

# 木材腐朽菌に對する銅鹽類の影響 (第1報)

## 蓚酸銅集積帶の形成について

Kin-ichi KEINO: Effects of copper salts upon the mycelial growth of wood-destroying fungi (I)

On the formation of "the accumulating zone" of copper oxalate.

農林技官 慶 野 金 市

### 目 次

緒 言	71
實 驗 1. 銅鹽の種類とワタグサレダケに依る蓚酸銅集積帶の形成との關係	72
實 驗 2. 集積された銅鹽の酸根の確認	73
實 驗 3. 銅鹽の集積現象とリーゼガング現象との關係	76
實 驗 4. 蓚酸銅集積帶の形成と菌の發育速度との關係	76
實 驗 5. Agar spot plate culture method と菌の生育との關係	77
實 驗 6. ワタグサレダケに對する蓚酸銅の生育阻止限界濃度	82
實 驗 7. 蓚酸の Catcher としての石灰鹽添加が蓚酸銅集積帶の形成に及ぼす影響	82
實 驗 8. ワタグサレダケ以外の木材腐朽菌の銅鹽集積現象	83
摘 要	84

### 緒 言

著者は木材防腐劑として水に難溶性の銅鹽類を用い、それ等の木材腐朽菌に對する生育阻止限界濃度を判定するために寒天扁平培養法に依り實驗中、たまたまワタグサレダケ (*Poria vaporaria*) に依つて、供試銅鹽  $\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{CuSO}_4$  が元の銅鹽とは全く異なる或一定の銅鹽に轉換され、附圖第Ⅰ乃至第Ⅶに示す如く、その菌叢附近の寒天培養基中に多重環狀に集積されることを觀察した。この時菌叢自身も亦附圖第Ⅶ、Ⅷに示す如く、それに對應して環狀をなし、相當高濃度の銅鹽を征服して生育が完遂される。

之は  $\text{CuO}$  を用いると、色調の變化が黒褐色からコバルトへ、恰もバーベンドムの反應<sup>1)</sup>の如く克明に現われるものである。著者は之に、銅鹽の集積現象 (*The accumulating phenomenon of copper salt*) 及銅鹽の集積帶 (*The accumulating zone of copper salt*) と命名した。この銅鹽の集積帶は、培養條件・菌の種類及供試銅鹽の種類並に狀態等に依り種々

の異つた様相を呈し、環の中・數・形狀等に可成の變化が見られる。

この實驗に於て、ヒイロタケ (*Polystictus sanguineus*) は  $\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{CuSO}_4$  の 0.06% に於て完全にその生育が阻止されたのに反して、ワタグサレダケの場合は 1.0% に於ても尙完全に生育を阻止することが出來ず、僅かに生育の抑制が行われたに過ぎなかつた。

ここに於て著者は、ワタグサレダケの銅鹽類に對する抵抗機構が、この集積現象を解明することに依つて同時に解決され、それが更に木材腐朽菌全體に擴充されるのではないかと考え、先ず集積銅鹽の酸根を追及して蓚酸を確認し、集積帶の生成條件を探究して *Agar spot plate culture method* を考案し、繰返し培養實驗を行い、菌の銅鹽に對する抵抗性を確認するに至つた。そこでこれ迄の實驗結果をまとめて第1報として報告する次第である。

本實驗の遂行に當つて、東京大學農學部林學科木材材料學第二教室川村教授の御助言を賜わり同教室多田常喜代氏に多大の御助力を辱うした。記してここに深甚の謝意を表わし、併せて種々御便宜を御與え下された中塚助教授・阪口宏司氏竝に教室各位に對し深謝する次第である。

### 實驗 1. 銅鹽の種類とワタグサレダケに依る蓚酸銅集積帶の形成との關係

先ず集積帶は如何なる銅鹽の場合に形成され、如何なるもの場合に形成されないか、即ち銅鹽の種類と集積帶の形成との關係に就て調べて見た。

實驗の材料は次の如きものである。

- i) 菌の種類      ワタグサレダケ。
- ii) 培養基      60~90 メツシュ位の玉蜀黍の粉末を、約 40% の水分を含む如く水を加えて捏り、これをコツホ殺菌釜に於て約 40 分間蒸して殺菌と蒸熟とを兼ねて行い、これに麴菌 (*Aspergillus Orygae*) を接種して常法に従え玉蜀黍麴を作り、出麴となつたものに 4 倍量(重量)の水を加えて 55~60°C で 10 時間以上糖化し、濾過殺菌したものを原液とする。これを 2 倍位に稀釋して 1.5~2.0% の寒天を加えたもの。pH 5.2~5.6。
- iii) ペトリ皿      徑 90mm, 高さ 15mm。
- iv) 銅鹽の種類      水溶性のものでは  
鹽化銅 ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、硫酸銅 ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )、硝酸銅 ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )。  
水に難溶性のものでは  
炭酸銅 ( $\text{CuCO}_3$ )、磷酸銅 ( $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ )、硫化銅 ( $\text{CuS}$ )、沃化銅 ( $\text{CuI}_2$ )、水酸化銅 ( $\text{CuO} \cdot \text{H}_2\text{O}$ )、錯酸銅 ( $\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )、 $\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{CuSO}_4$ 、蓚酸銅 ( $\text{CuC}_2\text{O}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ )、くえん酸銅 ( $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4[(\text{CH}_2\text{COO})_2\text{C}(\text{OH})\text{COO}]_2$ ) の 12 種類を用い、各 1.0, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05 % の濃度になる様に前記培養基中に混合して培養に供した。
- v) 培養の溫度及期間      26—28°C に調節したる孵卵器中に於て 7~21 日間培養した。

