

干潟底生系および浮遊系における一次生産と
それに関わる微小藻類-細菌相互間の関係

後藤直成

主 論 文

①

報告番号 F 第 4529 号

干潟底生系および浮遊系における一次生産と
それに関わる微小藻類-細菌相互間の関係

後藤直成

要 旨

陸-海域間の推移帯に位置する干潟は潮汐に応じて冠水と干出を繰り返す砂泥地帯であり、底生生態系にまで達する光エネルギーと陸域からの豊富な栄養供給により常に高い生物生産と生物の多様性を維持している。このような特徴的な環境要素を持つ干潟は、近年、その人間社会に対する価値（水産資源の生産、浄化機能、環境教育の場）と学問的重要性（希少種の存在、物質循環能力、未知の生物機能・生態系構造の発見）が再認識されつつあり、干潟生態系の機能や構造の解明が求められている。ある生態系の機能や構造を理解するためには、物質循環系の定量的な評価が必須である。しかしながら、干潟の主要な一次生産者であり、かつ、物質循環の駆動起点となる底生微小藻類の一次生産に関わる物質循環系、特に細胞外多糖類の生産とバクテリアによる利用などの底生微小藻類-バクテリア間の相互関係についてはほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では第1に、干潟の物理・化学・生物的環境特性を把握し、底生微小藻類の一次生産とそれに直接的な影響を及ぼす環境因子間の関係について調査研究した。第2に、底生微小藻類の大部分を占める羽状目底生珪藻による細胞外有機物（細胞外多糖類）の生産を評価し、さらにバクテリアによる細胞外有機物の分解・無機化過程を実験的に検討した。そして、上記の研究で得られた結果に基づいて、底生系における藻類-バクテリア間の炭素フラックスを、浮遊系と比較しながら、評価した。その結果、以下に示す知見が得られた。

第1に、底生微小藻類は低い増殖速度ではあるが、その豊富なバイオマスにより、干潟の一次生産において植物プランクトン以上に大きく寄与していたことが明らかとなった。特に、植物プランクトンの生産速度が減少する冬季において、底生微小藻類は干潟の従属栄養生物の有機物供給源として重要な役割を果たしていると考えられる。この観測期間中、干潟の水温、塩分、栄養塩濃度は日周的・季節的に大きく変動していた。つまり、これらの結果は、底生微小藻類が潮間帯の激しい環境変化に対して巧みに適応することにより、一年を通じて干潟の一次生産に大きく寄与していることを意味している。砂質干潟において、底生微小藻類のクロロフィル *a* 量と一次生産速度は底泥中の全菌数に対して有意な正相関を示した。また、干潟底生系はバクテリア由来の細胞外酵素（ β - α -グルコシダーゼ）による加水分解能のかなり高い環境であることが示された。つまり、これらの結果は、砂質干潟では、底生微小藻類とバクテリアが密接な相互関係にあり、底生微小藻類によって生産・分泌される有機物のバクテリアによる回転速度がかなり速やかであることを示唆している。一方、泥質干潟ではそれとは異なるバクテリアへの有機物供給機構（浮遊系からの有機物の堆積）が働いていると考えられる。

第 2 に、底生微小藻類の細胞外有機物生産は全一次生産の 42-72% に達し、そのほとんどは細胞外多糖類 (Extracellular polymeric substance: EPS) を 41-53% 含むコロイド状有機炭素 (Colloidal organic carbon: Colloidal-OC) であることが示された。干潟より単離培養した底生珪藻 *Nitzschia hybridiformis* を用いた実験では、これらの細胞外有機物画分は遷移期から定常期にかけて最も増加した。一方、植物プランクトンの細胞外有機物生産/全一次生産比は 1.5-22% の範囲にあり、その大部分は溶存態細胞外有機炭素 (Extracellular dissolved organic carbon: EDOC) であった。底生微小藻類 (天然群集と培養底生珪藻 2 種) によって生産・分泌される ^{14}C 標識細胞外有機炭素フラクション (^{14}C -EDOC, ^{14}C -Colloidal-OC, ^{14}C -EPS) のほとんどは底生性バクテリアによって速やかに利用されることが明らかとなった。この時、低分子量画分 (< 5 K M.W.) が大部分を占める ^{14}C -EDOC はバクテリアによって直接取り込まれ、無機化されていたけれども、一方、高分子量画分 (> 5 K M.W.) が優占する ^{14}C -Colloidal-OC と ^{14}C -EPS はバクテリアによって分泌される細胞外酵素によって一旦低分子化された後、利用されていたと解釈される。これらの結果は、底生微小藻類による細胞外有機物生産がこれまで過小評価されてきたことを明示し、また、大量に分泌される細胞外有機物のバクテリア群集による利用、つまり、干潟生態系の物質循環における微生物食物連鎖網の重要性を示唆するものである。

これらの観測結果に基づいて、底生系および浮遊系における微小藻類-バクテリア間の炭素フラックスを評価した結果、底生系では、浮遊系の約 2.4 倍の炭素が藻類からバクテリア群集へと伝達され、この炭素量は底泥中におけるバクテリア生産の 67-123% に相当すると推定された。この結果は、底生系における微小藻類-バクテリア間の炭素フラックスは浮遊系と比較してかなり大きく、微生物ループを通じた炭素フラックスが干潟生態系の炭素循環において重要な経路となっていることを示している。そして、このような底生系における底生微小藻類-バクテリア間の炭素フラックスは全一次生産の約 40-70% にも達する底生微小藻類による細胞外有機物の生産・分泌に起因している。

本研究は、干潟生態系の物質循環における底生微小藻類の細胞外有機物生産の重要性を示すものである。ここで得られた底生系および浮遊系における微小藻類-バクテリア間、そして、酵素的分解の仲介を伴う細胞外ポリマー-バクテリア間の相互関係は、新たな干潟生態系の物質循環像を構築するものであり、また、海洋ならびに湖沼沿岸生態系にも普遍的にあてはまる現象であると考えられる。今後、限られた範囲内に底生系と浮遊系が密接に存在する沿岸生態系の物質循環を考える上で、本研究は有用な知見となるであろう。

目 次

第1章 序論

- 1.1. 干潟の一次生産 1
- 1.2. 細胞外有機物の生産 4
- 1.3. 細胞外有機物の動態 7
- 1.4. 本研究の意義と目的 9

第2章 干潟底生系および浮遊系の環境特性と一次生産

- 2.1. はじめに 12
- 2.2. 方法 12
 - 2.2.1. 調査水域と試料採取 12
 - (a) 和歌浦河口干潟 12
 - (b) 三河湾一色干潟 14
 - 2.2.2. 物理・化学・生物的環境因子 16
 - 2.2.3. 植物プランクトンの一次生産 19
 - 2.2.4. 底生微小藻類の一次生産 20
 - 2.2.5. 一次生産の日周変化と光合成-光曲線 21
- 2.3. 結果 22
 - 2.3.1. 和歌浦河口干潟 22
 - (a) 干潟の物理・化学・生物的特徴 22
 - (b) 植物プランクトンの一次生産 28
 - (c) 底生微小藻類の一次生産 32
 - 2.3.2. 三河湾一色干潟 35
 - (a) 底生微小藻類と植物プランクトンの一次生産 35
 - (b) 光合成-光曲線 40
 - (c) 微小藻類・バクテリアとの関連因子 40
- 2.4. 考察 47
 - 2.4.1. 干潟環境における栄養塩の動態 47
 - 2.4.2. 一次生産と環境要因間の相互関係 48
 - 2.4.3. 底生微小藻類の一次生産 50

2.4.4. 一次生産の日周変化と季節変化	52
2.4.5. 微小藻類-バクテリア相互間の関係	55
2.5. 結論	58
第3章 細胞外有機物の生産と生分解	
3.1. はじめに	61
3.2. 方法	61
3.2.1. 細胞外有機炭素の分画	61
3.2.2. 増殖経過に伴う細胞外有機炭素の生産	65
3.2.3. 細胞外有機炭素の生分解	65
3.3. 結果	67
3.3.1. 増殖経過に伴う細胞外有機炭素の生産	67
3.3.2. 培養種による細胞外有機炭素の生産	70
3.3.3. 天然微小藻類群集による細胞外有機炭素の生産	70
3.3.4. 細胞外有機炭素の生分解	72
3.4. 考察	78
3.4.1. 細胞外有機炭素の分画法	78
3.4.2. 各成長相における細胞外有機炭素の生産	79
3.4.3. 細胞外有機炭素の生産	80
3.4.4. バクテリアによる細胞外有機炭素の酵素的分解と無機化	82
3.4.5. 細胞外有機物の生態学的役割	84
3.5. 結論	85
第4章 総合考察	87
謝辞	98
引用文献	99

第1章 序論

干潟は陸域と海域が隣接する推移帯であり、潮汐に応じて常に冠水と干出を繰り返している広く平らな砂泥地帯である。このような潮間帯環境はさまざまな地理的環境要素とそれに伴う物理・化学的特徴を持つ—1. 浅水域: 底泥への光エネルギーの供給, 2. 河口域: 河川からの豊富な栄養塩や有機物の輸送, 3. 碎波帯: 大気-海水相互間におけるガス交換の拡大。このような特徴により、干潟域では常に高い生物生産と生物の多様性が維持されている。そして、その多種多様な生物相を生物地球化学的循環を通じて支えているのが底泥の極表層に生息する底生微小藻類と海水中の植物プランクトンである。本研究は、干潟域の主要な一次生産者である底生微小藻類および植物プランクトンによる有機物生産、特に細胞外有機物生産の特徴を明らかにし、さらに、底生系と浮遊系における微小藻類-バクテリア間の炭素フラックスの解明を目的として行った。

1.1. 干潟の一次生産

水圏環境における一次生産者は、水深が充分にあるところではほとんどが水中に浮遊している植物プランクトンであるが、一方、太陽からの光エネルギーが底泥にまで達する浅水域（本論文では、一次生産者の持続的な光合成・成長を維持する光エネルギー供給が存在する水域と定義する）では大部分が堆積物極表層に存在する底生微小藻類である（Charpy-Roubaud and Sournia, 1990）。底生微小藻類群落は主に珪藻と藍藻によって形成されているが、概して羽状目に属する珪藻が底生一次生産者の主要な部分を担う。例えば、*Amphora*, *Nitzschia*, *Navicula* などはほとんどの浅水域で出現する普遍種である。ほとんどの底生微小藻類は、底泥表層数 cm 以浅に生息しており（MacIntyre and Cullen, 1995）、その細胞密度（ 10^5 - 10^7 cells cm^{-3} : 底泥表層 0-1 cm）は植物プランクトンと比較して非常に高い（MacIntyre *et al.*, 1996）。底

生微小藻類の生物量の指標とされるクロロフィル *a* 量はこれまで、陸水と海洋の様々な沿岸域で測定されてきており、それらのクロロフィル *a* 量（単位面積あたり）は、水柱の有光層全体に見られる植物プランクトン現存量の総量にほぼ匹敵、あるいはそれを上回ることがある（Varela and Penas, 1985; Barranguet *et al.*, 1996）。さらに、底生微小藻類は上層の有光層にだけ出現するわけではなく、それ以深の無光・嫌気層においても見られる。これは運動性珪藻（Epipelon）の鉛直移動（Sabbe, 1993）、潮汐流や波浪による物理的攪乱、マクロベントスによる生物的攪乱（Jonge, 1985）が原因となっている。光エネルギーの供給を受けなければ、藻類は死滅していくことになるが、底生微小藻類は溶存態有機物を利用する従属栄養代謝により、暗黒下において、かなりの長期間生息（20～80 日）が可能であるとされている（Admiraal and Peletier, 1979）。つまり、このような底生微小藻類の生態・能力は、底泥中における藻類現存量をより大きなものとし、潜在的な生産能を含めた浅水域の一次生産力をさらに高めるものと考えられる。

底生微小藻類の一次生産力は平均的な沿岸域の植物プランクトンの生産力とほぼ同等、あるいはその数倍に達する。Charpy-Roubaud and Sournia（1990）は、全球の海洋における底生微小藻類と植物プランクトンの一次生産力を比較し、底生微小藻類と植物プランクトンの生産力は、それぞれ、 $20\text{--}300\text{ g C m}^{-2}\text{ y}^{-1}$ （平均 $100\text{ g C m}^{-2}\text{ y}^{-1}$ ）と $50\text{--}300\text{ g C m}^{-2}\text{ y}^{-1}$ になると推定している。また、底生微小藻類の光合成が可能である平均的な限界深度を 50 m と仮定した場合、その全球の沿岸域（ $6.8 \times 10^{12}\text{ m}^2$ ）における底生微小藻類の一次生産量（ $0.34 \times 10^9\text{ t C y}^{-1}$ ）は、同じ沿岸域の有光層全体に見られる植物プランクトンによる一次生産（ $4 \times 10^9\text{ t C y}^{-1}$ ）の約 10%になると評価している。これらの推定値から、底生微小藻類は底泥表層数 mm 以浅の極わずかな層に高密度に生息し、そこで盛んに光合成することによって、多量の有機物を生産をしていることが想像できる。

底生微小藻類の重要性は、植物プランクトンと比較して、年間を通じて大きな生物量と高い生産力を維持していることである。浅水域では、高密度な藻類マットが、一年の大部分にわたって存在し、高い生産量を維持していることがしばしば確認さ

れている (Varela and Penas, 1985)。そして、底生微小藻類は浅水域における従属栄養生物、主に中型-大型底生動物、に対する安定した有機物供給源として重要な役割を果たす (Dame and Dankers, 1988; Miller *et al.*, 1996)。一方、植物プランクトンの生物量は一般的に、底生微小藻類と比較して、季節的変動が激しく、安定した有機物供給源となっていない。植物プランクトンは、水温や日射などの季節的な環境変動に大きく影響されるため、季節的にその優占種は入れ替わり、その生物量や種組成はかなり変動する。例えば、春の珪藻のブルームと秋の藍藻および渦鞭毛藻のブルームのような典型的な季節変動パターンがよく観察される。しかしながら、底生微小藻類の種組成の季節的变化はそれほど顕著ではなく、一年の大部分にわたって羽状目珪藻のある決まったグループが優占する (Colijn and Dijkema, 1981)。水塊と共に移動する植物プランクトンと比較して、基質に付着して生息する底生微小藻類は環境変動に曝される可能性が高いため、その生物量、種組成そして生産力も影響を受けやすいと思われる。しかしながら、ある一定の集団が一年にわたり優占し、比較的安定した高い生産力を維持しているのは興味深い。

さまざまな浅水域の中でも、干潟は特殊な環境条件を持つ。すなわち、干潟は潮汐による底泥の干出/冠水が、ある一定の周期で繰り返されている場である。そのため、干出時には底生微小藻類が主要な一次生産者となるが、冠水時には植物プランクトンも一次生産者として加わる (Kuipers *et al.*, 1981; van Es, 1982)。また、干潟は淡水と海水が混合しあうため、河川や潮汐が誘起する循環流が存在し、塩分、栄養塩濃度は潮汐と共に時空間的に大きく変動する (Valiela *et al.*, 1978; Valiela and Teal, 1979)。さらに、淡水と海水の混合は、淡水産と海産藻類が混在した生態系を干潟に作り出す。このような特徴的な環境に生息する底生微小藻類および河川や海から移流してきた植物プランクトンは大きな環境変動に曝され、時に、その影響を受ける (Admiraal, 1984)。Kromkamp *et al.* (1995) は、河口域における底生微小藻類と植物プランクトンの一次生産速度およびそれらに直接的な影響を及ぼす環境因子を同時に測定し、一次生産と環境因子の関係性を評価している。そして、彼らは、底生微小藻類の一次生産は藻類マット中への二酸化炭素の拡散制限によってのみ影響

され、一方、植物プランクトンの一次生産は主に、河口域の高い濁度が原因となって生じる光制限に影響されていると結論している。しかしながら、このような底生系と浮遊系の双方の生産を同時に測定し、さらに、それらに直接的な影響を与える因子（水温、塩分、栄養塩など）と生産過程間の関係を評価した研究はほとんどない。そのため、環境因子と一次生産の関係ならびに環境変化に応じた底生微小藻類の生態戦略はほとんど明らかにされていない。

1. 2. 細胞外有機物の生産

干潟のような浅水域に生息する底生微小藻類の大部分は羽状目珪藻であり、また、沿岸水域の浮遊系では円心目珪藻が優占している (Round *et al.*, 1990)。それらの珪藻の大きな特徴の一つとして、粘着性の細胞外有機物の生産がある。この粘液質の物質は珪藻の蓋殻上の縦溝や粘液孔から細胞外へ分泌され、柄、棲管、頂パッド (apical pads)、粘着膜、あるいは根毛のような形状で藻類細胞の周りを覆っている。これらの構造を持った細胞外分泌物は珪藻の生活史においてそれぞれ重要な機能を持つ (Hoagland *et al.*, 1993)。

この分泌物は細胞外多糖類 (EPS : Extracellular polymeric substance) と呼ばれている。その主成分は多糖類、あるいはカルボキシル基や硫酸基が付いた酸性多糖類であり、ヘキソースやペントースが種々の形態で結合して形成されている。EPS の単糖組成は珪藻種によって異なり、主にラムノース、フコース、ガラクトース (*Chaetoceros*) からなるもの (Haug and Myklestad, 1976)、ラムノース、フコース、マンノース (*Navicula*) から構成されるもの (Allan *et al.*, 1972)、大部分がグルコース (*Synedra acus*) を主成分とするもの (Yoshizawa and Nakamura, 1995) があり共通性はあまり見られなかった。しかしながら近年、底生微小藻類のかなりの部分を占める運動性珪藻の EPS については共通性が見られつつある。運動性珪藻による EPS の合成は、暗条件下や DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) の添加によっても阻害され

ない活動代謝過程の産物である (Cooksey and Cooksey, 1986)。つまり, EPS 生産は CO_2 の光合成による同化とは直接的に結びついていない。これは, 光合成で生産・貯蔵した貯蔵性多糖を EPS 合成の前駆物質として使っていることを示している。多くの海産珪藻は貯蔵性多糖として β -(1-3)-グルカンを持つ (Myklestad, 1988)。Wang *et al.* (1997) は, グルカンの生合成を阻害する 2, 6-dichlorobenzonitrile を *Achnanthes longipes* の培地中に添加したところ, その運動性が減少したと述べている。また, Taylor *et al.* (1999) は, 底生珪藻群落の底泥から抽出したコロイド状有機物は 80%以上がグルコースであることを見い出している。これらの知見は, 運動性珪藻の EPS がグルカンを主成分とするヘテロ多糖であることを暗示している。EPS の糖以外の成分としては, わずかな蛋白質や脂質が数種の珪藻から検出されている (Percival and McDowell, 1981)。

底生珪藻から分泌される EPS はその生態戦略上, 極めて重要な役割を数多く持つ。例えば, *Achnanthes* 属や *Gomphonema* 属などが細胞末端の粘液孔から分泌する柄状の粘液物質は基質に付着するため, *Thalassiosira* の繊維状物質は沈降速度を遅くするため (Walsby and Xypolyta, 1977), 運動性珪藻が潮汐周期に依存した滑走運動時に分泌する粘液は土壌安定化のため (Paterson, 1989; Underwood and Paterson, 1993b), その他, 耐乾燥性, 抗菌性, 集塊形成作用そして溶存態有機物の吸収などのさまざまな機能が提唱されている (Hoagland *et al.*, 1993)。また, EPS は珪藻自らの生存・成長のためだけでなく, 海洋生態系の従属栄養生物に対する有機物源としての役割も有する。その役割の中で EPS が持つ潜在的な重要性は, EPS が溶存態有機物を物理的に吸着することによって, 通常, バクテリアのみが利用可能である溶存態有機物の高次生物による直接的な利用を可能にすることである (Decho, 1990)。底生微小藻類によって生産される細胞外多糖類のメイオ・マクロベントスによる利用に関する研究は, これまでにいくらか行われてきた。干潟底生系の食物網においては, EPS は堆積物食者 (タマシキゴガイ, ムシロガイなど), あるいは初期稚貝期にあるアワビの幼生 (堅い珪酸質からできた珪藻の細胞殻を破壊できない) のような植食動物に対する高栄養価な有機物源となっている (Decho and Lopez, 1993; Kawamura *et al.*, 1998)。

つまり、食物網を通じた EPS の動態は底生生態系の物質循環において重要な役割を果たしていると考えられる。

先に述べたように、EPS は水圏生態系においてさまざまな役割を果たしており、その生産レベルを知ることは非常に重要である。EPS の微細構造、化学組成そして機能・役割についてはこれまで数多くの研究が行われてきた (Hoagland *et al.*, 1993)。しかしながら、底生珪藻が EPS を含む細胞外有機物をどの程度生産しているのか、つまり、一次生産に占める EPS 生産の割合に関する研究は非常に少ない (Myklestad *et al.*, 1989; Smith and Underwood, 1998)。しかも、これまで報告されてきた底生微小藻類による細胞外有機物生産は、過小評価されている可能性がある。つまり、EPS を含む粘液物質は藻類細胞の周りに非常に強く付着している。そのため、EPS 量を測定するには、まず、キレート剤 (エチレンジアミン四酢酸: EDTA) などを用いて EPS の架橋構造を破壊した後 (EPS の可溶化の促進)、遠心分離によって藻類細胞から粘液物質を抽出する必要がある (Decho, 1993)。しかしながらこれまで、細胞外有機炭素や細胞外多糖類は、EDTA などを用いることなく、培地中に溶出した成分、あるいは遠心分離によってのみ抽出した成分に対して測定されてきた。そのため、そのような測定法で評価した細胞外有機物ならびに EPS 生産量は過小評価となっている可能性が充分にある。

一般的に、植物プランクトンによる溶存態細胞外有機物 (低分子化合物) は栄養制限が起こる定常期において比較的多く生産・分泌される。浮遊性珪藻の細胞外多糖類 (高分子化合物) の生産もまた水域の栄養状態によって変動し、栄養制限状態にある時、特に窒素/リン比が高い時、比較的多くの細胞外多糖類が分泌されるという報告例が多い (Myklestad, 1977; Myklestad *et al.*; 1989; Mari, 1999)。しかしながら、栄養制限が起こる定常期よりも対数増殖期において細胞外多糖をより多く分泌する種 (*Porphyridium aerugineum*) も知られている (Ramus and Robins, 1975)。また, Penna *et al.* (1999) はリン制限下の対数増殖期と定常期では *Nitzschia closterium* が、窒素制限下の対数増殖期では *Skeletonema costatum* と *Chaetoceros* sp. が比較的多くの細胞外多糖を生産したと報告している。つまり、生産が最も盛んに行われる成長相と制限

因子は種によって異なり、浮遊性珪藻の成長過程に伴う細胞外多糖類生産の変動を一般化することは困難かと思われる。浮遊性珪藻による細胞外多糖類の生産に関しては上記のような多くの研究があるが、底生微小藻類による細胞外多糖類の生産と成長相の関係についての研究は皆無である。

1. 3. 細胞外有機物の動態

一般的に、従属栄養バクテリアはその炭素源およびエネルギー源として低分子有機化合物を選択的に利用する (Cho *et al.*, 1997; Iturriaga and Zsolnay, 1983)。植物プランクトンによって生産・分泌される細胞外有機物のほとんどは易分解性の低分子化合物であり、その大部分が分泌速度とほぼ同じ速度で速やかに浮遊性バクテリアによって取り込まれる (Iturriaga and Hoppe, 1977)。取り込まれた細胞外有機炭素が呼吸と菌体構成に使われた後、そのバクテリアが従属栄養微小鞭毛虫 (HNF: heterotrophic nanoflagellate) を主とする捕食者に消費され、さらに HNF がより大型の生物に捕食される (Sherr and Sherr, 1987)。つまり、植物プランクトンの細胞外有機炭素はバクテリア-HNF-大型捕食者(微生物ループ) を通じて浮遊生態系の炭素循環にリンクしている。

一方、底生微小藻類によって分泌される細胞外有機物は高分子化合物 (EPS) をかなり含んでいると推測される。Underwood and Paterson (1995) は、底生珪藻群落の生物膜から抽出した全炭水化物の平均 96% がコロイド状炭水化物であり、そのコロイド状炭水化物の平均 19.2% が EPS であると報告している。つまり、干潟の底生環境にある有機物の大部分はバクテリアが直接利用できない多糖類のような高分子化合物がかなりの部分を占めると考えられる。バクテリアは自らの細胞の周りに加水分解酵素 (例えば、グルコシダーゼやプロテアーゼ) を分泌することによって高分子化合物を分解させた後、その酵素的分解生成物を利用する (Chróst, 1990, 1991; Middelboe *et al.*, 1995)。同様に、底生微小藻類によって分泌されるコロイド状有機物

や EPS もまた、そのような酵素的分解を経た後、バクテリア群集によって取り込まれると推測される。

一般的に、海水中では浮遊性バクテリアが優占するが、底泥中では付着性バクテリアが全バクテリアの大部分を占める。固着性バクテリアは砂泥粒子に固着してその群体を発達させ細菌膜を形成するため (Reli, 1994), 浮遊系におけるバクテリアを補食するサイズの消費者よりも大型の生物 (メイオ・マクロベントス) に直接的に利用される機会が多い。つまり、底生系では、いくらかの栄養段階を経由することなく、効率の良い炭素の伝達が行われていると推測される。

植物プランクトン、例えば *Phaeocystis* sp. や *Scenedesmus bijugatus*, によって分泌される細胞外多糖類のバクテリアによる生分解・利用過程に関する研究はいくらかある (Weaver and Hicks, 1995; Janse *et al.*, 1999)。これらの研究は、藻類によって分泌される細胞外多糖はバクテリアによって急速に分解を受けるが、その分解速度や分解の様相は環境水中の栄養状態やバクテリア群集構成によって異なると結論している。しかしながら、バクテリアによる底生微小藻類起源の細胞外多糖類の利用、底生系における微小藻類-バクテリア間の関係、についての研究はほとんどない。底生微小藻類の分泌する多糖類が植物プランクトンの細胞外多糖と類似したものであるとすれば (Hoagland *et al.*, 1993), 底生微小藻類の細胞外多糖もまた速やかにバクテリアによって分解されると推測される。しかしながら、底生珪藻によって分泌される細胞外多糖類は底泥中に多量に含まれている金属イオン (Ca^{2+} , Mg^{2+}) と結合して錯体を形成するため (Decho, 1990), その分解の様相は植物プランクトン起源の細胞外多糖とは異なるかもしれない。つまり、多糖類の錯体形成は多糖の粘度を増加し、微生物による分解を鈍化させることがある (Parker *et al.*, 1996)。また、土壌中の多くの多糖類は粘土鉱物の吸着を受けるが、このことも多糖類の分解速度の低下に寄与している。このように底泥中に存在する多糖類はさまざまな環境因子の影響を受けながら動的平衡を保って存在していると考えられ、底生微小藻類によって分泌される細胞外多糖類の分解は一様には進行していない可能性がある。

バクテリアによって分泌される細胞外酵素は存在する部位と触媒反応が起こる位置から 2 つのグループに分けられている (Chróst, 1990) —エクトエンザイム(Ecto-enzyme): 細胞表層あるいはペリプラズム層に存在し, 活性部位を細胞外に向けている酵素群; 細胞外 (遊離) 酵素 (Extracellular enzyme) : 細胞から遊離し, 水中に溶存あるいはデトライタスや無機粒子に吸着して存在している酵素群。水圏に存在する細胞外酵素の大部分はエクトエンザイムであり, その加水分解活性は細胞外 (遊離) 酵素の活性より高い。これは, バクテリア細胞を覆っている EPS (莢膜) がエクトエンザイムの水中への遊離を防ぎ, 酵素活性を維持する役割を果たしているためと考えられている (Reli, 1994)。これらのエクトエンザイムの大部分は誘導酵素である。この誘導酵素が示すカタボライトリプレッションは, 細胞外多糖の酵素的加水分解と酵素反応生成物のバクテリアによる取り込み (バクテリア生産) が密接に関係していることを示している。細胞外多糖を分解する微生物起源の酵素としては, セルラーゼ (EC. 3. 2. 1. 4), α - \cdot β -グルコシダーゼ (EC. 3. 2. 1. 20, 21), β -ガラクトシダーゼ (EC. 3. 2. 1. 23) などがよく知られている。自然界に最も多く存在する炭水化物のセルロースとでんぷんの分解最終段階は, それぞれ, セロビオースとマルトースの β -グルコシダーゼと α -グルコシダーゼによる分解である。そして, その分解生成物であるグルコースは水圏に存在するバクテリアの最も一般的な基質である。また, グルコースは藻類の細胞外多糖類に共通に見られ, 多くの底生珪藻種の細胞外多糖の主成分ともなっている。そのため, 主に β - \cdot α -グルコシダーゼの活性を測定することによって, 多糖類の分解活性とバクテリアの取り込みとの関係が評価されてきている。

1. 4. 本研究の意義と目的

限られた空間に底生系と浮遊系が密接に存在している干潟はさまざまな生物の代謝グループが相互に関連し合うことにより干潟生態系の物質循環を多様にし, 活発

にしている。このような特徴を持つ干潟は人間社会への利便性と学問的重要性の 2 つの側面を有する。人間社会への便益の目から見ると、干潟が持つ高い生産力と浄化機能は、水産資源の生産を支えるものであり、富栄養化から海を守るものである。また近年では、環境教育の場としての干潟の価値が認識されつつある。学問的重要性の面において、干潟は浅水域独自の希少種が存在する場、そして多くの新たな知見を与えてくれる場である。さまざまな環境因子の変動に曝されながら多様な生物相が密接した空間に共存している干潟生態系は、その機能や構造について未知の部分が多く残されている。つまり、干潟を含めた浅水域生態系は、浅水域独自、あるいは自然界に普遍的に見られる未知の現象に対する発見の可能性を秘めた重要な場であると考えられる。

上記のような観点から、干潟生態系の様々な要素について研究し、物質循環系を通じた生態系の機能や構造を明らかにすることは重要な課題であると考えられる。浅水域生態系全体を対象とした物質動態の研究は Valiela and Teal (1979) に始まる。彼らは塩性湿地への窒素の負荷（降水、地下水、潮汐による水の交換、窒素固定）と塩性湿地からの窒素の流出（潮汐による水の交換、脱窒、堆積・埋没）を評価し、系全体の窒素収支を明らかにした。干潟生態系では、エムスエスチャリー（オランダ）で行われたプロジェクト（BOEME: Biological Research Ems-Estuary）が始まりである（BOEDE, 1985）。この研究は、生態系を構成するさまざまな物理的・化学的・生物的要素間の関係を定量的に把握し、干潟生態系の構造を詳細に説明している。しかしながらこの研究では、1980年代において確立された微生物ループという概念（Azam *et al.*, 1983）を考慮にいれた底生微小藻類とバクテリアの関係を実験的に評価していない。そして、現在に至るまで底生系における微生物ループを通じた底生微小藻類起源の溶存態有機物の動態はほとんど明らかにされていない。そこで本研究は、干潟の物質循環の駆動起点である底生微小藻類とバクテリア間の関係を解明するため、和歌山県和歌浦干潟と三河湾一色干潟において、底生微小藻類の一次生産と細胞外有機物生産、ならびにバクテリアによる細胞外有機物の取り込み・分解過程を浮遊系と比較しながら測定・評価した。

本論文は、干潟域の主要な一次生産者である底生微小藻類および植物プランクトンによる一次生産と細胞外有機物生産の特徴を明らかにし、さらに、酵素的分解を経た細胞外多糖類のバクテリアによる利用、つまり、底生系と浮遊系における微小藻類-バクテリア間の炭素フラックスの解明を目的として行った。本論文は、以後、3つの章で構成されている。つまり、第2章では、干潟における一次生産の特性を把握するため、和歌山県和歌浦干潟と三河湾一色干潟における底生微小藻類および植物プランクトンによる一次生産の日周的・季節的变化を、それらに直接的な影響を及ぼす環境因子と関連づけながら解析した。また、微小藻類・バクテリアに関連するいくつかの因子を測定し、微小藻類-バクテリア相互間の関係を評価した。第3章では、底生微小藻類と植物プランクトンの細胞外有機物生産の特徴を明らかにするため、EDTA溶液を用いてそれらの天然群集と培養種から抽出・分画した各細胞外有機炭素フラクションの全一次生産に占める割合を評価し、そして、それらの増殖過程に伴う各細胞外有機炭素フラクションが示す生産量の変動について考察を加えた。さらに、バクテリアによる細胞外有機物の生分解過程および微生物ループ中への炭素輸送の発端となるバクテリアによる細胞外有機物の利用を明らかにするため、底生微小藻類から抽出した細胞外有機物のバクテリアによる酵素的分解・無機化過程を評価した。第4章では、底生系と浮遊系における藻類-バクテリア間の炭素フローの特徴を示すため、本研究で得られた室内実験と現場観測データを過去の文献データと比較しながら、植物プランクトン・底生微小藻類-バクテリア間の炭素フラックスを推定した。

第2章 干潟底生系および浮遊系の環境特性と一次生産

2.1. はじめに

本研究の目的は、干潟の物理・化学・生物的環境特性を明らかにし、底生微小藻類と植物プランクトンの有機物生産に関わる生元素の生物地球化学的動態を把握することである。そこで、1995年と1996年の和歌山県和歌浦干潟において、底生微小藻類と植物プランクトンの光合成速度ならびに物理・化学・生物的環境因子を測定し、底生微小藻類および植物プランクトンが干潟の有機物生産と物質循環に果たす役割を評価した。三河湾一色干潟では、底生微小藻類および植物プランクトンの一次生産特性を明らかにするため、1997-1998年にかけて、底生微小藻類と植物プランクトンによる一次生産の日周変動（現場法）、季節変動（疑似現場法）および光合成速度と光強度の関係（光合成-光曲線）を ^{14}C 燃焼法（Colijn and Jonge, 1984; Saito *et al.*, 1990）により測定した。さらに、干潟底生系と浮遊系における微小藻類とバクテリアとの相互関係を評価するため、底泥と海水中のさまざまな化学・生物因子（炭水化物濃度、クロロフィル α 濃度、全菌数、一次生産速度、細胞外酵素活性）を測定した。

2.2. 方法

2.2.1. 調査水域と試料採取

(a) 和歌浦河口干潟

和歌浦干潟は和歌山県北部の和歌川河口（ $34^{\circ} 14' \text{N}$, $135^{\circ} 10' \text{E}$ ）に位置し、約7,400 haの集水域を持つ半閉鎖的な河口干潟である（図2.1）。干潟の総面積74 haのうち、約46 haの底泥が大潮の干潮時に干出する。干潟水の水深は、満潮時において1.0-

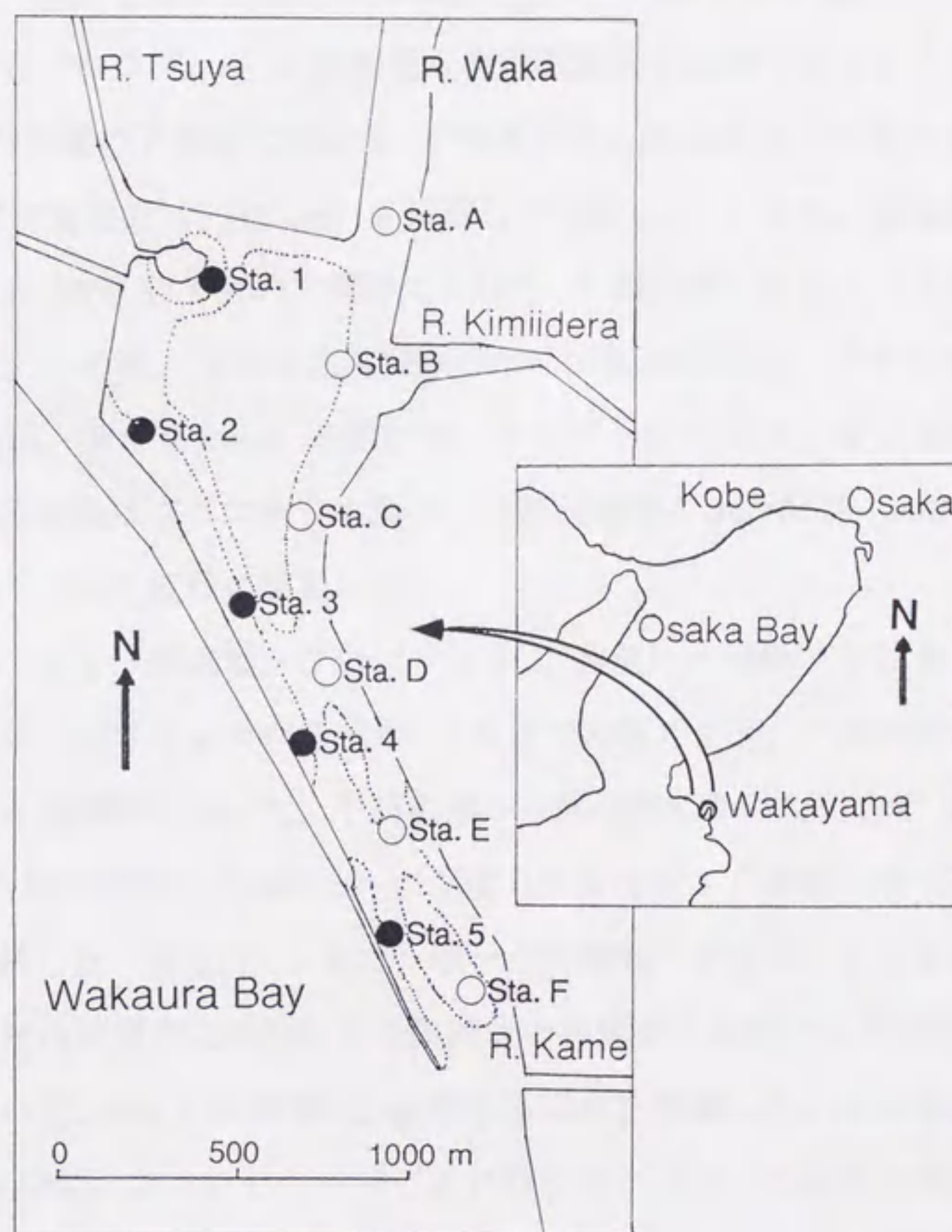


図 2. 1. 和歌浦干潟の調査地点

●：採泥地点 (Sta.1-Sta. 5), ○：採水地点 (Sta. A-Sta. F)。
 本研究において, Sta. A と B を干潟奥部, Sta. C と D を干潟
 中央部, Sta. E と F を干潟奥部と定義する。

3.8 m, 干潮時において0-2.1 mの範囲にあった。干潟では, 和歌川の河川水(低塩分, 富栄養)と黒潮の影響を受ける和歌浦湾の海水(高塩分, 貧栄養)が混合した, いわゆる汽水が, 潮汐と共に干潟河口の水路を通じて流動を繰り返している。

底生微小藻類のクロロフィル a 含有量と光合成速度を測定するため, 1995年10月, 11月, 12月の大潮の干潮時において, 干潟奥部から河口部までの合計5地点(Sta. 1からSta. 5)で表層底泥(0-0.5 cm)を採取した(図2.1)。また, 底生微小藻類の種を同定するため, 1996年8月の大潮時において, 干潟全域にわたって表層底泥(0-1 cm)を採取した。この時, 光合成速度測定のための底泥試料は, ステンレス製ペトリ皿(直径2.5 cm, 深さ0.5 cm)を用いて, そして, クロロフィル a 含有量と種の同定のための底泥試料はプラスチック製ペトリ皿(直径5 cm, 深さ1 cm)を用いて, 干潮時に底泥が干出した直後に採取した。

