

# 琵琶湖における微生物群集の増殖解析

京都大学 日下部武敏

## 1. はじめに

湖沼の水質問題の特徴として、閉鎖性が高いために滞留時間が長く、富栄養化や汚濁・汚染がいったん進行してしまえば、その影響が長期間にわたって継続すること、湖沼の水質改善・浄化には多大な時間とコストが必要となることが挙げられる。環境基準（BOD あるいは  $COD_{Mn}$ ）の達成率も、河川や海域に比べ依然として湖沼では低い状況にある（図 1）。特に、琵琶湖のような大きくて深い湖の水質形成メカニズムは複雑で不明な点が多い。琵琶湖では流入負荷と湖内 BOD 濃度は低減傾向にあるが、一方で、湖内  $COD_{Mn}$  濃度は 1980 年代半ばを境に漸増傾向に転じた。このことは、微生物に分解されにくい難分解性溶存有機物（R-DOM）の増加を示唆しており、生態系や水利用への悪影響が懸念されてきた。しかし、同定できる有機成分（タンパク質、炭水化物、等）は有機物全体の 10% 程度とされ（Thurman, 1985）、湖沼有機物に関する基盤情報が欠如していると言える。

有機物の物質循環過程は、有機物量だけでなく、化学組成や複合体の形成といった変質過程、また、生態系の多様な構成員（植・動プランクトン、細菌、原生動物、ウイルス等）の活性や構成員間の相互作用の影響を強く受ける。古典的な生食連鎖（藻類 動物プランクトン 魚）のほか、微生物ループ（溶存有機物 細菌 原生動物）や、ウイルス感染による細菌の溶菌（ウイルス

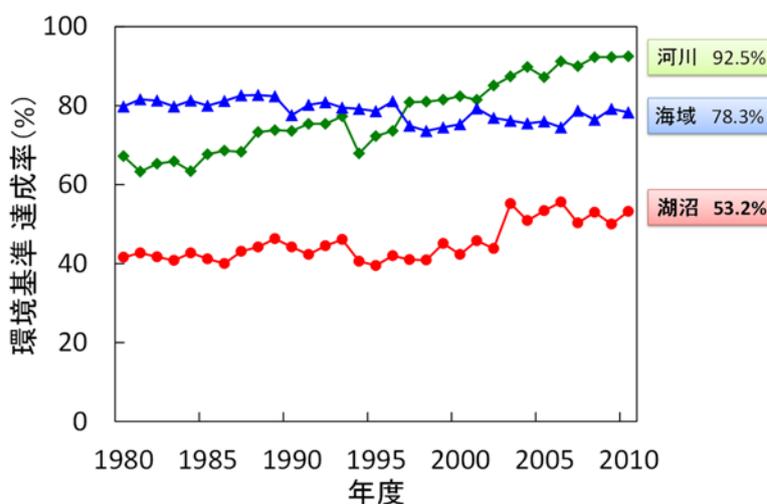


図 1 環境基準達成率の経年変化（環境省，2011）

分流）も物質循環の一部を担っている。さらに、温度や光、 $DO$ 、 $pH$  等の環境要因も考慮すべき非常に複雑な系である。湖沼の R-DOM に関する様々な報告があるものの、その生成機構や化学構造が十分に理解されたとは言えないのが現状である。

本研究では、細菌群集が介在する「微生物炭素ポンプ（microbial carbon pump）」が長期的な炭素貯留プロセス（難分解性有機物の生産プロセス）として駆動していることに鑑みて、微生物食物網（microbial food web）の結節点として細菌群集が重要な鍵になると考えた（図 2）。有機物や動植物の遺骸の微生物分解や、微生物ループに流れる有機物フラックスは、細菌群集の菌叢構造（種と数）および活性の大きさに強く依存し、季節的、空間的に大きく変動していることが予想される。細菌群集の組成については、次世代シーケンサー（NGS）の登場により、これまでにない勢いで膨大なデータの取得が可能となっている。

細菌の増殖量あるいは増殖速度を評価するためには、細菌細胞数や濃度を計数、定量する必要がある。そのためには、DAPI や SYBR 系の蛍光色素で核酸を染色した後に、蛍光顕微鏡 (EfM) や共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM)、フローサイトメーター (FCM) で計数したり、RT-PCR 法、NAD 測定、濁度法、乾燥菌体重量法、平板培養法、MPN 法などによって定量される。細菌増殖活性を評価するためにはこれらの方法による菌