以上の諸元に依り培養したる結果は第I表に示す通りで、修酸銅を除く 11 種の銅鹽の場合  
は、菌が生育し得たものに限り、難易遲速及環の幅の廣狹・數の多少等の差はあつたけれども  
明らかに集積帶の形成が行われた。しかるに修酸銅の場合は菌の生育が極めて良好であつたに  
も拘らず、全く集積帶の形成を見ることが出来なかつた。

第 I 表 銅鹽と集積帶の形成との關係

銅 鹽 の 種 類	濃 度 と 生 育 状 況										集積帶の 形 成	銅鹽の溶解度*
	1.0 %	0.8 %	0.7 %	0.6 %	0.5 %	0.4 %	0.3 %	0.2 %	0.1 %	0.05 %		
鹽 化 銅 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	(±)		(±)			(±)			(+)	(+)	顯著・遲延	435g/L(20°C)W.
硝 酸 銅 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	(-)		(±)			(+)			(+)	(+)	" . "	555.8g/L(20°C)W.
硫 酸 銅 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	(±)		(+)			(+)			(+)	(+)	" . "	172g/L(20°C)W.
炭 酸 銅 $\text{CuCO}_3$	(-)	(-)		(-)		(+)		(+)			顯著・迅速	1.5 p.p.m.W.
磷 酸 銅 $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$					(+)		(+)		(+)	(+)	" . "	
醋 酸 銅 $\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$					(-)		(-)		(+)	(+)	" . "	
硫 化 銅 $\text{CuS}$					(+)		(+)		(+)	(+)	" . "	0.3mg/L(18°C)W.
$\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{CuSO}_4$					(+)		(+)		(+)	(+)	" . "	
沃 化 銅 $\text{CuI}_2$					(-)		(-)		(+)	(+)	" . "	11.07g/L(20°C)W.
水 酸 化 銅 $\text{CuO} \cdot \text{H}_2\text{O}$					(+)		(+)		(+)	(+)	" . "	Soluble in ammonia solution
く え ん 酸 銅 $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4[(\text{CH}_2\text{COO})_2\text{C}(\text{OH})\text{COO}]_2$					(+)		(+)		(+)	(+)	" . "	
樟 酸 銅 $\text{CuC}_2\text{O}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$					(+)		(+)		(+)	(+)	集積帶形成せず	23.6mg/L(25°C)W.

\* Atherton SEIDELL, PH. D.: Solubilities of Inorganic and Organic Compounds, Second edition (1919) に據る。

