

呉市の水道貯水池から分離した青緑細菌 *Pseudanabaena* spp. によるカビ臭発生

森井 秀昭・笠間憲太郎・銭谷 武平

Musty Odor-Production by the Cyanobacteria *Pseudanabaena* spp.
Isolated from Reservoirs of Water Supply in Kure City

Hideaki MORII, Kentaro KASAMA and Buhei ZENITANI

Nineteen strains of cyanobacteria from reservoirs, during hot season, 1970 to 1977 were isolated as a causative agent of musty smell in water. These strains were divided into musty or odorless group by crude culture experiments, and of these, only 2 strains were able to be isolated as an axenic culture. As the axenic strain produced musty odor in the culture with BG-11 medium, it has suggested that odor was due to metabolites in the growth of musty strain. The ability to produce odorous substance, however, was none or variable by different strains. In general, musty strains showed a tendency to grow slowly in comparison with odorless strains, and trichome-yellowing of the former was later than that of the latter. All the strains were presumed as species of *Pseudanabaena* by modern identification system of Rippka et al. who revised generic assignment by pure cultures. Filamentous materials were observed on the cell envelope of musty strains, but in detail further study is required.

近年、全国各地で水道水にカビ臭が発生し、大きな社会問題となっている。この原因は、水道の水源池である河川や湖沼の富栄養化に伴って異常発生した放線菌（1～3）やらん藻（2, 4～6）などに起因することが知られている。

ところで、カビ臭物質は、放線菌（1～3, 7, 8）については2-メチルイソボルネオールとジェオスミン、らん藻（2, 6, 7）についてはジェオスミンが主成分であることが明らかにされている。そして、これらカビ臭物質の分離同定試験を行なうに際しては、放線菌については純粋分離株が用いられているが、らん藻すなわち青緑細菌*については従属栄養細菌が混

在した菌株が用いられている。従って、青緑細菌のカビ臭物質も青緑細菌自身の代謝産物であるとするには、やはり純粋分離株による確認が必要であろう。

そこで今回は、カビ臭発生および非発生青緑細菌（以下発臭および非発臭青緑細菌とする）を平板培養法、紫外線照射法、抗生物質法により純粋分離を試みると共に、これら青緑細菌の属の同定、発育状況の観察および電子顕微鏡観察などを行ない発臭株と非発臭株の差異を知ろうとした。

* 青緑細菌は従来かららん藻類として分類されているが、Stanier ら(13)や最近の分類からこれを細菌とし、またその用語（青緑細菌、青色細菌、らん菌など）も統一されていないので、本報では青緑細菌を用いることにした。

材料と方法

供試青緑細菌 本実験に用いた青緑細菌19株は1970～1977年にかけて、広島県呉市の三永、本庄、郷原の三貯水池の水深2～4 m層から採水し、分離したものである。これら供試株の粗培養では発臭・非発臭の双方が存在した。これらの詳細は Table 1 に示す通りである。

なお、供試株はいずれも呉市水質試験所において分離保存中の菌株を元同試験所の三浦博実氏から分譲されたもので、同氏の貴重な助言や教示に対し謝意を表す。なお、供試株は粗培養で、培養液中にはいずれも従属栄養細菌が混在していた（以下この細菌を共存細菌と呼ぶ）。

青緑細菌および共存細菌の培地および培養

青緑細菌の培養には Stanier ら(9)の BG-11培地を用いた。また共存細菌の確認は、Rippka ら(10)に従い、BG-11培地に0.2%グルコースと0.02%カザミノ酸を添加した培地および普通肉汁培地(Oxoid)を用いる寒天平板培養法によった。

