

超音波利用による昆虫病原糸状菌分生子懸濁液の調製

誌名	蠶絲研究
ISSN	00364495
著者名	河上,清 島根,孝典
発行元	農林省蠶絲試驗場
巻/号	125号
掲載ページ	p. 82-90
発行年月	1983年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



蚕糸研究 第125号 1983年4月
 Sansi-Kenkyu (Acta Sericologica)
 No. 125, April, 1983

超音波利用による昆虫病原糸状菌分生子懸濁液の調製

河上 清・島根孝典

硬化病菌やこうじかび病菌を供試して、それらの病原力の強弱、分生子の発芽・発育、菌の薬剤抵抗性などの各種性状を調査するに際しては、供試菌分生子を十分に分散させた分生子懸濁液（以下、菌液という）を必要とすることが多い。一般に、昆虫病原糸状菌の分生子は疎水性であるため、分生子が蒸留水によく分散された懸濁液を調製するには、界面活性剤の添加が効果的であることが知られている²⁾。

界面活性剤の使用は、確かに、分生子の分散効果を高めたが、昆虫病原糸状菌の分生子は、連鎖または集積して大小様々な集塊をつくって形成されるため^{4,5)}、それら分生子の集塊をほぐし、よく分散された菌液を調製するためには、さらに、機械的振動を加える必要があり、そこで、界面活性剤添加菌液を卓上型の小型攪はん機（サーモミキサー）にかける方法を用いてきた³⁾。しかし、この攪はんに時間を要することと、なお、分散効果が必ずしも十分でないことから、著者らは、集塊のない、分生子が良く分散した菌液を、迅速かつ簡便に調製する方法を確立する目的で、硬化病菌およびこうじかび病菌の各分生子に対する超音波処理の分散効果および影響について調査したので、その結果の概要について報告する。

材 料 と 方 法

1. 供 試 菌

蚕糸試験場硬化病研究室保存菌のうちから、黄きよう病菌 *Beauveria bassiana* (BALSAMO) VUILLEMIN, №32, №646, №767, 黒きよう病菌 *Metarrhizium anisopliae* (MET.) SOROKIN, №205, №460, 緑きよう病菌 *Nomuraea rileyi* (FARLOW) SAMSON, №202, №789, こうじかび菌 *Aspergillus flavus* LINK, S 85, および *Beauveria tenella* (DELACROIX) SIEMASZKO, №677, の 5 菌種 9 菌株を用いた。

2. 超音波処理の方法

超音波処理には、ブランソン220型卓上用超音波洗浄機（出力125W, 共振周波数45 kHz）を用いた。なお、対照には、小型攪はん機（サーモミキサー；サーモクニクス工業KK）を用いて、試験管外壁に振動を加え、内部の液体を無菌的に混合攪はんさせる、機械的振動だけを与える従来の方法を用いた。

斜面培地上に形成された分生子を Tween 40 (0.02%) 添加滅菌水 9 ml に懸濁して, $10^6 \sim 10^8$ /ml の菌液濃度とし, 攪はん機 (サーモミキサー) に軽く数秒間かけた後, その 1 ml を 10 倍に希釈して, 処理用菌液とした。

超音波処理, または攪はん機処理の時間は 30 秒～10 分間とした。

3. 分生子の分散効果

超音波洗浄機, または攪はん機で処理された菌液は, 所定の濃度に希釈され, 血球計算盤を用いて, 一定容量中の分生子数 (2 個以上の分生子集塊は 1 個として計算した) に対する単離分生子数の割合を調査して, 分散効果の良否を判定した。

4. 分生子に対する超音波処理の影響

超音波処理の菌に対する影響の有無については, 以下の二つの方法で調査した。

1) 分生子の発芽への影響: 超音波洗浄機, または攪はん機で処理された分生子を, 蚕蛹エキス寒天, またはツアペック寒天で所定時間培養した後, 10 視野, 1,500 個以上の分生子を検鏡して発芽率を求め, 発芽率の良否により超音波処理の影響の有無を判定した。

2) カイコ幼虫に対する菌の病原力への影響: 超音波洗浄機, または攪はん機で処理して調製された菌液を 10 倍段階希釈して, 支 124 号 × 日 124 号または支 140 号 × 日 140 号の 4 齡起蚕に塗布接種した後, 菌接種蚕を化蛹時まで飼育・保護して, その間に発生した病死蚕数から, LC_{50} 値を求め, その大小により病原力への超音波処理の影響の有無を判定した。

