

多摩川河川敷のカビ臭発生原因としての
河床付着微生物膜の研究

山 本 鎔 子

明治大学農学部教授

目 次

はじめに	1
実験方法	2
試料採取地点と水質	2
カビ臭産生微生物の分布と単離	3
官能テストによるカビ臭産生の確認	3
カビ臭分析	5
結 果	7
考 察	17
引用文献	18

はじめに

我々の日々の生活において欠かすことの出来ないものの一つである水道水に、近年カビ臭による水の異臭味障害が生じ、我々の生活を脅かすことが多くなった。異臭味のなかでも特にGeosminや2-methylisoborneol (2-MIB) を原因とするカビ臭は、湖沼や河川などの水道の原水に発生したラン藻類の*Anabaena*, *Phormidium*, *Oscillatoria*属 (Izaguirree al., 1982 ; 根来健ら 1983) や、放線菌類の*Streptomyces*や*Micromonospora*属 (Gerber and Lechevalier 1963 ; Gerber 1983) などが生産する二次代謝産物が原因であることが知られており、上水関係者のみならず一般の水道利用者からもおいしい水の確保という面から大きな関心が寄せられている。しかし、実際にはカビ臭が発生しているにもかかわらず原因を確定することができない水域もあり、カビ臭除去あるいは防除の対策をたてる上からも発生原因をつきとめることは重要である。

本報告は、古くから人々の生活に密着してきた多摩川の、とくに河川水中、あるいは河床におけるカビ臭産生微生物種を知ること、カビ臭産生微生物の分布、さらに単離した株の特徴を把握することにある。これらの結果を通じて、カビ臭の発生の予測や、カビ臭産生を未然に防ぐ手だてを見出す可能性を検討することにある。

実験方法

〈試料採取地点と水質〉

試料採取は、多摩川の羽村堰、日野大橋ガード下、二子玉川橋付近の3地点で、1996年5月22日および6月29日に行なった(図-1)。

試料は、河川水と水深約30~50cmの礫に付着した微生物膜から採取した。また、現場の水質として水温、BOD、DO、pHの測定も行なった。

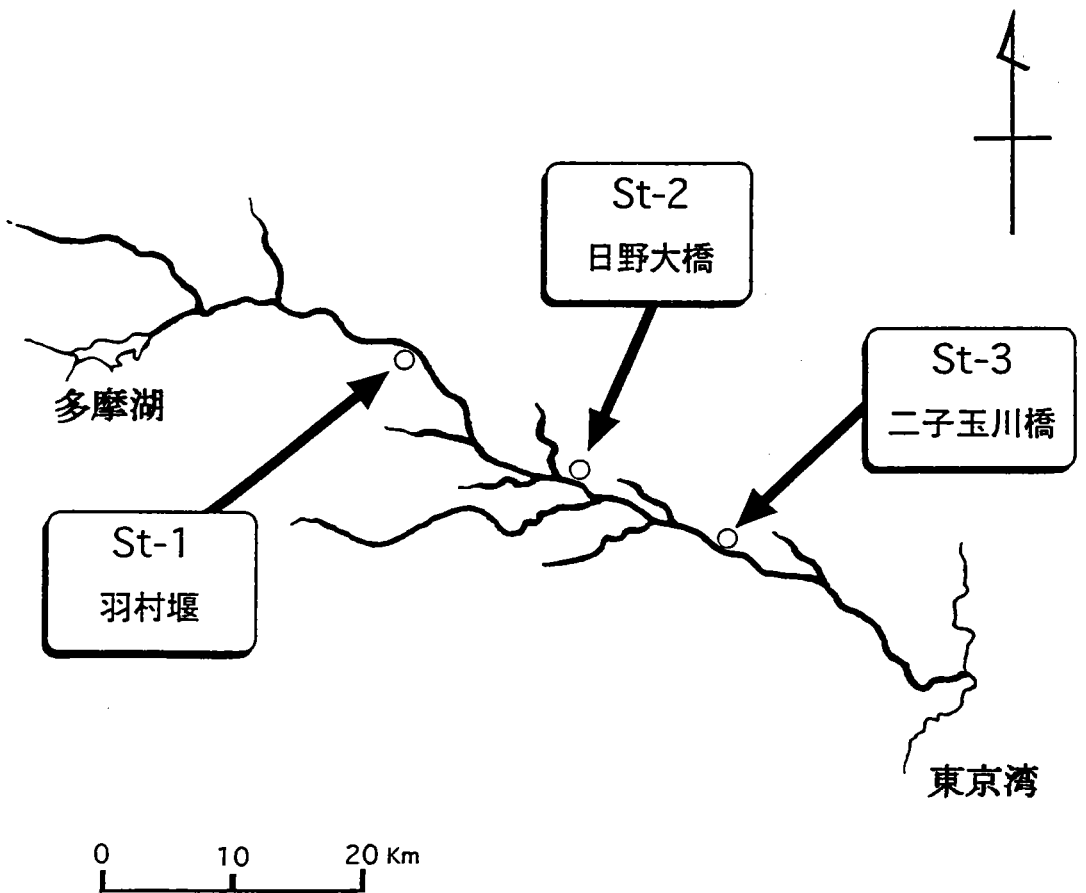


図-1. 多摩川試料採取地点

〈カビ臭産生微生物の分布と単離〉

礫表面の付着膜の剥離は、ブラッシで良く刷落し、1/100 M Tris-HCl緩衝液 (pH 7.2)で希釈後、微生物菌数の測定試料とした (山本 1978)。この希釈試料をISP-4培地 (表-1)で平板法により3~4週間培養し、培養後に生じたコロニーのうち、形態が糸状あるいは放線菌様のコロニーを選び計数した。一方、付着膜を採取した礫の表面積を求め、表面積あたりのコロニー数として表わした。また、ワックスマン、ISP-4、ISP-5の3種の培地から形態的に特徴の異なる20株を選び単離し、単離した株についてカビ臭の有無を検討した。

