信州大学審査学位論文

諏訪湖の貧栄養化に伴う植物プランクトンと

富栄養化指数の変遷

Changes of phytoplankton due to oligotrophication and

the trophic state index of Lake Suwa

2017年 9月

信州大学大学院

総合工学系研究科

山岳地域環境科学専攻

二木　功子

諏訪湖の貧栄養化に伴う植物プランクトンと富栄養化指数の変遷

要旨

湖沼における植物プランクトン種の優占種の変遷は, 水温, 降水量, 湖水の滞留時間, 湖水の混合期間, 栄養塩濃度及び栄養塩類の濃度比率, 湖水中の光量変化, 風の影響など様々な環境要因からの影響をうけた結果である。このように植物プランクトンは, 環境要因の変化に敏感に反応する湖沼生態系の重要な構成要素の一つであることから, 湖沼の環境変動を示す指標生物種として注目されている。

1965 年以降の諏訪湖は, 高度経済成長の影響を強く受けた結果, 工業廃水, 生活雑廃水, 農耕地排水, 畜産排水, また合成洗剤に含まれる高いレベルのリン酸が未処理のまま河川より諏訪湖へ流入し, 有機物汚染や過度の富栄養化現象を引き起こし藍藻 *Microcystis* 属が大量発生する原因となった。しかし, 1972 年から流域下水道及び終末処理場の建設などの浄化対策事業も進行していった。

水質の栄養状態の評価方法の一つとして, Carlson の富栄養化指数 (TSI；Trophic state index) がある。TSI とは, 全リン (TP：Total phosphorus)濃度, クロロフィル a (Chl. a)濃度, 透明度 (SD：Secchi disk depth)の関連性を基礎として湖の栄養段階 (貧栄養・富栄養・過栄養) をそれぞれの項目から個別に評価することができる。Carlson の TSI の提案以降, Kratzer と Brezonik により, 全窒素 (TN：Total nitrogen)濃度が加えられ, TSI の判定は, 湖沼を 0 から 100 の範囲で貧栄養 (TSI < 30), 中栄養 (30 < TSI < 50), 富栄養 (50 < TSI < 70), 過栄養 (TSI > 70) に分類することができる。

同一湖沼における長期変遷を TSI の基準で比較した例は無い。富栄養湖と分類してもその範囲は様々であり, 湖水の富栄養化のレベルを数字で表すことができる TSI は有効である考えられた。近年諏訪湖の植物プランクトンは *Microcystis* 属の減少が観察され,

植物プランクトンの優占種の変化は水質の変化を反映しているため, 長期間にわたる水質の変遷を TSI (TP, Chl, SD TN)によって明らかにすることを目的とした。

1948 年から 2015 年の植物プランクトンの変遷と TSI について解析した結果, 1948 年以降夏季植物プランクトン優占種より約 70 年間の水質の変遷を 4 期に区分できた。1 期目(1948 年から 1969 年)は,植物プランクトン優占種が珪藻から藍藻に変化し水質も中栄養から富栄養に進行した。1948 年には *Microcystis* 属が優占したが生物量は 0.1 $mm^3 L^{-1}$ から 1 $mm^3 L^{-1}$ 程度で 1960 年には優占しない年 (1963 年, 1965 年, 1966 年)も観られた。1965 年の優占植物プランクトンは, 珪藻 *Aulacoseira* 属, *Asterionella* 属, 糸状緑藻 *Mougeotia* 属の順で *Microcystis* 属は数 %の存在であった。

1 期目の 1948 年と 1963 年の TSI (TP)は 63 と富栄養であったが 1966 年には 49 から 63 と中栄養から富栄養を示した。1970 年代から 1998 年の *Microcystis* 属の優占が顕著であった期間を 2 期とした。1977 年には *Microcystis* 属が 99 %に達し *Microcystis* 属が最も優占した年と推測できる。1974 年には TSI は 100 を示し, 1980 年から 1989 年は過栄養を維持しているが, 1990 年代は過栄養と富栄養が混在していた。

3 期とした 1999 年から 2007 年は富栄養状態であるが, 夏季の植物プランクトンは *Microcystis* 属の減少及び窒素固定藍藻 *Aphanizomenon*. *flos-aquae* が出現した。湖の測定項目や TSI の変化は, 上下に変動しながら減少をしているのが観察された。

2008 年から 2015 年を 4 期とした。夏季植物プランクトンは珪藻 *Synedra* 属, 窒素固定藍藻 *Dolichospermum* 属, 糸状緑藻 *Mougeotia* 属が優占するようになり植物プランクトンの組成及び優占種の変化が観察された。この時点より溶存無機態リン及び溶存無機態窒素は 2 期及び 3 期に比較して有意な減少が現れた。TSI の分類による 3 期と 4 期の変化はまだ顕著ではないが植物プランクトンの種組成は TSI の変化より敏感に現れてきたことから, TSI と植物プランクトンの種組成を総合的に評価することが湖沼の栄養状態を表す一つの方法として有効である。2008 年以降諏訪湖は, 植物プランクトン優占種の変化と TSI より富栄養から中栄養への移行期で水質の改善が見られた。

諏訪湖の貧栄養化に伴う植物プランクトンと富栄養化指数の変遷

目次

第 1 章 諸言 ····· 1

1.1 植物プランクトンの成長要因 ····· 1

1.2 湖沼の富栄養化と貧栄養化 ····· 7

1.3 Trophic State Index (TSI)による湖水の評価 ····· 9

第2章 諏訪湖の夏季に優占する植物プランクトン種と富栄養化指数の変遷 ··· 15

2.1 はじめに ····· 15

2.2 方法 ····· 19

2.2.1 諏訪湖の観測データ ····· 19

2.2.2 植物プランクトンの計数 ····· 21

2.2.3 TSI による水質の評価 ····· 23

2.2.4 統計解析 ····· 23

2.3 結果と考察 ····· 26

2.3.1 諏訪湖の夏季プランクトンの優占種の変遷 ····· 26

2.3.2 TSI の変化 ····· 38

2.3.3 近年の諏訪湖の貧栄養化と植物プランクトンの変化 ····· 47

2.3.4 グラフィック法による湖水の解析 ····· 51

2.4 まとめ ····· 57

第3章 諏訪湖の夏季に優占した植物プランクトン種（2010年から2015）
の変化に影響した環境因子 ……58

3.1 はじめに ……58

3.2 材料と方法 ……58

3.2.1 測定方法……58

3.2.2 植物プランクトンの測定法 ……60

3.2.3 統計解析 ……61

3.3 結果 ……62

3.3.1 表層の植物プランクトンの季節変化 ……62

3.3.2 植物プランクトンと栄養塩濃度の変化 ……62

3.3.3 水質と植物プランクトンの変化 ……70

3.3.4 *Mougeotia* 属の 0,3,5 m の分布 ……71

3.3.5 Principal component analysis (PCA) による植物プランクトン
と環境変化 ……73

3.4 考察……73

3.4.1 水質と植物プランクトンの変化……73

3.5 まとめ ……79

第 4 章 諏訪湖の水質改善に伴う糸状緑藻 *Mougeotia* 属の出現 …… 80

4.1 研究の目的……80

4.2 試料の採取と計測の方法 ……81

4.2.1 植物プランクトン試料の採取……81

4.2.2 *Mougeotia* 属の細胞直径，長さの計測…… 81

4.2.3 遺伝子解析試料……82

4.3 結果……86

4.3.1 植物プランクトンの経年変化……86
4.3.2 *Mougeotia* 属の系統解析……87
4.3.3 *Mougeotia* 属の形態分類 ……89
4.3.4 *M. elegantula* の形態変化 ……93
4.4 考察 ……96
4.4.1 *Mougeotia* 属の 18S rRNA の系統解析 ……96
4.4.2 諏訪湖と琵琶湖の *Mougeotia* 属の形態分類 …… 98
4.4.3 *Mougeotia* 属の出現と水産被害…… 100
第 5 章 総合考察 ……101
5.1 諏訪湖の植物プランクトンの変遷……101
5.2 Trophic State Index(TSI)による湖水の評価……108
5.3 諏訪湖の環境変と植物プランクトンの変遷……112
謝辞……115
引用文献……116
付録
諏訪湖における *Microcystis* 溶藻バクテリアの年次変化（2008 年から 2011）
と溶藻微生物の分離……143
研究の目的……143
材料と方法……144
試料の採取と細胞の計数 …… 144
溶藻バクテリアプラークの作成と溶藻バクテリアの分離 ……145
バクテリアの分離と 16S r RNA による溶藻バクテリアの同定……146
Microbacterium sp. (MLBP1) と NIES298 の走査型電子顕微鏡（SEM）
による観察……147

Microbacterium sp. MLBP1 による NIES298 の溶藻 ····· 147

結果と考察 ····· 148

Microcystis 属の変化と溶藻プラーク数の変化 ····· 148

底泥の溶藻バクテリアプラーク数の変化 ····· 149

溶藻プラークの発達と SEM によるプラークの観察 ····· 149

溶藻バクテリアの 16S r RNA による同定 ····· 151

MLBP1 の産生する溶藻物質 ····· 153

List of Figures

Fig. 2- 1 Map of Lake Suwa showing Sampling Site ……18

Fig. 2- 2 Yearly changes of the COD and nutrients concentration in Lake Suwa ……31

Fig. 2- 3 Change in penetration rate of sewage system and concentration (conc.) of COD in Suwa area. (Referenced from Nagano Prefecture Environmen Division)……..……32

Fig. 2- 4 Yearly changes of dominant phytoplankton biomass in surface water from June to October during 1992 to 2015 of Lake Suwa. (a) *Microcystis* bio−volume, (b) dominant phytoplankton bio−volume with *Microcystis* bio− volume, (c) dominant Phytoplankton bio−volume without *Microcystis* bio−volume……33

Fig. 2- 5 Each period of changes of the nutrients concentration (conc.) in Lake Suwa. a) TP, b) TN, c) DIP d) DIP concentrations at center of surface water duaring 1970-1998, 1999-2007, 2008-2015. Turkey test was performed for multiple comparisons when significant differences were revealed by ANOVA. Horizontal lines of the box show first quartile, median, and third quartile from below. Error bars denotes 10 and 90 percentiles ……36

Fig. 2- 6 Changes in Water temperature, Secchi disk depth and pH in Lake Suwa during the summer (June to August) from 1948 to 2015. ……37

Fig. 2- 7 Yearly changes of trophic state index in surface water of Lake Suwa from June to August during 1948 to 2015……43

Fig. 2- 8 Yearly and seasonal changes of chlorophyll a and DIP concentrations ……44

Fig. 2- 9 Temperature, nitrate and phosphorus in 5 m depth in Lake Suwa from June to August during 1978 and 2015. Periods of maximum P concentrations are marked red ……45

Fig. 2- 10 Decline of phytoplankton biomass (measured in terms of chlorophyll-*a* concentration) in relation to the decline of total phosphorus concentrations ..……46

Fig. 2- 11 Seasonal plot of TSI values for (TP), (SD), (Chl) and (TN) ……53

Fig. 2- 12 Possible interpretations of deviations of Trophic State index (TSI) values of Lake Suwa..……54

Fig. 2- 13 Deviations between Lake Suwa TSI (Chl),TSI (SD),TSI (TP)ploted As Monthly values of 1977, 2006, 2015 following the formatted by Calson (1991) ……54

Fig. 2- 14 Seasonal TSI of CHL, SD, TP and Daphnia numbers are plotted of Lake Suwa (2011）……55

Fig. 2- 15 Comparison of precipitation from 2000 to 2015 (Cluster analysis) .……56

Fig. 3- 1 Seasonal changes of phytoplankton biovolume in surface water from March to December during 2010 to 2015 ….……65

Fig. 3- 2 Seasonal changes of dominant phytoplankton groups (*Dolichospermum* spp.

Mougeotia spp. and diatoms), DIN and DIP concentrations ……66

Fig. 3- 3 Difference between *Dolicospermum* and *Mougeotia* DIP concentration (conc.) from 2011 to 2015 ……67

Fig. 3- 4 Relationship between appearance of *Dolicospermum* and DIN concentration (conc.) from 2012 to 2015 ……68

Fig. 3- 5 Seasonal changes of phytoplankton groups (*Mougeotia* spp., *Dolichospermum* spp. and Diatoms) biovolume and retention time and precipitation from 2010 to 2015….69

Fig. 3- 6 Vertical distribution of *Mougeotia* (0, 3, 5 m) ……71

Fig.3- 7 Factor loading of PCA analysis based on environmental factor and phytoplankton of Lake Suwa (from 2010 to 2015) ……72

Fig. 3- 8 Changes in the light quantum from 2009 to 2012 ……77

Fig. 3- 9 Comparison of compensation depth from June to August during 1977 -1979, 1980 - 1989, 1990 - 1998, 1999 – 2007, 2008 – 2015 ……78

Fig. 4- 1 Seasonal changes of phytoplankton biovolume in surface water from March to December during 2008 to 2011……84

Fig. 4- 2 Estimated phylogenetic relationships of *Mougeotia* based on the nuclear DNA 18S rRNA sequence data (857-bp.) …… 88

Fig. 4- 3 Reproductive cycles for *Mougeotia paruvla* Hassall, b*M.nummuloides*(Hassall) de Ton. ……94

Fig. 4- 4 *M. elegantula* of Lake Suwa (a) Vegetative cell Iodine staining (pyrenoid) (b) Vegetative cell (c) Conjugated cell (d) Colony of Clade A (e) Colony of *M. elegantula* (Clade B). (e) Vegetative filaments, chloroplast has two axial single flat. (f) Chloroplat was thickened and minutely granulate. (g) The center of the cell swell out ……95

Fig. 4- 5 *M. elegantula* pure culture on agar plate (AF-6) . *elegantula* pure culture on agar plate (AF-6) (a) Papillar formation. (b) and (C) Papillar formation by paired cells (↓arrow). (d) Young zygospore in newly formed by gametangium and conjugation tube; (e, f) Mature zygospore ……96

Fig. 5- 1 Factor loading of PCA analysis based on environmental factor and phytoplankton Bio−volume from 1992 to 1996 and from 2010 to 2015 of Lake Suwa. ……107

Fig. 5- 2 Changes in phytoplankton and eutrophication in Lake Suwa from 1948 to 2015……111

Fig. 5- 3 Changes of phytoplankton due to oligotrophication of Lake Suwa.……..……114

List of Tables

Table 1- 1 The tolerance of various algal, resposentive of Summer assemblages and arranged in descending order of K' (growth rate) max to critical limiting factors. Phytoplankton functional classifications were analysed in this work ……5

Table 1- 2 Representive freshwater Nuisance..……6

Table 1- 3 Conditions associated with differences between trophic state indices, and suggestions of how they might affect the effectiveness of nutrient or food chain manipulation. ……14

Table 2- 1 Analysis method and measurement institution of past periodic survey of Lake Suwa…….22

Table 2- 2 Reference data of phytoplankton in Lake Suwa. …….23

Table 2- 3 Classes of Trophic State Index and OECD variables used to classify …….25

Table 2- 4 Yearly changes of dominant phytoplankton genus during summers from 1948 to 2015……30

Table 2−5 Results of maximum and minimum nutrient concentration of each phase. The second phase showed divided about every nine years.……34

Table 2- 6 Changes of the nutrients concentration during the summer season (June to August) in Lake Suwa (Phase1- 4) ……35

Table 2- 7 Results of maximum and minimum values of TSI of each phase, the second phase was

showed divided about every nine years ……41

Table 2- 8 Classification of the lake - type with dominant genus and TSI in Lake Suwa.……42

Table 4- 1 *Mougeotia* specimens examined ,sampling month and year, sampling site (lake), isolation name, clade number and GenBank accession numbers of nuclear gene 18S rRNA region in this study …… 85

Table 4- 2 Comparison of the *Mougeotia* cell size (field samples)……90

Table 4- 3 Comparison of the *Mougeotia* cell size (culture strain)……91

Table 4- 4 *Mougeotia* cell size in Lake Suwa (field samples) ……91

Table 4- 5 Morphological classification of *Mougeotia* ……92

Table 4- 6 Record of fish and shellfish transplant in LakeSuwa. ……97

第 1 章

緒言

第１章　緒言

１．１ 植物プランクトンの成長要因

植物プランクトンは食物網にエネルギーを供給し，淡水生態系を支える重要な役割を果たす一次生産者である (Rousseaux and Gregg, 2014)。植物プランクトンは様々な湖において，光，温度，栄養塩 (主に窒素とリン)濃度など，環境条件に適応する能力を持ち種々が好んだ環境で増殖をする (Reynolds, 1988a)。生態系の中でいくつかの植物プランクトンは同様の役割を持っているため，生態系の複雑さを単純化する目的で同じ生態学的特徴を持つ植物プランクトンをグループ化して示している。

以下のふたつは植物プランクトンを戦略別に分類している。r / K戦略はrに選択された種の成長のスピードが速く細胞サイズは小さいが，体積に対する表面積が大きい。K選択種は，大きな細胞又はコロニーからなり捕食に対する抵抗性としばしば運動性があり，生存性を高めることで絶滅の可能性を引き下げる戦略である (Margalef 1978, Sommer, 1981; Reynolds 1988a b)。

C-R-S は, 環境への適応能力に基づく機能性の違いによって植物プランクトンを 3 つに分類している。弱い湖水の攪乱と栄養塩制限などのストレスが低い状況では, 高い成長能力によって Competitive (C)-strategist (*Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Coenocystis*, *Rhodomonas* など)が優占し, 弱い擾乱と高いストレス環境下 (低い栄養，低い光，少ない炭素量など)ではストレス耐性種 Stress- (S)- strategist (*Microcystis* 属, *Anabaena* (*Dolichspermum*)属, *Gloeotrichia* 属,

Ceratium 属，*Peridinium* 属, *Chrysosphaerella* 属, *Uroglena* 属など) が他者と競合することが予想される。攪乱耐性種 Ruderals (R)-strategist (*Asterionella* 属, *Aulacoseira* 属, *Limnothrix* 属, *Planktothrix* 属)は, 低いストレス環境と強い攪乱環境で栄養を獲ることによって優占する (Reynolds, 1988)。

個々の植物プランクトン種の環境変動への反応について，Reynolds らによる新しいグループ分けが行われた。これらは Functional Groups で, 同様の形態学的，生理学的形質及び生態学的特徴を有する種を一緒にグループ分けすることを意図している (Reynolds, 2002)。栄養塩類 (リン, 窒素, シリカなど), 光と水温は一般的に植物プランクトンの成長率を規制する (Geider et al., 1997; Watson et al., 1997; Dignum et al., 2005)。そのため植物プランクトンは, 富栄養化に加えて季節によって起こる湖の成層や, 栄養の摂取などに敏感に反応する。Functional Groups は, 生息環境, 環境耐性及び栄養状態 (湖水の混合, 光, 温度, 溶存無機態リン: Dissolved Inorganic Phosphorus (DIP) 濃度, 溶存無機窒素：Dissolved Inorganic Nitrogen (DIN) 濃度, 溶存無機態シリカ: Soluble Reactive Silicon(SRSi), CO_2, 動物プランクトンの捕食) などによって 31 のグループに分類されている (Reynolds, 2002)。例えば，窒素固定藍藻 *Anabaena flos-aquae* 及び *Aphanizomenon* 属は, 分類コドン H1 に該当する。これらのグループは, 低い濃度の窒素及び炭素 に耐性があり窒素が枯渇した環境条件で優占することができるが, 攪乱や弱い光, 低濃度のリンには感受性があり増殖が抑制されるグループである。

単一のグループを形成する異なる藻類は, 類似の形態学的特徴を有する (Reynolds and Irish, 1997)。Table 1- 1 には, Reynolds (1983)を参照して夏季植物プランクトンの成長率を規

制する耐性因子を表した。Table 1- 2 には, 湖水で増殖すると問題となる藻類が成長するのに適した環境を示した。

ドイツ (Berlin)の Tegel 湖と Schlachtensee 湖では, 河川から湖に入る未処理水を避けるため，湖の流入河川の合流地点にリン除去プラントを設置し流入河川の全量を処理することで湖水の貧栄養化に成功した。その結果, 20～25 年間における植物プランクトンの優占種と TP 濃度との関係を明らかにした (Chorus and Schauser, 2011)。

藍藻は富栄養に分類された水域では，例外なく高い生物量 (> 0.1 または> 0.5 $mm^3 L^{-1}$)で発生した。藍藻は 0.05 または 0.09 mg L^{-1} の TP 濃度で出現し, 0.025mg L^{-1} を下回る TP 濃度では発生が抑制された。真核生物に属する植物プランクトンは, NH_4-N を栄養分とするが原核生物である藍藻は窒素源として NO_3-N を好む (Gerloff, 1952)。*Microcystis* 属の繁茂場所は低緯度の浅い又は深い成層した水面で, pH >8, 水温は 12 ℃未満では生物量が低下した (Chorus and Schauser, 2011)。

窒素固定能力を持つ異質細胞 (Heterocyst)を持つ藍藻種は，窒素制限下の水域において増殖に有利である (Levine and Schindler, 1999)。*Dolichospermum* 属と *Aphanizomenon* 属の生息する環境について比較してまとめた。*Dolichospermum* 属は TP < 0.025 mg L^{-1} の中栄養又は貧栄養水域では, >0.5 $mm^3 L^{-1}$ の生物量はほとんど記録されない(Chorus and Schauser, 2011)。*Aphanizomenon* 属は, 中栄養 (Chorus and Schauser, 2011)の低い TN 濃度と炭素濃度でも成長が可能であるが, 湖水の鉛直混合は不利である (Reynolds, 2002)。*Aphanizomenon* 属は窒素固定に必要な Fe イオンによって成長が制限されたが (Horne, 1975), リンの貯蔵には優れてい

る (Sommer,1986)。*Dolichospermum* 属のブルームは, 大変低い溶存無機態窒素濃度によってブルームを生じるが (Reynolds , 2002), *Aphanizomenon* 属に比較して窒素固定能力は高い (Nobel et.al., 1997)。*Dolichospermum* 属とのリンの取り込みに関する半飽和定数を比較した時に *Dolichospermum* 属は低いリン濃度での適応が高く, *Aphanizomenon* 属の成長は *Dolichospermum* 属の成長により制限された (Nobel et.al., 1997)。更に *Dolichospermum* 属のブルームは, 水面下の光も利用できるが *Aphanizomenon* 属は弱光環境を好む。湖沼での *Aphanizomenon* 属は鉛直混合時の表層以外の弱い光量でも優占し, *Dolichospermum* 属の生物量を上回ることができる (Bradburn, 2012)。

Bacillariophyceae (diatoms) ： *Asterionella formosa, Diatoma*属, *Fragilaria*属(colonial , solitary), *Nitzschia*属, *Asterionella formosa*などの珪藻はより撹拌された環境を好み, リン濃度の影響は低くシリカの濃度が生物量を決定するが, 水面が安定すると沈降する (Chorus and Schauser, 2011)。

Chlorophyceae ： 小型, 非運動性及び非コロニー性の種は, 富栄養や貧栄養より中栄養な環境での出現頻度が高い。TP範囲は0.01から0.025 mg L^{-1}である (Chorus and Schauser, 2011)。中栄養のよく撹拌された表層では*Tabellaria*属, *Cosmarium*属, *Staurodesumu* 属, 深く撹拌された表層, 光不足の環境には*Mougeotia*属, *Tribonema*属が発育することができる (Reynolds, 2002)。

Table 1- 1 The tolerance of various algal, resposentive of. Summer assemblages and arranged in descending order of K'(growth rate) max to critical limiting factors. Species with high tolerances (+++) may be expected to participate in modified periodic sequence (reading downwards) and from which intolerant species may be omitted.

	Growth rate tolerance of					
	Low temperature (< 10°C)	**High grazing** (a > 0.6 d^{-1})	**Low (P)** (< 0.4 µg PL^{-1})	**Low (N)** (< 300 µg NL^{-1})	**Low (C)** pH >9.5	**High** Z_m/Z_{eu} (> 1.0)
Species						
r-selected nanoplankton	++	•	•	•	++	+
Cryptomonus	++	•	++	+	+	+++
Eudorina	+	+++	•	+	+	•
Spherosystis	•	+	+++	•	++	•
Anabaena	+	+++	•	+++	++	+
Microcystis	•	+++	+	+	+++	++

Referenced of Reynolds, 1983. Z_{eu} : euphotic depth, Z_m : depth of mixing. a : grazing pressure. • : not tolerance.

Table 1- 2 Representative freshwater nuisance.

Kingdom/phylum	Genus	Prefered bloom condition
Prokaryota Cyanobacteria (N2-fixing)	*Anabaena*(*Dolichospermum*) *Aphanizomenon* *Cylindrospomopsis*	P-enriched,warm,strtified, Long¯residence time,high irradiance, eutrophic
Non-N2-fixing	*Microcystis* *Osillatoria*	N-and P-enriched, Eutrophic conditions Warm, stratified, Long Residence time
Eukaryota Chlorophyta	*Chlorococcus*	Eutrophic, N-and P-enriched
Phrhophyta (Dinophyta)	*Ceratium* *Peridinium*	N-and P-enriched stratified, Some oligohaline
Cryptophyta	*Cryptomonas* *Rhodomonas*	N-and P-enriched Eutrophied fresh to oligohaline, stratified.
Chrysophyta	*Mallomonas*	N-and P-enriched, toxic at High N enrichment, stratified

Referenced in Paerl et al., (2001).

１．２　湖沼の富栄養化と貧栄養化

藍藻ブルーム (*Microcystis, Planktothrix, Limnothrix, Dolichospermum, Aphanizomenon*)は悪臭, 底層の脱酸素 (低酸素と無酸素), 毒性, 魚の死滅, 食物網の変化を含む水質劣化の主要な要因である。貧栄養湖は集水域や河川からの窒素とリンの濃縮や蓄積で徐々に富栄養化する。藍藻は, 夏季の高い水温と (Tilman and Kiesling, 1984； McQueen and Lean, 1987； Robarts and Zohary, 1987), 高いリン濃度と窒素が制限された環境に適応して有利に増殖するため, 湖水の富栄養化は種の多様性を減少して, 生態系の機能に影響を与える (Gessnr et al., 2004)。世界的に起こっている湖水の汚染は, コロニーを形成する藍藻 (*Microcystis, Planktothrix, Limnothrix, Dolichospermum, Aphanizomenon*など)の優占が富栄養湖での植物プランクトン優占種変化の最終段階であるとみなされる (Dokulil and Teubner, 2000)。これらの原核生物の特性, 例えばガス小胞を持ち, 高いpHを好み, 窒素固定能力を持つことは特別な生態学的意義を有する (Schreurs, 1992； Mur et al., 1993)。

*Microcystis*属はコロニーの形成又は表層で集積して長時間有光層に留まる能力と頻繁に有光層に移動する能力を持つ。最適なN：P (mol)比は, *Microcystis wesenbergii* (18) , *Planktothrix. agardhii* (12から21)はほぼ違わないが, *M. aeruginosa* (5.0から8.5)はそれより低い (Andersen, 1997)。

中国の太湖 (表面積 2338 ㎢, 平均深度 2.0 m)は, 1980年代に水の消費量が増加し,水質汚濁及び水不足の結果となった。中国の多くの湖沼は浅く人口密度の高い低地に位置するた

め, 飲み水及び灌漑に使用される。この湖は1981年には, 年間の植物プランクトンの生物量が5 $mm^3 L^{-1}$未満であり, Chlorophyll a濃度が12 mg m^{-3}未満で貧から中栄養であったが, 富栄養化に伴い*Microcystis*属が優占した (Chen et.al., 2003)。珪藻から藍藻への富栄養化への変化は世界の他の湖でも共通している (Padisák, 1992)が，湖の深度も富栄養化に影響する。浅い湖沼はリンが底泥へ沈降して，蓄積したリンが水柱に移動するため，鉛直移動を行うことができる藍藻は，有利にリンを獲得することができる (Pettersson et al., 1993)。*Microcystis*属を軽減または防止するための水層の人為的な混合は, 有光層 / 混合の深さ(Z_{eu} /Z_{mix})または断続的に起きる乱流が*Microcystis*属の競争上の利点を低下させるために有用である (Steinberg and Hartmann, 1988)。

バラトン湖 (Hungary) は表面積593 ㎢, 平均水深3.14mの浅い大きな湖である。この湖でも1970から1980年代に富栄養化が進行した (Padisák, 1992)。一般に富栄養湖は, 水深が10 m以下である。1970年代高いリンの負荷で藍藻*Aphanizomenon*属 *Anabaenopsis elenkinii, Cylindrospermopsis raciborskii*を含む多くの種が突然現れた。1980年代初頭には管理プログラムが開始され, 水質の回復がみられた。これには, 最も危険な点源負荷の排除と下水処理の実施が行われた。下水道移送システムは, 湖の東部のリン負荷を30〜40 %減少させ復旧期間中の植物プランクトンの組成は, 他の多くの湖で見られたように, 実際の気象条件に対応して変化するように見えた (Sas, 1989)。夏期の栄養状態は, 中栄養から富栄養に変化し特定の予測が不安定になった。浅いバラトン湖の場合, 堆積物と水との相互作用, 内部のリン負荷, 周期的な再懸濁及び将来的に, 腐植物質含量の増加が予想され, 特に気候の影響が植物プ

ランクトンの発達に影響する。

スイスとイタリア国境のヨーロッパアルプスの深い湖Lake Genevaは, 人間活動の影響で貧栄養から中栄養に変化した。 近年, CIPEL (International Committee for the Protection of the water of Lake Geneva)プログラムの実施によりリンは減少した (Anneville et al., 2002)。一方で植物プランクトンは増加がみられた。Lake Mondseeではリン濃度の減少と植物プランクトンの減少との間にはタイムラグがあり必ずしも相関しないことが示された (Dokulil et al., 2005)。 植物プランクトンの動向とリン減少との応答は，かなりのタイムラグがあることが報告されている (Sas, 1989; Carpenter and Cottingham, 1997)。

レジームシフトは, ある環境要因の影響が閾値を超えると生態系は急激に他の状態へ移行し, 環境要因の影響がそれ以上大きくなっても, あまり変化しない状態となることを示す。このような生態系応答の重要な特徴のひとつは, 生態系に変化が起こった状態まで環境要因の影響を削除し, 生態系を回復しようとしてもその状態特有の緩衝機構によって容易には元の状態に戻らない (Scheffer and Carpenter, 2003)。特に水深の浅い湖では，底泥と接する水の割合が大きく, 堆積物からの主要な栄養素の内部負荷が回復を遅らせる (Malueg et al., 1973)。

１．３　Trophic State Index（TSI）による湖水の栄養状態の評価法

植物プランクトンは, 環境条件の変化に迅速に反応するため, 植物プランクトンの組成 (Flint, 1977; Reynolds, 1990 ; Ptacnik et al., 2008) 及び種の多様性は湖の富栄養化の生物学的指

標として重要である。Carlson (1977)は藻類バイオマスが湖水の栄養分類の基礎となることを前提として, 湖水の富栄養化状態を総合的に判断するため, 富栄養化指数 (TSI；Trophic state index)を用いた。これは以下の式により0から100の範囲で湖の栄養状態を評価することができる。原理は植物プランクトンと透明度との間には次の関係があることになる (Carlson, 1977；大槻ら, 1981)。

$$I\,z = I_{\,0}\exp\{-(kw + ks)z\} \qquad (1)$$

I_z＝セッキ(Secchi)透明度板が見えなくなる水深での光の強度

I_0＝水表面での光の強度。

k_w＝水および溶存物質による光の減衰係数。

k_s＝浮遊性藻類による光の減衰係数。

z ＝セッキ透明度板が見えなくなる水深

ここで，ks=βc とおき，βは係数．cは植物プランクトンの濃度(mg/m3)であり(1)式を置き換えると$\frac{1}{2}\mathrm{In}(\frac{I0}{Iz}) = kw + \beta c$ (2)

となる。経験的に$Iz = I_0/10$ (Tyler, 1968) が知られていることから, kw≪βc ならば透明度と植物プランクトン濃度との関係となる。そこで透明度を，2を底とする対数にとると透明度が2分の1になるごとに，藻類量は2倍ずつ増加することになる。現在まで観測された世界最高の透明度は摩周湖の41.6mであった。その値に最も近い2の累乗である透明度64mを藻類量が最も少ない自然水として，それをTSl＝0と仮定した。そして0～100までの数値で富栄養状態を表わすため，10倍して次式を提出した。

TSI(SD)＝10(6-$\log_2$(SD))＝$10\left(6-\frac{\mathrm{In(SD)}}{\mathrm{In\ 2}}\right)$

SD=透明度(m)　　(3)

また, 透明度とクロロフィル濃度との間には，経験的に1n〔SD〕＝2.04－0.681n(Chl)　(4)

Chl＝クロロフィルa濃度(mg/m^3)

クロロフィルaと全リン濃度との間には1n(Chl)＝1.4491n(TP)-2.442　(5)

TP=全リン濃度(mg/m^3)

の関係式があることから．クロロフィルa濃度および全リン濃度から同様にTSI(Chl)及び

TSI(TP)を求めることが出来る。

TSI(Chl)＝ $10\left(6-\frac{2.04-0.68\ \mathrm{In(Chl)}}{\mathrm{In\ 2}}\right)$　　(6)

TSI (TP)= $10\left(6-\frac{3.70-0.98\ \mathrm{In(Chl)}}{\mathrm{In\ 2}}\right)$　　(7) または近似式として

TSI (TP)= $10\left(6-\frac{\mathrm{In}(\frac{48}{\mathrm{TP}})}{\mathrm{In2}}\right)$　　(8)

これらは以下の式に換算される。

$\mathrm{TSI\ (TP)} = 14.42\ \ln\ (\mathrm{TP}) + 4.15$　　①

$\mathrm{TSI\ (Chl)} = 9.81\ \ln\ (\mathrm{Chl}) + 30.6$　　②

$\mathrm{TSI\ (SD)} = 60 - 14.41\ \ln\ (\mathrm{SD})$　　③

クロロフィル(Chl), Secchi depth (SD)及び総リン (TP)の3つの変数は, 独立して藻類バイオマスを推定できるがこの式による判定法は以下とおりである。

TSI values < 30　：Oligotrophy.

TSI values 50 - 70：　Eutrophy.

TSI values >70　：Hypertrophy.

TSI は SD のみでも評価できる利点があるが, TSI の欠点は湖水に懸濁態物質が混在している場合は植物プランクトン量として過大評価される (大槻ら, 1981)。Chl. a 濃度と TP 濃度は相関すると考えられるが, 藻類以外の懸濁物質に無視できない量のリンが存在していた場合でも TSI (TP)は富栄養に，TSI (Chl)は貧栄養に, TSI (SD)は富栄養に判断される。TP 濃度による TSI は, 低濃度 (5 μg L^{-1} 以下)での測定誤差により TSI 値 10 の違いが容易に変動することが予想される。また低水温及び弱光の冬・春期には利用可能な栄養塩類が存在しているにもかかわらず，Chl. a より算出する TSI が低く評価される可能性を指摘しており, 二つ以上の項目の TSI 平均値を用いることを推奨している (大槻ら, 1981)。

また, 異なる方法として経済協力開発機構 (OECD：Organization for Economic Co-operation and Development) の栄養レベルは, 富栄養湖の TP 濃度が年間平均 35 から 100 mg m^{-3}, Chl. a 濃度 (最高値) 25 から 75 mg m^{-3}, 中栄養湖の TP 濃度 10 から 35 mg m^{-3}, Chl. a 濃度 (最高値) 8 から 25 mg m^{-3}, 過栄養湖の TP 濃度　100 mg m^{-3} 以上，Chl. a 濃度 (最高値) 75 mg m^{-3} 以上と分類されている (OECD, 1982)。

TSI (TP) TSI (Chl)と TSI (SD) TSI (Chl)の正及び負の相互偏差が, 湖水の様々な状況を補強するために使用することができるという利点を持つ (Carlson, 1981)。すなわち, これらの偏差を用いて湖水の環境状況を特定できる(Carlson 1983, Carlson and Havens, 2005)。例えば, TSI (Chl) > TSI (SD)となる場合, *Aphanizomenon* 属のような大きな植物プランクトンが優占している可能性があることを示す。TSI (TP)＝TSI (SD) >TSI (Chl)であれば，光の減衰が藻

類によるものでなく，粘土粒子または溶解した腐蝕色が影響している可能性を示している (Table 1- 3)。TSI (TP) > TSI (SD) > TSI (Chl)となる場合は, 動物プランクトンによる捕食の可能性が示される。

Table1- 3 Conditions associated with differences between trophic state indices, and suggestions of how they might affect the effectiveness of nutrient or food chain manipulation.

TSI relationships and suggested interpretation	**Effect on nutrien Chlorophyll relationships and on manipulation**
TSI(CHL)＝TSI(SD)	
Algae dominate light	
TSI (SD) = TSI (CHL) = >TSI (TP) Algal bloom occurrence may respond more rapidly to P load.Phosphorus limits algal biomass and algae dominate**.**	Algal bloom occurrence may respond more rapidly to P load reduction.
TSI (TP) > TSI (CHL) = TSI (SD) Some factor other than phosphorus (zooplankton grazing, nitrogen, etc.) limits algal biomass.	Algal bloom occurrence may not change rapidly in response to P loading reductions, because P concentrations are in excess of nitrogen, etc.) limits algal biomass. demands by phytoplankton.
TSI (CHL) < TSI (SD)	
Small particles, not necessarily related to algae, dominate light attenuation	
TSI (TP = TSI (SD) > TSI (CHL) Non-algal particulate matter dominates light attenuation. Caution should be used in Particles contain phosphorus, hence the relationship between phosphorus and transparency, but do not contain chlorophyll	Cannot use Secchi transparency as an indicator of use-impairment related to algal blooms. Caution should be used in planning projects that might reduce levels of non-algal particles (*e.g.*, sediment removal), unless external nutrient sources also are controlled; light limitation may be preventing algal blooms.
TSI (SD) > TSI (CHL) = TSI (TP) Dissolved color affects transparency but not chlorophyll or total phosphorus concentrations.	Cannot use Secchi transparency as an indicator of use-impairment related to algal blooms. It may be possible to manipulate phosphorus concentrations and directly affect algal concentrations.
TSI (TP) > TSI (SD) > TSI (CHL) Zooplankton grazing has reduced the number of smaller increasing particles, leaving larger particles. Biomass has been reduced below levels predicted from total phosphorous.	There may exist a good potential to control algal blooms with bio manipulation of the planktonic food web (*e.g.*, increasing the biomass of large zooplankton).
TSI (CHL) > TSI (SD) Large phosphorus-containing particulates dominate	
TSI (CHL) = TSI (TP) >> TSI (SD) Large chlorophyll-containing particulates, such as *Aphanizomenon* flakes, dominate.	There does not exist a good potential to control algal blooms with food web manipulation, unless that manipulation directly affects nutrient inputs to the water column.

Data was referenced from Carlson and Havens, 2005 .

