

アサリに及ぼす硫化水素の影響に関する実験的考察

Experimental Consideration of the effects of Hydrogen Sulfide on *Ruditapes philippinarum*

上月康則¹・山中亮一²・松重摩耶³・齋藤 梓⁴・石田達憲⁵・大谷壮介⁶

Yasunori KOZUKI, Ryoichi YAMANAKA, Maya MATSUSHIGE, Azusa SAITO
Tatsunori ISHIDA and Sosuke OTANI

Various laboratory experiments were performed to examine the effects of H₂S (Hydrogen Sulfide) on *R. philippinarum* in this study. These results were as follows. 1) Most of clam closed its shell, in case was placed in the anoxic water. However, the number of clam that opened its shell increased with time. 20 hours later, the dying clam appeared after the clam extended the siphon and pelecypod. 2) H₂S exposure had an insignificant effect on the clam, they closed shells. However, the clam was significantly affected by H₂S exposure when they opened its shell and extended siphon and pelecypod. 3) When the water was hypoxic or anoxic before Blue tide occurrence (Aoshio), the clam would directly suffer severe effects of H₂S because the extended soft tissue from the inside of shell was exposed.

1. 緒論

アサリは最もよく知られた水産生物であるが、国内では多くの地域でその資源量が減少し、大きな問題となっている(水産庁, 2008)。硫化水素を含んだ無酸素化した水塊が海底から湧昇し、発生する“青潮”もアサリの資源量に大きな被害を及ぼしているが、貧酸素や無酸素化した水塊中のアサリの挙動については未だ不明なこともある。

例えば、従来より貧酸素や無酸素環境に対するアサリの挙動については、死亡率が取り上げられてきたが、著者らは、環境が回復した後も、ろ水機能の低下が長期間生じ、一部のものは死亡に至る「後遺障害」があることを見出した(上月ら, 2011; Kozuki et al., 2011)。これは貧酸素、無酸素化などの影響を評価するためには、曝露後のアサリの状態にも配慮する必要があることを示唆している。青潮は、貧酸素や無酸素の環境が続いた後に発生する。極浅い水深帯にまで貧酸素、無酸素化した場合には、アサリは、貧酸素、無酸素と硫化水素の影響を複合的に受けるが、既往の影響評価ではこの点に十分に配慮されていない。

そこで、本研究では、アサリに及ぼす青潮の影響を検討するために、3種類の影響評価実験を行った。実験では、短・長期間の硫化水素曝露実験、曝露後の回復過程の観察、曝露時のアサリの行動観察などを行った。特に、

硫化水素曝露の前に、貧酸素水中に置いておいたアサリを使った点に本研究の特色がある。本文では、この処理を“無酸素処理”と呼ぶ。

2. 実験方法

(1) 実験概要

a) 硫化水素濃度の調整

いずれの実験でも水温25℃、塩分28 psuの海水に、殻長35~40 mmの兵庫県赤穂産のアサリを入れて、実験を行った。無酸素化は、窒素曝気で、DOを調整して行った。硫化水素曝露の際のpHは、pHが低い状態で毒性が高くなることや、伊勢湾低層の無酸素状態時にはpHが7前後であることが観測されていることから(水野ら, 2009)、1N塩酸を用いてpH値6.5~7.5に調節を行った。硫化水素は窒素置換水に、硫化ナトリウム九水和物を用いて作成した。硫化物の添加は実験開始時の1回のみとし、硫化物が消失する時間までを実験時間とした。硫化水素への曝露は、死亡した個体の影響が、他の生存アサリ個体に及ばないように、アサリ一頭ずつ、容器を分けて実験を行った。本研究では、以下の実験A~Cまでの3つの実験を行った。なお、本実験では、行動観察を詳細にすることと、死亡時期を特定することを考え、底質を使わない実験系とした。

b) 硫化水素の曝露実験(実験A)

実験Aは、硫化水素の曝露濃度とその影響の程度との関係性をみることを目的に行った実験である。1日間、無酸素処理を施したアサリ50個体を、1頭ずつ容器内に入れ、所定の硫化水素濃度(a)0 mg/L(無酸素ではあるが硫化水素は添加しない系)、(b)2 mg/L、(c)20 mg/Lに調整した。アサリを1日間、硫化水素に曝露させた後、酸素が十分にある海水で満たされた水槽内に移し、1ヵ月間養

