<ノー ト>

環境水系からの2-メチルイソボルネオール分解菌 の分離とその性質

大谷 仁 己* 高野 富 夫* 秋 山 重太郎*

Isolation and Characterization of 2-Methylisoborneol Degrading Bacteria from Aquatic Samples

Yoshimi OHTANI*, Tomio TAKANO* and Jutaro AKIYAMA*

* Gunma Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 3-21-19, Iwagami-cho, Maebashi
371 Japan

Abstract

Isolation of 2-methylisoborneol (2-MIB) degrading bacteria from environmental water and sediment had been tried and the following results were obtained.

2-MIB degrading bacterium (Strain S6) isolated from a pond sediment was identified as *Pseudomonas* sp.

The strain formed colonies about 1mm in diameter after 5 days incubation at 25°C. The strain could degrade more than 90% of 4 mg·l⁻¹ 2-MIB in 4 days under an aerobic condition. The degradation of 2-MIB by the strain was proved to be co-metabolism. The strain could partly degrade 2-MIB in autoclaved river water and sediment. Ethanol assimilating bacteria could degrade 2-MIB partly through the acidification of culture media when incubated in ethanol containing media.

Key words: 2-methylisoborneol, biodegradation, co-metabolism, *Pseudomonas* sp.

1. 緒 言

2-メチルイソボルネオール (2-MIB) は藍藻類の *Phormidium tenue* などにより産生され、水道水のカビ臭の主な原因物質として知られている^{1),2)}。2-MIB は、凝集沈殿、急速砂戸過に、オゾン処理や活性炭処理などを組合わせた高度上水処理によって除去できる³⁾が、その際に、処理プラント内に生息する従属栄養細菌が2-MIBの分解に深く関わっていることが示唆されている⁴⁾。

2-MIB分解菌についてはすでに *P. fluorescens*⁵⁾, *P. putida*⁶⁾, *Candida*⁷⁾等^{4),8)}の菌が分離されている。しかし、これらの菌は2-MIBの処理に用いられた活性炭層や戸過砂層から分離されたものが多い^{4),5)}。環境水

系からの分離はほとんどなく、環境中における2-MIBの挙動についてはよくわかっていない。

そこで、著者らは前橋市内の河川と池の水および底泥から2-MIB分解菌の分離を試みた。その結果、池の底泥から2-MIB分解菌を分離でき、その細菌の2-MIB分解に関する性質について若干の知見を得たので報告する。

2. 実験方法

2.1 供試材料

前橋市内の河川4地点および池2地点の水と底泥を用いた。水は滅菌した広口ガラス瓶に、底泥はポリエチレン製の袋に採取し、供試まで冷蔵庫に保存した。

2.2 培 地

基礎培地として、無機塩のみの培地を使用した。組成は $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 900mg, KH_2PO_4 340mg, NH_4Cl 500mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 112mg, CaCl_2 14mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5mg, 蒸留水 1,000ml, pH6.9である。さらに、この培地に必要に応じて酵母エキス、エタノール、2-MIB等を添加して用いた。2-MIBは、細菌によって利用され難いジメチルスルホキシドに溶解（2ないし $4 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ）して使用した。

前培養には、基礎培地および基礎培地に酵母エキス $40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ とエタノール $1 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ を加えた培地に2-MIBを $4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 添加して用いた。

2-MIB分解菌の分離培養には、基礎培地にブレインハートインフュージョンブイヨン培地 $0.18 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 、寒天 $15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 、2-MIB $70 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ を加えた培地を用いた。

2-MIB分解菌の単離には1/10濃度のハートインフュージョン寒天培地（1/10HIA）を用いた。

分解性のスクリーニングには、基礎培地に酵母エキス $40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、エタノール $1 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ 、2-MIB $4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ を加えた培地を用いた。

2.3 分離方法

前培養 水は 100 ml をメンブランフィルターで濾過し、フィルターを前培養用の培地（ 20 ml ）に入れた。底泥は湿泥で $1 \sim 2 \text{ g}$ を培地に入れ、滅菌したテフロンシートをはさんで密封した。水の場合はさらに滅菌底泥 $1 \sim 2 \text{ g}$ を加えて同様に密封し、 25°C で3週間培養した。

