

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25281042

研究課題名(和文) 淡水環境におけるかび臭発生の原因解明とその発生抑制手法の開発

研究課題名(英文) Analysis of musty odor production in the freshwater environment and development of its occurrence suppression scheme

研究代表者

杉浦 則夫 (SUGIURA, Norio)

筑波大学・国際室・特命教授

研究者番号：10302374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：淡水環境で発生する異臭味の主要原因物質であるかび臭物質、geosminや2-MIBを産生する原因生物の一つ放線菌を研究対象に、かび臭物質発生に係る環境因子とその環境因子が変化した時の反応を解析した。その結果、放線菌のかび臭発生に可視光の波長の違い、溶存酸素濃度やその変化が影響を与えることが判明した。また、浄水場生物処理施設の生物膜を用いた通年のかび臭物質分解実験から、10℃以上の水温環境下では生物膜のかび臭物質の分解活性が温度依存的に高まること、生物膜中にはかび臭物質分解菌が常在していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In recent years, the occurrence of musty odor originated from microorganisms in freshwater environments has been reported in all over the world. In this study, we studied that what kind of environmental factors influence to musty odor production by actinomycetes and how to change musty odor production when the environmental factor has changed. As a result, the difference of wavelength and intensity of visible light, and dissolved oxygen concentration and its variation affected musty odor production by actinomycetes. Also, we found that the musty odor-degrading microbes existed in the biofilm of a practical biological water treatment plant throughout the year, and the musty odor degradation rate changed throughout a year, indicating that musty odor degradation rates were greatly affected by water temperature. Moreover, although the musty odor degradation rate was inhibited at lower temperatures, it can be recovered at appropriate water temperature.

研究分野：水環境生態工学

キーワード：かび臭 水資源・水システム 放線菌 生態工学 安全・安心

1. 研究開始当初の背景

人口増に伴い淡水の需要は増すばかりだが、世界中で顕在化している水質汚濁の進行により水量はあるが水質が悪化したため使用できない水源が増加している。そのため、貴重な淡水資源を確保・保全するための水質汚濁対策は世界中で緊急かつ切実な課題となっている。湖沼などの富栄養化はアオコの問題を引き起こすばかりでなく、湖内の放線菌や藍藻類が産生するかび臭発生の要因となり、浄水処理や水産業において大きな問題となっている(Suffet et al., 1996)。かび臭物質は2~3 ng/Lの極低濃度でも人間の嗅覚で感知され、頭痛等の原因となり得る(Young et al., 1996)。国内では水道法第4条に基づく水質基準に関する省令でかび臭物質である2-MIB(2-methylisoborneol)とジオスミン(geosmin)は、共に10 ng L⁻¹以下しなければならない。このため、水道事業者はかび臭物質に対して一層の水質管理の徹底が要求されるが、ランニングコストが数億円規模の高度浄水処理である粉末活性炭処理方法以外に根本的な対策が無く、上水からかび臭物質を除去するために膨大な経費(数億円/年、茨城県他)をかけており、財政を圧迫させる要因となっている。水源池ではかび臭が継続的に発生しており、最近では浄水場の処理量を越える(処理後も10 ng L⁻¹以上で存在する)かび臭発生事例が多くなっている(Kishida et al., IWA conference, 2011)。さらにかび臭は臭い吸着による魚介類の価値低下という二次被害(例: しじみ(宍道湖) えび、なまず(タイ) 他)を生じさせることから、水源池や湖沼における安価なかび臭発生抑制手法の開発は上水や魚介類の価値の維持や安価な浄水処理のために希求されている。かび臭に関して法律等で水道水質の規定があるのは我が国と大韓民国のみであるが、かび臭に関する研究は世界中から注目を集めている。我が国ではかび臭は、水道水の異臭味被害の60%を占める問題であり、その被害は現在も、事業者数で年間60~80箇所、人口は100万~400万人で推移している(図1; 厚労省、2007)。

