

びわ湖塩津湾における微生物の調査概要

特に真菌類について

藤井富美子・近藤 滋子

General Aspects of Micro-organisms of Shiozu

Wan of Lake Biwa

Especially on Eumycetes

by

F. FUJII and S. KONDO

はじめに

私たちは IBP (国際生物学事業計画), PF (陸水群集の生物生産力) の仕事の一環に加わり湖水における生物産生機構を解明するための基礎的研究として, びわ湖の塩津湾における有機物分解の活性過程をとらえる調査に参加する機会を得て目下研究をつづけている。

周知の如く近年河川や湖沼の水質汚濁が著明となり, 衛生上大きな問題となっている。かつては, 貧栄養湖として知られたびわ湖も例外ではない。もともと湖に流入する污水は貯蔵されるわけであるが, 一部は沈澱し他は均等化しつつ汚濁はすすむ。流れこむ表面水特に流入下水中に動植物の分解による有機物が豊富であれば, これを直接, 間接に栄養とする生物, 特に原生動物, 真菌細菌, 等の水中微生物は増加する。そこで各微生物はそれぞれの環境条件下で有機物分解の役割を果す結果, 湖自体の自浄作用は時間とともに進展するが生物の分布変化, 酸度の上昇, 下降, 温度, 光線の影響などもあってその速度は, もちろん一定ではない。

今回はびわ湖における有機物分解に関与する微生物全体をとらえる研究の一環として行なった真菌検査成績の一部を報告する。

調査の内容と方法

真菌特に糸状菌の湖水汚染の状態は必ずしも孢子という単細胞の状態ではない。普通は菌糸体であり, 不規則に切断された菌糸となっている場合もあって, 湖水を充分攪拌しても細菌のように単一のコロニーとして発生しない。したがってコロニー数 γ 当たりを大きな巾で記すことが正しい評価となることが多い。酵母および酵母様菌なら細菌の生菌数のカウントと同様に取扱ってよいと考えられる。

真菌数の調査は前処置法, 培地, 培養温度, 培養期間等により相異なることはいうまでもない。したがって今日まで共通に認めあったコロニーカウント方法がない現在, 諸家の成績は単なる参加程度とするよりほかないわけである。今回の調査も予備的調査の段階であるが, 一応平板法により生菌数の測定と分離培養を行なうことに主眼をおいた。そして目下直接計数法を試みているが, これについてはまだ結果の得られるところまでは到達していない。

もともと真菌類は好気性の生物であることから, 好気的な条件のもとでは栄養源が豊富であ

れば活発に活動するものと思われる。また一般河川と廃水の流入する水域とでは現存する種に大きな差があることは知られている。例えば *Aspergillus* 属や *Penicillium* 属は一般の河川、湖水中に広く分布している。しかし現在のところでは真菌類が浄化の役割をはたすことは考えられるが、汚れの指標になるかどうかは明らかにされていない。

Cooke (1954) はオハイオ州の Little creek で下水汚染をうける川水中の真菌類を年間通じて毎月数ヶ所の地点を選んで調査した結果、105 種の真菌を分離している。しかし通年各地点で発見されたのは次の 6 種 (*Aspergillus fumigatus*, *Gbotrichum candidum*, *Funiculosum*, *Penicillium*, *P. lilacum*, *P. ochrochloron*) にすぎなかったといていることからよく理解される。その他日本でも椿 (1962), 中村 (1962) らによって *Candida* に属する菌, *Monillia* sp., *Mucor* 属等が河川の調査結果から報告されている。

(1) 調査の場所と時期

びわ湖における調査は予備調査として図 1 に示すように京都大学理学部大津臨湖実験所横において 1968 年 5 月, 8 月, 11 月, 1969 年 1 月の 4 回行ない, 1969 年 7 月からは図 2 に示す塩津湾