分離培養 前培養で2-MIB分解性がよかった培養液5件を選び、2-MIB分解菌の分離を試みた。基礎培地で培養した菌液は 10^{-3} ～ 10^{-5} に希釈し、酵母エキスとエタノールを加えた培地で培養した菌液は 10^{-5} ～ 10^{-7} に希釈し、それぞれの 5 ml をメンブランフィルターで濾過した。濾過後フィルターを2-MIB分解菌分離用の培地にのせ、テフロンシートとビニールテープで密封し、 25°C で1～2週間培養した。培養後フィルター上のコロニーを各平板とも数十個、実体顕微鏡下で釣菌し、1/10HIAに画線培養した。画線培養後一部の菌を掻きとり、2-MIB分解性のスクリーニングを行った。スクリーニングで分解性が認められたコロニーは1/10HIA上で単コロニーを釣菌することを数回繰返して純培養した。

2.4 2-MIB分解性の確認方法

スクリーニングにおける2-MIBの分解性は、スクリーニング用培地で 25°C 1～2週間静置培養後検査した。単離したS6株とS126株の分解性の試験は密封した共栓付き三角フラスコで振とう培養して行った。

2-MIB濃度の測定はヘキサン抽出し、ガスクロマトグラフィー（GC）で行った。GCの分析条件は、検出器：FID、カラム：2%OV-1、ガラス $\phi 3 \text{ mm} \times 3 \text{ m}$ 、注入口温度： 170°C 、カラム温度： 140°C （スクリーニング） $70 \sim 140^\circ\text{C}$ $5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ （定量試験）、キャリアーガス流量： N_2 $50 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ である。

2.5 分離菌株の性状試験

分離菌株の性状試験は、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology⁹⁾、グラム陰性菌の同定¹⁰⁾、臨床材料より分離されるグラム陰性桿菌同定への手引き¹¹⁾等を参考にして行った。

2.6 菌数の測定

2-MIB分解菌の菌数の測定は培養液を10倍段階希釈し、その 0.1 ml を1/10HIA上にとりコンラージ棒で広げた。平板は 25°C で数日間培養し、生成したコロニーを計数した。一部の試料についてはMPN法とブリード法¹²⁾でも菌数を計測した。

2.7 環境水系中での分解性の検討

分離株の環境水系中での2-MIB分解性の検討は、利根川の水と底泥を用いて行った。水は 40 ml を、底泥は湿泥 20 g と水 40 ml を共栓付き三角フラスコに入れ、オートクレーブで滅菌して用いた。

3. 結果および考察

2-MIB分解菌の分離を試みた5検体のうち、分解菌が分離できたのは1検体のみであった。分離できたのはさちの池の底泥を基礎培地で前培養したもので、フィルター上のコロニー45個を調べたところ、2コロニー、S6株とS20株が分解菌であった。純培養後生化学的性状を調べたところ2株とも同じ性状であった。そこでこのうちのS6株について詳しく試験した。

2-MIB分解菌S6株が複数の菌の混合培養でないことは、MPN法で培地の混濁した試験管はすべて2-MIBの分解が確認されたこと、MPN3本法、寒天平板塗沫法による生菌数およびブリード法による全菌数がほぼ一致したことで確認された。試験した培養液の菌数はそれぞれの方法で、 $4.3 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ 、 $3.6 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ 、 $7.5 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ であった。

S6株は増殖速度が遅く、1/10HIA上 25°C の培養で3日目ようやく目視できるようになり、5日目で直径約 1 mm のコロニーを形成した。分解菌のスクリーニングの段階では2-MIBの分解性が見られたコロニーがかなりあったが、純培養の段階で分解性が消失したのは、複数の菌が混じっていたコロニーが多かったため増殖の速い非分解菌を選択釣菌したためと思われる。環境水系から分解菌の分離を試みる場合には、増殖の遅い菌にも注意を払う必要がある。

Table 1 Biochemical characteristics of strain S6

Characteristics	Reaction
Gram reaction	-
Cell shape	rod
Motility	+
Aerobic growth	+
Anaerobic growth	-
Catalase	+
Oxidase	+
Pigmentation	-
Growth at 37°C	-
Growth on MacConkey agar	-
Citrate, Simmons'	-
Acid produced from:	
Glucose	-
Maltose	-
Mannitol	-
Xylose	-
Nitrate reduction	-
Urease	-
Arginine dihydrolase	-
Deoxyribonuclease	-
Acylamidase	-

Fig. 1 Degradation of 2-methylisoborneol by strain S6 and its growth.

