

マツ死葉における表面殺菌法の検討\*<sup>1</sup>畑 邦彦\*<sup>2</sup> ・ 平田令子\*<sup>3</sup> ・ 曾根晃一\*<sup>2</sup>

畑 邦彦・平田令子・曾根晃一：マツ死葉における表面殺菌法の検討 九州森林研究 61：31-33, 2008 過酸化水素水を用いた表面殺菌法のマツ死葉における有効性とその際の適切な殺菌強度の検討を行うため、オートクレーブ滅菌したクロマツ針葉に対して、代表的な雑菌 *Penicillium* sp. の胞子を塗布したものと組織内部に生息する菌 *Lophodermium pinastri* を感染させたものを用意し、両者を異なる強度で殺菌して各菌の検出頻度を比較した。前者が検出されず、後者が検出されるのが適切な殺菌強度と考えられるが、結果として、検討された殺菌強度のうち、今回の試料においては70%エタノール1分間、15%過酸化水素水1分間、70%エタノール1分間の連続殺菌が妥当と考えられた。また、このような方法によって表面殺菌法の適用条件と殺菌強度を検討できる可能性が示唆された。

キーワード：表面殺菌法、過酸化水素水、クロマツ針葉、*Lophodermium pinastri*, *Penicillium* sp.

Hata, K., Hirata, R. and Sone, K.: A test for a surface-sterilization method on dead pine needles *Kyushu J. For. Res.* 61: 31-33, 2008 In order to examine the effectiveness of surface-sterilization method using hydrogen peroxide on dead needles of pines, autoclaved needles of Japanese black pine, either sprinkled with the spores of *Penicillium* sp., a representative contaminant, or infected with *Lophodermium pinastri*, an internal colonizer of pine needles, were prepared, sterilized in different procedures, and detection frequencies of each fungus were compared. When the former remains undetected but the latter detected, the procedure of surface-sterilization can be considered to be appropriate. As a result, the successive sterilization with 70% ethanol for 1min, 15% hydrogen peroxide for 1 min and 70% ethanol for 1 min seemed to be appropriate. With this result, this kind of test is suggested to be useful to examine the effective method of sterilization.

**Key words:** surface-sterilization method, hydrogen peroxide, Japanese black pine needles, *Lophodermium pinastri*, *Penicillium* sp.

## I. はじめに

植物組織の内部に生息する微生物を確認する方法としては、切片の顕微鏡観察などの直接的な手法の他に、組織内に存在する微生物を分離することによってその存在を把握する間接的なアプローチも存在する。後者の有力な方法の一つとして表面殺菌法がある。一般に表面殺菌法とは、試料の表面を殺菌して表面に付着または生息している微生物を排除した後に、試料を培地に置床、培養して出現した微生物を組織内部に生息するものとみなして分離する方法である(畑, 1997a)。これは、植物病原菌を分離する方法としては従来から常法の一つとなっているが、近年では内生菌を検出する際にも非常によく用いられている(畑, 1997a; 松尾ほか, 1980; Petrini, 1986)。

表面殺菌に用いる殺菌剤としては、これまで様々なものが用いられているが、最近比較的良好に用いられているものに、過酸化水素水がある。かつてよく用いられていた昇こうなどの水銀剤は、現在では安全性や環境負荷の問題から使用は奨められない。内生菌の分離をはじめ、表面殺菌に現在よく用いられているのは次亜塩素酸ナトリウムなど塩素系の殺菌剤(Bills, 1996)であるが、これらにおいても塩素ガスの発生という問題がある。その点で過酸化水素水は分解産物が酸素と水のみなので、環境負荷や安全性

の面で比較的優れている。この過酸化水素水を用いた殺菌法の有効性についてはいくつか検証例があり(Kinkel and Andrews, 1988; 畑, 1997b)、良好な結果が得られているが、これらの検証試験は基本的に生きたあるいは新鮮な葉組織を試料として用いたものであり、組織が完全に死んでいる植物試料でも同様に有効であるかどうかは明らかになっていない。殺菌剤を用いた既往の方法が有効でない場合、木材などの大きな試料であれば火炎滅菌法を応用した分離法(林, 1983)なども有力だが、落葉などが対象の場合、そういった方法は適用できないため、殺菌剤を用いる方法を突き詰めて検討する必要がある。