結 果

1. 超音波処理の分生子分散効果

超音波洗浄機による 1 ～ 2 分間処理は, 菌液調製における分生子の分散に非常に効果的であった(第 1 表)。なお, 攪はん機を用いた場合においても, 分生子分散効果は認められたが, 超音波処理時に比べ, その効果は不十分で, 2 分間以上の処理によつても, それ以上には分散効果が増大しなかった。

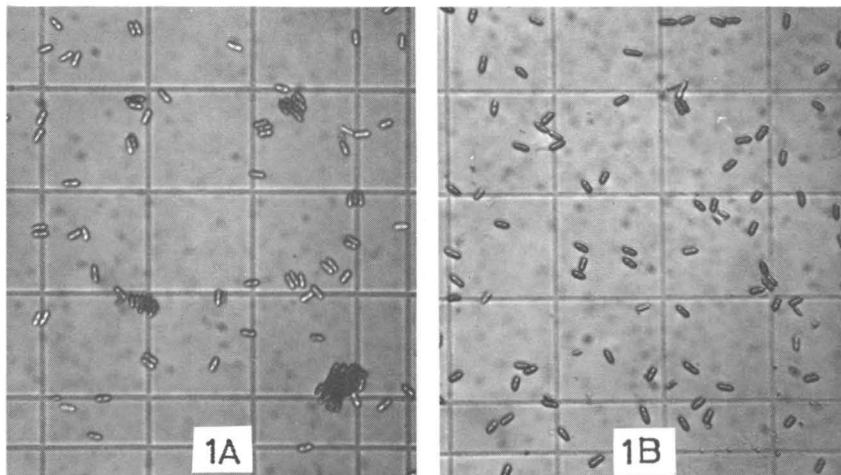
超音波処理による分散効果と菌種との関係をみると, 黄きょう病菌, 緑きょう病菌, およびこうじかび病菌では, 短時間, すなわち 30 秒または 1 分間処理での単離分生子の割合は 98 ～ 99% となり, 十分な分散効果が認められた。そして, これら菌種の場合は, 攪はん機による処理時にも, 比較的高い単離分生子割合がえられ, 超音波処理時におけるそれとの差が少ない傾向を示した。

つぎに, 黒きょう病菌や *Beauveria tenella* の場合, 超音波処理による分散効果は攪はん機処理に比べ著しかった。これら両菌種の分生子は上記 3 菌種の分生子に比べ分散し難い傾向を示し, 十分な分散効果をえるには, 2 分間の超音波処理を必要とした。いまその事例として, 黒きょう病菌について, 2 分間の超音波処理, および攪はん機処理の場合の菌液中における分生子の分散の違いを第 1 図に示した。

第1表 超音波処理による昆虫病原糸状菌分生子への分散効果

供試菌	処理法	各処理時間での菌液中の単離分生子の割合						
		処理前	0.5分	1	2	4	8	10
黄きょう病菌 <i>Beauveria bassiana</i> No.32	M.	79.7%	—	—	90.2	90.4	—	92.6
	U.		—	98.4	98.7	98.8	—	98.3
黒きょう病菌 <i>Metarrhizium anisopliae</i> No.205	M.	65.2	—	61.9	65.2	63.2	—	67.0
	U.		—	85.5	95.5	100	—	100
〃	M.	64.5	—	—	73.2	64.6	—	69.2
	U.		—	—	96.7	99.3	—	99.3
緑きょう病菌 <i>Nomuraea rileyi</i> No.202	M.	85.6	91.1	92.1	94.1	95.1	—	92.7
	U.		98.8	98.8	99.2	—	—	—
Beauveria tenella No.677	M.	74.9	—	77.3	76.7	78.2	78.9	—
	U.		90.4	92.4	94.1	97.3	99.9	—
こうじかび病菌 <i>Aspergillus flavus</i> S.85	M.	87.8	89.0	87.0	91.5	89.7	—	89.5
	U.		96.7	99.5	99.0	99.6	—	100
〃	M.	86.3	88.1	88.2	89.8	89.6	90.9	—
	U.		97.8	99.3	99.7	99.9	99.9	—

