

カビ 相談 Q&A vol.33

[回答] 株式会社テクノスルガ・ラボ 主席研究員 喜友名 朝彦

Q33-1. 環境サンプルを寒天平板培地上に塗抹したら様々な微生物のコロニーが出現してきました。各々のコロニーがカビ、酵母または細菌のいずれに該当する（分類される）か簡単に識別できる方法を教えてください。

A33-1.

環境サンプル等を表面塗抹した寒天平板培地上にはカビ、酵母や細菌のコロニーが混在して生育することが多く、その種類を識別することは重要です。それは微生物を同定する際に、微生物の種類により適した同定手法が異なるためです。微生物の種類を確実に識別するためには、コロニー性状の観察および細胞形態観察が必要です。しかし、すべてのコロニーからプレパラートを作製することは容易ではないため、各コロニー周縁部を、寒天平板培地の裏面から光学顕微鏡で観察して簡易的に識別する方法¹⁾を紹介します。

〈観察手順〉(図1, 表1)

- 1) 微生物を培養した寒天平板培地を裏返して光学顕微鏡のステージに載せます。
- 2) 対物レンズを10倍^{*}にセットして、横からのぞきながら(目視確認)、対物レンズとシャーレの距離がぎりぎりまでステージを上げます(粗動ハンドル使用)。

※注意：対物レンズが20倍以上だとレンズがシャーレに接触してしまう危険性があるため、対物レンズは10倍を使用してください(対物レンズ4倍でも可)。

- 3) 接眼レンズでのぞきながら、観察対象にピン

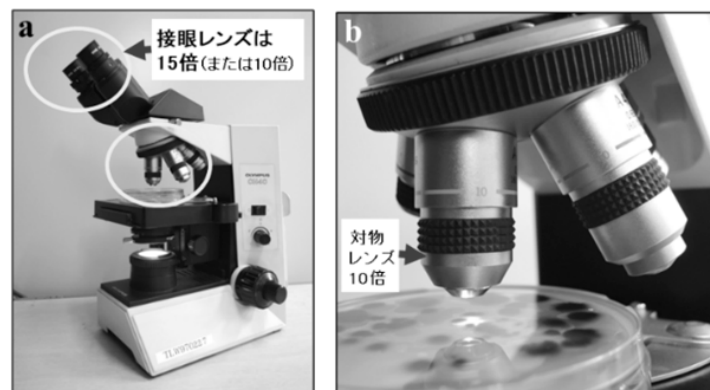


図1. 光学顕微鏡 (a) を用いたコロニー周縁部の観察方法の様子 (b)

トが合うまでステージを下げます（粗動／微動ハンドルを使用）。その際、接眼レンズは15倍が望ましいです（接眼レンズ10倍でも可）。

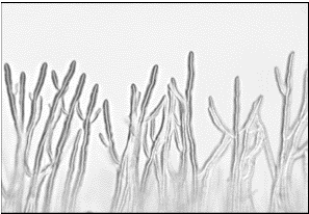
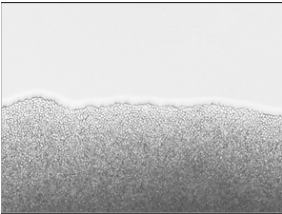
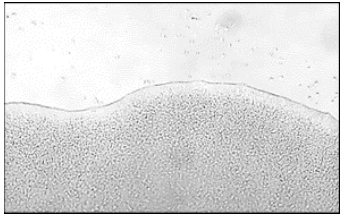
- 4) コロニー周縁部を観察視野の中心に移動して、観察します。
- 5) コロニー周縁部の細胞形態の特徴で、カビ、酵母あるいは細菌の識別を行います（表1）。

この観察方法は手軽にできる反面、あくまで簡易的な方法になるため、細胞が大きい細菌（*Bacillus* 属細菌など）の場合、逆に細胞が小さい酵母の場合、細菌なのか酵母なのかの判断に

迷う場合があります。その場合は、プレパラートを作製して高倍率で顕微鏡観察を行う必要があります。

また、土壌を塗抹した寒天平板培地ではカビのコロニーに混じって、放線菌（細菌の仲間）のコロニーが形成されることがあります。放線菌とカビはどちらも菌糸を形成するため、そのコロニー性状は類似しています。そのため、両者の識別は難しいですが、放線菌の菌糸は菌糸幅が1 μm以下と、カビの菌糸よりも細いため、この観察方法でもある程度識別可能です（図2）。

表1.カビ・酵母・細菌のコロニー周縁部をシャーレ裏面から光学顕微鏡で観察した際の識別点
 (写真はコロニー周縁部の観察視野の一例；観察倍率150倍＝接眼レンズ15倍×対物レンズ10倍)
 (喜友名・立里¹⁾を改変)

カビ	酵母	細菌
糸状細胞が判別可能です。	細胞の形は判別可能です。	細胞の形は判別困難です。
コロニー周縁部は糸状の細胞（菌糸）が柵状に並んでいる様子が分かります。	コロニー周縁部の内側（写真の下側）に、形が判別できる大きさの粒状の細胞が詰まっている様子が分かります。	コロニー周縁部の内側（写真の下側）に何かしらの物質が詰まっているのが分かる程度で、細胞は小さく形までは判別困難です。
		

