

モバイルPCRによる水道水源におけるジェオスミン産生ラン藻類の定量検出

パシフィックコンサルタンツ株式会社	正会員	○渡部	健
パシフィックコンサルタンツ株式会社	正会員	池田	幸資
パシフィックコンサルタンツ株式会社	正会員	真木	伸隆
神戸市水道局水質試験所		大森	惇平
神戸市水道局水質試験所		戎	紫穂
神戸市水道局水質試験所		清水	武俊
神戸市水道局水質試験所		小田	琢也
兵庫県立大学大学院シミュレーション学研究科		久保	貴大
兵庫県立大学大学院シミュレーション学研究科		土居	秀幸

1. 目的

水道水源地であるダム湖や貯水池では、富栄養化等の水質の悪化により、しばしば「かび臭」の原因となる物質（ジェオスミンや2-MIB）をつくりだすラン藻類や放線菌が異常増殖し問題になっている。ジェオスミン及び2-MIBは極めて低濃度でもかび臭発生の被害が報告されることから、現在、水質基準値は10 ng/Lに設定されている¹⁾。安全な浄水を持続的に供給するために発生抑制等の対策やかび臭発生を引き起こす因子の特定が急務となっている。

かび臭の原因物質を産生する微生物のなかで、特にラン藻類はかび臭原因物質濃度と近い挙動を示すことが知られており²⁾、浄水場におけるカビ臭対策費用等を減少させるうえで、水道水源におけるカビ臭産生ラン藻類を特定し、適切な対策を行なうことが不可欠である。一方で、カビ臭産生ラン藻類については、同属でも種や株によってカビ臭原因物質の産生能力が異なり、顕微鏡観察による外形分類により見分けるには高度な知識・技術が必要とされ、判別に長時間を有することもある。カビ臭原因物質を分析機器により直接測定することも有効であるが、カビ臭産生能力のあるラン藻類は、環境条件が整わないと原因物質を産生しない場合もあるため、カビ臭産生ポテンシャルをもつラン藻類の発生を早期に検出することは困難であった。

近年、上記の問題を解決する新たな手法として、カビ臭産生能力のあるラン藻類が共通して保持するカビ臭合成遺伝子を定量PCR法により測定するモニタリング手法の研究が注目されている³⁾。国内の水源地においてカビ臭合成遺伝子を実測した研究報告は少なく、その動態や機器分析と比較した検出精度についてはほとんど分かっていないが、岸田ら（2019）は、既往研究で報告された複数の検出系から、日本国内の水源地で優占する主なジェオスミン産生ラン藻類であるアナベナ属の種・株を特異的に検出するプライマーを選抜し、水源地ダムで採水した試料から測定したジェオスミン合成遺伝子数とジェオスミン濃度の間に高い相関関係を示すことを見出した。

一般に、水源となる貯水池は山間地域に位置し、実験室のある施設から離れている。このため、サンプル

を実験室に持ち帰ってから分析すると、結果を得るまでに時間がかかる。また、現地で確認状況に応じて、追加で状況を詳細に把握するためのサンプリングを行う等の柔軟な対処も困難である。そこで、本研究では、現地に携行可能な小型の定量PCR装置を利用し、水源地の現場で、かび臭（ジェオスミン）合成遺伝子について定量PCR法による調査を試みた。関連するラン藻類の細胞数及びカビ臭原因物質を測定することで、携行型PCRによるかび臭産生ラン藻類の検出能力の評価を行い、現場で早期・定量検出が可能であることを示唆する結果を得たので報告する。

2. 調査方法

調査は、兵庫県神戸市の主要な水源地の一つである千苺貯水池で行った（図1）。貯水池内に複数の調査地点を設定し2020年7月～10月に合計9回の採水を行った。

2.1 顕微鏡観察

かび臭産生ラン藻類の細胞数は、現地で採水した試料（300 mL）から10 mLを採り、口径0.2 μ mのPTFEフィルターで濃縮処理後に蛍光顕微鏡（G励起フィルター）で観察し、種ごとに計数した。

2.2 ジェオスミンの分析

かび臭原因物質（ジェオスミン）の分析は、前処理としてNaClを添加後、告示法に準拠してページ・トラップ・ガスクロマトグラフ・質量分析法（PT-GC/MS法）により行った。

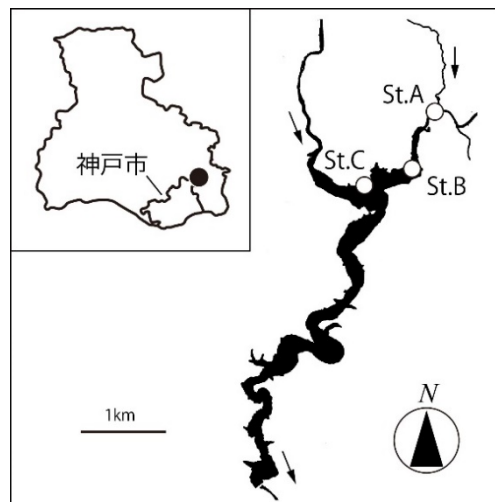


図1 調査地（●：千苺貯水池）

2.3 定量PCR分析

携行型の定量PCR (PicoGene® PCR1100, 日本板硝子社製) を用いて、採水試料に含まれるジェオスミン合成遺伝子の濃度を測定した。現地では、採水後すみやかにステリベクス-HV フィルター(0.45 μ m, Merck社製)でろ過(220~500mL)し、2時間以内にDNA抽出してかび臭合成遺伝子のPCR分析を行った。