第2章

諏訪湖の夏季に優占する植物プランクトン種と富栄養化

第 2 章　諏訪湖の夏季に優占する植物プランクトン種と富栄養化指数の変遷

２．１．はじめに

湖沼における植物プランクトン優占種の変遷は，水温 (Paerl and Huisman, 2008)，降水量 (Weyhenmeyer et al., 2004) 湖水の滞留時間 (Reichwaldt and Ghadouani, 2012)，湖水の混合期間 (Ryan et al., 2006), 栄養塩濃度 (Ruggiu et al., 1998)及び栄養塩類の濃度比率 (Smith, 1983) , 湖水中の光量変化 (Huisman et al., 1999), 風 (Visser, et al., 2015) など，様々な環境要因からの影響の結果である (Reynolds, 1998) 。このように植物プランクトンは，環境要因の変化に敏感に反応する湖沼生態系の重要な構成要素の一つである (Pauerl et al., 2001；Paul et al., 2011)。多くの湖沼では, 植物プランクトンの異常増殖によって初めて富栄養化に気づくことが多い (沖野, 2005)。湖の適切な栄養塩濃度について判断するためには，富栄養化する前の栄養塩濃度を知ることは重要である。日本の環境基準値は，水域群ごとに利水目的に応じて設けられた水域類型 (AA類型やA類型など)によって定められているが (長野県第6期諏訪湖水質保全計画 平成24年度から平成28年度 URL: tp://www. pref. nagano. lg.jp /mizutaiki/kurashi/shizen/suishitsu/6ki/6s-hp.html)，湖沼の富栄養状態を表す指標を特別に定めていない。よって，閉鎖性水域の富栄養化現象の変遷を示すためには，富栄養状態を表す指標が必要である (大槻ら，1981)。

水質の栄養状態の評価方法の一つとして, Carlsonの富栄養化指数 (TSI；Trophic state index)がある (Carlson, 1977)。TSIは, 全リン (TP：Total phosphorus)濃度，クロロフィルa (Chl. a)濃度, 透明度 (SD：Secchi disk depth)の関連性を基礎として湖の栄養段階 (貧栄養湖・富栄養・過栄養)をそれぞれの項目から個別に評価することが可能である。CarlsonのTSIの提案以降，KratzerとBrezonik (1981)により，全窒素 (TN：Total nitrogen) 濃度が加えられて, 湖沼

を0から100の範囲で，貧栄養 (TSI < 30), 中栄養(30 < TSI < 50)，富栄養 (50 < TSI < 70), 過栄養 (TSI > 70)に分類することができる。

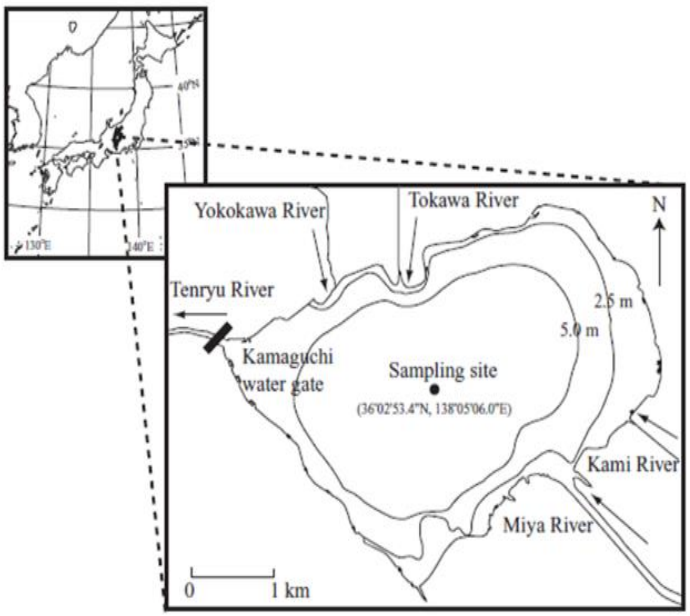
スペインのカタルーニャ州にある 4 つのダム湖では, TP, Chl. a, SD より求めた Carlson の TSI (TP), TSI (Chl), TSI (SD)の値を平均して, ダム湖を貧-中栄養, 富栄養, 過栄養と判定し, これらのダム湖の TSI の判定結果は, 貧-中栄養では珪藻・緑藻・クリプト藻，富栄養及び過栄養では藍藻が優占することを示した (Caputo, 2008)。

一方, ブラジルのサンパウロ州にある環境調査会社 (CETESB 社：COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL)は, 物理的指標として透明度 SD (m)，化学的指標として TP (mg L^{-1}) もしくは DIP (µg L^{-1})濃度, 生物的指標として Chl. a (µg L^{-1})の濃度を設け, 州内の淡水湖沼を Carlson の TSI の判断基準を更に細かく, 極貧栄養 (TSI ≦47 Ultraoligotrophic) , 貧栄養 (47< TSI < 52：Oligotrophic) , 中栄養 (52 < TSI < 59：Mesotrophic) , 富栄養 (59 < TSI < 63：Eutrophic) , 超富栄養 (63 < TSI < 67：Super eutrophic) , 過栄養 (TSI > 67：Hypereutrophic) の 6 つに分類することを提案している (Novo, 2013 ; Table 2-3b)。

経済協力開発機構 (OECD：Organization for Economic Co-operation and Development)の湖沼の分類基準は, 富栄養湖のTP濃度が年間平均35から100 mg m^{-3}, Chl. a濃度 (最高値) 25から75 mg m^{-3}, 中栄養湖のTP濃度 10から35 mg m^{-3}, Chl. a濃度 (最高値) 8から25 mg m^{-3}, 過栄養湖のTP濃度 100 mg m^{-3}以上，Chl. a濃度 (最高値) 75 mg m^{-3}以上と分類されている (OECD, 1982；Table 2-3c)。三田村ら (2014)は, 琵琶湖周辺の24の内湖の植物プランクトンの増殖に対する栄養評価をOECDの基準を用いて行った結果, 内湖のほとんどが富栄養湖であったが, 内湖は滞留時間が短い水系であるため，高い栄養塩の現存量を持つ湖水であっても植物プランクトンが充分に増殖・成長するまでの時間に，内湖から湖水が流出することが考えられ，Chl. a現存量による富栄養化の段階の評価が, リン現存量よりも貧栄養的に評価されやすい可能性があることを指摘し，この判定法を栄養段階に対する目安の評価であると報告している。一方TSIはSDのみでも評価できる利点があるが, 湖水に懸濁態物質が混在してい

る場合は植物プランクトン量として過大評価される(大槻ら, 1981)。低水温及び弱光の冬・春期には利用可能な栄養塩類が存在しているにもかかわらず，Chl. aより算出するTSIが低く評価される可能性を指摘しており, 二つ以上の項目の平均値を用いることが推奨されている(大槻ら, 1981)。

諏訪湖は長野県の中央 (標高 759 m) に位置し, 湖面積 13.3 km^2 最大水深 6.3 m, 平均水深 4.6 m の富栄養湖 (Fig. 2- 1)である (沖野・花里 2005)。 1965 年以降の諏訪湖は, 高度経済成長の影響を強く受け，工業廃水，生活雑廃水，農耕地排水，畜産排水，また合成洗剤に含まれる高いレベルのリン酸が未処理のまま河川より諏訪湖へ流入し，有機物汚染や過度の富栄養化現象を引き起こす原因となり (沖野, 2014)，藍藻 *Microcystis* 属が大量に発生した (Watanabe et al., 2012)。しかし, 諏訪湖では 1972 年から流域下水道及び終末処理場の建設などの浄化対策事業が進行していった (沖野, 2014)。最近の諏訪湖は,ワカサギなどの漁獲量の減少 (宮原・吉田, 2016)ワカサギやコイの大量死 (朝日新聞 デジタル URL. http://www.pref.nagano.lg.jp/suwakoryuiki/jigyo/gesui/fukyuritsu.html, 2017 年 8 月時点)が問題になっているが植物プランクトンの種組成は *Microcystis* 属の減少, 珪藻の優占，窒素固定藍藻が優占していることから複数の水質項目で諏訪湖の栄養状態を総合的に判断することは必要不可欠である。TSI 及び OECD の基準を用いた各湖沼間の富栄養化状態の比較は以前から行われているが, 同一湖沼における長期変遷を TSI で比較した例は無い。富栄養湖と分類してもその範囲は様々であり湖水の富栄養化のレベルを数字で表すことができる TSI は有効であると考えられた。近年諏訪湖の植物プランクトンは *Microcystis* 属の減少が観察され, 植物プランクトンの優占種の変化は水質の変化を反映しているため, 長期間にわたる水質の変遷を Carlson の TSI (TP, Chl, SD) Kratzer と Brezonik の TSI (TN)によって明らかにすることを目的とした。



諏訪湖の特徴	
集水域	531 km^2
湖面積	13.3 km^2
最大水深	6.3 m
平均水深	4 m
貯水量	0.063 km^3
滞留時間	40 days

Fig. 2-1 Map of Lake Suwa showing Sampling Site.
Sample was collected at lake center (●: 36º 02′ 50″ N, 138º 05′ 01″ E).

２．２ 方法

２．２．１ 諏訪湖の観測データ

本研究で用いたすべてのデータは夏季 (6 月から 10 月) の諏訪湖湖心 (36° 02′ 50″ N, 138° 05′ 01″ E) の表層より採水及び観測されたものである (Fig. 2-1)。

諏訪湖の表面積は 13.3 ㎢最大水深 6.3m, 平均水深約 4m, 貯水量は 0.063 km^3, 集水面積は 531 km^2 で湖面積の 40 倍である。直接流入面積は 31 本で主要河川は砥川， 上川, 宮川, 横河川であり, 流出河川は天竜川である (渡辺, 1997)。諏訪湖の流出口には釜口水門が建設され, 人為的な水位調整が行われている (長野県諏訪建設事務所, 2003)。

1997 年以降 2015 年までの栄養塩分析用試水は, 月に 2 回以上バケツによって採水しポリエチレン製の容器に入れて実験室に持ち帰り, また船上より SD, 水温 (550A, YSI Nanotech), pH (HM-30P, TOA-DKK)を測定した。実験室に持ち帰った試水の一部から TN をアルカリペルオキソ二硫酸カリウム-紫外吸光法 (大槻, 1981), TP をペルオキソ二硫酸カリウム分解法-モリブデンブルー法 (Murphy and Riley, 1962)でそれぞれ測定した。試水をガラス繊維濾紙 (GF/C, Whatman) にて減圧濾過し, 濾紙の Chl. a 濃度を Marker 法 (Marker,et al., 1980)で測定した。溶存無機態リン (DIP：dissolved inorganic phosphorus；PO_4-P) の測定は, アスコルビン酸還元法 (モリブデンブルー法), 溶存無機態窒素 (DIN：dissolved inorganic nitrogen；NO_3-N＋NO_2-N＋NH_4-N)の溶存亜硝酸態窒素 (NO_2-N)及び溶存アンモニア態窒素 (NH_4-N)はそれぞれ BR 法及びインドフェノール法で行った (西條・三田村, 1995)。これらの測定に比色計 (U2000, 日立製作所)を用いた。COD は 100℃における過マンガン酸カリウムによる酸素消費量 (西條・三田村, 1995)より求めた。溶存硝酸態窒素 (NO_3-N)はイオンクロマトグラフ (ICS-1500, DIONEX) にて測定した。

信州大学理学部付属諏訪湖臨湖実験所の定期観測は 1977 年から開始し, TN 濃度の測定は 1984 年から始めた。1977 年から 1996 年の Chl. a 濃度の測定は UNESCO /SCOR 法 (SCOR-UNESCO group, 1969)で， 1997 年からは上述の Marker 法を用いた。1977 年か 1996 年の pH

の測定は, 試水を持ち帰り実験室の卓上 pH メータにて測定している以外測定法に変化は無かった。1997 年から 2003 年の TP, TN, COD, pH 及び Chl.a 濃度は, 全層水のみが測定されていたので長野県のデータを用いた。またこの期間の DIN 及び DIP 濃度のデータは欠損した。この期間の長野県の測定法は, pH をガラス電極法 (JIS Z8802), TN 濃度を紫外吸光光度法 (JIS K0102　45.2), TP 濃度をペルオキソ二硫酸カリウム分解法 (JIS K0102　46.3), Chl. a 濃度をアセトン抽出による吸光光度法 (上水試験方法 74, 1985), COD 濃度を 100℃における過マンガン酸カリウムによる酸素消費量 (JIS K0102　17)であった。

1965 年から 1968 年の PO_4-P, Chl. a 濃度及び SD は, 諏訪湖浄化対策研究委員会 (諏訪湖浄化に関する研究 −湖沼汚濁への挑戦−, 1967),1969 年から 1973 年は, 諏訪湖研究グループ (倉沢, 1976；沖野ら, 1969)の研究結果を用いた。ガラス繊維濾紙 (GF/C, Whatman)にて濾過後濾液を用いて PO_4-P 濃度はアスコルビン酸混合法単一試薬法 (Strickland and Parsons, 1968)で定量をされ, 濾紙の Chl. a 濃度を UNESCO /SCOR 法で測定した。しかし, 各々のデータは, 不連続であり 1948 年及び 1966 年から 1969 の TN と TP, COD 濃度, NO_3-N, NO_2-N, NH_4-N 濃度及び 1979 年から 1982 年の TN 濃度は長野県のデータを用いた (長野県 1971 年 「昭和 46 年度までの水質調査 公共用水域水質測定結果. 長野県生活環境公害課編集・発行」 ; 長野県 1974 から 1982 「昭和 49 年度から昭和 57 年度 公共用水域水質測定結果. 長野県生活環境公害課編集・発行」)。TP 濃度の測定方法は, 過塩素酸分解後モリブデン青法 (水質汚濁調査指針 1965), COD 濃度は 30 分アルカリ法高温 0.25N $Na_2S_2O_3$ 滴定法 (水質汚濁調査指針,1965), TN 濃度は総和法 (上水試験法 25, 1971)であった。NO_3-N, NO_2-N, NH_4-N 濃度は, それぞれサリチル酸ナトリウム法 (水質汚濁調査指針, 1965), α -ナフチルアミン・スルファニル法, インドフェノール法 (上水試験法 25, 1971)で行った。これらの測定法は Table 2-1 にまとめて示した。

２．２．２ 植物プランクトンの計数

2008 年から 2015 年の植物プランクトン試料は, 夏季 (6 月から 8 月) における表層水 100 mL をホルマリンにて固定 (ホルムアルデヒドの最終濃度 1.5 %)し, 顕微鏡観察まで冷暗所に保存して 1 mL あたりの細胞数及び体積で示した (Wetzel and Likens, 2000)。

1965年から1972年の夏季植物プランクトン優占種の変遷を，倉沢 (1971)の報告書を元にTable 2- 4に細胞体積で表した。1981年の植物プランクトン優占種は, 長野県水産試験場諏訪支場の研究データを用いた (中村・山本, 1981)。1983年から2007年までは朴 (2009)による観察データ及び論文を参照した。1984年から1990年の6年間植物プランクトンの検鏡データが欠損しており連続して示すことができなかったが，1992年以降1997年までは1998年同様に*Microcystis*属の優占が顕著であったので表示せず省略した。2003年, 2004年, 2006年はcyanobacteriaのみ検鏡されていたためデータを示さなかった (Table 2-2)。本研究は1948年から2015年の諏訪湖における植物プランクトンの優占種の変遷の結果より4期に分け諏訪湖の富栄養化状態の変化を調べた。

Table 2- 1 Analysis method and measurement institution of past periodic survey of Lake Suwa.

Year	Measuring items	Methods	Reference data
1966 -1969	DIP：(PO_4-P), Chl. a, SD	PO_4-P：濾液アスコルビン酸単一試薬法 Chl. a：UNESCO/SCORE SD：Secchi disk depth	諏訪湖浄化対策研究委員会
1969 - 1973	DIP：(PO_4-P) , Chl. a, SD		諏訪湖研究グループ
1948, 1966 - 1969	TN TP, COD ：(Chemical oxygen remand) DIN：(NO_3-N+ NO_2-N + NH_4-N)	TN：総和法 TP：過塩素酸分解後モリブデンブルー法 COD：30 分アルカリ法高温 0.25N$Na_2S_2O_3$ 滴定法 NO_3-N：濾液サリチル酸 Na 法 NH_4-N：濾液インドフェノール法 NO_2-N：濾液 α-ナフチルアミンスルファニル法 TN：総和法	長野県環境部
1979 - 1982	TN のみ		
1997 - 2004	TN TP COD Chl.a DIN, DIP	紫外吸光法分解法 JIS K0102 の 45.2 ペルオキソ二硫酸カリウム分解法 JIS K0102 の 46.3 100℃における過マンガン酸カリウム JIS K0102 の 17 アセトン抽出による吸光光度法上水試験方法(1985)の 74 欠損	
1977 - 1996 1997 - 2004 全層データ 2011-2015	TN TP COD DIN：(NO_3N+ NO_2-N+NH_4-N) DIP：(PO_4-P) 光量子 Chl. a pH 水温	TN： ペルオキソ二硫酸カリウム-紫外吸光法分解法 TP：ペルオキソ二硫酸カリウム分解法-モリブデンブルー法 COD：100℃における過マンガン酸カリ ウムによる酸素消費量 NO_3-N：濾液イオンクロマトグラフィー NH_4-N：濾液インドフェノール法 NO_2-N：濾液 BR 法 PO_4-P：濾液アスコルビン酸還元法 照度計 Chl. a：UNESCO/SCORE 1997 年より Marker 法 1977 年から 1996 年は試水を持ち帰り実験室の卓上 pH メータにて測定 サーミスタ温度計	諏訪臨湖実験所 山地水環境教育センター 山地水環境教育センター未報告ﾃﾞｰﾀ

Table2-2 Reference data of phytoplankton in Lake Suwa.

Year	Reference data
1948, 1960 - 1972	倉沢ら, 1971
1981	長野県水産試験場諏訪支場, 中村・山本, 1981
1984 - 1990	データ欠損
1983, 1992 - 2007	朴, 2009, 中村, 2010
2008 - 2015	本研究

２．２．３ TSI による水質の評価

諏訪湖の 1948 年から 2015 年の 6 月から 8 月における栄養状態の変化を, TSI (TP, Chl, SD) 及び TSI (TN) の式を用いて算出, 判定した。TSI_{Mean} は, TSI (TP, Chl, SD, TN) の平均で栄養状態の変化を示す指標とした。ただし, 1977 年以前は連続データの欠損が多いためデータを示すことができない年もあった。各算出式を以下に示す (Carlson, 1977; Kratzer, Brezonik, 1981)。

$$TSI(TP) = 14.42 \ln(TP) + 4.15 \quad (1)$$

$$TSI(Chl) = 9.81 \ln(Chl) + 30.6 \quad (2)$$

$$TSI(SD) = 60 - 14.41 \ln(SD) \quad (3)$$

$$TSI(TN) = 54.45 + 14.43 \ln(TN) \quad (4)$$

$$TSI_{Mean} = [(TSI(TP) + TSI(Chl) + TSI(SD) + TSI(TN))/4] \quad (5)$$

本方法では, TSI が 30 以下は貧栄養, 30 から 50 が中栄養, 50 から 70 は富栄養, 70 以上では過栄養と判定する (Table 2-3a)。

２．２．４ 統計解析

諏訪湖における TSI の長期変遷について, 植物プランクトンの優占種の変遷より 4 期に分けた。第 1 期 1948 年から 1969 年のサンプル数は極端に少ないため統計データの対象からは外した。一元配置分散分析 (one-way ANOVA)を用いて, 第 2 期 1970 年から 1998 年, 第 3

期 1999 年から 2007 年, 第 4 期 2008 年から 2015 年の三つの期間について TSI に差があるか (有意水準 $p < 0.01$, $p < 0.05$)を判断した後, Tukey test (有意水準 $p < 0.01$, $p < 0.05$)によって TSI の平均値を比較した (Origin Pro 9.0, Origin Lab.)。また, TN 及び TP, DIN, DIP 濃度, pH, 水温及び透明度についても同様に one -way ANOVA と Tukey test にて検定を行った。

Table2-3 Classes of Trophic State Index and OECD variables used to classify.

(a) This study

Classes	Intervals
Oligotrophy (貧栄養)	30 < TSI
Mesotrophy (中栄養)	30 TSI < 50
Eutrophy (富栄養)	50 < TSI < 70
Hypertrophy (過栄養)	TSI > 70

(b) Trophic state classification –CETESB

Classes	Intervals
Ultra oligotrophy (極貧栄養)	TSI ≦47
Oligotrophy (貧栄養)	47< TSI < 52
Mesotrophy (中栄養)	52 < TSI < 59
Eutrophy (富栄養)	59 < TSI < 63
Super eutrophy (過栄養)	63 < TSI < 67
Hypertrophy (超過栄養)	TSI > 67

Source: CETESB (1978).

(c) OECD (Eutrophication of Waters. Monitoring, Assessment and Control)

Classes	TP mg m^{-3}	Chl.a mg m^{-3}	Chl.a mg m^{-3} (max)	SD (m) average
Extra oligotrophy	< 4	< 1	< 2.5	< 12
Oligotrophy	< 10	< 2.5	< 8	< 6
Mesotrophy	10 - 35	2.5 - 8	8 - 25	3 - 6
Eutrophy	35 - 100	8 - 25	25 - 75	1.5 - 3
Hypertrophy	> 100	> 25	> 75	> 1.5

Source: OECD (1982).

２．３ 結果と考察

２．３．１ 諏訪湖の夏季植物プランクトンの優占種の変遷

Table 2- 4 の植物プランクトンの優占種の変遷より 4 期に分けた結果, 1948 年から 1969 年を第 1 期とした。1948 年には *Microcystis* 属が優占したが生物量は 0.1 $mm^3 L^{-1}$ から 1 $mm^3 L^{-1}$ 程度で 1960 年代には優占しない年 (1963 年, 1965 年, 1966 年,1969 年)も観られた。1965 年の優占植物プランクトンは, 珪藻 *Aulacoseira* 属, *Asterionella* 属, 糸状緑藻 *Mougeotia* 属の順で *Microcystis* 属は数 %の存在であった (Table 2-4)。この期間の夏季 TP 濃度は, 0.022 から 0.08 mg L^{-1} で (Fig. 2-2c), COD 濃度は 1963 年の 0.61 mg L^{-1} から比較すると 1965 年には 4.41 mg L^{-1} (Fig. 2-2a)に増加していたことから, 1960 年代後半以降に *Microcystis* 属が増加してきたことが推察された。

1970 年代から 1998 年の *Microcystis* 属の優占が顕著であった期間を 2 期とした (Table 2-4)。1970 年には, *Microcystis* 属が 98 %, *Phormidium* 属, *Dolichospermum* 属と藍藻が優占し, 1977 年には *Microcystis* 属が 99 %に達していた。1974 年の植物プランクトンは記録になかったが, TP 濃度は 0.88 mg L^{-1} 及び COD 濃度 23.1 mg L^{-1} と観測期間中の最高値を示していることから, *Microcystis* 属が最も優占した年と推測できる (Fig.2-2a, c)。しかし, 1981 年の生物量は 66 $mm^3 L^{-1}$ 程度(Fig.2-4a, b)で *Microcystis* 属は 84 %, 2 位の *Aulacoseira* 属は 8 %であった。下水道供用開始 4 年目(長野県, 2016. ; Fig. 2-3) となった 1983 年の生物量は, 60 $mm^3 L^{-1}$ (Fig.2-4a, b) と *Microcystis* 属が 65 %まで減少し, *Dolichospermum* 属が 27 %出現したが, COD 濃度は 5.8 mg L^{-1} まで減少した (Fig. 2- 2a,)。

第 2 期の栄養塩濃度は増加と減少が観察されたため, 2 期を約 9 年ごとに区切って, 1 年ごとの平均値における最大値と最小値を Table 2-5 に示した。TN 濃度は, 1978 年の 5.7 mg L^{-1} が最高値で, 1980 年代には 2.8 mg L^{-1} から 1.0 mg L^{-1} まで減少したが, 1990 年は 2.6 mg L^{-1}, 1993 年には 2.1 mg L^{-1} と再び増加し上下に値が変動した (Fig. 2-2b, Table 2-5)。2 期における TN 濃度は, 一元配置分散分析 (one-way ANOVA)で有意差 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)があり, Tukey

test による平均の比較では, 3 期及び 4 期に比較して有意に濃度が高いことが確認 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)された。しかし 3 期と 4 期の間には有意差($P > 0.01$, $P > 0.05$)はなかった (Fig. 2-5d ,Table 2-6)。DIN 濃度は, 1993 年に最高値 (826 ± 299 μg L^{-1})に達し, 減少傾向がみられたのは 2009 年以降であった (Fig. 2-2d, 2-5d ,Table 2-5, 2-6)。

1980 年代の TP 濃度は, 1974 年に比較すると 1/5 から 1/8 に減少して 0.16 mg L^{-1} から 0.10 mg L^{-1} の範囲で変動がみられた (Fig. 2-2c, Table 2-5)。1990 年には 0.18 mg L^{-1} まで増加し, 1993 年には 0.05 mg L^{-1} まで減少していることから, TN 濃度と同様に増加と減少を繰り返している (Fig. 2-2c, Table 2-5)。

DIP 濃度は 1978 年の最高値 67.3 μg L^{-1} から 1981 年には 14.3 μg L^{-1} 以下にまで減少を示したが, 1990 年には再び 39.2 μg L^{-1} に増加した (Fig. 2-2e, Table 2-5)。DIN 濃度を除いた湖水の栄養塩濃度は, 1970 年代に比較すると 1980 年代には減少傾向が観察されている。しかし, 1990 年代には再び増加傾向が観察され, 1998 年は *Microcystis* 属が 99 %に優占していた (Table 2-4, 2-5, Fig. 2-2, Fig. 2-4a, b)。

第 3 期目は 1999 年から 2007 年で, *Microcystis* 属の現存量の急激な減少が示された。1999 年の *Microcystis* 属の現存量は, 1998 年の 3 %までに激減した (Fig. 2-4 a, b)。1970 年から 1998 年に比較して 1999 年から 2007 年の TN 濃度 (平均 0.66 ± 0.32 mg L^{-1}), TP 濃度 (平均 0.05 ± 0.02 mg L^{-1})の減少及び DIP 濃度の減少 (平均 7.4 ± 4.2 μg L^{-1})が観察された (Fig.2-2,b c, e, Table 2-6)。一方で, 1999 年から 2007 年の DIN 濃度 (平均 251 ± 340 μg L^{-1})は減少していないが, 2005 年 6 月下旬から 7 月中旬には, 窒素固定藍藻 *Aphanizomenon flos-aquae* (3.4 から 17.9 mm^3 L^{-1})が優占(中村ら, 2010)した (Fig. 2-4b, c)。有光層の DIN 濃度 (29 から 283 μg L^{-1}) と DIP 濃度 (10 から 11 μg L^{-1})の低下が確認され (Fig. 2-2d, e), それ以降毎年出現が認められた。*Ap. flos-aquae* は同じ窒素固定藍藻 *Dolicohspermum* 属とのリン接種に関する半飽和定数を比較したとき, より低いリン濃度での適応が高いことから (Nobel, 1997) DIP 濃度と DIN 濃度が低かったこの年に優占したと推測された。1999 年以降の *Microcystis* 属の変化の原因は, 1998 年 9 月に二度の台風の影響で湖内の栄養塩及び *Microcystis* 属の越冬細胞が湖外へ

と大量に流出した可能性が示唆された (朴, 2009； 宮原, 2009)。すなわち翌年度の *Microcystis* 属形成の時期の遅れが減少の要因となった。

第 4 期目は 2008 年から 2015 年であり, 2008 年から 2011 年の植物プランクトンは, *Microcystis* 属が減少し珪藻 *Synedra* 属が優占することで植物プランクトンの組成が変化した (Table 2-4, Fig. 2-4b, c)。

DIN 濃度は 2008 年から 2015 年 (平均値 141 ± 169 μg L^{-1}) に 300 μg L^{-1} 以下に半減した (Fig. 2-2d, Table 2-6)。2012 年以降から 2014 年では, 窒素固定藍藻 *Dolichospermum* 属が優占し, COD 濃度は上昇した (Table 2-4, Fig. 2-2a, Fig. 2-4 b, c)。特に 2013 年では, 6 月初旬から出現した *D. affinis* の生物量が 7 月中旬に最大値 (15.9 から 23.5 mm^3 L^{-1})に達し, 8 月中旬まで優占した (Fig. 2-4 b ,c)。この期間の DIN 濃度は 20 μg L^{-1} 以下を示した (Fig. 2- 2d)。 DIN 濃度は one-way ANOVA. $P < 0.05$ で有意差があり, 2 期及び 3 期と比較して 4 期に濃度の減少 ($P < 0.05$)がみられた (Fig. 2-2d, Table 2-5, Table 2-6)。

DIP 濃度は, 1999 年から 2007 年 (平均 7.4 ± 4.2 μg L^{-1})と比較すると 2012 年から 2015 年 (平均 6.7 ± 3.1 μg L^{-1})で減少が観られた (Table 2-4, Fig. 2-2e)。DIP 濃度は one-way ANOVA で有意差 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)が確認され有意水準 $P < 0.01$ では 2 期と 3 期に比較して 4 期は有意に濃度が低いことが確認された (Table 2-6, Fig.2-5)。すなわち, 2008 年から 2015 年の DIN と DIP 濃度の減少が *Microcystis* 属から珪藻 *Synedra* 属, *Dolichospermum* 属への優占種の変化に影響したと考えられた (Fig.2-2d, e, Fig 2-5, Table2-5, Table 2-6)。

諏訪湖の 6 月から 8 月の表層水温を Fig. 2-6 に示した。2 期である 1970 年から 1998 年の平均は 22.5 ± 2.7℃ (N = 186), 3 期の 1999 年から 2007 年は 23.4 ± 2.5℃ (N = 64), 4 期の 2008 年から 2015 年は 23.8 ± 2.3℃ (N = 80)と表層水温の増加が観察された。表層水温の増加は有意水準 $P < 0.01$ では 2 期と 4 期に有意差が観られた。表層の pH は, 1970 年から 1998 年の平均は 8.9 ± 0.8 (N = 173), 1999 年から 2007 年は 9.1 ± 0.5 (N = 37), 2008 年から 2015 年 9.1 ± 0.5 (N = 71)で有意水準 $P > 0.01$, $P > 0.05$ とも 3 つの期間において変化が観察されなかった。また SD については 1970 年から 1998 年 0.95 ± 0.38 m (N = 203), 1999 年から 2007 年

の平均 1.17 ± 0.34 m (N =72), 2008 年から 2015 年 1.24 ± 0.49 m (N = 106)で 1970 年から 1998 年に比較すると改善が見られる($P < 0.01$, $P < 0.05$)が, 3 期と 4 期に有意差はなかった ($P > 0.01$, $P > 0.05$)。水温の増加が 2008 年から 2015 年の植物プランクトンの生物量や栄養塩の濃度に影響を与えている可能性については更なる研究が必要である。

Table 2-4 Yearly changes of dominant phytoplankton genus during summers from 1948 to 2015.

① ~ ⑤ : Order of phytoplankton predominance ; + : 1-3% ; r : less than 1%.

Phases		1										2							3			4							
	Genus	1948	1960	1961	1963	1964	1965	1966	1967	1968	1969	1970	1971	1972	1977	1981	1983	1998	2002	2005	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Cyanophytae	*Microcystis*	①60%	①	①	③	①	③6%	+	①	①	+	①98%	①99%	①99%	①99%	①84%	①65%	①99%	①90%	②15%	①80%	④5%	③6%	+	r	r	r	r	r
	Chroococcus				+																								
	Aphanizomenon																			①80%	②10%	③9%	②10%	③7%	r	r	+	r	r
	Phormidium					+			③	③	+	②	②	②	②		③6%	②	②5%								r	r	
	Apanocapsa					+			+																		5%	5%	r
	Dolichospermum	⑤			+		+		+			③			+	r	②27%			+	④3%	⑤4%	+	④4%	r	①53%	①64%	①30%	3%
Bacillariophyta	*Aulacoseira*	②15%	②	②	①	②	①	②	②	②	+	④		③	④	②8%	r	③	③	③4%	③4%	②20%	④5%	②20%	②19%	③18%	8%	②29%	①41%
	Cyclotella	③	③	③	②	③	+	③	+	+	①	+	+	+	⑥	r	r	r	r		r	⑥3%	+		+	+	r	3%	3%
	Tabellaria																r												
	Asterionella	+	+	+	+	+	②	①		+		+			+					r				+			r	+	+
	Synedra	r	+	+			+	+	+	+		r			r			r	r	r		①50%	①60%	①46%	①26%	②24%	+	③21%	②23%
	Navicula														r		④					+							r
	Fragilaria		+		+				+		②																		
	Nitzschia	+					+			+					③			④	④										
Chlorophyta	*Micractinium*				+		+	+	+		+	⑥			r		r								r		r		
	Actinasttrum			+				+	+																				
	Staurastrum				+				+														r	r		3%	+	+	3%
	Scenedesumus		+			+	+		+	+						+													
	Coelastrum				+	+	+	+	+																				
	Mougeotia					+	③	r			+														③17%	+	4%	+	③19%
Flagellatae	*Peridinium*	④	+	+	+		+	+															r	+	+	+	5%	4%	r
	Euglena				+	+									⑤									+					
	Pandorina	r																											
	Eudorina								+		③	r																	

(Rewrite of Kurasawa , 1970 ; Park, 2009 ; Suwa branch, Nagano pre. fisheries experiment station, 1983).

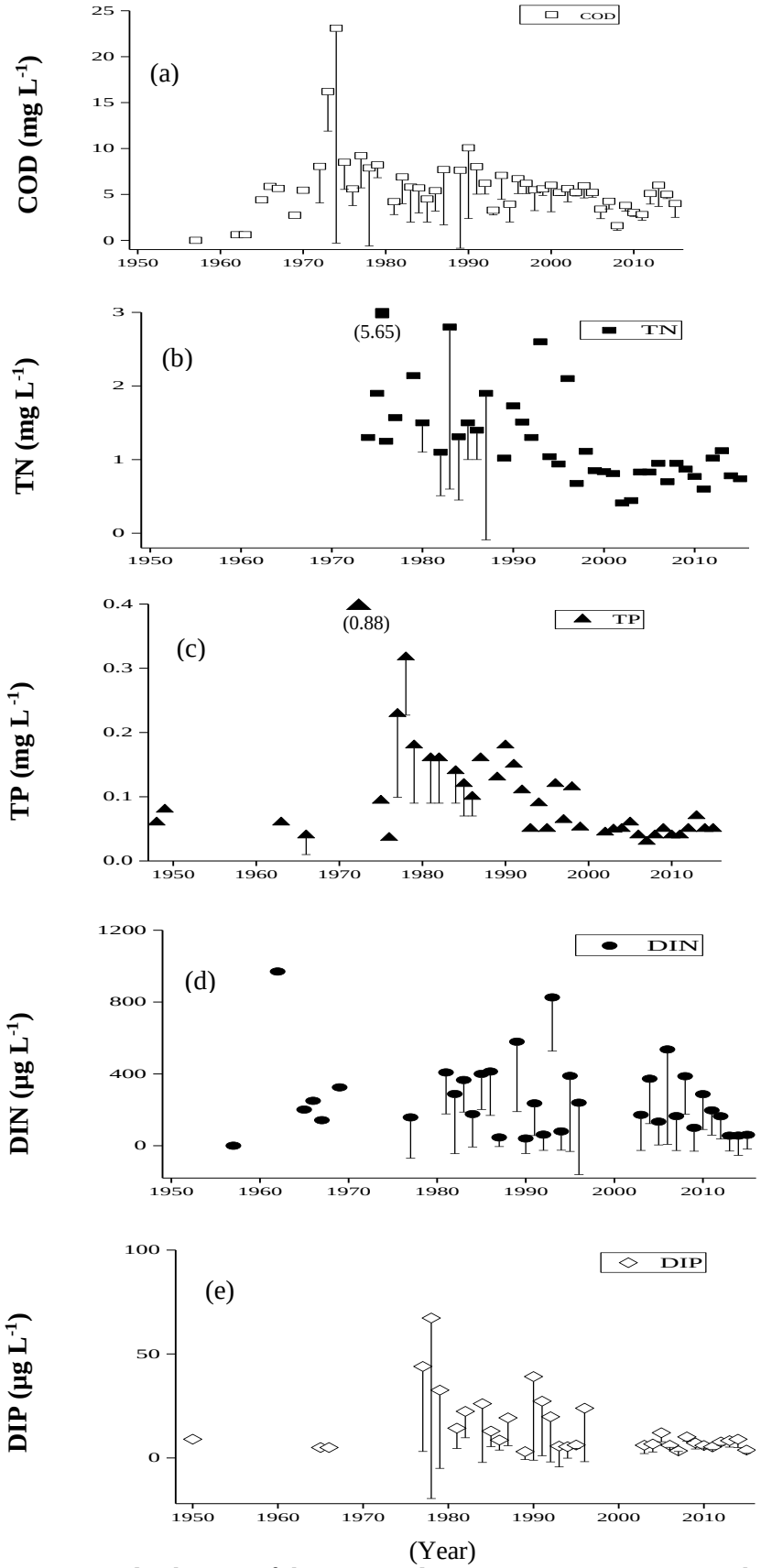


Fig.2-2 Yearly changes of the COD and nutrients concentration in Lake Suwa.Veraical bars represent standard deviations.

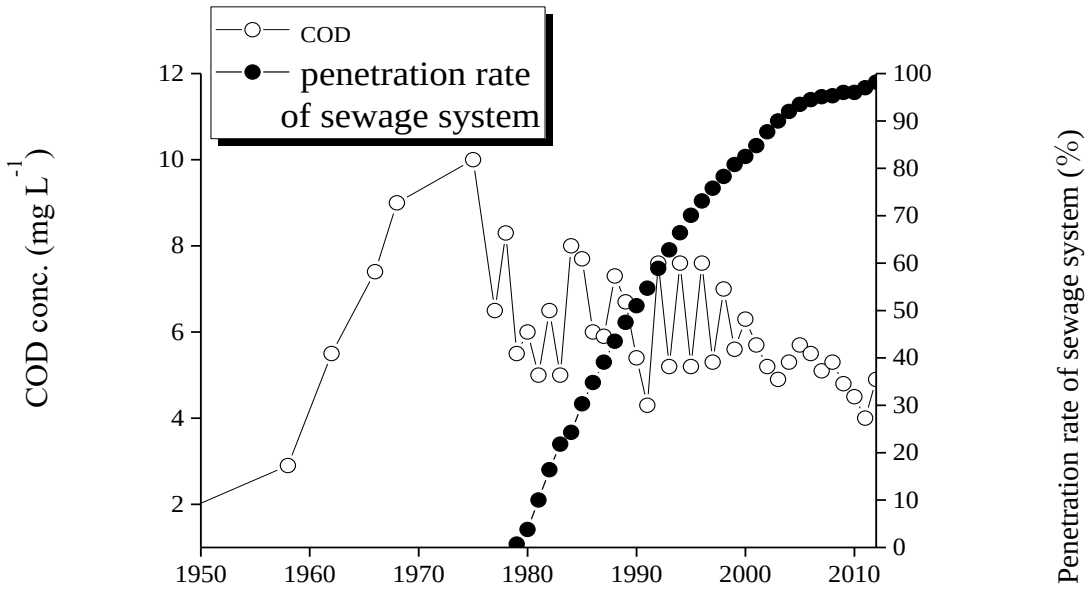


Fig.2-3 Change in penetration rate of sewage system and concentration(conc.) of COD in Suwa area. (Referenced from Nagano Prefecture Environment Division).

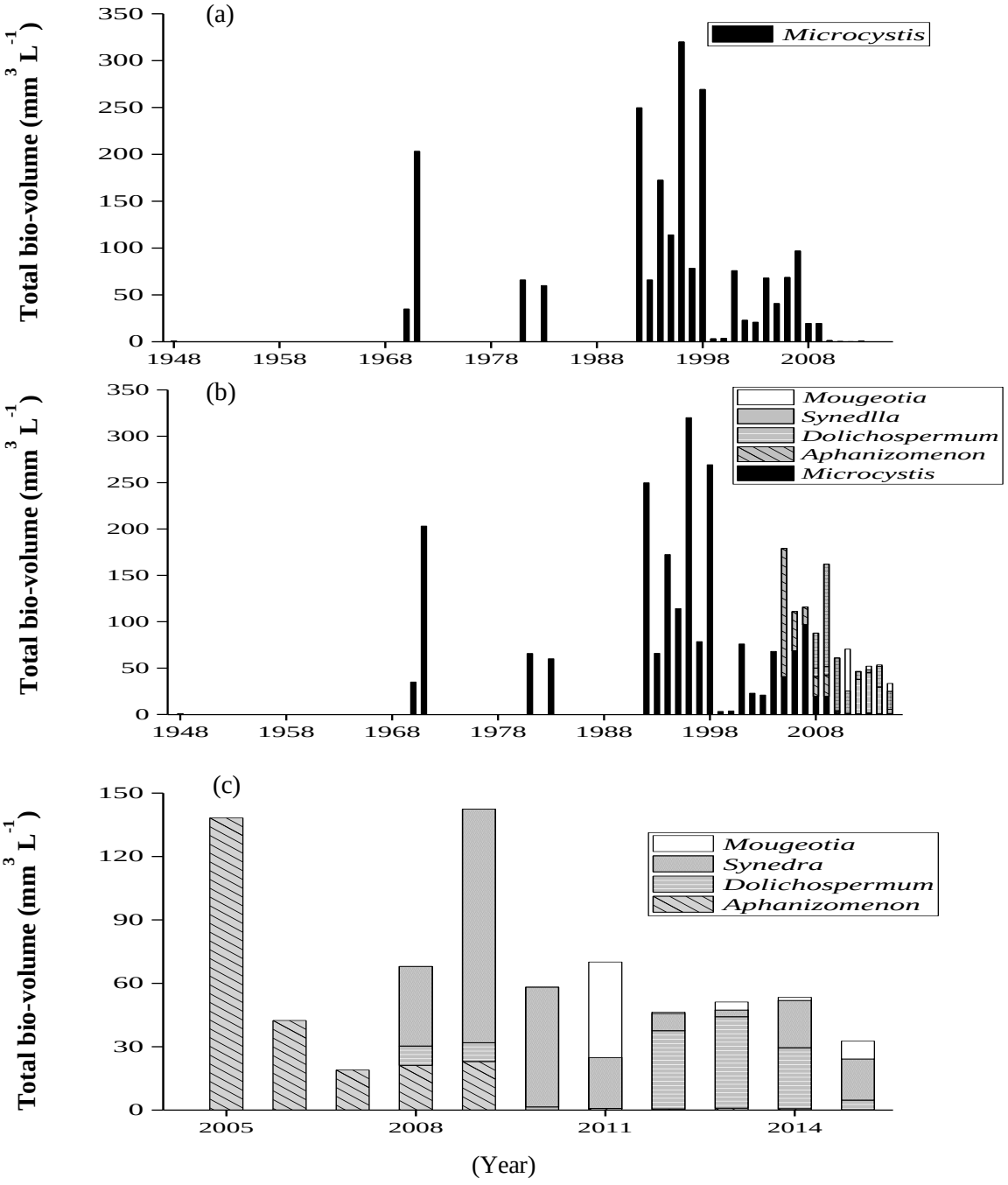


Fig. 2-4 Yearly changes of dominant phytoplankton biomass in surface water from June to October during 1992 to 2015 of Lake Suwa. (a) *Microcystis* bio-volume, (b) Dominant phytoplankton biomass with *Microcystis* bio-volume,
(c) Dominant phytoplankton biomass without *Microcystis* bio-volume.

Table 2-5 Results of maximum and minimum nutrient concentration of each phase. The second phase showed divided about every nine years. It is indicated by the max. and min. value of the average from June to October.

