

Cyanobacteria 門
  Actinobacteria 綱
  Cytophagia 綱
  Flavobacteriia
  Spingobacteriia 綱
  Alphaproteobacteria 綱
  Betaproteobacteria 綱
  Gammaproteobacteria 綱
  その他の門

図1 長沢浄水場処理工程水の綱レベルにおけるリード数の割合

表1 ろ過水より検出された主要な微生物

分類(門/綱)		近縁種(属)	相同性(%)
Cyanobacteria	Synechococcophycideae	<i>Synechococcus</i>	98~100
Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Ca. Planktophilia limnetica</i>	92.9~97.6
Bacteroidetes	Cytophagia	<i>Pseudarcicella</i>	93
	Flavobacteriia	<i>Flavobacterium</i>	97.2~100
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	100
		<i>Methylobacterium</i>	100
		<i>Rhizobium</i>	93
		<i>Azorhizobium</i>	94
	Betaproteobacteria	<i>Limnohabitans</i>	100
		<i>Janthinobacterium</i>	96.0~100
		<i>Undibacterium</i>	100
		<i>Ralstonia</i>	100
	Gammaproteobacteria	<i>Methylobacter</i>	100
		<i>Pseudomonas</i>	100
<i>Acinetobacter</i>		100	
<i>Moraxella</i>		100	
Deinococcus-Thermus	Deinococci	<i>Deinococcus</i>	100

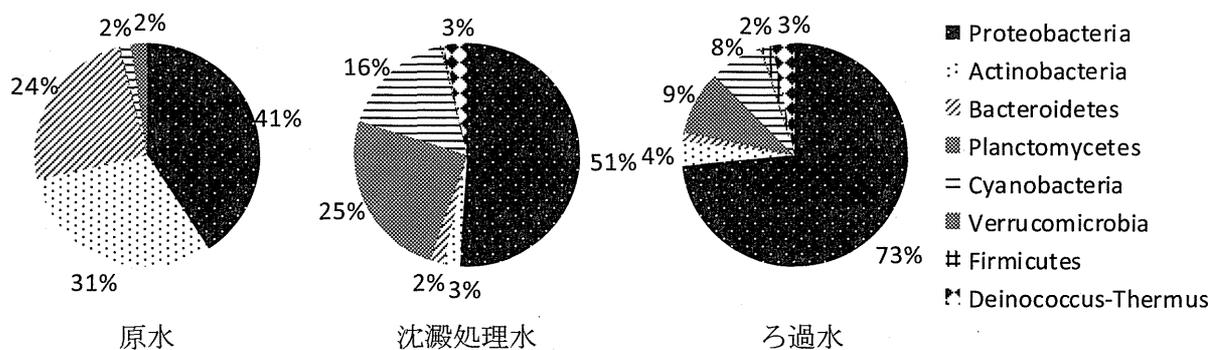


図2 栗山浄水場処理工程水の門レベルにおけるリード数の割合

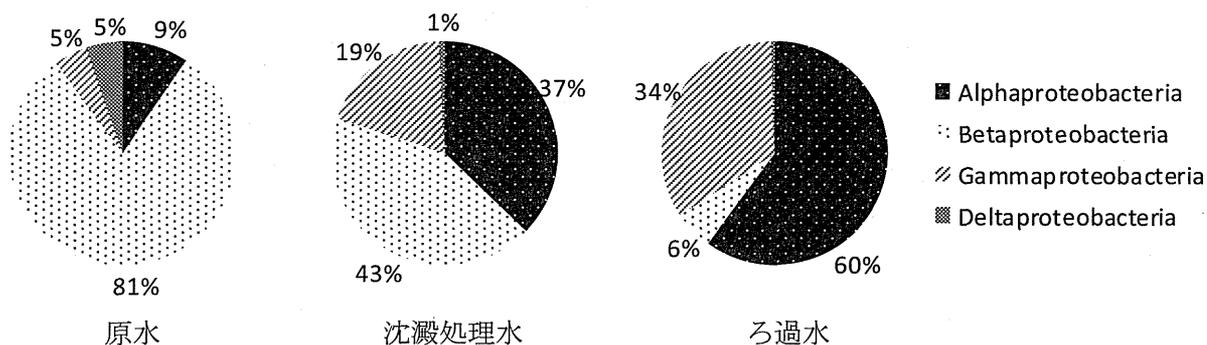


図3 栗山浄水場処理工程水の Proteobacteria 門における綱レベルのリード数の割合

表2 栗山浄水場処理工程水から検出された *Synechococcus* 属に近縁な OTU の近縁種と各工程水におけるリード数

OTU	近縁種	相同性(%)	原水	沈澱処理水	ろ過水
OTU1	<i>Synechococcus</i> sp. PCC9005	100.0	2388	3114	23
OTU2	<i>Synechococcus</i> sp. MH305	100.0	0	671	1296
OTU3	<i>Synechococcus</i> sp. MW6B4	100.0	4	706	303
OTU4	<i>Synechococcus</i> sp. LBB3	100.0	94	1472	28
OTU5	Uncultured <i>Synechococcus</i> sp. clone LS51	100.0	3	367	0
OTU6	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7009	100.0	99	0	0
OTU7	<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81	100.0	0	59	87
OTU8	<i>Synechococcus</i> sp. MA0607A	100.0	36	46	0
OTU9	<i>Synechococcus</i> sp. MA0607K	99.2	0	0	36
OTU10	<i>Synechococcus</i> sp. MA0607A	98.0	0	10	0
OTU11	<i>Synechococcus</i> sp. UBR	98.4	41	678	26
Synechococcus 属の合計リード数			2665	7123	1799

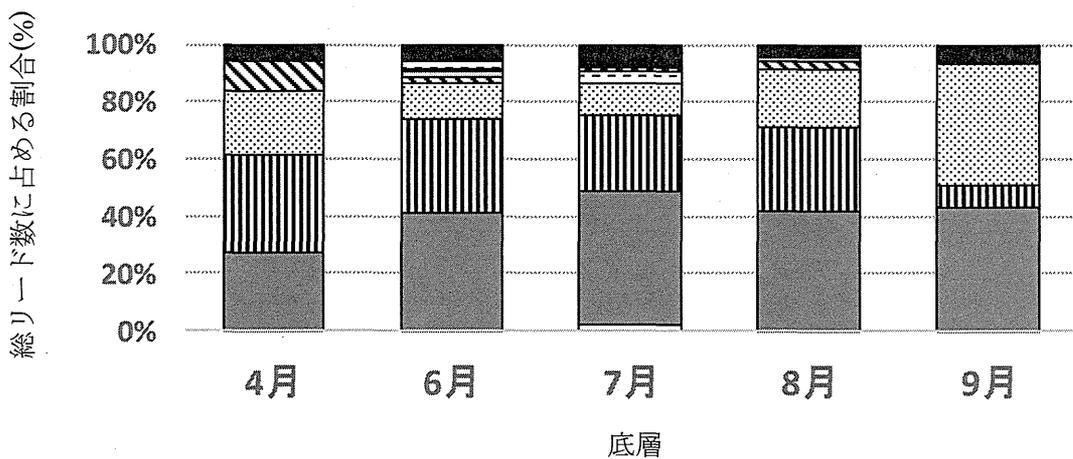
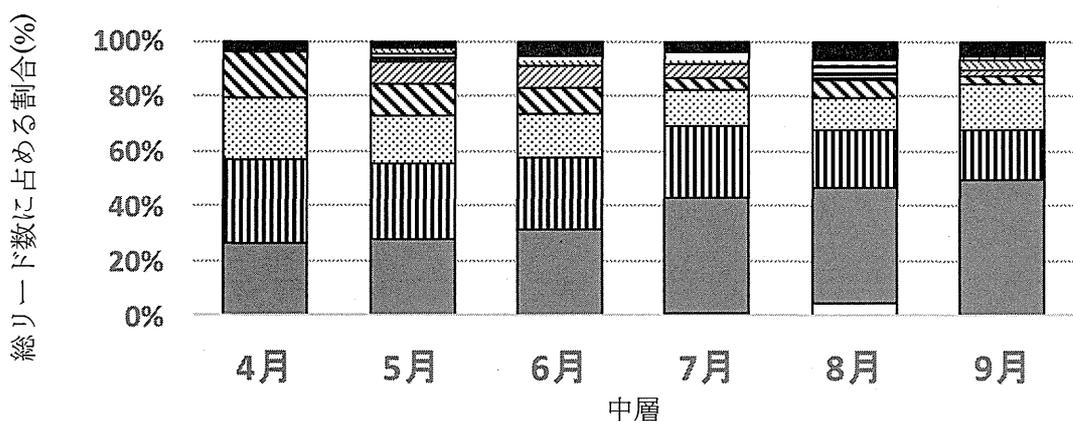
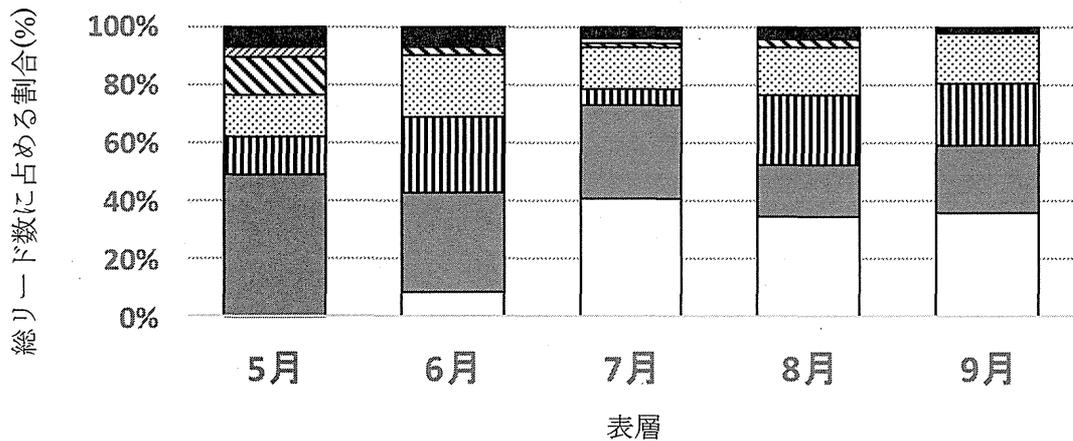


