

拮抗微生物による作物病害防除研究 第9報*

Trichoderma 属菌利用による植物病害の防除 (その2)

土壌中での *Trichoderma* 属菌の増殖, および その大量培養と酸性物質との関係

西 門 義 一・渡 辺 清 志

I. 緒 言

この実験は土壌中に施した *Trichoderma* 菌を土中で盛んに発育せしめ、その利用率を高めるとともに、その大量培養実施に資するために行なつたものである。

土壌中にはかなり多くの *Trichoderma* 属菌が生存しているが、*Trichoderma* 属菌のみが単独で生存しているのではなく他の微生物も多数生存している。それで *Trichoderma* 属菌は他の微生物の作用を受けその発育がかなり抑制せられていゝと考えられる。*Trichoderma* 菌をそのままの状態によりよく生育させるためには、最初から相当多量の培養を接種するか、または発育に好適なる条件を与えなければならない。そのために接種源を多くすることは簡単である。それより長期の効果をj得るには発育の最適条件を与え土中で *Trichoderma* を増殖せしめることが望ましい。このためには土壌中での他の微生物 (この実験の場合とくに *Trichoderma* の発育に有害な枯草菌、放線菌, *Aspergillus niger* および *Rhizopus sp.*) の発育を抑制し *Trichoderma* の発育を助長促進することである。また大量培養を行うにしても無殺菌のままて培養出来きればはなだ好都合である。

大概、今井氏 (1947) は *Penicillium* の発育について、キノノ酸、シュール酸、乳酸、リンゴ酸、クエン酸等の酸類を加えらると、その発育が良好であることを報告している。Waksman氏 (1917) は酸性土壌および湿潤地で、有機質の多い所は *Trichoderma* に富んでいるという。岡田要之助氏 (1939) は八甲田山での *Trichoderma* の分布について調査し pH 2.5 を示す酸性土壌および山の核心を表わしているような腐瘠地からもかなり多数の *Trichoderma* が分離出来たと報告している。その他抗生物質の分泌にも酸性物質が相当大きな関係を持つてゐることが多数の人によつて報告されている。現に *Trichoderma* のほとんどのものが中性より酸性にあつて、その発育が旺盛なることも充分に知られてゐる。これらの事実に基づき 16 種の酸性物質についてその *Trichoderma* 属菌増殖におよぼす影響を土壌中で、また無殺菌培養で行なつた。その実験の概要をここに報告する。

II. 土壌中での *Trichoderma* 菌の増殖と酸性物質との関係

a) 実験方法

縦 24cm 巾 16cm 深さ 2.5cm の磁製の発芽皿に自然乾燥土壌 (腐植質の少ない土壌) を 700 g ずつ入れ、馬鈴薯煎汁寒天培養基上に形成せしめた *Trichoderma sp.* 2418号菌株の分生胞

.....
*文部省科学試験研究費による研究成果。

子を殺菌蒸りゆ水に浮遊せしめた液 100cc (孢子数は 1 cc 中にはば 350,000 個) を接種かく拌して 1 昼夜放置した。その土壤に硫酸銅 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) 1/10,000, 硫酸鉄 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) 1/2,000, 石灰 (CaO) 1/200, 硫酸アンモニウム ($(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$) 1/200, 硫酸マグネシウム ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) 1/2,000, 硫黄 (S) 1/2,000, シュー酸 ($(\text{COOH})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) 1/2,000, クエン酸 ($\text{C}_3\text{H}_4(\text{OH})(\text{COOH})_3 + \text{H}_2\text{O}$) 1/2,000, フタル酸 ($\text{HOOC} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{COOH}$) 1/2,000, ピクリン酸 ($\text{OH} \cdot \text{C}_6\text{H}_2(\text{NC}_2)_3$) 1/2,000, 乳酸 ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$) 1/2,000, 硫酸 (H_2SO_4) 1/20,000, 塩酸 (HCl) 1/20,000 および硝酸 (HNO_3) 1/20,000 を、それぞれ約 5 g の麩に混ぜて前記土壤に混和し灌水した。その後 24 時間経過して、1 区当たり 5 カ所の土壤を取り自然乾燥せしめ冷蔵庫内に貯え、ペトリ皿 15 箇を使用し 3 回調査した。培養基は蒸留水 1000cc, 砂糖 20 g, 硫酸アンモニウム 10 g, 硫酸銅 1 g, 20 万単位ペニシリン 1/1000 液 10 cc, 寒天 20 g とした (ペニシリンは孢子形成を促進せしめ菌叢の伸長を抑制するため培養基をペトリ皿に流入する時、同時に使用した)。R. Koch 氏 (1881) の流入法によつて、10,000 倍でペトリ皿に流し込み 27°C で 2 日後に調査し基準となるべき *Trichoderma* 菌および、その他の糸状菌数を調査記録した (土壤および培養基を酸性としたため細菌の発育は非常に少なく、調査を行わなかつた)。6 日後には、前記同様の方法によつて、*Trichoderma* 菌および其の他の糸状菌の増加および減少状態を調査記録した。同実験結果は 5 回の平均結果である。