青緑細菌の培養は約30°C、約15,000 luxの白色蛍光灯下で静置培養した。

青緑細菌の純離 1) 平板培養法 まず、培養液を2,000rpmで20分間遠心沈殿し、沈渣を滅菌 BG-11培地で洗浄し、さらに同様にして遠沈、洗浄する。この洗浄操作を数回繰り返す、できるだけ共存細菌を除いた後、菌のけん濁液とし、平板にコンラージ法で塗抹する。これを数日間培養し、発育したコロニーの先端(トリコームの先端)を取り、液体培養し、さらに上述のようにして平板培養を繰り返す方法と、他方、コロニーの最先端を寒天と共に切り取り、新しい平板に直接これを接種、培養し、この操作を数回繰り返す方法を行なった。

2) 紫外線照射法 平板培養法と同様な操作で平板上に供試株を塗抹後、20Wの紫外線ランプで40cmの高さから紫外線照射した。照射試験は5分間隔で20分照射のものまで行なった。

3) 抗生物質法 まず、平板培養法によりできるだけ純化した青緑細菌の液体培養から、共存細菌の確認培地を用い共存細菌を分離した(なお、培養時間の経

Table 1. Strains of cyanobacteria used for the experiments.

Strain	Habitat	Sampling date	Color of colony	Odor
I	Minaga Reservoir	1970	Green	Musty
II	〃	May 13, 1971	〃	〃
III	〃	July 28, 〃	〃	Odorless
IV	〃	Sept. 27, 〃	〃	Musty
V	〃	Apr. 26, 1976	〃	〃
VI	〃	May 13, 〃	〃	〃
VII	〃	July 8, 〃	〃	〃
VIII	〃	Aug. 23, 〃	〃	Odorless
IX	〃	May 23, 1977	〃	Musty
X	Honjou Reservoir	July 29, 1970	〃	Odorless
X I	〃	May 23, 1972	〃	〃
X II	〃	〃 〃, 〃	Brown	〃
X III	〃	June 12, 1976	〃	〃*
X IV	〃	〃 19, 〃	〃	〃
X V	〃	〃 〃, 〃	〃	〃
X VI	〃	〃 21, 〃	Green	Musty
X VII	〃	〃 〃 〃	〃	〃**
X VIII	〃	〃 〃 〃	Brown	Odorless
X IX	Gouhara Reservoir	Sept. 28, 1971	Green	〃*

The cultures of cyanobacteria were made with BG-11 medium (9).

* Odorless and ** Musty in the initial test with Bristol medium at laboratory.

過に伴い、分離される共存細菌の種類が異なることが考えられたので、共存細菌の分離は各培養液から24時間間隔で1週間行なった。分離株は抗生物質の適量を添加した共存細菌の確認培地で1週間培養し、抗生物質に対する感受性を肉眼的にしらべた(抗生物質としてはペニシリンGとクロラムフェニコールを用いたが、ペニシリンGは0.45μのメンブランフィルターで濾過滅菌し、クロラムフェニコールは121°Cで15分間加圧滅菌した)。得られた結果をもとにして抗生物質添加培地での青緑細菌の培養を試みた。一方、分離したすべての共存細菌が感受性を示した濃度の抗生物質溶液(BG-11培地)中に青緑細菌の菌体を一定時間(2時間間隔で12時間まで)浸せき後、洗浄し、青緑細菌の培養を試みた。

青緑細菌の同定 Rippka ら(10)の同定方式に従い、属の段階まで同定した。

なお、本同定に用いた菌株はいずれも純離したものではないが、属の段階までの同定には共存細菌の存在

で結果が左右されないと判断される。

青緑細菌および共存細菌の遷移とカビ臭との関係に関する試験 発臭青緑細菌の3菌株について、BG-11培地で液体培養し、24時間間隔で1週間の青緑細菌数、共存細菌数および臭気度をしらべた。生菌数は、青緑細菌についてはBG-11寒天平板および共存細菌についてはグルコース・カザミノ酸添加BG-11寒天平板上にコンラージュ法で各培養液を塗抹し、1週間培養後のコロニー数を計数し、算出した。臭気度の測定は上水試験方法(1)記載の方法に従った。

