重金属, シアンの存在における *Geotrichum candidum* の発育と菌体構成成分について

Changes of Growth and Cell Component of *Geotrichum candidum*
on the Existence of Heavy Metals and Cyan

東北薬科大学第一衛生化学教室

坂 口 平・天 野 倫 子・高 下 忍・横 田 勝 司

Osamu Sakaguchi, Michiko Amano, Shinobu Takashita and Katushi Yokota

Thohoku College of Pharmacy, Sendai

Changes of growth and cell components of *Geotrichum candidum* belonging to sewage fungi were examined in synthetic medium containing heavy metals (Hg^{++} , Cu^{++} and Zn^{++}) and cyan.

The growth of *G. candidum* in medium was greatly inhibited in response to increasing amount of the tested poisons. The fungous grown in CN^- medium showed morphologically mycelium (filamentous) phase cells in which possess only a few septa, but in Cu^{++} or Zn^{++} medium abnormal mycelium and yeast-like phase were observed microscopically.

An increase of total sugar, 3%-NaOH soluble polysaccharide and total nucleic acids was generally found in the Cu^{++} and Zn^{++} media in proportion to metal concentration. Glucosamine content was reduced in Cu^{++} -containing medium, and DNA level was increased. However, appreciable quantitative change in these components was not observed in cells grown on CN^- and Hg^{++} media.

By addition of CN^- or Cu^{++} in the medium *G. candidum* was increased RQ value in their cell respiration.

緒 言

Geotrichum candidum は不完全菌類に属し分節胞子を形成する。自然界に常在するが、一般に清浄な水には不完全菌類は少なく、汚染に伴って増加するといわれているが、*G. candidum* は汚水中にしばしば出現する“Sewage fungi”のひとつでもある。都市下水や産業廃水の活性汚泥の浄化障害となる汚泥のバルキング現象(Bulking phenomenon)は、細菌では *Sphaerotilus* なる糸状細菌の優先的増殖によるものとされてきたが、最近の報告では *Beggiator*, *Thiothrix* などの他に *Bacillus*, *Escherichia* などでも原因となることがあるとされている^{1,2)}。一方真菌類では *Geotrichum*, *Fusarium*, *Trichoderma* などによっても惹起されることが報告されている¹⁻³⁾。このバルキング現象が如何なる条件で発

生するかは明確ではないが、その原因には、pH、酸素供給、BOD 負荷(栄養)などの他に重金属その他の毒性物質によっても発生し得ると考えられている^{2,3)}。酵母様真菌はもとより糸状菌でも、ある発育環境下ではしばしば形態学的に二相性(M形とY形)の栄養型発育形態をもつ現象^{4,5)}が古くから知られている。

重金属塩類は細菌や真菌類の消毒剤として古くから使われているが、培地環境内の重金属や有害物質の存在で大きく細胞代謝が障害される結果として、細胞壁構成成分の量的または質的变化がおこるとも考えられるので、シアンのほか数種の重金属による発育、菌体構成成分、呼吸活性などについて行って得た結果について報告したい。

実験方法

1. 使用菌株——*Geotrichum candidum* 1,597株 (大阪醸酵研究所) を使用した。

2. 培地——基本培地としてポリペプトン (大五栄養K.K.) 0.03%, 酵母エキス (大五栄養K.K.) 0.02%, glucose 0.07%, KH_2PO_4 0.0008%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.005%, NaCl 0.002%, KCl 0.001%, CaCl_2 0.001%, MgSO_4 0.0007%, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0005% を蒸留水で、pH 7.0 に調整し、この基本培地①に、glucose 1%, KH_2PO_4 0.1%, L-arginine 0.05% を加えて pH 7.0 に調整した培地②で培養を行った。金属およびシアンは、①および②の培地に Cu^{++} として $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Zn^{++} として $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Hg^{++} として HgCl_2 , CN^- として NaCN を用い、あらかじめオートクレーブで滅菌した培地に植菌する直前に、各イオンをそれぞれ記載の濃度に添加した。

