

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

琵琶湖における有機物収支の把握に関する研究
(5-1607)

平成28年度～平成30年度

Evaluation of organic carbon budgets in Lake Biwa
for management of water quality and ecosystem

〈研究代表機関〉

滋賀県琵琶湖環境科学研究センター

〈研究分担機関〉

滋賀県立大学
国立環境研究所
京都大学

2019年5月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発の方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた主な成果	
6. 研究成果の主な発表状況	
7. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	
II-1 環境因子と湖内生産量の関係整理および湖内生産量の明示化の検討 （滋賀県琵琶湖環境科学研究センター）	15
要旨	
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	
6. 国際共同研究等の状況	
7. 研究成果の発表状況	
8. 引用文献	
II-2 植物プランクトンの一次生産量の実測と環境因子との関係解析 （公立大学法人滋賀県立大学）	36
要旨	
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	
6. 国際共同研究等の状況	
7. 研究成果の発表状況	
8. 引用文献	
II-3 細菌生産の定量的解析 （国立研究開発法人国立環境研究所 地域環境研究センター）	54
要旨	
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	

4. 結果及び考察
5. 本研究により得られた成果
6. 国際共同研究等の状況
7. 研究成果の発表状況
8. 引用文献

II-4 メタゲノミクスによる細菌と原生生物の群集解析 73

(国立大学法人京都大学 生態学研究センター)

要旨

1. はじめに
2. 研究開発目的
3. 研究開発方法
4. 結果及び考察
5. 本研究により得られた成果
6. 国際共同研究等の状況
7. 研究成果の発表状況
8. 引用文献

II-5 動物プランクトンの生産量評価に関する検討 88

(滋賀県琵琶湖環境科学研究センター)

要旨

1. はじめに
2. 研究開発目的
3. 研究開発方法
4. 結果及び考察
5. 本研究により得られた成果
6. 国際共同研究等の状況
7. 研究成果の発表状況
8. 引用文献

III. 英文Abstract 108

I. 成果の概要

課題名 5-1607 琵琶湖における有機物収支の把握に関する研究
 課題代表者名 早川 和秀 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター 総合解析部門副部門長)
 研究実施期間 平成28～30年度
 累計予算額 74,390千円
 (うち平成28年度 :25,217千円、平成29年度 :25,217千円、平成30年度 :23,956千円)
 累計予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード 有機炭素、微生物食物連鎖、一次生産、クロロフィル蛍光法、細菌生産、メタゲノミクス解析、細菌摂食、動物プランクトン生産、生分解、

研究体制

- (1) 環境因子と湖内生産量の関係整理および湖内生産量の明示化の検討
滋賀県琵琶湖環境科学研究センター)
- (2) 植物プランクトンの一次生産量の実測と環境因子との関係解析 滋賀県立大学)
- (3) 細菌生産の定量的解析 国立環境研究所)
- (4) メタゲノミクスによる細菌と原生生物の群集解析 京都大学)
- (5) 動物プランクトンの生産量評価に関する検討 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター)

1. はじめに 研究背景等)

琵琶湖では、水質保全の取り組みによって富栄養化が改善されてきたが、在来魚介類の減少やプランクトン種の変化など湖沼生態系の攪乱が一層顕在化した状況にある。琵琶湖の水質と生態系の保全を図ることは喫緊の課題であり、その取組は全国の湖沼の保全や再生の先駆けとなることから必要とされており、平成 27 年度には、琵琶湖の保全及び再生に関する法律が施行された。

在来魚が減少している原因には生息環境の劣化など様々あるが、近年は水産関係者からアユの餌不足が指摘されている。ゆえに在来魚介類の復活には、生食連鎖における下位生物の生産量やそれを支える栄養塩や有機物も考慮する必要がある。つまり、これからの水質管理には、湖内の有機物質収支を把握して湖の利水要件を満たす水質保全を継続しながら、水質から水産資源量までを包括した総合的な視点に基づく効果的な施策が求められている。有機炭素量は水質から生物量までを包括できる指標であり、有機炭素量の現存量やフローをモニタリングして、生態系モデルによる収支を見て施策のバランスをとることが有効である。

現在、湖沼で使われている水質管理モデルの中に生態系モデルが組み込まれているものの、生態系モデル自体の研鑽は進んでいない。それは動植物プランクトンの生産量などの精度の高い実測が少なく、モデルの検証が進んでいないためである。よって上記の管理手法を実現するためには、確度の高い有機物の生産速度等や物質収支の把握に関する科学的情報が必要である。特に、富栄養化から貧栄養化に向かう過程においては、植物プランクトンから高次捕食者へつながる生食食物連鎖だけでなく、有機物を利用する細菌を出発点とする微生物食物連鎖が高次捕食者へのエネルギー供給に貢献する度合いが大きくなる可能性がある（図1）。よって国内では実測例のほとんどない微生物食物連鎖に焦点を当てる必要がある。

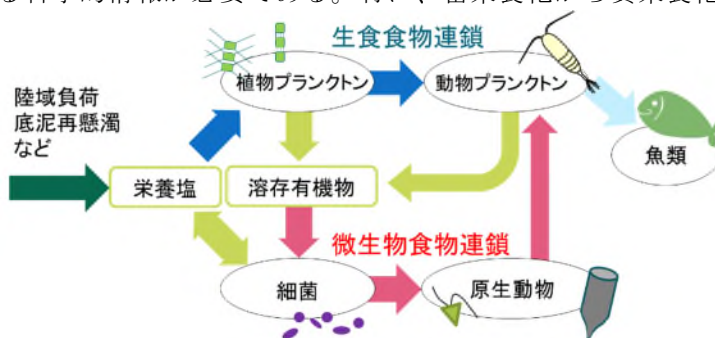


図1 湖沼の食物連鎖の模式図

2 研究開発目的

本研究では、琵琶湖における一次生産、細菌生産、動物プランクトンの生産について、野外の観測と室内実験を実施して有機物収支を把握して、水域内の食物連鎖にかかる物質循環の特性や問題点を明らかにすることを目的とした。また、このような有機炭素フローの把握を行うことで、湖沼環境の現状に合わせた確かつ効率的な水質管理や生態系管理が実現できるよう、湖の生産性の測定手法や管理指標の検討を行った。

サブテーマ1（以下サブ1と省略）では、微生物食物連鎖の起点である有機物について、有機物の微生物利用性の点で不明確となっていることが多いことから、微生物による有機物の生分解性の条件や微生物利用性の有機物のモニタリング指標、CODと有機炭素の関係を見直すことを目的とした。さらに、利用困難な有機物である難分解性有機物の細菌による生成についても検討した。サブ2では生食食物連鎖の起点である植物プランクトンの一次生産について、従来の手法よりも時空間的に高解像度の測定ができる光学的測定法を確立して、植物プランクトンの現存量、一次生産速度、種組成を明らかにすることを目的とした。さらにそれらと各環境因子（水温、光量子量、栄養塩濃度など）の関係性を評価した。サブ3では、微生物食物連鎖の中心である細菌生産量を、安定同位体の指標を用いた新たな測定方法を導入して、実測条件の検討やデータの収集を行うことを目的とした。国内で実測例のほとんどなかった細菌生産量の測定を国内の湖沼へ初めて適用した。サブ4では目覚ましい発展が見られる生物の分子系統解析を用いて、細菌種と原生生物の群集解析を空間・季節的に詳細に調査することを目的とした。また、優占種の細菌と各原生生物の摂食関係を考察した。サブ5では、琵琶湖における動物プランクトンの成長・生産量を測定するとともに、微生物食物連鎖の高次捕食者への貢献を検討することを目的として、細菌や原生生物を餌とした動物プランクトンの生存率、成長量、生産量や摂食・捕食速度、比取込み速度を室内試験および野外試験より求めた。最後にサブ1にて、以上のデータから低次食物連鎖網における有機炭素バイオマスとフローの収支をまとめて物質循環の特性を把握し、生態系保全に向けて対策すべき点を検討した。特に貧栄養化の影響により高次捕食者への餌が減少する懸念が考えられることから、流入負荷の増減がもたらす影響については食物連鎖モデルを構築して解析した。

3 研究開発の方法

(1) 環境因子と湖内生産量の関係整理および湖内生産量の明示化の検討

微生物による有機物の様々な条件下での利用性を検討するため、琵琶湖水で細菌を増殖させて様々な条件で湖水中の溶存有機物を分解させる生物分解試験を行った。採取した湖水を孔径0.2 μm Nucleporeフィルターでろ過した後にフラスコ中に試水と栄養塩や植種菌等を添加して、暗所振とうにて細菌を増殖させて、3、7日後の細菌数や有機炭素濃度(TOC)、溶存酸素(DO)の変化を調べた。

生分解性有機物量をモニタリングする手法として、BOD法の長期化改良による定量実用性を検討した。南湖2地点と北湖3地点において2015年4月～2018年12月に月1回表層水(水深0.5 m)を採水し、公定法のBOD₅と28日間培養したBOD₂₈の測定、それら試料のTOCを測定した。2018年1～8月には、南湖6B地点において、アリルチオ尿素添加により硝化反応を止めたBOD試験を行った。2017年8月～2018年7月の間に断続的に南湖1地点と北湖2地点の表層水にて、リン添加のBOD試験を検討した。同時にTOCも測定して有機物の分解状況も把握した。

琵琶湖におけるCODとTOCの関係性については、過去のデータより知見の整理を行った。過去の文献（岡本・早川2011, 佐藤ら 2016）で報告された琵琶湖およびその集水域の河川のBOD、COD、TOCと、100日生分解試験が行われた試料のBOD、COD、TOCのデータから、相関解析を行いデータの整理を行った。

D-アミノ酸は細菌特有の有機分子であり、バイオマーカーとして海洋では溶存有機物（DOM）の生成源への細菌寄与が調べられてきた。本研究ではその手法を湖沼に適用した。ガスクロマトグラフ質量分析計を用いたD-アミノ酸の化学分析技術を確立した後、琵琶湖の天然細菌を用いた培養実験によりバイオマーカーの端成分（End member）量を決定した上で、琵琶湖の湖水DOM中D-アミノ酸濃度の深度分布、季節変動を明らかにして、細菌の寄与度の定量を行った。琵琶湖北湖17Bの水深5 mと60 mの湖水を採取

し、DOCおよびD/Lアミノ酸の分析を行った。アミノ酸分析はYamaguchi & McCarthy (2018) の手法によった。また、Shen et al. (2015)の手法に基づき、北湖水で培地を作成した細菌培養試験を行った。

さらに、サブ1では研究プロジェクトの統括として各生物の有機炭素現存量や生産量の実測データを集約して俯瞰できるよう、フロー解析モデルであるエコパス (Ecopath) モデルを用いてまとめた。それらのデータを過去の琵琶湖のデータと比較した。

水域の健全性に関して検討して、物質循環の「円滑さ」の考え方から評価指標を提案した。同時に、貧栄養化の影響が懸念されている琵琶湖を対象として、流入負荷の増減がもたらす各生物種のバイオマスや健全性指標値への影響を、食物連鎖モデルを用いて解析した。モデルには、琵琶湖を対象とした簡易な食物連鎖モデルを構築した。琵琶湖全体を1ボックスの完全混合槽と仮定し、生物種の生産や捕食、呼吸、分解、沈降等を表現するモデルとして、モンテカルロ法により様々な食物連鎖を推定した。

② 植物プランクトンの一次生産量の実測と環境因子との関係解析

光学的手法を用いて、琵琶湖北湖沖域における植物プランクトンの一次生産速度、現存量（クロロフィルa濃度）、群集構造（珪藻、緑藻、シアノバクテリア）を時空間的に高解像度で測定し、植物プランクトン群集動態と各環境因子（水温、光量子量、栄養塩濃度など）との関係性の評価を行った。2017年8月21日から2018年10月21日、琵琶湖北湖多景島沖K4地点において、3深度にクロロフィル蛍光光度計と水中光量子計、深度計を係留して連続測定を行った。また、係留期間中の2017年11月6日と2018年7月11日、同年9月6日にプランクトンネットを用いて植物プランクトンをマイクロ植物プランクトン(> 20 μm)、ナノ植物プランクトン (5-20 μm)、ピコ植物プランクトン (< 5 μm) に分画し、各サイズの一次生産速度を測定した。同期間のK4地点において、月に一回の頻度で植物プランクトン群集構造（珪藻、緑藻、シアノバクテリア）を多波長励起クロロフィル蛍光計によって鉛直的に測定した。琵琶湖北湖全域におけるクロロフィルa濃度分布は、衛星Aquaに搭載された水色センサーMODISのデータを用いて算出した。

③ 細菌生産の定量的解析

安定同位体(^{15}N)で標識したデオキシアデノシン (dA) を細菌に取り込ませる ^{15}N -dA法 (Tsuchiya et al. 2015) を用い、琵琶湖における細菌生産の定量について検討した。初めに琵琶湖に最適な培養時間を決定した。試料に ^{15}N -dAを添加して培養後にDNAの固定を行い、DNA抽出まで-80℃で保存した。DNA抽出後、酵素反応によってヌクレオシドまで完全分解し、遊離してきた ^{15}N -dAをLC-MSで取り込み量を測定した。細菌現存量への変換係数は、検鏡による細胞数計測およびRT-PCRによる細菌16S rDNA濃度の測定より算出した。細胞当たりの炭素量は11 fgC cell^{-1} とした。

バクテリア呼吸速度は2017年9月から2018年11月に定点12Bの水深5 mにおいて測定した。濾過試水を300 mLのBODボトルに移し、現場温度に設定したインキュベータにおいて暗所下で培養した。培養開始から1〜5日後に、ウインクラ法を用いて酸素消費量を測定した。バクテリア呼吸速度の酸素から炭素への変換係数0.375を用いた。

一次生産の測定は、高速のパルス光を繰り返し照射してクロロフィル蛍光強度の時間変動を捉えるChelsea社製FRR (Fast Repetition Rate) 蛍光光度計(FastPro, 以下FRRFと略)を用い、Komatsu et al. 2015に準じて行った。また、湖沼における実際の一次生産の炭酸固定量とFRRFを比較検討するために、FRRFによる測定と同時に ^{13}C 法による測定も実施した。また、FRRF計は水中における微弱なクロロフィル蛍光を検出するため、強い太陽光が入射する環境では機器防御により計測を停止するので、強光下にある表層5 m以浅の測定が困難であった。この欠点を克服する改良を行った。

調査は琵琶湖定期水質調査地点に準拠し、2017年7月21日〜2018年11月21日まで琵琶湖北湖第二湖盆中央の12B地点において細菌生産の経時調査を実施すると共に、琵琶湖北湖第一湖盆 (ライン17: 4点)、北湖中央部 (ライン15: 3点) 第二湖盆 (ライン12: 4点) を選択し、多地点調査を実施した。また、2017年7月から細菌調査と呼吸調査の同時調査を行った。現場測定値は琵琶湖環境科学センターの保有する水質センサー (JFE Advantec AAQ) を用いて測定した。栄養塩 (全リン、全窒素、全溶存態リン、全溶存態窒素) は国立環境研究所 霞ヶ浦データベースの測定法に準拠して測定を実施した。

(4) メタゲノミクスによる細菌と原生生物の群集解析

琵琶湖北湖より得られたサンプルについて、Roche 454 GS-FLX Titanium sequencer (Roche Science, Mannheim, Germany)を用いてシーケンスを行い、細菌と原生生物の多様性を解析した。また、湖水中の原核生物（0.2–5.0 μm ）をサイズ分画により採集し、得られたサンプルから抽出したDNAを用いて、断片化した全DNAの網羅的シーケンスによるゲノムの再構築（ショットガンメタゲノム）を行い、湖水中の細菌の組成とその生理・代謝特性の推定を行った。原生生物については、CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence *in situ* Hybridization)を行い、細菌食者として重要と考えられた原生生物のグループごとに現存量の季節動態を調べた。原生生物による細菌の摂食による消費速度の測定については、琵琶湖から濃縮・集積した細菌を蛍光色素5-(4,6-ジクロロトリアジニル)アミノフルオレセイン (DTAF) で染色した細菌疑似餌 (FLB) を作成し、原生生物による細菌に対する摂食速度を測定した。

(5) 動物プランクトンの生産量評価に関する検討

琵琶湖北湖の今津沖中央17Bにおいて2016年～2018年に月1回の頻度で野外調査を実施し、動物プランクトン（ミジンコ類とカイアシ類）の現存量を把握するとともに、抱卵数等から生産量を推定した。一方、現在の琵琶湖の動物プランクトンが、植物プランクトンだけでなく微生物（細菌や原生生物）の積極的な利用を検証するため、まず、培養実験で動物プランクトンによる微生物の摂食の有無を確認した。次に、微生物と植物プランクトンを餌に用いた培養実験により、ミジンコの生存率、成長量、再生産量（産仔）を評価し、異なる餌間で結果を比較した。最後に、2018年に琵琶湖北湖南比良沖中央12Bにおいて実施した野外実験や ^{13}C トレーサー法を用いた室内実験により、現場に近い環境下においての微生物や植物プランクトンに対する動物プランクトンの摂食・捕食速度、比取込み速度を求め、どの種類、サイズの餌生物をより利用しているのかを評価した。

4. 結果及び考察

(1) 環境因子と湖内生産量の関係整理および湖内生産量の明示化の検討

微生物食物連鎖の起点となる有機物について、生分解性（生物利用性）の質について検討を行った結果、琵琶湖水中の溶存有機物の生分解率は低く、栄養塩の添加、植種菌、ミネラル、共代謝する有機物、例えば安息香酸エステルの添加、超音波や紫外線照射等の様々な促進条件に対しても耐性のあることが確認された。栄養塩リンの添加は細菌の代謝活性（酸素消費）を高めるが、有機物の無機化にはつながらなかった。

有機物の生分解性を評価するには、BODを利用することが有効なことが再評価された。琵琶湖水中での生分解は有機物の無機化に先立って有機物の変質が起こっており、生分解の測定には、TOCよりも酸素消費を測定した方が感度よく検出できる。BOD₅では琵琶湖水に対して測定下限となることが頻発していたが、BOD₂₈を用いることで、精度よく評価できることを確認した。

生分解試験におけるCODとTOCの比較から、琵琶湖においてCODは生分解の酸素消費量を直接示すものでないことが示された。ただし、CODは相対的な試水の有機物濃度（序列）には対応した指標である。

細菌由来の有機物指標となるD/L-アミノ酸の解析より、琵琶湖の難分解性DOMには、細菌由来DOMとそれ以外（植物プランクトン由来など）、少なくとも二種類の生成源を明らかにした。琵琶湖表層の準易分解性DOMは、主に真核植物プランクトン由来であった。

各実測値にもとづく琵琶湖沖帯の有機炭素収支を概算すると（図2）、細菌炭素要求量は一次生産量の約50%に相当していた。しかしながら、呼吸を引いた細菌生産量では値が小さく、微生物食物連鎖の上位の捕食者へのエネルギー供給源として乏しいことが明らかとなった。現在の琵琶湖は、1990年代に比べて植物プランクトン等の現存量は減少していないが、生産効率が落ちている可能性がある。

水域の健全性に関して、物質循環の「円滑さ」の考え方から評価指標を提案するとともに、貧栄養化の影響が懸念されている琵琶湖を対象として、流入負荷の増減がもたらす各生物種のバイオマスや健全性指標値への影響を、食物連鎖モデルを用いて解析した。解析結果からは、流入負荷を増やしても魚類が増加しないか、あるいは魚食性魚のみが増加する可能性が示唆された。

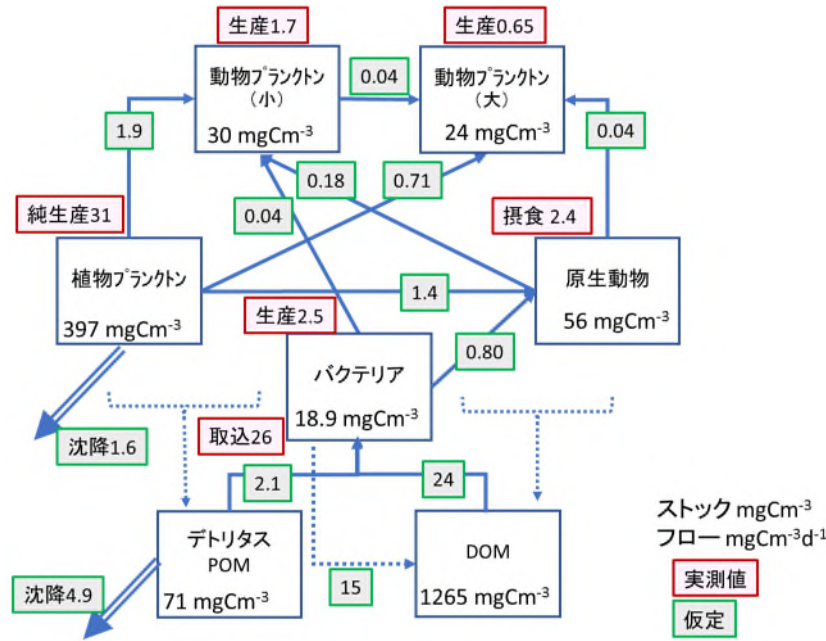


図2 エコパスモデルで推定された有機炭素収支

② 植物プランクトンの一次生産量の実測と環境因子との関係解析

琵琶湖における植物プランクトンの単位面積あたりの日間一次生産速度を測定・算出した結果、観測期間中、植物プランクトンの一次生産速度は0～3.92 (平均1.11) g C m⁻² d⁻¹の範囲を変動し、春 (4～6月)・夏期 (7～9月) に増加、秋 (10～12月)・冬期 (1～3月) に低下する傾向を示した (図3)。

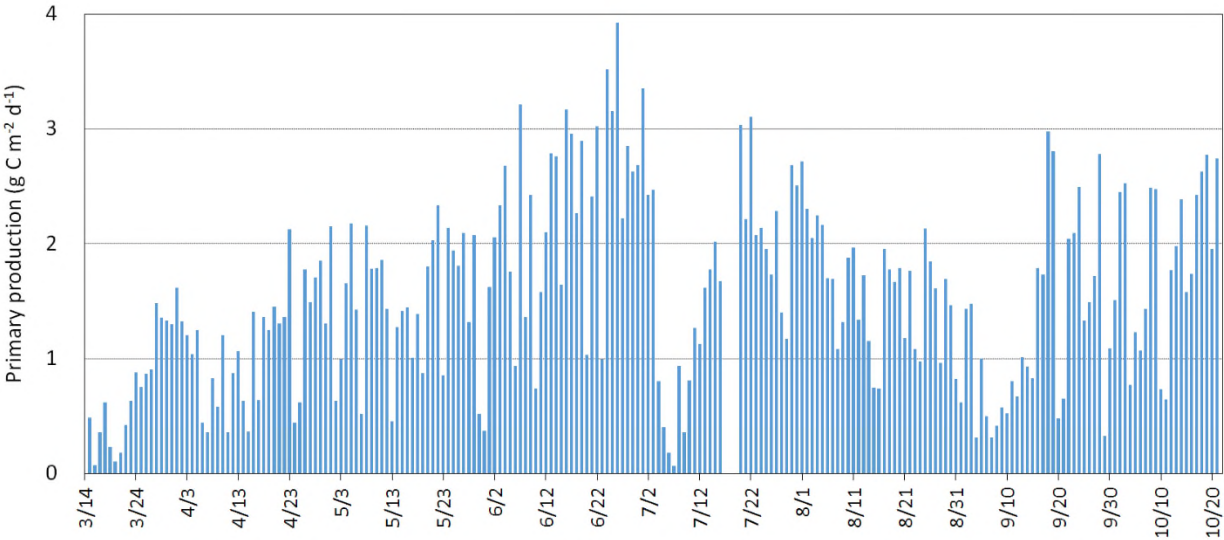


図3 琵琶湖北湖沖帯における一次生産速度の季節変化 (2018年3月～10月)

2018年春期後半における一次生産速度は最大でおよそ4 g C m⁻² d⁻¹に達し、琵琶湖北湖沖域で過去に報告された値の中でもっとも高い速度となった。この時期における高い一次生産速度は、主に、大型緑藻2種 (*Staurastrum dorsidentiferum*, *Micrasterias hardyi*) が担っていた。観測期間中に発生した台風や大雨などの気象イベントは、水中の光環境や栄養環境を大きく変化させ、一次生産速度に大きな影響を与えていた。一般に、台風や降水による気象イベントは栄養塩供給を増加させ、一次生産速度を増加させるが、極度に濁度を増加させる気象イベント (雨台風、集中豪雨) は一次生産速度を数週間にわたって低下させることが明らかとなった。全観測期間を通じて、一次生産速度の変動は概ね水中光量子量で説明

できたが、植物プランクトンのブルーム時には現存量（クロロフィルa濃度）の寄与も高くなった。

(3) 細菌生産の定量的解析

^{15}N -dA 法を琵琶湖に適用するにあたり、琵琶湖に最適な培養時間、琵琶湖の細菌の細胞当たりの炭素量、琵琶湖の細菌の 16S rDNA 含量の測定を行い、測定値を琵琶湖に最適化した。また、FRRF による現場一次生産測定法について、透明度の比較的高い琵琶湖への適用を試み、650 nm ショートパスフィルターの装着により、琵琶湖有光層全深度の一次生産の測定に成功した。これらの手法を用いて 2016 年 7 月から 2018 年 11 月まで毎月、琵琶湖北湖第二湖盆中央において、7 深度で細菌生産を測定（図 4）、2017 年度からは細菌呼吸も測定するとともに、季節ごとに FRRF を用いて一次生産の測定を行った。また、2018 年に 3 月、5 月、7 月、11 月の 4 回にわたり、北湖の多地点において、細菌生産及び一次生産の同時測定を行い、季節変化及び地点変化の計測を行った。その結果、呼吸が炭素消費に占める割合が大きいため、特に、20 m 以深における呼吸の正確な測定が重要であることが示された。これまで、これほど多地点、長期間の細菌生産と一次生産のデータはなく、現在の琵琶湖の状況を正確に把握するとともに、今後の変化推定へのベースデータを取得することができた。また、これらの検討の結果、細菌生産と一次生産の季節変動には時間的ずれがあること、また深さ方向、地点間のそれぞれの活性についても異なることが明らかとなった。一方、多くのデータを入力し俯瞰した結果、一次生産はリンの影響を受け、細菌生産は水温と DOC 及びリンの影響を受けている可能性が示された。

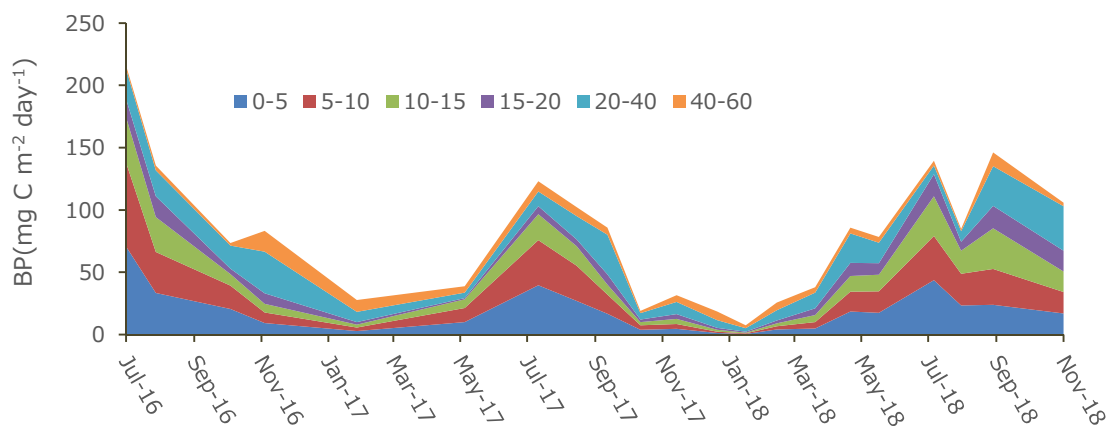


図4 水柱の細菌生産の季節変化

(4) メタゲノミクスによる細菌と原生生物の群集解析

琵琶湖北湖において、細菌と原生生物の現存量と種・グループレベルでの組成を季節的かつ鉛直的に測定し、さらに原生生物による細菌消費速度の測定、および細菌摂食者として重要な原生生物グループの推定を行った。細菌現存量は、4月から7月の表水層で特に高くなり、その他は9月から11月の表水層で比較的高くなった。表水層・深水層を通じて優占した細菌系統は *Bacteroidetes* と *Actinobacteria* であった（図5）。表水層では、上記2つの門の細菌に加えて *Betaproteobacteria* と *Alphaproteobacteria* の細菌門も多く見られ、深水層では上記2つの細菌門に加えて *Chloroflexi* や *Planctomycetes* 門の細菌も優占した。ショットガンメタゲノム解析では、琵琶湖で優占する50以上の細菌系統のゲノムを培養非依存的に決定した。その結果、新奇未培養細菌の一大系統群を含む琵琶湖の細菌群集の多様性の高さが示された。得られたゲノムにコードされている遺伝子の解析により各細菌系統の生理・生態的な特徴を予測した。原生生物群集解析の結果、表水層では *Cryptophyta*、深水層では *Dinophyta* の、いずれも鞭毛虫が優占した。細菌摂食者として重要と考えられた原生生物は、*Cercozoa*、*Kathablepharida*、*Pedinellids*、*Kinetoplastids* の鞭毛虫であった。繊毛虫は7月から9月の表水層で現存量が高く、細菌摂食者として重要であると示唆された。細菌生産速度と原生生物による細菌消費速度との比較から、水温が比較的高くかつ安定した表水層において細菌と原生生物との間の食物連鎖が活発となることが示された。

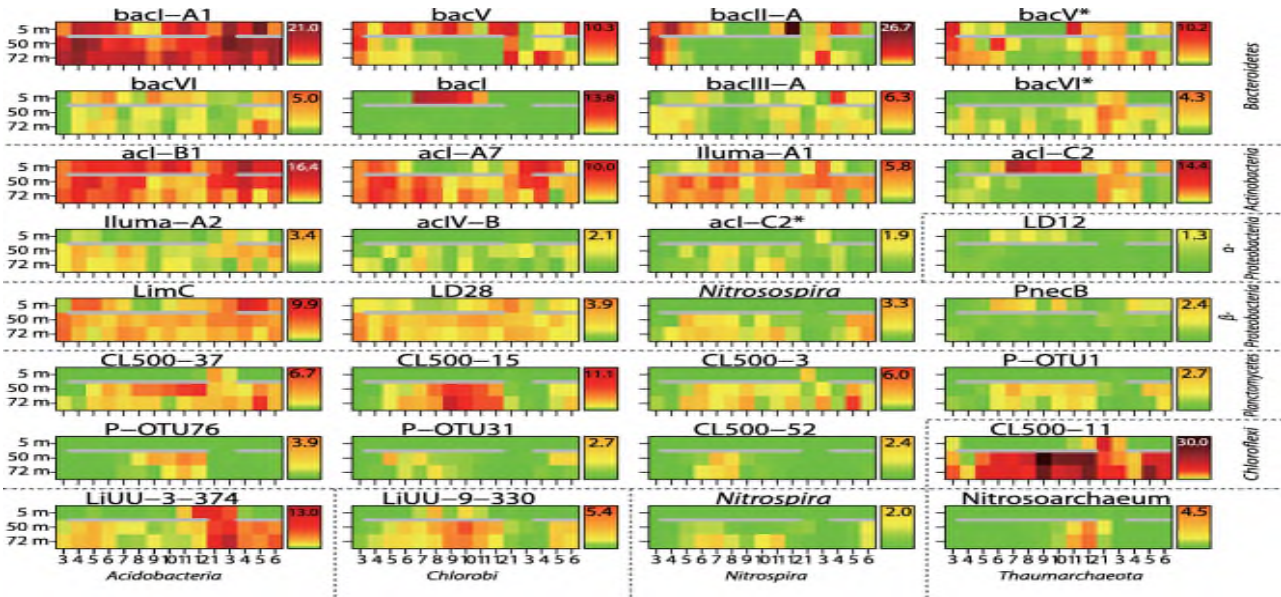


図5 琵琶湖北湖における各種細菌・古細菌の鉛直分布の季節動態

6) 動物プランクトンの生産量評価に関する検討

野外調査の結果、琵琶湖の動物プランクトン（ミジンコ類とカイアシ類）の現存量は、1980～1990年代と同程度の水準であった。餌の植物プランクトンが経年的な減少傾向にあるにもかかわらず、動物プランクトンが過去と同程度の現存量を維持できている要因の一つには、微生物等の他の餌生物を積極的に利用し始め、効率的な個体群増殖ができている可能性が考えられた。

微生物を餌にした培養実験により、琵琶湖の動物プランクトンは、微生物を積極的に摂食・捕食することを確認した。一方、微生物と植物プランクトンを餌に用いた培養実験の結果では、細菌や原生生物（アメーバ、繊毛虫等）を摂食・捕食しても、ミジンコの体成長量や再生産量がクロレラに比べて低くなった（図6）。この結果から、餌が微生物の場合には、植物プランクトンの場合に比べて、ミジンコ類の生産性が低くなる可能性が示された。

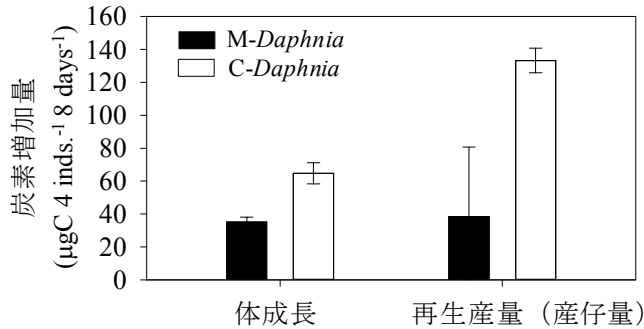


図6 2種類の餌処理系（餌量1.98 mgC L⁻¹）におけるプリカリアの体成長および再生産での炭素増加量。

M-Daphniaは微生物群の餌、C-Daphniaはクロレラの餌。平均±SD。

野外実験や¹³Cトレーサー法の室内実験の結果から、動物プランクトンの摂食・捕食速度、比取込み速度は、植物プランクトンに対して方が微生物に対してよりも高く（11月実験での比取込み速度は除く）、餌生物の中では、<20 µmの小型の植物プランクトンを最も多く摂食していることが分かった。しかし、微生物や他のサイズの植物プランクトンを全く利用していない訳ではなく、動物プランクトンは、時期によっては、微生物や20-45 µmの植物プランクトンも積極的に利用していた。この微生物や20-45 µmの植物プランクトンを積極的に利用するか否かには、動物プランクトンの種組成や餌生物の組成が影響していると考えられた。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

生態系保全を考慮した水質管理施策を実現するために必要となる、確度の高い一次生産や細菌生産などの測定手法の確立と実測、および細菌を出発点とする微生物食物連鎖の生産に対する貢献を明らかにするため、琵琶湖における低次生態系の生産量や有機物収支の把握を行った。その結果、以下の成果を得た。

- ◇ 一次生産では、パルス変調式クロロフィル励起蛍光法などの光学的手法を組み合わせることで日間一次生産速度の測定法を確立し、季節変動や気象イベントに応答する植物プランクトンの一次生産速度の変化を観測できた。これらは従来の測定法では捉えることができなかった植物プランクトン動態に関する現象であり、琵琶湖北湖における水質や一次生産を考える上で有用な知見となった。
- ◇ 細菌生産では、 ^{15}N -デオキシアデノシン法を用いた細菌生産の定量が確立し、これまでに現場での測定が困難であった細菌生産に関して、国内に類を見ない多地点、多頻度の細菌生産測定を行えるようになった。その結果、これまで知られていなかった湖内の地点間や深さ方向の細菌活性の違い、長期的な琵琶湖の細菌生産の変化を明らかにした。
- ◇ 細菌と原生生物の現存量と種・グループレベルでの群集組成をメタゲノミクス解析によって空間・季節的に詳細に明らかにして、新規未培養細菌の一大系統群を含む琵琶湖の細菌群集の多様性の高さを見出した。特に世界的にも稀有であった湖沼の細菌系統の生態に関する情報のみならず、断片化した全DNAの網羅的シーケンスによるゲノムの再構築により、細菌の生理・代謝特性の推定まで行った点は、従来の研究を国際的に凌駕する成果を得た。
- ◇ 動物プランクトンの毎月調査の結果、琵琶湖の動物プランクトンの現存量は、1980年代～1990年代と同程度の水準であることを確認した。細菌や原生生物の捕食による動物プランクトンの成長や生産を培養・野外実験から評価した結果、例外はあるものの、琵琶湖の動物プランクトンの生産性は、細菌や原生生物よりも植物プランクトンの捕食で高いことを見出した。
- ◇ 琵琶湖水中に含まれる難分解性の溶存有機物は微生物による生分解に対して促進を施しても耐性のあることが明らかとなった。有機物の生分解性の評価には、 BOD_{28} を用いることで精度よく評価できることを確認した。 COD は生分解時に起こる酸素消費量と等量でないことが示された。
- ◇ D-アミノ酸バイオマーカーを用いた細菌由来DOMの寄与度定量を、湖沼環境でも適用可能なアプローチとして世界で初めて確立した。細菌由来の有機物指標となるD/L-アミノ酸の解析より難分解性溶存有機物として細菌由来と真核植物プランクトンなどの、少なくとも二種類の異なる生成源を明らかにした。
- ◇ 食物連鎖モデルを用いて、栄養塩流入負荷の増減がもたらす各生物種のバイオマスや健全性指標値への影響を解析した結果、流入負荷を増やしても魚類が増加しないか、あるいは魚食性魚のみが増加する可能性が示唆された。
- ◇ 各実測値にもとづく琵琶湖沖帯の有機炭素収支を概算すると、細菌炭素要求量は一次生産量の約50%に相当していた。しかし細菌の呼吸を引いた細菌生産量は小さく、微生物食物連鎖の上位の捕食者への有機物供給は乏しいことが明らかとなった。現在の琵琶湖にとっての望ましい食物連鎖の流れは、 $<20\ \mu\text{m}$ の小型の植物プランクトンから動物プランクトンを経て高次捕食者へ至るパスであると考えられ、今後の琵琶湖保全の施策の方向性が見出された。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

- ◇ 湖沼水質保全特別措置法に基づく第7期琵琶湖に係る湖沼水質保全計画では、我々研究グループ

が提案していた生態系保全を視野に入れた有機炭素等による水質管理の重要性が認められ、生態系保全も視野に入れたTOC等による水質管理手法の検討を位置づけるとともに、従来のCODによる水質目標の提示に加えてTOCによる水質目標が提示された。

- ◇ 滋賀県庁で水産課を中心に立ち上げられた「アユの不漁原因解明に係る検討会」において、アユ不漁のその原因解明と対策の協議に、研究で得た動物プランクトンの密度、現存量、生産量に関わるデータの一部を情報提供した。検討会では、関係部局より提出された資料をもとにアユの不漁原因の絞り込みが行われ、滋賀県議会環境・農水常任委員会に報告された。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

- ◇ 有機炭素による低次生態系のバイオマスとフローの記載により、低次生態系の生産実態の把握が可視化された。今後、湖岸造成、河床耕耘、魚類の水田生育事業などの水域生態系や水産資源の保全施策が展開される中において、水質汚濁とのトレードオフや新たな生態系の変化につながらないよう、取組を総合的な視点から成果を測る指標として、上記成果を基にした有機炭素ベースによる環境評価の活用が考えられる。
- ◇ 本研究プロジェクトの中間報告では、生態系保全を視野に入れた水質管理を検討する科学的な情報蓄積のため、公共用水域の水質モニタリングにおいて、現状のCODに併用して有機炭素（TOC）の計測を行うことを政策提案した。この提案は、島根県や埼玉県などいくつかの自治体で関心をもたれており、今後、有機炭素の計測の利用が見込まれる。
- ◇ 海域や湖沼における環境基準として設定されているCODについては、水質を示す指標としての妥当性に疑問があるなどの問題があり、行政部局により科学的知見を網羅的に整理した上で取扱いを検討すべき課題がある。本研究のCODとTOCの関係整理は、湖沼や河川その他排水を網羅した情報となっていることから、課題検討での資料として活用が見込まれる。
- ◇ 植物プランクトンから動物プランクトン、および動物プランクトンからプランクトン食性魚への転換効率の向上が「水がきれいである」環境のために重要であることが明らかになった。換言すれば、捕食者に食べられやすいプランクトンを増加させることが、生態系に配慮した水質管理の上で重要といえる。
- ◇ 養殖のりの品質改善や魚介類の増加を目的として、瀬戸内海などでは下水処理場からの栄養塩の供給などが実施されているが、琵琶湖における安易な栄養塩の添加は、水質は悪化するが魚類は増えないか、あるいは漁獲対象ではない魚種が増えるなど、望まない結果をもたらす可能性があることに留意する必要がある。
- ◇ 琵琶湖に係る湖沼水質保全計画の策定についての施策の土台となる一次生産及び細菌生産の貴重なデータを取得し、過去との比較から現状の琵琶湖の状況についての科学的認識が深まった。次期の第8期琵琶湖に係る湖沼水質保全計画に向けて、本研究の結果をもとに水質生態系モデルによる水質と生物生産に関する正確な予測を行うことができる。さらに、国立研究開発法人国立環境研究所琵琶湖分室の設立時に行われた研究として、国立環境研究所琵琶湖分室と滋賀県琵琶湖環境科学研究センターの共同研究の先鞭となった。
- ◇ 本研究の一次生産と植物プランクトンの光学的測定法は、高解像度で一次生産速度を測定でき、また、測定にかかるコストも低いため、今後の湖における植物プランクトン群集の現存量、群集構造、一次生産速度のモニタリングに活用できると期待される。一次生産量は水域の健全性を考える上でも重要な要素である。今後、水質管理と水産資源管理のそれぞれの部局と連携を強化して活用方法について検討を進めることが必要である。
- ◇ また、本研究結果で得られた気象イベントに対する一次生産速度と植物プランクトン群集構造解析の結果は、大型緑藻の*Staurastrum dorsidentiferum*と*Micrasterias hardyi*の増殖特性と環境因子の関係

を明示した。大型緑藻の増大は、プランクトン食魚の餌環境や湖底の酸素消費へ影響を及ぼす可能性があり、それらの状態を危惧する琵琶湖環境の保全・再生にとって重要な知見となった。今後、大型緑藻の制御に向けた栄養塩管理に方策を検討すべきである。

- ◇ 我が国の多くの湖沼ではCODが環境基準を超えており、その低減のための早急な対策が求められている。CODの大きな部分はDOMによって占められているため、CODの低減のためには微生物によるDOM低減効率を高める方策が求められる。DOMの低減にかかる科学的知見には、細菌による生分解だけでなく、捕食や排泄といった微生物食物網も関与した機構の理解が必要である。本研究は、湖沼の微生物食物網を解明する手立てを示した。
- ◇ 動物プランクトンは、湖沼のプランクトン食魚の餌資源であり、その変動は植物プランクトンの発生状況だけでなく、移入種の出現や水温上昇等によって変わりうる。それゆえ、プランクトン食魚を生態系資源として保全をめざす湖沼では、動物プランクトンの現存量、生産量、摂食・捕食量の情報取得やモニタリングは重要である。本研究の成果は、1990年代以降、不足していた動物プランクトンの情報として貴重であり、今後、上記湖沼での参考資料としての活用が期待される。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) Y. OKAZAKI, S. FUJINAGA, A. TANAKA, A. KOHZU, H. OYAGI, S. NAKANO: ISME J. 11, 2279-2293 (2017), Ubiquity and quantitative significance of bacterioplankton lineages inhabiting the oxygenated hypolimnion of deep freshwater lakes.
- 2) I. MUKHERJEE, Y. HODOKI, S. NAKANO: Aquat. Microb. Ecol. 80, 123-137 (2017), Seasonal dynamics of heterotrophic and plastidic protists in the water column of Lake Biwa, Japan.
- 3) M. MEHRSHAD, M. M. SALCHER, Y. OKAZAKI, S. NAKANO, K. ŠIMEK, A. S. ANDREI, R. GHAI: Microbiome 6, 176 (2018), Hidden in plain sight—highly abundant and diverse planktonic freshwater Chloroflexi.
- 4) 早川和秀、岡本高弘、廣瀬佳則、佐藤祐一: 水環境学会誌、41(6), 193-203 (2018), 低濃度有機汚濁水域における有機物指標の特性把握: 琵琶湖流域における COD(Mn), BOD, TOC の比較から.
- 5) 永田貴丸、廣瀬佳則、岡本高弘、早川和秀: 日本水処理生物学会誌、54(3), 73-82 (2018), ミジンコの生存、成長および再生産に対する従属栄養性鞭毛虫の餌としての影響.
- 6) 塚本浩貴、後藤直成、吉原亜悠、高木裕太、新井那莉、林正能、石坂丞二: 日本リモートセンシング学会誌、39(2), (印刷中) (2019) 衛星リモートセンシングを用いた琵琶湖におけるクロロフィルa濃度の推定.

<その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 早川和秀、廣瀬佳則、岡本高弘、佐藤祐一、永田貴丸、今井章雄、富岡典子、小松一弘、土屋健司、中野伸一、程木義邦、後藤直成、田仲輝子、浅見正人、小松直樹: 第17回世界湖沼会議発表論文集, 374-376 (2018) 「琵琶湖における有機物指標の検討」
- 2) S. NAKANO, K. HAYAKAWA, Y. HODOKI, Y. OKAZAKI, I. MUKHERJEE, S. D. THOTTATHIL, H. TAKASU, S. FUJINAGA: 第17回世界湖沼会議発表論文集, 304-306 (2018) “Long-term Changes in Water Quality of Lake Biwa with Special Reference to Organic Matter Dynamics and Microbial Ecology”
- 3) 佐藤祐一、早川和秀、永田貴丸、尾原禎幸、廣瀬佳則、七里将一、岡本高弘、山口保彦、酒井陽一郎: 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター試験研究報告書 平成29年度版 (2018) 「政策課題研究3 生態系保全につながる物質循環のあり方に関する研究」

(2) 主な口頭発表 (学会等)

- 1) Y. OKAZAKI, S. FUJINAGA, A. TANAKA, A. KOHZU, H. OYAGI, and S. NAKANO: 16th International Symposium on Microbial Ecology, Montreal, Canada, (2016) "Unique bacterioplankton lineages ubiquitously inhabit oxygenated deep waters of freshwater lakes"
- 2) K. TSUCHIYA, T. TODA, T. SANO, N. TOMIOKA, A. IMAI, N. KAWASAKI, H. FUKUDA, K. HAMASAKI, Y. TSUDA, S. SHIMODE: SIL XXXIII Congress (2016) "Comparison between [^{15}N]-deoxyadenosine method and [^3H]-thymidine method for measuring bacterial production in aquatic environments"
- 3) 早川和秀, 岡本高弘, 廣瀬佳則, 佐藤祐一: 日本陸水学会第81回沖縄大会 (2016)
「琵琶湖におけるCODとTOCの相関性について」
- 4) 後藤直成, 加藤良太, 落合伸陽, 塚本浩貴: 日本陸水学会第81回沖縄大会 (2016)
「クロロフィル蛍光を利用した植物プランクトン現存量測定法の高精度化」
- 5) 塚本浩貴, 後藤直成, 林正能, 石坂丈二: 海洋・湖沼リモートセンシング研究会 (2016)
「衛星リモートセンシングを用いた琵琶湖におけるクロロフィルa濃度分布の推定」
- 6) 富岡典子, 土屋健司, 小松一弘, 福島路生, 高津文人, 霜鳥孝一, 篠原隆一郎, 今井章雄: 日本陸水学会第81回沖縄大会 (2016) 「貧中栄養湖における細菌群集と環境因子の関連について」
- 7) 小松一弘, 今井章雄, 富岡典子, 高村典子, 中川恵, 霜鳥孝一, 高津文人, 篠原隆一郎: 日本陸水学会第81回沖縄大会 (2016)
「Fast Repetition Rate Fluorometry (FRRF)法による実湖沼水中一次生産速度の測定」
- 8) 永田貴丸, 早川和秀: 日本陸水学会第81回大会 (2016)
「ミジンコ類と原生動物との捕食-被食関係について」
- 9) K. HAYAKAWA, R. KOJIMA, C. WADA, T. SUZUKI, Y. SUGIYAMA, T. KUMAGAI, N. TAKEI, D. BAMBA: 18th International Conference of International Humic Substances Society, Kanazawa, Japan, (2016) "Distribution and characteristics of ultraviolet absorption and fluorescence of dissolved organic matter in a large lake (Lake Biwa, Japan)."
- 10) 廣瀬佳則, 岡本高弘, 古角恵美, 早川和秀, 佐藤祐一, 田仲輝子, 川崎竹志: 第51回日本水環境学会年会 (2017) 「BODからみた琵琶湖における生分解性有機物について」
- 11) 岡本高弘, 廣瀬佳則, 田中 稔, 七里将一, 古角恵美, 早川和秀, 佐藤祐一, 川崎竹志, 田仲輝子: 第51回日本水環境学会年会 (2017) 「琵琶湖における長期BODの測定について」
- 12) 早川和秀: 第44回 BMS (Biological Mass Spectrometry) カンファレンス (2017)
「基調講演 琵琶湖環境の現状～課題と保全・再生に向けて～」
- 13) Y. OKAZAKI, S. FUJINAGA, A. TANAKA, A. KOHZU, H. OYAGI, and S. NAKANO : 17th International Symposium on River and Lake Environments & 3rd International Symposium on Aquatic Botany, Kusatsu, Japan, (2017) "Ubiquitous bacterioplankton lineages inhabiting the oxygenated hypolimnion of freshwater lakes"
- 14) I. MKHERJEE, Y. HODOKI, Y. OKAZAKI, S. FUJINAGA, K. OHBAYASHI and S. NAKANO : 17th International Symposium on River and Lake Environments & 3rd International Symposium on Aquatic Botany, Kusatsu, Japan, (2017) "Dominance of kinetoplastid flagellates in the oxygenated hypolimnion of Japanese deep lakes: underestimation of euglenozoans in molecular diversity studies"
- 15) S. NAKANO, K. HAYAKAWA, Y. HODOKI, Y. OKAZAKI, I. MUKHERJEE, S. D. THOTTATHIL, H. TAKASU, S. FUJINAGA: the second International Conference on Life Science and Biotechnology (ICOLIB), Jember, Indonesia, (2017) "Long-term changes in water quality in Lake Biwa with special reference to organic matter dynamics, microbial ecology and diversity"
- 16) 今井章雄: 第20回日本水環境学会シンポジウム (2017)
「湖沼における溶存有機物の研究－国環研20年の歩み」,
- 17) 富岡典子, 土屋 健司, 小松一弘, 高津文人, 今井章雄, 早川和秀, 廣瀬佳則, 岡本高弘, 永田貴丸:

- 日本陸水学会第 82 回仙北市田沢湖大会 (2017)「琵琶湖北湖における微生物群集の季節変化」
- 18) 早川和秀、廣瀬佳則、岡本高弘、佐藤祐一、永田貴丸、後藤直成、中野伸一、富岡典子、今井章雄：日本陸水学会第82回仙北市田沢湖大会 (2017)「琵琶湖水における有機物の生分解性について」
 - 19) 後藤直成、新井那莉、塚本浩貴、林正能、石坂丞二：日本陸水学会82回仙北市田沢湖大会 (2017)「衛星リモートセンシングによる琵琶湖におけるクロロフィルa濃度分布の解析」
 - 20) I. MUKHERJEE, Y. HODOKI, Y. OKAZAKI, S. NAKANO：日本陸水学会第82回仙北市田沢湖大会 (2017) “Unknown protists with high grazing characterize the oxygenated hypolimnion of Lake Biwa”
 - 21) K. HAYAKAWA：14th Tripartite Presidents Meeting among NIES, NIER and CRAES (TPM) International Workshop, Tsukuba, Japan (2017) "Lake health assessment of carbon flow and stocks in Lake Biwa"
 - 22) Y. OKAZAKI, S. NAKANO: 15th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, Zagreb, Croatia, (2017) "Vertical stratification of the viral community in a deep freshwater lake" SAME-15:
 - 23) 廣瀬佳則、岡本高弘、古角恵美、早川和秀、佐藤祐一、浅見正人、田仲輝子：第44回環境保全・公害防止研究発表会 (2017)「琵琶湖における酸素消費量と有機物分解との関係について」
 - 24) 土屋 健司、佐野友春、富岡典子、小松一弘、高津文人、今井章雄、早川和秀、岡本高弘: 2017 年日本プランクトン学会・ベントス学会合同大会 (2017)「琵琶湖北湖におけるバクテリア生産量の季節変動」
 - 25) 永田貴丸、早川和秀：2017 年日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会 (2017)「¹³C トレーサーを用いたミジンコ類と微生物との捕食－被食関係の把握」
 - 26) 佐藤祐一、早川和秀：第 52 回日本水環境学会年会 (2018)「物質循環からみた琵琶湖の健全性評価：循環の「円滑さ」を表す指標の提案」
 - 27) Y. OKAZAKI, Y. NISHIMURA, H. OGATA, T. YOSHIDA, S. NAKANO: 17th International Symposium on Microbial Ecology, Leipzig, Germany, (2018) “Comprehensive viromics uncovered the diverse viral community in a deep freshwater lake”
 - 28) 今井章雄：滋賀大学教育学部化学教室理科教育研究会（フラスコ会）総会 (2018)「国立環境研究所の概要と琵琶湖分室の研究活動について」
 - 29) 土屋 健司、佐野友春、富岡典子、小松一弘、高津文人、今井章雄、早川和秀、岡本高弘、廣瀬佳則：第 52 回日本水環境学会年会 (2018)「琵琶湖北湖の細菌生産動態」
 - 30) 今井章雄：滋賀バイオ産業振興機構平成 29 年度第 2 回バイオ技術研究セミナー(2018)「国立環境研究所の概要と琵琶湖分室の研究について」
 - 31) 早川和秀、佐藤祐一、永田貴丸、岡本高弘、廣瀬佳則、後藤直成、土屋健司、小松一弘、富岡典子、今井章雄、中野伸一：日本陸水学会第83回岡山大会 (2018)「微生物食物網を考慮した琵琶湖の物質循環の課題について」
 - 32) 後藤直成、塚本浩貴、岩木真穂：日本陸水学会第83回岡山大会 (2018)「琵琶湖北湖における一次生産の季節変動」
 - 33) 霜鳥孝一、今井章雄、佐藤貴之、小松一弘、高津文人、川崎伸之：日本陸水学会第 83 回岡山大会 (2018)「全有機炭素検出器を用いたサイズ排除クロマトグラフィーによる溶存有機物の分子サイズ分析と特性評価」
 - 34) 風間健宏、霜鳥孝一、早川和秀、今井章雄、小松一弘：日本陸水学会第 83 回大会岡山大会 (2018)「新型高速フラッシュ蛍光光度法 (FRRf) を用いた湖沼一次生産速度のリアルタイム測定」
 - 35) 永田貴丸、廣瀬佳則、岡本高弘、早川和秀：日本陸水学会第 83 回岡山大会 (2018)「ミジンコの成長と再生産に対する微生物群の餌としての影響」
 - 36) S. NAKANO, K. HAYAKAWA, Y. HODOKI, Y. OKAZAKI, I. MUKHERJEE, S. D. THOTTATHIL, H. TAKASU, S. FUJINAGA: The 17th World Lake Conference, Tsukuba, Japan (2018) “Long-term Changes in Water Quality of Lake Biwa with Special Reference to Organic Matter Dynamics and Microbial Ecology”

- 37) 早川和秀、廣瀬佳則、岡本高弘、佐藤祐一、永田貴丸、今井章雄、富岡典子、小松一弘、土屋健司、中野伸一、程木義邦、後藤直成、田仲輝子、浅見正人、小松直樹：第17回世界湖沼会議（2018）「琵琶湖における有機物指標の検討」
- 38) 尾原禎幸、岡本高弘、早川和秀、佐藤祐一、奥田一臣、田仲輝子、廣瀬佳則、古角恵美：全国環境研協議会第45回環境保全・公害防止研究発表会（2018）「BODの長期化による琵琶湖における易分解性有機物の把握について」
- 39) 後藤直成：日本リモートセンシング学会海洋・湖沼リモートセンシング研究会（2018）「衛星リモートセンシングを用いた琵琶湖におけるクロロフィルa濃度の推定」
- 40) 後藤直成：平成30年度ISEE研究集会「水圏クロロフィル蛍光に関する知識統合と研究戦略」（2018）「水中クロロフィル蛍光計を用いたクロロフィルa濃度測定法の高精度化」
- 41) 風間健宏、霜鳥孝一、早川和秀、今井章雄、小松一弘：平成30年度ISEE研究集会「水圏クロロフィル蛍光に関する知識統合と研究戦略」（2018）「新型高速フラッシュ蛍光光度法（FRRf）を用いた湖沼一次生産速度のリアルタイム測定」
- 42) 小松一弘、富岡典子、土屋健司、早川和秀、永田貴丸：平成30年度ISEE研究集会（2018）「水圏クロロフィル蛍光に関する知識統合と研究戦略」
- 43) 小松一弘、富岡典子、松崎慎一郎、高津文人、土屋健司、今井章雄、珠坪一晃、中川恵、早川和秀、永田貴丸：第53回日本水環境学会年会（2019）「琵琶湖と霞ヶ浦における一次生産の分布と時系列変化」
- 44) 土屋健司、富岡典子、小松一弘、高津文人、今井章雄、佐野友春、早川和秀、永田貴丸、岡本高弘、廣瀬佳則：第53回日本水環境学会年会（2019）「琵琶湖北湖における細菌生産の30年間の変化」
- 45) 佐藤祐一、早川和秀、酒井陽一郎：第53回日本水環境学会年会（2019）「「水のきれいさ」と「魚の豊かさ」は両立できるのか？琵琶湖における食物連鎖モデルを用いた解析」
- 46) 山口保彦、由水千景、陀安一郎、木庭啓介、早川和秀：日本地球惑星科学連合2019年大会（2019）「アミノ酸鏡像異性体バイオマーカーを用いた琵琶湖における細菌由来溶存有機物の寄与評価」（アブストラクト提出済み）

