

水域の環境変化（特に重金属や高分子化合物の負荷）に対する バクテリア群集の応答——中間報告——

Microbial response to the perturbation in aquatic environments

- 代表研究者 信州大学医療技術短期大学部助教授 加藤 憲 二
Assoc. Prof., School of Allied Medical Sci., Shinshu Univ.
Kenji KATO
- 協同研究者 岐阜大学医学部助手 山本 啓 之
Res. Assoc., School of Medicine, Gifu Univ.
Hiroyuki YAMAMOTO
- 信州大学諏訪臨湖実験所助教授 沖野 外輝夫
Assoc. Prof., Suwa Hydrobiological Station, Shinshu Univ.
Tokio OKINO
- 信州大学医療技術短期大学部教授 野本 昭 三
Prof., School of Allied Medical Sci., Shinshu Univ.
Shouzou NOMOTO

We attempted to assess bacterial response to the environmental perturbation from both stand points of their biomass and generic/species composition.

Recent studies in different aquatic ecosystems revealed that the bacterial biomass in number is very stable compared with other constituents of the ecosystem. Following this we examined bacterial behaviour under the artificial perturbation using meso-scale ecosystems built in a lake. Bacterial biomass changed little even by very drastic perturbation on primary producer from which bacteria primarily obtain their energy and carbon sources. The result suggests that bacteria sifted their energy and carbon sources from primary producer to the stocked ones in the water as dissolved organic materials.

Although it is very crucial to assess bacterial community structure in environmental study, there is not any suitable method yet. We first apply non radioisotope DNA-DNA hybridization technique to ecological study in this project. Some technical problems are overcome and we apply this technique to the natural samples.

研究の目的

さまざまな有機物の分解を担うバクテリアは、生態系の重要な一員である。とりわけ水界生態系においては、植物プランクトンなどによって、一次生産された有機物の30~60%もがバクテリアのパスを通過することが明らかとなってきた。水域の環境汚染の影響は、当然このバクテリアにも及んでいると考えられる。しかし、近年に至るまで、我々は、この天然のバクテリアを取り扱う適

当な生態学的方法を持ち合わせず、とりわけ種の同定については、今日に至るも適切で十分な手法がないため、環境変化に対するバクテリアの応答（対応）に関する歴史的な知見は皆無だといつてよい。

一方、バクテリアは分子遺伝学的に最も詳細に研究された生物であり、環境変化が遺伝子レベルに影響を及ぼしているか、否かを調べる事が可能になりつつある。手掛かりは、薬剤や重金属に

表1. 諏訪湖に設置した隔離水界の中のバクテリアの増殖速度 (μ : hour⁻¹) と倍加時間 (g: hour). 1 μ m 以下の分画では遮光による生態系攪乱開始 12 日目の 5 月 6 日, ENC-4 (対照の 1% に遮光) の μ は対照 (ENC-1, 2) にほぼ匹敵し, その 5 日後には遮光系 (ENC-4, ENC-5; 同 20%) と対照の間に増殖速度の差は認められない. 3 μ m 以下の分画はバクテリアの捕食者を含んでいたと思われるため, 結果の解釈が容易ではない。

Date	ENC-1		ENC-2		ENC-4		ENC-5		Lake		
	1- μ m	3- μ m	1- μ m	3- μ m	1- μ m	3- μ m	1- μ m	3- μ m	1- μ m	3- μ m	
6 May	μ	0.019	-0.053	0.058	-0.087	0.032 ¹	-0.126 ¹	0.006	-0.014	n.d.	n.d.
	g	36.5		11.9		21.7		115			
11 May	μ	0.019	0.033	0.053	-0.035	0.036	0.066	0.023	0.123	n.d.	n.d.
	g	36.5	21.0	13.1		19.3	10.5	30.1	5.6		
18 May	μ	0.011	n.d.	0.217	n.d.	0.094	n.d.	0.063	n.d.	0.089	-0.384
	g	64.4		3.2		7.4		11.0		7.8	
26 May	μ	0.022	0.004	0.103	-0.013	0.052	0.017	0.034	0.035	0.174	0.085
	g	31.5	173	6.7		13.3	40.8	20.4	19.8	4.0	8.2

