

醸造工場等の周囲に発生する微生物公害について 汚染菌の分離とその生理学的特徴 (第一報)

高橋 治男* 福田 芳生* 七山 悠三*
三浦 正人** 山本 充弘**

Pollution of Houses and Garden Trees Caused by Black Microorganisms around the Brewing Factories

Haruo TAKAHASHI*, Yoshio FUKUDA*, Yuuso NANAYAMA*,
Masato MIURA** and Mitsushiro YAMAMOTO**

Summary

Recently, the outside surfaces of houses and garden trees around brewing factories in Noda City have been contaminated in the soot-like appearances with the black microorganisms. Then, contaminating microorganisms were isolated and tentatively identified. Physiological characteristics of the isolated microbes were also investigated.

Three black colonies were obtained on Czapeck-Dox agar plates inoculated with contaminated leaves after 5 days incubation at 30°C. Microscopic observation revealed that all the strains isolated formed hyphae and blastospores along them. Further, the surface of the contaminated leaves was scanned by using an electron microscope and it was observed that the hyphae elongated and branched all over the leaves, bearing blastospores. One of the strains isolated, S-1 utilized urea and produced pullulan extracellularly. From these results, the strain was tentatively identified as *Aureobasidium pullulans*, one of the black yeasts.

A. pullulans S-1 utilized ethanol extremely readily as a sole carbon source. Methyl ethyl ketone was slightly assimilated, but *n*-butanol and methanol had little or no effect. The organism utilized a nitrogen source effectively in any form of urea, nitrate or ammonium salt when sugar was used as carbon source, but ammonium salt was preferable to nitrate when carbon source was ethanol. It grew favorably in the range between pH 4.0 and 9.0, most preferably at pH 7.0. The maximum, optimum and minimum temperatures for growth of it were 35, 31 and 13°C, respectively.

I 緒言

銚子市や野田市における醤油醸造は、古くから全国的にその名が知られ本県の重要な産業となっている。その一方では、住民の公害に対する意識が次第に高まり、工場周辺の住居、樹木などが、煤状の物質に黒く汚染されるという苦情がしばしばきかれる様になった。その様な黒色汚染は、醸造工場の外に印刷工場、油脂工場やアル

コール工場でもみられ、従来は煤塵として処理されてきた。

しかし、ごく最近になりそれらが微生物に由来することが明らかにされた。さらにそれらの工場が共通してアルコールを大気中に排出していることから、その微生物はアルコールを栄養源として繁殖していると推定された。そこで、野田市の醤油工場周辺で採取した樹木の葉から、汚染菌の分離を試み、若干の知見を得たので報告する。

*千葉県衛生研究所

**千葉県環境部大気保全課

(1980年月16日受理)

II 実験方法及び実験結果

1 菌の分離

黒変した樹木の葉を、ツァベック・ドックス(以下CDと略す)寒天培地上にて、28℃で10日間培養を行なった後、黒色を呈した集落3個を純粹分離し、供試菌株とした。それらの集落は、いずれも培養初期には酵母様で乳白色を示すが、後期では黒色皮革状を呈するようになった。

その外のかびの集落としては、野生型と思われる *Aspergillus flavus* 群の多いのが注目された。

2 分離菌株の同定

(1) 形態観察

スライド・カルチャー法：それら分離した3株を、スライド・カルチャー法により培養した後、光学顕微鏡にてその形態を観察した。その写真をPlate Iに示す。

写真は、成長した栄養菌糸の周囲から、分生子が放射状に出芽していることを示している。この様な胞子は、出芽胞子と呼ばれるものであり、従って、分離された菌は、“黒色酵母”に属し、不完全菌の *Aureobasidium* (古くは *Dematium*、次いで *Pullularia* と呼ばれた) *pullulans* の形態と良く一致した。出芽細胞の大きさは、3-410 μ mであった。