M. : 攪はん機処理, U. : 超音波処理



第1図 超音波処理と黒きょう病菌分生子の分散

1A: 攪はん機処理 (2分間) 1B: 超音波処理 (2分間)

2. 超音波処理の分生子発芽への影響

超音波処理を2分間行なった黄きょう病菌、および黒きょう病菌の各分生子の発芽率並びに発芽管長を調査した結果が第2表である。

第2表 超音波処理により調製された菌液の分生子発芽

供 試 菌	供試培地	発芽率	発芽管長
黄きょう病菌			
<i>Beauveria bassiana</i>			
No646	pd	89.2%	15.3-62.0±22.0-126.3μm
No646 U	pd	92.2	14.8-59.3±22.3-113.0
No767	pd	97.7	8.3-30.4±13.2- 98.5
No767 U	pd	97.1	5.9-32.0±14.0-126.9
黒きょう病菌			
<i>Metarhizium anisopliae</i>			
No205	pd	95.2	10.6-47.2±22.1-101.2
No205 U	pd	95.0	8.3-47.4±19.3- 91.7
No460	Czapek Dox	80.9	4.7-32.7±12.6- 59.0
No460 U	〃	77.2	3.0-28.1±12.5- 64.6

U: 超音波2分間処理区。発芽率および発芽管長は供試培地で27°C, 16時間培養後に1,500個および100個の分生子をそれぞれ検鏡してえた。供試培地pdは蚕蛹エキス寒天。

両菌種4菌株のいずれの場合においても、超音波処理の有無による発芽率、または発芽管長における差異は認められなかった。さらに、発芽時における分生子または発芽管の形態についても何ら異常は認められなかった。すなわち、分生子発芽に対する超音波処理の影響はみられなかった。

つぎに、昆虫病原糸状菌5菌種7菌株の各菌液を超音波処理により調製した場合の発芽率を、攪はん機処理によるそれらと対比して示したのが第3表である。

黄きょう病菌、黒きょう病菌、緑きょう病菌、*Beauveria tenella*、およびこうじかび病菌のいずれの菌種菌株においても、超音波2分間処理時の各分生子の発芽率は、攪はん機処理の場合の発芽率および処理前の発芽率とほど同様で差異がなく、超音波処理による影響は認められなかった。しかし、超音波処理が8~10分間になると、いずれの菌種においても、分生子発芽率は、攪はん機処理に比べやや低下して、超音波処理の悪影響が認められたが、この傾向は緑きょう病菌においてとくに顕著であった。

以上、分生子の発芽に対する超音波処理の影響調査から、2分間以内の同処理の場合、いずれの菌種に対しても、分生子発芽に対する影響は何ら認められなかった。

3. 超音波処理菌の病原力への影響

超音波処理、または攪はん機処理によって調製された菌液を供試して、カイコ幼虫

第3表 超音波処理による分生子発芽への影響調査結果

供 試 菌	培 養 条 件	処理	各処理後における分生子発芽率					
			処理前	1分	2	4	8	10
<i>Beauveria bassiana</i> No. 32	28°C-20時間	U	98.6%	—	97.1	98.6	—	95.5
<i>Metarrhizium anisopliae</i> No. 205	28°C-24	M U	98.3	—	98.0	99.0	—	98.8
<i>Nomuraea rileyi</i>	28°C-40	U	93.0	—	88.1	84.8	—	75.8
	25°C-24	M U	53.2	53.1 56.3	53.9 57.7	49.8 55.4	52.8 44.0	—
	25°C-24	M U	40.4	41.2 40.7	37.7 40.7	38.4 28.0	43.1 21.2	—
<i>Beauveria tenella</i> No. 677	25°C-20	M U	93.1	93.0 93.6	95.6 94.3	93.4 92.0	90.7 86.5	—
<i>Aspergillus flavus</i> S 85	25°C-16	M U	90.0	90.6 91.5	91.0 90.1	89.8 89.7	93.4 87.4	—

M: 攪はん機処理, U: 超音波処理. 発芽率はそれぞれ1,500個の分生子を検鏡して求めた.

に菌接種した場合の, 黄きょう病菌および黒きょう病菌の病原力を LC_{50} 値で第4表に示した.

