

## 伊豆沼におけるオオユスリカ幼虫の餌資源推定： 炭素安定同位体比と脂肪酸組成による解析

安野 翔<sup>1\*</sup>・山中寿朗<sup>2</sup>・嶋田哲郎<sup>3</sup>・鹿野秀一<sup>4</sup>・菊地永祐<sup>4</sup>

<sup>1</sup> 東北大学大学院生命科学研究科 〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2-1-1

<sup>2</sup> 岡山大学大学院自然科学研究科 〒700-8530 岡山市津島中三丁目 1-1

<sup>3</sup> 宮城県伊豆沼・内沼環境保全財団 〒989-5504 宮城県栗原市若柳字上畑岡敷味 17-2

<sup>4</sup> 東北大学東北アジア研究センター 〒980-8576 宮城県仙台市青葉区川内 41

\* 責任著者

キーワード: ユスリカ 底生動物 浅い湖沼 メタン酸化細菌

2010 年 1 月 7 日受付 2011 年 3 月 9 日受理

**要旨** 炭素安定同位体比および脂肪酸組成を用いて、伊豆沼に生息するオオユスリカ *Chironomus plumosus* 幼虫の餌資源内容の解明を試みた。餌候補である POM(浮遊懸濁有機物)および堆積物の炭素安定同位体比( $\delta^{13}\text{C}$ )は、それぞれ $-27.8 \pm 1.3\text{‰}$ 、 $-27.8 \pm 0.1\text{‰}$ であった。一方、オオユスリカ幼虫の $\delta^{13}\text{C}$ は、 $-50.9 \sim -27.5\text{‰}$ と個体間で大きく異なった。 $\delta^{13}\text{C}$ が高く、POMや堆積物と同様の値を示す個体はこれらの有機物を同化していると考えられるが、POMや堆積物に比べて極端に低い $\delta^{13}\text{C}$ を示す個体は、メタン酸化細菌を摂食することで、メタン起源の炭素を同化しているものと考えられる。 $\delta^{13}\text{C}$ の異なるオオユスリカ幼虫4個体( $-50.9\text{‰}$ 、 $-47.5\text{‰}$ 、 $-36.4\text{‰}$ 、 $-31.7\text{‰}$ )の脂肪酸組成を調べた。いずれの個体においても、珪藻や緑藻、藍藻起源の脂肪酸に比べ、細菌起源の脂肪酸マーカが多く含まれており、細菌の餌資源としての重要性が示唆された。細菌起源の脂肪酸マーカーの一種である*i17:0*含有率とオオユスリカ幼虫の $\delta^{13}\text{C}$ の間に有意な負の相関が認められた。したがって、*i17:0*は、メタン酸化細菌(メタン酸化細菌)に由来する脂肪酸であることが示唆される。

### はじめに

湖沼の底生動物の多くは、浮遊懸濁有機物や堆積有機物を餌とする。底生動物は、魚類等の高次捕食者の餌となり(Winfield et al. 2002, Ravinet et al. 2010)、ユスリカ等の水生昆虫の場合には、羽化後に鳥やクモといった陸域の捕食者の餌となる(Davies 1977, Collier et al. 2002)。つまり、底生動物、特にユスリカ幼虫は、底生食物網を沖帯食物網や陸域食物網へと繋げる役割をしている。また、湖底の有機物を系外へ運搬することで、湖沼を浄化しているとも見られる(Iwakuma & Yasuno 1983)。

底生動物の多くは、濾過食者や堆積物食者であり、消化する食物の内容から言えば、いずれもデトリタス食者である。デトリタスの主体は、起源不明の不定形有機物である。さらに、デトリタス中には植物遺体や微小藻類、細菌等多様な有機物が含まれており、動物は消化管内のデトリタス全体を消化・吸収するのではなく、藻類や細菌などの一部の成分を選択的に同化することも多いため(Doi et al. 2006)、従来の消化管内容物の観察による餌資源推定では解析が困難であった。そのため、動物の餌資源推定の手法として炭素・窒素安定同位体比が導入されるようになった。

安定同位体比の表記には、標準試料の  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  または  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  との差を千分率で表す  $\delta$  値(‰)が用いられる。動物体の炭素安定同位体比( $\delta^{13}\text{C}$ )は、餌物質に対して 0~2‰しか上昇せず、食物連鎖の起点となる生産者の推定に有効である(Fry & Sherr 1984)。また、餌物質に対して 3~5‰上昇する窒素安定同位体比(Minagawa & Wada 1984)と組み合わせることで、栄養段階の推定、更には食物網の解析が可能となる(例えば、Vander Zanden & Vadeboncoeur 2002)。さらに、動物がある程度の期間にわたり同化した餌を、個体別に推定できるという利点も持つ。

宮城県北部に位置する伊豆沼は、ハスやヒシ等が疎または密に生える、水深約 1.6 m の浅い富栄養湖である(設楽 1992)。富栄養湖では植物プランクトンによる一次生産力が高く、湖水中で生産された有機物は湖底に堆積し、底生動物の餌となり、また微生物により分解される。富栄養湖の湖底には、一般にデトリタス食のユスリカ類やイトミミズ類が優占しており、伊豆沼ではオオユスリカ幼虫が優占種となっている(安野ほか 2009)。湖底では活発な微生物の活性により、酸素は表層部の酸化層で消費され、堆積物中は嫌氣的(無酸素)な還元層となる。嫌氣的な還元層での微生物による有機物分解の最終生成物はメタンであり、富栄養湖ではメタンが堆積物中に多く蓄積することになる。しかし、還元層に蓄積したメタンは、堆積物表層部の酸化層でメタン酸化細菌により酸化されるため、そのまま上水中にまで拡散、溶出することは稀である。このようにメタンの循環(生成と消費のサイクル)は、微生物により駆動されて堆積物中で完結するため、従来湖沼ではメタンの食物網への寄与、つまり動物の餌としての寄与はないものと考えられてきた(例えば Vadeboncoeur et al. 2001)。

近年の炭素・窒素安定同位体比を用いた解析により、湖底に生息するデトリタス食とされている底生動物、とくにユスリカ幼虫の中に、堆積有機物や POM よりも極端に低い  $\delta^{13}\text{C}$  値を持つものがあることが明らかになってきた(例えば Kiyashko et al. 2001, Grey et al. 2004)。還元的な堆積物中で発生するメタンは、堆積有機物や POM に比べ、非常に低い  $\delta^{13}\text{C}$  値を示す(Sugimoto 1996, Hornibrook et al. 1999)。そのため、低い  $\delta^{13}\text{C}$  値を示すユスリカ幼虫は、メタンを炭素源として利用するメタン酸化細菌を餌資源としていと考えられている(例えば Grey et al. 2004, Kiyashko et al. 2004)。このメタンを基点とする「メタン食物連鎖」は多くの湖沼で報告されてきているが、これまでは夏季に湖水低層が貧酸素となる水深の深い富栄養湖(2 回循環湖)での報告が多く、伊豆沼のような夏季でも低層の酸素が低下することが少ない浅い湖での研究例は少ない。

一方近年、脂肪酸分析も動物の餌を解析する手法として使われるようになってきている(例えば Goedkoop et al. 2000, 藤林ほか 2008)。動物の脂肪酸組成は、同化した餌の脂肪酸組成を反映する。藻類や細菌は、特有の脂肪酸を有していることが知られており、上位の消費者に同化されてもほとんど変化しない。そのため、これらの脂肪酸をバイオマーカーとすることで、餌資源の推定が可能である(Napolitano 1998)。さらに、炭素・窒素安定同位体比解析と脂肪酸分析を組み合わせることで、細菌をも考慮に入れた詳細な食物網の解析が可能になると考えられる。しかし、安定同位体比分析と脂肪酸分