液体培養における菌の形態：分離株を、加圧殺菌した麦芽エキス5%を含む液体培地にて、30℃で72時間振盪培養を行なったときの形態をPlate IIに示す。

この場合、それらの菌は酵母様の増殖形態を示した。従って、それらの菌は、固体培養では、菌糸状、液体振盪培養では、酵母様の形態をとる典型的な二形性であると言いうる。それは、*A. pullulans* の示す特徴と一致した。

細胞は、1個あるいは2-3個が連なり、黒色を呈するものと無色のものとが混在した。黒化したものの多くは、多細胞で、無色のものは、単細胞から成る場合が多かった。また、黒色細胞の細胞壁は無色の細胞のそれより厚く、葉膜状の最外層と、黒色を帯びた比較的厚い内層との2重構造を示した。更にその下層に壁部分と細胞質とを画する黒色の薄膜もみとめられた。細胞の大きさは、黒色化したものは8-9 \times 9-10 μ mの値を有しほぼ球状に近く、無色の場合は7-8 \times 3-4 μ m値を、ほぼ楕円状であった。また、黒色細胞は、そうでないものより比較的大型であった。

走査型電子顕微鏡による観察：黒変した葉の表面を、日立走査型電顕S-450型により加速電圧20KV

で観察した。その写真をPlate III, IVに示す。

葉の表面を菌糸が縦横に走り、その大部分をおおっているが、葉の組織内には侵入していない。このことは、葉の表面から黒い皮革状の菌糸体が、容易に剝離されることから裏付けられる。栄養菌糸から出芽途中の胞子や、厚膜化し表面が粗造の細胞が数珠状に連なっているのが観察された。

(2) 生理学的試験

分離した3株は、いずれも同様の形態を示したので、このうちの1株を代表株(S-1)として選び、以後の生理学的試験に供した。

(i) 菌の増殖度測定

培養液を蒸留水にて10倍希釈し、島津光電比色計、Spectronic-20により、660nmの吸光度(O. D.)からもとめた。

(ii) 尿素同化能

A. pullulans は、これまで尿素同化能を有することが知られている²⁾。そこで、S-1株の尿素同化能の有無について調べた。

方法としては、常法通り、無菌ろ過した尿素の20%水溶液を調製し、CD液体培地の組成から、窒素源の硝酸ナトリウムを除いたものを加圧殺菌した後、その窒素量と等量となる様、尿素水溶液を添加し培地を調製した。その培地50mlを含む500ml容坂口フラスコに、供試菌株の保存培養から1白金鈎を接種し、30℃で48時間往復振盪培養を行ない、その増殖度を調べた。

その結果、S-1株は、0.78のO. D.値を示し、顕著な尿素同化能を有した。

(iii) プルラン産生能

A. pullulans は、プルランと呼ばれるグルコースの重合体である多糖を菌体外に産生することが知られている³⁾。そこで、Taguchiら⁴⁾の方法に従い、プルラン産生培地にて、本菌の産生能の有無を調べた。

まず、プルランの産生培地にて培養を行ない、培養物を遠心分離して培養濾液を得、それに1.5倍量のアセトンを加え多糖類を沈殿させた。その沈殿物に熱水を加え多糖類を抽出した後、アルコールで再度沈殿させた。次いで凍結乾燥を行ない、得られた白色固形物を供試々料とした。なお、培養終了時のO. D.は0.391であり、得られた固形物をプルランとした場合の、添加した糖に対する収量は約24%であった。

次に、このプルランを構成している単糖を調べるため、試料の酸加水分解を行なった。試料約10mgを10ml容の共栓試験管にとり1Nあるいは0.1N塩酸1mlを添加し、ドライ・ブロック中で100℃にて2時間加水分

