

マンガン酸化細菌 *Bosea* sp. BIWAKO-01 株の培養特性及び琵琶湖

底層部におけるメタロゲニウム粒子生成機構に関する研究

Characterization of a manganese-oxidizing bacterium, *Bosea* sp.
BIWAKO-01, and Metallogenium particle formation in the bottom
water of Lake Biwa

2015 年 3 月

古田 世子

目 次

| | | |
|-------|---|----|
| 第1章 | 緒 論 | 1 |
| 第1節 | 研究背景 | 1 |
| 第2節 | メタロゲニウム粒子について | 2 |
| 第3節 | 研究目的及び研究内容 | 6 |
| 第2章 | 琵琶湖北湖におけるメタロゲニウム粒子の発生状況と生成要因： 水質との関連性 | 7 |
| 第1節 | はじめに | 7 |
| 第2節 | 調査地点及び調査期間 | 7 |
| 第3節 | 調査方法及び試験方法 | 7 |
| 2-3-1 | 採水及び採泥方法 | 8 |
| 2-3-2 | メタロゲニウム粒子の計数方法 | 8 |
| 2-3-3 | 光学顕微鏡観察 | 8 |
| 2-3-4 | 電子顕微鏡観察 | 8 |
| 2-3-5 | 底泥の分析及び溶出試験方法 | 9 |
| 2-3-6 | 溶存二酸化炭素の定量法 | 9 |
| 第4節 | 結果 | 11 |
| 2-4-1 | 琵琶湖で観察されるメタロゲニウム粒子の形態 | 11 |
| 2-4-2 | 琵琶湖で観察されるメタロゲニウム粒子の微細構造 | 11 |
| 2-4-3 | 琵琶湖北湖底泥の解析 | 11 |
| 2-4-4 | 琵琶湖北湖におけるメタロゲニウム粒子の鉛直分布 | 12 |
| 2-4-5 | メタロゲニウム粒子の発生状況と水質との関連性 | 18 |
| 2-4-6 | メタロゲニウム粒子の発生状況と溶存二酸化炭素濃度 | 22 |
| 第5節 | 考察 | 22 |
| 第6節 | 要約 | 28 |
| 第3章 | マンガン酸化細菌 <i>Bosea</i> sp. BIWAKO-01 株の単離と特徴付け及び メタロゲニウム粒子の構造特性 | 31 |
| 第1節 | はじめに | 31 |
| 第2節 | 調査地点及び調査期間 | 31 |
| 第3節 | 試験方法 | 31 |
| 3-3-1 | メタロゲニウム粒子生成細菌の単離方法 | 31 |
| 3-3-2 | 供試菌株 | 32 |
| 3-3-3 | PCR 法及びシーケンシング | 32 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3-3-4 | 培養実験 | 33 |
| 3-3-5 | 光学顕微鏡観察 | 34 |
| 3-3-6 | 電子顕微鏡観察 | 34 |
| 3-3-7 | レクチン染色 | 35 |
| 第4節 | 結果 | 35 |
| 3-4-1 | BIWAKO-01 株の単離 | 35 |
| 3-4-2 | BIWAKO-01 株の系統分類と性状 | 36 |
| 3-4-3 | メタロゲニウム粒子の生成過程 | 36 |
| 3-4-4 | メタロゲニウム粒子の構造解析 | 39 |
| 3-4-5 | Mn ²⁺ イオン添加濃度がメタロゲニウム粒子の微細構造 に与える影響 | 46 |
| 3-4-6 | 他のマンガン酸化菌を用いた Mn 酸化物粒子の生成 | 49 |
| 第5節 | 考察 | 49 |
| 第6節 | 要約 | 55 |
| 第4章 | マンガン酸化細菌 <i>Bosea</i> sp. BIWAKO-01 株を用いたメタロゲニ ウム粒子生成要因の解析 | 56 |
| 第1節 | はじめに | 56 |
| 第2節 | 試験方法 | 56 |
| 4-2-1 | ねじ口瓶を培養器とした密閉系での培養試験 | 56 |
| 4-2-2 | シャーレを培養器とした非密閉系での培養試験 | 56 |
| 第3節 | 結果 | 57 |
| 4-3-1 | メタロゲニウム粒子生成に及ぼす DO 濃度および pH 値 の影響 | 57 |
| 4-3-2 | 糖類添加の影響 | 62 |
| 第4節 | 考察 | 62 |
| 第5節 | 要約 | 66 |
| 第5章 | 琵琶湖北湖でのメタロゲニウム粒子生成における植物プランクトン バイオマスの関与 | 68 |
| 第1節 | はじめに | 68 |
| 第2節 | 調査地点及び調査期間 | 68 |
| 第3節 | 試験方法 | 70 |
| 5-3-1 | メタロゲニウム粒子の観察及び植物プランクトン計数方法 | 70 |
| 5-3-2 | レクチン染色 | 70 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5-3-3 | <i>S. arctiscon</i> 及び <i>S. dorsidentiferum</i> の培養及び 粘質鞘分離方法 | 70 |
| 5-3-4 | 植物プランクトンの生分解試験方法 | 71 |
| 5-3-5 | 植物プランクトン共存下での BIWAKO-01 株の 培養試験方法 | 72 |
| 第4節 | 結果 | 72 |
| 5-4-1 | 琵琶湖北湖における植物プランクトンと メタロゲニウム粒子の発生 | 72 |
| 5-4-2 | 植物プランクトンバイオマスの生分解性 | 80 |
| 5-4-3 | 植物プランクトン共存下における BIWAKO-01 株の 培養特性 | 84 |
| 第5節 | 考察 | 84 |
| 第6節 | 要約 | 88 |
| 第6章 | 総括および展望 | 89 |
| 第1節 | 総合考察 | 89 |
| 第2節 | 今後の課題および展望 | 92 |
| | 謝辞 | 93 |
| | 本研究に関連する成果発表（報文） | 94 |
| | 参考文献 | 95 |

第1章 緒 論

第1節 研究背景

我が国最大の湖沼である琵琶湖は総面積 670.25 km²、最深部の水深は 103 m で、貯水量は 275 億 m³に達する¹⁾。その誕生は約 400 万年前と言われており、世界有数の古代湖でもある。琵琶湖水は、生活用水、農業用水、工業用水として京阪神地域における約 1400 万人の水利用を支えており、琵琶湖・淀川流域内の上水道事業体による供給量は、約 15.9 億 m³/年に達している^{2,3)}。さらに、琵琶湖には多様な動植物が生息しており、多くの渡り鳥の越冬地にもなっていることから、1993 年にはラムサール条約湿地として登録された。また、魚類に関して 50 数種が生息しており、その中には、ビワコオオナマズ、イサザ、ホンモロコ等 10 数種類が固有種として知られている。このように琵琶湖は自然豊かで、重要な機能をもっている。

近年の琵琶湖の水質は、水質保全計画の策定により流入負荷が減少したため、南湖・北湖ともに透明度は上昇傾向に、全窒素および全リンは減少傾向にあり、富栄養化の傾向は抑制されている。しかし、一方で化学的酸素要求量 (COD_{Mn}) は低下しておらず、難分解性有機物による影響と考えられている¹⁾。琵琶湖北湖水中の溶存有機物 (DOC) は主に藻類由来の内部生産によると報告されており^{4,5)}、滋賀県が 1979 年より継続して実施してきた琵琶湖のモニタリング調査から、植物プランクトンの種類数や群集構造の長期的な変遷がおきていることが明らかとなっている^{6,7)}。また、琵琶湖で発生する藍藻の 73%、緑藻の 37% が細胞外に細胞体積の 2 倍以上の粘質鞘 (多糖類) を持ち、琵琶湖北湖の最深部付近である今津沖中央地点 (図 1-1) における 2000~2009 年の植物プランクトンの総細胞容積は 1980~1989 年に比較して約 63% に減少したのに対し、粘質鞘容積は約 168% に増加していることが報告されている⁸⁾。増加した粘質鞘容積と有機物との関係については、粘質鞘を有する藍藻や緑藻の増加傾向と溶存有機物の挙動が一致していることが報告されている⁹⁾。近年増加してきた粘質鞘の一部が、湖水中の細菌類による分解を受け、難分解性有機物に変化している可能性があり、琵琶湖の DOC および D-COD_{Mn} が減少しない内部生産有機物の質的变化の一要因になっている可能性が示唆されている⁶⁾。

また、琵琶湖では 2006 年、記録的な暖冬により、通常 1 月~2 月に起きる全循環が 3 月下旬になって起きたため、底層部への酸素供給が十分に行われなかった。全循環とは、冬季に湖水が鉛直方向に湖底までよく混合することで、この混合により水温や溶存酸素 (DO) 濃度が表水層から深水層まで一様になる物理現象である。底層部への酸素供給が十分でなかったため、翌年湖底の DO 濃度が顕著に低下する現象が起きた¹⁾。DO 濃度が 2 mg/L 以下に低下すると、イサザが死滅するとの報告^{10,11)}がある。底層部への酸素の供給は湖沼底層部の生態系にとって非常に重要であり、底層部の低酸素化が深刻な問題となっている。

湖沼底層部の生態系や水産資源の保全の観点から、底層部貧酸素化とそれに

伴う物質循環への影響を明らかにすることは重要な課題である。湖沼底層部の貧酸素化現象は琵琶湖だけでなく全国の湖沼で起きており、環境省では、「湖沼水環境新規基準対策検討事業（平成 26～28 年度）」において、湖沼の底泥上 0.5 m の DO 濃度について監視・基準化を検討中である。これらの状況を鑑みると、湖沼底層部において貧酸素化に伴うメタロゲニウム粒子の生成機構を調査解析して物質循環の一端を解明すること、さらに、粒子生成をもたらす環境因子を明らかにすることにより、メタロゲニウム粒子生成時に実際の湖沼底層部環境がどのような状態にあるのか評価できるものと考えた。

第 2 節 メタロゲニウム粒子について

近年琵琶湖内の環境が変化してきている中で、メタロゲニウム粒子と呼ばれるマンガン酸化物粒子が南湖では 1992 年に浚渫跡地(図 1-1 : 086 地点)で^{12,13)}、北湖今津沖中央地点では 10 年後の 2002 年に水深約 90 m の第一湖盆(図 1-1)において、初めて観測された¹⁴⁾。図 1-2 に示すようにメタロゲニウム粒子は粒径 5～20 μm 程度のフィラメント状の形態をもち、琵琶湖北湖では 2002 年以降ほぼ毎年夏から冬にかけて出現するようになった。メタロゲニウム粒子は底層部が貧酸素化する成層湖において出現することが広く知られている¹²⁻²²⁾。海外では、レマン湖²³⁾やワシントン湖²⁴⁾、バイカル湖²⁵⁾のほかバルト海²⁶⁾など多くの水域で報告されている。琵琶湖北湖今津沖中央地点ではメタロゲニウム粒子の出現が 2002 年 11 月 6 日に初めて確認されたが、この 2 週間前の 2002 年 10 月 21 日において湖底直上 1 m の DO 濃度が 0.9 mg/L まで低下し、1979 年の調査開始以来 1987 年と並ぶ最低値を記録した²⁷⁾。夏季から冬季にかけて琵琶湖底層部の DO 濃度が低下するのに伴って、底泥から二価マンガンイオン (Mn^{2+}) が溶出し、溶存酸素が存在する直上の好気層において酸化が起こりマンガン酸化物として析出するものと考えられる。

最近では、琵琶湖最深層部が水中有索ロボットで探索され、底層表面付近がメタロゲニウム粒子で覆われている様子が観察されていることから²⁸⁾、発生時は湖底一帯で相当量生成していることが窺える。一瀬らは、メタロゲニウム粒子の生成には溶存態マンガンが不可欠であり、底泥表層部の酸化還元境界層で、「新しくできては沈殿していき、また、新しくできては沈殿していく」サイクルを繰り返しながら増加すると推察している¹⁴⁾。

底層部におけるメタロゲニウム粒子の生成は、底層部の貧酸素化が引き金になっていると考えられるが、一方で Mn^{2+} イオンの酸化過程や粒子生成をもたらす環境因子など、メタロゲニウム粒子の生成機構に関してはほとんど明らかにされていない。

また、メタロゲニウム粒子の主要成分はマンガンの¹²⁾、マンガンは、環境中に広く存在している金属元素の一つとして、地殻中には 0.12 wt.% が含まれている^{29,30)}。マンガンの発生源は、土壌、底泥、変成岩、堆積岩などで³¹⁾、湖沼

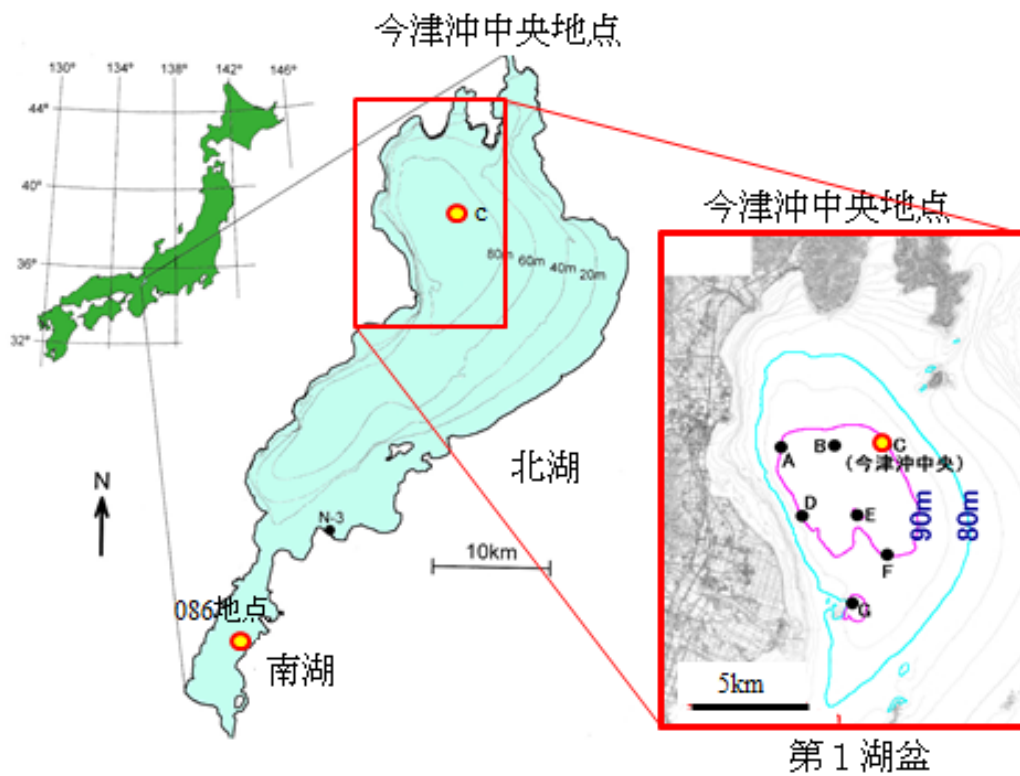


図 1-1 琵琶湖北湖及び南湖におけるメタロゲニウム粒子の発生地点

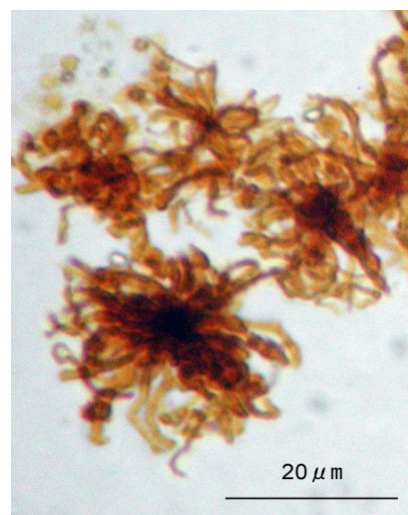


図 1-2 琵琶湖今津沖中央地点（水深約 90 m）から採取したメタロゲニウム粒子
(2008/10/6)

には河川水などにより運ばれた金属元素が堆積物として移行し、マンガンの濃集には、微生物の関与が指摘されている^{15,32,33)}。自然環境中で生成されるマンガン酸化物は、銅、亜鉛、ニッケル、カドミウム等の金属陽イオンに対する吸着能力が高いほか、金属陽イオンが過剰に存在する場合はヒ酸イオンやリン酸イオン等の陰イオンも吸着することが明らかにされている³⁴⁻³⁷⁾。琵琶湖の底泥表層（好気層）で生成された酸化マンガン塊にヒ酸イオンやリン酸イオンが吸着していることが報告されている³⁴⁻³⁷⁾。これらのことから、メタロゲニウム粒子の発生は琵琶湖底層部における金属元素や栄養塩の循環に大きな影響を及ぼしているものと推察される。

水環境中での Mn^{2+} イオンの酸化反応に関して、pH 値が中性付近では Mn^{2+} イオンの酸素による酸化は非常に遅いことから、環境中に広く生息するマンガン酸化微生物（細菌及び真菌）が Mn^{2+} イオンの $Mn(III, IV)$ 酸化物への酸化に大きく関与すると考えられている¹⁵⁾。このことから、湖沼や海域におけるメタロゲニウム粒子の生成も微生物の作用によるものと推察される。琵琶湖底層部におけるマンガン酸化においても、Kawashima らは生物活性を阻害するホルマリンやアジ化ナトリウムの添加により大きく阻害されることを報告している³⁵⁾。代表的なマンガン酸化細菌として、*Leptothrix discophora*³⁸⁻⁴⁴⁾、海洋性 *Bacillus* sp. SG-1 株⁴⁵⁻⁴⁷⁾、*Pseudomonas putida*^{48,49)}、*Pedomicrobium manganicum*⁵⁰⁾等があげられる。これらの細菌は細胞の最外層（*L. discophora* では細胞外鞘構造）にマルチ銅オキシダーゼであるマンガン酸化酵素を保有し、酵素反応により $Mn(III, IV)$ 酸化物を沈積させる¹⁵⁾。また以前より、真菌によるマンガン酸化も研究されてきている^{51,52)}。細菌と同様のマンガン酸化酵素が多様な真菌（子囊菌類）にも見出されている^{53,54)}。代表的なマンガン酸化真菌として *Acremonium strictum*⁵⁴⁾ があげられる。しかしこれらのマンガン酸化微生物の培養液中では通常、フィラメント状のメタロゲニウム粒子は生成せず、マンガン酸化物の凝集塊を生成する。

「メタロゲニウム」という名称はかつて、フィラメント状マンガン酸化物粒子を生成するマンガン酸化細菌の属名として付けられたものである（*Metallogenium* spp.）。湖沼等の環境試料からの *Metallogenium* spp. の分離培養は、これまでに世界中の研究者により試みられてきたが、純粋培養に成功したとの報告は非常に僅かである。それらの報告によれば、*Metallogenium* spp. は細胞壁を持たないマイコプラズマ様の原核生物であって^{55,56)}、マイコプラズマ用の選択培地を用いて増殖させることができること⁵⁷⁾、また単独では増殖が非常に困難であるが、別の細菌や真菌が混在すると寄生的に増殖し始める菌種（*Metallogenium symbioticum*）が存在すること⁵⁸⁾が示された。しかし、これらの報告以降、*Metallogenium* spp. を純粋培養したとの報告はなく、また分離されたとして報告された菌株も継代培養がなされず、現在のところそれらの増殖を再現することはできない。従って、*Metallogenium* spp. の位置付けは現在非常に不確かである^{15,59)}。むしろ現在では、フィラメント状粒子自体は微生物ではなく、

マンガン酸化微生物の作用によって生じたマンガン酸化物構造体であるとの認識が一般的である^{15,59)}。なお本論文では、フィラメント状マンガン酸化物構造体を「メタロゲニウム粒子」として表記する。Emerson らは、マンガン酸化真菌を静置培養したとき、培養液中にメタロゲニウム粒子が生成することを見出した⁵¹⁾。この粒子を透過型電子顕微鏡により観察しても細胞膜や細胞壁のような細胞構造は認められないこと、アクリジンオレンジのような核酸蛍光染色剤を使用して蛍光顕微鏡観察を行っても粒子中に核酸が検出されないことを示した⁵¹⁾。湖沼から採取したメタロゲニウム粒子でも同様の観察結果が得られている¹⁷⁾。

さらに、Emerson らは、真菌培養液中に生成されたメタロゲニウム粒子のフィラメント構造が酸性多糖及びタンパク質を含む細胞外ポリマーから成り、これにマンガン酸化物が沈着していること、マンガン酸化物を還元的に溶解して除去した後 Mn^{2+} イオンを添加すると、再びマンガン酸化物がフィラメント上に沈着することを明らかにした⁵¹⁾。これらの結果は、細胞外ポリマーの触媒作用により Mn^{2+} イオンが酸化され、粒子構造が作られることを示唆している。

マンガン酸化細菌では、*Leptothrix* sp. の培養液中でメタロゲニウム粒子の生成が観察されることがしばしば報告されている^{13,59)}。Miyajima は、琵琶湖南湖内の浚渫跡地で *Leptothrix* sp.、*Bacillus* sp. 等のマンガン酸化細菌を分離し、低濃度の寒天を含む半流動性培地を用いて静置培養を行うことによって、培養液中にメタロゲニウム粒子を一時的に生成することには成功したが、培養の継続によりその機能を失ったことを報告している¹³⁾。さらに Miyajima は、振盪培養時や寒天を加えない培地で静置培養を行った場合は粒子を生成しなかったことを報告しており¹³⁾、メタロゲニウム粒子の生成には特定の培養条件を整える必要があることを示唆しているともいえる。ただし、これらの単離株は継代培養を繰り返すうちに Mn^{2+} イオン酸化能力が失われたと報告されており^{13,60)}、詳細は未だ明らかになっていない。湖沼等でのメタロゲニウム粒子の生成は底泥上の還元層と酸化層の境界で起こることから、溶存酸素が十分には存在しない微好気条件が粒子生成に必要である可能性も想起することができる^{12,13,17,26)}。黒海では非常に低濃度 (3~5 μM) の溶存酸素水塊において急速なマンガン酸化が起こることが示されている¹⁸⁾。また Sternbeck は、ノルビケン湖 (スウェーデン) におけるメタロゲニウム粒子の発生には湖水の pH 値 (アルカリ度および溶存無機炭素濃度) が関係していることを示唆している¹⁹⁾。

湖沼等においてどのような微生物種がメタロゲニウム粒子生成を担っているのか、その実態は不明である。これを明らかにするためには、実験室内でメタロゲニウム粒子を再現性良く生成するマンガン酸化菌の培養系を確立し、どのような環境条件 (DO 濃度、pH 値など) が粒子生成をもたらすのか詳細に検討する必要がある。またこれらの検討を通して、メタロゲニウム粒子生成時に実際の湖沼底層部環境がどのような状態にあるのか評価できるものと考えられる。

第3節 研究目的及び研究内容

本研究では、琵琶湖北湖底層部における貧酸素化に伴うメタロゲニウム粒子の生成機構について、現場の水質調査データから発生要因を検討するとともに、メタロゲニウム粒子を再現よく生成する実験室培養系を確立することにより、詳細に解析することを一つの目的とした。さらに、この実験室培養系を用いて粒子生成をもたらす環境因子を特定することにより、琵琶湖底層部でどのような環境因子がメタロゲニウム粒子の生成に関与するのか調査解析した。

第2章では、これまでに取得された水質調査データおよび本研究で得た最近の水質調査データを基に、琵琶湖北湖におけるメタロゲニウム粒子の発生状況とDO濃度およびpH値といった水質と底質の関係性を経年変化や鉛直分布から解析を試みた。また、底層部より採取したメタロゲニウム粒子の構造特性について、多糖含有の有無、並びにマンガン酸化物の結晶構造の観点から詳細な解析を行った。

第3章では、琵琶湖水からマンガン酸化細菌を単離し、メタロゲニウム粒子を再現よく生成する培養系の確立を目指した。単離した細菌株の分類同定を行うとともに生理学的な特徴付けや増殖特性を明らかにしようとした。また単離した菌株が生成するメタロゲニウム粒子の形態や構造特性について、レクチン染色や電子顕微鏡観察等によって詳細に明らかにした。

第4章では、第3章で単離したマンガン酸化細菌におけるメタロゲニウム粒子の生成要因を明らかにするため、DO濃度、pH値、培地成分を変えて室内実験を実施し、その培養特性を解析した。

さらに、琵琶湖で発生したメタロゲニウム粒子が植物プランクトンおよびその分解物に付着している様子が頻繁に観察されたこと、マンガン酸化細菌単離株の培養特性として、メタロゲニウム粒子の生成には多糖類の添加が必要であったことから、琵琶湖北湖表層部で発生した粘質鞘を持つ植物プランクトンが底層部に沈降して、メタロゲニウム粒子生成に必要な多糖類の供給源として機能しているとの仮説を立てた。

そこで第5章では、植物プランクトン調査データから、琵琶湖北湖において観測されたメタロゲニウム粒子数と植物プランクトンバイオマス（総細胞容積）との関係性を解析した。さらに、単離したマンガン酸化細菌の培養試験により、植物プランクトンの関与を実験的に明らかにすることにより、粘質鞘をもつ植物プランクトンのメタロゲニウム粒子生成への関与について検討した。

第2章 琵琶湖北湖におけるメタロゲニウム粒子の発生状況と生成要因： 水質との関連性

第1節 はじめに

琵琶湖におけるメタロゲニウム粒子の発生は、1992年に南湖の浚渫跡地（図1-1：086地点）で Miyajima により初めて観測された¹²⁾。北湖今津沖中央地点では、10年後の2002年11月に水深約90 mにおいて初めて観測された¹⁴⁾。今津沖中央地点底層部ではそれ以降ほぼ毎年夏季から冬季にかけて DO 濃度の低下に伴い、メタロゲニウム粒子が観測されるようになった。南湖におけるメタロゲニウム粒子の発生は、浚渫跡地に限定して観測されたが、北湖では、第一湖盆全体で起きており（図1-1）¹⁴⁾、その発生範囲は極めて広い。

既往研究で、琵琶湖底層部では DO 濃度の減少により底泥から Mn^{2+} イオンが溶出することが報告されている^{12,61)}。溶出した Mn^{2+} イオンは、微生物の生物学的酸化作用により酸化され⁶¹⁾、フィラメント状のメタロゲニウム粒子を生成すると考えられているが¹²⁻¹⁴⁾、その実態は解明されていない。また、琵琶湖北湖の底層部においては、DO 濃度や pH 値などの水質変動とメタロゲニウム粒子発生に関連性について長期的に解析を行った報告はなされていない¹²⁻¹⁴⁾。

本章では、まず琵琶湖北湖の底層部で発生したメタロゲニウム粒子の形態や微細構造について詳細な解析を行なった。また同地点の底泥の組成を分析するとともに、 Mn^{2+} イオンの溶出試験を行い、メタロゲニウム粒子生成における Mn^{2+} イオンの供給ポテンシャルを評価した。さらに、琵琶湖で実施した2002～2013年度までの12年間の長期的なメタロゲニウム粒子発生状況と水質調査データの関連性を検討するとともに、pH 値低下の要因である溶存 CO_2 濃度との関連性についても解析を加えることとした。

第2節 調査地点及び調査期間

琵琶湖北湖の最深部付近である今津沖中央地点（北緯 35°23'41"、東経 136°07'57"）を調査地点とした（図1-1）。

本研究では、2002～2013年度の水質調査データ（DO 濃度、pH、水温及び Mn 濃度）は、滋賀県で調査し公表しているデータを文献値として用いた⁶²⁻⁷³⁾。水質及びメタロゲニウム粒子発生量は毎月2回計測を行い、2014年度の水質調査データは本研究で測定したものをを用いた。また、同地点で発生したメタロゲニウム粒子数に関して、2009年11月以前の観測データは、石川らによって報告⁷⁴⁾されたものをを用いた。2009年12月以降の観測データは本研究の調査によって得られたものである。

今津沖中央地点における底泥の採泥は2013年5月14日、7月9日及び10月28日に行った。

第3節 調査方法及び試験方法

2-3-1 採水及び採泥方法

今津沖中央地点水深約 90 m において、バンドーン採水器（20 L、離合社）を用いて、水深 0.5、5、10、15、20、30、40、60、80 m、湖底直上 1 m（約 90 m）において採水を行った。採水した試料は冷蔵（5℃）して持ち帰り、滋賀県琵琶湖環境科学研究センター内にて分析した。

底泥はコアサンプラー（孔径 63 mm、離合社）を用いて採取した。研究室に持ち帰った底泥コア試料は、コアサンプラー内部の底泥を下部から押し出ししながら、表面から 10 mm までは 1 mm 毎（約 3.1 mL）に、それより下層は 10 mm 毎に分取した。試料の保存は 5℃とし、分取後は速やかに分析を行った（図 2-1）。

2-3-2 メタロゲニウム粒子の計数方法

メタロゲニウム粒子数は、微分干渉顕微鏡（Eclipse 80i、CCD カメラ画像処理装置、Digital sight DS-L1 付、Nikon）を使用して倍率 100 または 200 倍で計数した。試料水 1 mL をプランクトン計数板（S6300、松浪硝子工業）に注いで検鏡した^{75,76)}。

2-3-3 光学顕微鏡観察

光学顕微鏡観察は、スライドグラスにメタロゲニウム粒子を含む試料水を滴下し、カバーグラスをかけて微分干渉顕微鏡装置（Eclipse 80i、Nikon）にて検鏡を行った。対物レンズ（×100）使用時はイマージョンオイル（Olympus）をカバーグラス上に滴下し検鏡を行った。

2-3-4 電子顕微鏡観察

走査型電子顕微鏡（SEM）観察では、メタロゲニウム粒子を含む琵琶湖試料水にグルタルアルデヒド 1%（v/v）となるように加え、20 分間固定を行った。

次に、メンブレンフィルター（孔径 0.2 μm、Whatman）にて吸引ろ過し、リン酸緩衝液（pH 7.3）5 mL を用いて 3 回洗浄した。その後、順次 50%、70%、90%、99.5%（v/v）エタノール（各 5 mL）で 2 回ずつ脱水処理を行い、風乾した後、真空蒸着装置にてプラチナコーティングした。試料は SEM（JSM-6380M、JEOL）を用いて観察を行った。

透過型電子顕微鏡（TEM）観察では、メタロゲニウム粒子を含む琵琶湖試料水を遠心分離（3000 rpm、5 分間、4℃）し、浮遊物を沈殿物として回収した。この沈殿物に、30 mM HEPES 緩衝液（pH 7.0）で希釈した 2%（v/v）グルタルアルデヒドを 1.5 mL 加え 4℃にて一晩固定した後、30 mM HEPES 緩衝液 1.5 mL を用いて 3 回洗浄を行った。次に、30 mM HEPES 緩衝液で希釈した 2%（v/v）四酸化オスミウム 1.5 mL を用いて 4℃で 1 時間固定し、30 mM HEPES 緩衝液 1.5 mL を用いて 3 回洗浄を行った。その後、50%、70%、90%（v/v）エタノールで各 1 回、99.5%エタノールで 4 回、各 10 分間ずつ懸濁して脱水処理を行った。さらに、プロピレンオキサイド 1.5 mL を用いて 10 分間置換処理（室温）を 2

回行った後、エポキシ樹脂（Epon 812、日新 EM 社）を用いて、60℃で 48 時間包埋を行った。これをウルトラミクロトーム（Ultracut-UCT、Leica）で薄切し、2%（w/v）酢酸ウラニル⁷⁷⁾を用いて 60℃にて 15 分間加温染色後、蒸留水にて流水洗浄を行った。最後に、Lead stain solution（シグマ社）で 5 分間染色し、蒸留水にて流水洗浄を行い、カーボンコーティング試料を調製した。この試料は TEM（JEM1200EX、JEOL）を用いて加速電圧 80 kV で観察を行った。

高分解能走査透過型電子顕微鏡（SETM）観察では、メタロゲニウム粒子を含む試料水をカーボンコートメンブランフィルター（日新 EM 社）でろ過し、フィルターを風乾した。この試料を STEM（JEM-2100、JEOL）内に設置し、加速電圧 200 kV にて観察を行った。また、装置に付属している電子線回折装置を用いてマンガン酸化物の結晶相の解析を行なった。さらに、高角度散乱暗視野法（HAADF-STEM）により観察を行った⁷⁸⁾。

2-3-5 底泥の分析及び溶出試験方法

底泥コア試料の DO 濃度及び酸化還元電位（ORP）（LDO-HQ30d、Hack）を測定した。Mn 及び Fe 含量は、灰化処理後の試料を濃硝酸及び 50%（v/v）フッ化水素酸処理後、希硝酸に溶解して、ICP 発光分光分析法（4300DV、パーキンエルマー社）を用いて定量した。全有機炭素（TOC）は、溶存態有機炭素（DOC）と懸濁態有機炭素（POC）を測定し、それらの合計値として求めた。DOC は、工業標準化法⁷⁹⁾に従い TNC 分析計（Model TNC-6000、東レエンジニアリング社）で測定した。POC は CN コーダー（SUMIGRAPH Model NC-22F、住化分析センター社）を用いた。全リン（T-P）は、吸光光度法（V-530、日本分光社）で分析を行った⁸⁰⁾。水分含量は、試料を 105℃で乾燥させた後秤量して求め、強熱減量は乾燥試料をマッフル炉で 550℃、2 時間強熱した後秤量した。

採取したコア試料を用いた底泥の溶出試験は、底泥厚およそ 30 cm とし、ガラス繊維ろ紙（GF/B、Whatman）でろ過した底層部の湖水を底泥上に高さ 30 cm（約 1 L）となるように添加した。試験条件として、上部を開放した好気条件と、N₂ ガスで曝気し、DO 濃度 1.0 mg/L 以下とした微好気条件を設定した（図 2-2）。Mn の分析は、24、48、72 時間後に添加した湖水（約 1 L）を回収して行った。

また、湖水回収前に底泥表層部から 15 cm の DO 濃度を測定した（LDO-HQ30d、Hack）。

2-3-6 溶存二酸化炭素の定量法

琵琶湖北湖の現地調査において、炭酸ガス濃度計（CGP-3、東亜 DKK 社）（図 2-3A）または溶存二酸化炭素計（Frana tech 社）（図 2-3B）を用いて溶存二酸化炭素（溶存 CO₂）濃度を測定した。

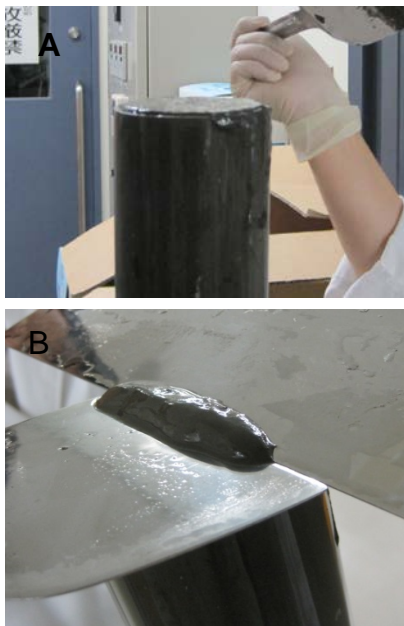


図 2-1 コアサンプラーを用いて採取した底泥の分取方法
A: 1 mm を計測、B: 平らなヘラで目的厚の底泥を採取

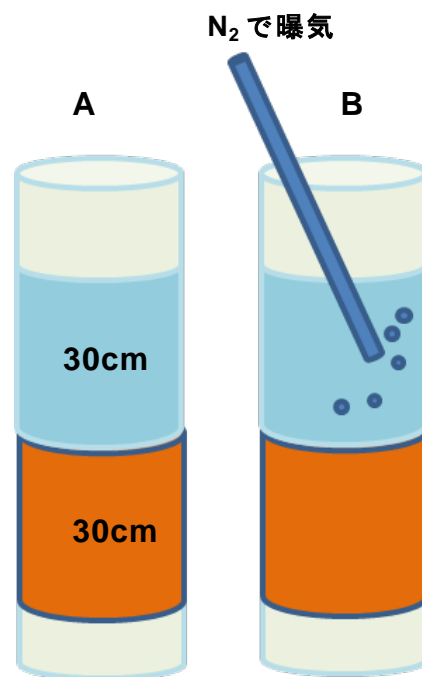


図 2-2 底泥コアを用いた Mn^{2+} イオンの溶出試験方法
A: 好気条件、B: 微好気条件

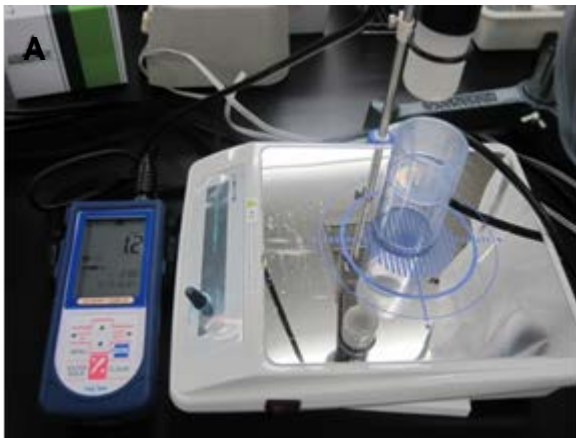


図 2-3 溶存二酸化炭素計
A: CGP-3 東亜 DKK 社、B: MET CO_2 Sensor Frana tech 社

第4節 結果

2-4-1 琵琶湖で観察されるメタロゲニウム粒子の形態

琵琶湖北湖の底層部で発生したメタロゲニウム粒子を光学顕微鏡で観察した結果を図 2-4 に示した。形状や大きさは調査時期によって異なっていた。粒子サイズは直径約 7~50 μm 程度で、フィラメントの長さや太さもそれぞれ異なっていた。2013 年 11 月 6 日に採取したメタロゲニウム粒子と、2014 年 1 月 21 日に採取した粒子について粒子径を比較すると、前者は $10.1 \pm 2.7 \mu\text{m}$ ($n = 30$)、後者は $15.8 \pm 3.2 \mu\text{m}$ ($n = 30$) で、粒子径が約 1.6 倍に増加していた。採取日に約 2 か月の差があったことにより、この間でメタロゲニウム粒子の生成反応が進行したため粒子径が増加したと推察した。

次に、メタロゲニウム粒子を SEM 及び TEM により観察した結果を図 2-5 に示した。メタロゲニウム粒子は、粒子中央部分からフィラメントが放射状に伸長した構造をもち、世界中の湖沼、海域で報告されているメタロゲニウム粒子の形状と一致していた^{12,14-17,23-26,51})。Klaveness らの報告¹⁶⁾では、観察したメタロゲニウム粒子の内部が空洞であることが示されていたが、琵琶湖で採取したメタロゲニウム粒子は、空洞のもの(図 2-5D)に加えて、内部に細胞の痕跡のような構造が含まれるもの(図 2-5C)が観察された。

2-4-2 琵琶湖で観察されるメタロゲニウム粒子の微細構造

メタロゲニウム粒子を STEM により観察した結果を図 2-6 に示した。粒子のフィラメント構造はシート状物質で構成され、細胞様の構造は認められなかったため、粒子自体は微生物の細胞ではないことが示された。シート状物質の電子回折パターンを解析した結果(図 2-6D)、 d 値 = 0.253 及び 0.148 nm を示す回折リングが観察された。これらの回折リングは、稜共有した MnO_6 八面体シートの面内(ab 面)に対応しており、 MnO_6 八面体シートが c 軸方向に積み重なっていることを示している。面間を示す回折リングが確認されなかったことと、メタロゲニウム粒子がマンガン酸化物からなることをふまえると、メタロゲニウム粒子を構成するシート状物質は、 Mn(IV)O_6 八面体の結晶格子が稜共有で繋がったプレートが積層したバーネサイト($\delta\text{-MnO}_2$)様であると推察された。

2-4-3 琵琶湖北湖底泥の解析

今津沖中央地点で採取した底泥コア試料の Mn、Fe、TOC、T-P、及び水分率の分析結果を図 2-7 に示した。なお試料は 2013 年 5 月 14 日、7 月 9 日、10 月 28 日に採取した。

底泥の Mn 濃度は底泥表層部(0~3 mm)で高く、4~10 mm でやや減少し、10 mm より下層ではほぼ一定の値となった。この傾向は、採取した時期に関係なくほぼ同様であった。底泥表層部 0~1 mm の Mn 含量は 5 月の試料で $8,200 \pm 1,100 \text{ mg/kg}$ (平均値 \pm SD : $n = 3$)、7 月の試料で $7,300 \pm 1,700 \text{ mg/kg}$ 、10 月の試料で $7,100 \pm 1,000 \text{ mg/kg}$ であった。この期間において、北湖底層部では 9 月

からメタロゲニウム粒子が観測された（粒子数：4200 個/mL）。TOC、T-P 及び水分率も底泥表層部（0～3 mm）で高かったことから、有機物等 SS 成分の沈降が考えられた。また、Mn は表層（0～3 mm）で高く深層で低い傾向があったが、Fe の濃度分布は異なっており底泥表層部から下層部までほぼ一定の含有率であった。

