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

高橋 威一郎^{1),*}
河野 博幸¹⁾

高瀬 勝教¹⁾
馬見塚 守¹⁾

竹下 佳代子¹⁾
岐津 英明¹⁾

State Transition of Musty-odor-producing Cyanobacteria and 2-Methylisoborneol in the Serikawa Dam Reservoir

Takeichiro TAKAHASHI^{1),*}, Katsunori TAKASE¹⁾, Kayoko TAKESHITA¹⁾,
Hiroyuki KAWANO¹⁾, Mamoru MAMIZUKA¹⁾ and Hideaki KIZU¹⁾

¹⁾ Water Purification Division, Oita City Waterworks Bureau, Furugo 1425-1, Oita, Oita 870-0844, Japan

Abstract

In October 2014, a high concentration of 2-methylisoborneol (MIB) was confirmed in the Serikawa dam reservoir because the concentration of musty-odor-producing cyanobacteria had increased. Therefore, serious off-flavor problems with the drinking water occurred in Oita city located downstream of the reservoir. We investigated the species that had the potential to produce musty/earthy odor compounds by genetic analysis, and determined them to be *Pseudanabaena limnetica* and *Pseudanabaena galeata*. After the autumn thermal destratification in the reservoir, the MIB concentration in the reservoir rapidly decreased. We considered that it was caused by biodegradation and analyzed the water in the reservoir by next-generation sequencing (NGS). The results showed changes in the bacterial community composition around the time of the autumn thermal destratification in the reservoir. The cyanobacteria survived in the low-temperature environment of a water temperature less than 10 °C and then showed an increase and high MIB-producing ability when the temperature reached 15 °C. We hypothesize that the onset of biodegradation has an optimal temperature.

Keywords: 2-Methylisoborneol (MIB); Cyanobacteria; Genetic analysis; Next-generation sequencing (NGS); Biodegradation

1. はじめに

近年、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ている¹⁾。大分県においても、平成26年10月に芹川ダムにおいて、かび臭物質産生藍藻（かび臭藍藻）が急激に増殖し、ダム湖水の2-メチルイソボルネオール（MIB）が高濃度となる事象が発生した。芹川ダムは、大分市と竹田市の境界に位置し、河川総合開発事業の一環として大分川の支川である芹川の中流域に昭和31年に建設された、発電・灌漑を目的とした多目的ダムであり、ダム底層部より毎秒10m³で取水され、水力発電に供された後、再び芹川に放水され、本川である大分川に流入している。本ダムは竣工後約60年を経過し、富栄養化の進行がみられ、例年藍藻綱 *Microcystis* 属によるアオコや渦鞭毛藻綱 *Peridinium* 属による淡水赤潮が確認されている。平成26年10月には

かび臭藍藻が突発的に増殖し始め、これに伴いMIBが上昇し、11月中旬には最高で約1,000 ng L⁻¹に到達した。芹川ダムに流入する3河川ではかび臭藍藻及びMIBは認められず、また本川である大分川と、支川である芹川との合流点より上流の本川側においてもかび臭藍藻及びMIBは認められなかった。このため、かび臭藍藻の増殖及びMIBの高濃度化は、大分川流域では芹川ダムにおいてのみ特異的に発生していることが明らかとなった。大分川と芹川との合流点を起点にして下流約16 kmに位置する大分市水道局えのくま浄水場取水口ではMIBが86 ng L⁻¹、同じく合流点より下流約20 kmに位置する大分市水道局古国府浄水場取水口では65 ng L⁻¹検出されるに至り、両浄水場水系の給水栓水において深刻なかび臭障害が発生した。芹川ダムにおけるこのようなMIB高濃度化事象は過去に発生したことがなく、かび臭藍藻の消長やMIBの推移の予測は困難を極めた。大分市水道局では、芹川ダムにおけるかび臭藍藻及びMIBの調査を継続して行い、傾向把握に努めた。その結果、MIBは平成26

1) 大分市水道局管理部浄水課 〒870-0844 大分市大字古国府 1425-1

* 連絡先: sj-suisitu@city.oita.oita.jp

年11月中旬以降急激に低減し、またかび臭藍藻も減少したが、冬季に至っても MIB は 3 ng L^{-1} 以上、かび臭藍藻は $5,000 \text{ cells mL}^{-1}$ 以上検出され続け、かび臭障害の再発について予断を許さない状況が継続した。また春季に至り、かび臭藍藻の増加が確認されたが、同時期に他の藍藻が飛躍的に増殖し、かび臭藍藻が低減するという競争関係も見られた。

各地のダム湖及び湖沼の調査の結果、藍藻の優占化には、窒素やリンといった栄養塩濃度、N/P 比、水温、深度等が関与するとの報告があり^{2, 3)}、また全国各地で発生しているかび臭等の異臭味障害の多くは、ダムや湖沼において増殖した生物に起因し、かつ高水温期に多発しているとの報告がある⁴⁾。冬季の芹川ダムにおいてかび臭藍藻を $1,000 \text{ cells mL}^{-1}$ 以上検出した事例は過去に無く、水温上昇に伴うかび臭藍藻の増殖能及び MIB 産生能の変化を評価することは、かび臭障害の再発防止策を講じる上で極めて重要であった。一方、芹川ダムに生息するかび臭藍藻は複数種存在すると推察されたが、これらの種の特定は形態観察的には難しく、かび臭藍藻の消長や MIB の推移を予測する上で支障となった。

