

## 諏訪湖における *Microcystis* 種組成, 及び細胞あたりの microcystin 含有量の変動

本間 隆満<sup>1)</sup>・朴 虎東<sup>2)</sup>

### Changes in *Microcystis* species composition and cell-quota basis of microcystin concentration in Lake Suwa

Takamitsu HONMA<sup>1)</sup> and Ho-Dong PARK<sup>2)</sup>

#### Abstract

The relationship between *Microcystis* species composition and microcystin concentration was investigated in Lake Suwa. *Microcystis* cell concentrations and microcystin concentrations varied from  $1.0 \times 10^3$  to  $7.4 \times 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$ , and from 0.09 to  $0.55 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively, and no relationship was found between the two. From 5 May to 3 June 2002, *M. aeruginosa* was the dominant species, and the cell-quota basis microcystin varied relative to higher values (from 0.03–0.49 pg cell<sup>-1</sup>). The dominant species shifted from *M. aeruginosa* to *M. wesenbergii* and *M. ichthyoblabe*, and the cell-quota basis of microcystin decreased. From August to October when *M. ichthyoblabe* dominated, the cell-quota basis of microcystins fluctuated from 0.003–0.012 pg cell<sup>-1</sup>, suggesting that microcystin concentrations in water were related to *Microcystis* species composition.

**Key words** : Lake Suwa, *Microcystis* species composition, microcystin, nitrogen, phosphorus

#### 摘 要

諏訪湖において *Microcystis* 種組成と湖水中の microcystin 濃度の関係について調査を行った。*Microcystis* 細胞密度は  $1.0 \times 10^3$  から  $7.4 \times 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$ 、湖水中の microcystin 濃度は 0.09 から  $0.55 \mu\text{g L}^{-1}$  の変動を示した。しかし、細胞密度と microcystin 濃度の変動には有意な関連は認められなかった。*Microcystis* 属の種組成は 5 月 8 日から 7 月 3 日までは *M. aeruginosa* が優占しており、細胞あたりの microcystin 含有量は 0.03 から 0.49 pg cell<sup>-1</sup> と高濃度であった。その後、優占種が *M. aeruginosa* から *M. wesenbergii*, *M. ichthyoblabe* へと交代し、細胞あたりの microcystin 量は減少した。*Microcystis* 属の細胞密度が増加した 8 月から 10 月の間、*M. ichthyoblabe* が 90% 以上の割合で占めており、細胞あたりの microcystin 含有量は最も低い濃度 (0.003–0.012 pg cell<sup>-1</sup>) であった。これらの結果は、諏訪湖における microcystin 濃度の変動は、*Microcystis* 属の現存量ではなく、有毒種 *M. aeruginosa* と無毒種 *M. ichthyoblabe* の割合の変化によって引き起こされることを示している。

キーワード：諏訪湖, *Microcystis* 種組成, microcystin, 窒素, リン

(2004年4月22日受付; 2005年9月16日受理)

<sup>1)</sup> 〒300-0023 茨城県土浦市沖宿1853, 茨城県霞ヶ浦環境科学センター. Ibaraki Kasumigaura Environmental Science Center, Tsutiura 300-0023, Japan

<sup>2)</sup> 〒390-8621 長野県松本市旭3-1-1, 信州大学理学部物質循環学科. Department of Environmental Sciences, Faculty of Science, Shinshu University, Matsumoto 390-8621, Japan

はじめに

湖沼の富栄養化に伴う有毒藍藻によるブルームの発生が世界中で観察されている (Sivonen and Jones, 1999)。本邦において、最も一般的に観察される有毒藍藻のブルームは *Microcystis* 属によるものが多い (Watanabe and Oishi, 1980; Park et al., 1993 a, b)。多くの場合、*Microcystis* 属のブルームは複数の *Microcystis* 種が共存して構成されている (Park et al., 1993b, 1998; Watanabe et al., 1994, 2000)。*Microcystis* 属の中には毒素を生産する有毒種だけではなく、無毒種も存在している (渡辺, 1994; Yasuno et al., 1998)。有毒種は *M. aeruginosa*, *M. viridis*, *M. ichthyoblabe*, 無毒種は *M. wesenbergii* と *M. novacekii* などが挙げられる (渡辺, 1994)。しかし、有毒種であっても、*M. ichthyoblabe* は分離株によって高濃度の毒素を生産する有毒株と生産しない無毒株が存在している (Watanabe et al., 1988, 1991; Park et al., 1998)。

