

乾燥・貯蔵粃にカビ臭被害を与えた *Streptomyces* 属菌

佐藤豊三*, 浅野亮樹

新潟食料農業大学 〒959-2702 新潟県胎内市平根台 2416

2020年、収穫後に乾燥・貯蔵された新潟県産粃の一部に異臭が発生し問題となった。原因微生物を特定するため、表面殺菌した被害玄米とその粃殻および無殺菌の両試料を4種類の培地に静置し、10~15日間、暗所で25℃に保温した。その結果、多くの真菌類および細菌が分離されたが、それらにはカビ臭は感じられなかった。一方、無殺菌の玄米と粃殻を置いた素寒天培地上では約半数の玄米およびすべての粃殻から淡黄色ないし白色粉状の放線菌が生育した。これらの分離菌株はすべて強いカビ臭を放ち、コロニーの特徴から同一種と考えられた。その代表菌株を精米に接種した結果、カビ臭の発生が再現された。普通寒天培地上で50日間培養した同分離菌株のコロニーは、直径10mm以下、表側中央は淡黄色で円錐状に盛り上がり放射状のしわがあり、周縁は乳白色でフリル状を呈した。同株は気生菌糸かららせん状に連鎖する胞子を大量に形成した。以上の培養特性、形態および16S rRNA遺伝子の塩基配列に基づき、本菌は *Streptomyces* 属菌と同定され、今回のカビ臭の原因微生物と考えられた。2020年は収穫前に多くのイネが倒伏したため、粃に付着した上記放線菌が増殖しカビ臭が発生したものと考えられた。

キーワード: *Streptomyces*, 放線菌, 玄米, 粃殻, 2-メチルイソボルネオール

大規模稲作地帯では、収穫された大量の粃は乾燥・貯蔵および出荷前処理を一貫して行う施設（カントリーエレベーター）に運ばれる。粃はゴミや小石などの除去と予備乾燥を経て本乾燥の後、出荷まで温湿度の管理されたサイロで貯蔵される。イネ品種の早晩性により地域ごとに収穫期が異なり、各品種の出荷時期も一様ではないため、貯蔵期間はさまざまであるが、1年サイクルで乾燥処理から出荷までの作業が繰り返される。2020年、新潟県で収穫され一施設で乾燥・貯蔵された粃に異臭が発生し問題となった。施設の管理者が分析専門の法人に異臭玄米の揮発成分の鑑定を依頼した結果、ガスクロマトグラフ/質量分析計（GC/MS）によりカビ臭（墨汁臭）物質の一つである2-メチルイソボルネオールが検出され、それは微生物に由来するものと示唆を受けた。そこで、本研究では、対策と再発防止のためにカビ臭の原因となった微生物を特定し被害の発生要因を推定することを目的とした。

被害玄米・粃殻から検出された微生物とそれらのカビ臭

被害粃からの微生物の検出には、2021年3月乾燥・貯蔵施設から採取された2020年産早生品種‘ゆきん子舞’の玄米とその粃殻を用いた。まず、70%エタノールに数秒間浸漬した後、ただちに1%次亜塩素酸

ナトリウムに約1分間浸漬した玄米12粒および粃殻12片、および無殺菌の玄米22粒および粃殻22片を以下のとおり殺菌試料は3種類、無殺菌試料は4種類の平板培地に静置した。2%ブドウ糖添加ジャガイモ煎汁寒天（PDA, Potato Dextrose Agar, BD Difco社製）、乳酸添加PDA（aPDA: PDA培地約5mlに30%乳酸を約30 μ l添加）および乳酸添加2%素寒天（aWA, Water Agar, 伊那食品工業社製 培地用寒天, aPDAと同様に乳酸添加）の各平板（直径55mm）に表面殺菌および無殺菌の玄米を4粒（2処理 \times 3種培地 \times 4粒=合計24粒）、ならびに粃殻を同じく4片置いた（2処理 \times 3種培地 \times 4片=合計24片）。また、それらとは別に無殺菌の玄米および粃殻を2%素寒天平板（WA, 直径90mm）2枚にそれぞれ10粒および10片置いた。これらの平板はすべて暗所で25℃に保った。次にWA平板では4, 10日後に、その他3種類の平板では2, 3, 11, 15日後に観察して出現微生物を記録するとともに、生育した微生物をコロニー性状あるいは胞子などの形態により類別し代表的な菌株を分離した。コロニーについては肉眼および実体顕微鏡（オリンパスSZX7）で、また胞子などはラクトフェノール液（フェノール10g, グリセリン10ml, 乳酸10ml, 蒸留水10mlを混合）で封入し、位相差顕微鏡（オリンパスCX43）で観察した。分離した微生物は試験管のPDA斜面培地に移植し25℃で十分培養した後、雑菌混入のないことを確認したものから順次試験管のシリコ栓を外し、成人3名によりカビ臭の有無を