よって本研究では、芹川ダムにおける平成 26 年 10 月以降のかび臭藍藻及び MIB の推移について評価するとともに、遺伝子配列解析に基づくかび臭藍藻の種の推定、かび臭藍藻及び MIB の低減要因、かび臭藍藻の増殖能及び MIB 産生能と水温の関係について検討を行ったので報告する。

2. 実験方法

2.1 芹川ダムでの糸状体藍藻及び MIB の推移

2.1.1 供試試料

試料は、芹川ダム堰堤付近水深 0.5 m より採取したダム湖水とした（図 1）。試料の採取期間は、平成 26 年 10 月から平成 27 年 7 月までとし、採取頻度は概ね月 2 回以上とした。

2.1.2 調査項目

水質調査項目は、水温及び MIB とした。また、生物調査項目は、糸状体藍藻とした。

2.1.3 MIB の定量

MIB の定量は、ヘッドスペースーガスクロマトグラフ質量分析法（HS-GC-MS）により行った。試料を緩やかに攪拌後、10 mL を採取し、3.5 g の NaCl を入れた 22 mL 耐圧バイアルに入れ、内部標準液 2 μL 添加後、セブタム及びアルミキャップにて密栓し、振とうして NaCl を溶解したのち、ガスクロマトグラフ質量分析計に注入し、検量線のピーク面積から定量する方法により行った。この方法による MIB を総 MIB（T-MIB）とした。また、試料瓶内の表層 5 cm より試料を 20 mL 採取してピーカーに移したのち、孔径 0.45 μm のシリンジフィルター（DISMIC 25CS045AN, ADVANTEC 社）にて 10 mL ろ過し、そのろ液を測定した結果を溶存態 MIB（D-MIB）とした。また、T-MIB から D-MIB を差し引いた値を細胞内保持態 MIB（C-MIB）とした（表 1）。

2.1.4 糸状体藍藻の定量

糸状体藍藻の定量は上水試験方法（2011）⁵⁾ に規定された試験方法に準拠して行い、D-MIB 測定用前処理としてピーカーに分取した試料の残液約 10 mL をシリンジ加圧

図 1 採水地点及び芹川ダム諸元

表 1 MIB 測定項目と説明

項目	説明
T-MIB	総MIB。 試料10mLをHS-GC-MSにて測定。
D-MIB	溶存態MIB。 試料10mLをろ過後、HS-GC-MSにて測定。
C-MIB	細胞内保持態MIB。 (C-MIB = T-MIB - D-MIB)

法にて加圧処理した後、標準計数板に注入し、30分静置後、光学顕微鏡にて形態を観察し、同定した^{6, 7)}。定量は、標準計数板内の400方眼中において確認される糸状体藍藻全てを顕微鏡用デジタルカメラ（DS-R1i, Nikon 社）にて撮影し、画像解析ソフトウェア（NIS-Elements BR, Nikon 社）の多点計測機能を用いて、撮影画像上で群体長計測を行い、各糸状体藍藻の全長を算出し、1細胞あたりの長さで除して、細胞数を算出した。

なお、試料中の糸状体藍藻としては、*Phormidium tenue* や *Oscillatoria agardhii* が多く確認された。国立科学博物館は、*Phormidium tenue* について、これま

で *Phormidium tenue*, *Oscillatoria limnetica*, *Pseudanabaena galeata*, *Pseudanabaena catenata*, *Pseudanabaena mucicola* 等とされてきたものを「*Pseudanabaena limnetica* 群」という名称でシノニムとしてまとめており、また *Oscillatoria* 属についても、本属名を *Planktothricoides-Planktothrix* 属のシノニムとしている⁸⁾。一方、水道におけるかび臭障害の原因生物としても、*Phormidium tenue* や *Oscillatoria agardhii* とする報告が多いという状況がある⁹⁾。このようなことから、本研究での糸状体藍藻の計数は、*Phormidium tenue* (*P.tenue*) や *Oscillatoria agardhii* (*O.agardhii*) の生物名により行うものとする。

2.2 藍藻の遺伝子配列解析及び臭気物質産生能評価

2.2.1 供試試料

試料は、平成27年1月から4月までの芹川ダム堰堤付近水深0.5 mのダム湖水より採取した糸状体藍藻とした。

2.2.2 藍藻の培養方法

芹川ダム湖水中には、糸状体藍藻の他、珪藻綱 *Cyclotella* 属の小型種やハプト藻綱 *Chrysochromulina* 属等、細胞長が10 µm以下の微細藻類が多く存在し、キャピラリーピペット法による糸状体藍藻の単藻釣藻を行うことが困難であったため、まず藍藻を分画することを目的として粗培養を行った。粗培養は、試料中の糸状体藍藻が含まれる部分を光学顕微鏡 (ECLIPSE Ni-U, Nikon 社) の下で滅菌済キャピラリーピペットにて吸引し、CT培地入り培養試験管に接種し、2週間静置して行った。山田ら¹⁰⁾ は、静置培養時の照度の至適条件について、500~2,000 lx とし、照度の違いによって *P.tenue* の増殖や MIB 産生量、藻体の呈色性が大きく変動することを報告している。今回の粗培養では2台の恒温槽を用い、培養温度は20℃で同一とし、CT培地入り培養試験管の底部における培養照度を一方は400 lx、他方は2,000 lx に調整し、照度の違いによる影響を検討した。その結果、付着型糸状体藍藻と浮遊型糸状体藍藻の群集の形成に至り、また付着型糸状体藍藻は、緑色を呈する群集と、茶色を呈する群集の形成に至った。400 lx 群と2,000 lx 群との培養過程比較では、MIB 産生量や増殖性に有意な差は認められなかったが、藻体の呈色性においては大きく異なり、400 lx 群の方が濃い緑色や茶色を呈した。MIB 産生量や増殖性に有意な差がない状況下では、藻体の呈色が強い方が形態観察上有利と考え、本研究での照度条件は400 lx とした。照度400 lx 環境下での粗培養により増殖した糸状体藍藻の群集を、色素呈色性や付着性、浮上性といった形態的特徴毎に分画し、単藻培養を行った。単藻培養は、まず各分画液中の糸状体藍藻を光学顕微鏡下で滅菌済キャピラリーピペットにて釣藻し、滅菌済4穴高撥水性印刷ウェルスライドガラス (MATSUMI 社) を用いて、CT培地液滴による4段階の洗浄を行って1糸状体のみを釣藻可能な状態としたのち、CT培地を1.8 mL 添加した培養用24穴プレートの各穴に1糸状体ずつ接種し、培養温度20℃、培養照度400 lx の環境下で3週間静置培養した。次に、十分に増殖が認められた培養穴より、滅菌済パスツールピペットにて群集を釣藻し、CT培地入り培養試験管に接種して単藻増殖させた。

