〔衛生化学〕
EISEI KAGAKU
37 (2) 132-136 (1991)

Anabaena macrospora の無菌化とジオスミン産生

青山 幹, 富田伴一, 茶谷邦男, 斎藤 真
愛知県衛生研究所

Isolation and Geosmin Production of Bacteria-free *Anabaena macrospora*

KAN AOYAMA, BANICHI TOMITA, KUNIO CHAYA and MAKOTO SAITO

Aichi Prefectural Institute of Public Health, 7-6, Nagare, Tsuji-machi, Kita-ku, Nagoya
462, Japan

(Received October 19, 1990)

Isolation of the bacteria-free clone of *Anabaena macrospora* from unialgal culture was attempted by using such four methods as UV irradiation, capillary-pipette washing, akinete dilution and akinete washing methods. The axenic clones were obtained by the UV irradiation and capillary-pipette washing methods.

The bacteria associated with *A. macrospora* were isolated and identified as *Micrococcus* sp.. Addition of these bacterial cells had no effects on the growth and the geosmin production ability of *A. macrospora*.

Keywords — *Anabaena macrospora*; UV irradiation method; capillary-pipette washing method; axenic clone; geosmin; *Micrococcus*

緒 言

国内の水道用水源からカビ臭が発生する原因は放線菌やらん藻類が産生する二次代謝物の 2-methylisoborneol (以下 2-MIB と略) と geosmin であることはすでによく知られている。¹⁾ 愛知県下においても水道用水源池の三河湖で *Phormidium tenue*, *Anabaena macrospora* の異常増殖によるカビ臭が発生し、巴川、矢作川下流域の約 26 万人の人々に影響を与えた。²⁾

らん藻類には *Anabaena* や *Microcystis* のように細胞外に多量の粘質物質を出し、これに細菌が付着しているため無菌株を得ることが困難なものが多³⁾。共存している細菌がカビ臭産生の原因でないことを証明することと *A. macrospora* のカビ臭産生についての性質を知るためには、細菌の共存していない *A. macrospora* を用いて実験を行う必要がある。

著者らはすでに湖水のカビ臭に関連し、らん藻類の *P. tenue* の増殖特性と無菌化,^{4,5)} *A. macrospora* の増殖特性⁶⁾ 及び放線菌の *Streptomyces griseofus-*

cus の増殖至適 pH, カビ臭産生に影響する物質^{7,8)} について報告してきた。今回、カビ臭の発生していた三河湖から単藻化した *A. macrospora* の無菌化を試み、紫外線照射法、キャピラリーピペット洗浄法を用いて無菌株を得ることができた。また共存細菌の分離とその菌が *A. macrospora* の無菌株に及ぼす影響と geosmin 産生について検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 試薬と装置 培地：細菌増殖用の普通ブイヨン、1/10 普通ブイヨン、トリプトソイブイヨンは栄研化学製を使用した。無菌検査用 I 培地は CT 培地⁹⁾ 1000 ml に Yeast extract (Difco 社製) 0.1 g, Tryptone (Difco 社製) 0.1 g を加えたもの、無菌検査用 II 培地は CT 培地 1000 ml に Proteose peptone (Difco 社製) 1 g を加えたものである。普通寒天、標準寒天、1/10 普通寒天、1/10 標準寒天培地は栄研化学製を使用した。無菌検査用平板寒天培地の組成は Table I に示した。グルコースは和光純薬製、Peptone, Beef extract, Agar は Difco 社製を

TABLE I. Media for Bacterial Test

Components		Media			
		A-1	A-2	A-3	A-4
Tryptone	(g)	0.5	0.5	0	0
Peptone	(g)	0	0.5	0.5	1
Beef extract	(g)	0	0.3	0.3	0
Yeast extract	(g)	0	0	0	1
Glucose	(g)	0	0	0	1
Agar	(g)	15	15	15	15
Deionized water	(l)	1	1	1	1