析を同時に用いて解析した研究は極めて少なく、とくに浅い湖での更なる研究データの蓄積が必要であると考えられる。

本研究では、浅い富栄養湖である伊豆沼の食物網解明の一環として、「メタン食物連鎖」の観点から、炭素安定同位体比解析を用いて、湖底で優占しているオオユスリカ幼虫の餌資源解析を行い、餌としてのメタン酸化細菌(メタン資化細菌)の寄与率を推定し、脂肪酸分析を組み合わせることでさらに詳細な解析を試みた。

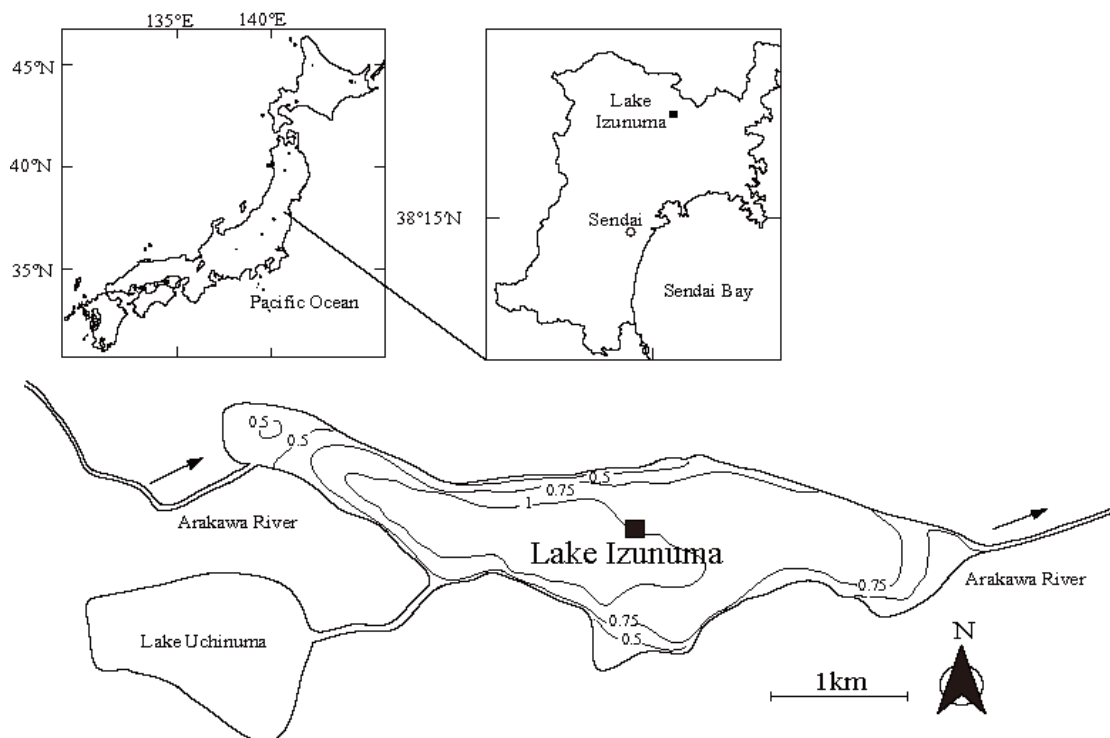


図 1. 伊豆沼における調査位置図. 実線は湖底の等深線を示す. ■はサンプルの採集地点を示す. 矢印は下流方向を示す.

Fig. 1. Sampling locations in Lake Izunuma. Solid lines indicate isobaths in meters. Solid squares represent the locations where samples were collected. Solid arrows indicate the direction of river flow.

## 方法

### 1. 試料の採集

伊豆沼の中央部(38°43' 16"N, 141 05' 12"E)で、2007 年 5 月 25 日に、オオユスリカ幼虫(14 個体)、湖底堆積物、湖水の採集を行った(図 1). オオユスリカ *Chironomus plumosus* は、伊豆沼で最も優占する富栄養湖に特徴的な底生動物である(安野ほか 2009).

オオユスリカ幼虫の採集にはエクマンバーج採泥器を用い、10 個体以上得られるまで採集を行った。湖底堆積物のサンプルを得るため、エクマンバーج採泥器による 1 回の操作により得た底泥の表層 0~1 cm の 3 箇所からサンプリングを行った。浮遊懸濁有機物(POM; Particulate Organic Matter)の安定同位体比測定のため、湖面表層から採水した。POM の同位体比は、狭い範囲であっても空間的にある

程度の不均一性を持つ可能性がある。そのため、船上の異なる場所から湖水をバケツで 3 回すくい、それぞれポリプロピレン製の容器に収容することで、POM の平均的な同位体比の推定を試みた。採集したサンプルについては、冷蔵して持ち帰った。湖水 150 mL を、予め 500 °C で 2 時間加熱処理をして有機物を除去したグラスフィルター(Whatman GF/F φ47 mm)を用いて濾過した。フィルター上に残った懸濁物をフィルターごと凍結乾燥し、POM の安定同位体比測定を試料とした。

## 2. 炭素安定同位体比分析

同位体比分析に先立ち、POM と堆積物の試料に 1N 塩酸を加えて無機炭酸塩の除去を行った。POM の試料として、懸濁物の載ったグラスフィルターをそのまま元素分析計で燃やして測定した。堆積物については、乳鉢ですりつぶして均質化した後に同位体比測定を行った。

濾過した湖水を入れたシャーレ中で、オオユスリカ幼虫の排糞処理を行った。糞を再び摂食するのを防ぐために、随時シャーレ内の糞を除去した。24 時間経過した段階で、実体顕微鏡を用いて消化管内に内容物が残っていないか確認した後、キムワイプで水分を除去し、湿重量を測定した。凍結乾燥させた後、各個体を溶媒で洗浄したメスで、尾部側から炭素安定同位体比測定のために必要量を採取し、残りを脂肪酸分析の試料として保存した。クロロホルム : メタノール = 2 : 1 (v : v) 混合液に試料を一晩浸して脱脂を行った。その後、予め 500 °C で 2 時間加熱処理をして有機物を除去したグラスフィルターで濾過してフィルター上に集め、再び凍結乾燥させた後、測定に供した。

元素分析計と直結した安定同位体比質量分析計(Finnigan 社製 DELTA plus)を用いて、連続フローモードで炭素安定同位体比を測定した。なお、炭素安定同位体比は、定法に従い以下の式で表される  $\delta$  値で表記する。

$$\delta^{13}\text{C} = (\text{R}_{\text{sample}} / \text{R}_{\text{standard}} - 1) \times 1000 (\text{‰})$$

ただし、 $\text{R} = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$  であり、 $\text{R}_{\text{standard}}$  は炭素同位体比の国際標準物質である、VPDB(Vienna Pee Dee Belemnite)の  ${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$  比である。なお、本研究における  $\delta^{13}\text{C}$  値の測定精度は  $\pm 0.1\text{‰}$ であった。ランニングスタンダードとして、L-ヒスチジン( $\delta^{13}\text{C} = -9.97\text{‰}$ , 昭和通商(株)杉戸研究所 SI 分析センター)を用いた。

2-source mixing model により、以下の式からオオユスリカ幼虫の餌資源へのメタン酸化細菌の寄与率  $f$  を求めた。

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{chironomid}} = f\delta^{13}\text{C}_{\text{MOB}} + (1 - f)\delta^{13}\text{C}_{\text{photo}} + \Delta\text{C} \quad (1)$$

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{MOB}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4} + \Delta\text{C}_{\text{MOB}} \quad (2)$$