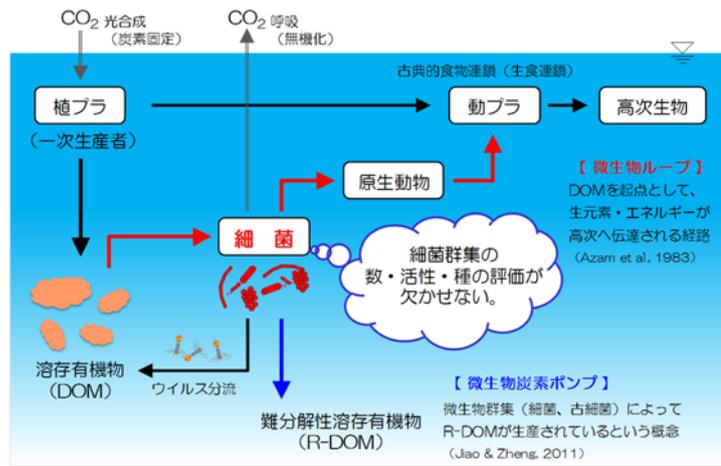


図 2 湖内物質循環の鍵を握る細菌群集

体量 (細胞数) や濃度の時間変化から比増殖速度  $\mu$  ( $d^{-1}$ ) を求める必要がある。しかし、必要細胞量が多いこと、培養時間を要すること、菌体の洗浄や乾燥などの操作が煩雑であること、そもそも培養できない (viable but non-culturable, VBNC) 細菌は評価が難しいことなどの課題がある。したがって、細胞分裂を経ずに、できるだけ短時間で増殖活性を評価できる手法が欠かせない。

そこで、実際の水環境中の条件における細菌群集の増殖活性を評価する手法の開発が行われてきた。細菌群集の増殖活性 (bacterial secondary productivity) については、放射性同位元素で標識した DNA 合成前駆物質 thymidine ( $^3H$ -TdR) や leucine ( $^3H$ -leucine) の取り込み量から評価する方法が広く利用されてきた (Fuhrman & Azam, 1982; Kirchman et al., 1985)。チミジン法では、DNA 合成前駆物質を増殖時に DNA に取り込ませ、新規 DNA 合成量の検出のために放射性同位元素で標識した  $^3H$ -TdR を使用し、シンチレーションカウンターなどの装置が必要となり、毒性のあるシンチレーションカクテルを取り扱う。国内では、放射性同位元素の取扱いに関する法規制が厳しいことなどから実施の困難性を有しており、細菌群集の生産性に関するデータが限られているのが現状である。その後、Steward & Azam (1999) によって非放射性代替法として 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を利用する方法が提案され、汎用的な手法となってきた。BrdU 法は、チミジン法と高い相関があり、細胞 (single cell) レベルでの検出が可能である (Pernthaler et al., 2002)。しかし、BrdU 法は、anti-BrdU 抗体で検出するために比較的強い透過処理や、加熱、塩酸などによる DNA 変性処理が必要であり、細胞形態を破壊するだけでなく、二本鎖 DNA の完全性の損失等の欠点を抱えている。したがって、微生物ループに流れる炭素量を評価しようとする際に、増殖活性

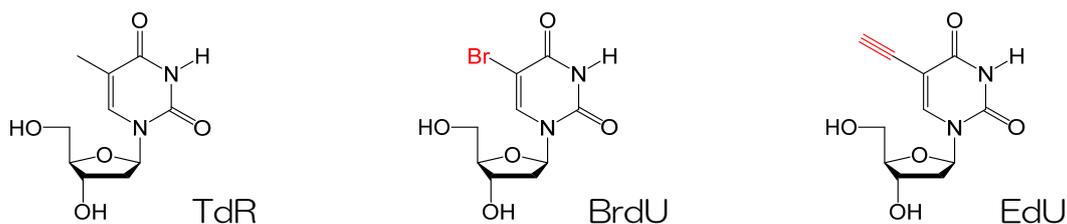


図 3 TdR、BrdU、EdU の化学構造

の大きさを評価するとともに、DNA を利用して細菌種の情報を得ることが極めて困難となる。

本研究では、既存の方法の欠点を補うべく、更なる代替法として、5-エチニル-2'-デオキシウリジン (EdU) を用いて、細菌の群集レベルおよび個々の細胞レベルでの増殖活性を評価することに取り組んだ。EdU は、BrdU 同様、チミジン・アナログとして、DNA 合成時 (真核細胞の場合は、S 期) に取り込まれる (図 3)。

EdU 法では、DNA に取り込まれた EdU に、サイズの小さいアジド化蛍光色素 (Alexa Fluor 488 など) を Click 反応により直接結合させて蛍光検出する (Salic & Mitchison, 2008)。この反応はアジドとアルキンが銅触媒存在下の比較的穏和な条件で進行する環化付加 (CuAAC) 反応を利用したものである (図 4)。アジドやアルキンは生体内には存在しない (Bioorthogonal) 官能基とされ、生体内でもほとんど阻害を受けない特徴を有しており、シンプルなプロトコールで高解像度のデータを取得することが期待できる。さらに、EdU 法では、透過処理の条件が比較的穏やかで、DNA の変性処理が不要で、BrdU 法と比べて穏和な条件で効率的に検出が可能である (図 5)。ゆえに、増殖活性の高低に基づいた細胞分取の後、菌叢解析を行うことができると考えられる。

