

硬化病菌の生産する毒性物質に関する研究

(第2報) 各種硬化病菌の培養液における 毒性物質の生産性

古 平 福 紀*

Yoshinori KODAIRA: Studies on the Toxic Substances Produced by Muscardine
Fungi. Part II. The Productivity of the Toxic Substances of
Various Muscardine Fungi in the Culture Media.

(1959年9月20日受理)

(1) 前報において9種14培養系の硬化病菌を peptone 0.5%含有の Czapek-Dox 培地に6日間培養した濾液を蚕児に添食させると *Aspergillus ochraceus* (麴かび病菌群の1種)および棘麴かび病菌 (*Sterigmatocystis japonica*) の2菌は蚕児に顕著な中毒症を起させるが、その他の菌の培養液は毒性が認められないことを報告した。しかし、青木等は白殭病菌 (*Beauveria Bassiana*) および褐殭病菌 (*Aspergillus flavus*) の1ヶ月培養液は蚕児に毒性があるとのべており、筆者の実験においては培養期間が短かつたこと、および培養液に加えた peptone 量が少なかつたことなどが毒性物質を生産しない菌が多かつた原因であろうと考え、その後更に *Asp. ochraceus* および棘麴かび病菌を除いた7種14培養系の硬化病菌について培養期間および培養液の種類と毒性物質の生産性との関係の詳細に検討した結果、いずれの菌も培養条件が好適である場合には毒性物質を生産することが判つたのでここに報告する。

材料および方法

供試菌

供試菌の種類および系統は次の通りである。

- 白殭病菌 *Beauveria Bassiana* (BALS.) VUILL.
4号, 5号, K2, KS.
緑殭病菌 *Spicaria pracina* (MAUBL.) AOKI.
黄殭病菌 *Isaria farinosa* (DICKS.) ER. 1号, MA.
赤殭病菌 *Isaria fumoso-rosea* WIZE
黒殭病菌 *Oospora destructor* (METSCH.) OD II.
褐殭病菌 *Aspergillus flavus* LINK 1号, 2号。

麴かび病菌 *Aspergillus oryzae* WEHMER S,
17号, 30号。

培養液

(a) 蛹煎汁培地

乾燥蛹150grを粉碎し、水で煮沸浸出し3lとした。これに sucrose を3%加え pH 6.4 に修正し、500ml 三角フラスコに200ml 宛分注し、高圧滅菌した。

(b) Bouillon 培地

肉エキス1% (食塩0.3%含有), peptone 1%, sucrose 3%の組成の培地を pH 6.5 に修正し、100ml 三角フラスコに80ml 宛分注し高圧滅菌した。

(c) Czapek-Dox 培地

K_2HPO_4 0.5%, $MgSO_4$ 0.5%, KCl 0.5%, $NaNO_3$ 0.2%, $FeSO_4$ 0.001%, sucrose 3%の組成の液に peptone を0.5%, 1%, 3%, 5%, 10%および15%の割合に加え pH6.5 に修正し、500ml 三角フラスコに150ml 宛分注し、高圧滅菌した。

実験方法

上記各培地にそれぞれ菌を接種し、25°~27°C に保ち、培養第4日より1日おきにその少量を無菌的に採り蚕児の血液内に注射した。注射量は4令蚕の場合には0.03~0.04ml、5令蚕の場合には0.05~0.07mlとした。培養液ははじめ次第に酸性度が高まりその後中性からアルカリ性に移行するので、注射した場合酸性またはアルカリ度の蚕児に対する影響が考えられるが、pH2.5或はpH8.5位の培養液でも毒性のない場合には影響がないことを確認したので培養液はすべて反応を無修正のまま注射した。培養液に毒性がある場合には蚕児は多くは注射直後または数分後に中毒症状を呈するが、例外として褐殭病菌2号株の場合には注射時にはなら異常なく10

* 信州大学繊維学部蚕体病理学研究室

時間位たつてから急に斃死する。従つて毒性の有無の判定は最大限注射後15時間までとした。この時間の範囲内では注射時における雑菌の汚染による敗血症死と中毒症とを混同する心配はなく、また培養液と共に血液に混入された硬化病菌の菌糸或は孢子により影響をうけることはない。

中毒症状は褐癭病菌 2号株の場合は注射後10~15時間位に急激に虚脱状を呈して斃死するが、その他の菌の培養液の場合は注射直後または数分位の間に前胸部が膨大し全体が硬直して卒倒する。しかし、毒性の軽微な場合には30分から1時間位ではぼ恢復する。

実験結果

(1) 蛹煎汁培地における毒性物質の生産性

硬化病菌は昆虫寄生菌であるので蛹の浸出後を培養液

として用いたら毒性物質の生産に好い結果が得られるのではないかと考えてこの培地を用いたのであるが、その結果は、各菌種は殆んど毒性を示さず僅かに白癭病菌の5号株が培養第22日のみに強い毒性を示したにすぎなかつた。

