

研究課題：秋季循環形成後の芹川ダムにおける 2-メチルイソボルネオール（2-MIB）の低減についての評価

研究代表者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 統括研究官

研究協力者 高橋 威一郎 大分市水道局管理部浄水課水質管理室 主査

研究要旨

大分市の水道水源上流域に位置する芹川ダムでは、平成 26 年秋季に *Pseudanabaena* 属が突発的に増殖し、2-メチルイソボルネオール(2-MIB)が高濃度化した。しかし、ダム湖での秋季循環形成後の同年 11 月中旬以降、急激な濃度低減が認められた。平成 27 年秋季の同ダムでは、2-MIB は高濃度化しなかったが、秋季循環後のダム湖水に 2-MIB を添加したところ濃度低減が認められた。2 ヶ年に亘り確認されたダム湖水の 2-MIB 濃度低減能を評価した結果、秋季循環の影響でダム底層部から全層へと拡散された微生物による 2-MIB 分解が関与する可能性が示唆された。また、秋季循環前後のダム湖水を対象として次世代シーケンサーによる微生物群集構造解析を行ったところ、2-MIB 濃度低減能が認められた秋季循環後の検液では、低減能が認められなかった秋季循環前の検液に比べ、Actinobacteria 門 *Ilumatobacter* 属の構成割合が大きかったことから、本属が 2-MIB 分解に寄与する可能性が示唆された。

A.研究目的

平成 26 年 10 月、大分県の芹川ダムにおいて、*Pseudanabaena limnetica* 及び *Pseudanabaena galeata* が急激に増殖し、ダム湖水の 2-MIB が高濃度となる事象が発生した。芹川ダムでの 2-MIB 濃度は、翌 11 月中旬には最高で約 1,000ng/L に到達し、この影響により、本ダムの下流に位置する当市浄水場水系の給水栓において深刻なかび臭障害が発生した¹⁾。一方、同年 11 月中旬以降、芹川ダムでの 2-MIB 濃度は急激に低減し、またその時期はダム湖での秋季循環の開始と重なっていた。この 2-MIB 濃度低減期間に、台風等による出水や堰堤洪水吐ゲートからの放流等に伴う、大規模な貯水量増減はなかったことから、秋季循環が 2-MIB 濃度低減に関与すると推察された。

水道水源となるダムや湖沼、河川等で、かび臭

物質を産生する浮遊型または付着型の藍藻が増殖したことに起因して水道水にかび臭が着臭し、大規模な異臭味障害となる事例が全国各地で発生し、報告されている²⁾。しかしその一方、ダムや湖沼等で高濃度化したかび臭物質が低減化した要因に関する既往知見は少ない。そこで本研究では、芹川ダムでの秋季循環と 2-MIB 濃度低減の関連について検証することを目的として、秋季循環前後の芹川ダム湖水を対象とした評価を行った。

B.研究方法

(1) 秋季循環前後の芹川ダム湖水による 2-MIB 濃度推移評価

試料採取は平成 27 年 11 月 5 日及び同年 11 月 25 日に行い、芹川ダム堰堤付近の水深 0.5m 及び湖底直上 1m(B+1m:約 13m)にて採取した、計 4 種のダ

ム湖水を試料とした。各試料につき「① 無処理水」「② 孔径 5 μ m のポリカーボネートフィルター (TNTPO4700, Merck Millipore 社)にて吸引る過後のろ液」「③ ①の高圧蒸気滅菌水」「④ ②の高圧蒸気滅菌水」の各調製をし、各液にて市販 2-MIB 標準液(和光純薬工業社)を希釈し、それぞれ 200ng/L とした(表 1)。以上計 16 種の検液を約 2 週間 20 $^{\circ}$ C 恒温保存し、継時的に 2-MIB 濃度を測定した。

表 1 秋季循環前後別評価検液調製一覧

検液 番号	試料		2-MIB 調製濃度
	採水日	水深 調製方法	
1		無処理	200ng/L
2		ろ過	200ng/L
3	H27.11.5	0.5m 無処理+滅菌	200ng/L
4		ろ過+滅菌	200ng/L
5	秋季循環 開始前	無処理	200ng/L
6		ろ過	200ng/L
7	B+1m	無処理+滅菌	200ng/L
8		ろ過+滅菌	200ng/L
9		無処理	200ng/L
10		ろ過	200ng/L
11	H27.11.25	0.5m 無処理+滅菌	200ng/L
12		ろ過+滅菌	200ng/L
13	秋季循環 開始後	無処理	200ng/L
14		ろ過	200ng/L
15	B+1m	無処理+滅菌	200ng/L
16		ろ過+滅菌	200ng/L