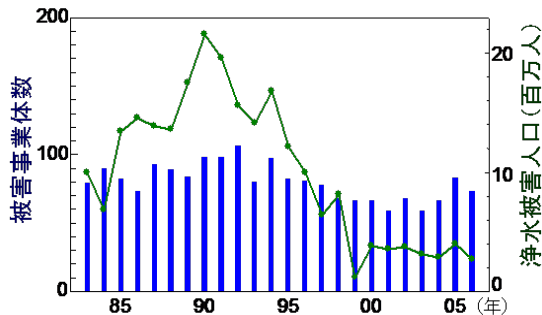


図1. 日本国内の異臭味被害の発生状況

厚労省が策定した「水道ビジョン」(H16)でも異臭味対策は重要項目に列挙され、安価で安心な上水供給には、水源池でのかび臭物質産生を抑制する対策および安価で効率的

なかび臭物質除去システムが必須である。しかし、かび臭物質産生生物のかび臭物質産生の制御機構は未解明である。

2. 研究の目的

研究課題では、現場調査研究と室内実験研究を駆使し、かび臭産生放線菌と藍藻類の個体群数、かび臭発生に介在する環境因子とかび臭発生との関係解析およびかび臭物質産生の制御機構を解明することを目指す。そして、最終的には水環境中のかび臭発生制御機構を解明することで、人為的なかび臭発生抑制法の構築を目標として設定した。

3. 研究の方法

かび臭は主に夏季に発生することが一般的に知られているが、茨城県霞ヶ浦は、近年、12月~3月の冬季に藍藻類が原因と考えられる高濃度のかび臭が発生している(茨城県水質年報)。それ以前は、春期に放線菌が原因と考えられる高濃度のかび臭が発生していた(Sugiura et al., 2000)。かび臭原因生物とかび臭発生とのメカニズムは未解明であり、一度かび臭が発生した場合、藍藻類と放線菌のどちらが主原因生物なのかがわからず、水源池対策がほとんどできないのが現状である。

そこで、霞ヶ浦における水中かび臭物質濃度の季節変動、水中および底泥中物理化学環境因子の変動が放線菌のかび臭物質産生能に与える影響について研究を行った。また、産生されたかび臭物質の効果的な除去方法を検討するため、2012年11月から、霞ヶ浦を水源とする浄水場Aの生物処理槽内に担体を採取1ヶ月前に毎回漬浸し、1ヵ月後これらを生物膜試料として回収した。各月に回収した担体を用い単位担体表面積あたりの生物膜乾重量並びにATP濃度を測定した。担体回収時に浄水場より採取した現場水を孔径0.2 μmのメンブレンフィルターでろ過し、このろ液20 mL及び生物膜付担体(表面積30 cm²相当)を100 mLバイアル瓶に入れ、液中geosmin濃度が1.5 μg L⁻¹になるようgeosmin溶液を加えた後密栓し、現場水温及び25度、暗所下において100 rpmで5日間浸透培養した。controlとして同表面積の新品の担体を入れた系を用いた。0、0.5、1、2、3、5日目における液中のgeosmin濃度をGC/MSにより測定した。

かび臭物質産生藍藻類は、分子生物学的解析ツールが揃っていない属であることから、本申請では分子生物学的解析ツールが揃っている放線菌を研究の主対象に設定し環境因子に対する放線菌の応答を解明することを目的に室内実験を行った。まず、放線菌のかび臭物質産生活性に関わる環境因子候補として光応答があることから、特定波長照射が可能なLED照明を用いた、可視光各波長照射における放線菌のgeosmin産生量の変化について、全ゲノム配列が決定されている

