参考資料２

対策効果の実証試験結果

1. 浮遊生態系構造変化検証試験

三河湾より採取した海水中の植物プランクトン群集を様々な条件の海水において培養することによって、

- 三河湾内の代表的な各所における植物プランクトン群集の増殖能（最大増殖能、速度、生産が起きるまでにかかる時間、優占する種類など）に違いはあるのか？
- 上記の違いが生まれる原因としてはどのような要素（貧酸素水の影響（捕食者となる上位生物の有無）、河川水の影響など）が強く影響するか？

を検討することを目的に実施した。

1.1 試験方法

1）試験水の採取

平成 23 年 10 月 12 日に上記条件の違いを把握する三河湾の数カ所において、試験に用いる海水を採取した。海水の採取場所は、局所的に閉鎖性が高い場所、干潟・浅場、河口部、湾央として、局所的に閉鎖性が高い場所、干潟・浅場の採取時刻は潮位による違いを考慮して、上げ潮時、下げ潮時の 2 潮時とし、河口部はより陸域水の影響が出やすい下げ潮時のみ、湾央部は干潮時のみとした。採取層は表層 1m程度、採水量は 5Lとした。採取した海水は試験室へ搬送した。具体的な調査場所は 図 1.1 のとおりである。

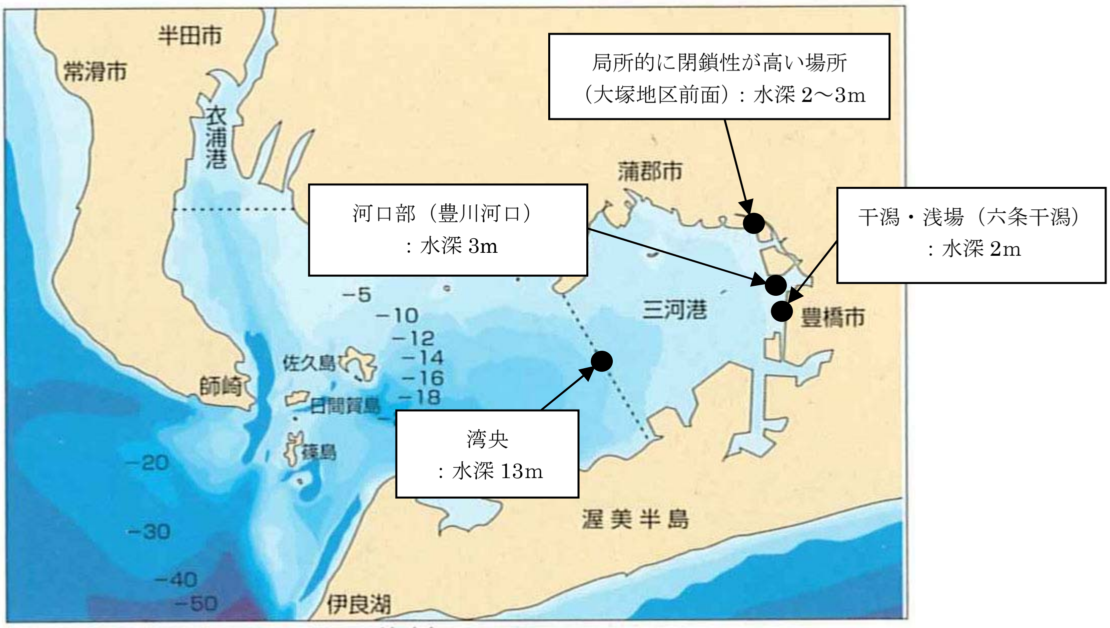


図 1.1　具体的な調査場所

2) 試験条件

試験条件を 表 1.1 に示す。

表 1.1　試験条件

項目	設定条件
供試生物	三河湾各所のプランクトン群集
試験場所	恒温室
試験水温	20℃（試験水を採取した現地水温が 20～21℃の範囲であった）
試験容器	2000mL 容量　三角フラスコ
試験期間	96 時間（サンプリング間隔：基本的に 1 日に 1 回）
光量・周期	白色蛍光灯 4,000lux（57μmol/m^2/s）、12 時間明期・12 時間暗期
その他	・試験容器は基本的に静置し、1 日に 1 回揺らして試験水中の植物プランクトン群集を懸濁させた。 ・貧酸素ケース（ケース①とケース②）の状態を確認するため、ケース①上げ潮の試験水について、1 日に 1 回溶存酸素計で DO を測定した。

3) 試験ケース

試験ケースを 表 1.2 に示す。

表 1.2　試験ケース

想定	対応ケース	設定
A－1：栄養が蓄積しやすいと想定される場の再現ケース（2 潮時）	ケース①上げ潮 ケース①下げ潮	貧酸素状態にした局所的に閉鎖性が高い場所の海水（窒素ガス）
	ケース②上げ潮 ケース②下げ潮	局所的に閉鎖性が高い場所の海水と河口部海水を 8:2 で混合して貧酸素状態（窒素ガス）
A－2：貧酸素水等の影響を取り除いたケース（2 潮時）	ケース③上げ潮 ケース③下げ潮	局所的に閉鎖性が高い場所の海水
B：目標となるケース（干潟・浅場ケース（2 潮時））	ケース④上げ潮 ケース④下げ潮	干潟・浅場海水
C：対照区（湾央海水）	ケース⑤（下げ潮）	湾央海水
補足：ケース②の対照として	ケース⑥（下げ潮）	局所的に閉鎖性が高い場所の海水と河口部海水を 8:2 で混合（貧酸素状態にしない）

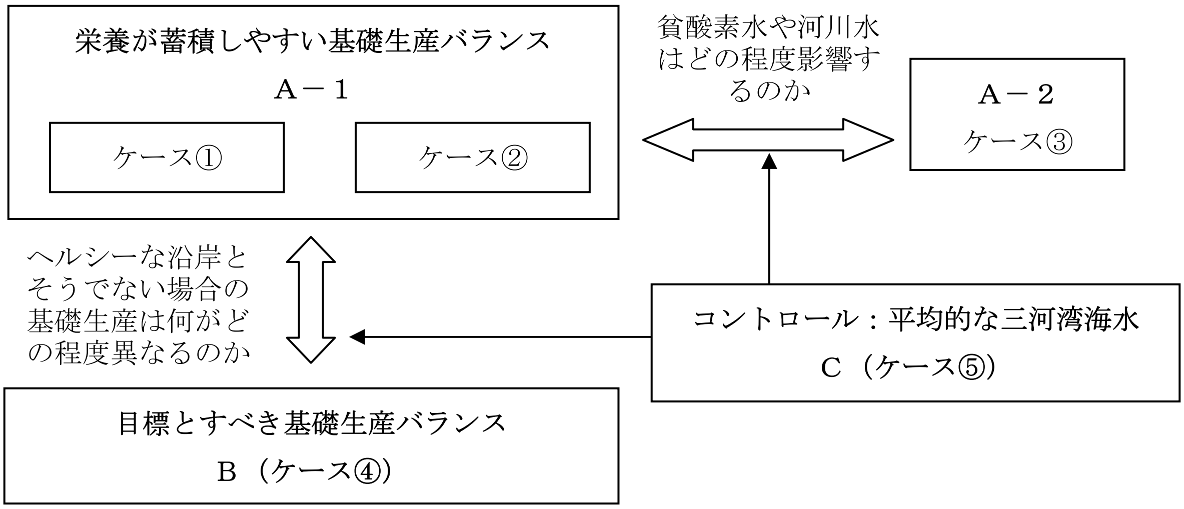


図 1.2　各ケースの比較による評価イメージ

4）試験手順

各試験ケースの試験水は、ゴミや大中型の動物プランクトンを除くため、目合い 100μm のナイロン製のプランクトンネットでろ過してから調整した。試験液の塩分は、25.0～28.5 の間にあった。試験液間で塩分が大きく異なることはなかったため、無調整とした。

ろ過した試験水をメスシリンダーで 1500mL計量し、2000mL容量の三角フラスコに分注した。なお、試験ケースのうち、ケース②とケース⑥は局所的に閉鎖性が高い場所の海水と河口部水を 8:2 となるように混合して用いた。試験液を分注した試験容器は、シリコセンで栓をして調温・調光した恒温室に設置して培養を開始した。各試験ケースは 2 連とした（ただし、後に示すサイズ分画は片方の容器でのみ分析）。また、ケース①とケース②は試験水を貧酸素状態とするため、試験容器にガラス管を差し込んで試験水に窒素ガスを吹き込んだ。窒素ガスの供給容量を 100mL/min.とした結果、図 1.3 のとおり試験期間中の試験容器内の溶存酸素濃度（ケース①上げ潮）は、概ね 3.0mg/Lより低く維持された。試験実施状況を 図 1.4 に示す。

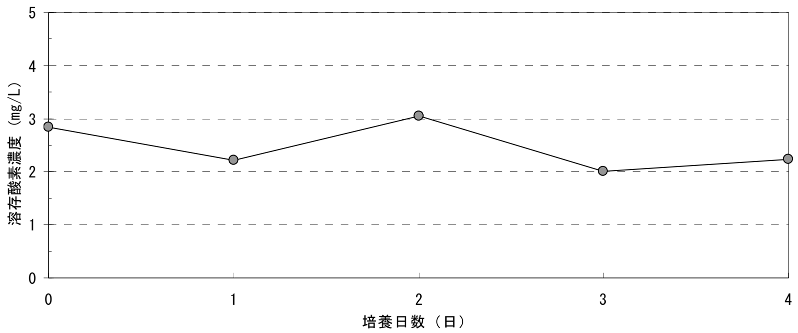


図 1.3　試験容器内の溶存酸素濃度（ケース①上げ潮）

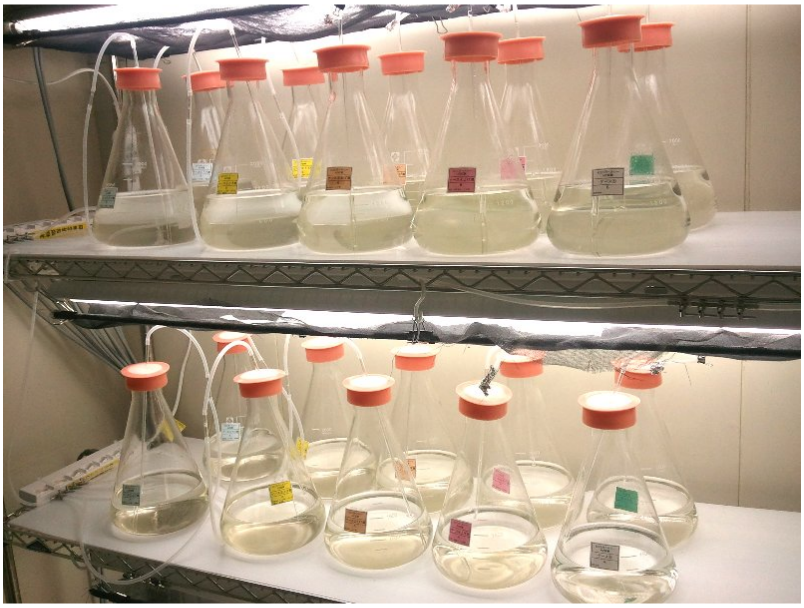


図 1.4　AGP 試験実施状況

5) 増殖モニタリング

培養期間中、1 日に 1 回各試験容器より試験水を分取した。試験容器の片方（容器 1）から分取した試験水は、サイズ分画（20μm以上、2-20μm、2μm未満の 3 サイズ）してから蛍光強度を測定することによって、植物プランクトン群集のサイズ別増殖量を確認した。もう片方の試験容器（容器 2）の試験水は、サイズ分画せずに蛍光強度を測定した。蛍光強度はターナーデザイン社製の蛍光光度計（TD-700）によって測定した。サイズ別のクロロフィル蛍光強度は、別途分析したクロロフィル a 量との関係式を求めて、クロロフィル a 量に換算した。