*Corresponding author

E-mail: sato_t@nibiohn.go.jp

Accepted: September 29, 2023

確認した。

すべての培地上ではほとんどの試料からケカビ類, *Aspergillus* 属および *Penicillium* 属菌などの真菌類が優先して生育し, 乳酸を含まない培地では殺菌の有無にかかわらず比較的多くの玄米と少数の粳穀から細菌が検出された。これらの分離菌株にはカビ臭は感じられなかった。一方, aPDA および aWA 上に置いた殺菌済みの玄米各 1 粒に淡黄～白色粉状の放線菌のコロニーが観察された。また, 無殺菌の両試料を置いた WA 上では約半数の玄米およびすべての粳穀から同様の放線菌が生育した (Fig. 1A, B, 2)。これらの分離菌株はすべて強いカビ臭を放ち, コロニーの特徴から同一種と考えられた (Fig. 1C-E)。

放線菌の接種による被害の再現

市販の‘こしひかり’の精米 60 粒を上記と同様に表面殺菌し, 滅菌蒸留水で 1 回すすいだ後, クリーンベンチ内で直径 55 mm の滅菌シャーレ 2 枚に 30 粒ずつ入れ水滴が無くなるまで乾かした。上記放線菌の代表菌株 MWA2 を PDA 斜面培地上 25℃ 14 日間培養して得られたコロニーに滅菌蒸留水を 5 ml 滴下し軽く振とうして胞子を懸濁させた。この懸濁液を一方のシャーレ内の米粒に 30 μ l 滴下して各米粒になじませた後風乾した。他方のシャーレの米粒には同量の滅菌蒸留水を滴下し対照無接種区とした。次に, 70%エタノールにより滅菌した V 字型プラスチック版でシャーレを仕切り片側に米粒を寄せ, 反対側に吸水させた球形吸水ポリマー (直径約 15 mm, 電光ホーム取り扱い) を 2 個入れ蓋をした。両シャーレを暗黒下 25℃ で 4 日間保った後, 成人 3 名によりカビ臭の有無を確認するとともに, 外観を観察した。さらに, カビ臭の確認後接種区および対照区の各 5 粒から接種菌の再分離を試みた。

その結果, 接種区で強いカビ臭が確認され, 米粒に淡黄色ないし淡褐色の変色が見られたが, 対照区ではカビ臭は感じられず変色も観察されなかった (Fig. 1F, G)。また, 接種区の 5 粒からはすべて接種した MWA2 と同様の放線菌が再分離されたのに対し, 対照区の米粒からは放線菌は分離されなかった。

カビ臭を放つ放線菌の同定

菌株 MWA2 を普通寒天 (NA, Nutrient Agar, 日本製薬社製) および PDA 平板に移植し暗黒下 25℃ で 50 日間培養した。形成されたコロニーおよび胞子などは