○: Yeast extract 5mg·l⁻¹, ●: Yeast extract 50mg·l⁻¹, ⊙: Yeast extract 250mg·l⁻¹, ⊕: Yeast extract 2,500mg·l⁻¹, △: Yeast extract 250mg·l⁻¹, Ethanol 1ml·l⁻¹, ▲: Ethanol 2ml·l⁻¹, □: No cells

S 6 株は Table 1 に示す性状により, *Pseudomonas* 属と思われた。

P. sp. S 6 株による 2-MIB の分解に対する共存有機物の影響を Fig. 1 に示す。培養中の pH は、常に 6.7~6.9 の範囲にあり、本菌による 2-MIB の分解は培養液の酸性化によるものではなかった。酵母エキス濃度が 5 mg·l⁻¹ では分解はわずかであったが (後出の Fig. 2 参照), 50mg·l⁻¹ と 250mg·l⁻¹ ではよく分解した。2,500mg·l⁻¹ と高濃度になると既報の株⁴⁾⁵⁾と同様分解速度が低下した。また、2-MIB を唯一の炭素源とした場合には、2-MIB を 0.25g·l⁻¹ と高濃度にして 1 週間培養したが、2-MIB 濃度に変化はなく、生菌数も 3.3×10^7 ml⁻¹ から 1.8×10^7 ml⁻¹ と半減し、2-MIB を利用した菌の増殖は起こらなかった。このことより、S 6 株は既報の株⁴⁾と同様、2-MIB を唯一の炭素源としては利用できず、易分解性の有機物を分解して増殖する際に、Co-metabolism で 2-MIB を分解しているものと思われた。また、2-MIB の分解は菌の増殖に遅れる傾向が見られた。このことから、菌の増殖に伴い産生された分解酵素系は、易分解性有機物が欠乏した際に 2-MIB に作用し、2-MIB を分解する可能性が考えられる。

Fig. 2 Degradation of 2-methylisoborneol by strain S6 at a low concentration of yeast extract.

Yeast extract: 5mg·l⁻¹, Number of cells inoculated: ○ 10⁶ ml⁻¹, ⊙ 10⁶ ml⁻¹, ⊕ 10⁴ ml⁻¹, ● 10² ml⁻¹, △ no cells

Fig. 3 Degradation of 2-methylisoborneol by strain S6 in the autoclaved water of Tone river.
Number of cells inoculated: ○ 10^2 ml^{-1} , ◐ 10^5 ml^{-1} , ● 10^3 ml^{-1} , ● no cells

Fig. 2には有機物濃度の低い場合、酵母エキス $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ での2-MIBの分解の様子を示す。2-MIB濃度の僅かな変化を測定できるよう2-MIB濃度も $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ と低くした。分解菌の菌数を変化させているが、初期の菌数が $10^2 \sim 10^6 \text{ ml}^{-1}$ では菌の増殖により培養後の菌数は 10^7 ml^{-1} でほぼ一定となった。また、 10^8 ml^{-1} の分解菌を加えた場合には培養中ほぼ一定の菌数を示した。菌数が少ない場合には増殖に時間が必要で、2-MIBの分解も遅れぎみであったが、どの場合にも1週間後の2-MIBの分解割合はほぼ同じになった。利用できる有機物の量と分解できる2-MIBの量とが関係あるように思われる。 $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ と低い酵母エキス濃度でも2-MIBの分解が確認されたことから、S6株は環境中においても2-MIBの分解に係わっている可能性がある。

実際の環境中での分解の可能性を探るため、滅菌河川水および底泥に分解菌と2-MIBを加えて検査した結果がFig. 3, 4である。河川水では利用できる有機物濃度が低いために菌の増殖も 10^6 ml^{-1} 以下に止まり、2-MIBの分解も 10^7 ml^{-1} を加えた系で僅かに見られただけであるが、底泥ではすべての系で 10^7 ml^{-1} 以上に増殖し、 $4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ のほとんどが分解された。オートクレーブで滅菌した底泥であるため、実際の環境中とはかなり異なるものと思われるが、S6株は環境中

Fig. 4 Degradation of 2-methylisoborneol by strain S6 in the autoclaved sediments of Tone river.
Number of cells inoculated: ○ 10^2 ml^{-1} , ◐ 10^5 ml^{-1} , ● 10^3 ml^{-1} , ● no cells

も主として底泥中で2-MIBの分解に関与している可能性がある。

また、2-MIB分解菌の分離にあたって、分解性のスクリーニングの培地にエタノールを加えてあったため、分離を試みた5検体すべてからエタノールを資化し、酸を生成する菌が分離された。本実験では用いた培地の緩衝能が低かったため、これらの菌の培養中に培地が酸性化し、2-MIBが一部分解した。2-MIBは酸性条件下では酸触媒による脱水反応によって分解されると推察されている。