6) 試験水の分析

採取した海水について試験開始前に水質及びプランクトン分析を行った。分析項目は次のとおりである。

pH、塩分、窒素（T-N 及び DON（ろ過前・ろ過（0.45μm メンブランフィルター）後）、NH_4-N、NO_2-N、NO_3-N）、リン（T-P 及び DOP（ろ過前・ろ過後）、PO_4-P）、珪素（SiO_2-Si）、全有機炭素（TOC））、動植物プランクトン、ピコ・ナノプランクトン

1.2 試験結果

1) 試験水のプランクトン種組成

① 試験開始時の動植物プランクトン

試験開始時の動植物プランクトン種組成を 表 1.3 に示す。採取場所別には、細胞数・個体数の多少はあるものの、優占していた植物プランクトンは概ね同様であった。細胞数、細胞サイズの両面から抽出した植物プランクトン優占種は以下の通りである。

渦鞭毛藻綱： *Prorocentrum sigmoides*(≧20μm)、*Ceratium furca*(≧20μm)、
Ceratium fusus(≧20μm)、
黄金色藻綱： *Dictyocha fibula* (2-20μm)
その他： 不明微細鞭毛藻類 (2-20μm)

また、動物プランクトンとしては、主に繊毛虫の *Tintinnopsis* sp.やカイアシ類のノープリウス幼生 (Nauplius of copepoda) が認められた。

表 1.3 試験開始時の動植物プランクトン種組成

単位：細胞・個体／mL

門	綱	種名	湾央海水	河口域	局所的に閉鎖性が高い場所 上げ潮	局所的に閉鎖性が高い場所 下げ潮	干潟・浅場 上げ潮	干潟・浅場 下げ潮
ｸﾘﾌﾟﾄ植物	ｸﾘﾌﾟﾄ藻	CRYPTOMONADALES	40	4	40	20	20	8
渦鞭毛植物	渦鞭毛藻	*Prorocentrum micans*		1		1		
		Prorocentrum minimum		2			40	
		Prorocentrum sigmoides	7	22	9	15	25	57
		Dinophysis acuminata		1				
		Dinophysis caudata	1				2	
		Dinophysis rotundata		1				
		Gyrodinium sp.		45		16	20	120
		Noctiluca scintillans	4		2	1	8	
		Protoperidinium sp.			2	3	2	1
		Ceratium furca	8	7	3	1	63	29
		Ceratium fusus	6	1	29	6	7	8
		Ceratium tripos	2					
		PERIDINIALES	4	125	60	24	6	40
黄色植物	黄金色藻	*Dictyocha fibula*	360	165	420	39	1,720	1,480
	珪藻	*Skeletonema costatum*		13	140	7	80	12
		Thalassiosira sp.					20	
		Thalassiosiraceae		60	60	45	40	60
		Leptocylindrus danicus				7	5	4
		Chaetoceros sp.(*Hyalochaete*)						3
		Lithodesmium variabile				2		1
		Nitzschia sp.(chain formation)		11	40	35	16	29
		Nitzschia sp.			60	10		9
緑色植物	ﾌﾟﾗｼﾉ藻	PRASINOPHYCEAE			20			5
不明	不明	Unknown Micro-flagellate	60	190	1,280	140	1,040	330
繊毛虫	多膜	*Tintinnidium mucicola*					2	7
		Tintinnopsis sp.		1	1	3	2	4
		Helicostomella sp.						2
		Eutintinnus sp.					1	3
		CILIOPHORA	1	2		1		3
節足動物	甲殻	*Oithona* sp.		1				2
		Nauplius of copepoda	2	2	1	1	1	5
		種類数	12	19	16	20	21	24
		合　計	495	654	2,167	377	3,120	2,222

② 試験終了時の動植物プランクトン

試験終了時の動植物プランクトン種組成を 表 1.4 に示す。細胞数、細胞サイズの両面からみた植物プランクトン優占種を試験ケース別に整理すると以下の通りである。

【ケース①、ケース②、ケース③、ケース⑤、ケース⑥】

珪藻綱　:　*Skeletonema costatum* (2-20μm)、*Leptocylindrus danicus* (≧20μm or 2-20μm)、*Nitzschia* sp.(chain formation) (2-20μm)

その他：　不明微細鞭毛藻類 (2-20μm)

【ケース④】

渦鞭毛藻綱：　*Ceratium furca*(≧20μm)

黄金色藻綱：　*Dictyocha fibula* (2-20μm)

その他：　不明微細鞭毛藻類 (2-20μm)

また、動物プランクトンとしては、主に *Tintinnopsis* sp. などの繊毛虫が認められた。

表 1.4　試験終了時の動植物プランクトン種組成

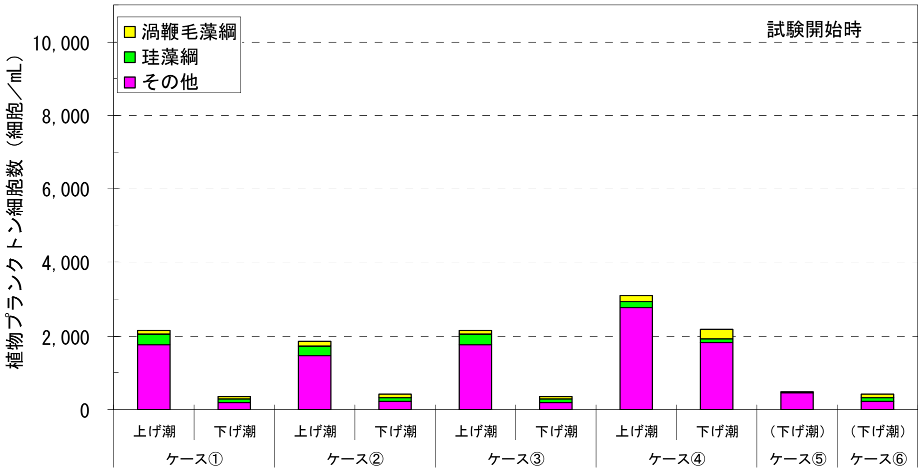
単位：細胞・個体／mL

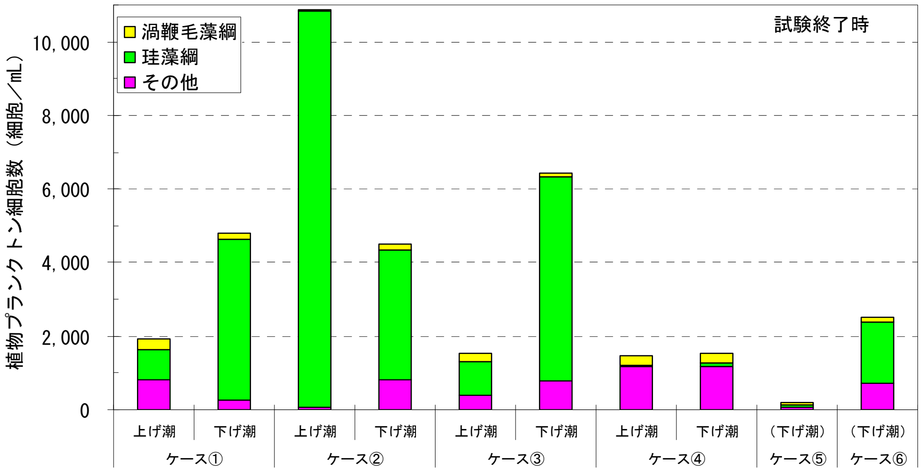
門	綱	種名	ケース① 上げ潮	ケース① 下げ潮	ケース② 上げ潮	ケース② 下げ潮	ケース③ 上げ潮	ケース③ 下げ潮	ケース④ 上げ潮	ケース④ 下げ潮	ケース⑤ (下げ潮)	ケース⑥ (下げ潮)
ｸﾘﾌﾟﾄ植物	ｸﾘﾌﾟﾄ藻	CRYPTOMONADALES		3		60	15	2		10		35
渦鞭毛植物	渦鞭毛藻	*Prorocentrum micans*		1		1		1	1			1
		Prorocentrum minimum	35	140	11	60	11	19	135	95	4	100
		Prorocentrum sigmoides	2	4	1	1		5	1	2		2
		Dinophysis acuminata	2									
		Dinophysis rotundata				1						
		Oxyphysis oxytoxoides			1							
		Gyrodinium sp.	230	10	9	65	155	60	120	85	8	13
		Polykrikos sp.					2					
		Noctiluca scintillans		1		1						
		Oblea sp.					2			2		
		Protoperidinium sp.	2	2			4	1		1	2	2
		Ceratium furca	4			2		1	10	22		
		Ceratium fusus	6	4		1	18	4			7	3
		Ceratium tripos					5					
		PERIDINIALES	7	5	1	35	12	4	12	60	32	3
黄色植物	黄金色藻	*Dictyocha fibula*	3	2	19	6	4	2	180	180	1	3
		Ebria tripartita	2			2	2					
	珪藻	*Skeletonema costatum*	540	3,850	10,500	2,230	545	4,930	16	23	12	1,220
		Thalassiosira sp.					1	1				3
		Thalassiosiraceae	45	160	210	90	4	23	3	35	3	85
		Leptocylindrus danicus	155	56	47	280	235	530	5	11	38	340
		Actinoptychus senarius			4							3
		Rhizosolenia fragilissima								8		
		Rhizosolenia sp.					1					
		Chaetoceros sp.(*Hyalochaete*)	13	10		62		11			13	
		Lithodesmium variabile	12	13	1	130	4	26	1	1		12
		Neodelphineis pelagica		12	4	6		17				
		Navicula sp.			1							
		Pleurosigma sp.				1		1				
		Nitzschia sp.(chain formation)	28	260		710	130	17	15		7	1
		Nitzschia sp.	15	20	6	30	2	1	1			1
ﾐﾄﾞﾘﾑｼ植物	ﾐﾄﾞﾘﾑｼ	EUGLENOPHYCEAE						1				
緑色植物	ﾌﾟﾗｼﾉ藻	PRASINOPHYCEAE	1								1	1
不明	不明	Unknown Micro-flagellate	815	250	60	740	370	770	980	990	60	690
繊毛虫	ｷﾈﾄﾌﾗｸﾞﾐﾉﾌｫｰﾗ	*Mesodinium rubrum*		2		1	2		1			
	多膜	*Tintinnidium mucicola*						7	12	18		5
		Tintinnopsis sp.	29	16	2	23	14	13	6	13		2
		Helicostomella sp.	2		1		2	1	1			
		Eutintinnus sp.	2				16			1		
		CILIOPHORA	17	2		6	19	8	13	5	8	4
節足動物	甲殻	*Paracalanus* sp.									1	
		Oithona sp.							1	1		
		Nauplius of copepoda	1			1			1		1	
原索動物	ｵﾀﾏﾎﾞﾔ	*Oikopleura* sp.					1					
		種類数	24	22	17	26	26	26	21	20	16	22
		合　計	1,968	4,823	10,878	4,545	1,576	6,456	1,515	1,563	198	2,529

2）試験開始時・終了時のプランクトン

① 動植物プランクトン

試験開始時･終了時の植物プランクトン細胞数を 図 1.5 に示す。試験開始時は渦鞭毛藻綱、珪藻綱以外の、その他に属する植物プランクトンが優占していた。試験終了時は、ケース①、ケース②、ケース③、ケース⑤、ケース⑥では、珪藻綱が優占していた。一方、ケース④は、その他に属する植物プランクトンが優占していた。細胞数はケース毎・潮時毎に増加している場合と減少している場合があった。





試験ケース
①局所的に閉鎖性が高い場所の海水（貧酸素化）
②局所的に閉鎖性が高い場所の海水+河口部海水（貧酸素化）
③局所的に閉鎖性が高い場所の海水
④干潟･浅場海水
⑤湾央海水
⑥局所的に閉鎖性が高い場所の海水+河口部海水

図 1.5　試験開始時・終了時の植物プランクトン細胞数（上：試験開始時、下：終了時）

試験開始時・終了時の動物プランクトン個体数を 図 1.6 に示す。動物プランクトン個体数は、ケース②上げ潮以外のケースでは、試験開始時に比べて、終了時に増加していた。