7. 研究者略歴

研究代表者

早川 和秀

名古屋大学大学院理学研究科博士課程修了、博士（理学）、
現在、滋賀県琵琶湖環境科学研究センター総合解析部門副部門長

研究分担者

- 1) 佐藤 祐一 〈サブテーマ1〉
京都大学大学院工学研究科修了、博士（工学）
現在 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター 主任研究員
- 2) 岡本 高弘 〈サブテーマ1〉
京都工芸繊維大学大学院工芸学研究科修了、修士
現在 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター 主任専門員
- 3) 後藤 直成 〈サブテーマ2 リーダー〉
名古屋大学大学院理学研究科修了、博士（理学）、
現在 滋賀県立大学環境科学部 准教授
- 4) 今井 章雄 〈サブテーマ3 リーダー〉
米国テキサス大学オースチン校修了、PhD
国立環境研究所地域環境研究センター センター長
現在 国立環境研究所琵琶湖分室 室長
- 5) 富岡 典子 〈サブテーマ3〉
千葉大学園芸学部卒、博士（農学）
現在 国立環境研究所地域環境研究センター 主任研究員
- 6) 佐野 友春 〈サブテーマ3〉
北海道大学大学院薬学研究科修了、博士（薬学）
現在 国立環境研究所環境計測研究センター 主任研究員
- 7) 小松 一弘 〈サブテーマ3〉
東京大学大学院工学研究科修了、博士（工学）
現在 国立環境研究所地域環境研究センター 主任研究員
- 8) 中野 伸一 〈サブテーマ4 リーダー〉
京都大学大学院理学研究科修了、博士（理学）
愛媛大学農学部教授
現在 京都大学生態学研究センター センター長
- 9) 程木 義邦 〈サブテーマ4〉
東京都立大学大学院理学研究科修了、博士（理学）
現在 京都大学生態学研究センター 特定准教授
- 10) 永田 貴丸 〈サブテーマ5 リーダー〉
信州大学大学院工学系研究科修了、博士（理学）
現在 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター 主任研究員

II. 成果の詳細

II-1 環境因子と湖内生産量の関係整理および湖内生産量の明示化の検討

滋賀県琵琶湖環境科学研究センター 総合解析部門 早川 和秀
 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター 総合解析部門 佐藤 祐一
 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター 環境監視部門 岡本 高弘
 <研究協力者>
 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター 環境監視部門 廣瀬 佳則
 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター 環境監視部門 尾原 禎幸
 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター 総合解析部門 山口 保彦

平成28～30年度累計予算額：15,371千円

（うち平成28年度：5,210千円、平成29年度：5,211千円、平成30年度：4,950千円）

累計予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

微生物食物連鎖の起点となる有機物について、生分解性（生物利用性）の質について検討を行った結果、琵琶湖水中の溶存有機物の生分解率は低く、様々な生分解の促進条件に対しても耐性があることが確認された。栄養塩リンの添加は細菌の代謝活性（酸素消費）を高めるが、有機物の無機化にはつながらなかった。

有機物の生分解性を評価するには、BODが有効であることが再評価された。琵琶湖水中での生分解では有機物の無機化に先立って有機物の変質が起こっており、生分解の測定にはTOCよりも酸素消費を測定した方が感度よく検出できる。BOD₅では琵琶湖水に対して測定下限となることが頻発していたが、BOD₂₈を用いることで精度よく評価できることを確認した。さらに琵琶湖においてCODは生分解の酸素消費量を直接示すものでないことが示された。ただし、CODは相対的な試水の有機物濃度（序列）には対応した指標である。琵琶湖水においてCODとBODの経年変動に見られる乖離の原因となっている難分解性有機物については、細菌由来の有機物指標となるD/L-アミノ酸の解析より難分解性溶存有機物として細菌由来とそれ以外（植物プランクトン由来など）、少なくとも二種類の生成源が明らかとなった。

湖内の食物連鎖において適度なエネルギー供給や物質循環が行われることが肝要であるとして、物質循環の「円滑さ」を水域の健全性として評価指標を提案した。また、貧栄養化の影響が懸念されている琵琶湖を対象として、流入負荷の増減がもたらす各生物種のバイオマスや健全性指標値への影響を、食物連鎖モデルを用いて解析した結果、流入負荷を増やしても魚類が増加しないか、あるいは魚食性魚のみが増加する可能性が示唆された。

各実測値にもとづく琵琶湖沖帯の有機炭素収支を概算すると、細菌炭素要求量は一次生産量の約50%に相当していた。しかしながら、呼吸を引いた細菌生産量では値が小さく、微生物食物連鎖の上位の捕食者への有機物供給源として乏しいことが明らかとなった。今後、植物プランクトンから動物プランクトンへの転換効率の向上が課題としてみえてきた。

[キーワード]

生分解、溶存有機物、微生物食物連鎖、有機炭素収支、健全性、

1. はじめに

流入負荷の削減により水質は改善する一方で、漁獲量が減少するなど生物への影響が見られる水域がある。この一因として、栄養塩の流入負荷の減少により植物プランクトンの生産量が減少し、それを餌

とする上位の生態系にも影響が生じるという「貧栄養化」の問題が指摘されている¹⁾。こうした水域の一部では、栄養塩の流入負荷を減らし続けるのではなく、水域の物質循環を円滑にし、魚介類資源を豊かにしていくことが方向として考えられる。このような総合的な視点で施策を行うには、系内の食物連鎖や生物生産量の把握に基づく物質収支の情報が不可欠である。

水中の生態系には、細菌群集の増殖を起点に繊毛虫や鞭毛虫などの原生生物が細菌を捕食し、さらに動物プランクトンの捕食へとつながる微生物食物連鎖が存在する。海洋では、植物プランクトンを起点とする生食食物連鎖だけでなく、微生物食物連鎖も高次捕食者の餌資源として貢献すると考えられている。湖沼では、微生物食物連鎖の起点となる細菌生産速度は、植物プランクトンの光合成の20~30%²⁾とされるが、国内においては実測例が不足しており不明な点が多い。近年、琵琶湖においては富栄養化が抑制されつつあり、リンの減少にともない植物プランクトンの現存量が減少している³⁾。貧栄養化に向かう経過において、一次生産の減少によって相対的に微生物食物連鎖の重要性が増す⁴⁾との考え方があり、細菌を起点とした微生物食物連鎖による湖内の物質循環への貢献が注目される。

一方で、水圏の細菌が有機物を利用する状態には複雑な様相がある。琵琶湖水の細菌に関する研究では、細菌生産はリン制限になって水中の溶存有機物を十分に利用していないとされる^{5),6)}。しかし、琵琶湖水中には溶存有機物(DOM)には難分解性有機物が多く存在することが報告されており⁷⁾、細菌によるDOMの利用が明解でない状況にある。微生物に利用される有機物の指標としてBODが測定されているが、琵琶湖ではBOD₅測定値が下限値となることが多く、正當に評価されていない。したがって、細菌類による湖水中の有機物の利用性を再評価しておくことが必要である。

海洋では、細菌がDOMの生成源として量的に重要であることが分かってきて、有機物を水中に固定するメカニズムとして「微生物炭素ポンプ」という概念が提唱されるに至っている⁸⁾。湖沼細菌によるDOMの消費のみならず生産・放出が活発に起きているとすれば、細菌によるDOMの利用が進むことで有機物の無機化が促進されたり、または有機物の難分解化が進行されたりすることが考えられる。こうした状況は、生態系にとっては「利用できる有機物が減少する」ことを意味し、特に魚など高次の捕食者の食物連鎖に悪影響を与える可能性がある。また、琵琶湖では近年のBODとCODの乖離から、難分解性DOMの濃度が増加している可能性が指摘されており、上記の課題に取り組むことは難分解性DOMの生成源として細菌の関与を考えることにもつながる。

本研究は、水質から水産資源量までを包括した総合的な視点に基づく効果的な施策のため、流域や湖内の水質や物質フローを有機炭素量で評価する新たな管理のあり方を示す基盤となる取組である。ただし、こうした枠組みの議論のためには、これまで有機汚濁の指標としてきたCODと有機炭素指標(TOC)の関係を整理する必要がある。プロジェクトの中間評価を受け、行政貢献として、琵琶湖において蓄積されたTOCのデータの整理を行い、今後、行政が実施する水質管理指標の議論への知見を提供することもあわせて行った。

2. 研究開発目的

サブテーマ1では、微生物食物連鎖の起点となる有機物の質について、琵琶湖では難分解性有機物が存在していて有機物の利用性が複雑であることから、問題点をいくつか絞って生分解性や指標性について、以下の取組を行った。

1) 湖水の有機物の基質等の違いによる微生物分解性の検討； 琵琶湖水の生分解試験は実験室にて恒温、暗条件下で分解を行い、評価が行われてきた。しかし、難分解性に疑念がもたれているため、生分解のポテンシャルを見ておく必要がある。有機化合物の生分解性試験は、OECD試験法などで標準的試験方法が決められており、植種源や媒体は試験の対象とする環境に合わせて選ばれる。そこで本研究では、琵琶湖における有機物の生分解が発揮されやすい条件を検討するため、実験室内での様々な生分解性試験の条件を検討し、琵琶湖水の生分解性ポテンシャルを見出すことを目的とした。

2) BOD法の長期化改良の検討； 生分解性有機物のモニタリング指標としてBOD法があるが、現在の琵琶湖水ではBOD測定の下限にあり、精度の高い測定を行うことができない。そこで、BOD測定を5日間より長期化することで測定精度を確保して、生分解性有機物量や細菌による代謝量のモニタリングす

る手法として、BOD法の長期化改良による定量実用性を検討した。さらに、琵琶湖水の生分解における栄養塩添加の影響についても検討を行った。

3) 細菌由来の溶存有機物による評価； 海洋では様々な海域で、D-アミノ酸（通常の生物が持つL-アミノ酸の鏡像異性体）など細菌特有の有機分子をバイオマーカーとして、DOMの生成源への細菌寄与度が調べられてきた^{9), 10)}。この定量法では、海洋遠洋域の微生物由来のDOMが、ある一定濃度の有機分子バイオマーカーを含むことを利用し、その値を100%の端成分として定量計算に用いている。淡水湖沼では、Kawasaki et al. (2013)¹¹⁾ が霞ヶ浦でD-アミノ酸を用いて細菌由来DOMの寄与定量を行っているのが、細菌寄与度の定量法や、D-アミノ酸の分析法など手法に課題が残っていた。本研究では、「D-アミノ酸を有機分子バイオマーカーとした、水圏DOM中の細菌成分の寄与度定量」を、湖沼でも適用可能な手法として、世界で初めて開発・確立することを目的とした。まず、D-アミノ酸の化学分析技術を、ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）を用いて、湖沼のDOMにも適用できるように確立する。次に、琵琶湖の天然細菌を用いた培養実験により、湖沼の微生物由来DOMに含まれる有機分子バイオマーカーの濃度を制約し、定量のための端成分を確立する。さらに琵琶湖の湖水DOM中D-アミノ酸濃度の深度分布、季節変動を明らかにして、琵琶湖の難分解性DOM（系外に流出する有機物）と準易分解性DOM（湖内で再利用される有機物）それぞれについて細菌の寄与度の定量を行った。

4) TOC指標に向けた整理； 本研究では琵琶湖において蓄積されたCODとTOCの関係性について知見の整理を行った¹²⁾。CODが示す有機物の質について検討することを目的として、琵琶湖およびその流域の河川と排水を用いて、CODとTOCやBODとの比較を行い、CODの検出性を検討した。さらに、有機物の生分解試験を行い、CODが示す有機物の質と分解性との関係も検討した。

また、サブ1では研究プロジェクトの統括として以下の取組を行った。

5) 琵琶湖沖帯の有機炭素収支； 本研究では、琵琶湖における一次生産、細菌生産、動物プランクトンの生産について、野外の観測と室内実験による知見を蓄積して、将来の生態系モデルの高度化のための各生物間の関係性を把握することを1つの到達点としている。プロジェクトで行われた実測データから各生物の現存量や生産量の関係性を俯瞰して、生態系の基礎となる低次食物連鎖網における有機炭素バイオマスとフローをまとめた。さらにまとめた琵琶湖沖帯における食物連鎖および有機炭素収支の問題点について考察した。

6) 食物連鎖モデルと健全性について； 流入負荷の削減により水質は改善する一方で、漁獲量が減少するなど生物への影響が見られる受水域がある。この一因として、栄養塩の流入負荷の減少により植物プランクトンの生産量が減少し、それを餌とする上位の生態系にも影響が生じるという「貧栄養化」の問題が指摘されている¹³⁾。こうした受水域の一部では、栄養塩の流入負荷を減らし続けるのではなく、適度に供給することで物質循環を円滑にし、魚介類資源を豊かにしていくことが検討されている。すなわち、良好な水質と魚介類の資源量の改善の両立をめざす。本研究では、物質循環の「円滑さ」から受水域の健全性を評価する指標を提案するとともに、貧栄養化の影響が懸念されている琵琶湖を対象として、流入負荷の増減がもたらす各生物種のバイオマスや健全性指標値への影響を、食物連鎖モデルを用いて解析した。

3. 研究開発方法

3. - 1 - 1 湖水の有機物の基質等の違いによる微生物分解性の検討

湖水に細菌を植種して増殖させ、様々な条件で湖水中の溶存有機物を分解させる生物分解試験を行った（表(1)-1）。採取した湖水をNucleporeフィルター（孔径0.2 μm、酸洗浄済、GEヘルスケア）でろ過した後生分解性試験に用いた。100 ml三角フラスコ中に試水と栄養塩や植種菌等を添加して、暗所振とうにて細菌を増殖させて湖水中の溶存有機物を分解させた。実験開始時、3、7日後にフラスコ中の細菌数や有機炭素濃度(TOC)、溶存酸素(DO)の測定を行い、経時変化を調べた。TOCの測定には、試水をバイアル瓶に入れて有機物を超音波破碎した後、全有機炭素計Shimadzu TOC-Lバイオマス測定用装置付（島津製作所）を用いた。試験は3連で実施し、植種しない系との比較を行った。植種菌には、南湖ろ過湖水と市販のBODシードを用いた。試水には、琵琶湖北湖、南湖赤野井湾、湖水中より20 μmメッシュネット

で集めたプランクトンの水抽出物を用いた。また南湖水を用いて様々な培養条件下での生分解性試験(条件は結果で表示)を行った。

表(1)-1 生分解試験の操作手順

湖水	[0.2 μm 湖水ろ過水, 100 mL三角フラスコまたはBODボトル]
細菌植種	[湖水GF/Fろ過水またはBOD Seed細菌]
栄養塩類添加	[NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , OECD生分解性試験栄養塩類 (OECD G301他)]
その他試験条件の適用	
↓	
暗所20℃振とう	(60回 min^{-1})
↓	
数日後、試料を一部採取、細胞数、有機炭素濃度、一部試料でDOの測定	

3. - 1 - 2 BOD法の長期化改良の検討

調査地点は、南湖2地点(唐崎沖中央6B, 新杉江港沖8C)と北湖3地点(今津沖17A, 今津沖中央17B, 長浜沖17C')の計5地点とした(図(1)-1)。各調査地点において2015年4月~2018年12月の間毎月1回表層水(水深0.5 m)を採水し、公定法のBOD₅と28日としたBOD₂₈の測定を行った。長期培養は暗室で行い、容器への付着物の発生や沈殿物の堆積を極力防ぐため水平振とう(60回/分)を行った。なお、植種および栄養塩の添加は、通常琵琶湖水のBOD₅が0.5 mg L^{-1} 程度前後、TOCで1.0~2.0 mg L^{-1} と低濃度であることから過去40年以上にわたる長期モニタリングでも行っていないため、本研究でも添加は行わなかった。



図 (1)-1 調査地点

2018年1~8月(7月は実施せず)には、南湖唐崎沖中央6B地点において、アリルチオ尿素(ATU)添加により硝化反応を止めて有機物の生分解を測定する試験を行った。BOD測定条件にATUを最終濃度2 mg L^{-1} になるように添加して、添加しないものとの比較を行った。

また、琵琶湖水の生分解における栄養塩添加の影響を検討した。調査地点は、琵琶湖北湖の南比良沖中央(12B,水深約60 m)、今津沖中央(17B,水深約90 m)の計2地点とした。17Bにおいては、2017年8, 9, 10, 12月, 2017年1月~6月の計10回表層水(水深0.5 m)を採取した。また、12Bにおいては、2017年7, 11月、2018年7月の計3回表層水の採水を行った。これらの試料についてリン添加(最終濃度 5 μM)の有無の2系列を用意し、BOD瓶(容量250 mLまたは300 mL)に分取・密閉した。

培養は20℃暗条件、原則28日間、水平振とう(60回/分)にて行った。その間、5、14、28日後にBOD瓶を回収し、1本をDO測定専用(他に1本はDOCとTOCの測定に使用した)。DOの分析は公定法(ウインクラール法と蛍光式DOセンサー)により行った。DOCの試料には450℃、2時間加熱処理したWhatman GF/Fろ紙でろ過後のろ液を使用し、TOCの試料には試水をバイアル瓶に入れた後超音波ホモジナイズ処理を行ったものを使用した。DOC、TOC測定にはTOC計(SHIMADZU 微細藻類バイオマス測定用TOC-L)を使用しNPOC法で測定した。

3. - 1 - 3 細菌由来の溶存有機物による評価

3-1-3 (1) 琵琶湖細菌を用いた培養実験

琵琶湖湖水は、琵琶湖北湖17Bサイト(今津沖中央)の表層(水深5 m)および深層(水深60 m)において、琵琶湖環境科学研究センターの調査船「びわかぜ」の多筒型ニスキン採水器またはバンドーン採水器を用いて、2018年8月27日、9月27日、10月25日に採水した。採取した湖水は、ナイロン製プランクトンネット(150 μm メッシュ、超純水で洗浄済)、Whatmann GF/Fフィルター(孔径0.7 μm 、450℃で5時間加熱済)、ポリカーボネート製Nucleporeフィルター(孔径0.2 μm 、酸洗浄済)を用いて、三段階の濾過で粒子状有機物と細菌細胞を除去し、湖水DOM試料を採取した。アミノ酸分析用の試料は、ポリプロピレン製容器(アルカリ・酸洗浄済)に入れて、-30℃で冷凍して保存した。

3.-1-3 (2) 琵琶湖細菌を用いた培養実験

9月27日に17Bサイト水深5 mから採取した湖水について、プランクトンネット（同上）とGF/Fフィルター（同上）の2段階濾過を行い、生物として湖水表層細菌細胞のみを含む濾液を得た。地下水中細菌を用いた培養実験を行ったShen et al. (2015)¹³⁾の手法に基づき、グルコース、硝酸ナトリウム、リン酸二水素カリウムをそれぞれ単一の炭素源、窒素源、リン源とした人工培地を作製した。湖水濾液を培地で50倍希釈し、ポリカーボネート製容器（酸洗浄済）に移して密栓した後、暗所20℃で振盪（60 rpm）し、培養実験を行った。培養実験開始後、27日目に試料を分取し、Nucleporeフィルター（同上）を用いて濾過を行い、培養実験DOM試料を採取した。アミノ酸分析用の試料は、濾過後、ポリプロピレン製容器（アルカリ・酸洗浄済）に入れて、-30℃で冷凍して保存した。

3.-1-3 (3) DOM試料の分析

湖水DOM試料および培養実験DOM試料のDOC濃度は、TOC計（島津製作所TOC-L）を用いて、濾過した当日に測定した。

アミノ酸分析用の試料はまず、内標準物質を添加した後、凍結乾燥でDOM成分を濃縮した。濃縮試料をリアクティブバイアルに移してアスコルビン酸を添加した後、ヘッドスペースを窒素ガスで置換した状態で、6N塩酸で液相加水分解（110℃、20時間）を行った。加水分解で遊離体として放出されたアミノ酸について、Yamaguchi & McCarthy (2018)¹⁴⁾の手法に基づき、イオン交換樹脂による精製と、TFA-iPr誘導体化を行った。誘導体化したアミノ酸について、キラルカラム（Agilent CP-Chirasil-L-Val：カラム長25 m、内径0.25 mm、膜厚 0.12 μm）を装着したGC-MS（Agilent 7890A GC - 5975C MSD）を用いて、D-アミノ酸、L-アミノ酸それぞれについて、選択イオンモニタリングモードで、各アミノ酸の特徴的なフラグメントイオンを用いて定量した（Yamaguchi & McCarthy, 2018¹⁴⁾の手法を改変）。

3.-1-3 (4) D-アミノ酸濃度を用いた細菌由来DOMの寄与定量

D-アミノ酸濃度は、Kaiser and Benner (2008)¹⁰⁾に基づき、同試料のDOC濃度で規格化し、有機炭素量あたりの値とした。細菌由来DOMの寄与定量は、Kaiser and Benner (2008)¹⁰⁾に基づき、培養実験DOM試料の規格化D-アラニン（D-Ala）濃度を100%として、湖水DOM試料の規格化D-Ala濃度から定量した。湖水の難分解性DOMと準易分解性DOMの値は、二成分モデルを用いたMaki et al. (2010)¹⁵⁾の手法を用いて計算した。10月水深60 m試料の値を難分解性DOMの代表値として、8～10月水深5 mの試料の値を難分解性DOMと各時期の準易分解性DOMの和として仮定した。

3.-1-4 TOC指標に向けた整理

2007～2010年度にかけて、琵琶湖、琵琶湖流域の河川水、流域内に存在する各種発生源からの排水より採取を行った^{7,16)}。湖水は、滋賀県が定点観測を行っている7地点で採取した計84試料を用いた。河川水は、安曇川、米川、宇曽川、白鳥川、日野川、野洲川、姉川、長命寺川で採取した計60試料を用いた。事業所排水、下水処理水、水田および畑、宅地道路、山林他の面源排水も採取し試験に用いた。有機物の分析には、公定法による BOD、CODの測定の他、TOCの測定を次の方法にて行った。試水をWhatman GF/Bでろ過後、ろ液をTOC計にて、ろ紙を元素分析計により計測し、その和をTOC値とした。生分解性試験には、100日間の振とう試験を行い¹⁹⁾、試験前後での前述の分析を行った。

3.-1-5 琵琶湖沖帯の有機炭素収支

有機物フローのまとめに用いた実測値は、2016～2018年に琵琶湖北湖にて本プロジェクトで測定された植物プランクトンの現存量と生産量（サブテーマ2）、動物プランクトン（CopepodaとDaphnia）の現存量と生産量（サブテーマ5）、細菌の現存量、生産量、炭素要求量（サブテーマ3）、原生生物の現存量と摂餌量（サブテーマ4）、湖水中の有機炭素量である。収支計算には、基礎生産から頂点捕食者に及ぶ食物網全体におけるバイオマスの流れを算出するフロー解析モデルであるエコパス（Ecopath）モ

デルを用いた¹⁷⁾。

エコパスモデルは次の式で生態系の構成要素の収支バランスをモデル化する。

$$\text{摂取}Q_i = \text{生産量}P_i + \text{呼吸量}R_i + \text{排泄量}U_i \quad (1)$$

$$\text{生産量}P_i = \text{漁獲量}Y_i + \text{被食死亡量}BM2_i + \text{移入量}EX_i + \text{生物蓄積量}BA_i + \text{その他死亡量}P_i(1-EE_i) \quad (2)$$

バイオマスが平衡状態にあると仮定した上で、被食によるバイオマスの減少が構成要素 n の連立一次方程式が成り立つよう捕食者の捕食比率を調整する。エコパスモデルを用いた利点は、本来水産資源の推定などに用いられる同モデルを使用することで、将来の水産資源保全の取り組みに役立つと考えられるためである。摂餌割合などモデルに不足するデータについては、琵琶湖において先行する生態系モデル^{4), 18)}から補完した。収支計算における条件設定は以下の表のとおりとした。

表(1)-2 Ecopathモデルによる収支の検討事項

Ecopath 6.5
2016-2018年琵琶湖北湖における実測による生産量、現存量を適用
年間平均値および四季平均値でのモデル計算を行い、モデルの妥当性を検討
0-20m深を積算、魚類等、高次の捕食者は勘案しない
モデルの基本構造、各生物間の捕食の関係性および摂餌における各生物の割合は加藤・増田 2016 ⁴⁾ を参照
ただし、微生物食物連鎖の寄与を実態に近づけるため、本研究のサブ5の研究結果 (ミジンコによる各生物の捕食割合、植物プランクトン90.8%, 原生動物7.6%, 細菌1.6%)により、摂餌割合を補正
エネルギー収支が合わない(Ecotrophic efficiencyが1を超える)場合は、摂餌率等を見直した
初期の計算では、収支上にデトリタスd0Mの残量が多く現れたため、Niquile et al 2006 ¹⁸⁾ のモデルの考え方に基づき、モデルを見直し、系外への沈降フラックス、各捕食者によるデトリタスの捕食、デトリタスからd0Mへの転換をプロセスに追加
系外への沈降フラックスは、Yoshizu et al 2001 ¹⁹⁾ に基づき、生産量の20.7%を沈降量とした
デトリタスからd0Mへの変質は、Niquile et al 2006 ¹⁸⁾ に基づき、デトリタスの37%とした

3. - 1 - 6 食物連鎖モデルと健全性について

受水域における物質循環の円滑さを、以下の2つの指標で捉える。

①「過不足がない」：群集総呼吸量／一次生産量

評価対象の受水域における生態系全体をみて、分解されずに残される有機物がほとんど存在せず、生産から呼吸を引いたものが生態系内の生体量の蓄積に対応している。

②「滞りがない」：転換効率（＝二次生産／一次生産等）

各栄養段階をみて、植物によって生産された有機物が高次の消費者に多く受け渡され、生物の連鎖の中で効率よく利用されている。

さらに、水質と魚介類資源のバランスを捉える以下の指標を追加し、受水域の健全性を評価する。

③「偏りがない」：魚類バイオマス／植物プランクトンバイオマス

物質循環が円滑になった結果として、水質が一定レベルに抑えられ、かつ魚介類の資源量が保全されるというように、各栄養段階のバイオマスが「偏りなく」存在する。数値が大きいほど「水がきれいで魚が豊かである」状態を示す。

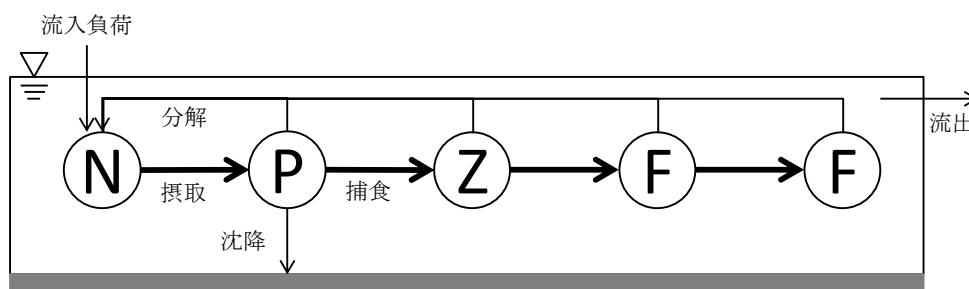
上記3つの指標値を向上させる方策について検討するため、琵琶湖を対象として簡易な食物連鎖モデルを構築した。具体的には、琵琶湖全体を1ボックスの完全混合槽と仮定し、図(1)-2に示す生物種の生産や捕食、呼吸、分解、沈降等を表現するモデルとした。季節変化は考慮せず、2010年代における年間の平均的な状況を再現できるようにした。流入負荷および栄養塩としては、生物に利用されやすい溶存態リンのみを考慮した。

各モデルパラメータは、最大値および最小値を文献等から設定し、その幅の範囲内でランダムに値を設定してモデルを10年間Runし、10年目の栄養塩濃度および各バイオマスの平均値が観測値の範囲内にあれば、そのモデルを採用することとした。モンテカルロ法により100パターンのパラメータセットが得られるまで繰り返した。

採用されたモデルについて、指標③と各種指標（各生物種のバイオマス、生産量、転換効率）との

相関関係を解析した。本研究では、琵琶湖における主たる漁獲対象魚がアユなどのプランクトン食性魚であることを踏まえ、「水がきれいである」「魚が豊かである」ことを「プランクトン食性魚バイオマス／植物プランクトンバイオマス」という指標（以下「水質・魚類両立指標」と呼ぶ。）でみた。また、富栄養化・貧栄養化の影響を把握するため、流入負荷量を0.5～2.0倍（10段階）にしたときに各指標値がどのように変化するか感度解析を行った。

なお本モデルでは、生産された有機物が水相中では迅速に分解されるという前提をおいており、指標①についてはどのような条件においても基本的に満たされるため、解析対象とはしないこととする。

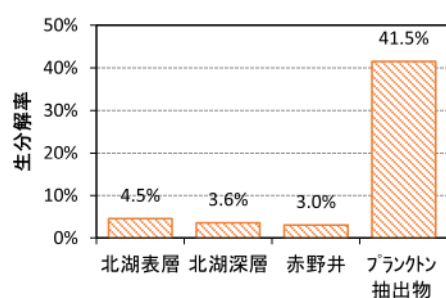


図(1)-2 食物連鎖モデルの構造； Nは栄養塩、Pは植物プランクトン、Zは動物プランクトン、Fは魚類（プランクトン食性魚、魚食性魚）を示す。

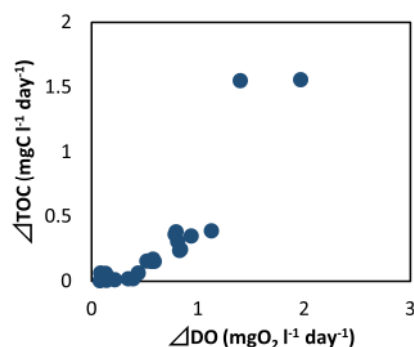
4. 結果及び考察

4. - 1 - 1 湖水の有機物の基質等の違いによる微生物分解性の検討

生分解試験の結果、琵琶湖水では北湖でも南湖（赤野井）でもTOC生分解率は低く、溶存有機物が難分解性であることが確認された（図(1)-3）。琵琶湖水のTOC生分解速度は $0.014 \sim 0.030 \text{ mgC L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であった。さらに、難分解である湖水中の溶存有機物の生分解を促進させる条件を探究した。栄養塩の添加、植種菌、ミネラル、誘引有機物、超音波や紫外線照射による有機物の破碎などを検討したが、培養液中に付着菌群の繁殖を促す媒体を添加した場合と、栄養塩としてのリンを添加した場合のみであった（表(1)-2）。生分解試験におけるTOCの減少量とDOの減少量を比較すると、両者は比例の関係にあるものの、低濃度領域ではTOCの差異が小さくDOの方が差異の検出が容易であった（図(1)-4）。



図(1)-3 3日後の各試水のTOC生分解率



図(1)-4 生分解試験における溶存酸素と有機炭素の減少量の比較

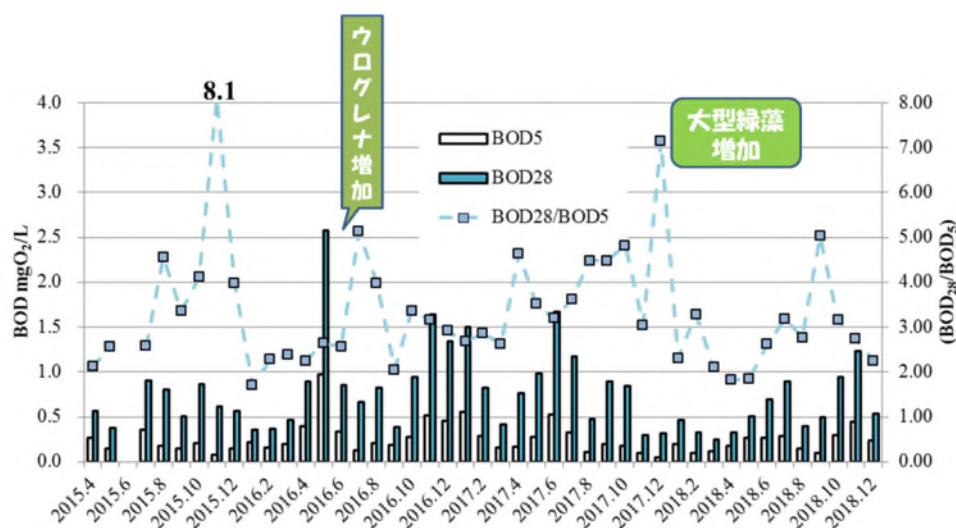
以上のことから、栄養塩添加等の生分解性の促進を図っても琵琶湖水の溶存有機物の生分解性は低く、生分解性を見るには溶存酸素、特にBODを利用することは有効であると考えられた。

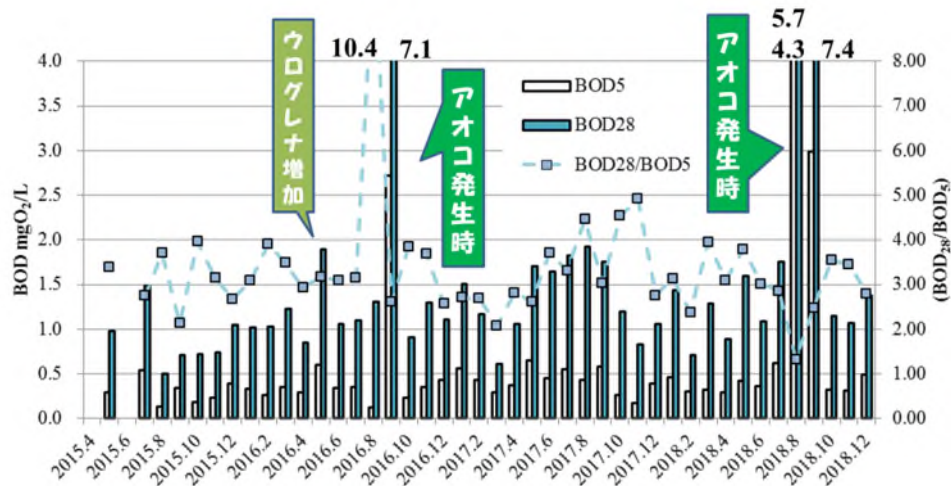
表(1)-3 各種培養条件によるTOCの減少

培養条件	方法	TOC減少で見られる分解促進性
媒体添加	GF/Fフィルターを添加	○
栄養塩 (リン添加)	10 ~ 20 $\mu\text{g/L}$ のリンを添加	△ 場合により促進)
微量金属の添加	0ECD分解試験 微量金属溶液を添加	-
植種菌	2 μm 、0.7 μm のろ過水添加 (細胞サイズ変更)	-
植種菌	BOD seed菌を添加	-
有機物添加	D-グルコースを添加	-
有機物添加	L-アラニンを添加	-
有機物添加	アデノシンを添加	-
有機物添加	メチル乳酸を添加	-
有機物添加	プランクトン 細胞溶出物を添加	-
超音波	試験前に超音波ホモジナイザーで溶液を発振	-
UV照射	試験前に溶液にUV照射 (8hr)	-

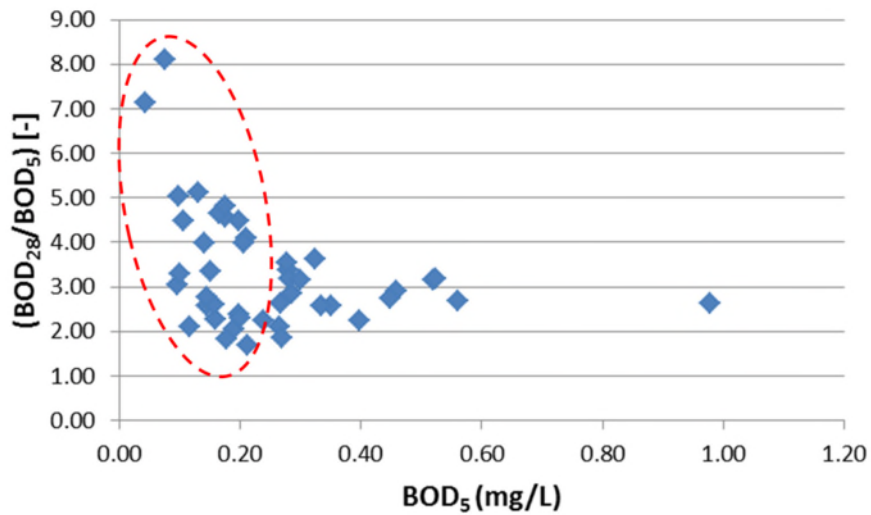
4. - 1 - 2 BOD法の長期化改良の検討

17Bおよび6Bにおける BOD_5 と BOD_{28} の測定結果を図(1)-5,6に示した。 BOD_5 は 0.5 mg L^{-1} を下回る試料が多く、値が低くなるほど精度の確保が困難であったが、培養期間を28日間に延長することにより酸素消費量が BOD_5 のほぼ3倍と顕著に大きくなり、値も多くの試料において 0.5 mg L^{-1} を上回った。特に、 BOD_5 が低い北湖17Bの試料では、 0.2 mg L^{-1} を下回ることは無くなった。17B点における BOD_5 と $\text{BOD}_{28}/\text{BOD}_5$ の関係を図(1)-7にプロットしたところ、 BOD_5 が 0.2 mg L^{-1} 以下で $\text{BOD}_{28}/\text{BOD}_5$ のばらつきが大きくなった。このことから、 BOD_5 の精度を確保するためにDO瓶の容量を250 mLまで増やしたとしても、 BOD_5 が 0.2 mg L^{-1} 以下ではばらつきが大きくなることから、培養時間の延長を行うことが必要であることが考えられた。

図(1)-5 北湖今津沖中央における BOD_5 と BOD_{28} の経月変動



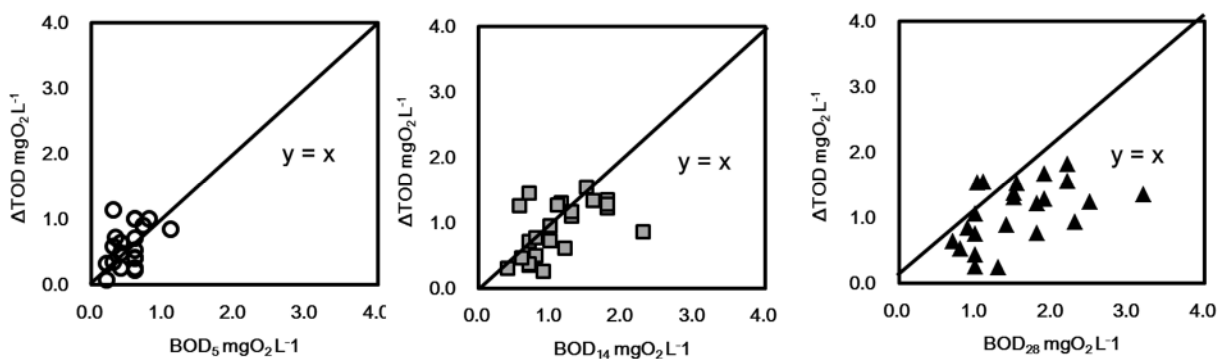
図(1)-6 南湖唐崎沖中央におけるBOD₅とBOD₂₈の経月変動



図(1)-7 BOD₅とBOD₂₈/BOD₅の関係（北湖今津沖中央17B）

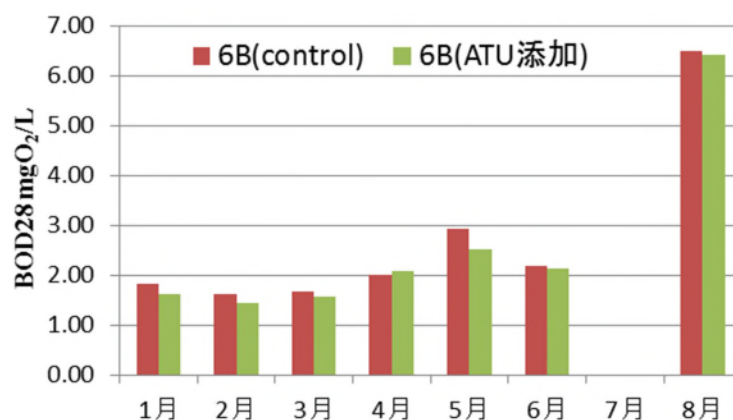
酸素消費量と有機物の分解による有機炭素の減少量との関係を把握するために、各地点の表層水について、分解期間ごとに測定した残存TOCより減少した有機物(ΔTOC)を算出し、CODによる酸化が糖類の反応で進むものと仮定して全て酸化し二酸化炭素として系外に放出するとした際に要する酸素量(ΔTOD)を次式から算出しBODとの関係を求め、図(1)-8に示した。

$$\Delta\text{TOD} (\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}) = 2.67 \times \Delta\text{TOC} (\text{mgC L}^{-1})$$



図(1)-8 酸素消費量と有機物の分解との関係について

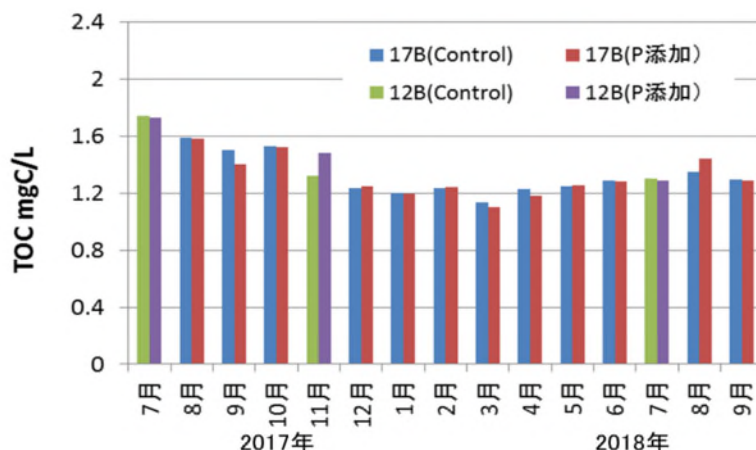
培養期間を長くすることでBOD値は精度が確保されたが、培養期間を28日まで延ばすと酸素消費量の増加より有機物分解量が少ないといった両者の間に乖離が認められた。酸素消費と有機物分解の乖離については、CO₂まで完全に無機化はされず、酸化は進むものの形態を変えて有機物として残存する化合物があることや有機態窒素の硝化による酸素消費の影響が考えられた。



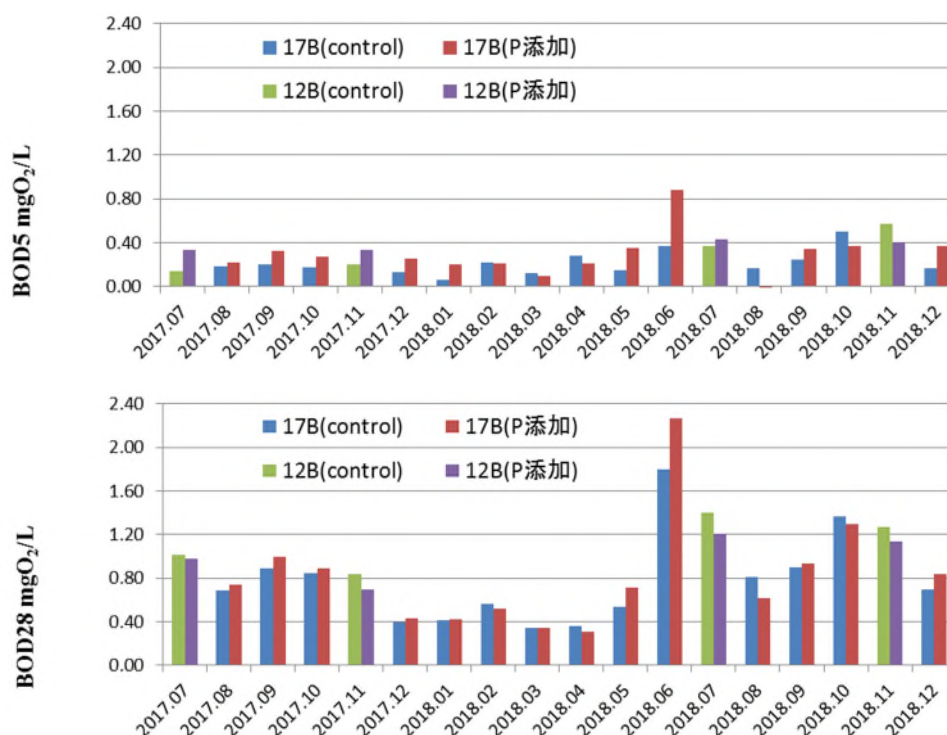
図(1)-9 南湖6B地点におけるATU添加の有無によるBOD₂₈試験

ATU添加して硝化反応を止めて有機物の生分解によるC-BODを測定した28日間培養の結果（図(1)-9）では、ATU添加の有無による酸素消費の差はわずかであった。よって、28日間の長期化によって酸素消費が進むことは、硝化反応による消費は小さく、5日間の生分解後も残存するまたは生成される有機物がCO₂まで無機化されず生分解が進むことが考えられる。すなわち、琵琶湖水中での生分解が有機物の無機化に先立って有機物の変質が起こっていることが明確となった。有機化合物の生分解において、中間生成物（分解物）が作られることは知られており²⁰⁾、分解過程においてDOCが見かけ上減少しないことは十分考えられる。また、湖沼の先行研究では、28日間の溶存有機物の分解過程において初期と後期の分解では分解されている有機物の質が異なり、生態系にとっても異なる機能を有する可能性が指摘されている²¹⁾。本研究の結果は、先行研究と同調するものであり、詳細なメカニズムは今後の課題である。

次に、栄養塩としてリンの添加効果を見るために、琵琶湖北湖（2017年7月, 11月：12B、その他の月：17B）における28日間の生分解試験後に残存する有機物の量を図(1)-10に示した。調査月において増減の変動は認められるもののリンの添加の有無による傾向は認められなかった。また、同様に琵琶湖北湖（2017年7月, 11月：12B、その他の月：17B）におけるBOD₅、BOD₂₈を図(1)-11に示した。2018年2-4月を除いてBOD₅の値の増加が認められたが、一方でBOD₂₈の値は2018年5, 6月を除いて有意な増加は認められなかった。これらの結果から、有機物の分解速度には一定の傾向は認められないが、リンの添加により初期の5日間の酸素消費が促進されていることが確認できた。よってリンの添加は細菌の代謝活性（酸素消費）を高めるが、有機物の無機化にはつながっていないことが考えられた。



図(1)-10 北湖17Bと12B地点におけるリン添加（P添加）と添加なしのBOD試験後の残存TOC

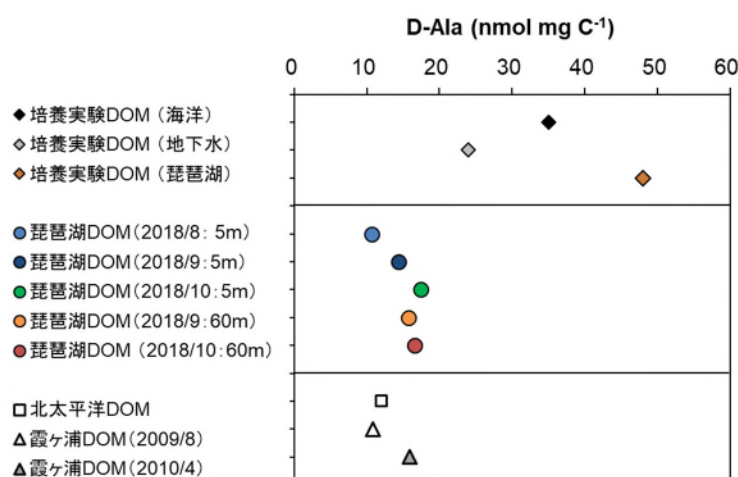


図(1)-11 北湖17Bと12B地点におけるリン添加（P添加）の有無によるBOD₅（上）とBOD₂₈（下）

湖水中の生分解作用は、BOD試験による酸素消費量と生分解性有機炭素量の比較、次節のD/L-アミノ酸の分析結果もあわせると、細菌等によるDOMの放出・生成が起こっているものと推察される。リンの添加によって細菌の代謝活性（酸素消費）を高めても、有機物の無機化にはつながらないことから、無機化には細菌の代謝活性だけでなく、従属栄養生物による捕食、排泄など、他の機構も関与していると推察される。

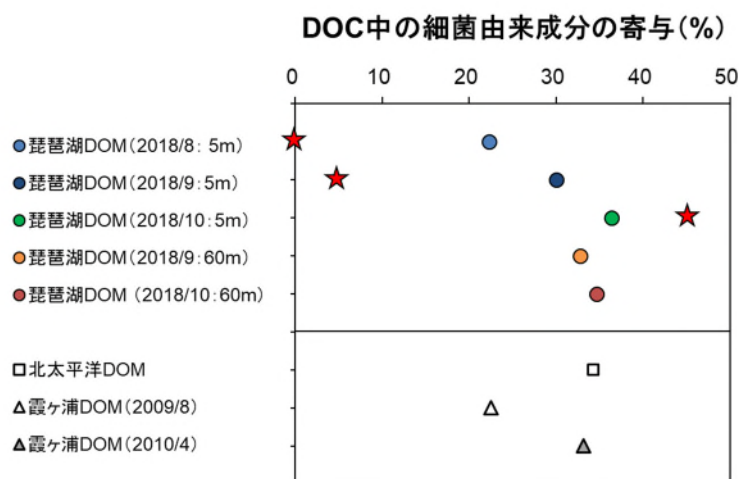
4. - 1 - 3 細菌由来の溶存有機物による評価

図(1)-12に、琵琶湖（本研究）および他環境（海洋、霞ヶ浦、地下水：文献値）における、天然DOMおよび培養実験DOMのDOC規格化D-Ala濃度を示した。琵琶湖の湖水天然DOMの値は、10～18 nmol mg C⁻¹の範囲を示し、北太平洋¹⁰⁾および霞ヶ浦の値¹⁵⁾と同程度となった。琵琶湖の湖水中細菌を用いた培養実験DOMの値は48 nmol mg C⁻¹となり、同様の培養実験が行われた海洋と地下水の値（それぞれ35 nmol mg C⁻¹¹⁰⁾；24 nmol mg C⁻¹¹³⁾）よりも高い値を示した。



図(1)-12：琵琶湖および他環境での、天然DOMと培養実験DOM中のD-AlaのDOC規格化濃度。

琵琶湖DOM（2018年8～9月：水深5m・60m）と培養実験DOM（琵琶湖）が本研究による値（それぞれ、丸印とオレンジ菱形印）。培養実験DOM（海洋）と北太平洋DOMの値（それぞれ、黒菱形印と白四角印）はKaiser and Benner (2008)¹⁰⁾より、霞ヶ浦DOMの値（三角印）はKawasaki et al. (2013)¹⁵⁾より、培養実験DOM（地下水）の値（灰菱形印）はShen et al. (2015)¹³⁾より、それぞれ引用した。



図(1)-13 : DOCで規格化したD-Ala濃度を用いて計算した、琵琶湖および他環境の天然DOMにおける、DOC中の細菌由来成分の寄与。

琵琶湖DOM (2018年8～9月：水深5m・60m) が本研究による値。丸印がDOM全体の値で、星印は二成分モデルを用いて計算した各月表層の準易分解性DOMの値。北太平洋DOMの値 (四角印) はKaiser and Benner (2008) ¹⁰⁾より引用し、霞ヶ浦DOMの値 (三角印) はKawasaki et al. (2013) ¹⁵⁾の値を基に再計算した。

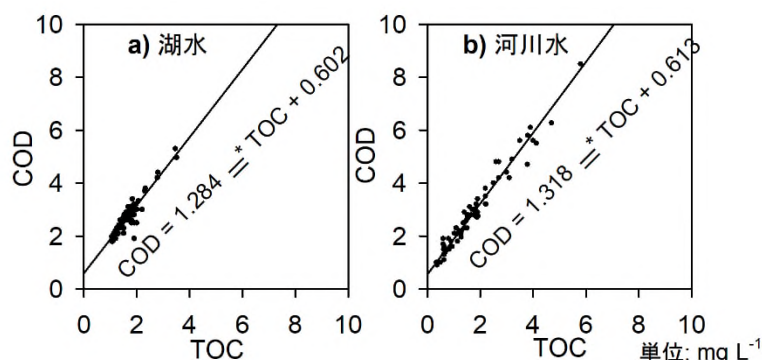
図(1)-13には、DOC規格化D-Ala濃度を用いて計算した、琵琶湖および他環境の天然DOMにおける、DOC中の細菌由来成分の寄与度を示した。琵琶湖の難分解性DOMを代表すると考えられる10月水深60mの値は、35%となった。つまり、琵琶湖の難分解性DOMには、細菌由来DOMとそれ以外 (植物プランクトン由来など)、少なくとも二種類の生成源が重要と言える。この琵琶湖の難分解性DOM (10月水深60m)の値は、北太平洋DOMの値¹⁰⁾と、霞ヶ浦DOMのうち2010年4月の値¹⁵⁾の天然DOMの値を基に、琵琶湖の培養実験DOMの値を端成分として再計算したところ、同程度となった。それぞれ、各環境における難分解性DOMを代表すると考えられる値であり、琵琶湖のような貧～中

栄養湖と、霞ヶ浦のような富栄養湖の両方で、海洋遠洋域と同様に「微生物炭素ポンプ」が重要であることを示唆する。さらに、同程度の値になったことは、共通のメカニズムが背景に存在する可能性を示唆するが、詳細の解明にはさらなる研究が必要となる。

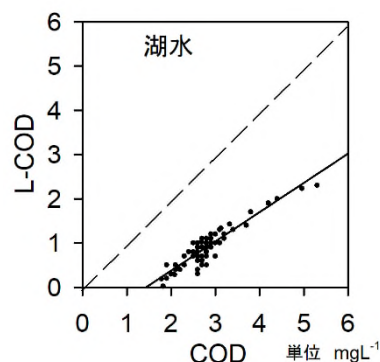
8～9月の琵琶湖表層の準易分解性DOMの値は、それぞれ $0 \pm 12\%$ 、 $4 \pm 15\%$ と計算され、測定・計算に伴う誤差を考慮しても、最大でも20%以下となった。細菌由来成分の寄与度が低かったことは、夏季の表層で生産され蓄積する準易分解性DOMは、主に真核植物プランクトン由来であることを示唆する。

一方で、10月 (秋季) の琵琶湖表層の準易分解性DOMにおいて、細菌由来成分の寄与度は $47\% \pm 20\%$ となり、8～9月の値よりも有意に大きかった。真核植物プランクトン由来の準易分解性DOMを表層湖水中の細菌が取り込み、細胞内の代謝で作り変えた後、細菌由来DOMが放出されたことが示唆される。2018年8月から10月にかけてのD-Ala濃度の変化から、細菌由来の準易分解性DOMの放出フラックスを計算すると、表層 (0-20 m) の積算値で、約 $0.04 \text{ gC m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ と推定された。これは、本研究課題サブテーマ3で推定された夏季表層の細菌生産フラックスの5%程度の値となる。細菌生産の残り (95%) が、原生生物による捕食とウイルス感染による易分解性DOMの放出・再利用で、生態系に有機炭素を供給していると考えられる。

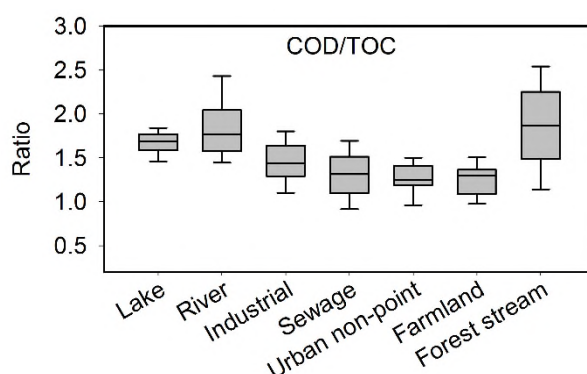
4. - 1 - 4 TOC指標に向けた整理 湖水、河川水のTOCとCODの相関性は高かった (図(1)-14、 $r^2 = 0.853, 0.964$)。このことは、琵琶湖水および流域河川水においてCODは有機物の総量の変動を捉えていた。CODによる酸化が糖類の反応で進むものと仮定すると、TOC-CODの傾きは2.67である。これを100%として、CODで検出されている有機物の割合を求めると、湖水で48.0%、河川水で49.4%に相当し、CODは酸化が十分でないことが確認された。以上により、琵琶湖集水域でのCODの酸化率は半分程度にすぎないが、「相対的に」有機汚濁のレベルを示す指標として有効といえる。



図(1)-14 湖水と流域河川水における TOC と COD の関係

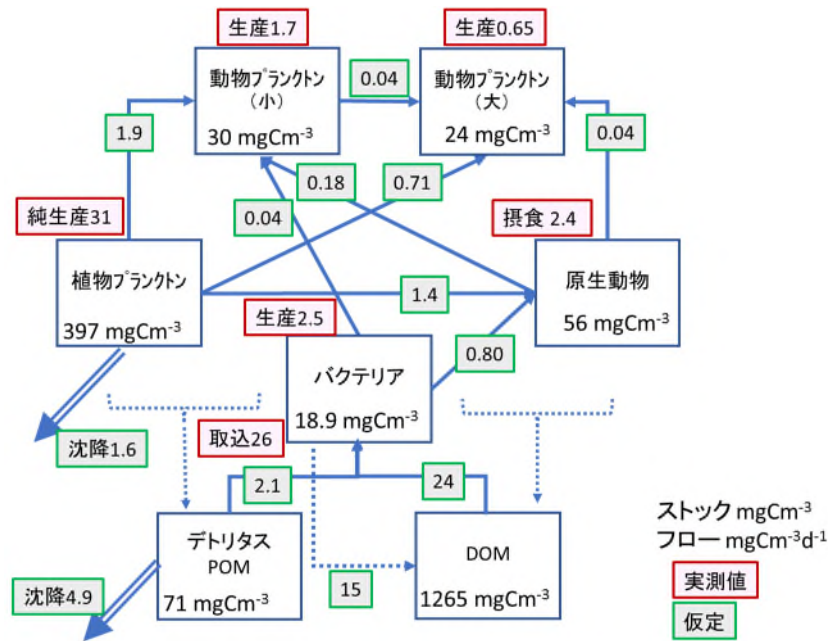
図(1)-15 湖水のCODと100日
生分解性COD (L-COD)

湖水における生分解試験によって減少した分解性有機物と試験前の有機物の濃度を比較したところ、両者には正の相関があった ($r^2=0.710$ 、図(1)-15)。しかし、湖水ではX軸に $0.5-1 \text{ mg L}^{-1}$ の切片が見られ、湖水には共通して $0.5-1 \text{ mg L}^{-1}$ の難分解性の有機物を含んでいた。河川水にはそのような切片は見られなかった。また、CODがすべて生分解性であった場合（グラフ上の点線）に比べて実際の生分解CODは著しく少なく、CODが酸素消費ポテンシャルを示すものでなかった。TOCに対するCODの比 (COD/TOC比) を比較したところ、河川水と渓流水で高く、各種排水の大半は、湖水、河川水よりも比が低かった（図(1)-16）。CODの検出率は水環境ごとに異なる可能性があり、そのことは流域からの有機物負荷の算定に影響する。例えば、滋賀県の第5期の湖沼計画でのCOD負荷量推定を、本研究のCOD/TOCを用いてTOC負荷量を算出すると、TOC計算では流域からの有機物総負荷量に対する山林からの負荷量の割合がCODで計算した場合に比べて11%低い結果が得られた。したがって、CODで測定された有機物の物質収支は、有機炭素収支より森林からの負荷を過大評価している。CODは、相対的な有機物濃度（序列）を示すが、実際に水環境中で起こりうる酸素消費量を示すものでなかった。また、試料の量や質によるCODの検出率の違いがときに負荷量に対して無視できない程度であることが確認された。