青緑細菌の光合成色素の分析 光合成色素の分析は48時間間隔で10日培養のものまで行なった。すなわち、培養液をまず2,000rpmで20分間遠沈し、菌体を集め、さらに2回洗浄・遠沈した。次に、この菌体部から80%アセトンで色素を抽出し、370~800nmの吸収スペクトルを測定した。

電子顕微鏡観察 斜面培養した発臭・非発臭青緑細菌の各2菌株について、シャドウイング試料(蒸着用金属としてクロムを使用)とレプリカ試料の電子顕微鏡観察を行なった。なお、レプリカの作製は微生物細胞学(2)記載の方法に従った。

結果と考察

1. 発臭性青緑細菌の増殖に伴う共存細菌の変化

前述のように、貯水池から分離した青緑細菌には従属栄養細菌が共存していた。しかもこれを除くことは困難であったため、まず発臭性を示した青緑細菌を培養し、その菌数ならびに共存細菌数の変化を測定し、

併せて臭気度との関係を見た。

Fig. 1に青緑細菌の発臭株I, VI, XVIの培養期間中における菌数、共存細菌数および臭気度を示す。

臭気度はいずれも3~4日目を境として急上昇し、またこの上昇に伴い共存細菌数も急増した。従って、共存細菌によるカビ臭物質の産生が考えられたが、青緑細菌の発臭株の培養液から分離した共存細菌をグルコース・カザミノ酸添加BG-11培地で培養したがカビ臭は感知されなかった。そこで、本培地成分を用いての、共存細菌によるカビ臭物質の産生はないと考えられた。しかし青緑細菌の菌体構成物質を分解し、共存細菌がカビ臭物質を生成することを全く否定することはできない。また青緑細菌の死滅分解に伴い、その細胞中のカビ臭物質が培地中に拡散したとも考えられる。いずれにしてもカビ臭物質は青緑細菌自身に由来することは確実であると思う。

2. 細胞黄色化の時間的差異と発臭との関係

供試青緑細菌を液体培養すると、培養時間の経過に伴い菌体は緑色から黄緑色へと変色した。しかもこの変色時期は菌株により異なり、その上発臭株は非発臭株に比べその時期が遅い傾向が見られた。そこで、培養時間の経過に伴う光合成色素の変化をしらべた。

Fig. 2に、発臭株(菌株I)と非発臭株(菌株XIV)の培養時間の経過に伴う光合成色素の吸収スペクトルの測定結果を例示する。

菌株IとXIVの間で吸収スペクトルの型が多少異なっているが(とくに菌株XIVは菌株Iに比べP-2のピークの値が高かった)、これら発臭株と非発臭株の差によるものではなく、供試株の間で、とくにP-2

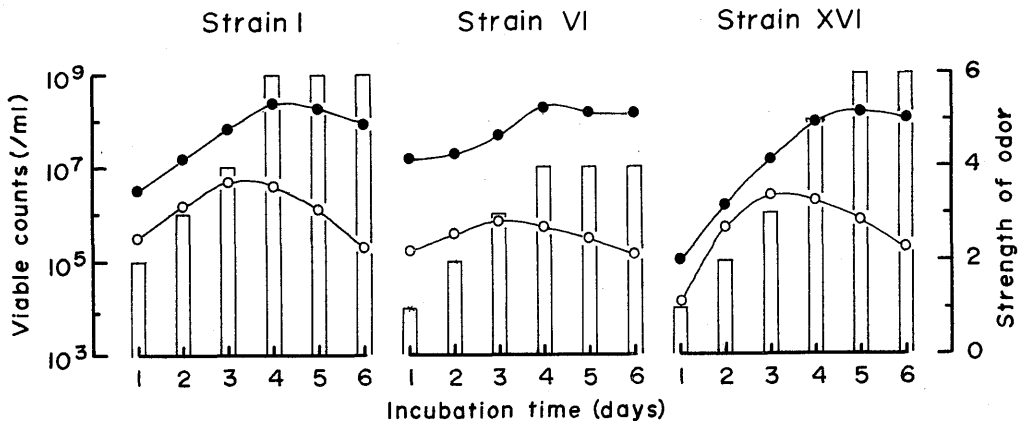


Fig. 1. Changes in counts of musty cyanobacteria (open dots) and heterotrophic bacteria (solid dots) and the strength of odor (columns) during culture period.

