

## 2.2. 印旛沼におけるバクテリアの季節変動及びその要因 Factors affecting seasonal variation of bacteria in Lake Inba

学籍番号 5606006 石鍋 順子 (鏡味研究室)

### 1. 研究の背景と目的

バクテリアは湖沼内において無機栄養塩を直接取り込むことや有機物を分解することで成長することができる。千葉県に位置する印旛沼は水質の悪化が現在問題となっているが、有機物の主要な分解者であるバクテリアに関しては全く研究がなされていない。そこで本研究では、印旛沼におけるバクテリアの季節変動及びその変動要因を明らかにし、印旛沼の生態系の把握に役立てることを目的とした。バクテリアに影響を与える要因として、水温・溶存酸素濃度 (DO)・pH・窒素・リン・捕食者 (鞭毛虫) に着目した。

### 2. 研究の方法

調査は2009年の4月から10月にかけて、印旛沼船戸大橋付近にて週1回行った。水温・DO・pHについてはマルチ水質チェッカー (堀場製作所) を用いて測定した。バクテリア及び鞭毛虫の試料は、湖水を8%パラホルムアルデヒド (最終濃度4%) で固定し計数するまで冷蔵保存した。バクテリアの計数にはSYBR Green I (DNA染色剤)、鞭毛虫の計数にはプリムリン (タンパク質染色剤) を用いてそれぞれ染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。窒素及びリンの測定は、西條・三田村 (2004) の方法に従って行った。バクテリア数がどの要因と相関があるのかを調べるために、ステップワイズ重回帰分析 (StatView) を行った。なお、統計を行う際は水温以外のデータは対数  $\log(n+1)$  の値に変換した。

バクテリアの成長を制限する要因及び捕食圧を明らかにするために培養実験を3回 (8/6, 10/7, 10/21) に採取を行った。採取した湖水をバクテリアのみが入った湖水 (孔径  $0.7\mu\text{m}$  のフィルターで濾過) とバクテリア+捕食者が入った湖水 (孔径  $100\mu\text{m}$  または孔径  $5\mu\text{m}$  のフィルターで濾過) にし、孔径  $0.2\mu\text{m}$  のフィルターで濾過した湖水で1:6.6の割合でそれぞれ希釈した。これに、炭素・窒素・リン・all・control (何も加えない) の5種類の処理を施し、2日間培養した。

### 3. 結果と考察

印旛沼船戸大橋付近におけるバクテリア数は約  $1.8\sim 9.5\times 10^6\text{cells/ml}$  の間で変動した (図1)。その変動は4月下旬に最大となり6月にかけて減少し、7月上旬にピークを

形成した後は徐々に減少していく傾向だった。鞭毛虫数は、約  $0.9\sim 13.3\times 10^4\text{cells/ml}$  の間で変動し、4月上旬・6月中旬・9月上旬にピークを形成した (図1)。バクテリア数の変動の74%は、pH・懸濁リン・鞭毛虫数によって説明された。湖沼の表層では、植物プランクトンの活発な光合成作用により二酸化炭素が消費され、その結果pHが上がる (西條・三田村 2004)。したがって植物プランクトンの活発な時はpHが上がり、懸濁リン (植物プランクトンの体内に含まれるリン) も増加する。このときバクテリアは植物プランクトンが生産した有機物を分解することによって成長でき、結果的にpH・懸濁リンと正の相関関係があったと考えられる。一方、鞭毛虫数とは負の相関関係があり、バクテリアの密度は鞭毛虫による捕食によって制限されることが示唆された。

3回の培養実験では、8/6はリン、10/7はall、10/21は炭素・窒素・allを加えたときにそれぞれバクテリアの成長が促進された。時期によって成長を促進する栄養塩が異なったのは、そのときの印旛沼の栄養条件が異なることや、バクテリアの種構成が異なっているためだと考えられる。また、8/6と10/21の実験では捕食圧が強かったが、10/7の実験ではむしろ捕食者の存在によってバクテリアは増加した。したがって、鞭毛虫などの捕食者はバクテリアを捕食して減少させるだけではなく、栄養塩の回帰によってバクテリアを増加させることもあると考えられる。