3. 培養法——②培地の斜面寒天で一日培養した菌を生理食塩水に浮遊させ、その一定量を培養液に加えて、L字管振盪恒温培養器または 500 ml 肩つきコルベンによる振盪恒温培養器内で 30℃ で培養を行った。

4. 測定法

1) 菌発育度測定——菌発育測定は、L字管振盪培養により発育した菌を、シェーカーミニソイットで振盪攪拌して分散した後、500 nm の吸光度を測定した。

2) 糖量測定——(i) 全糖量は、凍結乾燥菌体の一定量について Molish 法で 530 nm の比色測定を行い、glucose 量として表わした。(ii) Alkaline-soluble polysaccharide は、生菌一定量を 3% NaOH で室温下に 3 時間軽く振盪抽出した後、Molish 法で 530 nm の比色測定を行い glucose 量で表わした。(iii) アミノ糖の定量⁶⁾は、Elson-Morgan 法の Blix による変法で行い、530 nm で測定して glucosamine 量として表わした。

3) 核酸の定量⁷⁾——乾燥菌体より Schneider の変法によって 1N 過塩素酸で 30 分煮沸抽出して、DNA, RNA を同時抽出し、上清の一部で、両者を鯉精液製 DNA を標準物質として比色測定し、別に上清をジフェニルアミン法で同じく鯉精液製 DNA を標準物質として DNA のみを測定した。

4) 呼吸活性の測定——Warburg 検圧法で測定した。

5) コハク酸脱水素酵素活性測定——2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウム クロライド (TTC) 還元法で 0.1 M succinate を基質として行った⁸⁾。

5. 走査型電子顕微鏡観察

走査型電子顕微鏡による観察は、平板寒天で培養後一定時期に寒天ごと菌をとり、オスミウム酸ガス固定後、

メンブランフィルター上で自然乾燥して試料を作製し、炭素、金パナジウムで蒸着後顕鏡した。使用走査型電子顕微鏡は、日本電子 JSM, U3型である。

実験結果

1. 重金属塩およびシアン添加時の *G. candidum* の増殖に対する影響

増殖に対する影響を Fig. 1 と 2 に示した。前記の培地①と②に菌を接種し、30℃ で L 字管内での増殖を測定した。両培地とも定常期となる日数は、植菌量が同じであればほぼ同様であるが、①に比べて②培地では増殖度がほぼ 2 倍となっている。

供試重金属 (Hg^{++} , Zn^{++} , Cu^{++}) およびシアン添加時の成長曲線は、添加が増すにつれて抑制が見られるが、

Fig. 1 Effect of heavy metal and cyanide on the growth of *G. candidum*

Fig. 2 Effect of heavy metal and cyanide on the growth curve of *G. candidum*

特に Zn^{++} では 0.05% arginine 添加の②培地で著しく阻害率が減少し、この様に低濃度のアミノ酸の添加によっても阻害率が低下している。また、シアン添加菌でも同様の阻害率の減少が見られるが、シアンの場合は glucose の影響であろうと思われる。また、①培地では 50 ppm の CN^- で 6 日目に愈々発育増殖が見られた。5 ppm では対照よりも発育がむしろ良好であった。また、 Hg^{++}

2. 5 ppm では 6 日目に突然発育が増大している。これらは耐性菌の増殖によるものか馴化によるものかは明らかではない。以上の結果は、固型培地で行ったときもほぼ同じであった。

2. 重金属およびシアンの菌の形態変化に及ぼす影響

G. candidum はビール酵母やカンジタなどと異なり分節胞子と呼ばれ、始め菌糸が伸び隔壁 (septa) ができ

Fig. 3 Scanning electronmicroscopic picture of *Geotrichum candidum* on control medium ($\times 1,000$)

Fig. 4 Scanning electronmicroscopic picture of *Geotrichum candidum* on Cu^{++} -medium ($\times 1,000$)