次に、7 月と 10 月の底泥試料を用いた Mn^{2+} イオン溶出試験の結果を図 2-8 と図 2-9 に示した。7 月の底泥試料における溶存態 Mn（ Mn^{2+} イオン）濃度は、好気条件、微好気条件ともに 1 日後と 2 日後でほぼ同じ値を示し、3 日後の好気条件でも 0.48 ± 0.04 mg/L、微好気条件で 0.62 ± 0.09 mg/L とほぼ同程度であった。また、10 月の底泥試料についても、好気条件と微好気条件でほぼ同じ値を示し、1 日後より 2 日後で溶存態 Mn 濃度が高く、3 日後はさらに高くなった。この時の溶存態 Mn 濃度は、好気条件で 0.48 ± 0.25 mg/L、微好気条件は 0.45 ± 0.02 mg/L と 7 月と同程度の値を示した。溶存態 Mn 濃度が微好気条件と好気条件で変化がなかったことから、コア直上水中の DO 濃度を測定した（図 2-10）。3 日後における DO 濃度は、微好気条件で 1.2 mg/L、好気条件で 2.5 mg/L と共に低い値を示した。10 月 28 日採取のコア内底泥表層部の DO 濃度と ORP は、 0.7 ± 0.04 mg/L、 -25 ± 3 mV であったことから、底泥表層部が還元状態にあったため、好気条件であっても Mn^{2+} イオンが溶出したと推察した。

2-4-4 琵琶湖北湖におけるメタロゲニウム粒子の鉛直分布

今津沖中央地点における 2010～2012 年度までのメタロゲニウム粒子数、DO 濃度及び水温の鉛直方向における分布状況を示した（図 2-11～2-13）。2010 年度では、10 月に水深 90 m で DO 濃度が 3.6 mg/L に低下し、メタロゲニウム粒子が 780 個/mL 観測された。1 か月後の 11 月には DO 濃度が 3.6 mg/L と同程度であったが、メタロゲニウム粒子は、この年の最高値である 2,800 個/mL に達した。その後、1～2 月に琵琶湖の全循環が起き、この攪乱によりメタロゲニウム粒子が拡散したことで表層部まで観測された（図 2-11）。

2011 年度の水深 90 m では、9 月の DO 濃度が 4.6 mg/L でメタロゲニウム粒子は観測されなかったが、1 か月後の 10 月では、DO 濃度は 4.4 mg/L で、メタロゲニウム粒子が 820 個/mL 観察された。11 月の DO 濃度は 5.0 mg/L で 10 月に比べ高かったもののメタロゲニウム粒子数は 1,200 個/mL に増加した。その後 12 月の DO 濃度は 3.2 mg/L となり、この年の最も低い DO 値となった。一方でメタロゲニウム粒子数は最大値となる 3,500 個/mL に増加した。1 月になると、より上層の水深 60 m で 1,900 個/mL のメタロゲニウム粒子が観察された。これは、30～40 m 付近にあった水温躍層が弱まり、全循環がはじまったことにより、底層部にあったメタロゲニウム粒子が中層部にまで拡散したためと考えられた。さらに、2 月以降になると、全循環による完全混合が起き、DO 濃度の回復とメタロゲニウム粒子の拡散により、底層部から表層部まで、DO 濃度及びメタロゲ

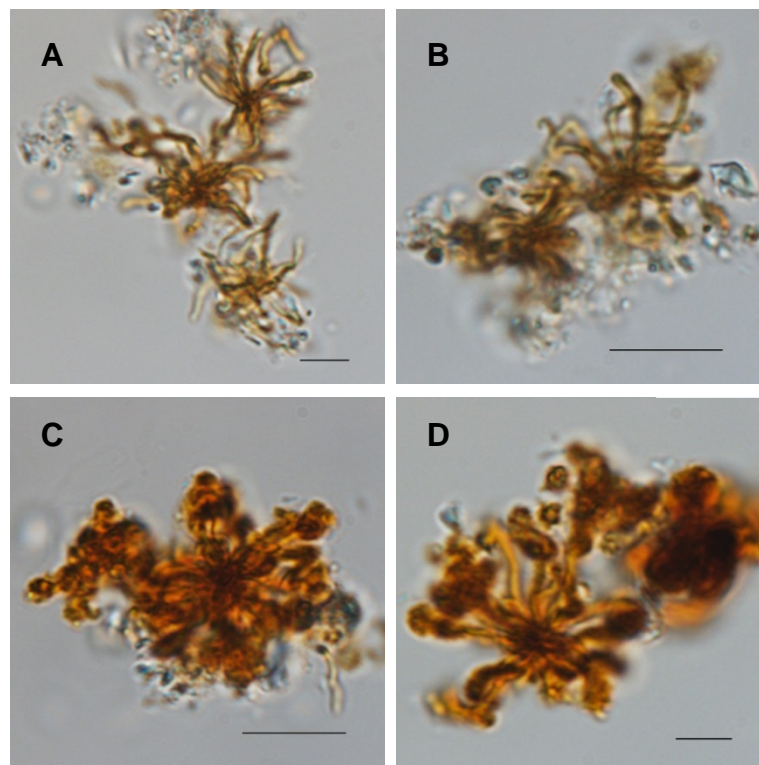


図 2-4 琵琶湖北湖（今津沖中央地点水深 90 m）で採取されたメタロゲニウム粒子（採取日： A, B: 2013 年 11 月 5 日、C, D: 2014 年 2 月 3 日） Bar = 10

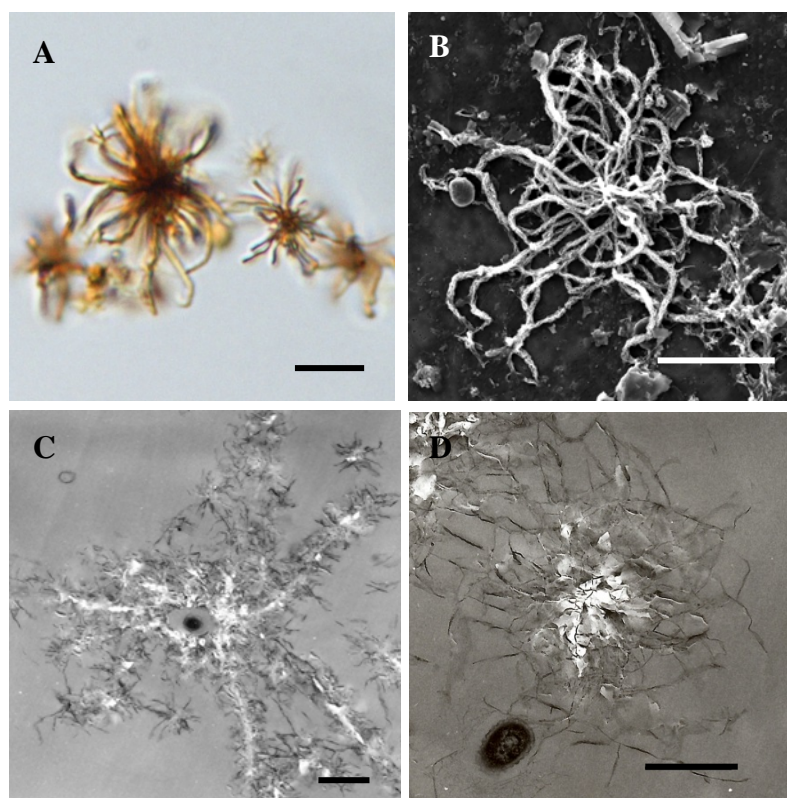


図 2-5 琵琶湖今津沖中央地点水深約 90 m のメタロゲニウム粒子
A: 微分干渉顕微鏡写真（採取日： 2012 年 8 月 22 日）、B: SEM 像（採取日： 2007 年 1 月 25 日）、C-D: TEM 像（採取日： 2008 年 10 月 6 日） Bar: A, B = 5 μ m, C, D = 50 nm

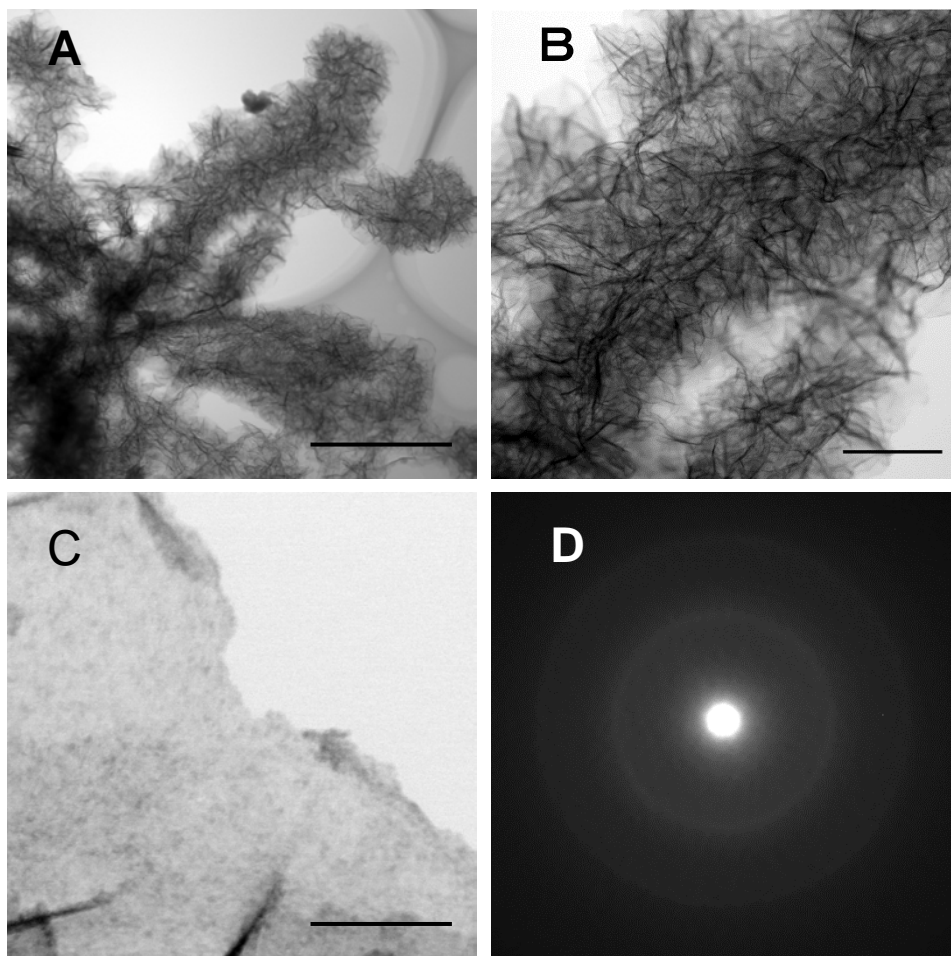


図 2-6 メタロゲニウム粒子の微細構造観察

A : 琵琶湖今津沖中央地点水深約 90 m から採取したメタロゲニウム粒子の STEM 像（採取日： 2013 年 1 月 7 日）、B : A の拡大像、C : B の拡大像、D : C の電子回折パターン Bar: A = 2 μm , B = 0.5 μm , C = 50 nm

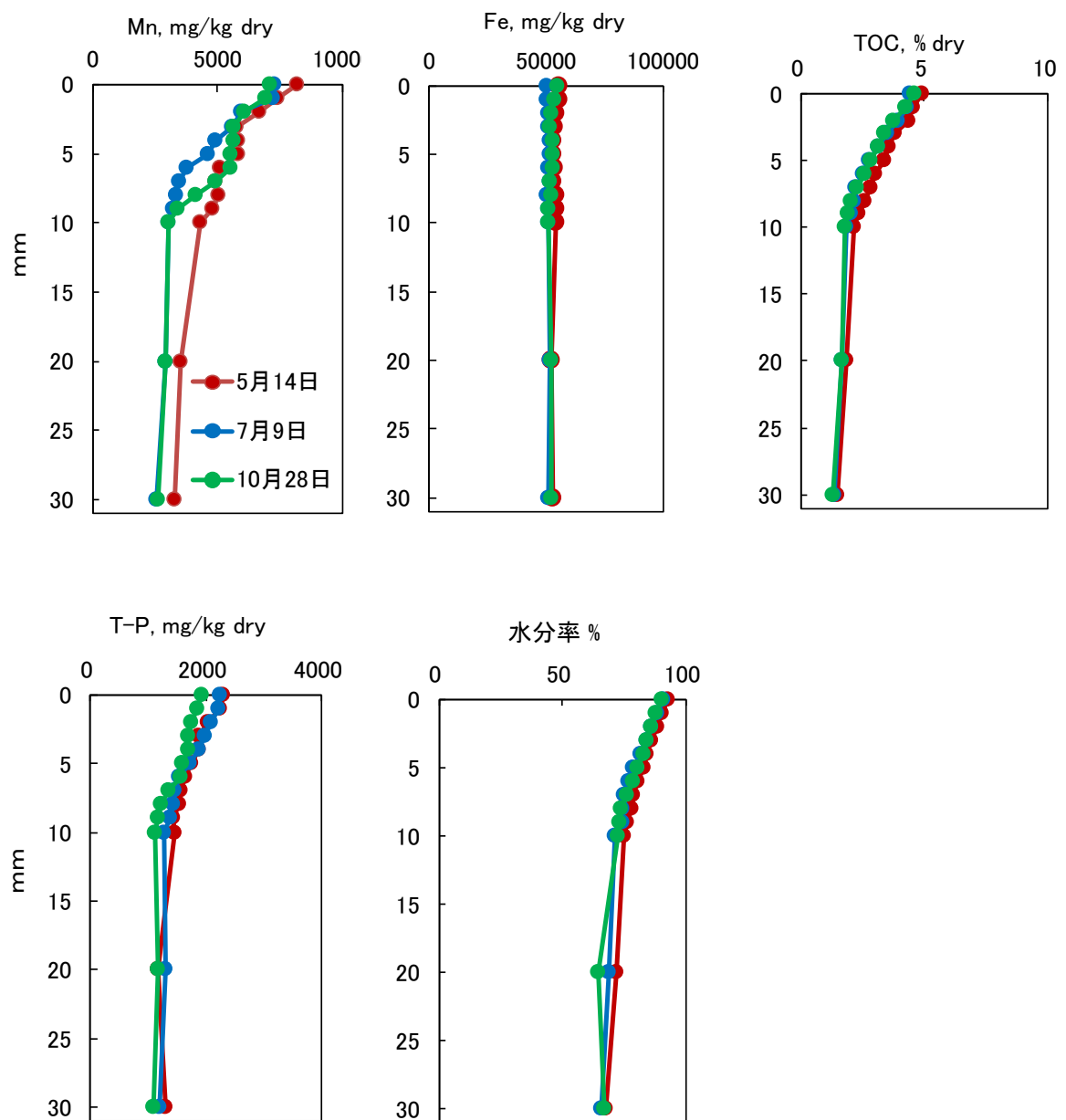


図 2-7 今津沖中央地点で採取した底泥の Mn、Fe、TOC、T-P、水分量の鉛直分布（採取日：2013 年 5 月 14 日、7 月 9 日、10 月 28 日）
 平均値（ $n = 3$ ）

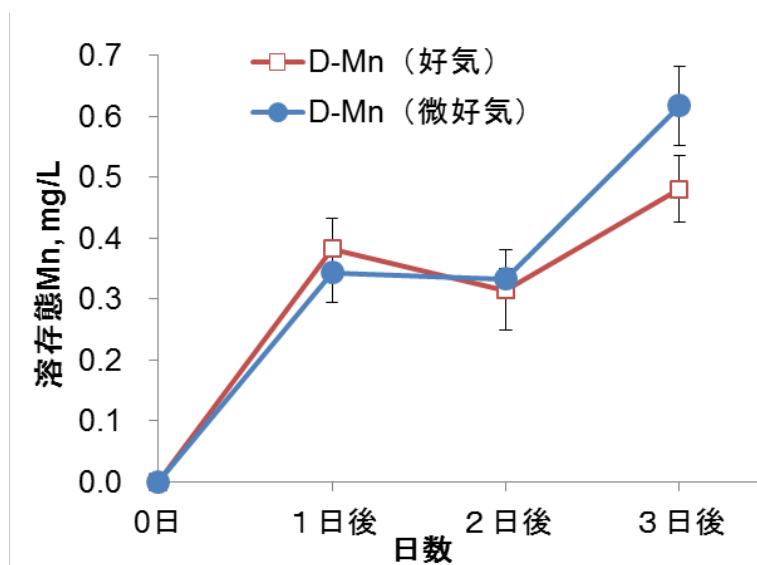


図 2-8 今津沖中央地点からコア採泥器にて採取した底泥を用いた Mn^{2+} イオン溶出試験結果 微好気条件 (DO 2 mg/L 以下)
(採泥日 : 2013 年 7 月 9 日) 平均値 \pm SD (n = 3)

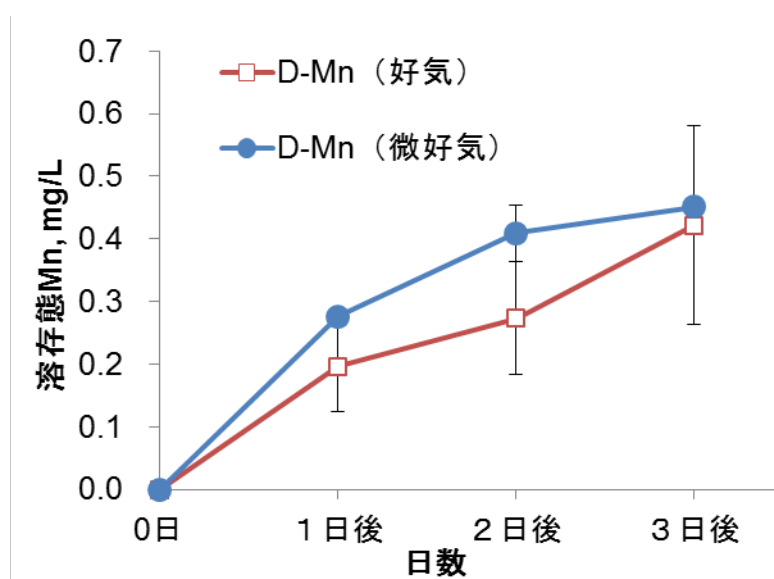


図 2-9 今津沖中央地点からコア採泥器にて採取した底泥を用いた Mn^{2+} イオン溶出試験結果 微好気条件 (DO 2 mg/L 以下)
(採泥日 : 2013 年 10 月 28 日) 平均値 \pm SD (n = 3)

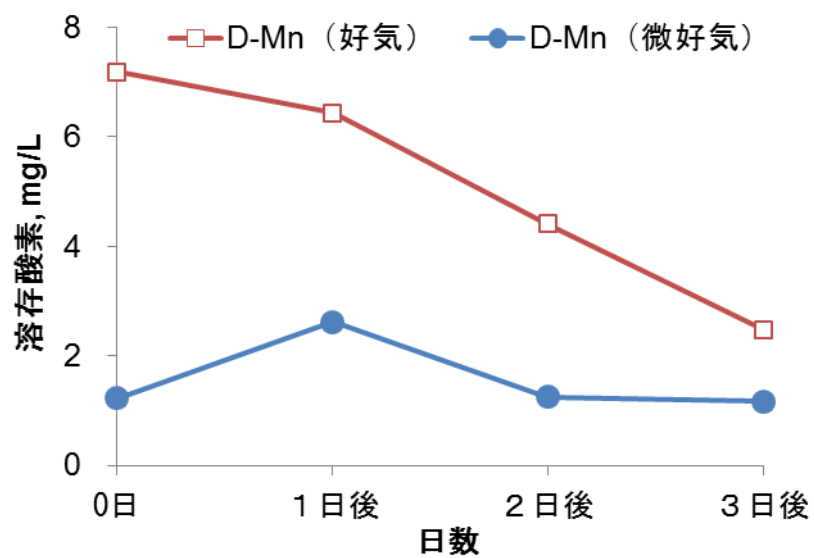


図 2-10 図 2-9 で示した溶出試験中の DO の変化
(採泥日：2013 年 10 月 28 日)

ニウム粒子数が均一化した。3月になると全ての水深でメタロゲニウム粒子は、ほとんど観測されなくなった（図 2-12）。

2012 年度についても、2010 年及び 2011 年とほぼ同様の傾向が確認できたが、9 月 18 日に台風 18 号の影響により湖水が攪乱され、10 月 2 日の観測では、9 月に水深 90 m に存在していたメタロゲニウム粒子が 80 m に移動し 2,700 個/mL となり、60 m においても 440 個/mL が観察された（図 2-13）。

しかし、水温躍層が強固であったため、底層部の DO 濃度は増加せず、11 月 5 日にはメタロゲニウム粒子は再度増加し 8,500 個/mL に達した。その後 1 月 7 日には、水温躍層が消失し、底層部の DO 濃度上昇とメタロゲニウム粒子数の減少が観察された。水温躍層が強固であれば、台風等の一時的な攪乱が起きても再度メタロゲニウム粒子が増加することが分かった（図 2-13）。

2010～2012 年度の 3 年間の測定データから、水深 90 m の底層部で DO 濃度が 3.6～6.4 mg/L に低下する秋季にメタロゲニウム粒子が発生し、1～2 月の冬季になると全循環により DO 濃度の回復とメタロゲニウム粒子の上層部への拡散が起きることが明らかとなった。また、水深 90 m のような深水層でも台風の影響を受け、メタロゲニウム粒子が拡散することも明らかとなった。メタロゲニウム粒子の発生状況は、年度によってほぼ変わることなく毎年繰り返されていた。

2-4-5 メタロゲニウム粒子の発生状況と水質との関連性

琵琶湖北湖底層部（水深 90 m）における 2002 年 4 月～2014 年 3 月までのメタロゲニウム粒子数と全 Mn 濃度、DO 濃度および pH 値の推移を図 2-14 に示した。メタロゲニウム粒子は、2003 年を除き毎年夏季から冬季にかけて観測されている。またその観測粒子数は年々増加傾向にあった。

メタロゲニウム粒子の発生は、DO 濃度及び pH 値が低下する時期と重なっていた。そこで、全 Mn 濃度と DO 濃度との相関係数を求めた、相関係数は $r = -0.56$ ($p < 0.05$)（図 2-15）で負の相関があり、底層部の低酸素化による Mn^{2+} イオンの溶出が推察された。

さらに、底層部における全 Mn 濃度とメタロゲニウム粒子数の経年変化はほぼ一致しており、両者の相関係数は $r = 0.81$ ($p < 0.05$) と高かったことから（図 2-16）、低酸素化により溶出した Mn^{2+} イオンの大部分が酸化されメタロゲニウム粒子として存在することが示唆された。

底層部における DO 濃度と pH 値の経年変化はほぼ一致していた（図 2-14）。DO 濃度と pH 値は $r = 0.78$ ($p < 0.05$) と高い相関関係にあった。メタロゲニウム粒子数と DO 濃度の相関をとると $r = -0.46$ ($p < 0.05$) となり（図 2-17）、弱い負の相関が認められた。さらに、メタロゲニウム粒子発生時（ > 10 個/mL、 $n = 146$ ）における DO 濃度の頻度解析の結果を図 2-18 に示した。最も頻度が多かったのは、DO 濃度 6 mg/L のときで、DO 濃度 6 mg/L 以下ではメタロゲニウム粒子発生件数の 61% を占めていたことから、DO 濃度が 6 mg/L 以下の時メタロゲニウム粒子が多く発生する傾向があると推定した。しかしながら、DO 濃度が 6

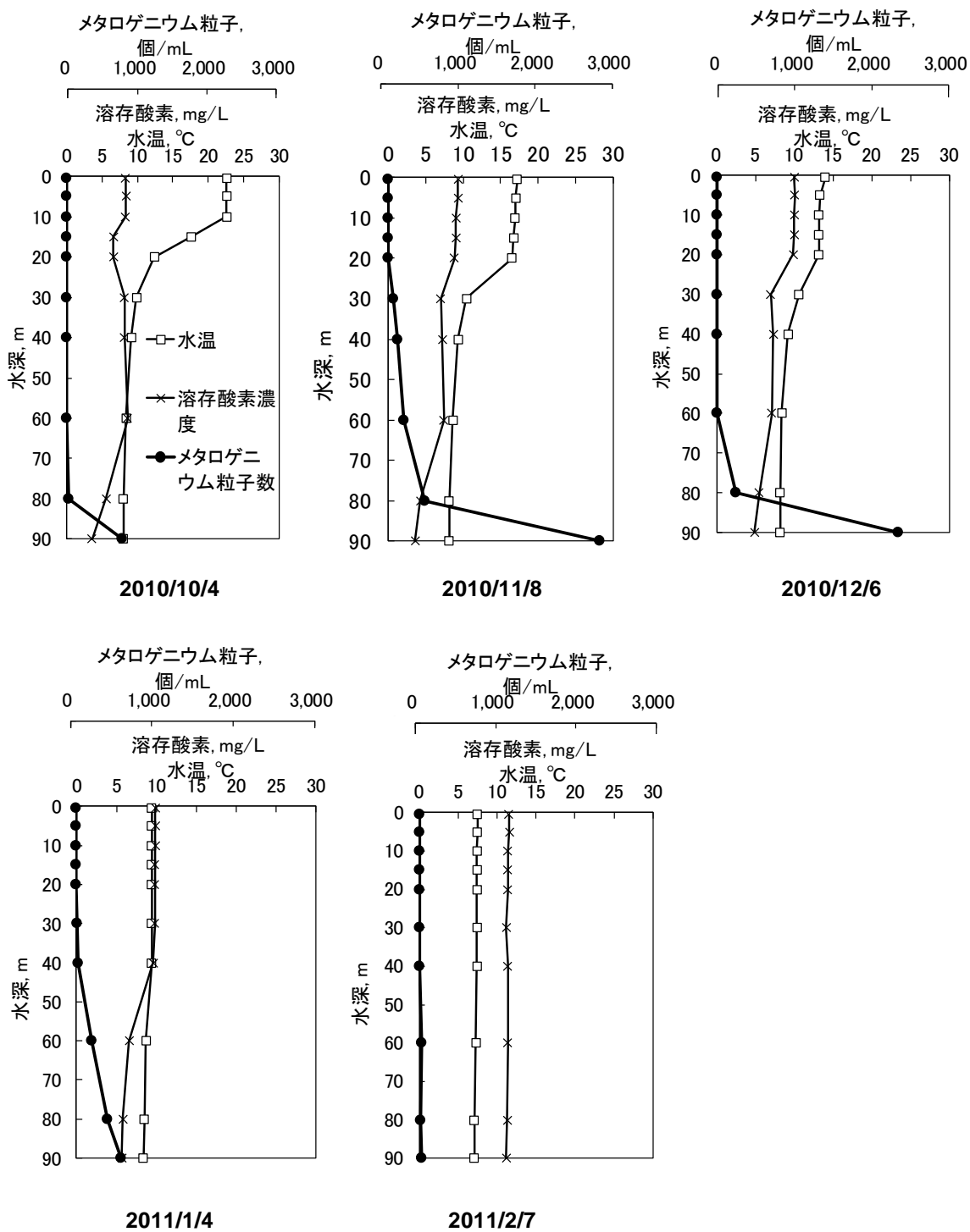


図 2-11 今津沖中央地点 (17B) におけるメタロゲニウム粒子と DO 及び水温の鉛直分布 (2010 年度)

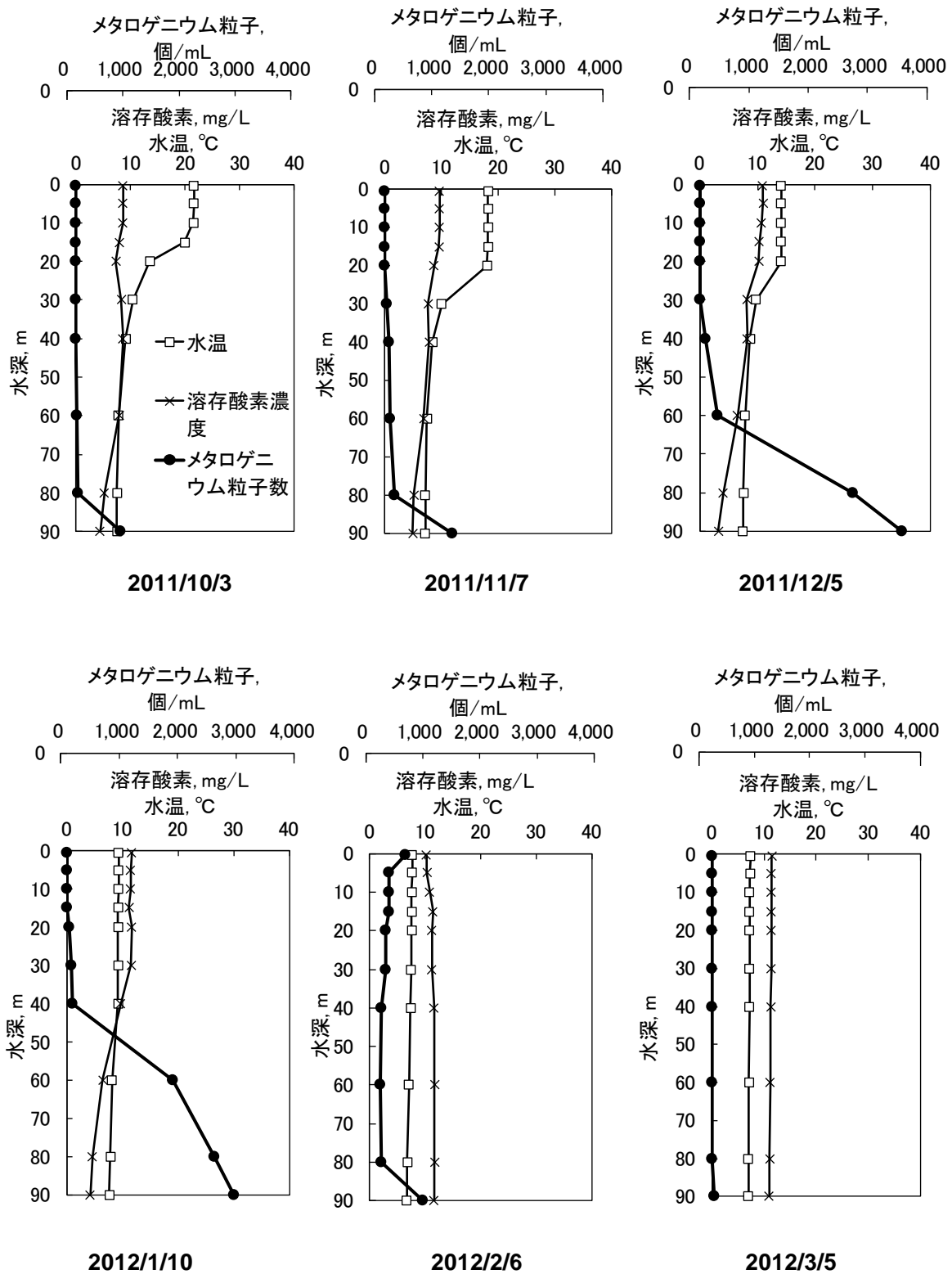


図 2-12 今津沖中央地点（17B）におけるメタロゲニウム粒子と DO 及び水温の鉛直分布（2011 年度）

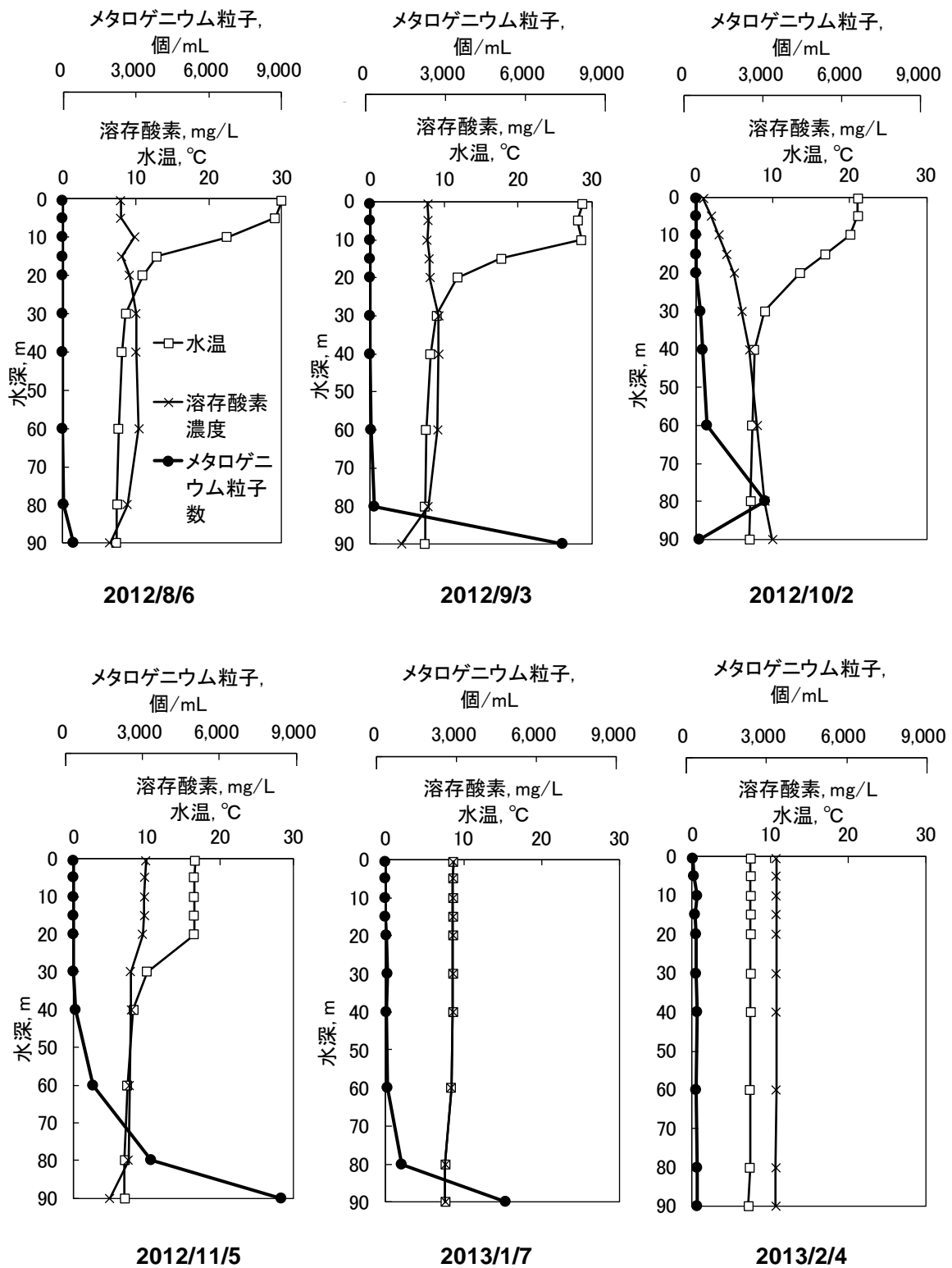


図 2-13 今津沖中央地点 (17B) におけるメタロゲニウム粒子と DO 及び水温の鉛直分布 (2012 年度)

mg/L 以下になってもメタロゲニウム粒子数が比較的少ない年もあり、DO 濃度だけではメタロゲニウム粒子数を説明することはできなかった。

また、メタロゲニウム粒子との関連性が報告¹⁹⁾されている pH 値に着目すると、pH 6.8~7.9 の時にメタロゲニウム粒子が発生しており、粒子数と pH 値の相関係数は $r = -0.41$ ($p < 0.05$ 、図 2-19) で、DO 濃度と同様に弱い負の相関があることが判明した（図 2-19）。さらに、メタロゲニウム粒子発生時における pH 値の頻度解析の結果を図 2-20 に示した。最も頻度が多かったのは、pH 7.2 のときであり、pH 7.2 以下のときメタロゲニウム粒子発生件数の 56% を占めていたことから、pH 7.2 以下の時メタロゲニウム粒子が多く発生する傾向にあると推定した。

2-4-6 メタロゲニウム粒子の発生状況と溶存二酸化炭素濃度

今津沖中央地点水深約 90 m において、2013 年 6 月~2014 年 11 月までメタロゲニウム粒子数、溶存 CO₂ 濃度及び pH を測定した結果を図 2-21 に示した。2013 年度のメタロゲニウム粒子発生数と溶存 CO₂ 濃度との関係性は確認できなかった。

しかし、溶存 CO₂ 濃度上昇時に pH 値が低下しており、メタロゲニウム粒子生成との関係性もあることが推察されたため、今後も調査を継続して検討する必要がある。

第 5 節 考察

琵琶湖で観察されるメタロゲニウム粒子の形態は、これまでにレマン湖²³⁾、ワシントン湖²⁴⁾、バイカル湖²⁵⁾及びバルト海²⁶⁾などで観察されているように、複数のフィラメントが中心部から放射状に伸長した構造を有していた。TEM 観察結果からメタロゲニウム粒子の内部が空洞のものと、内部に細胞の痕跡のような構造が含まれるものが観察されたが、メタロゲニウム粒子が生物であることを裏付けるような細胞膜や細胞壁のような細胞構造は認められなかった。この観察結果は Gregory らの報告¹⁷⁾と一致していた。メタロゲニウム粒子のフィラメント部分の微細構造は、シート状の層状構造で、バーネサイト様の結晶相であった。マンガン酸化細菌がバーネサイト様マンガン酸化物を作ると報告^{81,82)}されており、琵琶湖で採取したメタロゲニウム粒子も細菌由来であることが示唆された。

また、一瀬らは、琵琶湖から採取したメタロゲニウム粒子を、200 µM 硫酸マンガンを追加した M11 培地⁸³⁾を用いて 1 か月間 20°C でインキュベートすると、フィラメントが伸長するが、ホルマリンを加えて培養を行うと変化しないことを報告している^{14,61)}。本研究でも、2013 年 11 月 6 日に採取したメタロゲニウム粒子と、2014 年 1 月 21 日に採取した粒子の大きさを比較した結果、前者は $10.1 \pm 2.7 \mu\text{m}$ ($n = 30$)、後者は $15.8 \pm 3.2 \mu\text{m}$ ($n = 30$) と、約 2 か月間で、粒子径が約 1.6 倍に増加していた。さらに、琵琶湖で採取したメタロゲニウム粒子微細構

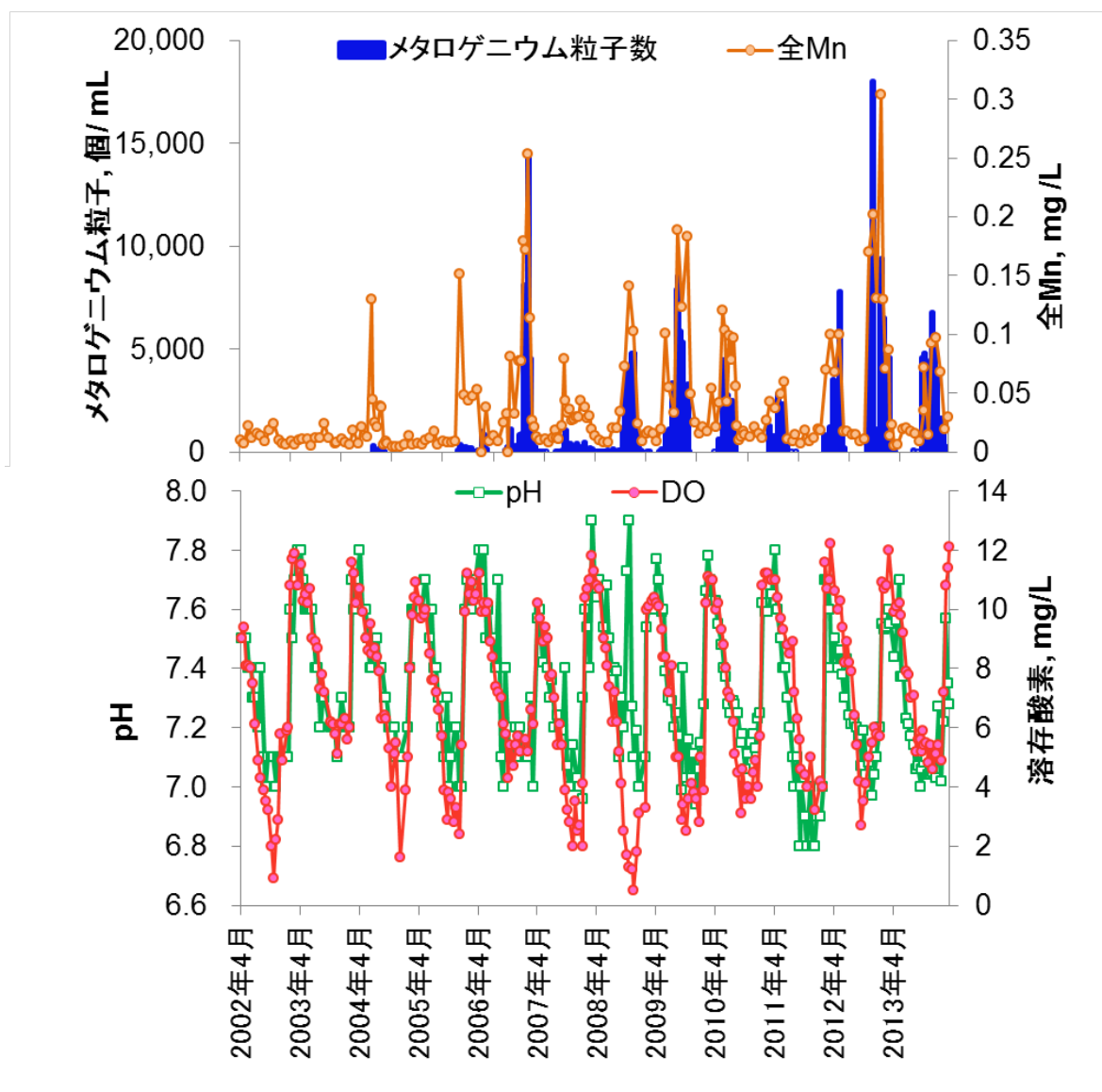


図 2-14 今津沖中央地点水深約 90 m におけるメタロゲニウム粒子の発生状況と全 Mn 濃度, DO 濃度, pH 値の経年変化 (2002~2013 年度)