図(1)-16 各種環境水のCOD/TOCの箱ひげ図
箱上下部 75%, 25%値、誤差線上下 10%90%値)

4. - 1 - 5 琵琶湖沖帯の有機炭素収支

一次生産量は、年間平均で $52 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (Gross、推定値) に対して、細菌生産において生産と呼吸を合わせた細菌炭素要求量の年間推定値は $26 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ であった（図(1)-17、表(1)-4）。過去の研究でも琵琶湖における細菌生産量は一次生産に比べて少なくないことが指摘されてきた^{22), 23)}。本研究においても、細菌炭素要求量は一次生産量の約50%に相当し活発であることがわかる。しかしながら、呼吸を引いた細菌生産量では値が小さく、上位の捕食者へのエネルギー供給源として乏しい。一方、細菌炭素要求量は陸域からの有機物の供給 ($4.9 \text{ mg C m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ ¹⁹⁾) を考慮しても過大であると考えられ、細菌生産に利用される有機物源を他に求める必要がある。溶存有機物中のアミノ酸鏡像体の研究の結果、難分解性溶存有機物の約3割は細菌に由来することが明らかとなった。そこでモデル構造にデトリタス有機物から溶存有機物への転換を加えた結果、有機炭素収支を取ることができた。よって、細菌生産は湖内の溶存有機物を利用しながらも収支上は半分近くが再循環されていると推定された。



図(1)-17 エコパスモデルで推定された有機炭素収支

動物プランクトンへの供給は植物プランクトンの割合が大きく、植物プランクトンの光合成生産によって動物プランクトンの生産が支えられている。微生物食物連鎖は機能しているが、高次の捕食者への有機物供給は限定的であった。

表(1)-4 琵琶湖における生態系モデルから推定される生物生産量

年代	1985年	1990年代	2010年	2017年
引用	加藤 増田2015 [#]	Niquile et al 2006	加藤 増田2015 [#]	本研究
植物プランクトン 現存量 gC/m^2	11.96	3.41	5.50	7.58
一次生産量 $\text{gC/m}^2/\text{day}$	3.48	1.58	1.22	0.63
植物プランクトン 生産量/現存量 比	0.29	0.46	0.22	0.083
細菌現存量 gC/m^2	2.78	0.64	1.50	0.38
細菌生産量 $\text{gC/m}^2/\text{day}$	3.72	0.46	1.36	0.052
細菌 生産量/現存量 比	1.34	0.72	0.91	0.14
動物プランクトン現存量 gC/m^2	3.05	0.64 ##	2.38	1.08
動物プランクトン 生産量 $\text{gC/m}^2/\text{day}$	0.27	0.23 ##	0.17	0.048
動物プランクトン 生産量/現存量 比	0.087	0.36 ##	0.073	0.044
細菌生産/一次生産	1.07	0.29	1.11	0.082
動物生産/一次生産	0.08	0.15	0.14	0.076

[#]: 水深 20 m までを仮定
^{##}: 夏季の測定値からの推定

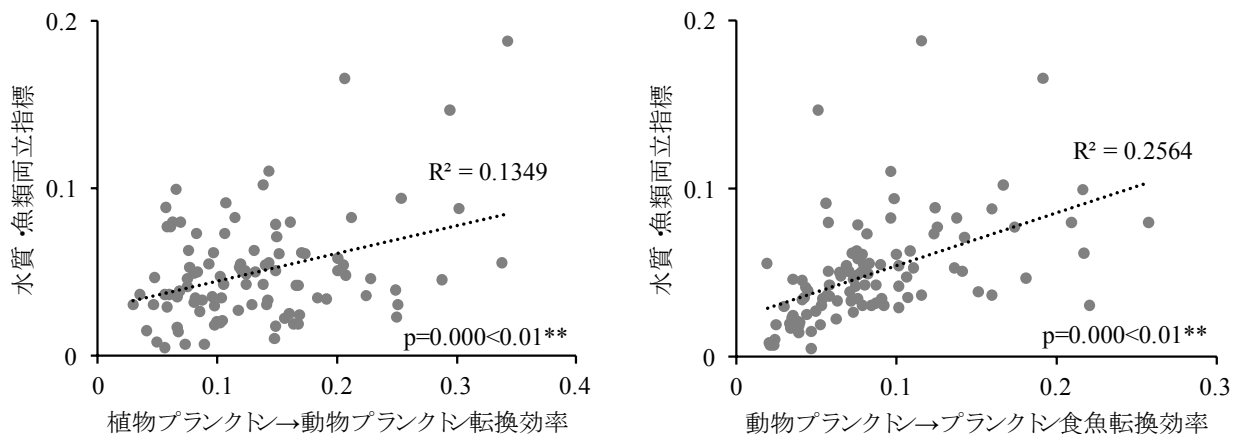
本研究と、過去に推定された琵琶湖の生態系モデル^{4), 17)}との比較を行った(表(1)-4)。各モデルで推定される生産量は測定方法や推定法が異なるため、精度を差し引いて考える必要があるが、過去に比べて植物プランクトンの現存量は減少していないが、一次生産量が減少している可能性がある。生産効率(P/B ratio)が落ちているのは、近年の大型緑藻の存在が影響しているかもしれない。細菌、動物プラン

クトンについても、現存量と生産量について、植物プランクトンと同様な傾向がみられた。一次生産に対する動物プランクトンの生産比は、推定によってバラツキがあるが、1985年に比べて現在は同等であり、動物プランクトンの生産を支える構造やその可変性についてさらに研究を進める必要がある。

4. - 1 - 6 食物連鎖モデルと健全性について

植物プランクトンの生産量およびバイオマスは、水質・魚類両立指標（プランクトン食性魚バイオマス/植物プランクトンバイオマス）と負の有意な相関がみられた。プランクトン食性魚の生産量およびバイオマスは、水質・魚類両立指標と正の有意な相関がみられた。各生物種の生産量とバイオマスの関係は明瞭であるため、水質・魚類両立指標の定義からこれらの結果は自明といえる。

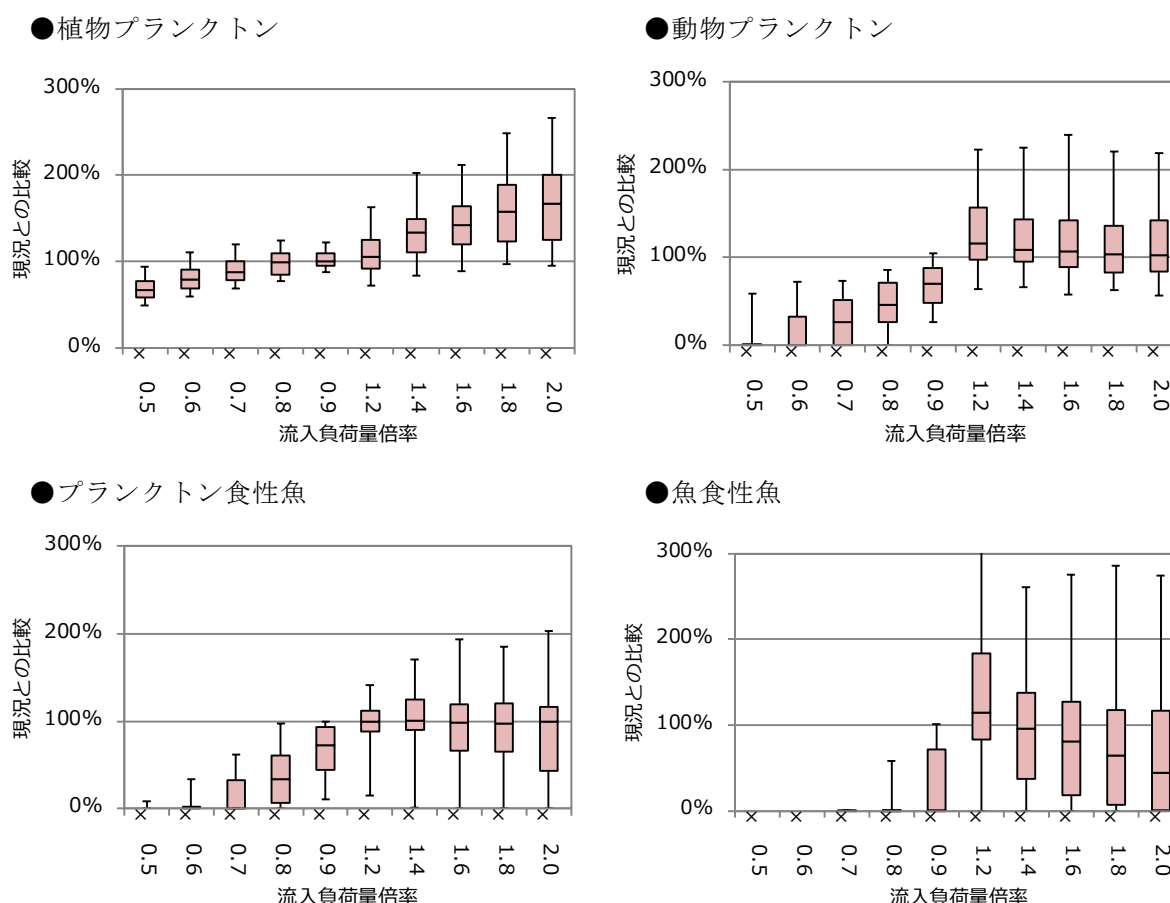
一方で、植物プランクトンから動物プランクトン、および動物プランクトンからプランクトン食性魚への転換効率の双方が、水質・魚類両立指標と正の有意な相関がみられた（図(1)-18）。このことは、動物プランクトンやプランクトン食性魚に食べられやすい餌生物が存在することが、「水がきれいで魚が豊かである」環境のために重要であることを示している。近年琵琶湖では植物プランクトン種の変遷が見られており²⁴⁾、このことが食物連鎖を通じて水質や魚類資源に影響を与えている可能性が示唆された。



図(1)-18 水質・魚類両立指標と転換効率の関係

流入負荷量増減時にモデルで予測された各バイオマスの変化を図(1)-19に示す。植物プランクトンについては、流入負荷の増減に概ね比例するようにバイオマスが変化する傾向がみられた。動物プランクトンについては、流入負荷の増加時にはバイオマスが変化せず、減少時にはバイオマスが減少する傾向がみられた。プランクトン食性魚については、流入負荷の増加時にはバイオマスが変化せず、減少時にはバイオマスが減少する傾向がみられた。魚食性魚については、流入負荷が1.2倍となるときはややバイオマスが増加するものの、それ以上の倍率ではむしろ減少する傾向がみられた。流入負荷の減少時にはバイオマスが顕著に減少する傾向がみられ、0.7倍より減少するとほぼ絶滅する結果となった。流入負荷が増加するにもかかわらず魚食性魚が減少した要因として、流入負荷の変化に伴いシステムとしての安定性が変化する中で、下位の生物の生産を上位の生物が効率よく利用していないことが考えられる。流入負荷増減時の各モデルの転換効率の変化をみると、流入負荷が増加したときの各転換効率が現況再現値（100%）より小さいケースが多く、栄養段階が上位の生物ほど生産が非効率になり、魚食性魚のバイオマスが減少したと考えられた。バイオマスの予測結果の幅についてみると、魚食性魚の不確実性が高くなる傾向がみられた。

魚類への影響について、本モデルの解析結果からは、流入負荷を増やしても魚類が増加しないか、あるいは魚食性魚のみが増加する可能性が示唆された。琵琶湖における主たる漁獲対象はアユやホンモロコなど主に動物プランクトンを捕食する魚類であり、魚食性魚の多くを占めると考えられるオオクチバスは行政の駆除対象となっている。魚類を増やすことを目的とした安易な栄養塩の添加は、水質は悪化するが魚類は増えないか、あるいは漁獲対象ではない魚種が増えるなど、望まない結果をもたらす可能性があることに留意する必要がある。



図(1)-19 流入負荷量増減時の各バイオマスの変化率

有機炭素収支の結果と食物連鎖モデルの結果を合わせると、琵琶湖において動物プランクトンへの給餌は植物プランクトンの割合が大きいことから、植物プランクトンから動物プランクトン、および動物プランクトンからプランクトン食性魚への転換効率の向上が課題としてみえてきた。特に、大型植物プランクトンの発生が動物プランクトンの摂餌の障害となっていることから、中・小型の植物プランクトンの発生を促す対策が求められる

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

琵琶湖水中に含まれる難分解性の溶存有機物は微生物による様々な生分解条件に対して頑健であることが明らかとなった。逆に生物利用性の点から有機物を評価するには、BODを利用することが有効であることが再評価された。琵琶湖水中での生分解は有機物の無機化に先立って有機物の変質が起こっている。生分解の大きさの推定には、TOCで測定するよりも酸素消費を測定した方が感度よく検出できる。BOD₅では琵琶湖全域で0.5 mg L⁻¹を下回る試料が多くて精度の確保が困難であったが、BOD₂₈を用いることで、水中の有機物の生分解性を評価できることを確認した。

生分解試験におけるCODとTOCの比較から、琵琶湖においてCODは生分解の酸素消費量を直接示すものでないことが示された。環境基準の目的の1つには、水環境中での溶存酸素を消費する生分解性有機物の低減があり、酸素消費量を示すCODが指標として使用される根拠であったが、本研究の結果はそのことを支持しない。ただし、CODは相対的な試水の有機物濃度（序列）を示すものであることを確認しており、CODは有機汚濁の大小を見る指標といえる。現代は、TOC計がCODに比べて精度よく簡便に扱えるようになっているので、測定の目的が有機物全量値を得るのであればTOCで満足できる。測定の簡便化を図るのであれば、TOCの利用は十分に考えられる。

孔径0.2 μm のフィルターによる濾過、GC-MSを用いた正確なD/L-アミノ酸の分析、天然湖水中細

菌を用いた培養実験を、それぞれ湖沼DOMのD-アミノ酸分析について初めて適用したことで、D-アミノ酸バイオマーカーを用いた細菌由来DOMの寄与度定量を、湖沼環境でも適用可能なアプローチとして世界で初めて確立した。本研究で開発した手法は、他の湖沼にも応用可能であり、今後様々な環境の湖沼で細菌由来DOMの動態解明が進むことが期待される。

琵琶湖の2018年8～10月のD-アミノ酸データからはまず、琵琶湖のような貧～中栄養湖と、霞ヶ浦のような富栄養湖の両方で、海洋遠洋域と同様に「微生物炭素ポンプ」（細菌による難分解性DOMの生産）が重要であることが示唆された。難分解性DOMの生成源としては、細菌による生産と、真核植物プランクトンなどによる生産の、少なくとも二種類の異なる経路が量的に重要であることが示された。また、夏季の琵琶湖表層湖水に蓄積する準易分解性DOMは、安定炭素同位体比の解析から、内部生産由来であることは判明していたが¹⁵⁾、本研究によって大部分は細菌由来ではなく真核植物プランクトン由来であることが初めて示された。

有機炭素収支のまとめから、琵琶湖の細菌活動は活発であったが、呼吸を引いた細菌生産量は値が小さく、上位の捕食者への主要なエネルギー供給源となっていないことが確認された。動物プランクトンへの給餌は、植物プランクトンの割合が大きい。健全性評価の視点も加えると、植物プランクトンから動物プランクトン、および動物プランクトンからプランクトン食性魚への転換効率の向上が課題としてみえてきた。

生物過程を中心とした湖沼の炭素フローは、湖内で生産される自生性有機物と集水域からの負荷される外来性有機物に二分される。自生性および外来性有機物は、有機汚濁として湖内の水質形成に関係する一方で湖内の生物生産を支えている。本研究では、水中の有機物の総量や生物の生産・死滅量を有機炭素で記述することにより、湖沼の水質と生態系の状態を把握しうることが示された。

（２）環境政策への貢献

＜行政が既に活用した成果＞

環境省の第7期琵琶湖に係る湖沼水質保全計画では、我々研究グループが提案していた生態系保全を視野に入れた有機炭素等による水質管理の重要性が認められ、従来のCODによる水質計画の提示に加え、TOCによる水質計画が提示された。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

- ・有機炭素による低次生態系のバイオマスとフローの記載により、低次生態系の生産実態の把握が可視化された。今後、湖岸造成、河床耕耘、魚類の水田生育事業などの水産資源保全の施策が展開される中において、水質汚濁とのトレードオフや新たな生態系の変化につながらないよう、取組を総合的な視点から成果を測る指標として、上記成果を基にした有機炭素ベースによる環境評価の活用が考えられる。
- ・本研究プロジェクトでは、生態系保全を視野に入れた水質管理を検討する科学的な情報蓄積のため、公共用水域の水質モニタリングにおいて、現状のCODに併用して有機炭素の計測を行うことを政府提案した。この提案は、島根県や埼玉県などいくつかの自治体で関心をもたれており、今後、有機炭素の計測の利用が見込まれる。
- ・滋賀県が呼びかけた湖沼水環境保全に関する自治体連携では、湖沼の水質・生態系の保全・再生のために様々な取組みにとりかかる予定であり、TOCを環境指標とする取組の共有も準備されている。本研究の成果は、自治体連携の基礎資料として活用が見込まれる。
- ・海域や湖沼における環境基準として設定されているCODについては、水質を示す指標としての妥当性に疑問があるなどの問題があり、行政部局により科学的知見を網羅的に整理した上で取扱いを検討すべき課題がある。本研究のCODとTOCの関係整理は、湖沼や河川その他排水を網羅した情報と

なっていることから、課題検討での資料として活用が見込まれる。

- ・植物プランクトンから動物プランクトン、および動物プランクトンからプランクトン食性魚への転換効率の向上が「水がきれいで魚が豊かである」環境のために重要であることが明らかになった。換言すれば、捕食者に食べられやすいプランクトンを増加させることが、生態系に配慮した水質管理の上で重要といえる。
- ・養殖のりの品質改善や魚介類の増加を目的として、瀬戸内海などでは下水処理場からの栄養塩の供給などが実施されているが、琵琶湖における安易な栄養塩の添加は、水質は悪化するが魚類は増えないか、あるいは漁獲対象ではない魚種が増えるなど、望まない結果をもたらす可能性があることに留意する必要がある。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) 早川和秀、岡本高弘、廣瀬佳則、佐藤祐一：日本水環境学会誌、41(6), 193-203 (2018), 低濃度有機汚濁水域における有機物指標の特性把握：琵琶湖流域におけるCOD(Mn), BOD, TOCの比較から。

<その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 早川和秀、廣瀬佳則、岡本高弘、佐藤祐一、永田貴丸、今井章雄、富岡典子、小松一弘、土屋健司、中野伸一、程木義邦、後藤直成、田仲輝子、浅見正人、小松直樹：第17回世界湖沼会議発表論文集, 374-376 (2018) 「琵琶湖における有機物指標の検討」
- 2) 佐藤祐一、早川和秀、永田貴丸、尾原禎幸、廣瀬佳則、七里将一、岡本高弘、山口保彦、酒井陽一郎：滋賀県琵琶湖環境科学研究センター試験研究報告書 平成29年度版 (2018) 「政策課題研究3 生態系保全につながる物質循環のあり方に関する研究」

(2) 口頭発表(学会等)

<口頭発表>

- 1) 早川和秀：第44回 BMS (Biological Mass Spectrometry) カンファレンス (2017) 「基調講演 琵琶湖環境の現状～課題と保全・再生に向けて～」
- 2) K. HAYAKAWA：14th Tripartite Presidents Meeting among NIES, NIER and CRAES (TPM) International Workshop, Tsukuba, Japan (2017) “Lake health assessment of carbon flow and stocks in Lake Biwa”
- 3) 廣瀬佳則、岡本高弘、古角恵美、早川和秀、佐藤祐一、浅見正人、田仲輝子：第44回環境保全・公害防止研究発表会 (2017) 「琵琶湖における酸素消費量と有機物分解との関係について」
- 4) 早川和秀、佐藤祐一、永田貴丸、岡本高弘、廣瀬佳則、後藤直成、土屋健司、小松一弘、富岡典子、今井章雄、中野伸一：日本陸水学会第83回岡山大会 (2018) 「微生物食物網を考慮した琵琶湖の物質循環の課題について」
- 5) 早川和秀、廣瀬佳則、岡本高弘、佐藤祐一、永田貴丸、今井章雄、富岡典子、小松一弘、土屋健司、中野伸一、程木義邦、後藤直成、田仲輝子、浅見正人、小松直樹：第17回世界湖沼会議 (2018) 「琵琶湖における有機物指標の検討」
- 6) 佐藤祐一、早川和秀：第52回日本水環境学会年会 (2018)

「物質循環からみた琵琶湖の健全性評価：循環の「円滑さ」を表す指標の提案」

- 7) 尾原禎幸、岡本高弘、早川和秀、佐藤祐一、奥田一臣、田仲輝子、廣瀬佳則、古角恵美：全国環境研協議会第45回環境保全・公害防止研究発表会（2018）「BODの長期化による琵琶湖における易分解性有機物の把握について」
- 8) 佐藤祐一、早川和秀、酒井陽一郎：第53回日本水環境学会年会（2019）
「「水のきれいさ」と「魚の豊かさ」は両立できるのか？琵琶湖における食物連鎖モデルを用いた解析」
- 9) 山口保彦、由水千景、陀安一郎、木庭啓介、早川和秀：日本地球惑星科学連合2019年大会（2019）「アミノ酸鏡像異性体バイオマーカーを用いた琵琶湖における細菌由来溶存有機物の寄与評価」（アブストラクト提出済み）

<ポスター発表>

- 10) 早川和秀、岡本高弘、廣瀬佳則、佐藤祐一：日本陸水学会第81回沖縄大会（2016）
「琵琶湖におけるCODとTOCの相関性について」
- 11) K. Hayakawa, R. Kojima, C. Wada, T. Suzuki, Y. Sugiyama, T. Kumagai, N. Takei, D. Bamba: 18th International Conference of International Humic Substances Society, Kanazawa, Japan, (2016) "Distribution and characteristics of ultraviolet absorption and fluorescence of dissolved organic matter in a large lake (Lake Biwa, Japan)."
- 12) 廣瀬佳則、岡本高弘、古角恵美、早川和秀、佐藤祐一、田仲輝子、川崎竹志：第51回日本水環境学会年会（2017）「BODからみた琵琶湖における生分解性有機物について」
- 13) 岡本高弘、廣瀬佳則、田中 稔、七里将一、古角恵美、早川和秀、佐藤祐一、川崎竹志、田仲輝子：第51回日本水環境学会年会（2017）「琵琶湖における長期BODの測定について」
- 14) 早川和秀、廣瀬佳則、岡本高弘、佐藤祐一、永田貴丸、後藤直成、中野伸一、富岡典子、今井章雄：第82回日本陸水学会仙北市田沢湖大会（2017）「琵琶湖水における有機物の生分解性について」

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) びわ湖研究セミナー「水環境保全に向けた新たな視点～物質循環（つながり）の観点から～」（2016年7月22日、大津合同庁舎7階7C会議室、観客60名）を主催
- 2) 滋賀県 平成28年度琵琶湖における新たな水質管理のあり方懇話会（一般公開 2017年3月27日、滋賀県庁、出席者約20名）にて研究報告「琵琶湖における有機物収支の把握に関する研究について」（早川）
- 3) 京都大学生態学研究センターシリーズ公開講演会：つなぐ・つながる生物多様性－大学共同利用・共同研究拠点による生態学が捉えた地球生物圏の変化、第8回「琵琶湖研究の最先端にふれる」（2017年2月19日、キャンパスプラザ京都、観客56名）を主催
- 4) 平成29年度瀬戸内海研究フォーラムin京都「川と海のつながりが育む豊かな文化と生態系」、第4セッション「豊かな生態系の琵琶湖との共生を探る」（2017年9月7日、京都大学百周年時計台記念館、観客約80名）にてコーディネーターおよび講演：講演「琵琶湖の底にあるちょっと変わった食物連鎖」（中野）、講演：琵琶湖の水質保全の現状と新たな動き」（早川）
- 5) 滋賀県 平成29年度琵琶湖における新たな水質管理のあり方懇話会（一般公開 2018年1月15日、滋賀県大津合同庁舎庁、出席者約20名）にて研究報告「琵琶湖における有機物収支の把握に関する研究について」（早川）
- 6) 平成29年度しが水環境ビジネス推進フォーラム研究・技術分科会（2018年1月24日コラボしが2

- 1、観客約50名)にて講演「生態系保全につながる物質循環のあり方に関する研究」(早川)
- 7) レイカディア大学びわこ環境学科講習会(2018年8月30日 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター、観客30名)にて講演「琵琶湖環境の現状～課題と保全・再生に向けて～」(早川)
- 8) 滋賀県計量協会環境計量証明部会技術研修会(2018年11月26日、レンタルスペース近江八幡、観客25名)にて講演「琵琶湖の水質の現状と課題」(早川)
- 9) 滋賀県 平成30年度琵琶湖における新たな水質管理のあり方懇話会(一般公開 2019年1月22日、滋賀県大津合同庁舎、出席者約25名)にて研究報告「琵琶湖における有機物収支の把握に関する研究について」(早川)
- 10) びわ湖セミナー「生態系保全をめざして-湖の水質と生き物のつながり～」(2019年3月1日、ピアザ淡海、観客170名)を主催

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) NHKおうみ発630(2017年4月4日、しがリサーチ 研究の概要について1分程紹介)
- 2) 京都新聞(2017年11月19日、滋賀版「より正確な水質汚濁測定 県、新指標を国に提案へ」研究の概要について紹介)
- 3) 中日新聞(2018年12月18日、滋賀版「よみがえれ琵琶湖 世界湖沼会議を振り返って」研究の概要について紹介)
- 4) 京都新聞(2019年1月31日、滋賀版26頁「植物プランクトン湖魚増減の鍵？」研究の概要について紹介)
- 5) 環境新聞(2019年2月6日、全国版5頁「水と生き物のつながりを探る 琵琶湖の挑戦(上)」研究の概要について紹介)
- 6) 環境新聞(2019年2月13日、全国版6頁「水と生き物のつながりを探る 琵琶湖の挑戦(下)」研究の概要について紹介)
- 7) 京都新聞(2019年3月2日、滋賀版20頁「「水清ければ魚棲まず」本当？プランクトンの質で左右」研究成果報告セミナーを報道)

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) 山本民次、花里孝幸：海と湖の貧栄養化問題、地人書館(2015)
- 2) J.J. COLE, S. FINDLAY, M.L. PACE: Mar. Ecol. Prog. Ser. 43(1/2) 1-10 (1988) Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview.
- 3) 早川和秀、辻村茂男、石川俊之、芳賀裕樹、岡本高弘、焦春萌、石川可奈子、熊谷道夫：水環境学会誌, 35(6), 89-100 (2012) 複数の定期調査データを用いた統合的な解析による琵琶湖における全リン、硝酸態窒素濃度およびいくつかの水質項目の長期変化.
- 4) 加藤伸吾、増田貴則：水環境学会誌 39(1) 1-15 (2016) 流域汚濁負荷量と湖水中有機物量の関係についての概念的食網モデルを用いた考察.
- 5) T.B. GURUNG, J. URABE: Microb. Ecol. 38(2) 136-145 (1999) Temporal and vertical difference in factors limiting growth rate of heterotrophic bacteria in Lake Biwa.
- 6) N. KISHIMOTO, C. YAMAMOTO, K. SUZUKI, S. ICHISE: J. Water Environ. Technol. 13(1) 1-14 (2015) Does a decrease in chlorophyll a concentration in Lake Biwa mean a decrease in primary productivity by phytoplankton?
- 7) 岡本高弘、早川和秀：水環境学会誌 34(5), 151-157 (2011) 琵琶湖における溶存有機物の現状と課題
- 8) N. JIAO, G.J. HERNDL, D.A. HANSELL, R. BENNER, G. KATTNER, S.W. WILHELM, D.L.

- KIRCHMAN, M.G. WEINBAUER, T. LUO, R.F. CHEN, F. AZAM: *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 593–599 (2010), Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean.
- 9) M.D. McCARTHY, J.I. HEDGES, R. BENNER: *Science* 281, 231–234 (1998), Major bacterial contribution to marine dissolved organic nitrogen.
- 10) K. KAISER, R. Benner: *Limnol. Oceanogr.* 53, 99–112. (2008), Major bacterial contribution to the ocean reservoir of detrital organic carbon and nitrogen.
- 11) N. KAWASAKI, K. KOMATSU, A. KOHZU A., N. TOMIOKA, R. SHINOHARA, T. SATOU, F.N. WATANABE, Y. TADA, K. HAMASAKI, M. KUSHAIRI, A. IMAI: *Appl. Environ. Microbiol.*, 79, 7160–7168 (2013), Bacterial contribution to dissolved organic matter in eutrophic Lake Kasumigaura, Japan.
- 12) 早川和秀, 岡本高弘, 廣瀬佳則, 佐藤祐一: *水環境学会誌* 41(6)、193-203(2018) 低濃度有機汚濁水域における有機物指標の特性把握: 琵琶湖流域におけるCOD(Mn), BOD, TOCの比較から.
- 13) Y. SHEN, F.H. CHAPELLE, E.W. STROM, R. BENNER: *Biogeochemistry*, 122, 61–78 (2015), Origins and bioavailability of dissolved organic matter in groundwater.
- 14) Y.T. YAMAGUCHI, M.D. McCARTHY: *Geochim. Cosmochim. Acta*, 220, 329–347 (2018), Sources and transformation of dissolved and particulate organic nitrogen in the North Pacific Subtropical Gyre indicated by compound-specific $\delta^{15}\text{N}$ analysis of amino acids.
- 15) K. MAKI, C. KIM, C. YOSHIMIZU, I. TAYASU, T. MIYAJIMA, T. NAGATA: *Limnology* 11: 143–153 (2010), Autochthonous origin of semi-labile dissolved organic carbon in a large monomictic lake (Lake Biwa): Carbon stable isotopic evidence.
- 16) 佐藤祐一, 岡本高弘, 早川和秀, 大久保卓也, 小松英司: *水環境学会誌* 39(1)、17-28 (2016) 琵琶湖における難分解性有機物の起源: 発生源における生分解試験とボックスモデルによる推計
- 17) V. CHRISTENSEN, C. J. WALTERS: *Ecological Modeling* 172(2-4) (2004) Ecopath with Ecosim: methods, capabilities and limitations.
- 18) N. NIQUIL, G. BARTOLI, J. URABE, G.A. JACKSON, L. LEGENDRE, C. DUPUY, M. KUMAGAI: *Freshwater Biol.*, 51(8) 1570-1585 (2006) Carbon steady - state model of the planktonic food web of Lake Biwa, Japan.
- 19) C. YOSHIMIZU, T. YOSHIDA, M. NAKANISHI, J. URABE: *Limnology* 2(1) 37–43 (2001) Effects of zooplankton on the sinking flux of organic carbon in Lake Biwa.
- 20) M. ALEXANDER: *Biodegradation and bioremediation*. Academic Press (1999)
- 21) F.GUILLEMETTE, P.A. DEL GIORGIO: *Limnol.Oceanogr.*, 56(2), 734–748 (2011) Reconstructing the various facets of dissolved organic carbon bioavailability in freshwater ecosystems.
- 22) T. NAGATA: *Appl. Environ. Microbiol.* 53(12) 2872-2882 (1987) Production rate of planktonic bacteria in the north basin of Lake Biwa, Japan.
- 23) T. B. GURUNG, J. URABE, K. NOZAKI, C. YOSHIMIZU, M. NAKANISHI: *Lakes & Reservoirs* 7(4) 317-323 (2002) Bacterioplankton production in a water column of Lake Biwa.
- 24) 池田将平、一瀬諭、古田世子、占部城太郎: *水環境学会誌*、41(5)、115-122 (2018) 琵琶湖北湖における植物プランクトン群集の季節変化とその長期変動: PEG モデルとの比較

Ⅱ－２ 植物プランクトンの一次生産量の実測と環境因子との関係解析

滋賀県立大学環境科学部 後藤直成

平成28～30年度累計予算額：4,587千円

（うち平成28年度：1,555千円、平成29年度：1,555千円、平成30年度：1,477千円）

〔要旨〕

本研究では、琵琶湖における植物プランクトンの一次生産速度を連続的に測定し、各環境因子との関係性を評価することを目的とした。2017年8月20日から2018年10月21日の琵琶湖北湖多景島沖（35°18.94'N, 136°11.45'E）において、3深度（5 m、10 m、15 m）にクロロフィル蛍光光度計および水中光量子計を係留し、クロロフィルa濃度と水中光量子量の連続測定を行った。これらの観測結果とパルス変調式クロロフィル励起蛍光法で得られた光合成－光曲線から、琵琶湖における植物プランクトンの単位面積あたりの日間一次生産速度を測定・算出した。観測期間中、植物プランクトンの一次生産速度は0～3.92（平均1.11） $\text{g C m}^{-2} \text{d}^{-1}$ の範囲を変動し、春（4－6月）・夏期（7－9月）に増加、秋（10－12月）・冬期（1－3月）に低下する傾向を示した。2018年春期後半における一次生産速度は最大でおよそ4 $\text{g C m}^{-2} \text{d}^{-1}$ に達し、琵琶湖北湖沖域で過去に報告された値の中でもっとも高い速度となった。この時期における高い一次生産速度は、主に、大型緑藻2種（*Staurastrum dorsidentiferum*, *Micrasterias hardyi*）が担っていた。観測期間中に発生した台風や大雨などの気象イベントは、水中の光環境や栄養環境を大きく変化させ、一次生産速度に大きな影響を与えていた。一般に、台風や降水による気象イベントは栄養塩供給を増加させ、一次生産速度を増加させるが、極度に濁度を増加させる気象イベント（雨台風、集中豪雨）は一次生産速度を数週間にわたって低下させることが明らかとなった。全観測期間を通じて、一次生産速度の変動は概ね水中光量子量で説明できたが、植物プランクトンのブルーム時には現存量（クロロフィルa濃度）の寄与も高くなった。

〔キーワード〕

琵琶湖北湖、植物プランクトン、一次生産速度、光学的測定法、気象イベント

1. はじめに

1990年以降、日本で最大の面積・容積を有する琵琶湖では、富栄養だった水質の改善が進んでいる一方で、漁獲量は年々減少傾向にあり、期待されたほどの在来生物群集の“にぎわい”は戻ってきていない。また、琵琶湖では、温暖化に起因するさまざまな問題（貧酸素化や生物現存量・多様性の低下、有害藻類の増加など）が徐々に顕在化してきている。これらの問題には、琵琶湖生態系を根本から支えている植物プランクトンが大きく関わっていると考えられ、その動態を詳細かつ正確に把握することが喫緊の重要な課題となっている。特に、植物プランクトンによる一次生産は琵琶湖の水質を左右するだけでなく、水産資源とも密接な関係にある。一般に、一次生産速度は漁獲量と正の相関関係にあることが、多くの海域や湖沼で報告されている¹⁾。

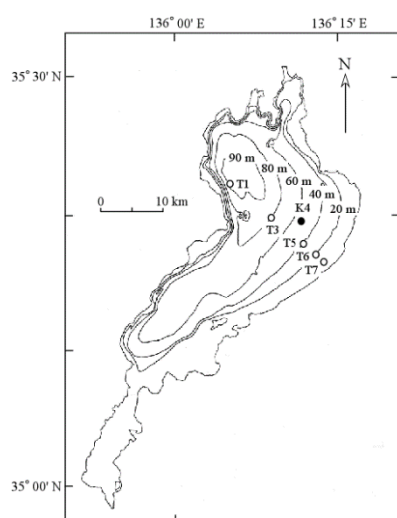
植物プランクトン群集の動態を把握するためには、現存量、種組成、一次生産速度などの情報が必要となり、従来、これらの測定には生物・化学的手法が用いられてきた。例えば、クロロフィルa濃度の分析は採水・色素抽出・蛍光強度測定、種組成の決定は採水・検鏡・計数、一次生産速度の測定は採水・ボトル培養・溶存酸素（あるいは有機炭素）量測定といった一連の時間を要する作業が必要となる。これらの手法は、測定精度は高いが、操作が煩雑で多くの時間を要するため、時空間的に解像度が低くなる。また、船舶を用いて試料を採取する必要があるため、測定できる範囲が一部の水域に限定されてきた。つまり、これらの方法では、時々刻々と変化する植物プランクトン群集の動態を詳細に把握することができない。琵琶湖における一次生産量を詳細かつ正確に把握すれば、琵琶湖環境の現状に合わせた適確かつ効率的な水質管理や漁場環境・水産資源管理が実現できる。

2. 研究開発目的

そこで本研究では、時空間的に、より高解像度の測定が可能である光学的測定法を用いて、植物プランクトン群集の現存量、種組成（群集構造）、一次生産速度の3因子を同時に測定し、琵琶湖北湖における植物プランクトン群集動態を捉えることを目的とした。琵琶湖北湖沖域における植物プランクトンの一次生産速度、現存量（クロロフィルa濃度）、群集構造（珪藻、緑藻、シアノバクテリア）を時空間的に高解像度で測定し、植物プランクトン群集動態と各環境因子（水温、光量子量、栄養塩濃度など）との関係性を評価した。

3. 研究開発方法

（1）係留地点および観測概要



2017年8月21日から2018年10月21日までの琵琶湖北湖多景島沖（K4地点：35°18.94'N, 136°11.45'E）において、3深度にクロロフィル蛍光光度計と水中光量子計、深度計を係留し、連続測定を行った（図(2)-1）。なお、クロロフィル蛍光光度計から得られた蛍光強度のデータは、後述（補足）の方法で光の影響を除外した後、蛍光強度をクロロフィルa濃度に換算した。この観測結果とパルス変調式クロロフィル励起蛍光法で得られた光合成-光曲線から、琵琶湖における植物プランクトンの日間一次生産速度を測定・算出した。また、係留期間中の2017年11月6日と2018年7月11日、同年9月6日にプランクトンネットを用いて植物プランクトンをマイクロ植物プランクトン（> 20 μm）、ナノ植物プランクトン（5-20 μm）、ピコ植物プランクトン（< 5 μm）に分離し、各サイズの一次生産速度を測定した。

同期間のK4地点において、月に一回の頻度で植物プランクトン群集構造（珪藻、緑藻、シアノバクテリア）を多波長励起クロロフィル蛍光計を用いて鉛直的に測定した。

琵琶湖北湖全域におけるクロロフィルa濃度分布は、衛星Aquaに搭載された水色センサーMODISのデータを用いて算出した。

図(2)-1. 係留系設置地点（K4）と衛星データ精度確認のための現場データ取得地点（T1～T7）

(2) 一次生産速度の測定法

一次生産速度の測定・算出は太田ら²⁾の方法に基づいて次のように行った。観測期間中、月に1回の頻度で、K4地点の3深度（5 m, 10 m, 15 m）で採水を行った。採水した試料は実験室内において、PAM式クロロフィル蛍光光度計（Water-PAM, Walz）を用いて採水時の現場水温下、0～2000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の8段階の光量子量でPSIIにおける量子収率（Yield）を測定し、以下の式（1）により電子伝達速度（ETR, $\mu\text{mol electron mg chl. a}^{-1} \text{s}^{-1}$ ）をGenty et al.³⁾の方法により算出した。

$$\text{ETR} = \text{Yield} \cdot \text{PAR} \cdot a^* \cdot 0.5 \quad (1)$$

ここで、PARは光合成有効放射（可視光域400～750 nmにおける光量子量）、 a^* はPARにおける単位クロロフィルa濃度当たりの平均光吸収係数を示す。なお、PSIとPSIIの光エネルギー配分率は1:1と仮定した。

a^* は以下に示すQuantitative Filter Technique（QFT）法で求めた。濾紙上に捕集された全粒子状物質の可視光域における吸光度（ OD_f ）を分光光度計（V-560, Jasco）にて測定し、式（2）により試水中の懸濁物質の吸光度（ OD_s ）を算出した。

$$\text{OD}_s = 0.392 \text{OD}_f + 0.655 \{\text{OD}_f\}^2 \quad (2)$$

さらに、式（3）により吸収波長（ λ ）における懸濁物質の光吸収係数（ $a_p(\lambda)$ ）を求めた。

$$a_p(\lambda) = 2.3 \text{OD}_s \cdot S / V \quad (3)$$

ここで、Sは濾紙の濾過面積（ m^2 ）、Vは試水の濾過容量（ m^3 ）を示す。続いて、濾紙上の植物色素をメタノールで1時間以上抽出した後に再び吸光度を測定することによって植物プランクトン以外の懸濁物質の光吸収係数（ $a_d(\lambda)$ ）を求めた。植物プランクトンの光吸収係数（ $a_{ph}(\lambda)$ ）は、 $a_p(\lambda)$ から $a_d(\lambda)$ を差し引くことで求めることができる。最終的に、 a^* は吸収波長400～750 nmにおける $a_{ph}(\lambda)$ の平均値を別途求めたクロロフィルa濃度で除することで得た。試水中のクロロフィルa濃度は、測定用に保存した試料を90%アセトン溶液に24時間浸漬し、濾紙上に捕集された植物プランクトン色素を抽出した後、抽出液の蛍光強度を分光蛍光光度計（TD-700, Turner）にて測定した。

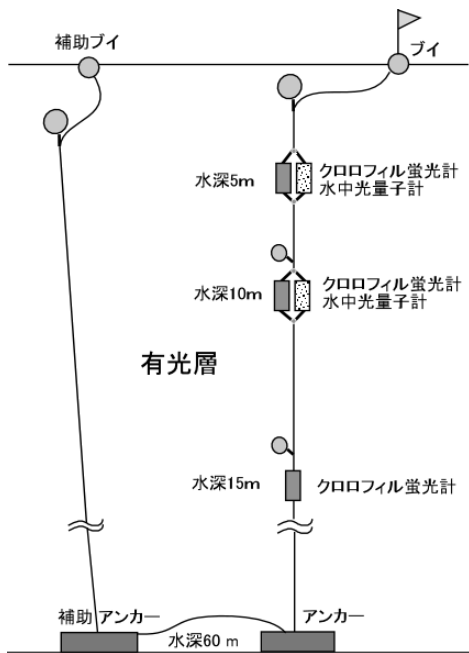
各水中光量子量（I）における光合成速度（P: $\mu\text{g C mg chl. a}^{-1} \text{s}^{-1}$ ）は、ETRに対する炭素固定量のモル比（C / ETR）を0.095⁴⁾として算出し、式（4）を用いて非線形回帰にて求めた。

$$P = P_s [1 - \exp(-\alpha I / P_s)] [\exp(-\beta I / P_s)] \quad (4)$$

ここで、 P_s は強光阻害がない時の最大光合成速度、 α は初期傾斜、 β は強光阻害係数を示す。

3深度における光合成速度は水中光量子量とそれぞれの観測月に得られた光合成-光曲線から求めた。求めた光合成速度に各深度におけるクロロフィルa濃度を乗じることで単位体積当たりの一次生産力を算出した。これを補償深度まで台形積分することで単位面積当たりの一次生産速度を求め、さらにこれを時間積分することで日間一次生産速度（ $\text{g C m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ）とした。

上記の一次生産速度の算出で用いる各深度におけるクロロフィルa濃度と水中光量子量は、K4地点に設置・係留したクロロフィル蛍光計（ACLW-USBおよびACLW-CMP, JFEアドバンテック）と水中光量子計（ALW-CMP, JFEアドバンテック）を用いて測定した（図(2)-2）。この時、クロロフィル蛍光光度計は3深度（5 m, 10 m, 15 m）に、水中光量子計は2深度（5 m, 10 m）にそれぞれ設置し、いずれも20分間隔でデータを記録した。なお、水深15 mの水中光量子量（ I_{15} ）は、水深5 mと10 mの水中光量子量から鉛直光消散係数（k）を算出し、以下の式（5）を用いて推定した。



図(2)-2. K4地点に設置した係留系図

$$I_{15} = I_0 e^{-15k} \quad (5)$$

ここで、 I_0 は水深0 mにおける光量子量を示す。また、補償深度 (Z_e) は、相対水中光量子量が1%に相当する深度として式(6) から算出した。

$$Z_e = -1/k \cdot \ln 0.01 \quad (6)$$

なお、本研究に使用した水中光量子計は下向光量子量 (I_d) のみを測定するため、適宜、スカラー光量子計 (LI-193, LI-COR) を用いて、スカラー光量子量 (I) の測定も行い、これらの比 (I/I_d) を求めることで、 I_d を I に変換した。

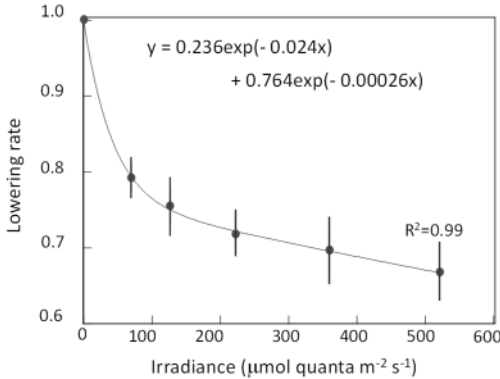
なお、本係留観測は船舶等との衝突事故などを防ぐため、事前に滋賀県から占有許可および工作物の新築許可を得て行った。また、県内漁業組合にも本係留観測について事前に説明を行い、協力を得た。

補足) 水中クロロフィル蛍光計を用いたクロロフィルa濃度測定法の高精度化について

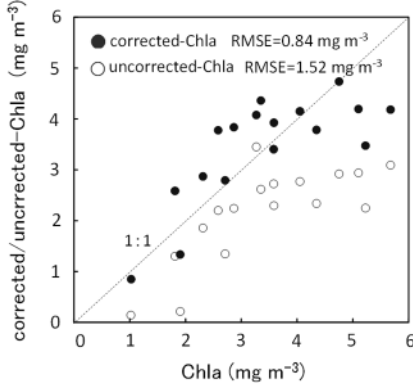
水中クロロフィル蛍光計の測定精度は色素抽出法と比較して低く、現場のクロロフィルa濃度を正確に測定できていないと指摘され続けてきた。そこで本研究では、琵琶湖の植物プランクトン群集を用いて、水中クロロフィル蛍光計の高精度化を以下のように行った。

植物プランクトン細胞から射出されるクロロフィル蛍光強度 (FI) は細胞が受ける光量子量 (LI) によって大きく影響される。そこでまず、北湖沖で採取した植物プランクトン群集を用いてFIとLIとの関係式を次のように作成した。培養器内のLIを数時間毎に段階的 ($0 \sim 523 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) に変化させ、関係式 ($FI = 0.236\exp(-0.024LI) + 0.764\exp(-0.00026LI)$) を作成した (図(2)-3)。この関係式を利用することにより、光の影響を除去した (暗適応下での) クロロフィル蛍光強度 (FI_{dark}) を求めることができる。続いて、 FI_{dark} をクロロフィルa濃度 (Chla) に変換する式を次のように作成した。暗適応させた植物プランクトン群集の FI_{dark} とChlaを、それぞれ、水中クロロフィル蛍光計と色素抽出・蛍光法で測定し、両者の関係式 ($Chla = 3.35 FI_{\text{dark}} + 2.60$) を得た。

2015年から2016年にかけて北湖沖に係留した水中クロロフィル蛍光計と水中光量子計のデータおよび上記2つの関係式を用いて、光の影響を除去して算出した値 (corrected-Chla) は、補正なしの値よりも精度が大きく向上した (図(2)-4)。



図(2)-3. 蛍光強度の低下率と光量子量との関係
2015年8月～2016年12月までの計8回の平均±標準偏差



図(2)-4. 補正前後のクロロフィルa濃度の測定精度

(3) 植物プランクトン群集構造

2017年6月から2018年3月にかけて、月に一回の頻度で、琵琶湖北湖のK4地点において多波長励起蛍光計（MFL10W-USB, JFEアドバンテック）を用いて9波長（375, 400, 420, 435, 470, 505, 525, 570, 590 nm）における励起蛍光強度の鉛直分布を測定した。これらの結果と事前に測定・決定した各植物プランクトングループ（珪藻、緑藻、シアノバクテリア）の基準励起蛍光スペクトルから、各グループのクロロフィルa濃度を推定した（表(2)-1）。なお、本研究で用いた以下の基準励起スペクトルは、単離培養8種と天然植物プランクトン群集のスペクトルの中から、もっとも精度良く推定できたスペクトルの組み合わせを選択した。

各グループの基準スペクトル作成に用いた単離培養種および天然植物プランクトン群集

シアノバクテリア：単離培養種2種（*Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus* sp.）

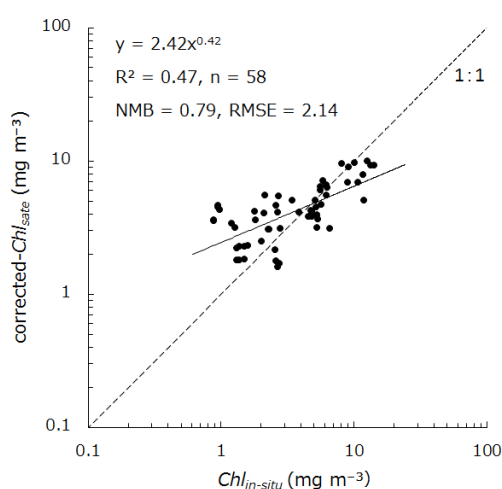
緑藻：2016年12月12日の琵琶湖北湖における緑藻群集（主に、*Staurostrum dorsidentiferum*が優占：体積比で緑藻96%）

珪藻：単離培養種 *Aulacoseira granulata*

表(2)-1. 多波長励起蛍光計で用いた各グループの基準励起蛍光スペクトル

励起波長 (nm)	シアノバクテリア	緑藻	珪藻
375	0.308	0.304	0.961
400	0.297	0.292	0.942
420	0.361	0.443	1.388
435	0.335	0.472	1.490
470	0.285	0.427	1.123
505	0.178	0.119	0.435
525	0.273	0.090	0.432
570	0.658	0.117	0.292
590	0.253	0.059	0.125

(4) 植物プランクトン現存量分布の推定



図(2)-5. 現場クロロフィルa濃度（ $Chl_{in-situ}$ ）と衛星データから推定した衛星クロロフィルa濃度との関係（ $corrected-Chl_{sat}$ ）

アメリカ航空宇宙局（NASA）が運営するホームページ（Ocean Color Web : <https://oceancolor.gsfc.nasa.gov>）から、衛星Aqua（観測幅2,330 km, 観測周期6～12時間）に搭載された水色センサーMODISの衛星リモートセンシング反射率（Level2）を取得した。塚本ら⁵⁾の方法に基づいて、取得した衛星リモートセンシング反射率を補正した後、琵琶湖に対応した水中生物光学アルゴリズムを用いて衛星クロロフィルa濃度を推定した。なお、本研究期間を通じて、2～3ヶ月に1回の頻度で現場（5地点：T1～T7, 図(2)-1）におけるリモートセンシング反射率を水中分光放射照度・輝度計（PRR600, PRR610, Biospherical Instruments）で、現場クロロフィルa濃度をWelschmeyer⁶⁾の方法で実測し、衛星クロロフィルa濃度の精度を確認、必要に応じてアルゴリズムを改良し、高精度化を随時行った（図(2)-5）。

4. 結果及び考察

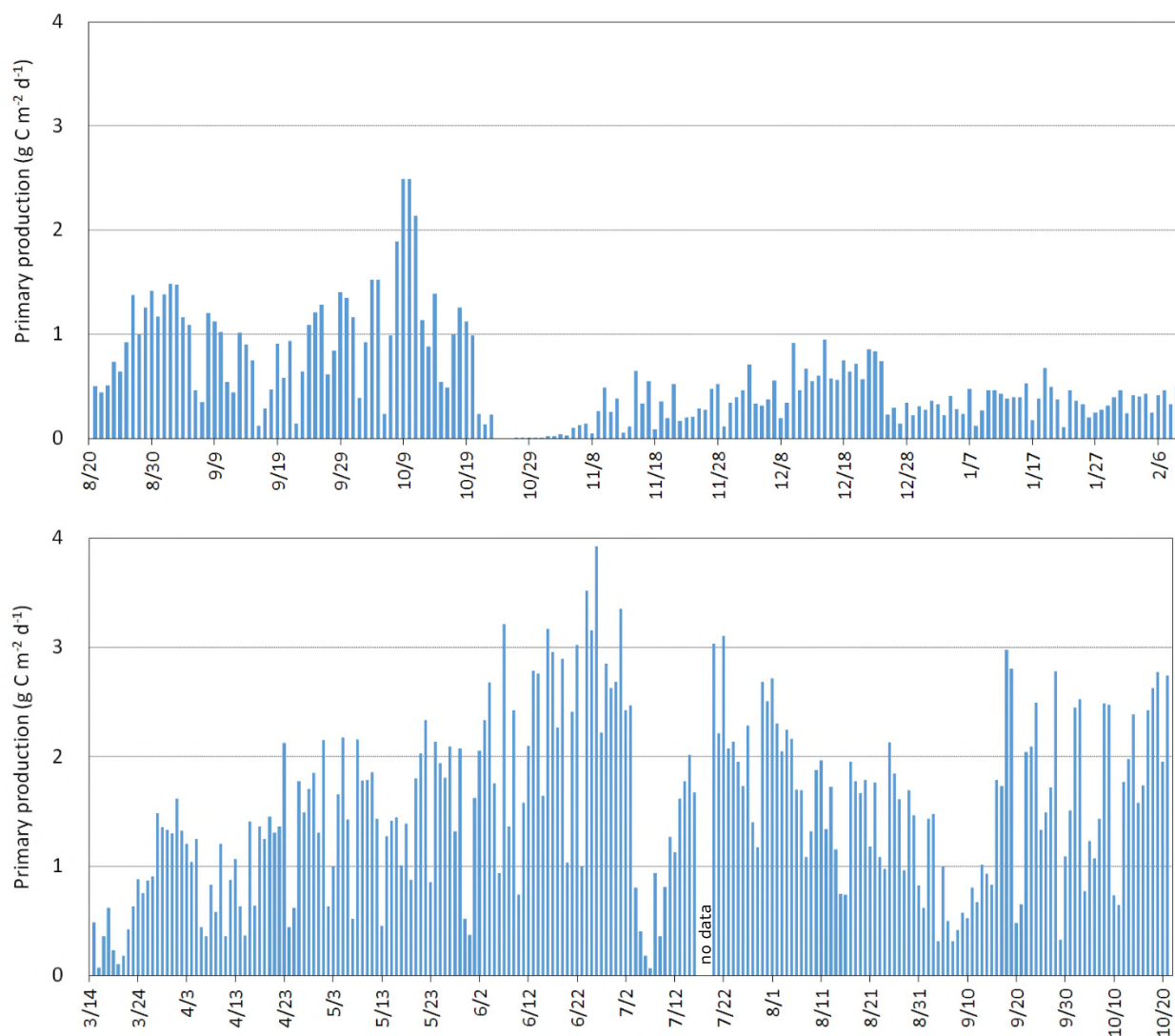
(1) 結果

1) 一次生産速度

全観測期間中、琵琶湖北湖沖域における植物プランクトンの一次生産速度は、0～3.92（平均1.11） $\text{g C m}^{-2} \text{d}^{-1}$ の範囲を変動した（図(2)-6）。

観測期間前期（2017年8月21日～2018年2月9日）の一次生産速度は、0～2.49（平均0.57） $\text{g C m}^{-2} \text{d}^{-1}$ の範囲を変動した。2017年8月下旬から10月中旬までは比較的高い一次生産速度で変動していたが、10月22日から23日に滋賀県に接近した台風21号の影響により、その後一週間程度、一次生産速度はほぼ0となった。2017年11月から2018年2月の一次生産速度は低い値で推移し、0.02～0.94（平均0.37） $\text{g C m}^{-2} \text{d}^{-1}$ の範囲にあった。

観測期間後期（2018年3月15日～10月21日）の一次生産速度は前期と比較して高く、0.06～3.92（平均1.53） $\text{g C m}^{-2} \text{d}^{-1}$ の範囲を変動した。3月中旬から6月下旬にかけて一次生産速度は大きく増加し、6月26日には観測期間最大値となる3.92 $\text{g C m}^{-2} \text{d}^{-1}$ に達した。その後、7月6日から8日にかけての集中豪雨（平成30年7月豪雨）で一旦大きく減少した後、9月上旬まで減少傾向が続いた。9月中旬以降、一次生産速度は再び増加し、観測終了の10月21日まで高い値を維持した。