図4 草木湖の各水深における門レベルにおけるリード数の割合

- |                          |                   |                  |
|--------------------------|-------------------|------------------|
| □ Cyanobacteria          | ■ Proteobacteria  | ▨ Actinobacteria |
| ▤ Bacteroidetes          | ▧ Verrucomicrobia | ▩ Planctomycetes |
| ▥ Armatimonadetes        | ▦ Acidobacteria   | ▫ Nitrospirae    |
| ▧ Candidate_division_OD1 | ▨ Archaea         | ▬ Other          |

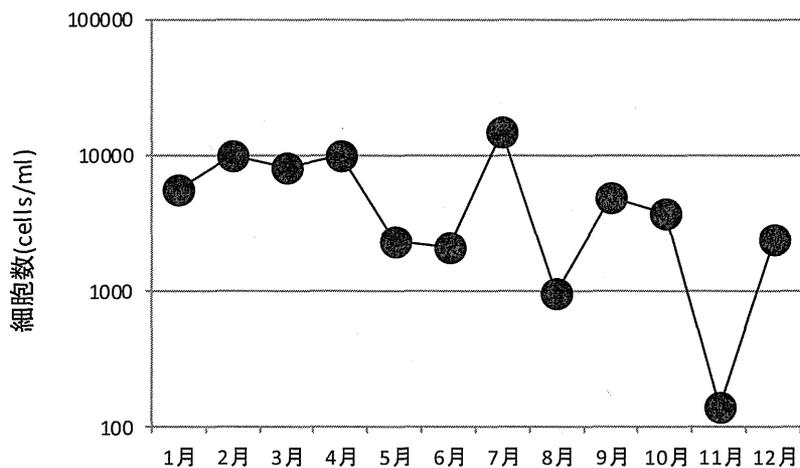


図5 草木湖の真核ピコ植物プランクトン細胞数の推移(2015年)

表3 草木湖の緑藻綱をターゲットとした生物相解析結果(2015年)

OTU	近縁種	相同性(%)	クローン数											
			1月	2月	3月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	
1	<i>Mychonastes homosphaera</i>	100	36	36	48	45	3	42	40	21	12	34	28	
2	<i>Chlamydomonas noctigama</i>	99.3	4			3	45	6	2	27	8	7	8	
3	<i>Chlamydomonas bacca</i>	98.8	4	4					4		26	7	8	
4	<i>Chlamydomonas fasciata</i>	99.8									2		4	
5	<i>Chlamydomonas</i> sp. NIES-2315	100	4						2					

分担研究報告書 4

ろ過漏出障害を回避するための浄水処理プロセスの開発

研究代表者 秋葉 道宏  
研究分担者 西村 修

分担研究報告書

研究課題：ろ過漏出障害を回避するための浄水処理プロセスの開発

研究代表者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 統括研究官  
研究分担者 西村 修 東北大学大学院工学研究科 教授

研究要旨

ピコ植物プランクトン *Synechococcus* sp.と藍藻 *Microcystis aeruginosa* を用いて凝集に関わる基本的特性としての pH とゼータ電位の関係、荷電中和に必要な凝集剤注入量、および荷電中和時の残留濁度を比較検討した。両藻類とも pH の上昇とともに荷電中和が起こり、*Synechococcus* では pH が 5 と 6 の間で、*Microcystis* では 6 と 7 の間で正電荷から負電荷に変化した。PAC を用いて pH6.5 と 7 における荷電中和に必要な凝集剤注入量を求めたところ、*Microcystis* は pH6.5 および 7 の両条件において凝集剤注入量は 5 から 10mg/L 必要であり pH 変化の影響は認められなかったが、*Synechococcus* では pH6.5 において 50 から 60mg/L、pH7 において 100 から 200mg/L と多量の凝集剤注入量が必要であり、pH のわずかな変化に大きな影響を受けることが明らかになった。

また、最適凝集剤注入量における残留濁度は *Microcystis* と比較して *Synechococcus* で著しく高く、荷電中和のために多量の凝集剤注入量を必要とする条件下で再分散が生じている可能性が考えられた。

なお、高塩基度 PAC による凝集に関する既往研究をまとめた結果、ピコ植物プランクトンの処理に有効である可能性が高いことから、H28 年度は高塩基度 PAC および二段凝集によってピコ植物プランクトンを除去することの有効性を検討する。

A. 研究目的

ピコ植物プランクトンは 0.2-2 $\mu$ m のサイズの小さな植物プランクトンで、ピコシアノバクテリアと真核性光合成生物からなる<sup>1)</sup>。ピコ植物プランクトンおよびその代謝物質が原水に存在することで、処理水の濁度上昇、ろ過閉塞、異臭味障害、同化可能有機物(AOC)、消毒副生成物、毒性物質等の様々な問題が発生する<sup>2-8)</sup>。

このようにピコ植物プランクトンによる浄水障害の発生が問題視され、様々な研究がなされてきているが、ピコ植物プランクトンの凝集阻害およびろ過漏出障害に関する研究は進んでおらず、対策技術の開発が求められているとともに、そのための基礎情報の取

集が必要な段階にある。そこで本研究では、ピコ植物プランクトンの発生するような富栄養化水源の原水 pH が高いことに注目し、そのような水質に適すると考えられる新たな凝集剤の凝集特性に関する既往研究の文献調査を行った。また、ピコ植物プランクトンの凝集における pH の影響を明らかにすることを目的として、実験的検討を行なった。

B. 研究方法

1) 文献調査

高塩基性塩化アルミニウム（高塩基度 PAC）に関する既往研究<sup>10-14)</sup> について整理し、植物ピコプランクトンの凝集に応用する場合の研究課題をまとめた。

