

幼稚園園庭における土壌菌類の調査

濱田 彩希

(平成 17 年 10 月 6 日受理)

Investigation of Soil Fungi in a Kindergarten Playground

HAMADA, Aki

(Received on October 6, 2005)

キーワード：菌類, 幼稚園

Key words: Fungi, kindergarten

I. 緒 言

近年, 多くの保育所あるいは公園などの砂場の衛生調査が行われ, 砂場の衛生管理および手洗いの検討がなされた報告がある¹⁻³⁾. こうした衛生調査の報告を受け, 保育所あるいは公園の砂場では, イヌ・ネコの糞害などを防ぐためシートを被せる, 抗菌砂を利用する, あるいは微生物(細菌・糸状菌)汚染を防ぐため定期的な消毒剤の散布や加熱による殺菌・消毒処理が行われている. しかし, 砂場に限ったことではなく園児を取り巻く環境全てに微生物が存在することは明らかであり⁴⁾, 園庭において, 砂場だけに殺菌・消毒処理を施すことが適切な対策といえるのかどうか疑問である. また, 病原性大腸菌 O-157 の流行発生以後, 畑の作物や庭木の実をそのまま食べるといった自然とのかかわりあいをやめて, 加熱調理もしくは消毒をしなければ食べられないという制約が出ている公立保育所もある. このように個々の施設・園で衛生管理に差がみられるのは, 行政の衛生管理に関するガイドラインおよび遵守する側の意識に曖昧さが残されているのではないだろうか. 微生物に触れることは免疫力を高め感染症への抵抗力を養うという意味で大切なことと思われるが, それらとうまく『共生』していくにはどうすればいいのかを考え, 実践方法などを検討していきたい. そのためには園児を取り巻く環境に生息する微生物の分布を明らかにする必要がある. 本研究では, 保育環境における土壌糸状菌相を調査し, その結果を報

告する.

II. 研究方法

1) 糸状菌の分離

土壌試料は本学附属幼稚園内の砂場, 水田, 畑より採取した. 以下, 写真・図表では砂場を A, 水田を B, 畑を C と表記する. 火炎殺菌した葉さじで各土壌 1.0g を滅菌葉包紙に量り取り, 滅菌水にて $10^2 \sim 10^6$ 倍に希釈した. これら土壌希釈液をクロラムフェニコール (CP) 添加ジャガイモ・ブドウ糖寒天 (PDA) 平板培地に塗布して 25°C で培養後, コロニー分離法によって, 砂場から 9 種類 (菌株 No. A-1 ~ 9), 水田から 3 種類 (菌株 No. B-1 ~ 3) 畑から 7 種類 (菌株 No. C-1 ~ 7), の糸状菌を純粋分離した. 培地組成は下記のとおりである. PDA (日水製): ポテトエキス 4.0g, ブドウ糖 20.0g, 寒天 15.0g, クロラムフェニコール $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$, 蒸留水 1000ml

2) コロニーの性状観察

コロニーの性状観察をするために, 純粋分離した菌株は麦芽エキス寒天 (MA) 培地に 3 点植菌し, 25°C で 7 日間培養した. コロニーの直径, 表面および裏面の色調, 可溶性色素の有無およびその色調を観察した (表 1). 色調はマンセル記号で表した⁵⁾. MA 培地組成は下記のとおりである.

