短 報 [Note]

印旛沼におけるバクテリアの季節変動パターン及び変動要因の解明

鏡味麻衣子¹⁾・石鍋順子¹⁾

Factors affecting seasonal variations in bacterial abundance in Lake Inba

Maiko KAGAMI¹⁾ and Junko ISHINABE¹⁾

Abstract

Lake Inba is one of Japan's most eutrophic lakes. Few studies have examined its plankton dynamics, including bacteria. To investigate the factors affecting the bacterial abundance in Lake Inba, data were collected weekly from April to October 2009. That abundance ranged from 1.8 to 9.5×10^6 cells mL⁻¹, with its highest in late April. Multiple regression analysis revealed that the bacterial abundance was significantly correlated with particulate phosphorus concentrations and heterotrophic nanoflagellates (HNF), but not with water temperature, nutrient concentrations or chlorophyll *a*. A significant relationship with particulate phosphorus, but not with chlorophyll *a* concentration, indicated that organic substrates including allochthonous input were an important source for bacterial growth in the lake. That also implied that phosphorus might limit bacterial growth, although no relationship was found with SRP due to its extremely low concentrations. Negative relationships with HNF indicated that HNF reduced the bacterial abundance through grazing. These results indicate that bacterial abundance in the eutrophic Lake Inba was regulated not only by top-down factors, that is grazing by HNF, but also by bottom-up factors including organic sources and phosphorus.

Keywords: Lake Inba, bacteria, phosphorus, nanoflagellates

摘 要

印旛沼は日本で最も富栄養な湖のひとつである。水質と密接に関係のあるプランクトンの生態に関する研究はされていない。本研究ではプランクトンの中でもバクテリアについて、その季節変動パターンおよび変動要因を明らかにするため、2009年4月から10月にかけて週1回の調査を行った。バクテリアの密度に影響を与えるボトムアップ効果として窒素・リン・有機物（クロロフィル *a*, 懸濁態リン）、トップダウン効果として捕食者（鞭毛虫）を考慮に入れ、これら要因がバクテリアの密度に与える影響の相対的重要性について検討した。バクテリアの密度は約 $1.8 \sim 9.5 \times 10^6$ cells mL⁻¹ の間で変動し4月下旬に最大となった。重回帰分析の結果、バクテリア数は懸濁態リンとは正の相関、鞭毛虫とは負の相関がみられたが、水温、栄養塩濃度（窒素、リン）、クロロフィル濃度との間には有意な関係は認められなかった。懸濁態リンとの関係はあったがクロロフィル量との関係がみられなかったことから、外来性の物も含め

1) 東邦大学理学部生命環境科学科 〒274-8510 千葉県船橋市三山 2-2-1 Department of Environmental Science, Faculty of Science, Toho University, Miyama 2-2-1, Funabashi, Chiba 274-8510, Japan
(連絡先 鏡味麻衣子 ✉ kagami@env.sci.toho-u.ac.jp)

有機物量全体がバクテリアの変動を制限していると考えられた。栄養塩のうち、リン濃度は非常に低く、バクテリア密度との間には関係がみられなかったが、バクテリアの成長を制限しているのかもしれない。一方、鞭毛虫との間に負の相関関係があり、バクテリアの密度は鞭毛虫による捕食によって制限されていることが示唆された。以上の結果より、富栄養な印旛沼のバクテリア数はトップダウン効果（鞭毛虫による捕食）だけでなくボトムアップ効果（懸濁態リンの濃度）によっても制限されていることが示された。

キーワード：印旛沼，バクテリア，リン，鞭毛虫

(2010年4月2日受付；2010年12月9日受理)

はじめに

印旛沼は、千葉県民の「命のみずがめ」ともよばれ、上水道や工業用水および農業用水の水源として利用されている。戦後の流域都市化に伴う生活排水の流入で水質は悪化し、今では日本で最も富栄養化の進んだ湖の1つとなった。現在、環境省から水質改善が必要な湖沼に指定されている。水質を改善するためには、有機物の分解者であるバクテリア（細菌類）の生態や機能についての理解が不可欠である。また、バクテリアは原生動物やワムシ、甲殻類動物プランクトンに捕食されることにより有機物や栄養塩類を上位栄養段階に運ぶ機能も担うため、印旛沼の物質循環を理解するためにも欠かせない存在である。過去20年間、千葉県水質保全課によって栄養塩濃度や有機物量(COD)など水質関連項目についての詳細なモニタリングが行われてきている。しかし、バクテリアの生態に関する研究はほとんどなされていない。