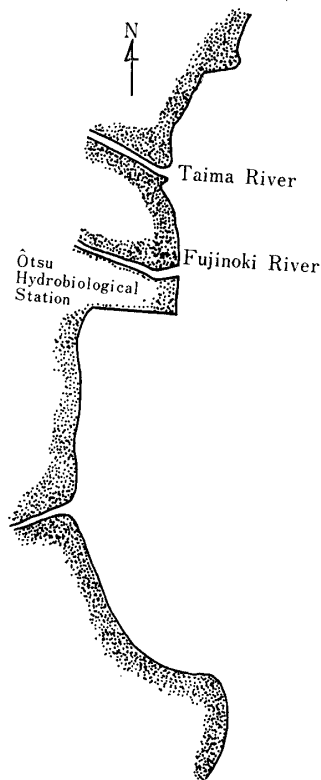


図 1 びわ湖東南の調査地点

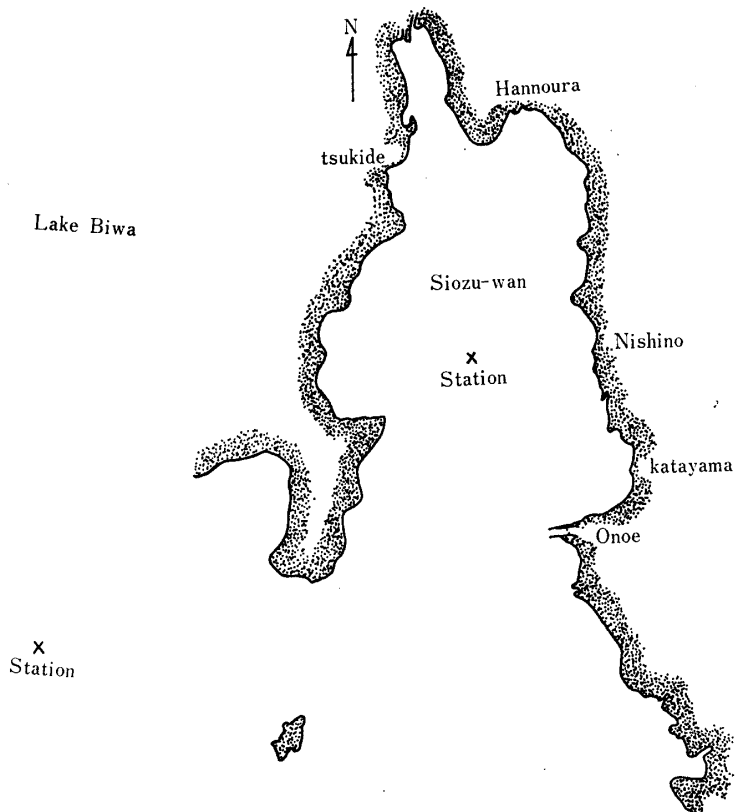


図 2 塩津湾における調査地点

において行なった。なお塩津湾の場合は 1969 年 7 月 27 日～30 日, 11 月 27 日～29 日, 1970 年 7 月 24 日～26 日の 3 回行なった。塩津湾の場合一日のサイクルをとらえるため, 日の出前, 日中, 日没後の 3 回にわたって採水を行なった。もちろんこれは真菌調査のためでなく, 分解に関与する微生物全体をとらえる一環として行なったからである。(JPF, びわ湖一分解班, 京都大学門田研究室) その調査内容を表にまとめると表 1 に示す通りである。

表 1

現地での測定

pH, 水温, 気温, 溶存酸素, 透明度

採取した試料についての実験室

- Particulate...C, Particulate...N, Particulate...P
- detrilus 中のたんぱく質のアミノ酸組成
- detrilus 中の多糖類の糖組成または多糖類の種類
- Chlorophyll, Carotenoids
- Dry matter, Ash.