これ等の集積したる銅鹽は、顯微鏡検査の結果菌體外にあることが判明した。

## 實 験 2. 集積された銅鹽の酸根の確認。註)

次に集積された銅鹽は如何なるものであるか、即ち酸根の確認を行つた。

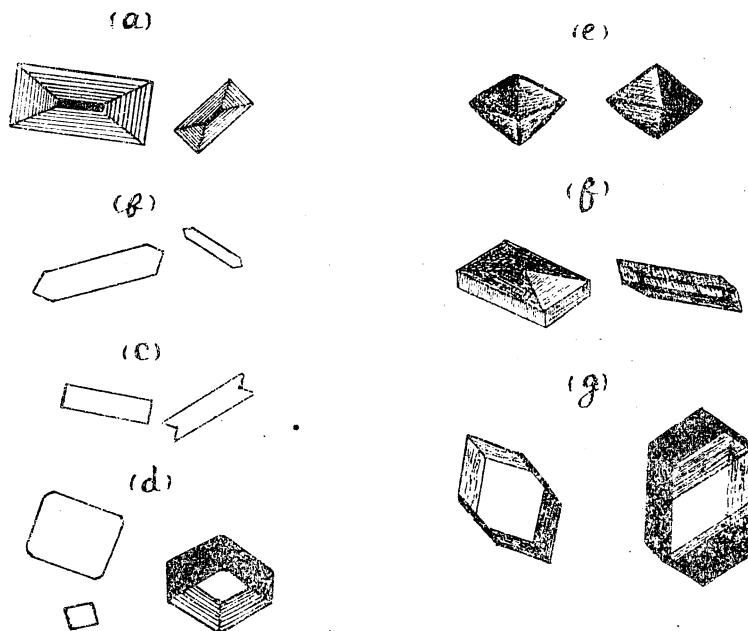
1) 集積銅鹽の分離 次の三つの方法を試みた。

a) 扁平培養に依り集積帶の生じたものから菌叢を剥ぎ取り、集積層を寒天と共に掻き集め、水を加えて煮沸し濾過洗滌する。これを數回繰り返す。

註) 培養基、培養温度、ペトリ皿等は特に明記せざる限り實驗1と同一である。これは實驗3以下も同様である。

- b) 扁平培養したものを菌體と共に前同様に掻き集め、適當に水を加えて煮沸し乍ら稀鹽酸 (1:1) を加え銅鹽を全く溶解せしめる。これを濾過して菌體を除き、濾液に苛性曹達を加えて弱酸性の處で止め、一夜放置すると再び元の銅鹽が沈澱して来る。これを濾紙上に集め、水と煮沸して濾過洗滌を繰返して精製する。
- c) 銅鹽を加えず常法に依り 500cc 容三角フラスコを用い、3~4 週間液體培養して、菌體を除いた培養液に  $\text{CuO}$  の濃厚懸濁液を加えつつ煮沸し、その黒褐色が尙残る程度に加えた時中止し、冷後沈澱を濾過洗滌し前法通りに精製する。
- 2) カルシウム鹽の作製 以上の様にして分離精製した銅鹽は、これを水に分散して置いて苛性曹達の 20 % 水溶液を加え、アルカリ性とすれば銅は悉く水酸化銅となつて分離沈澱して来る。これを濾過して水酸化銅を除き、濾液に濃醋酸を加えて酸性となし、これに鹽化カルシウムを加えて煮沸し熱時濾過する。濾紙上の沈澱はそのまま少量の稀鹽酸 (1:1) を加えて溶解し、これにアンモニアを加えてアルカリ性とし、これを醋酸で酸性とすれば再びカルシウム鹽が沈澱して来る。これを數回繰返して精製すると殆ど純白に近いカルシウム鹽となすことが出来る。<sup>2)</sup>
- 3) カルシウム鹽の性質 上記のカルシウム鹽はこれを少量の水に分散し、煮沸しながら 1 規定乃至  $\frac{1}{10}$  規定鹽酸に溶解し一夜放置する。かくして生じた結晶を顯微鏡で 200 倍前後に擴大して檢鏡したが特定の結晶<sup>3), 4), 5), 6)</sup>とはならず、數回の結果を綜合すると第 I 圖 a, b, c, d, e, f, g の如き結晶型を有するものが現われた。

第 1 圖 Calcium Oxalate の結晶型



これ等の結晶は次の如き性質のものであつた。

- a) カルシウム鹽に 1 規定鹽酸を加えて溶解し、これにアンモニアを加えると再び沈澱して来る。(結晶型第 I 圖d<sup>5)</sup>.)
- b) カルシウム鹽を稀鹽酸に溶解し、これに醋酸曹達溶液を加えると再び沈澱する。
- c) カルシウム鹽を稀鹽酸に溶解し、これに苛性曹達を加えてアルカリ性となし、醋酸を加えて酸性にすると再びカルシウム鹽を沈澱する。
- d) カルシウム鹽を水に分散し、これに稀硫酸を加えてカルシウムを硫酸カルシウムとして除き、濾液に更に稀硫酸を少量加えて 60~70°C に溫め、過マンガン酸加里の溶液を加えると定量的に脱色する。
- e) カルシウム鹽を稀硫酸で分解し、硫酸カルシウムの沈澱を除いた濾液 5cc に稀硫酸 (1:2) 1cc と 10 %硫酸銅溶液 2 滴を加え、これに約 1 瓦の亞鉛末を加えて 3 分後にその 0.2cc を採る。これを 2cc の濃硫酸にレゾルシンの 2% 水溶液 0.1cc を加えて良く混合したものに加えると藤紫色となり、溫めるとその色が濃くなる。<sup>2)</sup>
- f) カルシウム鹽 1 庇とレゾルシン 1 庇をグリセリンの 1~2 滴と良く混和し、これに濃硫酸を 1~2cc 加えて靜かに攪拌すると藤紫色となり、これを多量の水で稀釋すると赤褐色となる。<sup>3)</sup>
- g) 遊離酸の結晶の作製 上記のカルシウム鹽を秤量して水に分散し、これに醋酸カルシウムとして計算した當量の濃硫酸を徐々に加え、生ずる硫酸カルシウムを除き、湯煎上でこれを濃縮し乾固前に中止し、生成せる硫酸カルシウムの結晶の混じたまゝ 96 % エチルアルコールで抽出し、硫酸カルシウムの結晶を除く。エチルアルコール溶液はこれより溶媒を溜去し殘渣を氷室に放置して結晶を析出せしめる。

その結晶の性質は次の如くである。

- i) 稜柱狀及多角板狀の結晶型を有す。
- ii) 融點 100~101°C。
- iii) レゾルシン反應陽性。

尙前記カルシウム鹽の元素分析の結果は次の如くである

試 料	0.0973g	
分 析 値	CO <sub>2</sub> 0.0654g	CaO 0.0429g
理 論 値	CO <sub>2</sub> 0.0669g	CaO 0.0427g

(Ca (COO)<sub>2</sub> として計算)

