

アサリ資源回復のための干潟環境条件解明

実施機関および担当者名：

独立行政法人水産総合研究センター
 養殖研究所 生産システム部増養殖研究グループ 日向野純也
 同 飼餌料研究グループ 徳田雅治
 水産工学研究所 水産土木工学部環境分析研究室 桑原久実・齋藤 肇
 宮崎大学 農学部生物環境科学科 荒西太士
 学習院女子大学 国際文化交流学部 品川 明

調査実施年度： 平成15年度～17年度

緒言

我が国におけるアサリの生産量は昭和60年から減少を続け、現在の年間生産量は最盛期の4分の1程度の3～4万トンで低迷し続けている。アサリ資源の回復は危急の課題であり、干潟造成等によりアサリの生息場を増大させるためには、好適環境の構築・維持が必須である。本課題では、具体的な事例を通して生産阻害要因となる環境要因を明らかにし対策のための技術開発に資することを目的とし、内湾性の強い長崎県小長井町のアサリ養殖場および流動環境が卓越した熊本県緑川河口のアサリ漁場で調査を実施した。

長崎県諫早湾に面する小長井町漁協ではかつて潜水タイラギ漁が営まれ主要な収入源となっていたが、諫早干拓工事の進行にともないタイラギ資源は激減し、現在漁は行われていない。一方、昭和50年代から客土覆砂による造成漁場でアサリ養殖業が営まれ、年間の生産量は数百トンに及び(図1)現在は主要な漁家の収入源となっている。しかしながら、平成10年以降、表1に示すように夏季にしばしば大量へい死を生じるようになり、特に平成12年の小長井町全域にわたる大規模なへい死では、翌年の生産量、生産額が半分以上減少した。へい死要因として赤潮(シャットネラ属)が強く疑われたものの、大潮の干潮時になってから軟体部の腐敗したアサリの死殻が確認されたため、要因の特定やへい死に至る経過は不明であった。有効な対策を講ずるためには環境要素とアサリへい死との因果関係を明らかにする必要がある。

水温、溶存酸素などの水質環境はアサリの生残に大きな影響をもたらす因子といえることができるが、へい死に至るプロセスを明らかにするためには連続的にモニタリン

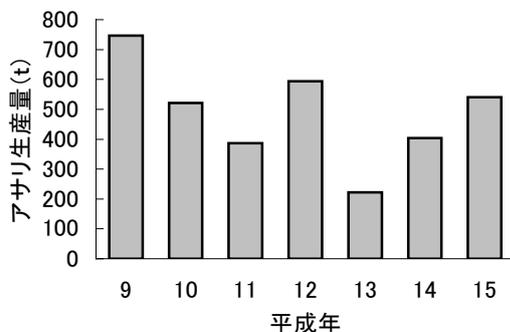


図1 小長井町漁協における近年のアサリ生産量
平成12年夏季に大規模なへい死を生じており、その翌年に生産が大きく減少している。

表1 小長井町アサリ養殖場におけるへい死事例

平成年	発生時期	発生範囲	斃死発生漁場の推定斃死率(%)
6	5月下旬	一部(湾央)	60
10	7月下旬	全域	40
11	8月下旬	一部(湾奥)	10
	9月下旬	全域	27
12	8月上旬	全域	24~100
13	7月下旬	一部(湾央)	26~77
14	8月上旬	ごく一部(湾口)	10~40
15	8月上旬	ごく一部(湾奥)	21~66
	9月上旬	湾央~湾奥	8~100

グする必要がある。現在、現場設置型の計測器で測定が可能な水質項目については携帯電話回線を用いてリアルタイムに送信が可能なシステムが実用化されており、現地データの監視とデータのロギングが可能となっている。

また、二枚貝は溶存酸素濃度が低い時には酸素を消費しない嫌氣的代謝により比較的長期間生存が可能である¹⁾。嫌氣的代謝では体に蓄えられているグリコーゲンとアミノ酸（アスパラギン酸等）を利用し、生命維持に必要なエネルギーを得ているが、酸素が無いと水と二酸化炭素にまで分解することはできず、コハク酸、プロピオン酸など様々な代謝産物が蓄積される²⁾。特に有機酸の一種であるプロピオン酸がある程度以上の濃度になるとアサリが死に始めることが実験的に明らかにされている¹⁾。この特性を利用すればへい死に低酸素症など呼吸生理障害が関与していたのか否か特定が可能である。

これらの技術を用い、小長井町のアサリ養殖場において平成15年度から自動水質観測機器を用いた環境計測およびアサリの生理状態のモニタリングを行った。この間、平成16年夏季に大規模なへい死の発生に遭遇したため、この時の水温や溶存酸素等の水質変化およびアサリのへい死状況とグリコーゲンや有機酸などアサリの健康状態を示す指標の変化から、アサリの衰弱に対する環境要因の関与、へい死に至る過程について検討した。また環境条件を複合的に変化させた状況下でのアサリの飼育実験を行い、生化学的な指標の有効性を検証した。調査と実験によって明らかになったアサリを衰弱させる環境要因を排除または軽減するための手法について考察を加え、今後の方策について提案を行う。

一方、流動環境が卓越した漁場ではしばしば覆砂によって漁場造成が成功する例が見られるが、その効果が持続しないことも多く覆砂効果そのものが疑問視されることがある。熊本県緑川河口域のアサリ漁場では熊本県緑川河口干潟では、アサリの浮遊幼生は、比較的毎年安定して見られるが、その後、何らかの要因により数ミリ程度の稚貝にならず、漁獲に繋がらない場合が多く問題になっている。この様なアサリ稚貝の減耗要因は、潮流・波浪などの流動による稚貝の輸送、輸送された場所の環境条件などと密接に関係しているものと考えられている。砂面の変動とアサリ稚貝の移動の観点から覆砂による底質・稚貝移動の抑止効果を検証する。

調査の実施においては長崎県総合水産試験場、熊本県水産研究センターに多大な御協力を戴いた。

調査方法

1. アサリ養殖場の水質環境のモニタリング

長崎県諫早湾小長井町のアサリ養殖場（図2）において、定点A（潮間帯養殖場，DL.+60cm，アサリの地蒔き養殖が行われている）と定点B（潮下帯覆砂域，DL.-30cm，50m×50mに50cm厚の覆砂をしている）にノリ養殖用のコンポーズを使用して高さ約6mの櫓を立て多項目水質計HYDROLAB社DS4aにTurner Designs社SCUFAクロロフィルセンサーを装着し設置（センサーの位置は底上約5cm）した。測定項目は水温，塩分，溶存酸素，pH，ORP，クロフィル，濁度，水深である。櫓には太陽電池パネルとバッテリー，携帯電話回線を利用したDOPA送信ユニットを取り付け，30分間隔で測定したデータが遠隔地でも受信出来るようにした。1～2週間に1回の割合でセンサーを引き上げて清掃及び酸素電極の膜交換，キャリブレーションを行うと共に採水及び海

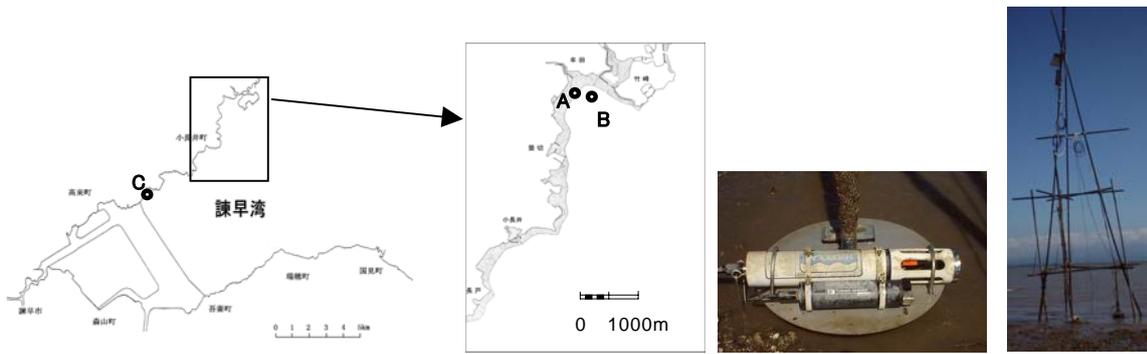


図2 調査地点図。長崎県小長井町釜地区の定点A（潮間帯のアサリ養殖場）、定点B（潮下帯の覆砂試験地）および諫早湾奥金崎地区の定点C。写真は連続観測機器設置用の治具と観測槽。

洋観測によりデータのクロスチェックを行い補正した。湾奥の定点Cには水温、塩分、溶存酸素、水深センサーを備えたHYDROLAB社MS4aを設置し、同様にデータ送信、記録、クロスチェックを行った。計測期間と機器の設置場所は以下の通りである。

- 平成15年 6月初旬から11月末まで 定点A, B
- 平成16年 3月初旬から12月末まで 定点A, B, C
- 平成17年 1月初旬から10月末まで 定点A, C

2. 調査海域周辺の地形測量および底質調査

平成15年12月に小長井町釜地区周辺の海底地形の測量を音響測深器およびGPSを用いて行うと共に採泥器を用いて底質を採集し、粒度分析、酸揮発性硫化物(AVS)等の測定を行った。

3. アサリの生理状態のモニタリング、貧酸素時の集中観測

1) カゴ収容アサリの生残試験

アサリを砂と共にカゴに収容して小長井町アサリ養殖場内に移植を行った。収容されたアサリは大潮毎に取り上げ生残率、軟体部グリコゲン含量、外套腔液（外套膜で包まれた内側の鰓周辺に溜まっている水；図3）中の各種有機酸含量を測定した。

平成15年6月6日（定点A, B; 10カゴ, 120個体/カゴ収容=1,000個体/m²相当）

平成16年5月21日（定点A, C; 11カゴ, 120個体/カゴ収容=1,000個体/m²相当）

2) 平成16年夏季の赤潮および無酸素発生時における集中観測

小長井町地先では貧酸素の発生に先立ちシャットネラ赤潮が発生していた。シャットネラは魚類に強い毒性を示すが、アサリに対する毒性も指摘されている。今回、シャットネラが濃密に発生していた8月8日にアサリを採取し、糞や消化管内容物を観察した。また、8月10日から貧酸素水の接岸が予想されたので、当日採取した健全と思われるアサリを網袋に入れてその後1日2回ずつ取り上げ生残率及び有機酸含量を調べた。

3) 環境変動に伴うアサリ機能遺伝子の発現変動

平成15年6月～9月の約4ヶ月間に合計10回、3個体/回のアサリを採集し、それらの鰓部からmRNAを調製した。常法に従いmRNAからcDNAを合成し、8種類のプライマーを用いたRAPD

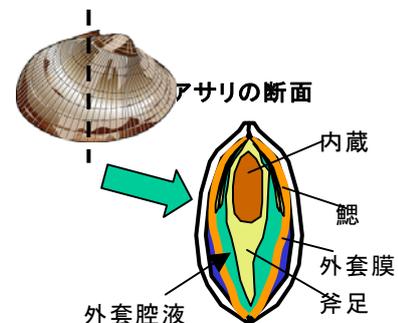


図3 アサリの健康状態を調べるための外套腔液採取部位

(randomly-amplified polymorphic DNA) 法により、全 10 採集日の試料を同時にディファレンシャル・ディスプレイ解析した。

4. アサリの貧酸素耐性に関する室内実験

1) アサリ生残に対する無酸素および硫化水素の影響試験

恒温槽中に 0.5 μ m のフィルターを通過した濾過海水を満たした密閉式容器 (容量約 1L および 700mL) を浸漬しアサリをそれぞれ 5 個体および 3 個体収容して, Strathkelvin 溶存酸素計 (電極が酸素を消費しない) で容器内の溶存酸素量をモニターした。容器内に窒素を曝気してほぼ無酸素が確認された状態で密閉し, 1L の容器にはほぼ 10mg-S/L となるように Na₂S 溶液を添加した。この時炭酸ガスを吹き込んで pH がおよそ 7 になるように調整した。実験中, 両容器の側面に水中マグネチックスターラーを装着して容器内の海水を攪拌した。対照として濾過海水を約 700mL 入れた容器内にアサリを 3 個体収容して恒温槽内に浸漬し空気を曝気して酸素が飽和した状態を維持した。実験は 30 $^{\circ}$ C および 25 $^{\circ}$ C で行い, それぞれ 13 および 21 時間暴露した。実験終了後にアサリの外套腔液を採取して前節と同様に有機酸を定量した。室内実験ではアサリの酸素消費速度を水温別に測定すると共に 30 $^{\circ}$ C 及び 25 $^{\circ}$ C で無酸素及び無酸素に Na₂S を 10mg-S/L の濃度になるよう添加してそれぞれ 13, 21 時間暴露し外套腔液中の有機酸の挙動を調べた。尚, 海水中の硫化物濃度の分析は Fonselius ら³⁾の方法に従った。

