貯穀微生物のくん蒸効果に関する研究 (第3報)

ふけ米菌 (*Absidia* sp.) 孢子にたいする
臭化メチルの殺菌効果について

松 野 守 男*・柳 井 昭 二*

Morio MATSUNO and Shoji YANAI: Researches on gas sterilizing effect upon
microbes in stored grain. (3) The fungicidal activity of methyl bromide
for *Absidia* sp. (fungus of moldy rice grains).

殺虫剤, 土壤殺菌剤, 殺線虫剤としてすでに広く使用されている臭化メチルは, 貯穀くん蒸において, 殺菌効果, 殺虫効果ともに期待されている。

臭化メチルのようなガス状殺菌剤の殺菌効果は, 菌自体の生物的活性と, 温度・ガス濃度およびそのくん蒸時間によつてきまる。また別の環境要因として, 湿度が問題になつてきている。

貯蔵穀物に寄生する微生物を実際に殺菌するとき, 温度は外気温と穀温によつてほぼきまり⁹⁾, ガス濃度はおもに穀物自体と倉庫壁体, 天井および床に吸収され, 一部はガス漏れにより投薬濃度の約 1/5 に低下する⁹⁾。湿度はくん蒸操作中密閉されれば, 穀物の水分によつて決まる⁹⁾。このようなくん蒸諸条件が微生物におよぼす影響を解析する手がかりとし, また投薬量および投薬時期決定の参考にするため, 前記の菌自体の生物的活性と温度・ガス濃度・くん蒸時間および湿度の関係について, 寄生対象物なしの基礎実験をおこなつたので報告する。

本研究は, 農林省特別研究の一環として実施したもので, 本研究に際し, 御指導御鞭達をいただいた主任研究者, 穀類貯蔵加工部長上村光男博士ならびに発酵食品部長中野政弘博士, 松浦慎治博士に感謝の意を表す。

I. 実験方法

(1) 供試菌 ふけ米菌 (*Absidia* sp.) は第2報¹⁾

* 農林省食糧研究所

** 武蔵式無菌通風乾燥機

*** 自動制御の定温定湿室で, 床面積 3.7×1.4 m, 高さ 2.5 m の実験室である。温度は日立製作所の EOI と日本電熱計器 KK の入力調整器にて再調整し制御し, 湿度は山武ハネウェル計器 KK の電子管式制御リレー R 70223 により制御した。温度は 15°~30°±1°C, 湿度は 55~95%±2% の性能を有する。

**** Applicator Supplier 新農業研究法 (1958) 山本亮編, 東京, pp. 453 に記載されている。

に供試した菌株である。

(2) 培養 麵汁寒天 (B 11 g. 10°) 斜面に1週間培養した孢子を, 1 l 入りルー・ビンの麵汁寒天培地 (B 11 g. 10°) に接種し, 7 日間, 30°C で培養した。

(3) 供試検体の作成 あらかじめ乾熱殺菌した清浄な¹⁾径 2.5~4.5 mm のすりガラス玉を, 前記培養したルー・ビン中に入れて, *Absidia* sp. の孢子をガラス玉に付着させた。このガラス玉 10 コ前後を, 小型キューベツト (内径 1.8 cm, 高さ 1.2 cm 丸型ガラス製) 内に入れた。25°~30°C にて 30 分間, 無菌通風乾燥機**で乾燥固定してのち, くん蒸条件と同じ一定温湿度にしたくん蒸室*** にて, 小型キューベツト上部にカバーガラス (2.4 cm 角) をのせ, 水ガラス・エポキシ樹脂 (ボンド) 二重接着方法¹⁰⁾により密封した。密封を完全にするため, 一夜同室放置後新考案の経時的くん蒸実験装置¹⁰⁾内の各くん蒸時間相当の位置に装置した。

