藍藻 *Oscillatoria splendida* によるカビ臭物質 geosmin の産生

松本 淳彦 ・ 土屋 悦輝

(東京都立衛生研究所)

Musty-Odor Substance, Geosmin, from a Blue-green

Alga *Oscillatoria splendida*

Atsuhiko MATSUMOTO and Yoshiteru TSUCHIYA

(Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

1. 緒 言

水道水源におけるカビ臭発生で問題となる微生物としては、放線菌および藻類、とくに藍藻が知られている。前者については多くの報文があり、著者らも三宅島の水道水源である大路池のカビ臭発生時に、放線菌を多く分離し報告した(松本, 土屋, 1977)。

一方、藍藻によってもカビ臭物質が産生されるという報告もかなり見受けられる(Safferman, *et al.*, 1967), (Medsker, *et al.*, 1968), (Kikuchi, *et al.*, 1975), (Tabachek, *et al.*, 1976)。これらの微生物によって産生されるカビ菌物質としては、現在、geosmin と 2-methylisoborneol とが知られている。培養実験では、放線菌はこの両者を同時に産生するものが多いが、藍藻はどちらか一方を産生するようである。我々は、数年前からカビ臭発生水域(湖、濠、養魚池等)を調査しているなかで、水中のこれら物質を検討したところ、この両物質が共存する水域、geosmin 或いは 2-methylisoborneol の一方のみが存在する水域のあることを知った。さらに、河川も含めて、これら種々の水域から発臭微生物を分離中であるが、今回、善福寺川の付着藻類から藍藻 *Oscillatoria splendida* を単一分離培養したところ、geosmin を産生することが確認された。この事実は Tabachek ら(1976)、矢野ら(1977)の報告と同様であったが、産生された geosmin の定量分析を行なった報文は、知る限りでは見あたらないため、本種の増殖にともなうその産生量について検討を行なった。

2. 善福寺川の概況

善福寺川は、東京都杉並区の善福寺池に端を発し、旧神田上水に合流する約10kmの、主に治水機能を目的とした小河川である。上流部には湧水が点在し、降雨のない時期は、比較的流量が安定している。中流域にはオオカ

ナダモのほか、ヤナギモ、エビモ等の水生植物がよく繁茂し、また、二、三種の魚影をみることもできる比較的清冽な河川である。

3. 方 法

3-1. 付着藻類の調査

1976年4月から1977年1月の間に、15回にわたって付着藻類の植生を調査した。調査5地点のうち、糸状藍藻が比較的多くみられた大宮橋において、石面に付着する藻類を定量的に採取し、また、水草の付着物は適量をとって定性的に鏡検を行なった。珪藻類については、硫酸、過酸化水素水でクリーニングし、永久プレパラートを作製して鏡検し、同定、計数した。

3-2. *O. splendida* の単一分離

付着物の適当量を10倍段階で希釈し、液体培地を入れた300ml容三角フラスコに接種し、綿栓後、上から約700 lx の弱光で白色蛍光灯を照射して前培養を行なった。3～5週間経過後、フラスコの壁にそって光源方向へ増殖した糸状藍藻を少量とり、0.5% 寒天平板の一端の寒天層中へ接種した。そして反対方向から同照度で蛍光灯を照射した。2週間後、接種点からもっとも離れた距離へ発育した藻体を取り、試験管中の液体培地へ植つぎ、照度1,000lx 下で3週間培養を行なった。この操作を2回実施して単一分離を行なった。

3-3. 大量培養と geosmin の定量

培地は Na₁₁ 培地 (Hughes, 1958) を pH7.5～8.0 に調整後、ポアサイズ 0.45μ のメンブランフィルター(ミリポア社製)で汙過したものを使用した。増殖曲線の測定培養には、100mlの培地を入れた300ml容三角フラスコを使用し、chlorophyll *a* を測定した。geosmin 定量用の培養には、1ℓの培地を入れた直径24cmの平底フラスコを使用した。各フラスコには、あらかじめ3回煮沸洗

滌したガラスウール、木綿糸片を3：1の割合で底一面に敷き、高圧蒸気滅菌（121°C、30分）を行なった。これに汙過滅菌をした培地を注入後、新たな培地で均一な浮遊液とした藻体を chl. *a* 量として3.5μg/ℓの割合で接種した。綿栓後、40Wの白色蛍光灯によって照度1,000lxで連続照射し、25±1°Cで静置培養を行なった。この条件下で1週間経過ごとに chl. *a*、geosmin および臭気濃度について分析を行なった。geosmin の定量法は既報の方法（1977）に準じた。