b) 実験結果

実験結果は第 1 表および第 1 図表の如くで、それによると先ず *Trichoderma* 菌では酒石酸区が

第 1 表 *Trichoderma* 菌の土中増殖におよぼす各種酸性物質の影響

酸性物質名	<i>Trichoderma</i>			雑菌		
	基準数	6 日後	増加倍数	基準数	6 日後	増加倍数
硫酸銅	21.9	103.5	4.73	31.8	20.3	0.64
硫酸鉄	77.3	101.3	1.31	48.4	22.5	0.47
石灰	27.5	74.2	2.7	12.8	33.8	2.63
硫酸アンモニウム	26.4	96.8	3.67	50.2	15.8	0.31
硫酸マグネシウム	23.7	91.1	3.85	50.4	21.0	0.42
硫黄	33.2	83.3	2.51	52.7	114.0	2.16
シュウ酸	40.8	83.3	2.04	65.5	27.0	0.41
クエン酸	25.9	30.0	1.16	56.3	48.0	0.85
コハク酸	16.9	25.0	1.48	41.6	50.0	1.2
酒石酸	15.8	106.3	6.75	28.1	40.0	1.42
フタル酸	40.2	36.3	0.9	24.1	50.0	2.07
ピクリン酸	99.0	102.5	1.03	125.2	111.0	0.89
乳酸	30.4	65.0	2.14	87.8	146.8	1.67
硫酸	25.9	38.8	1.5	9.0	33.3	3.7
塩酸	40.4	111.3	2.83	4.4	10.0	2.28
硝酸	50.3	108.7	2.16	13.1	16.3	1.24
標準	64.1	74.4	1.16	15.3	46.5	3.05

備考 土壤の反応価は大体同一で pH 4—4.5 であるが石灰区と標準区は別

* 増加倍数の大きいものと小さいものは肉太文字で表わした。

最も良く増殖しており
6日後には6.75倍の
増加が見られた。次い
で硫酸銅区、硫酸マ
グネシウム区および
硫酸アンモニウム区
で4.73倍から3.67
倍に増加していた。
以上3種のものでは
雑菌数は非常に減少
していた。ついで良好
と見られるものは塩酸
区、石灰区、硫黄と
区、硝酸区、乳酸
区およびシュウ酸区の
2.88から2.04倍とな
っている。この内シュ
ウ酸区のみで雑菌数
は非常に減少してい
た。フタル酸区、ピ
クリン酸区およびクエ

