

小川原湖における糸状藍藻類の発生メカニズムの解明と対策の検討事業

静一徳・眞家永光¹

目 的

形態的な特徴に乏しい異臭産生糸状藍藻類のモニタリング手法を確立し、小川原湖で異臭被害の原因となる糸状藍藻類の発生メカニズムを解明するとともに対策を検討する。

材料と方法

1. 糸状藍藻類モニタリング

(1) 調査月日

2017年4月～2017年12月（2018年1月～3月は結氷のため中止）

(2) 採水場所・水深（図1）

湖南：0m、5m、湖中央：0m、5m、10m、湖北：0m、5m、姉沼：0m、内沼：0m

2017年10月11日のみ：内沼、姉沼を除く9地点

(3) 調査体制

内水面研究所、北里大学

(4) 調査内容

各定点において表層はボトルを沈め、水面下10cmより湖水を直接採水し、水深5m、10mはバンドーン採水器により採水した。サンプルを冷蔵下で研究所に搬送後、1%ルゴール液で固定した。糸状藍藻はガス胞による浮上により沈殿濃縮が難しかったため、未濃縮サンプルを計数に供した。外部形態として、異質細胞やアキネートを持たず、トリコーム（糸状体）が真直ぐかやや曲がり、細胞隔壁部がくびれ、細胞幅が $1.6\mu\text{m}$ ～ $2.8\mu\text{m}$ 、細胞の長さが幅より長い特徴を有する糸状藍藻類を計数した。

高密度（ ≥ 500 本/mL）の場合はフックスローゼンタール血球計算盤（グリッド領域深度0.2mm、面積 0.0625mm^2 ）により計数し、低密度（ < 500 本/mL）の場合はセジウィックラフターチャンバーで計数した。糸状藍藻密度は1mLあたりの $100\mu\text{m}$ のトリコーム本数として算出した。

また2008年以降のモニタリング結果についてとりまとめた。

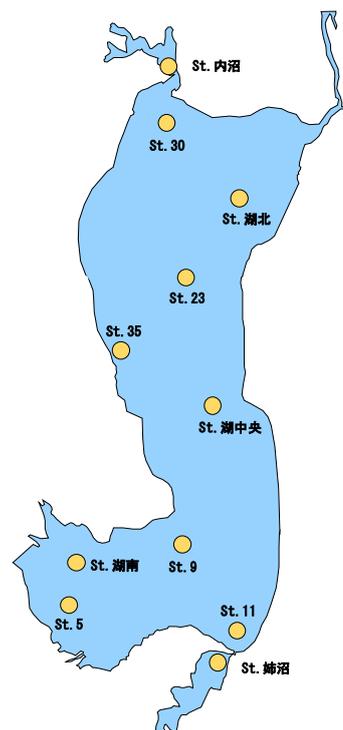


図1. 調査定点図

2. 水質の長期的変動解析

(1) 調査内容

過去の水質モニタリングデータを整理し、糸状藍藻発生との関係を調べた。

3. 簡便なモニタリング技術の検討～異臭原因種の特定

(1) 調査内容

¹ 北里大学獣医学部

発表誌：Shizuka, K., M. Ikenaga, J. Murase, N. Nakayama, N. Matsuya, W. Kakino, H. Taruya, & N. Maie (2020) Diversity of 2-MIB-producing cyanobacteria in Lake Ogawara: Microscopic and molecular ecological approaches. *Aquaculture Science*, 68, 9-23.

小川原湖、姉沼、内沼の湖水からピペット洗浄法により単離した糸状藍藻類を CT 培地を使い 20℃（暗 12 時間、明 12 時間）で培養し、株を確立した。

プレートに達した培養株について、墨汁臭の有無を官能により判定した。

株からの DNA 抽出はフェノール・クロロホルム法¹⁾により行った。

16S rRNA V3-V4 領域の PCR 増幅を、PCR 装置に TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Model TP600、プライマーに CYA371F²⁾と CYA781R³⁾、PCR 酵素に Platinum® DNA Taq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて行った。PCR 産物のダイレクトシーケンシングは装置に 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems)、PCR と同じプライマーを用いて行った。

