

# ウバガイ稚貝生理実験

藤原しのぶ

## 1. はじめに

沿岸域の砂質底を主分布域とするウバガイ *Spisula sachalinensis* (SCHRENCK) をはじめとする埋在性二枚貝数種の新規加入群は、砂質底だけでなく湾奥や沖合の泥底にも高密度で着底する事例が知られている。しかしながら、泥底に着底した稚貝の生残率はきわめて低く、これら泥底域では稚貝の生息に対する規制要因が強く作用しているものと考えられている。

この減耗要因について既往知見から机上検討すると、底質に含まれる微細粒子の多寡が稚貝の生息に対し最も影響しているものと推察されるが、野外ならびに実験室においてそれらの因果関係を定量的に検証した報告はみられない。

こうした観点から、本実験は底質中の泥分含有率が着底直後における稚貝の生残にどのような影響を与えているかについて、実験室内での飼育実験による呼吸量と濾水量(摂餌量)の変化から検証することとした。

## 2. 供試材料

### (1) 稚貝

実験に用いたウバガイ稚貝は鹿部種苗センター(北海道)から殻長約3mmのものを搬入し、実験室において個体数を計数後、馴化槽に収容した。実験室搬入時(平成6年11月1日15時)の輸送容器内の水温は10.5℃であった。

〈馴化〉 水温を約12±1℃に設定し、曝気を行った馴化槽を用い、無給餌、暗条件下で蓄養した。馴化槽内には砂などの基質は入れなかった。

馴化期間は次項の選抜期間を含めて、実験1「予備実験」、実験2「呼吸実験」、実験3「摂餌実験」でそれぞれ43、70、93時間であった。

〈選抜〉 実験開始の約20時間前に後述の基質を敷いた平底容器に、個体の大きさに著しい格差を生じないように選別した殻長2～3mm前後の個体をピペットにより移し、実験開始直後に潜砂した個体を正常個体とみなし実験に供試した。

〈計測〉 実験に供した稚貝は、実体顕微鏡下でマイクロメーターにより殻長を計測し、さらに一部の個体は湿重量と乾燥重量を測定した。

### (2) 試水

実験に用いた試水は北海道区水産研究所地先において取水後簡易濾過した海水を、実験室においてさらにGF/Cフィルターで濾過後曝気したものである。塩分は32.988であった。

### (3) 基質

今回の実験では、実験容器底に粒径約0.1mmの川砂を敷き基質とし、潜砂により稚貝の代謝を安定させるように努めた。川砂は超音波洗浄器CA-5372(海上電機K.K.)により超音波処理した後、試水中で反復洗浄したものをを用いた。

### (4) 恒温槽

実験に用いた恒温槽は発泡スチロール製の冷却槽とその内部の亚克力製の加温槽とから成り、冷却槽には循環式のクーラー、加温槽には攪拌装置付きのヒーターを装備した(図1)。水温は12±1℃となるようにヒーター内の制御装置を設定した。