The standing crop of the micro-organisms in the water and the bottom mud of Lake Biwa

Sampling Data

Station

Stations Depth

- Bacteriai Samples
- i) water (2 m layer)
 - ii) filtered water with 0.8 μ Millipore filter
 - iii) filtered water with 0.8 μ Millipore filter after 30 sec. sonication
 - iv) mud (Surface layer, 0~4cm)
 - v) mud (lower layer, 21~24cm)

Standing crop of micro-organisms (cells/1 ml of water or 1 g of bottom mud)

Total heterotrophs (aerobes)

Total anaerobes

Ammonifiers

Gelatin liquefiers

Nitrate reducing bacteria

Denitrifying bacteria

Nitrogen fixing bacteria

anaerobes

aerobes

Ammonia oxidizing bacteria

Nitrite oxidizing bacteria

(2) 真菌の測定法

真菌の生菌数を測定するにあたっては希釈寒天塗抹法および混釈培養法を用いた。

無菌的に採水および湖底堆積物を採取し、冷却して研究室に持ちかえり、滅菌水で順次希釈して滅菌ペトリ皿に分注した。そこへあらかじめ用意しておいた真菌用寒天培地 (NaNO₃... 1g, K₂HPO₄... 1g, C₆H₁₂O₆... 5g, rosebengal... 70mg, soil extract... 100ml, agar... 15g, H₂O... 900ml, pH 6.0) およびサブロー培地 (Pepton... 10g, C₆H₁₂O₆... 40g, agar... 15g, H₂O... 1000ml, pH 6.0 \pm 0.2) を溶解したのち 45°C 以下に保った培地を前記のペトリ皿に注ぎ、混釈したのち凝固させて平板とした。また一方すでに平板状に冷却凝固した培地上に 0.1ml の菌液を塗抹した。

以上の方法により処理した寒天平板は25℃で5～7日間培養を行ない、後発生したコロニーを計算して試料中の生菌数とした。また発生したコロニーの中から肉眼的に異なった形態をしたものを取り出し、平板上に巨大コロニーを作らせて肉眼観察を行なった。

(3) 観察と記載

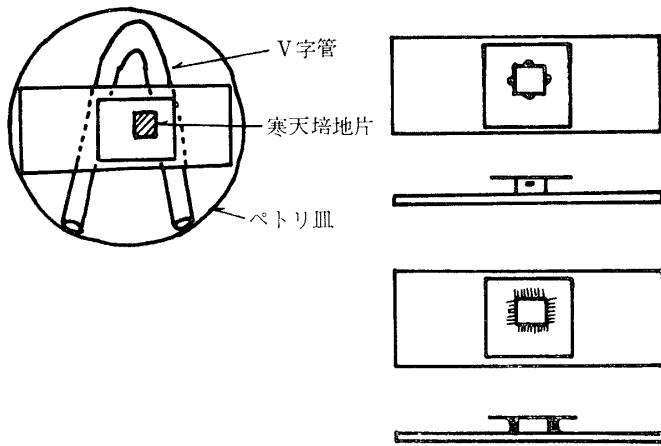
コロニーの形態

巨大コロニーについては肉眼的に次の項目について注意しながら観察を行なった。

- ・発育の速度…培養日数とコロニーの直径
- ・コロニーの色…表面（子実体，気中菌糸，菌核などによる），裏面（埋没菌糸……）などによる色とその変化
- ・コロニーの表面…平滑かしわがあるか，同心円状かまたは放射状かなど中心部，中間部，円周部について調べる。
- ・コロニーの菌叢…ビロード状，綿毛状，粉末状など
- ・コロニーの高さ…扁平，丘状隆起など
- ・コロニーの辺縁…全縁，繊毛状など
- ・培地の着色または色調の変化

(4) 顕微鏡的形態

巨大集落のみで各器管の状態を知ることにはできないので，生育状態をそのまま検鏡するためのスライド培養を行なった。すなわち図3に示すようにペトリ皿にV字型のガラス管を入れ，その上にスライドガラスをのせて蓋をして滅菌する。別のペトリ皿に用意した培地（厚さ2mm