Phases	**1**	**2**			**3**	**4**
Year	**1948 - 1969**	**1970 - 1979**	**1980 - 1989**	**1990 -1998**	**1999 - 2007**	**2008 - 2015**
TN (mg L^{-1})	__*	**1.3 -5.7** (N = 5)	**1.0 - 2.8** (N = 8)	**0.7 - 2.6** (N = 9)	**0.4 – 0.9** (N = 9)	**0.6 - 1.1** (N = 9)
TP (mg L^{-1})	**0.04 - 0.08** (N = 5)	**0.04 - 0.88** (N = 4)	**0.10 - 0.16** (N = 7)	**0.05 – 0.18** (N = 9)	**0.03 - 0.06** (N = 7)	**0.04 - 0.07** (N = 9)
DIN (µg L^{-1})	**142 - 970** (N = 6)	**158** (N = 1)	**46 - 579** (N = 8)	**40 - 826** (N = 7)	**134 - 536** (N = 5)	**56 - 387** (N = 9)
DIP (µg L^{-1})	**5 - 9** (N = 3)	**32.6 - 67.3** (N = 3)	**3.0 - 26.1** (N = 7)	**5.4 - 39.2** (N = 7)	**3.4 - 12.1** (N = 5)	**3.8 - 10.1** (N = 9)

*: No data. N = number of samples.

Table 2-6 Changes of the nutrients concentration during the summer season (June to August) in Lake Suwa (Phase 1- 4).

Phases	**1**	**2**	**3**	**4**
Year	1948 - 1969	1970 - 1998	1999 -2007	2008 - 2015
TN (mg L^{-1})	—*	**1.35 ± 0.84** ^{A} (N = 128)	**0.66 ± 0.32** ^{B} (N = 35)	**0.86 ± 0.39** ^{C} (N = 61)
TP (mg L^{-1})	**0.06 ± 0.02** (N = 4)	**0.12 ± 0.09** ^{A} (N = 158)	**0.05 ± 0.02** ^{B} (N = 54)	**0.05 ± 0.01** ^{C} (N = 60)
TN/TP (mol)	—*	**25.9 ± 16.6** (N = 149)	**38.7 ± 19.1** (N = 47)	**40.1 ± 8.5** (N = 41)
DIN (µg L^{-1})	**313 ± 379** (N = 5)	**271 ± 306** ^{a} (N = 146)	**251 ± 340** ^{b} (N = 27)	**141 ± 169** ^{c} (N = 59)
DIP (µg L^{-1})	**6.3 ± 2.3** (N = 3)	**19.4 ± 29.0** ^{A} (N = 137)	**7.4 ± 4.2** ^{B} (N = 28)	**6.7 ± 3.1** ^{C} (N = 55)

N.D: No data. N = number of samples.A, B, C: level of significans $p < 0.01$. a, b, c: level of significans $p < 0.05$.

TN, TP : AB, AC ($p < 0.01$, $p < 0.05$), BC ($p > 0.01$, $p > 0.05$). DIP : AC ($p < 0.01$, $p < 0.05$) ,

AB ($p > 0.01$, $p < 0.05$). BC ($p > 0.01$, $p > 0.05$), DIN : ac ($p < 0.05$), ab, bc ($p > 0.05$).

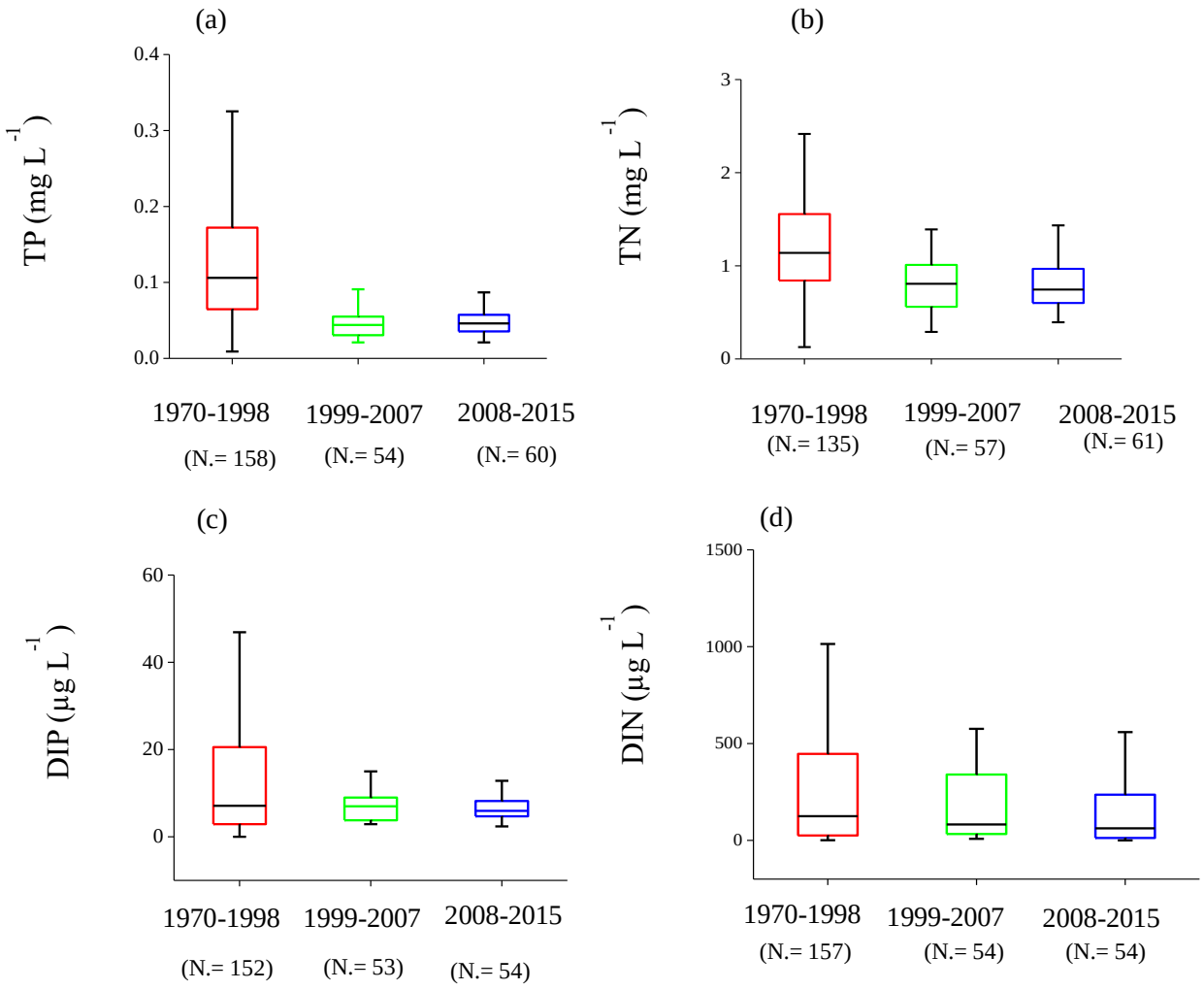


Fig. 2-5 Each period of changes of the nutrients concentration in Lake Suwa.

a) TP, b) TN, c) DIP d) DIN concentrations at center of surface water duaring 1970-1998, 1999-2007, 2008-2015. Turkey test was performed for multiple comparisons when significant differences were revealed by ANOVA. Horizontal lines of the box show first quartile, median, and third quartile from below. Error bars denotes 10 and 90 percentiles.

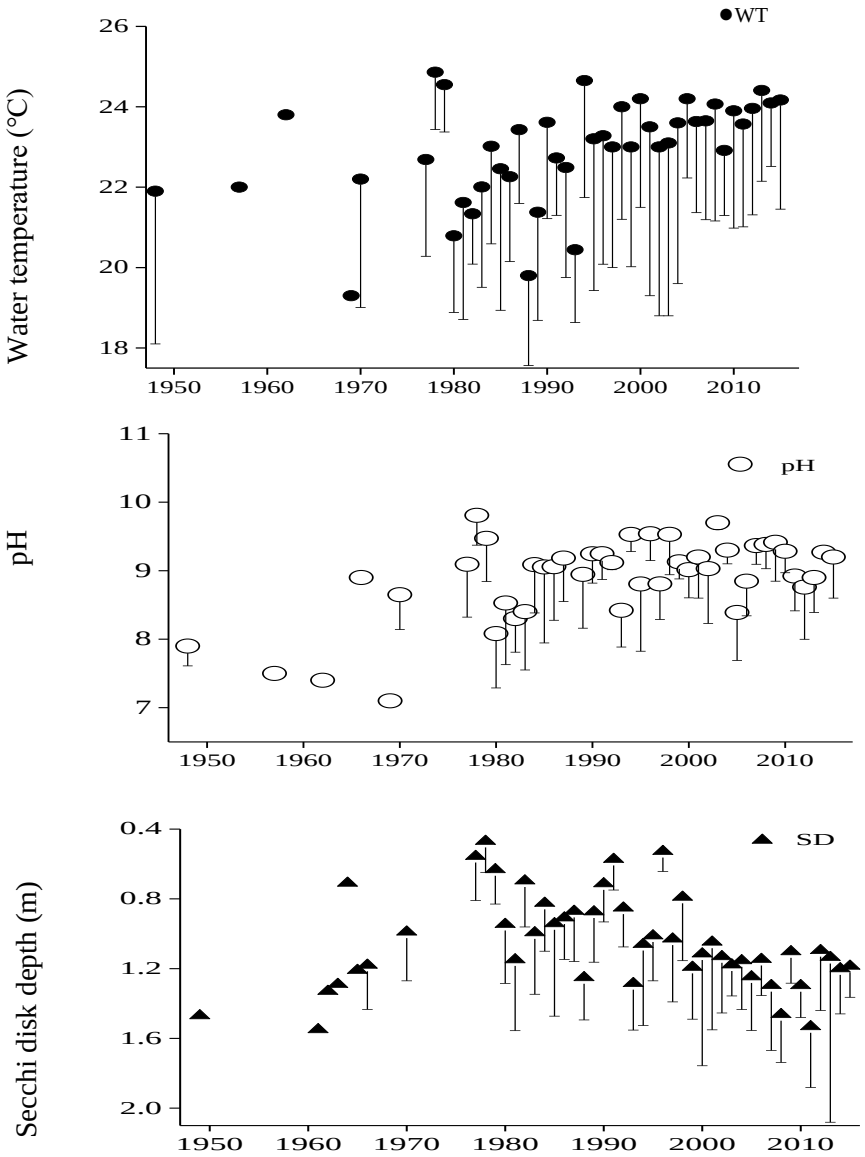


Fig.2-6 Changes in Water temperature, Secchi disk depth and pH in Lake Suwa during the summer (June to August) from 1948 to 2015. Veraical bars represent standard deviations.

２．３．２ TSI の変化

1 期目の 1948 年と 1963 年の TSI (TP)は 63 と富栄養であったが 1966 年 7 月には 49 から 63 と中栄養から富栄養を示した (Fig. 2-7a)。TSI (Chl) は, 1968 年, 1969 年にそれぞれ 57 ± 23 (N = 5), 64 ± 5 (N = 9)を示し中栄養から富栄養に分類された (Fig. 2-7b)。1949 年の TSI (SD) は, 54 を示し, 1961 年から 1966 年は 56 ± 4 (N = 6)で富栄養に分類された (Fig. 2-7c)。TSI (TN) は, 1973 年までデータがなかったため TSI_{Mean} も計算できなかった (Fig. 2-7d, e)。これらの結果から, 1948 年から 1960 年代は中栄養の上限から富栄養の間を示し 1960 年代後半から 1970 年代に富栄養から過栄養に変化したと言えるだろう (Fig. 2-7)。

Table 2-7 は 2 期を約 8 から 9 年ごとに分け, その期間の平均値の最大と最小値を示した。TSI (TP)は, 1974 年には 100 を示した。1980 年から 1989 年は過栄養を維持しているが, 1990 年代は過栄養と富栄養が混在していた (Fig. 2-7a, Table 2-7)。TSI の長期変動について, one-way ANOVA と Tukey test により, データ数が少ない第 1 期を除いた 3 期分 (1970 から 1998 年, 1999 から 2007 年, 2008 から 2015 年)の値を比較し有意差を示した (Table 2-8)。TSI (TP) は, 2 期の平均値 (70.8 ± 9.8)に比較して 3 期 (59.6 ± 4.4)及び 4 期 (59.6 ± 4.4)は 10 以上の変化が観察された。TSI (TP)の変化は, TSI の減少傾向が最も顕著に表れ, 2 期に比較して 3 期と 4 期の平均値は有意に低かった ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。しかし TSI (TP)の 3 期と 4 期の間に有意差は無かった ($p > 0.01$, $p > 0.05$).

1977 年及び 1978 年の TSI (Chl) は, 80 から 85 に増加し過栄養を示したが, 1980 年代と 1990 年は過栄養から富栄養まで減少し, 再び 1990 年代には過栄養に上昇した。1999 年以降

は富栄養に位置し, 増減を繰り返しながら減少傾向を示した (Fig. 2-7b, Table 2-7, Table 2-8)。TSI (Chl) は 2 期の平均値 71.8 ± 8.3 に比較して 3 期 65.3 ± 6.1 及び 4 期 65.3 ± 6.0 の差が約 5 程度観察され有意に低い ($p < 0.01$, $p < 0.05$)が, 3 期と 4 期の間に有意差は無い ($p > 0.01$, $p > 0.05$)。

TSI (SD)は 1971 年から 1977 年のデータが欠落しているため, 1978 年が 72 と最高値を示しているが, 他の TSI データより推察するとこの欠落した期間に最高値があったのだろう (Fig. 2-7c)。1980 年から 1989 年の 61 - 66 に比較して 1990 年から 1998 年の 57 - 70 は最小値の低下が観察されたが再び穏やかな増加傾向が観察された (Fig. 2-7c, Table 2-7)。TSI (SD)も 2 期の平均値に比較すると 3 期, 4 期の平均値は有意に低い ($p < 0.01$, $p < 0.05$)が, 3 期と 4 期には有意差 ($p > 0.01$, $p > 0.05$)はなかった。

第 2 期に分類した 1974 年から 1979 年の TSI (TN)は, 1974 年の 79 が最高値で過栄養から富栄養の範囲 平均 56.7 ± 7.3 に分布した。TSI (TN)は, 1990 年以降減少している傾向が観察され, 3 期の 1999 年から 2007 年は, 55 から 48 (平均 51.5 ± 6.8), 4 期の 2008 年から 2015 年 54 から 47 (平均 50.9. ± 5.6)貧栄養から中栄養が混在した状態となった (Fig. 2-7d, Table 2-7, Table 2-8)。

1977 年から 1979 年の TSI_{Mean} は 75.1 ± 0.8 の間で過栄養に分類された (Fig. 2-7e)。2 期目の 1970 年から 1998 年の平均 (66.1 ± 6.3)で過栄養から富栄養の境界を上下している (Table 2-8)。2000 年以降は 60 以下に減少し, 4 期目の 2008 年以降は 63 から 54 (平均 58.5 ± 2.7)の範囲に位置した (Fig. 2-7e, Table 2-7, Table 2-8)。

Caputo, (2008)は, 類型が同じで標高の異なる 4 つの湖の 19 か所のサンプル地点から, TSI (TP), TSI (Chl), TSI (SD) の平均を使って湖水の栄養段階を分類し, 植物プランクトンの群集構造を調査した。その結果 TSI と植物プランクトンの関係は, 栄養段階の増加に沿って珪藻の減少及び cyanobacteria の増加が観察され, 緑藻は TSI の中栄養段階で増加した。諏訪湖での TSI と植物プランクトンの関係は, 栄養段階の増加で *Microcystis* 属が優占し, 中栄養への移行期では *Microcystis* 属の減少, 珪藻 *Synedra* 属の増加, 緑藻の増加及び窒素固定藍藻 *Dolichospermum* 属が観察されるようになっている。

Table 2-8 には, 夏季の諏訪湖の優占植物プランクトンと各分類期間における TSI の栄養分類の判定結果を示した。1 期では, TSI (TP)と TSI (Chl)はそれぞれ, 61.1 ± 7.2 及び 65.4 ± 5.3 と近い値を示し中栄養の上限値から富栄養を示した。2 期では, TSI (TP)と TSI (Chl)はそれぞれ, 70.8 ± 9.8 及び 71.8 ± 6.1 とほぼ同じ TSI 値を示し富栄養から過栄養に分類された。

TSI (SD)及び TSI (TN)の評価はそれぞれ 63.8 ± 6.1, 56.7 ± 7.3 とそれより低く富栄養から過栄養を示した (Table 2-8, Fig. 2-7)。TSI_{Mean} は, これらの平均値 66.1 ± 6.3 であるために中間値として評価することができ, 評価に差が生じた時に判断しやすいことに利点がある。

TSI (TN) は，過栄養の期間データ数が少なかったこともあるが，過栄養の評価が他の TSI 値に比較して低く観察されたことから，諏訪湖における過栄養を評価するには適していないように見えた (Fig. 2-7d, Table 2-8)。

3 期と 4 期では, TSI (TP)と TSI (SD)及び TSI_{Mean} の判定はほぼ等しいと評価されたが,TSI (Chl)は高く, 過栄養と富栄養の変化が緩慢である (Fig. 2-7b, Table 2-8)。Chl. a 濃度は直接植

物プランクトン量を現わしていると考えられるが, Lake Mondsee (Austria)は，TP 濃度が減少して，植物プランクトンの組成が変化したにもかかわらず，植物プランクトンの生物量は増加が観察された。これは，様々な植物プランクトンの減少にタイムラグがあることを示唆している(Dokulil and Teubner, 2005)。よって諏訪湖での TSI (Chl)は, 今後もモニタリングする必要がある。

Table 2-7 Results of maximum and minimum values of TSI of each phase the second phase was showed divided about every nine years. It is indicated by the max. and min. value of the avege from June to October.

Phase	**1**	**2**			**3**	**4**
Year	**1948 - 1969**	**1970 - 1979**	**1980 - 1989**	**1990 - 1998**	**1999- 2007**	**2008- 2015**
TSI (TP)	**49 - 67**	**56 - 101**	**71 - 78**	**59 - 77**	**52 - 64**	**55 - 65**
	(N = 4)	(N = 6)	(N = 7)	(N = 9)	(N = 9)	(N = 8)
TSI (Chl)	**57 - 64**	**62 - 85**	**68 - 75**	**66 - 75**	**62 - 69**	**61 - 72**
	(N = 2)	(N = 4)	(N = 7)	(N = 9)	(N = 5)	(N = 8)
TSI (SD)	**52 - 65**	**61 - 72**	**57 - 70**	**57 - 70**	**57 - 61**	**54 - 61**
	(N = 7)	(N = 4)	(N = 8)	(N = 9)	(N = 9)	(N = 8)
TSI (TN)	__*	**58 - 79**	**54 - 67**	**53 - 64**	**48 - 55**	**47 - 54**
		(N = 6)	(N = 8)	(N = 9)	(N = 9)	(N = 8)
TSI $_{Mean}$	__*	**72 - 81**	**50 - 68**	**59 - 70**	**56 - 59**	**54 - 63**
		(N = 3)	(N = 7)	(N = 9)	(N = 5)	(N = 8)

*: No data. N = number of samples .

Table 2-8 Classification of the lake - type with dominant genus and TSI in Lake Suwa.

Phases	**1**	**2**	**3**	**4**
Year	**1948 - 1969**	**1970 - 1998**	**1999 - 2007**	**2008 - 2015**
Dominant genus	*Aulacoseira* *Mougeotia* *Microcystis*	*Microcystis*	*Microcystis* *Synedra* *Aphanizomenon*	*Aulacoseira* *Dolichospermum* *Mougeotia*
Classification by TSI	Mesotrophy -Eutrophy	Hypertropy -Eutrophy	Eutrophy	Eutrophy -Mesotrophy
TSI (TP)	**61.1 ± 7.2** (N = 4)	**70.8 ±9.8** ^{A} (N = 146)	**58.4 ± 5.2** ^{B,} (N = 41)	**59.6 ± 4.4** ^{C} (N =60)
TSI (Chl)	**65.4 ± 5.3** (N = 15)	**71.8 ± 8.3** ^{A} (N = 167)	**65.3 ± 6.1** ^{B} (N=49)	**65.3 ± 6.0** ^{C} (N=127)
TSI (SD)	**56.5 ± 4.0** (N = 8)	**63.8 ± 6.1** ^{A} (N = 186)	**58.4 ± 4.6** ^{B} (N=72)	**56.9 ± 6.5** ^{C} (N=144)
TSI (TN)	_*	**56.7 ± 7.3** ^{A} (N = 127)	**51.5 ± 6.8** ^{B} (N=41)	**50.9 ± 5.6** ^{C} (N=61)
TSI $_{Mean}$	_*	**66.1 ± 6.3** ^{A} (N = 19)	**58.8 ± 1.9** ^{B} (N=8)	**58.5 ± 2.7** ^{C} (N=8)

*: No data. N = number of samples. A, B, C: level of significans $p < 0.01$. $p < 0.05$. AB, AC ($p < 0.01$, $p < 0.05$), BC ($p > 0.01$, $p > 0.05$).

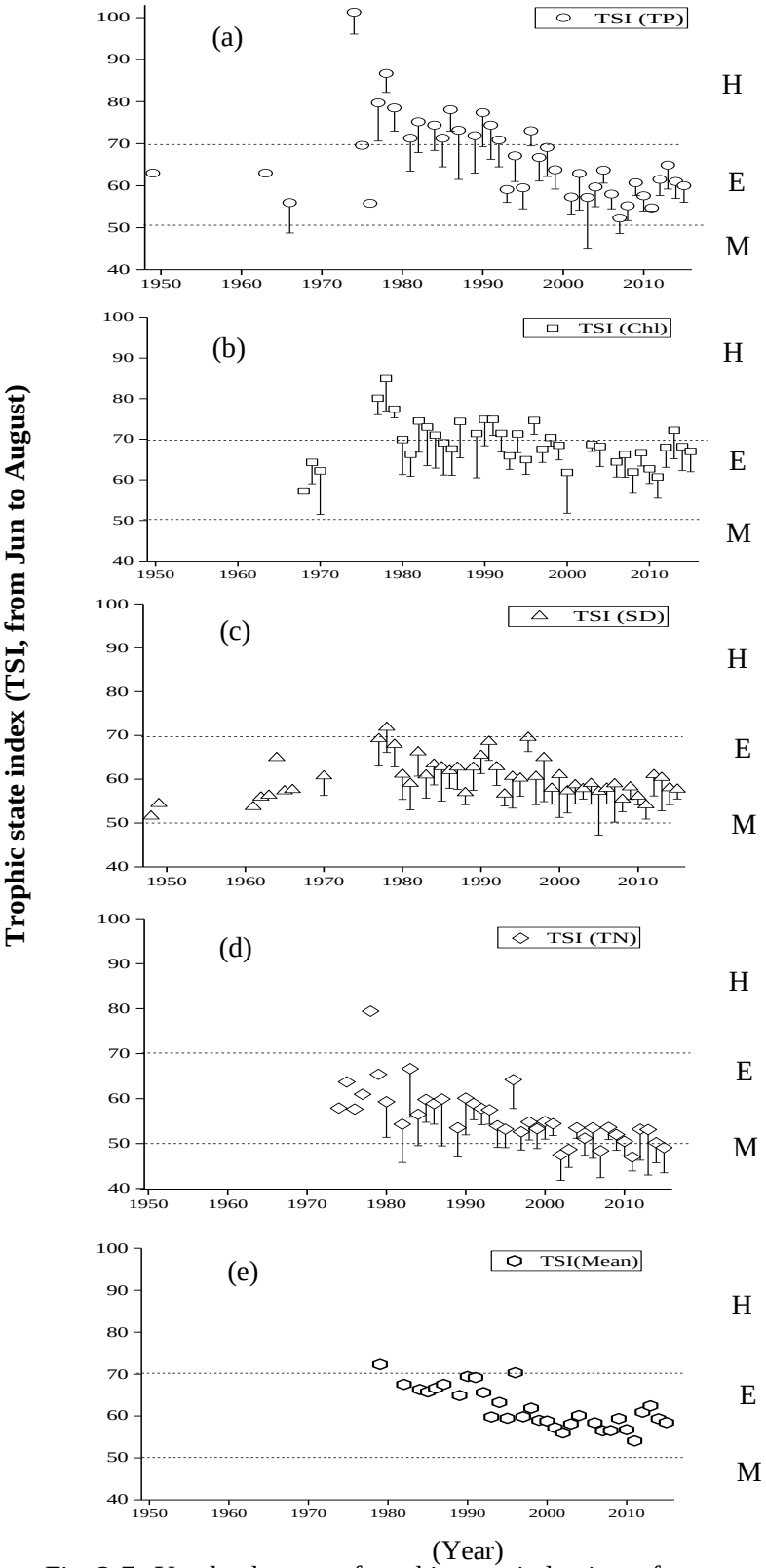


Fig. 2-7 Yearly changes of trophic state index in surface water of Lake Suwa from June to August during 1948 to 2015. (M) : Mesotrophy, (E) : Eutrophy, (H) : Hypereutrophy. Veraical bars represent standard deviations.

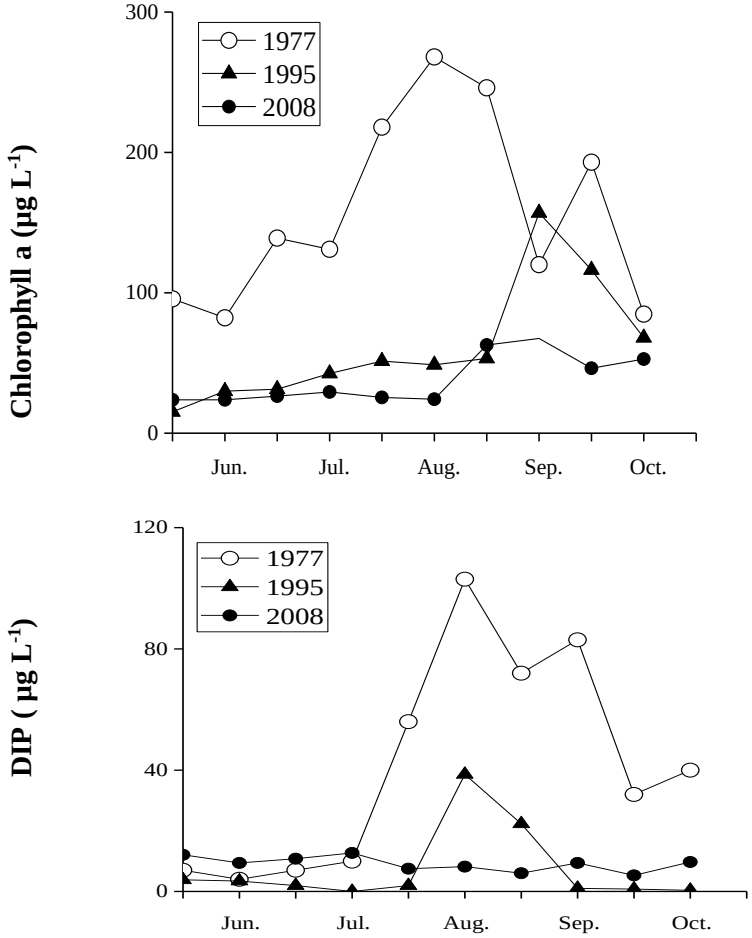


Fig. 2- 8 Yearly and seasonal changes of chlorophyll a and DIP concentration.

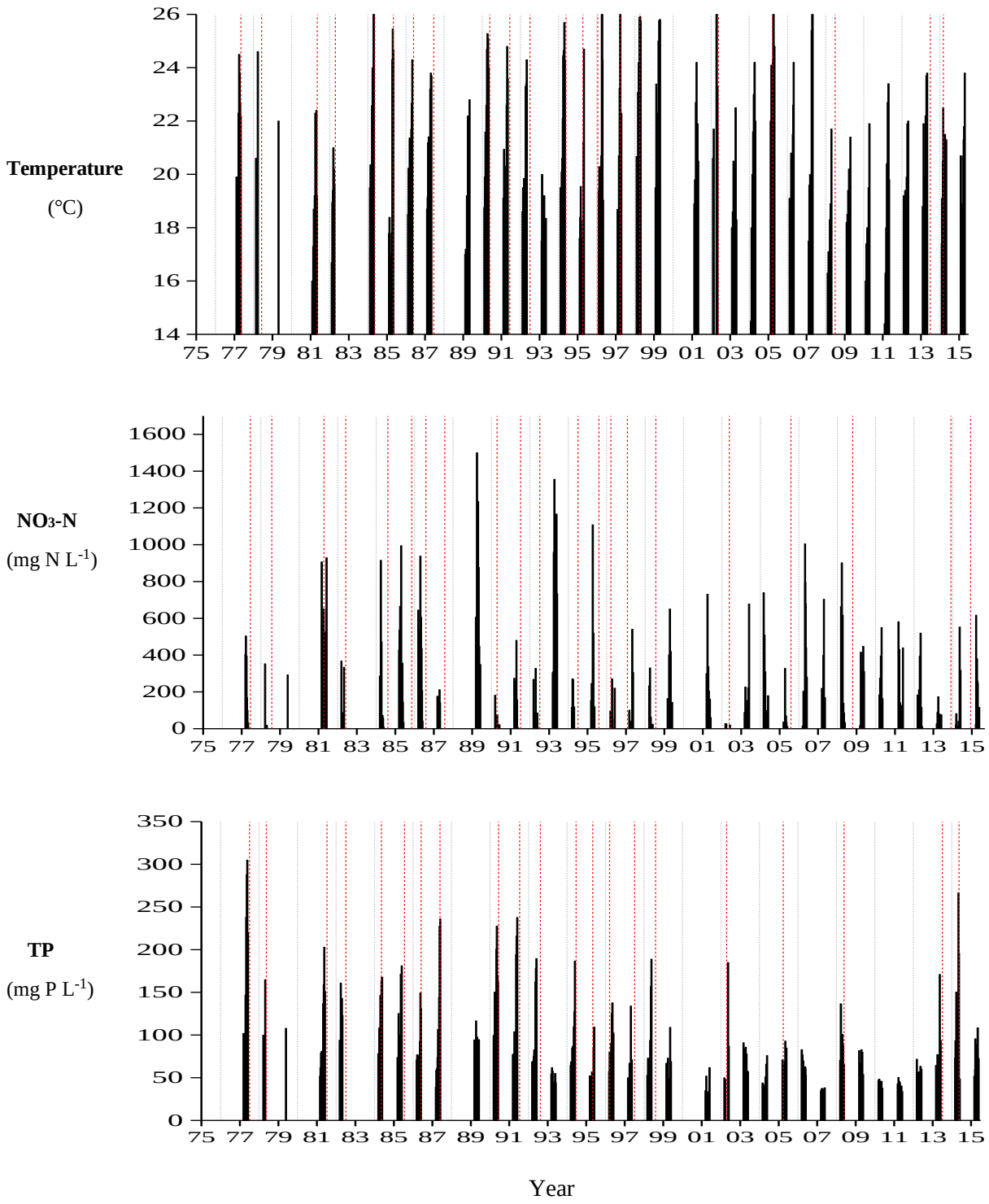


Fig. 2-9 Temperature, nitrate and phosphorus of 5 m depth in Lake Suwa from June to August during 1978 and 2015. Periods of maximum P concentrations are marked red.

-

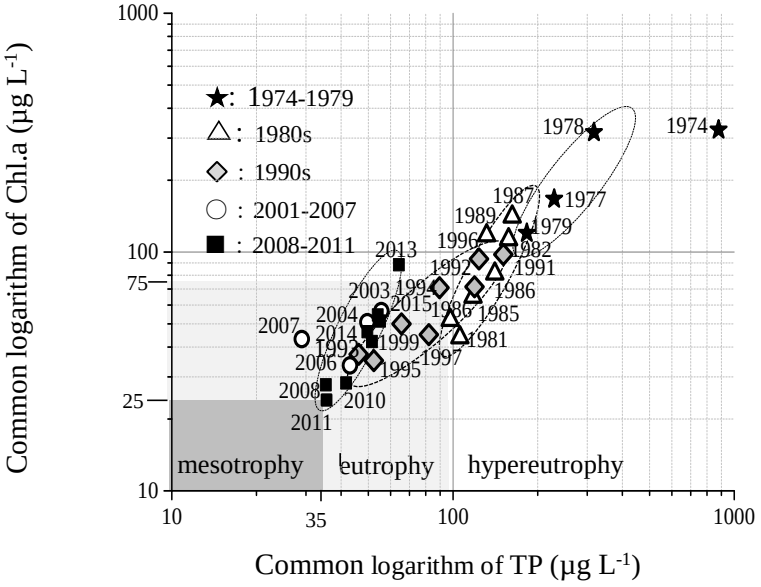


Fig. 2- 10 Decline of phytoplankton biomass (measured in terms of chlorophyll-*a* concentration) in relation to the decline of total phosphorus concentrations (using the OECD classification).

２．３．３ 近年の諏訪湖の貧栄養化と植物プランクトンの変化

琵琶湖の北湖 (平均水深43 m)は，TP濃度から貧栄養，TN濃度から中栄養湖に分類される (Kishimoto et al., 2013)。琵琶湖でも, TP濃度と硝酸態窒素濃度が急激に増加したのは1960年代中頃からで，TP濃度は1980年代には減少に転じたが硝酸態窒素濃度は1990年代中頃まで増加した。琵琶湖ではTP濃度の増減が植物プランクトンの増減と対応して富栄養化の変遷を示していた (早川ら, 2012)。1970年代のTP濃度の最大値が1960年代前半の2倍程度であり，集水域からのリン負荷は大きいにもかかわらず湖内のリン濃度の増加が小さいことは, リンの湖底への沈降フラックスが大きいことが原因とされている (Tezuka, Y., 1992)。同様に水深の深い (平均水深は33 m)ワシントン湖 (Lake Washington : Seattle)では，1955年には藍藻*Oscillatoria ruhescens*が優占していたが, 処理された下水の流路にバイパスを作ることで湖に入る廃水の量は次第に減少し，湖は栄養分の減少に反応して透明度 (1955年は2.1 mから1975年は5.6 m)が2倍以上変化した (Edmondson and Lehman., 1981)。

一方でシャガワ湖 (Lake Shagawa : Minnesota) は平均水深 6 m の二回循環湖で，下水処理施設の建設によりリン濃度は減少したが，秋季には *Aphanizomenon* 属及び *Anabaena* 属(*Dolichospermum*)が発生した (Larsen et al., 1981)。これは水深の浅い湖での無酸素堆積物からのリン放出が起こったことが原因とされた(Larsen and Malueg, 1980)。沖野 (2014)によれば，1975 年から 1998 年の諏訪湖でも，下水道普及率は 78 %まで達

し諏訪湖浄化のため対策は水質には反映をしていたが，*Microcystis* 属の発生が続いていたため, 住民には湖水の状態が改善されたようには見えなかった時期であったと述べている。TP 濃度及び TN 濃度は 1999 年以降に減少し，DIP 濃度及び DIN 濃度は 2008 年以降に減少した (Fig.2-2, Table 2-6)。1977 年の過栄養の諏訪湖では, 3 月から 5 月にかけて珪藻が優占し, 6 月から 8 月には *Microcystis* 属の生物量が増加したため Chl. a 濃度は夏季に最大値 268 μg L^{-1} を示した (Fig. 2-8)。約 20 年後の 1995 年 8 月の Chl. a 濃度は 27 から 51 μg L^{-1} に減少したが, 2008 年での夏季 Chl. a 濃度は, さらに減少 (20 から 31 μg L^{-1})した。これは夏季の *Microcystis* 属の減少により, DIP 濃度の底泥からの内部負荷の減少が影響していると考えられた。すなわち春の珪藻のブルームによって夏季表層の栄養塩濃度が減少し 2008 年以降の植物プランクトン現存量の減少及び種の変化に影響していると推察された (Fig. 2-4, 2-8)。2 期から 4 期への TN/TP 比 [59]の増加は, 下水道普及によるリンの流入負荷の減少及びリンの内部負荷の減少が影響したと考えられた (Table 2-6, Fig. 2-8)。Fig. 2-9 には諏訪湖の水面下 5m の NO_3-N 濃度と水温及び TP 濃度を示した。1989 年には水温の低下 NO_3-N 濃度の増加 TP 濃度の減少が観察された。リンは直上水や体積物内部の溶存酸素の減少により酸化還元電位が低下すると堆積物中の鉄の還元が始まり三価の鉄が二価に還元され吸着していた溶存反応性のリンは溶出する (Klom and Berner, 1980)。

ブラジルの CETESB 社の TSI の判定法 (Novo,et al., 2013)では, 判定基準値が細かく区切られているため, TSI のレベル変化が反映されやすく, Chl. a, TP, SD などの測定値でも判定ができる利点があると考えられた。この TSI の判定基準を用いると, 諏訪湖の 2008 年以降 2015 年までの TSI (TP)は, 富栄養レベルから中栄養に判定される。TSI (SD)及び TSI_{Mean} は, 富栄養から中栄養が混在した状態である。一方で TSI (Chl) は過栄養から富栄養を示し, TSI (TN) は 47 から 53 の範囲で, 中栄養から貧栄養に分類された。

OECD での湖沼の分類基準は, 富栄養湖 TP 濃度 35 から 100 mg m^{-3}, Chl. a 濃度 (最高値) 25 から 75 mg m^{-3}, 中栄養湖の TP 濃度 10 から 35 mg m^{-3}, Chl. a 濃度 (最高値) 8 から 25 mg m^{-3} であるが, 諏訪湖の 1977 年から 2015 年の 6 月から 8 月における TP 及び Chl. a 濃度の平均値を対数グラフで示した (Fig.2-10)。1974 年から 1980 年代はほぼ過栄養に分布し, 1990 年代は過栄養から富栄養の範囲に減少傾向が観られた。湖の測定項目や TSI の変化は, 上下に変動しながら減少をしているのが観察された。2001 年から 2007 年は富栄養, 4 期目に当たる 2008 年から 2015 年は, 富栄養から中栄養の上限を示したため中栄養への移行期であることを結論付けることができる。1960 年以降, 諏訪湖の植物プランクトンは, 珪藻類優占から藍藻 *Microcystis* 属が優占し, 富栄養化が進行した。しかし 1999 年以降の変化は *Microcystis* 属の減少, 藍藻 *Ap. flos-aquae* の出現など富栄養化の進行時と異なる変化が観察された。

TSI 及び OECD による湖沼の分類値を比較すると, OECD (TP)の富栄養湖の判定基準の範囲 35 μg L^{-1} から 100 μg L^{-1} は, TSI に換算すると 55 から 71 になる。TSI の判定基準範囲 (50 から 70)の TP 濃度は 25 μg L^{-1} から 103 μg L^{-1} に相当するため, OECD の基準の下限値より TSI の下限値のほうが 10 μg L^{-1} ほど低い。OECD (TP)の判定で中栄養湖となる湖沼が TSI では中栄養湖に富栄養湖と判定されることになる。

中栄養について比較すると, OECD の判定基準 10 μg L^{-1} から 35 μg L^{-1} は, TSI に換算すると 37 から 55 になるため, TSI の 30 から 50 (6 μg L^{-1} から 25 μg L^{-1})の判定基準はやや OECD 判定より判定の基準が厳しいかもしれない。OECD 中栄養の Chl.a Max.値の基準 8 μg L^{-1} から 25 μg L^{-1} は, TSI に換算すると 51 から 62 であり OECD では富栄養になる。TP 濃度と Chl.a 濃度の OECD と TSI の判定では 10 μg L^{-1} 程の差があるものと思われた。

本研究では, 同一湖沼における長期変遷を 1948 年から 2015 年の諏訪湖の植物プランクトンの変遷から 4 期に分け富栄養化から貧栄養化への変遷の過程を, TSI による変化を用いて時系列で表した。諏訪湖では浄化対策を始めてから約 50 年をかけて植物プランクトンの種組成に変化が現れた。TSI (SD), TSI (TP),TSI_{Mean} は, 3 期の後半 60 を切った時点から, TSI (TN)では 50 以下から植物プランクトンの組成に変化が表れ，優占種の変化が観察された。この時点より DIN 濃度と DIP 濃度に減少がみられたが, TSI (Chl)は他の TSI に比較して減少の変化に乏しいことが示された。TSI の分類による 3

期と 4 期の変化は顕著では無かったが, 植物プランクトンの種組成の変化は TSI の変化より敏感に現れてきたことから, TSI と植物プランクトンの種組成を総合的に評価することが湖沼の栄養状態を表す一つの方法として他の湖での使用も有効である。

２．３．４ グラフィック法による湖水の解析

TSI (Chl), TSI (TP), TSI (SD) の表す連続するデータは, 富栄養化を示すだけでなく栄養制限と動物プランクトンの捕食, リンの相対量, 非クロロフィル粒子による濁度の影響などをFig. 2-11及びFig. 2-12, Fig. 2-13のグラフから読み取ることができる (Carlson, 1992 ; Carlson and Havens)。過去12年の不連続なデータより, TSI (Chl), TSI (TP)及びTSI (Chl), TSI (SD)の偏差が示している意味をCarlsonとHavensが提唱するグラフより解析した (Fig. 2- 11, 12, 13)。

Fig.2-11は1977年, 1978, 1984年, 1989年, 1994年, 1999年, 2006年, 2008年, 2011年, 2013年, 2014年, 2015年の3月から12月までのTSI (Chl), TSI (TP), TSI (SD), TSI (TN)の変化を示した (1977年のTSI (TN)の連続データはない)。1977年及び1978年, 1984は8月から10月にかけてTSI (Chl) とTSI (TP)に差が見られており, TSI (Chl)はTSI (TP)より減少している。この偏差は, 動物プランクトンによる植物プランクトンの捕食が起きていた可能性が示唆される。1970年代の諏訪湖では, 8月から9月までゾウミジンコとニセゾウミジンコが混在する (倉沢, 1973)ことが示されており, ニセゾウミジンコの高いピークが観察されている。1977年, 1984の9月から10月の捕食の影響は, Fig. 2- 12とFig. 2-13からも読

み取ることができるがこの関係は1999年以降観察されていない。Fig. 2-13は1977年, 2006年, 2015年を月毎に示した。1977年はリンが過剰であること8月から10月にかけてのミジンコによる捕食の影響が観える。一方で2011年の動物プランクトンとTSIの関係をみると (Fig. 2-12, 2-14), 8月の*Daphnia*の増加時 TSI (Chl)は減少しているようにも見えるが, TSI (TP)も減少していることから, 捕食よりは栄養塩が減少した影響であろうと推察された。

2006年7月から9月は, TSI (SD)がTSI (TP)とTSI (Chl)より高く, クロロフィルやリンに関係ない粒子によって湖水が影響されていることを示す (Table 1- 3)。2006年7月17日から19日の降水量は非常に高く350mmに達している。長野県中央部の岡谷市, 諏訪市, 辰野町にかけて梅雨前線の豪雨によって各地で土石流が発生した (Fig.2-15)。全てのTSIは減少し(Fig. 2- 11), 7月と8月には藻類とは関係のない湖水の濁りによる影響を示している (Fig. 2- 13)。

2008年と2011年は, TSI (Chl) > TSI (TP＝SD)で, *Mougeotia*属や*Aphanizomenon*属のような大きなChl.aを含む粒子が優占しているだろうことが示された。このグラフから1999年以降の諏訪湖でリン制限が起きていることが推測できる (Fig.2- 12)。

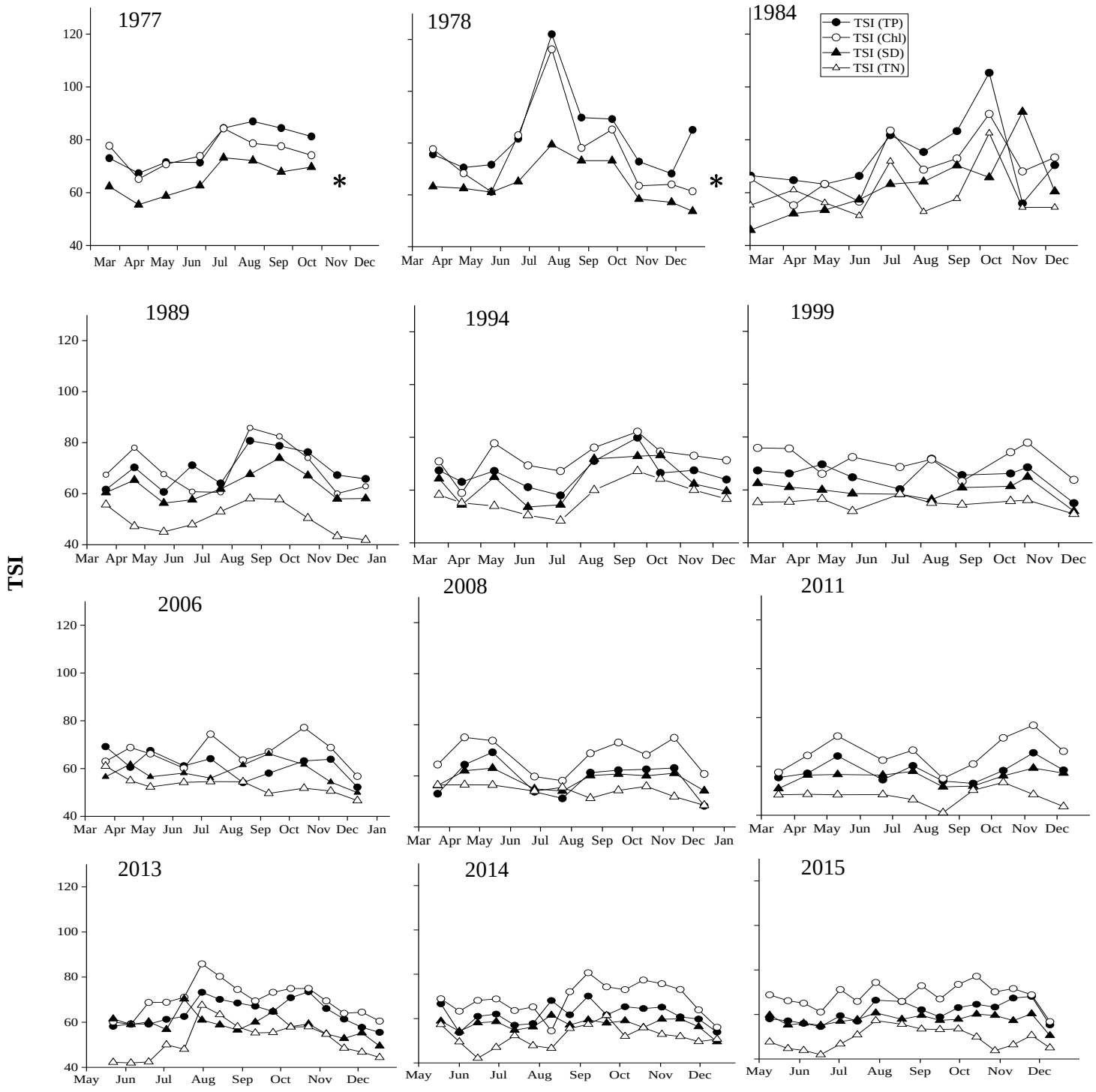


Fig. 2-11 Seasonal plot of TSI values for (TP), (SD), (Chl) and (TN). ● : TSI(TP) ○ : TSI(Chl) ▲ : TSI(SD) △ : TSI(TN). ＊ TSI (TN) no data (1977, 1978).

