

第1節 自然科学的立場からのモニタリング

5. 琵琶湖-淀川水系に与える影響

5.5 メタンを食うユスリカ幼虫

成田哲也¹⁾、近藤俊三²⁾、杉本敦子³⁾※1)、Kiyashko, S. I.⁴⁾、和田英太郎⁵⁾※2)

1) 元 京都大学生態学研究センター、2) 三菱化学生命科学研究所、3) 京都大学生態学研究センター

4) ロシア科学アカデミー 極東地区 海洋生物学研究所、5) 総合地球環境学研究所

※1) (現所属) 北海道大学地球環境科学研究院

※2) (現所属) 海洋研究開発機構地球環境フロンティア研究センター

1. はじめに

湖内や湖外に由来し湖底に堆積した有機物は微生物により分解される。堆積物中の無酸素環境下で分解される炭素の多くは、メタンとして生成される。この時に生成されるメタンの炭素安定同位体千分率比 ($\delta^{13}\text{C}$) は非常に低いことが知られている¹⁾。このメタンの多くは底泥から水中に漏れ出すと考えられている。しかし琵琶湖では、生成されたメタンの多くが底泥堆積物の表面近くで酸化されているらしく、深層水のメタン濃度は小さい²⁾。

琵琶湖の深底部に棲息するアシマダラユスリカ属 (*Stictochironomus*) の幼虫には、メタンの値に近い非常に低い $\delta^{13}\text{C}$ 値 (-55~-70%) を示すものがある³⁾。このことは、それらのアシマダラユスリカ幼虫は、直接的か間接的にメタンを利用していることを示唆している。これまでの結果では、大型個体はメタンに近い低い $\delta^{13}\text{C}$ 値を示すが、それに比べて小型個体は底泥に近い高い $\delta^{13}\text{C}$ 値を示した。

そこで、 $\delta^{13}\text{C}$ 値の異なるアシマダラユスリカ属の大型幼虫と小型幼虫は、同種で齢期が異なる幼虫なのか、あるいは異なる種の幼虫であるのか明らかにすること、言い換えれば、メタンを利用しているのは違った種であるのか、同種の異なる齢であるかを先ず明らかにすることを目的とした。次いでアシマダラユスリカ属幼虫はどのようにしてメタンを利用しているのかを明らかにすることを目的とした。

2. 方法

琵琶湖北湖新海沖の45mと75mで、2002年1月~4月、2002年9月~2003年3月に、採泥器および底曳網を用いてアシマダラユスリカ幼虫を採集した。幼虫は頭蓋殻を胴体部から切り取り、個体毎に頭幅を測定し、その後スライドガラスに封入し

て下唇板の形態観察および幅を測定した。胴部は実体顕微鏡で撮ったデジタル写真から体長を測定し、その後乾燥して個体毎に $\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$ を測定した。

トレーサー実験：2002年2月のトレーサー実験では、密封栓実験瓶に*Stictochironomus akizuki* (以下akizukiと記す)、*S. pictulus* (以下pictulus) 幼虫をそれぞれ各4個体ずつ単独に入れた実験瓶各1本と、akizukiとpictulusを各2個体ずつ混在させた実験瓶を2本、2セット準備した。1セットは実験区としてメタン0.5mlを添加し、他方の対象区には空気0.5mlを添加した。実験は8日間継続した。

2003年2月の実験では、akizuki、pictulus各4個体ずつを単独に封入した密閉実験瓶を実験区各2本、対象区各2本準備し、実験区瓶にはメタン0.5 ml、対象区瓶には空気0.5 mlを注入した。実験は8日間継続した。

3. 結果および考察

3.1 種の同定と幼虫の炭素安定同位体比の季節変化

アシマダラユスリカ属の幼虫は頭幅と下唇板幅の関係から2群に分かれた (図1)。

これら2群では下唇板の形態が異なるので、琵琶湖深底部には2種のアシマダラユスリカの幼虫が生息していると推測した。

ユスリカ類は幼虫ではなく成虫でないと種の同定ができないので、幼虫を羽化させた。成虫の羽の斑紋・雄の交尾器の形態から、小型幼虫は*Stictochironomus akizuki* (アキズキユスリカ)、大型幼虫は*Stictochironomus pictulus* と同定された (山本優博士による同定)。

