

# ナラタケ栽培における雑菌汚染

- 汚染経路の解明 -

宜寿次盛生      原田      陽      米山      彰造

## Fungal Contamination in the Cultivation of *Armillaria ostoyae*

-Investigation of the background of contaminant-

Seiki GISUSI    Akira HARADA    Shozo YONEYAMA

Fungal contamination often occurs in spawn running of *Armillaria ostoyae*. The causes of the contamination were investigated by repeated subcultures on sawdust media. Though the high protective capacity of the cap reduced contamination, the reduction of the microorganism density in the incubation room was more effective for avoiding it. The incubation room of spawn for inoculum must maintain a low density of microorganisms and be separate from that of spawn for fruiting.

*Key words:* *Armillaria* spp., incubation room, fungal contamination, microorganisms density, spawn  
ナラタケ, 培養室, 雑菌汚染, 微生物密度, 種菌

ツバナラタケの培養中にしばしば発生する雑菌汚染の原因を解明するため 培養済み菌床を種菌として用いた培養試験を行い 汚染率を比較し検討した。その結果 培養容器の性能によって雑菌汚染を抑制することが可能であるが 培養室の微生物密度がより大きく影響することが判明した。栽培工程を考慮すると 子実体生産を目的とする培養室と種菌製造の培養室は別に設け 管理する必要がある。

### 1. はじめに

林産試験場では野生のナラタケ属菌から菌床栽培に適したツバナラタケ (*Armillaria ostoyae* ; 以下, ナラタケ) 2 菌株を選抜し, 種々の栽培条件を検討し, ピン栽培が可能となった<sup>1-4)</sup>。しかし, 培養中にしばしば発生する雑菌汚染<sup>5)</sup> が, 生産性の向上に向けた課題の一つになっている。林産試験場においても, 他の食用菌 (タモギタケ, マイタケ, ナメコなど) と

同様にピンを用いて栽培試験を行った場合, ナラタケは培養初期に雑菌汚染が確認されることが多く, また時には, 汚染頻度および汚染程度が大きく, 栽培試験にも支障を来す事例があった。

食用菌の生産において, 雑菌汚染は, 子実体収穫量の減少など重大な経済的被害を与えるため, その原因究明と対策が重要である。培養中に雑菌汚染が認められた場合, 培養室での雑菌の混入のほか,

それ以前の栽培工程に原因があることが考えられ、各段階を点検していく必要がある<sup>6)</sup>。また、施設および機器類の不備や人為的な作業ミスのほか、種菌の雑菌汚染が原因の場合も考えられる<sup>6)</sup>。

本研究では、ナラタケの培養試験を行い、雑菌汚染を観察することで、汚染経路の解明を試みた。

## 2. 材料と方法

### 2.1 菌株および培地組成

供試菌は、ナラタケ林産試験場保存菌株 HFP-Am82-14 を用いた。

種菌および培養試験のおが粉培地は、ダケカンバおが粉にフスマとコーンブランを所定量混合し水道水を加え培地水分を調整後、850mL のポリプロピレン製栽培ビンに所定重量ずつ充填し、121℃ で 60 分間オートクレーブにより殺菌した。雑菌検出検査および落下菌の測定には、ポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地を用いた。

### 2.2 接種および培養

種菌由来の雑菌汚染の危険を分散し、汚染源を特定するため、同一試験区内で 2 本以上の種菌ビンを用いた。接種の前に、種菌の菌床表面に雑菌が認められないことを確認し、殺菌済みの薬さじを用いて菌床表面を掻き取り、70%エタノールを含ませた脱脂綿でビン口周縁部を拭った。別の殺菌済み薬さじを用いて種菌の菌床を粉碎し、培地中央部の接種孔および培地表面を被覆するように接種した。接種後の培養ピンはフィルター付きキャップを装着して、 $22 \pm 1$ ℃ で培養した。

試験は 2 回行い以下の通り試験区を設定した。

試験 1 は、通常の培養と培養中のピンをシートで被覆する試験区を比較した。

試験 2 では、殺菌後の培地に種菌を接種しない試験区を設け (以下、無接種区)、接種した培地と同様に培養室に配置し雑菌汚染を観察した。また、内部通気孔面積が異なる 2 種類のキャップ (N; ヒラタケ用キャップ, H; プナシメジ用キャップ, 通気孔面積は  $N > H$ ) を用い、通常使用する培養室 (培地調制作業を行う施設内に設置; RA) と、他の施設内に設置された、別の培養室 (RB) の 2 つの環境下で、それぞれ比較した。供試ピン数は各試験区 16 本で、