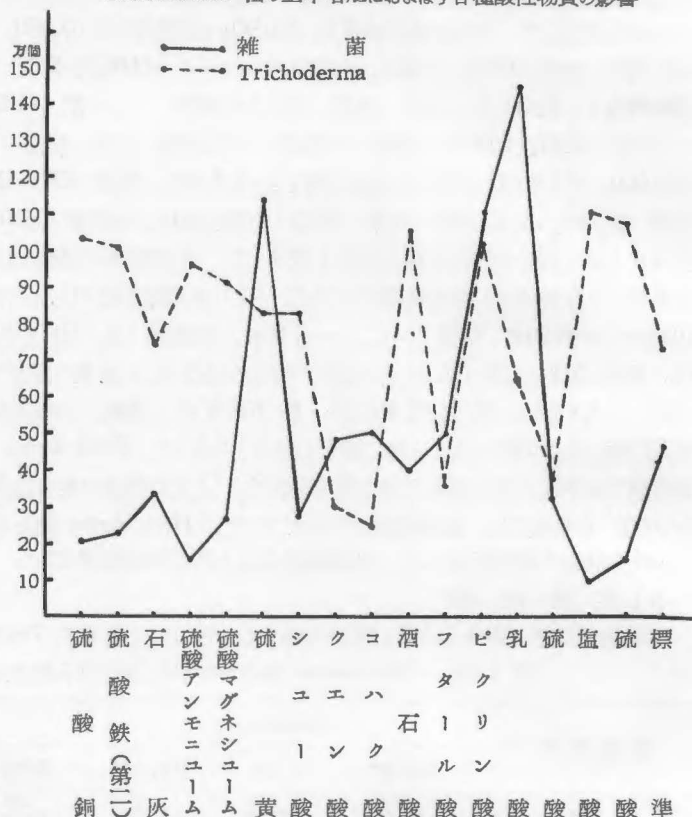
ン酸区では標準区より減少している。なかでもフタル酸の場合には基準数の0.9倍に減少している
事実が認められた。

つぎに雑菌の部〔この実験の場合、分離せられた *Trichoderma* 以外の糸状菌, *Aspergillus*
niger, *Penicillium italicum*?, *Monilia* sp., *Aspergillus* sp. (No. 1, 2, 3) *Penicillium* sp.

(No. 1, 2, 3, 4), *Fusarium* sp. (No. 1, 2) および *Alternaria* sp.〕について見ると総合的
には、標準区および硫酸区において多く4.13倍および3.7倍となっている。硫酸アンモニウム区、
シュウ酸区、硫酸マグネシウム区、硫酸銅区にては極度に減少し0.31倍乃至0.64倍となつて
いる。

各区の雑菌の種類は第2表に示す。

Trichoderma 菌の土中増殖におよぼす各種酸性物質の影響



III. *Trichoderma* の無殺菌培養

a) 実験方法.

前記Ⅱの実験結果を基礎として縦54cm, 巾32cm, 深さ12cmの木箱24箇を準備し4部,
24区に区分し第3表に示す各々の配合培養基を入れ馬鈴薯煎汁培養基(馬鈴薯200g砂糖15
g硫酸アンモニウム5g寒天20g)に形成せしめた *Trichoderma* sp. 2418号菌株の分生胞子を接
種しよくかく拌して22~23°Cの半地下室に保ち24時間後および36時間後におのおの1回かく拌

第 2 表 各種酸性物質添加土壌において発育した雑菌

添加酸性物質名	発育の多かった雑菌	発育の少なかった雑菌
硫酸銅	P.*sp. No. 1, 3.	<i>A. niger</i> , F. sp. No. 2.
硫酸鉄	<i>P. italicum</i> , P. sp. No. 3, 4, <i>A. niger</i> .	R. sp.
石灰	<i>A. sp.</i> No. 1, R. sp.	<i>P. italicum</i> , P. sp. No. 2, 4, F. sp. No. 1, M. sp.
硫酸アルミニウム	<i>A. sp.</i> No. 2.	<i>A. niger</i> , P. sp. No. 2, 4.
硫酸マグネシウム	<i>A. sp.</i> No. 1. 2, 3, P. sp. No. 2.	<i>P. italicum</i> , F. sp. No. 2.
硫酸	<i>A. sp.</i> No. 2, 3, P. sp. No. 2. 4.	R. sp. M. sp., <i>P. italicum</i> , <i>A. sp.</i>
シュウ酸	P. sp. No. 1. 4.	R. sp. <i>A. sp.</i>
クエン酸	P. sp. No. 1, 3, 4, R. sp., F. sp. No. 1, <i>P. italicum</i> .	M. sp.
コハク酸	P. sp. No. 1. 4, F. sp. No. 2, <i>P. italicum</i> .	F. sp. No. 1, M. sp.
酒石酸	P. sp. No. 4, <i>P. italicum</i> , <i>A. niger</i> .	<i>A. sp.</i> No. 1. 2.
マール酸	<i>A. niger</i> , F. sp. No. 3, <i>P. italicum</i> .	P. sp. No. 1, 3, M. sp.
ピクリン酸	<i>A. niger</i> .	F. so. No. 2, <i>A. sp.</i> No. 1, M. sp.
乳糖	<i>P. italicum</i> , P. sp. No. 1, 2, M. sp., <i>A. sp.</i>	F. sp. No. 2, M. sp., <i>P. italicum</i> .
塩	<i>A. sp.</i> No. 1, 1, 3, P. sp. No. 1. 2.	M. sp., P. sp. No. 2, 3, 4, <i>A. sp.</i> No. 3, <i>P. italicum</i> .
硝酸	R. sp.	F. sp. No. 1, M. sp., P. sp. No. 1. 2, 3,
硫酸	<i>A. sp.</i> No. 2, 3, <i>P. italicum</i> , R. sp.	R. sp. <i>P. italicum</i>
標準	<i>A. sp.</i> No. 2, 3, <i>A. niger</i> , P. sp. No. 1.	

