

土壌カビの簡便な増殖・観察法

Simple Methods for Growth and Observation of Soil Filamentous Fungi

岩 井 草 介*

Sosuke IWAI*

要旨

土壌には多くのカビ（糸状菌）が生息し、分解者として土壌生態系の食物連鎖や物質循環に大きな役割を果たしている。土壌中のカビを教材として活用するために、本研究では土壌カビの簡単な増殖・観察法を検討した。その結果、土の上に輪切りのバナナを置くだけで土壌中のカビを容易に採集・増殖できることを見出した。さらに、バナナを基質としてスライドガラス上で土壌カビを培養することによって、カビの孢子囊などを簡単に顕微鏡で観察できた。増殖した土壌カビについて、デンプン寒天培地を用いることによってデンプン分解（アミラーゼ）活性を検出できることも示した。

キーワード：土壌微生物 菌類 カビ（糸状菌） 分解者 教材

1. はじめに

土の中には多様な生物が生息している。特に微生物はわずか1 gの土に億単位の数が生息していることから、土は「微生物の宝庫」とも呼ばれる¹⁾。土壌中の微生物は、細菌を主とする原核生物、および真核生物の2つに大きく分けられる。土壌の真核微生物には、原生動物や菌類などがいる。これらの土壌微生物は、生物遺体や有機物の分解者として、土壌生態系の食物連鎖や物質循環に大きな役割を果たしている。

菌類は、光合成を行わず、外部からの吸収によって栄養を摂取し、従属栄養生活を営む多細胞体制の真核生物である^{2), 3)}。菌類の中でも、菌糸が錯綜したものを“カビ”（糸状菌）と呼んでいる。土壌に多く生息するカビとしては、接合菌類のケカビ・クモノスカビや、不完全菌類のアオカビ・コウジカビなどがいる⁴⁾。接合菌類は、無性生殖では孢子囊胞子を形成して繁殖するが、環境条件によっては有性生殖も行い、菌糸に生じた配偶子囊の接合によって接合胞子を形成する。一方、不完全菌類は有性生殖器官が発見されていない菌類全般を指し、無性胞子としてはさまざまな形態の分生子を形成する。本稿では以降これらの土壌に生息するカビを土壌カビと呼ぶ。土壌カビは、菌糸先端細胞から酵素を分泌し、糖類からセルロース・ケラチン質などの難分解性の高分子基質に至るさまざまな物質を分解して吸収することによって、土壌中で腐生的に生

活している。

菌類や細菌などの微生物は、生態系における分解者として中学校の理科などで扱われている。分解者としての微生物をよく理解するためには実際にその微生物を観察することが望ましいが、微生物は肉眼では見えないことが多く、野外での採集は手間がかかる。土壌細菌やカビについては、寒天培地を用いて採集・培養することができるが⁵⁾、土壌中のカビは細菌よりも個体数が少ないため、寒天培地上でのコロニーの出現頻度は高くはない。空気中に飛散しているカビを簡単に採集して繁殖させる方法としては、寒天培地の代わりに食パンを用いる方法が提案されている⁶⁾。土壌カビについては、果実などを用いることによって実験室や野外で簡単に増殖させることができる⁴⁾。以上のように食材を基質としてカビを増殖させる方法は、1種類のカビを単離することはできないものの、寒天培地を作製する手間が省けるため、学校では有用と考えられる。本研究では、土壌カビを教材としてより活用するために、学校でもできるような簡単な土壌カビの増殖・観察法を検討した。その結果、土の上にバナナを置くだけで土壌中のカビを容易に採集・増殖できることを見出した。さらにバナナを基質としてスライドガラス上で土壌カビを培養することによって、カビの孢子囊などを簡単に観察する方法も考案した。分解者としての役割を理解するために、増殖した土壌カビを用