1: Estimated from 4 hour incubation. n.d.; not determined

対して耐性のあるバクテリアは, それを核外遺伝子 (プラスミッド) によっているケースが多いということである。

そこで, さまざまな栄養・環境汚染段階の水域からバクテリアを採取し, より直接的な方法により, 構成種の多様性を, また, 核外遺伝子の保有の有無を明らかにし, あわせて, その水域の環境特性を特に有機物と重金属に焦点を合わせて明らかにすることから, バクテリアの環境変化に対する応答の仕方についての基礎的なデータを集め, そのメカニズムを探ることを本研究の目的とする。

研究の経過と成果

有機物の分解代謝を中心に据えて, バクテリアの生態をより直接的な方法によって理解することを目的とした本研究は, 大きく分けて次の二つの部分から成る。一つは, 対象とする水域でのバクテリアの活性や増殖特性についての, より正確な情報を集積することである。この点に関する我が国の湖沼や河川における情報集積量は, 欧米諸国に比べ明らかに少ない。環境問題を考えるに際しても, 欧米の水系で得られた数値をそのまま我が国の環境に当てはめるわけには行かないと考えられる。情報の集積は不可欠で, かつ緊急であろう。もうひとつは, 近年めざましい発展を遂げた微生物遺伝学や分類学の手法を導入して, 天然のバクテリア群集の構造の解析に新しいアプローチを試

みることである。

(1) 環境攪乱に対するバクテリア群集の増殖特性の変化

1980 年代に入って, ³H ラベルされたチミジンを前駆体とした DNA の合成から天然水中のバクテリアの合成速度を推定する方法が開発され, さまざまな水域でのバクテリアの増殖速度についての知見が集められつつある (参考論文-1)。そこで本研究では, 同一水系内に異なった環境条件を持つ中規模の水界生態系を作り (特定研究 (N) メソコスムによる水域生物相互作用系の実験的解析), これに種々の攪乱を加えて, バクテリアの現存量や増殖速度の変化を, 上記した方法などを用いて実験的に解析することを試みた。

我が国の代表的な富栄養湖である諏訪湖で実験は行なわれたが, この湖における春から秋にかけてのバクテリアの現存量 (細胞数) は, 湖水 1 m 当たり $1 \sim 2 \times 10^7$ 。倍加速度は, 数時間から 1 日であることが初めて明らかにされた (発表論文-1)。諏訪湖の湖水中には, バクテリアの増殖に必要な有機物が多量に存在する。浅い湖で, 多くの流入河川を持つ諏訪湖では, 有機物は, 流入河川から持ち込まれたものや, 湖底で植物プランクトンなどが分解され水中へ回帰してきたものなど, さまざまな供給源が考えられる。しかしながら諏訪湖においても, 水中の有機物濃度の低い海洋と同じように, 一次生産者・植物プランクトンが細