3. 結果

顕微鏡観察により、ジェオスミン産生の*Anabaena* 属ラン藻として、*Anabaena circinalis*及び*A. crassa*の2種が確認された。また、かび臭非産生種では*A. flos-aquae*, *A. mendotae*, *A. smithii*が確認された。かび臭産生ラン藻類の細胞数の合計値は、調査開始から9月1日の調査までは2巻/mL未満であったが、9月26日から2地点(St. B、St. C)で急激に増え(図2A)、調査日の値として10月6日ではピークに達した。その後、かび臭原因ラン藻類を抑制するため貯水池内に硫酸銅が散布されたため、10月22日にかけて急激に減少した。

調査地点別のジェオスミン濃度の季節変化の状況は、図2Bに示すとおりである。いずれの地点でも、調査開始から9月1日の調査までは5ng/L未満であったが、その後、2地点(St. B、St. C)では急激な濃度の上昇が観察され10月6日には、St. Bでは240 ng/L、St. Cでは120 ng/Lに達した。St. Aでは、9月16日に13 ng/Lまで上昇したものの、その後は10 ng/L未満で推移した。

現場で測定されたジェオスミン合成遺伝子の濃度は各地点でジェオスミン産生ラン藻類の細胞数やジェオスミンの濃度の変化と同様の変動を示した(図2C)。

4. 考察

本研究で使用したジェオスミン合成遺伝子を検出するプライマーは、Tsaoら(2014)の示したプライマー(3139F/3245R)を微修正したものであり、岸田らの実験(2019)でも*A. circinalis*及び*A. crassa*を検出できることが確認されている。本研究におけるPCR分析の結果には、千苅貯水池で確認されたかび臭産生の2種の動態が反映されていたと考えられる。

ジェオスミン産生ラン藻類の細胞数とジェオスミン合成遺伝子の濃度は極めて類似した動態を示していることから、ジェオスミン合成遺伝子の定量PCR分析は、水源貯水池内でのジェオスミン産生ラン藻類の増殖状況を指標するマーカーとなりえることを強く示唆する結果である。

今回の調査期間中にかび臭非産生の*Anabaena*属の種として、*A. flos-aquae*, *A. mendotae*, *A. smithii*が確認されているが、既存のDBでは、今回利用したプライマーが上記3種に対して陰性となるかどうかは確認できていない。ただし、*A. mendotae*と*A. smithii*は顕微鏡観察での確認頻度が少なく濃度も低かった。また、*A.*

*flos-aquae*は高濃度に検出されたものの、ジェオスミン産生ラン藻類やジェオスミン濃度とは異なる動態を示していたことから、今回の調査結果に対して偽陽性による影響を与えていた可能性は小さいと考えられる。一方、貯水池には多様なラン藻類が発生することから、プライマーの特異性が有効な種群を明確にすることは今後の重要な課題である。

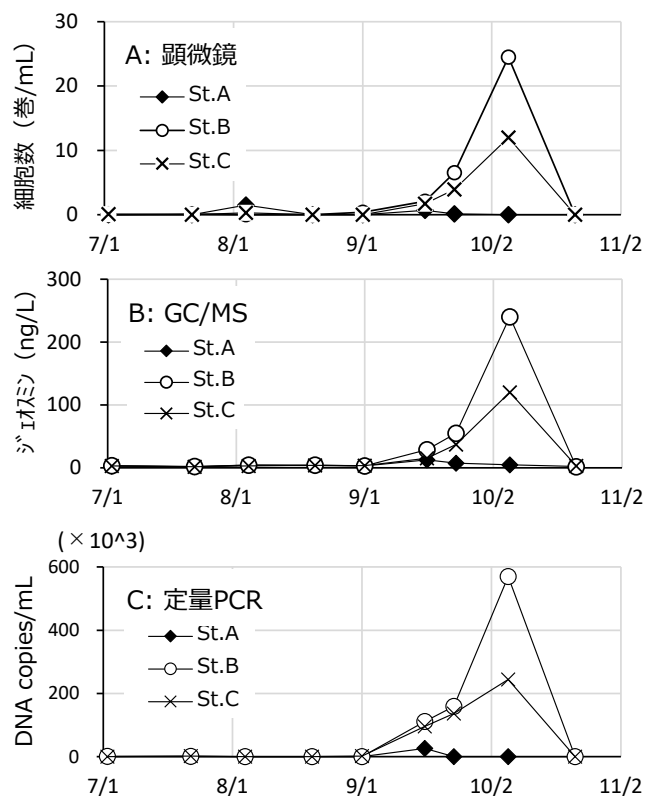


図2 各測定値の季節変化

《参考文献》

- 1) 厚生労働省：厚生労働省令第一三五号 水道基準に関する省令 (2007)
- 2) Jüttner, F & Watson, S. B. (2007). Biochemical and Ecological Control of Geosmin and 2-Methylisoborneol in Source Waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14):4395-406.
- 3) Tsao, H.-W., Michinaka, A., Yen, H.-K., Giglio, S., Hobson, P., Monis, P., Lin, T.-F. (2014) Monitoring of geosmin producing *Anabaena circinalis* using quantitative PCR. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 58(4):297-307.
- 4) 岸田直裕, 藤瀬大輝, 秋葉道宏 (2019) 定量PCRによる水道水源に存在するジェオスミン産生*Anabaena*属の早期検出・定量. *用水と排水*, 61(11): 55-61.