

硝子に發生する絲狀菌の研究 第2報

培養上の諸條件に就て¹Studies on the Glass-mould. II
Conditions for its cultivation大槻虎男 (Torao Ohtsuki)
Botanical Laboratory, Faculty of Science,
Ochanomizu University, Tokyo

Résumé

Many strains of the glass-mould, *Aspergillus glaucus* var. *tonophilus*, were cultivated under artificial conditions and their physiological properties were studied. Results obtained are as follows:

1. They grow best in culture media of pH 5-6. Optimum temperatures are 27°C - 30°C (Table 1, 2.)

2. They grow almost to the same extent on synthetic media such as Czapek's, Raulin's and Richards' more rapidly on a natural fungus medium (malt medium), but very insufficiently on natural bacteria medium (bouillon medium, adjusted to pH 5.5 before autoclaving) (Table 3).

3. Oligodynamic actions of heavy metal ions, Cu, Zn, As, Mn, Se, Co, Ni, are researched. Their accelerating actions upon the growth of fungi are not so remarkable (Table 5).

4. Concerning the nutritious value of nitrogen and carbon sources for the growth of fungi, ammonium salt is higher than nitrate and organic nitrogen compound. As carbon sources sugars and alcohols are comparatively good, but polyoses and organic acids are not favourable (Table 4, 6).

5. By means of adding CaCl₂ to the culture medium containing 10% NaCl, antagonistic action of calcium ion against sodium ion is tested.

緒言 光學器械のレンズ, プリズム等硝子部分に絲狀菌發生し, 曇りを惹起することは高温多濕の氣象を有する我國及び季節風帶諸國土に特有な現象で歐米には見られない。従つて歐米には研究報告がない。我國に於ては手島安太郎氏¹⁾の研究がある。私共はその追試を行つて多數の菌種を得た。そのものは手島氏の硝子菌と稱したものと同じであるに拘らず, 自然に硝子に發黴する條件では發芽が困難であることを知り, 眞の硝子菌を別に求めざるを得なかつた。諸方法により眞の硝子發黴菌の探索を試み, 遂に糖類, 食鹽

¹ Contributions from Department of Biology, Faculty of Science, Ochanomizu University, No.3.

等滲透壓活性の物質を多量に培地中に添加することにより、その上に特殊な生理的性質を備えた糸状菌を分離することに成功した。*Aspergillus glaucus* var. *tonophilus* がこれである。我々はこれを以て眞の硝子菌とする。^{2) 3)}

以上第1報に續き本報告では培養中に現われる生理的性質を實驗的に解明しようとして、培養上の諸實驗とその觀察を行つた。本菌の形態學上の性質は第1報告に記述した。

實驗及び結果

1. 水素イオン濃度との關係 手島氏の記す所によると硝子菌は普通よりアルカリ性のpHを適當とする。大部分は6.5が最適で中には7乃至9のものがある。概してpH7以上の培地に良好に發育する。同氏は硝子面に溶出するアルカリに菌が適應したと解する。

我々は好稠菌を實驗菌として、この點に關する實驗を試験管内液体培地を使用して行う。即ち食鹽15%添加麥芽培地6ccに對し3ccの緩衝液を加えpHを3から10まで調整する。殺菌操作後出来るだけ平等に孢子を接種し、30°Cの溫度に保ち、發育の状態を觀察する。菌株は分離源を異にする14株を供試する。接種後4日で發育が認められる。8日で培養を打切り、最終pHを検する。代表的な3株に就て得た結果のみを挙げる。

1. No.1. を代表とす。No.2 No.4, No.5, No.9, No.12 がこれに類する。最も發育の良好なるもの。實驗結果は發育初期にはpH5—6に生え、後期にはpH3—1に發育範圍が廣がる、pHは菌培養の進行と共に變化し、特にアルカリ性側のものが酸性に偏して來る。

2. No.8 を代表とす。No.10, No.11, No.15 がこれに類する。發育程度の中等度なるもの。この場合にはpH5に先ず發育が認められ徐々に擴つて行く。pHは同じく酸性側に向つて變化する。

3. No.6 を代表とす。No.7, No.14 がこれに類する。發育の最も悪いもの。8日の後辛うじて5—6に發育が認めらる。pHの影響が敏感に現われている。

Table 1. Growth of the fungi on various media, adjusted to different pH-values.