(2) 市販 2-MIB 及び生物産生型 2-MIB の濃度推移評価

生物産生型 2-MIB は、当市で CT 培地にて培養中の *Pseudanabaena galeata* (2016, Serikawa Dam Reservoir, Accession No. LC085885) 培養株試験管を 15 分超音波処理したのち、予め 50% エタノールにて通液洗浄しておいた孔径 0.20 μ m のシリンジフィルター(DISMIC 25CS020AN, ADVANTEC 社)にて培養液を 5mL ろ過することにより調製した。平成 27 年 11 月 25 日に採取した水深 0.5m の試料にて、市販 2-MIB 及び生物産生型 2-MIB を希釈し、それぞれ 200ng/L とした。また超純水にて生物産生型 2-MIB を希釈し 200ng/L とした後に 2 つに分

け、一方には生物の不活化を目的として次亜塩素酸ナトリウムを添加し残留塩素濃度 1mg/L に調製し、これらの 2 種を対照系とした(表 2)。以上計 4 種の検液を 20 日間 20 $^{\circ}$ C 恒温保存し、継時的に 2-MIB 濃度を測定した。

表 2 2-MIB 種類別評価検液調製一覧

検液 番号	試料	2-MIB		NaClO
		種別	調製濃度	調製濃度
1	H27.11.25	市販	200ng/L	—
2	水深0.5m	生物産生型	200ng/L	—
3	超純水 (対照)	生物産生型	200ng/L	—
4		生物産生型	200ng/L	1mg/L

(3) 微生物群集構造解析による 2-MIB 分解生物の評価

微生物群集構造解析は、次世代シーケンサーによる 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析により行った。試料は、平成 26 年及び平成 27 年の 2 カ年に亘り、芹川ダム堰堤付近水深 0.5m より採取したダム湖水と(表 3)、B. (1)で示した 2-MIB 濃度推移評価に用いた、評価後の検液の一部とした(表 4)。

表 3 ダム湖水供試検液調製一覧

検液 番号	試料			
	採水日	秋季循環	水深	調製方法
1	H26.11.4	開始前	0.5m	無調整
2	H26.11.23	開始後	0.5m	無調整
3	H27.11.5	開始前	0.5m	無調整
4	H27.11.25	開始後	0.5m	無調整

表 4 2-MIB 濃度推移評価後の供試検液一覧

検液 番号	試料			
	採水日	秋季循環	水深	調製方法
1	H27.11.5	開始前	0.5m	ろ過
2			B+1m	ろ過
3	H27.11.25	開始後	0.5m	ろ過
4			B+1m	ろ過

DNA 抽出は、ISOIL for Beads Beating(ニッポンジーン社)を用いて行い、Nishijima ら³⁾及び Takahashi ら⁴⁾の方法に基づき 16S rRNA 領域にお

いて PCR を行い、約 430 塩基対の DNA 断片を得た。PCR 増幅でのプライマーは、341F⁵⁾(Forward primer)及び 806R⁶⁾(Reverse primer)を採用した。PCR 反応では、98°Cで 2 分間の初期変性に続いて、98°Cで 10 秒間の変性、65°Cで 15 秒間のアニーリング、68°Cで 30 秒間の伸長を 1 サイクルとし、1 サイクル毎にアニーリング温度を 1°C下げるタッチダウンを 10 サイクル行い、次に変性及び伸長の条件は同一のままアニーリング温度を 55°C一定として 25 サイクルを行った。Polymerase は MightyAmp DNA Polymerase Ver.2(タカラバイオ社)、buffer 及び dNTP Mixture は MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 に付属のものを使用した。PCR 産物を MultiScreen PCRu96 filter plate(Merck Millipore 社)を用いて精製し、MiSeq(Illumina 社)により次世代シーケンス解析を行い、Ribosomal Database Project(RDP)によるデータベース検索により解析を行った。

C.研究結果および D.考察

(1) 秋季循環前後の芹川ダム湖水による 2-MIB 濃度推移評価

平成 27 年 11 月 5 日の芹川ダムは、水深 0.5m と B+1m とで水温差が 1.0°Cであり、秋季循環前と推察された。またいずれの試料も採取時の 2-MIB 濃度は 2ng/L 以下であった。両試料に 4 種の調製をした後、各調製液にて 2-MIB を希釈した、計 8 種の検液での 2-MIB 濃度推移評価の結果、いずれも有意の低減は認められなかった(図 1)。このことから、秋季循環前のダム湖水では、2-MIB 低減機構は発現していないと推察された。

