

マツタケの人工培養を目指して～マツタケ菌糸の培養方法の確立～

3年B組 結崎 祈 1年B組 加藤 大翔 1年B組 木下 綾太
指導教員 櫻井 昭

1. 要約

私たちの班は、マツタケの人工培養を目指し平成23年度から研究を始めて4年になる。マツタケ菌の純粋培養を試み、なぜマツタケ菌の人工培養が困難であるのか、培養するための培地条件の検討を行なっている。昨年まではマツタケ菌の培地への植継ぎの時にコンタミネーションが起りマツタケ菌を維持することができないでいたが、今年初めて植継いだ後成長させることができ、マツタケ菌を維持できるようになった。

キーワード IFO-7培地、浜田培地、クリーンベンチ、パラフィルム、インキュベータ、プラズマクラスター、コンタミネーション、コンタミチェック

2. 研究の背景と目的

マツタケの人工培養の成功例はいまだ報告されていない。私たちは、なぜマツタケは人工培養が困難なのか興味をもち、マツタケの人工培養の成功を目指して研究を平成23年度から始めた。1年目はシイタケの人工培養を成功させ、2年目からマツタケの人工培養をめざして研究してきたが、毎回植継ぎの時にカビなどの繁殖により、マツタケ菌が汚染され増えなくなるという失敗(コンタミネーション)を重ねてきた。そこで、植継ぎの手順を見直すことで植継ぎの成功率を上げようと試みることにした。

れてしまった。そこで「他の菌がシャーレ内に入り込む原因は何か」という要因を突き止めたいと考えた。なぜならマツタケ菌の植継ぎは、無菌状態の空間で行い密閉するため、マツタケ菌や培地が外気にふれることは本来無いはずである。このことは、次に示す一連の操作手順からいえる。

マツタケ菌の植継ぎは、実験室内に設置されている“クリーンベンチ”という無菌状態の空間を作り出す機械の中で行う4センチほどに成長したマツタケ菌のコロニー(菌が集まり肉眼で見える大きさになったもの)を、メスで5ミリ角ぐらいに切り分け、それを新しい培地に植継ぐ。そのあと、培地が乾燥しないよう“パラフィルム”という薄いパラフィンでできたフィルムをシャーレと蓋の隙間に巻き、密閉する。それらのシャーレを“インキュベータ(恒温機)”に入れ、28度で培養する。以上の操作より、他の菌が培地内(シャーレ内)に入ることはないはずなのだが、毎回培地は菌に侵食さ

3. 実験内容

3.1 実験場所の環境を調べる

3.1.1 実験仮説

通常、マツタケ菌はIFO-7培地という培地で培養されるが、私たちがこの培地を使ってマツタケ菌の培養を試みたところ、マツタケ菌が殖えず、すぐに他の菌に浸食さ

れていた。

そこで、奈良女子大学の植野洋志先生に相談させていただいたところ「実験を行う部屋の環境そのものに問題があるのではないかと、ご助言いただいた。そこで、「実験を行う場所にはどれくらいの菌がいるのか」を調べるために、コンタミネーションチェック(以下コンタミチェック)を行った。

3.1.2 実験方法

クリーンベンチ内、インキュベータ内、実験室内の3ヶ所でコンタミチェックを行った。コンタミチェックの手順は以下の通りである。

1. マツタケ菌を培養するため、IFO-7培地と浜田培地の2種類の寒天培地のシャーレを作成する。
2. それぞれの培地のシャーレの蓋を3か所で1分間開けた後閉め、パラフィルムを巻く。
3. それらの培地を28度のインキュベータ内で1週間培養する。

実験に使用した培地の組成をまとめると以下ようになる。

・ IFO-7 培地

乾燥酵母	1.5g
グルコース	6.0g
寒天	5.4g
蒸留水	Σ300ml

・ 浜田培地

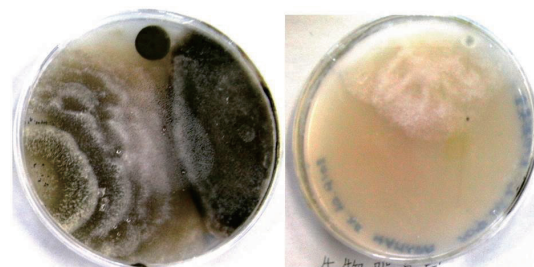
グルコース	6.0g
乾燥酵母	1.5g
磷酸カリウム	0.6g
硫酸マグネシウム	0.3g
寒天	6.0g
蒸留水	Σ300ml

3.1.3 実験結果

クリーンベンチ内で蓋を開けた培地には、コンタミネーション(以下コンタミ)がなかった。

インキュベータ内で蓋を開けた培地には、コンタミが見られた。また、培地によって繁殖した菌に、違いが見られた。IFO-7培地は、白くふわふわとしたコロニーが培地の半分を占めていた。浜田培地は、3種類ほどの菌が見られたが、コロニーの大きさは小さかった。

実験室で蓋を開けた培地にも、コンタミが見られた。こちらにも、コンタミの仕方に違いが見られ、浜田培地では、1~2センチほどの小さなコロニーが3つ見られ、その他は白いコロニーで、培地の1/4ほど覆われていた。IFO-7培地では、培地のほとんどが有色のコロニーで覆われており、コロニーの色の違いから、3種類ほどのコロニーはあるように思われた。



IFO-7培地 浜田培地
生物器具室のコンタミチェック

3.1.4 考察

コンタミしていた面積が浜田培地に比べ IFO-7 培地が広がった理由は、浜田培地にだけ入っている物質が、菌の増殖に対して何か作用しているのかもしれないが、今回の実験だけではわからなかった。そして、インキュベータ内と実験室には菌が多いことが分かった。また、クリーンベンチ内に