試験区ごとに同一コンテナに載せ、コンテナは室内の培養棚にランダムに配置した。

なお、試験 1 に用いた種菌は、培養室 RA で培養し、試験 2 の種菌は培養室 RB で培養した。また、必要に応じて種菌の各菌床 (各ビン) に番号を付して示した (例: 種菌 No.1)。

### 2.3 空中落下菌の測定

試験 2 では、富樫らの方法<sup>7)</sup> に準じて培養室の落下菌を測定した。落下菌の採取は、PDA 平板培地を培養室あたり 5 枚供試し、床から約 1.5 m の高さの位置で 5 分間開放して行った。落下菌の測定は、落下菌を採取した PDA 平板培地を 25℃、照明下で培養し、コロニー数を colony forming unit (以下, CFU) として計測した。また、菌数の多い主要な雑菌は、目視によるコロニーの特徴と顕微鏡観察から属レベルの同定を行った。

### 2.4 雑菌汚染率の測定

雑菌汚染率は、後述する 2.4.1 および 2.4.2 で雑菌を確認または検出したピン数を供試したピン数で除して表した。

雑菌汚染率 (%) = 雑菌が検出されたピン数 / 供試したピン数 × 100

#### 2.4.1 目視による雑菌の確認

試験 1 では、1 週ごとにピンすべてを観察し、クリーンベンチ内でキャップを開け、雑菌を目視で確認した。試験 2 では、外観から雑菌の混入が確認出来た時点で、キャップを開け、雑菌を目視で確認した。

#### 2.4.2 寒天培地を用いた雑菌の検出

試験 1 では無作為に抽出した 6 本の菌床表面から、試験 2 では、4 週間培養終了後、目視で雑菌汚染が認められなかったすべての菌床表面から雑菌の検出を試みた。すなわち、火炎滅菌したピンセットを用いて、菌床表面の一部を無作為に 3 点切り取り、PDA 培地に分離し、25℃、照明下で培養し、雑菌の有無を確認した。また、接種後残った種菌の菌床を粉碎し、PDA 培地に接種、25℃ 照明下で培養し、雑菌汚染の有無を確認した。

### 2.5 子実体の発生

試験 1 では、培養終了後、雑菌検出に用いた菌床および種菌用として保存した菌床を除き ( $n = 6 \sim$

16), 子実体の発生を試みた。供試した菌床数で, 子実体を収穫した菌床数を除した値を収穫菌床率として求めた。

収穫菌床率 (%) = 子実体を収穫した菌床数 / 子実体発生に供試した菌床数 × 100

### 3. 結果

#### 3.1 種菌由来の雑菌汚染

試験1の雑菌汚染の推移と収穫菌床率を第1表に示した。この結果から, 種菌由来の雑菌汚染を推定することが出来た。試験1は, シート被覆の有無で培養中の雑菌汚染を比較する目的で行った試験であるが, 試験区間で差はみられなかった。しかし, 用いた種菌別にデータを見ると, 種菌 No.1 を用いた菌床は, 1週目から明らかに種菌 No.2 の菌床よりも雑菌汚染率が高くなった。試験1に用いた2本の種菌とも雑菌が検出されたが, 特に種菌 No.1 からはコロニーの形態が異なる2種類のペニシリウム属菌 (*Penicillium* spp.) が数多く検出された。種菌 No.2 を用いた菌床は, 種菌からの雑菌汚染がほとんど無かったと考えられるが, No.1 を用いた菌床はほぼすべて種菌接種とともに雑菌を混入させたものと判断された。

また, 培養終了後, 2.4.2 で述べた6本の菌床表面からは全て *Penicillium* spp. などの雑菌が寒天培地で検出され, 目視では確認できない雑菌汚染の可能性が示唆された。No.2 を接種した無処理区のように, 雑菌汚染がほとんど見られなければ子実体発生に影響はないが, No.1 を接種した菌床では, 菌床表面が全て雑菌に被覆され子実体が発生しないなど, 収穫菌床率が低くなった。