ここで、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{chironomid}}$ ,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOB}}$ ,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{photo}}$ ,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$  はそれぞれオオユスリカ幼虫、メタン酸化細菌、光合成産物(POM と堆積物の平均)、メタンの炭素安定同位体比を表す。メタンの炭素安定同位体比は、通常およそ  $-80 \sim -50\text{‰}$ であるため、 $-80$ ,  $-70$ ,  $-60$ ,  $-50\text{‰}$ の 4 つの値を仮定してそれぞれ解析を行った。 $\Delta\text{C}$  は動物の餌物質に対する  $\delta^{13}\text{C}$  の上昇率を表し、ここでは  $1\text{‰}$ と仮定した。 $\Delta\text{C}_{\text{MOB}}$  はメタン酸化細菌によるメタンの同化の際の同位体効果を表す。これは、 $-20 \sim 0\text{‰}$ の間の値をとる(Summons et al. 1994)。ここでは、Deines et al. (2007)の解析と同様に  $-16\text{‰}$ として計算した。

### 3. 脂肪酸分析

脂肪酸分析に用いるオオユスリカ幼虫については、炭素安定同位体比を測定後、異なる同位体比を持つ4個体を選び、試料とした。なお、湿重量ができるだけ近い個体を選ぶよう留意した。

脂質の抽出方法については、Harvey et al. (1987)の方法を参考に一部改変した。試料をクロロホルム：メタノール = 3：1(v：v)混合溶液に浸し、超音波ホモジナイザーにより脂質を抽出した。抽出物に水酸化カリウム、メタノール溶液を加えて加熱し、ケン化を行った。ケン化後、ヘキサン：ジエチルエーテル = 9：1(v：v)と水を加えて液-液抽出を行い、有機溶媒層に移動した中性成分を取り除いた後、水層に6N塩酸を加えて再度ヘキサン：ジエチルエーテルにて液-液抽出を行い、有機溶媒層に移動した酸性成分(脂肪酸画分)を得た。この脂肪酸画分を3フッ化ホウ素、メタノール錯体を加えて加熱し、メチルエステル化を行った。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、モノカルボン酸画分をヘキサン：ジクロロメタン = 2：1(v：v)溶液で溶出させ分取した。これをヘキサンに溶かし、FID検出器を備えたガスクロマトグラフ(島津製作所製GC-17A)を用いて分析した。無極性カラムであるGL Science社製TC-1(内径0.25 mm, 膜厚0.25  $\mu$ m, 長さ30 m)と、極性カラムであるRestek社製RTX-2330(同上)を用い、ヘリウムをキャリアーガスに用いた。昇温プログラムは以下のとおりである。TC-1カラムで50°Cで5分保持した後、10°C/minの昇温速度で150°Cまで昇温し、4°C/minで300°Cまで昇温後20分間保持、RTX-2330カラムで50°Cで5分保持した後、150°Cまで5°C/minで昇温後、230°Cまで4°C/minで昇温し30分間保持した。各脂肪酸の同定については、市販のスペルコ社製FAME37mix, bacterial FA等を用いてリテンションタイムを比較することにより行なった。標品に無い成分についてはTC-1カラムを用いてGC/MS(島津製作所製QP-2000)にて分析を行い、マススペクトルにより同定した。

脂肪酸の表記については、定法に従い炭素数と不飽和結合の数をコロンで繋ぎ、不飽和結合の位置を

表 1. 脂肪酸マーカーとその起源.

Table1. Fatty acid biomarkers and their source.

Fatty acid biomarker	Source
i15:0, ai15:0, i17:0, ai17:0, 18:1(n-7)	細菌 bacteria
16:1(n-8), 18:1(n-8)	メタン酸化細菌 methane-oxidizing bacteria
16:1(n-7), 20:5(n-3)	珪藻 diatom
18:2(n-6), 18:3(n-3)	緑藻／藍藻 green algae and cyanobacteria
22:6(n-3), 18:4(n-3)	渦鞭毛藻 dinoflagellate
LCFA (24:0, 26:0, 28:0, 30:0, 32:0)	陸上植物 terrestrial plants

アルキル鎖の末端側からの炭素数を $\omega$ の後に示した(例えば炭素数が18でアルキル末端から7番目の炭素と8番目の炭素の間に不飽和結合が1つある脂肪酸の場合, 18:1 $\omega$ 7と表す). 末尾のアルファベットのhは不飽和結合を挟んだ構造を示し, cはシス型, tはトランス型である. なお, メチル側鎖を一つもつ分岐脂肪酸のうちアルキル末端から数えて2番目および3番目の炭素に分岐があるものを, それぞれi(イソ型)とai(アンテナイソ型)と表記した.

既往の研究において, 各餌資源に特有な脂肪酸として報告されている脂肪酸(Ackman et al. 1968, Bowman et al. 1991, Jahnke et al. 1995, Napolitano 1998, Mfilinge et al. 2005)を表1にまとめ, バイオマーカーとして利用した. なお, 18:1 $\omega$ 7は細菌と藍藻に多く含まれる脂肪酸であるが, 淡水の藍藻にはごく少量しか含まれていないことから(Napolitano 1998), 18:1 $\omega$ 7脂肪酸(以下脂肪酸はFAと略す)については細菌由来の脂肪酸として扱った.

## 結果

POM および堆積物の $\delta^{13}\text{C}$ 値(平均  $\pm$  標準偏差,  $n = 3$ )は, それぞれ $-27.8 \pm 1.3\text{‰}$ ,  $-27.8 \pm 0.1\text{‰}$ であった. 一方, オオユスリカ幼虫の $\delta^{13}\text{C}$ 値は,  $-50.9\text{‰} \sim -27.5\text{‰}$ と個体間で大きく異なり, POM や堆積物に比べて20‰以上も低い値を示す個体も見られた(図2). オオユスリカ幼虫の湿重量は,  $30.9 \pm 6.9 \text{ mg}$ (平均  $\pm$  標準偏差)であり, 15.4~42.5 mgと個体間で大きく異なった. 湿重量と $\delta^{13}\text{C}$ 値との間には, 有意な相関は認められなかった( $r = -0.435$ ,  $P = 0.12$ ,  $n = 14$ ).

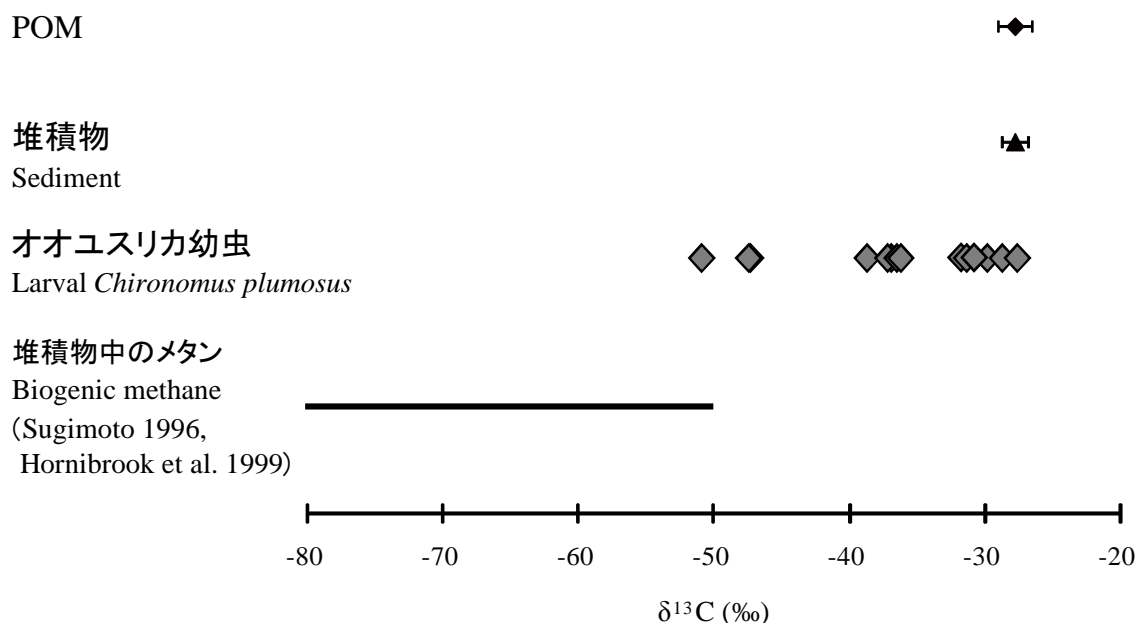


図2. オオユスリカ幼虫および餌資源, 炭素源の $\delta^{13}\text{C}$ の範囲.