湖沼において、バクテリアの細胞密度は様々な要因に制限される。バクテリアにとって餌となる有機物量だけでなく、リンや窒素などの栄養塩濃度や水温によってバクテリアの成長が制限されることが明らかになってきた(Cole et al., 1988; Currie, 1990; Jeppesen et al., 1997; Simon et al., 1998; Gurung and Urabe, 1999)。また、鞭毛虫や繊毛虫などの原生動物や動物プランクトンによる捕食、ウィルスの寄生によってバクテリアの密度は抑えられる(Sanders et al., 1992; Fuhrman, 1999; Gurung et al., 2000)。さらには、栄養塩や有機物量によるボトムアップ効果と、捕食者によるトップダウン効果のどちらがバクテリアの密度を制御するうえで重要であるかについても議論がなされてきた。ボトムアップ効果とトップダウン効果の重要性は季節や湖の栄養塩状態、深度などによって変わると言われている(Simon et al., 1998; Gurung et al., 2001)。

本研究では、日本で最も富栄養な湖のひとつである印旛沼を調査地とし、印旛沼におけるバクテリアの季節変動パターンを把握し、その変動に影響を与えるボトムアップ効果とトップダウン効果の重要性を評価することを目的とした。バクテリアの密度に影響を与えるボトムアップ要因として窒素・リン・有機物(クロロフィル *a*, 懸濁態リン)、トップダウン要因として捕食者(鞭毛虫)を考慮に入れ、バクテリアの密度に与えるこれら要因の相対的重要性について検討した。

方 法

調査地

本研究の調査地である印旛沼は、千葉県北西部の下総台地のほぼ中央部に位置し、北印旛沼と西印旛沼に二分され、捷水路で結ばれる形となっている。沼の面積は、北印旛沼と西印旛沼を合わせて11.55km²で、水深は平均1.7m、最大2.5mである(財団法人印旛沼環境基金2006)。印旛沼は洪水対策をはじめ、上水道、工業および農業等の利水に支障をきたすことがないように、水門によって水位は常に調節されている。全窒素量は昭和50年以前は約1.0mg L⁻¹であったが、年々増加していき、2006年には約3.0mg L⁻¹にまで増加した。逆に全リン量については昭和50年代前半は約0.3mg L⁻¹であったが、近年では0.1mg L⁻¹前後まで減少してきている(財団法人印旛沼環境基金, 2006)。

試料の採取・固定

調査は2009年4月から2009年10月にかけて、西印旛沼の船戸大橋付近にて週1回行った。水温・DO・pHについてはマルチ水質チェッカー(堀場製作所 U-50 シリーズ)を用いて測定した。試料は水深約20cmの表層の水をバケツにて採取した。バクテリア及び鞭毛虫の

試料は、湖水 50mL を 8%パラホルムアルデヒド（最終濃度 4%）で固定し、計数するまで冷蔵保存した。窒素（アンモニア態窒素・亜硝酸態窒素・硝酸態窒素）及びリン（リン酸態リン・溶存態有機リン）の試料は、熱処理した GF/F フィルター（Whatman）で濾過した濾過湖水を用い、分析するまで冷凍保存した。懸濁態リン及びクロロフィル *a* の試料は、湖水 100mL を熱処理した GF/F フィルターで濾過し、フィルターをアルミホイルに包み、分析するまで冷凍保存した。（なお、懸濁態リンとクロロフィル *a* の試料は、4 月上旬～中旬はとっていない。）