使用した。

紫外線照射法に用いた紫外線ランプは東芝製殺菌ランプ GL-15, 実体顕微鏡は日本光学工業製 SMZ-10, 顕微鏡は日本光学工業製生物顕微鏡 OPTIPHOT, 顕微鏡写真撮影装置は日本光学工業製 MICROFLEX HFX-II を使用した。

キャピラリーピペット, スライドガラスは 170°C, 2 時間乾熱滅菌, CT 培地は 121°C, 20 分間高圧滅菌して用いた。A. macrospora の無菌化のための操作はすべて無菌室内で行った。

2. 供試藻類 キャピラリーピペット洗浄法と前報⁶⁾で報告した吊り上げ法を交互に用いて単藻化した A. macrospora を実験に用いた。

3. 無菌化方法 3-1) 孢子希釈法⁹⁾——単藻化した A. macrospora を CT 培地に接種して 8 週間培養後, キャピラリーピペットを用いてその 0.1 ml を 10 ml の CT 培地の入ったモルトン栓試験管 10 本に取り, 各試験管をよく振とうした (第一段階の希釈)。ついで, 各試験管より培養液 0.1 ml を採取し, 10 ml の CT 培地の入ったモルトン栓試験管 10 本にそれぞれ採取した (第二段階の希釈)。第一, 第二段階の希釈後, それぞれについてこれを 28°C, 1500 lux で 4 週間培養した。

3-2) 孢子洗浄法——粘液質をもたない胞子を洗浄することによって無菌化する目的で, 単藻化した A. macrospora を CT 培地に接種して 8 週間培養後, 培養液の培養フラスコ底部に沈殿したトリコームの 1 個体を先端を細くしたキャピラリーピペットで吸い上げ, スライドガラス上の 1 ml の CT 培地に移した。さらに, これを再びキャピラリーピペットで吸い上げ, 新たなスライドガラス上の 1 ml CT 培地に移した。この操作を 4—5 回繰返したのち, トリコームを 10 ml の CT 培地の入ったモルトン試験管に移し, 28°C, 1500 lux で 1 月間培養した。

3-3) 紫外線照射法⁹⁾——単藻化した A. macrospora についてその対数増殖期の培養液 5 ml を

取り, これを内径 8.5 cm のガラス製シャーレに入れ, シャーレの蓋をはずして 15 W の紫外線ランプで上方 20 cm の距離から一定時間照射した。

この培養液の 0.2 ml をメスピペットを用いて 5 ml の CT 培地の入ったモルトン栓試験管に移した。これを 28°C, 1500 lux で 20 日間培養した。

3-4) キャピラリーピペット洗浄法⁹⁾——キャピラリーピペットを用いて, 単藻化した A. macrospora についてその対数増殖期の培養液の 1 滴をスライドガラス上に取り, 実体顕微鏡下で, 先端を細くしたキャピラリーピペットを用いて単一藻体を吸い上げ, スライドガラス上の CT 培地 1 ml に移した。CT 培地中で 10 回藻体の洗浄を繰返したのち, 10 ml の CT 培地に移し, 28°C, 1500 lux で 20 日間培養した。この一連の洗浄, 培養操作を 2 回繰返す方法と CT 培地中で 5 回藻体の洗浄を繰返したのち培養する一連の操作を 5 回繰返す方法を行った。

4. 無菌株の無菌確認方法 紫外線照射法, キャピラリーピペット洗浄法により処理し, 無菌化された A. macrospora について対数増殖期後半の藻体 1 ml を 3 種類の増菌用培地各 10 ml に接種し, 30°C で 1 週間培養した。この培養液を 4 種類の寒天培地各 10 枚に塗布し, 30°C で 10 日間培養した。次いで, これらの平板培地に細菌の増殖が見られなかった A. macrospora の培養液を選択し, その 0.2 ml を Table I に示した無菌検査用平板寒天培地に塗布し 30°C, 10 日間培養した。