〈官能テストによるカビ臭産生の確認〉

異なった培地によるカビ臭産生量の比較をするために、単離株をISP-2、ISP-4、ISP-5、ISP-6、ISP-7の5種の培地 (表-1)を用いて培養し、官能試験によりカビ臭産生株を選別した。

表-1. 培地組成

(1) ISP-2 (イースト・麦芽糖寒天培地)

イーストエキス	4g
麦芽エキス	10g
グルコース	4g
蒸留水	1000ml
pH	7.3
寒天	20g

(2) ISP-4 (スターチ・無機塩寒天培地)

液 I ;	
スターチ 10g を少量の冷水でペースト状にしたのち更に蒸留水を加え 500ml とする。	
液 II ;	
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1g
NaCl	1g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g
CaCO ₃	2g
微量塩液	1ml
pH	7.0~7.4
寒天	20g
液 I と液 II を混合する。	
微量塩液は ISP-5 のものと同じ。	

表-1. 培地組成つづき

(3) ISP-5 (グリセロール・アスパラギン寒天培地)

L-アスパラギン	1g
グリセロール	10g
K ₂ HPO ₄	1g
蒸留水	1000ml
微量塩液	1ml
PH	7.0~7.4
寒天	20g
・微量塩液	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.1g
蒸留水	100ml

(4) ISP-6 (ペプトン・イースト・鉄寒天培地)

ペプトン・鉄寒天	36g
イーストエキス	1g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1g
蒸留水	1000ml
pH	7.0~7.2
#ペプトン・鉄寒天	
ペプトン	15g
プロテオゼ・ペプトン	5g
クエン酸鉄アンモニウム	0.5g
K ₂ HPO ₄	1g
Na ₂ S ₂ O ₃	0.08g
寒天	15g

(5) ISP-7 (チロシン寒天培地)

グリセロール	15g
L-チロシン	0.5g
L-アスパラギン	1g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g
NaCl	0.5g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01g
蒸留水	1000ml
微量塩液	1ml
pH	7.0~7.4
寒天	20g

微量塩液はISP-5と同じ

〈カビ臭分析〉

単離した各株をISP-2、ISP-4、ISP-5、ISP-7の各液体培地で5日間、振とう培養し、遠心により上清を得る（培養液中に放出されたカビ臭量）。細胞内のカビ臭量は遠心により集めた細胞にメタノールを添加し、超音波処理後、さらに遠心し上清について以下に従いカビ臭濃度の分析を行なった。

臭気分析（Yamamoto et al., 1994）は、蒸留水に上記の上清を適量注入しパージ・トラップ法に従い、臭気物質をTENAXで捕獲濃縮し、TENAXに保持された臭気物質を加熱により追い出してガスクロマトグラフィー（日立-263-30、カラムTC-1あるいはDB-1）により分析を行った（図-2）。ガスクロマトグラフィーの分析条件を表-2に示す。

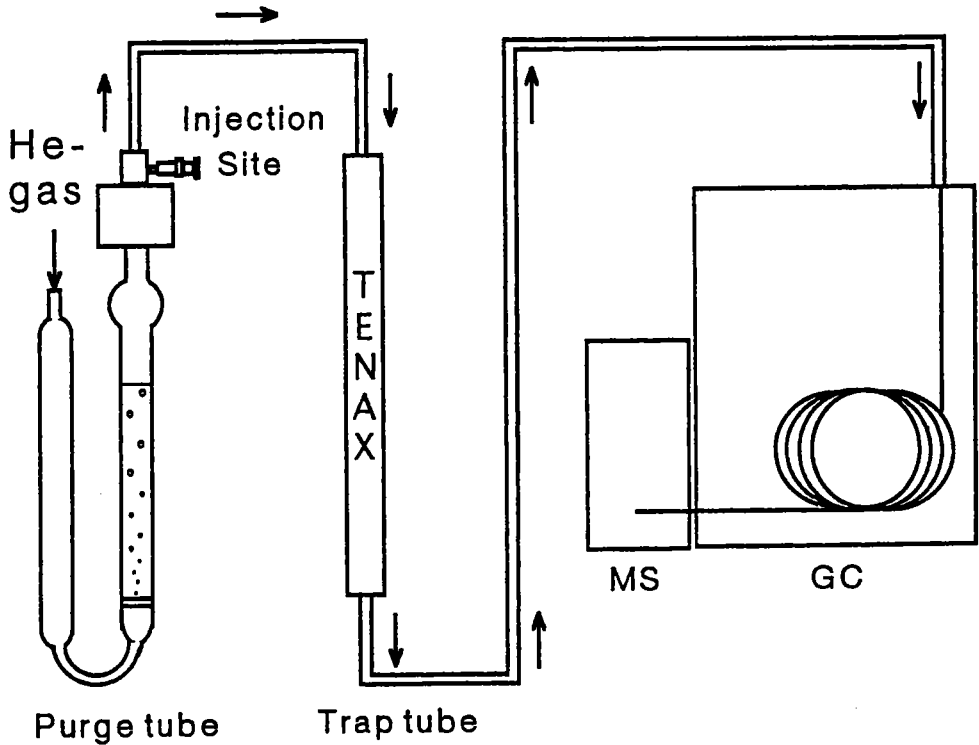


図-2. カビ臭測定装置

表-2. パージ・ガスクロマトグラフィーの分析条件

Purge trap material	TENAX
Purge time	12min
Purge flow	45mL・min ⁻¹
Cool down Temp	-120℃
Desorb. Temp	185℃ for 40min
Injection temp	200℃ for 4min
Bake temp	225℃ for 15min
GC/Ms GC column	DB-1 fused silica capillary 0.25mm x 30m
Carrier gas	He, 1mL・min ⁻¹
Oven temp	50℃ 1min, programmed at 10℃・min ⁻¹ to 220℃
Transfer line	280℃
Ionization energy	70eV