Streptomyces coelicolor A3(2) M145 株を用いて行った。M145 株を YMPD 液体培地で 2 日間前培養し、洗浄・遠心濃縮後、炭素源入り SFM 平板培地に 10^5 CFU mL⁻¹ となるように調整後接種した。光強度が調節可能な LED 照明パネル（青・白）を用い、光強度 1, 20, 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に設定した光照射および暗所で 28 度、7 日間培養を行った。培養後メタノールおよび n-ヘキサンを用いて geosmin の抽出を行い、GC/MS で geosmin 濃度を測定した。各実験系は 5 連で行い、最大値及び最小値を除く 3 連のデータを解析に用いた。

また、既往報告から低酸素条件が放線菌のかび臭物質産生に影響を与えていることが予想されているが、未解明である。Geosmin 産生株である *Streptomyces coelicolor* A3(2) を実験に供した。*S. coelicolor* A3(2) を YMPD 培地で 48 時間培養後、菌体を洗浄・遠心濃縮した。それを、100 mL バイアル瓶に入った DO 濃度調節済み Dispersed-BS 培地 (20 mL) に接種し、30 度、暗所、120 rpm で 72 時間培養した。実験には、DO が 8 mg L⁻¹ の系および 0 mg/L の系を用いた。DO を 8 mg L⁻¹ とするため、オートクレーブ滅菌後の Dispersed-BS 培地を室温で一晩静置し、大気中の酸素で飽和させた後、密栓した。DO を 0, 0.4, 2.0, 4.0 mg L⁻¹ とするため、培地を滅菌後ただちに純窒素、もしくは純窒素と酸素の流量比を変えた混合ガスで曝気し、密栓した。培養開始後 0, 24, 48, 72 時間に、分光光度計を用いて、波長 450 nm における培養液の吸光度 (OD450) を測定し、増殖曲線を作成した。次に、嫌気条件で 1 日または 3 日間培養後、孔径 0.2 μm のフィルターを通して無菌化した空気の曝気により、酸素環境を DO 8 mg L⁻¹ の好気条件へ移行させ、さらに 3 日間培養した。コントロール系として、DO 0 mg L⁻¹ (窒素曝気) の嫌気系および 8 mg/L (空気曝気) の好気系を作成し、3 日間培養した。以上すべての実験系について、培養液中の geosmin をヘキサンで抽出し、その濃度をガスクロマトグラフ質量分析計で測定した。

4. 研究成果

茨城県霞ヶ浦 A 浄水場の霞ヶ浦湖水の水温・DO・pH は、研究機関中、水温平均 16 度 (最高 28 度 (8 月)、最低 5 度 (1 月))、溶存酸素濃度が飽和～過飽和状態、pH が中～弱アルカリ性であった。生物処理槽内の生物膜量は月により異なるものの、単位担体当たりの ATP 濃度はいずれの月も 5×10^{-2} nmol/mg 程度で推移した。生物膜の geosmin 分解速度水温が 10 度以下となる 11 月～2 月において顕著に低下した (図 2)。浄水場原水では、2、3 月にかけて geosmin 濃度が 150 ng L⁻¹ 程度検出された。また、生物処理後の水では原水よりもかび臭物質濃度が低下する傾向が認められた。原水と生物処理水の差より生物処理におけるかび臭物質除去率を算出すると、水温が 10 °C 以下となる 12 月、1