個体毎に測定した胴部の炭素安定同位体比をみると、pictulusは、2個体を除き、全て低い $\delta^{13}\text{C}$ 値 (-55~-70%) を示した (図2)。

一方、akizukiは $\delta^{13}\text{C}$ が $-22\sim-35\%$ で、表面底泥の $\delta^{13}\text{C}$ に近い値を示した。従って同所的に棲息する2種の幼虫では、 $\delta^{13}\text{C}$ 値はほとんど重複しなかった。

2002年9月～2003年3月に採集した2種のユスリカ幼虫の下唇板幅を時期を追って調べた(図3)。

pictulusでは3齢幼虫が9月1日まで見られたが、それ以降はすべて4齢幼虫であった。一方akizukiでは3齢幼虫は11月後半まで見られ、それ以降はすべて4齢幼虫であった。それぞれの個体の $\delta^{13}\text{C}$ の季節変化を見ると、akizukiは季節に係わらず

ほぼ同じ $\delta^{13}\text{C}$ 値であるが、pictulusでは10月末まで $\delta^{13}\text{C}$ の高い($-25\sim-40\%$)3齢や4齢個体がいるが、11月以降は $-45\sim-68\%$ と低い値であった(図4)。

3.2 繊毛虫を介してバクテリアを摂食する可能性

pictulus幼虫の一部には、頭蓋殻背面に繊毛虫の塊を付着させているものが顕微鏡下で観察された。頭蓋殻背面に付着した繊毛虫が泥中でメタン酸化細菌を含むバクテリアを摂食し、ユスリカがその繊毛虫を食べることにより、間接的にメタン

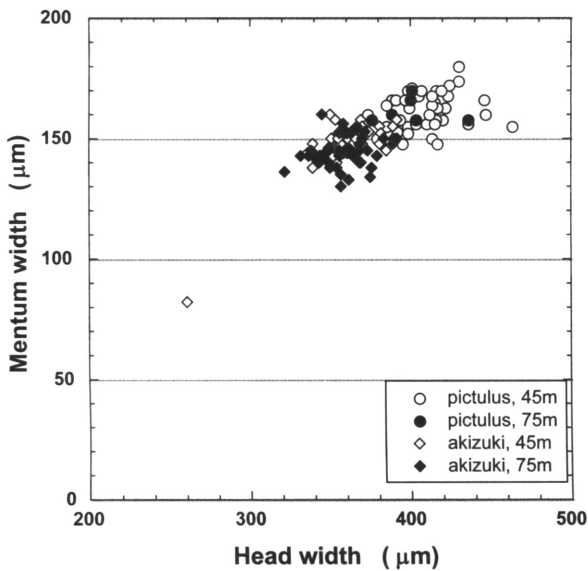


図1 アシマダラユスリカ属幼虫の下唇板幅と頭蓋幅の関係

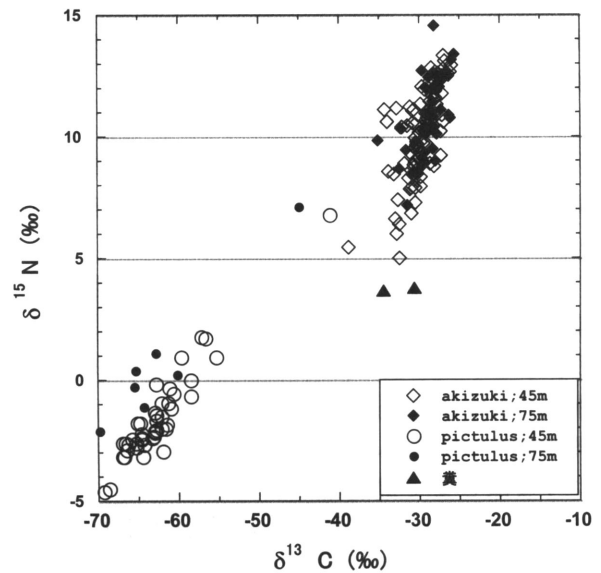


図2 2002年1月から4月に琵琶湖北湖で採集したアシマダラユスリカ属幼虫の $\delta^{13}\text{C}$ - $\delta^{15}\text{N}$ の関係