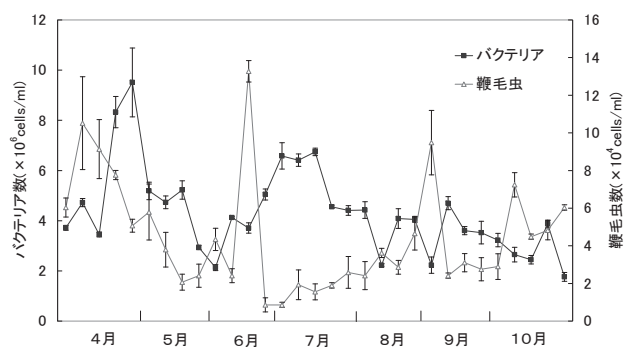


図1: 船戸大橋付近におけるバクテリアと鞭毛虫の変動

<参考文献>

西條八東, 三田村緒佐武 (2004) 新編 湖沼調査法

## 23. 印旛沼におけるジュンサイハムシによるオニビシの被食過程について Grazing process of leaf beetle, *Galerucella nipponensis*, on aquatic plant, *Trapa natans* L. var *japonica*, in lake Inba.

学籍番号 5606029 小林 達也 (鏡味研究室)

### 1. 研究の背景と目的

オニビシは一年生の浮葉植物で、湖底及び水中に根をはり、水面に葉をロゼット状に展開して群落を形成する。千葉県印旛沼では80年代から大発生して水面を覆い尽くし、漁船の操業に支障をきたしたため1987年～1995年に大規模なオニビシの刈り取りを行った。しかしその後、水質の悪化が発生していることからオニビシがリン等の栄養塩を吸収していると考えられる(小林・木内・平間 1995)。そこで本研究では、印旛沼内に存在するオニビシの葉面積・乾燥重量・リン含量を測定し、オニビシの生物量とリンの吸収量を推定した。また、オニビシの葉を捕食する陸生昆虫、ジュンサイハムシの密度と捕食量を測定することによりジュンサイハムシにより湖外に運ばれる物質量を推定した。

### 2. 研究の方法

調査は、西印旛沼のオニビシ群落が形成されている一本松湖岸で6月30日、7月24日、8月13日、9月8日、10月2日、10月19日の6回行った。

現地で1m<sup>2</sup>中のジュンサイハムシの個体数とオニビシのロゼット数の計数を行った。またオニビシのサンプルを持ち帰り、研究室で葉面積と乾燥重量を測定し、生物量を算出した。被食量は被食跡から推定した。さらにオニビシに含まれるリン含量を測定した。

### 3. 結果と考察

オニビシの生物量は、6月～8月は約36g/m<sup>2</sup>とほとんど変化が見られなかったが、9月に急増し85g/m<sup>2</sup>と最大の生物量となり、10月は減少して10月末に消滅した(図1)。

ハムシの個体数は、幼虫は7月に、成虫は8月にピークがみられた(図2)。10月には、越冬個体として陸地に移動したため成虫・幼虫ともに観察できなかったと考えられる。

オニビシのハムシによる被食量は、8月に3g/m<sup>2</sup>と最も多くなった(図3)。オニビシの重量当りのリン含量(0.8±0.2g/m<sup>2</sup>)及び印旛沼のオニビシ群落の総面積から算出して、印旛沼全体のオニビシの年間リン吸収量は1271kg、ハムシの年間リン吸収量は66.4gとなった。印旛沼全体の湖水に含まれるリンの総量が1964kgのため、湖水中のリンの約60%を吸収し、ハムシへと5%が転換されて系外へと運ばれたと推察される。