さらに, 無菌検査用平板寒天培地に細菌の増殖が見られなかった培養液について 2 種類の無菌検査用液体培地を用いて, 28°C, 1500 lux で 4 週間培養し, 混在している細菌のために液体培地が白濁することがないことを確認し, その藻体株を無菌株とした。

5. A. macrospora の増殖量と geosmin の定量方法 A. macrospora の増殖量は Chl. a 量で示した。Chl. a 量と geosmin 量は前報⁶⁾の方法に従って測定した。各数値は 3 個のフラスコを使用した実験の平均値として示した。

実験結果

1. 孢子希釈法, 孢子洗浄法

孢子希釈法については A. macrospora の培養液 0.1 ml を添加して培養した第 1 段階目の希釈で A. macrospora は増殖したが, 細菌が共存していることが無菌検査用平板寒天培地で確認された。第 2 段階目の希釈では A. macrospora は増殖しなかった。この方法を 2 回行ったが 2 回とも第 2 段階目の希釈培

養液では *A. macrospora* は増殖しなかった。胞子洗浄法ではこの方法を2回行ったが2回ともに胞子は発芽せず、従って藻体は増殖しなかった。

2. 紫外線照射法

紫外線照射法による無菌化の結果は単藻化した *A. macrospora* に紫外線を5分間以上照射しないと共存細菌が死滅しなかった。しかし、*A. macrospora* の藻体は10分間紫外線を照射すると発育せず死滅した。5分照射を数回試みたところ、*A. macrospora* の増殖はみられるが共存細菌が死滅していた無菌株1株が得られた。

3. キャピラリーピペット洗浄法

キャピラリーピペット洗浄法により無菌化を試みた。1回について、1 ml の CT 培地中で洗浄を10回くり返して、10 ml の CT 培地の入った試験管で培養する行程を2回くり返した場合、*A. macrospora* の藻体に無菌検査用平板寒天培地で共存している細菌が認められた。1回について、1 ml の CT 培地中で洗浄を5回くり返し、次いで10 ml の CT 培地の入った試験管で培養する行程を5回くり返した場合には *A. macrospora* の藻体には無菌検査用平板寒天培地、無菌検査用液体培地で共存している細菌が認められない藻体があった。

Fig. 1 (a) は単藻化した *A. macrospora* の藻体の顕微鏡写真を示した。細胞の周囲に細菌が付着しているのが認められた。Fig. 1 (b) は紫外線照射法により無菌化を行った *A. macrospora* の藻体の顕微鏡写真であり、Fig. 1 (c) はキャピラリーピペット法により無菌化を行った *A. macrospora* の藻体の顕微鏡写真である。Fig. 1 (a) で見られた細菌は Fig. 1 (b), (c) の藻体共に認められなかった。

4. 共存細菌の同定

単藻株の藻体から数種の平板寒天培地を用いて共存細菌の分離を試みたところ、ペプトン肉エキス平板培地から2株の細菌が分離された。単離された共存細菌2株について細菌学的性質を新井¹⁰⁾の方法に準じて検討したところ、両株ともに Table II の性状を示した。この結果からこの株は *Micrococcus* 属に属する細菌であると同定された。

5. 無菌株の増殖に及ぼす共存細菌の影響

単藻株より得られた共存細菌、*Micrococcus* 属2株のうち、増殖の良好な1株を1/10トリプトソイ寒天平板培地で培養したのちその1白金耳を採取し、これを0.85%生理食塩水で希釈し、 2.7×10^3 cells/ml になるように CT 培地 70 ml に添加した。これにキャピラリーピペット洗浄法と紫外線照射法により

Fig. 1. Micrographs of *Anabaena macrospora* Stained with Fuchine

- (a) bacteria-associated *Anabaena macrospora*,
- (b) bacteria-free *Anabaena macrospora* isolated by UV irradiation method,
- (c) bacteria-free *Anabaena macrospora* isolated by capillary-pipette washing method.