Fig. 5 *Geotrichum candidum* from synthetic medium (II) ($\times 400$)

て、それが各個に分離しおのおの独立機能をもつようになる (Fig. 3 参照)。

重金属，シアン添加における発育形態変化は， Cu^{++} 添加 5 ppm では対照と比べてあまり変化は見られないが，10 ppm，25 ppm の添加濃度では菌形は非常にくずれて，ところどころに Yeast (Y) 様形態のものが多く (Fig. 4, 5 参照)。 Zn^{++} 添加のものも同様で，走査型電顕像は Cu^{++} の場合と同様であった。一方これに反して CN^- の存在では細長い菌糸がのびているが，septa が極く少なく mycelium (M) 様を示している (Fig. 5 参照)。 Hg^{++} 添加菌では， Cu^{++} ， Zn^{++} とは異なり M，Y 相的形態変化は示さないが，対照と比べて異なる形態を示した。

3. 重金属，シアンの存在で発育した菌体の糖および核酸量への影響

Table 1 に Total sugar，3%NaOH-soluble polysaccharide，glucosamine および核酸量を乾燥菌体に対する重量%で表わした。

糖および核酸量に著しい変化があったのは Cu^{++} ， Zn^{++} であって，添加量に応じて全糖量と表在性と思われる 3% NaOH-soluble polysaccharide は増大しているが， Cu^{++} では hexosamine 量は逆に減少している。これはキチン層の減少を示すものであろう。全核酸量も Cu^{++} ，

Zn^{++} の添加によって増大が見られるが，DNA量は Zn^{++} では変化がないけれども Cu^{++} 添加で増大している。しかしながら， CN^- および Hg^{++} の添加で発育した菌は，全糖量，3%NaOH-soluble polysaccharide，核酸量とも対照と比較してさしたる変化は見られなかったが CN^- 添加では DNA の僅かな減少が見られている。

以上の結果で，3%NaOH 抽出を生菌で行った場合も何れもほぼ同様な傾向が見られた。

4. *G. candidum* 生菌の呼吸活性および TTC 還元活性

Warburg 検圧法により，休止菌による O_2 吸収を測定した。

G. candidum は他の真菌と同様に，一般に endogenous respiration が高く，発育栄養環境にもよるが，菌体内に直ちに資化し得るエネルギー源を多量に保有するものと考えられ，基質 0.1M glucose による exogenous respiration の O_2 吸収は， CN^- 添加菌でやや多く見られたにすぎない (Fig. 6)。同様に Warburg 法により O_2 吸収と CO_2 の放出を測定して得た R.Q 値から見て，Table 2 のように Cu^{++} 添加菌は対照よりも CO_2 放出が大きく，より嫌氣的呼吸に依存していると思われる。 CN^- 添加菌も同様であり，これはシアン酵母が嫌氣的であるとの Stier⁹⁾ らの報告と一致している。*G. candi-*

Table 1 Analysis of cell components

Poison (ppm)	Total sugar (%)	3%-NaOH soluble polysaccharide (%)	Glucosamine (%)	Total nucleic acids (%)	DNA (%)
Control	19.58±0.94	7.37±0.24	5.70±0.15	0.90±0.02	0.46±0.02
Cu^{++} 5	18.53±0.66	7.13±0.17	5.65±0.14	0.95±0.02	0.61±0.02
10	29.75±0.50	14.33±0.57	4.43±0.17	1.55±0.03	1.14±0.05
25	34.67±0.79	15.60±0.61	3.46±0.10	2.66±0.02	1.14±0.02
Zn^{++} 5	18.36±0.64	6.90±0.2	6.48±0.09	1.75±0.02	0.58±0.03
25	23.50±0.30	6.38±0.22	6.24±0.10	1.67±0.07	0.56±0.03
50	20.11±0.51	9.33±0.39	4.88±0.20	2.68±0.01	0.59±0.06
75	26.19±1.02	10.36±0.53	6.60±0.47	2.14±0.01	0.56±0.04
CN^- 5	20.29±0.67	7.17±0.10	5.08±0.30	0.81±0.09	0.38±0.05
25	21.73±0.47	6.87±0.44	4.23±0.22	0.81±0.06	0.37±0.04
50	18.19±0.83	7.00±0.69	4.65±0.10	0.72±0.05	0.38±0.03
Hg^{++} 2.5	20.61±0.89	6.91±0.17	6.13±0.17	1.06±0.05	0.53±0.04
12.5	24.28±0.51	7.58±0.17	6.65±0.22	1.04±0.05	0.59±0.04
25	21.00±0.56	6.83±0.10	6.30±0.09	1.14±0.05	0.56±0.06

