

穴道湖におけるジェオスミンを産生する
藍藻コエロスファエリウムに関する研究

Study on geosmin producing species, *Coelosphaerium*
(Cyanobacteria) in Lake Shinji, Japan.

平成 28 年 9 月

神門 利之

目次

第1章 序章

1. 1	はじめに	4
1. 1. 1	植物プランクトンによる生活への支障	4
1. 1. 2	カビ臭原因物質	4
1. 1. 3	カビ臭産生生物	5
1. 1. 4	穴道湖の概要	5
1. 1. 5	穴道湖・中海の水理学的特徴	6
1. 1. 6	穴道湖における植物プランクトンによる生活への支障	8
1. 1. 7	斐伊川水系で場所により発生する植物プランクトンの差異	9
1. 1. 8	環境水のカビ臭物質の分析方法	11
1. 2	研究の背景及び目的	12
1. 3	論文の構成	13

第2章 環境水中ジェオスミンの三つの定量法による測定値の差の要因

2. 1	はじめに	14
2. 2	方法	17
2. 3	結果と考察	19
2. 3. 1	穴道湖におけるジェオスミン濃度の推移と臭気の原因	19
2. 3. 2	前処理温度の影響	21
2. 3. 3	3種類の測定方法による比較と評価法の確立	22
2. 4	結論	24

第3章 密度勾配液を用いた比重分離による藍藻コエロスファエリウムからのジェオスミンの検出

3. 1	はじめに	25
3. 2	調査水域の概要と測定方法	28
3. 2. 1	調査水域の概要と試料採取	28
3. 2. 2	湖水のプランクトンの観察方法	29
3. 2. 3	臭気物質の分析方法	31
3. 2. 4	密度勾配液による分離方法	31
3. 3	結果と考察	34
3. 3. 1	穴道湖でのジェオスミンの濃度変化と植物プランクトン優占種との関係	34
3. 3. 2	密度勾配液を用いた比重分離によるジェオスミンの濃度変化と植物プランクトン優占種との関係	38
3. 4	結論	44

第4章 穴道湖産コエロスファエリウム純粋培養株からのジェオスミンの検出

4. 1	はじめに	45
4. 2	方法	47
4. 2. 1	水域と現地調査	47
4. 2. 2	培養株の作成	48
4. 2. 3	プランクトンの形態観察と計数, 同定	49
4. 2. 4	塩基配列分析	50
4. 2. 5	無菌純粋株の確認方法	51
4. 2. 6	ジェオスミンの分析方法	52
4. 3	結果	53
4. 4	考察	64

第5章 おわりに

5. 1	本研究のまとめ	67
5. 2	今後の展望	68

参考文献	69
------	----

謝辞	90
----	----

第1章 序章

1. 1 はじめに

1. 1. 1 植物プランクトンによる生活への支障

世界の多くの湖沼には、流入する栄養塩が過多になり、その栄養塩をもとに植物プランクトンが増殖する「富栄養湖」が数多く存在する。このような湖では、時々、植物プランクトンの異常発生が起これり周辺住民の生活への影響を与えることもある。

これらの現象の典型的なものとしては、その見た目からか「アオコ」, 「赤潮」などと呼ばれる。具体的な影響としては、アオコの場合は、見た目の悪化、腐敗時の悪臭、アオコ構成種によっては毒性による飲料水等への影響があげられる。赤潮では、見た目の悪化の他、赤潮の構成種によっては毒性があるため、赤潮を摂食した貝類を人が食べることによる貝毒などが発生する場合がある。

このほかには、カビ臭を発生する植物プランクトンの異常増殖により、湖水を水道水源として飲用する場合にカビ臭による異臭味問題が生じたり、カビ臭が発生している湖水で養殖した魚介類等がカビ臭を呈することによる水産物の価格低下や出荷停止などが起こっている。

1. 1. 2 カビ臭原因物質

水系の臭気を生ずる代謝物は主にテルペノイド、脂肪酸及びその派生物質であるが、その代表的なものがカビ臭原因物質の二環性セスキテルペン E-1,10-dimethyl-E-9-decalol (ジェオスミン), 二環性モノテルペン 2-methylisoborneol (2-MIB) である (Watson, 2003)。一般にジェオスミンは土臭, 2-MIB は墨汁臭といわれることが多く、わずかに臭いは異なる。

1. 1. 3 カビ臭産生生物

主なカビ臭原因物質であるジェオスミンまたは 2-MIB を産生する生物としては、シアノバクテリア（藍藻）、放線菌、カビ、真菌、粘菌などの一部が報告されている (Gerber and Lechevalier, 1965; Kikuchi et al., 1983; Yamamoto et al., 1994; Hayes et al., 1991)。

シアノバクテリア（藍藻）のうち、ジェオスミンまたは 2-MIB を産生するものは *Aphanizomenon*（アファニゾメノン）、*Dolichospermum*（ドリコスペルムム）（旧 *Anabaena*（アナバエナ））、*Oscillatoria*（オスキラトリア）、*Phormidium*（フォルミジウム）、*Planktothrix*（プランクトトリクス）などがあげられるが、*Coelosphaerium*（コエロスファエリウム）がカビ臭を産生するとの報告はない (Watson, 2003; Watson et al., 2016)。

なお、藍藻の分類についてはいくつかの体系が提案されており、今回注目している *Coelosphaerium* については、Chroococcales（クロオコックス目）に属するというものと Synechococcales（シネココックス目）に属するというものがある。本論文では、Komárek et al. (2014) の分類体系に従い、*Coelosphaerium* についてはシネココックス目に属するものとして記述する。

1. 1. 4 宍道湖の概要

宍道湖・中海は斐伊川水系の下流部に位置する湖であり、日本海からの海水の遡上の影響を受け、広大な汽水域を形成していることが特徴である。汽水湖で、常時塩分を含むことから、水道水源、農業水源としての利用はない。

両湖ともに水深は浅く、河川からの自然的発生源による栄養塩の供給に加え、人間活動に伴う人的発生源による供給もあり富栄養化している。そのため、植物プランクトンが異常発生することがあり、宍道湖ではアオコが、中海では赤潮が発生する。一

方で、湖の生産性も高いため、日本一の生産を誇るヤマトシジミをはじめとする魚介類は宍道湖の重要な資源となっている。

また、冬には数万羽の水鳥が飛来し、えさをついばんだり羽を休めるなど、西日本一の越冬地となっている。2007 年 11 月にはラムサール条約湿地に登録され、その保護とともに賢明な利用が求められており、観光地や環境学習のフィールドとしても多くの人が訪れている。

1. 1. 5 宍道湖・中海の水理学的特徴

宍道湖は平均水深 4.5 m、最大水深 6.4 m、湖面積 79.7 km² の日本で 7 番目に大きな湖であり、その下流は大橋川を介して中海とつながっている。この宍道湖・中海は斐伊川流域の下流部に位置し、上流から、斐伊川、宍道湖、大橋川、中海、境水道と続き日本海につながっている (Fig. 1-1)。日本海に近く、宍道湖より下流については日本海からの海水の遡上の影響を受け、日本最大の汽水域を形成している。

日本海から中海・宍道湖への海水の遡上は河川流と潮汐振動による潮流とのバランスによって決まるが、上下混合が比較的少ない弱混合型に分類され、淡水に比べ比重の大きい海水が河川水の下をくさび状に上流側へ侵入している。

中海では、上下混合が起こりにくいため、水深 3 ～ 4 m 付近に常時塩分成層が発達しており、その塩分はおおむね上層 10 psu、下層 30 psu である (Ishitobi et al., 1993)。一方、宍道湖では、中海に比べると、高塩分水の侵入が頻繁ではないこと、侵入した場合でもその塩分が比較的低く、かつ、高塩分水の厚さも数 10 cm と薄いことから、塩分成層は常には存在せず、存在した場合でもその観測は困難である。宍道湖の通常時の塩分はおよそ 4 psu であるが、塩分成層がみられるときには 10 psu 程度の高塩分水が下層に侵入していることもある。

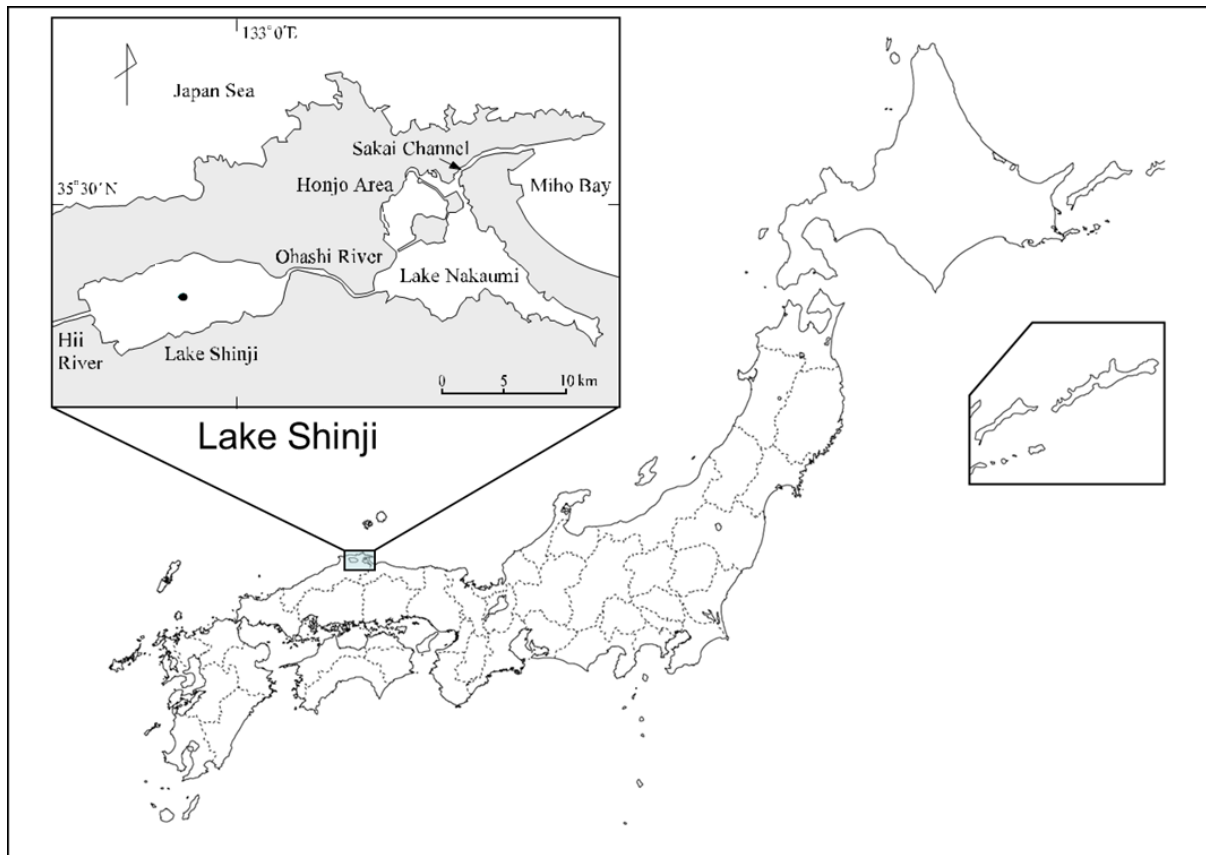


Fig. 1-1. Study location. Lake Shinji, the surrounding area.

これらの侵入した高塩分水の移動・混合現象の観測は容易ではなく、その事例はそれほど多くはない。中海では、例えば筆者らの行った調査 (godo et al., 2001) があり、連続した強風により中海の特性でもある水塊の2層構造の上層と下層の水の動き、塩分と風との関係を捉えている。1996年10月31日から11月2日にかけての観測では、東の風が10mを超え始める10月31日8時頃からおよそ2時間の間に、風下側の地点における塩分は最も深い水深5.0mを除き一定の値に収束していった。すなわち、わずかな混合を伴いながら塩分の薄い上層が厚くなっていった。この間、上層の流向は風下側に、下層の流向は風上側に向かい上下層の間で逆方向を示した。つまり、一定の強風により、表層水が風下に吹き寄せられ、風下側で表層水の厚さが増すとともに、

その補償流として下層水が風上側に流れて風上側では下層水の厚さが増すことを示している。

この事例では、平均風速が 10 m s^{-1} を超える東からの一定方向の風が 14 時間継続しているが、気象庁ホームページの松江地方気象台の風のデータを見ると、日最大風速が 10 m s^{-1} 以上の日数は 1981 年～2010 年までの平均で年間 65.9 日であり、数時間以上継続する事例はこれよりもかなり少なくなるものと考えられる。

一方、宍道湖への高塩分水の侵入については、石飛ら (1989) が検討しており、斐伊川の低出水期において気象潮の長期波動の上昇期と天文潮の一回潮が重なる場合に、中海の塩水の侵入が起きることが分かったとしている。この状況に加え、増木ら (2013) は前述した例とは風向きが異なるが、中海で西から強風が継続した場合において、風上側である中海西側の大橋川飲み口付近で高塩分である下層水の厚みが増し、高塩分水の宍道湖への侵入がいっそう容易になるとしている。

このように、日本海から、中海に流入した高塩分水は気象等の条件が伴った場合に、より宍道湖へ流入しやすくなると考えられる。ただし、継続した強風の日数は限られており、大量の高塩分水の侵入の頻度は多くはない。このため、中海と宍道湖との塩分差が生じている。

1. 1. 6 宍道湖における植物プランクトンによる生活への支障

宍道湖・中海における植物プランクトンの調査は、秋山、伊達、近藤、大谷らを中心に 1960 年代から続けられている。またこの間の植物プランクトンの異常発生についてもまとめられており、宍道湖では主に藍藻 *Microcystis* (ミクロキスチス) によるアオコが、中海では渦鞭毛藻 *Prorocentrum minimum* (プロロセントルム・ミニムム) による赤潮がたびたび発生してきた。

近年、宍道湖においては、2010 年から 2012 年にかけて 3 年間、夏季から秋季にかけて毎年アオコの大発生が起こった。原因種は *Microcystis ichthyoblabe* (ミクロキスチス・イクチオブラベ) であった。この時はヤマトシジミの出荷停止といったことは起こらなかったが、見た目の悪化以外にアオコ発生時のガス様臭で地域住民が困惑した。島根県の調査でアオコが産生する硫黄系の化合物、2 - プロパンチオールおよびジイソプロピルジスルフィドが原因物質であることが判明した (島根県環境生活部環境政策課, 2011)。

またこのほか、新聞報道等 (eg. 山陰中央新報, 1993; 山陰中央新報, 2007) によれば宍道湖でカビ臭の問題が 1987 年、1993 年および 2007 年から 2009 年にかけて生じており、いずれも出荷自粛などの被害が生じている (島根県保健環境科学研究所, 2008)。

1. 1. 7 斐伊川水系で場所により発生する植物プランクトンの差異

宍道湖ではアオコの原因種である *Microcystis* やカビ臭の原因種である *Coelosphaerium* が発生する一方、中海では赤潮の原因種である *Prorocentrum* がたびたび発生してきた。これ以外の種についても発生の概要が大谷 (1996; 1997; 2005) によって取りまとめられている。中海で通常大発生する種が宍道湖で発生する、宍道湖の「藻類フロラの変換」事例は、1974 年 (秋山, 1975) , 1978 年 (秋山, 1979) , 1984 年 (秋山, 1986; 伊達ら 1990) , 1993 年～1994 年 (大谷, 1996) , などに観察されている。

宍道湖の植物プランクトンの経年変化を見ていくと、10 年に 2 ～ 3 回程度、宍道湖の藻類フロラの変換が生じており、必ず気象状況の変化に伴う塩分の低下や上昇が関係している。秋山 (1982a) によると、その変換の臨界塩化物イオン濃度は、ほぼ 2500 ～ 3000 mg L⁻¹ と考えられ、宍道湖は塩分環境の面で、植物プランクトン群集の淡水型から海域内湾型フロラへの臨界点に近い、きわめて不安定な水域であるとされる。秋

山 (1979) は穴道湖産藻類を分離し、それらの塩分耐性実験を行っている。また、Kondo et al. (1990) は穴道湖の大橋川入口付近から中海にかけての植物プランクトンの塩分あるいは水温との関係を、1979 年～1986 年の現場調査データと培養実験による結果をもとに検討している。本論文で取り上げる *Coelosphaerium* は、中海でも時々見られるが、高塩分耐性はあまりなく、穴道湖の通常の塩分程度でよく見られるとしている。

秋山 (1984) は塩分環境の変化と同時に水界への栄養塩の添加が種類構成に及ぼす影響を調べている。この結果からは、河川水中の藻類プランクトンの種類構成に対しては、栄養塩の変化効果に先立ち、環境浸透圧の変化によりその耐性を持った種のスクリーニング効果が初動的に作用するため、塩分環境の変化の寄与が顕著であると述べている。

このように、斐伊川水系の湖の生態系は塩分に大きく支配されており、それが水平方向の生物の分布に影響を与えているだけではなく、短期間に塩分が変化することに対する生物の応答にも大きく影響を与えていることがわかる。

Kondo et al. (1990) は、斐伊川水系産 *Coelosphaerium kuetzingianum* の塩分耐性を培養実験により確かめており、5 psu までは増殖速度が大きいを超えると低下し、10 psu を超えると、ほとんど増殖しないとしている。

今回、穴道湖で発生する *Coelosphaerium* がカビ臭を産生したとの研究を取りまとめているが、同じ水系である中海でほとんど見られずカビ臭の問題が中海で生じないのは、*Coelosphaerium* の塩分耐性が高くないいために、中海の塩分環境下での増殖が困難であるためと考えられる。

1. 1. 8 環境水のカビ臭物質の分析方法

日本において、ジェオスミン及び 2-MIB に関しては環境水である公共用水域の環境基準項目にはない。水道法ではこれら 2 物質は、1992 年の水道水質基準の改正と同時に快適水質項目として追加された。その後、2003 年「水質基準に関する省令」で水道水質基準に追加され、上水試験方法 2011 年版によると、測定法はパージ・トラップ・GC/MS (PT-GC/MS) 法以外にヘッドスペース・GC/MS (HS-GC/MS) 法、固相抽出・GC/MS (Solid-phase extraction GC/MS: SP-GC/MS) 法及び固相マイクロ抽出・GC/MS 法が採用されている。

水道水においては、供給前に沈殿・ろ過など様々な処理が行われるため、懸濁物の存在はほとんど無視できる。一方、環境水においては、例えば藍藻によるカビ臭の場合、カビ臭物質は生物の体内に存在していると言われており (根来ら, 1984) , 水道水の試験方法がそのまま環境水に適用できるか否かについては明らかになっていない。また、藻体内に存在するジェオスミンが藻類の分解や分泌等によってどのような存在形態変化をするのかは明らかにされていない。

1. 2 研究の背景及び目的

湖沼水質保全特別措置法により指定湖沼となっている穴道湖・中海は、5 期 25 年に渡る水質保全計画において様々な水質改善のための対策が行われ、2016 年現在、第 6 期の計画が進行している。両湖の化学的な水質結果には改善の兆しが見られるものの、生物学的な指標であり、住民の目にも直接触れる、赤潮やアオコといったプランクトンの異常発生はこの間断続的に起こっている状態であり、特に 2007 年から 2009 年にかけては穴道湖でカビ臭が発生し、行政、研究者、住民ともその対応に苦慮したところであった。

特に、発生初期においては、カビ臭の原因物質がジェオスミンであることは、島根県の調査により早期に判明したが、原因生物は特定できていない状況にあり（島根県保健環境科学研究所, 2008）、カビ臭が発生し、水産物に着臭したのちに事後的に対応することしかできない状況であった。

また、カビ臭の測定方法については、上水道の供給水について、定められた方法（上水試験法）はあるものの、環境水についても、同じ方法がそのまま適用できるか否かの検討はこれまで十分になされていなかった。

そこで、本研究では、まず、環境水におけるカビ臭物質の測定方法について、上水試験方法がそのまま適用できるか否か、適用できない場合には代替手法を検討し、今後の環境水のカビ臭物質の評価分析の一助となることを目的とした。

その上で、穴道湖のカビ臭発生生物を特定することにより、原因となる生物の増殖を抑えることはできないまでも、カビ臭による水産物への影響が生じる前の段階で、苦情が出る前の段階での予防的な出荷停止、あるいは、水産物のカビ臭の効果的な除去方法の開発の一助となることを目的とした。

1. 3 論文の構成

本論文は5章から構成されている。第1章「序論」、第2章「環境水中ジェオスミンの三つの定量法による測定値の差の要因」、第3章「密度勾配液を用いた比重分離による藍藻コエロスファエリウムからのジェオスミンの検出」、第4章「穴道湖産コエロスファエリウム純粋培養株からのジェオスミンの検出」、第5章「おわりに」である。

以下に本論文の概略を構成順に述べる。

第1章では、研究の背景、研究の目的及び意義について述べる。

第2章では、環境水中のジェオスミンを三つの定量法により測定することにより、それぞれの測定法の特徴を明らかにするとともに、環境中でのジェオスミンの存在形態についても述べる。

第3章では、密度勾配液を用いた比重分離を用いて、藍藻コエロスファエリウムを見出し、そこからジェオスミンを検出することで、カビ臭産生生物をほぼ特定できたことを述べる。

第4章では、穴道湖産藍藻コエロスファエリウムの無菌純粋培養株を用いてカビ臭の測定を行い、本種がカビ臭産生生物あることを述べる。

第5章では、本研究に関する成果を簡単にまとめるとともに、今後の研究の展望について述べる。

第2章 環境水中ジェオスミンの三つの定量法による測定値の差の要因

2. 1 はじめに

ジェオスミンと2-メチルイソボルネオール (2-MIB) は、飲用水や水産物にも異臭味被害を及ぼす(Lanciotti et al., 2003; Klausen et al., 2005; Westerhoff et al., 2005; Percival et al., 2008; Watson et al., 2008) ことから、日本のみならず世界的にも関心の高い物質である。日本水道協会 (<http://www.jwwa.or.jp/mizu/list.html>) の公表資料によると、2011年度の全国の水道水源及び浄水場出口のジェオスミン及び2-MIB濃度の測定平均値は、ジェオスミンが4806施設のうち水道原水39施設、浄水場出口1施設で基準値 10 ng L^{-1} を超過していた。また、2-MIBでは4810施設のうち水道水源27施設で基準値 10 ng L^{-1} を超過していたが、浄水場出口では超過しているところはない。

