

## 放線菌を原因とするウォーターサーバーのかび臭発生事例

保坂三継\*, 眞木俊夫\*

### Occurrence of Musty Odor in a Water Server due to an Actinomycete Contamination

Mitsugu HOSAKA\* and Toshio MAKI\*

**Keywords:** かび臭 musty odor, 放線菌 actinomycete, 2-メチルイソボルネオール 2-methylisoborneol, ウォーターサーバー water server, ミネラルウォーター mineral water

#### 緒言

安全でおいしい水を求める消費者の意識が強まる中、水道水の異臭味、特にかび臭がしばしば水道使用者の苦情の原因となっている。かび臭の発生は藍藻類や放線菌類が産生する代謝産物である2-メチルイソボルネオール(MIB) (1,2,7,7-tetramethyl-*exo*-bicyclo-[2,2,1]heptan-2-ol) やジェオスミン (*trans*-1,10-dimethyl-*trans*-9-decalol) が原因であり、これらの生物が繁殖しやすい湖沼水や河川水を水源とする水道水で問題となることが多い。こうした水道水の異臭味が一般にミネラルウォーターと称されるびん詰め水(以下ミネラルウォーターという)の需要を伸ばす要因となっているといわれている<sup>1)</sup>。

「ミネラルウォーター」や「ナチュラルミネラルウォーター」と表示して販売されるミネラルウォーターは地下水を原水としており<sup>1)</sup>、光合成生物である藍藻や有機物を栄養源とする放線菌等の代謝物を原因とするかび臭が発生するとは通常考えられていない。しかし今回、筆者らは、大容量のミネラルウォーターのボトルを内蔵したウォーターサーバーで、放線菌を原因とするかび臭苦情の事例を経験したので、報告する。

#### 材料及び方法

##### 1. 試料水

平成12年7月、港区内の会社に設置されていたウォーターサーバーの水に墨汁臭がするという苦情が保健所に寄せられ、本装置内に残っていた水試料3検体が当所に搬入された。

- 1) 容器水 本装置内に収納されていた容量10Lのミネラルウォーター容器内に残存していた水(S製天然ナチュラルミネラルウォーター, 原水は山梨県を採水地とする湧水)。
- 2) 未開封容器水 容器水と同ロットの未開封容器の水。
- 3) タンク内残存水 本装置内の受水タンクに残存していた水。

##### 2. 放線菌の検出方法

スターチカゼイン寒天培地(表1)を用いた混積平板培養法<sup>2,3)</sup>で試験した。試料水を段階希釈し、各希釈試料水の1mLをスターチカゼイン寒天培地で混積し、30℃で7日間培養した。培養後、培地上あるいは培地内に出現したコロニーを実体顕微鏡(NIKON製SMZ-U)並びに位相差装置付生物顕微鏡(NIKON製OPTIPHOTO)で観察し、上水試験方法に従って綿状のコロニーで周辺に菌糸が放射状に伸びる特徴を持つものを放線菌として計数し<sup>2)</sup>、試料水中の放線菌数を算出した。なお、試料水が飲料水であり、目視では特に濁りや目立った浮遊物が認められず、他の微生物汚染の可能性は少ないと思われたため、抗真菌剤アクチジオンの添加<sup>2)</sup>あるいは従属栄養細菌抑制のための塩化ナトリウムの増量<sup>3)</sup>は行わなかった。

##### 3. かび臭物質分析用の放線菌の培養

放線菌によるかび臭発生を確認するための機器分析用試料を得るため、分離した放線菌コロニーを釣菌して滅菌リン酸塩緩衝希釈水<sup>2)</sup>中に懸濁させ、これを1分間超音波処理して菌体を分散させた後、あらかじめ平板に固めたスターチカゼイン寒天培地に塗布した。また、スターチカゼイン培地(スターチカゼイン寒天培地の組成から寒天を除去した液体培地<sup>2)</sup>200mLを入れた500mL三角フラスコにも接種した。これらを上記と同一条件で培養した。