程度)をミクロスパテルで無菌的に5mm平方の寒天片を切り取り，スライドガラスの上ののせ，4つの辺に白金線で菌を接種し，滅菌したカバーガラスをかけ，培養中の乾燥を防ぐため滅菌水3～5mlを加えて25℃のフラン器内で培養した。24時間から48時間後にとり出し，カバーガラスを寒天片から離し，他の一方スライドガラスの寒天を取り除き，2枚の試料としてラクトフェノール・コトンプルー液（グリセリン…40ml，フェノール…20ml，乳酸…20ml，蒸留水…20ml，コトンプルー…0.05g）で染色して検鏡した。

図3 プレパレート培養法

リン…40ml，フェノール…20ml，乳酸…20ml，蒸留水…20ml，コトンプルー…0.05g）で染色して検鏡した。

結 果

前記7回にわたって行なった調査結果，水温，pH…などについては表2および図4に示す通りである。次に真菌については原液， $\times 10$ ， $\times 10^2$ ， $\times 10^3$ ， $\times 10^4$ ， $\times 10^5$ の5段階（途中で3段階にする）について培養を行なったが，発生したコロニー数にはばらつきが多く，先述したように技術的に問題点があると思うがしかし一応塩津湾のパターンが得られたものとする。(図5)

1970年7月調査の時得られた菌について巨大コロニーをつくり観察した結果を表3にまとめて整理した。

表2

調 年	查 月	pH			DO			W. T.			透明度 cm	乾燥重量 mg/ /10ℓ	強熱減量 mg/ /10ℓ
		表	中	底	表	中	底	表	中	底			
1968.	5.	7.2	7.2		9.50 97	9.56 98	9.35 % 96	17.2	17.2	17.1	130	41.2	15.0
1968.	8.	7.2	7.2	7.2	7.43 96	7.64 97	7.74 % 98	28.4	28.2	28.0	200	26.3	6.31
1968.	11.	7.2	7.2	7.2	10.20 96	10.35 97	10.43 % 89	12.8	12.8	13.0	—	39.2	10.8
1969.	1.	7.2	7.2	7.2	11.28 93	11.66 92	11.72 % 93	7.4	5.4	5.4	220	25.4	8.2

	Fungi	Yest like body
i) Water (2 m layer)	1. 2×10^2	5×10^2
	2. 19×10^2	46×10
	3. 17×10^2	3×10^2
ii) 0.8μ filter 3液	1. 0	0
	2. —	—
	3. —	—
iii) (0.8μ filter, 3液), 30 sec. sonic	1. 0	0
	2. 2×10^2	24
	3. 5×10^2	16
iv) mud (surface layer 0~4cm) (0~2)	1. 13×10^2	31×10^3
	2. 41×10^2	48×10^3
	3. 14×10^2	21×10^3
v) mud (lower layer 21~24cm) (21~25)	1. 2×10^2	2×10^2
	2. 5×10	36×10
	3. 7×10^2	19×10