ン約60%を吸収し、ハムシへと5%が転換されて系外へと運ばれたと推察される。

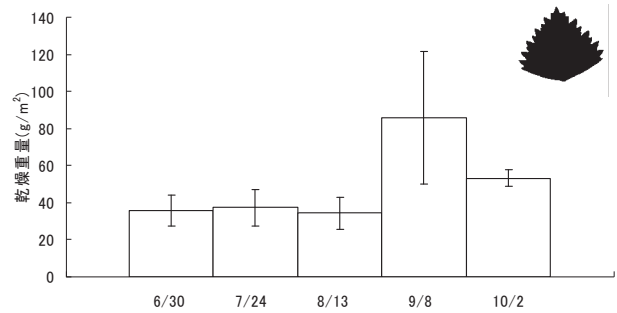


図1 オニビシの生物量(g/m<sup>2</sup>)の変化

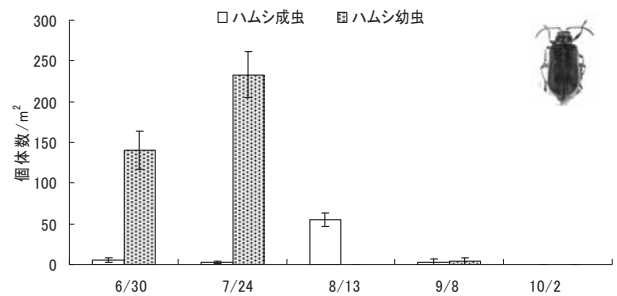


図2 ハムシの個体数/m<sup>2</sup>の変化

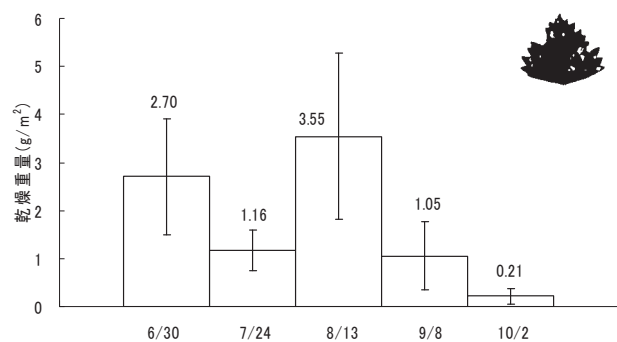


図3 オニビシのハムシによる被食量(g/m<sup>2</sup>)の変化

<参考文献>

小林節子・木内浩一・平間幸雄(1995) 印旛沼のオニビシ刈り取りによる水質影響調査、千葉県水保研年報(平成7年度)、135~140。

## 24. 印旛沼における真菌類種組成の季節変動 Seasonal change of fungal species composition in Lake Inba

学術番号 5606036 佐藤 麻未 (鏡味研究室)

### 1. 研究の背景と目的

真菌類は、生物に寄生し栄養を得る寄生性の種類と有機物を分解する腐生性の種類があり、陸上の物質循環過程において真菌類の果たす役割は極めて大きいと認識されている。分類上ツボカビ門、接合菌門、子囊菌門、担子菌門の4大系統群で構成されている。一方、湖沼では顕微鏡観察や培養が難しく、その生態についてあまり研究されていない。

そこで本研究では、DGGE法(変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法)、クローンライブラリ法という分子学的手法によって、印旛沼における真菌類の種数の季節変動と種組成を求めることにした。

DGGE法とクローンライブラリ法は、16S rRNA配列をターゲットとしたプライマーによって、環境中の多くの真菌類DNAを培養せずに検出できる。DGGE法とは、生物群集の構成種を多数のバンドとして可視化できるので、環境中に存在する菌類の種数を求められる。一方、クローンライブラリ法とは、検出したDNAを大腸菌に組込むことによって、出現した真菌類の種名とその出現頻度を求めることができる。

本研究では、DGGE法、クローンライブラリ法、蛍光顕微鏡観察を併用することで、印旛沼における真菌類の種組成とその存在形態を確認した。

### 2. 研究の方法

2009年4月～10月の間、1、2週間に1回印旛沼船戸大橋付近の棧橋からバケツで湖水を採集し、生物をフィルターで濾過捕集した。湖水中の生物をそのまま孔径0.2μmのフィルター上に濾過捕集する他に、ツボカビの遊走子を含む小型菌類(<5μm)を0.2μmのフィルター上に捕集した。その後、フィルターに濾過捕集した生物のDNAを抽出した。抽出したDNAは、PCR法と濃縮を行った。その中で、真菌類のDNA量が十分に確認できたもののみDGGE法を行い、バンドの検出から真菌類の出現種数の季節変動を把握した。

クローンライブラリ法では、6/17、7/29、10/29の試料を使い、クローニング、シーケンスにて塩基配列の決定を行った後、BLAST検索にて真菌類の種組成を求めた。