(4) くん蒸方法 くん蒸容器を密閉後, ガスシリンドラ****より気化した臭化メチルをだし, ガスビュレットに所定容量を投入した。一方, くん蒸ガス濃度に相当した容量の空気をくん蒸容器より排除したのち, ガスビュレット内の所定量の臭化メチルをくん蒸容器内に入れた。同容器内圧を常圧としたのち, くん蒸容器内のせん風機にてよくかくはんした。かくはん 5 分後, 光波干渉型ガス検知器でガス濃度を測定し⁹⁾, 加不足をさらに調節した。調節後, さらに 30 分間せ

ん風機にてよくかくはんし、ガス濃度を均一にした。

所定のくん蒸時間になるとタイム・スイッチにて自動的に破砕装置が動きだし、カバーガラスを破砕してキュベット内にガスが侵入し、ガラス玉上の胞子と直接接触する。長いくん蒸時間の区より破砕が始まり、最後に最も短いくん蒸時間の区の破砕がおこなわれる。標準試料区は最後まで破砕せず、開放後大気中で破砕した。くん蒸後取りだした試料用キュベットは、大気中で臭化メチルをよく排除してのち、冷蔵庫（約5℃）に36～40時間放置した。

(5) 検体培養 試料用キュベット内のガラス玉1～2粒を、あらかじめ95%アルコール浸漬後105℃、3～5時間殺菌した5ml用注射器内に入れた。さらに界面活性剤 Triton X 100 を0.1%入れたMcIlvaineのリン酸緩衝液(pH 5.8～6.0)を殺菌したものを1～3ml吸いあげ、静かに振とうして麴汁寒天平板(15mm角、厚さ2mm弱)に2滴滴下し、全体にひろげた。胞子濃度は、500倍の視野(0.1015mm²)あたり10～15胞子になるように、ガラス玉数と液の量をあらかじめしらべて調節した。

培養温度は、標準試料では34℃、7～8時間、くん蒸検体は、くん蒸時間の延長につれ発芽時間がのびるので、それぞれの試料条件によつて、7時間より24時間あるいはそれ以上培養時間を延長した。培養は中型シャーレの湿室でおこなつた。培養完了後の検体は、中型シャーレのまま直ちに冷蔵庫に入れた。

おのおのの試料につき約1,000の胞子について、600～800倍の顕微鏡下で、発芽胞子と非発芽胞子を測定して発芽率をだした。発芽率と非くん蒸検体の発芽率より、下記により補正死滅率をだした。

$$d = \frac{g - g_n}{g} \quad \begin{array}{l} d: \text{補正死滅率} \\ g: \text{標準発芽率} \\ g_n: \text{所定時発芽率} \end{array}$$

発芽率のいちじるしく低いところは、前記の培養試料と同じ濃度の懸濁液を固化した麴汁寒天シャーレ上に滴下した。胞子が安定してから余分の液を流し取り、同じく34℃で2～7日間培養した。

培養したものにつき、発芽コロニー数を測定した。一方、同じシャーレについて、600～800倍で約30視野につき、胞子数を測定して1視野の平均胞子数をだした。この視野の面積とシャーレ内の培地の面積との比率をだし、1視野の平均胞子数よりシャーレ内の培地全体の胞子数を推定した。発芽コロニー数とシャーレ内の培地上の推定総胞子数より発芽率をだした。

この値についても同じように補正死滅率をだした。

湿度75%にて、温度15℃、20℃、25℃、30℃について、それぞれ5.5mg/l、15.5mg/l、25.5mg/l、36mg/l、72mg/l(15℃では15.5mg/l以下を除く)の各ガス濃度について、経時的くん蒸効果を最長72時間までみた。また湿度の関係について、25℃、25.5mg/lの条件で経時的くん蒸効果をみた。その他の条件の温度、ガス濃度について、一定時間のくん蒸効果をみる装置*にて72時間のくん蒸効果をみた。