##### 4. 放線菌培養物のかび臭原因物質分析方法

放線菌が繁殖している平板表面部分をかき取り、ねじ栓付き遠心沈殿管に入れ、ジクロロメタン5mLを加え、攪拌してかび臭物質を抽出した。抽出後、ジクロロメタン層を1PSろ紙(Whatman製)でろ過し、ろ液を用いて貞升ら<sup>4)</sup>の分析条件でガスクロマトグラフ(GC)並びにガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)でかび臭物質の分析を行った。

##### 5. 放線菌の耐熱性試験

分離した放線菌を斜面塗抹培養により十分な期間培養した後、白金耳で培地表面の菌体をかき取った。これを滅菌

\* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

\* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

表1 スターチカゼイン寒天培地

可溶性でんぷん	10 g
カゼイン	10 g
硝酸カリウム	2 g
塩化ナトリウム	2 g
リン酸一水素カリウム	2 g
硫酸マグネシウム	0.05 g
炭酸カルシウム	0.02 g
硫酸第一鉄	0.01 g
粉末寒天	15 g
精製水	1,000 mL
pH	7.0

リン酸塩緩衝希釈水に懸濁させ、1分間超音波処理して菌体を分散させ、放線菌浮遊液とした。この放線菌浮遊液の一定量を滅菌リン酸塩緩衝希釈水を入れた中試験管に添加して検液とし、これらを室温（約23℃）及び所定の温度（48℃、60℃及び70℃）に設定した水浴中に置いた。一定時間ごとに試験管を攪拌して少量の検液を採取し、2. 放線菌の検出方法に従ってコロニー数を測定した。

## 結果及び考察

### 1. 放線菌試験結果

試料水3検体のうち、容器水とタンク内残存水は顕著な

かび臭（墨汁臭）を感じた。なお、これらの試料水からは、貞升ら<sup>4)</sup>によってMIBが検出された。未開封容器水は無臭だった。

本装置内に収納されていたのは容量10LのS社製ナチュラルミネラルウォーターであり、山梨県の湧水を原水としている。地下水である湧水に光合成を営む藍藻が繁殖することは考えられず、搬入された試料水の一部を検鏡しても藍藻はみられなかったため、放線菌の汚染を疑い、スターチカゼイン寒天培地を用いて混釈法により放線菌の試験を行った。なお未開封容器の水ではかび臭を感じなかったため、放線菌の培養は行わなかった。

30℃で7日間の培養後、多数の綿状のコロニーが出現した（写真1）。出現コロニー数は容器水で740 CFU/mL、タンク内残存水で2.4 CFU/mLであった。貞升ら<sup>4)</sup>によれば、本研究に用いた試料水のMIB濃度は容器水で1.2 µg/L、タンク内残存水で0.9 µg/Lと報告されており、放線菌コロニー数とMIBの測定値とは比例していなかった。

出現したコロニーの色調は白色で、コロニーの形状はすべて同一であった。コロニーは極めて細い菌糸のかたまりで、多数の密集した気中菌糸を伸ばし、コロニーの中央部と周辺部には段差を生じていた（写真2、3）。栄養菌糸は極めて細く、分断せず、直径1 µmに満たなかった（写真4）。この放線菌については孢子の観察が出来ていないため、現在のところ未同定である。なお、細菌や真菌のコ