水温 25 $^{\circ}$ C 及び 30 $^{\circ}$ C に設定した水槽において有酸素及び無酸素状態に 24 時間暴露したアサリを採集し (5 個体/区 \times 4 実験区), それらの鰓部より調製した mRNA から cDNA を合成し, 前述と同様の方法にてディファレンシャル・ディスプレイ解析した。

2) アサリの酸素消費速度測定

アサリを 1 個体ずつ約 200ml 容の容器に収容し, Strathkelvin 溶存酸素計で容器内の溶存酸素量をモニターした。両容器の側面に水中マグネチックスターラーを装着して容器内の海水を攪拌しながら, 溶存酸素の変化を記録した。実験は 30, 25, 20, 15 $^{\circ}$ C の各水温で行い, 溶存酸素がほぼゼロに近づくまで継続した。実験終了後にアサリの殻長等の計測および軟体部を 60 $^{\circ}$ C で乾燥させ乾重量を計測した。



図4 貧酸素対策試験に用いた曝気装置

5. 貧酸素対策試験

1) エアレーターを用いた試験

平成 16 年夏季の小潮時に貧酸素化することが予想されたので, 米国 Aeration Industries International 社の曝気装置 Aire-O₂ を用いた貧酸素解消試験を行った (図 4)。本装置は高速で回転するスクリーに空気が吸い込まれて泡を吹き出す方式で陸上養殖池の水質改善

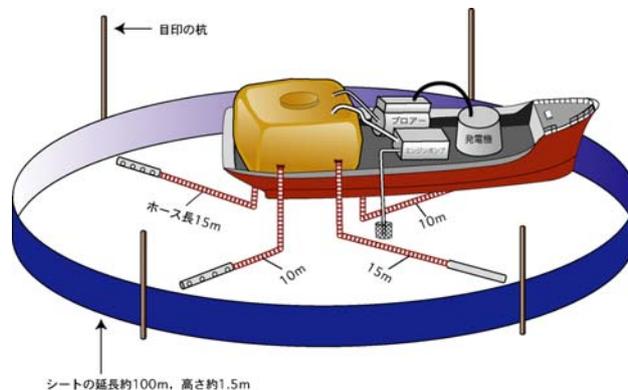


図5 貧酸素水侵入防除用シートと曝気海水導入装置対策試験に用いた曝気装置

などに用いられている。実験は平成16年7月23日に作動試験、8月10～11日に釜地区のアサリ養殖場にて実施した。

2) ブルーシート簡易膜と曝気海水導入試験予備試験として平成16年9月に、ブルーシート(長さ5m, 巾1.8m)による簡易フェンスの展開試験を実施した。長さ5mあたり12kgとなるように錘チェーン、浮力300g程度の浮きを6個取り付け、これら4セットを連結して直径約6mの囲い状に設置し、全体の形状や隙間を海上及び水中から観察した。平成17年度は、長さ100m, 巾1.8mのブルーシートを10mずつ(後に50m)裁断し、長さ1mあたり1kgの錘ロープをシートの下端から10cm上方に縫い付け、浮力300g程度の浮きを1個/mの割合になるよう取り付け、簡易スクリーンを作成した。また、エンジンポンプ、ブロワー、ローリータンク(500L容)、カナラインホース(40mm)、塩ビ管側方に10cmピッチで穴を開けた噴流ノズルを組み合わせ、曝気海水を底層に導入する装置を作成した(図5)。エンジンポンプの揚水速度は350L/min, ブロワーの通気能力は0.15kgf/cm²で83L/min(100V,60Hz)である。平成17年9月2日に釜地区のアサリ養殖場にてシートの展開および曝気海水導入の試験運転を行った。

6. 流動場における覆砂機能の解明

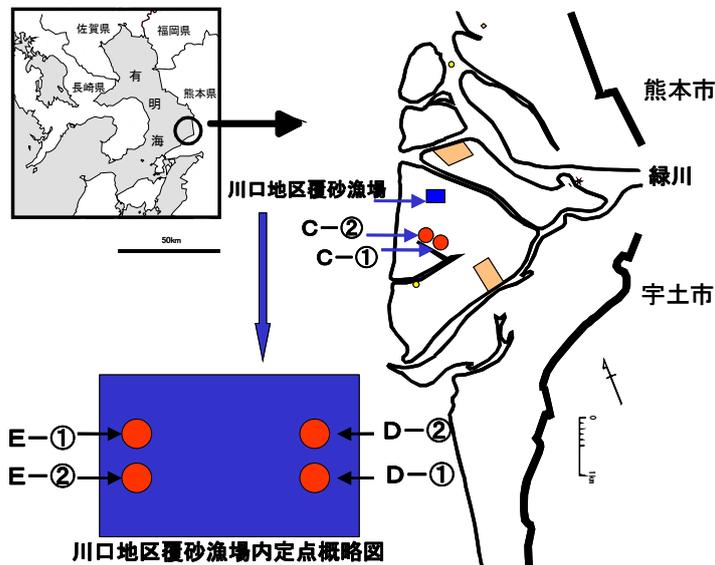


図6 調査海域の概要

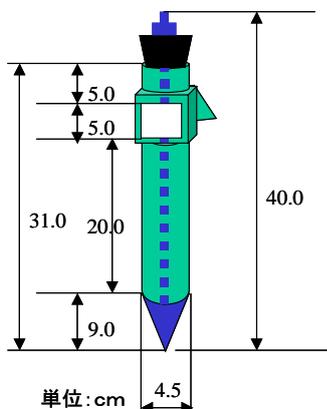


図7 捕砂器の概要

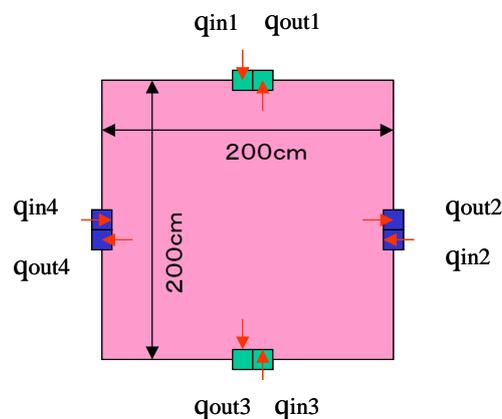


図8 捕砂器の設置方法

熊本県緑川河口域のアサリ漁場において漂砂に伴うアサリ稚貝の移動と覆砂の効果を把握するため、覆砂漁場の侵食域と堆積域、その周辺の一般漁場を対照域として土砂収支と稚貝収支を得るための調査を実施した。図6に示す緑川河口地区覆砂漁場の侵食区(E)と堆積区(D)および対照区(C)においてそれぞれ2箇所ずつ調査区を設け、平成16年12月14日～15日に実施した。

捕砂器の概要は図7のとおりである。一方向からの稚貝や底質が採取できるように、一方には、流れにより開閉する蓋が取り付けられている。この捕砂器を各調査箇所について図8のように設置した。2m×2mの領域に流入・流出する底質や稚貝量を算出

できるようにした。捕砂器による局所洗掘を防止するために海底面に塩ビ平板(40cm×40cm×0.5cm)を置き、その中に捕砂器を設置するようにした。

流動環境を測定するために、川口地区の覆砂漁場に水深計と流速計を設置した。

調査結果

1. アサリ養殖場の水質環境のモニタリング

各年の定点 A における夏季の観測結果を図9から図11に示す。

平成15年観測結果(図9)：水温は7月下旬から25~30℃に達したが、8月前半は台風の影響等で例年より低めであったが9月初旬は日中30℃を上回っていた。8~9月には小潮時に日較差が大きく、躍層の影響が現れていた。DOは7~9月にかけて小潮時に日内変動が大きく、大潮時に小さくなる傾向が見られた。8月下旬と9月上旬の大潮では赤潮が発生したため、日中過飽和、夜間貧酸素となり、特に9月上旬の小潮時には1日に6~12時間無酸素状態を記録した。また、無酸素時に酸化還元電位は大きく下がり、マイナス付近に達していた。

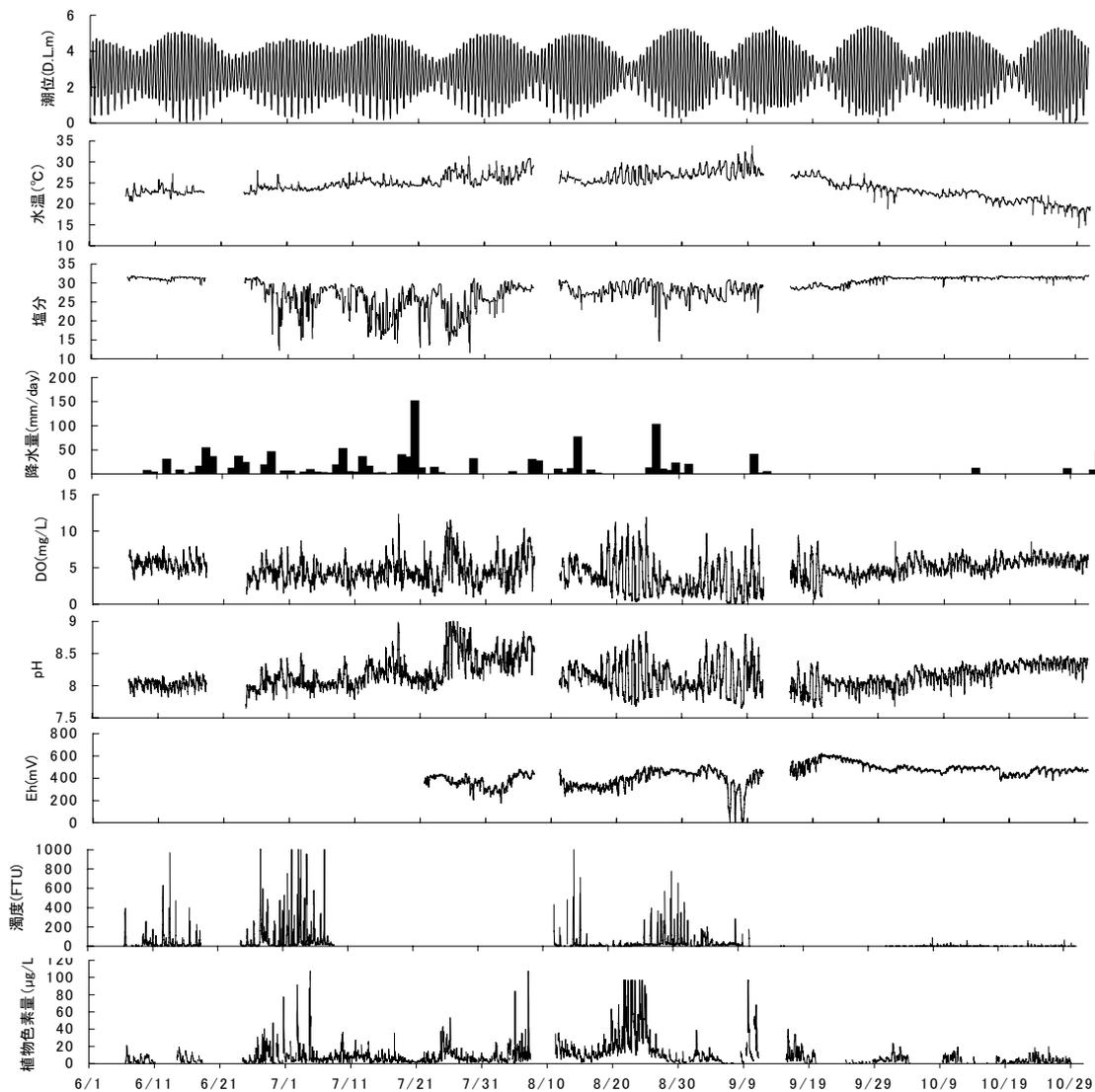


図9 平成15年夏季に定点Aで観測された水温、塩分、DO、pH、酸化還元電位、濁度、植物色素量(Chl.a+Phaeo)及び大浦検潮所の潮位、諫早測候所で観測された降水量。