Fig. 2. Ranges of  $\delta^{13}\text{C}$  for larval *Chironomus plumosus* and their potential food or carbon sources.

メタンの  $\delta^{13}\text{C}$  値は、 $-80\sim-50\text{‰}$ と範囲が広いとため、オオユスリカの餌としてのメタン酸化細菌の寄与率の計算値は、メタンの  $\delta^{13}\text{C}$  値を範囲内のどの値に設定するかにより変化する。 $\delta^{13}\text{C}$  の最も低い個体 ( $\delta^{13}\text{C} = -50.9\text{‰}$ ) のメタン酸化細菌の寄与率は、メタンの  $\delta^{13}\text{C}$  値の範囲内最低値 ( $-80\text{‰}$ ) に設定した場合は 35.2%，最大値 ( $-50\text{‰}$ ) では 63.2%であった (図 3)。一方、同位体比の最も高い個体 ( $\delta^{13}\text{C} = -27.5\text{‰}$ ) では、メタン酸化細菌の寄与率は 1.1~1.9%であった。このように、オオユスリカの餌としてのメタン酸化細菌の寄与率は個体間で大きく異なった (図 3)。

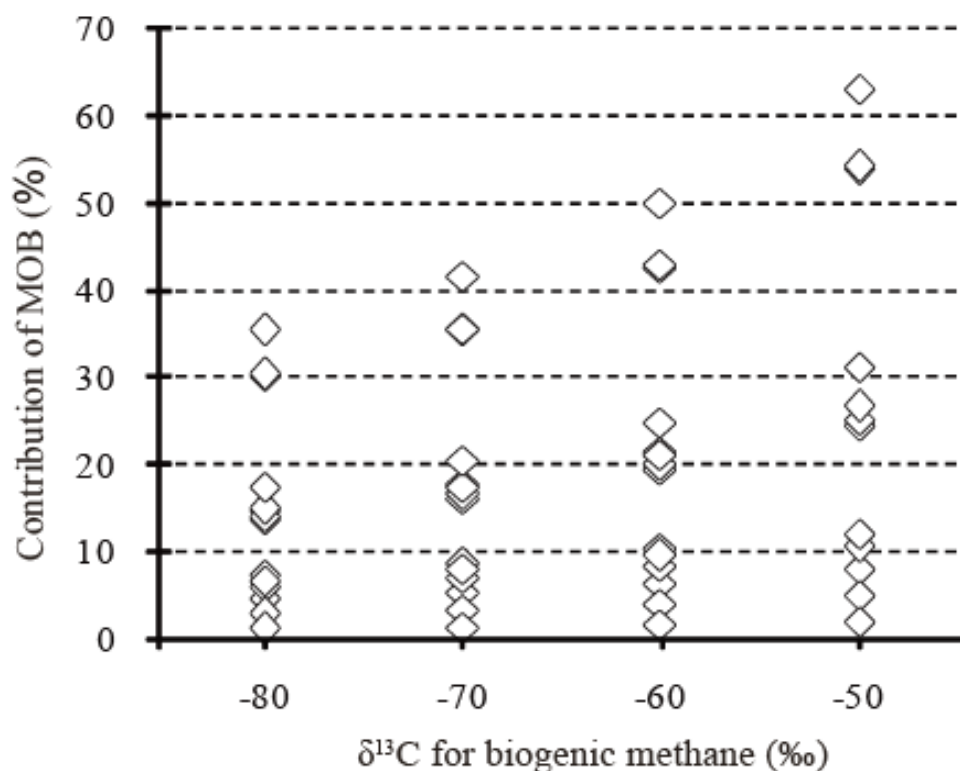


図 3. オオユスリカ幼虫へのメタン酸化細菌 (MOB) の寄与率. MOB の寄与率は、メタンの同位体比が  $-80\sim-50\text{‰}$  の範囲にあると仮定し、2-source mixing model により推定した。

Fig. 3. Contributions of methane-oxidizing bacteria (MOB) to larval *Chironomus plumosus*. The contributions of MOB were estimated by using 2-source mixing model assuming that  $\delta^{13}\text{C}$  levels for biogenic methane ranged from  $-80$  to  $-50\text{‰}$ .

オオユスリカ幼虫 14 個体のうち、 $\delta^{13}\text{C}$  値が異なる 4 個体 ( $\delta^{13}\text{C} = -50.9\text{‰}$ ,  $-47.5\text{‰}$ ,  $-36.4\text{‰}$ ,  $-31.7\text{‰}$ ) を選び、脂肪酸分析を行った。なお、脂肪酸分析に用いた各個体の湿重量は、それぞれ 28.5, 28.5, 31.0, 25.3 mg であった。全脂肪酸に対する緑藻・藍藻、珪藻、細菌の脂肪酸マーカーの割合は、4 個体の平均でそれぞれ、 $2.7 \pm 1.6\%$ ,  $1.1 \pm 0.1\%$ ,  $12.5 \pm 4.1\%$  であり、いずれの個体においても細菌起源の脂肪酸バイオマーカー (以下、細菌マーカーとする) の割合が高かった (図 4)。細菌マーカーの内訳は、18:1 $\omega$ 7, i17:0, i15:0, ai15:0 の 4 種類の FA であり、18:1 $\omega$ 7, i15:0 ai15:0FA の含有率は、4 個体いずれにおいても同様の傾向を示した (図 5)。一方、i17:0FA の含有率は、オオユスリカ幼虫の  $\delta^{13}\text{C}$  値との間に強い負の相関を示した ( $r = -0.969$ ,  $P < 0.05$ ; 図 6)。  $\delta^{13}\text{C}$  値の最も高い幼虫 ( $-31.7\text{‰}$ ) では、i17:0FA はトレースレベルであった。

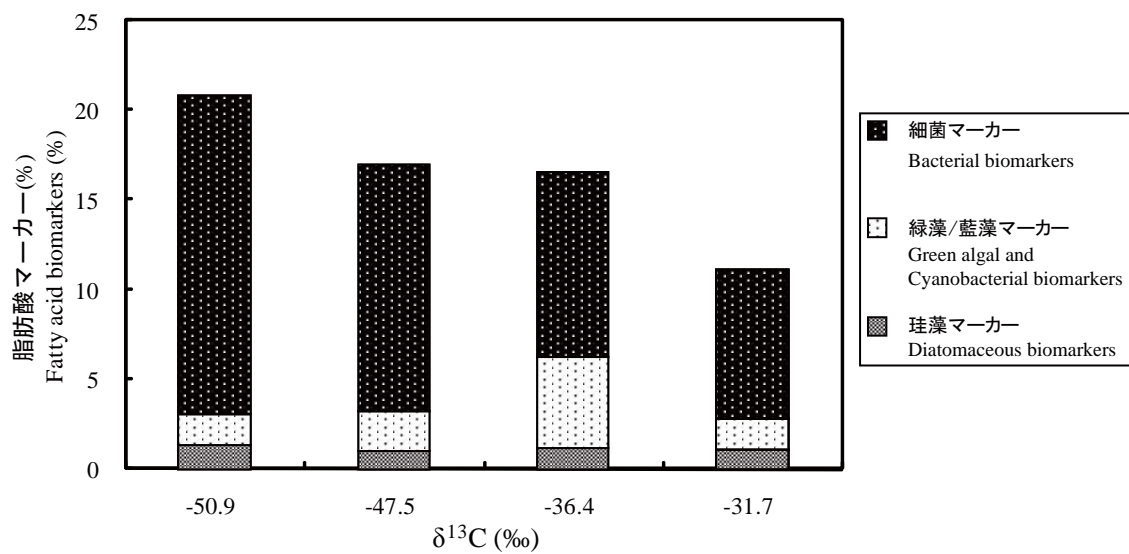


図 4. オオユスリカ幼虫の脂肪酸マーカ含有率.