前項に述べたとおり観察し顕微鏡写真は WRAYC-AM-EM310 により撮影した。その結果, 分離菌株 MWA2 の NA 上のコロニーは直径 10 mm 以下, 表側中央は淡黄色で放射状のしわのある円錐状で, 周縁は乳白色のフリル状を呈した。裏側は一樣に乳白色で放射状のしわがあるが表側よりも少なかった (Fig. 1C, D)。また, PDA 上のコロニーは, 直径 15~20 mm, 表側中央は黄色ないし黄土色で不規則に盛り上がり, 白粉状気菌糸塊が散在した。周縁ほど菌叢が薄くなり黄白色で同心円状の輪紋が見られ, 輪郭はほぼ円形ないし楕円形を呈した。裏側は濃黄色ないし黄土色でしわは見られなかった (Fig. 1E)。らせん状に連鎖する胞子が気菌糸から大量に生じ (Fig. 1H), 胞子は単細胞で直径 0.5~1 μ m であった。

次に菌株 MWA2 を PDA 平板に移植し 25℃ 暗黒下で 30 日間培養し, 形成された胞子塊や気菌糸を滅菌した爪楊枝先端部でごく微量かき取った。100 μ l の TE バッファーを分注したチューブ内で爪楊枝先端の菌体を懸濁させた後, 99℃ 10 分間加熱し放冷した。この溶液を鋳型として GoTaq DNA Polymerase (Promega 社製) を用い 16S rRNA 遺伝子の DNA 断片を PCR にて増幅した。プライマーは E8F および E1541R (Baker *et al.*, 2003) を用い, 最初 95℃ に 4 分保った後, 95℃ 30 秒→55℃ 30 秒→72℃ 1 分 30 秒を 30 サイクル繰り返し, さらに 72℃ に 10 分保つ温度条件を適用した。次に E8F プライマーを用いて BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific 社製) によりシーケンス反応を行い, DNA シークエンサー (ABI PRISM 3100, Thermo Fisher Scientific 社製) により増幅産物の塩基配列を片側から解析した。なお, シークエンス反応およびシーケンシングは秋田県立大学バイオテクノロジーセンターに解析を依頼した。得られた塩基配列をアクセッション LC777275 として DNA DataBank of Japan (DDBJ) に登録した。この塩基配列を用いて NCBI の BLASTn 検索を行った結果, *Streptomyces olivaceiscleroticus* Pridham 1970 (JCM 4805, MT760617) および *Streptomyces ochraceiscleroticus* Pridham 1970 (NBRC 13483, NR_112409) など *Streptomyces* 属菌の複数種のそれと 100% (488/488bp) 一致した。以上の培養特性, 形態的特徴および 16S rRNA 遺伝子の相同性より, 菌株 MWA2 を *Streptomyces* 属菌の 1 種と同定した。