平成16年観測結果(図10): 7月以降前年より高水温, 高塩分で推移し8月中旬には28~33℃, 30psu 前後であった。溶存酸素は7月までは前年同様であったが, 8月に入りシャットネラ赤潮の影響で大きく上昇しその後無酸素が観測された。この時にはpH および酸化還元電位も大きく下がっていた。観測の結果, 無酸素水は養殖場周囲から流入していた。8月13日に採取した底層水の硫化水素濃度は0.9~4.0mg-S/L と高かった。濁度および植物色素量は大潮時に振幅が増幅する傾向にあったが, 植物色素は赤潮時には小潮でも大きく上下し, 上層付近に藻類の密度が高い様子が見られた。

平成17年観測結果(図11): 7月下旬以降から高水温となり, 8月中旬には30℃近くに達し, 9月上旬まで高い状態が継続した。7月上旬と8月上旬にまとまった降水があったため塩分がやや低下する時期が認められており, 前年とは若干様相を異にした。

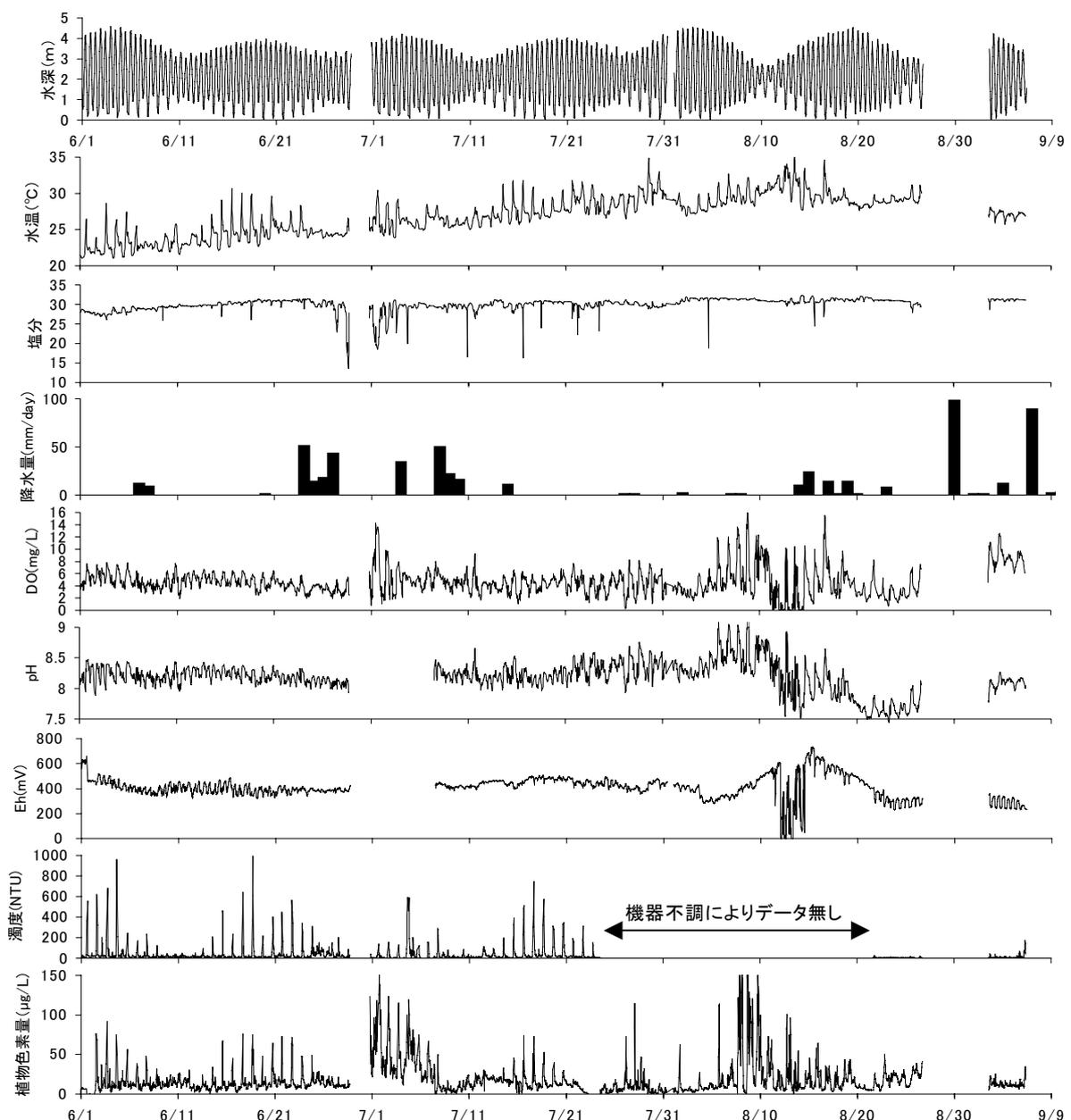


図10 平成16年夏季に定点Aで観測された水深, 水温, 塩分, DO, pH, 酸化還元電位, 濁度, 植物色素量(Chl.a+Phaeo)及び諫早測候所で観測された降水量。観測期間中の欠測は台風退避及び機器不調による。

溶存酸素は 8 月上旬の大潮時に低下したが、間もなく回復しその後の小潮時に再度低下傾向が見られたが、平成 15,16 年のような無酸素は観測されなかった。天候は非常に静穏であったにもかかわらず、シャットネラ赤潮の発生がなかったため（8 月上旬に *Gymnodinium sanguineum* の赤潮が発生）、植物色素量の極端な上昇も見られなかった。したがって pH や酸化還元電位も著しい低下は見られず、3 カ年の観測の中で最も安定した水質条件であった。

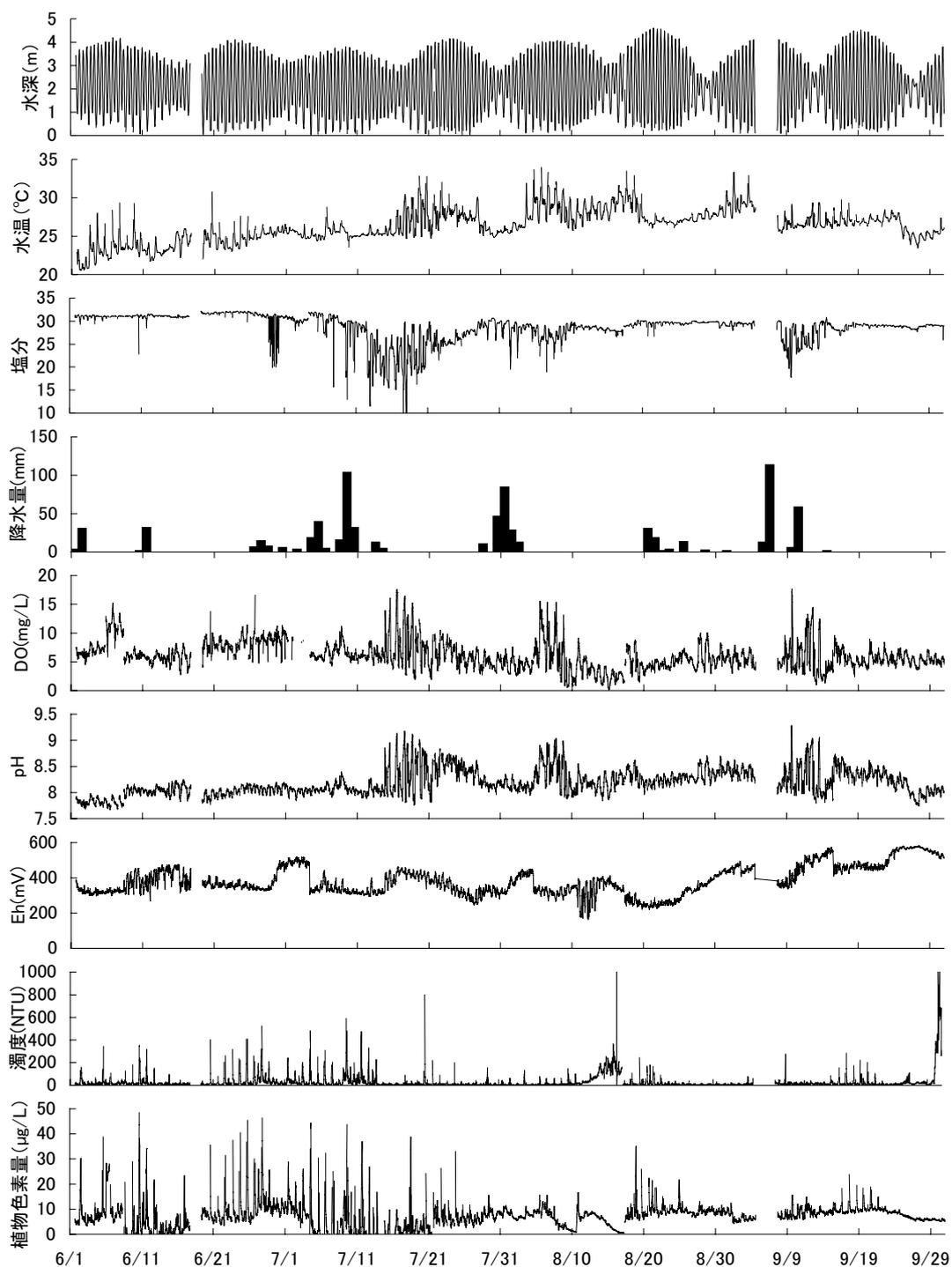


図 11 平成 17 年夏季に定点 A で観測された水深、水温、塩分、DO、pH、酸化還元電位、濁度、植物色素量(Chl.a+Phaeo)及び諫早測候所で観測された降水量。

2. 調査海域周辺の地形測量および底質調査

釜地区の南に位置する築切港の航路が周辺より 2m 程度深くなっているが、その沖は緩勾配で平坦な地形となっていた。底質は泥質で Mdφ は 7~8 と非常に細かく、冬季にもかかわらず底質の AVS が乾泥 1g あたり 0.5mg 以上で中には 1mg を超える場所も見られた (図 12)。このようにアサリ養殖場のすぐ沖に有機物含量の高い軟泥が堆積しており、貧酸素の発生源になり易いことを示している。