そこで、本研究においては、まずマツ生葉をオートクレーブ滅菌することによって条件の揃った死葉を人工的に用意し、次に、それら死葉に対して、実験室で雑菌としてしばしば混入する *Penicillium* 属菌の胞子を表面に塗布したものと、内生菌または初期落葉菌としてしばしばマツ針葉組織内部に高頻度で感染している *Lophodermium* 属菌(二井・畑, 2000)を培地上で内部まで感染させたものを用意して、最後にそれぞれ様々な強度の殺菌処理を施した上で菌の分離を行い、検出率を比較した。以上のよう手順により、過酸化水素水を用いた殺菌法のマツ死葉における有効性とその際の適切な殺菌強度の検討を行った。

\*<sup>1</sup> Hata, K., Hirata, R. and Sone, K.: A test for a surface-sterilization method on dead pine needles

\*<sup>2</sup> 鹿児島大学農学部 Fac. Agric. Kagoshima Univ., Kagoshima 890-0065

\*<sup>3</sup> 鹿児島大学大学院連合農学研究科 United Grad. Sch. Agr. Sci. Kagoshima Univ., Kagoshima 890-0065

## II. 材料及び方法

2002年11月2日に鹿児島県桜島の鹿児島大学農学部附属演習林桜島溶岩実験場より採取したクロマツ当年生針葉を材料として用いた。均一な実験材料を用意するため、試料針葉は基部と先端部をそれぞれ約1 cm 取り除いた後に、約5 mm の長さに切断した。試料針葉断片はオートクレーブ滅菌後に *Penicillium* 塗布処理または *Lophodermium* 感染処理を施した。前者は2%麦芽エキス寒天培地上で生育させた *Penicillium* sp. の胞子を同培地上で滅菌針葉断片に塗布することによって、後者は2%麦芽エキス寒天培地上で生育させた *Lophodermium* 属の一種 *L. pinastri* のコロニー上に滅菌針葉断片を置床して20℃で2週間インキュベートすることによって用意した。ここで用いた *Penicillium* sp. は実験室の環境中より分離したもの、*L. pinastri* は桜島溶岩実験場のクロマツ健全生葉より分離したものである。試料は異なる強度で表面殺菌を行った後、2%麦芽エキス寒天培地上、20℃で培養し、*Penicillium* sp. または *L. pinastri* が出現するかどうか確認を行った。表面殺菌は70%エタノールと15%過酸化水素水を用いて行い、無殺菌 (C 区)、70%エタノール1分間 (E 1 区)、15%過酸化水素水1分間 (H 1 区)、70%エタノール1分間→15%過酸化水素水1分間→70%エタノール1分間の連続殺菌 (E 1 H 1 E 1 区)、70%エタノール1分間→15%過酸化水素水15分間→70%エタノール1分間の連続殺菌 (E 1 H15E 1 区) という5区を設けた。針葉断片は各処理の各表面殺菌区につき50用いた。

殺菌効果は処理菌の検出頻度によって判断したが、その検出頻度は、

$$\text{検出頻度} = \frac{\text{処理菌出現断片数}}{\text{総断片数}} \times 100 (\%)$$

として計算した。検出頻度の統計的な比較は Fisher の正確確率検定法を用いた2者間比較により行ったが、この場合殺菌区間の差の検定が多重比較になるため、有意水準に関して Bonferroni の補正を行った。すなわち、5区間の比較は2者間比較で10回の検定回数が必要となるため、 $P = 0.005$  を有意水準とした。