The values showed $\text{M} \pm \text{SE}$ from 4 experiments

Fig. 6 Respiratory activities of *G. candidum* grown in media containing copper and cyanide

Table 2 Effect of copper and cyanide on the O_2 uptake and CO_2 evolution of *G. candidum*

	CO_2	O_2	$RQ = \frac{CO_2}{O_2}$
Control	14.66	13.33	1.10
Cu^{++} 25ppm	51.74	30.80	1.68
CN^- 25ppm	77.90	50.91	1.53

The results showed mean values from 2 experiments

Fig. 7 Effect of copper and cyanide on respiration of *G. candidum*

dum でも、 CN^- の存在で P-フェニレンジアミンを用いたチトクロームオキシダーゼに関する定性的試験では正常に比し甚だ弱い陰性であり、嫌氣的解糖の増大していることを示している。

次に、Fig. 7 に示すように Warburg 法で休止菌（感受性菌）の呼吸に及ぼす Cu^{++} 、 CN^- の影響を見た結果は、1/20 CN^- は呼吸阻害が著しいが、1/80 Cu^{++} は影響があまり見られない。

TTC 色素による基質 succinate 脱水素酵素活性を測定した結果は、 Cu^{++} 添加菌では対照や CN^- 添加菌に比

べて活性が著しく低下した（表略）。

考 察

活性汚泥のような混合微生物集団に対しての重金属や有害性物質の影響に対する報文は数多く見られる。一般に金属イオンが微生物の殺菌作用ないしは発育阻止作用をあらわす濃度は、微生物の発育培地中に存在するタンパクと結合し、その含有量などに大きく支配される。よって minimum synthetic medium ①とそれに Arginine, glucose などを追加添加した培地②で、 Hg^{++} 、 Cu^{++} 、 Zn^{++} 、 CN^- などによる *G. candidum* の発育および形態的観察、構成成分などについて実験した。

その結果は、発育阻害度で Hg^{++} が Zn^{++} や Cu^{++} よりも大きく①培地の方が顕著であった。また一般的に lag period の延長を見るが、 CN^- の存在では 50 ppm 添加のものが数日後（①培地でも 6 日後）に、また Hg^{++} 2.5 ppm でも急速な増殖を示している。これは生き残った耐性菌が増殖したのか、または馴化によるものかもしれない。*G. candidum* の重金属イオンによる発育阻害は僅かに培地に 0.05% Arginine の存在であっても阻害度が低下している。故に活性汚泥での影響は、より高濃度の重金属イオンの存在でおこるものと考えられる。

一方、有害性金属やシアンの存在下での菌の発育には著明な形態学的変化が見られた。*G. candidum* は、シアンの存在ではこの分節胞子の隔壁がきわめて少なく M 形であり、 Cu^{++} 、 Zn^{++} 特に Cu^{++} の存在では対照と比較して異なる卵円形の Y 様形のものが多く見られ、また一般に変形態であった。

一般的に重金属塩の存在で真菌が二相性変化を示す例は、*Histoplasma capsulatum*、*Candida albicans*、*Mucor rouxii*、*Saccharomyces cerevisiae* などで報告されている^{4,5)}。このように重金属はある種の真菌の dimorphic change の誘導剤のひとつに数えられている。