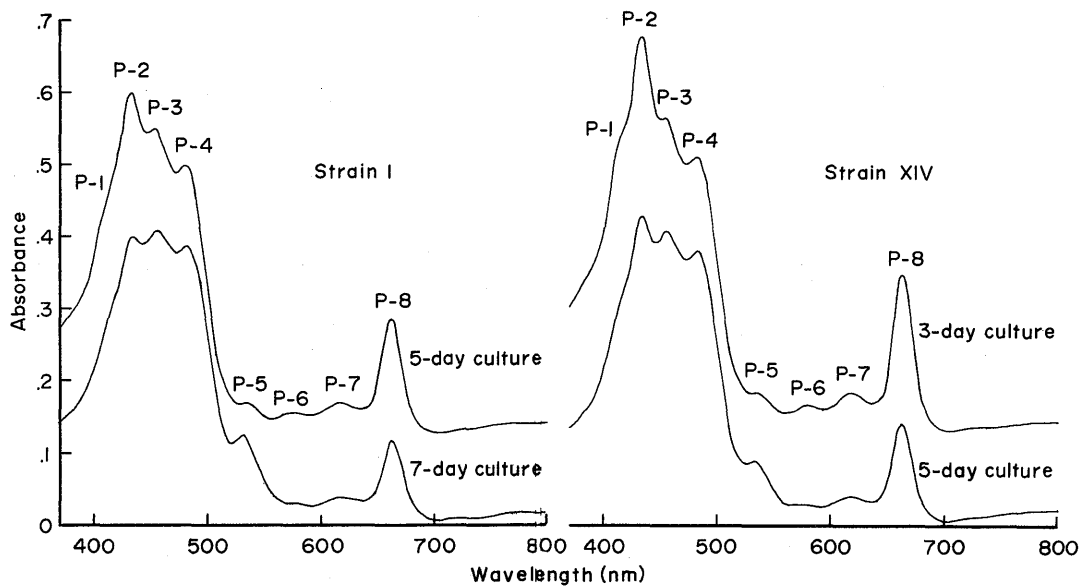


Fig. 2. Comparison between absorption spectra of 80% acetone extract by incubation time in musty strain I and odorless strain XIV of cyanobacteria.

の値は種々異なっていた。

菌株 I および XIV とともに培養時間の経過に伴い P-1, P-2, P-8 などのクロロフィル a に相当するピークが減少し, P-3, P-4 のカロチノイドに相当するピークは余り変化は見られなかった。これらの傾向は他の供試株でも同様で, 液体培養時に見られた菌体の黄色化はクロロフィル a の減少に伴うカロチノイドの相対的な増加に起因するものと考えられる。

なお, 菌株 I および XIV とともに, クロロフィル a の減少に伴い不明物質 P-5 も著増していた。しかし, 他の供試株では増加しないものも多くあり, 従ってこの物質の増加が菌体の黄色化に直接的に関与したとは考え難い。

一方, ピークが変動する時期は, 発臭株 I では培養 5~7 日目を, また非発臭株 XIV では培養 3~5 日目を境としていた。また他の供試株の結果を見ても, 発臭株は非発臭株に比べこれらのピークの変動の時期が遅いものが多かった。おそらく黄色化は定常期になってから起きるもので, 定常期に達する時間の差異によるものと考えられる。

3. 純離青緑細菌による発臭性

共存細菌の除去は極めて困難であるが, しかし青緑細菌が単独で発臭性を示すか否かを明らかにするにはやはり青緑細菌の純離が必要であった。そこで次に示す諸法によって実験し, 2 菌株について共存細菌を除

