

令和**2**年度
きのこ類の種菌の有害菌等調査関連業務
調査報告書

令和**3**年**3**月

一般財団法人 日本きのこ研究所

1. 事業の実施状況

本業務は、種苗法(平成 10 年法律第 83 号)に基づく指定種苗であるきのこ類の有害菌等の有無について確認・種別判定等の調査を行うものであり、令和 2 年 11 月 13 日に締結した請負契約書、および仕様書に準拠して実施した。

調査対象は、林野庁が種苗法に基づき検査のために種苗販売業者 8 事業者から収集し、当研究所に送付されたきのこの種菌等(表 1)を保存・培養し、林野庁に対して有害菌等の有無の判定に関する調査報告、及び適切な助言を行うことを目的とした。

なお、有害菌とは、種苗法施行規則(平成 10 年農林水産省令第 83 号)第 23 条第 3 項第 3 号の規定に基づき、農林水産大臣の指定する *Trichoderma* 属菌を指し、それ以外を害菌として説明する。

表 1 検査対象事業者および検査種菌等の一覧

都道府県	検査対象事業者	検査種菌等			検体番号	試験管番号
		形態	種類	数量		
■	■	瓶種駒	しいたけ	12 床	A1~A12	A01~A12
	■	袋菌床	しいたけ	12 床	B1~B12	B01~B12
■	■	瓶種菌	えのきたけ ぶなしめじ	12 床	C1~C12	C01~C12
	■	瓶種菌	ぶなしめじ	12 床	D1~D12	D01~D12
■	■	瓶種菌	しいたけ	20 床	E1~E20	E01~E20
■	■	瓶種菌	しいたけ	12 床	F1~G12	F01~F12
■	■	袋菌床	しいたけ	20 床	G1~G20	G01~G20
■	■	袋菌床	しいたけ	20 床	H1~H20	H01~H20
6 県	8 種苗販売業者			120		