MA (Difico): 麦芽エキス 15.0g, 寒天 15.0g, 蒸留水 1000ml

3) 顕微鏡による形態観察

上述の方法により培養した各菌株の分生子形成および

その色調ならびに分泌物の有無およびその色調、表面の状態の観察には実体顕微鏡を用いた。一方、分生子や分生子柄の形状はスライド培養法によってプレパラートを作製しコットンブルーで染色し、顕微鏡観察および写真撮影を行った。

4) 糸状菌の属までを同定

コロニーの性状および分生子、分生子柄の形状の観察結果に基づいて各種文献の記載^{6~9)}と比較して、属までの同定を行った。

Ⅲ. 結果および考察

1) コロニーの性状観察

菌株No.A-1~9, B-1~3, C-1~7のコロニーの直径、表面および裏面の色調、可溶性色素の有無およびその色調を観察した結果を表1にまとめた。

2) 顕微鏡による形態観察

研究方法Ⅱ-3に従い、菌株No.A-1~9, B-1~3, C-1~7の分生子、分生子形成細胞、分生子柄、菌糸の形態を顕微鏡観察した結果を図1に示した。

3) 属の同定

菌株No.A-1(写真1)は、明色、多細胞で横隔壁を有する三日月形のフィアロ型分生子を形成し、その基部に特徴的な柄足細胞から *Fusarium* 属と一致する。

菌株No.A-2, B-1, B-2, B-3, C-1, C-2, C-3, C-4, C-6(写真2~10)は、分生子柄は隔壁を有する明瞭な分生子柄を形成し、分岐する。分生子形成細胞(フィアライド)は分生子柄もしくは分枝の先端に輪生する。分生子は内出芽型で、球形~楕円形、1細胞で連鎖する。これら分生子や分生子柄の形状から *Penicillium* 属ないし近縁の属であることがわかる。これらの内、B-2はコロニーの色調が緑を帯びず、分生子形成細胞の先端が細長いことなどから *Paecilomyces* 属と同定した。その他は *Penicillium* 属であるとした。

菌株No.A-3(写真11)は、実体顕微鏡下でコロニーの性状を観察したところ、分生子の形成が不明瞭であった。写真11に見られるような黒い分節孢子風の菌糸をつくる糸状菌は多く存在することから、現段階では属を同定するには困難である。

菌株No.A-4(写真12)は、明瞭な分生子柄を有し、分生子柄は単生で分岐しない。分生子形成細胞の先端部に

空いた小孔を通して横隔壁と縦隔壁を有する分生子が生み出され、次第に成熟して離脱する特徴は *Alternaria* 属と一致する。

菌株No.A-5, A-8, A-9(写真13~15)は、白色の綿毛状のコロニーに黒褐色の粘性のある分泌物状の分生子塊を生ずることや分生子の先端に3本、基端に1本の付属糸を持ち、5つの細胞からなる分生子の中央部分2個ないし3個の細胞が暗褐色になる分生子の形状から *Pestalotiopsis* 属と一致する。

菌株No.A-6(写真16)は、コロニーが酵母状で、分生子が単細胞性で分生子柄を形成せず、分生子形成細胞は菌糸に内在することから *Aureobasidium* 属と一致する。

菌株A-7(写真17)は、菌糸が培地中によく伸びて生育していたが、分生子の形成が見られず、現段階では属を同定するには困難であった。

菌株C-5(写真18)も、属の同定はできなかった。

菌株C-7(写真19)は、明色で分節型分生子を形成するので *Geotrichum* に類縁の糸状菌であると考えられる。

これらの結果をまとめると、砂場からは、*Fusarium* 属、*Penicillium* 属、*Alternaria* 属、*Pestalotiopsis* 属、*Aureobasidium* 属の糸状菌、水田からは、*Penicillium* 属、*Paecilomyces* 属の糸状菌、畑からは、*Penicillium* 属、*Geotrichum* 様の分節孢子をつくる糸状菌が見られた。そのほとんどが土壌腐生菌として代表的なものである。現段階での種の同定では不明であるが、種によっては毒性の強いカビ毒を産生するものもあり、その場合は、注意を要する。こうした菌類の負の要素を1つ1つ挙げていくと人体には悪影響しか及ぼさないように思われるが、しかし、その一方で抗生物質を産生する菌株も存在する。すなわち、環境下で糸状菌と細菌が拮抗関係にある場合もあり、仮に砂場の砂を殺菌することにより微生物の多様性が失われ、単純化した微生物相の中で元来存在した拮抗関係もなくなる可能性もある。その結果ヒトにとって望ましくない微生物が相対的に増加することは考えられる。糸状菌にはヒトに対して利害両面あることは周知のことである。今回の結果から特定の糸状菌が砂場に特化して生息するのではなく、水田・畑いづれの箇所にも見られ、いずれも腐生菌であった。今後は今回得られた糸状菌の種の同定および細菌類の実態調査と糸状菌の生理活性と合わせて検討することが望まれる。

