

# エノキタケ [*Collybia velutipes* (Curt.) Fr.]

## の人工栽培における雑菌問題

### 混入雑菌の諸性質

田部 真・田端信一郎

信州大学農学部 植物病理学研究室

### 緒 言

近年エノキタケ人工栽培が普及するとともに、栽培にともなう種々の障害が生じてきた。特に培地殺菌後種菌接種から発茸、収穫期にわたり、培地中での各種菌類のまん延および子実体の腐敗現象が多発し問題となっている。

栽培過程において雑菌混入が考えられる個所については前報で述べたとおりである<sup>6)</sup>。その中で最も注意すべき点は培地素材のコヌカ、古オガクズに付着しているきわめて耐熱性の強い細菌芽胞の殺菌不完全、殺菌後種菌接種時の操作不注意による空中雑菌類の混入、および菌培養期間中培養ビンの紙栓不良による雑菌の混入等である。また収穫期あるいは収穫後子実体が軟化腐敗することもしばしば観察されている。培地中には種々の菌類が生育可能であるから、常に雑菌混入まん延の危険が高く減収をきたす恐れが多い。しかしそれ以上に食品衛生上大きな問題を含んでいるものと思われる。

著者らは栽培過程で生ずる雑菌問題の大部分は空中菌に起因したものと考え、年間を通じての空気中のマイクロフローラの変化および捕集菌の諸性質について調べた<sup>6-8)</sup>。

エノキタケ栽培最盛時の冬期における空中菌密度は他の時期に比較して最も高く、桿菌を主とした細菌類と *Penicillium* が多数出現する。他の時期には *Penicillium* 以外の糸状菌類が多かった。捕集した菌類の耐熱性、耐紫外線性をみると、概して湿熱に弱く、紫外線には細菌類が糸状菌類より弱い傾向を示した。これらの結果から雑菌混入防除について種々考察してきたが、実際栽培地における雑菌混入の様相、菌の種類およびその諸性質を知る目的で本実験を行なった。実験を行なうにあたり、長野県上伊那郡上伊那農業改良普及所野村佐雄氏および南安曇郡南安曇農協豊科事業所岩瀬国昌氏のご協力を得た。ここに謝意を表する。

### 雑菌混入の様相および菌の種類

長野県伊那市東春近および南安曇郡豊科町の栽培地から集めた40本の雑菌混入培養びんについて調査した結果は表一のとおりである。純粹にエノキタケ菌のみが生育した場合には、白色菌糸がびん内部を均一にしかも密に分布している。一方菌糸まん延が異常な場合その様相は種々であるが、外観から大別すると、1) びんの上部から中間部へかけてのエノキ菌生

表一 雑菌混入培養びん内の菌糸まん延状態および雑菌の種類

びん記号	菌まわりの状態	培地表面			培地内部		培地の変色	分離菌の種類
		口部	中部間	底部	内部	中心		
1	不均一	卍	+	+	卍	卍		B
2	不均一	卍	++	卍	卍	卍	黒色	F
3	不均一	卍	+	卍	++	++		B
4	不均一	+	++	卍	++	卍		B
5	不均一	卍	-	卍	++	卍		B
6	不均一	++	++	++	++	卍		B
7	不均一	卍	-	卍	-	++		B
8	不均一	卍	+	+	+	+		B
9	不均一	++	++	++	-	卍		F
10	不均一	卍	+	+	++	卍		B
11	不均一	卍	-	卍	++	卍		B
12	不均一	卍	-	卍	++	卍		B
13	均一	卍	卍	卍	卍	卍	黒色	B
14	不均一	卍	+	+	-	-		F
15	不均一	卍	+	卍	+	-		F
16	均一	卍	卍	卍	卍	卍		B
17	均一	卍	卍	卍	卍	卍		B
18	均一	卍	卍	卍	-	-	黒色	F
19	不均一	卍	+	+	-	-		F
20	均一	卍	卍	卍	卍	卍		B
21	均一	卍	卍	卍	卍	卍		B
22	均一	卍	卍	卍	卍	卍		B
23	均一	卍	卍	卍	卍	卍		F
24	不均一	卍	+	+	-	-		F
25	均一	卍	卍	卍	卍	卍		B
26	均一	卍	卍	卍	卍	卍		B
27	均一	卍	卍	卍	卍	卍		B
28	不均一	卍	++	卍	+	卍		B
29	均一	+	+	+	-	-		F
30	不均一	+	-	卍	+	++		F
31	均一	+	+	+	-	-		F
32	不均一	++	+	卍	+	卍		B
33	均一	++	++	++	++	++		B
34	均一	卍	卍	卍	+	+		B
35	均一	卍	卍	卍	++	-		B
36	均一	卍	卍	卍	卍	卍		B
37	均一	卍	卍	卍	++	-		B
38	均一	卍	卍	卍	卍	卍		B
39	均一	++	++	++	++	++		B
40	均一	++	++	++	++	++		B

