

調査報告

琵琶湖北湖深層部における微生物由来のマンガン酸化物構造体 - *Metallogenium* sp. の大量発生について (2002年) -

一瀬 諭^{*1}, 若林徹哉^{*1}, 岡本高弘^{*1}, 藤原直樹^{*1}, 井上 健^{*2}
加賀爪敏明^{*1}, 宮島 利宏^{*3}

Particulate Material of Oxidized Manganese Fostered Microbiologically in Deepest Layer of the Northern Part of Lake Biwa - Morphology and Examination Result of *Metallogenium* sp. (2002) -

Satoshi ICHISE^{*1}, Tetsuya WAKABAYASHI^{*1}, Takahiro OKAMOTO^{*1},
Naoki FUJIWARA^{*1}, Ken INOUE^{*2}, Toshiaki KAGATSUME^{*1}
and Toshihiro MIYAJIMA^{*3}

2002年11月上旬における琵琶湖深層部のプランクトン調査において、直径20 μ m程度の赤褐色微粒子が 10^3 particles \cdot ml⁻¹以上計数され、検水のろ過作業に障害が生じた。このような現象は定期調査開始後、初めてのことであった。また、この時期の深層部調査から、きわめて底層部では溶存酸素量が少ない水層が確認され、この水層に多量に本微粒子が分布していることが明らかとなった。さらに、その分布域は水深90m層以深に広く分布しており、概算でも約20km²と広範囲に及んでいることが推察された。その後、この微粒子は宮島¹⁾の研究から*Metallogenium* sp.と呼ばれる微生物由来のマンガン酸化物の構造体であることが明らかとなった。今回、琵琶湖深層部の広範囲にわたり本微粒子が多量に出現したということは、そのすぐ下にまで還元層(貧酸素層)が存在していたことが示唆され、今後、本微粒子を琵琶湖の低酸素化のマーカーとして使用して行きたいと考える。

キ-ワ-ド: 琵琶湖, 深層部, メタロゲニウム, マンガン酸化物, 溶存酸素量

はじめに

琵琶湖は滋賀県の中央部に位置し、面積670km²最大水深104mの日本最大の湖であり、その水量は275億m³を保有し、近畿1,400万人の貴重な飲料水源となっている。さらに琵琶湖は400万年前に誕生したと言われる古代湖の1つである。

当所では、琵琶湖のプランクトン調査を1978年から実施しており、深層部におけるプランクトン調査についても1994年から毎月2回の頻度で実施してきている。

今回、2002年11月6日までの定期調査時において、深層部検体から茶褐色の微粒子が初めて観察された。

本微粒子についてはMiyajima, T.の過去の研究¹⁻³⁾から*Metallogenium*と呼ばれる微生物由来のマンガン酸化物構造体であることが報告されている。しかし、今回

のような広範囲に多量に観察されたことは初めてのことである。我々は、この微粒子の形態的特徴やその平面分布・鉛直分布についての調査を実施したので報告する。

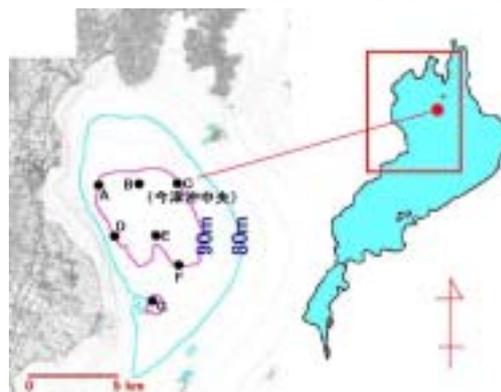


図1 琵琶湖北湖深層部における調査地点

*1 滋賀県立衛生環境センター 〒520-0834 滋賀県大津市御殿浜13-45

Shiga Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, 13-45, Gotenhama, Ohtsu, Shiga, 520-0834, Japan

*2 (現)(財)滋賀県下水道公社(湖南中部事務所) 〒525-0066 滋賀県草津市矢橋町帰帆2108

Shiga Prefectural Sewerage Management Public Corporation, 2108, Kihan, Yabase-cho, Kusatsu, Shiga, 525-0066, Japan