1 正会員 博(工) 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部教授
2 正会員 博(工) 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部講師
3 学生会員 徳島大学大学院先端技術科学教育学部環境創生工学専攻
4 非会員 修(工) クボタ工建(株)
5 正会員 修(工) (株)エコー建設コンサルタント
6 正会員 博(工) 大阪府立大学工業高等専門学校講師

生させ、死亡の有無を観察した。

c) 硫化水素の軟体部直接曝露実験 (実験B)

実験Bは、硫化水素の直接曝露の影響をみることを目的に行った実験である。ここでは、殻の開閉の影響を除くために、水管を出していることを確認し、そこにピペットで20 mg/Lに調整した硫化水素を浴びせかけた。なお、本実験は開放系で実験を行っているため、曝露後、5時間程度で硫化水素は消失し、それと同時に、実験Aと同様、酸素を十分含んだ海水中に戻し、養生7日目のアサリの生存の有無とろ水速度を測定した。なお、ここでは、無酸素処理を施したアサリと、全くストレスを与えないアサリを用いた2種類の実験を行った。

d) 硫化水素曝露に対するアサリの行動観察 (実験C)

実験Cは、硫化水素曝露中の行動とその後の影響の程度を検討することを目的に行った。無酸素処理を施していないコントロールの系を(a)、無酸素処理を施した後、硫化水素濃度0 mg/L、2 mg/Lに曝露させた系をそれぞれ(b)、(c)、無酸素処理を施さずに硫化水素濃度2 mg/Lに曝露させた系を(d)として実験を行い、(b)、(c)については、詳細な行動解析を行った。またアサリなどの底生生物の硫化物耐性は水温の影響を大きく受ける(中村ら、1997; 姜ら、1993)ことから、水温20℃の条件下でも同様の実験(e)を行った。

(2) 測定方法

a) 硫化物濃度

硫化物の測定方法は管原ら(2010)メチレンブルー法で測定した。ガラスシリンジ30 mlにサンプルを10 ml採水し0.27M酢酸亜鉛溶液を1 ml、6N塩酸を2 ml、ジアミン混合液を0.5 ml入れて発色させ20分以上放置したのち吸光度計667 nmで測定した。

b) アサリのろ水速度

ろ水速度の測定は、懸濁物質として赤潮の代表種である*S.costatum*を用いた。実験容器内に*S.costatum*を赤潮と同程度の濃度となるように加え、蛍光光度計(TURNER DESIGNS製, AquafuorTM)を用いて*S.costatum*の減少量とろ水速度(J.Coughlan, 1969)を算出した。なお、2時間を経過しても水管を出さなかった個体は計測不可とし測定しなかった。

c) アサリ体内のグリコーゲン

グリコーゲンはアンスロン硫酸方法(吉川, 1952)で測定した。アサリの全肉を24時間以上凍結乾燥させたのち、これを試験管に入れ30%水酸化カリウムを入れ1時間沸騰水浴中に浸す、その後20分以上冷却水に付け、エタノールを入れ上澄みを捨て、沈降物に蒸留水を加えて適宜希釈した。これにアンスロン試薬をいれ吸光度計620 nmにて測定した。

3. 実験結果

(1) 実験A

図-1に養生後14日間のアサリの生存率を示す。なお、図中のControlの系は、無酸素処理をせず、かつ硫化水素にも曝露させていないアサリの実験結果を示している。無酸素処理されたアサリを各硫化物濃度、(a) 0 mg/L、(b) 2 mg/L、(c) 20 mg/Lに1日間曝露させた直後のアサリの生存率はそれぞれ82%、74%、68%と硫化水素の濃度に比例して死亡個体は増加した。また曝露後、酸素が十分ある系に移し替えても、障害を負い、死亡する個体が発生し、7日目の生存率は56%、62%、30%と減少した。また0 mg/L(無酸素ではあるが硫化水素を添加していない系)と、2 mg/Lの海水中に置かれたものとの生残率には、大きな違いは認められなかった。

なお、無酸素環境下ではアサリは体内のグリコーゲンをエネルギー源にして、嫌気代謝を行い生存する。そのため、グリコーゲン量と死亡率との間に関係がみられるとの報告がある(黒田ら, 1998)。本実験でも、期間中のアサリのグリコーゲン含有量の変化を測定したが、無酸素処理およびその後の硫化水素曝露を行った後でも、大きな変化は無かった。このことから本実験でのアサリの死亡には、グリコーゲン量の影響は小さいと思われる。