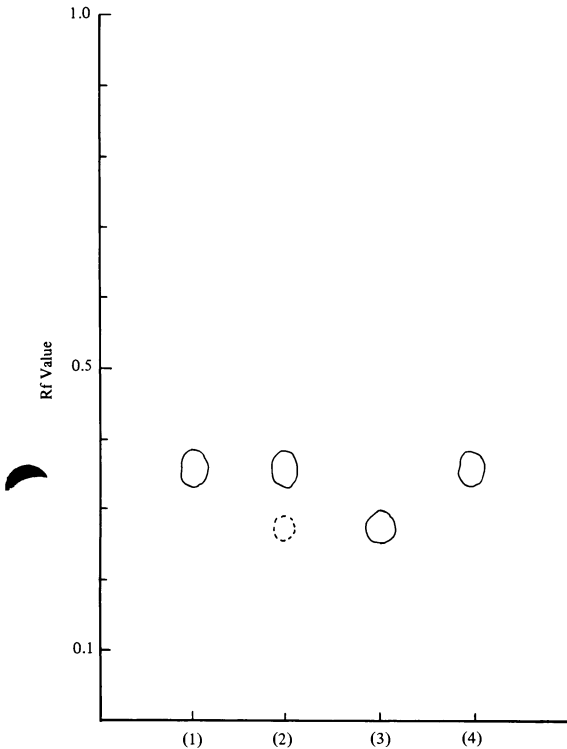


Fig. 1 Paper chromatographic behavior of the hydrolyzate of extracellular polysaccharide with dilute HCl produced by *Aureobasidium pullulans* S-1

(1) Authentic D-glucose (2) Hydrolyzate of the polysaccharide with 0.1N HCl (3) Authentic maltose (4) Hydrolyzate of polysaccharide with 1N HCl.

解を行なった。次いで、その酸加水物から減圧下で塩酸を除去した後、東洋濾紙No.51にグルコース及びマルトースの標準品と共に適当量スポットレ、n-ブタノール：エタノール：水(4 : 1 : 5, V/V/V),あるいは、n-プロパノール：水(65 : 35, V/V)の溶媒系で展開した。展開後風乾したペーパーを、アルカリ硝酸銀法⁵⁾により、呈色させ、そのクロマトグラムを Fig. 1 に示した。

1N塩酸による酸加水物は、グルコースの単一スポットのみであったが、0.1N塩酸の場合には、グルコース以外に、痕跡量のマルトースに相当するスポットを与えた。1N塩酸による完全加水分解によるグルコース量を Somogyi-Nelson⁶⁾の還元糖の定量法を用いて測定し、プルランとしての純度をもとめた結果、約50%であった。

この多糖区分の水溶液は、希ヨード液を加えても色調の変化はみられず、いわゆるデンプン反応を示さなかった。

このS-1株の産生する多糖は、比較的多量に菌体外に産生され、構成糖としてグルコースのみから成るデンプン反応陰性の高分子である。これらの特徴は、プルランの有する特性と良く合致することから、本菌はプルラン産生能を有するものと推定される。プルランを産生する菌としては、現在のところ *A. pullulans* として分類されている⁷⁾。

以上の形態学的及び生理学的特徴から、S-1株は *Aureobasidium pullulans* と推定される。

3 その他の生理学的特徴

(1) アルコール類とメチル・エチル・ケトン資化能及びpHの影響

本論の *A. pullulans* が、工場から排出されるエタノールを炭素源として増殖する微生物であるかどうかを確認する上で、この菌のエタノール資化能を検討することは重要な意義を有する。そこで、S-1株のエタノール資化能について調べた。その他、その同族体であるメタノール、ブタノール及び、この醸造工場と共に黒色汚染で問題となった印刷工場において、アルコールと共に溶媒として多量に使用されているメチル・エチル・ケトンについても、その資化能を調べた。更に、それらを炭素源とした場合の菌の増殖への至適pHも併わせて調べた。

Table 1 Assimilation of methanol, ethanol, n-butanol or methyl ethyl ketone by *A. pullulans* S-1 at various pH.

C-source	pH	O.D. at 660 nm
Methanol	4.0	0.00
	7.0	0.00
	10.0	0.00
Ethanol	4.0	0.52 (x 10)
	6.0	0.55
	7.0	1.03
	8.0	0.68
	10.0	0.05
n-Butanol	4.0	0.00
	6.0	0.00
	7.0	0.00
	10.0	0.02
Methyl ethyl ketone	4.0	0.00
	6.0	0.10
	7.0	0.13
	8.0	0.17
	10.0	0.01

Carbon source was added at the concentration of 1% V/V to the medium.