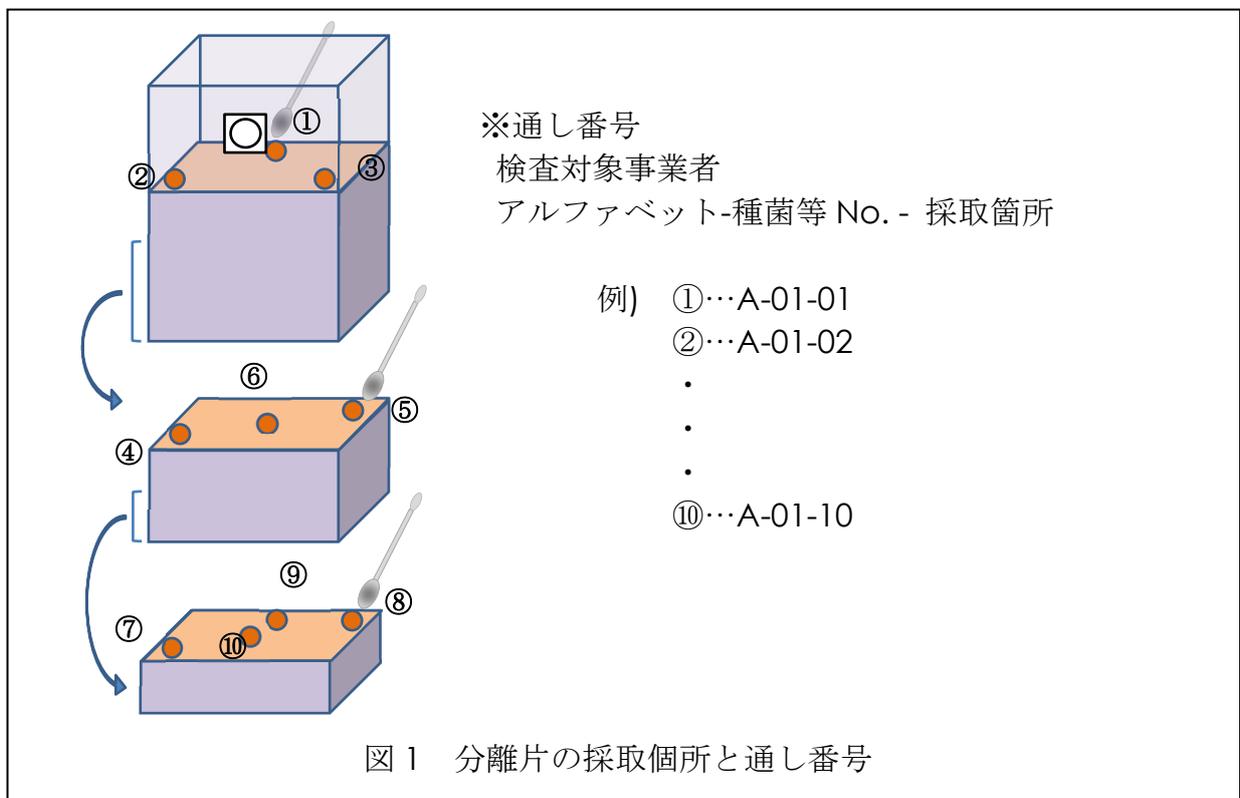
1) 調査内容と方法

(1) 送付された種菌等の消毒・保管

- ① 送付された種菌等の数量を確認し、容器の破損、菌叢表面の状態等を点検したのち、外側をエタノール消毒液で消毒した。
- ② 種菌等は保冷库内(5~10℃)の整理棚に収納し、分離片の採取まで保管した。
- ③ 上記の作業途上で、目視によって菌叢の状態(異常の有無等)を確認した。
- ④ 分離片の採取は、種菌等の到着日、または到着から遅くても1日以内に実施した。

(2) 寒天培地を用いた分離片採取・培養

- ① 分離用培地としては馬鈴薯・ブドウ糖寒天培地(Difco 社製、以下、PDA 培地と称す)を用いた。なお、いずれも試験管に約 10 ml 分注し、オートクレーブ殺菌(120℃、20 分間)して供試した。
- ② 種菌等の分離片採取は、クリーンルーム内のクリーンベンチ(無菌作業台、清浄度：クラス 100 以上)で実施した。ピンセット、エーゼ等の分離器材は、種菌等を1片分離する都度、アルコール殺菌、および火炎殺菌を行った。
- ③ 種菌等の PDA 培地による分離片は、1 検体から上面(3 隅各 1 点、計 3 点)と中段面(2 隅各 1 点、および中央部 1 点、計 3 点)、下段面(3 隅各 1 点、および中央部 1 点、計 4 点)の合計 10 点を採取し、試験管には分離箇所と対応するよう、通し番号(A-01-01、A-01-02、A-01-03・・・)をつけた(図 1)。
- ④ 分離片の培養は、接種した試験管を培養室(25℃)で 14 日間程度行った。



(3) 培養期間中の点検・調査

培養期間中の点検・調査は、おもに有害菌等の発生の有無(菌糸の生長状況、及び色の変化等)を中心に、分離から3～5日目、7～8日目、10～12日目、14～15日目の計4回行った。なお、最終点検・調査が終了したそれぞれの試験管は、5℃の保冷庫で保管した。

(4) 異常菌糸が発生した場合の菌の判定、及び有害菌等の同定

分離片から異常菌糸が発育した試験管については、光学顕微鏡等による観察を行った。なお、有害菌等の属の分類・同定は、基本的にはスライドカルチャー方式によって得た菌糸体を供試し、光学顕微鏡を用いて行った。

2) 調査結果

(1) 有害菌等調査関連業務のフローチャート

林野庁によって種苗販売業者8事業者から有害菌等調査のために収集され、当研究所に送付されたきのこの類の種菌等について、その受入れ、分離、および調査等に関する作業日程のフローチャートを表2に示す。

種菌等各部位からの分離片採取は、種菌等の到着日、または遅くても到着後1日以内に実施した。調査は分離から3～5日目、7～8日目、10～12日目、14～15日目の計4回行った。