*Microcystis* 属の種毎の microcystin 産生能や生産量の違いは報告されているが、野外における *Microcystis* 属の種組成や毒素の産生能を決定する要因については未だ不

明な点が多い。*Microcystis* 種組成とそれらが生産する microcystin を制御する要因を解明できれば、環境中の *Microcystis* ブルームの毒性を監視、制御する上で重要な情報となりうる。そこで、本研究では水塊中の硝酸態窒素とリン酸態リン濃度が *Microcystis* 種組成と細胞あたりの microcystin 含有量に及ぼすと想定し、栄養塩濃度と *Microcystis* の種組成、及び microcystin 生産量を経時的に観測し、それらの関連について検討した。

材料と方法

試料の採取

2002年5月から10月にかけて、2週間毎に諏訪湖の湖心 (東経136° 05′, 北緯36° 03′; Fig.1) の表層 (0m) の湖水を採取し、湖水中の *Microcystis* 細胞計数、硝酸態窒素、リン酸態リン濃度分析、及び microcystin 定量分析用の試料とした。

*Microcystis* の種組成と細胞密度の算出

試水に最終濃度が 2% になるようにホルムアルデヒド

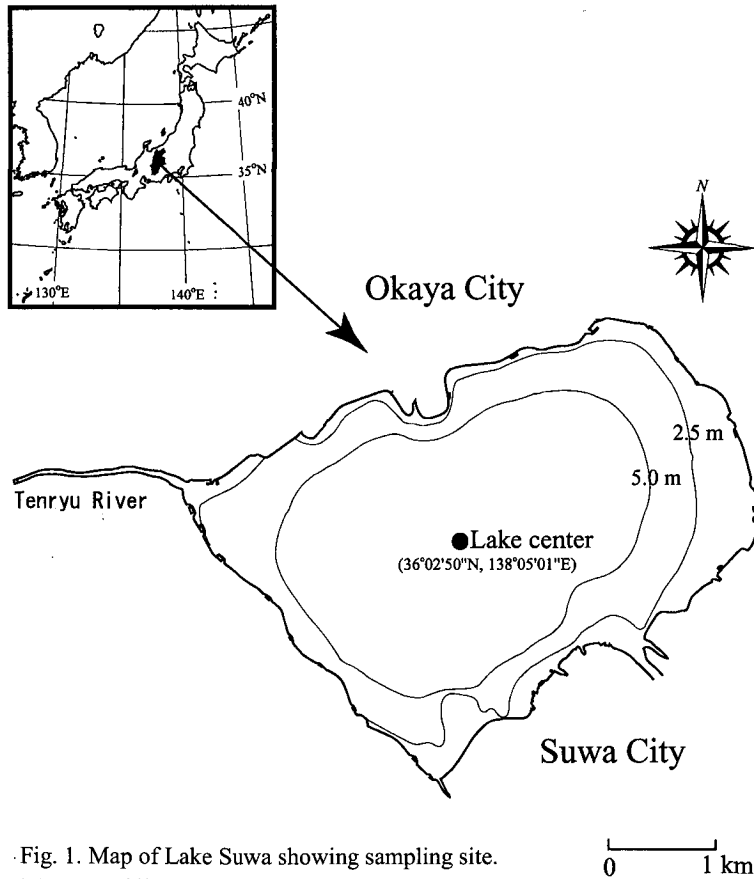


Fig. 1. Map of Lake Suwa showing sampling site.  
図1. 諏訪湖における採水地点.