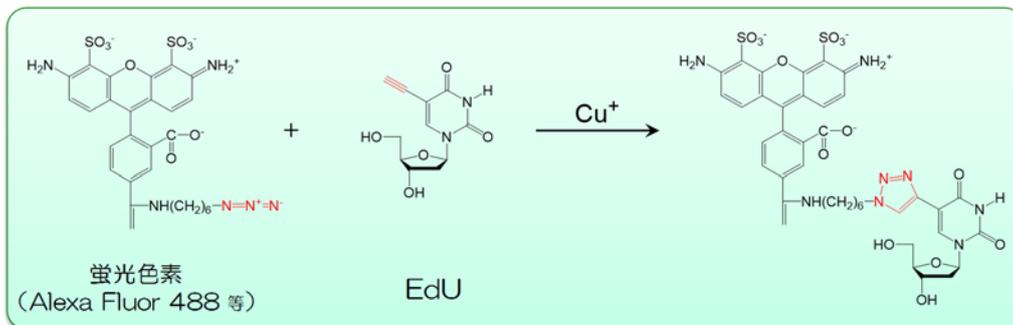


図 4 Click 反応を利用した EdU の蛍光標識化

本研究において、細菌群集レベルでの増殖解析にとどまらず、個々の細胞レベルでの増殖解析に進もうとしたとき、EdU 法の感度を高める必要が求められた。個々の細胞レベルでの増殖解析とは、細菌群集を構成する細菌細胞ごとに増殖活性を調べるとい

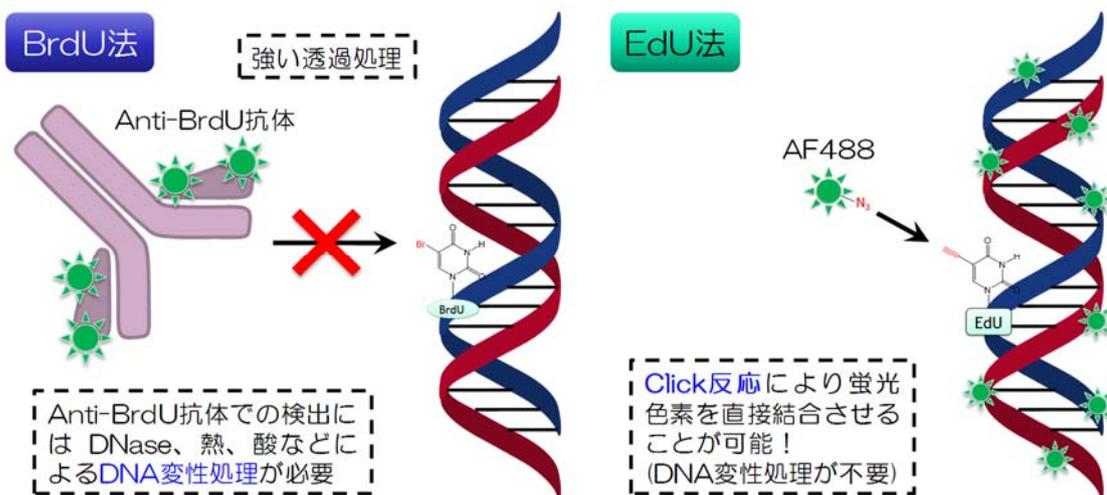


図 5 BrdU 法と EdU 法の違い

うことである。ゆえに、冬季や深水層などの低水温環境下での低い増殖活性を定量的に評価する必要があった。図5に示した通り、DNAの新規合成にあたってDNAの二本鎖の中に取り込まれたEdU分子に対して、蛍光色素1分子を標識化していたが、チラミドシグナル増感(TSA)法を用いてEdU分子に対して、蛍光色素を数多く取り付けることで、蛍光シグナルを10~100倍増幅できる可能性がある(Haines, 2010)。TSA法では、EdU分子に直接蛍光色素を標識化せず、まずDNAに取り込まれたEdUをClick反応でbiotin化する。このbiotinに対して、horseradish peroxidase (HRP)で標識化したstreptavidinを反応させる。次に、蛍光標識化したtyramideを反応させる。tyramide化合物は、過酸化水素の存在下で、HRP触媒作用によりラジカル化され、その近傍にある芳香族化合物(ブロッキング剤の中のtyrosineやtryptophanといった芳香族アミノ酸残基など)と非特異的に共有結合する。これにより、HRP(すなわちDNAに取り込まれたEdU)の周辺に数多くの蛍光標識tyramideを集積させることが可能となり、蛍光シグナルを増幅することができる。また、TSA法で使用する物質はstreptavidinがもっとも分子量が大きく53,000 Daであり、抗体の分子量(例えば、IgGは150,000 Da)よりも小さい。したがって、TSA法を採用した場合でも、依然としてBrdU法よりもマイルドな透過処理で試薬は細胞膜を通過すると予想される。

