

1. 湖沼・貯水池におけるかび臭等の発生予測と抑制に関する研究

担 当 機 関 厚生労働省 国立保健医療科学院水道工学部 国包章一

重点強化事項 土壌 研究期間 平成12年度～平成14年度
研究予算総額 27,568千円

研究の背景と目的

水道水のかび臭等の異臭味被害は近年減少傾向にあるものの、未だに数多くの水道利用者が影響を受けている状況にある。この一因として湖沼・貯水池等の富栄養化による水質悪化が指摘されており、早急な対策が必要となっている。一方、水道事業体ではかび臭対策として高度浄水処理の導入、粉末活性炭の投入などの対策で過度の負担を強いられているところもある。そこで湖沼・貯水池におけるかび臭等の発生予測及び制御方法を確立していく必要がある。本研究では、全国の多くの湖沼・貯水池で発生している藻類の増殖に伴うかび臭問題に対し、かび臭の発生予測法の検討、バイオセンサーを用いたかび臭の常時計測法の開発と応用、藻類等の代謝産物や共存する他の微生物などのかび臭原因藻類の増殖促進・抑制因子の検討とそれを利用した制御法など、環境水中でのかび臭発生の予測と制御手法の開発を目標とし、環境改善とそれに伴う利水障害の軽減化を目的とするものである。

研究の成果

1. 湖沼・貯水池におけるかび臭発生と水質因子との関係

湖沼・貯水池から原水を直接取水している183浄水場を対象に、かび臭発生と水質因子についてアンケート調査を行い、その結果について検討した。その結果、滞留時間が長くなるほど、水温については高くなるほど、pHについてはpH6.5以上の範囲ではpHの上昇に伴い発生割合も高くなった。T-N、T-P濃度との関係については、T-P濃度が0.01mg/L以下の湖沼・貯水池においては発生していないこと、かび臭が発生したほとんどの湖沼・貯水池のN/P比が5～30の範囲であることがわかった(図1)。また、水質因子とかび臭との相関係数を求めた結果、相関が最も高かったのは、T-Pで相関係数が約0.08、次いでN/P比、T-N、CODの順であり(図2)かび臭発生予測に関してT-P、N/P比が重要な因子であることが示唆された。

2. ニューラルネットワークモデルによる2-MIB発生予測

ニューラルネットワークモデルを用いた2-MIB濃度の学習結果と実測値を比較すると、十分学習できていたが、予測期間3日の予測精度が最も高く、実用面を考えると少なくとも1週間程度の猶予が必要と考えられるため、2-MIBの実測値を表1に示す方法でランク分けし、そのランクを学習、予測した結果、正解率は高くなかったが概ねランク予測ができた。また、ランク0と1をまとめて50ng/L未満、ランク2と3をまとめて50ng/L以上として予測結果を修正したところ、概ね予測できていた。そこで50ng/L未満を0、50ng/L以上を1とし、ニューラルネットワークの学習と予測を行い、4ランクを2つにまとめた結果と比較すると、ある程度細かなランク分けをした方がモデルの性能が向上していることが分かった(図3,4)。

3. SPR法を用いたかび臭センサーの活用によるかび臭常時監視方法の検討

SPR法を用いたかび臭センサーの活用によるかび臭物質の常時監視についての検討を行った結果、連続測定を行うと同一サンプルにおいて測定値が安定しないなどの現象が確認された。その原因として、HEPESとNaClの混合液が測定に影響を及ぼしていることが確認されたため、この薬品を取り除くことにより緩衝液の組成を読み取る課題は改善されたが、この操作のみでは測定値の完全な安定化は図ることができなかった。次に、ブロッキング剤及び解離剤、界面活性剤の検討を行った結果(図5,6)タンパク質とDNAが解

離されないことが原因となっており、ベースラインの不安定化を引き起こしていることが示唆され、これらの原因をクリアすることで連続測定下における測定値の安定化につながるものと考えられた。

