

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370010

研究課題名(和文)琵琶湖における細菌群集と溶存有機物の相互作用による両者の質的変遷

研究課題名(英文) Quantitative and qualitative changes in dissolved organic matter and bacteria in Lake Biwa

研究代表者

中野 伸一 (Nakano, Shin-ichi)

京都大学・生態学研究センター・教授

研究者番号：50270723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、以下を解明した。琵琶湖では、夏季に表水層で植物プランクトンがタンパク質様の溶存有機物(DOM)を生産し、タンパク質様DOMは細菌により難分解な腐植様DOMへと変換される。腐植様DOMは、冬季に深水層へと輸送される。夏季の成層期の琵琶湖深水層では、クロロフレクサス門に属するCL500-11細菌一種が優占し、さらに細菌食者である原生動物のキネトプラスチド鞭毛虫も優占する。すなわち、成層期の琵琶湖の深水層では、腐植様DOMがCL500-11細菌に消費され、CL500-11細菌はキネトプラスチド鞭毛虫始めとする原生生物に摂食される、深水層特有の生態系が駆動しているのかもしれない。

研究成果の概要(英文)：We have clarified the microbial processes below: In the epilimnion of Lake Biwa during the stratified period, phytoplankton produce protein-like dissolved organic matter (DOM), and the DOM is converted into humic-like DOM through decomposition by planktonic bacteria. The humic-like DOM is transported to the hypolimnion through winter vertical mixing. In the hypolimnion during the stratified period, only one bacterial species, CL500-11 (phylum Chloroflexi), predominates, and bacterivorous Kinetoplastid flagellates also dominate. So, in the hypolimnion of Lake Biwa during the stratified period, there may be the unique microbial food webs where humic-like DOM is consumed by bacterial assemblages predominated by CL500-11, and where those bacteria are grazed by bacterivorous protists such as Kinetoplastids.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生態・環境

キーワード：溶存有機物 植物プランクトン 浮遊細菌 化学組成 遺伝系統解析

1. 研究開始当初の背景

近年、世界中の湖沼において、水中の窒素：リン比の異常上昇が問題となっている。この理由は、人間活動の増大に伴って湖沼に流入する窒素量が増大した、あるいは湖沼へのリン流入負荷削減により水質改善が進んだ結果と考えられている。水中の栄養塩類環境に直接影響を受ける生物は植物プランクトンと細菌であり、世界中の水質改善が進む主要湖沼において、窒素：リン比の上昇がこれら微生物の生態に与える影響について詳細に研究すべき時期に来ている。

湖水中の窒素：リン比上昇は琵琶湖も例外ではなく、湖水の窒素：リン比が200を上回り、アンバランスな窒素・リン環境が植物プランクトンの一次生産に始まる琵琶湖生態系に及ぼす影響が懸念されている。琵琶湖では、経年的な化学的酸素要求量(COD)の増加傾向が見られ、これは湖水中の難分解の溶存有機物(DOM)の蓄積が原因と考えられている。この難分解DOMは、元々は植物プランクトンが生産したDOMが何らかの変化で生成すると考えられているが、先述の窒素：リン比上昇と難分解DOM蓄積が時期的に重なることから、両者の関係が注目されている。

植物プランクトンが生産する有機物のうち、細胞外に放出されるDOMの多くは多糖類であり、それらはそれほど難分解ではない。しかし、琵琶湖水中の糖類によっては、細菌による分解を経ることによって組成が変化し、難分解性となる可能性が指摘されている。

2. 研究の目的

本研究では、以下の4点を明らかにすることを目的とした。

1. 植物プランクトンが生産し細胞外放出するDOM量の測定と化学組成の解明
2. 植物プランクトンが生産し細胞外放出するDOMの細菌による変性の解明
3. 植物プランクトンによるDOM排出、および排出されたDOMの化学組成変遷に対する窒素・リン供給の影響
4. 上記3つの結果起こる細菌群集の現存量と組成の変化の解明

以上の3つの過程は一連の生物化学的反応として起こっていると考えられる。さらに、細菌群集の組成の変化は、細菌の餌資源であるDOMの供給(ボトムアップ効果)だけでなく、細菌の摂食者による死滅(トップダウン効果)も考えられる。このため、細菌の摂食者として最も重要な原生生物の鞭毛虫の現存量と組成についても研究を進めた。