株名 培地	J-1	J-2	J-3	J-4	J-5	J-6	J-7	J-8	J-9	J-10
ISP-2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ISP-4	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ISP-5	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ISP-6	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ISP-7	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

株名 培地	J-11	J-12	J-13	J-14	M-1	M-2	M-3	M-4	M-5	M-6
ISP-2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ISP-4	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ISP-5	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ISP-6	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ISP-7	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

=かび臭有り
 =かび臭なし
 =生育せず

図-3. 官能試験による単離株のカビ臭産生の有無

結 果

表-3は1996年6月の試料採取地点の水質と微生物の分布を示す。採取地点のBOD値は、1~10の範囲で上流から下流にむけて上昇する傾向を示した。

採取した礫表面の放線菌もしくは糸状菌のコロニー数（ISP-2およびISP-4培地上で形成されたコロニー数）は、礫の表面積1cm²あたり10³~10³であった。

平板寒天上にみられるコロニーのうち形状の異なるものを、さらにワックスマンNo.2、ISP-4、ISP-5の3種の寒天培地上で生育させ、菌体の色や形状から特徴的な20株（真菌類16株、放線菌2株、細菌2株）を選び、これについて、官能テストによるカビ臭産生の有無を調べた。結果を図-3に示す。培地の違いによりカビ臭の産生量は異なる。20株中、2株（M-1株とJ-11株）に強いカビ臭の産生が認められた。そこでこの2株、M-1株とJ-11株について、さらにクロマトグラフィーによりカビ臭濃度の詳細について測定を行なった。

図-4a、-4bはISP-2、ISP-4、ISP-5、ISP-7培地で5日間、25℃で培養したのちの培養液1Lあたりのカビ臭量を示したものである。両株ともGeosminと2-MIBを産生した。官能テストでも示されるように、培地が異なれば同じ株でも産生するGeosminと2-MIB量の異なることがより明確に示された。

M-1株を異なった培地を用いてカビ臭量の測定を行なったところGeosminは0.03~0.05 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、2-MIBは0.1~0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ の値をそれぞれ示し、ISP-4培地で培養した時に最も高濃度の2-MIB量（1Lあたり0.5 μg ）を得た。Geosminは、0.05 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ であった。

一方、J-11株も、M-1株と同様に培地の組成によりカビ臭産生量は異なった。培地の組成の違いによりGeosminは、0.15~18 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、2-MIBは0.1~56 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 産生し、両カビ臭ともISP-4培地で高濃度のGeosmin 18 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、2-MIB 56 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ をそれぞれ産生した。

図-5は、25℃で5日間培養したときの菌体内に保持されたカビ臭と菌体外に放出されたカビ臭量の比率を示す。同一株でも培地の組成の違いが、細胞内に保持されるカビ臭量へ大きく影響している。

図-6、図-7に両株の光学顕微鏡図および走査電顕像を示す。また、表-4に生理的特徴を示す。生理的な特徴、胞子の大きさとその形状からM-1株は真菌類の*Aspergillus*属、J-11株は*Streptomyces*属であると判定した。

表-3. 試料採取地点における水質と微生物の分布

地点	水質 (河川水)				微生物数		
	水温	pH	DO	BOD	ISP 2 *	ISP 4	x10 ²
	°C		mg·L ⁻¹				
羽村堰	22.8	8.77	10.4	1.07	35	5	
日野橋	26.0	7.70	7.8	2.34	1.1	11	
二子玉川橋	27.2	8.06	6.9	10.2	4.4	<10 ²	

1996年6月29日採取試料の各測定値

* ; 培地の種類

表-4. 単離株 (M-1、J-11株) の生理的特徴

	M-1	J-11
	真菌類	放線菌
Spore size(μ m)	1.5-2.0 μ m	0.2-0.8 μ m
Spore shape	spherical	cylindrical
Spore surface	rugose	warty
Spore chain	straight	rectiflexibles
Aerial mycelium(diameter)	3 μ m	0.5 μ m
Aerial mass color	yellow-green	gray
Soluble pigment		
melanin	-	+
others	-	-
Carbon utilization		
L-arabinose	±	++
sucrose	+	++
D-mannitol	±	+
D-fructose	±	++
raffinose	±	++
D-xylose	+	++
inositol	±	+
Hydrolysis of starch	+	+
Decomposition of cellulose	-	-
Gelatin liquefaction	+	+
Catalase production	+	+
Oxydase production	-	-
NaCl tolerance	12%	5%
Milk peptonization	+	-
Cell wall constituents		
ornithine	+	-
alanine	-	+
lysine	+	-
aspartic acid	-	-
glutamic acid	-	+
glycine	+	-
glucose	-	-
galactose	+	-
rhamnose	-	-
arabinose	-	-
xylose	+	-
isoprenoid quinone	menaquinone,ubiquinone	ubiquinone
mycolic acid	+	+
Fatty acid composition	c16:0,c17:0(?),c18:1,c18:2	c16:1,c17:0(?),c18:1