G. candidum は酵母と糸状菌の境界に位置する。真菌類の骨格をなす細胞壁は一般細菌類と異なる化学組成を有し、糸状菌では chitin (N-Acetylglucosamine polymer) か $\beta 1 \rightarrow 4$ glucan であり、真正酵母では chitin は極く微量で、 $\beta 1 \rightarrow 3$ および $\beta 1 \rightarrow 6$ 結合よりなる glucan が細胞壁骨格をなし、その外層は mannan または phosphomannan 層で包まれているとされている^{10,11)}。*G. candidum* については、Sietsma and Wouters¹²⁾ は細胞壁多糖体が chitin と、 $\beta 1 \rightarrow 3$ および $\beta 1 \rightarrow 6$ 結合よりなる glucan と、galactomannan よりなることを述べている。Nickerson¹³⁾ は、酵母細胞壁の外層多糖体を 1N KOH

で 1hr, 30°C で抽出し、外層の Alkaline-soluble polysaccharide を得ている。

G. candidum の chitin 層は酵母細胞壁での rigid glucan に相当するものであり、おそらく 3 %NaOH-soluble polysaccharide は抽出後の菌形態が維持されているので、galactomannan に相当するものであり、表在性多糖体と思われる。Cu⁺⁺, Zn⁺⁺ の存在で発育した菌が、変形した M 形と Y 形様変化を示すとともに全糖量、Alkaline-soluble polysaccharide が増大し逆に glucosamine が Cu⁺⁺ では減少している。glucosamine の量は chitin の量を示すものと考えられる¹⁴⁾。ゆえに、表在性糖量は増加しても rigid な内層は Cu⁺⁺ の存在では薄くなっているのではないかと考えられる。

さきに Nickerson¹⁵⁾らは *mucor rouxii* の Y 相細胞壁は M 相菌よりも mannan 含量が高く、M 相は内層壁が極めて薄い細胞壁よりなるといっている。同様に、電顕的形態像で *H. capulatum* でも M 相の細胞壁が薄くなっていると Domer¹⁶⁾らは述べている。山口らは⁵⁾、*C. albicans* では M 相が Y 相に比較して mannan 外層が著しく薄いことを電顕的に観察しているが、*S. cerevisiae* や *Hansenula schneeggi* では、M 相菌は mannan 含量が高いことが報告されているのでかならずしも絶対的所見ではないとされている⁵⁾。

G. candidum で糖所見では、Cu⁺⁺ や Zn⁺⁺ の存在で表在性多糖体に何らかの変化が起っていることが充分考えられた。特に Cu⁺⁺ の存在で菌体内 glucosamine の減少は chitin 層の減少となり細胞壁の変形 Y 様化をきたすものと思われる。Lynen¹⁷⁾らは酵母を 10⁻³M CN⁻ で呼吸阻害した時、直ちに嫌気的解糖に入り、醗酵が始まり、酸化的リン酸化阻害による無機リンの増加と ATP の生成減少を見ている。Cu⁺⁺ 添加でも Warburg 法による結果は嫌气的であった。続報¹⁸⁾するように、Cu⁺⁺ の存在下での *G. candidum* の呼吸電子伝達系の差スペクトルに CN⁻ とは異なった特有なピークの消失が見られることをわれわれは見ている。CN⁻ や Cu⁺⁺ の存在で何らかの代謝の変化を生じ、それが何らかの機序で壁多糖体構成に質的、量的変化を生じ、最終的に菌形態の異常変化を導くものと考えられる。重金属での異常な Y, M 様変形態は発育後の沈降性も悪く、完全な M 相でなくても沈降性不良を呈していた。*G. candidum* はバルキング汚泥中でしばしば糸状細菌の *Sphaerotilus* と形態学的に甚だ類似し、誤認されることは Jones¹⁹⁾が指摘する所である。われわれはさらに種々な環境下での発育状態について研究を進めている。