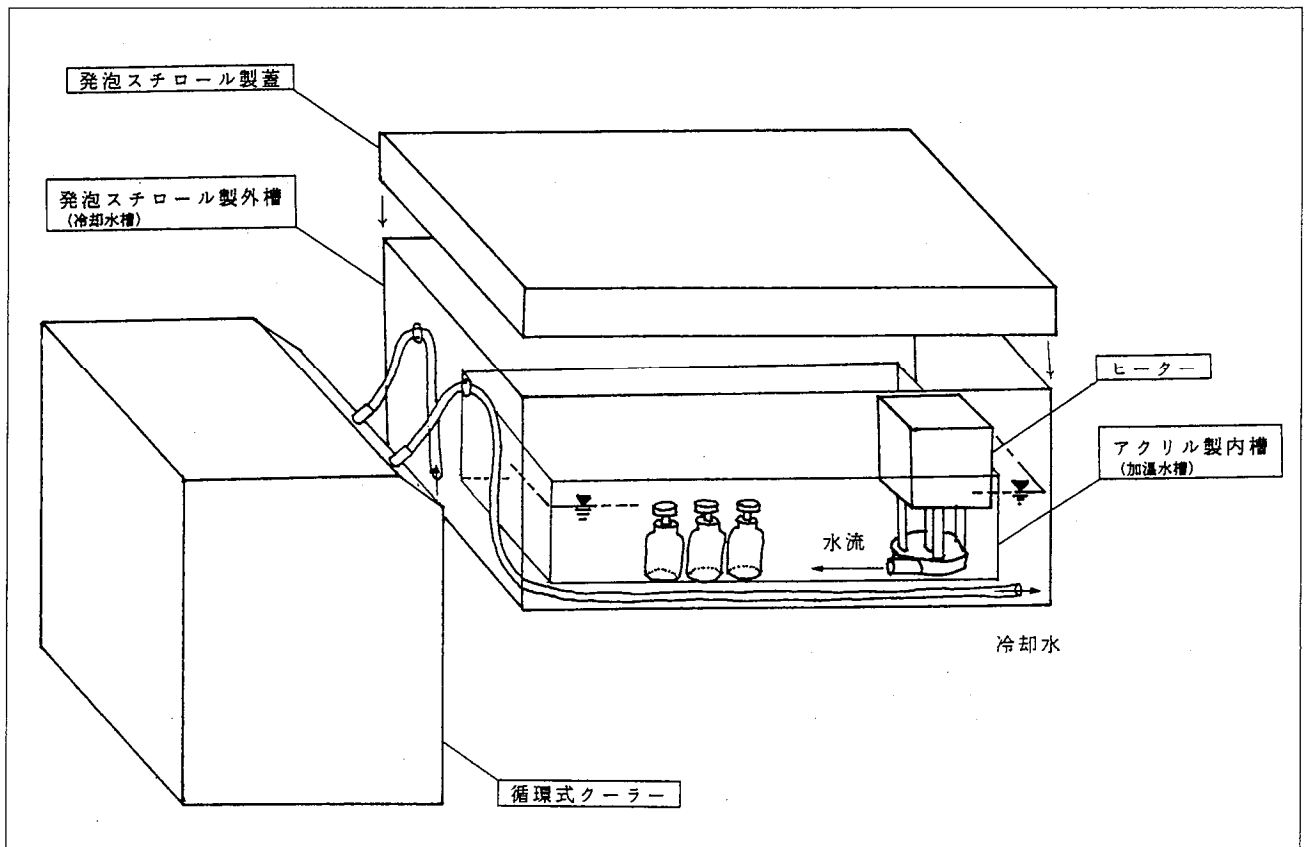


図1 恒温槽概要

### 3. 実験目的および方法

#### (1) 実験1「予備実験」

##### A. 目的

基質の有無が稚貝の呼吸量に及ぼす影響を把握するとともに、稚貝の供試個体数と実験時間の設定が適切かを検証することを目的とした。

##### B. 方法

50ml のDO瓶を用い、稚貝の個体数を20, 40とした実験区にそれぞれ基質の添加区と無添加区を設けた。基質添加区は川砂をDO瓶内に約5mmの厚さ(約8g, 容積約4ml)となるように入れた。実験時間はそれぞれ120分と180分の合計8実験区(各3検体)とし、また基質の有無に対し、それぞれ稚貝を入れない対照区を4区設けた(表1)。

実験に先立ち、試験区に試水を深さ約1cmとなるように注入し、稚貝を所定の個体数ずつ収容した。なお、基質添加区はあらかじめ基質をDO瓶に敷いた後、稚貝を入れた。

DO瓶への試水の注入は、ゴムチューブを用いて静かに行いオーバーフローさせたのち密栓し、恒温槽内に設置して実験時間の開始とした。

溶存酸素量(以下DOと呼称する)はウィンクラー法に従った。実験中の恒温槽水温は12.4~12.8℃であった。

#### (2) 実験2「呼吸実験」

##### A. 目的

懸濁物が稚貝の呼吸に及ぼす影響について知見を得ることを目的とした。

##### B. 方法

実験1と同様に50ml のDO瓶を用い、実験

区全てに基質を敷き、稚貝の供試個体数を20個体として行った。懸濁物には乳鉢で粉碎処理したカオリン（和光純薬K.K.）を使用した。懸濁物濃度（以下SSと呼称する）は0, 10, 30, 50mg/lの4区、実験時間は30, 60, 120分の3区を設け、合計12実験区（各3検体）として、SSが0 mg/lの基質無添加区と各SSの基質添加区を設置した（表2）。

