

速報

きのこ菌床栽培施設の落下菌調査に適した培地組成の検討^{*1}宮崎和弘^{*2}・山下和久^{*3}・川端良夫^{*4}・新田 剛^{*5}

宮崎和弘・山下和久・川端良夫・新田 剛：きのこ菌床栽培施設の落下菌調査に適した培地組成の検討 九州森林研究 59：275-276, 2006 落下菌調査用の培地として使用されているペプトン・ローズベンガル培地の改良を行うことを目的として試験を行った。試験は、細菌抑制用の抗生物質の組み合わせと、ローズベンガル濃度を変えたときの影響について観察した。抗生物質の検討では、供試した3菌株の細菌のうち2菌株で抗生物質の組み合わせを変えても、コロニー形態に違いが観察されず、通常の培地と同じくストレプトマイシン単独(0.004%)で使用することで十分と判断された。ローズベンガル濃度の検討では、4種の害菌として分離された菌の菌糸伸長速度と3種の菌の孢子発芽率を測定した。ローズベンガル濃度は、5段階(0%, 0.0025%, 0.005%, 0.010%, 0.050%)設定した。その結果、ローズベンガルを入れることで、すべての菌で菌糸伸長、孢子発芽率ともに落ちることが観察された。特に、通常の培地で設定される0.005%の培地で、孢子の発芽率が67%となる菌もあったことから、落下菌の調査用の培地にはローズベンガル濃度0.0025%の方が適していると判断された。

キーワード：落下菌調査、ローズベンガル、抗生物質

I. はじめに

きのこの菌床栽培施設では、栽培目的以外の菌が培地に混入する、いわゆる害菌問題が発生することがある。これは、栽培行程のどこかで培地内に害菌が混入することが問題になる。被害回避のためには、害菌の生息場所や密度の推定が出来る落下菌調査を行うことが重要となってくる。落下菌調査を行う上では、培地に落下した菌をすべてカウント出来ることが理想的であるが、再生コロニー数でカウントする場合、実際には発芽しない孢子があったり、菌糸伸長が遅いため、他の菌に圧倒されることでカウント出来ない菌が存在するため、両者の値にはずれが生じる。落下菌調査を行うためには、そのずれが小さい方が望ましい。よって、孢子の発芽率は高く、菌糸伸長の速い菌の生長は抑えられる培地が調査には適している。現在、落下菌調査用の培地としては、Martin (I) が土壌菌類の分離用に提唱したペプトン・ローズベンガル培地がよく利用されている。しかし、きのこの栽培施設は、土壌環境に比べ、生物相は単純であるので、菌類や細菌類の生長を抑える目的で使用されているローズベンガルの濃度や抗生物質の種類等には検討の余地があると考えられた。そこで、今回実際にきのこの栽培施設から分離された菌および細菌を使用し、菌糸伸長速度、孢子発芽率、およびコロニーの形態におよぼす影響を調べたので、その結果を報告する。

II. 材料と方法

(1) 供試菌株

試験には、トリコデルマ属菌2菌株(KRCF175: *Trichoderma harzianum*, KRCF306: *T. longibrachiatum*), ペニシリウム属菌1菌株(KRCF227: *Penicillium citrinum*), クモノスカビ属菌1菌株(KRCF498: *Rhizopus* sp.), および細菌類3菌株(KRCB1, KRCB20, KRCB70)を使用した。

(2) 菌糸伸長速度の測定

孢子懸濁液を接種源とし、柄付き針の先に孢子懸濁液をつけ、その先端部分を平板培地(直径:90mm)中央に接触させることで接種した。ペプトン・ローズベンガル培地(ポリペプトン0.6%, デキストロース1.0%, KH_2PO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, ローズベンガル0.005%, ストレプトマイシン0.004%, 寒天1.6%)を基本培地として、ローズベンガル濃度を5段階(0%:RB-0, 0.0025%:RB-1/2, 0.005%:RB-1, 0.010%:RB-2, および0.050%:RB-10)設定し、試験を行った。接種点を中心に、直角に交わる2方向において、コロニー直径を測定した。菌糸伸長速度として、測定点を最小二乗法によって求められる回帰直線の勾配を用いた。

(3) 孢子発芽率の測定

ローズベンガルを前述した5段階の濃度に調整したペプトン・ローズベンガル培地を準備し、試験を行った。あらかじめ滅菌し

*1 Miyazaki, K., Yamashita, K., Kawabata, Y. and Nitta, T.: The study on the component of medium for researching on air borne fungi in mushroom cultivation houses.

*2 森林総合研究所九州支所 Kyushu Res. Center, For. Forest Prod. Res. Inst., Kumamoto 860-0862

*3 大分県きのこ研究所 Oita Mushroom Res. Inst., Mie, Oita 879-7111

*4 福岡県森林林業技術センター Fukuoka Pref. For. Res. and Ext. Ctr., Kurume, Fukuoka 839-0827

*5 宮崎県林業技術センター Miyazaki Pref. Forestry Tech. Ctr., Saigou, Miyazaki 883-1101

た0.1%のTween 20溶液に、培養コロニーを懸濁し、胞子濃度を約 10^6 個/mlの濃度に調整し、その希釈液100 μ lを培地にプレーティングした。光学顕微鏡下で、ある視野に入った胞子すべてを観察し、全胞子数とそのうちの発芽胞子数をカウントした。数カ所を観察し、全胞子数が200以上となるまで観察を行った。