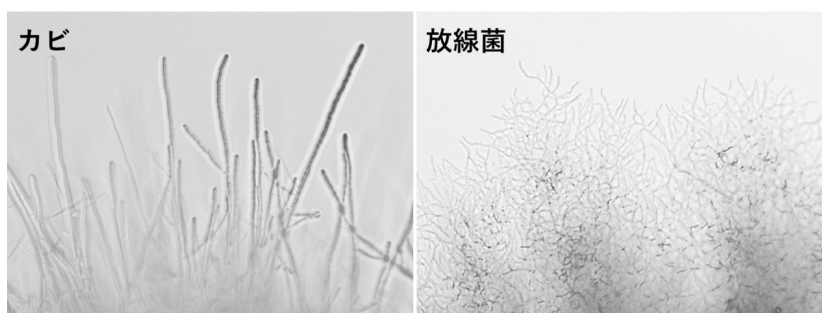


図2.カビと放線菌のコロニー周縁部の菌糸体（コロニー裏面から撮影）

Q33-2. 微生物細胞を顕微鏡で観察する際のカビ、酵母あるいは細菌を識別する方法を教えてください。

A33-2.

微生物実験室において、比較的取り扱うことが多いカビ、酵母や細菌について、増殖様式および細胞形態の特徴から、顕微鏡観察時の主な識別ポイントを表2および図3にまとめました。通常、細胞のサイズ（大きさ）を表すには球形の細胞は直径で、桿菌などの長方形あるいは卵円形の細胞は「長さ（長径）×幅（短径/太さ）」

（長さは種類によって様々）で示されることが多いですが、本稿では、カビ・酵母・細菌の細胞サイズを分かりやすく比較できるように、「幅」のみで説明します。また、関連する内容として、本誌「かびと生活」の「カビ相談Q&A」シリーズ vol.1 ①、vol. 11 (Q24-2)、vol. 13 (Q27-1) の解説も参考にしてください。

表 2. カビ・酵母・細菌の主な増殖形態と細胞形態の比較（無染色による観察）^{a)b)}

	カビ	酵母	細菌
増殖形態	菌糸成長 (分岐伸長) 胞子形成	出芽 (一部は分裂)	分裂 (二分裂)
細胞の大きさ	菌糸は不均一	不均一 (分裂時は均一)	ほぼ均一
細胞の色	無色～有色 (カビの細胞は色素沈着により 着色する種類あり)	無色	無色
細胞サイズ (幅)	(菌糸の幅) 約 2-10 (-30) μm	約 2-5 (-10) μm	約 0.2-2 μm 平均的に 1 μm 以下

- a) 細菌の仲間の放線菌は、カビと同じような菌糸成長や胞子形成をします。しかし、放線菌の菌糸幅は 1 μm 以下と、カビの菌糸よりも細いため、カビとの識別が可能です。
- b) 1 マイクロメートル (μm) は、1 ミリメートル (mm) の 1000 分の 1。

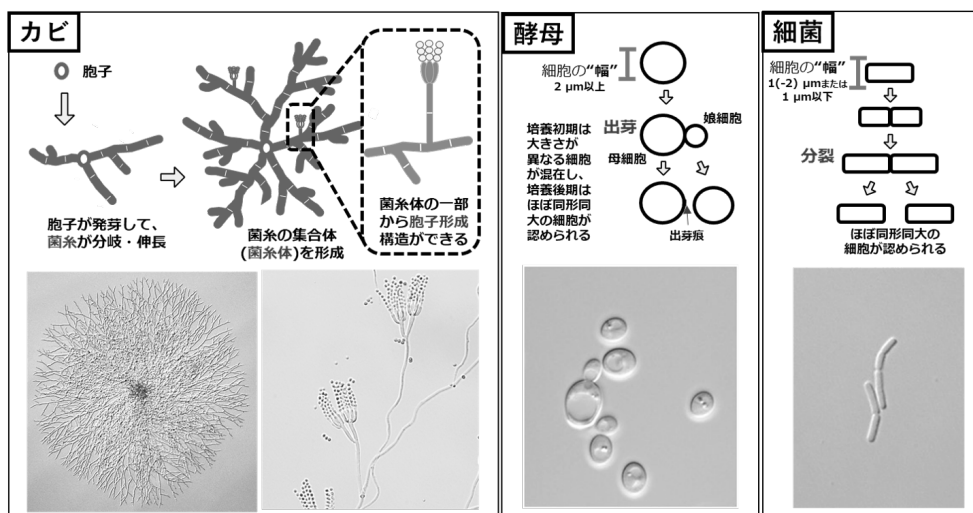


図 3. カビ・酵母・細菌の主な増殖形態模式図および細胞形態（喜友名・立里¹⁾を改変）

Q33-3. カビや酵母などを純粋培養したはずの寒天平板培地(シャーレ)上にいつの間にか、コロニーの一部が食い荒らされたような跡や別の微生物のコロニーが点在して形成されることがありますが、その原因を教えてください。

A33-3.