2-MIB 合成酵素遺伝子の PCR 増幅にはプライマーに MIB3313F⁴⁾と MIB4226R⁴⁾を用いた。geosmin 合成酵素遺伝子の PCR 増幅にはプライマーに geo78F⁴⁾、geo971R⁴⁾、geo982R⁴⁾（リバースプライマーの違いによる 2 セット）を用いた。PCR 装置、PCR 酵素は 16S rRNA と同じものを用いた。2%アガロースゲル電気泳動により増幅の有無を確認した。

結果と考察

1. 糸状藍藻類モニタリング

糸状藍藻類のモニタリングは 2008 年より実施しているが（図 2）、現行の分類基準でのモニタリングは 2011 年 4 月から開始した（図 3）。2011 年以前の分類基準については記録が残っていない。

年により糸状藍藻類の出現状況は大きく異なった。2011 年以前では、2008 年 10 月～2008 年 12 月、2009 年 8 月～2011 年 3 月にかけて大規模な発生があり、水産物への着臭被害が生じた。2011 年以降では 2013 年 11 月～2014 年 2 月、2015 年 7 月～2016 年 3 月、2016 年 7 月～2017 年 1 月に比較的大規模な発生があり、水産物への着臭や操業自粛等による被害が生じた。季節としては秋から冬にかけて多く出現する傾向が認められた。

2017 年は 10 月に湖平均 161 本/mL～342 本/mL 出現し、一部操業自粛が行われた。10 月 11 日に実施した 9 定点の調査では、湖東部（St. 11、St. 中央、St. 23、St. 湖北）で少なく、湖西部（St. 湖南、St. 5、St. 9、St. 30、St. 35）で多い傾向が認められた。

2. 水質の長期的変動解析

水質項目により、長期的変動には異なる特徴がみられた（図 4、表層湖平均）。水温、DO には明確な長期的傾向は認められなかった。

塩分は 1999 年以降上昇し、2009 年 4 月に 2.6‰に達した。その後低下傾向を示し、2012 年には 0.7‰まで低下したが、2012 年 12 月～2013 年 1 月に 1.7‰まで上昇した。その後、2014 年 9 月に 0.8‰まで低下したが、再び上昇し、2016 年 2 月に 2.3‰となった。その後は低下傾向にあり、2017 年 12 月には 1.4‰であった。

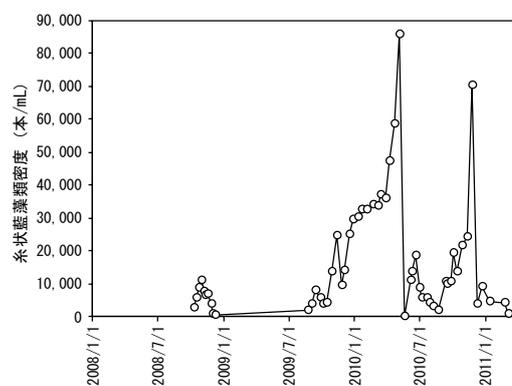


図 2. 糸状藍藻類モニタリング結果
(2008 年 10 月～2011 年 3 月)

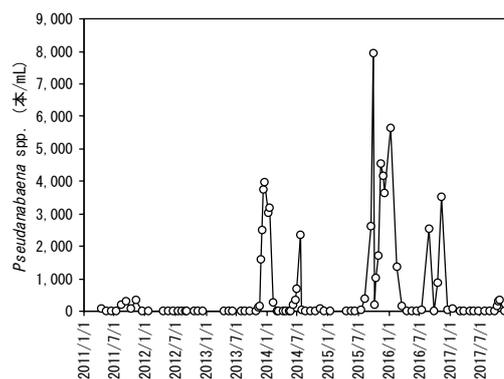


図 3. 糸状藍藻類モニタリング結果
(2011 年 4 月～)

pHは2000年までは7~8の間で推移し、月間変動は小さかったが、2000年以降、大きな月間変動を示すようになった。2000年以降上昇傾向を示し、2009年5月に9.2を示した後、低下傾向に転じ、2012年10月には6.7となった。その後は7~9の間でほぼ横ばいであった。