水の化学分析(塩分, 栄養塩・クロロフィル a 濃度)と植物プランクトンの光合成速度測定のため, 1995年6月から同年12月までの毎月1回, 干潟水を採取した。水試料は, 干潮と満潮時において, 干潟奥部から河口部にかけての合計6地点(Sta. AからSta. F:各地点間隔は約400 m)の深度0.5 mから5 l容量のポリエチレンタンクを用いて採取した(図2.1)。また, 塩分, 栄養塩・クロロフィル a 濃度, 植物プランクトンの光合成速度ならびにその種組成の日周変化を調べるために, 1996年8月の大潮時において, Sta. Fの深度0.5 mから干潟水を採取した。この採水は, 半日周潮周期(約12時間)にわたり1時間ごとに行った。(注:和歌浦干潟における植物プランクトンの光合成速度の日周変動は, 現場で採水した試料を研究室に持ち帰り, 一定光強度 $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件下でインキュベーションして測定した)

(b) 三河湾一色干潟

一色干潟 ($34^{\circ} 46' \text{ N}$, $137^{\circ} 02' \text{ E}$) は愛知県三河湾の中央部に位置し, 矢作古川によって形成された前浜干潟である(図2.2)。干潟水域の面積は約920 haである。底生微小藻類のクロロフィル a 含有量と光合成速度を測定するため, 1997年4月から1998年3月までの毎月1回, 干潟全域の合計8地点で表層底泥を採取した(図2.2)。採泥は, 干潮時に底泥が干上がった直後において, クロロフィル a 測定用の試

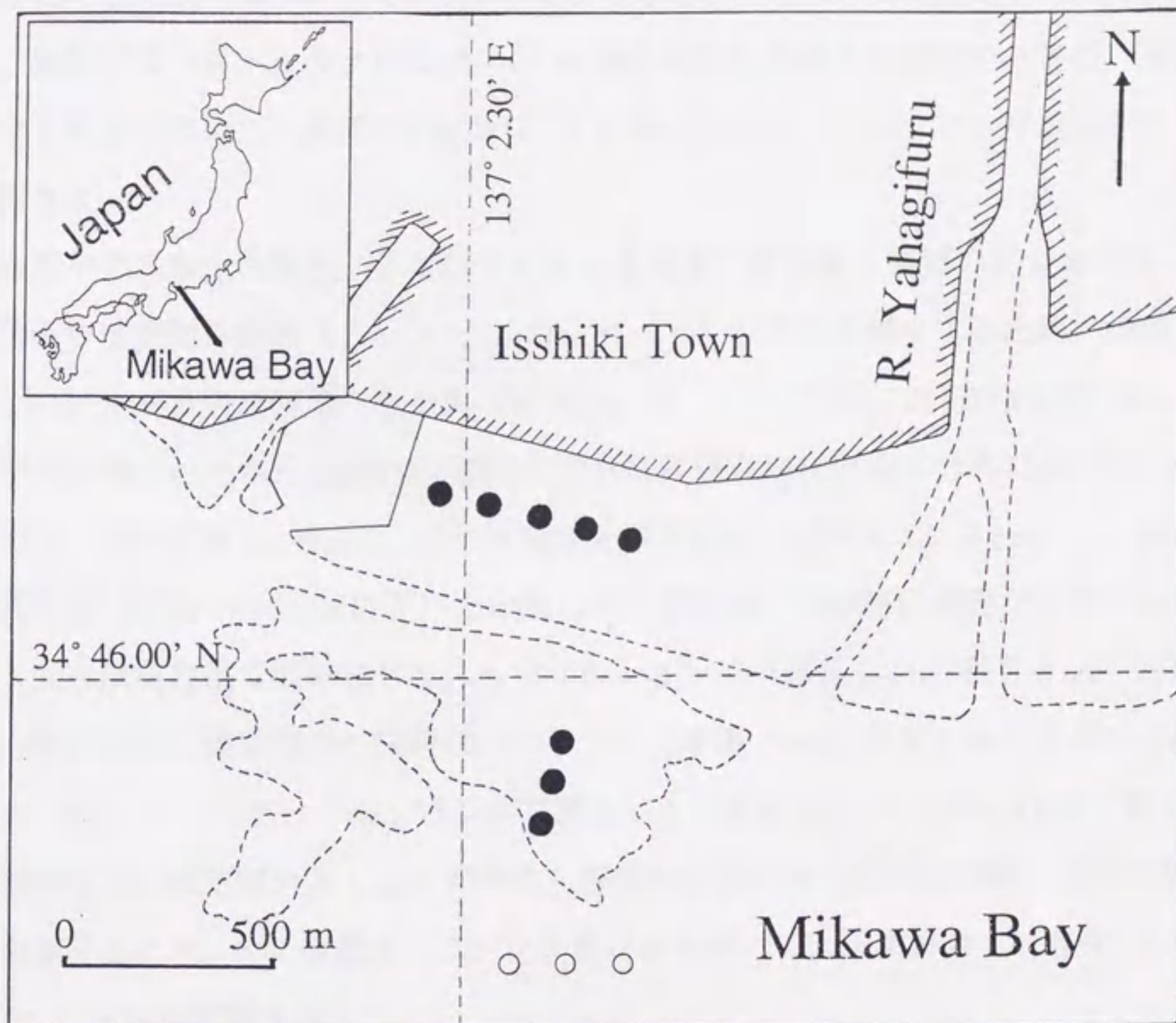


図 2. 2. 一色干潟の調査地点

● : 採泥地点 (8 地点), ○ : 採水地点 (3 地点)。
 点線で囲った部分は大潮の干潮時に干出する干潟を示す。

料はペトリ皿（直径 5 cm, 深さ 1 cm）を用いて, 光合成速度測定用の試料はプラスチック製シリンジ（直径 2 cm, 長さ 8 cm）を用いて行った。シリンジで採泥した光合成測定用の試料は, 0-3 mm の表層底泥のみを切り取り, 測定用試料とした。同時に, 植物プランクトンのクロロフィル a 濃度と光合成速度を測定するため, 干潟の沖合 3 地点において, 深度 0.5 m から, 5 l ポリエチレンタンクにより採水を行った（図 2.2）。

底泥中の炭水化物濃度, クロロフィル a 含有量, 底生微小藻類の光合成速度, 全菌数そして細胞外酵素 (β - \cdot α -グルコシダーゼ) の活性を測定するため, 1999 年 5 月 17 日と 19 日の三河湾一色干潟 (34° 46' N, 137° 02' E) において, 表層底泥 (0-1 cm) を干潟全域にわたり計 12 地点で採取した。試料採取地点の粒度分布に基づき, 本研究では, 試料採取 12 地点のうち, 9 地点を砂質干潟 (粒度 1/16-2 mm), 3 地点を泥質干潟 (粒度 1/16 mm 以下) と定義した。採泥は, 干潮時に底泥が干上がった直後, 光合成測定用の試料はプラスチック製シリンジ (直径 2 cm, 長さ 8 cm) を用いて, それ以外の測定項目の試料は, ペトリ皿 (直径 5 cm, 深さ 1 cm) を用いて採取した。なお, プラスチック製シリンジで採取した光合成測定用の試料は, 最上層 3 mm を切り取り, 測定試料とした。同時に, 海水中における上記の化学的・生物学的因子を測定するため, 5 l 容量ポリエチレンタンクを用いて, 干潟沖合 (1 地点) の水深 0.5 m から海水試料を採取した。

2.2.2. 物理・化学・生物的環境因子

干潟水域の流速は流速計 (CR-7 type: Cosmo Riken) により, 塩分と水温は電気伝導度計 (SC82 type: Yokogawa) により測定した。

栄養塩とクロロフィル a 濃度の測定のために採取した水試料は, 直ちに, 前処理 (450°C で 3 時間加熱) したガラス繊維フィルター (GF/F: Whatman) でろ過し, そのフィルターとろ液を分析まで -80°C で冷凍保存した。ろ液中のアンモニア態窒素は Sagi (1966) の方法, 亜硝酸態窒素は Bendschneider and Robinson (1952) の方法, 硝

酸態窒素は Wood *et al.* (1967) の方法, 尿素態窒素は Newell *et al.* (1967) の方法, そして, リン酸態リンは Murphy and Riley (1962) の方法を用いて測定した。

和歌浦干潟と一色干潟のクロロフィル *a* 量の測定法は異なる。つまり, 和歌浦干潟における水中と底泥中のクロロフィル *a* 量は, それぞれ, Lorenzen (1967) の方法と Colijn and Dijkema (1981) の方法により測定した。一色干潟の水中と底泥中のクロロフィル *a* 量は, 共に, 液体高速クロマトグラフシステム (SCL-6B システムコントローラー, SIL-6B オートインジェクター, LC-6AD ポンプ; Shimadzu) とフォトダイオードアレイ紫外・可視検出器 (SPD-M6A; Shimadzu) を用いた Suzuki *et al.* (1997) の方法に従って測定した。

和歌浦干潟における底生微小藻類と植物プランクトンの種組成は光学顕微鏡を用いて調べた。試料は 500-1,000 ml の干潟水を採水し, 中性ホルマリン (最終濃度 0.4%) で固定した。植物プランクトンの固定試料は沈澱法により濃縮した。砂泥中の底生微小藻類は手で激しく攪拌した後, その上澄み中の藻類細胞を沈澱・濃縮した。濃縮した試料は酢酸カーミンにより生細胞のみを染色した。藻類種の相対優占度は, 封入プレパラートを作製し, 1 試料あたり 500 以上の生細胞を計数して決定した。また, 藻類種の同定は, 細胞を希塩酸で洗浄した後, 永久プレパラートを作製して行った。

底泥と海水中の全炭水化物濃度は, グルコースを標準溶液として, フェノール・硫酸法 (Dubois *et al.*, 1956) により測定した。また, 4 mM のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) で底泥から抽出されるコロイド状有機物画分と, 70% エタノールにより分別沈澱される多糖類画分の炭水化物濃度を測定した。底泥中のコロイド状有機物画分と多糖類画分の抽出は Decho (1993) の方法に基づき, 以下に記す実験手順で測定した。まず, 採取した表層底泥を 4 mM の EDTA 溶液中で 1 時間静かに攪拌した後, 遠心分離 (4000×g, 10 分, 3 回: 同じ上澄み中で攪拌・再懸濁) によりコロイド状有機物を底泥から溶出させた (EDTA を使用したコロイド状有機物の抽出法に関しては, 第 3 章 3.4.1. 「細胞外有機炭素の分画法」で詳しく述べている)。本研究において, この上澄み中の炭水化物を Colloidal-Carbohydrate 画分と定義した。この上澄みの一部にエタノール (最終濃度 70%) を加え, 冷暗所 (4°C) にて 8 時間静置し, 多

糖類画分を沈澱させた。その沈澱物を遠心分離 (4000×g) によって集め、上澄みを捨てた後、蒸留水を加えて再溶解した。この操作を計 2 回繰り返した後に得られた白色沈澱物中の炭水化物を、本研究では、EPS-Carbohydrate 画分と定義した。これらの画分の炭水化物濃度は、グルコースを標準溶液として、フェノール・硫酸法 (Dubois *et al.*, 1956) により測定した。

底泥中の全菌数は、Epstein and Rossel (1995) の方法に従い、4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色と蛍光顕微鏡により測定した。底泥試料は、中性ホルマリシ (最終濃度 3%) で固定し、固定後 1 週間以内にバクテリア細胞を計数した (各地点につき 3 試料)。砂泥粒子からのバクテリアの剥離は、プローブ型超音波細胞破砕器 (UR-200P: Tomy Seiko) を用いて、試料を冷却しながら 180 秒間超音波処理することによって行った。超音波処理した試料は激しく攪拌した後、上澄みを採取した。さらに、砂泥試料に残存しているバクテリアを採取するため、無菌蒸留水を加えて攪拌した後、上澄みを採取した (この操作を計 5 回繰り返した)。砂泥から剥離したバクテリア細胞は DAPI (最終濃度 $5 \mu\text{g ml}^{-1}$, 10-15 分間) で染色した後、ポリカーボネートブラックフィルター (孔径 $0.2 \mu\text{m}$: Nuclepore) でろ過採集した。そのフィルターを無菌海水で 2 度洗浄した後、落射型蛍光顕微鏡 (Axioskop 50: Carl Zeiss) でバクテリア細胞を計数した。計数は 10-15 視野から合計 400 以上の細胞数を計数した。海水試料に対する全菌数の測定は、Porter and Feig (1980) の方法に従い、DAPI 染色と蛍光顕微鏡によって測定した。

底泥と海水中の β - α -グルコシダーゼ活性は Hoppe *et al.* (1983) の方法に従って、酵素反応 [$\beta(\alpha)$ -D-glucosidase: MUF- $\beta(\alpha)$ -D-glucopyranoside \rightarrow MUF + D-glucose] の結果、蛍光生成物 [4-methyl-umbelliferone (MUF)] を遊離する蛍光性人工基質 (MUF- β -D- α -D-glucopyranoside: Molecular Probes) を用いて測定した。採取した底泥試料をろ過海水で希釈し (24-39 倍)、マグネチックスターラーで攪拌・懸濁させた。その懸濁液 5 ml を 15 ml 容量の遠沈管 [各試料につき 3 本、ブランク 1 本: 加熱 (100°C) して失活させた] に注ぎ、数段階の濃度 (1-500 μM) の人工基質 (2-methoxyethanol に溶解) を添加した。静かに攪拌しながらインキュベーション (水温 20°C, 30 分) した後、4 M NaOH (最終濃度 90 mM) (Bélanger *et al.*, 1997) を加え

て酵素反応を停止した。遊離した MUF の蛍光強度は蛍光光度計 (RF-5000: Shimadzu) を用いて測定 (ex. 365 nm, em. 455 nm) した。検量線 (0-40 μM) は MUF 標準溶液を用いて作製した。最大酵素活性は, Michaelis-Menten の速度式に基づいて Lineweaver-Burk プロットを行い, その直線の式から算出した。海水中の β - \cdot - α -グルコシダーゼ活性は上記と同じ方法で, 5 ml の海水試料に対して測定した。本研究における“バクテリアの細胞外酵素”とは, エクトエンザイム (ecto-enzyme: 細胞表層に存在する酵素) と菌体外酵素 (細胞から遊離した酵素) を含めたものである。

本研究において, 海水中の炭水化物濃度, クロロフィル a 量, 細胞外酵素活性は干潟の水深を 1 m と仮定して評価した。また, 底泥における上記の測定因子については, 底泥表層 0-1 cm の値に換算した。

2. 2. 3. 植物プランクトンの一次生産

植物プランクトンの光合成速度は Steemann Nielsen (1952) の方法に従い測定した。採水した水試料を 20 ml 容量のバイアル瓶 (明瓶 2 本, 暗瓶 1 本) に注ぎ, 放射性同位元素 $^{14}\text{C-NaHCO}_3$ (1 ml, 37 kBq ml^{-1} ; NEN) をトレーサーとして添加した。インキュベーションは, 採水現場の水温に合わせて温度調節した培養器中において, 一定光強度 $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の下, 4 時間行った。中性ホルマリンの添加により生物活性を停止させた後, 試料をガラス繊維フィルター (GF/F: Whatman) でろ過した。そのフィルターは, 植物プランクトンによって取り込まれなかった無機態の ^{14}C を除去するため, 50 ml の 2% 塩酸 (各試料と同じ塩分のろ過海水で希釈) で洗浄した。フィルターは乾燥させた後, シンチレーションバイアルに入れ, 10 ml の液体シンチレーターを加えた。なお, 和歌浦干潟の試料に対しては Scintisol TDP-I-SL 液体シンチレーター [PPO (4 g), POPOP (0.1 g), Toluene (1000 ml)] を, 一色干潟の試料に対しては Scintisol-EX-H (Dojindo) を使用した。ろ液は, 無機態の ^{14}C を除去するため, H_3PO_4 水溶液を添加し, 試料を酸性 (pH2~3) にした後, 窒素ガスで曝気 (15 分) した。通気処理したろ液は, シンチレーションバイアル中で, 液体シンチレーター

(Aquasol-2: Packard) と十分に混合した。フィルターとろ液中の ^{14}C の壊変数 (dpm) は液体シンチレーションカウンター (Model LSC-5000: Aloka) で測定した。本研究では、フィルター (粒状態) とろ液中 (溶存態) の dpm を合計して植物プランクトンの光合成速度を算出した。試料中の全炭酸濃度は、Satake *et al.* (1972) の方法に従い、赤外線 CO_2 分析器を用いて測定した。なお、1999年5月17日と19日の三河湾一色干潟の測定試料中の全炭酸濃度は、全有機炭素計 (TOC-500: Shimadzu) で測定した。

2. 2. 4. 底生微小藻類の一次生産

底生微小藻類の光合成速度は、Steemann Nielsen (1952) の方法に基いた ^{14}C 燃焼法 (Colijn and de Jonge, 1984; Saito *et al.*, 1990) により測定した。この燃焼法は、従来の湿式酸化法 (Raalte *et al.*, 1974) や懸濁法 (Cadée and Hegeman, 1974) と比較して、カラー・ケミカルクエンチングがなく、 ^{14}C 量の高精度な測定が可能である。この ^{14}C 燃焼法に関する検討は本章の 2. 4. 3. 「底生微小藻類の一次生産」でさらに詳細に論じる。

採取した底泥試料を容量 20 ml のバイアル瓶 (明瓶 3 本, 暗瓶 1 本) に入れ、ろ過海水と $^{14}\text{C}\text{-NaHCO}_3$ (1 ml, 74 kBq ml^{-1} : NEN) を加えた。インキュベーションは、採水現場の水温に合わせて温度調節した培養器中において、一定光強度 $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の下、4 時間行った。中性ホルマリンの添加により生物活性を停止させた後、底泥試料をガラス繊維フィルター (GF/F: Whatman) でろ過し、底泥とろ液に分別した。底泥は、無機態の ^{14}C を除去するため、2% 塩酸で洗浄した後、サンプルオキシダイザ (ASC-113 type: Aloka) により燃焼した。ここで、発生した $^{14}\text{CO}_2$ は、アルカリ溶液 (Carbo-Sorb E: Packard) により効率的に吸収させた。ろ液は、 H_3PO_4 水溶液を添加して酸性 (pH2~3) にした後、窒素ガスで曝気 (15 分) し、無機態の ^{14}C を除去した。 $^{14}\text{CO}_2$ を吸収したアルカリ溶液とろ液はシンチレーションバイアル中で、液体シンチレーター (Aquasol-2: Packard) と十分に混合させ、それらの ^{14}C の dpm は液体シンチレーションカウンター (Model LSC-5000: Aloka) で測定した。本研究では、底泥とろ

液中の dpm を合計して底生微小藻類の光合成速度を算出した。

底泥試料に加えたろ過海水中の全炭酸濃度は、Satake *et al.* (1972) の方法に従い、赤外線 CO₂ 分析器を用いて測定した。なお、1999 年 5 月 17 日と 19 日の三河湾一色干潟の測定試料中の全炭酸濃度は、全有機炭素計 (TOC-500: Shimadzu) で測定した。

2. 2. 5. 一次生産の日周変化と光合成-光曲線

現場環境における底生微小藻類と植物プランクトンの光合成速度の日周変化を調べるため、1998 年 11 月 3 日の大潮時、一色干潟において、表層底泥と海水試料を採取した。クロロフィル *a* 量測定用の試料は、05:30, 10:00, 14:00, 17:00 に採取した。光合成速度測定用の試料は 05:30, 10:00, 14:00 に採取し、それぞれ、06:00-09:00, 10:30-13:30, 14:30-17:30 における ¹⁴C 取り込み実験に使用した。各試料の採取方法は先に述べた方法と同じである。観測日の潮汐・気象条件は以下に示す：満潮：5 時 6 分と 17 時 14 分、干潮：11 時 3 分、日の出：6 時 14 分、日没：16 時 57 分、晴れ時々曇り。

底生微小藻類と植物プランクトンの光合成速度の測定は ¹⁴C 法で行った。底泥または海水試料を含む 20 ml 容量のバイアル瓶に ¹⁴C-NaHCO₃ (底泥試料：1 ml, 74 kBq ml⁻¹, 海水試料：1 ml, 37 kBq ml⁻¹) を添加し、底泥試料は干潟上の透明プラスチックコンテナ内に静置、海水試料は深度 0.3 m に吊した。インキュベーション終了後、中性ホルマリンを添加し、生物活性を停止した。試料はアイソトープ研究室に持ち帰り、それ以後の処理は、上記と同じ方法 (2. 2. 4 と 2. 2. 5 参照) によって処理した。

また同日、底生微小藻類ならびに植物プランクトンの光合成と光の関係 (光合成-光曲線) を一色干潟の野外環境において調べた。光は深青色のセロファンフィルターで遮光し、8 段階の光強度を設定した [0 (Dark), 20, 60, 100, 205, 230, 600, 1200 μE m⁻² s⁻¹]。光合成実験および ¹⁴C の dpm の測定に関わる実験・処理は先に述べた方法 (2. 2. 4 と 2. 2. 5 参照) と同じである。P-I 曲線は Eilers and Peeters (1988) の理論的モデルに基づいた次式に曲線回帰した。

$$P^B = I / (aI^2 + bI + c) \quad (2.1)$$

ここで P^B は光合成活性 ($\text{mg C mg chl } \alpha^{-1} \text{ h}^{-1}$)、 I ($\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) は光強度、 a 、 b 、 c は回帰係数である。P-I 曲線の立ち上がり勾配 (α) は $1/c$ 、最大光合成活性 (P_{\max}) は $[b + 2(a \times c)^{0.5}]^{-1}$ 、光飽和定数 (I_k) は P_{\max} / α として計算した。

現場の光強度は水中型 (LI-192SB: Li-Cor) と地上型 (LI-190SB: Li-Cor) の光量子センサーを使用して、光量子計 (LI-185B: Li-Cor) で測定・記録した。

2.3. 結果

2.3.1. 和歌浦河口干潟

(a) 干潟の物理・化学・生物的特徴

和歌浦干潟河口水域の潮汐は M_2 分潮 (12 時間 25 分) が卓越しており、その潮汐に伴う水位の上下運動は、干潟河口に水平方向の潮汐流を発生させる。その結果、上げ潮時には、和歌浦湾の海水が干潟の上流方向へ流入し、下げ潮時には、和歌川河川水を含む汽水が和歌浦湾に流出していくという周期的な往復潮汐流が観察された。河口部 (Sta. F) における上げ潮と下げ潮時の最大流速は、それぞれ、 39 cm s^{-1} (上流方向) と 63 cm s^{-1} (下流方向) であった。また、流れと水位の間の位相差 [約 15 度 (約 1/24 周期) : 1995 年 4 月の大潮時] はほとんど見られなかった。以上の結果から、和歌浦干潟の水の流動は、平常時においては、河川流よりも往復潮汐流によって支配されていると考えられる。

干潟内の観測期間中の平均水温は、8 月の最高水温 31.2°C から 12 月の最低水温 10.2°C まで徐々に低下していった。また、干潟奥部から河口部までの水平方向における水温差は観測期間中 $0.2\text{--}2.0^\circ\text{C}$ の範囲にあった。

和歌浦干潟のような河口感潮域では、河川水と海水の間の密度差が原因となって

塩分クサビ（塩分成層）が発達する。その成層構造により、感潮域の水柱では、栄養塩・クロロフィル α 濃度などに鉛直的な濃度勾配が形成される。そこで、本研究を始めるにあたり、1995年4月の小潮時において、塩分の鉛直分布を干潟全域にわたって調べた。その結果、干潟奥部（Sta. A付近）で、わずかに塩分の鉛直的な濃度勾配が見られたが、それ以外の観測地点では、塩分は鉛直的にほぼ一定であった。つまり、和歌浦干潟では各潮時に関係なく、常に強混合型の水域であると考えられる（小潮時の干潟奥部は緩混合型水域）。強混合型の水域では、成層構造は混合過程で壊され、塩分は河川から海へ向かって徐々に増加していく。この特徴は、和歌浦干潟でも観測され、奥部から河口部にかけて塩分は徐々に増加していた。和歌浦干潟の汽水は、和歌川河川水と和歌浦湾の海水が混合しながら、行ったり来たりして作られていると解釈されるため、干潮と満潮時の塩分は大きく異なる。半年にわたる観測期間中、干潮と満潮時における塩分は、それぞれ、13.9-34.5（平均 27.9）と 22.0-35.5（平均 33.5）の範囲にあった。

感潮域における往復潮汐流は塩分のみでなく、栄養塩やクロロフィル α 濃度の周期的な変動も引き起こす。全窒素栄養塩（TNN；DIN + Urea-N）とリン酸態リン（天然水中の無機態のリンのほとんどが酸化状態のリン， PO_4^{3-} で存在していると考え以後、DIPとして記述）濃度は潮汐周期と共に時空間的に大きく変動していた（図 2.3A, B）。観測期間中、干潮と満潮時における TNN 濃度は、それぞれ、29.1-169.6 μM （平均 60.1 μM ）と 3.2-46 μM （平均 18.3 μM ）の範囲を変動していた。TNN 濃度におけるアンモニア態窒素、硝酸態窒素、尿素態窒素の割合は、それぞれ、7-92%（平均 43%）、1-76%（平均 42%）、5-23%（平均 11%）の範囲であった。干潮と満潮時における DIP 濃度は、それぞれ、1.1-6.7 μM （平均 3.9 μM ）と 0.1-3.7 μM （平均 1.0 μM ）の範囲を変動していた。以上の結果から、干潮時には、低塩分・富栄養な和歌川河川水が、満潮時には、高塩分・貧栄養な和歌浦湾の海水が干潟に流入していることが明らかとなった。しかしながら、このように栄養塩濃度は半日周期的に大きく変動したけれども、季節的にはほとんど変化せず、常に高濃度であった。これは、大量の栄養塩が、和歌浦干潟に注ぐ大小合わせて 5 つの都市河川から干潟へ定常的に輸送されていたことが原因であると考えられる。それらの栄養塩の水平

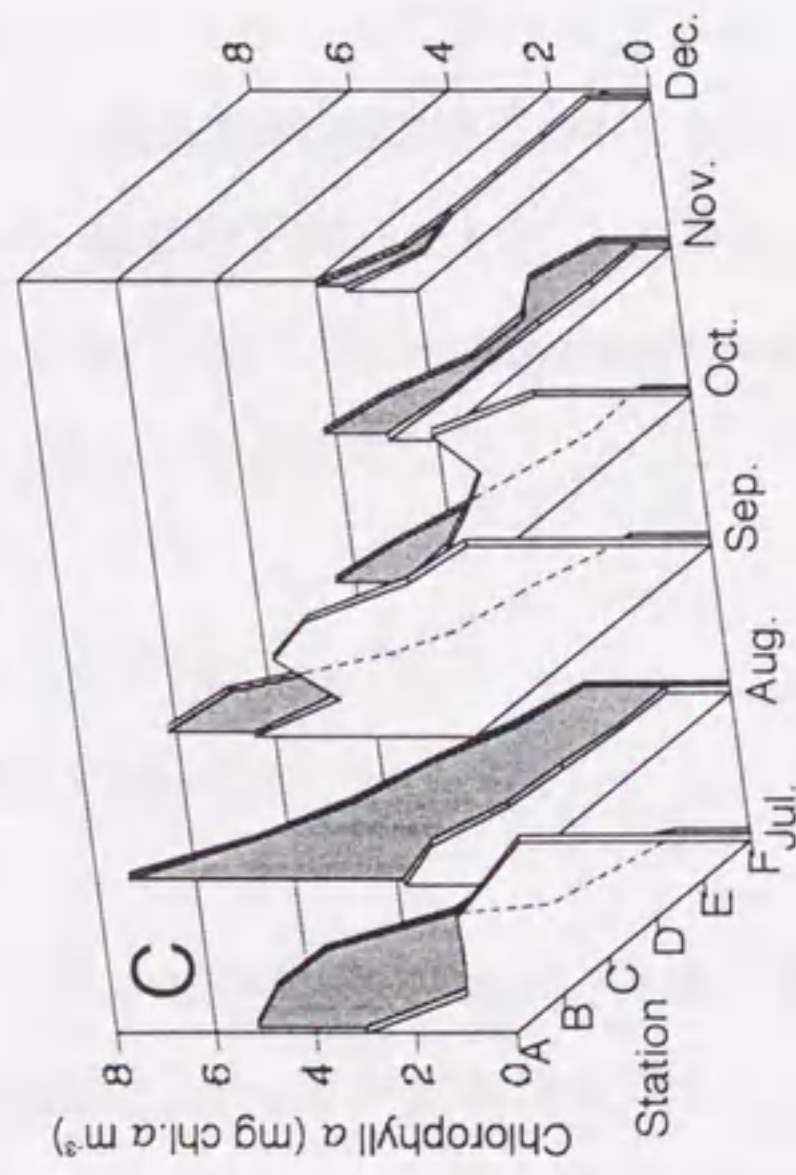
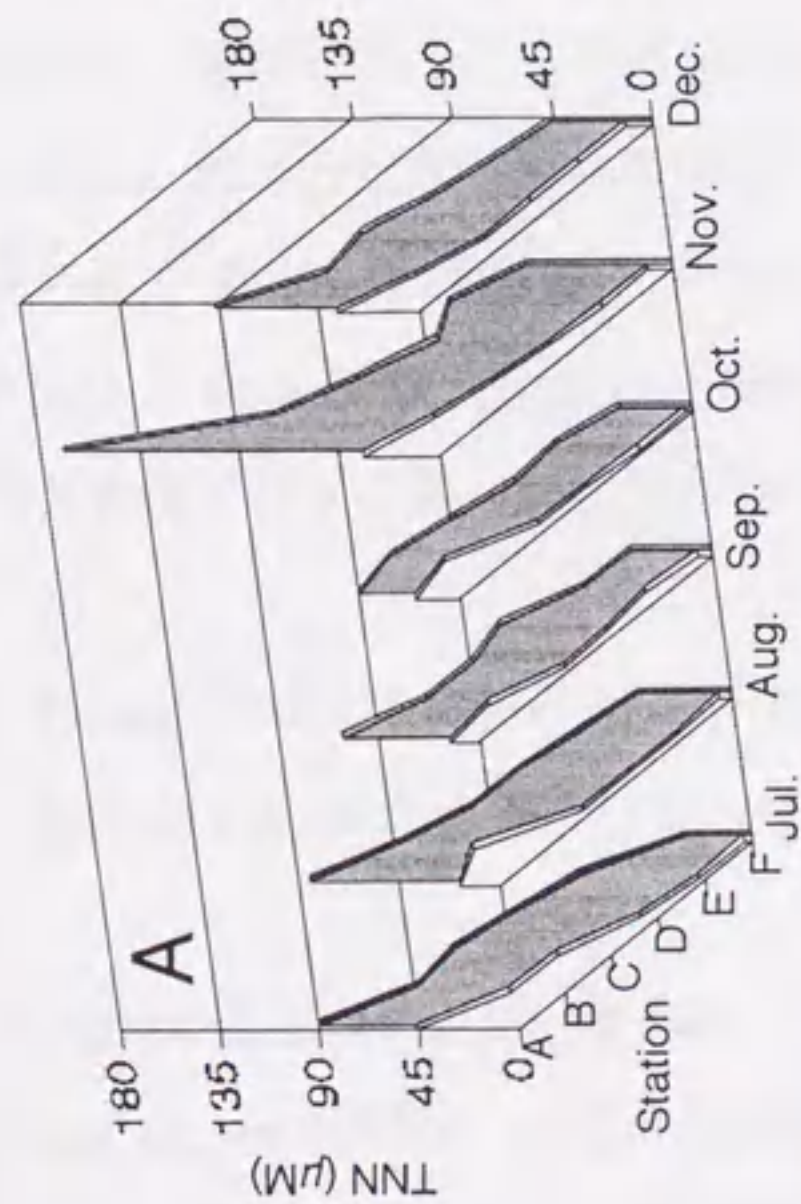
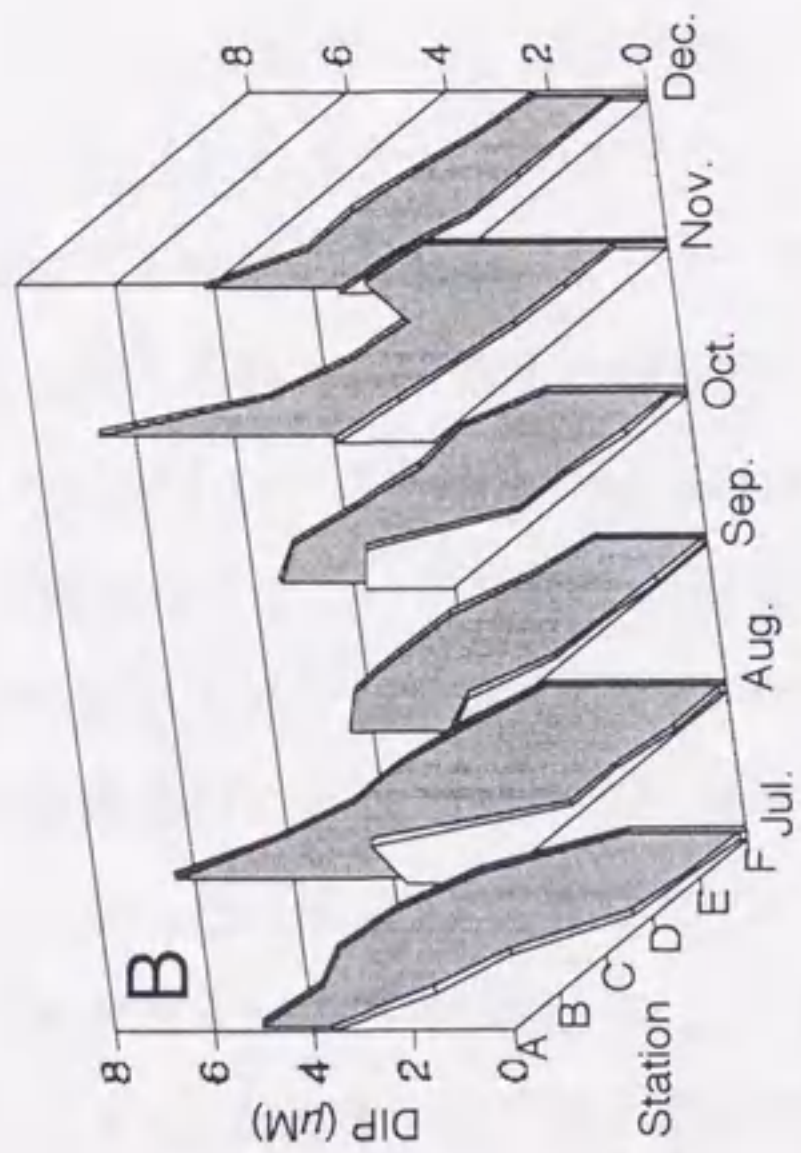


図2.3. 和歌浦干潟の各観測地点における全窒素栄養塩濃度 (TNN:アンモニア態窒素+亜硝酸態窒素+硝酸態窒素+尿素態窒素) (A), リン酸態リン濃度 (DIP), (B) 及びクロロフィルa濃度 (C) の季節変化。

■: 干潮時 □: 満潮時

分布は、干潮と満潮時共に、干潟奥部から河口部にかけて減少する傾向にあった。栄養塩濃度には、潮汐に起因すると思われる2つの明瞭な特徴(1.干潮時の高濃度と満潮時の低濃度, 2.干潟奥部から河口部にかけての濃度の減少)が示されたけれども、クロロフィル *a* 濃度には、潮汐に起因すると思われる規則的な時空間的変動は見られなかった(図 2.3C)。このようなクロロフィル *a* 濃度の不規則な水平的分布は、潮汐波による底泥の再懸濁、つまり、底生微小藻類の再懸濁が主な原因の一つではないかと考えられる。干潮時と満潮時におけるクロロフィル *a* 濃度は、それぞれ、 $0.8-7.4 \text{ mg chl } a \text{ m}^{-3}$ (平均 $2.7 \text{ mg chl } a \text{ m}^{-3}$) と $0.6-6.3 \text{ mg chl } a \text{ m}^{-3}$ (平均 $2.3 \text{ mg chl } a \text{ m}^{-3}$) の範囲にあった。クロロフィル *a* 濃度の季節的な変化は、水温の低下と共に夏から冬にかけて減少していく傾向にあった。

線形回帰分析により、DIN・DIP 濃度と塩分の間には顕著な負の相関があることが明らかとなった(表 2.1)。すなわち、干潟の栄養塩濃度は、主に、栄養塩濃度の高い河川水が海水により希釈されることで決まると考えられる。しかしながら、クロロフィル *a*・尿素濃度と塩分間の相関係数は低くなっていた。和歌浦干潟における栄養塩濃度が、物理的または生物的環境要因のどちらに主に依存しているのかを評価するために、淡水と海水の混合率に基づいた溶存態無機窒素 (DIN: $\text{NH}_4^+\text{-N} + \text{NO}_2^-\text{-N} + \text{NO}_3^-\text{-N}$) 並びに尿素態窒素 (Urea-N) 濃度の予測値とそれら実測値の比較を行った。DIN と Urea-N の予測値 (Estimated value-DIN と Estimated value-Urea-N) は保存性の混合を表す以下の式 (2.2 と 2.3) に従って計算した。

$$\text{Estimated value-DIN} = (1-x) \times r\text{DIN} + x \times s\text{DIN} \quad (2.2)$$

$$\text{Estimated value-Urea-N} = (1-x) \times r\text{Urea} + x \times s\text{Urea} \quad (2.3)$$

ここで、 $r\text{DIN}$ と $s\text{DIN}$ は、それぞれ、和歌川と和歌浦湾の DIN 実測濃度を、 $r\text{Urea-N}$ と $s\text{Urea-N}$ は、それぞれ、和歌川と和歌浦湾の Urea-N 実測濃度を示している。また、 x は河川水(和歌川)と海水(和歌浦湾)の混合率を示し、以下の式に従って計算した。

$$x = (S_t - S_r) / (S_s - S_r) \quad (2.4)$$

表2.1. 和歌浦干潟における塩分, 水温 (Temp.), 溶存態無機窒素濃度 (DIN), 尿素態窒素濃度 (Urea), リン酸態リン濃度 (DIP), 植物プランクトンのクロロフィル α 濃度 (Chl α -pla.), 底生微小藻類のクロロフィル含有量 (Chl α -ben.), 植物プランクトンの光合成速度 (P-pla.) ならびに光合成活性 (P^m-pla.), 底生微小藻類の光合成速度 (P-ben.) ならびに光合成活性 (P^m-ben.) 間の相関係数。

	Temp.	DIN	Urea	DIP	Chl α -pla.	Chl α -ben.	P-pla.	P ^m -pla.	P-ben.	P ^m -ben.
DIN	-0.29*									
Urea	-0.11	0.71**								
DIP	-0.08	0.88**	0.74**							
Chl α -pla.	0.57**	0.22	0.24	0.09						
Chl α -ben.	0.11	-0.08	-0.20	-0.07	-0.04					
P-pla.	0.66**	-0.13	0.24	-0.11	0.69**	0.08				
P ^m -pla	0.56**	-0.43**	-0.03	-0.36**	0.05	0.69**				
P-ben.	0.07	0.12	0.06	0.03	0.10	0.76**	0.19	0.13		
P ^m -ben.	-0.20	0.10	-0.08	0.05	-0.02	-0.05	-0.05	0.12	-0.79**	
Salinity	-0.38*	-0.85**	0.71**	-0.84**	-0.58**	0.09	-0.30*	0.04	-0.14	-0.22