## 2) ピコ植物プランクトンの凝集実験

本研究ではピコ植物プランクトンとしてシアノバクテリア *Synechococcus* sp. (NIES-1348)を国立環境研究所より入手し、CB培地で水温  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、蛍光灯下 ( $18 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ 、12-h light/12-h dark) で培養した。

200mLの三角フラスコに100mLのCB培地を入れ、90rpm で振とう攪拌を行い、定常期になった培養液を水道水で希釈して  $1.5 \times 10^6$ (個/mL)の濃度に調整し実験に用いた。

また比較のため *Microcystis aeruginosa*(NIES-87)を用いた実験も行った。培養方法は *Synechococcus* sp.と同様であり、 $1.2 \times 10^6$ (個/mL)の濃度に調整し実験に用いた。

凝集剤としてはポリ塩化アルミニウム(PAC)を用いた。

また、ゼータ電位の測定には Micro-Electrophoresis Apparatus Mk II(Rank Brothers, UK)を用いた。室温  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 、80mV の条件で、Smoluchowski 式によって計算してゼータ電位を得た。

ジャーテストは、4枚のパドルスターラー(60mm×30mm)が設置された装置を用いて行なった。HClあるいはNaOHにてpHを所定の濃度に調整した植物プランクトン懸濁液に対して凝集剤を注入し150rpm、3分の急速攪拌、30rpm、30分の緩速攪拌および60分の沈殿を行い、水面から2cm下の澄み液を採取し分析に供した。

## C. 研究結果およびD. 考察

### 1) 文献調査結果および考察

「超高塩基度 PAC のアルミニウム溶解度と pH 管理目標値」(中島ら)

鹿児島県薩摩川内市丸山浄水場では、季節的な要因で原水 pH が上昇することがあり、pH 調整のために凝集剤(PAC)を過剰に注入することで処理水質の安定化を図ってきた。この問題に対応するために、高 pH 原水用に開発された塩基度 70% (通常のパACの塩基度は 50%) の超高塩基度 PAC を平成 26

年 11 月より試験的に使用したところ、通常 PAC の場合、残留アルミニウム濃度水質管理目標値 0.1 mg/L 以下に対する pH 管理目標値は 7.2 以下であったのに対して、高塩基度 PAC の pH 管理目標値は 8.2~8.3 となり、pH 制御を行う必要がないことがわかった。

「高濁度原水の処理不良時における二段凝集処理による濁度およびクリプトスポリジウムの除去効果ならびに感染リスク評価」(島崎ら)

近年の豪雨発生件数の増加により、高濁度原水や有機物濃度上昇の発生頻度が高まり、水道事業体では対応に苦慮しており、導入しやすく効果の高い原水濁度対応技術が必要とされている。このため二段凝集処理、高塩基度 PAC によるクリプトスポリジウム模擬粒子の除去特性を調べたところ、高濁度原水における二段凝集処理の適用により、沈殿不良、凝集不良の発生時ともに砂ろ過水の濁度低減効果が確認され、特に沈殿不良時における清澄化の効果が大きく表れた。しかし、高塩基度 PAC は従来型 PAC と同程度の濁度除去能力を示すものの、クリプトスポリジウムの除去性は優れない可能性が示唆された。

「高塩基度 PAC の運用効果」(青木ら)

福岡県筑後川表流水を主とする原水の処理において、高塩基度 PAC を用いた凝集実験を行った。凝集剤注入率を低減した系においても浄水処理の安全性を図るために設けている企業団水処理指針における水質管理値を満足することができるとともに、薬品注入量については凝集剤のみならず pH 調整剤(硫酸、消石灰)も含めた薬品使用量の低減効果が確認できた。

「高塩基度ポリ塩化アルミニウムの浄水処理への適応性」(長良ら)

明石市の鳥羽浄水場では、ろ過池の洗浄水が混和池に返流されることで原水の水温変動が著しく、原水 pH の変動を自動調整できないことも重なり、凝集処理が悪化する問題が生じている。この鳥羽浄水場の全系統(1系:地下水、2・3系:河川水)で、原水 pH の上昇に伴う凝集不良などの改善を目的と

した高塩基度 PAC の試験を実施したところ、高塩基度 PAC の効果が少ないと想定された冬季にあえて試験を実施したにもかかわらず、フロック形成もよく除濁性、沈降性も向上し、濃縮槽の界面管理も容易になった。また、汚泥濃度も上昇し、汚泥脱水機の運転回数も減少した。さらに長期的に観ると、脱水ケーキ量の削減、電力量の削減、ろ布の交換周期の延長の可能性があることがわかり、高塩基度型 PAC の注入量削減の可能性は原水が河川水の場合に高く、使用コスト削減も可能であることが示唆された。

「ウイルス処理に有効な新規アルミニウム系凝集剤の開発」(白崎ら、北海道大学大学院)

近年の水道水源の富栄養化に伴う pH 上昇により、従来のアルミニウム系凝集剤では最適 pH 条件下(中性付近)での処理が困難な状況が生じてきており、そのような弱アルカリ性の原水においては、ウイルスの処理性も著しく低下することが知られている。また、最適 pH 条件下での処理のために凝集剤の多量注入や酸注入による pH 制御を実施せざるを得ない場合も多く、結果として薬品の大量消費、注入設備の増設、管理の煩雑性、さらには処理水中の残留アルミニウム濃度の増加といった問題が生じている。このような背景に鑑み、高塩基度 PAC によるウイルス処理に関する凝集実験を行い、凝集剤の塩基度および凝集剤中の硫酸はウイルスの処理性に影響し、塩基度が高く硫酸を含まない凝集剤を用いることにより、従来型 PAC に比べて高い除去率が得られることが明らかになった。

以上の通り、高塩基度 PAC を用いた凝集に関する研究は限られているが、高塩基度 PAC の特徴は以下の通りまとめられる。

弱アルカリ域でも使用でき、pH 制御を行う必要が少なく、残留アルミニウム濃度が低減できる。

従来型 PAC と同程度、同等以上の濁度除去能力を示すが、クリプトスポリジウムの除去性は濁度より優れない可能性がある。

薬品注入量については、凝集剤のみならず pH 調整剤も含めた薬品使用量の低減効果がある。

冬季においてもフロック形成が良く、除濁性、沈降性も従来型 PAC よりも向上し、汚泥処理においても負荷の低減効果が期待できる。

ウイルスの処理性に関して、高塩基度 PAC は従来型 PAC に比べて高い除去率が得られる。

しかしながら、植物プランクトンおよびピコ植物プランクトンの凝集処理に高塩基度 PAC を用いた研究は無いことから、今後研究をすすめて凝集特性を明らかにする必要がある。

2) ピコ植物プランクトンの凝集に及ぼす pH の影響

藍藻 *Microcystis* とピコ植物プランクトン *Synechococcus* のゼータ電位と pH の関係を図 1 に示す。

*Synechococcus* は pH2 から 4 の強い酸性領域で約 10 から 20mV の正電荷を有していたが、*Microcystis* はさらに大きな正電荷(約 30 から 40mV)を呈していた。しかし、pH の上昇とともに荷電中和が起これ、*Synechococcus* では pH が 5 と 6 の間で、*Microcystis* では 6 と 7 の間で正電荷から負電荷に変化した。結果として pH7 付近で両者とも負電荷であるものの、*Synechococcus* は pH7 で約-10mV、*Microcystis* は-20mV 以下であり、pH7 付近でのわずかな pH 変化が凝集に大きな影響を及ぼすことが予想された。

このようなピコ植物プランクトンおよび藍藻の特徴をふまえ、通常のパックを用いて pH6.5 と 7 に調整して荷電中和に必要な凝集剤注入量を求めるための実験を行った。その結果は表 1 に示す通り、*Microcystis* は pH6.5 および 7 の両条件において凝集剤注入量は 5 mg/L 必要であり、pH 変化の影響は認められなかったが、*Synechococcus* では pH6.5 において 50 から 60mg/L、pH7 において 100 から 200mg/L と多量の凝集剤注入量を必要とし、それは pH のわずかな変化に