くことに成功した。

まず平板培養法による全青緑細菌の純離を試みた。その結果, 菌株 XV ではその培養液からは, 共存細菌の確認培地での培養で, 共存細菌の発育を認めなかった。しかも, この青緑細菌の培養液を顕微鏡観察しても共存細菌は確認できなかった。従って, 菌株 XV は純離できたものと考えられた。この菌株は, 平板培養ではトリコームの一部が平板から離れ空中に伸長し, この伸長したトリコームの先端を分離することで純離できたものと考えられ, この点他の 18 菌株とは異なっていた。他の菌株は平板培養で純離を反復したが, なお 1~9 菌株の共存細菌が分離された。

この方法ではこれ以上の共存細菌の除去は困難であると判断されたので, 次に紫外線照射法を試みた。しかし今回採用した方法では供試青緑細菌は純離できなかった。

そこでさらに, 抗生物質法による純離を試みた。

Table 2 に青緑細菌 (菌株 XVII) の培養液から分離した共存細菌 8 株の, ペニシリン G およびクロラムフェニコールに対する感受性試験の結果を示す。

ペニシリン G およびクロラムフェニコールとも, 100 $\mu\text{g/ml}$ で感受性を示さない共存細菌も見られたが, 200 $\mu\text{g/ml}$ ではすべての共存細菌が感受性を示した。しかし, 青緑細菌をペニシリン G またはクロラムフェニコールの 100 および 200 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で培養したが, い

Table 2. Sensitivities of heterotrophic bacteria to penicillin or chloramphenicol.

Antibiotic	Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				Strain number of heterotrophic bacteria*
	40	80	100	200	
Penicillin G	-	-	-	-	2
	+	-	-	-	1
	+	+	-	-	2
	+	+	+	-	3
Chloramphenicol	-	-	-	-	2
	+	-	-	-	2
	+	+	-	-	1
	+	+	+	-	
	+	+	+	-	

* The heterotrophic bacteria were isolated from culture solution of the cyanobacteria, strain XVII.

+ : Growth. - : No growth.

いずれも発育を示さなかった。

そこで、各抗生物質濃度100および200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の溶液中に、2時間間隔で12時間まで青緑細菌(菌株XVII)を浸せし、それを洗浄後平板培養した。その結果、12時間浸せししたものでも青緑細菌が発育し、また共存細菌のコロニーも見られた。しかしながら、菌株XVIIの純離を困難としていた、伸展性でしかも発育が青緑細菌よりも先行していた共存細菌のコロニー出現は認められなかった。そこで、青緑細菌コロニーの最先端部を切り取り培養した結果、培養液中には共存細菌は全く確認されなかった。しかもカビ臭はなお感知された。すなわち、菌株XVIIのカビ臭物質は青緑細菌自身の代謝産物であることが確認された。共存細菌を全く排除した純粋培養を得ることは非常に困難であって、全供試株を純化することはできなかった。

ところで、分離当初、発臭株XVIIは非発臭株とされ、また非発臭株XIIIとXIXは逆に発臭株とされている(Table 1)。すなわち、これらの事実は同一株がカビ臭物質を産生する場合としない場合があることを示唆している。また、これまでの実験においても、発臭株Vでは臭気をほとんど感じない場合も多々あった。

前述のように、発臭株の発育が非発臭株に比べ遅い傾向が見られたが、これについては供試発臭株の発育環境条件や培地組成のような物理的・化学的要因も関係するものと考えられる。しかし、同じ株でありながらカビ臭物質を産生したりしなかったりすることがあることから、さらに他の複雑な生物学的要因も関係するものと考えられ、これらの点についての検討が必要