** : $P < 0.01$, $n = 72$, $n = 30$ (下線部)

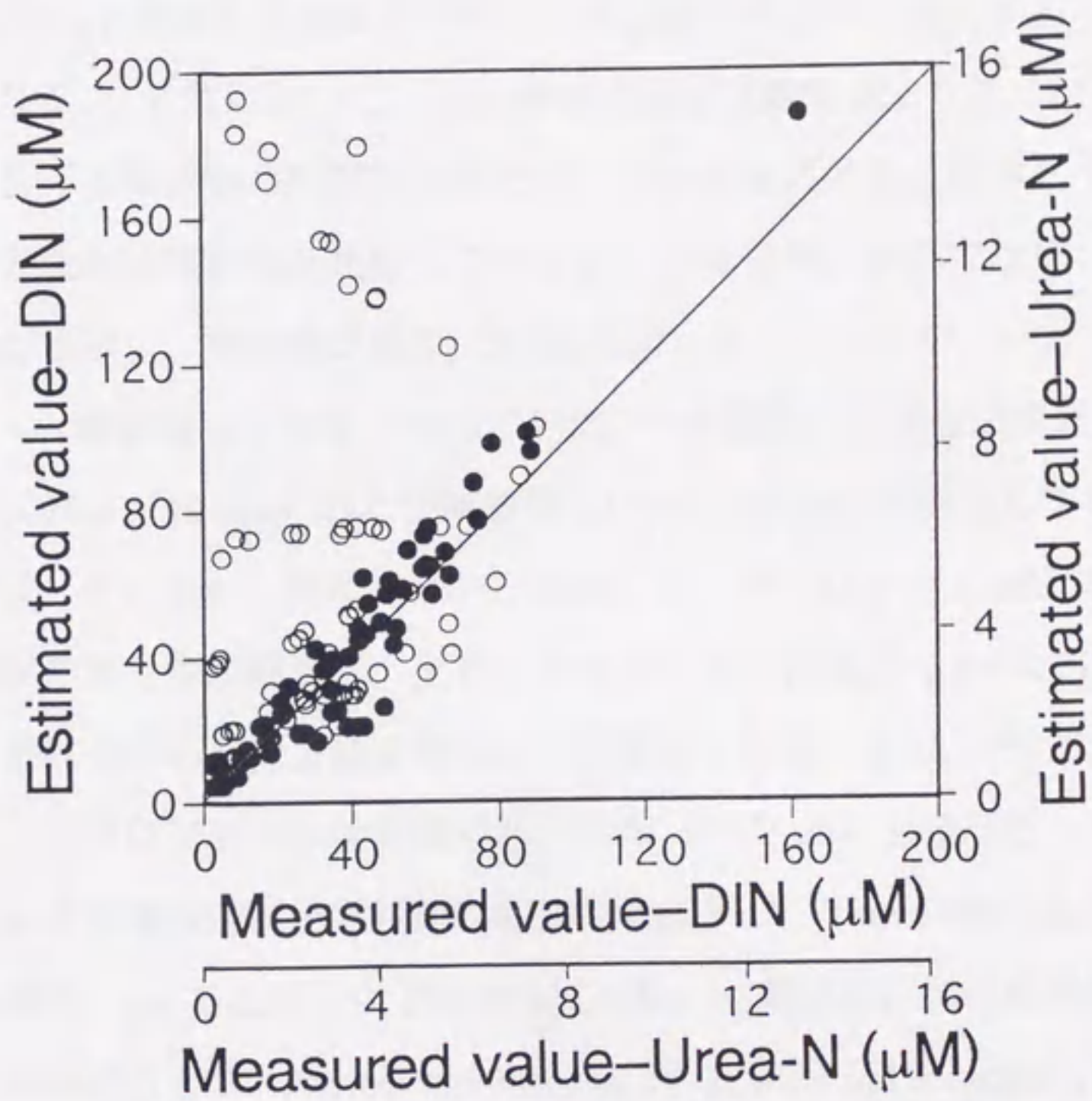


図 2. 4. 和歌浦干潟の各観測地点における溶存態無機窒素濃度 (DIN : ●) ならびに尿素態窒素濃度 (Urea-N : ○) の実測値と予測値の関係。

ここで、St, SrそしてSsは、それぞれ、干潟内、和歌川そして和歌浦湾の塩分を示す。この式から評価されたDINとUrea-N濃度の結果は図2.4において、それらの実測値と共に示している。DIN濃度の予測値は、実測値とほぼ一致していたけれども、Urea-N濃度は予測値と評価値との間に大きな差が見られる期間があった。水温が比較的高くなる7, 8月において、Urea-Nの実測値は評価値より低くなっていた。

干潟における堆積物の物理的な特徴は、その流速に大きく依存している。和歌浦干潟奥部の流速は河口部と比較して小さい。その結果、奥部では軽い細かい無機・有機粒子が堆積し、酸化層が浅く(2 cm未満)になっていたが、一方、河口部では、粒度が粗く、酸化層はより深くなっていた。干潟奥部における表層底泥(0-1 cm)はシルト(1/256-1/16 mm)および極細砂(1/16-1/8 mm)が優占していた。中央部と河口部では、それぞれ、細砂(1/8-1/4 mm)と中砂(1/4-1/2 mm)が優占していた。

堆積物中の底生微小藻類は、上層の有光層だけに出現するわけではない。この現象は底生系における一次生産を考える上で極めて重要である。そこで、1995年8月において、クロロフィルa含有量の鉛直分布(0-10 cm)を調べた。その結果、クロロフィルa含有量は深度と共に指数関数的に減少し、3 cm以深の底泥中では1.0 mg chl a m⁻²(深さ1 cmあたり)以下となっていた。一般的に、光は底泥表層の数mmしか透過しないけれども(Fenchel and Straarup, 1971; Kühl and Jørgensen, 1994), クロロフィルaはそれより深い嫌氣的な(Eh: -210-0 mV)無光層にさえ出現していた。このような鉛直分布は、潮汐流や波浪による底泥の物理的攪乱、マクロベントスなどによる生物的攪乱、そして、Epipelonと呼ばれる運動性の底生珪藻の鉛直移動などによって引き起こされていたと解釈される。

(b) 植物プランクトンの一次生産

観測期間中、満潮と干潮時における植物プランクトンの光合成速度は、それぞれ、2.1-45 mg C m⁻³ h⁻¹(平均10.7 mg C m⁻³ h⁻¹)と0.3-32 mg C m⁻³ h⁻¹(平均8.5 mg C m⁻³ h⁻¹)の範囲を変動し、9月を除いて、満潮時の光合成速度が干潮時のそれよりも高くなっていた(図2.5A)。平均光合成速度(Sta. AからSta. Fの平均)は、満潮と干潮時共に、7月から12月にかけて大きく減少した。光合成速度の水平分布は、満潮

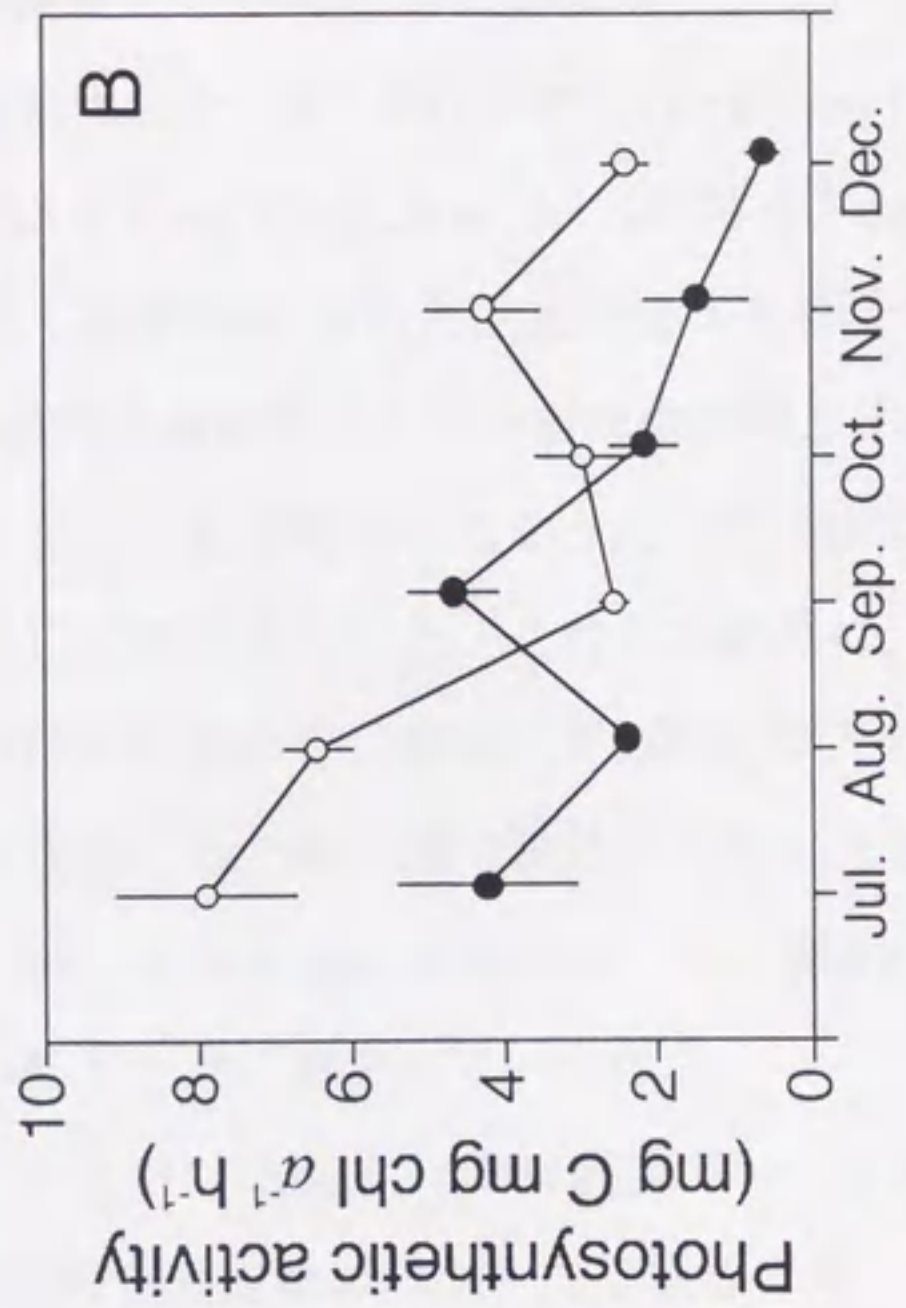
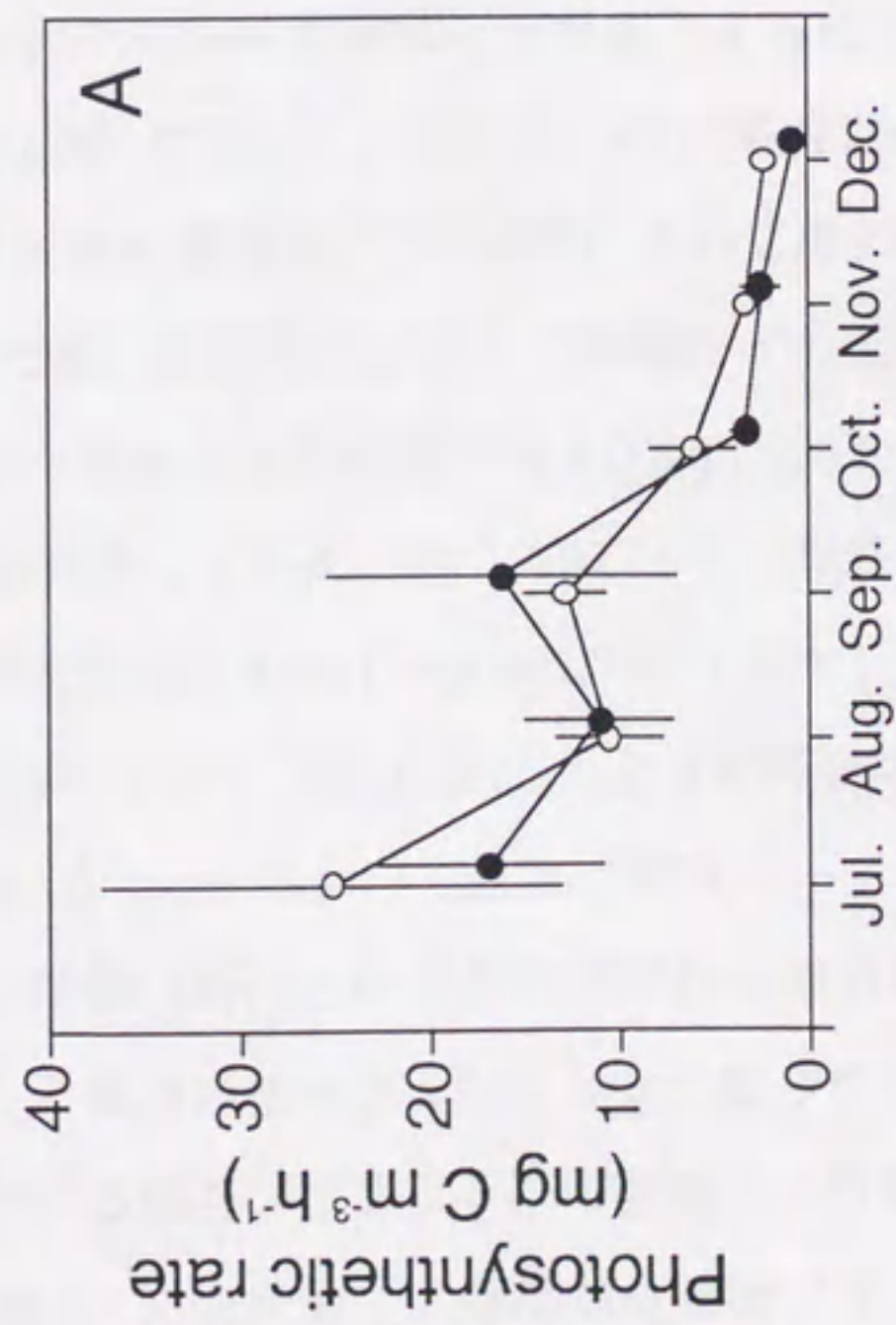


図2. 5. 和歌浦干潟の干潮時 (●) と満潮時 (○) における植物プランクトンの光合成速度 (A) ならびに光合成活性 (B) の季節変化。平均±標準偏差。

と干潮時共に、クロロフィル a 濃度の水平分布とほぼ一致していた（データは表示していない）。満潮時と干潮時における植物プランクトンの光合成活性（単位クロロフィル a 量で規格化した）は、それぞれ、 $2.0-9.6 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$ （平均 $4.5 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$ ）と $0.3-6.0 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$ （平均 $2.5 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$ ）の範囲を変動し、9月を除いて、満潮時の平均光合成活性は干潮時のそれよりも高くなっていた（図 2. 5B）。その光合成活性の水平分布は満潮時と干潮時共に、Sta. A から Sta. F まで、地点間でほとんど差が見られなかった（データは表示していない）。この傾向は観測期間を通じて常時見られた。これらの結果は、干潟の植物プランクトン群集は潮汐周期と共に入れ替わり、満潮と干潮時にはそれぞれ、奥部から河口部までほぼ同じ生理学的状態にある同一種で構成されていたのではないかと考えられる。平均光合成活性（Sta. A から Sta. F の平均）は、満潮時と干潮時共に、7月から12月にかけて水温の低下と共に減少していった。

図 2. 6A に Sta. F における塩分、TNN 濃度そしてクロロフィル a 濃度の日周変化を示す。TNN 濃度の日周変動のパターンは塩分に対して逆相関の関係にあった。下げ潮時（09:00-15:00）、TNN 濃度は塩分が低下するにつれて増加し、干潮時（15:00）に最大濃度（ $47.8 \mu\text{M}$ ）に達した。転流後、TNN 濃度は塩分の増加に伴って急激に減少した。クロロフィル a 濃度は、下げ潮時において増加し、13:00 に最大濃度（ $3.8 \text{ mg chl } a \text{ m}^{-3}$ ）に達した後、憩流時をはさんで満潮時（20:00）まで減少していった。植物プランクトンの光合成速度の日周変動は $4.0 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ （20:00）から $35 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ （15:00）の範囲を変動していた（図 2. 6B）；下げ潮時に増加し、上げ潮時に低下。光合成活性の日周変動は $4.8 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$ （19:00）から 11.1 （16:00） $\text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$ を範囲を変動していた（図 2. 6B）；上げ潮時に増加傾向、16:00 に最大活性に達した後、16:00 から 19:00 にかけて急激に低下。

汽水域では、河川棲（河川水の滞留時間が長い河口域では河川棲藻類群集がしばしば発達しうる）と海産の植物プランクトンが混じり合って存在している。図 2. 6C に和歌浦干潟における植物プランクトンの種組成の日周変動を示す。12:00（珪藻 72%、藍藻 24%、その他 4%）を除いて、珪藻が全植物プランクトン種の 96%以上を占めていた。干潟で最も優占していた珪藻種は *Thalassiosira weissflogii* で、一日を通じて

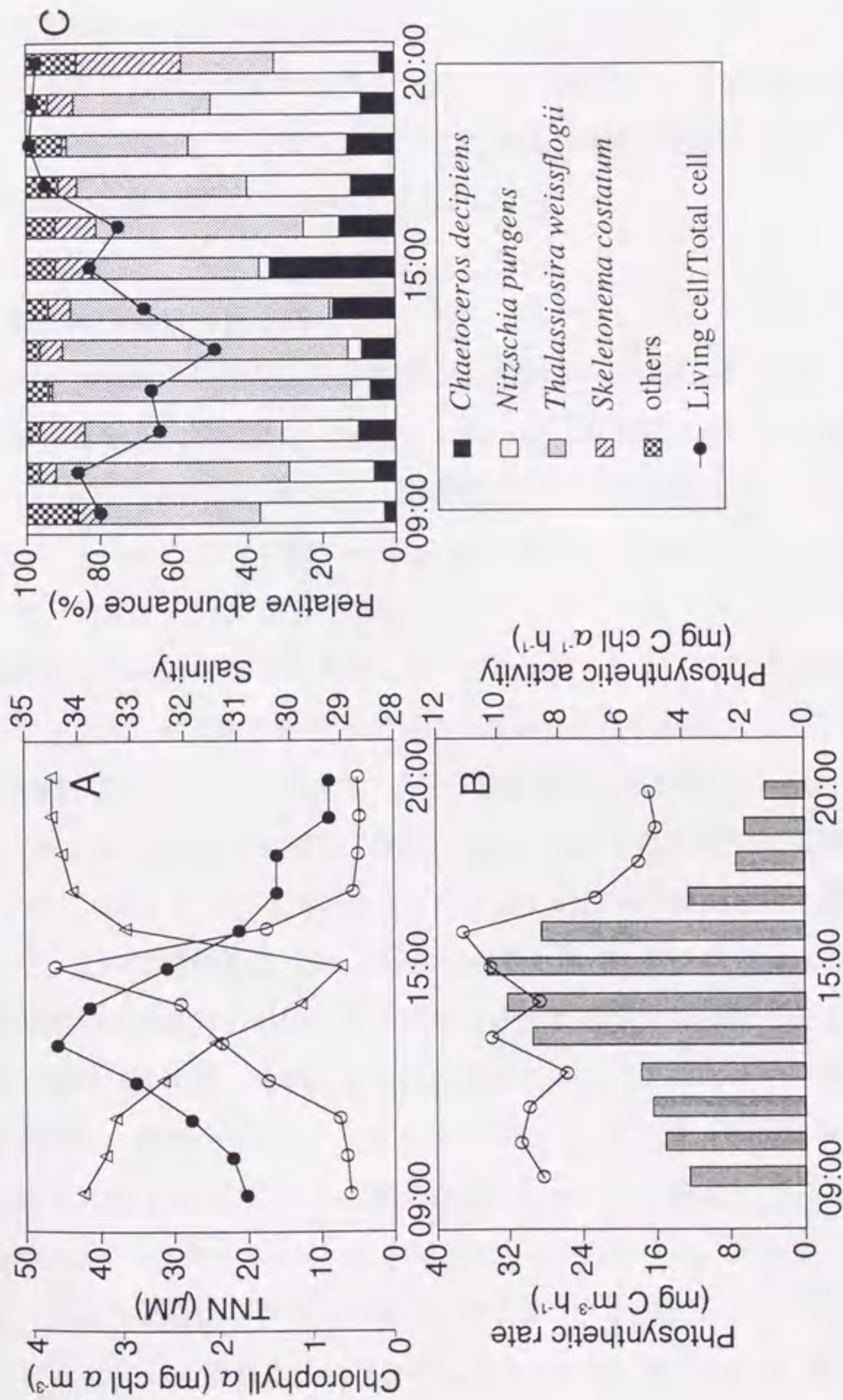


図2.6. A: 塩分 (△), 全窒素栄養塩濃度 (○) そしてクロロフィルa濃度 (●) の日周変動
 B: 植物プランクトンの光合成速度 (棒グラフ) と光合成活性 (折れ線グラフ) の日周変動
 C: 生細胞数における浮遊性珪藻の種組成の日周変動

常時出現していた。和歌川上流部で細胞数において最も優占していた珪藻の *Chaetoceros decipiens* は干潮時に増加する傾向が見られた。この結果は、*C. decipiens* が下げ潮の間に和歌川上流から流下してきたことを示唆している。河口域では、一般的に、有意な数の底生藻類が見られる。Jonge (1985) は Ems Estuary において、懸濁している底生珪藻の細胞数はベントスとして存在している細胞数の 16-50% と見積もっている。同様に、この観測においても、底生性羽状目珪藻に属する *Navicula* spp. と *Nitzschia* spp. が干潟水柱において見られた。

(c) 底生微小藻類一次生産

和歌浦干潟底泥中に出現した分類群の大部分は、珪藻綱と藍藻綱で占められていた。各地点とも羽状目珪藻の *Navicula cancellata* (細胞数における相対優占度：5.4-10.0%) と藍藻の *Merismopedia* sp. (細胞数における相対優占度：12.9-44.3%) が優占していた。その他には、珪藻の *Amphora coffeaeformis* や藍藻の *Phormidium* sp. が出現していた。また、通常、浮遊性の植物プランクトンとして知られる円心目珪藻の *Thalassiosira weissflogii* が干潟先部において多く見られた。これは恐らく、憩流時に植物プランクトンが沈降・堆積したものであると考えられる。

底泥表層 (0-0.5 cm) のクロロフィル a 含有量は、観測期間中 (10-12 月)、1.6-50 mg chl a m^{-2} の範囲を変動しており、地点間で大きな濃度差が観測された (図 2.7A)。特に、Sta. 5 におけるクロロフィル a 含有量は他の観測地点と比較して低くなっていた。この観測結果は、Sta. 5 は流速が最も速く (最大流速 63 cm s^{-1})、そして波浪の影響を直接受ける場所であるため、底生藻類が付着基質である砂泥粒子と共に懸濁・輸送 (掃流砂) されることに起因していたのではないかと考えられる。この調査期間中、植物プランクトンの平均クロロフィル a 量 [単位面積あたり (m^2) の水柱におけるクロロフィル a 量を積算した値] は、水温の低下と共に、10 月 (20.5°C) から 12 月 (10.2°C) にかけて減少したけれども、底生微小藻類の平均クロロフィル a 含有量はそのような傾向を示さなかった (表 2.2)。底生微小藻類の平均クロロフィル a 含有量は、植物プランクトンのクロロフィル a 量よりも 5.4-8.1 倍高かった。

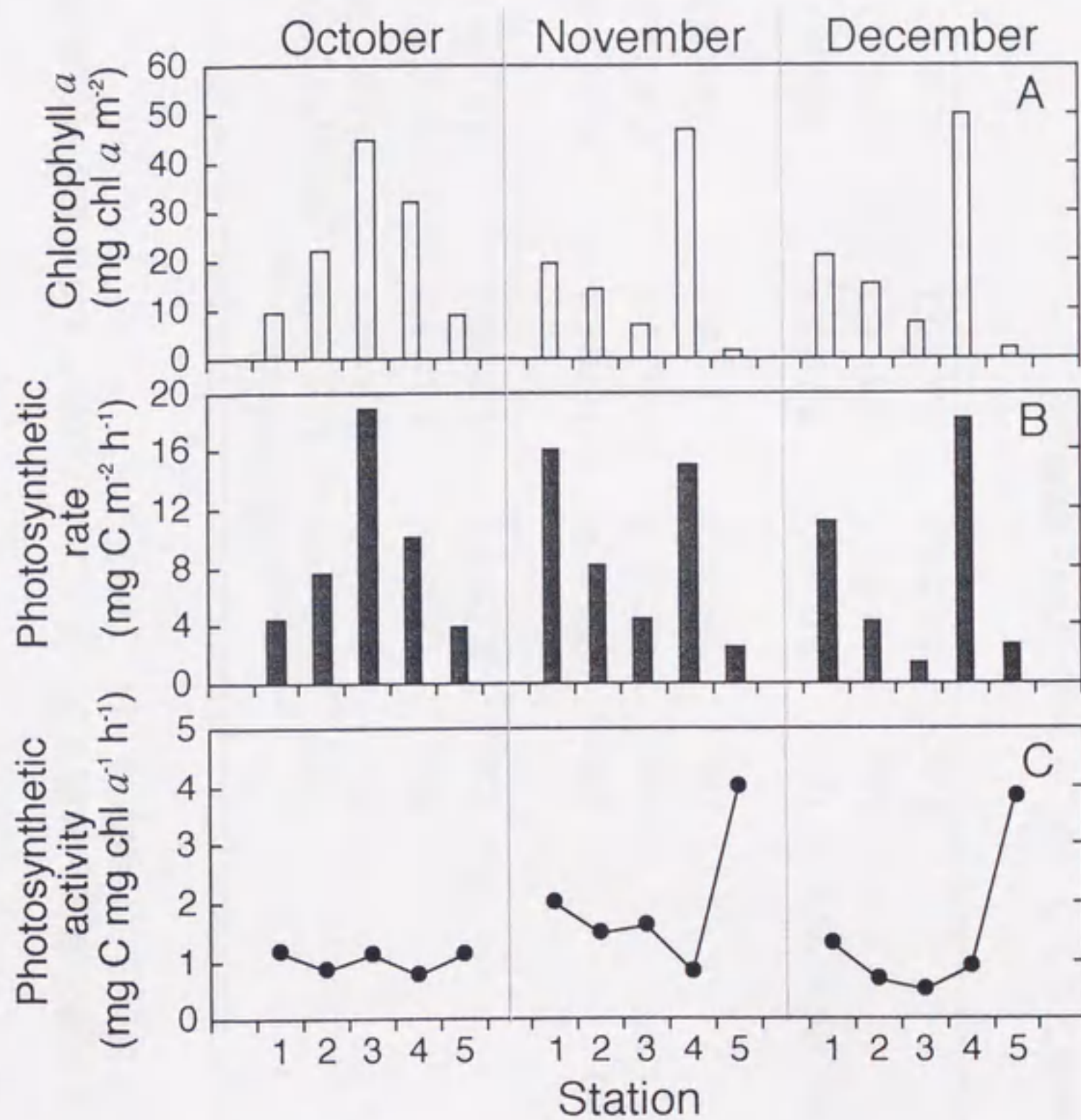


図2.7. 和歌浦干潟における（1995年10, 11, 12月）底生微小藻類のクロロフィル*a*含有量（A），光合成速度（B）そして光合成活性（C）。

表2.2. 和歌浦干潟における底生微小藻類と植物プランクトンのクロロフィル a 量, 光合成速度
 として光合成活性の季節変化 (1995年10, 11, 12月)。

Variable	Dates	Phytoplankton		
		High water	Low water	Microphytobenthos
Chlorophyll a (mg chl a m^{-2})	Oct.	5.7 \pm 3.2	2.9 \pm 1.1	23.5 \pm 15.6
	Nov.	1.9 \pm 0.3	3.1 \pm 1.3	17.9 \pm 17.7
	Dec.	2.7 \pm 0.5	1.7 \pm 0.7	19.0 \pm 18.9
Photosynthetic rate (mg C m^{-2} h^{-1})	Oct.	15.6 \pm 5.8	5.7 \pm 1.4	10.5 \pm 8.6
	Nov.	8.2 \pm 1.3	4.0 \pm 1.9	10.4 \pm 8.0
	Dec.	6.4 \pm 1.1	1.0 \pm 0.1	7.4 \pm 8.4
Photosynthetic activity (mg C mg chl a^{-1} h^{-1})	Oct.	3.0 \pm 0.6	2.1 \pm 0.5	1.0 \pm 0.3
	Nov.	4.3 \pm 0.7	1.4 \pm 0.7	1.9 \pm 1.2
	Dec.	2.4 \pm 0.3	0.6 \pm 0.2	1.5 \pm 1.3

† 底生微小藻類: $n = 10$, 植物プランクトン: $n = 6$, 平均 \pm 標準偏差

底生微小藻類の光合成速度は $1.1-19 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ (平均 $9.4 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) の範囲を変動し、地点間で大きな速度差が観測された (図 2. 7B)。その水平分布は底泥中のクロロフィル a 含有量の分布とほぼ一致しており、光合成速度とクロロフィル a 含有量の間には顕著な正の相関があった (表 2. 1)。10 月における底生微小藻類の平均光合成速度は植物プランクトンのそれ [単位面積あたり (m^2)] とほぼ同じであったけれども、11 月と 12 月の底生微小藻類の光合成速度は植物プランクトンのそれよりも 1.2-7.4 倍高くなっていた (表 2. 2)。

底生微小藻類の光合成活性は $0.4-4.1 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$ (平均 $1.5 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$) の範囲を変動していた (図 2. 7C)。ここで、底生微小藻類の光合成活性は、底泥中の有光層が一般的に 0-2mm (MacIntyre *et al.*, 1996) と考えられているため、底泥表層 2 mm までのクロロフィル a 含有量で規格化した。光合成活性と底泥中のクロロフィル a 含有量の間には、逆相関の関係が見られ (図 2. 8), Sta. 1 から Sta. 4 (低クロロフィル a 含有量) までの底生微小藻類の光合成活性は、観測期間中、 $2.0 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$ 以下であったけれども、Sta. 5 (低クロロフィル a 含有量) の光合成活性は、11 月と 12 月において、 $4.0 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$ に達していた。調査期間を通じて、底生微小藻類の光合成活性は植物プランクトンの光合成活性よりも低い傾向にあった (表 2. 2)。植物プランクトンの平均光合成活性は 10 月から 12 月にかけて水温の低下に伴い減少したが、底生微小藻類の平均光合成活性は、観測期間中、ほとんど変化していなかった (表 2. 2)。

2. 3. 2. 三河湾一色干潟

(a) 底生微小藻類と植物プランクトンの一次生産

底生微小藻類と植物プランクトンのクロロフィル a 量ならびに光合成速度の季節的変動を調べた。底生微小藻類 (底泥表層 0-1 cm) と植物プランクトン (干潟の水深を 1 m と仮定して計算) のクロロフィル a 量は、それぞれ、 $83-149 \text{ mg chl } a \text{ m}^{-2}$ (平均 $112 \pm 41 \text{ mg chl } a \text{ m}^{-2}$) と $0.5-15.3 \text{ mg chl } a \text{ m}^{-2}$ (平均 $4.3 \pm 4.6 \text{ mg chl } a \text{ m}^{-2}$) の範囲

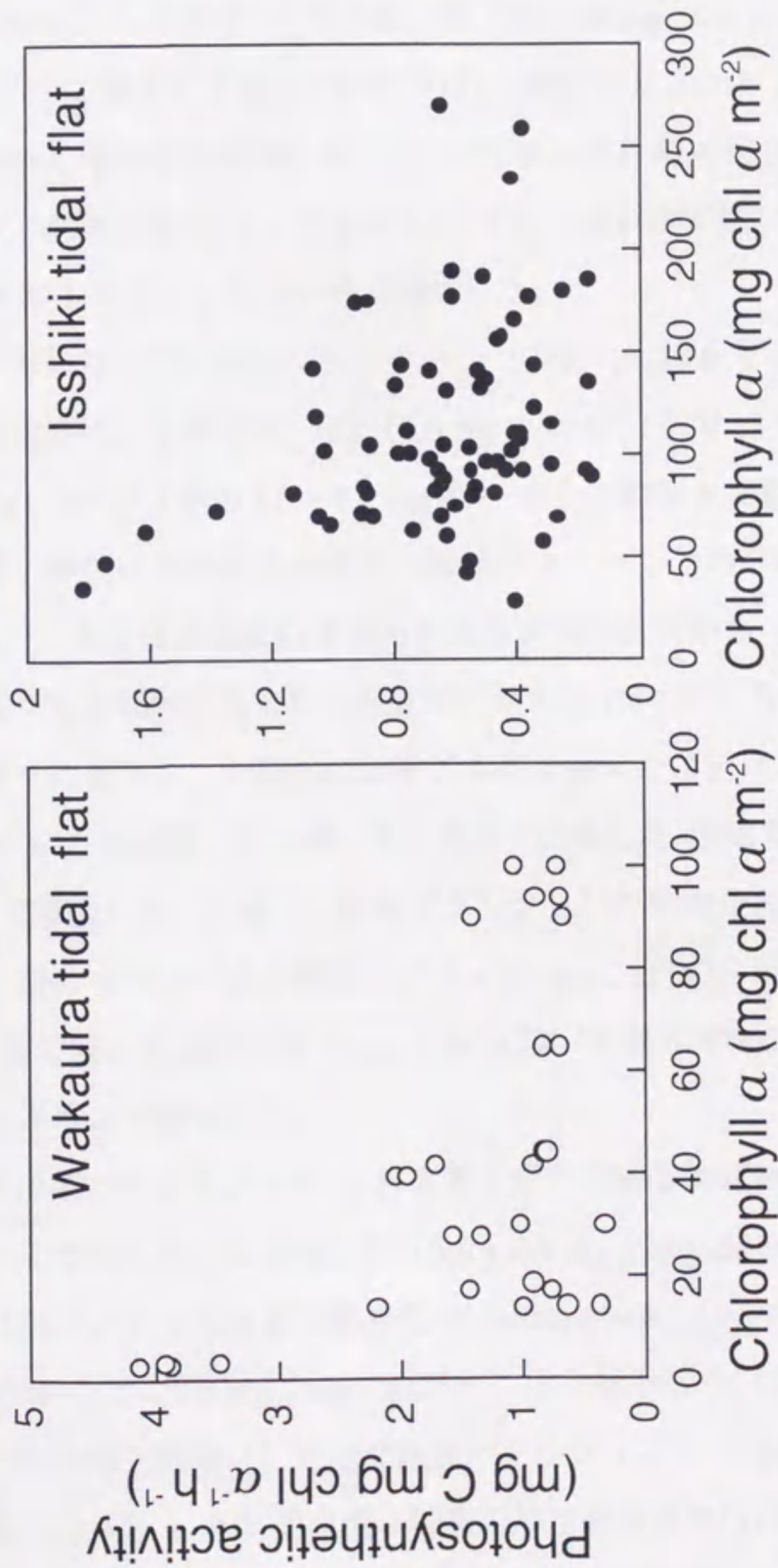


図2.8. 和歌浦干潟と一色干潟における底泥中 (0-1 cm) のクロロフィルa含有量と
光合成活性の関係。

を変動しており、底生微小藻類の平均クロロフィル a 濃度は植物プランクトンのそれより数十倍高かった。(図 2. 9B)。底生微小藻類の平均クロロフィル a 量は年間を通じて高く、そして、大きな季節的変動を示さなかった: 1997 年 4 月の最大値 ($149 \pm 76 \text{ mg chl } a \text{ m}^{-2}$) から同年 10 月の最小値 ($83 \pm 38 \text{ mg chl } a \text{ m}^{-2}$) まで徐々に減少し、その後、わずかに増加する傾向が観察された。植物プランクトンのクロロフィル a 量は春期において増加する傾向にあった: 1997 年 5 月に最大値 ($15.3 \pm 3.1 \text{ mg chl } a \text{ m}^{-2}$) を示した後、急激に減少し、7 月から 12 月まで低い現存量 ($3 \text{ mg chl } a \text{ m}^{-2}$ 以下) が続き、1998 年 1 月から 3 月にかけて増加した。

底生微小藻類ならびに植物プランクトン (干潟の水深を 1 m と仮定して計算) の平均光合成速度は、それぞれ、 $8.2\text{--}18.0 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ (平均 $13.9 \pm 6.4 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) と $3.1\text{--}17.4 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ (平均 $9.0 \pm 5.1 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) の範囲を変動しており、4 月を除いて、底生微小藻類の平均光合成速度は植物プランクトンのそれより高くなっていた (図 2. 9C)。底生微小藻類の平均光合成速度は水温 (図 2. 9A) が比較的高い夏期において低くなる傾向があった: 水温が上昇する 1997 年 5 月から 8 月にかけて光合成速度は徐々に低下し、干潟水の水温が 30°C を越えた 8 月において最小速度 ($8.2 \pm 3.2 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) を観測、その後、最大速度を記録した 1998 年 2 月 ($18.0 \pm 8.0 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) まで増加した。同様に、植物プランクトンの平均光合成速度は夏期において低かった: 1997 年 4 月 (最大速度: $17.4 \pm 2.2 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) から 7 月まで減少した後、同年 12 月まで低い光合成速度 ($6 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ 以下) を示す期間が続き、その後、1998 年 1 月から 3 月まで増加した。

底生微小藻類のクロロフィル a 含有量と光合成速度は植物プランクトンのそれらより高かったけれども、光合成活性 ($0.6 \pm 0.4 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$) [底泥表層 2mm までのクロロフィル a 含有量で規格化 (MacIntyre *et al.*, 1996)] は植物プランクトンの光合成活性 ($3.2 \pm 1.8 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$) より低かった (図 2. 9D)。和歌浦干潟で観測された結果と同様に、光合成活性とクロロフィル a 含有量の間には、負の相関関係があった (図 2. 8)。底生微小藻類の平均光合成活性は一年を通じてほとんど変化していなかったが、一方、植物プランクトンの平均光合成活性は季節的に大きく変動していた: 1997 年 5 月に最小活性 ($0.8 \pm 0.2 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$) を示した後、