卍 菌糸まん延状態良好, ++ やや不良, + かなり不良, - 菌糸はみられない, B 細菌, F 糸状菌

育不良，2) びん中間部での生育不良，3) びん底部の生育不良，4) びん全体に菌の生育不良，5) 発芽後数センチに生長した子実体の根際が細菌の増殖により軟化腐敗する等となる。培地内部での菌糸分布は外観から判断した状態とほぼ一致した。以上のような外観上の菌糸生育不良から雑菌混入ということが判断出来るが，更に診断を確実にするため次のような諸点に注意すべきである。

1) 培地の変色，2) 異臭の発生，3) 培地の水分含量，4) 拡大鏡による培地中の雑菌孢子形成有無，5) 菌の生育不良箇所培地を水に分散させしばらく放置後振りまぜた場合の白濁有無による細菌の存否。

混入雑菌の種類を細菌類と糸状菌類に分けて培養びんを調べると，細菌によるもの29本，糸状菌によるもの11本で，細菌混入の場合が非常に多かった。これらの雑菌混入の径路は明確に断言できないが，培地中のまん延様相とその程度等から判断すると，大部分が種菌接種時か接種後混入したものと思われた。

培地中からの雑菌分離は希釈平板法により行ない，細菌12種，*Penicillium* 3種，その他の糸状菌5種を得た。これらの菌類には401，……の記号を付し，細菌をB，*Penicillium*をP，その他の糸状菌をFで示した。