本研究のねらいは、BrdUの代替としてEdUを用いて、蛍光顕微鏡あるいはセルソーターを利用して群集レベルだけでなく個々の細胞レベルでの細菌の増殖活性を評価することにある。平成30年度はEdUを利用して細菌群集の増殖活性の分布を把握することを目的とした。

## 2. 実験方法

### 2.1 採水調査

平成30年度は、琵琶湖北湖・今津沖中央17B(全水深約90 m)において採水調査を実施した。琵琶湖での採水調査は、滋賀県琵琶湖環境科学センター所有の調査船「びわかぜ」により実施し、表層水(水深0.5 m)の採水にはステンレス製バケツを、深層水(水深60 m)の採取にはバンドーン採水器をそれぞれ用いた。採取した湖水サンプルは実験室に持ち帰り、速やかに実験に供した。さらに、各種実験条件の検討には唐橋付近(瀬田川)の表流水も用いた。(図6)

### 2.2 EdU法

まず、EdU法を行うにあたり、蛍光色素(AF488)の蛍光量 $F$ と新規合成A-T塩基対量( $T$ にEdUが取り込まれている) $T$ を関連付けるための蛍光係数を得る必要があった。そこで、本研究では*E. coli* K-12株(NBRC 3301)を用いて、蛍光量 $F$ を新規合成A-T塩基対量 $T$ へと変換するAF488蛍光係数を求めた上で、琵琶湖北湖の細菌群集に対してEdU法を適用した。

本研究では、琵琶湖細菌群集の増殖活性の評価において、いくつかの仮定を置いた。まず、培養困難な細菌種を含む琵琶湖細菌群集の増殖活性は、EdU取り込み培養の時間(本研究では、6時間)において、現場環境の増殖活性を維持していると仮定した。本研究のEdU取り込み培養の間、細菌群集全体の増殖活性は定常、すなわち比増殖速度

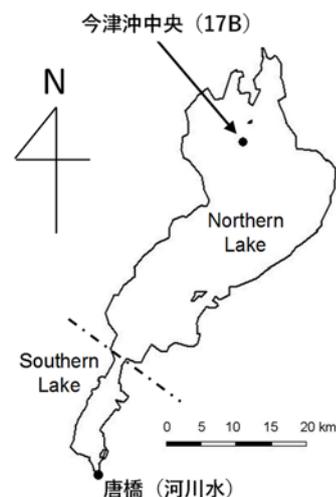


図6 サンプリング地点

$\mu$  ( $d^{-1}$ ) は一定であると考えた。細菌細胞密度 (群集サイズ)  $N$  の増加速度は一次反応で表され、 $\mu$  が一定の条件では式 (1) が導出される。式 (1) は、琵琶湖細菌群集が対数増殖しているということと同義である。琵琶湖北湖においては、ある時間スケールでは細菌細胞密度 (cells/mL) はほぼ一定 (すなわち、増殖速度と捕食を含む死滅速度がバランスしている) とみなせることから、単純な対数増殖モデルを適用しても妥当と考えられる。

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \quad N(t) = N_0 \times e^{\mu t} \quad (\mu = \text{一定}) \quad (1)$$

第二に、本研究で扱う細菌群集が対数増殖しているとき、DNA 合成 (すなわち、EdU 取り込み) 速度が一定で、全ゲノム長が 2 倍になったときに細胞分裂するとした。これにより、細胞分裂を伴う培養法から求まる比増殖速度  $\mu$  ( $d^{-1}$ ) と EdU 法で求まる倍加時間  $T_d$  (min) が式 (2) で結ばれることになる。

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2)$$

第三に、増殖速度の温度依存性は、 $Q_{10}$  値を用いて式 (3) で説明できるとした。一般的に、化学反応のみならず、生体内の反応や微生物増殖反応では、 $Q_{10}$  値は 2~3 の範囲をとるとされる。

$$Q_{10} = \left( \frac{r_2}{r_1} \right)^{\frac{10}{(T_2 - T_1)}} \quad (3)$$

第四に、琵琶湖細菌群集の全ゲノム長を 4.1 Mbp、GC 含量を 50.5% と仮定した。これらの数値は、米国 National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベースに登録されていた Bacteria のデータ 13,178 個の中央値である (図 7)。図 7 に示したのは使用した Bacteria のデータのまとめである。箱ひげ図に示したひげの上下端は第 95 百分位値と第 5 百分位値である。箱の上下端は第 75 百分位値と第 25 百分位値であり、箱内には中央値を示している。