平成 27 年 11 月 25 日の芹川ダムは、水深 0.5m と B+1m の水温差が 0.4°Cであり、秋季循環後と推察された。またいずれの試料も採取時の 2-MIB 濃度は 1ng/L 以下であった。両試料に 4 種の調製をした後、各調製液にて 2-MIB を希釈した、計 8 種の検液での 2-MIB 濃度推移評価の結果、水深及びろ過の有無にかかわらず、未滅菌の検液において、12 日間で 50%程度の 2-MIB 濃度低減が認められ

た(図 2)。このことから、秋季循環後のダム湖水では 2-MIB 濃度低減機構が湖内全層的に発現し、この機構には、高圧蒸気滅菌で失活する 5 μ m 以下の因子が関与することが明らかとなった。

先行研究では、かび臭物質を分解する微生物についての報告⁷⁾もあることから、この 2-MIB 濃度低減には微生物による生物分解が関与し、芹川ダムの秋季循環によって微生物が底層部から巻き上げられ、湖内に拡散することにより、全層的に 2-MIB 分解能を有するようになるかと推察された。

(2) 市販 2-MIB 及び生物産生型 2-MIB の濃度推移評価

本研究における C.(1)により 2-MIB 濃度低減能が認められた平成 27 年 11 月 25 日のダム湖水にて、市販 2-MIB 及び生物産生型 2-MIB を希釈した、2 種の検液での 2-MIB 濃度推移評価を行った。その結果、生物産生型 2-MIB を用いた調製検液は市販 2-MIB を用いた調製検液よりも大きい濃度低減速度が認められた。一方、対照系の 2 種の検液での 2-MIB 濃度推移評価の結果でも、当初調製濃度から約 25%の低減が認められた。次亜塩素酸ナトリウムの有無による 2-MIB 濃度低減速度の差は認められないことから、この低減に対する、生物による 2-MIB 分解の関与は低いと推察された。我々は先行研究の中で、超純水に市販 2-MIB を添加した場合は有意の濃度低減がなかったことを認めている⁸⁾。これらのことから、対照系では、生物産生型 2-MIB の自己分解等による濃度低減が生じたものと推察された。この対照系の 2-MIB 濃度低減結果を考慮しても、本実験系での生物産生型 2-MIB の濃度低減速度は市販 2-MIB よりも大きく、両者の 2-MIB 構造の違いが、生物分解の進行に影響していると推察された。

(3) 微生物群集構造解析による 2-MIB 分解生物の評価

先行研究⁸⁾及び本研究における C.(1)において、平成 26 年及び平成 27 年の秋季循環後の芹川ダム湖水には 2-MIB 濃度低減能が認められたことから、

2-MIB 分解に寄与する微生物群は、秋季循環後に増加すると推察された。したがって、秋季循環前後のダム湖水中の微生物群集構造解析を行い、秋季循環後に構成割合が増加した微生物群に着目することとした。

まず、平成 26 年及び平成 27 年の秋季循環前後の芹川ダム湖水における微生物群を比較することにより、2-MIB 分解に寄与する微生物を検証した。門レベルの解析の結果、秋季循環後の増加は、平成 26 年は 1 つの門で認められ、平成 27 年は 3 つの門で認められた。2 ヶ年に亘り共通して増加した微生物門は、唯一 Actinobacteria 門のみであった(図 4)。秋季循環後のダム湖水中におけるこの門の微生物が、2-MIB 分解に寄与する可能性を想定し、属のレベルまで解析を行った。解析の結果、平成 26 年及び平成 27 年の秋季循環後では、2 ヶ年共、*Ilumatobacter* 属が多くを占めていた(図 5)。

次に、2-MIB 濃度推移評価後の検液のうち、秋季循環前の試料をろ過して調製した検液 2 種と、秋季循環後の試料をろ過して調製した検液 2 種における微生物群を比較することにより、2-MIB 分解に寄与する微生物群を検証した。門レベルの解析の結果、全ての検液において、Proteobacteria 門が多くを占めていた。この門について綱のレベルの解析をしたところ、2-MIB 濃度低減が認められた秋季循環後の 2 種の検液で、共通して特徴的に増加した微生物群は本綱中には見出されず、本評価での 2-MIB 分解には関与していないものと推察された。一方、門レベル解析におけるその他の特徴的な推移としては、Actinobacteria 門の構成割合の増加が認められた(図 6)。濃度低減が認められた検液中におけるこの門の微生物が、2-MIB 分解に寄与する可能性を想定し、属のレベルまで解析を行った。解析の結果、2-MIB 濃度低減検液 2 種では、いずれも *Ilumatobacter* 属が多くを占めていた(図 7)。