図(2)-6. 琵琶湖北湖沖域における一次生産速度の季節変化

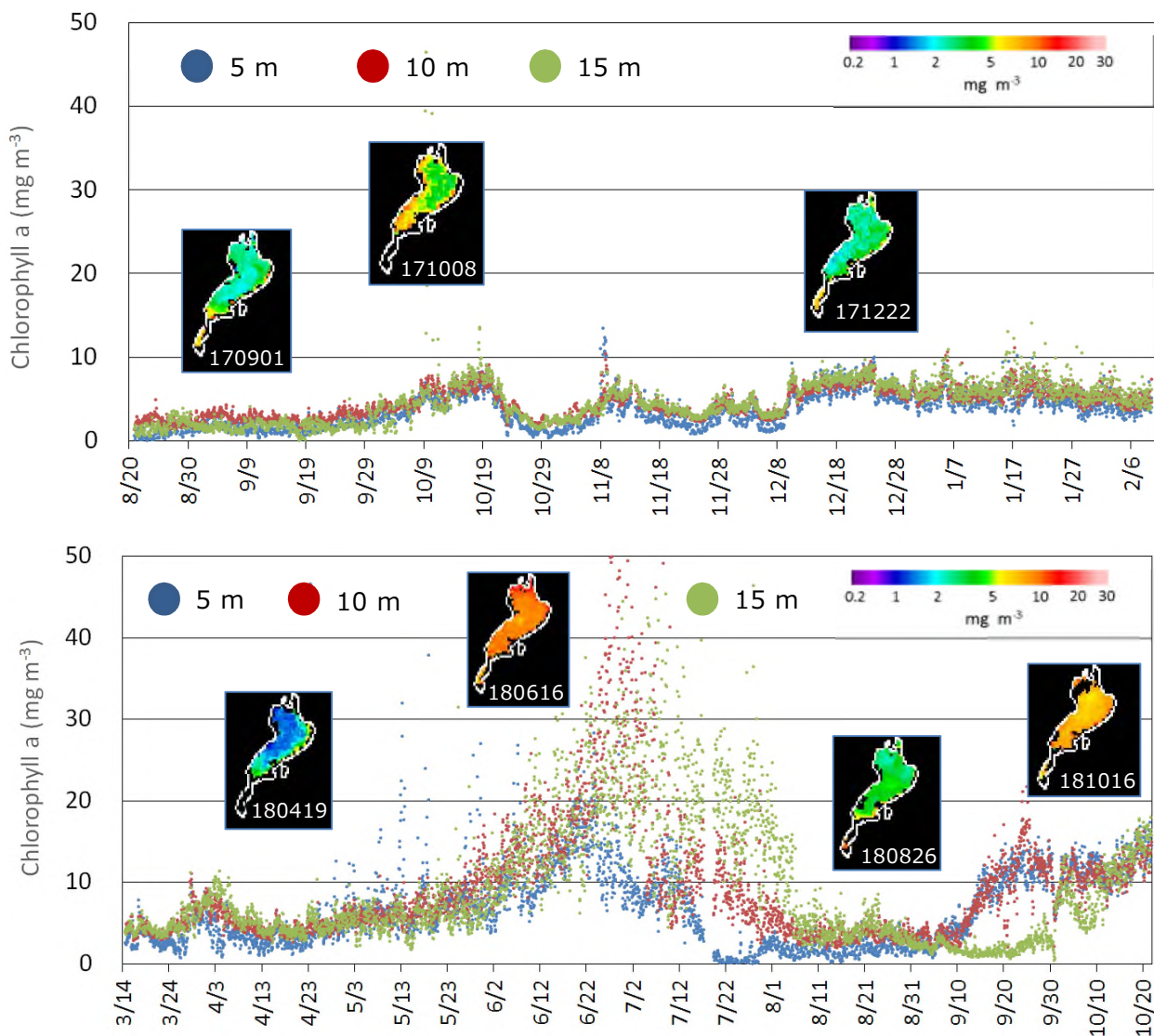
上図：前期 2017年8月21日～2018年2月9日

下図：後期 2018年3月15日～10月21日

2) クロロフィルa濃度

琵琶湖北湖沖域におけるクロロフィルa濃度の季節変化を図(2)-7に示す。観測期間前期（2017年8月21日～2018年2月9日）のクロロフィルa濃度は、およそ1～2（5m: 平均3.5, 10m: 平均4.4, 15m: 平均4.6） mg m^{-3} の範囲を変動した。3深度のクロロフィルa濃度はほぼ同じ変動を示し、9月下旬から10月中旬にかけて増加した後、台風21号（10月22日～23日）が滋賀県に接近する数日前から急減傾向を示し、10月末まで低下し続けた。台風22号（10月29日）以降は増加傾向を示し、その後、増減を繰り返しつつ、比較的高い濃度で推移した。

観測期間後期（2018年3月15日～10月21日）におけるクロロフィルa濃度は、およそ1～50（5m: 平均5.3, 10m: 平均7.0, 15m: 平均7.1） mg m^{-3} の範囲を変動した。4月下旬から6月下旬にかけてクロロフィルa濃度は3深度ともに大きく増加し、特に、深度10 mと15 mのクロロフィルa濃度は30 mg m^{-3} を越える値にまで達した。その後（平成30年7月豪雨後）、クロロフィルa濃度は3深度ともに急減し、9月上旬まで低い値で推移した。台風20号（8月24日）と21号（9月4日：彦根最大瞬間風速46.2 m）通過後の9月中旬から、深度5 mと10 mのクロロフィルa濃度が再び増加し、10月下旬までおよそ10～15 mg m^{-3} の範囲を変動した。深度15 mにおけるクロロフィルa濃度も10月上旬から急増し、10月下旬にはおよそ15 mg m^{-3} に達した。



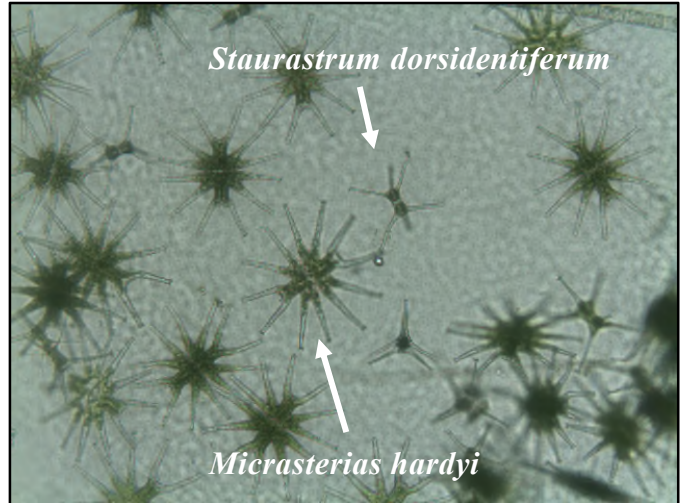
図(2)-7. 琵琶湖北湖沖域におけるクロロフィルa濃度の季節変化

上図：前期 2017年8月21日～2018年2月9日

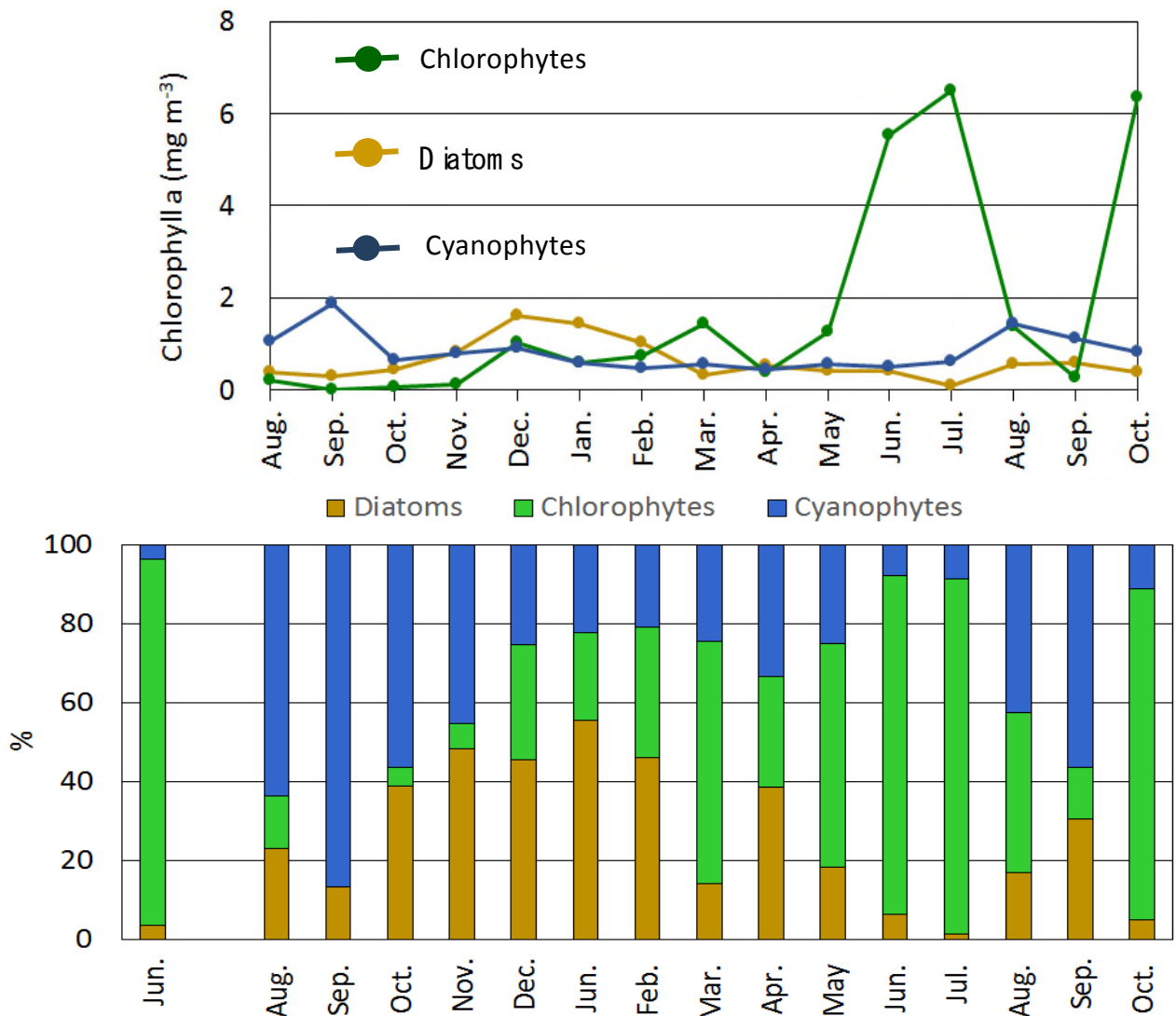
下図：後期 2018年3月15日～10月21日

3) 群集構造

琵琶湖北湖沖域における各グループ（珪藻、緑藻，シアノバクテリア）のクロロフィルa濃度と各藻類グループ割合の季節変化を図(2)-8に示す。2017年8月～12月はシアノバクテリア（平均55%）と珪藻（平均34%）が優占したが、2018年は緑藻（平均51%）が優占する傾向にあった。特に、6月～7月は大型緑藻の *Staurastrum dorsidentiferum* と *Micrasterias hardyi* が大増殖し（図(2)-9）、緑藻の占める割合（6月：86%，7月：90%）が大幅に増加した。この大型緑藻2種のブルームは、翌月の8月には終息したが、その後の10月に *S. dorsidentiferum* と *M. hardyi* が再び増加を始め、その割合は84%となった。



図(2)-9. 2018年6月～7月と10月に琵琶湖北湖において優占した大型緑藻2種



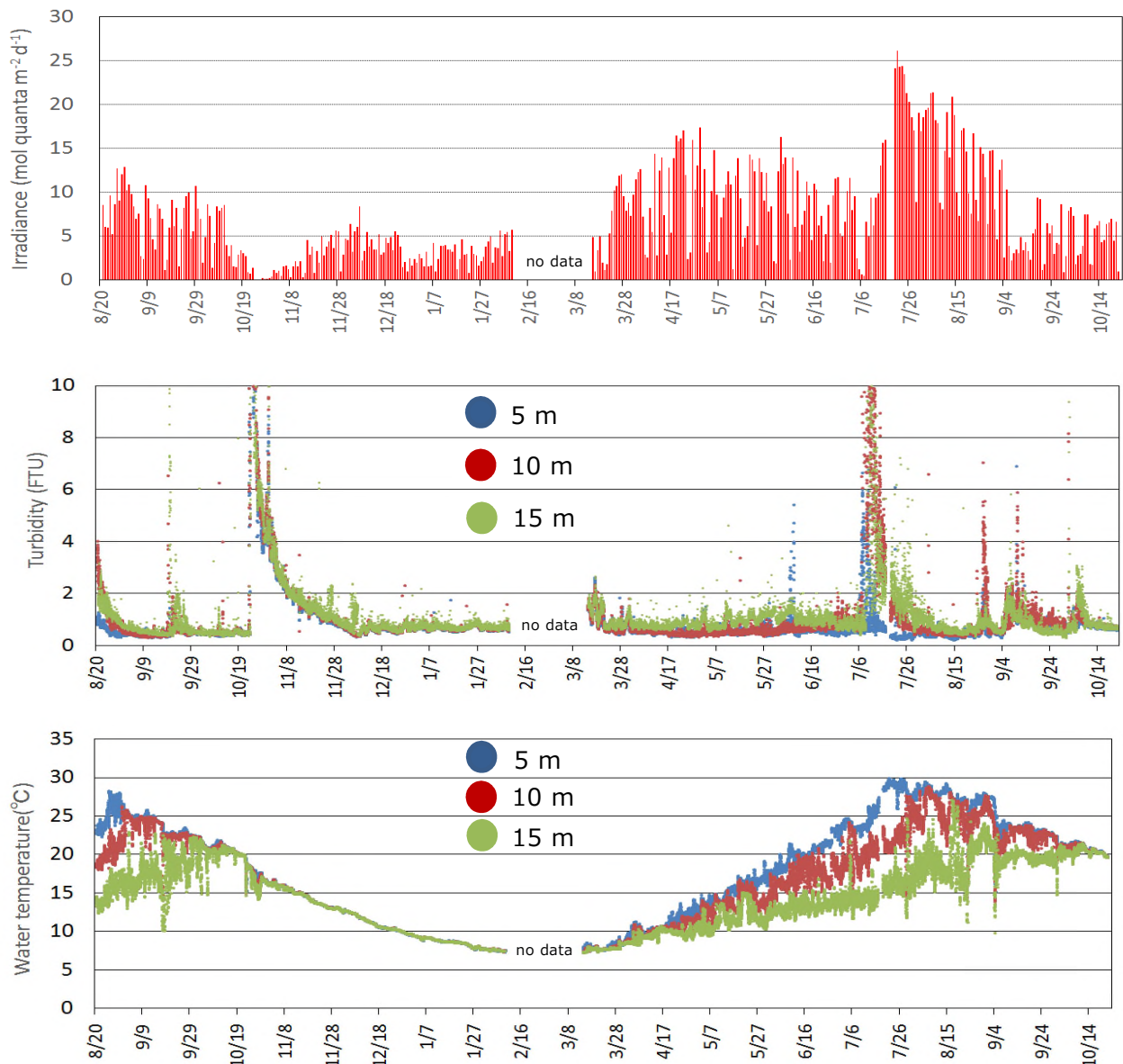
図(2)-8. 琵琶湖北湖沖域における各藻類グループ（珪藻，緑藻，シアノバクテリア）のクロロフィルa濃度（上図）と各グループ割合（下図）

4) 環境因子

琵琶湖北湖沖域における日積算光量子量（深度5 m）、濁度、水温を図(2)-10に示す。深度5 mにおける日積算光量子量は0～26.2 mol quanta m⁻² d⁻¹の範囲を変動し、2017年8月下旬から10月中旬にかけて徐々に減少した後、台風21号（10月22日～23日）の影響（濁水の流入と堆積物の巻き上げ）のため、ほぼ0となった。この台風の影響に起因する低値はその後数週間程度続いた。2018年3月中旬から4月下旬にかけて日積算光量子量は徐々に増加し、梅雨期間にいくらか低下した後、梅雨明け後（7月9日）から急増した。特に、7月下旬から8月中旬は高値（15 mol quanta m⁻² d⁻¹以上）で推移し、その後は徐々に低下した。

濁度は各深度ともに、台風と降雨の影響を受けて、大きく変動した。特に、2017年の台風21号（10月22日～23日）と2018年の集中豪雨時（7月6日～8日）は濁度が大きく急増し、水中に透過する光量を数週間にわたり大きく減少させた。

観測期間中、水温は深度5 mと10 mで、それぞれ、7.3～29.9℃と7.2～28.8℃の範囲を変動した（深度15 m: 7.2～26.9℃）。特に、2018年夏期は猛暑の影響により、深度5 mで水温が30℃付近にまで達し、水温成層が湖面付近から形成・発達していた（通常、夏期表層0～10 m付近で観察される混合層（水温がほぼ一定）が形成されなかった）。



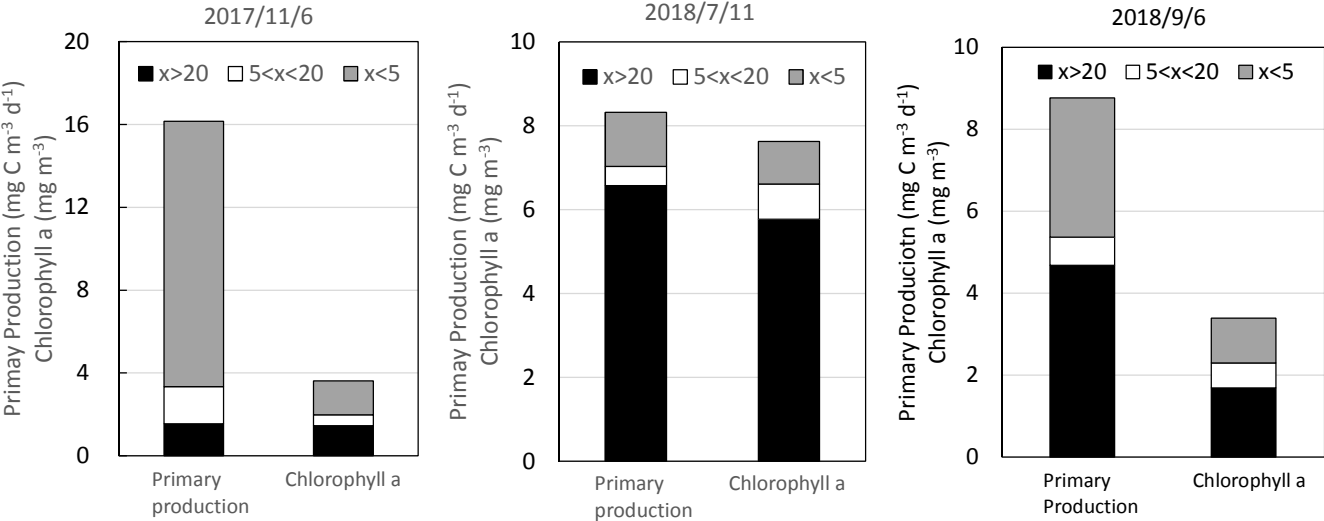
図(2)-10. 琵琶湖北湖沖域における日積算光量子量（深度5 m）（上図）、濁度（中図）、水温（下図）の季節変動

5) 各サイズにおける一次生産速度とクロロフィルa濃度

サイズ別の植物プランクトン一次生産速度とクロロフィルa濃度を図(2)-11に示す。2017年秋期(2017年11月6日)における各サイズの一次生産速度の寄与率はピコ植物プランクトン(<5 μm)がもっと高く(79%)、次いでナノ植物プランクトン(5-20 μm, 11%)、マイクロ植物プランクトン(>20 μm, 10%)の順であった。また、この時のサイズ別クロロフィルa濃度はピコ植物プランクトン(45%)とマイクロ植物プランクトン(41%)の占める割合が高くなっていた。ナノ植物プランクトンの割合は14%であった。

2018年7月11日における各サイズの一次生産速度はマイクロ植物プランクトンが大きく寄与していた(79%)。また、クロロフィルa濃度の割合もマイクロプランクトンが多くを占めていた(76%)。ピコ植物プランクトンおよびナノ植物プランクトンの割合は、それぞれ、13%と11%であった。

2018年9月6日における各サイズの一次生産速度の寄与率はマイクロ植物プランクトンがもっとも高く(53%)、次いで、ピコ植物プランクトン(39%)、ナノ植物プランクトン(8%)であった。また、この時のサイズ別クロロフィルa濃度はマイクロ植物プランクトン(50%)とピコ植物プランクトン(32%)の占める割合が高くなっていた。ナノ植物プランクトンの割合は18%であった。



図(2)-11. 2017年11月6日, 2018年7月11日, 2018年9月6日におけるサイズ別の一次生産速度とクロロフィルa濃度.

以下に各サイズの一次生産速度とクロロフィルa濃度の数値データを付す.

表(2)-2. 各サイズの一次生産速度とクロロフィルa濃度

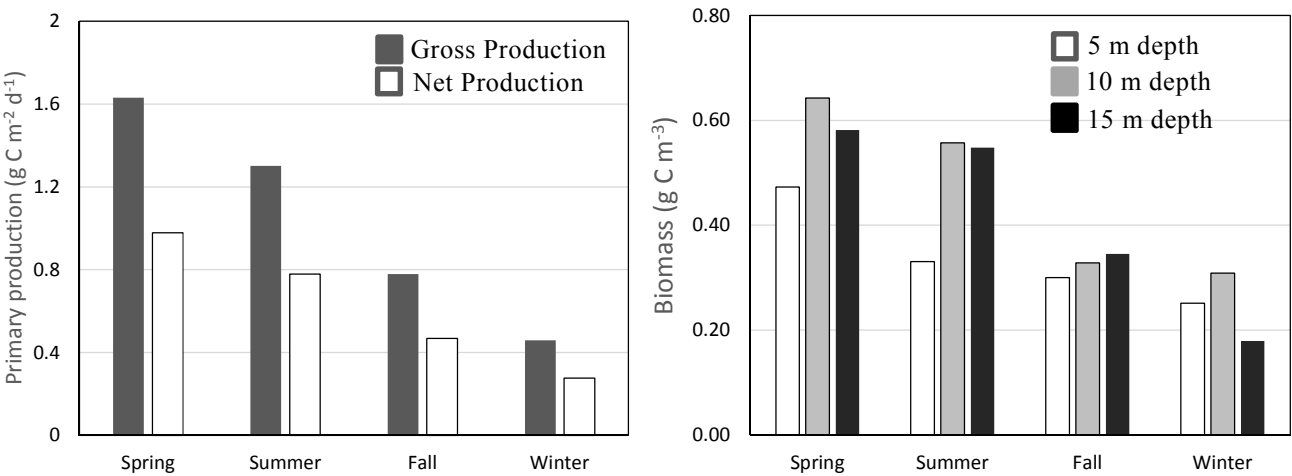
		Primary production		Chlorophyll a	
		mg C m ⁻³ d ⁻¹	%	mg m ⁻³	%
6 November 2017					
Microphytoplankton	> 20 μm	1.55	10	1.47	41
Nanophytoplankton	5-20 μm	1.80	11	0.51	14
Picophytoplankton	< 5 μm	12.80	79	1.64	45
11 July 2018					
Microphytoplankton	> 20 μm	6.57	79	5.77	76
Nanophytoplankton	5-20 μm	0.46	5	0.84	11
Picophytoplankton	< 5 μm	1.29	16	1.02	13
6 September 2018					
Microphytoplankton	> 20 μm	4.68	53	1.69	50
Nanophytoplankton	5-20 μm	0.69	8	0.61	18
Picophytoplankton	< 5 μm	3.4	39	1.09	32

(2) 考察

1) 琵琶湖北湖沖域における一次生産速度の季節変動

2017年8月21日から2018年10月21日において、琵琶湖北湖沖域における植物プランクトンの一次生産速度は、0～3.92（平均1.11） $\text{g C m}^{-2} \text{d}^{-1}$ の範囲にあり、春期（4-6月）と夏期（7-9月）に高く、秋期（10-12月）と冬期（1-3月）に低下した（図(2)-12）。特に、2018年春期における一次生産速度は、 $3.92 \text{ g C m}^{-2} \text{d}^{-1}$ （6月26日）に達しており、琵琶湖北湖沖域における過去の報告例の中でもっとも高い値となった。この非常に高い一次生産速度は、主に、この時期に大増殖していた大型緑藻の2種（*Staurastrum dorsidentiferum*, *Micrasterias hardyi*）によって担われていたと考えられる（図(2)-8, 9）。このような一次生産速度の季節的変動は、本サブテーマ代表者が北湖沖域で測定してきた過去の観測結果と同様であった（表(2)-3）。

クロロフィルa濃度から炭素量に換算した植物プランクトン現存量は、一次生産速度と同様の季節変化を示し、春期と夏期に高く、秋期と冬期に低くなった（図(2)-12）。



図(2)-12. 各季節（Spring: 4-6月，Summer: 7-9月，Fall: 10-12月，Winter: 1-3月）における平均一次生産速度と平均生物量。純生産速度は総生産速度に0.56⁷⁾を乗じて求めた。

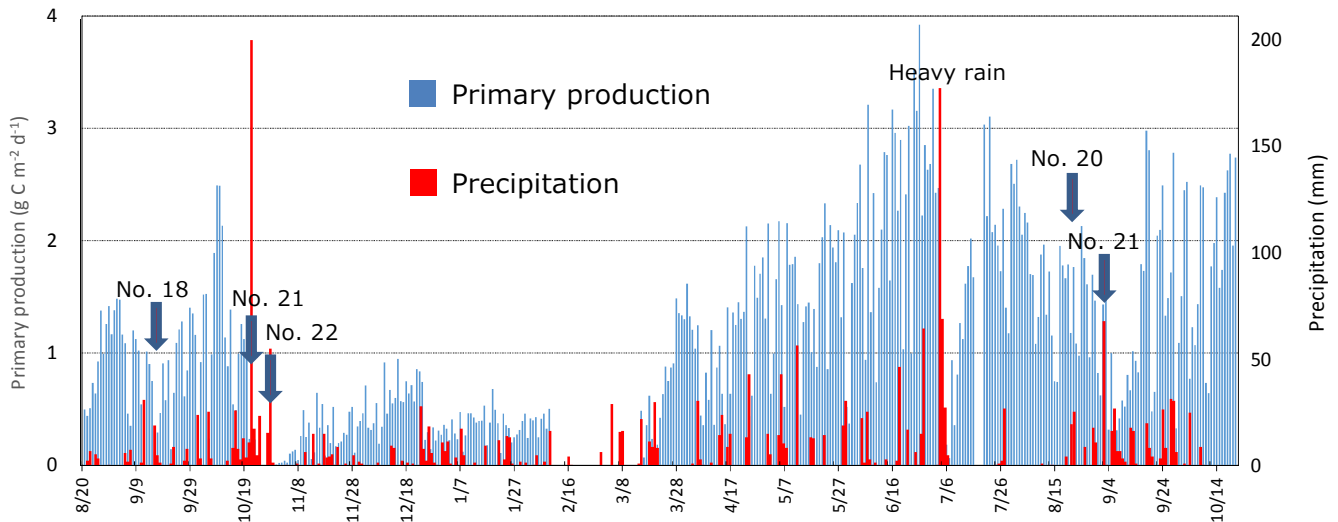
現存量は以下の炭素/クロロフィルa比⁸⁾を用いて算出した。

Spring : C/Chl.a = 60.6, Summer : C/Chl.a = 87.0, Fall : C/Chl.a = 55.6, Winter : C/Chl.a = 57.1

表(2)-3. 琵琶湖北湖北部沖域における各季節の平均一次生産速度（総生産： $\text{mg C m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ）

期間	春 4-6月)	夏 7-9月)	秋 10-12月)	冬 1-3月)	年間	場所	測定法	観測数
2002年4月-12月	1002	1140	778		950	北湖湖心部	¹³ C 現場)	6
2006年9月- 2007年12月	650	976	407	312	574	北湖湖心部	酸素 現場)	12
2008年12月- 2009年12月	779	572	259	235	466	北湖高島市沖	係留観測	359
2012年4月-12月	833	899	748		822	北湖多景島北	係留観測	201
本研究 2017年8月- 2018年10月	1634	1305	776	463	1106	北湖多景島北	係留観測	392

観測期間前期（2017年8月21日～2018年2月9日）の一次生産速度は気象イベントに応じて大きく変動した（図(2)-13）。降水量が比較的少なかった台風18号（2017年9月17日）の通過後、一次生産速度は大きく増加した。この時期、台風通過後の深度5 mにおける水中光量子量はほぼ一定であり、クロロフィルa濃度は増加していた（図(2)-7, 10）。つまり、この一次生産速度の急増は、台風に伴う波浪や内部波による湖底堆積物の攪乱および出水に起因にする栄養塩負荷によって引き起こされたと推察される。一方、降水量が非常に多かった台風21号（2017年10月22日～23日）の通過後は、一次生産速度は急減した（図(2)-13）。この台風による出水と堆積物の巻き上げにより、濁度は大きく急増し、深度5 mにおける水中光量子量はほぼ0となった（台風通過後のおよそ1週間、係留地点の透明度は1 m以下であった）（図(2)-10）。この影響により、台風21号通過後の一次生産速度は数週間程度、非常に低い値で推移した。これらの観測結果から、北湖では、一次生産速度の応答が風台風と雨台風で大きく異なることが示された。



図(2)-13. 琵琶湖北湖沖域における一次生産速度と降水量（彦根）。 図中の数値は台風番号を示す。

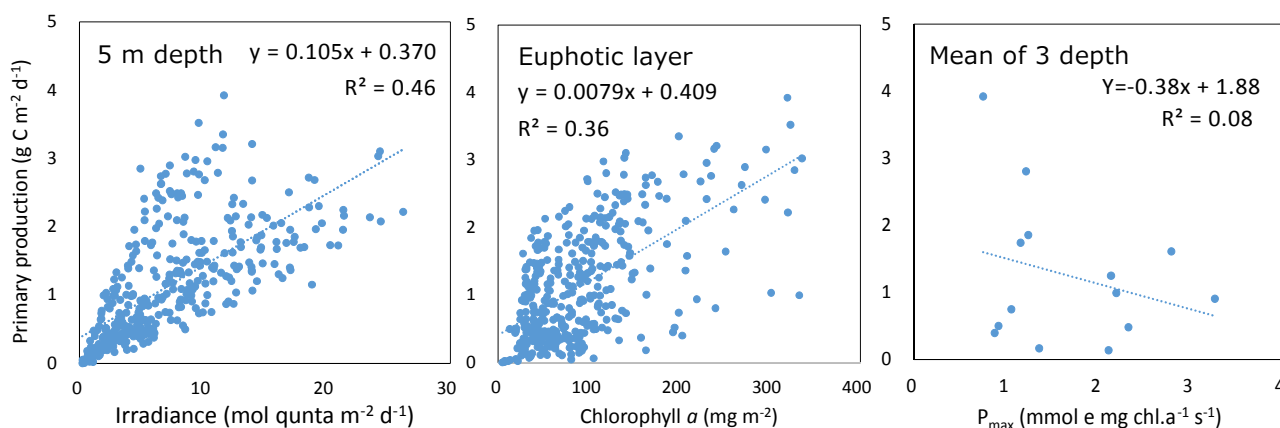
観測期間後期（2018年3月15日～10月21日）の一次生産速度は、光量子量の増加に伴って、3月中旬から4月下旬にかけて徐々に増加した（図(2)-10, 13）。その後、水中光量子は若干の低下傾向を示したが、一次生産速度はその後も増加を続け、6月下旬にはおよそ $4 \text{ g C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ となった。2018年3月～6月は、例年と比較して、降水量が多く、陸域からの栄養塩負荷も多かったと考えられる。この栄養塩負荷により、植物プランクトン（クロロフィルa濃度）が3月から6月にかけて大きく増加した結果、非常に高い一次生産速度になったと考えられる（図(2)-7, 13）。この高い一次生産速度を担っていた植物プランクトンは、動物プランクトンなどに直接捕食されにくい大型緑藻2種（*Staurastrum dorsidentiferum*, *Micrasterias hardyi*）で、近年、琵琶湖北湖で特に優占する種であった（図(2)-8, 9）。2018年7月11日に行ったサイズ別の一次生産速度では、 $20 \mu\text{m}$ 以上のマイクロ植物プランクトンの寄与率がおおよそ80%で、また、クロロフィルa濃度もマイクロ植物プランクトンがもっとも高い割合（76%）となっていた（図(2)-11）。

その後、7月6日から7日の「平成30年7月豪雨」以降、一次生産速度は光量子量の低下とともに8月下旬まで徐々に低下した（図(2)-13）。この時期における一次生産速度の低下は、記録的な猛暑と低風速がもたらす成層強化に起因する栄養塩不足と大型緑藻 *Micrasterias hardyi* の有光層以深への沈降もまた要因になっていたと考えられる。その後、猛烈な暴風と大雨を伴う台風21号（9月4日）通過後は、再び急増し、一次生産速度は $2 \sim 3 \text{ g C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ の高い値で10月下旬まで推移した。この時期、光量子量は比較的低下したが、大型緑藻2種（*S. dorsidentiferum*, *M. hardyi*）が再び優占し、クロロフィルa濃度が 10 mg m^{-3} 程度まで増加していた（図(2)-8, 9）。

本研究で2018年6月下旬に観測されたおよそ $4 \text{ g C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ に達する一次生産速度は、1960年以降の琵琶湖北湖沖域での値としては過去に報告例がなく、過去最大の値である。今後の一次生産速度の増減傾向を推測することはむずかしいが、2018年のように大型緑藻の異常増殖が続けば、このような高い一次生産速度が今後も継続する可能性はあると思われる。

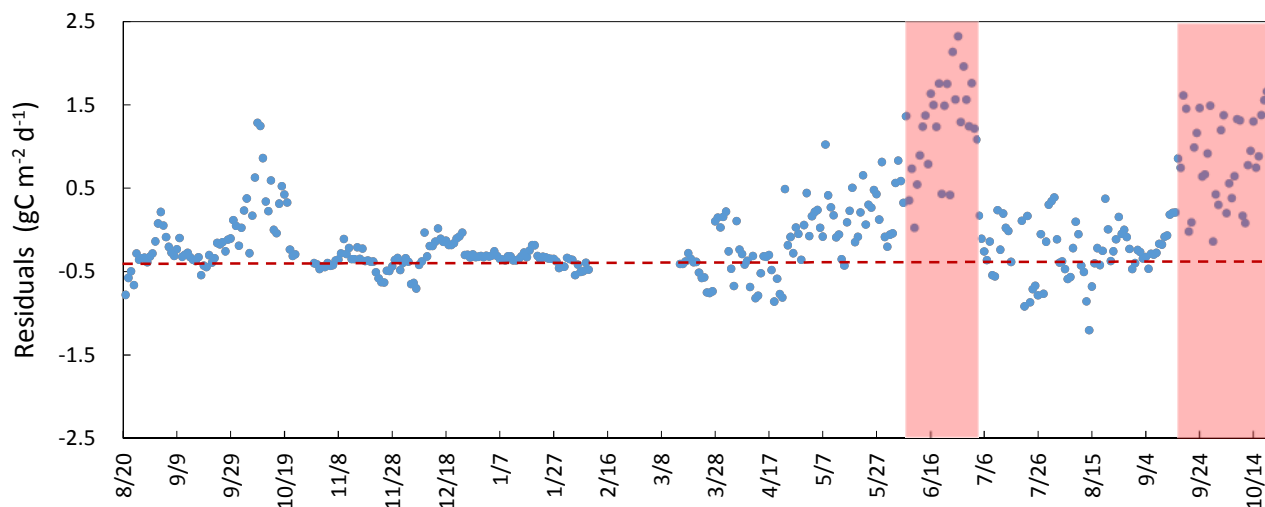
2) 一次生産速度と各環境因子との関係

本研究における一次生産速度の算出には、3深度における水中光量子量、クロロフィルa濃度、光合成－光曲線のデータが用いられる。そこで、上記の各因子と一次生産速度との関係を評価し、それぞれの因子の寄与率を評価した（図(2)-14）。その結果、光量子量の寄与率（ $R^2 = 0.46$ ）がもっとも高く、次いで、有光層内のクロロフィルa量の寄与率（ $R^2 = 0.36$ ）が高くなっていた。光合成－光曲線における最大電子伝達速度と一次生産速度との間には相関関係は見られなかった（ $R^2 = 0.08$ ）。過去の報告例においても、琵琶湖北湖のような最大水深100 mを越えるような湖では、水柱あたりの日間一次生産速度は光によって第一に制限されるとの報告⁹⁾がいくつかあり、本研究はそれらの報告と同じ結果となった。



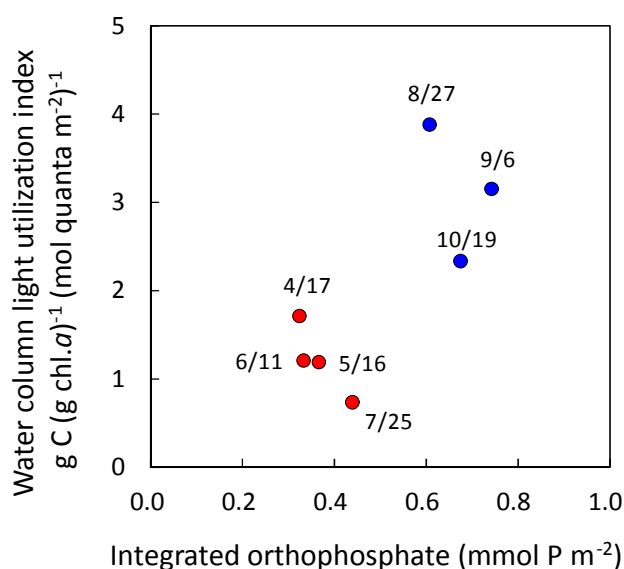
図(2)-14. 光量子量（深度5mにおける日積算値），クロロフィルa量（有光層の積算値），最大光合成速度（3深度における最大電子伝達速度の平均値）と一次生産速度との関係

次に、一次生産速度に対する寄与率が高かった水中光量子量から推定した一次生産速度と実測値の残差プロットを作成した（図(2)-15）。2017年は比較的残差が小さくなっていたが、2018年はバラツキが大きくなり、特に、6月中旬から7月上旬と9月中旬から10月中旬までの期間において残差が正の方へ大きく偏っていた。これらの両時期は、ともに、一次生産速度が特に高く、また、大型緑藻が大増殖した時期と重なっている（図(2)-6, 7）。大型緑藻の大増殖は、適度な光と栄養塩供給に加えて、低い捕食圧などの結果と考えられる。つまり、この時期は、光だけでなく、上記のような因子が一次生産に大きく寄与していたと考えられる。



図(2)-15. 琵琶湖北湖沖域における一次生産速度の実測値と推定値の残差プロット

図中の赤帯箇所は大型緑藻が著しく増殖・優占した時期を示す。



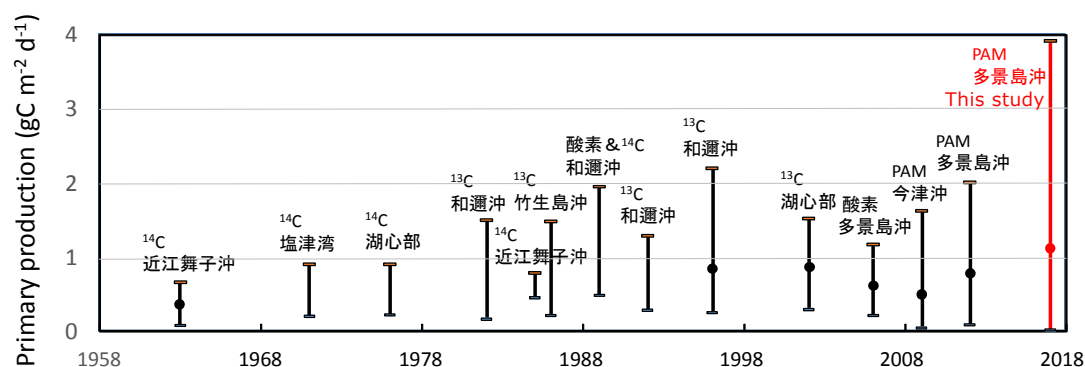
図(2)-16. 北湖沖域における光利用指数と積算正リン酸量(0-20m)との関係(2018年4月~10月, K4地点)

滋賀県立大学丸尾雅啓教授と伴修平教授から2018年4月~10月の琵琶湖北湖沖域(K4地点)における正リン酸濃度のデータ提供を受けたので、正リン酸量と一次生産速度(光利用指数)との関係性を評価した(図(2)-16)。光利用指数は、日間一次生産量($\text{g C m}^{-2} \text{d}^{-1}$)を有光層の積算クロロフィルa量(g chl.a m^{-2})と日間積算光量子量($\text{mol quanta m}^{-2} \text{d}^{-1}$)で除した値で、水柱全体の平均的な量子収率を表すパラメータである。4月から7月における積算正リン酸量(0~20 m)が比較的少ない時期における光利用指数は、 $0.73 \sim 1.71 \text{ g C (g chl.a)}^{-1} (\text{mol quanta m}^{-2})^{-1}$ の範囲にあったが、一方、8月から10月の積算正リン酸量が多い時期における光利用指数は、より高い値($2.3 \sim 3.9 \text{ g C (g chl.a)}^{-1} (\text{mol quanta m}^{-2})^{-1}$)を示した。8月から10月における光量子量とクロロフィルa濃度は、4月から7月におけるそれらよりも比較的低い時期であるが、8月から10月にかけての台風や出水

などに伴う急激かつ多量のリン供給を受けて植物プランクトンが光利用効率を上げ¹⁰⁾、高い一次生産速度を維持していたのかもしれない(図(2)-7, 10)。

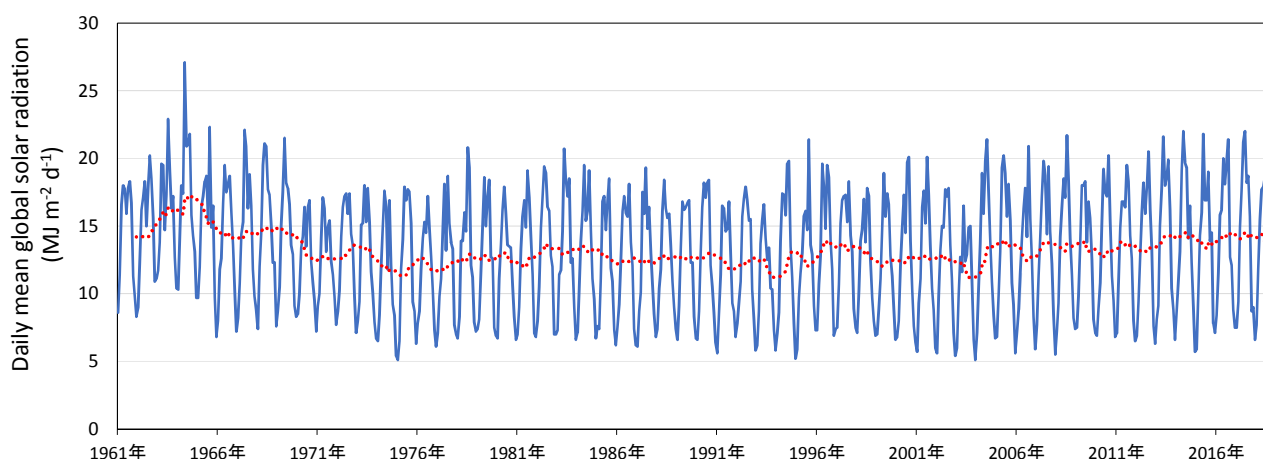
3) 1960年代以降における琵琶湖北湖沖域における一次生産

1960年代以降に琵琶湖北湖沖域で測定されてきた一次生産速度の経年変化を図(2)-17に示す。1960年代から現在まで、一次生産速度に明瞭な増加・減少傾向はないように思われる。なお、一次生産速度は測定法や測定場所(北湖北部、南部)、測定頻度、測定時の気象条件などによって変化するため、各値の比較には注意を要することを付記する。たとえば、 ^{13}C ・ ^{14}C トレーサー法で測定した一次生産速度は総生産と純生産の範囲で培養時間に応じて変化し、酸素法とクロロフィル蛍光法で測定した一次生産速度は総生産に相当する。琵琶湖では、1980年代以降、透明度は増加傾向を示し、全リンや全窒素、クロロフィルa濃度は低下傾向にあると報告されている¹¹⁾。また、1960年代から現在まで、全天日射量は明瞭な増減傾向を示していない(図(2)-18)。これら諸因子の変動傾向から考えると、琵琶湖北湖における一次生産速度は低下傾向にあると考えられるが、そのような傾向は見られない。これは、透明度の上昇に伴う有光層深度の増加や近年の水温上昇に起因する表層で有機物分解速度やリン循環速度の増加が一次生産速度の増加に寄与し、低下因子の影響を相殺しているのかもしれない。



図(2)-17. 1960年代以降における琵琶湖北湖沖域における一次生産速度 (琵琶湖ハンドブック三訂版における「一次生産速度, 石川俊之著」にデータを追加して作成)

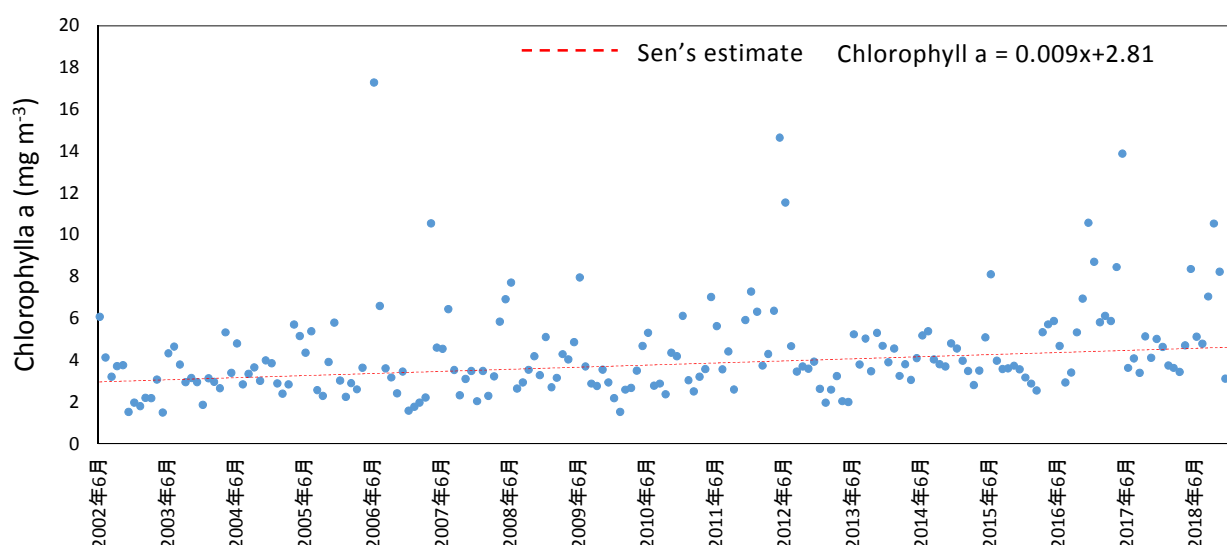
図中の ^{14}C と ^{13}C はトレーサー法, 酸素は酸素法, PAMはクロロフィル蛍光法を示す。



図(2)-18. 1960年代以降における月平均全天日射量（彦根）。

赤い点線は13ヶ月移動平均を示す。トレンド検定（Mann-Kendall test）により変動傾向を調べた結果、有意なトレンドはなかった（Z Test = 0.58）。

本研究において一次生産速度と正の相関関係にあったクロロフィルa濃度について、最近17年間（2002年6月～2018年12月）の琵琶湖北湖全域における衛星クロロフィルa濃度（人工衛星Aqua/MODISデータから算出）の経年変化を解析した。その結果、有意水準0.1%で有意な増加傾向を示した（図(2)-19）。これは近年（2012年以降）の大型緑藻の増殖・優占が影響していると考えられるが、はっきりとした要因はわかっていない。今後の琵琶湖北湖における水環境を考える上で、このようなクロロフィルa濃度の増加と大型緑藻の優占傾向は今後注視していく必要がある。



図(2)-19. 2002年から2018年における月平均衛星クロロフィルa濃度の経年変化。

トレンド検定には、Mann-Kendall test（Z test = 5.12, n=196）, と Sen's slope method（傾きQ = 0.009, 切片B = 2.81, n=196）を用いた。

4) まとめ

本研究では、琵琶湖北湖における植物プランクトンの一次生産速度を年間を通じて連続的に測定し、各環境因子との関係性を評価した。その結果、以下が明らかとなった。

- ・一次生産速度は $0 \sim 3.9 \text{ gC m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ の範囲を変動し、春・夏期に増加、秋・冬期に低下する傾向を示した。また、本研究期間に観測された一次生産速度は過去の報告値の中でもっとも高い値となった。

- ・2018年春期（5月～6月）における一次生産速度は最大でおよそ $4 \text{ g C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ に達するほど高い値を示し、その高い一次生産速度は大型緑藻2種（*Staurastrum dorsidentiferum*, *Micrasterias hardyi*）が担っていた。
- ・台風や大雨などの気象イベントは、水中の光環境や栄養環境を変化させ、一次生産速度に大きな影響を与えていた。極度の濁度上昇を伴わない気象イベント（風台風）は一次生産速度を増加傾向に導き、一方、極度に濁度を増加させる気象イベント（雨台風、集中豪雨）は、一次生産速度を数日から数週間にわたって大きく低下させた。
- ・一次生産速度の変動は水中光量子量で概ね説明できたが、植物プランクトンのブルーム時には現存量（クロロフィルa濃度）の寄与も高くなった。光化学系IIにおける最大電子伝達速度（最大光合成速度の指標）と一次生産速度との間には顕著な相関関係は見られなかった。
- ・1960年代から現在（本研究を含む）までに報告されてきた一次生産速度の経年変化には、明瞭な増減傾向は認められなかった。

5. 本研究により得られた成果

（1）科学的意義

従来の化学・生物学的測定法では捉えることができなかった植物プランクトン動態に関する現象をいくつか捉えることに成功し、以下に示す琵琶湖における植物プランクトン群集の新たな動態像が明らかとなった。

- ・琵琶湖の一次生産速度の変動範囲は従来報告されてきた範囲よりも大きく、主に水中光量に依存して日々激しく変動する。この結果は、これまでの報告値は時間的解像度が低いために、多くの現象を見逃してきた可能性が高いことを示唆している。
- ・従来、台風や降雨等の気象イベントは一次生産の増加を引き起こすと考えられてきたが、気象イベントの規模や様態によっては一次生産速度の反応は異なり、数週間にわたって一次生産速度を減少させる場合もある。
- ・成層構造が極端に発達した2018年夏期（7月下旬～8月中旬）は、栄養塩供給の停滞や大型植物プランクトン（緑藻*Micrasterias hardyi*）の有光層以深への沈降により、一次生産速度が大きく減少した。この観測結果は、今後予想される温暖化が琵琶湖北湖の一次生産速度にどのような影響を与えるのかを考える上で重要な知見となる。
- ・2002年以降の北湖におけるクロロフィルa濃度は増加傾向を示した。これは、近年、琵琶湖北湖で優占している大型緑藻（*Staurastrum dorsidentiferum*, *Micrasterias hardyi*）の増殖に起因していると考えられる。今後の琵琶湖北湖における水環境を考える上で、これら大型緑藻の動態は注視していく必要がある。
- ・衛星リモートセンシングによるクロロフィルa濃度分布の観察では、夏期成層期において北湖東岸から沖域へと伸びるクロロフィルa濃度の帯状分布が頻繁に観測された。これは、沿岸から沖域への物質輸送（植物プランクトン色素・リンの輸送）を考える上で重要な知見となる。

（2）環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

本研究の光学的測定法は、高解像度で一次生産速度を測定でき、また、測定にかかるコストも低いため、今後の湖における植物プランクトン群集の現存量、群集構造、一次生産速度の長期モニタリングに活用できると期待される。今後、水質管理と水産資源管理のそれぞれの部局と連携を強化して、上記モニタリングで得られる情報の活用方法について協議を進めることが必要である。

また、本研究結果で得られた気象イベントに対する一次生産速度と植物プランクトン群集構造解

析の結果は、大型緑藻の*Staurastrum dorsidentiferum*と*Micrasterias hardyi*の増殖特性と環境因子の関係を明示した。大型緑藻の増大は、プランクトン食魚の餌環境や湖底の酸素消費へ影響を及ぼす可能性があり、それらの状態を危惧する琵琶湖環境の保全・再生にとって重要な知見となった。今後、大型緑藻の制御に向けた栄養塩管理に方策が期待される。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) 塚本浩貴、後藤直成、吉原亜悠、高木裕太、新井那莉、林正能、石坂丞二：日本リモートセンシング学会誌．衛星リモートセンシングを用いた琵琶湖におけるクロロフィルa濃度の推定．vol, 39, no. 2, (2019), (印刷中)

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 後藤直成、加藤良太、落合伸陽、塚本浩貴(2016)クロロフィル蛍光を利用した植物プランクトン現存量測定法の高精度化．日本陸水学会第81回大会，那覇市，11月4日～6日．
- 2) 塚本浩貴、後藤直成、林正能、石坂丈二(2016)衛星リモートセンシングを用いた琵琶湖におけるクロロフィルa濃度分布の推定．海洋・湖沼リモートセンシング研究会，9月24日，広島大学．
- 3) 後藤直成、新井那莉、塚本浩貴、林正能、石坂丞二(2017)衛星リモートセンシングによる琵琶湖におけるクロロフィルa濃度分布の解析．日本陸水学会82回大会，仙北市(9月30日)．
- 4) 早川和秀、廣瀬佳則、岡本高弘、佐藤祐一、永田貴丸、後藤直成、中野伸一、富岡典子、今井章雄(2017)琵琶湖水における有機物の生分解性について．日本陸水学会82回大会，仙北市(9月30日)．
- 5) 後藤直成、塚本浩貴、岩木真穂(2018)．琵琶湖北湖における一次生産の季節変動．日本陸水学会第83回大会，岡山市(10月7日)．
- 6) 早川和秀、後藤直成、他9名(2018)微生物食物網を考慮した琵琶湖の物質循環の課題について．日本陸水学会第83回大会，岡山市(10月8日)．
- 7) 早川和秀、後藤直成、他13名(2018)琵琶湖における有機物指標の検討．第17回世界湖沼会議，茨城，10月15日～19日．
- 8) 後藤直成(2018)衛星リモートセンシングを用いた琵琶湖におけるクロロフィルa濃度の推定．日本リモートセンシング学会 海洋・湖沼リモートセンシング研究会，静岡市(9月5日)．
- 9) 後藤直成(2018)水中クロロフィル蛍光計を用いたクロロフィルa濃度測定法の高精度化．水圏クロロフィル蛍光に関する知識統合と研究戦略，名古屋大学(2018年11月6日)．

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 滋賀県教育委員会主催高大連携事業大学連続講座「琵琶湖の水環境」(2018年7月31日，受講者約20名)
- 2) 京都大学主催，東アジアとドイツ学生のための多文化共学短期受入れ留学プログラム「琵琶

湖の大規模貧酸素水塊と温暖化」(2018年8月9日, 受講者約40名)

- 3) 滋賀県立河瀬中学における高大連携事業特別授業「琵琶湖のプランクトン」(2018年9月13日, 受講者約30名)
- 4) 彦根市立旭森小学校における総合的な学習の時間「琵琶湖環境学習」(2018年10月24日, 受講者120名)
- 5) 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター主催びわ湖セミナー「生態系保全をめざしてー湖の水質と生き物のつながり」(2019年3月1日, 受講者170名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) S. W. NIXON: Limnol. Oceanogr., vol. 33, no. 4, 1005-1025 (1988) Physical energy inputs and the comparative ecology of lake and marine ecosystem.
- 2) 太田洋平、後藤直成、伴修平: 陸水学雑誌, vol. 74, no. 2, 173-181 (2013) クロロフィル蛍光を用いた現場植物プランクトン一次生産力測定法の検討.
- 3) B. GENTY, J. M. BRIANTAIS and N. R. BAKER: Biochemica et Biophysica Acta, vol. 990, 87-92 (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence.
- 4) N. GOTO, H. MIYAZAKI, N. NAKAMURA, H. TERAJ, N. ISHIDA and O. MITAMURA: Fundamental and Applied Limnology, vol. 172, 121-134 (2008) Relationships between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated (PAM) chlorophyll fluorescence and photosynthetic rates by traditional and common methods in natural freshwater phytoplankton.
- 5) 塚本浩貴、後藤直成、吉原亜悠、高木裕太、新井那莉、林正能、石坂丞二: 日本リモートセンシング学会誌, vol. 39, no. 2, (2019) 衛星リモートセンシングを用いた琵琶湖におけるクロロフィルa濃度の推定. (印刷中)
- 6) N. A. WELSCHMEYER: Limnology and Oceanography, vol. 39, 1985-1992 (1994) Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and pheopigments.
- 7) N. GOTO, Y. TANAKA and O. MITAMURA: Fundam. Appl. Limnol., vol. 184, no. 4, 261-275 (2014) Relationships between carbon flow through freshwater phytoplankton and environmental factors in Lake Biwa, Japan.
- 8) Y. TEZUKA: Jpn. J. Limnol., vol. 46, no. 4, 239-246 (1985) C:N:P Ratios of seston in Lake Biwa as indicators of nutrient deficiency in phytoplankton and decomposition process of hypolimnetic particulate matter.
- 9) J. URABE, T. SEKINO, K. NOZAKI, A. TSUJI, C. YOSHIMIZU, M. KAGAMI, T. KOITABASHI, T. MIYAZAKI and M. NAKANISHI: Ecol. Res. vol. 14, 233-242 (1999) Light, nutrients and primary productivity in Lake Biwa: An evaluation of the current ecosystem situation.
- 10) P. G. FALKOWSKI, and J. A. RAVEN (1997) Aquatic photosynthesis, Blackwell.
- 11) 早川和秀、辻村茂男、石川俊之、芳賀裕樹、岡本高弘、焦春萌、石川可奈子、熊谷道夫: 水環境学会誌, vol.35, no. 6, 89-100 (2012) 複数の定期調査データを用いた統合的な解析による琵琶湖における全リン、硝酸態窒素濃度およびいくつかの水質項目の長期変化.