得られた無菌株を Chl. a 量として 0.8 mg ずつ接種し、24–26°C, 1500 lux で2週間培養した。その結果を Table III に示したが今回の実験条件では共存細菌

菌である *Micrococcus* の有無は無菌株の Chl. a 量, geosmin 産生量には影響しなかった。

考 察

藻類が湖水中で異常増殖をしばしば繰り返すことによって、藻類から湖水中に放出された二次代謝物や藻体そのものが水道水の水質に大きな影響を与えている。¹⁾ *A. macrospora* や *P. tenue* はカビ臭物質を、*Uroglena americana* は生ぐさ臭を水道水に与えてきた。これらの藻類は通常細菌と共存しているので、発臭性藻類の研究には最初に無菌化が必要である。従来、微細藻類の無菌化は物理的な方法と化学的な方法により行われてきた。⁹⁾ 著者らは既に *P. tenue* の無菌化によりカビ臭物質は *P. tenue* そのものが産生することを明らかにした。⁵⁾ 熊谷ら¹¹⁾ は *Microcystis aeruginosa* についてキャピラリーピペット洗浄法により、Watanabe ら¹²⁾ は *M. aeruginosa*, *M. viridis*, *M. wesenbergii* について超音波処理、遠心分離、マイクロピペット洗浄法を組合せる方法により、岩崎ら¹³⁾ は赤潮べん毛藻類の *Heterosigma inlandia*, *Eutreptiella* sp. と *Exuviaella* sp. を毛細管ピペット法により無菌化に成功している。

A. macrospora の粘膜の厚さは *P. tenue* に比較して厚く、細胞の幅とほぼ等長である^{1,14)} ので、共存する細菌を完全に除去することは非常に困難である

TABLE II. Characteristics of the Bacteria Associated with *Anabaena macrospora*

Shape of cells	Coccus
Gram strain	Positive
Mobility	Non mobile
Pigment	Not produced
Catalase test	Positive
Oxidase test	Negative
Glucose fermentation	Negative

とわれてきた。

今回、著者らは *A. macrospora* の孢子形成を利用した無菌化法について検討を行ったが成功しなかった。これは孢子の発芽をコントロールする具体的な手法に欠けていたためと考えられる。

紫外線照射法は、*P. tenue*,⁵⁾ *Microcystis*¹¹⁾ について試みられているが無菌株は得られていない。らん藻類は細菌と同じ原核細胞であるので紫外線に対する抵抗力は似ていると考えられるが、共存している細菌数が著しく減少している藻体について、ごく短時間の、又は照射距離の遠い紫外線照射を行うと無菌化ができることも考えられる。今回の実験では上方 20 cm の距離で 15 w の紫外線ランプで照射を行ったが、5 分間照射では細菌が死滅しない場合と死滅して無菌株が得られる場合があった。

キャピラリーピペット洗浄法は多くの海産、淡水の微細藻類の無菌化に成功している方法であるが、手間と時間を必要とする。しかし、無菌培地による洗浄は、共存する菌による影響以外にはその本来持つ性質に変化をもたらさない。今回、キャピラリーピペット洗浄法により得られた無菌株の培養結果から *A. macrospora* のカビ臭は共存する細菌によって産生されるのではなく、*A. macrospora* それ自体がカビ臭を産生することが明らかになった。

共存細菌は細菌学的性質から *Micrococcus* 属の細菌であることが確かめられた。著者らは既に *P. tenue* の無菌化についての報告の中で混生している菌は *Flabobacterium* 属、*Micrococcus* 属に属していたと報告した。⁵⁾ 石橋¹⁵⁾ はらん藻類、*P. tenue* の共存細菌としてグラム陽性菌である *Streptococcus* 属、*Bacillus* 属の細菌を分離している。一方、共存している菌の働きは熊谷ら、¹¹⁾ 山田ら⁵⁾ によって報告されているが、いずれの場合も無菌株の増殖よりも分離した細菌共存時の藻体の増殖が良好であったと報告している。また、熊谷ら¹¹⁾ によればアオコ群体から分離された細菌は 20 株であり、そのうちアオコの