4. 藍藻類 *Phormidium* sp. の栄養塩制限下におけるかび臭物質 2-MIB の産生特性

窒素制限下における 2-MIB 濃度の産生特性について検討した結果（図 7,8）窒素が枯渇した *Phormidium* sp. に対する窒素再添加後における 2-MIB 濃度及び藻体量の時間的变化をみると、増殖よりも速やかに 2-MIB が産生されることが明らかとなり、湖沼や貯水池において硝酸性窒素の変動が起こった場合、2-MIB 含有量が変動する可能性が示唆された。次に、2-MIB 産生におよぼす水温及び光の影響について検討した結果、水温を 30℃、光条件を 2500 lx に設定した条件において藻体量および 2-MIB 含有量の増加が最も大きかった。

5. かび臭原因藻類の増殖に及ぼす細菌の影響

霞ヶ浦及び印旛沼より採取した湖沼水を用いて、かび臭原因藻類に対して増殖抑制効果を有する細菌の分離を試みた結果、重層寒天平板培養法より 50 株、マイクロプレート法により 8 株の細菌を分離することができた。分離した細菌について *Phormidium tenue* の増殖抑制試験を行った結果、増殖抑制効果を示す細菌として 4 株を確認し、*Pseudomonas* 属、*Streptomyces* 属であると示唆された。次に、*P. tenue* の増殖抑制が増殖抑制細菌の生菌によるものか、細胞外物質によるものかを検討した結果、*P. tenue* の増殖抑制は増殖抑制細菌の細胞外物質によって起こることが明らかとなった。

6. 不飽和高級脂肪酸によるかび臭原因藻類 *Phormidium tenue* の 2-MIB 産生抑制

P. tenue の増殖及び 2-MIB 産生に及ぼす不飽和高級脂肪酸（表 2）の不飽和度の影響について比較検討した結果、*P. tenue* 抑制効果はステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸の順に高くなり、脂肪酸に存在する二重結合（不飽和結合）の数はそれぞれ 0,1,2,3 であることから、不飽和度の増加とともに抑制効果が高くなることがわかった。また 2-MIB の産生は脂肪酸の種類に関係なく、*P. tenue* の細胞数の減少とともに抑制された（図 9）。また、*P. tenue* の増殖及び 2-MIB 産生に及ぼすリノール酸添加濃度の影響について検討した結果、濃度の増加に伴い *P. tenue* の増殖及び 2-MIB 産生の抑制効果が高まった。

7. ホスミドマイシンを用いたかび臭産生経路の特定とかび臭産生阻害

藍藻類 *P. tenue* の培養液に、非メバロン酸経路に作用してテルペノイド合成を抑制すると共に、生物の増殖阻害を引き起こす抗生物質であり、哺乳動物などメバロン酸経路を経る生物には作用しないホスミドマイシンを各種濃度（0 ~ 200 µg/mL）で 7 日毎に添加し、37 日間培養を続けて増殖阻害度および 2-MIB 産生阻害度を測定した結果、ホスミドマイシンを添加したすべての試料で、添加しないものに比べ、増殖度の抑制と 2-MIB 産生量の抑制が検出された（図 10）。この結果より、ゲノム解析によって明らかになっている他の藍藻類と同様に *P. tenue* も非メバロン酸経路を持ち、この経路によって 2-MIB を合成していることが明らかになった。また、ホスミドマイシンを添加したすべての試料で、増殖が完全に抑制されることはなかったが、2-MIB 産生量は添加した濃度が高いほど早い時期に産生阻害が示され、一旦阻害されると 2-MIB 濃度は増加せず一定の濃度で持続された。

8. PCR による *Phormidium tenue* 同定法の開発

16S-rDNA 塩基配列のグループ特異性が高い部位に対する 11 種類 DNA プライマーを合成した。そのプライマーの組み合わせのうち 6 から 8 通りのプライマーの組み合わせで PCR を行うことによる *P. tenue* 同定法を検証するために、2002 年夏季に釜房湖から単離された株の同定を試みた結果、藍色で 2-MIB 産生株は PCR による同定法によっても、16S-rDNA 塩基配列に基づく系統樹作成の結果によっても NIES-512 株と分類され PCR による同定法が正しいことが実証されたが（図 11,12）褐色株においては現状の PCR 同定法では正確に分類できないことが示された。この点は今後、褐色株で 2-MIB 産生株が見つかった場合にさらなる塩基