を添加し, 固定した後, *Microcystis* 細胞密度の計数と種組成の観察を行った。全細胞密度は固定試料の一部を試験管に分注し超音波によってコロニー状の細胞を十分に分散させ, Fuchs-Rosenthal血球計数盤 (Kayagaki Works, Tokyo, Japan) を用いて計数した (Park et al., 1998)。 *Microcystis* 属は, Komárek (1991) に従いコロニーの形態と細胞の平均直径から, *M. aeruginosa* (Kützing) Kützing, *M. flos-aquae* (Wittrock) Kirchner, *M. ichthyoblabe* Kützing, *M. viridis* (A. Brown) Lemmerman, *M. wesenbergii* (Komárek) Komárek に分類した。しかし, *M. flos-aquae* に関しては, *M. aeruginosa* と形態による判別がつきにくいことから, *M. aeruginosa* と *M. flos-aquae* をあわせて *M. aeruginosa* として分類した。試料ごとに 100 コロニー以上について種を同定し, コロニーごとの細胞数を求め, 細胞数の総計に対する種ごとの細胞数の割合から相対的な *Microcystis* 属の種組成を算出した。

#### 高速液体クロマトグラフィ (HPLC) による microcystin 定量分析

Microcystin濃度はPark et al. (1998) の方法に基づき高速液体クロマトグラフィで定量した。分析条件は, カラム Cosmosil 5C18-AR (4.6 × 150 mm), 移動相はメタノール: 0.05M リン酸バッファー (pH3) = 58:42, 流速 1 mL min<sup>-1</sup>, 検出器はフォトダイオードアレイで検出波長は 238 nm である。Microcystin-RR と microcystin-LR を合計した値を Total-microcystin濃度とした。細胞あたりの microcystin 含

量は, 湖水あたりの microcystin 濃度を *Microcystis* 細胞密度で割り算出した。

#### 栄養塩分析

試水を GF/C フィルターで濾過し, 硝酸態窒素, リン酸態リンの分析に用いた。硝酸態窒素濃度はイオンクロマトグラフィー (DX-120, DAOINEX, USA) で定量分析を行った。リン酸態リン濃度はモリブデン酸ブルー・アスコルビン酸還元法 (Murphy and Riley, 1962) に従った。

### 結果と考察

#### *Microcystis* 属の細胞密度および種組成と microcystin 濃度の季節変化

調査を開始した 2002 年 5 月 7 日の水温は 16.1 °C で, *Microcystis* 細胞密度は  $1.0 \times 10^3$  cells mL<sup>-1</sup> であった。夏期に向かうにつれ, 水温が上昇し 7 月 31 日には最高水温 26.9°C に達した。*Microcystis* 細胞密度は 8 月 14 日には最大密度  $7.4 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup> に達した。その後, 9 月 11 日から 10 月 23 日にかけて水温が 24.0 から 13.2 °C に急激に低下し, *Microcystis* 細胞密度も減少し, 10 月 23 日の細胞密度は  $1.6 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup> となった (Fig.2)。

*Microcystis* 属は調査期間中を通して, *M. aeruginosa*, *M. ichthyoblabe*, *M. wesenbergii*, *M. viridis* の 4 種が出現した。*Microcystis* 属の種組成は, 5 月から 6 月にかけては 80% 以上を *M. aeruginosa* が占めていたが, 7 月 19 日では

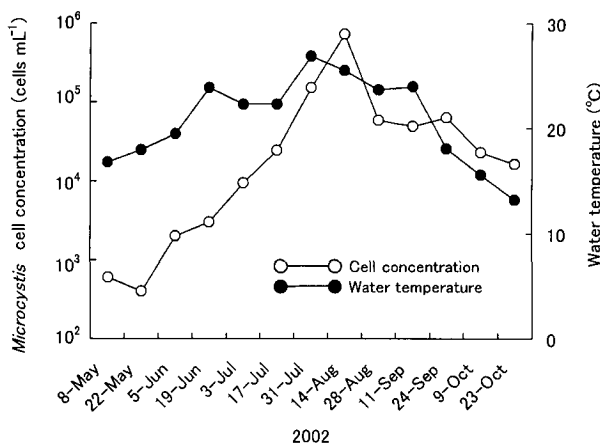


Fig. 2. Seasonal changes in *Microcystis* cell concentration (○) and temperature (●) of the surface water of Lake Suwa in 2002. Samples were collected from lake center at two-week intervals from May 8 to October 23.

