

エノキタケの栽培時に混入する細菌による  
「ストップ症状」の発生機作

北本 豊\*・尾崎規子\*・紫田瑞代\*・白鳥 保\*\*・  
柿本陽一\*\*・内山虎歳夫\*\*・市川吉夫\*

昭和62年5月20日受付

Inhibition of Mycelial Growth Caused  
by Contamination of Certain Bacteria  
in commercial Cultivation of *Flammulina velutipes*

Yutaka KITAMOTO\*・Noriko OSAKI\*・Mizuyo SHIBATA\*・  
Tamotsu SHIRATORI\*\*・Youichi KAKIMOTO\*\*・Tosao UCHIYAMA\*\*・  
Yoshio ICHIKAWA

This paper presents the results of an investigation of bacterial contamination causing a symptom called "Stop-Shoujyou" into the culture bottles of "Enokitake" mushroom, in the mushroom houses located in Iiyama, Nakano and Shinonoi, Nagano Prefecture. Most of isolated bacteria from the culture bottles showing this symptom were identified to be the genus *Bacilli*, but the other genera of facultative anaerobes such as *Prototus* and *Aeromonas* were also detected. *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. polymixa* were the members isolated at high frequency rates from contaminated bottles. When the fungal mycelia and the isolated bacterium were inoculated adjacent to each other on a PDA plate, the inhibitory zone against the fungal growth appeared around the bacterial colony. The inoculation of isolates, such as *B. polymixa* 19-2 and *B. licheniformis* 10-5a, into the saw-dust medium at the mycelium-seeding-process in mushroom culture reproduced the symptom characteristic of "Stop-Shoujyou", and also caused the symptom of "Negusare-Shoujyou", which was the bacterial corruption against the stems of mushrooms. However, the inoculation of these bacteria after the mycelium-propagation-process only caused "Negusare-Shoujyou". On the other hand, the other *Bacilli* or *A. salmonicida* merely caused "Negusare-Shoujyou", even they were inoculated at the mycelium-seeding-process in mushroom cultivation.

---

\* 鳥取大学農学部農林総合科学科資源利用化学講座

\* Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tottori University

\*\* 長野県野菜花き試験場

\*\* Vegetable and Ornamental Crops Experiment Station, Nagano Prefecture

## 緒 言

近年、エノキタケの生産規模の拡大にともなって細菌汚染による被害が増大している。このうち、エノキタケ栽培の菌まわし工程で培養基の細菌汚染により栄養菌糸の生長が抑制され発育阻止帯が形成される現象は「ストップ症状」と呼ばれ、同じく細菌汚染により発生する子実体茎部の軟化褐変症状である「根腐れ症状」とともに大きな被害を引き起こしている。ところで、エノキタケの細菌汚染についての調査研究はきわめて乏しく<sup>3)</sup>、これらの症状の誘起する細菌の同定と発生機作の解明については報告が見られない。

そこで、著者らは、エノキタケの栽培規模が最も大きい長野県で「ストップ症状」が多発した栽培農家を調査し、被害が発生した栽培ビンから原因細菌の分離と症状の再現を試み、原因細菌の混入経路と本症状の発生機作について検討を加えた。

## 実験材料および方法

1. 供試細菌の分離 エノキタケ栽培施設の「ストップ症状」あるいは本症状と「根腐れ症状」を併発した栽培ビンから培養基を掻き出し、常法のPotato-Dextrose寒天(PDA)斜面培地に接種して、28°Cで3日間培養した。培地上で生育した菌体を白金耳で釣菌し、これを滅菌水で希釈後、PDA培地16mlを分注したペトリ皿に塗抹して平板培養し、形成された独立コロニーを白金鉤で移植して純粋培養とした。これらの分離細菌を以下の形態学的・分類学的試験および培養特性と耐熱性の試験、ならびに細菌による症状再現試験に供した。

2. 形態学的観察 分離細菌の形態は、光学顕微鏡および白金パラジウムでシャドウイングした試料を透過型電子顕微鏡で観察した。細菌の運動性は0.2%寒天添加肉汁半流動培地を用いてさく刺培養し、観察した。細菌の孢子形成能は、Dornerの孢子染色法<sup>2)</sup>、および細菌懸濁液を85°C、10分間加熱処理し、その後の生育の有無より判定した。

3. 分類学的試験 分離細菌の同定のための生理学的性質の試験は、「微生物の分類と同定」<sup>4)</sup>および「食品工学実験書(下巻)」<sup>7)</sup>に従って行った。細菌の同定は、「Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8th Edition)」に従った<sup>1)</sup>。