実験手順は実験1とほぼ同様に行い、稚貝をDO瓶に収容した後、恒温槽内で1～2時間静置し、潜砂を促した。各実験区が所定のSSとなるよう、各SSに調整した試水をスターラーで攪拌しながら、ゴムチューブを用いて各DO瓶への注水を行った。各実験区における基

質直上水のSSを直接計測することは試水が少なく困難であったため、各実験区の基質近傍の試水5 mlを採取し、分光光度計により濁度を求めSSに換算した。実験時間内の恒温槽の水温は12.6～13.1℃であった。

### (3) 実験3「摂餌実験」

#### A. 目的

懸濁物質が稚貝の摂餌速度に及ぼす影響について知見を得ることを目的とした。

#### B. 方法

100ml ビーカーに基質を約20g敷き、実験2と同様に稚貝の供試個体数は各実験区20個体とした。懸濁物はカオリンを用い、0, 10, 30, 50mg/lの4濃度区（各3検体）を設け、各ビー

表1 試験区分（実験1）

試験区 基質\稚貝	対照区	実験区	
	0個体	20個体	40個体
無添加区	初期区	—	—
	120分	120分	120分
	180分	180分	180分
添加区	120分	120分	120分
	180分	180分	180分

注：各区にはそれぞれ3検体を設けた。

表2 試験区分（実験2）

試験区 基質\稚貝	対照区	実験区			
	0 mg/l	0 mg/l	10mg/l	30mg/l	50mg/l
無添加区	初期区	—	—	—	—
添加区	—	初期区	初期区	初期区	初期区
	30分	30分	30分	30分	30分
	60分	60分	60分	60分	60分
	120分	120分	120分	120分	120分

注1：各区にはそれぞれ3検体を設けた。ただし対照区は1検体もしくは2検体。

注2：稚貝個体数は実験区20個体、初期区と対照区は0個体。

カーに100mlずつを入れた。対照区は、懸濁物と稚貝を入れない基質と試水のみとした(表3)。餌料には黄色鞭毛藻類の *Pavlova lutheri* (DROOP) GREENを用い、全ての実験区で密度がほぼ $5.7 \times 10^4$  cells/ml となるようにPavlova培養液を添加した。

各実験区は、曝気により攪拌しSSが均一となるように努めた。実験終了時の所見では基質表面に懸濁物が沈澱している様子は認められなかった。

SSとPavlova細胞数の経時変化を知るために、開始時を含め20分毎に7回、各区から1mlの試水を2検体ずつ採取し、中性ホルマリンで約1%になるよう固定した。採取した試水はコールターカウンターによる測定用と光学顕微鏡による細胞数計数用に供した。

#### 4. 結果

##### (1) 実験1「予備実験」

本実験では、稚貝の溶存酸素消費量の算出にあたり、各実験区における基質および稚貝の有無ならびに基質が占める容積を考慮した。表4に本実験での計算方法を示した。ただし試水自身によるDOの変化は、対照区である実験結果の数値にばらつきがみられたため(表5)、稚貝のDO消費量を求める上では使用せずに、ここでは変化しないものとして扱った。

実験結果を経時的にみると(表6, 図2), 120分実験区は基質の有無に係わらず個体数の異なる実験区で若干の差が認められ、40個体の実験区でやや少ない値を示した。180分実験区におけるDO消費量は、基質および個体数が異なっても0.0013~0.0016mg/hrと安定した。