以上の結果より集積銅鹽の酸根を醋酸  $\begin{pmatrix} \text{COOH} \\ | \\ \text{COOH} \end{pmatrix}$  と判定した。

### 實驗 3. 銅鹽の集積現象とリーゼガング現象との關係。

集積銅鹽が蓚酸銅であり、且それが明らかに菌體外にあるとすれば、この集積現象と類似の物理化學的現象即ちリーゼガング現象との間に何等かの關連性がなければならぬとの觀點から、次の如き實驗を試みた。

先ずワタグサレダケの培養に使用した培養基と全く同一の  $1.0\% \text{CuO}$  と  $1.0\% \text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{CuSO}_4$  との2種類の培地を作り、その各に蓚酸の飽和溶液又は結晶塊をその中央に置き、培養と同一の温度の孵卵器中に放置した。すると數日後に 附圖第Ⅱ(B) に示す如き立派なリーゼガング環が現われた。しかしこの場合各環の間に濃淡の差はあつたけれども間隔がなく、單に供試銅鹽との間に透明な環がつ出来たのみであつた。これはワタグサレダケに依つて、

$3.0\% \text{CuO}$  の寒天扁平培地に形成された集積帯の一つ(附圖第Ⅱ(A))と略同一のものであつた。

### 實驗 4. 蓚酸銅集積帯の形成とワタグサレダケの發育速度との關係

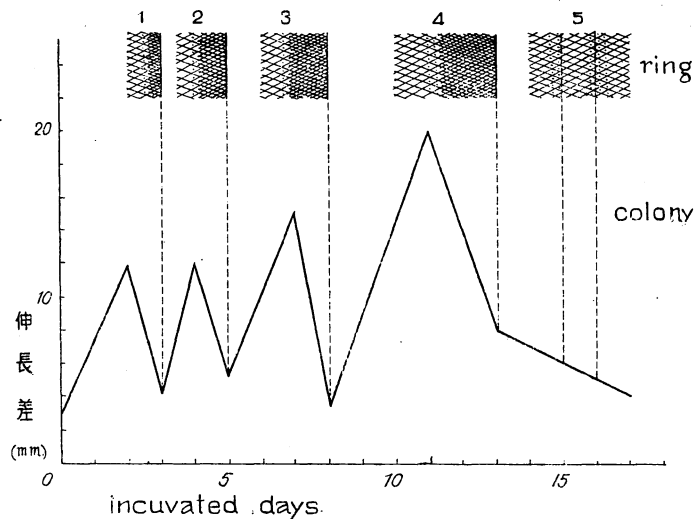
集積帯の形成が菌の發育速度に如何に影響して來るかにつき、毎日1回菌叢の直徑の増加を測定した結果は第Ⅱ表及圖表第Ⅰに示す如くである。

第Ⅱ表 集積帯の形成とワタグサレダケの生育速度との關係 \*

測定日	Control (spotなし)	A (spot 15mm)	B (spot 15mm)	C (spot 15mm)
30/X	Inoculation	Inoculation	Inoculation	Inoculation
3/X	16mm ) 11mm	24mm ) 10mm	27mm ) 10mm	25mm ) 10mm
4/X	27 " ) 5 "	34 " ) 6 "	37 " ) 6 "	35 " ) 6 "
5/X	32 " ) 5 "	40 " ) 5 "	43 " ) 6 "	41 " ) 6 "
6/X	37 " ) 10 "	45 " ) 11 "	49 " ) 15 "	47 " ) 13 "
7/X	47 " ) 3 "	56 " ) 13 "	64 " ) 8 "	60 " ) 12 "
8/X	50 " ) 20 "	69 " ) 15 "	72 " ) 12 "	72 " ) 13 "
11/X	70 " ) 8 "	84 " ) 15 "	84 " ) 12 "	85 " ) 13 "
13/X	78 " ) 4 "			
17/X	82 " ) 4 "			

\* 測定數字は菌叢の直徑、兩欄内の數字は差、銅鹽は  $\text{CuO}$  1% 使用。

圖表 1 菌の生長と Ring 形成との關係



使用銅鹽  $\text{CuO}$ , 1.0%. spot 15mm (後述す)。

使用菌種 ワタグサレダケ。

これに依ると、接種した菌絲が徐々に伸びて第一の環が形成されると、急速に伸長して第二の環の形成が開始される。するとこの間暫らく生長が停止するか又は極めて遲滯する。第二の環が完成に近附くと再び急速に伸長する。

かくの如くにして環の形成と菌絲の生長とは交互に行われ、結局集積帯の環の數と巾に對應して菌絲の環が形成される。(附圖第Ⅴ(裏面)及第Ⅶ(正面)に相當する。)そして菌の生長が常に集積帯の形成に先行する。