#### 3.2 清浄な室内での培養とキャップの効果

試験2での両培養室 (RA および RB) の空中落下菌数の推移を第2表に示した。培養室 RA では, 試験期間中, 増減が認められるものの落下菌数は多い状態で推移していた。一方, 培養室 RB は, 全試験期間を通して *Penicillium* spp. のコロニーが一つ検出されたのみであり, RA に比べ清浄な室内環境であった。

次に, 無接種の培養ビンへの雑菌汚染の経過を第1図に示した。培養室 RA では, 培養2週目に雑菌汚染が認められ, 週の経過とともに雑菌汚染率は増加した。一方, 培養室 RB では, 全試験期間を通して雑菌汚染は認められなかった。また, 培養室 RA での雑菌汚染率をキャップの種類で比較すると, Nキャップに比べ H キャップは約半分程度であった。

第1表 ナラタケ培養中の雑菌汚染率の推移と収穫菌床率 (試験1)  
Table 1. Relation between ratio of fruiting and fungal contamination for spawn running of *A. ostoyae*. (1st experiment)

種菌 No. SpawnNo.	被覆 <sup>1)</sup> Treatment	雑菌汚染率 (%) <sup>2)</sup> Ratio of fungal contamination					収穫菌床率 (%) <sup>3)</sup> Ratio of fruiting
		週 Week from inoculation					
		1	2	3	4	5	
1	有り Covered	69	100	100	100	100	69
2	有り Covered	0	0	0	0	0	100
1	なし Exposure	69	88	94	94	94	71
2	なし Exposure	0	0	0	0	0	100

雑菌汚染のない菌床を目視で確認し, 種菌として使用した

1) 培養中の培養ビンに施したシート被覆の有無

2) 雑菌汚染率 = 雑菌が検出されたビン数 / 供試したビン数 × 100

3) 収穫菌床率 = 子実体を収穫した菌床数 / 子実体発生に供試した菌床数 × 100

Non-contaminated spawn visible to naked eye was used for inoculum.

1) Treatment: Bottles of spawn were covered with/without a plastic sheet during incubation.

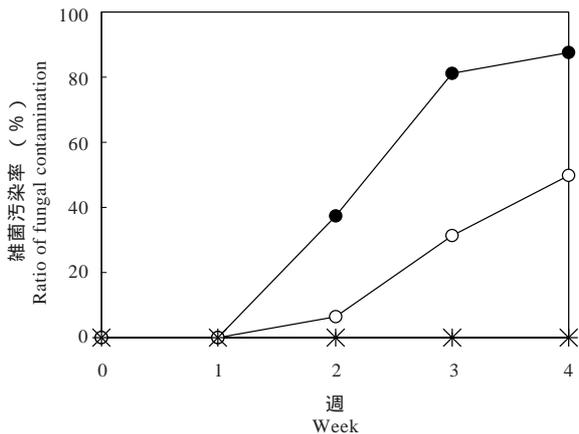
2) Ratio of fungal contamination = Number of spawn contaminated/Number of trial spawn × 100

3) Ratio of fruiting = Number of fruiting spawn/Number of trial spawn × 100

第2表 ナラタケ培養中における培養室内の空中落下菌数の推移 (平均 CFU, 試験2)

Table 2. Changes of airborne microorganisms isolated on PDA plates in incubation rooms for *A. ostoyae*. (Mean value of CFU per plate of 9 cm diameter, 2nd experiment)

		週 Week	0	1	2	3	4	5	平均 Mean
培養室 RA Incubation room RA	糸状菌 Mold		10.2	3.6	13.0	0.8	1.6	7.0	6.0
	ペニシリウム属菌 <i>Penicillium</i> spp.		3.0	2.4	10.6	0.0	1.0	2.4	3.2
	クラドスポリウム属菌 <i>Cladsporium</i> spp.		1.2	0.0	1.8	0.2	0.4	0.4	0.7
	トリコデルマ属菌 <i>Trichoderma</i> spp.		0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	菌糸型不完全菌類 <i>Mycelia Sterilia</i>		4.0	0.8	0.2	0.6	0.2	0.8	1.1
	その他および不明 Others or unknown		1.8	0.4	0.4	0.0	0.0	3.4	1.0
	細菌 Bacteria		1.8	2.8	0.2	3.4	0.8	0.0	0.0
培養室 RB Incubation room RB	糸状菌 Mold		0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0
	ペニシリウム属菌 <i>Penicillium</i> spp.		0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0
	その他および不明 Others or unknown		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	細菌 Bacteria		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0



第1図 培養室の違いによる無接種培地への雑菌汚染率 (試験2)

凡例) ○: NキャップをしてRAで培養, ●: HキャップをしてRAで培養, +: NキャップをしてRBで培養, ×: HキャップをしてRBで培養した。

Fig. 1. Difference of fungal contamination to non-inoculated sawdust medium between incubation rooms (2nd experiment).