Ⅱ－３ 細菌生産の定量的解析

国立研究開発法人国立環境研究所

地域環境研究センター	琵琶湖分室	今井 章雄
地域環境研究センター	環境技術システム研究室	富岡 典子
地域環境研究センター	湖沼・河川環境研究室	小松 一弘
環境計測研究センター	基盤計測化学研究室	佐野 友春

<研究協力者>

日本学術振興会特別研究員PD 国立環境研究所

地域環境研究センター	湖沼・河川環境研究室	土屋 健司
------------	------------	-------

滋賀県琵琶湖環境科学研究センター

環境監視部門	公共用水域係	廣瀬 佳則(H29年7月～H30年3月)
		尾原 禎幸(H30年4月～11月)

平成28年度～30年度累計予算額：22,234千円

(うち平成28年度：7,537千円、平成29年度：7,537千円、平成30年度：7,160千円)

累計予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

琵琶湖の生産性の現状を把握するために、安定同位体(^{15}N)で標識したデオキシアデノシンを細菌に取り込ませる ^{15}N -デオキシアデノシン法(^{15}N -dA法)を用い、琵琶湖における細菌生産の定量について検討した。琵琶湖に適用するに当たり、琵琶湖に最適な培養時間、琵琶湖の細菌の細胞当たりの炭素量、琵琶湖の細菌の16S rDNA含量の測定を行い、測定値を琵琶湖に最適化した。また、Fast Repetition Rate Fluorometry (FRRF) による現場一次生産測定法について、透明度の比較的高い琵琶湖への適用を試み、650 nmショートパスフィルターの装着により、琵琶湖有光層全深度の一次生産の測定に成功した。これらの手法を用いて2016年7月から2018年11月まで毎月、琵琶湖北湖第二湖盆中央において、7深度で細菌生産を測定するとともに、季節ごとにFRRFを用いて一次生産の測定を行った。また、2018年に3月、5月、7月、11月の4回にわたり、北湖の多地点において、細菌生産及び一次生産の同時測定を行い、季節変化及び地点変化の計測を行った。また、細菌による炭素消費量算出のために、2017年度から細菌生産と細菌呼吸の同時測定を行い、細菌生産値から細菌呼吸値を推定するための近似式を作成した。その結果、呼吸が炭素消費に占める割合が大きいこと、全層の炭素消費を算出するためには、20 m以深における呼吸の正確な測定が重要であることが示された。これまで、これほど多地点、長期間の細菌生産と一次生産のデータはなく、現在の琵琶湖の状況を正確に把握するとともに、今後の変化推定へのベースデータを取得することができた。また、これらの検討の結果、細菌生産と一次生産の季節変動には時間的ずれがあること、また深さ方向、地点間のそれぞれの活性についても異なることが明らかとなった。一方、多くのデータを入力し俯瞰した結果、一次生産はリンの影響を受け、細菌生産は水温とDOC及びリンの影響を受けている可能性が示された。

[キーワード]

細菌生産、一次生産、 ^{15}N -dA法、FRRF法

1. はじめに

湖では、一次生産者（藻類）により、光合成によって生産された藻体と、藻体外への漏出及び藻類の死滅により湖水に供給される有機物と河川及び面源から流入する有機物の分解により増殖した細菌類の菌体が食物連鎖（カーボンフロー）の出発点となる。藻類及び細菌の存在量はその増殖速度と、死滅速度及び捕食による減少によってバランスが取られている。そのため、細菌数、及び藻体量のみの情報では、上位への有機物のフローを明らかにすることができない。これまでも、藻類の炭素固定速度（一次生産）及び細菌の増殖に伴う炭素固定（細菌生産）の測定は試みられてきたが、細菌生産の測定法の主流であった放射性同位体で標識されたチミジン^[1]、もしくはロイシン^[2]の取り込み速度を測定し、それを細胞増殖量及び炭素量に換算する手法は、放射性同位体の使用が必要であり、先進国、特に我が国ではその利用に多くの制限があり、細菌生産の測定は重要であるにも関わらず、ほとんど実施されてこなかった。この問題は標識化合物に安定同位体を用いることで解決でき、国内の任意の場所で細菌生産測定が可能となる。サブ3では、研究協力者らにより新たに開発された、安定同位体(¹⁵N)で標識したデオキシアデノシンを細菌に取り込ませる¹⁵N-デオキシアデノシン法 (¹⁵N-dA法)^[3]を用い、琵琶湖における細菌生産の定量について検討し、多検体、多地点での現場での測定を可能にした。また、一次生産の現場での短時間測定にはやはり、¹⁴CO₂が使用され、細菌生産と同じ理由で、測定が困難であった。サブ3では一次生産についても、これまで海洋で使用されていたFRRFを湖にも適応できる手法を開発し、琵琶湖に於いて多地点において有光層全体の一次生産を定量することを可能とした。両手法を同時に用いて琵琶湖を調査することによって、琵琶湖における細菌生産と、一次生産の現況を明らかにすることが可能となる。また、琵琶湖においては、全リンの流入負荷が削減され、全リン濃度が減少してきた。リンの流入量の減少は、一次生産や細菌生産に影響を及ぼす可能性があり、多くのデータをもとに、湖の生産性と環境因子の関連を明らかにすることが重要である。

2. 研究開発目的

本サブテーマでは一次生産（光合成）と細菌生産（細菌の増殖に伴う菌体への炭素の固定量）の現場でのデータを取得し、琵琶湖における基礎生産の動態を明らかにすることを目的とする。まず、一次生産及び細菌生産の琵琶湖現場への適応手法の開発を行い、琵琶湖において両生産を同時に測定することを試みる。また、多地点において、環境因子も同時に測定し、この二つのフロー間の関係及び環境因子との関連を明らかにすることを目的としている。

3. 研究開発方法

3. - 1 細菌生産の測定

3. - 1 - 1 ¹⁵N-dA法取り込み活性の測定

試料に終濃度50 nMになるよう¹⁵N-dAを添加し数時間から一日培養し、¹⁵N-dAを細菌DNAに取り込ませた。反応停止は2017年2月調査までは、直径25 mm ポアサイズ0.2 µm のOmnipore PTFE 膜（Merck Millipore）に直接ろ過、2017年5月調査以降は、終濃度20%になるよう99.9%エタノールを培養液に添加した。直接ろ過した場合はろ過後、細菌を捕集したPTFE膜に70%エタノールを1 mL程度加え、DNAの固定を行った。エタノールを添加した試料は冷却保存し、実験室に持ち帰った後、PTFE膜に速やかにろ過した。細菌を捕集したPTFE膜はDNA抽出まで-80℃で保存した。DNA抽出にはExtrap Soil DNA Kit Pl us ver.2（日鉄住金環境）を用い、各試料に対して100 µLのDNA抽出液を回収した。抽出DNAはNuclease P1、Phosphodiesterase I 及びAlkaline Phosphataseによって、ヌクレオシドまで完全分解し、遊離してきた¹⁵N-dAをLC-MSで測定し、培養時間中に細胞DNAに取り込まれた¹⁵N-dA量を測定した。

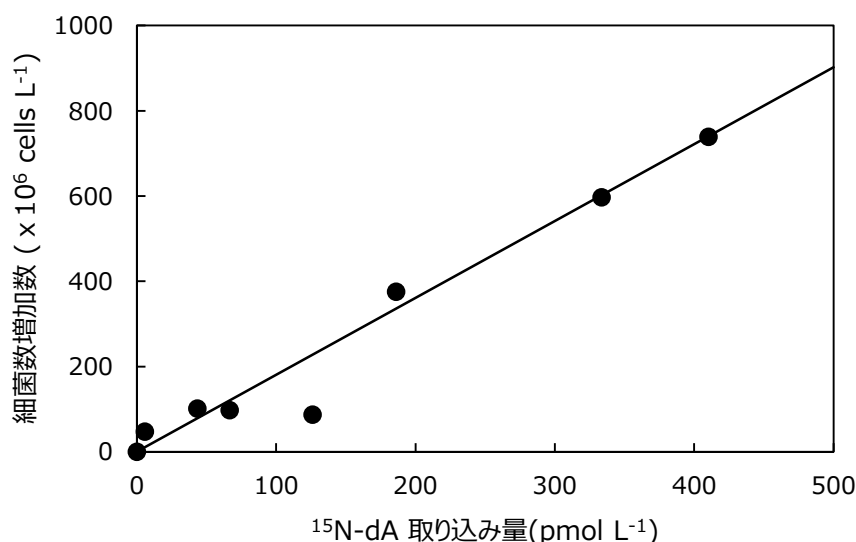
3. - 1 - 2 細菌濃度の推定

細菌濃度の推定は¹⁵N-dA取り込み活性の測定時に抽出したDNA中の細菌16S-rRNA遺伝子（16S-rDNA）

濃度を細胞当たりの16S rDNA濃度で除して算出した。細菌1細胞当たりの16S rDNA濃度は細菌の種類及び増殖活性によって変動するため、春夏秋冬の琵琶湖湖水に於いて、16S rDNAとDAPI染色による細菌濃度の測定を実施した。細胞当たりの16S rDNA濃度は春に高く(5.2 copies/cell)、冬に低かった(2.1 copies/cell)。本調査の細菌濃度の推定には、細胞あたりの16S rDNA濃度として、4季節の平均値3.2 copies/cellを用いた。16S rDNA濃度の測定は真性細菌のユニバーサルプライマーである357f及び518rプライマー^[4]及びLightCycler Master Mixを用いて LightCycler480 にて測定した。細胞数はDAPI染色後、蛍光顕微鏡U励起を用いて計測した。

3. - 1 - 3 ^{15}N -dA取り込み活性から細菌数増加速度への換算

捕食者による影響を排除するために直径47 mm ポアサイズ1.0 μm のNuclepore Track-Etch Membrane (GEヘルスケア) で前ろ過した琵琶湖湖水を用いた。試水に ^{15}N -dAを添加後24時間培養を行い、 ^{15}N -dA取り込み量を測定した。同時に ^{15}N -dA添加系と同じ条件で培養前と24時間培養後の試水について細菌16S rDNA濃度を測定し、 ^{15}N -dA取り込み量と細菌数増加数の換算係数を算出した。その結果、細菌増殖と ^{15}N -dA取り込み量の関係は $1.83 \times 10^6 \text{ cells pmol}^{-1} \text{ }^{15}\text{N}$ -dAと算出された(図(3)-1)。本研究では、この換算係数を用いて細菌増加量を算出している。



図(3)-1 ^{15}N -dA取り込み量と細胞増加数の関連

3. - 1 - 4 細胞あたりの炭素濃度の測定

細胞当たりの炭素量は多くの文献で求められているが、栄養状態によって大きく変化するので本研究では細胞をアクリジンオレンジで染色後、蛍光顕微鏡下で細胞体積を実測した。得られた細胞体積に $106 \text{ fgC } \mu\text{m}^{-3}$ ^[5]を乗じ、細胞当たりの炭素量は $11.8 \text{ fgC cell}^{-1}$ と算出された。過去に琵琶湖に於いて測定された炭素量 11 fgC cell^{-1} ^[5]とほぼ同じで有り、およそ30年間大きく変化していないことが明らかとなった。細菌の炭素換算濃度はこの値を利用して算出した。

3. - 1 - 5 呼吸速度の測定

細菌呼吸速度は2017年9月から2018年11月において、定点12Bの水深5mにおいて測定した。試水を直径47 mm ポアサイズ1.0 μm のNuclepore Track-Etch Membrane (GEヘルスケア) を用いてろ過し、ろ液を300 mLのBODボトルに移した。その後、現場温度に設定したインキュベータにおいて暗所下で培養した。培養開始から1日~5日後に、ウインクラー法を用いて酸素消費量を測定した。細菌呼吸速度の単位を $\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ から $\text{mgC L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ に変換するため、呼吸商を1と仮定し、変換係数0.375を用いた。

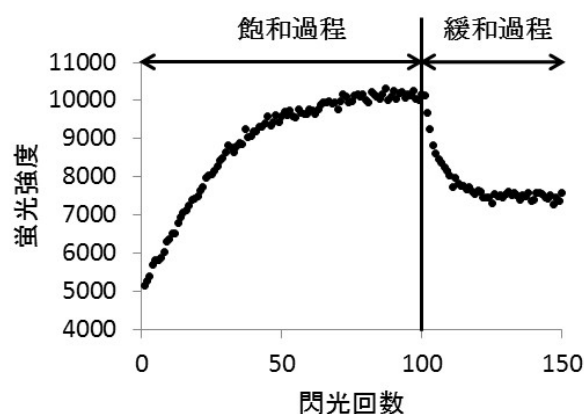
3. - 2 一次生産の測定

3. - 2 - 1 FRRFによる測定原理と炭素固定量算出方法

FRRF法では、水中に存在する植物プランクトンに対し、高速のパルス光(飽和過程で1 μ 秒間隔、緩和過程で50~200 μ 秒間隔)を繰り返し照射し、クロロフィル蛍光強度の時間変動を捉え(Kautsky誘導曲線)、同曲線から得られる様々なパラメーターを用いて一次生産速度を算出する。本研究では使用したパルス光は450 nm、530 nm、624 nmの3種類であり、藍藻類や緑藻類の光合成にも対応できる。パルス光照射条件は表(3)-1の通りであり、得られる誘導曲線の一例は図(3)-2の通りである。

表(3)-1 FRRF法におけるパルス光の照射条件

ホトマル電圧	LED強度	閃光条件			
			閃光回数	閃光時間 (μ s)	閃光間隔 (μ s)
300 (V)	23.3	飽和過程	100	1	1
	(μ mol/photon/ m^2/s)	緩和過程	50	1	49



図(3)-2 Kautsky誘導曲線の一例

Kolberら^[6]によると一次生産速度は式(1)を用いて求めることができる。なお一次生産速度算出に係る以下の記述(式(1)~式(5))はKolberらの報告^[6]に準ずる。

$$P_{O_2}^*(E) = E \cdot \sigma_{PSII} \cdot n_{PSII} \cdot f \cdot qP(E) \cdot \phi_e(E) \quad (1)$$

ここで $P_{O_2}^*(E)$ は一次生産速度($\text{O}_2\text{-mol/Chl.}a\text{-mol/s}$)、 E は現場で太陽光から与えられる光エネルギー($\text{quanta/m}^2/\text{s}$)、 σ_{PSII} は光化学系II(PSII)の有効光吸収断面積(m^2/quanta)、 n_{PSII} はChl. a 1分子あたりのPSIIにおける反応中心クロロフィル(P680)数($\text{electron/Chl.}a$)、 f は有効なP680の割合、 $qP(E)$ は有効なP680のうち還元状態にあるものの割合、 $\phi_e(E)$ は1電子が流れて発生する酸素量($\text{O}_2\text{-mol/electron}$)である。なお酸素量から炭素量に換算する事も可能である。光化学反応では、1 molの CO_2 が使用されるに伴い、Cと O_2 がそれぞれ1 molずつ生産される。そのため、換算係数=1として換算できる。本研究では炭素量として表現している。これら6つのパラメーターを求めれば、一次生産速度を算出することができる。そのうち E については観測現場で太陽光から与えられる光量子数であり、FRR蛍光光度計に付属している光合成有効放射(Photosynthetically Active Radiation、PAR)センサーで測定する事ができる。またKautsky誘導曲線における飽和過程での曲線は式(2)の様に表現でき、フィッティングにより σ_{PSII} を得ることができる。

$$F_t = F' + (F_m' - F') \cdot \left\{ 1 - \exp(-\sigma_{PSII} \cdot \int^t I_t) \right\} \quad (2)$$

ここで $\int I_t$ は積算閃光エネルギー、 F_t は時間 t における蛍光強度、 F_m' は明条件における F_t の最大値、 F' は最小値である。 n_{PSII} は、1クロロフィルあたり反応中心(P680)の数であり、数多くの実験から

0.002(-/Chl.a)とされている。 f と $qP(E)$ は式(3)及び式(4)から導くことができる。暗条件における F_m 、 F_0 のパラメーターが必要となるため、ダークチャンバーを装着したFRR蛍光光度計を用いて求めた。

$$f = (F_m - F_0)/F_m/0.65 \quad (3)$$

$$qP(E) = (F_m' - F')/(F_m - F_0) \quad (4)$$

最後に $\phi_e(E)$ については式(5)により算出した。

$$E \cdot \sigma_{PSII} \cdot qP \cdot \tau_p \leq 1 \text{ の場合, } \phi_e(E) = 0.25$$

$$E \cdot \sigma_{PSII} \cdot qP \cdot \tau_p \geq 1 \text{ の場合, } \phi_e(E) = 0.25/(E \cdot \sigma_{PSII} \cdot qP \cdot \tau_p) \quad (5)$$

ここで τ_p は、PSII内において電子伝達を司るプラストキノンが再酸化する際に必要な時間であり、Kautsky誘導曲線における緩和過程の曲線から導くことができる。

3.-2-2 ^{13}C 法との比較検討

FRRFによる一次生産は理論値と海洋における経験値により一次生産が算出される。湖沼における実際の炭酸の固定量との比較検討を実施するために、FRRFによる測定と同時に ^{13}C 法による測定も実施した。

比較実験は2017年5月25日の琵琶湖第2湖盆中央調査時に実施した。 ^{13}C 法による測定は内容量600 mLのポリカーボネートの透明ボトルに、終濃度 $1.63 \text{ mg } ^{13}\text{C L}^{-1}$ になるよう ^{13}C 炭酸水素ナトリウム($\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$)を添加後、ボトルを深さ0, 2, 5, 10及び15 mに設置し9時40分～11時50分の間現場光量で ^{13}C を取り込ませた。培養後、終濃度20%になるよう99.9%エタノールを添加し、反応を停止し、ガラスフィルターGF/Fに、植物プランクトンを回収した。GF/Fを乾燥後、 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 炭素安定同位体比の分析に供した。安定同位体比の分析はGF/F試料をデシケーター中で塩酸に暴露し、余剰の炭酸塩を除去した後、質量分析計(Thermo Fisher Scientific社、Flash 2000/Delta V)で $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 炭素安定同位体比を測定した。一次生産の算出はHamaらの方法^[7]に従って算出した。なお、($\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$)添加量は2016年11月及び2017年2月に測定した0, 5, 10 及び15 mの溶存無機炭素(dissolved inorganic carbon、DIC)濃度の平均値(16.3 mg L^{-1})の10%になるように設定した。また、測定当日のDIC、粒子状有機炭素、(Particulate Organic Carbon、POC)も各深さについて測定し、一次生産の計算に供した。また、この時間帯の彦根気象台の全天積算日射量データと式(6)から算出した結果、この時間帯は水中直下のPARにして $590.27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ が定常的に照射されている状態に相当していた。

$$\text{水中直下の光量子}(\text{mol/m}^2/\text{d}) = \text{全天日射量}(\text{MJ/m}^2) \times 0.42 \times 0.79 \times 0.20 \times 23.4 \quad (6)$$

この値と現地で測定したPARにより求められた減衰係数を用いて、 ^{13}C 法による一次生産を求めた。

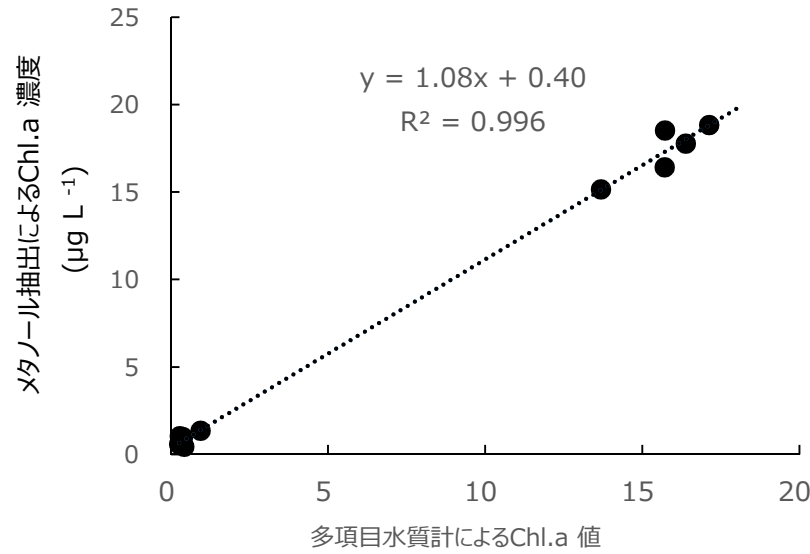
3.-2-3 FRRFの表層測定への適応

FRRF法で使用する蛍光光度計は水中における微弱なクロロフィル蛍光を検出するものであるため、強い太陽光が入射する環境においては機器防御のため検出を停止することがある(得られる蛍光強度がゼロとなる)。すなわち強光下にある表層付近での測定が難しい。具体的に言えば琵琶湖では5 m以浅での測定ができない。これは湖水柱における生産の大半が表層付近のものである陸水においては、「湖水柱の一次生産をほぼ測定できていない」と言うに等しく、致命的な欠点である。この欠点を克服するためには、太陽光を遮断する必要がある。しかし全ての太陽光を遮断してしまうと光合成に必要なはずの光も遮断してしまうことになる。そのため、センサーの検出波長(665-697 nm)の光を遮断しながらも、光合成に必要な太陽光(約400 nm～650 nm)の光を透過することができる650 nmショートパスフィルターフィルターを機器に装着した。

3.-3 環境因子の測定

現場測定値は琵琶湖環境科学センターの保有する直読式総合水質計AAQ(JFEアドバンテック)を用いて測定した。栄養塩、全リン(TP)、全窒素(TN)、溶存全窒素(DTN)、溶存態全リン(DTP)は国立環境研

究所 霞ヶ浦データベースの測定法に準拠して測定を実施した。なお、一部琵琶湖水質調査報告のデータの開示を受けた。FRRF法による一次生産の計算には多深度のChl.a濃度が必要であるため、抽出法では測定が困難である。そこで、Chl.aはメタノール抽出法とAAQの結果から換算式を作成し（図(3)-3）、AAQの補正データをChl.a濃度として用いた。



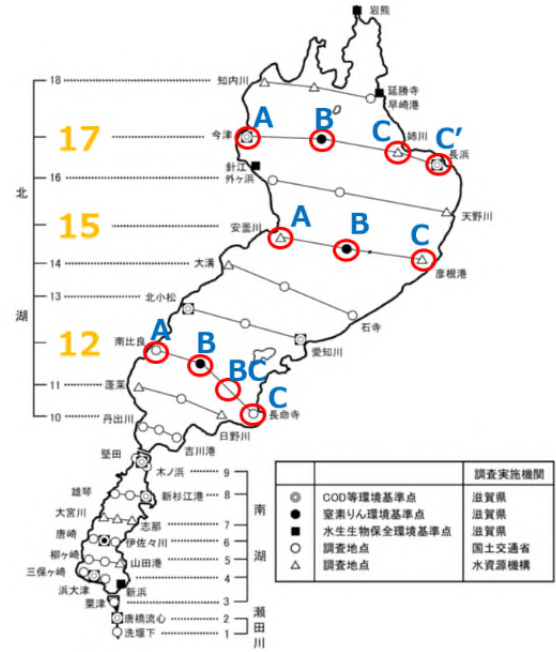
図(3)-3 多項目水質計とメタノール抽出Chl.aの関係

3.－4 調査地点と調査日程

調査は琵琶湖定期水質調査地点に準拠し、2017年7月21日～2018年11月21日まで琵琶湖北湖第二湖盆中央の12B地点において細菌生産の経時調査を実施すると共に、琵琶湖北湖第一湖盆（ライン17：4点）、北湖中央部（ライン15：3点）第二湖盆（ライン12：4点）を選択し、多地点調査を実施した。また、2017年7月から細菌調査と細菌呼吸の同時調査を開始した。図(3)-4及び表(3)-2に調査地点を、表(3)-3に調査日程と調査項目を示す。

表(3)-2 調査地点と調査深度

地点	地点名	測定深度 (m)
17A	今津沖	0, 5
17B	今津沖中央	0, 20, 40
17C	姉川沖	0, 20, 40
17C'	長浜沖	0
15A	安曇川沖	0, 20, 40
15B	安曇川沖中央	0, 20, 40
15C	彦根港沖	0, 4
12A	南比良沖	0, 20, 30
12B	南比良沖中央	0, 5, 10, 15, 20, 40, 60
12BC	南比良沖東	0, 8
12C	長命寺沖	0, 6



図(3)-4 調査地点

表(3)-3 調査日程と調査項目

	2016年				2017年						
	7/21	8/17	10/24	11/24	2/16	5/25	7/31	9/4	10/2	11/1	12/4
細菌生産	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
一次生産		●		●		○	○			○	
呼吸							○	○	○	○	○
多地点											

●はショートパスフィルターなし

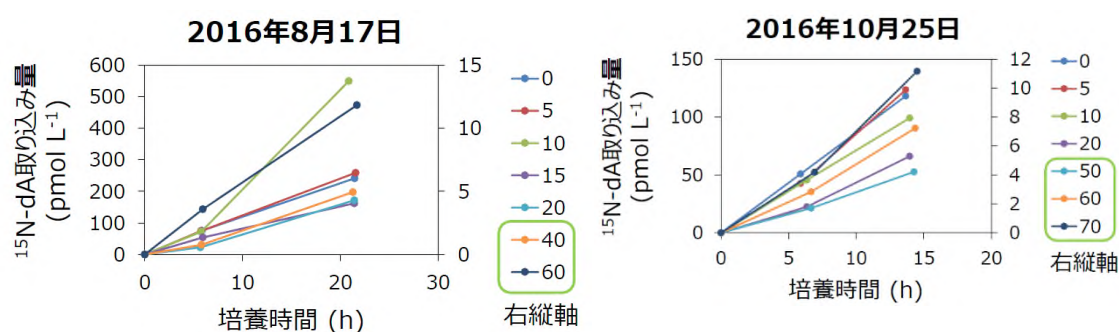
	2018年										
	1/10	2/5	3/5	3/22	4/9	5/11	6/6	7/26	8/20	9/18	11/21
細菌生産	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
一次生産				○		○		○			○
呼吸	○	○	○		○	○	○		○	○	○
多地点				○		○		○			○

4. 結果及び考察

4. - 1 琵琶湖北湖における細菌生産

4. - 1 - 1 細菌生産の測定法の琵琶湖への最適化

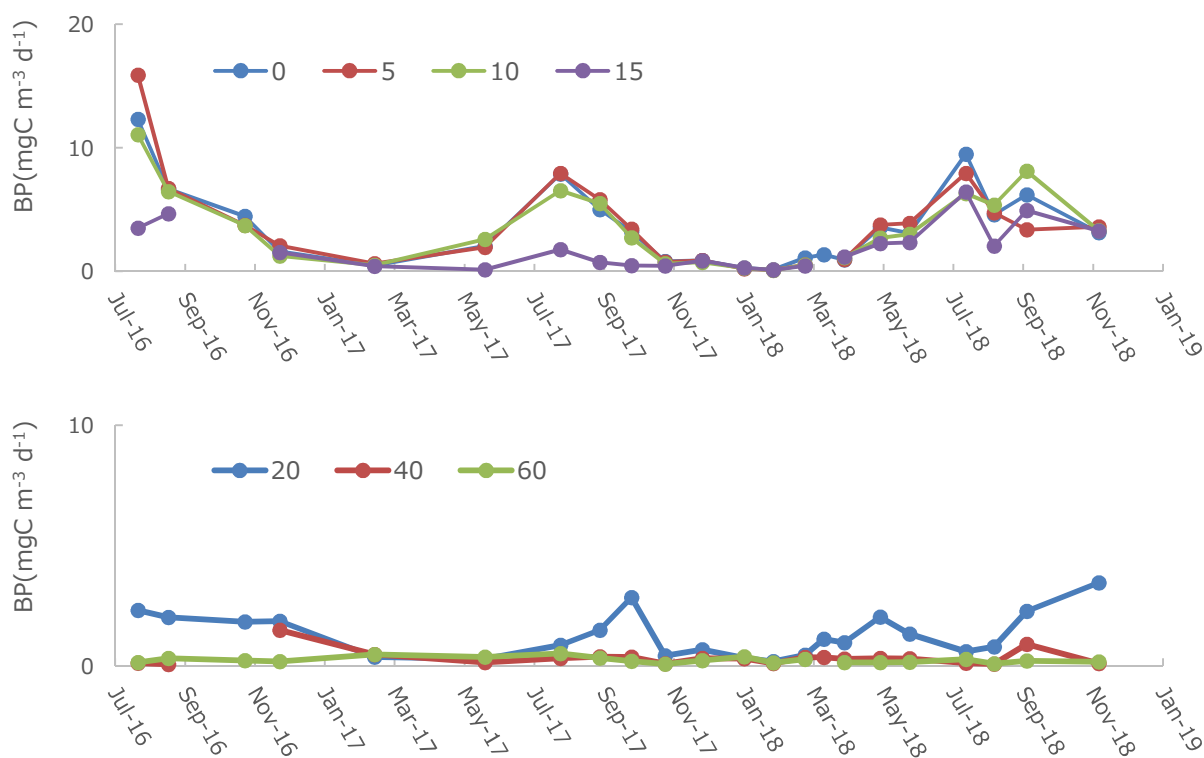
富栄養湖の霞ヶ浦においては現在1時間程度の培養で、 ^{15}N -dAを取り込ませている。貧中栄養湖である琵琶湖においては、測定精度のため、もう少し長い培養時間が必要と考えられる。そこで、最適培養時間を決定するために、培養時間を変更して ^{15}N -dAの取り込み量を測定した。その結果、琵琶湖では6時間、12時間、24時間のどの培養時間でも同様の取り込み速度が得られることが明らかとなった(図(3)-5)。以下、6時間培養で測定を実施した。

図(3)-5 ^{15}N -dA取り込みの時系列変化

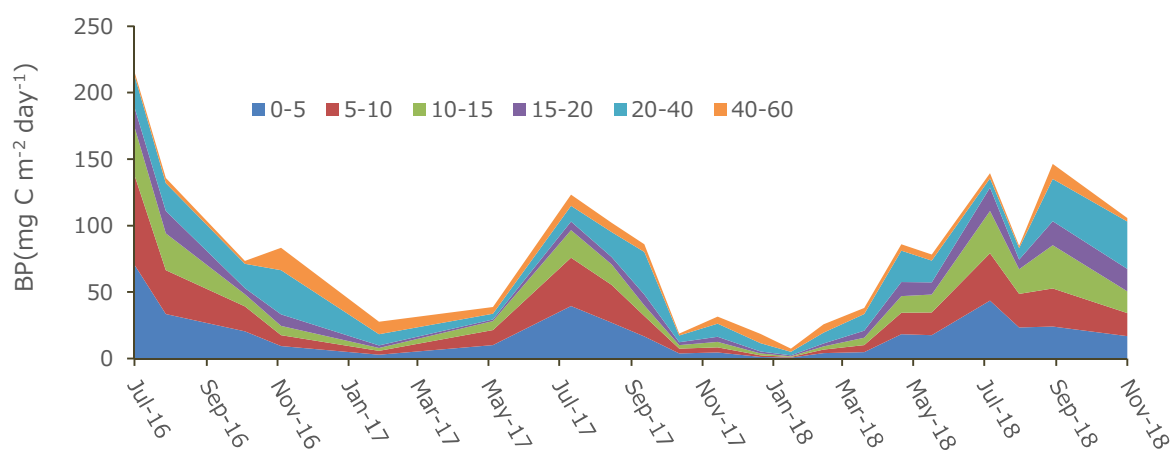
4. - 1 - 2 細菌生産の季節変化

12B地点における深さ別の細菌生産の季節変化を図(3)-6に示した。0から10 mまでは大きな季節変動を示し、春から増加し、7月に最大値を示し、その後減少するという、周年変化を示した。最低値を示す時期は年によって異なった。15 mは16年夏及び18年夏には0 mから10 mに匹敵するほどに増加したが、2017年夏には7月に僅かに増加を示すだけで、深さ方向の細菌生産の変動は年により異なることが明らかとなった。20 m以深は季節変動が小さかったが、20 mの最大値は夏ではなく、秋及び春に出現した。秋の

上昇は有機物の供給が増えたためと、水温躍層が下層まで広がった結果と考えられる。40 m及び60 mはほとんど季節変化が認められなかった。各深さの平均の生産量が各水界で起きていると仮定した、水柱の細菌生産の季節変化を図(3)-7に示した。水柱の細菌生産は夏に増加し、冬に減少していた。また、秋に20 m～60 m層の寄与が高くなる傾向が認められ、特に2018年11月には細菌生産の40%程度が20 m～60 mで起こっていると考えられた。



図(3)-6 深さ別細菌生産の季節変化

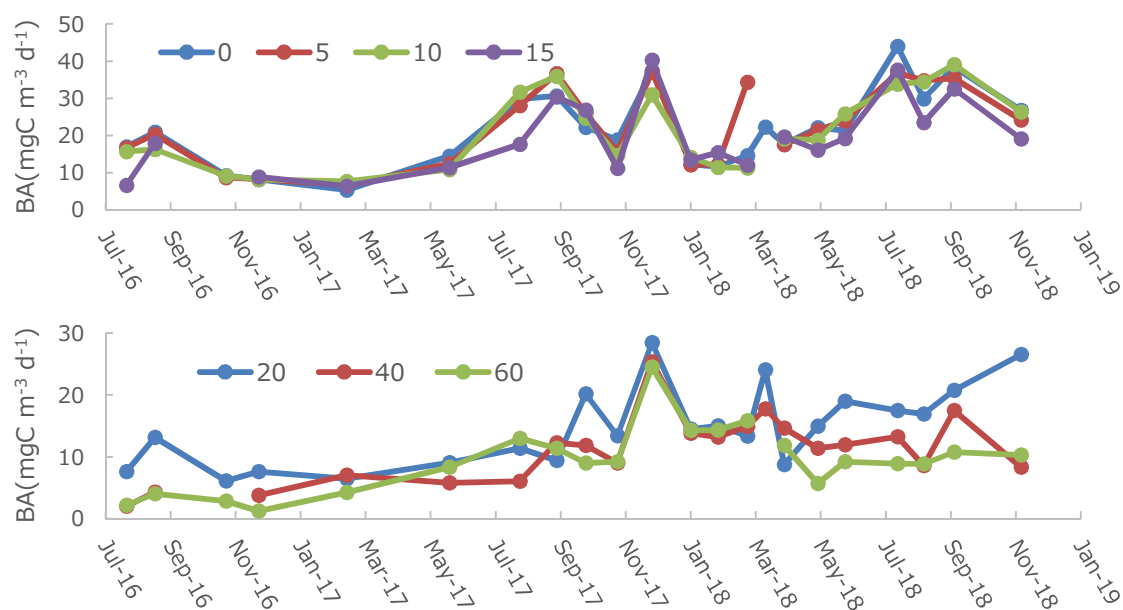


図(3)-7 水柱の細菌生産の季節変化

4. - 1 - 3 細菌の存在量の季節変化

図(3)-8に細菌存在量の季節変化を示した。表層部の細菌存在量は2017年7月から9月と12月及び2018年7月から9月に増大した。2017年、2018年共に細菌生産の最大値は7月だったことから、細菌生産量の増大が存在量の増加につながっている可能性が考えられた。また、2017年12月の前の時期には高い生産は認められず、現場で増殖し、増加した可能性が低いことから、別の場所で増加した細菌が移動してきたと考

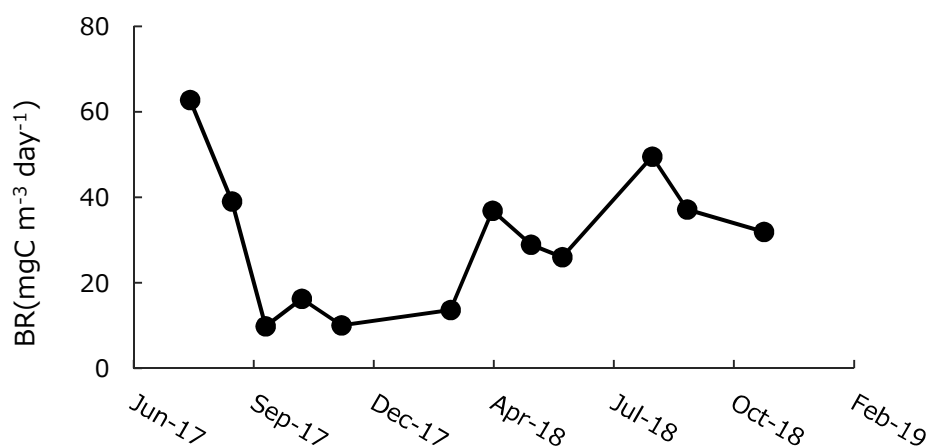
えられる。また、底層部の細菌存在量も季節的に大きく変化した。特に、40 mと60 mは細菌生産量にほとんど季節変化が見られなかったにもかかわらず、2017年12月に大きく値が増加した。2017年12月の湖水の混合は40 mには達していなかったため、湖水の混合よりも、表層から沈降してきた有機物が影響を与えた可能性が考えられた。



図(3)-8 細菌存在量の季節変化

4. - 1 - 4 細菌呼吸の季節変化

細菌呼吸の測定は深さ5 mにおいて細菌生産調査と同じ調査で実施した。2017年11月1日の調査では水深40 mについても測定を試みたが、培養開始時からの酸素の減少が認められず、検出限界以下と判断された。また、水温の低い2018年1月10日及び2018年2月5日も明瞭な測定結果が得られなかったため解析から除外した。(図(3)-9)に季節変化を示すが、細菌呼吸も細菌生産同様、夏に高く、冬に低い傾向が認められ、温度の関数と推察された。

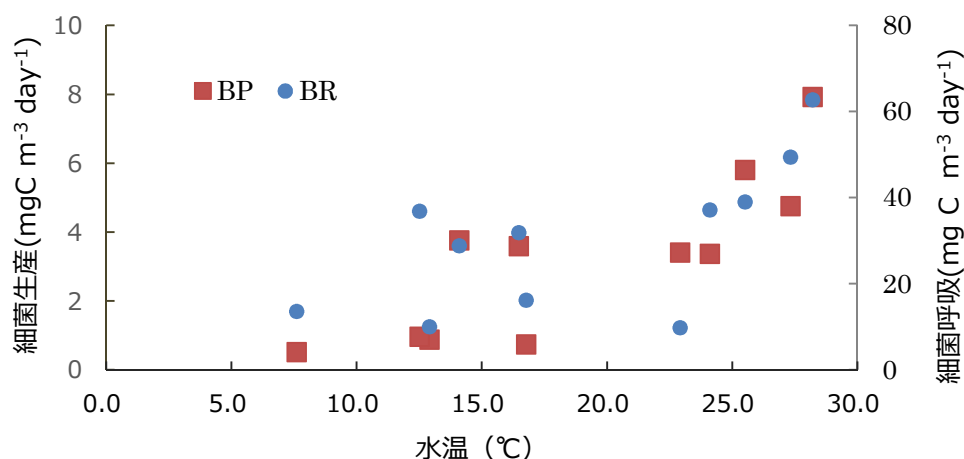


図(3)-9 呼吸の季節変動 (水深5 m)

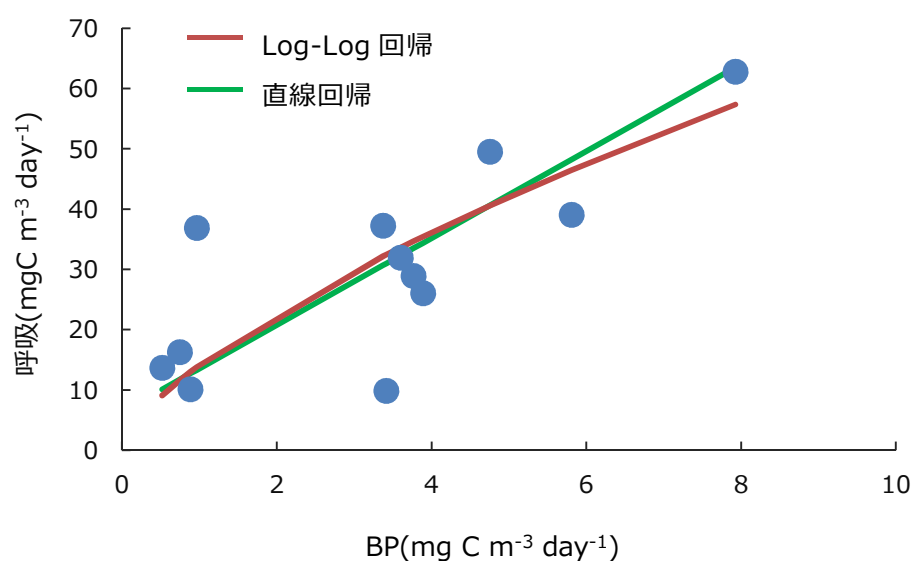
4 - 1 - 5. 細菌生産と細菌呼吸の水温応答

同時測定を行った5 m水深の細菌呼吸(BR)と細菌生産(BP)のデータを水温とプロットすると、細菌生産と細菌呼吸は水温に対して、類似した挙動を示した(図(3)-10)。また、Amadoら^[8]は細菌生産と細菌呼

吸に相関があることを示しているため、細菌生産から細菌呼吸を算出する近似式について検討を行った(図(3)-11)、表(3)-4。Log-Log回帰、直線回帰共に比較的大きな切片を持った。この切片が基礎呼吸に当たるかどうかについては今後検討の必要がある。また、大きな切片をもつ近似式に基づいて細菌生産から細菌呼吸を算出した場合、細菌生産が低いときの細菌呼吸が大きくなる可能性があり、実態の把握が必要である。



図(3)-10 細菌生産と呼吸の温度に対する応答

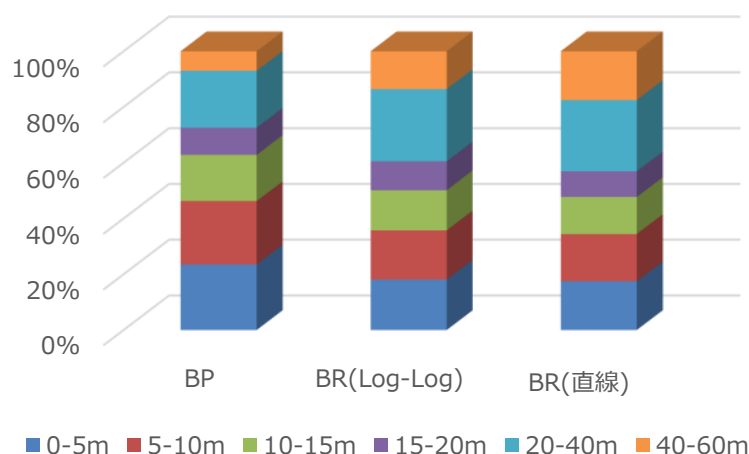


図(3)-11 細菌生産と細菌呼吸の線形近似

表(3)-4 細菌生産 (BP) と細菌呼吸 (BR) のⅡ型回帰式

Log-Log回帰	$\text{Log}_{10}(\text{BR}) = 0.677 \times \text{Log}_{10}(\text{BP}) + 1.1496$
直線回帰	$\text{BR} = 7.212 \times \text{BP} + 6.323$

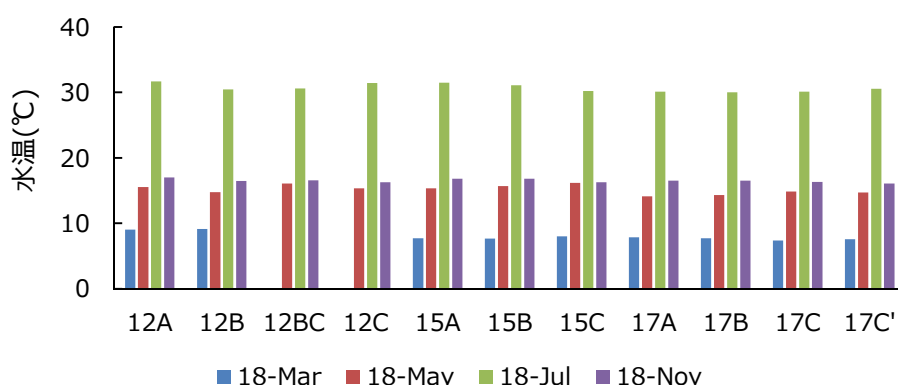
図(3)-12に上記回帰に基づいた調査期間中の呼吸と細菌生産の深さ方向の寄与率を示した。細菌生産は0-20 mが70%を占めている一方、Log-Log回帰、直線回帰共に呼吸は20 m以深が40%と深いところでの細菌呼吸の寄与が大きく現れている。細菌呼吸は細菌生産の数倍の値を示すことから、細菌呼吸はカーボンフローの計算に大きく影響する。このため、カーボンフローの正確な把握には細菌呼吸の正確な把握、特に深層部の細菌呼吸の実測が今後、重要となると考えられる。



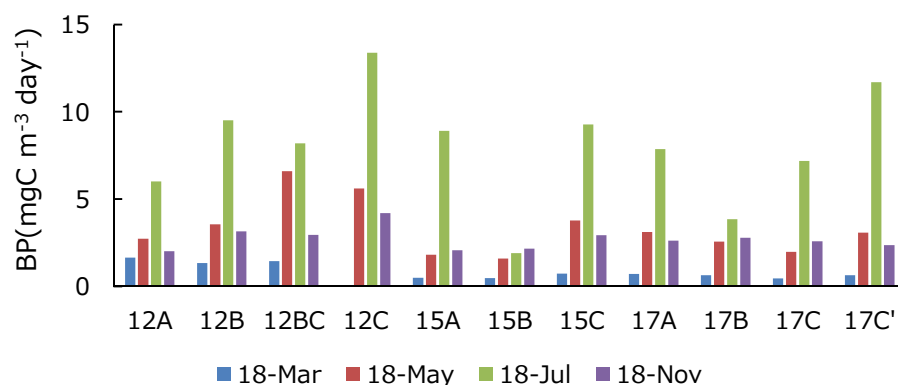
図(3)-12 細菌生産及び呼吸の深さ方向の寄与率

4. - 1 - 6 北湖多地点調査による細菌生産の地点間の変動

2018年3月、5月、7月及び11月に実施した多地点調査の表層水温と表層細菌生産の結果を図(3)-13及び図(3)-14に示した。表層水温は季節ごとに大きく変動する一方、地点間の差は小さかった。地点間差では18年3月に第二湖盆が高い傾向にあった。細菌生産も季節ごとの差は大きく、いずれの地点でも7月に最大、3月に最小となり、季節変動は水温によって支配されられると考えられる。一方、細菌生産は地点間の差異も大きかった。18年3月は水温の高めの第二湖盆が高い傾向にあり、7月は三ラインとも左岸が高い傾向が認められた。左岸は浅く、人口密集地も控えていることから、水温の高い7月は水質等の水温以外の因子の影響が顕著に出たと考えられる。



図(3)-13 多地点表層の水温の季節変化

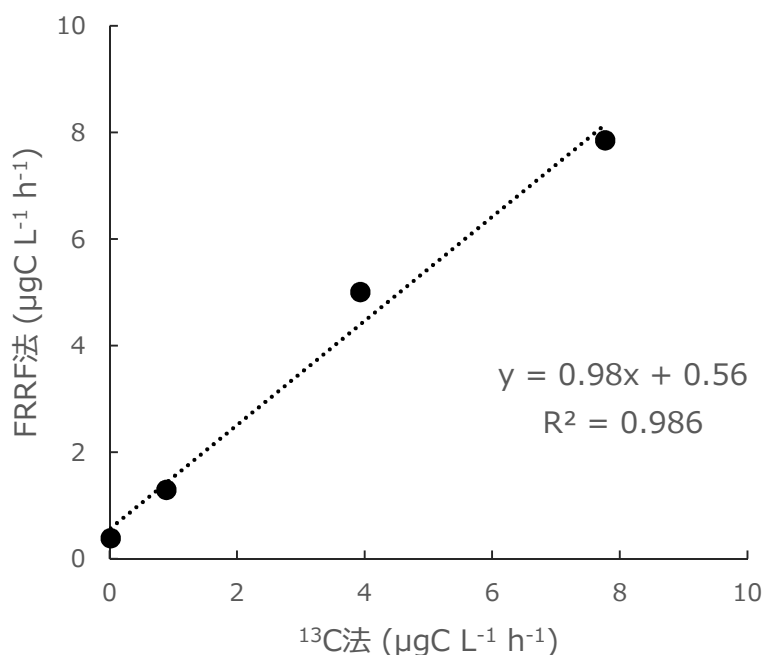


図(3)-14 多地点表層の細菌生産の季節変化

4. - 2 琵琶湖北湖における一次生産

4. - 2 - 1 琵琶湖へのFRRFの適応について

2017年5月25日に12B地点でFRRFと ^{13}C 法による一次生産の比較を実施した。5月25日は天候が不安定で、直達日射は時々刻々変化した。そのため、FRRF測定時における水面直下のPAR ($207.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)と ^{13}C 測定時間平均PAR ($590.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)とを用いて、FRRFの結果に $590.3/207.2$ を換算係数として乗じ同時間帯の一次生産とした。単位を揃えて同一深度の一次生産をプロットした結果を図(3)-15に示した。両者の間に高い相関性が認められた。また傾きも1に近いものとなり、FRRF法によって算出される一次生産速度の値は ^{13}C 法と比べても妥当なものであると考えられた。

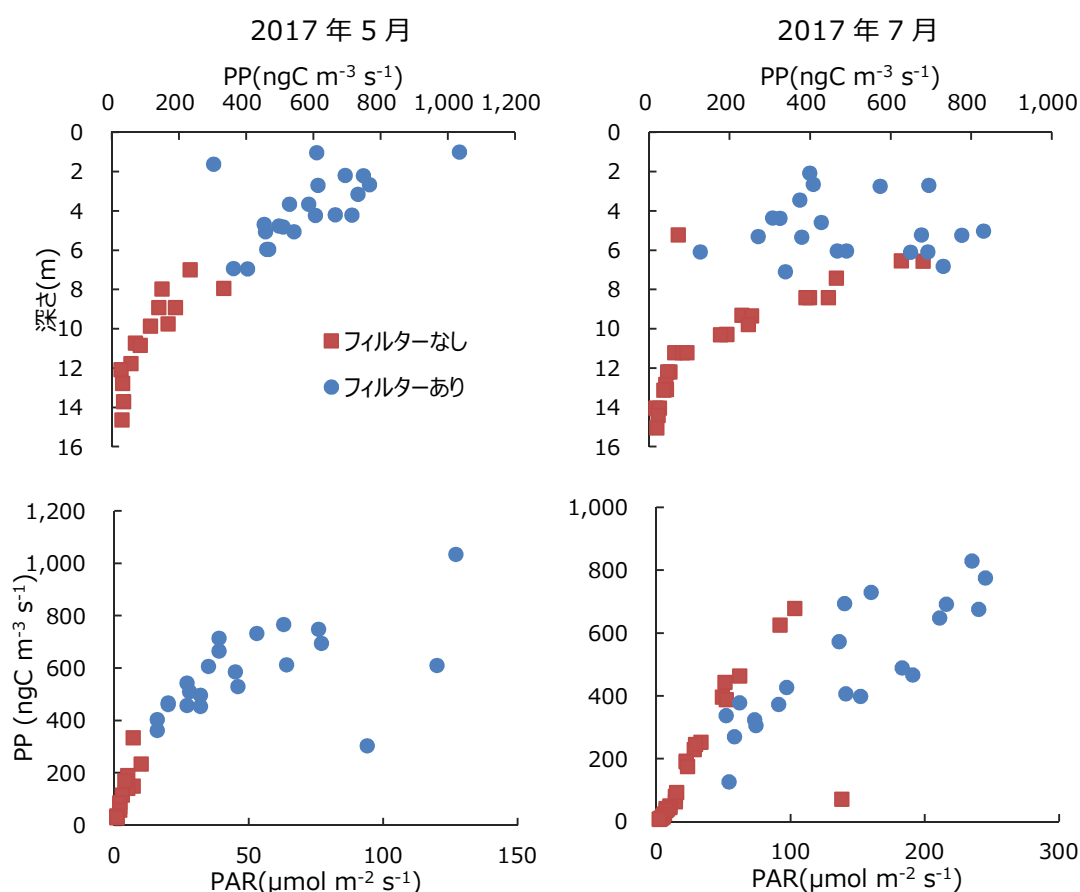


図(3)-15 FRRFと ^{13}C 法により一次生産測定比較

4. - 2 - 2 FRRF測定の琵琶湖への最適化

2017年5月及び7月にショートパスフィルターの効果の確認を実施した（図(3)-16）。ショートパスフィルターを装着せず5 mまで測定する系と、ショートパスフィルターを装着して8 mから表層まで測定する系を順次実施した。左側に2017年5月の測定結果を、右側に2017年7月の測定結果を示した。5月はショートパスフィルターなしでは6 m以浅では値が得られなかった。一方、ショートパスフィルター装着時は表層まで測定が可能であり、二つの測定結果が連続的につながり、表層まで高い一次生産が観察された。PARが $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ を超えてもショートパスフィルター装着で測定できることが示された。7月もショートパスフィルターなしでは、6 m以浅では値がほぼ得られなかった。一方、ショートパスフィルター有りでは深さ2 m、PAR $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ まで値を得ることができた。天候が不安定だったため、PARの値がめまぐるしく変化した、表層での強光阻害も検出できていると考えられる。

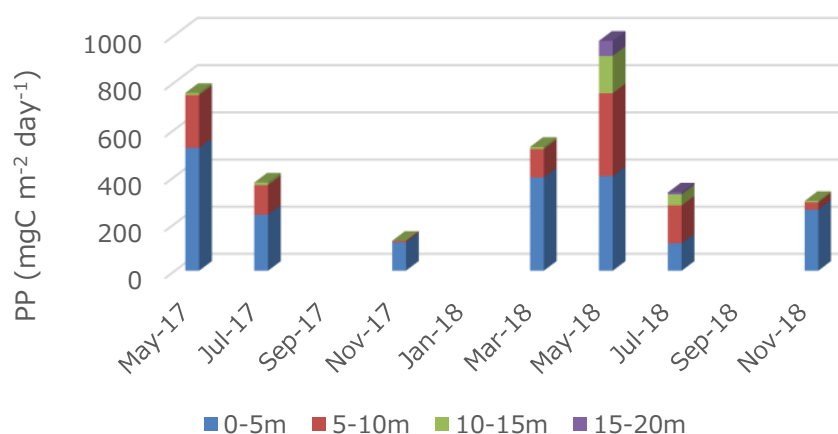
2016年度のFRRFの測定は残念ながらショートパスフィルター装着前であったことから、表層の一次生産が測定できておらず、水柱の一次生産は測定できていないと判断されたため、今回は解析から除外することとした。



図(3)-16 ショートパスフィルター装着の効果

4. - 2 - 3 一次生産の季節変化

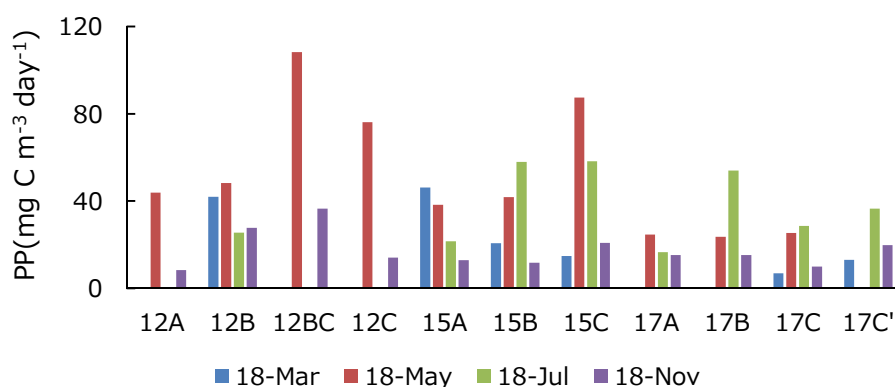
表層まで測定が可能だった2017年5月～2018年11月までの一次生産の水深別季節変化を図(3)-17に示した。一次生産は5月に最大になり、夏～秋にかけて減少することが明らかとなった。また、2018年5月を除いて光合成は表層から10 mまでで、成層している夏でも全層のおよそ半分に及ぶ細菌生産に必要な有機物は、表層からの降下または、陸域から供給に依存していると考えられた。特に2018年7月の水柱の一次生産およそ300 mgC m⁻² day⁻¹は同日の細菌生産およそ150 mgC m⁻² day⁻¹の2倍でしかなく、有機物の供給と消費のバランスが取れていないと考えられる。



図(3)-17 水柱の一次生産の季節変化

4. - 2 - 4 北湖多地点調査による地点間の変動

図(3)-18に多地点での一次生産の変化を示した。棒グラフがないところは、測定を実施していない。3月は測定点が少ないため、はっきりしたことは言えないが、第二湖盆、北湖中央部が高い傾向にあった。5月は、第二湖盆、北湖中央部ではほぼ最大となり、第一湖盆はそれに比べて低い傾向にあった。一方、7月は第一湖盆が最大で、地点間で一次生産の挙動に違いがあった。また、左岸(12BC、12C、15C、17C及び17C'地点)は浅く、水深が有光層に達しないところもあったが、細菌生産同様水柱での生産は高い傾向があり、供給される栄養塩が影響している可能性が示された。



図(3)-18 多地点有光層の一次生産の季節変化

4. - 3 まとめ

4. - 3 - 1 琵琶湖における細菌生産の長期間における推移

表(3)-5に過去の研究と今回の研究の細菌生産の比較を示した。Ieは京都大学が第二湖盆中央に設定しているサイトで、12B地点とほぼ同じ地点である。その結果、1980～1990年代と2000～2010年台では細菌生産が4から6分の一に減少していることが示された。今後、この減少の原因を解明することが重要になると考えられる。

表(3)-5 琵琶湖における細菌生産の推移

* The smaller conversion factor (2×10^6 cells μmol^{-1}) was used

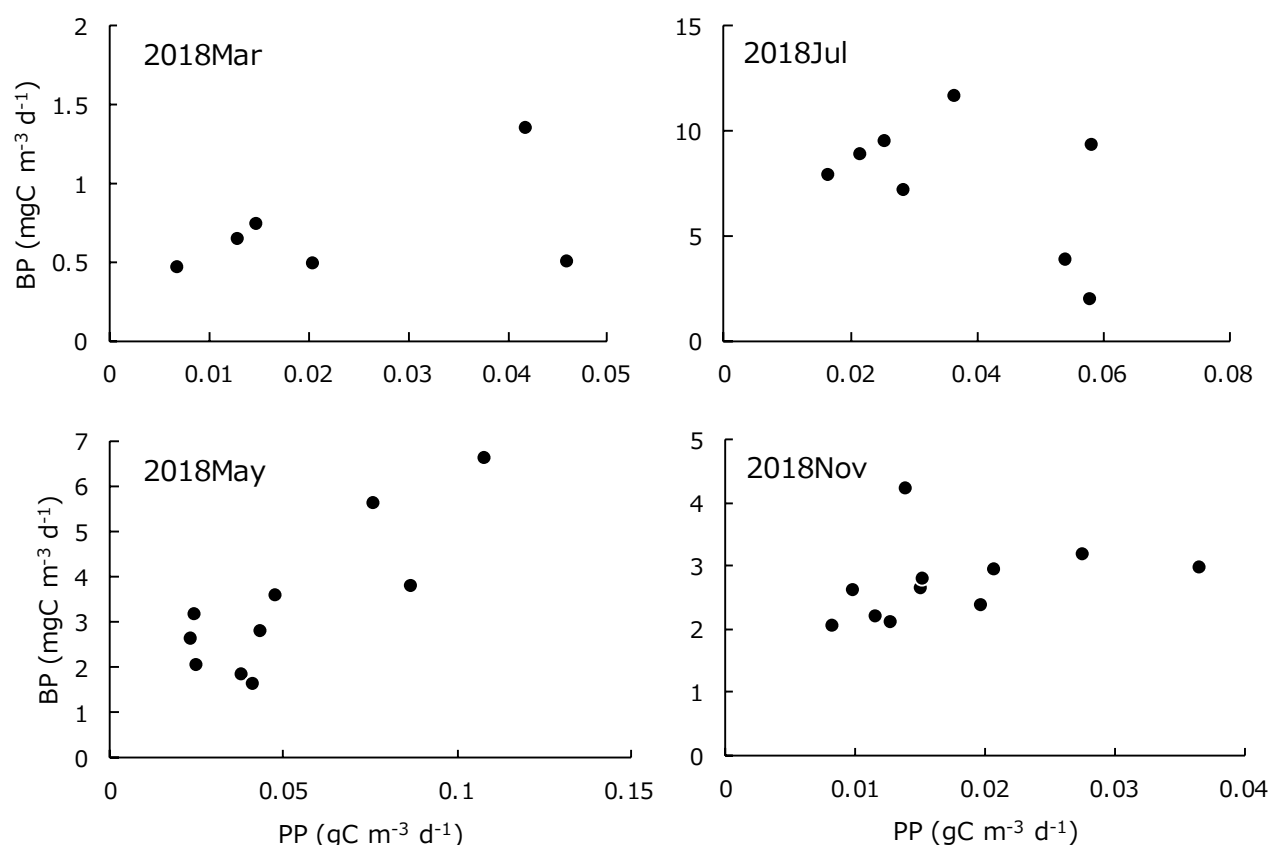
Lake	St.	N	Year	BP range ($\mu\text{gC L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Season	Reference
Lake Biwa	Ie	57	1986	5-59*	Apr-Oct	Nagata [9]
Lake Biwa	Ie	24	1996-1997	1.7-63	Annual	Gurung et al. [10]
Lake Biwa	Ie	24	2005-2006	0.2-11.5	Annual	Pradeep Ram et al. [11]
Lake Biwa	12B	150	2016-2018	0.07-15.9	Annual	This study

