

イモゾウムシ卵のエタノール浸漬による人工飼料のバクテリア汚染抑制： 卵をファーセラン水溶液とともに飼料に接種した場合

大野 豪・佐々木智基・小濱 継雄
(沖縄県ミバエ対策事業所)

Suppression of bacterial contamination of artificial diet by ethanol submersion of eggs of the West Indian sweetpotato weevil, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (Coleoptera: Curculionidae), before planting eggs suspended in furcellaran solution on the diet. Suguru Ohno, Tomonori Sasaki and Tsuguo Kohama (Fruit Fly Eradication Project Office, Okinawa Prefectural Government, Naha, Okinawa 902-0072, Japan)

We tested the suppression of bacterial contamination of artificial diet by 5-min submersion of *Euscepes postfasciatus* eggs in 70% ethanol before a simple egg-seeding method that is used for mass-rearing of other weevil species. In this egg-seeding method, eggs are suspended evenly in a sterile furcellaran solution (a viscous liquid); the mixture is then dropped onto the surface of the diet. When weevil eggs rinsed only with sterile water were mixed with the solution and placed on the diet, bacterial colonies formed in all replicates within 3 days. Ethanol treatment of the eggs before mixing with the solution significantly reduced and delayed formation of bacterial colonies on the surface of the diet by 29% and 8d, respectively. However, these values were significantly less than those achieved by an ordinary egg sterilization method (20-min submersion in 5% formaldehyde; 71% and 13d). Therefore, it appears that ethanol treatment of *E. postfasciatus* eggs alone is insufficient for preventing bacterial contamination of diet in the mass-rearing of *E. postfasciatus*.

Key words: bacteria, egg-surface sterilization, ethyl alcohol, mass-rearing, moisture, quarantine pest

緒 言

沖縄県では、植物防疫法により特殊病害虫に指定されているイモゾウムシ *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (甲虫目:ゾウムシ科) の、不妊虫放飼法による根絶防除のため、人工飼料を用いた本種の大量増殖法の開発が進められている (山岸・下地, 2000)。昆虫類の人工飼育では一般に、バクテリアやカビの発生による飼料の汚染を防ぐための方法のひとつとして、ホルマリン等を用いた卵の表面殺菌が行われる (湯島ら, 1991; Sikorowski and Lawrence, 1994)。イモゾウムシの人工飼育において、表面殺菌が施されていない卵を人工飼料に接種した場合、接種後数日以内に飼料表面にバクテリアの発生が認められる (下地, 2003)。一方、卵を5%ホルマリンに20分浸漬したのち接種を行うと、孵化率を低下させることなく、飼料のバクテリア発生を接種後平均20日間にわたって抑制し、飼育虫の生存率を有意に上

昇させることができる (下地, 2003)。

昆虫類の卵の表面殺菌において、卵が殺菌液になじみにくい場合には、70%エタノール浸漬による前処理が行われることがある (湯島ら, 1991)。イモゾウムシの卵は水になじみやすいため前処理は必要とされないが、最近の研究から、エタノールは本種卵の殺菌液としても使用可能であることが示された。下地 (2003) は、70%エタノールに30秒から5分間浸漬した卵を人工飼料に接種して7日間観察を行い、孵化率の低下と飼料表面のバクテリア発生は認められないことを示した。大野ら (2004) は、70%エタノールに5分浸漬 (以下、エタノール処理) したイモゾウムシ卵の孵化後の生存・発育が、5%ホルマリンに20分浸漬 (以下、ホルマリン処理) したものに比べて遜色ないことを明らかにした。下地 (2003) では、エタノール処理・ホルマリン処理間でのバクテリア汚染抑制力の比較はなされていないが、大野ら (2004) は、約2ヶ月の試験期間を通じて、エタノー

ル処理区とホルマリン処理区の人工飼料のどちらにもバクテリアの発生が観察されなかった事実から、これら2つの処理が同等のバクテリア汚染抑制能力をもつと考えた。

下地 (2003) および大野ら (2004) において、飼料への卵の接種は、殺菌後自然乾燥させた卵を、面相筆を用いて互いに接しないように飼料表面に並べることによって行われた。筆を用いた卵接種は時間と手間がかかるため、現在我々は、イモゾウムシと同じゾウムシ科に属するワタミゾウムシ *Anthonomus grandis* (Boheman) の大量増殖に採用された卵接種法 (Sikorowski et al., 1984) をイモゾウムシの人工飼育に導入するための試験を進めている。この方法では、卵を海草由来の増粘安定剤の一種であるファーセラン (fucellaran) の水溶液と混合して水溶液中に均一に分布させた後、溶液ごと卵を人工飼料表面に接種する。イモゾウムシ卵のエタノール処理が、この大量増殖向けの接種法を用いた場合でも、十分なバクテリア抑制効果をもつかは明らかでない。そこで本研究では、イモゾウムシのエタノール処理卵、ホルマリン処理卵および無処理卵を、ファーセラン水溶液に混合して人工飼料に滴下し、飼料のバクテリア汚染を調べた。