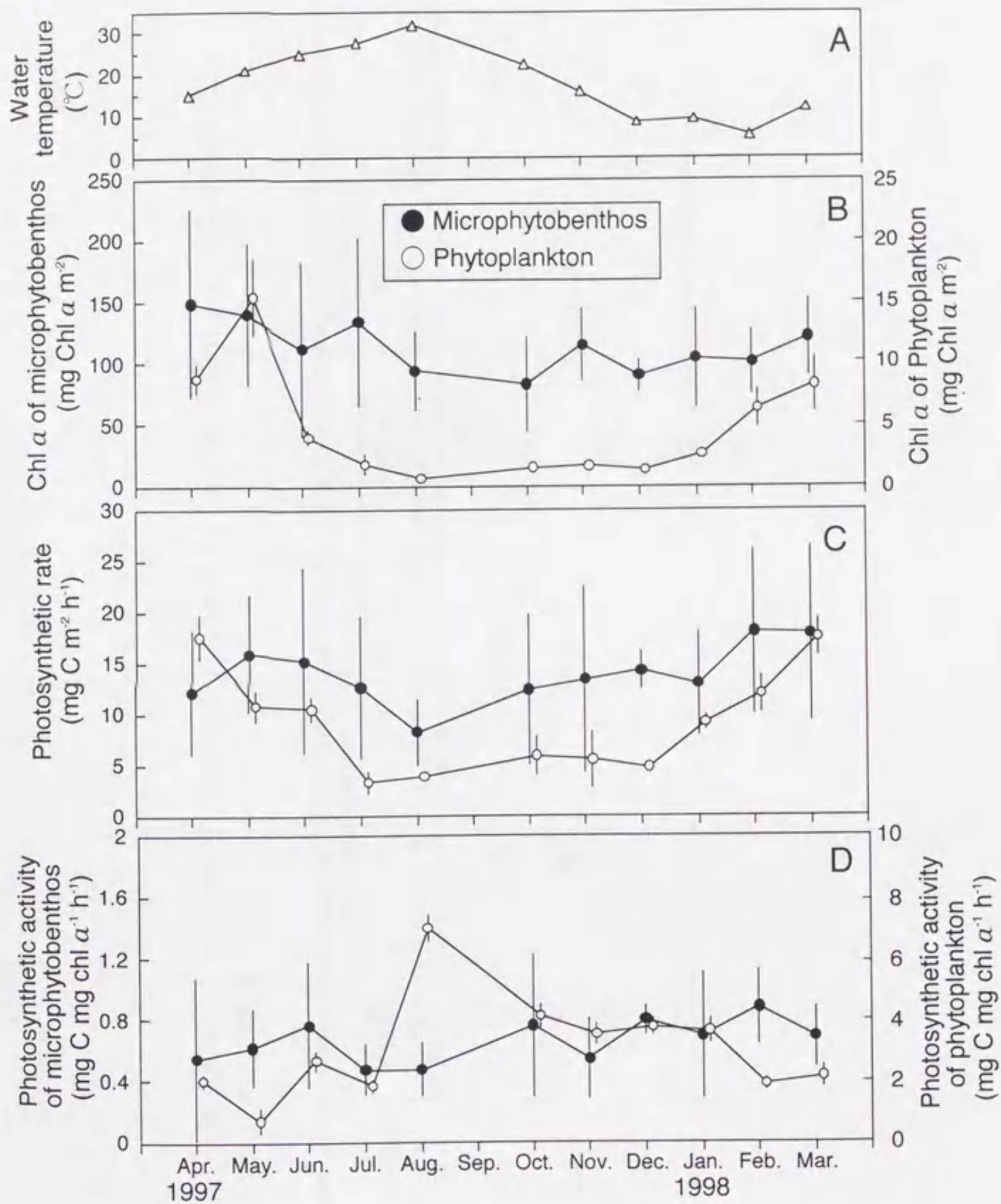


図2.9. 一色干潟における水温の季節変動 (A), 底生微小藻類と植物プランクトンのクロロフィルa量 (B), 光合成速度 (C) そして光合成活性 (D) の季節変化。平均±標準偏差

表2.3. 一色干潟における底生微小藻類ならびに植物プランクトンのクロロフィル α 量 (Chl α), 光合成速度 (P) として光合成活性 (P^B) の日周変動。

Sampling time (h)	Incubation Time (h)	Total Irradiance ($E\ m^{-2}$)	Microphytobenthos			Phytoplankton		
			Chl α ($mg\ chl\ \alpha\ m^{-2}$)	P ($mg\ C\ m^{-2}\ h^{-1}$)	P^B ($mg\ C\ mg\ chl\ \alpha^{-1}\ h^{-1}$)	Chl. α ($mg\ chl\ \alpha\ m^{-3}$)	P ($mg\ C\ m^{-3}\ h^{-1}$)	P^B ($mg\ C\ mg\ chl\ \alpha^{-1}\ h^{-1}$)
5:30			78			1.8		
	06:00-09:00	4.4		13.7	0.88		3.3	1.8
10:00			168			2.0		
	10:30-13:30	12.4		31.2	0.93		17.8	8.9
14:00			102			6.0		
	14:30-17:30	2.4		2.1	0.10		9.3	1.6
17:00			88			2.2		

8月において急激に増加し、最大活性 ($7.2 \pm 1.8 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$) を記録、その後は徐々に低下した。

表 2. 3 に、底生微小藻類と植物プランクトンのクロロフィル a 量ならびに光合成速度の日周変動を示した。底生微小藻類 (底泥表層 0-1 cm) と植物プランクトンのクロロフィル a 量は、それぞれ、10:00 ($168 \text{ mg chl } a \text{ m}^{-2}$) と 14:00 ($6.0 \text{ mg chl } a \text{ m}^{-3}$) に最大濃度へ達し、一日を通じて変化していた。両者の光合成速度は、共に、10:30-13:30 のインキュベーション実験に対して最大速度 (底生微小藻類: $31.2 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, 植物プランクトン: $17.8 \text{ mg C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) を示した。底生微小藻類の光合成活性は 10:30-13:30 のインキュベーション実験において最大値 ($0.93 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$) を示し、その後、14:30-17:30 で急激に減少した。植物プランクトンの光合成活性は一日を通じて底生微小藻類のそれより高く、10:30-13:30 のインキュベーション実験に対する活性 ($8.9 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$) は 06:00-09:00 ($1.8 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$) と 14:30-17:00 ($1.6 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$) における活性よりも 5 倍ほど高かった。

(b) 光合成-光曲線

図 2. 10 において底生微小藻類と植物プランクトンの光合成-光曲線を示した。底生微小藻類の光合成活性は本実験における光強度の範囲内 ($0-1200 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) では強光阻害を示さず、光強度 $1200 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ まで増加し続けた。植物プランクトンの光合成活性は 0 から $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ まで直線的に増加し、光強度 $600 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 以上で強光阻害が観測された。底生微小藻類と植物プランクトンの最大光合成活性 (P_{max}) は、それぞれ、 $0.95 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$ と $11.8 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$ であった。底生微小藻類の α (P_m/I_k : 立ち上がり勾配) と I_k (光飽和定数) は、それぞれ、 $0.00854 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1} (\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1})^{-1}$ と $110 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ であった。植物プランクトンの α と I_k は、それぞれ、 $0.0434 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1} (\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1})^{-1}$ と $272 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ であった。

(c) 微小藻類・バクテリアとの関連因子

底泥 (底生微小藻類) と海水中 (植物プランクトン) のクロロフィル a 量、光合成速度および光合成活性は過去の一色干潟における観測結果とよく一致した。つま

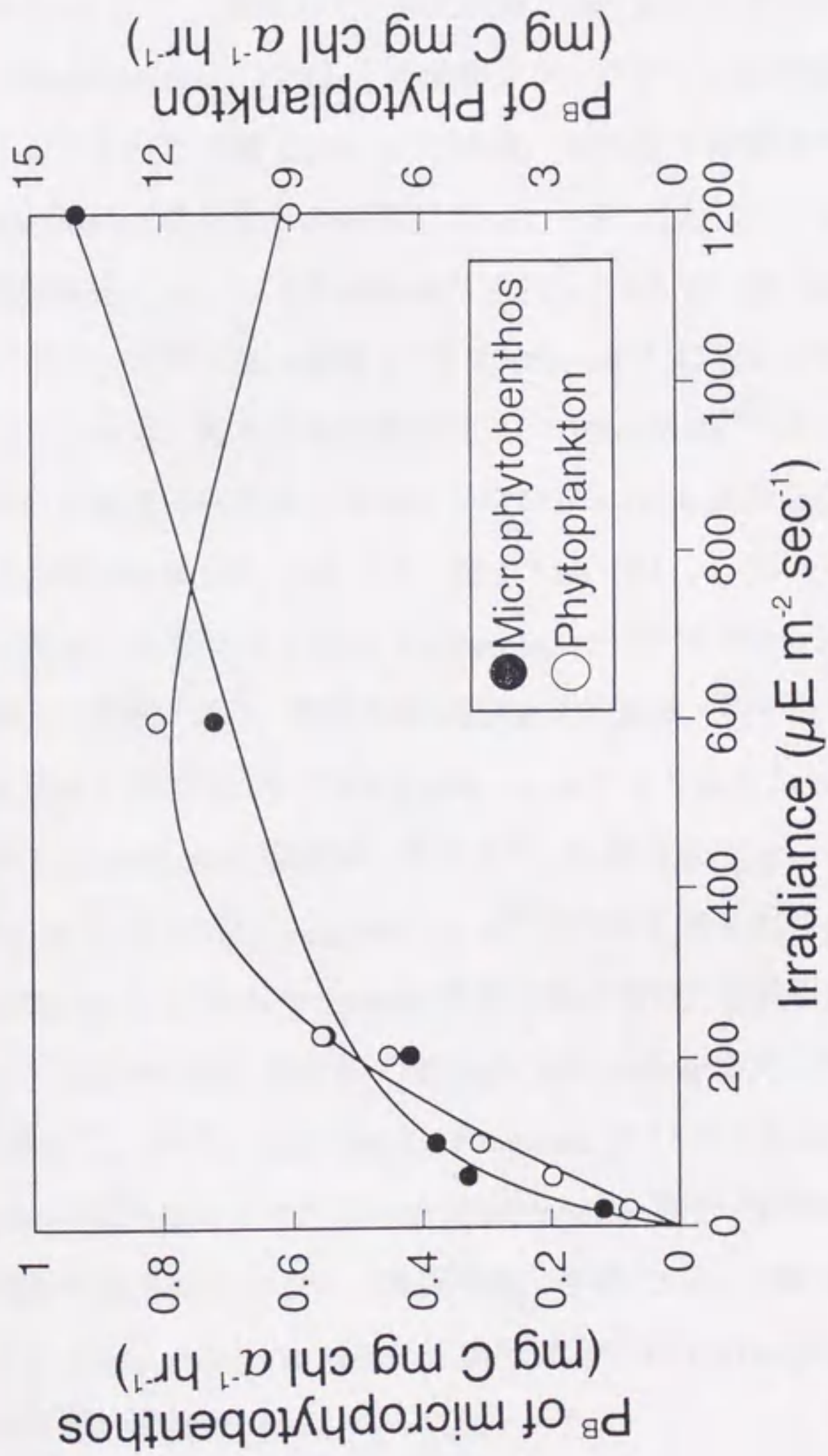


図2.10. 一色干潟における底生微小藻類と植物プランクトンの光合成-光曲線。回帰曲線 ($P = I / aI^2 + bI + c$) の回帰係数と決定係数は以下のとおりである。

底生微小藻類 : $a = -4.90 \times 10^{-4}$, $b = 1.52$, $c = 1.17 \times 10^2$, $r^2 = 0.976$

植物プランクトン : $a = 7.15 \times 10^{-5}$, $b = 3.66 \times 10^3$, $c = 23$, $r^2 = 0.986$

り、底泥中のクロロフィル *a* 量は海水中のクロロフィル *a* 量より 9-32 倍高くなっていた (表 2. 4)。そして、底生微小藻類の平均光合成速度は植物プランクトンの平均光合成速度とほぼ同じであったけれども、底生微小藻類の光合成活性 [底泥中の有光層を表層 2 mm までと仮定して、底泥表層 2 mm 以浅のクロロフィル *a* 含有量で規格化した (MacIntyre *et al.*, 1996)] は植物プランクトンの光合成活性と比較してかなり低いレベルであった (表 2. 4)。この時、底生微小藻類のクロロフィル *a* 量と一次生産速度の間には有意な正の相関があった (表 2. 5)。

底泥中の全菌数は $0.4-1.9 \times 10^9$ cells cm^{-3} ($1.2 \pm 0.4 \times 10^9$ cells cm^{-3} , 平均 \pm 標準偏差) の範囲にあり、泥質干潟 (平均 1.7×10^9 cells cm^{-3}) において高くなっていた (表 2. 4, 図 2. 11)。一方、海水中の全菌数は 3.1×10^6 cells mL^{-1} であった。砂質干潟において、底泥中の全菌数は底生微小藻類のクロロフィル *a* 量ならびにその一次生産速度に対して正の相関を示した (表 2. 5, 図 2. 11A・B)。

底泥中の全炭水化物濃度は $2.0-15.7$ g gluc. eq. m^{-2} (平均 6.4 ± 3.9 g gluc. eq. m^{-2} , 平均 \pm 標準偏差) の範囲にあり、泥質干潟の全炭水化物濃度 (平均 11.6 g gluc. eq. m^{-2}) は砂質干潟の全炭水化物濃度 (平均 4.5 g gluc. eq. m^{-2}) より高くなっていた (図 2. 12A)。Colloidal-と EPS-Carbohydrate 濃度は、それぞれ、 $0.80-5.05$ g gluc. eq. m^{-2} (平均 2.72 ± 1.05 g gluc. eq. m^{-2}) と $0.34-1.33$ g gluc. eq. m^{-2} (平均 0.65 ± 0.25 g gluc. eq. m^{-2}) の範囲にあり、Colloidal-と EPS-Carbohydrate 濃度の最大値は、泥質干潟で観測された (図 2. 12B・C)。全炭水化物における Colloidal-Carbohydrate 画分の割合は 37-71% (平均 49%) であった。また、Colloidal-Carbohydrate 画分の 17-44% (平均 25%) が EPS-Carbohydrate 画分であった。Colloidal-Carbohydrate 画分/全炭水化物比において、泥質干潟と砂質干潟の間には違い (泥質干潟: 平均 55%, 砂質干潟: 平均 32%) が観測されたけれども、EPS-Carbohydrate 画分/Colloidal-Carbohydrate 画分比においては、それらの干潟に顕著な違いは見られなかった。

海水中の全炭水化物濃度は 1.34 g gluc. eq. m^{-2} であった。本研究で用いた Colloidal-と EPS-Carbohydrate 画分の抽出法および測定法では、それらの画分の炭水化物濃度は検出できなかった。

表 2. 4. 三河湾一色干潟における底泥と海水中のクロロフィル α 濃度, 一次生産速度, 光合成活性, 全菌数, β - \cdot α -グルコシダーゼ, バクテリア細胞比 β - \cdot α -グルコシダーゼおよび全グルコシダーゼ活性 (β -グルコシダーゼと α -グルコシダーゼの和)。

Parameters	Sediment (average \pm SD, range)	Seawater
Chlorophyll α (mg chl α m^{-2})	136 \pm 42.0 (55.2 - 186)	5.9
Photosynthetic production (mg C m^{-2} h^{-1})	14.9 \pm 6.2 (5.6 - 22.7)	15.8
Photosynthetic activity (mg C chl α^{-1} h^{-1})	0.56 \pm 0.26 (0.27 - 1.24)	2.7
Bacterial abundance (10^9 cells cm^{-3} ; sediment, 10^6 cells ml^{-1} ; seawater)	1.2 \pm 0.4 (0.4 - 1.9)	3.1
β -glucosidase activity (μ mol m^{-2} h^{-1})	151 \pm 79.8 (29.4 - 306)	27.5
Cell-specific β -glucosidase activity ($\times 10^{-20}$ mol cell $^{-1}$ h^{-1})	1238 \pm 325 (689 - 1847)	597
α -glucosidase activity (μ mol m^{-2} h^{-1})	85.0 \pm 45.0 (19.8 - 176)	4.0
Cell-specific α -glucosidase activity ($\times 10^{-20}$ mol cell $^{-1}$ h^{-1})	706 \pm 189 (465 - 1039)	87.2
Total glucosidase activity (μ mol m^{-2} h^{-1})	236 \pm 124 (49.2 - 482)	31.5

表 2.5. 一色干潟の底泥中における β -D-グルコシダーゼ (β -Gluc., α -Gluc.), 全炭水化物濃度 (Total Carbo.), Colloidal-Carbohydrate 濃度 (Colloidal-Carbo.), EPS-Carbohydrate 濃度 (EPS-Carbo.), クロロフィル a 量 (Chl a), 底生微小藻類の一次生産速度 (P.P.) として全菌数 (B.A.) 間の相関係数。

** : $P < 0.01$, * : $P < 0.05$, $n = 12$

	β -Gluc.	Total Carbo.	Colloidal-Carbo	EPS-Carbo.	Chl a	P.P.	B.A.
Total Carbo.	0.86**						
Colloidal-Carbo.	0.79**	0.88**					
EPS-Carbo.	0.73**	0.90**	0.91**				
Chl a	0.09	0.02	0.41	0.12			
P.P.	0.54	0.61*	0.24	0.41	0.71**		
B.A.	0.91**	0.73**	0.69*	0.58*	0.24	0.35	
α -Gluc.	0.98**	0.85**	0.78**	0.69*	0.08	0.56	0.89**

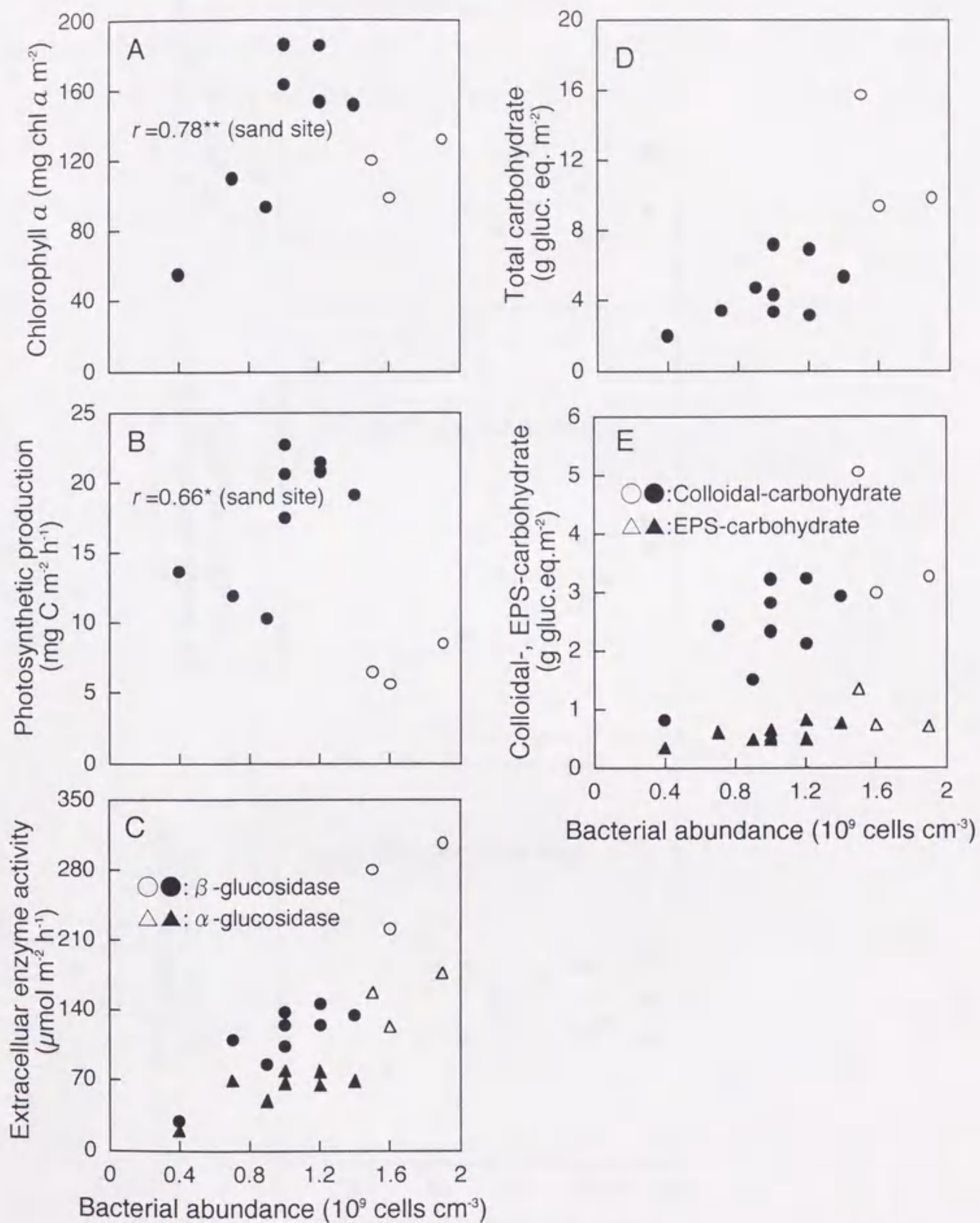


図2.11. 一色干潟における底泥中の全菌数に対するクロロフィル a 量 (A), 一次生産速度 (B), β - α -グルコシダーゼ細胞外酵素活性 (C), 全炭水化物濃度 (D) そしてColloidal- \cdot EPS-Carbohydrate濃度 (E) の関係。**: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$, \bullet と \blacktriangle : 砂質干潟, \circ と \triangle : 泥質干潟

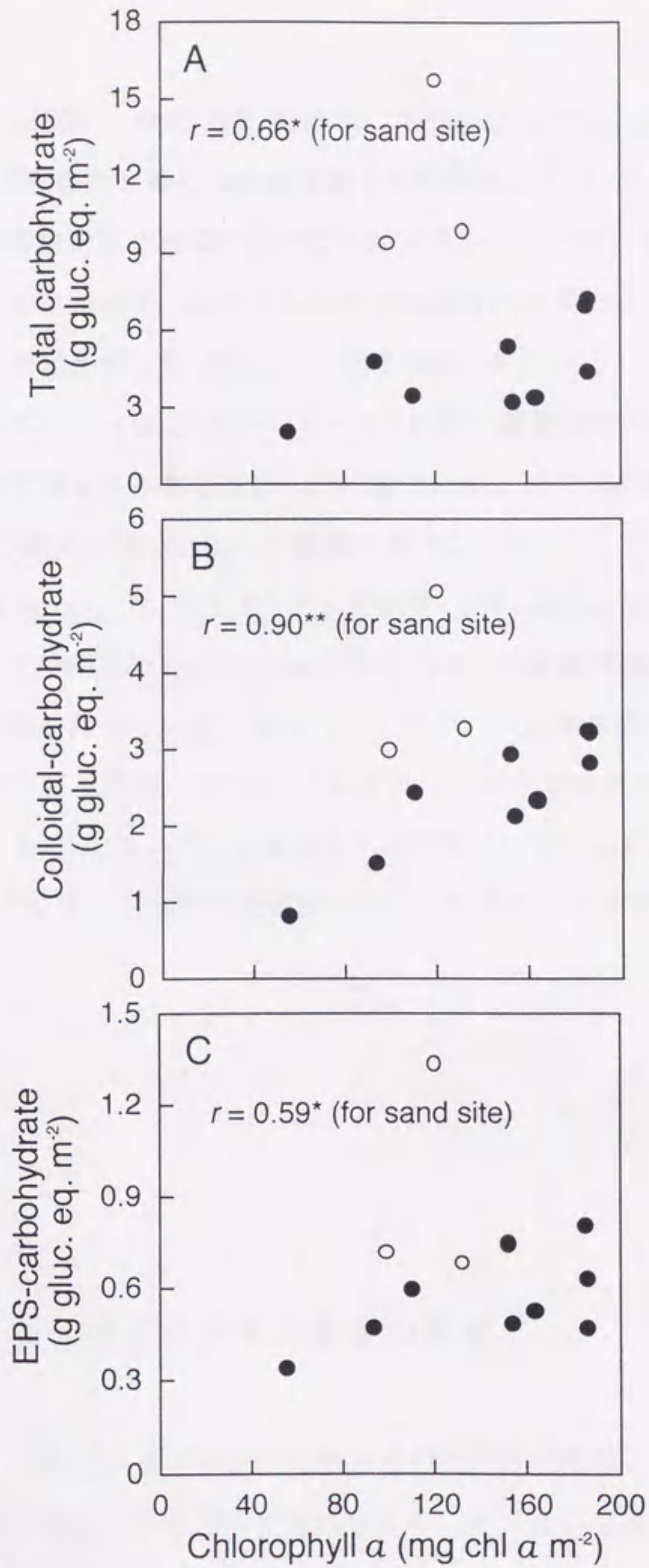


図2. 12. 三河湾一色干潟における底泥中のクロロフィル*a*濃度に対する全炭水化物濃度 (A), Colloidal-Carbohydrate濃度 (B) そしてEPS-Carbohydrate濃度の (C) 関係。**: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$, ●: 砂質干潟, ○: 泥質干潟

回帰分析の結果、全炭水化物濃度、Colloidal-Carbohydrate 濃度そして EPS-Carbohydrate 濃度の相互間には有意な正の相関関係があり、それら 3 つの画分の炭水化物濃度は全菌数と正の相関を持つことが明らかとなった（表 2.5, 図 2.11D・E）。また、砂質干潟において、それらの炭水化物濃度はクロロフィル α 含有量に対しても有意な正の相関を示した（表 2.5, 図 2.12A・B・C）。

底泥中における β - \cdot - α -グルコシダーゼの細胞外酵素活性は海水中におけるそれらの細胞外酵素活性よりも数倍高かった（表 2.5）。それらの細胞外酵素活性の水平分布は、泥質干潟の 3 地点において顕著に高くなっていた（ β -グルコシダーゼ活性：平均 $269 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$, α -グルコシダーゼ活性： $153 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ）（図 2.11C）。底泥中のバクテリア細胞あたりの β - \cdot - α -グルコシダーゼ比活性は海水中におけるそれらの比活性より高くなっていた（表 2.5）。それらの比酵素活性の水平分布もまた、泥質干潟において高くなっていた（ β -グルコシダーゼ比活性 — 平均 $1631 \times 10^{-20} \text{mol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$, α -グルコシダーゼ比活性：平均 $914 \times 10^{-20} \text{mol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ ）。底泥中の β - \cdot - α -グルコシダーゼ活性は全菌数に対して有意な正の相関を示した（表 2.5, 図 2.11C）。

2.4. 考察

2.4.1. 干潟環境における栄養塩の動態

一般的に、干潟は、流入河川から輸送された砂泥の堆積と潮流や波浪による底泥の浸食作用が平衡している場所に形成される。そのような推移帯 (Ecotone) は、物理・化学的性質の異なる 2 種の水 (淡水と海水) が混合しあい、そして、生物量も豊富であるため、窒素やリンなどを含んだ生元素化合物は、激しい物理化学的変化を受ける。和歌浦干潟における栄養塩濃度 (DIN, Urea-N, DIP) は塩分に対して逆相関の関係にあった (表 2.1)。また、淡水と海水の混合率に基づいて算出された

DIN 濃度ならびに Urea-N 濃度の予測値とそれらの実測値の間には、ほぼ 1:1 の関係があった (7, 8 月の Urea-N を除いて) (図 2.4)。つまり、和歌浦干潟における DIN, Urea-N そして DIP の供給源は主に、陸起源の淡水であり、それらの濃度は潮汐と河川流量などの物理的因子によってほぼ決まると考えられる。しかしながら、水温が上昇する 7 月と 8 月における Urea-N 濃度の予測値と実測値には大きな差が見られた。これは、植物プランクトン (Mitamura, 1986, Mitamura *et al.*, 1989), 底生微小藻類そしてバクテリア (Mitamura *et al.*, 1994) による尿素的取り込みが、河川から干潟への尿素的供給よりも上回っていたことが原因であると考えられる。同様に、窒素やリンなどの無機化合物もまた積極的に底生藻類や植物プランクトンによって摂取・利用されていたと考えられるけれども、それらの濃度は生物地球化学的過程において平衡状態にあったため、DIN 濃度の評価値と実測値の間には、差が表れなかったと思われる。以上の結果から、和歌浦干潟における生元素動態は、基本的には物理過程が大きく影響を及ぼしているが、生物地球化学的過程もかなり活発であると考えられる。

2.4.2. 一次生産と環境要因間の相互関係

潮間帯は水圏環境の中でも環境変動が最も大きいため、そのような環境に移流されてくる植物プランクトンは塩分や水温の大きな変動に曝され、それらによって影響を受ける。しかしながら、河口域は、河川からの定常的な栄養塩の供給と底泥からの栄養塩の回帰が盛んであるため、植物プランクトンに対する栄養制限が起きること少ない。和歌浦干潟において、植物プランクトンの光合成活性は水温に対してのみ顕著な正の相関を示し、塩分や栄養塩濃度に対しては相関を示さなかった (表 2.1)。この結果は、和歌浦干潟は常に大量の栄養塩の供給がある富栄養な環境であるため、栄養塩が植物プランクトンの成長に対する制限因子になっていなかったことを示唆している。また、植物プランクトンの光合成活性は、和歌浦干潟内で観測

された塩分の変動範囲 (13.9-35.5 psu) では、ほとんど影響を受けていなかったと考えられる。

浮遊性藻類は水塊と共に移動するため、周囲の生育環境は比較的安定している。しかし一方、底生微小藻類は基本的に基質である砂泥に付着して生活しているため、水塊が藻類細胞の周りを流れることになる。その結果として、底泥極表層に存在する底生微小藻類は水温、塩分そして栄養塩濃度などの急激な変化に曝される可能性が高い [底泥の極表層以深では逆に環境は安定しているが (Goldman and Horne, 1983)、本研究では底生微小藻類が光合成を行うことができる極表層 (0-2mm) の底泥環境を考察する]。河口域の底泥中では間隙水中の栄養塩濃度が高いため、一般的に、底生微小藻類の一次生産は栄養塩によって制限されない。また、河口に生息する底生珪藻は、塩分の変化に対してプランクトン性の種類よりもはるかに耐性が高い。Admiraal (1977) は、底生珪藻 (*Navicula arenaria* と *Nitzschia sigma*) の単位クロロフィル *a* 量あたりの光合成は塩分が 4-60‰ の範囲ではほとんど影響されないことを室内実験で示している。和歌浦干潟において、底生微小藻類の光合成活性に対する塩分と栄養塩濃度の影響を調べるため、満潮時 (高塩分、低栄養塩濃度) と干潮時 (低塩分、高栄養塩濃度) の干潟水を用いて底生微小藻類の光合成速度を測定した。その結果、満潮時と干潮時の光合成活性に違いは見られなかった。また、1995年10月から12月までの調査においても、底生微小藻類の光合成活性は、塩分や栄養塩濃度に対して相関を示さなかった (表 2.1)。これらの結果は、和歌浦干潟では栄養塩が底生微小藻類の光合成活性の制限因子になっていないことを示し、また、底生微小藻類が広範囲の塩分変動に適応できる能力を持っていることを意味している。

水温もまた底生微小藻類の増殖に影響を及ぼす因子であるけれども、和歌浦干潟における底生微小藻類の光合成速度と水温の間には相関はほとんど見られなかった (表 2.1)。水温と光合成の関係については本章 2.4.4 節でさらに詳しく考察する。

2.4.3. 底生微小藻類の一次生産

潮間帯の堆積物中にはおびただしい数の底生微小藻類が存在しており、底泥表層(0-1 cm)のクロロフィル *a* 含有量は、通常、20-400 mg chl *a* m²の範囲で報告されている。これらの値は、底泥直上の水柱における植物プランクトン現存量の総量と同じ、あるいはそれ以上になる (MacIntyre *et al.*, 1996)。また、底生微小藻類の現存量は一年を通じて目立った季節的変動を示さず、一年の大部分にわたって大きな現存量を持つことが多い (Varela and Penas, 1985)。このような現象は、和歌浦干潟と一色干潟の研究においても観測された：底生微小藻類のクロロフィル *a* 含有量は一年を通じて植物プランクトンのそれより数十倍高く、季節的な変化を明瞭に示さなかった (表 2.2, 図 2.9B)。この結果は、底生微小藻類が、年間を通じて、干潟の一次生産者として重要な役割を果たしていることを示している。

底生微小藻類は基質表面という限られた場所で増殖するため、マット状の3次元構造を形成する。この細胞の高密度化は、底生微小藻類の光合成活性と底泥中のクロロフィル *a* 含有量の間、負の相関関係 (高い生物量-低い活性, 低い生物量-高い活性) を生じさせる (Goldsborough and Robinson, 1996)。この現象は、和歌浦干潟と一色干潟においても観測された (図 2.8)。これはおそらく、藻類細胞が高密度になることによって起こる、無機炭酸塩の拡散の制限 (Admiraal *et al.*, 1982) や自己遮光 (Colijn and Jonge, 1984) が原因になっているのかもしれない。

底生微小藻類の光合成速度の正確な測定には、技術的な問題があり、いまだに確立されていない (Colijn and Jonge, 1984)。底生微小藻類の光合成速度の測定はこれまで主に、酸素法 (Pomeroy, 1959) と¹⁴C法 (Raalte *et al.*, 1974) によって行われてきており、炭素の取り込みを直接的に測定する後者の方法はより広く利用されてきている。しかしながら、懸濁法 (Cadée and Hegeman, 1974) や湿式酸化法 (Raalte *et al.*, 1974) によって底泥試料中の¹⁴Cの崩壊数 (dpm) を測定する場合、自己吸収やカラー・ケミカルクエンチングの問題が通常生じる。その結果、これらの方法によって測定された¹⁴C試料のdpmは、実際に底生藻類によって取り込まれた¹⁴Cのdpmよりも低くなり、一次生産の過小評価となる可能性がある。このような問題を克服す

るため、本研究ではサンプルオキシダイザを用いた燃焼法 (Colijn and Jonge 1984, Saito *et al.*, 1990) を採用した。この方法は ^{14}C を含む試料を酸素気流中で燃焼 (550-600°C) した後、発生した $^{14}\text{CO}_2$ を捕集し測定する方法である。この燃焼法によって、底生微小藻類の光合成速度が、底泥の粒度 (泥-砂-礫) に関わらずより正確に測定できるようになった。本研究では、 ^{14}C -グルコースを用いて定期的にサンプルオキシダイザの ^{14}C 回収率を検定した。その結果、本研究期間中の ^{14}C 回収率は平均 $97.8 \pm 3.4\%$ だった。

一般に、水深が浅くなるにつれて一次生産における底生微小藻類の寄与は大きくなる。和歌浦干潟と一色干潟における底生微小藻類の光合成速度は、さまざまな浅水域の底生微小藻類の光合成速度 (干潟: $2-115 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, 塩性湿地: $5-85 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, 沿岸域: $1-125 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, MacIntyre *et al.*, 1996) と比較して適当な値であった。Charpy-Roubaud and Sournia (1996) は全地球の海洋沿岸域における底生微小藻類の一次生産速度をレビューし、その平均値を $100 \text{ g C m}^{-2} \text{ y}^{-1}$ と結論づけている。この値は富栄養化した内湾における植物プランクトンの平均的な一次生産量に匹敵する。同様に、和歌浦干潟ならびに一色干潟の研究においても、底生微小藻類の一次生産速度は植物プランクトンと同じか、あるいはそれ以上であった (表 2.2, 図 2.9C)。

しかしながら、底生微小藻類の光合成活性 (単位クロロフィル a あたりの光合成速度) は、一般的に、河口や湾内における植物プランクトンの光合成活性よりも低い (Admiraal, 1984; MacIntyre and Cullen, 1996)。Gargas (1980) は、Danish Fjord の浅水域において、飽和光下にある底生微小藻類と植物プランクトンの光合成活性が、それぞれ、 $0.6-3.9 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$ と $0.7-13.5 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$ の範囲にあったと報告している。同様に、和歌浦干潟ならびに一色干潟の研究においても底生微小藻類の光合成活性は植物プランクトンの活性より低かった (表 2.2, 図 2.9D)。つまり、以上の結果を要約すると、底生微小藻類は、植物プランクトンより低い増殖速度ではあるけれども、その豊富な生物量によって一年を通じて高い生産力を維持していると結論づけられる。

2.4.4. 一次生産の日周変化と季節変化

1995年6月から12月の和歌浦干潟において、植物プランクトンの光合成活性（光強度一定の条件下）は満潮時（平均 $4.5 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$ ）と干潮時（平均 $2.5 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$ ）で大きく異なっていた。一般に、植物プランクトンに見られる光合成活性の日周変動は細胞周期（年齢）や概日リズムなどによって制御される。そして、それらの生理学的因子は植物プランクトン各種に固有のものである。そのような観点から、干・満潮時で異なる光合成活性は、潮汐による植物プランクトン種の“入れ替わり”が原因ではないかと考え、1996年8月、植物プランクトンの光合成活性の日周変動を調べた。その結果、塩分、栄養塩濃度そしてクロロフィル a 濃度は、潮汐と共に約12時間周期で規則的な変動を繰り返し、また、植物プランクトンの光合成活性（光強度一定の条件下）及び種組成も一日を通じて大きく変化していた（図2.6A・B）。光合成活性が16:00から19:00にかけて急激に減少した時、それまで第1優占種であった *Thalassiosira weissflogii* の相対優占度が減少し、*Nitzschia pungens* の相対優占度が増加した（図2.6C）。この時、光合成活性は水温、塩分そして栄養塩濃度に対してほとんど相関を示さなかった。つまり、光強度一定条件の下で植物プランクトンの光合成活性に見られた日周変動ならびに干・満潮時における活性の違いは、種組成の変化（生理学的状態の変化）によって引き起こされていたのだろうと考えられる。また、底生微小藻類の光合成活性は植物プランクトンの活性より低かったことから、干潮時に再懸濁した底生微小藻類（相対優占度は5%以下ではあるけれども）の植物プランクトン試料への混在が、干潮時の活性低下を引き起こしていたのかもしれない。

同様に、干潟水域における底生微小藻類の一次生産速度は光以外の物理的環境条件によってもまた大きく左右され、日周的に変化する。つまり、干潟の冠水/干出という潮汐と日光との間の干渉が有光層中の底生微小藻類の現存量に重大な影響をもたらし、その結果として、光合成速度は日周的に大きく変化する。運動性の底生珪藻は $1\text{--}25 \mu\text{m s}^{-1}$ の範囲で底泥中を移動することが一般的に知られている：滑走運動（Edger, 1984）。それらの運動性の底生珪藻は概日リズムに従った鉛直移動を行う：

干潮時に底泥が干出した際には底泥表面に上昇して光合成を行い、上げ潮時には底泥下層へ移動する (Varela and Penas, 1985; Pinckney and Zingmark, 1991)。このような底生珪藻の鉛直移動は一色干潟においても観測された：底生微小藻類のクロロフィル a 含有量は干潮時 ($102\text{--}168 \text{ mg chl } a \text{ m}^{-2}$) に増加し、満潮時 ($78\text{--}88 \text{ mg chl } a \text{ m}^{-2}$) に減少した (表 2.3)。Sabbe (1993) は、レンズペーパー法によって、砂質干潟における運動性と固着性の底生珪藻細胞数の相対的割合を調べ、それぞれ、33%と67%であると見積もった。一色干潟におけるクロロフィル a 含有量の日周変動は、上記の論文に基づく底生珪藻の移動速度 ($3.6\text{--}90 \text{ mm h}^{-1}$) と運動性の底生珪藻の割合 (33%) から説明できる。また、潮汐や波浪による底泥の物理的攪乱やメイオ・マクロベントスによる生物学的攪乱もクロロフィル a 量の鉛直分布に影響を及ぼしていたのであろう。この日周鉛直移動と光強度の増加に伴って、一色干潟における底生微小藻類の光合成速度ならびに光合成活性は干潮時と正中時が重なった時間帯 (10:30–13:30) で最大 ($31.2 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, $0.93 \text{ mg C mg chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$) となった (表 2.3)。