Legends) ○: Incubated at room RA with N-cap; ●: room RA with H-cap; +: room RB with N-cap; ×: room RB with H-cap, respectively.

種菌に用いた菌床3本からは、雑菌は全く検出されなかった。ナラタケを接種した菌床の目視による雑菌汚染率と、寒天培地で検出した雑菌汚染率を第3表に示した。ナラタケ培養4週目において、目視で検出した雑菌汚染は、培養室RAで13ないし31%にとどまったが、寒天培地では、高頻度で雑菌が検出された。菌床表面から検出された雑菌の種は *Penicillium* spp. が最も多かった。培養室RAの雑菌汚染ピン数をキャップの種類で比較すると、Nキャップに比べHキャップは少なくなり、第1図に示した無接種区の結果と一致した。一方、培養室RBでは目視、寒天培地とも雑菌は全く検出されず、落下菌数(第2表)および無接種培地への雑菌汚染(第3表)の結果と一致した。

第3表 ナラタケ菌床から目視で検出した雑菌汚染率と、PDAで検出した雑菌汚染率（試験2）  
 Table 3. Fungal contamination to spawn of *A. ostoyae*. Ratio of contamination visible to naked eye and isolated by PDA plates. (2nd experiment)

	培養室 RA Incubation room RA		培養室 RB Incubation room RB	
	Nキャップ N cap	Hキャップ H cap	Nキャップ N cap	Hキャップ H cap
目視検出雑菌汚染率（%） Ratio of fungal contamination visible to naked eye.	31	13	0	0
PDA検出雑菌汚染率（%） Ratio of fungal contamination isolated by PDA plates.	69	63	0	0
検出された雑菌数 Number of contaminants isolated by PDA plates.				
ペニシリウム属菌 <i>Penicillium</i> spp.	26	15		
クラドスポリウム属菌 <i>Cladsporium</i> spp.	2	4		
菌糸型不完全菌類 Mycelia Sterilia	1	2		
その他および不明 Others or unknown	2	2		
無接種培地における 目視検出雑菌汚染率（%） Ratio of fungal contamination visible to naked eye on sawdust medium.	88	50	0	0

#### 4. 考察

ナラタケの培養試験を繰り返し行うことで、ナラタケ栽培における雑菌汚染の経路が明らかになった。ナラタケ子実体発生に大きく影響する培養中の雑菌汚染は、種菌接種時の雑菌混入が主要因と考えられる。一方、ナラタケ培養中にも *Penicillium* spp. など雑菌の孢子混入は起こるが、子実体発生への影響は比較的小さい。

第2表に示したように通常用いる培養室 RA の空中落下菌は他の食用きのこ生産施設同様<sup>7-10)</sup>、*Penicillium* spp. が最も多く検出された。これらの雑菌が、ナラタケ培養中に菌床表面へ混入していることが第3表から推察される。培養初期に培地表面のナラタケが被覆していない部分に雑菌の孢子が付着すると、成長の遅いナラタケが蔓延する前に、雑菌

のコロニーは大きく広がり、目視で容易に確認可能となることが多い。また、外観で雑菌汚染が認められない場合でも、雑菌が菌床内部でナラタケとすみ分けコロニーを形成している場合もある。一方、ナラタケの黒変被膜が菌床表面を完全に被覆した後、雑菌が混入した場合、黒変被膜上で雑菌は次第にコロニーを形成し、孢子を形成するが、黒変被膜を通過することは出来ず、菌床内部へは侵入できない。3.1で述べたように、これら雑菌に汚染された菌床でも、子実体発生は問題ない場合が多い。

しかし、雑菌に汚染された菌床を種菌として用いた場合、雑菌汚染が拡大する危険性は高くなる。菌床内部に雑菌を保持した種菌の場合は、ナラタケとともに雑菌を接種し、培地には成長の早い雑菌が繁殖する。一方、菌床表面のみが雑菌に汚染されてい