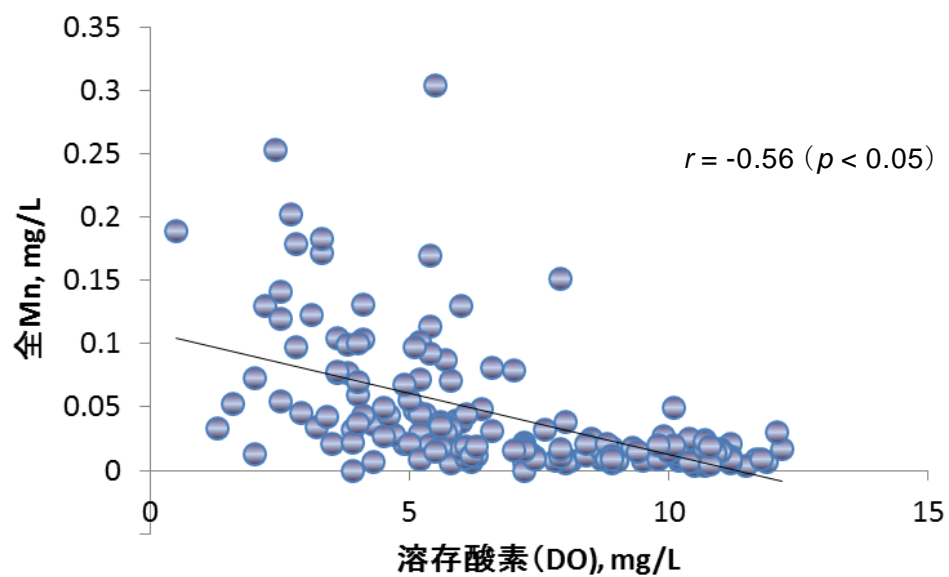


図 2-15 今津沖中央地点水深約 90 m における全 Mn 濃度と DO 濃度との関係（2002～2013 年度）

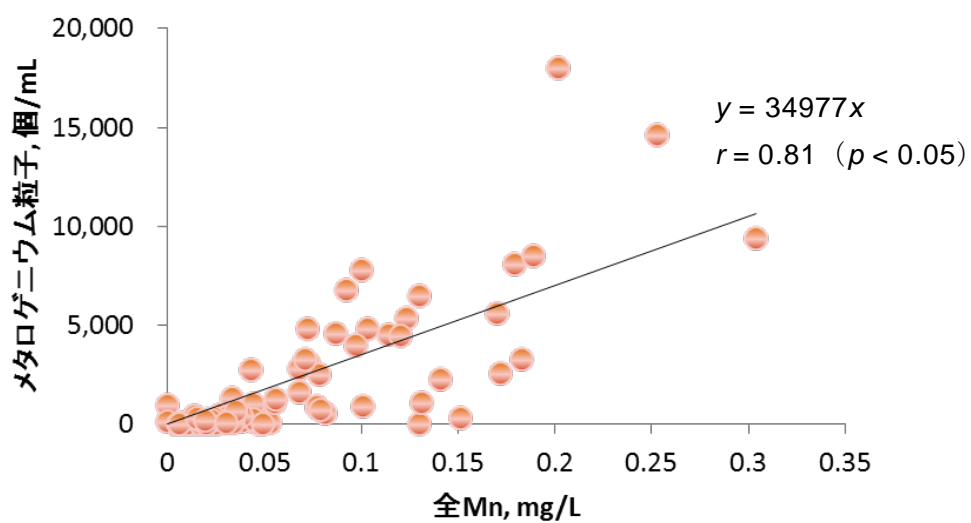


図 2-16 今津沖中央地点水深約 90 m におけるメタロゲニウム粒子数と全 Mn 濃度の関係（2002～2013 年度）

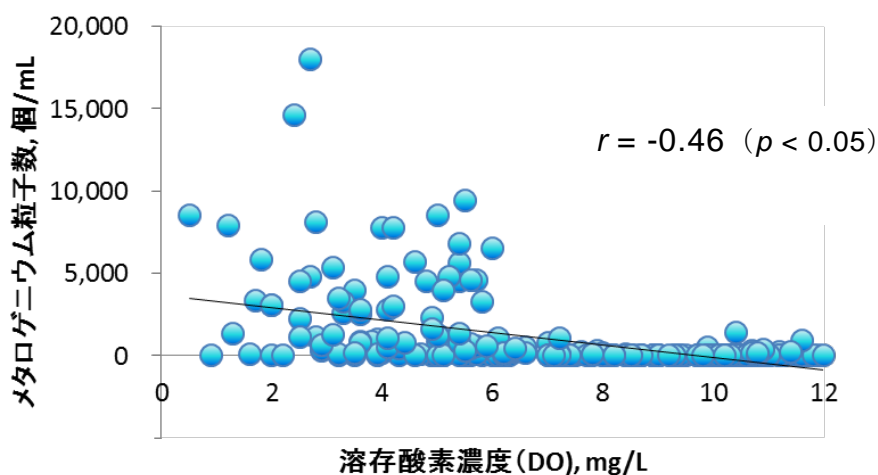


図 2-17 今津沖中央地点水深約 90 m におけるメタロゲニウム粒子数と DO 濃度の関係（2002～2013 年度）

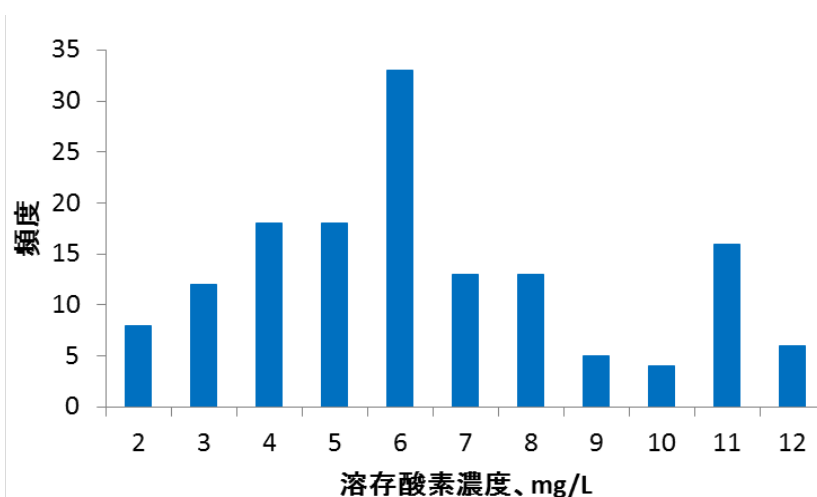


図 2-18 今津沖中央地点水深約 90 m におけるメタロゲニウム粒子発生(メタロゲニウム粒子数が 10 個/mL 以上)と DO 濃度の分布状況（2002～2013 年度）

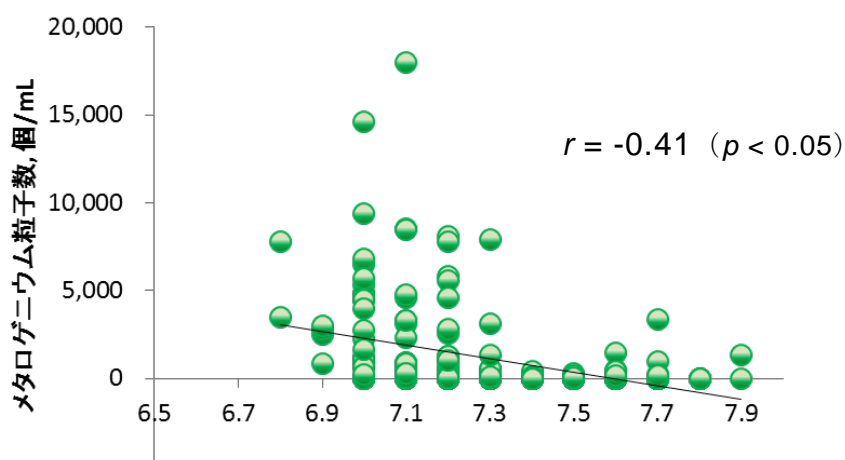


図 2-19 今津沖中央地点水深約 90 m におけるメタロゲニウム粒子数と pH 値の関係（2002～2013 年度）

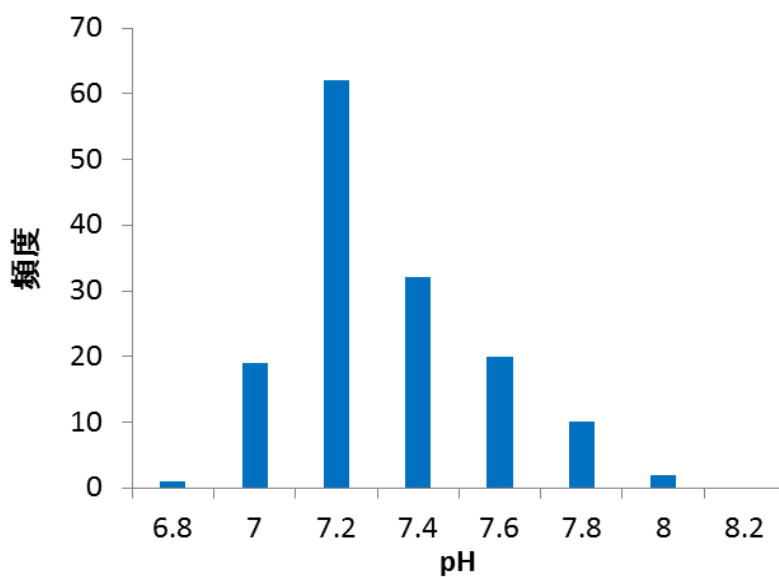


図 2-20 今津沖中央地点水深約 90 m におけるメタロゲニウム粒子発生（メタロゲニウム粒子数が 10 個/mL 以上）と pH 値の分布状況（2002～2013 年度）

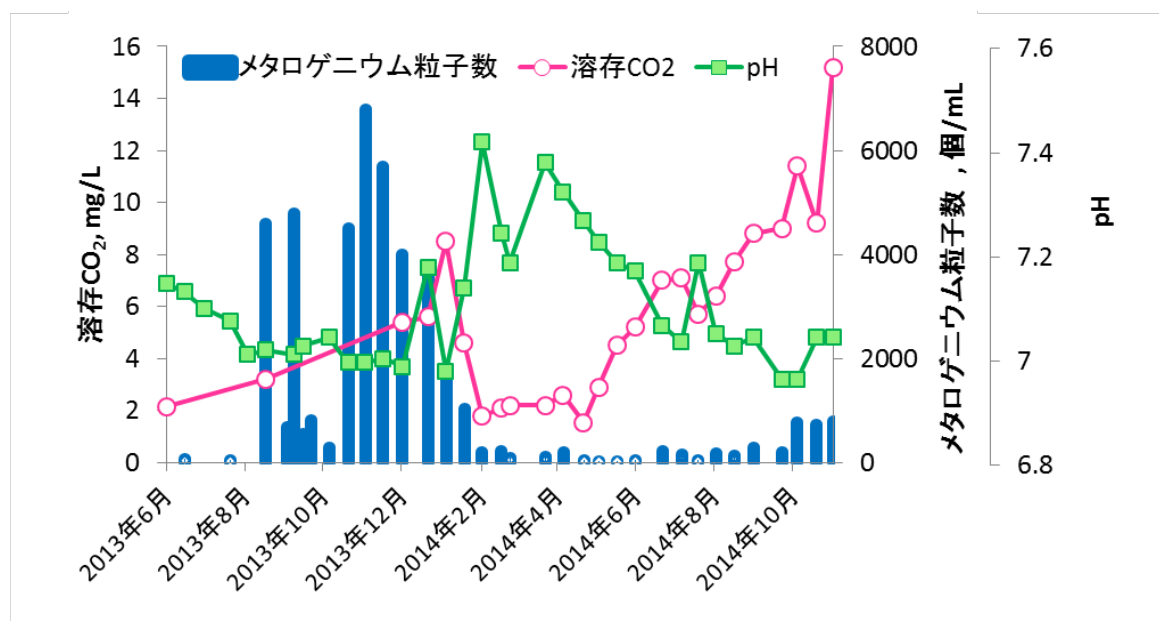


図 2-21 今津沖中央地点水深約 90 m におけるメタロゲニウム粒子の発生状況と溶存 CO₂ 濃度及び pH 値の推移（2013 年 6 月 17 日～2014 年 10 月 20 日）

造がバーネサイト様であることから、琵琶湖でのメタロゲニウム粒子の伸長には生物反応が関与するものと考えられた。

コアによる底泥解析の結果から、底泥表層部（0～3 mm）で Mn 濃度が乾燥重量当たり 7,100～8,200 mg/kg と高いことが分かった。Kawashima らは、琵琶湖北湖の最深部付近で採取した堆積物の表層で Mn 濃度が極めて高く、以下急激に減少し下層ではほとんど一定の濃度であると報告⁶¹⁾しており、本章の結果と一致していた。このことについて Kawashima らは、溶存態 Mn (Mn^{2+} イオン) が湖底の酸化層から底水層に溶出した後、底層水中で酸化され、また生じた酸化物に Mn^{2+} イオンが吸着することによって粒子状になり、再び堆積物として沈降することで底泥表層部に Mn が高濃度に集積すると報告⁶¹⁾している。一瀬らも、メタロゲニウム粒子の生成には Mn^{2+} イオンが不可欠であり、底泥表層部の酸化還元境界層で、「新しくできては沈殿していき、また、新しくできては沈殿していく」サイクルを繰り返しながら増加すると推察している¹⁴⁾。Kawashima ら⁶¹⁾や一瀬ら¹⁴⁾が指摘した、溶存態 Mn の酸化・沈殿作用をマンガン酸化細菌が担っており、底泥表層部に Mn が高濃度に集積したことが考えられた。

一方で Fe は、底泥表層部から深層部までほぼ一定の値を示した。このことは、Mn のような底泥からの溶出が起きていないことを示唆している。還元的環境下（ORP：約±10 mV）では、酸化鉄は Fe^{2+} イオンに還元されて溶出することが報告されている^{84,85)}。今津沖中央地点水深 90 m における 2002～2013 年度の DO 濃度の最小値は 0.5 mg/L で、微好気ではあるものの嫌気状態にまでは至っていないため、 Fe^{2+} イオンの溶出は、ほとんど起きていないと推察した。

底泥コアを用いた Mn^{2+} イオン溶出試験結果では、 Mn^{2+} イオンの溶出濃度は 3 日間の試験期間で 0.45～0.62 mg/L（平均値：0.5 mg/L）となった。現地の水深約 90 m（底泥表面の直上 1 m）の全 Mn 濃度の平均値は 0.04 mg/L で、これと比較すると 15～20 倍もの高い値を示しており、同地点の全 Mn 濃度の最高値である 0.30 mg/L と比較してみても約 2 倍と高い値であった。

そこで、 Mn^{2+} イオン溶出試験結果を用いて、底泥（高さ 30 cm、表面積 0.0031 m^2 ）から、溶出する Mn 濃度を 0.5 mg/L（ Mn^{2+} イオン溶出試験平均値）とし、メタロゲニウム粒子が発生している第 1 湖盆（図 1-1）内の底泥から溶出される Mn^{2+} イオン量の試算を行った。

第 1 湖盆内水深 80 m 及び 89 m の底面積と容積は、滋賀県琵琶湖環境科学研究センターが保持する 50 m メッシュの水深データから湖盆の体積を算出し、同じ体積を持つ逆円錐を仮定して、湖盆の底面積および容積を概算した。水深 80 m より深い湖底の底面積は、82 km^2 で、水深 80 m より下層部の容積は、0.59 km^3 と概算した。また、この地点は水深約 90 m であるため底層直上 1 m である水深 89 m の概算を行った。水深 89 m より深い湖底の底面積は、73 km^2 で、水深 89 m より下層部の容積は、0.078 km^3 と概算した。

この概算結果を用いて、底泥からの Mn^{2+} イオン溶出が水深 80 m より下層部の底面積で起きたと仮定して Mn 濃度を求めると、約 0.022 mg/L と試算された。

実際の水深 90 m における Mn 濃度の平均値 0.04 mg/L (2002~2013 年度) のおよそ 1/2 相当の値を示した。次に、底泥からの Mn^{2+} イオン溶出が水深 89 m より下層部の底面積で起きたと仮定すると、約 0.17 mg/L と試算された。この結果は、水深 90 m におけるメタロゲニウム粒子発生時 (> 10 個/mL) の Mn 濃度の平均値 0.06 mg/L (2002~2013 年度) の約 3 倍の値で、実際の測定値の最大値 0.30 mg/L (2002~2013 年度) のおよそ 1/2 相当であった (図 2-22)。以上の結果から、コアによる Mn^{2+} 溶出試験結果と、実際の湖底環境における Mn 濃度の実測値に大きな隔たりは認められないことから、メタロゲニウム粒子生成における Mn の供給源として底泥が機能していることが示唆された。

次に、鉛直方向での調査 (2010~2013 年度) から、メタロゲニウム粒子は、水深 90 m の底層部で DO 濃度が 3.6~6.4 mg/L に低下する秋季に発生し、1~2 月の冬季になると全循環により DO 濃度の回復とメタロゲニウム粒子の拡散が起き、2~3 月になると消失するという、現象が毎年繰り返されていることが明らかとなった。メタロゲニウム粒子の消失については、拡散後に全層で低濃度の粒子態 Mn と溶存態 Mn が確認されることから、沈降と溶解の両方が起きていることが示唆された (図 2-23)。

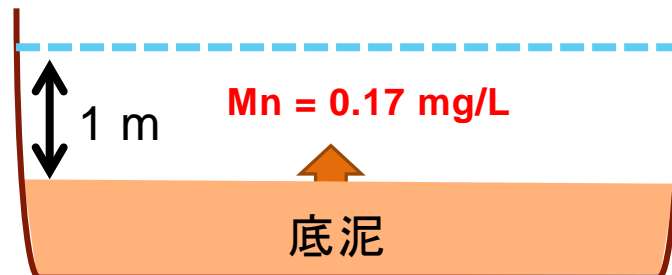
琵琶湖北湖今津沖中央地点水深約 90 m における、メタロゲニウム粒子と DO 濃度および pH 値の観測結果から、DO 濃度は 6 mg/L 以下で pH 値は 7.2 以下の時にメタロゲニウム粒子が発生する傾向にあった。しかし、DO 濃度及び pH 値は、メタロゲニウム粒子数と弱い負の相関関係であったことから、メタロゲニウム粒子の生成には DO 濃度や pH 値以外の環境因子も関与していることが推察された。

湖沼底層部における貧酸素化要因のひとつとして、植物プランクトンの異常発生によることが報告されている^{86,87)}。植物プランクトン等の有機物分解に伴い、酸素が消費されて、溶存 CO_2 濃度が上昇し pH 値が低下する。今津沖中央地点水深 90 m の調査結果 (図 2-21) から、溶存 CO_2 濃度の上昇と pH 値の低下は同時に起きていたことが確認できる。Sternbeck は、マンガン酸化物の生成は、pH 7.44~7.63 で起きており pH 値に依存することを報告している¹⁹⁾。琵琶湖における pH 値の状況は、その大半が pH 6.8~7.3 で分布しており、pH 7.2 以下になるとメタロゲニウム粒子が観察される傾向にあることから、Sternbeck の結果¹⁹⁾とほぼ一致していた。

第 6 節 要約

本章では、琵琶湖で発生したメタロゲニウム粒子の形態やその微細構造について解析を行った。琵琶湖から採取したメタロゲニウム粒子の形態は、レマン湖、ワシントン湖、バイカル湖及びバルト海で確認されたメタロゲニウム粒子とほぼ同様の形状で、細胞膜や細胞壁のような細胞構造が確認できなかったことから粒子自体が生物であるとは考えられなかった。フィラメント部分の構成成分は主に MnO_2 で、シート状の層状構造を持つバーネサイト様の結晶相であ

北湖第一湖盆水深 89m より下層部の底泥部表面積 73 km²
 水深 90m 直上 1m 容積 0.078 km³



90m Mn 濃度（平均値）= 0.06 mg/L
 （2002～2013 年度/粒子発生時期）

図 2-22 今津沖中央地点水深 90 m の底泥表面から溶出する Mn²⁺イオン量を求めたイメージ図（概算値は Mn²⁺イオン溶出試験結果を基とした）

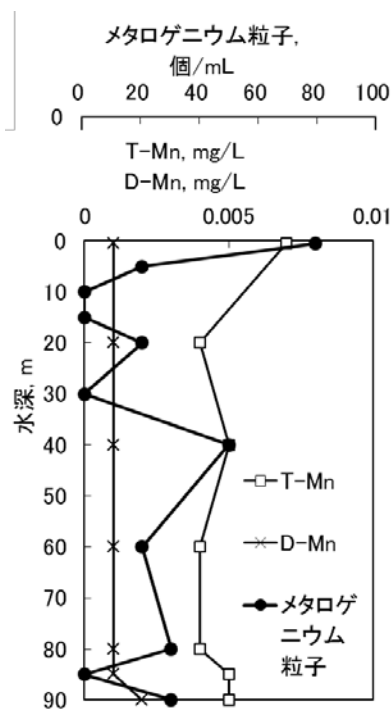


図 2-23 今津沖中央地点におけるメタロゲニウム粒子数と全マンガン濃度および溶存態 Mn 濃度の鉛直分布（2013/2/18）

ることが明らかとなった。

底泥中の Mn 濃度及び Mn^{2+} イオン溶出試験結果により、底泥の Mn 供給ポテンシャルを評価しメタロゲニウム粒子生成における Mn の供給源として底泥が機能していることが判明した。

さらに、琵琶湖で実施した 2002～2013 年度の水質調査データより、メタロゲニウム粒子生成要因の検討を行ったところ、底層部の DO 濃度が 6 mg/L 以下、pH 7.2 以下になるとメタロゲニウム粒子が発生する傾向が認められた。

しかし、メタロゲニウム粒子数と DO 濃度及び pH 値には弱い負の相関関係しか認められず、メタロゲニウム粒子生成に関する因子として、DO 濃度や pH 値以外にも未知の因子が存在していることが推察された。

第3章 マンガン酸化細菌 *Bosea* sp. BIWAKO-01 株の単離と特徴付け及びメタロゲニウム粒子の構造特性

第1節 はじめに

琵琶湖今津沖中央地点では、2002年11月に初めてメタロゲニウム粒子が観測された。メタロゲニウム粒子は Mn^{2+} イオンの微生物酸化により生成されると報告^{12,61)}されているがその実態は不明である。メタロゲニウム粒子を生成するマンガン酸化細菌の単離事例は、1964年の *Metallogenium symbioticum* の報告⁸⁸⁾まで遡るが、現在に至るまでメタロゲニウム粒子を生成する微生物の生態及び発生機構についてはほとんど解明されていない。

Emerson らは、マンガン酸化真菌の培養液中で生成されたメタロゲニウム粒子の構造を解析した⁵¹⁾。メタロゲニウム粒子の Mn 酸化物をヒドロキシルアミンで溶解すると、何らかの物質が残り、これが酸性多糖類及びタンパク質を含むこと、触媒活性をもち Mn^{2+} イオンを添加すると再び Mn 酸化物が沈着することを明らかにしている。また、光学顕微鏡や透過型電子顕微鏡観察により、粒子内には菌糸など細胞の構造は含まれないことを示した。しかし、詳細な構造や生成機構は未だ明らかにされていない。

メタロゲニウム粒子に関して研究がほとんどされなかったのは、メタロゲニウム粒子を生成する微生物培養系を取得しても、継続培養すると Mn 酸化能力を失うことが報告¹³⁾されており、実験室内の培養条件でメタロゲニウム粒子を安定して生成する培養系を取得することは困難であったためと考えられる。

従って、メタロゲニウム粒子生成の微生物生態や機構の解明には、メタロゲニウム粒子を生成するマンガン酸化細菌を単離して、メタロゲニウム粒子を安定して生成する培養条件を確立する必要がある。

本章では、琵琶湖湖水からメタロゲニウム粒子を生成するマンガン酸化細菌を単離し、その系統分類や生理学的な性状について検討した。また、培養液中でのメタロゲニウム粒子の生成過程を詳細に観察するとともに、生成した粒子の構造特性についてナノレベルで明らかにすることを目的として解析を行った。

第2節 調査地点および調査期間

琵琶湖北湖の最深部付近である今津沖中央地点水深約 90 m（北緯 35°23'41"、東経 136°07'57"）において、バンドン採水器（20 L、離合社）を用いて 0.5、5、10、15、20、30、40、60、80 及び 90 m の水深から滅菌瓶に採水し、冷蔵保存（5℃）にて持ち帰った。この採水は、2005年11月16日、11月21日、12月7日、12月20日の4回実施し、合計40個の湖水試料を培養の植種源とした。

第3節 試験方法

3-3-1 メタロゲニウム粒子生成細菌の単離方法

メタロゲニウム粒子生成細菌の培養には、Miyajima の半流動培地¹³⁾（以下、

M3 半流動培地と記す)を用いた。文献¹³⁾に記載された培地組成は、麦芽エキス (100 mg/L、Oxoid)、酵母エキス (40 mg/L、Oxoid)、NaHCO₃ (500 μM)、寒天 (500 mg/L、Grade A、BBL)、MnSO₄ (200 μM) であったが、本研究では MnSO₄ を最終濃度 2 mM となるように添加した。滅菌した M3 半流動培地 15 mL (30 mL 容ねじ口試験管を使用) に各湖水試料を 5 mL ずつ各 5 本接種し、20℃、暗所で 2 週間から 4 週間静置培養を行った。培養中に茶褐色の Mn 酸化層を生成した培養液については、茶褐色部分の検鏡を行いメタロゲニウム粒子の存在を確認した。メタロゲニウム粒子を確認した茶褐色層の 10 μL を無菌的に植え継ぐことを数十回繰り返し安定した培養系を得た。なお、孔径 0.2 μm のメンブランフィルター (Whatman) を用いてろ過滅菌した湖水を同様に接種・培養し、コンタミネーションが起こっていないことを確認した。

得られた培養液は、M3 半流動培地の寒天の添加量を 15 g/L に増量した M3 寒天平板培地及び R2A 寒天培地 (Oxoid) 上に塗抹した。これらの平板培地を、脱酸素剤である「アネロパック微好気」(三菱ガス化学) とともに専用密閉容器内に入れ、微好気条件下、20℃、暗所にて培養を行った。脱酸素剤を加えた密閉容器内は、O₂ 濃度 6~12%、CO₂ 濃度 5~8% (メーカーの取扱説明書) に維持される。この作業を数回繰り返すことで純粋培養株 (BIWAKO-01 株) を得た。

3-3-2 供試菌株

前述の操作で得られた BIWAKO-01 株に加えて、本研究では比較のため、他のマンガン酸化細菌 *Bosea* sp. UAY-3 株及び *Leptothrix discophora* SP-6 株 (ATCC 51168)^{40,89)}を使用した。*Bosea* sp. UAY-3 株は秋田県立大学 宮田直幸博士より分与された。

3-3-3 PCR 法及びシーケンシング

BIWAKO-01 株の菌体を 200 μL の滅菌超純水に懸濁し、2 μL を分取して Direct PCR の鋳型とした。この PCR 産物を QIAQuick PCR Purification kit (QIAGEN) で精製した後、再度 PCR を行った。この 2 度目の PCR 産物を、再度 QIAQuick PCR Purification kit で精製し、塩基配列解読の鋳型 DNA とした。PCR は Ex Taq Hot start version (Takara) を用い、反応液 20 μL (10x Ex Taq buffer : 2 μL、dNTP mixture : 1.6 μL、Forward primer : 1 μL、Reverse primer : 1 μL、Ex Taq HS (5 U/μL) 0.1 μL、滅菌超純水 : 12.3 μL、鋳型菌体液 : 2 μL) を調製した。フォワードプライマーには EUB8F (AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG)⁹⁰⁾を、リバースプライマーには 1492R (GGC TAC CTT GTT ACG ACT T)⁹⁰⁾を用いた。遺伝子の増幅には Thermal cycler (MyCycler、BIO-RAD) を用い、94℃で 40 秒保持した後、25 サイクルの反応 (変性 : 94℃・40 秒、アニーリング : 55℃・30 秒、伸長 : 72℃・90 秒、25 サイクル目の伸長 : 72℃・360 秒) を繰り返し、16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を増幅した⁹⁰⁾。これを、アガロースを用いて 50 V で 3 時間電気泳動を行った。PCR 法により増幅した遺伝子の塩基配列はシーケンサー (CEQ2000XL、Beckman)

を用いて決定した。シーケンシング反応には、Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Beckman) を用い、8F (AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG)⁹⁰⁾、515F (GTG CCA GCA GCC GCG GT)⁹⁰⁾、536R (GTA TTA CCG CGG CTG CTG)⁹⁰⁾、1114F (GCA ACG AGC GCA ACC C)⁹⁰⁾の各プライマーを使用した。得られた塩基配列はDDBJのBLASTを利用して相同性検索を行い、相同性のある塩基配列を検索・収集した。この配列はMEGA 4.0を用いたマルチプルアラインメントを行い、Kimura 2-parameterによる近隣結合法^{91,92)}によって分子系統樹を作成した。

3-3-4 培養実験

BIWAKO-01株によるメタロゲニウム粒子生成には、M3半流動培地を基本培地として使用した。培養は、容量30 mLのねじ口試験管または容量500 mLのねじ口瓶を用いる場合は、植菌後に密栓して、20℃、暗所で静置した。これらの培養系では、容器外からの酸素供給が大きく制限され、密閉培養器内の気相部分からの供給にほぼ限定される。シャーレを用いる場合は、前述の微好気条件（アネロパック微好気）もしくは嫌気条件（アネロパック・ケンキ（三菱ガス化学））で、O₂濃度1%以下、CO₂濃度約5%（メーカーの取扱説明書）下で培養した。

Bosea sp. UAY-3株はMn²⁺イオン濃度を200 μMとしたM3半流動培地を用いて、ねじ口試験管の蓋を緩めた好気条件で培養し、*L. discophora* SP-6株はBIWAKO-01株培養と同様にMn²⁺イオン濃度を2 mMとしたM3半流動培地のねじ口試験管を密栓し、20℃にて培養した。

BIWAKO-01株は、グラム染色後に光学顕微鏡観察により細胞形態を調べた。菌体のオキシダーゼ活性は、*N, N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine oxalate disc（日水製薬）を用いて、カタラーゼ活性は3%（v/v）H₂O₂水懸濁時の気泡発生の有無を検鏡により判定した。生化学的性状については、IDtest-EB20（日水製薬）およびAPI 50CH（BioMérieux）を用いて、好気条件下、30℃で2日及び7日間培養し、各種の基質に対する資化性を調べた⁹³⁾。

鞭毛観察は、培養菌体をネガティブ染色⁹⁴⁾後、透過型電子顕微鏡（TEM）で観察した。染色は菌株を23 mM HEPES 緩衝液（pH 7.4）に懸濁し、Cu グリッドに張ったカーボン支持膜上に分散した。次いで2%（w/v）酢酸ウラニル⁷⁷⁾で2分間染色し、室温風乾後顕鏡試料とし、TEM（JEM 2000EX、JEOL）を用い100 kVで観察した。

BIWAKO-01株のMn酸化速度と溶存態Mn濃度との関係を求めるため、M3半流動培地のMn濃度を0.1 mMとして滅菌シャーレに20 mLを添加し、BIWAKO-01株植種液（約1.0×10⁸ CFU/mL）100 μLを植種して20℃、O₂濃度10% CO₂濃度0%、M3半流動培地のNaHCO₃の替りに20 mM HEPES 緩衝液（pH 6.0）を用いて静置培養を行った。培養開始後、2、3、4、7、9、11日目にMnSO₄水溶液（20 mM）0.1 mLを培養液に添加し最終Mn²⁺イオン濃度を0.7 mMとして培養を行った。同様にMnSO₄水溶液（20 mM）を0.2 mL添加し最終Mn²⁺イオン

濃度を 1.3 mM とした培養系と、 MnSO_4 水溶液 (20 mM) を 0.30 mL 添加し最終 Mn^{2+} イオン濃度を 1.9 mM とした培養系を作成し、2、4、7、9、11 および 14 日目の酸化態 Mn 濃度を測定した。

また、 MnSO_4 水溶液 (20 mM) 0.1 mL を培養液に添加し最終 Mn^{2+} イオン濃度を 0.7 mM とした前述の培養系を用いて培養を継続し、21 日～60 日まで 2～3 日毎に MnSO_4 水溶液 (20 mM) 0.1 mL を 24 回添加し、最終 Mn 濃度 2500 μM まで培養を行い。21 日 (Mn^{2+} イオン濃度 : 0.9 mM) と 60 日目 (Mn^{2+} イオン濃度 : 2.5 mM) の培養液を採取し、電子顕微鏡観察を行った。

3-3-5 光学顕微鏡観察

BIWAKO-01 株の培養液で生成したメタロゲニウム粒子は、微分干渉顕微鏡装置 (Eclipse 80i、Nikon) にて検鏡した。対物レンズ ($\times 100$) 使用時はイマージョンオイル (Olympus) をカバーガラス上に滴下した。また、メタロゲニウム粒子のフィラメント成分を明らかにするため、培養液をスライドグラスに滴下した後、0.2% (w/v) アスコルビン酸溶液をその上に滴下し、メタロゲニウム粒子の Mn 酸化物を溶解させた。この試料に、酸性多糖の染色剤であるアルシアンブルー溶液 (和光純薬)⁹⁵⁾ を滴下してから、同様に観察した。

メタロゲニウム粒子内に細胞が存在するか調べるため、メタロゲニウム粒子を含む培養液 (培養期間 : 10、21、28、35 日) をスライドグラスに滴下し、0.2% (w/v) アスコルビン酸で Mn 酸化物を溶解させた後、10% (v/v) ホルマリンで 30 分間固定し、5 mg/L DAPI 溶液 (同仁堂)⁹⁶⁾ で核酸をもつ細胞を染色した。各試料について、落射蛍光顕微鏡装置 (D-FL、Nikon) とフィルター (DAPI、Nikon) を用いて、各試料につき 30 個のメタロゲニウム粒子を観察し、内部に BIWAKO-01 株細胞を保持する粒子の比率を求めた。

3-3-6 電子顕微鏡観察

BIWAKO-01 株のメタロゲニウム粒子生成過程は、走査型電子顕微鏡 (SEM) 及び TEM を用いて観察した。SEM 観察では、所定時間培養した培養液にグルタルアルデヒドを 1% (v/v) となるように添加し、20 分間固定した後、メンブレフィルター (孔径 0.2 μm 、Whatman) で吸引ろ過し、リン酸緩衝液 (pH 7.3) 5 mL で 3 回洗浄した。その後、順次 50%、70%、90%、99.5% (v/v) エタノール (各 5 mL) を 2 回ずつ添加して脱水処理を行った。これを風乾した後、真空蒸着装置にてプラチナコーティングして、SEM (JSM-6380M、JEOL) を用いて観察した。

TEM 観察では、培養物 (菌体とメタロゲニウム粒子) を遠沈回収した。沈殿物は蒸留水に再度懸濁し、洗浄・回収した。これに、30 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0) で調製した 2% (v/v) グルタルアルデヒド溶液を 1.5 mL 加え 4℃で一晩固定し、その後 30 mM HEPES 緩衝液 1.5 mL で洗浄した。次に、30 mM HEPES 緩衝液で調製した 2% (v/v) 四酸化オスミウム溶液 1.5 mL で懸濁して 4℃にて 1

時間放置後、30 mM HEPES 緩衝液 1.5 mL で洗浄した。その後、50%、70%、90% (v/v) エタノールで各 1 回、99.5%エタノールで 4 回、いずれも 10 分間の脱水処理を行った。さらに、プロピレンオキサイド 1.5 mL を用いて、10 分間置換処理（室温）を 2 回行い、エポキシ樹脂を用い、60℃にて 48 時間放置して樹脂による包埋を行った。これをウルトラミクロトームで薄切した後、2% (w/v) 酢酸ウラニル溶液で 60℃、15 分間加温染色し、蒸留水で洗浄した。最後に、lead stain solution（シグマ社）で 5 分間染色し、蒸留水で洗浄してから風乾後、カーボンコーティングを行った。調製した試料は、TEM（JEM1200EX、JEOL）を用い、加速電圧 80 kV にて観察した。

走査透過型電子顕微鏡（STEM）観察では、第 2 章 第 3 節 2-3-4 で記述した方法に従ってメタロゲニウム粒子のナノ構造を解析した。BIWAKO-01 株を M3 半流動培地で 2 週間培養し、菌体とメタロゲニウム粒子を遠沈回収した。沈殿物は蒸留水に再度懸濁し、前述の操作により洗浄を 10 回繰り返した。この試料をカーボンコートメンブランフィルター（日進 EM）でろ過した後、風乾させ、STEM（JEM-2100F、JEOL）を用いて 200 kV にて観察を行った。装置付属の電子線回折装置で Mn 酸化物の結晶構造を解析するとともに、高角度散乱暗視野法（HAADF-STEM）と電子エネルギー損失分光法（EELS）の併用により、粒子の構成元素を分析した⁷⁸⁾。

3-3-7 レクチン染色

BIWAKO-01 株の培養液中で生成したメタロゲニウム粒子に含まれる多糖の組成を調べるため、レクチンを用いて粒子を染色した⁹⁷⁾。蛍光標識されたレクチン（Vector Laboratories）は表 3-2 に記載したものをを用いた。培養 6 週目の培養液を 3000 rpm、10 分間遠沈分離し、菌体及びメタロゲニウム粒子を沈殿物として回収した。沈殿物は滅菌蒸留水に懸濁後に遠心分離し、懸濁－遠心分離の操作を 10 回繰り返して、培地に溶解していた余剰の寒天を除去した。洗浄した試料は、各レクチンを終濃度 10 µg/mL となるように添加した人工池水（0.1 mM KCl、0.1 mM CaCl₂、1 mM NaCl、5 mM HEPES（pH 7.0））⁹⁷⁾に懸濁し、23℃で 15 分間インキュベートした。次に、人工池水で 3 回洗浄後、蛍光顕微鏡装置 BX60（CCD カメラ画像処理装置 DP70 付、Olympus）を用いて励起波長 470～490 nm で観察した⁹⁷⁾。

第 4 節 結果

3-4-1 BIWAKO-01 株の単離

琵琶湖今津沖中央地点で採取した合計 40 検体の試料を M3 半流動培地に植種した結果、2005 年 12 月に水深 15 m で採取した湖水試料から、メタロゲニウム粒子を安定して生成する Mn 酸化菌の培養系を得ることができた。この培養液を M3 寒天培地及びハートインフュージョン寒天培地で画線培養を行い、これを繰り返すことで、目的とする細菌を単離することができた。この単離株を

BIWAKO-01 株と命名した。2 mM Mn^{2+} イオンを添加した M3 寒天培地上では培養初期のコロニーは白色であったが、4 週間後には Mn 酸化物を生成して茶褐色に変化した (図 3-1A)。 Mn^{2+} イオンを添加しない R2A 寒天培地上では、乳白色のコロニーを形成した (図 3-1B)。

BIWAKO-01 株は M3 半流動培地を用いて 5 年以上継代培養しているが、この間、Mn 酸化能力を失うことなくメタロゲニウム粒子を生成している (図 3-1C)。

生成したメタロゲニウム粒子の形態は琵琶湖で採取される粒子の形態 (図 1-2) と類似していた。

3-4-2 BIWAKO-01 株の系統分類と性状

BIWAKO-01 株の 16S rRNA 遺伝子配列及び BLAST 検索で相同性の高かった配列を用いて作成した分子系統樹を図 3-2 に示した。BIWAKO-01 株の配列は、*Bosea* 属細菌 (α -Proteobacteria 綱 Rhizobiales 目 Bradyrhizobiaceae 科) の配列と相同性が高く、*B. eneeae* 34614^T (T = type strain)、*B. vestrisii* 34635^T、*B. lupini* R-45681^T、*B. thiooxidans* DSM 9653^T、*B. massiliensis* 63287^T、*B. robiniae* R-46070^T、及び *B. lathyri* R-46060^T と 98.5% 以上 (1425~1438 bp) の一致度であった。この結果からは種レベルでの帰属は困難であったため、本研究においては本株を *Bosea* sp. BIWAKO-01 株と同定した。