用いたくん蒸剤は市販の臭化メチル(三光化学KK製・純度99.8%以上)である。

II. 実験結果

湿度75%でおこなつた結果につき、補正死滅率のプロビットを縦軸にとり、くん蒸時間の対数値を横軸にとつて、死滅率回帰直線が得られた¹⁾。温度別にそれぞれのガス濃度・時間反応図を第1図、第2図、第3図、第4図に示す。

温度別にみると、15℃、25.5mg/lでは50%の死滅率を示すのにほぼ50時間を要し、15℃、72mg/lではほぼ20時間を要する。温度が上昇すれば、50%の死滅率を示すくん蒸時間はどのガス濃度でも短縮する。しかし、くん蒸時間の延長にたいする効果はすくなく、25℃、72mg/lで99.99%を得られているが、30℃でも検体胞子数10～40万で100%の死滅率を得るにいたらなかつた。

くん蒸時間の影響は、温度・ガス濃度にかかわらずガス濃度・時間反応図は平行しており、時間延長の効果は緩慢である。ガス濃度別のくん蒸効果は、25℃より30℃になると差がすくなくなる傾向があり、25℃と30℃それぞれでは各ガス濃度とも顕著な差がない。

しかるに、湿度によりガス濃度・時間反応図はいちじるしく変わってくる。25℃、25.5mg/lで55%、65%、75%、85%、95%の各湿度条件別におこなつた結果を第5図に示す。低湿度55%より最高湿度95%まで、湿度の上昇にともない、回帰直線の傾斜がいちじるしく大きくなつていく。とくに湿度75%以上ではその影響が強く、湿度85%では、36時間で100%(検体胞子数約40万)の死滅率を得ている。湿度95%になればさらに100%死滅の時間が短縮する。

湿度別、ガス濃度別にそれぞれの温度に対する72時間くん蒸における死滅率を第1表に示す。湿度75%ならびに55%では、温度の上昇につれ死滅率も上昇

* 定時くん蒸実験装置：経時的くん蒸実験装置を改良して定時的装置としたもの。

第1図 15°Cにおける *Absidia* sp. のガス濃度・時間反応 第2図 20°Cにおける *Absidia* sp. のガス濃度・時間反応 第3図 25°Cにおける *Absidia* sp. のガス濃度・時間反応 第4図 30°Cにおける *Absidia* sp. のガス濃度・時間反応

はするが、いずれも 100%にはならない。しかるに、湿度95%では 15°Cでも 100%の死滅率が得られている。20°Cにおいても 5.5 mg/l のみが 99.2%の死滅率で、それ以上のガス濃度ではいずれも 100% (検体孢子数 10~40 万), さらに 25°C, 30°C ではどのガス濃度も死滅率 100%を示した。

III. 考 察

Absidia sp. の孢子を用いガラス玉上に固定して、寄生対象物なしの条件下でくん蒸剤臭化メチルの抗かび作用試験をおこなった。くん蒸後ガラス玉上の孢子の懸濁液を麴汁寒天平板上で培養し、発芽率を直接計測する方法およびコロニー数と推定孢子数より発芽率

第5図 *Absidia* sp. の湿度別にみたガス濃度・時間反応第1表 *Absidia* sp. の各温度における湿度別の一定時間くん蒸効果^a

湿度	ガス濃度					
	温度 C	5.5 mg/l	15.5 mg/l	25.5 mg/l	36 mg/l	72 mg/l
95%	15°	—	100	100	100	—
	20°	99.2	100	100	100	100
	25°	100	100	100	100	100
	30°	100	100	100	100	100
75%	15°	—	—	82.4	82.7	83.7
	20°	19.8	96.9	96.9	96.4	99.9
	25°	53.2	88.4	95.7	98.7	99.9
	30°	93.7	97.5	96.4	99.4	99.8
55%	20°	1.5	7.3	2.7	5.7	0.9
	25°	—	—	—	0.34	0.11
	30°	1.4	2.0	8.7	18.9	66.1