表2 有害菌等調査関連業務のフローチャート

検査対象事業者									
検体番号	試験管番号	都道府県	名称(略)	きのこの種類	数量	培地作製日	受入日	分離日	最終調査日
A	A	■■■■	■■■	しいたけ	12床	11/6	11/24	11/24	12/8
B	B	■■■■	■■■	しいたけ	12床	11/6	11/24	11/25	12/9
C	C	■■■■	■■■■	えのきたけ ぶなしめじ	12床	12/1	12/21	12/21	1/4
D	D	■■■■	■■■■	ぶなしめじ	12床	12/1	12/21	12/22	1/5
E	E	■■■■	■■■■	しいたけ	20床	11/13	12/2	12/3	12/17
F	F	■■■■	■■■	しいたけ	12床	1/5	1/29	1/29	2/12
G	G	■■■■	■■■■	しいたけ	20床	1/5	1/25	1/25	2/9
H	H	■■■■	■■■	しいたけ	20床	11/5	11/19	11/20	12/4

(2) 有害菌等の分離結果

培養中の点検・調査は、分離から3～5日目、7～8日目、10～12日目、14～15日目の計4回行い、分離培地からの菌糸の生育状況、及び有害菌等の混入の有無・菌叢の色の変化等について観察した。分離片採取後、汚染が見られた種菌等は4回目の観察でも有害菌や害菌が確認されたため、最終調査の結果のみを表3に示す。

表 3 調査結果(4回目の観察時)

検査対象事業者				きのこの種類	数量	有害菌および害菌の有無と場所			
検体番号	試験管番号	都道府県	名称(略)			検出・非検出	上面	中段面	下段面
A	A	■	■	しいたけ	12床	検出	3床-3点	×	×
B	B	■	■	しいたけ	12床	非検出	×	×	×
C	C	■	■	えのきたけ ぶなしめじ	12床	非検出	×	×	×
D	D	■	■	えのきたけ	12床	非検出	×	×	×
E	E	■	■	しいたけ	20床	非検出	×	×	×
F	F	■	■	しいたけ	12床	非検出	×	×	×
G	G	■	■	しいたけ	20床	検出	20床-60点	×	×
H	H	■	■	しいたけ	20床	検出	20床-60点	4床-4点	4床-5点

×：有害菌等の非検出。

(3) 害菌の種類

検出された有害菌および害菌の種類と、検出された試験管番号の詳細を表 4 に示す。

表 4 有害菌および害菌の種類と、検出された試験管番号の詳細

検体 番号	試験管 番号	名称 (略)	検出された害菌	検出された 試験管番号
A	A	■	<i>Penicillium</i> 属菌	A-03-03 A-07-01 A-12-01
G	G	■	<i>Trichoderma</i> 属菌	G-01-01,02,03 G-02-02,03 G-03-01,02,03 G-04-01,02,03 G-05-01,02,03 G-06-01,02,03 G-07-01,02,03 G-08-01,02,03 G-09-02,03 G-10-01,02,03 G-11-01,02,03 G-12-01,02,03 G-13-01,02,03 G-14-01,02,03 G-15-01,02 G-16-01,02,03 G-17-01,02,03 G-18-01,02,03 G-19-01,02 G-20-02,03
			<i>Cladosporium</i> 属菌	G-02-01 G-20-01
			Bacteria	G-09-01 G-15-03 G-19-03 G-20-01

検体 番号	試験管 番号	名称 (略)	検出された害菌	検出された 試験管番号
H	H	■	<i>Trichoderma</i> 属菌	H-01-01,02,03 H-02-02,03 H-03-01,02,03 H-04-01,03,07 H-05-02 H-06-01 H-07-01,02 H-08-01,02,03 H-09-01,02,03 H-10-01,02,03 H-11-02,08 H-12-01,02,03 H-13-01,02,03 H-14-01,02,03 H-15-01,02,03 H-16-01,02,03 H-17-01,02,03 H-18-01,02,03 H-19-01,02,03 H-20-01,02,03
			<i>Penicillium</i> 属菌	H-05-04
			Bacteria	H-01-09 H-02-01 H-04-02,04 H-05-01,03 H-06-02,03 H-07-03 H-09-05 H-10-01,02,03 H-11-01,03,07 H-20-06,09

光学顕微鏡による調査の結果、有害菌とされる *Trichoderma* 属菌、害菌とされる *Penicillium* 属菌、*Cladosporium* 属菌、Bacteria が検出された。