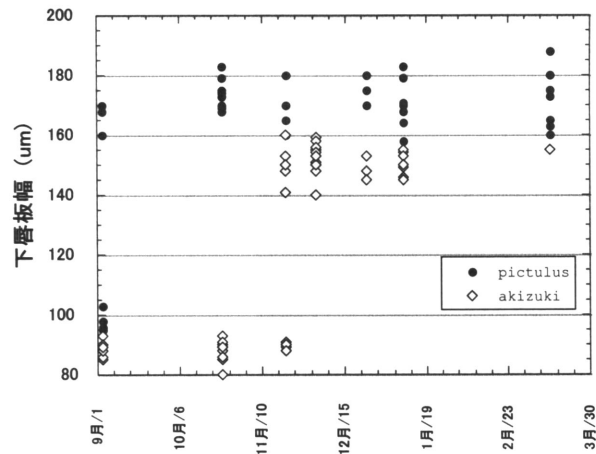


図3 akizuki、pictulus幼虫の季節にともなう下唇板幅の変化

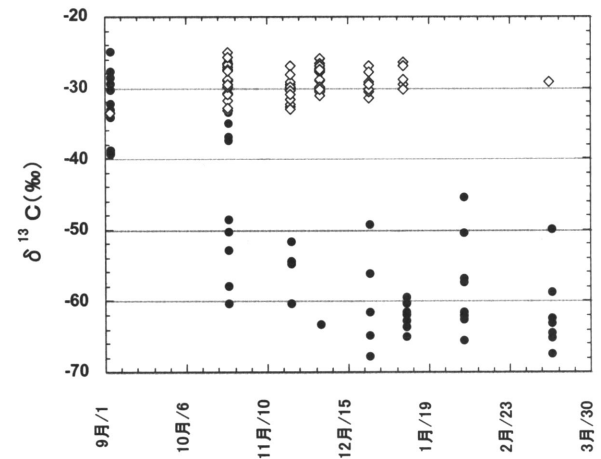


図4 akizuki およびpictulus幼虫の $\delta^{13}\text{C}$ の季節変化

酸化細菌を利用しているのではないかと考え、頭殻の繊毛虫塊の有無、そのおおまかな量および幼虫各個体の $\delta^{13}\text{C}$ を調べた。

その結果、繊毛虫の有無や量とpictulus個体の $\delta^{13}\text{C}$ 値には関係がないことが判明した(図5)。

したがって、pictulus幼虫は繊毛虫を介してメタンを利用しているのではないようである。

3.3 摂食によるのか共生細菌によるのか 摂食仮説；

ユスリカ幼虫は大きくなると(体長が長くなると)泥中に深く掘潜することができるようになり、酸化還元境界層に繁茂するメタン酸化細菌を摂食することができるのではないかというのが摂食仮説である。そこで体長と $\delta^{13}\text{C}$ 値の関係をみると(図6)、pictulus幼虫は体長が大きくなると低い $\delta^{13}\text{C}$ を示す個体が増加するが、akizuki幼虫では、pictulusとほぼ同じ体長の個体でも-30%前後の高い $\delta^{13}\text{C}$ 値を示した。

摂食仮説の難点の1つは、堆積物中の酸化還元境界が底層からの深さによって異なることである。したがって底泥表面のメタン酸化層の深さは水深や場所により違っていると予想される。もし、同じような体長のユスリカ幼虫が堆積物中の同じような深さまで掘潜して摂食しているのであれば、異なる場所に生息するpictulus個体の $\delta^{13}\text{C}$ 値にはかなりの変異があると予測される。しかし