Shaking culture for 8 days at 31 C.

These measurements were performed without diluting with distilled water except for the experiment of ethanol.

Table 2 Utilization of ethanol and nitrogen source at various pH by *A. pullulans* S-1.

N-source	pH	O.D. at 660 nm (x 10)
Ammonium sulfate	4.0	0.54
	6.0	0.56
	7.0	1.07
	8.0	0.62
	9.0	0.06
Sodium nitrate	7.0	0.32*

Shaking culture for 48 hrs. at 31 C.

Ethanol was added at the concentration 1% (V/V) to the medium. Shaking culture for 60 hrs. at 31 C.

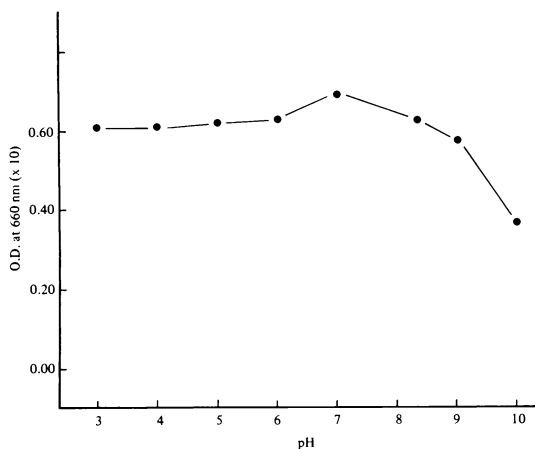


Fig. 2 Effect of pH on growth of *A. pullulans* S-1 on Czapeck-Dox solution.

Shaking culture for 60 hrs. at 31 C.

方法としては、CD 液体培地の組成から糖源と、窒素源の硝酸ナトリウムをあらかじめ除き、窒素源として硫酸アンモニウムを、硝酸ナトリウムを用いた時の窒素量に等しくなる様添加し、4~10までの所定の pH に調整した後、加圧滅菌を行なった。それらに、供試の炭素源を 1%(V/V)になる様に添加調製した後、その 10ml を滅菌済みの 20ml 容 L 型試験管に分注した。あらかじめ準備した種培養から、それらの試験管に一定量ずつ菌を接種し、31°C で 8 日間、東洋振盪温度勾配

培養装置 TN-3 にて培養を行なった。なお、種培養は、CD 液体培地 50ml を 500ml 容坂口フラスコにとり、斜面培養から菌を接種し、30°C で 72 時間往復振盪培養して行った。実験結果を Table 1 に示す。

エタノールには顕著な資化能がみとめられ、またメチル・エチル・ケトンには弱い炭素源としての利用性がみとめられた。しかし、n-ブタノール及びメタノールではごく弱いか、全く利用されなかった。従って、本菌が工場から排出されるエタノールを唯一の炭素源として増殖が可能であることを示し、メチル・エチル・ケトンを炭素源としている可能性は少ないとみられる。

本菌のアルコールを炭素源としたときの pH の影響は、酸性側の pH4 では、微弱ながら増殖がみとめられるのに対し、アルカリ側の pH10 では全く増殖がみとめられず、その最適 pH は 7 であった。

グルコースを炭素源とした CD 液体培地での実験結果を Fig. 2 に示す。アルコールの場合同様に、最適 pH は 7 附近にあり、増殖も酸性側に比してアルカリ側で劣った。

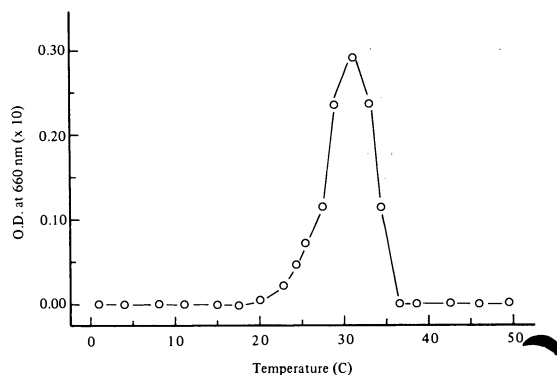


Fig. 3 Effect of temperature on growth of *A. pullulans* S-1 on Czapeck-Dox solution.