*弘前大学教育学部理科教育講座

Department of Science Education, Faculty of Education, Hirosaki University

いてデンプン分解（アミラーゼ）活性の検出も試みた。以下では、順にその実験方法と結果について述べる。

2. 実験方法と結果

2-1 バナナを用いた土壌カビの採集・増殖

検討の結果、安価で1年を通じて入手が容易な材料であるバナナを基質として用いることによって、土壌カビを容易に採集して増殖させることができた。校庭で採取した生土の上に輪切りのバナナを置いたところ、1週間程度でカビが発生した（図1土あり）。対照としてバナナのみを容器に放置した場合、カビの発生は有意に遅かったことから（図1土なし）、土の上に置いたバナナに発生したカビは土壌由来のものと言える。ただし空気中にもカビの胞子は飛散しているので、培養を無菌的に行わない限りは、バナナのみを放置した場合もいずれは何らかのカビが発生する。バナナ上に発生した土壌カビをそのまま実体顕微鏡で観察したところ、菌糸や孢子囊を確認できた（図2）。

以下に、バナナを用いた土壌カビの採集・増殖法の

土あり 土なし

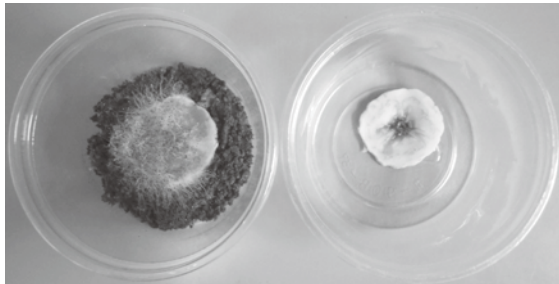


図1 バナナの上に発生した土壌カビ。校舎周辺で採取した生土の上に輪切りのバナナを置き、1週間置いた（土あり）。対照として、バナナだけ1週間容器に置いた（土なし）。写真は容器の蓋を開けて撮影した。

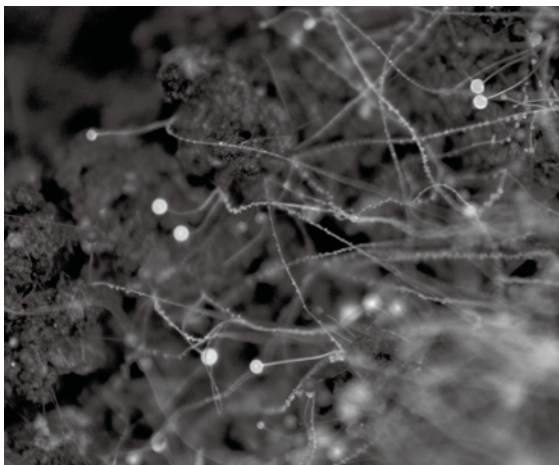


図2 バナナの上に発生した土壌カビの実体顕微鏡による観察。バナナと土の境界付近で成長したカビを観察した。実体顕微鏡 LW-710T（レイマー）に0.5倍補助対物レンズ（レイマー；SK05）を取り付け、LED（レイマー；LDR50）の光を照射して観察した。写真はUSBカメラ WRAYCAM-G900（レイマー）で撮影した。

1例を示す。

- ① 透明な容器（透明丸型カップなど）に採集した生土を敷き詰め、霧吹きで土を軽く湿らせる。
- ② バナナの皮をむき、5 mm 程度の厚さになるように輪切りにして土の上に置く。
- ③ 蓋をして常温で1週間以上置く。
- ④ 蓋を開けてルーペや実体顕微鏡で観察する。

上記の方法では、土壌に多く生息するケカビ類やアオカビ類⁴⁾に似たカビが発生することが多かった。グラウンドの砂などを除きほとんど全ての土壌で速やかにカビの発生が見られたことから、カビはほとんどの土壌に生息していることが分かる。また、土の量を多少減らしても変わらずカビは発生した。これは、1 gの土に個体数にして $10^4 \sim 10^5$ という多数のカビが生息していること⁵⁾を考えると不思議ではない。輪切りのバナナの上に土を置くよりも、土の上に輪切りのバナナを置く方がその後のカビの成長は活発であった。土の上に一定の厚さの果実を置いた場合、その上まで成長できる土壌微生物は菌糸を伸ばすカビ類に限られるため、他の微生物によってカビの成長が抑制されることがないのかもしれない。