Mn 酸化能力を持つ *Bosea* 属として、生物学的な Mn 除去バイオリアクターから RM1 株が分離されている⁹⁸⁾。RM1 株と BIWAKO-01 株の 16S rRNA 遺伝子配列との一致度は 99% であった (図 3-2)。しかし、RM1 株がメタロゲニウム粒子を形成するとの記載はなく、粒子生成するか否かは不明である。同様に Mn 酸化能力を持つ UAY-3 株とも 99% の一致度であったが、本株もメタロゲニウム粒子を形成するかは不明である。従って、本研究は *Bosea* 属細菌がメタロゲニウム粒子を生成することを示したはじめての報告事例となる。

BIWAKO-01 株はグラム陰性で、長辺約 1 μm 、短辺約 0.4 μm の桿菌であった (図 3-3A)。また、極鞭毛を 1 本有していることが分かった (図 3-3B)。

BIWAKO-01 株の生理学的及び生物学的試験結果を表 3-1 に示した。オキシダーゼ、カタラーゼ反応ともに陽性であった。また好気条件及び微好気条件で増殖するが、嫌気条件での増殖は認められなかった。好気条件において、5℃では増殖しなかったが、8~37℃では増殖が認められた。興味深い結果として、本菌はアルギニン、リジンおよびオルニチンのようなアミノ酸を資化した一方で、グリセロール及び種々の糖質 (グルコース、ガラクトース等) を資化できず、利用できる基質が非常に限定されていることが明らかになった (表 3-1)。

3-4-3 メタロゲニウム粒子の生成過程

BIWAKO-01 株を M3 半流動培地入りのねじ口試験管に植種し、20℃、暗所にて培養を行うと、1 週間で試験管中央部分が白濁し (図 3-4A)、3 週間後には白濁層が薄く褐変した (図 3-4B)。さらに 4 週間目には濃い茶褐色の層が確認でき

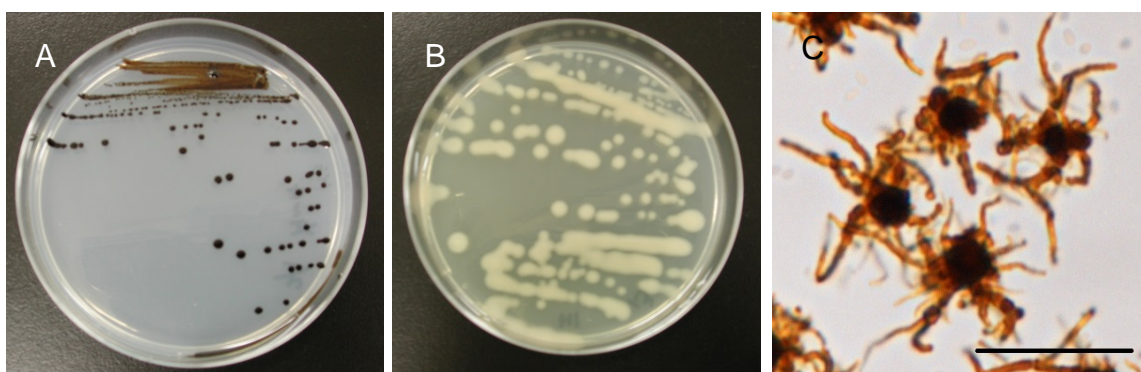


図 3-1 BIWAKO-01 株のコロニーとメタロゲニウム粒子

A : M3 寒天培地で 4 週間培養（微好気、20℃）

B : R2A 寒天培地で 2 週間培養（微好気、20℃）

C : BIWAKO-01 株を M3 半流動培地にて 10 週間培養（微好気、20℃）
した光学顕微鏡写真 Bar = 20 µm

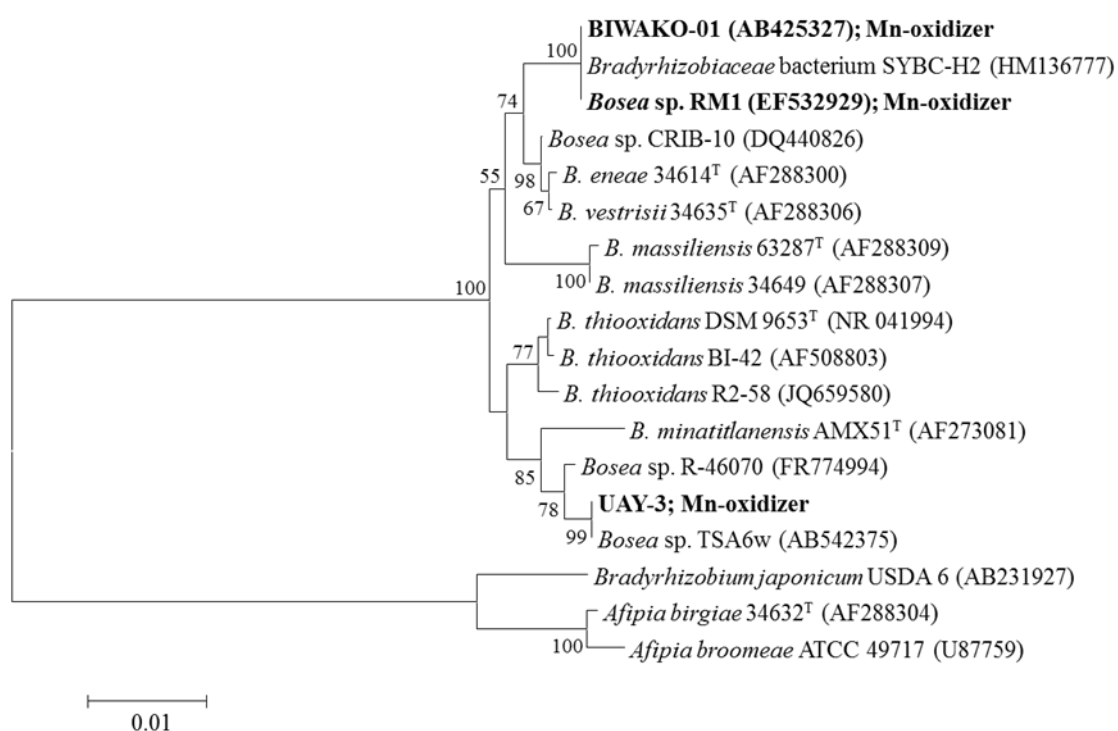


図 3-2 近隣接合法により作成した BIWAKO-01 株の分子系統樹

各分岐上の数字は 1000 回の試行によるブーツストラップ確率（％）を示した。マンガン酸化菌の *Bosea* sp. RM1⁹⁸⁾ と UAY-3 は太字で示している。スケールバーは、遺伝的距離を表した。

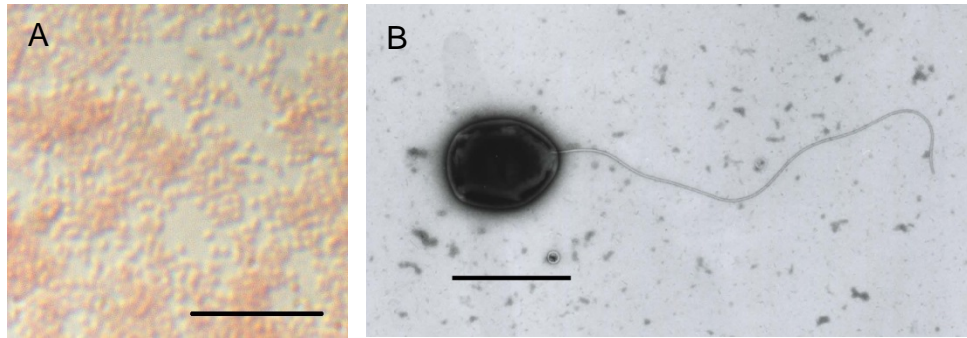


図 3-3 BIWAKO-01 株の顕微鏡写真

A : BIWAKO-01 株のグラム染色写真、B : 鞭毛染色した BIWAKO-01 株の TEM 像 Bar : A = 10 μ m, B = 1 μ m

表 3-1 BIWAKO-01 株の生理学的試験結果

| 試験内容 | 結果 | 試験内容 | 結果 | 試験内容 | 結果 |
|--------------------------|----|----------------|----|------------|----|
| 菌体形状 | 桿菌 | 嫌気条件での増殖 | — | 芽胞 | — |
| グラム染色 | — | 好気条件での増殖 | + | 運動性 | + |
| ギムザ染色 | + | 微好気条件での増殖 | + | カタラーゼ | + |
| NB培地での増殖 | + | 5°Cでの増殖 | — | オキシダーゼ | + |
| BYCE培地での増殖 | + | 8~37°Cでの増殖 | + | インドール反応 | — |
| 5%ヒツジ血液添加コロンビア寒天培地での増殖 | + | グルコース分解による酸の産生 | — | V-P反応 | + |
| [有機物の資化性] | | | | | |
| L-アルギニン | + | L-ソルボース | — | D-トレハロース | — |
| L-ロイシン | + | L-ラムノース | — | イヌリン | — |
| L-オルニチン | + | ズルシトール | — | D-メレジトース | — |
| クエン酸 | + | イノシトール | — | D-ラフィノース | — |
| ウレアーゼ | + | D-マンニトール | — | スターチ | — |
| グリセロール | — | D-ソルビトール | — | グリコーゲン | — |
| エリスリトール | — | D-グルコース | — | キシリトール | — |
| D-アラビノース | — | D-フルクトース | — | ゲンチオビオース | — |
| L-アラビノース | — | D-マンノース | — | D-ツラノース | — |
| D-リボース | — | アミグダリン | — | D-リキソース | — |
| D-キシロース | — | アルブミン | — | D-タガトース | — |
| L-キシロース | — | エスクリン | — | D-フコース | — |
| D-アドニトール | — | サリシン | — | L-フコース | — |
| D-ガラクトース | — | D-セロビオース | — | D-アラビトール | — |
| メチル- β D-キシロピラノシド | — | D-マルトース | — | L-アラビトール | — |
| メチル- α D-マンノピラノシド | — | D-ラクトース | — | グルコン酸塩 | — |
| メチル- α D-グルコピラノシド | — | D-メリビオース | — | 2 ケトグルコン酸塩 | — |
| N アセチルグルコサミン | — | D-シュクロース | — | 5 ケトグルコン酸塩 | — |

+: 陽性、+: 弱い陽性、—: 陰性

(図 3-4C)、6 週間ではその層の厚みが増加していた (図 3-4D)。この茶褐色の層を採取して光学顕微鏡及び SEM で観察した (図 3-5)。培養 1 週間では、粒径 1 μm の茶褐色の粒子から数本のフィラメントが伸長していた。その後、フィラメントの長さとは数は増加していた。

次に、メタロゲニウム粒子の内部構造を観察するとともに、粒子内における菌体の存在を調査した。培養初期 (培養 10 日目) における観察結果を図 3-6 に示す。培養 10 日目のメタロゲニウム粒子は、前項の培養 1 週間の形態とほぼ同様の形態であった。SEM 像、TEM 像ともに、菌体の周りに生成物が認められ、光学顕微鏡の観察結果と併せると、この生成物は Mn 酸化物であると推察された。さらに培養 2 週間、4 週間及び 6 週間目のメタロゲニウム粒子を TEM で観察した結果、図 3-7 及び 3-8 の培養 4 週間目 (図 3-8A) と培養 6 週間目 (図 3-8B) では、粒子内部が空洞で菌体が存在していないものも認められた。

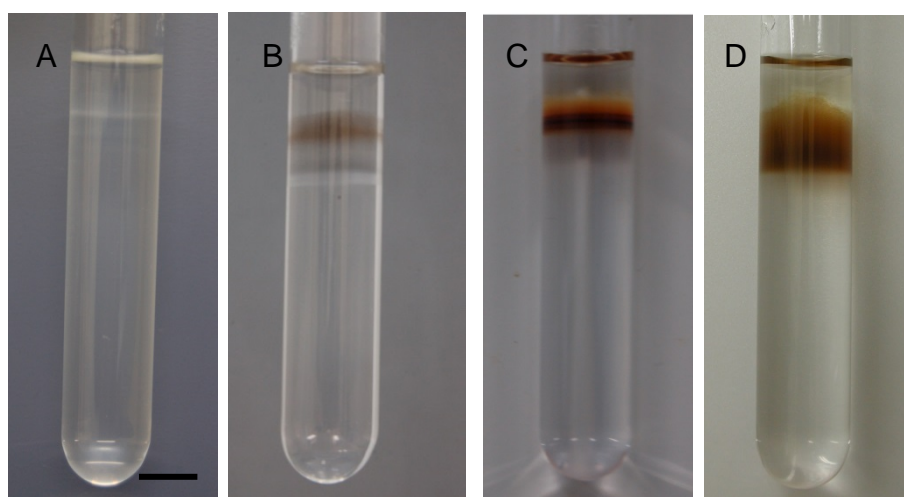
メタロゲニウム粒子をアスコルビン酸で溶解した後、DAPI 染色を行った結果 (図 3-9)、培養 10 日では、90% の粒子で内部に菌体が存在していたが、培養 21 日後は 50%、培養 28 日後は 23% と、培養日数の経過に伴い内部に菌体を保持する粒子の割合は徐々に減少し、35 日後には 13% にまで減少することが明らかになった (図 3-10)。

3-4-4 メタロゲニウム粒子の構造解析

メタロゲニウム粒子は、最初に茶褐色の粒子が菌体を核として生成し、この粒子からフィラメントが伸長して形成されることを前項で示したが、このフィラメント部分について詳細な解析を行った。BIWAKO-01 株を M3 半流動培地で 4 週間培養して得たメタロゲニウム粒子 (図 3-11A) をアスコルビン酸処理して Mn 酸化物を溶解した。その結果、Mn 酸化物が除去されたフィラメント部分に繊維状の構造体が残存していた (図 3-11B)。この構造体は、アルシアンブルーで染色すると青色に染まったことから (図 3-11C)、酸性多糖類であることが示された。

さらに、酸性多糖類を構成する糖質を特定するため、種々の糖類に特異的に結合する 19 種のレクチンを用いてフィラメントに含まれる糖鎖の解析を行った。この結果、コンカナバリン A (ConA)、*Lycopersicon esculentum* レクチン (LEL)、*Ricinus communis* アグルチニン I (RCA I)、大豆アグルチニン (SBA) の 4 種のレクチンで陽性反応を示し、ジャックフルーツシード (ジャッカリン) とピーナッツアグルチニン (PNA) の 2 種では偽陽性 (±) となった (図 3-12、表 3-2)。試験陽性となった 4 種のレクチンが認識する糖鎖を基に、メタロゲニウム粒子のフィラメント部分には少なくとも α -マンノース、 α -グルコース、ガラクトース、*N*-アセチル-D-ガラクトサミン、*N*-アセチル-D-グルコサミンが含まれていることが示唆された。

BIWAKO-01 株を 3 週間培養して生成したメタロゲニウム粒子の STEM 像を図 3-13 に示した。フィラメント部分について EELS 解析により、Mn、酸素、炭素



1 週間

3 週間

4 週間

6 週間

図 3-4 ねじ口試験管を用いた BIWAKO-01 株の培養

Bar = 10 mm

1 週間

2 週間

3 週間

6 週間



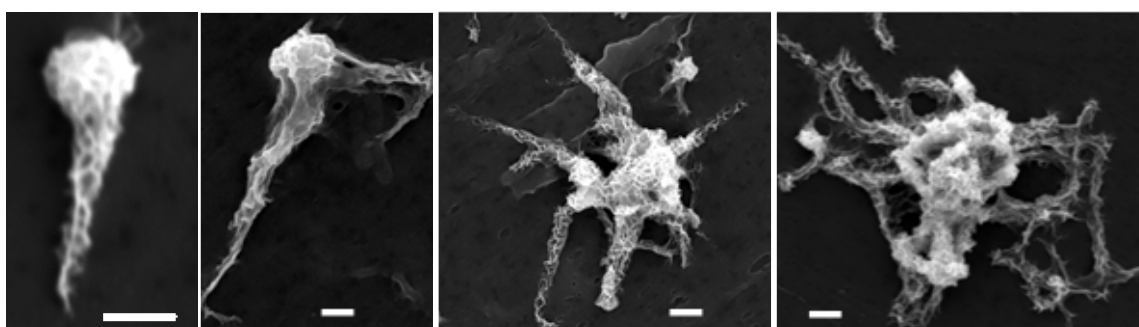
Bar = 2 μ m

1 週間

2 週間

3 週間

6 週間



Bar = 1 μ m

図 3-5 BIWAKO-01 株が生成したメタロゲンウム粒子の形態
(上：光学顕微鏡写真、下：SEM 像)

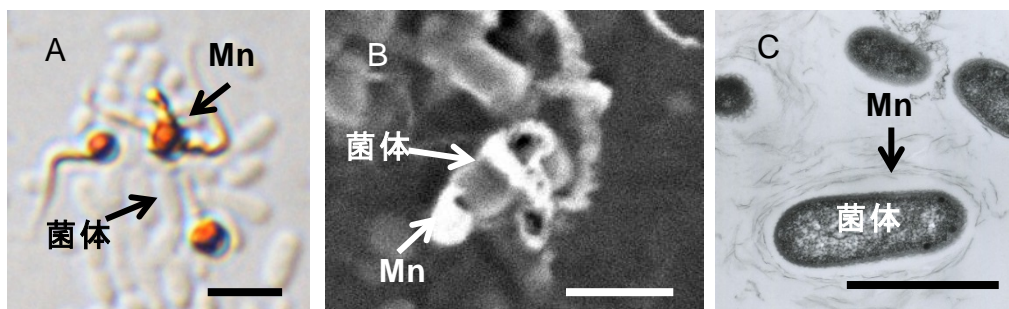


図 3-6 BIWAKO-01 株が生成したメタロゲニウム粒子
(培養 10 日間)

A : 微分干渉顕微鏡写真、B : SEM 像、C : TEM 像

Bar = 1 μ m

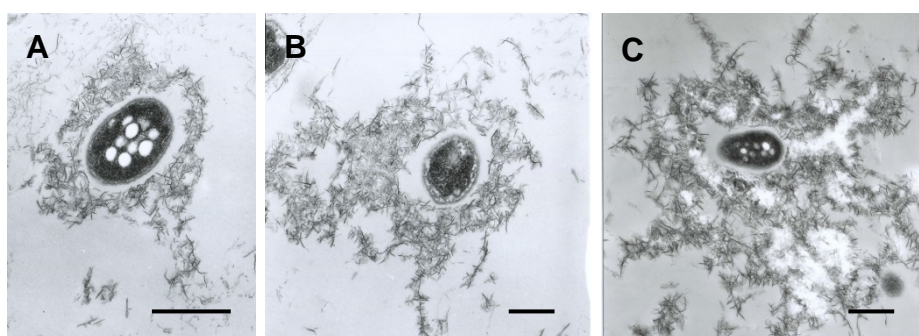


図 3-7 メタロゲニウム粒子の TEM 像 (粒子内に菌体有り)

A : 培養 2 週間、B : 培養 4 週間、C : 培養 6 週間

Bar = 1 μ m

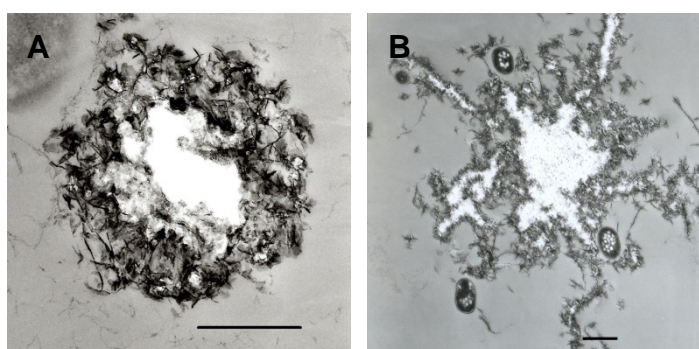


図 3-8 メタロゲニウム粒子の TEM 像 (粒子内は空洞)

A : 培養 4 週間、B : 培養 6 週間

Bar = 1 μ m

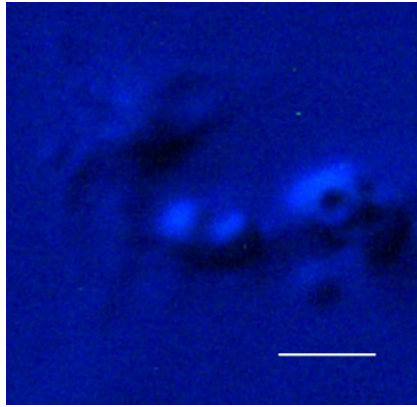


図 3-9 メタロゲニウム粒子の DAPI 染色像
(培養 4 週間、0.2% アスコルビン酸処理後)
Bar = 10 μ m

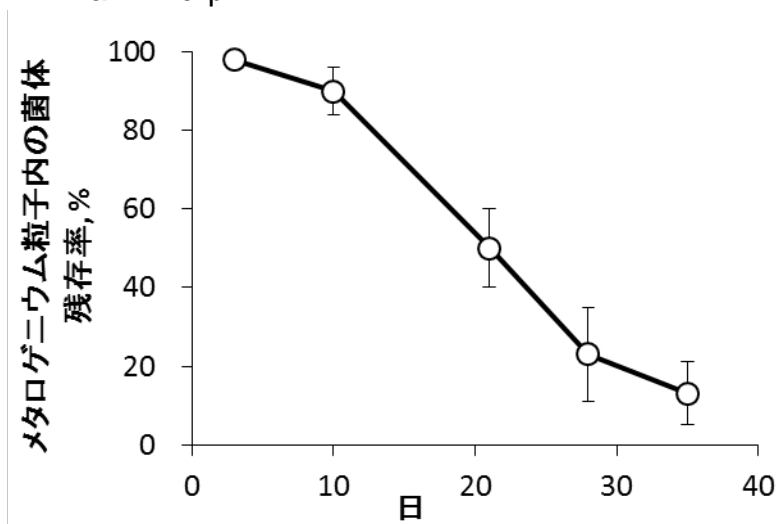


図 3-10 BIWAKO-01 株が生成したメタロゲニウム粒子の粒子内の菌体残存率 平均値 \pm SD (n = 30)

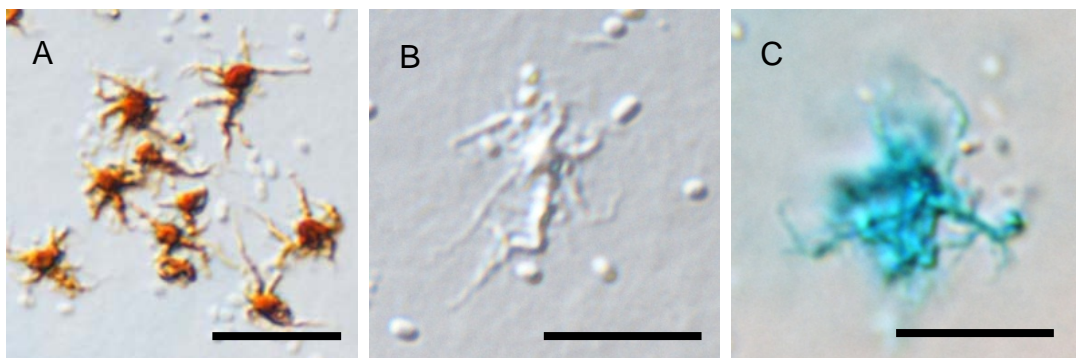


図 3-11 メタロゲニウム粒子のフィラメント構造
A : BIWAKO-01 株が生成したメタロゲニウム粒子 (培養 4 週間)、B :
アスコルビン酸処理後の粒子、C : アルシアンブルー染色後の粒子
Bar : A = 10 μ m, B, C = 5 μ m

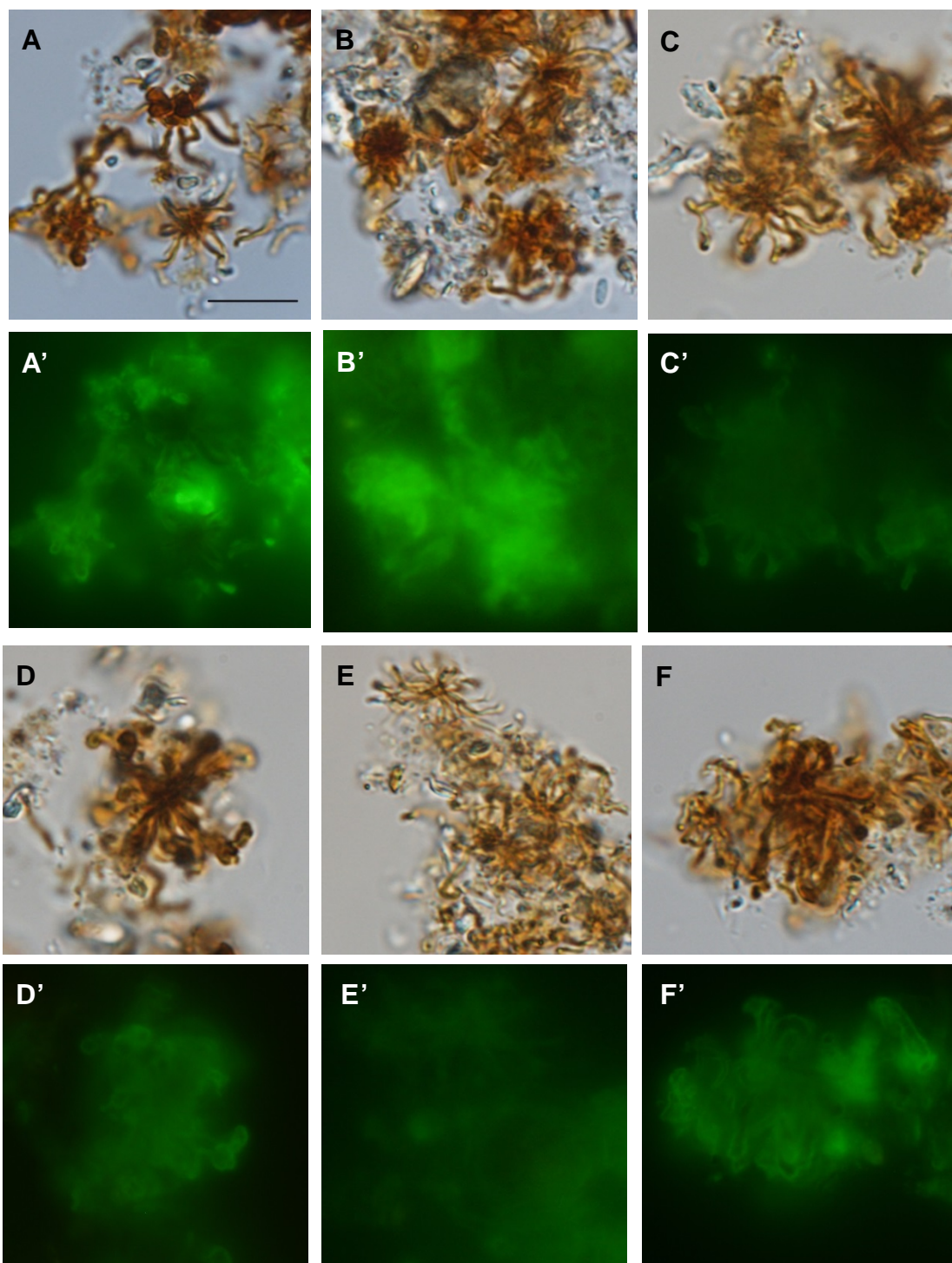


図 3-12 メタロゲニウム粒子のレクチン染色結果

用いたレクチン、A, A' : ConA、B, B' : LEL、C, C' : ジャッカリン、D, D' : PNA、E, E' : RCA I、F, F' : SBA

A-F : 微分干渉顕微鏡観察

A'-F' : 落射蛍光顕微鏡観察

Bar = 10 μ m

表 3-2 メタロゲニウム粒子のレクチン染色結果

| レクチン名 | レクチン反応 | 構成糖 |
|--|--------|------------------------------------|
| <i>Bandeiraea simplicifolia</i> レクチン I (BSL I) | — | Gal α , GalNAc α |
| <i>Bandeiraea simplicifolia</i> レクチン II (BSL-II) | — | GlcNAc α , GalNAc β |
| コンカナバリン A (Con A) | + | Man α , Glc α |
| <i>Dolichos biflorus</i> アグルチニン (DBA) | — | GalNAc α |
| <i>Datura stramonium</i> レクチン (DSL) | — | (GlcNAc)n, Gal β 1-3 GlcNAc |
| <i>Erythrina cristagalli</i> レクチン (ECL) | — | Gal β 1-4 GlcNAc, Gal |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> (トマト) レクチン (LEL) | + | (GlcNAc)n |
| ジャックフルーツシードレクチン (Jacalin) | ± | Sialyl-Gal β , 1-3 GalNAc-O- |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> エリスロアグルチニン (PHA-E) | — | N-linked bi-antennary sugar |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> 白血球凝集素 (PHA-L) | — | N-linked tri/tetra-antennary sugar |
| ピーナッツ アグルチニン (PNA) | ± | Gal β 1-3 GalNAc |
| <i>Pisum sativum</i> アルゲチニン (PSA) | — | Man α |
| <i>Ricinus communis</i> アグルチニン I (RCA I) | + | Gal, GalNAc |
| 大豆アグルチニン (SBA) | + | GalNAc |
| <i>Sophora japonica</i> アグルチニン (SJA) | — | Gal β , GalNAc β |
| <i>Solanum tuberosum</i> レクチン (STL) | — | (GlcNAc)n |
| <i>Ulex europaeus</i> アグルチニン I (UEA I) | — | Fuc α |
| <i>Vicia Villosa</i> レクチン (VVL) | — | GalNAc |
| 小麦胚芽 アグルチニン (WGA) | — | (GlcNAc)n, Sialic Acid |

* +: 陽性、—: 陰性、±: 偽陽性、Glc: D-グルコース、Gal: D-ガラクトース、Man: マンノース、GlcNAc: N-アセチル-D-グルコサミン、GalNAc: N-アセチル-D-ガラクトサミン、Fuc: L-フコース

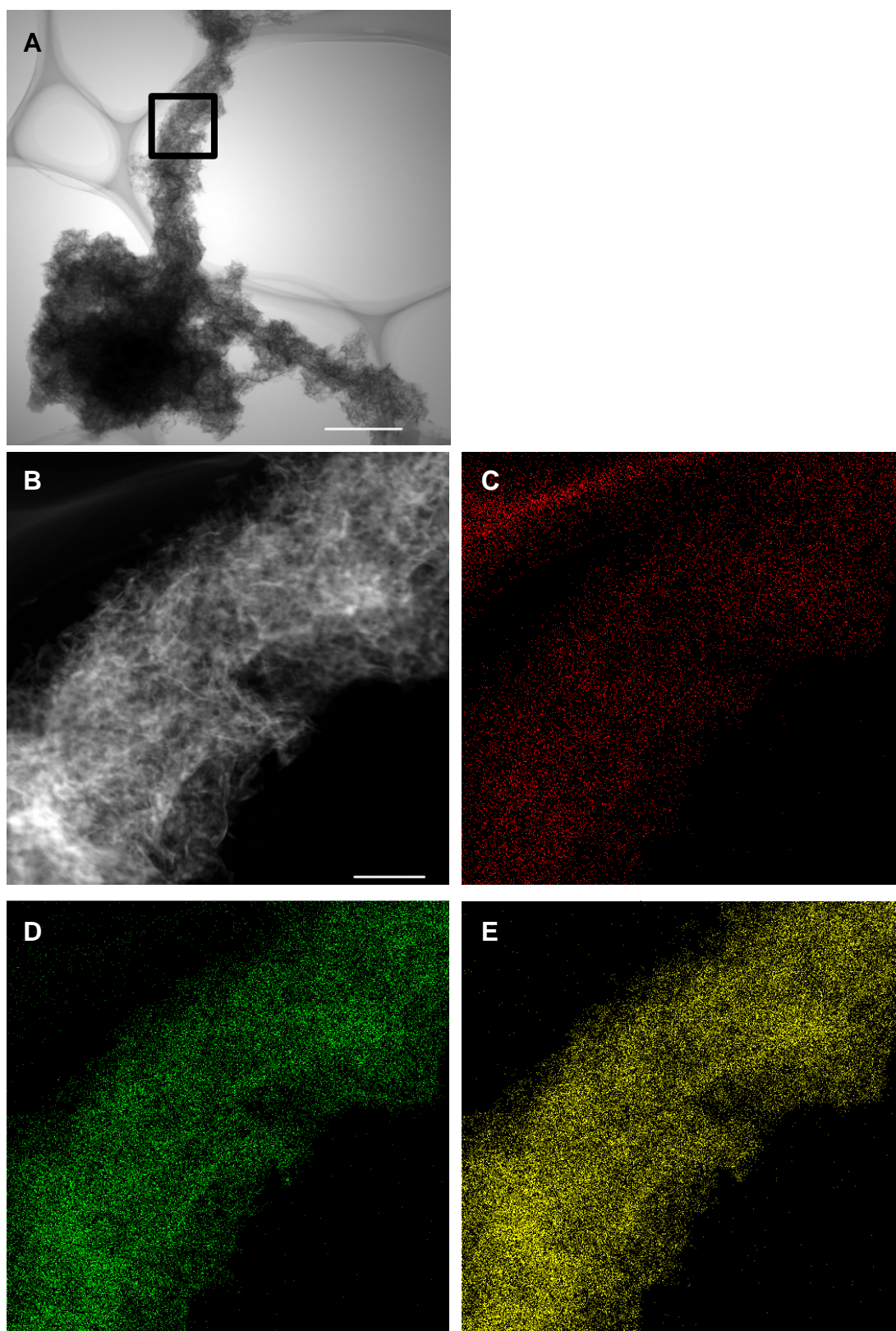


図 3-13 BIWAKO-01 株が生成したメタロゲニウム粒子（フィラメント部分）の STEM-EELS 解析（培養 3 週間）

A : STEM 像、B : A 枠内の拡大像、C : A 枠内の炭素マップ、D : 酸素マップ、E : Mn マップ Bar : A = 1 μ m, B = 50 nm, C = 200 nm

元素のマッピングを検討した結果（図 3-13B～E）、これらの元素はフィラメント構造に様に分布することが示された。

フィラメント部分についてさらに微細構造を解析した結果を図 3-14～16 に示す。琵琶湖底層部で採取されたメタロゲニウム粒子の微細構造（図 2-6）と同じように、フィラメント部分は基本的にはナノシート構造で構成されていることが示された。しかし一方で、琵琶湖底層部の粒子では見られなかった、ナノロッド構造が混在していることが明らかになった（図 3-14）。

EELS マッピングの結果、ナノシート構造部分において Mn と酸素は同位置で分布しており、Mn 酸化物として存在していると推察された。Mn と炭素の局在性をみると、これらの元素の位置は異なっており、有機物が Mn 酸化物構造体（ナノシート）の隙間を埋めるようなかたちで存在していることが示された（図 3-15）。メタロゲニウム粒子のフィラメント部分には酸性多糖が含まれるため、この多糖が炭素化合物として検出されていたものと推察された。また、ナノシート構造部分は、琵琶湖で採取したメタロゲニウム粒子のフィラメント部分と類似した構造であったことから、バーネサイト（ $\delta\text{-MnO}_2$ ）様 Mn 酸化物で構成されているものと推察された。

ナノロッド構造についても同様の解析を行なった結果（図 3-16）、ナノロッド部分もナノシート部分と同様に Mn と酸素の分布は一致しており、Mn は Mn 酸化物として存在していると結論付けた。また Mn と炭素の局在性から、ナノロッド構造の Mn 酸化物を有機物が糊のように繋ぎとめているような様子が観察された。ナノロッド構造の電子線回折解析を行ったところ、 d 値 = 0.345、0.265、0.241、0.225、0.167 nm を示す回折リングが得られた（図 3-16A）。データベースとの照合結果から、ナノロッド構造部分は Mn(III)化合物であるマンガナイト（ $\gamma\text{-MnOOH}$ ）であることが明らかとなった。

3-4-5 Mn^{2+} イオン添加濃度がメタロゲニウム粒子の微細構造に与える影響

BIWAKO-01 株の培養液中で生成したメタロゲニウム粒子では、琵琶湖底層部で採取された粒子と異なり、ナノロッド構造が見られた。BIWAKO-01 株の培養では、 Mn^{2+} イオンは 2 mM と高濃度で添加されていたことから、高濃度 Mn^{2+} イオンの影響により湖沼とは異なる構造体が生成した可能性が考えられた。そこで、0.1 mM Mn^{2+} イオンを含む M3 半流動培地で培養を開始した後、低濃度の Mn^{2+} イオンを数日毎に添加し（添加濃度：0.1、0.2 または 0.3 mM）、培養液中の Mn^{2+} イオン濃度を低く維持することを試みた。この培養条件で得られた Mn 酸化の経時変化を図 3-17 に示す。0.1 mM Mn^{2+} イオンを添加した培養液では、7 日目以降では添加された Mn^{2+} イオンのほぼ全量が酸化物態として存在しており、 Mn^{2+} イオンは低濃度で保たれていたことが明らかである。一方で、0.2 mM 及び 0.3 mM の濃度で添加した培養液では、添加した一部しか酸化されておらず、大部分が Mn^{2+} イオンとして残存していた。各培養液での Mn 酸化速度を求めると（図 3-17）、0.1 mM で 0.043 mM/日、0.2 mM で 0.024 mM/日、0.3 mM では 0.015