配列情報収集を行い、特異的なプライマー構築が必要となる。

9. かび臭合成遺伝子の単離

ボルネオールサイクラゼ遺伝子を青色コロニーで識別することができる青白スクリーニング法の構築を試み、基質合成プラスミド、モニタープラスミド、サイクラゼプラスミドからなる、サイクラゼ遺伝子がある時のみ青く発色する大腸菌コロニーを識別することができるシステムを構築することができた。本方法を *P. tenue* のゲノミックライブラリーに適用して、かび臭合成遺伝子の単離を試みたところ 55 個の青色コロニーを得ることができた。このうちの 7 個のクローンの塩基配列を決定し、相同性解析を行ったところ、テルペンサイクラゼと相同性を示すクローンは得られなかった。残る 48 個のクローンの解析が今後の課題である。

10. 光触媒を用いたかび臭原因物質の分解

超純水中にかび臭物質として Geosmin 及び 2-MIB を添加し分解実験を行った結果、光源としてはブラックライト (BL) より低圧紫外線ランプ (UV) が優れていると考えられたため、UV や UV/TiO₂ による水道原水中のかび臭物質の分解への適用可能性を検討した結果 (図 13, 14) 原水でのかび臭物質の分解は、純水中よりも遅く、また、各系で得られた分解速度を比較すると、純水において UV 系の方がかび臭物質の分解が速かったが、原水では UV/TiO₂ 系の方が分解が速かった。UV 系で観察されたかび臭物質の分解は主にオゾンによるものであり、UV/TiO₂ 系でのかび臭物質の分解の主要因は光触媒反応であることが示唆されたことから、ラジカルスカベンジャーが共存する系では、光触媒が有効であると考えられた。また原水でのかび臭物質分解の低下は、炭酸イオンやフミン酸によることが示唆された。

研究のまとめ

- (1) アンケート調査より、かび臭発生と水質因子等の関係を検討した結果、T-P 濃度及び N/P 比がかび臭発生予測に関して重要な因子であることがわかった。
- (2) ニューラルネットワークモデルによる 2-MIB 濃度の予測はある程度細かなランク分けをした方が正解率は向上することが分かった。
- (3) SPR 法を用いたかび臭センサーの活用によるかび臭物質の常時監視を行うための課題として、連続測定を行うと同一サンプルにおいて測定値が安定しないなどの現象が確認され、原因は、リプレッサータンパクとセンサーチップに固定化したオペレーターがうまく解離されないことによると考えられた。
- (4) 素が枯渇した *Phormidium* sp. に対して硝酸性窒素を与えると、増殖に先だって 2-MIB が産生され、湖沼や貯水池において硝酸性窒素の変動が起こった場合、2-MIB 含有量が変動する可能性が示唆された。
- (5) 増殖抑制効果を示す細菌として *Pseudomonas* 属および *Streptomyces* 属の 4 株を確認し、増殖抑制の要因として増殖抑制細菌の細胞外物質が考えられた。
- (6) *P. tenue* の増殖は、不飽和度の増加とともに抑制効果が高くなることがわかり、2-MIB の産生は脂肪酸の種類に関係なく、*P. tenue* の細胞数の減少とともに抑制された。
- (7) ホスミドマイシンを用いて *P. tenue* のかび臭合成経路の特定とかび臭抑制剤としての可能性を検討した結果、増殖度と 2-MIB 産生量の抑制が検出され、*P. tenue* も非メバロン酸経路を持ち、この経路によって 2-MIB を合成していることが明らかになった。
- (8) *P. tenue* を PCR で同定する方法を検討した結果、かび臭産生グループのみを同定することができ、褐色株においては正確に分類できないことが示された。
- (9) 発光型かび臭センサーを応用して、かび臭合成に関与するモノテルペンサイクラゼ遺伝子を保有する大腸菌のみを青色コロニーとして識別できる、青白スクリーニング法を開発することができた。
- (10) UV、UV/TiO₂ 共に純水中や水道原水中のかび臭物質を分解し、純水においては TiO₂ の存在が分解速度の