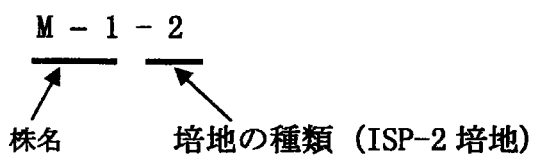
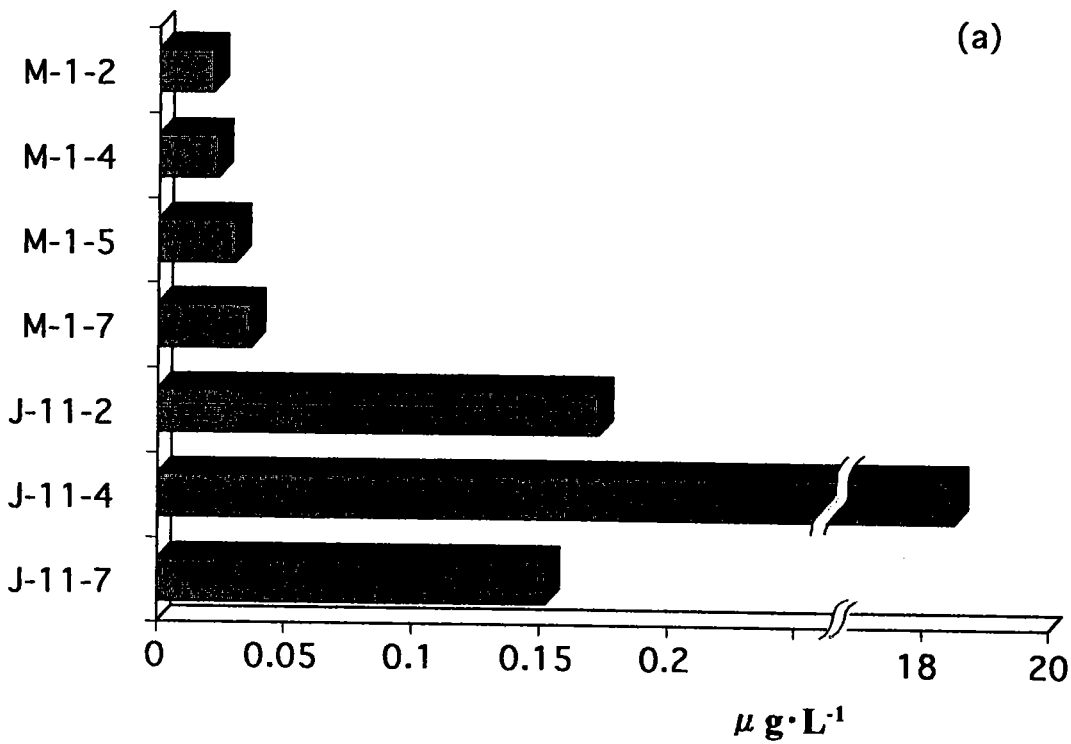
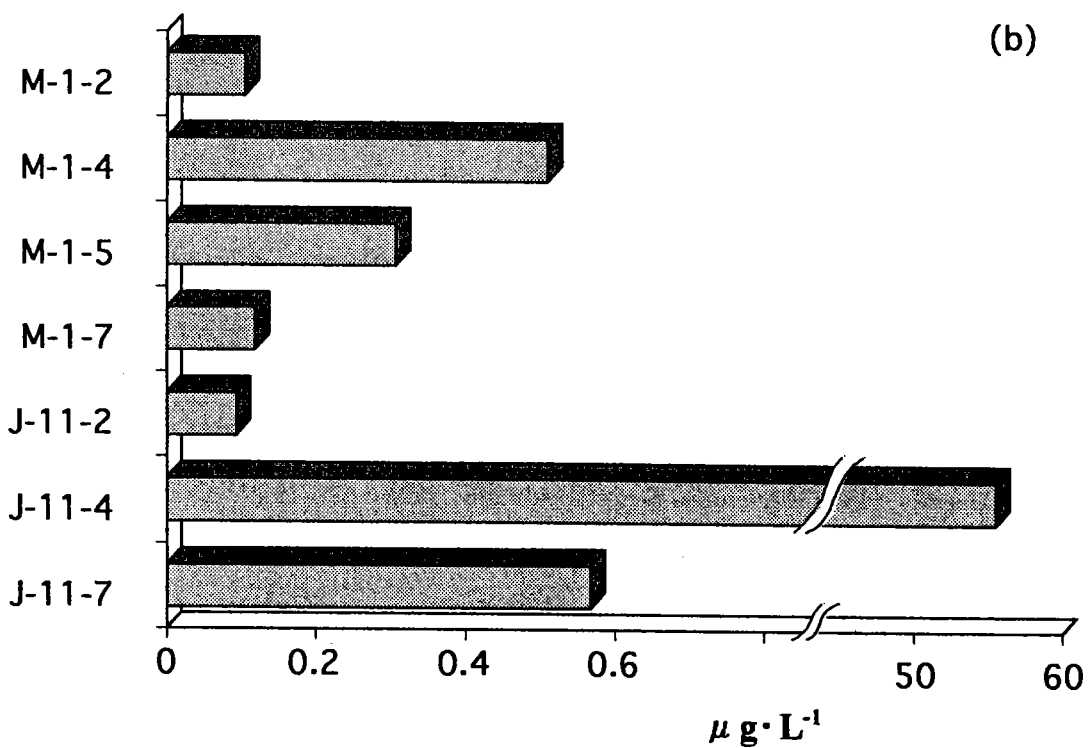


図-4. 種々の培地で培養した時のカビ臭産生量
(a ; Geosmin, b ; 2-Methylisoborneol)