備考 *P.=*Favittia*, A=*Aspergillus*, M.=*Monilia*, R=*Rhizopus* F=*Fusarium*

して培養基の固化を防いだ。(培養基の水分含量は培養基をにぎりしめて、手の面がぬれる程度。)その後は室内に十分に散水して培養基の乾燥を防いだ。4~5日後に醗酵温度が下り *Trichoderma* が分生胞子を形成し始めて2~3日後に完成した。この完成した培養は顕微鏡で1g中の分生胞子数を調査記録した。それと同時に R. Koch 氏(1881)の流入法によつて100万および10万倍で硫し雑菌数および *Trichoderma* の胞子数を調査記録した。この外に醗酵温度が大きく関係するので地中自記寒温計を使用して醗酵温度を記録した。

第 3 表

				穀	粗 穀		鋸 屑		
各部の培養基配 合量	{	第 1 部	500g		200g		300g		
		" 2 "	300		200		500		
		" 3 "	—		200		800		
		" 4 "	800		200		—		

				クエン 酸	硫酸銅	シュール酸	硫酸鉄	石灰	硫酸ア ンモニ ウム	硫酸	硫酸マ グネシ ウム	塩酸
各部の区別酸性 物質の配合量	{	1 区 1g	—	1	—	2	—	—	—	1		
		2 " —	2	—	—	—	2	—	1	—		
		3 " 2	—	—	1	—	—	—	—	1		
		4 " —	—	2	—	1	—	1	1	1		
		5 " —	—	—	—	—	1	2	1	1		
		6 " —	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

備考 各部を各々6区に区分した。

b) 実験結果

実験結果は第4表の如くで、第1部では第2区が最も良く、醗酵温度も低く *Trichoderma* の分生胞子数は非常に多く培養1g中45,000万個が検出せられた。次いで第5区が相当多くの *Trichoderma* 分生胞子を形成したが雑菌数もかなり多くなっている。第2区の雑菌数は1,800万個で非常に少ない。最も悪いのは第6区(標準区)であるがこれは別として処理区では第1区と第3区である。この6区の内培養として使用し得るものは第2区、第4区および第5区であつた。

第2部では、第2区が最も優れ *Trichoderma* の分生胞子数は59,000万個、雑菌数400万個で本実験中最高の好結果を示した。この第2部は全般に良い結果を示しているが第3区では *Trichoderma* 数はかなり多く25,000万個形成したが同時に雑菌が多く *Trichoderma* と同程度の数を示し培養全体が暗褐色となつた。圃場使用は不可能である。

第3部では麩を全々使用していないため醗酵温度は低く雑菌数も少ない。この部では第2区第3区および第5区が良い結果を示したが全体として *Trichoderma* の分生胞子数が非常に少なく実際に使用できる培養にはならなかつた。

第4部では麩を多量に使用しているため醗酵温度が高く *Trichoderma* の分生胞子数が比較的少なく雑菌数は反対に多くて第2区と第5区が使用可能と云うだけであつた。

