に用いた海水中の; (A) アンモニア態窒素とリン酸塩、(B) 硝酸及び亜硝酸態窒素とケイ酸塩の濃度の推移。青枠は大型台風が上陸した時期を示す。

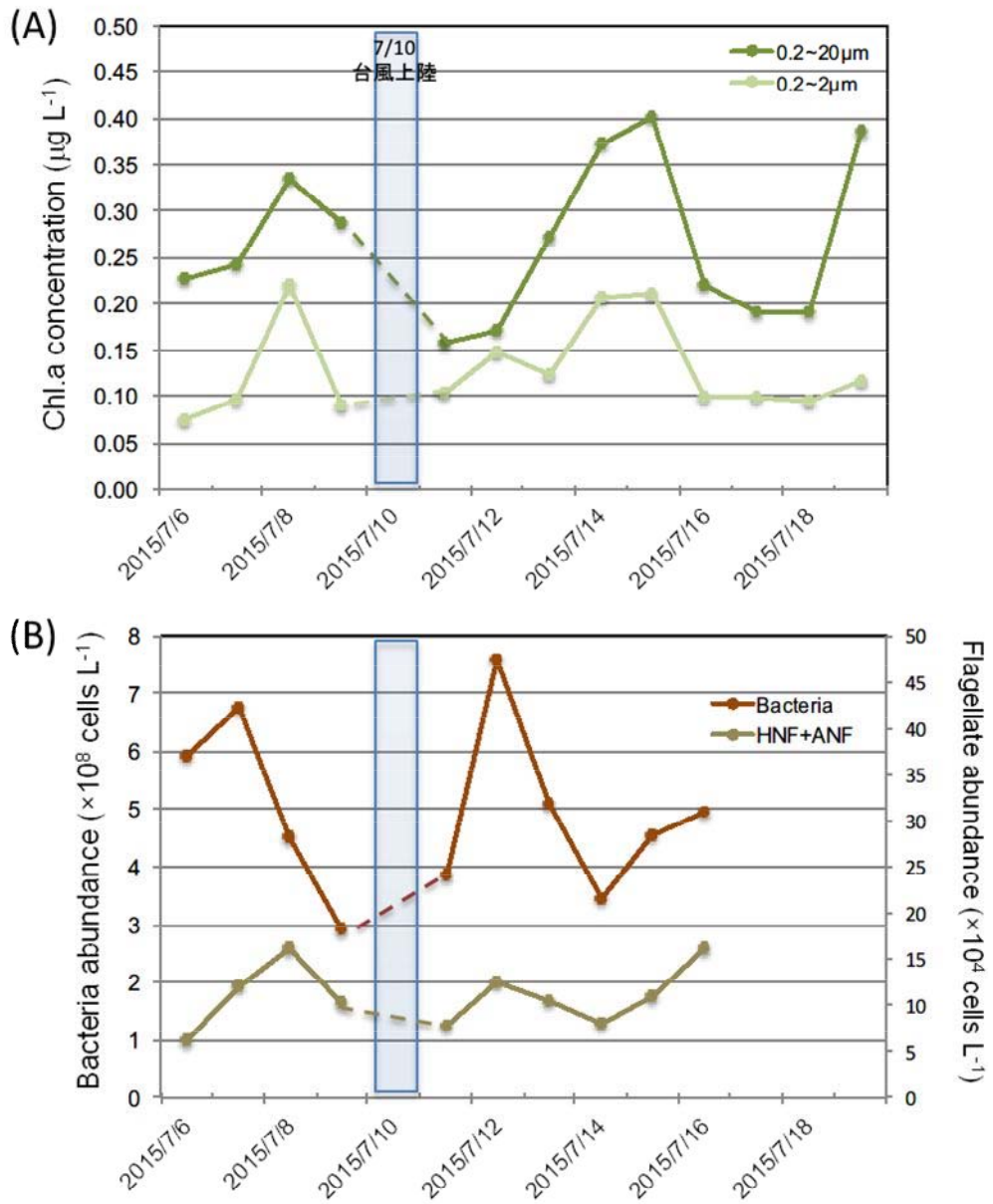


図3-6-5. 飼育培養に用いたPOMに含まれる; (A) サイズ分画したPOM中のクロロフィルa濃度、(B) バクテリアとナノ鞭毛虫の細胞密度。青枠は大型台風が上陸した時期を示す。