日本ではかつて水道水のカビ臭が社会問題となったが、近年は少し落ちついた状況にあるように見える。ジェオスミンはいわゆるカビの臭いがするが、2-MIBは墨汁の臭いに最も近いとされている(日本薬学会, 1990)。本来カビ臭は水道水源等の淡水域で発生し、水道水に影響を及ぼすものであったが、最近、宍道湖、鳥取県湖山池、青森県小川原湖などの汽水湖においてもカビ臭が発生し、水産物に着臭したため漁の自粛を行うなどの事例も発生するようになった。このように、近年、各地の水道水源でカビ臭が発生し水道水に着臭したり、汽水湖でカビ臭が発生し、水産物に着臭するなど、大きな問題となっている。

カビ臭の原因物質であるジェオスミン及び2-MIBはある種の放線菌やシアノバクテリア(藍藻類)が産生するとの報告が多数あるが、シアノバクテリアとしては

Oscillatoria 属, *Dolichospermum* 属 (旧 *Anabaena* 属) , *Phormidium* 属等にカビ臭物質を産生する種があることが知られている (Mallevialle and Suffet, 1987; 水資源開発公団試験研究所水環境研究室, 2000; Sugiura et al., 2004; 古里ら, 2003a; 古里ら, 2003b; 工藤ら, 2004; 中村, 1988; 中村, 1989; 八木, 1984) 。鳥取県湖山池では 2-MIB を産生する原因生物をユレモ目に属する *Planktothrix raciborskii* としている (永瀬ら, 2008) 。青森県小川原湖では *Oscillatoria* 属のある種が 2-MIB を産生しているとしている (環境省, 2014) 。宍道湖水は春先及び秋季, 水温が 15 °C 前後の時ジェオスミンによるカビ臭が発生することが多い。ジェオスミンによるカビ臭の産生生物は, シアノバクテリアではあるが今までカビ臭を産生するという報告がなかったシネココックス目の一種の *Coelosphaerium kuetzingiamum* であることが強く示唆された (Godo et al., 2011) 。その後, 我々は本種の無菌単藻培養株の作成に成功し, ジェオスミンを産生することを明らかにした (Godo et al., 2017) 。

平成 15 年 5 月 30 日に告示された水道水質基準の改定に伴い, ジェオスミンと 2-MIB が水質基準項目に新たに取り入れられた。基準値は, 10 ng L^{-1} が設けられており, 定量下限値としては, さらにその $1/10$ の 1 ng L^{-1} という極低濃度の測定が必要となった。当時, 告示で指定された測定法は, パージ・トラップーガスクロマトグラフ・質量分析法 (PT-GC/MS 法) , ヘッドスペースーガスクロマトグラフ・質量分析法 (HS-GC/MS 法) , 固相抽出ーガスクロマトグラフ・質量分析法 (SP-GC/MS 法) の三つの方法である。PT-GC/MS 法は, 試料水中のジェオスミン及び 2-MIB をパージして気相に追い出し, トラップ管に濃縮した後, トラップ管を加熱して対象化合物を GC/MS に導入して, 選択イオン検出 (SIM) 法またはマスクロマトグラフ法で測定し, 濃度を決定する手法である。この方法は, 目的成分の全量が GC に導入されるため, 高感度な測定が可能である。HS-GC/MS 法は, 一定温度で気-液平衡状態にある気相の一定量を GC/MS を用いて SIM 法またはマス

クロマトグラフ法で測定し、濃度を決定する。SP-GC/MS 法は、試料水中のジェオスミンと 2-MIB を固相カラムに吸着し、ジクロロメタンで溶出させた試験溶液を GC/MS を用いて SIM 法またはマスクロマトグラフ法で測定し、濃度を決定するものであるが、大容量の水試料に適用でき、また、操作が簡便という利点がある。さらに、Zhang and Pawliszyn (1993) によって固相マイクロ抽出ーガスクロマトグラフ・質量分析法が開発され、米国公衆衛生協会 (APHA) , 米国水道工事協会 (AWWA) , 水質汚濁防止連盟 (WPCF) や日本の上水試験方法 2011 年版 (日本水道協会, 2011) に採用されている。

シアノバクテリアによるカビ臭の場合、カビ臭物質は藻体内に存在していると言われている (根来ら, 1984) 。そこで、島根県の汽水湖穴道湖を対象にジェオスミンによるカビ臭が発生する前からカビ臭が終息するまでの間、高頻度に調査を行い藻体内および溶存態のジェオスミンを測定し、その変化と臭いの関係を調べることにした。また、公定法では、SP-GC/MS 法の場合 (室温で操作) は、固相カートリッジの目詰まりを防ぐため、前操作でろ過が必要となる。従って、カビ臭物質を含む懸濁物質はろ紙により除去され、懸濁物質中のカビ臭物質は測定されないことになる。PT-GC/MS 法では、原水 (ろ過前の未処理試料) を 40℃ に加温してカビ臭物質をパージする。HS-GC/MS 法の場合は原水を 80℃ に加温して気相中のカビ臭物質を測定する。このように、これら 3 法はろ過や加温温度といった前処理条件が異なるため、植物プランクトンのような生物は加温により死滅し、体内からカビ臭物質が溶け出すことが考えられる。そこで、本研究では、穴道湖の湖水試料に対し 80℃ で加温する HS-GC/MS 法を用いて、溶存態ジェオスミンと全ジェオスミンをそれぞれ定量し、臭いとその濃度の関係を検討した。また、上記 3 法を用いて、ろ過や加温温度の前処理条件を変えてジェオスミンを測定し、それぞれの手法に対する最適前処理手法の検討を行った。

2. 2 方法

ジェオスミンの濃度と臭いの関係を明らかにするため、ジェオスミンによるカビ臭が発生していない 2008 年 4 月 14 日からカビ臭が臭わなくなった 6 月 3 日まで、ほぼ 1 週間に 1 回ずつ穴道湖湖心 (水深 5.7 m) においてステンレス製バケツを用いて表層水を、バンドーン採水器を用いて底層水 (湖底上 50 cm) の採水を行った。現場ではセンサーを用いて水温、電気伝導度、溶存酸素濃度の測定を行った。湖水サンプルは直ちに実験室に持ち帰り、原水 (生試料) と Whatman GF/C を用いてろ過したろ液のジェオスミン濃度をそれぞれ HS-GC/MS 法で測定した。カビ臭の判定は、あらかじめ、10 人のパネラーに対し 100 ng L⁻¹ のジェオスミン標準液とジェオスミンを含まない (Blank) 溶液の臭いを嗅がせ、ジェオスミンの有無を判別できた 7 人で試験を行った。さらに、湖水を持ち帰った後、室内試験も行った。

生試料の前処理温度が測定結果に及ぼす影響を調べるため、2009 年 10 月 13 日に採水した穴道湖湖心の表層水を用いて、生試料を室温 (20 °C) でろ過した試料と、40 °C、60 °C および 80 °C で 30 分間加温処理後にろ過した試料を HS-GC/MS 法を用いてそれぞれ分析し、測定値の比較を行った。また、カビ臭を感じた 2009 年 10 月 27 日の湖心表面水の原水とろ過水をそれぞれ用いて、HS-GC/MS 法、PT-GC/MS 法および SP-GC/MS 法の 3 つの手法でジェオスミンを測定した。各測定方法の概要 (公定法) を Fig. 2-1 に示す。HS-GC/MS 法による測定は、公定法に従い生試料を 30 分間 80 °C で加温したものを測定した。PT-GC/MS 法による測定は、公定法では生試料を 30 分間 40 °C で加温することとしているが、本実験では 30 分間 60 °C で加温したものを分析に供した。さらに、HS-GC/MS 法と PT-GC/MS 法による測定では、GF/C でろ過した試料についてもそれぞれの前処理温度で加温した後、そのろ液中のジェオスミンを測定した。SP-GC/MS 法では、公定法に従い、

室温でろ過した試料を測定した。また、比較として原水を 80 °C で 30 分間加温した後ろ過し、そのろ液中のジェオスミンについても測定した。各測定とも 5 回繰り返し分析を行った。

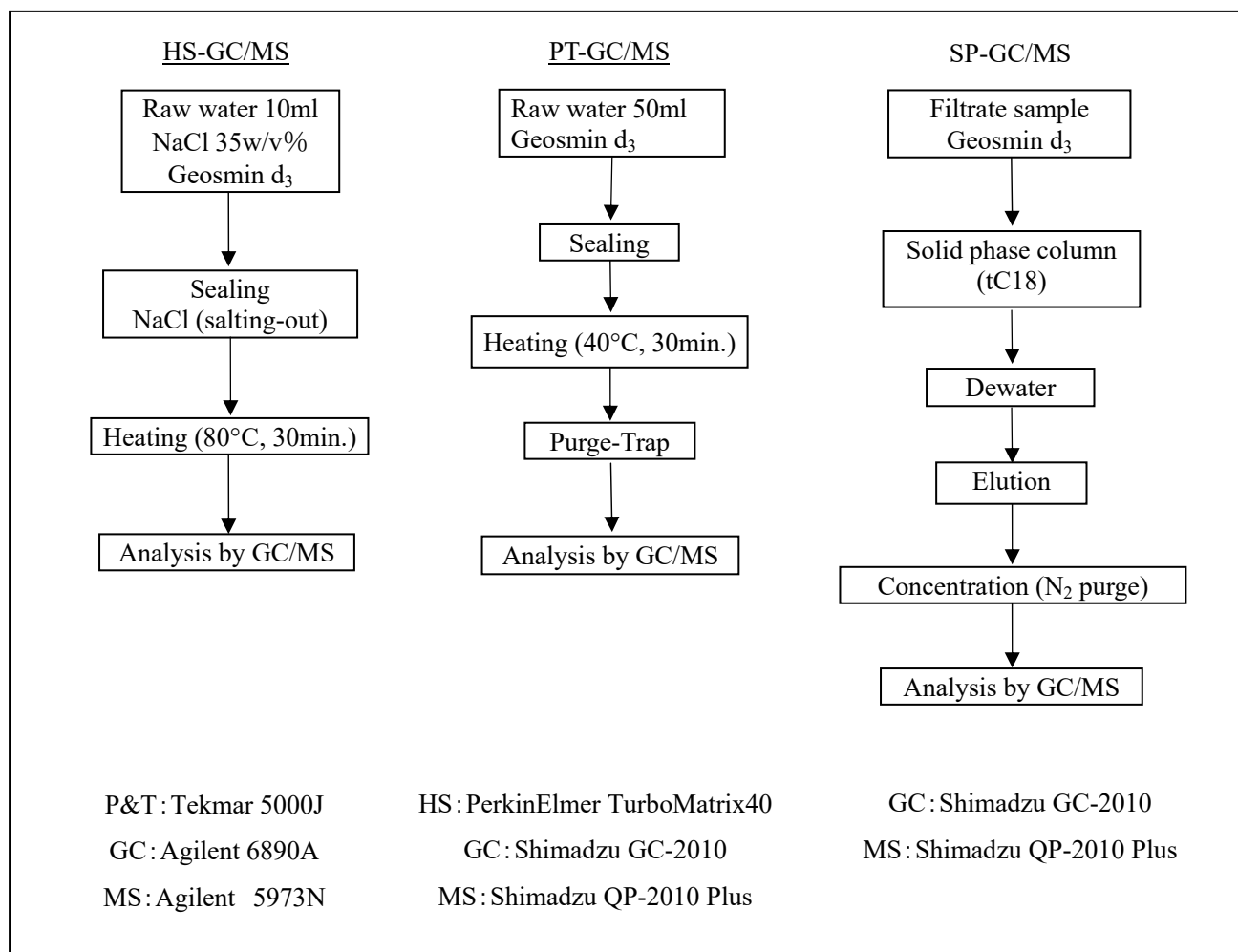


Fig. 2-1. Standard analytical procedure in three determination methods for geosmin

2. 3 結果と考察

2. 3. 1 穴道湖におけるジェオスミン濃度の推移と臭気の原因

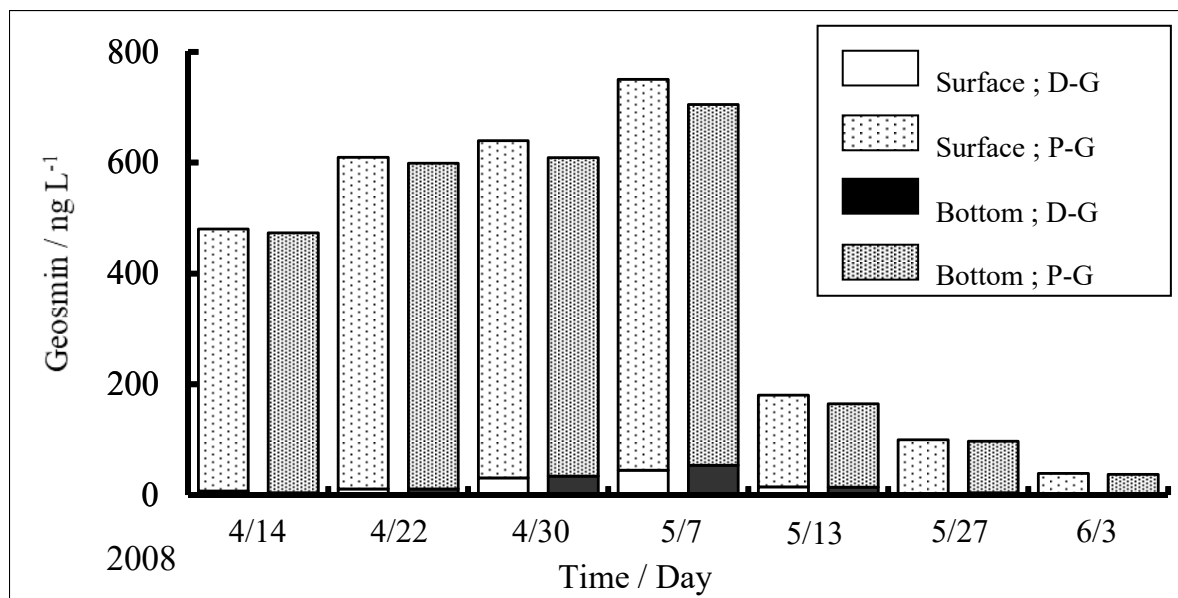


Fig. 2-2. Daily changes in the concentration of dissolved geosmin (D-G) and particulate geosmin (P-G) in surface water (left side) and bottom water (right side) in Lake Shinji

Fig. 2-2 に HS-GC/MS 法で測定した 2008 年 4 月 14 日から 6 月 3 日までの穴道湖湖心の表層水及び底層水（湖底から 50 cm 上）の懸濁態ジェオスミン濃度、溶存態ジェオスミン濃度の変化を示す。臭いを感じるようになったのは溶存態ジェオスミン濃度が 28 ng L^{-1} となった 4 月 30 日以降で、その後 5 月 13 日の試料まで臭いを感じた。全ジェオスミン濃度は調査期間中、十分臭いを感じる濃度を上回っていたが、4 月 30 日から 5 月 13 日まで以外は臭いを感じなかった。臭いを感じた 4 月 30 日から 5 月 13 日については溶存態ジェオスミン濃度が $15 \sim 45 \text{ ng L}^{-1}$ の範囲で存在していた。これらのことから、カビ臭は植物プランクトン藻体内に高濃度にあっても感じず、低濃度であっても溶存していれば臭いを感じるということが明らかとなった。上水試験法解説編（1993 年版）の記述には、「ジェオスミンは純カビ臭を呈し、臭気の閾値は 10 ng L^{-1} といわれている。しかし、20 人のパネラー

による臭気感知範囲は $12.9 \sim 685 \text{ ng L}^{-1}$ となり、個人差が大きいとの報告や 25°C における 50% 閾値が 33 ng L^{-1} との報告もある。実際、あらかじめ行った感知試験でも 16 ng L^{-1} で臭いを感じる人がいる一方で 33 ng L^{-1} でも臭いを感じない人もいた。本調査では臭いを感じたのは溶存態ジェオスミンが $15 \sim 45 \text{ ng L}^{-1}$ 存在していたときで、一般的に言われているジェオスミンの臭気を感じる濃度に近い数値であった。

懸濁態ジェオスミン濃度は表層水・底層水とも 5 月 7 日までは高濃度に存在したが、5 月 13 日には急激に減少した。しかし、このとき溶存態ジェオスミンも同時に減少しており、懸濁態ジェオスミンからの溶出による溶存態ジェオスミンの濃度上昇は観測されなかった。シアノバクテリアは通常、藻体内にカビ臭物質の大部分を保持し、死滅・分解時に藻体外へ放出すると言われている (根来ら, 1984) が、今回、表層水・下層水とも懸濁態ジェオスミンが減少するときに溶存態ジェオスミンの濃度上昇はなく、藻体外の湖水に移行していることを示す結果は得られなかった。ジェオスミン濃度の減少は揮発による大気中への発散や分解が考えられるが、今回の観測では、底層においても溶存態ジェオスミン濃度の上昇はなかった。もしジェオスミンの揮発が原因であるなら底層水の溶存態ジェオスミン濃度は上昇してしかるべきである。このことから、揮発によってジェオスミンが減ったのではなく、おそらく分解されているものと推測された。このことを確かめるためには室内実験で培養を行い、さらに検証する必要がある。

2. 3. 2 前処理温度の影響

HS-GC/MS 法は、生試料を 80 °C に加温して測定するため、溶存態と懸濁態の総量 (全ジェオスミン) を定量する。そこで、前処理温度が測定結果に及ぼす影響をみるため、生試料を加温せずそのままろ過した試料と 40 °C、60 °C および 80 °C で加温後にろ過を行い、そのろ液中に含まれるジェオスミンを HS-GC/MS 法で測定した (Table 2-1)。また、公定法に準じ、生試料を用いて 30 分間 80 °C で加温した試料も測定した。各測定の繰り返し精度相対標準偏差 (RSD) は、1.8~6.1%の範囲にあり満足できるものであった。加温せずそのままろ過した試料水中に含まれるジェオスミン濃度の平均値は 12 ng L⁻¹ だったのに対し、40 °C、60 °C および 80 °C で加温後ろ過した試料水中に含まれるジェオスミン濃度の平均値はそれぞれ 25 ng L⁻¹、240 ng L⁻¹ および 240 ng L⁻¹ だった。加温によりジェオスミン濃度が上昇したことから、藻体中に含まれるジェオスミンが溶け出したものと考えられる。40 °C での加温では低値を与えたが、60 °C および 80 °C で加温した測定結果がほぼ同じだったことから、60 °C 以上の加温でほぼすべてのジェオスミンが溶出することも分かった。これより、全ジェオスミンを確実に測定するには、公定法通り生試料を 80 °C で 30 分間加温するのが望ましいことが立証された。

Table 2-1. Effect of temperature on the analytical result of geosmin in HS-GC/MS

Unit	Room temp. (20°C)	40°C	60°C	80°C	Standard method (80°C)
	Filtrate sample after heating				Raw sample
Run 1	12	25	240	240	220
Run 2	12	25	240	240	220
Run 3	12	25	240	240	250
Run 4	11	25	240	240	240
Run 5	11	26	240	250	220
Ave.	12	25	240	240	230
RSD (n=5)	4.6	1.8	1.9	1.9	6.1

2. 3. 3 3種類の測定方法による比較と評価法の確立

宍道湖水のジェオスミンを HS-GC/MS 法, PT-GC/MS 法および SP-GC/MS 法の 3 種類の方法を用いて測定した結果を Table 2-2 に示す。各サンプルに対し 5 回繰り返し測定を行い、RSD%は全て 10%以下で満足できるものであった。基準となる HS-GC/MS 法では、生試料およびろ過水中に含まれるジェオスミン濃度はそれぞれ 700 ng L^{-1} および 16 ng L^{-1} だった。ろ過水のジェオスミン濃度が大きく減少したことから、ジェオスミンの多くは懸濁態であると考えられる。また、2. 3. 2 の実験を踏まえ、前処理温度を 40°C (公定法) から 60°C に上げて PT-GC/MS 法で測定すると、生試料では $580 \sim 630 \text{ ng L}^{-1}$ のジェオスミンを検出したものの、HS-GC/MS 法と比較すると 100 ng L^{-1} 程度低かった。これは、 60°C で加温したことで水蒸気がトラップ管に入り、トラップ管の吸着能力が低下したためだと考えられる。2. 3. 2 の結果から、全ジェオスミンを測定するには、少なくとも 60°C 以上に加温する必要があるが、その場合、PT-GC/MS 法の特性を考えると、過小評価になることが示唆された。その一方で、ろ過試料の測定結果は HS-GC/MS 法と同程度だった。このことから、PT-GC/MS 法は溶存態ジェオスミンのみを定量する場合に限られることが分かった。公定法に準じた SP-GC/MS 法での測定は、試料をカラムに通水する前にろ過を行うため、その結果は HS-GC/MS 法のろ過水の結果とほぼ同じだった。一方、生試料を 80°C で 30 分間加温後のろ過水をカラムに通水すると、 $720 \sim 760 \text{ ng L}^{-1}$ のジェオスミンが検出され、基準となる HS-GC/MS 法とほぼ同程度の結果が得られた。