全区を総合して培養の経過、完成状態を見ると第2部の第2区が最も良くて醗酵温度は24℃。

Trichoderma 分生孢子数は 59,000 万個、雑菌数は非常に少なく 400 万個で培養全体はきれいな深緑色であつた、これについて第 2 部の第 5 区、第 1 部の第 2 区および第 5 区が良い結果を示した。これら良好な結果を示したものは、いずれも深緑色のきれいな培養となつた。反対に結果の悪かつたものは麩を全々加用しなかつた第 3 部と、標準区は別として第 4 部の第 1 区および第 4 区、第 1 部の第 3 区で、これらの培養は暗褐色であつた。この内第 3 部では *Trichoderma* 孢子数も雑菌数も共に極度に少なかつた。

第 4 表 無 殺 菌 培 養 調 査 結 果

		醱 最高温度	醱 平均温度	テリコデルマ 分生孢子数	雑 菌 分生孢子数	培 養 完 成 日 数	培養使用 の醱(○) 否(×)
第 1 部	1 区	47°C	35°C	18,000万	13,000万	6	×
	2 区	35	31	45,000	1,800	7	○
	3 区	41	34	9,000	7,000	7	×
	4 区	41	33	12,000	4,000	7	○
	5 区	31	28	38,000	2,500	7	○
	6 区	54	49	4,500	21,300	5	×
第 2 部	1 区	48	35	29,000	20,000	7	×
	2 区	30	24	59,000	400	8	○
	3 区	39	29	25,000	25,000	7	×
	4 区	39	31	18,000	3,500	7	○
	5 区	30	25	40,000	800	7	○
	6 区	52	39	1,200	32,000	6	×
第 3 部	1 区	25	24	2,000	200	8	×
	2 区	22	22	8,000	250	9	×
	3 区	24	23	9,000	270	8	×
	4 区	23	22	3,000	150	8	×
	5 区	24	23	5,000	65	9	×
	6 区	23	23	500	300	6	×
第 4 部	1 区	51	48	9,000	12,300	5	×
	2 区	42	39	14,000	8,000	6	○
	3 区	43	39	11,000	19,000	6	×
	4 区	43	35	8,000	8,500	5	×
	5 区	38	37	10,000	7,000	7	○
	6 区	67	58	10	54,000	4	×

この様にして見ると各部共、硫酸銅、硫酸アンモニウムおよび硫酸マグネシウムを加えた第 2 区、シュール酸、石灰、硫酸、硫酸マグネシウム、および塩酸を加えた第 4 区、アンモニウム、硫酸、硫酸マグネシウム、および塩酸を加えた第 5 区が良かつた。

各区の雑菌の種類は第 5 表に示した。

IV. 結 論

以上の結果から見て本実験に使用した *Trichoderma* sp. 2418 号菌株では硫酸アンモニウム、

硫酸マグネシウム、硫酸銅およびシュール酸等の酸性物質を小量供用する時は、*Trichoderma*を増殖せしめ、其の他の雑菌の発育を抑制するものと思われる。これはそのおのこの物質に対する、各菌の抵抗性に関係しているものと考えられる。従つて *Trichoderma* に対する他菌の対抗作用価を相当に低下せしめ得るため、または *Trichoderma* 自身の抗性物質の分泌を助長するため他の菌が発育を抑制せられ *Trichoderma* の発育が旺盛になつたとも考えられる。これから考へて、前記4つの物質はかなり利用価値のあるものと云い得る。それに比較して硫酸、塩酸、硝酸、乳酸、コハク酸、硫酸および石灰などは *Trichoderma* の発育を促進しているが、他の菌の発育を抑制せず、かへつて助長した。この場合酸性のため細菌は発育していないが、特に *Penicillium* sp., *Penicillium italicum*, *Aspergillus* sp. *Aspergillus niger* 等の抗菌作用により *Trichoderma* のその後の発育および殺生または抗菌作用が抑制せられるので実用の意味に乏しいものである。

なお *Trichoderma* の増殖から見て、ただ単に土壌の pH のみに関係するものではないことは明らかに考えられるが、その物質に対する抵抗性かまたは嗜好性に差異を有することも考えられる。抵抗性によるものか嗜好性によるものかの問題については大量培養を行う上にも土壌中で増殖させるため