3. 研究の方法

琵琶湖において、京大大学生態学研究センターが1965年以来定期観測を行っている北湖の定点Ie-1について、毎月一回の頻度で調査・サンプル採取を行った。上記定点において、水質連続測定プロファイラーを用いた物理化学環境項目の鉛直プロファイルの測定

を行い、さらに鉛直的にいくつかの水深から試水を採取し、以下の項目について分析を行った。

- 基本環境項目(水温、溶存酸素、pH): 水質連続測定プロファイラー
- 栄養塩類濃度(窒素、リン): オートアナライザー(プラン・ルーベ社)を用いた。
- DOM濃度測定: 島津のTOCメーター(TOC-L)を用いた。
- 溶存有機物化学組成: 3次元蛍光スペクトル分析法(EEM)を用いた。吸光度は日立U-2001紫外・可視光吸光度計で、EEMは日立F-4500蛍光分光計で測定を行った。DOMスペクトルを二次処理することや、統計解析法の1つであるParallel Factor Analysis(PARAFAC)は、Stedmon and Bro (2005)の配布するMATLABプログラムにより解析を行った。
- 植物プランクトン現存量・組成: クロロフィル濃度は、蛍光法を用いた。組成は、酸性ルゴール固定・検鏡法によった。
- 細菌群集解析: 現存量はDAPI法、組成はFluorescently *in situ* Hybridization (FISH)法を用いた。
- 原生生物群集解析: 現存量はプリムリン法、組成はFISH法を用いた

4. 研究成果

本研究では、琵琶湖のCOD増加および難分解性DOM生成メカニズムの一端を解明した。この成果は、申請者の研究グループが解明してきた関連業績と合わせて、琵琶湖深層の興味深い生態系を示唆している。

琵琶湖水の紫外吸収スペクトルは、長波長側へ指数的に小さくなる形状であったが、260-290 nm付近に肩状に膨らみの形状が見られた(図1)。この特徴は、特に表層水に

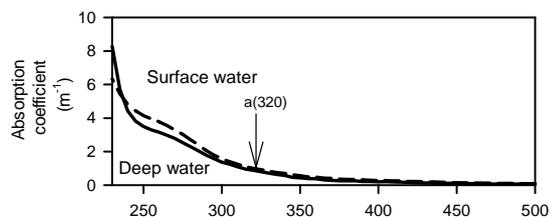


図1 北湖表層と深層水の紫外吸収スペクトル

見られた。260-290 nm付近の紫外吸収については、プリンやピリミジン環、芳香環などによる吸収といわれている。そこで、紫外吸収スペクトルを波長について一次微分をとると、全体の吸収に依存しない肩状成分の相対的な強度が得られた。この結果をサンプル間の変動と比較すると、表水層でのDOMの季節変動によく類似していた。全体の紫外吸収強度(例えば320 nm)の季節変動は、DOMの変動とは類似しなかった。よって、紫外吸収全体は分子内の二重結合や芳香環に由来するものであるが、本研究での260-290 nmの肩状の吸収は、より湖内の生物生産に連動し

た成分に由来するものであると考えられた。

琵琶湖試水の EEM スペクトル上には、励起 280 nm/蛍光 325-340 nm、励起 300-310 nm/蛍光 405-430 nm 付近にピークが見られた(図 2)。これらは、過去の EEM 研究で前者がタンパク質様ピーク、後者がフミン物質様ピークに相当した。

琵琶湖北湖沖帯表層、沖帯深層、北湖沿岸、南湖、河川の採取地点別のデータセットから EEM の PARAFAC 解析を行った。その結果、統計的な信頼性から、励起/蛍光波長 320/330 nm 付近のタンパク質様蛍光成分 1 つと 370/450 nm 付近のフミン物質様蛍光成分 2 つの 3 成分に分離された(図 2)。