注 1. 1968年5月, 2. 1968年8月, 3. 1968年11月 調査

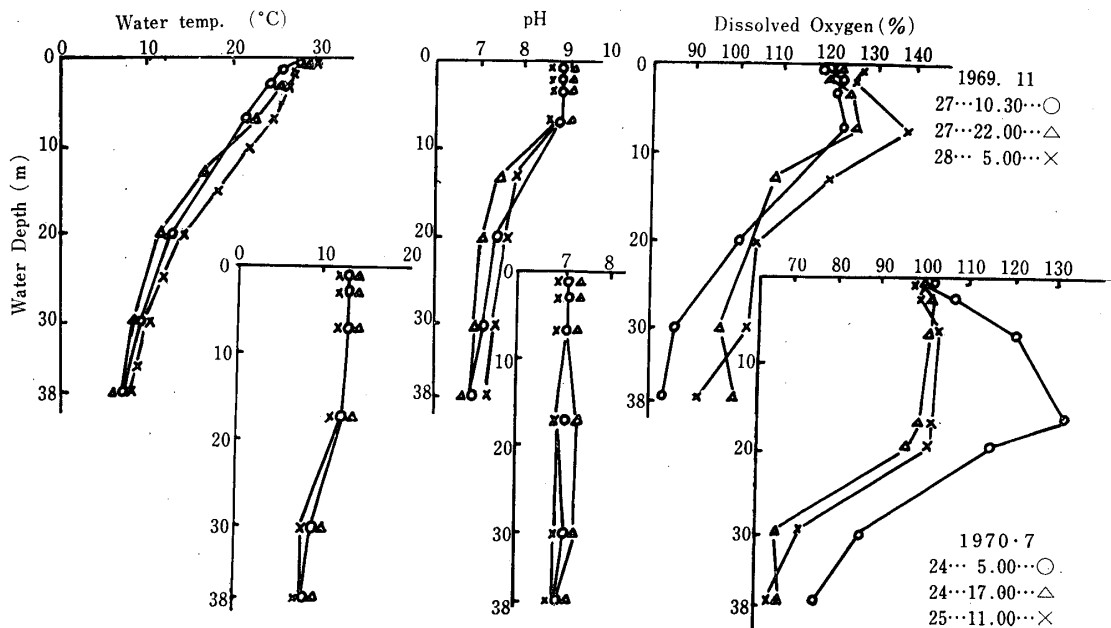


図 4 水温 pH 溶存酸素の調査結果

Population Dencity (n/ml)