* The smaller conversion factor (2×10^6 cells μmol^{-1}) was used

4. - 3 - 2 一次生産と細菌生産の関連について

図(3)-19に4回調査それぞれについて、表層水の細菌生産と有光層の一次生産平均値の関係を示した。3月と5月は一次生産が高ければ細菌生産も高い傾向が認められた。一方、7月には関係は認められなかった。細菌生産が最も高い7月に細菌生産と一次生産に関係が認められなかったことは、細菌生産

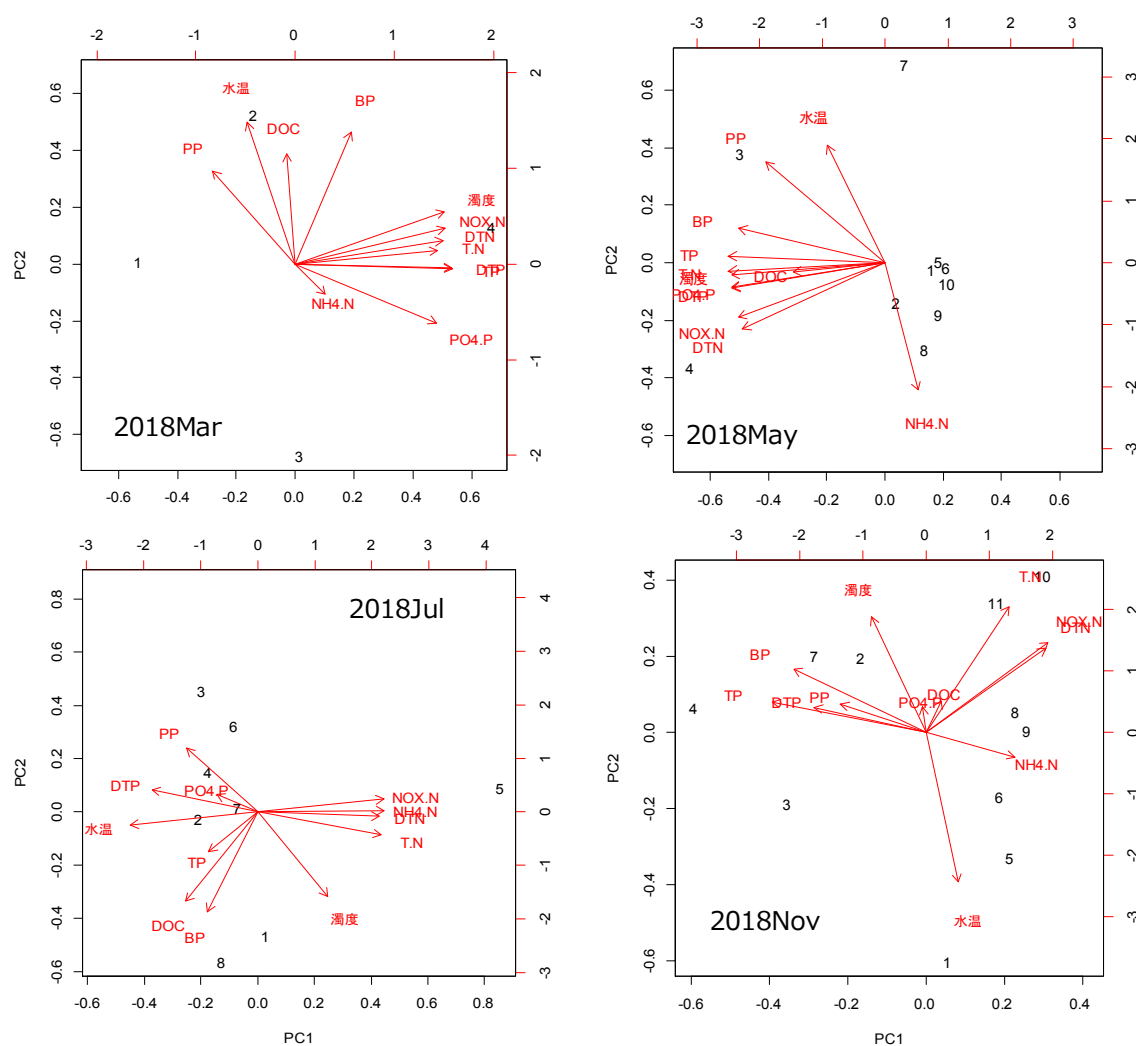
と一次生産を支配している環境因子が異なるためと考えられたが、現場で固定された有機物の影響が迅速に細菌生産に反映されるわけではないことも、示していると考えられる。



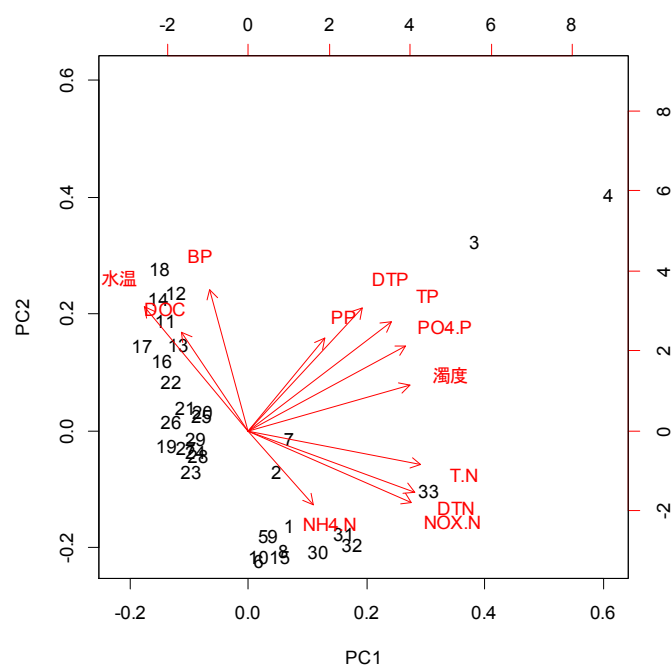
図(3)-19 多地点調査における一次生産と細菌生産の関係

多地点調査の有光層一次生産、表層細菌生産及び環境因子のデータに基づいて主成分分析を行った結果を図(3)-20に示した。PC1、PC2の寄与率は2018年3月、5月、7月及び11月それぞれ、(0.559, 0.240)、(0.694, 0.170)、(0.554, 0.183)、(0.324, 0.237)であり、11月を除いて、PC1が50%以上でPC1とPC2併せて70%以上であった。この結果から、3月の細菌生産のベクトルは濁度とDOCと間に位置し、細菌生産は陸域から供給される有機物に影響されている可能性が高かった。5月の細菌生産もTPをはじめとするアンモニアを除く栄養塩、有機物などと関連が強いことが示され、5月も沿岸から供給される栄養塩及び有機物が細菌生産の増加に寄与している可能性が示唆された。5月の一次生産は水温と関係が強く、日射量の増加に伴い、水温上昇と一次生産の増加が起こっていると考えられる。季節的に最も活性の高かった7月については、一次生産が可給態のリンに規定されている可能性が高いのに対して、細菌生産は有機物の供給により影響を受けていると考えられる。11月はPC1、PC2で56%の寄与率だったが、一次生産、細菌生産共にリンとの関係が強い傾向が認められた。

これらを全てまとめた多変量解析を、図(3)-21に示した。PC1、PC2の寄与率はそれぞれ0.468, 0.259で、2次元で73%を説明できた。その結果、一次生産のベクトルはリンと同方向であり、一次生産はリンに規定されていると考えられた。一方、細菌生産のベクトルは水温・DOCと一次生産・リン濃度の間に位置した。これらの結果から、全体として一次生産はリンにより規定されており、細菌生産は一次生産、リン及び水温、DOCに複合的に影響を受けていると考えられる。リン濃度の変化が一次生産及び細菌生産に影響を与えている可能性があり、生産性とリンとの関連を今後注視していく必要がある。



図(3)-20 多地点調査における一次生産と細菌生産及び環境因子の主成分分析（月ごと）



図(3)-21 多地点調査における一次生産と細菌生産及び環境因子の主成分分析（4ヶ月）

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

これまでに現場での測定が困難であった細菌生産と一次生産に関して、安定同位体を用いた方法及びFRRFを使用することによって、現場で正確なデータが取得できるようになった。また、今回得られた結果は長期的な琵琶湖の変化を示していた。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

琵琶湖の保安全管理において、琵琶湖に係る湖沼水質保全計画の策定についての施策の土台となる一次生産及び細菌生産の貴重なデータを取得し、過去との比較から現状の琵琶湖の状況についての科学的認識が深まった。次期の第8期琵琶湖に係る湖沼水質保全計画に向けて、本研究の結果をもとに水質生態系モデルによる水質と生物生産に関する正確な予測を行うことができると考える。さらに、国立研究開発法人国立環境研究所琵琶湖分室の設立時に行われた研究として、国立環境研究所琵琶湖分室と滋賀県琵琶湖環境科学研究センターの今後の円滑な共同研究の先鞭となった。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) K. TSUCHIYA, T. TODA, T. SANO, N. TOMIOKA, A. IMAI, N. KAWASAKI, H. FUKUDA, K. HAMASAKI, Y. TSUDA, S. SHIMODE: SIL XXXIII Congress, Abstracts, 110-111 (2016), Comparison between [¹⁵N]-deoxyadenosine method and [3H]-thymidine method for measuring bacterial production in aquatic environments.
- 2) 富岡典子, 土屋健司, 小松一弘, 福島路生, 高津文人, 霜鳥孝一, 篠原隆一郎, 今井章雄: 81回日本陸水学会沖縄大会, 同予稿集, 196 (2016), 貧中栄養湖における細菌群集と環境因子の関連について
- 3) 小松一弘, 今井章雄, 富岡典子, 高村典子, 中川恵, 霜鳥孝一, 高津文人, 篠原隆一郎: 第81回日本陸水学会大会, 同予稿集, 123 (2016), Fast Repetition Rate Fluorometry (FRRF)法による実湖沼水中一次生産速度の測定
- 4) 今井章雄: 第20回日本水環境学会シンポジウム, 第20回日本水環境学会シンポジウム講演集, 57 (2017), 湖沼における溶存有機物の研究－国環研20年の歩み
- 5) 富岡典子, 土屋 健司, 小松一弘, 高津文人, 今井章雄, 早川和秀, 廣瀬住則, 岡本高弘, 永田貴丸: 日本陸水学会第82回大会, 同講演要旨集, 172 (2017), 琵琶湖北湖における微生物群集の季節変化
- 6) 今井章雄: 滋賀大学教育学部化学教室理科教育研究会（フラスコ会）総会(2018), 国立環境研究所の概要と琵琶湖分室の研究活動について
- 7) 土屋 健司, 佐野友春, 富岡典子, 小松一弘, 高津文人, 今井章雄, 早川和秀, 岡本高弘: 2017年日本プランクトン学会・ベントス学会合同大会, 同予稿集, 52 (2017), 琵琶湖北湖における細菌生産量の季節変動

- 8) 土屋 健司, 佐野友春, 富岡典子, 小松一弘, 高津文人, 今井章雄, 早川和秀, 岡本高弘, 廣瀬佳則: 第52回日本水環境学会年会, 同予稿集, 3 (2018), 琵琶湖北湖の細菌生産動態
- 9) 今井章雄: 滋賀バイオ産業振興機構平成29年度第2回バイオ技術研究セミナー(2018), 国立環境研究所の概要と琵琶湖分室の研究について
- 10) 霜鳥孝一, 今井章雄, 佐藤貴之, 小松一弘, 高津文人, 川崎伸之: 日本陸水学会大83回大会, 同予稿集 (2018), 全有機炭素検出器を用いたサイズ排除クロマトグラフィーによる溶存有機物の分子サイズ分析と特性評価
- 11) 風間健宏, 霜鳥孝一, 早川和秀, 今井章雄, 小松一弘: 日本陸水学会 第83回大会 岡山大会, 同予稿集, 129 (2018), 新型高速フラッシュ蛍光光度法 (FRRf) を用いた湖沼一次生産速度のリアルタイム測定
- 12) 風間健宏, 霜鳥孝一, 早川和秀, 今井章雄, 小松一弘: 平成30年度ISEE研究集会「水圏クロロフィル蛍光に関する知識統合と研究戦略」(2018), 新型高速フラッシュ蛍光光度法 (FRRf) を用いた湖沼一次生産速度のリアルタイム測定
- 13) 小松一弘, 富岡典子, 土屋 健司, 早川和秀, 永田貴丸: 平成30年度ISEE研究集会「水圏クロロフィル蛍光に関する知識統合と研究戦略」(2018), FRRF (Fast Repetition Rate Fluorometry)法による湖水中一次生産の測定
- 14) 小松一弘, 富岡典子, 松崎慎一郎, 高津文人, 土屋健司, 今井章雄, 珠坪一晃, 中川恵, 早川和秀, 永田貴丸: 第53回日本水環境学会年会, 同予稿集 (2019), 琵琶湖と霞ヶ浦における一次生産の分布と時系列変化
- 15) 土屋健司, 富岡典子, 小松一弘, 高津文人, 今井章雄, 佐野友春, 早川和秀, 永田貴丸, 岡本高弘, 廣瀬佳則: 第53回日本水環境学会年会, 同予稿集(2019), 琵琶湖北湖における細菌生産の30年間の変化

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) びわ湖研究セミナー[水環境保全に向けた新たな視点～物質循環（つながり）の観点から](主催：滋賀県琵琶湖環境科学研究センター、平成28年7月22日、大津滋賀県大津合同庁舎にて研究紹介)
- 2) 平成30年度びわ湖セミナー「生態系保全をめざして一湖の水質と生き物のつながり」(主催：滋賀県琵琶湖環境科学研究センター、平成31年3月1日、大津ピアザ淡海大会議室において、基調講演及び一般講演)

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

1. J.A. FUHRMAN, F. AZAM: Appl. Environ. Microbiol., 39, 6, 1085-95 (1980), Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British-Columbia, Antarctica, and California.
2. D. KIRCHMAN, E. KNEES, R. HODSON: Appl. Environ. Microbiol., 49, 3, 599-607 (1985), Leucine incorporation and its potential as a measure of protein-synthesis by bacteria in natural aquatic systems.

3. K. TSUCHIYA, T. SANO, N. KAWASAKI, H. FUKUDA, N. TOMIOKA, K. HAMASAKI, et al.: *J. Oceanogr.*, 71, 6, 675-83 (2015), New radioisotope-free method for measuring bacterial production using N-15(5) -2'-deoxyadenosine and liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) in aquatic environments.
4. D.J. LANE : In, E. STACKERBRANDT, M. GOODFELLOW editors, *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester: John Wiley & Sons (1991), 16S/23S rRNA sequencing.
5. T. NAGATA : *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 1, 28-32 (1986), Carbon and nitrogen-content of natural plankton bacteria.
6. Z. KOLBER, P.G. FALKOWSKI: *Limnol. Oceanogr.*, 38, 8, 1646-65 (1993), Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis in-situ.
7. T. HAMA, T. MIYAZAKI, Y. OGAWA, T. IWAKUMA, M. TAKAHASHI, A. OTSUKI, et al.: *Mar. Biol.*, 73, 1, 31-6 (1983), Measurement of photosynthetic production of a marine-phytoplankton population using a stable C-13 isotope.
8. A.M. AMADO, F. MEIRELLES-PEREIRA, L.O. VISAL, H. SARMENTO, H. ARMENTO, A.L. SUHETT, V.F. FARJALLA, et al.: *Front Microbiol.*, 4, 8 (2013), Tropical freshwater ecosystems have lower bacterial growth efficiency than temperate ones.
9. T. NAGATA: *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 12, 2872-82 (1987), Production-rate of planktonic bacteria in the north basin of Lake Biwa, Japan.
10. T.B. GURUNG, J. URABE, K. NOZAKI, C. YOSHIMIZU, M. NAKANISHI: *Lakes & Reservoirs Research and Management*, 7, 4, 317-23 (2002), Bacterioplankton production in a water column of Lake Biwa.
11. A.S.P. RAM, Y. NISHIMURA, Y. TOMARU, K. NAGASAKI, T. NAGATA: *Aquat. Microb. Ecol.*, 58, 3, 249-59 (2010), Seasonal variation in viral-induced mortality of bacterioplankton in the water column of a large mesotrophic lake (Lake Biwa, Japan).

Ⅱ－４ メタゲノミクスによる細菌と原生生物の群集解析

京大大学生態学研究センター 水域生態学部門 中野 伸一・程木 義邦

〈研究協力者〉

京大大学生態学研究センター 水域生態学部門 インドラニル ムカルジ

平成28～30年度累計予算額：23,600千円

（うち平成28年度：8,000千円、平成29年度：8,000千円、平成30年度：7,600千円）

累計予算額は、間接経費を含む。

〔要旨〕

琵琶湖北湖において、細菌と原生生物の現存量と種・グループレベルでの組成を季節的かつ鉛直的に測定し、さらに原生生物による細菌消費速度の測定、およびどの細菌摂食者として重要な原生生物グループの推定を行った。細菌現存量は、4月から7月の表水層で特に高くなり、その他は9月から11月の表水層で比較的高くなった。表水層・深水層を通じて優占した細菌系統は*Bacteroidetes*と*Actinobacteria*であった。表水層では、上記2つの門の細菌に加えて*Betaproteobacteria*と*Alphaproteobacteria*の細菌門も多く見られ、深水層では上記2つの細菌門に加えて*Chloroflexi*や*Planctomycetes*門の細菌も優占した。ショットガンメタゲノム解析では、琵琶湖で優占する50以上の細菌系統のゲノムを培養非依存的に決定した。その結果、新奇未培養細菌の一大系統群を含む琵琶湖の細菌群集の多様性の高さが示された。得られたゲノムにコードされている遺伝子の解析により各細菌系統の生理・生態的な特徴を予測した。原生生物群集解析の結果、表水層ではCryptophyta、深水層ではDinophytaの、いずれも鞭毛虫が優占した。細菌摂食者として重要と考えられた原生生物は、Cercozoa、Kathablepharida、Pedinellids、Kinetoplastidsの鞭毛虫であった。繊毛虫は7月から9月の表水層で現存量が高く、細菌摂食者として重要であると示唆された。細菌生産速度と原生生物による細菌消費速度との比較から、水温が比較的高くかつ安定した表水層において細菌と原生生物との間の食物連鎖が活発となることが示された。

〔キーワード〕

微生物食物連鎖、メタゲノミクス解析、細菌摂食、溶存有機物、分解

1. はじめに

湖沼や海洋の沖帯における浮遊生物食物網において、植物プランクトンが光合成中間代謝物や自己分解物として排出する溶存態有機物（Dissolved Organic Matter, 以下DOM）を細菌が栄養基質として利用し、細菌を原生生物が捕食し、さらに原生生物が甲殻類等の大型動物プランクトンに捕食されることによって生食連鎖につながる食物連鎖は、微生物ループあるいは微生物食物連鎖（本稿では、後者を用いる）と呼ばれる。沖帯の食物網では、植物プランクトンと動物プランクトンとの食物連鎖である生食連鎖が良く知られている。貧栄養水域では植物プランクトンの一次生産が低いため、浮遊生物食物網全体の物質循環における微生物食物連鎖の相対的重要性が高まるとされている。

近年、次世代シーケンス技術の発展により、微生物食物連鎖を構成する微生物の種やグループレベルでの組成が明らかになりつつある。しかし、微生物の組成が明らかになっている水域は限られており、特に湖沼における情報は未だ少ない。さらに、微生物は種やグループごとに物質循環における役割が異なると考えられるが、種やグループレベルの解像度での有機物動態の研究は未だなされていない。

2. 研究開発目的

琵琶湖の有機物動態を理解するためには、微生物の生態学的役割を解明することが極めて重要である。微生物は種やグループごとに物質循環における役割が異なると考えられるが、琵琶湖の細菌や原生生物の種・グループ組成はほとんど解明されていない。我々は、メタゲノミクス解析技術を用いながら、細菌や原生生物の生態をグループや種レベルで検討し、これら微生物を介した有機物の動きを検討した。

3. 研究開発方法

琵琶湖近江舞子沖および近江今津沖において、ニスキン採水器により表水層（水深5 m）と深水層（水深50 mか60 m）から試水を得た。得られた試水について、細菌および原生生物の細胞密度を、DAPI法により測定した。

さらに、得られた試水は0.2 μm 孔径のPCフィルターにろ過し、MO Bio 社のPowerSoil DNA Isolation Kitを用いてDNA を抽出した。細菌の16S rRNA のV4とV5領域を改変530Fおよび907RプライマーにてPCR増幅し、8塩基から成るDNAタグと454アダプターを2回目のPCRで結合させ、PCR産物を等モルずつプールしてRoche 454 GS-FLX Titanium sequencer (Roche Science, Mannheim, Germany)を用いてシーケンスした。シーケンス・データは、UPARSE を用いて97%以上の相同性を持つものを操作的分類群（OTU）として分類した。各OTUはSINA 1.2.11 online toolを用いて同定した。原核生物以外のOTUを除去した後、残ったリードを次の解析に用いた。得られたOTUは、湖沼に生息する細菌系統を16S rRNA遺伝子情報に基づいて整理した基準¹⁾に準拠して分類した。また、湖水中の原核生物（0.2–5.0 μm ）をサイズ分画により採集し、DNA を抽出した。得られたDNA を用いて、断片化した全DNA の網羅的シーケンスによるゲノムの再構築（ショットガンメタゲノム）を用いて、湖水中の微生物の組成とその生理・代謝特性の推定を行った。

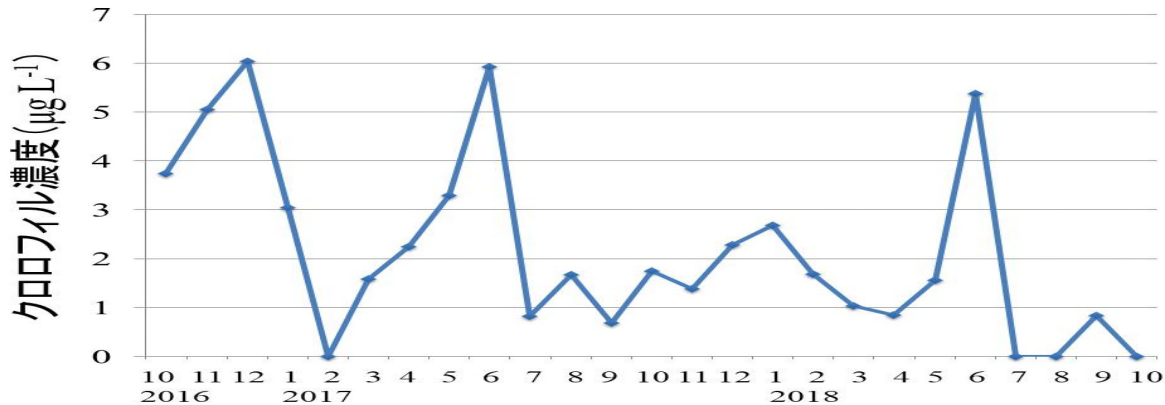
原生生物については、月に一回の頻度で、琵琶湖定期観測点であるIe-1地点において、表層（5 m）および深層（50 m）で採水を行った。サンプルはメッシュサイズ20 μm のプランクトンネットをろ過を行い（本研究では、ナノサイズの原生生物を対象とした）、細胞計数またはCARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence *in situ* Hybridization)用のサンプルとして現場で固定した。DNAの抽出はMO Bio社のPowerSoil DNA Isolation Kitを用いて行い、真核生物のユニバーサルプライマーを用いPCRを行ったのち、Roche 454 GS-FLX Titanium sequencerを用いて塩基配列の決定を行った。また、細菌食者として重要と考えられた原生生物グループについて、CARD-FISHによる定量評価を行った。

原生生物による細菌の摂食による消費速度の測定については、琵琶湖から採取した湖水をワットマンGF/Cフィルターをろ過して細菌より大きい粒子を取り除き、そのろ液をさらに0.2 μm 孔径のPC フィルターをろ過して細菌をフィルター上に捕集し、そのフィルターを反転して蒸留水で洗い流すことにより、琵琶湖の細菌を濃縮・集積した。このようにして集められた細菌を蛍光色素5-(4,6-ジクロロトリアジニ

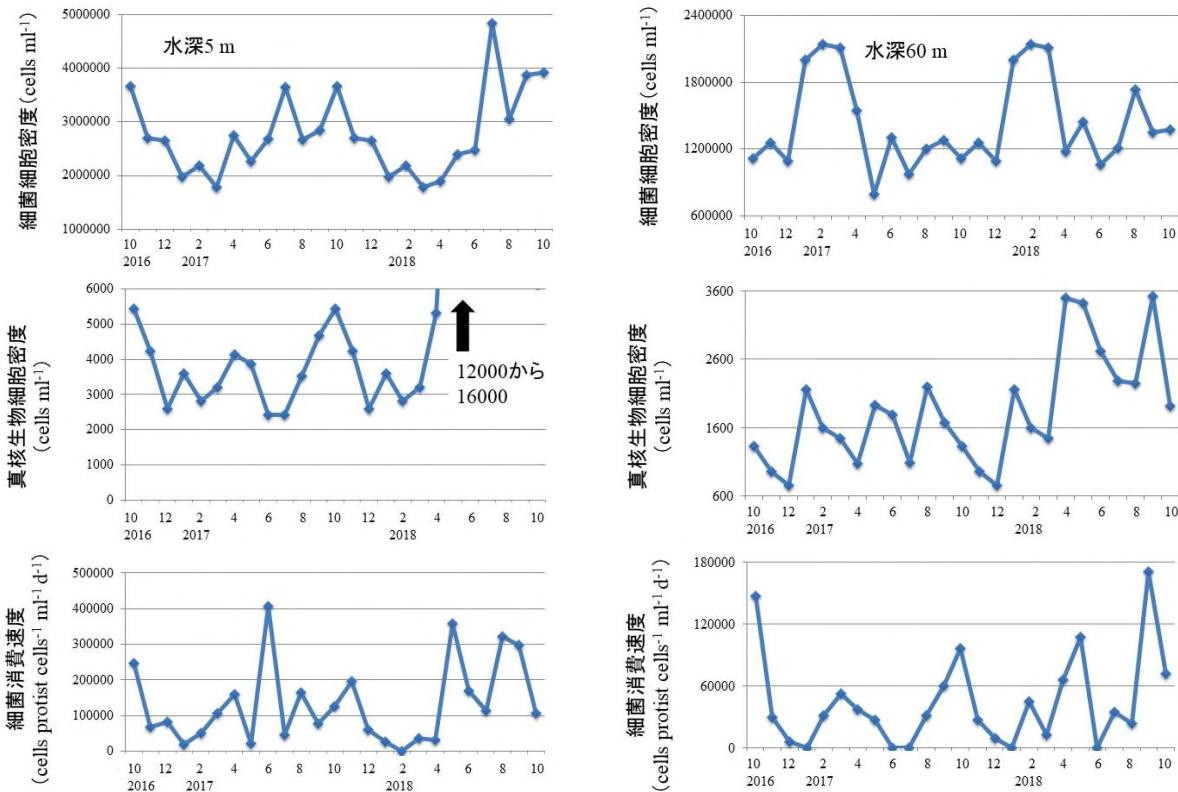
ル)アミノフルオレセイン (DTAF) で染色することにより、細菌疑似餌 (FLB) を作成した。琵琶湖の水深5 m (表水層) および水深50 m (深水層) から試水について、中野らの方法²⁾に従って原生生物による細菌に対する摂食速度を測定した。

4. 結果及び考察

本研究期間中、植物プランクトン現存量の指標であるクロロフィルa濃度 (図(4)-1) は、表水層において2016年10月から12月と2017年3月から6月にかけて特に高くなり、その他は同年の10月から1月の表水層で比較的高くなった。クロロフィルa濃度は2018年6月にも一時的に高くなったが、これは長続きしなかった。表水層における細菌細胞密度は、クロロフィルa濃度が高い時期に高くなる傾向が見られた (図(4)-2)。



図(4)-1：琵琶湖北湖の水深5 mにおけるクロロフィルa濃度の季節動態

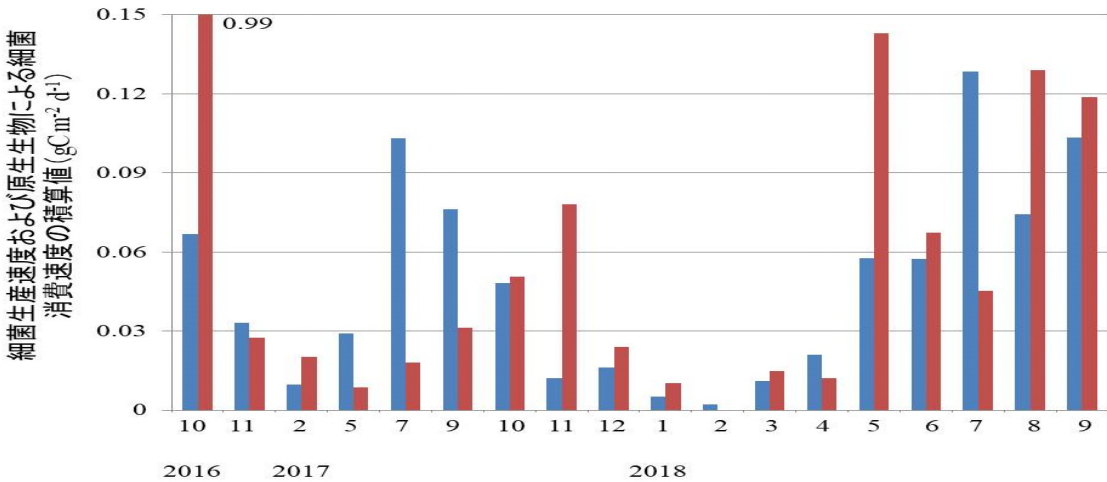


図(4)-2：琵琶湖北湖の水深5 m (左) と60 m (右) における細菌細胞密度、真核生物 (鞭毛虫) 細胞密度、および原生生物による細菌消費速度の季節動態

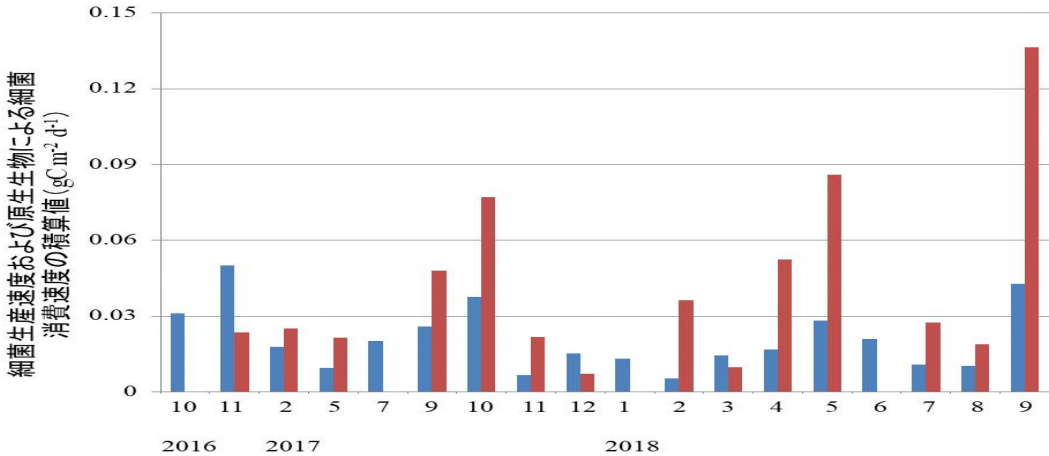
一方、深水層における細菌細胞密度は、クロロフィルa濃度の季節動態とは異なる季節動態を示した（図(4)-2）。原生生物細胞密度（真核生物細胞密度としているが、その内容はほぼ鞭毛虫の細胞密度である）の季節動態は、表水層においては細菌細胞密度ほどではないが、概ねクロロフィルa濃度の季節動態に近い動態を示した（図(4)-2）。深水層の原生生物細胞密度は、クロロフィルa濃度や細菌細胞密度とは異なる季節動態を示した（図(4)-2）。

細菌細胞密度の季節動態を、原生生物細胞密度および原生生物による細菌消費速度（以下、消費速度）の季節動態と比較した（図(4)-2）。表水層（5 m）では、細菌細胞密度は水温成層が発達する時期に高くなった。鞭毛虫細胞密度にはあまり明確な季節動態は得られなかったが、水温成層が発達する時期に高い傾向が得られた。消費速度も同様に、水温成層が発達する時期に高くなる傾向を示した。一方、深水層（60 m）では、細菌細胞密度は1月から3月の湖水循環期に高くなったが、鞭毛虫の細胞密度や消費速度には明確な季節動態は得られなかった。

原生生物による細菌消費速度の積算値を、サブテーマ3が測定した細菌生産速度の積算値と比較した（図(4)-3と4）。表水層（表面から水深20 mまでの積算値、 $\text{gC m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ）では毎年5月から10月にかけて高くなり、それ以外の季節は低い速度であった（図(4)-3）。一方、深水層（水深20 mから60 mまでの積算値）では、季節動態は表水層のそれと似ているものの、表水層ほど明確ではなかった（図(4)-4）。この結果をサブテーマ3が測定した細菌の生産速度と比較すると、細菌の生産速度も消費速度と同様の季節動態を示した（図(4)-4）。



図(4)-3：琵琶湖北湖における細菌生産速度（青色）と原生生物による細菌消費速度（赤色）について、湖水表面から水深20 mまでの速度の積算値の季節動態比較

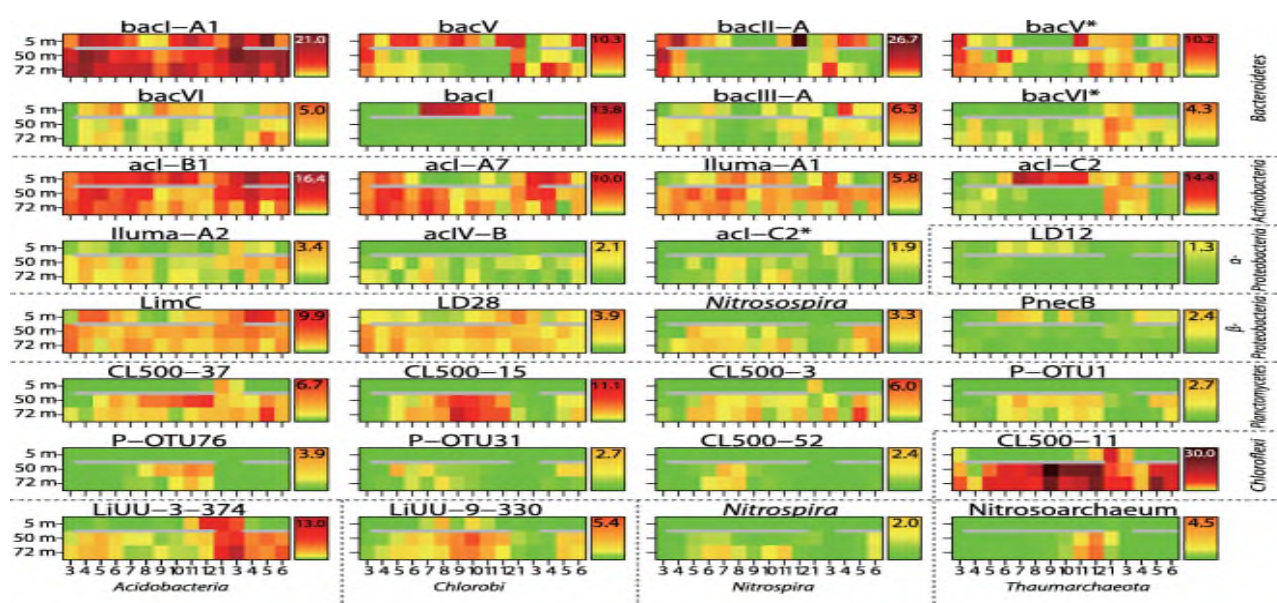


図(4)-4：琵琶湖北湖における細菌生産速度（青色）と原生生物による細菌消費速度（赤色）について、水深20 mから60 mまでの速度の積算値の季節動態比較

以上のように、本研究では細菌生産と原生生物の消費速度の間に季節的な相関性を認めた。例えば、0-20 mでは細菌生産の高い季節には原生生物の消費速度も高い傾向があった。20-60 mでは、細菌生産、原生生物ともに表水層に比べて低く、細菌生産との連関性が示唆された。その結果において、原生生物の消費は細菌生産に応答していることが確認されたといえる。湖沼では、表水層での原生生物による消費速度が高くなる期間は明確な水温成層が認められる季節と一致しており（図(4)-3と4）、水温が比較的高くかつ安定した表水層において細菌と原生生物との間の食物連鎖が活発となることが示された。湖沼では、表水層において原生生物による細菌消費の方がウイルス感染による細菌死滅よりも高いとされており³⁾、琵琶湖北湖でもそのことが報告されている²⁾。本研究ではウイルス感染による細菌死滅を測定していないが、本研究において表水層における消費速度の方が深水層におけるそれよりも高かったこと、および表水層において細菌と原生生物との食物連鎖が明確に示されたことから、本研究の結果は琵琶湖における先行研究の結果と一致している。

次に、細菌生産と消費速度を比較すると、細菌生産に比して消費速度は0-20 m、20-60 mにおいても同等に近い数値となった。このことから、原生生物が生産された細菌を高い効率で消費している、または別のエネルギー伝達物、例えば小粒子などを消費しているのかもしれない。ただし、本研究の原生生物の消費速度は、真核生物をバイアスとして含む測定法であるため、数値が高めに出ている可能性がある。

琵琶湖では、表水層・深水層を通じて *Bacteroidetes* と *Actinobacteria* が優占し、これらの細菌門の中でも *aci-B1*、*aci-C2*、*aci-A7*、*Iluma-A1* (以上、*Actinobacteria*)、*bacI-A1* の各系統と、*bac-II-A* clade、および *bacI* と *bacV* 系統(以上、*Bacteroidetes*)¹⁾、さらに *LimC* cluster の *Limnohabitans* 属 (*Betaproteobacteria*) が検出された（図(4)-5）⁵⁾。表水層では、上記2つの門の細菌に加えて *Betaproteobacteria* と *Alphaproteobacteria* の細菌門も多く見られた（図(4)-5）⁵⁾。一方、深水層では上記2つの細菌門に加えて *Chloroflexi* や *Planctomycetes* 門の細菌も優占する（図(4)-5）⁵⁾。先行研究における琵琶湖の表水層で優占する細菌門は *Alphaproteobacteria* であるが⁶⁾、我々のプロジェクト以前の予備的な調査でも *Alphaproteobacteria* が優占することがあった（潮私信）。本研究とこれらの先行研究における優占細菌門の違いが何に起因するものであるかは、現段階では分からない。



図(4)-5：琵琶湖北湖における各種細菌・古細菌の鉛直分布の季節動態⁵⁾

Actinobacteria の *aci-B1*、*aci-A7*、*Iluma-A1* は、他の世界の湖沼でも表水層に多く出現する¹⁾。*aci* 系統の一部は、アクチノロドプシンという光捕集機能をもつ膜タンパク質を有しており⁷⁾、このことがこれらの細菌を表水層で優占的にしているのかもしれない。また、*aci* の細菌系統は、アミノ酸やポリアミン、オリゴペプチド、炭水化物のような、表水層に比較的豊富に存在しかつ生物に比較的使用され易い溶存有

機物を利用する⁷⁾ことから、生物に利用されにくい難分解性溶存有機物の占める比率が高い深水層では優占しないのかもしれない。

ショットガンメタゲノムからは、琵琶湖で優占する50以上の細菌系統のゲノムを培養非依存的に決定でき、その多くが90%以上の復元率(completeness)の高品質なゲノムであった(図(4)-6)。これらの中には、先述した表水層・深水層それぞれで優占する細菌系統のほか、その系統的新奇性から一般的な16S rRNA遺伝子のPCRプライマーが適合しないために検出できていなかった、新奇未培養細菌の一大系統群”Candidate Phyla Radiation (CPR)”⁸⁾に属する細菌のゲノムも含まれており、琵琶湖の細菌群集の多様性の高さが改めて示された(図(4)-6)。得られたゲノムにコードされている遺伝子の解析により各細菌系統の生理・生態的な特徴を予測した結果、深水層で優占するCL500-11系統はタンパク様の窒素が豊富なDOMを、CL500-3系統は多糖類を主要な資源としている可能性が示された。また、深水層で優占する古細菌Ca. Nitrosoarchaeumのゲノムからは、この細菌が独立栄養のアンモニア酸化古細菌であり、深水層における窒素及び炭素循環において重要な機能を担う系統であることが裏付けられた。また、Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Chlorobiに属する細菌において、16S rRNA遺伝子に基づく解析では同一OTUに分類されるものについて、表水層と深水層で「種」レベルで異なるゲノムが得られるケースがあった。このことは、近縁細菌系統であっても表水層と深水層それぞれに適応した異なる「種」が存在すること、琵琶湖の細菌多様性を正確に評価するためには、16S rRNA遺伝子ではなく全ゲノム解像度で解析を行う必要があることを示している。

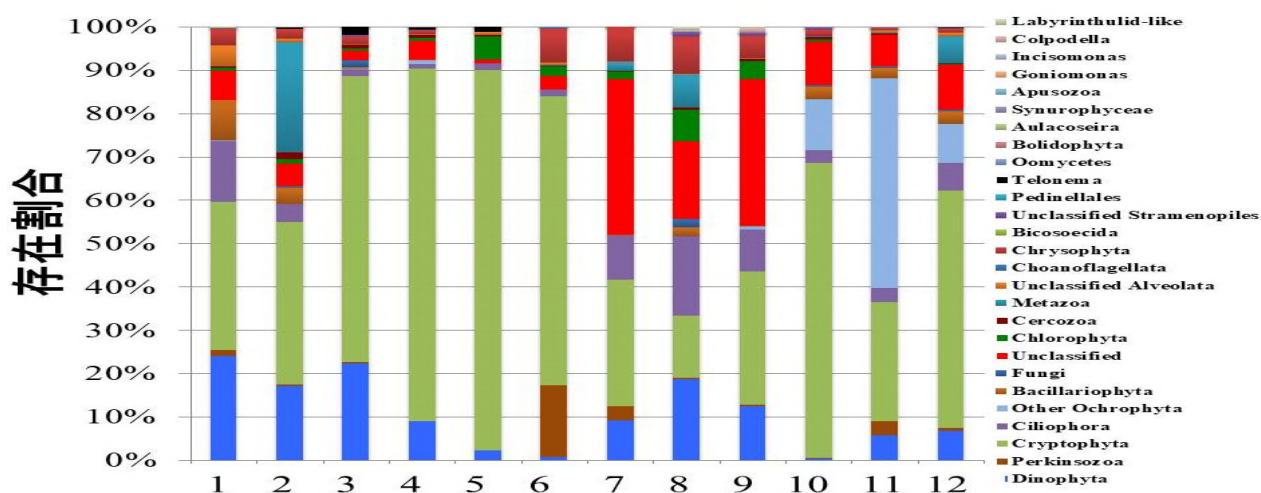
Phylum	Bin	Size (Mb)	GC%
Actinobacteria	epi.bin1_acI	0.81	44.2
	epi.bin2_acIV	1.70	59.7
	epi.bin3_acI-Phila	1.25	45.1
	epi.bin4_acIHI	1.26	38.6
	epi.bin5_acIV	1.46	50.4
	epi.bin6_acIV	1.77	51.3
	hypo.bin1_acI-A7	1.30	45.8
	hypo.bin2_acI	1.37	44
	hypo.bin3_acI-CI	1.96	43.6
	hypo.bin4_acI	0.81	44.1
	hypo.bin5_acIV	2.21	52.2
	hypo.bin6_acIV	2.02	51.3
	hypo.bin7	1.81	53.4
	hypo.bin8_acSIL	2.25	58.9
	hypo.bin9_acIV	1.77	48.7
α-proteobacteria	epi.bin1_LD12	0.73	29.4
	epi.bin2	1.63	29.9
	hypo.bin1_LD12	0.96	29.9
	hypo.bin2_Methylocystis	2.16	45.5
β-proteobacteria	epi.bin1_LD28	1.18	37.2
	hypo.bin1_LD28	1.22	37.1
	hypo.bin2_Limnhabitans	3.69	61.6
	hypo.bin2_Nitrospira	1.45	50.1
γ-proteobacteria	hypo.bin3_Nitrospira	1.32	40.6
	hypo.bin1_Methylobacter	2.13	39.7
δ-proteobacteria	hypo.bin1	6.95	68.2
Cyanobacteria	epi.bin1	1.94	68.9
	epi.bin2	2.14	63.4
	epi.bin3	3.53	65.8

Phylum	Bin	Size (Mb)	GC%
Bacteroidetes	epi.bin1_bacI	1.90	42
	epi.bin2_bacI	2.20	41.1
	epi.bin3	3.57	37.3
	epi.bin4	2.64	41.5
	hypo.bin1	2.27	42.6
	hypo.bin2	3.19	36.7
Chlorobi	epi.bin1_OPB56	2.37	40.2
	hypo.bin1_OPB56	2.41	33
Chloroflexi	hypo.bin1_CL500-11	2.62	61.3
	hypo.bin2_TK10	3.66	61.8
Planctomycetes	epi.bin1	6.34	59.4
	epi.bin2	3.98	69.7
	epi.bin3	3.66	60.1
	hypo.bin1_CL500-15	4.13	60.5
	hypo.bin2	2.58	53.8
	hypo.bin3	2.27	51.8
	hypo.bin4	6.16	60
Verrucomicrobia	hypo.bin5	5.25	65.4
	hypo.bin1_CL120-10	2.36	65.9
	hypo.bin2	7.89	64.2
	hypo.bin3	4.93	62.9
Acidobacteria	hypo.bin1	1.17	46.7
Nitrospira	hypo.bin1	1.84	57.6
Gemmatimonadetes	hypo.bin1	2.45	64.8
Armatimonadetes	hypo.bin1	2.87	52.6
Ca. Levybacteria	hypo.bin1	0.81	31.5
Ca. Saccharibacteria	epi.bin1	0.68	39.2
Thaumarchaeota	Ca. Nitrosoarchaeum	1.35	32.9

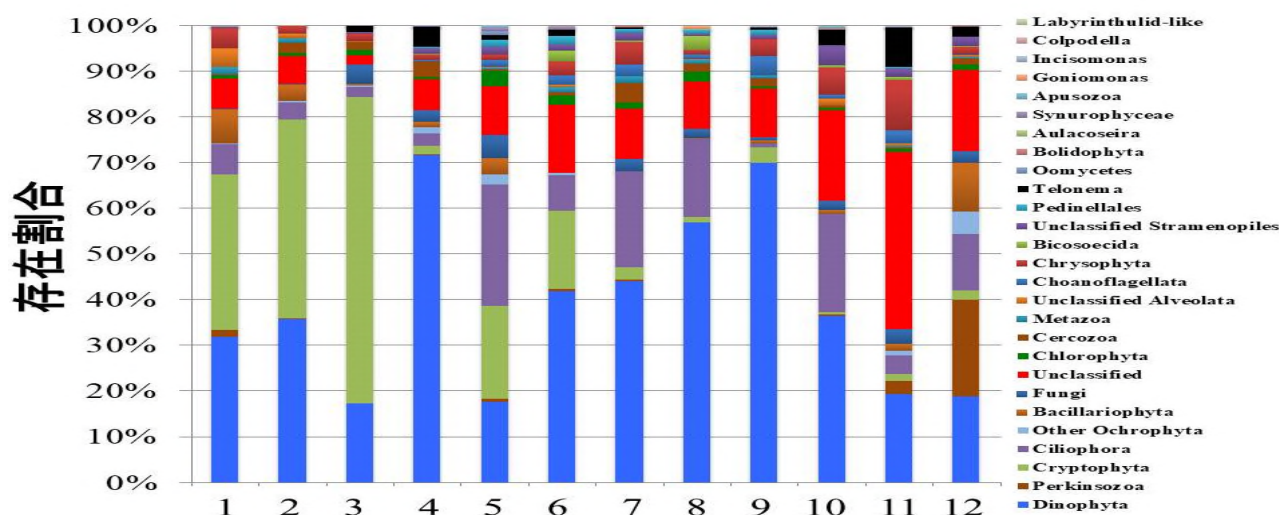
図(4)-6：琵琶湖北湖における優占細菌の全ゲノム解析状況。

★印は、90%以上の復元率の高品質なゲノムを示す

次世代シーケンサーを用いた原生生物群集解析の結果、表水層および深水層共に、真核生物のスーパーグループの一つであるアルベオラータに属する生物群（Dinophyta, Perkinsozoa, Cliliophora）およびCryptophytaの割合が年間を通して高かった（図(4)-7と8）。第1優占は、表水層ではCryptophyta、深水層ではDinophytaであった。



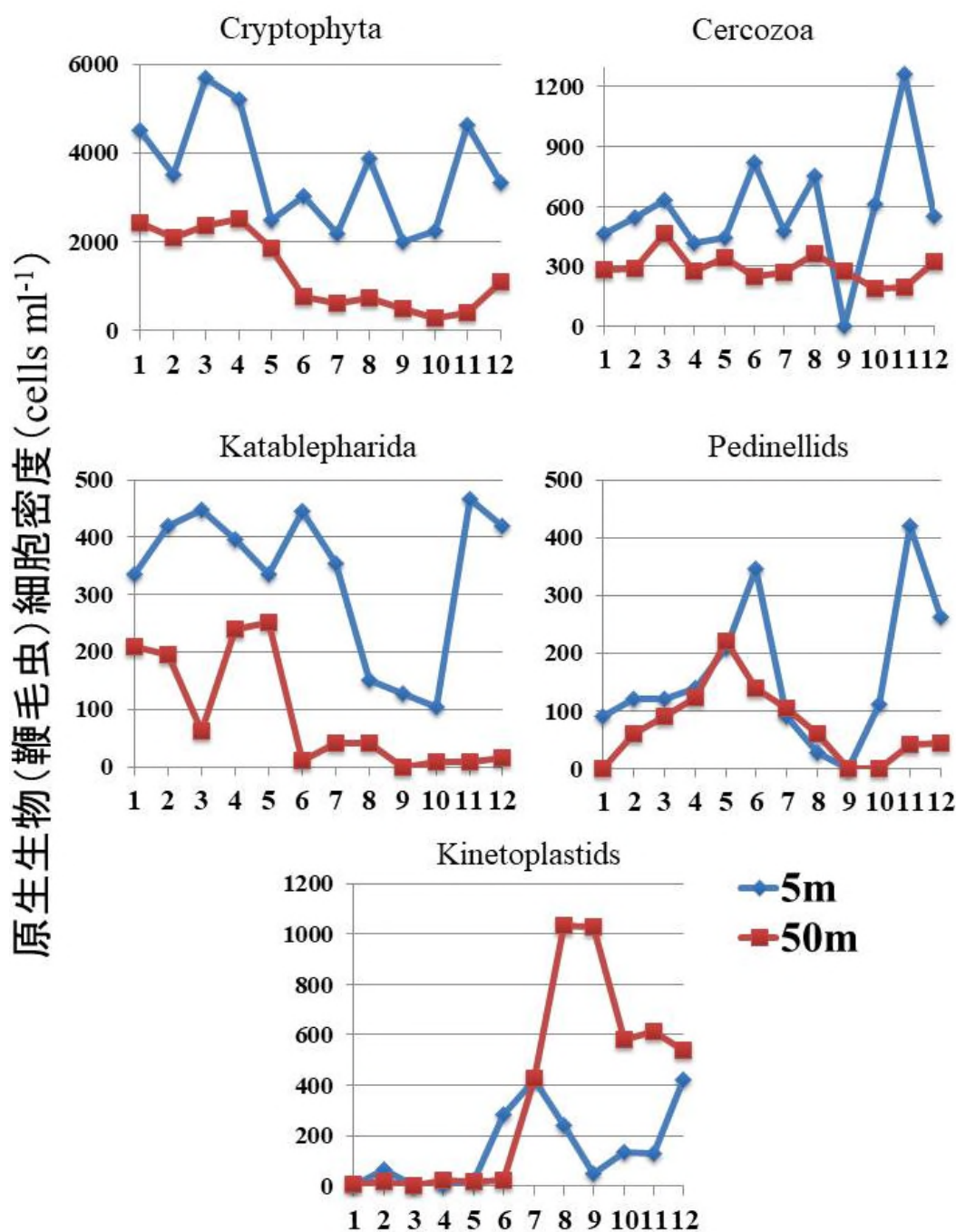
図(4)-7：琵琶湖表層におけるナノサイズの原生生物組成の季節変化（2016年）



図(4)-8：琵琶湖深層におけるナノサイズの原生生物組成の季節変化（2016年）

CARD-FISH法による特定原生生物グループの現存量の季節動態については、特に細菌摂食を行うであろう原生生物に着目した。CercozoaとPedinellidsの現存量（図(4)-9）は、表水層において5月から7月と10月から12月にピークが見られ、従来報告のある細菌の細胞密度の季節変化と概ね一致した（図(4)-2）。また、Kinetoplastidsについては、夏季成層期に深水層で現存量が増殖し、深水層での主要な細菌食者であると考えられた。以上により、原生生物の群集解析の結果では出現率が低かったものの、表水層ではCercozoaとPedinellids、深水層ではKinetoplastidsが主要な細菌食者であると考えられた。

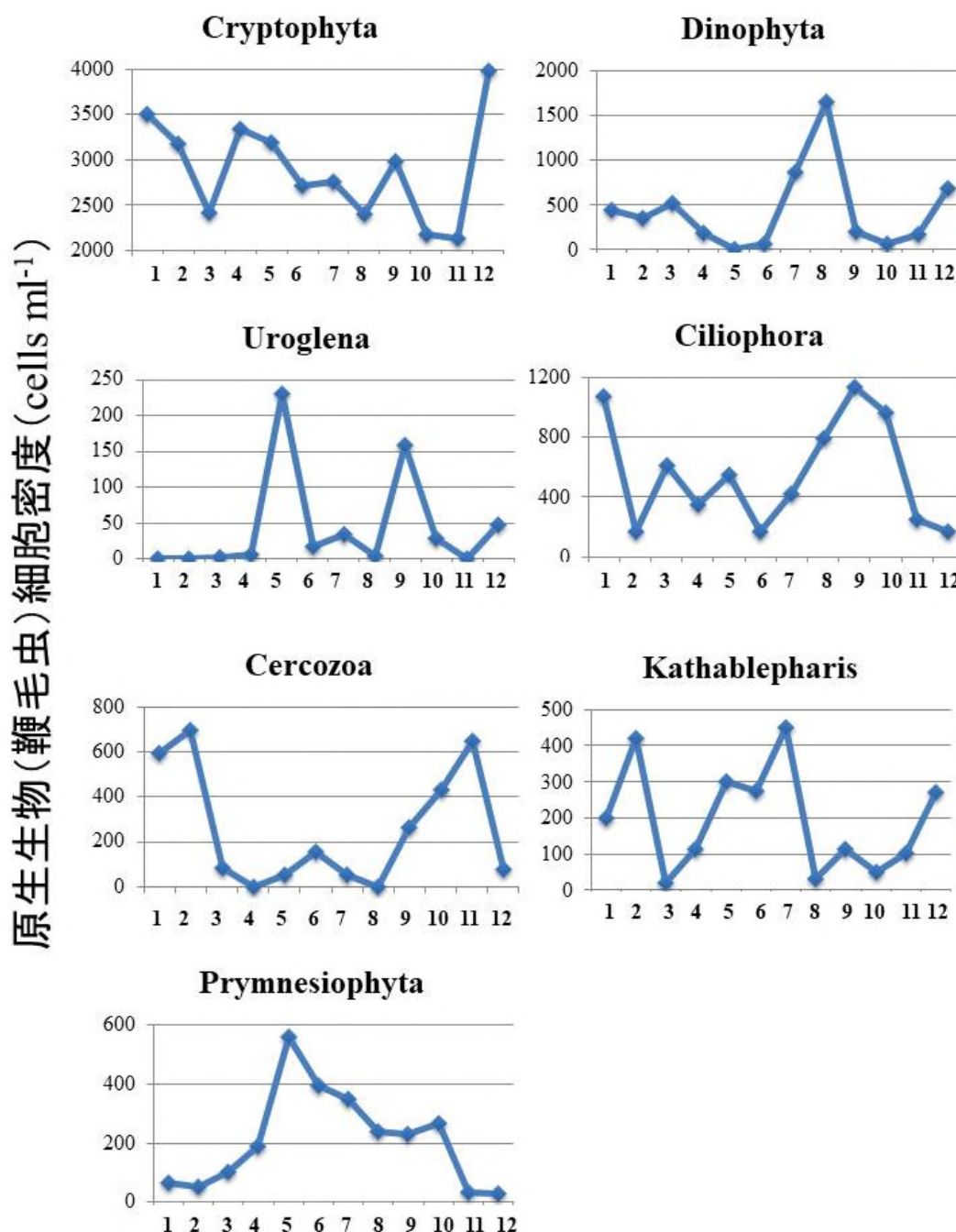
Cryptophytaは、混合期の表水層において現存量が高く、深水層においても同様の季節動態を示した。Kathablepharidaもこれに似た季節動態を示した。表水層・深水層で共通して優占したCryptophytaやDinophytaの生物には混合栄養のものが多く、表水層では主に光合成によりエネルギーを獲得していると考えられる。一方、深水層では細菌を摂食して増殖しているとも考えられた。そこで、従属栄養のクリプト植物門の系統であるCry 1 lineageについてCARD-FISHを行い、当該系統の現存量の季節動態と消費速度のそれとを比較した。その結果、両者は全く異なる季節動態を示したことから、琵琶湖のCryptophytaは細菌の摂食者とあまり寄与していないと考えられた。繊毛虫は7月から9月の表水層で現存量が高く、細菌摂食者として重要であると示唆された。