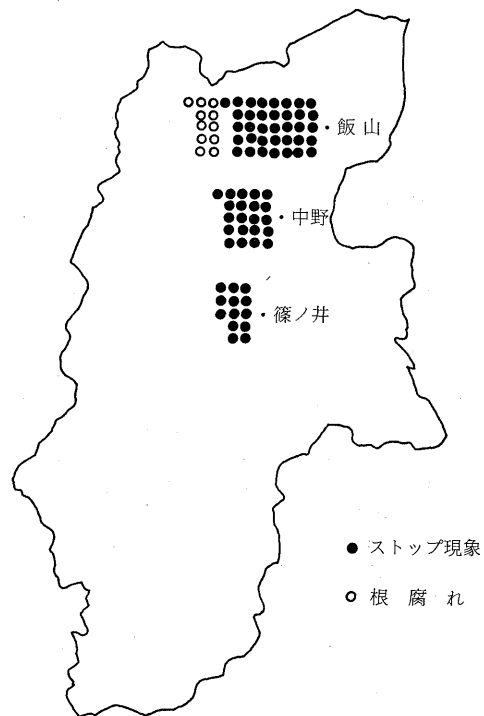
3. 培養特性と耐熱性試験 分離細菌の培養温度特性は、PD培地に11mM濃度でリン酸カリウムバッファー(pH 7)を添加して24時間静置培養し、660nmで比濁度を

測定した。pH特性は、上記バッファーのpHを変えて30°Cで24時間培養後、比濁度を測定した。

4. 症状再現試験 細菌症状の再現試験には、800ml PP栽培ビンに常法の鋸屑・米糠培地を分注して、120°Cで45分間殺菌したものに、エノキタケ (*Flammulina velutipes*)・中野株を接種し、分離細菌の懸濁液を殺菌前、殺菌後の菌床面および菌掻き後の菌床面に接種して、経過を観察した。エノキタケの栽培は、菌まわし工程は、室温19-21°C、湿度70-80%で約25日間培養し、菌掻きをした。芽出し工程は室温12-13°C、湿度85-90%で10日間、抑制工程は室温4°C、湿度85-90%で6-8日間、生育工程は室温5-7°C、湿度70-80%で培養し、接種約2か月後に子実体を収穫した。

## 実験結果

1. 細菌症状の発生と被害の状況 本研究のため調査した長野県北部での「ストップ症状」が多発したエノキタケ栽培施設における細菌汚染の被害状況を、第1図に

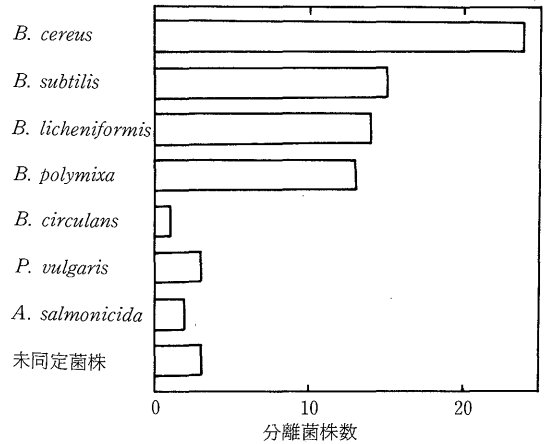


第1図 長野県北部のエノキタケ栽培施設における細菌汚染の発生状況

示す。

細菌汚染の状況を調査した81例のうち、中野、篠ノ井では被害ビンの主な症状は「ストップ症状」のみであったが、飯山では被害ビンの4分の1の主たる病徴は「根腐れ症状」であった。「ストップ症状」には、栄養菌糸の横方向の生育が抑制されるもの、ビン全体の生育が抑制されるもの、および生育抑制を生じた境界部分に褐色の帯線が形成されるものに分類された。一方、「根腐れ症状」を呈した被害ビンでは、アンモニア臭が感じられ、栄養菌糸の生育には特段の変化はみられなかったが、子実体発生が抑制され茎部分の組織が褐変して崩壊が進み、さらに傘部分で局所的に着色するものも観察された。これらの細菌被害の発生状況は、調査した栽培農家の大半では栽培ビン総数の5—10%程度の被害であったが、栽培施設が老朽化し、かつ栽培管理の不十分な農家で約半数のビンに被害が観察されるところもあった。