(2) 実験B

図-2に硫化水素に直接曝露されたアサリのろ水速度を示す。無酸素処理をしなかったアサリ(a)では、硫化物を直接添加しても曝露後7日目のろ水速度に差は無かった。しかし、無酸素処理をしたアサリ(b)では、硫化物を直接添加すると、曝露後7日間養生させてもろ水速度は回復せず、有意に減少した。

これは、無酸素処理によって、なんらかの機能低下が生じ、硫化水素の影響をより強く受けたことが直接の原因と考えられる。他にも、アサリの行動の観察をしていると、無酸素処理の有無では次のような違いが見られた。処理をしていないアサリに、硫化水素を直接添加すると、

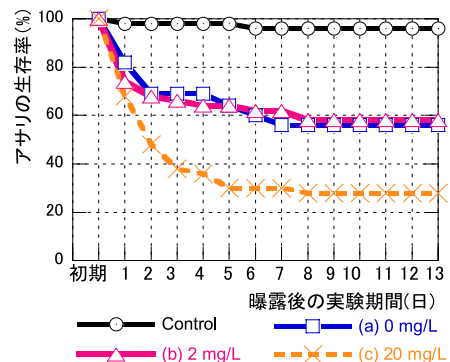


図-1 無酸素処理を行ったアサリの硫化水素曝露実験

全ての個体は水管を引っ込め、殻を閉じた。溶存酸素が十分にある環境に戻し、しばらくするとアサリは水管を出していた。しかし、処理を施した全てのアサリは、水管の先をすばめるような行動をとるものの、長く伸ばした水管を引っ込めることはなく、結果的に硫化水素を

長時間軟体部に直接接触させることとなった。なお、本実験で死亡した個体は、無酸素処理をした系で、1個体のみであった。

(3) 実験C

実験中のアサリの行動を30分間隔で観察し、結果を図-3にまとめた。図-3 (a) はコントロール系の実験結果、(b) は無酸素水中のアサリの行動、(c) は無酸素処理中とその後の硫化物濃度2 mg/L中の行動、(d) は実験開始時から硫化水素2 mg/Lの海水にあるアサリの行動、(e) は(d)と同じ条件で水温を20℃とした時のアサリの行動である。なお、図-3 (b), (c) では、無酸素処理中のアサリの行動も図示したため、観察時間は70時間となった。無酸素や硫化水素などのストレスを与えていないコ