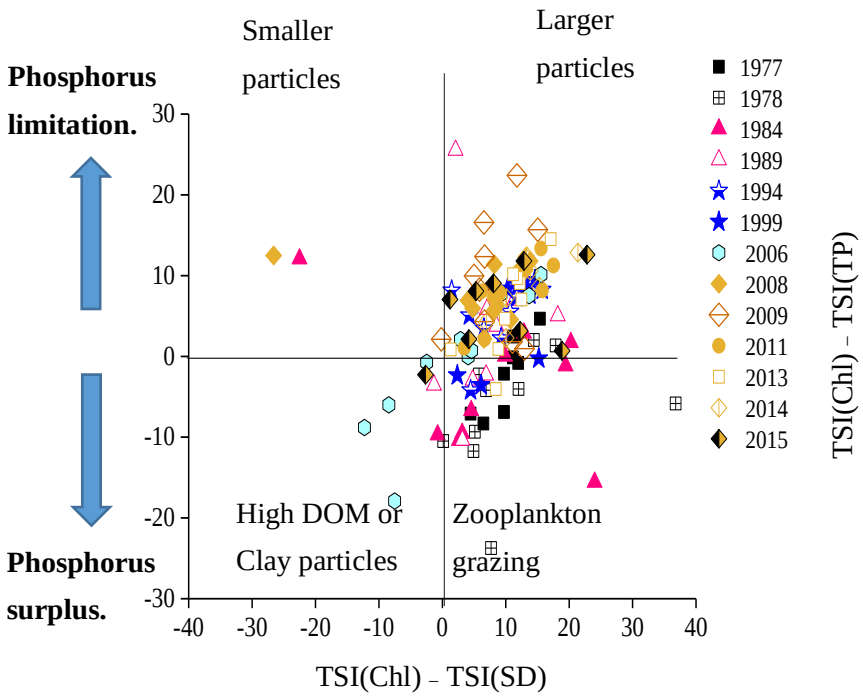


Fig. 2-12 Possible interpretations of deviations of Trophic State index (TSI) values of Lake Suwa.

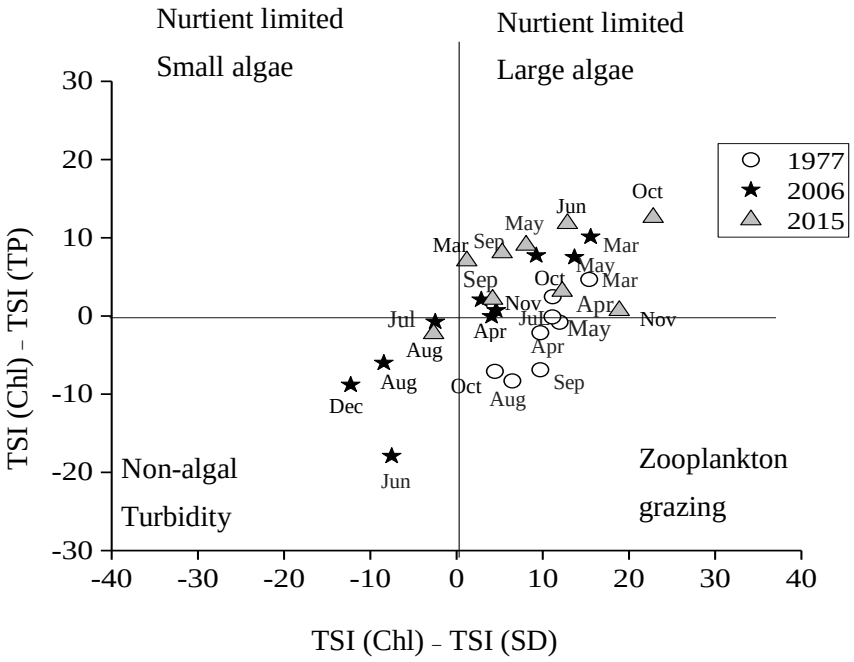
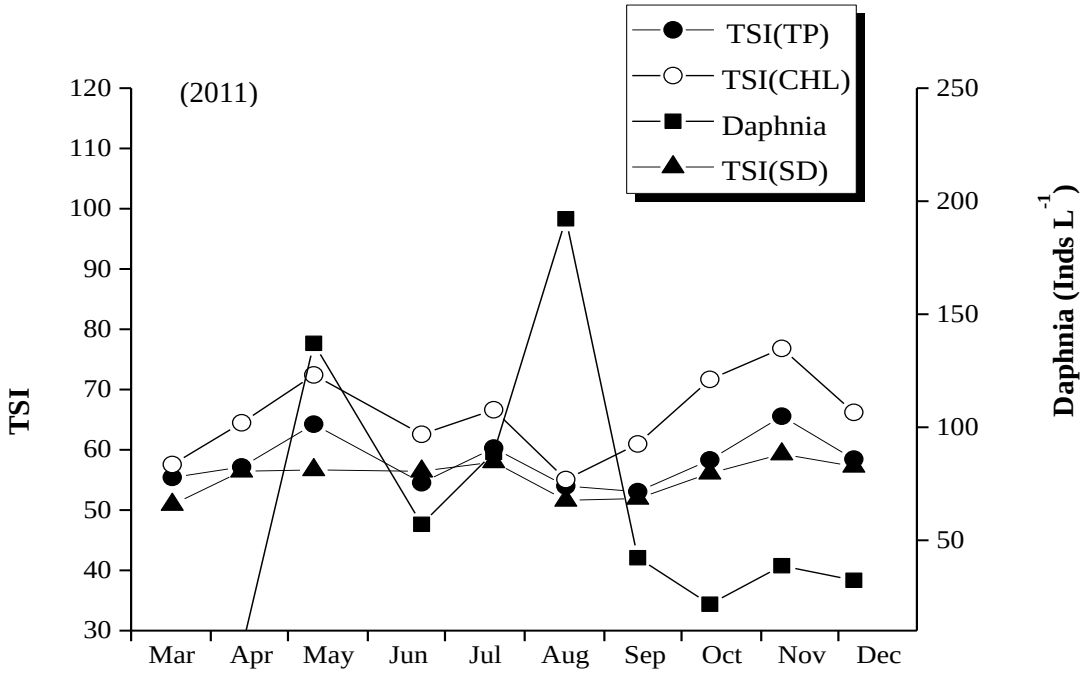


Fig.2-13 Deviations between Lake Suwa TSI (Chl),TSI (SD),TSI (TP)ploted As Monthly values of 1977, 2006, 2015 following the formatted by Calson (1991).



(Data was referenced from Kimijima (2011) referenced.)

Fig. 2-14 Seasonal TSI of Chl, SD, TP and Daphnia numbers were plotted of Lake Suwa.

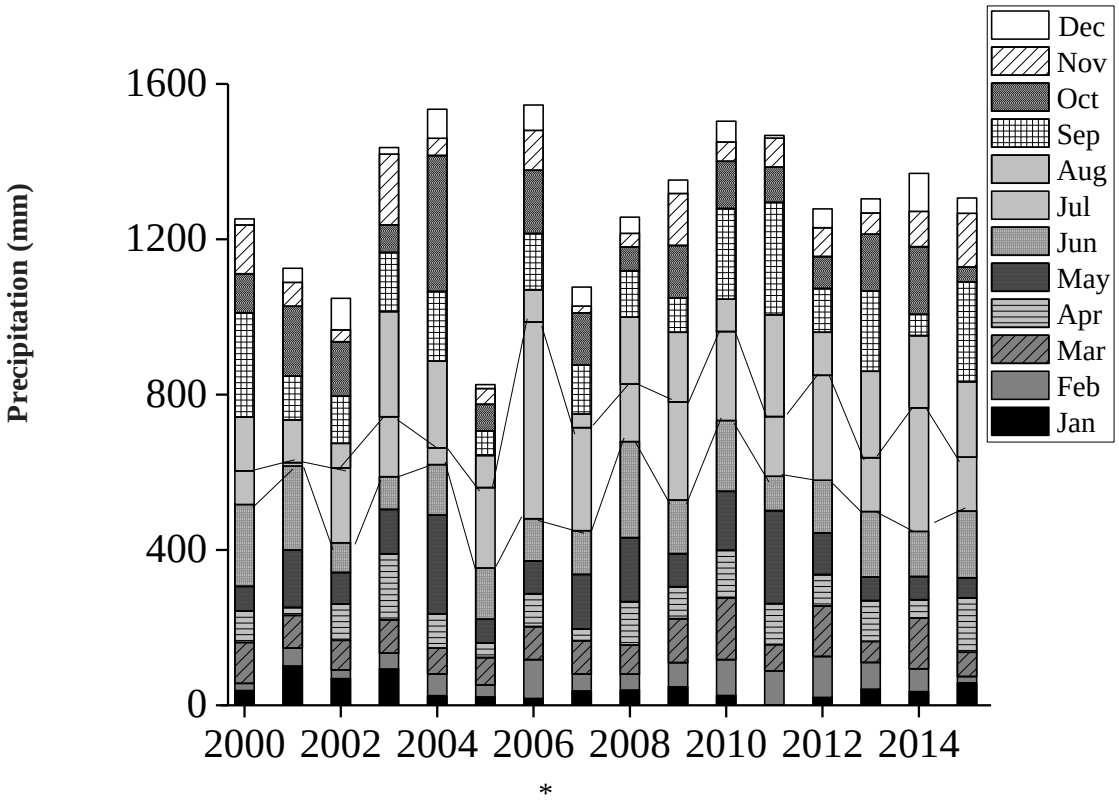


Fig. 2-15 Comparison of precipitation from 2000 to 2015.

4．まとめ

1948 年以降の諏訪湖の夏季の植物プランクトンの優占種の長期にわたる変遷の結果から諏訪湖の約 70 年の変化を 4 期に分けることができた。諏訪湖の水質は 1948 年から 1969 年までは中栄養から富栄養を示し, 1970 年から 1998 年までは富栄養から過栄養であった。1999 年から 2007 年は, 夏季植物プランクトンは *Microcystis* 属の減少及び *Ap. flos-aquae* が出現するようになり富栄養を示した。2008 年以降の諏訪湖は, 珪藻 *Synedra* 属, 窒素固定藍藻 *Dolichospermum* 属, 糸状緑藻 *Mougeotia* 属が優占するようになり,植物プランクトンの変遷と富栄養化指数より富栄養湖から中栄養湖への移行期であると結論した。

第 3 章

諏訪湖の夏季に優占した植物プランクトン種(2010年から2015年)

の変化に影響した環境因子

第 3 章 諏訪湖の夏季に優占した植物プランクトンの変化に影響した環境因子

３．１ はじめに

植物プランクトンは, 水面下の光, 栄養塩濃度, 温度, 成層の形成, 湖水の混合など最も適応する生息場所で高いレベルの生物量に達する (Reynolds, 1984)。諏訪湖では, 1990年以降から1998年にかけては*Microcystis*属の現存量は10-60 $mm^3 L^{-1}$の間を推移したが, 1999年以降は10 $mm^3 L^{-1}$ 以下に減少した (本間・朴, 2005)。栄養塩濃度レベルが低下した2000年以降, 諏訪湖の全植物プランクトン組成は, *Microcystis*属の減少, *Ap. flos-aquae*の優占, 珪藻の優占, 秋季に*Mougeotia*属の優占など変化がみられた。

本研究は2010年から2015年の優占植物プランクトンと諏訪湖の水温, 降水量, 湖水の滞留時間, 湖水の混合, 栄養塩濃度及び栄養塩類の濃度比率, 湖水中の光量変化との関係を明らかにすることを目的とした。

３．２ 材料と方法

３．２．１ 測定方法

2010 年から 2015 年の栄養塩分析用試水を, 諏訪湖湖心 (36° 02′ 50″ N, 138° 05′ 01″ E)の表層において, 月に 2 回以上バケツによって採水し, ポリエチレン製の容器に入れて実験室に持ち帰った。船上より, Secchi disk 深度 (SD), 水温 (550A, YSI Nanotech), pH

(HM-30P, TOA-DKK) 水中照度 (ライト・メーター：LI-250A, 光量子センサー：LI-192SA, LI-COR.)を 0.5 m 毎に測定した。持ち帰った試水の一部から, TN をアルカリペルオキソ二硫酸カリウム-紫外吸光法 (大槻, 1981), TP をペルオキソ二硫酸カリウム分解法-モリブデンブルー法 (Murphy, 1962)でそれぞれ測定した。

試水をガラス繊維濾紙 (GF/C, Whatman)にて減圧濾過し, 濾紙上の Chl. a 濃度を Marker 法 (Marker, 1980)で測定した。濾液を用いて, 溶存総窒素 (DTN：dissolved total nitrogen)， 溶存総リン (DTP：dissolved total phosphorus)濃度を, 上記 TN 及び TP と同じ方法にて測定した。 溶存無機態リン (DIP：dissolved inorganic phosphorus ；PO_4-P)の測定は, アスコルビン酸還元法 (モリブデンブルー法), 溶存無機態窒素 (DIN：dissolved inorganic nitrogen ；NO_3-N＋NO_2-N＋NH_4-N)の溶存亜硝酸態窒素 (NO_2-N) 及び溶存アンモニア態窒素 (NH_4-N) をそれぞれ BR 法及びインドフェノール法 (西條, 三田村, 1995) で行った。 これらの測定に比色計 (U2000, 日立製作所)を用い, 溶存硝酸態窒素 (NO_3-N) をイオンクロマトグラフ (ICS-1500, DIONEX)にて測定した。

諏訪湖の補償深度は, 1977年から2015年まで8月の水中照度のデータを用いた。水面下の相対照度を100 %とした時, 1 %に相当する深度を補償深度として求めた。 水中照度のデータが欠落した際には, 諏訪湖での補償深度とSDとの関係式

補償深度=2.1×SD (m)を用いた (Poole and Atkins, 1929)。降水量は, 気象庁ホームページの諏訪湖特別地域観測所データベース日ごとの値 (気象庁統計情報, URL. http://www.jma.go.Jp/jma/menu/report.html. 2016 3月時点)を参照した。諏訪湖からの流出量及び水位は, 長野県諏訪建設事務所によって制御されており, 1983年からは水門越による表層放流が行われている。諏訪湖水の滞留時間 (R days)は, 釜口水門において測定されている日平均貯水量 (V m^3)と日平均放流量 (Q $m^3 day^{-1}$) より算出した。

$$R = \frac{V}{Q}$$

３．２．２　植物プランクトンの測定法

植物プランクトン計数用の試水は表層から採取後, ホルマリンを用いて固定 (ホルムアルデヒドの最終濃度 1.5 %)した。*Mougeotia* 属の垂直分布を調べるために, 3m 及び 5m の試水を VAN DORN 採水器にて採水し, 同様に固定した。*Mirocystis* 細胞密度の計測は固定試料を超音波によってコロニー状の細胞を十分に分散後, Fuchs-Rosenthal 血球計算板 (Kayagaki)を用いて行った。その他の植物プランクトンの計測には, プランクトン計数チャンバー (離合社) を用いて, 1mL 中の細胞数を光学顕微鏡 (BX51, Olympus) 下で計数した。それぞれの種の細胞体積への換算は, 種ごとの形状を球体, 錘体, 方体, 円筒など (Wetzel and Likens, 2000) に近似させて, 細胞の長径を計測して求めた。

３．２．３　統計解析

緑藻*Mougeotia*属と藍藻*Dolichospermum*属が出現した2011年から2015年 (6月から10月) における全てのDIP濃度 (それぞれN=11)を一元配置分散分析 (one-wayANOVA)によって差を確認後に, Tukey testによってDIP濃度の平均値の比較をした (Origin Pro 9.0, Origin Lab.)。

DIN濃度は，*Dolichospermum*属現存量の増加時に減少するだけでなく, *Mougeotia*属の生物量の増加に伴う減少も観察されたことから, 2012年から2014年 (6月から10月)の*Dolichospermum*属の生物量が2 $mm^3 L^{-1}$以上出現している時 (N=15), 全く出現していない時 (N=8) の二つに分類し, DIN, DTN, TN濃度と*Dolichospermum*属の生物量の関係を, t 検定 (Welch) によって比較した (Origin Pro 9.0, Origin Lab.) 。

諏訪湖における夏季の補償深度の長期変動について, 8月に測定された補償深度のデータを1977年から1979年 (N=8), 1980年代及び1990年代 (それぞれN=27), 2000年代 (N=35), 2010年から2015年 (N=25) を5つの群に分け, 一元配置分散分析 (one-way ANOVA) により検定し補償深度の各年の平均値をTukey testによって比較した (Origin Pro 9.0, Origin Lab.)。

水質及び植物プラントンデータを評価するため, 主成分分析 (PCA: Principal Component Analysis Origin Pro 9.0, Origin Lab.) を行った。2010年から2015年5月から12月 (N = 35)の期間を解析した。

成分分析に用いた成分は, TN, TP, DIN, DIP, DTP, DTNの各濃度, 水温, 降水量,Chl. a, 各プランクトン及び*Microcystis*属の現存量, TN/TP 比 (モル比), 滞留時間 (RT), SD及びpHである。

３．３　結果

３．３．１　表層の植物プランクトンの季節変化

2010 年から 2011 年にかけての諏訪湖の表層の植物プランクトンの組成を Fig. 3- 1 に示した。2012 年, 2013 年, 2014 年では, 夏季に窒素固定藍藻 *Dolichospermum* 属のブルーム (Fig. 3- 1c, d, e) が観察された。 特に 2013 年では, 6 月初旬から出現した *D. affinis* は, 7 月中旬に最大値 (15.9 から 23.5 $mm^3 L^{-1}$)に達し, 8 月中旬まで優占した。2011 年は, 8 月に *Mougeotia* 属 (1.7 $mm^3 L^{-1}$)と *Au. granulata* (1.9 $mm^3 L^{-1}$) が出現し, 10 月中旬の *Au. granulata* の減少した後も 12 月まで優占した(Fig. 3- 1b)。

2015年は, 9月中旬から10月中旬の*Mougeotia*属の生物量は, 3から16.8 $mm^3 L^{-1}$へと変化を示した (Fig. 3- 1f)が, 10月後半には減少が観察された。

３．３．２　植物プランクトンと栄養塩濃度の変化

2010年から2015年の植物プランクトンの種組成 (Fig. 3- 1)と, 栄養塩濃度 (Fig. 3- 2)の年変動には, 二つのパターンが観察された。2012年, 2013年, 2014年では, 夏季に窒素固

定藍藻*Dolichospermum*属のブルーム (Fig. 3- 1 c, d, e)が観察された。これら3年間の6月から10月のDIP濃度は, 平均9から10 μg L^{-1}以上 (Fig. 3- 2c, d, e)を示した。

一方で糸状緑藻*Mougeotia*属の優占した2011年, 2015年のDIP濃度は5から6 μg L^{-1}で, *Dolichospermum*属の優占した年と, *Mougeotia*属の優占した年のDIP濃度は一元配置分散分析 (one-wayANOVA)にて検定後, Tukey testで年ごとの平均を比較した ($p < 0.05$；Fig. 3- 2b, f, Fig. 3- 3)。

2013年の*Dolichospermum*属出現時のDIN濃度は, 20 μg L^{-1}以下を示した。2012年から2014年 (6月から10月)において, *Dolichospermum*属の生物量が2 $mm^3 L^{-1}$以上を示した時のDIN濃度は, その期間全く出現していない時に比較して有意に低かった (t 検定: $t = -2.75$, $df = 7.47$, $p = 0.026$；Fig. 3- 2, Fig. 3- 4)。DTN及びTNには, 有意差を認めなかった (それぞれ t 検定: $t = -2.44$, $df = 7.85$, $p = 0.055$, $t = 0.50$, $df = 18.17$, $p = 0.062$)。

一方で, 2011年秋季に優占した糸状緑藻*Mougeotia*属は, 8月初旬より出現して, 12月まで優占した (Fig. 3- 1b)。2011年8月下旬から9月中旬に, *Mougeotia*属の生物量が約5倍 (2.0から9.5 $mm^3 L^{-1}$) に増加を示した時, DIN濃度も5倍の増加が観察された (121から669 μg L^{-1}；Fig. 3- 2b)。しかし, 11月下旬に, 最大生物量15.1 $mm^3 L^{-1}$を示した時のDIN濃度は, 142 μg L^{-1}まで減少していた。同様に2015年9月中旬から10月中旬の生物量は, 3から16.8 $mm^3 L^{-1}$へと変化を示した (Fig. 3- 1f)。10月下旬に生物量が約1/8に低下 (2.0 $mm^3 L^{-}$

^{1})した時, 10月中旬のDIN濃度 (382 μg L^{-1})は, 20 μg L^{-1}以下にまで変化を示した (Fig. 3-2f)。

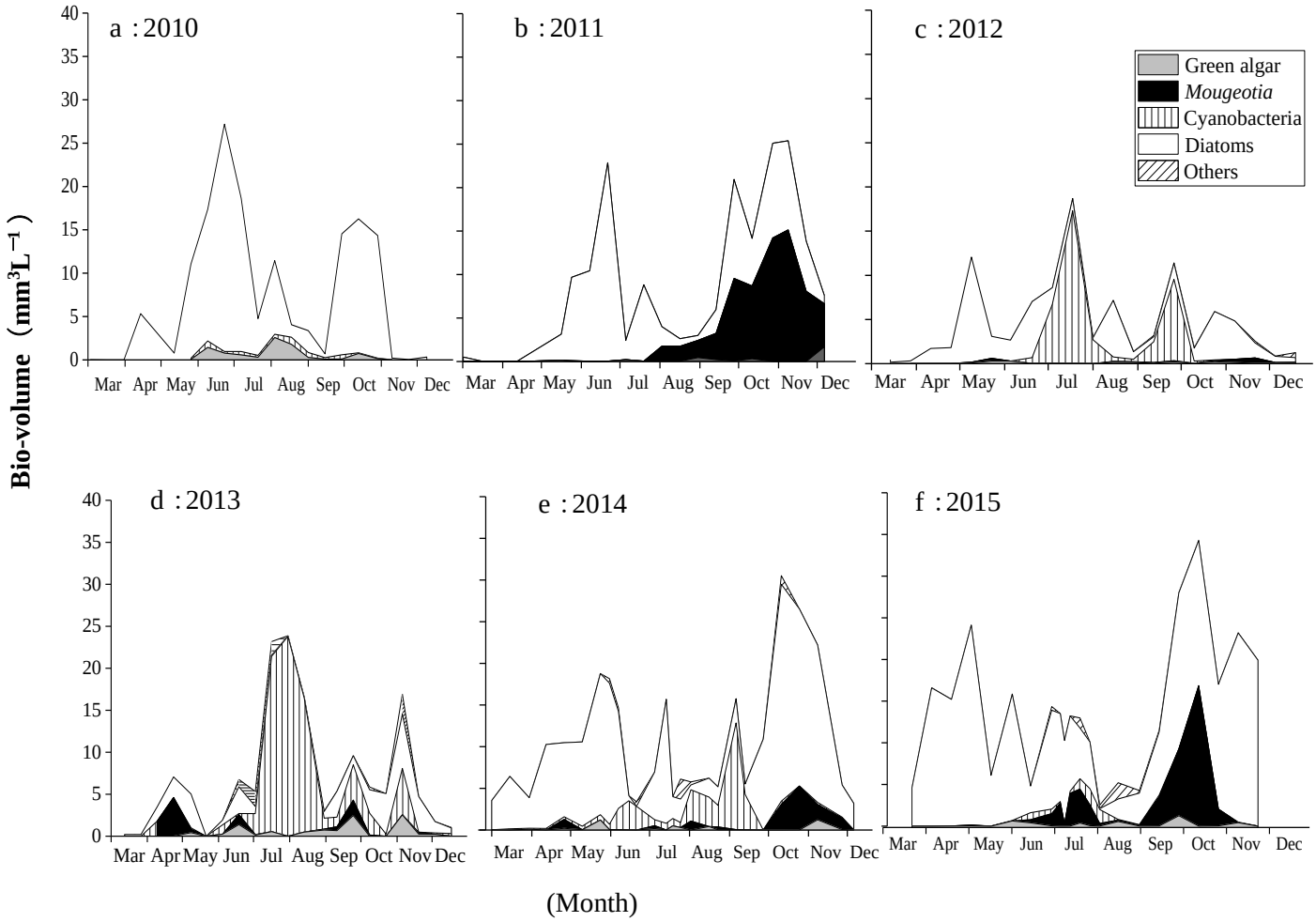


Fig.3- 1 Seasonal changes of phytoplankton bio-volume in surface water from March to December during 2010 to 2015 ∗ *Mougeotia* was not included in the green algae category. N.D. : no data : Cyanobacteria : Diatoms : *Mougeotia* : Green algae : Others.

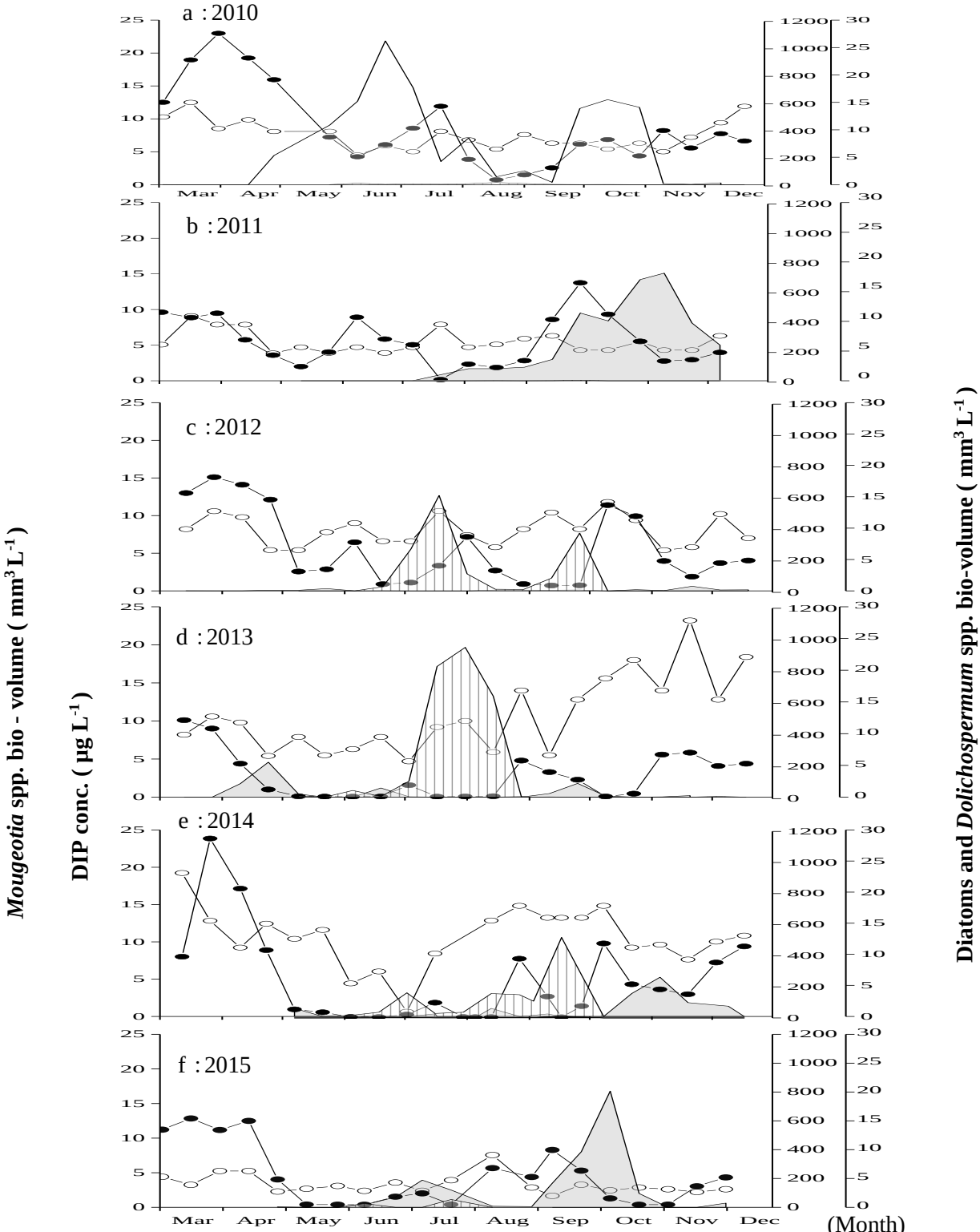


Fig. 3-2 Seasonal changes of dominant phytoplankton groups (*Dolichospermum* spp. *Mougeotia* spp. and diatoms), DIN and DIP concentrations (conc.).●:DIN, ○ : DIP, :*Mougeotia* bio-volume. : *Dolichospermum* bio-volume. :Diatoms bio-volme.

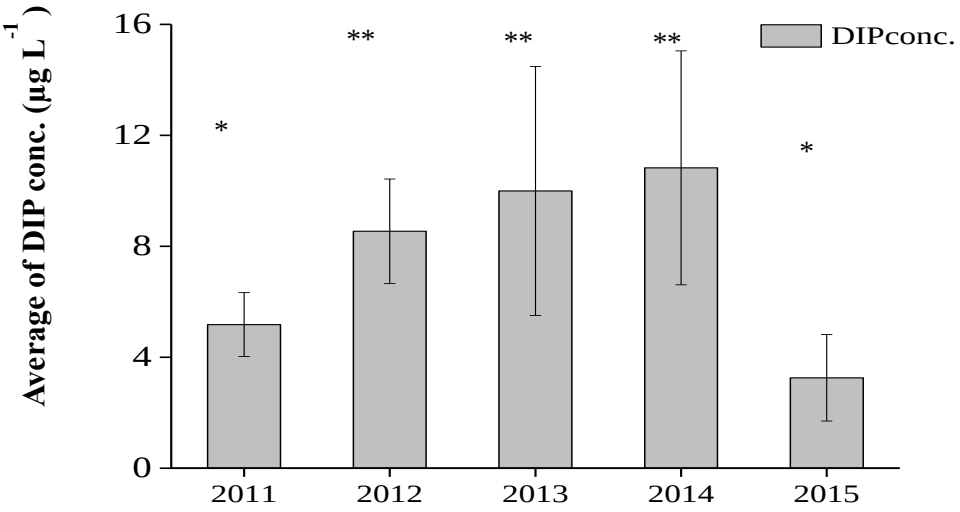


Fig. 3-3 Difference between *Dolichospermum* and *Mougeotia* DIP concentration (conc.) from 2011 to 2015. Tukey test was performed for multiple comparisons when significant differeces were revealed by ANOVA. N=11 (respectively). Veraical bars represent standard deviations. *Indicated a significant difference (P<0.05).

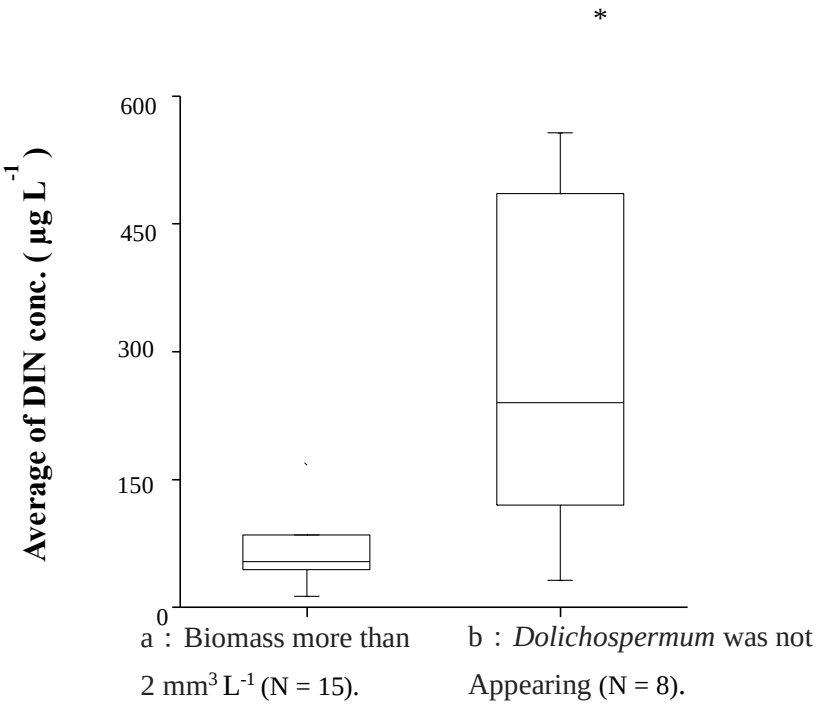


Fig. 3-4 Difference between *Dolichospermum* and *Mougeotia* DIN concentration (conc.) from 2011 to 2015.
Horizontal lines of the box show first quartile, median, and third quartile from below. Error bars denotes 10 and 90 percentiles . * Indicated a significant difference (P<0.05).

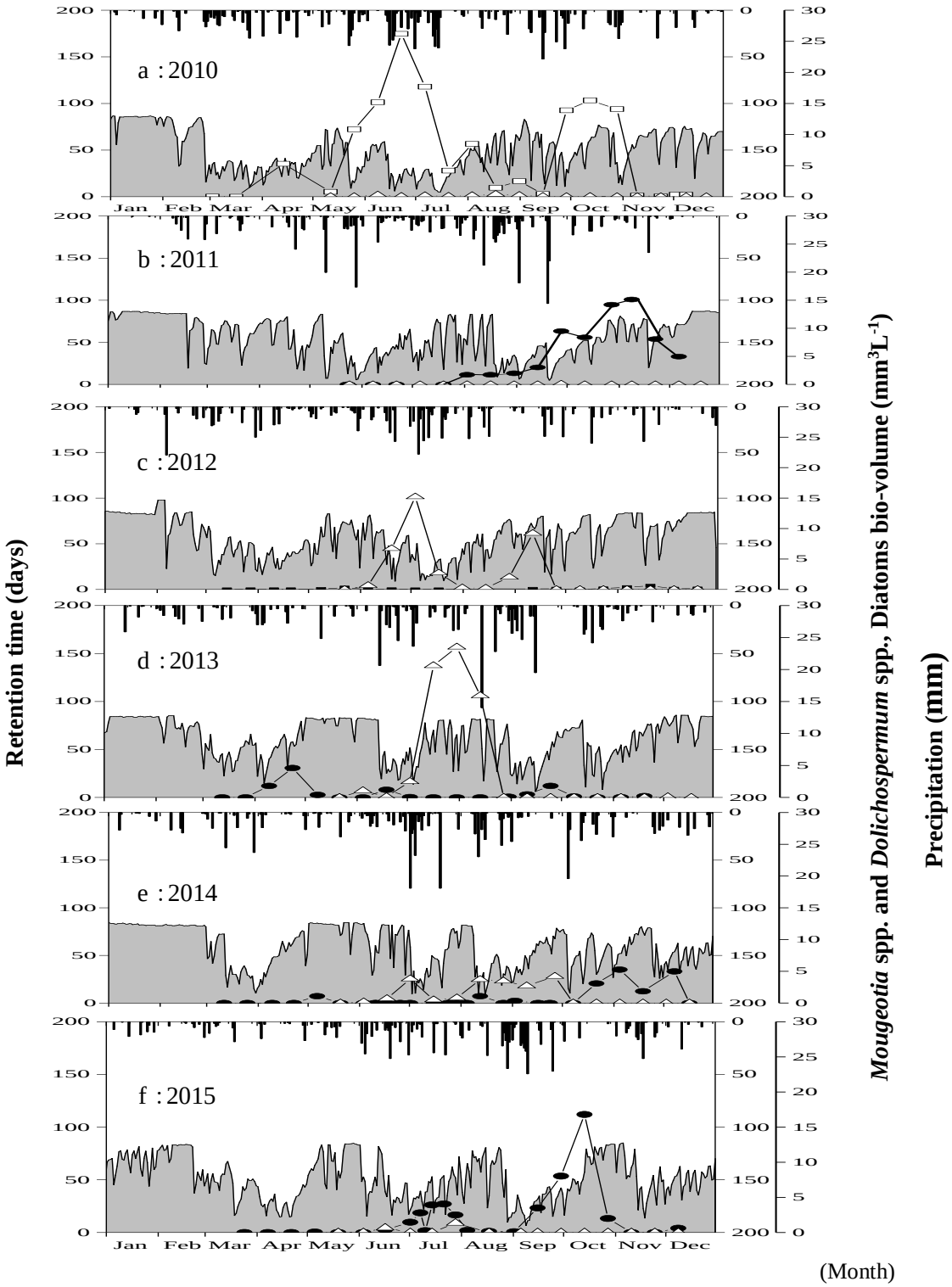


Fig. 3- 5 Seasonal changes of phytoplankton groups (*Mougeotia* spp., *Dolichospermum* spp and Diatoms) bio-volume and retention time and precipitation from 2010 to.2015.