4. 結果および考察

4-1、付着藻類相

善福寺川はコンクリート護岸が施こされ、降雨時には

著しく水位が上昇し、流速も速くなる。これらの状況が生物に及ぼす影響を及ぼすかを把握する目的の一環として調査を実施したものである。5地点（上流より耕整橋、出山橋、春日橋、大宮橋、和田広橋）における植生の調査結果はすでに報告されているが、糸状藍藻が比較的多く見られたのは、中、下流域の大宮橋、和田広橋であった。*O. splendida* が分離された大宮橋における植生を示すと表1のごとくであった。出現 Taxa 数は14～22であり、石面1mm²当たりの個体数は2,500～47,000で、調査月によってかなりの変動がみとめられた。しかし、植生には大きな変動はなく、珪藻類の *Gomphonema parvulum*, *Navicula minima*, *Nitzschia amphibia*, *N. palea*

表1. 善福寺川の大宮橋における付着藻類

付着藻類名	調査年月日										1977
	4.27	6.1	6.28	7.27	8.23	9.16	10.26	11.19	12.15	1.17	
Blue-green algae											
<i>Homoeothrix janthina</i>	24		340	220	180		30		400	120	
<i>Oscillatoria</i> spp.	96		200	16					130	240	
<i>Phormidium</i> sp.		80									
Green algae											
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	16										
<i>Scenedesmus</i> spp.	8	220	30	160	720	70	15	15	15		
<i>Stigeoclonium</i> sp.	260	80	110	65	250	420	15		220	320	
Diatoms											
<i>Achnanthes japonica</i>	600	30	24		210	60	40	70	1100	3300	
<i>Achnanthes lanceolata</i>	24	30						10	15	1200	
<i>Cocconeis placentula</i>		16									
<i>Cocconeis placentula</i> v. <i>lineata</i>			24		56	230					
<i>Cyclotella comta</i>	16	20									
<i>Cyclotella meneghiniana</i>				24	56						40
<i>Cyclotella</i> sp.			16			10					
<i>Eunotia</i> sp.	16										
<i>Gomphonema apicatum</i>		970	190	180		30	80	55	30		
<i>Gomphonema gracile</i>	48	230	8					15	110		
<i>Gomphonema parvulum</i>	2600	5000	370	880	580	140	160	310	900	680	
<i>Gomphonema parvulum</i> v. <i>microps</i>	440	40			48	16	50	55	980	720	
<i>Gomphonema</i> sp.					10						
<i>Melosira granulata</i>						16					
<i>Melosira varians</i>	24		24	24	56		25	10			
<i>Navicula adnata</i>					2600	1700	55		60		
<i>Navicula cryptocephala</i>	430	100	56	240	140	56	80	370	1400	1500	
<i>Navicula minima</i>	6400	300	220	90	590	980	270	3400	14000	22000	
<i>Navicula pupula</i>		200	40		16		10	10	30		
<i>Nitzschia frustrum</i> v. <i>perpusilla</i>	80								9200	3300	
<i>Nitzschia amphibia</i>	1500	30	1300	5700	2900	7200	940	2400	15000	6900	
<i>Nitzschia palea</i>	710	3800	80	1600	600	2400	420	370	2700	520	
<i>Nitzschia</i> sp.	48	240	50	30	24	16			180		
<i>Pinnularia gibba</i> v. <i>parva</i>							15	15			
<i>Pinnularia</i> sp.			8								
<i>Rhoicosphenia curvata</i>	16										
<i>Surirella angusta</i>	140	16									40
<i>Synedra ulna</i>	1900	2500	510	500	490	50	240	250	350	40	
Total no. of cells/mm ²	15,000	14,000	3,600	9,700	9,500	13,000	2,500	7,400	47,000	41,000	
Number of taxa	22	19	19	14	18	16	16	15	19	15	

などが通年優占種として出現していた。

4-2, *O. splendida* の同定

本種は、採取時の鏡検では個体数が少なかったことと、細胞壁、先端細胞が不明瞭であったことから種を決定するに至らなかった。しかし、培養したトリコームは、よくその特徴を観察することができた。すなわち、細胞の