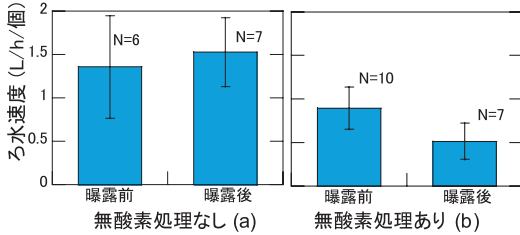


図-2 ろ水速度変化

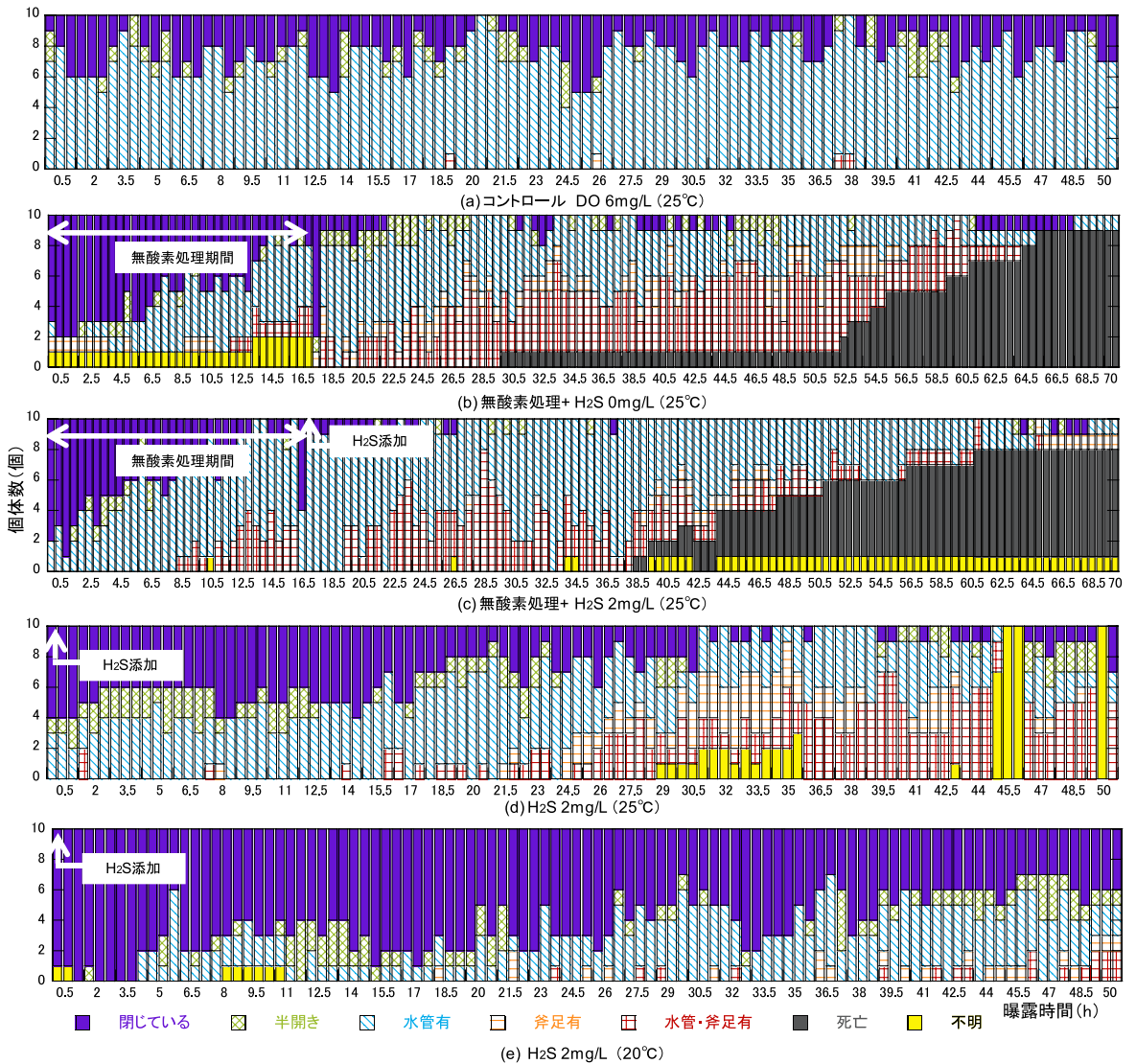


図-3 アサリの行動

ントロール系のアサリは (図-3 (a)), 水管を出す, あるいは殻を閉じるかのいずれかの行動をし, 斧足を出す個体はほとんど見あたらなかった。

一方, 図-3 (b) より, 無酸素処理を始めると, 大半のアサリが殻を閉じるが, 徐々に半開き, 水管を出す個体が増え, 20時間を経過すると, 殻を閉じている個体が減少し, 代わって水管だけを出す個体, 水管と斧足の両方を出す個体が増加した。約55時間以降は死亡する個体が増加し, 70時間頃には, 90%の個体が死亡した。なお, 既往の知見 (柿野, 1982; 萩田, 1985) では, 水温25℃, 無酸素環境下では, 個体差は大きいものの3~4日で死亡するとあり, 本実験結果もその範囲にあった。

次に, 無酸素処理後に硫化水素2 mg/L相当を添加する (図-3 (c)) と, アサリは一時, 斧足を引っ込めるが, 2時間後には斧足と水管を出す個体が増えた。行動は無酸素を続けた図-3 (b) と同じ傾向にあるが, 硫化水素曝露から死亡するまでに要する時間は, 無酸素処理をしたアサリの方が42時間を過ぎてからと, やや早かった。この死亡する時間の差が硫化水素2 mg/Lに曝露された影響と思われる。

また, 実験開始時から無酸素水に硫化水素2 mg/Lを加えた海水に置いたアサリ (図-3 (d)) では, 15時間程度は殻を閉じる個体が半数あり, その後, 水管と斧足の両方を出す個体が増加した。ただし, 実験終了50時間経っても死亡する個体はなかった。

20℃での実験 (図-3 (e)) でも, 無酸素水中に置くとすぐに殻を閉じ, それはしばらく続いた。その後, 水管を出す個体が現れ, 50時間を過ぎると斧足と両方出す個体が見られた。なお, この間死亡する個体はなかった。