バクテリア及び鞭毛虫の計数

バクテリアの計数には SYBR Green I（Lonza 社製）を用いて DNA を染色し、鞭毛虫の計数にはプリムリンを用いてタンパク質を染色し計数した（Sherr et al., 1993; Noble and Fuhrman, 1998）。バクテリアについては、固定したサンプル 1mL と 5%SYBR GreenI 20 μ L（最終濃度 0.1%）を濾過器に注ぎ、孔径 0.2 μ m のフィルター（ADVANTEC）で濾過した。フィルターをスライドガラスの上に載せイマージョンオイルをたらし、カバーガラスをかぶせた後再びオイルをたらした。計数は蛍光顕微鏡（ $\times 1000$, Blue 励起）を用いて行った。この操作を 1 サンプルにつき 3 回繰り返し、300 細胞以上計数し、平均値と標準誤差を求めた。今回は、0.2～0.7 μ m の大きさで球形のものをバクテリアとみなし、自家蛍光を発するシアノバクテリアは計数しなかった。糸状のバクテリアも出現したが、低密度であり同じ試料でもフィルターによるばらつきが大きかったため、計数しなかった。

鞭毛虫については、固定したサンプル 2mL を濾過器に注ぎ、孔径 0.2 μ m のフィルター（ADVANTEC）で濾過した。調製した 0.025%プリムリン溶液（0.1M Trizma-HCl (pH=4) にプリムリンを溶かした）1mL を濾過器に注ぎ、5 分～10 分放置した後濾過した。フィルターをスライドガラスの上に載せイマージョンオイルをたらし、カバーガラスをかぶせた後再びオイルをたらした。計数は蛍光顕微鏡（ $\times 1000$, UV 励起）を用いて行った。この操作を 1 サンプルにつき 3 回繰り返し、30 細胞以上計数し、平均値と標準誤差を求めた。1mL あたりのバクテリア及び鞭毛虫の細胞数は、フィルターの濾過面積と計数面積から換算した。

栄養塩および有機物の分析

栄養塩の分析は、アンモニア態窒素はインドフェノール法、亜硝酸態窒素は BR 法、硝酸態窒素は硫酸ヒドラ

ジニウム法、リン酸態リンはモリブデン青法により行った（西條・三田村, 2004）。溶存態有機リンと懸濁態リンはペルオキシ二硫酸カリウムで分解後、モリブデン青法により行った（西條・三田村, 2004）。吸光度測定には 1cm セルを用いた。ただし、アンモニア態窒素・リン酸態リン・懸濁態リンの吸光度測定には 5cm セルを用いた。クロロフィル *a* の分析については、ロレンツェン法により行った。なお、クロロフィル *a* 量はフェオ色素を含めた値とした。

統計解析

バクテリア数の季節変動がどの要因と相関があるのかを調べるために、統計ソフト R を用いて重回帰分析を行った。バクテリア数を応答変数とし、説明変数として水温、DIN（アンモニア態窒素・亜硝酸態窒素・硝酸態窒素）、SPR（リン酸態リン）、DOP（溶存態有機リン）、PP（懸濁態リン）、クロロフィル *a*、鞭毛虫数を含め、AIC（赤池情報量規準）を基に最も当てはまりのよいモデルを選択した。なお、統計を行う際は水温以外のデータは対数 log の値に変換して分析した（Jeppesen et al. 1997）。

結 果

水温は 11.3～27.4℃の間で変動し、4 月から 7 月にかけて上昇し、8 月下旬から低下した（Fig. 1A）。溶存酸素濃度（DO）は約 85～194%，約 8～16mg L⁻¹ の間で変動し、比較的 5 月から 7 月中旬にかけて低い値となり増減を繰り返した（Fig. 1B）。pH は 6.7～9.5 の間で変動し、4 月は 9 付近と常に高く、それ以降は増減を繰り返した（Fig. 1C）。

アンモニア態窒素は 0.02～0.17mg L⁻¹ の間で変動し、比較的 6 月と 7 月は低い値となった（Fig. 2A）。亜硝酸態窒素は 0～0.08mg L⁻¹ の間で変動し、4 月で高い値となり 8 月には最も低くなった。硝酸態窒素は 0～0.1mg L⁻¹ の間で変動し、あまり季節的な変化は見られなかった。全体の窒素量としては、4 月・5 月および 8 月に一時的に高い値を示した（Fig. 2A）。

リン酸態リンは最高値 0.01mg L⁻¹ と常に低い値をとった（Fig. 2B）。溶存態有機リンは 0～0.01mg L⁻¹ の間で変動し、4 月下旬と 8 月上旬にピークを形成した（Fig. 2B）。懸濁態リンは 0.20～0.85mg L⁻¹ の間で変動し、4 月下旬に最も高い値となりそれ以降は増減を繰り返した（Fig. 2C）。

Fig.1. Seasonal changes in (A) water temperature, (B) percentage of dissolved oxygen and (C) pH at the surface layer in the west basin of Lake Inba.