低下を招いたが、水道原水中のかび臭物質の分解はTiO₂存在下で速やかに進行した。

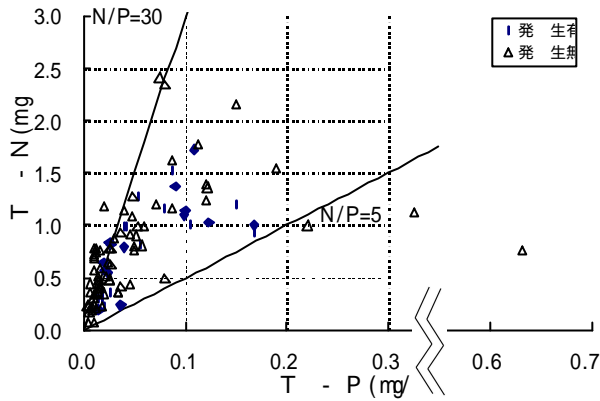


図1 各因子とかび臭発生との相関係数

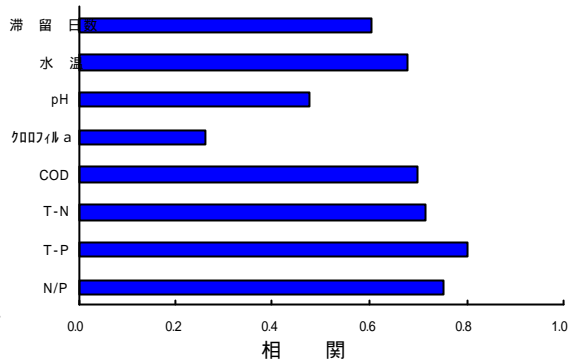


図2 各因子とかび臭発生との相関係数

| 2-MIB濃度のランク | 2-MIB濃度の範囲 | 備考 |
|-------------|-------------------|--------|
| 0 | <10ng/L | 安全レベル |
| 1 | 10ng/L以上50ng/L未満 | 要監視レベル |
| 2 | 50ng/L以上100ng/L未満 | 要対策レベル |
| 3 | 100ng/L | 非常事態 |

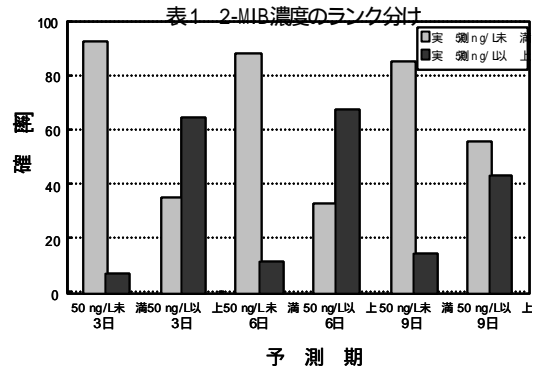


図3 閾値50ng/L予測結果に対する実測値の確立分布

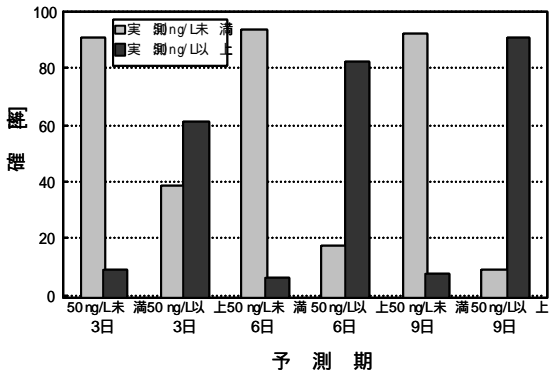


図4 閾値50ng/L予測結果に対する実測値の確率分布 (ランク分けした2-MIB濃度予測モデルより)