2.2.3 遺伝子配列解析

単藻培養により得た3種の株にて遺伝子配列解析を行

った。付着型株は、培養液中で懸濁後、その懸濁液1 mLを1.5 mLチューブに分取し、遠心して液層を除去し、沈澱したペレットをDNA抽出に供した。また浮遊型株は、遠心しても沈澱しなかったため、浮遊型糸状体藍藻が高密度に存在していた培養液上層部0.4 mLを1.5 mLチューブに分取し、99%エタノールを1 mL 添加後、遠心して液層を除去し、沈澱したペレットをDNA抽出に供した。DNA抽出は、ISOPLANT II (ニッポンジーン社) を用いて行い、角田ら¹¹⁾ の方法に基づき16S rRNA 領域及びITS 領域においてPCRを行い、約2,000塩基対のDNA断片を得た。PCR増幅でのプライマーは、16 S27F¹²⁾ (Forward primer) 及び23 S30 R¹²⁾ (Reverse primer) を採用した (表2)。PCR反応では、94℃で2分間の初期変性に続いて、94℃で45秒間の変性、57℃で45秒間のアニーリング、72℃で2分間の伸長を1サイクルとして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54℃として25サイクル行い、最後に72℃で7分間の伸長を行った (表3)。Polymerase はTakara Ex Taq (タカラバイオ株式会社)、buffer 及びdNTP Mixture はTakara Ex Taq に付属のものを使用した。PCR産物をQiaquick PCR purification kit (QIAGEN 社) を用いて精製し、両端2つ及び内部4つのプライマー (表2) を用いてシーケンス反応を行い、DNAシーケンサーによって塩基配列を解析した。配列エディタによって6つのプライマーで得た配列を編集し、PCRに用いた2つのプライマーに挟まれた領域全体の塩基配列を得た。得られた塩基配列を基に、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) のBLAST 検索システムに供して類似配列種を検索し、解析プログラム CLUSTAL W を

表2 遺伝子配列解析における使用プライマー

Primer	Sequence(5'→3')
16S27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
23S30R	CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT
16S378F	GGGGAATTTTCCGCAATGGG
16S1114F	GTCCC GCAACGAGAGCAACCC
16S781R	GACTACTGGGGTATCTAATCCATT
16S1494R	GTACGGCTACCTTGTTACGAC

表3 遺伝子配列解析におけるPCR条件

Cycle step	Temperature	Time	Cycles
Initial Denaturation	94℃	2 m	1
Denaturation	94℃	45 s	10
Annealing	57℃	45 s	
Extension	72℃	2 m	
Denaturation	94℃	45 s	25
Annealing	54℃	45 s	
Extension	72℃	2 m	
Final Extension	72℃	7 m	1

用いてアライメントを行い、編集ソフトウェア MEGA6 を用いて分子系統樹を作成し、各々の相関を確認した。

2.2.4 臭気物質産生能評価

糸状体藍藻の臭気物質産生能評価については規定法がないことから、HS-GC-MS を用いた臭気物質測定評価を試みた。本評価は、耐圧バイアル内に採取した超純水 10 mL に、培養した糸状体藍藻の群集を添加し、HS-GC-MS にて臭気物質を測定することにより行った。臭気物質産生能評価用の添加群集量は約 0.1 mm 四方から開始し、不検出となるごとに段階的に添加量を増やし、最終的に約 2 mm 四方となるまで行った。

2.3 かび臭藍藻及び MIB の低減要因

2.3.1 ダム湖鉛直分布調査

ダム湖鉛直分布調査試料は、平成 26 年 10 月 23 日から 11 月 18 日までの、芹川ダム堰堤付近の表層から底層に至るまでのダム湖水とし、調査項目は水温及び MIB とした。

2.3.2 MIB 低減化調査

MIB 低減化調査試料は、平成 26 年 11 月 20 日に採取した、芹川ダム堰堤付近水深 0.5 m のダム湖水とし、250 mL 遮光瓶 4 本に分取し、5 °C、10 °C、14 °C、26 °C それぞれにおいて恒温保存し、経時的に MIB を測定した。また対照系として、MIB 標準液を超純水にて希釈し 200 ng L⁻¹ に調製し、同様に温度別に恒温保存し、経時的に MIB を測定した。