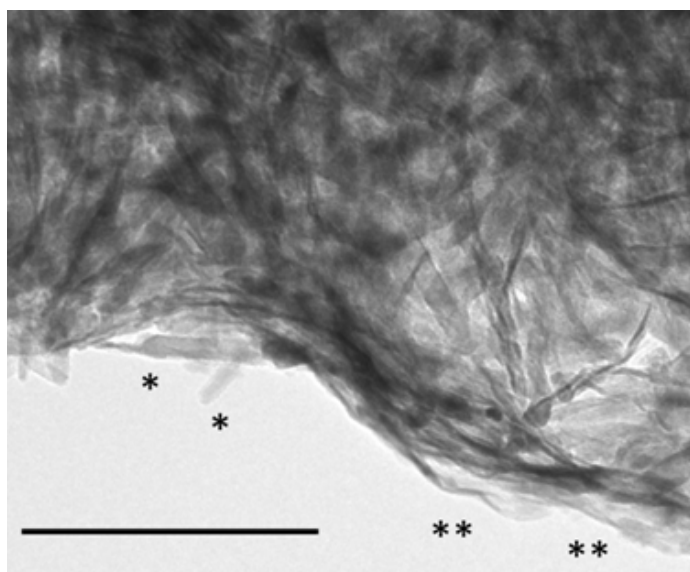


図 3-14 BIWAKO-01 株が生成したメタロゲニウム粒子（フィラメント部分）の TEM 像（培養 3 週間）

* : ナノロッド構造

** : ナノシート構造

Bar = 100 nm

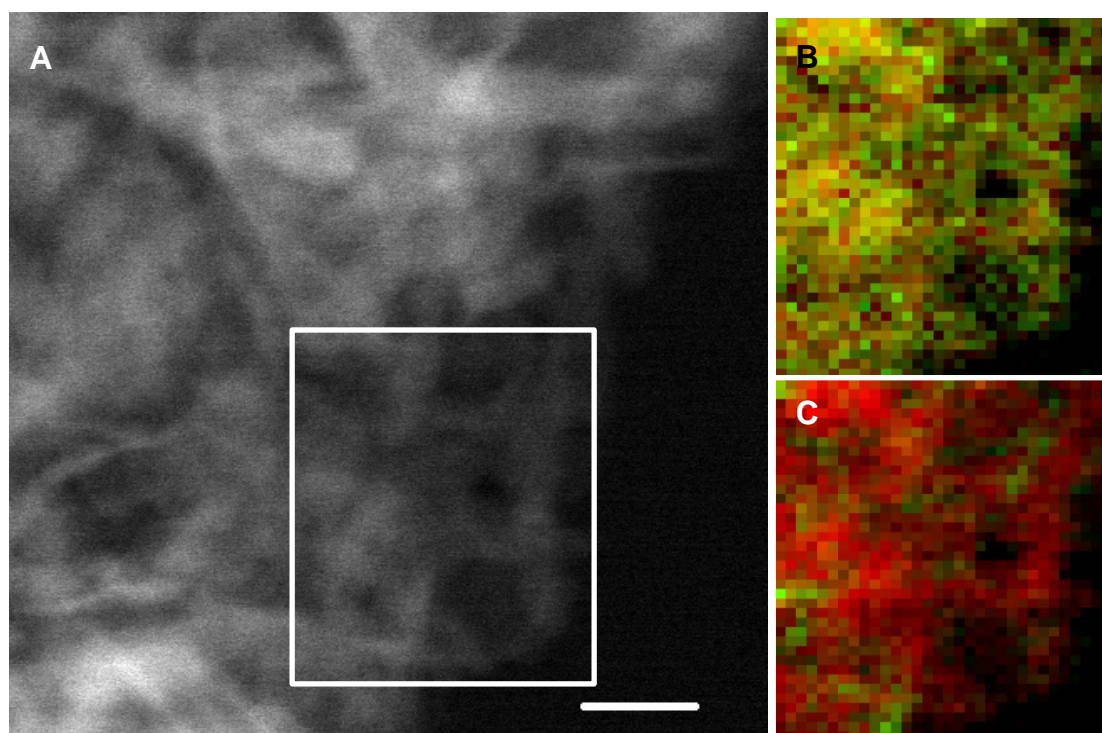


図 3-15 BIWAKO-01 株が生成したメタロゲニウム粒子のナノシート構造の STEM-EELS 解析（3 週間培養）

A : HAADF-STEM 像

B : A 枠内の Mn（赤）及び酸素（緑）マップ（両者の重なりにより黄色に見える）

C : A 枠内の Mn（赤）及び炭素（緑）マップ

Bar = 20 nm

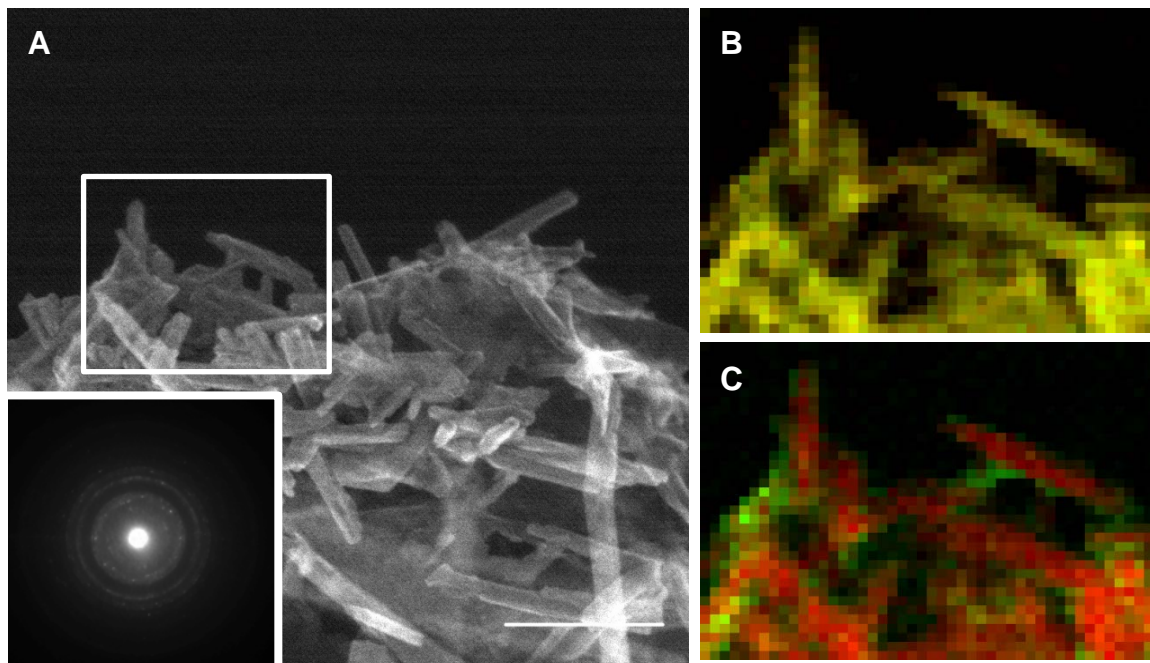


図 3-16 BIWAKO-01 株が生成したメタロゲニウム粒子のナノロッド構造の STEM-EELS 解析（3 週間培養）

A : HAADF-STEM 像、左下の挿入図は電子回折パターン、B : A 枠内の Mn（赤）及び酸素（緑）マップ（両者の重なりにより黄色に見える）、

C : A 枠内の Mn（赤）及び炭素（緑）マップ

Bar = 100 nm

mM/日となり、 Mn^{2+} イオン濃度を 0.1 mM 以上に増加させると Mn 酸化速度は減少することが示された。

前述した 0.1 mM 添加の培養液（図 3-17）から 21 日目に回収したメタロゲニウム粒子（累積 Mn 濃度：0.9 mM）、及び 0.1 mM Mn^{2+} イオンを 2～3 日毎に添加しながらさらに長時間培養し 60 日目に回収したメタロゲニウム粒子（2～3 日毎に 24 回添加、累積 Mn 濃度：2.5 mM）について HAADF-STEM 観察を行った。その結果、培養 21 日目、培養 60 日目ともに、メタロゲニウム粒子のフィラメント部分は、琵琶湖北湖で採取した粒子と同様にナノシート構造のみで構成され、ナノロッド構造は観察されなかった（図 3-18）。この結果は、培地中で形成する Mn 酸化物の結晶構造は Mn^{2+} イオンの影響を強く受け、低濃度（～0.1 mM）で維持するとナノシート構造（バーネサイト様）が、高濃度 Mn^{2+} イオン（～2 mM）の存在下ではナノロッド構造（マンガナイト）が生成することを示していた。

3-4-6 他のマンガン酸化細菌を用いた Mn 酸化粒子の生成

マンガン酸化細菌である *Bosea* sp. UAY-3 株及び *L. discophora* SP-6 株を M3 半流動培地に植種し、20℃で培養を行った。その結果、UAY-3 株は 1～1.5 μm の球状粒子を形成したものの、メタロゲニウム粒子特有のフィラメント構造は観察されなかった（図 3-19A）。SP-6 株は細胞の外側に鞘構造を有し、その鞘構造に Mn 酸化物が沈着することが明らかになっている^{40,89)}。本研究の培養条件においても同様の Mn 酸化物の生成が観察され、メタロゲニウム粒子は生成しないことが示された（図 3-19B）。

第 5 節 考察

琵琶湖北湖の湖水からマンガン酸化細菌 *Bosea* sp. BIWAKO-01 株を取得し、実験室内の培養条件下で安定してメタロゲニウム粒子を生成する培養系を確立することができた。確立に至る培養初期段階では、ねじ口試験管やねじ口瓶を用いて培養を行い、培養液内が微好気条件になるよう工夫するとともに、培地の Mn^{2+} イオン濃度を 2 mM と高濃度で培養することによりメタロゲニウム粒子を生成する培養系の構築に成功した。安定的に継続してメタロゲニウム粒子を生成する室内培養系は今までに報告されておらず、本研究の大きな成果の一つであるといえる。

BIWAKO-01 株は、16S rRNA 遺伝子配列の解析結果から *Bosea* 属に帰属された。Walsh ら⁵⁵⁾や Dubinina⁵⁶⁾により報告されているマイコプラズマ等の他の細菌の当該遺伝子は確認されなかったことから、マイコプラズマ等の生物が BIWAKO-01 株に寄生し⁵⁸⁾、メタロゲニウム粒子を生成したとは考えられず、BIWAKO-01 株の持つ Mn 酸化作用により、メタロゲニウム粒子が生成されたと結論付けた。また、Mn 酸化能力をもつ *Bosea* 属は、Mariner らによって報告⁹⁸⁾されていたが、メタロゲニウム粒子を生成するか否かは不明である。*Bosea* 属細菌がメタロゲニウム粒子を生成するとの知見はこれまでに見当たらず、本研

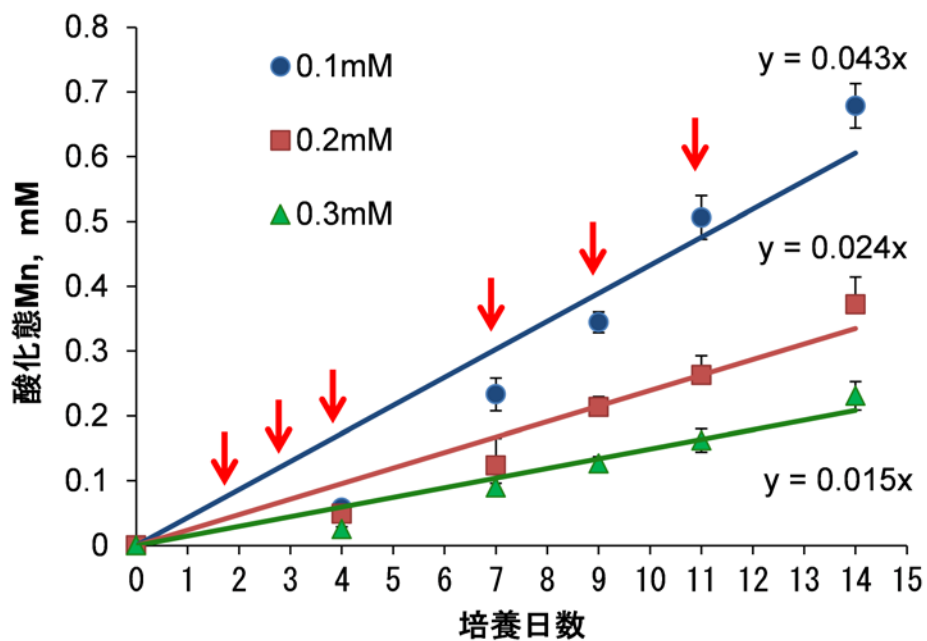


図 3-17 Mn^{2+} を低濃度で添加した培地における BIWAKO-01 株による酸化態 Mn 生成の経時変化

0.1 mM Mn^{2+} 含有培地で培養開始後、矢印で示した時間で Mn^{2+} を添加した。 Mn^{2+} 添加濃度：0.1 mM（累積濃度 0.7 mM）、0.2 mM（累積濃度 1.3 mM）または 0.3 mM（累積濃度 1.9 mM）。

平均値 \pm SD (n = 3)

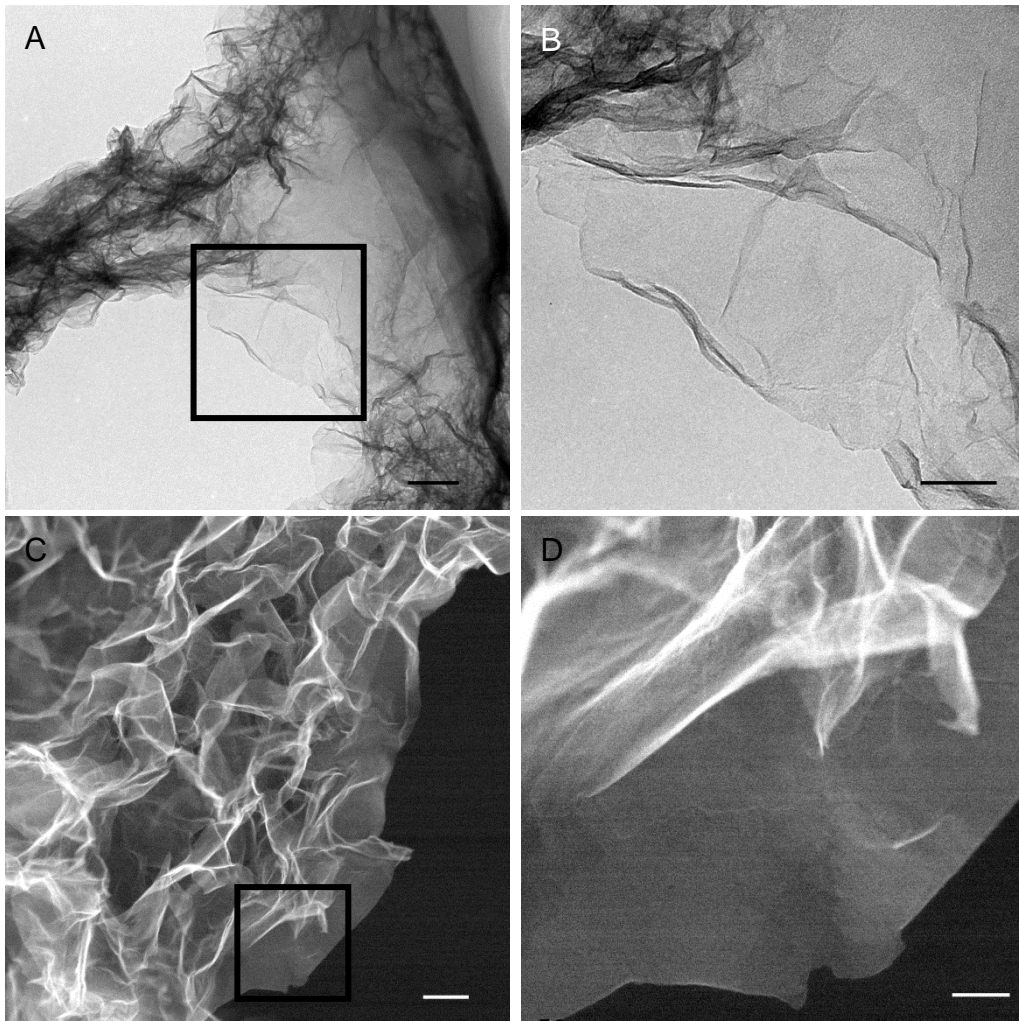


図 3-18 0.1 mM Mn^{2+} を添加した BIWAKO-01 株の培養系で生成したメタロゲニウム粒子（フィラメント部分）の微細構造

A : 培養 21 日目（0.1 mM Mn^{2+} を 6 回添加； Mn^{2+} 累積添加濃度：0.9 mM）の TEM 像、B : A 枠内の拡大像

C : 培養 60 日目（0.1 mM Mn^{2+} を 24 回添加； Mn^{2+} 累積添加濃度：2.5 mM）の HAADF-STEM 像、D : C 枠内の拡大像

Bar : A = 100 nm、B, D = 50 nm、C = 200 nm

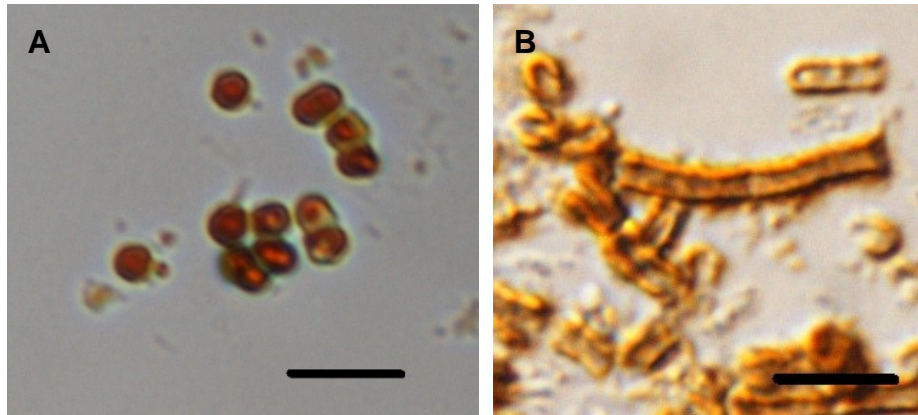


図 3-19 マンガン酸化細菌 *Bosea* sp. UAY-3 株 (A) 及び *L. discophora* SP-6 株 (B) の培養液中で生成した Mn 酸化粒子

A : 0.2 mM Mn^{2+} 含有 M3 半流動培地で 12 週間静置培養 (培養温度 : 20°C 、好気条件)

B : 2 mM Mn^{2+} 含有 M3 半流動培地で 4 週間静置培養 (培養温度 : 20°C 、ねじ口瓶で密栓培養)

Bar = 5 μm

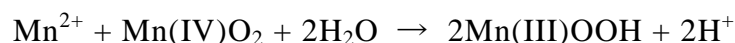
究が初めての報告となる。BIWAKO-01 株の 4～6 週間の培養で生成したメタロゲニウム粒子の形態は、これまでに成層湖や海域で報告されてきたメタロゲニウム粒子の形態とよく一致していた^{12,14-17,23-26,51)}。培養初期のメタロゲニウム粒子内部を TEM 観察することにより、メタロゲニウム粒子は菌体表面で Mn 酸化物が沈積した後フィラメント構造が発達するが、その過程で内部の細胞は徐々に失われ空洞化することが明らかになった。成層湖や海域で発生したメタロゲニウム粒子の内部に微生物の細胞構造は観察されておらず、本研究でも同様に琵琶湖北湖の底層部で採取したメタロゲニウム粒子内部に細胞構造は認められなかった(第 2 章、図 2-5 及び 2-6)。BIWAKO-01 株の培養液での観察結果から、実際の湖沼等で観察されるフィラメントがよく発達した典型的なメタロゲニウム粒子は、生成直後からある程度時間が経っており、内部の微生物細胞が抜けてしまった状態であると推察された。内部の微生物細胞がどの程度の期間保持されるかは不明であるが、湖水環境(栄養基質濃度、温度等)に大きく依存すると考えられる。

Emerson らは、真菌培養液中で生成されたメタロゲニウム粒子のフィラメントは酸性多糖及びタンパク質を含む細胞外ポリマーに Mn 酸化物が沈着した構造であることを報告している⁵¹⁾。さらに、この細胞外ポリマーには、Mn²⁺イオン酸化触媒の機能があり、この作用により酸化物が沈着することを明らかにしている⁵¹⁾。BIWAKO-01 株が生成したメタロゲニウム粒子をアスコルビン酸で溶解すると繊維状の物質が残り、これがアルシアンブルー染色により青色に染まったことから、酸性多糖類であることが判明した。この結果は、Walsh らの報告⁵⁵⁾や Emerson らの報告⁵¹⁾と一致していた。さらに、酸性多糖類を構成する糖質を特定するため、レクチンを用いて糖鎖の解析を行い、メタロゲニウム粒子のフィラメント部分に、 α -マンノース、 α -グルコース、ガラクトース、N-アセチル-D-ガラクトサミン、N-アセチル-D-グルコサミンを含む糖鎖が存在していることが示唆された。この結果は鉄酸化細菌である *Leptothrix* sp. の細胞外多糖類の構成成分⁹⁹⁾と一致していた。これまでに室内の微生物培養系及び湖沼等水環境で生成したメタロゲニウム粒子の構成糖を分析した事例はなく、本研究により新規の知見を得ることができた。

本研究では Mn 酸化の反応機構に関する検討は行わなかったが、pH 中性付近では DO による Mn²⁺イオンの酸化は起こりにくいため、触媒が介在するはずである。前述のとおり Emerson ら⁵¹⁾は、メタロゲニウム粒子のフィラメントに含まれる細胞外ポリマーが Mn²⁺イオン酸化活性をもつことを明らかにしている。幾つかの細菌種において、細胞表層の細胞外ポリマー(*Leptothrix discophora* の鞘構造、海洋性 *Bacillus* sp. SG-1 株のスポアコート、*Pseudomonas putida* の細胞表層多糖など)に含まれる酵素タンパク質が Mn 酸化に関与しており、Mn 酸化酵素として、活性中心に銅を保有するマルチ銅オキシダーゼ及びヘム鉄を保有するペルオキシダーゼが明らかにされている¹⁰⁰⁾。多様な子囊菌類でもマルチ銅オキシダーゼによる Mn 酸化が示されている^{53, 54)}。一方で、非酵素的な Mn 酸

化機構も提唱されてきている。ヒドロキシカルボン酸のような微生物による代謝産物が Mn^{2+} イオンの酸化剤として働く可能性が指摘されている¹⁵⁾ほか、最近では、海洋性細菌 *Roseobacter* sp. AzwK-3b 株において、細胞外に放出されるスーパーオキシドアニオン (O_2^-) が Mn 酸化に関与することが明らかにされている^{101,102)}。BIWAKO-01 株においても、酵素的、または非酵素的に Mn 酸化が起こり得るであろう。

本研究では、2 mM と高い Mn^{2+} イオン濃度の培地を基本培地として用いた。この培地中で生成したメタロゲニウム粒子の微細構造として、ナノシート構造とナノロッド構造が認められ、前者はバーネサイト ($\delta\text{-MnO}_2$)、後者はマンガナイト ($\gamma\text{-MnOOH}$) と、異なる Mn 酸化物が形成していることが示された。微生物が形成する Mn 酸化物は一般的にバーネサイト様であることが知られているが^{81,82)}、マンガナイトのような Mn(III)酸化物の生成も報告されてきた。*Bacillus* sp. SG-1 株の培養液において、高濃度 (mM レベル) の Mn^{2+} イオンを添加すると、pH や培養時間に応じてファイトクネヒタイト ($\beta\text{-MnOOH}$)⁴⁶⁾、またはファイトクネヒタイトとハウスマンナイト (Mn_3O_4) の混合相¹⁰³⁾を生じることが報告されている。これらの Mn(III)酸化物は、微生物反応により生成したバーネサイト (Mn(IV)酸化物) 上で Mn^{2+} イオンが化学的に酸化されて生じたものであると考えられている⁸¹⁾。Lefkowitz ら¹⁰⁴⁾は、pH 7.0~7.5 において化学合成したバーネサイトが mM レベルの Mn^{2+} イオンと反応し (次式)、ファイトクネヒタイトやマンガナイトを生成することを明らかにした。



BIWAKO-01 株の培養液中においても、初めに生成したバーネサイトが培地中の高濃度 Mn^{2+} イオンと反応し、二次的に生成したと推察された。

本研究で使用してきた M3 半流動培地の初期 Mn^{2+} イオン濃度を 0.1 mM に、また 20 mM HEPES 緩衝液を加え pH 6.0 として、BIWAKO-01 株の培養を開始した。その後、培地中の Mn^{2+} イオン濃度が過剰にならないように 0.1 mM Mn^{2+} イオンを繰り返し添加した結果、生成したメタロゲニウム粒子のフィラメント部分はナノシート構造のみで構成されることが明らかになった。この結果は、上記のナノロッド構造が高濃度 Mn^{2+} イオンと Mn(IV)酸化物との反応で生じたことを支持するものである。琵琶湖今津沖中央地点水深約 90 m における全 Mn 濃度は、2002~2013 年度の平均値が 0.04 mg/L (約 0.7 μM)、最大値は 0.30 mg/L (約 5.5 μM)であったことから(第2章)、これらの低 Mn^{2+} イオン条件では Mn(III)酸化物の生成は起こらず、観察されたメタロゲニウム粒子はナノシート構造を有していたものと推察された (第2章、図 2-6)。低濃度 Mn^{2+} イオン存在下で生成したメタロゲニウム粒子は、琵琶湖から採取したメタロゲニウム粒子と同様のナノシート構造を有していたことから、本試験で用いた条件下での BIWAKO-01 株の培養系は、湖沼底層部でのメタロゲニウム粒子生成のラボ・モ

デル系として有用であることが示された。

最後に、BIWAKO-01 株と同じ *Bosea* 属細菌の UAY-3 株、別のマンガン酸化細菌である *L. discophora* SP-6 株を BIWAKO-01 株と同様に培養しても、メタロゲニウム粒子の形成は認められなかったことから、環境中には分子系統的に多様なマンガン酸化細菌が普遍的に存在するが、それらのマンガン酸化細菌が必ずしもメタロゲニウム粒子を形成するのではなく、環境中において BIWAKO-01 株を含む特定の細菌がメタロゲニウム粒子の生成に関与していることが示唆された。

第 6 節 要約

湖水を分離源として、メタロゲニウム粒子を生成するマンガン酸化細菌 BIWAKO-01 株を単離した。BIWAKO-01 株は継代培養において継続的にメタロゲニウム粒子を生成し、安定したメタロゲニウム粒子生成培養系を確立することに成功した。16S rRNA 遺伝子配列結果から BIWAKO-01 株は、*Bosea* 属 (α -*Proteobacteria* 綱) に帰属された。このような培養系は今まで確立されておらず、湖沼のメタロゲニウム粒子生成のモデル系としての利用が期待された。BIWAKO-01 株の培養液中で生成したメタロゲニウム粒子には、内部に菌体が存在する粒子と空洞の粒子が観察され、培養の経過日数とともに内部に菌体が確認できる粒子は減少した。また、メタロゲニウム粒子の構造に関して、フィラメント部分は酸性多糖を含むことが示され、さらにレクチンを用いた糖鎖解析により、 α -マンノース、 α -グルコース、ガラクトース、*N*-アセチルガラクトサミン、*N*-アセチルグルコサミンを構成糖として含むことが示唆された。M3 半流動培地 (Mn^{2+} イオン濃度：2 mM) で培養して得たメタロゲニウム粒子のフィラメント部分の微細構造を STEM 等により解析した結果、ナノシート構造及びナノロッド構造が観察された。ナノシート構造 (バーネサイト： $\delta\text{-MnO}_2$) は琵琶湖底層部で採取されたメタロゲニウム粒子と同じ形態であったが、ナノロッド構造は電子回折パターンから Mn(III) 酸化物であるマンガナイト ($\gamma\text{-MnOOH}$) と同定された。培養液中の Mn^{2+} イオン濃度を 0.1 mM 以下と低濃度で維持すると、琵琶湖で採取したメタロゲニウム粒子と同様にナノシート構造のみで構成されることが明らかになり、BIWAKO-01 株の培養系は湖沼底層部でのメタロゲニウム粒子生成の室内モデル系として有用であることが示された。

第 4 章 マンガン酸化細菌 *Bosea* sp. BIWAKO-01 株を用いたメタロゲニウム粒子生成要因の解析

第 1 節 はじめに

第 3 章では、琵琶湖水からマンガン酸化細菌 *Bosea* sp. BIWAKO-01 株を単離し、M3 半流動培地を用いた静置培養によりメタロゲニウム粒子が生成されることを明らかにした。

第 2 章の結果により、琵琶湖北湖の底層部でのメタロゲニウム粒子の発生には DO 濃度、pH 値に加えて未知の因子の関与が示唆されたことから、本章では、BIWAKO-01 株の培養特性を詳細に調査し、メタロゲニウム粒子生成をもたらす環境因子を明らかにすることを目的とした。

まず、M3 半流動培地入りの密栓した培養瓶を用いて、BIWAKO-01 株を静置培養し、メタロゲニウム粒子生成時の DO 濃度や pH 値条件に関する知見を得た。この知見を基に、DO 濃度や培地 pH 値を制御しながら培養を行い、それらの環境因子がメタロゲニウム粒子生成に及ぼす影響を調査解析した。

さらに、BIWAKO-01 株の培養条件において、M3 半流動培地に含まれる寒天を除くとメタロゲニウム粒子を生成しなくなったことから、メタロゲニウム粒子生成における寒天（多糖類）の関与について検討を行った。

第 2 節 試験方法

4-2-1 ねじ口瓶を培養器とした密閉系での培養試験

BIWAKO-01 株を容量 500 mL のねじ口瓶を用いて 2 mM Mn^{2+} イオンを含む M3 半流動培地で静置培養した。培養中ねじ口瓶は密栓したため、培地への酸素供給はねじ口瓶上部の気相部分に限定されていた。20°C、暗所で培養を行い、所定時間毎に培養液表層部から 1 cm 毎に深さ方向の DO 濃度、pH 値を測定した（LDO-HQ30d、Hack）。酸化態 Mn の濃度は、ロイコベルベリンブルー試薬³⁹⁾を用い、分光光度計（UV-2550、島津製作所）により 620 nm の吸光度を測定して定量した。なお実験は 3 連で行なった。

4-2-2 シャーレを培養器とした非密閉系での培養試験

2 mM Mn^{2+} イオンを含む M3 半流動培地を 20 mL ずつ滅菌シャーレに分注し、これに BIWAKO-01 株の植種液 100 μL （約 1.0×10^8 CFU/mL）を添加した。気相中の O_2 濃度と CO_2 濃度の影響を調べるために、植種したシャーレをステンレス製真空デシケーター（SV-300、Asone）に入れ、13.3 Pa まで脱気、 N_2 ガスを約 0.8 気圧（810 hPa）まで充填した後、 O_2 （0~0.1%（0~1 hPa）、2%（20 hPa）、5%（51 hPa））及び CO_2 （1%（10 hPa）、2%（20 hPa）、5%（51 hPa））を各割合で混合したガスを充填し、さらに 1 気圧（1013 hPa）となるように N_2 ガスを充填した。これを暗所、20°C で静置した。なお、気相中の O_2 濃度と CO_2 濃度は各々 O_2 モニター（OXY-1、Jikco）及び CO_2 モニター（COZY-1、Jikco）を用いてモ

ニタリングした。

pH 値の影響を調べる培養実験では、所定の pH に調製した 20 mM HEPES 緩衝液を含む M3 半流動培地 (NaHCO₃ 未添加) を使用した。培地 pH は 5.0、5.5、6.0、6.3、6.5、7.0 及び 7.5 に設定した。これに BIWAKO-01 株の植種液 100 µL (約 1.0×10^8 CFU/mL) を添加した。

メタロゲニウム粒子生成における多糖類の添加効果を調べる実験では、BIWAKO-01 株を 0.2 mM Mn²⁺イオン及び 40 mM HEPES (pH 6.0) を含有する M3 半流動培地で培養した。このとき、0.5 g/L 寒天の代わりに、同濃度のアガロース S (和光純薬)、ゲランガム (和光純薬)¹⁰⁵⁾、ペクチンリンゴ (和光純薬)、ペクチンかんきつ (和光純薬)、デンプン (馬鈴薯由来、和光純薬) 及びデンプン (トウモロコシ由来、シグマアルドリッチジャパン) を添加したほか、比較のため多糖未添加の培地も調製した。なお、これらの添加した多糖は培地のオートクレーブ滅菌 (121℃、15 分) の間に溶解していた。静置培養は、20℃、微好気条件 (アネロパック微好気) で行った。

また、多糖類の代わりに各種の単糖を添加した試験も行った。上記 M3 半流動培地 (0.2 mM Mn²⁺イオン含有、40 mM HEPES (pH 6.0)) の含有する 0.5 g/L 寒天に替えて、同濃度の D-マンノース、L-アラビノース、D-ガラクトース、6-デオキシ-L-ガラクトース、α-L-ラムノース水和物、D-グルコース、D-キシロース、ガラクトツロン酸、D-グルクロン酸、D-グルコサミン塩酸塩、D-フコース、D-マンノサミン塩酸塩を添加して実施した。培養条件は、20℃、気相 O₂ 濃度 10% とした。

なお、酸化物態 Mn はロイコベルベリンブルーを用いた比色法³⁹⁾により定量した。

第 3 節 結果

4-3-1 メタロゲニウム粒子生成に及ぼす DO 濃度および pH 値の影響

第 3 章で述べたねじ口試験管を用いた BIWAKO-01 株の培養の様子 (図 3-4) をみると、茶褐色のメタロゲニウム粒子が試験管中央部分より上層部で観察された。この現象は何度培養を行っても同じであったため、メタロゲニウム粒子が生成している茶褐色層の DO 濃度及び pH 値がメタロゲニウム粒子生成に適した条件になっていると考えられた。そこでねじ口瓶を用いて同様に 42 日間培養を行い、培養液の深さ方向の DO 濃度、pH 値および Mn 濃度を測定した。その結果を図 4-1 と 4-2 に示す。

DO 濃度は、培養開始前 (0 日目) は、表層 0~8 cm で 7.6 mg/L 程度であったが、培養 1 週間で 4 cm より下層で急激に下がりはじめ、2 週間では表層から 4 cm で約 6 mg/L、6 cm で約 2 mg/L と顕著に低下した (図 4-1)。3 週間後に表層から 5 cm 付近で茶褐色の Mn 酸化層が生成されたが、このときの 5 cm の DO 濃度は 3.9 mg/L に低下していた。5 週間後になると、表層から 5 cm を中心とした部分で濃茶褐色の Mn 酸化層が見られ、中心部の DO 濃度は 2.0 mg/L になっていた

(図 4-2)。これらの結果から、Mn 酸化層における DO 濃度はおよそ 2~4 mg/L の範囲にあり、この DO 濃度条件においてメタロゲニウム粒子が生成することが示唆された。また、ねじ口瓶の蓋を綿栓に替えて通気を行った場合には Mn 酸化層は生成されなかった (データ不掲載)。

pH 値については、培養 1 週間後では pH 7.2 であったが、茶褐色の Mn 酸化層が観察され始めた 3 週間後では僅かに低下が認められ (pH 7.0)、さらに Mn 酸化層が発達した 4 週間後には pH 6.8、5 週間後には pH 5.7 にまで低下した (図 4-2)。これらの結果から Mn 酸化層が生成されている時の pH 値範囲は 5.7~7.0 にあるといえる。

以上の結果から、BIWAKO-01 株による Mn 酸化及びメタロゲニウム粒子生成には、DO 濃度が制限された状態 (低酸素条件) が必要であることが示唆された。また、培養液中の Mn 酸化層では pH 値が低下していた、DO の消費に伴って生成する CO₂ が加水分解して H⁺を放出することから、DO 濃度と pH 値の低下は連動していると推察された。一方で、培養液中で増加した CO₂ (HCO₃⁻) が BIWAKO-01 株のメタロゲニウム粒子生成を直接的に促進している可能性も考えられた。

次に、シャーレを培養器として、密閉チャンバー内で気相中の O₂ 及び CO₂ ガス濃度を適宜変えて培養試験を行い、O₂ 及び CO₂ の影響を調べた。この結果を図 4-3 に示した。Mn 酸化により酸化態 Mn が生成したのは CO₂ を 1~5% 添加し、かつ O₂ 濃度を 5~10% に制限した条件のときであった。O₂ 濃度が 5~10% のときでも CO₂ 濃度が大気レベル (390 ppm) の場合は、培養液中で Mn 酸化は進行しなかった。

M3 半流動培地 (基礎培地) は緩衝液未添加のため、気相中の CO₂ 濃度を高めると、培地の pH 値が低下し、メタロゲニウム粒子が生成されたことから、pH 値がメタロゲニウム粒子生成の要因となることが考えられた。そこで、HEPES 緩衝液を添加し所定の pH 値に調整した M3 半流動培地を用いて CO₂ ガスを加えない条件 (O₂ : 5%) で培養を行ったところ、Mn 酸化が起きることが明らかになった (図 4-4)。即ち、14 日間の培養において、pH 5.5~6.5 で酸化態 Mn が生成した。酸化態 Mn の生成量が最も多かった pH 値は、7 日間では pH 6.0、14 日間では pH 6.3 のときであった。これらの結果から、図 4-3 で示した CO₂ の添加効果は、培地 pH 値をメタロゲニウム粒子生成に適した pH 値まで低下させることであると結論付けた (図 4-4)。また、酸化態 Mn の生成量が最も多かった 7 日では pH 6.0、14 日では pH 6.3 と異なっていた。本試験で使用した M3 半流動培地には、20 mM HEPES 緩衝液を添加したが、14 日間の培養により培養液の pH 値は 0.1~0.3 程度低下していた。つまり、BIWAKO-01 株による Mn 酸化の最適 pH 値は pH 6.0 と推定される。7 日では pH 6.0 であった培養液が 14 日目には pH 5.7~5.9 に低下したため酸化速度が減少したものと推察した。

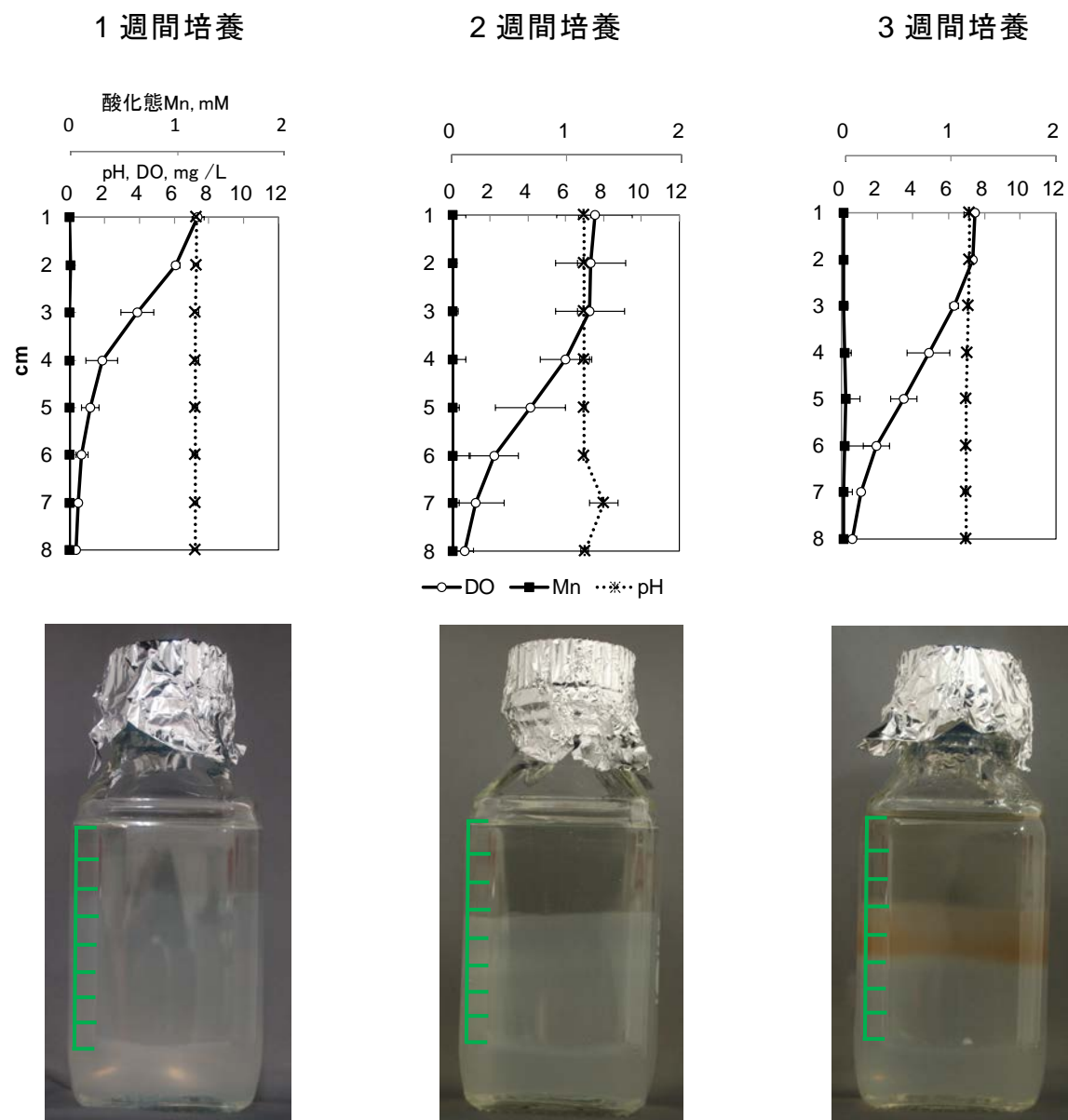
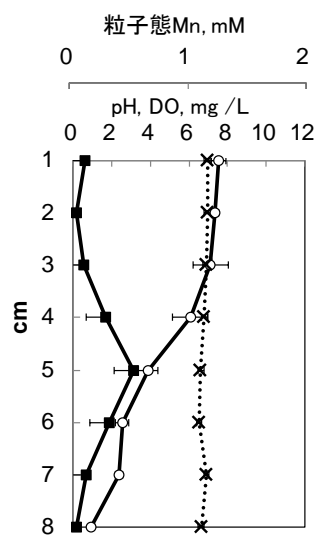
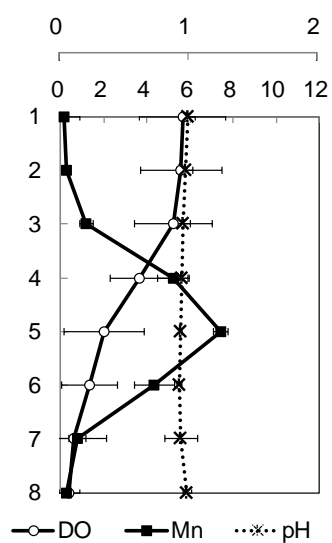


図 4-1 ねじ口瓶を用いた BIWAKO-01 株の培養試験結果
(1～3 週間培養) 平均値 \pm SD (n = 3)

4 週間培養



5 週間培養



6 週間培養

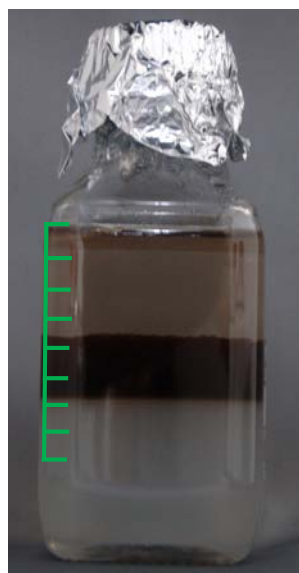
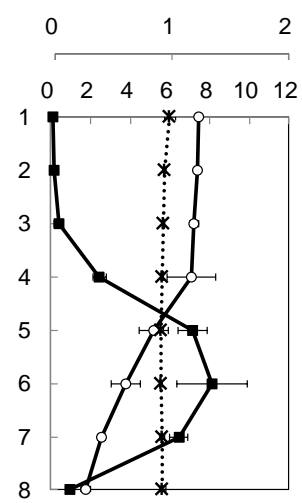