## III. 結果

図-1に示すように、無殺菌区では、*Penicillium* 塗布処理、*Lophodermium* 感染処理共に全ての断片から処理菌が検出され

た(検出頻度100%)が、E 1 H15E 1 区では、*Penicillium* 塗布処理、*Lophodermium* 感染処理共に全く菌が検出されなかった(検出頻度0%)。E 1 区、H 1 区、E 1 H 1 E 1 区では、*L. pinastri* は各100%、94%、100%と高頻度で検出されたが、*Penicillium* sp. は各0%、24%、6%と検出頻度は顕著に低かった。

それぞれの処理を見ると、*Penicillium* 塗布処理においては、表面殺菌を行った4区とも無殺菌区より有意に検出頻度が低かったが、H 1 区については、検出頻度が0%であったE 1 区、E 1 H15E 1 区と比較して有意に高い検出頻度(24%)が認められた。*Lophodermium* 感染処理においては、E 1 H15E 1 区以外の殺菌区では無殺菌区と検出頻度に有意差はなかった。

## IV. 考察

組織内部の菌を検出するために有効な表面殺菌法およびその強度とは、組織表面に生息または付着している菌を殺して検出できなくし、かつ組織内部の菌の検出に影響のない程度のもので定義できる。今回の試験に当てはめるならば、試料表面に塗布した *Penicillium* sp. の検出頻度が十分低く、かつ試料内部まで感染させた *L. pinastri* が十分高頻度で検出できるレベルが適切な殺菌強度ということになる。その意味では、*L. pinastri* まで検出できなかったE 1 H15E 1 区の処理は、オートクレーブしたマツ針葉断片には強すぎ、E1区、H 1 区、E 1 H 1 E 1 区、特にE 1 区とE 1 H 1 E 1 区の処理が適切ということになる。畑(1997b)の試験においては、生きたクロマツの二年生針葉に様々な強度の表面殺菌を行い、その結果、今回のE 1 H15E 1 区と同じ殺菌法で、自然感染していた *Lophodermium* 属菌が100%検出された一方、E 1 区、H 1 区、E 1 H 1 E 1 区と同じ殺菌法では葉面菌と思われる菌がある程度出現し、特にE 1 区と同じ殺菌法では無視できないレベルであったため、今回のE 1 H15E 1 区に相当する殺菌法を妥当と結論付けている。これは今回と異なる結果であるが、この時は生きた針葉を用いて検証しており、それがこの違いの原因であると思われる。すなわち、オートクレーブ処理は針葉の細胞を完全に殺し、組織を破壊してしまうため、畑(1997b)の生きた針葉における試験と比較して殺菌剤が組織内に容易に浸透したことによると考えられる。一方、今回H 1 区でかなりの

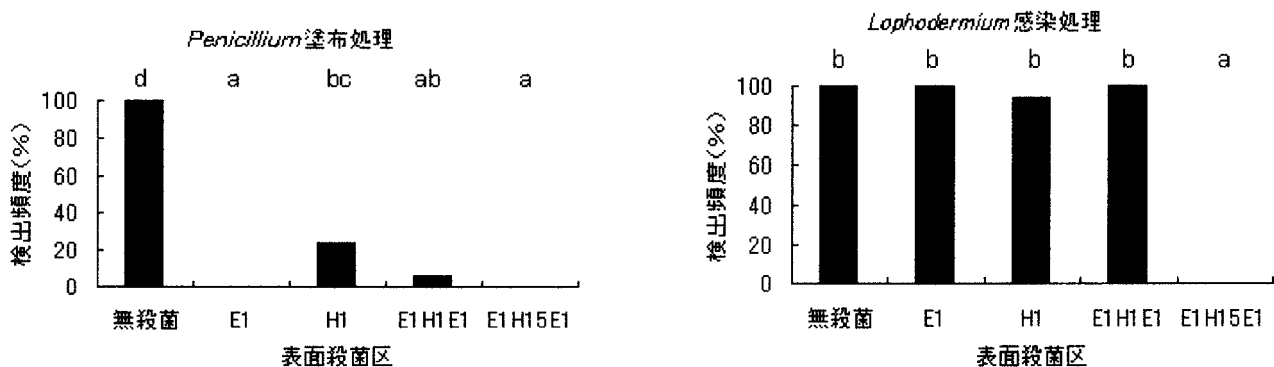


図-1. *Penicillium* 塗布および *Lophodermium* 感染処理試験における表面殺菌の効果 (棒グラフ上の記号は、同じ記号が含まれる場合に有意差がないことを示す)