Fig. 4. Content of fatty acid biomarkers in larval *Chironomus plumosus*.

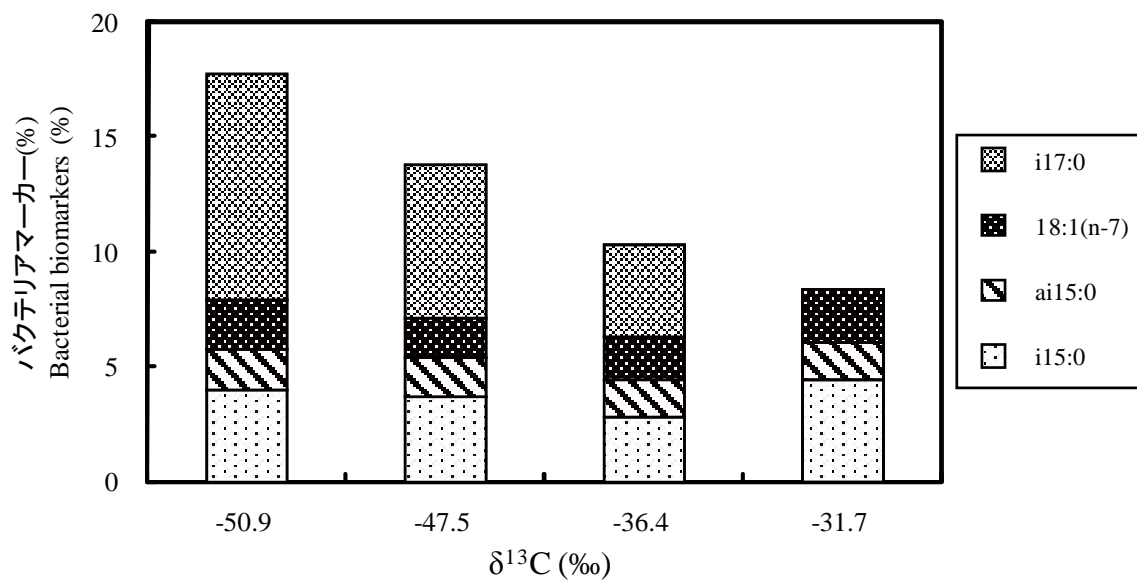


図 5. オオユスリカ幼虫における細菌の脂肪酸マーカ含有率.

Fig. 5. Content of bacterial fatty acid biomarkers in larval *Chironomus plumosus*.

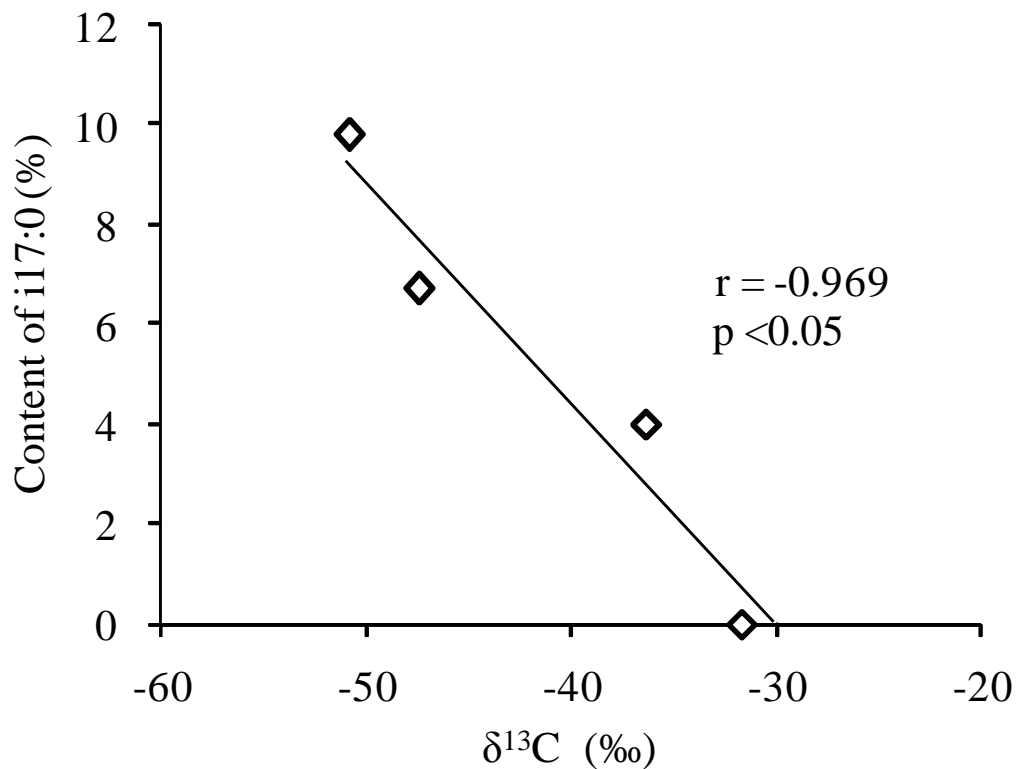


図 6. 17:0 の含有率と  $\delta^{13}\text{C}$  の関係.

Fig. 6. Relationship between content of i17:0 and  $\delta^{13}\text{C}$ .

## 考察

オオユスリカ幼虫の  $\delta^{13}\text{C}$  値は、 $-50.9\text{‰}$ ～ $-27.5\text{‰}$ と個体間で大きく異なった(図 2). 同地点で採集したユスリカ幼虫であっても、安定同位体比が個体間で大きく異なる事例はこれまでもいくつか報告があり(例えば Kiyashko et al. 2001, Grey et al. 2004), 生息微環境の違いに起因する餌資源の違いを反映していると考えられている(Kiyashko et al. 2001). オオユスリカ幼虫は、堆積物中に U 字形または J 字形の巣穴を掘ってその中に棲んでおり、POM や堆積有機物を食べることが知られている(McLachlan 1977). 本調査では、POM および堆積物の  $\delta^{13}\text{C}$  値は、それぞれ、 $-27.8 \pm 1.3\text{‰}$ 、 $-27.8 \pm 0.1\text{‰}$ であった. 陸上植物や藻類などの光合成で炭素を固定する生物の  $\delta^{13}\text{C}$  値はおよそ $-28\text{‰}$ であり(例えば Kohzu et al. 2004), POM および堆積物の  $\delta^{13}\text{C}$  値は光合成産物の値と合致している. 2006 年 6 月から 2007 年 4 月の POM の  $\delta^{13}\text{C}$  値は $-31\text{‰}$ ～ $-28\text{‰}$ の間で変動し、堆積物は $-28\text{‰}$ ～ $-27\text{‰}$ の間でほぼ一定の値を示した(安野 未発表データ). 動物の安定同位体比は、過去のある一定期間内に食べた餌の同位体比の平均的な値を反映すると考えられる. オオユスリカ幼虫のうち、 $\delta^{13}\text{C}$  値の高い個体は、POM および堆積物と同様の  $\delta^{13}\text{C}$  値を持っており、光合成産物由来の POM や堆積有機物を主な餌資源として消化・吸収していることが示唆される. 一方、POM や堆積物に比べて  $20\text{‰}$ 以上も低い  $\delta^{13}\text{C}$  値を示す個体が見られた(図 2). このように、POM 等の光合成産物起源の有機物に比べて極端に低い  $\delta^{13}\text{C}$  値を示すユスリカ幼虫は、琵琶湖(Kiyashko et al. 2001)やヨーロッパの湖沼(Grey et al. 2004)等で