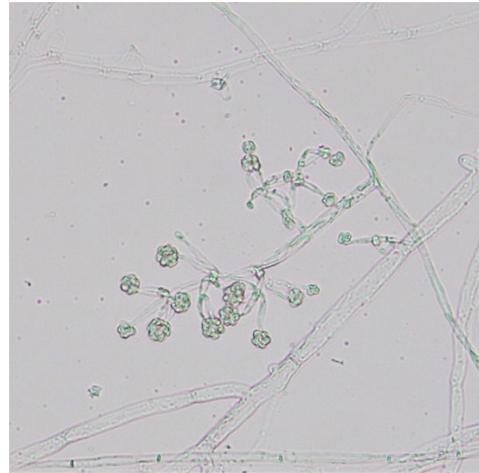
検出された害菌のきのこ栽培施設での落下菌検査における検出頻度は、*Trichoderma* 属菌、*Penicillium* 属菌、*Cladosporium* 属菌は高頻度、Bacteria は低頻度である。これらの有害菌および害菌の混入を防止するに

は、培地殺菌工程の最適化、施設の清掃を徹底し、施設内をできるだけ清潔に保つことが重要である。

分離された有害菌および害菌の PDA 培地上での写真、および分生子柄、分生孢子等の顕微鏡写真を図 2,3,4,5 に示す。

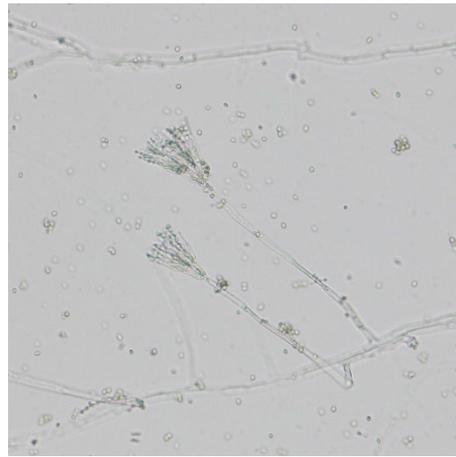


Trichoderma 属菌 (検体番号 H-03)



Trichoderma 属菌 (検体番号 G-01)

図 2 分離された害菌の菌叢および顕微鏡写真



Penicillium 属菌 (検体番号 A-12)



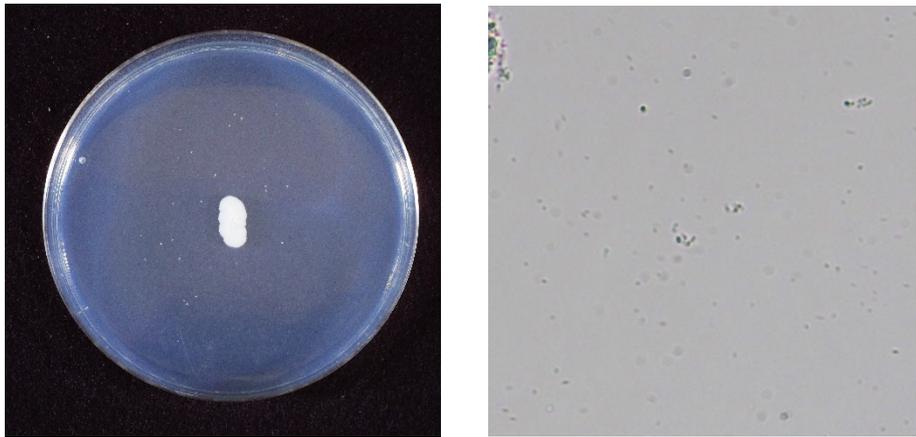
Penicillium 属菌 (検体番号 H-03)

図3 分離された害菌の菌叢および顕微鏡写真

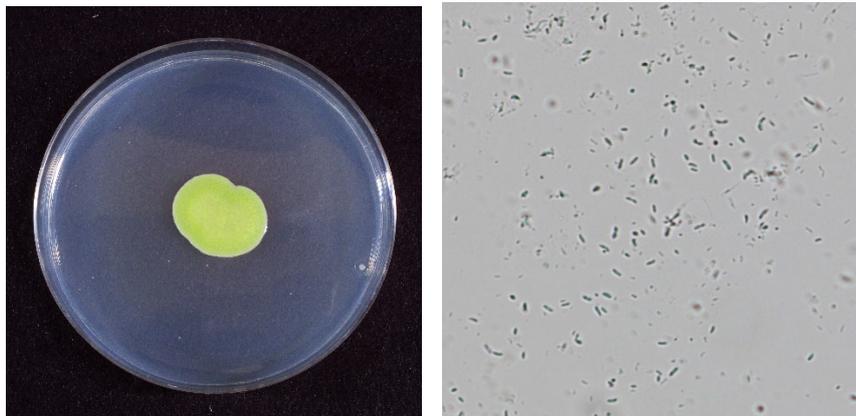


Cladosporium 属菌 (検体番号 G-02)