Strain	pH Time	pH							
		3	4	5	6	7	8	9	10
No. 1.	5 days	—	—	+	+	—	—	—	—
	6 "	++	++	+++	+++	+	—	—	—
	8 "	+++	+++	+++	+++	++	—	—	—
	end pH	3.4	4.0	4.9	5.4	6.2			
No. 8.	5 days	—	—	+	±	±	—	—	—
	6 "	—	—	+	+	+	—	—	—
	8 "	—	—	+++	+++	++	—	—	—
	end pH			4.8	5.4	6.0			
No. 6.	5 days	—	—	—	—	—	—	—	—
	6 "	—	—	±	±	—	—	—	—
	8 "	—	—	±	±	—	—	—	—
	end pH			5.0	5.4				

— Mycelia-formation absent

± Mycelia-formation doubtful

+ Only few colonies are observed, scattering on the medium surface

+++ Mycelia are formed most abundantly all over the medium surface

上表から明かな如く最適の pH は5—6 の中間に存し普通菌種の最適 pH と異なる所がない。No.3. で唯1例初發 pH 8に3日目に發芽のが認められたが該培養液の pH はその時 6.8 を示した。全菌株の最適 pH を記すと No.1. 5.0, No.2. 5.5, No.3. 5.2, No.4. 5.0, No.5. 5.5, No.6. 5.2, No.7. 6.0, No.8. 5.5, No.9. 5.5, No.10. 5.5, No.11. 5.5, No.12. 5.5, No.14. 5.5, No.15. 6.0 となる。

我々の考えでは本菌の發育は硝子面に限られたものでなく、乾燥物体一般に起るのであるから、特に硝子のアルカリに適應していなくともよろしいわけである。

2. 温度との關係 本菌は暑熱時に盛に發生するから比較的高温が豫期される。實驗は好稠菌3株を麥芽汁に 15% NaCl を添加、最適 pH に調整し寒天5%を加えた固体培地で行う。6種の温度条件を與え、7日間培養する。結果は第2表に示す。

Table 2. Growth of the fungi at different temperatures.

Temp Strain	37°C	33°C	30°C	27°C	24°C	20°C
No. 1.	+	++	+++	++	+	-
No. 5.	++	+++	+++	++	+	±
No. 7.	-	++	+++	+++	++	-

No.1. は 30°C に No.5 は 30—33°C に No.7 は 30—27°C に夫々最適温度が存する。普通よりはやゝ高温を好むというべきである。我々が好稠菌に関する實驗の温度として 30°C を選ぶ理由もここに存する。

3. 培地組成との關係 本實驗施行目的の1は菌發育に高滲透壓培地なる条件外に何等かの物質的條件の存否を検すること、2は高滲透壓培地でも菌絲体造成は普通菌に比し不良であるから刺戟物質其他の添加により發育を強大にすることを豫期したことである。

1. 天然培地と合成培地 我々は菌分離にはすべて麥芽汁食鹽培地を使つた。これと合成培地との比較を行つた。普通な合成培地である下記3種(食鹽加)を供試する。

1.	2.	3.
(Czapek's medium)	(Raulini's medium)	(Richards' medium)
MgSO ₄ 0.5	Saccharose 70	ZnSO ₄ 0.07 KNO ₃ 10
K ₂ HPO ₄ 1.0	Tartaric acid 4	FeSO ₄ 0.07 KH ₂ PO ₄ 5
KCl 0.5	NH ₄ NO ₃ 4	K ₂ SiO ₃ 0.07 MgSO ₄ 2.5
NaNO ₃ 2.0	K ₂ CO ₃ 0.6	Water 1.5L. Saccharose 50
Saccharose 30.0	(NH ₄) ₂ HPO ₄ 0.6	Water 1L.
FeSO ₄ trace	MgCO ₃ 0.4	
Water 1L.	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.25	

天然培地としては細菌用のブイオンを供試する。組成は鯉節浸液(4gを200cc水にて浸出)100cc, ペプトン 0.6g, 食鹽 10g, 水 10cc, pH 5.5。

表を概観すると合成培地間には著しい相異は見られない。發育初期に於ける差も10日位でほぼ同程度に平均される。天然培地の麥芽は最も良好である。又 Bouillon は著しく悪い培地である。10日を過ぎてよく生えて來ない。3種に發芽が認められ、1種に菌絲体造成があつたに過ぎない。

Table 3. Growth of the fungi on various media.