*3 東京大学海洋研究所 〒164-8639 東京都中野区南台1-15-1

Ocean Research Institute, the University of Tokyo 1-15-1 Minamidai, Nakano-ku, Tokyo, 164-8639, Japan

方 法

定期的な水深別調査は、図1に示す今津と長浜を結ぶ線上の中央地点(st.C:水深約90m)において水深0.5m, 5m, 湖底から1mの3層で実施した。植物プランクトン計数は、採水後直ちに検水1mlをプランクトン計数板(離合社製)に取り、検水1ml中の植物プランクトン種とその総細胞数を生物顕微鏡(ニコン製: オプチフォト)で計数した。また、動物プランクトンの計数は、検水1Lをグルタルアルデヒド5% v/vで固定し、24時間自然沈殿させ上澄み液をアスピレーターで除去した後、10mlにまで沈降濃縮した。この濃縮液中の1mlをプランクトン計数板に取り、検水100ml中の動物プランクトンの種類と個体数を生物顕微鏡で計数した。

水温や溶存酸素量などの理化学調査についても同時に実施した。

本微粒子の確認後は、鉛直分布調査を水深0.5, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 湖底から1mの10層で計6回実施した。また、北湖深層部における溶存酸素量の分布調査は図1に示した8地点で2回実施した。*Metallogenium* sp.の計数は10月31日の第1回目には3地点で、また、12月4日の第2回目には6地点で実施した。

水温および溶存酸素飽和率は、DOセンサーによる現場測定を行い、その他の項目については実験室に持ち帰り、分析・計数を行った。水温はサーミスタ温度計で測定し、溶存酸素は隔膜電極法により測定した。なお、採水にはバンドーン採水器(容量20L)を用いた。

Metallogenium sp.の測定は、検水1mlをプランクトン計数板に直接取り、生物顕微鏡にて全マスを計数し、1ml中の*Metallogenium* sp.の総個体数を計数した。

また、鉛直方向における水深別調査については、*Metallogenium* sp.の現存量が底層部に比べ少ないため宮島の計数方法¹⁾に準じて行った。宮島の方法は、検水10mlの湖水(グルタルアルデヒド5% v/v固定)をミリポアHAフィルター(口径: 25mm)でろ過した後、40

の乾燥機においてフィルターを乾燥し、無蛍光イメージジョンオイルで透明化した後、フィルター表面に捕集された微粒子を生物微分干涉顕微鏡で検鏡する方法である。

結 果

1. 深層部主要プランクトン

近年におけるC地点湖底から1m層の主な植物プランクトンの変遷は、珪藻の*Stephanodiscus carconensis* (S.suzukii) や *Fragilaria crotonensis*、褐色鞭毛藻の*Rhodomonas* sp.などが主要種となり、冬季に少なく秋季に多い傾向が毎年繰り返されていた。また、動物プランクトンでは、小型繊毛虫の*Storobilidium* sp.が最も多く、次いで球形の*Amoeba*が主な優占種となった。ワムシ類では *Polyarthra vulgaris* や *Keratella*

quadrata、*Kellicottia longispina*が3~10月に多かった。また、甲殻類では、*Eodiaptomus japonicus* や *Daphnia galeata*が夏季から冬季にかけて深層部で多く認められた。しかし、今回の検体から赤褐色の微粒子が多量に計数された2002年11月6日の定期調査では、植物プランクトンでは、群体性藍藻の*Aphanothece clathrata*、原生動物では小型の繊毛虫に属する*Storobilidium* sp.、ワムシでは*Filinia longiseta*と出現種も相違し大型の甲殻類は、ほとんど観察されなかった。また、この調査時の底層部における植物プランクトン総細胞数や動物プランクトン総個体数を過去のデータと比較した結果、2002年11月6日は例年より50%以下と少なかった。