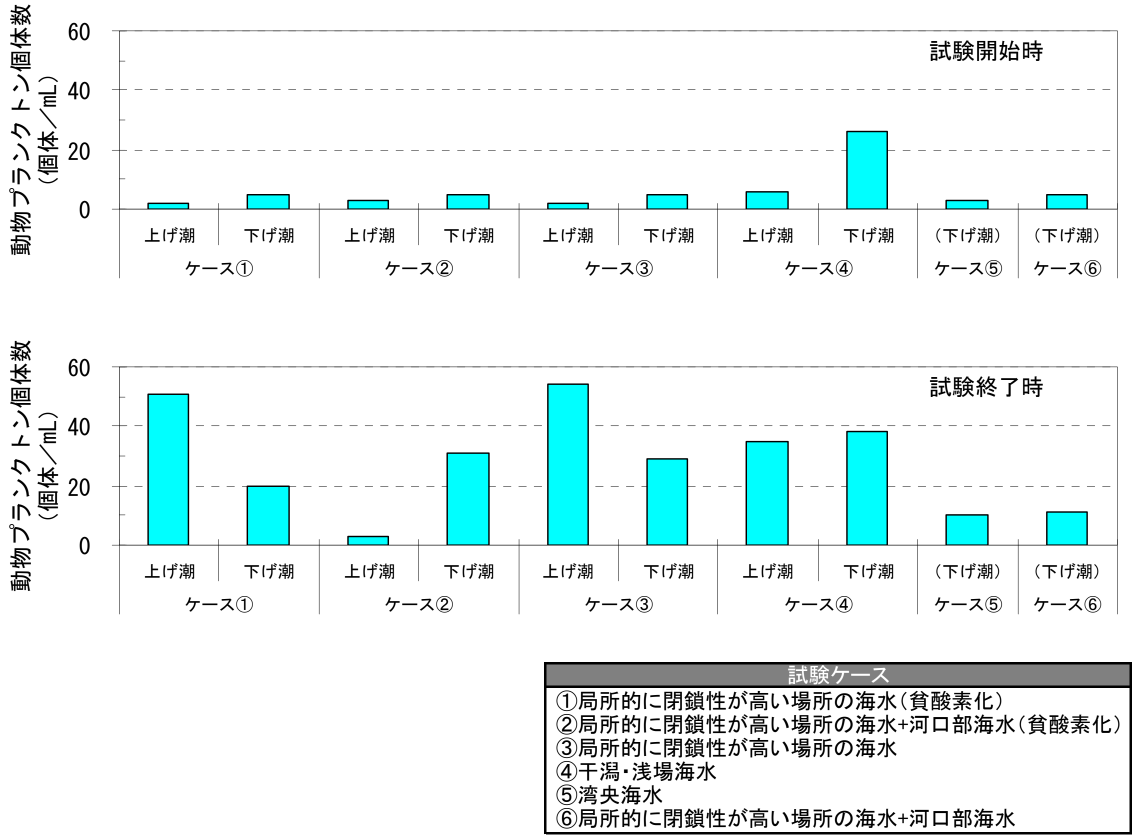
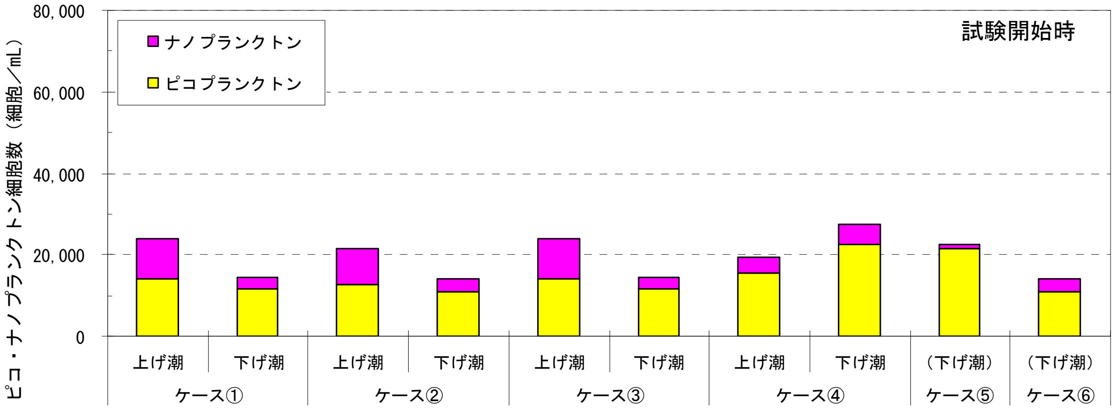
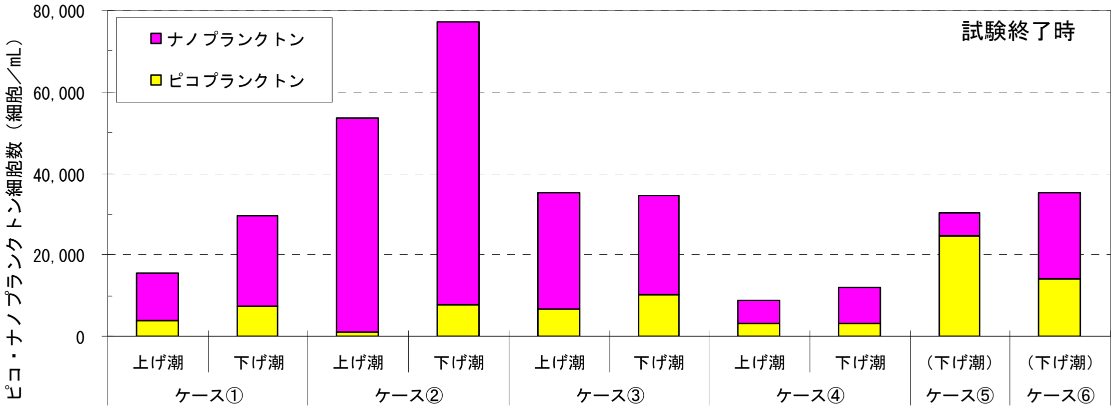


図 1.6　試験開始時・終了時の動物プランクトン個体数（上：試験開始時、下：終了時）

② ピコ・ナノプランクトン

試験開始時・終了時のピコ・ナノプランクトン細胞数を 図 1.7 に示す。ピコプランクトン細胞数は、ケース⑤以外の試験ケースで試験開始時に比べて終了時に減少していた。ナノプランクトン（独立栄養性）は、試験ケースによって異なるが、いずれの試験ケースにおいても試験開始時に比べて終了時に増加していた。特に、ケース②ではナノプランクトンが大幅に増加していた。





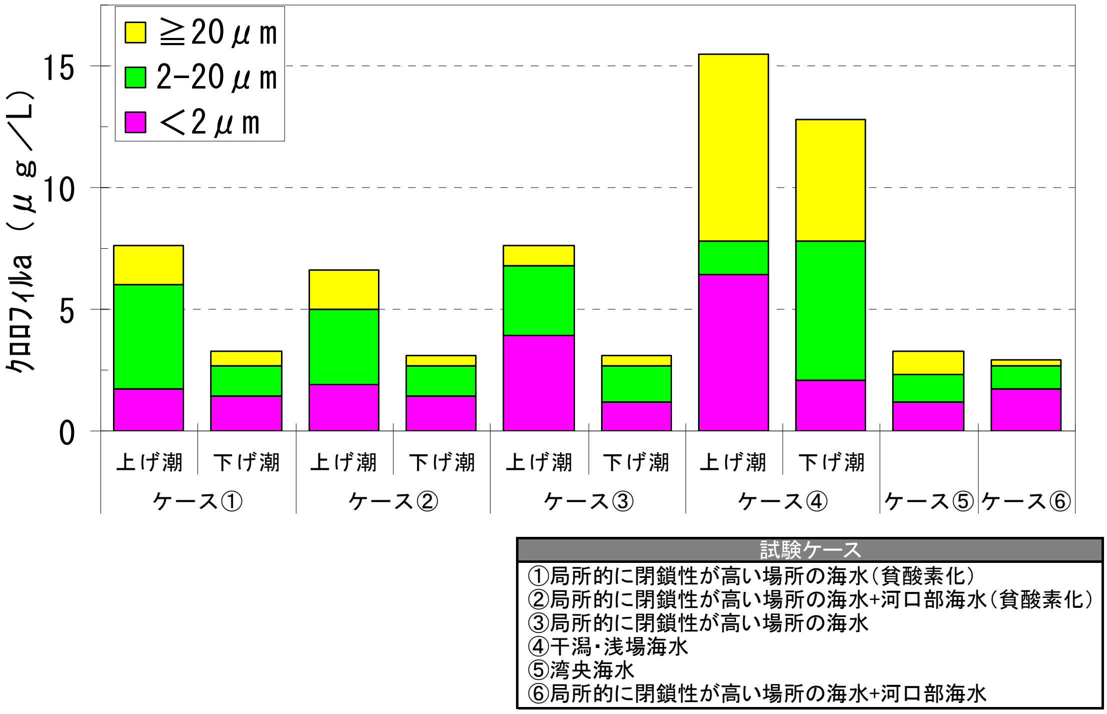
試験ケース
①局所的に閉鎖性が高い場所の海水（貧酸素化）
②局所的に閉鎖性が高い場所の海水+河口部海水（貧酸素化）
③局所的に閉鎖性が高い場所の海水
④干潟・浅場海水
⑤湾央海水
⑥局所的に閉鎖性が高い場所の海水+河口部海水

図 1.7　試験開始時・終了時のピコ・ナノプランクトン細胞数（上:試験開始時、下:終了時）

③ 試験開始時のサイズ別クロロフィル a 量

試験開始時のサイズ別クロロフィルa量を 図 1.8 に示す。

- ケース①～ケース④では、合計クロロフィル a 量はいずれも上げ潮時が下げ潮時より多い傾向がみられた。
- ケース①～③はいずれも局所的に閉鎖性が高い場所の海水であるが、概ね≧20μm が少なく、2-20μm 及び＜2μm が多い傾向にあった。
- ケース⑤は湾央海水、ケース⑥は下げ潮時に採取した局所的に閉鎖性が高い場所の海水であるが、ケース①～③の下げ潮と同様のサイズ組成がみられている
- ケース④は干潟・浅場海水であるが、クロロフィル a 量が多く、サイズ別では≧20μm の画分の量が多かった。