以上の微生物群集構造解析により、2-MIB 濃度低減能が認められた各種検液では Actinobacteria 門

Ilumatobacter 属の構成割合が大きいという共通の結果が得られたことから、本属が 2-MIB 分解に寄与する可能性が示唆された。

E. 結論

2-MIB 濃度推移評価により、秋季循環形成後の芹川ダムでは、微生物による 2-MIB 分解が発現し、濃度低減に寄与することが示唆された。またこの生物分解は、化学合成された市販 2-MIB よりも、自然界に存在する生物産生型 2-MIB に対して、速度が大きいことが示唆された。2-MIB 濃度低減能が認められた検液と認められなかった検液とを対象とした、次世代シーケンサーによる微生物群集構造解析に基づく比較により、2-MIB 濃度低減能が認められた各種検液では Actinobacteria 門 *Ilumatobacter* 属の構成割合が共通して大きいという結果が得られたことから、本属が 2-MIB 分解に寄与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- (1) 高橋威一郎, 高瀬勝教, 廣川諒, 河野博幸, 馬見塚守, 岐津英明. 秋季循環形成後の芹川ダムにおける 2-メチルイソボルネオール の低減についての評価. 平成 28 年度全国会議(水道研究発表会); 2016 年 11 月, 京都市, 同講演集 pp. 788-789.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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) 竹下佳代子, 高橋威一郎, 高瀬勝教, 日名子栄人, 馬見塚守, 岐津英明. (2015). 平成 26 年度に大分川水系において発生した臭気障害の対応. 第 66 回全国水道研究発表会講演集, 日本水道協会, 148-149, 東京.
- 2) 厚生労働省, 水質汚染事故等の発生状況: URL. <http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/topics/bukyoku/kenkou/suido/kikikanri/03.html> (2017)
- 3) Nishijima, M., Lindsay, D. J., Hata, J., Nakamura, A., Kasai, H., Ise, Y., Fisher, C. R., Fujiwara, Y., Kawato, M. and Maruyama, T. (2010). Association of thioautotrophic bacteria with deep-sea sponges. *Marine biotechnology*, 12(3), 253–260.
- 4) Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., and Nishijima, M. (2014). Development of a

prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of bacteria and archaea using next-generation sequencing. *PloS one*, 9(8), e105592.

5) Muyzer, G., De Waal, E. C., and Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 59(3), 695-700.

6) Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N. and Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4516-4522.

7) Ho, L., Hoefel, D., Bock, F., Saint, C. P., and Newcombe, G. (2007). Biodegradation rates of 2-methylisoborneol (MIB) and geosmin through sand filters and in bioreactors. *Chemosphere*, 66(11), 2210-2218.

8) 高橋威一郎, 高瀬勝教, 竹下佳代子, 河野博幸, 馬見塚守, 岐津英明. (2016). 芹川ダムにおけるかび臭物質産生藍藻及び 2-メチルイソボルネオールの推移についての評価. *水環境学会誌*, 39(2), 51-62.