:Retention time :Precipitation ● : *Mougeotia*. △ : *Dolichospermum*. □ : Diatoms.

３．３．３ 水質と植物プランクトンの変化

植物プランクトン優占種と湖水滞留時間との関係をFig. 3- 5に示した。2011年の8月後半は, 台風12号, 更に9月後半には21号の影響があり, 9月の総降水量は282 mmが観察された。 特に9月3日から10日, 9月20から28日の湖水滞留時間は, 9から18 daysであった。 湖水滞留時間が最短になったこの時期から, *Mougeotia*と*Au. granulate*の出現が認められた (Fig. 3- 1b, 2b, 5b)。湖内の物理的環境要素であるSDは, 8月初旬に2.1 mを示した。これは, 7月初旬と比較すると1 mの増加である。7月中旬の表層水温と水深5 mの水温差が約6.4 ℃であったのに対し, 8月初旬の水温差は2.8℃に低下した。しかし, *Mougeotia*属と*Au. granulate*の生物量のピークは, 10月下旬から11月中旬の降水量が少ない (滞留時間50から65 days) 全層混合期に観察された。

同様に2015年は, 8月下旬から9月初旬にかけて降水量が289 mm (湖水滞留時間は22 days)に達した。特に8月29日と9月9日の湖水滞留時間は, それぞれ10 days, 7 daysと著しく減少した。この時期に*Mougeotia*属は出現し, 生物量が増加を始めた (Fig. 3- 5f)。

対照的に, 2013年の7月初旬から中旬の*D. affinis, D. macrospora*の生物量は, 2.5から20.8 mm^3 L^{-1}へと, 約8倍の増加が観察された (Fig.3- 1f, 5d)。 この期間の降水量は, 101 mm (湖水滞留時間は34 days)であった。

３．３．４　*Mougeotia*属の0,3,5mの分布

*Mougetia*属の垂直分布をみると, 表層だけでなく, 3m及び5mまで分布していることが観察された。 特に生物量が多い11月では, 表層から5mまでほぼ同じ生物量で分布していた (Fig.3- 6)。

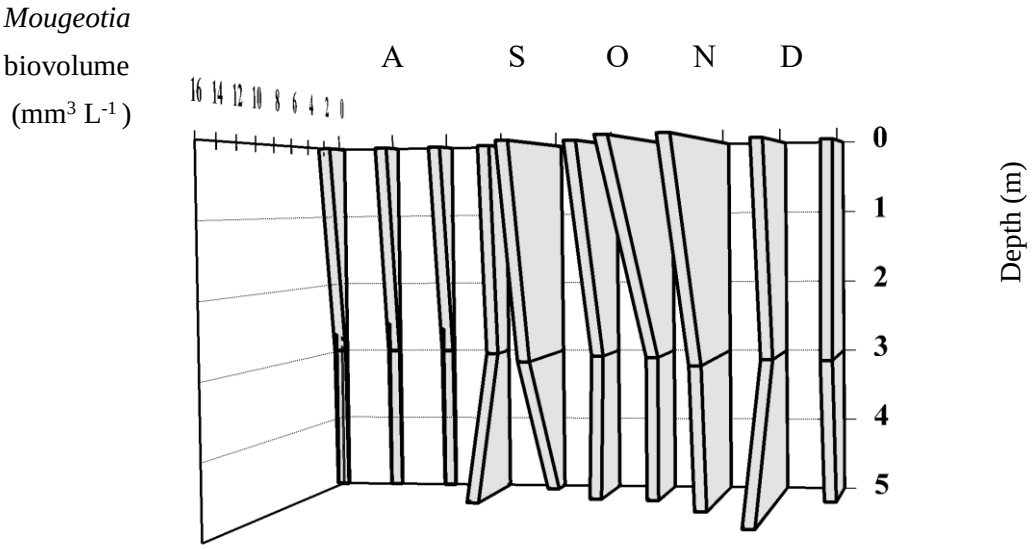
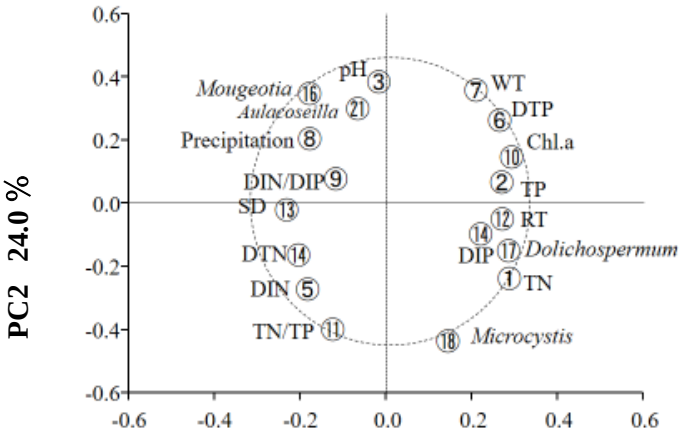


Fig. 3-6 Vertical distribution of *Mougeotia* (0, 3, 5 m)



From 2010 to 2015 (May to December).

Fig. 3- 7 Factor loading of PCA analysis based on environmental factor and phytoplankton of Lake Suwa (from2010 to 2015).

A : first principal component showed 55.6 %for total variation, while second principal component showed 24.0 %.

Symbol showed 1: TN, 2: TP, 3: pH, 5: DIN, 6: DTP, 7: Water temperature (WT), 8: Precipitation, 9: DIN/DIP, 10: Chl. a, 11: TN/TP, 12: Retention time (RT), 13: Secchi disk depth (SD), 14 DIP

16: *Mougeotia*, 17 : *Dolichospermum*, 18 : *Microcystis.*

21: *Aulacoseira*.

３．３．５　Principal component analysis（PCA）による植物プランクトンと環境変化

2010年から2015年における各成分の寄与率は, (PC1)が55.6 %であり, (PC2)が24.0 %で全変動の79.6 %を説明している (Fig. 3- 7)。第1成分は湖の物理環境とそれに影響される環境要因及び植物プランクトンの挙動を説明できる。第2成分はcyanobacteriaを減少させた要因を示している。2010から2015年のデータを用いたPCAの第2主成分では, *Mougeotia*属及び*Aulacoseira*属によるChl. a 濃度の正の寄与が大きく，湖水におけるChl. a 濃度の増加が両種によって引き起こされると考えられる。すなわち, 諏訪湖では降雨によって河川水が大量に供給されると湖水のDIN濃度は増加する一方, RT, DIPは減少するため*Dolichospermum*属及び*Microcystis*属は減少する。この環境では, *Microcystis*属はChl. a 濃度を増加する要因ではない。

３．４　考察

３．４．１　水質と植物プランクトンの変化

夏季成層期におけるリン濃度の増加は, 湖底の貧酸素状態による底泥からの溶出 (朴, 2009；宮原, 2009)によると考えられた。藍藻 (*Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*など)は, 湖水が上下混合した環境よりも, 安定した成層環境下において増加すると指摘されている (Huisman, et al., 2004)。*Dolichospermum*属の生物量が10から15

$mm^3 L^{-1}$の時, DIN/DIP比は23から25であった。2013年に*Dolichospermum*属の生物量が20 $mm^3 L^{-1}$以上の時, 湖水のDIN/DIP比は20以下を示した。すなわち, *Dolichospermum*属の生物量の大小に, DIN濃度が関係していることが示唆された。

一方で2011年以降, *Mougeotia*属は春と秋に出現が確認されているが, 生物量の増加が認められたのは, 2011年と2015年の秋季のみである。*Au. granulate*は, *Mougeotia*属の出現とほぼ同時期に観察された。これら二つの植物プランクトンは, R-strategistに分類され弱光耐性 (Reynolds, 2002) の特性があり, 細胞は大きく動物プランクトン (Coepods, Cladoceransなど) に捕食されにくい (Salmaso, 2000, 2002)。

2010年以降の湖水中の光量変化は，植物プランクトン優占種の変化の要因のひとつであると考えられた (Huisman et al., 1999)。2010年代8月の補償深度は平均3.0 ± 0.7 mで, 1977年から1979年の平均0.8 ± 0.1 m及び2000年代平均2.2 ± 0.7 mと比較しても, 補償深度が深まったことが証明された (Fig 3- 8)。 2010年8月には, 藍藻に代わって緑藻 (*Eudorina*属, *Staurastrum*属など) が観察されるようになったことも, 湖水中の光量変化が影響した可能性が考えられた (Fig.3- 8, 3- 9)。また, 補償深度の深さは, 弱光性を好む*Mougeotia*属の全層に分布する生物量の増加を可能にしたであろう。倉沢ら (1972)によると, 1965年秋に増加した*Mougeotia*属は沖部より湖岸に向かい増えて, *Microcystis*属のように表層に集中する傾向は無く, 深部にまで均等に分散すると述べており, 2011年9月からの本研究の垂直分布の状況を肯定する。

降水量の増加は, 湖水温の低下, pHの減少, 成層期における湖水の鉛直混合を進めると共に, 流入水の増加による湖の滞留時間を減少させる。秋期より出現する糸状緑藻には, 有利に働いた可能性がある。

2011年以降, DIP濃度が低い諏訪湖での*Mougeotia*属の出現と増加は, 諏訪湖の栄養レベルの低下を反映していると考えられた。スイス南西部に位置するLake Genevaは, 面積582 ㎢, 水深309 mの大きい湖で, SRP (soluble reactive phosphorus) 濃度の1年の平均が, 1997年と同じであった1960年代は, *Mougeotia gracillima*の出現が報告されていた。1979年代に60 µg L^{-1}であったSRPは, 1997年では, 3 µg L^{-1}以下にまで減少し, *M. gracillima*が再び出現した。この湖では, 栄養塩濃度は減少したにもかかわらず, *M. gracillima*による生物量の増加が観察された (Anneville, 2000, 2002)。諏訪湖でも1965年に*Mougeotia*属の出現が記録されていることから, 2011年からの再出現 (二木, 2015)は, Lake Genevaでの現象とよく似ている。諏訪湖では, 降雨時に集水域から河川を経て, DINが流入することが報告されている (宮原・小松, 2011)。諏訪湖の主要な河川の一つである宮川の河川流域は, 高原野菜等の産地であり葉菜収穫のために窒素肥料が必要であった。施肥改善対策で減量されたが, まだ農地への残留が続いており, 降雨時には畑地等から土壌が流出しやすい。八ヶ岳高原は火山灰土壌で,リンは吸着されやすいのに比較して, 窒素は好気的条件下の浅層地下水中では, 安定した硝酸態窒素になり易い (沖野・花里, 2005)。一方で, 2011年 9月6日と21日には, 風速8から9 m s^{-1}以上の西北西の風が7から8時間連続

した。諏訪湖に卓越する, 西北西の 7から9 ms^{-1}程度の強風は, 4時間程度吹き続けると上下層が混合され，湖全域で底層の貧酸素状態が解消されることが報告されている (木村ら, 2015)。風による湖水撹拌影響は, DIN濃度の増加及び糸状緑藻沈降の抑制にも有利に働いたであろう。湖内のDIN濃度は, *Mougeotia*属生物量の増加と共に減少することが観察されている。このことは, DIN濃度が*Mougeotia*属の生物量の増加に必要な栄養素であることを示唆している。すなわち, 2015年10月後半の*Mougeotia*属の生物量の減少は, DIN濃度の欠乏が影響したものと考えられた。Salmasso (2000)もイタリア北部Lake Gardaでの*Mougeotia*属生物量の減少時に, Nの需要が高く, 湖内でのDIN濃度の減少は, *Mougeotia*属の存在による可能性を除外できないと述べている。本研究のPCA分析 (Fig 3- 7)の結果からも, *Mougeotia*属はDIP濃度の減少時に, 高いDIN濃度 (DIN/DIP比330から510)で出現し, DIN濃度が高くなる秋季に, 生物量を増加する傾向が確認されている。

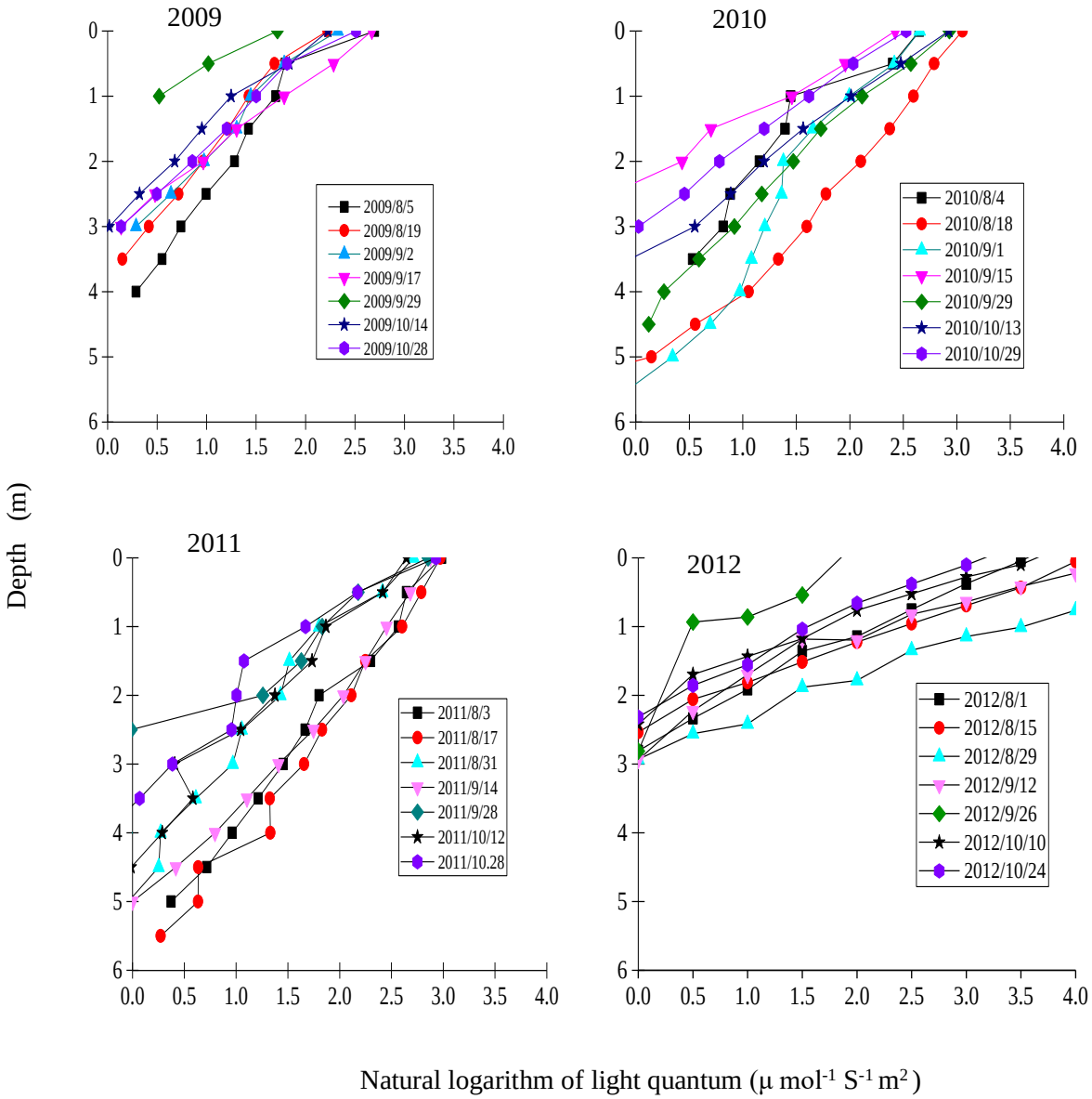


Fig. 3-8 Changes in the light quantum (μ mol^{-1} S^{-1} m^2) from 2009 to 2012.

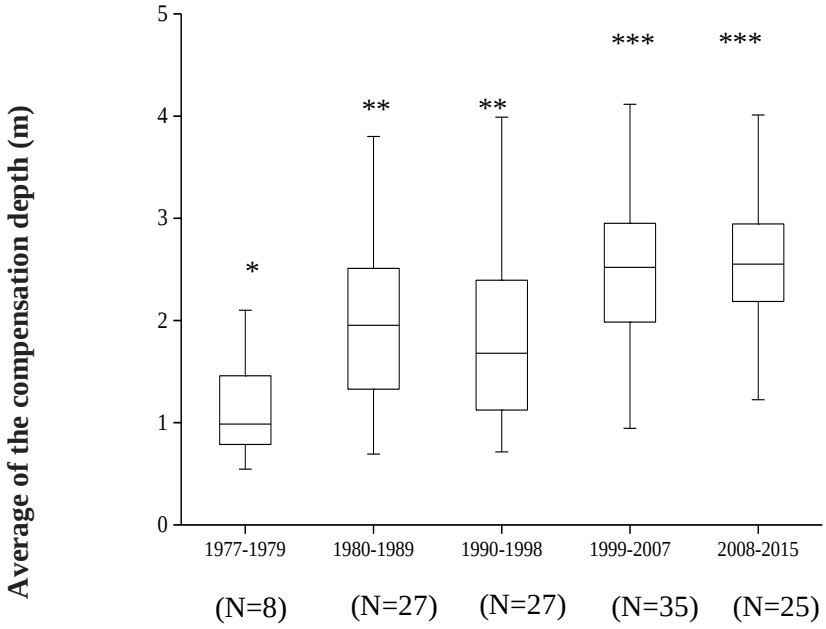


Fig. 3-9 Comparison of compensation depth from June to August during 1977 -1979, 1980 - 1989, 1990 - 1998, 1999 - 2007, 2008 - 2015. Tukey test was performed for multiple comparisons when significant differences were revealed by ANOVA. Horizontal lines of the box show first quartile, median, and third quartile from below. Error bars denotes 10 and 90 percentiles. * Indicated a significant difference (P<0.05).

３−５　まとめ

1965 年以降の諏訪湖は富栄養化が進行し，夏季の植物プランクトンの *Microcystis* 属の優占は 1998 年まで続いたが，1999 年から生物量も減少した。しかし 2010 年以降の諏訪湖では，*Microcystis* 属の現存量は激減し 2011 年以降, 窒素固定藍藻 *Dolichospermum* 属, 糸状緑藻 *Mougeotia* 属，珪藻 *Aulacoseira* 属が優占するようになった。2013 年の *Dolichospermum* 属は，溶存無機態窒素が 20 μg L^{-1} 以下と溶存無機態リンが 10 μg L^{-1} 以上の夏期に高い生物量を示した。湖水中の溶存無機態窒素が 400 μg L^{-1} 以上と溶存無機態リンが 10 μg L^{-1} 以下では，秋季に *Mougeotia* 属の生物量が増加していた。

第 4 章

諏訪湖の水質改善に伴う糸状緑藻 *Mougeotia* 属の出現

第４章　諏訪湖の水質改善に伴う糸状緑藻 *Mougeotia* 属の出現

４．１　研究の目的

栄養塩濃度レベルが低下した 2000 年以降, 諏訪湖の全植物プランクトン組成にも変化が現れた (朴, 2009)。2011 年夏期は, 降雨による透明度の増加により 8 月から *Mougeotia* 属 (以下 *Mougeotia* とする)が出現した。*Mougeotia* は糸状の接合藻でホシミドロ科に属し, イタリア・アルプスの水深の深い湖 (Sommer, 1985 ; Salmasso, 2000, 2002 ; Garibaldi et al., 2003)や日本の琵琶湖 (Kagami and Urabe, 2012 ； Hsieh et al., 2010), 北アメリカの酸性湖沼 (Graham et al., 1996 ; Pillsbury and Lowe, 1999 ; O’ Grady and Brown, 1989), イスラエルの Lake Kinneret (Zohary et al., 2012)でも優占や出現が報告されている。

Mougeotia は世界の湖沼で 138 種 (Hoshaw et al., 1988)報告されているが, 形態分類を行うためには有性生殖により形成される接合胞子 (Zygospore)の観察が必要不可欠である (Transeau, 1926, 1951; 廣瀬・山岸ら, 1997)。諏訪湖の *Mougeotia* について, *Mougeotia* の形態分類と核 DNA 18S rRNA 領域塩基配列による系統解析を行うことを目的とした。

４．２　試料の採取と計測の方法

４．２．１植物プランクトン試料の採取

植物プランクトン試料の採取は諏訪湖湖心 (36° 02′ 50″ N, 138° 05′ 01″ E)において 2008 年から 2011 年にかけて, 毎年 6 月から 12 月までの 2 週間毎に行われた。植物.プランクトン計数用の試水は表層から採取後, ホルマリンを用いて固定 (ホルムアルデヒドの最終濃度 1.5 %)した。*Mirocystis* 細胞密度の計測は固定試料を超音波によってコロニー状の細胞を十分に分散後, Fuchs-Rosenthal 血球計算板 (Kayagaki, 東京)を用いて行った (本間・朴, 2005)。その他の植物プランクトンはプランクトン計数チャンバー (離合社, 東京)を用いて, 1mL 中の細胞数を光学顕微鏡 (BX51, Olympus, 東京)下で計数した。それぞれの種の細胞体積への換算は, 種ごとの形状を球体, 錘体, 方体, 円筒など (Wetzel and Likens, 2000)に近似させて, 細胞の長径を計測して求めた。*Mougeotia* の細胞体積は *Mougeotia* の基本形を円筒形として求めた。

４．２．２　*Mougeotia* 属の細胞直径, 長さの計測

諏訪湖では 2011 年 9 月から 11 月, 2012 年 1 月・11 月, 2013 年 6 月に採取された試料, 琵琶湖では 2013 年 6 月の試料について計測を行った。*Mougeotia* のピレノイドと細胞壁は日本薬局方希ヨードチンキ (60 %水希釈, 吉田製薬)で染色した。その後, 100 倍の油浸対物レンズを装着した光学顕微鏡 (BX51)と画像解析装置 (Sport RT Camera, Diagnostic instruments inc.)

を用いて培養細胞と野外試料の長さは Mann-Whitney U-検定 (Origin Pro 9.0, Origin Lab.) で比較した。

４．２．３ 遺伝子解析試料

諏訪湖の *Mougeotia* 試料は 2012 年 1 月, 2012 年 11 月, 2013 年 6 月に湖心で得られた試料を用いた。各試料は 50 mL を滅菌遠心管 (Becton・Dickinson)に入れ, 実験室に持ち帰った。琵琶湖の *Mougeotia* 試料は 2013 年 6 月に北湖の湖水を採取した。それぞれの湖水は液体 AF-6 培地 (Kato, 1982)で数日培養後, 光学顕微鏡でコロニーを観察し, 有柄針で細胞を採取して純粋培養を確立した。 培養は 23 ℃の恒温室において, 白色蛍光灯 (L / D：12 / 12hr)で約 40 μmol m^{-2} s^{-1} の光条件で行った。

総 DNA (genomic DNA)の抽出・精製は DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を製品プロトコルに準じて用いた。この総 DNA を鋳型にして, 核 DNA 18S rRNA の領域の部分塩基配列を解析した。18S rRNA 領域の PCR 増幅には Euk A 5’- AACCTGGTTGATCCTG CCAGT-3’ (Medlin et al., 1988)と 5R 5’- CTTGGCAAATGCTTTCGC-3’ (Giribet et al., 1996)のプライマーセットを用い, 以下の条件で PCR を行った。 94℃1 分間のプレヒート後, 「94℃で 1 分間の熱変性, 50℃で 1 分間のアニーリング, 72℃で 1 分間の伸長」を 1 サイクルとする反応を 30 サイクル行った後, 4℃で試料を保存した。PCR 反応の酵素には rTaq (TOYOBO)を用い, また PCR 増幅にはサーマルサイクラー (Program Temp Control System PC350 , Astec)を用いた。PCR 産物の精製は (Exo SAP IT, GE Healthcare)

または (Illustra™ Exo Star , GE Healthcare)を用いて行い, 蛍光ラベリングは Big Dye (Terminatorvi.1 Sequencing Kit, GE Healthcare)にて行った。これらの反応にはサーマルサイクラー (ABI 2720Applied Biosystems)を用いた。塩基配列の解析には (ABI 3130 / 3130xl DNA Analyzer, Perkin Elmer / Applied Biosystems)を用い, シーケンス後の塩基配列についてはソフトウエア (CLC Genomics Workbench software, Filgen)を用いてアセンブリ整列作業を行った。整列した塩基配列を基に, 近隣接合法 (Saitou and Nei, 1987)及び最尤法 (Felsenstains, 1981)により分子系統樹を作成した。これらの解析には Clustal W (Thompson et al., 1994)や MEGA ver. 5 (Tamura et al., 2011) を解析ソフトとして用いた。また各ノードにおける信頼性の評価をするため, 近隣接合法及び最尤法に関しては 1,000 回反復のブートストラップ解析を行った。なお, 本研究で解析した全ての遺伝子配列情報を GenBank 登録した (Table 4 - 1)。

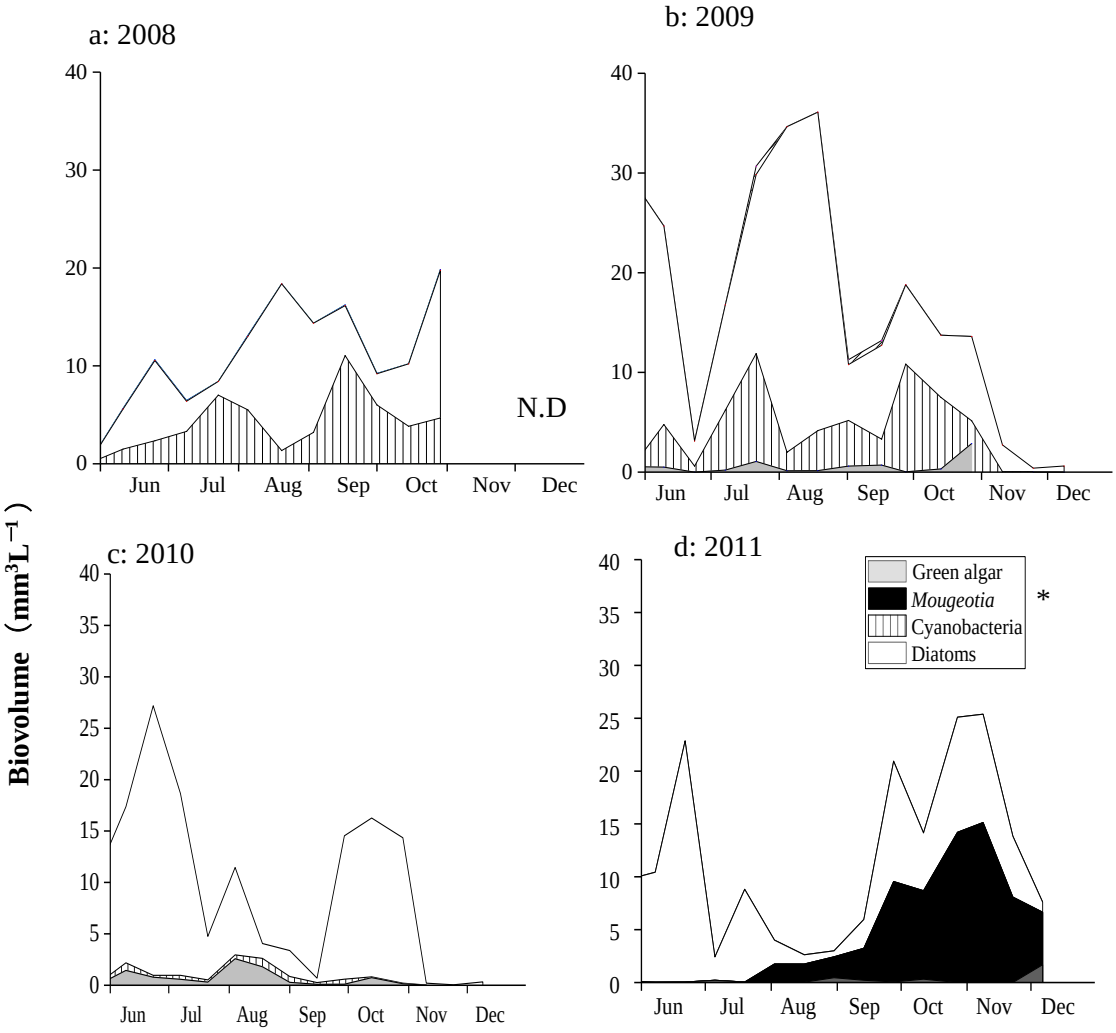


Fig. 4-1 Seasonal changes of phytoplankton biovolume in surface water from March to December during 2008 to 2011 .

* *Mougeotia* was not included in the green algae category. N.D. : no data.

: Cyanobacteria :Diatoms :*Mougeotia* :Green algae.

Table4- 1 *Mougeotia* specimens examined , sampling month and year, sampling site (lake), isolation name, clade number and GenBank accession numbers of nuclear genes 18SrRNA region in this study.

Sampling month and year	**Sampling site (lake)**	**Isolation name**	**Clade number**	**Accession numbers**
Nov. 2012	Suwa	SW1	A	AB907686
Nov. 2012	Suwa	SW2	A	AB907682
Nov. 2012	Suwa	SW3	A	AB907683
Jun. 2013	Suwa	SW4	A	AB907695
Jan. 2012	Suwa	SW5	B	AB907687
Jan. 2012	Suwa	SW6	B	AB907685
Jan. 2012	Suwa	SW7	B	AB907688
Jan. 2012	Suwa	SW8	B	AB907693
Jan. 2012	Suwa	SW9	B	AB907694
Jun. 2013	Biwa	BW1	A	AB907689
Jun. 2013	Biwa	BW2	A	AB907690
Jun. 2013	Biwa	BW3	A	AB907691
Jun. 2013	Biwa	BW4	A	AB907684
Jun. 2013	Biwa	BW5	A	AB907692

４．３　結果

４．３．１植物プランクトンの経年変化

2008 年から 2011 年にかけての諏訪湖の表層の植物プランクトンの組成を Fig.4-1 に示した。2008 年は 6 月と 8 月中旬に珪藻 *Synedra acus* が優占種として増加した。7 月には藍藻 *Dolichospermum flos–aquae* が増加し, 9 月中旬から 10 月初旬にかけて *Aphanizomenon flos–aquae* が優占種であった。2009 年は 6 月初旬から中旬に *S. acus* は減少したが, 8 月初旬から中旬には再び増加した。7 月中旬には, 藍藻 *Ap. flos–aquae* と *M. wesenbergii, D. flos–aquae* などが観察され, 9 月中旬からは *Aulacoseira granulata* が優占した。藍藻の現存量は 2010 年から減少が見られた。2009 年 7 月中旬の最大値 10.8 mm^3L^{-1} と比較すると 2010 年の 8 月の最大値は 0.8 $mm^3 L^{-1}$ と 1/10 以下であった。2010 年は過去 2 年間に比較して 8 月に緑藻 *Staurastrum* spp.と *Eudorina elegans* の優占 (2008 年 0.1 $mm^3 L^{-1}$, 2010 年 2.5 $mm^3 L^{-1}$)が特徴的であった。6 月中旬には, 珪藻 *Synedra* spp., 9 月後半には *Au. granulata* が主であった。2011 年の藍藻現存量の最大値 (0.37 mm^3L^{-1}) は過去 4 年間で最少であった。6 月には珪藻 *S. acus* と *Au. granulata* が優占したが, 7 月中旬から 8 月初旬までは *Fragilaria crotonensis* が優占した。2011 年 8 月に *Mougeotia* (1.7 $mm^3 L^{-1}$) と *Au. granulata* (1.9mm^3L^{-1})が出現し, 10 月中旬の *Au. granulata* の減少した後も 12 月まで優占した (Fig. 4-1d)。

４．３．２　*Mougeotia* 属の系統解析

諏訪湖から分離した*Mougeotia* 9株 (2012年1月採取: SW5, SW6, SW7, SW8, SW9, 2012年11月採取： SW1, SW2, SW3, 2013年6月採取： SW4)と, 琵琶湖の5株 (2013年6月採取： BW1, BW2, BW3, BW4, BW5)について, すでにGenBankの記載種 (*Mougeotia*, *Mesotaenium*, *Zygnemopsis*)を基にして最尤法 (ML)による分岐図を作成し, 類縁関係を示した (Fig. 4-2)。

諏訪湖の9株は, 二つの系統群 (以下クレードA, クレードBと記す)に分かれることが示された。2012年11月, 2013年6月の分離株はクレードAに, 2012年1月の分離株はクレードBに属した。 一方琵琶湖の分離株は諏訪湖の4株 (SW1- 4)と同じクレードAに属した。クレードA とクレードB 間の遺伝的距離 (p-distance)は約4 %であった。

Mougeotia **MLtree nDNA 18S rRNA (857-bp)**

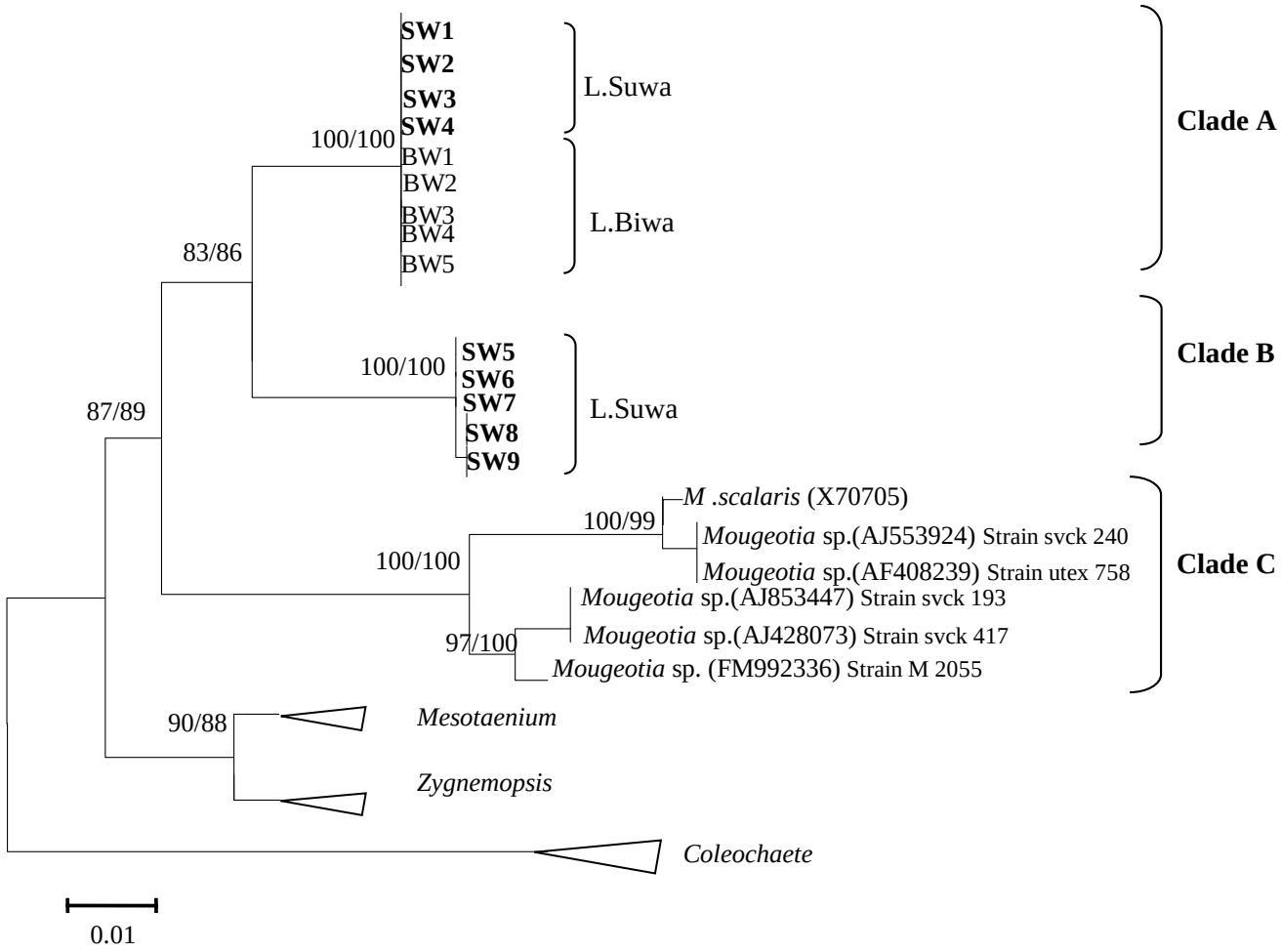


Fig. 4-2 Estimated phylogenetic relationships of *Mougeotia* based on the nuclear DNA 18S rRNA sequence data (857-bp). The Maximum-likewood (ML) dendrogram was constructed using the related species *Coleochaete* as outgroup. The scale bar indicate substitutions per site. The topologies presented by NJ are essentially identical to those presented by the ML tree. Numbers at major nodes indicate the ML/NJ bootstrap values. SW：*Mougeotia* of Lake Suwa. BW：*Mougeotia* of Lake Biwa.

４．３．３ *Mougeotia* 属の形態分類

諏訪湖 (2012 年 1 月, 11 月, 2013 年 6 月)の *Mougeotia* 細胞と琵琶湖 (2013 年 6 月) *Mougeotia* 細胞の直径, 長さ, 長さ / 直径比, 細胞体積を Table 4-2 に示した。諏訪湖の 2012 年 1 月試料と 11 月試料の直径 (平均 5.1 ± 0.5 μm)と細胞長 (平均 63.5 ± 14.8 μm)は有意差 (Mann-Whitney U-検定, $P > 0.05$)がなかった。諏訪湖 (2012 年 11 月, 2013 年 6 月)と琵琶湖 (2013 年 6 月)の *Mougeotia* 細胞の大きさは細胞直径 (4～6 μm)と細胞長 (30～80 μm)が共通する範囲であった。さらに, 琵琶湖には諏訪湖より直径と細胞長の大きい *Mougeotia* が存在している。

諏訪湖 (SW3, 4, 5)及び琵琶湖の分離株 (BW4)の *Mougeotia* 細胞の計測結果を Table 4-3 に示した。クレード A である (SW3, SW4)と琵琶湖 (BW4)の直径と細胞長には有意差は認めなかった (Mann-Whitney U-検定, $p > 0.05$)。クレード B の諏訪湖 (SW5)の *Mougeotia* 細胞長は, クレード A (SW3, 4)より長い (約 20 μm)ことが認められた (Mann-Whitney U-検定, $p < 0.05$)。

諏訪湖 (2011 年の 9 月, 10 月, 11 月と 2012 年 1 月)の *Mougeotia* 細胞長と直径を比較した結果, 2012 年 1 月の細胞長は前年の結果よりも長いことが分かった (Mann-Whitney U-検定, $p < 0.05$, Table 4-4) 。

今回, 諏訪湖の 2011 年の *Mougeotia* から接合子を形成させることはできなかった。しかし, 2012 年 1 月採取の *Mougeotia* 細胞を AF - 6 培地にて単培養し, 継代培養した際

に接合胞子形成を観察することができた (Fig. 4-4, 4-5)。接合胞子は角が丸く四角 (17～25 µm × 17～24 µm)であり , 接合胞子の形態観察から *Mougeotia elegantula* であろうと思われる (Table 4-5, Fig. 4-3, 4-4, 4-5)。 もう 1 種類の *Mougeotia* の接合子は形成することができなかった。

Table 4- 2 Comparison of the *Mougeotia* cell size (field samples)

Sampling (month / year)	**Jan. 2012**	**Nov. 2012**	**Jun. 2013**	**Jun. 2013**
Sampling site	**(L. Suwa)**	**(L. Suwa)**	**(L. Suwa)**	**(L. Biwa)**
Cell size				
Length (µm)	66.7 ± 15.6	63.5 ± 14.8	43.9 ± 12.0	52.6 ± 23.6
∗ Min.- max. length (µm)	40.2 – 115.0	38.0 - 95.0	27.2 - 82.4	32.4 - 154.1
Diameter (µm)	4.8 ± 0.4	5.1 ± 0.5	5.0 ± 0.5	5.9 ± 0.6
∗ Min.- max. diameter (µm)	3.8 - 5.5	3.9 - 6.1	3.8 - 5.5	4.6 - 7.6
Cell volume ($\mu m^3 cell^{-1}$)	1,183 ± 304	1,296 ± 426	871 ± 287	1,497 ± 827
Length / diameter	14.1 ± 3.8	12.6 ± 2.9	8.9 ± 2.6	8.9 ± 3.9
Total number of measuring	153	150	150	168

∗Min. : Minimum, Max. : Maximum. Values are means and standard deviations.