2. 分離細菌の同定と検出状況 被害ビンから分離された細菌の同定と検出割合を第2図に示す。分離細菌の大部分は鞭毛があり運動性を有するグラム陽性の好気性ないしは通性嫌気性の短桿菌で、孢子形成能を有し、*Bacillus*属細菌と同定されたが、通性嫌気性でグラム陰性の運動性のある無孢子性の短桿菌として*Proteus*属および*Aeromonas*属細菌も少数例検出された。*Bacillus*属細菌では、*B. cereus*、*B. subtilis*、*B. licheniformis*、*B. Polymixa*の順序で検出頻度が高かった。これらの結果から、「ストップ症状」の原因細菌として、*Bacillus*属細菌が示唆された。



第2図 エノキタケの「ストップ症状」被害ビンから検出された細菌の出現頻度

3. 分離細菌の培養特性 分離細菌のエノキタケの培養基内における増殖の可否を知るため、上記の検出結果に基づいて*Bacillus*属細菌から9菌株を選択し、それらの培養温度および培養可能pH領域を検討した。その結果を第1表に示す。供試細菌はいずれも37—45°Cに至適培養温度があり、エノキタケの菌まわし工程におけるビン内温度環境下(23—27°C)で生育可能であった。供試細菌はいずれもpH 7付近に至適領域があったが、エノキタケの培養基の初発pHであるpH 5—6付近でも生育可能で、

第1表 分離細菌の培養温度およびpH特性

| 分離菌株                          | 濁度 (660nm) |        |        | 濁度 (660nm) |       |       |
|-------------------------------|------------|--------|--------|------------|-------|-------|
|                               | pH5.0*     | pH6.0* | pH7.0* | 20°C       | 25°C  | 37°C  |
| <i>A. salmonicida</i> 18-4    | 0.218      | 0.268  | 0.333  | 0.113      | 0.265 | 0.032 |
| <i>B. cereus</i> 3-3          | 0.107      | 0.148  | 0.156  | 0.031      | 0.080 | 0.389 |
| <i>B. cereus</i> 10-1         | 0.104      | 0.138  | 0.172  | 0.049      | 0.093 | 0.443 |
| <i>B. licheniformis</i> 2-3   | 0.098      | 0.145  | 0.224  | 0.029      | 0.076 | 0.379 |
| <i>B. licheniformis</i> 10-5a | 0.118      | 0.153  | 0.188  | 0.061      | 0.129 | 0.381 |
| <i>B. polymixa</i> 17-3       | 0.068      | 0.114  | 0.140  | 0.014      | 0.029 | 0.404 |
| <i>B. polymixa</i> 18-3       | 0.052      | 0.074  | 0.084  | 0.007      | 0.036 | 0.400 |
| <i>B. polymixa</i> 19-2       | 0.045      | 0.063  | 0.120  | 0.015      | 0.043 | 0.404 |
| <i>B. subtilis</i> 1-2        | 0.086      | 0.122  | 0.178  | 0.046      | 0.057 | 0.414 |
| <i>B. subtilis</i> 9-3        | 0.052      | 0.060  | 0.080  | 0.029      | 0.071 | 0.377 |
| <i>P. vulgaris</i> 7-5a       | 0.097      | 0.163  | 0.192  | 0.050      | 0.151 | 0.180 |

\*培養条件：30°C，24時間。

増殖により培地pHが0.3-0.4程度低下した。

4. 分離細菌の耐熱性試験 分離細菌のエノキタケ培養基への汚染が、培養基の不十分な殺菌によるものか、あるいは殺菌後の混入によるものかを推察するため、分離細菌から代表的な菌株を12株選び、耐熱性試験を行った。その結果を第2表に示す。有孢子細菌である*Bacillus*属は100°C、30分の加熱処理では死滅せず、殺菌には少なくとも110°C、30分以上の処理が必要であった。無孢子細菌2菌株も100°C、10分間処理では完全に死滅せず、比較的高い耐熱性を示した。これらの結果から細菌汚染の