も報告されており、これらのユスリカ幼虫は、メタン酸化細菌(メタン資化細菌)を摂食していると考えられている(Kiyashko et al. 2001, Grey et al. 2004). メタン酸化細菌は、堆積物表層などの酸化還元境界層に生息しており、還元層で嫌氣的に生成されたメタンを好氣的に酸化してエネルギーを生産する一方、メタンを炭素源としても利用する(Hanson & Hanson 1996). 還元的な堆積物中で発生するメタンは、 $-80\sim-50\text{‰}$ と非常に低い  $\delta^{13}\text{C}$  値を示す(Sugimoto 1996, Hornibrook et al. 1999). メタン酸化細菌は、 $\delta^{13}\text{C}$  値の低いメタンを同化するため(Fry & Sherr 1984), メタン酸化細菌を餌としているユスリカ幼虫も通常より低い  $\delta^{13}\text{C}$  値を示すと考えられている(Kiyashko et al. 2001, Grey et al. 2004). したがって、POM や堆積物に比べて  $\delta^{13}\text{C}$  値が低い個体はメタン起源の炭素を同化したものと考えられる. このようにメタンを起点とする食物連鎖は、「メタン食物連鎖」と呼ばれている(木庭・高津 2009; 図 7 参照).

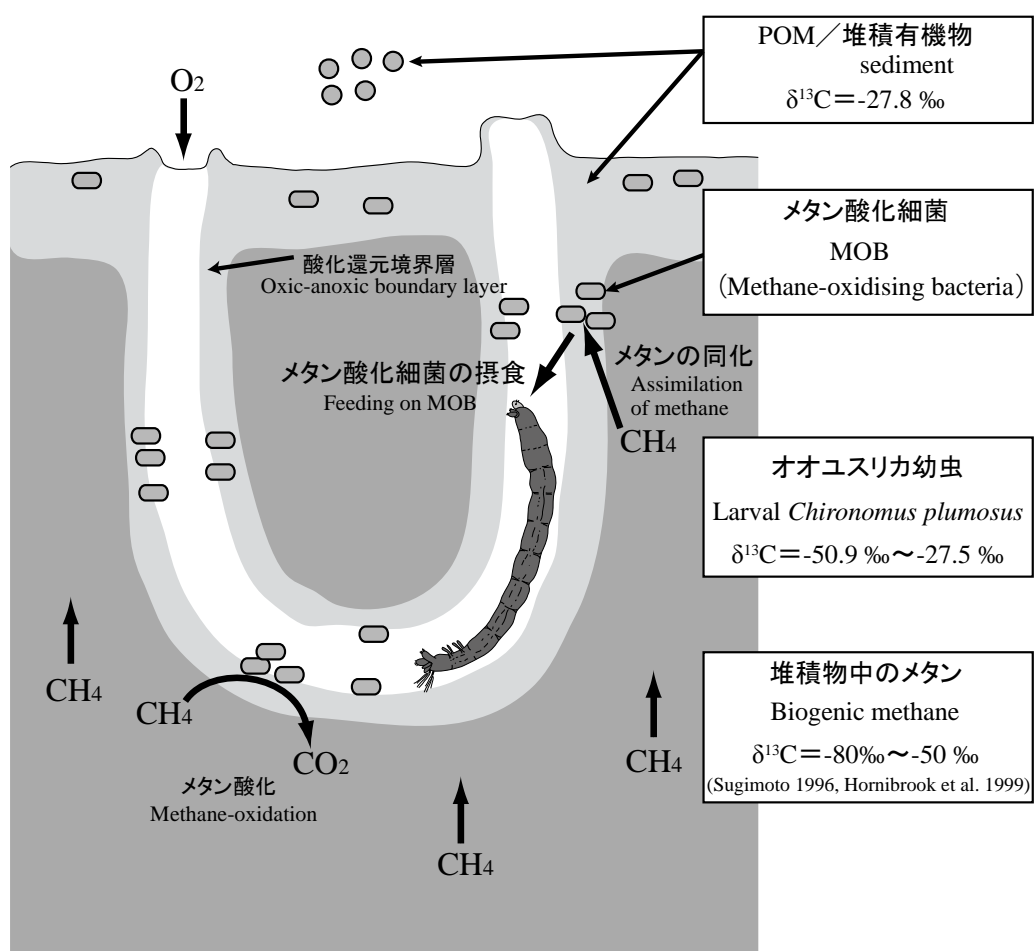


図 7. メタン食物連鎖の概念図(Deines et al. 2007 を改変). オオユスリカ幼虫は、巣管内に水を循環させることで、酸化還元境界層を作り出す。メタン酸化細菌は、メタンを同化しながら巣管内壁で増殖する。オオユスリカ幼虫がメタン酸化細菌を摂食することで、メタン起源の炭素を同化すると考えられる。  
Fig. 7. Mechanism of methane food chain. Larval *Chironomus plumosus* makes an oxic-anoxic boundary layer inner surface of the tube by drawing water into the tube. MOB assimilate biogenic methane and multiply on the inner surface. The larva is thought to feed on MOB and thus assimilate carbon derived from biogenic methane.

最も低い  $\delta^{13}\text{C}$  値を示した個体 ( $\delta^{13}\text{C} = -50.9\text{‰}$ ) について、メタン酸化細菌の餌資源としての寄与率を推定したところ、35.4～63.2%であり、個体によって寄与率に差があるものの、重要な餌資源であることが示唆された。

$\delta^{13}\text{C}$  値の異なる4個体の幼虫において脂肪酸分析を行ったところ、いずれの個体においても、細菌起源のバイオマーカーの全脂肪酸に対する割合が、珪藻、緑藻・藍藻マーカーよりも高かった(図4)。したがって、細菌がオオユスリカ幼虫の重要な餌資源であると考えられる。安定同位体比からは、 $\delta^{13}\text{C}$  値の高い個体 ( $-31.7\text{‰}$ ) においては、87.1～92.8%が光合成産物、すなわち POM や堆積有機物が主な餌資源であると推定された。光合成産物よりも細菌の脂肪酸マーカーが相対的に多く検出されたことを考えると、懸濁物や堆積物中で光合成産物由来のデトリタスを分解して増殖した従属栄養細菌が、 $\delta^{13}\text{C}$  値の高いオオユスリカ幼虫の主な餌資源であると考えられる。

検出された細菌マーカー4種類のうち、3種類の FA(18:1 $\omega$ 7, i15:0, ai15:0)の含有率は、オオユスリカ幼虫4個体いずれにおいても類似の傾向を示した。一方、i17:0FAの含有率は、オオユスリカ幼虫の  $\delta^{13}\text{C}$  値との間に強い負の相関を示した ( $r = -0.969$ ,  $P < 0.05$ ; 図6)。すなわち、 $\delta^{13}\text{C}$  値の低い幼虫ほど i17:0FA をもつ細菌をより多く摂食・同化していることになる。オオユスリカ幼虫の  $\delta^{13}\text{C}$  値の低下の要因としては、極めて低い  $\delta^{13}\text{C}$  値を持つメタン由来の炭素の寄与が考えられた。今回測定したオオユスリカ幼虫の  $\delta^{13}\text{C}$  の最低値は、 $-50.9\text{‰}$ であった。このように極端に低い  $\delta^{13}\text{C}$  値を持つオオユスリカ幼虫の餌としては、既往の研究結果から見る限り、メタンを直接的・間接的に利用できるメタン酸化細菌など「メタン食

表2. オオユスリカ幼虫の脂肪酸組成. 表中には同定できた脂肪酸のみ記した.