Table 4- 3 Comparison of the *Mougeotia* cell size (culture strain)

Sampling(month / year)	**Jan. 2012**	**Nov. 2012**	**Jun. 2013**	**Jun. 2013**
Clade (Strain name)	**B (SW5)**	**A (SW3)**	**A (SW4)**	**A (BW4)**
Cell size				
Length (μm)	✱ 78.4 ± 20.3	57.1 ± 15.3	56.5 ± 20.0	54.4 ± 12.4
Diameter (μm)	5.7 ± 0.4	5.9 ± 0.4	5.5 ± 0.6	6.0 ± 0.4
Cell volume ($\mu m^3 cell^{-1}$)	1,992 ± 564	1,582 ± 508	1,309 ± 525	1,542 ± 423
Length / diameter	13.8 ± 3.8	9.6 ± 2.5	10.4 ± 4.3	9.1 ± 2.2
Total number of measuring	152	170	150	158

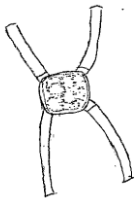
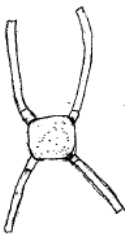
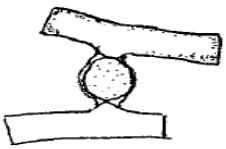
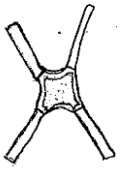
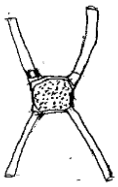
✱ $p < 0.05$, Mann-whitney U-test . Values are means and standard deviations.

Table 4- 4 *Mougeotia* cell size in Lake Suwa (field samples)

Sampling (month / year)	**Sept. 2011**	**Oct. 2011**	**Nov. 2011**	**Jan. 2012**
Cell size				
Length (μm)	47.0 ± 8.5	54.5 ± 13.2	50.0 ± 13.3	✱ 66.7 ± 15.6
Diameter (μm)	4.5 ± 0.5	4.9 ± 0.3	4.9 ± 0.4	4.8 ± 0.4
Cell volume ($\mu m^3 cell^{-1}$)	738 ± 187	1029 ± 294	954 ± 298	1,183 ± 304
Length / diameter	10.7 ± 2.6	11.2 ± 2.7	10.3 ± 2.7	14.1 ± 3.8
Total number of measuring	150	176	150	153

＊ $p < 0.05$, Mann-whitney U-test. Values are means and standard deviation

Table 4- 5 Morphological classification of *Mougeotia*.

Species **Sampling site** **Clade**	**Vegetative cells** **(µm)** **Diameter × length**	**Number** **of** **pyrenoids**	**Zygospores** **Shape and size**	**Conjugation and Zygospore formation**
L. Suwa **Jan. 2012** **Clade B**	3.5~ 5.5 × 40 ~100	3 ~ 6	Quadrate 17~25×17~24 µm rounded corners	
M. elegantula	3.5~ 4.5× 50 ~ 135	4 ~ 8	Cruciate-quadrate 18~24 ×18~24µm rounded corners Sporangia adjoined by 4 cells.	
M. parvula	6~12 × 30 ~140	4 ~8	Wholly in the conjugating tube, globose .13~25µm in diameter.	
M. scalares	20~34 × 40 ~180	4 ~10	Ovoid to globose, 30~38 µm in diameter. Sporangia adjoined by 2cells	
M. viridis	6~8 × 24 ~ 80	4 ~ 6	Quadrate with concave sides and retuse angles. 20 ~32 × 20~32 µm	
M. boodlei	4 ~5 × 85~ 150	4 ~ 6	Quadrate.13~18 × 13~18 µm. gametangium curved .corners somewhat rounded.	

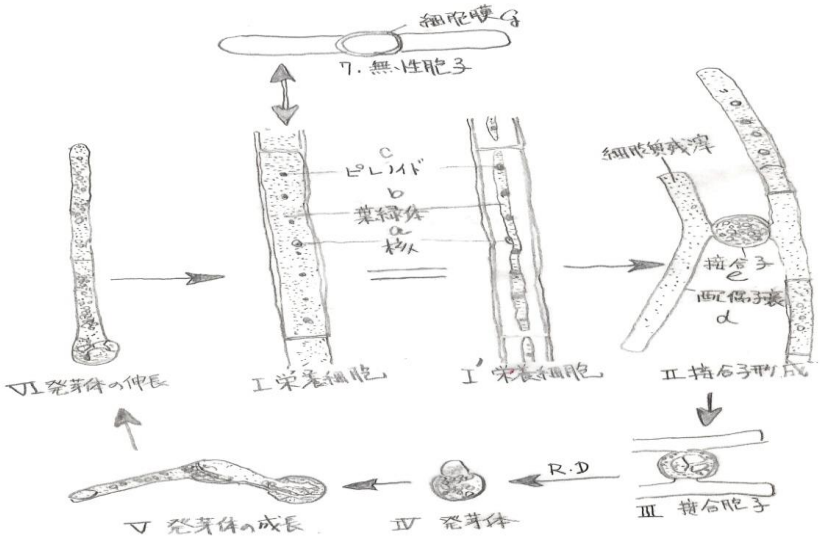
(Transeau, 1926 and 1951. Illustrations of the Japanese fresh-water algae, 1997 .referenced.)

４．３．４　*M. elegantula* の形態変化

諏訪湖より分離した *Mougeotia* の生長細胞は, どの様な条件で有性生殖を行うのかはわからなかった。 分離した 2 種類の中で 1 種類は接合が観察できたが，一方は見られなかった。 また，接合胞子から発芽体も形成できなかった。 しかし *M. elegantula* と思われる接合胞子の形成過程は AF-6 寒天上で観察することができた。*Mougeotia* の生長細胞は，ヨードで染色するとピレノイドが紫色に染まり観察し易くなった(Fig.4- 4a)。またその数は同定のために必要である (Fig.4- 4a)。生長細胞は長く束のように増殖するのが観察され，細胞質の葉緑体は細胞質全体を占めている(Fig.4- 4e)のが徐々に細く変化して，細胞質には顆粒が観察されるようになる (Fig.4- 4f)。

諏訪湖の新鮮な試水を, 液体の AF-6 培地にいれ, 室内温度で約 2〜3 週間培養後, *Mougeotia* のコロニーを白金耳で 1 % AF-6 寒天培地に塗布して純粋培養(Fig.4- 4d, e)を確立した。培養温度は 23℃の恒温室において, 白色蛍光灯 (L / D：12 / 12hr)で約 40 μmol m^{-2} s^{-1} の光条件で行った。 *M. elegantula* だろうと考えられた接合子を形成した細胞は, 1 から 2 週間以内に有性生殖を開始するのが, 培地上を直接顕微鏡で観察することで確認できた (Fig.4-5a-f) 。しかし, 培地成分の窒素及びリンをフリーにすると, 栄養細胞のクロロフィルが抜ける現象がみられた。諏訪湖の *M. elegantula* 以外の *Mougeotia* は, 細胞の先端や中間部が乳頭状に突起する形態の変化は見られたが, 有性生殖は観察

することができなかった。接合できない乳頭状の突起は, 細胞内が黒く変色していく (Fig.4- 4g)。有性生殖を形成する突起 (Fig.4- 5a)は, 栄養細胞のクロロフィルが突起に入り込み，突起が大きく成長していく (Fig.4- 5b, c)。 隣の乳頭状突起と接触すると突起はひとつになり徐々に大きく成長し, 接合子を形成する (Fig.4- 5c, Fig.4- 5d)。*M. elegantula* は scalariform を形成し, 5〜6 の接合子が連なった (Fig.4- 5d, e) 。 接合子が成熟するとこれらをつないでいた接合管は消失した (Fig.4- 5f)。しかし, 接合胞子からの発芽体以降は見られていない (Fig.4-3IV,V)。 接合を形成しなかった諏訪湖の *Mougeotia* のコロニーは, 緑色が濃くコロニー全体がけばだって観察された (Fig.4- 4d, e)。*M. elegantula* のコロニーは, 色素が淡く小さく観察された。 どのような条件で, *Mougeotia* 属が接合を開始するのかは明確でないが種によって違うのだろう。



堀輝三 1994 (藻類生活史集成 緑藻類 第 1 巻 P322 引用)

Fig. 4-3 Reproductive cycles for *Mougeotia paruvla* Hassall, *M.nummuloides*(Hassall) de Ton.

*

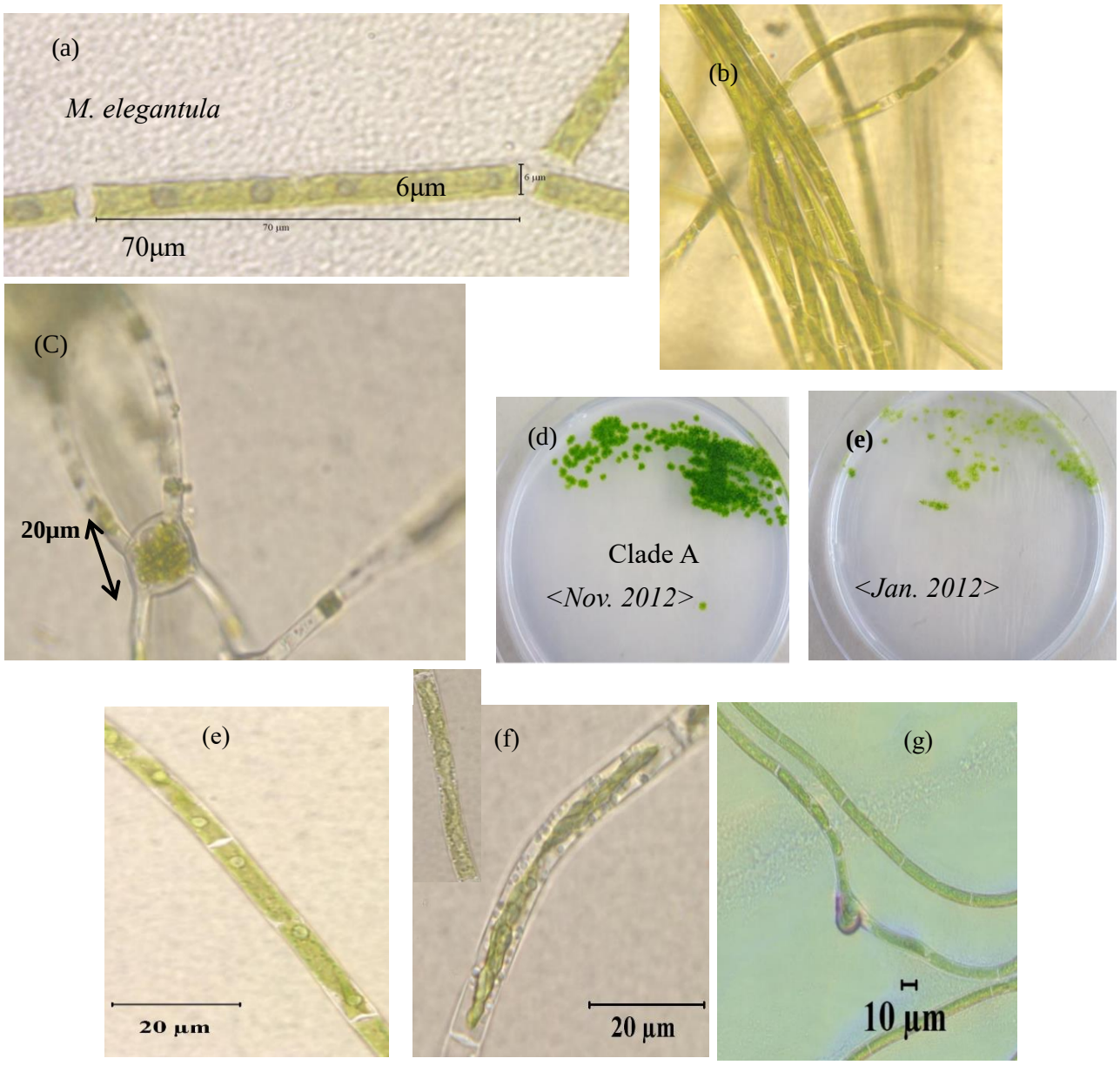


Fig.4- 4 *Mougeotia* of Lake Suwa. (a) Vegetative cell Iodine staining (pyrenoid) (b) Vegetative cell (c) Conjugated cell (d) Colony of Clade A (e) Colony of *M. elegantula* (Clade B). (e) Vegetative filaments, chloroplast has two axial single flat. (f) Chloroplast was thickened and minutely granulate. (g) The center of the cell swell out.

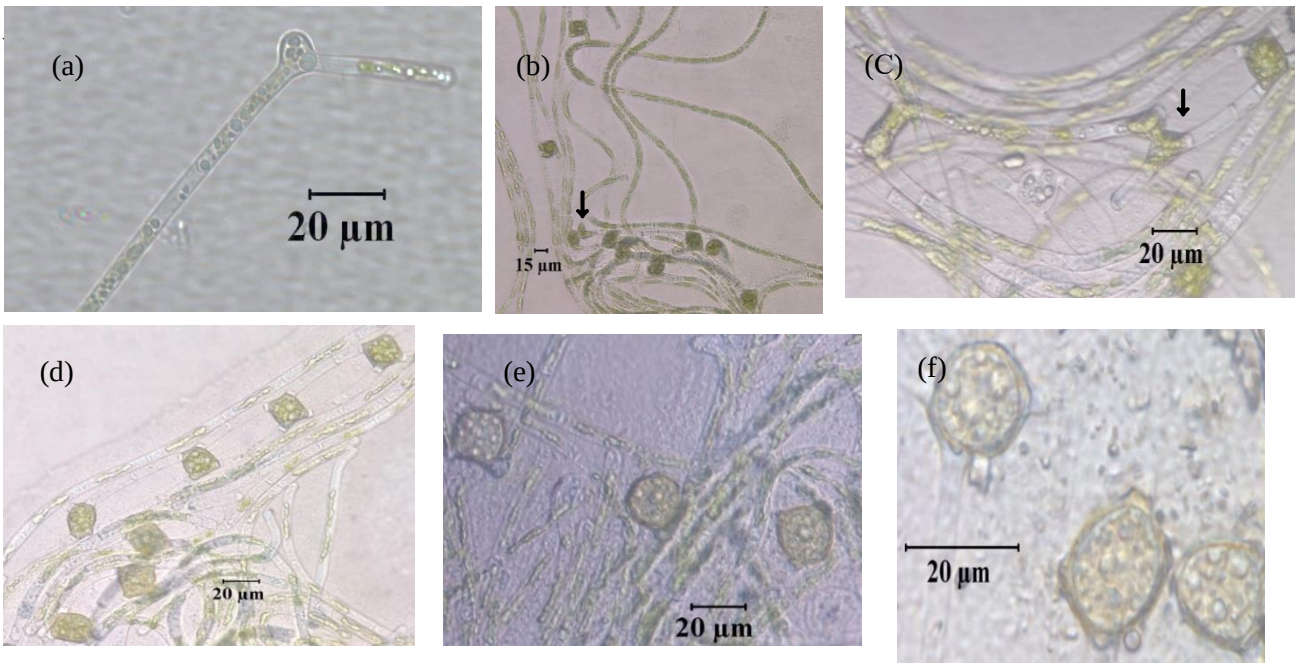


Fig.4-5 *M. elegantula* pure culture on agar plate (AF-6) (a) Papillar formation. (b) and (C) Papillar formation by paired cells (↓arrow). (d) Young zygospore in newly formed by gametangium and conjugation tube; (e, f) Mature zygospore.

４．４　考察

４．４．１　*Mougeotia* 属の 18S rRNA の系統解析

諏訪湖には少なくとも遺伝的に異なる 2 つの系統群の *Mougeotia* が存在し, これらの系統群は塩基配列 4%の違いから別種と考えられる。 しかし形態的特徴に基づく種分類の情報は, GenBnak (DNA Data Bank of Japan , 2013)登録件数が少なく，現在のところ 1 種 *Mougeotia scalaris* (Kranz et al., 1995)の情報が登録されているに過ぎず，遺伝子解

析の結果から種を同定するまでには至らなかった。諏訪湖の *Mougeotia* は *M. scalaris* グループとも異なるクレードであり, 諏訪湖と琵琶湖より分離した複数の株 (9 株)が同じクレード A であることを始めて明らかにした。諏訪湖では, 1591 年より琵琶湖からの魚介類移入 (倉沢・磯部, 1981；倉沢ら, 1982)が記録されて現在にも続いている(Table 4- 6)。 諏訪湖に放流された魚介類とともに琵琶湖から諏訪湖に *Mougeotia* が人為的に移入された可能性も示唆されるが, 現時点で魚介類の移入に伴い *Mougeotia* の拡散が生じたかについては情報が不十分であり, 今後さらなる調査・研究が必要である。

Table 4- 6 Record of fish and shellfish transplant in LakeSuwa.

Year	Invasive species	Japanease name	Origin of introduction (Lake)
1591	*Carassius cuvieri*	ゲンゴロウブナ	Biwa
1913-1915	*Plecoglossus altivelis*	コアユ	Biwa
1923-1968	*Corbicula sandai*	セタシジミ	Biwa
1930-1934	*Plecoglossus altivelis*	アユ	Biwa
1952	*Hyriopsis schlegelii*	イケチョウガイ	Biwa

(倉沢ら, 1981)

４．４．２　諏訪湖と琵琶湖の *Mougeotia* 属の形態分類

諏訪湖の *Mougeotia* は, 2011 年 9 月から 2012 年 1 月にかけて細胞長と直径が大きくなったことが示された (Table 4-4)。この時期の *Mougeotia* 細胞の大きさの変化について二つの可能性が考えられる。一つ目は諏訪湖の *Mougeotia* は出現時には複数の種が存在して, 季節変化により優占種が交代した可能性である。二つ目は, 諏訪湖の *Mougeotia* は 1 種のみ存在した仮説である。諏訪湖の 2011 年 8 月初旬の表層水温は 24.7 ± 0.4℃で *Mougeotia* が増加した 10 月から 11 月は 15.7 ± 1.2℃であった。そして, 2012 年 1 月は 7.1 ± 0.1℃から氷点下までに至った。2012 年 1 月の *Mougeotia* の分離株の細胞長は長く, 18S rRNA の解析結果からはクレード A とは別種であった。したがって, 諏訪湖の *Mougeotia* は 2 種以上が存在し, 季節によって優占種が変化した。つまり秋から冬にかけて低温に適した種に変移したと考えることが妥当であろう。

Mougeotia 分離株のクレード A とクレード B の細胞の大きさは有意に異なった (Table 4-3) ことや, 諏訪湖の *Mougeotia* 細胞が 2012 年 1 月と 11 月で大きさに差が認められなかった (Table 4-2) ことから, 2012 年 11 月の諏訪湖にはクレード A とクレード B に属する両方の *Mougeotia* が混在していたのではないかと推察された。1960 年代の諏訪湖 *Mougeotia* の平均細胞体積は, 1,080 μm^3 $cell^{-1}$ と記載された (倉沢ら, 1972)。 2011

年の諏訪湖 *Mougeotia* 細胞の平均体積は 912.5μm^3 cell^{-1}, 2012 年 11 月と 2013 年 6 月の *Mougeotia* 細胞の平均体積は 1083.5 μm^3 cell^{-1} で倉沢らの記載に近似しているが, 同じ体積や大きい体積も存在する。諏訪湖の *Mougeotia* の出現期間も, 1963 年は 9 月から 12 月の間, 1971 年は 5 月から 7 月と本報告での 2011 年から 2013 年にかけての出現期間も似ている。一方, 琵琶湖の北湖の先行研究 (Kagami and Urabe, 2001)では 1998 年 5 月の *Mougeotia* 平均細胞体積は 1,086 μm^3 cell^{-1} であり, 1979 年から 2009 年にかけての *Mougeotia* 平均細胞体積は 27,000 μm^3 cell^{-1} であった (Kishimoto et al., 2013)。これらのことから, 琵琶湖には諏訪湖より大型の *Mougeotia* と同等な *Mougeotia* が共存している可能性もあるだろう。2013 年 6 月に琵琶湖からクレード A の *Mougeotia* が分離されたのは, この時期にクレード A の *Mougeotia* が比較的多く琵琶湖に存在していたことが考えられる。2011 年の琵琶湖北湖のプランクトン調査結果 (平成 23 年度滋賀県水産試験場事業報告)では, *Mougeotia* は 4 月から 8 月に出現し特に 6 月の細胞数は多いが, その後 12 月, 1 月, 2 月にも再び観察されていることから, 水温が異なる時期に分離を行えば, 琵琶湖でもクレード A 以外のクレードを得ることが可能であろう。

４．４．３　*Mougeotia* 属の出現と水産被害

近年の琵琶湖の北湖は全窒素の濃度からは中栄養で, 全リン濃度からは貧栄養に分類される (Kishimoto et al., 2013)。2011 年には, 刺網における「*Mougeotia* の目詰まり現象」が報告されている (平成 24 年度滋賀県水産試験場事業報告)。諏訪湖でも 2011 年 12 月に *Mougeotia* による投網 (ワカサギ漁)の目詰まりによる漁獲高の減少が示された (藤森, 私信)。その後, 2007 年から 2008 年の諏訪湖夏季では *Ap. flos-aquae* や珪藻の優占が観察されている (朴，2009)。そして, 2010 年には藍藻はさらに減少し, 緑藻の増加が認められている。2011 年 11 月の *Mougeotia* の生物量 (15.1 $mm^3 L^{-1}$)は 2010 年 8 月の緑藻の生物量 (2.5 $mm^3 L^{-1}$)の約 6 倍に達した。2011 年 8 月における *Mougeotia* の出現は 1971 年以来の記載である。藍藻が優占していた 1971 年から 2010 年の 40 年間, 諏訪湖で *Mougeotia* の報告がなかった理由は, *Mougeotia* 属は *Microcustis* 属が出現するような富栄養な環境には適応しないことから *Mougeotia* 出現には適さなかったことだと考えられる。

第 5 章

総合考察

第 5 章 総合考察

５．１．諏訪湖の植物プランクトンの変遷

湖の栄養状態の評価の為に植物プランクトンは欠くことができない構成要素である。湖の生態の短期，長期の環境変化の追跡は富栄養化が始まる前になされた研究と富栄養化時と現在のデータを比較することで，重要な変化のサインを知ることができる。また水深の深い大きな湖に比較して小さな浅い湖での植物プランクトンは, 降雨, 風, 河川からの流入水の増加など気象学上のイベントに対する変化や季節による成層や全層混合などの影響を強く受ける傾向がある (Sommer *et al*. 1986; Salmaso and Decet 1997)。

1908 年 8 月諏訪湖の植物プランクトンは, *Asterionella subtilissima*, *Cocconeis placenttula*, *Taellaria fenestrata*, *scenedesumus quadricauda* など珪藻や緑藻, 藍藻では *Anabaena flos-aquae* が多または夥多と記録されている (田中, 1918)。しかし, 1948 年の夏季の記録では, すでに *Microcystis* 属が出現していた (倉沢・沖野, 1983)。

諏訪湖は, 1920 年頃より製糸産業が発達し湖水は製糸用水として利用されたが大量の有機排水が捨てられた。戦後は精密工業が発展しメッキ排水が流された。その後も人口の増加, 家庭下水, し尿処理水などがそのままの状態で諏訪湖に流入

した (倉沢, 1970)。この時期の諏訪湖の植物プランクトンは, その年の気象条件により藍藻が出現しない年も見られた。

ヨーロッパの Lake Balton (Hungary)の平均水深は 3.1m で諏訪湖の 40 倍以上の表面積を持つが 1960 年代から 1970 年代に中栄養から富栄養化が急速に進み窒素固定藍藻が現れた (Herodek, 1984)。しかし，湖の水質の復旧期間中の植物プランクトンの組成は，他の多くの湖で見られるように，実際の気象条件に対応して非常に変動するように見えた (Sas, 1989)。結果として栄養状態は, 中から富栄養に近い間で内部のリン負荷，周期的な再懸濁，各年における気象条件が植物プランクトンの発生に大きな影響を与えた (Padisák and Reynolds, 1998)。

1970 年以降の諏訪湖もこのような人為的な影響で, 富栄養化が進行し夏季には *Microcystis* 属が優占し湖水の富栄養化が問題になった。1979 年には諏訪湖の流域下水道が一部供用開始になり諏訪湖のリン濃度は低下を始めたが, *Microcystis* 属の優占は 1998 年まで続いた。1999 年から *Microcystis* 属の種組成が変化して生物量が減少し, 2008 年以降 *Microcystis* 属は優占種ではなくなった。珪藻 *Synedra* 属が優占するようになり, 糸状緑藻 *Mougeotia* 属の出現が観察された。2013 年に高い現存量を示した窒素固定藍藻 *Dolichospermum* 属は, 溶存無機態窒素が 20 µg L^{-1} 以下と溶存無機態リンが 10 µg L^{-1} 以上の夏期に高い生物量を示した。湖水中の溶存無機態窒素が 400 µg L^{-1} 以上と溶存無機態リンが 10 µg L^{-1} 以下では, 秋季に

Mougeotia 属の生物量が増加していた。2005 年に秋に優占した *Ap. flos aquae* は近年高い生物量を示さない。これは, *Dolichospermum* 属が *Ap. flos aquae* より高いリン濃度での適応が高いことから (Nobel et al.,1997), 諏訪湖のリン濃度が 2005 年より高濃度を示した 2012 年, 2013 年, 2014 年には *Dolichospermum* 属によって *Ap. flos aquae* の生物量が制限された可能性が示唆された。諏訪湖では, 降雨によって河川水が大量に供給されると湖水の DIN 濃度は増加する一方, 滞留時間, 水温, DIP 濃度及び Chl.a 濃度は減少する。このような環境の変化によって植物プランクトンの増減がコントロールされていると考えられた。Cyanobacteria は温度成層が形成された表層へ集積することから, 湖水の循環が起きると光の獲得ができなくなり生物量は減少する。一方で珪藻は安定した成層条件下では沈降する。諏訪湖で 2011 年秋季に優占した *Mougeotia* 属は, 弱光に耐性 (Reynolds, 2002)であることから, 深部まで生物量が観察できたと示唆された。諏訪湖では, 2010 年以降 DIN 濃度の減少が観察され, 植物プランクトン種は, Chroococcales (*Microcystis* 属) より Nostocales (*Ap. flosaqae, Dolichospermum* 属)が増加してきた。また, 夏季の植物プランクトン量は減少し湖内リンの減少が観察された。しかし, 湖の貧栄養化に伴ってその環境に適応した植物プランクトンが増殖を始める可能性も示唆される。Lake Kinneret (Israel) は Deng et al. (2014)の TSI の結果 43 で中栄養に分類される。2001 から 2014 の TN 濃度の平均が 0.5 mg N L^{-1} に減少し Nostcales 属 *Ap.*

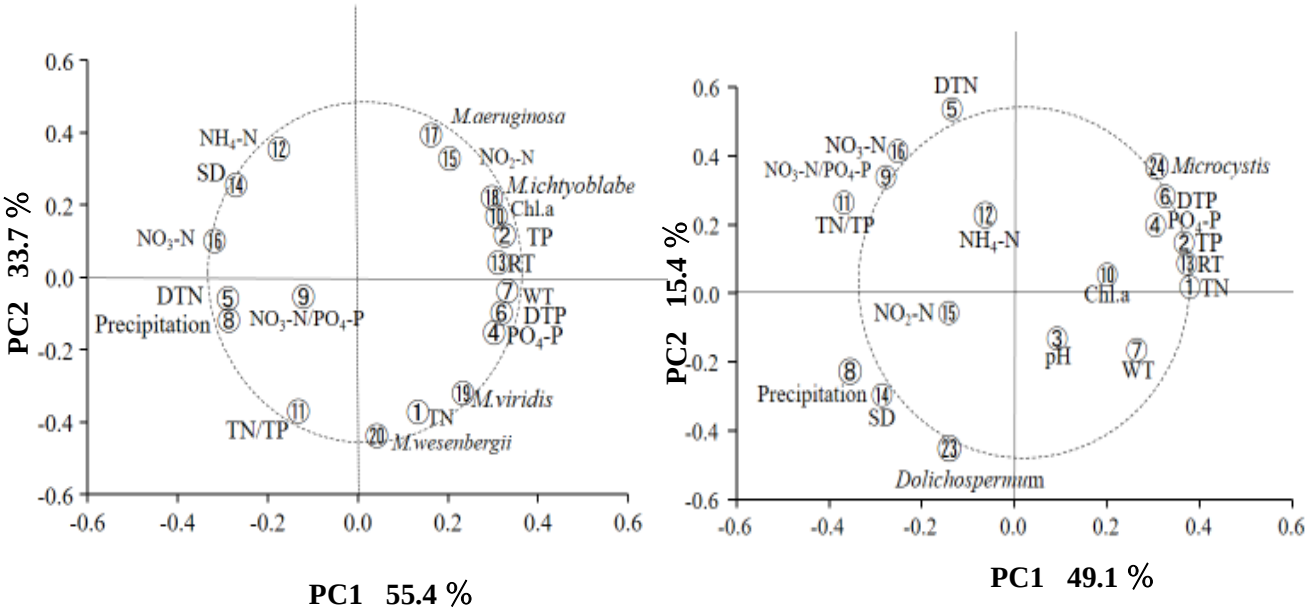
ovalisporum (1994) *Cylindrospermopsis Raciborski* (2005)が, 窒素制限下において生物量が維持されるようになった (Hadas et al., 2012)。

霞ヶ浦では, 1990 年ごろより *Microcystis* 属がより減少し *Oscillatoria* 属, *Phormdium* 属及び珪藻が増加してきた。*Oscillatoria* 属, *Phormdium* 属は夏季だけでなく年間を通して増殖し冬でも透明度が悪い。それだけでなく湖底の土が巻き上がる白濁化の問題や諏訪湖と同じく底層の酸素欠乏の問題が起きている (田渕, 2005)。

Fig. 5- 1 では, PCA による栄養塩の変化と植物プランクトンの関係を解析した。Fig. 5- 1a の PCA は *Microcystis* が優占していた 1992 年から 1996 年の 6 月から 10 月 (N = 25) の環境を現した。Fig. 5- 1b は 1992 年から 1996 年の 6 月から 10 月と窒素固定藍藻，緑藻，珪藻が優占した 2010 年から 2015 年 6 月から 10 月 (N = 25) の 2 つの期間 (N = 50) を合わせて解析した。Fig. 5- 1a の 1992 年から 1996 年の富栄養湖における PCA の結果は, 第 2 主成分である NO_3-N 濃度, NH_4-N 濃度及び第 1 主成分の PO_4-P 濃度の増加は, *M. aeruginos*a 及び *M. ichityoblabe* が増加する要因である。湖水における Chl. a 濃度の増加が, 両種によって引き起こされていた。一方で, NO_3-N 濃度, NH_4-N 濃度の低下は, *M.viridis* 及び *M.wesenbergii* の生物量に影響する。 1990 年代の *Microcystis* 属の PCA の結果から, 諏訪湖における Chl. a の増減は, 降水量の増加による滞留時間の減少 (釜口水門の水門越流による表層

放流の影響; 中村, 2007. ; 田渕, 2009)及び水温変化, NO_3-N 濃度や PO_4-P 濃度などの因子が, *Microcystis* 属の種の変化や生物量の増減に関与していることが示唆された。また, 本間・朴(2005) は, 1993 年から 1996 年の 4 種類の *Microcystis* 種の変化に関して, *M. ichtyoblabe* は 1992 年から 1995 年まで低い生物量 (0.1 から 1.4 $mm^3 L^{-1}$)で, 毎年現れていたことを報告している。1995 年には *M. wesenbergii* の増加が観察されており, *M. aeruginsa* の生物量が減少した年に, *M. wesenbergii* の生物量が増加している傾向を指摘している。その後, 1999 年以降は, 優占種が *M. aeruginsa* 及び *M.viridis* に変わって, *M. ichtyoblabe* と *M. wesenbergii* の生物量が増加していった。*M. ichtyoblabe* は, 細胞が小さい為低い DIP (<10 $\mu g L^{-1}$) 濃度の環境下で, 増殖可能な特性があり, 一方, *M. wesenbegii* は過剰な窒素供給のある状態から, 窒素欠乏状態へと変化した時に, 他の *Synechococcus* 属に比べ有利に増殖できる (中原, 1993) 。Fig. 5- 1a の結果からは 1990 年代の植物プランクトンの変化は, 湖水の栄養塩濃度の変化を反映していると考えられた。Fig. 5- 1b の結果から, 第一主成分の PO_4-P, DTP 濃度及び第 2 成分の NO_3-N, NH_4-N, DTN 濃度が共に高い環境下では, *Microcystis* 属が優占するが *Dolichospermum* 属の生物量は減少している。 窒素, リン濃度が共に高い環境下では, *Dolichospermum* 属は優占種になれないことを示している。

本研究では夏季植物プランクトンの変遷とTSIの結果より判断して現在の諏訪湖は富栄養湖から中栄養への移行期に当たると結論した。1970年代には短期間で珪藻類優占から*Microcystis*属が優占した。1999年以降の諏訪湖は藍藻の優占種交代及び緑藻や珪藻への移行という変化が観察されている。この植物プランクトンの変化は，富栄養化と環境改善の一般論として諏訪湖以外のケースにも適用できるのかもしれない。しかしLake Kinneret及び霞ヶ浦のように新しいNostcales属が増殖する可能性も考えられる。



a：1992～1996 (June to October). **b：1992～1996 and 2010～2015** (June to October)

Fig. 5-1 Factor loading of PCA analysis based on environmental factor and phytoplankton

biovolume from 1992 to 1996 and from 2010 to 2015 of Lake Suwa. a：First principal component showed 55.4 % for total variation, while second principal component showed 33.7 %. . b：first principal component showed 49.1 % for total variation, while second principal component showed 15.4 %.

Symbol showed 1: TN, 2: TP, 3: pH, 4: PO_4-P, 5: DTN, 6: DTP, 7: Water temperature (WP) 8: Precipitation, 9: NO_3-N / PO_4-P, 10: Chl. a, 11: TN/TP, 12: NH_4-N, 13: Retention time (RT), 14: Secchi disk depth (SD), 15: NO_2-N, 16: NO_3-N, 17: *M.aeruginosa*, 18: *M.ichtyoblabe*, 19: *M.viridis*, 20: *M.wesenbergii*, 21: *Aulacoseira*, 23：*Dolichospermum*, 24： *Microcystis.*

５．２ Trophic State Index (TSI)による湖水の評価

諏訪湖では, 1期目の1948年から1969年のTSI (TP)は, 61.1 ± 7.2で1963年, 1965年, 1966年には優占していない年も見られた。1974年TSI (TP)は100に増加していることから富栄養化が急激に進行したことが推察された。1970年から1998年の過栄養状態の諏訪湖では, TSI (TP)とTSI (Chl)は非常に近いTSI値を示した。TSI (SD)及びTSI (TN)はそれより低く評価された。透明度はプランクトンによる光の消散係数がそれ以外の溶存物質や懸濁物による消散係数に比べて必ずしも高くなく，透明度が植物プランクトン量によってのみ決まるものではないことを示している(Sakamoto, 1966)。芳賀・大塚 (2003)はプランクトンの細胞総容積が一定なら構成種のサイズが大きいほど散乱係数は低下し，透明度は上昇することを示唆している。過栄養状態の諏訪湖では, CarlsonのTSI (TP)とTSI (Chl)に比較してTSI (SD)の評価が低い傾向が観察されたが, *Microcystis*属の表層に集積したコロニーが関係しているのかは本研究では明らかにできなかった。

3 期と 4 期では, TSI (TP)と TSI (SD) 及び TSI_{Mean} の判定がほぼ等しいと評価されたが, TSI (Chl)は他の評価より高い結果となり過栄養と富栄養の変化が緩慢であった。TSI (Chl)については, 植物プランクトンの種組成の変化が観察されることから，今後生物量は減少するのかあるいは湖水の栄養状態に適した植物プラン

クトンが増加するのか観察が必要である。これらの TSI の変化の違いより TSI による富栄養化の評価には, 平均を用いるのが良いと考えられた。

TSI 及び OECD による湖沼の分類値を比較した。OECD (TP)の富栄養湖判定基準の範囲は 35 μg L^{-1} から 100 μg L^{-1} であり，TSI を用いると 55 から 71 になる。TSI の富栄養湖判定基準範囲(50 から 70)の TP 濃度は 25 μg L^{-1} から 103 μg L^{-1} に相当するため, OECD の基準の下限値より TSI の下限値のほうが 10 μg L^{-1} ほど低い。OECD (TP)の判定で中栄養湖となる湖沼が TSI では富栄養に判定されることになる。中栄養について比較すると, OECD の判定基準 10 μg L^{-1} から 35 μg L^{-1} は, TSI に換算すると 37 から 55 になるため, TSI の 30 から 50 (6 μg L^{-1} から 25 μg L^{-1}) の判定基準はやや OECD 判定より判定の基準が厳しいかもしれない。Chl.a では, OECD の中栄養の判定 2.5 μg L^{-1} から 8 μg L^{-1} は TSI に換算すると 39.6 から 51 で TSI の判定値である 30 から 50 は 1 μg L^{-1} から 7 μg L^{-1} に相当する。そのため, OECD では貧栄養である判定が TSI (Chl) で中栄養に分類される。また OECD 中栄養の Chl.a Max.値の基準 8 μg L^{-1} から 25 μg L^{-1} は, TSI に換算すると 51 から 62 であり OECD では富栄養になる。TP 濃度と Chl.a 濃度の OECD と TSI の判定では 10 μg L^{-1} 程の差があるものと思われた。

グラフィック法による判定では, 1999 年以降の諏訪湖はリン制限である可能性が示され, 動物プランクトンによる影響も顕著ではなくなった。

TSI 及び OECD による湖沼の分類は, 同一湖沼の貧栄養化の変化を表すツールとして有効である。植物プランクトンの種組成の変化は, これらより敏感に表れてきたことから TSI による栄養化指数での湖水評価と植物プランクトンの種組成を総合的に評価することが湖沼の栄養状態を表す方法としてより有効である。

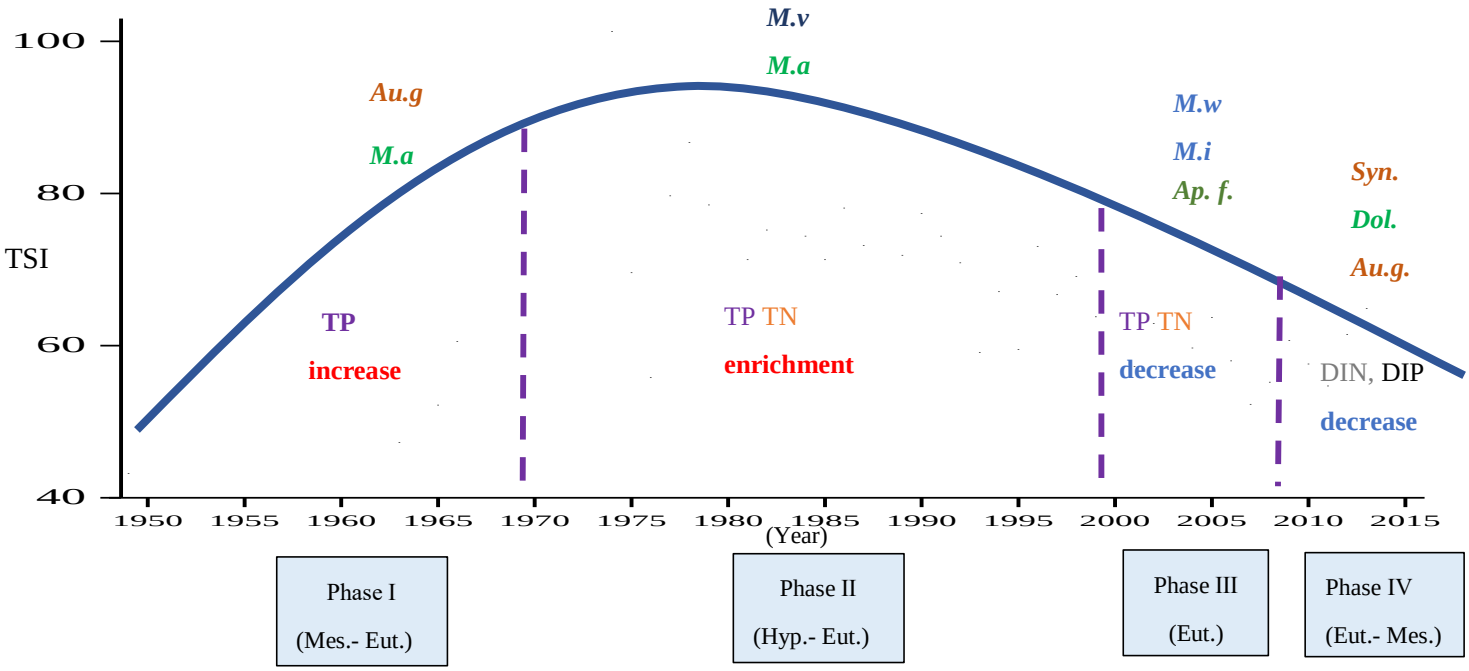


Fig. 5- 2 Changes of the phytoplankton and trophic state index in Lake Suwa from 1948 to 2015.