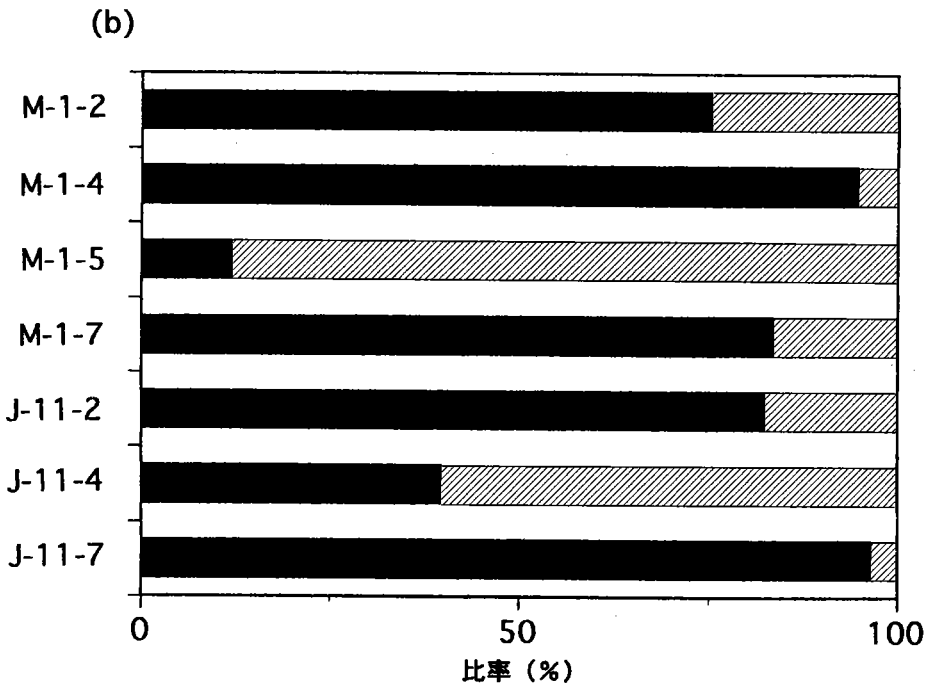
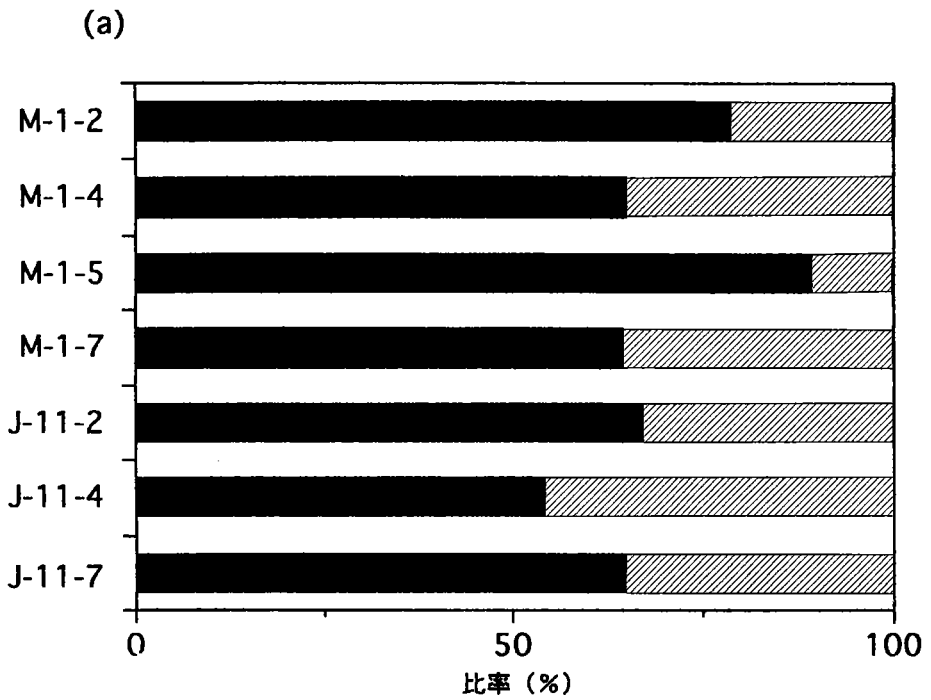