である。

4. 供試青緑細菌の属の同定

従来カビ臭発生青緑細菌として *Oscillatoria* や *Phormidium* が報告されているが、これらの所属は主に野外試料の形態観察をもとにした藻類分類法によったものである。今回、らん藻類をグラム陰性原核生物すなわち青緑細菌として、もっぱら純培養による性状をもとにした Rippka ら(10)の類別形式に従い、供試菌株の所属を明らかにした。この分類では、まず青緑細菌を5部(section)に区別し、さらに群別(genusあるいはgroup)する方式によっている。供試株の特徴はTable 3に示す。

すなわち供試株の構造単位は単細胞ではなく、トリコーム(細胞の鎖)を形成する。トリコームは内部細胞分裂を繰り返すことにより横裂する。増殖はトリコームの任意の切断によって行なわれる。従って供試株はI・II部ではなくIII・IV部に該当するが、トリコームはヘテロシストを形成せず、栄養細胞だけから成ることからIII部に所属することになる。

この部は *Spirulina*, *Oscillatoria*, *Pseudanabaena*, LPP (*Lyngby*, *Phormidium*, *Plectonema*) グループA・B群に区別される。

すなわち供試株は、トリコームを形成する細胞は平円盤状ではなく、等軸状または円柱状で、増殖はトリコームの長鎖および短鎖への断裂により行なわれ、さらにトリコームは運動性を有し鞘では包まれず、細胞は極ガス胞(Fig. 3)を有し深くびれを伴って分裂することから *Pseudanabaena* に所属するものと判定してもよいと考える。

従って供試株はすべて同一属に該当しているが、発臭性と非発臭性が果たして種による差異か、それとも同一種内の菌株によるものであるかはこの試験の範囲内ではわかに決定できない。

なお、青緑細菌の崩壊についてはウイルスによる場合も多く報告されている。しかし供試株は通常バクテリオファージに感染されている場合に見られるようなプラークをすべて形成しなかった。そこでさらに、細胞表面の微細構造についても知見を得たいと考え、電子顕微鏡による観察を行なった。

発臭株(菌株IX)と非発臭株(菌株XIII)を試料として電子顕微鏡観察した結果をFig. 4に示す。

Table 3. Properties of the isolates for generic assignment of the cyanobacteria by identification system of Rippka et al.

<i>Properties for sub-group assignments</i>	
Unit of structure	: A trichome (chain of cells) grows by intercalary cell divisions.
Means of reproduction	: By random trichome breakage
Composition of trichome	: Only vegetable cells
Cell divisions	: Only one plane
<i>Properties for generic assignments</i>	
Trichome form	: Straight
Cell form	: Isodiametric, cylindrical
Cell size (μ)	: 1.5–1.8 x 2.0–2.3
Transverse wall formation	: By deep constriction
Means of reproduction	: By transcellular or intracellular trichome breakage
Motility of trichome	: Motile
Sheath of trichome	: None
Polar gas vacuole in cells	: Present

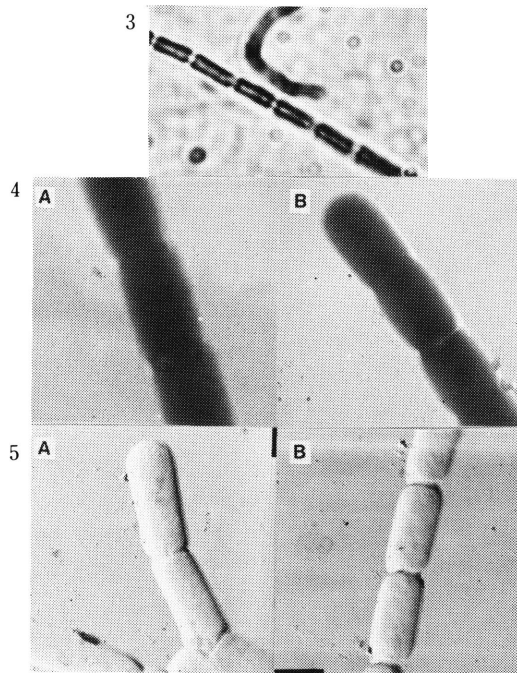


Fig. 3. Photomicrograph of trichome containing polar gas vacuoles (Strain VIII). (x 2,000)