図2. 諏訪湖湖心の表層水における *Microcystis* 細胞密度 (○) と水温 (●) の季節変化 (2002年5月~10月)。

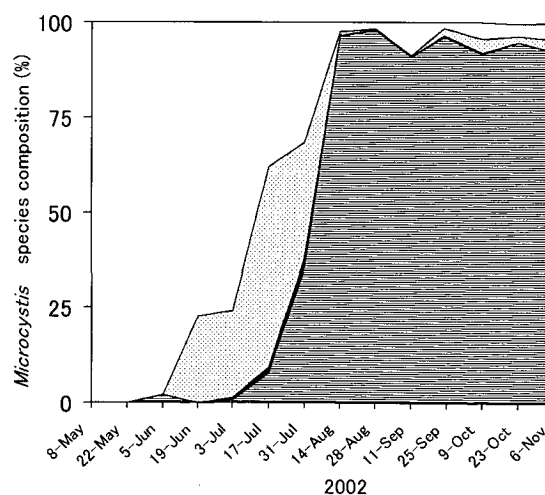


Fig. 3. Species composition of Genus *Microcystis* in surface water of Lake Suwa.

図3. 諏訪湖の表層水中における *Microcystis* 種組成の季節変化。

*M. wesenbergii* が全 *Microcystis* 細胞数の 52% を占め、割合が最も高かった。その後、次第に *M. ichthyoblabe* の割合が増加し、7月31日には *M. aeruginosa*, *M. wesenbergii* と *M. ichthyoblabe* がそれぞれ 31, 31, 35% と同程度の割合で出現していた。*Microcystis* 属の細胞密度がピークに達した8月14日以降は *M. ichthyoblabe* の占める割合が急激に増加し、10月まで90%以上を占めていた (Fig. 3)。

2002年5月から10月の湖水あたりの microcystin 濃度と *Microcystis* 細胞あたりの microcystin 含量を Figure 4 に示す。観測を行なった5月から11月上旬の全ての試料から microcystin を検出することができた。湖水あたりの microcystin 濃度は5月8日から5月22日に一度減少したが、6月5日に  $0.53 \mu\text{g L}^{-1}$  にまで急激に増加した。6月中旬から7月中旬にかけて濃度が減少したが、7月下旬以降再び増加し、9月11日には最大濃度  $0.55 \mu\text{g L}^{-1}$  に達した。9月11日以降、濃度は減少し10月23日には湖水中の microcystin 濃度が  $0.09 \mu\text{g L}^{-1}$  となった。*Microcystis* 細胞あたりの microcystin 量は調査を開始した5月8日に最大値  $0.49 \text{ pg cell}^{-1}$  を示した。5月22日と6月5日には最大値の50%程度にまで microcystin が減少した。6月以降も減少し、8月14日には  $0.001 \text{ pg cell}^{-1}$  以下にまで低下した。細胞あたりの microcystin 含有量は8月から10月まで  $0.003 \sim 0.012 \text{ pg cell}^{-1}$  の低濃度の範囲で変動した。

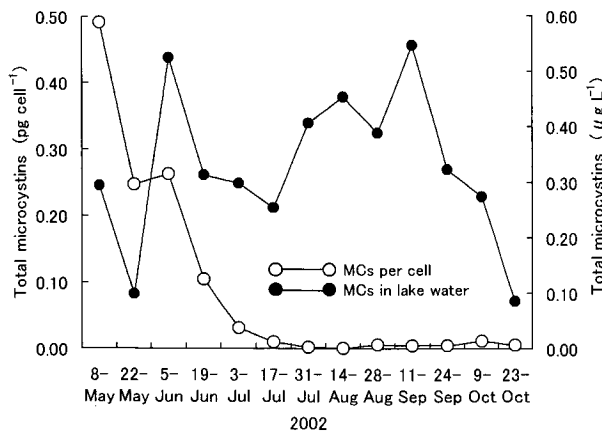


Fig. 4. Seasonal changes in total microcystin concentration of surface water lake-water basis (●) and cell-quota basis (○) at the center of Lake Suwa in 2002. Samples were collected at two-week intervals from May to October.