図-5. 菌体内と菌体外のカビ臭の比率

25°C、5日間培養後の菌体 (■) および培地 (▨) に放出されたカビ臭Geosmin(a)および2-Methylisoborneol (b)量の比率を示す

a



b

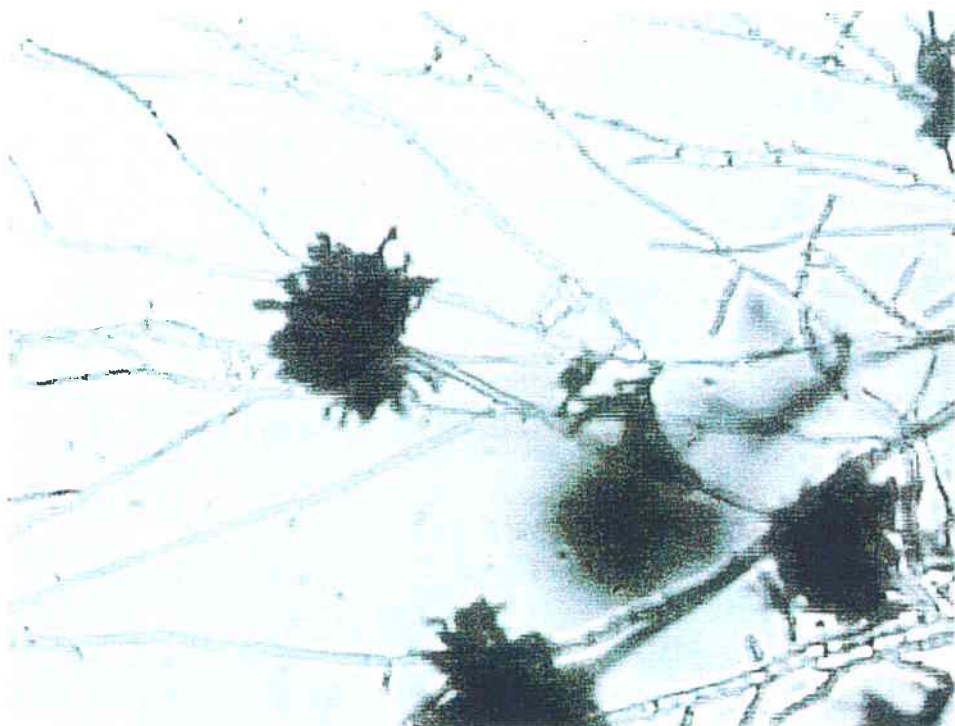
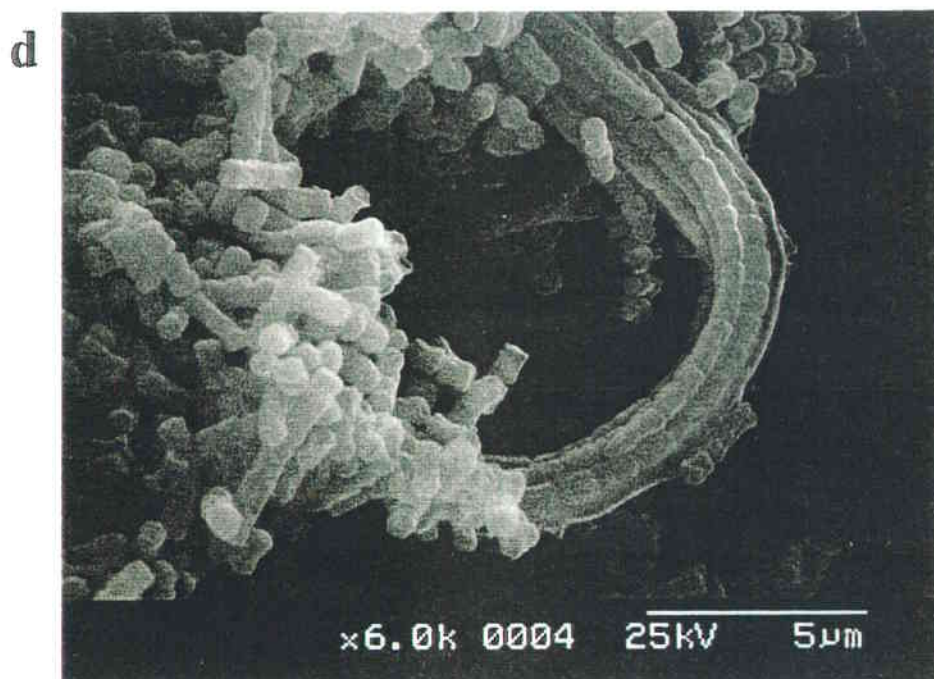
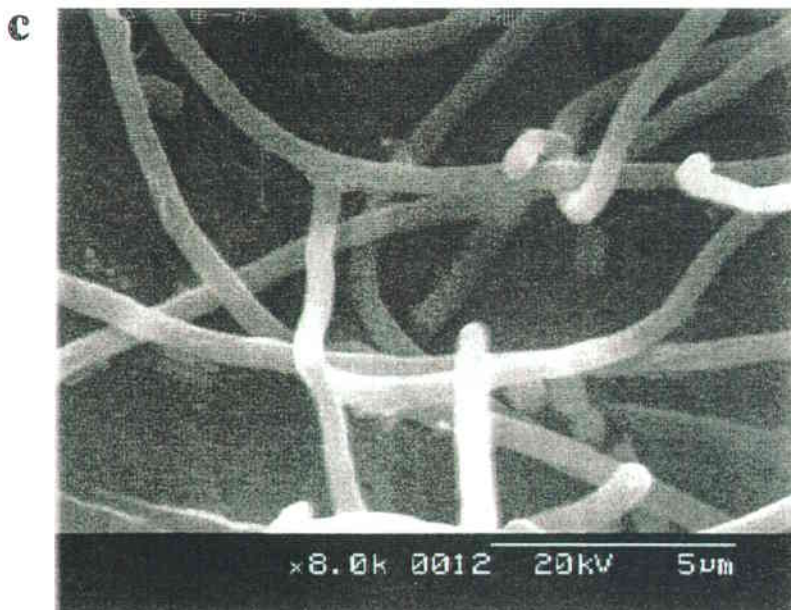
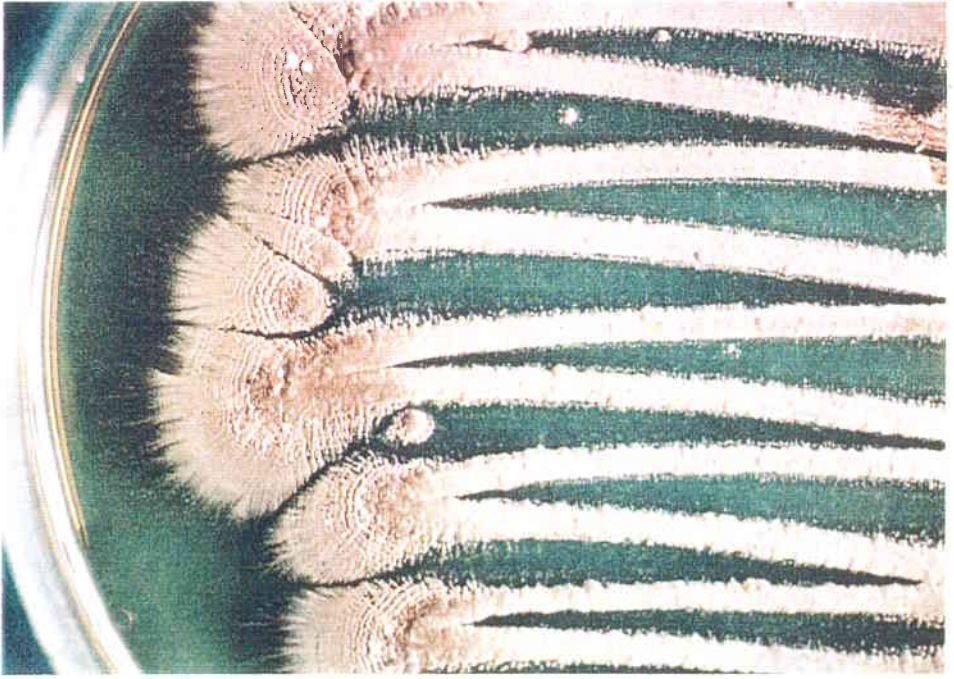