透明度は2004年まで1.7m~4.4mで推移していたが、2004年に急激に低下し、2008年11月まで1.3m~3.8mで推移した。2009年4月~2011年10月はさらに低下し、1.1m~2.5mで推移した。2011年11月以降は年や月により大きく変動した。

水温、塩分、DO（溶存酸素濃度）、pH、透明度の長期変動と、糸状藍藻類の発生を比較した結果、塩分が高く、pH、透明度が低い期間に糸状藍藻類が多い傾向が認められた。一方、水温、DOとは明確な関係は認められなかった。pHに関しては、高pHは藍藻類の増殖に有利に働き、また一次生産の増大によってもpHが高くなることから、糸状藍藻類の発生との相互関係が推察される。透明度に関しては糸状藍藻類が発生する期間の一次生産の高さにより結果的に低下したと推察される。塩分に関しては、塩分が直接的、または間接的に糸状藍藻類に影響を与えているか、または塩分と同調的に変動する高塩分層からの微量元素等が糸状藍藻類の発生に影響した可能性が推察される。異臭産生糸状藍藻類の発生要因解明のためにはさらなる研究が必要である。

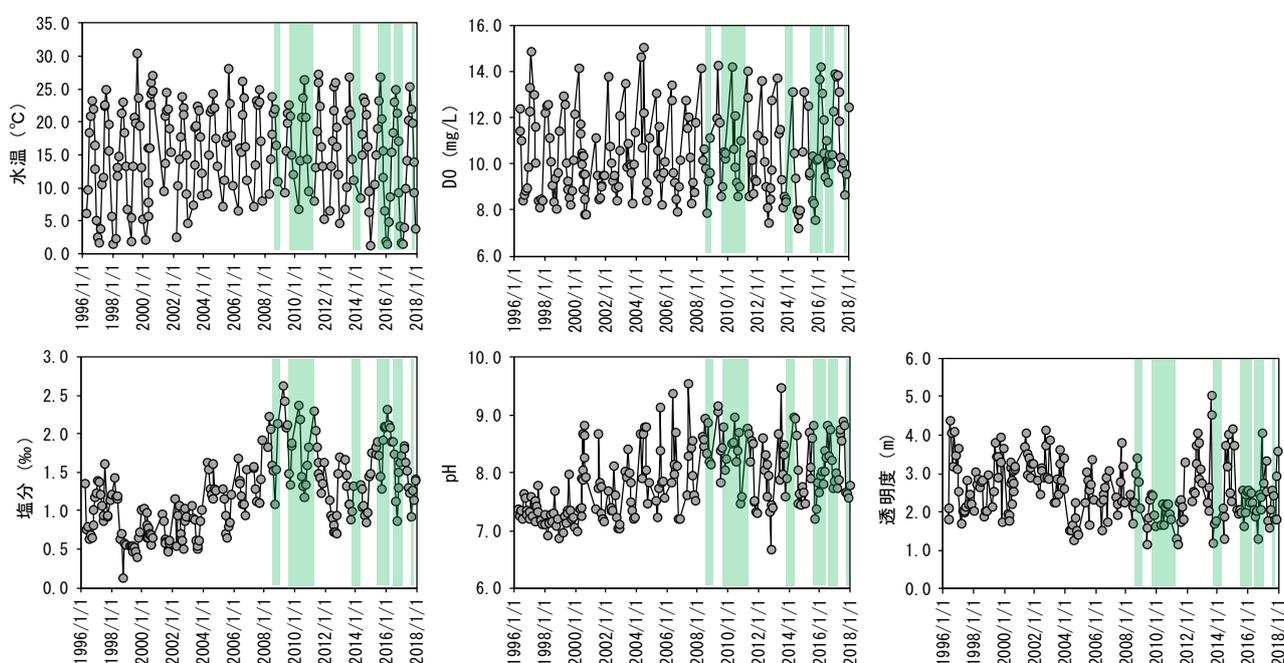


図4. 各水質項目の長期時系列（表層平均）

3. 簡便なモニタリング技術の検討～異臭原因種の特定

小川原湖、姉沼、内沼の水サンプルから糸状藍藻類の単離培養株を計15株確立した。

官能試験の結果、15株中、5株から墨汁臭を感知した。

良好にPCRできた11株について16S rRNAのV3-V4領域遺伝子配列のBLAST検索を行った結果、11株は*Planktothrix*属、*Limnothrix*属、*Pseudanabaena*属の3属であることが推定された。