^a くん蒸時間 72 時間

を計測する方法の併用によつて、ガス濃度・くん蒸時間・温度・湿度のくん蒸効果に及ぼす影響をしらべた。

湿度別にくん蒸の時間的効果をみると、各温度とも 5.5 mg/l の低ガス濃度では時間別の死滅率の値は乱れが大きい、高ガス濃度では比較的乱れがすくなくなっている。

本菌では時間の延長によるくん蒸効果の増大がすくなく、短時間でも多少の効果を示す一方、長時間くん蒸でもそれ程効果があがらない。これは湿度 75% における本菌のくん蒸効果の動態の一特徴である。またくん

蒸時間・死滅率回帰直線の傾斜は、一定関係湿度では温度・ガス濃度に関係なくほぼ一定である。

湿度の影響をみると、Munnecke⁶⁾ らが *Alternaria solani* でおこなつた実験結果と同じく、湿度とは別の因子として、高湿度がくん蒸効果を促進させている。Lubatti⁸⁾ は、くん蒸を受けた穀物種子が水分の多少によつて発芽率の低下の程度を異にすることについて、トウモロコシ、コムギ、カラスムギ、オオムギ、ライムギを用いて実験しているが、穀物によりそれぞれ差はあるけれども、いずれも多水分では発芽率の低下がいちじるしいことを述べている。Strong⁹⁾ もコメ・オオムギなどを水分量別にくん蒸して、12~13%と14~16%との間で発芽率低下の差がいちじるしいことを認めている。著者らの実験結果および Munnecke⁶⁾ らの実験結果は、湿度がかびにたいする臭化メチルくん蒸効果に与える影響と、穀物種子の水分量別のくん蒸効果に与える影響とが同じ傾向にあることを示している。その影響のしかたは Sampson⁷⁾ が同じく水に難溶性のクロールピクリンについて得た結果と類似している。

以上くん蒸効果を促進する要因より考察すると、*Absidia* sp. の実際のくん蒸殺菌には、湿度 75% 以下では温度を高くしてもそれほど効果が期待できない。またくん蒸時間を延長しても一般に効果はすくない。実際くん蒸では、湿度は前述のとおり穀物の水分の影響を受けやすいので、水分の多い米ほどより殺菌効果が期待されることは実際問題として重要である。しかし、100% の死滅を期待する濃度となると、食糧研究所害虫研究室原田豊秋博士によると貯穀害虫の 100% 致死量は 6~13 mg/l、25°C、5 時間くん蒸であり、一方 *Absidia* sp. が湿度 75% では死滅率 100% が本実験では発見できなかったのと比べ、完全死滅の有効濃度に大きな差が認められる。湿度 95% でも、25.5 mg/l、25°C、12 時間くん蒸が必要であり、薬量×時間の値で比較すると 4.5~10 倍になる。つまり、同じくん蒸時間であれば、貯穀害虫に実際にきく薬量の 4.5~10 倍の薬量が必要である。

IV. 摘 要

ふけ米菌 (*Absidia* sp.) 胞子を使い、臭化メチルの殺菌効果についてしらべた。顕微鏡下で直接死滅率を計測し、また死滅率の高いところはシャーレ上のコロニー数と推定胞子数より死滅率をだした。

湿度 75%では温度が 25°C より 30°C に上昇しても、くん蒸効果はさほどあがらなかった。

くん蒸時間の延長による効果は非常にすくなく、湿度 75%, 温度 30°C, ガス濃度 72 mg/l, 72 時間でおお 100%死滅するにいたらなかった。

くん蒸時間を対数値とし、死滅率をプロビット値におきかえたくん蒸時間・死滅率回帰直線は、湿度が一定のときは温度、ガス濃度に関係なく、*Absidia* sp. 固有の傾斜値を示すことがわかった。

湿度が高くなると、くん蒸効果はいちじるしく増大する。
(1962. 11. 2 受理)