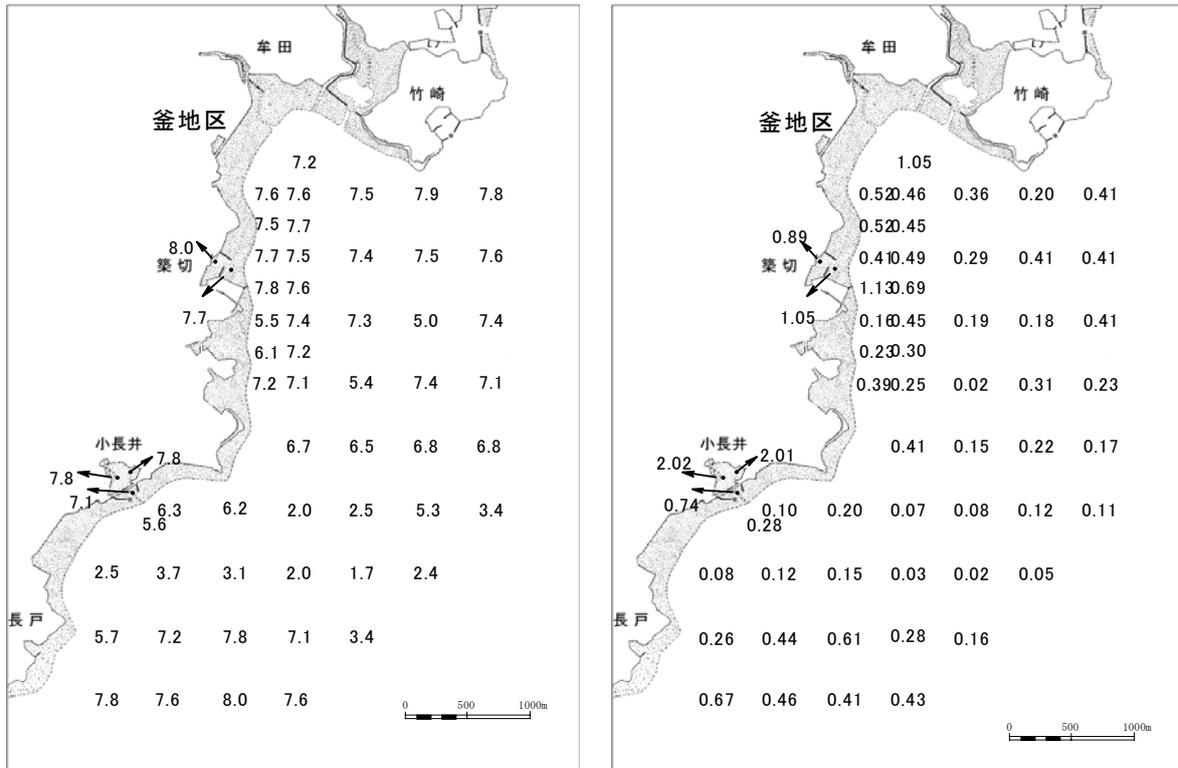


図 12 諫早湾小長井町沿岸のアサリ養殖場沖合における底質の中央粒径 (Mdφ, 左側) および底質乾燥重量 1g あたりの AVS 含量 (mg) (右側)。

3. アサリの生理状態のモニタリング, 貧酸素時の集中観測

1) カゴ収容アサリの生残試験

平成 15 年度の試験結果を図 13 に示す。収容されたアサリは 8 月末までの生残率は

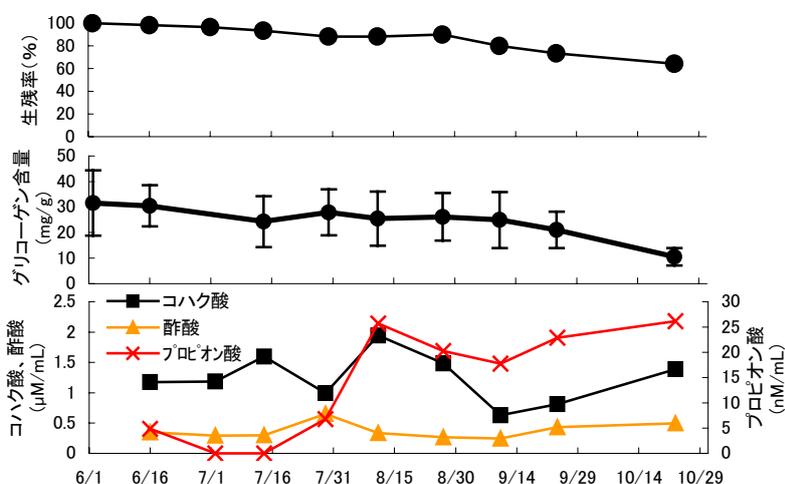


図 13 平成 15 年夏季のカゴ試験により求めたアサリの生残率, グリコーゲン含量, 各種有機酸含量の変化。

90%であったが、無酸素観測後の 9 月 10 日では 80% とやや落ち込み、10 月 23 日取り上げ時には 64% であった。9 月を過ぎて水温が下降を始め、貧酸素も生じなくなったが、生残率の低下傾向はむしろ盛夏より増していた。また、閉殻筋のグリコーゲン含量は軟体部湿重 1g あたり 30mg 程度で余り変

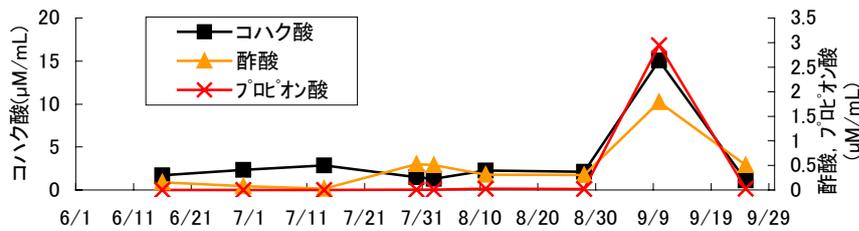


図 14 平成 15 年 9 月上旬にへい死率が高かった諫早湾奥の定点 C におけるアサリ外套腔液の有機酸含量の変化。定点 A, B では無酸素は観測されたがこのような上昇は認められなかった。なお、15 年度は定点 C の連続観測は未実施。

傾向にあり、秋季の産卵のピークと共にエネルギー支出が超過していた可能性がある。アサリ外套腔液中の有機酸含量の変化は、プロピオン酸が僅かであるが 8 月から上昇していたが、コハク酸濃度と共に危険な領域まで上昇することはなく、9 月上旬の無酸素時にも特に大きな問題は見られなかったようである。

一方、定点 C に隣接する漁場では 9 月上旬の無酸素時にかなりのへい死が認められ、アサリの有機酸含量は著しく上昇していた(図 14)。外套腔液中のコハク酸濃度が 15 μM/mL、プロピオン酸が 2 μM/mL を超えると危険な状態になることが確認されており、この時のアサリは嫌気代謝がかなり進行して危険な状態にあったと推察される。

平成 16 年 5 月 20 日にカゴに収容されたアサリは 8 月初旬まで約 8 割生残していたが、8 月 11~14 日の無酸素時にすべてへい死した。アサリ軟体部のグリコーゲン含量はカゴ設置期間内では 5 月以降大きな変動は見られず 8 月初旬には 30mg/g 以上でエネルギー蓄積は十分と考えられた(図 15)。

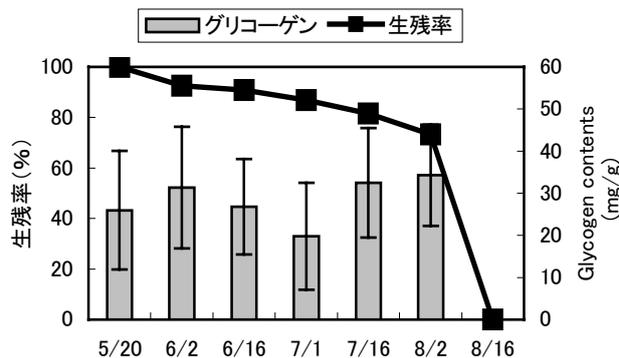


図 15 平成 16 年に定点 A に設置したカゴ試験によるアサリの生残率と軟体部のグリコーゲン含量の推移。生残率は 8 月 11~14 日にいたる無酸素により全滅したが、直前までグリコーゲン含量は高く十分なエネルギーストックがあったと考えられる。

小長井町沿岸のうちほぼ全滅したのは 3 カ所で、平成 12 年に次ぐ大規模なへい死であった(図 16)。アサリがへい死に至る直前の 8 月 11 日午後には既に死亡して殻を開いている個体が散見されたが、大半は潜砂しており水管を長く伸ばしている様子が観察された。16 日の干潮時には干潟上にアサリの死殻が大量に露出しており、無酸素下で砂中から這い上がってきた後に死亡したものと思われる。



図 16 小長井町アサリ養殖場(緑色の部分)とほぼ 100% のへい死を生じた場所(赤囲い)および貧酸素時におけるアサリの状況(平成 16 年 8 月 11 日 17 時頃)とへい死したアサリの貝殻(8 月 16 日)。

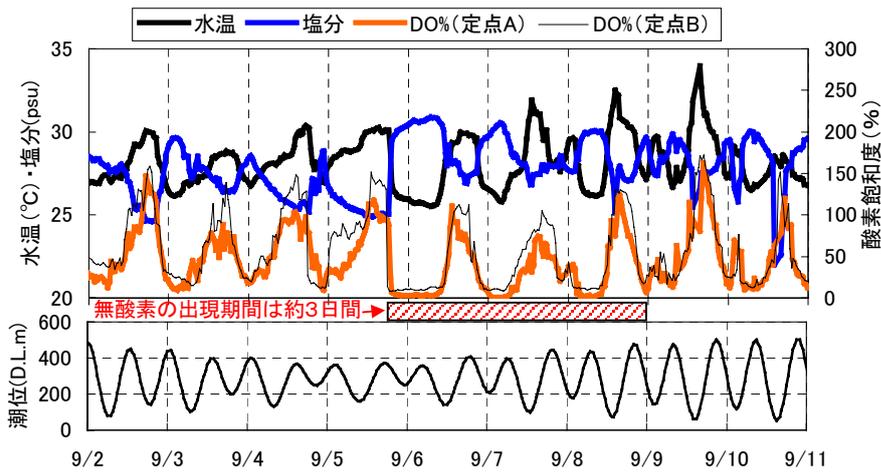


図17 平成15年夏季無酸素発生時における水温、塩分、溶存酸素および潮位の変化。小潮の後から3日間にわたり無酸素が記録され、無酸素水の水温は26°C程度である。定点Bよりも地盤高の高い定点AでDOがより低い。

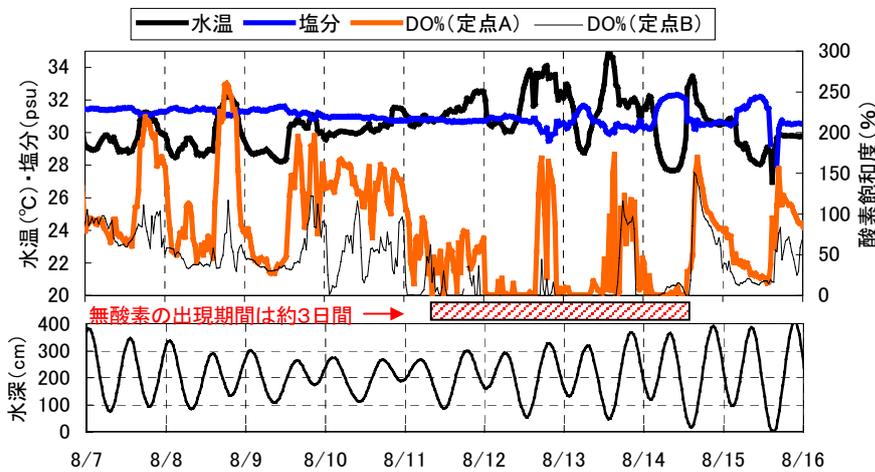


図18 平成16年夏季無酸素発生時における水温、塩分、溶存酸素および水深の変化。シャットネラ赤潮により溶存酸素が激しく上下し、小潮の後から3日間にわたり無酸素が記録された。無酸素水の水温は28~32°C程度であり、沖側の定点BではDOがより低く無酸素継続時間も長かった。

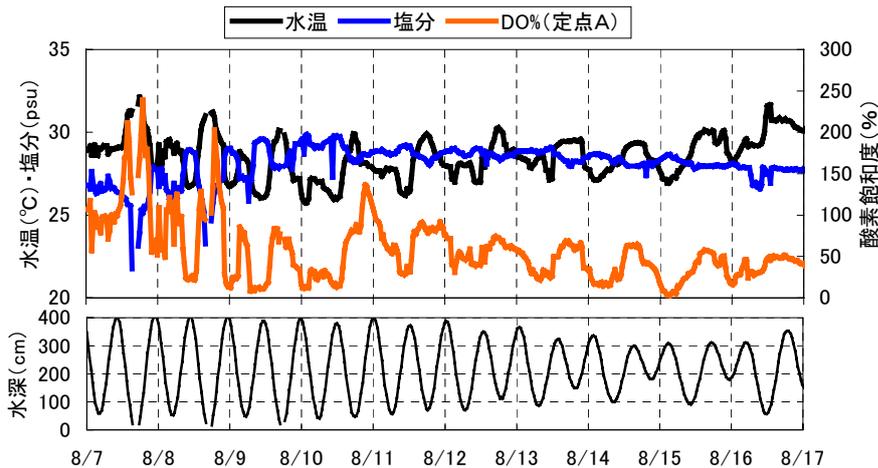


図19 平成17年夏季における水温、塩分、溶存酸素および水深の変化。無酸素は観測されず、酸素飽和度10%以下の貧酸素も一時的であった。

18)。無酸素水塊の水温は28~32°C、塩分は30~32と広い幅があり、真夜中から午後まで無酸素、午後から真夜中まで回復する過程を3日間繰り返した。平成16年の場合は沖側の定点Bの方がDOは低めに推移し、無酸素の継続時間も長かった。平成17年