Strain No.	Synthetic media									Natural media					
	1(Czapek)			2(Raulin)			3(Richards)			4(malt)			5(bouillon)		
	5	7	13	5	7	13	5	7	13	5	7	13	days		
1	+	++	+++	+	++	+++	+	+++	+++	+	++	+++	-	-	±
2	+	++	+++	+	++	+++	-	++	+++	+	++	+++	-	-	-
3	+	++	+++	+	++	+++	+	+++	+++	+	++	+++	-	-	±
4	+	+	++	+	++	+++	+	++	+++	+	+++	+++	-	-	+
5	+	+	+++	-	+	+++	+	+	++	++	+++	+++	-	-	-
6	-	+	+++	+	++	+++	-	+	+++	+	++	+++	-	-	-
7	-	+	+++	-	+	++	+	+	++	++	+++	+++	-	-	-
8	+	++	+++	+	+	++	-	+	+++	+	+++	+++	-	-	-
9	-	+	+++	-	+	+++	-	+	+++	+	++	+++	-	-	-
10	-	+	+++	-	+	+++	+	++	+++	+	++	+++	-	-	-
11	-	+	+++	-	+	+++	-	+	+++	-	+	++	-	-	-
12	+	++	+++	+	+	++	+	++	+++	+	++	+++	-	-	-
13	-	+	++	-	+	+++	-	+	++	+	++	+++	-	-	-
14	-	+	++	-	+	+++	+	+	++	-	+	++	-	-	-
15	-	+	++	-	+	+++	+	++	+++	+	++	+++	-	-	-

2. 硝酸鹽とアンモニウム鹽 無機窒素源としては普通硝酸鹽とアンモニウム鹽が使用される。兩者の比較を試みる。即ち次の基礎培地を造り、これに夫々の窒素源を加える。

蔗糖	30g	KH ₂ PO ₄	0.5	FeSO ₄	trace
NH ₄ Cl	5.5	MgSO ₄	0.5	NaCl	100
Water	1L.				

Table 4. Growth of the fungi on media of two different N-sources.

	Strain Time	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15														
		KNO ₃ - medium	5 days	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	8 "	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+
	13 "	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++
NH ₄ Cl- medium	5 days	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	8 "	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+
	13 "	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

發育初期にはアンモニア窒素の方良好で後期には兩者同等となる。本菌は種々の點から物質代謝能力の弱小が窺われる。細胞内にては NO₃ は NH₄ を經て蛋白合成に利用されるとすれば直接に利用可能な NH₄ が早期の發育に都合よきことが了解される。

3. 重金屬イオンの添加 從來絲狀菌の發育に重金屬イオンの微量が好影響を及ぼすとされ或はその不可缺が唱えられて來た。よつて本菌に對する6種の重金屬イオン微量の影響を試験する。基礎培地は前實驗使用と同じ。5ccに磷酸緩衝劑 2.5ccを加え pH 5.8とし、50cc容の Erlenmeyerflask に 20cc 培地を入れ、それと硫酸ニツケル (NiSO₄)、セレン酸ソーダ (Na₂SeO₃)、砒酸ソーダ (Na₂AsO₃)、硫酸銅 (CuSO₄)、鹽化亞鉛 (ZnCl) を 10⁻⁶ モルと 2×10⁻⁶ の2種の濃度になるよう添加する。對照には全然加えない。食鹽は10%添加、供試菌は下記4株、溫度 30°C、發育はこの場合にも肉眼的に觀察さる。

乾燥菌体量は少く、誤差が多いことを恐れたためである。

結果の詳細は記述を省き、次に各イオンの添加の下に見られた發育の良不良の順序を示すに止める。

Table 5. Series of heavy metal ions affecting the growth of the fungi.