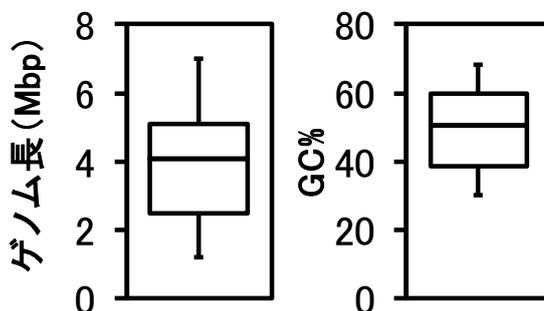


図 7 Bacteria のゲノム長と GC 含量のデータ (NCBI)

### 3. 実験結果および考察

#### 3.1 *E. coli* K-12 株を用いた AF488 蛍光係数の決定

AF488 蛍光係数を決定するために、培養法で対数増殖期における *E. coli* K-12 株の

比増殖速度( $\mu$ )すなわち倍加時間 $T_d$ から新規合成された A-T 塩基対量  $T$ を求める実験と、EdU 法で対数増殖期における大腸菌株の蛍光量( $F$ )を得る実験を並行して行った。

培養法の実験においては、大腸菌株を復元培養と前培養 2 回を経て対数増殖させ、対数増殖期の大腸菌株を植え継いで、LB 培地、37℃、振とう 180rpm の条件で培養しながら、濁度(OD600)測定を行った。得られた増殖曲線を図 8 に示した。回帰直線の傾きから大腸菌株の比増殖速度( $\mu$ )は  $1.8(\text{hr}^{-1})$  で、倍加時間( $T_d$ )は 23 (min) と求められた。大腸菌株(*E. coli* K-12, NBRC 3301)の全ゲノム長を 4.6 Mbp、AT 含量を 49.2%とすると、15 分間に新規合成された A-T 塩基対量  $T$ は 1.46 Mbp であると求められた。この実験に並行して EdU 法を実施した。培養法の実験における経過時間 30 分の時点で EdU を添加して 15 分間の EdU 取り込み培養を行い、その時の AF488 蛍光量( $F$ )は  $7.4 \times 10^{-4}$ であった(図 9)。以上のことから、EdU 法によって得られる蛍光量  $F$ と新規合成される A-T 塩基対量  $T$ との換算式を  $F = 5.07 \times 10^{-4} T$ と決定した。

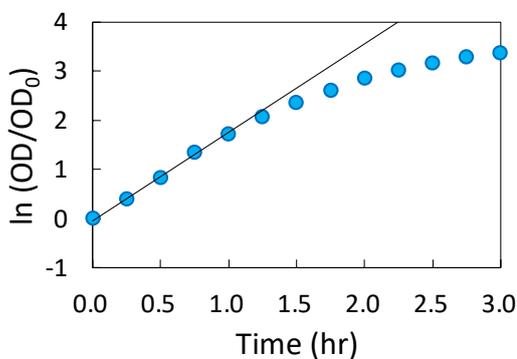


図 8 培養法で得られた大腸菌株の増殖曲線

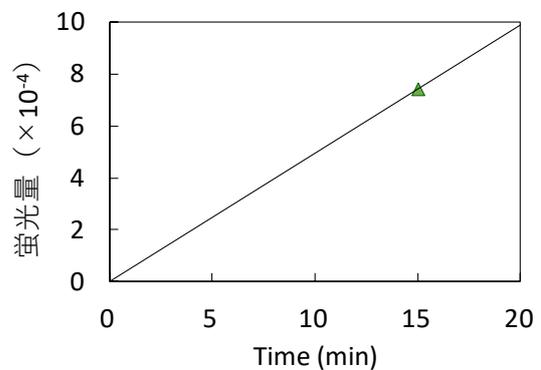


図 9 EdU 法で得られた蛍光量

### 3.2 EdU 法による琵琶湖細菌群集の増殖解析

2018 年 1 月(冬季)・2018 年 8 月(夏季)の水深 0.5 m において採取した湖水サンプルで琵琶湖細菌群集から蛍光を得ることができた(図 10)。核酸対比染色で蛍光が見られても、AF488 蛍光が見られない細菌があり、活性の低い細菌がいることがわかった。一方で、対比染色と AF488 染色の両方で活性を有する細菌を観察することができ、活