図1. 西印旛沼の表層における (A) 水温, (B) 酸素飽和度, および (C) pH の季節変化。

クロロフィル *a* 量は約 $9.3 \sim 53.8 \mu\text{g L}^{-1}$ の間で変動し, 5月から8月下旬にかけて徐々に増加し, それ以降は徐々に減少した (Fig. 3C)。

バクテリア数は, 約 $1.8 \sim 9.5 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ の間で変動した (Fig. 3A)。その変動は4月下旬に最大となり, 6月にかけて減少していき, 7月上旬にピークを形成し, それ以降は徐々に減少していく傾向となった。鞭毛虫数は約 $0.9 \sim 13.3 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ の間で変動し, その変動はバクテリア数と逆のパターンを示し, 4月上旬, 6月中旬, 9月上旬にピークを形成した (Fig. 3B)。

回帰モデルのうち, 最も当てはまりのよいモデルは, 懸濁態リン ($\log(\text{PP})$) および鞭毛虫 ($\log(\text{HNF})$) の2つが説明変数である場合であった ($\log(\text{bacteria}) = 18.80 - 0.31\log(\text{HNF}) + 0.50\log(\text{PP})$)。バクテリア数 ($\log(\text{bacteria})$) と懸濁態リンとは正の相関 ($P < 0.01$), 鞭毛虫とは負の相関 ($P < 0.05$) があった。2つの変数によって, バクテリア密度の40%の変動が説明された ($r^2 = 0.40$, $p < 0.005$, $\text{d.f.} = 23$)。

Fig.2. Seasonal changes in the concentrations of (A) ammonia and dissolved inorganic nitrogen (DIN), (B) soluble reactive phosphorus (SRP) and total dissolved phosphorus (DTP), and (C) particulate organic phosphorus (POP) at the surface layer in the west basin of Lake Inba.

図2. 西印旛沼の表層における (A) アンモニア態窒素と溶存態無機窒素濃度, (B) リン酸態リンと溶存全リン濃度, および (C) 懸濁態有機リン濃度の季節変化。

Fig. 3. Seasonal changes in the abundance of (A) heterotrophic bacteria and (B) heterotrophic nanoflagellates (HNF), and (C) chlorophyll *a* concentrations at the surface layer in the west basin of Lake Inba.

図3. 西印旛沼の表層における (A) 従属栄養バクテリアの密度, (B) 従属栄養鞭毛虫の密度, および (C) クロロフィル濃度の季節変化。

考 察

西印旛沼船戸大橋付近のバクテリア数は、約 $1.8 \sim 9.5 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ の間で変動し、富栄養湖の平均的なバクテリアの密度の範囲であった (Wetzel, 2001)。バクテリア密度の季節変動は懸濁態リン及び鞭毛虫数によって40%説明され、バクテリア密度と懸濁態リンの間には正の相関関係が、鞭毛虫数との間には負の相関関係があることが明らかとなった。