図4. 諏訪湖湖心表層水中の湖水中microcystin濃度(●), および細胞あたりのmicrocystin量(○)の季節変化(2002年5月~10月)。

#### 硝酸態窒素濃度とリン酸態リン濃度の季節変動と *Microcystis* 種組成の変動との関連

諏訪湖表層水中の硝酸態窒素濃度は5月から8月にかけては検出限界以下から  $64 \mu\text{g L}^{-1}$  の範囲で増減していた。8月14日以降、*Microcystis* 細胞密度の減少に従い、8月28日から10月23日にかけて硝酸態窒素濃度が22から  $171 \mu\text{g L}^{-1}$  にまで増加した。リン酸態リン濃度は5月から6月19日にかけて、最小濃度  $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$  から最大濃度  $11.9 \mu\text{g L}^{-1}$  まで増加した。その後、*M. ichthyoblabe* の増殖に伴い7月中旬までリン濃度は減少した。*M. ichthyoblabe* が優占した7月から10月のリン酸態リン濃度はおよそ  $7 \mu\text{g L}^{-1}$  とほぼ一定であった (Fig. 5)。

*Microcystis* 細胞密度の増加に従い、*M. aeruginosa* の占める割合は低下し、7月17日には *M. wesenbergii*, 7月31日以降は *M. ichthyoblabe* がそれぞれ優占した (Fig. 3)。*M. wesenbergii* は *M. aeruginosa* よりも細胞内に窒素を多く蓄えることができる (中原, 1993) ことから、低い硝酸態窒素濃度が観察された5月から7月にかけて *M. aeruginosa* よりも有利に増殖できたのであろう。7月中旬以降、急激に *M. ichthyoblabe* の細胞密度が増加し、*Microcystis* ブルームの90%以上を *M. ichthyoblabe* が占めるようになったが (Fig. 3), *M. ichthyoblabe* のブルームに関する報告例は少なく (Sabour et al., 2002), 硝酸態窒素濃度の変動との関係を考察することはできなかった。

また、高村(1988)は *Microcystis* 属が優占する湖沼に共

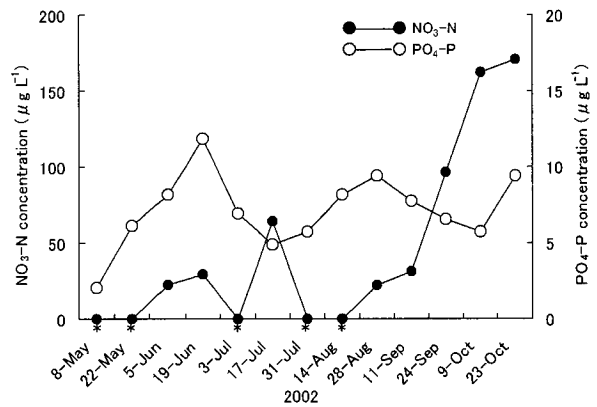


Fig. 5. Seasonal changes in  $\text{NO}_3\text{-N}$  (●) and  $\text{PO}_4\text{-P}$  (○) concentrations at surface water in the center of Lake Suwa. \*: not detected.

