

VII-26

釜房湖かび臭発生藍藻類の FISH 法による検出

○東北学院大学大学院 学生員	阿部 隆弘、東北学院大学大学院	田山真由美
東北学院大学	林 麻理子、東北学院大学	我妻 大
前澤工業（株）	正会員 及川 栄作、東北学院大学大学院 学生員	渡部 英
東北学院大学	星宮 務、東北学院大学	正会員 石橋 良信

1. はじめに

釜房湖のかび臭はダム築造の翌年からではじめており、2-メチルイソボルネオール(2-MIB)産生種の *Phormidium tenue* (*P.tenue*) が原因の藻類である。昭和 59 年までは激しく臭気がでていたが、このような弊害に対処するため、建設省では昭和 59 年 6 月に空気揚水筒を 2 筒設置し、同年 9 月、昭和 62 年、平成元年と増設され、現在 9 筒が稼働している。

空気揚水筒は、ダムの底から空気を間欠的に送り出しながら湖内の水を循環させる装置である。この操作により、低層の冷たい水を表層にもってきたり、表層の水を光の届かない下層に導いて藻類の増殖を抑える効果があるといわれている。事実、揚水筒設置前は *P.tenue* の藻体数が数千、甚だしくは 1 万個、かつかび臭が発生していたものが、設置後は数 100 のオーダーになり、かび臭は発生していない時期が続いた。このことから釜房湖は全国的にも空気揚水筒が成功した例として着目されてきた。しかし、平成 8 年冬季から再びかび臭が発生しだし、現在は夏季、冬季で悩まされている。同時に空気揚水筒が絶対ではないことになり、浄水場ではその処理に苦慮している。なお、かび臭対策のために茂庭浄水場では粉末活性炭を、富田浄水場では粒状活性炭を用いて臭気を除去している。

最近の原因生物に関する調査では、顕微鏡のもとで観察し、*P.tenue* と判定されながらもかび臭を生みだすもの、生みださないもの、さらに細胞表面に藍藻のもつ色素が現れて褐色にみえるもの、冬季にも発生するものなど数種類の *P.tenue* かまたは近縁の種が存在していることがわかってきている。本研究室ではこれらの藍藻 9 株の 16S リボソーム(r)RNA に基づく系統発生分類を試み、釜房湖の藍藻類は大きく分けて 2 群、細かく分けて 4 群に別れることを見い出している。さらに、本研究室では、このような釜房湖や地球・人間環境フォーラムから譲与された琵琶湖や愛知県の *P.tenue* の 16SrRNA の塩基配列情報と他の藍藻の 16SrRNA の塩基配列を比較することによって、釜房湖の *P.tenue* に種特異的な塩基配列部位を数箇所特定した。

特定した *P.tenue* に種特異的な塩基配列部位は PCR や蛍光プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)法に用いて、迅速にかび臭発生藍藻類を計数および同定して、かび臭発生の監視やかび臭処理対策に役立てることができると考えられる。

本研究では特定した *P.tenue* に種特異的な塩基配列部位に対する蛍光標識したオリゴヌクレオチド DNA プローブを作製した。そして、この蛍光プローブを用いて釜房湖の表層水を試料にして Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)法を試み、*P.tenue* の検出を試みた。

2. 研究方法

釜房湖の水は 6 月～11 月までの表層水を用いた。採取した数 L の水は 7,000 rpm で遠心して、全微生物

を集めた。微生物を含む沈澱物は 3.7 %ホルムアルデヒド溶液に懸濁して、FISH に使用するまで 4℃保存した。スライドガラスのコートはクロムアラムゼラチン法を用いた。FISH に用いた *P.tenue* の 16SrRNA に対する蛍光プローブの配列はの大腸菌の 16SrRNA で 533 部位(PT533)および 641 部位(PT641)の 20 塩基を用いた。プローブの標識に用いた蛍光色素は X-ローダミンまたは FITC を用いた。FISH 法は Amann らの方法に従って行った。

3. 研究結果

- 1) プローブを用いないコントロールの環境水を用いた場合の蛍光顕微鏡像を写真 1 に示し、X-ローダミンで標識した PT533 プローブを用いた場合の蛍光顕微鏡像を写真 2 に示した。二つの写真を比較した結果、プローブを用いない場合も用いた場合も *P.tenue* と考えられる藍藻が赤色に光り、違いは観察されなかった。この実験のあとで *Anabaena* 属などの藍藻も蛍光顕微鏡で観察したところ、赤く光る結果が得られ、この現象は多くの藍藻類に共通して観察されることが確認された。
- 2) 黄色の蛍光色の FITC で標識したプローブを用いた場合も、プローブを用いない場合の蛍光色と大きな違いを見出すことはできなかった。
- 3) 以上の結果から、本研究のコンディションによる FISH 法は釜房湖の *P.tenue* を特異的に検出することはできないことが示された。

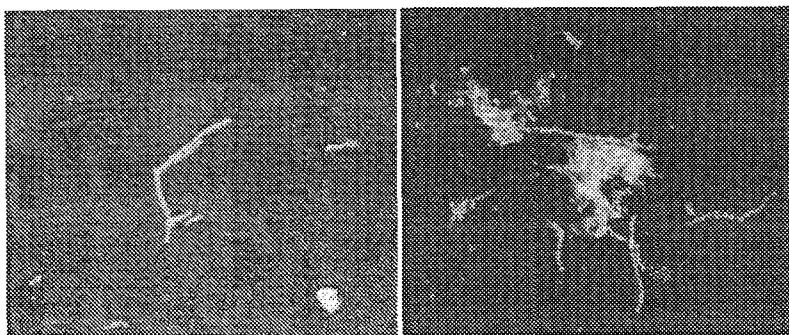


写真1 プローブ (-)

写真2 プローブ (+)

4. おわりに

本研究で用いた蛍光顕微鏡のフィルターはローダミンも FITC もカバーすることができる蛍光波長の範囲が広いものである。今後は FITC のみを透過させることができる波長域の狭いフィルターを用いて、FISH 法を試み釜房湖の *P.tenue* を特異的に検出することができるか確認したいと考えている。また、今回検出した藍藻の発する特異的な赤色の蛍光物質は同定できてないが、この蛍光強度は今後藍藻の増殖度を知る指標として使用することができるのではないかと考えられた。

参考文献

Amann, R.I., et al. (1990) J. Bacteriol. 172, pp.762-770.