図-6. M-1株の光学および走査電顕図

(a) 寒天培地上での生育、(b) 光学顕微鏡、(c、d) 孢子



a



b

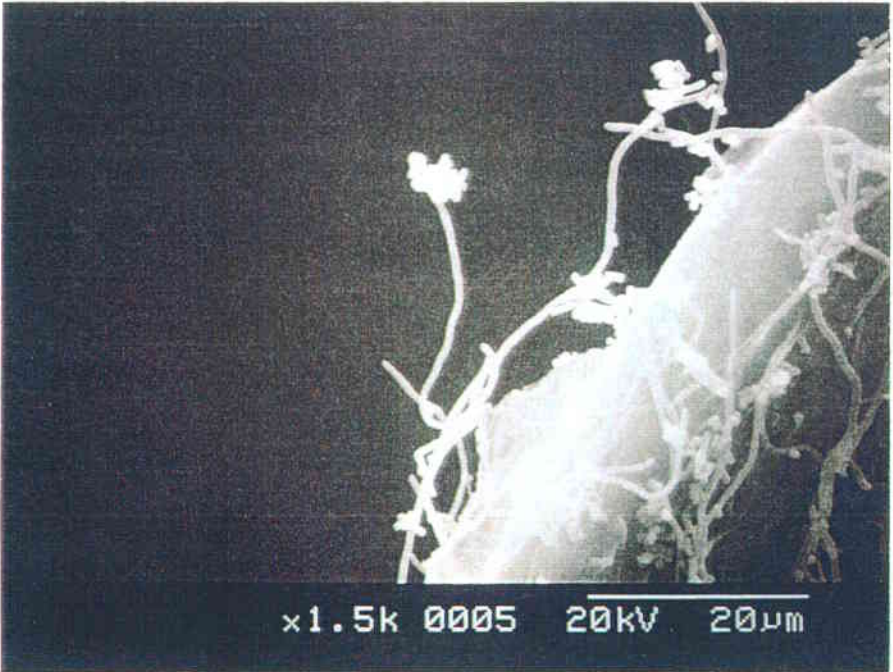
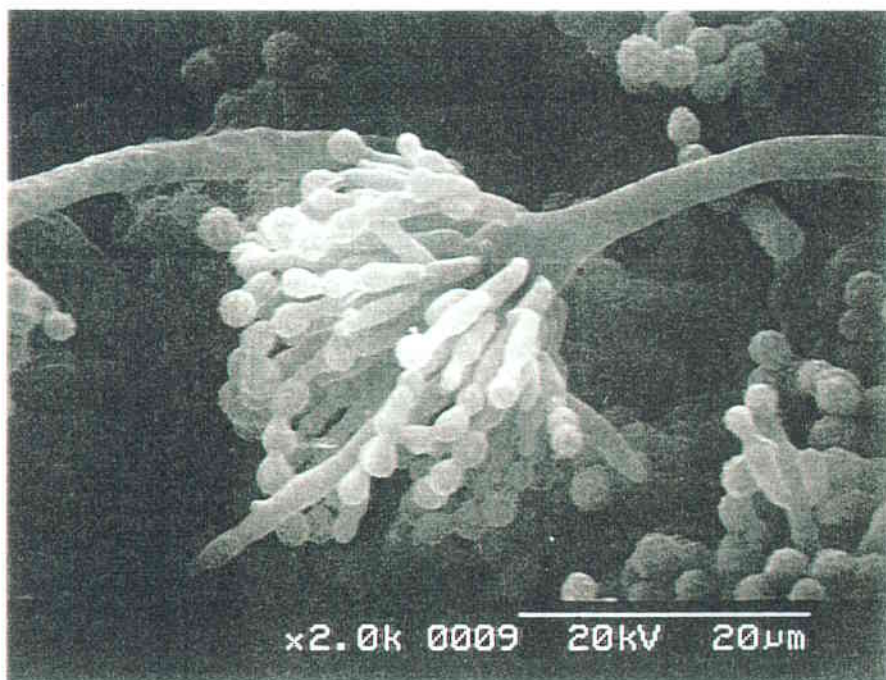
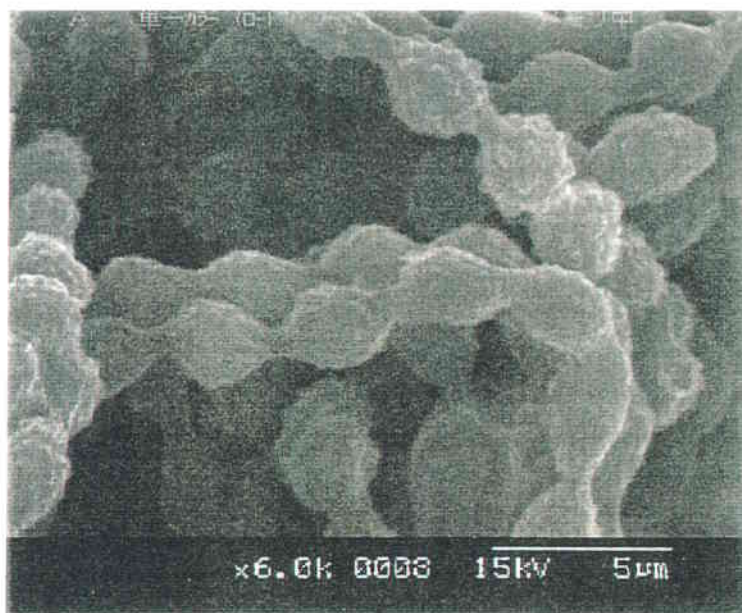