2-2 バナナを用いた土壌カビの簡便スライド培養と顕微鏡観察

増殖した土壌カビを顕微鏡で詳しく観察するためにピンセットなどで菌体を採取して通常の方法でプレパラートを作製しても、後述のようにカビの胞子は容易に水中で分散するため、孢子囊は観察できないことが多い。そのため、カビを顕微鏡で観察・同定するためにはスライドガラス上に寒天培地を載せてそこでカビを培養する“スライド培養”がよく行われるが⁷⁾、学校で行うには培地の作製などの作業が煩雑である。そこで、前項でバナナの上に発生した土壌カビはバナナのみを基質として増殖・成長できると考えられるので、それを利用してスライドガラス上でもバナナを用いることによって土壌カビを簡単に培養することができた。

以下に、バナナを用いた土壌カビの簡便スライド培養の1例を示す。

- ① スペーサーとして、スライドガラスに幅5 mm程度のビニルテープの短冊を2本平行に貼り付ける（図3A）。
- ② バナナをメスなどで少量（耳かき1杯分ほど）削り取り、前項で発生した土壌カビを付着させてから、スライドガラス上にある2本のビニルテープ

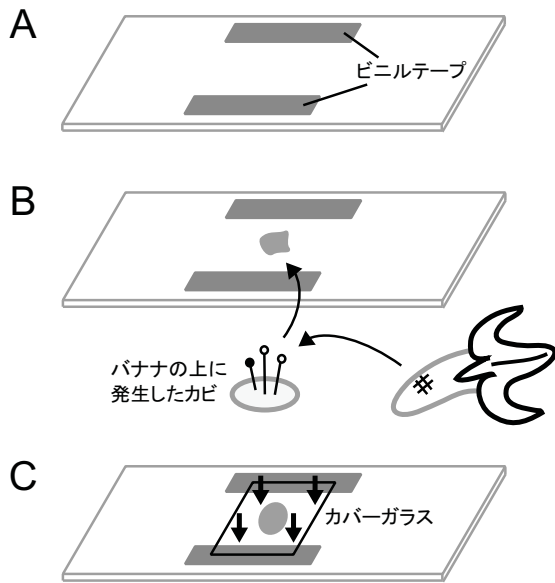


図3 バナナを用いた簡便スライド培養の模式図。詳細は本文参照。

の間に置いて切り刻む (図3 B)。

- ③ バナナの上にカバーガラスを載せ、カバーガラスがビニルテープにつくまで押しつぶす (図3 C)。
- ④ 密閉できる容器 (食品保存容器など) にスライドガラスを置き、湿度を保つために濡らしたちり紙を容器に入れてから蓋をして常温で静置する。
- ⑤ 1晩以上置くとバナナの外側にカビが成長するので、そのまま生物顕微鏡で観察する。

この方法では従来のスライド培養同様に土壌カビはスライドガラスとカバーガラスの隙間で成長するため、40倍の対物レンズで菌糸や孢子囊などの構造を詳しく観察することができた。多数の孢子を含む孢子囊を形成したカビは (図4 A)、接合菌類のケカビの仲

間と考えられる⁴⁾。観察された孢子囊の形態は多様であった。また、分枝した分生子を形成した不完全菌類の仲間と思われるカビも見られた (図4 B)。これらの無性生殖器官の観察から、バナナを基質として増殖した土壌カビにも多数の種が存在することが示唆された。なお、この方法で特にカビの孢子囊を観察したい場合は、バナナにカビを付着させる際、実体顕微鏡などで予め孢子囊の形成が確認された領域を優先的に付着させるとよいだろう。

カビの孢子は気流や水、さらには昆虫や動物などによって分散され、分布を拡大する³⁾。特に土壌に生息するケカビ類の孢子囊孢子の多くは、少なくとも最初は水によって分散すると考えられている⁸⁾。そこで、バナナでスライド培養した土壌カビを用いて、水による孢子囊孢子の分散を観察した。上記のスライド培養に対して、スライドガラスとカバーガラスの隙間からミネラルウォーターを注入したところ、水によって孢子囊の大部分の孢子が分散し、孢子囊柄は離れるのが観察された (図5)。