(4) 抗生物質の組み合わせの検討

試験した抗生物質は、ストレプトマイシンおよびテトラサイクリンの2種類であった。試験を行った培地は、抗生物質以外は基本的なペプトン・ローズベンガル培地と同様の組成とし、(a) 抗生物質を含まない培地、(b) ストレプトマイシン0.004%、(c) テトラサイクリン0.004%、(d) それぞれの抗生物質が0.002%の4種類の培地を用意し、試験を行った。あらかじめ普通寒天培地(日水製薬)で、培養したコロニーを、滅菌したつまようじの先につけ、その後前述の平板培地(直径:90mm)上の5カ所に接種し、25℃の培養器中で培養を行い、6日目のコロニーを観察した。

Ⅲ. 結果と考察

(1) ローズベンガルの菌糸伸長速度への影響

ローズベンガル濃度を変えたときの、各菌株の菌糸伸長速度を表1に示した。すべての菌において、ローズベンガルを加えた培地では、ローズベンガルを加えない培地に比べ、菌糸伸長が抑えられた。ただし、抑えられる程度には菌株によって違いがみられた。特に同じトリコデルマ属菌であっても、*T. harzianum* (KRCF175)では、RB-10の区でRB-0の区に比べてときの菌糸伸長速度は、57.4%までしか抑えられていないのに比べ、*T. longibrachiatum* (KRCF306)は、10.9%まで抑えられた。また、最も菌糸伸長速度に差があった組み合わせは、KRCF 227 vs. KRCF 498であったが、RB-0区では、21.1倍の違いがあったのに比べ、RB-1/2区では菌糸伸長速度の違いが5.5倍にまで縮まった。

これらのことにより、ローズベンガルを加えることで落下菌の菌糸伸長が抑えられること、さらに接合菌であるクモノスカビ属菌でより顕著に菌糸伸長速度が抑えられることが分かった。またその効果は、0.0025%の濃度でも認められた。

(2) ローズベンガルの胞子発芽率への影響

ローズベンガルにより胞子の発芽は遅れる傾向が見られた(表2)。特に、トリコデルマ属菌(KRCF175)においては、RB-10の区では、ほとんど胞子の発芽が見られなかった(表2)。ペニシリウム属菌(KRCF 227)およびクモノスカビ属菌(KRCF 498)では、RB 2区までは最終的に100%近い発芽率を示したが、トリコデルマ属菌(KRCF 175)は、RB-1区で発芽率が90%に達することがなかった(表2)。トリコデルマ属菌の胞子発芽率の試験結果から、ローズベンガルの濃度は、0.0025%以下が望ましいと考えられた。

(3) 抗生物質の組み合わせの検討

試験に用いた3菌株(KRCB 1, KRCB 20, およびKRCB 70)のうち、1菌株(KRCB 70)において、抗生物質を加えない培地に比べ、明確にコロニーの形成が抑えられたが、他の2菌株では、目立った抑制効果は見られなかった。また、抑制されたKRCB

70において、ストレプトマイシンとテトラサイクリンの違いは観察されず、抗生物質の組み合わせの違いによる効果の違いは見られなかった。これは、ローズベンガル単独でもある程度の抗菌効果があることが影響していると思われる。

Ⅳ. まとめ

今回の結果をまとめると、今後の落下菌調査を行う上では、ローズベンガルに関しては、0.0025%が最も適当と考えられた。また、抗生物質に関しては、ストレプトマイシンにテトラサイクリンを併用した場合でも、抑制効果が上がることはなかったため、今まで推奨されたとおり、前述のローズベンガルを含む培地に、ストレプトマイシンを0.004%の濃度になるよう加えることで十分であると考えられた。

謝 辞

本試験に供試した菌株の同定において、神奈川県立生命の星地球博物館の出川氏に大変お世話になりました。ここに、深謝の意を表します。なお、本試験は農林水産省予算の先端技術を活用した農林水産研究高度化事業(課題番号:1742)の一部として行われた。

参考文献

(1) Martin, J. P. (1950) Soil Sci. 69: 215-232.

(2005年11月14日 受付:2005年12月22日 受理)

表1. 菌糸伸長速度に対するローズベンガル濃度の影響

菌株番号	菌糸伸長速度 (mm/h)				
	RB-0	RB-1/2	RB-1	RB-2	RB-10
KRCF175	0.745	0.437	0.438	0.495	0.427
KRCF306	0.737	0.155	0.156	0.129	0.080
KRCF227	0.059	0.040	0.034	0.028	0.022
KRCF498	1.252	0.221	0.261	0.266	0.373

表2. ローズベンガルの胞子発芽に対する影響

菌株番号	試験区	発芽率 (%)						
		4hr	8hr	16hr	24hr	32hr	40hr	48hr
KRCF175	RB-0	-*	0.0	96.0	99.0	-	-	-
	RB-1/2	-	0.0	84.2	98.6	-	-	-
	RB-1	-	0.0	54.9	59.0	78.1	84.7	67.0
	RB-2	-	0.0	64.1	64.9	79.7	81.2	80.4
	RB-10	-	0.0	0.0	0.9	1.0	1.9	0.9
KRCF227	RB-0	-	0.0	86.0	100.0	-	-	-
	RB-1/2	-	0.0	61.8	99.0	-	-	-
	RB-1	-	0.0	14.0	93.8	98.1	-	-
	RB-2	-	0.0	1.0	41.1	76.9	95.3	-
	RB-10	-	0.0	0.0	4.0	8.5	78.6	71.4
KRCF498	RB-0	2.3	98.1	-	-	-	-	-
	RB-1/2	0.0	92.5	90.1	-	-	-	-
	RB-1	0.0	50.4	89.0	-	-	-	-
	RB-2	0.0	60.3	95.5	-	-	-	-
	RB-10	0.0	0.0	50.9	74.4	70.9	-	-

*-:測定せず