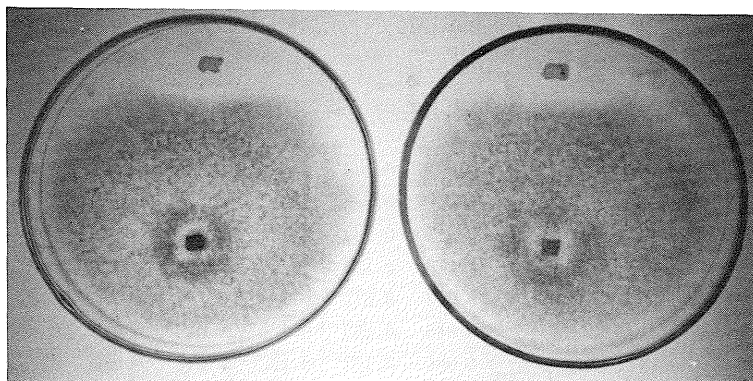
原因として、不十分な殺菌による培養基素材の汚染細菌の生存、および殺菌後の放冷と接種時に細菌が混入する機会が示唆された。

5. 生育阻害試験 分離細菌によるエノキタケ栄養菌糸体に対する生育抑制の有無を、エノキタケ・中野株と細菌各菌株のPDA平板培地上での対峙培養により観察した。その結果、第3図に示すように、エノキタケ菌糸体の伸長が細菌の接種点の近傍で阻止され、細菌が分泌する抗菌性物質により発育阻止帯が形成された。つぎに、分離細菌12菌株の菌糸生長抑制効果を比較した結果を、

第2表 分離細菌の耐熱性試験

| 分離菌株                          | 孢子形成 | 加熱処理条件*   |           |           |           |           |
|-------------------------------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                               |      | 100°C-10分 | 100°C-30分 | 110°C-10分 | 110°C-30分 | 120°C-30分 |
| <i>A. salmonicida</i> 18-4    | +    | +         | -         | -         | -         | -         |
| <i>B. cereus</i> 3-3          | +    | +         | +         | -         | -         | -         |
| <i>B. cereus</i> 10-1         | +    | +         | +         | -         | -         | -         |
| <i>B. circulans</i> 19-3      | +    | +         | +         | -         | -         | -         |
| <i>B. licheniformis</i> 2-3   | +    | +         | +         | -         | -         | -         |
| <i>B. licheniformis</i> 10-5a | +    | +         | +         | -         | -         | -         |
| <i>B. polymixa</i> 17-3       | +    | +         | +         | -         | -         | -         |
| <i>B. polymixa</i> 18-3       | +    | +         | +         | -         | -         | -         |
| <i>B. polymixa</i> 19-2       | +    | +         | +         | -         | -         | -         |
| <i>B. subtilis</i> 1-2        | +    | +         | +         | -         | -         | -         |
| <i>B. subtilis</i> 9-3        | +    | +         | +         | -         | -         | -         |
| <i>P. vulgaris</i> 7-5a       | +    | +         | -         | -         | =         | -         |

\* 加熱処理後の分離細菌の生存試験は、細菌懸濁液を1白金耳、肉汁培地に接種して37°Cで培養した。



第3図 エノキタケ・中野株と分離細菌の対峙培養。  
(左) 中野株×*B. cereus* 3-3, (右) 中野株×  
*B. licheniformis* 2-3

第3表 エノキタケ栄養菌糸と分離菌の対峙培養

|                               | 生育阻害(A)または<br>発育阻止帯形成(B) |
|-------------------------------|--------------------------|
| <i>A. salmonicida</i> 18-4    | B                        |
| <i>B. cereus</i> 3-3          | A                        |
| <i>B. cereus</i> 10-1         | A                        |
| <i>B. circulans</i> 19-3      | B                        |
| <i>B. licheniformis</i> 2-3   | B                        |
| <i>B. licheniformis</i> 10-5a | B                        |
| <i>B. polymixa</i> 17-3       | B                        |
| <i>B. polymixa</i> 18-3       | B                        |
| <i>B. polymixa</i> 19-2       | B                        |
| <i>B. subtilis</i> 1-2        | B                        |
| <i>B. subtilis</i> 9-3        | A                        |
| <i>P. vulgaris</i> 7-5a       | —*                       |

\*エノキタケ菌糸体が細菌菌叢上を生育した。

第3表に示す。細菌の増殖速度が菌糸伸長に対してとくに速かった*B. licheniformis*および*B. cereus*の一部の菌株では菌糸体伸長の完全阻害が観察されたが、その他の*Bacillus*属分離菌株および*A. salmonicida*では、阻止帯の形成が観察された。*P. vulgaris*は阻害効果を有しなかった。