また、湖水中に存在する真菌類を真菌類のキチン質を

染色するCalcofluor White染色液を用いて、蛍光顕微鏡下で観察した。

### 3. 結果と考察

DGGE法の結果、印旛沼の5μm以下の真菌の種数は、6月の終わりから7月まで、各調査について最高8種類、全調査を通じて合計14種確認された。

クローンライブラリのBLAST検索の結果、6月、7月、10月の5μm以下のサンプルにおいてツボカビ門は半数以上を占め、生態的に重要な位置を占めていることが確認できた。その他、子囊菌門、担子菌門、コウマクノウキン門なども検出された(図1)。

顕微鏡観察の結果、印旛沼に優占している珪藻に3種類のツボカビが寄生していた(図2)。また、4種の緑藻にもツボカビの寄生が観察された。

真菌類のツボカビ門の出現頻度が湖沼において高い事、顕微鏡観察においてツボカビが植物プランクトンの優占種に寄生している事が確認された事からも、ツボカビは、湖沼の物質循環過程において重要な位置を占めると考えられる。一方、ツボカビ門以外の真菌類が、湖沼においてどのように存在し、役割を果たしているのか不明であった。今後、湖沼における真菌類全体の物質循環、生物間相互作用においてどのような役割を果たすのか、さらに解析する必要がある。

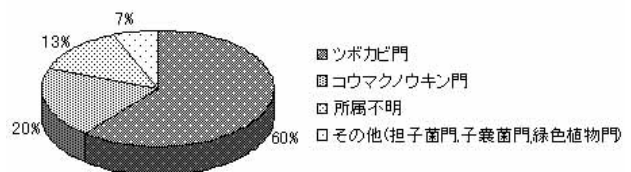


図1 菌類の各分類群の出現割合 2009.7.29の印旛沼船戸大橋付近の5μm以下の湖水試料のクローンライブラリを門レベルで分類し、円グラフで表した。クローンの総数は46である。

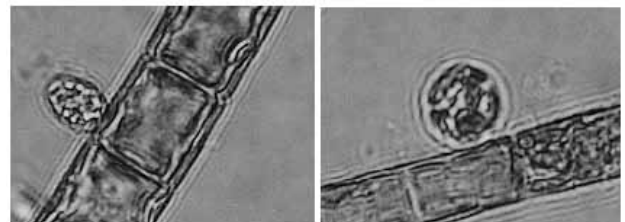


図2 *Aulacoseira granulata*に寄生するツボカビ

## 25. 印旛沼における植物プランクトンの成長制限要因の解明 Factors limiting Phytoplankton growth in Lake Inba.

学籍番号 5606069 廣瀬 豊 (鏡味研究室)

### 1. 研究の背景と目的

印旛沼は全国でも有数の富栄養湖として知られている。人口増加に伴う生活排水が流入により栄養塩濃度が高くなった結果、植物プランクトン生物量が増加した。本研究では、栄養塩が十分にあると予想される富栄養湖において、植物プランクトンの成長が何によって制限されているのかを解明する事を目的とした。

植物プランクトンの成長は水温、光条件、栄養塩濃度などの環境要因により決定される。今回は栄養塩に着目し、どの栄養塩が植物プランクトンの成長を最も制限しているかを調査した。湖水にケイ素、窒素、リン、3種の栄養塩全てを加え培養し、植物プランクトン成長を制限している要因と成長率を比較することで明らかにした。

### 2. 研究の方法

調査は西印旛沼船戸大橋にある栈橋で、週に一度の間隔で行った。植物プランクトンの種組成は顕微鏡で、全量はクロロフィル a 量として測定した。環境要因として水温と各種栄養塩 (N、P、Si) を分析した (西條・三田村,2004)。

培養実験では、培養中の栄養塩枯渇を防ぐため、培養する水は生物を除いた水 (<0.2 μm) と、捕食者を取り除いた植物プランクトンを含む水 (<100 μm) を 6:1 の割合で混合したものを使用した。培養水は栄養塩を加えないもの (control)、ケイ素 (Si)、窒素 (N)、リン (P)、3種全てを加えたもの (ALL) 5種類を3個ずつ用意し、計15個の100ml三角フラスコで培養した。栄養塩濃度はリン (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) : 1.5 μmol P/L、窒素 ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) : 20 μmol N/L、ケイ素 (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> · 9H<sub>2</sub>O) : 15 μmol Si/L として、培養時の温度は採水時の水温に合わせ、光量は 180 μmol/m<sup>2</sup>/s とした。日照時間は現地の日の出日の入り時刻に合わせた。培養中の植物プランクトン成長率は蛍光光度計で測定したクロロフィル a 増加量から、指数関数増殖をすると仮定して計算した。