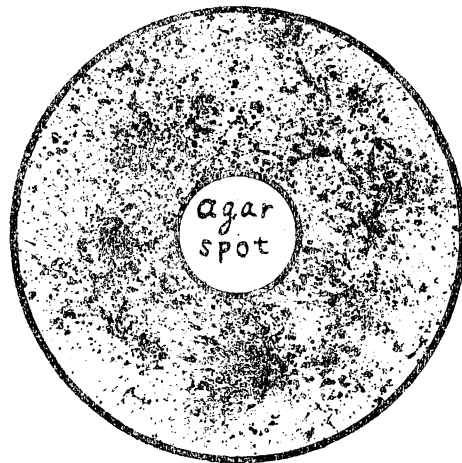
これを第Ⅱ表及圖表第Ⅰについて見ると、spot 上に發育したワタグサレダケは、そこに浸透して來た  $\text{CuO}$  を先ず蓚酸銅に轉換して、spot よりも少しく小さい環を形成する。次に少しく菌の生長が停滯し略 spot と同大の環が形成され、再び急速に伸長する。かくの如くにして第三、第四、第五の環が伸長と停滯の度合に應じて廣狹粗密を現出し乍ら完成される。この場合第五の環は菌絲がシャーレの壁に近接し、その爲に伸長が阻害され完全な形を備えるに至つて居らぬ。

### 實驗 5. Agar spot plate culture method.

蓚酸銅の集積現象に對して “蓚酸銅以外の銅鹽に對し、蓚酸に依りリーゼガング環を物理化學的に形成せしめ得ることは、明らかにワタグサレダケの代謝産物である蓚酸に依り<sup>3)</sup>生物化學的にリーゼガング環を形成し得ることを示すものである。而して生成せる蓚酸銅の溶解度が極めて低きが故に (25°C の水 11 中に 23.6mg 溶解する)<sup>9)</sup>、結果として銅イオン濃度が

生育阻止限界濃度より遙かに低い帶域を生ぜしめることとなり、これに乗じて急速に生育を完遂して行くことが出来るものである”との解釋を下すならば、“既に培養基に生育阻止濃度以上の銅イオンを含む時、ワタダサレダケは菌絲の少量の接種又は孢子の接種等に依つては決して生育することが出来ず、従つて代謝産物たる蓚酸の生成も行われず、集積現象も亦起らないであろう。然るに、若しも培養基の一部に生育阻止限界濃度以下の銅イオンを含むものがあり、この部分に上記の接種が行われたとしたらばどうなるであろうか？ 假にここに足場を取つて若干の發育が行われたとするならば、忽ちその附近の銅鹽は蓚酸銅に轉換され、次々と生育に伴う菌叢の擴大に比例して銅イオン濃度の低下した帶域が擴大され、完全な生育阻止濃度を持つた部分が全く征服されるに至るであろう。然るに酸生成の極めて少いスエヒロタケ<sup>10)</sup> (*Schizophyllum commune*) の如きもの場合は、前者とは全く反對に足場の有無に拘らず一定の濃度を境として明白なる生育の能否を示すであろう”との想定の下に、銅鹽を含む扁平培養基の中央を、第Ⅱ圖に示す如く直徑 15~30mm の試験管で截り取り、そこに銅鹽を含

第Ⅱ圖 Agar spot plate culture 用 spotting method

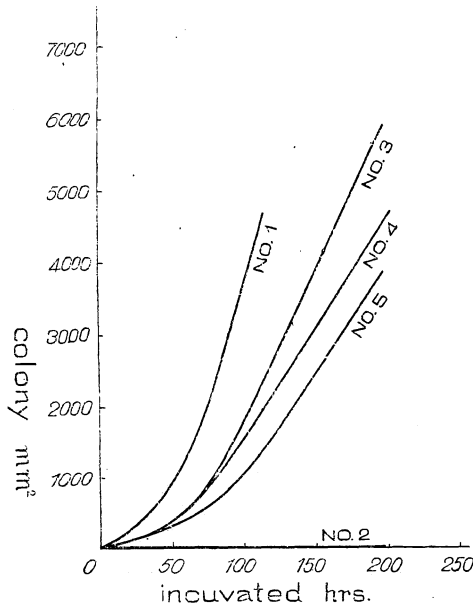


まね全く同一の寒天培養基を注ぎ、固化後直ちにここに供試菌絲 3mm 平方位を接種して培養し（以下この方法を *Agar spot plate culture method* と呼び、この培養基を *Agar spot plate* と呼ぶことにする。）、その生育状態を種々の濃度の銅鹽について測定し、一方同じ濃度の銅鹽を含む培養基に依り普通の寒天扁平培養法を行つて、兩者の生育状態を比較して見たその結果は圖表第Ⅱ乃至第Ⅴ及第Ⅲ乃至第Ⅵ表に示す通りである。



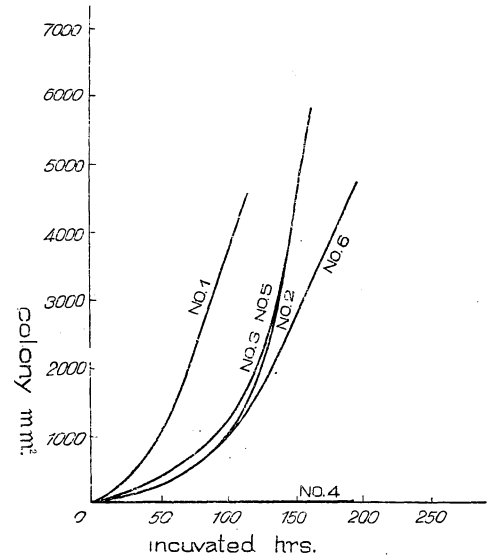
圖表Ⅱ 硫酸銅 ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) の *Poria vaporaria* の生育に及ぼす影響及 spot culture の生育に及ぼす影響