第5表 無殺菌大量培養において発育した雑菌

区	発育の多かつた雑菌	発育の少なかつた雑菌
第一部	1 <i>Aspergillus</i> sp.	
	2 <i>Aspergillus</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.
	3 <i>Penicillium</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.
	4	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Rhizopus</i> sp
	5 <i>Rhizopus</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.
	6 <i>Rhizopus</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp.	
第二部	1 <i>Rhizopus</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp
	2	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Rhizopus</i> sp
	3 <i>Rhizopus</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp	<i>Penicillium</i> sp.
	4 <i>Aspergillus</i> sp. <i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium</i> sp.
	5 <i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium</i> sp.
	6	
第三部	1 <i>Aspergillus</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.
	2 <i>Aspergillus niger</i>	<i>Rhizopus</i> sp.
	3 <i>Rhizopus</i> sp.	
	4 <i>Rhizopus</i> sp.	
	5 <i>Rhizopus</i> sp.	
	6 <i>Rhizopus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
第四部	1	
	2	<i>Aspergillus</i> sp.
	3	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Penicillium</i>
	4 <i>Rhizopus</i> sp	<i>Aspergillus</i> sp.
	5	<i>Penicillium</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp.
	6 <i>Aspergillus</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp

にも相当重大なることではあるがそれは現存のところ不明である。ただ 検出せられた雑菌もほとんどのものが酸性に対して、相当強力なものであつたことも、何かの意味を持つていられるように思われる。

無殺菌培養の場合第2部第2区の麴 300 g, 粃殻 200 g, 鋸屑 500 g, 硫酸銅 2 g, 硫酸アンモニウム, 2 g, 硫酸マグネシウム 1 g の配合区が最も良く、無殺菌のままでも細菌の発育はほとんどなく、醗酵温度も低く他の糸状菌(雑菌)も非常に少なく完全な培養に近い。醗酵温度が高いと *Trichoderma* の発育が非常に悪く *Rhizopus* sp. または *Aspergillus* sp. 特に *Aspergillus niger* の発育が強力なるため培養は全々だめになることがしばしばあつた。これらの事実から考えて低い醗酵温度で培養することが望ましく、培養基中の間隙を多くし反応を酸性化し、有機窒素源となるべき物質の量を減じ無機窒素源を与えて、*Trichoderma* の発育を促進しなければならぬ。しかし極度に有機窒素源を減ざると、第3部の実験からわかるように *Trichoderma* の発育も非常に弱くなるので2~3割程度を最適とするようである。

以上の結果を総括すると、前記殺菌物質が他の雑菌の発育を抑制したことと、*Trichoderma* の発育を促進したために、他の雑菌が充分発育出来なかつたものと考ええる。

V. 摘 要

1) この実験に供用した酸性物質 16 種の内硫酸アンモニウム、硫酸マグネシウム、シュウ酸および硫酸銅を少量加用すれば *Trichoderma* は土壤中で良く増殖し他の糸状菌の発育を抑制する。

2) *Trichoderma* の無殺菌培養を行なうには培養基を酸性にし、醗酵温度を低くすることとともに酸素の供給をはかるが良い。

3) *Trichoderma* の無殺菌培養の培養基の配合はふすま 300 g, 粃殻 200 g, 鋸屑 500 g, 硫酸銅 2 g, 硫酸アンモニウム 2 g, 硫酸マグネシウム 1 g が最も良好であつた。

4) *Trichoderma* の培養に対し最も問題になる雑菌は *Aspergillus* sp., (*A. niger* を含む), *Rhizopus* sp. であつた。

文 献

- 1) Weindling, R.; Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. Phytop. vol. XXIV, p p. 1153—1179, 1934
- 2) Haensler, C. M. and Allen, M. C.; Toxic action of *Trichoderma* on *Rhizoctonia* and other soil fungi. Phytop. vol. XXIV p. 10, 1934
- 3) 岡田要之助, 八甲田山における *Trichoderma* の分布について. 生態学研究 Vol. 3 pp. 309—321 1939.
- 4) 大槻虎男, 今井百里江子, ペニシリン生産菌培養の研究. I. ペニシリン vol. 1 No. 4 pp. 205—208 1949.
- 5) 梅沢純夫, 拮抗微生物の化学 1949.
- 6) 岡田要之助, 土壤微生物概論 1949.
- 7) 遠藤茂, 微生物の拮抗作用による細菌核の生物学的防除の可能性とその応用上留意すべき事項について. 日本植物病会報 8 巻 2 号 pp. 193—194 1938