Table 2-2. Analytical results in three determination methods for geosmin

Geosmin												
Unit	Raw sample (Standard method)		Filtrate sample		Raw sample		Filtrate sample (Standard method)					
	HS-GC/MS		PT-GC/MS		SP-GC/MS							
	Heated at 80°C		Heated at 60°C		Heated at 80°C							
Run 1		650		15		630		15		760		14
Run 2		730		16		630		16		720		14
Run 3	ng L ⁻¹	650		16		580		16		750		14
Run 4		730		16		600		14		740		14
Run 5		730		16		580		14		750		13
Ave.	ng L ⁻¹	700		16		600		15		740		14
RSD (n=5)	%	6.3		2.8		4.2		6.7		2.8		3.2

2. 4 結論

本章の結果から、カビ臭を感じるのは、高濃度で存在していた懸濁態ジェオスミンではなく、わずか数十 ng L^{-1} の溶存態ジェオスミンだったことから、カビ臭のモニタリングには溶存態ジェオスミン濃度の調査が重要であることが分かった。また、その測定には、HS-GC/MS 法または PT-GC/MS 法を用いる場合はろ過水を分析に供し、SP-GC/MS 法は公定法通りに測定を行わなければならない。しかし、その水域のジェオスミンのポテンシャルという観点からみると、全ジェオスミンの定量が肝要であり、その定量には公定法に準じた HS-GC/MS 法または 80 °C で加温した試料を SP-GC/MS 法で測定する必要がある。また、2016 年現在、日本で浄水処理に用いられている急速ろ過には凝集剤が使用されているが、これにより植物プランクトンが死滅し、藻体内にあったカビ臭物質が溶出する可能性がある。また、急速ろ過の場合、ろ過前に塩素消毒を行う施設もあることから、殺菌によって藻類が死滅し、藻体内に存在していたカビ臭物質が溶出することもある。このように、藻体内に溶存していたジェオスミンが浄水の過程で溶出する可能性もあることから、そのジェオスミンがもともと溶存していたのか、あるいは浄水の過程で生じたものなのか、解析の際には十分な注意が必要である。さらには、湖沼におけるジェオスミンの挙動も未解明な部分が多いことから、これらについても今後調査・検証が必要と考える。

第3章 密度勾配液を用いた比重分離による藍藻コエロスマ ファエリウムからのジェオスミンの検出

3. 1 はじめに

水道水源や湖沼に生息する浮遊性藻類、底棲性の藻類あるいは放線菌などは様々な代謝物質を放出し、その結果、飲料水や水産物に様々な問題を引き起こしている (Gerber and Lechebali, 1965; Izaguirre et al., 1982; Kikuchi et al., 1983; Jüttner, 1995, Watson et al., 2000; Jüttner and Watson, 2007)。ある種の物質は人や動物にとって有害であり、有毒物質を含んだ水を飲んだ家畜が大量死した例も報告されている (Francis, 1878)。これとは別に、人の健康には影響を与えないが味覚や嗅覚には影響を及ぼす物質もある。人間の感覚は飲料水や食用の水産物に対しては重要であり、それゆえに、水域の臭気物質の調査が、化学的、生物学的見地から数多く行われている (eg., Engle et al., 1995)。

水系の臭気を生ずる代謝物は主にテルペノイド、脂肪酸及びその派生物質であるが、その代表的なものは二環性セスキテルペンの E-1, 10-dimethyl-E-9-decalol (geosmin), 二環性モノテルペンの 2-methylisoborneol (2-MIB) である。これらの物質からは、カビ臭あるいは土臭を感じ、その閾値は 10ng L^{-1} である (eg., Jensen et al., 1994)。ジェオスミンおよび 2-MIB のどちらも通常の浄水処理を行った後でも飲料水の臭いに影響を与え、また魚や二枚貝へ蓄積した場合はその商品価値を下げることもある。

ジェオスミンや 2-MIB は湖水中や底泥に存在するある種の藍藻類、湖内の藻類や草木に付着している藻類が原因であるとの報告がなされている (須藤ら, 1989)。浮遊性の藍藻類の中では *Anabaena* (アナバエナ) 属, *Phormidium* (フォルミジウム)

属, *Oscillatoria* (オスキラトリア) 属にあたる種が典型的である (Watson, 2003; Jüttner and Watson, 2007)。ミクロシスチンを産生する *Microcystis* (ミクロキスチス) 属は臭いのある代謝物である β シクロシトラールも産生する。*Phormidium* (フォルミジウム) は代表的な底生性のジェオスミンと 2-MIB を産生する藍藻類である。さらに、土壌由来の放線菌や真菌もジェオスミンや 2-MIB を産生する (Gerber and Lechebali, 1965; Kikuchi et al., 1983; Yamamoto et al., 1994, Hayes et al., 1991)。

穴道湖では、1987 年 12 月に、穴道湖・中海全域の植物プランクトンからカビ臭が認められ、穴道湖のヤマトシジミにもこのカビ臭が約 1 ヶ月間続いた (川上ら, 1988)。1993 年 9 月に、前月末の大雨の後、穴道湖から境水道まで無色・透明な糸状性のものが優占し、穴道湖西部水域が特に多かった。現場調査時及び試料ろ過時に、かすかに下水臭に近いにおいが感じられた (江角, 1995), との報告がある。これらの場合は、カビ臭物質及びカビ臭産生生物は同定されなかった。2007 年 5 月中旬にカビ臭が発生した際は穴道湖沿岸の住民にも感じられるほどの臭いであった。原因物質はジェオスミンであることが判明したが、原因生物は不明であった。ジェオスミン濃度は 5 月末には低下したが、10 月に再度ピークを迎え冬季も低濃度で継続した。2007 年春季および同年秋季から冬季にかけて、湖水、底泥および湖内に生息するヤマトシジミからジェオスミンが検出された。2-MIB は検出されなかった (島根県保健環境科学研究所, 2008; 福田, 2008a; 福田, 2008b; 神谷ら, 2009)。

さらなる調査の結果、底泥からジェオスミンを産生する放線菌が検出されたが、これを原因生物とするには、(i) ごく微量であり、(ii) ジェオスミン濃度の増減と放線菌量の関係が明確でなく、(iii) 特に冬季の低水温下で放線菌が増殖し相当量のジェオスミンを産出することが可能か、といった疑問点もあった (島根県保健環境科学研究所, 2008)。

穴道湖は塩分を海水の 10 分の 1 程度含む汽水湖であり、その水は水道水源として利用されていない。そのため、飲料水の異臭味問題とはなっていない。しかし、穴道湖で漁獲されるヤマトシジミは重要な水産資源であり、異臭味が感じられる場合は漁業への影響も懸念される。実際に、ヤマトシジミからカビ臭が感じられたために、漁業者による自主的な出荷自粛もあった。また、穴道湖周辺で異臭がするとの苦情も寄せられ、直接の健康被害はないものの、生活や、観光産業などへの影響も考えられる。

そこで、我々は、穴道湖水にジェオスミン産生生物を見出すことができないか、その後も継続して調査を行い検討した。

この章では、カビ臭産生生物同定に向けた初期の研究として、カビ臭が発生している穴道湖湖心の水の、カビ臭濃度の分析と植物プランクトンの計数を行いその関係を検討するとともに、密度勾配液を用いた比重分離法により、湖水中に存在する懸濁物質の分離を試み、カビ臭濃度との関係について検討した。

3. 2 調査水域の概要と測定方法

3. 2. 1 調査水域の概要と試料採取

宍道湖は面積 81.8 km²、平均水深 4.5 m の汽水湖である。流入河川には流入水量の約 75%を占める斐伊川がある。また、長さ 7.5 km、幅 0.1 km の大橋川により中海と繋がっており、さらに長さ 7.5 km、幅 0.3 km の境水道により日本海に繋がっている (Fig. 3-1)。宍道湖の塩分濃度は、気象等により 1~10 psu の範囲で変動する (Ishitobi et al., 1993) が平均的には海水の約 1/10 の 4 psu 程度とされている。

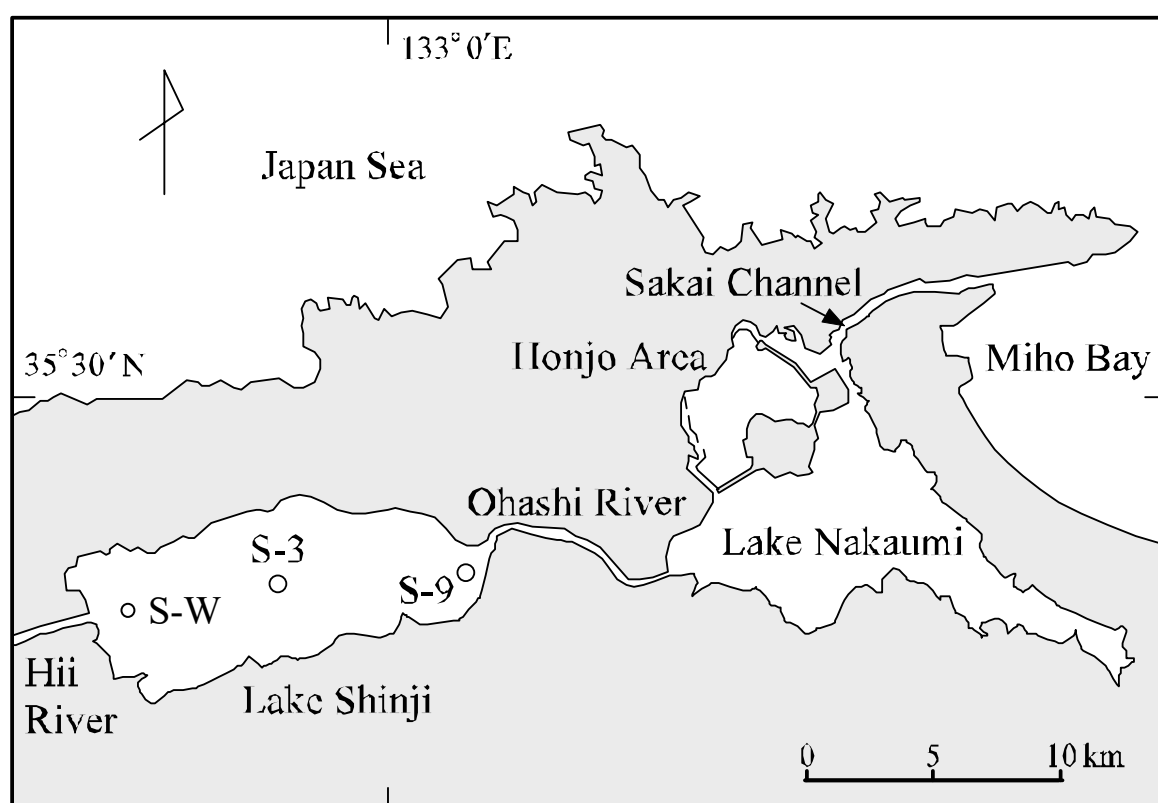


Fig. 3-1. Lake Shinji, the surrounding area, and sampling points

また、1969 年以降、月 1 回の水質および植物プランクトンの種組成の調査が島根大学および島根県保健環境科学研究所の研究者によって続けられている (秋山, 1975; 1976; 1977; 1978; 1979; 1981; 1982; 1983; 1984; 1985; 1986; 江角, 1992; 1995;

神谷, 1991; 1994; 1995; 神谷ら, 1983; 川上ら, 1988; 1990; 中島・大谷, 2013; 野尻ら, 2011; 2012; 2014; 大谷ら, 1996; 1997; 1998; 1999; 2000; 2001; 2003; 2004; 2005; 2006; 2007; 2008; 崎ら, 2009; 2010; 崎・大谷, 2015; 安田ら, 1984; 1986)。1969年当時から現在まで、ほぼ毎年、珪藻類の *Cyclotella* 属の数種類が優占し、塩分が低い年は、淡水性藍藻類の *Coelosphaerium* や *Microcystis*, 緑藻類の *Monoraphidium*, *Pseudodictyosphaerium* や *Scenedesmus*, 淡水から汽水に出現する珪藻類の *Chaetoceros* sp. などが増減をしながらたびたび出現している (大谷, 1996; 1997; 2005)。

今回着目した *Coelosphaerium* sp. (2015年度までは *Coelosphaerium kuetzingianum* として記録されている) は、1969年から1994年の間、およびその後も2005年を除き毎年出現しており、穴道湖では主要な種である (大谷, 1997; 2005 ほか)。

試料は Fig. 3-1 に示す S-3 (湖心), S-9 (東部) および S-W (西部) の3地点で採取した。表層水はステンレス製バケツにより、底泥はエックマンバージ採泥器により採取し、速やかに実験室に持ち帰り試験に供した。

3. 2. 2 湖水のプランクトンの観察方法

野外生試料は、次の方法により濃縮した後観察を行った。湖水 198 mL を口径 0.45 μm のメンブランフィルター (Millipore Corp.) を用いて弱い圧力で吸引ろ過した後、フィルター表面に集積した植物プランクトンをミクロスパチュラを用いて丁寧にかきとり、湖水でサンプルチューブに流し込み、さらに 2 mL までメスアップし、100倍濃縮試料とした。試料を保存する場合は、100倍濃縮生試料に 2.5% グルタルアルデヒド約 2 mL を加え保存し、検鏡時に保存した試料の上澄みを慎重に捨て、沈殿した試料を 2.5% グルタルアルデヒドを用いて全量が 2 mL になるように調整し、100倍濃縮試料を作製した。

種の同定は蛍光光学顕微鏡 (Olympus BX60, Japan) を用い、100 倍濃縮試料を 400 倍及び 1000 倍の倍率で注意深く行った。

各々の種ごとの細胞数及びコロニー数の計測は、100 倍濃縮試料をトーマの血球計算板に滴下し、400 倍の倍率で行った。 1.0×10^{-7} L 中の細胞数又はコロニー数を計測したことになる。計測は 3 回行いその平均値を細胞数とした。

調査期間中に、直径が 3 μm で球形の細胞がコロニーを形成している藍藻 *Coelosphaerium* sp. と緑藻 *Pseudodictyosphaerium minusculum* が同時に出現した。葉緑体の形状が大きく異なるため、G 励起を用いた観察や 1000 倍の倍率での観察では識別は比較的容易であったが、細胞及びコロニーの形状が類似しているため、トーマの血球計算板を用いて 400 倍の倍率で細胞数を計測することは困難であった。そこでこの 2 種については、注意深くコロニー数を求め、そして、あらかじめ 2008 年 4 月 22 日の試料を用いて、それぞれコロニー中の細胞数を 1000 倍の倍率で焦点を動かしながら 50 回計測して 1 コロニー当たりの細胞数を求め、コロニー数をかけることで細胞数を求めた。*Coelosphaerium* sp. と *Pseudodictyosphaerium minusculum* の 1 コロニー当たりの細胞数はそれぞれ、17.3 [61% (RSD)] と 8.5 [64% (RSD)] であった。

また、400 倍の倍率では、非常に小さい *Synechocystis* (球形、直径約 1 μm) と *Synechococcus* (亜球形、直径約 1 μm) を識別することがきわめて困難であったため、*Synechocystis* の細胞数には *Synechococcus* の細胞数がわずかに含まれている可能性がある。

3. 2. 3 臭気物質の分析方法

ジェオスミン及び 2-MIB 濃度の測定は生試料およびろ過水及び底質についてヘッドスペース-GC/MS (Shimadzu GCMS-QP2010 Plus, Kyoto) 法により行った。底質試料の分析に当たっては、分液ろうとに底質 5 g に対して超純水 120 mL を入れ、1 分間激しく震とうした後、直ちに沈降した砂れき等を除去した後、上澄み液及び上澄み液の Whatman GF/C によるろ液を供した。

試料 10 mL を正確に専用のガラス製バイアル瓶に分取し、NaCl 3.5 g と内部標準としての d_3 -ジェオスミンを加えた後、専用のアルミキャップで密封した。80 °C、30 分間の予備加熱の後、バイアル瓶中の気相を GC/MS に導入し測定を行った。GC の昇温条件は、35°C で 1 分保持した後、30°C/min. で 150°C まで、5°C/min. で 200°C まで、30°C/min. で 230°C まで昇温し、この温度で 5 分間維持した。このときキャリアーガスの He の圧力は 100 kPa であった。質量分析計の測定モードは SIM 法で行った。検出下限は、ジェオスミン及び 2-MIB それぞれ 1 ng L^{-1} (6.4% RSD: $n=5$) 及び 1 ng L^{-1} (4.5% RSD: $n=5$) であった。懸濁態のジェオスミン濃度は、生試料のジェオスミン濃度からろ過水のジェオスミン濃度を差し引いて算出した。

後述するように、湖水及び底質の生試料はそれぞれのろ過試料よりも高濃度のジェオスミンを含んでいた。それゆえ、湖水の表層水と底質それぞれの懸濁物質からジェオスミン産生生物を分離しようと試みた。

3. 2. 4 密度勾配液による分離方法

ジェオスミンを生成する生物を特定するため、Percoll (Pharmacia Biotech, Sweden) による密度勾配液を用いた比重分離法を実施した。方法の詳細は Fukushima et al. (2007) を参照いただきたい。

密度勾配液 (Percoll 重層液) の調整

まず, Percoll 原液 90%に対し 1.5 M NaCl 10%を加えた等張に希釈した Percoll 溶液 (Stock Isotonic Percoll, 以後, SIP とする) を調整した。SIP を 0.15 M NaCl で次の 5 段階の密度の溶液に希釈した。1.064 g/mL (SIP-0.15 M NaCl, 5:5) , 1.052 g/mL (SIP-0.15 M NaCl, 4:6) , 1.040 g/mL (SIP-0.15 M NaCl, 3:7) , 1.028 g/mL (SIP-0.15 M NaCl, 2:8) , 1.016 g/mL (SIP-0.15 M NaCl, 1:9) 。この溶液を 15 mL 試験管に密度の大きいものから順に 1 mL ずつ慎重に重層し密度勾配液 (Percoll) 重層液とした。

比重分離方法

500mL の湖水又は超純水に底質を分散させた試水を遠心分離器 (10,000 rpm, 10 分) にかけた。この操作によって生じた沈殿物 (1~2mL) を調整した密度勾配液に加え, 3,500 rpm で 10 分, 遠心分離を行った。5 つ比重の percoll 希釈液の境界面とその上下から 6 つの画分をエッペンドルフ容器に分取した。Percoll を除去するため, それぞれに 0.15 M の NaCl 溶液を 1.5 mL になるよう加え, 8,500 rpm で 5 分, 遠心分離を行い, 上澄み液を除去した。この操作を 2 回繰り返し, 最後に 0.15 M の NaCl 溶液を加え 1.25mL に調整した。各々の画分の臭気物質は GC/MS によって測定するとともに, 光学顕微鏡により注意深く観察した。

生湖水を分離した際, 最も軽い比重の画分から高濃度のジェオスミンが検出され, その画分では群体性の植物プランクトンのみが観察された。このことは, この植物プランクトンがジェオスミンを産生していることを示唆する。しかしながら, 後述するように, 4 月 30 日までの同じ画分の試料からは, よく似た形状だが異なる 2 種の群体性の植物プランクトンが観察された。そして, 5 月 7 日以降の試料からは 1 種類のものだけが観察されるようになった。この 2 つの種は蛍光特性の違いにより識別できた。群体性の植物プランクトン 1 細胞当たりのジェオスミン含有量

を見積もるため、2008 年 4 月 14 日、4 月 30 日、5 月 7 日、5 月 13 日の生湖水試料の 6 つの画分の各々について、ジェオスミン濃度と種類ごとの細胞数を計測した。細胞数の計測は、超音波洗浄機 (Iuchi, DG-1) で 45 W で 2 分処理することで各群体を細胞ごとに分離した後、光学顕微鏡でトーマの血球計算板を用いて 3 回計測した。蛍光を用いた観察も併行して行った。細胞数は 3 回の平均値を採用した。

3. 3 結果と考察

3. 3. 1 宍道湖でのジェオスミンの濃度変化と植物プランクトン優占種との関係

カビ臭原因物質及びその存在形態

宍道湖の湖水及び底質からジェオスミンが臭気物質として検出された。2008 年 4 月 14 日, 22 日, 30 日, 5 月 7 日, 13 日, 20 日, 27 日, 6 月 1 日の宍道湖 3 地点における表層水およびそのろ過水, 底質及びその抽出水のジェオスミン濃度, 表層水の塩分濃度, クロロフィル a 濃度の変化を Fig. 2-2 に示す。なお, 2-MIB はいずれの検体も検出されなかった。

宍道湖湖心表層水生試料のジェオスミン濃度の変化は, 2008 年 5 月 7 日まで高いままであったが, その後急激に減少した。この期間, ろ過水のジェオスミン濃度は生試料と比べ明らかに低かった。底質のジェオスミン濃度は不規則に変動したが, 最も高い値は 3 地点ともに 4 月 30 日に計測された。しかしながら, 底質抽出水と底質のジェオスミン濃度の変動の関係は, S-3 地点についてはおおむね一致していたが, S-9 地点についてはわずかに類似性が見られたのみであった。未ろ過の表層水のジェオスミン濃度はろ過水よりも明らかに高かった。従って, カビ臭発生のこの期間においては, 懸濁物質中にジェオスミン産生生物が存在することを示唆する。

生試料のジェオスミン濃度は 3 地点間でほぼ同様な変化を示しているが, 4 月 22 日の S-W 地点については極めて低い値を示した。これは, 宍道湖に流入する斐伊川からの大量の流入水によって希釈されたためと考えられる。また, S-W 地点の底質のジェオスミン濃度は S-3 地点や S-9 地点と比べ低濃度であった。このことは, ジェオスミンは河川からの流入ではなく, 河口近くの湖底付近からの集積によるものであることを示唆する。S-3 地点及び S-9 地点においては, 底質のジェオスミン

濃度のピークは湖水のジェオスミン濃度の増加と関係している。ジェオスミン産生物を含む懸濁物質の沈降が、底質の高いジェオスミン濃度を引き起こしていることは、あり得ることであり、湖水起源であることを示唆する。