2.3.3 微生物群集構造解析

微生物群集構造解析用試料は、11 月 4 日及び 11 月 23 日に採取した、芹川ダム堰堤付近水深 0.5 m のダム湖水とした。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。DNA 抽出は、ISOIL for Beads Beating (ニッポンジーン社) を用いて行い、Nishijima ら¹³⁾ 及び Takahashi ら¹⁴⁾ 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、341F¹⁵⁾ (Forward primer) 及び 806R¹⁶⁾ (Reverse primer) を採用した (表 4)。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 (表 5)。Polymerase は MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 (タカラバイオ株式会社)、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 PCR₉₆ filter plate (Merck Millipore) 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。

表 4 次世代シーケンス解析における使用プライマー

Primer	Sequence(5'→3')
341F	CCTACGGGAGGCAGCAG
806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT

表 5 次世代シーケンス解析における PCR 条件

Cycle step	Temperature	Time	Cycles
Initial Denaturation	98 °C	2 m	1
Denaturation	98 °C	10 s	10
Annealing	65~55 °C (-1 °C/cycle)	15 s	
Extension	68 °C	30 s	
Denaturation	98 °C	10 s	25
Annealing	55 °C	15 s	
Extension	68 °C	30 s	

2.4 培養温度変更による評価

2.4.1 供試試料

試料は、平成 27 年 1 月 8 日に採取した、芹川ダム堰堤付近水深 0.5 m のダム湖水とし、1 L 透明ガラス瓶 3 本に分取し、400 lx 連続照射下で、5 °C、10 °C、20 °C それぞれにおいて静置培養を行った。また培養開始後 27 日目に温度条件を全て 20 °C とした。

2.4.2 水質及び生物調査項目

水質調査項目は MIB、生物調査項目は糸状体藍藻とし、経時的に測定を行った。

2.5 温度別培養による評価

2.5.1 供試試料

試料は、平成 27 年 2 月 19 日に採取した、芹川ダム堰堤付近水深 0.5 m のダム湖水とし、1 L 透明ガラス瓶 4 本に分取し、400 lx 連続照射下で、5 °C、10 °C、15 °C、20 °C それぞれにおいて静置培養を行った。

2.5.2 水質及び生物調査項目

水質調査項目は MIB、生物調査項目は糸状体藍藻とし、経時的に測定を行った。

3. 結果と考察

3.1 芹川ダムでの糸状体藍藻及び MIB の推移

芹川ダムにおいて MIB 上昇が見られた平成 26 年 10 月以降、月 2 回以上の頻度でダム湖の水質調査を行った (図 2)。P.tenue は平成 26 年 10 月に突発的に増殖し始め、11 月上旬には最高で 120,000 cells mL⁻¹ となり、MIB も 11 月中旬には最高で 1,000 ng L⁻¹ に達した。11 月中旬以降、P.tenue 及び T-MIB は急激に低減したものの、ダム湖の水温が 10 °C 以下となる冬季に至っても P.tenue は死滅することなく生息し続け、また T-MIB も検出され続けた。冬季の MIB の最低値は 3 ng L⁻¹ であった。藻類によるかび臭の発生は夏季に多いとの報告¹⁷⁾ がある一方で、Kishida ら¹⁸⁾ は、水温別にダム湖内の MIB を調査し、10 °C 以下においても 8 ng L⁻¹ 程度の MIB が検出されることを報告しており、芹川ダムにおいて水温が 10 °C 以下となった平成 26 年 12 月から平成 27 年 2 月にかけての T-MIB の推移は、この報告とよく一致していた。水温が上昇に転じ、15 °C を安定的に上回るようになった 3 月下旬以降、P.tenue は再び増殖に転じ、T-MIB も上昇傾向となったが、同時期に O.agardhii の増殖が著しくなり、それ以降低減に転じた。平成 27 年 7 月に至り、ダム湖試料中ではこれらの糸状体藍藻は確認されなくなり、代わ

図2 平成26年10月以降の糸状体藍藻及びMIBの推移

図3 平成26年12月以降の*P.tenue*とMIBの推移

って藍藻綱 *Microcystis* 属が優占した。

平成26年12月以降の、ダム湖試料中の *P.tenue* と各MIBの推移調査の結果（図3）、冬季のT-MIBの80%以上はD-MIBであったが、C-MIBもわずかに検出され続けた。また平成27年春季の *P.tenue* 再増殖期では、T-MIBの70%以上がC-MIBであった。

本調査の結果から、*P.tenue* と *O.agardhii* の増殖には競争関係があり、また *P.tenue* は水温が10℃以下となる冬季でもわずかにMIB産生能を有し、また増殖では15℃以上が至適条件のひとつであることが示唆された。

3.2 藍藻の遺伝子配列解析及び臭気物質産生能評価

単藻培養後の藍藻を形態観察したところ、付着型緑色糸状体藍藻と付着型茶色糸状体藍藻はいずれも *P.tenue* の特徴を満たし、また浮遊型糸状体藍藻は *O.agardhii* の特徴を満たしていた。しかし、形態的特徴をもって付着型緑色糸状体藍藻（PG株）、付着型茶色糸状体藍藻（PB株）、浮遊型糸状体藍藻（O株）の種の同定を行うことが困難であった。形態観察による種の同定が困難な際に、遺伝子配列解析による種の推定を行う方法が報告されている¹¹⁾。よって本調査においても、これらの糸状体藍藻の遺伝子配列解析と、その系統分類を行い、種の推定を