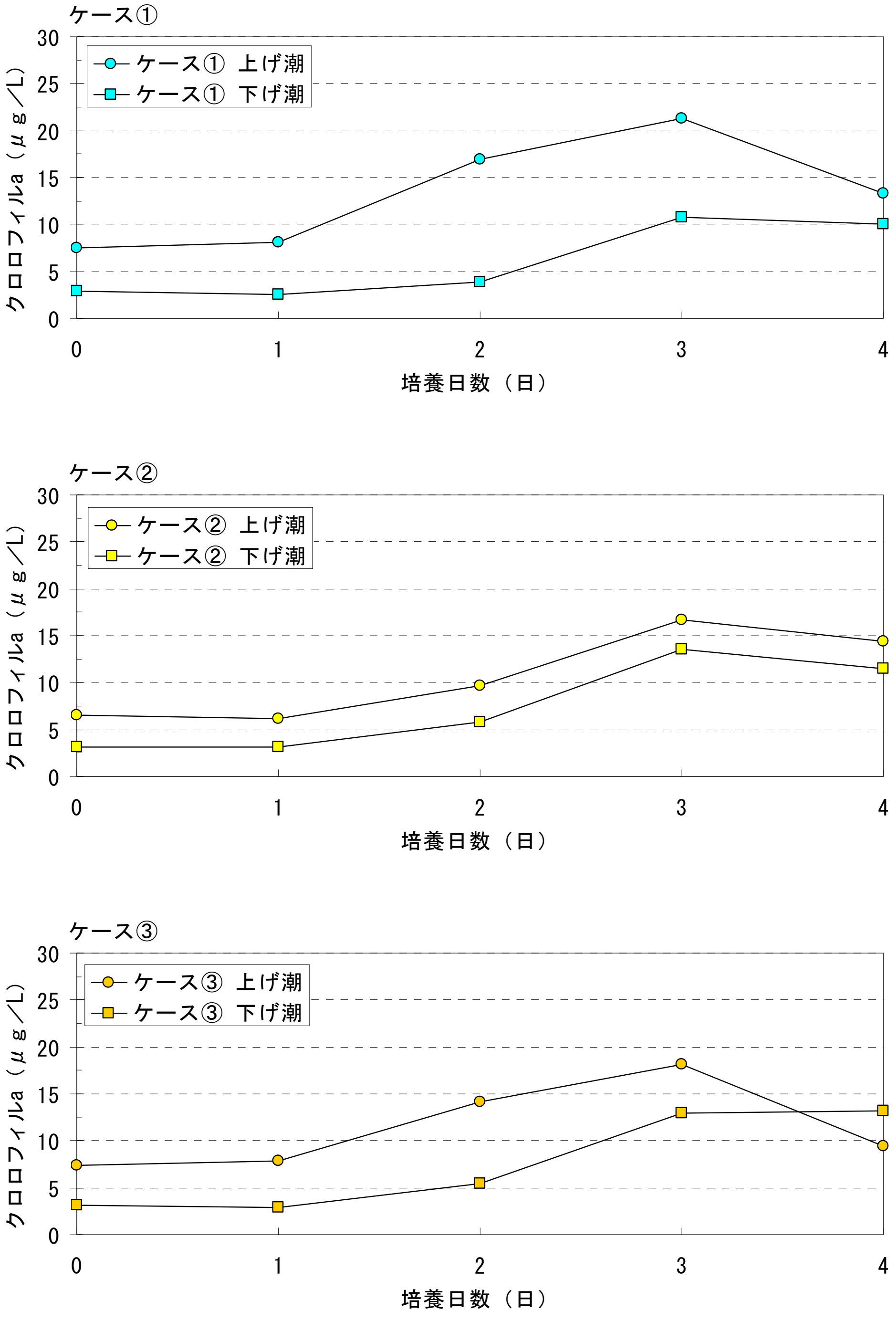
＊ グラフ中に示したクロロフィル a 量は片方の容器（容器１）の測定結果

図 1.8 試験開始時のサイズ別クロロフィル a 量

④ 増殖曲線

各試験ケースの増殖曲線を 図 1.9 に示す。

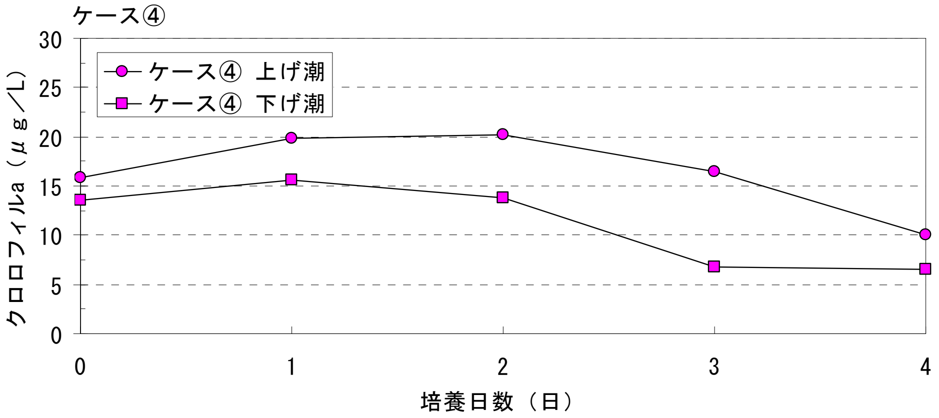
- 試験開始時のクロロフィル a 量（2 連の平均）は、ケース①上げ潮が 7.5μg/L、下げ潮が 2.5μg/L、ケース②上げ潮が 6.5μg/L、下げ潮が 3.1μg/L、ケース③上げ潮が 7.4μg/L、下げ潮が 3.1μg/L、ケース④上げ潮が 15.9μg/L、下げ潮が 13.6μg/L、ケース⑤が 3.5μg/L、ケース⑥が 2.9μg/L であった。
- ケース①、ケース②、ケース③及びケース⑥では、試験開始後 3 日目まで増殖が確認された。ケース④は、試験開始後 1～2 日目まで増殖が確認されたが、それ以降は減少した。ケース⑤は増殖しなかった。

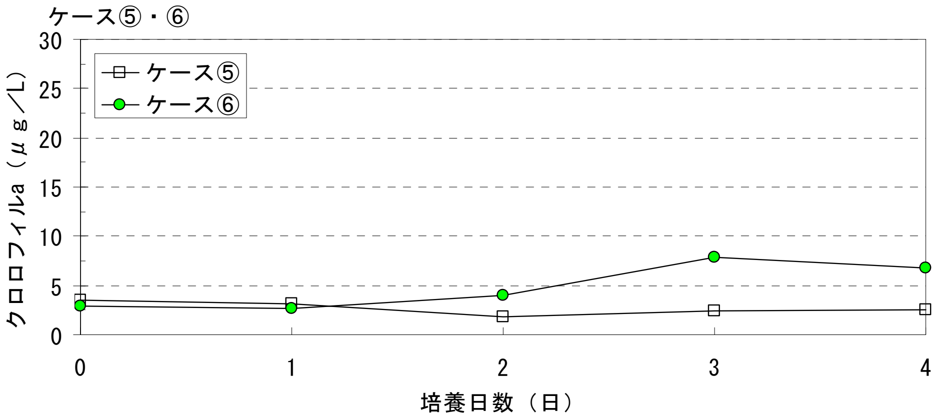


試験ケース
①局所的に閉鎖性が高い場所の海水（貧酸素化）
②局所的に閉鎖性が高い場所の海水+河口部海水（貧酸素化）
③局所的に閉鎖性が高い場所の海水
④干潟・浅場海水
⑤湾央海水
⑥局所的に閉鎖性が高い場所の海水+河口部海水

*グラフ中に示したクロロフィルａ量は２連の平均

図 1.9(1) 増殖曲線





試験ケース
①局所的に閉鎖性が高い場所の海水(貧酸素化)
②局所的に閉鎖性が高い場所の海水+河口部海水(貧酸素化)
③局所的に閉鎖性が高い場所の海水
④干潟・浅場海水
⑤湾央海水
⑥局所的に閉鎖性が高い場所の海水+河口部海水

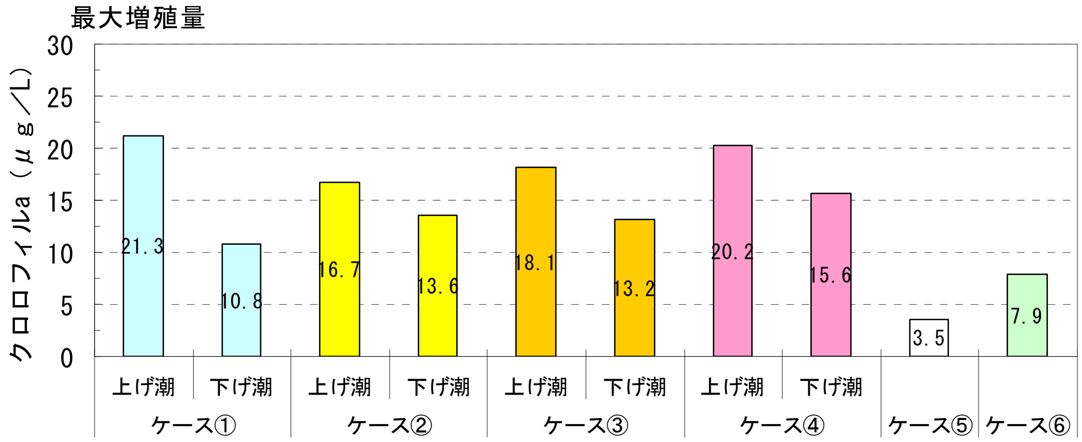
*グラフ中に示したクロロフィルａ量は２連の平均

図 1.9(2)　増殖曲線

⑤ 最大増殖量

各試験ケースの最大増殖量を 図 1.10 に示す。

- 各試験ケースの最大増殖量（クロロフィルａ量）は、ケース①上げ潮が 21.3μg/L、下げ潮が 10.8μg/L、ケース②上げ潮が 16.7μg/L、下げ潮が 13.6μg/L、ケース③上げ潮が 18.2μg/L、下げ潮が 13.2μg/L、ケース④上げ潮が 20.2μg/L、下げ潮が 15.6μg/L、ケース⑤が 3.5μg/L（開始時の値）、ケース⑥が 7.9μg/L であった。
- ケース①～④では、上げ潮時の方が最大増殖量（クロロフィルａ量）が多かった。試験開始時と同様の傾向であった。



試験ケース
①局所的に閉鎖性が高い場所の海水（貧酸素化）
②局所的に閉鎖性が高い場所の海水+河口部海水（貧酸素化）
③局所的に閉鎖性が高い場所の海水
④干潟・浅場海水
⑤湾央海水
⑥局所的に閉鎖性が高い場所の海水+河口部海水

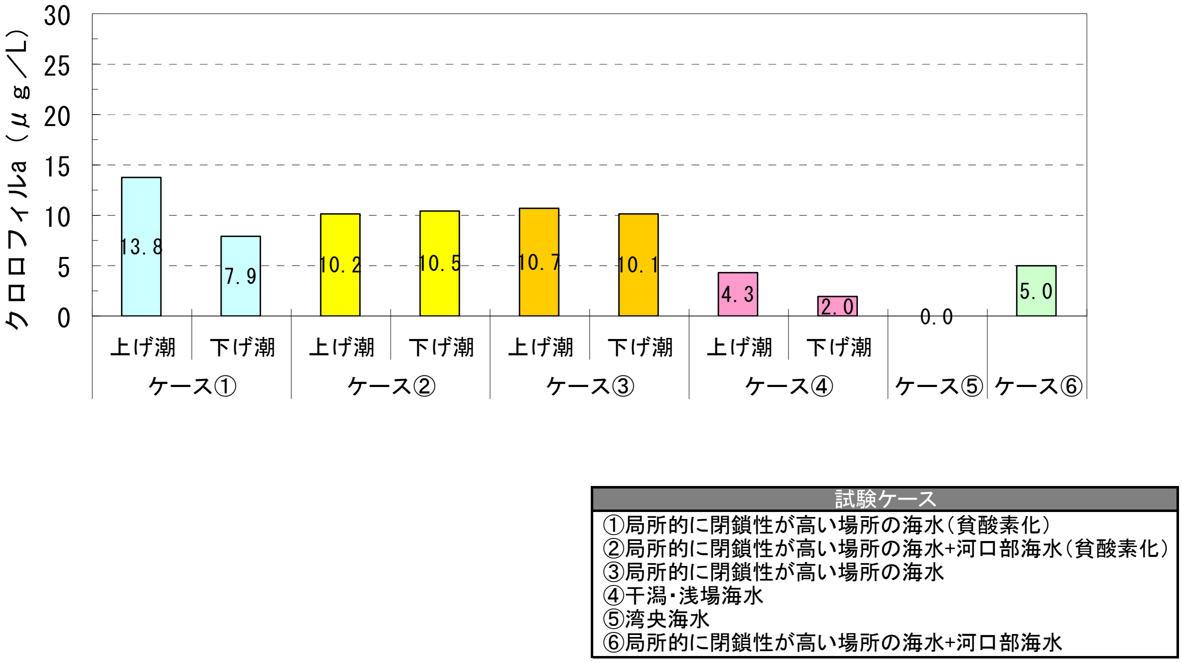
*グラフ中に示したクロロフィル a 量は 2 連の平均

図 1.10　最大増殖量（クロロフィル a 量）

⑥ 増殖量の差分

各試験ケースの増殖量の差分を 図 1.11 に示す。

- 各試験ケースの増殖量の差分（クロロフィル a 量）は、ケース①上げ潮が 13.8μg/L、下げ潮が 7.9μg/L、ケース②上げ潮が 10.2μg/L、下げ潮が 10.5μg/L、ケース③上げ潮が 10.7μg/L、下げ潮が 10.1μg/L、ケース④上げ潮が 4.3μg/L、下げ潮が 2.0μg/L、ケース⑤が 0.0μg/L（増殖せず）、ケース⑥が 5.0μg/L であった。
- ケース①～③では、クロロフィル a 量として 10μg/L 前後の増加が認められたが、ケース④では、ケース①～③より低い増分であった。また、ケース⑤では増加が認められなかった。