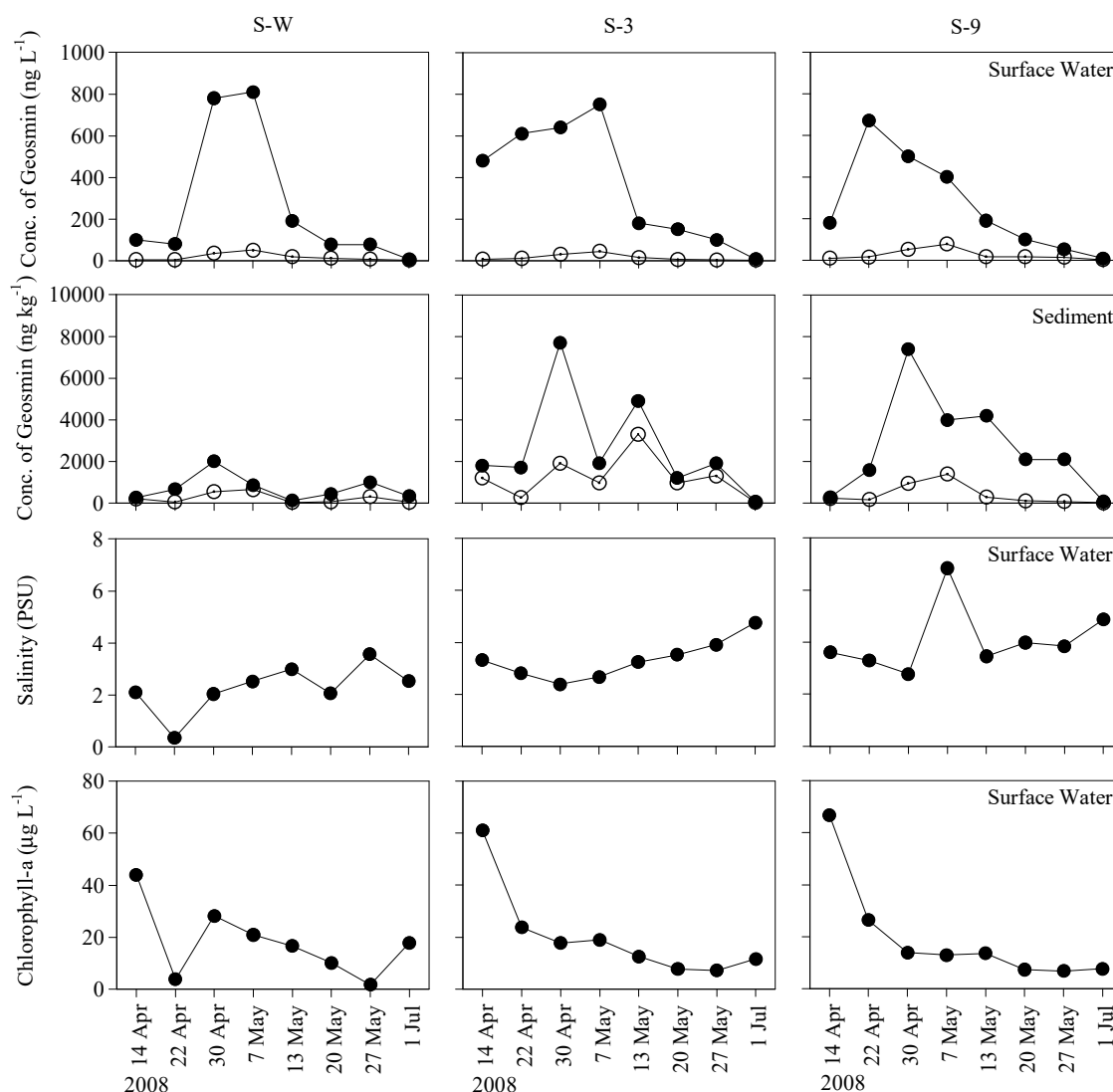


Fig. 3-2. Change in the concentration of geosmin in the raw (*filled circles*) and filtered (*open circles*) water; salinity and Chlorophyll-a for surface water, sediment (*filled circles*) and extracted water from sediment (*open circles*) at the western (S-W), central (S-3), and eastern (S-9) point from 14 April to 1 July 2008. Sediment data sampled 20 June were conveniently shown at 1 July.

植物プランクトンの観察結果

2008 年 4 月 22 日, 30 日, 5 月 7 日, 13 日, 20 日, 27 日, 6 月 20 日及び 7 月 1 日の宍道湖湖心表層水に存在した植物プランクトンの主な種類の細胞数の変化を Table. 3-1 に示す。

Table 3-1. Change in species composition and cell numbers of major phytoplankton taxa identified from samples taken from the surface at the central site in Lake Shinji, Japan, from 22 April to 1 July 2008.

Date	Cell number ($\times 10^5 \text{ L}^{-1}$)				
	<i>Synechocystis</i>	<i>Coelosphaerium</i>	<i>Pseudo-dictyosphaerium</i>	<i>Monoraphidium</i>	<i>Cyclotella</i>
22 April 2008	ND	1042	1000	125	19
30	ND	1638	15	267	63
7 May	787	2353	0	375	117
13	924	784	0	198	10
20	2540	640	0	79	95
27	1309	138	0	69	20
20 June	184	17	0	5	23
1 July	ND	29	0	5	74

Numbers are consistent with sell numbers counted and averaged in 10^{-7} L condensed water by 100-fold

ND no data available

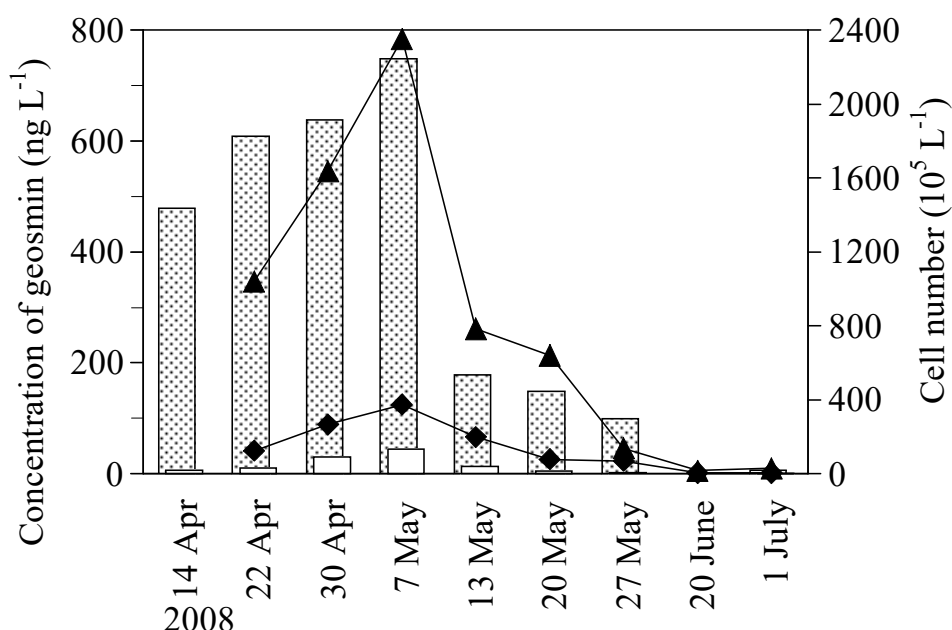


Fig. 3-3. Change in geosmin concentration in raw (*hatched bar*) and filtered (*white bar*) water samples at the central point, S-3, from 14 April to 1 July 2008 (no data on 20 June). Changes in cell numbers of *Coelosphaerium* sp. (*filled triangles*) and *Monoraphidium contortum* (*filled squares*) are also indicated

緑藻 *Pseudodictyosphaerium minusculum* は4月22日まで細胞数から見て優占種であった。4月22日の 1.0×10^8 cells L⁻¹ が最も多く、4月30日には 1.5×10^6 cells L⁻¹ に減少しその後5月7日以降は検出されなかった。藍藻 *Coelosphaerium* sp. は4月14日(未計測)から観察され、7月1日まで恒に観察された。細胞数は4月22日の 1.0×10^8 cells L⁻¹ から最大値を示した5月7日の 2.4×10^8 cells L⁻¹ に向かってなだらかに上昇した。この日を境に急激に減少し、5月13日には 7.8×10^7 cells L⁻¹、7月1日には 2.9×10^6 cells L⁻¹ に減少した (Fig.3-3)。緑藻 *Monoraphidium contortum* (紡錘状、長さ約 20 μm、直径 1-2.5 μm) もほぼ同様の傾向を示している。珪藻 *Cyclotella* spp. (円筒状、長さ約 4 μm、直径約 4 μm) は期間中に3回のピークを示した。それぞれ、5月7日は 1.2×10^7 cells L⁻¹、5月20日は 9.5×10^6 cells L⁻¹、7月1日は 7.4×10^6 cells L⁻¹ であった。藍藻 *Synechocystis* sp. (球形、直径約 1 μm) は5

月 7 日から計数されはじめ 5 月 20 日に最大値 2.5×10^8 cells L⁻¹ を観測し、6 月 20 日 (1.8×10^7 cells L⁻¹) に向かって減少した。

2008 年のカビ臭が発生していた時点で、ジェオスミンを産生する *Anabaena*, *Phormidium*, などの既知の植物プランクトン種 (Persson 1988, Jüttner and Watson 2007; Smith et al., 2008) は毎週の調査からは見られなかった。

3. 3. 2 密度勾配液を用いた比重分離によるジェオスミンの濃度変化と植物プランクトン優占種との関係

5 段階の密度勾配液を用いて、宍道湖水懸濁物質及び底質から、植物プランクトンの抽出に成功した。

2008 年 4 月 30 日の宍道湖湖心 (S-3) 表層水の比重分離試料において、最も密度の小さい画分から高濃度の、2 番目に密度の小さい画分から低濃度のジェオスミンが検出された (Fig. 3-4 a)。光学顕微鏡を用いた注意深い観察により、最も密度の小さい画分から、わずかな *P. minusculum* とごくわずかな不明な懸濁物質 (直径約 1 μm) を含む、大量の *Coelosphaerium* sp. が確認された。2 番目に密度の小さい画分からは、変形が見られるものの、同じ植物プランクトンが観察された。

2008 年 5 月 7 日 S-9 地点の底質の比重分離試料において、すべての画分からジェオスミンが検出された (Fig. 3-4 b)。光学顕微鏡を用いた注意深い観察を、最も密度の小さい画分、3 番目に密度の小さい画分、最も大きい密度の画分について行った。最も軽い画分について、細胞の表面を覆うゼラチン質にわずかなバクテリアが付着している *Coelosphaerium* sp. が確認された。3 番目に密度の小さい画分について、変形した *Coelosphaerium* sp. , *M. contortum*, ごくまれに *Synechocystis* sp. が見られた。最も密度の大きい画分について、*Cyclotella* spp. , *M. contortum* とわずかな由来のよくわからないデトリタスを含む *Coelosphaerium* sp. が確認された。

Coelosphaerium sp. のみがこの 3 つの画分に共通して存在した。また、変形した *Coelosphaerium* sp. は比重分離試料の密度の大きい画分から分離される傾向が見られた。そして、複雑な形をしたデトリタスは藍藻の群体に付着し、藍藻の群体の比重を大きくしているようであった。

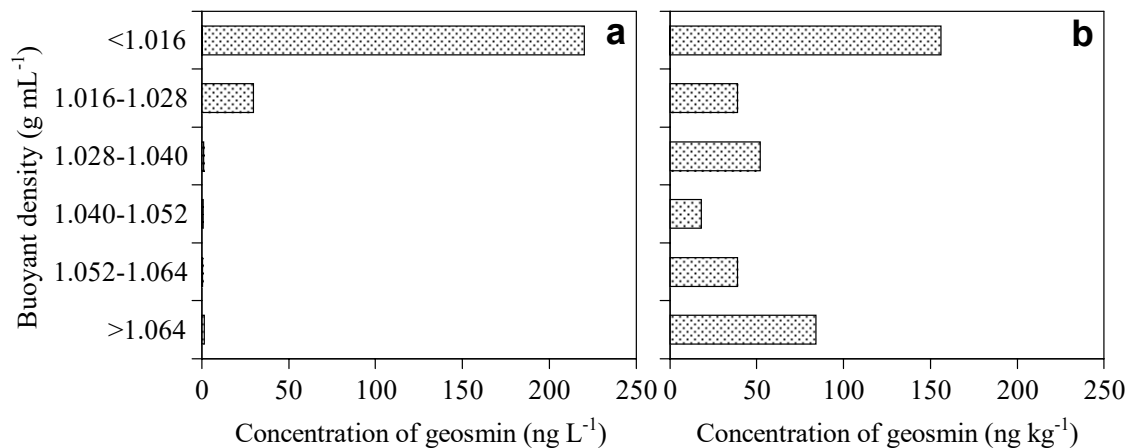


Fig. 3-4. Geosmin concentration in each portion (hached bar) obtaine by step dencity gradient medium from the raw water sampled at the central point (S-3) on 30 April and b the sediment sampled at the eastern point (S-9) on 7 May 2008.

霞ヶ浦においてはアオコ形成種である藍藻 *Microcystis aeruginosa* や珪藻 *Synedra acus* といった植物プランクトンのコロニーの廻りで成長する, ある種の放線菌が存在する (杉浦, 1989) ことが報告されている。Sugiura et al. (1994) は, 400 倍の倍率でで撮影した顕微鏡写真により, 植物プランクトンが形成する群体のまわりに放線菌が付着していることを明らかにした。Nielsen et al. (2006) によって行われたように, 光学顕微鏡では, 放線菌の単細胞の棒状のものと糸状のものを識別することは出来ないが, 放線菌の糸状態の 1 μm もしくはそれ以上のものを識別できる。本実験では, 湖水及び底質から得られた高濃度のジェオスミンを含んでいる最も密度の低い画分には, ばらばらになった群体性の植物プランクトンと非常にまれではある

が直径 1 μm の物体のみが存在し、糸状態の物体は観察されなかった。それゆえ、放線菌は高濃度のジェオスミンを生産している生物とは考えられなかった。同様に光学顕微鏡を用いた詳細な観察から、*Coelosphaerium* sp. 以外の約 1 μm を超える大きさの非常にまれな物質を評価すると、ジェオスミン産生生物の存在は考えられない。例えば、底生性のジェオスミンを生産する生物としての菌類は約 1 μm を超える (山本ら, 2001) 。さらに、バクテリアが光学顕微鏡によって湖水から見つからなかったことから、バクテリアの可能性も除外される。なぜなら、より低濃度のジェオスミン濃度が孔径 1.2 μm のフィルターでろ過された湖水から検出されているからである。以上のことから、密度勾配液を使った分離実験からジェオスミンを生産する生物は *Coelosphaerium* sp. である可能性の高いことが示唆された。

2008 年 4 月において、計数上の優占種は *Coelosphaerium* sp. と形態的に類似している *P. minusculum* であった。*Coelosphaerium* sp. と *P. minusculum* は両方とも比重分離後の最も密度の小さいところに集積していた。緑色光を照射することによる励起 (G 励起) で、*P. minusculum* の細胞は弱い蛍光を示したのに対し、*Coelosphaerium* sp. の細胞は非常に強い蛍光を発した (Fig. 3-5) 。この性質により、同一サンプル中に両種が存在した際の *Coelosphaerium* sp. の計数は比較的容易であった。

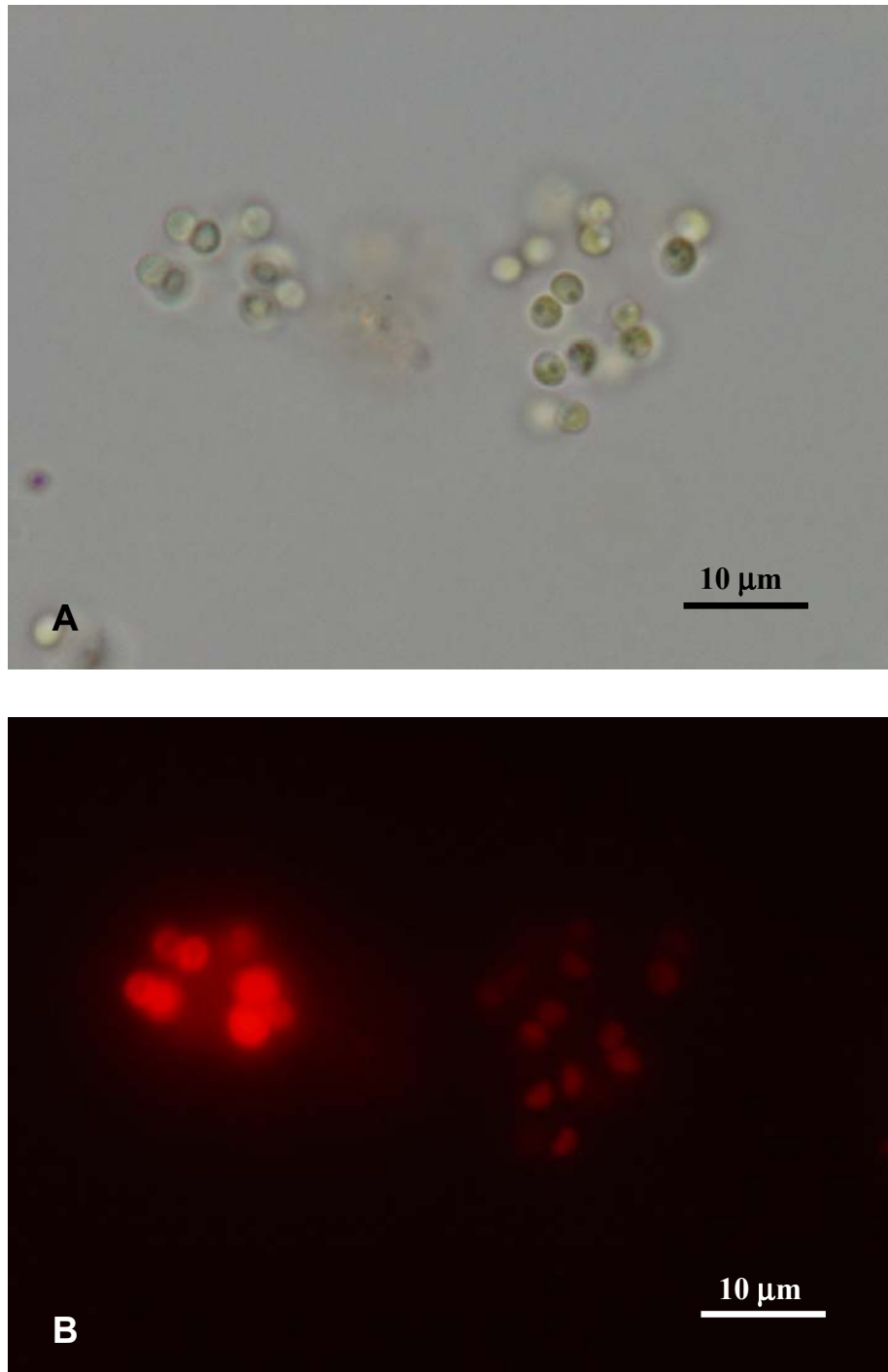


Fig. 3-5. **A** Bright-light optical image and **B** corresponding fluorescent image under green light excitation of *Coelosphaerium* sp. (left) and *Pseudodictyosphaerium minusculum* (right) . Prokaryotic *Coelosphaerium* sp. shows stronger fluorescence excitation at this wavelength than that of eukaryotic *P. minusculum*

試料採取日ごとに、比重分離した6つの試料の *Coelosphaerium* sp. 細胞数とジェオスミン濃度の相関図を示す (Fig. 3-6)。

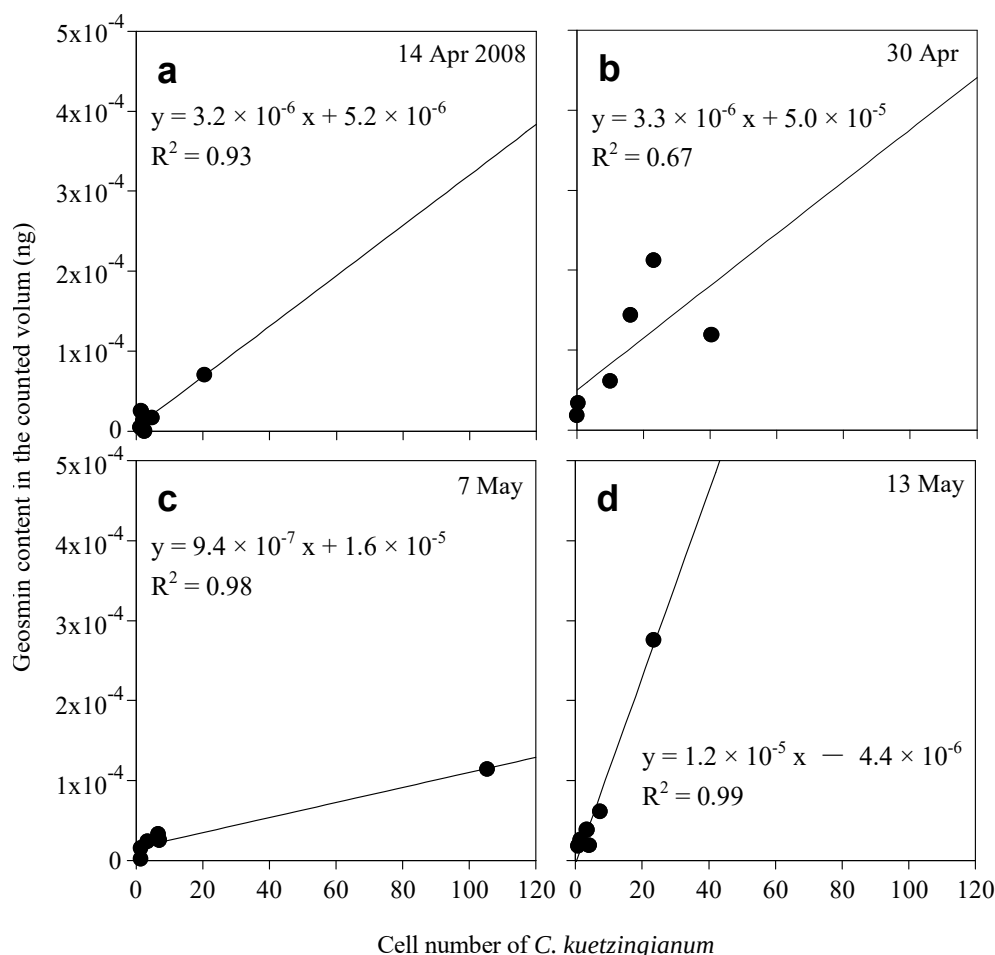


Fig. 3-6. Correlation plots between the concentration of geosmin and the cell numbers of *Coelosphaerium* sp. in the 6 portions separated from each water sample at the central point. **a** 14 April, **b** 30 April, **c** 7 May, **d** 13 May 2008