図(4)-9：琵琶湖の表水層（5m）と深水層（50m）における、CARD-FISHで測定した各原生生物グループの現存量の季節動態（2017年）

なお、参考のために、図(4)-10に次世代シーケンス（454）解析のリード数から算出した原生生物現存量の測定結果を示す（表水層のみ）。ただし、原生生物グループごとの細胞密度の測定は、CARD-FISHによる方が精度は高い。次世代シーケンスの結果からは、Cryptophyta、Dinophyta、Uroglena、Kathablepharis、Cercozoa、Prymnesiophytaの各鞭毛虫グループが、琵琶湖の表水層における重要な細菌摂食者として考えられた。先述の通り、Cryptophytaについては細菌摂食者として機能していないと考えられる。Cryptophyta以外の5つ鞭毛虫グループのうちいくつかは、CARD-FISHで特定された鞭毛虫グループとも一致したことから、本研究で特定した鞭毛虫グループは琵琶湖における細菌摂食者としての重要性が高いと考えられる。

以上をまとめると、琵琶湖で毎年比較的安定して植物プランクトンの現存量が高いのは春季から初夏



図(4)-10：琵琶湖の表水層における、次世代シーケンス（454）で測定した各原生生物グループの現存量の季節動態（2017年）

にかけてであるが、この時期には細菌の現存量も高くなり、原生生物による細菌に対する消費速度も高まる（図(4)-2と3）。すなわち、琵琶湖北湖の表水層では春季から初夏にかけて細菌と原生生物との微生物ループが機能していることが明らかとなった。また、本研究ではこの時期の高い細菌消費速度の原因となる原生生物グループが特定され、表水層ではCercozoa、Kathablepharidaなどであると推測された（図(4)-9と10）。

一方、深水層では表水層に比べて原生生物の現存量と摂食活性共に低く、深水層における細菌細胞密度や細菌生産速度の季節動態と原生生物の摂食による細菌の消費速度との間には、表水層ほどの明確な対応関係は見いだせなかった。しかし、CARD-FISHによる鞭毛虫グループごとの現存量の季節動態の結

果から、Kinetoplastidsが細菌食者として重要であると示唆された。深水層で優占的であったCL500-11細菌系統は大型の細菌であり、その他に優占したCL500-15細菌系統は粒子に付着していることが多い。つまり、これらの細菌系統は原生生物に摂食されにくいのかも、このために深水層における細菌細胞密度の季節動態と原生生物の摂食との間には明確な対応関係が見られなかったのかもしれない。しかし、深水層で優占する原生生物であるKinetoplastidsは、大型細菌の摂食も行うとの報告もあり、深水層の微生物食物連鎖についてはさらなる研究が必要である。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

(1) - 1 細菌について

微生物食物連鎖に関わる微生物では、細菌の分子系統解析が広く進められており、海洋では環境中の細菌のDNAを網羅的に解析する全ゲノムショットガン配列決定法や、対象とする系統分類群のみに蛍光標識する蛍光in situ ハイブリダイゼーション法 (FISH)、群集組成を比較解析する変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) に代表されるDNAフィンガープリント法を用いて、細菌の系統的多様性およびその動態が明らかとなってきた。なかでも、FISHを用いた研究では、外洋でもっとも高い優占率を示す *Alphaproteobacteria* の SAR11 という系統に属する細菌群の存在を明らかにした。特に近年目覚ましい発展が見られるのは、次世代シーケンスを用いた海洋細菌群集多様性の網羅的解析である。これらの研究から、海洋の細菌群集は、現存量が高いごく少数の種 (Operational Taxonomy Unit, OTU) と現存量は低い膨大な種 (OTU) によって群集 (「rare biosphere」と呼ばれる⁹⁾) が形成されていることが明らかとなった。

湖沼でも、FISH、DGGEを用いた細菌群集系統解析は行われており、湖沼では *Betaproteobacteria* が優占的との報告が多い一方、湖沼において *Alphaproteobacteria* が優占するといった報告もある。しかし、湖沼細菌の多様性と生態の情報は、これまでは主に欧米湖沼における研究から得られており、我が国の湖沼における情報はほとんど得られていなかった。さらに、湖沼沖帯における細菌の生態学的役割についての研究は、主に植物プランクトンの一次生産が活発な表水層において行われてきた。一方、水温成層が形成される十分な水深を持つ湖沼では、太陽光が届かない深水層の容積は表水層のそれに比べてはるかに大きく、深水層には窒素やリンなどの栄養塩類が高濃度で存在していることから、その生物地球化学的重要性はかねてより指摘されてきた。貧・中栄養湖沼では、水温成層が十分に発達している時期においても深水層は好氣的となる。このような有酸素の深水層をもつ湖沼は世界各地に多くあるが、有酸素深水層に生息する細菌系統の生態に関する情報は、従来、世界的にほぼ皆無であった。

琵琶湖では、FISHを用いた研究で、水温成層期の表水層からクロロフィル極大層において *Alphaproteobacteria* が優占するとの報告がある⁹⁾。また、同じくFISHを用いた研究により、水温成層の後期における深水層ではクロロフレクサス門のCL500-11細菌が優占することも報告されている¹⁰⁾。さらに、Okazaki & Nakano (2016)⁵⁾ は、琵琶湖北湖の表水層から深水層にかけての細菌群集組成について、次世代シーケンスによりその鉛直分布の季節動態の詳細を解明した。今回の環境研究総合推進費5-1607では、この結果を確認しつつ、さらに湖水中の細菌から抽出したDNAを用いて断片化した全DNAの網羅的シーケンスによるゲノムの再構築 (ショットガンメタゲノム) により、細菌の生理・代謝特性の推定を行った。

このように、本サブテーマの研究は、琵琶湖の細菌群集の多様性や生態の情報を国際的なレベルにまで引き上げたのみならず、優占的な細菌系統について生理・代謝特性の推定まで行った点で、世界の湖沼における従来の研究を国際的に凌駕する成果を得た。また、上記は、湖沼の水質においてCODの低減が求められる中で、細菌による有機物の分解機構を考える上で基礎となる知見である。

(1) - 2 原生生物について

原生生物の多様性研究においても、分子生物学的技術による解析が発展しており、細菌の場合と同様、

海洋での研究が多い。海洋では、特にStramenopilesと呼ばれるグループに属する原生生物が多く検出され¹¹⁾、我々が通常「鞭毛虫」と呼んでいるものの多くが含まれる。多くの鞭毛虫は、固定剤で処理するとその形が変化してしまったり、また元々細胞の形態的特徴が乏しいことから個体群の検出には細菌の場合と同様にFISHを用いる研究が多い^{12), 13)}。

「rare biosphere」という考え方⁹⁾では、原生生物でも細菌の場合と同様で、現存量は低いが種数の多くを占める群集の存在が、原生生物群集全体としての現存量の安定性を支えている⁹⁾。例えば、Countway et al. (2005)¹⁴⁾は、北西大西洋の海水を培養した結果、各原生生物種の現存量は培養時間と共に変化し、現存量の低い rare な生物種も培養時間によっては現存量が高くなったことを示した。このことは、rare biosphere の原生生物は遺伝子の貯蔵庫として環境変化に鋭敏に反応しながら、原生生物群集全体の現存量の安定性に貢献していることを示唆している⁹⁾。これらの結果は、海洋の研究で得られたものであるが、淡水ではどうなのか、海洋と淡水で違いがあるのか、淡水における研究が望まれる。

本研究では、琵琶湖の原生生物群集の組成は季節的な変化を有していることが示された。このことから、細菌を原生生物が摂食することによって駆動する微生物食物連鎖についても、季節動態に着目した研究が必要であろう。この観点では、今回の環境研究総合推進費 5-1607 における本サブテーマの研究は、原生生物の多様性研究について国際的に重要な成果を上げたと言える。

(1) - 3 原生生物による細菌の摂食について

原生生物は、細菌の遺伝系統グループごとに摂食やその結果としての増殖が異なるのかについて、これまでさまざまな研究がなされてきた。海洋における研究では、細菌の遺伝系統グループの違いが原生生物による摂食に与える影響は認められていない¹⁵⁾。一方、淡水では、細菌遺伝系統群ごとに原生生物による被食が異なるケースも報告されている¹⁶⁾。また、むしろ細菌のサイズの方が重要で、大型の細菌ほど原生生物に摂食されにくく、その理由は原生生物が当該細菌を摂食するのにある程度の時間がかかるからであるとの報告もある^{17), 18)}。

しかし、逆の視点で、どの原生生物グループが細菌をより多く摂食しているのかについては、未だほとんど研究がなされていない。今回の環境研究総合推進費5-1607における本サブテーマの研究では、細菌と各原生生物グループの現存量の季節動態を比較しただけではあるが、琵琶湖ではどの原生生物グループが細菌摂食者として重要であるか推定することに成功した。この点で、我々のサブテーマは、湖沼や海洋の原生生物の生態学にとって、極めて重要かつ新規性の高い成果を上げた。

また、1990年代半ば以降、混合栄養（光合成と従属栄養の両方による栄養摂取）を行う原生生物による細菌摂食にも注目が集まっている。混合栄養原生生物による細菌摂食は、湖沼・海洋問わず、従属栄養原生生物による細菌摂食との相対的重要性の視点で研究が進められている。Zubkov & Tarran (2008)¹⁹⁾は、北大西洋温帯域において光合成色素を持つ原生生物と持たない原生生物による細菌摂食を比較した。その結果、光合成色素を持つ原生生物は個体（細胞）当たりの細菌摂食速度は低いが小型（細胞サイズ2 μm以下）のものは現存量が高いために全体としての細菌消費速度は高くなり、光合成色素を持たない原生生物は現存量はそれほど高くないが個体当たりの細菌摂食速度が高いため全体としては最も細菌摂食が高くなることを示した。

淡水でも、混合栄養原生生物の研究は進められてきた。琵琶湖では、Cryptomonasが細菌摂食を行うことが報告されている²⁰⁾。当該研究では、独立栄養のCryptomonasと従属栄養のものとの区別はしていない。我々のサブテーマの結果では、独立栄養のCryptomonasは表水層で優占したことから、これらのCryptomonasは栄養摂取を主に光合成に依存しており、細菌摂食にはあまり依存していないと推察した。さらに、従属栄養のCryptomonasについても検討し、細菌とこのCryptomonasの現存量の季節動態の比較から、従属栄養のCryptomonasも細菌摂食者としてはそれほど重要でないとの結論を得た。混合栄養原生生物の細菌摂食者としての重要性は、未だ議論のあるトピックであるが、我々のサブテーマはこの課題に極めて重要な情報を提供した。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

現在、世界各国の湖沼において、溶存有機物（DOM）濃度の上昇が問題となっている。DOMとは、天然由来や人為由来の様々な有機物のうち、水に溶けているものの総称である。DOMの成分中には、そのままでは人体に有害な物質、あるいは何らかの化学反応過程によっては有害なものに変化する物質が含まれる可能性があり、安全安心な飲料水源の確保を義務とする地方自治体等の水質管理では、DOM濃度管理が喫緊の課題となりつつある。

DOMは、湖沼に生息する細菌の餌資源となるが、DOMのある部分は難分解であることと、湖水中に細菌の増殖に必要な窒素やリンの栄養物質が限られていることから、湖沼における細菌によるDOMの分解はあまり顕著ではないとされている。人間の飲料水源となる湖沼は、大きな水体のため、大量の水を水処理プラント等により処理することは経済の面で現実的ではなく、自然状態での自浄作用（DOM分解）の促進が必要である。

本研究の結果、原生生物は細菌生産に応答して高い効率で生産された細菌を消費していることが明らかとなった。すなわち、細菌から原生生物への有機物伝達は効率良く行われている。よって、琵琶湖水中の有機物の低減には、微生物食物網よりも細菌による有機物の生分解機構に課題があることが示された。本研究は、湖沼の微生物食物網を解明する手立てを示した上で、COD低減のための課題の絞り込みに貢献した。

また、現在、「湖沼を地域の資源として活用していく」という考え方がある。この考え方においては、「地域の望ましい湖沼像（地域の湖沼のあるべき姿）」を当該湖沼のステークホルダー（行政、地域住民、民間団体、事業者など）で共同して設定・共有し、地域で湖沼の管理方法を決める。これを行う際、地域の資源として湖沼がどのような姿をもっているか、特に地域特有の生物資源の存否は重要な観点となる。本研究では、琵琶湖の表水層や深水層に特有な細菌種の生息が確認され、またそれらの細菌種のいくつかについては生理・代謝特性も明らかとなった。これらの情報は、琵琶湖特有の生物資源の発見として、今後の琵琶湖の管理に有益な情報となるかもしれない。

6. 国際共同研究等の状況

二国間共同研究（チェコとの共同研究）、「二湖沼におけるユニークな手法の組み合わせによる鞭毛虫と細菌の群集動態と相互作用」、平成29から30年度、カウンターパート：Karel Šimek教授（チェコ科学アカデミー・生物学センター・水生生物研究所）

互いに栄養状態が異なるチェコのリモフ貯水池と琵琶湖における、表水層と深水層の鞭毛虫やその他の微生物群集の組成や現存量の違いを検討し、これら両水域における鞭毛虫の摂食における選択性はあるか？、また深水層で優占するクロロフレクサス門細菌（CL500-11）の個体群動態に鞭毛虫による摂食の影響はあるか？、この際にキネトプラスチド鞭毛虫の果たす役割は何か？について研究を行った。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) Y. OKAZAKI, S. FUJINAGA, A. TANAKA, A. KOHZU, H. OYAGI, S. NAKANO: ISME J. 11, 2279-2293 (2017), Ubiquity and quantitative significance of bacterioplankton lineages inhabiting the oxygenated hypolimnion of deep freshwater lakes.
- 2) I. MUKHERJEE, Y. HODOKI, S. NAKANO: Aquat. Microb. Ecol. 80, 123-137 (2017), Seasonal dynamics of heterotrophic and plastidic protists in the water column of Lake Biwa, Japan.
- 3) M. MEHRSHAD, M. M. SALCHER, Y. OKAZAKI, S. NAKANO, K. ŠIMEK, A. S. ANDREI, R. GHAI:

Microbiome 6, 176 (2018), Hidden in plain sight—highly abundant and diverse planktonic freshwater Chloroflexi.

<論文（査読なし）>

- 1) S. NAKANO, K. HAYAKAWA, Y. HODOKI, Y. OKAZAKI, I. MUKHERJEE, S. D. THOTTATHIL, H. TAKASU, S. FUJINAGA: Proceedings of the second International Conference on Life Science and Biotechnology (ICOLIB) (2017) Long-term changes in water quality in Lake Biwa with special reference to organic matter dynamics, microbial ecology and diversity.
- 2) S. NAKANO, K. HAYAKAWA, Y. HODOKI, Y. OKAZAKI, I. MUKHERJEE, S. D. THOTTATHIL, H. TAKASU, S. FUJINAGA: Proceedings of the 17th World Lake Conference (2018) Long-term changes in water quality in Lake Biwa with special reference to organic matter dynamics and microbial ecology.

（２）口頭発表（学会等）

<口頭発表>

- 1) Y. OKAZAKI, S. FUJINAGA, A. TANAKA, A. KOHZU, H. OYAGI, and S. NAKANO 16th International Symposium on Microbial Ecology, Montreal, Canada, 2016
"Unique bacterioplankton lineages ubiquitously inhabit oxygenated deep waters of freshwater lakes"
- 2) 岡崎友輔、藤永承平、田中敦、高津文人、大八木英夫、中野伸一：日本微生物生態学会第31回大会（2016）
「国内の大水深淡水湖に生息する細菌群集の網羅的分析」
- 3) Y. OKAZAKI, S. FUJINAGA, A. TANAKA, A. KOHZU, H. OYAGI, and S. NAKANO : 17th International Symposium on River and Lake Environments & 3rd International Symposium on Aquatic Botany, Kusatsu, Japan, 2017
"Ubiquitous bacterioplankton lineages inhabiting the oxygenated hypolimnion of freshwater lakes"
- 4) I. MUKHERJEE, Y. HODOKI, Y. OKAZAKI, S. FUJINAGA, K. OHBAYASHI and S. NAKANO : 17th International Symposium on River and Lake Environments & 3rd International Symposium on Aquatic Botany, Kusatsu, Japan, 2017
"Dominance of kinetoplastid flagellates in the oxygenated hypolimnion of Japanese deep lakes: underestimation of euglenozoans in molecular diversity studies"
- 5) 程木義邦、西野寛志、大林夏湖、中野伸一：日本藻類学会第41回大会（2017）
「富栄養化した湖沼に出現するクリプトモナス属の種組成とその季節変化」
- 6) S. NAKANO, K. HAYAKAWA, Y. HODOKI, Y. OKAZAKI, I. MUKHERJEE, S. D. THOTTATHIL, H. TAKASU, S. FUJINAGA: the second International Conference on Life Science and Biotechnology (ICOLIB), Jember, Indonesia, 7-8 August 2017
"Long-term changes in water quality in Lake Biwa with special reference to organic matter dynamics, microbial ecology and diversity"
- 7) I. MUKHERJEE, Y. HODOKI, Y. OKAZAKI, S. NAKANO : 日本陸水学会第 82 回田沢湖大会(2017)
"Unknown protists with high grazing characterize the oxygenated hypolimnion of Lake Biwa"
- 8) Y. OKAZAKI, S. NAKANO: 15th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, Zagreb, Croatia, 2017
"Vertical stratification of the viral community in a deep freshwater lake" SAME-15:
- 9) 岡崎友輔、中野伸一：NGS 現場の会 第五回研究会（2017）
「琵琶湖メタ GVT プロジェクト」
- 10) 中野伸一、早川和秀、程木義邦、岡崎友輔、INDRANIL MUKHERJEE, SHOJI D. THOTTATHIL、高巢裕之、日本生態学会第 65 回札幌大会（2018）
「琵琶湖の底にある、ちょっと変わった微生物ループ」
- 11) Y. OKAZAKI, Y. NISHIMURA, H. OGATA, T. YOSHIDA, S. NAKANO: 17th International Symposium

on Microbial Ecology (2018.8, Leipzig, Germany, 2018

“Comprehensive viromics uncovered the diverse viral community in a deep freshwater lake”

- 12) 岡崎友輔：日本微生物生態学会第32回大会 シンポジウム(2018)

「複数湖の比較環境ゲノム解析から紐解く微生物の生き様」

- 13) S. NAKANO, K. HAYAKAWA, Y. HODOKI, Y. OKAZAKI, I. MUKHERJEE, S. D. THOTTATHIL, H. TAKASU, S. FUJINAGA: The 17th World Lake Conference, Tsukuba, Japan, 2018

“Long-term Changes in Water Quality of Lake Biwa with Special Reference to Organic Matter Dynamics and Microbial Ecology”、招待講演

- 14) 岡崎友輔：第 83 回日本陸水学会岡山大会 (2018)

「メタゲノム解析で明らかにする湖の微生物生態系」

<ポスター発表>

- 1) I. MUKHERJEE, Y. HODOKI, Y. OKAZAKI, S. NAKANO: 15th Symposium on Aquatic Microbial Ecology-SAME15, Zagreb, Croatia (国外), 3-8 September (2017) Unknown protists characterize the microbial eukaryotic communities in the oxygenated hypolimnion of deep freshwater lakes.
- 2) Y. OKAZAKI, Y. NISHIMURA, H. OGATA, T. YOSHIDA, S. NAKANO: 17th International Symposium on Microbial Ecology, Leipzig, Germany, 2018
- "Comprehensive viromics uncovered the diverse viral community in a deep freshwater lake"

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 京都大学アカデミックデイ2016：ちゃぶ台囲んで膝詰め対話、琵琶湖における有機物収支の把握に関する研究（2016年9月18日、京都大学時計台、入場客400名以上）にて成果紹介
- 2) 京都大学生態学研究センターシリーズ公開講演会：つなぐ・つながる生物多様性—大学共同利用・共同研究拠点による生態学が捉えた地球生物圏の変化、第8回「琵琶湖研究の最先端にふれる」（2017年2月19日、キャンパスプラザ京都、観客56名）にて講演。
- 3) 平成29年度 瀬戸内海研究フォーラム in 京都：第4セッション「豊かな生態系の琵琶湖との共生を探る」（2017年9月6日～7日、京都大学、観客約200名）にて琵琶湖のセッションを企画・運営し、かつ講演も行った。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

- 1) 第8回（平成29年度）日本学術振興会 育志賞

岡崎友輔（京都大学大学院・理学研究科・生物科学専攻）「大水深淡水湖に生息する細菌の多様性と生態の解明」

8. 引用文献

- 1) R. J. NEWTON, S. E. JONES, A. EILER, K. D. McMAHON, S. BERTILSSON: Microbiol. Mol. Biol. Rev. 75, 14-49 (2011), A guide to the natural history of freshwater lake bacteria.
- 2) S. NAKANO, N. ISHII, P. M. MANAGE, Z. KAWABATA: Aquat. Microb. Ecol. 16, 153-161 (1998), Trophic roles of heterotrophic nanoflagellates and ciliates among planktonic organisms in a hypereutrophic pond.

- 3) M. G. WEINBAUER, M. G. HOFLE: Appl. Environ. Microbiol. 64, 431-438 (1998), Significance of viral lysis and flagellate grazing as factors controlling bacterioplankton production in a eutrophic lake.
- 4) H. TAKASU, T. KUNIHITO, S. NAKANO: Limnology 15, 257-270 (2014), Protistan grazing and viral lysis losses of bacterial carbon production in a large mesotrophic lake (Lake Biwa).
- 5) Y. OKAZAKI, S. NAKANO: Environ. Microbiol. Rept. 8, 780-788 (2016), Vertical partitioning of freshwater bacterioplankton community in a deep mesotrophic lake with a fully oxygenated hypolimnion (Lake Biwa, Japan).
- 6) Y. NISHIMURA, T. NAGATA: Aquat. Microb. Ecol. 48, 231-240 (2007), Alphaproteobacterial dominance in a large mesotrophic lake (Lake Biwa, Japan).
- 7) M. MARTINEZ-GARCIA, B. K. SWAN, N. J. POULTON, M. I. GOMEZ, D. MASLAND, M. E. SIERACKI, R. E. STEPANAUSKAS: ISME J. 6, 113-123 (2012), High-throughput single-cell sequencing identifies photoheterotrophs and chemoautotrophs in freshwater bacterioplankton.
- 8) L. A. HUG, B. C. THOMAS, I. SHARON, C. T. BROWN, R. SHARMA, R. L. HETTICH, M. J. WILKINS, K. H. WILLIAMS, A. SINGH, J. F. BANFIELD: Environ. Microbiol. 18, 159-173 (2016), Critical biogeochemical functions in the subsurface are associated with bacteria from new phyla and little studied lineages.
- 9) D. A. CARON, P. D. COUNTWAY: Aquat. Microb. Ecol. 57, 227-238 (2009), Hypotheses on the role of the protistan rare biosphere in a changing world.
- 10) Y. OKAZAKI, Y. HODOKI, S. NAKANO: FEMS Microbiol. Ecol. 83, 82-92 (2013), Seasonal dominance of CL500-11 bacterioplankton (Phylum *Chloroflexi*) in the oxygenated hypolimnion of Lake Biwa, Japan.
- 11) R. MASSANA, R. TERRADO, I. FORN, C. LOVEJOY, C. PEDROS-ALIO: Environ. Microbiol. 8, 1515-1522 (2006), Distribution and abundance of uncultured heterotrophic flagellates in the world oceans.
- 12) E. L. LIM, M. R. DENNET, D. A. CARON: Limnol. Oceanogr. 44, 37-51 (1999), The ecology of *Paraphysomonas imperforata* based on studies employing oligonucleotide probe identification in coastal water samples and enrichment cultures.
- 13) I. MUKHERJEE, Y. HODOKI, S. NAKANO: FEMS Microb. Ecol. 91, fiv083 (2015), Kinetoplastid flagellates overlooked by universal primers dominate in the oxygenated hypolimnion of Lake Biwa, Japan.
- 14) P. D. COUNTWAY, R. J. GAST, P. SAVAI, D. A. CARON: J. Eukaryot. Microbiol. 52, 95-106 (2005), Protistan diversity estimates based on 18S rDNA from seawater incubations in the Western North Atlantic.
- 15) T. YOKOKAWA, T. NAGATA: Appl. Environ. Microbiol. 71, 6799-6807 (2005), Growth and grazing mortality rates of phylogenetic groups of bacterioplankton in coastal marine environments.
- 16) K. ŠIMEK, M. G. WEINBAUER, K. HORNAK, J. JEZBERA, J. NEDOMA, J. R. DOLAN: Environ. Microbiol. 9, 789-800 (2007), Grazer and virus-induced mortality of bacterioplankton accelerates development of *Flectobacillus* populations in a freshwater community.
- 17) V. GRUJCIC, V. KASALICKY, K. ŠIMEK: Appl. Environ. Microbiol. DOI: 10.1128/AEM.00396-15 (2015), Prey-Specific Growth Responses of Freshwater Flagellate Communities Induced by Morphologically Distinct Bacteria from the Genus *Limnohabitans*.
- 18) K. ŠIMEK, V. GRUJCIC, M. W. HAHN, K. HORNAK, J. JEZBEROVA, V. KASALICKY, J. NEDOMA, M. M. SALCHER, TA. SHABAROVA: Limnol. Oceanogr. 63, 484-502 (2018), Bacterial prey food characteristics modulate community growth response of freshwater bacterivorous flagellates.
- 19) M. V. ZUBKOV, G. A. TARRAN: Nature 455, 224-227 (2008), High bacterivory by the smallest phytoplankton in the North Atlantic Ocean.
- 20) J. URABE, T. B. GRUNG, T. YOSHIDA, T. SEKINO, M. NAKANISHI: Limnol. Oceanogr. 45, 1558-1563 (2000), Diel changes in phagotrophy by *Cryptomonas* in Lake Biwa.

Ⅱ－５ 動物プランクトンの生産量評価に関する検討

滋賀県琵琶湖環境科学研究センター

永田 貴丸

平成28～30年度累計予算額：8,598千円

（うち平成28年度：2,915千円、平成29年度：2,914千円、平成30年度：2,769千円）

累計予算額は、間接経費を含む。

【要旨】

琵琶湖では、植物プランクトンの種数や現存量が経年的な減少傾向にあるにも拘らず、その消費者であるミジンコ等の動物プランクトンは一定水準の現存量を維持している。その要因の一つには、微生物等の他の餌生物を積極的に利用し始め、効率的な個体群増殖ができていた可能性が挙げられる。本サブテーマでは、現在の琵琶湖における動物プランクトンが、餌として植物プランクトンだけでなく、微生物も積極的に利用しているか否かを検証するため、微生物や植物プランクトンを餌にした場合の動物プランクトンの生存率、成長量、生産量を評価するとともに、微生物や植物プランクトンに対する動物プランクトンの摂食・捕食速度、比取込み速度を求めた。

培養実験の結果から、琵琶湖の動物プランクトンは、微生物を積極的に摂食・捕食することを確認できた。しかし、細菌や湖沼で一般的な従属栄養性鞭毛虫キネトプラスト類を餌に培養しても、ミジンコの生存率は非常に低く、再生産（産仔）は観察できなかった。この結果から、すべての種類の原生生物（鞭毛虫）が、動物プランクトンにとっての好適な餌となる訳ではなく、捕食しても生存、成長、再生産するための栄養を十分に得られないケースもあることが分かった。

野外実験や¹³Cトレーサー法の実験で求めた動物プランクトンの摂食・捕食速度、比取込み速度は、植物プランクトンに対しての方が微生物に対してよりも高かった（11月実験での比取込み速度は除く）。また、餌生物の中では、 $<20\ \mu\text{m}$ の小型の植物プランクトンを特に多く摂食していることが分かった。しかし、微生物や他のサイズの植物プランクトンを全く利用していない訳ではなく、動物プランクトンは、時期によっては、微生物や $20\text{--}45\ \mu\text{m}$ の植物プランクトンも積極的に利用していた。本サブテーマの結果から、現在の琵琶湖にとっての望ましい物質循環（餌の流れ）は、 $<20\ \mu\text{m}$ の小型の植物プランクトンから、動物プランクトンを経て、アユ等の高次消費者へ繋がるルートであると考えられた。今後、 $<20\ \mu\text{m}$ の植物プランクトンが増える環境・メカニズムを評価できれば、それに応じた対策で物質循環を今以上に円滑にでき、水質管理と豊かな生態系保全の両立に近づくと考える。

【キーワード】

動物プランクトン、餌、微生物、植物プランクトン、餌のサイズ

1. はじめに

琵琶湖では、植物プランクトンの種数や現存量が経年的な減少傾向にあることから、その消費者であるミジンコ等の動物プランクトンの現存量も随行して減少すると予想された。しかし、動物プランクトンの現存量は、1980年代や1990年代と比べても遜色のない水準を維持している¹⁾。植物プランクトンが減ったにも拘わらず、動物プランクトンが一定水準の現存量を維持できる要因の一つに、動物プランクトンが生食食物連鎖からのエネルギー（植物プランクトンの餌）だけでなく、微生物食物連鎖からのエネルギー（微生物の餌、細菌や原生生物）も積極的に利用し始め、効率的な個体群増殖ができていた可能性が挙げられる。実際、動物プランクトンは、微生物を摂食・捕食すると考えられている²⁾。現在の琵琶湖における動物プランクトンが、餌として植物プランクトンだけでなく、微生物も積極的に利用しているのかを実測に基づき検証することが必要である。

2. 研究開発目的

琵琶湖のミジンコ類やカイアシ類等の動物プランクトンは、微生物や植物プランクトン等の生産者を摂食・捕食し、自らも捕食されることでアユ等の高次消費者へ栄養素（炭素や窒素等）を受け渡す物質循環の架け橋的な役割を果たす。そのため、ミジンコ類やカイアシ類の摂食速度や生産量等を把握することで、湖沼生態系の物質循環を評価するための基盤となる情報を収集できる。本サブテーマでは、ミジンコ類やカイアシ類といった甲殻類の動物プランクトンに着目し、動物プランクトンのストック（現存量）とフロー（摂食・捕食速度、生産量等）を評価するために下記の1）～6）を行った。

- 1) 野外調査での動物プランクトンの現存量の把握と生産量の推定
- 2) 室内実験での琵琶湖の動物プランクトンによる細菌や原生生物の摂食・捕食の有無の確認
- 3) 室内実験での細菌や従属栄養性の鞭毛虫を餌にした場合におけるミジンコ類の生産量の評価
- 4) 室内実験での微生物群を餌にした場合におけるミジンコ類の生産量の評価
- 5) 野外実験での植物プランクトンや微生物に対する動物プランクトンの摂食・捕食速度の評価
- 6) 室内実験での植物プランクトンや微生物に対する動物プランクトンの比取込み速度の評価

以上6つの調査・実験の結果から、現在の琵琶湖の動物プランクトンが生食食物連鎖からのエネルギー（植物プランクトンの餌）だけでなく、微生物食物連鎖からのエネルギー（微生物の餌、細菌や原生生物）も積極的に利用しているのか否かを評価した。また、その成果を用い、琵琶湖にとっての望ましい物質循環（餌の流れ）を提言した。

3. 研究開発方法

3. - 1 野外調査での動物プランクトンの現存量の把握と生産量の推定

琵琶湖における甲殻類の動物プランクトン（ミジンコ類とカイアシ類）の現存量の把握と生産量の推定のため、2016年～2018年に北湖の今津沖中央（17B, 水深約90 m, 北緯35° 23' 41", 東経136° 07' 57"）において月1回の頻度で野外調査を行った。これまでの北湖北部17Bと南部（南比良沖中央, 12B, 水深約60 m, 北緯35° 11' 39", 東経135° 59' 39"）の調査結果により、沖帯の動物プランクトンの現存量は、北部17Bと南部12Bで同じ挙動を示し、量的にもほとんど変わらないことを把握している（永田, 未発表）。北湖北部（17Bやその付近）については、30年以上に渡る動物プランクトンのデータがあり¹⁾、経年的な比較が可能である。本サブテーマでは、北部である17Bを動物プランクトンの現存量等を評価するための代表地点とした。

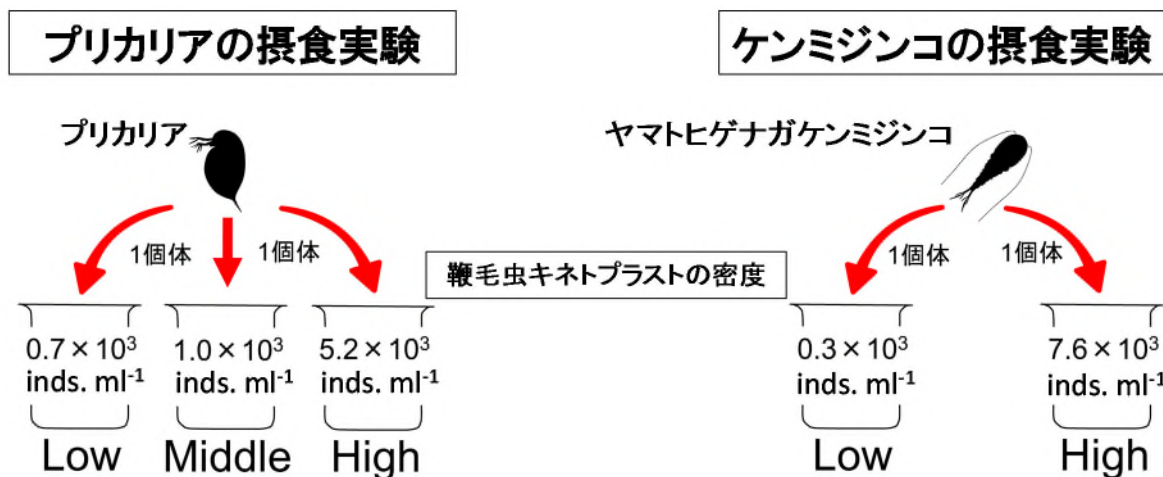
琵琶湖の沖帯では、動物プランクトンのほとんどは15 mより上の層に分布していることから³⁾、動物プランクトンは、メッシュサイズが100 μ mのプランクトンネットを0～20 m層で鉛直引きすることで採取した。採取した動物プランクトンは、ホルマリンの最終濃度が4%のシュガーホルマリンで固定し、光学顕微鏡下で同定・計数した。また、動物プランクトン各種の体長を計測し、それぞれの種ごとにある体長と乾燥重量の関係式から、乾燥重量を求めた^{4), 5)}。*Daphnia pulicaria*（プリカリア）については、*D. pulex*の関係式を代用した。求めた乾燥重量は、Urabe and Watanabe (1990)⁶⁾の炭素量と乾燥重量の比（0.45）から炭素量へと変換した。

琵琶湖の甲殻類の動物プランクトン群集は、ほとんどの時期で*Daphnia*属のミジンコと*Eodiaptomus japonicus*（ヤマトヒゲナガケンミジンコ）によって7割以上が占められる⁶⁾。そこで、琵琶湖の動物プランクトンの生産量を推定するため、採取した動物プランクトンのうち、*Daphnia*属の2種のミジンコ（*Daphnia galeata*, カブトミジンコと*D. pulicaria*, プリカリア）およびヤマトヒゲナガケンミジンコの抱卵数を数えた。数えた抱卵数等から*Daphnia*属のミジンコとヤマトヒゲナガケンミジンコの実産量を関係式より推定した^{7), 8)}。カブトミジンコとプリカリアの卵から孵化するまでの日数（development time）の算出には、それぞれBottrell et al. (1976)⁹⁾とAlevras (1970)¹⁰⁾の式を使用した。本サブテーマでは、ケンミジンコのノープリウス幼生をCyclopoida (*Mesocyclops dissimilis*等)とCalanoida（ヤマトヒゲナガケンミジンコ）に区別しなかったため、ヤマトヒゲナガケンミジンコの実産量算出のため

に用いるdevelopment timeは、ノープリウス幼生期を除外するために卵からコペポデイド期になるまでの期間とし、Liu et al. (2014)¹¹⁾の式を用いた。

3. - 2 室内実験での琵琶湖の動物プランクトンによる細菌や原生生物の摂食・捕食の有無の確認

琵琶湖の動物プランクトンが、細菌や原生生物といった微生物を摂食・捕食するのかを確認するため、細菌や原生生物を餌にした摂食・捕食実験を行った。実験には、琵琶湖から採取した細菌、琵琶湖を含む様々な湖沼で一般的な従属栄養性鞭毛虫キネトプラスト (kinetoplastid, Metakinetoplastina, 原生生物, 体長約15 μ m)、ミジンコ類のプリカリアおよびカイアシ類のヤマトヒゲナガケンミジンコを用いた。予め鞭毛虫の密度を調整した20 mlの試験水（鞭毛虫の培養時の餌である細菌を含む）にプリカリア（成体, 1.9 ± 0.2 mm）、あるいはヤマトヒゲナガケンミジンコ（成体, 0.97 ± 0.05 mm）をそれぞれ1個体ずつ加えた（図(5)-1）。動物プランクトンの摂食・捕食は、餌の濃度によって影響を受けるため、鞭毛虫の密度を基にして数パターンの餌濃度の処理系を用意した。プリカリアを用いた実験では、鞭毛虫の密度がLow (0.7×10^3 inds. ml^{-1})、Middle (1.0×10^3 inds. ml^{-1})、High (5.2×10^3 inds. ml^{-1}) の3処理系を作成し、ヤマトヒゲナガケンミジンコの実験ではLow (0.3×10^3 inds. ml^{-1}) とHigh (7.6×10^3 inds. ml^{-1}) の2つの処理系を作った。また、試験水に2種の動物プランクトンを加えないcontrolも設けた。動物プランクトンを加えた後、24時間ごとに72時間まで鞭毛虫の残存数および細菌数の変化を調べ（プリカリアの実験時間は24時間）、動物プランクトンを加えていないcontrolと比較した。



図(5)-1 微生物に対するプリカリアとヤマトヒゲナガケンミジンコの摂食・捕食実験のデザイン

3. - 3 室内実験での細菌や従属栄養性の鞭毛虫を餌にした場合におけるミジンコ類の生産量の評価

湖沼では、一般的に繊毛虫より鞭毛虫の方が多いため、微生物食物連鎖を考えた場合、鞭毛虫の方が重要視される^{12), 13)}。本実験では、微生物を餌にした場合の動物プランクトンの生産量を評価するため、琵琶湖の細菌や、琵琶湖を含む様々な湖沼で一般的な従属栄養性鞭毛虫キネトプラスト類を餌にしてミジンコ類を培養し、生存、成長、再生産（産仔）を調べた。また、生食食物連鎖からの餌を代表して緑藻のクロレラでもミジンコ類を同様に培養し、生存、成長、再生産（産仔）を調べ、餌が微生物の場合の結果と比較した。

実験には、琵琶湖で採取し、実験室内で継代培養している細菌（長径 1.6 ± 0.4 μ m, 短径 1.05 ± 0.2 μ m）、従属栄養性鞭毛虫のキネトプラスト類、ミジンコ類のプリカリアを用いた。また、緑藻のクロレラ（超純水で洗浄済み、リーセンテック株式会社）も使用した。細菌、キネトプラスト類、クロレラの細胞あたりの炭素含有量は、それぞれ 0.23 ± 0.04 pgC、 63.95 ± 30.45 pgC、 5.49 ± 0.16 pgCであり¹⁴⁾、その値を基に一定の炭素量になるようにオートクレーブ滅菌水で希釈して50 mlビーカーに加えた（液量50 ml）。その後、ビーカーに24 h以内齢のプリカリア（体長 0.77 ± 0.05 mm）をそれぞれ1個体ずつ入れた。本実験では、キネトプラスト類とその餌に用いた細菌を分離できなかったため、両者を一緒に入れた。餌の種類を変えた処理系としては、4つ設け（細菌のみ、キネトプラスト類+細菌、クロレラのみ、

キネトプラスト類50%+細菌+クロレラ50%)、各処理系における餌量(炭素量)は0.128~8.29 mgC l⁻¹とした(表(5)-1)。各餌の処理系では、5~13の繰り返しを設けた。添加した餌生物が、細菌のみ、クロレラのための処理系を、それぞれ細菌100%とクロレラ100%とした。キネトプラスト類+細菌と、キネトプラスト類50%+クロレラ50%+細菌の処理系では、キネトプラスト類と一緒に細菌が混入するため、まずキネトプラスト類とクロレラの炭素量で餌量を決め、次いで細菌数を数えて混入した細菌量(炭素量)を求めた。実験条件は、明暗周期12h-Light/12h-Dark、20±2℃とした。食べ残した餌の影響等をなくするため、1日置きに新しい餌が入ったビーカーにプリカリアを移し替えた。実験終了日は、プリカリアの死亡、あるいは3回目の産仔日とした。実験期間中に新たに生まれた仔虫は計数後に除去した。

実験期間中、プリカリアの生存と産仔の有無の毎日確認し、体成長を評価するために体長(mm)も顕微鏡下で測定した。体長(mm)は、Snow (1972)¹⁵⁾の関係式で炭素量(μgC)に換算した。プリカリアが成熟あるいは死亡するまでの体成長量(μgC)を経過日数で割ることにより、体成長率(μgC day⁻¹)を求め、各処理系で比較した。

表(5)-1 各処理系の餌生物の条件(永田ら2018)¹⁴⁾を改変

餌の種類	濃度 (mgC l ⁻¹)		密度 (cells ml ⁻¹)
細菌100%	高	8.29	3.60 × 10 ⁷
	中	5.5	2.40 × 10 ⁷
	低	0.86	3.74 × 10 ⁶
キネトプラスト類+細菌	高	8.29 (鞭=0.64, 細=7.65)*	鞭=1.0 × 10 ⁴ , 細=3.32 × 10 ⁷
	低	0.86 (鞭=0.128, 細=0.732)*	鞭=2.0 × 10 ³ , 細=3.18 × 10 ⁶
クロレラ100%	高	5.5	1.0 × 10 ⁶
	中	0.64	1.17 × 10 ⁵
	低	0.128	2.34 × 10 ⁴
キネトプラスト類50%+細菌 + クロレラ50%**		0.81	鞭=1.0 × 10 ³ , 細=2.96 × 10 ⁶ , ク=1.17 × 10 ⁴
(鞭=0.064, 細=0.681, ク=0.064)*			

*餌の組成 (鞭=キネトプラスト類, 細=細菌, ク=クロレラ)。

**この処理系では、キネトプラスト類とクロレラの炭素量を同じに設定。

3. - 4 室内実験での微生物群を餌にした場合におけるミジンコ類の生産量の評価

実験に用いる微生物群(細菌、繊毛虫、鞭毛虫等)を確保するため、琵琶湖北湖で表層水を採水し(約20 l)、40 μmメッシュネットを用いてその湖水からミジンコ類等の動物プランクトンを除去した(図(5)-2)。次いでその湖水を実験室で20 lタンクに移し替え、グルコース、ペプトン、酵母エキスを2日に1回程の頻度でそれぞれ2 mg l⁻¹、1 mg l⁻¹、1 mg l⁻¹の濃度で加えて微生物群を13日間増殖させた。培養条件は、藻類の増殖を抑えるため、24 h暗期とした(20±2℃)。培養開始から13日後、暗所および静置培養のため、湖水に含まれていた藻類の多くがタンクの底に沈殿しているのを確認した。そこで、微生物群のみを集めるため、タンク内の湖水20 lのうち、水面から10 lの水を攪拌しないように緩やかに別の新しいタンクに移し替えた。その後、その湖水10 lに¹³Cグルコース(¹³C atom% = 25.0)、ペプトン、酵母エキスをそれぞれ2 mg l⁻¹、1 mg l⁻¹、1 mg l⁻¹の濃度でほぼ毎日加え、微生物群を再び暗所(20±2℃)で7日間増殖させるとともに¹³Cでラベルした。

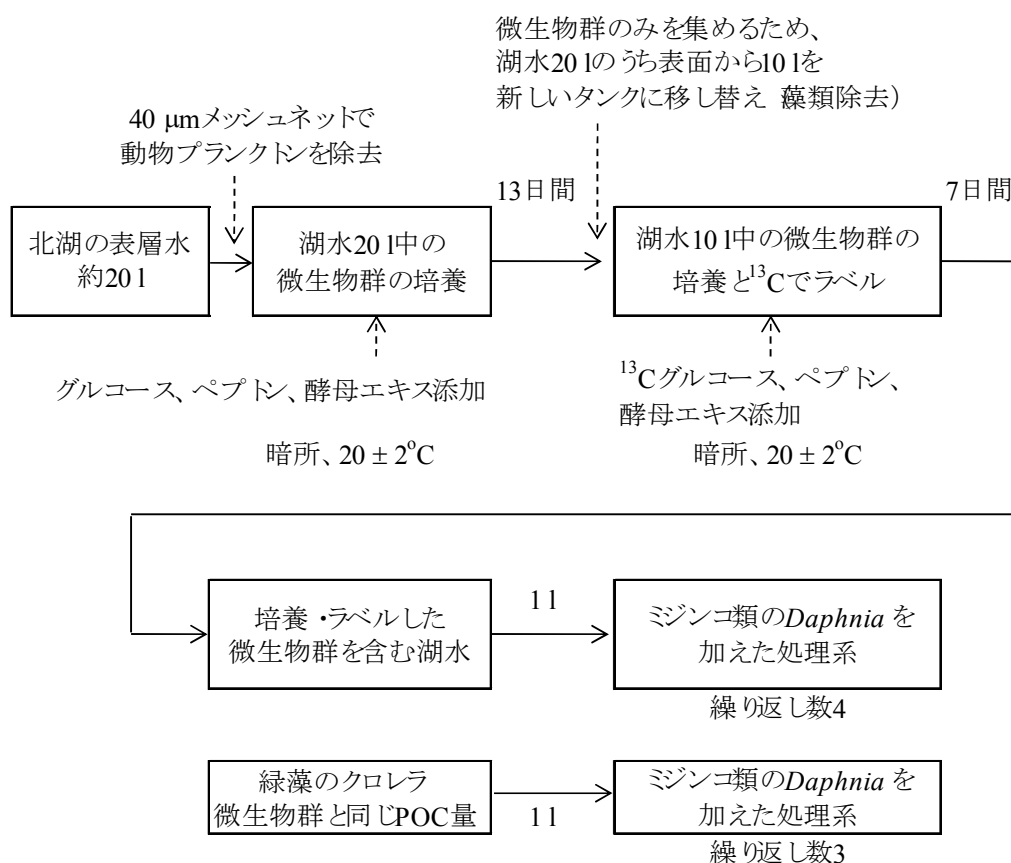
微生物群の培養とラベル後、微生物群を餌にした場合のミジンコ類の生産量を評価するため、微生物群を含むタンク内の湖水を4つの1 lビーカーにそれぞれ1 lずつ入れ、そこに予め体長を測定した生後

24 h以内のミジンコ類のプリカリアを4個体ずつ加えた（図(5)-2、処理名をM-*Daphnia*とする）。一方、緑藻のクロレラ（超純水で洗浄済み、リーセンテック株式会社）を微生物群と同じ炭素量（ 1.98 mgC l^{-1} ）になるように3つの1 lビーカーにそれぞれ入れ、そこに体長を測定した24 h以内齢のプリカリアを4個体ずつ加えた（処理名をC-*Daphnia*とする）。その後、すべてのビーカーを暗所（ $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ）に移し、プリカリアを8日間培養した。生後24 h以内齢のプリカリアのうち、M-*Daphnia*とC-*Daphnia*の処理系に使わなかった数十個体を、炭素安定同位体比の測定に使用した（数十個体をまとめて測定）。

実験開始から8日後、全ビーカー内のプリカリアの数を計数した。その後、すべての個体をオートクレーブ滅菌水で洗浄するとともに、消化管内容物を除去するために滅菌水の中で24 h維持した。24 h後、滅菌水内のプリカリアの体長を測定し、Snow (1972)¹⁵⁾式で体長（mm）を炭素量（ μgC ）に換算した。体長を測定したプリカリアは、次いで炭素安定同位体比の測定に使用した（個体数が少ないため、ビーカー内のプリカリア全個体をまとめて測定）。

プリカリアの生産量を調べる実験の開始前には、用いた微生物群の組成を顕微鏡で確認した。また、実験の前後で、微生物群の炭素安定同位体比と粒子態有機炭素量（POC）を測定した。プリカリアと餌に用いた微生物群の炭素安定同位体比とPOCから、大槻(1985)¹⁶⁾の式を用いて、プリカリアによる微生物群の取込み速度（ $\mu\text{gC day}^{-1}$ ）を求めた。

プリカリアの体成長による炭素増加量を、実験開始時のPOC（各ビーカー4個体）と実験終了時のPOCの差から求め、M-*Daphnia*とC-*Daphnia*の処理系で比較した。再生産（産仔）による炭素増加量も、仔虫の体長を炭素量に換算することで求め、M-*Daphnia*とC-*Daphnia*の処理系で比較した。



図(5)-2 4) の微生物群やクロレラを餌にしたミジンコの培養実験のデザイン

3. - 5 野外実験での植物プランクトンや微生物に対する動物プランクトンの摂食・捕食速度の評価

現場の動物プランクトンが、植物プランクトンと微生物をそれぞれの程度利用しているのかを評価するため、現場でのボトル実験により、動物プランクトンによる植物プランクトンと微生物の摂食・捕食速度を求めた。

実験は、琵琶湖北湖の南比良沖中央（12B、水深約60 m、北緯 $35^\circ 11' 39''$ 、東経 $135^\circ 59' 39''$ ）に

において2018年7月、9月、11月に行った。各月の実験開始日に水深10 mの湖水を採水し、そこに含まれる $>250 \mu\text{m}$ の動物プランクトンの密度を0、0.5倍、1.0倍、1.85倍、2.85倍になるよう、メッシュサイズが $250 \mu\text{m}$ のふるいを用いて調整した。琵琶湖での $>250 \mu\text{m}$ の動物プランクトンは、ミジンコ類とカイアシ類である。ふるいで密度を調整する際には、ふるいを予め動物プランクトンを完全に除去した湖水に浸し、そこに湖水を加えることによって、動物プランクトンに可能な限り物理的なダメージを与えないようにした。実験時の動物プランクトンの密度倍率1.0倍は、各月の実験開始日における現場の密度を示し（湖水そのまま）、0は、ふるいで $>250 \mu\text{m}$ の動物プランクトンを除去した実験水（湖水）を示す。また、0.5倍、1.85倍、2.85倍は、それぞれの実験開始日における現場の動物プランクトンの密度を0.5倍、1.85倍、2.85倍にした実験水（湖水）を示す。密度調節のための希釈水には、 $250 \mu\text{m}$ のふるいで動物プランクトンを除去した湖水を使った。動物プランクトンの密度を0、0.5倍、1.0倍、1.85倍、2.85倍に調整した各実験水を、それぞれ異なる5 lボトル（透明、総容量6.5 l）に入れ、浮標に吊るして現場の10 m深で1週間程度培養した。実験開始時における動物プランクトンの密度や現存量を評価するため、各月の現場の湖水（6.5 l）に含まれる動物プランクトンを $250 \mu\text{m}$ のふるいで集め、最終濃度が4%のシュガーホルマリンで固定した。採取した動物プランクトンは、実験室で計数と体長測定を行い、密度と現存量を求めた（現存量の換算は前節の方法に同じ）。1週間程度の培養後、各ボトルの実験水を $250 \mu\text{m}$ のふるいに通すことで動物プランクトンを採取し、実験を終了させた。採取した動物プランクトンの計数と体長測定を行うことで、実験終了時の密度と現存量を求めた。

各実験時における動物プランクトンの餌量の変化を評価するため、実験開始時の現場の湖水と実験終了時の各ボトル内の実験水（終了のために $250 \mu\text{m}$ のふるいを通した後の実験水）を3つのサイズ画分（ $<20 \mu\text{m}$ 、 $20\text{--}45 \mu\text{m}$ 、 $45\text{--}250 \mu\text{m}$ ）に分け、それぞれの画分のPOCとクロロフィルa量（Chl. a、植物プランクトン量の指標）を測定した。サイズ画分には、メッシュサイズが $20 \mu\text{m}$ と $45 \mu\text{m}$ のふるいを用いた。一方、 $<20 \mu\text{m}$ の画分については、細菌と鞭毛虫の計数のため、100 mlをサブサンプルとして採取し、そこに1%になるようにグルタルアルデヒドを加えて細菌と鞭毛虫を固定した。固定したサンプル中の細菌と鞭毛虫は、それぞれ4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) とプリムリンで染色し、蛍光顕微鏡（ $\times 1000$ ，UV励起）で計数した。

Chl. a量、鞭毛虫数、細菌数に対する動物プランクトンの影響を解析するため、 $>250 \mu\text{m}$ 動物プランクトンの密度倍率と実験終了時におけるChl. a量、鞭毛虫数、細菌数との関係をみた。動物プランクトンの密度倍率に伴って有意に減少していた項目については、その減少を全て動物プランクトンの摂食・捕食によるものとし、動物プランクトンの密度倍率0と1.0倍の処理間の差を培養日数で割ることにより、現場の存在量での動物プランクトンの摂食・捕食速度を求めた。さらに、摂食・捕食速度を炭素量で評価するため、各月の実験開始時でのPOC:Chl. aの比を求め、その比からChl. aあたりの摂食速度を炭素量あたりの摂食速度に換算した。鞭毛虫や細菌については、細胞数の減少を永田ら(2018)¹⁴⁾の細胞あたりの平均炭素量を用いて炭素量の減少量に換算し、それを動物プランクトンによる捕食速度とした。

3. - 6 室内実験での植物プランクトンや微生物に対する動物プランクトンの比取込み速度の評価

動物プランクトンによる植物プランクトンや微生物の比取込み速度を評価するため、 ^{13}C グルコースや ^{13}C 炭酸水素ナトリウムでそれぞれラベルした微生物と植物プランクトンを餌に動物プランクトンを培養する実験を行った。

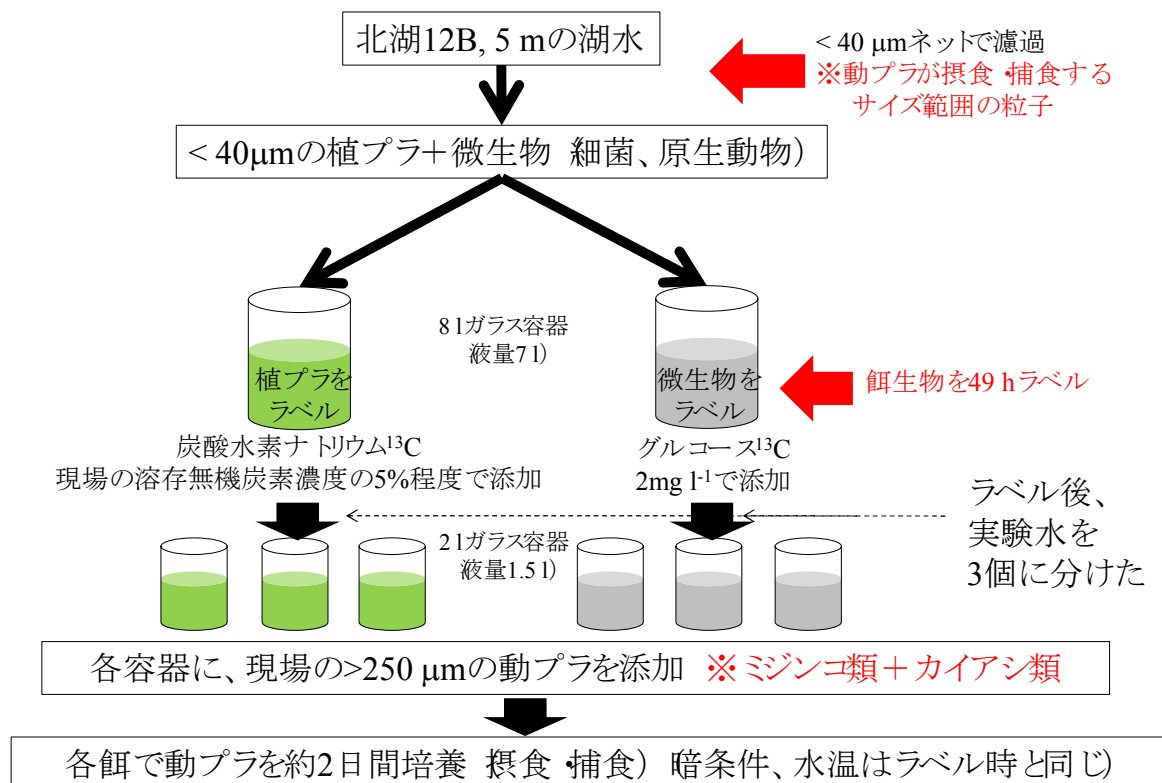
実験は2018年7月、9月、11月に行った。各月の実験開始時に南比良沖中央（12B、水深約60 m、北緯 $35^\circ 11' 39''$ 、東経 $135^\circ 59' 39''$ ）の5 mの湖水を採水した。採水した湖水をメッシュサイズ $40 \mu\text{m}$ のふるいに通すことで、ワムシ類、ミジンコ類、カイアシ類等の動物プランクトンを除去し、動物プランクトンが摂食・捕食可能な $<40 \mu\text{m}$ の粒子¹⁷⁾（微生物と植物プランクトン）のみの実験水を作成した（図(5)-3）。実験水の一部を用いて、微生物と植物プランクトンの ^{13}C ラベル前におけるPOC、Chl. a、細菌数、微生物と植物プランクトンの炭素安定同位体比を分析した。

実験水のうち、7 lに ^{13}C グルコース（ ^{13}C atom% = 25.0）を 2mg l^{-1} の濃度で加え、培養器内で49 h培養することにより、微生物（細菌と原生生物）を ^{13}C でラベルした（図(5)-3）。一方、別の7 lに ^{13}C 炭酸水

素ナトリウムを各月の現場の溶存無機炭素濃度の5%程度になるように加え、培養器内で49 h培養することで植物プランクトンを ^{13}C でラベルした。培養器内の条件は、各月の現場の水深5 mと同じ水温(7月28℃、9月25.5℃、11月18.5℃)、光量子束密度(約 $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)に設定した。植物プランクトンをラベルし易くするために49h-Lightにし、微生物も同じ条件で同時にラベルした。49hのラベル後、各実験水のPOC、Chl. *a*量、細菌数、微生物あるいは植物プランクトンの炭素安定同位体比を分析した。残りの各実験水は、それぞれ3つの2 lガラス容器に1.5 lずつ入れた(図(5)-3)。その後、各月の実験開始時に南比良沖中央(12B)で採取した現場の $>250 \mu\text{m}$ 動物プランクトンをそれぞれの容器に一定量入れ、暗条件にした培養器内で約2日間培養することにより、動物プランクトンに微生物、あるいは植物プランクトンを摂食・捕食させた。水温は、微生物と植物プランクトンのラベル時と同じにした。各容器に添加した動物プランクトンの量を把握するため、添加量と同量のサブサンプルを採取し、動物プランクトンを同定・計数するとともに体長を測定した。体長測定後の動物プランクトンは、実験開始前の炭素安定同位体比の測定に使用した。

動物プランクトンを添加してから約2日後、動物プランクトンを各容器から取り除き、オートクレーブ滅菌水(実験室でのミジンコの培養水)で洗浄し、24 h滅菌水で維持することで消化管内容物を排出させた。動物プランクトンを取除いた後の各容器の実験水は、実験終了時のPOC、Chl. *a*量、微生物あるいは植物プランクトンの炭素安定同位体比の測定に使用した。一方、24 h滅菌水内で消化管内容物を排出させた動物プランクトンは、計数と体長測定の後、炭素安定同位体比の測定のために使用した。

微生物と植物プランクトンに対する動物プランクトンの比取込み速度を、培養前後(餌生物を食べる前後)における動物プランクトン、微生物あるいは植物プランクトンの炭素量(μgC)および炭素安定同位体比(^{13}C atom%)から、大槻(1985)¹⁶⁾の式を用いて算出した。微生物と植物プランクトンの炭素安定同位体比は、ラベル後と実験終了時(動物プランクトンの摂食・捕食後)で異なり、実験期間中に変化していたため、ラベル後と実験終了時の平均値を計算に使用した。各月の実験において微生物と植物プランクトン間で求めた比取込み速度を比較することにより、現場の動物プランクトンが、微生物と植物プランクトンのうち、どちらをよく利用していたのかを評価した。



図(5)-3 動物プランクトンの比取込み速度を評価する実験のデザイン

4. 結果及び考察

4. - 1 野外調査での動物プランクトンの現存量の把握と生産量の推定

2016年から2018年における琵琶湖の動物プランクトン（ミジンコ類+カイアシ類）の現存量や生産量を表(5)-2に示す。2016年から2018年の現存量は、2006年と2007年のピーク時より低かったが、1980年代や1990年代とほぼ同じ水準を維持していた¹⁾。このことから、琵琶湖での植物プランクトンの現存量や種数の経年的な減少は、動物プランクトンの現存量にはそれほど影響していない可能性が考えられた。しかし、経年的な減少傾向にあるのは植物プランクトンの総量であり、動物プランクトンの可食サイズ(1~50 μm)¹⁷⁾の植物プランクトンの経年的な変動傾向や動物プランクトンとの関係は分からない。これまでに、琵琶湖の植物プランクトンを粒子サイズで分けることを試みた研究はあるが、いずれも細胞体積で分類している^{18), 19)}。植物プランクトンの細胞形状や生活様式（単細胞でも群体を形成する等）が多様なため、細胞体積からは動物プランクトンの可食サイズか否かを判断できない。今後は、現場の植物プランクトンをふるい等で粒子サイズに分け、その粒子サイズごとの現存量や生産量と動物プランクトンとの関係を解析する必要がある。一方、魚類等の捕食者が動物プランクトンへ与える影響も未だ評価されていない。現在の琵琶湖では、1980年代~1990年代に比べて漁獲量が減少している。従って、捕食圧が低下したために、動物プランクトンが一定水準の現存量を維持できているのかもしれない。今後、動物プランクトンと魚類等の高次消費者との関係も解析する必要がある。

Eodiaptomus japonicus（ヤマトヒゲナガケンミジンコ）と*Daphnia*属2種のミジンコ（*D. galeata*:カブトミジンコ、*D. pulicaria*:プリカリア）の生産量を推定したところ、両者ともに冬1-3月は生産量が低く、夏や秋に高かった（表(5)-2）。琵琶湖では、同じ方法で生産量を推定した研究例はないが、霞ヶ浦の沖帯で1980年代に評価された値とほぼ同程度のため、ある程度の妥当性のある値と考える⁸⁾。今後は、比較のためにも同じ方法で過去のサンプルについても再評価し、データを蓄積する必要がある。

表(5)-2 各季節の琵琶湖における動物プランクトンの現存量と生産量. 月1データの平均値.