2. 微粒子の形態について

琵琶湖深層部で確認されたこの微粒子を写真1, 2に

示した。この微粒子の形態は、毛球様であり、球体の中心部から紐状の突起物を数本から十数本放射状に出している。また、この紐状の突起物は不規則に湾曲し、先端が丸いものや(写真3, 4)、先端が細くなり尖るもの(写真5, 6)、突起物が長く伸びるもの(写真7)

など様々な形態のものが観察された。本微粒子の色彩は、酸化マンガニ物特有の黒っぽい茶褐色を呈しており、クロロフィル色素を有する多くの植物プランクトンや運動性を有する動物プランクトンとは容易に区別が可能であった。また、 1.4×10^3 particles \cdot ml⁻¹と多く出現した底層部(2002年11月6日: C地点)の微粒子は、茶褐色の色がより濃く写真1~4に示したように、はっきりした太い突起物を持っているものが多く、その湖水を濃縮した沈殿物も写真8に示したように底層のものは黒色化していた。しかし、湖水が循環期に入る時期(2003年1月14日)の微粒子は色素が薄く写真9に示したように、紐状突起も欠けたものや細く変形したものが多く観察され、形態が変化すること



写真1 *Metallogenium* sp.
毛玉様のもの



写真2 *Metallogenium* sp.
毛玉様のもの

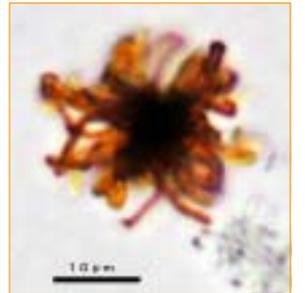


写真3 *Metallogenium* sp.
先端が丸く太いもの

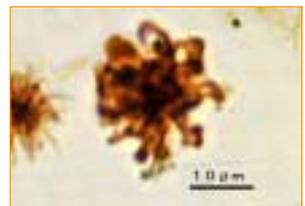


写真4 *Metallogenium* sp.
先端が丸いもの

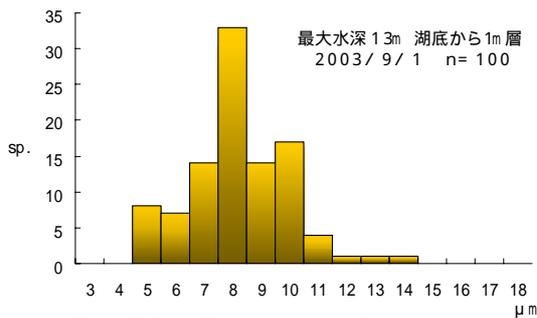
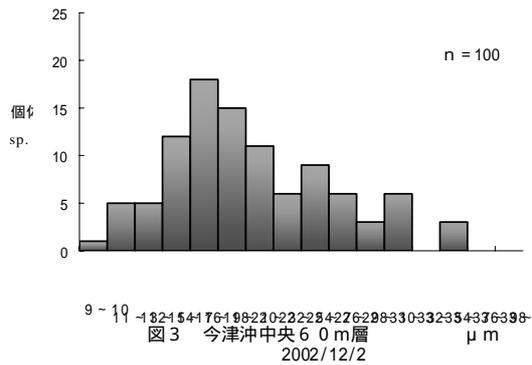
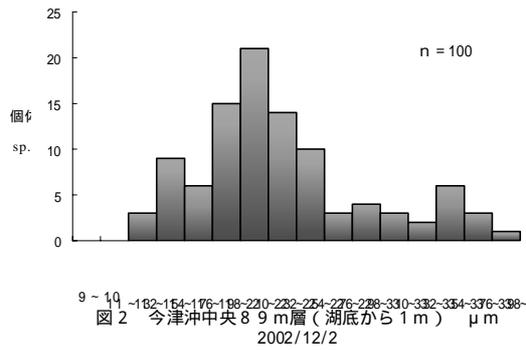