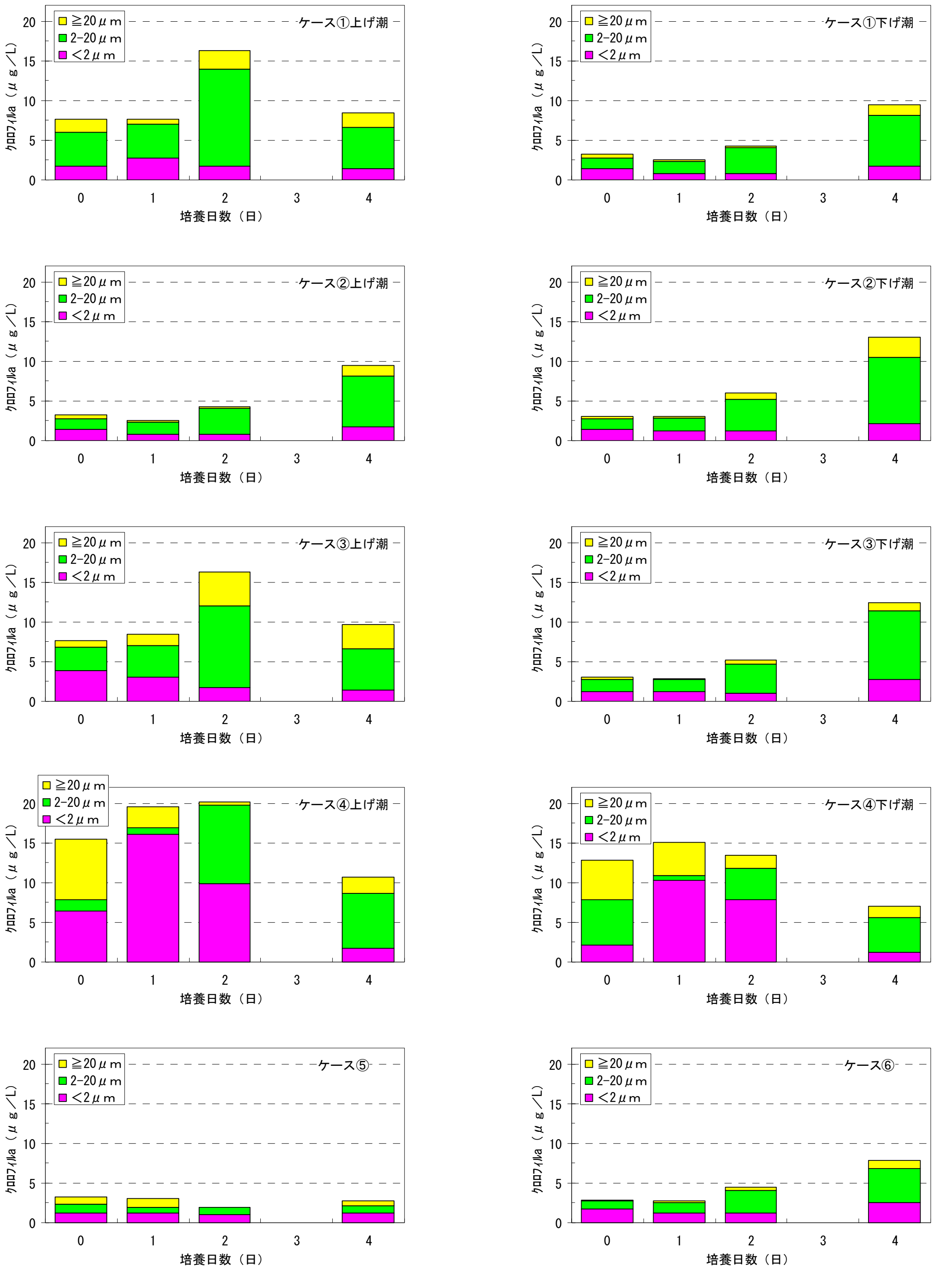
*グラフ中に示したクロロフィルａ量は２連の平均

図 1.11　増殖量の差分（クロロフィルａ量）

⑦ サイズ別クロロフィルａ量の変化

サイズ別クロロフィルa量の変化を 図 1.12 に示す。

- 試験開始後 2 日目をみると、ケース⑤を除くいずれの試験ケースとも、2-20μm 画分のクロロフィルａ量が増加していた。
- ケース④では、他のケースと異なり、試験開始後 1～2 日目に<2μm 画分のクロロフィルａ量が増加していた。



試験ケース
①局所的に閉鎖性が高い場所の海水(貧酸素化)
②局所的に閉鎖性が高い場所の海水+河口部海水(貧酸素化)
③局所的に閉鎖性が高い場所の海水
④干潟・浅場海水
⑤湾央海水
⑥局所的に閉鎖性が高い場所の海水+河口部海水

＊　グラフ中に示したクロロフィルａ量は片方の容器（容器１）の測定結果

＊　試験開始３日目のサイズ別クロロフィルは欠測

図 1.12　サイズ別クロロフィルａ量の変化

⑧ 水質分析結果

試験開始時の水質分析結果を 表 1.5 に示す。

- 試験開始時の溶存無機態の窒素・リンは、DIN が 0.01 未満～0.15mg/L、DIP が 0.006～0.012mg/L であり、窒素、リンともに低かった。
- 珪酸塩は 1.8～10.8mg/L であり、珪藻類が増殖するのに十分な量を含んでいた。

表 1.5　試験開始時の水質分析結果

単位：mg/L

項目		湾央海水	河口域	局所的に閉鎖性が高い場所		干潟・浅場	
				上げ潮	下げ潮	上げ潮	下げ潮
窒素	TN	0.40	0.72	0.55	0.52	0.52	0.55
	DTN	0.31	0.48	0.38	0.32	0.34	0.36
	DIN	<0.01	0.15	0.07	0.06	0.03	0.01
	NH_4-N	<0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01
	NO_2-N	<0.002	0.008	0.004	0.002	<0.002	<0.002
	NO_3-N	<0.01	0.12	0.05	0.05	0.01	<0.01
リン	TP	0.014	0.039	0.022	0.025	0.021	0.022
	DTP	0.011	0.020	0.018	0.021	0.017	0.013
	PO_4-P (DIP)	0.009	0.009	0.009	0.012	0.006	0.006
珪酸塩	SiO_2-Si	1.8	10.8	2.2	2.8	5.2	9.4
全有機炭素	TOC	1.2	1.7	1.5	1.4	1.6	1.4

1.3 まとめ

試験の結果から考えられる内容を以下に示す。

- 試験開始時の植物プランクトン量（クロロフィル a 量）は干潟・浅場域＞局所的に閉鎖性の高い場所（＞湾央）であった。潮時では、上げ潮＞下げ潮であった。サイズ組成は、局所的に閉鎖性の高い場所では 2-20μm 画分が多いのに対し、干潟・浅場域では≧20μ画分が多かった。試験開始時の栄養塩類は、DIN、DIP ともに通常の三河湾よりかなり低い値であったことから、各ケース（海域）における植物プランクトン量（クロロフィル a 量）やサイズ組成と栄養環境の関係について比較検討することは難しかった。今後、同様の現象をとらえていく中で、再現性を確認する必要があるものと思われる。
- クロロフィル a の最大増殖量は、潮時による違いはあるものの、局所的に閉鎖性の高い場所と干潟・浅場域という場所よる大きな違いはなかった。一方、増殖量の差分は、ケース①～③では 10μg/L 前後の増加が認められたが、ケース④では、ケース①～③より低い増分であった。また、ケース⑤では増加が認められなかった。各ケースの溶存態無機栄養塩類は上述のとおりかなり低い値であったが、リン（DIP）は大きな違いはみられないのに対して、窒素（DIN）は河口部＞局所的に閉鎖性の高い場所＞干潟・浅場であった。これらのことから、増殖量の差分は残存する窒素（DIN）の量に依存した結果であったことが示唆された。

- 局所的に閉鎖性の高い場所での貧酸素水の植物プランクトン増殖に対する影響を確認した（ケース①、②）。貧酸素化していないケース③と比較すると、最大増殖量やサイズ別のクロロフィル a 量の組成に際だった違いは認められなかった。このことから、貧酸素水が植物プランクトンの増殖に大きな影響を与えることはないものと推察される。ただし、現場海域での貧酸素水には、底層での還元化に伴う硫化水素および硫化物も多く含まれ、これらが植物プランクトンの増殖（三河湾の一次生産）に与える影響については課題である。
- 局所的に閉鎖性の高い場所の海水に河口部海水を添加して培養したが（ケース②、ケース⑥）、添加していない局所的に閉鎖性の高い場所の海水（ケース①、ケース③）と比較して植物プランクトンの増殖に与える影響は認められなかった。河口部海水の溶存態無機栄養塩は、DIN が 0.15mg/L、DIP が 0.009mg/L であり、窒素は局所的に閉鎖性の高い場所より若干多く、リンはほぼ同様であった。本試験では、添加ケース（ケース②と⑥）について、局所的に閉鎖性の高い場所の海水と河口部海水を 8:2 で混合した。この混合率で想定されるケース②上げ潮の DIN 濃度は 0.09mg/L、ケース②上げ潮の DIN 濃度は 0.08mg/L である。河口部海水の添加効果が認められなかったのは、元の局所的に閉鎖性の高い場所の海水（DIN 濃度 0.06～0.07mg/L）とほとんど変わらなかったためと推察される。
- 干潟・浅場域（ケース④）は、試験開始時に≧20μ画分が多く、培養中に＜2μm 画分が多く増殖しており、局所的に閉鎖性の高い場所と異なった結果となった。この原因については現時点でよく分からないが、今後、同様の現象をとらえていく中で明らかにしていく必要があるものと思われる。
- 試験水は試験開始前に大中型の動物プランクトン（100μm≧）を除いているが、それより小さい動物プランクトンを含んでの培養である。試験開始時と終了時の動物プランクトン個体数をみると、試験終了時の方が明らかに動物プランクトンが増加していた。本試験で得られた増殖曲線、サイズ組成（クロロフィル a 量）の変化は、動物プランクトンの摂食影響を含んでいることを留意する必要がある。
- 今後は、過去の三河湾での AGP 試験の結果や、他の閉鎖系海域での事例も併せて検討していく必要がある。試験結果は、試験を採取する時期（水質環境）や、試験水中の種組成によって異なることが想定される。

2. 底生動物（二枚貝）による植物プランクトン捕食時のサイズ選好試験

2.1 試験方法

1) 供試生物と試験水の採取

試験に用いた二枚貝は、平成 23 年 11 月 28 日に三河湾奥の干潟域より採取した。採取された二枚貝の種類は、アサリ、シオフキ、バカガイであり、殻長 7mm から 35mm の範囲にあった。採取した二枚貝はただちに試験場所に搬入し、試験開始まで馴致飼育を行った。試験に用いた試験水は、平成 23 年 11 月 28 日に二枚貝を採取した場所の表層より採取した。採取時の水温は 15℃前後であった。