			春4-6月	夏7-9月	秋10-12月	冬1-3月
総動物プランクトン (ミジンコ類 +カイアシ類)	現存量	単位 gC m^{-2}	16年1.024	16年1.726	16年0.409	16年0.455
			17年0.516	17年0.877	17年0.585	17年0.476
			18年1.356	18年1.341	18年0.529	18年0.756
<i>Eodiaptomus japonicus</i>	現存量	単位 gC m^{-2}	16年0.819	16年1.307	16年0.046	16年0.387
			17年0.041	17年0.463	17年0.311	17年0.087
			18年0.614	18年0.858	18年0.233	18年0.667
	生産量	単位 $\text{gC m}^{-2} \text{ day}^{-1}$	16年0.012	16年0.096	16年0.035	16年0.006
			17年0.003	17年0.017	17年0.040	17年0.002
			18年0.012	18年0.020	18年0.019	18年0.012
<i>Daphnia</i> 属2種 (<i>Daphnia galeata</i> + <i>D. pulicaria</i>)	現存量	単位 gC m^{-2}	16年0.091	16年0.070	16年0.041	16年0.020
			17年0.409	17年0.255	17年0.011	17年0.299
			18年0.637	18年0.160	18年0.054	18年0.065
	生産量	単位 $\text{mgC m}^{-2} \text{ day}^{-1*}$	16年2.135	16年5.402	16年1.429	16年0.327
			17年2.214	17年12.000	17年1.903	17年2.480
			18年7.125	18年3.880	18年2.003	18年0.869

16年=2016年, 17年=2017年, 18年=2018年を示す.

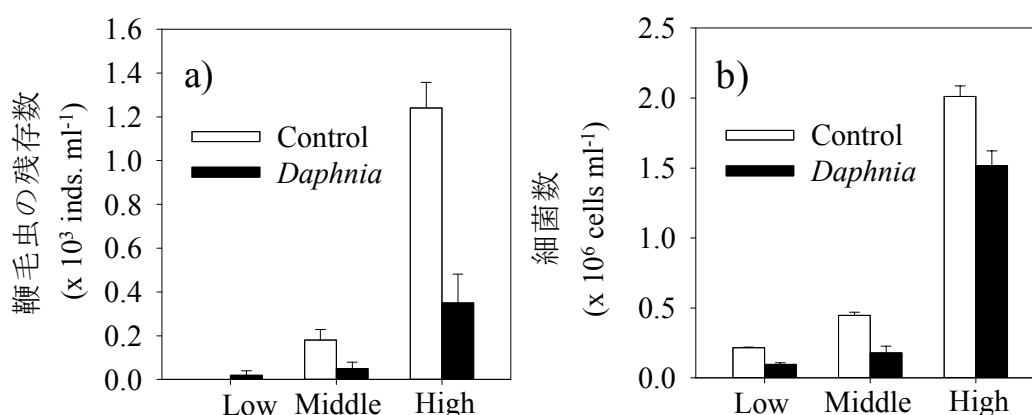
*他の項目とは単位のオーダーが異なる.

4. - 2 室内実験での琵琶湖の動物プランクトンによる細菌や原生生物の摂食・捕食の有無の確認

琵琶湖の動物プランクトンが、積極的に微生物を利用するのかを確認するため、細菌や鞭毛虫に対しての動物プランクトンの摂食・捕食実験を行った。実験の結果、ミジンコ類のプリカリアを加えた場合のMiddleとHighの処理系では、実験終了時の鞭毛虫の残存数がcontrolに比べて低くなった(図(5)-4a)。また、プリカリアが存在すると、実験終了時の細菌数もcontrolに比べて減少していた(図(5)-4b)。これらの結果により、ミジンコ類のプリカリアが、鞭毛虫や細菌類を摂食することを確認できた。

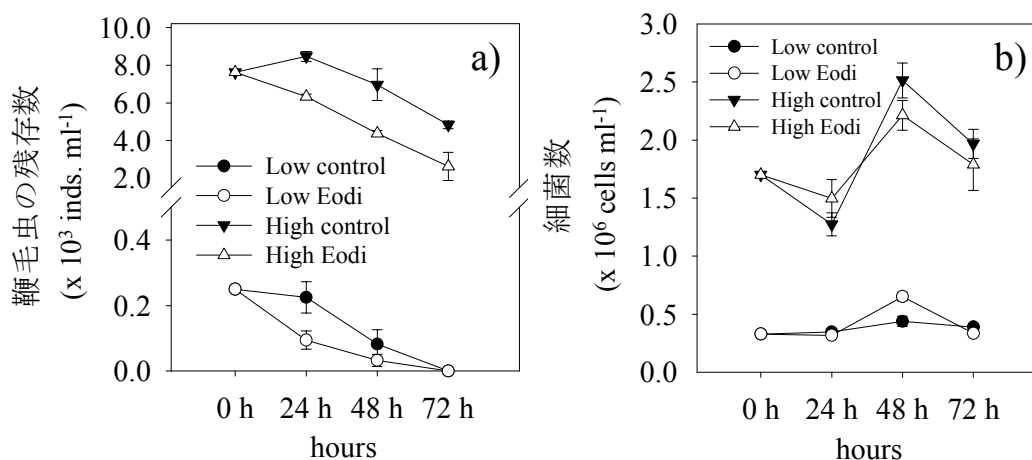
ヤマトヒゲナガケンミジンコを入れた場合、LowとHighの両処理系において、鞭毛虫の残存数がcontrolに比べて低く推移していた(図(5)-5a)。これに対して、細菌数はcontrolと差がなかった(図(5)-5b)。これらの結果から、ヤマトヒゲナガケンミジンコは、鞭毛虫は摂食するが、細菌類は摂食しないと考えられた。

実験により、琵琶湖の動物プランクトンのプリカリアとヤマトヒゲナガケンミジンコが微生物を積極的に摂食することを確認できた(ヤマトヒゲナガケンミジンコは細菌を摂食しない)。プリカリアについては、 ^{13}C でラベルした細菌や鞭毛虫キネトプラスト類を一定時間摂食・捕食させた実験でも、微生物を食べることを確認できた(本最終報告書では、結果を省略する)。今後は、微生物を餌にした場合の動物プランクトンの生産量を評価する必要がある。これについては、3.-3と3.-4の室内実験によって評価を試みた。また、琵琶湖には、プリカリアやヤマトヒゲナガケンミジンコ以外にも動物プランクトンが存在し、微生物も鞭毛虫キネトプラスト類だけではない。そこで、3.-5の野外実験と3.-6の室内実験では、様々な微生物群や動物プランクトンが混在する群集レベルにおいて、動物プランクトンが植物プランクトンと微生物のうち、どちらをより摂食・捕食するのかを評価した。



図(5)-4 プリカリア (*Daphnia*) を加えた実験における鞭毛虫の残存数と細菌数.

a) 実験終了時 (24時間後) の鞭毛虫の残存数, b) 実験終了時 (24時間後) の細菌数. 平均±SE.



図(5)-5 ヤマトヒゲナガケンミジンコを加えた実験における鞭毛虫の残存数と細菌数.

a) 実験期間中における鞭毛虫の残存数の変化, b) 実験期間中における細菌数の変化.

Eodi = ヤマトヒゲナガケンミジンコ. 平均±SE

4. - 3 室内実験での細菌や従属栄養性の鞭毛虫を餌にした場合におけるミジンコ類の生産量の評価

微生物と植物プランクトンを餌にした場合で動物プランクトンの生産量を比較するため、細菌、従属栄養性鞭毛虫キネトプラスト類、クロレラを餌にしてミジンコ類のプリカリアを培養する実験を行った。

実験の結果、クロレラ100%以外の餌処理系では、プリカリアは成熟する前に死亡したため、再生産（産仔）を観察できなかった（表(5)-3）。ミジンコ類は、餌が細菌のみでは多価不飽和脂肪酸（PUFA）やステロール等の栄養が不足するために再生産できないことが知られており^{20), 21), 22)}、本実験の細菌100%の結果はその知見を支持するものであった。

従属栄養性の鞭毛虫は、ミジンコ類の生産性に貢献する餌になると考えられていた²³⁾。しかし、本実験のキネトプラスト類+細菌の処理系では、プリカリアは成熟に至らなかった（表(5)-3）。また、クロレラが少量含まれていたキネトプラスト類50%+細菌+クロレラ50%の処理系においても、プリカリアは成熟に達することができなかった。従属栄養性の鞭毛虫はPUFA等の含有量が種によって異なり、それは食べる餌の種類で変わる²⁴⁾。本実験で用いたキネトプラスト類は細菌食者であるため、PUFA等の含有量が低い可能性が高い。従って、ネットプラスト類+細菌、キネトプラスト類50%+細菌+クロレラ50%の処理系でプリカリアが成熟前に死亡したのは、細菌100%の処理系と同じく、PUFA等の炭素以外の栄養が不足していたためと考えられる。キネトプラスト類は、琵琶湖でも夏から秋に多くみられる湖沼では一般的な細菌食性の鞭毛虫である。本実験の結果により、すべての鞭毛虫がミジンコ類の適した餌になる訳ではなく、捕食しても生産に必要なエネルギーを十分には得ることができない鞭毛虫も存在することが明らかになった。

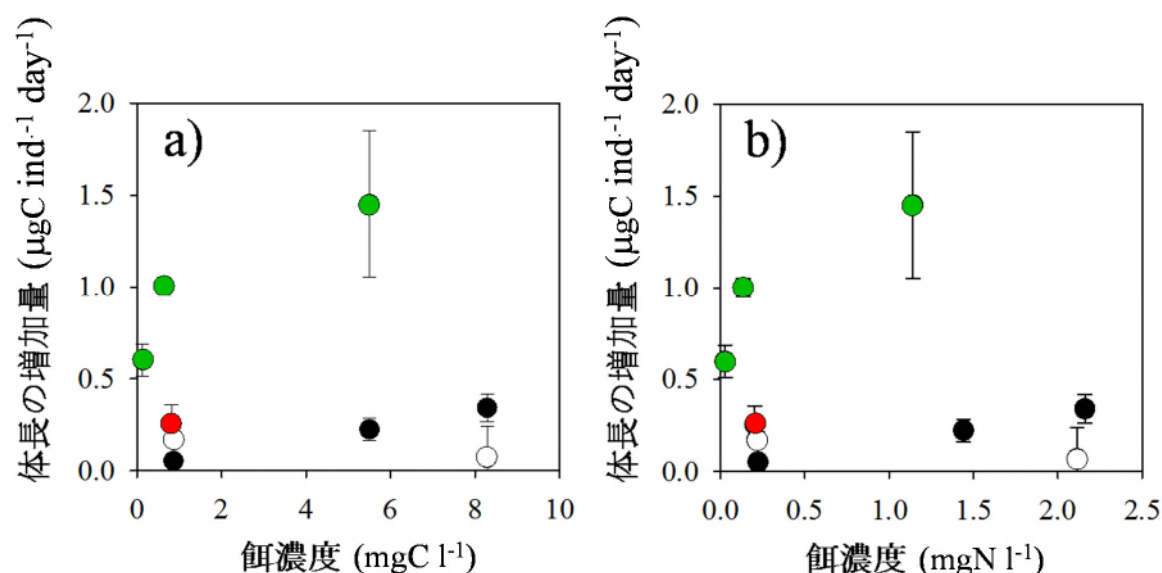
プリカリアの体長の増加量（ $\mu\text{C ind.}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ）を各処理系で比較した結果、クロレラ100%の処理系のプリカリアが最も体長の増加量が多く、クロレラの供給濃度に伴って増加していた（図(5)-6a）。細菌100%の処理系のプリカリアも、細菌の供給濃度に伴って体長の増加量が増えていた。しかし、クロレラ100%以外の餌処理系では非常に体長の増加量が少なく、クロレラ100%の低濃度 0.128 mgC l^{-1} の何十倍もの炭素量をプリカリアに供給しても（細菌100%の高濃度だと約65倍の量となる）、クロレラ100%の低濃度での体長増加量と同程度までに達する他の餌処理系はなかった。各餌生物の窒素含有量から実験時の餌量をみても¹⁴⁾、同様の傾向であった（図(5)-6b）。本結果でも、生存や生産量の結果と同じく、すべての従属栄養性鞭毛虫がミジンコ類の良好な餌となり得る訳ではなく、生存、生産、成長に必要な炭素や窒素以外の栄養素（PUFA等）が十分に得られないケースもあることが明らかになった。しかし、野外には、本実験で用いたキネトプラスト類以外の様々な鞭毛虫や繊毛虫等の他原生生物も存在する。そこで、3. - 4の室内実験では、様々な微生物群を餌にしてミジンコを培養する実験を行い、動物プランクトンの生産量への微生物群の餌としての影響を評価した。

表(5)-3 各餌処理系におけるプリカリアの成熟%、純再生産割合.

餌の種類	濃度	成熟%	純再生産割合** (R : 仔虫 メス^{-1})
細菌100%	高	0 (5.8)*	—
	中	0 (5.2)*	—
	低	0 (0.8)*	—
キネトプラスト類 + 細菌	高	0 (1.0)*	—
	低	0 (3.8)*	—
クロレラ100%	高	100	29.5
	中	100	5.4
	低	44.4	3.6
キネトプラスト類50% + 細菌 + クロレラ50%		0 (4.5)*	—

* ()内は、平均生存日数. クロレラ100%では全濃度で3回目の産仔日より長く生存した個体があったため、データなし. クロレラ100%での3回目の産仔日: 低濃度区は23日, 中濃度区は17日, 高濃度区は12日.

** 生後から3回目の産仔日まで.



図(5)-6 餌濃度と異なる餌で培養したプリカリアの体長増加量との関係. a) 餌量を炭素で評価した場合、b) 餌量を窒素で評価した場合. 黒丸=細菌100%、白丸=キネトプラスト類+細菌、緑丸=クロレラ100%、赤丸=キネトプラスト類50%+細菌+クロレラ50%. 平均±SE. 永田ら(2018)¹⁴⁾を改変.

4. - 4 室内実験での微生物群を餌にした場合におけるミジンコ類の生産量の評価

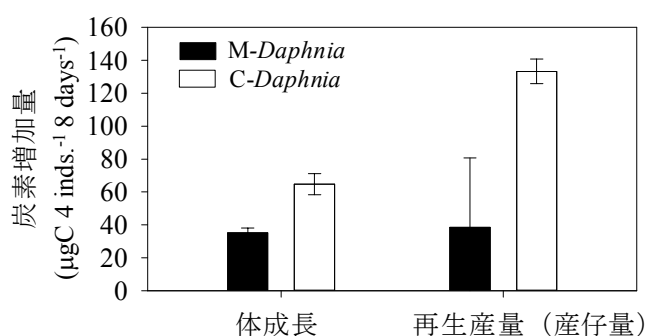
プリカリアの餌に使用した微生物群の組成を調べたところ、太陽虫、アメーバ、繊毛虫、襟鞭毛虫であり、藻類は観察できなかった。これにより、藻類等の光合成を行う生物を可能な限り除去できたと考える。一方、培養前後のプリカリアの ^{13}C atom%、微生物群の ^{13}C atom%、培養後のプリカリアの炭素量から(表(5)-4)、プリカリアによる微生物群の取込み速度を求めると、 $1.39 \pm 0.14 \mu\text{gC day}^{-1}$ となり、微生物群を摂食・捕食していたことが確認できた。取込み速度は、プリカリアの個体ごとに求め、M-*Daphnia* 処理系のビーカー間で統計的な差がなかったため(ANOVA, $F = 1.06$, $p > 0.1$)、全ビーカーにおけるすべての個体の平均値で表した。

表(5)-4 プリカリアによる微生物群の取込み速度にかかわるパラメータ

培養後のプリカリアの ^{13}C atom%	6.41
培養前のプリカリアの ^{13}C atom%	1.09
餌の微生物群の ^{13}C atom%	7.25
培養後のプリカリアの炭素量 (μgC)	$12.84 \pm 1.27^*$

* 平均 $\pm$ SD.

2つの餌処理系 (M-*Daphnia*とC-*Daphnia*) でプリカリアの体成長による炭素増加量を比較した結果、M-*Daphnia*処理系のプリカリアはC-*Daphnia*処理系のものより増加量が低くなり、C-*Daphnia*の54.4%であった (図(5)-7)。また、再生産量もM-*Daphnia*処理系のプリカリアはC-*Daphnia*より少なくなり、C-*Daphnia*の28.8%となった。これらのことから、前述の3. - 3実験と同じく、炭素量で餌の供給量を定めた場合には (本実験は両処理系を 1.98 mgC l^{-1} で統一)、微生物群は藻類に比べてミジンコ類の生産量を維持・向上させる好ましい餌には成りえない可能性が示された。しかし、藻類の中でもクロレラは、栄養素の含有量 (多価不飽和脂肪酸等) が高く、ミジンコ類にとって比較的質の高い餌と考えられており²⁵⁾、その様な質の高い藻類が琵琶湖に常に豊富に存在する訳でない。また、実験時の餌量 (POC) を琵琶湖の現場に比べてかなり高く設定したため、3. - 1の野外調査で推定した生産量との比較ができなかった。そのため、実際の琵琶湖の餌量でミジンコ類の生産量を評価することや、様々な餌生物が混在する環境中においてミジンコ類が微生物ループ (微生物群の餌)、あるいは生食食物連鎖 (藻類の餌) のそれぞれにどの程度寄与しているのかを評価することが今後の課題と考える。後者の寄与については、3. - 5の野外実験と3. - 6の室内実験で評価を試みた。



図(5)-7 2種類の餌処理系 (餌量 1.98 mgC l^{-1}) におけるプリカリアの体成長および再生産での炭素増加量. M-*Daphnia*は微生物群の餌, C-*Daphnia*はクロレラの餌. 平均 $\pm$ SD.

4. - 5 野外実験での植物プランクトンや微生物に対する動物プランクトンの摂食・捕食速度の評価

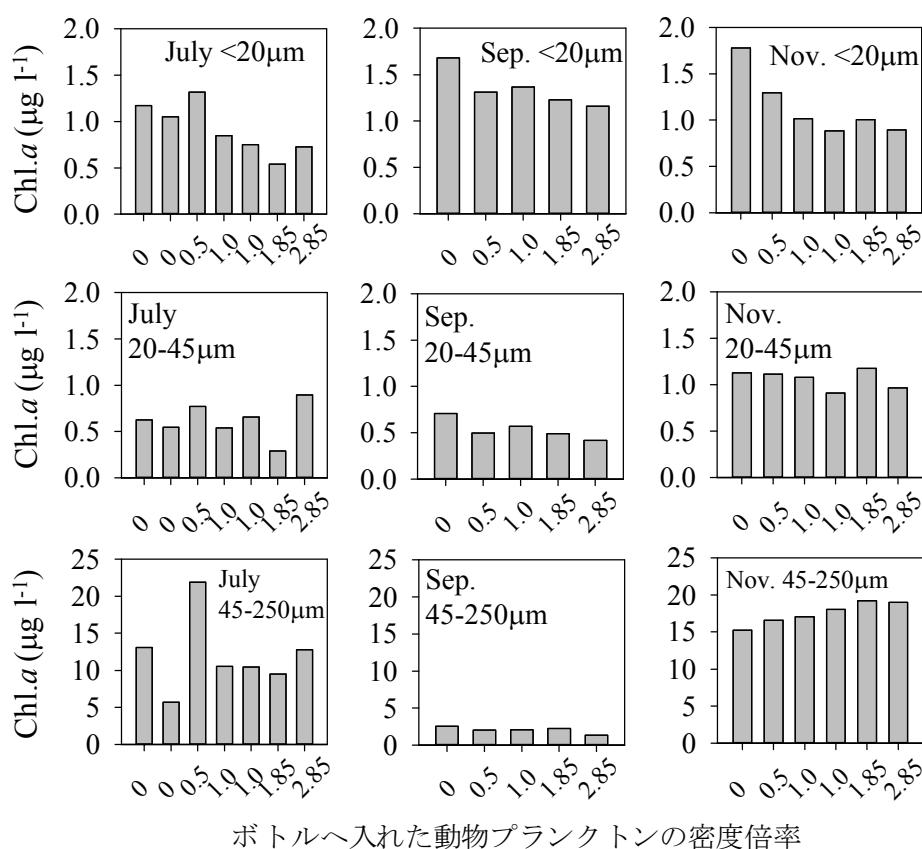
各月の実験開始時における動物プランクトンの現存量は、7月に最も高く、9月と11月は同程度であった (7月 $94.2 \mu\text{g l}^{-1}$ 、9月 $29.7 \mu\text{g l}^{-1}$ 、11月 $29.1 \mu\text{g l}^{-1}$)。これが各月の実験における動物プランクトンの密度倍率1.0倍の密度になる。一方、各月の動物プランクトンの組成は、7月は*Daphnia galeata* (カブトミジンコ) と*Eodiaptomus japonicus* (ヤマトヒゲナガケンミジンコ) が90%以上を占めており、9月は*E. japonicus*が約60%、11月は*D. galeata*と*Diaphanosoma* spp. (オナガミジンコ) が60%以上を占めていた。

各ボトルへの動物プランクトンの密度倍率と実験終了時におけるサイズごとのChl. *a*との関係をみた結果、 $<20 \mu\text{m}$ のChl. *a*は、どの月の実験でも、動物プランクトンの密度倍率の増加に伴って減少していた ($P < 0.1$, 図(5)-8)。また、9月の実験については、 $20-45 \mu\text{m}$ のChl. *a*も動物プランクトンの密度倍率と有意な負の関係がみられた ($P < 0.1$)。これらの結果から、 $<20 \mu\text{m}$ のChl. *a*や9月の $20-45 \mu\text{m}$ のChl. *a*は、動物プランクトンの摂食影響によって減少したと考えられた。これに対し、11月の $45-250 \mu\text{m}$ のChl. *a*は、動物プランクトンの密度倍率の増加に伴って増えていた。これは、動物プランクトンが $<20 \mu\text{m}$ の小型の植物プランクトンを食べ、その結果で栄養塩が放出され、利用可能な栄養塩量が増えたことが要因と考えられた。

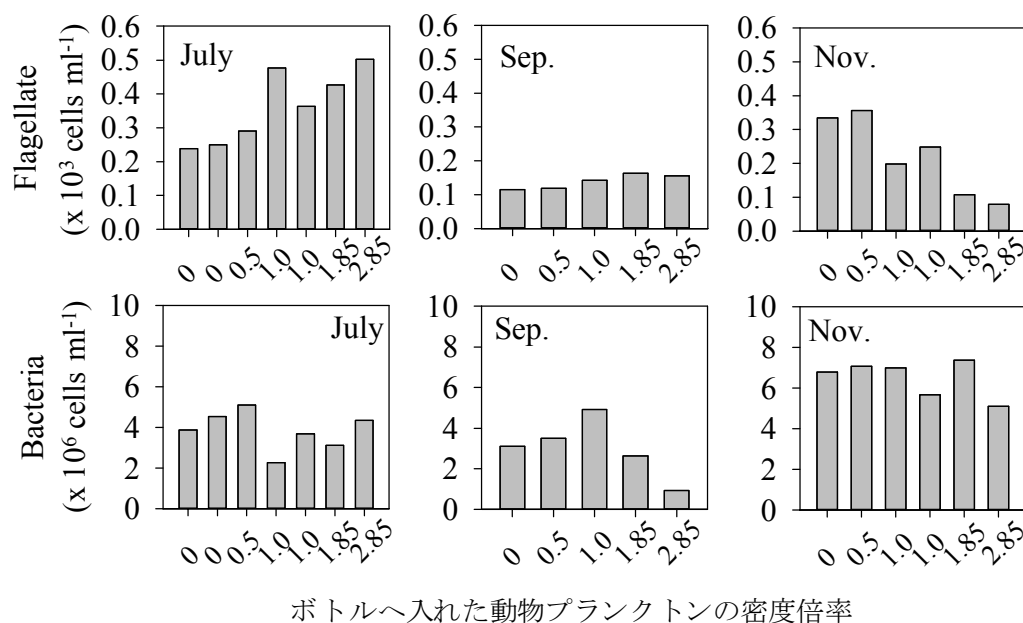
動物プランクトンの密度倍率と実験終了時の鞭毛虫数との関係をみた結果、7月と9月の鞭毛虫数は、動物プランクトンの密度倍率に伴って増えていた ($p < 0.1$, 図(5)-9)。対照的に、11月の鞭毛虫数は、動物プランクトンの密度倍率の増加に伴って有意に減少する傾向がみられた ($p < 0.01$)。これらの結果から、11月のみ動物プランクトンの捕食の影響で減少したと考えられた。11月は7月や9月とは異なり、オナガミジンコが多くいた。オナガミジンコは、ミジンコ類の中でも摂餌器官である濾過肢毛のメッシュサイズが細かく、より小さい餌生物を摂食・捕食できる²⁶⁾。従って、オナガミジンコによる小型鞭毛虫の効率的な捕食で、鞭毛虫数が減少したと考えられる。一方、細菌数は、動物プランクトンの密度倍率とは関係がなく、動物プランクトンによる捕食の影響がみられなかった。

動物プランクトンの密度倍率と有意な負の関係が得られたChl. *a*量、鞭毛虫数の減少量から、動物プランクトンの摂食・捕食速度を求めた結果、 $<20 \mu\text{m}$ の植物プランクトンに対する摂食速度は $65.84 \sim 105.17 \text{ mgC m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ (7月、9月、11月)であった。また、 $20\text{--}45 \mu\text{m}$ の植物プランクトンに対する摂食速度は $34.59 \text{ mgC m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ 、鞭毛虫に対する捕食速度は $17.84 \text{ mgC m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ であった。細菌については、動物プランクトンの捕食による減少がみられなかったため、捕食速度を算出できなかった。植物プランクトンについては、動物プランクトンによる摂食速度は、1990年代に本実験とは異なる方法で評価された値に比べてやや低かった ($<20 \mu\text{m}$ の植物プランクトンは約1/3、 $>20 \mu\text{m}$ の植物プランクトンは約1/6)²⁷⁾。方法が異なるため厳密には言えないが、動物プランクトンの現存量は同程度であるので、植物プランクトンの群集組成 (現存量や種組成) が変化したことが要因と思われる。

摂食・捕食速度で評価すると、動物プランクトンは、どの時期 (7月、9月、11月) でも $<20 \mu\text{m}$ の小型の植物プランクトンをより積極的に利用しており、現在の琵琶湖の動物プランクトンにとっての重要な餌資源は $<20 \mu\text{m}$ の小型の植物プランクトンであると考えられた。一方、 $20\text{--}45 \mu\text{m}$ の植物プランクトンや鞭毛虫等の微生物も動物プランクトンに利用されない訳ではなく、時期によっては積極的に利用されているようであり、それには動物プランクトン群集の種組成が影響すると考えられた。



図(5)-8 各月の実験 (7月、9月、11月) でボトルへ入れた $>250 \mu\text{m}$ 動物プランクトンの密度倍率と実験終了時のChl. *a*との関係. 上段は $<20 \mu\text{m}$ 、中段は $20\text{--}45 \mu\text{m}$ 、下段は $45\text{--}250 \mu\text{m}$ のサイズ画分をそれぞれ示す. 左列は7月実験、中央列は9月実験、右列は11月実験の結果を示す.



ボトルへ入れた動物プランクトンの密度倍率

図(5)-9 各月の実験(7月、9月、11月)でボトルへ入れた $>250 \mu\text{m}$ 動物プランクトンの密度倍率と実験終了時の鞭毛虫数、細菌数との関係。上段は鞭毛虫数、下段は細菌数を示す。左列は7月実験、中央列は9月実験、右列は11月実験の結果を示す。

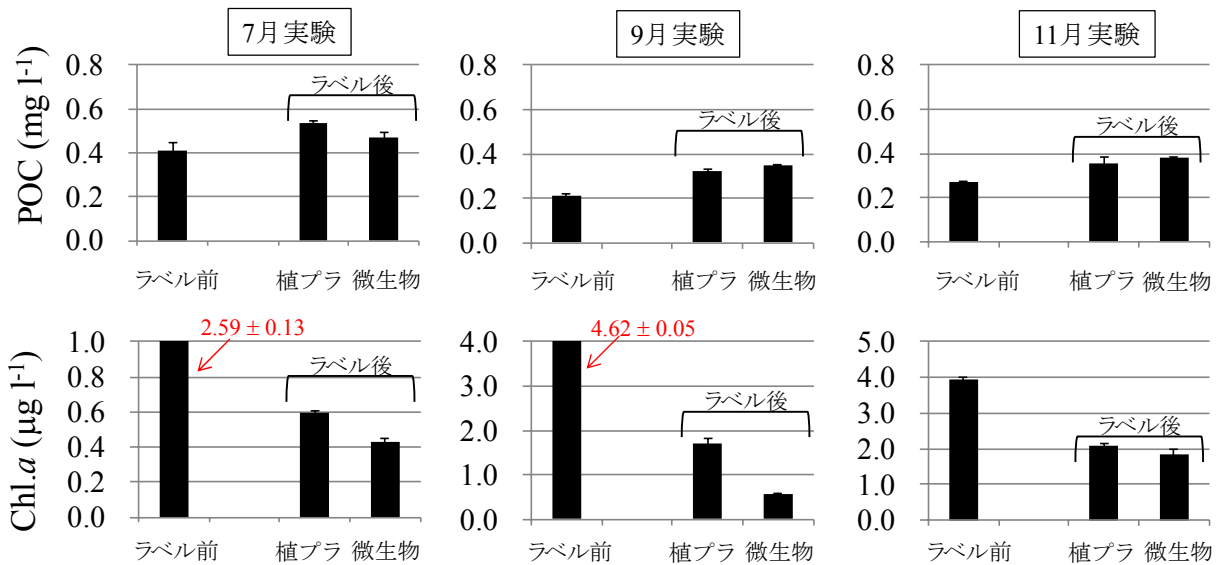
4. - 6 室内実験での植物プランクトンや微生物に対する動物プランクトンの比取込み速度の評価

¹³Cでのラベル前後でPOCを比較したところ、植物プランクトンをラベルした処理系と微生物をラベルした処理系では、ラベル前に比べてラベル後にPOCが増加していた(図(5)-10)。対照的にChl. *a*量は、両処理系ともにラベル前に比べてラベル後に大きく減少していた。これらの結果は、¹³Cのラベル後にPOC(動物プランクトンの餌の総量)に占める植物プランクトンの割合が低下したことを示し、動物プランクトンの餌の組成が、琵琶湖の現場に比べて微生物の割合が大きく増加したケースになっていた。従って、本実験結果は、餌の組成が異なるために現場の状況をそのまま反映するものではないが、植物プランクトンと微生物に対する比取込み速度を比較することで、生態系における微生物食物連鎖(微生物)の関与を高めた場合であっても、生食食物連鎖からのエネルギー(植物プランクトン)の方を動物プランクトンが利用するかを検証できると考える。

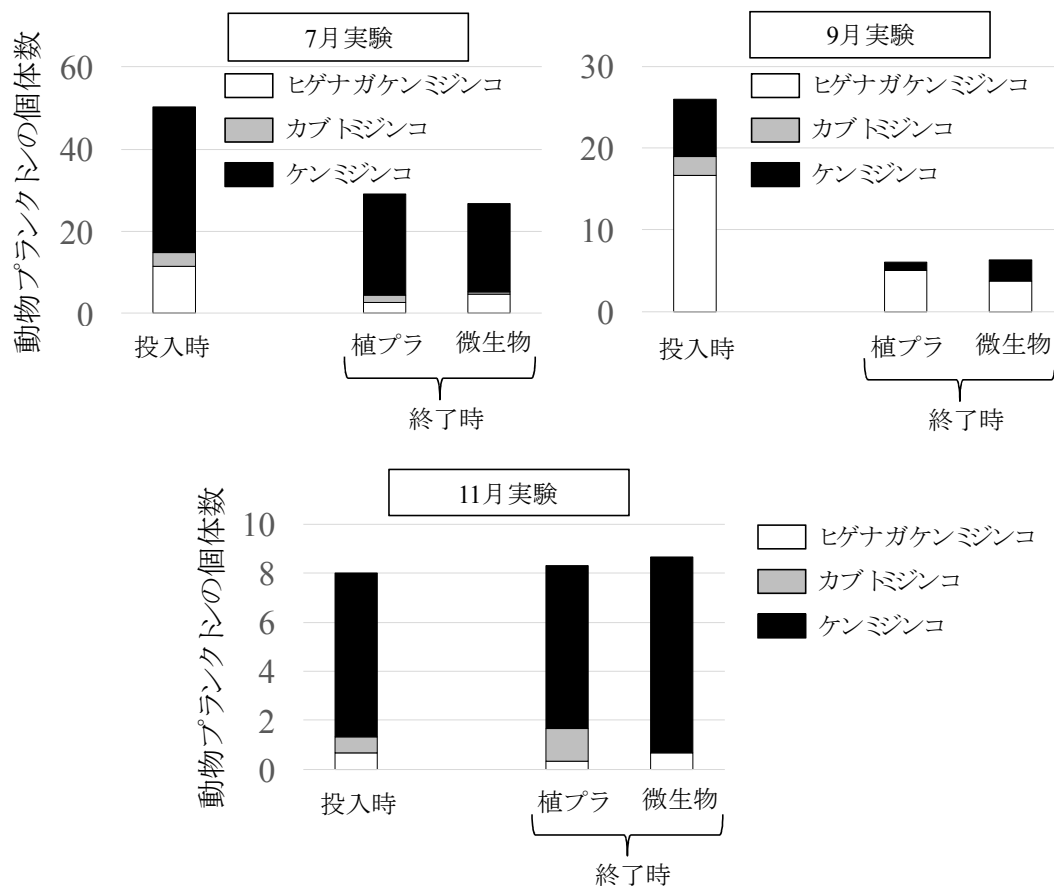
各月の実験における容器投入時(餌の摂食・捕食開始時)と実験終了時の動物プランクトンの個体数は、7月と9月の実験では、投入時に比べて終了時に大きく減少していた(図(5)-11)。これに対して、11月の実験では、投入時と終了時にほとんど変わらなかった。ヤマトヒゲナガケンミジンコやカブトミジンコは、ケンミジンコに比べて餌不足や物理的ストレスに弱い。今後、同様の実験を行うにあたっては、実験時における動物プランクトンの死亡率を低下させることが課題である。一方、動物プランクトンの種組成については、どの月の実験でも、投入時と終了時でほとんど差がなかった。

9月と11月の実験では、実験終了時における動物プランクトンの生存数が少なかったため、同処理系の3つの容器(繰り返し3つ、図(5)-3)の動物プランクトンを一つにまとめて炭素安定同位体比を測定した。各月の実験における微生物と植物プランクトンに対する動物プランクトンの比取込み速度を比較したところ、7月と9月の実験では、植物プランクトンに対しての方が微生物の方よりも比取込み速度が高かった(図(5)-12)。この結果は、7月と9月については、生態系における微生物食物連鎖(微生物)の関与を高めた場合でも、動物プランクトンは生食食物連鎖からのエネルギー(植物プランクトン)の方をより利用していたことを示す。これに対して、11月の実験では、動物プランクトンの比取込み速度は、植物プランクトンに対してよりも微生物の方が高かった。このことから、時期によっては、微生物も積

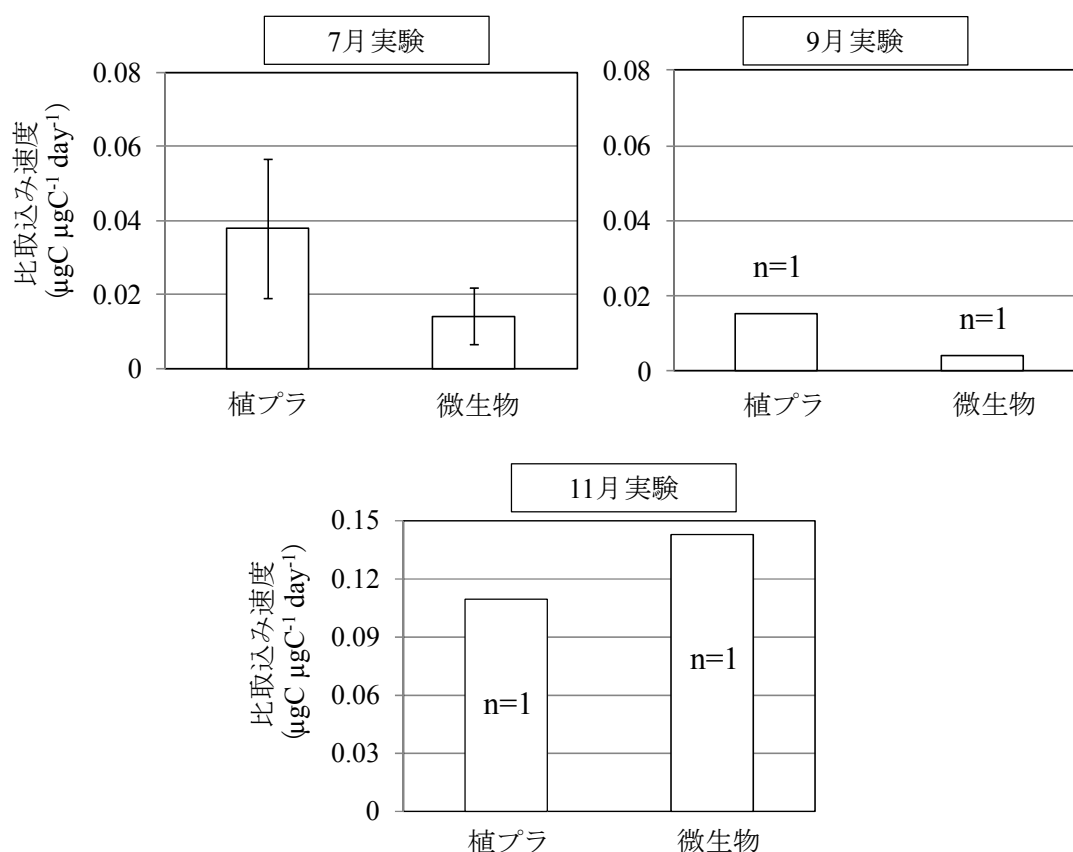
極的に利用される可能性が示されたが、比取込み速度の繰り返し数が1であるため、今後、再現性を検証する必要がある。11月の本実験では、同じ月の3. - 5の野外実験とは動物プランクトンの種組成が異なり、ケンミジンコが多かった。同野外実験の結果と本実験の結果から、餌となる微生物群集の組成も、動物プランクトンの餌利用に影響すると考えられる。



図(5)-10 各月の実験での ^{13}C ラベル前後におけるPOC、Chl. *a*量. 植プラは ^{13}C 炭酸水素ナトリウムで植物プランクトンをラベルした処理系を示し、微生物は ^{13}C グルコースで微生物をラベルした処理系を示す. 平均 $\pm$ SD.



図(5)-11 各月の実験における容器投入時（餌の摂食・捕食開始時）と実験終了時の動物プランクトンの個体数と種組成. 植プラは餌が ^{13}C ラベルした植物プランクトンの処理系を示し、微生物は餌が ^{13}C ラベルした微生物の処理系を示す. 3つの容器の平均値.



図(5)-12 各月の実験における微生物と植物プランクトンに対する動物プランクトンの比取込み速度。植プラは餌が ^{13}C ラベルした植物プランクトンの処理系を示し、微生物は餌が ^{13}C ラベルした微生物の処理系を示す。平均 $\pm$ SD。

4. - 7 調査・実験結果のまとめ

以上の調査・実験結果から、下記①～⑥のことが分かった。

- ① 琵琶湖の現在の動物プランクトンの現存量は、1980年代～1990年代とほとんど同じ水準である。
- ② 琵琶湖の動物プランクトンは、微生物（細菌や原生生物）を摂食・捕食する。
- ③ 細菌だけを摂食しても、動物プランクトンは再生産（産仔）できない。
- ④ すべての種類の原生生物（鞭毛虫）が動物プランクトンにとっての好適な餌になる訳ではなく、捕食しても生存、成長、再生産するための栄養を十分に得られない種類も存在する。
- ⑤ 現在の琵琶湖の動物プランクトンは、餌生物の中では、 $<20\ \mu\text{m}$ の小型の植物プランクトンを特に多く摂食している（7月、9月、11月のどの時期でも）。
- ⑥ 時期によっては（本サブテーマの実験結果では11月）、動物プランクトンは、 $20\text{--}45\ \mu\text{m}$ の植物プランクトンや微生物も餌として積極的に利用している。

これらの成果から、琵琶湖にとっての望ましい物質循環（餌の流れ）は、 $<20\ \mu\text{m}$ の小型の植物プランクトンから、動物プランクトンを経て、魚介類等の高次消費者へ繋がるルートであると考えられる。動物プランクトンは $1\text{--}50\ \mu\text{m}$ の粒子を好んで摂食・捕食すると知られることから¹⁷⁾、本サブテーマで提言する望ましい物質循環は、琵琶湖だけでなく、世界中の湖沼に当てはまると考える。今後は、小型の植物プランクトンが、琵琶湖で発生する環境条件やメカニズムを評価するとともに、それに付随してどの程度の動物プランクトンの生産量が発揮され得るのかの評価が必要である。さらに、その研究成果を活用して $<20\ \mu\text{m}$ の植物プランクトンを増やす検証実験ができれば、琵琶湖の物質循環が今以上に円滑になり、水質管理と豊かな生態系保全の両立に近づくと考える。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

動物プランクトンは、微生物や植物プランクトン等の生産者を摂食・捕食し、自らも捕食されることで魚介類の高次消費者へ栄養素（炭素や窒素等）を受け渡す物質循環の架け橋的な役割を果たす。そのため、動物プランクトンは、湖沼生態系における物質循環を把握するために、世界中の研究者に注目されてきた。琵琶湖でも1990年代までは、動物プランクトンの現存量、生産量、摂食量等を評価する野外調査・野外実験が多くなされていた^{e.g. 3), 19)}。しかし、それ以降は、実験室での培養実験に主眼を置いた研究だけになり、新たな移入種の出現²⁸⁾や環境変化（温暖化に伴う水温上昇等）が生じて、現場の動物プランクトンの情報はアップデートされてこなかった。本研究における琵琶湖の動物プランクトンの現存量、生産量、摂食・捕食量のデータは、不足していた情報をアップデートする大変貴重なものである。また、ここ最近（特に2016年と2017年）は、琵琶湖のアユの漁獲量が激減し、その原因解明と対策が必要とされている。動物プランクトンは、琵琶湖内のアユの餌資源であることから、本研究成果は、アユ等の水産資源に対する餌環境の影響評価を行ううえでも重要な情報であると考えられる。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

平成28年（2016年）～平成29年（2017年）にかけての琵琶湖のアユ漁は、過去に例がないほどの不漁であり、滋賀県庁では水産課を中心として「アユの不漁原因解明に係る検討会」が立ち上げられ、その原因解明と対策の協議がなされた。本サブテーマの担当者は、研究で得た動物プランクトンの密度、現存量、生産量に関わるデータの一部を検討会に情報提供した。

- ・平成29年5月16日 アユ不漁に関する原因解明に係る検討会
- ・平成29年7月7日 第2回アユの不漁原因解明に係る検討会
- ・平成29年9月25日 第3回アユの不漁原因解明に係る検討会
- ・平成29年11月30日 第4回アユの不漁原因解明に係る検討会
- ・平成30年3月23日 第5回アユの不漁原因解明に係る検討会
- ・平成30年8月31日 平成30年度第1回アユの不漁原因解明に係る検討会
- ・平成31年1月29日 平成30年度第2回アユの不漁原因解明に係る検討会

尚、他の年、地点、水深との比較のため、本環境研究総合推進費（5-1607）以外の研究（県費、地方創生関連事業）で得た結果も合わせた情報提供である。検討会では、関係部局より提出された資料をもとにアユの不漁について議論して原因の絞り込みを行い、平成29年12月14日滋賀県議会環境・農水常任委員会に報告された。

<行政が活用することが見込まれる成果>

特に記載すべき事項はない。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) 永田貴丸、廣瀬佳則、岡本高弘、早川和秀：日本水処理生物学会誌、54, 3（巻, 号）, 73-82（2018）, ミジンコの生存、成長および再生産に対する従属栄養性鞭毛虫の餌としての影響。

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

（２）口頭発表（学会等）

- 1) 永田貴丸、早川和秀：日本陸水学会第81回大会（2016）
「ミジンコ類と原生動物との捕食-被食関係について」
- 2) 永田貴丸、早川和秀：2017年日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会（2017）
「¹³Cトレーサーを用いたミジンコ類と微生物との捕食-被食関係の把握」
- 3) 永田貴丸、廣瀬佳則、岡本高弘、早川和秀：日本陸水学会第83回大会（2018）
「ミジンコの成長と再生産に対する微生物群の餌としての影響」

（３）知的財産権

特に記載すべき事項はない。

（４）「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 平成28年度びわ湖セミナー「在来魚介類のにぎわい復活に向けて」（主催：滋賀県琵琶湖環境科学研究センター、平成29年3月25日、コラボしが21、観客約100名）にて成果紹介
- 2) しが水環境ビジネス推進フォーラム研究・技術分科会「琵琶湖の生態系保全に向けた研究最前線」（主催：滋賀県琵琶湖環境部、平成31年2月12日、大津市勤労福祉センター、観客約50名）にて講演
- 3) 平成30年度びわ湖セミナー「生態系保全をめざして一湖の水質と生き物のつながり」（主催：滋賀県琵琶湖環境科学研究センター、平成31年3月1日、ピアザ淡海、観客約170名）にて成果紹介

（５）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

（６）その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) 永田貴丸、池田将平、一瀬諭、伴修平、藤原直樹、古田世子、木村道德：琵琶湖環境科学研究センター研究報告書，13，47-60（2017）在来プランクトン食魚の餌資源評価に関する研究
- 2) K. JÜRGENS, S. A. WICKHAM, K. O. ROTHHAUPT, B. SANTER: Limnol Oceanogr, 41, (8), 1833-1839 (1996) Feeding rates of macro- and micro-zooplankton on heterotrophic nanoflagellates
- 3) J. URABE, M. NAKANISHI, K. KAWABATA: Limnol Oceanogr, 40, 232-241 (1995) Contribution of metazoan plankton to the cycling of nitrogen and phosphorus in Lake Biwa
- 4) E. MACCAULEY: J. A. DOWNING, F. H. RIGLER (eds.), A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters, 2nd edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 228-265 (1984) The estimation of the abundance and biomass of zooplankton in samples
- 5) K. KAWABATA, J. URABE: Freshwater Biol, 39, 199-205 (1998) Length-weight relationships of eight freshwater planktonic crustacean species in Japan
- 6) J. URABE, Y. WATANABE: Oecologia, 82, 362-368 (1990) Influence of food density on

- respiration rate of two crustacean plankters, *Daphnia galeata* and *Bosmina longirostris*
- 7) H. ADALSTEINSSON: Oikos, 32, 162-194 (1979) Zooplankton and its relation to available food in Lake Mývatn
 - 8) T. HANAZATO, M. YASUNO: Hydrobiologia, 124, 13-22 (1985) Population dynamics and production of cladoceran zooplankton in the highly eutrophic Lake Kasumigaura
 - 9) H. H. BOTTRELL, A. DUNCAN, Z. M. GLIWICZ, E. GRYGIEREK, A. HERZIG, A. HILLBRICHT-ILKOWSKA, H. KURASAWA, P. LARSSON, T. WEGLENSKA: Norw J of Zool, 24: 419-456 (1976) A review of some problems in zooplankton production studies
 - 10) R. A. ALEVRAS: Oregon State University, Master's thesis (1970) A comparison of the reproductive rates of zooplankton in east and paulia lakes
 - 11) X. LIU, D. BEYREND-DUR, G. DUR, S. BAN: Limnology, 15, 85-97 (2014) Effects of temperature on life history traits of *Eodiaptomus japonicus* (Copepoda: Calanoida) from Lake Biwa (Japan)
 - 12) 中野伸一: 日本生態学会誌, 50, 41-54 (2000) 湖沼有機物動態における微生物ループでの原生動物の役割
 - 13) 中野伸一: 原生動物学雑誌, 48, 21-30 (2015) 湖沼・海洋沖帯の微生物ループにおける原生生物の生態学的役割
 - 14) 永田貴丸、廣瀬佳則、岡本高弘、早川和秀: 日本水処理生物学会誌, 54, (3), 73-82 (2018) ミジンコの生存、成長および再生産に対する従属栄養性鞭毛虫の餌としての影響
 - 15) N. B. SNOW: Limnol Oceanogr, 17, (6), 909-912 (1972) The effect of season and animal size on the caloric content of *Daphnia pulicaria* Forbes
 - 16) 大槻晃: 日本微生物生態学会 (編集), 微生物の生態13化学的手法をめぐって, 学会出版センター, 東京, pp. 111-124 (1985) ^{13}C , ^{15}N トレーサの同時使用による霞ヶ浦における炭素・窒素動態の研究
 - 17) C. BRÖNMARK, L. A. HANSSON: Oxford University Press, (2018) The biology of lakes and ponds (third edition)
 - 18) N. KISHIMOTO, S. ICHISE, K. SUZUKI, C. YAMAMOTO: Limnology, 14, 117-128 (2013) Analysis of long-term variation in phytoplankton biovolume in the northern basin of Lake Biwa
 - 19) M. KAGAMI, T. YOSHIDA, T. B. GURUNG, J. URABE: Oecologia, 133, 356-363 (2002) Direct and indirect effects of zooplankton on algal composition in in situ grazing experiments
 - 20) D. MARTIN-CREUZBURG, B. BECK, H. M. FREESE: FEMS Microbiol Ecol, 76, 592-601 (2011) Food quality of heterotrophic bacteria for *Daphnia magna*: evidence for a limitation by sterols
 - 21) S. J. TAIPALE, M. T. BRETT, K. PULKKINEN, M. J. KAINZ: FEMS Microbiol Ecol, 82, 50-62 (2012) The influence of bacteria-dominated diets on *Daphnia magna* somatic growth, reproduction, and lipid composition
 - 22) S. J. TAIPALE, M. T. BRETT, M. W. HAHN, D. MARTIN-CREUZBURG, S. YEUNG, M. HILTUNEN, U. STRANDBERG, P. KANKAALA: Ecology, 95, 563-576 (2014) Differing *Daphnia magna* assimilation efficiencies for terrestrial, bacterial, and algal carbon and fatty acids.
 - 23) R. W. SANDERS, K. G. PORTER: Limnol Oceanogr, 35, 188-191 (1990) Bacterivorous flagellates as food resources for the freshwater crustacean zooplankter *Daphnia ambigua*
 - 24) A. VÉRA, C. DESVILLETES, A. BEC, G. BOURDIER: Aquat Microb Ecol, 25, 271-279 (2001) Fatty acid composition of freshwater heterotrophic flagellates: an experimental study

- 25) M. T. BRETT, D. C. MÜLLER-NAVARRA: Freshwat Biol, 38, 483-499 (1997)
The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes
- 26) W. GELLER, H. MÜLLER: Oecologia, 49, 316-321 (1981) The filtration apparatus of
Cladocera: filter mesh-sizes and their implications on food selectivity
- 27) N. NIQUIL, G. BARTOLI, J. URABE, G. A. JACKSON, L. LEGENDRE, C. DUPUY , M. KUMAGAI:
Freshwat Biol, 51, 1570-1585 (2006) Carbon steady-state model of the planktonic food
web of Lake Biwa, Japan
- 28) J. URABE, S. ISHIDA, M. NISHIMOTO, L. J. WEIDER: Limnology, 4, 35-41 (2003)
Daphnia pulicaria, a zooplankton species that suddenly appeared in 1999 in the offshore
zone of Lake Biwa

III. 英文Abstract

Evaluation of organic carbon budgets in Lake Biwa for management of water quality and ecosystem

Principal Investigator: Kazuhide HAYAKAWA

Institution: Lake Biwa Environmental Research Institute (LBERI)
5-34 Yanagasaki, Otsu-City, Shiga 520-0022, JAPAN
Tel: +81-77-526-4800 / Fax: +81-77-526-4803
E-mail: hayakawa-k@lberi.jp

Cooperated by: University of Shiga Prefecture, National Institute for Environmental Studies, Kyoto University

[Abstract]

Key Words: Organic carbon, Microbial food web, Primary production, Chlorophyll fluorescence analysis, Bacterial production, Metagenomic analysis, Grazing bacteria, Zooplankton production, Biodegradation

We measured primary and secondary productions in Lake Biwa to clarify the contribution of microbial food web with respect to lake production, based on establishment of accurate and rapid methods to measure these productions in lakes.

An optical sensor system using PAM method was established to measure primary production rates. The estimation of daily primary production rates showed alterations in the production rates of phytoplankton because of seasonality and weather events.

The quantitative determination of bacterial production using the ^{15}N -deoxyadenosine method was established. Surveys of bacterial production rates were frequently conducted at the several sites in Lake Biwa, which clarified the spatial diversity and long-term decrease of bacterial activity in the lake. In the metagenomic analyses of bacterial communities in the lake, seasonal and vertical variations in the population and composition of bacteria and protists on a species and group level, respectively were determined including a large group of novel uncultured bacteria. The findings showed not only the information on the bacterial ecology in the lake but also the metabolic characteristics of bacteria by exhaustively sequencing of the fragmented DNA.

Examination of growth and production of zooplankton by predation of bacteria and protists in the culture and fields indicated that zooplankton production in Lake Biwa is more dependent on predation of phytoplankton than that of bacteria and protozoan. The analysis of the D/L ratios of amino acids showed that the recalcitrant dissolved organic matter in the lake has at least two different sources, including bacteria and eukaryotic phytoplankton. The biodegradability of organic matter in the lake can be evaluated using the BOD₂₈ method.

From a comprehensive perspective, we examined the changes in biomass and ecological integrity of each species caused by alteration of the nutrient loadings using a simple food chain

model via the Monte Carlo method for Lake Biwa. The results indicated that an increase in nutrient loading does not exactly induce fish resources. When the organic carbon budgets in the offshore zone of Lake Biwa were estimated based on each observation, the bacterial carbon demand was equivalent to about 50% of the primary production rates. However, bacterial production based on the subtraction of bacterial respiration was so small that the organic matter supply from microbial food chain was insufficient for superior predator. Thus, at present, the desirable flow of the food chain in Lake Biwa originates from small phytoplankton <20 μm to superior predators via zooplankton. It indicates the future direction of policy for lake conservation.