は、菌がほとんどいないことも確認できた。これらの結果から、クリーンベンチ内で操作をしているにもかかわらず、菌が入ってくるのは、インキュベータ内か、もしくは実験室にシャーレを置いている時の可能性が高いと考えられる。

以前、クリーンベンチ内で培地作成作業を行い、その後一度も蓋を開けていない培地で、コンタミが見られたことがあった。このシャーレを調べてみたところ、パラフィルムに穴があいているのを見つけた。これらのことから、シャーレを実験室やインキュベータ内に置いておくと、このパラフィルムの穴から培地に他の菌が侵入し、コンタミを生じさせていたと考えられる。

3.2 空気中の菌を減らす工夫

3.2.1 実験仮説

実験 3.1 より、実験を行っている実験室と、培地を培養しているインキュベータ内には菌が多く、菌をなるべく減らすための工夫が必要だということが分かった。そこで、実験室内の菌を減らすには空気清浄機が使えるのではないかと考えた。またインキュベータ内は、空気清浄機を置けないため、インキュベータ内に付着している菌を少しでも減らそうと考え、実験を行うことにした。「プラズマクラスターを実験室に導入し、実験を行えば空気中の菌が減るのではないか」「インキュベータ内をアルコールで掃除・消毒すればインキュベータ内の菌が減るのではないか」と仮説をたて、実験室とインキュベータ内で再度コンタミチェックを行った。

3.2.2 実験方法

実験室内で、実験を行っている場所をビ

ニールカーテンで区切り、その中でプラズマクラスターを約 24 時間つけ放しにする。この際、区切られた空間の空気が入れ替わらないように、窓と扉は実験終了まで一切開けないようにする。また、インキュベータ内はアルコールで掃除・消毒する。

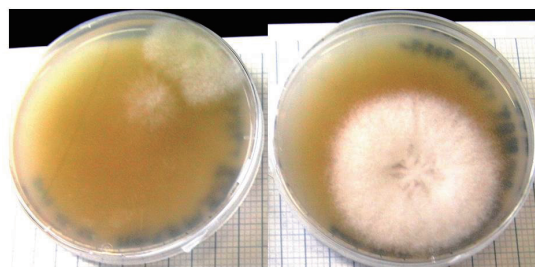
翌日、3-1-2 と同じ方法でコンタミチェックを行う。

3.2.3 実験結果

プラズマクラスターをつけた実験室の空間で蓋を開けたシャーレは、前回(3-1)と同じようにコンタミが見られたが、どちらの培地もコロニーに覆われた面積は、前回よりも狭かった。

インキュベータ内で蓋を開けたシャーレにコンタミが見られたが、コロニーの大きさは前回とあまり違いはなかった。

どちらのコンタミチェックで観察されたコロニーは、白くふわふわしたもの一種類のみだった。



IFO-7培地 浜田培地
生物器具室(プラズマクラスター有)
コンタミチェック

3.2.4 実験考察

前回のシャーレには赤、青、白等の多種多様なコロニーが殖えていたが、今回は白くふわふわしたもの一種類のみだった。このことからプラズマクラスターやアルコール消毒によって、培地に侵入する菌の総数は、減らすことができると考えられる。

3.3 マツタケの純粋培養

3.3.1 実験仮説

3.2の実験より、プラズマクラスターとアルコール消毒は効果があると分かった。そこで、「プラズマクラスターをつけた空間で実験を行えばシャーレに菌が入り込む確率が減り、マツタケ菌が侵食されることなく殖えるのではないか」という仮説を立て、マツタケ菌を培地に植え継ぐことにした。

3.3.2 実験方法

実験室内の、実験を行っている場所をビニールカーテンで区切り、その中でプラズマクラスターを約24時間つけ放しにする。この際、区切られた空間内の空気が入れ替わらないよう窓と扉は実験終了まで一切開けないようにする。また、インキュベータ内をアルコールで掃除・消毒する。

翌日、プラズマクラスターをつけた空間内にあるクリーンベンチ内で、マツタケ菌の植継ぎを行う。

3.1.4より、パラフィルムの穴も菌が入り込む原因の一つと考えられるため、穴があかないようにパラフィルムを2重に巻き、28度のインキュベータ内で、2ヶ月間培養した。

3.3.3 実験結果

10枚植継いだうち、菌に侵食されたものは1枚のみだった。残りのシャーレは順調にマツタケ菌のコロニーが成長していた。



IFO-7培地 浜田培地
成功したマツタケ菌の植継ぎ

3.3.4 実験考察

今までマツタケ菌を新しい培地に植継いでも、すべて他の菌に侵食されてしまっていたが、今回はほぼすべてが侵食されることなく、マツタケ菌のみ培地上で殖えていた。このことから「プラズマクラスターをつけた空間で実験を行う」「アルコールでインキュベータ内を掃除、消毒する」「パラフィルムを2重に巻く」という操作過程は、マツタケ菌の純粋培養に有効であると考えられる。

4. 今後の課題

現段階では、マツタケ菌の菌糸の維持が可能になっただけであり、子実体にする方法を確立していない。私たちが食用としているのは、子実体である。そして、キノコ類の菌糸が子実体になるには、ある特定のショックが必要であり。しかし、マツタケ菌糸が、子実体になるために必要なショックはまだ解明されていないため、そのショック法の検討を今後行いたい。

また、マツタケ菌はアカマツの木の周辺に生息しているため、マツタケ菌とアカマツの関係についても調べていきたいと考えている。

5. 謝辞

本研究活動において、奈良女子大学の植野洋志先生、顧問の櫻井先生に、多大なご指導を賜りました。そして、サイエンス研究会生物班のメンバー(2A 天野桃花さん、2A 松本淳子さん)にご協力をいただきました。この場で、深く感謝申し上げます。