No.1	control			
No.2	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.0, 0.7, 0.4%	spot	なし
No.3	"	0.4%	spot	30mm
No.4	"	0.7%	"	"
No.5	"	1.0%	"	"



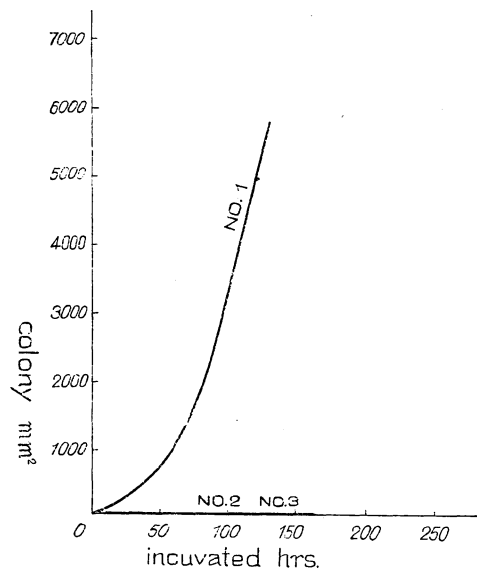
圖表Ⅲ 酸化銅 ( $\text{CuO}$ ) の *Poria vaporaria* の生育に及ぼす影響及 spot culture の生育に及ぼす影響

No.1	control			
No.2	$\text{CuO}$	1.0%	spot	なし
No.3	"	"	spot	15mm
No.4	"	2.0%	spot	なし
No.5	"	"	spot	15mm
No.6	"	3.0%	"	"



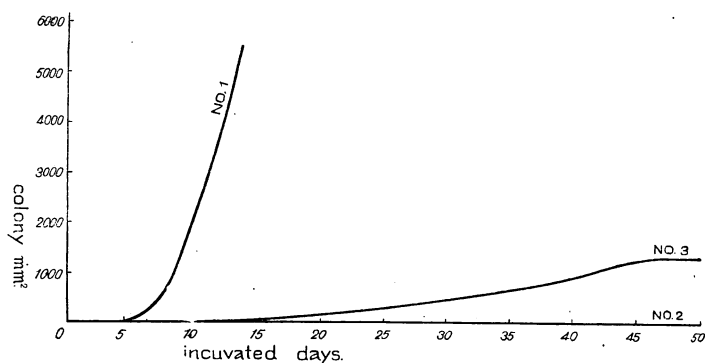
圖表Ⅳ 酸化銅 ( $\text{CuO}$ ) の *Schizophyllum commune* の生育に及ぼす影響

No.1	control			
No.2	$\text{CuO}$	1.0%	spot	なし
No.3	"	"	spot	15mm



圖表 V  $\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{CuSO}_4$  の *Cortinellus Berkeleyanus* の生育に及ぼす影響及 spot culture との関係

No.1 control  
No.2  $\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{CuSO}_4$  1.0% spot なし  
No.3 " " spot 15mm



第 III 表 硫酸銅 ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) のワタグサレダケの生育に及ぼす影響, 及 *Agar spot plate culture* の影響 \*

培養時間	control	1 %		0.7 %		0.4 %	
		spot なし	spot 30mm	spot なし	spot 30mm	spot なし	spot 30mm
42hrs	30mm	(-)	17mm	(-)	19mm	(-)	19mm
114 "	77 "	(-)	42 "	(-)	49 "	(-)	54 "
186 "		(-)	70 "	(-)	78 "	(-)	87 "

\* 測定数字は菌叢の直径

第 IV 表 酸化銅 ( $\text{CuO}$ ) のワタグサレダケの生育に及ぼす影響及 *Agar spot plate culture* の影響 \*

培養時間	control	1 %		2 %		3 %
		spot なし	spot 15mm	spot なし	spot 15mm	spot 15mm
42hrs	30mm	15mm	20mm	(-)	20mm	15mm
114 "	77 "	42 "	45 "			42 "
138 "				(-)	66 "	53 "
162 "		85 "	85 "			
186 "						77 "

\* 測定数字は菌叢の直径

第 V 表 酸化銅 (CuO) のスエヒロタケの生育に及ぼす影響 \*

培 養 時 間	control	1	%
		spot なし	spot 15mm
66hrs	37mm	(-)	(+)
134 "	85 "	(-)	(+)

\* 測定数字は菌叢の直径

第 VI 表  $\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{CuSO}_4$  のシヒタケの生育に及ぼす影響 \*