6-3-5. 餌資源としての POM の量的・質的評価

前項で示した POM を構成する各成分を有機炭素量に換算し、実験期間中におけるそれらの構成比とそれらの合計値の推移を図 3-6-6 に示した（ナノ鞭毛虫は $<2 \mu\text{m}$ の画分では除外）。各成分の相対存在比に注目すると、 $<20 \mu\text{m}$ の POM において常に 50%以上の割合で存在したデトリタス由来の炭素が最も多く、最大で 93.1%を占める場合もあった（図 3-6-6A）。一方、 $<2 \mu\text{m}$ の POM においてはバクテリア由来の炭素が大きな割合（18.3 ~ 73.3%）占めており、次いでデトリタス由来の炭素が大きく貢献していた（図 3-6-6B）。また、植物プランクトン由来の炭素が占める割合は最大でも $<20 \mu\text{m}$ で 20.7%、 $<2 \mu\text{m}$ で 30.8%であり、ナノ鞭毛虫の存在比は非常に小さかった。この結果は、オニヒトデ幼生が周囲の有機物粒子を非選択的に濾過捕食していると仮定すると、 $<20 \mu\text{m}$ の画分ではデトリタスを、 $<2 \mu\text{m}$ の画分ではバクテリア（シアノバクテリアを含む）を主な炭素源としていることを意味している。

次に各成分の炭素あたりの濃度に注目すると、 $<20 \mu\text{m}$ の合算値は 47.5 ~ 225.9、 $<2 \mu\text{m}$ は 13.1 ~ 30.5 mgC/L で推移し、最大で約 10 倍の差が見られた（図 3-6-6C、D）。この差を生んだ主要因はデトリタス由来の炭素であり、バクテリアと植物プランクトン由来の炭素量は POM の各画分の間で顕著な差は見られなかった。幼生の餌要求量の指標としてよく用いられるクロロフィル a 濃度を $C/Chl. a = 30/1$ (Parsons et al. 1984) を用いて炭素量換算し、餌要求量を満たす濃度 ($0.80 \mu\text{g/L}$) と餌が欠乏する POM 中の炭素濃度 ($0.25 \mu\text{g/L}$) をそれぞれ” Safety Line” と” Danger Line” として図中に示し、その濃度の比較を行った（図 3-6-6）。両画分を比較すると、 $<20 \mu\text{m}$ の系列では概ねクロロフィル a 単独で Danger Line は超えており、バクテリアとナノ鞭毛虫を合算した生物態有機炭素で Safety Line の 9 割近くに達するが、 $<2 \mu\text{m}$ の系列ではクロロフィル a だけでは Danger Line を超えず、デトリタスも含めた全ての有機炭素を合わせても Safety Line に達しない場合が確認された。本研究の飼育実験では、 $<20 \mu\text{m}$ の POM を含む系列と $<2 \mu\text{m}$ の POM を含む系列ともに、実験終了時の 14 日目までオニヒトデ幼生の生存率は 80%以上あったことから、植物プランクトンだけで Danger Line を超えていない $<2 \mu\text{m}$ の系列では POM に含まれるバクテリアやデトリタスなどを主な炭素源として生存していたことを示唆している。

さらに本研究では、 $<20 \mu\text{m}$ と $<2 \mu\text{m}$ の POM を餌とした条件下で、炭素安定同位体比からはどちらの系列も POM を利用しているという結果が得られたが、幼生の発生段階の到達度には顕著な違いが見られた。すなわち、実験終了時まで $<20 \mu\text{m}$ の POM を餌とする系列では多くの幼生がブラキオラリア初期に到達したのに対して、 $<2 \mu\text{m}$ の POM を餌とする系列ではブラキオラリア期に到達する個体はほとんどいなかったが、これは植物プランクトン以外の有機粒子を捕食してもなお、POM 中の有機炭素の総量がオニヒトデ幼生の健全な成長に必要な量に達していなかったことが原因の一つであると考えられたが、本研究でその原因を特定することは困難であった。

餌資源の量的な観点からみると、植物プランクトンが少なくてもデトリタスやバクテリアなどの炭素源が豊富に存在すれば、オニヒトデ幼生は生存が可能であると言える可能性はある。しかし本実験結果を踏まえると、炭素量としては生存が出来る濃度の餌があったとしても、ブラキオラリア期やその後の着底に至るまで成長する他の栄養素（例えば植物プランクトンに豊富に存在する必須アミノ酸や必須脂肪酸など）が必要不可欠であり、餌の質的な観点から一定量の植物プランクトンが POM 中に含まれていることが重要であることが考えられる。実際に、窒素を比較的豊富に含む植物プランクトンやバクテリアなどの生物態有機物に比べ、主に生物の死骸や糞など