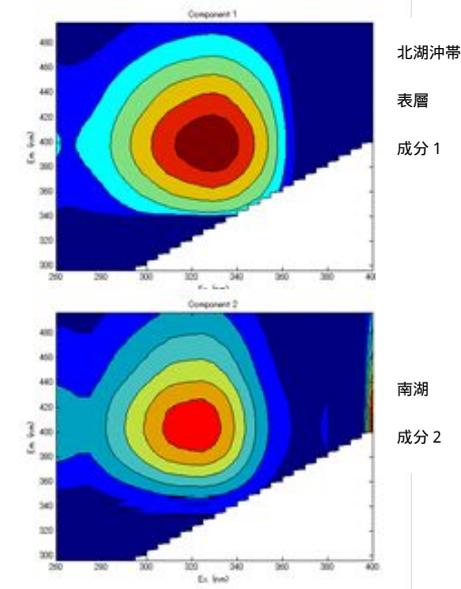


図 2 : PARAFAC による北湖沖帯表層と南湖における EEM スペクトル成分 1、2

タンパク質様の蛍光性 DOM (FDOM-T) は、春から秋にかけて表水層で蓄積した。この蓄積は、表水層が窒素あるいはリン制限に陥ったことにより、細菌による有機物分解活性が低下したものと考えられる。

フミン物質様の蛍光性 DOM (FDOM-M) は、深度が増すごとに増加し、栄養塩濃度や全炭酸の鉛直分布と似たパターンが見られた。このパターンは、溶存酸素濃度とは逆の関係にあった。さらに、FDOM-M は見かけの酸素消費速度、全炭酸、硝酸、リン酸と有意な正の相関関係にあり、このことは FDOM-M が深水層での栄養塩等の無機化過程において生成されることを示唆している。

琵琶湖北湖沖帯の細菌の群集組成を検討した結果、夏季の水温成層している琵琶湖北湖全域の深水層において、クロロフレクサス門に属する CL500-11 細菌一種のみが第一優占することを解明した(図 3)。琵琶湖の深水層は、DOM 濃度が低いいため、細菌の餌資源に乏しい環境である。CL500-11 細菌は、難分解な腐植様 DOM を利用せざるを得ないであろう。

さらに、主に細菌食者である原生生物のキ

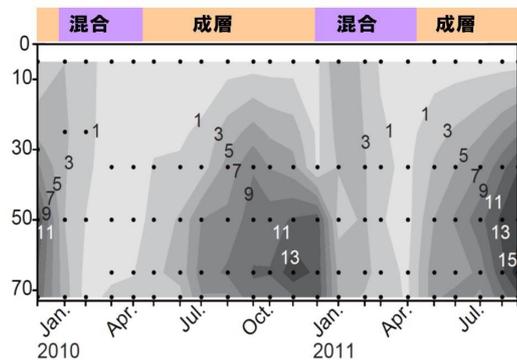


図 3 : 2010 年 1 月から 2011 年 9 月までの、琵琶湖北湖 Ie-1 定点における CL500-11 細菌の、全細菌数に占める割合 (%)。

ネトプラスチド鞭毛虫に特異的な遺伝子プローブを用いた FISH を行ったところ、夏季の琵琶湖深水層ではキネトプラスチド鞭毛虫が、全鞭毛虫において第一優占していることを解明した(図 4)。成層期の琵琶湖深水

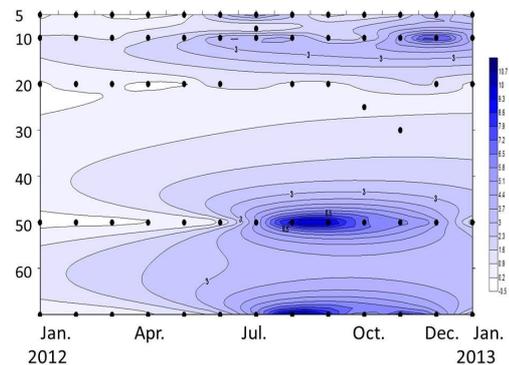


図 4 : 2012 年 1 月から 2013 年 1 月までの、琵琶湖北湖 Ie-1 定点におけるキネトプラスチド鞭毛虫の細胞密度 ($\times 10^2$ cells ml^{-1})。

層では、CL500-11 細菌がキネトプラスチド鞭毛虫に摂食される、深水層特有の微生物による生態系が駆動しているのかもしれない。しかし、CL500-11 は、細菌としては大型であり、鞭毛虫が摂食しにくいサイズであるとも考えられ、この細菌 - 鞭毛虫の食物連鎖については、今後更なる検討が必要である。