干潟における底泥の干出と日照時間の一致は底泥表面への入射光を増加させ、真夏の日中において、底泥表面の光強度は $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ に達する。一色干潟において、光強度 $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ で測定された底生微小藻類の光合成活性 (1997年4月–1998年3月、実験室内で測定) は、光強度 $1200 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ における光合成活性 (1998年11月、現場で測定) の56%であった (図 2.10: P-I 曲線参照)。消散係数を 1.4 m^{-1} 、水面への入射光を $1200 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ と仮定 (これらの値は、一色干潟で1998年11月3日の満潮時に測定した) すると、光強度 $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ は水深 1.1 m における底泥表面の光強度に相当する。水深 1.1 m は一色干潟の平均的な水深である。これらの結果から、研究室の測定で得られた光合成速度は現場の日中における平均値を反映していたと考えられる。

一色干潟と和歌浦干潟共に、底生微小藻類の光合成活性は植物プランクトンよりも低かった。また、一色干潟で評価された底生微小藻類の I_k (図 2.10 の P-I curve から算出) はこれまで論文で報告されている値 ($160\text{--}1260 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) より低かった (Shaffer, 1988; Pinckney and Zingmark, 1993)。つまり、1997年11月における底生微小藻類群集は、藻類細胞の高密度化による自己遮光 (Colijn and Jonge, 1984) や底泥

極表層における光の急激な減衰のため、光制限された陰適応状態にあったのかもしれない。陰適応状態にある藻類は強光阻害を受けやすい (Hill, 1996)。しかしながら、一色干潟における底生微小藻類は強光阻害を受けていなかった (図 2. 10)。一般的に、植物プランクトンの光阻害は、 $100\text{--}300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で始まるが、底生微小藻類は非常に強い光強度でも強光阻害を示さないことが多い。これは、光が底泥表層の数百 μm 以浅で強い消散を受けるため (Haardt and Nielsen, 1980)、底泥最表層に存在するわずかな底生微小藻類のみが光阻害を受けていたことに起因するのかもしれない。

干潟を含む浅水域の底生微小藻類の重要性は、植物プランクトンと比較して、大きな現存量を持ち、そしてその高い生物量・生産量を年間を通じて維持していることである (Varela and Penas, 1985)。和歌浦干潟と一色干潟共に、底生微小藻類の光合成速度および光合成活性の季節的変動は植物プランクトンのそれらの季節変動と比較して小さかった (表 2. 2, 図 2. 9C・D)。また一般的に、底泥中に出現する底生藻類の優占種と種組成は、植物プランクトンと比較して、季節的変動が少ない (そのような現象は一色干潟においても観測された: 愛知県水産試験場の定期調査資料より)。以上のことから、年間を通じた底生微小藻類による高い生産速度の維持は、各季節の水温に最適温度を持つ種が優占するという“種の遷移”によってではなく、光や水温の季節的变化に対して細胞中の色素組成や各酵素の相対的割合を変えることによって、光合成に関わる代謝をその環境条件に巧みに適応させていたことが原因になっているのかもしれない (Mortain-Bertrand *et al.*, 1988; Thompson *et al.*, 1992)。そのような生態的戦略を用いて、底生微小藻類は大量の有機物を年間を通じて干潟の従属栄養生物に供給し、特に、植物プランクトンの一次生産が減少する冬季においては、干潟の有機物供給源としてより重要な役割を果たしていると考えられる。

しかしながら、干潟に生息する底生微小藻類の光合成速度は、短期的に、急激な低下を示すことがある。Hopkins (1964) は、水温が上昇する夏期において、底生微小藻類の光合成速度が低下するという観測結果を報告した。一色干潟における底生微小藻類の平均光合成速度および活性は、8月に最低値 ($8.2 \pm 3.2 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, $0.47 \pm 0.17 \text{ mg C mg chl } \alpha^{-1} \text{ h}^{-1}$) を記録した。真夏の干潮時の一色干潟では、底泥が直接太

陽光に曝されるため、急激な温度上昇が起こり、底泥表層の温度は 30℃を越える。そのような急激な温度変化による熱ショックは、藻類細胞の蛋白質を変性させ (Denicola 1996)、藻類細胞を損傷させていたのかもしれない。このような光合成に対する温度阻害は、夏期における干潟の物質循環を考える上で極めて重要であり、今後、研究を進めていく必要があると考えられる。

2.4.5. 微小藻類-バクテリア相互間の関係

底泥中のコロイド状炭水化物はバクテリア群集によっても生産されるが、主には底生珪藻起源であり、その濃度は底泥中のクロロフィル α 含有量と密接な関係がある (Underwood and Paterson, 1995; Underwood and Smith, 1998; Yallop *et al.*, 1994)。同様に、本研究における砂質干潟の Colloidal-Carbohydrate 濃度と EPS-Carbohydrate 濃度は底泥中のクロロフィル α 含有量と正の相関を示した (図 2.12B・C)。この結果は、砂質干潟におけるコロイド状炭水化物や EPS 画分の炭水化物は、主に、底生珪藻によって生産されていることを示唆している。一方、泥質干潟の Colloidal-Carbohydrate 濃度と EPS-Carbohydrate 濃度は砂質干潟のそれらの濃度よりも高く、クロロフィル α 濃度とは有意な相関関係がなかった。これは、泥質干潟が吹送流、潮汐流あるいは波浪などの影響が比較的小さく、外来性有機物が沈澱・堆積しやすい環境にあったためと考えられる。

Underwood and Paterson (1995) は、干潟底泥のさまざまな微生物群集マットにおけるコロイド状炭水化物/全炭水化物比が 26-96%の範囲にあったと報告した。さらに彼らは、そのコロイド状炭水化物の 19.2-38.2%が EPS 炭水化物であることを示した。本研究において、Colloidal-Carbohydrate/全炭水化物比と EPS-Carbohydrate/Colloidal-Carbohydrate 比は、それぞれ、32-71% (平均 49.9%) と 17-44% (平均 25%) の範囲にあり、先の研究報告と比較して適当な値であった。これら底泥中の全炭水化物に対するコロイド状炭水化物あるいは EPS 炭水化物画分の割合は高分子化合物の酵素的分解のレベルを示す有効な指標となりうる。本研究の EPS-

Carbohydrate/Colloidal-Carbohydrate 比においては、砂質と泥質干潟で明瞭な違いが見られなかったけれども、Colloidal-Carbohydrate/全炭水化物比は泥質干潟と砂質干潟でその違いがはっきりと観察された。つまり、泥質干潟の Colloidal-Carbohydrate/全炭水化物比 (32%) は砂質干潟のその比 (52%) よりも低かった。この時、泥質干潟の β - \cdot - α -グルコシダーゼ活性は、砂質干潟のそれらの酵素活性よりも約 2 倍高かった (図 2. 11C)。これらの結果は、泥質干潟では細胞外酵素によるコロイド状有機物 (高分子化合物) の分解が活発に行われていることを暗示している。また、天然底生微小藻類群集が分泌する細胞外有機物の 90% 以上がコロイド状有機炭素画分 (Colloidal-OC) であったことも、干潟における生分解活性の高さを裏付けている (第 3 章 3. 3. 3)。

本研究において測定された底泥中のクロロフィル α 量、底生微小藻類の一次生産速度そして全菌数はこれまで報告されてきた文献値と比較して適当な値であった (Billen *et al.*, 1990; van Duyl and Kop, 1990; MacIntyre and Cullen, 1996)。砂質干潟の全菌数は底生微小藻類のクロロフィル α 濃度と一次生産速度に対して正の相関を示した (図 2. 11A・B)。これは、砂質干潟の従属栄養バクテリア群集が底生微小藻類によって生産される有機物に大きく依存していることを示唆している。一方、泥質干潟におけるバクテリア群集の有機物源は、底生微小藻類による一次生産物よりむしろ内在性有機物 (メイオ・マクロベントス起源) や外来性有機物 (水柱からの堆積物) であると推測される。

水圏環境における有機物の大部分 (約 90%, 河口域では 50-90%) は溶存態であり、その溶存態有機物のかなりの部分はバクテリアが直接取り込み・利用できないポリマーとして存在していると言われている (Chróst, 1990, 1991)。そのような高分子化合物を微生物代謝に利用するためには、細胞外酵素などによってポリマー状高分子化合物をモノマーへと変換・分解する必要がある。水圏に見られる細胞外酵素の多くは海水中や底泥中の従属栄養バクテリアによって生産される加水分解酵素 (グルコシダーゼ, アミノペプチダーゼ, アルカリホスファターゼ) である (Chróst, 1990, 1991; Middelboe *et al.*, 1995)。Taylor *et al.* (1999) は、干潟の底生珪藻から抽出した細胞外コロイド状有機物 (多糖類) の単糖組成を調べ、コロイド状有機物の約

80%がグルコースで、その他の成分としてガラクトースやラムノースがわずかに検出されたと報告している。つまり、底生珪藻のコロイド状有機物は主に、グルカンあるいはグルコースを主成分とするヘテロ多糖から成っていると考えられる。そこで本研究では、 β - \cdot - α -グルコシドを加水分解するエキソ型酵素 β - \cdot - α -グルコシダーゼの活性を測定した。

本研究の底泥中における β - \cdot - α -グルコシダーゼ活性は全菌数と顕著な正の相関があった(表 2.5, 図 2.11C)。これは、 β - \cdot - α -グルコシダーゼが干潟底泥中のバクテリア群集によって生産・分泌されていること如実に示している。バクテリア細胞あたりの β - \cdot - α -グルコシダーゼ比活性は、砂質干潟よりも泥質干潟において高くなっていた。バクテリアによって生産される β - \cdot - α -グルコシダーゼは誘導酵素である。つまり、バクテリア細胞の周囲に高分子有機基質が存在する時に細胞外酵素が生産され、一方、バクテリアが容易に利用できる低分子有機基質(藻類の細胞外分泌物、溶存遊離アミノ酸ならびにグルコース)が充分にある時には酵素の合成は阻害される(Chróst, 1991)。一色干潟の泥質域は、吹送流、潮汐流あるいは波浪などの影響が小さく、生物・非生物的粒状態有機物が沈澱・堆積しやすい環境であった。堆積した粒状態有機物の分解には底生性バクテリアのさまざまな代謝グループが交替で関与するため、そのような底泥環境では段階的な分解過程の途中にある高分子有機物が比較的多く含まれていると考えられる。つまり、泥質干潟では、高いバクテリア現存量を支える十分な有機物供給があり、そして、酵素の生産を促進するような高分子有機基質(グリコーゲン、ヘミセルロースなど)が豊富に存在していることが、泥質干潟における β - \cdot - α -グルコシダーゼの高い比活性を引き起こしていると考えられる。また、泥質干潟の細かな泥粒子(粒度 1/16 mm 以下)は、砂質干潟と比較して、バクテリアが利用できる表面積が広く、そして、間隙率が小さい。底泥中の細胞外酵素のほとんどはバクテリア細胞表層に存在しており、そのようなエクトエンザイムの加水分解活性は間隙水中に遊離している細胞外酵素の活性より高い(Reli, 1991)。つまり、底泥の粒度のような物理的因子もまた、 β - \cdot - α -グルコシダーゼ比活性を左右する原因の一つになっているのではないかと考えられる。

一般的に、水中では浮遊性バクテリアが優占するが、底泥中においては全バクテ

リアのほとんどが付着性バクテリアである (Painchaud and Therriault, 1989; Smith *et al.*, 1995; Unanue *et al.*, 1992)。Chróst (1990) は, Plußsee 湖水柱において, 付着性バクテリアの β -グルコシダーゼ比活性が浮遊性バクテリアが示すその比活性よりも 6.0 倍高いことを見出した。本研究において, 底泥中の β - \cdot - α -グルコシダーゼ比活性は水中におけるそれらの比活性より 1.2-12 倍高かった (表 2.4)。またこの時, 底生微小藻類の一次生産速度は植物プランクトンの一次生産速度とほぼ同じであったけれども, 全グルコシダーゼ活性は海水中よりも底泥中において高くなっていた (表 2.4)。これらの結果は, 底生系では微小藻類からバクテリアへの炭素フラックスが浮遊系と比較して非常に大きく, 微生物食物連鎖を通じた炭素の流れが干潟生態系の炭素循環においてかなり大きな経路となっていることを示唆している。さらに, 底生微小藻類による細胞外有機炭素の生産・分泌が植物プランクトンによる細胞外有機炭素の生産よりも数倍高かったことから (後述: 第 3 章), 底生系における微生物ループを通じた炭素フラックスはさらに拡大されるものと解釈できる。

2.5. 結論

本研究では, 和歌浦干潟 (1995 年-1996 年) と一色干潟 (1997 年-1998 年) における底生微小藻類と植物プランクトンの一次生産ならびにそれらに直接的な影響を及ぼす環境因子 (水温, 光, 塩分, 栄養塩濃度) を測定し, 一次生産と環境因子の間の関係を評価した。また, 底生系および浮遊系における微小藻類-バクテリア相互間の関係を明らかにするため, 三河湾一色干潟のさまざまな化学・生物的因子を測定し, 従来の浮遊系における細胞外溶存態有機物を介した微生物ループとは異なる底生系独自の炭素フラックスが干潟生態系の炭素循環とどのように関わっているのかを評価した。その結果得られた主な結論は以下のとおりである。

- (1) 和歌浦干潟における栄養塩濃度は, 塩分に対して逆相関の関係にあり, 塩分を

指標とした河川水と海水の混合率でほとんど説明できた。これは、干潟の栄養塩濃度が、物質循環過程よりむしろ、物理的因子（潮汐と河川流量）によって決められていることを示している。

- (2) 干潟における底生微小藻類のクロロフィル a 量と光合成速度は、植物プランクトンと比較して、同等、あるいはそれ以上であったけれども、光合成活性は低かった。これは、底生微小藻類は低い増殖速度ではあるが、その豊富な生物量により干潟の一次生産に大きく寄与していることを示唆している。
- (3) 底生微小藻類の光合成速度は、様々な環境因子（水温、塩分、栄養塩濃度）に対して相関を示すことなく、年間を通じて高い生産量を維持していた。特に、植物プランクトンの生産量が低下する冬季において、底生微小藻類は干潟の有機物供給源として、より重要な役割を果たしていると考えられる。
- (4) 底生微小藻類の光合成速度および光合成活性は水温が上昇する夏期において低下した。これは、真夏の干出時における底泥温度の急激な上昇の結果、熱ショックによって藻類細胞の蛋白質の変性や損傷が引き起こされていたことに起因するのではないかと推測される。
- (5) 底生微小藻類のクロロフィル a 濃度と光合成速度は日周期的に大きく変動していた。これは、潮汐と日射の干渉に関わる運動性底生珪藻の鉛直移動で説明できる。同様に、植物プランクトンのクロロフィル a 濃度と光合成速度もまた日周期的に変動していた。これは、潮汐に伴う種組成の変化に起因していると解釈される。
- (6) 植物プランクトンは光強度 $600 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上で強光阻害が観測されたが、一方、底生微小藻類には強光阻害 ($0-1200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) が見られなかった。また、この時、底生微小藻類の I_k ($110 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) は低かった。これは、底泥表層数百 μm に存在するわずかな底生微小藻類のみが光阻害を受けていることを示唆している。

- (7) 砂質干潟において、全菌数は底泥中のクロロフィル a 含有量と底生微小藻類の一次生産速度に対して有意な正の相関を示した。これは、砂質干潟における従属栄養細菌が底生微小藻類の一次生産物を主要な有機物源としていることを示している。一方、泥質干潟の細菌群集は底生微小藻類起源以外の有機物に大きく依存していると推測される。
- (8) 底生微小藻類と植物プランクトンの一次生産速度はほぼ同じであったけれども、全グルコシダーゼ活性は海水中よりも底泥中においてその値が高くなっていた。これは、干潟底生系における微小藻類から細菌への炭素フラックスは浮遊系と比較して非常に大きく、微生物食物連鎖を通じた炭素の流れが干潟生態系の炭素循環においてかなり大きな経路になっていることを示唆するものである。

以上のことから、底生微小藻類は、激しい環境変動に曝されながらも、巧みな生態戦略を用いてその環境に適応し、一年を通じて高い生産速度を維持していると結論づけられる。また、底生微小藻類と底生性細菌は密接にリンクしており、底生微小藻類は底泥中の細菌群集に対して、多量の有機物を供給していると推測される。

第3章 細胞外有機物の生産と生分解

3.1. はじめに

第2章では、藻体外に分泌・滲出した有機物と粒状態有機物を分別することなく、底生微小藻類と植物プランクトンの全一次生産について議論した。そこで次に本章では、放射性同位元素 ^{14}C をトレーサーとして用いることにより、底生微小藻類と植物プランクトンの光合成生産物を、粒状態有機炭素 (POC), EDTA によって抽出したコロイド状有機炭素 (Colloidal-OC) そして細胞外溶存態有機炭素 (EDOC) に分画し、全一次生産 (TPP) に占めるそれらの割合を評価した。さらに、コロイド状有機炭素画分に占める細胞外多糖類 (EPS) 画分の割合を測定した。本章では、干潟底泥と海水中の微小藻類群集ならびに底生珪藻と植物プランクトンの培養種に対して行った上記の一連の分画実験について述べる。

底生微小藻類によって分泌される細胞外有機物は干潟生態系においてさまざまな役割を果たしていると考えられるが、その中でも、従属栄養生物に対する有機物源としての細胞外有機物の役割は干潟生態系の物質循環を考える上で特に重要である。そこで本研究ではさらに、細菌による細胞外有機物の生分解過程および微生物ループ中への炭素輸送の発端となる細菌による細胞外有機物の利用を評価するため、底生微小藻類から得られた各細胞外有機炭素フラクション (^{14}C -EDOC, ^{14}C -Colloidal-OC, ^{14}C -EPS) の細菌による酵素的分解と無機化過程を追跡した。

3.2. 方法

3.2.1. 細胞外有機炭素の分画

底生微小藻類と植物プランクトンによる光合成生産物の分画を行うため、1998年

6月13日と18日の三河湾一色干潟 (34° 46' N, 137° 02' E) において、表面底泥 (天然底生微小藻類群集) と海水 (天然植物プランクトン群集) を採取した。また、研究室で培養していた底生性藻類 3 種と浮遊性藻類 4 種も光合成生産物の分画実験に使用した。底生性藻類の 3 種, *Nitzschia longissima*, *Nitzschia hybridaeformis*, *Amphora coffeaeformis*, は一色干潟の底泥中から単離・培養した羽状目に属する底生珪藻である。浮遊性藻類 4 種は, *Thalassiosira weissflogii*, *Chaetoceros decipiens* (Bacillariophyceae), *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyta), *Tetraselmis* sp. (Prasinophyceae) である。上記の底生微小藻類と植物プランクトンの各種は f/2 培地 (Guillard and Ryther, 1962) 中で培養した。培養条件は次のとおりである: 光強度 $80 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 水温 20°C , 明暗周期 12 h : 12 h。なお, 光合成生産物の分画実験には, 遷移期にある藻体を用いた。

底生微小藻類と植物プランクトンによって生産される有機炭素は次のように分画・定義した。

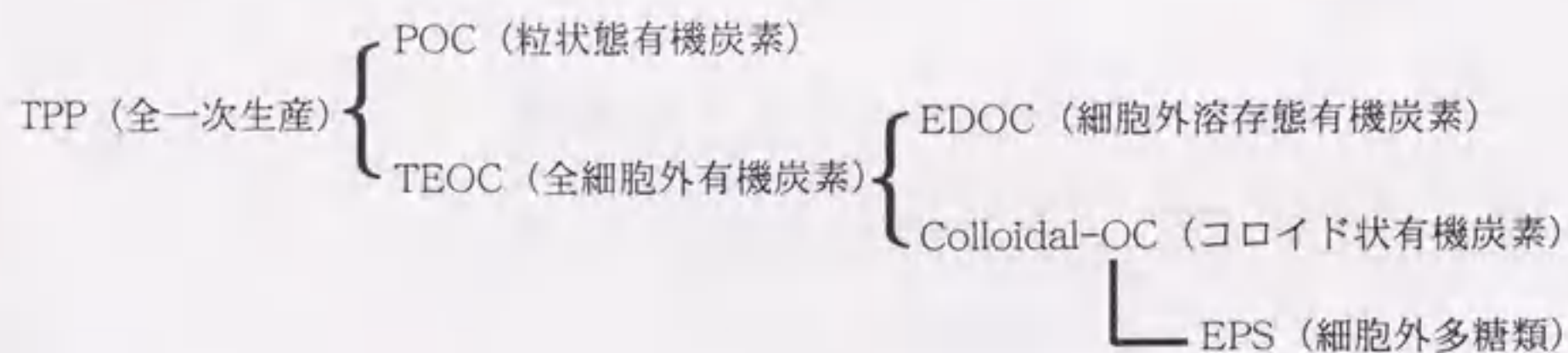


図 3. 1 においてその分画実験の操作手順を示す。始めに, 抗生物質混液 [benzylpenicillin potassium (最終濃度 $75 \mu\text{g ml}^{-1}$): Wako, streptomycin sulfate (最終濃度 $125 \mu\text{g ml}^{-1}$): Wako] を含む 20 ml 容量のバイアル瓶に藻類試料を加え, 1 時間ブレインキュベーションを行った。ブレインキュベーション終了後, $^{14}\text{C-NaHCO}_3$ (1 ml, 148 kBq ml^{-1} : NEN) を添加し, 光強度 $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 水温 20°C の条件下で, さらに 8 時間インキュベーションを行った。インキュベーション終了後は, 藻類試料をホルマリン等で固定することなく, 以下に記す分析処理を速やかに行った。まず始めに, 試料をガラス繊維フィルター (GF/F: Whatman) でろ過し, 藻類細胞とろ液に分画した。そのろ液は, 無機態の ^{14}C を除去するため, リン酸溶液を添加して酸性 (pH2~3)

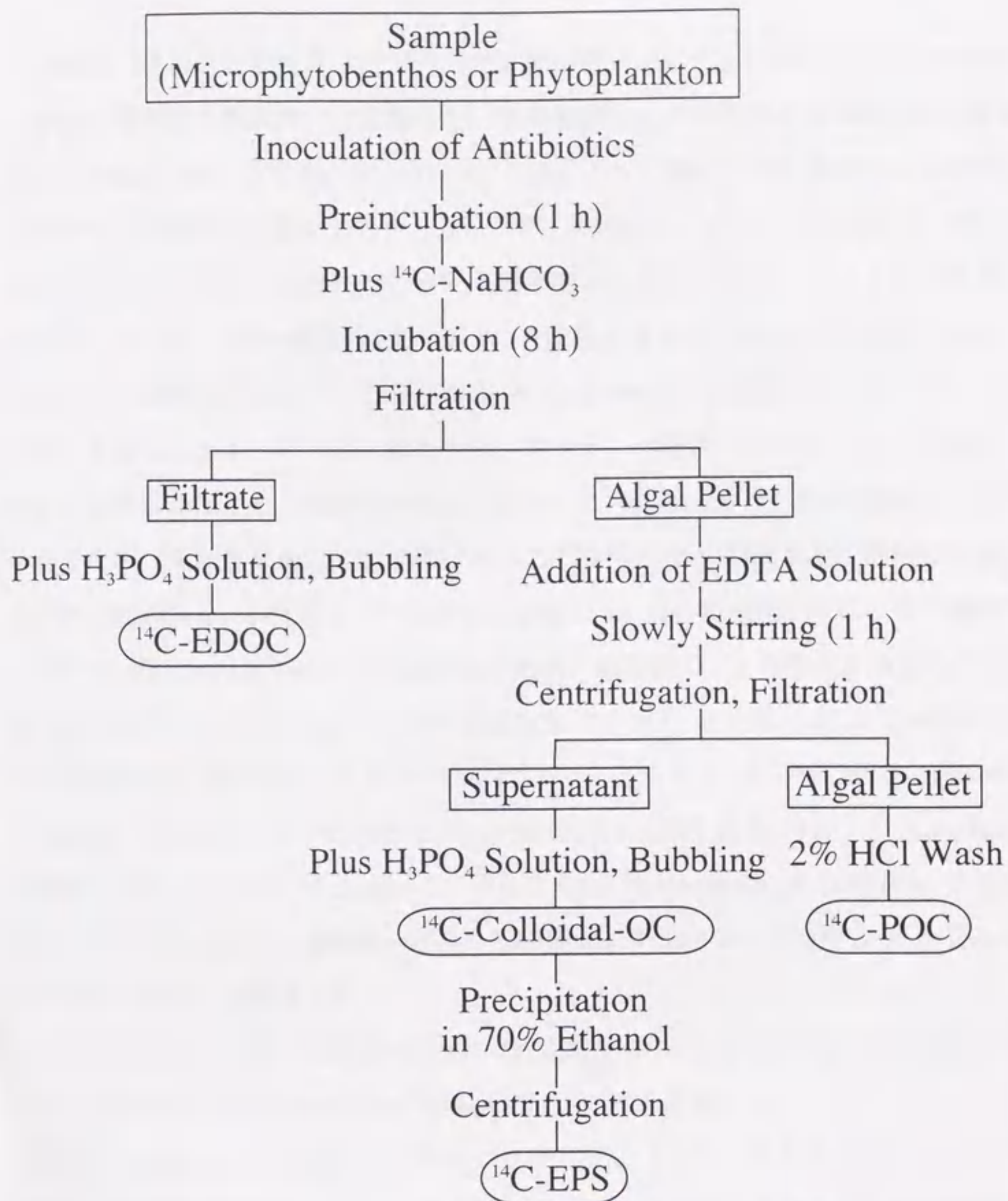


図3. 1. 底生微小藻類と植物プランクトンによる光合成生産物の分画実験の操作手順。

粒状態有機炭素 (POC: Particulate organic carbon)

細胞外溶存態有機炭素 (EDOC: Extracellular dissolved organic carbon)

コロイド状有機炭素 (Colloidal-OC: Colloidal organic carbon)

細胞外多糖類 (EPS: Extracellular polymeric substances)

にした後、窒素ガスで曝気（15分）した。本研究において、このろ液を ^{14}C -EDOC（細胞外溶存態有機炭素）と定義した。藻類細胞からの粘着性の有機炭素化合物の抽出は Decho (1993) の方法に従い行った。ろ過によって集めた藻類細胞を 4 mM EDTA 溶液中で 1 時間静かに攪拌した後、遠心分離（ $4000\times\text{g}$, 10 分, 3 回：毎回、同じ上澄み中で十分に攪拌・混合）によって藻類細胞から EPS を含むコロイド状有機炭素を抽出した。その上澄み液は、無機態の ^{14}C を除去するため、先に述べた方法で気化・曝気した。本研究において、このろ液を ^{14}C -Colloidal-OC と定義した。続いて、このろ液の 1 部にエタノール（最終濃度 70%）を加え、冷暗所（ 4°C ）にて 8 時間静置し、EPS を沈澱させた。その沈澱物を遠心分離（ $4000\times\text{g}$, 10 分）によって集め、上澄みを捨てた後、蒸留水を加えて再溶解した。この操作を計 3 回繰り返した後に得られた白色の沈澱物を、本研究では ^{14}C -EPS と定義した。残りの藻類細胞はガラス繊維フィルター（GF/F: Whatman）でろ過採取した後、無機態の ^{14}C を除去するため 2% 塩酸で洗浄した。本研究では、この藻類細胞を ^{14}C -POC と定義した。 ^{14}C -EDOC と ^{14}C -Colloidal-OC 画分はシンチレーションバイアルに入れ、15 ml の Aquasol-2 (Packard) を添加した。 ^{14}C -EPS と ^{14}C -POC 画分は可溶化試薬 (NSC II: Amersham) で溶解した後、シンチレーションバイアルに入れ、Scintisol EX-H (Dojindo) を添加した。それぞれの画分の崩壊数 (dpm) は液体シンチレーションカウンター (Model LSC-5000: Aloka) で測定した。

本論文において、全一次生産 (TPP) は粒状態有機炭素 (^{14}C -POC) と全細胞外有機炭素 [TEOC: ^{14}C -Colloidal-OC + ^{14}C -EDOC] の和と定義する。

藻類から分泌される細胞外有機物のバクテリアによる取り込みを阻害するために、本研究では実験期間を通じて、上記に記した抗生物質混液を使用した。抗生物質による取り込みの阻害率は、 ^{14}C -glucose (0.5 ml , 24 kBq ml^{-1} : NEN) を使って定期的に調べた。また、この研究を始めるにあたり、底生微小藻類と植物プランクトンの一次生産に対する抗生物質の影響を調べた。

TEOC 画分への細胞内物質の混入を調べるために、Smyth and Dugger (1981) の方法に従って、藻類細胞 (POC 画分) を超音波破碎装置で破壊して得られたフラクションと EDTA で細胞外有機物を抽出したフラクション (Colloidal-OC 画分) のグルコー

ス-6-リン酸脱水素酵素（細胞内酵素，G6PD，EC 1. 1. 1. 49）の活性を測定した。また，POC 画分と Colloidal-OC 画分中の蛋白質濃度を，それぞれ Smyth and Dugger（1981）と Bradford（1976）の方法によって測定した。この時，Bovine serum albumin をスタンダードとして用いた。

3. 2. 2. 増殖経過に伴う細胞外有機炭素の生産

底生微小藻類（*Nitzschia hybridaeformis*）と植物プランクトン（*Thalassiosira weissflogii*）の増殖経過に伴う各細胞外有機炭素フラクションの生産の変化を測定した。実験開始前に，底生微小藻類（ ~ 300 cells ml^{-1} ）または植物プランクトン（ ~ 300 cells ml^{-1} ）を含んだ 50 ml 容量のバイアル瓶を，それぞれ，6 本ずつ準備した。この時，全ての培養種は抗生物質混液（組成は上記参照）によって無菌化した。各試料は f/2 培地（Guillard and Ryther, 1962）中で培養した。培養条件は以下のとおりである：光強度 $80 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ，水温 20°C ，明暗周期 12 h : 12 h。各試料は 0（2 h），7，10，17，23，30 日後に採取し，光合成実験，次いで，光合成生産物の分画実験に使用した。光合成実験ならびに分画実験は先に述べた方法と同じである（3. 2. 1. 参照）。この時，グルコースをスタンダードとして，各フラクションの炭水化物濃度をフェノール・硫酸法（Dubois *et al.*, 1956）で測定した。POC 画分の炭水化物濃度は，Myklestad and Haug（1972）の方法により加水分解した後，フェノール・硫酸法（Dubois *et al.*, 1956）によって測定した。

3. 2. 3. 細胞外有機炭素の生分解

底生珪藻 2 種と天然底生微小藻類群集（一色干潟底泥）が分泌した細胞外有機物のバクテリアによる分解・無機化の経時変化（0-24 h）を追跡した。羽状目底生珪藻 2 種，*Nitzschia hybridaeformis*，*Amphora coffeaeformis*，は一色干潟の底泥から単離・

培養した。それらの底生珪藻 2 種と底生微小藻類群集を含む底泥に合計 296 kBq の ^{14}C - NaHCO_3 を添加し (1 日間隔で 3 回添加), 7 日間培養した。培養条件は次のとおりである: 培地 f/2 (Guillard and Ryther, 1962), 水温 20°C , 光強度 $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 明暗周期 12 h : 12 h。 ^{14}C で標識した底生珪藻 2 種と底生微小藻類群集の細胞外有機物の分画法は本章 3. 2. 1. 「細胞外有機炭素の分画」で記した方法と同じである。

一色干潟から採取した表層底泥 (0-1 cm, 砂質干潟底泥: 粒度 1/16 -2 mm) を含む血清ゴム栓付き 50 ml バイアル瓶 ($^{14}\text{CO}_2$ を吸収するための副室を持つ) に, 底生珪藻 2 種および底生微小藻類群集から得られた各細胞外有機炭素フラクション (^{14}C -EDOC, ^{14}C -Colloidal-OC, ^{14}C -EPS) を添加した。インキュベーションは静かに攪拌しながら, 温度 25°C , 暗条件下で行った。インキュベーション開始から 2, 4, 6, 8, 12 そして 24 時間後, 試料の固定と酸性化 (pH 2-3) のため, 血清ゴム栓を通してホルマリン (最終濃度 3%) と 2 N の硫酸を試料に添加した。続いて, 発生した $^{14}\text{CO}_2$ を完全に吸収させるため, 副室に挿入したフィルター (GF/C: Whatman) に NSC-II (Amersham) を染み込ませ, 12 時間静かに攪拌した。 $^{14}\text{CO}_2$ を吸収したフィルターをシンチレーションバイアルに入れ, 10 ml の Scintisol EX-H (Dojindo) を加えた。 ^{14}C の崩壊数 (dpm) は液体シンチレーションカウンター (Model LSC-5000: Aloka) で測定した。同時に, 底生珪藻 *Nitzschia hybridaeformis* の各細胞外有機物フラクションを添加した反応溶液をポリカーボネートフィルターで (孔径: $0.2 \mu\text{M}$, 直径 25 mm: Nuclepore) でろ過し, そのろ液を限外ろ過 (Ultrafree-4: Amicon) により分子量分画 (> 100 K, 100 K-30 K, 30 K-5 K, < 5 K M. W.) した。そして, 各分子量画分が示す ^{14}C の dpm を液体シンチレーションカウンター (Model LSC-5000: Aloka) で測定し, 各分子量画分の相対的割合を求めた。

3.3. 結果

3.3.1. 増殖経過に伴う細胞外有機炭素の生産

底生微小藻類と植物プランクトンの増殖過程は、それぞれのクロロフィル *a* 濃度の推移に基づいて次のように定義した（図 3. 2）— 7 日：誘導期，10 日：対数増殖期，17 日：遷移期，23 日：定常期，30 日：死滅期。始めに底生微小藻類の結果を示す。底生微小藻類は対数増殖期において ^{14}C -POC 画分の dpm が増加し，TPP における ^{14}C -POC 画分の割合が増加した [^{14}C -POC (77.6%)， ^{14}C -EDOC (2.7%)， ^{14}C -Colloidal-OC (19.7%)]（図 3. 2，図 3. 3）。次いで遷移期においては， ^{14}C -Colloidal-OC 画分の dpm が増加し，TPP に対する ^{14}C -Colloidal-OC 画分の割合が増加した [^{14}C -POC (58.1%)， ^{14}C -EDOC (1.6%)， ^{14}C -Colloidal-OC (40.3%)]。定常期になると， ^{14}C -EDOC/TPP 比が増加し， ^{14}C -POC/TPP 比が減少した [^{14}C -POC (48.7%)， ^{14}C -EDOC (11.6%)， ^{14}C -Colloidal-OC (39.7)]。 ^{14}C -Colloidal-OC 画分における ^{14}C -EPS 画分の割合は遷移期において最も高くなった [29.7% (誘導期)，31.4% (対数期)，51.0% (遷移期)，27.7% (定常期)，23.1% (死滅期)]。

次に植物プランクトンの結果を示す。植物プランクトンの各フラクションは，誘導期から定常期まで，底生微小藻類と比較して変化が小さく [^{14}C -POC ($90.1 \pm 2.1\%$)， ^{14}C -EDOC ($3.5 \pm 1.1\%$)， ^{14}C -Colloidal-OC ($6.5 \pm 1.2\%$)，平均 \pm 標準偏差]， ^{14}C -POC 画分が TPP の大部分を占めていた（図 3. 2，図 3. 3）。 ^{14}C -EPS 画分の dpm ならびに ^{14}C -EPS/ ^{14}C -Colloidal-OC 比 ($4.1 \pm 1.6\%$ ，平均 \pm 標準偏差) は，全ての成長相において，底生微小藻類のそれらよりもかなり低かった。

実験期間を通じて，底生微小藻類の EDOC 画分と Colloidal-OC 画分の炭水化物濃度は POC 画分のそれより高かった（図 3. 2）。一方，植物プランクトンは遷移期において POC 画分の炭水化物濃度が急激に増加し，Colloidal-OC 画分と EDOC 画分の炭水化物濃度より高くなった。

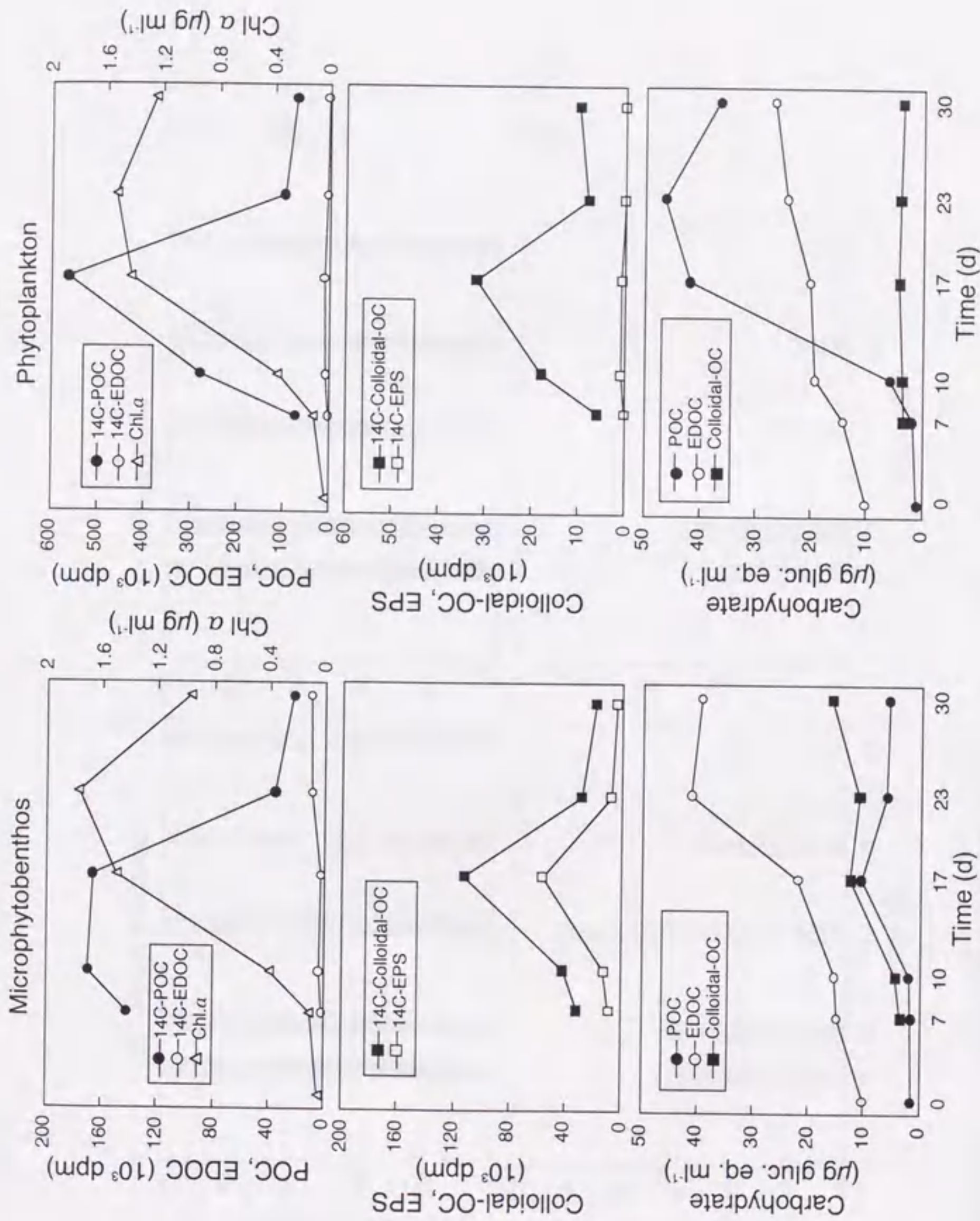


図3.2. 増殖過程における底生微小藻類 (*Nitzschia hybriadaeformis*) と植物プランクトン (*Thalassiosira weissflogii*) のクロロフィル α 濃度, 各フラクション (POC, EDOC, Colloidal-OC, EPS) のdpm およびそれらの培養液1 mlあたりの炭水化物濃度 [$\mu\text{g gluc. eq. ml}^{-1}$ ($\mu\text{g glucose equivalent ml}^{-1}$)] の変化。

