

拮抗放射状菌の培養粉末に就て

西門 義一・*大島 俊市・森田日出男

目 次

1. 緒言 2. 拮抗放射状菌の發育と溫度及び pH
3. 培養基の炭素源及び窒素源 4. 菌体粉末の貯藏試験 5. 死滅溫度 6. 孢子形成に就て 7. 培養粉末 8. 結言 9. 摘要

*専賣公社岡山煙草試験場技師

1. 緒 言 筆者等は第1報に於てトマト青枯病菌に拮抗作用を有する放射状菌 No. 1091, 1141, 1154及び1166を選出した事を報告した。其後、拮抗放射状菌を土壤に添加する方法に就て検討して、土壤中に拮抗菌を廣く且密に分布させるには相当量の培養を撒布し、充分耕耘すれば良いと考へた。この方法に使用する培養は孢子を多量に含む乾燥粉末が好適である。筆者等は之を培養粉末と呼ぶ。

茲に報告するものは培養粉末を作る目的で行つた、諸実験の結果を取纏めたものである。

本研究は文部省科学試験研究費によつて施行した、記して謝意を表する。

2. 拮抗放射状菌の發育と溫度及び pH

拮抗放射状菌の發育最適溫度及び pH を知る爲に、次の如き実験を行つた。

実験方法：第一報に述べた合成培養基の組成で、溫度実験では寒天斜面を、pH 実験では液

第1表 拮抗放射状菌の發育と溫度

溫度°C	20	24	27	30	33	36	40
拮抗菌							
No. 1091	+++	+++	+++	+++	++	+	-
1141	+	+	++	+++	+++	+++	+++
1154	+	++	+++	+++	+++	+	±
1166	+	+	++	+++	+++	+++	++

第2表 拮抗放射状菌の發育と pH

pH	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
拮抗菌						
No. 1091	-	+	++	+++	+++	+++
1141	+	++	+++	+++	++	-
1154	+	++	+++	+++	+++	++
1166	+	++	+++	+++	+++	-

(註) + 發育程度、- 發育せず

体培養基を使用した。実験法は常法による。

実験結果：第1表及び第2表の如くである。

第1表及び第2表に依れば、發育適温及び最適 pH は、1091 では 24—27°C, pH 7.0—7.5, 1141 は 36—40°C pH 7.0, 1154 は 30°C, pH 7.0, 1166 は 33°C, pH 7.0 である。

3. 培養基の炭素源及び窒素源 培養基に用ひる炭素源、窒素源の種類と拮抗放射状菌の發育とを試験した。

(1) 炭 素 源

炭素源の種類：Galactose, Glucose, Glycerine, Inulin, Lactose, Laevulose, Maltose, Mannit, Starch, Sucrose, Acetic acid, Citric acid, Tartaric acid.

実験方法：基本培養液 (Basal solution)

NH₄NO₃ 3.0g MgSO₄ 0.5 K₂HPO₄ 1.0
KCl 0.5 NaCl 1.0 FeSO₄ 0.01
CaCl₂ 1.0 蒸溜水 1000cc

基本培養液に各炭素源を 1.0% 加へ、三角フラスコに 50cc 宛分注殺菌し、放射状菌を植付け、1週間培養してその發育状態を調査した。接種には接種量を一定にする爲、孢子懸濁液を作り、1白金耳宛懸滴した。

実験結果：第3表の如くである。

第3表によれば、最適炭素源として、1091は Glycerine, 1141は Galactose, Glucose, Maltose, 1154は Mannit, Sucrose, 1166は Galactose, Mannit, Maltose である。四種を通じて良いものは Maltose, Mannit, Galactose, Glucose, Glycerine, である。有機酸類は何れも不良であつた。1154は Sucrose, Mannit が成績良く、Glucose が不良で、他の三種と異なる。

茲に注意すべきことは、第3表に示される最適炭素源と大量培養に於る夫とは、必ずしも一致しない事である。即ち抗菌物質抽出の爲、大量に培養する場合等では發育は他の養分や培養条件に支配せられ、利用され易い炭素源は過早に消費されて、養分の均衡を失ふ場合があり、斯る場合は往々、培養基 pH は激變し、發育不良となる。