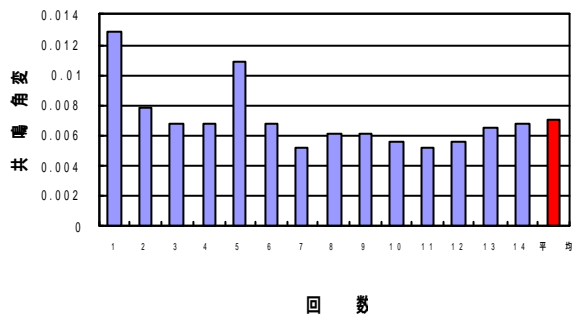


図5 解離剤としてglycine-HClを用いた場合の共鳴角変化

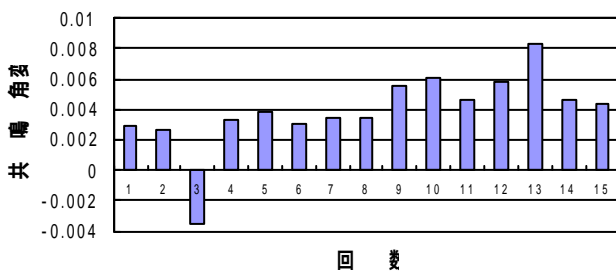


図6 溶解剤としてMgCl2を用いた場合の共鳴角変化

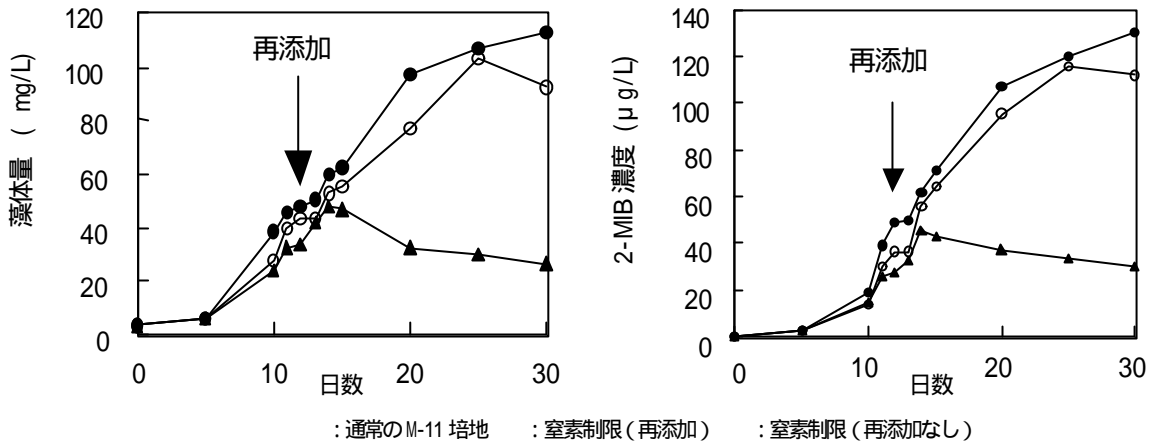


図7 窒素制限下のPhormidium sp.の培養における藻体量の経時変化

図8 窒素制限下のPhormidium sp.の培養における2-MIB濃度の経時変化

表2 添加脂肪酸結元

| 名 | 略 記 | 構 | 分 量 | 融 |
|---------|---------|--|--------|-------|
| ス テ ア リ | 18:0 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ | 284.48 | 69.6 |
| オ レ イ ン | 18:1n-9 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ | 282.47 | 13.4 |
| リ ノ ール | 18:2n-6 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_2(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ | 280.45 | -5.2 |
| リ ノ レ ン | 18:3n-3 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_7(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ | 278.44 | -11.3 |