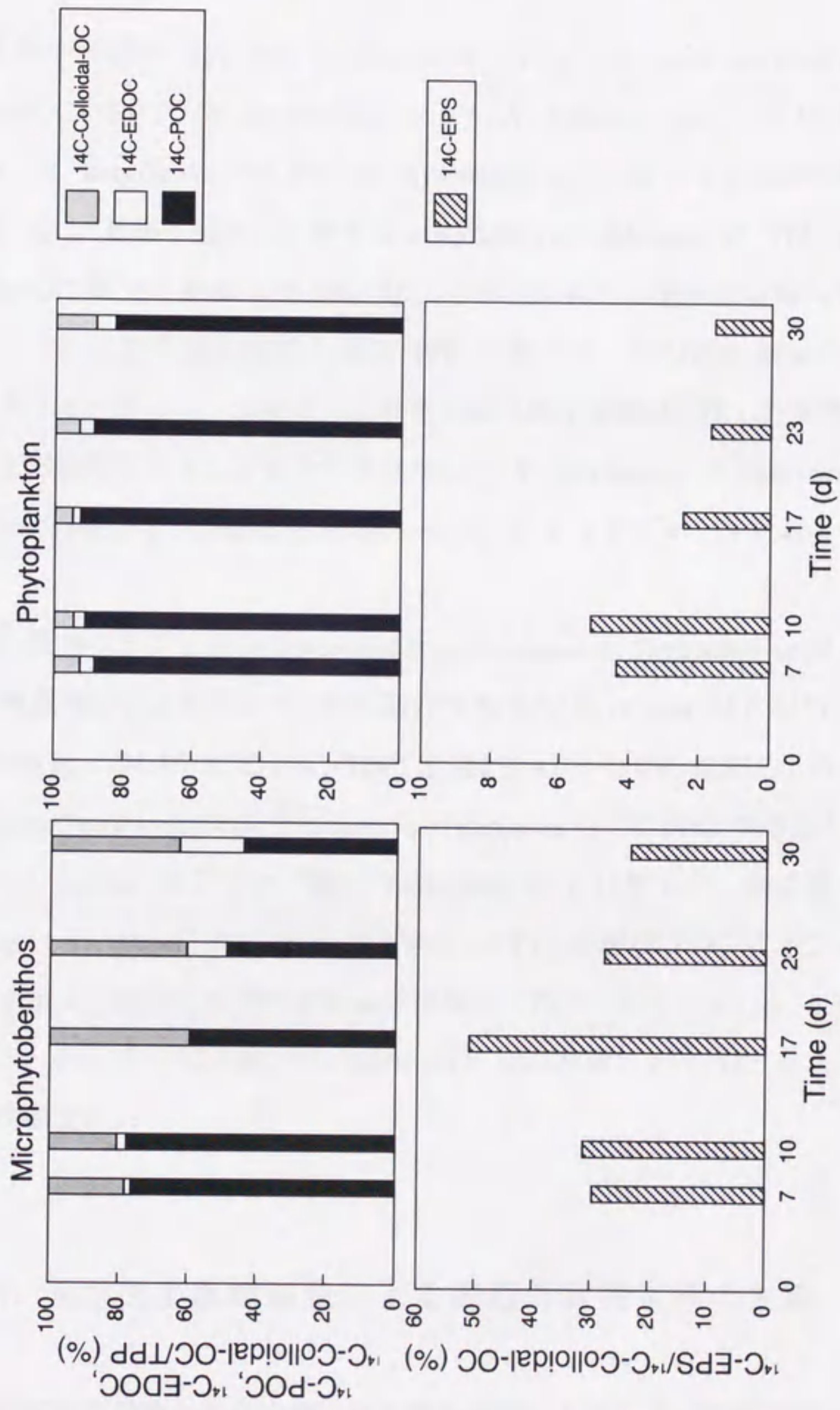


図3.3. 増殖過程における底生微藻類と植物プランクトンの全一次生産物に占める各フラクションの割合

3.3.2. 培養種による細胞外有機炭素の生産

底生微小藻類の *Nitzschia longissima* ならびに *Nitzschia hybridiformis* の ^{14}C -Colloidal-OC/TPP 比 (*N. longissima*: 49.6%, *N. hybridiformis*: 47.1%) と ^{14}C -POC/TPP 比 (*N. longissima*: 47.3%, *N. hybridiformis*: 50.7%) はほぼ同じであった (図 3.4)。基質へ強力に付着する *Amphora coffeiformis* の TPP に対する ^{14}C -Colloidal-OC 画分の割合 (70.3%) は、その他の画分の割合に比較して、特に高くなっていた。これら底生珪藻 3 種の TPP に対する ^{14}C -EDOC 画分の割合は、いずれも、約 3% であった。つまり、これら 3 種の底生珪藻は生産した有機炭素の 49.3-73.3% を細胞外に分泌していたことになる。 *N. longissima*, *N. hybridiformis* そして *A. coffeiformis* の ^{14}C -EPS/ ^{14}C -Colloidal-OC 比は、それぞれ、53.3, 41.4 そして 43.8% だった。

一方、植物プランクトンの *Nannochloropsis oculata* と *Tetraselmis* sp. によって生産された有機炭素のほとんどは ^{14}C -POC 画分であった [*N. oculata*: 98.6% (^{14}C -POC/TPP), *Tetraselmis* sp.: 94.2% (^{14}C -POC/TPP)] (図 3.4)。しかしながら、円心目珪藻に属する *Thalassiosira weissflogii* と *Chaetoceros decipiens* の ^{14}C -POC/TPP 比は、真正眼点藻である *N. oculata* やプラシノ藻の *Tetraselmis* sp. と比較して、低くなっていた [*T. weissflogii*: 85.1%, *C. decipiens*: 78.5%]。これらの植物プランクトン 4 種は先の底生珪藻 3 種より細胞外有機物の分泌が少なく (TEOC/TPP: $11.2 \pm 8.0\%$, 平均±標準偏差), そして, ^{14}C -EPS/ ^{14}C -Colloidal-OC 比は非常に低かった ($6.1 \pm 2.1\%$, 平均±標準偏差)。

3.3.3. 天然微小藻類群集による細胞外有機炭素の生産

一色干潟から採取された底泥 (底生微小藻類) と海水中 (植物プランクトン) の藻類群集に対して光合成生産物の分画実験を行った。その結果、底生微小藻類群集の TPP に対する各フラクションの割合は以下のとおりであった: ^{14}C -POC ($57.3 \pm 3.7\%$),

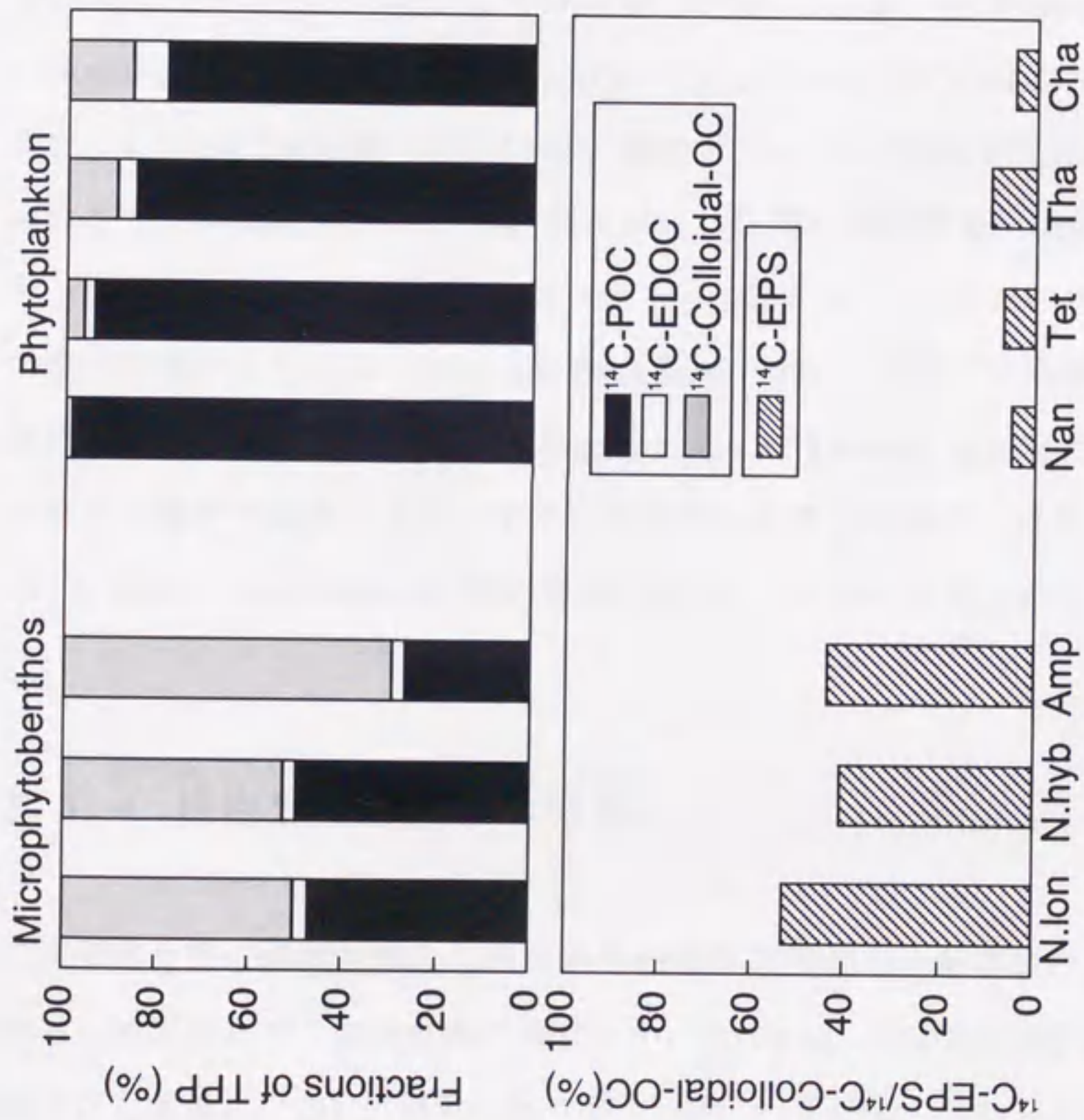


図3.4. 培養種における底生微小藻類と植物プランクトンの全一次生産に占める各フラクションの割合。
 N. lon: *Nitzschia longissima*, N. hyb: *Nitzschia hybridaeformis*, Amp: *Amphora coffeaeformis*,
 Nan: *Nannochloropsis oculata*, Tet: *Tetraselmis* sp., Tha: *Thalassiosira weissflogii*,
 Cha: *Chaetoceros decipiens*

^{14}C -EDOC ($3.7 \pm 0.5\%$), ^{14}C -Colloidal-OC ($38.9 \pm 3.3\%$), 平均±標準偏差 (図 3.5)。そして, ^{14}C -EPS/ ^{14}C -Colloidal-OC 比は $41.3 \pm 1.9\%$ であった。一方, 植物プランクトン群集の TPP に対する各フラクションの割合は次のとおりであった: ^{14}C -POC ($81.4 \pm 1.8\%$), ^{14}C -EDOC ($3.5 \pm 0.5\%$), ^{14}C -Colloidal-OC ($12.9 \pm 2.8\%$), 平均±標準偏差 (図 3.5)。そして, ^{14}C -EPS/ ^{14}C -Colloidal-OC 比は $24.0 \pm 3.6\%$ であった。つまり, 底生微小藻類群集の TPP に対する ^{14}C -EDOC 画分の割合は植物プランクトン群集のそれとほぼ同じレベルであったけれども, 底生微小藻類群集の ^{14}C -Colloidal-OC/TPP 比ならびに ^{14}C -EPS/ ^{14}C -Colloidal-OC 比は植物プランクトン群集のそれらよりもはるかに高くなっていた。植物プランクトン群集の ^{14}C -Colloidal-OC 画分に占める ^{14}C -EPS 画分の割合 ($24 \pm 3.3\%$, 平均±標準偏差) は全ての植物プランクトン培養種よりも高くなっていた (図 3.4, 図 3.5)。浅水域の水中には, 有意な数の底生珪藻が見られる (Jonge and Beusekom 1992)。同様にこの調査でも, 通常, 羽状目の底生珪藻として知られる *Amphora*. spp. や *Navicula*. spp. などが出現していた。つまり, 潮汐や波浪によって水中に再懸濁した底生珪藻が, 植物プランクトン群集の ^{14}C -EPS/ ^{14}C -Colloidal-OC 比の増加に寄与していたのかもしれない。

3.3.4. 細胞外有機炭素の分解

天然底生微小藻類群集から得られた細胞外有機物の分解実験において, 実験開始から4時間後まで, 底泥試料に添加した ^{14}C -EDOC, ^{14}C -Colloidal-OC そして ^{14}C -EPS 画分から急速に $^{14}\text{CO}_2$ が発生した (図 3.6A)。その後, それらの画分は徐々に無機化され, 24時間後には, ^{14}C -EDOC, ^{14}C -Colloidal-OC そして ^{14}C -EPS 画分は, それぞれ, 加えた基質の 54%, 40% そして 54% が無機化された。*Amphora coffeaeformis* から抽出した各細胞外有機炭素フラクションは, 実験開始から12時間後まで, ほぼ一定の割合で $^{14}\text{CO}_2$ を発生し, その後わずかに無機化された。そして, 24時間後には, *A. coffeaeformis* の ^{14}C -EDOC, ^{14}C -Colloidal-OC そして ^{14}C -EPS 画分は, それぞれ, 66%, 58% そして 55% が無機化された (図 3.6B)。また, *Nitzschia hybridaeformis* から採取

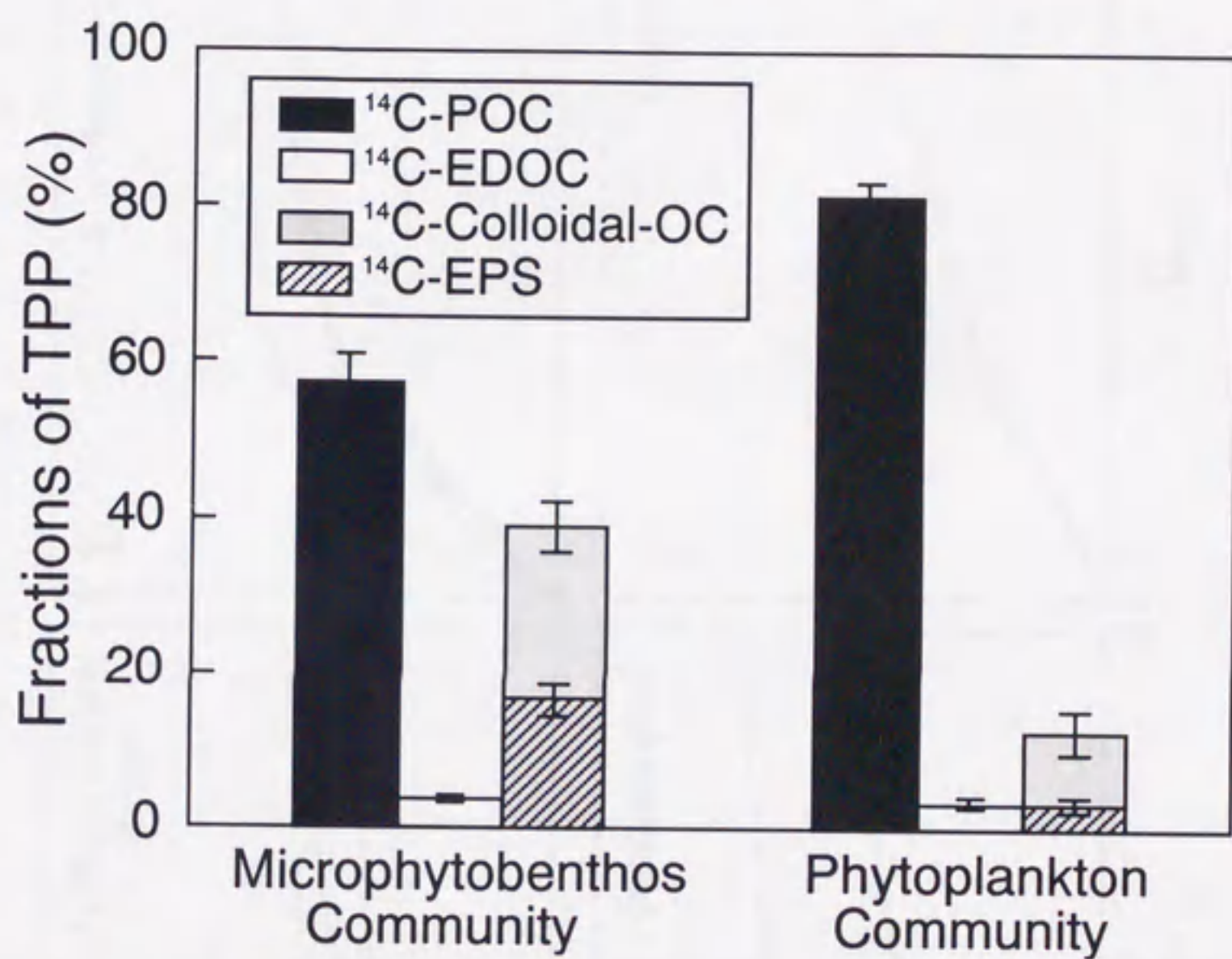


図3.5. 天然群集における底生微小藻類と植物プランクトンの全一次生産に占める各フラクションの割合。鉛直線は標準偏差，底生微小藻類： $n = 8$ ，植物プランクトン： $n = 3$)

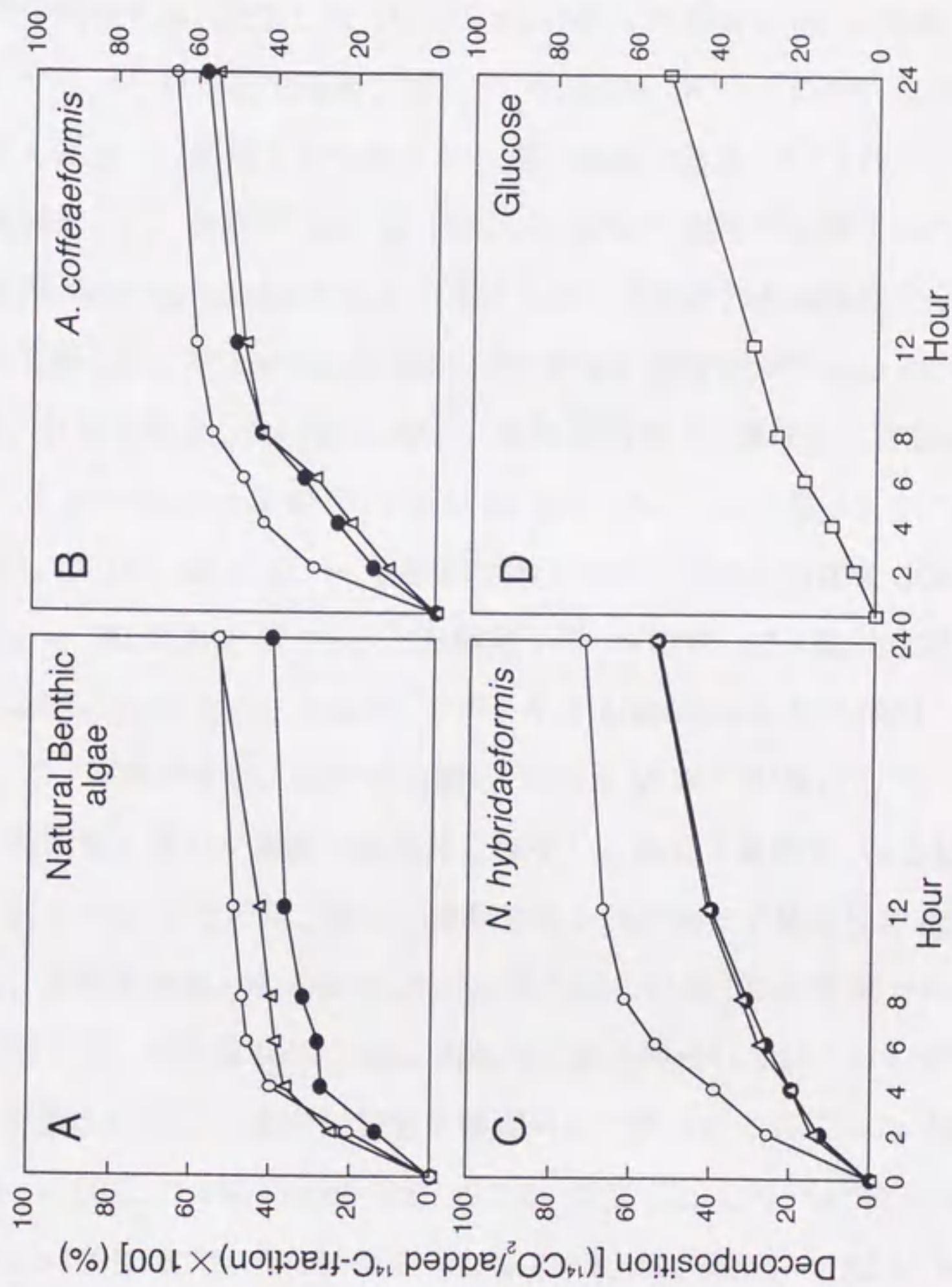


図3.6. 天然底生微小藻類群集 (A) と底生珪藻 *Amphora coffeaeformis* (B), *Nitzschia hybridaeformis* (C) から得られた各細胞外有機炭素フラクション [^{14}C -EDOC (○), ^{14}C -Colloidal-OC (●), ^{14}C -EPS (△)] として ^{14}C -グルコース (D) の底泥バクテリア群集による無機化。

した¹⁴C-EDOC, ¹⁴C-Colloidal-OC そして¹⁴C-EPS 画分は, それぞれ24時間以内に, 72%, 54%そして55%が無機化された(図3.6C)。上記の底生珪藻2種の¹⁴C-EDOC 画分は, ¹⁴C-Colloidal-OC や¹⁴C-EPS 画分と比較して, 急速に無機化され, また, 24時間以内の無機化率(発生した¹⁴CO₂のdpm/加えた基質のdpm)も高くなっていた。しかしながら, それら底生珪藻2種の¹⁴C-Colloidal-OC と¹⁴C-EPS 画分の無機化過程にはほとんど違いは観測されなかった。単一基質である¹⁴C-グルコースはほぼ一定速度で無機化され, 24時間後には, 添加した基質の53%が無機化された(図3.6D)。

底生珪藻 *Nitzschia hybridaeformis* から得られた各細胞外有機炭素フラクションの分解過程を追跡した。*N. hybridaeformis* の¹⁴C-EDOC 画分が示すdpmは, 実験開始から2時間後, 急激に減少した(図3.7A)。実験開始前(分解前)と実験後(24時間後)における*N. hybridaeformis* の¹⁴C-EDOC 画分は, 共に, 分子量5K以下のフラクションが優占していた(図3.8) — 実験開始前: >100K: 5.2%, 100K-30K: 2.0%, 30K-5K: 5.4%, <5K M.W.: 87.4%; 実験終了時: >100K: 12.4%, 100K-30K: 11.0%, 30K-5K: 2.0%, <5K M.W.: 74.6%。一方, *N. hybridaeformis* から抽出した¹⁴C-EPS 画分のdpmは, 実験開始前, 高分子量画分(>5K M.W.)が優占していたが, 実験開始から2時間後, 高分子量画分は急激に減少し, 低分子量画分(<5K M.W.)が増加した(図3.7B)。その後, 高分子量画分ならびに低分子量画分のdpmは緩やかに減少した。実験開始前, *N. hybridaeformis* から得られた¹⁴C-EPS 画分の各分子量画分の相対的割合は, 分子量100K-30Kの画分が最も優占していたけれども, 24時間後には, 分子量5K以下の画分が全分子量画分の大部分を占めていた(図3.8) — 実験開始前: >100K: 27.0%, 100K-30K: 43.2%, 30K-5K: 4.3%, <5K M.W.: 25.5%; 実験終了時: >100K: 6.7%, 100K-30K: 2.2%, 30K-5K: 2.2%, <5K M.W.: 88.9%。*N. hybridaeformis* から得られた¹⁴C-Colloidal-OC 画分は, 実験開始前, 全分子量画分における高分子画分(>5K M.W.)と低分子画分(<5K M.W.)の割合はほぼ同じであったけれども(100K: 11.9%, 100K-30K: 32.9%, 30K-5K: 6.4%, <5K M.W.: 51.2%), 実験終了時には, ¹⁴C-Colloidal-OC 画分のほとんどは低分子化されていた(100K: 1.1%, 100K-30K: 3.3%, 30K-5K: 2.2%, <5K M.W.: 93.4%) (図3.8)。

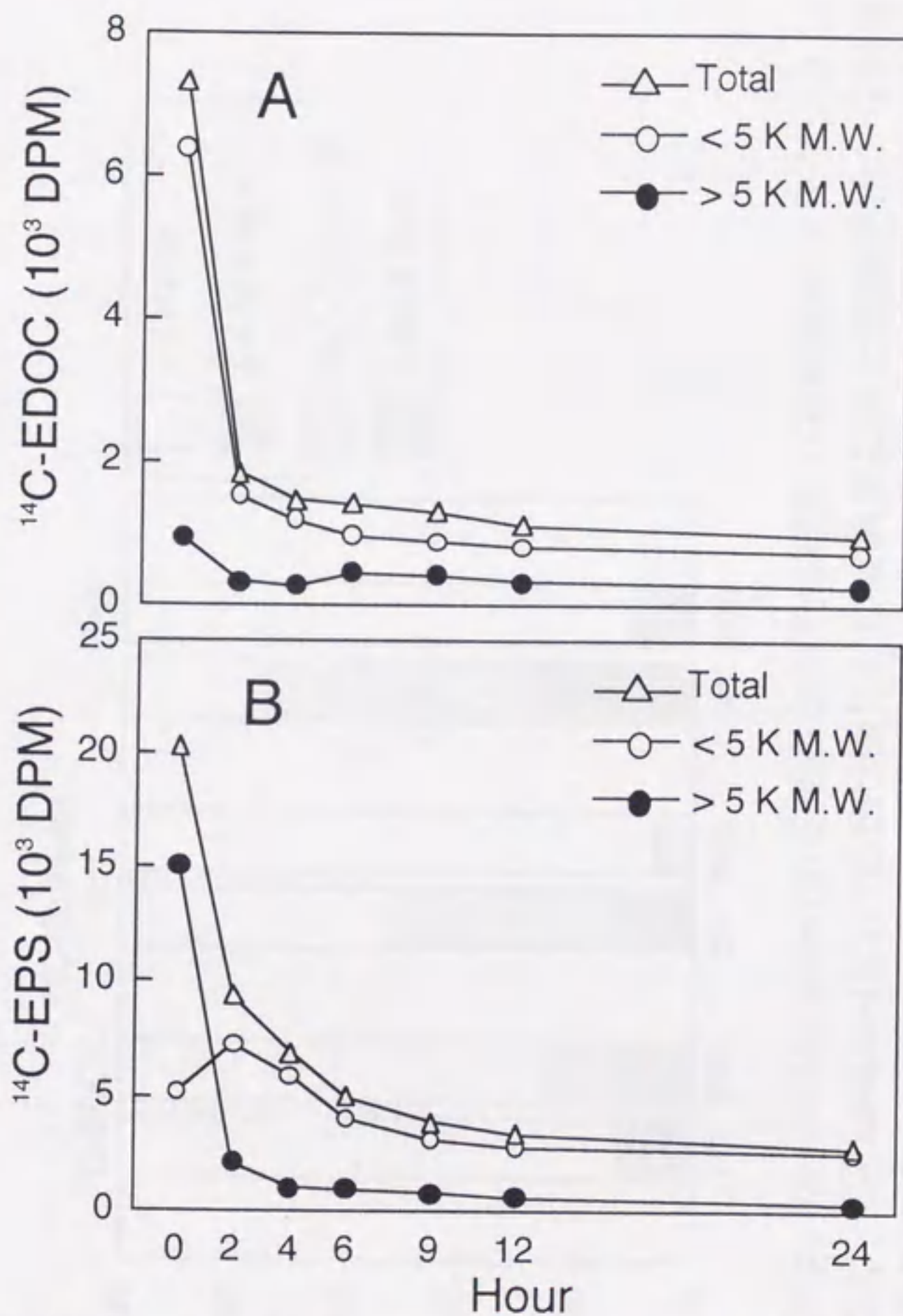


図3.7. 底生珪藻 *Nitzschia hybridiformis* から抽出された ^{14}C -EDOC (A) ならびに ^{14}C -EPS 画分 (B) における高分子量画分 (\bullet : 分子量5 K以上) と低分子量画分 (\circ : 分子量5 K以下) の分解に伴う dpm の経時変化。
 Δ : Total は全分子量画分の dpm を示す。

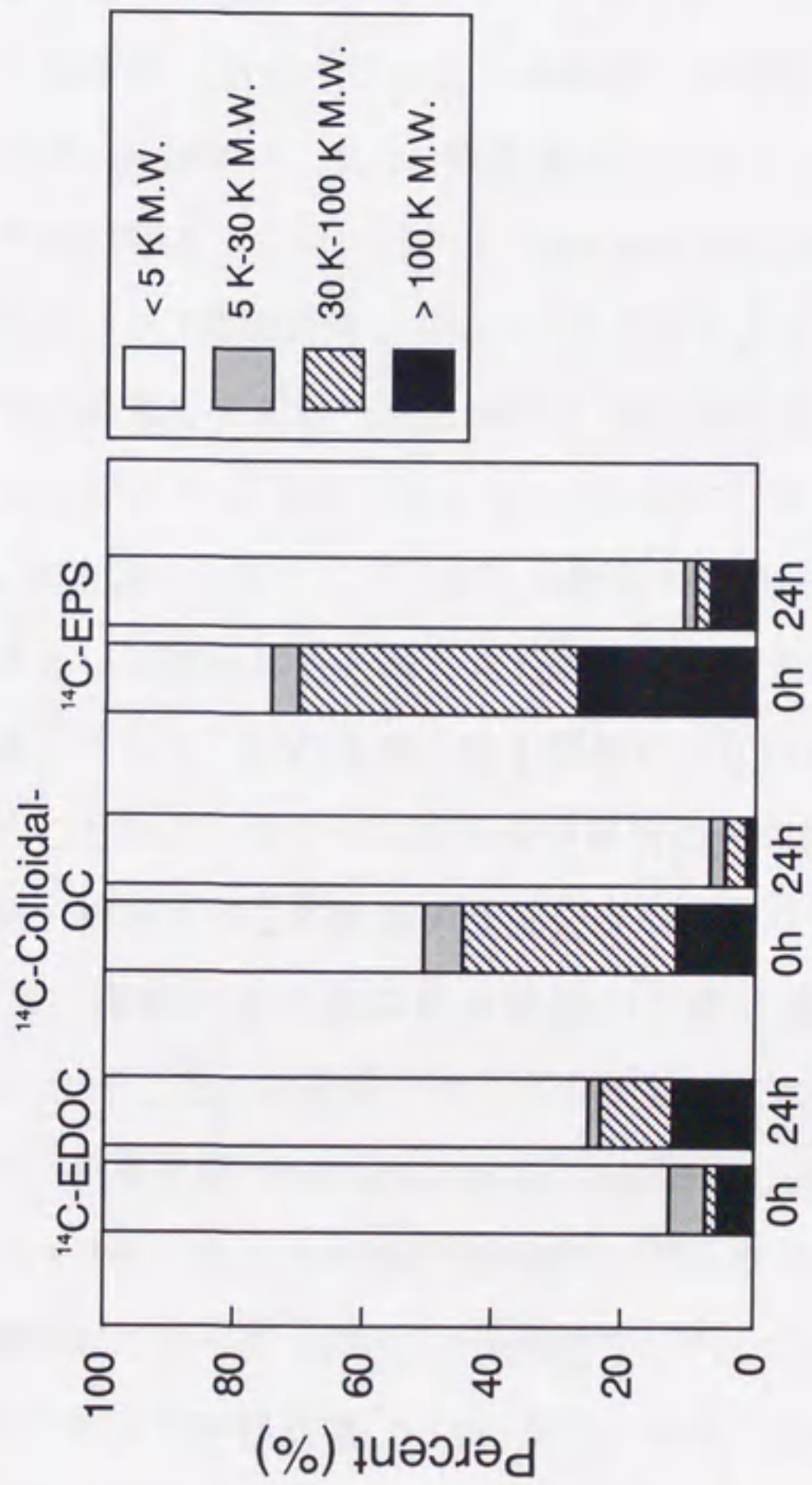


図3.8. 底生珪藻 *Nitzschia hybridaeformis* から抽出された各細胞外有機炭素フラクション (¹⁴C-EDOC, ¹⁴C-Colloidal-OC, ¹⁴C-EPS画分) の実験開始前と実験開始から24時間後の分子量組成 (> 100 K, 30 K-100 K, 5 K-30 K, < 5 K M. W.)。

3.4. 考察

3.4.1. 細胞外有機炭素の分画法

光合成反応を停止するためにホルマリンがしばしば使用される場合がある。しかしながら、多くの場合、ホルマリンによる固定は、細胞内物質の滲出を引き起こす (Carpenter and Lively, 1980)。また、極性溶媒であるホルマリンは藻類細胞から多糖類を抽出するために時として用いられる (Medcalf and Larsen, 1977)。本研究において、中性ホルマリン (最終濃度 1-3%) やグルタルアルデヒド (最終濃度 1-3%) によって底生微小藻類を固定した時の EDOC 画分の生産は、固定を行わなかった時の EDOC 画分の生産より 10 倍以上高くなった (植物プランクトンは 1.1-1.3 倍増加)。これは恐らく、固定液の添加により、細胞内物質や藻類細胞の周りを覆っている細胞外多糖が滲出あるいは溶出したと考えられる。この現象は、底生微小藻類の EDOC 生産の過大評価、そして、POC 生産の過小評価につながる。そのため、本研究では、固定液を用いることなく、速やかに光合成生産物の分画処理を行った。

藻類から分泌・排出される有機物の大部分はバクテリア群集によって速やかに取り込まれるため、藻類による溶存態有機物の生産は過小評価される恐れがある (Jensen, 1984)。そこで、本研究では、バクテリアによる溶存態有機物の取り込みを阻害するため、抗生物質 (benzylpenicillin potassium と streptomycin sulfate) を使用した。その結果、バクテリアによる溶存態有機物 (^{14}C -グルコース) の取り込みは、添加した抗生物質混液によって 96% 以上が阻害された。この結果から、本実験では、バクテリアによる溶存態有機炭素 (EDOC 画分) の取り込みは無視できるとした。高濃度の抗生物質やある種の抗生物質は藻類の光合成に影響を与えるけれども (Jensen, 1984)、本研究で使用した抗生物質とその濃度において、底生微小藻類および植物プランクトンの光合成は影響を受けていなかった。

藻類の細胞外多糖類は、2 価の金属イオン (Ca^{2+} , Mg^{2+} など) と錯体を形成しているため、その抽出の際には、キレート剤などを用いてその架橋構造を破壊する必要がある。本研究では、コロイド状有機炭素ならびに EPS の藻類細胞からの抽出を

促進させるために EDTA を使用した。しかしながら、高濃度の EDTA は細胞膜を破壊し、細胞内物質を滲出させる可能性がある (Cheng *et al.*, 1970)。Platt *et al.* (1985) と Decho and Moriarty (1990) は、それぞれ、10 mM と 40 mM の EDTA 溶液でバクテリアの細胞外多糖類 (莢膜多糖) を抽出した。その結果、10 mM と 40 mM の EDTA 溶液で抽出された細胞外多糖中に、それぞれ、3.3% と 4.1% の細胞内物質の混入があったと指摘した。Underwood and Paterson (1995) は、100 mM の EDTA 溶液を使って、さまざまな微生物群集 (バクテリア、藍藻、珪藻) が生息する干潟底泥から EPS を含む細胞外コロイド状有機物を抽出した。そして、彼らは、抽出した EPS の大部分がウロン酸であったことなどから (細菌莢膜や藻類の細胞外多糖類に多く含まれる成分)、100 mM までの EDTA 溶液ならば、底生微生物の細胞内物質が滲出することは、ほとんどないだろうと推測した。しかしながら、底生珪藻に対して、そのような細胞内物質の混入を直接的に測定 (例えば、細胞内酵素の測定) した研究報告はない。そこで、本研究では、藻類細胞 (POC 画分) を超音波破碎装置で破壊して得られた画分と 4 mM EDTA で細胞外有機物を抽出した画分 (Collidal-OC 画分) のグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) の活性およびそれら蛋白質濃度を測定した [G6PD は細胞質成分の指標として考えられている (Li and McClure, 1989)]。その実験に対して *Amphora coffeaefomis* と *Nitzschia hybridaeformis* を用いた結果、Colloidal-OC 画分の G6PD 活性と蛋白質濃度は共に、POC 画分のそれらの 1% 以下であった。つまり、本研究で使用した EDTA の濃度においては、細胞内物質の細胞外有機物フラクションへの混入は、ほとんど皆無であったと考えられる。

3.4.2. 各成長相における細胞外有機炭素の生産

藻類による細胞外有機物の分泌量は成長相の移行に伴って変動し、一般的に、栄養塩制限が起こる対数期後期から定常期において、藻類は最も細胞外有機物を生産すると考えられている。Sharp (1977) は、対数増殖期における健康な藻類は光合成

によって固定した炭素をほとんど細胞外に放出しないが、定常期から死滅期にある藻類は多量の有機物を細胞外に排出すると報告している。また、Myklestad *et al.* (1989) は、対数増殖期にある海産珪藻 *Chaetoceros affinis* は全有機物生産の 10% に相当する有機物を細胞外に分泌するが、定常期にある *C. affinis* の細胞外有機物生産は全一次生産の 58% にも達すると報告している。本研究において、底生微小藻類の ^{14}C -TEOC/TPP 比は対数増殖期 (22.4%) から定常期 (51.3%) にかけて増加しており、遷移期において TEOC の生産が最も高くなった (図 3.2, 図 3.3)。細胞外多糖類もまた、栄養塩制限が生じる対数期後期から定常期にかけて、その生産が最も盛んに行われると考えられている (Myklestad *et al.*, 1972)。本研究において、底生微小藻類 (*Nitzschia hybridaeformis*) と植物プランクトン (*Thalassiosira weissflogii*) の ^{14}C -EPS/ ^{14}C -Colloidal-OC 比は遷移期において最も高くなり、また、 ^{14}C -EPS ならびに ^{14}C -Colloidal-OC の生産が最大になった (図 3.2, 図 3.3)。これらの結果に基づいて、本研究では、遷移期にある底生微小藻類と植物プランクトンを光合成生産物の分画実験に使用した。