### 3. 結果と考察

印旛沼における植物プランクトンの優占種は、春は珪藻類の *Aulacoseira granulata*、*A. ambigua*、夏はラン藻類の *Anabaena sp.* であった。クロロフィル a 濃度は週ごとに増

減を繰り返し、夏季に若干高くなる傾向があった。印旛沼の栄養塩濃度の季節変動は、リンは常に濃度が低かった。窒素とケイ素は比較的高い濃度で存在したが、窒素は8月に一時的に減少した。ケイ素は7月および9月に減少した。

植物プランクトンの成長率は、栄養塩を加えない control 条件では夏季に成長率が高い傾向を示し、冬に向かって成長率は下がった (図1)。栄養塩を加えた場合、リンと全ての栄養塩を加えた時に成長率が高くなる結果が出たが、最も高い成長率を示した8月では窒素を加えた成長率の方が高くなった。以上の結果から印旛沼の植物プランクトンは富栄養化したにも関わらず、未だにリンにより成長が制限されていることが明らかとなった。栄養塩を加えた条件 (ALL) では、成長率が季節的に大きく変動したが、その変動は水温など他の環境条件が効いていると考えられた。

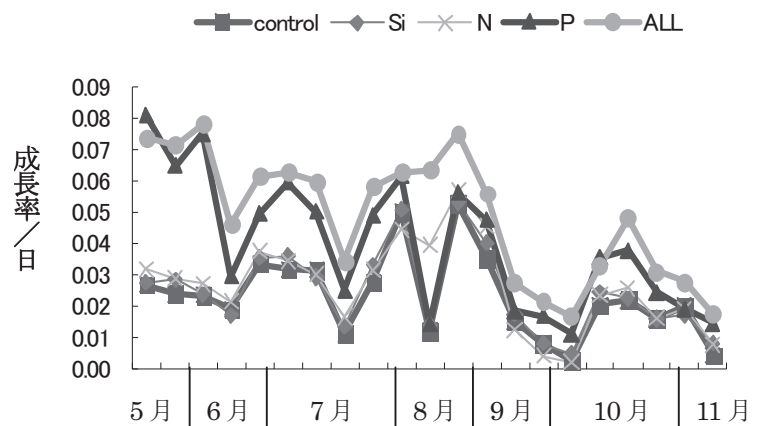


図1 植物プランクトン成長率の季節変動

<参考文献>

西條八東・三田村緒佐武 新編 湖沼調査法 (2004)



## 26. ヤブツバキ葉上リテイズマ科菌類にみられる個体群サイズの地理的変異 Geographical variation of Rhytismataceae population size on *Camellia japonica* leaf litter

学術番号 5606078 松倉 君予 (鏡味研究室)

### 1. 研究の背景と目的

生物種の地理的な分布は、地史や気候、種間関係等の影響を受けて形成されていることが一般的に知られている。菌類においても、落葉分解菌の一種で、気候要因と相関する地理的な分布のパターンが明らかにされている (Tokumasu 2001)。しかし、微生物である菌類は肉眼での観察が容易でなく、生息域の特定が困難であるため、地理的な分布が明らかにされている種は限られている。さらに、定量的な評価を行うことも難しいため、生息場所の利用をめぐる種間関係が地理的な分布に及ぼす影響は、殆ど明らかにされていない。これらを検討するために、ヤブツバキ葉上に生息する代表的なリグニン分解菌であるリテイズマ科菌類に着目した研究を行った。本科菌類はリグニンの分解に伴い落葉を漂白化させ (小出 2004)、他種と対峙した際に境界部に黒色の帯線を形成する (Hirose and Osono 2006、図1)。これらの特徴から、落葉上の各種の漂白面積を測定することにより、各種の個体群サイズを算出することができる。本研究では、ヤブツバキ葉上リテイズマ科菌類にみられる個体群サイズの地理的な分布パターンを明らかにすることを最終的な目標とし、その第一段階として、ヤブツバキ自生地北限と南限で個体群サイズの比較を行うことを目的とした。