図5. 諏訪湖表層水中の硝酸態窒素濃度(●)とリン酸態リン(○)濃度の季節変化.\*:  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  以下。

通する特徴の一つとして, *Microcystis* 属のブルームが発生している間, 湖水中のリン酸態リン濃度が増加し, 亜硝酸態と硝酸態窒素が欠乏することを挙げている。しかし, 本研究では *M. ichthyoblabe* によるブルームが観察された間, リン酸態リン濃度の増加は認められなかった (Fig.5)。

本研究は諏訪湖水中における藍藻毒素 microcystin の濃度変化は *Microcystis* 種組成, 特に有毒種 *M. aeruginosa* と無毒種 *M. ichthyoblabe* の割合の変化に影響されていることを示した。

## 文 献

- Komárek, J. (1991): A review of water-bloom forming *Microcystis* species, with regard to populations from Japan. *Algological Studies*, 64: 115-127.
- Murphy, J. and J. P. Riley (1962): A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters, *Analytica Chimica Acta*, 27: 31-36.
- 中原紘之 (1993): 藍藻類. 水域の窒素: リン比と水産生物, 吉田陽一 (編著), 39-50. 恒星社厚生閣, 東京.
- Park, H.-D., M. F. Watanabe, K.-I. Harada, H. Suzuki, M. M. Watanabe and H. Hayashi (1993a): Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters. *Natural toxins*, 1: 353-360.
- Park, H.-D., M. F. Watanabe, K.-I. Harada, M. Suzuki, H. Hayashi and T. Okino (1993b): Seasonal variations of *Microcystis* species and toxic heptapeptide microcystins in Lake Suwa. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 8:425-435.
- Park, H.-D., C. Iwami, M. F. Watanabe, K.-I. Harada, T. Okino and H. Hayashi (1998): Temporal variability of the concentrations of intra- and extracellular microcystin and toxic *Microcystis* species in hypertrophic lake, Lake Suwa, Japan (1991-1994). *Environmental Toxicology and Water Quality*, 13: 61-72.
- Sabour, B., M. Loudiki, B. Oudra, V. Vasconcelos, R. Martins, S. Oubraim and B. Fawzi (2002): Toxicology of a *Microcystis ichthyoblabe* waterbloom from Lake Oued Mellah (Morocco). *Environmental Toxicology*, 17: 24-31.
- Sivonen, K. and G. Jones (1999): Chapter 3 Cyanobacterial Toxins. *Toxic Cyanobacteria In Water, A Guide to Their Health Consequences, Monitoring and Management*, I. Chorus and J. Bartram (eds): 41-112. E & FN Spon, London.
- 高村典子 (1988): ラン藻による水の華, 特に *Microcystis* 属の生態学的研究の現状, *藻類*, 36: 65-79.
- Watanabe, M.F. and S. Oishi (1980) Toxicities of *Microcystis aeruginosa* collected from some lakes, reservoirs, ponds and a moat in Tokyo and adjacent regions. *Japanese Journal of Limnology*, 41: 5-9.
- Watanabe, M. F., S. Oishi, K.-I. Harada, K. Matsuura, H. Kawai and M. Suzuki (1988): Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon* 26: 1017-1025.
- Watanabe, M. F., M. Watanabe, T. Kato, K.-I. Harada, and M. Suzuki (1991): Composition of cyclic peptide toxins among strains of *Microcystis aeruginosa* (blue-green algae, cyanobacteria), *Botanical Magazine of Tokyo*, 104:49-57.
- Watanabe, M. F., H.-D. Park and M. Watanabe (1994): Compositions of *Microcystis* species and hepatotide toxins. *Verh International Verein Limnology*, 25: 2226-2229.
- 渡辺真利代 (1994): アオコーその出現と毒素, 渡辺真利代・原田健一・藤木博太 (編): 101-117. 東京大学出版, 東京.
- Watanabe, M. F., H.-D. Park and T. Nakajima (2000): Composition of *Microcystis* and microcystins in Lake Biwa. *Verh International Verein Limnology*, 27: 2899-2903.
- Yasuno, M., Y. Sugiura, K. Kaya and M. Watanabe (1998): Variation in the toxicity of *Microcystis* species to *Moina macrocopa*. *Phycological Research*, 46 (Suppl.): 31-36