頻度 (24%) で *Penicillium* sp. が検出された理由として考えられるのは、過酸化水素水処理中に多量に発生する気泡が結果的に過酸化水素水の対象菌への接触を一部妨げたのではないかということである。その意味で、気泡を取り除く効果のあるエタノール処理は重要な意味があると思われる。また、今回は葉面菌をシミュレートするために *Penicillium* sp. の塗布を用いたわけだが、これには二つの問題点がある。一つは塗布された *Penicillium* sp. が通常の葉面菌に比べて死にやすかったのではないかという問題である。例えば、畑 (1997b) では無殺菌区で *Cladosporium cladosporioides* や黒色酵母類といった菌が高頻度で出現しており、通常の葉面菌相ではこういった耐久性の強い黒色真菌がかなり存在していることを示唆している。これは E 1 区における今回と畑 (1997b) の違いの原因の一つだと思われる。もう一つの問題は、塗布処理を寒天上で行ったために試料針葉断片に粘着した寒天を完全に排除出来なかったということである。H 1 区だけでなく E 1 H 1 E 1 区でも多少 (6%) *Penicillium* sp. が検出されたのは、これが一つの原因と思われる。これらのことを踏まえ、今回の結果と畑 (1997b) のそれを合わせて考慮すれば、マツの死葉から組織内部の菌を検出するためには、E 1 H 1 E 1 区が殺菌強度としては妥当ではないかと考えられる。

以上のように、オートクレーブ滅菌処理を施したマツ死葉内部の菌を分離する際にも過酸化水素水を用いた方法は有効であることを示す結果が得られた。ただし、この種のシミュレーションはあくまで目安であって、野外試料への応用に際しては慎重な適用が求められる。今後、実際に野外において死葉内部に生息する菌の分離を行い、本報告で適当と考えられた殺菌条件が野外調査においても実際に適正であるかを検討する必要があると思われる。

## 謝 辞

本研究は日本学術振興会科学研究費補助金 (若手研究 (B): 課題番号14760104) によって行われた。また、研究の計画立案、実施、取りまとめの各段階で議論及び作業を鹿児島大学大学院農学研究科の樹病学特論平成14年度受講生と協力して行った。

## 引用文献

- Bills, G. F. (1996) Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. (*In* Endophytic fungi in grasses and woody plants. Redlin, S. C. and Carris L. M. (eds.), 223pp, APS Press, St. Paul), 31-65.
- 二井一禎・畑邦彦 (2000) 落葉分解に関与する植物の内部共生菌 - 見えざる共生者・内生菌とその生態学的位置づけ -. (森林微生物生態学. 二井一禎・肘井直樹編, 322pp, 朝倉書店, 東京), 27-39.
- 畑邦彦 (1997a) 日菌報 38 : 110-114.
- 畑邦彦 (1997b) 京都大学大学院農学研究科博士論文, 102pp.
- 林康夫 (1983) 建築材の腐朽菌類. (菌類研究法, 青島清雄ほか編, 423pp, 共立出版, 東京), 274-277.
- Kinkel, L. L. and Andrews, J. H. (1988) Trans. Br. Mycol. Soc. 91 : 523-528.
- 松尾卓見ほか (1980) フザリウム病実験法. (作物のフザリウム病, 松尾卓見ほか編, 502pp, 全国農村教育協会, 東京), 361-419.
- Petrini, O. (1986) Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. (*In* Microbiology of the phyllosphere. Fokkema, N. J. and van den Heuvel, J. (eds), 392pp, Cambridge University Press, Cambridge), 175-187.

(2007年11月19日受付 ; 2008年 2月 6日受理)