各々の日ごとに、ジェオスミン濃度と *Coelosphaerium* sp. 細胞数の間には相関が見られるが、その傾きは試料採取日ごとに異なっていた。この傾きの違いの理由は明らかに出来なかったが、これらの回帰式から計算された4月30日、5月7日、5月13日の *Coelosphaerium* sp. 1細胞当たりのジェオスミン含有量は、それぞれ、 3.3×10^{-6} , 9.4×10^{-7} , 1.2×10^{-5} ng , であった。一方、同じ日に採取された生湖

水中の *Coelosphaerium* sp. 1 細胞当たりのジェオスミン含有量は、それぞれ、3.7, 3.0, 2.1×10^{-6} ng であった。変動はあるものの、密度勾配法により分離された *Coelosphaerium* sp. 1 細胞当たりのジェオスミン含有量と生湖水中に存在する *Coelosphaerium* sp. 1 細胞当たりのジェオスミン含有量はおおむね近い値を示した。

3. 4 結論

今日まで、多くのシアノバクテリアがジェオスミンもしくは 2-MIB を産生することは知られているものの、*Coelosphaerium* sp. がジェオスミンを産生するとは考えられていなかった。それは、主要な臭気物質を産生するシアノバクテリアをとりまとめた総説 (Jüttner and Watson, 2007; Watson, 2003) に、*Coelosphaerium* sp. は物質は特定できていないがある種の毒物を産生するものの臭気物質は産生しないと記載されていることから伺える。本研究では、密度勾配液を用いた湖水及び底質の比重分離試料の最も軽い画分に多量の *Coelosphaerium* sp. の群体が含まれ、それが高濃度のジェオスミンの存在と合致することを見い出した。しかしながら、試料中に放線菌や菌類が存在しないことの検証に対しては、光学顕微鏡を用いた詳細な観察のみであった。また、サンプル中の大量の *Coelosphaerium* sp. の中にごくまれに直径 1 μm の物質が存在していたことから、臭気物質の産生に対する放線菌や菌類の関与を完全に否定するまでには至らなかった。

宍道湖における、2008 年春季の臭気産生生物を特定するために、密度勾配分離法を用いる検討を試み、湖水中の懸濁物質及び底質の表面から、他の生物をわずかに含む *Coelosphaerium* sp. の分離に成功するとともに、*Coelosphaerium* sp. がジェオスミンを産生するシアノバクテリアである可能性が高いことを見い出した。今後は、*Coelosphaerium* sp. 無菌純粋培養とそこからのジェオスミンの検出が必要である。

第4章 宍道湖産コエロスファエリウム純粋培養株からの ジェオスミンの検出

4. 1 はじめに

生物が引き起こす飲料水や魚の異臭味の大部分はジェオスミンと 2-MIB によるものであり、カビ臭と呼ばれる。これまでの研究で、カビ臭を産生する生物はシアノバクテリアの他、放線菌、カビ、真菌、粘菌などの一部が報告されている (Gerber and Lechevalier, 1965; Kikuchi et al., 1983; Yamamoto et al., 1994; Hayes et al., 1991)。

生物がカビ臭を発生するのが初めて確認されたのは放線菌によるものであるが、Safferman et al. (1967) は藍藻類の *Symploca muscorum* の培養液からジェオスミンを検出し、シアノバクテリアにもカビ臭を発生する物の存在が明らかとなり、以降、ジェオスミンを産生する様々なシアノバクテリアの報告がある (Persson, 1983; Watson, 2003; Jüttner and Watson, 2007; Watson et al., 2016)。ジェオスミンを産生するのは、*Oscillatoria* 属、*Dorichospermum* 属、*Phormidium* 属、*Aphanizomenon* 属、*Lyngbya* 属、*Symploca* 属の 6 属であるが、これらはいずれもオスキラトリア目またはノストク目に属しており、シネココックス目でジェオスミンを産生する種はこれまで確認されていなかった (Watson et al., 2016)。

宍道湖においては、1993 年 9 月に湖周囲でカビ臭が感じられ、漁業にも影響を与えた。しかし、原因となる生物は特定されなかった (江角, 1995)。また、2007 年 5 月中旬に湖周辺の住民からスズキの身にカビ臭があるという苦情が寄せられた。固相抽出-ガスクロマトグラフ質量分析計で湖水中にジェオスミンが高濃度に存在することを確認できたが、顕微鏡観察ではこれまでカビ臭を発生すると報告されているオスキラトリア目またはノストク目の植物プランクトンは確認できず、カビ臭を産生す

る放線菌が水中・底泥中にわずかに確認できたが (巢山, 2008; 2009), ジェオスミンの濃度変化と放線菌数の変化が同調せず, 放線菌がカビ臭の原因とは判断できなかった (島根県保健環境科学研究所, 2008)。翌年もカビ臭が発生したため, はカビ臭の発生している宍道湖湖水について密度勾配液を用いた比重分離法を用いて水中の懸濁物を分離し, カビ臭との関係を調べたところ, シネココックス目の *Coelosphaerium kuetzingiamum* (その後本種は *Coelosphaerium* sp. と再同定された (Godo *et al.*, 2017)) がジェオスミンを産生していることが強く疑われた (Godo *et al.*, 2011)。

そこで, *Coelosphaerium* sp. がジェオスミンを産生するとの仮定の元, 我々はカビ臭の発生している時期の湖水より同植物プランクトンの無菌純粋培養を試み, 顕微鏡観察, PCR による種の確定, ガスクロマトグラフ質量分析法によるジェオスミンの測定を行い, ジェオスミン生産を確認した。

また, 加えて, この時期の *Coelosphaerium* sp. 細胞数と懸濁態ジェオスミン濃度の変動傾向とがよく一致していたことから, 宍道湖における 2009 年秋季のカビ臭発生原因は *Coelosphaerium* sp. の増殖によるものと考えられたので報告する。シネココックス目の藍藻がジェオスミンを生産することの報告は初めての例である。

4. 2 方法

4. 2. 1 水域と現地調査

宍道湖は、汽水湖であり、大橋川を介して流入する中海の高塩分水も考慮した平均滞留日数は 59.4 日である (1993 年から 2011 年の平均値) (神谷ら, 2014) 。宍道湖への淡水流入量の約 75 %は西端に位置する斐伊川からもたらされている (Fig. 4-1) 。塩分のほとんどが下流に位置する中海から大橋川を経由して供給され、その量は気象等に大きく影響されている (Ishitobi et al., 1989; Ishitobi et al., 1993) 。そのため、宍道湖の塩分は年により大きく変動しているが、1993 年 1 月から 2012 年 12 月までの平均では約 3.5 psu である。宍道湖へ流入した中海の高塩分水は、その重さのため密度流となって宍道湖へ侵入し、湖底上で成層を形成する (山室ら, 2011) 。

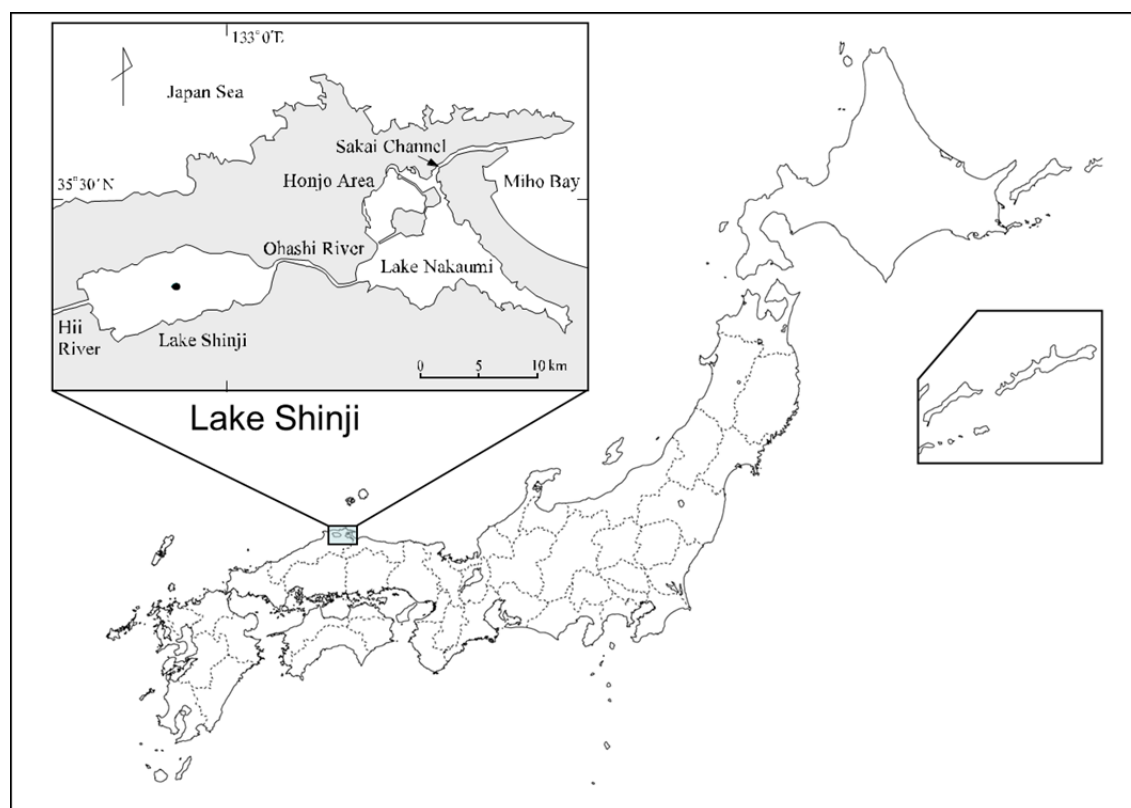


Fig. 4-1. Lake Shinji, the surrounding area, and sampling points

夏季においては、水温及び生物活性が高いため、塩分成層した場合、成層下部は貧酸素化しやすく、また栄養塩濃度が著しく上昇する (神谷ら, 1996)。1969 年以降、原則毎月の水質測定及び植物プランクトンの種組成の調査が行われており、種組成は優占種の数または相対出現頻度によって決定している。今回着目した *Coelosphaerium* sp. (2015 年度までは *Coelosphaerium kuetzingianum* として記録されている) は、1969 年から 1994 年の間、およびその後も 2005 年を除き毎年出現しており、穴道湖では主要な種である (大谷, 1997)。

調査は、カビ臭の発生していない 2009 年 9 月 16 日から、カビ臭が発生している期間、その後カビ臭を感じなくなった 11 月 4 日まで、穴道湖湖心 (Fig. 4-1) において毎週 1 回ずつ表層水の採水を行った。採水にはステンレス製のバケツを用いて行い、4 時間以内に実験室に持ち帰った。現場ではセンサー (HACH Hydrolab, MS5, Denver) により表層から堆積物直上まで、深度 1 m ごとに水温・電気伝導度・溶存酸素濃度の測定を行った。実験室に持ち帰った試料は、ヘッドスペースガスクロマトグラフ質量分析計を用いてジェオスミン濃度を測定した。また、トーマの血球版及び微分干渉光学顕微鏡を用い、必要に応じて蛍光 (G 励起) を照射して *Coelosphaerium* sp. の細胞数を計測した。

4. 2. 2 培養株の作成

試料は、カビ臭が感じられた 2009 年 10 月 5 日に穴道湖湖心表層水をステンレス製バケツにより採水したものを使用した。採水後 4 時間以内に実験室に持ち帰り、冷暗所で保管し、1 週間以内に培養の準備に取り掛かった。

培養は、実態顕微鏡下でピペット洗浄法 (Pringsheim, 1946) により試験水から 1 群体取り出し、培地で 6 回洗浄した後培養試験管に移した。培地は M-11 (萩原ら, 1984) 改変培地を用いた。この培地は M-11 の溶媒に、精製水の代わりに穴道湖湖

水を口径 0.45 μm のメンブランフィルター (Millipore corp.) でろ過したろ液と蒸留水を等量混合したものをを用いた。培養条件は、プランクトン培養装置 (TG-280CCFL-5LE Nippon Medical & Chemical Instruments, Japan) を用いて、 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 、12 時間ごとの明暗サイクルとし、明条件は $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とした。また、M-11 培地を用いた培養株の経代培養が不安定になった際には、塩分濃度を 3psu に調整した、CA 培地 (Ichimura & Watanabe, 1974) 又は IMK 培地 (Nihon Pharmaceutical Co.Ltd., Osaka) を使用した。

4. 2. 3 プランクトンの形態観察と計数, 同定

野外生試料は、次の方法により濃縮を行った後観察を行った。湖水 198 mL を口径 0.45 μm のメンブランフィルターにより緩やかに吸引ろ過した後、フィルター表面に集積した植物プランクトンをミクロスパチュラを用いて丁寧にかきとり、湖水約 1.5 mL でサンプルチューブに流し込み、さらに湖水で 2 mL にまでメスアップし、100 倍濃縮試料とした。試料を保存する場合は、100 倍濃縮生試料に 2.5% グルタルアルデヒド約 2 mL を加え保存した (固定試料)。固定試料の検鏡時には保存した試料の上澄みを慎重に捨て、沈殿した試料を 5% ホルマリンを用いて全量が 2 mL になるように調整し、100 倍濃縮試料を作製し、検鏡に供した。

観察は蛍光光学顕微鏡 (Olympus BX60, Japan) を用い、まず 400 倍で、続いて 1000 倍の倍率で注意深く行った。

群体もしくは細胞の大きさを計測する際は、1000 倍の倍率で対物マイクロメーターを用いて、各々の試料から無作為に 10 以上の対象物を選んで測定を行った。

細胞数の計測は、100 倍濃縮試料をトーマの血球計算版に滴下し、400 倍の倍率で行った。計測は 3 回行いその平均値を細胞数とした。

4. 2. 4 塩基配列分析

DNA は ISOPLANT (Nippon Gene Co Ltd., Toyama) を用いて, その取扱説明書に従い, 培養株中の細胞から抽出した。16S rRNA 及び 16S-23S rRNA internal transcribed spacer (ITS 領域) を含む約 2-kb の断片を KOD plus ポリメラーゼ (Toyobo, Co. Ltd., Osaka) を fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Weisburg et al., 1991) と 23S-R130-16 (5'-GGGTTTCCCCATTCGG-3') を共に用いて増幅した。PCR の増幅は製造者の取扱説明書に従い実施した。PCR サイクルは, 94°C で 2 分間の Pre-Run の後, 94°C で 15 秒, アニーリングを 50°C で 30 秒, 伸長反応を 68°C で 2.5 分のサイクルを 30 回行い, その後, Post-Run を 68°C で 10 分行った。塩基配列の決定は BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit と ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA)により行った。詳細は Huong et al. (2007) に記載されている。プライマーは, Table 4-1 のものを使用した。塩基配列は BLAST 検索により DNA Data Bank of Japan (DDBJ) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/searches-j.html>)と比較した。系統樹は MEGA7 (Kumar et al., 2016)を用いて, 近隣接合法により作成した。この研究での塩基配列は, DDBJ, Euroiean Nucleotide Archibe (EMBL) , GenBank database に LC151466 で登録されている。

Table 4-1 Primer Information

Primer name	Sequence information	Referance
fD1	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	Weisburg et al., 1991
F338	5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'	Huong et al., 2007
926 F	5'-AAACTCAAAGGAATTGACGG-3'	Sato et al., 2008
1512 f	5'-GTCGTAACAAGGTAGCCGT-3'	Hiraishi et al., 1997
518r	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	Huong et al., 2007
907r	5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'	Huong et al., 2008
rP2	5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'	Weisburg et al., 1991
23S-R130-16	5'-GGGTTTCCCCATTCGG-3'	Godo et al., 2017

4. 2. 5 無菌純粋株の確認方法

顕微鏡では観察できない培養液中の微小な細菌等の確認には、3つの方法を用いた。一つは無菌確認培地6種 (B-I, B-II, B-III, B-IV, B-V, YT) (Ichimura & Watanabe, 1977; 市村・伊藤, 1977) に培養液を接種し、30°C、暗条件で2週間培養を行い、培養後の培養液の白濁状況を目視で確認することにより、全ての種類の培養液が混濁せず、細菌の増殖が認められない場合、無菌と判断した。2つ目は、培養株をエチジウムブロマイドによる染色後、蛍光顕微鏡観察により行い (染谷ら, 2003; Someya et al., 1995) , 対象とするもの以外の蛍光が見られない場合、無菌と判断した。3つ目は、培養株の 16S rRNA を変性材濃度勾配ゲル電気泳動中で電気泳動させる (denaturing gradient gel electrophoresis) PCR-DGGE 法により展開し、対象とするバンド以外が検出されない場合、無菌と判断した (Huong et al., 2007; Huong et al., 2008)。

概略は、培養株から抽出された DNA を 2 つのプライマー、F338GC (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') (Morimoto et al., 2005) 及び 907r と共に増幅することで 16S rRNA の断片が得られる。6%ポリアクリルアミドゲル中に変性材を 30%から 60%まで濃度勾配をつけて変性材濃度勾配ゲルを作成する。電気泳動は印加電圧 100 V、60°C で 16 時間行った。電気泳動後のバンドが複数見られたことから、バンドごとに切り出し、これを鋳型として PCR 増幅を行い、それらがすべて同一で、対象プランクトン由来の塩基配列であることが確認されれば、無菌と判断する。

4. 2. 6 ジェオスミンの分析方法

ジェオスミン濃度の測定は生試料およびろ過水についてヘッドスペース-GC/MS 法 (Shimadzu GCMS-QP2010 Plus, Kyoto) により行った。試料 10 mL を正確に専用のガラス製バイアル瓶に分取し, NaCl 3.5 g と内部標準としての d_3 -ジェオスミンを加えた後, 専用のアルミキャップで密封した。80°C, 30 分間の予備加熱の後, バイアル瓶中の気相を GC/MS に導入し測定を行った。GC の昇温条件は, 35°C で 1 分維持した後, 30°C/min. で 150°C まで, 5°C/min. で 200°C まで, 30°C/min. で 230°C まで昇温し, この温度で 5 分間維持した。このときキャリアーガスの He の圧力は 100 kPa であった。質量分析計の測定モードは SIM 法で行った。検出下限は, 1 ng L⁻¹ であった (6.4% RSD:n=5)。懸濁態のジェオスミン濃度は, 生試料のジェオスミン濃度からろ過水のジェオスミン濃度を差し引くことにより算出した。

4. 3 結果

培養に用いた 2009 年 10 月 5 日の穴道湖湖心表層水の植物プランクトンには、シアノバクテリアである *Synechocystis* sp. (シネコキスチス) , *Synechococcus* sp. (シネココッカス) , *Aphanocapsa* sp. (アフアノカプサ) , *Merismopedia* sp. (メリスモペディア) , *Eucapsis* sp. (エウカプシス) , そして *Coelosphaerium* sp. (コエロスファエリウム) が観察された。この中に既知のカビ臭産生植物プランクトンは存在しないが、ジェオスミンを産生すると強く疑われると報告 (godo et al. 2011) された *Coelosphaerium* sp. が存在していた。このとき現場でカビ臭は感じられなかったが、実験室に持ち帰った後再度確認すると、わずかにカビ臭が感じられた。このときの全ジェオスミン濃度は 84 ng L^{-1} , ろ液のジェオスミン濃度は 12 ng L^{-1} であった。

***Coelosphaerium* sp. の同定と形態学的な特徴**

穴道湖において、2007 年から 2009 年にかけてカビ臭を産生すると示唆される生物として、群体を形成する *Coelosphaerium* sp. が同定された。この種は 2007 年 5 月 (細胞数の記録はない) , 2008 年 5 月 ($1.50 \times 10^7 \text{ cells L}^{-1}$) , 2009 年 5 月 ($1.06 \times 10^7 \text{ cells L}^{-1}$) に優占した。Fig. 4-2 および Table 4-2 にこの野外試料の *Coelosphaerium* sp. の形態学的特徴を示す。

穴道湖で観察された本種のコロニーは、浮遊性で、球形から亜球形の形状をし、墨汁を加えた観察でもコロニーの外側には粘質鞘を確認することはできなかった。コロニーの長径は $13 \sim 23 \mu\text{m}$, 短径は $11 \sim 20 \mu\text{m}$, 厚さは $9 \sim 23 \mu\text{m}$ である。時々 2 個のサブコロニーに分かれている場合がある。1 コロニーあたりの細胞数は $14 \sim 80$ 個であった。コロニーの内部にはひも状構造や糸状構造は観察されなかった。細胞はコロニーの表面に配置され、球形から亜球形の形状をし、粘質鞘は確認できなかった。直径は $2 \sim 3 \mu\text{m}$ で、ガス胞をもたなかった。観察中に細胞分裂の様子が確認できたが、

均等に2分裂をしていた。

Table 4-2. Morphological characteristics of *Coelosphaerium* sp. collected from Lake Shinji when the musty odour was present, from 2007 to 2009.