3.4.3. 細胞外有機炭素の生産

光合成生産物の分画実験において、底生微小藻類群集と植物プランクトン群集には明瞭な違いが観察された (図 3.5)。つまり、底生微小藻類群集の ^{14}C -Colloidal-OC/TPP 比と ^{14}C -EPS/ ^{14}C -Colloidal-OC 比は、植物プランクトン群集のそれらの比と比較して数倍高くなっていた。また、各成長相におけるそれぞれのフラクション (POC, EDOC, Colloidal-OC, EPS 画分) が示す炭水化物濃度は、底生微小藻類による細胞外有機物の生産が植物プランクトンによる細胞外有機物の生産よりもかなり高いことを示していた (図 3.2)。Smith and Underwood (1998) はキレート剤である EDTA を使用することなく、遠心分離だけで干潟の付着珪藻細胞から EPS を含むコロイド状有機物を抽出し、全一次生産に対するコロイド状有機炭素と EPS の割合を

調べた（各フラクションを ^{14}C で標識してそれらの割合を評価）。そして、彼らは、コロイド状有機炭素と EPS（70%エタノール中で沈澱した成分）は、それぞれ、光合成によって固定された炭素の 8.0-10.9%と 0.8-1.0%であると評価した。しかしながら、これらの値は、先に述べた理由（3.4.1. 参照）により過小評価になっている可能性がある。本研究においては、底生微小藻類群集の TPP に対する ^{14}C -Colloidal-OC 画分と ^{14}C -EPS 画分の割合は、それぞれ、平均 38.9%と平均 16.1%（ ^{14}C -EPS/ ^{14}C -Colloidal-OC：平均 41.3%）となっていた（図 3.5）。

Chapman and Rae (1969) は底生微小藻類による細胞外有機物（本研究における EDOC 画分に相当する）の生産は全一次生産の 1-3%と見積もっている。植物プランクトンによる細胞外有機物の排出に関してはこれまで数多くの研究が行われてきており、植物プランクトンによる細胞外有機物生産は、一般的に、全光合成生産物の 5-35%の範囲である（Larsson and Hagström, 1979）。本研究において、底生微小藻類と植物プランクトンの TPP における EDOC 画分の割合はほぼ同じで、これまでの研究報告と比較して適当な値であった。

本研究において、底生珪藻 2 種（*Nitzschia longissima*, *Nitzschia hybridaeformis*）の TPP に対する各フラクションの割合は、底生微小藻類群集におけるそれらの割合とほぼ同じであった（図 3.4, 図 3.5）。しかしながら、*Amphora coffeaeformis* の ^{14}C -Colloidal-OC/TPP 比は 70%に達していた。*A. coffeaeformis* は蓋殻上の粘液孔あるいは縦溝から EPS を含んだ粘性物質を分泌することによって自身の細胞周囲に粘液質の膜を作り出す（Daniel *et al.*, 1980）。そして、この粘着膜は非常に強い付着力を有する（Kawamura and Hirano, 1992）。つまり、*A. coffeaeformis* は基質に強く付着するために、大量の粘液、つまり EPS を含むコロイド状有機物を分泌していると考えられる。

全一次生産における細胞外有機物生産の割合は、藻類の綱や種によって異なる（Nalewajko, 1966）。本研究の植物プランクトンに対する分画実験において、珪藻 2 種とその他の 2 種の間には違いが見られた（図 3.4）。つまり、真正眼点藻の *Nannochloropsis oculata* とプラシノ藻の *Tetraselmis* sp. の ^{14}C -POC 画分は TPP の 95%以上を占めていたけれども、珪藻 2 種、*Thalassiosira weissflogii* と *Chaetoceros decipiens* の

TPP に対する ^{14}C -POC 画分の割合は、それぞれ、85.1%と 78.5%であった。これらの結果は、珪藻が EPS を含む細胞外有機物をより多量に生産する網の 1 つであることを示している。

3. 4. 4. バクテリアによる細胞外有機炭素の酵素的分解と無機化

従来の知見では一般的に、微小藻類によって分泌される細胞外有機物の大部分は易分解性の溶存態有機物であり、従属栄養バクテリア群集によって速やかに利用されるとされている (Bell, 1983; Jensen, 1983; Rieman and Søndergaard, 1986)。例えば、細胞外有機物に含まれるアミノ酸やグルコースのような基質は、時に、 1 d^{-1} に近い回転速度を示し、藻類による生産・分泌とそれに続くバクテリアによる消費のずれはわずか数時間しかない (Iturriaga and Hoppe, 1977)。本研究において、天然底生微小藻類群集と底生珪藻 2 種から得られた各細胞外有機炭素フラクション (^{14}C -EDOC, ^{14}C -Colloidal-OC, ^{14}C -EPS 画分) は、24 時間以内に、添加した基質の 50%以上が無機化された (図 3. 6A・B・C)。バクテリアの同化効率が 0.1-0.4 の間にあると仮定すると (Smith *et al.*, 1995), ^{14}C -EDOC, ^{14}C -Colloidal-OC そして ^{14}C -EPS 画分のほとんどは、干潟底泥中のバクテリア群集によって利用されていたと解釈できる。前章において、底生微小藻類は固定した炭素の 42-73%を細胞外に分泌し、その細胞外有機物の大部分が EPS (^{14}C -EPS 画分) を 41-53%含むコロイド状有機炭素 (^{14}C -colloidal-OC 画分) であることを示した。つまり、底生微小藻類によって大量に生産・分泌される細胞外有機物は、底泥中のバクテリア群集の好適な有機基質源として大きく寄与していると考えられる。

バクテリアによる溶存態有機物の取り込み速度ならびに無機化速度はバクテリアが利用する基質 (C/N 比や化学的組成) に依存して変動する (Hobbie and Crawford, 1996; Rieman and Søndergaard, 1986)。本研究において、底生微小藻類群集と底生珪藻 2 種から抽出した ^{14}C -EDOC 画分は、 ^{14}C -Colloidal-OC 画分や ^{14}C -EPS 画分より急速に無機化されていた (図 3. 6A・B・C)。また、底生珪藻 *Nitzschia hybridiformis*

から抽出したそれら3つの細胞外有機炭素フラクションの分子量組成を調べた結果、生産された ^{14}C -EDOC画分のほとんどは低分子量画分(<5 K M.W.)であった。これに対して、 ^{14}C -Colloidal-OCと ^{14}C -EPS画分は、高分子量画分(>5 K M.W.)が優占していた(図3.8)。溶存遊離した低分子化合物は、バクテリアによって直接取り込まれるけれども、高分子化合物は一旦バクテリア由来の細胞外酵素によって低分子化された後、バクテリアによって取り込まれ、利用される(Chróst, 1990, 1991; Jensen, 1983)。つまり、藻類から分泌される有機基質の分解性が、細胞外有機物の生産とバクテリアによる消費の時間的ずれを生じさせる。このような観点から、本研究において、主に低分子化合物からなる ^{14}C -EDOC画分はバクテリアによって速やかに同化・無機化されていたけれども、高分子化合物をより多く含有する ^{14}C -Colloidal-OCと ^{14}C -EPS画分は酵素的分解を経た後、バクテリアによって利用されていたと考えられる。この解釈は、本研究で得られた次の結果からも支持される(図3.7A・B)：*Nitzschia hybridaeformis*の ^{14}C -EPS画分を添加した反応溶液中のTotal dpmは、実験開始から2時間後、始めに添加したdpmの54%へと減少していたが、 ^{14}C -EDOC画分のdpmは、その時、24%にまで減少していた。

底生珪藻*Nitzschia hybridaeformis*から採取された ^{14}C -Colloidal-OCと ^{14}C -EPS画分の高分子量画分(>5 K M.W.)は実験開始から24時間後、それぞれ、50.9%から6.6%と74.5%から11.1%へ減少した(図3.8)。これは、バクテリア由来の細胞外酵素によって高分子化合物が酵素的分解を受けたためと考えられる(Arnosti, 1995; Chróst and Riemann, 1994)。 ^{14}C -EPS画分の酵素的分解過程、高分子化合物から低分子化合物への変換、は ^{14}C -EPS画分を添加した反応溶液中における高分子量画分(>5 K M.W.)と低分子量画分(<5 K M.W.)のdpmの経時変化からもまた説明できる(図3.7B)：実験開始から2時間後、高分子量画分のdpmが急激に減少した時、低分子量画分のdpmが増加した。この結果は、バクテリア群集による低分子化合物の直接的な消費よりも、高分子化合物の酵素的分解、つまり、低分子化合物の生成が上回っていたことを示唆している。

3.4.5. 細胞外有機物の生態学的役割

底生珪藻が分泌する EPS には、これまで数多くの役割や機能が提唱されてきたけれども (Hoagland *et al.*, 1993), 実証データを有し、かつ、十分に支持された EPS の役割としては、運動性、付着性、抗菌性、群体形成作用などがある。その中でも干潟生態系に対する役割として特に重要なのが、従属栄養生物の有機物源としての役割、そして、干潟土壌の安定性に果たす役割である。

本研究で定義した Colloidal-OC 画分には多糖類 (EPS) の他に、低分子化合物の遊離アミノ酸や遊離グルコースが含まれており (Decho, 1990), それら易分解性有機物はバクテリアによって速やかに取り込まれる (Münster and Chróst, 1990)。また、高分子化合物からなる浮遊性珪藻の粘液層 (本研究の Colloidal-OC や EPS 画分に相当) はバクテリアによって分泌される細胞外酵素 (グルコシダーゼやプロテアーゼ) によって加水分解され、低分子化された後、バクテリア群集に利用される (Smith *et al.*, 1995)。底生食物網において、EPS はバクテリアだけでなくメイオ・マクロベントスに対する潜在的な食料源としての役割も有する (Decho, 1990)。これは、EPS が溶存態有機物 (アミノ酸や必須脂肪酸) あるいは微量金属イオン (Ca^{2+} や Mg^{2+}) を吸着することによって、EPS 自身の栄養価をさらに高めることに起因している。本研究の結果および上記の文献的知見から、底生微小藻類によって生産される多量の細胞外有機物は、干潟生態系において、従属栄養生物の有機物源として大きく寄与していると考えられる。

また、底生珪藻によって分泌される粘着性の EPS は干潟土壌の安定化に対して重要な役割を果たしている (Yallop *et al.*, 1994)。そのため、底泥における EPS 濃度は粘着性土壌の“生物による安定化” (biostabilization) のレベルを示す指標として使われてきた (Underwood and Paterson, 1993a; Underwood and Smith, 1998)。Underwood and Paterson (1995) は、塩水で抽出した EPS は、底泥中の全コロイド状炭水化物濃度の一定の割合 (約 25%) を占め、そして、その全コロイド状炭水化物濃度は底泥中のクロロフィル α 濃度と線形関係にあることを示した。その研究結果に基づいて、彼らは全コロイド状炭水化物濃度から土壌の安定性のレベルを評価した。しかしなが

ら、本研究において、底生微小藻類による EPS の生産は、そのクロロフィル a 濃度よりむしろ、その成長相に依存していた (図 3.2)。この結果は、EPS 生産に関わる土壌の安定性のレベルはクロロフィル a 濃度だけで評価ができるものではなく、底生珪藻群落の生理学的状態にも依存して変化することを意味している。このような観点から、干潟底泥の安定性は底生珪藻による EPS 生産の変動と共に、日周的かつ季節的に変動すると考えられる。

3.5. 結論

本研究の目的は、浅水域における底生微小藻類と植物プランクトンによる光合成生産物を、各フラクション [粒状態有機炭素 (POC), 細胞外溶存態有機炭素 (EDOC), コロイド状有機炭素 (Colloidal-OC), 細胞外多糖類 (EPS)] に分画し、全一次生産 (TPP) に占めるそれらの割合を評価することであった。さらに、底生微小藻類によって生産・分泌される各細胞外有機炭素フラクション (EDOC, Colloidal-OC, EPS) のバクテリアによる利用ならびにそれら各細胞外有機炭素フラクションの分解過程の解明を目的とした。その結果、以下に示す底生微小藻類および植物プランクトンの細胞外有機物生産に関する知見が得られた。

- (1) 底生微小藻類 (*Nitzschia hybridaeformis*) による Colloidal-OC 画分ならびに EPS 画分の生産は、遷移期において盛んになった。またこの時、Colloidal-OC/TPP 比ならびに EPS/Colloidal-OC 比は最大になった。
- (2) 天然藻類群集において、底生微小藻類の TPP に占める細胞外有機物生産の割合 ($42.6 \pm 3.7\%$: EDOC: $3.7 \pm 0.5\%$, Colloidal-OC: $38.9 \pm 3.3\%$) は植物プランクトンのその割合 ($16.4 \pm 1.8\%$: EDOC: $3.5 \pm 0.5\%$, Colloidal-OC: $12.9 \pm 2.8\%$) より高かった。このような TPP に対する細胞外有機物生産の割合は底生珪藻 3 種と

植物プランクトン 4 種の培養株に対しても確認された。この結果から、底生微小藻類による細胞外有機物の生産はこれまで過小評価されてきたことが明らかとなった。

- (3) 天然群集と培養種において、底生微小藻類の EPS/Colloidal-OC 比 ($44.9 \pm 5.7\%$) は、植物プランクトンが示したその比 ($9.9 \pm 8.1\%$) よりも高かった。以上の結果から、底生微小藻類によって大量に分泌される EPS を含む細胞外有機物は干潟生態系において多くの重要な役割を果たしていると考えられる。
- (4) 植物プランクトンの珪藻 2 種 (*Thalassiosira weissflogii* と *Chaetoceros decipiens*) の POC/TPP 比は、その他の 2 種 (真正眼点藻 *Nannochloropsis oculata* とプラシノ藻 *Tetraselmis* sp.) より高かった。この結果は、珪藻が EPS を含む細胞外有機物をより多量に生産する網の 1 つであることを示している。
- (5) 天然底生微小藻類群集ならびに培養底生珪藻 2 種 (*Amphora coffeaeformis*, *Nitzschia hybridaeformis*) によって生産された各細胞外有機炭素フラクション (EDOC, Colloidal-OC, EPS) のほとんどは一色干潟底泥中の従属栄養細菌によって利用されていることが明らかとなった。
- (6) EDOC 画分は Colloidal-OC や EPS 画分よりも急速に無機化された。この結果は、主に低分子化合物からなる EDOC 画分は細菌によって直接取り込まれ、そして無機化されるけれども、主に高分子化合物からなる Colloidal-OC と EPS 画分は細菌由来の細胞外加水分解酵素によって一旦低分子化された後底生性細菌群集によって利用されることを示唆している。

以上のことから、底生微小藻類は光合成によって固定した炭素の約 40-70% を高分子量の有機物として細胞外に分泌し、その細胞外有機物は干潟底泥中の細菌群集によって速やかに酵素的分解を受け、利用されていると結論づけられる。

第4章 総合考察

本論の主題は、干潟生態系における底生微小藻類の一次生産者としての役割を、干潟水柱の植物プランクトンと比較しながら、評価することであった。特に、干潟生態系の炭素フラックスに対する底生微小藻類の細胞外有機物の寄与に関して焦点を絞り、本研究を進めた。その結果、従来の浮遊系の溶存態有機物を介した微生物ループとは異なる底生系独自の炭素フラックスが明らかとなった。

底生微小藻類は、増殖速度は低いけれども、その豊富な生物量と潮間帯環境に巧みに適応する能力により、干潟の一次生産に大きく寄与していた(第2章)。特に、植物プランクトンの生産が減少する冬季において、底生微小藻類は干潟生態系の従属栄養生物の有機物供給源として重要な役割を果たしていると考えられる。そして、底生微小藻類の大部分を占める羽状目珪藻は、光合成により固定した炭素の42-72%を細胞外に分泌し、その細胞外有機物のほとんどが ^{14}C -EPS画分を41-53%含む ^{14}C -Colloidal-OC画分であった(第3章)。一方、植物プランクトンの細胞外有機物生産/全一次生産比は1.5-22%の範囲にあり、細胞外有機物に占める高分子フラクション(^{14}C -Colloidal-OCと ^{14}C -EPS画分)の割合は底生珪藻と比較して低かった。これらの結果は、底生微小藻類による細胞外有機物生産がこれまで過小評価されてきたことを明示し、腐食連鎖網の重要性を示唆するものであった。そこで、底生微小藻類によって生産・分泌される細胞外有機物のバクテリアによる生分解過程を評価した。その結果、天然底生微小藻類群集ならびに底生珪藻の単離種から抽出した各細胞外有機炭素フラクション(^{14}C -EODC, ^{14}C -Colloidal-OC, ^{14}C -EPS)のほとんどは、底泥中のバクテリア群集によって利用された。この時、主に高分子化合物からなる ^{14}C -Colloidal-OCと ^{14}C -EPS画分はバクテリア由来の細胞外加水分解酵素によって一旦低分子化された後、底生性バクテリア群集に取り込まれていたと考えられる。

一色干潟現場データから、底生微小藻類と植物プランクトンの一次生産速度はほぼ同じであったが、細胞外酵素活性(β - \cdot - α -glucosidase activity)は海水中よりも底泥中において高いことが示された(第2章)。この結果から、底生系では、酵素的分解の仲介を経た細胞外分泌有機物の微生物ループを通じた炭素フラックスが、浮遊

系と比較して、かなり大きいと考えられる。ここでは次に、このような観点に基づいて、干潟底生系ならびに浮遊系における微小藻類からバクテリアへの炭素フラックスをいくらかの仮定をふまえて評価する。以下に示す各パラメータの値はこれまで一色干潟で行われた研究結果に基づいて決定した。

(1) 一次生産

底生微小藻類：14.9 mg C m⁻² h⁻¹，植物プランクトン：15.8 mg C m⁻² h⁻¹

底生微小藻類ならびに植物プランクトン（干潟の水深を1 mと仮定）の一次生産速度は1999年5月大潮時における測定値〔平均値，第2章 2.3.2(c)〕を用いた（測定条件：疑似現場水温，一定光強度250 μE m⁻² s⁻¹）。1998年11月大潮時に測定した消散係数1.4 m⁻¹と入射光強度1200 μE m⁻² s⁻¹を与えると，光強度250 μE m⁻² s⁻¹は水深1.1 mにおける底泥表面の光強度に相当する〔第2章 2.3.2.(b)〕。この水深1.1 mは一色干潟の平均的な水深であることから，ここで用いた底生微小藻類と植物プランクトンの一次生産速度は現場日中の平均的な値を反映していると考えられる。

(2) 細胞外有機物生産/全一次生産比

底生微小藻類：42.6%，植物プランクトン：16.4%

底生微小藻類ならびに植物プランクトンの細胞外有機物生産/全一次生産比は底泥と海水中の天然藻類群集に対する分画実験で得られた平均値（第3章 3.3.3）を用いた（測定条件：20℃，一定光強度200 μE m⁻² s⁻¹）。ただし，これらの比は藻類群集の生理学的な状態〔光強度（Smith and Underwood, 1998），成長相（第3章 3.3.1）〕によって変化する。底生微小藻類の細胞外有機物生産は暗条件下あるいは低い光強度（~200 μE m⁻² s⁻¹）で増加し，その時，細胞外有機物に占める高分子ポリマー（EPS画分）の割合が増加する（Smith and Underwood, 1998）。対照的に，植物プランクト

ンの細胞外有機物生産は高い光強度、貧栄養条件下で最も盛んになる (Fogg, 1983; Decho, 1990)。今後、光環境が細胞外有機物の成分組成に及ぼす影響を明らかにし、干潟環境における光-細胞外有機物生産間に存在する生態学的意味を明らかにする必要がある。

(3) 全グルコシダーゼ活性 (β -グルコシダーゼと α -グルコシダーゼ活性の和)

底泥中: $17 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, 海水中: $2.3 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$

底泥中 (底泥表層 0-1cm) ならびに海水中 (水深 1 m) の全グルコシダーゼ活性は 1999 年 5 月の大潮時における測定値 [平均値, 第 2 章 2.3.2. (c)] を炭素換算した。この全グルコシダーゼ活性は、加水分解によって人工基質から分離するグルコース (C_6 : hexose) の遊離速度 ($\text{mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) であり, Lineweaver-Burk プロットの直線式から算出した最大酵素活性を示している。表 4. 1. に, さまざまな水域の底泥および水中における β - α -グルコシダーゼ活性 (人工蛍光基質法によって測定された V_{max}) を示す。底泥中の β - α -グルコシダーゼ活性は水域によってかなり異なり, 広範囲の数値が報告されているが, 一般的には, 沿岸域で高い傾向にある。本研究で得られた測定値はこれまで報告されてきた文献値の範囲内にある。これらの活性は, slurry 法または Intact core 法によって測定されるが, 本研究で用いた slurry 法による測定値は Intact core 法 [Meyer-Reil (1986)] による測定値よりも高い値 (潜在的酵素活性) を示していると考えられる。

本測定で使用した人工蛍光基質は MUF と単糖 (グルコース) からなる二量体であるため, 3 次構造を持った天然マトリックス多糖の生分解速度を精確に示す代用基質とはなりえない。また, 人工合成基質は目的の天然基質に対する酵素以外の酵素の基質になること, そして, MUF の励起波長 (365 nm) と最大蛍光波長 (455 nm) は天然 DOC の励起波長 (350 nm) と最大蛍光波長 (450 nm) に近いことが, 測定誤差を引き起こす。このように人工蛍光基質を用いた細胞外酵素活性の測定には多くの問題があるため, その結果の解釈には注意する必要がある。そこで, 現在では, 蛍光ラ

表4. 1. 底泥および水中における β - α -グルコシダーゼ活性[範囲 (平均), 人工蛍光基質法によって測定された V_{max}]の比較。底泥中の β - α -グルコシダーゼ活性は底泥表層0-1 cmで規格化した値。

Location	β -glucosidase activity ($\mu\text{mol MUF m}^{-2} \text{h}^{-1}$)	α -glucosidase activity ($\mu\text{mol MUF m}^{-2} \text{h}^{-1}$)	References
In sediment			
Continental slope			Poremba and Hoppe (1995)
depth 135 m	6.8	1.2	
depth 580 m	4.2	0.8	
depth 1216 m	1.7	0.2	
Coastal sea (depth 18 m)	5.6-83*		Meyer-Reil (1986)
Intertidal zone	13920		King (1986)
Intertidal flats	29.7-306 (151)	19.8-176 (85.0)	This study
In water			
Reservoir	2.0-7.9	0.7-5.0	Vrba et al. (1992)
Eutrophic lake	1.37-8.47		Chrøst et al. (1989)
Coastal sea	0.75-3.35 (1.92)	0.16-0.91 (0.48)	Karner and Rassoulzadegan (1995)
Coastal mesocosms			Chrøst and Riemann (1994)
Calm	28 \pm 4		
After storm	117 \pm 8		
Coastal mesocosms	1.3-19.4	1.0-11.9	Smith et al. (1995)
Intertidal flats	27.5	4.0	This study

*Intact sediment core

ベル多糖 (fluorescently labeled polysaccharide: FLA, 例えば, FLA-pullulan, FLA-laminarin, FLA-xylan) を用いた研究が増加しつつある (Arnosti, 1995, 1998)。

(4) バクテリア生産

底生性バクテリア: $5.1-9.1 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, 浮遊性バクテリア: $1.7-3.0 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$

底泥中 (底泥表層 0-1cm) ならびに海水中 (水深 1 m) のバクテリア生産速度はトリチウムで標識したチミジン ($^3\text{H-TdR}$) のバクテリア DNA 中への同化速度 (平均値) から評価した (Fuhrman and Azam, 1980)。試料の採取は 1999 年 5 月の大潮時に行った (底泥 12 地点, 海水 1 地点, データは本論で示していない)。 $^3\text{H-TdR}$ の取り込みからバクテリアの生産速度への変換は次の係数を用いて算出した—チミジンの取り込みとバクテリア増殖の変換係数: $2 \times 10^9 \text{ cells nmol}^{-1}$ (Fuhrman and Azam, 1982; Moriaty, 1986), 平均細胞体積: $0.159 \mu\text{m}^3$ (底生性バクテリア), $0.088 \mu\text{m}^3$ (浮遊性バクテリア) (Imai, 1987), 炭素量変換係数: $105-186 \text{ fg C } \mu\text{m}^{-3}$ (表 4.4 参照)。チミジンの取り込みからバクテリア生産速度への変換係数は一般的に $1-4 \times 10^9 \text{ cells nmol}^{-1}$ の範囲で報告されているが (表 4.2), 本研究ではその中でも最も平均的な値とされている $2 \times 10^9 \text{ cells nmol}^{-1}$ (Ducklow and Carlson, 1992) の値を使用した。底生性と浮遊性バクテリアの平均細胞体積は, それぞれ, 概ね $0.1-0.2 \mu\text{m}^3$ と $0.01-0.15 \mu\text{m}^3$ の範囲にあるようである (表 4.3)。本研究では, 山口県大海湾の干潟における底生性と浮遊性バクテリアの平均細胞体積を使用した (Imai, 1987)。炭素量変換係数はかなりの広範囲で報告されている (表 4.4)。しかし, 平均的には $100-200 \text{ fg C } \mu\text{m}^{-3}$ の範囲にあるので, 本研究ではその変動範囲で報告されている平均値 ($105-186 \text{ fg C } \mu\text{m}^{-3}$) を使用し, 幅を持たせてバクテリア生産速度を算出した。これらの変換係数を用いて算出したバクテリア生産速度はこれまで報告されてきた文献値 [底生性バクテリア: $< 0.1-213 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ (底泥表層 0-1 cm), 浮遊性バクテリア: $< 0.1-135 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$] の範囲内である (表 4.5)。しかしながら, チミジン法によるバクテリア生産速度の測定は非常に多くの仮説からなり, さまざまな問題が指摘されている (Bell, 1993; Findlay,

表4.2. チミジンの取り込み速度からバクテリア生産速度への変換係数 [範囲 (平均)]

Location	Thymidine conversion factors	
	(10^9 cells nmol ⁻¹)	References
Coastal sea	1.7-2.4	Fuhman and Azam (1982)
Eutrophic lake	1.9-2.2 (2.0)	Bell et al. (1983)
Estuary	1.7-4.0 (2.5)	Austio (1990)
Coastal sea	0.3-2.7 (1.1)	Riemann et al. (1987)
Marine*	2.0	Ducklow and Carlson (1992)

*The average of 97 marine studies

表4.3. 底生性および浮遊性バクテリアの平均細胞体積 [範囲 (平均)]

Location	Cell volume (μ m ³)		References
	Benthic bacteria	Pelagic bacteria	
Intertidal flat	0.13-0.14		Cammen and Walker (1986)
Freshwater littoral zone	0.103-0.162 (0.135)		Starink et al. (1996)
Fjord		0.015-0.146 (0.060)	Rieman et al. (1984)
Marsh	0.18	0.06	Rublee et al. (1983)
Intertidal flat	0.105-0.226 (0.159)	0.083-0.091 (0.088)	Imai (1987)

表4.4. さまざまな水域における炭素量変換係数 [範囲 (平均)]

Location	Carbon conversion factors	
	(fg C μ m ⁻³)	References
Coastal sea	121	Watson et al. (1977)
Estuary	178-728 (351)	Bjornsen (1986)
Marine	84-353 (186)	Kogure (1987)
Freshwater lake	59-207 (154)	Scavia and Laird (1987)
Freshwater lake	59-252 (136)	Nagata (1990)
Freshwater and marine*	105 ± 26	Theil-Nielsen and Søndergaard (1998)
Freshwater lake	39-188 (106)	Nagata (1986)

*5092 cells の平均値 ± SD

表4.5. 底生性および浮遊性バクテリア生産速度の比較 [範囲 (平均)]

Location	Depth (cm)	Bacterial production (mg C m ⁻³ h ⁻¹)	Bacterial production (normalized to 1 cm)	Reference
In sediment				
Tropical mangrove system	0-2	8.3-213 (66.7)	4.2-107 (33.4)	Alongi (1988)
Fresh water littoral	0-1		0.6-8.5 (2.6)	Starink et al. (1996)
Blakish water river	0-1		0.1-22.1 (2.1)	Findlay et al. (1986)
Marsh	0-1		1.8-2.8	Austin and Findlay (1989)
Coastal sea				
0.25 km off	0-25	33.8	1.4	Fallon et al. (1983)
6 km off		13.8	0.6	
15 km off		4.2	0.2	
Coastal sea	0-0.5	0.8-6.0 (3.4)	1.7-11.9 (6.9)	van Duyl et al. (1993)
Coaral reef flat	0-0.4	0.8-15.4 (6.3)	2.0-38.5 (15.9)	Moriarty et al. (1985)
Intertidal sandy flats				van Duyl and Kop (1990)
Balgzand	0-0.3	<0.1-65 (16.3)	0.1-216 (54.1)	
Scheurrak Omdraai		<0.1-3.8 (1.4)	0.1-12.8 (4.6)	
Oost Meep		<0.1-1.8 (1.3)	0.1-6.1 (4.2)	
Intertidal flat	0-1		4.3-8.2 (6.1)	This study
In water				
Tidal creeks		(mg C m ⁻³ h ⁻¹)		
River estuary		2.0-135 (26.6)		MacMillin et al. (1992)
Coastal sea		0.8-3.6 (2.2)		Crump and Baross (1996)
Coastal sea		0.3-0.6 (0.5)		Leakey et al. (1996)
Canada		0.3-3.0		Fuhrman and Azam (1980)
California		<0.1-2.2		
Intertidal flat		3.7		This study

1993)。また、上記の変換係数は対象とする系によって大きく異なるため、これらの変換係数の取り方とその結果の解釈には注意を要する。

上記で決定した底生系と浮遊系における一次生産、バクテリア生産そして全グルコシダーゼ活性を比較した(図 4.1)。底生微小藻類と植物プランクトンの一次生産速度はほぼ同じレベルであったが、バクテリア生産は海水中より底泥中において高くなった(図 4.1)。特に、全グルコシダーゼ活性は底泥中において顕著に高く、全グルコシダーゼ/一次生産比は 166%となっていた(海水:14%)。

続いて、底生系と浮遊系における微小藻類からバクテリアへの炭素フラックスを評価した(図 4.2)。先の仮定から底生微小藻類と植物プランクトンの細胞外有機炭素生産は、それぞれ、 $6.3 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ と $2.6 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ となる。天然底生微小藻類群集と底生珪藻 2 種の各細胞外有機炭素フラクションは、24 時間以内に添加した基質の 50%以上が無機化された(3章 3.3.4)。この時バクテリアの同化効率を 0.1-0.4 の間(Smith *et al.*, 1995)にあると仮定すると、底生微小藻類由来の細胞外有機物のほとんどがバクテリアによって利用可能と考えられる。また、植物プランクトンの細胞外分泌有機物の大部分は易分解性有機物であることから、そのほとんどはバクテリアによって速やかに取り込まれる(Bell, 1983; Jensen, 1983; Rieman and Søndergaard, 1986)。さらに、この時の底泥と海水中の全グルコシダーゼ活性が、それぞれ、 $17.0 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ と $2.3 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ であったことから、底生微小藻類と植物プランクトンによって生産される細胞外有機物は全てバクテリア群集に利用されると推測される。この結果、底生系では、浮遊系の約 2.4 倍の炭素が藻類からバクテリア群集へ伝達されることになり、この炭素量はバクテリア生産の 67-123%に相当する(浮遊系:87-153%)。また、底生性バクテリアの炭素要求量(Bacterial carbon demand: BCD)がバクテリア生産の 2.5-10 倍(同化効率 0.4-0.1)であると仮定すると(Smith *et al.*, 1995)、この炭素量は BCD の 7-49%に相当する(浮遊系:9-61%)。この BCD の残部に相当する底生微小藻類起源以外の主な有機炭素源としては、隣接河川から輸送される溶存態・粒状態有機物や海水柱からの堆積物などが考えられる。一方、浮遊系における植物プランクトン以外の有機炭素源としては、河川から輸送

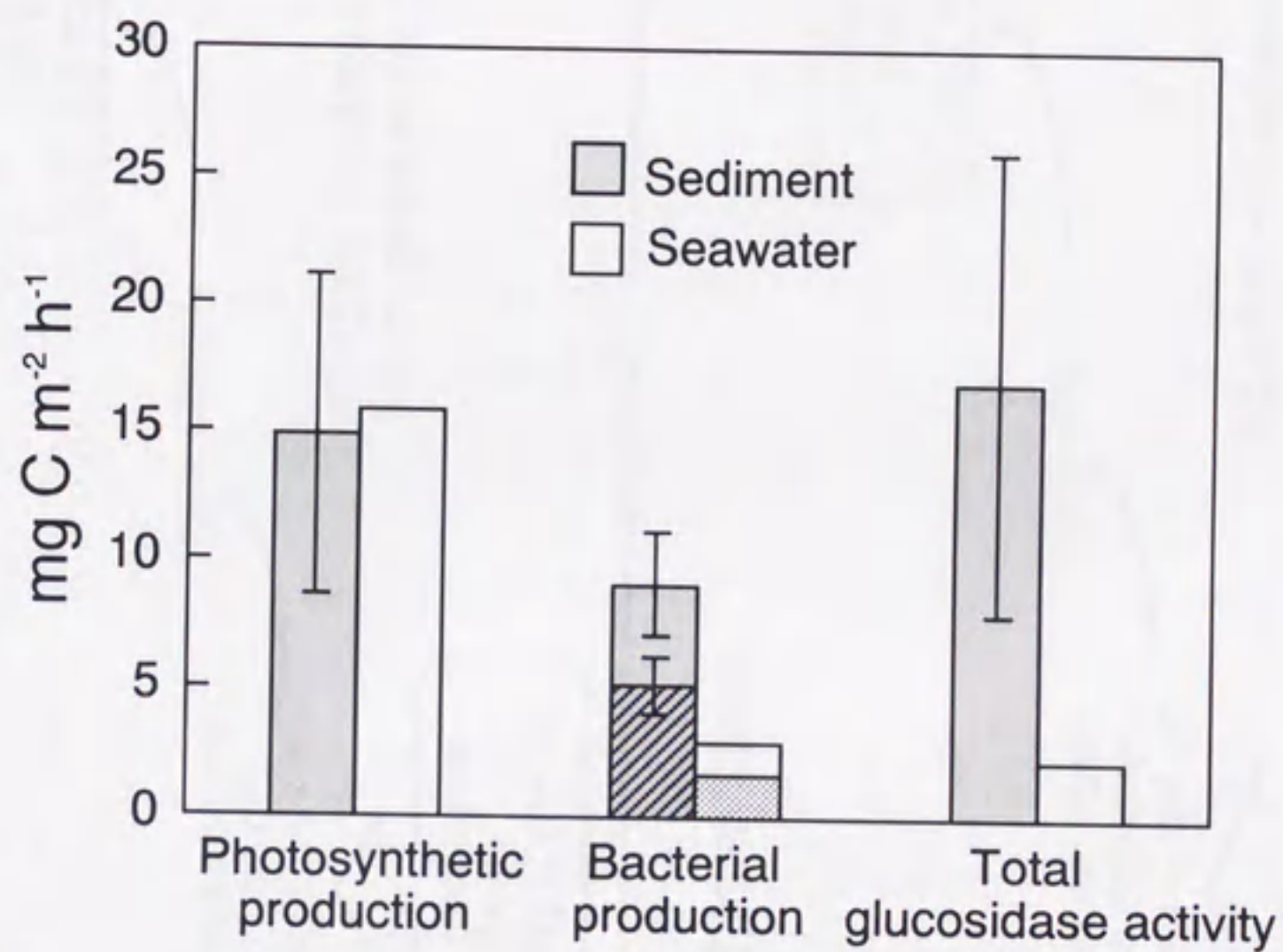


図4.1. 底泥と海水中における一次生産速度，バクテリア生産速度ならびに全グルコシダーゼ活性（ β -グルコシダーゼと α -グルコシダーゼの和）。バクテリア生産速度は炭素量変換係数 $105 \text{ fg C } \mu\text{m}^{-3}$ （斜線部と打点部）と $186 \text{ fg C } \mu\text{m}^{-3}$ から計算した値を示す。鉛直線は標準偏差。

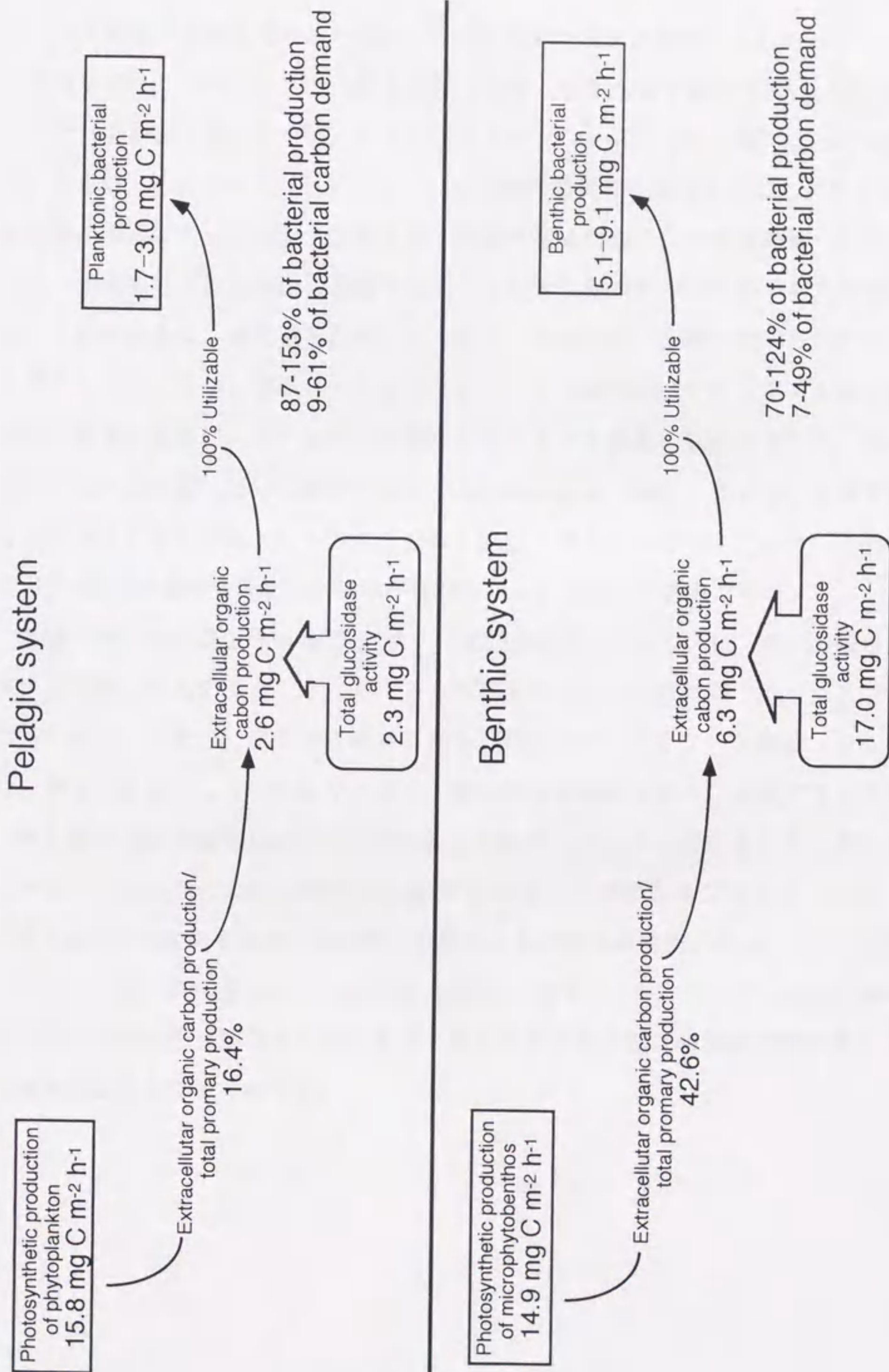


図4.2. 底生系と浮遊系における微小藻類からバクテリアへの炭素フラックス

される有機物や底泥堆積物から溶出した溶存態有機物などが考えられる。

底生系では、バクテリアの大部分は原生動物（鞭毛虫類や繊毛虫類）、メイオファウナ（主に線虫類や多毛類）あるいはマクロベントス（ゴカイ類）によって補食され、さらに、それらのベントスがより高次段階の消費者に補食されることによって、底生微小藻類によって生産・分泌される細胞外有機炭素は、生食連鎖網へと伝達される。底泥中では微生物食物連鎖を経由する栄養段階が少ないため、高次段階に転送される炭素量は、海水中と比較して、多く、効率の良い生物生産が行われていると考えられる。しかしながら、付着性バクテリア（底生性バクテリアの大部分）は細胞外酵素や基質に付着するための細胞外ポリマーを多量に分泌するため、その成長効率はかなり低いという報告がある（Middelboe *et al.*, 1995）。これは、生産者としての寄与よりも分解者としての働きがより重要であることを示している。このバクテリア-従属栄養捕食者間の関係は今後明らかにする必要があるだろう。