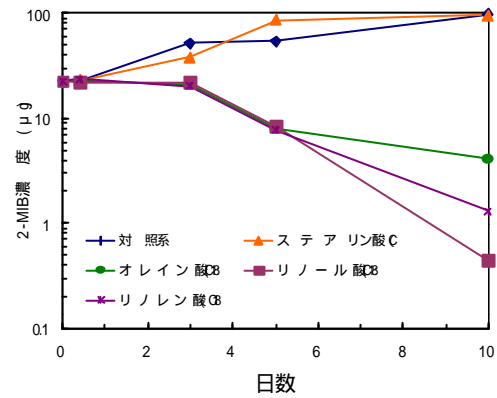
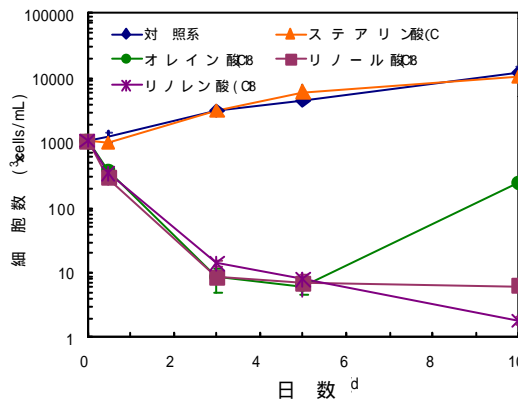