懸濁態リンとバクテリア密度との間に正の相関関係が認められたことは、バクテリアの密度が有機物量に制限されている事を示唆している。海洋や湖沼において、一般にバクテリアの密度はクロロフィル量や基礎生産量、全リン濃度など植物プランクトン密度や生産量との間に正の相関関係がある (Cole et al., 1988; Currie 1990; Jeppesen et al., 1997)。今回、植物プランクトンの量をクロロフィル量として測定したが、バクテリア密度との間に有意な関係は見られなかった。富栄養湖においてラン藻など毒性のある植物プランクトンが優占する場合、クロロフィルとバクテリア密度の間に関係が見られないこともある (Nakano et al., 1998)。しかし、今回は懸濁態リンとの間には相関関係があったことから、むしろ植物プランクトンだけでなく陸上から流入する他生性の有機物もバクテリアの重要な有機物源となっているのかもしれない。懸濁態リンに占める植物プランクトン(自生性の有機物)の割合を、クロロフィル当たりのリンの比率 (PP/Chl) を1と仮定して (Aizaki and Otsuki 1987) 推定したところ、約10%と非常に少なかった。印旛沼では有機物のうち、植物プランクトンの生産する自生性の有機物よりも他生性のほうが多く占めているのかもしれない。他の湖沼においても、バクテリアの成長は植物プランクトンから供給される有機物だけでなく他生性の有機物にも支えられている事が明らかになっている (del Giorgio et al., 1997)。一方で、有機物ではなく栄養塩のリンがバクテリアの成長に影響しているのかもしれない。印旛沼においては、溶存態無機リン (SRP) の濃度は非常に低く、バクテリアの成長もリンによって制限されている可能性はある。しかし、バクテリアの密度は栄養塩 (リン、窒素) との間には明瞭な関係が見られなかった。野外で測定している栄養塩濃度はバクテリアや植物プランクトンが消費した残りの濃度を反映しているため、供給量を反映したものではない。栄養塩濃度が低い時、バクテリアの成長が栄養塩によって制限されている可能性を確かめるには、リンや窒素を添加し密度変化を

確かめる現場培養実験が有効である (Gurung and Urabe 1999)。実際、印旛沼の植物プランクトンを用いた培養実験では、リンを添加したときに植物プランクトンの成長が促進されることが確認されている (鏡味, 未発表)。また、8月に一時的に窒素濃度が減少した時、窒素添加によって植物プランクトンの成長が促進された (鏡味, 未発表)。バクテリアに関しては、さらに有機物 (グルコース) を加える系を設けることで、バクテリアの成長を制限している要因が栄養塩であるのか有機物量であるのかを検証できる。培養実験を行う事により、印旛沼のバクテリア密度がボトムアップ効果のうち栄養塩または有機物のどちらによって制限されているが明らかになると考えられる。

鞭毛虫数と負の相関関係があったことは、バクテリアの密度が鞭毛虫による捕食によって制限されることを示唆している。Sanders et al. (1992) は、様々な栄養状態の湖沼と海洋のバクテリア密度と鞭毛虫密度を比較することによって、富栄養下ではバクテリア数の調節にはトップダウン効果 (捕食) がより重要であると示した。しかし、富栄養湖において、バクテリア密度と鞭毛虫密度の間に相関関係がほとんど認められない場合もある (Jürgens and Stolpe 1995)。Jürgens and Stolpe (1995) は、バクテリア密度が鞭毛虫に制御されるか否かは、ミジンコなど大型動物プランクトンが鞭毛虫を捕食する程度に依存すると推察している。印旛沼において、大型の甲殻類動物プランクトンはほとんど出現せず、ゾウミジンコやワムシ類など小型の動物プランクトンが卓越していた (鏡味, 未発表)。また、鞭毛虫数は約 $0.9 \sim 13.3 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ の間で変動し、一般的な従属栄養性の鞭毛虫の密度 ($10^3 \sim 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$) よりも高くなった (Jürgens and Stolpe, 1995; Gurung et al., 2001)。印旛沼においては、鞭毛虫の密度を顕著に低くするほどまでに大型動物プランクトンが出現しないために、鞭毛虫は比較的高い密度を保ち、バクテリアの主要な捕食者として機能したのかもしれない。

今回の研究からは、印旛沼のバクテリア数の季節的な変動はトップダウン効果 (鞭毛虫による捕食) とボトムアップ効果 (懸濁態リンの濃度) の両方によって制限されているといえる。琵琶湖のような深い湖において、バクテリアの密度を制限する要因は表層・中層・深層のそれぞれの層で異なり、表層や中層では水温と動物プランクトンの両方と相関関係がみられるが、深層では水温のみと負の相関があった (Gurung et al., 2001)。印旛沼は琵琶湖と違ってかなり浅い湖であるため、表層と深層で