以上をまとめると、以下のようになる。琵琶湖では、夏季に表水層で DOM 濃度が上昇する。これは、表水層で植物プランクトンが FDOM-T を生産するが、表水層の窒素・リンが枯渇しているために細菌による分解が促進されず、細菌による分解は窒素・リンが比較的多く供給される水温躍層(表水層と深水層の間の、水温が急激に変化する層)に限定される。この際、FDOM-T は難分解な FDOM-M へと変換される。琵琶湖における COD の上昇は、この FDOM-M の蓄積と考えられる。ここで生成した FDOM-M は、冬季にかけて湖水が鉛直循環するために深水層へと輸送される。深水層では、おそらく CL500-11 細菌が FDOM-M を資化しており、キネトプラスチド鞭毛虫が CL500-11 を始め

とする細菌の摂食者として機能しているであろう(図5)。

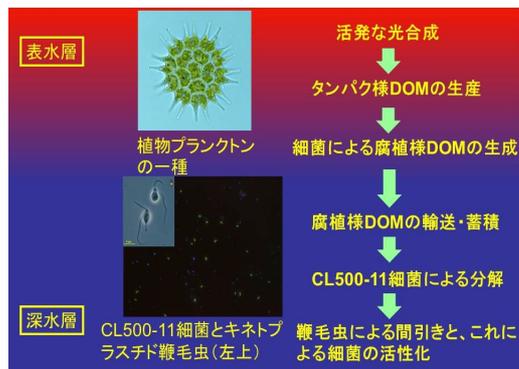


図5：本研究成果の概念図。図の上の赤い部分は琵琶湖の表水層、下の青い部分は深水層を意味している。植物プランクトンの写真は <http://homepage2.nifty.com/nyanpu-/plankton64.jpg> より、キネトプラスチド鞭毛虫の写真は <http://pinkava.asu.edu/starcentral/microscope/portal.php?pageid=assetfactsheet&imageid=3578&linkpage=2&BLOCKID=9&CHILDID=19660> より、それぞれ引用した。

以上のように、本研究では、琵琶湖や他の社会的に重要な湖沼において問題となっているCOD増加および難分解性DOM生成について、それらのメカニズムの一端を解明しただけでなく、成層期の琵琶湖深水層における微生物の食物連鎖について興味深い結果を得た。

我々人間が普段使用した水は、污水处理プラントで活性汚泥により浄化される。活性汚泥とは、細菌が汚水中のDOMを分解して増殖し、増殖した細菌は原生動物に摂食されて「間引き」される、細菌と原生動物との食物連鎖を人為的に強化した系である。琵琶湖の深水層でも、CL500-11細菌やキネトプラスチド鞭毛虫を含む微生物の食物連鎖を活性化すれば、DOM分解が促進される可能性がある。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計6件)

1. Takasu, H., T. Kunihiro, S. Nakano (2014, in press) Protistan grazing and viral lysis losses of bacterial carbon production in a large mesotrophic lake (Lake Biwa). *Limnology* (査読有)
2. 津田久美子, 早川和秀, 岡本高弘(2014): 有機汚濁と環境基準—琵琶湖を例にして—。用水と廃水 56(3), 59-72 (査読有)
3. Thottathil, S., K. Hayakawa, Y. Hodoki, C. Yoshimizu, Y. Kobayashi, S. Nakano (2013) Biogeochemical control on fluorescent dissolved organic matter dynamics in a large freshwater lake (Lake Biwa, Japan). *Limnol. Oceanogr.* 58: 2262-2278 (査読有)
4. Ushio, M., K. Makoto, J. Klaminder, S. Nakano (2013) CARD-FISH analysis of prokaryotic community composition and

abundance along small-scale vegetation gradients in a dry arctic tundra ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry* 64: 147-154(査読有)

5. Takasu, H., T. Kunihiro and S. Nakano (2013) Estimation of carbon biomass and community structure of planktonic bacteria in Lake Biwa using respiratory quinone analysis. *Limnology* 14: 247-256 (査読有)
6. Okazaki, M., Y. Hodoki, S. Nakano (2013) Seasonal dominance of CL500-11 bacterioplankton (Phylum *Chloroflexi*) in the oxygenated hypolimnion of Lake Biwa, Japan. *FEMS Microbiol Ecol* 83: 82-92 (査読有)

〔学会発表〕(計14件)