Strain	Time	Metal ions 10^{-6} mol.	Metal ions 2×10^{-6} mol.
No. 1.	4 days	Zn>Mn>Cont>As>Ni>Cu, Se	As>Cont>Mn, Cu>Zn, Ni, Se
	10 "	Zn>Cont>Mn, As>Ni>Cu>Se	As, Cu, Mn, Cont>Ni>Zn>Se
No. 5.	4 days	Zn>Mn>Cont, Cu, Ni>As>Se	Cu, Cont>Mn, Zn, Ni>As>Se
	10 "	Zn, Ni, Mn, Cont>As>Se	Zn, Cont>As>Cu>Ni>Mn>Se
No. 7.	4 days	Cu>Ni>Cont>Zn>As>Mn>Se	Mn, Cont, As>Cu>Se>Ni, Zn
	10 "	Cu>Cont>Zn, Mn, As, Ni>Se	As, Mn, Cont>Cu, Se>Ni>Zn
No. 8.	4 days	Mn, Ni, Zn, Cu>Cont>As, Se	Cu<As>Cont Se>Zn, Ni, Mn
	10 "	Cu>Mn>Cont, As, Zn, Ni, Se	As, Cont>Cu>Se>Mn>Ni>Zn

對照は7日後は全液面に薄い菌蓋を造り、或ものは菌蓋がより厚くなり、又他のものは集落が點在してより不良な發育を示す。又或ものは全然發育を肉眼的に認められない。これは表中イオン名の下に線を引いて現わす。 2×10^{-6} 添加の際には害作用が著しく、發育を全く阻止するものがある。それを除いては良不良の幅は狭く、その影響は甚しく著明でない。重金属イオン添加により顯著な發育促進を期待出来ない。

こゝに付け加えて鹽化石灰添加の實驗結果を示す。或種のカチオンのみ多量に存すると害作用が現われ、他の拮抗的カチオンを加えると中和される。本菌の培養には Na^+ のみ多量に存するため發育が悪いとの可能性を考慮し、 Na^+ と拮抗的に働くと知られた Ca^{++} を $1/20$ 量添加して發育を検する。基礎培地は麥芽汁、食鹽 10%、鹽化石灰 0.5%。pH 5.5。固体、液体兩培地及び夫々の對照に就き實驗を行つた。菌株は15株。

結果は多少の變化はあるがほぼ對照に類し重金属イオンの場合と同じく、 Ca^{++} 添加により顯著な發育改善を望めない。

4. 炭素源に関する實驗 絲狀菌の發育に役立つと知られた炭素化合物即ち糖類、多糖類、有機酸類、アルコール類を唯一炭素源として本菌に與え、その發育状態を検する。基礎培地としては前掲の NH_4Cl を窒素源とするものを用い、蔗糖 3g の代りに同量の他の炭素化合物を加える。半量の磷酸鹽緩衝液を加え pH を 5.5 とする。食鹽濃度 10%。50cc 容の Erlenmeyer に 20 cc の培養液を入れ、孢子接種する。有機物の存在で高壓殺菌をすると分解變質を來すことが往々ある。これを避けるために、炭素源溶液は別けて殺菌して後に混合する方法を取つた。供試炭素源は 6 炭素糖 (葡萄糖, 果糖, マンノース, ガラクトース), 2 重糖 (麥芽糖, 蔗糖, 乳糖), アルコール (マンニツト, ソルビツト, グリセリン) 多糖類 (澱粉, イヌリン, 蒟蒻マンナン, グリコゲン), 5 炭素糖 (キシロース, アラビノース), 脂肪酸 (醋酸, 酪酸), オキシ酸 (乳酸, 枸橼酸, 林檎酸), 琥珀酸, キナ酸の 22 種化合物である

以上の物質は必ずしも多量に使用することを許されないので菌株は No. 1, No. 5, No. 7, No. 8 の 4 株に制限する。有機酸は苛性ソーダ 1N 溶液で中和する。高張培地上の胞子を供用す。

Table 6. Nutritious values of various carbon sources for the fungi.

Strain	Best	Better	Moderate	Poor	None
No.1.	glucose galactose saccharose sorbite	fructose mannose xylose maltose mannite glycerin	arabinose lactose inulin starch konjakmannan butyric acid lactic acid	glycogen succinic acid quinic acid acetic acid	citric acid tartaric acid malic acid
No.5.		glucose fructose galactose mannose saccharose maltose mannite sorbite quinic acid glycerin acetic acid	xylose arabinose lactose inulin konjak- mannan butyric acid	starch glycogen citric acid malic acid	malic acid succinic acid
No.7.	glucose fructose mannose saccharose mannite	galactose xylose arabinose maltose sorbite glycerin	inulin konjak- mannan quinic acid lactic acid	lactose starch glycogen succinic acid acetic acid	citric acid tartaric acid malic acid
No.8.	glucose fructose galactose mannose saccharose mannite sorbite	xylose arabinose maltose glycerin	lactose inulin konjak- mannan succinic acid quinic acid lactose	glycogen butyric acid acetic acid	citric acid tartaric acid malic acid