Oscillatoria Splendida Grev

幅は 3μ 長さは $5\sim 10\mu$ 弱であり、先端にいくほど細くなり、先端が小球状を呈している。この特徴を顕微鏡写真で示したが、Labenhorst, (1932), Desikachary, (1959), Prescott (1961), 水野(1964)等の記載のうち、Labenhorst の記載図に類似しており、*Oscillatoria splendida* Greville と同定した。

4-3, *O. splendida* の増殖にともなう geosmin の産生量

O. splendida は付着性の糸状藍藻であるため、試験管やフラスコ中で培養した場合、その増殖過程で藻体同士が絡み合って塊状となり、その中心部が黄枯化する傾向が観察された。そこで前記の付着基質を使用したところ、藻体はこれに付着しながら均一に広がり、よく増殖することが確かめられた。付着基質を使用しなかったものとの比較は、chl. *a* の測定によって明らかに差を認めることができた。この状態で 6 週間まで培養をつづけたが、図 1 に 5 週間培養後に蒸留、濃縮した試料のガスクロマトグラムを示した。geosmin のピーク (G) が明瞭に

図 1. *O. Splendida* の産生揮発物質のガスクロマトグラム (培養 5 週間)

表 2. 藍藻 *O. splendida* の増殖と geosmin 産生量, 臭気濃度および共存バクテリア

week	1	2	3	4	5	6
chl. a ($\mu\text{g/l}$)	326	1530	5830	9340	7700	6800
geosmin (mg/l)	0.02	0.15	0.75	1.62	2.34	2.00
TO (臭気濃度)	400	2000	3300	6700	10000	10000
total colo. (n/ml)	3.0×10^3	2.6×10^4	6.0×10^4	7.6×10^4	2.6×10^4	5.6×10^5
hetero. bact. (n/ml)	5.0×10^5	2.3×10^6	1.8×10^6	4.2×10^6	2.8×10^6	2.8×10^6
actinomyces (n/ml)	0	0	0	0	0	0
fungi (n/ml)	0	0	0	0	0	0

確認された。なお, 2-methylisoborneol に相当するピークは認められなかった。

1 週間経過ごとに測定した結果を表 2 に示した。chl. a は, 培養 1 週間で接種量の約 100 倍に相当する $326 \mu\text{g/l}$ となった。その後さらに増殖をつづけ, 4 週間後には $9,300 \mu\text{g/l}$ と最大増殖を示した。これにともなう geosmin は, 1 週間後 0.02 ppm , 3 週間後 0.75 ppm , そして 5 週間培養後には最高の 2.34 ppm の産生量を測定した。この両者の関係を図 2 に示したが, とともに同様な曲線で増

図2. chlorophyll a と geosmin との関係

加し, chl. a は 4 週間後に, geosmin 量はこれより 1 週間おくれた 5 週間目でそれぞれ最高値を示した。

また, 臭気濃度は, フラスコを密閉状態で強く攪拌し, No. 5 A 濾紙で自然濾過した濾液について測定したが, 表 2 に示したように, やはり増殖にともなって高くなり, 最高 10,000 を記録した。本種の発生臭気は, 静置状態ではむしろ藻臭が強く感じられるが, 攪拌すると著しくカビ臭が強くなるようであった。

4-4. 共存バクテリア

細胞に付着していると考えられるバクテリアは, 紫外線, 抗生物質, 次亜塩素酸ナトリウム等の使用を試みたが, 藻体の抵抗力との関係で現在除去するまでに至っていない。これらの処理を行なうことによって一次的に菌数は減少するが, 培養の過程で増加してしまう。藻体を接種する時点では, 一般細菌数 (普通寒天地, 37°C , 24 時間培養) は $10^2/\text{ml}$, 従属栄養細菌数 (桜井培地, 25°C 3 日間培養) は $10^3/\text{ml}$ の菌数であったものが, 培養 1 週間で, $10^8, 10^5/\text{ml}$, 2 週間後には $10^4, 10^6/\text{ml}$ とそれぞれ増菌した。それ以後はほとんど菌数に増減はみられなかった。これらの共存バクテリアは, 藻体の増殖あるいは geosmin の産生に何らかの影響をおよぼしているものと考えられる。平板培養を反復することによって除菌できるという報告もあり, 現在, 薬品処理と併わせて検討中である。なお, 藻体を濾取したバクテリアのみを同条件下で 3 週間培養したが, geosmin は検出されなかった。また, これらバクテリア中には, 放線菌, 糸状菌類の共存は認められなかった。

