

DGGE 法を用いた釜房湖の付着藻類の同定法の確立

東北学院大学工学部 学生員 ○山川裕美恵

東北学院大学工学部 太田康裕, 村上将也

東北学院大学工学部 正会員 韓連熙, フェロー 石橋良信

1. はじめに

釜房湖では貯水開始から現在に至るまで、かび臭が報告されており、原水のかび臭の発生と抑制に苦慮している。本研究では、かび臭産生に影響すると考えられる付着藻類を解析する手法として、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（PCR-DGGE 法）を適用し、付着微生物の属種を同定した。付着微生物の同定、把握は、付着するかび臭産生藻類の水質および微生物への寄与について究明する一助と考えた。

2. 実験方法

サンプルは 2009 年 9 月釜房湖に設置した付着装置から採取した付着藻類を対象にした。サンプル採取後、染色体を抽出し、DNA を PCR にかけた。その際に使用した primer は EUB 338F-GC と UNIV 907R である。増幅された PCR 産物は DGGE 法で電気泳動にかけ、回収した付着生物のサンプルの解析を行った。DGGE 法は電圧 70 V、泳動時間 20 h、Buffer 温度 58℃に条件を固定し泳動した。DGGE 法で回収されたゲルは、さらに PCR 法で増幅、QIAXII kit (QIAGEN, GmbH, Germany)で精製し、シーケンサーで相同性解析を行った。解析に使用した遺伝情報サイトは DDBJ 上のデータベースであり、塩基配列の結果をもとに微生物を分類した。なお、DGGE 法後の PCR は primer を 520F と 907R に替えて増幅した。

3. 実験結果および考察

3-1 DGGE 法による微生物の分類

20 h の泳動で同定された付着微生物の割合を円グラフとして図-1 に示す。

図-1 より、Cyanobacteria（藍藻類）と picoplankton が全体の約 7 割を占めており、釜房湖に存在する付着性の生物叢は、藍藻類が中心であることが判明した。Cyanobacteria の中には、以前からかび臭産生藻類として釜房湖に生息している藍藻類の *Phormidium* 属の他、同様に代表的なかび臭産生生物である *Oscillatoria* 属や *Anabaena* 属が検出された。Cyanobacteria 以外の微生物は、Bacteria 14%、*Burkholderia* 8%、*Bacillus* 6%、picoplankton 5%、*Streptomyces* 1% が検出された。

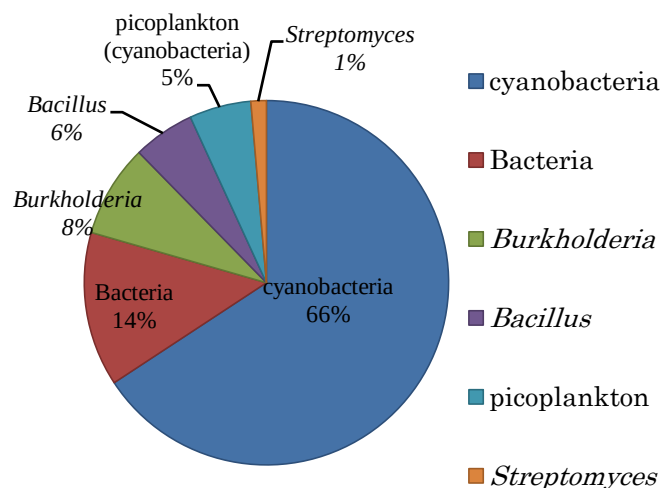


図-1 DGGE 法で検出された生物叢の割合

キーワード：DGGE 法、かび臭、付着微生物

住所：多賀城市中央一丁目 13 - 1・電話 022 - 368 - 7418, FAX : 022 - 368 - 7070

図-1 で得られた藍藻類を、さらに詳しく図-2 に表示した。

Cyanobacteria の中においてユレモ目は 8 割を占めた。ユレモ目の他に *Cyanobacterium*, および *Synechococcus* が 6%, *Fischerella* は 4%, それ以外は 2% 検出された。藍藻類の中には、2-メチルイソボルネオール (2-MIB) を産生する *Phormidium tenue* や、picoplankton など、かび臭物質を産生する微生物が多く含まれていた。picoplankton は、かび臭を産生するものや、ろ過水のブレイクスルーをきたすものも存在する。

なお、ユレモ目は文字に下線を表示した。

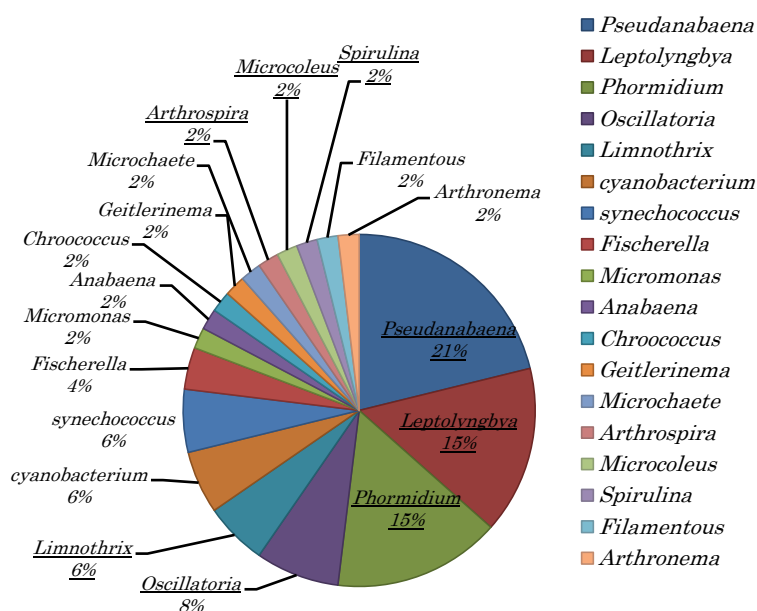


図-2 DGGE 法で検出された藍藻類の割合

3-2 PCR における primer の変更

通常 DGGE 法で得られた DNA 断片を PCR で増幅する場合、DGGE 法の際に付加した GC クランプが影響し、スミアなどが発生したため増幅が困難であった。今回 F 側の primer を EUB 338F-GC から、UNIV 520F に変更したところ増幅がみられた。その理由として、F 側の primer を GC クランプから離れたことにより、GC クランプの影響を受けずに増幅が進んだと推測される。したがって、従来困難であった DGGE 法後の PCR に成功した。DGGE 法の確立により、さらなる適用の可能性があると考えられる。

4. おわりに

付着藻類を見出す手法として DGGE 法を試みた結果、20 h の泳動で picoplankton を含め、藍藻類が約 7 割検出された。したがって、釜房湖に存在する付着性生物の多くは藍藻類であると考えられる。

将来の展望として、経月的に釜房湖の付着藻類を把握し、水中への付着藻類の挙動について考える必要がある。付着藻類同定を行い、かび臭物質の濃度や発生時期と比較できれば、かび臭の発生予測および抑制に寄与できると考えられる。

参考文献)

BIO-RAD 社 微生物群集解析アプリケーションマニュアル Vol 6