Medsker *et al.* (1969) は *Streptomyces antibioticus*

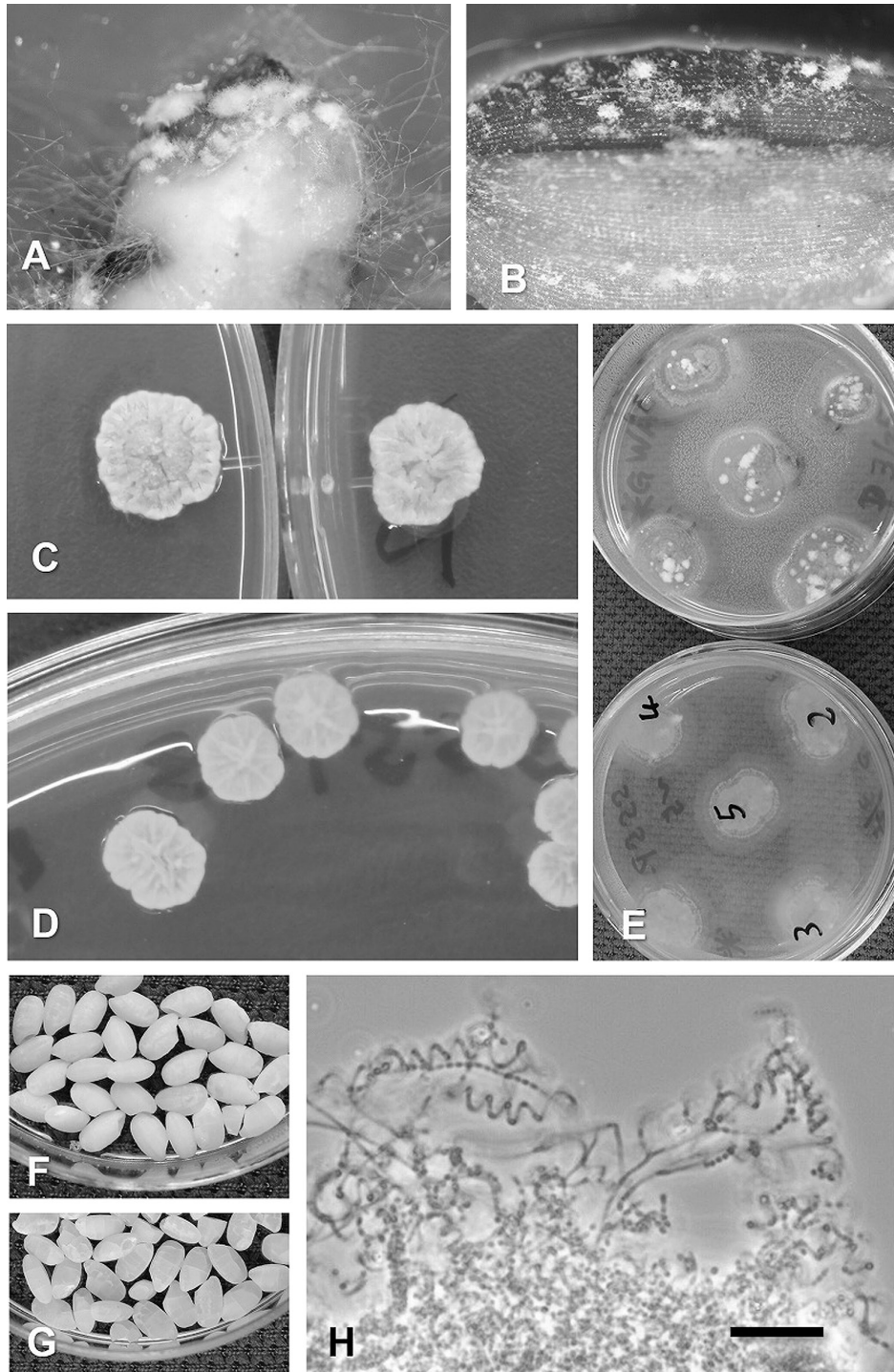


Fig. 1

A-H: *Streptomyces* sp. with musty odor on rice, **A:** white colonies on rice grain, **B:** white colonies on rice hull, **C:** surface side of colonies on Nutrient Agar (NA) cultured at 25°C for 50 days, **D:** reverse side of colonies on NA, **E:** colonies on potato dextrose agar cultured at 25°C for 50 days (upper: surface side, lower: reverse side), **F:** milled rice grains incubated in high humidity at 25°C 4 days after inoculation with spore suspension of *Streptomyces* sp., **G:** milled rice grains treated as same as 'F' except for no inoculation. **H:** spiral spore chains (phase contrast micrograph, bar: 10 µm)