図4 琵琶湖南湖帰帆島沖浚渫跡地深層部における *Metallogenium* sp. の粒径分布

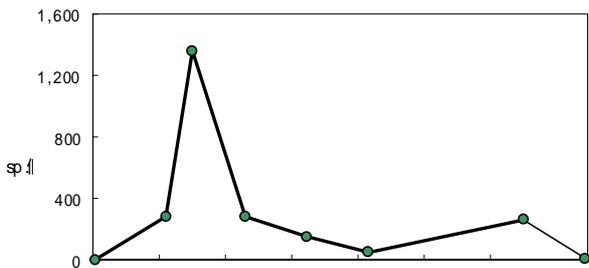


図5 琵琶湖北湖C地点深層部における *Metallogenium* sp.調査結果(2002)

が明らかとなった。

3. 微粒子の粒径分布について

2002年12月2日のC地点湖底から1 m層に分布していた微粒子と、水深60 m層に分布していた微粒子の粒径の分布を図2と図3に示した。図2に示したように底層部の微粒子の粒径は13 ~ 40 μm の範囲で変動し、平均は21 μm と大型で、宮島²⁾が報告した琵琶湖

和逆沖の水深75 m地点での粒径よりも、さらに大型であった。また、同地点の水深60 m層のものは、平均17 μm の粒径であり、底層部のものより中層部のものは小型化する傾向が認められた。また、酸化マンガン色である黒い茶褐色の濃度も底層部のものと比べると中層部のものは色が薄かった(写真9)。

琵琶湖南湖では図4に2003年9月1日、南湖の矢橋帰帆島沖浚渫跡地深層部(最大水深約13 m湖底から1 m層)における *Metallogenium* sp.の粒径分布を示した。粒径は5 ~ 14 μm の範囲で変動し、平均8 μm と小型(写真10)であり、北湖のものより突起状の枝が短かく細かった。これは宮島¹⁾が報告した粒径と一致した。このように水深の深い北湖のものは水深の浅い南湖のものより粒径でも2倍以上大型であった。

4. *Metallogenium* sp.の経日変化

C地点の深層部において毎月2回実施しているプランクトン調査結果では、本微粒子は過去10年間の調査では全く観察されなかった。しかし、図5に示したように2002年10月31日に $2.8 \times 10^2 \text{ particles} \cdot \text{mL}^{-1}$ 計数され、11月6日には $1.4 \times 10^3 \text{ particles} \cdot \text{mL}^{-1}$ と微粒子は急増した。その後、徐々に減少傾向が認められたが、直ぐには消滅せず11月18日で $2.8 \times 10^2 \text{ particles} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、12月2日で1.5



写真5 *Metallogenium* sp.
先端が細いもの



写真6 *Metallogenium* sp.
先端が細く尖るもの

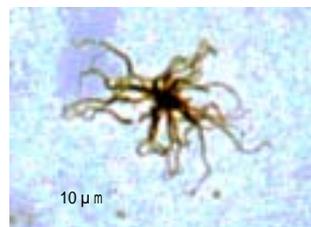


写真7 *Metallogenium* sp.
先端が細く長く伸びるもの

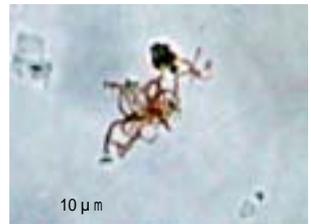


写真9 *Metallogenium* sp.
先端が細く変形したもの

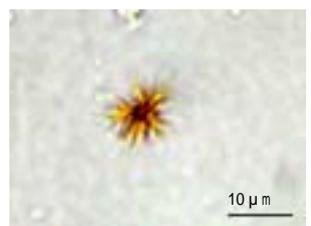


写真10 *Metallogenium* sp.
南湖矢橋帰帆島沖
浚渫跡地のもの

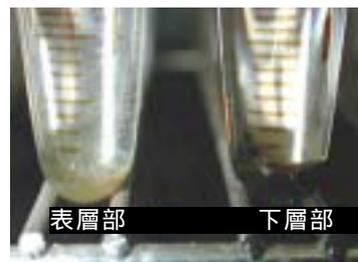


写真8 北湖C地点における
1 L中の沈殿物(11/18)

× 10²particles・ml⁻¹, 2003 年 1 月 14 日で 3.0 × 10²particles・ml⁻¹, 1 月 20 日の調査時においても微粒子を 2.6 × 10²particles・ml⁻¹ 計数し, その後, 計数されなくなった.