### 分離菌とエノキタケ菌の培地上での競合

前報の方法によりジャガイモ寒天平板培地を用いて対峙培養を行ないその型を調査した。結果は表一2，図一1のようである。

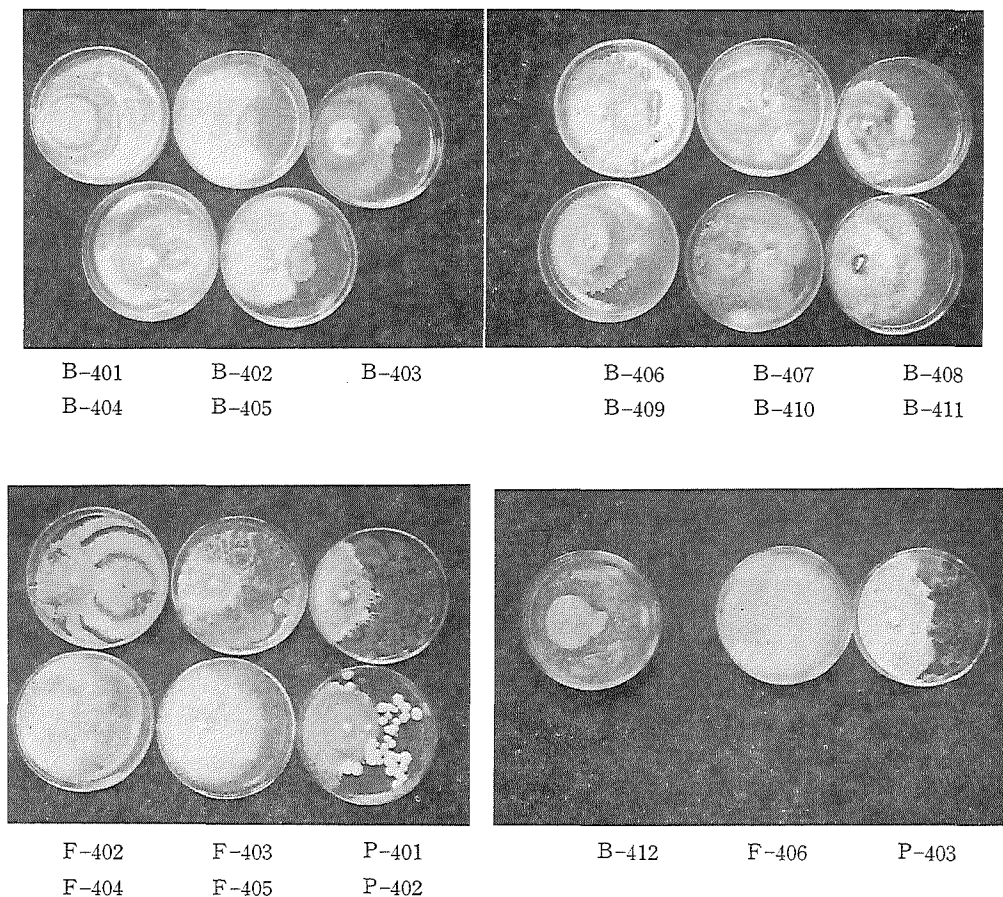
表一2 分離雑菌とエノキタケ菌との対峙培養型

A 型	B 型	C 型	D 型	E 型	F 型
B-406	B-402	P-402	B-401	F-402	P-401
410	405		403	404	
411	407		404	406	
P-403			408		
			409		
			412		
			F-403		
			405		

エノキタケ菌の生育を阻害しないと思われるA，B型を示す菌は細菌6種，*Penicillium* 1種であった。孢子を飛散しやすい菌による生育阻害型Cは *Penicillium* 1種のみであった。分離菌がエノキタケ菌を完全に包囲し，生育を停止させるD型の菌は細菌6種，糸状菌2種であった。D型に近いE型を示す菌は糸状菌3種で，エノキタケ菌よりやや優勢な生育を示す場合のF型は *Penicillium* 1種であった。

年間を通じての捕集空中菌類による対峙培養の結果と非常に異なり，エノキタケ菌生育阻害を示す菌が多数を占めた。特にD，E型を示す菌が11種あり，ある程度培地およびエノキタケ菌とこれら分離菌の間に親和性の存在が考えられた。

図 1



ペトリ皿中左側白色菌糸集落はエノキタケ菌，右側に分離菌を対峙させた。

## 分離菌の形態的生理的性質

### 1 分離細菌類の形態的生理的性質

分離細菌の形態的生理的性質および培地上の諸性質について調べた結果は表-3, 4のようである。桿菌が大部分で $\text{NH}_3$ の生成, M-R反応陰性, メチレン青還元, 糖を分解し酸生成, ペニシリン, スルファミン耐性の性質を示す傾向が認められた。捕集空中細菌の性質と比較すると, 冬期間の細菌の諸性質<sup>6)</sup>と傾向がよく一致し, 特にM-R反応陰性, メチレン青還元, 糖分解酸生成およびペニシリン耐性の性質が類似していた。冬期間の空中細菌は他の時期の菌と比較してエノキタケ菌生育阻害を示す菌が多いことから考えると, 分離菌および冬期空中細菌に共通の性質を示す菌がエノキタケ菌生育を阻害するものと思われる。

B-410はグラム陰性, 無孢子性桿菌でラクトースを分解し, 酸およびガスを生成した。この性質は大腸菌群と一致するものであることから飲料水の細菌学的試験における大腸菌群

表一3 分離細菌の培地上性質

	ジャガイモ培地					ブイヨン培地					穿刺培養	ゼラチン溶解	液体培地での生育						
	色	斜面		平面		色	斜面		平面				形態	程度	濁度	膜	沈澱		
		形態	横断	形態	横断		形態	横断	形態	横断								形態	程度
B-401	淡黄	r	c	i	u	Lo	淡黄	e	u	i	r	l	f	+	-	卅	-	+	
402	白	p	f	i	u	a	黄	e	r	i	r	a		±	i	卅	卅	+	+
403	白	p	c	i	c	u	白	f	c	i	c	a		-	c	卅	卅	+	+
404	白	e	c	i	u	u	白	e	c	i	r	u		-	c	卅	卅	卅	-
405	白	p	r	c	u	l	淡黄	p	c	i	u	u		-	i	卅	卅	+	+
406	黄褐	e	u	c	r	e	黄	e	c	c	c	e	p	+	-	卅	+	+	
407	淡黄	p	r	i	r	u	白	e	r	c	u	Lo	v	+	i	卅	卅	+	+
408	白	e	c	i	u	b	白	e	f	i	r	u	v	+	St	卅	卅	-	卅
409	白	e	c	i	u	Lo	淡白	e	r	c	c	e	b	+	n	+	卅	+	+
410	白	s	r	c	c	e	白	e	r	c	c	e	p	+	-	卅	-	+	
411	白	e	c	r	c	l	淡黄	e	c	i	c	u		-	-	卅	-	+	
412	白	e	r	c	r	e	黄	e	r	c	c	e	b	+	-	卅	+	+	