2) 平成16年夏季の赤潮および無酸素発生時における集中観測

平成15,16,17年夏季に最もDOが低下した時の定点Aにおける水温、塩分、DO及び水深(または潮位)の変化を図17~19に示す。

平成15年は9月初旬にシャットネラ赤潮が観測された後、小潮に相当する9月5日夜間から無酸素が観測され約3日間にわたり無酸素と飽和状態付近までの有酸素を交互に繰り返した。無酸素水塊の水温は約26°C、DOの高い水塊の水温は30°C以上であったが、潮位変動とDOの変動に一定の関係はみられなかった(図17)。また、沖側の定点Bの方がDOはやや高めに推移していた。

平成16年は8月5日からシャットネラ赤潮が確認された後、小潮の翌日からの8月11~14日に無酸素が観測され、継続期間は約3日間であった(図

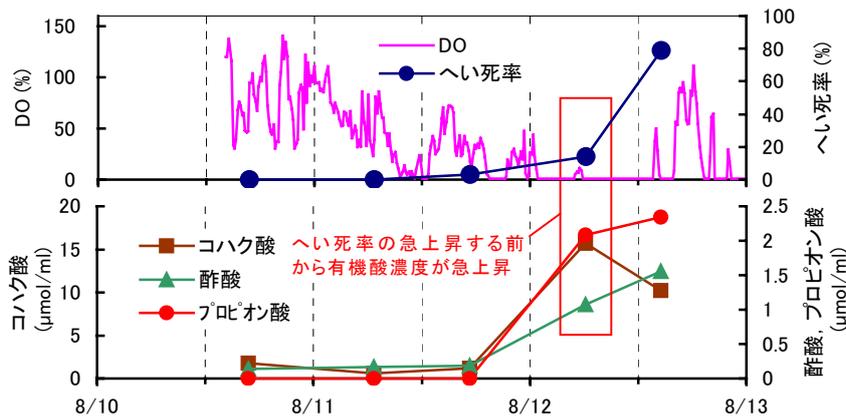


図20 溶存酸素とアサリへい死率との関係および外套腔液中の各種有機酸含量。平成16年8月10日に採取したアサリを網袋に入れて海底に沈め、11、12日に2回ずつ取り上げてへい死率を求めると共に外套腔液試料を採取した。へい死率が急上昇する前にコハク酸やプロピオン酸含量が急上昇している。

は8月9日の大潮時、15日の小潮時に一時的に10%以下までDOの低下がみられたが継続時間は短く、水温は約27℃であった(図19)。

平成16年8月に実施したアサリのへい死と外套腔液中の有機酸の分析結果を図20に示す。無酸素が連続して観測される以前の11日17時には有機酸濃度は嫌気代

謝を行っていないレベルであったが、13時間後の12日6時にはコハク酸濃度が15μmol/ml、プロピオン酸濃度が2μmol/mlを超え、大量へい死が確認される前に極めて急激な有機酸の上昇が起こり、嫌気代謝が急激に進んでいた。

3) 環境変動に伴うアサリ機能遺伝子の発現変動

アサリ浮遊幼生で確認されたアサリ発現遺伝子の機能別内訳を図21に示す。1900余りのクローンのうちストレス応答や代謝調節にかかわるものがそれぞれ3%、13%確認されている。へい死が顕著ではなかった平成15年度調査においても、高水温時(約25℃)には7月以降の水温上昇に伴って、熱ショックタンパク質HSP70(CL53)やHSP30C(ARN0019_C3), transcription factor 2B(CL98), RNA polymerase II(CL107)

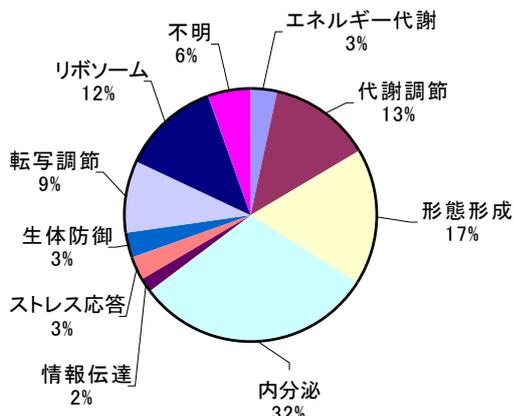


図21 アサリEST解析の結果。孵化27時間後のアサリD型幼生cDNAライブラリーから回収した1,919 ESTクローンの機能別内訳。

等の発現量が増加し始めた。また、fructose-1,6-bisphosphate aldolase A(CL17)やacyl-CoA thioesterase(CL69), ATP synthase(CL87), splicing factor(ARN0017_A2)等代謝関連遺伝子の発現量も増加していた。その後、8~9月末の期間では、上記のストレス応答遺伝子の発現量は6~7月よりも高レベルで変動していたが、一方、上記の代謝関連遺伝子の発現量は相対的に低下していた。また、二枚貝類の生理生態機能において重要とされている金属代謝関連遺伝子の発現量が、6月以降低下し続けていた。

4. アサリの貧酸素耐性に関する室内実験

1) アサリ生残に対する無酸素および硫化水素の影響試験

いずれの条件下でも実験終了時まで死亡したアサリは見られず、閉殻も速やかで外見上は異常が見られなかった。Na₂S添加区における実験終了時の硫化物濃度は30℃および25℃でそれぞれ9mg-S/L, 13.4mg-S/Lであった。飼育水のpHは約7であったので、非イオン態硫化水素がおおよそ半分を占めることになる。図22に30℃および25℃

における無酸素+硫化水素，無酸素および有酸素状態でのアサリ外套腔液中の有機酸濃度を示す。30℃では無酸素及び無酸素+H₂S でコハク酸，酢酸，プロピオン酸とも有酸素に対し $p<0.05$ で有意に上昇し 13 時間でプロピオン酸濃度が 1 μ mol 以上に達していたが，無酸素に対する H₂S 添加の影響はコハク酸以外は有意差はみられなかった。25℃では 21 時間後に無酸素及び無酸素+H₂S でコハク酸のみ有酸素に対し $p<0.05$ で有意に高かった。有意差は検出できなかったがプロピオン酸は無酸素+H₂S でのみ上昇が見られ，嫌気代謝の進行に対して硫化水素の影響が非常に大きいことがわかった。

また，水温 (25,30℃) と DO (無酸素，飽和) の機能遺伝子発現の評価においては，30℃実験区では有酸素，貧酸素のいずれの状態でも，HSP70 (CL53) 等のストレス応答遺伝子の発現量が高い一方，他の機能遺伝子の発現量が低かった。そのため，酸素の有無による機能遺伝子の発現変動を検出できなかった。また 25℃実験区では，ストレス応答以外の機能遺伝子の発現量が 30℃実験区に比べて高く，有酸素状態と貧酸素状態間で発現量が増加または低下する複数の遺伝子が確認できた。しかし，それらの塩基配列を解読したところ，GenBank データベース及び前項で作成したカタログともに該当する機能遺伝子がなく (或いは相同性が著しく低く)，同定できなかった。

2) アサリの酸素消費速度測定

容器内の DO の変化は階段状であり，アサリは酸素を消費する時間帯と消費しない時間帯を交互に発現させて容器内の溶存酸素を節約して使用しているようにみえた。しかし，個体差が大きく酸素を消費しない時間帯を計算に入れて酸素消費速度を計算するのは困難であったため，15 分ごとに区切った読み取り値から酸素濃度低下時についてのみ勾配を求め消費速度を計算した。30℃および 25℃で 6 個体を 3 回ずつ測定した結果を図 23 に示す。溶存酸素が飽和に近い場合(5mg/L 以上)では，軟体部乾重 1g あ

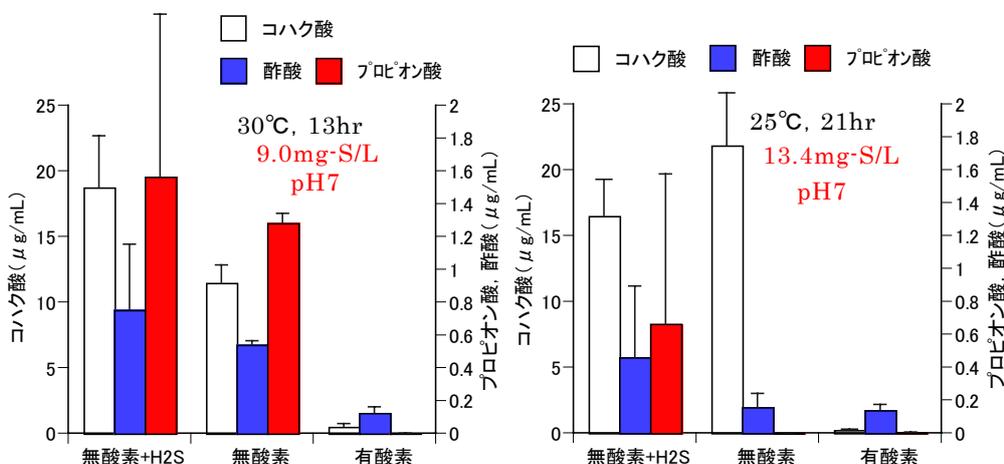


図22 アサリ外套腔液の変化に対する無酸素と硫化水素の影響実験結果。30℃では無酸素，無酸素+H₂S共に3種の有機酸とも上昇している。25℃では無酸素でコハク酸のみが上昇したが，無酸素+H₂S ではすべて上昇している。

たり消費速度は 30℃で 1.5~2mg/h/g, 25℃で約 1mg/h/g であったが，溶存酸素が低下すると下降し，DO が 1mg/L ではそれぞれ 0.5, 0.4mg/h/g 程度であった。

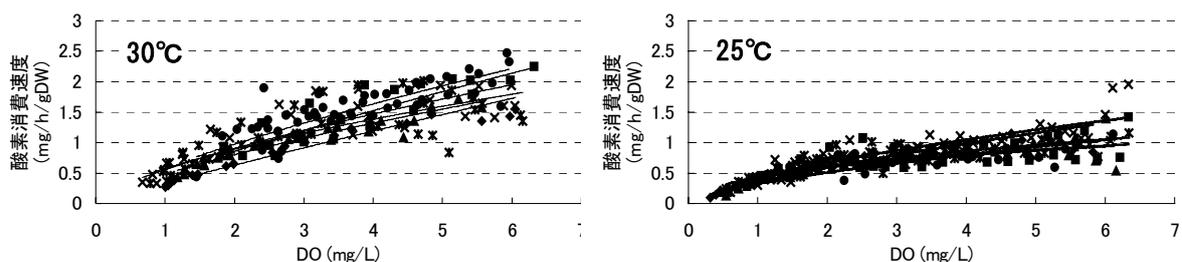


図 23 容器内の溶存酸素量と酸素濃度の低下の勾配から求めた溶存酸素量とアサリの酸素消費速度の関係。

5. 貧酸素対策試験

1) エアレーターを用いた試験

試験に用いた曝気装置はプロペラシャフトを 45 度程度まで傾けることができ、この時は水面から 2m 強まで微細気泡が勢いよく送り込まれているのが確認された。ただし、プロペラにより強い流れが発生する上に開放系で設置・測定を行ったため、装置直近でも DO の変化を捉えることが出来なかった。また潮位が低い時に水流で底面を侵食し、アサリを掘り出してしまったため問題点を残した。以上によりアサリ養殖場周辺で発生した無酸素水が養殖場内に流入するのを防ぐ必要がある。