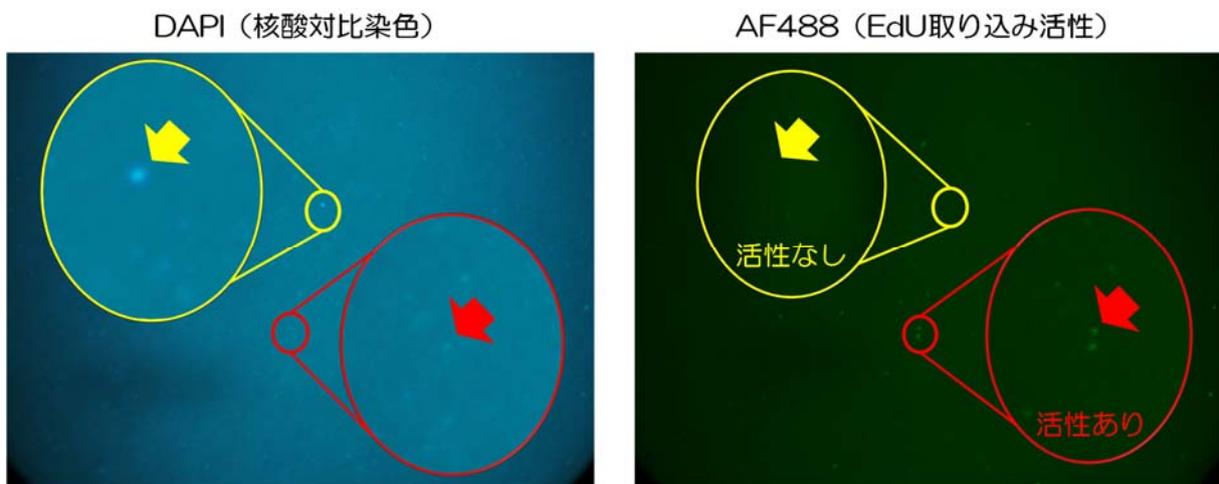


図 10 EdU 法で得られた琵琶湖細菌の蛍光顕微鏡写真

性のある細菌を細胞レベルでとらえることができた。ImageJ を用いてカラーで取得された AF488 画像を 16-bit グレースケールに変換し、個々の細菌細胞について蛍光量  $F$  を数値化した(図 11)。これを前述の換算式を用いて新規合成された A-T 塩基対量に変換し、さらに本実験の EdU 取り込み培養条件(6 時間)と、前述の仮定を踏まえて、比増殖速度( $\mu$ )を求めた。以上のことより、琵琶湖細菌群集の比増殖速度は、冬季においては  $2.5 \times 10^{-2}$  ( $d^{-1}$ )、夏季においては  $3.2 \times 10^{-2}$  ( $d^{-1}$ )と求めた。

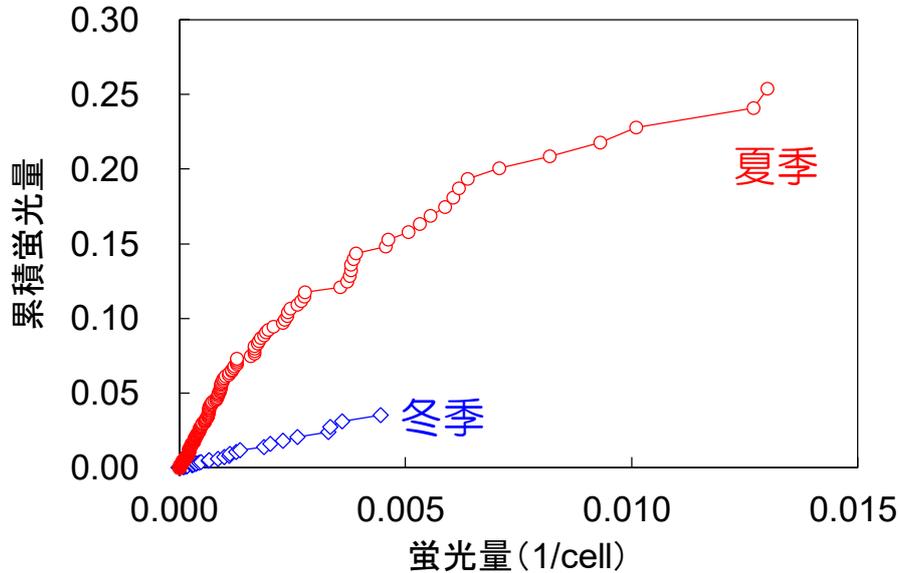


図 11 琵琶湖細菌群集に対する EdU 法によって得られた累積蛍光量

図 11 から琵琶湖細菌群集から得られた累積蛍光量を考えると、夏季においては、上位 4.9%の細菌が累積蛍光量 (EdU の取り込み量) すなわち細菌二次生産量の約 50% を占めていた。したがって、高水温期である夏季であっても、活発に増殖している細菌はごく一部であることが推察された。つまり、細菌細胞ごとに増殖解析を行うことによって、群集全体の増殖解析では把握できない、水圏における増殖活性の構造を詳細に明らかにすることが可能となる。

本研究で求めた細菌群集の比増殖速度( $\mu$ )を琵琶湖北湖における文献と比較すると、その値は本研究では低く評価されていることがわかった。他の淡水域の文献情報と比較するために、比増殖速度の情報を対数増殖モデルに従って倍加時間( $T_d$ )に換算すると、本研究で得られた琵琶湖細菌群集の倍加時間( $T_d$ )は約 22~28 日であった。この値は、カーチマン(2016)で報告されている淡水域における細菌群集の倍加時間 0.7 日~25 日程度と比べてやや高いものの、概ね同じレベルにあると考えられた。