実験時間内に消費された稚貝1mg当たりのDOは、基質の有無に係わらず180分実験区より120分実験区の方が大きい値を示し(表7), 実験開始直後に酸素消費量の大きいことがうかがえた。

##### (2) 実験2「呼吸実験」

本実験では稚貝をいれない初期実験区および対照区として、「SSが0mg/lで基質無添加の初期実験区」、「SSが0, 10, 30, 50mg/lの各濃度に基質を添加した初期実験区」および「SSが0mg/lで基質を添加した対照区」を設けた。

さらに仮定条件として実験1と同様、試水によるDOの変化はないものとしたが、この場合「各SSに基質無添加の初期実験区」を設けなかったことから、ここでは「SSが0mg/lで基質無添加の初期実験区」のDOを初期値として用いた。その後の稚貝1mg(乾燥重量)当たりが消費するDOの求め方は、実験1と同様に行い結果を表8に示した。この方法では前述のように各濃度区における初期値が同じ値であるため、実験の稚貝DO消費量に若干の差異

表3 試験区分(実験3)

試験区	濁度			
対照区	0mg/l	—	—	—
実験区	0mg/l	10mg/l	30mg/l	50mg/l

注1: 各区にはそれぞれ基質を添加し, 3検体を設けた。

注2: 稚貝個体数は実験区20個体, 対照区は0個体。

表 4 稚貝酸素消費量計算方法

A. 実験 1 「予備実験」および実験 2 「呼吸実験 (方法 1)」

仮定：試水の溶存酸素量はそれにより変化しない

基質容量 (mg)	= 基質容量 (g) × 8/15
D0 (mg/l)	= (測定値 × 規定値 × 200) / (真の容量 (ml) - 1)
基質による D0 変化量 (mg/l)	= 初期値 D0 の平均値 (mg/l) - D0 (mg/l)
基質 1 g あたりの D0 変化量 (mg)	= 現存量換算 (mg) / 基質容量 (g)
稚貝のみによる D0 変化量 (mg/l)	= 初期値 D0 の平均値 (mg/l) - D0 (mg/l)
基質と稚貝による D0 変化量 (mg/l)	= 初期値 D0 の平均値 (mg/l) - D0 (mg/l)
現存量換算 (mg)	= (初期値 D0 の平均値 (mg/l) - D0 (mg/l)) × (真の容量 (ml) - 1) / 1000
稚貝の D0 消費量 (mg)	= 現存量換算 (mg) - 基質 1 g の D0 消費量 (mg) × 基質容量 (g)
D0 消費量 (稚貝 1 個体当たり)	= 稚貝の D0 消費量 (mg) / 稚貝個体数
D0 消費量 (稚貝乾重 1 mg 当たり)	= 稚貝の D0 消費量 (mg) / 稚貝乾重 (mg)
D0 消費量 (稚貝乾重 1 mg, 1 時間当たり)	= 稚貝の D0 消費量 (mg) / 稚貝乾重 (mg) / 実験時間 (hr)

B. 実験 2 「呼吸実験 (方法 2)」

仮定：試水および基質の溶存酸素量はそれにより変化しない

D0 (mg/l)	= (測定値 × 規定値 × 200) / (真の容量 (ml) - 1)
稚貝のみによる D0 変化量 (mg/l)	= 初期値 D0 の平均値 (mg/l) - D0 (mg/l)
現存量換算 (mg)	= (初期値 D0 の平均値 (mg/l) - D0 (mg/l)) × (真の容量 (ml) - 1) / 1000
D0 消費量 (稚貝 1 個体当たり)	= 稚貝の D0 消費量 (mg) / 稚貝個体数
D0 消費量 (稚貝乾重 1 mg 当たり)	= 稚貝の D0 消費量 (mg) / 稚貝乾重 (mg)
D0 消費量 (稚貝乾重 1 mg, 1 時間当たり)	= 稚貝の D0 消費量 (mg) / 稚貝乾重 (mg) / 実験時間 (hr)

ただし、D0：溶存酸素量 (mg/l)