る場合は、接種工程の前処理で他のキノコ同様、菌床表面部分は除去される<sup>11, 12)</sup>ので、新たな培地に雑菌を接種する危険性は低い。しかし、第3表から分かるように、ナラタケ培養中に菌床表面へ、*Penicillium* spp. など雑菌の胞子が高頻度で混入しているにもかかわらず、目視で確認できない場合がある。これは、雑菌の胞子が発芽、増殖して目視で確認できるまでの時間差があるほか、ナラタケの黒変被膜上に付着した雑菌の胞子が発芽、増殖するのを抑制する何らかの作用が起こっていることも考えられる。シイタケは、菌糸生育が旺盛な条件下では、その雑菌であるトリコデルマ (*Trichoderma* spp.) の侵害を抑制することが指摘されており<sup>13-15)</sup>、また、抗菌性物質を生産することもわかっている。ナラタケも黒変被膜で雑菌の侵入を阻止するほか、シイタケ同様に雑菌の生育を阻害していることも考えられる。いずれにせよ、目視だけで雑菌の存在を確認するには限界があり、正確な検査を行うには寒天培地へ分離培養して確認する必要がある。目視で確認不可能な汚染部分の除去が不完全な場合は、残存した雑菌を接種することになり、試験1の種菌 No.1 を接種した菌床のように汚染が拡大する。

このように、目視で確認不可能な雑菌を種菌とともに接種し培養することで、雑菌汚染が拡大し目視で確認可能となるが、試験2で示したように培養工程においても常時、雑菌の混入が起きていることから、種菌由来の汚染か培養中の汚染かを特定することは困難であった。そこで、種菌由来の雑菌汚染の危険を分散し、汚染源を特定するため、2本以上の種菌ビンを用いることが有効であった。しかし、種菌からの雑菌汚染が推測された場合、危険回避のためにも、そのロット全ての種菌が汚染されていると考えた方がよい。本研究においても、試験1は種菌2本すべてから雑菌が検出され、他方、試験2の種菌3本からは全く雑菌は検出されなかった。

試験2の結果から(第1図, 第3表), キャップの性能によって培養中の雑菌汚染が抑制出来ることが示唆された。渡辺は、市販のキャップを改良した高性能のキャップを開発しており<sup>16)</sup>、キャップの性能は、防塵性に優れ通気性と保湿性のバランスが重要であると述べている。しかし高性能のキャップを用

いても防塵性を100%にすることは困難であり<sup>16)</sup>、種菌培養中の雑菌汚染を防ぐには室内環境をより良く管理することがキャップの性能を上げることより有効と考えられる。すなわち、種菌として用いる菌床の培養室は、子実体生産を目的とする培養室とは別に設け、室内の微生物密度を低減することが重要である。

## 文 献

- 1) 富樫巖, 瀧澤南海雄: 木材学会誌, **40**, 213-219 (1994)
- 2) 富樫巖, 瀧澤南海雄: 木材学会誌, **41**, 211-217 (1995)
- 3) 富樫巖: 木材学会誌, **41**, 956-962(1995)
- 4) 富樫巖: 木材学会誌, **42**, 186-193(1996)
- 5) 宜寿次盛生: “キノコ栽培全科”, 農文協, 198-200(2001)
- 6) 宜寿次盛生: 林産試だより, 9月号, 1-3(2002)
- 7) 富樫巖, ほか3名: 木材学会誌, **42**, 1258-1263 (1996)
- 8) 河野又四, 寺下隆夫: 日菌報, **23**, 511-522 (1982)
- 9) 米虫節夫, ほか4名: 防菌防黴, **16**, 3-8(1988)
- 10) 吉田忠, 高尾彰一: 北海道大学農学部邦文紀要, **13**, 81-100(1982)
- 11) 山本秀樹: “キノコ栽培全科”, 農文協, 85-96 (2001)
- 12) 角田茂幸: “キノコ栽培全科”, 農文協, 120-127 (2001)
- 13) 有田郁夫: 菌蕈研報, **9**, 36-56(1971)
- 14) 小松光雄: 菌蕈研報, **13**, 1-113(1976)
- 15) 大賀祥治, 近藤民雄: 木材学会誌, **24**, 650-654 (1978)
- 16) 渡辺和夫: 奈良県林試情報, **32**, 2-3(1992)

- きのこ部 生産技術科 -  
(原稿受理: 04.08.16)