

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06331

研究課題名(和文) 浄水処理負荷を低減するカビ臭発生抑制法の開発

研究課題名(英文) Development of suppressive method of musty odor that reduce water treatment load

研究代表者

内海 真生 (UTSUMI, MOTOO)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：60323250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：極微量濃度でも人間が感知するカビ臭物質除去のため上水作成過程で大きな費用が計上され、臭い吸着で水産物の経済的損失も生じている。本研究はカビ臭物質産生微生物である放線菌がどのような環境条件でカビ臭物質を産生するのかを明らかにし、その知見に基づくカビ臭発生抑制手法開発につなげる目的で実施した。特に影響を与えると考えられた光と溶存酸素について検討した結果、光の有無は放線菌の増殖に影響しないが波長や強度がカビ臭物質産生に影響すること、好気から微好気下の対数増殖期にカビ臭物質を産生し、嫌気下では増殖もカビ臭物質産生もせず、嫌気環境継続期間が増殖やカビ臭物質産生に影響を与えることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水道水水産物にカビ臭があると、不快によるクレームや商品価値低下など社会的に大きな問題と損失が生じる。水中でのカビ臭物質産生微生物の有力種である放線菌のカビ臭産生や増殖と光環境、溶存酸素濃度環境が大きな影響を及ぼすことを示した今回の成果は、水源池など現場でのカビ臭発生対策に資する重要な知見を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：The removal of musty odor substances is a major expense in producing drinking water and causes economic loss of fishery products due to odor adsorption. This study was conducted to clarify the environmental factors under which actinomycetes, musty odor-producing microorganisms, produce musty odor substances and to develop musty odor control methods based on this knowledge. The results showed that the presence or absence of light did not affect the growth of actinomycetes. However, the wavelength and intensity of light affected their production of musty odor substances. In addition, it was found that the musty odorant was produced during the logarithmic growth phase under aerobic to microaerophilic conditions, and neither growth nor production of musty odorant under anaerobic conditions, indicating that the duration of anaerobic conditions affects the growth and production of musty odorant.

研究分野：水環境生態工学

キーワード：カビ臭物質 放線菌 光環境 溶存酸素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

湖沼水中や底泥、河床の放線菌やある種の藍藻類が産生するカビ臭物質に起因するカビ臭発生は、浄水処理や水産業において大きな社会問題となっている。しかしながら、水源でのカビ臭発生メカニズムは十分な解明に至っていない。すなわち、これまでの研究によりカビ臭物質合成経路は解明され、遺伝子レベルでカビ臭物質産生が制御されていることが判明しているが、カビ臭発生の引き金因子(カビ臭発生を惹起する条件)についてはほとんど明らかになっていないのが現状である。

カビ臭物質は2~3 ng/Lの極微量濃度でも人間の嗅覚で感知できることから、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カビ臭物質である2-MIB(methylisoborneol)とジオスミン(geosmin)の基準濃度が共に10 ng/L以下に規定されている。このため、水道事業者はかび臭物質を極微量濃度で管理しなければならない。現在の浄水処理工程では、残念ながらオゾン処理など高度浄水処理や粉末活性炭による吸着のみが除去に有効なため、カビ臭物質除去に膨大な経費(数億円/年、茨城県他)が必要となっている。水源池でのカビ臭は継続的発生のみならず、これまでに発生事例のない水源での突発的な発生が問題となってきている他、浄水場の処理能力を越える(処理後も10 ng/L以上で存在する)事例報告も増加している。さらにカビ臭は、臭い吸着による水産物の商品価値低下という二次被害(例:しじみ(宍道湖) なまず(タイ国)他)を生じさせている。従って、水源や水域におけるカビ臭発生抑制法の開発は、上水処理や水産養殖業の現場から渴望されている。我が国では、カビ臭は水道水の異臭味被害の90%程度を占める問題(H28年度)であり、被害人口は1990年代までと比較すると減少したものの近年は微増傾向にある他、被害事業者数は2013年に最大(134事業者)を記録するなど、現在も対応が難しい問題である。こうした現状から厚労省の「水道ビジョン」(H16年)でもかび臭を含む異臭味対策は重要項目に列挙されており、安心な上水供給のためカビ臭発生抑制対応策の開発と実行が希求されている。

### 2. 研究の目的

カビ臭物質産生生物のカビ臭物質産生を惹起する環境条件(引き金因子)は未解明である。本研究ではカビ臭物質産生を惹起する条件・引き金因子を明らかにし、知見に基づいたカビ臭発生抑制手法を開発するための情報を得る、ことである。