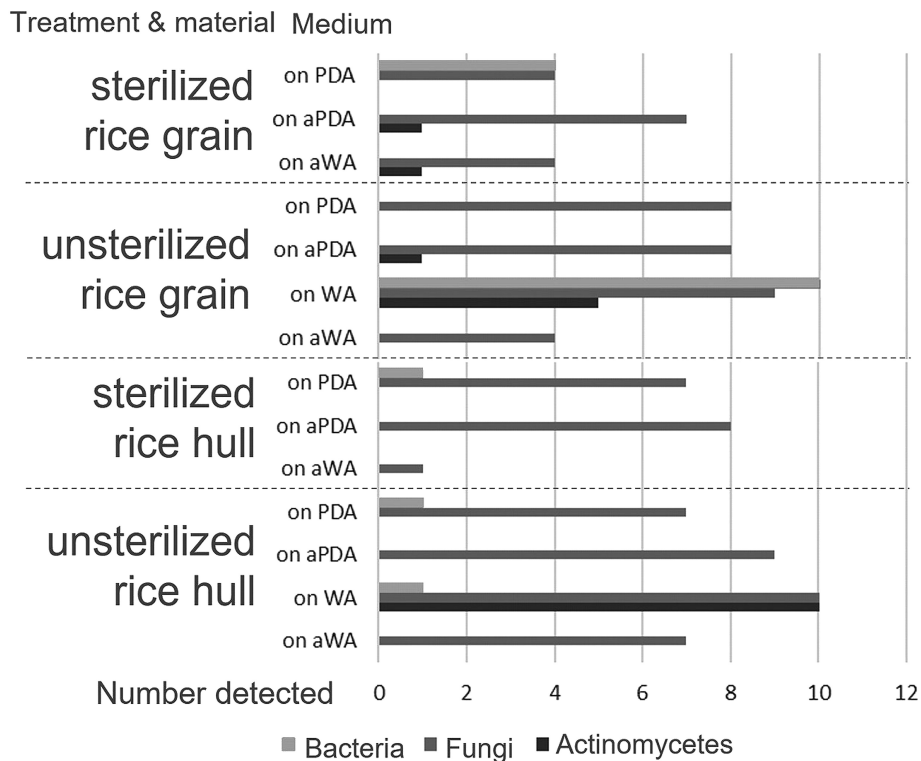


Fig. 2 Numbers of microbial colonies grown from rice grain or rice hull with moldy odor after incubation in darkness at 25°C for 10–15 days. PDA: potato dextrose agar, aPDA: acidicated potato dextrose agar, WA: water agar, aWA: acidicated water agar

(Waksman and Woodruff 1941) Waksman and Henrici 1948 などの放線菌がカビ臭物質の一つ 2-メチルイソボルネオールを生産することを初めて明らかにした。次いで、Gerber (1969) は、*Streptomyces lavendulae* (Waksman and Curtis 1916) Waksman and Henrici 1948 および *Actinomadura* 属の放線菌も同じカビ臭物質を生産することを報告した。国内では、杉浦ら (1983) が霞ヶ浦の湖水および底泥からカビ臭を発生する 6 株の *Streptomyces* 属菌を分離し、全株が 2-メチルイソボルネオールを生産することを報告した。上述のとおり被害籾のカビ臭物質が 2-メチルイソボルネオールと同定されたこと、および同物質を生産する *Streptomyces* 属菌が複数報告されていることから、被害籾由来菌株 MWA2 を代表とする *Streptomyces* 属菌も 2-メチルイソボルネオールを生産すると推定され、これが今回のカビ臭の原因微生物であると特定した。なお、同菌株を農研機構の農業生物資源データベースに MAFF 225061 として登録・保

存した。

日本植物病名目録には変色米など米穀粒の微生物汚損が 24 件採録されており、その原因微生物としては真菌が最も多く、次いで数種の細菌と 1 種の放線菌が挙げられている (日本植物病理学会, 2023)。これまで国内では輸入米に *Streptomyces flavovirens* (Waksman 1923) Waksman and Henrici 1948 が土臭と黄変を起すことが報告されたが、同菌の胞子はやや湾曲した線状に鎖生することや気菌糸が豊富であることから、今回のカビ臭原因菌株 MAFF 225061 とは明らかに異なる (角田ら, 1959)。また、2012 年、新潟県佐渡市産の精米を淡紅色に着色しカビ臭を発生する放線菌の 1 種 (MAFF 225060) も胞子を線状に鎖生し、汚灰色のコロニーを形成することから、やはり MAFF 225061 とは異なる (農業生物資源データベース)。以上より、国内では今回特定された *Streptomyces* 属菌による貯蔵籾のカビ臭被害は本報告が初めてと思われる。