Collecting date	Colony shape	Number of cells per colony	Length of colony (μm)	Width of colony (μm)	Thickness of colony (μm)	Cell shape	Diameter of cells (μm)
May 2007	Spherical to widely oval	14-40	13-19	11-15	13-20	Spherical to hemispherical	2.5
May 2008	Spherical to widely oval	19-80	14-20	12-20	9-23	Spherical to hemispherical	2.0-3.0
May 2009	Spherical to widely oval	21-75	13-17	13-17	13-19	Spherical to hemispherical	2.5-3.0
Oct. 2009	Spherical to widely oval	31-80	15-20	13-17	10-19	Spherical to hemispherical	2.5-3.0

Coelosphaerium sp.の分類学的検討

上記の形質は Nägeli (1849) の *Coelosphaerium* 属の原記載と良く一致し、最近のモノグラフ (Komarek and Hindak, 1988; Komarek & Anagnostidis, 1998) の記載とも良く一致する。*Coelosphaerium* の群体の形態は同じ Coelosphaeriaceae 科の *Snowella* 及び *Coelomolon* とよく似ている。しかし *Snowella* 属は細胞と細胞をつなぐ連絡糸が存在するが、穴道湖産標本には認められなかった。また、*Coelomolon* 属は細胞が楕円体であるが、穴道湖産標本の細胞は球形から亜球形であった。これらのことから穴道湖のカビ臭を発生する野外試料中のものは *Coelosphaerium* 属の一種と同定した。

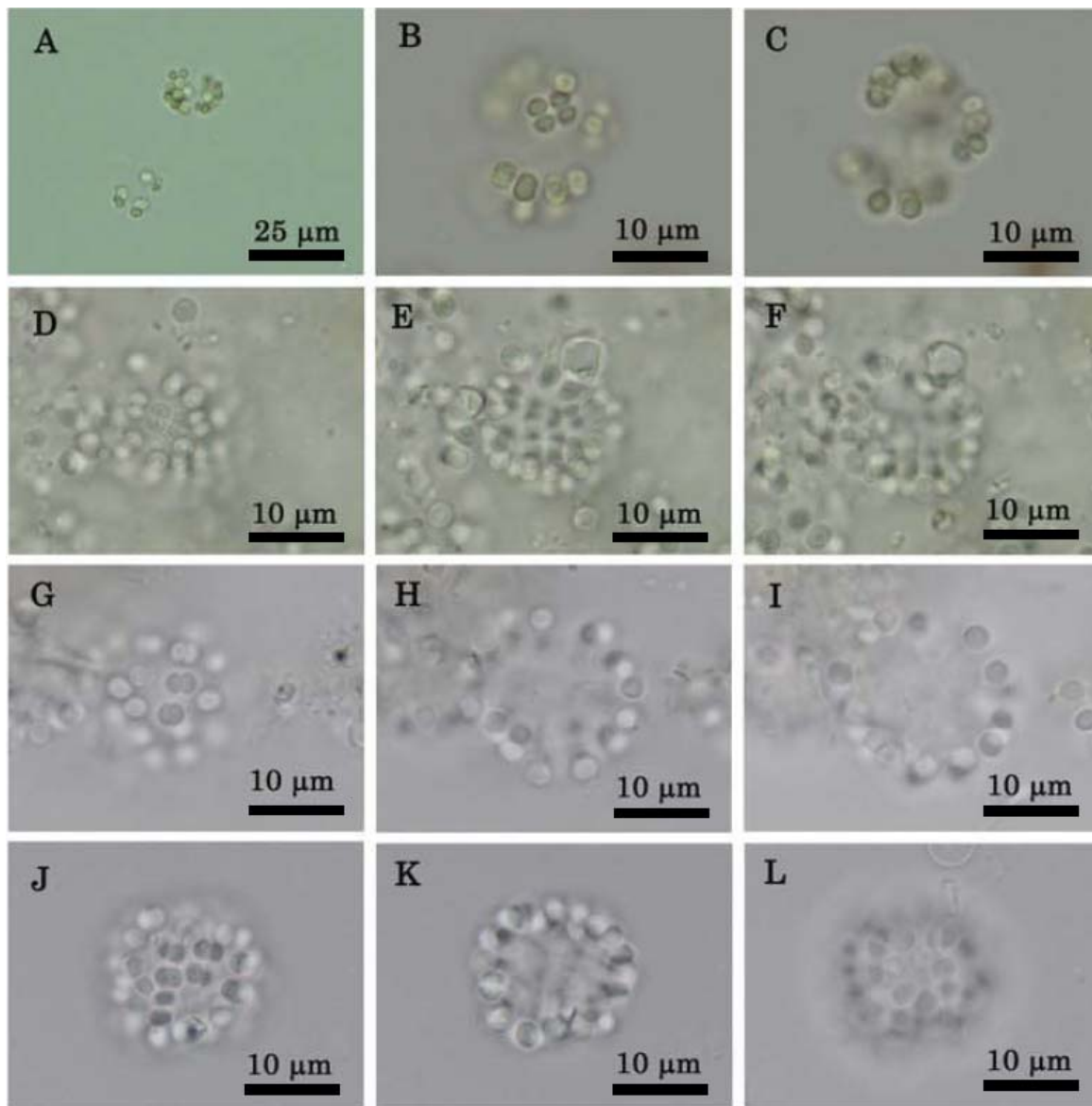


Fig. 4-2. Morphological characteristics of *Coelosphaerium* sp. in the field samples in May 2007, 2008, and 2009. (A–C) Live colonies of *Coelosphaerium* sp. sampled in May 2007. (A) Colonies of different sizes. (B) Surface view of colony. (C) Optical section of colony. (D–L) Colonies preserved in a glutaraldehyde– formaldehyde solution. (D–F) Spherical colony sampled in May 2007. (D) Surface view of colony. (E) Optical section of colony. (F) Bottom view of colony. (G–I) Spherical colony sampled in May 2008. (G) Surface view of colony. (H) Optical section of colony. (I) Bottom view of colony. (J–L) Spherical colony sampled in May 2009. (J) Surface view of colony. (K) Optical section of colony. (L) Bottom view of colony.

Nägeli (1849) は、ヨーロッパのチューリッヒで採取された試料に基づき、*C. kuetzingianum* の特徴を記載している。Nägeli (1849) の原記載では、群体の形状は球形で、細胞の直径は $2.2\ \mu\text{m}$ であり、穴道湖で確認された群体の形状と良く一致している。しかしながら、Nägeli (1849) の報告では、群体の直径と群体の細胞数がそれぞれ $44\ \mu\text{m}$ 以上、約 400 個と、穴道湖のものとは大きく異なっている。穴道湖のものの群体の直径と群体の細胞数はそれぞれ $13\sim 23\ \mu\text{m}$ 、 $14\sim 80$ 個であった (Table 4-1)。

Komarek & Anagnostidis (1998) は、ヨーロッパ産の *C. kuetzingianum* の群体の直径は $100\ \mu\text{m}$ 以上と報告している。Tilden (1910) はアメリカ合衆国のこの種の群体の直径は $30\sim 90\ \mu\text{m}$ としている。このように、ヨーロッパや北アメリカの試料では、穴道湖の試料と比べ、群体の直径が大きく、1 群体当たりの細胞数も多い。

これまで、穴道湖において、本種は *C. kuetzingianum* と名付けられ、報告も多くされてきたが、上述の検討から今後は *Coelosphaerium* 属の一種と呼ぶことが望ましいことから、本論文でもそのように記載している。

***Coelosphaerium* sp. 培養株の形態**

2009 年 10 月に、穴道湖でカビ臭が感じられたことから、穴道湖湖心表層水から *Coelosphaerium* sp. の培養株を分離した。分離された培養株 G2 の形態学的特徴 (Table 4-2) , および、穴道湖湖水中の *Coelosphaerium* sp. の写真 (Fig. 4-3 A)~D)) を示す。

また、M11 培地で 1 ヶ月間分離・培養した G2 株は、当初、群体を形成していた (Fig. 4-3 E, F, Table 4-2)。この写真は 1 ヶ月後のある群体を示している。群体の直径、幅、群体の細胞数はそれぞれ $20\ \mu\text{m}$ 、 $18\ \mu\text{m}$ 、20 個であった。細胞は藍色、球形、ガス胞はなく、その直径は $4\sim 5\ \mu\text{m}$ であった。細胞分裂の際は均等に 2 分裂をしていた。M-11 培地中の細胞の直径は湖水中の試料の直径の $2\sim 3\ \mu\text{m}$ と比べ幾分大きかった。

分離から 2 ヶ月後の M11 培地中で、群体が 2 又は 4 分裂しているのが確認された。

継続して M11 培地中で培養を行った G2 株は、色が薄くなり、増殖速度も遅くなってくるといった不安定な成長を示したことから、この G2 株を CA 培地に移植した。CA 培地により G2 株の増殖を再び促進することに成功したが、群体を形成しなくなり、その後 2009 年から 2014 年まで継続した観察を行ったが、単細胞もしくはせいぜい 2 細胞のものしか確認できなかった (Fig. 4-3 K, L)。分離から 6 年経過した 2015 年 7 月現在、よりよい培地が見つかり、群体の表面で一部の細胞が欠落してはいるが 16 細胞のものを含むいくつかの群体が形成されるようになった (Fig. 4-3 G-I)。現在、G2 株は 10%の海水を含む 1/10 濃度の IMK 培地により経代培養されている。培養条件は、20°C、明暗条件は 12 時間明と 12 時間暗を繰り返している。それでも、G2 株は単細胞又は 2 細胞のものだけである。G2 株の群体を形成するための培養条件は未だ不明である。

Table 4-2. Morphological characteristics of strain G2, isolated from Lake Shinji.

—: Colonies were not formed. (): Rarely observed

Date of observation	Shape of Colony	Number of cells	Length of colony (μm)	Width of colony (μm)	Cell shape	Diameter of cells (μm)	Medium
2 Nov. 2009	Oval	ca.20	20	18	Spherical	4.0-5.0	M11
22 Dec. 2009	Spherical	2-4 (12)	16	14	Spherical to hemispherical	3.5-4.5	M11
23 July 201	Oval	1-4 (16)	18	13	Spherical to hemispherical	3.5-4.0	1/10 IMK
24 Mar. 2016	-	1-2	-	-	Spherical to hemispherical	2.5-3.0	CA

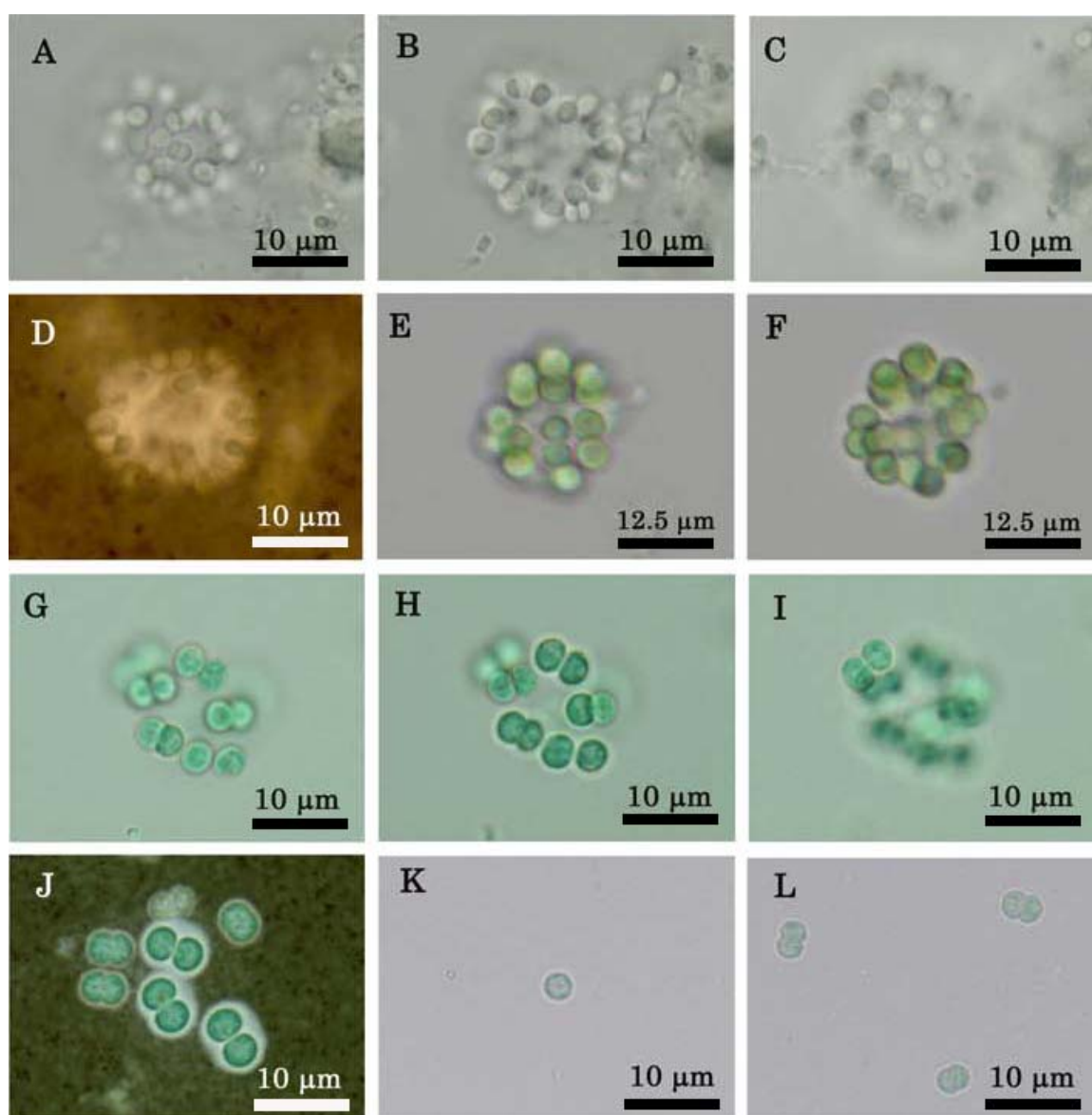


Fig. 4-3. Morphological characteristics of *Coelosphaerium* sp. isolated in October 2009 from Lake Shinji and colonies or cells of strain G2. (A–D) Oval colony sampled in October 2009, preserved in a glutaraldehyde–formaldehyde solution. (A) Surface view of colony. (B) Optical section of colony. (C) Bottom view of colony. (D) Mucilage was not observed around the colony after negative staining with India ink. (E–L) Strain G2 in culture. (E–F) Oval colony after one month of isolation in M11 medium. (E) Surface view of colony. (F) Optical section of colony. (G–J) Colony composed of 16 cells of strain G2 in 1/10IMK medium. (G) Surface view of colony. (H) Optical section of colony. (I) Bottom view of colony. (J) Cells with narrow mucilage revealed by negative staining with India ink. (K–L) One or two cells in CA medium.

培養株の無菌確認

培養株 G2 が無菌であることを証明するため、次の 3 つの基準により確認した。

- ① 無菌確認培地を用いた G2 株の培養により混濁が見られないこと
- ② エチジウムブロミドを用いた DNA 染色により、*Coelosphaerium* sp. 以外の赤い斑点が見られないこと
- ③ 16S rRNA PCR-DGGE 法によっていくつかのバンドが見られたが、すべて *Coelosphaerium* sp. に由来するものであったこと

以上のことから本培養株は無菌の *Coelosphaerium* sp. 培養株であると結論づけた。

16S rRNA と 16S-23S rRNA ITS 領域の遺伝子解析

G2 株の細胞の 16S rRNA 及び 16S-23S rRNA の ITS 領域を含む 2028-bp の配列を読み取ることが出来た。BLAST 解析の結果からは、未培養の *Coelosphaerium* spp. (EF638722, EF638723) (Rueckert et al., 2007) と最も近縁であった。このデータは、ニュージーランドの Okawa 湾の試料から得られたものである。また、*Snowella litoralis* (AJ781041, AJ781039, AJ781042) (Rajaniemi et al., 2005) 及び *Coelomoron pusillum* AICB1012 (KJ746507) との相同性がそれぞれ 98~99%, 93% と高かった。

Fig. 4-4 に 16S rRNA 解析による *Coelosphaerium* sp. 及び関連するシアノバクテリアの遺伝子系統図を示す。この系統図から、G2 株は、未培養の *Coelosphaerium* spp. や *Snowella* spp. と同じ枝の中にあり、それは、*Synechocystis* spp. を含む球形のシアノバクテリアグループに属している。*Coelosphaerium* sp. と判断された G2 株は、*Coelosphaerium* 科でジェオスミンを産生すると初めて報告されたものである。

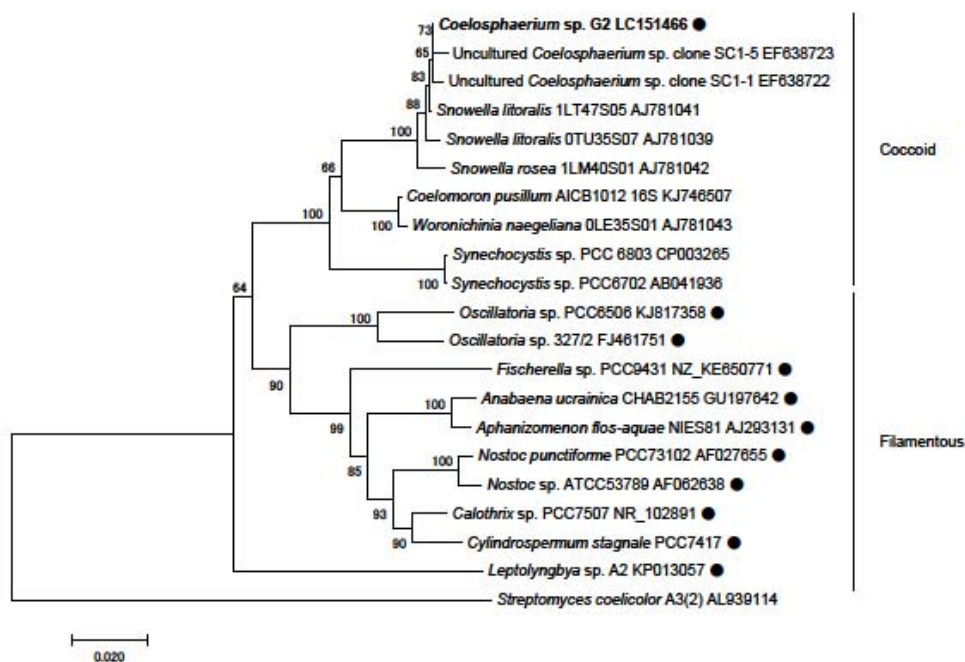


Fig. 4-4. Phylogenetic tree of *Coelosphaerium* sp. G2 and the related cyanobacterial group based on 16S rRNA gene sequences (1076 bp). The phylogenetic tree was constructed using the neighbour joining method and 1000 bootstrap replicates, constructed with MEGA7 software program. Bootstrap values above 60% are shown at the nodes. The accession numbers are shown to the right of the strain name. Sequences from *Coelosphaerium* sp. G2 are indicated in bold. Closed circles indicate geosmin producers of cyanobacteria. The cell form is indicated to the right of the figure. The scale bar indicates substitutions per site. The actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) was used as an outgroup.

臭気物質の同定

Coelosphaerium sp. の無菌純粋株であることが判明した培養液をヘッドスペースガスクロマトグラフ質量分析計 (HS-GC/MS) により測定した。標準液のジェオスミンのピークと同じ分離時間に培養株のピークが検出された。また、2-MIB の分離時間にピークは見られない。Fig. 4-5 に標準液ジェオスミンのピークと培養株のジェオスミンと思われるピークの質量パターンを示す。両者の質量分布は極めて類似している。これらのことから発生していたカビ臭はジェオスミンと同定した。

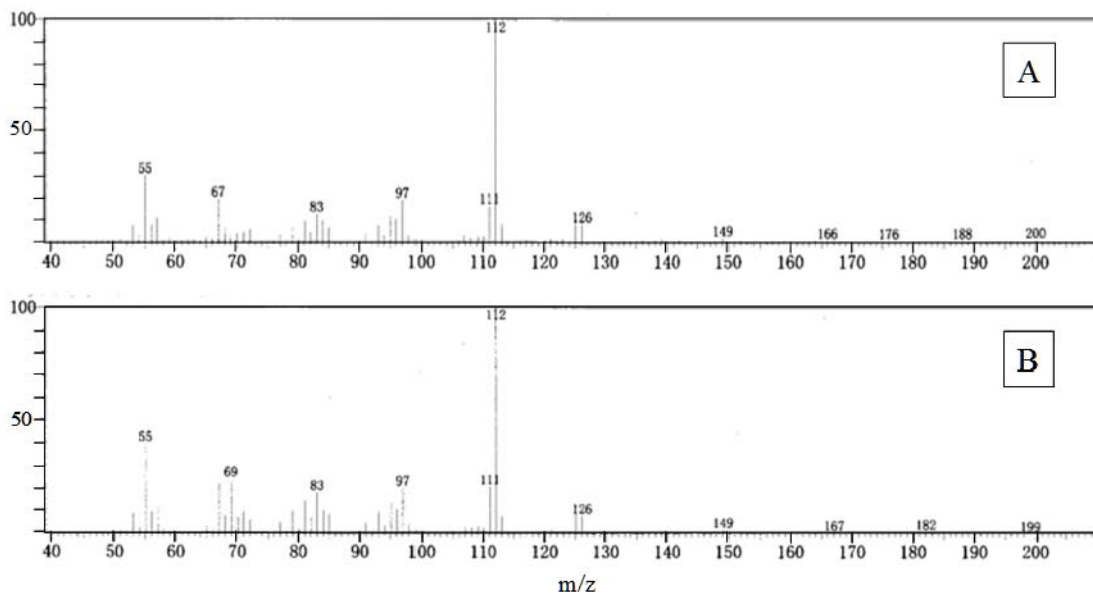


Fig. 4-5. Mass spectrum of (A) a peak in the geosmin standard solution and (B) a peak in strain G2 that appears to be geosmin.