Shaking culture for 42 hrs.

(2) 最適増殖温度

加圧滅菌した CD 液体培地 10ml を含む L 型の試験管に、アルコール類の資化能の検討の場合と同様に、種培養を接種し、東洋温度勾配培養装置 TN-3 を使い、温度を 1~50°C の範囲に設定した後、42 時間振盪培養を行ない最適増殖温度を調べた。その結果を Fig 3 に示す。

本菌は、13~35°C の温度範囲で増殖し、31°C 附近に最適温度を有する典型的な中温菌であった。また、最適温度より高温になるに従い、増殖速度は急激に低

下し、40℃付近では全く増殖がみとめられなかった。

(3) 窒素源の形態による利用性

エタノールを炭素源とした場合の窒素源の形態による利用法と、空中窒素の固定能について調べた。

(i) 形態による利用性

エタノール資化能の検討の際に調製した培地、あるいは、その窒素源を硫酸アンモニウムからCD液体培地本来の窒素源の硝酸ソーダとした培地、それぞれ50mlを500ml容の坂口フラスコに注入し、これまでと同様に種培養を接種し、31℃で72時間往復振盪培養を行ない、窒素源の形態による利用性を比較した。その結果をTable 2に示す。

本菌はエタノールを炭素源とした場合、アンモニア態窒素を窒素源として利用できるが、硝酸態窒素はほとんど利用できなかった。

さきのエタノール類等の資化能の検討の際に、硝酸塩に代えて硫酸アンモニウムを用いたのは、この理由に基づいた。

(ii) 空中窒素の固定能

*A. pullulans*の中には、空中窒素を利用できるものがあることが知られている⁹⁾。そこで、本菌についてもその固定能の有無を調べた。

CD寒天培地の組成から窒素源の硝酸ナトリウムを除いた無窒素培地を調製し、それをシャーレに流し込んだ後、S-1株をその平板上に画線し、30℃で80日間培養を行なった。対照として麹菌(*Aspergillus oryzae*)を同様に接種し、培養を行なった。

麹菌は、その様な条件下ではほとんど増殖できなかったのに対し、S-1株は弱いながらも一定の増殖がみとめられた。従って、本菌は微弱ながら空中窒素の固定能を有するとみられる。その増殖状態をPlate Vに示す。

III 考察

黒すす病は、椿や柑橘類等の常緑樹に多発するが、その病原菌の分類学的所属は多種にわたり、生活様式も寄生性のものから腐生性のものまで多様である。

*Aureobasidium*の様に腐生性の菌としては、それ以外に *Cladosporium* や *Alternaria* 属の菌が知られ、それらの菌が同時に分離されることも少なくない。今回の試験では、黒すす病菌としては、*Aureobasidium* 以外の菌は分離されず、従って本菌が今回の黒色汚染に主要な役割を果たしているものと推定される。

この黒すす病菌は、現地の醸造工場周辺において、一般に微生物の増殖には適さない条件下、たとえば直射日

光の当たる所や乾燥した場所でも、増殖・生存が可能であった。このかびが、その様な劣悪な条件下でも生存できる大きな理由の一つとして、この菌の細胞壁が非常に厚いことが考えられる。このことは、光学顕微鏡による観察や、走査型電子顕微鏡による観察時にも細胞が高真空に耐え、収縮していないことから裏付けられる。この厚い細胞壁が、細胞質の急激な乾燥を防ぐだけでなく、有害な光線の作用から保護する役割も有していると推測される。