本文に入るに先立ち、実験を手伝って下さった沖縄県ミバエ対策事業所の青野恵美氏にお礼申し上げる。

材料および方法

1994年8月に沖縄県読谷村で採集し、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、14L:10Dの条件下でサツマイモ塊根を用いて累代飼育しているイモゾウムシ個体群 (年当たり5世代) より、2003年3月から5月にかけて塊根から自然脱出した成虫をひとまとめにして採卵に用いた (採卵法については大野ら, 2004を参照)。卵はろ紙を敷いたプラスチックシャーレに入れ、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、14L:10Dに保った恒温器中で、使用するまで保管した。大野ら (2004) に従い、卵の表面殺菌および飼料への接種には6日齢の卵を用いた。これらの卵から、メスピペットを用いた卵数推定法 (大野 豪ら, 未発表) により約5,000個の卵群を3群用意した。

これら3群のそれぞれに対し、70%エタノール処理、5%ホルマリン処理、および対照区として滅菌水で2度すすぐだけの処理のいずれかを行った。エタノールとホルマリンへの浸漬時間はそれぞれ5分および20分とした (下地, 2003; 大野ら, 2004)。浸漬中は約1分おきに容器を軽く揺らして攪拌し、浸漬後の卵は滅菌水で2度すすいだ。浸漬する殺菌液およびすすぎに用いる滅菌水の量はいずれも1回につき100 ml とした。処理後の卵は、

高圧蒸気滅菌 (121°C , 40分) 済みの0.6%ファーセラン水溶液 (蒸留水とファーセラン粉末 [伊那食品工業] を重量比500:3で混合したもの) に1 ml 当たり約100卵を含むように混合し、卵を溶液中に均一に拡散するために溶液をよく攪拌した。それぞれの処理区に対し、イモゾウムシ幼虫の大量増殖用に開発した防腐剤入りの人工飼料 (Shimoji and Yamagishi [2004] の飼料と同一原料を用い、より簡易な方法で作製したもの; 上里卓己・小濱継雄, 未発表) が約23 g (範囲22-24 g) 入った直径9 cmの滅菌済みガラスシャーレを15個ずつ用意した。それぞれのシャーレの飼料表面に、卵を含んだファーセラン水溶液を1 ml ずつ、滅菌済みチップ (卵が詰まらないよう先端から2 mm 程度を切り落としたもの) を装着したマイクロピペットを用いて滴下した。接種後のシャーレは、蓋と本体の隙間をセロハンテープで目張りしたのち、上記と同じ恒温器中に保管した。

接種の翌日から35日後まで毎日飼料表面を観察し、シャーレごとのバクテリア発生日を記録した。人工飼料表面に肉眼で認識できる大きさのコロニー (下地, 2004を参照) が初めて観察された日をバクテリア発生日とした。少数のシャーレにおいて、セロハンテープで目張りした部分に発生したカビが内部に侵入して飼料表面を覆い、バクテリア発生の確認が困難になったため、これらのシャーレは分析から除外した。観察終了後、各処理区におけるバクテリア発生率 (バクテリア発生が観察されたシャーレ数/カビが発生したシャーレをのぞく全シャーレ数) およびバクテリア発生までの平均日数を算出した。

結果および考察

バクテリア発生率と発生までの平均日数を Table 1 に示した。殺菌処理をしていない卵を接種した対照区では、全てのシャーレにおいて接種から3日後にバクテリア発生が観察された。エタノール処理区では71.4%のシャーレ (14個中10個) で接種から平均7.8日後に、ホルマリン処理区では28.6%のシャーレ (14個中4個) で接種から平均13.3日後に観察された。バクテリア発生率およびバクテリア発生までの平均日数の双方とも、3処理区のすべての組み合わせ間で有意に異なった ($P < 0.05$; 発生率: Ryan の多重範囲検定; 平均日数: 対数変換後のデータに対する Tukey - Kramer の HSD 検定)。

以上の結果から、イモゾウムシ卵のエタノール処理は、ファーセラン水溶液による卵接種法を用いた場合においても、人工飼料のバクテリアの増殖を抑制し遅延させる効果があるものの、その効果はホルマリン処理のそれ

Table 1. Bacterial contamination of larval artificial diet after seeding of *Euscepes postfasciatus* eggs submerged in 70% ethanol for 5 min or in 5% formaldehyde for 20 min^{a)}

	Egg-surface treatment		
	Control ^{b)}	Ethanol	Formaldehyde
No. of contaminated Petri dishes / No. of tested Petri dishes (%) ^{c)}	15/15 (100)	10/14 (71.4)	4/14 (28.6)
Days to observation of bacteria (mean \pm SD) ^{d)} [range]	3.0 \pm 0.0 [3]	7.8 \pm 4.5 [5-20]	13.3 \pm 2.5 [12-17]

a) One milliliter of sterile 0.6% furcellaran solution containing approximately 100 eggs was dropped into a Petri dish filled with 23g of artificial diet (a modified version of Shimoji and Yamagishi's [2004] diet; T. Uesato and T. Kohama, unpublished), and bacterial colony formation was visually inspected daily for 35 days. Fifteen Petri dishes were used for each treatment. Dishes contaminated by fungus were excluded from the statistical analyses. b) Eggs rinsed only with sterile water. c) Contamination ratio varied significantly among all pairs of treatments (Ryan's multiple-range test, $P < 0.05$). d) Mean days varied significantly among all pairs of treatments (Tukey-Kramer's HSD test on \log_{10} -transformed data, $P < 0.05$).