フィールドでの *Coelosphaerium* sp. の細胞数とジェオスミン濃度との関係

Coelosphaerium sp. は2009年9月16日及び18日には観察されず、その後、9月24日の 4.8×10^5 cells L⁻¹ から増加し、10月27日に極大値 6.12×10^7 cells L⁻¹ を記録した。その後、細胞数は減少に転じ、11月4日は 4.64×10^7 cells L⁻¹ であった。

湖水のジェオスミン濃度は、9月16日には生試料、ろ過試料それぞれ 3 ng L⁻¹, 1 ng L⁻¹ であった。9月24日にはそれぞれ 12 ng L⁻¹, 4 ng L⁻¹ に増加し、10月27日にそれぞれ極大値 640 ng L⁻¹, 20 ng L⁻¹ を記録した。その後、ジェオスミン濃度は減少に転じ、11月4日はそれぞれ 413 ng L⁻¹, 17 ng L⁻¹ であった。Fig. 4-6 にジェオスミン濃度と *Coelosphaerium* sp. 細胞数の経日変化を示す。

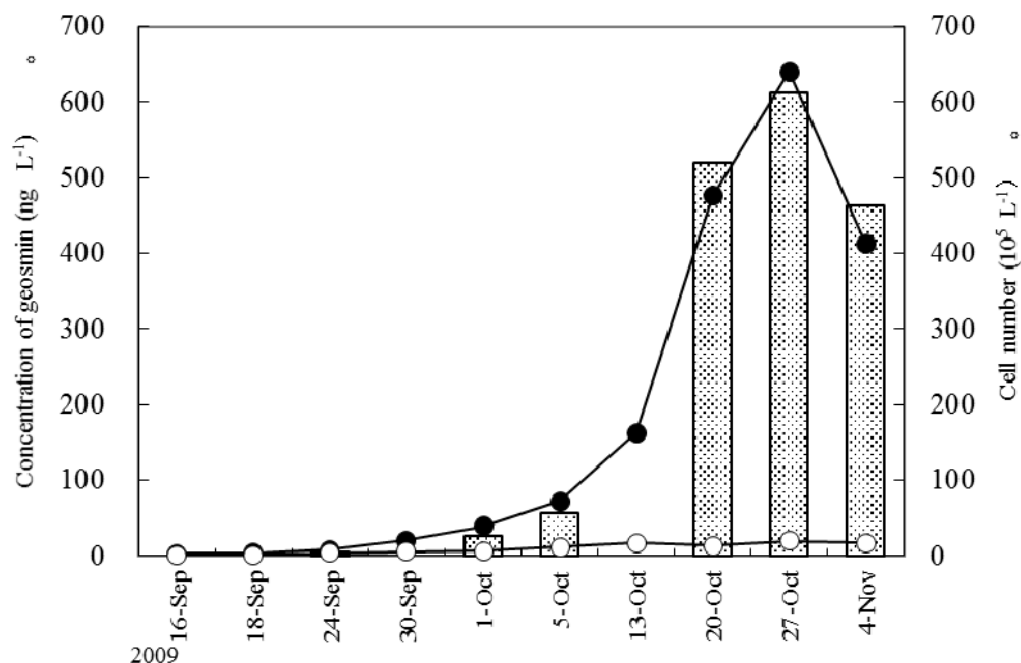


Fig. 4-6. Change in geosmin concentration in raw (filled circle) and filtered (open circle) water samples at the central point, from 16 September to 4 November 2009 (no data on 13 October). Changes in cell numbers of *Coelosphaerium* sp. (hatched bar) are also indicated

ジェオスミン濃度と *Coelosphaerium* sp.の細胞数の変化は良く同調していた。その間、フィールドでの調査者のカビ臭の関知状況は、10月20日までは臭いを感じず、次の調査日の10月27日に初めてカビ臭を感知したが、11月4日には感知しなかった。一方、採取後実験室で再度カビ臭を確認すると、10月5日以降はカビ臭が感じられた。

Fig. 4-7 に、この期間中の、湖水中の *Coelosphaerium* sp.の細胞数とジェオスミン濃度の相関図を示す。*Coelosphaerium* sp.の細胞数と湖水生試料中のジェオスミン濃度の相関係数は $R^2 = 0.99$ と極めて高い一次相関性が示された。

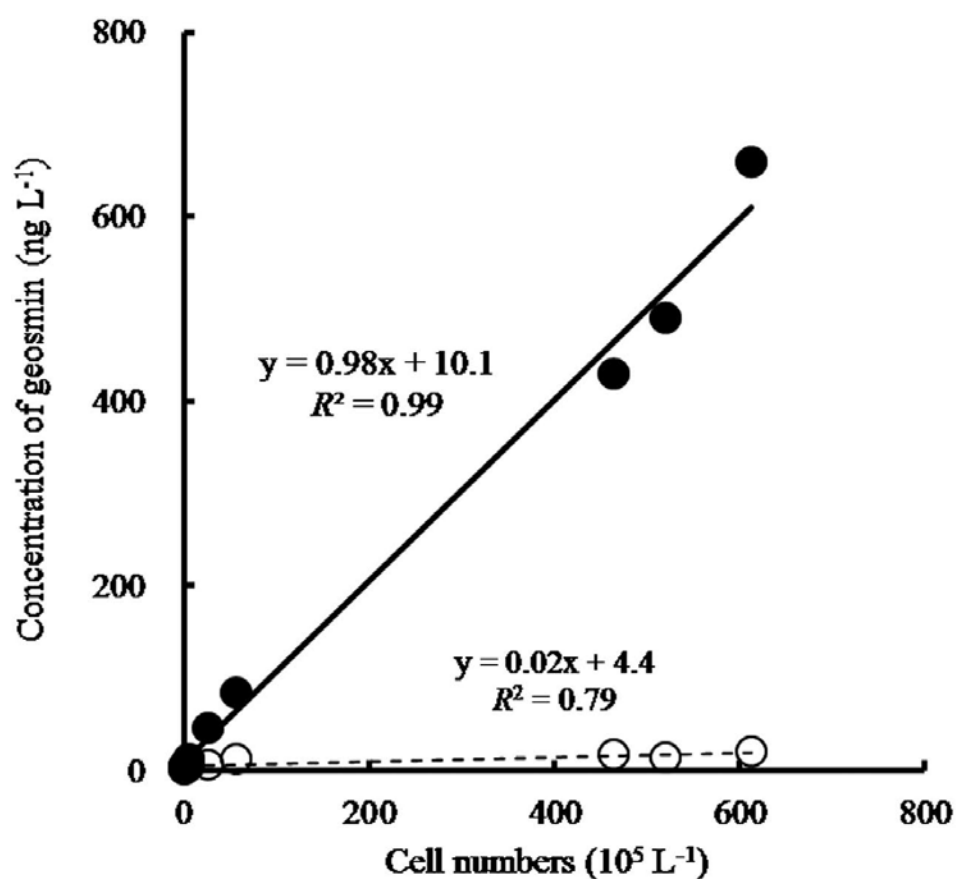


Fig. 4-7. Correlation analysis. Correlation plots between the concentration of geosmin and cell numbers of *Coelosphaerium* sp. from September 16 to November 4, 2009. Filled and open circles indicate raw and filtered sample, respectively.

4. 4 考察

宍道湖湖心の表層水から G2 株を作成した。この G2 株は形態学的特徴と PCR の解析から *Coelosphaerium* 属の 1 種のみが含まれていると結論づけた。更にこの G2 株は、無菌確認培地を用いた検査、エチジウムブロミドによる染色及び PCR-DGGE 法による 16S rRNA 解析の 3 つの結果から無菌であることが示された。また、ヘッドスペース GC/MS 分析の結果から、G2 株でジェオスミンが生成されていることが判明した。この結果は、*Coelosphaerium* 属の 1 種がジェオスミンを産生するという初めての事例である。

Persson (1983) はある生物がカビ臭物質を作るか作らないかを判断する基準として、次の 3 つの事項をあげている。

- ① 生態学的証明：カビ臭とその微生物とが同じ水域に発生すること
- ② 培養によって生成したカビ臭の嗅覚による確認
- ③ 臭気物質の化学分析による同定

この基準に従って *Coelosphaerium* sp. がジェオスミンを産生するかどうか確認を行い、いずれにも合致していることを示した。加えて、湖水中の *Coelosphaerium* sp. の細胞数とジェオスミン濃度の間に良い相関関係があることも確認した (Fig. 4-7)。以上のことから、宍道湖における 2009 年秋季のジェオスミンによるカビ臭の原因は *Coelosphaerium* sp. によるものと結論づけた。

様々なシアノバクテリアがジェオスミンもしくは 2-MIB を産生することが知られているが (Watson et al. 2016)，*Coelosphaerium* 属の 1 種がジェオスミンを産生するシアノバクテリアであることはこれまで知られていなかった。

従って、本章の元となる論文 (godo et al., 2017) は、*Coelosphaerium* 属の 1 種がジェオスミンを産生するという初めての報告となった。加えて、本種の 16S rRNA と 16S-23S rRNA ITS 領域のヌクレオチド配列の解析を行った初めての報告でもあった。

水中のジェオスミン濃度の人が感じる閾値は個人差はあるものの $4\sim 10\text{ ng L}^{-1}$ 以上といわれている (Watson, 2003; Krasner et al., 1983; Mallevialle, J. & Suffet, I. H., 1987; Jensen et al., 1994; Young et al., 1996)。今回の調査において、全ジェオスミン濃度は、2008 年 9 月 24 日は 12 ng L^{-1} 、9 月 30 日は 27 ng L^{-1} であり、その後上昇していったが、現場もしくは実験室では 10 月 5 日以降にカビ臭が感じられた。ろ過水のジェオスミン濃度は 10 月 5 日に 12 ng L^{-1} を示し、その後しばらくはそれよりも高い値であった。これらの結果は、ジェオスミンの臭いは藻体の細胞内にあるものを含む全ジェオスミン濃度よりも、水中にとけ込んでいるジェオスミン濃度に関連していると考えられる。2008 年春に穴道湖で観察された同様の現象は、神門ら (2015) により確認されており、第 2 章においても記載している。

穴道湖において、植物プランクトンの観察は 1969 年より定期的に行われているが、*Coelosphaerium* sp. は水温が 15°C 前後の春及び秋にふつうに発生している種類である (大谷, 1997)。1969 年以降で、穴道湖においてカビ臭らしき臭いが記録されているのは 5 例しかない。1 例目は、1987 年 12 月の事例 (川上ら, 1988) で、詳細な記録は残されておらず、科学的な考察はなされていないが、貴重な資料である。2 例目は 1993 年の 9 月の事例 (江角, 1995) で、穴道湖で強いカビ臭が発生した。当時 GC/MS 等の分析機器がなく、同定は出来なかったが、臭いからしておそらくジェオスミンであろうと考えられた。この時、*C. kuetzinganum* は観測されていたが、優先種とまではなっていなかった。一方この時期、カビ臭を産生する種である *Phormidium* と思われる種が確認されていた (江角 1995)。この年の 11 月から翌年の 3 月にかけて *C. kuetzinganum* が計測できるほど優先したが、カビ臭は感じられず、苦情等も寄せられなかった。3 例目以降は 2007 年 5 月から 2009 年にかけて起こった。*Coelosphaerium* sp. が観測され、ジェオスミンが検出された。2010 年以降、*Coelosphaerium* sp. は観測されるものの、カビ臭は感じられない状態が続いている。

宍道湖では、*Coelosphaerium* sp. は極めて良く出現する種であるが、カビ臭は数年から十数年ごとにしか発生せず、カビ臭が発生しない期間の方が遙かに多い。Schrader et al. (2011) はタンク実験において *Coelosphaerium* sp. が大量に存在したがカビ臭は感じられず、機器分析においても不検出であったとしている。Oikawa and Ishibashi (2004) は、*Pholmidium tenue* には、カビ臭生産株と非生産株があり、遺伝的に異なるグループであることを報告している。これらのことから、宍道湖の *Coelosphaerium* sp. には2つもしくはそれ以上の遺伝的に異なるグループが存在し、その内のいくつかだけがジェオスミンを産生するのではないかと考えられる。シアノバクテリアにおけるジェオスミン生合成遺伝子はすでに解明されているものがあり (Ludwig et al., 2007; Giglio et al., 2008) , 今後、宍道湖の *Coelosphaerium* sp. についても、ジェオスミン生合成遺伝子を決定していく予定である。

第5章 おわりに

5. 1 本研究のまとめ

- ① 環境水中のジェオスミンを三つの定量法により測定し、それぞれの測定法の特徴を明らかにするとともに、ジェオスミンの存在が細胞内か外かにより測定結果が異なることが示された。カビ臭のモニタリングには溶存態ジェオスミン濃度の調査が重要であることが分かった。しかし、その水域のジェオスミンのポテンシャルという観点からみると、全ジェオスミンの定量が肝要であり、その定量には公定法に準じた HS-GC/MS 法または 80°C で加温した試料を SP-GC/MS 法で測定する必要があることが分かった。
 - ② 2008 年のカビ臭発生時の湖水について密度勾配液を用いて比重分離し、比重ごとにジェオスミン濃度の測定と構成する生物種の観察を行った。ジェオスミンの濃度と、シアノバクテリアであるコエロスファエリウム細胞数との間に密接な関係がみられた。また、その他ジェオスミンの濃度やプランクトンの観察結果の推移から総合的に判断して、宍道湖のカビ臭であるジェオスミンの産生生物は藍藻コエロスファエリウムの可能性が高いことが判明した。
 - ③ 再度カビ臭が発生し始めた、2009 年 10 月の宍道湖湖心の表層水を用いて、コエロスファエリウムの純粋培養を試みた。純粋培養は成功し、この培養株からジェオスミンが産生することが分かった。このことから宍道湖産コエロスファエリウムがジェオスミンを産生することが明らかになった。また、コエロスファエリウムが属するシアノバクテリアのシネココックス目でカビ臭を産生する種としては初めての発見である。
- また、2007 年～2009 年までの宍道湖のカビ臭の原因生物は本種と考えられた。

5. 2 今後の展望

これまでの研究で、宍道湖産コエロスファエリウムがジェオスミンを産生することが明らかになった。シアノバクテリアのシネココックス目に属するものがカビ臭を算出するという報告は初めてのものである。

また、宍道湖のカビ臭の原因もこのコエロスファエリウムによるものであることが明らかとなった。

しかし、コエロスファエリウムが優占している場合であってもカビ臭がせず、このコエロスファエリウムがカビ臭を産生しない事例も確認されており、今後の検討が必要である。そこで、カビ臭を産生するものとししないものの遺伝子解析を行い、ジェオスミン生合成遺伝子の有無を検討すべきであると考えている。

参考文献

秋山優 (1975) : 宍道湖のプランクトンおよび着生藻類の推移に関する調査. 中海・宍道湖の水質保全に関する調査報告書 (第 1 報), 島根県: 31-53.

秋山優 (1976) : 宍道湖のプランクトンおよび着生藻類の推移に関する調査. 中海・宍道湖の水質保全に関する調査報告書 (第 2 報), 島根県: 23-58.

秋山優 (1977) : 宍道湖のプランクトンおよび着生藻類の推移ならびに淡水藻類の発生予察に関する調査. 中海・宍道湖の水質保全に関する調査報告書 (第 3 報), 島根県: 25-72.

秋山優 (1978) : 宍道湖のプランクトンおよび着生藻類の推移ならびに淡水藻類の発生予察に関する調査. 中海・宍道湖の水質保全に関する調査報告書 (第 4 報), 島根県: 25-52.

秋山優 (1979) : 宍道湖水系におけるプランクトンおよび着生藻類の推移ならびにその生態学的研究. 中海・宍道湖の水質保全に関する調査報告書 (第 5 報), 島根県: 33-62.

秋山優 (1981) : 宍道湖水系におけるプランクトンおよび着生藻類の推移ならびにその生態学的研究. 中海・宍道湖の水質保全に関する調査報告書 (第 6 報), 島根県: 27-54.

秋山優 (1982a) : 宍道湖・中海の藻類. 遺伝 **36** (10) : 90-94.

秋山優 (1982b) : 中海・宍道湖水系における植物プランクトンおよび着生藻類の推移
ならびにその生態学的研究 (VII). 中海・宍道湖の水質保全に関する調査報告
書 (第 7 報), 島根県: 23-49.

秋山優 (1983) : 中海・宍道湖水系における植物プランクトンおよび着生藻類の推移
ならびにその生態学的研究 (VIII). 中海・宍道湖の水質保全に関する調査報
告書 (第 8 報), 島根県: 29-52.

秋山優 (1984) : 中海・宍道湖水系における植物プランクトンおよび着生藻類の推移
ならびにその生態学的研究 (IX). 中海・宍道湖の水質保全に関する調査報告
書 (第 9 報), 島根県: 13-37.

秋山優 (1985) : 中海・宍道湖水系における植物プランクトンおよび着生藻類の推移
ならびにその生態学的研究 (X). 中海・宍道湖の水質保全に関する調査報告
書 (第 10 報), 島根県: 23-49.

秋山優 (1986) : 中海・宍道湖水系における植物プランクトンおよび着生藻類の推移
ならびにその生態学的研究 (XI). 中海・宍道湖の水質保全に関する調査報告
書 (第 11 報), 島根県: 26-38.

秋山優 (1991) : 中海・宍道湖水系における植物プランクトンおよび着生藻類の推移ならびにその生態学的研究 (XII). 中海・宍道湖の水質保全に関する調査報告書 (第 12 報), 島根県: 1-20.

伊達善夫編 (1990) : 中海・宍道湖の水質およびプランクトンに関する研究. 宍道湖・中海淡水湖化に伴う水管理及び生態変化に関する研究委員会, 水質・プランクトン小委員会, p348.

Engle C. R., Pounds G. L., van der Ploeg M. (1995) : The cost of off flavor. *J. World Aquac. Soc.* **26**: 297–306.

衛生試験法・注解 日本薬学会編 (1990) : 金原出版

江角比出郎 (1992) : 宍道湖中海の植物プランクトンの調査結果について (1992 年度). 島根県衛生公害研究所報 **34**: 99–105.

江角比出郎 (1995) : 宍道湖中海の植物プランクトンの調査結果について (1993 年度). 島根県衛生公害研究所報 **35**: 76–83.

福田俊治 (2008a) : 宍道湖の水と泥からのカビ臭. 第 22 回島根県保健環境科学研究
所研究発表会抄録集 p13.

福田俊治 (2008b) : 宍道湖で発生したカビ臭について. 第 49 回島根県保健福祉環境
研究発表会抄録集 p3.

Francis G. (1878) : Poisonous Australian Lake. *Nature* **18**: 11–12.

Fukushima H, Katsube K, Hata Y, Kishi R, Fujiwara S (2007) Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and realtime PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 92–100.
doi:10.1128/AEM.01772-06

古里栄一, 浅枝隆, 須藤隆一 (2003a) : アンテナ色素の吸光特性に基づく藍藻類の光学および水理学的発生条件に関する理論的考察—減衰スペクトル特性と混合水深—. 水環境学会誌 **26**: 277-284.

古里栄一, 浅枝隆, 須藤隆一 (2003b) : アンテナ色素の吸光特性に基づく藍藻類の光学および水理学的発生条件に関する現地データを用いた考察—アンテナ色素・浮力周波数仮説—. 水環境学会誌 **26**: 285-293.

Gerber, N. N., Lechevalier, H. A. (1965) : Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes. *Appl. Microbiol.* **13**: 935–938.

Giglio S., Jiang J., Saint C. P., Cane D., Monis P. T. (2008) : Isolation and Characterization of the Gene Associated with Geosmin Production in Cyanobacteria. *Environ Sci Technol.* **42**: 8027–8032.

Godo T., Kato K., Kamiya H., Ishitobi Y. (2001) : Observation of wind-induced two-layer dynamics in Lake Nakaumi, a costal lagoon in Japan. *Limnology* **2**: 137–143.

- Godo T., Ohtani S., Saki Y., Ishitobi Y. (2011) : Detection of geosmin from *Coelosphaerium kuetzingianum* separated by a step density gradient medium from suspended materials in water in Lake Shinji, Japan. *Limnology* **12**: 253–260.
- Godo T., Saki Y., Nojiri Y., Tsujitani M., Sugahara S., Hayashi S., Kamiya H., Ohtani S., Seike Y. (2017) : Geosmin-producing Species of *Coelosphaerium* (Synechococcales, Cyanobacteria) in Lake Shinji, Japan. *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/srep41928.
- 神門利之, 大城等, 野尻由香里, 管原庄吾, 神谷宏, 清家泰 (2015) : 環境水中ジェオスミンの三つの定量法による測定値の差の要因. *分析化学* **64**: 769–773.
- 萩原富司, 矢木修身, 高村義親, 須藤隆一 (1984) : 霞ヶ浦に発生する *Microcystis aeruginosa* の純粋分離. *水質汚濁研究* **7**: 437–442.
- Hayes S. J., Hayes K. P., Robinson B.S. (1991) : Geosmin as an odorous metabolite in culture of free-living amoeba, *Vannella* species (Gimnamoebia, Vannelidae). *J Protozool* **38**: 4–47.
- Hiraishi A., Inagaki K., Tanimoto Y., Iwasaki M., Kishimoto N., Tanaka H. (1997) : Phylogenetic characterization of a new thermoacidophilic bacterium isolated from hot springs in Japan. *J Gen Appl Microbiol* **43**: 295–304.