図 4-2 ねじ口瓶を用いた BIWAKO-01 株の培養試験結果
(4~6 週間培養) 平均値 \pm SD ($n = 3$)

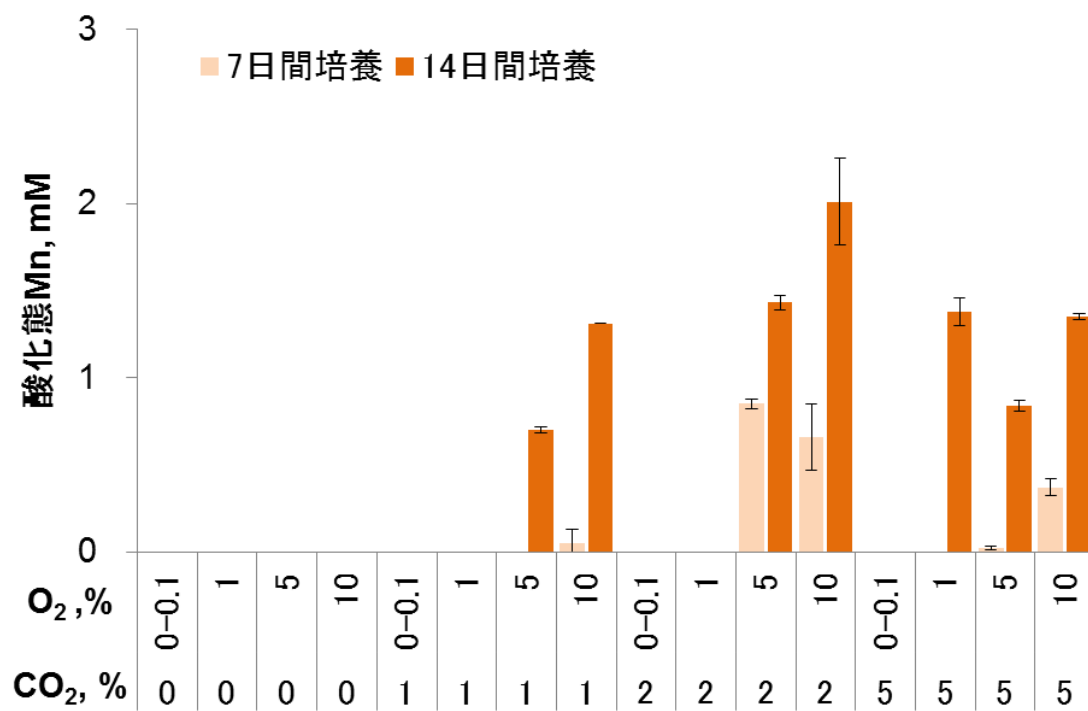


図 4-3 気相中の CO₂ 濃度と O₂ 濃度が BIWAKO-01 株による酸化態 Mn 生成に及ぼす影響 平均値 ± SD (n = 3)

次に HEPES 緩衝液を添加した M3 半流動培地 (pH 6.0) を用いて、O₂ 濃度の影響を調べた。その結果を図 4-5 に示した。気相の O₂ 濃度が 2~20% のとき (培養液中の DO 濃度 : 2.0~8.8 mg/L)、Mn 酸化が起きたが、主として 5~15% (DO 濃度 : 4.6~6.5 mg/L) で酸化態 Mn が生成しており、O₂ 濃度が 10% のとき (DO 濃度 : 6.3 mg/L)、最も Mn 酸化が速く進行することが明らかになった (図 4-5)。

4-3-2 糖類添加の影響

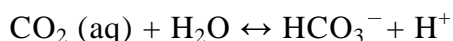
非常に興味深いことに、M3 半流動培地を用いて BIWAKO-01 株を培養する際に、培地成分に 0.5 g/L 寒天を添加しないとメタロゲニウム粒子は生成しないことが示された。このことから、メタロゲニウム粒子の生成には寒天成分が必要であると考えられた。そこで、寒天の代わりに他の多糖類や単糖類を添加した M3 半流動培地を用いて培養試験を実施した。その結果を図 4-6 と表 4-1 に示す。何れの多糖類も添加しない培地では Mn 酸化は起こらなかったが、アガロース、ゲランガム、ペクチン、及びデンプンの添加により酸化態 Mn が生成した。寒天を精製したアガロースを添加しても寒天同様に酸化が認められたことから、寒天中に含まれる不純物が関与していたのではなく、寒天を構成する多糖自体が粒子生成に関与していたと推察された。

種々の単糖類を添加した結果 (表 4-1)、試験した何れの単糖類でも Mn 酸化は認められなかった。

第 4 節 考察

メタロゲニウム粒子生成に及ぼす O₂ 濃度の影響では、ねじ口瓶を用いた培養試験の結果、培養液中で形成した DO 濃度勾配の 2~4 mg/L の部位において Mn 酸化層が増大していた。また、O₂ 濃度を制御した培養試験の結果から、酸化態 Mn が生成した時の気相 O₂ 濃度は 2~20% (培養液中の DO 濃度 : 2.0~8.8 mg/L) であり、O₂ 濃度を 10% (DO 濃度 : 6.3 mg/L) に制限したとき最も生成量が多かった。これまでに報告されてきたマンガン酸化細菌は全て好気性であり、Mn 酸化にも O₂ が必要であるため、細菌による Mn 酸化活性に及ぼす O₂ 濃度の影響は殆ど検討されていない。また、酸素制限条件における微生物培養系において、Mn 酸化速度が速くなる現象はしばしば観察されており、*Pseudomonas putida* GB-1 株において DO 濃度が飽和濃度の 26% のときに、Mn 酸化速度が速くなることが報告されている¹⁰⁶⁾ものの、その機構は依然として不明である¹⁵⁾。

メタロゲニウム粒子生成に及ぼす pH 値の影響では、ねじ口瓶を用いて培養したとき pH 5.7~7.0 の部位で Mn 酸化層が形成していた。本研究では、当初は緩衝液を添加せずに培養を行ったが、そのような培地では CO₂ 生産に伴い次式により培地 pH 値の低下が起こっていたと推察された。



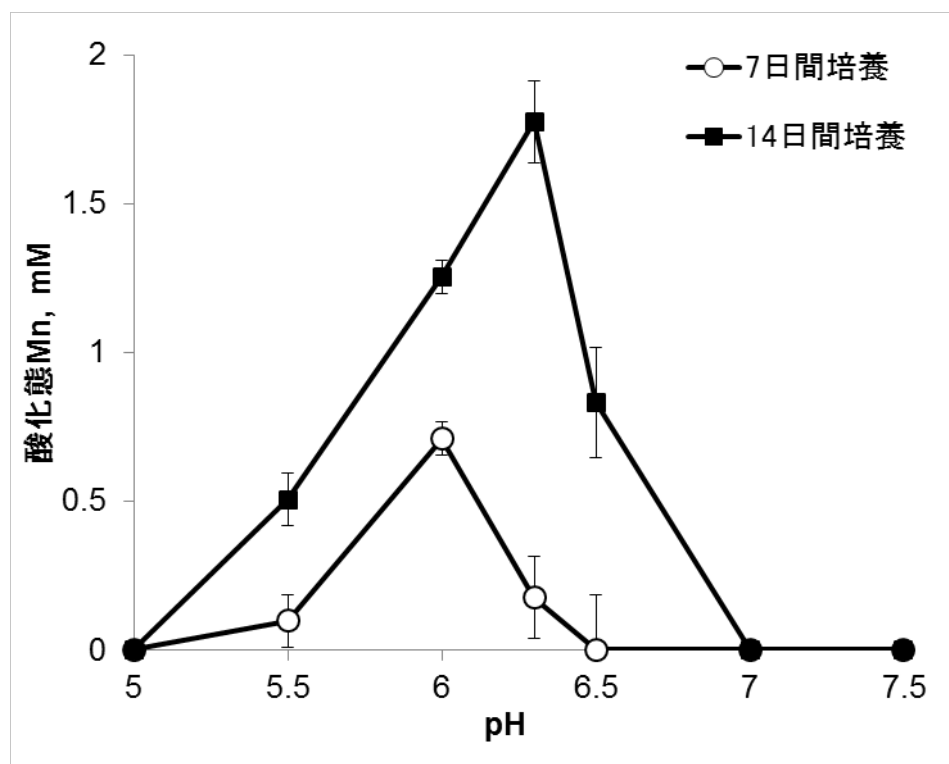


図 4-4 BIWAKO-01 株による酸化態 Mn 生成に及ぼす pH 値の影響
(HEPES 緩衝液各 20 mM、M3 半流動培地) 平均値 \pm SD ($n = 3$)

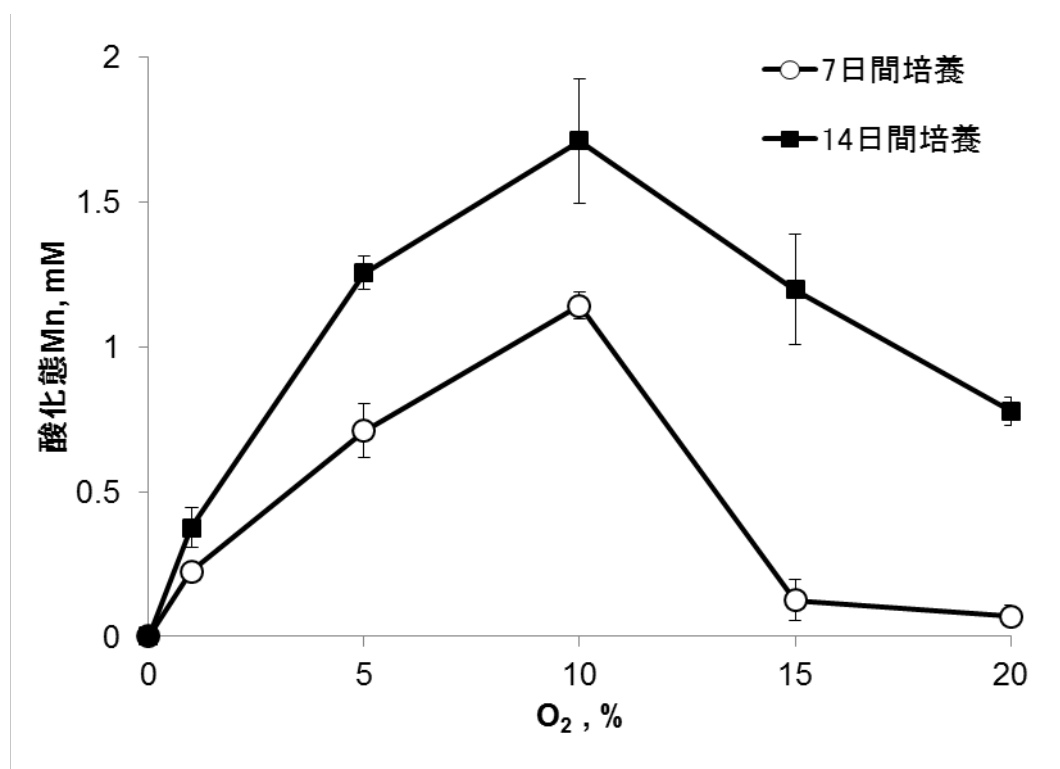


図 4-5 BIWAKO-01 株による酸化態 Mn 生成に及ぼす酸素濃度の影響
(M3 半流動培地、pH 6.0) 平均値 \pm SD ($n = 3$)

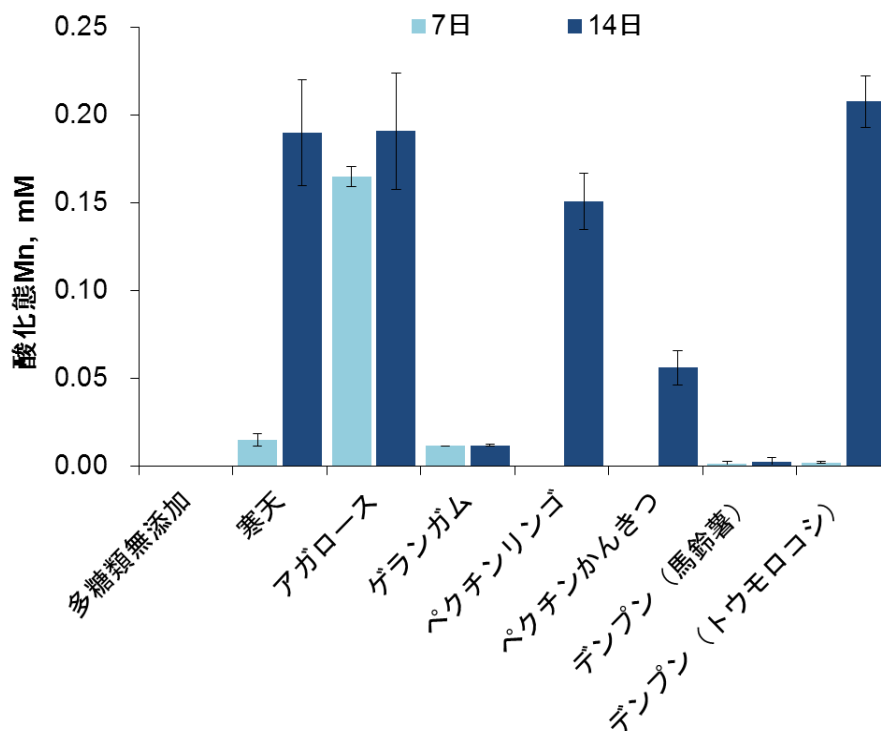


図 4-6 BIWAKO-01 株による酸化態 Mn 生成に及ぼす多糖類添加の影響
 平均値 ± SD (n = 3、アガロース、デンプン (馬鈴薯由来)、多糖類無添加は n = 2)

表 4-1 BIWAKO-01 株による酸化態 Mn 生成に及ぼす単糖類添加の影響
 (n = 3)

| 単糖 (0.5 g/L) | 酸化態Mn (mM) | |
|-----------------|------------|------|
| | 7日 | 14日 |
| D-マンノース | <0.1 | <0.1 |
| L-アラビノース | <0.1 | <0.1 |
| D-ガラクトース | <0.1 | <0.1 |
| 6-デオキシ-L-ガラクトース | <0.1 | <0.1 |
| α-L-ラムノース水和物 | <0.1 | <0.1 |
| D-グルコース | <0.1 | <0.1 |
| D-キシロース | <0.1 | <0.1 |
| ガラクツロン酸 | <0.1 | <0.1 |
| D-グルクロン酸 | <0.1 | <0.1 |
| D-グルコサミン塩酸塩 | <0.1 | <0.1 |
| D-フコース | <0.1 | <0.1 |
| D-マンノサミン塩酸塩 | <0.1 | <0.1 |

BIWAKO-01 株の培養液中において、DO の消費は CO₂ を発生させるため、上述した DO 濃度制限条件でのメタロゲニウム粒子生成には、CO₂ (あるいは HCO₃⁻) 濃度の上昇が寄与している可能性も考えられた。*Arthrobacter* sp. の培養系¹⁰⁷⁾ やモデル土壌系¹⁰⁸⁾での Mn 酸化において、CO₂ 濃度を高めた条件下で培養液が弱酸性化し、Mn 酸化が急速に進行することが報告されている。さらに、このモデル土壌系での報告では、微生物的な Mn 酸化作用への CO₂ の直接的な寄与もあることが議論されている。Miyajima は M3 半流動培地を用いた培養試験によって、*Leptothrix* 属及び *Bacillus* 属の単離株がやはり弱酸性条件 (pH 5.5~7) でメタロゲニウム粒子を形成することを報告している¹³⁾。本研究において、緩衝液を添加して pH 5.0~6.0 に調整した培地では CO₂ 濃度を高めなかった条件でもメタロゲニウム粒子生成が起こったことから、CO₂ は培地 pH 値を低下させることにより、粒子生成に関与していたと結論付けた。緩衝液により pH 値を制御した培養試験では、酸化態 Mn は pH 5.0~6.5 で生成し、pH 6.0~6.3 で生成量が最も多くなった。これらの結果から、BIWAKO-01 株の培養液中では、酸素制限条件 (ねじ口瓶での培養：2~4 mg/L、シャーレでの培養：6 mg/L 付近)、かつ弱酸性条件 (pH 5.5~6.5) でメタロゲニウム粒子生成が促進されることが明らかになった。

さらに興味深いことに、BIWAKO-01 株によるメタロゲニウム粒子の生成には、寒天等の多糖の添加が必要であることが示された。一方で、アガロースの主な構成成分である D-ガラクトースをはじめとする各種の単糖類を添加してもメタロゲニウム粒子は生成しなかった。Miyajima の報告から、メタロゲニウム粒子を生成する微生物培養系には、0.5 mg/L のアガロースの添加が必要なが示されており¹³⁾、本試験結果はこの結果と一致していた。現時点ではなぜ多糖を要求するのか不明であるが、第 3 章で述べたように、BIWAKO-01 株の増殖特性として、増殖のための基質 (エネルギー源、炭素源) として各種の糖類を資化できないことから、添加した多糖が増殖の基質として利用されているとは考えられなかった。なお、先の Miyajima の報告¹³⁾では、アガロースを添加しない培地では、メタロゲニウム粒子は生成しなかったが、Mn 酸化は生じていた (不定形粒子として沈積)。このことから、多糖の存在は、メタロゲニウム粒子のフィラメント構造の発達において重要な役割を果たしている可能性がある。しかし本研究の BIWAKO-01 株では、多糖無添加の培地では Mn 酸化活性自体が発現しておらず、多糖存在下で Mn 酸化活性が発現するとの新しい知見を得ることができた。寒天やアガロース等を低濃度で添加することにより培地の粘性が増加するが、そのような培養液の物理的性状の変化により、BIWAKO-01 株の Mn 酸化活性の発現が起こり、メタロゲニウム粒子の生成が促進された可能性がある。BIWAKO-01 株による細胞外多糖 (フィラメント) の生成と伸長は、培養液中での菌体の運動性に関係しているかもしれない。BIWAKO-01 株は極鞭毛を持ち (図 3-3B) 自由遊泳できるが、種々の細菌で培地の流動性が菌体の遊泳性に大きく影響することが知られており^{109,110)}、菌体の運動性が大きく低下することで

Mn 酸化活性の発現と粒子生成がもたらされたことも否定できない。

BIWAKO-01 株を用いた培養試験で得られた結果から、湖沼底層部で (1) 酸素制限条件、(2) 弱酸性条件、及び (3) 多糖の存在下で、メタロゲニウム粒子が生成していると推察された。酸素制限条件に関して、第 2 章で示した 2002 年以降の琵琶湖北湖底層部での水質の経年変化では、DO 濃度が低下する夏季から秋季にかけてメタロゲニウム粒子が生成し、DO 濃度とメタロゲニウム粒子出現数には弱い負の相関が認められた。これまでに、琵琶湖¹²⁾及び他の成層環境 (ワシントン湖¹⁷⁾、バルト海²⁶⁾) 等において、メタロゲニウム粒子生成は DO 濃度に依存し、酸素制限条件においてより普遍的であることが報告されている。この理由として、DO 濃度の低下により底質からの Mn^{2+} イオンの溶出が促進されるため、メタロゲニウム粒子数の増大に繋がるものと推察されていた。しかしながら、BIWAKO-01 株を用いた培養試験結果からは、酸素制限が微生物による Mn 酸化活性の発現を直接的に制御し、メタロゲニウム粒子生成をもたらししていることが示唆された。

また弱酸性条件に関して、第 2 章では、琵琶湖北湖底層部の pH 値とメタロゲニウム粒子発生数に弱い負の相関が認められることを明らかにした。メタロゲニウム粒子発生が顕著になったときの pH 値に着目すると、pH 7.2 で発生頻度が最も高くなり、さらに pH 7.2 以下でより多く発生する傾向が示された。BIWAKO-01 株の培養液中では pH 5.0~6.5 で最も Mn 酸化速度が速くなり、琵琶湖北湖底層部でのメタロゲニウム生成時の pH 値よりも低い値であるが、弱酸性領域が重要であることは明らかである。琵琶湖底層部水の pH 値を決定付ける最も重要な因子の一つとして CO_2 が挙げられ、この観点から、湖沼底層部での DO 消費による CO_2 生産はメタロゲニウム粒子生成に間接的に寄与しているといえる。

最後に、第 2 章では、メタロゲニウム粒子の発生には DO 濃度、pH 値に加えて未知の因子の関与を示した。本章でも BIWAKO-01 株の培養結果によりメタロゲニウム粒子生成に DO 濃度と pH 値について関与が示され、さらに多糖の存在下で生成することを示した。第 2 章では未知の因子であったが、これが多糖の存在下であることが示唆された。

さらに、多糖に関して琵琶湖北湖底層部における多糖の存在とメタロゲニウム粒子生成については、「琵琶湖北湖表層部で発生した粘質鞘を持つ植物プランクトンが底層部に沈降して、メタロゲニウム粒子生成に必要な多糖類の供給源として機能している」との仮説を立て、次章で検討を行うこととした。

第 5 節 要約

本章では、BIWAKO-01 株によるメタロゲニウム粒子生成に及ぼす O_2 濃度、pH 値及び多糖類添加の影響について試験した。 O_2 濃度の影響では(培地:pH 6.0、培養期間:14 日間)、気相 O_2 濃度 2~20% (培養液中の DO 濃度:2.0~8.8 mg/L) で Mn 酸化物が生成し、気相 O_2 濃度を 10% (DO 濃度:6.3 mg/L) に制限したと

き、Mn 酸化速度が最大になることが明らかになった。pH 値の影響を調べた結果、14 日間の培養において弱酸性条件 (pH 5.5~6.5) で酸化態 Mn が検出され、メタロゲニウム粒子を生成していた。

さらに、BIWAKO-01 株は寒天未添加の培地ではメタロゲニウム粒子を生成しないことが示された。アガロース、ペクチン及びでんぷんを添加した場合は、寒天添加時と同様に粒子生成が認められた。これらの結果から、BIWAKO-01 株の培養液中では、弱酸性条件、酸素制限条件及び寒天等の多糖成分の存在下でメタロゲニウム粒子の生成が促進されることが明らかになった。琵琶湖北湖底層部でこれらの環境条件が整ったとき、マンガン酸化細菌の働きによりメタロゲニウム粒子が発生すると推察された。

第 5 章 琵琶湖北湖でのメタロゲニウム粒子生成における植物プランクトンバイオマスの関与

第 1 節 はじめに

第 4 章では、マンガン酸化細菌 *Bosea* sp. BIWAKO-01 株の培養特性を解析し、低酸素条件、弱酸性条件及び寒天のような多糖存在下において、培養液中でメタロゲニウム粒子の生成が進行することを明らかにした。琵琶湖底層部においても、これらの諸条件が揃った環境下で、微生物によるメタロゲニウム粒子生成が起こっているものと推察された。この結果を基に、琵琶湖北湖表層部で発生した粘質鞘を持つ植物プランクトンが底層部に沈降して、メタロゲニウム粒子生成に必要な多糖類の供給源として機能しているとの仮説を立て、本章で検討を行うこととした。

湖沼における底層部の貧酸素化要因の一つとして、表層部での植物プランクトンの異常発生が挙げられている^{86,87)}。琵琶湖北湖の湖水中で季節変動する有機物は主として易分解性で、植物プランクトン由来の粒子態有機物 (POC) である¹¹¹⁾と報告されている。一瀬らは、琵琶湖で観察される藍藻 70 種中 51 種 (73%)、緑藻 286 種中 106 種 (37%) が細胞容積の 2 倍以上の容積をもつ細胞外多糖 (粘質鞘) を保持し、さらに、琵琶湖北湖今津沖中央地点では近年、単位湖水容積当たりの粘質鞘を含む総細胞容積が増加したことを報告している⁸⁾ (図 5-1)。また、雨宮らは、粘質鞘の構成成分として多糖類が含まれていることを報告¹¹²⁾しており、粘質鞘を利用してメタロゲニウム粒子は生成可能である。

本章では、琵琶湖北湖での植物プランクトン発生量と底層部でのメタロゲニウム粒子発生との関連性について、過去の植物プランクトン調査データ (2002 年以降) を基に解析を行った。また、粘質鞘をもつ緑藻 (*Staurastrum arctiscon*) の培養藻体について生分解性試験を行い、藻体や粘質鞘の湖沼環境中での残存性を明らかにしようとした。さらに、緑藻 (*S. arctiscon* 及び *Staurastrum dorsidentiferum*) の培養藻体の共存下で Mn 酸化細菌 *Bosea* sp. BIWAKO-01 株を培養し、メタロゲニウム粒子生成における粘質鞘 (多糖) の要求性について調査した。

第 2 節 調査地点、調査方法及び調査期間

琵琶湖北湖の最深部付近である今津沖中央地点 (北緯 35°23'41"、東経 136°07'57") を調査地点とした (図 1-1)。

同地点において、バンドーン採水器を用いて水深 90m の採水を行った。また、湖底部に採水器を着地させ底泥の表層部を巻き上げながら底泥懸濁液試料を採取した (水深約 90 m)。採取した試料は冷蔵 (5℃) して持ち帰り検鏡した。

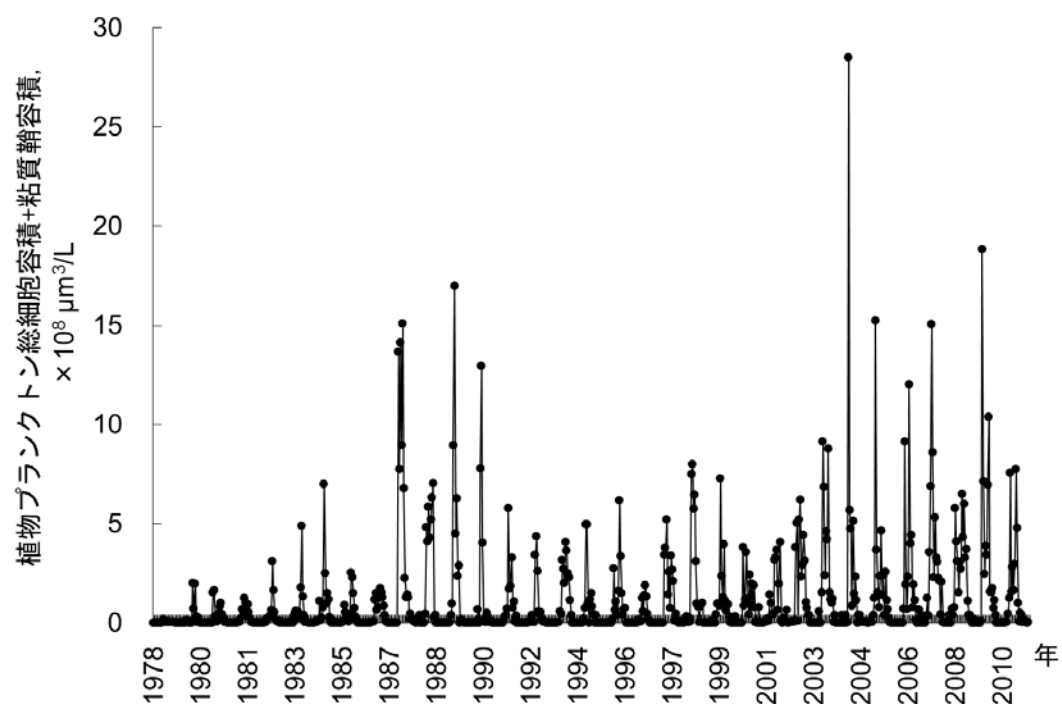


図 5-1 琵琶湖北湖今津沖中央地点（水深 0.5 m）における植物プランクトンの総細胞容積と粘質鞘（EPS）容積の合計値の推移⁸⁾

本研究では、2002～2013 年度の水質調査データ（DO、pH、水温、Mn 濃度、植物プランクトン量）は、滋賀県で調査し公表しているデータを文献値として用いた⁶²⁻⁷³⁾。2014 年度の水質データは本研究で測定したものをを用いた。また、同地点で発生したメタロゲニウム粒子数に関して、2009 年 11 月以前の観測データは石川ら⁷⁴⁾によって報告されたものを、2009 年 12 月以降は本研究の調査によって得られたものをを用いた。水質、植物プランクトン及びメタロゲニウム粒子発生量は全期間にわたって毎月 2 回計測された。

第 3 節 試験方法

5-3-1 メタロゲニウム粒子の観察及び植物プランクトンの計数方法

メタロゲニウム粒子数は第 2 章 第 3 節 2-3-2 項に従って計数した。湖水中の植物プランクトンの同定計数は、試料水 1 mL をプランクトン計数板（S6300、松浪硝子工業）に注いで 100 倍または 200 倍で微分干涉顕微鏡装置（Eclipse 80i、Nikon）にて検鏡した^{75,76)}。植物プランクトン種ごとに湖水試料 1 mL 当たりの細胞数を計数した後、一瀬らにより報告された細胞容積値¹¹³⁾を用いて、植物プランクトンの総細胞容積を算出し、粘質鞘容積は、粘質鞘計測用スライドグラス⁸⁾を用いて墨汁染色後に微分干涉顕微鏡により倍率 100 倍で計測を行った。湖水試料も、同様に墨汁染色後に検鏡観察を行った。

5-3-2 レクチン染色

湖水試料の懸濁物質中に多糖類が含まれるか調べるため、第 3 章 3 節 3-3-7 項に従って *Lycopersicon esculentum* レクチンを用いて懸濁物質のレクチン染色を行った。レクチン染色後は、蛍光顕微鏡装置 BX60（CCD カメラ画像処理装置 DP70 付、Olympus）を用いて励起波長 470～490 nm で観察した⁹⁷⁾。

5-3-3 *Staurostrum arctiscon* 及び *Staurostrum dorsidentiferum* var. *ornatum* の培養及び粘質鞘分離方法

緑藻 *S. arctiscon* 及び *S. dorsidentiferum* var. *ornatum*（以下 *S. dorsidentiferum*）は、琵琶湖環境科学研究センターにて琵琶湖水から分離され、継代保存している培養株（単藻株）を用いた。これらの藻類の培養にはオートクレーブ滅菌した CT 培地¹¹⁴⁾を用いた。培地組成は、15 mg/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、10 mg/L KNO_3 、4 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5 mg/L β -グリセロリン酸二ナトリウム、1 $\mu\text{g/L}$ ビタミン B_1 、0.01 $\mu\text{g/L}$ ビタミン B_{12} 、0.01 $\mu\text{g/L}$ ビオチン、40 mg/L TAPS、及び 0.3 mL/L PIV 金属混合液（pH 8.2）である。なお、PIV 金属混合液は 1 L 当たり、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 19.6 mg、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3.6 mg、 $\text{ZnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.2 mg、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.4 mg、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mg 及び $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mg を含んでいる。供試株を植種後、20℃、

12 時間毎の明暗条件で 3 週間培養した。明期の光強度は $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ に設定した。

S. arctiscon は藻体を生分解試験に供するため、以下の手順により大量培養を行った。100 mL の CT 培地を入れた三角フラスコ 150 本に植種し、3 週間培養した。各々の三角フラスコから培養液を 30 mL ずつ採取し、次に 100 mL の M11 改変培地を入れた三角フラスコ 400 本に植種し、3~4 週間培養を行った。M11 改変培地は M11 培地⁸³⁾の 6 mg/L 硫酸鉄を 0.6 mg/L クエン酸鉄に変更したもので、培地 1 L 当たり 100 mg Na_2NO_3 、10 mg K_2HPO_4 、75 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、30.2 mg CaCl_2 、20 mg Na_2CO_3 、0.6 mg クエン酸鉄、1 mg $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を配合した (pH 7.5)。以上の操作は無菌的に行い、培養は 20°C 、振盪速度 60 rpm、12 時間毎の明暗周期で、光強度 $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ に設定して行った。この培養により、対数増殖期後期から定常期初期にある *S. arctiscon* 藻体の培養液 30 L を得た。

S. arctiscon 及び *S. dorsidentiferum* の培養藻体から細胞外粘質鞘を分離除去するため、Girollo らの方法¹¹⁵⁾を参考に培養藻体の洗浄を行った。各藻体の培養液 10 L をガラス繊維ろ紙 (GF/B、Whatman) で吸引ろ過し、ろ紙上の藻類細胞に噴射瓶を用いて滅菌蒸留水を噴射、吸引ろ過する作業を 20 回繰り返した。この洗浄作業の後、光学顕微鏡による観察で藻類細胞を墨汁染色し形態観察 (200 倍) を行い、細胞から粘質鞘がほぼ除去されたことを確認した。ろ紙上の洗浄藻体はろ紙ごと M11 改変培地内で濯ぎ、培地に再懸濁させることで細胞を回収した。

5-3-4 植物プランクトンの生分解試験法

S. arctiscon の培養液を上述した操作により 30 L 調製し、生分解試験に供した。このとき、細胞外粘質鞘を除去していない培養液を P 培養液 (Positive extracellular polysaccharides 培養液)、洗浄操作により粘質鞘を除去した培養液を N 培養液 (Negative extracellular polysaccharides 培養液) として試験に用いた。P 培養液中の *S. arctiscon* の細胞密度は 1,100 cells/mL、N 培養液中では 1,160 cells/mL であった。P 培養液のブランク試験には *S. arctiscon* 培養液 20 L をガラス繊維ろ紙 (GF/B、Whatman) で吸引ろ過して調製したろ液を用いた。また、N 培養液のブランク試験には、新鮮な M11 改変培地を用いた。ろ液の生分解試験は植継ぎの際に培地成分等の持越し量を評価するために実施した。

生分解試験は、今井らの方法^{110,111)}を基に実施した。加熱処理 (450°C , 2 時間) したガラス瓶に P 培養液を 10 L 添加し、微生物植種液を培養液の 2% (v/v) となるように接種した。植種液には琵琶湖水 (琵琶湖北湖今津沖中央地点: 水深 60 m) をメンブレンフィルター (孔径 $10 \mu\text{m}$ 、Merck Millipore) でろ過したろ液を用いた。N 培養液やブランク試験液についても同様に調製した。各々の試験液は暗所、 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 、60 rpm で 200 日間振盪攪拌し、試験期間中、各培養液から 300

mL ずつ採取して懸濁態有機性炭素（POC）及び溶存態有機性炭素（DOC）を測定した。

POC 濃度は、各試料を 450℃、2 時間処理したガラス繊維ろ紙（GF/B）を用いてろ過した後、ろ紙を 40℃で 2 時間乾燥後、全窒素・全炭素分析装置（NC-22F、住化分析センター社）で分析することにより求めた。DOC 濃度は、GF/B ガラス繊維ろ紙でろ過したろ液に 2 M HCl を添加して pH 2 に調整後、純空気の通気により無機炭素を除去してから TOC 分析装置（TOC-5000A、島津製作所）を用いて測定した。なお、POC と DOC の合計値を全有機性炭素（TOC）とした。培養藻体に由来する DOC 量は、P 培養液の場合は P 培養液の DOC 値から P 培養ろ過液の DOC 値を差し引いて求めた^{116,117)}。一方、N 培養液では、N 培養液の DOC 値から M11 改変培地の DOC 値を差し引いて求めた。

5-3-5 植物プランクトン共存下での BIWAKO-01 株の培養試験法

Bosea sp. BIWAKO-01 株の培養では、第 4 章 2 節 4-2-2 項で記載した M3 半流動培地（20 mM HEPES 緩衝液（pH 6.0）、2 mM MnSO₄を含む）の寒天を除いた培地を用いた。この培地 20 mL を滅菌シャーレに入れた後、*S. dorsidentiferum*（細胞密度：15,500 ± 800 cell/mL）または *S. arctiscon*（細胞密度：16,300 ± 500 cell/mL）の CT 培養液を 1 mL ずつ添加した。また比較実験のため、洗浄操作により粘質鞘を除去した *S. dorsidentiferum*（細胞密度：15,000 ± 500 cell/mL）または *S. arctiscon*（細胞密度：15,000 ± 300 cell/mL）の CT 培地懸濁液も同様に 1 mL ずつ添加した。これらの培地に BIWAKO-01 株の菌体懸濁液（ 1.6×10^7 CFU/mL）を 100 μL ずつ植種し、20℃、暗所、気相 O₂ 濃度 10% 下で静置培養を行った。酸化態 Mn の濃度はロイコベルベリンブルー試薬³⁹⁾を用いて定量した。藻類培養液中の糖濃度は、アンスロン硫酸法¹¹⁸⁾により定量した。氷中で冷却した試料水 2 mL にディスペンサーを用いてアンスロン試薬（95%硫酸 100 mL に 0.2 g アンスロンを溶解）を 4 mL 滴下した後、沸騰水浴上で 10 分間加熱し、室温で放冷した。検量線の作成には、標準試料として 0～0.1 mg/mL グルコース溶液を用いた。分光光度計（UV-2550、島津製作所）により 620 nm の吸光度を測定して糖濃度を算出した。なお実験は 3 連で行なった。

第 4 節 結果

5-4-1 琵琶湖北湖における植物プランクトンとメタロゲニウム粒子の発生

琵琶湖北湖の今津沖中央地点水深約 90 m で採取したメタロゲニウム粒子を含む懸濁物質を光学顕微鏡で観察した結果を図 5-2 に示す。メタロゲニウム粒子とともに底質表層由来の懸濁物質が混在していた。この試料を墨汁染色すると、墨汁で染まらない部分（図 5-2A：白色部分）が認められ、さらに、この部分に

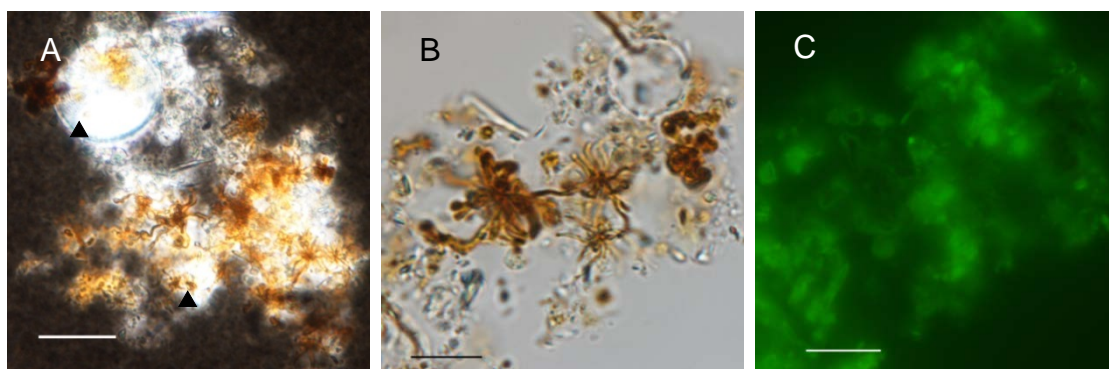


図 5-2 今津沖中央地点（水深約 90 m）から採取したメタロゲニウム粒子を含む試料水

A： 墨汁染色した懸濁物試料の微分干渉顕微鏡写真（採取日：2014 年 1 月 20 日、▲：墨汁に染まらない部分） B： *Lycopersicon esculentum* レクチンを用いて蛍光染色した試料水の位相差顕微鏡写真（採取日：2012 年 11 月 6 日）、 C： B と同視野の蛍光顕微鏡写真 Bar: A, B = 10 μ m, C = 20 μ m

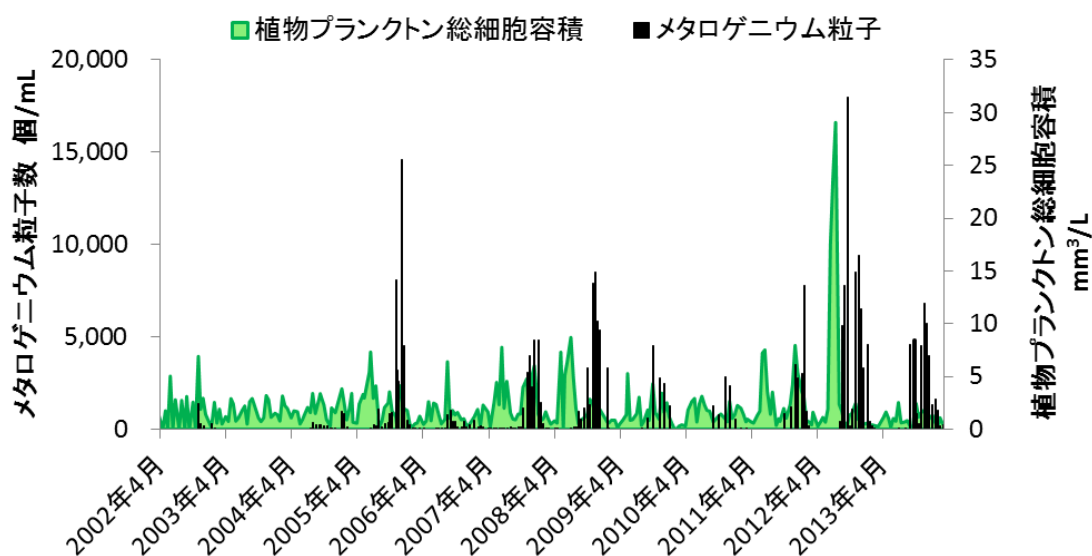


図 5-3 琵琶湖今津沖中央地点水深約 90 m におけるメタロゲニウム粒子数と表層 0.5 m の植物プランクトン総細胞容積の経年変化(2002～2013 年度)