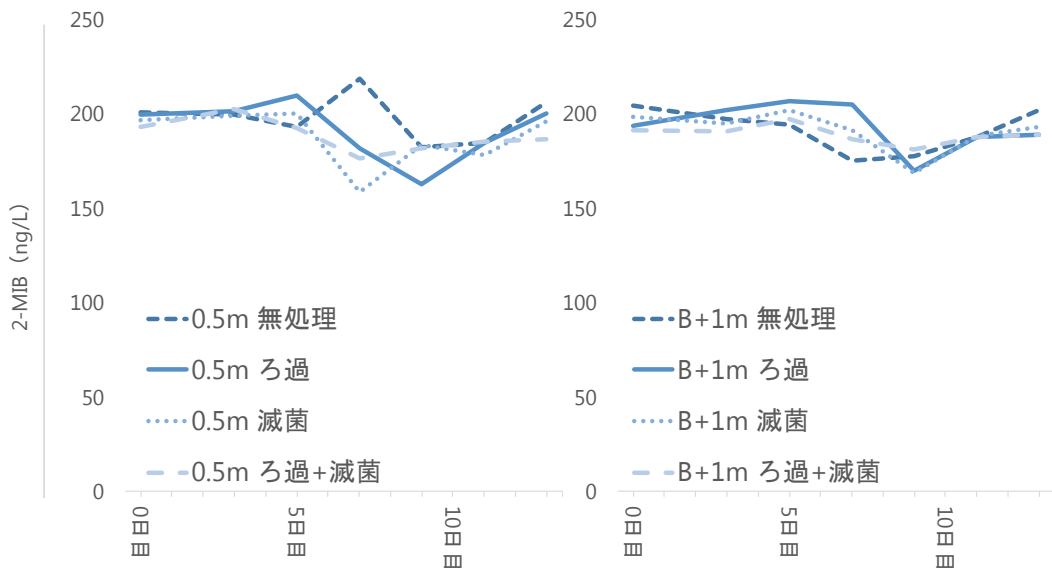


図1 秋季循環前検液での2-MIB濃度の推移

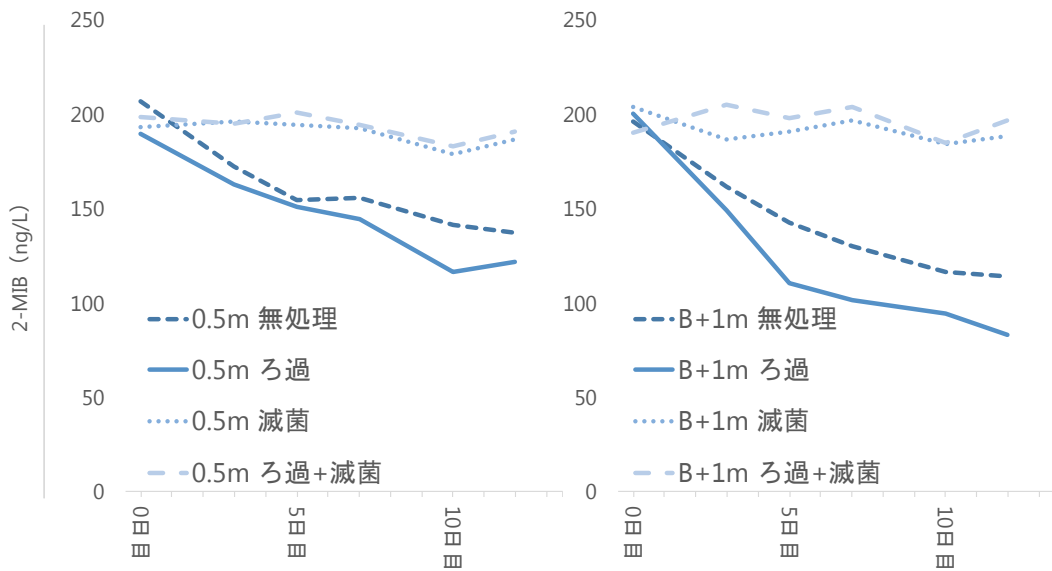


図2 秋季循環後検液での2-MIB濃度の推移