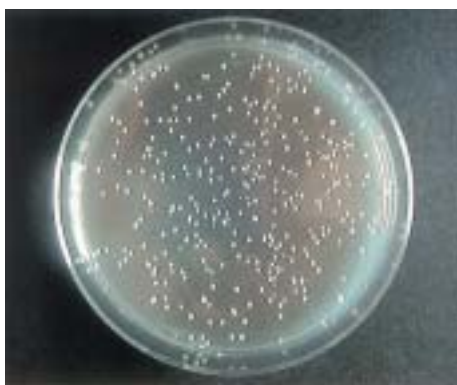


写真1 スターチカゼイン寒天培地平板上の放線菌コロニー

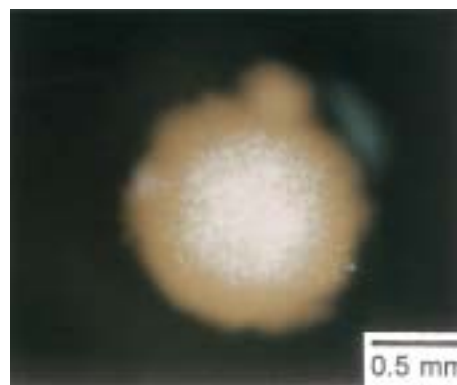


写真2 コロニー拡大図  
（気中菌糸が未発達のもの）



写真3 コロニー拡大図  
（気中菌糸の発達したもの）

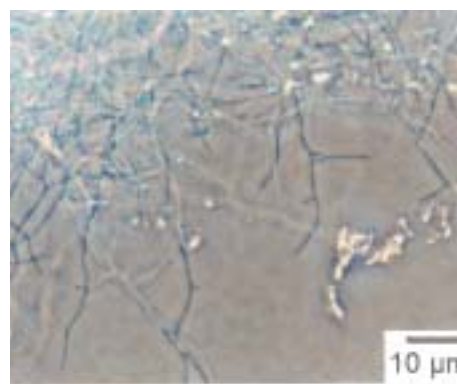


写真4 栄養菌糸

コロニーは観察されなかった。

## 2. 放線菌によるMIB産生の確認

放線菌を計数した混積平板では、培地内にコロニーが出現し始めた当初はかび臭を感じなかったが、コロニーが成長して培地表面に達し、気中菌糸が伸びる頃になって墨汁臭を感じるようになった。すなわち、MIBの産生能を有する可能性が示された。

平板培養ではすべてのコロニーが気中菌糸を伸ばし、その平板からは顕著な墨汁臭が確認された。一方、寒天以外は同一組成の液体培養では、菌体は増殖したものの、墨汁

臭を感じることはなかった。放線菌によるかび臭の場合、水中ではかび臭を産生しないと考えられること<sup>5)</sup>や、平板培養ではかび臭を発生していた放線菌が液体培養ではかび臭の発生が認められなくなることが知られており<sup>2)</sup>、今回の分離株もこうした性質があるものと思われた。そのため、放線菌のコロニーが多数生育している寒天平板培養からジクロロメタンでかび臭物質を抽出し、GC並びにGC-MS分析に供した。結果を図1、図2に示す。