放線菌の代謝応答に関する重要な環境因子として光が存在し、青色光( $2.4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )の照射でカロテノイドが産生され、同じ光強度の赤色光の照射でカロテノイドが産生されないことが報告されている。カロテノイドとgeosminは同じテルペノイド化合物であり、ファルネシル二リン酸を共通の合成前駆物質としていることから、放線菌のgeosmin産生にも光が影響することが強く疑われている。そこで異なる波長光および光強度環境下で放線菌を平板培養し、放線菌のgeosmin産生に及ぼす光の影響を検討した。

これまでに、水源池水中の溶存酸素(DO)濃度の低下に伴い、放線菌由来のgeosmin濃度が増加したことが確認されている。しかし、大部分の放線菌は絶対好気性であると考えられており、水源池底泥などで発生する低DO濃度環境下での挙動は未解明である。そこで本研究では、放線菌のgeosmin産生に対し低DO濃度が及ぼす影響を明らかにすることを目的に、培養初期のDO濃度が異なる条件、および嫌気環境を異なる時間持続させた後、好気環境に移行した条件で放線菌を培養することで検討した。

### 3. 研究の方法

全ゲノム配列が決定されている放線菌、*Streptomyces coelicolor* A3(2)をモデル放線菌として実験に供した。*S. coelicolor* A3(2)をYMPD液体培地に接種し、暗所で30、2日間前培養を行った。形成したペレットを、炭素源を除いたBS培地を用いて洗浄・遠心濃縮した後、SFM培地平板プレートに $10^7$  CFU/mLとなるように濃度を調整し接種した。その後30のインキュベーター内で各光照射条件および暗所で、7日間培養を行った。光照射は赤色光(660 nm)、緑色光(525 nm)、青色光(470 nm)および白色光のLED照明パネルを用いた。光強度は1、10、20、30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に設定した。7日間培養後、プレート毎にメタノールおよび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8連で行い、最大及び最小を除く4連のデータを解析に用いた。

*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溶存酸素(DO)濃度調節済みDispersed-BS培地(20 mL)に接種し密栓後、30、暗所、120 rpmで72時間培養した。DO濃度は25の室温環境下で純N<sub>2</sub>ガスと純O<sub>2</sub>ガスのそれぞれの流量をマスフローコントローラーで一定割合になるように調整して曝気することで8、4、2、0.4、0 mg/L条件を作成した。培養開始後0、24、48、72時間に培養液中の菌体密度を表す波長450 nmにおける吸光度(OD<sub>450</sub>)を測定した。geosmin濃度は、各時間に分取した培養液にヘキサンを加えた後、振とうおよび遠心によりgeosminを抽出しGC-MSで定量した。

次に、嫌気環境の継続が*S. coelicolor* A3(2)の増殖やカビ臭物質産生に及ぼす影響を明らかにす

るため、嫌気条件で1日、3日、または7日間培養後、空気曝気により DO 8 mg/L に回復させた好気環境条件でさらに3日間培養する実験を行った。コントロール系として、DO 0 mg/L の嫌気系および 8 mg/L の好気系を作成し同期間の培養を行った。培養実験中、細胞密度 (OD<sub>450</sub>) および geosmin 濃度を毎日測定した。培養液中の geosmin 濃度については上述と同様の方法で測定した。

#### 4. 研究成果

水源池や湖沼水中の変化する環境因子として光強度 / 光波長に注目し、波長の違いや光強度の違いが *S. coelicolor* A3(2) のカビ臭物質産生量に与える影響について平板培養法を用いた検討を行った。その結果、暗所を含めた赤、緑、青および白の全ての波長光照射条件で全面に菌糸の形成が確認され、*S. coelicolor* A3(2) の増殖速度や細胞量には光の有無や波長や光強度の違いが影響を与えることは認められなかった。一方、全ての波長光で光強度 1 μmol から 20 μmol の範囲では、光強度を強くすることで *S. coelicolor* A3(2) のカビ臭物質産生量は増加し、光強度 30 μmol でカビ臭物質産生量の減少が確認された。さらに平板プレートあたりの産生カビ臭物質量を比較すると、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。このことから、*S. coelicolor* A3(2) のカビ臭物質産生に波長光が影響すること、光強度に閾値が存在している可能性があることを明らかにした (図1)。