メタロゲニウム粒子が付着するようにして存在することが明らかになった（図 5-2A）。墨汁で染まらない部分はゲル状物質であると推察され、また墨汁で染まらない部分には珪藻の残骸も観察され図 5-2A に▲で示した。また、懸濁物質をレクチン染色した結果、メタロゲニウム粒子が付着している浮遊物質から強い蛍光シグナルが検出された（図 5-2B,C）。本レクチンは *N*-アセチル-D-グルコサミンを含む糖鎖と結合することから、メタロゲニウム粒子がこれらの糖鎖から成る多糖成分に付着して存在することが示唆された。

今津沖中央地点水深 90 m における、2002～2013 年度のメタロゲニウム粒子発生状況と同地点表層 0.5 m の植物プランクトン総細胞容積の経年変化を図 5-3 に示した。2012 年 6～7 月にかけて過去にないレベルで植物プランクトンが大量発生していたが、この時のプランクトン種は緑藻 *S. dorsidentiferum* であった。その 2 か月後にやはり過去最高となる 18,000 個/mL のメタロゲニウム粒子が観測された。この様に植物プランクトンが多く発生した時期（6 月～11 月）の 2 か月程度後にメタロゲニウム粒子が多く発生する様子が全期間を通して見られた。2005 年 9～11 月は緑藻 *S. arctiscon* が多く発生した後、12 月に 14,600 個/mL のメタロゲニウム粒子が観察され、また、2008 年は 7～8 月に *S. dorsidentiferum* が多く発生した後、11 月に 8,500 個/mL のメタロゲニウム粒子が観測された。年度毎のメタロゲニウム粒子数の累積値（年間 24 回計測）と植物プランクトン総細胞容積の累積値（年間 24 回計測）を表 5-1 に示した。これらの値に対して相関係数を求めたところ $r = 0.69$ ($p < 0.05$) となり、メタロゲニウム粒子数と植物プランクトンバイオマス量には正の相関があることが明らかになった（図 5-4）。

前述のように、*S. dorsidentiferum* の大量発生から 2 か月程度後でメタロゲニウム粒子が発生していたことから、緑藻が時間をかけて底層部に沈降し、メタロゲニウム粒子の生成に関与していた可能性が示された。そこで *S. dorsidentiferum* が底層部に沈降するまでの期間を Kagami らが報告した植物プランクトンの沈降速度（0.13～0.64 m/日）¹¹⁹⁾を基に推定した。表層部で発生した *S. dorsidentiferum* が水深 90 m まで沈降するとき、沈降速度が 0.13 m/日では 690 日を要することになるが、沈降速度 0.64 m/日とすると 140 日（約 5 か月）と推定された。メタロゲニウム粒子の発生は主に 9 月～12 月であることから 5 か月遡り、各年度で 4～7 月に発生した植物プランクトン総細胞容積の累積値とその年度のメタロゲニウム粒子数の累積値について、相関係数を求めた。その結果、 $r = 0.66$ ($p < 0.05$) と正の相関関係が示され、前述の年度累積値間の相関とほぼ同じ結果となった。

次に、出現した植物プランクトン種とメタロゲニウム粒子生成の関係性を調べた。各年度の植物プランクトンの綱ごとの総細胞容積を図 5-5 に示した。緑藻の内、最も多く観測された *S. dorsidentiferum*、及び琵琶湖固有種の *Pediastrum biwae* を図 5-6A 及び B に示した。

表 5-1 メタロゲニウム粒子数年度累積値と植物プランクトン総細胞容積の年度累積値（2002～2013 年度）

| 年度 | メタロゲニウム粒子数 年度累積値 (個/mL) | 植物プランクトン総細胞容積年度累積値 (mm ³ /L) |
|------|-------------------------------|--|
| 2002 | 2.4×10 ³ | 33.4 |
| 2003 | 0 | 41.4 |
| 2004 | 3.6×10 ³ | 44.4 |
| 2005 | 3.8×10 ⁴ | 55.6 |
| 2006 | 4.7×10 ³ | 36.0 |
| 2007 | 2.3×10 ⁴ | 58.9 |
| 2008 | 4.2×10 ⁴ | 55.6 |
| 2009 | 1.2×10 ⁴ | 35.0 |
| 2010 | 7.9×10 ³ | 38.0 |
| 2011 | 2.0×10 ⁴ | 62.7 |
| 2012 | 6.6×10 ⁴ | 89.6 |
| 2013 | 3.7×10 ⁴ | 25.5 |

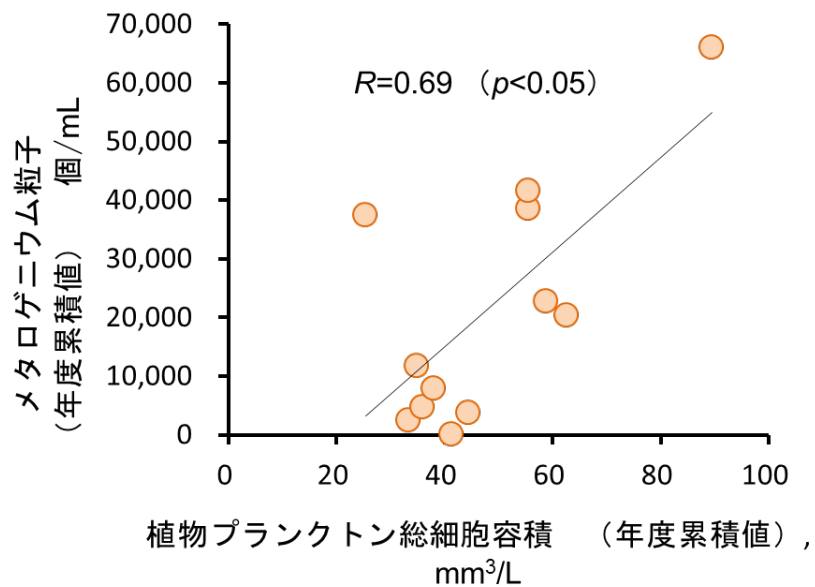


図 5-4 メタロゲニウム粒子数年度累積値と植物プランクトン総細胞容積の年度累積値の相関（2002～2013 年度）

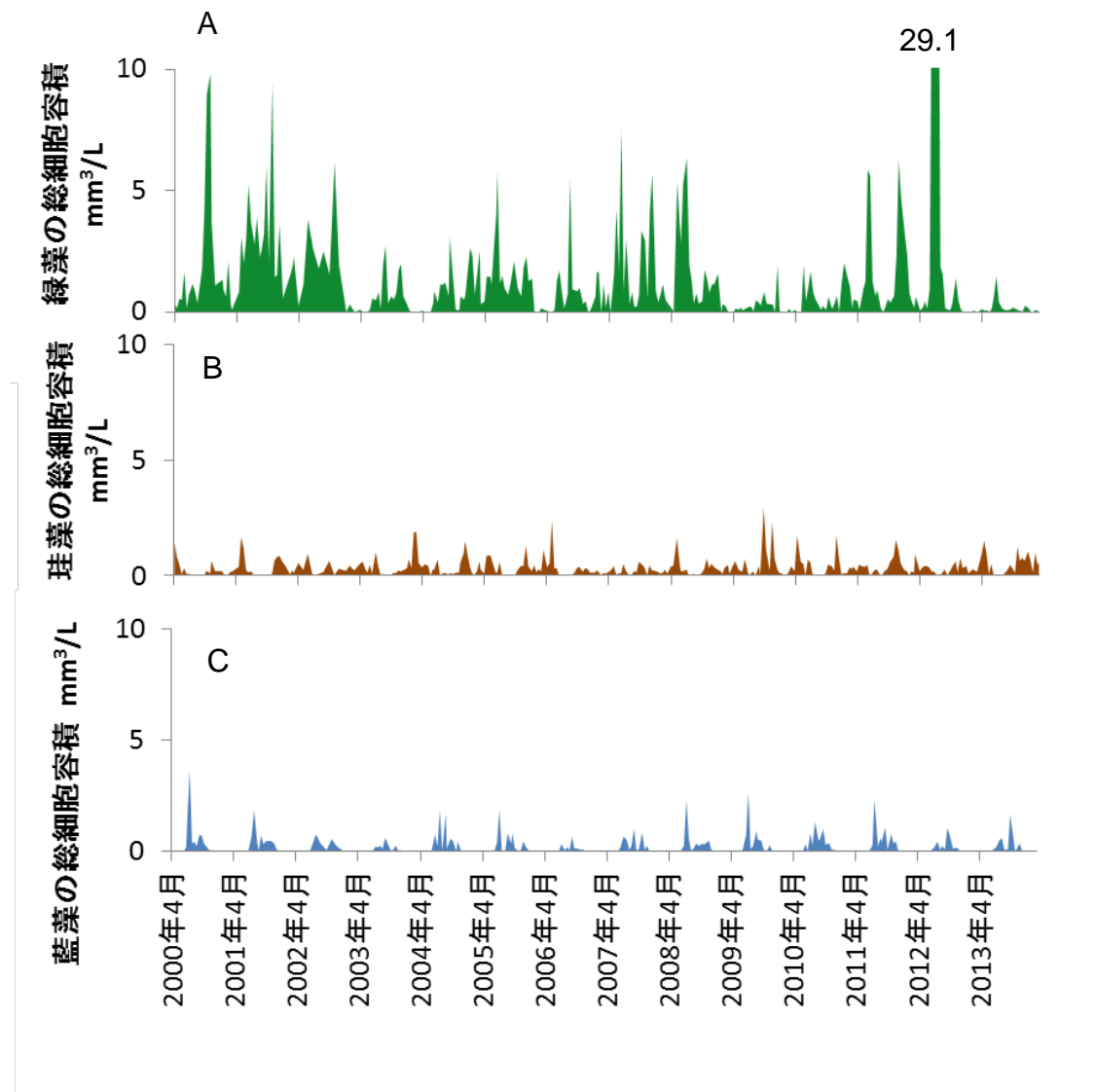


図 5-5 琵琶湖今津沖中央地点表層 0.5 m における藻類種毎の総細胞容積の経年変化 (2002～2013 年度) A : 緑藻類、B : 珪藻類、C : 藍藻類

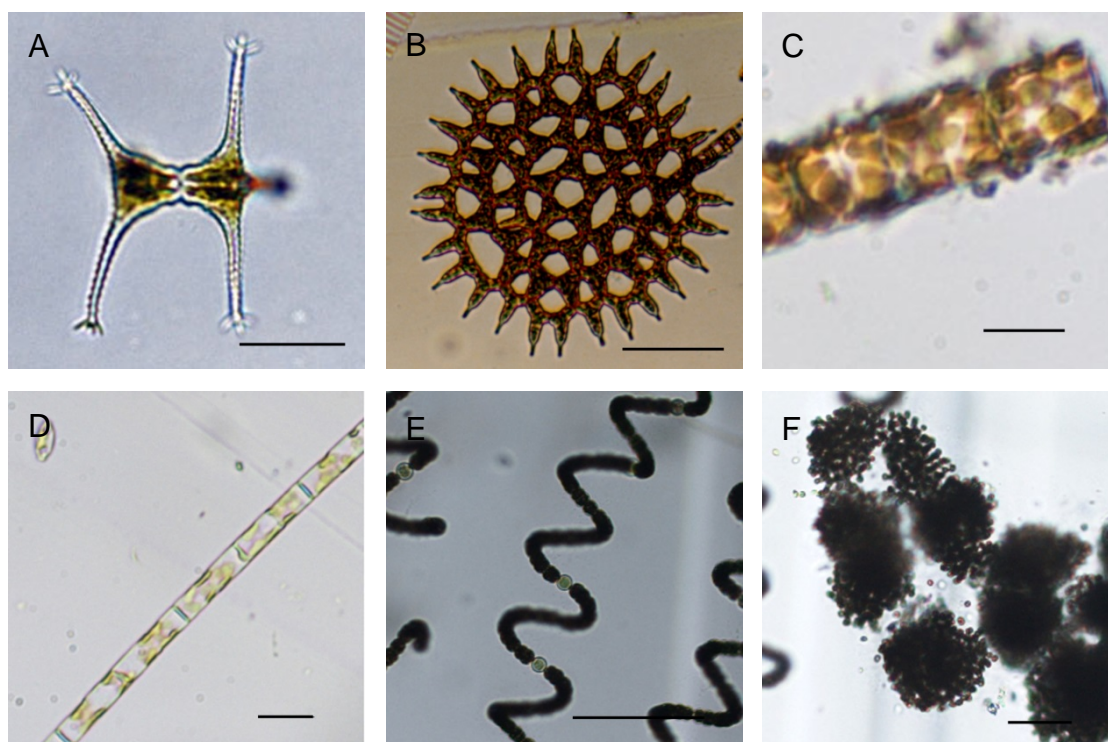


図 5-6 琵琶湖で観察される植物プランクトン
 緑藻 A: *S. dorsidentiferum* var. *ornatum*、B: *P. biwae*
 珪藻 C: *M. varians*、D: *A. granulata*
 藍藻 E: *A. spiroides* var. *crassa*、F: *M. aeruginosa*
 Bar: A, E, F = 30 μm , B = 50 μm , C, D = 10 μm

表 5-2 植物プランクトン総細胞容積に占める各藻類種の割合（％）

| | 緑藻 | 珪藻 | 藍藻 | その他 | <i>S. dorsidentiferum</i> |
|----------------------|----|----|----|-----|---------------------------|
| 2002年度 | 66 | 11 | 6 | 16 | 45 |
| 2003年度 | 34 | 25 | 5 | 36 | 22 |
| 2004年度 | 50 | 18 | 14 | 18 | 27 |
| 2005年度 | 58 | 15 | 9 | 17 | 26 |
| 2006年度 | 56 | 18 | 5 | 21 | 10 |
| 2007年度 | 73 | 9 | 7 | 11 | 30 |
| 2008年度 | 60 | 12 | 10 | 17 | 36 |
| 2009年度 | 18 | 33 | 18 | 32 | 7 |
| 2010年度 | 41 | 25 | 15 | 19 | 33 |
| 2011年度 | 63 | 15 | 11 | 11 | 51 |
| 2012年度 | 82 | 7 | 4 | 7 | 75 |
| 2013年度 | 17 | 48 | 18 | 16 | 10 |
| 2002-2013年度 の全平均値 | 57 | 17 | 9 | 17 | 36 |

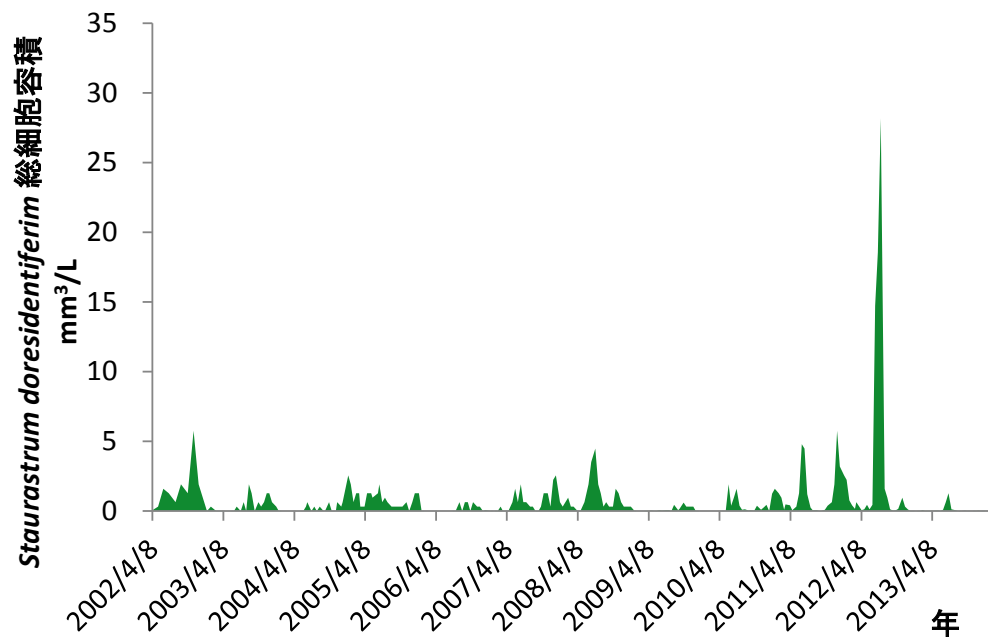


図 5-7 琵琶湖今津沖中央地点表層 0.5 m における *S. dorsidentiferum* の細胞容積の経年変化（2002～2013 年度）

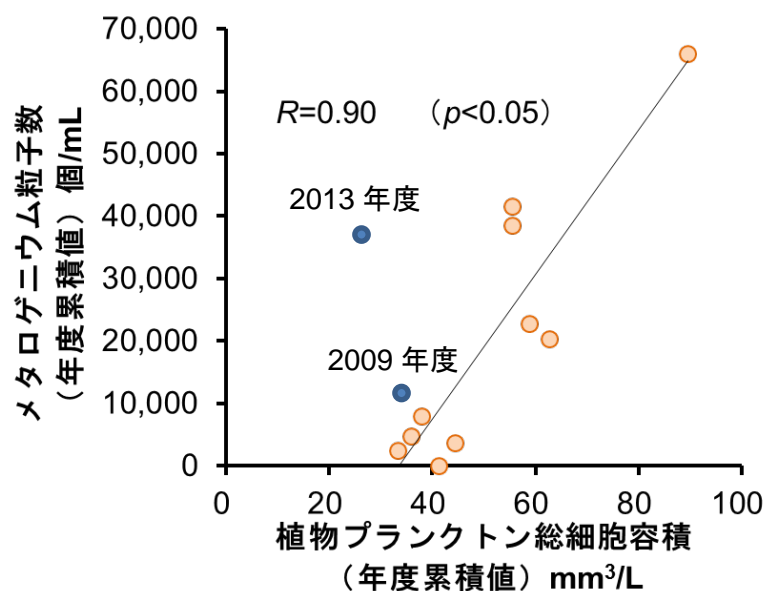


図 5-8 メタロゲニウム粒子数年度累積値と植物プランクトン総細胞容積の年度累積値の相関（2002～2012 年度、但し 2009 年度と 2013 年度のデータは含まない）

また、琵琶湖の代表的な珪藻類として *Melosira varians*、*Aulacoseira granulata* を図 5-6C 及び D に、代表的な藍藻類として *Anabaena spiroides* var. *crassa*、*Microcystis aeruginosa* を図 5-6E 及び F に示した。緑藻の総細胞容積の経年変化は植物プランクトン全体の総細胞容積の経年変化とほぼ一致しており、発生した植物プランクトンの総細胞容積の中で緑藻が占める割合が高いことが示された（図 5-3 及び 5-5）。12 年間の細胞容積の平均値でみると、緑藻の植物プランクトン全体に占める割合は 57%であり、全期間を通して大きなウェイトを占めていた（表 5-2）。さらに図 5-7 に示したように、琵琶湖北湖で観察されてきた緑藻の主な種は、*S. dorsidentiferum* であった。発生した *S. dorsidentiferum* の細胞容積の植物プランクトン総細胞容積に占める割合を表 5-2 に示した。2002～2013 年度の平均では *S. dorsidentiferum* の細胞容積は全体の 36%、緑藻類では 77%を占めていることが分かった（表 5-2）。しかし、2009 年度と 2013 年度では緑藻の細胞容積は植物プランクトン全体の各々 18%、17%と低く、緑藻の発生量が少なかったことが分かった。一方で両年とも珪藻類の *Asterionella formosa* と *Stephanodiscus suzukii* の占める割合が高く、2009 年度は 33%、2013 年は 48%であった。このように 2009 年度と 2013 年度は他の年度と優占種が大きく異なっていたことから、メタロゲニウム粒子数と植物プランクトン総細胞容積について、2009 年度と 2013 年度のデータを除いて再度相関係数を求めたところ、 $r = 0.90$ ($p < 0.05$) となり、高い正の相関関係にあることが明らかになった（図 5-8）。

これらの結果から、2002 年以降琵琶湖北湖でのメタロゲニウム粒子の発生は、その年に発生した植物プランクトン（特に緑藻類）のバイオマス量と高い相関関係にあることが明らかになり、底層部でのメタロゲニウム粒子生成に植物プランクトンバイオマスが深く関与していることが示唆された。

5-4-2 植物プランクトンバイオマスの生分解性

琵琶湖から採取した微生物群を用いて緑藻 *S. arctiscon* の培養藻体の生分解試験を実施した。また、試験期間中採取した試料を墨汁染色し、藻体の細胞外粘質鞘を観察した（図 5-9 で染色されず白色に見える部位が粘質鞘である）。図 5-9 に示したように、粘質鞘を保有していた P 培養液中の *S. arctiscon* 藻体は生分解試験 7 日後では、粘質鞘容積を求めたところ約 40%が消失し（図 5-9A, B）、さらに 14～21 日後には粘質鞘の大部分が消失していた（図 5-9C, D）。21 日後には細胞内部にも空間が形成され、葉緑体の色素も薄くなっていた（図 5-9D）。しかし、77 日後においても藻体の周りで僅かながら粘質鞘が観察され、完全には分解されずに残存することが示された（図 5-9E）。一方、洗浄操作によって粘質鞘を分離除去した N 培養液中の *S. arctiscon* は 7 日後には、細胞内で細胞小器官が

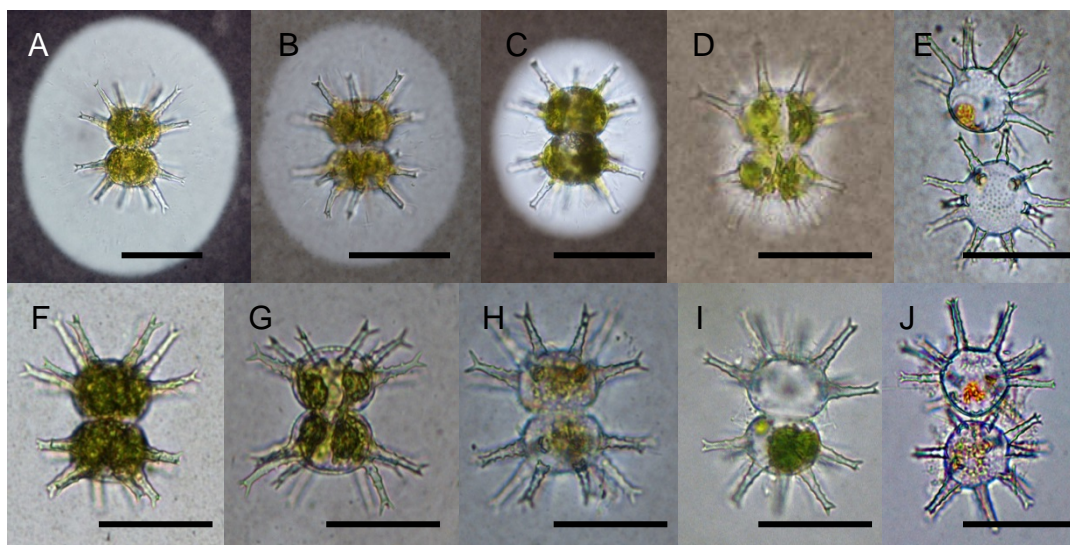


図 5-9 生分解試験における *S. arctiscon* 細胞の光学顕微鏡写真（墨汁染色像）

P 培養系 : A: 0 日、B: 7 日、C: 14 日、D: 21 日、E: 77 日

N 培養系 : F: 0 日、G: 7 日、H: 14 日、I: 21 日、J: 77 日

Bar = 50 μ m

少ない空間が観察され始め（図 5-9G）、14 日後には多くの細胞で葉緑体が減少した（図 5-9H）。21 日後には葉緑体がさらに減少し（図 5-9I）、77 日後には細胞内は空洞になっていた（図 5-9J）。

次に、粘質鞘の有機物量を求めた。試験開始時の P 培養液の POC は 4,200 pg-C/cell であり、N 培養液では 3,100 pg-C/cell であったことから、*S. arctiscon* が保持している粘質鞘の炭素量は 1,100 pg-C/cell と見積もられた。また、*S. arctiscon* の細胞及び粘質鞘容積を算出したところ、細胞容積に対する粘質鞘容積は 30 ± 2 倍（平均 \pm 標準偏差）であり、1 細胞がもつ粘質鞘の炭素量は細胞炭素量に比べて 1/3 程度であったことから、*S. arctiscon* の細胞、粘質鞘の各々の容積当りの有機炭素量（有機炭素密度）の比率は約 90:1 と見積もられた。生分解試験の結果（図 5-10）、POC では、P 培養液は 7 日後で初期値 4.7 mg-C/L から 3.9 mg-C/L に減少した。さらに 200 日後には 1.2 mg-C/L となり、初期値の 25% にまで減少した。一方、N 培養液では初期値 3.5 mg-C/L であった POC は生分解試験 21 日後には 1.8 mg-C/L に減少し、200 日後には 1.1 mg-C/L になった。試験開始時の P 培養液の POC（4.7 mg-C/L）は、細胞由来 3.5 mg-C/L、粘質鞘由来 1.2 mg-C/L によって構成されており、生分解試験 200 日後では細胞由来 1.1 mg-C/L、粘質鞘由来 0.1 mg-C/L であったことから、細胞および粘質鞘の残存率はそれぞれ 31%（1.1/3.5）、8%（0.1/1.2）と見積もられた。これらの結果から、粘質鞘は細胞と比較して分解・可溶化され易いと言えるが、長期間（200 日）を経ても一部は POC 成分として細胞構造とともに残存することが明らかになった。DOC では、P 培養液で 21 日後に最大値 1.09 mg-C/L を示した（図 5-11）。その後、一旦減少したが、47 日後に 0.69 mg-C/L と再上昇し、77 日後以降から 200 日目までは 0.46~0.50 mg-C/L で推移した（図 5-11）。一方、N 培養液でも 21 日後に DOC は最大値（0.46 mg-C/L）を示したが、P 培養液の値と比較すると分解率は約 40%にとどまった。また、N 培養液では、P 培養液でみられた 2 つ目の DOC のピークはみられず、47 日以降、0.08~0.15 mg-C/L（初期 POC の 2~4%）で推移した（図 5-11）。図 5-9D に示したように、P 培養系では 21 日後に粘質鞘の大部分が分解除去されていたことから、P 培養系では、先ず粘質鞘が分解され、その後に細胞自体が分解されるという 2 段階で生分解が起きており、細胞成分の 2~4%が DOC として長期間残存することが示唆された。DOC の減衰が安定した 77~200 日において、P 培養液 DOC は 0.46~0.50 mg-C/L、N 培養液 DOC は 0.08~0.15 mg-C/L であったことから、この差分である 0.35~0.42 mg-C/L は、粘質鞘の分解により生じた DOC と推測される。また、この差分の 0.35~0.42 mg-C/L は、粘質鞘の初期値 1.2 mg-C/L の 29~35%に相当した。すなわち、*S. arctiscon* の粘質鞘は大半が生分解されるが、一部（29~35%）は DOC として長期間にわたり残存することが明らかとなった。

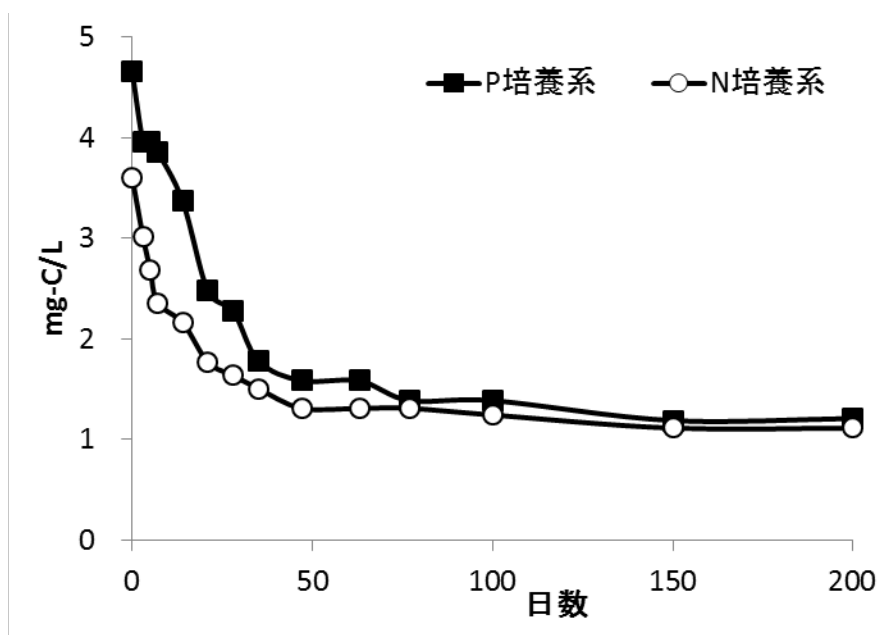


図 5-10 *S. arctiscon* を用いた生分解試験における粒子態有機炭素 (POC) の経時変化 (P 培養系：粘質鞘あり、N 培養系：粘質鞘なし)

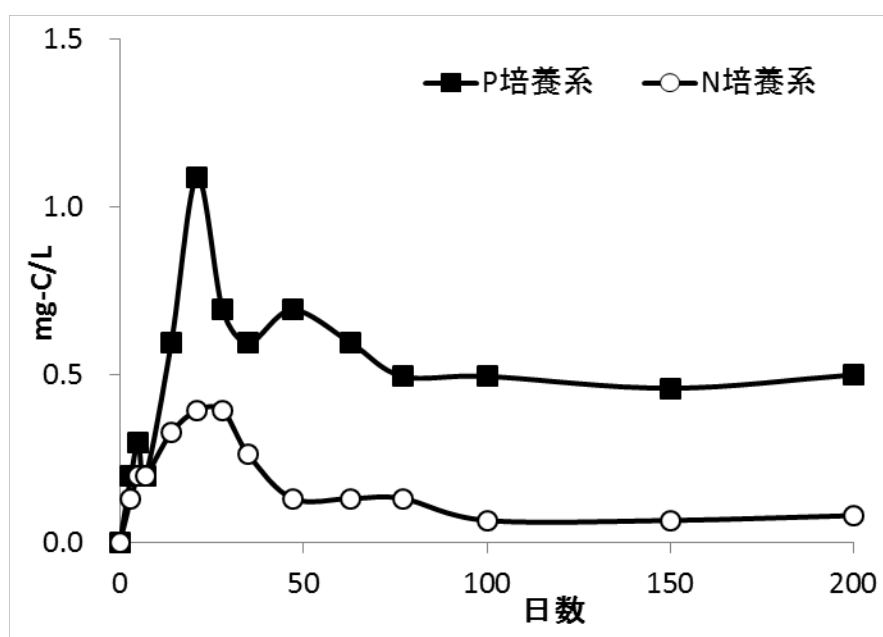


図 5-11 *S. arctiscon* を用いた生分解試験における溶存態有機炭素 (DOC) の経時変化 (P 培養系：粘質鞘あり、N 培養系：粘質鞘なし)

5-4-3 植物プランクトン共存下における BIWAKO-01 株の培養特性

第4章で示したように、*Bosea* sp. BIWAKO-01 株の培養液中におけるメタロゲニウム粒子の生成には、寒天のような多糖類の添加が必要であった。そこで寒天等の多糖類に替えて、*S. dorsidentiferum* または *S. arctiscon* の培養藻体を M3 半流動培地に添加して BIWAKO-01 株の培養を行った。その結果を表 5-3 及び図 5-12 に示す。藻類を添加しなかった培地（多糖無し）で BIWAKO-01 株を培養した場合は、2 週間経過しても Mn 酸化は認められなかった。*S. dorsidentiferum* 藻体を添加した培養液では 1.2 ± 0.3 mM の酸化態 Mn が生成し、メタロゲニウム粒子が観察された。*S. arctiscon* 藻体を添加した培養液でも同様の結果が得られ、BIWAKO-01 株はこれらの緑藻の共存下で Mn^{2+} を酸化してメタロゲニウム粒子を形成することが明らかになった。また、図 5-12 に示したように、両培養系ともに藻体周辺の粘質鞘に付着したかたちでメタロゲニウム粒子が生成していた。一方で、粘質鞘を分離除去した藻体を添加した培養液では、*S. dorsidentiferum*、*S. arctiscon* とともに酸化態 Mn は検出されなかった（表 5-3）。また、培養液の光学顕微鏡観察においても、メタロゲニウム粒子の生成は認められなかった（図 5-12C, D）。

これらの結果から、BIWAKO-01 株は *S. dorsidentiferum* や *S. arctiscon* のような植物プランクトンの共存下で Mn^{2+} を酸化してメタロゲニウム粒子を生成すること、及び植物プランクトン藻体の粘質鞘（細胞外多糖）がメタロゲニウム粒子形成において重要な役割を果たしていることが明らかになった。ここで、*S. dorsidentiferum* と *S. arctiscon* の添加時における酸化態 Mn 生成量を比較すると、前者での生成量は後者の約 1.7 倍高かった（表 5-3）。この理由として、2 つの培養藻体では細胞外多糖の保持量が異なり、このために酸化態 Mn の生成濃度に差異が生じた可能性が考えられた。しかしながら、細胞当たりの多糖保持量を求めたところ、*S. dorsidentiferum* で 1.74 ng/cell、*S. arctiscon* では 3.22 ng/cell であり、多糖の保持量の違いによって酸化態 Mn 生成量の違いを説明することはできなかった。

第5節 考察

前章の *Bosea* sp. BIWAKO-01 株培養試験により、琵琶湖北湖表層部で発生した粘質鞘を持つ植物プランクトンが底層部に沈降して、メタロゲニウム粒子生成に必要な多糖類の供給源として機能しているとの仮説を立て、本章で検討を行うこととした。

琵琶湖北湖（今津沖中央地点）の水深 90 m より採取した懸濁物質を墨汁染色及びレクチン染色して観察した結果、底層部の懸濁物質中には粘質鞘様のゲル状物質が存在し糖鎖も含まれること、このような懸濁物質に付着するようなか

表 5-3 植物プランクトン共存下における BIWAKO-01 株の培養試験結果
20℃、気相酸素濃度 10% 下で 2 週間静置培養 平均値 ± SD (n = 3)

| | 種 名 | 培養液中の添加細胞 密度 (cell/mL) | 酸化物態Mn (mM) |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|
| 粘 質 鞘 あ り | <i>S. dorsidentiferum</i> | 790 ± 40 | 1.2 ± 0.3 |
| | <i>S. arctiscon</i> | 810 ± 15 | 0.7 ± 0.2 |
| 粘 質 鞘 な し | <i>S. dorsidentiferum</i> | 750 ± 25 | <0.1 |
| | <i>S. arctiscon</i> | 750 ± 15 | <0.1 |

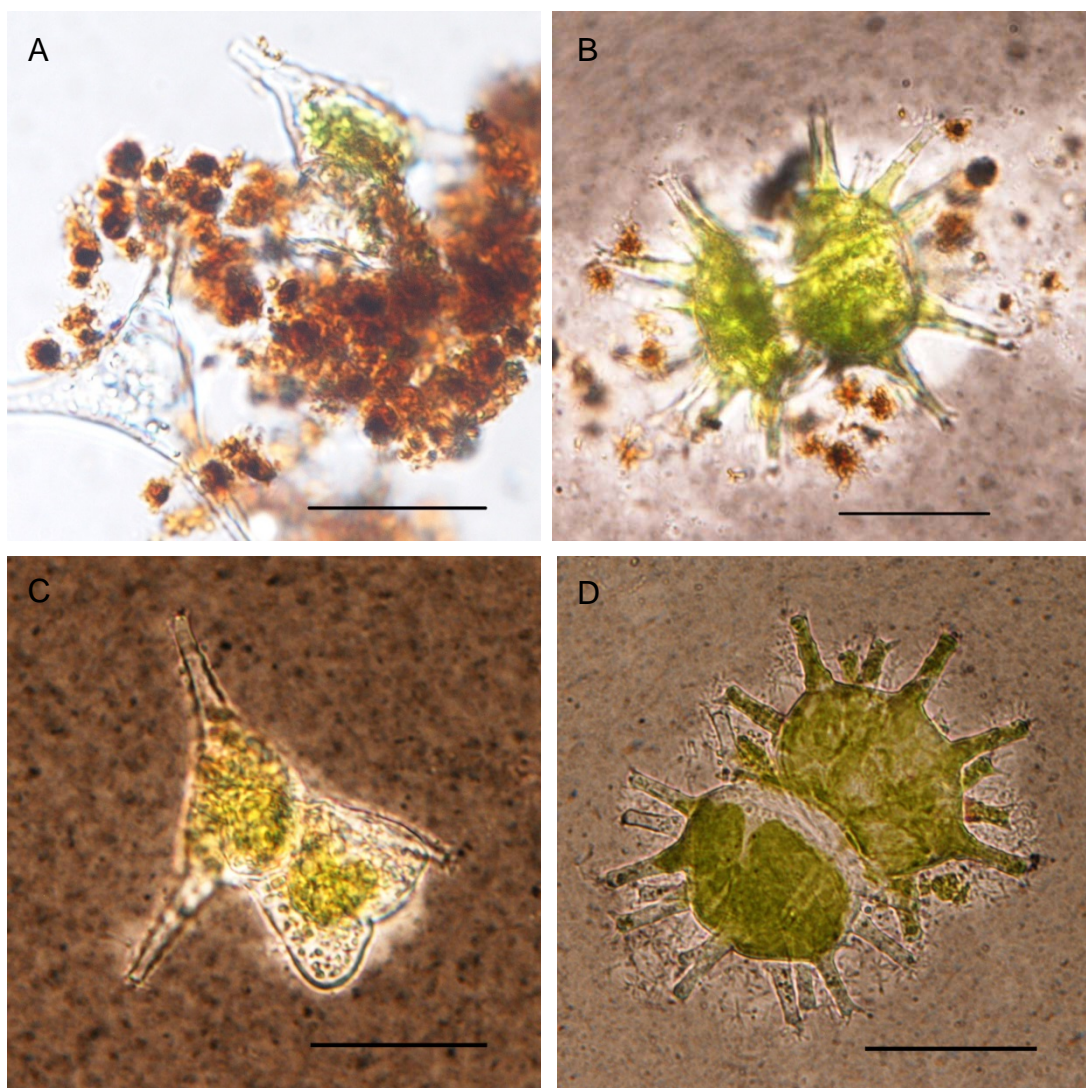


図 5-12 植物プランクトン共存下における BIWAKO-01 株の培養試験結果
墨汁染色後に光学顕微鏡により観察

A: *S. dorsidentiferum* 添加

B: *S. arctiscon* 添加

C: *S. dorsidentiferum* (粘質鞘除去藻体) を添加

D: *S. arctiscon* (粘質鞘除去藻体) を添加

20°C、気相酸素濃度 10% 下で 2 週間静置培養

Bar = 30 μ m

たちでメタロゲニウム粒子が存在していることが明らかになった。

Neretin らは、バルト海ゴトランド海盆の底層部（有酸素／無酸素境界層）で発生したメタロゲニウム粒子を観察し、多くのメタロゲニウム粒子（全体の 68%）は浮遊微粒子（SS 成分）に付着して存在し、SS 成分に付着していない遊離のメタロゲニウム粒子は 32%に留まることを報告している²⁶⁾。Neretin らの報告²⁶⁾では SS 成分への付着について特に意義付けをしていなかった。しかしながら、本研究の観察結果によれば、琵琶湖底層部の懸濁物質には多糖が含まれること、及びメタロゲニウム粒子の生成には多糖の関与が示唆されることから、多くのメタロゲニウム粒子が懸濁物質に付着して存在することには重要な意義が包含されていると推察された。これらの結果を併せると、墨汁染色で染色されなかったゲル状物質は植物プランクトンが細胞外に生産した粘質鞘であり、このゲル状物質にメタロゲニウム粒子が付着して発生している可能性が示された。

2002～2013 年度に収集された琵琶湖北湖での植物プランクトンの発生量とメタロゲニウム粒子発生量に関するデータを整理し、これらの関係性について検討した結果、年度毎のメタロゲニウム粒子の累積発生量と植物プランクトン総細胞容積の累積値には比較的高い正の相関があることが明らかになった（ $r = 0.69 : p < 0.05$ ）。植物プランクトン種との関係性では、特に植物プランクトン総細胞容積の主要部分を占めている緑藻類が強く影響を及ぼしていることが示唆された。珪藻類が優占していた 2009 年度と 2013 年度の調査データを除外すると、この相関はより高くなった（ $r = 0.90 : p < 0.05$ ）。さらに、琵琶湖北湖の主要な緑藻類は *S. dorsidentiferum* であり、メタロゲニウム粒子発生における *S. dorsidentiferum* の重要性が窺えた。*S. dorsidentiferum* は、細胞容積の約 3.1 倍の容積の粘質鞘をもつことが知られており、琵琶湖で発生する植物プランクトンには粘質鞘を持つ種が多く、近年それらの存在量が相対的に増加していることが報告されている⁸⁾。