Fig. 4. Electron micrographs of metal shadowed cells of the cyanobacteria.
A: musty strain IX with filamentous materials. (x 6,000)
B: odorless strain XIII. (x 6,000)Fig. 5. Electron micrographs of replica at the cyanobacterial cells.
A: musty strain XVII with filamentous materials. (x 5,000)
B: odorless strain VIII. (x 5,000)

発臭株IXとXVIIでは細胞の周縁に線維状構造物が観察されたが、非発臭株XIIIとVIIIではその構造物は観察されなかった。

次に、これら構造物の存在をさらに明らかにするため、レプリカ試料の電子顕微鏡観察を行なった (Fig. 5)。

発臭株XVIIとIXでは細胞周縁に線維状構造物が観察されたが、その数は一つの細胞に1本から数本と少なかった。しかし細胞周辺部には線維状構造物の断片が観察され、従って細胞周縁部にその構造物が少なかったのは試料作製の過程で細胞周縁から離脱した可能性もある。他方、非発臭株VIIIとXIIIには線維状構造物は見られなかった。

なお、これら発臭株の線維状構造物は、同一株のすべての細胞に見られるのではなく、むしろこの構造物を持たない細胞の方が多かった。この構造物は電子顕微鏡用試料の作製の段階で人工的に作られている可能性もあり、さらに検討しなければならない。

要 約

水道貯水池より得た青緑細菌19株を用い、青緑細菌によるカビ臭の発生について検討し、次の結果を得た。

1) カビ臭は純離株XVIIでは全く青緑細菌自身の臭気であることを確認した。

2) 供試株はすべてが *Pseudanabaena* spp. に属し、これらはカビ臭発臭性のものと非発臭性が含まれた。

3) カビ臭発臭株の細胞周縁には電子顕微鏡によって線維状構造物が観察された。

参 考 文 献

1) Rosen, A. A., Mashni, C. I., and Safferman, R. S. (1970). *Water Treat. Exam.*, 19, 106-119.

- 2) 菊地 徹・三村鉄太郎・伊藤義邦・鉄間矢研二・松田良夫・正田芳郎 (1975). 水協誌, 492, 23-37.
- 3) 松本淳彦・土屋悦輝 (1977). 水協誌, 514, 42-50.
- 4) 森井秀昭・金津良一・福原忠信 (1967). 本誌, 23, 163-185.
- 5) Silvey, J. K., Henley, D. E., and Wyatt, J. T. (1972). *J. Amer. Water Works Assoc.*, 64, 35-39.
- 6) 土屋悦輝・首藤紘一・岡本敏彦 (1979). 衛生化学, 25, 216-220.
- 7) Thomas, J. F. (1968). *Envir. Sci. & Tech.*, 2, 461-464.
- 8) Thomas, J. F. (1969). *Envir. Sci. & Tech.*, 3, 476-477.
- 9) Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., and Cohen-Bazire, G. (1971). *Bacteriol. Rev.* 35, 171-205.
- 10) Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., and Stanier, R. Y. (1979). *J. Gen. Microbiol.*, 111, 1-61.
- 11) 日本水道協会 (1970). 上水試験方法, 日本水道協会, 東京, pp. 126-132.
- 12) 永山在明 (1977). 微生物細胞学 (小川和郎・黒住一昌・小池聖淳・佐藤正一編), 朝倉書店, 東京, pp. 39-43.
- 13) Stanier, R., Aderberg, E., and Ingraham, J. 編, 高橋 甫・斎藤日向・手塚泰彦・水島昭二・山口英也 訳 (1978). 微生物学 (上), 培風館, 東京, p. 426.
- 14) 天児和暢 (1977). 微生物細胞学 (小川和朗・黒住一昌・小池聖淳・佐藤正一 編), 朝倉書店, 東京, pp. 386-393.