4. 考察

(1) 無酸素海中でのアサリの行動

ストレスのない健全な環境では, アサリは, 殻を閉じる, ろ水, 摂餌するといった行動を繰り返す。しかし, 貧酸素, 無酸素水の中に入れると, 多くのアサリは, まず殻を閉じ, 嫌氣的代謝を始める (日向野, 2005)。その後, 徐々に殻を開き, 水管を出す個体が増加する。水温25℃の環境では, 20時間経ると殻を閉じる個体はほとんど見られなくなった。一般に水管は, 健全な状態では, 底質表面から数mmほど, 短く覗かせる程度で, 水中で水管を見つけるのは容易ではない。しかし, 実海域でも, 本実験中にも, 貧酸素, 無酸素環境中のアサリは, 酸素を求めようとして水管を数cmも異常に伸ばしていた (写真-1)。実験では, 同時に, 斧足を出す個体が見れ, その後死亡個体が増加した。斧足は潜砂する時に使われるが, ここで斧足を出した行動は, ストレスを緩和, あるいはその場から忌避する行動と理解することができる。



写真-1 無酸素中のアサリの様子 (2009.8.26 兵庫県御前浜)

(2) 青潮に対する影響評価

青潮は貧酸素, 無酸素環境下で発生するが, 硫化水素と無酸素の影響を区別して, 評価することは容易ではない。実験Bの結果では, 無酸素処理をしていない個体に直接硫化水素を短時間曝露させても, 死亡する個体は無く, ろ水機能に後遺障害が発生することも無かった。ただし, 無酸素処理を施したアサリを使った場合には, ろ水機能に後遺障害が生じた。また長時間, 硫化水素に曝露させた実験Cでも, 無酸素処理を施したアサリの方がより影響が顕著に表れた。これは無酸素処理を施したことで, 生理面に悪影響が生じ, 硫化水素耐性が低くなったためと思われる。さらに, 実験では, 無酸素処理を施されたアサリは, ある一定の時間を経ると水管や斧足を出し, その軟体部が硫化水素に直接接触れる。このことも硫化水素に対する耐性低下の理由の一つになっていると思われる。

実環境では, 青潮発生前に, アサリの生息する浅い水深帯でも貧酸素化や無酸素化が生じることもあることから, 本実験と同じく, 実海中でも水管などの軟体部を海中にさらす個体は多いと思われる。青潮時のアサリの大量斃死は, 青潮発生前にアサリが無酸素環境下にあり, 軟体部を大きくさらしている時に, 硫化水素に曝露されることも一因となって発生すると推察できる。その一方で, 青潮が発生しても, 殻を閉じている時間内に消滅すれば, 被害は小さく収まると思われる。例えば, 柿野 (1986) は, 東京湾でのアサリの青潮被害が, 青潮の規模と一致しないこともあることを報告しているが, 本実験で指摘した要因も被害規模に影響を及ぼす一因である可能性がある。

このように, 実環境でも無酸素処理の有無によってアサリが受ける影響程度は異なるため, 青潮の影響評価にあたっては, 発生前の貧酸素, それに対するアサリの状況も配慮する必要がある。

(3) 青潮, 無酸素耐性に及ぼす水温の影響

実験Cの水温の異なる実験結果から, 耐性に及ぼす水温の影響を考察する。実験開始時から硫化水素濃度2

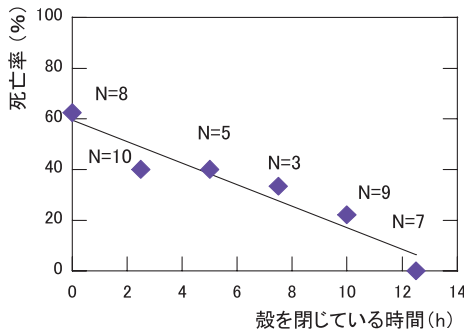


図-4 殻を閉じている個体と死亡率の関係

mg/L, 水温25℃ (図-3 (d)), あるいは20℃ (図-3 (e))で行った実験結果を比較すると, 25℃の系では実験開始から30時間経つと, 殻を閉じる個体がほとんど見られなくなるが, 20℃の系では, 約40%の個体は殻を閉じていた。また水管, 斧足を出す個体が, 25℃の系では半数を超えたのに対し, 20℃の系では10%程度と少なかった。これまでも, アサリの硫化物耐性は低水温中にあるものの方が高い (柿野, 1982) と報告されおり, 本実験でも, 25℃より, 20℃に置かれたアサリの硫化水素耐性の方が高いことが示された。