光環境とともに放線菌の増殖と代謝に強く影響を及ぼすと考えられる溶存酸素 (DO) について、濃度の違いが *S. coelicolor* A3(2) のカビ臭物質産生量に与える影響について検討した。まず、実験で使用する培養系で培地の DO 濃度を制御するため 100 mL 容量バイアルビンとブチルゴム栓、アルミニウムキャップを用いた密栓液体培養系を構築した。次に、窒素ガスと酸素ガスの流量を制御して曝気を行うことでバイアルビン内に任意の溶存酸素濃度条件を創出した。

異なる初期 DO 濃度条件下での培養実験の結果、DO 8 mg/L 条件では、培養開始 24 時間程度まで対数増殖期、72 時間まで定常期が継続し、カビ臭物質濃度は対数増殖期に増加したが定常期には増加しないことが判明した (図2)。この結果は、*S. coelicolor* A3(2) は好気環境下では対数増殖期にカビ臭物質を産生し、定常期にはその産生を減少する、もしくは止めることを示すものである。

DO 4 mg/L および 2 mg/L 条件系では、8 mg/L 条件と比較して、培養終了時の OD<sub>450</sub> および geosmin 濃度は低下していたが、OD<sub>450</sub> あたりの geosmin 濃度を算出した結果、その値は同程度となった。したがって、増殖初期の 2-4 mg/L 程度の低 DO 濃度環境は、*S. coelicolor* A3(2) の増殖活性を低下させるが細胞あたりの geosmin 産生活性には影響を与えないことが示された。DO 0.4 mg/L および 0 mg/L 条件では、培養中増殖は無く、カビ臭物質濃度も増加しなかった。従って、0.4 mg/L の著しい貧酸素条件や 0 mg/L の嫌気条件では *S. coelicolor* A3(2) は増殖せずカビ臭物質も産生しないことが判明した。

嫌気環境を異なる時間持続させた後好気環境に回復させる培養実験より、1日間の嫌気環境持続系では、好気環境での培養開始後 1-2 日目に対数増殖期となり、2-4 日目に定常期となることが確認された。geosmin 濃度は 2-4 日目にかけて増加し続けた。好気環境へ移行後の OD<sub>450</sub> は好

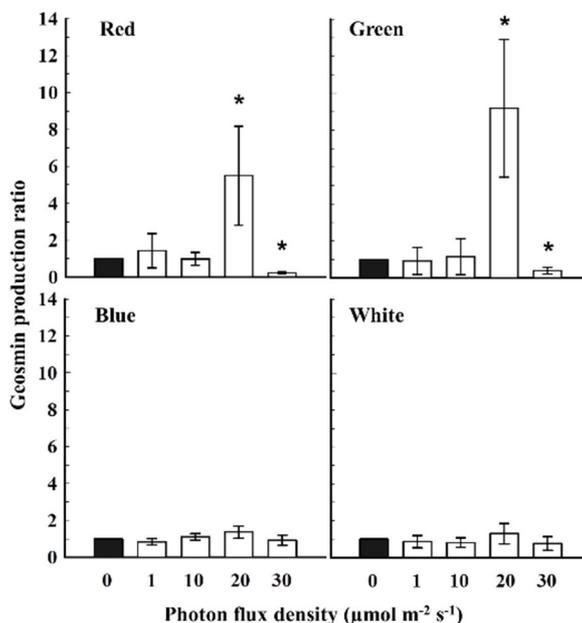


図1. 異なる波長光および光強度環境下で7日間培養後の *S. coelicolor* A3(2) により産生された geosmin の濃度比。geosmin 濃度比はそれぞれの暗所培養の平均 geosmin 濃度を1として算出した。エラーバーは4回の独立試行から算出した標準偏差を示す。\* 暗所培養と比較して有意差有り (p < 0.05)。

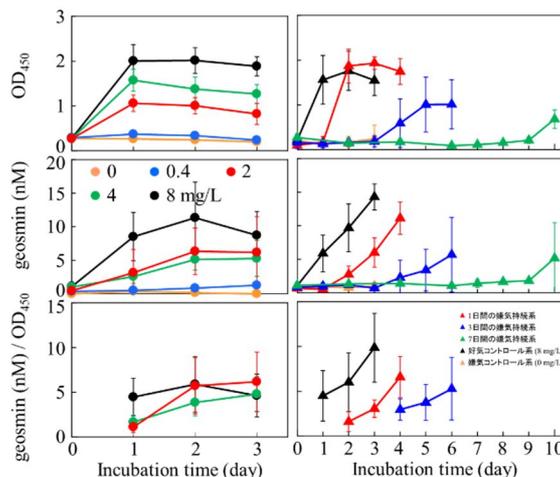


図2. 異なる初期 DO 濃度および嫌気環境日での *S. coelicolor* A3(2) の OD<sub>450</sub> および geosmin 濃度の経時変化。