次に、本研究で得られた琵琶湖細菌群集の比増殖速度( $\mu$ )の値を用いて、温度依存性を表す  $Q_{10}$  値を算出した結果、 $Q_{10}=1.14$  と求められた。化学反応のみならず、細菌などの増殖反応においても、典型的には  $Q_{10}=2 \sim 3$  の範囲にあるとされており、本研究における増殖速度の温度依存性は小さく評価されている可能性がある。

### 3.3 琵琶湖北湖における細菌二次生産量の推定

琵琶湖北湖における増殖活性を評価することができたため、本研究ではさらにつかの仮定を置いて琵琶湖北湖における年間の細菌二次生産量を推定した。本研究で得られた結果の妥当性を考察するとともに、湖内物質循環のさらなる理解を深め R-DOM

の生成機構に迫ることにつながると考えたためである。推定にあたって、DAPI 染色による計数法で求めた全菌数  $N$  (cells/mL)、透過型電子顕微鏡 (TEM) により求めた細菌細胞容積  $V$  ( $\mu\text{m}^3$ )、琵琶湖北湖における細菌細胞の炭素密度  $\alpha$  ( $\text{fgC}/\mu\text{m}^3$ ) (Nagata, 1986)、水温データを用いた。月ごとに測定を行った全菌数  $N$ 、細菌細胞容積  $V$ 、比増殖速度  $\mu$ 、さらに通年で一定として採用した細菌細胞の炭素密度  $C$  の値を用いて、細菌二次生産量 ( $\mu\text{gC}/\text{L}/\text{day}$ ) を算出し、これを積算することで月ごとの細菌二次生産量を推定した (図 12)。

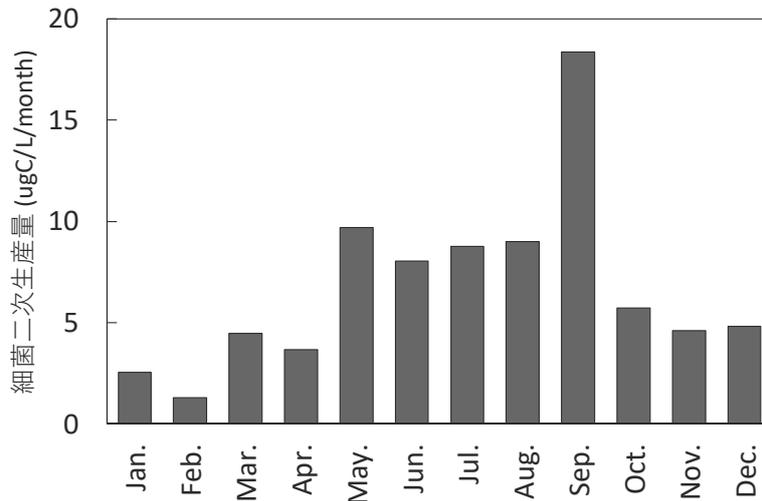


図 12 琵琶湖北湖における月ごとの細菌二次生産量の推定値

本研究で得られた琵琶湖北湖における細菌二次生産量は、各月の推定値を積算することによって、年間で  $80.9 \mu\text{gC}/\text{L}/\text{year}$  と推定された。また、月ごとに変動するものの、細菌の現存量 ( $\mu\text{gC}/\text{L}$ ) を細菌二次生産量 ( $\mu\text{gC}/\text{L}/\text{day}$ ) で除した回転率 (turnover) は 30~40 日であった。したがって、一般的に数日と考えられる回転率と比較すると、やや長い回転率となった。EdU 法で求めた細菌二次生産量の値 ( $80.9 \mu\text{gC}/\text{L}/\text{year}$ ) は琵琶湖北湖の容積を  $27.3 \text{ km}^3$  とすると、細菌純生産量 (BP) は  $0.22 \text{ 万 tonC}/\text{year}$  となった。さらに、細菌増殖効率 (bacterial growth efficiency, BGE) が  $0.26$  (Del Giorgio & Cole, 1998; 永田, 熊谷, 吉山, 2012) とすると、無機化された炭素 (細菌呼吸量、BR) を含めた年間の細菌の炭素取り込み量 (BP+BR) は  $0.85 \text{ 万 tonC}/\text{year}$  となる。琵琶湖北湖における一次生産量を  $10 \text{ 万 tonC}/\text{year}$  とすると、その約 9% に相当する炭素量が、琵琶湖細菌群集に流れたと推定された。文献情報を参照すると、琵琶湖北湖における細菌純生産速度 (bacterial net production rate) は  $5 \sim 59 \mu\text{gC}/\text{L}/\text{day}$  であり、一次生産量のうち約 30% が細菌群集に流れているという報告がある (Nagata, 1987)。また、1997 年 4 月~1997 年 10 月に琵琶湖北湖表層で行われた調査では、一次生産量に対する細菌生産量の割合について 9.9~37% と報告されている (Gurung et al., 2002)。本研究の結果は、琵琶湖北湖において、細菌群集が利用できる炭素量が既報と比べてかなり減少しており、細菌群集にとって炭素制限となっている可能性を示唆しているのかもしれない。