第 3 表
拮抗放射状菌の発育と炭素源との関係

炭素源の種類	1091	1141	1154	1166	総点数
Galactose	+	≡	≡	≡	11
Glucose	≡	≡	+	≡	11
Glycerine	≡	≡	≡	≡	11
Inulin	≡	+	≡	≡	9
Lactose	+	≡	+	≡	9
Laevulose	—	≡	±	+	3.5
Maltose	≡	≡	≡	≡	14
Mannit	≡	≡	≡	≡	12
Starch	≡	≡	+	≡	7
Sucrose	≡	+	≡	≡	9
Acetic acid	±	—	+	±	2
Citric acid	—	+	≡	+	4
Tartaric acid	+	—	—	—	1
Control (Basal solution)	—	—	—	—	0

(註) 総点数は十印の数の総和である。

(2) 窒 素 源

窒素源の種類: NaNO_3 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, Asparagin, Casein, Eggalbumin, Peptone, Urea,

実験方法: 基本培養液 (Basal solution)

K_2HPO_4 1.0g KCl 0.5 NaCl 1.0
 FeSO_4 0.01 CaCl_2 1.0

Glucose (1154 のみは Sucrose) 20.0

MgSO_4 0.5 蒸留水 1000cc

基本培養液に各窒素源を1000ccに対し2.0g加へ、炭素源の場合と同様実験した。

実験結果: 第4表の如くである。

第 4 表
拮抗放射状菌の発育と窒素源との関係

窒 素 源	1091	1141	1154	1166	総点数
NaNO_3	±	+	≡	—	2.5
NH_4NO_3	≡	≡	≡	≡	9
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	≡	≡	≡	≡	10
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	+	+	—	+	3
AsParagin	≡	≡	≡	≡	14
Casein	≡	≡	≡	≡	16
Eggalbumin	≡	≡	≡	≡	14
Peptone	≡	≡	≡	≡	12
Urea	≡	—	—	—	3
Control (Basal solution)	—	—	—	—	0

第4表によれば、最適窒素源として 1091 は Asparagin, Casein, 1141 は Asparagin, Casein, Eggalbumin, Peptone, 1154 は $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Casein, Eggalbumin, 1166 は Asparagin, Eggalbumin, Peptone である。全体を通じて良いのは、Casein, Eggalbumin, Asparagin, Peptone, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ である。有機態の窒素の方が、無機態よりも良く無機態の中ではアンモニウム鹽類が好成績を示した。

4. 菌体粉末の貯藏試験 拮抗放射状菌の聚落を乾燥し、粉末にして貯藏した場合、何の程度生命を維持するかと謂ふ事は、培養粉末の應用價值を左右する重大な問題である。若し乾燥によつて死滅するならば、乾燥粉末は供試し得ない。

筆者等は乾燥した菌体粉末が、死滅する迄の日数、即ち有効保存期間を知る爲に次の如き実験を行つた。

実験方法: 放射状菌の液体培養聚落を殺菌シャーレに採集し、 40°C .にて2日乾燥し無菌操作によつて粉碎し、之を殺菌綿栓試験管に少量宛分配する。斯るものを、室内暗所と、鹽化石灰デシケーターとに保存し、1週間毎に、少量を採つてプイオン寒天に植付け生死を鑑別した。

実験結果: 第5表の如くである。

第 5 表
拮抗放射状菌乾燥粉末の有効保存期間

日 数	15	22	29	36	43	50	64	85	92	106	120
室内暗所	1091	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
	1141	+	+	+	+	±	±	+	—	±	—
	1154	+	+	+	+	+	+	+	±	+	±
	1166	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
デシケーター	1091	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1141	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1154	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1166	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(註) +は生存、—は死滅を示す。昭和23年1月29日開始、11月—3月平均気温 74°C 。

第5表に示す如く、室内暗所で保存した場合は 1091, 1166 は約1ヶ月有効である。1141 は2ヶ月位から死滅が始り、3ヶ月半位で完全に死滅する。1154は3ヶ月頃から死滅し始めるが