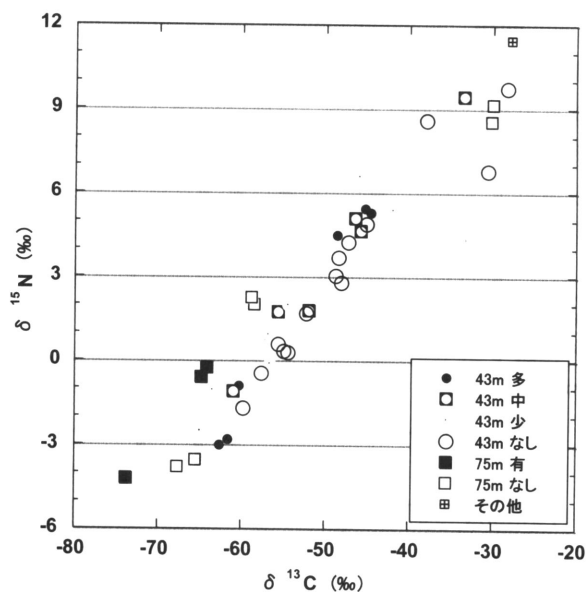


図5 アシマダラユスリカ幼虫の頭蓋に付着した繊毛虫塊の有無と各個体の $\delta^{13}\text{C}$ の関係

pictulus幼虫では、1個体を除き、 $\delta^{13}\text{C} \cdot \delta^{15}\text{N}$ の個体間の変異は小さく、またakizuki幼虫の $\delta^{13}\text{C} \cdot \delta^{15}\text{N}$ とも重複しなかった。

このことから、pictulusとakizuki幼虫は泥中において摂餌する深度が異なるか、あるいはまったく違った選択的摂餌法を採ることも考えられる。しかし、底泥中における各種幼虫の微細生息深度については未知である。

共生仮説；

pictulus幼虫(全て4齢)の $\delta^{13}\text{C}$ が個体間で小さな変異しか示さないのは、体内にメタンを利用することができる共生細菌を持っている可能性も否定できない。そこで、pictulus、akizuki幼虫の横断切片をつくり、腸内および腸壁の微生物を透過型電子顕微鏡で調べた。

透過型電子顕微鏡写真によると、akizukiとは異なり、pictulus幼虫の体前部の消化管にはメタン酸化細菌らしきものが観察された。また体後部の消化管には、腸内細菌と異なる微生物が見られた。しかし、これらが共生細菌であるか否かは不明である(写真1, 2)。