よりも弱いことが示された。

下地 (2003) は、エタノール処理卵を筆を用いて人工飼料に接種した後、7日間に渡ってバクテリア発生が観察されなかったことから、エタノールは本種の卵表面の殺菌液として十分に使用可能であると考えた。大野ら (2004) は、同様な処理卵を同様に飼料に接種した後、すべての成虫の羽化が終了するまでの間 (63日間)、バクテリア発生が観察されなかったことを報告している。しかし、大量増殖を想定した卵接種法を採用した本研究では、エタノール処理区のバクテリア発生率は71%にのぼり、発生の過半数 (10シャーレ中6個) は接種後7日以内に観察された。このため、卵の70%エタノール5分浸漬処理は、単独ではイモゾウムシの大量増殖における飼料のバクテリア汚染抑制法として不十分であると考えられる。

ホルマリン処理区の少数のシャーレにみられたバクテリア発生もまた、下地 (2003) の場合 (接種から平均20日) より早く、すべて接種から17日以内 (Table 1) に観察された。本研究の結果は、ファーセラン水溶液を用いた卵接種法が、従来の筆を用いた接種法よりも、バクテリアの増殖に好適な環境をもたらしていることを示唆している。ファーセラン水溶液の滴下により、飼料表面が湿った状態に保たれることが、バクテリアの増殖に都合がよい可能性がある。もしこの考えが正しければ、水溶液の滴下後に、飼育容器の通気性を保つなどして飼料表面を乾燥させれば、バクテリアの増殖をいくらか抑制することができるであろう。また、エタノールとホルマリンを組み合わせた使用や殺菌液への浸漬時間の延長により、バクテリア汚染抑制効果が向上する可能性も考えられる。ただし、殺菌液の複数使用や浸漬時間の延長がイモゾウムシの孵化や発育に及ぼす影響については明

らかでなく、今後調べる必要がある。

摘 要

イモゾウムシ人工飼料のバクテリア汚染防止法としての有効性が最近確かめられた、70%エタノール5分間の卵浸漬処理が、他種ゾウムシの大量増殖に導入された簡易な卵接種法を使用した場合にも効果を示すかを調べた。この方法では、卵はファーセラン水溶液という粘度のある液体に混合され、水溶液ごと飼料表面に滴下される。エタノール処理したイモゾウムシ卵を滅菌済みファーセラン水溶液と混合して飼料に接種すると、滅菌水ですすいだだけの卵を同水溶液と混合して接種した場合に比べ、飼料のバクテリア発生率およびバクテリア発生までの日数を有意に低下・遅延させることができた。しかし、卵をエタノール処理した場合でも、バクテリア発生率は71%にのぼり、従来のイモゾウムシ卵の殺菌法 (5%ホルマリンに20分浸漬) と比べると、発生率の低下・発生までの日数の遅延の程度は有意に弱かった。このため、卵の70%エタノール5分処理は、ファーセラン水溶液を卵接種に使用する場合には、単独では飼料のバクテリア汚染抑制法として不十分であると考えられた。

引用文献

- 大野 豪・佐々木智基・浦崎貴美子・小濱継雄 (2004) エタノールによる卵表面処理がイモゾウムシの孵化後の生存・発育に及ぼす影響。九病虫研会報 50: 40-43.
下地幸夫 (2003) イモゾウムシの卵接種が起因となる人工幼虫飼料汚染の防止。沖縄農業 37: 57-60.
下地幸夫 (2004) サツマイモ害虫イモゾウムシの人工飼育法。沖縄県特殊病害虫特別防除事業特別研究報告第3号。沖縄県ミバエ対策事業所 (那覇), pp. 73.

- Shimoji, Y. and M. Yamagishi (2004) Reducing rearing cost and increasing survival rate of West Indian sweetpotato weevil, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (Coleoptera: Curculionidae) on artificial larval diet. *Appl. Entomol. Zool.* 39 : 41-47.
- Sikorowski, P. P., J. G. Griffin, J. Roberson and O. H. Lindig (1984) *Boll Weevil Mass Rearing Technology*. University Press of Mississippi (Jackson), pp. 172.
- Sikorowski, P. P. and A. M. Lawrence (1994) Microbial contamination and insect rearing. *Am. Entomol.* 40 : 240-253.
- 山岸正明・下地幸夫 (2000) 不妊虫放飼法によるゾウムシ類の根絶 (7) イモゾウムシの大量増殖・不妊化・マーキング・輸送・放飼. *植物防疫* 54 : 476-478.
- 湯島 健・釜野静也・玉木佳男 (編) (1991) *昆虫の飼育法*. 日本植物防疫協会 (東京), pp. 392.