第4表 菌液調製時の処理とカイコに対する病原力

供 試 菌	4齢起蚕に対する LC_{50}	
	攪はん機処理	超音波処理
黄きょう病菌		
<i>Beauveria bassiana</i> No. 646	4.0×10^7 conidia/ml	$\geq 5.9 \times 10^7$ conidia/ml
No. 767	$\geq 7.2 \times 10^7$	$\geq 4.0 \times 10^7$
黒きょう病菌		
<i>Metarrhizium anisopliae</i> No. 205	1.6×10^5	2.3×10^5
No. 460	$\leq 7.8 \times 10^3$	$\leq 6.6 \times 10^3$

供試蚕品種: 支124号×日124号, 各処理の時間は2分間.

黄きょう病菌, および黒きょう病菌のいずれの菌株においても, 2分間の超音波処理と攪はん機処理との間において, LC_{50} 値に差異が認められなかった. すなわち, 2

分間超音波処理された菌のカイコに対する病原力への影響は認められなかった。このことは前項において、2分間の超音波処理が、分生子発芽に何ら影響を与えなかったことと一致している。

つぎに、黄きょう病菌、黒きょう病菌、および緑きょう病菌の超音波処理菌の病原力を調査した結果を第5表に示した。なお、その時に調査した分生子発芽率を併記して示した。

第5表 超音波処理により調製された菌液でのカイコへの病原力調査結果

供 試 菌	処理時間	4齢起蚕に対する LC ₅₀	同 菌 液 の 分生子発芽率
黄きょう病菌			
<i>Beauveria bassiana</i>			
No. 32	0 分	1.3×10^6 conidia/ml	97.8 ^{a)} %
	2	$\leq 4.7 \times 10^5$	98.3
	4	$\leq 3.0 \times 10^6$	98.8
黒きょう病菌			
<i>Metarrhizium anisopliae</i>			
No. 205	0	9.9×10^3	98.4 ^{a)}
	2	1.8×10^4	95.6
	4	$\leq 8.9 \times 10^3$	92.3
	8	$\leq 1.3 \times 10^4$	—
No. 460	0	6.7×10^3	98.7 ^{b)}
	2	3.0×10^3	93.9
	4	1.7×10^4	91.8
	8	3.4×10^3	—
緑きょう病菌			
<i>Nomuraea rileyi</i>			
No. 202	0	4.5×10^5	55.7 ^{c)}
	2	1.3×10^6	61.1
	4	$\leq 5.6 \times 10^6$	54.0
No. 789	0	$\leq 2.2 \times 10^4$	—
	2	$\leq 6.2 \times 10^4$	—
	4	$\leq 3.5 \times 10^4$	—

供試蚕品種は支140号×日140号。発芽率調査の培養条件は、a) 28°C18時間 b) 28°C16時間 c) 28°C24時間である。

黄きょう病菌の場合、超音波処理時間が4分間までの範囲においては、LC₅₀値に大きな差異はなく、超音波処理による影響は認められなかった。

黒きょう病菌の場合も、上記と同様の傾向で、8分間処理の範囲では、LC₅₀値に差異は認められなかった。

緑きょう病菌の場合、供試した菌株間に病原力の差が認められたが、超音波処理の有無によるLC₅₀値の差異はなく、同処理による菌の病原力への影響は、本調査の範囲では認められなかった。

そして、本調査の発芽率からは、すでに示したと同様に、超音波処理の影響は認められなかった。

考 察

昆虫病原糸状菌の分生子は、一般に、疎水性であり、その上に、フィアロ型分生子 (phialoconidium)、またはシンポジオ型分生子 (sympodioconidium) といわれる型の形成方法で生産されるため^{4,5)}、各分生子は連鎖したまゝ集積したり、房状集塊 (cluster) を形成するので、通常の蒸留水では、分生子が浮遊して、菌液を調製することは困難である。

そこで著者らは、石原・広瀬 (1965) の方法を参考に、各種昆虫病原糸状菌の分生子に対して分散効果が認められると同時に、分生子の発芽、およびカイコに対する病原力、さらには、塗布時にカイコ幼虫そのものにも何ら影響のない菌液をえるため調製法として、Tween 40 (0.02%) 添加滅菌蒸留水に分生子を懸濁させ、これをさらにサーモミキサーで 5 分間前後、攪はん処理する方法を用いてきた³⁾。

上記の従来の菌液調製法は、その分散効果や迅速さにおいて、まだ十分満足できる方法とはいえないかった。そこで、最近、普及の著しい小型卓上用超音波洗浄機の利用を検討した。