斜面培養の生育状態

平面培養集落形態

平面培養集落周辺

斜面、平面培養集落横断

穿刺培養の生育形態

ゼラチン溶解形態

f糸状, eいぼ状, p羽毛状, r仮根状

c円形, i不規則状, r仮根状

e全縁, u波状, a耳状, l切裂状, Lo裂片状

f扁平状, c凸円状, u中心凸状, r隆起状, ub中凹状

f糸状, p小乳頭状, b念珠状, vじゅう毛状

nかぶ状, c噴火口状, iろ斗状, St層状

表一4 分離細菌の形態的・生理的性質

	エノキタケ対峙形態	形	大	大きさ	グ	ゼ	硫	ア	M	V	硝	メ	糖分解酸発生				薬剤耐性				
													ラ	フ	サ	ラ	ガ	ペ	ス	ス	ス
B-401	D	桿	3.2×1.0μ		-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	±	+	±	+
402	B	桿	1.0~1.5×1.0		-	卅	+	+	+	-	-	±	+	+	-	-	+	卅	±	-	卅
403	D	桿	1.5×1.0		-	卅	-	+	-	-	±	+	-	-	-	-	卅	-	-	卅	
404	D	球	3.2		±	卅	-	卅	-	-	-	+	-	-	-	-	卅	-	±	卅	
405	B	球	1.0		-	卅	-	+	-	-	±	+	+	-	-	-	+	卅	卅	卅	卅
406	A	桿	1.5~2.0×1.0		-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	卅	-	-	卅
407	B	球	1.0×1.0		+	卅	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	卅	-	-	卅
408	D	球	1.5×1.5		-	卅	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	卅	-	-	卅
409	D	桿	2.0×1.0		-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	卅	-	+	卅
410	A	桿	1.5~2.5×1.0		-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	卅	-	-	卅
411	A	桿	1.5×0.5		+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	
412	D	桿	0.8×0.5		-	-	-	+	-	+	±	+	+	+	+	+	+	卅	±	-	卅

検査を実施した<sup>4)</sup>。その結果明らかに大腸菌群に属するものであることが確かめられた。

大腸菌群は大別すると普通人畜の腸管内に寄生し、外界では増殖できない *Coli* type と、これに性質が類似して下水、土壌、穀類から分離される *Aerogenes* type に分けられる。B-410がどの型に属するかを IMVIC に対する反応で調べた結果 *Aerobacter aerogenes* 型の菌であった<sup>4)</sup>。

## 2 *Penicillium*およびその他の糸状菌の培地上性質

表-5 *Penicillium* の培地上性質

	エノキタケ 対峙型	ツァベック 培地上集落									坂 口・王 培地		
		直 径 mm	状 色	外 円 部 色	隆起 中 心 部	隆起 中 間 部	様 相	放 射 状 し わ	裏 側 色	色 素 生 産		し ん 出 水 滴	
p-401	F	20	灰緑	羊毛	灰緑	-	-	均一	+	褐	黄	-	+
402	C	20	灰緑	綿毛	灰緑	-	-	均一	+	褐	橙黄	-	+
403	A	28	暗灰緑	綿毛	白	+	-	均一	+	灰褐	-	+	-

表-6 糸状菌類の培地上性質

	エノキ 対峙型	菌叢色	色素生産	胞子形態	胞子形成量
F-401		白		単胞	卅
402	E	暗緑		単胞	卅
403	D	暗緑	暗黄緑	単胞	卅
404	E	暗灰		単胞	卅
405	D	灰		単胞	卅
406	E	暗灰		単胞	卅

糸状菌類の培地上性質を調べた結果を表-5, 6に示した。*Penicillium*, その他の糸状菌類ともに胞子形成がおう盛で、空中密度を高く保ちながら分散するのに適した性質である。

## 分離菌の耐熱性

分離菌類の耐乾熱、湿熱性を調べた結果を表-7, 8に示した。

1 耐乾熱性 捕集空中菌類は乾熱処理に対する抵抗力が強く、100°C 90分処理でもかなり生存していた。これと比較して分離菌類は乾熱に弱い傾向にあったが、B-401, F-404は100°C 90分でも死滅しなかった。他の菌は100°C 60分以下で死滅した。特にB-403, 404, 407, 411, 412, およびF-401の5種は非常に弱く、60°C 30分処理で生存できなかった。

