

Kobayashi, Y., Y. Hodoki, K. Ohbayashi, N. Okuda and S. Nakano (2015)  
Changes in bacterial community structure associated with  
phytoplankton succession in outdoor experimental ponds  
*Plankton Benthos Res.* **10**: 34-44.

野外実験池における植物プランクトン相の遷移に伴った細菌群集構造の変化

湖沼の沖合において、細菌プランクトンはプランクトン食物網の物質循環で重要な役割を担っている。これまで、植物プランクトンの優占種と、種々の細菌系統群との関係についての研究は、ほとんどがPCR-変性勾配ゲル電気泳動法 (PCR-DGGE) を用いて行われてきた。PCR-DGGE の利点は、得られたDNA バンドの位置から細菌の系統群を特定できる点である。しかし、結果がDNA の抽出やPCR の手順に影響されやすく真の姿を示しているか疑問が残る。細菌の系統群を調べる別の方法としてCARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence *in situ* Hybridization) がある。PCR を用いずに、種々の系統群の細菌の存在量を推定できるが、DNA の塩基配列の決定を通じて細菌の系統群を特定できない。PCR-DGGE とCARD-FISH の両方を用いることにより、量的に細菌の群集構造と優占種を特定できると考えられるが、実際に植物プランクトンの優占種の変化に伴う細菌群集構造の変化についての知見は未だ乏しい。そこで本研究では、両者の関係を調べるために実験を行った。

実験は、京大大学生態学研究センター内の2つの実験池で行った。実験池Aには*Microcystis* のブルームが入った琵琶湖の湖水3m<sup>3</sup>を、細胞密度を約1.8×10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup>に濃縮して導入し、実験池Bはコントロールとして植物プランクトンを導入しなかった。また、両実験池では、成分を調整したMA 培地を添加した。水試料は2009年の8月20日から11月19日にかけて、週1回または2回採取した。採水時は、水温とpHをそれぞれ棒状温度計とpHメーターで測定した。水試料中の硝酸塩、亜硝酸塩、溶存無機リン (DIP) 濃度はオートアナライザーを用いて分光分析で測定した。アンモニウム濃度はTD-700 フルオロメーターを用いて蛍光分析により測定した。クロロフィルa濃度は分光蛍光光度計で測定した。細菌の計数は、細胞を4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) で10分間染色し、落射蛍光顕微鏡を用いて行った。*Microcystis* の細胞はグルタルアルデヒドで、他の植物プランクトンの細胞はアセトアルデヒドでそれぞれ終濃度1%になるよう固定し、顕微鏡下で計数した。CARD-FISHでは、細胞を37°Cで一晩穏やかに孵かし、HRP (Horseradish Peroxidase) で標識したプローブをハイブリダイズした。ハイブリダイズさせた細胞とDAPI陽性細胞は顕微鏡下で識別し計数を行った。DGGEは、細菌の16S rRNA 遺伝子をPCRで増幅し、電気泳動は50V、60°Cの条件で16時間行った。明確なDNAバンドは切り出してその塩基配列を分析した。

水温は、実験池A,Bでいずれも31°Cから10.8°Cへと徐々に低下していった。一方、pH、DIP濃度及びDIN濃度は変動していたが、季節性等の特徴的なパターンは認められなかった。実験池Aには*Microcystis* を導入したが、クロロフィルa濃度は実験2週間目以降ではほぼ安定しており、植物プランクトンの組成としては*Microcystis aeruginosa* が優占し、*Aphanizomenon issatschenkoi* が次いで多かった。実験池Bでは*Planktothrix* 属のみが優占した。藍藻類が優占した後は、どちらの実験池でも緑藻類が優占した。細菌はどちらの実験池でもα-proteobacteriaが増加した。実験池Aでは当初β-proteobacteriaと*Cytophaga-Flavobacteria* 系統群 (CF-系統群) が優占しており、実験76日目には次いでα-proteobacteriaが優占した。実験池Bでは期間中、α-proteobacteriaとCF-系統群が優占した。しかし、実験の半ばでCARD-FISHによってβ-proteobacteriaが多く計数された。実験池Aでは*Verrucomicrobia* が実験14日目から76日目の細菌密度の1-5%を占めていたが、実験池Bでは検出されなかった。DGGEによって検出されたDNAバンドの数をみると、実験池Aではeubacteriaで13-27、α-proteobacteriaで9-21、CF-系統群で4-13であり、実験池Bでは順に12-28、5-14、6-14であった。植物プランクトンと各細菌の系統群との関係を検討したところ、緑藻の存在量とα-proteobacteriaの種数に有意な関係が見出された。また*Microcystis* を入れた実験池Aにおいては、DGGEによりミクロスピリウム分解細菌の塩基配列が2つ検出された。さらに、実験池Aにおける*Microcystis* のブルーム発生時に*Verrucomicrobia*が増加したが、実験池Bではこのグループは検出されなかった。こうした結果から、植物プランクトン相の遷移は、細菌の群集構造の変化に影響を与える重要な要因の1つであると示唆された。

大洞 裕貴

\*\*\*\*\*

今回のゼミ(10月26日(月)9:30~, 204にて)は成果報告です。