また、殺菌した直後の微生物相がどの様に変化するかも興味深い話題である。これらを調査することを今後の課題としたい。さらに、微生物に対する知識を正しく得て、手洗いを励行するなど園児の衛生管理を行い、私たちがそれらとうまく『共生』していくにはどうすればいいのかを考えていくうえで、今後も、微生物に対する認識調査を実施したいと考える。

要 約

保育環境における土壌糸状菌類を調査した結果、砂場からは、*Fusarium* 属、*Penicillium* 属、*Alternaria* 属、*Pestalotiopsis* 属、*Aureobasidium* 属、水田からは、*Penicillium* 属、*Paecilomyces* 属、畑からは、*Penicillium* 属、*Geotrichum* 様の分節胞子をつくる糸状菌が認められた。いずれの糸状菌もきわめて普遍的な腐生菌であり、砂場に特徴的な菌類が存在するのではなく、水田・畑いずれの箇所にも見られた。今後は種の同定、細菌類の実態調査と糸状菌の生理活性と合わせて検討することが望ましいと思われる。

謝 辞

本論文を作成するにあたり、ご指導下さいました奥田徹教授（玉川大学学術研究所菌学応用研究施設）に深謝いたします。またご協力いただきました綿貫知彦教授、大澤 力助教授、藤森文啓助教授、古茂田恵美子助手、土壌試料をご提供下さいました東京家政大学附属みどり

ヶ丘幼稚園教職員の皆様方に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 辻 明良, 石川あづさ: 東邦大学医療短期大学紀要, **15**, 23 (2001)
- 2) 菊池和子, 正岡亮太, 岩井 徹, 藤井光子, 山根博文: 広島県獣医学会雑誌, **15**, 112 (2000)
- 3) 菊田治典, 鈴木 譲: *J.Rakuno Gakuen Univ.*, **25** (2), 281 (2001)
- 4) 村松ミネ子: *Life and Environment*, **48**, No.10, 81 (2003)
- 5) 日本色彩研究所: 改良マンセル色票, 日本色彩研究所 (1957)
- 6) Robert.A. SAMSON, Ellen S. HOEKSTRA, Jens C. FRISVAD, Ole FILTENBORG: *INTRODUCTION TO FOOD-AND AIRBORNE FUNGI*, CBS (2004)
- 7) 高鳥浩介: かび検査マニュアルカラー図譜, (株) テクノシステム (2002)
- 8) 椿 啓介, 徳増征二, 安藤勝彦, 中桐 昭, 岡田元: 不完全菌類図説—その採集から同定まで—, (株) アイピーシー (1999)
- 9) <http://www.botany.utoronto.ca/ResearchLabs/MallochLab/Malloch/Moulds/Pestalotiopsis.html>