大きな影響を受けることが明らかになった。

このように荷電中和に必要な凝集剤注入量が *Synechococcus* と *Microcystis* で大きく異なる理由の一つとしては、細胞の大きさが関与しているものと考えられる。本実験で用いた *Microcystis* の細胞は球形であり、直径は  $5.5 \mu\text{m}$  程度であった。一方、*Synechococcus* の直径は  $2 \mu\text{m}$  であり、結果として細胞当たりの表面積は 8 倍程度 *Synechococcus* の方が大きい。本実験では、細胞濃度を *Microcystis* は  $1.2 \times 10^6$  (個/mL)、*Synechococcus* は  $1.5 \times 10^6$  (個/mL) と同程度に調整したため、負に帯電する表面積の比はやはり 8 倍程度 *Synechococcus* 懸濁液の方が大きい。このような違いが荷電中和に必要な凝集剤注入量の違いをもたらしたと考えられる。

*Synechococcus* において pH が 6.5 から 7 に変化したときに荷電中和のための凝集剤注入量が倍以上増加する理由についてゼータ電位の変化は見られないことから凝集剤に対する pH の影響ではないかと考えられた。高塩基度 PAC は、弱アルカリ域でも使用でき、アルミニウムイオンの重縮合が進み多核錯体となっているためアルミニウムモノマーイオンより高いプラスの電荷を有し、架橋性も有している。このような特性からウイルスの除去性にも優れていると考えられるが、本研究の対象とするピコ植物プランクトンを藍藻と比較すると、高塩基度の特性はピコ植物プランクトンの凝集に有利な特徴を有していると評価できる。

図 2 には pH 6.5 における *Microcystis* と *Synechococcus* のゼータ電位と残留濁度の関係を示した。凝集性の悪いことで知られている *Microcystis* と比較しても *Synechococcus* の凝集沈殿処理性は悪く、荷電中和領域と言えるゼータ電位の範囲 ( $-5 \sim +5\text{mV}$ ) でも高い残留濁度を示した。この理由としては、荷電中和のために  $50 \sim 100\text{mg/L}$  と多量の凝集剤注入量を必要とする条件下で、再分散が生じている可能性が考えられた。このことについてさらに検討を要

するが、高塩基度 PAC は荷電中和のみならず架橋作用も期待できるため、ピコ植物プランクトンに適用した場合に凝集効果は少なからず期待できるものと考えられる。

#### E. 結論

ピコ植物プランクトン *Synechococcus* の凝集に関する基本的特性に関して、*Microcystis* と比較しながら検討し、PAC より凝集しにくい特性を有すること、このためより多量の凝集剤注入量を必要とすること、その結果再分散が生じている可能性が高いことを明らかにした。また、文献調査から高塩基度 PAC によって凝集効果を高めることが可能と考えることを考察した。

#### G. 研究発表

- 1) 論文発表  
該当なし
- 2) 学会発表  
該当なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

- 1) 特許取得  
該当なし
- 2) 実用新案登録  
該当なし
- 3) その他  
該当なし

#### I. 参考文献

- 1) J.G. Stockner, N.J. Antia, Algal picoplankton from marine and freshwater: A multidisciplinary perspective, Can. J. Fish. Aquat. Sci. 43 (1986) 2472–2503.
- 2) F. Jutter, Physiology and biochemistry of odorous compounds from freshwater cyanobacteria and algae, Water. Sci. Technol. 31(11) (1995) 69–78.

- 3) C.D. Wu, X.J. Xu, J.L. Liang, Q. Wang, Q. Dong, W.L. Liang, Enhanced coagulation for treating slightly polluted algae-containing surface water combining polyaluminum chloride (PACl) with diatomite, *Desalination* 279 (2011) 140–145.
- 4) S.D. Faust, O.M. Aly, *Chemistry of Water Treatment*, Butterworth, 1983, pp. 137–139.
- 5) T. Nakamura, K. Soneda, M. Miyata, K. Takeyasu, Leakage of turbidity to filtrate by picophytoplankton and investigation for measures in water purification plant, *Jpn. J. Water Treat. Biol.* 33(4) (1997) 233–243.
- 6) T. Hoson, K. Soneda, M. Miyata, T. Takeyasu, Occurrence of picophytoplankton in Yodo river basin and its effect on turbidity control in water treatment system, *J. Water Waste* 44(9) (2002) 755–762.
- 7) P. Domingos, T.K. Rubim, R.J.R. Molica, S.M.F.O. Azevedo, W.W. Carmichael, First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a Northeast Brazilian drinking water supply, *Environ. Toxicol.* 14(1) (1998) 31–35.
- 8) W.W. Carmichael, L. RenHui, Cyanobacteria toxins in the Salton Sea, *Aquat. Biosyst.* 2(5) (2006) 5–18.
- 9) J. Shi, Y. Zhang, K. Zou, F. Xiao, Speciation characterization and coagulation of poly-silica-ferric-chloride: The role of hydrolyzed Fe(III) and silica interaction, *J. Environ. Sci.* 23(5) (2011) 749–756.
- 10) 中島浩ほか、超高塩基度 PAC のアルミニウム溶解度と pH 管理目標値、平成 27 年度水道研究発表会講演集、pp.636-637
- 11) 島崎大ほか、高濁度原水の処理不良時における二段凝集処理による濁度およびクリプトスピリジウムの除去効果ならびに感染リスク評価、平成 27 年度水道研究発表会講演集、pp.622-623
- 12) 青木綾佑ほか、高塩基度 PAC の運用効果、平成 27 年度水道研究発表会講演集、pp.302-303
- 13) 長良野柄ほか、高塩基度ポリ塩化アルミニウムの浄水処理への適応性、平成 27 年度水道研究発表会講演集、pp.300-301
- 14) 白崎伸隆ほか、ウイルス処理に有効な新規アルミニウム系凝集剤の開発、土木学会論文集 G(環境)、Vol.68, No.7、2012 年、pp.III\_41-III\_50

#### J. 謝辞

高塩基度 PAC に関する情報をご提供いただきました多木化学株式会社にご心より感謝いたします。

表1 植物プランクトンの荷電中和に必要な凝集剤 (PAC) 注入量

	pH 6.5	pH 7
<i>Microcystis</i>	5-10 mg/L	5-10 mg/L
<i>Synechococcus</i>	50-60 mg/L	100-200 mg/L

注) 初期細胞濃度 (個/mL) : *Microcystis*  $1.2 \times 10^6$ 、*Synechococcus*  $1.5 \times 10^6$