1. Fujinaga, S., S. Nakano: Bacterial community composition and enzyme activity from littoral zone to pelagic region in Lake Biwa, “Big microbes”: International workshop on microbial ecology for young scientists, 2013年11月18日、大津市、滋賀県
2. 藤永承平・中野伸一：琵琶湖河口域から沖帯にかけての真菌現存量と酵素活性、日本陸水学会第78回大津大会、2013年9月11日、大津市、滋賀県
3. Mukherjee, I., H. Nishino, H. Takasu, Y. Hodoki, S. Nakano: Seasonal changes in vertical abundance of Kinetoplastid nanoflagellates in Lake Biwa with special reference to ecological importance of a particular flagellate group, 日本陸水学会第78回大津大会、2013年9月11日、大津市、滋賀県
4. 高巢裕之・Jessica E. LeClair・山本貴幸・谷幸則・中野伸一：静岡県佐鳴湖におけるピコプランクトン群集の増殖と原生生物の捕食による死滅、日本陸水学会第78回大津大会、2013年9月11日、大津市、滋賀県
5. Murakami, A., N. Okuda, T. Iwata, R. Williams, S. Nakano: Different land use patterns affect responses of river epilithic biofilms: A case study in Yasu River Watershed, Shiga, Japan. The 13th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, 2013年9月10日、Stresa, Italy
6. Mukherjee, I., H. Nishino, H. Takasu, Y. Hodoki, S. Nakano: Seasonal changes in vertical abundance of Kinetoplastid nanoflagellates in Lake Biwa with special reference to ecological importance of a particular flagellate group, 第6回日本進化原生生物学研究会、2013年6月29日、大阪市、大阪府
7. 高巢裕之・國弘忠生・中野伸一：呼吸鎖キノンを生物指標とした湖沼浮遊細菌の炭素バイオマス量および群集構造の評価、日本陸水学会第77回名古屋大会、2012年9月16日、名古屋市、愛知県

8. 早川和秀・小島礼慈・和田千弦・杉山裕子・熊谷哲(2012): 琵琶湖水中の紫外吸収・蛍光物質の分布と特性の評価、日本陸水学会第77回名古屋大会、2012年9月16日、名古屋市、愛知県
9. 高巢裕之・國弘忠生・中野伸一: 琵琶湖の浮遊細菌群集の炭素現存量とその行方、2012年度日本地球化学会年会、2012年9月11日、博多市、福岡県
10. Thottathil, S., K. Hayakawa, Y. Hodoki, C. Yoshimizu, Y. Kobayashi, S. Nakano: Biogeochemical control on fluorescent dissolved organic matter in a large freshwater lake (Lake Biwa, Japan), Association for Sciences of Limnology and Oceanography Aquatic Sciences Meeting 2012, 2012年7月11日、コラボしが、大津市、滋賀県
11. Takasu, H., T. Kunihiro, S. Nakano: Carbon content and community structure of planktonic bacteria in large mesotrophic Lake Biwa using respiratory quinone analysis, Association for Sciences of Limnology and Oceanography Aquatic Sciences Meeting 2012, 2012年7月9日、コラボしが、大津市、滋賀県
12. Hayakawa, K., S. Tsujimura, T. Ishikawa, H. Haga, T. Okamoto, C. Jiao, K. Ishikawa, M. Kumagai (2012): Long-term changes in the concentrations of nutrients and water quality parameters in Lake Biwa using integrated analysis from several monitoring data. Association for Sciences of Limnology and Oceanography Aquatic Sciences Meeting 2012, 2012年7月9日、コラボしが、大津市、滋賀県
13. Murakami, A., S. Nakano: Microbial ecology of epilithic biofilms – Spatial and temporal positioning matters, Association for Sciences of Limnology and Oceanography Aquatic Sciences Meeting 2012, 2012年7月9日、コラボしが、大津市、滋賀県
14. Okazaki, Y., S. Nakano: Dominance of curve-shaped bacteria undetectable with conventional FISH probes in hypolimnion of Lake Biwa, Japan, The 12th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, 2011年8月30日、Rostock-Warnemunde, Germany

〔図書〕(計1件)

1. Okuda, N., K. Watanabe, K. Fukumori, S. Nakano, T. Nakazawa: Biodiversity and evolutionary research: from genome to ecosystem: Lake Biwa (査読有)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 伸一 (NAKANO, Shin-ichi)
京都大学・生態学研究センター・教授
研究者番号：50270723

(2) 研究分担者

早川 和秀 (HAYAKAWA, Kazuhide)
滋賀県琵琶湖環境科学研究センター・主任
研究員
研究者番号：80291178