5. まとめ

(1), 善福寺川の付着藻類中からカビ臭発生藍藻 *Oscillatoria splendida* を単一分離し, 液体培養した結果, geosmin を産生することが判明した。

(2), 培養条件に付着基質を使用したところ, 非常に発育がよく, 4 週間後に最大増殖 (chl. a として $9,300 \mu\text{g/l}$) に達した。

(3), 増殖にともない geosmin 産生量は増加し培養 5 週間で最大 2.34 ppm を測定した。

(4), 臭気濃度は最高 10,000 であった。

河川等の流水域でカビ臭を感知するのは困難と思われるが, 付着藻類中には止水域と同様にカビ臭を発する藍

藻が存在する。河川でも渇水期や、防潮堰堤によって水が長時間停滞したときなど、水道水源として取水する場合には、カビ臭問題を引き起こすことが予想される。

謝 辞

本藍藻の同定に際しては、東京都水道局水質センター、乙幡 恵氏ならびに横浜国立大学、福島 博博士に御助言、御確認をいただいた。当所水質研究科長、松本浩一博士には御校閲を賜わり、山崎洋子、大野正彦、渡辺真利代の諸氏には試料の採取に協力をお願いした。ここに深謝の意を表する。

引用文献

- 1) Desikachary, T. V. : Cyanophyta. Ind. Council Agricul. Res., New Delhi. (1959)
- 2) Hughes, E. O., P. R. Gorham and A. Zehnder : Toxicity of a Unialgal Culture of *Microcystis aeruginosa*. Can. J. Microbiol., **4**, 225 (1958)
- 3) 環境管理センター：善福寺川生態系実態調査報告書（その1）. (1976)
- 4) ——：同上（その2）. (1977)
- 5) 菊地 徹，三村鉄太郎，他：神戸市上水道水源池から分離された放線菌，藍藻および真菌類の臭気成分ならびに干貯貯水池の水から 2-Methylisoborneol の検出. 水協誌，**492**，23 (1975)
- 6) Labenhorst, L. : Kryptogamen-Flora, Akademische Verlagsgesellschaft m. b. H., Leipzig (1932)
- 7) 水野寿彦：日本淡水プランクトン図鑑，保育社，大阪 (1964)
- 8) 松本淳彦，土屋悦輝：大路池のカビ臭と放線菌および臭気物質. 水協誌，**514**，42 (1977)
- 9) Medsker, L. L., D. Jenkins and J. F. Thomas : Odorous Compounds in Natural Waters. An Earthy-Smelling Compound Associated with Blue-green Algae and Actinomycetes. Env. Sci. Tech., **2**, 6, 461 (1968)
- 10) McCurdy, Jr. H. D. and W. Hodgson : The Isolation of Blue-green Bacteria in Pure Culture. Can. J. Microbiol., **20**, 272 (1974)
- 11) Prescott, G. W. : Algae of the Western Great Lakes Area. W. M. C. Brown Co. Publishers, U. S. A. (1961)
- 12) 西条八束：クロロフィルの測定法，陸水誌，**36**，3，103 (1975)
- 13) Stanier, R. Y., et al. : Purification and Properties of Unicellular Blue-green Algae (Order Chroococcales). Bact. Rev., **35**, 2, 171 (1971)
- 14) Safferman, R. S., A. A. Rosen, et al : Earthy-Smelling Substance from a Blue-green Alga. Envi. Sci. Tech., **1**, 5, 429 (1967)
- 15) Tabachek, J. L. and M. Yurkowski : Isolation and Identification of Blue-green Algae Producing Muddy Odor Metabolites, Geosmin, and 2-Methylisoborneol, in Saline Lakes in Manitoba. J. Fish. Res. Board Can., **33**, 1, 25 (1976)
- 16) 矢野 洋，川田晴彦，有本敏之：らん藻類 *Phormidium tenue* によるカビ臭物質 2-methylisoborneol の検出と細菌叢との関係について. 水処理生物学会講演要旨集 (1977)