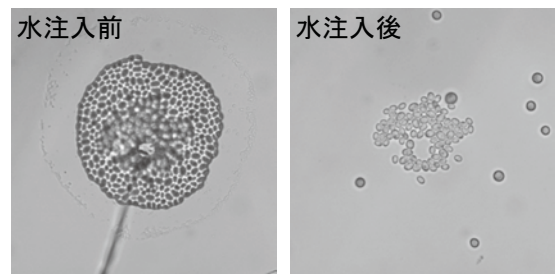


図5 水による土壌カビの孢子囊孢子の分散。スライド培養した土壌カビの孢子囊を図4と同様に観察してから (水注入前)、スライドガラスとカバーガラスの隙間から南アルプス天然水 (サントリー) を数十マイクロリットル注入した (水注入後)。スケールバーは50 μ m。

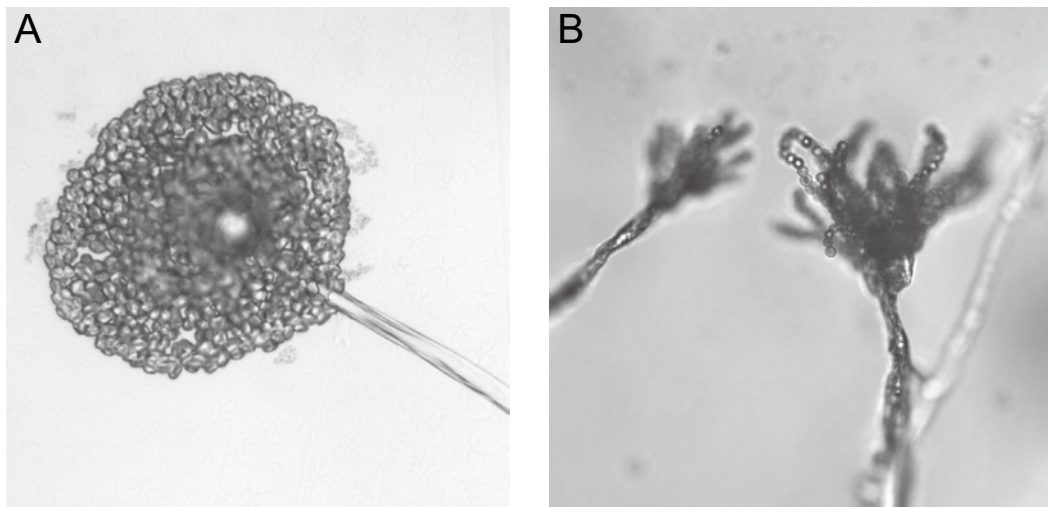


図4 バナナを用いてスライド培養した土壌カビの顕微鏡観察。生物顕微鏡 CH30 (オリンパス) で40倍の対物レンズを用いて観察し、USBカメラ WRAYCAM-G900 (レイマー) で撮影した。スケールバーは50 μ m。
A: 接合菌類の孢子囊。B: 不完全菌類の分生子。

元々スライドガラスに付着していたものと思われる。

2-3 土壌カビによるデンプン分解活性の検出

土壌カビの分解者としての役割を理解するために、前々項でバナナの上に発生した土壌カビを用いて、デンプンの分解（アミラーゼ）活性を検出した。活性の検出は、以下のようにデンプン寒天培地とヨウ素液による染色を用いて行った。培地の成分がデンプンと寒天だけだとカビの成長は遅いので、炭素源以外の栄養として酵母エキスなどを含む“マギー化学調味料無添加ブイヨン”（ネスレ）も培地に添加した。化学調味料無添加ブイヨンには、寒天培地作製の際に培地表面に油分がたまらないという特長がある⁹⁾。ただしカビ以外の細菌などの増殖を抑えるために、ブイヨンの濃度は0.1%とした。