放線菌からの抽出物のGC分析ではいくつかのピークが出現したが、標品のMIBのピーク(9.97分)と同一の保持

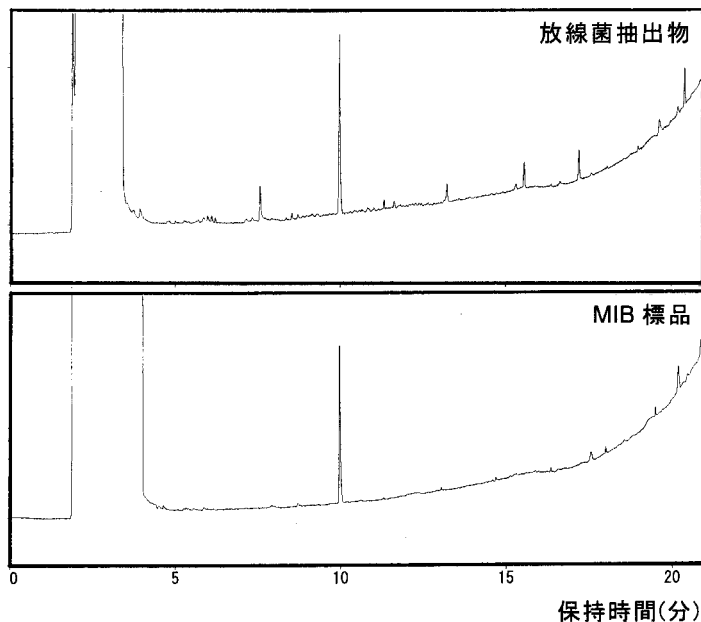


図1 放線菌抽出試料のガスクロマトグラフ分析結果

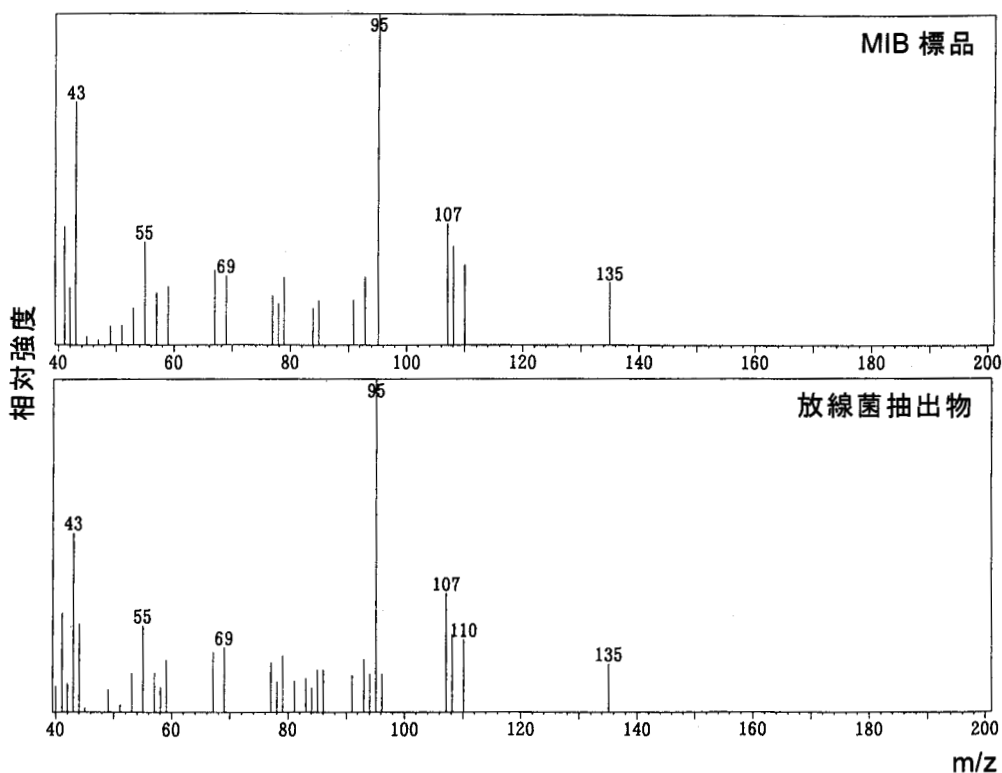


図2 放線菌抽出試料と2-メチルイソボルネオールのマスペクトル

時間に最も大きなピークが出現した(図1)。次いでGC-MSで標品のMIBとマススペクトルを比較した。放線菌抽出物はm/z95にベースピークがあり、MIBに特徴的なm/z108あるいはm/z135のマスフラグメントの存在ならびに各フラグメントイオンの相対強度など、マススペクトルパターンが標品のMIBと一致した(図2)。これらのことから、分離された放線菌がMIBを産生することが明らかとなった。

Persson<sup>6)</sup>は、ある生物を臭気発生の原因と特定するための条件として、

1. 臭気のする水にその生物が存在すること、
  2. その生物が、水と同じ種類の臭気を発していること、
  3. 機器分析によって水とその生物の臭気の原因物質が同一であることが確認されること、
- の3点を提示している。今回分離された放線菌はこの条件に合致する。すなわち、今回のかび臭はこの放線菌によって引き起こされたものと結論することができる。

### 3. 放線菌の耐熱性

本装置は、メーカーの説明や資料によれば、1日1回、装置内の水を自動的に70℃にまで加熱し、10Lのミネラルウォーター容器内を含めて循環させ、雑菌の繁殖を防ぐシステムが採用されているという。しかし、本装置には温度計等が無く、実際に70℃にまで加熱されているのか確認できない。また、放線菌の殺菌に70℃までの加熱で十分かどうかは不明である。そこで、分離された放線菌の耐熱性について調べた。結果を図3に示す。

放線菌コロニー数は室温(約23℃)から60℃までの温度では30分経過した後もほとんど減少しなかった。一方、

70℃では、加熱後15分間まではおよそ5分ごとに1logの割合でコロニー数が減少した。15分以後はコロニーの減少傾向が鈍化した。加熱後30分でおおよそ4.5log減少し、実験開始時に150,000 CFU/mLあったコロニーが5 CFU/mLにまで低下した。さらに加熱を継続すれば0 CFU/mLに至ったものと推察される。このことから、本装置の70℃の加熱循環システムは、実際には規定の温度に達していなかったか、あるいは70℃を保持したままでの循環時間が短かったため、放線菌の繁殖を抑制できなかったものと推察される。