バクテリア数が大きく変わることは考えられにくい、トップダウン効果とボトムアップ効果の両方が影響することは同様であろう。

以上、印旛沼のバクテリアは懸濁態リンの量と捕食者の両方の影響を受けていることが明らかになった。今後印旛沼に窒素やリンがさらに流入すると、バクテリアの成長が促進され、それに伴って鞭毛虫などの捕食者も増加する可能性がある。今回、バクテリアの種組成については調査しなかった。今後 DNA 解析によるバクテリア種組成の把握や培養実験による成長特性の解明により、印旛沼全体の有機物分解過程と物質の流れがより詳細に明らかになるであろう。

謝 辞

本研究は双葉電子記念財団自然研究助成金および印旛沼環境基金助成金の援助を受け行われた。

文 献

- Aizaki M. and A. Otsuki (1987): Characteristic of variations of C:N:P:Chl ratios of seston in eutrophic shallow lake Kasumigaura. *Japanese Journal of Limnology*, 48:S99-S106.
- Cole J. J., S. S. Findlay, M.L. Pace (1988): Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross system overview. *Marine Ecology Progress Series*, 43:1-10.
- Currie D. J. (1990): Large scale variability and interaction among phytoplankton, bacterioplankton and phosphorus. *Limnology and Oceanography*, 35:1437 – 1455.
- del Giorgio P. A., J. J. Cole and A. Cimleris (1997): Respiration rates in bacteria exceed phytoplankton production in unproductive aquatic systems. *Nature*, 385: 148-151.
- Fuhrman J. A. (1999): Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, 399:541-548.
- Gurung, T. B. and J. Urabe (1999): Temporal and Vertical Difference in Factors Limiting Growth Rate of Heterotrophic Bacteria in Lake Biwa. *Microbial Ecology*, 38: 136-145.
- Gurung, T. B., M. Kagami, T. Yoshida and J. Urabe (2001): Relative importance of biotic and abiotic factors affecting bacterial abundance in Lake Biwa: an empirical analysis. *Limnology*, 2: 19-28.
- Gurung, T. B., M. Nakanishi and J. Urabe (2000): Seasonal and vertical difference in negative and positive effects of grazers on heterotrophic bacteria in Lake Biwa. *Limnology and Oceanography*, 45:1689-1696.
- Jeppesen, E., M. Erlandsen, M. Søndergaard (1997): Can simple empirical equations describe the seasonal dynamics of bacterioplankton in lakes: an eight-year study in shallow hypertrophic and biologically highly dynamic lake Søbygård, Denmark. *Microbial Ecology*, 34:11-26.
- Jürgens, K. and G. Stolpe (1995): Seasonal dynamics of crustacean zooplankton, heterotrophic nanoflagellates and bacteria in a shallow, eutrophic lake. *Freshwater Biology*, 33:27-38.
- Nakano, S., N. Ishii, P. M. Manage, and Z. Kawabata (1998): Trophic roles of heterotrophic nanoflagellates and ciliates among planktonic organisms in a hypereutrophic pond. *Aquatic Microbial Ecology*, 16: 153-161
- Noble R. T. and J. A. Fuhrman (1998): Use of SYBR Green for rapid epifluorescence count of marine viruses and bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 14:113-118.
- 西條 八束, 三田村 緒佐武 (2004): 新編 湖沼調査法, 講談社, 東京.
- Sanders R.W., D. A. Caron and U. G. Berninger (1992): Relationship between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and fresh waters: an inter-ecosystem comparison. *Marine Ecology Progress Series*, 86:1-14.
- Sherr E. B., D. A. Caron, B. F. Sherr (1993): Staining of Heterotrophic Protists for Visualization via Epifluorescence Microscopy. In *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*, P. F. Kemp, B. F. Sherr, E. B. Sherr and J. J. Cole (eds): 213-227. Lewis Publishers, New York.
- Simon M., M. M. Tilzer, H. Müller (1998): Bacterioplankton dynamics in a large mesotrophic lake: I. abundance, production and growth control. *Archiv für Hydrobiologie*, 143:385-407.
- Wetzel R. G. (2001) : *Limnology*. Academic Press, New York.
- 財団法人 印旛沼環境基金 (2006): 印旛沼のはなし. 財団法人印旛沼基金, 千葉.