2) ブルーシート簡易膜と曝気海水導入試験

ブルーシートによる簡易フェンスの予備試験では、大潮時の潮流および風成流にも流されることなく設置時の形状を保持したが、錘チェーンとシートが密着していないと接地部から底層水が侵入した。錘の重量は十分であるが、シート下端部を海底に密着させる必要があり本試験のような方式を決定した。

平成 17 年は無酸素は貧酸素（目安として酸素飽和度 10% 以下）が観測されなかったため、

比較的溶存酸素が低かった 9 月 2 日に試験を行った。シートの接地状況、噴流ノズルの状況を図 24 に示す。シートの展開は目印の旗を立てておくことにより、小型の漁船で船頭を除き 4 人

掛かりの作業ではあったが、10 分程度で完了させることができた。

ブルーシートを展開した後に曝気海水導入装置の運転を開始し、約 30 分経過後に溶存酸素飽和度が 50% 程度の底層水が接岸したため、ブルーシート内外の水質を測定した。水深は約 2.4m でシートの上端は水面下に没していたため表層水はシート敷設場所の上を流れていったが、底層ではシートの内側と外側で水温・DO・塩分共に明確な差が見られ、シート下端からの侵入は短時間には起こっていないと判断された（図 25）。また、曝気海水導入装置に汲み上げる底層水とローリータンク内（曝気槽）の溶存酸素の差を比較したところ、1 回目で 4.58mg/L が 5.68 mg/L、2 回目で 4.22mg/L が 5.27 mg/L に上昇しており、約 1mg/L 上昇させる効果が認められた。



図 24 ブルーシート簡易膜設置と曝気海水導入試験の様子。（平成 17 年 9 月 2 日）

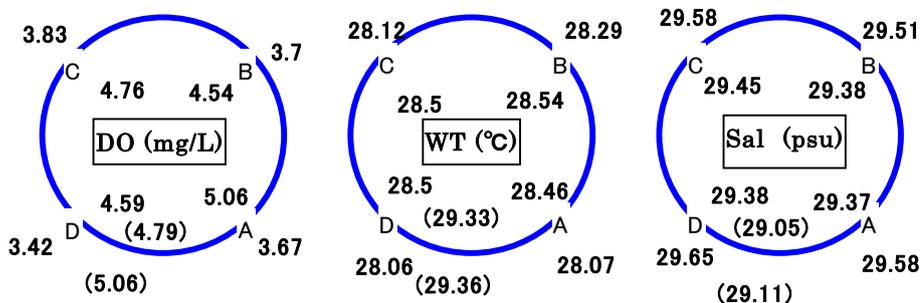


図 25 ブルーシート展開後に曝気海水導入装置を運転し、0.5~1 時間後に測定したシート内外の海底直上の水質の比較。括弧内は表層水。DO と水温におけるシート内外の差から簡易シートで水塊を十分遮断していることがわかる。

6. 流動場における覆砂機能の解明

1) 流動環境

平成16年12月14～15日にかけて観測された流速等の測定結果を図26に示す。上から順に、潮位、流動の移流成分、流動の変動成分を示している。潮位変動は、双峰形を示した。今回の観測では、移流および変動成分のうち移流成分が大きく表れた。移流成分の方向は満潮時に270°以上、干潮時に180°以下になるが、速度との明確な関係は見いだせない。変動成分は、方向が約300°程度であり、これは有明海の長軸方向に一致している。また、変動速度は、満潮時に小さく干潮時に大きくなる傾向にある。このように移流成分と変動成分の状態が、刻々と変化しており、この変化に伴って底質や稚貝の移動様式も変わると考えられる。

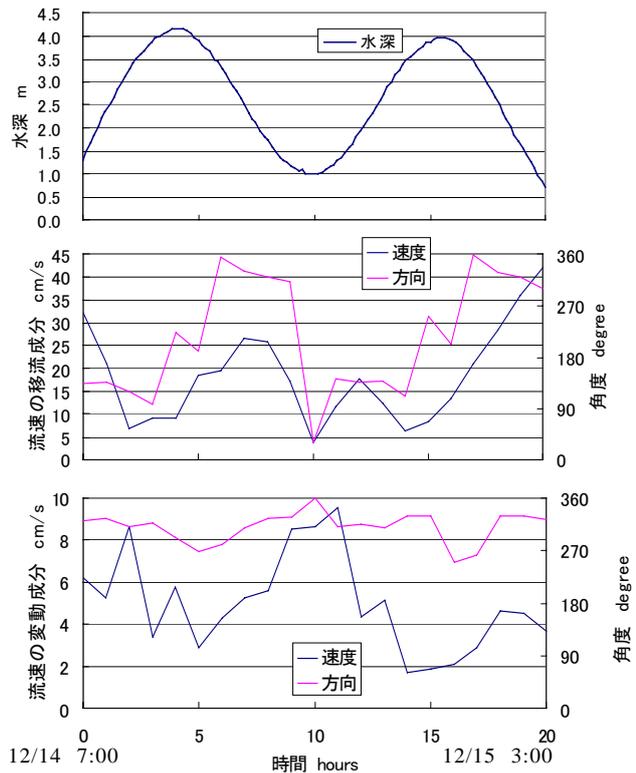


図26 流動特性

2) 粒度組成

調査点における底質の粒度組成は、覆砂漁場の堆積区と侵食区では、対照区に比較して、0.2mm以上の粒径が多く分布していた。捕砂器に採取された粒度組成は、対照区では底質とほぼ同等であったが、覆砂漁場では底質より細かい粒径分布に偏っていた。また、堆積区よりも侵食区で粗い粒径が多くなっており、捕砂器の設置方向により粒度組成に違いが見られた。

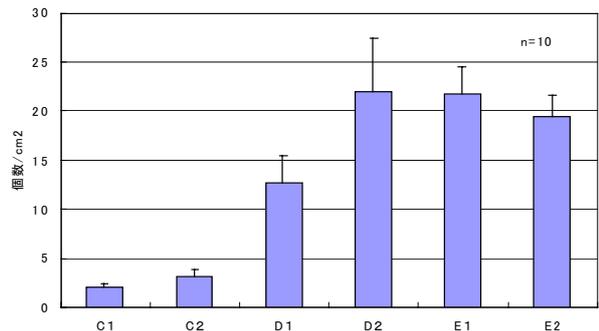


図27 アサリ稚貝の分布密度

3) アサリ稚貝の分布密度

アサリ稚貝の分布密度を図27に示す。対照区(C)は2～3個体/cm²であるが、覆砂漁場の堆積区(D)と侵食区(E)では10～20個体/cm²と高い分布密度であった。この理由として、覆砂漁場は粒径が大きいので底質が安定しているためアサリ幼生の着底が容易であるうえに着底後の波浪による移動が少ないことがあげられる。また、粒径の大きい砂粒の割合が多いので凸凹が形成され、凹部に稚貝が留められることも考えられる。

4) 捕砂器で採取された土砂量、二枚貝及びアサリの個体数

図28は、上から順に、各位置に設置した捕砂器に採取された土砂量、二枚貝の個体数(種組成)及びアサリの個体数(殻長組成)を示している。上段の土砂量をみると、対照区は粒径が小さいため、覆砂漁場の堆積区や侵食区より多くなっており漂砂が活発に生じていたものと考えられる。中段の二枚貝や下段のアサリの個体数を見ると、

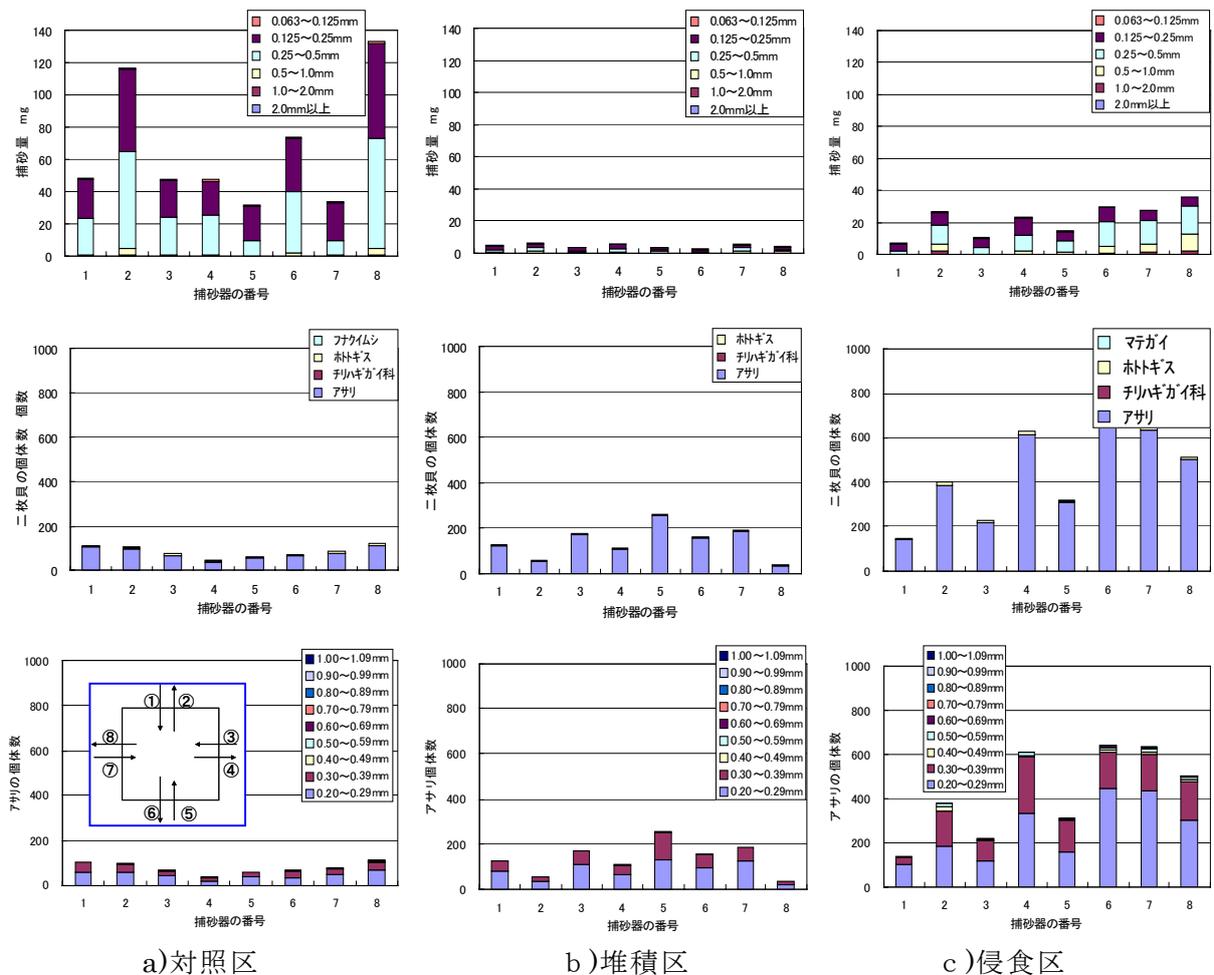


図 28 捕砂器に採取されたサイズ別土砂量と二枚貝の種類及びサイズ別個体数(上:土砂, 中:二枚貝, 下:アサリ) 図8に対応する捕砂器の番号の位置関係を a)对照区の図内に示す。

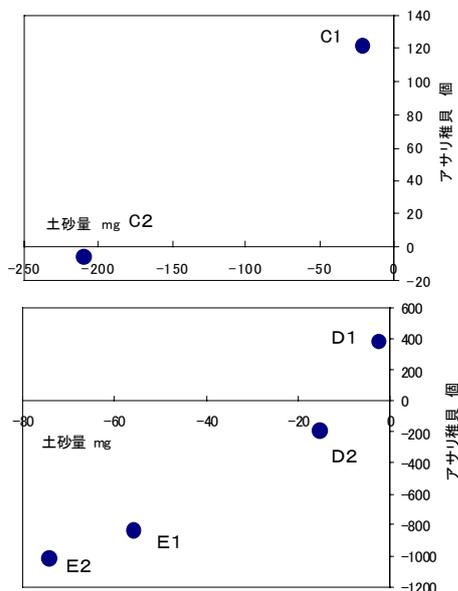


図 29 捕砂器に採取された土砂量とアサリ個体数の収支の関係 (収支は(①-②)+(⑤-⑥)+(③-④)+(⑦-⑧)で計算した。上図は对照区、下図は覆砂漁場の堆積区と侵食区を示す)