月、2 月における除去率はその他の月と比較し顕著に低下しており、年間を通してみると、geosmin 分解速度と水温の間に有意な相関があることが判明した。

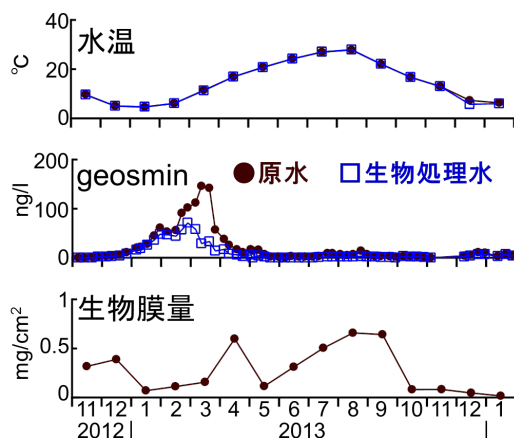


図 2. 霞ヶ浦原水および浄水場処理水における水温、geosmin 濃度、生物膜量の変化。

各月に採取した生物膜を用いた現場水温条件下での geosmin 分解実験から、すべての月で生物膜による geosmin 分解が確認されたが、生物膜試料回収時の水温が低い程、geosmin の分解開始時間が遅くなる傾向が認められた。25 度の水温環境で培養した場合、すべての月で geosmin 分解が確認されたことから、浄水場 A 生物処理槽には geosmin 分解菌が常在しており、水温が低下することで geosmin 分解菌の geosmin 分解活性が顕著に低下すると推測された。また、同じ水温環境下では、秋季よりも春季の方が geosmin 分解速度が大きい傾向が認められたことから、水温だけでなくかび臭物質分解菌群の構成によってもかび臭物質分解速度が異なることが考えられる。

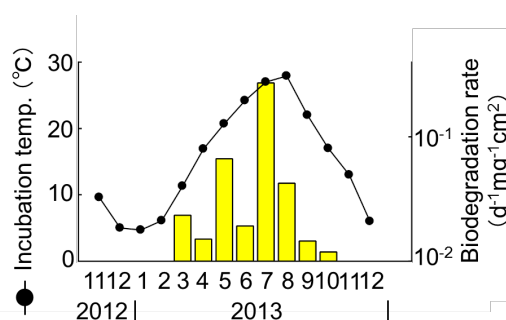


図 3. 月毎の現場水温環境下での生物膜による geosmin 分解速度の変化。(分解速度係数は培養開始 0～1 日目における control 及び生物膜付着担体添加系の geosmin 濃度の差より算出)

7 日間培養後の平板プレートには、コントロール (暗所) を含め全ての光照射条件下で全面に *S. coelicolor* A3(2) の菌糸が形成していた。赤色光および緑色光の光強度 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 照射で暗所培養と比較し geosmin 産生量の有

意な増加が認められ、 $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 照射で有意な減少が認められた(図4)。青色光および白色光では光強度 $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 照射で暗所培養と比較して geosmin 産生量の増加傾向が、光強度 $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で減少傾向が認められた。また、平板プレートあたりの産生 geosmin 量を比較すると、長波長光(赤・緑)よりも短波長を含む光(青・白)照射の方が大きかった。

光強度 $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ から $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の範囲では全ての波長光で、光強度を強くすることで *S. coelicolor* A3(2) の geosmin 産生量は増加し、 $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上の光強度で geosmin 産生量が減少したことから、放線菌の geosmin 産生に光が影響すること、光強度の閾値が存在することが推測された。

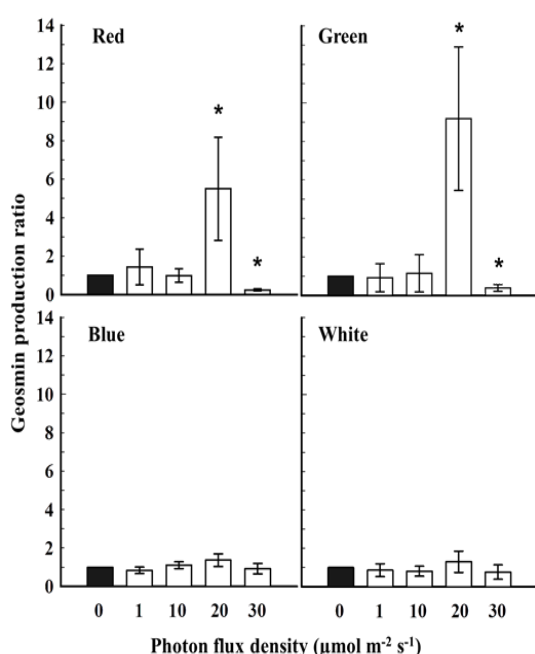


図4. 異なる波長光および光強度環境下で7日間培養後の *S. coelicolor* A3(2) により産生された geosmin の濃度の相対比。geosmin 濃度比はそれぞれの暗所培養の平均 geosmin 濃度を 1 として算出した。エラーバーは 4 回の独立試行から算出した標準偏差を示す。* 暗所培養と比較して有意差有り ($p < 0.05$)