表5 試水のD0変化

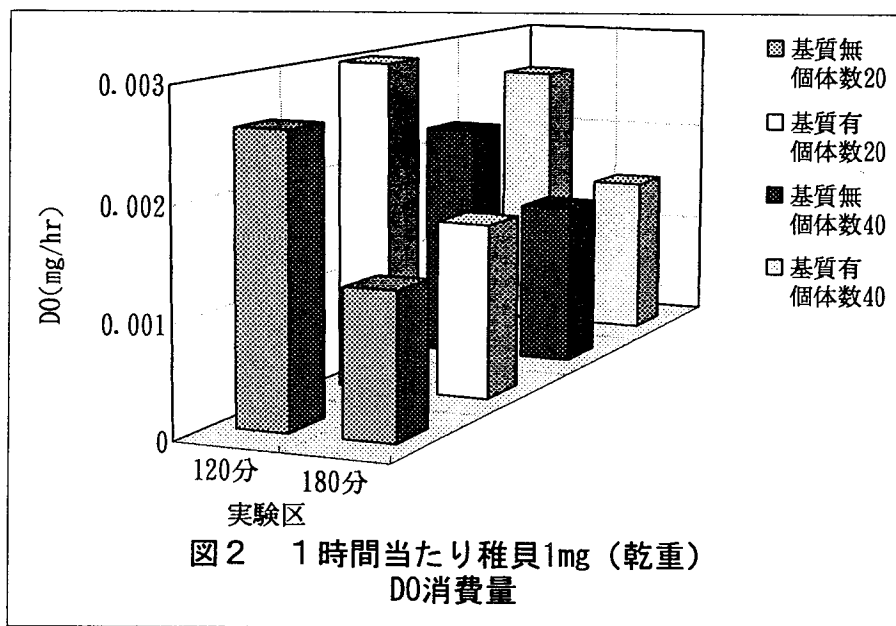
				(単位: mg/l)
時間\DO瓶NO.	1	2	3	平均値
120分	-0.0474	-0.1011	-0.3040	-0.1508
180分	0.0594	0.0297	0.0670	0.0520

表6 1時間当たり稚貝1mg (乾重) D0消費量

					(単位: mg/l)
区 分 時間\稚貝	基質無添加		基質添加		
	20個体	40個体	20個体	40個体	
120分	0.0026	0.0022	0.0034	0.0026	
180分	0.0013	0.0015	0.0016	0.0015	

表7 実験時間内稚貝1mg (乾重) D0消費量

					(単位: mg/l)
区 分 時間\稚貝	基質無添加		基質添加		
	20個体	40個体	20個体	40個体	
120分	0.0051	0.0044	0.0068	0.0051	
180分	0.0040	0.0045	0.0047	0.0045	



が予想される。このため第2の方法として、基質によるDO変化もないものと仮定し、「各SSに基質を添加した初期実験区」のDOを初期値として用い、稚貝のDO消費量を算出した(表9)。これら2つの計算方法による結果を図3、4に示した。

方法2による結果からは、SSが50mg/lの実験区を除くと、実験開始後30分ではさらに各SS実験区のDO消費量は、時間経過とともにいずれもおよそ0.005mg/l前後で安定した。

実験時間中の濁度を分光光度計により測定した結果を表10に示した。濁度は若干のばらつきが認められるものの、時間とともに減少する傾向を示し、懸濁物が基質の間に沈降した可能性はあるものの、稚貝による懸濁物

に対する濾過作用がうかがえた。

### (3) 実験3「摂餌実験」

光学顕微鏡下では固定したPavlova細胞とカオリン粒子がほぼ同じ大きさで約5~7μmの範囲にあったことと、Pavlova細胞の外形が固定により変化しSS粒子と外見上正確な識別が困難であったことから、細胞数の計数ができなかった。またコールターカウンターによる計数も同様の理由から結果を得ることはできなかった。

DAPIおよびAO染色による蛍光顕微鏡を用いた細胞数の計数も試みたが、デトリタスや擬糞などの有機物も同様に染色されてしまうため、Pavlova細胞との識別が困難であった。