### 4. 放線菌によるミネラルウォーター汚染に関する考察

放線菌は土壌微生物としてよく知られており、水道水のかび臭との関係でも、湖沼や河川の底泥中からかび臭を産生する株がしばしば得られている<sup>7-12)</sup>。また、従属栄養を行うため、有機物が多く存在する汚濁水域や生物の遺骸等が堆積する底泥でよく繁殖すると考えられている<sup>13,14)</sup>。したがって地下水など一般に有機物に乏しいと思われる環境は放線菌の繁殖には不向きであり、実際、井戸を水源とする水道で放線菌が原因となったかび臭事例は知られていない。

しかし、鉱泉水を原水とするミネラルウォーターが製造過程においてレジオネラに汚染された例<sup>15)</sup>や、地下水を原水とするミネラルウォーターから目視で確認できる大きさの異物として真菌が検出された例があり<sup>16)</sup>、ミネラルウォーターであっても微生物汚染や微生物繁殖の可能性があることに注意しなければならない。

今回の事例の水は、同ロットの未開封容器のものでは何ら異常がなかったことから、原水中にもともと放線菌が繁

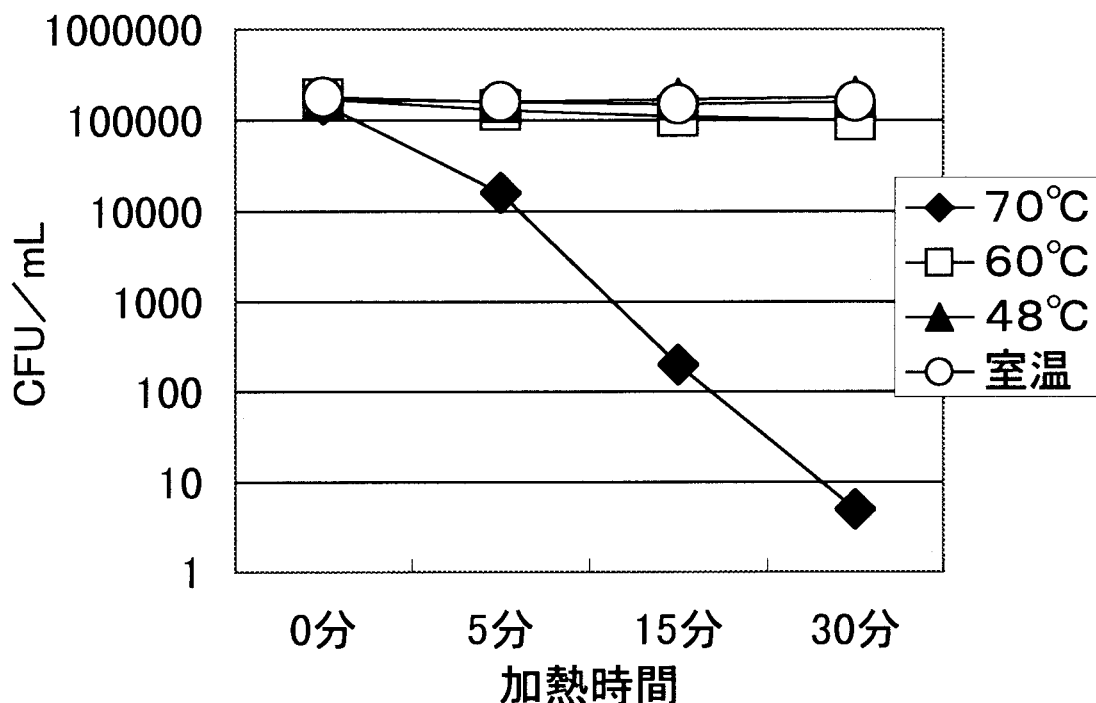


図3 分離された放線菌の熱抵抗性

殖していたとは考えにくく、製造過程あるいは使用の段階で放線菌汚染が起きたものと推察される。小島<sup>17)</sup>は水道水のかび臭苦情の調査から、石綿セメント管に付着して放線菌が繁殖した事例を報告している。また、放線菌は高分子化合物を分解する能力を有し<sup>18)</sup>、配水管のジョイントやパッキン類に用いられるゴムを劣化させることも知られている<sup>19)</sup>。したがって、本装置のゴムやプラスチック製の部分あるいは装置内配水系統の一部に繁殖した放線菌が不十分な加熱状態で装置内を循環する水とともにミネラルウォーターの容器やタンク内に入り込み、繁殖した可能性があると考えられる。しかし、かび臭苦情を起こしたウォーターサーバーは本件の調査開始後間もなくメーカーによって撤去されており、混入した放線菌がかび臭を発生するまでに繁殖が可能であった理由や本装置における繁殖場所を追求することはできなかった。今後、類似の事例に遭遇した場合は、水のみならず、関係する装置等についても原因究明の試料として調査の対象とする必要性が指摘される。

### ま と め

業務用のミネラルウォーターを用いたウォーターサーバーでかび臭苦情が発生したため、その原因を調査した。

1. かび臭の原因物質として2-メチルイソボルネオール(MIB)が検出されたミネラルウォーター容器内の水と受水タンクの水から放線菌が検出された。放線菌のコロニー数はMIB濃度とは比例していなかった。
2. 放線菌の培養物からGC及びGC-MS分析によってMIBの存在が確認され、ウォーターサーバー内の水から分離された放線菌がかび臭の原因と判明した。