- ① 200 ml の三角フラスコにミネラルウォーター（サントリー；南アルプス天然水など）を100 ml 入れる。
- ② デンプン（片栗粉など）0.5 g、化学調味料無添加ブイヨン（ネスレ）0.1 g、粉末寒天（伊那食品工業；かんてんクックなど）1.5 g を量り取って加える。
- ③ ガスコンロなどで（時々振り混ぜながら）加熱してデンプンと寒天を溶かす。
- ④ 培地が沸騰し始めたら、吹きこぼれないようにすぐに火を止めてからアルミ箔をかぶせる。
- ⑤ 熱湯消毒したペトリ皿に培地を注ぎ入れたら蓋をして寒天が固まるまで放置する。

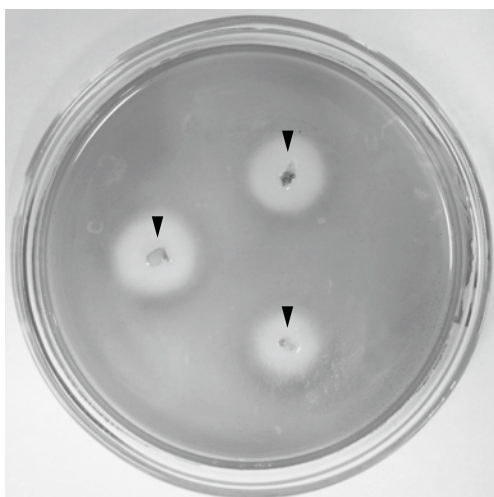


図6 土壌カビのデンプン分解(アミラーゼ)活性の検出。デンプン寒天培地に土壌カビを移植してから2日後に、イソジンうがい薬(明治)を水で10倍に希釈したものを5 ml 加え、液を捨ててから撮影した。矢尻は最初に土壌カビの菌糸を置いた場所を示す。写真では見えないが、カビの菌糸はおおよそ染色されなかった領域まで成長していた。

- ⑥ バナナ上で増殖した土壌カビの菌糸の一部をピンセットで採取してデンプン寒天培地に置く。
- ⑦ 常温で数日間置いてカビがある程度成長したら、寒天培地にヨウ素液（イソジンうがい薬（明治）を水で10倍希釈したものでよい）を数 ml 培地全体に満遍なく加える。
- ⑧ ヨウ素液を捨ててから、寒天培地を白い紙などの上に置いて染色を調べる。

土壌カビがある程度成長してから寒天培地をヨウ素液で染色したところ、おおむね菌糸の成長した領域で青紫色がなくなり透明となったことから（図6）、土壌カビにはデンプン加水分解（アミラーゼ）活性があることが確かめられた。なお、このデンプン寒天培地は栄養濃度が低いいため他の微生物による汚染は比較的少ないものの、それを避けるためにはやはり寒天培地作製後はなるべく早くカビを植えることが望ましい。寒天培地を用いた微生物の分解活性検出法としては、他にスキムミルクを用いてタンパク質分解（プロテアーゼ）活性を検出するものがあるが、スキムミルク培地は栄養が豊富なため、カビの成長や混入している細菌の増殖が速すぎて土壌カビの活性検出は難しかった。

3. 考察

本研究では、土壌に生息するカビを教材として活用するために、その簡便な採集・増殖法や観察法を検討した。まずバナナを基質として用いることによって、土壌中のカビを容易に採集・増殖できることを見出した。食材を基質としてカビを増殖させる方法は、1種類のカビを単離することはできず、また土壌中のカビの個体数を調べることもできないという欠点はあるものの、寒天培地を作製する手間は省けるという点において学校では有用と考えられる。中でもバナナは、安価で1年を通じて入手が容易であり、同時に多数の土壌試料で実験を行うことも容易である。本研究の方法では土壌中のカビの個体数は分からないが、ほとんど全ての土壌で速やかにカビが発生することから、カビが土壌に多数生息していることは感じ取れるだろう。土壌中にはカビの他にも多くの微生物が生息するはずであるが、土の上にバナナを置けばカビが優先的に増殖・成長することが分かった。土の上に一定の厚さの果実を置いた場合、その上まで成長できる土壌微生物は菌糸を伸ばすカビ類に限られ、他の微生物は増殖しにくいかもしれない。