図-7. J-11株の光学および走査電顕図
(a)寒天培地上での生育、(b、c、d)走査電顕図

c



d



考 察

ラン藻 (Jüttner 1984) あるいは粘液細菌 (Yamamoto et al., 1994) ではGeosminか2-MIBの一方のみを産生し、同時に両カビ臭を産生しない。多摩川から単離した株は何れも両カビ臭を高濃度に産生した。単離された株の多くは、真菌類であり、湖沼でのカビ臭要因生物がラン藻や放線菌であったことと大きく異なる。河川水は河床のカビ臭要因生物が湖沼のそれと異なるとすれば、その原因は流水という条件のため酸素の供給が大きいことにあると考える。

Woodら(1985)は、放線菌の増殖に必要な基質とカビ臭のGeosmin産生量との関係を調べ、基質が植物性である場合にGeosmin産生量の高いことを報告している。図-5に示すように培地の組成を変えるとカビ臭の産生量が異なる。すなわち増殖に必要な基質の違いがカビ臭の産生量に著しく影響を与えることが判る。しかし、どのような基質がカビ臭産生に有効であるのか不明であり検討する必要がある。

橋本(1986)によれば、水道水源となる水域でのカビ臭発生は、富栄養化に伴うラン藻類の消長とかかわりが深く、とくに*Microcystis*属の出現がカビ臭の発生を予測する決め手になると報告している。しかし、河川水の場合、*Microcystis*属の出現は堰きとめられた水域では観察されることがあるが、流れのある場合には、この属が大量発生することは殆どない。

一般に、環境が異なればそこに生息する微生物種も、またカビ臭を産生する種も異なる。カビ臭の制御には、先ず、微生物種の確認と同定が必要である。また、真菌類のように孢子形成時に多量のカビ臭を放出することも報告されているので、河川水や河床で、これらの菌がどのような形態で存在するかについて検討を加える必要がある。さらに、それに応じてカビ臭の除去などの手当てを考えねばならない。

引用文献

- Gerber, N. N. and Lechevalier, H. A. (1963) Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from *Actinomyces*. *Appl. Microbiol.*, 13, 935-938.
- Gerber, N. N. (1983) Volatile substances from *Actinomyces* : their role in the odor pollution of water. *Water Sci. Tech.* 115, 115-125.
- 橋本徳蔵 (1986) カビ臭発生湖沼の栄養塩とプランクトン相、用水と廃水. 25(5), 3-8.
- Izaguirre, G., Hwang, C. J., Krasner, S. W. and McGuire, M. J. (1982) Geosmin and 2-methylisoborneol from cyanobacteria in three water supply systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 708-714.
- Jüttner, F. (1984) Dynamics of the volatile organic substances associated with cyanobacteria and algae in a eutrophic shallow lake. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47(4), 814-820.
- 根来健・安藤政義・市川延繁 (1984) カビ臭発生機構－藍藻類－・用水と廃水, 26(8), 21-25.
- Yamamoto, Y., Tanaka, K. and Komori, K. (1994) Volatile compounds excreted by myxobacteria isolated from lake. *Jp. J. Limnol.*, 55, 241-245.
- 山本鎔子 (1978) 寒天重層法による湖沼中のラン藻溶解性微生物因子の測定、陸水学雑誌, 39, 9-14.
- Wood, S., Williams, T. and White, W. R. (1985) Potential sites of geosmin production by *Streptomyces* in and around reservoirs. *J. Appl. Bacteriol.*, 58, 319-326.

「^た多^ま摩^か川^か河^{せん}川^{しき}敷^ののカ^び臭^{しゅう}産^{さん}生^{せい}原^{げん}因^{いん}としての
河^か床^{しょう}付^ふ着^{ちく}微^{せい}生^{せい}物^{ぶつ}膜^{まく}の研究^{けんきゅう}」

(学術研究VOL. 27 研究助成・A類No. 197)

著 者 ^{やま}山 ^{もと}本 ^{よう}鎔 ^こ子
発行日 1999年3月31日
発 行 財団法人 とうきゅう環境浄化財団
〒150-0002 渋谷区渋谷1-16-14
(渋谷地下鉄ビル内)
TEL (03)3400-9142
FAX (03)3400-9141