結 論

汚泥真菌の *Geotrichum candidum* の発育、形態、構成成分などに対する重金属 (Cu⁺⁺, Zn⁺⁺, Hg⁺⁺) およびシアンの影響を観察した。その結果、CN⁻ 発育菌は隔壁の極めて少ない mycelium 相を呈し、Cu⁺⁺ と Zn⁺⁺ では変形した mycelium と yeast like 相をより多く示し、また、菌の全糖量、3%NaOH-soluble polysaccharide、全核酸量などの増大が見られるが、特に Cu⁺⁺ 発育菌では glucosamine の減少と DNA の増量が見られた。発育は一般に、これら有毒物の存在で添加濃度の増大とともに抑制される。しかし、シアン、Hg⁺⁺ 発育菌では、それらの細胞成分は一般的に著明な量的変化は見られなかった。呼吸活性は、シアン、Cu⁺⁺ の添加では R.Q 値の増大が見られた。

文 献

- 1) 上野英世：水中の特殊細菌（污水細菌），メディア・サークル，7，285-294（1974）。
- 2) 須藤隆一：都市下水処理プロセスの水質管理，3，743-752（1972）。
- 3) Pipes, W. O.: Bulking of activated sludge, 9, 185-234（1967）。
- 4) Romano, A. H.: Dimorphism (The fungi), vol. II (ed. Ainsworth, G. C. and Sussman, A. S.), p.181, Academic press, New York and London（1966）。
- 5) 山口英世，岩田和夫：真菌細胞の二形性と壁の構造，蛋白質核酸酵素，17，588-603（1972）。
- 6) 満田久輝：炭水化物の定量法，実験栄養化学，p. 129，いづみ書房，京都（1960）。
- 7) 下村道夫：核酸の抽出及び定量法，標準生化学実験（江上不二夫他編），p.143，文光堂，東京（1953）。
- 8) 佐藤 了：TTC による脱水素酵素作用の測定，標準生化学実験（江上不二夫他編），p.304，文光堂，東京（1953）。
- 9) 田中正三，鈴木達雄：細菌の代謝（M. Stephenson），p.292，丸善，東京（1955）。
- 10) 山口英世：真菌における細胞分化と形態形成（微生物学，石田名香雄他編），p.323，朝倉，東京（1973）。
- 11) 坂口 平，鈴木益子，多巻郁夫：真菌と真菌症，8，300-304（1967）。
- 12) Sietsma, J. H. and Wouters, J. T. M.: Cell wall composition and "protoplast" formation of *Geo-*

- trichum candidum*, Arch. Microbiol., **79**, 263-273 (1971).
- 13) Nickerson, W. J.: Symposium on biochemical bases of morphogenesis in fungi, IV. Molecular bases of form in yeasts, Bacteriol. Rev., **27**, 305-324 (1963).
- 14) 谷 勇, 喜井莞爾, 森 幹治: 真菌の表面構造に関する研究, 日細菌誌, **23**, 191-198 (1968).
- 15) Carcia, S. B. and Nickerson, W. J.: Nutrition, growth, and morphogenesis of *Mucor rouxii*, J. Bacteriol., **84**, 841-858 (1962).
- 16) Domer, J. E., Hamilton, J. G. and Harkin, J. C.: Comparative study of the cell walls of the yeast-like and mycelial phases of *Histoplasma capsulatum*, J. Bacteriol., **94**, 466-474 (1967).
- 17) Lynen, F., Hartmann, G., Netter, K. F. and Sch-negra, A.: Regulation of cell metabolism [ed. Wolstenholme, G. E. & O'Conner, C.], p.256 (1959).
- 18) 坂口 平, 高下 忍, 天野倫子, 横田勝司: 未発表.
- 19) Jones, P. H.: The effect of temperature and oxygen tension on one of the microorganisms responsible for sludge bulking, Proc. 19th. Ind. Wast conf., Eng. Bull., **49**, 902-914 (1964).

(受付 1977年3月28日)