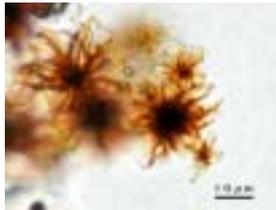


写真 11 *Metallogenium* sp.
小型の個体が発生したもの

5. *Metallogenium* sp. の細胞確認

Metallogenium sp. の粒子は, マンガンの厚い殻を有するためか微干渉顕微鏡やギムザ染色を用いた細胞染色による検鏡法および核酸染色剤(アクリジンオレンジ等)を用いた落射蛍光顕微鏡観察では細胞質の存在を確認することが出来なかった. また, 植物性プランクトンの場合, 葉緑体を G 励起や B 励起を用いて落射蛍光顕微鏡(自家蛍光存在)によって確認することが可能であるが, この方法を用いても *Metallogenium* sp. の細胞質の存在は確認できなかった. さらに, 吸光光度計を用いてクロロフィル - a の分析を行ったが, クロロフィル - a 特有の吸光は認められなかった.

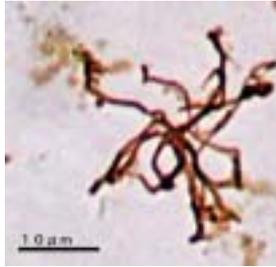


写真 12 *Metallogenium* sp.
突起が単独に分離したもの

6. *Metallogenium* sp. の固定と培養

Metallogenium sp. はグルタルアルデヒド固定液(5 % v/v)を加えた場合には, 微粒子は固定され成長しなかった. しかし, この *Metallogenium* sp. を分離し, 溶解性マンガンを微量加え M11 改変培地で 1 ヶ月間静置培養(20)を行ったところ写真 11, 12 に示すように突起が長く伸びたり, 小型の *Metallogenium* sp. の新たな存在が多く確認され, 本種が微生物由来のものであることが推察された.

7. *Metallogenium* sp. と溶存酸素飽和度

琵琶湖北湖深層部において, 8 月 12 日, 10 月 31 日および 12 月 4 日の 3 回にわたり溶存酸素飽和度の調査を行った. 溶存酸素飽和度が低下した 10 月 31 日と 12 月 4 日の測定結果を表 1 に示した. 夏季の 8 月 12 日の調査では, C 地点で溶存酸素飽和度 42 %, G 地点において

表1. 琵琶湖北湖深層部の *Metallogenium* sp. の分布 (2002)
湖底から1m (約水深9.0m)

Sta.	DATE	<i>Metallogenium</i> sp.	DO (%)	DO (mg/l)
C	2002/10/31	280	24	2.6
F	2002/10/31	2,700	9	1.1
G	2002/10/31	1,100	16	1.9
A	2002/12/4	1,580	31	3.6
B	2002/12/4	850	30	3.5
D	2002/12/4	730	30	3.5
E	2002/12/4	1,820	24	2.8
F	2002/12/4	1,200	34	4.0
G	2002/12/4	600	34	4.0