表8 方法1による稚貝呼吸量

#### A-a. 初期DO

	(単位: mg/l)
SS	0 mg/l
初期値	7.699

#### A-b. 基質1g当たりのDO変化量

	(単位: mg)
時間 \ 変化量	
30分	-0.0018
60分	-0.0020
120分	-0.0018

#### B. 1時間当たり稚貝1mg(乾重) DO消費量

	(単位: mg/hr)			
時間 \ SS	0 mg/l	10mg/l	30mg/l	50mg/l
30分	-0.0720	-0.0040	0.0012	-0.0007
60分	-0.0010	0.0001	0.0026	0.0008
120分	0.0011	0.0007	0.0021	0.0016

#### C. 実験時間内稚貝1mg(乾重) DO消費量

	(単位: mg)			
時間 \ SS	0 mg/l	10mg/l	30mg/l	50mg/l
30分	-0.0037	-0.0021	0.0006	-0.0008
60分	-0.0010	0.0001	0.0026	0.0008
120分	0.0022	0.0013	0.0042	0.0032

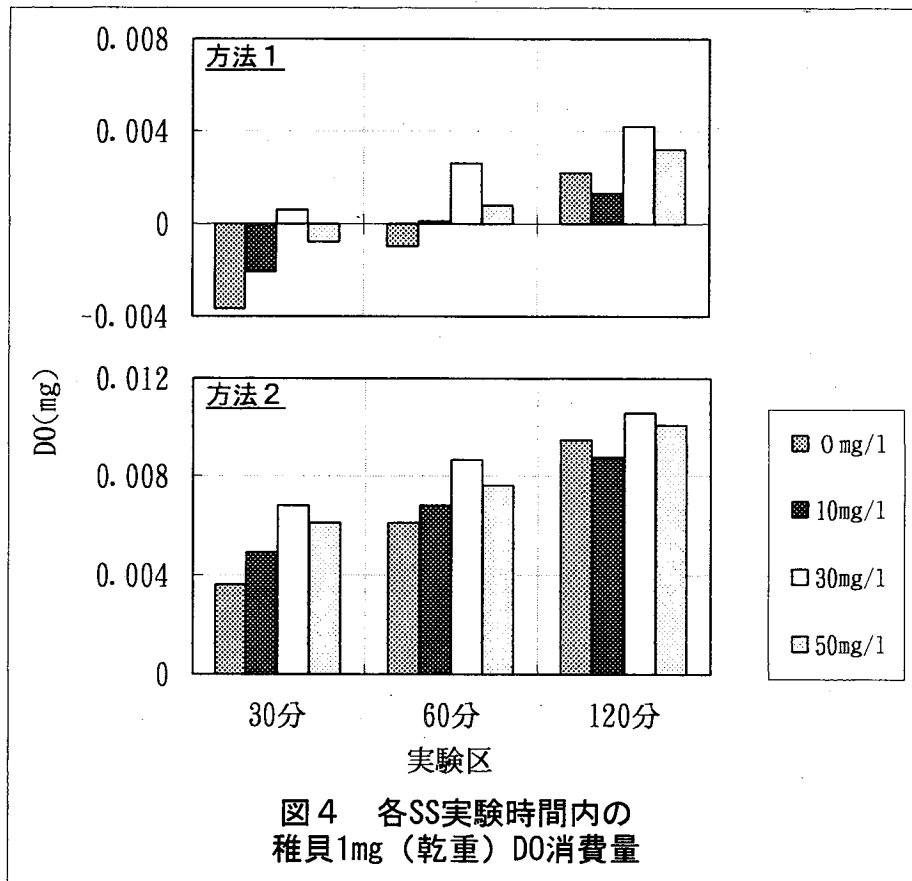
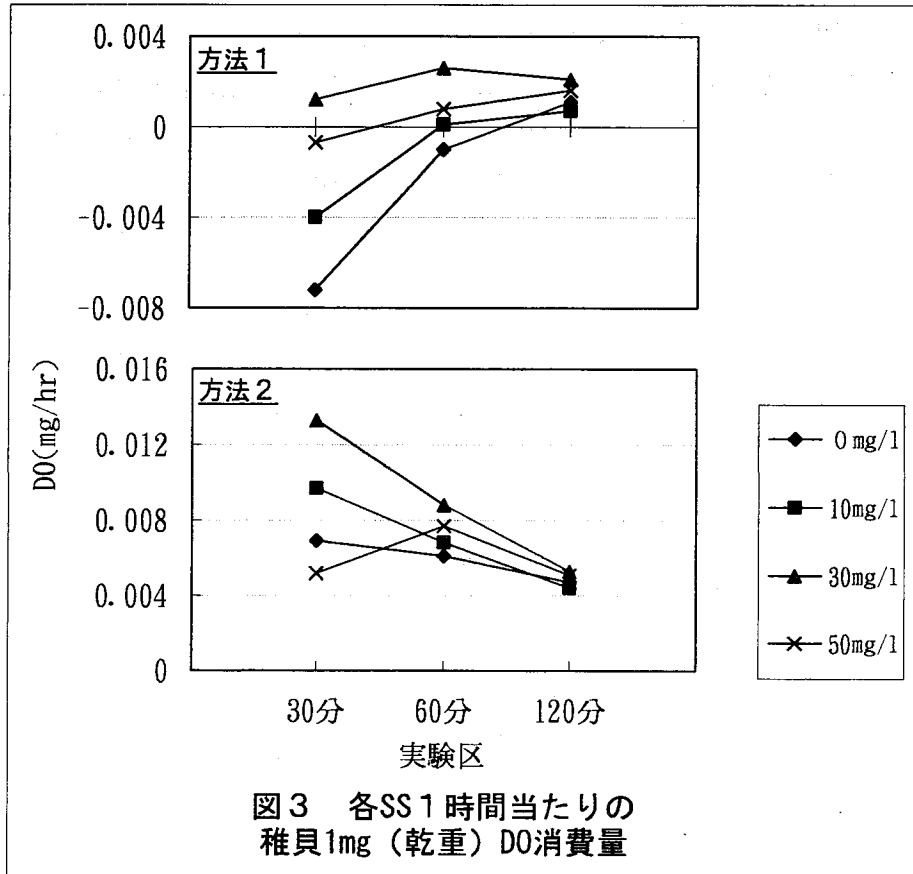