Table1. Fatty acid composition of larval *Chironomus plumosus*.

	<i>C.plumosus</i> No.1	<i>C.plumosus</i> No.2	<i>C.plumosus</i> No.3	<i>C.plumosus</i> No.4
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	-50.9	-47.5	-36.4	-31.7
Fatty acids(%)				
14:0	7.5	8.3	7.3	13.8
i15:0	4.0	3.7	2.8	4.5
ai15:0	1.8	1.7	1.7	1.6
15:0	2.1	2.0	2.2	2.5
16:0	18.8	22.0	20.0	28.6
i17:0	9.8	6.7	4.0	0.0
16:1(n-9)c	17.2	13.4	13.4	22.5
16:1(n-7)	1.3	1.0	1.2	1.1
17:0	1.1	1.4	1.2	1.2
17:1	0.7	0.0	0.5	0.8
18:0	4.2	4.9	4.9	3.0
18:1(n-9)c	1.5	1.6	1.8	3.2
18:1(n-7)	2.2	1.7	1.8	2.3
18:2(n-6)	1.8	2.2	4.2	1.5
20:0	0.0	0.0	0.0	0.2
18:3	0.0	0.0	0.9	0.2
Total FAs	74.0	70.6	68.0	87.0

物連鎖」に関わる細菌群以外には考え難い。オオユスリカ幼虫のうち、高い  $\delta^{13}\text{C}$  値を持つ個体の i17:0FA の含有率は極めて低く、 $\delta^{13}\text{C}$  値の低下に伴う i17:0FA 含有率の増加は、メタン酸化細菌など「メタン食物連鎖」に関わる細菌群が i17:0FA の供給源となっていることを強く示唆している。

メタン酸化細菌に特有の脂肪酸として、16:1 $\omega$ 8, 18:1 $\omega$ 8 が報告されている (Bowman et al. 1991, Jahnke et al. 1995)。今回の分析では、これらの脂肪酸は定量限界以下であった (表 2)。Kiyashko et al. (2004) の研究では、琵琶湖湖底で採集されたアシマダラユスリカ属幼虫 ( $\delta^{13}\text{C} = -62.4 \sim -57.4\text{‰}$ ) から 16:1 $\omega$ 8FA が検出されており、全脂肪酸に対して 7~10% 程度の割合を占めていた。一方、今回検出された細菌マーカーの i17:0FA は、Kiyashko et al. (2004) の研究では検出されていない。琵琶湖の湖底堆積物表層からは、16:1 $\omega$ 8FA 及び i17:0FA が確認されており、全脂肪酸に占める割合はそれぞれ 3.0%, 1.0% と、前者の方がより大きな割合を示した。今回の研究では、湖底堆積物表層の脂肪酸組成を分析していないが、琵琶湖の湖底堆積物表層に比べて i17:0FA の含有量が 16:1 $\omega$ 8 よりも相対的に多いことが予想される。今後、堆積物表層についても脂肪酸分析を行うことで、オオユスリカ幼虫において 16:1 $\omega$ 8FA が定量限界以下であった理由が明らかになると期待される。

以上の結果から、伊豆沼のオオユスリカ幼虫は、細菌類、すなわち光合成産物由来の有機物を同化する従属栄養細菌を餌資源とする個体から、メタンを同化するメタン酸化細菌 (メタン資化細菌) を餌資源として利用する個体まで幅広く存在していると考えられる。ただし、今回の研究では、5 月の 1 回のみの分析であるため、餌資源の季節的な変化を考慮していない。メタン酸化細菌は、堆積物表層などの酸化還元境界層に生息しており、還元層で嫌氣的に生成されたメタンを上水中からの酸素で酸化してエネルギーを得て、増殖する (Hanson & Hanson 1996)。伊豆沼の堆積物中のメタン濃度は冬季に減少し、晩夏から初秋に増加する (安野・鹿野 未発表) ので、メタンの増減に応じて、堆積物中のメタン酸化細菌のバイオマスは増減するものと考えられる。動物の安定同位体比及び脂肪酸組成は、過去のある一定期間内に食べた餌の積算値を反映するので、オオユスリカ幼虫の安定同位体比及び脂肪酸組成も季節変化をする可能性が高い。そのため、オオユスリカ幼虫の主要な餌資源の推定には、年間を通した調査が必要である。今後、他の季節においても同様の分析を行うことで、伊豆沼の底生食物連鎖におけるメタン食物連鎖の寄与をより詳細に解明できると考えられる。

## 謝辞

東北大学大学院農学研究科の伊藤絹子博士には、安定同位体比分析装置の使用を快諾して頂いた。東北大学大学院生命科学研究科の千葉友紀氏、宮城県伊豆沼・内沼環境保全財団の進東健太郎氏には、現地調査の際に多大なご協力を頂いた。心より感謝の意を表す。本研究の一部は、日本学術振興会科学研究補助金 (No. 20570013, No. 20570014) によって実施された。

## 引用文献

Ackman, R. G., Tocher, C. S. & McLachlan, J. 1968. Marine phytoplankter fatty acids. J.

- Fisheries Res. Board Canada. 25: 1603-1620.
- Bowman, J. P., Skerratt, J. H., Nichols, P. D. & Sly, L. I. 1991. Phospholipid fatty acid and lipopolysaccharide fatty acid signature lipids in methane-utilizing bacteria. FEMS. Microbiol. Ecol. 85: 15-22.
- Collier, K. J., Bury, S. & Gibbs, M. 2002. A stable isotope study of linkages between stream and terrestrial food webs through spider predation. Freshwater Biol. 47: 1651-1659.
- Davies, N. B. 1977. Prey selection and social behavior in wagtails (Aves: Motacillidae). J. Anim. Ecol. 46: 37-57.
- Deines, P., Grey, J., Richnow, H. H. & Eller, G. 2007 Linking larval chironomids to methane: seasonal variation of the microbial methane cycle and chironomid  $\delta^{13}\text{C}$ . Aquat. Microb. Ecol. 46: 273-282.
- Doi, H., Kikuchi, E., Takagi, S. & Shikano, S. 2006. Selective assimilation by deposit feeders: Experimental evidence using stable isotope ratios. Basic. Appl. Ecol. 7(2): 159-166.
- Fry, B. & Sherr, E. B. 1984.  $\delta^{13}\text{C}$  measurements as indicator of carbon flow in marine and freshwater ecosystems. Contrib. Mar. Sci. 27: 13-47.
- 藤林 恵・中野和典・千葉信男・野村宗弘・西村 修. 2008. 脂肪酸解析による伊豆沼周辺に生息するタニシ類の餌同化内容の解明. 伊豆沼・内沼研究報告 2:27-34.
- Goedkoop, W., Sonesten, L., Ahlgren, G. & Boberg, M. 2000. Fatty acids in profundal benthic invertebrates and their major food resources in Lake Erken, Sweden: seasonal variation and trophic indications. Can. J. Fish. Aquat. Sc. 57: 2267-2279.
- Grey, J., Kelly, A. & Jones, R. I. 2004. High intraspecific variability in carbon and nitrogen stable isotope ratios of lake chironomid larvae. Limnol. Oceanogr. 49(1): 239-244.
- Harvey, H. R., Eglinton, G., O'Hara, S. C. M. & Corner, E. D. S. 1987. Biotransformation and assimilation of dietary lipids by Calanus feeding on a dinoflagellate. Geochim. Cosmochim. Acta. 51: 3031-3040.
- Hanson, R. S. & Hanson, T. E. 1996. Methanotrophic Bacteria. Microbiol. Rev. 60: 439-471.
- Hornibrook, E. R. C., Longstaffem, F. J. & Fyfe, W. S. 1999. Factors influencing stable isotope ratios in  $\text{CH}_4$  and  $\text{CO}_2$  within subenvironments of wetlands: implication for  $\delta$ -signatures of emissions. Isot. Environ. Healt. S. 36: 151-176.
- Iwakuma, T. & Yasuno, M. 1983. Fate of the univoltine chironomid, *Tokunagayusurika akamusi* (Diptera: Chironomidae), at emergence in Lake Kasumigaura, Japan. Arch. Hydrobiol. 99: 37-59.
- Jahnke, L. L., Summons, R. E., Dowling, L. M. & Zahiralis, K. D. 1995. Identification of methanotrophic lipid biomarkers in cold-seep mussel gills: chemical and isotopic analysis. Appl. Environ. Microbiol. 61: 576-582.
- Kiyashko, S. I., Imbs, A. B., Narita, T., Svetashev, V. I. & Wada, E. 2004. Fatty acid composition of aquatic insect larvae *Stictochironomus pictulus* (Diptera: Chironomidae): evidence of feeding upon methanotrophic bacteria. Comp. Biochem. Phys. B. 139(4):