(2) Bouillon 培地における毒性物質の生産性

蛹煎汁培地では毒性物質が殆んど生産されないののでこれに代わるべきものとして Bouillon を用いた。その結果は第1表に示すようにいずれの菌もこの培地で毒性物質を生産することが判つた。しかし、赤癭病菌と白癭病菌 KS 株は毒性物質の生産が非常に弱かつた。

なお、この培地で毒性物質の生産が良好な菌は緑癭病菌、褐癭病菌 1号株、2号株および白癭病菌 KS 株であつた。

第1表 Bouillon 培養液の蜜児に対する毒性

培養日数 供試菌		培養日数										
		第6日	第8日	第10日	第12日	第14日	第16日	第18日	第20日	第22日	第24日	第26日
白癭病菌	4号	—	—	○	○	○	●	●	○			
		6.8	7.0	7.0	7.0	7.3	7.4	7.6				
	5号	—	—	—	○	●	●	○				
		3.0	3.2	3.4	3.5	5.8	7.2	7.5				
K 2		○	●	●	●	●	●					
		4.8	5.5	6.0	6.4	6.8	7.0					
KS		—	—	—	○	○	○					
		5.3	6.0	6.3	6.5	7.5	7.5	7.8				
緑癭病菌		—	○	●	●	●	●	●	●	●	●	
		4.6	4.9	5.1	5.5	7.2	7.6	7.6	8.0	8.1	8.2	
黄癭病菌	1号	—	—	—	○	●	●	●				
		4.6	4.9	4.9	5.0	6.9	7.6	7.8				
MA		—	—	—	○	●	●	—				
		4.9	5.3	6.2	6.9	7.6	7.6	8.0				
赤癭病菌		—	○	○	○	○	—	—	—	—	—	
		6.0	5.5	6.1	6.5	7.0	7.5	7.7	8.2	8.4	8.4	
褐癭病菌	1号	○	●	●	●	●	●	●				
		6.6	7.8	8.1	8.1	8.2	8.5	8.5	8.4			
2号	○	○	○	●	●	●	●	●				
		7.3	8.1	8.2	8.3	8.3	8.4	8.4	8.4			
麴かび病菌	S	—	○	○	○	●	●	○				
		7.2	7.4	7.5	7.9	8.0	8.1	8.4				
	17号	—	—	—	○	●	●	●				
		7.6	8.0	7.9	8.0	8.7	8.2	8.5				
30号	—	○	○	○	○	●	●	○				
		7.6	8.0	8.0	8.0	8.0	8.3	8.5				

備考 (1) ●印は毒性の強い状態すなわち供試蜜10匹中全部が中毒症状を呈した場合、○印は毒性が弱い状態すなわち10匹中9匹~5匹まで症状を呈した場合または10匹全部が注射後間もなく症状を呈しても暫くしてから恢復した場合を示す。また、—印は毒性が全くない場合を示す。

(2) 数字はpH試験紙による培養液のpH値である。

(3) この実験では黒癭病菌は用いながつた。

(3) Peptone を加えた Czapek-Dox 培地における毒性物質の生産性

Bouillon 培地においては毒性物質の生産が弱い菌があり、また良好な生産状態の菌であっても毒素の抽出に当つてはこの培地では不適當であると考えられるので更に peptone を種々の濃度に加えた合成培地について検討を行つた。

硬化病菌が培地において毒性物質を生産するには peptone が良好な窒素源となつているが、毒性物質の抽出等に当つては、peptone 含量が少い方が望ましいことである。しかし、嶋は硬化病菌の生産する毒酸は培地の peptone 含量が多い方が生成が良好であるとのべており、また蚕児の血液には有機窒素が多量に含まれている点から peptone 量はなるべく多く加える必要を感じた。以上の2つの理由から添加する peptone の量は0.5%から15%まで種々の濃度に加え、peptone の量と毒性物質の生産性との関係を調べた。

第2表は培養液の毒性の持続期間を培養日数によつて表わしたものである。これによると白殭病菌はいずれの系統も peptone 量が3~5%の場合に毒性物質の生産がよく、緑殭病菌、黄殭病菌および黒殭病菌は peptone 量の多少には余り関係なく毒性物質を生産し、殊に黒殭病菌は培養第4日より毒性物質を強く生産しており、供試硬化病菌中最も早い時期に毒性物質を生産し、かつ、その毒力は他の菌より強い点が大きな特徴であつた。

赤殭病菌は peptone 量10%以下では全く毒性物質を生産しないか、或は生産時期が遅いが、15%の場合に限つて比較的早くかつ強く毒性物質が生産された。

褐殭病菌および麴かび病菌の *Aspergillus* 属菌は概して peptone 量1%の場合に最も強く毒性物質を生産し、5%以上の高濃度においては、かえつて生産しにくい。また *Aspergillus* 属菌は他の硬化病菌に較べ培地の反応が中性からアルカリ性になつた場合に毒性物質が生産される傾向があつた。