Metallogenium sp. : particles・ml⁻¹

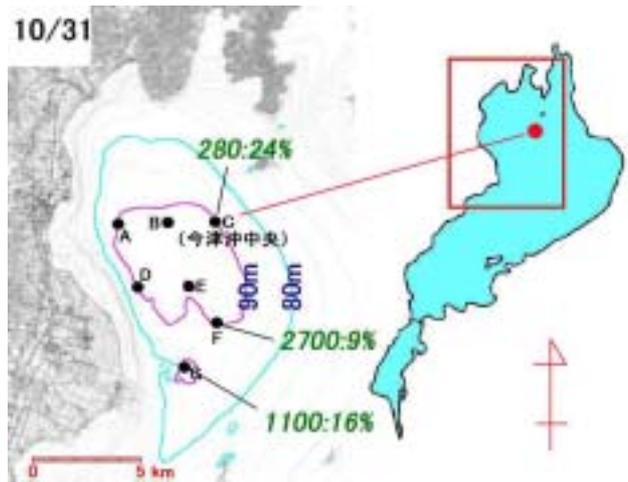


図6 琵琶湖北湖深層部における調査結果 10/31

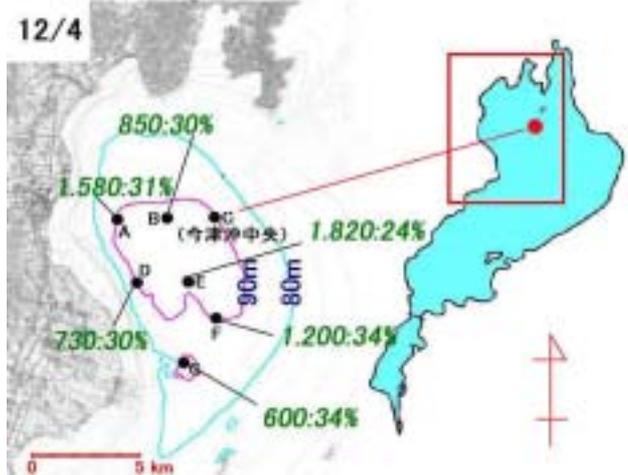


図7 琵琶湖北湖深層部における調査結果 12/4

53 %, 安曇川沖中央において 59 %, 南比良中央で 56 %であった. しかし, 10 月 31 日の調査(図 6)では, 水深 90m の湖盆である A, B, D, E, F 調査地点で 9 ~ 17 % という非常に低い溶存酸素飽和度を計測し, また最深部(G 地点)においても 16 % と低い溶存酸素飽和度を記録した. また, 約 1 ヶ月後の 12 月 4 日に行った調査(図 7)では, 今津沖から安曇川沖にかけての水深 90 m 湖盆, 最深部近傍(K M 点)および水深 80m の各地点において 24 % ~ 34 % の分布を示し前回より回復していた.

この低い溶存酸素飽和度を測定した地点においての *Metallogenium* sp. の分布は, 10 月 31 日の調査では比較的溶存酸素飽和度が高かった C 地点では 2.8 × 10²particles・ml⁻¹ と比較的少なかったが, 飽和度が 9 % と低かった F 地点では 2.7 × 10³particles・ml⁻¹ と多い *Metallogenium* sp. を計数し, また, 最深部(水深 104m)である G 地点でも溶存酸素飽和度は 16 %, *Metallogenium* sp. は 1.1 × 10³particles・ml⁻¹ と多かった. さらに, 溶存酸素飽和度 24 % ~ 34 % と回復した約 1 ヶ月後の 12 月 4 日に行った調査では, 全地点において, *Metallogenium* sp. の分布は 6.0 × 10²particles・ml⁻¹ ~ 1.8 × 10³particles・ml⁻¹ と比較的多かった.