705-711.

- Kiyashko, S. I., Narita, T. & Wada, E. 2001. Contribution of methanotrophs to freshwater macroinvertebrates: evidence from stable isotope ratios. *Aquat. Microb. Ecol.* 24: 203-207.
- 木庭啓介・高津文人. 2008. 流域環境におけるメタン酸化とメタン食物連鎖の評価. 永田 俊・宮島利宏 (編). 流域環境評価と安定同位体 水循環から生態系まで. pp. 240-248. 京都大学出版会, 京都府.
- Kohzu, A., Kato, C., Iwata, T., Kishi, D., Murakami, M., Nakano, S. & Wada, E. 2004. Stream food web fueled by methane-derived carbon. *Aquat. Microb. Ecol.* 36(2): 189-194.
- McLachlan, A. J. 1977. Some effects of tube shape on the feeding of *Chironomus plumosus* L. (Diptera: Chironomidae). *J. Anim. Ecol.* 46: 139-146.
- Mfilinge, P. L., Meziane, T., Bachok, Z. & Tsuchiya, M. 2005. Litter dynamics and particulate organic matter outwelling from a subtropical mangrove in Okinawa Island, South Japan. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 63: 301-313.
- Minagawa, M. & Wada, E. 1984. Stepwise enrichment of  $\delta^{15}\text{N}$  along food chains: Further evidence and the relation between  $\delta^{15}\text{N}$  and animal age. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 48: 1135-1140.
- Napolitano, G. E. 1998. Fatty acids as trophic and chemical markers in freshwater ecosystem. In: M. T. Arts & B. C. Wainman (ed.). *Lipids in Freshwater Ecosystems*. pp. 21-44. Springer, New York.
- Ravinet, M., Syväranta, J., Jones, R. I. & Grey, J. 2010. A trophic pathway from biogenic methane supports fish biomass in a temperate lake ecosystem. *Oikos*. 119: 409-416.
- 設楽 寛. 1992. 伊豆沼・内沼をとりまく社会条件. 伊豆沼・内沼環境保全対策検討委員会(編). 伊豆沼・内沼環境保全対策に関する報告書. pp. 155-164. 宮城県.
- Sugimoto, A. 1996. GC/GC/C/IRMS system for carbon isotope measurement of low level methane concentration. *Geochem. J.* 3: 195-200.
- Summons, R. E., Jahnke, L. L. & Roksandic, Z. 1994. Carbon isotopic fractionation in lipids from methanotrophic bacteria: relevance for interpretation of the geochemical record of biomarkers. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 58: 2853-2863.
- Vadeboncoeur, Y., Lodge, D. M. & Carpenter, S. R. 2001. Whole-lake fertilization effects on distribution of primary production between benthic and pelagic habitats. *Ecology*. 82: 1065-1077.
- Vander Zanden, M. J. & Vadeboncoeur, Y. 2002. Fishes as integrators of benthic and pelagic food webs in lakes. *Ecology*. 83(8): 2152-2161.
- Winfield, I. J., Bean, C. W. & Hewitt, D. P. 2002. The relationship between spatial distribution and diet of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, in Loch Ness, UK. *Environ. Biol. Fishes.* 64: 63-73.
- 安野 翔・千葉友紀・嶋田哲郎・進東健太郎・鹿野秀一・菊地永祐. 2009. 伊豆沼の栄養状態とユスリカ科幼虫を中心とした底生動物群集の変化. 伊豆沼・内沼研究報告 3:49-62.

Dietary analyses of *Chironomus plumosus* larvae in Lake Izunuma using carbon stable isotope ratios and fatty acid composition.

Natsuru Yasuno<sup>1\*</sup>, Toshiro Yamanaka<sup>2</sup>, Tetsuo Shimada<sup>3</sup>, Shuichi Shikano<sup>4</sup>, Eisuke Kikuchi<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Life Sciences, Tohoku University. 2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8577, Japan

e-mail pumosussia@yahoo.co.jp

<sup>2</sup> Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University. 1-1, Naka 3-chome, Tsushima, Okayama, 700-8530 Japan

<sup>3</sup> Miyagi Prefectural Izunuma-Uchinuma Environmental Foundation. 17-2 Shikimi, Wakayanagi, Kurihara, Miyagi 989-5504, Japan

<sup>4</sup> Center for Northeast Asian Studies, Tohoku University. 41 Kawauchi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8576, Japan

\*Corresponding author

**Abstract** Dietary components of larval chironomid species, *Chironomus plumosus*, in Lake Izunuma were investigated using carbon stable isotope ratios and fatty acid composition. Carbon stable isotope ratios ( $\delta^{13}\text{C}$ ) of the potential foods for the larval chironomids, particulate organic matter (POM) and sediment, were  $-27.8 \pm 1.3\text{‰}$  and  $-27.8 \pm 0.1\text{‰}$ , respectively. The larval chironomids showed large inter-individual  $\delta^{13}\text{C}$  variation;  $-50.9$  to  $-27.5\text{‰}$ . Some larvae, which showed similar  $\delta^{13}\text{C}$  values to POM and sediment, were considered to assimilate carbon derived from POM and/or sediment, while others which showed dramatically lower  $\delta^{13}\text{C}$  than POM or sediment were considered to assimilate carbon derived from biogenic methane sources by feeding on methane-oxidizing bacteria (MOB). Fatty acid composition of 4 larval individuals which showed different  $\delta^{13}\text{C}$  levels ( $-50.9\text{‰}$ ,  $-47.5\text{‰}$ ,  $-36.4\text{‰}$ ,  $-31.7\text{‰}$ ) were analyzed. All larvae contained a higher ratio of bacterial fatty acid biomarker i17:0 than did diatoms, green algae, and cyanobacteria. This indicated that bacteria are an important food source for larval chironomids. The content of i17:0 was correlated with larval  $\delta^{13}\text{C}$ . This result suggested that i17:0 was derived from methane-utilizing bacteria such as MOB.

**Keywords:** *Chironomus plumosus*, carbon stable isotope ratio, fatty acid, methane-oxidizing bacteria

Received: January 7, 2010 / Accepted: March 9, 2011