〔生理及び生態について〕

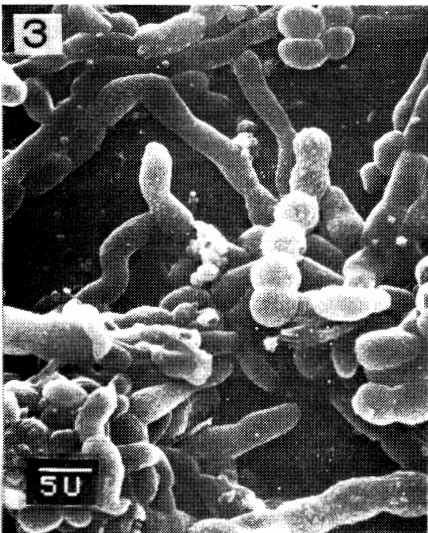
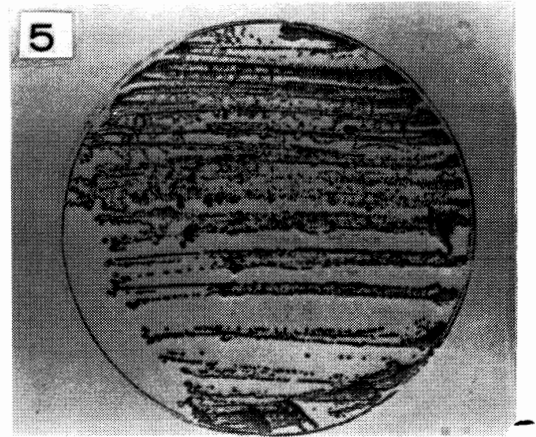
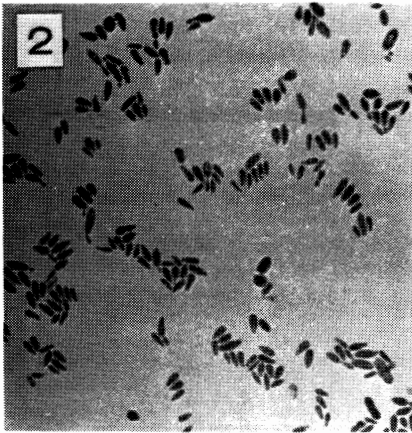
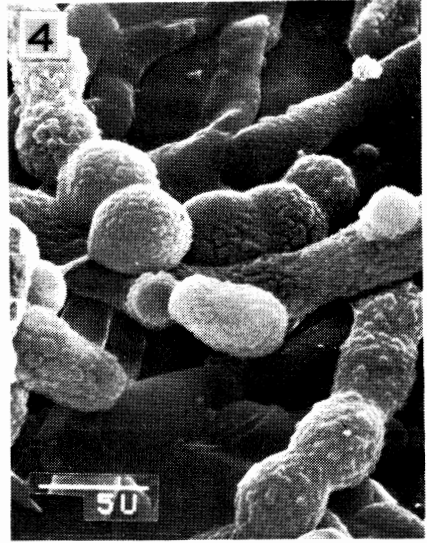
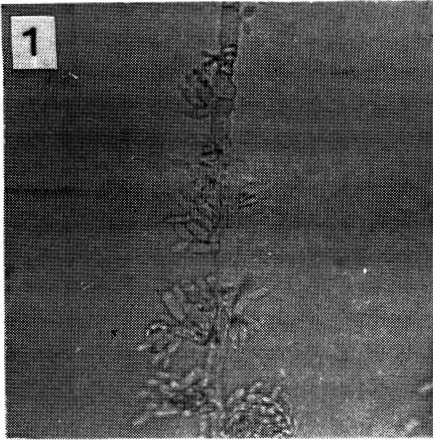
プルランは微生物により菌体外に産生される多糖として、デキストランなどと共によく知られている。この多糖は、近年接着剤、フィルムなどの用途に有用性がみとめられ、企業化の段階にある。今回のS-1株によるプルランの対糖収率は約24%で、大量生産に用いられる菌株のその約65%以下であった。*A. pullulans*は、細胞外に産生されたプルランの接着性に依り、樹木やビニールなどに付着している可能性もあるが、それについては今後の検討を要する。