本論で得られた底生微小藻類-バクテリア間の炭素フラックスは、多くの仮定をふまえて評価したものであるが、底生系と浮遊系におけるその炭素フラックスは特徴づけられた。つまり、底生系における微小藻類からバクテリアへの炭素フラックスは、浮遊系と比較して、かなり大きく、微生物食物連鎖を通じた炭素フラックスは干潟生態系の炭素循環において重要なルートになっていると考えられる。そして、このような底生系における底生微小藻類-バクテリア間の炭素フラックスは全一次生産の約40-70%にも達する底生微小藻類による細胞外有機物の生産・分泌に起因している。今後、この底生系における微小藻類-バクテリア間、そして、細胞外多糖-バクテリア間の相互関係は干潟生態系を含めた浅水域生態系の物質循環を考える上で有用な知見となるであろう。

謝 辞

本研究の遂行に際しては、非常に多くの方々の協力を得た。名古屋大学大気水圏科学研究所の寺井久慈博士には本研究を通じて貴重なご指導を賜った。また、名古屋大学大気水圏科学研究所の才野敏朗教授には本研究に関して有益な示唆とご支援を賜った。一色干潟での試料採取においては、愛知県水産試験場の漁場環境研究部の鈴木輝明博士ならびに青山裕晃氏に多大な便宜とご協力をしていただいた。東北区水産研究所の河村知彦博士には、一色干潟からの底生珪藻種の単離・同定をしていただいた。河村知彦博士のこのご尽力により、本研究は多くの知見を得た。和歌浦干潟の底生微小藻類および植物プランクトン種の同定においては、名古屋女子大学の石田典子助教授にお世話になった。名古屋大学大気水圏科学研究所の鈴木光次博士には植物プランクトン培養株をご提供いただいた。放射性同位元素を用いた実験を進めるにあたっては、名古屋大学アイソトープ総合管理センターの皆様にお世話になった。名古屋大学大学院在学時には、名古屋大学大気水圏科学研究所水圏微生物過程分野の多くの方々に大変お世話になった。分子生物学的手法を用いた実験では、京都大学大学院理学研究科の後藤美穂氏（現、名古屋大学法学研究科）に適切にご教示をいただいた。滋賀県立大学環境科学部の三田村緒佐武博士には、本研究の全期間にわたり、多大なご指導と有益なご助言を賜った。最後に、本研究の一部は、水産庁漁場環境修復推進調査事業（平成10年～12年）の助成を得て行われたことを付記する。

本研究を支えて下さった以上の方々に深い感謝の意を表します。

引用文献

- Admiraal, W. (1977): Salinity tolerance of benthic estuarine diatom as tested with a rapid polarographic measurement of photosynthesis. *Mar. Biol.* 39 : 11-18.
- Admiraal, W. (1984): The ecology of estuarine sediment-inhabiting diatoms. In *Progress in Phycological Research, Vol. 3*, Round, F. E. and Chapman, G. (eds.): 269-322. Biopress Ltd.
- Admiraal, W. and Peletier, H. (1979): Influence of organic compounds and light limitation on the growth rate of estuarine benthic diatoms. *Br. Phycol. J.* 14: 197-206.
- Admiraal, W., Peletier, H. and Zomer, H. (1982): Observations and experiments on the population dynamics of epipelagic diatoms from an estuarine mudflat. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 14 :471-487.
- Allan, G. C., Lewin, J. and Johnson, P. G. (1972): Marine polymers. IV. Diatom polysaccharides. *Bot. Mar.* 15: 102-108.
- Alongi, D. M. (1988): Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. *Microb. Ecol.* 15:59-79.
- Arnosti, C. (1995): Measurement of depth- and site-related differences in polysaccharide hydrolysis rates in marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 59:4247-4257.
- Arnosti, C. (1998): Rapid potential rates of extracellular enzymatic hydrolysis in Arctic sediments. *Limnol. Oceanogr.* 43: 315-324.
- Austin, H. K. and Findlay, S. E. G. (1989): Benthic bacterial biomass and production in the Hudson River Estuary. *Microb. Ecol.* 18: 105-116.
- Autio, R. M. (1990): Bacterioplankton in filtered brackish water cultures: Some physical and chemical parameters affecting community properties. *Arch. Hydrobiol.* 117: 437-451.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Mayer-Reil, L. A. and Thingstad, F. (1983): The ecological role of water column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10:257-263.
- Barranguet, C., Plante-Cuny, M. R. and Alivon, E. (1996): Microphytobenthos production in the Gulf of Fos, French Mediterranean coast. *Hydrobiologia* 333 : 181-193.
- Bell, R. T. (1993): Estimating production of heterotrophic bacterioplankton via incorporation of tritiated thymidine. In: *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*, Kemp, P. F., Sherr, B. F., Sherr, E. B. and Cole, J. J. (eds): 495-503. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Bell, T. B., Ahlgren, G. M. and Ahlgren, I. (1983): Estimating bacterioplankton production by measuring ³H-thymidine incorporation in a eutrophic Swedish lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1709-1721.

- Bell, W. H. (1983): Bacterial utilization of algal extracellular products. 3. The specificity of algal-bacterial interaction. *Limnol. Oceanogr.* 28:1131-1143.
- Bélanger, C., Desrosiers, B. and Lee, K. (1997): Microbial extracellular enzyme activity in marine sediments: extreme pH to terminate reaction and sample storage. *Aquat. Microb. Ecol.* 13:187-196.
- Bendschneider, K. and Robinson, R. J. (1952): A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in the sea water. *J. Mar. Res.* 11 : 87-96.
- Billen, G., Joiris, C., Meyer-Reil, L. and Lindeboom, H. (1990): Role of bacteria in the north sea ecosystem. *Neth. J. Sea. Res.* 26:265-293.
- Bjornsen, P. K. (1986): Automatic determination of bacterioplankton biomass by image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1199-1204.
- BOEDE (1985): Biological research Ems-Dollard estuary. Rijkswaterstaat Communications. 40: 1-182.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Cadée, G. C. and Hegeman, J. (1974): Primary production of the benthic microflora living on tidal flats in the Dutch Wadden Sea. *Neth. J. Sea Res.* 8 : 260-291.
- Cammen, L. M. and Walker, J. A. (1986): The relationship between bacteria and micro-algae in the sediment of Bay of Fundy mudflat. *Estuarine, Coast. Shelf Sci.* 22: 91-99.
- Carpenter, E. J. and Lively, J. S. (1980): Review of estimates of algal growth using ¹⁴C tracer techniques. In: *Primary productivity in the sea*, Falkowski, P. G. (ed.): 161-178. Plenum Press, New York.
- Chapman, G. and Rae, A. (1969): Excretion of photosynthate by a benthic diatom. *Mar. Biol.* 3: 341-351.
- Charpy-Roubaud, C. and Sournia, A. (1990): The comparative estimation of phytoplanktonic, microphytobenthic and macrophytobenthic primary production in the oceans. *Marine Microbial Food Webs* 4 : 31-57.
- Cheng, K. G., Ingram, J. M. and Costerton, J. M. (1970): Release of alkaline phosphatase from cells of *Pseudomonas aeruginosa* by manipulation of cation concentration and of pH. *J. Bacteriol.* 104: 748-753.
- Cho, J. C., Kim, M. W., Lee, D. H. and Kim, S. J. (1997): Response of bacterial communities to changes in composition of extracellular organic carbon from phytoplankton in Daechung Reservoir (Korea). *Arch. Hydrobiol.* 138:559-576.
- Chróst, R. J. (1990): Microbial ectoenzymes in aquatic environments. In: *Aquatic Microbial Ecology: Biochemical and Molecular Approaches*, Overbeck, J. and Chróst, R. J. (eds.): 47-78. Springer-Verlag, New York.

- Chróst, R. J. (1991): Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. In: *Microbial enzymes in aquatic environments*, Chróst, R. J. (ed.): 29-59. Springer-Verlag, New York.
- Chróst, R. J., Münster, U., Rai, H., Albrecht, D., Witzel, P. K. W. and Overbeck, J. (1989): Photosynthetic production and exoenzymatic degradation of organic matter in the euphotic zone of a eutrophic lake. *J. Plank. Res.* 11: 223-242.
- Chróst, R. J. and Riemann, B. (1994): Storm-stimulated enzymatic decomposition of organic matter in benthic/pelagic coastal mesocosms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 108:185-192.
- Colijn, F. and Dijkema, K. S. (1981): Species composition of benthic diatoms and distribution of chlorophyll *a* on an intertidal flat in the Dutch Wadden Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 4: 9-21.
- Colijn, F. and Jonge, de. V. N. (1984): Primary production of microphytobenthos in the Ems-Dollard Estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 14: 185-196.
- Cooksey, K. E. and Cooksey, B. (1986): Adhesion of fouling diatoms to surfaces: Some biochemistry. In: *Algal biofouling*, Evans, L. V. and Hoagland, K. D. (eds.): 41-53. Elsevier, Amsterdam.
- Crump, B. C. and Baross, J. A. (1996): Particle-attached bacteria and heterotrophic plankton associated with the Columbia River estuarine turbidity maxima. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 138: 265-273.
- Dame, R. F. and Dankers, N. (1988): Uptake and release of materials by a Wadden Sea mussel bed. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 118: 207-216.
- Daniel, G. F., Chamberlain, A. H. L. and Jones, E. B. G. (1980): Ultrastructural observations on the marine fouling diatom *Amphora*. *Helgol. wiss Meeresunters* 34: 123-149.
- Decho, A. W. (1990): Microbial exopolymer secretions in ocean environments: Their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 28: 73-153.
- Decho, A. W. (1993): Methods for the observation and use in feeding experiments of microbial exopolymers. In: *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*, Kemp, P. F., Sherr, B.F., Sherr, E.B. and Cole, J. J. (eds.): 685-694. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Decho, A. W. and Moriarty, D. J. M. (1990): Bacterial exopolymer utilization by a harpacticoid copepod: A methodology and results. *Limnol. Oceanogr.* 35: 1039-1049.
- Decho, A.W. and Lopez, G.R. (1993): Exopolymer microenvironments of microbial flora: Multiple and interactive effects on trophic relationships. *Limnol. Oceanogr.* 38: 1633-1645.
- Denicola, D. M. (1996): Periphyton responses to temperature at different ecological levels. In: *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*, Stevenson, R. J., Bothwell, M. L. and Lowe, R. L. (eds.): 149-181. Academic Press.

- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956): Colorimetric method of determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 18: 350-356.
- Ducklow, H. W. and Carlson, C. A. (1992): Oceanic bacterial production. *Adv. microb. Ecol.* 12: 113-181.
- Edgar, L. A. (1984): Diatom Locomotion. In *Progress in Phycological Research, Vol. 3*, Round, F. E. and Chapman, G. (eds.): 48-88. Biopress Ltd.
- Eilers, P. and Peeters J. (1988): A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecol. Model.* 42: 199-215.
- Epstein, S. S. and Rossel, J. (1995): Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal protocol. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 117:289-298.
- Fallon, R. D., Newel, S. Y. and Hopkinson, C. S. (1983): Bacterial production in marine sediments: Will cell-specific measures agree with whole-system metabolism? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 11: 119-127.
- Fenchel, T. and Straarup, B. J. (1971): Vertical distribution of photosynthetic pigments and the penetration of light in marine sediments. *Oikos* 22 : 172-182.
- Findlay, S., Meyer, J. L. and Risley, R. (1986): Benthic bacterial biomass and production in two Blackwater Rivers. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 1271-1276.
- Findlay, S. (1993): Thymidine incorporation into DNA as an estimate of sediment bacterial production. In: *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*, Kemp, P. F., Sherr, B. F., Sherr, E.B. and Cole, J. J. (eds.): 505-508. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Fogg, G. E. (1983): The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. *Bot. Mar.* 26: 3-14.
- Fuhrman, J. A. and Azam, F. (1980): Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica, and California. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:1085-1095.
- Fuhrman, J. A. and Azam, F. (1982): Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar. Biol.* 66:109-120.
- Gargas, E. (1980): Production and photosynthetic efficiency of microalgae (phytoplankton and microbenthos) in a shallow Danish fjord. *Vatten* 2 : 125-138.
- Goldsborough, L. G. and Robinson, G. G. C. (1996): Pattern in Wetlands. In: *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*, Stevenson, R. J., Bothwell, M. L. and Lowe, R. L. (eds.): 77-117. Academic Press.
- Guillard, R. R. L. and Ryther, J. H. (1962): Studies of marine planktonic diatoms I : *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Clave) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.

- Haardt, H. and Nielsen, G. A. E. (1980): Attenuation measurements of monochromatic light in marine sediments. *Oceanol. Acta* 3: 333-338.
- Haug, A. and Myklestad, S. (1976): Polysaccharides of marine diatoms with special referens to *Chaetoceros* Species. *Mar. Biol.* 34: 217-222.
- Hill, W. (1996): Effects of light. In: *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*, Stevenson, R. J., Bothwell, M. L. and Lowe, R. L. (eds.): 121-148. Academic Press.
- Hoagland, K. D., Rosowski, J. R., Gretz, M. R. and Roemer, S. C. (1993): Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry, and physiology. *J. Phycol.* 29: 537-566.
- Hobbie, J. E. and Crawford, C. C. (1969): Respiration corrections for bacterial uptake of dissolved organic compounds in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 14:528-532.
- Hopkins, J. T. (1964): A study of the diatoms of the Ouse estuary, Sussex. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 44: 613-644.
- Hoppe, H. G. (1983): Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 11:299-308.
- Horne, A. J. and Goldman, C. R. (1983): Estuaries. In: *Limnology*: 317-340. McGraw-Hill, Inc., New York.
- Imai, I. (1987): Size distribution, number and biomass of bacteria in intertidal sediments and seawater of Ohmi Bay, Japan. *Bull. Japan. Soc. microb. Ecol.* 2: 1-11.
- Iturriaga, R. and Hoppe, H. G. (1977): Observations of heterotrophic activity on photoassimilated organic matter. *Mar. Biol.* 40:101-108.
- Iturriaga, R. and Zsolnay, A. (1983): Heterotrophic uptake and transformation of phytoplankton extracellular products. *Bot. Mar.* 26:375-381.
- Jense, I., Rijssel, M. van, Ottema, A. and Gottschal, J. C. (1999): Microbial breakdown of *Phaeocystis* mucopolysaccharides. *Limnol. Oceanogr.* 44: 1447-1457.
- Jensen, L. M. (1983): Phytoplankton release of extracellular organic carbon, molecular weight composition, and bacterial assimilation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 11:39-48.
- Jensen, L. M. (1984): Antimicrobial action of antibiotics on bacterial and algal carbon metabolism: on the use of antibiotics to estimate bacterial uptake of algal extracellular products (EOC). *Arch. Hydrobiol.* 99: 423-432.
- Jonge, V. N. de (1985): The occurrence of 'episammic' diatom populations: a result of interaction between physical sorting of sediment and certain properties of diatom species. *Estuarine. Coastal. Shelf Sci.* 21:607-622.
- Jonge, V. N. de and van Beusekom, J. E. E. (1992): Contribution of resuspended microphytobenthos to total phytoplankton in the Ems estuary and its possible role for grazers. *Neth. J. Sea Res.* 30 : 91-105.

- Karner, M. and Rassoulzadegan, F. (1995): Extracellular enzyme activity: Indications for high short-term variability in a coastal marine ecosystem. *Microb. Ecol.* 30: 143-156.
- Kawamura, T. and Hirano, R. (1992): Seasonal changes in benthic diatom communities colonizing glass slides in Aburatsubo Bay, Japan. *Diatom. Res.* 7: 227-239.
- Kawamura, T., Roberts R. D. and Takami H. (1998) A review of the feeding and growth of postlarval abalone. *J. Shellfish Res.* 17: 615-625.
- King G. M. (1986): Characterization of β -glucosidase activity in intertidal marine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 373-380.
- Kogure, K. and Koike, I. (1987): Particle counter determination of bacterial biomass in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 274-277
- Kromkamp, J., Peene, J., Rijswijk, P., Sandee, A. and Goosen, N. (1995): Nutrients, light and primary production by phytoplankton and microphytobenthos in the eutrophic, turbid Westerschelde estuary (The Netherlands). *Hydrobiologia* 311 : 9-19.
- Kuipers, B. R., de Wilde P. A. W. J. and Creutzberg, F. (1981): Energy flow in a tidal flat ecosystem. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 5: 215-221.
- Kühl, M. and Jørgensen, B. B. (1994): The light field of microbenthic communities: Radiance distribution and microscale optics of sandy coastal sediments. *Limnol. Oceanogr.* 39 : 1368-1398.
- Larsson, U. and Hagström, A. (1979): Phytoplankton exudate release as an energy source for the growth of pelagic bacteria. *Mar. Biol.* 52: 199-206.
- Leakey, R. J. G., Archer, S. D. and Grey, A. J. (1996): Microbial dynamics in coastal waters of East Antarctica: bacterial production and nanoflagellate bacterivory. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 142: 3-17.
- Lorenzen, C. J. (1967): Determination of chlorophyll and phaeopigments: Spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.* 12 : 343-346.
- Li, Z. C. and Macclure, J. W. (1989): Contamination of oat mesophyll protoplasts by apoplastic polyamine oxidase. *Physiologia Plantarum* 77: 347-351.
- MacIntyre, H. L. and Cullen, J. J. (1995): Fine-scale vertical resolution of chlorophyll and photosynthetic parameters in shallow-water benthos. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 122 : 227-237.
- MacIntyre, H. L. and Cullen, J. J. (1996): Primary production by suspended and benthic microalgae in turbid estuary: time-scales of variability in San Antonio Bay, Texas. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 145 : 245-268.
- MacIntyre, H. L., Geider, R. J. and Miller, D. C. (1996): Microphytobenthos: The ecological role of the "Secret Garden" of unvegetated, shallow-water marine habitats. I. Distribution, abundance and primary production. *Estuaries* 19 : 186-201.
- MacMillin, K. M., Blum, L. K. and Mills, L. A. (1992): Comparison of bacterial dynamics in tidal creeks of the lower Delmarva Peninsula, Virginia, USA. 86: 111-121.

- Mari, X. (1999): Carbon content and C:N ratio of transparent exopolymeric particles (TEP) produced by bubbling exudates of diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 183: 59-71.
- Medcalf, D. G. and Larsen, B. (1977): Fucose-containing polysaccharides in the brown algae *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. *Carbohydr. Res.* 59: 531-537.
- Meyer-Reil, L. A. (1986): Measurement of hydrolytic activity and incorporation of dissolved organic substrates by microorganisms in marine sediments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 31: 143-149.
- Middelboe, M., Søndergaard, M., Letarte, Y. and Borch, N. H. (1995): Attached and free-living bacteria: production and polymer hydrolysis during a diatom bloom. *Microb. Ecol.* 129:231-248.
- Miller, D. C., Geider, R. J. and MacIntyre, H. L. (1996): Microphytobenthos: The ecological role of the "Secret Garden" of unvegetated, shallow-water marine habitats. II. Role in sediment stability and shallow-water food webs. *Estuaries* 19 : 202-212.
- Mitamura, O. (1986): Urea metabolism and its significance in the nitrogen cycle in the eutrophic layer of Lake Biwa. II. Half-saturation constant for nitrogen assimilation by fractionated phytoplankton in different trophic areas. *Arch. Hydrobiol.* 107 : 167-182.
- Mitamura, O., Cho, K. S., Hong, S. U. and Lee, H. K. (1989): Urea decomposition and its turnover time in eutrophic layer of reservoirs in the North Han River System. *Kor. J. Lim.* 22 : 227-238.
- Mitamura, O., Cho, K. S. and Hong, S. U. (1994): Urea decomposition associated with the activity of microorganisms in surface waters of the North Han River, Korea. *Arch. Hydrobiol.* 131 : 231-242.
- Moriarty, D. J. W. (1986): Measurement of bacterial growth rates in aquatic systems from rates of nucleic acid synthesis. *Adv. Microb. Ecol.* 9:245-292.
- Moriarty, D. J. W., Pollard, P. C., Hunt, W. G., Moriarty, C. M. and Wassenberg, T. J. (1985): Productivity of bacteria and microalgae and the effect of grazing by holothurians in sediments on a coral reef flat. *Mar. Biol.* 85: 293-300.
- Mortain-Bertrand, Descolas-Gros, A., C. and Jupin, H. (1988): Growth, photosynthesis and carbon metabolism in the temperate marine diatom *Skeletonema costatum* adapted to low temperature and low photon-flux density. *Mar. Biol.* 100 : 135-141.
- Murphy, J. and Riley, J. P. (1962): A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27 : 31-36.
- Münster, U. and Chróst, R. (1990): Origin, composition, and microbial utilization of dissolved organic matter. In: *Aquatic microbial ecology*, Overbeck, J. and Chróst, R. (ed.): 8-46. Springer-Verlag, New York.
- Myklestad, S. (1977): Production of carbohydrate by marine planktonic diatoms. II. Influence of the N/P ratio in the growth medium on the assimilation ratios, growth rate and

- production of cellular and extracellular carbohydrate by *Cheatocecos affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt and *Skeletonema costatum* (Grev) Cleve. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 29: 161-179.
- Myklestad, S. (1988): Production, chemical structure, metabolism, and biological function of the (1-3)-linked β -D-glucans in diatoms. Biol. Oceanogr. 6: 313-326.
- Myklestad, S. and Haug, A. (1972): Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 9: 125-136.
- Myklestad, S., Haug, A. and Larsen, B. (1972): Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. II. Preliminary investigation of the extracellular polysaccharide. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 9: 137-144.
- Myklestad, S., Holm-Hansen, O., Vårum, K. M. and Volcani, B. E. (1989): Rate of release of extracellular amino acids and carbohydrates from the marine diatom *Chaetoceros affinis*. J. Plankton. Res. 11: 763-773.
- Nagata, T. (1986): Carbon and nitrogen content of natural planktonic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 52: 28-32.
- Nagata, T. and Watanabe, Y. (1990): Carbon- and nitrogen-to-volume ratios of bacterioplankton grown under different nutritional conditions. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1303-1309.
- Nalewajko, C. (1966): Photosynthesis and excretion in various planktonic algae. Limnol. Oceanogr. 11: 1-10.
- Newell, B. S., Morgan, B. and Cundy, J. (1967): The determination of urea in seawater. J. Mar. Res. 25 : 201-202.
- Painchaud, J. and Therriault, J. C. (1989): Relationship between bacteria, phytoplankton and particulate organic carbon in the upper ST. Lawrence estuary Canada. Mar. Ecol. Prog. Ser. 56: 301-311.
- Parker, D. L., Schram, B. R., Plude, J. L. and Moore, R. E. (1996): Effects of metal cations on the viscosity of a pectin-like capsular polysaccharide from the cyanobacterium *Microcystis flos-aquae* C3-40. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1208-1213.
- Paterson, D. M. (1989): Short-term changes in the erodibility of intertidal cohesive sediments related to the migratory behavior of epipellic diatoms. Limnol. Oceanogr. 34: 223-234.
- Penna, A., Berluti, S., Penna, N. and Magnani M. (1999): Influence of nutrient ratios on the *in vitro* extracellular polysaccharide production by marine diatoms from the Adriatic Sea. J. Plank. Res. 21: 1681-1690.
- Percival, E. and McDowell, R. H. (1981): Algal walls-composition and biosynthesis. In: *Plant carbohydrates II (Extracellular carbohydrate)*, Tanner, W. and Loewus, F. A. (eds.): 277-

316. Springer-Verlag, Berlin.
- Pinckney, J. and Zingmark, R. G. (1991): Effects of tidal stages and sun angles on intertidal benthic microalgal productivity. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 76: 81-89.
- Pinckney, J. and Zingmark, R. G. (1993): Photophysiological responses of intertidal benthic microalgal communities to *in situ* light environments: Methodological considerations. *Limnol. Oceanogr.* 38: 1373-1383.
- Platt, R. M., Geesey, G. G., David, J. D. and White, D. C. (1985): Isolation and partial chemical analysis of firmly bound exopolysaccharide from adherent cells of a freshwater sediment bacterium. *Can. J. Microbiol.* 31: 675-680.
- Pomeroy, L. R. (1959): Algal productivity in a salt marshes in Georgia. *Limnol. Oceanogr.* 4 : 386-397.
- Poremba, K. and Hoppe, H. G. (1995): Spatial variation of benthic microbial production and hydrolytic enzymatic activity down the continental slope of the Celtic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 118: 237-245.
- Porter, K. G. and Feig, Y. S. (1980): The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25:943-948.
- Raalte, van C. , Stewart, W. C. and Valiela, I. (1974): A ^{14}C technique for measuring algal productivity in salt marsh muds. *Botanica Marina* 17 : 186-188.
- Ramus, J. and Robins, D. M. (1975): The correlation of Golgi activity and polysaccharide secretion in *Porphyridium*. *J. Phycol.*, 11: 70-74.
- Reli, L. A. M. (1991): Ecological aspects of enzymatic activity in marine sediment. In: *Microbial enzymes in aquatic environments*, Chróst, R. J. (ed.): 84-95. Springer Verlag, New York.
- Reli, L. A. M. (1994): Microbial life in sedimentary biofilms-the challenge to microbial ecologist. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 112: 303-311.
- Riemann, B. and Søndergaard, M. (1986): Bacteria. In: *Carbon dynamics in eutrophic, temperate lakes*, Riemann, B. and Søndergaard, M. (eds.): 127-197. Elsevier, The Netherlands.
- Riemann, B. and Bjørnsen, P. K. (1987): Calculation of cell production of coastal marine bacteria based on measured incorporation of [^3H] thymidine. *Limnol. Oceanogr.* 32: 471-476.
- Riemann, B., Nielsen, P., Jeppesen, M., Marcussen, B. and Fuhrman, J. A. (1984): Diel changes in bacteria biomass and growth rates in coastal environments, determined by means of thymidine incorporation into DNA, frequency of dividing cells (FDC), and microautoradiography. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 17: 227-235.
- Round, F. E., Crawford, R. M. and Mann, D. G. (1990): The diatoms: biology & morphology of the genera. p. 747. Cambridge University Press, Cambridge.

- Rublee, P. A., Merkel, S. M. and Faust, M. A. (1983): The transport of bacteria in the sediments of a temperate marsh. *Estuarine, Coast. Shelf Sci.* 16: 501-509.
- Sabbe, K. (1993): Short-term fluctuations in benthic diatom on an intertidal sandflat in the Westerschelde estuary (Zeeland, The Netherlands). *Hydrobiologia* 269: 275-284.
- Sagi, T. (1966): Determination of ammonia in sea water by the indophenol method and its application to the coastal and off-shore waters. *Oceanogr. Mag.* 18: 43-51.
- Saito, K., Miyatake, H. and Kurihara, N. (1990): A combustion method for the simultaneous determination of ^3H , ^{14}C , and ^{35}S in triply labeled organic samples by liquid scintillation counting. *Analytical Biochemistry* 190: 276-280.
- Satake, K., Saijo, Y. and Tominaga, H. (1972): Determination of small quantities of carbon dioxide in natural waters. *Jap. J. Limnol.* 35: 16-20.
- Scavia, D. and Laird, G. A. (1987): Bacterioplankton in Lake Michigan: Dynamics, controls, and significance to carbon flux. *Limnol. Oceanogr.* 32: 1017-1033.
- Shaffer, G. P. (1988): K-system analysis for determining the factors influencing benthic microfloral productivity in a Louisiana estuary, USA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 43: 43-54.
- Sharp, J. H. (1977): Excretion of organic matter by marine phytoplankton: Do healthy cells do it?. *Limnol. Oceanogr.* 22: 381-399.
- Sherr, E. B. and Sherr, B. F. (1987): Bacteria: Link or Sink? *Science* 235: 88-89.
- Smith, D. C., Steward, G. F., Long, R. A. and Azam, F. (1995): Bacterial mediation of carbon fluxes during a diatom bloom in a mesocosm. *Deep-Sea Res. II* 42: 75-97.
- Smith, D. J. and Underwood, G. J. C. (1998) Exopolymer production by intertidal epipellic diatoms. *Limnol. Oceanogr.* 43: 1578-1591.
- Smyth, D. A. and Dugger, W. M. (1981): Cellular changes during boron-deficient culture of the diatom *Cylindrotheca fusiformis*. *Physiol. Plant.* 51: 111-117.
- Starink, M., Bär-Gilissen, M. J., Bak R. P. M. and Cappenberg, T. E. (1996): Bacterivory by heterotrophic nanoflagellates and bacterial production in sediments of a freshwater littoral system. *Limnol. Oceanogr.* 41: 62-69.
- Steemann Nielsen, E. (1952): The use of radioactive carbon (^{14}C) for measuring organic production in the sea. *J. Cons. perm. Int. Explor. Mer.* 18: 117-140.
- Suzuki, K., Handa, N., Nishida, T. and Wong, C. S. (1997): Estimation of phytoplankton succession in a fertilized mesocosm during summer using high-performance liquid chromatographic analysis of pigments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 214: 1-17.
- Taylor, D., Paterson, D. M. and Mehlert, A. (1999): The quantitative variability and monosaccharide composition of sediment carbohydrates associated with intertidal diatom assemblages. *Biogeochemistry.* 45: 303-327.
- Theil-Nielsen, J. and Søndergaard, M. (1998): Bacterial carbon biomass calculated from biovolumes. *Arch. Hydrobiol.* 141: 195-207.

- Thompson, P. A., Guo, M. and Harrison, P. J. (1992): Effects of variation in temperature. I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. *J. Phycol.* 28 : 481-488.
- Unanue, M., Ayo, B., Azua, I., Barcina, I. and Iriberry, J. (1992): Temporal variability of attached and free-living bacteria in coastal waters. *Microb. Ecol.* 23:27-39.
- Underwood, G. J. C. and Paterson, D. M. (1993a): Recovery of intertidal benthic diatoms after biocide treatment and associated sediment dynamics. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 73: 25-45.
- Underwood, G. J. C. and Paterson, D. M. (1993b): Seasonal changes in diatom biomass, sediment stability and biogenic stabilization in the Severn Estuary. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 73: 871-887.
- Underwood, G. J. C. and Paterson, D. M. (1995): The measurement of microbial carbohydrate exopolymers from intertidal sediments. *Limnol. Oceanogr.* 40: 1243-1253.
- Underwood, G. J. C. and Smith, D. J. (1998): Predicting epipellic diatom exopolymer concentrations in intertidal sediments from sediment chlorophyll *a*. *Microbiol. Ecol.* 35:116-125.
- Vrba, J., Nedoma, J., Simek, K. and Seda, J. (1992): Microbial decomposition of polymer organic matter related to plankton development in reservoir: activity of α -, β -glucosidase, and β -N-acetylglucosaminidase and uptake of N-acetylglucosamine. *Arch. Hydrobiol.* 126: 193-211.
- Valiela, I. and Teal, J. M. (1979): The nitrogen budget of a salt marsh ecosystem. *Nature* 280 : 652-656.
- Valiela, I., Teal, J. M., Volkmann, S., Sharfer, D. and Carpenter, E. J. (1978): Nutrient and particulate fluxes in a salt marsh ecosystem : Tidal exchanges and inputs by precipitation and groundwater. *Limnol. Oceanogr.* 23 : 798-812.
- van Duyl, F. C. and Kop, A. J. (1990): Seasonal patterns of bacterial production and biomass in intertidal sediments of the Western Dutch Wadden Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 59:249-261.
- van Duly, F. C., van Raaphorst, W. and Kop, A. J. (1996): Benthic bacterial production and nutrient sediment-water exchange in sandy North Sea sediments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 100: 85-98.
- van Es, F. B. (1982): Community metabolism of intertidal flats in the Ems-Dollard estuary. *Mar. Biol.*, 66: 95-108.
- Varela, M. and Penas, E. (1985): Primary production of benthic microalgae in an intertidal sand flat of the Ria de Arosa, NW Spain. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 25 : 111-119.
- Walsby, A. E. and Xypolyta, A. (1977): The form resistance of chitan fibers attached to the

- cells of *Thalassiosira fluviatilis* Hustedt. Br. Phycol. J. 12: 215-223.
- Wang, J., Lu, J., Mollet, J. C., Gretz, M. R. and Hoagland, K. D. (1997): Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae), II: 2, 6-Dichlorobenzonitrile inhibition of motility and stalk production in the marine diatom *Achnanthes longipes*. Plant. Physiol. 113: 1071-1080.
- Watson, S. W., Novitsky, T. J., Quinby, H. L. and Valois, F. W. (1977): Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. Appl. Environ. Microbiol. 33: 940-946.
- Weaver, D. T. and Hicks, R. E. (1995): Biodegradation of *Azotobacter vinelandii* exopolymer by Lake Superior microbes. Limnol. Oceanogr. 40: 1035-1041.
- Wood, E. D., F. Armstrong A. J. and Richards F. A. (1967): Determination of nitrate in sea water by cadmium-copper reduction to nitrite. J. mar. biol. Ass. U. K. 47: 23-31.
- Yallop, M. L., de Winder, B., Paterson, D. M. and Stal, L. J. (1994): Comparative structure, primary production and biogenic stabilization of cohesive and non-cohesive marine sediments inhabited by microphytobenthos. Estuar. Coast. Shelf. Sci. 39: 565-582.
- Yoshizawa, K. and Nakamura, F. (1995): Extracellular products of *Synedra acus* Kützing. Diatom 11: 9-15.

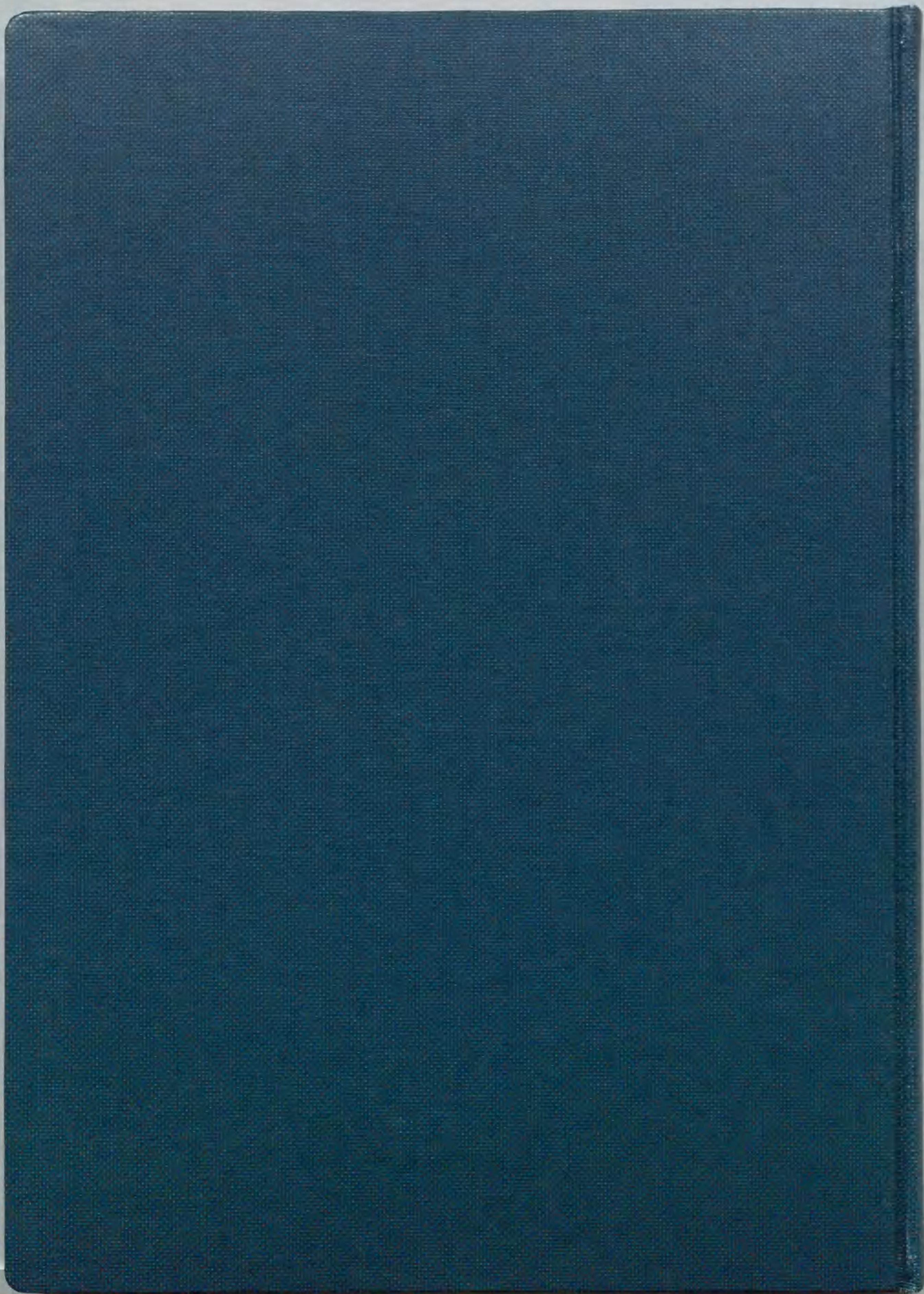
副 論 文

副論文

3 冊

題目

1. Physicochemical Features and Primary Production of Microphytobenthos and Phytoplankton at Wakaura Tidal Flat in Japan.
N. Goto, O. Mitamura, H. Terai and N. Ishida
Jpn. J. Limnol., 59: 391-408, 1998
2. Importance of extracellular organic carbon production in the total primary production by tidal flat diatoms in comparison to phytoplankton.
N. Goto, T. Kawamura, O. Mitamura and H. Terai
Mar. Ecol. Prog. Ser., 190: 289-295, 1999
3. Seasonal variation in primary production of microphytobenthos at the Isshiki intertidal flat in Mikawa Bay.
N. Goto, O. Mitamura and H. Terai
Limnology (in press)



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