培養開始時の溶存酸素濃度と放線菌の増殖、geosmin 産生に関しては、 $\text{DO } 8 \text{ mg L}^{-1}$ の系では、培養開始後 24 時間まで対数増殖期にあり、その後 72 時間まで定常期が継続した。geosmin 濃度は対数増殖期に増加したが、定常期には増加しなかった。したがって、 $\text{DO } 8 \text{ mg L}^{-1}$ の好気環境下で、*S. coelicolor* A3(2) は対数増殖期に geosmin を産生し、定常期には産生しないことが明らかとなった。 $\text{DO } 4 \text{ mg L}^{-1}$ および 2 mg L^{-1} の系では、定常期の OD450 がそれぞれ $\text{DO } 8 \text{ mg L}^{-1}$ の系の 8 割および 5 割程度となり、DO 濃度の低下に伴い

増殖細胞数が減少したことが確認された。これまでに、大気環境下および窒素曝気環境下で *S. halstedii* を培養した場合、窒素曝気環境下の *S. halstedii* の増殖が抑制されたことが確認されている (Schrader and Blevins, 1999)。したがって、DO 濃度の減少に伴い *S. coelicolor* A3(2) の増殖が抑制されることが強く示唆された。一方、geosmin 濃度は対数増殖期から定常期にかけて増加し、培養開始後 72 時間に $\text{DO } 8 \text{ mg L}^{-1}$ の好気環境下と同程度となることが確認された。好気環境下に比べ増殖細胞数が減少したにも関わらず geosmin 濃度は同程度であったことから、 $\text{DO } 4 \text{ mg L}^{-1}$ および 2 mg L^{-1} の貧酸素環境下では、DO 濃度の低下に伴い *S. coelicolor* A3(2) の 1 細胞あたりの geosmin 産生量が増加したことが確認された。これまでに、酸素濃度 8% の系における *Streptomyces albidoflavus* の geosmin 産生量が、酸素濃度 16% の系を上回ったことが報告されている (Sunesson et al., 1997) こちからも DO 濃度の低下に伴い放線菌の geosmin 産生能が活性化される可能性が強く示唆された。

$\text{DO } 0.4 \text{ mg L}^{-1}$ および 0 mg L^{-1} の系では、培養期間中 *S. coelicolor* A3(2) の増殖は認められず、geosmin 濃度も増加しなかった。したがって、 $\text{DO } 0.4 \text{ mg L}^{-1}$ の著しい貧酸素環境下、および $\text{DO } 0 \text{ mg L}^{-1}$ の嫌気環境下では、*S. coelicolor* A3(2) は増殖せず、geosmin も産生しないことが明らかとなった。また、*S. coelicolor* A3(2) の増殖および geosmin 産生が $\text{DO } 0.4 \text{ mg L}^{-1}$ の系では確認されなかったものの $\text{DO } 2 \text{ mg L}^{-1}$ の系では確認されたことから、 $\text{DO } 0.4\text{-}2 \text{ mg L}^{-1}$ に、*S. coelicolor* A3(2) の増殖および geosmin 産生が可能となる DO 濃度の下限値が存在することが示された。これまでに、*S. halstedii* が窒素パージ環境下で geosmin を産生したことが確認されている (Schrader and Blevins, 1999)。そのため、geosmin 産生が可能となる DO 濃度の下限値は、放線菌の種に依存することが示唆された。