の分解産物であるデトリタスは窒素に乏しいため、有機炭素と同様に $<20\mu\text{m}$ と $<2\mu\text{m}$ のPOMの間では含有窒素濃度やその総量も異なる。オニヒトデ幼生の摂餌速度や同化速度には限界があり、もしも幼生個体周辺のPOMを非選択的に利用している場合は、幼生が同化出来る有機物はPOM中の構成要素に依存すると予想される。したがって、単に炭素量だけでなく、必須栄養素などを豊富に含む良質な有機物であるかどうかというPOMの質的な要素が幼生の発生段階に影響している可能性があるため、オニヒトデ幼生の成長に対する化合物レベルでのPOMの質的評価が重要であると考えられた。

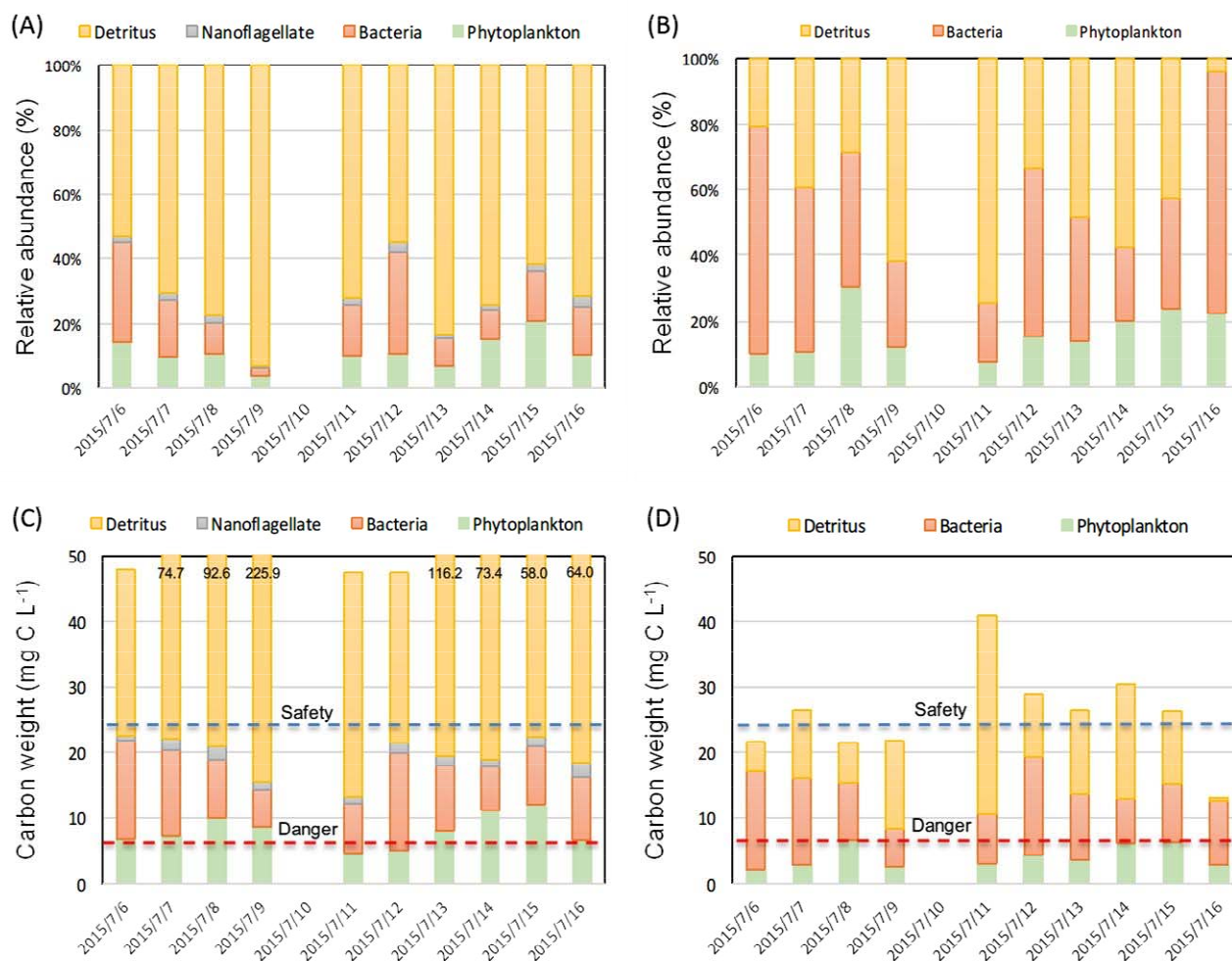


図3-6-6. 炭素量換算したPOM中を構成する植物プランクトン、バクテリア、ナノ鞭毛虫、デトリタスの相対存在比と濃度。(A) $<20\mu\text{m}$ のPOM中の相対存在比、(B) $<2\mu\text{m}$ のPOM中の相対存在比、(C) $<20\mu\text{m}$ のPOM中の濃度、(D) $<2\mu\text{m}$ のPOM中濃度。図中の赤点線は餌欠乏状態の濃度(Chl. a = $0.25\mu\text{g/L}$ を炭素量換算)、青点線は幼生の餌要求量を満たす濃度(Chl. a = $0.80\mu\text{g/L}$ を炭素量換算)を示す。

6-4. まとめと今後の展望

本研究によりオニヒトデ幼生がPOMを餌資源として同化していることが明らかとなった。さらに、これまで $<2 \mu\text{m}$ 以下の微小生物の餌資源としての寄与は低いと考えられていたが、バクテリアやデトリタスが一定程度存在していればそれらも餌資源として幼生がビピンナリア後期までは成長し、少なくとも2週間は生存できることも明らかとなった。一方で、本実験で餌として用いたPOM中のクロロフィルa量は幼生が安定的に成長するとされる濃度 ($0.80 \mu\text{g/L}$) を超えておらず、幼生がブラキオラリア後期またはそれ以降の着底する段階まで成長しなかったか原因は明確にならなかった。また、具体的にPOMを構成する有機物のうち、何かを選択的に捕食しているかという点や、非選択的に捕食している場合はどのような栄養素が最も成長に影響を与えるかという点については未解明である。

今後はこれまでの結果を踏まえて、現場海水を濃縮または希釈してPOM中に含まれる植物プランクトンやデトリタスの濃度を変化させた系列を作った飼育実験や、培養した植物プランクトンを現場海水中に添加するなどしてPOM中有機物の組成比を調整した飼育実験を行うことにより、POMの質・量的な影響についてより詳細な結論を得ることが期待される。さらに、必須脂肪酸や必須アミノ酸に着目して、ガスクロマトグラフィー／燃焼／安定同位体比質量分析計 (GC/C/IRMS) による分子レベルの安定同位体比分析を応用すれば、幼生が同化した有機物の中でも具体的に何に由来する炭素や窒素が主な餌資源として寄与しているのか、より詳細な知見が得られると期待される。

<参考文献>

- Ayukai T (1994) Ingestion of ultraplankton by the planktonic larvae of the crown-of-thorns starfish, *Acanthaster planci*. Biological Bulletin. 186:90-100.