TABLE III. Effect of Isolated Bacteria (*Micrococcus*) on the Growth of the Axenic Clone of *Anabaena macrospora*

Using method	UV irradiation		Capillary-pipette washing	
	Bacteria-free Mean $\pm$ S.D.	Bacteria-associated Mean $\pm$ S.D.	Bacteria-free Mean $\pm$ S.D.	Bacteria-associated Mean $\pm$ S.D.
Chl. a ^{a)} (mg/l)	0.45 $\pm$ 0.10 ^{b)}	0.45 $\pm$ 0.06	0.15 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.04
Geosmin (μ g/l)	145 $\pm$ 24	147 $\pm$ 25	46 $\pm$ 7.9	53 $\pm$ 11.8

* a) : Chlorophyll a,

* b) : Mean $\pm$ S.D. (n=3),

Chl. a, Geosmin: concentrations after 2 weeks.

増殖に関係していたのは一部の共存細菌のみであったことを報告している。今回共存細菌として分離された *Micrococcus* が Chl. a 量と geosmin 産生に影響を及ぼさなかったのは、共存細菌であっても培養条件がその影響を調べるのに不適當であったか、あるいは増殖や二次代謝と直接関係のない性状に関係することを示唆するものと考えられる。

ま と め

4 種類の方法を用いて *Anabaena macrospora* の無菌化を試み、紫外線照射法、キャピラリーピペッ

ト洗浄法の 2 方法で無菌化に成功することができた。*A. macrospora* に共存していた細菌は *Micrococcus* 属に属しており、この細菌は本条件化では無菌株の増殖や geosmin 産生には影響を及ぼさなかった。

謝辞 この研究に愛知県小牧保健所長 伊藤正夫博士、愛知県企業庁水質試験所 森島信雄専門員、京都市水道局水質試験所 根来健氏の御助言を受けたことを感謝します。

引 用 文 献

- 1) 八木正一, “異臭味対策の指針, 「付」水道水のカビ臭の原因と対策,” 日本水道協会編, 東京, 1980, pp. 2—18.
- 2) 青山 幹, 山田直樹, 富田伴一, 茶谷邦男, 用水と廃水, **29**, 217 (1987).
- 3) 萩原富司, 矢木修身, 高村義親, 須藤隆一, 水質汚濁研究, **7**, 437 (1984).
- 4) 山田直樹, 青山 幹, 山田益生, 浜村憲克, 水質汚濁研究, **8**, 515 (1985).
- 5) 山田直樹, 青山 幹, 山田益生, 浜村憲克, 水質汚濁研究, **9**, 379 (1986).
- 6) 青山 幹, 富田伴一, 茶谷邦男, 衛生化学, **36**, 21 (1990).
- 7) 青山 幹, 山田直樹, 山田益生, 浜村憲克, 衛生化学, **32**, 85 (1986).
- 8) Kan Aoyama, *J. Appl. Bacteriol.*, **68**, 405 (1990).
- 9) 西沢一俊, 千原光雄, “藻類研究法,” 共立出版, 東京, 1979, pp.177—183, 186—187, 219—220.
- 10) 新井武利, 金子精一, 工藤泰雄, “最新微生物検査法の実際,” 衛生技術会, 東京, 1979, pp.211—215.
- 11) 熊谷光彦, 高村義親, 矢木修身, 須藤隆一, 日本陸水学会誌, **47**, 219 (1986).
- 12) Makoto Watanabe, Shoichiro Suda, Fumie Kasai, Tomihiro Sawaguchi, *Bull. JFCC*, **11**, 57 (1985).
- 13) 岩崎英雄, 佐々田憲, 日本水産学会誌, **35**, 943 (1969) : Hideo Iwasaki, *J. Oceanograph. Soc. Japan*, **27**, 152 (1971).
- 14) 岡山治一, 高木良治, 西川光春, 根来 健, 京都市水道局水質試験年報, **35**, 261 (1983).
- 15) 石橋良信, 水道協会雑誌, **644**, 9 (1988).