第2表 peptone 量を替えた Czapek-Dox 培養液の蚕児に対する毒性の出現時期

peptone 量		0.5%	1%	3%	5%	10%	15%
供試菌	白殭病菌 4号	—	—	20日~24日 II (6.5~6.9)	10日~26日 II (5.3~6.7)	10日~26日 II (5.0~6.4)	—
	5号	—	14日~16日 (4.9~6.6)	14日~18日 II (5.1~6.6)	14日~18日 (5.1~6.8)	12日~16日 (4.7~6.8)	21日~25日 ▲ (5.6~6.9)
	K2	—	—	13日~15日 (5.3~6.6)	10日~16日 II (4.9~6.5)	14日~20日 (5.1~5.2)	—
	KS	—	28日~30日 (7.1)	22日~26日 (6.5~7.1)	—	28日~31日 II ▲ (5.3~5.4)	—
緑殭病菌	—	16日~24日 II (6.6~7.6)	16日~26日 II (5.2~8.0)	16日~26日 II (5.3~6.4)	16日~26日 II (5.8~7.8)	16日~26日 II (6.4~8.4)	—
黄殭病菌	1号	16日~20日 (3.7~6.0)	10日~26日 II (3.6~7.8)	—	18日~24日 II (5.1~5.3)	18日~24日 II (4.8~5.0)	29日~31日 II (7.3)
	MA	—	10日~26日 II (3.5~8.0)	—	8日~16日 II (4.4)	12日~20日 II (5.1~5.2)	13日~19日 II (3.7~5.8)
赤殭病菌	—	—	22日~26日 II (8.4~8.6)	—	—	20日~22日 ▲ (3.6~6.6)	10日~26日 II (3.6~6.6)
黒殭病菌OD II	—	4日~10日 II (5.8~6.6)	4日~10日 II (5.7~6.2)	—	—	—	5日~17日 II (5.4~7.3)
褐殭病菌	1号	10日~12日 (8.0~8.2)	10日~12日 (7.8~8.0)	12日~24日 II (8.0~8.4)	12日~24日 II (7.8~8.2)	18日~20日 ▲ (7.3~7.5)	—
	2号	10日~20日 (7.2~8.1)	10日~24日 (7.6~8.4)	—	—	—	—
麴かび病菌	S	—	18日~26日 II (8.2~8.3)	—	14日~20日 ▲ (7.3)	12日~26日 II ▲ (7.0~6.9)	15日~17日 ▲ (7.0~7.4)
	17号	—	16日~26日 II (8.2~8.4)	—	14日~18日 ▲ (7.3)	14日~24日 ▲ (6.7~7.2)	17日 ▲ (7.6)
	30号	22日~26日 II (7.5~7.6)	22日~26日 II (7.3~7.7)	—	18日~22日 ▲ (7.2~7.3)	12日~24日 ▲ (6.8~6.9)	15日~17日 ▲ (7.4~7.8)

備考：表中の日数は培養日数で、毒性が現われた日から終る日までの持続期間を示す。但し、培養日数の次に II 印のあるものは、その日を以て実験を中止した場合を、一印は毒性が全く現れない場合を、また▲印は毒性の弱い状態を示す。その程度は第1表の場合と同様である。

要 約

7種類14培養系の硬化病菌について培養液内に蚕児に対する毒性物質を生産するか否かを調べた。

(1) Bouillon 培地においては、供試菌はいずれも毒性物質を生産するが、生産性の弱い菌もあつた。

(2) peptone を加えた Czapek-Dox 培地においてもいずれの菌も毒性物質を生産するが、peptone 量と毒性物質の生産性との関係は、緑癭病菌、黄癭病菌および黒癭病菌は peptone 量の多少に余り関係がなく、白癭病菌は3~5%の場合に、赤癭病菌は15%の場合に、また褐癭病菌および麴かび病菌は1%の場合に強く生産する傾向があつた。

(3) 供試菌中、毒性物質の最も強い菌は黒癭病菌であつた。

終りに、この研究に終始熱心に協力された東川静夫氏に対し厚く感謝の意を表す。

(この報告の概要は1958年日本蚕糸学会中部支部発表会において報告した。)

文 献

- (1) 古平福紀：信大織報 (4), 47 (1954)
- (2) 青木襄児・下平睦夫：日蚕誌 21 (2・3), 152 (1952)
- (3) 嶋万次郎：蚕糸試験場報告 14 (8), 433 (1955)

Summary

This paper dealt with the productivity of the toxic substances of various muscardine fungi, which are shown in the followings, in the culture media.

Beauveria Bassiana (BALS.) VUILL. Four strains

Spicaria pracina (MAUBL.) AOKI

Isaria farinosa (DICKS.) FR. Two strains

I. fumoso-rosea WIZE

Oospora destructor (METSCH.) DELAC.

Aspergillus flavus LINK Two strains

A. oryzae WEHMER Three strains

(1) Every strain of the above fungi produced commonly the toxic substances in Bouillon media and Czapek-Dox media added peptone in various concentrations, by which the productivity of the toxic substances were influenced.

(2) Among the fungi used, *Oospora destructor* produced the toxic substances in earlier period of culturing than the rest and the toxicity to the silkworms was strongest.