- Birkeland C (1982) Terrestrial runoff as a cause of outbreaks of *Acanthaster planci* (Echinodermata: Asteroidea). Marine Biology. 69:175-185.
- Casareto BE, Suzuki Y, Fukami K, Yoshida K (2000) Particulate organic carbon budget and flux in a fringing coral reef at Miyako Island, Okinawa, Japan in July 1996. Proceedings 9th International Coral Reef Symposium, Vol.1.
- Faburicius KE, Okaji K, De'ath G (2010) Three lines of evidence to link outbreaks of the crown-of-thorns seastar *Acanthaster planci* to the release of larval food limitation. Coral Reefs, 29:593-605.
- Lucas JS (1982) Quantitative studies of feeding and nutrition during larval development of the coral reef asteroid *Acanthaster planci* (L.). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 65:173-193.
- Okaji K, Ayukai T, Lucas JS (1997) Selective feeding by larvae of the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* (L.). Coral Reefs, 16:47-50.
- Olson RR (1987) In situ culturing as a test of the larval starvation hypothesis for the crown-of-thorns starfish, *Acanthaster planci*. Limnology and Oceanography. 32:895-904.
- Suzuki R, Ishimaru T (1990) An improved method for the determination of phytoplankton chlorophyll using n,n-dimethylformamide. Journal of Oceanography. 46:190-194. DOI: 10.1007/BF02125580.
- Welschmeyer NA (1994) Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and pheopigments. Limnology and Oceanography. 39:1985-1992.