对照区は覆砂漁場の堆積区や侵食区より少ない。これは、对照区と覆砂漁場とのアサリ稚貝分布密度の差異が影響しているものと思われる。覆砂域漁場の侵食区と堆積区を比較すると、侵食区は堆積区より土砂量、二枚貝やアサリの個体数のいずれも多く、侵食区は底質が不安定な状況にあったためと考えられる。捕砂器の流入口(4.5cm×5.0cm)を約20時間で、侵食区では約400個体、堆積区では約100個体のアサリ稚貝が通過して採取されたことになり、多くのアサリ稚貝が流動によって輸送されていることが明らかとなった。採取された二枚貝は、ほとんどアサリ稚貝であり、殻長は約0.2mmと着底直後であると考えられる。

5) 捕砂器に採取された土砂量とアサリ個体数の収支の関係

捕砂器に採取された土砂量とアサリ個体数から収支計算を行った。収支の計算方法と共に図

29 に示す。いずれの場合も土砂量は負値となり侵食傾向を示したが、負の値が小さい場合にはアサリ稚貝の収支は正值になり、アサリ稚貝が集積する傾向にある事がわかった。

考察

1. アサリへい死要因について

平成 16 年度の調査においてアサリの大量へい死に遭遇し、アサリの死因を推定するためのデータが多く得られた。当初アサリのへい死要因として想定されていたのは貧酸素のほか高水温やシャットネラ等の赤潮植物プランクトンの影響である。8月初旬にシャットネラ赤潮(*Chattonella antiqua* と *marina* の混成)が濃密な状態であったが、まだ溶存酸素の低下は観測されていない 8月8日に小長井町釜地区のアサリ養殖場で海底の観察を行うと共にアサリを採集した。図 30 に示すようにアサリ養殖場の干潟上に大量の糞塊が集積していた。また、アサリの糞や消化管内容物を蛍光顕微鏡下 (G 励起) で観察すると植物色素が赤い蛍光を発しており、珪藻等に混じった赤い雲状の筋はシャットネラと思われる。このことからアサリはシャットネラを消化管内に取り込

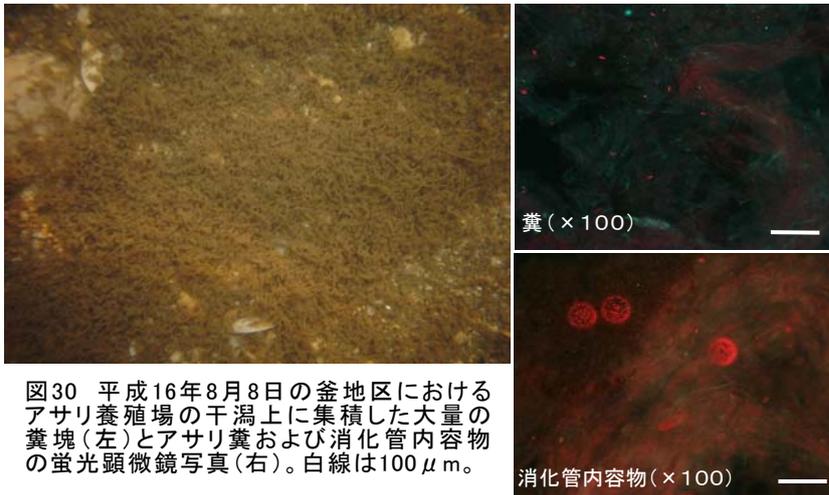


図30 平成16年8月8日の釜地区におけるアサリ養殖場の干潟上に集積した大量の糞塊(左)とアサリ糞および消化管内容物の蛍光顕微鏡写真(右)。白線は100 μ m。

でいたと考えられ、アサリがシャットネラを取り込んで大量の糞を排出していたと思われる。すなわちアサリはシャットネラを忌避する行動を示さない、また魚類に対する影響のような急性毒性により直ちに傷害を受けることはないと思われる。しかし、取り込んだ後の慢性的な毒性等については不

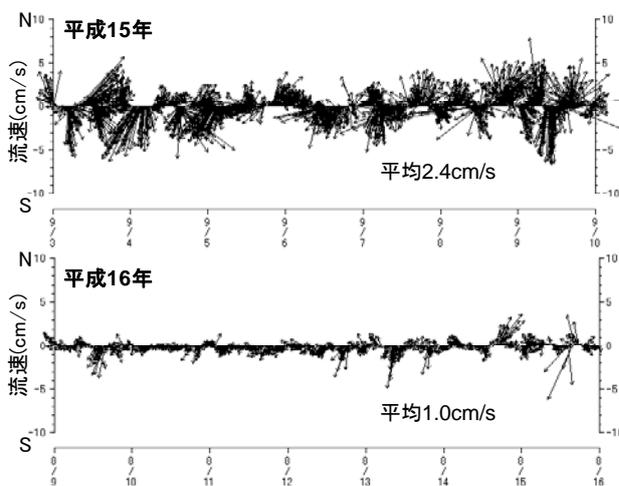


図31 釜地区アサリ養殖場底面で電磁流速計により観測された流速ベクトル時系列図

明である。また、もし毒性がないとしても高濃度のシャットネラを濾過し続けることはアサリにとって生理的に負担になる可能性があることからシャットネラはアサリに無害であると断定することは出来ない。

無酸素が観測されたのは小潮の後3日間程度であり、平成15年も同様であった。しかし無酸素水の由来は両年で異なっていると考えられる。図 31 に干潟上の流速を示す。平成15年は海岸線にはほぼ平行な北東-南西方向に比較的卓越した流れがあり、また沖側の定点 B で DO が低い傾向になかったことか

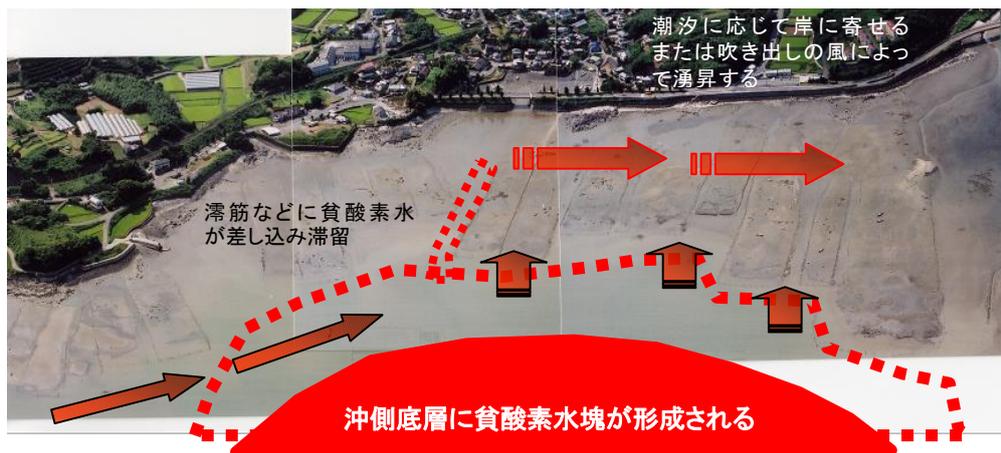


図 32 想定される貧酸素(無酸素)水の流入経路。平成 15 年は深みから海岸線に平行に、16 年は干潟のすぐ沖で大規模に発達した無酸素水が接岸したと思われる。

ら、航路や滞筋などの深みに無酸素水が差し込み、そこから海岸線に沿ってアサリ養殖場内に侵入してきたと考えられる。一方、平成 16 年は流れが非常に弱く 8 月

10～12 日にかけては流れの卓越方向に特徴は見られない。さらに定点 B で DO がより低く推移したことから養殖場のある干潟のすぐ沖側全面の底層で無酸素層が発達し、徐々に干潟に接岸したと思われる(図 32)。平成 17 年は比較的高水温で推移したにもかかわらず、シャットネラ赤潮は観測されず、無酸素の発生がなかったことから、シャットネラ赤潮+小潮+高水温+静穏な天候の継続という条件が満たされた時に無酸素の発生に至ると推測される。有明海のような潮差の大きい場でも無酸素化する事実とその詳細なメカニズムの解明は不詳にしてもおおよそその無酸素化する条件が明らかになった。

平成 15 年も 3 日間に渡る無酸素が観測されたが、アサリのへい死は平成 16 年に顕著であった。平成 16 年のへい死の過程は、濃密なシャットネラ赤潮の発生、これにより海底の酸素消費が進行すると共に大量の糞排泄が見られたことから恐らくアサリも生理的な負荷を強いられていたと推察される。また、生理機能遺伝子の発現解析から盛夏の野外サンプルやや水温 30℃での実験サンプルでは熱ショックタンパク質など高温によるストレス応答が顕著で代謝調節などの生理機能遺伝子の発現レベルが低く、高水温の影響も大きいと思われる。平成 16 年の無酸素水は平均 31.4℃の高水温となっており、無酸素曝露に対し嫌気代謝によって生存可能な時間は 26℃の時よりも遙かに短縮されたと思われる。この水温の差により平成 15 年 9 月の無酸素とアサリのへい死に大きな違いがあったと考えられる。現地観測値からは 8 月 12 日 0 時半～14 日 12 時半の 60 時間のうち 15hr,(6hr),14hr,(13hr),12hr で無酸素と有酸素が断続しており、溶存酸素の上からは嫌気代謝から回復する機会があったと思われたが、室内実験結果からもわかるように 30℃という高水温では十数時間でもプロピオン酸は危険なレベルにまで上昇していたとおおり、8 月 12 日中に小長井町釜地区のアサリは全滅していた。さらに底質の還元化や無酸素水に伴う硫化水素の影響が考えられ、極めて短時間に外套腔液中のプロピオン酸濃度が上昇すると共にへい死に至ったと思われる。最大の死因は無酸素によるということが確認された。アサリの最終的な死因など生理学的な疑問点は残るが、今後の課題としたい。

2. 無酸素によるへい死予防対策とその効果について

無酸素によるへい死過程が明らかになったが、へい死を防ぐ対策を至急行う必要がある。平成 16 年の調査ではへい死対策としての備えが十分でなかったため、17 年度には貧酸素水の侵入防止と曝気海水導入の試験を実施しその効果を実地に検証する予定であった。しかし、17 年夏季には貧酸素が見られなかったので実際の防御効果を確認することができなかった。今後に向けてより効率的に貧酸素対策手法を開発しておく必要があるため、アサリの生理面と曝気装置の効率やコストパフォーマンスの面から検討しておく必要がある。

まず、曝気効率について理論的検討を行う必要があるが、本装置は海底の水を汲み上げては曝気して海底に流していく不完全閉鎖系であり、タンク内の曝気の理論を適用することが困難なので、現地実験データから検討を行った。

1) 曝気海水導入装置の曝気効率の算定

以下の式により酸素溶入効率（ブローにより通気した空気中の酸素のうちどれだけ海水中に溶解込むか）を実験的に求める。

$$DO_{out} = (DO_{in} \times R_w + \alpha \times 0.21 \times 32 \times p \times R_{air}/RT)/R_w$$

ここで、

DO_{in} : 流入水の溶存酸素(mg/L), DO_{out} : 流出水の溶存酸素(mg/L) R_w : ポンプ流量 350L/min, R_{air} : ブロー流量 80L/min,

α : 酸素溶入効率, p : 圧力, R : 気体定数, T : 絶対温度

本装置のポンプ、ブローの流量を代入すると、

$$DO_{out} = (DO_{in} \times 350 + \alpha \times 2.164 \times 10^4)/350$$

観測結果より、 $DO_{out} = 5.2$, $DO_{in} = 4.2$ (mg/L) を代入すると、

$$\alpha = 0.016$$

底層水の溶存酸素が低い場合には流入水と流出水の差がもう少し大きくなることも期待できるが、ポンプ流量を大きくしたり、エアーストンをより微細気泡の発生できるものに改良する等の工夫が必要である。このうち酸素の供給速度を最も律速しているのはポンプの流量であるので、より大型のポンプを用いるか複数台を投入する、またホース径を大きくすることが効果的である。

