

VII-16

2003 年釜房湖で単離されたかび臭産生藍藻類の同定

東北学院大学大学院
新エネルギー産業技術総合開発機構、NEDO フェロー
元

学生会員 ○浅沼史絵
正会員 及川栄作

東北学院大学 フェロー会員 石橋良信

1. はじめに

近年、高度処理の普及にともなって、かび臭問題は以前のように注目されなくなった。しかし、水源となる貯水池では依然として、かび臭産生藍藻類は増殖し、かび臭発生の根本的な解決につながっていない。したがって、特に中小の企業体では未だ対策に苦慮しているところも少なくない。それに加え、水道基準に関する省令が平成 16 年度 4 月 1 日から施行され、水道基準値にかび臭物質であるジェオスミンと 2-methylisoborneol (2-MIB) が加えられ、かび臭に対する制御をより一層、厳しくする必要が生じた。しかし、水源となるすべての貯水池から、かび臭を産生する藍藻類が存在しているのではない。また、かび臭を産生する藍藻類が数多く存在しているにも関わらず、臭いをあまり感じなかったり、それとは反対に臭いを感じたりする場合もあることをよく耳にする。

本研究では、このような事象に対して、釜房湖でのかび臭産生藍藻類 *Phormidium tenue* (*P. tenue*) を対象とした顕微鏡では判別しにくい藍藻類の種の判断を現場で簡易に同定するための方法として、種特異的 PCR と開発したによる藍藻類の同定法を開発し、この方法を用いて 2003 年に釜房湖で新たに発生した池の水を単離、同定を試みた。

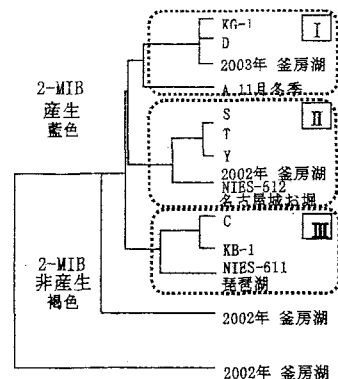
なお、対象とした釜房湖は東北地方にあり、かび臭問題が生じるダム湖としてよく知られており、冬季にも発生する希有な湖である。釜房湖のかび臭は 2-MIB を産生する *P. tenue* が原因藻類である。

2. 種特異的 PCR を用いた同定法

釜房湖に生息し、2-MIB を産生する *P. tenue* に着目し分類を試みた結果図 1 のように大きく 3 つのグループに分けられた。第 I グループは藍色株で 2-MIB を産生し、冬季に発生する株を含み、釜房湖のみに生育するグループ、第 II グループも藍色株で 2-MIB を産生するが、名古屋城から単離された NIES-512 株を含むグループ、第 III グループは褐色株で琵琶湖から単離された NIES-611 を含むグループである。褐色の株は 2-MIB を産生せず、藍色のみが 2-MIB を産生するグループである。はじめに、用いた A 株、B 株、C 株、D 株、KG-1 株、KB-1 株、S 株、T 株、Y 株、NIES-512 株、NIES-611 株のそれぞれの塩基配列の特異性の高い部位の検索を行なった。得られた塩基配列の相同性を調べ、特に塩基配列の異なりが集中している 3 箇所について GC 含量、塩基配列の片寄り、塩基数などを考慮に入れて、約 20 塩基長のフォワードプライマー [F] を 6 種類、リバースプライマー [R] を 5 種類、計 11 種類の PCR プライマーを合成し、30 通りの組み合わせにより、16S-rDNA の増幅産物を調べた。増幅産物の良否で株の同定ができるプライマーの組み合わせ(プライマー 9 種、組み合わせ 7 種)を表 1 に示した。

表 1 *P. tenue* 同定のためのプライマー組み合わせ

グループ 別菌株	1F-7R	2F-8R	3F-7R	4F-8R	5F-7R	5F-8R	6F-9R
A	×	○	×	○	×	○	○
D	×	×	○	×	×	×	×
KG-1	×	×	○	×	×	×	×
512	○	×	×	○	○	○	△
Y	○	×	×	○	○	○	×
S	○	×	×	○	○	○	×
T	○	×	×	○	○	○	×
611	×	×	×	○	○	○	○
KB-1	×	×	×	○	○	○	○
C	×	×	×	○	○	○	○
B	×	×	×	×	○	○	○
-DNA control	×	×	○	×	×	×	×