3. 分離された放線菌は70℃で30分以上の加熱により殺菌できたが、これよりも低い温度では30分加熱してもほとんど殺菌できなかった。このことから、毎日自動的に70℃で内部の水を循環するようにプログラムされていた当該ウォーターサーバーのシステムが正しく作動していなかった可能性が示唆された。
4. 当該ウォーターサーバーが直ちに撤去されたため放線菌の繁殖箇所や原因の解明ができなかった。今後こうした事例では水のみならず関係機器についても調査対象に含める必要があることを指摘した。

### 文 献

- 1) アクア研究会：みんなで考える飲み水のはなし，32-37, 1995，技報堂出版株式会社，東京。
- 2) 厚生省生活衛生局水道環境部監修：上水試験方法 1993年版，463-467及び533-535, 1993，日本水道協会，東京。
- 3) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2000, 954-955, 2000，金原出版株式会社，東京。
- 4) 貞升友紀，井部明広，田端節子，他：東京衛研年報，52, 149-153, 2001。
- 5) 梶正一，服部和夫：水処理技術，13(8), 33-38, 1972。
- 6) Persson, P.: *Wat. Sci. Tech.*, 15, Finland, 1-11, 1983。
- 7) 萩原光子，末吉和美：水道協会雑誌，No.386, 61-66, 1966。
- 8) 菊地徹，三村鉄太郎，森脇祥寿，他：薬学雑誌，93(5), 658-663, 1973。
- 9) 松本淳彦，土屋悦輝：水道協会雑誌，No.514, 42-50, 1977。
- 10) 杉浦則夫，飯島昭夫，照沼義廣，他：用水と廃水，21, 1396-1402, 1979。
- 11) 青山幹，富田伴一，茶谷邦男：衛生化学，39(3), 207-212, 1993。
- 12) Jensen, S. E., Anders, C. L., Goatcher, L. G. *et al.*: *Wat. Res.*, 28(6), 1393-1401, 1994。
- 13) 杉浦則夫，矢木修身，須藤隆一：水質汚濁研究，6, 77-86, 1983。
- 14) 杉浦則夫，矢木修身，須藤隆一：水質汚濁研究，9, 596-601, 1986。
- 15) 鹿児島県鹿屋保健所：レジオネラ属菌が混入したミネラルウォーター製造施設原因究明検討委員会報告書，平成12年3月15日。
- 16) 斉藤和夫，田口信夫，大石充男，他：東京衛研年報，47, 113-125, 1996。
- 17) 小島貞男：日本水処理生物学会誌，15(2), 2-7, 1980。
- 18) 平石明：*Streptomyces*，小島貞男，須藤隆一，千原光雄編，環境微生物図鑑，93-94, 1995，講談社，東京。
- 19) 日本水道協会：日本の水道生物 - 写真と解説 - ，182，1993，日本水道協会，東京。