2) 酸素収支からみたアサリ収容量の算定

本報告には掲載していないが別途実施した調査では DO が 0.5mg/L 程度でコハク酸の上昇が見られた例があり、アサリが嫌気代謝に切り替わる溶存酸素濃度の下限を知ることが、曝気海水導入装置等による対策を講ずる上と貧酸素被害を予想する上で重要な知見となる。本課題については現在実験を行っているところであるが未だ結論にいたっていない。測定例を増やして下限値として特定が可能か否かも含めて検討する必要がある。

また、アサリの酸素消費速度は有酸素呼吸時の測定を基に算定された数値から、酸素が十分にある場合には 30°C で 1.5~2mg/h/g, 少ない時（飽和度 10%程度）には 0.5mg/h/g 程度であった（図 23）。この結果を基に現地試験で行ったブルーシート簡易膜と曝気海水導入装置の規格のバランスが適正であるか否か考察した。

DO の収支計算を以下のように行う。

$$DO \text{ 供給速度} : 60 R_w (DO_{out} - DO_{in}) \text{ (mg-O}_2\text{/hr)}$$

ここで、ポンプ流量 R_w を 350L/min, $DO_{out} - DO_{in}$ を 1mg/L とすると $350 \times 1 \times 60 = 21\text{g-O}_2\text{/hr}$ 。すなわち、1 時間に 21g の酸素を供給する。

DO 消費速度： $k \times S \times A$ (mg/hr)

ここで、 x ： アサリの酸素消費速度 (mg/g/hr)， k ： アサリの換算係数 (Dry flesh wt. / Total wt.)， S ： アサリの収容量 (g/m^2) (小長井では $10\text{kg}/\text{m}^2$ 以上)， A ： シートによる囲い込みの面積 (m^2) 本試験のケースでは、アサリの酸素消費速度に低酸素時の測定値を用いた。

$$x = 0.5, k = 0.05, S = 10000, A = 700$$

$$k \times S \times A = \underline{175\text{g-O}_2/\text{hr}}$$

酸素の供給速度が 1 時間あたり 21g なのに対し、消費速度は 175g と約 8 倍に達している。すなわち、試験を行ったアサリ養殖場の単位面積あたりアサリ収容量(約 $10\text{kg}/\text{m}^2$) は 100m のブルーシート一巻き分 (約 700m^2) に 7 トンの現存量という計算になる。曝気海水導入装置の能力は 1/8 に過ぎないことになる。

一方、曝気海水導入装置の能力から 1 台あたりでサポートできるアサリの量は、

$$x = 0.5, k = 0.05 \text{ とすると } 0.025SA = 21, SA = \underline{840\text{kg}} \text{ と計算される。}$$

すなわち、1 式で 840kg のアサリを救うことができる！？

アサリの水揚げ単価を 350 円/kg とした場合、840kg は 29.4 万円に相当する。一方、曝気海水導入装置の製作材料費はすべて新品を購入したとして 1 式で 15 万円 (船は除く)、ブルーシート簡易膜の制作費は 1m あたり 2 千円強なので、100m で 20 万円強、50m なら 10 万円強である。本方式でアサリをへい死から救うことができれば、1 回でほぼ装置への投資が回収できることになる。

小長井町漁協では組合員 1 名あたりの養殖場面積が 0.5~1ha である。アサリ収容密度を $10\text{kg}/\text{m}^2$ とした場合には

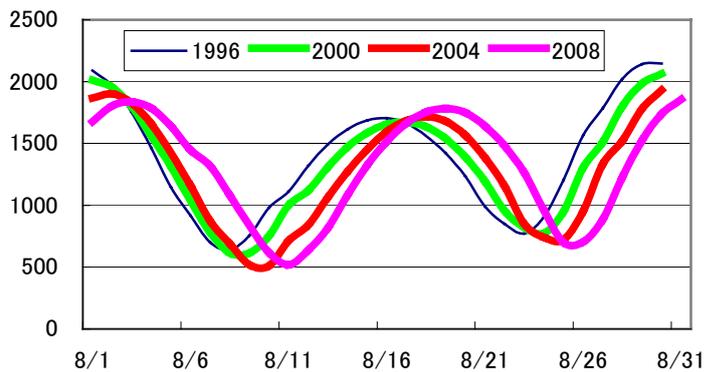


図 33 大浦の潮位表に基づく各年における潮位変動の小さい時期の予測。大量へい死のあった平成 12 年、16 年共に 8 月上旬に最も潮位変動の小さい時期が重複している。この次は 2008 年に大被害が出る可能性が高い？

50~100 トンの現存量を保有することになる。これらの時価は 1,750~3,500 万円に相当するので、大規模な無酸素の襲来 (図 32) に対しては十分な備えが必要であるし、一定のコストをかけるメリットもあると考えられる。また漁業者が所有の機器類等既存の装置を用いたり、シートの加工を簡略化することによりコストはさらに抑えることが可能

である。したがって、本装置の稼働試験を今後も積極的に行い、実用化に向けた検討が必要である。また、アサリ養殖場全体を防護するといった大規模な展開を行った場合は、Air-O₂ のような装置も水平攪拌の装置として効力を発揮できる可能性があり、曝気海水の海底導入装置等と組み合わせて用いればより効率的な無酸素対策を講ずることができると思われる。

本課題の調査結果を踏まえ、貧酸素化によりアサリに被害の出やすい海域では潮位情報を基にした貧酸素の発生予察 (例えば図 33) を行うと共に、貧酸素・無酸素の発生検知やアサリ生息環境評価のための水質の連続観測や貧酸素水侵入防止・酸素供給等の対策に必要な施設 (貧酸素防止幕支持、電線敷設用杭の設置) の基盤整備 (図 34) が提案される。

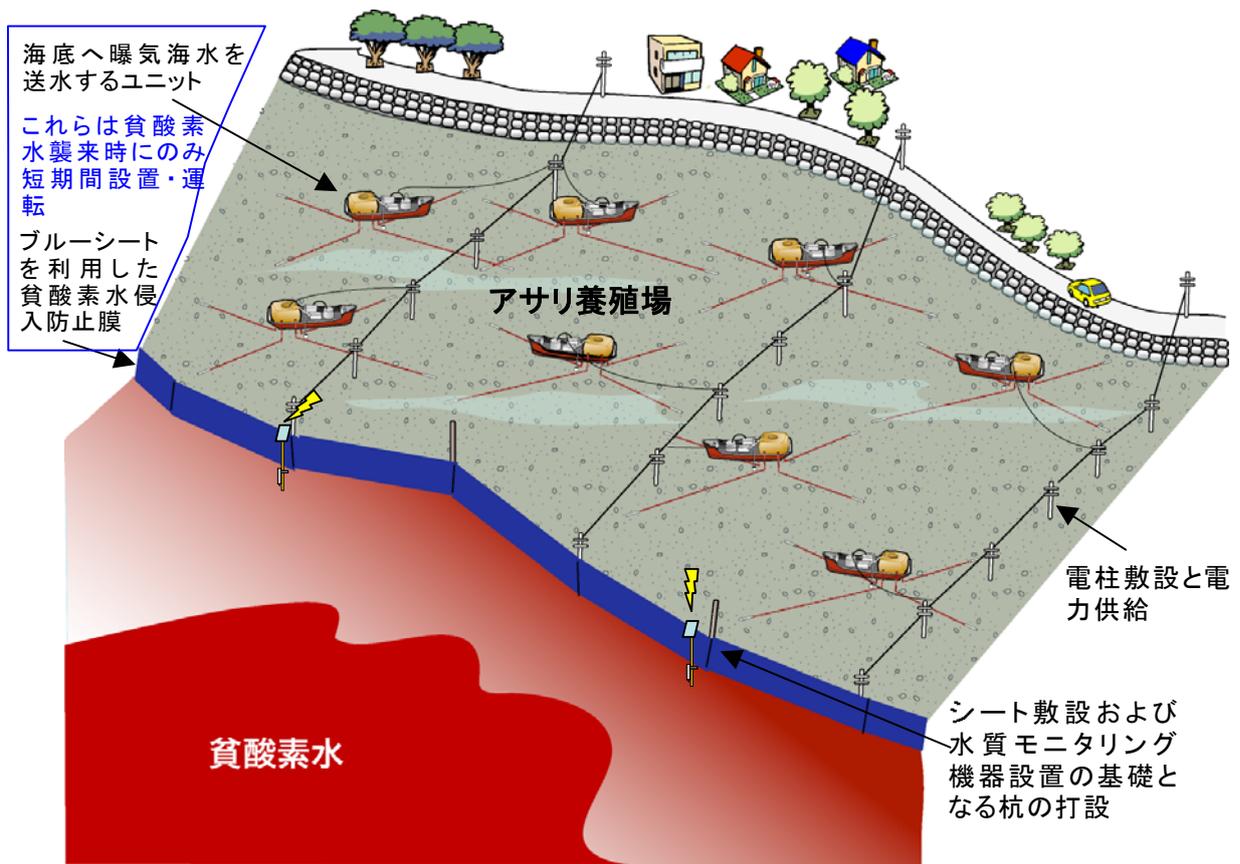


図 34 アサリ貧酸素被害防止のために必要な基盤整備の一例

摘要

内湾度の高い諫早湾の小長井町アサリ養殖場で生産阻害要因になっている大量への死とその原因，対策についての調査を行い以下のような成果を得た。

- ・夏季の小潮時に高水温（25℃以上）でシャットネラ赤潮が発生し静穏な天候が継続すると無酸素が発生する。
- ・無酸素と有酸素を断続的に繰り返す，その継続期間は合計3～4日間である。
- ・無酸素の状態が30℃以上で少なくとも13時間以上継続すると嫌気代謝産物であるプロピオン酸の濃度が危険なレベルまで高くなり，その後アサリは斃死する。
- ・ブルーシートを加工した簡易なスクリーンで無酸素水の侵入を防止することが可能である。
- ・簡易スクリーンで保護したアサリに数日間酸素を供給するための曝気海水導入装置を考案し，試験を行った結果1式で1時間あたり21gの酸素供給能力が確認された。

今後は貧（無）酸素対策の試験を通じて，システムの実用化を図っていくと共に効果の検証を行う必要がある。また，貧酸素が発生しやすい周辺の底質改良等（覆砂及び耕耘）を進めたり，底質の還元層を簡易に酸化させる手法も取り入れて，アサリの資源の有効活用と増産を進める技術体系を構築することが必要である。

開放度の高い熊本県緑川河口域アサリ漁場の調査では、着底初期のアサリ稚貝の移動特性に関する調査から以下のことを明らかにした。

- ・アサリ稚貝の見られない粒径の細かい一般漁場では、粗い粒径を覆砂した漁場に比べ土砂の輸送が非常に激しかった。

- ・覆砂漁場では一定区画内への土砂の収支を調べると、ほとんど堆積することはないが、アサリ稚貝の収支は土砂の侵食が小さい場所で堆積傾向となっていた。

- ・覆砂の効果はアサリ幼生の着底と稚貝の移動抑制の両面で発揮されていると推測された。

今後、海底境界層におけるアサリ稚貝と底質移動の関係を明らかにし、さらにアサリの移動と減耗との関係を解明する必要がある。さらに、アサリの稚貝発生促進や保護のために用いられている制御手法（碎石散布、網掛けなど）の効果のアサリ稚貝の移動や減耗抑制の観点から理論的に検証をする必要がある。

引用文献

- 3) Fonselius S., Dyrssen D. and Yhlen B., 1999: Determination of hydrogen sulfide. In Methods of seawater analysis (eds. Grasshoff K., K. Kremling and M. Ehrhardt), Wiley-vch, Weinheim, 91-100
- 2) Hochachka P. W., 1984: 低酸素適応の生化学—酸素なき世界で生きぬく生物の戦略（橋本周久, 阿部宏喜, 渡部終五訳）, 恒星社厚生閣, 東京, 194pp.
- 1) 中村幹雄, 1997: 宍道湖におけるヤマトシジミと環境との相互関係に関する生理・生態学的研究. 北海道大学博士論文