測 定 月 日	control	1	%
		spot なし	spot 15mm
30/X	Inoculation	Inoculation	Inoculation
4/X	8mm	(-)	6mm
6/X	20 "	(-)	12 "
8/X	43 "	(-)	15 "
11/X	58 "	(-)	15 "
13/X	70 "	(-)	17 "
17/X	83 "	(-)	18 "
30/X		(-)	25 "
5/X		(-)	30 "
10/X		(-)	35 "
15/X		(-)	40 "
22/X		(-)	40 "

\* 測定数字は菌叢の直径

即ちワタグサレダケに於ては硫酸銅及酸化銅の兩者を通じ、*Agar spot plate culture* を行わないものは一定の濃度を限界として全く生育し得なかつたのに反して、*Agar spot plate*

*culture* を行つたものの場合、硫酸銅では spot の直径が 15mm では効果なく普通の寒天扁平培養のものと相違なきも、30mm のものは明らかに効を奏して標準區と略同様な生育を遂げた。酸化銅の場合は spot の直径 15mm で同様の結果が現われた。

これに反してヒイロタケの場合は、spot の有無に拘らず一定の濃度を限界として生育の能否を現わし、spot のある場合は僅かに spot 上に菌絲の伸長を見た。(附圖第 III (C) 下)

これ等は何れも最初の想定 of 誤りでなかつたことを證明するもので、代謝産物として蓚酸を出す木材腐朽菌の銅鹽防腐劑に對する抵抗機構であると認め得る。

即ち蓚酸を生産する木材腐朽菌は、初期發育 (第一の集積環を形成するに足る丈の蓚酸を造るに必要な生育) の基盤を得ることに依つて、生育阻止限界濃度以上の銅イオンを含む基質をもこれを征服して、完全に侵害し得る状態に轉換し得るものである。

**實驗 6. ワタグサレダケに對する修酸銅の生育阻止限界濃度。**

CuO の如く、これを修酸銅に轉換することに依り多少とも生育に影響を及ぼす副生物を生じない銅鹽を使用した場合、ワタグサレダケが初期發育の基盤を得たとしたならば果して幾何の濃度迄征服し得るものであるかを知る爲に、純修酸銅を用い spot を作らずに普通の寒天扁平培養を行つて見た。

その結果は第Ⅶ表に示す如く、3.0, 5.0, 7.0, 10, 20, 30% の各の濃度に於て、生育の抑制作用が全然認められなかつた。

第Ⅶ表 修酸銅濃度とワタグサレダケの生育との關係 \*

測 定 日	3 %	5 %	7 %	10 %	20 %	30 %
4 / X	Inoculation	Inoculation	Inoculation	Inoculation	Inoculation	Inoculation
6 / X	15mm	15mm	15mm	15mm	15mm	15mm
7 / X	32 "	32 "	30 "	30 "	32 "	30 "
8 / X	42 "	45 "	42 "	45 "	45 "	45 "
11 / X	65 "	72 "	75 "	78 "	78 "	73 "
13 / X	75 "	87 "	85 "			85 "

\* 測定數字は菌叢の直徑

従つて修酸銅は何等生育に悪影響がなく、培養基中の濃度が極端に多くなると、榮養源の稀釋効果に依つて單に榮養不良におちいらしめるのみである。

**實驗 7. 修酸の Catcher として石灰鹽の添加が修酸銅集積帶の形成に及ぼす影響。**

銅鹽の修酸銅に轉換することを防止し、併せてその防菌効果を保持する爲に修酸の Catcher として各種の石灰鹽を添加し、Agar spot plate culture を行つて見た。使用銅鹽は酸化銅の 1.0% で、Catcher には鹽化石灰の 0.2% 及水酸化石灰の 1.0% を用いた。spot の大きさは前後者共 15mm では生育し得なかつたが、30mm では完全に生育した。その結果は第Ⅷ表に示す通りである。

即ち Catcher として鹽化石灰の 0.2% を用いたる場合及水酸化石灰の 1.0% を用いたる場合共何等妨害効果を現わさず、忽ち集積帶を形成して旺盛なる發育を遂げた。

これは硫酸銅溶液と鹽化石灰との混合物に修酸溶液を加えると殆ど同時に修酸銅と修酸石灰の沈澱が生成し、又逆に修酸銅を水に分散し鹽酸微酸性に於て鹽化石灰を加えても修酸石灰の沈澱が生成せず、且又修酸銅を鹽酸に溶解し、これに鹽化石灰を加えても修酸石灰の沈澱が生

成せず、これを苛性曹達で中和し微酸性にすると蓚酸銅の沈澱が生成すること、及電化列  $Ca > Cu$  から化學的にも證明される。

第Ⅷ表  $CuO$  の medium に  $CaCl_2$  及  $Ca(OH)_2$  加用の影響 \*

培養時間	1% $CuO$ +1% $Ca(OH)_2$				control	1% $CuO$ +0.2% $CaCl_2$
	A	B	C	D		
42hrs	15mm	16mm	15mm	12mm	37mm	22mm
60 "	24 "	25 "	27 "	25 "		31 "
108 "	29 "	33 "	35 "	31 "	75 "	
170 "	45 "	47 "	45 "	45 "		67 "
218 "	59 "	63 "	55 "	58 "		
266 "	73 "	80 "	71 "	73 "		