引用文献

1. Bliss, C.I. (1949). Statistical Tables for Biological Agricultural and Medical Research. 3rd edition (Fisher, R.A. and Yates, F.), London. pp. 50-51.
2. 神戸隆造 (1957). 麦研叢書 第 19 輯, 東京.
3. Lubatti, O.F. and Blackith, R.E. (1957). J. Sci. Food Agr. 8: 691-697.
4. 三坂英和 (1958). 新農薬研究法 (山本亮編). 東京. pp. 454.
5. Munnecke, D.E., Ludwig, R.A. and Sampson, R.E. (1959). Canad. J. Bot. 37: 51-58.
6. 内藤広・松野守男・菊池三千雄 (1956). 食研報 11: 129-136.
7. Sampson, R.E. and Ludwig, R.A. (1956). Canad. J. Bot. 34: 37-43.
8. Strong, R.G. (1959). J. Economic Entomology 52: 51, 319, 415, 706.
9. 辻二郎・大島秀男・難波進 (1956). 工業物理学講座 E 5. 東京. pp. 63-94.
10. 上村光男・松浦慎治・松野守男・柳井昭二 (1962). 食研報 15: 94-97.
11. 同上 (1963). 食研報 17: 49-54.

Summary

Fungicidal properties of methyl bromide was studied with spores of *Absidia* sp., the fungus of moldy rice grains.

Spore mortality was assessed under microscope in most cases, but colony counting on Koji extract agar in petri dish combined with direct spore counting was also applied in case of high mortality.

At air humidity of 75 per cent, the fungicidal effect was not much different at 25°C and 30°C. At this humidity, 100 per cent mortality could not be attained within 72 hrs., at temperatures from 15° to 30°C.

Probit of mortality plotted against logarithm of fumigation time yielded straight lines. At a given air humidity, slopes of these straight lines are almost constant, irrespective of temperature and concentration of methyl bromide.

The fungicidal effect markedly increased with air humidity. At 95 per cent air humidity and 25°C, at gas concentration of 25.5 mg/l, 100 per cent mortality was attained in 12 hrs.

(Food Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry, Tokyo, Japan)

文 献 紹 介

ケイ光抗体を用いた媒介昆虫体内のウイルス抗原の検出

Sinha, R.C. and Black, L.M.: Studies on the smear technique for detecting virus antigens in an insect vector by use of fluorescent antibodies. Virology 17: 582-587, 1962.

ケイ光抗体 (直接法および間接法) を用いて, Wound tumor virus を保毒したヨコバイ汁液の塗抹中の抗原検出を試みた。直接法では家兎から得た抗体を硫酸塩析で globulin を分離し, これにケイ光色素 (fluorescein isothiocyanate) を結合させたものを用いた。また間接法では家兎の γ -globulin に対する羊血清にケイ光色素を結合したものを用いた。両法とも特異的に染色される物質は黄緑色のケイ光を有して粒子状に見えた。抗体にケイ光色素を結合すると力価は低下する。これは結合の操作中に消失するか, 不活化するかのいずれかであろう。直接法

でヨコバイ汁液塗抹中のウイルス抗原を検出するにはケイ光抗体を 1/2 にしか稀釈することができない。しかるに間接法では 1/80 (ケイ光を標識していない血清) まで稀釈しても満足すべき結果を得た。また非特異反応は直接法より間接法が少なく, 間接法が優れている。罹病植物を吸汁した虫 379 頭の塗抹試験 (直接法) と伝染試験を比較した結果, 204 頭は保毒で, 134 頭は無毒であることが両試験で確かめられた。しかし 18 頭は塗抹試験では保毒を示したのに伝染試験では無毒であつた。また 23 頭は伝染試験では保毒であつたのに塗抹試験では無毒を示した。対照として用いた 319 頭の無毒虫は塗抹試験でも無毒であつたが 1 頭だけは保毒のうたがいがあつた。これらの結果から, 塗抹試験は約 10% の誤差はあるが, 媒介昆虫の保毒虫率を知る有力な方法であることに注目すべきである。(木村 郁夫)