表1 コロニーの性状（培養日数7日 MA培地）

【採取場所A】

| 菌株 No. | A-1 | A-2 | A-3 | A-4 | A-5 | A-6 | A-7 | A-8 | A-9 |
|---------|--------------------|----------------|---------|---------|----------|---------|---------------------|---------|---------|
| 直径 (mm) | 34-36 | 12 | 22-25 | 33-35 | 45 | 32-43 | 35-42 | 57-60 | 49 |
| 分生子形成 | 綿状 | 中心：綿状 周辺：粉状 | 綿状 | 綿状 | 綿状 | 綿状 | 綿状 | 綿状 | 綿状 |
| コロニー色調 | 白 | 7.5GY5/2 | 10YR8/2 | 白 | 白 | 白 | 白 | 白 | 白 |
| 菌糸の色 | 白 | 白 | 白 | 白 | 白 | 白 | 白 | 白 | 白 |
| 質感 | 縄状 | ピロード状 | 縄状 | 縄状 | 縄状 | 縄状 | ピロード状 | 縄状 | 縄状 |
| 可溶性色素 | 無色透明 | 無 | 無 | 無色透明 | 黒色粘性 | 茶褐色 | 無 | 黒色粘性 | 黒色粘性 |
| 裏面の色調 | 10YR6/8、 5R4/10 | 2.5Y8/4 | 10YR4/4 | 10YR6/8 | 7.5YR8/8 | 2.5Y3/2 | 10YR5/6、 10YR9/2 | 2.5Y9/4 | 2.5Y9/4 |

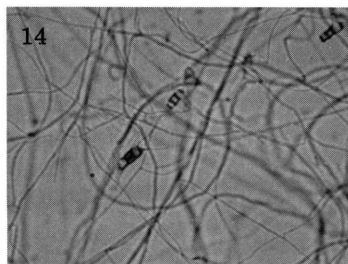
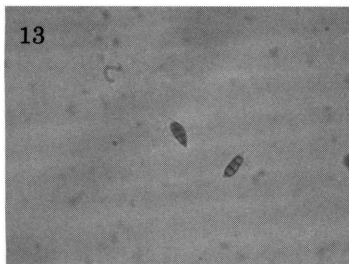
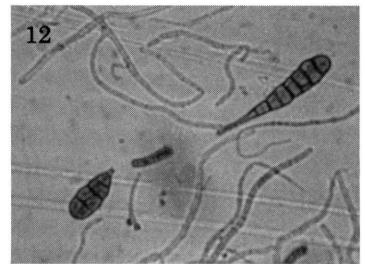
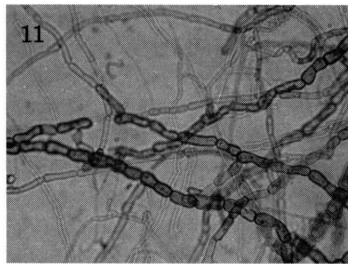
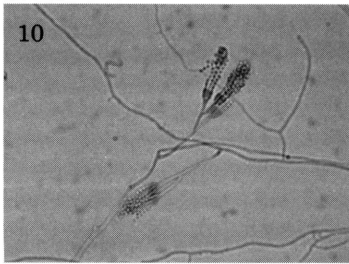
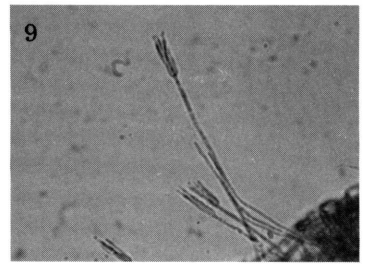
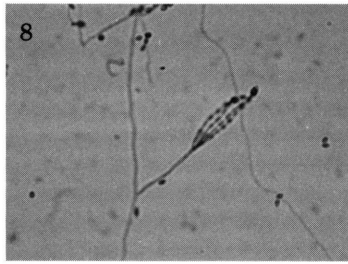
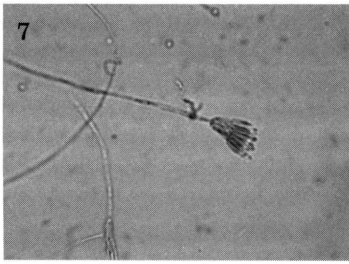
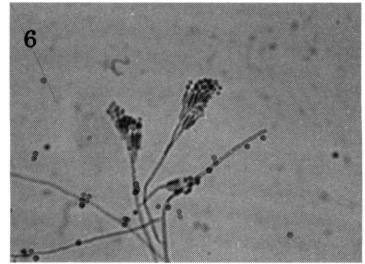
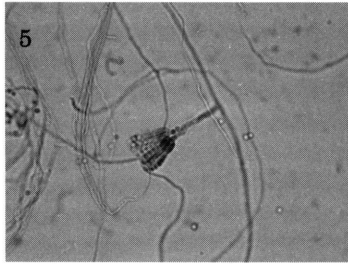
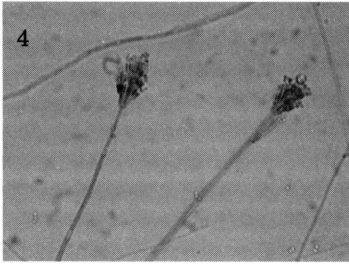
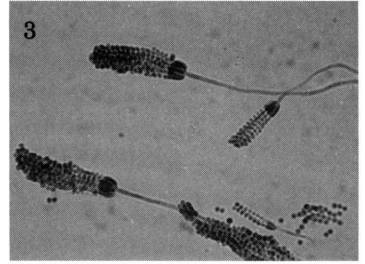
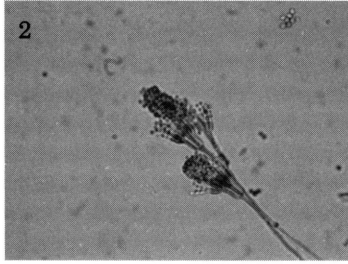
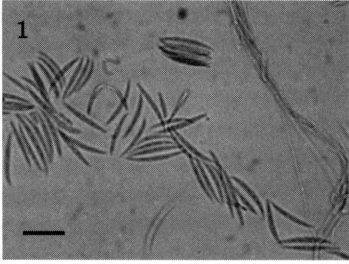
【採取場所B】