エタノール資化性菌を同定したところ、*Pseudomonas* sp. 3株、*Acinetobacter* sp. 1株、*Enterobacter aerogenes* 1株であった。最も多量に酸を生成した株、さちの池の水から分離した *E. aerogenes* S126株の例をFig. 5に示す。エタノールのみを炭素源とした場合には、培養液は2日目以降急速に酸性化し、最終的にはpH3.8まで低下した。また、エタノール以外に酵母エキスを $0.25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 添加した系でも徐々に酸性化し、10日目にはpH4.4まで低下していた。この菌株による2-MIB分解性は、基礎培地中のリン酸塩濃度を1桁高め緩衝能を上げるか、エタノールの添加量を1桁下げ、培養中のpHを一定に保つことで消失した。このことより、エタノール資化性菌は、実際の環境水

Fig. 5 Acid degradation of 2-methylisoborneol by strain S126 and its growth.

○: Ethanol $2\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$, ●: Ethanol $1\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$,
Yeast extract $0.25\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, ⊙: Ethanol $1\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$,
Yeast extract $2.5\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, ●: Yeast extract $0.25\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$,
△: No cells

系中では、2-MIBの分解には関与していないものと思われる。

4. ま と め

環境水系からの2-MIB分解菌の分離を試み、以下の知見を得た。

1) 池の底泥より2-MIB分解菌を分離した。分離した菌株(S6株)は*Pseudomonas*属であった。

2) S6株の増殖は遅く、1/10HIA上、 25°C 5日間の培養で直径約1 mmのコロニーを形成した。

3) S6株は $4\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の2-MIBを 25°C 4日間で90%以上分解できた。

4) S6株は2-MIBを唯一の炭素源としては利用できず、S6株による2-MIBの分解はCo-metabolismによるものと思われた。

5) S6株は滅菌した河川水や河川底泥中で2-MIBを分解できた。

6) エタノール資化性菌をエタノール存在下で培養すると培地の酸性化により2-MIBが分解されることがあった。

謝 辞

本研究を行うにあたりご協力をいただいた当研究所の細菌課の方々に深謝いたします。

(原稿受付 1992年6月11日)

(原稿受理 1992年9月27日)

参 考 文 献

- 1) 山田直樹, 青山幹, 山田益生, 浜村憲克 (1985) 天然水のカビ臭に関する研究 (第一報) *Phormidium tenue* の増殖特性とカビ臭について, 水質汚濁研究, 8, 515-521.
- 2) 八木正一 (1989) 植物性プランクトンによる異臭の実態, 用水と廃水, 31, 859-868.
- 3) 藤原啓助, 梶野勝司, 芦谷和芳, 寺島勝彦 (1987) パイロットプラントを用いた淀川原水中の微量有機物の高度処理実験 (I), 水道協会雑誌, 56(5), 14-24.
- 4) 芳倉太郎, 北野雅昭, 西尾孝之, 森下日出旗, 池田勝洋, 新妻啓寿 (1991) 2-MIB分解菌の高度上水処理過程からの分離と2-MIB分解特性, 用水と廃水, 33, 463-470.
- 5) 住友恒, 石田浩昭, 佐々木邦臣 (1989) 上水臭気分解菌の単離・同定, 水道協会雑誌, 58(12), 15-20.
- 6) 宮島年男, 布浦雅子, 荒井基夫 (1990) カビ臭物質2-MIB分解菌の分離と同定, 水道協会雑誌, 59(12), 12-18.
- 7) 住友恒, 大村康久, 石田浩昭 (1987) 上水道臭気の分解酵母・バクテリアの増殖と2-MIB分解特性, 水道協会雑誌, 56(2), 31-40.
- 8) 稲森悠平, 大内山高広, 杉浦則夫, 須藤隆一, 青山寛爾 (1990) カビ臭生成 *Phormidium tenue* の細菌および微小動物による分解・除去, 水質汚濁研究, 13, 592-598.
- 9) Krieg, N.R. et al. (1984) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore.
- 10) Weaver, R.E., Hollis, D.G. 著, 坂崎利一監訳 (1985) グラム陰性菌の同定<除・腸内細菌>, 医典社, 東京.
- 11) 土屋俊夫監修 (1978) 臨床材料より分離されるグラム陰性桿菌同定への手引 (GNRコード), 栄研化学, 東京.
- 12) 厚生省環境衛生局監修 (1973) 食品衛生検査指針 I, 日本食品衛生協会, 東京.