次に、本研究で得られた月ごとの細菌二次生産量の変動を説明する環境要因を探るために、同地点での各種水質データならびに本研究での調査項目について相関分析を行った。高い正の相関 ( $0.7 < r$ ) が認められた項目は DAPI 細菌数のみであった。水温、

TOC、D-TOC、細菌細胞体積  $V$  については正の相関 ( $0.4 < r < 0.7$ ) が認められた。D<sub>0</sub>、NH<sub>4</sub>-N については低い負の相関 ( $-0.4 < r < -0.2$ ) が認められた。T-N、NO<sub>3</sub>-N、については負の相関 ( $-0.7 < r < -0.4$ ) であった。Chl. *a* 濃度についてはほとんど相関がなかった。

#### 4. まとめ

本研究では、微生物群集が難分解性溶存有機物の生産プロセスを担っているという微生物炭素ポンプを念頭に置いて、微生物食物網の結節点として細菌が極めて重要であると考えた。本研究のねらいは、EdU を利用して細菌群集ならびに個々の細胞レベルでの増殖活性の評価ならびに、DNA 変性処理が不要な EdU 法の処理フローの利点を活かした琵琶湖北湖における細菌群集の増殖解析手法を開発することであった。本研究で得られた主な成果および知見は以下の通りである。

- ・ 琵琶湖北湖の夏季において、上位 4.9%の細菌が、細菌二次生産量の約 50%を占めており、高水温期においても一部の細菌が活発に増殖していることを明らかにした。
- ・ 琵琶湖北湖における年間細菌二次生産量は 80.9 μgC/L/year であり、一次生産量の約 9%に相当する炭素量が、琵琶湖細菌群集に流れたと推定された。

今後は、TSA 法の適用による高感度化を経て、セルソーターを用いた細胞レベルでの琵琶湖細菌群集の増殖活性の評価と、セルソーティングした細菌細胞の次世代シーケンサーによる菌叢解析を実施することによって、難分解性溶存有機物の生産を担う細菌種の究明を目指す。

#### 謝辞

本研究は、平成 30 年度公益財団法人琵琶湖・淀川水質保全機構・水質保全研究助成のご支援を賜りました。琵琶湖での採水調査を遂行するにあたり、滋賀県琵琶湖環境科学研究センターの皆様のご協力を賜りました。本研究の実施に際し、京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センターの学生(吉野魁人君、沈尚君)のご協力を賜りました。ここに記して、関係各位に深く感謝の意を表します。

#### 参考文献

- Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer-Reil, L.A. & Thingstad, F. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, **10**(3), pp.257-263.
- Del Giorgio, P.A. & Cole, J.J. (1998). Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **29**(1), pp.503-541.
- Fuhrman, J.A. & Azam, F. (1982). Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Marine biology*, **66**(2), pp.109-120.
- Gurung, T.B., Urabe, J., Nozaki, K., Yoshimizu, C. & Nakanishi, M. (2002). Bacterioplankton production in a water column of Lake Biwa. *Lakes & Reservoirs: Research & Management*, **7**(4), pp.317-323.

- Haines, K.M., Feldman, E.L. & Lentz, S.I. (2010). Visualization of mitochondrial DNA replication in individual cells by EdU signal amplification. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (45), 2147. doi:10.3791/2147
- Jiao, N. & Zheng, Q. (2011). The microbial carbon pump: from genes to ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**(21), pp.7439-7444.
- Kirchman, D., K'nees, E. & Hodson, R. (1985). Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**(3), pp.599-607.
- Nagata, T. (1986). Carbon and nitrogen content of natural planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**(1), pp.28-32.
- Nagata, T. (1987). Production rate of planktonic bacteria in the north basin of Lake Biwa, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**(12), pp.2872-2882.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J. & Amann, R. (2002). Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**(6), pp.3094-3101.
- Salic, A. & Mitchison, T.J. (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**(7), pp.2415-2420.
- Steward, G.F. & Azam, F. (1999). Bromodeoxyuridine as an alternative to <sup>3</sup>H-thymidine for measuring bacterial productivity in aquatic samples. *Aquatic microbial ecology*, **19**(1), pp.57-66.
- Thurman, E.M. (2012). Organic geochemistry of natural waters (Vol.2). Springer Science & Business Media.
- 環境省 水・大気環境局 (2011). 平成 22 年度公共用水域水質測定結果.
- デイビッド・L・カーチマン著 (2016). 微生物生態学, 京都大学学術出版会, pp.208-213.
- 永田俊, 熊谷道夫, 吉山浩平編 (2012). 温暖化の湖沼学, 京都大学学術出版会, pp.142-143.