図4 分離された害菌の菌叢および顕微鏡写真



Bacteria (検体番号 G-15)



Bacteria (検体番号 H-11)

図5 分離された害菌の菌叢および顕微鏡写真

(4) 発生原因に関する考察

害菌の汚染が確認された分離片の位置、その種類、受け入れた種菌等の状態、および担当者の過去の経験等を加味し、害菌の発生原因を総合的に判断するとともに、若干の考察を加えた(表 5)。なお、栽培現場の様子や作業手順等については不明な部分もあり、考察(原因とその対策)は推測を含むものである。

表 5 発生原因に関する考察

検体番号	検査対象事業者 (きのこの種類)	発生原因に関する考察 〔観察結果、原因、および対策〕
A	<p>■■■■■ ■■■■■ ■■■■■ (しいたけ)</p>	<p>〔観察結果〕 12床のうち、3床の上段3点から <i>Penicillium</i> 属菌が検出された。</p> <p>〔原因〕 送付された種菌はしいたけ菌糸が培地全体に蔓延した状態であった。種菌上面に <i>Penicillium</i> 属菌が観察された原因として、種菌上面の乾燥によりしいたけ菌糸の活力が低下したところに <i>Penicillium</i> 属菌が付着したものと考えられる。</p> <p>〔対策〕 培養と共に種菌上面の乾燥が進み、種菌上面のしいたけ菌の活力が低下することで害菌が付着、繁殖しやすい環境となる。種菌上面の害菌繁殖の対策は培養室の清浄度の保持である。具体的には、定期的な換気扇や空調機等の点検、清掃、及び培養室の床や壁面の洗浄、消毒を行うことで培養室内に存在する有害菌等を少なく保ち、累積汚染を防ぐことが重要である。 <i>Penicillium</i> 属菌は種菌上面のみから観察されており、種駒が充填されている部位からは、有害菌および害菌が観察されていないことから、種駒には <i>Penicillium</i> 属菌は繁殖していないと考えられる。このため、種菌上部の菌糸を十分に取り除いてから種駒を原木栽培の接種源として使用することを勧める。</p>
G	<p>■■■■■ ■■■■■ (しいたけ)</p>	<p>〔観察結果〕 20床のうち、20床の上段55点から <i>Trichoderma</i> 属菌が検出され、2床の上段2点から <i>Cladosporium</i> 属菌、4床の上段4点から <i>Bacteria</i> が検出された。</p> <p>〔原因〕 菌床培養方法は散水培養法である。散水培養法とは接種から菌</p>