2) 試験条件

試験条件を 表 2.1 に示す。

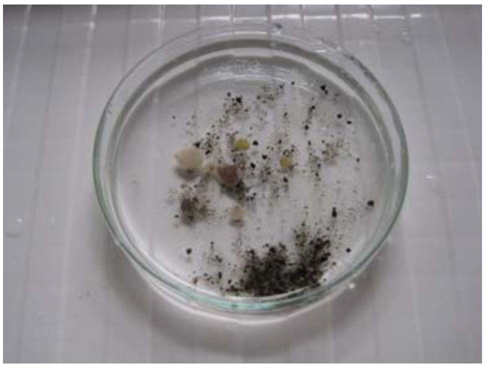
表 2.1　試験条件

項目	設定条件
供試生物	三河湾湾奥より採取した二枚貝（アサリ、シオフキ、バカガイ） 大きさ別に小型サイズ（殻長 7mm 前後）、中型サイズ（殻長 15mm 前後）、大型サイズ（殻長 35mm 前後）の 3 グループに分類
試験場所	恒温室
試験水温	15℃（供試生物、試験水の採取時の水温を考慮して設定）
試験水	三河湾海水を 2 日間培養し、植物プランクトン総細胞数として 10^3 細胞／mL のオーダー以上とした
試験容器	1L ビーカー
試験期間（時間）	1 時間（サンプリング間隔：0、0.25、0.5、1.0 時間）
その他	• 試験容器への二枚貝の収容個体数は、小型サイズが 8 個体、中型サイズが 4 個体、大型サイズが 2 個体 • 試験容器に砂を敷き、二枚貝が潜砂した状態で試験実施 • 試水中の植物プランクトンが沈降せず、細胞密度が均一となるように、容器側面からスターラーで撹拌

3）試験ケース

試験ケースを 表 2.2 に示す。

表 2.2　試験ケース

試験区	内容	備考（供試生物の写真）
小型サイズ	殻長 7mm 前後の二枚貝（アサリ 4 個体、シオフキ 2 個体、バカガイ 2 個体）を潜砂させ、培養した三河湾海水を添加	
中型サイズ	殻長 15mm 前後の二枚貝（アサリ 3 個体、シオフキ 1 個体）を潜砂させ、培養した三河湾海水を添加	
中型サイズ	殻長 35mm 前後の二枚貝（アサリ 2 個体）を潜砂させ、培養した三河湾海水を添加	
対照区	試験区と同様量の細砂を敷き、培養した三河湾海水を添加	供試生物（二枚貝）は無し

4）試験手順

f/2 培地を添加して 2 日間培養した三河湾海水（植物プランクトンを含む）を試験液とした。二枚貝馴化用海水は、目合い 0.2μｍのフィルターでろ過して植物プランクトンを除いた。ビーカーに細砂を敷き、馴化用海水（ろ過海水）を 200mL入れて試験水温（15℃）になってから二枚貝を収容した。試験容器中のすべての二枚貝が潜砂したこと確認してから、試験水を 500mL添加して試験を開始した。試験中は、試水中の植物プランクトンが沈降せず、細胞密度が均一となるように容器側面からスターラーで撹拌した。試験実施状況を 図 2.1 に、

試験装置を 図 2.2 に示す。

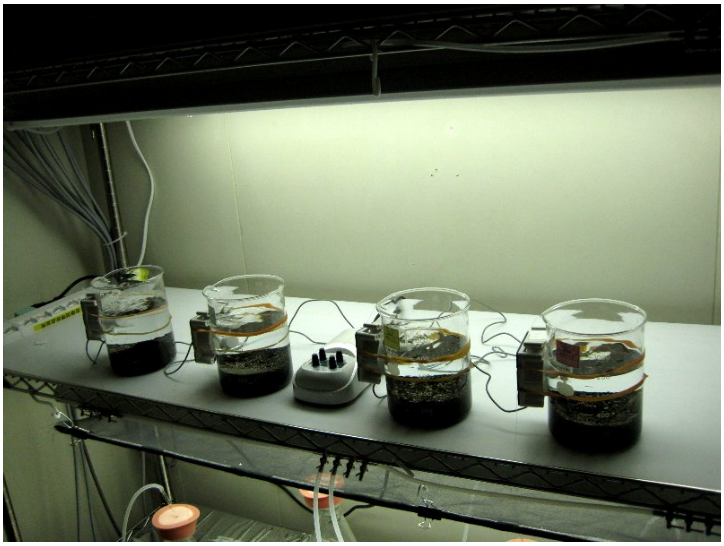


図 2.1　底生動物（二枚貝）による植物プランクトン捕食時のサイズ選好試験実施状況

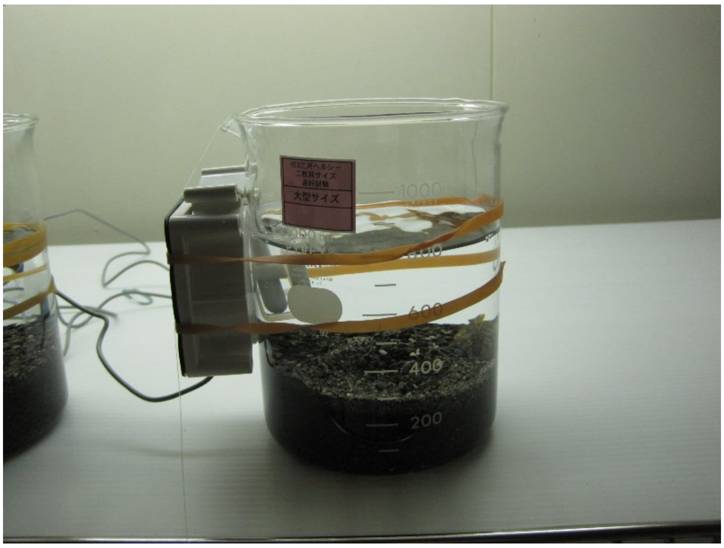


図 2.2　試験装置

5）試験水の分析

試験開始時、試験開始 0.25 時間後、0.5 時間後、1.0 時間後に試験水の一部を採取した。試験開始時と終了時（開始 1 時間後）は、サイズ別クロロフィルとプランクトン種組成を把握した。0.25 時間後と 0.5 時間後はクロロフィルを測定した。

表 2.3　試験期間中のモニタリング項目と頻度

モニタリング項目	試験開始時	0.25時間後	0.5時間後	1時間後	備考
サイズ別クロロフィル	○	△	△	○	○：20μm以上、2-20μm、2μm未満の3サイズ △：サイズ分画なし
プランクトン（植物主体で動物）	○			○	顕微鏡観察（開始時は対照区のみ、1 時間後は試験区と対照区）
ピコ・ナノプランクトン	○			○	顕微鏡観察（開始時は対照区のみ、1 時間後は試験区と対照区）

注：○、△が採取・測定

6) 結果の解析方法

① 二枚貝のろ水速度

二枚貝のろ水速度は以下の式により算出した。

$$F = (V/t) \times [\ln(C_0/C_t)-\ln(Cb_0/Cb_t)]$$

ここで、C_0：試験開始時のクロロフィル a 量、C_t:試験期間中のクロロフィル a 量、Cb_0：試験開始時の対照区（ブランク）のクロロフィル a 量、Cb_t:試験期間中の対照区（ブランク）のクロロフィル a 量とする。また、V：試験水量、t：試験時間とする。

② ろ水による植物プランクトン減耗率

二枚貝のろ水による植物プランクトン減耗率（%）は以下の式により算出した。

$$R = (1-C_t/Cb_0) \times 100$$

2.2 試験結果

1) プランクトン種組成

試験開始時（対照区）・終了時のプランクトン種組成を 表 2.4 に示す。細胞数、細胞サイズの両面から判断した植物プランクトン優占種は以下のとおりである。

珪藻綱： *Skeletonema costatum*（≧20μm または 2-20μm）

Thalassiosira sp.（≧20μm または 2-20μm）

その他： 不明微細鞭毛藻類（2-20μm）

表 2.4 試験開始時（対照区）・終了時のプランクトン種組成

単位：細胞・個体／mL

門	綱	種名	開始時（対照区）	終了時 小型サイズ	終了時 中型サイズ	終了時 大型サイズ
ｸﾘﾌﾟﾄ植物	ｸﾘﾌﾟﾄ藻	CRYPTOMONADALES	4	4		
渦鞭毛植物	渦鞭毛藻	*Prorocentrum micans*	1			
		Prorocentrum minimum	1			
		Prorocentrum sigmoides	4	4	2	
		Dinophysis acuminata	1			
		Gymnodinium sp.	1			
		GYMNODINIALES	2	2	4	1
		Protoperidinium bipes	3	5		
		Protoperidinium sp.	1			
		PERIDINIALES	1		1	
黄色植物	珪藻	*Lauderia annulata*	5	4	2	
		Skeletonema costatum	6,220	3,410	3,630	465
		Thalassiosira sp.	140	11	14	4
		Thalassiosiraceae	55	5	6	2
		Leptocylindrus danicus	8	1		
		Rhizosolenia fragilissima	1			
		Cerataulina pelagica	10		1	
		Chaetoceros sp.(*Hyalochaete*)	41	1	5	
ﾐﾄﾞﾘﾑｼ植物	ﾐﾄﾞﾘﾑｼ	EUGLENOPHYCEAE	4	4	2	
不明	不明	Unknown Micro-flagellate	90	55	11	1
繊毛虫	多膜	*Tintinnopsis* sp.	1			
		Ciliophora	3	1	3	
		種類数	22	13	12	5
		合　計	6,597	3,507	3,681	473

試験開始時（対照区）・終了時のピコ・ナノプランクトン細胞数を 表 2.5 に示す。試験開始時はピコプランクトンが 3,810 細胞/mL、独立栄養性ナノプランクトンが 5,260 細胞/mLであった。試験終了時は、いずれの試験区でもピコ・ナノプランクトンの細胞数が減少していた。

表 2.5 試験開始時（対照区）・終了時のピコ・ナノプランクトン細胞数

単位：細胞／mL

種名	開始時（対照区）	終了時 小型サイズ	終了時 中型サイズ	終了時 大型サイズ
ピコプランクトン	3,810	2,360	1,910	2,090
ナノプランクトン	5,260	2,220	2,270	1,090

2）クロロフィル a の経時変化とろ水速度

各試験区のクロロフィルaの経時変化を 図 2.3 に示す。試験開始時の各試験区のクロロフィルaは、それぞれ 14.3～15.5μg/Lであった。試験期間中は、各試験区とも二枚貝のろ水（捕食）に伴ってクロロフィルaが減少し、試験終了時には小型サイズが 9.3μg/L、中型サイズが 9.4μg/L、大型サイズが 4.4μg/Lであった。

試験開始時～試験終了時の間のクロロフィル a より算出される二枚貝のろ水速度は、小型サイズが 30mL/個体/時間、中型サイズが 74mL/個体/時間、大型サイズが 400mL/個体/時間であった。

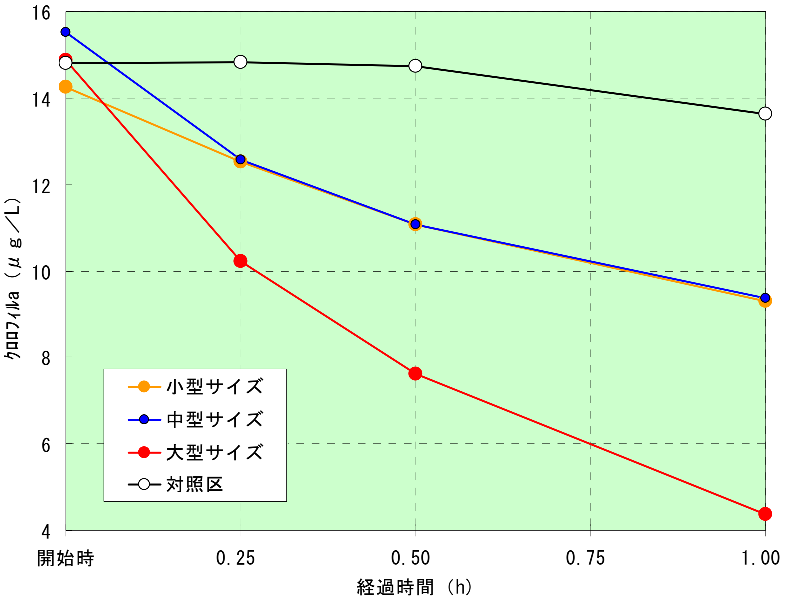


図 2.3　各試験区のクロロフィル a の経時変化

3）サイズ別クロロフィル a

試験開始時・終了時のサイズ別クロロフィルaを 図 2.4 に、サイズ別クロロフィルの減耗率を 図 2.5 に示す。試験開始時の対照区のクロロフィルaは、≧20μmが 2.6μg/L、2-20μmが 7.5μg/L、＜2μmが 5.2μg/Lであった。試験終了時には、いずれのサイズ画分でもクロロフィルaの減耗が確認されたが、減耗の仕方に違いがみられた。各試験区の減耗率（≧20μm、2-20μm、＜2μmの順で）は、小型サイズが 46%、44%、23%、中型サイズが 60%、35%、27%、大型サイズが 96%、89%、33%であった。