図9 P. tenueの増殖及び2-MIB産生に及ぼす脂肪酸の不飽和度の影響

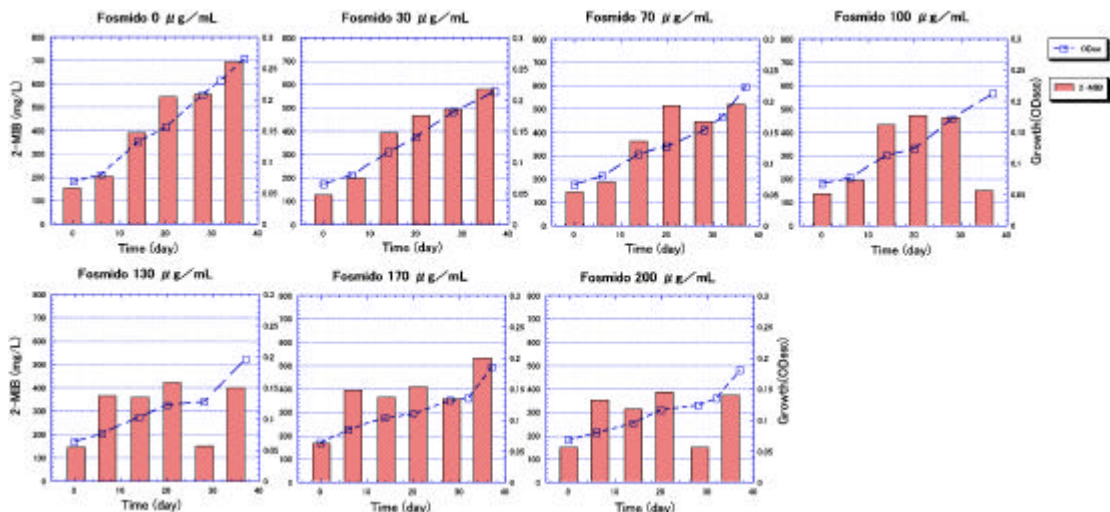


図10 各種濃度ホスミドマイシン添加による2-MIB産生量と増殖度との関係

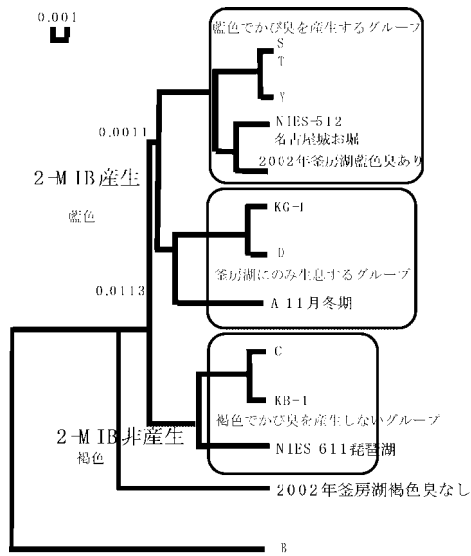


図11 P. tenueの系統樹と2002年釜房湖から単離されたP. tenueの16S リボソームDNA塩基配列に基づく分類結果

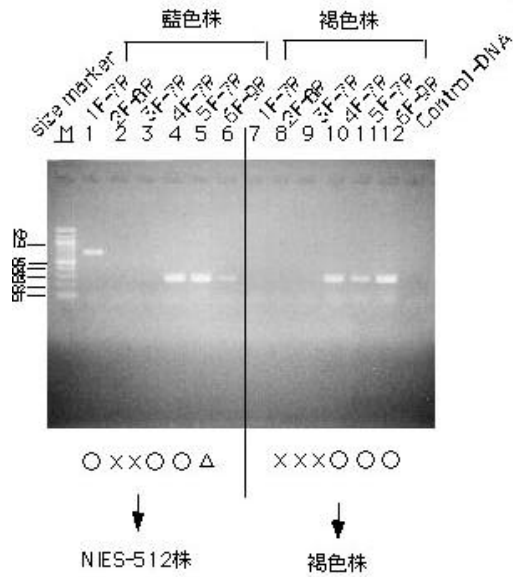


図12 6種のプライマーを用いたPCR分類結果

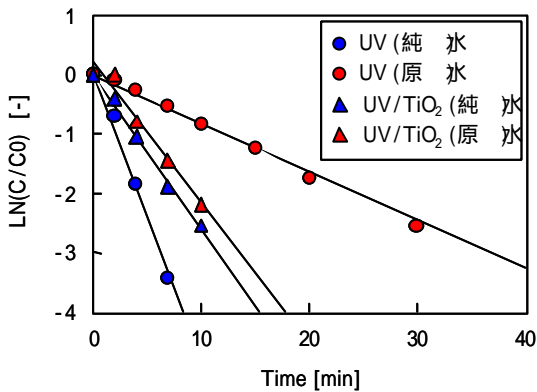


図13 純水、原水中の2-MIB (10 µg/L)の分解

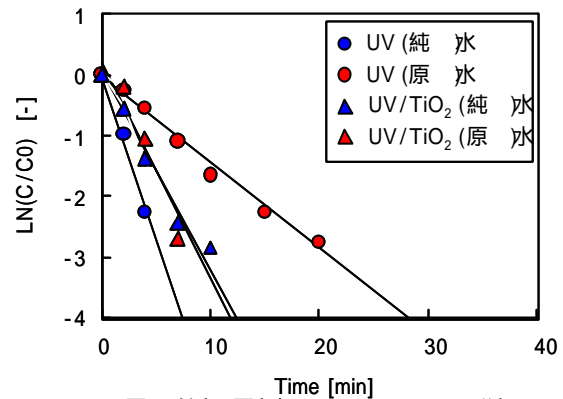


図14 純水、原水中の2-MIB (10 µg/L)の分解

研究発表

| 発表題名 | 掲載法/学会等 | 発表年月 | 発表者 |
|---|------------------------------|------|-------------------|
| ・湖沼・貯水池におけるかび臭発生と水質因子との関係 | 第53回全国水道研究発表会 | 14.5 | 川合、国包、秋葉 |
| ・Application of an artificial neural network formulated to predict the outbreak of musty order. | Asian water quail 2002 Proc. | 01 | HOSOMI, TATEMUKAI |
| ・不飽和高級脂肪酸による Phormidium tenue の2-MIB 産生抑制 | 第54回全国水道研究発表会 | 03.5 | 齋藤、川合、金、秋葉、国包 |
| ・Phormidium tenue の増殖と2-MIB 産生量に対するホスミドマイシンの作用効果 | 平成14年度土木学会東北支部技術研究発表会 | 03 | 浅沼、及川、石橋 |
| ・PCR法によるかび臭産生藍藻類の検出 | 平成12年度土木学会東北支部技術研究発表会 | 01 | 梅津、及川、石橋 |
| ・かび臭産生藍藻類 Phormidium Tenue 同定のためのPCRプライマーの検討 | 第54回全国水道研究発表会 | 03.5 | 及川、浅沼、梅津、石橋 |
| ・かび臭生成経路解明のためのかび臭前駆物質合成遺伝子単離法の考案 | 平成12年度土木学会東北支部技術研究発表会 | 01 | 安部、及川、石橋 |