Au.g : *Aulacoseira granulate*. *M.a*:*Microcystis aerugnosa*. *M.w*:*M. wesenbergii*. *M.v*:*M. viridis*. *M.i*:*M. icthyoblabe*. *Ap.f.*:*Aphanizomenon flos-aquae*. *Syn*: *Synedra* sp. *Dol: Dolichospermum*.

Mes.: Mesotrophic state. Eut: Eutrophic state Hyp.: Hypertrophic state.

５．３ 諏訪湖の環境変化と植物プランクトンの変遷

諏訪湖の 1948 年から 2015 年の夏季の植物プランクトンの変遷と富栄養化から貧栄養化への変遷の過程を 4 期に分け表した (Fig. 5-2)。諏訪湖では 1948 年から 1969 年の TP 濃度の平均は 0.06 ± 0.02 mg L^{-1} 程度で *Microcystis* 属の優占はその年の環境に依存して変化を示したと思われる。1960 年代には, *Microcystis* 属は優占したが, 珪藻 *Aulacoseira* 属や *Cyclotella* 属が優占する年も観察された。1960 年から 1970 年代にかけて TP 濃度の増加で急激に富栄養化が進んだ。2 期とした 1970 年から 1998 年は *Microcystis* 属 1 種が優占した。1978 年の TP 濃度は 0.32 ± 0.09 mg L^{-1} で, DIP 濃度は 67.3 ± 86.8μg L^{-1} と変動を示している。下水道供用開始 4 年目の 1983 年から TP 濃度は 0.14 mg L^{-1} 前後まで減少したが *Microcystis* 属は減少しなかった。河野ら(1981)は, 諏訪湖の底質圏とその上層水圏の間で栄養塩の相互移動があり, 富栄養化に及ぼす底質の影響が大きいことを述べている。また, 諏訪湖の表層泥のリンの溶出量は, 深層泥からの溶出量に比較して 20 倍, 溶出速度は深層泥の約 11 から 39 倍に達した。溶出に影響を及ぼすと考えられる無機態リンは深層泥の約 4 倍でこれは高度経済成長に伴う流入負荷の増大とリンの蓄積性によるものと考えられた (河野, 1985－1986)。しかし, 近年では外部からのリンの負荷量の減少により今後は減少していくことが示唆される。

2005 年では, 窒素固定藍藻 *Ap. flos - aquae* が優占した。出現時の DIP 濃度は 20 μg L^{-1} 以下で NO_3-N 濃度は 7 月上旬及び 10 月中旬以降を除いた期間 20 μg L^{-1} 以下を維持した。2008 年以降の植物プランクトンは *Microcystis* 属の優占はなく, 珪藻 *Synedra* 属, *Au. granulata*, 窒素固定藍藻 *Dolichospermum* 属が優占した。中栄養に変化していく過程の諏訪湖はその年の降水量や水温の変化など環境変化によって藍藻あるいは珪藻が優占する植物プランクトンの変化が観察されているが, この様な不安定な変化が中栄養移行期の特徴であるのかもしれない。浄化対策を始めてから約 50 年をかけて植物プランクトンの種組成に変化が現れた。諏訪湖はまだ変化の途中であるが, 今後どこまで貧栄養化に持っていくべきかはこれからの課題である。このままリンが減少すれば, 藍藻の出現は抑えられ緑藻, 珪藻, 渦鞭毛藻が増加していく可能性, または窒素が減少して窒素固定藍藻が増加する可能性の 2 つが考えられる。

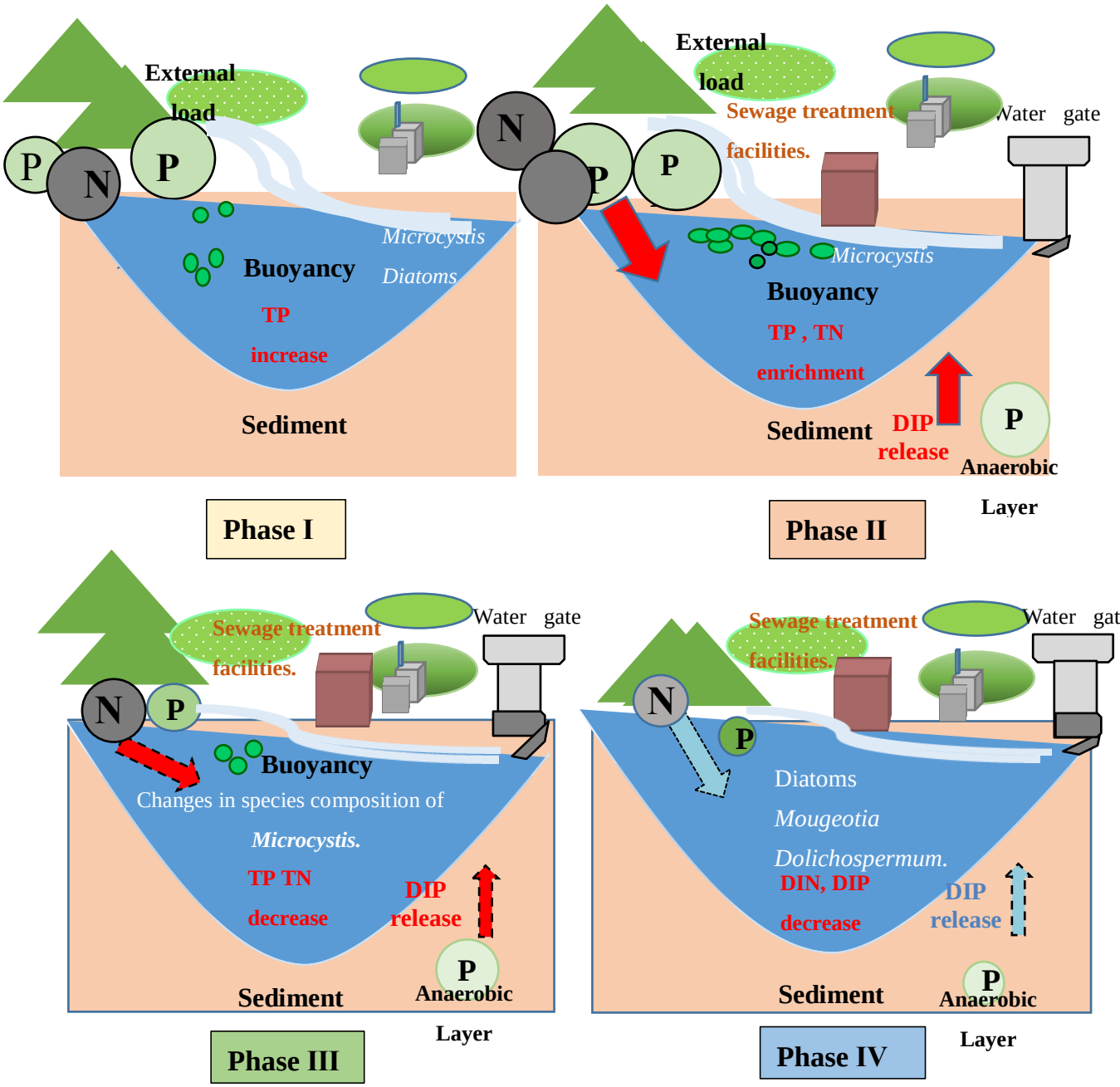


Fig. 5-3 Changes of phytoplankton due to oligotrophication and eutrophication in Lake Suwa.

謝辞

本研究の実施にあたり, 多くのご指導をいただきました信州大学理学部物質循環学科教授朴 虎東先生に深く感謝いたします。 物質循環学科教授戸田 任重先生, 國頭 恭先生,生物学科東城 幸治先生, 信州大学先鋭領域融合研究群 山岳科学研究所 花里 孝幸先生, 宮原 裕一先生に心より感謝申し上げます。

滋賀県水産試験場の皆さまには *Mougeotia* の採取に御協力を頂きこの場を借りて深い感謝の意を表します。 また諏訪湖定期調査で同行した信州大学山岳科学総合研究所の皆様に心よりお礼を申し上げます。 そして, 諏訪湖 *Mougeotia* 及び諏訪湖の資料について多くの御助言頂きました元長野県水産試験場諏訪支場長武居 薫先生, 信州大学名誉教授 沖野 外輝夫先生に感謝申し上げます。 溶藻バクテリアでお世話になりました名城大学教授 原田 健一先生, 渡辺 圭司先生 (現 埼玉県環境科学国際センター) 大変お世話になりました。

Microcystin 遺伝子の解析実験では, クローニングを教えて頂いた東京大学教養学部総合文化研究科嶋田研究室の皆様, 大林 夏湖先生, 慶応義塾大学自然科学教育センターの皆様, 程木 義邦先生 (現 京都大学生態学研究センター) お世話になりました。 Microcystin 遺伝子の実験当初 PCR のバンドも出なかった解析実験に辛抱強く付き合って下さった斎藤 梨絵さん (現 福島県環境創造センター研究部)とても心強く最後まで結果が出せたことに感謝致します。

引用文献

Andersen, T.（1997）Pelagic nutrient cycles. Herbivores as sources and sinks. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 280 p.

Anneville, O., Pelletier, J. P. (2000) Recovery of Lake Geneva from eutrophication：quantitative response of phytoplankton. Hydrobiologia 148(4), 607-624.

Anneville, O., Souissi, S., Ibanez, F., Ginot, V., Druart, J. C. and Angeli, N. (2002) Temporal mapping of phytoplankton assemblages in Lake Geneva: Annual and interannual changes in their patterns of succession. Limnolgy and Oceanogrphy 47(5), 1355-1366.

Bellinger, E. G. and Sigee D. C. (2010) Freshwater Algae: Identificationand use as bioindicators. John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, UK.

Brookes, J. D. and Carey, C. C. (2011) Resilience to blooms.Science 334 (46): 46–47.

Burnham, J.C., Hashimoto, T., Conti, S. F. (1968) Electron microscopic observations on the penetration of *Bdellovibrio* bacteriovorus into gram-negative bacterial hosts, J. Bacteriol. 96, 1366-1381.

Burnham, J.C., Stetak,T., Gregory, L.(1976) Extracellular lysis of the bluegreen alga *Phormidium luridum* by *Bdellovibrio* bacteriovorus, J. Phycol. 12, 306-313.

Burnham, J. C., Collart , S. A., Highiso, B.W. (1981) Entrapment and lysis of the

cyanobacterium *Phormidum luridum* by aqueous colonies of *Myxococcus xanthus* PCO2, Arch. Microbiol. 129, 285-294.

Burnham, J.C., Susan, A.C., Daft, M.J. (1984) *Myxococcal* predation of the cyanobacterium *Phormidium luridum* in aqueous environment, Arch Microbiol., 137, 220-225.

Caputo, L., Naselli-F. L., Ordoñez, J., Armengol, J. (2008) Phytoplankton distribution along trophic gradients within and among reservoirs in Catalonia (Spain). Freshwater Biology 53, 2543–2556.

Carlson, R. E. (1977) A trophic state index for lakes. Limnology and Oceanography, 22(2), 361–369.

Carlson, R. E. (1991) Expanding the Trophic State Concept to Identify Non-Nutrient Limited Lakes and Reservoirs. Enhancing The States Lake management programs, 1991: 59-71

Carlson, R. E. and Havens. K.E. (2005) Simple graphical methods for the interpretation of relationships between Trophic State Variables. Lake and Reservoir Management 21(1), 107-118.

Carmicael, W.W. (1992) Cyanobacteria secoundary metabolites- the cyanotoxins, J.Appl.Bact.,72, 445-459.

Carpenter, S. R., and Cottingham. K. L. (1997) Resilience and restoration of lakes. Conserv. Ecol., http://www.consecol.org/vol1/iss1/art2.

Chen, Y., Qin, B., Teubner, K., Dokulil, M. K. (2003) Long-term Dynamics of Phytoplankton Assemblages: Microcystis-domination in Lake Taihu,a Large Shallow Lake in China. J. Plankton Res. 25, 445–453.

Chorus, I., Schauser. I. (2011) Oligotrophication of Lake Tegel and Schlachtensee, Berlin-Analysis of system components, causalities and response thresholds compared to responses of other waterbodies." Umweltbundesamt, Texte, 45 157.

Dignum, M., Matthijs, H. C. P., Pel, R., Laanbroek, H. J., and Mur, L. R. (2005) Nutrient limitation of freshwater cyanobacteria. ChapterIV.

DNA Data Bank of Japan (DDBJ) http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html (2014年 8月 7日).

Dodson, S. I., Arnott S. E. and Cottingham, K. L. (2000) Therelationship in lake communities between primary productivityand species richness. Ecology 81, 2662–2679.

Dokulil, M. T. and Teubner, K. (2003) Eutrophication and restoration of shallow lakes: Is the concept of alternative stable equilibria a useful tool? Hydrobiologia, in press.

Dokulil, M.T.; Teubner, K. **(**2005) Do phytoplankton communities correctly track

trophic changes? An assessment using directly measured and palaeolimnological data. Freshw. Biol. 50, 1594–1604.

Downing, J. A., Watson, S. B., McCauley, E., (2001) Predicting Cyanobacteria dominance in lakes. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 58(10), 1905-1908.

Edmondson W. T., Lehman J. T., (1981) The effect of changes in the nutrient income on the condition of Lake Washington. Limnology and Oceanography 26, 1.

Falconer, I. R. (1999) An overview of problems caused by toxic blue–green algae (Cyanobacteria) in drinking and recreational water, Environment al toxicology, 14, 5-12.

Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences : a maximum likelihood approach. Journal of Molecular Evolution, 17, 368-376.

Havens, K. E., Jin, K., Iricanin R.N. and James, R. T. (2007) Phosphorus dynamics at multiple time scales in the pelagic zone of a large shallow lake in Florida, USA. Hydrobiologia 581, 25–42

Flint, E. A. (1977) Phytoplankton in seven monomictic lakes near Rotorua, New Zealand. New Zealand Journal of Botany 15, 197–208.

Fukami, K., Nishijima ,T., Murata, H., Doi, S.and Hata, Y. (1991) Distribution of bacteria Influential on the developme and the decay of Gymnodinium nagasakiense red tide and their effects on algal growth, Nippon Suisan Gakkaishi 57 (12), 2321-2326.

二木功子，斎藤梨絵，中村剛也，宮原裕一，東城幸治，花里孝幸，朴虎東 (2015) 諏訪湖の水質改善に伴う糸状緑藻*Mougeotia*属の出現．日本陸水学雑誌 76, 99-109.

Garibaldi, L. Anzani, A. Marieni, A. Leoni B. and Mosello R. (2003) : Studies on the phytoplankton of the deep subalpine Lake Iseo. Journal of Limnology 62, 177- 189.

Geider, R. J., MacIntyre, H. L. and Kana, T. M. (1997) Dynamicmodel of phytoplankton growth and acclimation: responsesof the balanced growth rate and the chlorophyll a: carbon ratio to light, nutrient-limitation and temperature. Marine Ecology Progress Series 148, 187–200.

Gerloffg, C. and Skoog, F. (1957) Nitrogen as a limiting factor for the growth of *Microcystis aeruginosa* in Southern Wisconsin lakes. Ecology 38, 556-61

Giribert, G., Carranza, S., Baguñà, J., Riutort, M., Ribera, C. (1996) First molecular evidence for the existence of a Tardigrada +Arthropoda clade. Mol. Biol. Evol. 13, 76–84. ...

Gophen, M.; Smith, V.H.; Nishri, A.; Threlkeld, S.T. (1999) Nitrogen deficiency, phosphorus sufficiency, and the invasion of Lake Kinneret, Israel, by the N2-fixing cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. Aquat. Sci.61, 293–306.

Graham, M. J., P. Arancibia, A., Graham L. E. (1996) : Effect of pH and selected metalson growth of the filamentous green alga *Mougeotia* under acidic conditions. Limnology and Oceanography 41,263-270.

Gumbo, J. R., Ross, G., Cloete, E. T. (2008) Biological control of *Microcystis* dominated harmful algal blooms. African Journal of Biotechnology 7 (25) , 4765-4773.

Hadas, O.; Pinkas, R.; Malinsky-Rushansky, N.; Nishri, A.; Kaplan, A.; Rimmer, A.; Sukenik, A. (2012) Appearance and establishment of diazotrophic cyanobacteria in Lake Kinneret, Israel. Freshw. Biol. 57, 1214–1227.

Hadas, O., Kaplan. A., Sukenik, A. (2015) Long-Term Changes in Cyanobacteria Populations in Lake Kinneret (Sea of Galilee), Israel: An Eco-Physiological Outlook, Life 5, 418-431.

芳賀裕樹・大塚泰介, (2003) 琵琶湖北湖沖帯透明度の73年間の変遷 日本陸水学雑誌 64, 133-139.

濱田仁 (1990) 接合藻の生物学第 8 版, コウヨウ社　大阪.

花里孝幸，小河原誠，宮原裕一, (2003). 諏訪湖定期調査 (1997 – 2001)の結果.

信州大学山地水環境教育研究センター研究報告 1, 109-174.

Hashimoto, Y., Okaichi, T., Dang, L.D. (1968) Gleodine an ichtiotoxine substance oroduced by a *Peridinium polonium*, Bull ap.soc. Sei. Fisheries 34, 528-534

早川和秀, 辻村茂, 石川俊, 芳賀裕樹, 岡本高弘, 焦春萌, 石川可奈子, 熊谷道夫, (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. 水環境学会誌 35(6), 89-100.

Hayashi, S., Itoh, K., Suyama, K. (2011) Growth of the Cyanobacterium Synechococcus leopoliensis CCAP1405/1 on Agar Media in the Presence of Heterotrophic Bacteria, Microbes Environ.26 (2), 120–127.

Hoshaw,R.W. , Richard, M., McCourt, R. M. (1988) The Zygnemataceae (Chlorophyta): a twenty-year update of research. Phycologia, 27(4) 511-548.

Huisman, J.; Matthijs, H.C.; Visser, P.M. (2005) Harmful *Cyanobacteria*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 3.

Huisman, J. Richard, R., Jonker, R.R., Zonneveld, C and Franz, J. Weissing, F. J.(1999) Competition for light between Phytoplankton species:experimental tests of mechanistic theory. Ecology 80(1), 211–222.

廣瀬弘幸・山岸高旺 (編) (1997) 日本淡水藻図鑑 (Illustrations of the Japanese fresh-water algae.) pp. 416-439. 内田老鶴圃, 東京.

本間隆満・朴虎東 (2005) 諏訪湖における *Microcystis* 種組成, 及び細胞あたりの microcystin 含有量の変動. 日本陸水学雑誌 66:191-195.

本間隆満・朴虎東 (2005) 諏訪湖における*Microcystis*種組成および藍藻毒 microcystin濃度に及ぼす硝酸態性窒素・リン酸態リン濃度の影響. 水環境学会誌 28(6), 373-378.

堀輝三 (編) (1994)：藻類の生活史集成第1巻　緑色藻類 (An Illustrated atlas of the life history of algae) 322. 内田老鶴圃, 東京.

Horne, A. J. and Goldman C. R. (1994) Limnology, (2nd ed.) : McGraw-Hill, Inc., New York.

Hoshaw, R. W. and McCourt R. M. (1988) The Zygnemataceae (Chlorophyta) : a twenty-year update of research. Phycologia 27, 511-548.

Hsieh, H. C., Ishikawa, K., Sakai, Y., Ishikawa, T., Ichise, S., Yamamoto, Y. Kuo, T. C., Park, H. D. Yamamura, H. D. and Kumagai M. (2010) Phytoplankton community reorganization driven by eutrophication and warming in Lake Biwa. Aquatic Sciences, 72: 467–483.

Huisman, J., Sharples, J., Stroom, J. M., Petra, M. V., Edwin, A., Kardinaal, W. E. A., Verspagen, J. M. H., Sommeijer, B.(2004) Changes in turbulent mixing shift competition for light between phytoplankton species. Ecological Society of America 85(11), 2960-2970.

市村輝宜 (1979) 藻類の分離と培養法：淡水藻類，294-305,『藻類研究法』 西澤俊・千原光雄編, 共立出版，p.754.

市村輝宜・伊藤忠雄 (1979) 微細藻類の保存法 (I)，355-373,『微生物の保存法』根井外輝雄編，東京大学出版会, P. 466.

Interlandi, S. J. and Kilham, S. S. (2001) Limiting resources and the regulation of diversity in phytoplankton. Ecology 82, 1270–1282.

James R. T., Havens K., Zhu, G., Qin, B. (2009) Hydrobiologia 627, 211–231.

Jeppesen E, Søndergaard M, Jensen JP, Havens KE, Anneville O, et al. (2005) Lake responses to reduced nutrient loading–an analysis of contemporary long-term data from 35 case studies. Freshwater Biol. 50, 1747–1771.

Kagami, M. andUrabe J. (2001) Phytoplankton growth rate as a functionof cell size: an experimental test in Lake Biwa. Limnology, 2:111–117.

Kamenir1,Y., Dubinsky, Z., Zohary, T. (2006) The long-term patterns of phytoplankton taxonomic size-structure and their sensitivity to perturbation: A Lake Kinneret case

study Aquat. Sci. 68, 490–501.

環境省ホームページ生活環境の保全に関する環境基準(湖沼)

URL.http://www.env.go.jp/kijun/wt2-1-2.html. (2016年8月時点).

河野行雄, 鹿角孝雄, 長瀬叶彦 (1981) 諏訪湖底泥からのリンの溶出

－ 表層泥と深層泥からのリンの溶出 ―長野県衛生公害研究所研究報告3,61-63

河野行雄 (1985-1986) 湖沼の富栄養化に及ぼす低湿ない栄養塩類の影響諏訪湖底

質中の栄養塩類の分布とその挙動.日本衛生学雑誌 40(6), 892-902.

Kato, S. (1982) Laboratory culture and morphology of *Colacium vesiculosum* Ehrb.

(Euglenophyceae). Japan Journal of Phycology 30, 63-67.

Kim, B-H., Sang, M., Hwang, S-J., Han, M-S. (2008) In situ bacterial mitigation of the

toxin cyanobacteriu*m Mycrocystis aeruginosa*: A Implications for biological bloom

control, Limnology and Oceanography 6, 513-522.

木村昌嗣, 豊田政史, 宮原裕一 (2015) 現地観測に基づく諏訪湖における貧酸素水

塊の時空間特性の分析水工学論文集 71(4),1769-1774.

Kishimoto, N., Ichise, S., Suzuki K.and Yamamoto C. (2013) : Analysis of long- term

variation in phytoplankton biovolume in the northern basin of Lake Biwa. Limnology

14, 117-128.

気象庁統計情報, URL. http://www.jma.go.Jp/jma/menu/report.html (2016 年 3 月時点).

Kranz, H. D., Miks, D., Siegler, M. L., Capesius, I., Sensen, C .W.and Huss V.A.R. (1995) : The Origin of Land Plants : Phylogenetic relationships among Charophytes, Bryophytes, and vascular plants inferred from complete small - subunit ribosomal RNA gene sequences. Journal of Molecular Evolution 41, 74-84.

Kratzer, C. R., Brezonik, P. L. (1981) A Carlson-type trophic state index for nitrogen in Florida lakes. Water Res. Bull. 17, 713-715.

倉沢秀夫・山岸宏 (1971)　湖沼と地域開発．地域開発 77，17- 29.

倉沢秀夫・山岸宏・吉川正武・偽政園野 (1971) : 諏訪湖のプランクトンの季節変化 (1970 年) プランクトンの数と量との優占種の比較. JIBP-PF 諏訪湖生物群集の生産力に関する研究経過報告 3, 41-53.

倉沢秀夫・青山莞爾・磯部吉章 (1972) : 最近10年間の諏訪湖プランクトンの変遷と水平，垂直分布．陸水不栄養化の基礎的研究報告1, 5-10.

倉沢秀夫・他 JIBP－PF・諏訪湖研究グループ (1976) 諏訪湖の生物群集の生産力に関する研究.

倉沢秀夫・磯部吉章 (1981) : 諏訪湖各種移植魚貝類の放流年次と各種の年間漁獲物量順位の推移．信州の自然環境モニタリングと環境科学の総合化に関する研究，環境科学年報 3, 7-13.

倉沢秀夫・山本雅道・沖野外輝夫 (1982) : 諏訪湖の魚貝類相の変遷と移植

放流種について．信州の自然環境モニタリングと環境科学の総合化に関る研究，環境科学年報 4, 1-6.

Krom, M. D., and. Berner, A. B. (1980) The diffusion coefficients of sulfate, ammonium, and phosphate ions in anoxic marine sediments. Limnol. Oceanogr. 25(2), 327-337.

Lane, D. J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, pp. 115–175. Edited by E. Stackebrandt and M. Goodfellow. Chichester: Wiley.

Larsen, D. P., Malueg, K.W. (1980) Whatever became of Shagawa Lake? Restoration of Lakes and Inland Waters, techalive.mtu.edu. 66-72.

Larsen, D. P., Donald, W., Schults, D.W., Kenneth W. Malueg, K.W. (1981) Summer internal phosphorus supplies in Shagawa Lake, Minnesota. Limnol. Oceanogr. 26(4), 740-753.

Liu, W. T., Nielsen, A. T., Wu, J. H., Tsai, C. S., Matsuo, Y., Molin，S. (2001) In situ Identification of polyphosphate- and polyhydroxyalkanoate-accumulating traits for microbial populations in a biological phosphorus removal process, Environ Microbiol. 3, 110-122.

Margalef, R. (1978) Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in a unstable environment. Oceanologica Acta 1, 493–509.

Marker, A. F. H., Nusch, E.A. Rai, H., Riemann, B. (1980) The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: conclusions and recommendations.Ergebn. Limnol. 14, 91-106.

McCarthy M. J. James R.T Chen Y East T.L Gardner.W.S. (2009) Limnology 10, 215–227

McQueen, D. J., Lean, D. R. S. (1987) Influence of water temperature and nitrogen to Phosphorus ratios on the dominance of blue-green algae in Lake St. George, Ontario. Can. J. Fish. aquat.Sci. 44, 598–604.

Medlin, L., Elwood, H. J. Sticakel, S., Sogin L. (1988) : The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16s-like rRNA- coding region (sequence analysis ; polymerase chain reaction ; diatoms ; *Skeletonema costatum*). Gene 71,491- 499.

三田村緒佐武，尾崎正樹，後藤直成 (2014) 琵琶湖周辺内湖の植物プランクトン増殖に対する栄養評価．滋賀大学環境総合研究センター研究年報 11 (1), 47 - 56.

宮原裕一 (2007) 諏訪湖定期調査 (2002 – 2006)の結果. 信州大学山地水環境教育研究センター研究報告 5, 47-94.

宮原裕一 (2009) 水質浄化対策が引き起こす富栄養湖の生態系構造の変化と人とのかかわり. 水環境学会誌 32(5), 222-225.

宮原裕一, 小松正知 (2011) 諏訪湖水質分布の季節変動とその要因. 信州大学環境科学年報 33, 25-38.

宮原裕一 (2013) 諏訪湖定期調査 (2007 – 2011)の結果. 信州大学山地水環境教育研究センター研究報告 9, 1-214.

宮原裕一, 吉田知可(2016) 諏訪湖の現状と課題. 用水と廃水.58(1),61-66.

Moss, B.; Barker, T.; Stephen, D.; Williams, A.E.; Balayla, D.J.; Beklioglu, M.; Carvalho, L. (2005) Consequences of reduced nutrient loading on a lake system in a lowland catchment: Deviations from the norm? Freshw. Biol. 50, 1687–1705.

Murphy, J., Riley, J.P. (1962) A modified single solution method for the determination of Phosphate in natural waters, Anal. Chim. Acta 27, 31-36.

長野県ホームページ 諏訪湖水質の経年変化. URL.http://www.pref.nagano.lg.jp/mizutaiki/kurashi/shizen/suishitsu/5ki/documents/s-wq.pdf. (2016 年 4 月時点).

長野県 1979～1982 (昭和 54 年度から昭和 57 年度) 公共用水域水質測定結果. 長野県生活環境公害課編集・発行.

長野県 1971 (昭和46年度までの水質調査) 公共用水域水質測定結果. 長野県生活

環境公害課編集・発行.

長野県水産指導所諏訪支所 (1980) : 昭和 55 年度赤潮対策技術開発試験報告書. 漁業生物による富栄養化防止試験, 4-14.

長野県諏訪建設事務所(2012) 諏訪湖のあゆみ, URL.http://www.pref.nagano.lg.jp/suwaken/shisaku/ayumi.html (2016 年 4 月時点).

中原紘之 (1993) 4.ラン藻類, 水域の窒素：リン比と水産生物 (吉田陽一), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 39-50,

中村淳，山本長, 1981. 赤潮予測調査報告書 諏訪湖における「スス水」発生機構の解明. 長野県水産試験場諏訪支場, 1-22.

中村剛也，本間隆満，宮原裕一，花里孝幸，朴虎東 (2010) : 諏訪湖における藍藻の現存量・種組成変化に及ぼす滞留時間の影響. **水環境学会誌** 33, 123 - 129.

Nishizawa, T., Nishizawa, A., Asayama, M. Harada, K., Shirai, M. (2007) Diversity within the microcystin biosynthetic gene clusters among the genus *Microcystis*, Microbers envirn. 22, 380-390.

Nobel, W. T. D., Huisman, J., Snoep, J. K., Mur, L. R. (1997) Competition for phosphorus between the nitrogen-fixing cyanobacteria *Anabaena* and *Aphanizomenon.* FEMS Microbiology Ecology 24(3), 259–267.

Novo, E. M. L. M., Londe, L. R., Barbosa, C., Araujo, C.A.S., Rennó, C. D. (2013) Proposal for a remote sensing trophic state index based upon Thematic Mapper/ Landsat V. Ambiente and Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science 8(3), 66-82.

Nygaard, G., (1949) Hydrobiological studies on some Danishponds and lakes, II: the quotient hypothesis and some littleknown or new phytoplankton organisms. Kunglige Danske Vidensk, Selskab. 7, 1–242.

OECD (1982): Eutrophication of waters: Monitoring, Assessment and Control. OECD, Paris.p. 154.

荻原敬三 (1997) : 湖岸の再生計画　「アーバンクボタ 36」: 株式会社クボタ広報宣伝部，大阪，3-20.

落合照雄 (1984) : 信州自然科学シリーズ ⑤ 信州の湖沼：信濃教育会出版部.

O’ Grady, K., Brown L. M. (1989) Growth inhibition by high light intensities in algae from lakes undergoing acidification. Hydrobiologia 184, 201-208.

大槻晃 (1981) アルカリ性ペルオキソ二硫酸カリウム分解を用いる環境水中の全窒素測定法おける紫外線吸光光度定量法の応用．化学分析 30, 688-689.

Ohkubo, N., Yagi, O., Okada, M. (1993) Studies on the succession of blue-green algae, *Microcystis, Anabaena, Oscillatoria* and *Phormidium* in Lake Kasumigaura , Environmental Technology 14, 433-442.

沖野外輝夫 (1997) : 生物相の変遷 「アーバンクボタ 36」 : 株式会社クボタ広報宣伝部，大阪，20-41.

沖野外輝夫, 花里孝幸 (1997) 信州大学理学部臨湖実験所報告10, 7-249.

沖野外輝夫, 花里孝幸編 (2005) 山岳科学叢書 3, アオコが消えた諏訪湖. 信濃毎日新聞社, 長野, PP. 31-42.

沖野外輝夫, 花里孝幸編 (2005) 山岳科学叢書 3, アオコが消えた諏訪湖. 信濃毎日新聞社, 長野, PP. 50-70.

沖野外輝夫 (2014) 諏訪湖-回復期の課題と対策-環境技術 143(8),495-501.

大前信輔・金辻宏明 (2012) : 植物プランクトンが刺網へ付着する機構の解明 : 滋賀県水産試験場事業報告 (平成 24 年度). 琵琶湖沿岸環境変動の影響調査研究．ホームページ. URL.

http://www.pref.shiga.lg.jp/g/suisans/jigyohoukoku/files/h24p6667.pdf.(2014 年 8 月 7 日)

Padisák, J. and Reynolds, C. S. (1998) Selection of phytoplankton associations in Lake Balaton, Hungary, in response to eutrophication and restoration measures, with special reference to the cyanoprokaryotes. Hydrobiologia 384**,** 41–53.

Padisák, J. (1992) Seasonal succession of phytoplankton in a large shallow lake (Balaton, Hungary) a dynamic approach to ecological memory, its possible role and mechanisms. J. Ecol. 80, 217–230.

Paerl, H.W., Huisman, J. (2008) Blooms like it hot. Science 320, 57–58.

朴虎東 (2009) : 諏訪湖で起きたアオコの激減とラン藻組成の変化. 水環境学会誌 32:229-231.

Pauerl, H. W., Fulton, R. S., Moisander, P. H., Dyble, J. (2001) Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. The Scientific World 1, 76-113.

Pettersson, K., Herlitz, E. and Istvanovics, V. (1993) The role of *Gloeotrichis echinulata* in the transfer of phosphorus from sediments to water in Lake Erken. Hydrobiologia 253, 123‑129.

Pillsbury, R. W., Lowe R. (1999) The response of benthic algae to manipulations of light in four acidic lakes in northern Michigan. Hydrobiologia 394, 69‒81.

Poole, H. H., Atkins W. R. G. (1929) Photo-electric Measurements of Submarine Illumination throughout the Year. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 16, 1 pp. 297-324.

Qin BQ (2008) Lake Taihu, China: dynamics and environmental change. In: Dumont H J, editor. Monographiae Biologicae. Springer Verlag. p. 342.

Reichwaldt, E. S., Ghadouani, A. (2012) Effects of rainfull pattern on toxic cyanobacterial blooms in a changing climate: Between simplistic scenarios and complex dynamics. Water research 46, 1372-1393.

Reynolds C.S. (1983) The ecology of freshwater phytoplankton, Cambridge University Press, Cambridge. pp. 281–300.

Reynolds C.S. (1988a) Functional morphology and the adaptive strategies of freshwater phytoplankton. In: Growth and Reproductive Strategies of Freshwater Phytoplankton (Ed. C.D. Sandgren), Cambridge University Press, Cambridge. pp. 388–433.

Reynolds, C. S., Huszar, V., Kruk, C., Flores, L. N., Melo, S. (2002) Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. Journal of plankton research 24(5), 417-428.

Reynolds, C. S. (1987) Community organisation in the freshwater plankton. In Gee, M. and Giller, P. S. (eds), Organization of communities, past and present. Blackwell Scientific Publications, Oxford 267–295.

Reynolds, C. S. (1990) Temporal scales of variability in pelagicenvironments and the response of phytoplankton. FreshwaterBiology 23, 25–53.

Reynolds C.S., Irish A. E. (1997) Modelling phytoplankton dynamics in lakes and reservoirs: the problem of in-situ growth rates. Hydrobiologia 349, 5–17.

Reynolds, C. S. (1998) What factors influence the species composition of phytoplankton in lakes of different trophic status? Hydrobiologia 369/370, 11–26.

Rhee G.Y., Gothan, I. (1981) The effect of environmental factors on phytoplankton growth: temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation. Limnol Oceanogr. 26, 635–648.

Robarts, R.D., Zohary, T. (1987) Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of blocm-forming cyanobacteria, New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 21, 391-399.

Rousseaux C.S. and Gregg W.W. (2014) Interannual variationin phytoplankton primary production at a global scale. Remote Sensing 6, 1–19.

Ruggiu, D., Morabito, G., Panzani, P., Pugnetti, A. (1998) Trends and relations among basic phytoplankton characteristics in the course of the long term oligotrophication of Lake Maggiore (Italy), Hydrobiologia 369/370, 243-257.

Ryan, E. F., Duggan, I. C., Hamilton, D. P., Burger, D. F. (2006) Phytoplankton assemblages in North Island lakes in New Zealand: Is trophic state, mixing, or light climate more important? New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 40, 389–398.

Sakamoto, M. (1966) primaryproduction by phytoplankton community in some Japanese lake and dependence on lake depth・Arch・Hydrobiol 62, l-28.

西條八束, 三田村緒佐武, (1995) 新編 湖沼調査法.講談社サイエンティフィク, 東京, pp. 157-159.

西條八束, 三田村緒佐武, (1995) 新編 湖沼調査法. 講談社サイエンティフク, 東京, pp. 179-183.

Saitou, N., Nei M. (1987) The neighbor- joining methods : a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4, 406-425.

Salmaso, N. (2000) Factors affecting the seasonality and distribution of cyano bacteria and chlorophytes : a case study from the large lakes south of the Alps, with special reference to Lake Garda. Hydrobiologia 438, 43-63.

Salmaso, N. (2002) : Ecological patterns of phytoplankton assemblages in Lake Garda : seasonal, spatial and historical features. Journal Limnology 6, 95-115.

Sas, H. (1989) Lake restoration by reduction of nutrient loading: Expectations, experiences, extrapolations. Richarz, Academia Verlag.

Scheffer M., Carpenter S R. (2003) Catastrophic regime shifts in ecosystems: linking theory to observation TRENDS in Ecology and Evolution 18(12), 648- 656.

Schindler, D. W. (1987) Detecting Ecosystem Responses to Anthropogenic Stress. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 44, 6–25.

SCOR-UNESCO group (1969) Determination of photosynthetic pigments in sea-water., Monogr. Oceanogr. Methodol 1, 1-66.

滋賀県水産試験場事業報告 (平成 23 年度) : 琵琶湖定点定期観測データ，植物プランクトン出現種. http://www.pref.shiga.lg.jp/g/suisan-s/jigyohoukok /files/h23_p114_128.pdf. (2014 年 8 月 7 日).

Shilo, M .(1970) Lysis of Blue Green Algae by *Myxobacter*,J. Bacteriol. 104, 453-461.

Smith, V. H. (1983) Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. Science 221, 669–671.

Sommer, U. (1985) Comparison between steady state and non-steady state competition : experiments with natural phytoplankton. Limnology and Oceanography30, 335-346.

Sommer, U. (1989) The role of competition for resources in phytoplankton sucession.In: Phytoplankton Ecology.Succession in Plankton Communities(Sommer,U., ED), Springer-Verlag, Berlin. pp57－106.

Stabenau, H..and Säftel, W. (1989). Induction of conjugation in *Mougeotia*. – Canadian Journal of Botany 67, 2217–2218.

Stockner, J. G. (1972) Paleolimnology as a means of assessing eutrophication. Verhandlungen der internationale Vereinigun fu¨r theoretische und angewandte Limnologie 18, 1018–1030.

田渕俊雄 (2005) 湖の水質保全を考える -霞ヶ浦からの発信- 技報堂出版株式会社, 東京.

田渕俊雄 (2009) 湖沼の流域特性と水質改善～諏訪湖と霞ケ浦の事例から～. 水環境学会誌 32(5), 226－228.

Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and Kumar S. (2011) : MEGA 5 :molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 28, 2731-2739.

田中阿歌麿 (1918) 湖沼学上よりみたる諏訪湖の研究下巻，岩波書店，東京 p. 965.

Tezuka, Y. (1992) Recent trend in the eutrophication of the north basin of Lake Biwa, Japan. Journal of Limnology 5(2), 139-144.

Thompson, J. D, Higgins D. G. and Gibson T. J. (1994) : CLUSTALW : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Resarch 22, 4673-4680.

Tilman, D.; Kiesling, R. L. (1984) Freshwater algal ecology: taxonomic trade-offs in the temperature dependence of nutrient competitive abilities. In: Klug, M. J.; Reddy, C. A. ed., Current perspectives in microbial ecology, Washington D.C. American Society for Microbiology. pp. 314-319.

Tooming-Klunderud, A. T., Mikalsen, B., Jakobsen, K. S. (2008) The mosaic structure of the *mcyABC* operon in microcystis, Microbiology 154, 1886-1899.

Transeau, E. N. (1926) The genus Mougeotia. Ohio Journal of Science 26, 311-338.

Transeau, E. N. (1951) : The ZYGNEMATACEAE (FRESH-WATER CONJUGATE ALGAE) The Ohio University Press , Columbus.

Tyler, E. (1968) TheSecchi disk・Limnol・Oceanog. 13, l－6.

Vézie, C., Rapala, J.,Vaitomaa, J., Seitsonen, J., Sivonen, K. (2002) Effect of Nitrogen

and Phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations Microbial Ecology43, 443-454.

Vollenweider, R. A. Kerekes J. J. (1980) Synthesis Report, Cooperative Programme on Monitoring of Inland Waters (Eutrophication Control). Report prepared on behalf of Technical Bureau, Water Management Sector Group, Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Paris, p.290.

Vörosmarty, C. J., Green, P. Salisbury J., Richard, B. (2000) Global water resources: vulnerability from climate changeand population growth. Science 289, 284–288.

Visser, P. M., Ibelings, B. W., Bormans, M., Huisman, J. (2015) Artificial mixing to control cyanobacterial blooms: a review. Aquatic Ecology 1-19.

Wang S.M, Dou H. S (1998) Lakes of China. Beijing, China: Science Press.