本研究から、水源池底層が貧酸素環境になると放線菌 1 細胞あたりの geosmin 産生量が増加するため、放線菌由来の geosmin 濃度が増加する可能性が示唆された。特に、晩春から初夏の水源池底層の貧酸素環境は、晩秋から初冬における貧酸素環境よりも長く継続する。この長期的な貧酸素環境において放線菌由来の geosmin 濃度が増加することが、夏季のかび臭被害多発の原因の 1 つとなっている可能性がある。

次に継時的に DO 濃度を变化させた系について、1 日間の嫌気後、好気へ移行させた系では、培養開始後 1-2 日目に対数増殖期となり、2-4 日目に定常期となった。定常期の OD450 は、好気コントロール系の定常期と同程度の約 1.9 だった。3 日間の嫌気後、好気へ移行させた系では、培養開始後 3-5 日目の 2 日間対数増殖期を示した。5-6 日目の定常期の OD450 は約 1.1 となり、この値は好気コン

トロール系の6割程度だった。よって、1日程度の嫌気環境曝露は増殖に影響を及ぼさないが、3日程度の曝露は対数増殖を緩やかにし、定常期の細胞密度を低下させることが明らかとなった(図5A)。

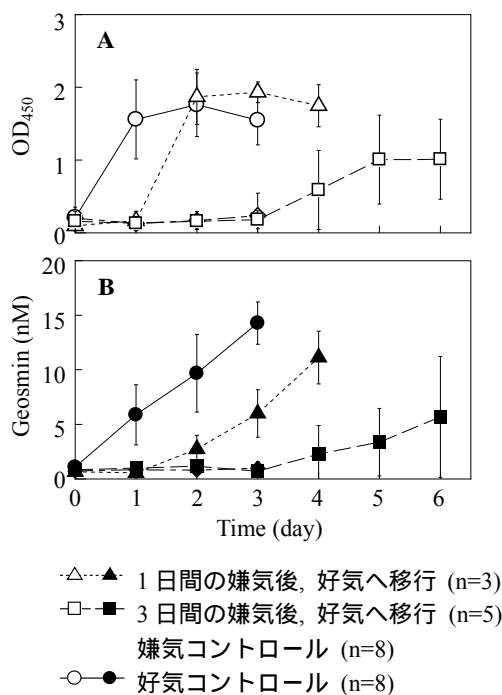


図5. 期間の異なる嫌気環境曝露後の *S. coelicolor* A3(2)のA; 細胞密度 (OD₄₅₀), B; geosmin 濃度の経時変化

geosmin 濃度については、1日間の嫌気系の1-2日目における増加が、好気コントロール系の0-1日目と比較し小さかった。3日間の嫌気系では、1日間の嫌気系と比べ geosmin 濃度がより緩やかに増加した(図5B)。OD₄₅₀あたりの geosmin 濃度は好気コントロール系では1日で約5 nM/OD₄₅₀に達したが、この値に達するまでに1日間の嫌気系では2.5日、3日間の嫌気系では3日かかった。また、各系の好気条件移行後3日目における値は、好気コントロール系は約10 nM/OD₄₅₀、1日間の嫌気系は約7 nM/OD₄₅₀、3日間の嫌気系は約5 nM/OD₄₅₀となった。以上の結果から、1日および3日程度の嫌気環境曝露は、細胞あたりの geosmin 産生量に影響を及ぼし、嫌気環境の継続時間が長いほど OD₄₅₀あたりの geosmin 濃度が低下することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

Li, Q., Hirokawa, M., Utsumi, M. 2016. Effect of temperature on geosmin-biodegradation by biofilm in a biological water treatment plant. Jpn. J. Water

Treatment Biology, 52(1): 11-18. 【査読有】
Sutani, D., Utsumi, M., Kato, Y., Sugiura, N. 2014. Estimation of the phytoplankton community composition in a volcanic acidotrophic lake, Inawashiro, Japan. Jpn. J. Water Treatment Biology, 50(3): 53-69. 【査読有】