### 2. 研究の方法

本研究では、帯線を境界とする落葉漂白部の面積を、葉上におけるリテイズマ科菌類各種の個体群サイズとして定義する。これを基に、以下の式の通り個体群サイズ比を算出し、採取地間で比較を行った。

$$\text{個体群サイズ比} = \frac{\text{各種の個体群サイズ (m}^2\text{)}}{\text{リテイズマ科菌類の総個体群サイズ (m}^2\text{)}}$$

ヤブツバキ落葉の採取は、国内のヤブツバキ天然分布域の北限にあたる青森県夏泊及び秋田県男鹿、南限の沖縄県沖縄島及び石垣島、緯度の点でそれらの中間に位置する千葉県銚子 (旭、猿田、外川) と館山 (那古、富士見、洲崎) の計 10 箇所で行った。種同定は子実体形態と rDNA の ITS 領域の塩基配列に基づき行った。また 15-30 度の異なる温度で分離菌株を培養し、菌糸成長特性を調べた。

### 3. 結果と考察

採取地には *Coccomyces sinensis* と *Lophodermium* sp. の少なくとも 2 種が分布し (図 1)、個体群サイズ比に地理的変異がみられた。すなわち北限では *C. sinensis* が優占し、南限では 2 種が共存して *Lophodermium* sp. が高い占有率

を示した (図 2)。分離菌株の培養では *C. sinensis* は 20-25 度、*Lophodermium* sp. は 25 度で最も菌糸成長速度が高く、各種の温度適性に相違がみられた。

これらの結果は、採取地の気温差が落葉後の菌糸成長に影響し、個体群サイズの地理的変異をもたらした可能性を示唆している。各種の温度適性の違いは種間関係に影響を及ぼす可能性も考えられる。今後は採取地をさらに増やすことにより、地理的分布と各採取地の気候要因との関連性を詳細に検討したい。同時に、胞子発芽、菌糸成長、子実体形成といった各菌種が有する生活史の特性や種間関係に気候要因が及ぼす影響を調べるために、室内培養実験や野外操作実験を行いたい。

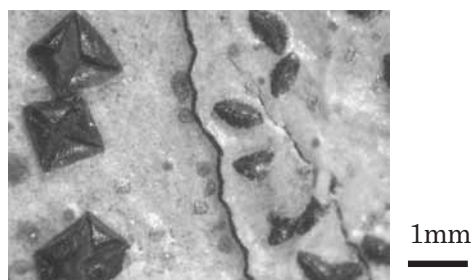


図1 *C. sinensis* (左) と *Lophodermium* sp. の子実体及び、コロニーの境界に生じた帯線

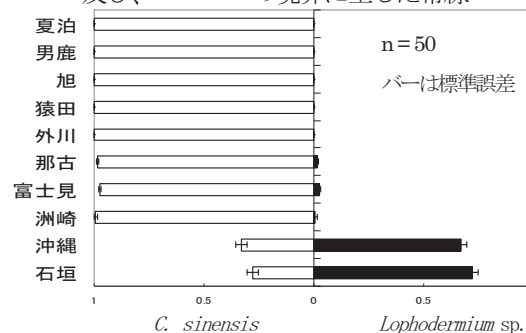


図2 地域間でみられた個体群サイズ比の変異

#### <参考文献>

- 小出 奏 (2004) ヤブツバキ落葉の初期分解過程と菌類の役割, 京都大学大学院農学研究科 修士論文, 86 pp
- Hirose D. and Osono T. (2006) Development and seasonal variations of *Lophodermium* populations on *Pinus thunbergii* needle litter, *Mycoscience* 47, 242-247
- Tokumasu S. (2001) Geographical distribution of *Sporidesmium goidanichii* in pine forest of Japan, *Mycoscience* 42, 575-589

## 27. 印旛沼における大型動物プランクトンの季節遷移 Seasonal succession of macrozooplankton in Lake Inba

学籍番号 5606096 渡辺 実和 (鏡味研究室)