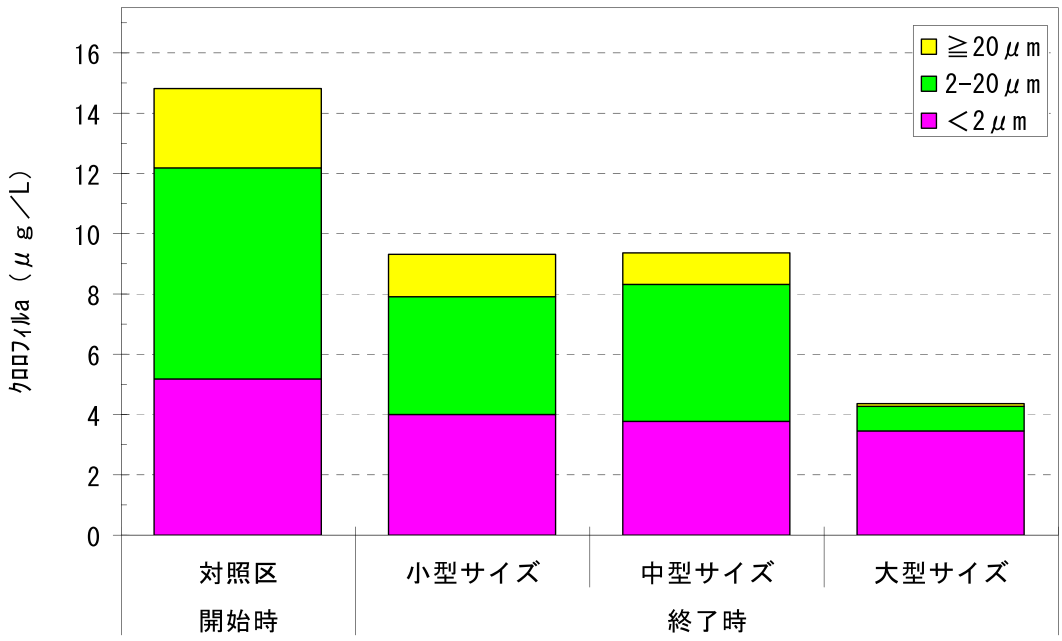


図 2.4　試験開始時・終了時のサイズ別クロロフィルａ

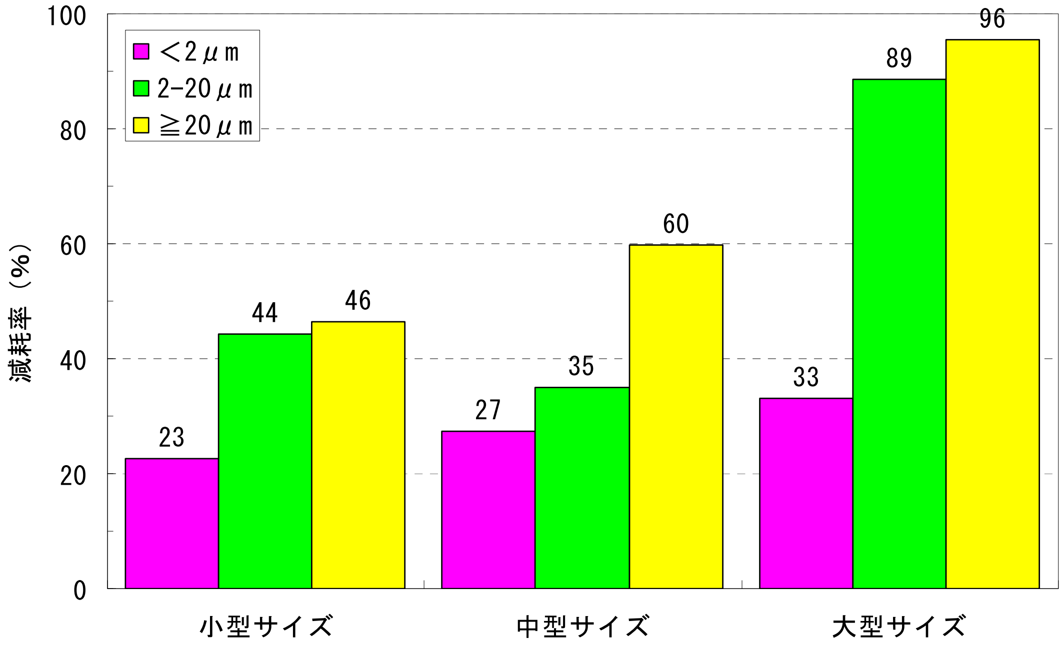


図 2.5　サイズ別クロロフィルの減耗率

2.3 まとめ

- 培養した三河湾海水を二枚貝（小型サイズ、中型サイズ、大型サイズの 3 試験区）に与えて経時的に植物プランクトン（クロロフィル a）量を把握したところ、いずれの試験区においても植物プランクトン（クロロフィル a）量は減耗した。これは、二枚貝によって植物プランクトンがろ水（捕食）されたためである。
- 各試験区のろ水速度は、小型サイズが 30mL/個体/時間、中型サイズが 74mL/個体/時間、大型サイズが 400mL/個体/時間であった。
- 試験開始時と終了時にサイズ別クロロフィル a を測定した。試験終了時には、いずれのサイズ画分でもクロロフィル a の減耗が確認されたが、減耗の仕方に違いがみられた。

3. 動物プランクトンによる植物プランクトン摂餌状況確認試験（補足情報）

三河湾の海水を培養し、海水中の植物プランクトン量（クロロフィル a）の変化を把握することで、動物プランクトンによる植物プランクトンの捕食特性を把握する。試験方法は希釈培養法とする。希釈培養法は、海水中のプランクトン群集（植物プランクトン・動物プランクトン）を数段階希釈して培養することによって、増殖する植物プランクトンの増殖速度と、動物プランクトンによる植物プランクトンの摂食速度を求めることが出来る。

3.1 試験方法

1) 試験水の採取

試験に用いた試水は、平成 23 年 10 月 27 日に三河湾の局所的に閉鎖性の高い場所の水深 0.5m 層より採取した。採取時の水温は表層 18℃、下層 20℃であった。

2) 試験条件

試験条件を 表 3.1 に示す。

表 3.1　試験条件

項目	設定条件
試験水	三河湾における局所的に閉鎖性の高い場所の海水（三河湾のプランクトン群集：植物・動物プランクトン混合試料）
試験場所	インキュベーター
試験水温	20℃（現地水温が 18～20℃であり、また先に行った AGP 試験が 20℃で実施されたことを考慮して設定）
試験容器	200mL 容量三角フラスコ
試験時間	24 時間
光量・周期	AGP 試験と同様（白色蛍光灯 4,000lux（57μmol/m^2/s）、12 時間明期・12 時間暗期）

3) 試験ケース

試験ケースを 表 3.2 に示す。

表 3.2　試験ケース

試験区	内容
100%区	局所的に閉鎖性の高い場所の海水＋栄養添加（f/2）
75%区	局所的に閉鎖性の高い場所の海水とろ過した局所的に閉鎖性の高い場所の海水を 75:25 の比率で混合＋栄養添加(f/2)
50%区	局所的に閉鎖性の高い場所の海水とろ過した局所的に閉鎖性の高い場所の海水を 50:50 の比率で混合＋栄養添加(f/2)
25%区	局所的に閉鎖性の高い場所の海水とろ過した局所的に閉鎖性の高い場所の海水を 25:75 の比率で混合＋栄養添加(f/2)
10%区	局所的に閉鎖性の高い場所の海水とろ過した局所的に閉鎖性の高い場所の海水を 10:90 の比率で混合＋栄養添加(f/2)
対照区	局所的に閉鎖性の高い場所の海水のみ

4）試験手順

試験水は、大中型の動物プランクトンを除くため、目合い 200μｍのナイロン製のプランクトンネットでろ過した。ろ過した試験水の一部は目合い 0.2μｍのメンブレンフィルターでろ過した（ろ過海水)。生海水とろ過海水を試験ケースに示した混合比率となるようにビーカーに入れて撹拌・混合した。これをメスシリンダーで 150mL計量し、200mL容量の三角フラスコに分注した。各試験ケースとも２連で実施した。試験液の分注が終わった試験容器は、シリコセンで栓をして調温・調光した恒温室に設置して上記試験条件で培養を開始した。培養は静置で実施した。試験実施状況を 図 3.1 に示す。

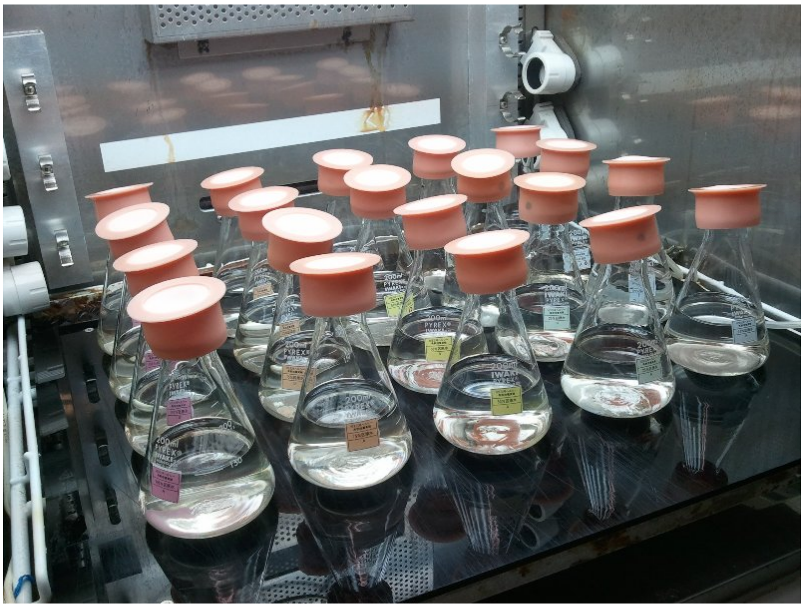


図 3.1　希釈培養試験　実施状況

5) 試験水の分析

試験開始時・終了時にサイズ別クロロフィルを測定した。また、試験開始時にプランクトン種組成を把握した。

表 3.3　試験期間中のモニタリング項目と頻度

モニタリング項目	開始時	終了時	備考
サイズ別クロロフィル	○	○	*20μm以上、2-20μm、2μm未満の3サイズ
プランクトン（植物主体で動物）	○		顕微鏡観察（対照区のみ）
ピコ・ナノプランクトン	○		顕微鏡観察（対照区のみ）

注：○が採取・測定

6) 結果の解析方法

植物プランクトンのみかけの比増殖速度（μ）は以下の式により算出した。

$$\mu = \ln(C_t/C_0)/t$$

ここで、C_t:試験終了時のクロロフィル a 量、C_0：開始時のクロロフィル a 量とする。また、上記で算出された比増殖速度（μ）は、未ろ過海水の混合割合（x）の増加に対して、

$$\mu = \mu_{max} - gx$$

と、右下がりの直線関係が成立する。ここで、μ_{max} は植物プランクトンの最大増殖速度、g は微小動物プランクトンなど捕食者の比捕食速度となる。

3.2 試験結果

1）試験開始時のプランクトン種組成

試験開始時のプランクトン種組成を 表 3.4 に示す。試験水採取時の三河湾は赤潮状態であった。細胞数、細胞サイズの両面から判断した植物プランクトン優占種は以下の通りである。

渦鞭毛藻綱： *Prorocentrum sigmoides*（≧20μm）、*Ceratium furca*（≧20μm）

珪藻綱： *Skeletonema costatum*（≧20μm または 2-20μm）

ラフィド藻綱： *Heterosigma akashiwo*（2-20μm）

その他： 不明微細鞭毛藻類（2-20μm）

また、捕食者となる動物プランクトンや従属栄養性の種類は以下の通りである。

動物プランクトン：多毛類（ゴカイ）、カイアシ類の幼生

渦鞭毛藻： *Gyrodinium* sp.、*Polykrikos* sp.