Watanabe, K., Park, H. D., Kumon, F. (2012) Historical change of phytoplankton in a eutrophic lake in Japan as determined by analysis of photosynthetic pigments in a lakebed sediment core. Environmental Earth Sciences 66(8), 2293-2300.

Watanabe, K., Takihana, N., Aoyagi, H., Hanada, S., Watanabe, Y., Ohmura, N., Saiki, H., Tanaka H. (2005) Symbiotic association in Chlorella culture, FEMS Microbiology Ecology 51**,** 187–196.

渡辺義人 (1997) 水質の変換 ：「諏訪湖アーバンクボタ 36」株式会社クボタ広報宣伝部, 大阪 2-19.

Watson, S. B., McCauley, E., Downing, J. A. (1997) Patterns in phytoplankton taxonomic composition across temperate lakes of differing nutrient status. Limnology and Oceanography 42, 487–495.

Wetzel, R. G. and Likens G. E. (2000).Limnologycal analyses. Third (ed.) Composition and Biomass of phytoplankton. Springer verlag. New York.

Weyhenmeyer, G. A., Wilen, E., Sonesten, L. (2004) Effects of an extreme precipitation event on water chemistry and phytoplankton in the Swedish Lake Mälaren. Boreal enviroment research 9, 409-420.

White, E., Law, K. Payne G., Pickmere, S. (1985) Nutrientdemand and availability among planktonic communities –an attempt to assess nutrient limitation to plant growth in12 central volcanic plateau lakes. New Zealand Journal ofMarine and Freshwater Research 19, 49–62.

Wood, S. A., Rueckert, A., Hamilton, D. P., Cary S. C., Dietrich D.R. (2011)Switching toxin production on and off:intermittent microcrystal synthesis in a Microcystis bloom.Environmental Microbiology Reports 3, 118–124.

Yamagishi,T.(1963) Classification of the Zygnemataceae Sci Rep Tokyo Kyoiku Daigaku section B Science Report Vol.11,No.17.

Yamashita, T., Sasaki,T. (2012) Conditions for the induction of the mating process and changes in contents of carbohydrates and nitrogen compounds during the mating process of *Spirogyra* Journal of Plant Research1 25 (3), 457–464.

山本鎔子 (1978) 寒天重層法による湖沼中の藍藻溶解性生物因子の測定, 陸水学雑誌 39(1), 9-14.

山本鎔子(1988) 溶藻性微生物の種類と日本の湖沼, 河川における分布. 日本微生物生態学会誌2 (2), 77-88.

Yamamoto, Y. and Suzuki, K. (1990) Distribution and algal-lysing activity of fruting Myxobacteria In Lake Suwa, J. Phycol. 26, 457-462.

Yamamoto, Y., Niizuma ,S., Kuroda, N. and Sakamoto, M. (1993) Occurrence of heterotrophic bacteria casing lysis of cyanobacteria in a eutrophic lake, Jpn. J.phycol.41, 215-220.

Yamamoto, Y., Kouchiwa, T., Hodoki Y., Hotta, K., Uchida, H., Harada, K. (1998) Distribution and identification of actinomycetes lysing cyanobacteria in a eutrophic lake, J. Appl. Phycol. 10, 391-397.

Zhao L. L., Zhu, G.W., Chen, Y.F., Li ,W., Zhu, M.Y., (2011) Thermal stratification and its influence factors in a large-sized and shallow Lake Taihu. Adv Water Sci 22: 844–850.

Zhu, G., Wang, F., Gao, G., Zhang,Y., (2008) Variability of Phosphorus Concentration in Large, Shallow and Eutrophic Lake Taihu, China, Water Environment Research,80(9), 832-839.

Zohary, T. (2004) Changes to the phytoplankton assemblage of Lake Kinneret after decades of a predictable, repetitive pattern. Freshwater Biology 49, 1355–1371.

Zohary, T.,Nishri A., Sukenik A. (2012) : Presen – absent : a chronicle of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* from Lake Kinneret. Hydrobiologia 698, 161–17.

Zwirn, M., Chen, C., Uherl, B. and Schagerl, M. (2013) Induction of sexual reproduction in Spirogyra clones − does an universal trigger exist? Fottea, Olomouc 13(1), 77–8.

付録

諏訪湖における *Microcystis* 溶藻バクテリアの年次変化（ 2008 年から 2011 ）と溶藻微生物の分離

研究の目的

富栄養化した湖沼では，藍藻ブルームが増加し (Wetzel, 2001), 中でも有毒藍藻ブルームは 2 次代謝産物である肝臓毒やカビ臭を産生することで環境上問題となっている (Carmicael, 1992)。近年の研究では，水環境中の多くの微生物の中でバクテリアと藻類はお互いの成長に刺激や抑制を与えていることが報告されている (Fukami et al, 1997; Watanabe et al, 2005 ; Hayashi et al, 2011)。湖の従属栄養細菌群集の変動は，植物プランクトン群集の変動と関連している (Kuroda and Sakamoto,1986)。

Cyanobacteria 細胞に対して溶藻能力のあるバクテリアは 1970 年代より研究されている(Shilo, 1970； Burnham et al. 1968, 1976, 1981, 1984； Yamamoto et al., 1988； Kim et al., 2008. ; Gumbo et al., 2008)。諏訪湖に発生した藍藻から, *Myxococcus fulavus*, *Streptomyces* 属などの溶藻バクテリア (Cyanobacteria Lying Bacteria：CLB)が分離されており, *Alcaligenes* 属 41 種の 46 %に溶藻活性があったと報告された (Yamamoto et.al.,1990, 1993,1998)。 諏訪湖は 1970 年から 1977 年の夏には, 過栄養状態となり *Microcystis* 属の生物量は 100 $mm^3 L^{-1}$ に達した (沖野, 1997)。しかし, 近年の諏訪湖は, 藍藻優占の富栄養型から, 中栄養湖沼型への水質改善の進行過程と考えられ, *Microcystis* 属の現存量は

減少し植物プランクトン種は変動が観察される。2010 年では緑藻の増加が見られるようになり, 2011 年には糸状緑藻 *Mougeotia* 属が優占した。それに伴い湖内微生物の種類や数も変化すると考えられる。本研究は, 2008 年から 2011 年の諏訪湖の湖水における *Microcystis* 属の変化を明らかにし, 湖水と底泥の溶藻プラーク数の変化を観察した。また, 湖水から形成したプラークより単離したバクテリア 8 種類に溶藻能力が確認できた。分離した *M.aeruginosa* 溶藻バクテリアを 16S rRNA により同定を行った。そのなかで, *Microbacterium*sp. (MLBP1)は, グラム陽性短桿菌で諏訪湖水と底泥試料の溶藻プラークから, 異なる時期に分離された。*Microbacterium* sp. が藍藻の溶藻に関わるという報告が無いことから, 評価することを目的とした。

材料と方法

試料の採取と細胞の計数

試料の採取は諏訪湖湖心 (36° 02′ 50″ N, 138° 05′ 159 01″ E)において 2008 年から 2011 年の毎年 6 月から 10 月までの 2 週間毎に行なった。*Mirocystis* 属の細胞計数用の試水は, 表層 (湖面 0〜15 cm) より採取後, ホルマリン(ホルムアルデヒドの最終濃度 1.5%)を用いて固定した。*Microcystis* 属の細胞密度の計測は, コロニー状の細胞を超音波によって十分に分散後, Fuchs-Rosenthal 血球計算板 (Kayagaki) を用いて光学顕微鏡 (BX51, Olympus) 下で計数した (本間・朴, 2005)。

底泥は 0〜10cm の底泥をベックマン採泥器にて採取した。溶藻バクテリアを分離するための試料 (湖水, 底泥)は, 滅菌チューブに入れ冷蔵して実験室に持ち帰った。

溶藻バクテリアプラークの作成と溶藻バクテリアの分離

重層寒天法 (山本, 1978) を僅かに改良して, 藻類プレートに形成されたプラーク (溶藻斑)から溶藻バクテリア量を求めた。湖水サンプルは, 2 分間の超音波処理 (B1200, ヤマト科学)後, 3 μm のメンブレンフィルター (Millipore Co.)を通した。湖水濾液は, 藍藻生育液体培地を用いて原液, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} に希釈した。採集した底泥サンプル $5cm^3$ をあらかじめ 10^{-1} に希釈後混合し, 泥の沈殿後に湖水濾液と同様に希釈して培養した。

Microcystis 培養株は対数増殖期の *Microcystis aeruginosa* NIES298 (霞ヶ浦産)と *Microcystis aeruginosa* NIES3349 (諏訪湖産)を用いた。*Microcystis* 培養株をそれぞれ藍藻生育培地 (NIES298, CB 培地, 市村・伊藤, 1977)；NIES3349, MA 培地, 市村, 1979)を用いて 10^8 cells mL^{-1} に調節した。希釈した湖水濾液と *Microcystis* 培養液は, 低温ゲル化寒天 (Nacalai Tesque)を加えて (最終濃度 0.9 %)混合した。シャーレの下層には, 藍藻生育培地を 1cm の深さで固化後, 湖水濾液と *Microcystis* 培養液の混合液を重層した。プレートは 3 枚ずつ作製し, 23℃の恒温室白色蛍光灯下光強度 40 μmol m^2 s^{-1} (L：

D / 12:12h)の条件で培養し, 形成した溶藻斑 (Plque forming unit：PFU) を計数した (プラーク観察は 2008 年 8 月から開始した)。その後形成されたプラークの一白金耳を 10^{-1}

に希釈した Nutrient (Difco)寒天培地で培養し 23℃で純粋培養を確立した。溶藻活性の確認は, NIES298 と NIES3349 をそれぞれ重層した培地に, 約 3 mm^3 の大きさのバクテリアをのせ溶藻を確認した。シアノファージによる溶藻を否定する為に, 表層水を 0.2μ メンブランフィルター (Millipore Co.)で濾過後 2%クロロホルム (Wako)を添加したサンプルを作成し同様にプラークの観察を行った。

バクテリアの分離と 16S r RNA による溶藻バクテリアの同定

総 DNA (genomic DNA)の抽出・精製は DNeasy Kit (QIAGEN)を製品プロトコルに準じて用いた。16Sr RNA 領域の PCR 増幅には 27f 5'- AGAGTTTGATCMTGGCT CAG-3' (Lane .,1991) と 1492R 5'- ACGGYTACCTTGTTACG-3' (Liu et al., 2001) のプライマーセットを用い, 抽出した DNA を増幅した。95℃10 分間のプレヒート後, 「95℃で 30 秒の熱変性, 60℃で 3 分間のアニーリング, 72℃で 1 分間の伸長」を 1 サイクルとする反応を 30 サイクル行い, 付加伸長反応 72℃で 7 分, 4℃で試料を保存した。PCR 反応の酵素には TaKaRa Ex Taq polymerase (Takara Bio)と PCR 増幅には Gene Amp® PCR system 9700 (Applied Biosystems) を用いた。PCR 産物の精製は Qiaquic PCR product purification kit (Qiagen)で行なった。 PCR 産物は Dye Terminator Cycle sequencing kit (Beckman Coulter)で蛍光染色後, CEQ2000 シーケンサーを用いた。本研究で解析した全ての遺伝子配列情報を Gene Bank (http://www. ddbj.nig.ac.jp) に登録し, Gene bank へのアクセッション番号は Table X 1 に示した。

Microbacterium sp.(MLBP1)と NIES298 の走査型電子顕微鏡(SEM)による観察

NIES298(1×10^7 mL)と MLBP1 (1×10^8 mL)を 9:1 で 24℃, 7 日間培養した。コントロールには同期間培養した NIES298 を用いた。2.5%グルタルアルデヒド (Wako) で固定後, 形成されたプラークを切り抜き 1%オスミウム (Heraeus) で後固定した。脱水後 t－ブチルアルコール (Difco)で置換し, 凍結乾燥後にオスミウムでコ-ティングして, SEM (JSM-6510LV JEOL.)で観察した。

Microbacterium sp.MLBP1 の NIES298 の溶藻

Microbacterium sp.MLBP1 が NIES298 を溶藻するメカニズムを確認する目的で以下の実験を行った。NIES298 は lag phase で細胞数は 5×10^5 cells mL^{-1} に調整した。MLBP1 は 10^{-1} 濃度の Nutrient ブロスで 23℃3 日間純粋培養し, 細胞数は約 3×10^7 cells mL^{-1} を使用した。透析膜はセルロースチューブ透過分子量 14000 でポアサイズは 50 Å (三光純薬)を用いた。3 個の腰高シャーレを用意し 380 mL ずつ NIES298 を入れた。一つには 20mL の MLBP1 を直接, 一方には高圧滅菌した透析膜に 20mL の MLBP1 を入れ間接的に反応させた。コントロールは 10^{-1} 濃度の Nutrient ブロスを透析膜に入れ培養した。60 rpm min^{-1} (Thomas scientific co.Ltd.)で水平に攪拌した。室温 23℃光照度(L：D / 12: 12h)約 40μmol photons $m^{-2}s^{-1}$ で培養した。この時の NIES298 の細胞数の変化をフックスローゼンタール計算板で計数して評価した。

同時に培養した *M.aeruginosa* と MLBP1 の細胞変化を SYBR Gold (Invitrogen, USA)で染色した。0.2 μm フィルター(Watman)でろ過した湖水サンプルを用いた。適量の試水に SYBR Gold(Invitrogen) 原液(×10,000)を TE バッファで希釈し, 最終濃度が 2.5 倍になるように加え, 暗条件で染色後落射型蛍光顕微鏡 (BH2-RFC, Olympus, Co. Ltd.）B 励起(励起波長 450～480 nm, U-MWU, Olympus)で観察した。

結果と考察

Microcystis 属の変化と溶藻プラーク数の変化

諏訪湖の 2008 年は, 9 月中旬に *M. aeruginosa* (1.1 $mm^3 L^{-1}$), *M. viridis* (0.1$mm^3 L^{-1}$), *M ichithyoblabe* (1.1 $mm^3 L^{-1}$), *M. wesenbergii* (2.7 $mm^3 L^{-1}$)が出現し, 4 年間の中ではこの期間の NIES298 に形成されたプラーク数は多く観察された(1.3×10^4 PFU mL^{-1})。NIES3349 では, 6×10^2 PFU mL^{-1} が観察された。ウイルスプラークも 9 月中旬 (2×10^2 PFUmL^{-1}) に出現した。しかしその他の年では確認できなかった。一方で 2009 年の 7 月から 8 月は降水量が高く 2008 年の同時期に比較して *Microcystis* 現存量は少なかった (Fig. X1)。2009 年のプラーク数は 10 月後半 NIES3349 (4.3×10^3 PFU mL^{-1})が高く, NIES298 によるプラークは 9 月後半(9×10^2 PFU mL^{-1})にピークが確認された。*Microcystis* 属の現存量減少に伴い, ローンのプラーク数も減少が確認された。現存量の高い *M. wesenbergii* は, 形態的に明瞭な袋状外縁部を持ちそれを満たす粘液状の部分からなる (渡辺, 1994)。溶藻ローン

に使用した NIES298 や NIES3349 を溶藻するバクテリアとは異なるバクテリアが溶藻に関わった可能性も示唆された。4 年間の観測からは, 10 月初旬の *Microcystis* 終焉時のプラーク数が増加を示した。2010 年と 2011 年の諏訪湖は *Microcystis* 属の生物量が 2008 年の 1/10 から 1/100 へと減少 (二木, 2014)し, プラーク数にも減少が見られた (Fig. X1)。

底泥の溶藻バクテリアプラーク数の変化

底泥の溶藻プラーク数は, 表層の藍藻が沈降する 9 から 10 月に増加するのが確認された。その数は 1 年を通して 10^3 から 10^4 g^{-1} の間であった。先行研究では, 1998 年の諏訪湖底泥コアサンプルの 0- 2 cm では好気性, 嫌気性の溶藻プラークは 10^4 ～10^6 g^{-1} であると報告がある (山本, 1991)。本研究の結果はコアではないこと, 嫌気性プラーク数を考慮していないことから単純に比較はできないが, 諏訪湖底泥プラーク数は 1/10～1/100 に減少傾向が見られた。これは底泥の堆積物 (プランクトン数)の変化に関係していると思われた (Fig. X2)。

溶藻プラークの発達と SEM によるプラークの観察

溶藻プラーク形成は, 実験開始約 4 日目から寒天上に薄く出現を始めた。その後は徐々に増加しプラーク形成ははっきりと表れた。7 日目と 11 日目のプラークでは直径の大きさが 2mm から 4mm または 3mm から 6mm と約 1.5 倍大きく発達した (Fig. X3- a,

b)。平坦なプラークや陥没プラークが見られたのは溶藻バクテリア種の違いによる溶藻のメカニズムに関係があると考えられた。CYBR Gold による蛍光染色では, バクテリアが NIES298 に群がっているのが観察された (Fig. X3- D)。 Cyanobacteria の溶藻バクテリアに関する報告をまとめると大きく 4 つに分類された。一つはバクテリアが藍藻に付着してから細胞外物質を分泌して細胞壁を溶かす (Shilo, 1970 ; Sallal, 1994 ; Choi et al., 2005 ; Rashidan and Bird, 2001; Kim et al., 2008 ; Gumbo et al., 2010)。しかし細胞外物質は出していないという報告もある (Manage et al., 2000)。二つ目はバクテリアが藍藻細胞を取り囲み (entrapment) 細胞外物質を分泌し, ダメージを与える (Yamamoto, 1990 ; Kang et al.,2004 ; Shi et al.,2006)。三つ目はバクテリアの細胞内外への寄生 (Burnham et al., 1976 ; Caiola and Pellegrini, 1984)の報告がある。そして, 四つ目は特にメカニズムは述べられていないがバクテリアからの溶藻関連物質が特定されている又は溶藻が確認されている報告である (Wright and Thompson ,1985 ; Ashton and Robarts , 1987 ; Dakhama et al., 1993 ; Yamamoto et al., 1998 ; Yoshikawa et al., 2000 ; Walker and Higginbotham , 2000)。Kodani et al. (2003) は, *Pseudomonas* sp.K44-1 のメタノール抽出液より Harman (1-methyl－β－carboline)を分離し, *Anabaena cylindrical*(NIES19)に対して拮抗活性を報告している。

プラークを 10^{-1} 倍に希釈した Nutrient 寒天培地で培養するとプラーク中のバクテリアは数種類が分離された。一つのバクテリアが溶藻プラークを形成するのではなく, 数

種類のバクテリアから形成されていた。プラークを重層寒天培地上にのせると, 数日後には再び強い溶藻を形成してくることから, 溶藻活性を示さなくてもこれらのバクテリアは何らかの関与をしている可能性も示唆された。SEM により *Microcystis* 細胞の形態とバクテリアを観察した。*M.aeruginosa* と MLBP1 を同時に培養した 7 日目の SEM による細胞変化では, MLBP1 に囲まれている像, *M.aeruginosa* の表面の溝が深くなり, バクテリアが細胞内に侵入している像や委縮している細胞が確認された (Fig. X4 c, d)。またバクテリアに細胞を覆われるため光が遮蔽されるとも考えられた。これらの結果より, バクテリアの増加によって *Microcystis* 細胞は収縮または細胞膜のダメージ，光合成阻害などバクテリアの増加によってプラークが大きく形成されていくと推定された。湖水でも同様な現象が見られているのだろう。

溶藻バクテリアの 16S r RNA による同定

2009年から2010年にかけて湖水プラークから8種類のバクテリアを分離し溶藻を確認した (Table X1)。これらのバクテリアはNIES298やNIES3349を溶藻することが確認された。分離した7種類の中で*Acinetobacter*は先行研究において*M. aeruginosa*, *M. wesenbergii* に溶藻活性が確認されている (Yamamoto et .al.,1993)。*Aeromonas hydrophila*は, *Aphanozomenon flos-aquae*と*Tychonema bourrellyi*のメタノール抽出液での成長阻害が報告されている (Østensvik et.al., 1998)。このバクテリアが産生するエンテロトキシンの一つは, 時にヒトに下痢症状を起こすことが知られている (Trust et.al., 1979)。本研究では

*Aeromonas hydrophila*が*Microcystis*属の溶藻にも関係している結果となり, 相互に影響を及ぼしている可能性も示唆された。

これらのバクテリアの中でMLBP1は, *Microbacterium chocolatum*との相同性が99% (Fig. X5)のスムーズな淡いピンク色のコロニーを形成するグラム陽性短桿菌 (0.8 ± 0.19 × 0.6 ± 0.1 µm)である。SIM培地 (Sulfide Indol Motility medium, Nissui) での運動性 は(＋)であった。MLBP1は, pH7-11の間で発育が可能であったが, pH8～9の成長速度が高く観察された。温度変化による成長は15℃～37℃まで可能であったが, 生長速度は20℃～28℃で高かった (データは示さない)。*Microcystis*の増殖時に本バクテリアの成長は適していると考えられた。SYBR Gold染色の顕微鏡下での観察より MLBP1とNIES298の混合培養ではNIES298の周囲にMLBP1が取り巻いている様子が確認された (Fig.X 3d)。炭水化物の代謝はglucose, sucroseが陽性で, 脂肪酸エステルを加水分解する。α-Dグルコシド, β- Dグルコシド, β- Dグルコサミニド, リン酸塩, プロリン, トリプトファン, ロイシンの加水分解が確認された。 カタラーゼは陽性, オキシダーゼ陰性であった。

16S rRNAによる系統樹の解析では*Microbacterium kitamiense* と近縁種であった (Fig. X5)。*Microbacterium kitamiense* は日本の甜菜工場の廃水から2種類分離された。このバクテリアは, 唯一炭素源として蔗糖を利用しバッチ培養では溶性, 不溶性の菌体外多糖類 (EPS)を製造していることが報告されている (Matsuyama et al.,1999)。*Microcystis*の群

体は酸性糖を含む多糖で覆われておりタンパク質を主成分としている(雨宮・中山, 1984)。*Microbacterium* MLBP1は, 栄養分を*Microcystis*から獲得できたと考えられた。また*Microbacterium oleivorans* sp. novと*Microbacterium hydrocarbonoxydans*は原油を分解する能力が報告されている (Schippers et al., 2005.)。*Microbacterium oxydans* S15-M2は, シベリアの放射性廃棄物保管所で分離された報告があり, 環境に適応する能力に優れている (Nedelkova et al., 2006)ことから, 分解能力や分解物質を出す能力を持っているのかもしれない。

MLBP1 の産生する溶藻物質

先行研究をまとめるとバクテリアの溶藻には溶藻物質を分泌しているものが報告されている。NIES298 と MLBP1 を透析膜に入れ溶藻を確認した実験では, 開始 3 日目以降 lag phase 5×10^5cells ml^{-1} の NIES298 細胞数は減少を示した。このことから 14kDa 以下の溶藻物質が分泌されている可能性が示唆された。しかし直接 MLBP1 を NIES298 に接触させた時の細胞の減少が一番早く観察された。その強さは透析膜に MLBP1 を入れた実験系に比較して 5 日目の NIES298 の細胞数は 1.6 倍減少が早く, 実験 7 日目では 2.6 倍の差が見られた (Fig. X6)。これらの結果は, MLBP1 は直接藍藻細胞を取り巻いてから何らかの物質を分泌し細胞膜を溶かしたことを示した。本研究では, バクテリアが藍藻に付着してから細胞外物質を分泌して細胞壁を溶かすというメカニズムに該当すると考えられ, 溶藻が起きたと示唆された。溶藻バクテリアを継代して培養していくと,

溶藻活性は弱まっていくのが観察された。一つには，栄養の良好な寒天培地で培養すると藍藻から糖分などの有機物を採る必要がなくなってしまう。又はバクテリアを単離培養せずにプラーク寒天をそのままローンの藍藻に接触させると大きな溶藻が確認されたことから，純粋培養で継代を繰り返すことによって溶藻能力が弱まってしまうのかもしれないと考えられた。

クオラムセンシング機構は, バクテリア間の情報伝達機構を利用してバクテリア集合体内の個々のバクテリアのさまざまな行動や代謝系の制御を行っているといわれている (Miller et al.，2001；whitehead et al., 2001；Fuqua et al., 2001)。バクテリアはオートインデュウサーと呼ばれる低分子化合物を細胞外に放出して，菌体数の増加に伴いこれを感知して情報伝達を行っている。集団として，同時期に同調して形質を発現し，効果的に種の発現を図っている (Kleerebezem et al., 1997)。バクテリアと cyanobacteria 間でも伝達物質の働きにより一定のバクテリア集団が増殖し cyanobacteria を減少させるような機構が働いているのかもしれない。

Microbacterium sp. MLBP1 は諏訪湖の湖水を使って *M. aeruginosa* 上に形成されたプラーク内から分離された。MLBP1 は, NIES298 の周りに集まり, 溶藻物質を分泌していると推定されたが, 特定には至らなかった。*Microcystis* 種の溶藻に *Microbacterium* 属が関係しているという報告は今までなかった。近年の諏訪湖では植物プランクトンの変化に伴い溶藻バクテリア種にも変化がみられた。2008 年から 2011 年の諏訪湖水は，藍

藻優占の富栄養型から中栄養型の湖沼型へと水質改善が進行している結果，*Microcystis* 属の減少に伴い，溶藻バクテリア数も減少を示した。

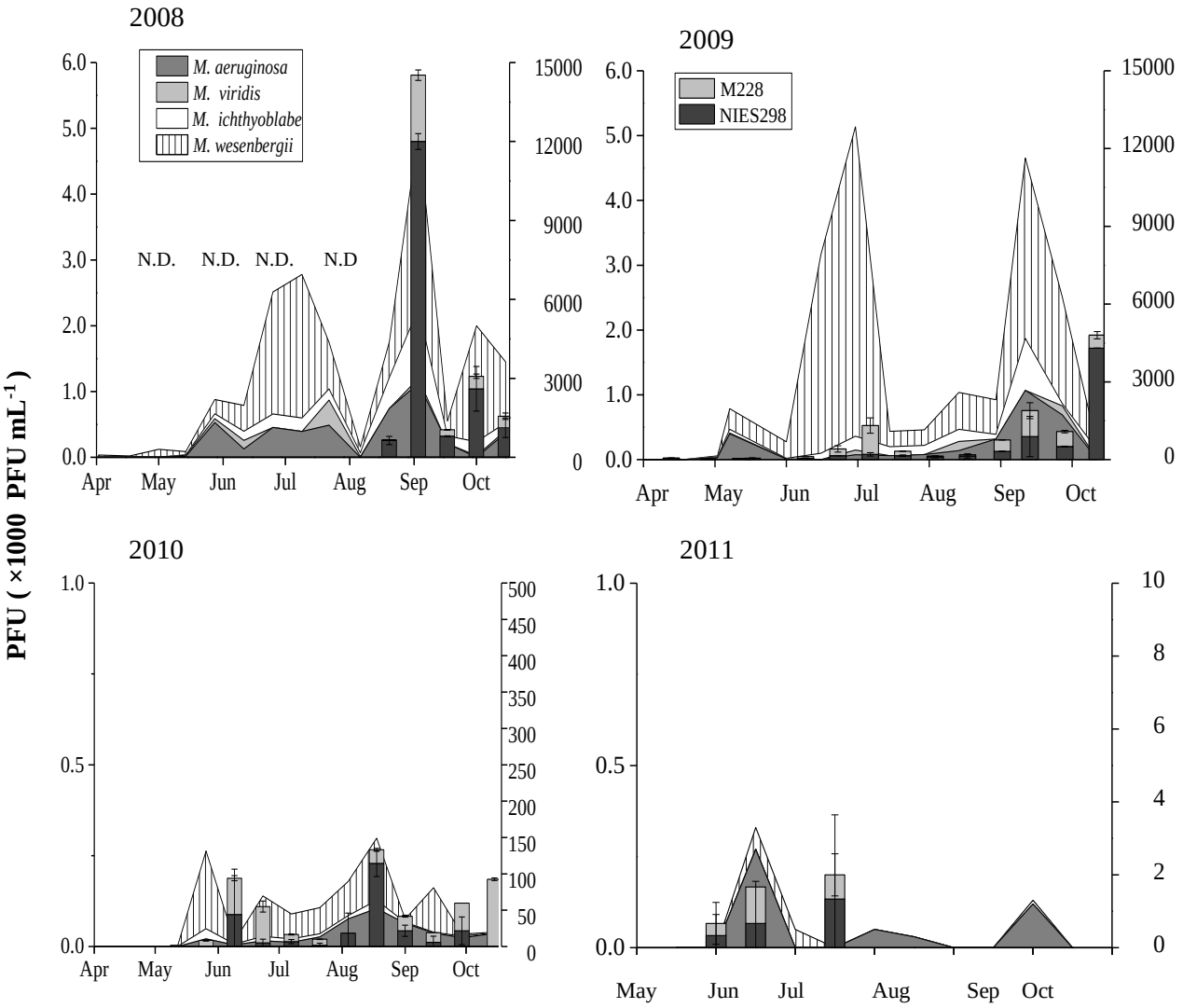


Fig. X 1 Yearly changes of number of plaqe forming unit and *Microcyst* biovolume in Lake Suwa. : *M.aeruginosa* biovolum. : *M. wesenbergii* : *M. ichtyoblabe* biovolum. : *M.viridis.* : The number of the plaque formed NIES298 nutrient medium : The number of the plaque formed M228 nutrient medium N.D. : No data.

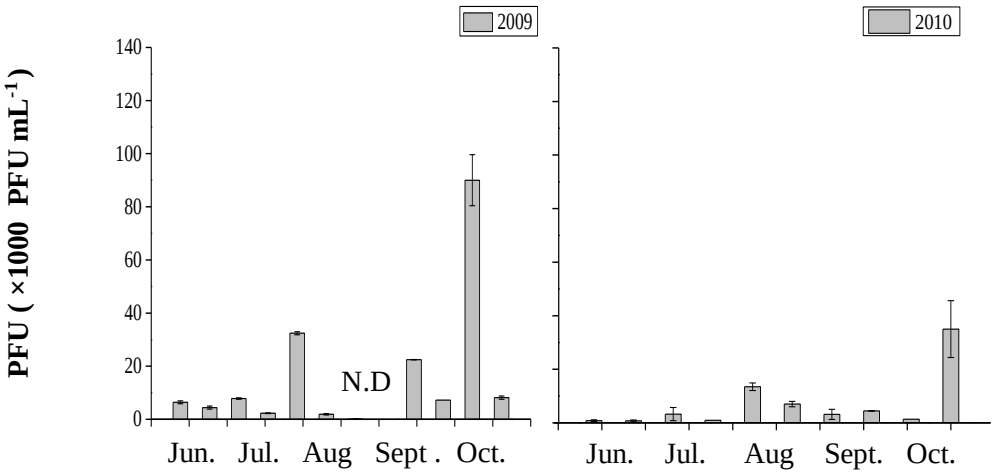


Fig. X2 Plaqe forming unit (PFUmL^{-1}) by Lake sediment (from 2009 to 2010)
: The number of the plaque formed NIES298 nutrient medium.
N.D : no data.

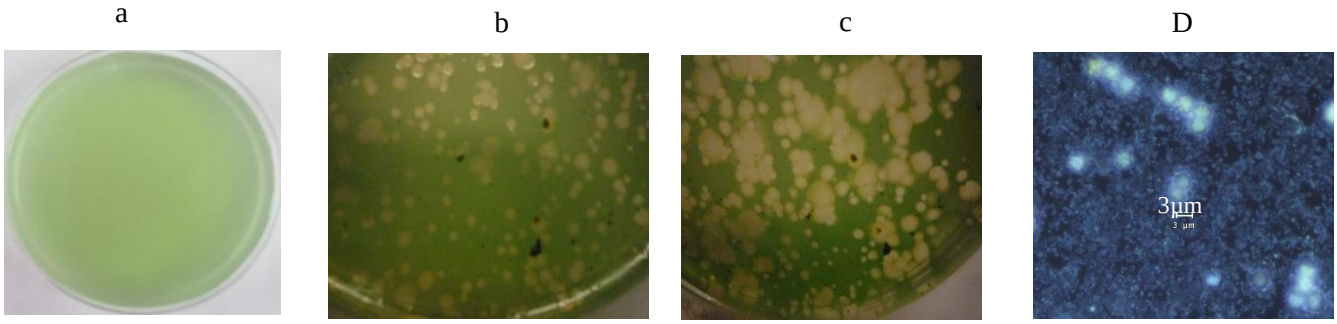


Fig. X 3 The formation and internal structure of the plaque. a: Result of plaque formation after 0 days. b: Result of plaque formation after 7days. c: Result of plaque formation after 11days. d: SYBR Gold strain. MLBP1 surrounding the cell of NIES298.

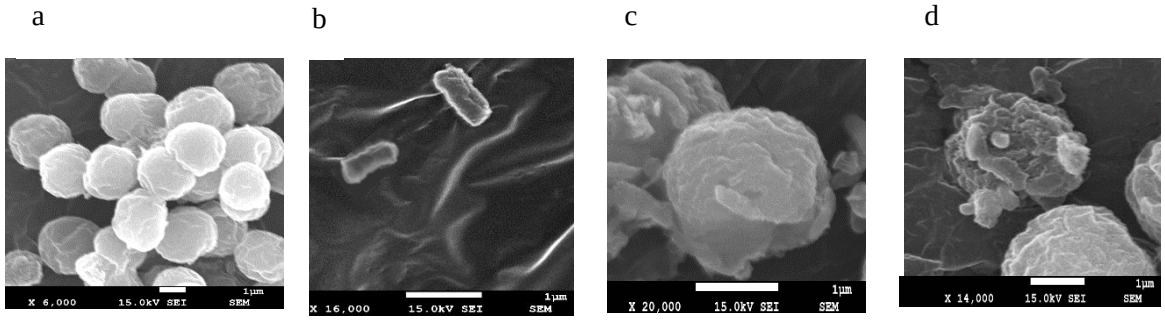


Fig. X4 Impact statement of MLP1 bacteria for NIES298. a ：NIES298 cells b ：MLBP1(*Microbacterium* sp.).c ：Invasion of cells. d：Cell invasion and cell atrophy.

Table X 1 Phylogenetic affiliation of isolated and pure-cultured microbes and cultibated on NTagar plate, based on partial 16S rRNAgene analysis.

Sampling days	**Length (bp)**	**Isolationname (Accession)**	**Top match (Accession)**	**Identity (%)**	**Toxonomic affiliation**
2009-06-24	1397	MLBP1 AB610595	*Microbacterium chocolatum* (AM181503)	99	Actinobacteria
2009-6-24	1397	MLBP2 AB610596	*Microbacterium chocolatum* (AM181503)	99	Actinobacteria
2010-08-04	1415	MLBW1 AB610598	*Acinetobacter* sp. BS6 (HM132103)	99	Gammaproteo bacteria
2010-09-15	1426	MLBW3 AB610600	*Acinetobacter* calcoaceticus (DQ187381)	100	Gammaproteo bacteria
2010-09-15	1393	MLBY1 AB610601	*Microbacterium oxydans*OL-4 (HQ202812).	99	Actinobacteria
2010-09-21	1426	MLBP4 AB610602	*Microbacterium chocolatum* (AB181503)	99	Actinobacteria
2010-10-1	1425	MLBY2 AB610604	*Aeromonas hydrophila* MS19 (FM997617)	100	Gammaproteo bacteria
2010-09-21	1397	MLBW4 AB610605	*Acinetobacter* sp.2CGa-13 (GU138160)	100	Gammaproteo bacteria

***Microbacterium* MLtree nDNA 16S rRNA (1348-bp)**

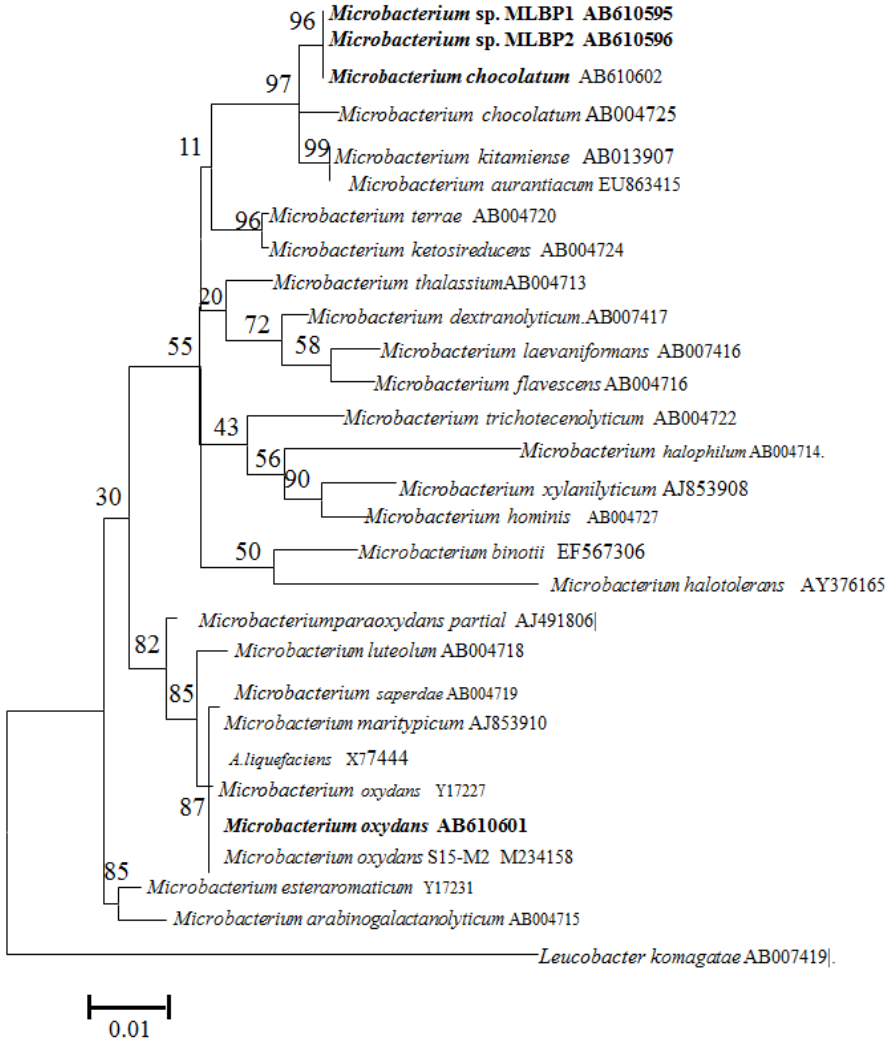


Fig. X5 Estimated phylogenetic relationships of based on the nuclear *Microbacterium* MLtree n DNA 16S rRNA sequence data (1348-bp).

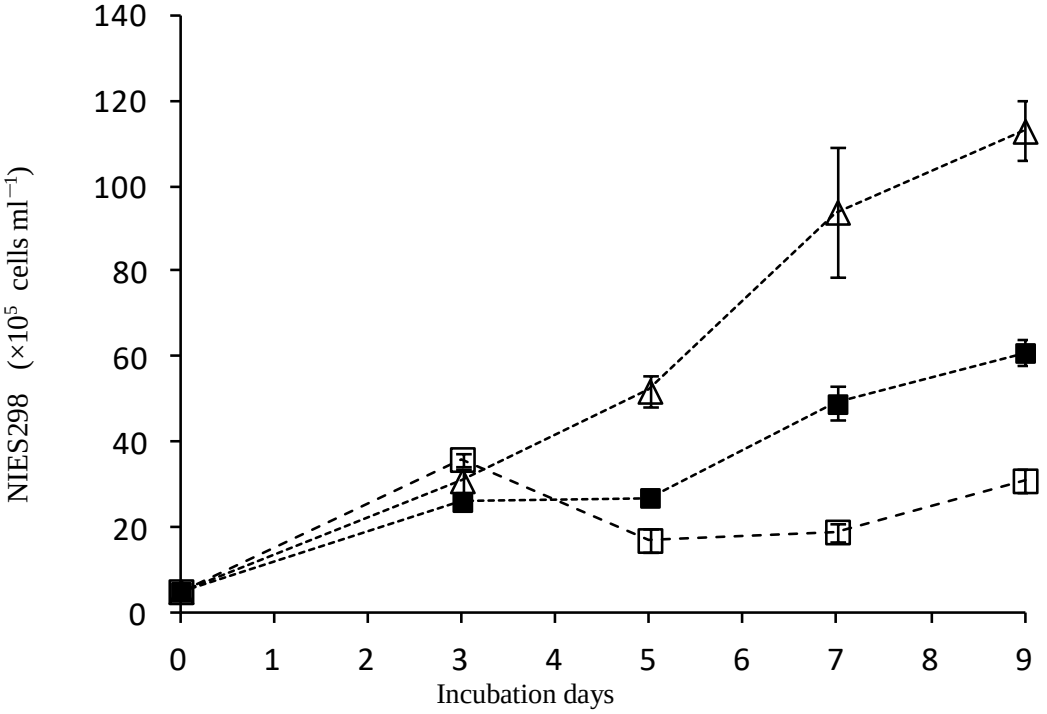


Fig. X6 Grouth effect of *Microbacterium* sp. (MLBP1) in dialysis cellulose tubing (MWCO14000, Pore size50Å) NIES298 Lag phase (5×10^5cells ml^{-1}) MLBP1 Lag phase (1×10^7cells ml^{-1}). ■ : MLBP1 culture strain in dialysis cellulose tubing. □ : MLBP1 culture strain. △ : Control (NIES298)