

宍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.

神門 利之

要旨

宍道湖・中海は斐伊川流域の下流部に位置し、また日本海にも近く水位差も少ないことから日本海からの海水の逆流の影響を受け、広大な汽水域を形成していることが特徴であるとともに、特に宍道湖は塩分の変動範囲が、湖内で生息する生物にとっては厳しい状況であり、生息する生物種は限定的なものとなっている。

湖沼水質保全特別措置法により指定湖沼となっている宍道湖・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、現在 6 期目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は見られるものの、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 年にかけてはかび臭が発生し、行政、研究者、住民ともその対応に苦慮した。

特に、発生初期においては、かび臭の原因物質がジェオスミンであることは早期に判明したが、原因生物は特定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、宍道湖のカビ臭産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。

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た。宍道湖の湖水試料に対し 80°C 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。HS-GC/MS 法でおよそ一週間ごとの測定を測定した 2008 年 4 月 14 日から 6 月 3 日までの宍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見ると、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 15~45 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。

また、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 法で測定するとともに、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。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。

さらに、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。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、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 ~ 630 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。これらの結果から、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 ~ 760 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。

以上のことから、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。

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た。

全段として、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を調べた。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、湖心についてはおおむね一致していたが、東部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 日の西部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、西部の底質のジェオスミン濃度は湖心や東部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。湖心及び東部においては、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おり、湖水起源であることを示唆する。

また、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調べた。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。緑藻 *Monoraphidium contortum* もほぼ同様の傾向を示している。珪藻 *Cyclotella* spp. 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. 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は毎週の調査からは見られなかった。

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。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。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細菌が付着している *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。

光学顕微鏡を用いた詳細な観察から, *Coelosphaerium* sp. 以外の物質を評価すると, ジェオスミン産生生物の存在は考えられなかったことから, 密度勾配液を使った分離実験からジェオスミンを産生する生物は *Coelosphaerium* sp. である可能性の高いことが示唆された。また, 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。

本章では, 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。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章では、宍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た。

培養に用いた 2009 年 10 月 5 日の宍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。

宍道湖において、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。

宍道湖で観察された本種のコロニーの形質は、過去の分類学的検討結果とも良く一致する。しかし、宍道湖のものは、ヨーロッパや北アメリカの試料と比べ、群体の直径が小さく、1 群体当たりの細胞数も少ないことから、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。

また、培養株 G2 が次の 3 つの基準を満たすことから、無菌であると結論づけた。

- 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

G2 株の 16S rRNA 及び 16S-23S rRNA の ITS 領域を含む 2028-bp の配列を BLAST 解析した結果、確かに *Coelosphaerium* sp. と判断された。この 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。

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、発生していたカビ臭はジェオスミンと同定した。

2009 年 9 月 16 日から 11 月 4 日の、湖水中の *Coelosphaerium* sp. の細胞数とジェオスミン濃度の相関を調べたところ、*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。

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。

第5章の今後の展望では、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。*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との報告もある。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、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。