表 3.4　試験開始時のプランクトン種組成

単位：細胞／mL

門	綱	種名	100%区 開始時
ｸﾘﾌﾟﾄ植物	ｸﾘﾌﾟﾄ藻	CRYPTOMONADALES	40
渦鞭毛植物	渦鞭毛藻	*Prorocentrum sigmoides*	46
		Gyrodinium sp.	880
		Polykrikos sp.	2
		Ceratium furca	136
		Ceratium fusus	3
		PERIDINIALES	6
黄色植物	珪藻	*Skeletonema costatum*	21,800
		Thalassiosira sp.	80
		Thalassiosiraceae	40
		Leptocylindrus danicus	240
		Actinoptychus senarius	40
		Guinardia flaccida	2
		Bacteriastrum sp.	3
		Chaetoceros lorenzianum	9
		Nitzschia sp.(chain formation)	120
	ﾗﾌｨﾄﾞ藻	*Heterosigma akashiwo*	5,520
ﾐﾄﾞﾘﾑｼ植物	ﾐﾄﾞﾘﾑｼ	EUGLENOPHYCEAE	80
緑色植物	ﾌﾟﾗｼﾉ藻	PRASINOPHYCEAE	120
不明	不明	Unknown Micro-flagellate	1,440
環形動物	ｺﾞｶｲ	Larva of Polychaeta	1
節足動物	甲殻	Nauplius of copepoda	2
		種類数	22
		合　計	30,610

ピコ・ナノプランクトンは、ピコプランクトンが 15,900 細胞/mL、独立栄養性ナノプランクトンが 14,500 細胞/mL であった。

2) 試験開始・終了時のサイズ別クロロフィル a 量

試験開始時・終了時のサイズ別クロロフィルa量を 図 3.2 に示す。試験開始時 100%区のクロロフィルa量は、95.8～97.1μg/Lであり、サイズ別には≧20μmが 26.8～29.7μg/L、2-20μmが 61.3～62.3μg/L、<2μmが 6.6～6.7μg/Lであった。サイズ別の組成比率は、≧20μmが 28～30%、2-20μmが 63～65%、<2μmが 7%であり、2-20μmの画分（ナノサイズの植物プランクトン）が多かった。

試験終了時のクロロフィル a 量は、栄養（f/2）を添加した試験区では、いずれも増加していた。一方、栄養を添加しない対照区（原水）では試験開始時よりクロロフィル a 量が減少していた。

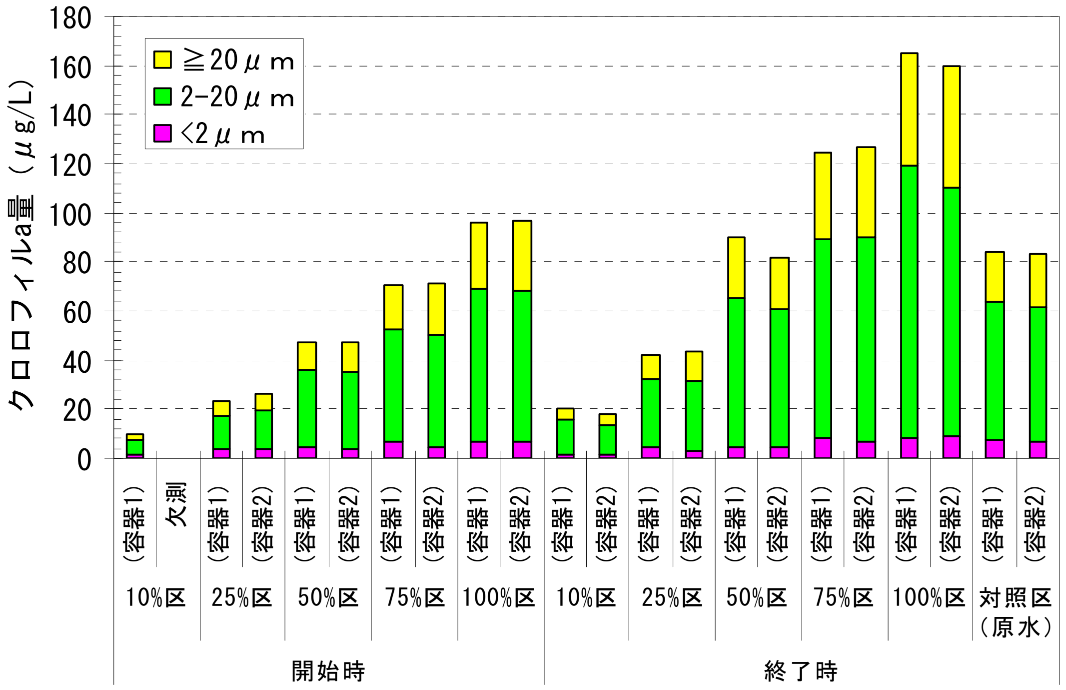
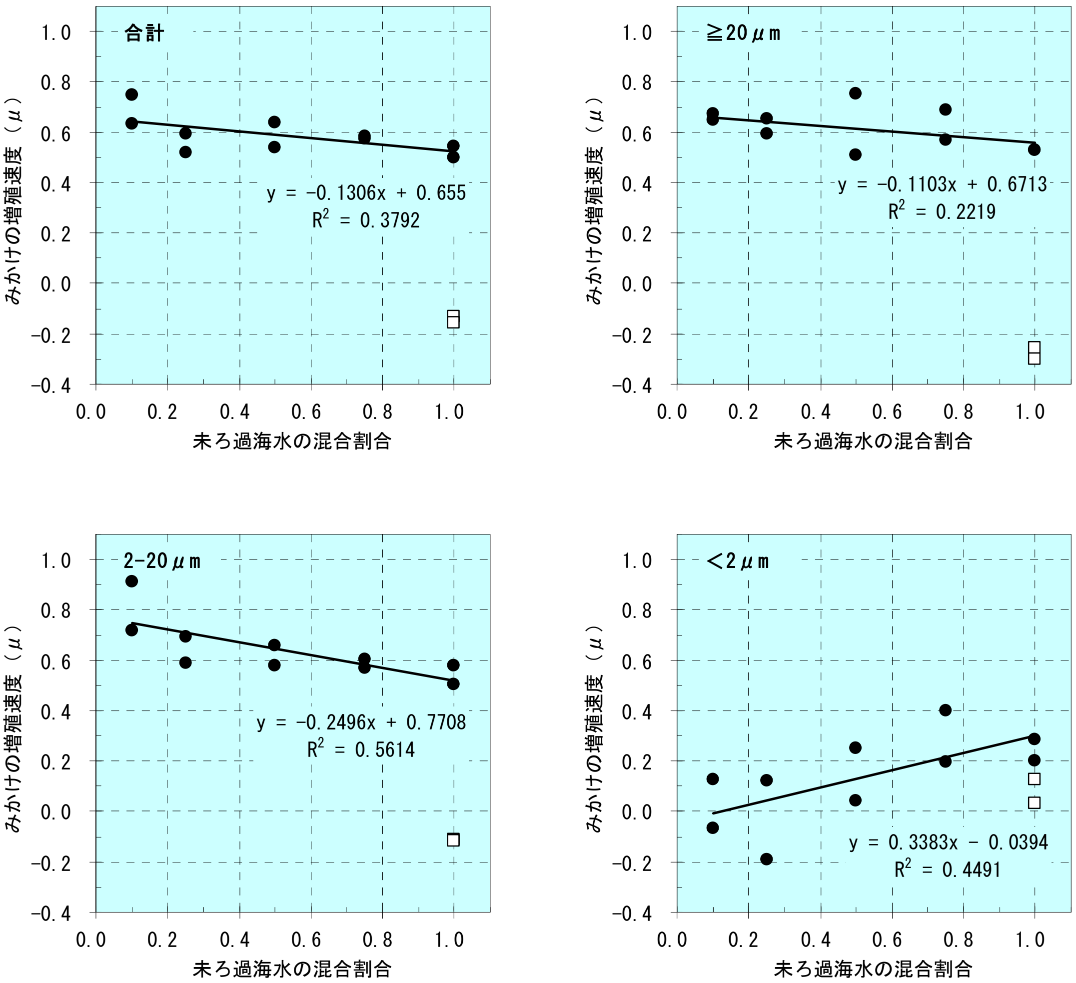


図 3.2　試験開始・終了時のサイズ別クロロフィル a 量

3) 植物プランクトンの比増殖速度と捕食者による比捕食速度

植物プランクトンの比増殖速度と捕食者による比捕食速度を 図 3.3 に示す。クロロフィル a量の合計では、未ろ過海水の混合割合とみかけの増殖速度の間に有意な右下がりの直線関係がみとめられた。このときの植物プランクトン最大増殖速度（μ_{max}）は 0.65、捕食者による比捕食速度（d）は 0.13 であり、μ_{max}に占めるdは 20%であった。

サイズ別には、≧20μm と 2-20μm では、未ろ過海水の混合割合とみかけの増殖速度の間に有意な右下がりの直線関係がみとめられたが、<2μm では右上がりの直線関係であった。特に、2-20μm では植物プランクトン最大増殖速度（μ_{max}）は 0.77、捕食者による比捕食速度（d）は 0.25 であり、μ_{max}に占める d は 32%であった。



注：図中の●は試験区（栄養添加有り）、□は対照区（原水：栄養添加なし）を示す

図 3.3　植物プランクトンの比増殖速度と捕食者による比捕食速度

3.3 まとめ

- 三河湾における局所的に閉鎖性の高い場所の海水を試験水として希釈培養試験を実施した結果、未ろ過海水の混合割合とみかけの増殖速度の間に有意な右下がりの直線関係がみとめられた。
- 特に 2-20μm 画分で植物プランクトンの高い比増殖速度（μ：0.77）と、動物プランクトンなど捕食者による比捕食速度（d：0.25）がみとめられた（三河湾においてナノサイズの植物プランクトンが動物プランクトンなど捕食者にとって餌料として有効であることを示唆する結果か？）
- 試験水で優占していたナノサイズの植物プランクトンはラフィド藻 *Heterosigma akashiwo*、捕食者である微小動物プランクトンは多毛類（ゴカイ）とカイアシ類の幼生である。また、渦鞭毛藻で従属栄養性の *Gyrodinium* sp. は細胞数が多かった。ナノサイズの植物プランクトンの主な捕食者はこれら微小動物プランクトン（の幼生）や、従属栄養性の渦鞭毛藻であったことが考えられる。
- 一方、＜2μm 画分では、植物プランクトンの増殖と動物プランクトンなど捕食者による捕食の関係性は認められなかった。
- 植物プランクトン最大増殖速度（μmax）に占める捕食者による比捕食速度（d）の割合は、全量で 20%、2-20μm で 32%であった。これは植物プランクトンの増殖が捕食者による捕食より大幅に上回っていることを示唆している（捕食者による捕食が植物プランクトンの増殖の制限条件になっていない？）。
- 試験結果は、試験を採取する時期（水質環境）や、試験水中の種組成によって異なることが想定される。