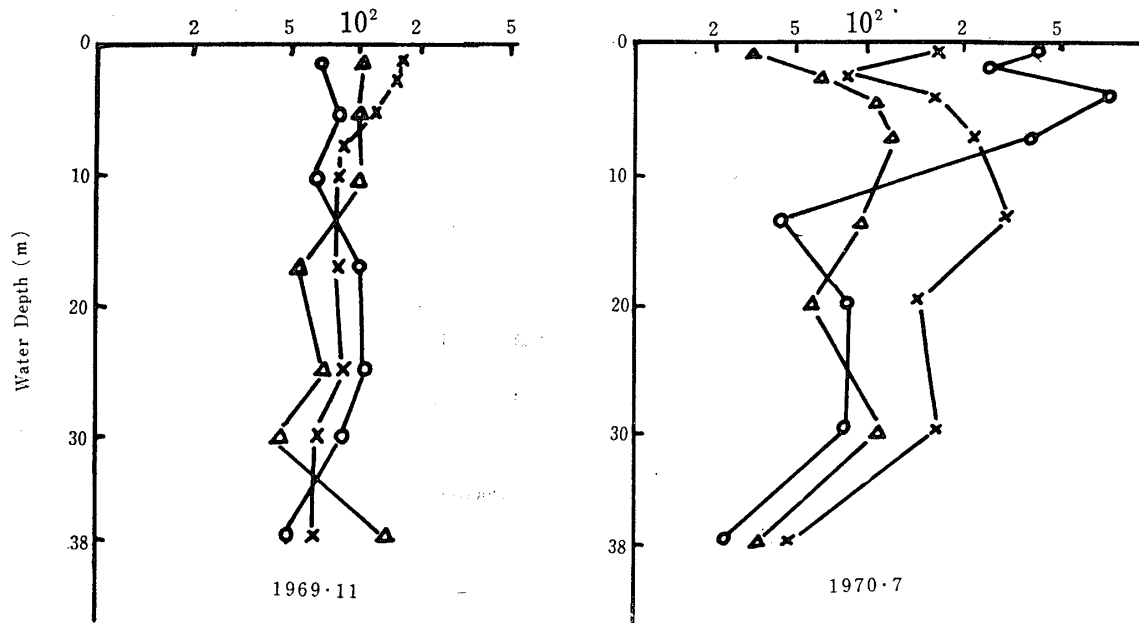


図 5 真菌類の調査結果

表 3 糸状菌用培地における周落

コロニー No.	大きさ mm	表面の色	裏面の色	菌叢の 高さ mm	状 態
1	24	白・灰緑・白	卵 白 色	3	同心円状, 密ビロード状
2	シャーレ	白	〃	2	羽毛状, 中央密
3	29	灰・緑・灰緑・白	〃	2	中央凸凹, 密ビロード状
4	29	うぐいす色	褐 色	2	中央5本のひだ, 密ビロード状
5	72	緑 ・ 白	緑がかった卵白色	2	粗ビロード状, 細い羽毛状
6	23	ピンク・灰緑	黄 土 色	3	中央凸凹, 密ビロード状
7	シャーレ	緑 褐	卵 白 色	2	放射状, 粗粉状
9	4	肌 色	赤・乳白色	2	しわしわ, ビロード状
10	20	卵 ・ 灰 緑	黄	3	中央凸凹, 密ビロード状
11	26	灰・白・灰緑	緑がかった卵白色	2	中央粗ビロード状, 周密ビロード状
12	73	灰褐・灰緑・白	〃	2	中央凸凹, 粗ビロード状, 細い 羽毛状
13	46	〃	〃	2	〃
14	74	〃	〃	2	中央大きいひだ, 粗ビロード状 細い羽毛状
15	71	〃	〃	2	中央凸, 粗ビロード状, 細い羽毛状
16	4	肌 色	肌 色	2	しわしわ, ビロード状
17	19	卵 ・ 灰 緑	黄	3	中央凸凹, 密ビロード状
18	9	深 緑	黒	2	粗ビロード状
19	41	濃 緑 ・ 白	山 吹 色	2	中央密ビロード状, 綿毛状
20	シャーレ	か き 色	赤	14	綿毛状
21	4	ピ ン ク	赤・乳白色	1	平 滑

22	21	肌 色	乳 白 色	2	粗, ピロード状
23	6	ク	ク	1	皿状, しわしわ
24	4	緑	赤	1	粗ピロード状
25	18	緑	ロ ー ズ 色	1	密ピロード状
26	1	濃 緑	黒	1	湿った状葉
28	34	白	ロ ー ズ 色	3	綿毛状
29	3	濃 緑	黒	1	粗ピロード状
30	1	緑	赤 黒	1	粗ピロード状
31	12	白・灰・緑	ロ ー ズ 色	1	粗ピロード状
32	10	灰緑・黄	褐色・赤	2	粗ピロード状
33	7	灰緑・黄・白	ロ ー ズ 色	2	盛り上り, ピロード状
34	9	灰 褐	褐色・白	2	綿毛状

25°C 72時間培養 (植えかえ '70.7.31, 記録 8.3)
 サブロー寒天培地

む す び

湖水中の真菌培養には前処理, 培地, 培養条件など検討すべき点が少なくない。また真菌コロニーの算定に対する評価にも問題がある。さらに大事な検定菌種の同定のための適当な分類書がなく, 菌類の種属は実際のところ完成されたものがない現状である。正確に同定するために手許に標準株を用意したり, またある属だけのある程度まとめられたモノグラフなど準備して同定を手がけるより方法がない。