2 耐湿熱性 分離菌類は乾熱処理に弱いと同様に湿熱に対しても抵抗力は極めて弱か

表一七 分離雑菌の耐乾熱性

	60°C			80°C			100°C		
	30分	60分	90分	30分	60分	90分	30分	60分	90分
B-401	+	+	+	+	+	+	+	+	+
402	+	+	+	-	-	-	-	-	-
403	-	-	-	-	-	-	-	-	-
404	-	-	-	-	-	-	-	-	-
405	+	+	+	-	-	-	-	-	-
406	+	+	+	-	-	-	-	-	-
407	-	-	-	-	-	-	-	-	-
408	+	+	-	-	-	-	-	-	-
409	+	+	+	+	-	-	-	-	-
410	+	+	+	+	+	+	+	+	-
411	-	-	-	-	-	-	-	-	-
412	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P-401	+	+	+	+	+	+	+	+	-
402	+	+	+	+	+	+	-	-	-
403	+	+	+	-	-	-	-	-	-
F-401	-	-	-	-	-	-	-	-	-
402	+	+	+	+	+	+	-	-	-
403	+	+	+	+	+	+	+	-	-
404	+	+	+	+	+	+	+	+	+
405	+	+	+	+	+	+	-	-	-
406	+	+	+	+	+	+	+	+	-

表一八 分離雑菌の耐湿熱性

	60°C			80°C			100°C		
	30分	60分	90分	30分	60分	90分	30分	60分	90分
B-401	+	+	+	+	+	+	+	+	+
402	-	-	-	-	-	-	-	-	-
403	-	-	-	-	-	-	-	-	-
404	-	-	-	-	-	-	-	-	-
405	+	-	-	-	-	-	-	-	-
406	-	-	-	-	-	-	-	-	-
407	-	-	-	-	-	-	-	-	-
408	-	-	-	-	-	-	-	-	-
409	+	-	-	-	-	-	-	-	-
410	-	-	-	-	-	-	-	-	-
411	-	-	-	-	-	-	-	-	-
412	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P-401	+	+	+	-	-	-	-	-	-
402	-	-	-	-	-	-	-	-	-
403	+	+	+	-	-	-	-	-	-
F-401	-	-	-	-	-	-	-	-	-
402	+	-	-	-	-	-	-	-	-
403	+	+	+	-	-	-	-	-	-
404	-	-	-	-	-	-	-	-	-
405	-	-	-	-	-	-	-	-	-
406	+	+	-	-	-	-	-	-	-

った。B-401以外の菌は80°C 30分以上の処理では生存を認めることはできなかった。B-401は耐乾熱、湿熱性が強く、100°C 90分処理でも生存していた。おそらく耐熱性胞子を形成する細菌と思われる。

### 耐 紫 外 線 性

紫外線照射処理に対する抵抗性を調べた結果は表一九のとおりである。

表一九 分離雑菌の耐紫外線性

菌記号	照射時間			菌記号	照射時間			菌記号	照射時間		
	5分	10分	20分		5分	10分	20分		5分	10分	20分
B-401	+	+	+	B-408	-	-	-	P-403	+	+	+
402	-	-	-	409	-	-	-	F-401	-	-	-
403	-	-	-	410	+	-	-	402	+	+	+
404	-	-	-	411	-	-	-	403	+	+	+
405	-	-	-	412	-	-	-	404	+	+	-
406	-	-	-	P-401	+	+	+	405	+	+	+
407	-	-	-	402	+	+	+	406	+	+	+

耐熱性が非常に強く、胞子を形成する細菌と思われるB-401は紫外線に対しても強い抵抗力を示した。その他の細菌類は紫外線により容易に死滅した。*Penicillium*、その他の糸状菌ではF-401をのぞき耐紫外線性が強く、20分間照射でもほとんど生存できた。

## 考 察

空中菌類の調査に続き、エノキタケ栽培地から集めた雑菌混入培養びんより菌の分離を行ない、それらの諸性質について調査した。

混入雑菌は細菌類が多かったが、空中菌類も細菌類が多いことから当然のことと思われる。冬期エノキタケ栽培は最盛期となることから、冬期間空中雑菌類が問題となる混入雑菌類と類似するものと考えられた。混入雑菌特に細菌類についてみると冬期空中細菌類の示す性質ときわめて似ており、雑菌問題の主要な原因は冬期間空中細菌類によるものと思われる。