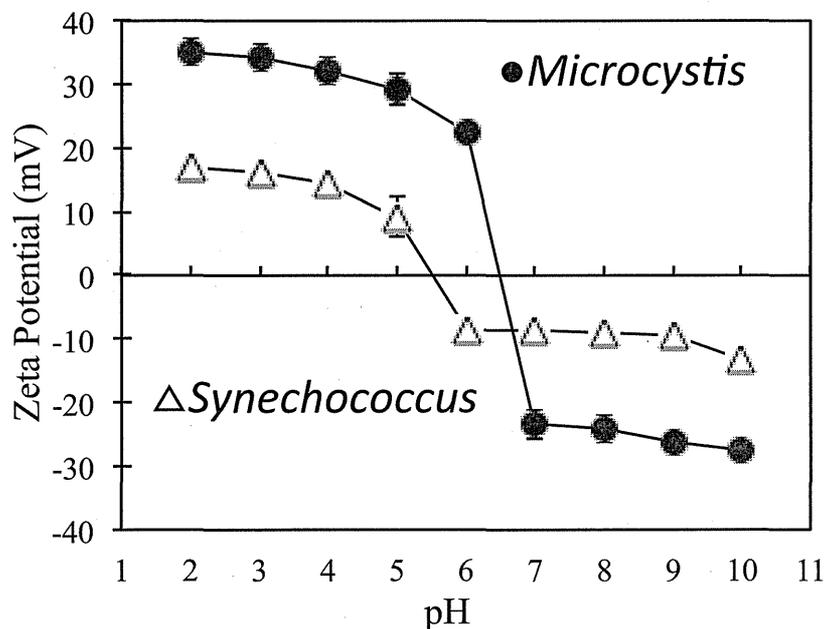


図1 藍藻 *Microcystis* とピコ植物プランクトン *Synechococcus* の pH とゼータ電位の関係

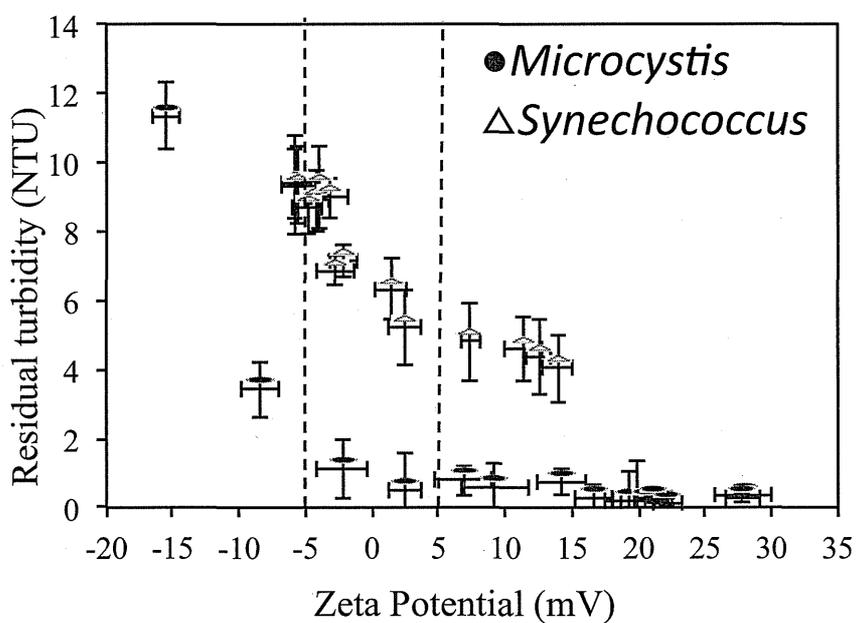


図2 *Microcystis* と *Synechococcus* のゼータ電位と残留濁度の関係 (pH 6.5)

カビ臭発生予測手法の構築

研究代表者	秋葉 道宏
研究分担者	清水 和哉
研究分担者	岸田 直裕

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）  
「大規模災害および気候変動に伴う利水障害に対応した環境調和型水道システムの構築に関する研究」  
分担研究報告書

研究課題：カビ臭発生予測手法の構築

研究代表者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 統括研究官  
研究分担者 清水 和哉 東洋大学生命科学部 講師  
研究分担者 岸田 直裕 国立保健医療科学院 主任研究官

研究要旨

水源におけるカビ臭発生抑制手法の構築を目的として、水源におけるカビ臭発生の状況およびカビ臭物質産生微生物群の定量とカビ臭物質産生活性の定量手法の開発のためにカビ臭物質合成酵素遺伝子の保存性を解析した。その結果、平成 16 年から平成 22 年の期間内における水道水質基準値を超えるカビ臭の検出は、継続的に同水源から検出された。カビ臭物質合成酵素遺伝子に関しては、ジェオスミン合成酵素遺伝子ホモログは、放線菌内において高度に保存されていることが、単離菌の解析により明らかとなった。藍藻類においては、遺伝子塩基配列の相同性を利用することにより「属」毎に分けられることがわかった。従って、ジェオスミン産生微生物個体群数の定量およびジェオスミン合成活性分析において、放線菌と藍藻類を別にして解析できることがわかった。2-MIB 産生関与するゲラニルニリン酸メチルトランスフェラーゼ遺伝子およびモノテルペンシクラーゼ遺伝子について解析した。放線菌および藍藻類の塩基配列登録数が少ないことから、放線菌と藍藻類を分けた解析ができるのかについてはわからないものの、ジェオスミン合成酵素遺伝子ホモログと同様の解析ができることが推測された。

A. 研究目的

我が国の主な上水水源は、表流水であるため気候変動に影響を受けやすく、環境因子の変動や気温上昇に伴う水温の上昇は、水源環境微生物群集構造に影響を与えることが予測される。カビ臭物質は、水道水質を悪化させる生物由来の水汚染物質である。その産生原因生物は、放線菌と藍藻類であるため、環境因子の変動や水源環境微生物群集構造に影響を受けることが考えられる。カビ臭物質が、生物由来水汚染物質であることから、化学物質による水汚染とは異なり、発生および消失の予測や発生抑制制御が困難であった。近年のカビ臭物質産生微生物の分子生物学的知見により、培養や顕微鏡による手法に加えて、カビ臭物質産生微生物群個体数の定量手法（早期検出技術に応用可能）が構築でき

ると考えられる状況となってきた<sup>1),2)</sup>。しかしながら、分子生物学的解析で標的としているカビ臭物質合成酵素遺伝子の保存性に関する知見が少ないのが分子生物学的手法の適用の課題となっている。一方、カビ臭発生対策手法の構築には、どのような環境因子が引き金となってカビ臭物質産生にいたるのかを解明することが必要となる。そのために、カビ臭物質産生に与える環境因子の解析が報告されてきた<sup>3)</sup>。室内実験による環境因子の知見およびカビ臭発生現場における環境因子の知見を総合させた解析は、極めて少ないのが現状である。そのため、どの環境因子をカビ臭発生抑制の指標とできるのかが不明瞭である。

上水源におけるカビ臭発生抑制手法の構築を目的として、本年度は、上水源における

カビ臭発生状況およびカビ臭物質産生微生物群の定量とカビ臭物質産生活性の定量手法の開発のためにカビ臭物質合成酵素遺伝子の保存性を放線菌の単離菌を用いた遺伝子配列解読や遺伝子データベース解析により実施した。

## B. 研究方法

### 1) カビ臭発生状況分析

カビ臭発生現場におけるカビ臭物質産生の引き金に関与する環境因子を同定するために、公益社団法人日本水道協会が発行している「水道統計」<sup>4)10)</sup>を用いて、全国の各水源におけるカビ臭発生状況を分析した。分析方法はカビ臭物質であるジェオスミンと2-メチルイソボルネオール(2-methylisoborneol; 2-MIB)の1年間における検出最高濃度がそれぞれ  $1 \text{ ng/L} \leq N_1 < 5 \text{ ng/L}$ 、 $5 \text{ ng/L} \leq N_2 < 10 \text{ ng/L}$ 、 $10 \text{ ng/L} \leq N_3$ 、それぞれ検出された水源を都道府県別に分析した。そして、各都道府県の全浄水場当たりについて、カビ臭が確認された浄水場の割合を算出した。加えて、カビ臭が発生している水源を解析し、どのような上水源(河川、湖沼、ダム等)で多くカビ臭が発生しているのかを分析した。

### 2) カビ臭物質産生合成酵素遺伝子の多様性

カビ臭物質産生微生物群の定量とカビ臭物質産生活性の定量手法の開発のために、上水源や水域から放線菌を単離した。単離源は、ひょうたん池(群馬県邑楽郡板倉町)、草木ダム、渡良瀬川、思川、手賀沼、信濃川、谷中湖から河川堆積物・底泥・表層水サンプルから得た。それぞれ ISP medium No.4 (ISPM4) を用い単離した。表層水サンプルは、100  $\mu\text{L}$  ずつ ISPM4 寒天培地に塗布した。底泥サンプルは、3日間自然乾燥させた後、30分110°Cで乾熱乾燥させた後に、乾燥重量1gを採取し、滅菌水9mLに懸濁させた。これを原液とし10倍、50倍、100倍希釈し、それぞれ100  $\mu\text{L}$  ずつ ISPM4 寒天培地に塗布した。また乾燥させていない河川堆積物・底泥サン