- Huong N. L., Itoh K., Miyamoto M., Suyama K., Yamamoto H. (2007) Chlorophenol hydroxylase activity encoded by TfdB from 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-degrading *Bradyrhizobium* sp. strain RD5-C2. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **71**: 1691–1696.
- Huong N. L., Itoh K., Suyama K. (2008) : 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)- and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)-degrading bacterial community in soil–water suspension during the enrichment process. *Microbes Environment* **23**: 142–148.
- Ichimura T., Watanabe M. M. (1974) : The *Closterium calosporum* complex from the Ryukyu Islands – Variation and taxonomical problems. *Mem. Natn. Sci. Mus. Tokyo* **7**: 89-102.
- Ichimura T., Watanabe M. (1977) : An axenic clone of *Microcystys aeruginosa* Kutz. emend. Elenkin from Lake Kasumigaura. *Bull. Jpn. Soc. Phycol.* **25**: 177-181.
- 市村輝宜, 伊藤忠夫 (1977) : 17 微細藻類の保存法 (I) 微生物の保存法, 根井外喜男編, 東京大学出版会, 355-373.
- Ishitobi Y., Kamiya H., Hayashi K., Gomyoda M. (1989) : The tidal exchange in Lake Shinji under low discharge conditions. *Japanese Journal of Limnology* **50**: 105-113.

Ishitobi Y., Kamiya H., Itogawa H. (1993) : Tidal, meteorological and hydrological effects on the water level variation in a lagoon, Lake Shinji, Japan. *Japanese Journal of Limnology* **54**: 69-79.

Izaguirre G., Hwang C. J., Krasner S. W., McGuire M. J. (1982) : Geosmin and 2-methylisoborneol from cyanobacteria in three water supply systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 708–714.

Jensen S. E., Anders C. L., Goatcher L.J., Perley T., Kenefick S., Hrudey S. E. (1994) : Actinomycetes as a factor in odour problems affecting drinking water from the North Saskatchewan River. *Water Res.* **28**: 1393–1401.

Jüttner F. (1995) : Physiology and biochemistry of odorous compounds from freshwater cyanobacteria and algae. *Water Sci. Technol.* **31**: 69–78.

Jüttner F., Watson S. B. (2007) : Biochemical and ecological control of geosmin and 2-methylisoborneol in source waters. *Appl Environ Microbiol* **73**: 4395-4406.

神谷宏, 安田幸伸, 川津充夫, 石飛裕, 林喬一郎 (1983) : 昭和 58 年度の穴道湖・中海調査結果について. 島根県衛生公害研究所報 **25**: 83-99.

神谷宏 (1991) : 穴道湖・中海の植物プランクトン調査結果について. 島根県衛生公害研究所報 **33**: 98-100.

神谷宏 (1994) : 穴道湖・中海の植物プランクトン調査結果 (平成 6 年度). 島根県衛生公害研究所報 **36**: 104-110.

神谷宏 (1995) : 穴道湖・中海の植物プランクトン調査結果 (平成 7 年度). 島根県衛生公害研究所報 **37**: 94-98.

神谷宏, 石飛裕, 井上徹教, 中村由行, 山室真澄 (1996) : 夏季の穴道湖の底層水に蓄積する栄養塩の起源. 陸水学雑誌 **57**: 313-326.

神谷宏, 北脇悠平, 崎幸子, 福田俊治, 吉岡勝廣, 後藤宗彦, 石飛裕 (2009) : 穴道湖中海水質調査結果 (2007 年度). 島根県保健環境科学研究所報 **49**: 113-117.

神谷宏, 管原庄吾, 嵯峨友樹, 佐藤紗知子, 野尻由香里, 岸真司, 藤原敦夫, 神門利之 (2014) : 浅い汽水湖沼における夏季に堆積物から溶出したリンの湖底への再沈降割合とその機構. 陸水学雑誌 **76**: 139-148.

環境省 (2014) : 日本の汽水湖—汽水湖の水環境の現状と保全—.

川上誠一, 石飛裕, 高橋順一, 神谷宏, 林喬一郎 (1988) : 穴道湖・中海のナノプランクトン調査 (昭和 62 年度及び昭和 63 年度の結果から). 島根県衛生公害研究所報 **30**: 77-89.

川上誠一, 黒崎理恵, 神谷宏, 高橋順一, 石飛裕, 林喬一郎 (1990) : 宍道湖・中海のナノプランクトン調査結果について (1989 年 4 月－1991 年 3 月). 島根県衛生公害研究所報 **32**: 101-125.

Kikuchi T., Kadota S., Suehara H., Nishi A., Tsubaki K., Yano H., Hariyama K. (1983) : Odorous metabolites of fungi, *Chaetomium globosum* KINZE ex FR and *Botrytis cinerea* PERS ex FR, and a blue-green algae, *Phormidium tenue* (MENEHINI) GOMONT. *Chem. Pharm. Bull.* **31**: 659-663.

気象庁：過去の気象データ検索

<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>

Klausen C., M. H. Nicolaisen, B. W. Strobel, F. Warnecke, J. L. Nielsen, N. O.G. Jørgensen (2005) : Abundance of actinobacteria and production of geosmin and 2-methylisoborneol in Danish streams and fish ponds. *FEMS Microbiology Ecology* **52**: 265-278.

Komárek J., Hindak F. (1988) : Taxonomic review of natural populations of the cyanophytes from the *Gomphosphaeria*-complex. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* **80** (Algological Studies 50–53): 203–225.

Komárek, J., Anagnostidis, K. (1998) : Cyanoprokaryota. 1. Teil: Chroococcales In *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/1 (eds Ettl, H., Gärtner, G., Heynig, H. & Mollenhauer, D.): 548 pp. (Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm).

Komárek J., Kaštovský J., Mareš J., Johansen J. R. (2014) : Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* **86**: 295-335.

Kondo K., Seike Y., Date Y. (1990) : Relationship between phytoplankton occurred and salinity or water temperature in brackish lake Nakanoumi, 1979-1986. *Jpn. J. Limnol.* **51**: 173-184.

厚生労働省 (2013): 水質基準に関する省令. 平成 15 年 5 月 30 日付け, 厚生労働省令第 101 号

Krasner S. W., Huang C. J., McGuire M. J. (1983) : A standard method for quantification of earthy-musty odorants in water, sediments and algal cultures. *Water Sci. Technol.* **15**: 127-138.

工藤 勝弘, 河上智行, 山田正 (2004) : ダム貯水池におけるフォルミディウムとカビ臭. 水文・水資源学会誌 **17**: 331-342.

Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016) : MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*.

Lanciotti E., C. Santini, E. Lupi, D. Burrini (2003) : Actinomycetes, cyanobacteria and algae causing tastes and odours in water of the River Arno used for the water Supply of Florence. *Journal of Water Supply: Research and Technology* **52**: 489-500.

Ludwig F., Medger A., Börnick H., Opitz M., Lang K., Göttfert M., Röske I. (2007) : Identification and expression analyses of putative sesquiterpene synthase genes in *Phormidium* sp. and prevalence of geoA-like genes in a drinking water reservoir. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6988-6993.

Mallevalle J., I.H. Suffet (1987) : Identification and Treatment of Tastes and Odors in Drinking Water. *American Water Works Association*, Chapter 5.

増木新吾, 戸島邦哲, 別所大, 和田洋一, 管原庄吾 (2013) : 宍道湖西岸十四間川における青潮発生時の水質変化. *水環境学会誌* **36**: 143-148.

水資源開発公団試験研究所水環境研究室 (2000) : ダム貯水池の水質. 試験研究所報告書 99405: 41-42.

永瀬知美, 奥田益算, 若林健二 (2008) : 湖山池のカビ臭原因プランクトンに関する研究. *鳥取県衛生環境研究所報* **49**: 24-29.

Nägeli C. (1849) : *Gattungen einzelliger Algen physiologisch und systematisch bearbeitet*. 139 pp., 8 pls. (Friedrich Schulthess, Zürich,) (in German)

中島結衣, 大谷修司 (2013) : 宍道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果 (2013年度) 概要. *島根県保健環境科学研究所報* **55**: 77-79.

中村寿子 (1988) : 琵琶湖産のカビ臭原因藍藻類 *Phormidium* の分類および生理学的検討—落射蛍光顕微鏡による MIB 産生・非産生株の分別計数—. 用水と廃水 **30**: 872-879.

中村寿子 (1989) : 糸状藍藻類の種類および形態変化と臭気. 用水と廃水 **31**: 908-915.

根来健, 安藤政義, 市川延繁 (1984) : かび臭発生機構—藍藻類—用水と廃水 **26**: 831-836.

Nielsen J. L., Klausen C., Nielsen P. H., Burford M., Jørgensen N. O. G. (2006) : Detection of activity among uncultured Actinobacteria in a drinking water reservoir. *FEMS Microbiol Ecol.* **55**: 432–438

日本水道協会 (2011) : 上水試験方法 2011 年版. 日本水道協会.

日本薬学会編 (1990) : 衛生試験法・注解. 金原出版.

野尻由香里, 崎幸子, 大谷修司 (2011) : 穴道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果 (2011 年度). 島根県保健環境科学研究所報 **53**: 53-61.

野尻由香里, 佐藤紗知子, 大谷修司 (2012) : 穴道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果 (2012 年度) 概要. 島根県保健環境科学研究所報 **54**: 66-68.

野尻由香里, 小林結衣, 大谷修司 (2014): 穴道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果 (2012, 2013, 2014 年度). 島根県保健環境科学研究所報 **56**: 65-106.

大谷修司 (1996): 穴道湖・中海水系の藻類. 穴道湖・中海の藻類研究会 : 1-34. 高浜印刷, 松江.

大谷修司 (1997): 穴道湖・中海水系の植物プランクトンの種類組成と経年変化. 沿岸海洋研究 **35**: 35-47.

大谷修司 (2005): 穴道湖・中海の植物プランクトンの種組成と現存量の経年変化. 環境省水環境部, 平成 16 年度湖沼水質保全対策・総合レビュー検討調査報告書 : 197-216.

大谷修司, 神門利之, 景山明彦, 芦矢亮, 嘉藤健二, 藤江教隆 (1996): 穴道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果 (平成 8 年度). 島根県衛生公害研究所報 **38**: 115-122.

大谷修司, 神門利之, 景山明彦, 芦矢亮, 嘉藤健二, 藤江教隆, 朱根海 (1997): 穴道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果 (平成 9 年度). 島根県衛生公害研究所報 **39**: 72-78.

大谷修司, 嘉藤健二, 景山明彦, 芦矢亮, 福田俊治, 藤江教隆, 朱根海 (1998): 穴道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果 (平成 10 年度). 島根県衛生公害研究所報 **40**: 94-103.

大谷修司, 景山明彦, 福田俊治, 生田美抄夫, 三島幸司, 藤江教隆 (1999): 宍道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果 (平成 11 年度). 島根県衛生公害研究所報 **41**: 123-132.

大谷修司, 福田俊治, 三島幸司, 松尾豊, 生田美抄夫, 小川俊介 (2000): 宍道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果 (平成 12 年度). 島根県保健環境科学研究所報 **42**: 89-97.

大谷修司, 三島幸司, 石原純子, 松尾豊, 神谷宏, 川田一喬, 江原亮 (2001): 宍道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果 (2001 年度). 島根県保健環境科学研究所報 **43**: 151-161.

大谷修司, 三島幸司, 石原純子, 後藤宗彦, 神谷宏, 狩野好宏, 江原亮 (2003): 宍道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果 (2002, 2003 年度). 島根県保健環境科学研究所報 **45**: 117-136.

大谷修司, 江角周一, 後藤宗彦, 神谷宏, 狩野好宏, 江原亮 (2004): 宍道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果 (2004 年度). 島根県保健環境科学研究所報 **46**: 99-111.

大谷修司, 狩野好宏, 福田俊治, 神谷宏, 吉岡勝廣, 後藤宗彦 (2005): 宍道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果 (2005 年度). 島根県保健環境科学研究所報 **47**: 99-109.

大谷修司, 北脇悠平, 崎幸子, 狩野好宏, 福田俊治, 神谷宏, 吉岡勝廣, 後藤宗彦, 石飛裕 (2006): 穴道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果 (2006 年度). 島根県保健環境科学研究所報 **48**: 108-115.

大谷修司, 北脇悠平, 崎幸子, 福田俊治, 神谷宏, 吉岡勝廣, 後藤宗彦, 石飛裕 (2007): 穴道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果 (2007 年度). 島根県保健環境科学研究所報 **49**: 118-125.

大谷修司, 崎幸子, 神門利之 (2008): 穴道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果 (2008 年度). 島根県保健環境科学研究所報 **50**: 99-103.

Oikawa E. & Ishibashi Y. (2004) : Species specificity of musty odor producing *Phormidium tenue* in Lake Kamafusa. *Water Sci. Technol.* **49**: 41–46.

Percival S., Drabsch P., Glencross B. (2008) : Determining factors affecting muddy-flavour taint in farmed barramundi. *Lates calcarifer Aquaculture* **284**: 136-143.

Persson P. E. (1983) : Off-flavours in aquatic ecosystems – an introduction. *Water Sci. Technol.* **15**: 1–11.

Persson P. E. (1988) : Odorous algal cultures in culture collections. *Water Sci. Technol.* **20**: 211–213.

Pringsheim E. G. (1946) : Pure culture of algae, their preparation and maintenance. : p119.

Cambridge University Press, Cambridge

Rajaniemi-Wacklin P., Anne Rantala, Maria. A. Mugnai, Silvia Turicchia, Stefano Ventura,

Jarka Komárková, Liisa Lepistö, Kaarina Sivonen (2005) : Correspondence between phylogeny and morphology of *Snowella* spp. and *Woronichinia naegeliana*, cyanobacteria commonly occurring in lakes. *J. Phycology* **42**: 226–232.

Rueckert A., Wood S. A., Cary S. C. (2007) : Development and field assessment of a

quantitative PCR for the detection and enumeration of the noxious bloom-former *Anabaena planktonica*. *Limnol. Oceanogr. Meth.* **5**: 474–483.

Safferman R. S., Rosen A. A., Mashini C.I., Morris M.E. (1967) : Earthly-smelling substance

from a blue-green alga. *Environ. Sci. Technol.* **1**: 429-430.

山陰中央新報 (1993) : 山陰中央新報社, 1993 年 9 月 17 日発行

山陰中央新報 (2007): 山陰中央新報社, 2007 年 5 月 20 日発行

Sato T, Matsumoto K, Okumura T, Yokoi W, Naito E, Yoshida Y, Nomoto K, Ito M, Sawada

H. (2008) : Isolation of lactate-utilizing butyrate-producing bacteria from human feces and in vivo administration of *Anaerostipes* strain L2 and galacto-oligosaccharides in a rat model. *FEMS Microbiol. Ecol.* **66**: 528–536.

崎幸子, 神門利之, 大谷修司 (2009): 宍道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果 (2009 年度). 島根県保健環境科学研究所報 **51**: 79-86

崎幸子, 神門利之, 大谷修司 (2010): 宍道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果 (2010 年度). 島根県保健環境科学研究所報 **52**: 79-86.

崎幸子, 大谷修司 (2015) : 宍道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果 (2015 年度). 島根県保健環境科学研究所報 **57**: 69-83.

Schrader K. K., Green B. W., Perschbacher P. W. (2011) : Development of phytoplankton communities and common off-flavours in a biofloc technology system used for the culture of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquacultural Engineering* **45**: 118–126.

Smith J. L., Boyer G. L., Zimba P. V. (2008) : A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture* **280**: 5–20. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.05.007

島根県保健環境科学研究所 (2008) : 平成 20 年度春季の宍道湖のカビ臭について. 平成 19・20 年度調査研究中間報告書, 島根県保健環境科学研究所.

島根県環境生活部環境政策課 (2011) : H22 宍道湖で発生したアオコについて
http://www.pref.shimane.lg.jp/shinjiko_nakaumi/suisitu_zyouka_torikumi/sinnziko_suisitu.data/22_02_06.pdf

Someya T. (1995) : Three-dimensional observation of soil bacteria in organic debris with a confocal laser scanning microscope. *Soil Microorg.* **46**: 61–69.

染谷孝, 王曉丹, 龔春明, 越田淳一, 中川秀明, 田中智佳子, 石橋正文, 横堀加奈里, 井上興一 (2003) : 蛍光染色による土壌・堆肥中の特異的微生物検出技術 土と微生物 **57**: 115–123.

須藤隆一, 稲森悠平, 杉浦則夫 (1989) : 水環境におけるカビ臭の生成. 臭気の研究 **20**: 328-338.

杉浦則夫 (1989) : 霞ヶ浦のカビ臭原因生物と環境要因. 用水と廃水 **31**: 876–881.

Sugiura N., Inamori Y., Hosaka Y., Sudo R., Takahashi G. (1994) : Algae enhancing musty odor production by streptomycetes in Lake Kasumigaura. *Hydrobiologia* **288**: 57–64.

Sugiura N., Utsumi M., Bin Wei, Iwami N., Okano K., Kawauchi Y., Maekawa T. (2004) : Assessment for the complicated occurrence of nuisance odours from phytoplankton and environmental factors in a eutrophic lake. *Lakes & Reservoirs, (research & management)* **9**: 195-201.

巢山弘介 (2008) : カビ臭物質を生成する放線菌の同定と生体に関する研究. 受託研究成果報告書: p10.

巢山弘介 (2009) : 穴道湖におけるカビ臭物質生成生物に関する研究. 受託研究成果
報告書: 9-10.

Tilden J. (1910) : Minnesota Algae Volume I. The Myxophyceae of North America and
Adjacent Regions Including Central America, Greenland, Bermuda, The West Indies
and Hawaii. *Report of the Survey*. Botanical Series 8: 328 pp., 20 pls. Minneapolis.

Watson S. B., Brownlee B., Satchwill T., McCauley E. (2000) : Quantitative analysis of trace
levels of geosmin and MIB in source and drinking water using headspace SPME.
Water Res. **34**: 2818-2828.

Watson S. B. (2003) : Cyanobacterial and eukaryotic algal odour compounds: signals or
by-products? A review of their biological activity. *Phycologia* **42**: 332–350.

Watson S. B., J. Ridal, and G. L. Boyer (2008) : Taste and odour and cyanobacterial toxins:
impairment, prediction, and management in the Great Lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*
65: 1779–1796.

Watson S. B., Monis P., Baker P., Giglio S. (2016) : Biochemistry and genetics of taste- and
odor-producing cyanobacteria. *Harmful Algae* **54**: 112-127.

Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. (1991) : 16S ribosomal DNA
amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriology* **173**: 697–703.

Westerhoff P., Rodriguez-Hernandez M., Baker L., Sommerfeld M. (2005) : Seasonal occurrence and degradation of 2-methylisoborneol in water supply reservoirs. *Water Res.* **39**: 4899-4912.

八木正一 (1984) : 水道におけるかび臭障害の現状. 用水と廃水 **26**: 813-822.

Yamamoto Y., Tanaka K., Komori N. (1994) : Volatile compounds excreted by mysobacteria isolated from lake water and sediments. *Japanese Journal of Limnology* **55**: 241-245.

山本 鎔子, 辰巳 和子, 土崎 尚史, 田中 和明 (2001) : 多摩川の河床礫付着膜から単離したカビ臭産生微生物の特徴について. 日本土壌肥料学雑誌 **72**: 9-17.

山室真澄, 神谷宏, 石飛裕 (2011) : 汽水湖沼である穴道湖における成層に伴う貧酸素化と COD (Mn) との関係. 水環境学会誌 **34**: 57-64.

安田幸伸, 神谷宏, 川津充夫, 石飛裕, 林喬一郎 (1984) : 昭和 59 年度の穴道湖・中海調査結果について. 島根県衛生公害研究所報 **26**: 113-132.

安田幸伸, 神谷宏, 石飛裕, 川上誠一, 林喬一郎 (1986) : 昭和 61 年度の穴道湖・中海調査結果について. 島根県衛生公害研究所報 **28**: 98-101.

Young W. F., Horth H., Crane R., Ogden T., Arnott M. (1996) : Taste and odour threshold concentrations of potential potable water contaminants. *Water Res.* **30**: 331-340.

Zhang Z., Pawliszyn J. (1993) : Headspace Solid Phase Microextraction. *Analytical Chemistry*. **65**: 1843-1852.

謝辞

本研究の遂行にあたり、懇切丁寧なご指導ご鞭撻を賜った清家泰教授に衷心より感謝の意を表します。NPO法人自然と人間環境研究機構理事長石飛裕博士には、本研究のいくつかのブレークスルーに対するアイディアをいただいたとともに、研究に対する心構えなど、研究者としての基本から教えていただき、また、全てのことに對して常に真摯に對應していただきましたことを心より感謝申し上げます。共同研究の中心であり、私に多くのあたたかいご指導ご助言を賜った島根大学教育学部大谷修司教授に心からお礼申し上げます。島根県保健環境科学研究所環境科学部長神谷宏博士には、水環境科に在籍した合計9年間において本研究に関して多大なるご指導やご助言を賜り、研究所から異動後も論文をまとめる際に暖かくご支援して頂き感謝申し上げます。本論文の特に遺伝子解析について指導をいただいた島根大学生物資源科学部林昌平助教に感謝申し上げます。本論文の作成に当たり、有益なご指導ご助言を賜った島根大学菅原庄吾助教に感謝申し上げます。島根県保健環境科学研究所所長大城等博士には暖かい助言や励ましを頂き感謝申し上げます。島根県保健環境科学研究所水環境科の皆様には試料の測定や暖かいご助力をいただき、心より感謝いたします。また、島根県立大学短期大学部故森山秀俊教授には研究を始めるはるか前の大学生時代から公私にわたり様々な助言をいただき心より感謝申し上げます。

研究に本格的に着手したのは2008年からで、以来9年が経過しようとしています。その間、私的には子育ての大事な時期でありましたが、休日に、時には深夜に論文を執筆する私をいつも暖かく応援してくれた妻留美子、明るくのびのびと育ち、時には実験の様子を見守ってくれた三姉妹の菜月、彩花、鈴菜に感謝します。