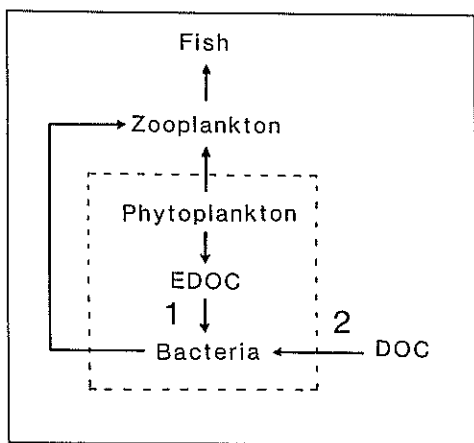


図1. 水圏生態系における炭素フローの概念図

胞外へ排出した有機物（光合成産物）が、水中のバクテリアの生産の半分以上を担っていることが認められている（参考論文-2）。

ここで、一次生産者として珪藻が優占する5月に、系への入射光量をコントロールの1%に制限し、光合成に大きなダメージを与えてみた。光の制限は、2か月足らずの実験期間中にはバクテリアの捕食者（動物プランクトン）には大きな影響を与えず、植物プランクトンの光合成活性は著しく低下した。しかしながら、上述したように、元来バクテリアの生産の多くが植物プランクトンの光合成活性に直接依存していたにもかかわらず、光制限下でもバクテリアの現存量の減少は小さく、増殖速度も遮光後およそ10日間で回復した（表-1）。このことから、バクテリア群集は、光制限という大きな環境条件の変動に対して、増殖に必要な有機物を、植物プランクトンの細胞外排出物（図-1中の①）から、湖水中にストックされていたもの（図-1の②）へシフトさせ、その結果、バクテリアの現存量には大きな変動が生じなかったのではないかと推察された（口頭発表-1, 発表論文-1）。このように水中のバクテリア群集の中には、最も好適な基質（有機物）の供給が断たれるという大きな環境の変化に対して、有機物源をスイッチし、群集の大きさを保つという機構が作動する仕組みを備えているように思われる。

(2) バクテリアの群集構造の解析

対象とする水域からバクテリアを採取し、これをまずDNA中のG+C含量の高いもの（Pseudomonas属など）と低いもの（Flavobacterium属など）に分け、それぞれの群内および群間で非アイソトープ“DNA-DNAハイブリダイゼーション”を行ない群集を構成するバクテリアの多様性を、煩雑な手法で種の同定を行なうことなく直接的に解析する新しい方法を野外サンプルに初めて導入した（口頭発表-2）。

一方、バクテリアの群集特性を遺伝的に解析する目的で、“プラスミッド（核外遺伝子）保有の有無”を調べた。現在までのところ、諏訪湖のサンプルでは採取したバクテリアの約10%がプラスミッドを保有していることがわかっている。これらのバクテリアを、DNA-DNAハイブリダイゼーション法を用いて解析することによって、天然のバクテリアのプラスミッド保有とバクテリアの分類特性との関連を解析することが可能となろう。ここからバクテリアのプラスミッドと環境との関連についての糸口も開けて行くものと考えられる。

バクテリアの分類や遺伝特性の解析には、天然の試料からバクテリアを取り出し、これを培養することが必要であるが、実際には、落射型の蛍光顕微鏡を用いて直接計数されるバクテリアのごく一部分しか培養できない。これがバクテリアの生態学を進める上で最大の障害となっている。近年、培養に用いる培地中の有機物濃度を自然の場に近づけるべく低下させると、培養されるバクテリア数がしばしば増大することが指摘されている。そこで、異なった有機物濃度の培地で採取されたバクテリアについて、DNA-DNAハイブリダイゼーションやプラスミッドの検索を行なうことにより、それぞれのバクテリア群が同じ母集団を包括しているのか否か、という極めて基本的だが重要な知見が提供されると考えられる。

今後の課題と発展

前記(2)については、研究がようやく軌道に乗ったところであるが、本研究の目的である新しい方法の確立を急ぎたい。なお当初、蛍光抗体法

をバクテリア群集の解析法として採用することを考えたが、DNA-DNA ハイブリダイゼーション法が、プラスミッド検索との関連や手法の簡便性の上から、本研究にふさわしいと考え、変更した。

また(1)については、他の方法による生態系攪乱実験も行なっており、結果の解析にとりかかっている。

論文発表

- 1) Kato, K. *et al.*: Enclosure experiment on planktonic bacterial response to the perturbation on phytoplankton. (in preparation)

口頭発表

- 1) 加藤憲二, 他: バクテリア数の安定性と有機基質のシフト, 日本陸水学会第53回大会(1988年10月).
- 2) 山本啓之, 加藤憲二, 他: 非アイソトープ DNA-DNA ハイブリダイゼーション法による湖水分離菌の同定, 日本微生物生態学会第4回大会(1988年11月).

参考論文

- 1) 加藤憲二: 水圏生態系におけるバクテリアの新しい生態像, 公害, 8:1-9.
- 2) Kato, K.: Carbon flux from phytoplankton to free-living bacterial DNA. Arch. Hydrobiol. Ergebn. Limnol. (in press).