ル1gを滅菌水9mLに懸濁し、同様に塗布した。植菌した ISPM4 寒天培地は、すべて25°C、遮光で培養した。ISPM4 寒天培地に生育した細菌をさらに3回、ISPM4 寒天培地に塗布し、単離した。単離菌を YMPD 液体培地で十分な生育が得られるまで1日から5日間、25°C、225 rpm で培養した。液体培地で十分に培養した単離菌から全DNAをビーズビーディング法により抽出した。また、グリセロールストックも合わせて作成し、-80°Cに保存した。

全DNAを用いて、16S rRNA 遺伝子(27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')-1492r(5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'))プライマーセット、16S rRNA 遺伝子解析用のユニバーサルプライマーセットである)および *geoA* 遺伝子ホモログ(249F(5'-CTTCTTCGACGACCACTTCC-3')、1860R(5'-CGTACTCGATCTCCTTCTGG-3')、塩基配列データベース上に登録のあったジェオスミン合成酵素遺伝子ホモログの塩基配列より報告者が作成したプライマーセットである)をPCRクローニングし(KOD-Plus-Neo(東洋紡ライフサイエンス))、アガロースゲル電気泳動法を用いたPCR産物の精製後(NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up(MACHERY-NAGEL))、塩基配列解読に供した。得られた塩基配列を用いてblastn解析を行い、16S rRNA 遺伝子配列に基づいた単離菌の同定および *geoA* 遺伝子ホモログの塩基配列を同定した。また、*geoA* 遺伝子ホモログを保存している細菌をblastn検索により調査した。

塩基配列データベース(DDBJ、NCBI、EMBL/EBI)を用いてジェオスミン合成酵素遺伝子(*geoA* 遺伝子ホモログ)および2-MIB合成に関与する重要な遺伝子である<sup>11)</sup>、ゲラニルニリン酸メチルトランスフェラーゼ遺伝子および2-MIB合成酵素遺伝子であるモノテルペンシクラーゼ遺伝子<sup>11)</sup>をデータベースから探索し、保存性の解析を行った。

## C. 研究結果およびD. 考察

## 1) カビ臭発生の状況分析

全国的に様々な水源でカビ臭発生が確認されているが(図1-図10)、河川や湖沼、貯水池での発生が多かった。濃度に依らない頻度および水道水質基準値 10 ng/L を超える頻度のどちらにおいても、河川が多数を占めた。発生したカビ臭物質濃度の最高値は、湖沼やダム、貯水池が示した。分析した平成16年から平成22年までのカビ臭発生水源において、ほぼ同水源から継続的にカビ臭物質が検出されていた。しかしながら、平成25年以降、これまでにカビ臭発生が観測されていなかった水源の発生報告があり、気候変動等による環境因子の変動が、カビ臭物質産生微生物に影響を与え、カビ臭発生に至っていることが予測された。

平成16年から平成22年において、5 ng/L未満のカビ臭発生においては、2-MIBの検出数が、ジェオスミンよりも多いものの、5 ng/L以上10 ng/L未満においては、ジェオスミンの検出数が多かった。10 ng/L以上では、ジェオスミンの検出数が多い傾向にあったが、2-MIBの検出数が多い年もあった(図11)。カビ臭物質が、水道水質基準値の10 ng/L以上の発生がない水源は、秋田県、富山県、石川県、山梨県、岐阜県、静岡県、愛知県、鳥取県、高知県、熊本県、宮崎県、鹿児島県であった。カビ臭物質濃度が、5 ng/L未満の発生があった水源が多く確認され、山口県の水源が最多検出された。水道水質基準値を超えるカビ臭物質は、ジェオスミンと2-MIBの両方が各都道府県において確認されたが、ジェオスミンのみ(京都府(湖沼)、和歌山県(河川))や2-MIBのみ(北海道(河川)、奈良県(河川)、徳島県(河川))もあった。高濃度カビ臭物質発生は、湖沼やダム等の滞留時間が長い水源であった。近年、河床における付着性藍藻類や定着性藍藻類が、カビ臭発生に寄与していると考えられている。そのため、湖沼やダム等のみならず、河床における藍藻類のカビ臭物質産生の引き金に関与する環境因子の同定が必要である。しかしながら、本年度は、カビ臭物質産生の引き金に

係わる環境因子のカビ臭発生現場と室内実験結果を総合した環境因子同定に至らなかった。来年度以降に、「水道統計」等の水質データベースおよび室内実験から同定し、各水源に適用可能なカビ臭発生抑制対策手法を構築する。

以上から、従来から実施されてきた湖沼やダム等におけるカビ臭発生対策のみならず、持続可能な水道システムの利用のためには、今後、河川における有効な対策を講じる必要があることが確認された。

## 2) カビ臭物質産生合成酵素遺伝子の多様性

採取したサンプルから39株を単離した。現在までに16S rRNA 遺伝子の塩基配列解読を終えた23株をblastn解析に供した結果、15株が、カビ臭物質産生の報告例が多い*Streptomyces*属であった。これら*Streptomyces*属と同定された15株から*geoA*遺伝子ホモログをPCRクローニング後の塩基配列解読により同定した。遺伝子データベース上(DDBJ、NCBI、EMBL/EBI)の*geoA*遺伝子ホモログを保持している主な放線菌は、*Streptomyces*属であった。その他の放線菌でデータベース上に登録されていたのは、*Kitasatospora*属、*Frankia*属、*Kribbella*属等があった。以上から、*Streptomyces*属以外にも多くの放線菌に保存されていることがわかった。ジェオスミン産生藍藻類に関しては、異なる「属」間においては、*geoA*遺伝子ホモログのアミノ酸配列の相同性は高いものの遺伝子塩基配列の相同性が、低い領域があることがわかった。そのため藍藻類においては、遺伝子塩基配列の相同性を利用することにより「属」毎に分けられることがわかった。以上から、放線菌については、*geoA*遺伝子ホモログを標的とした共通配列を用いた分子生物学的手法により、ジェオスミン産生放線菌個体群数を推量でき、藍藻類においては、各「属」におけるジェオスミン産生藍藻類個体群数を推量できることが推測できた。

一方、2-MIB合成に関与する酵素に関して、アミノ酸配列の相同性は、放線菌および藍藻

類のどちらも高いことが報告されていた<sup>12)</sup>。また、遺伝子データベース解析から、放線菌の *geoA* 遺伝子ホモログよりも、藍藻類における遺伝子塩基配列の相同性が高いことが確認された。しかしながら、藍藻類の遺伝子登録数は極めて少ないため、*geoA* 遺伝子ホモログと同様に高度に保存されているのかは、決定的ではない。これまでに、2-MIB 産生藍藻類 *Pseudanabaena limnetica* (Castaic Lake) の全ゲノム解析が一例のみ報告されている<sup>12)</sup>。しかし、ゲノム情報は、未だ遺伝子データベースに登録されていない。そのため、どのような分子生物学的な経路によってカビ臭物質産生の引き金が稼働するのか、反対に、カビ臭物質産生抑制の引き金が稼働するのか、の詳細な解析が実施できない状況にある。一方、放線菌においては、ゲノム情報が多数報告されており、とくにカビ臭物質産生の引き金に関与する分子生物学的な経路の解析が進みつつある。放線菌の多くは、ジェオスミンと 2-MIB のどちらも産生できる<sup>12)</sup>。しかし、藍藻類の多くは、ジェオスミンもしくは 2-MIB のどちらかのみしか産生することができない。水道水質基準値を超えるカビ臭発生を予測するとともに、基準値を超えるカビ臭の発生後、基準値を下回るのがいつになるのかといったカビ臭消失の予測、発生予測・消失予測のどちらも可能な早期検出技術開発およびカビ臭発生抑制技術の構築のために、ジェオスミン産生藍藻類および 2-MIB 産生藍藻類のゲノム解析を実施することが必要である。