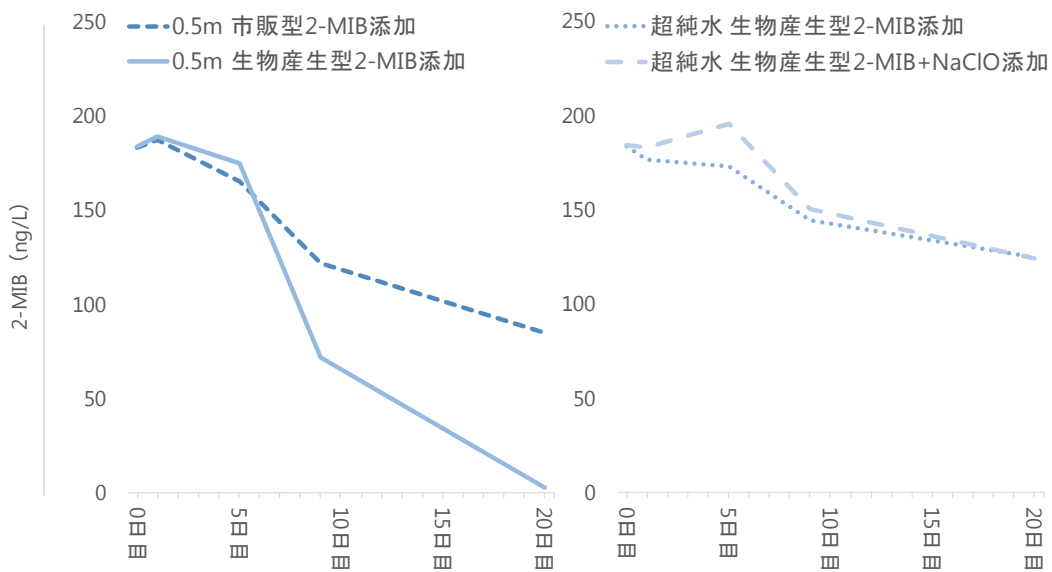


図3 循環後検液での2-MIB濃度の推移

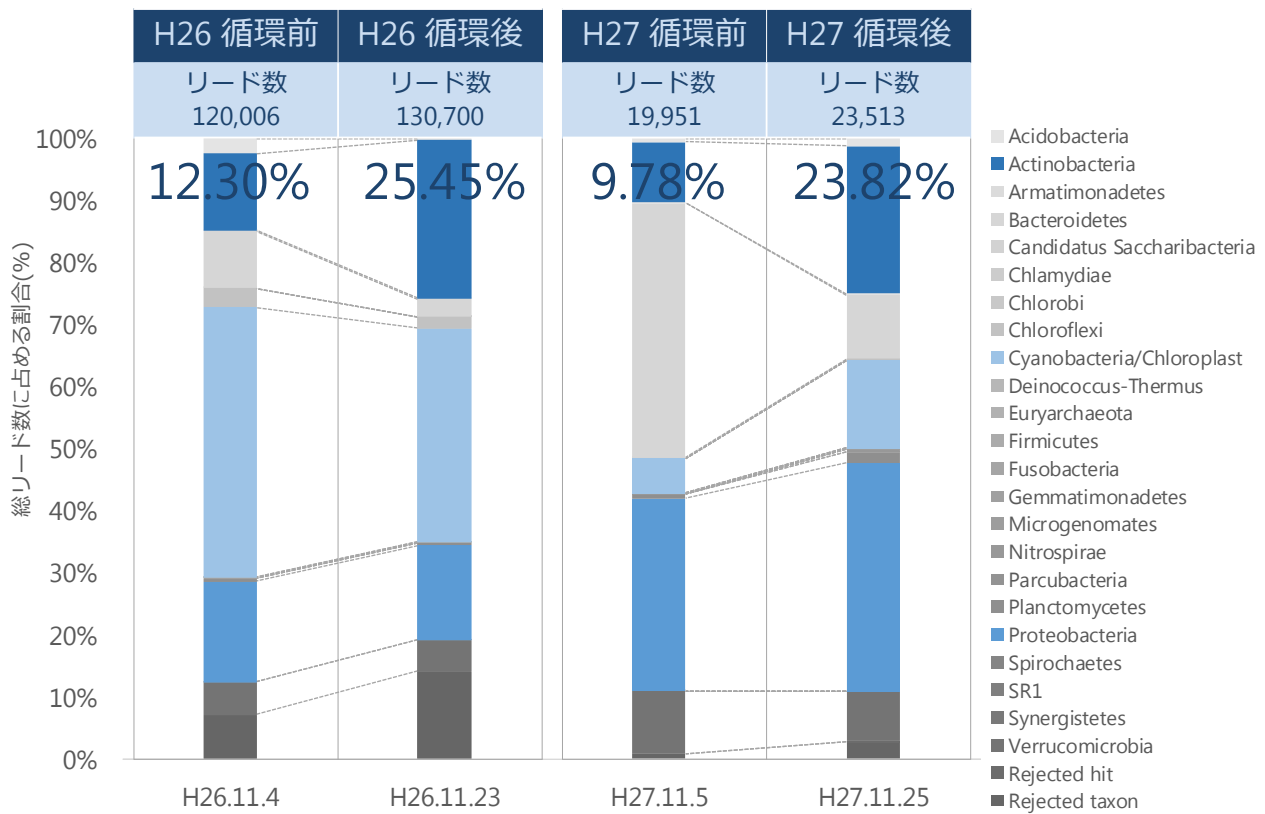


図4 秋季循環前後のダム湖水を対象とした微生物群集構造解析結果比較