| 菌株 No. | B-1 | B-2 | B-3 |
|---------|--------|----------|---------|
| 直径 (mm) | 27-35 | 20 | 27 |
| 分生子形成 | 粉状 | 粉状 | 粉状 |
| コロニー色調 | 5GY4/2 | 7.5YR7/2 | 5G4/2 |
| 菌糸の色 | 白 | 白 | 白 |
| 質感 | ピロード状 | ピロード状 | ピロード状 |
| 可溶性色素 | 無 | 無色透明 | 無 |
| 裏面の色調 | 5Y6/6 | 2.5Y7/10 | 2.5Y9/4 |

【採取場所C】

| 菌株 No. | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 | C-7 |
|---------|---------|-----------------------|---------|----------------------------|---------|---------|--------------|
| 直径 (mm) | 30 | 25-28 | 26 | 18-22 | 35 | 16 | 30 |
| 分生子形成 | 粉状 | 粉状 | 粉状 | 綿状 | 粉状 | 粉状 | 綿状 周辺：滑らか |
| コロニー色調 | 10Y4/2 | 5Y8/8 周辺 5GY4/2 | 10GY3/2 | 7.5YR7/10 周辺 7.5Y4/2 | 10Y4/2 | 10G5/2 | 2.5Y9/2 |
| 菌糸の色 | 白 | 白 | 緑 | 白 | 白～緑色 | 白 | 白 |
| 質感 | ピロード状 | ピロード状 | ピロード状 | ピロード状、 縄状 | ピロード状 | ピロード状 | 縄状 |
| 可溶性色素 | 無 | 無 | 無 | 無色透明 | 赤色透明 | 無色透明 | 無 |
| 裏面の色調 | 7.5Y8/2 | 10YR8/10 | 5Y6/2 | 7.5YR7/10 | 2.5Y8/4 | 10YR7/6 | 2.5Y9/2 |