表 6 解析に供した株及び近縁種

Accession No.	Source Organism	Isolation Source Location	bp(Length)
LC085884	<i>Pseudanabaena limnetica</i> strain PG	Japan: Serikawa Dam,Oita (This study)	1972
KM386857	<i>Pseudanabaena limnetica</i> CHAB774	China: West Lake, Hangzhou	1981
LC085885	<i>Pseudanabaena galeata</i> strain PB	Japan: Serikawa Dam,Oita (This study)	2032
KM386853	<i>Pseudanabaena galeata</i> CHAB2916	China: Erhai Lake,Dali	1961
LC085886	<i>Planktothrix agardhii</i> strain O	Japan: Serikawa Dam,Oita (This study)	1824
GQ351571	<i>Planktothrix agardhii</i> PCC 9801	(cultural strain)	1466

図 4 全長 (16S rRNA 領域及び ITS 領域) の近隣結合法による分子系統樹

表7 かび臭物質産生能評価結果

評価株	臭気物質	産生能評価
PG株	2-MIB	++
	geosmin	—
PB株	2-MIB	+++
	geosmin	—
O株	2-MIB	—
	geosmin	—

— : <1 ng mm⁻²
 + : 1~10 ng mm⁻²
 ++ : 10~100 ng mm⁻²
 +++ : >100 ng mm⁻²

試みた。

培養したPG株、PB株、O株の各群集を遺伝子配列解析に供したところ、PG株とPB株では、PCR産物を直接シーケンスして塩基配列を決定できた。一方O株では、16S rRNA領域は直接シーケンスで塩基配列が決定できたが、ITS領域は複数の配列の混合により塩基配列が決定できなかったため、PCR産物をプラスミドにクローニングし、大腸菌を形質転換して15クローンを拾い塩基配列を決定することとした。15クローン中9クローンはほぼ同一の配列であり、16S rRNA領域はPCR産物を直接シーケンスしたものとはほぼ同一の配列であったので、これをO株の16S rRNA領域及びITS領域の塩基配列とした。遺伝子配列解析の結果、PG株は*Pseudanabaena limnetica* CHAB774と、PB株は*Pseudanabaena galeata* CHAB2916と、O株は*Planktothrix agardhii* PCC 9801と、それぞれ近縁であることが明らかとなった。今回得られたこれら3種の遺伝子配列は、DDBJに登録した（表6）（図4）。

PG株、PB株、O株それぞれの臭気物質産生能をHS-GC-MSにて評価したところ、PG株及びPB株は共にMIB産生型かつgeosmin非産生型であり、特にPB株に強いMIB産生能が認められた。またO株はMIB及びgeosmin共に非産生型であった（表7）。

本調査の結果から、芹川ダムにおいてMIBを産生したかび臭藍藻は、*Pseudanabaena limnetica* 及び*Pseudanabaena galeata*と推察された。

3.3 かび臭藍藻及びMIBの低減要因

芹川ダムでのMIBは、平成26年11月11日に最高値1,000 ng L⁻¹が測定されて以降、急激に降下した。この間、台風や突発的豪雨といった大規模出水はなく、ダム湖への流入河川水量に大きな変化はなかった。10月中旬のダム湖水採取試料で、試料瓶中の間隙を十分に有したまま冷暗所で30日間保存したのちT-MIBを測定したところ、ほとんど低減化は見られなかったことから、11月11日以降の芹川ダムにおいて、MIBの自然低減や大規模出水による希釈等とは異なるMIB低減要因が新たに付与されたことが推察された。

ダム湖堰堤部付近の鉛直分布調査の結果、10月下旬に躍層破壊が確認されて以降、部分循環が進行し、11月14日には表層部と底層部の水温差は0.5℃となり、4日後

の18日には表層と比べて水深2~12 mの方が高水温となった（図5-a）。またT-MIBは、11月12日までは表層から水深5 mまでの範囲に高濃度に検出されたが、11月14日には表層から底層に至るまでほぼ均一の濃度となり、4日後の18日には底層部の方がわずかに高濃度となった（図5-b）。

水温及びT-MIBの鉛直分布調査の結果、芹川ダム堰堤付近は、平成26年10月下旬以降に循環対流水深の拡大が進行し、11月12日以降11月18日までの間に、全層循環に至ったと考えられた。

(a) 鉛直水温分布

(b) 鉛直T-MIB分布

図5 芹川ダム堰堤部付近の鉛直分布

11月20日に採取したダム湖水を用いて温度別に恒温保存し、経時的にT-MIBを測定した。その結果、11月20日採取試料におけるT-MIBの低減速度は対照系よりも大きく、かつ高温であるほど、濃度低減速度が大きいことが明らかとなった（図6-a, b）。

押見ら¹⁹⁾は、*P.tenue*に対して溶藻効果を示す細菌を霞ヶ浦から分離し、10～35℃の範囲内において、温度が高くなるほど溶藻菌による溶解が速やかに起こることを報告しており、またHoら²⁰⁾は、砂ろ過層内の生物膜や生物処理装置において、MIBやgeosminに対して分解効果を示す細菌が確認されたことについて報告している。また、Westerhoffら²¹⁾は、湖水のMIBの増減に季節的な特徴があり、秋季の躍層破壊後に大幅に低減し、かつこの低減化には生物分解が大きく寄与することを報告している。これらのことから、芹川ダムにおける*P.tenue*やMIBの低減には、*P.tenue*溶藻菌やMIB分解菌による生物分解が関与し、かつこれらの作用の発現にはダム湖における秋季循環が影響していることが推察された。このため、秋季循環期到来前後のダム湖試料を用いて、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、群集構造変化を調査した（図7）。群集構造解析に供した試料における遺伝子のリード数は、秋季循環前の11月4日採取試料で12万リード、秋季循環後の11月23日採取試料で13万リードであった。