結果は發育經過等の詳細を省き、概略を表示するに止める。發育の等級は5に分つ。最良 (best) とは接種後1日で小形白色菌斑所々に生じ、約3日で菌蓋が培養液全面に生じ、7日で綠色孢子の生ずるもの。これを以てしても尙菌蓋薄く、こうじかび、くろかびに比較すると $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{10}$ 程度に過ぎない。佳良 (better), 良 (moderate) はやゝ劣つて接種後1日或は2日で小菌斑全面に生じ7日に至るも液面全体を覆うに至らない。佳良とは菌蓋面積が $\frac{1}{2}$ 以上を占め、良とは $\frac{1}{2}$ 以下を占める。不良 (poor) とは培養液と壁面の接觸部に限られて片々たる小菌糸斑が辛じて認められるものを指す。不發育 (none) とはそれもないものを指す。

上表示を要約すると6炭素糖が最もよく、それを基体とする重糖これに次ぎ、多糖類及び

5 炭素糖は餘り良好でない。高級のアルコールは總じて良好でソルビット、マンニットは6 炭素糖に匹敵し、グリセリンはやゝ劣る。有機酸類は糖類に劣る不良な炭素源をなす。醋酸、酪酸はまだよい方で枸橼酸、林檎酸の如きオキシ酸は供試炭素源中最不良である。

要するに本菌も他の絲狀菌と炭素源利用に就ては大なる差を示さない。たゞ一言を要するのは多糖類利用が劣ることであり、これに關聯して我々は本菌のポリアーゼ生産力の實驗を試みた。即ちイヌリン、蒟蒻マンナン、澱粉を各3%に唯一炭素源として添加した培地に4菌株を接種し1月の後培養液を取り還元性を檢し、又菌蓋を集め磨碎し糜汁をトルオールが存在下に各4%に上記3種の多糖類を加えて、37°C 7日後還元性を檢した。

Table 7. Results obtained by testing three kinds of polyases, which indicate the absence of amylase.

Strain \ Substrate	No.1.		No.5.		No.7.		No.8.	
	in vivo	enzyme	in vivo	enzyme	in vivo	enzyme	in vivo	enzyme
inulin	+	+	+	+	++	+	++	+
konjakmannan	-	+	-	+	-	+	-	+
starch	-	-	-	-	-	-	-	-

結果を見るとイヌリン(生菌, 酵素), 蒟蒻マンナン(酵素)には糖化が認められる。アミラーゼの存しないことは、*A. oryzae*, *A. niger*等の既知菌株が何れもアミラーゼを有するに對比し意外であつた。本菌は物質代謝が低度で、エネルギー源をなす炭素源も多くを要しないと推せられる。

要約 硝子發黴菌 *Asp. glaucus* var. *tonophilus* の液体或は固体培養を行い、水素イオン濃度、溫度の關係を明かにし、次に諸種の培養基を比較した。NH₄ 鹽とNO₃ 鹽では前者やゝ勝る。重金属イオンは10⁻⁶程度では或ものは菌發育を促進するが甚しくはない。本實驗の行われた条件下では食鹽(ナトリウムイオン)の害作用がカルシウムイオンで中和されることはない。本報告の諸實驗には總て10—15%の食鹽が培地中に添加されている。食鹽濃度並びに糖類濃度の關係は培地製作に根本的に重要であるが紙數の都合で第3報に譲る。

本報告諸實驗は齊正子、上野千代子兩氏の協力の下に行われたことを附記する。本研究には文部省科學研究費をあてた。

文 献

- 1) 手島安太郎 光學器械レンズ面に發生する絲狀菌及其豫防法, 講演筆記, 1934.
- 2) T. Ohtsuki: Proc, Imp, Acad, Tokyo. vol. 19 (1943), 312 u. 688.
- 3) 大槻虎男, 須田善子, 齊正子 資源研彙報 17—18. (柴田紀念號), 1950, P. 69.