6. 細菌症状の再現試験 分離細菌による「ストップ症状」および「根腐れ症状」の再現のため、エノキタケ・中野株を栽培ピンを培養し、これに分離細菌の懸濁液を培地内、殺菌後の菌床面および菌掻き後の菌床面に接種して、経過を観察した。その結果を第4表に示す。「ストップ症状」は、培地内接種区にのみ発生し、*B. polymixa* 19-2 および*B. licheniformis* 10-5aで、それぞれ20および10%の比率で被害ピンが観察され、子実体収量が16%程度低下した。また、これらの接種区では60-90%の高い比率で「根腐れ症状」が発生し、両症状が単一原因細菌により発症し得ることが確認された。*B. cereus*, *B.*

第4表 「ストップ症状」再現試験

| 分離菌検                          | ストップ症<br>状発生率<br>(%) | 根腐れ症状<br>発生率(%) | 菌糸伸長率(%) |     | 子実体収量<br>(g/ピン) |
|-------------------------------|----------------------|-----------------|----------|-----|-----------------|
|                               |                      |                 | 側面       | 底面  |                 |
| (無接種区)                        | 0                    | 0               | 100      | 100 | 134             |
| (培地内接種)                       |                      |                 |          |     |                 |
| <i>A. salmonicida</i> 18-4    | 0                    | 89              | 77       | 76  | 83              |
| <i>B. cereus</i> 3-3          | 0                    | 60              | 93       | 99  | 109             |
| <i>B. licheniformis</i> 10-5a | 10                   | 60              | 94       | 99  | 113             |
| <i>B. polymixa</i> 17-3       | 0                    | 40              | 99       | 99  | 114             |
| <i>B. polymixa</i> 19-2       | 20                   | 90              | 92       | 92  | 112             |
| (菌床面接種)                       |                      |                 |          |     |                 |
| <i>A. salmonicida</i> 18-4    | 0                    | 100             | 94       | 97  | 115             |
| <i>B. cereus</i> 3-3          | 0                    | 30              | 98       | 100 | 102             |
| <i>B. licheniformis</i> 10-5a | 0                    | 50              | 100      | 100 | 111             |
| <i>B. polymixa</i> 17-3       | 0                    | 0               | 100      | 100 | 125             |
| <i>B. polymixa</i> 19-2       | 0                    | 22              | 94       | 97  | 100             |
| (菌掻き後接種)                      |                      |                 |          |     |                 |
| <i>A. salmonicida</i> 18-4    | 0                    | 30              | 100      | 100 | 133             |
| <i>B. cereus</i> 3-3          | 0                    | 10              | 100      | 100 | 135             |
| <i>B. licheniformis</i> 10-5a | 0                    | 30              | 100      | 100 | 135             |
| <i>B. polymixa</i> 17-3       | 0                    | 0               | 100      | 100 | 131             |
| <i>B. polymixa</i> 19-2       | 0                    | 22              | 100      | 100 | 130             |

*subtilis*では「根腐れ症状」のみが観察された。無孢子細菌, *A. salmonicida*18-4接種区では, 約90%の栽培ビンで「根腐れ症状」を発症し, その多くは「芯腐れ症状」の併発がみられ, 収量が約40%低下した。

分離細菌の菌床面接種では, *B. polymixa* 17-3を除く同属細菌により「根腐れ症状」が発症したが, 発生率は培地内接種より低率であった。*A. salmonicida*接種区では, 栽培ビン全数で「根腐れ症状」と「芯腐れ症状」が併発し, 子実体収量が25%低下した。

菌掻き後の菌床面接種では, 「根腐れ症状」の発症率は30%以下で, 子実体収量は無接種区と変わらなかった。

## 考 察

「ストップ症状」が多発した長野県下のエノキタケ栽培施設で選別した被害ビンから, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. polymixa*などの耐熱性・通性嫌気性で芽胞を形成する*Bacillus*属細菌が, 高頻度で分離された。また, 通性嫌気性の無孢子細菌として, *Proteus*属および*Aeromonas*属細菌が少数例検出された。*Bacillus*属分離細菌はいずれもデンプン分解能およびゼラチン液化能を示し, エノキタケの培養基である鋸屑・米糠培地で生育可能で, 栽培ビンのpH (5.5-7.5) および温度環境下 (23-27°C) でも比較的高い増殖能を示した。本症状が発生した被害ビンでは, エノキタケ栄養菌糸の希薄な生長や発育阻止帯形成が観察されたので, 分離細菌とエノキタケ栄養菌糸の対峙培養を試みたところ, 菌糸生長の阻害, ないしは発育阻止帯形成が再現された。これらの分離細菌をエノキタケ栽培ビンの培地内および殺菌後あるいは菌掻き後の菌床面に接種して細菌症状の再現を試みたところ, 「ストップ症状」は*B. licheniformis*および*B. polymixa*のそれぞれ1菌株を培地内に接種した実験区にのみ発生した。これらの結果を総括すると, 本症状の原因細菌は*B. licheniformis*, *B. polymixa*などの*Bacillus*属細菌であり, 培地内で増殖する原因細菌から分泌される抗菌性物質の局在あるいは拡散による栄養菌糸の生育阻害が病徴の多様性発現の主因であるが, 細菌の増殖による培養基内の栄養環境および物理環境の悪化も本症状の発症を相加的あるいは相乗的に促進する要因と考えられる。原因細菌の混入経路は, 発症に培地内汚染が前提であるため, 培地調製時に混入した細菌の不十分な殺菌による残存が主経路と考えられる。また, 同一種でも異菌株では発症能が異なる点から, *Bacillus*属の他種細菌にも本症状に対する発症能を有する菌株が存在する可能性が残存した。*Bacillus*属細菌はヒラタケの「ストップ症状」