カビ臭被害の発生要因と対策

Medsker *et al.* (1969) および杉浦ら (1983) は水圏のカビ臭物質を生産する *Streptomyces* 属菌を報告したが、*Streptomyces* 属菌は土壌中にも広く生息することが知られている (服部・宮下, 1996)。2020年、カビ臭被害のイネが栽培された地域では収穫2週間前頃頻繁にイネが倒伏したことから、収穫前にカビ臭の原因となった *Streptomyces* 属菌が穂に付着し増殖した可能性が考えられる。また、本研究でカビ臭の原因となった *Streptomyces* 属菌が乾燥・貯蔵後の被害籾から分離されたことは、カントリーエレベーター内でも本菌が生存していたことを示している。さらに、わずかながら表面殺菌した玄米からも同菌が分離されたことから、一部は玄米内部 (果皮・種皮・胚・胚乳) に侵入していたと考えられる。したがって、乾燥処理前にすでにカビ臭原因菌に汚染された籾を通気のないサイロに貯蔵したことにより、付着した放線菌が多少なりとも増殖し放出したカビ臭成分が籾に染みついたものと推測された。今回のような微生物による籾の異臭被害を回避するには、被害の発生したカントリーエレベーターの清掃と滅菌を徹底することはもちろん、イネの倒伏の原因をできるかぎり排除し、収穫籾は迅速かつ十分に乾燥することが重要と考えられる。

謝 辞

被害玄米と籾殻および貴重な情報をご提供頂いた全農新潟県本部に厚くお礼申し上げます。また、実験を補助しカビ臭の官能試験に参加して頂いた吉永実記氏に感謝の意を表す。

文 献

- Baker, G.C., Smith, J.J. & Cowan, D.A. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* **55**: 541-555.
- Gerber, N.N. 1969. A volatile metabolite of Actinomycetes, 2-Methylisoborneol. *J. Antibiotics* **22**: 508-509.
- 服部 勉, 宮下清貴 1996. 第2章 培養可能な土の微生物たち, 土の微生物学, p. 23-29, 養賢堂, 東京.
- Medsker, L.L., Jenkins, D., Thomas, J.F. & Koch, C. 1969. Odorous compounds in natural waters: 2-Exo-hydroxy-2-methylbornane, the major odorous compound produced by several actinomycetes. *Environ. Sci. Technol.* **3**: 476-477.
- 日本植物病理学会 (編) 2023. イネ穀粒, 日本植物病名目録 (2023年8月版), p. 769-772, 日本植物病理学会, 東京.
- 農業生物資源データベース 2012. 微生物遺伝資源の詳細 MAFF 225060. https://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_search_detail.php?maff=225060. 最終訪問日 2023年8月21日.
- 杉浦則夫, 矢木修身, 須藤隆一 1983. 放線菌 (*Streptomyces*) のカビ臭発生能に及ぼす各種環境因子の影響. *水質汚濁研究* **6**: 77-86.
- 角田 広, 杉本貞三, 鶴田 理 1959. 微生物による貯蔵穀類の被害に関する研究 (第25報). *食糧研究所研究報告* **14**: 58-61.

Streptomyces sp. spoiling rough rice with a musty odor after drying and storage

Toyozo Sato and Ryoki Asano

Niigata Agro-Food University

The spoilage of rough rice with a musty odor occurred after harvest, drying and storage in an area of Niigata prefecture in 2020. Both surface sterilized and unsterilized husked rice and the rice hull were incubated on four kinds of agar media in darkness at 25°C for 10–15 days to discover the microbes causing the odor. Although many fungi and several bacteria were isolated, they did not have a musty odor. In contrast, an actinomycete that ranged in color from pale yellow to white and with a powdery texture and a strong musty odor grew on unsterilized rice grains and hull pieces on water agar. The spoilage was reproduced by an inoculation with a representative isolate of the actinomycete on milled rice grains. The isolate grew up to 10 mm in diameter after being cultured on nutrient agar in darkness at 25°C for 50 days. The surface side of the colony was conical and pale-yellow in color with radial wrinkles and a white frilled margin. The isolate produced abundant spiral spore chains from aerial hyphae. The cause of the musty odor of the rice was identified as a species of *Streptomyces* based on the properties of colonies, microscopic morphology, and the DNA sequence of the 16S rRNA gene. The spoilage in 2020 was assumed to be caused by rice plants often falling over before the harvest, and consequently the musty *Streptomyces* sp. appeared to contaminate the ears and propagate on rough rice.