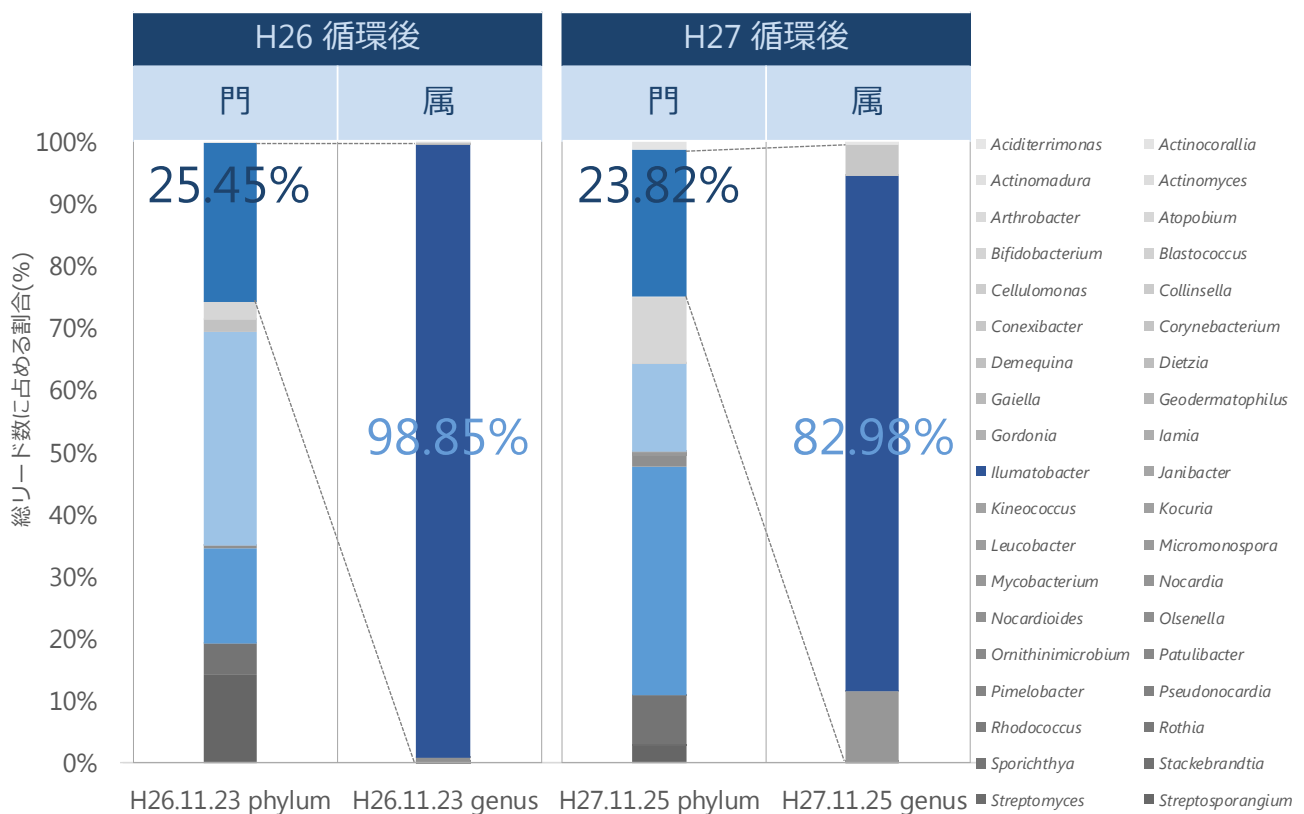


図5 秋季循環後のダム湖水中における Actinobacteria 門の属レベル解析

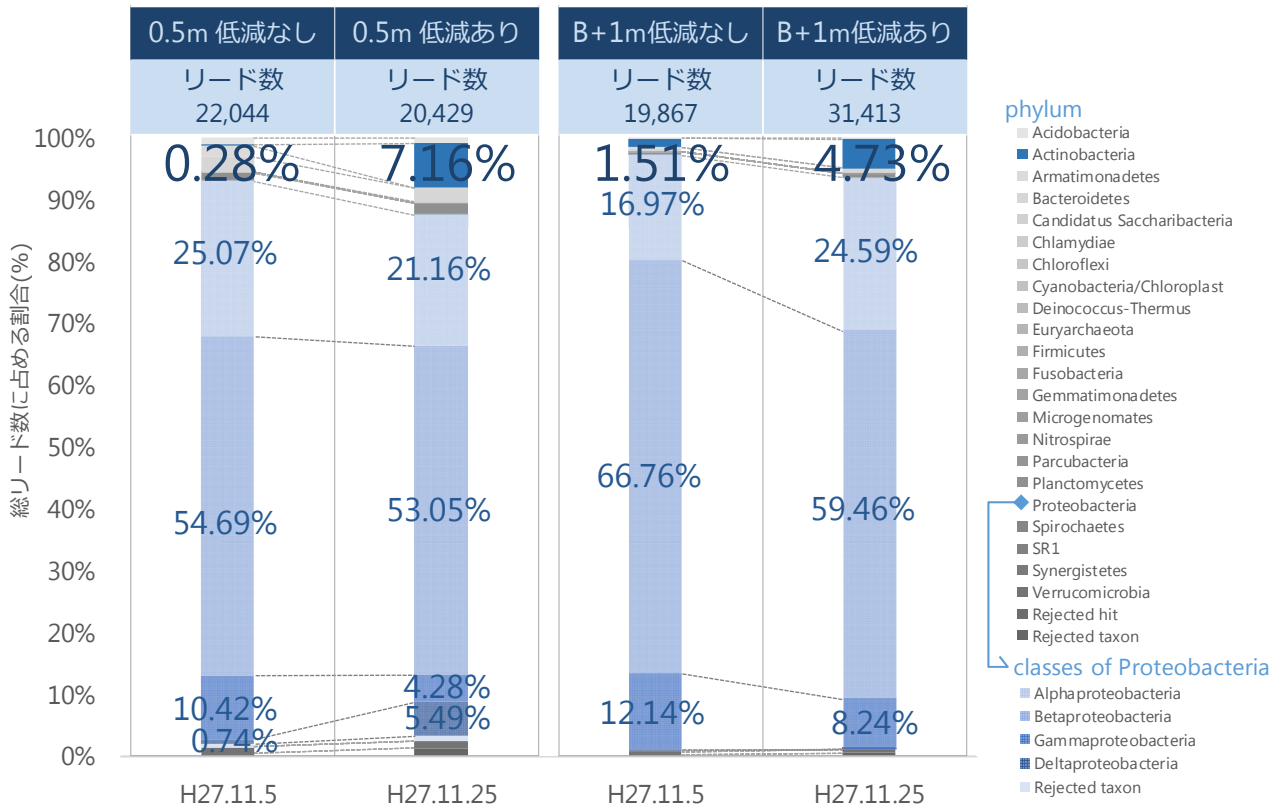