幼稚園園庭における土壌菌類の調査



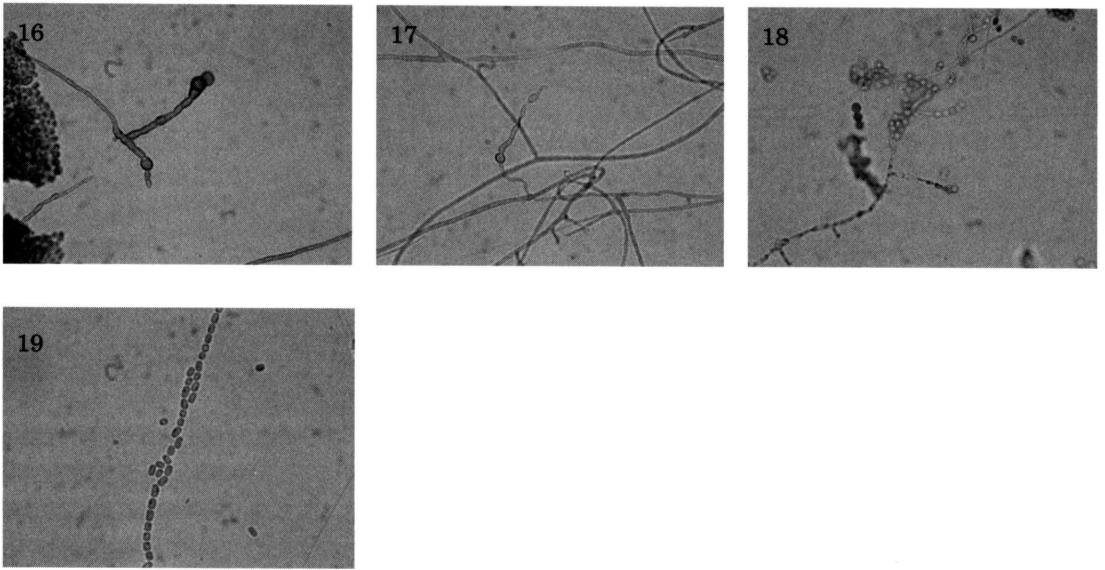


図1 顕微鏡による形態観察

- (1) 菌株No.A-1 ; *Fusarium* 属. (2, 3, 5~10) 菌株No.A-2, B-1, 3, C-1, 2, 3, 4, 6 ; *Penicillium* 属.
(4) 菌株No.B-2 ; *Paecilomyces* 属. (11) 菌株No.A-3 ; 未同定. (12) 菌株No.A-4 ; *Alternaria* 属.
(13~15) 菌株No.A-5, 8, 9 ; *Pestalotiopsis* 属. (16) 菌株A-6 ; *Aureobasidium* 属. (17) 菌株No.A-7 ; 未同定.
(18) 菌株No.C-5 ; 未同定. (19) 菌株No.C-7 ; *Geotrichum* 属類縁. Bar=20 μ m

Abstract

The following filamentous fungi were isolated from environmental samples collected near the kindergarten: *Fusarium* sp., *Penicillium* spp., *Alternaria* sp., *Pestalotiopsis* sp., and *Aureobasidium* sp. from the sandbox in the kindergarten. *Penicillium* spp., *Paecilomyces* sp., from the rice field near the kindergarten. *Penicillium* spp. from the crop field, also near the kindergarten. In the crop field, there was a fungus that produced *Geotrichum*-like arthroconidia. All of these fungi encountered are ubiquitous saprophytes, which have been reported frequently from soil. Sand-box specific fungi are not found, so that the sanitary issues will be the quantity or better to say inoculum size of fungi inhabiting, not the existence of the fungi above. Some fungi found from the sand box, rice field and crop field may be harmful to the human body, but they may produce antibiotics controlling the fungi and the bacteria in the environment. In the future, therefore, the examination of bacteria, the relationship between bacteria and fungi, fungal physiology controlling the relationship and identification of these fungi to the species level will be necessitated.