遺伝子のリード数は、両検体とも*Cyanobacteria*門が

図7 門レベルにおけるリード数の割合

最も多く、11月4日採取試料では44%、11月23日採取試料では34%であった。また、*Cyanobacteria*門の総リード数に占める、真核藻類の葉緑体に含まれる遺伝子のリード数は、11月4日採取試料では22%、11月23日採取試料では81%であり、この期間の芹川ダムにおける藍藻類と真核藻類の、検鏡に基づく消長結果と一致していた。次いでリード数が多かったのは、*Actinobacteria*門、*Proteobacteria*門であった。いずれもリード数が10%以上であり、この期間の芹川ダムにおける主要な微生物群であることが明らかとなった。また*Proteobacteria*門のリード数は両検体とも15%程度であり大きな変化がなかったのに対し、*Actinobacteria*門のリード数は、11月4日採取試料では12%、11月23日採取試料では26%と、急激な上昇が見られた。*Actinobacteria*門について属レベルで評価すると、*Ilumatobacter*属のリード数が、11月4日採取試料では4%であったのに対し、11月23日採取試料では8%となっており、特に顕著な上昇であった。

本調査の結果から、ダム湖における秋季循環期の到来を境として、細菌群集構造が変化することが明らかとなった。Ghaiら²²⁾は、*Actinobacteria*門について、藍藻と負の相関の増殖傾向を示すことや、難分解性有機物の分解に寄与することを報告している。一方*Actinobacteria*門は、MIB等のかび臭物質を産生する放線菌としても知られている。そのため、水道水のかび臭問題においては、分解者としてではなく供給者としての報告が多い²³⁾。芹川ダムにおける*Actinobacteria*門による*P.tenue*の溶藻やMIBの分解への寄与については現在のところ不明であり、今後の究明課題としたい。

3.4 培養温度変更による評価

芹川ダム湖での水温が10℃を定常的に下回るようになる平成27年1月に至っても*P.tenue*や*O.agardhii*といった糸状体藍藻は生息し、またMIBも検出され続けた。低水温環境下で生育を継続した糸状体藍藻の増殖能及びMIB産生能の評価と共に、*P.tenue*によるMIB産生の至適水温とされる20℃¹⁰⁾に変更後の増殖能及び

(a) 温度別T-MIB濃度推移

(b) Control

図6 平成26年11月20日採取分ダム湖水による温度別MIB変化

図8 平成27年1月8日採取試料の温度別培養による推移

MIB 産生能の評価を行うため、平成27年1月8日に採取したダム湖試料を用いて、水温条件別に培養し、糸状体藍藻細胞数及びMIBを測定した。

20 °C 群（図8-c）においては、*P. tenue* 及び *O. agardhii* 共に培養開始後15日あたりに増殖のピークを迎え、その後双方共に低減した。MIBも、*P. tenue* 細胞数に追従するように増減した。糸状体藍藻の低減傾向が見られる15日目から、桿菌様の微小生物の付着が多数確認されるようになった（図9-a）。微小生物付着後に *P. tenue* が溶解する様子も確認されたため（図9-b）、本生物は溶藻菌であると推察された。また同時期にMIBも低減していることから、MIB分解菌も作用していると推察された。

5 °C 群（図8-a）及び10 °C 群（図8-b）においては、培養開始後26日を経過しても *P. tenue* 及び *O. agardhii* の急激な増殖は認められず、また10 °C 群においては、

(a) 微小生物の付着 (b) 付着後の溶解

図9 微小生物付着に伴う *P. tenue* の溶解

O. agardhii の低減が進行し、殆ど確認されない状況に至った。また両群共、糸状体藍藻への微小生物の付着は殆ど確認されなかった。培養開始後27日目に、5 °C 群及び10 °C 群の温度条件を20 °Cに変更し、3群同一環境下培養に切り替えた。5 °C→20 °C 変更群においては、*P. tenue*

図10 平成27年2月19日採取試料の温度別培養による推移

と *O. agardhii* 共に増殖傾向が見られたが、特に *O. agardhii* において顕著であった。*P. tenue* の増殖に伴う MIB の上昇も認められたが、*O. agardhii* の増殖傾向が強く、*P. tenue* の増殖が抑制される競争関係が認められた。10 °C

→ 20 °C 変更群においては、*P. tenue* の増殖のみが顕著に認められ、これに伴い MIB も極めて高い値となった。温度変更直前において殆ど確認されない状況にまで低減していた *O. agardhii* は、温度変更後も増殖しなかった。

5℃→20℃変更群及び10℃→20℃変更群ともに、培養開始後41日目（温度変更後14日目）にMIBが最高値となり、その後低減し、糸状体藍藻への微小生物の付着が多数見られるようになった。また同時期にはMIBも低減した。この点は、20℃群における培養開始後15日目以降と酷似した傾向を示しており、*P.tenue* 溶藻菌及びMIB分解菌は、20℃環境下では培養後15日目前後に強く作用することを示唆した。

本調査の結果から、*P.tenue* 及び *O.agardhii* は低水温環境においても生息が可能であり、至適温度環境となった場合は再び活発に増殖することが明らかとなった。また、*P.tenue* と *O.agardhii* は競争関係にあり、一方が急激に増殖する際は、もう一方の増殖を抑制する傾向にあることが示唆された。20℃環境下での *P.tenue* 及び *O.agardhii* の生育は培養初期において良好であるが、培養後15日目以降、両藍藻の細胞数及びMIBは共に低減し、溶藻菌やMIB分解菌による生物分解の作用が強くなることが示唆された。