3.4 トレーサー実験

もし、消化管内の微生物が共生細菌であれば、メタンを与えれば共生細菌を介してユスリカ幼虫体内にメタンが同化されると考え、メタントレーサー実験を行った。

2002年2月に行った実験の結果では、実験区の混在瓶中のakizuki 1個体と単独瓶のpictulus 2個体

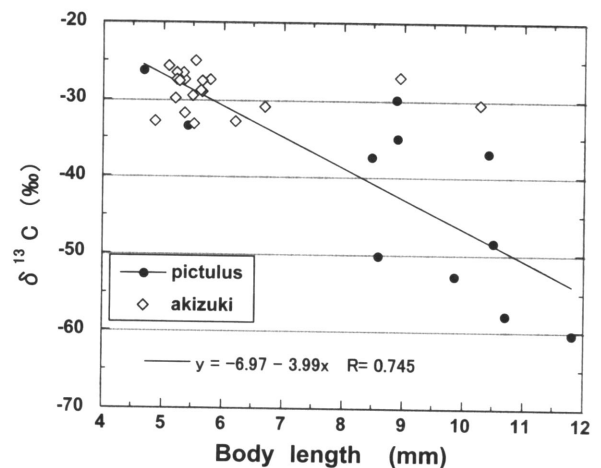


図6 akizukiおよびpictulus幼虫の体長と各個体の $\delta^{13}\text{C}$ の関係

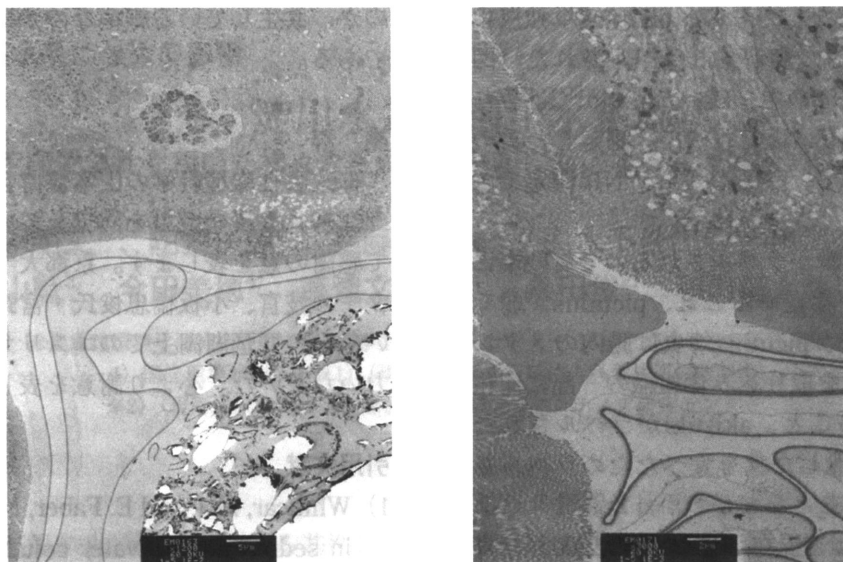
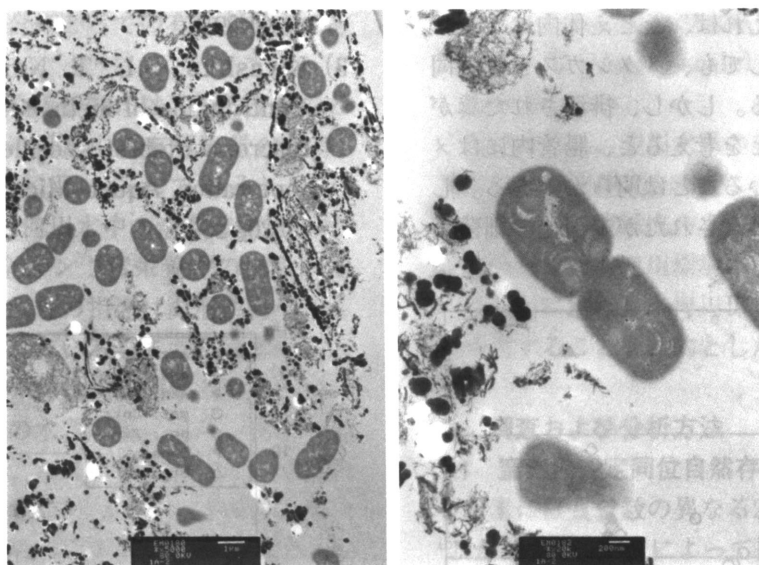
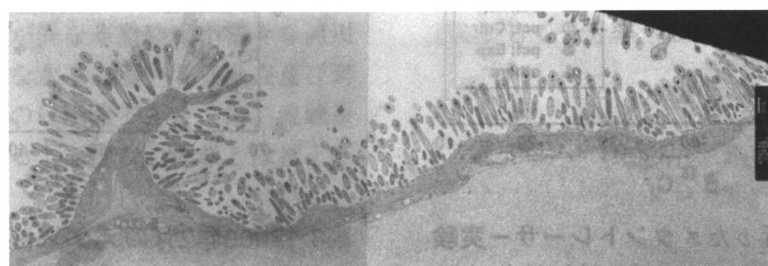


写真1 透過型電子顕微鏡によるakizuki幼虫の消化管 (×1200, ×3000)
(成田・近藤ほか 未発表)



ピクトルス幼虫の消化管前部の腸内細菌 (×5000, ×20000)



ピクトルス幼虫の消化管後部の腸内細菌 (×2000)

写真2 透過型電子顕微鏡によるpictulus幼虫の消化管内細菌
(成田・近藤ほか 未発表)

が弱くラベルされた。さらに、*pictulus*単独瓶中で*pictulus*が排泄した糞が少しラベルされた(図7)。混在瓶1および2の中に残った糞の $\delta^{13}\text{C}$ はそれぞれ140.3および445.5%であった。測定した糞の量が少なかったため、残念ながら $\delta^{15}\text{N}$ は測定できなかった。

このことから、糞がラベルされるので糞の中にメタン酸化細菌が存在すること、*pictulus*が弱くラベルされたので、*pictulus*幼虫は腸内のメタン酸化細菌がメタンを取り込み体組織の一部に同化した可能性があること、*akizuki*がラベルされたのは*pictulus*が排泄した糞を食べたためラベルされた可能性があることなどがわかった。

*pictulus*と*akizuki*を混在させなかった2003年2月のトレーサー実験では、実験区中の*pictulus*の1個体を除き、*pictulus*、*akizuki*ともラベルされなかった。しかし瓶中に排泄された*pictulus*の糞は弱くラベルされた(図8)。