4ヶ月に至るも完全には死滅しない。デシケーターに保存したものは4ヶ月でも各菌株共、死滅の傾向を認めない。

5. 死滅温度 培養菌体を乾燥する場合の温度限界を知る爲に、拮抗放射状菌の死滅温度を実験した。

実験方法：内径1cmの小試験管に液体培養基を1cc宛分注、綿栓殺菌する。之に各菌株の孢子浮游液を1白金耳懸滴する。この際、白金耳が管壁に触れてはならない。試験管は各菌株につき各温度毎に5本宛準備し、所定温度の湯槽にて10分間処理した。この場合、培養液の面が水面より少くとも4cm下になる様注意した。処理を終れば、直ちに水で冷却した後、定温器に保つて発育の有無を調査した。

実験結果：第6表の如くである。

第6表 拮抗放射状菌の死滅温度

温度	50°C	54	56	58	60	62	64	66	68	70
1091	+	+	+	+	+	±	±	-	-	-
1141	+	+	+	+	+	±	±	-	-	-
1154	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
1166	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

(註) 1166のみは菌糸他は孢子を供試した。

第6表によれば、死滅温度は1091、1141及び1154では64—66°C、1166は56—58°Cである。1166は菌糸の死滅温度であり、孢子の夫は之より高いものと思はれる。要之、拮抗放射状菌の死滅温度は孢子で65°C附近、菌糸では少々低い。

6. 孢子形成に就て 培養粉末は孢子を豊富に含有してゐる事が望ましい。筆者等は孢子形成の豊富な培養を作る爲に、実験を行つた。

(1) 単孢子分離による孢子形成力の強い系統の選出 単孢子分離によつて得た多数の系統について、その性質を比較すれば、その間に著しい差異を認める。一例を示せば第7表の如くである。

一般に孢子形成、色素生産の旺盛な系統は拮抗作用も強い様である。筆者等は孢子形成の良い系統を選んで培養に供した。

(2) 培養基 pH と孢子形成 孢子は一般に、中性乃至微アルカリに於て良く形成せられる。微酸性培養基に培養すれば、菌糸のみ発育して、

第7表

拮抗放射状菌 No.1154 単孢子分離系統の性質

系 統	孢子形成	色素生産	No. 1209 Bacterium sp. 阻止帯の幅 mm
A. 1	—	—	3.0
A. 2	+	—	6.0
A. 4	—	—	3.0
A. 10	卅	卅	14.0
A. 12	卅	卅	10.0
A. 13	卅	卅	12.0

濡潤な光澤ある聚落を形成し、孢子を作らない。然し乍ら、長く培養を続けると、新陳代謝によつて pH がアルカリに移動するので、漸次孢子を形成し始める。微アルカリに於ては、菌糸の発育と孢子形成が同時に行はれ、聚落は最初から粉状を呈してゐる。著しい酸性又はアルカリ性では発育不良で、孢子を形成しない。

(3) 酸素の供給 酸素の供給不充分の時は孢子を形成しない。従つて孢子をよく形成させるには通氣を行ふのが良い。後述する大量培養に於て攪拌するのはこの爲である。

7. 培養粉末 前項迄に述べた実験によつて拮抗放射状菌の培養について基礎知識を得たので、之を基として培養粉末を作る事を試みた。應用目的に副ふ爲には、1.) 培養基材料が安價で豊富であること、2.) 培養方法が簡単であること、3.) 量産可能であること、等の條件を満足しなければならない。

(1) 培養材料。養分源として種々の材料を供試した。即ちふすま、米糠、玉蜀黍粉、土壤、細末堆肥等を用ひたが、何れも放射状菌は発育した。而して土壤及び細末堆肥は、均一の材料を得難く、大量に取扱ふ事が困難である。筆者等は最も入手し易い米糠を使用した。