Tian, X., Utsumi, M., Shimizu, K., Zhang, Z., Sugiura, N. 2013. Degradation kinetics of geosmin by biofilm with organic carbon as a substrate. Jpn. J. Water Treatment Biology, 49(3):93-101. 【査読有】

[学会発表](計 11件)

加村瑞希、内海真生、秋葉道宏、清水和哉、かび臭物質産生微生物によるかび臭物質産生特性. 第50回日本水環境学会年会(2016年3月17日、徳島県徳島市アステイ徳島)

橋本梓、清水和哉、内海真生. 経時的な溶存酸素濃度の変化が放線菌の geosmin 産生に及ぼす影響. 第50回日本水環境学会年会(2016年3月17日、徳島県徳島市アステイ徳島)

Nurul Shahirah, S. N. A., Utsumi, M., Sugiura, N., Zuriati, Z., Nor'Azizi, O., Iwamoto, K., Goto, M., Hara, H. Characterization of musty odor producing actinomycetes in Malaysia. International Conference on Sustainability Initiative (ISCI2015) (2015年8月25日、マレーシアクアラルンプール市 UTM KL, Razak Tower)

Aeyshah, A. K., Nurul Shahirah, S. N. A., Hara, H., Nor'Azizi, O., Zuriati, Z., Sugiura, N., Utsumi, M. Isolation and molecular detection of geosmin production bacteria from source of drinking water, Malaysia. International Conference on Sustainability Initiative (ISCI2015) (2015年8月25日、マレーシアクアラルンプール市 UTM KL, Razak Tower)

金沢彩子、清水和哉、杉浦則夫、内海真生. 光の波長及び強度が放線菌の geosmin 産生に及ぼす影響に関する研究. 第49回日本水環境学会年会(2015年3月16日、石川県金沢市金沢大学)

橋本梓、金沢彩子、清水和哉、内海真生. 溶存酸素濃度が放線菌の geosmin 産生に及ぼす影響. 第49回日本水環境学会年会(2015年3月16日、石川県金沢市金沢大学)

金沢彩子、清水和哉、内海真生、杉浦則夫. Streptomyces Coelicollor A3(2)の geosmin 産生への光の波長と強度の影響. 日本水処理生物学会第51回大会(2014年11月13日、山梨県甲府市 JA 会館甲府)

Kanazawa, A., Shimizu, K., Sugiura, N., Utsumi, M. Influence of light wavelength and intensity on geosmin production of Streptomyces coelicolor A3(2). 15th World

Lake Conference (2014年9月3日、イタリアペルージャ市ペルージャ大学)

金沢彩子、清水和哉、内海真生、杉浦則夫、
放線菌の geosmin 産生に及ぼす光の影響
解析．第48回日本水環境学会年会(2014
年3月17日、宮城県仙台市東北大学川内
北キャンパス)

廣川真理子、天野千恵、清水和哉、岡野邦
宏、内海真生、杉浦則夫、生物処理法にお
けるかび臭物質の分解・除去機構解析．第
48回日本水環境学会年会(2014年3月17
日、宮城県仙台市東北大学川内北キャン
パス)

廣川真理子、天野千恵、清水和哉、内海真
生、生物処理槽内生物膜のかび臭物質分解
能の温度特性解析．第29回日本微生物生
態学会(2013年11月24日、鹿児島県鹿
児島市鹿児島大学群元キャンパス)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉浦 則夫 (SUGIURA, Norio)
筑波大学・国際室・特命教授
研究者番号：10302374

(2)研究分担者

内海 真生 (UTSUMI, Motoo)
筑波大学・生命環境系・准教授
研究者番号：60323250

間世田 英明 (MASEDA, Hideaki)
徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究
部・准教授

研究者番号：10372343

清水 和哉 (SHIMIZU, Kazuya)
東洋大学・生命科学部・講師

(3)連携研究者

()

研究者番号：