3.5 温度別培養による評価

芹川ダム湖での水温が10℃を定常的に下回り、かつ水温の年間最低値を記録する平成27年2月に至っても *P.tenue* や *O.agardhii* といった糸状体藍藻は生息し、またMIBも検出され続けた。低水温環境下で更に生育を継続した糸状体藍藻の増殖能及びMIB産生能の評価と共に、溶藻菌やMIB分解菌による生物分解の評価を行うため、平成27年2月19日に採取したダム湖試料を用いて、水温条件別に培養し、糸状体藍藻細胞数及びMIBを測定した。

5℃群（図10-a）においては、特異的な糸状体藍藻の増加やMIBの上昇は認められなかったが、糸状体藍藻は死滅することではなく、またT-MIBも有意に低減することなく検出され続けた。T-MIBに占めるD-MIBの割合が約90%を維持したことから、5℃環境下における *P.tenue* のMIB産生能は低いと推察された。また *P.tenue* 細胞数やMIBの低減が認められなかったことから、溶藻菌やMIB分解菌による生物分解の作用は小さいと推察された。10℃群（図10-b）においては、糸状体藍藻の急激な増殖は認められないものの、5℃群よりは多く確認され続けた。またT-MIBも徐々に上昇し、C-MIBも同様に上昇したことから、*P.tenue* 細胞内でMIBの産生が定常的に行われていたことが示唆された。また10℃群においては、5℃群と同じく、*P.tenue* 細胞数やMIBの低減が認められなかったことから、溶藻菌やMIB分解菌による生物分解の作用は小さいと推察された。15℃群（図10-c）と20℃群（図10-d）においては、*P.tenue* 細胞数及びMIBの顕著な上昇が認められたが、20℃群は15℃群に比べて早期にこれらの上昇のピークを迎え、その後低減した。20℃群においては、*P.tenue* と *O.agardhii* 共に培養開始後12～15日あたりに増殖のピークを迎え、その後共に低減した。MIBも *P.tenue* 細胞数に追従するように増減した。同時期には *P.tenue* への桿菌様の微小生物の付着が多数確認されたことから、20℃群における *P.tenue* 細胞数の減少は、溶藻菌の作用によるものと推察された。また同時期にMIBも低減していることから、MIB分解菌も作用していると推察された。15℃群においては、培養開始後34日に増殖のピークを迎えたあたりから、

O.agardhii の増殖が活発になった。*P.tenue* への溶藻菌の付着は殆ど認められず、またT-MIBが低減期となってもその約60%以上はC-MIBであり、残存する *P.tenue* による活発なMIB産生が認められたことから、15℃群における *P.tenue* 細胞数の減少は、*P.tenue* 溶藻菌に伴う死滅ではなく、*O.agardhii* との競争関係の影響に伴う増殖抑制によるものと推察された。一方T-MIBは低減したことから、MIB分解菌による生物分解は作用していたと推察された。

本調査の結果から、5～10℃の低水温環境においても、*P.tenue* 及び *O.agardhii* は生息が可能であり、10℃においてはMIB産生能を示すことが明らかとなった。また低水温環境下では *P.tenue* 細胞数及びMIBの低減が見られないことから、溶藻菌やMIB分解菌による生物分解の作用も小さいと推察された。15℃～20℃の環境下では *P.tenue* 細胞数とMIBの顕著な上昇が認められ、その後低減したが、細胞数の低減には、溶藻菌の作用や競争生物の増殖による影響が関与することが示唆された。また溶藻菌の作用は20℃以上において強く発現し、MIB分解菌の作用は15℃以上において強く発現することが推察された。

4. まとめ

以上の調査結果から、下記の諸事項が明らかとなった。

- 1) 芹川ダムに生息する *P.tenue* は、水温が10℃以下となる冬季でもわずかにMIB産生能を有し、また増殖では水温15℃以上が至適条件のひとつであることが示唆された。
- 2) 芹川ダムに生息する糸状体藍藻の遺伝子配列解析の結果、芹川ダムにおいてMIBを産生したかび臭藍藻である *P.tenue* は、*Pseudanabaena limnetica* 及び *Pseudanabaena galeata* であると推察された。
- 3) 芹川ダムにおいて平成26年11月中旬に認められた *P.tenue* 細胞数とMIBの急激な低減には、細菌による生物分解が関与していることが示唆された。また微生物群集構造解析の結果から、ダム湖の秋季循環期の到来前後で群集構造が変化することが明らかとなった。
- 4) ダム湖試料を用いた培養温度変更実験から、低水温環境においても、*P.tenue* 及び *O.agardhii* は生息が可能であり、至適温度環境となった場合は再び活発に増殖し、*O.agardhii* の増殖は *P.tenue* の増殖を抑制する場合があることが示唆された。
- 5) ダム湖試料を用いた温度別培養実験から、*P.tenue* の低減に関与する溶藻菌の作用は20℃以上において強く発現し、またMIBの低減に関与するMIB分解菌の作用は15℃以上において強く発現することが示唆された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、大分県企業局工務課並びに大分県土木建築部河川課の皆様にご多大なるご支援を頂いた。ここに記して謝意を表する。

遺伝子配列解析においては一般財団法人九州環境管理協会の大井和之氏に、また微生物群集構造解析においては株式会社テクノスルガ・ラボの高橋俊輔氏にご協力を

頂いた。ここに記して謝意を表する。

本研究の一部は、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、H27-健危一般-003）により行われた。ここに記して謝意を表する。