### 1. 研究の背景と目的

動物プランクトンは、主に植物プランクトンを餌とする草食性の種類と小型の動物プランクトンを捕食する肉食性の種類がいる。これらの動物プランクトンはモツゴなどの小型の魚により捕食される。よって動物プランクトンは植物プランクトンを食べることで湖沼の水質に影響を及ぼし、魚に捕食されることで漁獲量と大きく関わる重要な構成要素であると考えられる。しかし印旛沼においては動物プランクトンについて定量的な調査がなされておらず、その動態や被食・捕食の関係が明らかではない。本研究では、動物プランクトン(100 $\mu$ m以上)の個体数の季節変動を把握すること、また大型動物プランクトンの被食・捕食関係を明らかにすることを目的とした。

本研究では大型動物プランクトンの個体数の計数の他に、食物網解析のために窒素の安定同位体分析を行った。窒素の同位体比 $\sigma N^{15}$ の値は栄養段階が一つ上がるごとに約3.4‰上昇することが知られているため、(Minagawa and Wada 1984)窒素同位体比から、各生物の栄養段階を推定した。

### 2. 研究の方法

2009年6月から11月にかけて西印旛沼船戸大橋付近の定点において週1回調査を行った。動物プランクトンは湖水30Lを目あい100 $\mu$ mのプランクトンネットで濾すことで採集した。試料は濃縮し、顕微鏡下で動物プランクトンの個体数について種ごとに計数を行った。またフクロワムシ(*Asplanchna brightwelli*)については消化管内容物を観察した。

食物網を把握するための窒素の安定同位体の測定に用いた試料については4月から9月まで北印旛沼1地点、西印旛沼3地点の定点にて月1回調査を行った。試料は植物プランクトン(0.7 $\mu$ mから100 $\mu$ m)、動物プランクトン小(100 $\mu$ mから300 $\mu$ m)動物プランクトン大(300 $\mu$ m以上)にサイズ分けをした。

### 3. 結果と考察

印旛沼ではワムシが優占的に出現していた(図1)。初夏にはフクロワムシ(*Asplanchna* spp.)が優占し、その後はフクロワムシの個体数減少と共にゾウミジンコ

(*Bosmina longirostris*)など様々な種が出現した(図1)。そのことから、フクロワムシが捕食により他の動物プランクトンの個体数に影響を与えていることが推察された。フクロワムシの消化管内容物の観察では、消化管内にツボワムシ(*Brachionus* sp.)とカメノコワムシ(*Keratella* sp.)が見られ、フクロワムシが実際にこれら他のワムシを捕食していることが確認された。

安定同位体測定の結果は、フクロワムシとオナガケンミジンコ(*Cyclops vicinus*)が多く含まれる300 $\mu$ m以上の動物プランクトンの $\sigma N^{15}$ がゾウミジンコやフクロワムシ以外のワムシ類の多く含まれる100 $\mu$ mから300 $\mu$ mの動物プランクトンの $\sigma N^{15}$ より約3.1‰高い値となった。このことから、フクロワムシとオナガケンミジンコが他の小型動物プランクトンを捕食していると考えられる。

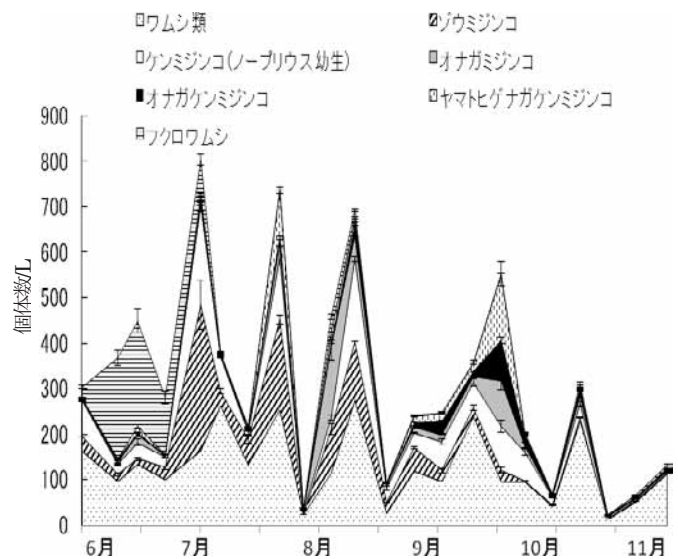


図1 動物プランクトンの個体数

<参考文献>

Minagawa, M and Wada, E. (1984) Stepwise enrichment of  $^{15}N$  along food-chains – further evidence and the relation between  $^{15}N$  and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48: 1135–1140