このことから、*pictulus*幼虫はメタンを同化できないこと、言い換えれば、たとえ体内にメタン細菌を持っているとしても、メタンガスを直接同化できないようである。しかし、排泄された糞が弱くラベルされたことを考えると、腸管内にはメタン細菌が存在していることは明らかである。しかしこれら細菌が、摂食されたが未消化の細菌な

のか、共生している細菌なのかは今のところ不明である。

謝辞

株式会社環境科学の山本優博士には、アシマダラユスリカ属の成虫を同定していただいた。記して感謝の意を表します。京都大学生態学研究センターの技官、小坂橋忠俊氏・宮野貴広氏には厳しい冬季の琵琶湖湖上でのユスリカ幼虫採集にご協力いただいた。心より謝意を表します。

引用文献

- Whiticar, M.J. and E. Faber, Methane oxidation in sediment and water column environments - isotope evidence. *Org. Geochem.* 10 (1986) pp.759-768.
- Murase, J., Y. Sakai, A. Sugimoto, K. Okubo and M. Sakamoto, Sources of dissolved methane in Lake Biwa., *Limnology.* 4 (2003) pp.91-99.
- Kiyashko, S.I., T. Narita and E. Wada, Contribution of methanotrophs to freshwater macroinvertebrates: evidence from stable isotope ratios. *Aquat. Microb. Ecol.*, 24 (2001) pp.203-207.

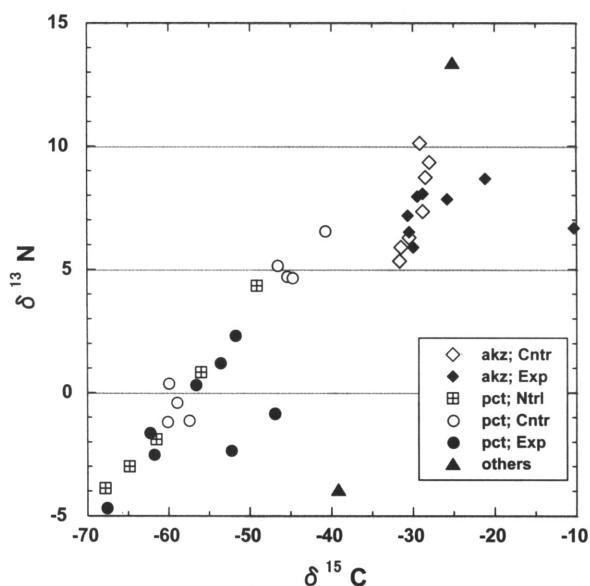


図7 2002年2月に行ったメタントレーサー実験における、*akizuki*、*pictulus*の対象区(Cntrl)、実験区(Exp)、および琵琶湖で採集したが実験に使用しなかった*pictulus*個体(Ntrl)の $\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$ の関係

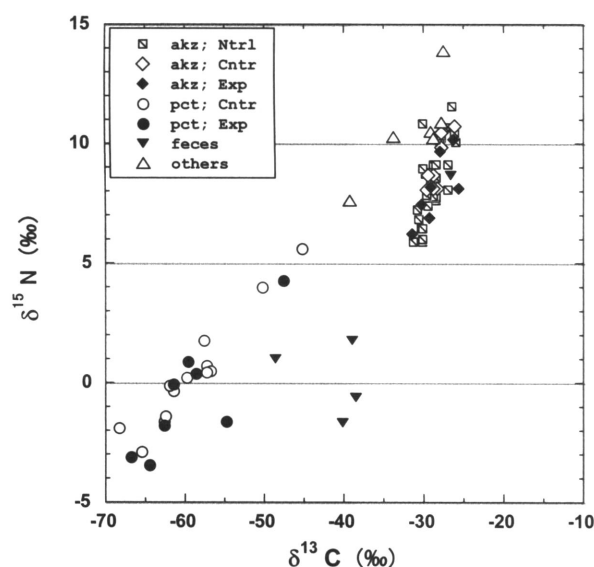


図8 2003年2月のメタントレーサー実験における、*akizuki*、*pictulus*の対象区(Cntrl)、実験区(Exp)、実験に使用しなかった*pictulus*個体(Ntrl)、および実験瓶中にあった糞の $\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$