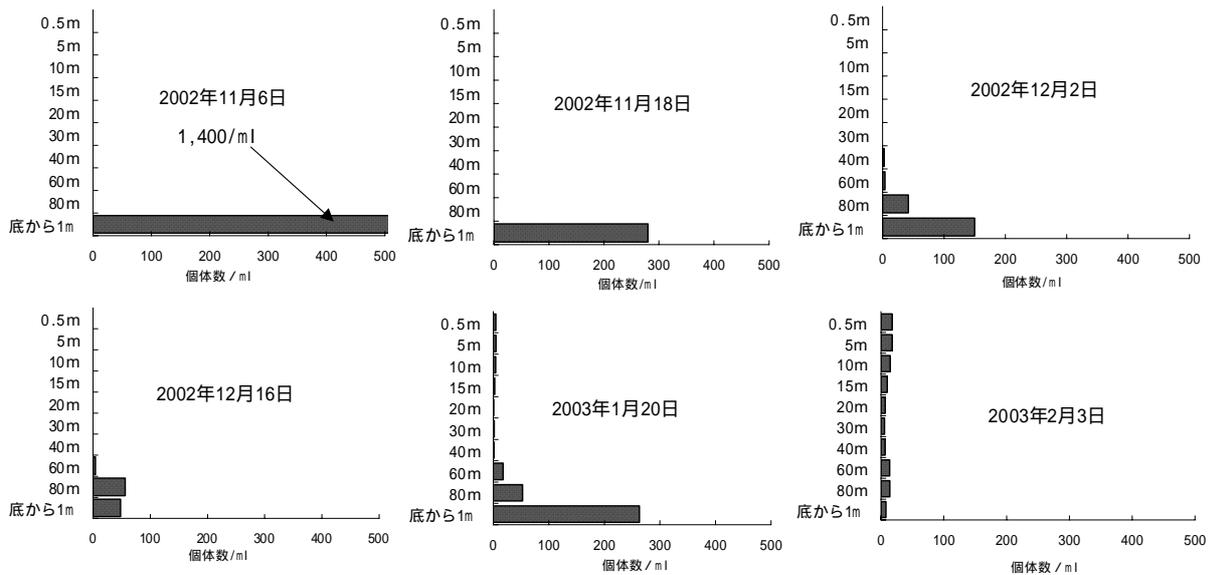


図8 琵琶湖今津沖中央における *Metallogenium* sp. の鉛直分布 (2002~2003)

今回の調査結果から、深層部の溶存酸素量が少ない水層で多量に本微粒子が多く分布していることが明らかとなった。また、その分布域は水深 80m 層以深で特に多く分布しており、 $5.0 \times 10^2 \text{ particles} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以上計数された分布域の面積を地図上から単純に概算すると約 20km^2 と広範囲に及んでいることが今回の調査結果から推察された。さらに、*Metallogenium* sp. は一度、本微粒子が生成されると好気的な環境下においては分解しにくく安定な形態を長期間保つことも推察された。

9. 鉛直分布

次に、C地点における *Metallogenium* sp. の鉛直分布を図8に示した。11月6日は底層部でのみ多量に計数されたが、12月2日の調査では、水深 40m 層まで *Metallogenium* sp. が計数され、2003年2月3日の調査時では、表層部から底層部まで全ての水深で少量ながらも *Metallogenium* sp. が観察され、徐々に底から上昇してくる傾向が認められた。このことは、秋季に水温の低下とともに湖水の鉛直混合により *Metallogenium* sp. の一部が上層部にも運ばれる可能性が示唆された。

考 察

今回、琵琶湖深層部の調査において多量に計数された微粒子の形態的特徴が、宮島¹⁻³⁾や世界各地の貧酸素層を有する湖沼の学者によって報告⁴⁻¹⁰⁾されている、微粒子と一致していたことから *Metallogenium* sp. であると同定した。この *Metallogenium* sp. の代表的な報告例としてはワシントン湖⁹⁾やレマン湖¹⁰⁾、また旧ソ連の研究者によるロシア国内の湖における報告¹¹⁻¹²⁾がある。しかし、この *Metallogenium* と呼ばれている微粒子が微生物であるのか、否かについてはまだ未解明である。

一つの仮説としては旧ソ連の研究者 Zavarin (1961)¹¹⁾

らはマイコプラズマ細菌に類似した、非常に小さなアメーバ状の微生物が存在し、細胞の周囲にマンガン酸化物を沈着する。本微粒子自体が微生物であるとしている。

これに対し、アメリカの研究者 Klaveness¹³⁾らは微粒子自体は微生物ではなく、他の微生物が生産して細胞外に分泌した、ある種のタンパク質が核となって、二次的にマンガン酸化物を沈着・生成するものであるとしている。いずれにしても、この微粒子が固定すれば形態的に変化しないことから何らかの微生物の働きによってできることは確実であり、*Metallogenium* sp. は微生物由来のものであると考えられた。

琵琶湖において川嶋¹⁴⁾や寺島¹⁵⁾らは、琵琶湖は中栄養湖であり、北湖では水柱全体が通年酸化的であり、還元層およびその酸化還元接触層は底層または底層表面に存在し、北湖の最深部では夏に粒子態マンガンが蓄積することや、琵琶湖南湖の浚渫された水域でのみ季節的に嫌気底層が認められ、中層に典型的な酸化還元接触層が見られ、そこではマンガン沈降が起こり、それは主に生物作用によって起こっていることを報告¹⁴⁾している。