*A. pullulans*はエタノール及びn-アルカンを唯一の炭素源として増殖できるが⁹⁾、メタノールについては利用できないとされている⁸⁾。今回の試験においても、エタノール資化能はみとめられたが、メタノールは利用できずこれまでの報告と良く一致した。メチル・エチル・ケトンには、エタノールよりも利用性が低かった。従って、工場周辺に排出されたこの溶剤は、少なくとも我々が分離した *A. pullulans* S-1株によっては全く利用されていないと推定される。

エタノールを炭素源としたときの、本菌の増殖範囲はpH 4~8であり、至適増殖pHは7の中性付近にあった。県下における雨水の調査結果¹⁰⁾では、季節や地域による若干の変差はあるが、ほぼpH 4~8の間にあり、本菌の繁殖に適した条件を与えている。

窒素源としては、エタノールを炭素源とした場合、硝酸態よりもアンモニア態窒素の利用性が高いことから、雨水等に含まれる微量のアンモニア水を利用しているものと考えられる。また、この汚染菌は、雨水から遮蔽された様な場所でも増殖がみとめられることがある。その場合は、空中の窒素を固定して利用していることも考えられる。

本菌の増殖温度範囲は、13℃~35℃で、40℃付近では全く増殖がみとめられなかった。このことは、現地での汚染が春から初夏及び秋にかけて、進行するという事実と符合する。*A. pullulans*の最適増殖温度についての報告は、これまで27℃とするものが多い。この違いが、炭



写真の説明

1. *Aureobasidium pullulans* S-1のスライド・カルチャーにおける形態。長く伸びた栄養糸に沿って、鈴なりに出芽胞子が形成されている。
2. *A. pullulans* S-Aを5%麦芽エキス培地で振盪培養した場合の酵母様増殖。
3. 4. 汚染された樹木から採取した葉の表面の走査型電子顕微鏡写真。C：厚膜化した栄養細胞 B：出芽胞子。
5. *A. pullulans* S-1株の窒素源無添加寒天培地上における増殖を示す。

素源に依るものかあるいは菌株によるものかは、今後の検討を要する。

IV 要約

近年、野田市その他の醸造工場などの周辺において、家屋、屋根や樹木の葉の表面などがすす状に黒く汚染され、その原因が、顕微鏡的観察や細菌学的検査結果から *Aureobasidium pullulans* によるものと推定された。

A. pullulans はエタノールを唯一の炭素源として非常によく増殖した。この場合の窒素源は、硝酸態よりもアンモニア態の利用性が高く、空中窒素の固定能も有する。

増殖温度は、13~35℃の範囲にあり最適は31℃であった。

増殖可能 pH は 4~9.0、至適 pH は 7.0 であった。

文献

- 1) 三浦正人：醸造工場周辺の微生物汚染について、大気汚染研究, 11, 273, 1976(第17回大気汚染研究全国協議会大会特集号)。
- 2) 飯塚広, 後藤昭二著：酵母の分類同定法, 73, 東大出版会(東京), 1969.
- 3) S. Ueda, et al. Polysaccharide Produced by the Genus *Pullularia*, Appl. Microbiol., 11, 211-215, 1963.
- 4) R. Taguchi, et al. Uniformity of Pullulan Produced by Several Strains of *Pullularia pullulans*, Agr. Biol. Chem., 37, 1583-1588, 1973.
- 5) 赤堀四郎：酵素研究法第1巻401朝倉書店(東京)。
- 6) 福井作蔵, 還元糖の定量法, 10-12, 東京大学出版会(東京), 1969.
- 7) 結縁鎬吉：プルランの物性と用途, 日化協月報, 5, 25-31, 1976.
- 8) Cooke, W. B.: An Ecological Life of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud., Mycopathologia, 12, 1-45, 1959.
- 9) Emanuel, M., et al.: Utilization of n-Alkanes by *Pullularia pullulans*, Appl. Microbiol., 20, 651-652, 1970.
- 10) 押尾敏夫, : 千葉県における雨水の化学的性状について, 第15回千葉県公衆衛生学会大会口演要旨集, 34, 1977.