シャーレの蓋をきちんと閉めた状態で培養しており、落下菌などによるコンタミネーションの可能性が低い場合は、ダニによる汚染が起きている可能性が考えられます。

ダニは自然環境中や人間生活環境に広く分布し、アレルギー原因物質のひとつとしても知られています。微生物実験室では、土壌や植物体などの自然環境由来、ハウスダストなどの生活環境由来などの様々な検体が外部から持ち込まれますが、そのような検体や実験室内(実験台や床面など)のほこりなどにもダニが生息していることがあります。実験室に発生したダニはカビなどを培養しているシャーレなどに入り込み、特にカビのコロニーを好んで食べる傾向が

あります。また、シャーレで培養している微生物とは異なる別の微生物を持ち込んで、コンタミネーションなどの問題を引き起こすことが知られています。

ダニに汚染されたシャーレのコロニーを観察すると、元々、植菌培養していたコロニーとは別に、(例えば、画線した箇所以外に)別の微生物コロニーが不規則に形成されることがあります(図4a、4b)。これはシャーレに侵入したダニに付着した別の微生物細胞が持ち込まれ、ダニの歩いた跡にその微生物がコロニーを形成したことによります。また、コロニーの一部が食い散らかされていることもあります(図4c、4d)。そのような現象が起きているシャーレを実

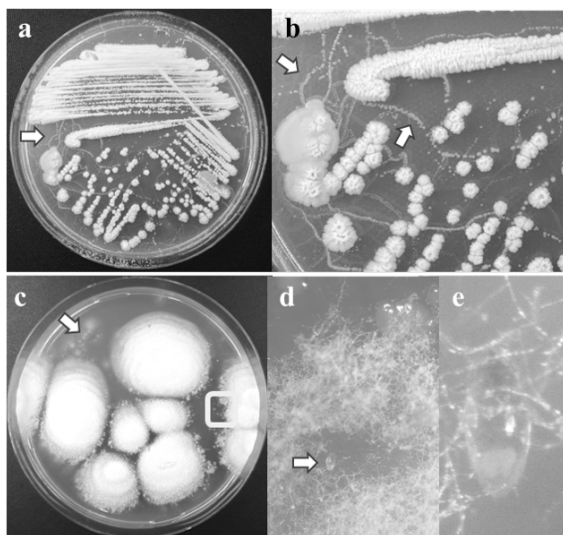


図4. ダニによって汚染された平板像およびダニ

a-b: 酵母を画線した箇所以外で、ダニが歩いた跡に黄色の細菌コロニーが形成されている様子(矢印、bはaの部分拡大像)、c-d: 白色カビコロニーの周辺に細菌コロニーの形成が認められる(c矢印)、コロニー表面の気中菌糸がダニによって食べられている様子(dはcの枠内拡大像)、e: ダニ(d矢印の拡大像)

体顕微鏡で観察すると、ほとんどの場合、ダニがカビのコロニーを食べている様子を観察することができます (図 4e)。

このようにダニに汚染されたシャーレをそのままにしておくと、シャーレで増殖したダニが別のシャーレに移動してコンタミネーションを引き起こし、微生物汚染の連鎖が生じることに

なります。その場合、目的の微生物コロニーを釣菌して、再度、純化培養を試み、ダニで汚染されたシャーレは直ちに滅菌処分する必要があります。もし、汚染されたシャーレを直ちに滅菌処分できない場合は、チャック付き袋に入れて隔離してから冷蔵保存することで、ダニによる汚染拡大を抑えることができます。

Q33-4. 黒色酵母と酵母の違いを教えてください。

A33-4.

黒色酵母 (black yeasts) とは、生活環のある時期にメラニン化した褐色～黒色の出芽細胞を形成する酵母様菌類の一群です。酵母状の出芽増殖をするとともに、発芽して菌糸伸長をします。一般的に、黒色酵母は、酵母ではなくカビの仲間として取り扱われることが多いです。一方で、酵母 (yeasts) は、主に出芽 (一部は分裂) 増殖をし、中には菌糸 (または仮性菌糸) を形成する種類もありますが、黒色酵母のように細胞表面が着色することはありません。

黒色酵母の仲間には生活環境からもよく分離されるアウレオバシジウム属 (*Aureobasidium*)

やエクソフィアラ属 (*Exophiala*) などが知られています。一般的な酵母のコロニー色調は明色系 (白色、クリーム色、黄色、赤色) を示すのに対して、黒色酵母は主に褐色～黒色の色調を示し、酵母様の湿ったコロニー性状を示します。*Aureobasidium* 属の仲間には、培養初期のコロニー色調がクリーム色を示し、培養時間の経過に伴ってコロニーが暗色化する種類や、コロニー色調がクリーム色のままの種類が知られています。一般的な酵母のコロニーは培養時間の経過に伴う色調の変化はありません。

参考文献

- 1) 喜友名朝彦・立里臨 (2022) 微生物の基礎と取り扱い, 微生物の取り扱いと微生物管理に関わる試験法 (若林裕真 編集), 17-64, 株式会社 R&D 支援センター, 東京.