		<p>糸が培地全体に蔓延するまで袋内で培養した後に、袋から菌床を取り出して菌床に適宜散水して培養を行う方法である。菌床を袋から取り出して培養を行うことで空気中に浮遊する有害菌等が菌床に付着するため、すべての菌床の上面を分離したところ有害菌等が検出された。一方、菌床中段面および下段面は菌床の切断面からの分離であるため、有害菌等は検出されなかった。</p> <p>〔対策〕</p> <p>散水培養法により製造された菌床のしいたけ菌糸の活力が正常な場合、菌床に付着した有害菌等の繁殖は抑制されるためしいたけ栽培に悪影響を及ぼさない。一方、菌床のしいたけ菌糸の活力が低下した場合は菌床に付着した有害菌等が繁殖してしいたけ栽培に悪影響を及ぼす。</p> <p>散水培養法で菌床のしいたけ菌糸の活力を正常に保つには、適切な温湿度の保持、適当な散水、換気が必要となる。また、定期的な使用水の水質検査、換気扇や空調機等の点検、清掃、及び培養室の床や壁面の洗浄、消毒を行うことで培養室内に存在する有害菌等を少なく保ち、累積汚染を防ぐことが重要である。</p>
H	<p>■■■■■ (しいたけ)</p>	<p>〔観察結果〕</p> <p>20床のうち、20床の上段51点、2床の下段2点から <i>Trichoderma</i> 属菌が検出され、1床の中段1点から <i>Penicillium</i> 属菌が検出され、7床の上段12点、3床の中段3点、3床の下段3点から <i>Bacteria</i> が検出された。</p> <p>〔原因〕</p> <p>菌床培養方法は散水培養法である。散水培養法とは接種から菌糸が培地全体に蔓延するまで袋内で培養した後に、袋から菌床を取り出して菌床に適宜散水して培養を行う方法である。菌床を袋から取り出して培養を行うことで空気中に浮遊する有害菌等が菌床に付着するため、すべての菌床の上面を分離したところ有害菌等が検出された。一方、菌床中段面および下段面は菌床の切断面からの分離であるため、多くの菌床で有害菌等は検出されなかった。いくつか害菌が検出された菌床中段面および下段面の検体は、菌床からスラントへの分離工程で、菌床表面の害菌が飛散したものが菌床に付着して検出された可能性がある。</p> <p>〔対策〕</p> <p>散水培養法により製造された菌床のしいたけ菌糸の活力が正常な場合、菌床に付着した有害菌等の繁殖は抑制されるためしいたけ栽培に悪影響を及ぼさない。一方、菌床のしいたけ菌糸の活力が低下した場合は菌床に付着した有害菌等が繁殖してしいたけ栽培に悪影響を及ぼす。</p> <p>散水培養法で菌床のしいたけ菌糸の活力を正常に保つには、適</p>

		切な温湿度の保持、適当な散水、換気が必要となる。また、定期的な使用水の水質検査、換気扇や空調機等の点検、清掃、及び培養室の床や壁面の洗浄、消毒を行うことで培養室内に存在する有害菌等を少なく保ち、累積汚染を防ぐことが重要である。
	まとめ	<ol style="list-style-type: none"> 1. 8事業者、120の種菌等を供試し、有害菌類の有無を調査したところ、3事業者の菌床から害菌の検出が認められた。 2. 有害菌として指定されている <i>Trichoderma</i> 属菌は2事業者の菌床から検出が認められた。 3. 菌床上部、中部、下部の汚染の原因は、以下が推察された。 <ul style="list-style-type: none"> ・培養途中に菌床を袋から取り出す散水培養法では、菌床表面から分離する菌床上部で有害菌等が検出された。 ・長期培養により菌床上部が乾燥してきのこ菌糸の活力が低下しているため害菌が付着して繁殖した。 ・菌床の移動や、コンテナ等から出し入れする際・菌床の移動や、コンテナ等から出し入れする際の瓶と瓶の蓋穴を通じて害菌が混入した。 ・菌床中部および下部から有害菌等が検出されたものは、分離工程で菌床表面から飛散した有害菌等と考えられる。 4. 有害菌等の汚染防除の対策としては、培養室の清掃や消毒の徹底、培養に適した環境制御、接種作業の再点検、菌床移動作業工程、菌床移動などにかかわる設備の再点検が考えられる。

(5) 検出された害菌の特徴

検出された *Trichoderma* 属菌、*Penicillium* 属菌、*Cladosporium* 属菌、*Bacteria* のそれぞれの特徴を表6に示す。

表6 検出された害菌の特徴

種類	特徴
<i>Trichoderma</i> 属菌 (有害菌)	<p>世界的に分布し、森林土壌、木材、繊維、穀類、果実・野菜、食用きのこ(害菌として)などから検出される。</p> <p>セルロース分解力が強く、トリコデルミンなどの毒性代謝産物を産生し、菌寄生型の有害菌とされている。しいたけ栽培において激しい被害を及ぼし高温・過湿条件が継続され、しいたけ菌の活力が低下すると、<i>Trichoderma</i> 属菌の侵害を受けることが観察されており、注意が必要な有害菌である。</p>
<i>Penicillium</i> 属菌 (害菌)	<p>アオカビ(青かび)と呼ばれ、最も普遍的にみられる不完全菌。胞子が青みを帯びていることからその名前がつけられたが、種類によって色彩は白色、黄緑色、青緑色、灰緑色などさまざまである。</p> <p>土壌、圃場菌類として生鮮果実・野菜など、貯蔵菌類として農産物、</p>