図 1 釜房湖の *P. tenue* 系統樹

3. 実験方法

釜房湖から採水した試料水を、1×CT 寒天培地に培地に塗抹し、シングルコロニーを形成させた。形成されたシングルコロニーを植え継ぎ純水培養を行った。培養液 1.5 ml を 1.5 ml 容エッペンドルフチューブに移し、4℃、15,000 rpm、1 min で遠心した。約 20 μ l の培地を残し、上清を捨て、菌体を懸濁させた。懸濁した培地を 0.2 ml 容の PCR チューブに全量移し、サーマルサイクラーで 99℃、10 min 加温し、容菌し、この内の 1 μ l を PCR 反応に使用する。PCR 条件は、変性反応 94sec アニール 45sec 伸長反応 2min を 25 cycle 行なった。PCR 反応終了後、反応液を 2 μ l 電気泳動し、16S-rDNA が増幅されたか確認した。増幅バンドが検出されなかった場合は、一度 PCR 反応が終了した反応液 1 μ l を同じ PCR 反応で 10~20cycle(通常は 10 cycle) PCR を行った。PCR 後に反応液 2 μ l を電気泳動し、16S-rDNA の増幅産物を確認した。

4. 実験結果

2003 年度釜房湖から単離した *P. tenue* の PCR 同定結果写真を写真 1 に示す。検体 NO. 1 および NO. 2 の違いは、単離した寒天培地上のコロニーの違いであるが、いずれも、プライマー 3F-7R を用いた場合のみに 737 Kb にバンドを確認することができ、3F-7R のみで増殖産物が検出された。表 1 の簡易分類表より、この株は第 I グループの釜房湖のみに確認されている D および KG-1 株と同じグループであると同定できた。

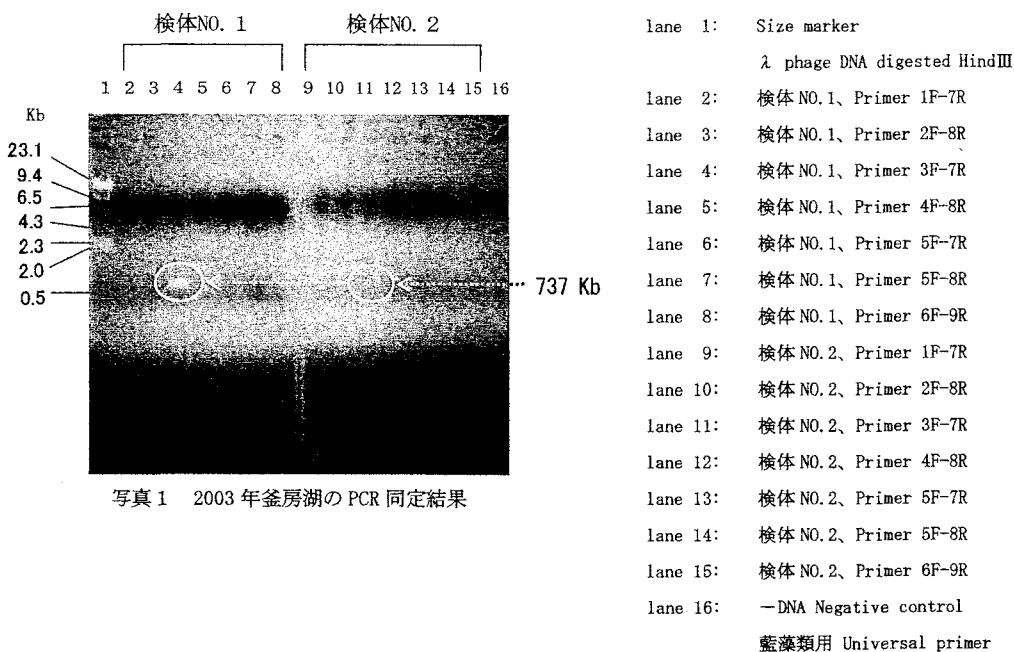


写真 1 2003 年釜房湖の PCR 同定結果

5. おわりに

本特定法あら、顕微鏡下では判別しにくい *P. tenue* の、迅速な分類・同定を行なうことが可能になった。また高度な遺伝子工学の知識を必要とせず、PCR 装置もさほど高価ではないことから、現場の水道技術者が容易に活用されることが考えられる。また、水道基準に関する省令が施行されるにあたり、オゾン処理や活性炭処理などの高度処理を行なう必要が生じた。しかし、それらの施設は建設費も維持費も高い。本法のような手法を用い、容易に *P. tenue* の同定ができるならば、かび臭を産生する、あるいは産生しない藍藻類に対して高価な活性炭処理注入量を適切に見極めることができるなど、直接、高度処理へのコスト削減につながる可能性がある。

最後に実験遂行にあたり、卒研生の大橋直哉君、佐々木悠也君に感謝する。