図6 2-MIB 濃度推移評価後の検液を対象とした微生物群集構造解析結果比較

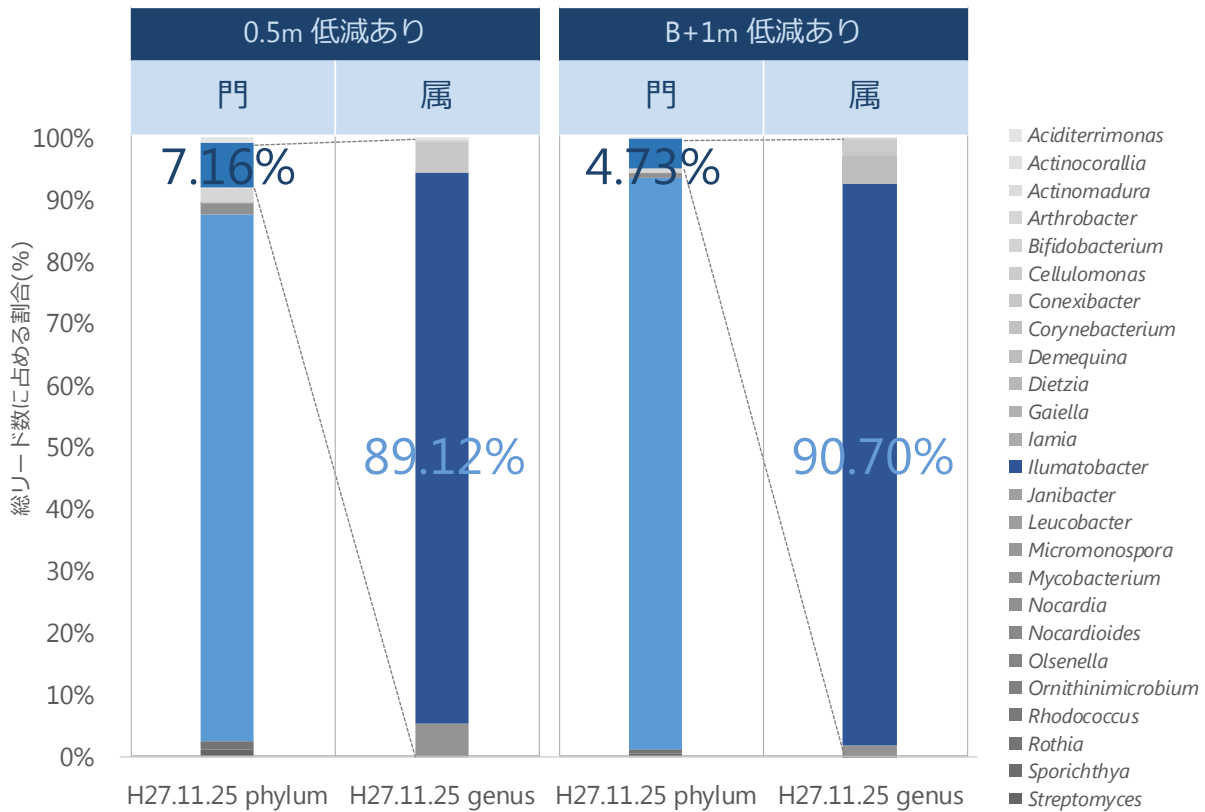


図7 2-MIB 濃度推移評価で濃度低減が認められた検液中における Actinobacteria 門の属レベル解析