気コントロール系と同程度で推移したが、geosmin 濃度および OD450 あたりの geosmin 濃度の増加は緩やかになっていた。このことから、嫌気条件の継続時間が 1 日間の場合、好気環境へ回復した後の増殖および geosmin 産生に対する影響が小さいことが示された。

3 日間の嫌気環境持続系では、好気環境での培養開始後 3-5 日目の 2 日間にかけて対数増殖を示した後、5-7 日目にかけて定常期が継続した。geosmin 濃度は 3-7 日目にかけて徐々に増加した。OD450 および geosmin 濃度は好気コントロール系と比較し 5 割以下に低下した。OD450 あたりの geosmin 濃度の増加はさらに緩やかになった。したがって、3 日間の嫌気条件後、好気環境に変化させた系では、1 日間の嫌気条件の系や好気コントロール系と比較し細胞密度および geosmin 濃度の増加が遅れ、細胞あたりの geosmin 産生にも影響を与えることが判明した。

7 日間の嫌気環境持続系では、OD450 および geosmin 濃度の増加開始は最も遅く、好気環境へ移行後 3 日目にようやく増加が確認された。したがって、嫌気環境の持続時間が長いほど、好気環境へ移行後の増殖および geosmin 産生の開始が遅れ、細胞あたりの geosmin 産生活性が低下し、最終的な増殖量および geosmin 濃度が減少することが判明した。

以上の結果より、実際の水源池において、初夏の低 DO 濃度環境下では、春季の好気環境下で増加した放線菌が初夏も変わらぬ活性で geosmin を産生することで、放線菌由来の geosmin 濃度が増加する可能性が示唆された。一方、晩秋から初冬の低 DO 濃度環境下では、夏季から秋季の長期的な嫌気環境の持続が影響し、放線菌由来の geosmin 濃度は低下することが考えられた。

以上の本研究で得られた成果より、水源池底泥中に生息しカビ臭物質を産生する放線菌に対して、光環境の制限および底泥中 DO 濃度を低濃度で維持することが、水中へのカビ臭物質供給削減につながる事が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Pham Thanh-Luu, Bui Manh Ha, Driscoll Mark, Shimizu Kazuya, Motoo Utsumi	4. 巻 22
2. 論文標題 First report of geosmin and 2-methylisoborneol (2-MIB) in Dolichospermum and Oscillatoria from Vietnam	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Limnology	6. 最初と最後の頁 43～56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10201-020-00630-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shen Qingyue, Shimizu Kazuya, Miao Hanchen, Tsukino Shinya, Utsumi Motoo, Lei Zhongfang, Zhang Zhenya, Nishimura Osamu, Asada Yasuhiro, Fujimoto Naoshi, Takanashi Hirokazu, Akiba Michihiro	4. 巻 28
2. 論文標題 Effects of elevated nitrogen on the growth and geosmin productivity of Dolichospermum smithii	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Science and Pollution Research	6. 最初と最後の頁 177～184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11356-020-10429-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shudirman Shahirah, Abang Kassim Aeyshah, Shamsol Anuar Nurul Syahirah, Utsumi Motoo, Shimizu Kazuya, Muhammad Yuzir Muhamad Ali, Megat Mohd Noor Megat Johari, MD Akhir Fazrena Nadia, Othman Nor'azizi, Zakaria Zuriati, Sugiura Norio, Hara Hirofumi	4. 巻 67
2. 論文標題 Limitation of nutrients stimulates musty odor production by Streptomyces sp. isolated from a tropical environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 92～99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2323/jgam.2020.08.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hanchen Miao, Ji Zhang, Yasuhiro Asada, Motoo Utsumi, Zhongfang Lei, Hirokazu Takanashi, Naoshi Fujimoto, Michihiro Akiba, Zhenya Zhang, Kazuya Shimizu
2. 発表標題 Monitoring of geosmin-producing Anabaena by whole cell PCR
3. 学会等名 日本水処理生物学会第56回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	清水 和哉  (SHIMIZU KAZUYA)  (10581613)	筑波大学・生命環境系・准教授   (12102)	
研究 分担者	李 沁潼  (RI SHINTO)  (80821727)	東洋大学・生命科学部・助教   (32663)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------