表9 方法2による稚貝呼吸量

A. 初期DO

(単位: mg)				
SS	0 mg/l	10mg/l	30mg/l	50mg/l
初期値	8.7243	8.7197	8.6260	8.6665

B. 1時間当たり稚貝1mg (乾重) DO消費量

(単位: mg/hr)				
時間\SS	0 mg/l	10mg/l	30mg/l	50mg/l
30分	0.0069	0.0097	0.0133	0.0052
60分	0.0061	0.0068	0.0088	0.0077
120分	0.0047	0.0044	0.0053	0.0051

C. 実験時間内稚貝1mg (乾重) DO消費量

(単位: mg)				
時間\SS	0 mg/l	10mg/l	30mg/l	50mg/l
30分	0.0036	0.0049	0.0068	0.0061
60分	0.0061	0.0068	0.0087	0.0076
120分	0.0095	0.0088	0.0106	0.0101

表10 実験区のSS変化

(単位: mg/l)				
SS\時間	実 験 区 分			
	0分	30分	60分	120分
0 mg/l	0	0.9	2.6	0.9
10mg/l	4.3	4.3	4.3	4.3
30mg/l	17.4	11.3	7.0	2.6
50mg/l	20.9	9.6	8.7	2.6

このように正確な細胞数の計数ができなかった原因として、ホルマリンによる固定の影響、あるいはその濃度がPavlovaに不適切であった可能性が考えられる。

以上、今回の実験では基質や懸濁物質条件と初期減耗の関係を明らかにするには至らなかった。今後はさらに実験条件や計測手法に検討を加えていく予定である。