また、宮島は *Metallogenium* sp. が発生する条件として 材料となる酸素と還元態マンガン・イオンが共存していること。生成に関与する微生物が存在すること。

pH が中性(7)付近であること。炭水化物を主成分とした有機栄養素があること。溶存重碳酸イオンが存在すること。リン酸イオンの濃度は低いことなどをあげている。

この *Metallogenium* sp. には、嫌気的な環境でないと溶出してこない溶存態マンガンの存在が不可欠であり、この微粒子が琵琶湖北湖深層部の湖水中で多量に見つかったということは、そのすぐ下にまで還元層(貧酸素層)が迫ってきているものと考えられ、琵琶湖湖底面の酸化膜がはがれた部分が北湖深層部の底層についても生

じたことが推察された。

次に *Metallogenium* sp. を非固定状態で保存培養すると、小型の *Metallogenium* sp. が発生したり、突起が3倍以上に成長することなども今回の培養結果から確認されたことから、この粒子自体がマンガン酸化能力を持っていることも推察された。

この *Metallogenium* 粒子が湖水中において、なぜこのような大増加を示すのかは明確ではないが、酸化還元境界付近において、「新しく出来ては沈殿して行き、また新しく出来ては沈殿して行く」そんなサイクルを繰り返しながら増加していることが推察された。

宮島は *Metallogenium* sp. 粒子の増加は、その生存場所の下にある還元層から拡散してくる2価のマンガンイオン量によってコントロールされることを報告²⁾しており、今後も琵琶湖北湖における鉛直方向の水質を注意深くモニタリングしていくとともに、*Metallogenium* sp. を琵琶湖低酸素化のマーカーとして継続的な調査・研究を実施して行きたいと考える。

謝 辞

本研究にあたり琵琶湖研究所の西野麻知子総括研究員、中島拓男上席総括研究員、滋賀大学の川嶋宗継教授に多くの助言を頂きましたことに心より感謝いたします。

文 献

- 1) Miyajima, T.: Arch. Hydrobiol., 124., 317-335, (1992)
- 2) Miyajima, T.: Arch. Hydrobiol., 130., 303-324, (1994)
- 3) Miyajima, T.: Arch. Microbiol., 158., 100-106, (1992)
- 4) Davison, W. : STUMM, W. (ed.), Chemical Processes in Lakes, 31-54, Wiley, New York. (1985)
- 5) Nealson, K. H., Tebo, B. M. & Rosson, R. A.: Adv. Appl. Microbiol. 33, 279-318, (1988)
- 6) Stumm, W. & Morgan, J. J.: Aquatic Chemistry, 2nd ed., Wiley-Interscience, New York, (1981)
- 7) Brewer, P.G. & Spencer, D.W.: Limnol. Oceanogr. 16, 107-110, (1971)
- 8) Davies, S.H.R. & Morgan, J. J. : J. Colloid Interface Sci., 129, 63-77, (1989)
- 9) Gregory, E., Perry, R. S. & Staley, J. T. : Microb. Ecol. 6, 125-140, (1980)
- 10) Jaquet, J.-M., Nembrini, G., Garcia, J. & Vernet, J.-P. : Hydrobiologia, 91, 323-340, (1982)
- 11) Zavarzin, G.A. & Hirsch, P.: Staley, J.T. et al. (eds.), Bergey's Manual of systematic Bacteriology, 9th edition, 3, 1986-1989. (1989)
- 12) Zavarzin, G.A.: Microbiologija, 32, 1020-1023, (1969) (Russ.)
- 13) Klaveness, D : Hydrobiologia, 56, 25- 33 (1977).
- 14) Kawashima, M., Takamatsu, T. & Koyama, M.: Water Res. 22, 613-618 (1988)
- 15) Terashima, A. & Ueda, T.: Jpn. J. Limnol. 43, 81-87 (1982)