(2) 嵩増材料。水分、養分を保持し、培養基の組織を多孔性にして、酸素の供給を良くする爲に嵩増材料を必要とする。

最初、嵩増材料として鋸屑を用ひたが、放射状菌の発育は不良であつた。その原因が鋸屑の含有成分にあるか否かは明でない。目下筆者等の使用してゐるのは枳殻である。枳殻は現在の所、最も適當の様である。更に土壤を、保水材料或は pH 緩衝材料として添加すれば結果が

良く、養分源としても働く様である。

(3) 培養方法。培養方法に就ては実験中であるが、現在行つてゐる方法を紹介すれば次の如くである。

重量比で粃殻 20、米糠 1、土壤 10 の割合で混合してよく攪拌する。次に水を加へて、60—70 % 迄水を含ませ、消石灰で pH を 7.0 前後にする。高圧殺菌する。殺菌を終れば、培養基を取出し冷却する。50°C 位迄冷却した時、放射状菌の菌体粉末又は、孢子懸濁液を接種する。充分攪拌して後、培養基を、容器に入れ、適温に保つ。2—3 日培養すれば、粃殻表面に点々と放射状菌の聚落を発生し、特有の臭氣を發する。此の時、培養基を攪拌して、通氣を計り、層を薄くする。培養の初期には、乾燥しない様に取り扱はねばならない。後期は徐々に排出し、温度は少々低目に保つ。

7—10 日で完全に繁殖するから、之を 50°C 以下で直射日光を避けて乾燥し、粉末とする。出来上つたものは防濕処置をして、乾燥状態に保存する。

8. 結 言 本報告は拮抗放射状菌の培養粉末を作る迄の実験経過の概要を述べたものである。研究の目的は *Bacterium solanacearum* に由るトマト、煙草等の病害を防除するに在り、培養粉末は、防除に用ひる一供試材料に過ぎ無い。之を土壤に施用して効果を顯すか否かは今後の研究に俟たねばならない。

9. 摘 要

(1) 本報告はトマト青枯病菌 *Bact. solanacearum* に対する拮抗放射状菌 No. 1091, 1141, 1154, 及び 1166 に就て、土壤施用に供する培養粉末を作る迄に行つた実験経過の概要である。

(2) 發育適温及び最適 pH は No. 1091 は 24—27°C pH 7.5 附近、No. 1141 36—40°C pH 6.5、No. 1154, 30°C pH 7.0、No. 1166 33°C pH 7.0、であつた。

(3) 培養基の炭素源として最適のものは No. 1091 には Glycerine, No. 1141 Galactose, Glucose, Maltose, No. 1154 Mannit, Sucrose, No. 1166 Galactose, Mannit, Maltose であつた。

(4) 最適窒素源は No. 1091 Asparagin, Casein, No. 1144 Asparagin, Casein, Eggalbumin,

Peptone, No. 1154 は $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Casein, Eggalbumin, No. 1166 Asparagin, Eggalbumin, Peptone であつた。

(5) 乾燥した菌体粉末を室内暗所とデシケーターとに保存して生存期間を調査した結果、室内暗所では、No. 1091, No. 1166 は約 1 ヶ月で死滅、No. 1141 は 2 ヶ月頃から死滅し始め、約 3 ヶ月で完全死滅、No. 1154 は 3 ヶ月位から死滅し始めるが、4 ヶ月に至るも未だ完全死滅しない。

デシケーターに保存したものは、何れも、4 ヶ月に至るも死滅の傾向を認めない。実験期間の平均気温は 7.4°C である。

(6) 死滅温度は各菌株共、孢子では 64—66°C 菌糸では少々低い様である。

(7) 孢子を豊富に形成せしめる爲の條件は、(1) 孢子形成力の強い系統を選んで用ひること、(2) 培養基の pH を中性乃至微アルカリに保つこと、(3) 酸素の供給を充分ならしめる事である。

(8) 放射状菌の培養粉末を作るには、米糠を養分源とし、粃殻を嵩増材料として混じ、pH を中性附近に矯正して、殺菌した培養基に放射状菌粉末又は孢子懸濁液を接種し、繁殖せしめ充分發育するを待つて、之を 50°C 以下で乾燥し、粉末とする。

参 考 文 献

Levine and Schoenlein: A compilation of culture media for the cultivation of microorganisms. 1930.