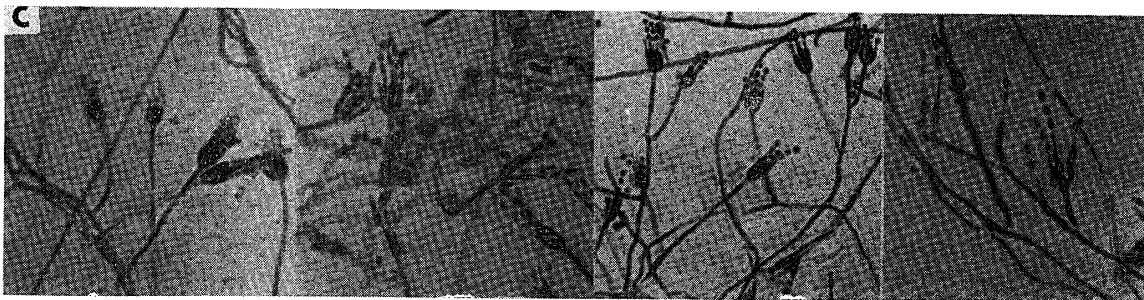
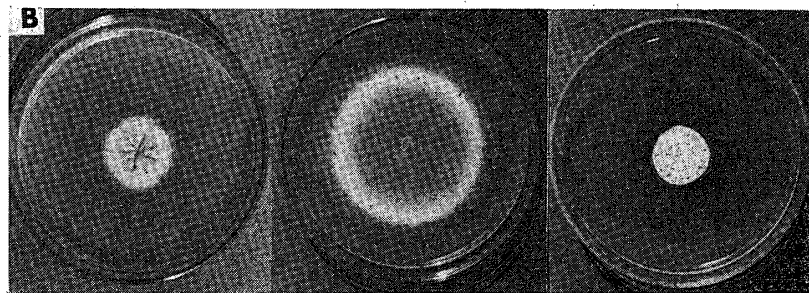
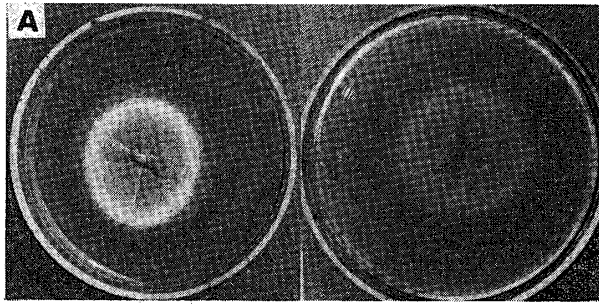
ともあれびわ湖沿岸2ヶ所につき年間を通じ, 時間毎に, 深度をかえて採取した湖水の真菌の検出状況を諸因子とむすびつけて一応の報告とし, 今後充実したものとしたい。

