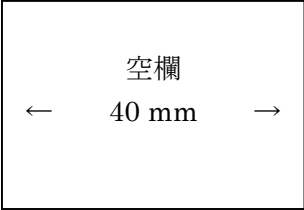


# 水生菌類を用いたハイスループット培養試験法の検討

永井孝志\* (農研機構・農業環境変動研究センター)



## 1. はじめに

農薬のなかでも殺菌剤は植物病原菌などの菌類をターゲット（防除対象）としたものである。使用した殺菌剤が湖沼や河川などの水域に流出した場合、ノンターゲットの水生菌類に対する影響が懸念される。ところが、水生菌類を用いた毒性試験はこれまでほとんど報告がなく、その試験法も未確立である。また、水域生態系を代表するような試験生物種の選定も大きな課題である。そこで本研究では、試験への適合性のみならず生態学的な重要性も考慮して、数種の水生菌類を試験生物種として選抜し、効率的なハイスループット培養試験法を検討した。

## 2. 材料と方法

菌類を用いた農薬の試験では、防除対象である植物病原菌を用いた薬剤感受性検定試験が現状広く行われている。この方法として、薬剤を添加したシャーレ内の寒天培地に病原菌を接種してその生育を調べるのが一般的である。ところがこの試験は、(1)結果の定量的な評価が難しい、(2)寒天培地を用いるため操作が煩雑で、大量の試験を効率よく行うことができない、(3)水生菌類の生息の場である「水中」での試験ではない、という欠点がある。一方、藻類を用いた毒性試験法では、従来の三角フラスコを用いた試験法を改良し、96穴マイクロプレート中で培養を行い、蛍光プレートリーダーで自家蛍光を測定することでバイオマスの指標とする試験法が実用化されてきた。菌類のバイオマス定量については、細胞内のATP量をルシフェラーゼ試薬による発光として定量する手法が、ISOの繊維製品の抗かび性

試験法において標準的な手法として採用されている。このときの発光量は生菌数と比例することが知られており、マイクロプレートリーダーによって自動的に測定可能であることから、非常に効率的である。本研究では、マイクロプレートを用いた培養試験とATP発光によるバイオマス定量法を組み合わせ、最適な試験法の検討を行った。

試験生物種の選定は、以下の4つの観点から考慮して行った：(1)日本の水圏生態系に一般的に分布し、頻繁に見られる種であること；(2)幅広い分類群をカバーしていること；(3)試験の普及と再現性確保のため、公的な系統保存施設に保存されており誰でも入手可能なこと；(4)マイクロプレートを用いた培養試験に適合すること。

モデル物質として殺菌剤のマラカイトグリーンを用いた毒性試験を行って、試験法の妥当性の検討を行った。

## 3. 結果と考察

上記に挙げた条件を満たす試験生物種として表1の5種を選定した。マイクロプレートを用いて様々な培養条件を検討した結果、共通の培地としてポテトデキストロースブロス 2.4 g/L、ペプトン 0.4 g/L、pH 7.0（緩衝剤としてMOPSを使用）、温度 20°C、試験期間 48 時間、試験開始時の ATP 濃度 0.01 μM を選定した。5種全てでこの共通の培養条件を用いて、安定した再現性のある増殖を得ることができた。マラカイトグリーンの半数影響濃度は 0.82~170 μg/L となり、他の生物種に比べて高い毒性を示した。

表 1. 試験候補種 5 種の特徴

種名	株番号	分類群	形状	
<i>Rhizophydium brooksiaum</i>	NBRC-103829	真菌	ツボカビ門	遊走子嚢
<i>Chytrium hyalinus</i>	NBRC-102555	真菌	ツボカビ門	遊走子嚢
<i>Tetracladium setigerum</i>	NBRC-102389	真菌	子嚢菌門	分生子
<i>Sporobolomyces roseus</i>	NBRC-10566	真菌	担子菌門	酵母
<i>Aphanomyces stellatus</i>	NBRC-103817	ストラメノパイル	卵菌類	糸状体