放線菌由来のカビ臭物質がどの程度かび臭被害に寄与しているのかは、明らかにされていないが、例えば、放線菌の *geoA* 遺伝子ホモログの発現量と藍藻類の *geoA* 遺伝子ホモログの発現量を比較解析することで、カビ臭発生の主要原因生物を特定でき、原因生物それぞれのカビ臭発生の寄与度を明らかにできると考えられる。

以上から、分子生物学的手法を用いてカビ臭発生予測・消失予測手法を構築できることが見いだされた。来年度以降は、分子生物学的

手法も織り交ぜ、カビ臭発生抑制手法の検討を継続して実施する。

## E. 結論

水道水質基準値を超える水源の多くが、河川であったが、カビ臭発生源は上流であると考えられることも多かった。多くのカビ臭発生は、ジェオスミンおよび 2-MIB の両方によるものであったが、水源によっては、それらどちらかのみ事例もあった。

カビ臭物質合成酵素遺伝子群が、放線菌および藍藻類のそれぞれに保存されていることを明らかにした。カビ臭産生微生物個体群数の増加とカビ臭物質濃度の間には正の相関関係がわかっているため、分子生物学的手法を用いてカビ臭物質産生微生物群個体数を推量することにより、カビ臭物質産生予測手法・消失予測手法を構築できることが期待される。

## G. 研究発表

1) 論文発表  
該当なし

2) 学会発表

(1) 加村瑞希、遠藤雅也、篠原健吾、内海真生、岸田直裕、秋葉道宏、清水和哉. 第 51 回日本水環境学会年会；2016 年 3 月；徳島. 要旨集 (印刷中).

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

1) 特許取得  
該当なし

2) 実用新案登録  
該当なし

3) その他  
該当なし

## I. 参考文献

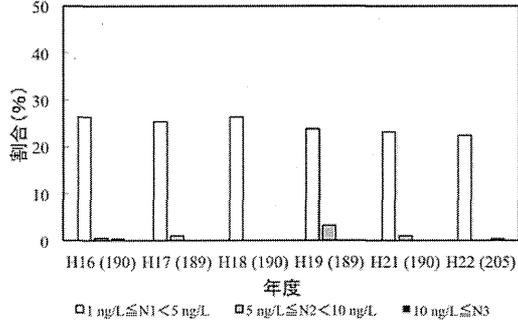
1) Auffret M., Pilote A., Proulx É., Proulx D.,

- Vandenberg G., and Villemur R. (2011) Establishment of a real-time PCR method for quantification of geosmin-producing *Streptomyces* spp. in recirculating aquaculture systems. *Water Research* **45**(20), pp.6753-6762.
- 2) Su M., Gaget V., Giglio S., Burch M., An W., and Yang M. (2013) Establishment of quantitative PCR methods for the quantification of geosmin-producing potential and *Anabaena* sp. in freshwater systems. *Water Research* **47**(10), pp. 3444-3454.
  - 3) Wang Z. and Li R. (2015) Effect of light and temperature on the odor production of 2-methylisoborneol-producing *Pseudanabaena* sp. and geosmin-producing *Anabaena ucrainica* (cyanobacteria). *Biochemical Systematics and Ecology* **58**, pp. 219-226.
  - 4) 日本水道協会 (2004) 平成 16 年度水道統計. 日本水道協会, 東京.
  - 5) 日本水道協会 (2005) 平成 17 年度水道統計. 日本水道協会, 東京.
  - 6) 日本水道協会 (2006) 平成 18 年度水道統計. 日本水道協会, 東京.
  - 7) 日本水道協会 (2007) 平成 19 年度水道統計. 日本水道協会, 東京.
  - 8) 日本水道協会 (2008) 平成 20 年度水道統計. 日本水道協会, 東京.
  - 9) 日本水道協会 (2009) 平成 21 年度水道統計. 日本水道協会, 東京.
  - 10) 日本水道協会 (2010) 平成 22 年度水道統計. 日本水道協会, 東京.
  - 11) Komatu M., Tsuda M., Omura S., Oikawa H., and Ikeda H. (2008) Identification and functional analysis of genes controlling biosynthesis of 2-methylisoborneol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**(21), pp. 7422-7427.
  - 12) Giglio S., Chou W.K.W., Ikeda H., Cane E.D., and Monis T.P. (2011) Biosynthesis of 2-Methylisoborneol in Cyanobacteria. *Environmental Science & Technology* **45**(3), pp. 992-998.