捕集空中細菌および分離した細菌類に共通した性質はM-R反応陰性、メチレン青還元、糖分解酸生成、ペニシリン耐性の諸点である。このようにある程度共通の性質を示す菌が雑菌として問題となることから考えると、培地、エノキタケ菌菌糸または子実体とこれらの細菌類との間に何らかの親和性が存在するのではないかと思われる。すなわちエノキタケに対し病原菌としての性質を有していると考えられる。このような性質は *Penicillium* その他の糸状菌にも存在するものと思われるが、病原性の問題に関しては菌の生態、栄養摂取の方法等を調べた後に検討したい。

分離雑菌類の耐熱性は捕集空中菌類の場合と傾向が似ていたが、熱処理には弱い菌が多かった。また紫外線に対しても細菌類は弱かった。これらのことから培地素材の高圧蒸気殺菌、種菌接種室内の紫外線照射等は雑菌混入防止に必須の操作となる。しかし高圧殺菌時の熱分布の不均一、殺菌終了後の処理の不手際、種菌接種時の不注意、紫外線照射に対する過信等は雑菌混入を生ずる原因であるから操作に対しては十分な注意を要する。

種菌接種後菌培養を行なう培養基室は床、壁、たな、室外環境等は清潔に保ち、すき間風、温度の急変を防ぎ、出入には外部からの雑菌を持ち込まないように注意すべきである。

微生物食品としてのエノキタケは、栽培過程で常に各種菌類汚染の危険を伴っている。特に分離菌中に大腸菌群に属する菌が認められたことから、食品衛生上一層の注意が払われるべきである。これらの点に関しては多くの成書があり<sup>1-3,5)</sup>、著者らもしばしば指摘してきた点で今後のきわめて重要な問題である。

## 摘 要

1. エノキタケ栽培地より集めた雑菌混入培地から菌分離を行なった結果細菌12種、*Penicillium* 3種、その他の糸状菌5種を得た。
2. エノキタケ菌との対峙培養の結果A型4種、B型3種、C型1種、D型8種、E型3種、F型1種であった。
3. 分離した雑菌類について形態的、生理的性質を調査した。分離細菌はM-R反応陰性、



メチレン青還元，糖分解酸生成およびペニシリン耐性の性質の点で冬期間空中細菌と性質が類似した。

4. 耐乾熱性の比較的強いもの2種で他は弱かった。
5. 耐湿熱性は耐乾熱性よりかなり弱く，耐性が強いもの1種で他はすべてかなり弱かった。
6. 耐紫外線性は細菌1種，*Penicillium*，糸状菌8種が強く，他は弱かった。

### 参 考 文 献

1. 相磯和嘉ら編（1967）．食品衛生学．東京．朝倉書店．
2. 平松利男（1951）．千葉大腐研報．4：31．
3. 日本薬学会編（1965）．衛生試験法注解．東京．金原出版．
4. 太田達男（1964）．微生物学実験書．東京．広川書店．
5. 桜井芳人ら編（1967）．食品保蔵．東京．朝倉書店．
6. 田部真・田端信一郎（1968）．信州大農紀要．5：19．
7. —————・—————（1968）．信州大農紀要．5：65
8. 田端信一郎・田部真（1969）．信州大農紀要．6：1

**Some Problems of Air-borne Micro-organisms in  
Cultivation of *Collybia velutipes* (Curt.) Fr.**

**Some Properties of Micro-organisms Isolated from the Culture Media**

**By Makoto TANABE and Shin-ichiro TABATA**

Laboratory of Phytopathology, Fac. Agric., Shinshu Univ.

**Summary**

1. Twelve bacteria, 3 *Penicillium* and 5 other fungi were collected from culture media of *C. velutipes* infected with various micro-organisms.
2. Results of competition of isolated micro-organisms to *C. velutipes* were 4 A-type, 3 B-type, 1 C-type, 8 D-type, 3 E-type and 1 F-type.
3. On the isolated micro-organisms morphological and physiological properties were investigated. Bacteria of isolated micro-organisms corresponded to bacteria collected during the winter on physiological properties of no reaction to methyl red, reduction of methylene blue, acidification by decomposition of sugar and tolerance to penicillin.
4. Two of micro-organisms treated with dry heat were tolerant and others susceptible.
5. Sterilization experiments by hot water treatment indicated that one bacteria was tolerant and others were most susceptible.
6. One bacteria, 3 *Penicillium* and other fungi were tolerant to ultra-violet treatment.