	<p>食品原材料、加工食品などに発生し、しばしばきのこ栽培の培地にも混入する。きのこの栽培培地の場合は、ある程度熟度が進み、菌床表面が乾燥し、菌糸の活力が低下した場合に付着、定着し、高湿度環境で成長、発生する。</p> <p>きのこの菌糸を殺傷することはないが、繁殖した胞子が空気中を漂いやすい(伝播能力が高い)ため、培地内部への混入率がきわめて高い。接種時など早い段階で培地内に混入した場合は、きのこの菌糸が生育する前に培地内にコロニーを形成するため、きのこの菌糸との栄養競合がおこり、子実体発生の遅れ、発生量の低下等の原因となる場合がある。一方、培養途上に混入した場合は、しいたけ菌の不良環境等による活力の著しい低下がなければ大きな問題となることはない。</p> <p><i>Penicillium</i> 属菌は、無菌的な配慮が不十分な培養室等には多量に空中浮遊する害菌である。</p>
<p><i>Cladosporium</i> 属菌</p>	<p>世界中に分布する不完全菌である。土壌、穀類、野菜等から検出される。野外では植物遺体を中心に検出される。空中浮遊菌として 30～40%(PDA 培地での検査)を占める。</p> <p>PDA 培地でのコロニー生育は比較的遅く、暗緑色～オリーブ黒色である。裏面は黒色。暗色、滑面、直立した分生子柄の先端が出芽して樹上に分岐し、長い連鎖になる。分生子形成は出芽型。分生子は1～2細胞、淡褐色～暗褐色、楕円形～レモン形、滑面または粗面。わずかなショックで連鎖が壊れ、中間の枝状の部分も含めてばらばらになる。</p> <p>きのこの栽培施設での落下菌検査では高い確率で検出される。特に、接種室や放冷室で検出される。接種時など早い段階で培地内に混入した場合は、きのこの菌糸との栄養上の競合がおこり、子実体発生の遅れ、発生量の低下等の原因となる場合がある。一方、培養途上に混入した場合は、しいたけ菌の不良環境等による活力の著しい低下がなければ大きな問題となることは少ない。</p>
<p>Bacteria (害菌)</p>	<p>生物圏とされているほぼ全ての環境に生息する。土壌や湖沼はもちろん、上空 8,000m までの大気圏、熱水鉱床、水深 11,000m の海底、南極の氷床などといった、生物にとって過酷な環境でも生育ないし存在が確認されている。しかし、生育には水分が必須であり乾燥に対しては極めて弱い。</p> <p>通常温度条件で、しいたけ菌が健全な状態であれば、Bacteria による被害はほとんど見られない。しかし、高温・加湿状態が続きしいたけ菌の活力が著しく低下すると Bacteria に汚染され、発生した子実体が腐敗することがある。また、水を介して感染し、被害が拡大するため、加湿機や結露水には注意する必要がある。</p>

3) 調査後の種菌等の保管と処分

調査後の種菌等については、林野庁担当者の了解を得て廃棄処分を行った。害菌を検出した培地は、殺菌後に容器と培地を類別したのち、培地部分は堆肥化して廃棄処分した。害菌を検出していない培地は、容器と培地を類別したのち、培地部分は堆肥化して廃棄処分した。

2. 担当者

林野庁から送付されたきのこ類の種菌等からの分離片採取、および害菌の確認調査については、当研究所に組織したチームで実施した(表 7)。

判定に関する調査報告書、及び助言の内容については、チーム内で十分検討を加えたのちに作成した。

表 7 担当者一覧

担当者		主な業務
■■■■■	■■■■■	〔統括〕 菌叢観察、報告書作成
■■■■■	■■■■■	菌叢観察、報告書作成
■■■■■	■■■■■	分離、菌叢観察、報告書作成
■■■■■	■■■■■	分離、菌叢観察、菌株保存 報告書作成
■■■■■	■■■■■	培地作製、経理事務
■■■■■ ■■■■■	■■■■■ ■■■■■	菌株の分類・同定
■■■■■ ■■■■■	■■■■■ ■■■■■	菌株の分類・同定