これらの解析結果は、北湖表層部で発生した植物プランクトン（主として緑藻類）が底層部に沈降し、マンガン酸化細菌によるメタロゲニウム粒子生成において多糖の供給源として機能するとの仮説を支持するものである。

細胞外粘質鞘を含む植物プランクトンバイオマスが湖沼中でどの程度の期間残存するのか、生分解性を試験した。その結果、緑藻 *S. arctiscon* 藻体の粘質鞘は 77 日間の長期間分解されずに一部残存しており、粘質鞘の多糖成分は湖沼底層部で少なくとも一定期間、残存するものと推察された。この結果は、*Staurostrum orbiculare* から単離した粘質鞘の生分解試験の報告¹¹⁵⁾による POC および DOC の濃度変化とも整合するものであった。さらに、粘質鞘を保持する *S. arctiscon* 藻体は粘質鞘を除去した藻体よりも藻体の分解が進行しにくかったことから、粘質鞘を持つ植物プランクトンは底層部でより残存し易いと推察され

た。このことを支持するように、琵琶湖北湖湖底の懸濁物には、ゼラチン状の粘質鞘様物質とともに植物プランクトンの細胞残渣も頻繁に観察された。

最後に *Bosea* sp. BIWAKO-01 株を緑藻 *S. dorsidentiferum* または *S. arctiscon* 藻体の共存下で培養し、本菌の培養液中での Mn^{2+} 酸化及びメタロゲニウム生成において、植物プランクトンの持つ粘質鞘が直接的に関与することが示された。 Mn 酸化細菌による Mn 酸化あるいはメタロゲニウム粒子の生成において、植物プランクトン（粘質鞘）が関与するとの報告はこれまでになく、本研究の結果が初めての知見であるといえる。

本研究の結果から、琵琶湖北湖の底層部におけるメタロゲニウム粒子の生成において、表層部で発生した粘質鞘をもつ植物プランクトンが重要な役割を担っていると結論付けた。このようなメタロゲニウム粒子生成への植物プランクトン（粘質鞘）の関与は既往研究では検討されてこなかったが、淡水湖²²⁻²⁴⁾ やバルト海²⁶⁾ でメタロゲニウム粒子が水中の懸濁物質に結合した状態で観察されていることから、他の湖沼や海域でも同様の関与が十分に想定される。植物プランクトンの粘質鞘がどのような機構により細菌のメタロゲニウム粒子生成を促進しているのか、現時点では不明であるが、本研究で得られた知見は、水環境中での Mn の生物地球化学的な循環を理解する上で、大きな意義をもつものといえる。今後、詳細に解析することにより、湖沼や海洋でのメタロゲニウム粒子の生成機構の解明に繋がることが期待される。

第 6 節 要約

琵琶湖北湖表層部で発生した粘質鞘を持つ植物プランクトンが底層部に沈降して、メタロゲニウム粒子生成に必要な多糖類の供給源として機能しているとの仮説を立て、本章で検討を行うこととした。

底泥表層部では、粘質鞘様のゲル状の懸濁物にメタロゲニウム粒子が付着して存在しているのが確認され、植物プランクトン総細胞容積とメタロゲニウム粒子発生数には、正の相関 ($r = 0.69 : p < 0.05$) が認められた。また、*S. arctiscon* を用いた生分解試験により、植物プランクトンの粘質鞘は長期間残存することが示され、BIWAKO-01 株を用いた培養試験により、粘質鞘を持つ培養藻体の共存下でメタロゲニウム粒子を生成し、この過程には培養藻体が保持する粘質鞘が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

これらの結果は、琵琶湖北湖底層部でのメタロゲニウム生成において植物プランクトンが多糖の供給源として機能しているとの仮説を強く支持するものであり、成層湖や海域でのメタロゲニウム粒子生成機構を理解する一助になることが期待された。

第6章 総括および展望

第1節 総合考察

琵琶湖北湖今津沖中央地点で、メタロゲニウム粒子が2002年に初めて観測された。この環境の変化について、2002～2013年度の12年間の水質調査データを基に解析を行い発生要因の検討を行った。さらに、メタロゲニウム粒子を生成する実験室培養系を確立することにより、メタロゲニウム粒子の微細構造を特定するとともに粒子生成をもたらす環境因子を特定した。これらの結果から琵琶湖底層部でどのような環境因子がメタロゲニウム粒子の生成に関与するのか解析を行った。

第2章では、今津沖中央地点で発生したメタロゲニウム粒子の形態や微細構造について詳細な解析を行い、同地点の底泥の組成を分析するとともに、 Mn^{2+} イオンの溶出試験を行うことで、メタロゲニウム粒子生成における Mn^{2+} イオンの供給ポテンシャルを評価した。さらに、琵琶湖で実施した2002～2013年度までの12年間の長期的なメタロゲニウム粒子発生状況と水質調査データの関連性について検討を行った。

その結果、琵琶湖から採取したメタロゲニウム粒子の形態は、レマン湖、ワシントン湖、バイカル湖及びバルト海で確認されたメタロゲニウム粒子とほぼ同様の形状で、細胞膜や細胞壁のような細胞構造が確認できなかったことから粒子自体が生物であるとは考えられなかった。フィラメント部分の構成成分は主に MnO_2 で、シート状の層状構造を持つバーネサイト様の結晶相であることが明らかとなった。また、底泥中のMn濃度及び Mn^{2+} イオン溶出試験結果により、底泥のMn供給ポテンシャルを評価しメタロゲニウム粒子生成におけるMnの供給源として底泥が機能していることが判明した。

さらに、琵琶湖で実施した2002～2013年度の水質調査データより、メタロゲニウム粒子生成要因の検討を行ったところ、底層部のDO濃度が6 mg/L以下、pH 7.2以下になるとメタロゲニウム粒子が発生する傾向が認められた。

しかし、メタロゲニウム粒子数とDO濃度及びpH値は弱い負の相関関係しか認められず、メタロゲニウム粒子生成に関する因子として、DO濃度やpH値以外にも未知の因子が存在していることが推察された。

第3章では、1960年代からメタロゲニウム粒子を生成する微生物の生態及び発生機構について様々な研究がなされていたにもかかわらず、現在に至るまで解明されなかった。そこで、琵琶湖湖水から単離したメタロゲニウム粒子生成菌について、その系統分類や生理学的な性状について解析を行った。加えて培養液中でのメタロゲニウム粒子の生成過程を詳細に観察するとともに、生成した粒子の構造特性についてナノレベルで明らかにすることを目的として解析を行った。

その結果、湖水を分離源として、メタロゲニウム粒子を生成するマンガン酸化細菌 BIWAKO-01 株を単離し、継続的にメタロゲニウム粒子を生成する安定した培養系を確立することに成功した。16S rRNA 遺伝子配列結果から BIWAKO-01 株は、Bosea 属 (α -Proteobacteria 綱) に帰属された。

BIWAKO-01 株の培養液中で生成したメタロゲニウム粒子には、内部に菌体が存在する粒子と空洞の粒子が観察され、培養の経過日数とともに内部に菌体が確認できる粒子は減少した。また、メタロゲニウム粒子の構造に関して、フィラメント部分は酸性多糖を含むことが示され、さらにレクチンを用いた糖鎖解析により、 α -マンノース、 α -グルコース、ガラクトース、*N*-アセチルガラクトサミン、*N*-アセチルグルコサミンを構成糖として含むことが示唆された。M3 半流動培地 (Mn^{2+} イオン濃度 : 2 mM) で培養して得たメタロゲニウム粒子のフィラメント部分の微細構造を STEM 等により解析した結果、ナノシート構造及びナノロッド構造が観察された。ナノシート構造 (バーネサイト : $\delta\text{-MnO}_2$) は琵琶湖底層部で採取されたメタロゲニウム粒子と同じ形態であったが、ナノロッド構造は電子回折パターンから Mn(III) 酸化物であるマンガナイト ($\gamma\text{-MnOOH}$) と同定された。培養液中の Mn^{2+} イオン濃度を 0.1 mM 以下と低濃度で維持すると、琵琶湖で採取したメタロゲニウム粒子と同様にナノシート構造のみで構成されることが明らかになり、BIWAKO-01 株の培養系は湖沼底層部でのメタロゲニウム粒子生成の室内モデル系として有用であることが示された。

第 4 章では、前章で単離した BIWAKO-01 株を用いて、M3 半流動培地入りの密栓した培養瓶で静置培養し、メタロゲニウム粒子生成時の DO 濃度や pH 値条件に関する知見を得た。この知見を基に、DO 濃度や培地 pH 値を制御しながら培養を行い、それらの環境因子がメタロゲニウム粒子生成に及ぼす影響を調査解析した。

その結果、 O_2 濃度の影響では (培地 : pH 6.0、培養期間 : 14 日間)、気相 O_2 濃度 2~20% (培養液中の DO 濃度 : 2.0~8.8 mg/L) で Mn 酸化物が生成し、気相 O_2 濃度を 10% (DO 濃度 : 6.3 mg/L) に制限したとき、Mn 酸化速度が最大になることが明らかになった。pH 値の影響を調べた結果、14 日間の培養において弱酸性条件 (pH 5.5~6.5) で酸化態 Mn が検出され、メタロゲニウム粒子を生成していた。

さらに、BIWAKO-01 株は寒天未添加の培地ではメタロゲニウム粒子を生成しないことが示された。アガロース、ペクチン及びでんぷんを添加した場合は、寒天添加時と同様に粒子生成が認められた。これらの結果から、BIWAKO-01 株の培養液中では、弱酸性条件、酸素制限条件及び寒天等の多糖成分の存在下でメタロゲニウム粒子の生成が促進されることが明らかになった。

第 5 章では、粘質鞘を持つ植物プランクトンが底層部に沈降して、メタロゲ

ニウム粒子生成に必要な多糖類の供給源として機能しているとの仮説を立て、検討を行うこととした。これは、第 4 章で明らかにした弱酸性条件、酸素制限条件及び寒天等の多糖成分の存在について、琵琶湖底層部においても、これらの諸条件が揃った環境下で、微生物によるメタロゲニウム粒子生成が起こっているものと推察されたことによる。粘質鞘の構成成分には多糖類が含まれることが既に報告されていることから、粘質鞘の利用によりメタロゲニウム粒子は生成可能であると推察した。

このため、琵琶湖北湖での植物プランクトン発生量と底層部でのメタロゲニウム粒子発生との関連性について、過去の調査データ（2002 年以降）を基に解析を行った。また、粘質鞘をもつ緑藻 *Staurastrum arctiscon* の培養藻体について生分解性試験を行い、藻体や粘質鞘の湖沼環境中での残存性を明らかにするとともに、粘質鞘を持つ緑藻（*S. arctiscon* 及び *Staurastrum dorsidentiferum*）の培養藻体の共存下で BIWAKO-01 株を培養し、メタロゲニウム粒子生成における粘質鞘（多糖）の要求性を調べた。

その結果、琵琶湖底泥表層部では、粘質鞘様のゲル状の懸濁物にメタロゲニウム粒子が付着して存在しているのが確認され、植物プランクトン総細胞容積とメタロゲニウム粒子発生数には、正の相関（ $r = 0.69 : p < 0.05$ ）が認められた。

また、*S. arctiscon* を用いた生分解試験により、植物プランクトンの粘質鞘は長期間残存することが示された。粘質鞘を持つ培養藻体の共存下で BIWAKO-01 株を培養するとメタロゲニウム粒子は生成されたが、粘質鞘を取り除いた培養藻体ではメタロゲニウム粒子が生成しなかった。この結果により培養藻体が保持する粘質鞘が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

これらの結果により、琵琶湖北湖底層部でのメタロゲニウム生成において植物プランクトンが多糖の供給源として機能しているとの仮説を強く支持する結果が得られた。

以上の結果を基に琵琶湖底層部でメタロゲニウム粒子形成をもたらす環境要因をまとめると、以下のようになる。

1. 琵琶湖表層部で粘質鞘（細胞外多糖）をもつ植物プランクトンが発生する。
2. 発生した植物プランクトンが湖底に沈降する。
3. 湖底では植物プランクトン等の有機物分解により O_2 が消費されて DO が低下し、 CO_2 が発生する。 CO_2 の発生により pH が低下する。
4. DO の低下により底泥から Mn^{2+} が溶出する。
5. 粘質鞘の一部は湖底で長期間残存する。
6. 酸素制限条件、弱酸性条件及び植物プランクトン由来の多糖の存在下でマンガン酸化細菌の働きにより溶出した Mn^{2+} が酸化され、メタロゲニウム粒子が生成する。

第2節 今後の課題および展望

本研究では、琵琶湖の湖底環境の変化について、メタロゲニウム粒子の長期的な観測という側面から、琵琶湖の水質調査データを基に解析を行い、メタロゲニウム粒子の発生要因について明らかにした。さらに、Mn 酸化細菌 *Bosea* sp. BIWAKO-01 株を単離したことにより、メタロゲニウム粒子の生成をもたらす環境因子の特定を行い、多糖の重要性など新しい知見を得ることができた。

今後は、メタロゲニウム粒子生成機構の解明に向けて Mn 酸化細菌 *Bosea* sp. BIWAKO-01 株の微生物生態とメタロゲニウム粒子生成にかかる Mn 酸化機構と多糖類との関係について更なる研究を行っていききたい。

また、本研究により植物プランクトンバイオマスについては、メタロゲニウム粒子生成をもたらす環境因子に関する新しい知見として、成層湖および海域でメタロゲニウム粒子が関与する物質循環の一端を解明する重要な手掛かりとして提供できたことから、今後の調査研究による更なる解明が期待される。

さらに、国内の湖沼において底層部環境の質的評価が非常に重要な課題であり、近年、琵琶湖底層部がどのような環境に変化してきているのか、メタロゲニウム粒子生成の側面から捉えることで、北湖底層部の水質や生態系の保全対策を講じるための基礎的な知見として活用できることも期待される。今後の琵琶湖調査では、メタロゲニウム粒子を生物指標として琵琶湖底層部環境の保全対策の基礎データとして活用・評価していききたい。

謝 辞

本研究の遂行と本論文の執筆にあたり、多くの方々からご指導とご支援を頂きました。

秋田県立大学生物資源科学部・教授 宮田直幸博士には、研究開始当初より丁寧なご指導と的確なアドバイスを賜り、そして、何より時間を惜しまぬ研究に対する姿勢と意欲を学ばせて頂きました。心より感謝申し上げます。

本論文の査読及びご校閲を頂きました同大学生物資源科学部・教授 尾崎保夫博士、並びに同学部・教授 片野登博士、筑波大学生命環境系・准教授 内海真生博士には、多くの貴重なご助言を頂きました。謹んで感謝の意を表します。

また本研究では多くの方々の研究協力を賜り、懇切丁寧なご指導、ご助言を頂きました。岡山大学大学院・特任教授／JST-CREST 代表 高田潤博士、並びに同大学・特任助教 橋本英樹博士にはメタロゲニウム粒子の微細構造解析で研究協力頂きました。山梨大学大学院・元准教授 河野哲郎博士、並びに東京大学海洋研究所・助教 宮島利宏博士には BIWAKO-01 株の培養及び特徴付けで、兵庫県立大学・研究員 池谷仁里博士、並びに秋田県立大学生物資源科学部 松本拓也氏には多糖の分析でご協力頂きました。さらに、独立行政法人国立環境研究所・地域環境研究センター・センター長 今井章雄博士には、植物プランクトンの生分解試験で研究指導を頂きました。大阪産業大学・教授 津野洋博士、龍谷大学・教授 岸本直之博士には、琵琶湖水質調査データの解析等についてご指導、ご助言を頂きました。東レテクノ株式会社 馬場大哉次長には琵琶湖底泥調査に研究協力を頂きました。ここに記して、心より感謝申し上げます。

また、滋賀県琵琶湖環境科学研究センター・センター長 内藤正明博士をはじめとする上司の方々と中島拓男元部門長、山中直元部門長をはじめとする元上司の方々には、本研究のご指導を賜り厚くお礼申し上げます。

最後に、同センター、環境監視部門 一瀬諭博士をはじめとする職員の方々と本研究の実施にご尽力くださいました、堀口和彦氏、宇仁温子氏に深く感謝申し上げます。

本研究に関連する成果発表（報文）

1. 古田世子, 吉田美紀, 岡本高弘, 若林徹哉, 一瀬諭, 青木茂, 河野哲郎, 宮島利宏: 琵琶湖水から採取培養したマンガン酸化微生物 *Metallogenium* の発育形態について, 陸水学雑誌, 68, 433–441 (2007).
2. 古田世子, 池谷仁里, 池田将平, 藤原直樹, 岡本高弘, 一瀬諭, 馬場大哉, 岸本直之, 今井章雄: 琵琶湖で優占する緑藻 *Staurastrum arctiscon* (Desmidiaceae)の生分解特性について, 水環境学会誌, 37, 103-109 (2014).
3. Seiko Furuta, Hisato Ikegaya, Hideki Hashimoto, Satoshi Ichise, Tetsuro Kohno, Naoyuki Miyata, and Jun Takada: Formation of filamentous Mn oxide particles by the alphaproteobacterium *Bosea* sp. strain BIWAKO-01, Geomicrobiology Journal (2015), in press. DOI:10.1080/01490451.2014.982837.

参考文献

- 1) 滋賀県 (2012). 琵琶湖ハンドブック改訂版. 10-14, 142-143.
- 2) 琵琶湖・淀川水質保全機構 (2012) BYQ 水環境レポート—琵琶湖・淀川の水環境の現状. 平成 24 年度, 2-4.
- 3) 国土交通省近畿地方整備局琵琶湖河川事務所 (2014). ホームページ (<http://www.biwakokasen.go.jp/biwako/riyou>), 琵琶湖の水利用.
- 4) 岡本高弘, 佐藤祐一, 早川和秀, 古角恵美.(2009) 難分解性有機物を含めた有機物による琵琶湖の水質汚濁メカニズムについて. 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター研究報告書, 5, 25-35.
- 5) 佐藤祐一, 小松英司, 永禮英明, 上原浩, 湯浅岳史, 大久保卓也, 岡本高弘, 金再奎. (2011) 陸域-湖内流動-湖内生態系を結合した琵琶湖流域水物質循環モデルの構築とその検証. 水環境学会誌, 34, 125-141.
- 6) 一瀬諭, 岸本直之, 馬場大哉, 古田世子, 早川和秀. (2010) B-0805 湖内生産および分解の変化と難分解性有機物を考慮した有機汚濁メカニズムの解明に関する研究. 環境省環境研究総合推進費終了研究成果報告書, 66-78.
- 7) 一瀬諭, 藤原直樹, 古田世子, 池田将平, 岸本直之. (2010) 琵琶湖におけるプランクトン等の長期変遷に関するモニタリング. 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター研究報告書, 7, 196-218.
- 8) 一瀬諭, 池谷仁里, 古田世子, 藤原直樹, 池田将平, 岸本直之, 西村修. (2013) 琵琶湖に棲息する植物プランクトンの総細胞容積および粘質鞘容積の長期変動解析. 日本水処理生物学会誌, 49, 65-74.
- 9) Kishimoto, N., Ichise, S., Suzuki, K., Yamamoto, C. (2013) Analysis of long-term variation in phytoplankton biovolume in the northern basin of Lake Biwa. *Limnology*, 14, 117-128.
- 10) 熊谷道夫, 石川俊之. (2010) D-0804 温暖化が大型淡水湖の循環と生態系に及ぼす影響評価に関する研究 (4) 温暖化が底生動物と魚類に及ぼす影響評価に関する研究. H22 年度環境研究総合推進費終了成果報告集. pp 12.
- 11) 熊谷道夫. (2008) 地球温暖化が琵琶湖に与える影響, 環境技術, 37, 407-413.
- 12) Miyajima, T. (1992) Biological manganese oxidation in a lake. I. Occurrence and distribution of *Metallogenium* sp., and its kinetic properties. *Arch. Hydrobiol.*, 124, 317-325.
- 13) Miyajima, T. (1992) Production of *Metallogenium*-like particles by heterotrophic manganese-oxidizing bacteria collected from a lake. *Arch. Microbiol.*, 158, 100-106.
- 14) 一瀬諭, 若林徹哉, 岡本高弘, 藤原直樹, 井上健, 加賀爪敏明, 宮島利宏. (2006) 琵琶湖深層部の微生物由来のマンガン酸化物構造体 *Metallogenium* の発生. 用水と廃水, 48, 71-79.

- 15) Ehrlich, H. L., Newman, D. K. (2009) Geomicrobiology of manganese. *In*; *Geomicrobiology*, 5th ed. CRC Press, Boca, Raton, 347-420.
- 16) Klaveness, D. (1977) Morphology, distribution and significance of the manganese-accumulating microorganism *Metallogenium* in lakes. *Hydrobiologia*, 56, 25-33.
- 17) Gregory, E., Perry, R. S., Staley, J. T. (1980) Characterization, distribution and significance of *Metallogenium* in Lake Washington. *Microb. Ecol.*, 6, 125-40.
- 18) Clement, B. G., George, W. L. III, Tebo, B. M. (2009) Rapid, oxygen-dependent microbial Mn(II) oxidation kinetics at sub-micromolar oxygen concentrations in the Black Sea suboxic zone. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 73, 1878-1889.
- 19) Sternbeck, J. (1996) Manganese cycling in a eutrophic lake: Rates and pathways. *Aquat. Geochem.*, 1, 399-426.
- 20) Mudroch, A., Bistricki, T. (1981) Occurrence of manganese-rich microparticles in the eastern basin of Lake Erie. *Canadian Mineralogist*, 435-440.
- 21) Tipping, E., Thompson, D., W., Davison, W. (1984) Oxidation products of Mn(II) in lake waters. *Chem. Geol.*, 44, 359-383.
- 22) Granina, L. Z., Parfenova, V. V., Zemskaya, T. I., Zakharova, Y. R., Golobokova, L. P. (2003) On iron and manganese oxidizing microorganisms in sedimentary redox cycling in Lake Baikal. *Berl. Paläobiol. Abhand.*, 4, 121-128.
- 23) Jaquet, J. M., Nembrini, G., Garcia, J., Vernet, J. P. (1982) The manganese cycle in Lac Léman, Switzerland: The role of *Metallogenium*. *Hydrobiologia*, 91-92, 323-340.
- 24) Maki, J. S., Tebo, B. M., Palmer, F. E., Nealson, K. H., Staley, J. T. (1987) The abundance and biological activity of manganese-oxidizing bacteria and *Metallogenium*-like morphotypes in Lake Washington. USA, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 45, 21-29.
- 25) Zakharova, Y. R., Parfenova, V. V., Granina, L. Z., Kravchenko, O. S., Zemskaya, T. I. (2010) Distribution of iron- and manganese-oxidizing bacteria in the bottom sediments of Lake Baikal. *Inland Water Biol.*, 3, 313-321.
- 26) Neretin, L. N., Pohl, C., Jost, G., Leipe, T., Pollehne, F. (2003) Manganese cycling in the gotland deep Baltic Sea. *Mar. Chem.*, 82, 125-143.
- 27) 藤原直樹, 岡本高弘, 井上健, 一瀬諭, 内藤幹滋, 原良平, 加賀爪敏明.
(2003) 琵琶湖深水層における溶存酸素の変動 (2002 年). 滋賀県立衛生環境センター所報, 38, 89~94.
- 28) 滋賀県 (2012) 県政 e 新聞報道資料, 北湖深水層での DO の回復について. (公開日 2013 年 2 月 27 日)
<http://www.pref.shiga.lg.jp/hodo/e-shinbun/dc31/de51/20130227.html>
- 29) Weiss, S. A. (1977) manganese: the other uses. A study of the nonsteelmaking applications of manganese. *Mrtal. Bull.*, Orcester Park, 360.

- 30) Graedel, T. E. (1978) Inorganic elements, hydrides, oxides, and carbonates. In: *Chemical compounds in the atmosphere*, New York, N. Y., Academic Press, 35-41, 44-49.
- 31) Reimer, P. S. (1999) *Environmental effects of manganese and proposed freshwater guidelines to protect aquatic life in British Columbia* [MSc thesis]. Vancouver, B. C., University of British Columbia.
- 32) Ehrlich, H. I. (1975) The formation of ores in the sedimentary environment of the deep sea with microbial participation. *Soil Sci.*, 119, 36-41.
- 33) 原田憲一. (1983) マンガンノジュール形成と生物の役割. *海洋科学*, 15, 382-390.
- 34) Takamatsu, T., Kawashima, M., Matsushita, R., Koyama, M. (1985) General distribution profiles of thirty-six elements in sediments and manganese concretions of Lake Biwa. *Japan. J. Limnol.*, 46, 115-127.
- 35) Kawashima, M., Tainaka Y., Hori, T., Koyama, M., Takamatsu, T. (1986) Phosphate adsorption onto hydrous manganese(IV) oxide in the presence of divalent cations. *Water Res.*, 20, 471-475.
- 36) 藤永太一郎, 宗宮由樹, 一色健司. (2005) 海と湖の化学 微量元素で探る. 京都大学学術出版会, 291-342.
- 37) Takamatsu, T., Nakata, R., Yoshida, T., Kawashima, M. (1985) Depth profiles of dimethylarsinate, monomethylarsonate, and inorganic arsenic in sediment from Lake Biwa. *Japan. J. Limnol.*, 46, 93-99.
- 38) Astrid, J., Joline, R., Widmeyer, R. A., Gordon, L. I., Bendell, Y., Margo, M. M., Crozier, E. D. (2004) The structure of the manganese oxide on the sheath of the bacterium *Leptothrix discophora*: An XAFS study. *Am. Mineral.*, 89, 1110-1118.
- 39) Boogerd, F. C., Vrind, J. P. (1987) Manganese oxidation by *Leptothrix discophora*. *J. Bacteriol.*, 169, 489-494.
- 40) Emerson, D., Ghiorse, W. C. (1993) Ultrastructure and chemical composition of the sheath of *Leptothrix discophora* SP-6. *J. Bacteriol.*, 175, 7808-7818.
- 41) Jilber, T., Slomp, C. P. (2013) Iron and manganese shuttles control the formation of authigenic phosphorus minerals in the euxinic basins of the Baltic Sea. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 107, 155-169.
- 42) Adams, L. F., Ghiorse, W. C. (1985) Influence of manganese on growth of a sheathless strain of *Leptothrix discophora*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 556-562.
- 43) Nelson, Y. M., Lion, L. W., Ghiorse, W. C., Shuler, M. L. (1999) Production of biogenic Mn oxides by *Leptothrix discophora* SS-1 in a chemically defined growth medium and evaluation of their Pb adsorption characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 175-180.
- 44) Emerson, D., Ghiorse, W. C. (1992) Isolation, cultural maintenance, and taxonomy

- of a sheath-forming strain of *Leptothrix discophora* and characterization of manganese-oxidizing activity associated with the sheath. Appl. Environ. Microbiol., 58, 4001-4010.
- 45) Dick, G. J., Lee, Y. E., Tebo, B. M. (2006) Manganese(II)-oxidizing *Bacillus* spores in Guaymas Basin hydrothermal sediments and plumes. Appl. Environ. Microbiol., 72, 3184-3190.
 - 46) Bargar, J. R., Tebo, B. M., Bergmann, U., Webb, S. M., Glatzel, P., Chiu, V. Q., Villalobos, M. (2005) Biotic and abiotic products of Mn(II) oxidation by spores of the marine *Bacillus* sp. strain SG-1. Am. Mineral., 90, 143–154.
 - 47) Bargar, J. R., Tebo, B. M., Villinski, J. E. (2000) In situ characterization of Mn(II) oxidation by spores of the marine *Bacillus* sp. strain SG-1. Geochim. Cosmochim. Acta, 64, 2775-2778.
 - 48) Brouwers, G. J., de Vrind, J. P. M., Corstjens, P. L., Cornelis, P., Baysse, C., de Vrind-de Jong, E. W. (1999) *cumA*, a gene encoding a multicopper oxidase, is involved in Mn²⁺ oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1. Appl. Environ. Microbiol., 65, 1762-1768.
 - 49) Toner, B., Fakra, S., Villalobos, M., Warwick, T., Sposito, G. (2005) Spatially resolved characterization of biogenic manganese oxide production within a bacterial biofilm. Appl. Environ. Microbiol., 71, 1300–1310.
 - 50) Sly, L. I., Arunpairojana, V., Dixon, D. R. (1990) Binding of colloidal MnO₂ by extracellular polysaccharides of *Pedomicrobium manganicum*. Appl. Environ. Microbiol., 56, 2791-2794.
 - 51) Emerson, D., Garen, R. E., Ghiorse, W. C. (1989) Formation of *Metallogenium*-like structures by a manganese-oxidizing fungus. Arch. Microbiol., 151, 223-231.
 - 52) Timonin, M. I., Illman, W. I., Hartgerink, T. (1972) Oxidation of manganous salts of manganese by soil fungi. Can. J. Microbiol., 18, 793-799.
 - 53) Miyata, N., Tani, Y., Maruo, K., Tsuno, H., Sakata, M., Iwahori, K. (2006) Manganese(IV) oxide production by *Acremonium* sp. strain KR21-2 and extracellular Mn(II) oxidase activity. Appl. Environ. Microbiol., 72, 6467–6473.
 - 54) Miyata, N., Tani, Y., Sakata, M., Iwahori, K. (2007) Microbial manganese oxide formation and interaction with toxic metal ions. J. Biosci. Bioeng., 104, 1-8.
 - 55) Walsh, F., Mitchell, R. (1972) An acid-tolerant iron-oxidizing *Metallogenium*. J. Gen. Microbiol., 72, 369-376.
 - 56) Dubinina, G. A. (1984) Infection of Procaryotic and Eucaryotic Microorganisms with *Metallogenium*. Cur. Microbiol., 11, 349-356.
 - 57) Dubinina, G. A. (1970) Morphology of *Metallogenium* and its relation to *Mycoplasma*. Z. Allg. Microbiol., 10, 309-320.
 - 58) Dubinina, G. A. (1984) Infection of procaryotic and eucaryotic microorganisms

- with *Metallogenium*. Cur. Microbiol., 11, 349-356.
- 59) Ghiorse, W. C. (1984) Biology of iron-and manganese- depositing bacteria. Annu. Rev. Microbiol., 38, 515-550.
 - 60) Miyajima, T. (1994) Mud-water fluxes of inorganic nitrogen and manganese in the pelagic region of Lake Biwa: Seasonal dynamics and impact on the hypolimnetic metabolism. Arch. Hydrobiol., 130, 303-324.
 - 61) Kawashima, M., Takamatsu, T., Koyama, M. (1988) Mechanisms of precipitation of Manganese (II) in Lake Biwa, a fresh water lake. Water, Res., 22, 613-618.
 - 62) 滋賀県・環境白書 (2002 年度版)
 - 63) 滋賀県・環境白書 (2003 年度版)
 - 64) 滋賀県・環境白書 (2004 年度版)
 - 65) 滋賀県・環境白書 (2005 年度版)
 - 66) 滋賀県・環境白書 (2006 年度版)
 - 67) 滋賀県・環境白書 (2007 年度版)
 - 68) 滋賀の環境, 資料編 (2008 年度版)
 - 69) 滋賀の環境, 資料編 (2009 年度版)
 - 70) 滋賀の環境, 資料編 (2010 年度版)
 - 71) 滋賀の環境, 資料編 (2011 年度版)
 - 72) 滋賀の環境, 資料編 (2012 年度版)
 - 73) 滋賀の環境, 資料編 (2013 年度版)
 - 74) Ishikawa, K., Furuta, S., Nakajima, T. (2012) Lake Biwa Interactions between Nature and People. Kawanabe H et al (ed.), Springer, 231-233.
 - 75) 一瀬諭, 若林徹哉, 藤原直樹, 水嶋清嗣, 伊藤貢. (1999) 琵琶湖における植物プランクトン優先種の経年変化と水質. 用水と廃水, 4, 582-591.
 - 76) Kishimoto, N., Ichise, S., Suzuki, K., Yamamoto, C. (2013) Analysis of long-term variation in phytoplankton biovolume in the northern basin of Lake Biwa. Limnology, 14, 117-128.
 - 77) Huxley, H. E., Zubay, G. (1963) Preferential staining of nucleic acid containing structures for electron microscopy. J. Biophysic, and Biochem, Cytol., 11, 273.
 - 78) Suzuki, T., Hashimoto, H., Matsumoto, N., Furutani, M., Kunoh, H., Takada, J. (2011) Nanometer-scale visualization and structural analysis of the inorganic/organic hybrid structure of *Gallionella ferruginea* twisted stalks. Appl. Environ. Microbiol., 77, 2877-2881.
 - 79) 社団法人産業環境管理協会 (2013) JISK0102 工場排水試験方法, 51-54.
 - 80) 社団法人産業環境管理協会 (2013) JISK0102 工場排水試験方法, 179.
 - 81) Spiro, T. G., Bargar, J. R., Sposito G., Tebo, B. M. (2010) Bacteriogenic manganese oxides. Acc. Chem. Res., 43, 2-9.
 - 82) Tebo, B. M., Johnson, H. A., McCarthy, J. K., Templeton, A. S. (2005) Geomicrobiology of manganese(II) oxidation. Trend. Microbiol., 13, 421-428.

- 83) 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.
- 84) Campbell, P., Torgersen, T. (1980) Maintenance of iron meromixis by iron redeposition in a rapidly flushed monimolimnion. Can. J. Fish Aqua. Sci., 37, 1303-1313.
- 85) Stumm, W., Morgan, J. J. (1981) Aquatic Chemistry. 2nd ed., Wiley-Interscience, New York.
- 86) 相馬明郎, 関口泰之, 桑江朝比呂, 中村由行. (2008) 東京湾の底生系における酸素消費メカニズム -内湾複合生態系モデルの解析-. 海岸工学論文集, 55, 1206-1210.
- 87) 山室真澄, 石飛裕, 中田喜三郎, 中村由行. (2013) 貧酸素水塊 現状と対策. 生物研究社, 1-178.
- 88) Zavarzin, G. A. (1964) *Metallogenium symbioticum*. Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiology, 4, 390-395.
- 89) Emerson, D., Ghiorse, W. C. (1992) Isolation, cultural maintenance, and taxonomy of a sheath-forming strain of *Leptothrix discophora* and characterization of manganese-oxidizing activity associated with the sheath. Appl. Environ. Microbiol., 58, 4001-4010.
- 90) Lane, D. J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing, In: Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Chichester, UK: John, Wiley & Sons, 115-175.
- 91) Kimura, N. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol., 16, 111-120.
- 92) Saito, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol., 4, 406-425.
- 93) La Scola, B., Barrassi, L., Raoult, D. (2000) Isolation of new fastidious alpha Proteobacteria and *Afipia felis* from hospital water supplies by direct plating and amoebal co-culture procedures. FEMS Microbiol. Ecol., 34, 129-137.
- 94) Van Bruggen, E. F. J., Wiebinger, E. H., Gruber, M. (1960) Negative staining electron microscopy of proteins at pH values below their isoelectric points: its application to hemocyanin. Biochim. Biophys. Acta, 42:171.
- 95) Sheehan, D.C., Hrapchak, B.B. (1980) Theory and practice of histotechnology (2nd ed.). St. Louis, The C.V., Mosby Co., 172-173.
- 96) Morikawa, K., Yanagida, J. (1981) Visualization of individual DNA molecules in solution by light microscopy: DAPI staining method. J. Biochem. Tokyo, 89, 693-6.
- 97) Ikegaya, H., Nakase, T., Iwata, K., Tsuchida, H., Sonobe, S., Shimmen, T. (2012) Studies on conjugation of *Spirogyra* using monoclonal culture. J. Plant. Res., 125,

- 457–464.
- 98) Mariner, R., Johnson, D. B., Hallberg, K. B. (2008) Characterisation of an attenuation system for the remediation of Mn(II) contaminated waters. *Hydrometallurgy*, 94, 100-104.
 - 99) Furutani, M., Suzuki, T., Ishihara, H., Hashimoto, H., Kunoh, H., Takada, J. (2011) Assemblage of bacterial saccharic microfibrils in sheath skeleton formed by cultured *Leptothrix sp.* strain OUMS1. *J. Marine Sci. Res. Development*, 2011, S:5, <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9910.S5-001>.
 - 100) Tebo, B. M., Bargar, J. R., Clement, B. G., Dick, G. J., Murray, K. J., Parker, D., Verity, R., Webb, S. M. (2004) Biogenic manganese oxides: properties and mechanisms of formation. *Annu. Rev. Earth Planet Sci.*, 32, 287-328.
 - 101) Learman, D. R., Wankel, S. D., Webb, S. M., Martinez, N., Madden, A. S., Hansel, C. M. (2011) Coupled biotic-abiotic Mn(II) oxidation pathway mediates the formation and structural evolution of biogenic Mn oxides. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 75, 6048-6063.
 - 102) Learman, D. R., Voelker, B. M., Vazquez-Rodriguez, A. I., Hansel, C. M. (2011) Formation of manganese oxides by bacterially generated superoxide. *Nat. Geosci.*, 4, 95-98.
 - 103) Mandernack, K. W., Post, J., Tebo, B., M. (1995) Manganese mineral formation by bacterial spores of the marine *Bacillus*, strain SG-1: evidence for the direct oxidation of Mn(II) to Mn(IV). *Geochim. Cosmochim. Acta*, 59, 4393–4408.
 - 104) Lefkowitz, J. P., Rouff, A. A., Elzinga, E. J. (2013) Influence of pH on the reductive transformation of birnessite by aqueous Mn(II). *Environ. Sci. Technol.*, 47, 10364-10371.
 - 105) Shungu, D., Valiant, M., Tutlane, V., Weinberg, E., Weissberger, B., Koupal, L., Gadebusch, H., Stapley, E. (1983) GELRITE as an agar substitute in bacteriological media, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 840-845.
 - 106) Okazaki, M., Sugita, T., Shimizu, M., Ohode, Y., Iwamoto, K., de Vrind-de, Jong, E. W., de Vrind, J. P. M., Corstjens, P. L. A. M. (1997) Partial purification and characterization of manganese-oxidizing factors of *Pseudomonas fluorescens* GB-1. *Appl., Environ., Microbiol.*, 63, 4793–4799.
 - 107) Bromfield, S. M. (1974) Bacterial oxidation of manganous ions as affected by organic substrate concentration and composition. *Soil., Biol., Biochem*, 6, 383–392.
 - 108) Uren, N. C., Leeper, G. W. (1978) Soil Biol Biochem Microbial oxidation of divalent manganese. 10, 85–87.
 - 109) Atsumi, T., Maekawa, Y., Yamada, T., Kawagishi, I., Imae, Y., Homma, M. (1996) Effect of viscosity on swimming by the lateral and polar flagella of *Vibrio alginolyticus*. *J., Bacteriol.*, 178, 5024–5026.

- 110) Kearns, D. B. (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat., Rev., Microbiol.*, 8, 634-644.
- 111) 佐藤祐一, 大久保卓也, 岡本高弘. (2011) 琵琶湖流域を対象とした水物質循環モデルの構築と行政施策への活用. *水環境学会誌*, 34, 125-141.
- 112) 雨宮由美子, 中山大樹. (1984) 藻類 *Mycrocystis* より単離した粘質鞘物質の化学的性質と金属類に対する吸着特性. *陸水学雑誌*, 45, 187-193.
- 113) 一瀬諭, 若林徹哉, 藤原直樹, 水島清嗣, 野村潔. (1999) 琵琶湖における植物プランクトン優先種の経年変化と水質. *用水と廃水*, 41, 582-591.
- 114) Watanabe, M., Ichimura, T. (1977) Fresh- and salt-water forms of *Spirulina platensis* in axenic cultures. *Bull. Jpn. Soc. Phycol.*, 25, Suppl. (Mem. Iss. Yamada), 371-377.
- 115) Girolardo, D., Vieira, A. A. H., Paulshn, B. S. (2005) Microbial degradation of extracellular polysaccharides released by a tropical strain of *Staurastrum orbiculare* (Zygnematophyceae). *Phycologia*, 44 , 671-677.
- 116) 今井章雄, 松重一夫, 木幡邦夫, 高村典子, 井上隆信, 野原精一, 佐野友春, 相崎守弘, 福島武彦, 小澤秀明, 滝和夫, 細見正明 (2001) 湖沼において増大する難分解性有機物の発生原因と影響評価に関する研究－特別研究－平成 9 年度～平成 11 年度, 国立環境研究所特別研究報告, 環境庁国立環境研究所, SR-36, 38.
- 117) 今井章雄, 松重一夫 (2004) 湖沼における有機炭素の物質収支および機能・影響の評価に関する研究－特別研究－平成 13 年度～平成 15 年度, 国立環境研究所特別研究報告, 独立行政法人 国立環境研究所, SR-62, 52.
- 118) 吉川春寿. (1952) 臨床医化学 I. 協同医書出版社, 東京, 150-152.
- 119) Kagami, M., Gurung, T. B., Yoshida, T., Urabe, J. (2006) To sink or to be lysed? Contrasting fate of two large phytoplankton species in Lake Biwa. *Limnol. Oceanogr.*, 51, 2775-2786.