本法によれば、1～2 分間の超音波処理で十分に分散した均一な菌液をえることができた。

超音波のうち、細菌細胞の殺菌には 200～1,500 kHz (周波数 20～150 サイクル/sec) の超音波が有効で、水中の細菌や牛乳中の細菌も殺すといわれる¹⁾。さらに、山耕ら (1942) は、カイコの膿病ウイルスの不活化にも有効であることを報告している⁶⁾。しかし、このような超音波のもつ物理的殺菌効果の面については、別の機会に検討することとし、本文では、超音波のもつ、液体中の粒子や固体での破壊分散作用を、菌液調製に利用できることを明らかにした。

超音波処理時間と分生子分散効果を菌種との関係でみると、黄きよう病菌、緑きよう病菌、およびこうじかび病菌では、1 分間の処理で十分な分散効果が認められたが、黒きよう病菌および *Beauveria tenella* の場合、1 分間処理では分散が不十分で、分生子に対する十分な分散効果を得るには 2 分間の超音波処理を要した。

一方、分生子形成法についてみると、*Beauveria* 属菌は sympodiospore 型であり、*Aspergillus* 属菌および *Metarrhizium* 属菌のそれは phialospore 型である⁴⁾。したがって、同じ型の分生子形成法をもつ菌種の間においても、菌液への分散に難易のあることが示された。このことから、分生子を菌液中に分散させる場合の要因としては、分生子形成法の違いだけでなく、分生子の表面性状や粘質物の有無、分生子の大小・形状などの要因も関与していると思われる。

超音波を利用した昆虫病原糸状菌の殺菌については、本調査結果からすると、相当強力な出力、または比較的長い時間の処理を必要とすることが推察される。

摘要

昆虫病原糸状菌を供試した各種調査には、分生子が個々にできるだけ良く単離して分散した均一な菌液を調製する必要があるため、従来法より一層簡便で分散効果の高い菌液調製法について検討したところ、昆虫病原糸状菌の分生子懸濁液を超音波処理することにより、集塊のない、良く分散した菌液を迅速・簡便に調製することができた。

分生子を Tween 40 (0.02%) 添加滅菌蒸留水に懸濁して、出力125W, 共振周波数45kHz の卓上用小型超音波洗浄機で 2 分間処理した場合、分散効果は十分で、処理された分生子の発芽およびカイコに対する菌の病原力への影響はまったく認められなかつた。

引用文献

- 1) 堀口 博 1982. 防菌防黴の化学 : p.p. 318, 三共出版.
- 2) 石原 廉・広瀬安春 1965. 硬化病菌胞子の懸濁液の一調製法. 日蚕雑, 34 : 129—130.
- 3) 河上 清・三国辰男 1965. 未発表資料.
- 4) Kendrick, W.B., and Carmichael, J.W. 1973. Hyphomycetes. p. 323—509, in "The Fungi" vol. IV 'A (Edit. Ainsworth et al.), Academic Press.
- 5) Tubaki, K. 1963. Taxonomic Study of Hyphomycetes. Ann. Rep. Inst. Fermentation, Osaka No. 1, 25—54.
- 6) 山耕義寛・笠原道夫・雄山平三郎・緒方誠一 1942. 超音波の家蚕臘病ウイルスに及ぼす影響. 蚕糸界報, 51 (603) : 18—22.

Summary

Preparation of conidial suspensions of entomogenous
fungi by use of ultrasonic cleaner

By

Kiyoshi KAWAKAMI and Takanori SHIMANE

As conidia of most of entomogenous fungi are hydrophobic, it is not so easy to prepare the conidial suspension separated fully conidia from each other in the sterile distilled water.

The authors improved the method for preparation of conidial suspensions of entomogenous fungi. Sonication by dipping for two minutes in a table-top ultrasonic cleaner (capacity: 125 W, wave length: 45 kHz, manufactured by Branson Co. in U.S.A.) showed high-level effect to separate adhesive masses of

conidia in the sterilized distilled water containing 0.02 per cent of Tween 40.

Sonication for two minutes had no influence on the germination of conidia and on the infectivitiy of fungi to silkworm larvae.

(*Sericultural Experiment Station, Yatabe, Ibaraki 305, Japan*)