被害ビンでも分離され<sup>5)</sup>, 未同定の*Bacillus*属および*Listeria*属分離細菌の接種による同菌の発症も報告されている<sup>6)</sup>。

原因細菌の培地内接種により「ストップ症状」が再現された被害ビンでは, 「根腐れ症状」の併発がみられた。しかしながら, 同一菌株の菌床面接種では「根腐れ症状」のみが観察された。本症状は*Bacillus*属のいずれの分離細菌の接種でも発生し, 比較的耐熱性のある無孢子細菌, *A. salmonicida*18-4株の接種ではきわめて高頻度で発生した。一方, 菌掻き後の菌床面接種では, いずれの菌株でも発生率が低かった。したがって, 本症状の発生は特定の特異な細菌により誘起されるものではなく, エノキタケの栽培環境に混在する比較的耐熱性の高い細菌が培養基上部の好氣的部位で生育し, 子実体発生後, 茎基部の老化が進んで抵抗性が低下した組織の質化を進める結果, 病変が生じたものと思われる。これらの細菌による菌床面汚染は, 殺菌後の放冷時に栽培ビンへ再入する「戻り空気」による混入の可能性がもっとも高く, 釜だし→放冷→接種工程における無菌管理には特段の注意が必要であろう。

## 摘 要

エノキタケ栽培施設において, 細菌汚染により発生する「ストップ症状」を解明するため, 長野県下の細菌被害が多発したエノキタケ栽培施設から本症状, あるいは「根腐れ症状」を併発した栽培ビンを選別し, 原因細菌の分離を試みた。被害ビンから検出された細菌の多くは芽胞を形成する*Bacillus*属細菌であったが, 通性嫌気性の無孢子細菌として, *Proteus*属および*Aeromonas*属細菌が少数例が分離された。*Bacillus*属細菌では*B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. polymixa*が高い検出頻度を示した。これらの細菌をエノキタケの栄養菌糸と対峙培養したところ, 細菌の分泌する抗菌性物質による発育阻止が観察された。分離細菌による細菌症状の再現試験では, *B. polymixa* 19-2 および *B. licheniformis* 10-5aを培地内に接種した実験区で「ストップ症状」と「根腐れ症状」が併発したが, 菌床面接種では「根腐れ症状」のみが発症した。*B. cereus*, *B. subtilis* および, 無孢子細菌, *A. salmonicida*接種区では「根腐れ症状」のみが観察された。

## 文 献

- 1) BUCHANAN, R. E. & GIBBONS, N. E. ed.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8th

- Ed.). Wavery Press Inc., Baltimore (1975) pp. 1-1268.
- 2) JENNISON, M. W. : Manual of Microbiological Methods. (ed. by M. J. PELCZAR et al.) McGraw-Hill Book Co., New York (1957). pp. 20-21.
- 3) 衣川堅二郎, 荒井 滋:キノコの事典. 中村克也編 朝食書店, 東京 (1982) pp. 384-385.
- 4) 駒形和男:微生物の分類と同定. 長谷川 喜代治編, 東京大学出版会, 東京 (1976) pp.204-208.
- 5) 河野又四, 寺下隆夫:日菌報, **23**, 517-522 (1982).
- 6) 河野又四, 寺下隆夫:近畿大学農紀要, **17**, 101-112 (1984).
- 7) 満田久輝他:食品工学実験書(下巻). 京都大学食品工学教室編, 養賢堂, 東京 (1970) pp.88-93.