（原稿受付 2015 年 10 月 1 日）

（原稿受理 2015 年 12 月 18 日）

参考文献

- 1) 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> (2015 年 9 月時点).
- 2) 藤本尚志, 福島武彦, 稲森悠平, 須藤隆一, 1995. 全国湖沼データの解析による藍藻類の優占化と環境因子との関係. 水環境学会誌 18(11), 901-908.
- 3) 川合正恭, 秋葉道宏, 国包章一, 2002. 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講演集, pp.86-87.
- 4) 秋葉道宏, 岸田直裕, 下ヶ橋雅樹, 2013. 国内の浄水場における生物障害の発生および対策実態の把握, 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「水道システムにおける生物障害の実態把握とその低減対策に関する研究」平成 25 年度総括・分担研究報告書, 17-35.
- 5) 日本水道協会, 2011. 上水試験方法 2011 年版 IV. 生物編 (生物部会). 日本水道協会, 東京, pp.120-126.
- 6) 日本水道協会, 2008. 日本水道生物. 日本水道協会, 東京, pp.18-19.
- 7) 小島貞夫, 須藤隆一, 千原光男, 1995. 環境微生物図鑑. 講談社, 東京, pp.153-168.
- 8) 国立科学博物館, ダム湖のプランクトン. URL: <http://www.kahaku.go.jp/research/db/botany/dam/> (2015 年 9 月時点).
- 9) 日本水道協会, 2006. 生物障害を引き起こさないための浄水処理の手引き. 日本水道協会, 東京, pp.27-28.
- 10) 山田直樹, 青山幹, 山田益生, 浜村憲克, 1985. 天然水のカビ臭に関する研究 (第 1 報). 水質汚濁研究 8(8), 515-521.
- 11) 角田徳子, 中東寛和, 金見拓, 及川智, 2014. 多摩川上流に発生したかび臭産生藍藻の遺伝子解析結果. 水環境学会誌 37(1), 9-13.
- 12) Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., De Wit, R., Wilmotte, A., 2003. Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. Appl. Environ. Microbiol. 69, 5157-5169.
- 13) Nishijima, M., Lindsay, D.J., Hata, J., Nakamura, A., Kasai, H., Ise, Y., Fisher, C.R., Fujiwara, Y., Kawato, M., Maruyama, T., 2010. Association of thioautotrophic bacteria with deep-sea sponges. Marine Biotechnology 12, 253-260.
- 14) Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., Nishijima, M., 2014. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. PLoS One 9, e105592.
- 15) Muyzer, G., de Waal, E.C., 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. Appl. Environ. Microbiol. 59, 695-700.
- 16) Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., Knight, R., 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108(1), 4516-4522.
- 17) 日本水道協会, 1999. 生物起因の異臭水対策の指針. 日本水道協会, 東京, pp.4-27.
- 18) Kishida, N., Konno, Y., Nemoto, K., Amitani, T., Maki, A., Fujimoto, N., Akiba, M., 2013. Recent trends in microorganism-related off-flavor problems in drinking water treatment system in Japan. Water Sci. Technol.: Water Supply 13(5), 1228-1235.
- 19) 押見誠則, 藤本尚志, 大西章博, 鈴木昌治, 秋葉道宏, 国包章一, 2005. かび臭産生藍藻 *Phormidium tenue* を溶解する細菌の分離と溶藻特性に関する研究. 水環境学会誌 28(6), 379-384.
- 20) Ho, L., Hoefel, D., Bock, F., Saint, C.P., Newcombe, G., 2007. Biodegradation rates of 2-methylisoborneol (MIB) and geosmin through sand filters and in bioreactors. Chemosphere 66(11), 2210-2218.
- 21) Westerhoff, P., Rodriguez-Hernandez, M., Baker, L., Sommerfeld, M., 2005. Seasonal occurrence and degradation of 2-methylisoborneol in water supply reservoirs. Water Res. 39(20), 4899-4912.
- 22) Ghai, R., Mizuno, C.M., Picazo, A., Camacho, A., Rodriguez-Valera, F., 2014. Key roles for freshwater Actinobacteria revealed by deep metagenomic sequencing. Mol. Eco. 23(24), 6073-6090.
- 23) 日本水道協会, 2011. 上水試験方法 2011 年版 V. 微生物編 (微生物部会). 日本水道協会, 東京, pp.130-137.

論文要旨

大分県の芹川ダムにおいて、平成 26 年 10 月に 2-メチルイソボルネオール (MIB) が高濃度化し、本ダムの下流の表流水を水道水源とする大分市では大規模なかび臭障害が発生した。原因はダム湖内でのかび臭物質産生藍藻 (かび臭藍藻) の増殖であり、遺伝子配列解析及び MIB 産生能評価の結果、*Pseudanabaena limnetica* 及び *Pseudanabaena galeata* と推定された。11 月中旬のダム湖秋季循環期到来以降、湖内のかび臭藍藻や MIB は急激に低減し、微生物群集構造解析の結果、湖水循環前後での群集構造の変化が認められ、細菌による生物分解の関与が示唆された。かび臭藍藻は水温が 10℃ 以下の低水温環境でも生息し続け、MIB 産生能もわずかに有し、15℃ 以上となると活発な増殖と高い MIB 産生能を示した。また、かび臭藍藻の溶藻や MIB の分解等の生物分解の発現にも至適温度があることが示唆された。

キーワード: 2-メチルイソボルネオール (MIB); 藍藻; 遺伝子配列解析; 次世代シーケンス解析; 生物分解