2-MIB・geosmin合成酵素遺伝子特異的プライマーによりPCRした結果、geosmin合成酵素遺伝子はいずれの株からも検出されなかったものの、官能試験で墨汁臭が確認された5株から2-MIB合成酵素遺伝子が検出された。よってこの5株は2-MIB産生能を有すると考えられた。5株はいずれも*Pseudanabaena*属の同一種と推定され、形態的にもこれまでのモニタリング対象と一致していたことから、当種が小川原湖における異臭産生糸状藍藻類の1種と推定された。

表 1. 単離した株の採取場所・地点情報、墨汁臭の有無と、遺伝情報に基づく分類推定、異臭合成遺伝子の検出結果
 分類推定は 16Sr RNA 遺伝子 V3-V4 領域に基づく

株名	採水 年月日	採水 地点・水深	BLAST		PCR		墨汁臭
			分類名	類似性 (%)	2-MIB合成酵素遺伝子	geosmin合成酵素遺伝子	
AIFI-1	2015年10月5日	湖中央0m	<i>Limnothrix</i> sp.	100.00	-	-	-
AIFI-2	2016年9月28日	湖中央10m		PCR不良			-
AIFI-3	2016年6月15日	姉沼0m	<i>Pseudanabaena</i> sp.	100.00	+	-	+
AIFI-4	2016年6月15日	姉沼0m	<i>Pseudanabaena</i> sp.	100.00	+	-	+
AIFI-5	2016年6月15日	姉沼0m	<i>Pseudanabaena</i> sp.	99.76	+	-	+
AIFI-6	2016年6月15日	姉沼0m	<i>Pseudanabaena</i> sp.	99.76	+	-	+
AIFI-7	2016年6月15日	姉沼0m	<i>Pseudanabaena</i> sp.	99.76	+	-	+
AIFI-8	2016年9月28日	湖中央10m		PCR不良			-
AIFI-9	2016年9月28日	湖北5m		PCR不良			-
AIFI-17	2017年7月27日	湖南0m	<i>Synechococcus</i> sp. / <i>Aphanothece</i> sp. / <i>Cyanobium</i> sp.	100.00	-	-	-
AIFI-18	2017年7月27日	内沼0m	<i>Pseudanabaena</i> sp.	99.76	-	-	-
AIFI-19	2017年7月27日	内沼0m	<i>Pseudanabaena</i> sp.	99.53	-	-	-
AIFI-20	2017年8月21日	内沼0m	<i>Planktothrix</i> sp.	99.76	-	-	-
AIFI-21	2017年8月28日	内沼0m		PCR不良			-
AIFI-22	2017年9月21日	湖南0m	<i>Pseudanabaena</i> sp.	99.76	-	-	-

参考文献

- 1) Kojima, H., R. Tokizawa, K. Kogure, Y. Kobayashi, M. Itoh, F. K. Shiah, N. Okuda and M. Fukui (2014) Community structure of planktonic methane-oxidizing bacteria in a subtropical reservoir characterized by dominance of phylotype closely related to nitrite reducer. *Sci. Rep.*, 4, 5728.
- 2) Janse, I., M. Meima, W. E. A. Kardinaal and G. Zwart (2003) High-resolution differentiation of cyanobacteria by using rRNA-internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 6634-6643.
- 3) Nübel, U., F. Garcia-Pichel and G. Muyzer (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3327-3332.
- 4) Suurnäkki, S., G. V. Gomez-Saez, A. Rantala-Ylinen, J. Jokela, D. P. Fewer and K. Sivonen (2015) Identification of geosmin and 2-methylisoborneol in cyanobacteria and molecular detection methods for the producers of these compounds. *Water Res.*, 68, 56-66.

謝辞

調査においては小川原湖漁業協同組合に多大な協力をいただきました。この場を借りて御礼申し上げます。