また, アサリの挙動を観察結果から, 死亡時間と殻を閉じる行動との間に何らかの関係があるように伺えた。そこで, 硫化水素曝露の実験開始から50時間以内の間, アサリが殻を閉じていた時間を個別に求めた。これを2.5時間刻みで区分し, 各時間帯にあるアサリの死亡率を求めた (図-4)。その結果, 殻を閉じる時間が多いほど50時間以内での死亡率は低下する関係にあることがわかった。この結果は, アサリは殻を閉じることで硫化物の影響を回避し, 生存時間を延ばしていることを示唆している。

5. 結論

本研究では, アサリに及ぼす硫化水素の影響を明らかにすることを目的に室内実験を行った。1) アサリは無酸素環境下に置かれると, 殻を閉じる。20時間程度を過ぎると, 徐々に殻を開けて, 斧足, 水管を出す個体が増え, 同時に死亡する個体が増えた。2) 殻を閉じている時に, 硫化水素に曝露されても影響は小さい。しかし, 斧足や水管などの軟体部を出している時に硫化水素に曝露されると, 大きな影響を受けることがわかった。3)

水温25℃と20℃で, アサリの硫化水素に対する耐性を比較すると20℃の方が高かった。

以上のことから, 青潮によってアサリの大量斃死が起こる一因は, 青潮発生の前に無酸素化が生じ, 殻を閉じず, 軟体部を露出するアサリが多くなり, そこで硫化水素の曝露を受けるためであることが示唆された。

謝辞: 本研究を進めるにあたって, 菅原庄吾氏 (環境システム (株)) には硫化水素の測定方法のご指導を, 津山拓郎氏 (徳島大学工学部) にはデータ解析の協力を得た。ここに謝意を記す。

参考文献

- 柿野 純 (1982): 青潮によるアサリへの死原因について 貧酸素および硫化物の影響, 千葉水産試験場研究報告, 40, pp.1-6.
- 柿野 純 (1986): 東京湾奥部における貝類への死事例, 水産土木, 23, pp.41-47.
- 姜柱賛・松田 治 (1993): 有用甲殻類 3種の無酸素と硫化水素に対する耐性, 広島大学生物生産学部紀要, 32, pp.71-78.
- 黒田伸郎・甲斐正信・原 保 (1998) 漁場環境変動に伴うアサリのグリコーゲン含量の変動, 愛知県水試研報, 5, pp.35-39.
- 上月康則・大谷社介・山中亮一・平井 研・齋藤 梓・酒井 孟・藤木洋二・岩雲貴俊 (2009): 大阪湾湾奥に創出された人工海浜の底生生物に及ぼす貧酸素化・青潮の影響, 土木学会論文集 B2-65 (海岸工学), pp.1211-1215.
- 水産庁 (2008): 干潟生産力改善のためのガイドライン, pp.1-16.
- 菅原庄吾・塚本達也・鮎川和泰・木元克則・千賀有希子・奥村 稔・清 家泰 (2010): 砂泥堆積物中溶存硫化物の簡便な現場抽出/吸光度定量及びその有明海北東部堆積物への適用, 分析化学, 59, pp.1155-1161.
- 中村幹雄・品川 明・戸田顕史・中尾 繁 (1997): ヤマトシジミの硫化水素耐性, 水産養殖, 45, pp.17-24.
- 萩田健二 (1985): 貧酸素水と硫化水素水のアサリのへい死に与える影響, 水産養殖, 33, 2, pp.67-71.
- 日向野順也 (2005): 貧酸素・硫化水素・浮泥等の環境要因がアサリに及ぼす影響, 水産総合研究センター研究報告, 3, pp.27-33.
- 水野知巳・程川和宏・日向野純也 (2009): 水産業による水質浄化機能の向上技術開発事業 アサリ等の二枚貝の資源量増大対策, 水産総合研究センター研究報告, p.82.
- 吉川春寿 (1952): 臨床医科学 I, 共同医書出版, 東京, pp.150-152.
- Coughlan, J. (1969): The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions, Marine Biology, pp.356-358.
- Hochachka, P.W. (1984): 低酸素適応の生化学, 恒星社厚生閣, 東京, pp.40-54.
- Kozuki, Y. R., Yamanaka, M., Matsushige, A., Saitoh, S., Otani, and T., Ishida. (2011): The After-effects of Hypoxia Exposure on the Clam *Ruditapes philippinarum* in Omaehama beach, Japan. EMECS9, p.89.