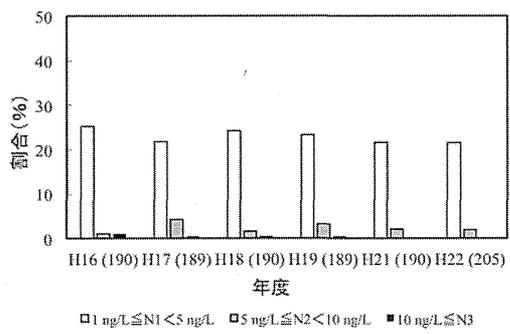
J. 謝辞

神奈川県企業庁北村壽朗氏、川崎市上下水道局藤瀬大輝氏、千葉県水道局田中宏憲氏、千葉県福増浄水場宮崎啓彰氏に感謝いたします。

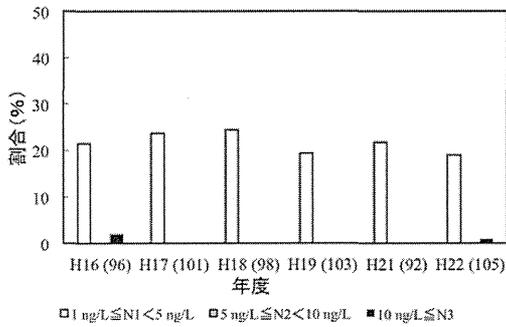
北海道 MIB



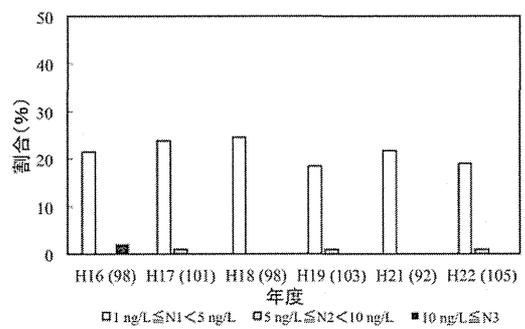
北海道 ジェオスミン



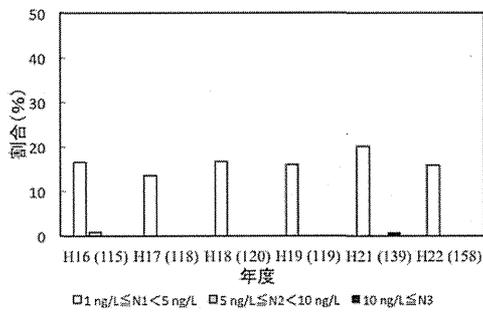
青森県 MIB



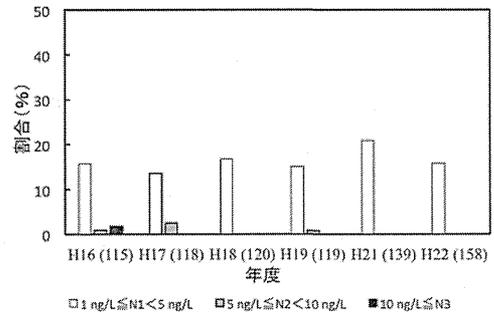
青森県 ジェオスミン



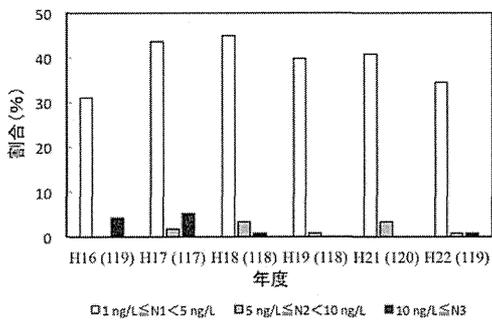
岩手県 MIB



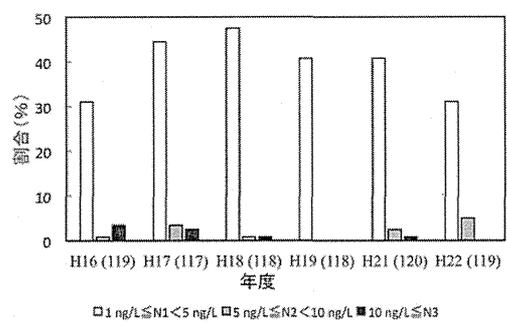
岩手県 ジェオスミン



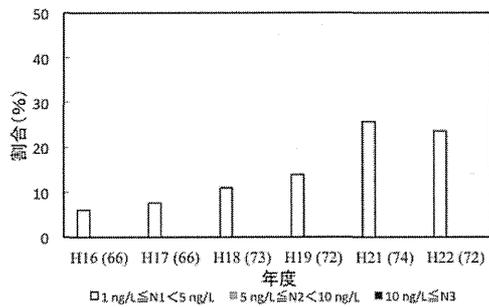
宮城県 MIB



宮城県 ジェオスミン



秋田県 MIB



秋田県 ジェオスミン

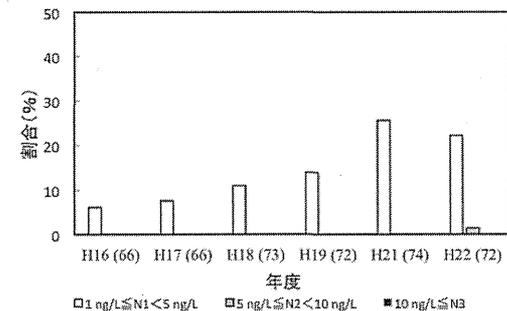


図1 水源におけるカビ臭発生状況 (北海道、青森県、岩手県、宮城県、秋田県)

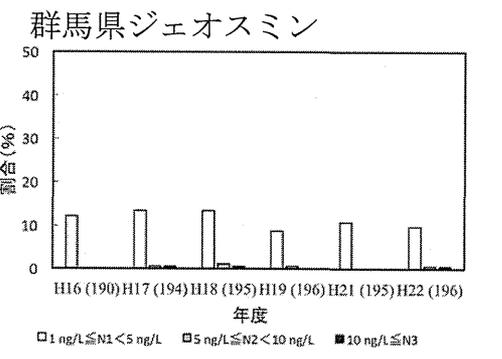
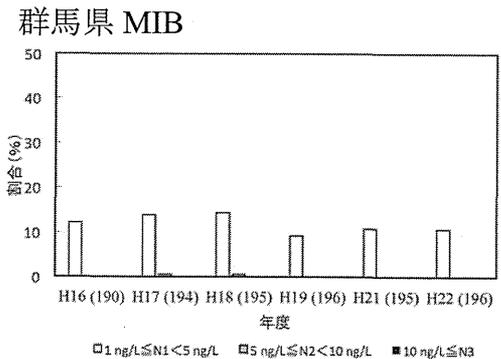
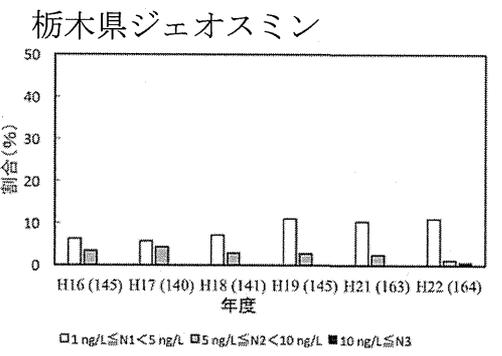
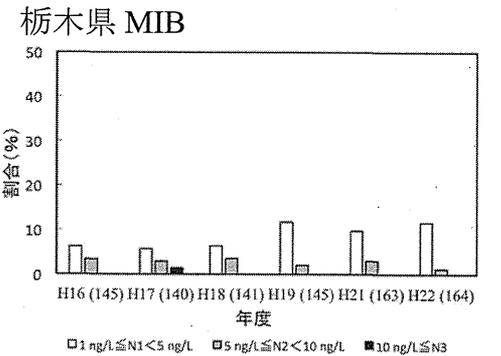
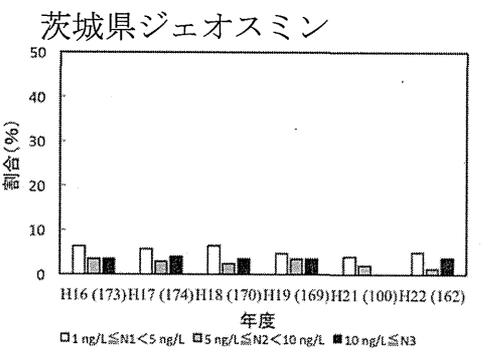
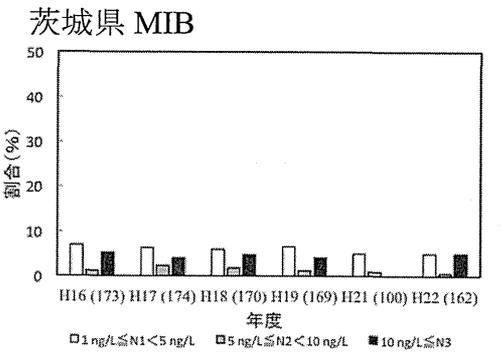
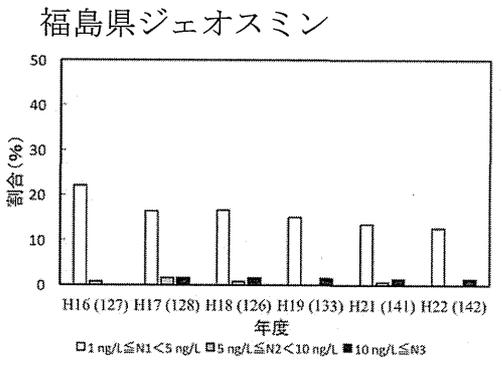
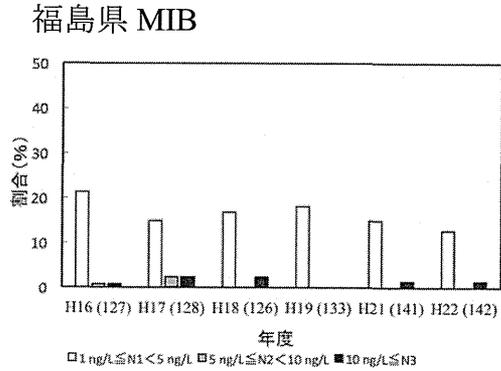
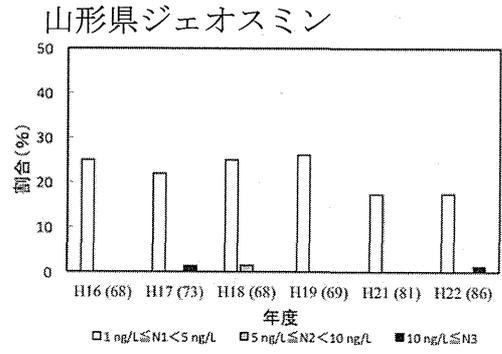
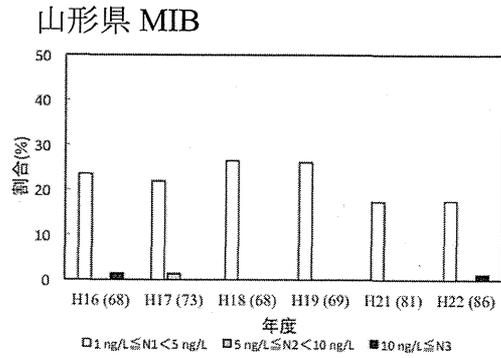


図2 水源におけるカビ臭発生状況 (山形県、福島県、茨城県、栃木県、群馬県)