カビの胞子などを生きている状態で顕微鏡観察する

ために、菌類をスライドガラス上で培養する“スライド培養”が行われるが⁷⁾、培地の作製などの作業が煩雑である。本研究では、バナナを基質として用いることによって、カビのスライド培養も簡単にできることを示した。バナナを用いた簡便スライド培養は、少なくとも土壌カビの観察には有効であり、菌糸だけでなく接合菌類の孢子嚢や不完全菌類の分生子などを通常の生物顕微鏡で観察することができた。特に、孢子嚢孢子と水によるその分散を観察することは、菌類による無性生殖に対する理解を助けると考えられる。また、孢子嚢や分生子などの形態から、バナナを基質として増殖した土壌カビにも多数の種が存在することが示唆された。このことから土壌には多種多様なカビが生息していることが理解できる。本研究では主として孢子嚢孢子や分生子などカビの無性孢子を観察したが、土壌には接合菌類のケカビ類が多く生息するため、今後はバナナを用いたスライド培養試料をさらに詳しく調べることによって、有性環の接合孢子も観察したい。

土壌カビは、他の微生物同様、生物遺体や有機物の分解者として土壌生態系の食物連鎖や物質循環に大きな役割を果たしている。カビがバナナの上で成長するとバナナの体積は大きく減少することからも、土壌カビがバナナのデンプンを分解していることは見当がつく。本研究では、デンプン寒天培地を用いることによって、バナナの上に発生した土壌カビのデンプン分解（アマラーゼ）活性を検出した。培地の材料は全てスーパーなどで入手可能であるため、この実験も比較的容易に行うことができる。土壌によるデンプン分解活性の検出は中学校の教科書でも取り扱われるが、本研究のように土壌カビを成長させてからその活性を検出すれば、分解が微生物によるものであることをより明確にできると考えられる。さらに、菌類が生産する酵素は、現代ではさまざまな産業に利用されている³⁾。特に日本酒の醸造や発酵食品の製造に用いられるコウジカビは、 α -アマラーゼ・グルコアミラーゼ・ α -グ

ルコシダーゼといった酵素群を分泌してデンプンを分解する。コウジカビの仲間が土壌にも多く生息していること⁴⁾を知れば、土壌カビのデンプン分解活性を検出することによって、菌類などの微生物の産業利用に対する興味にもつながることが期待できる。

参考文献

- 1) 服部勉・宮下清貴・齋藤明広 (2008) 『改訂版 土の微生物学』(養賢堂) など
- 2) 杉山純多編 (2005) 『バイオディバーシティ・シリーズ 4 菌類・細菌・ウイルスの多様性と系統』(裳華房)
- 3) 日本菌学会企画、柿島眞・徳益征二責任編集 (2014) 『菌類の生物学 分類・系統・生態・環境・利用』(共立出版)
- 4) 細矢剛・出川洋介・勝本謙 (2011) 『カビ図鑑』(全国農村教育協会)
- 5) 福田直 (1989) 「土壌微生物の観察・計数」『遺伝』43(7): 102-107.
- 6) 加藤良一・齋藤亜樹子・長根智洋・鈴木隆 (2011) 「中学校理科 2 分野の生物教材としてのカビの発生・繁殖方法」『山形大学 教職・教育実践研究』6: 1-6.
- 7) 宇田川俊一 (1978) 「同定のための培養法」宇田川俊一・椿啓介他『菌類図鑑 (下)』(講談社) pp.1220-1224.
- 8) Dobbs, C. G. (1942) On the primary dispersal and isolation of fungal spores. *New Phytologist* 41 (1) : 63-69.
- 9) 岩井草介・菊池智子・三浦貴士 (2013) 「酵母の簡便な培養法と教材化の検討」『弘前大学教育学部紀要』110: 23-29.

謝辞

本研究を行うに当たって実験に協力いただいた三浦貴士氏・藤原憲示氏・菊池康哉氏・馬場里美氏・藤田京佑氏・前田一平氏・茂野智哉氏・渡邊誠也氏(弘前大学教育学部または教育学研究科)に感謝します。また文章の修正に協力いただいた福士皓太氏(弘前大学教育学研究科)に感謝します。

(2017. 8. 4 受理)