最後にこの調査研究を行なうにあたりご指導下さった, 名大医真菌研究施設の阿多教授ならびに調査に協力いただいた本学八木助手に対し深く感謝の意を表します。

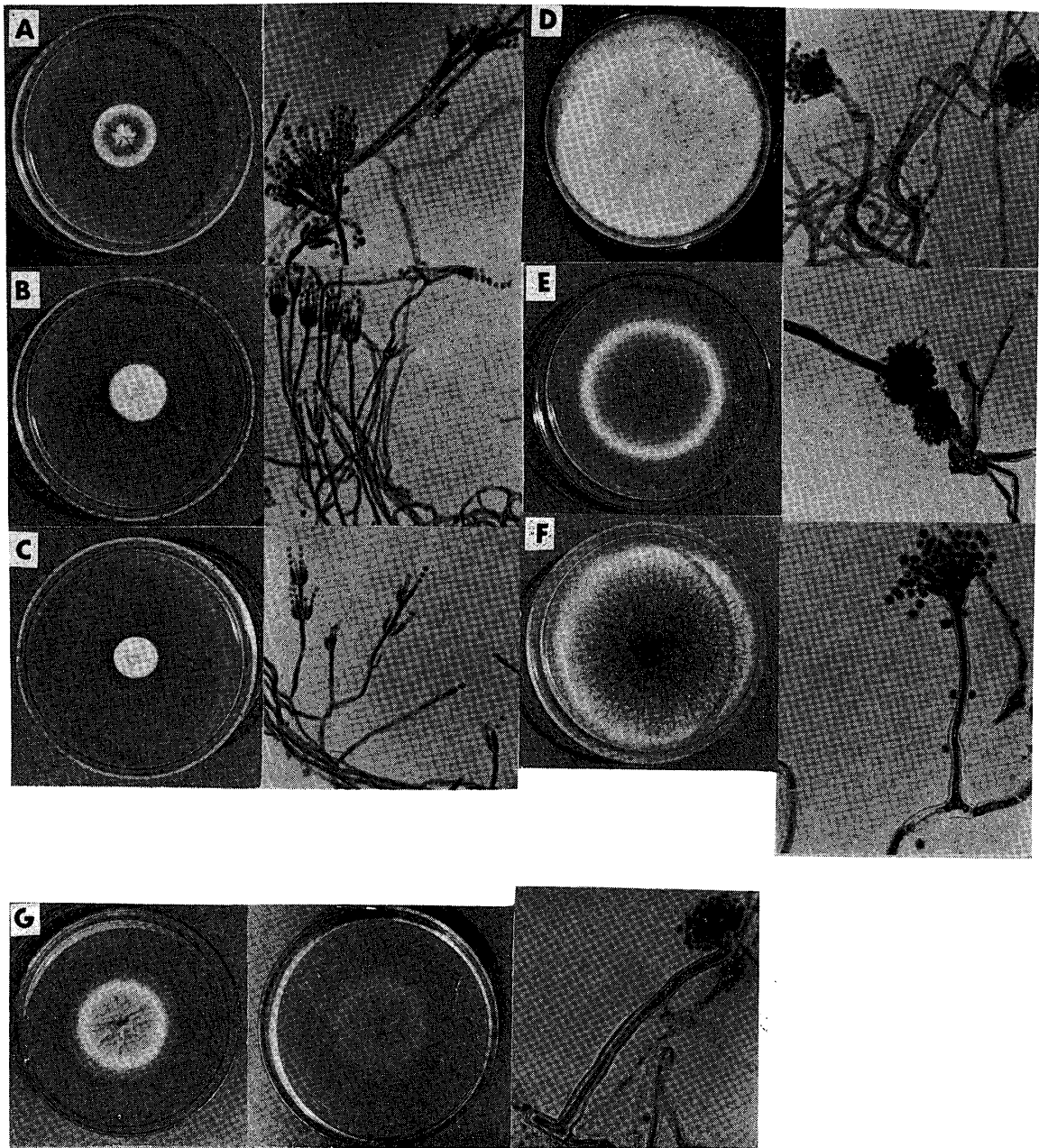
最後にスライド培養の結果を写真におさめたのでその一部を示す。

参 考 文 献

- Tubaki, K. : (1962) Trans, Mycol, Soc. JAPAN, 3, 29,
 鈴木 静夫 (1996) 用水と廃水, 3. 351,



- A : 平板培地上の巨大コロニー (表面 裏面)
 B : 発育速度の例 表面 (表 3. コロニーNo. 4, No. 15 *Asp. sp.*, No. 6)
 C : プレプレート培養法による顕微鏡写真
 (表3. 左より No. 17 *Pen. sp.*, No. 5, No. 1 *Pen. sp.*, サブロー培地より)



平板培地上の巨大コロニーとプレパラート培養

- A: *Pen. urticae* series (表 3. No. 3)
 B: *Pen. sp.*
 C: *Pen. sp.* (表 3. No. 10)
 D: *Asp. sp.*
 E: *Asp. sp.* (表 3. No. 5)
 (ローズベンガル加糸状菌用培地をわずかに脱色)
 F: *Asp. wentii* (表 3. No. 7)
 (ローズベンガル加糸状菌用培地を脱色, 成長は速い)
 G: *Asp. sp.* サブロー分離培地より純粹培養
 表面, 裏面, 顕微鏡写真