\* 測定數字は菌叢の直径、菌種はワタグサレダケ

以上の結果は銅鹽防腐劑の効力補強の意味に於て石灰鹽を併用することが、ワタグサレダケの如く代謝産物として蓚酸を多量に生産する腐朽菌にして初期發育の基盤を得たものに對しては全く無意味であることを指示する。

### 實驗 3. ワタグサレダケ以外の木材腐朽菌に依る蓚酸銅の集積現象。

代謝産物として蓚酸を生成すると云われるシヒタケ<sup>11)</sup> (*Cortinellus Berkeleyanus*) 及ツガサルノコシカケ<sup>10)</sup> (*Fomes pinicola*) 等が、果してワタグサレダケの如く集積帯を形成するか否かに就て實驗して見た。

その結果シヒタケに就ては生育の抑制が著しく目立つけれども *Agar spot plate culture* が効を奏し明らかに集積帯の形成が行われた。(圖表第Ⅴ)

ツガサルノコシカケの場合は第Ⅵ表及圖表Ⅵに示す如く、*Agar spot plate culture* に依れば殆ど抑制を受けずに生育した。

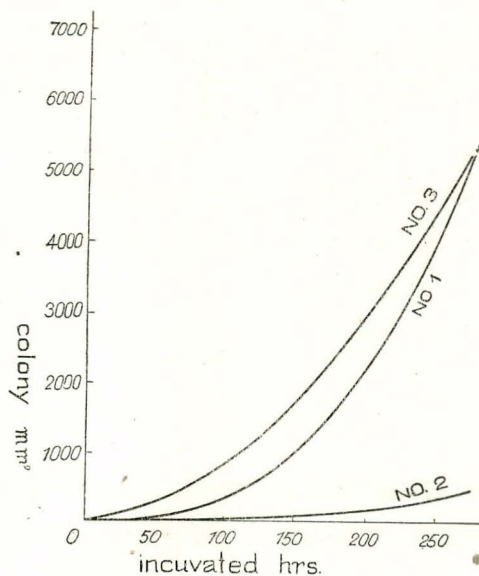
*Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. 等も亦同様に集積帯の形成を見た。

然しこれ等の場合は何れも多重環は形成せられず、單環であつた。

尙これ等の場合に於ける酸根の確認は行つて居ない。

圖表Ⅶ  $\text{CuO}$  の *Fomes pinicola* の生育に及ぼす影響

No.1 control  
 No.2  $\text{CuO}$  0.5% spot なし  
 No.3 " " spot 15mm

第Ⅷ表  $\text{CuO}$  とツガサルノコシカケの生育との關係 \*

培養時間	0.5% $\text{CuC} \cdot \text{H}_2\text{O}$			Control
	A spot 15mm	B spot 15mm	C spot なし	
38hrs	15mm			
66 "		21mm	(+)	
90 "				21mm
110 "	35 "			
138 "				37 "
186 "		73 "	14mm	50 "
230 "	80 "			
258 "				73 "
278 "	86 "	85 "	25 "	83 "

\* 測定数は菌叢の直径

## (摘 要)

著者は  $\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{CuSO}_4$  を混じた寒天扁平培養基の上に、木材腐朽菌ワタグサレダケ (*Poria vaporaria*) を培養した。該菌は培養基中の銅鹽を別の銅鹽に轉換沈積して、菌叢附近の寒天中に 多重環狀の集積環を形成した。著者はこれに銅鹽の集積現象及集積帯と命名した。

この集積銅鹽は蓚酸銅であることを確認し、且この現象が菌の銅鹽に對する一種の抵抗性の現われであることを、著者の考案になる *Agar spot plate culture method* に依つて實驗し確認した。

- 1) ワタグサレダケに依る蓚酸銅の集積帯は、蓚酸銅を除く種々の銅鹽を培養基に混じた場合に大抵現われることを認めた。
- 2) ワタグサレダケに依る蓚酸銅の集積現象は、生物化學的に生じた一種のリーゼガング現象である。
- 3) 菌の生長は常に集積帯の形成に先行し、集積帯の環に對應して菌絲の環が形成される。
- 4) *Agar spot plate culture* (銅鹽を混じた寒天扁平培養基の中央を直径 15~30 mm の圓形に截り取り、これに銅鹽を混じない同一寒天培養基を注入して固化後直ちにその中央

に接種培養する)に依り、普通の寒天扁平培養法では生育し得ない高濃度の銅鹽混合培養基にも生育が可能となる。即ち初期發育(第一の集積帯が形成される迄の發育)の基盤があれば、生育阻止限界濃度以上の銅鹽を含む培養基にも易々と生育が遂げられる。従つてこれは明らかに銅鹽防腐劑に對する木材腐朽菌の抵抗機構であると認め得る。

- 5) ワタグサレダケは醋酸銅の如何なる濃度に於てもその生育が阻害されない。従つて醋酸銅に轉換されて外に生育を阻害する何物をも副生しない銅鹽は、初期發育の基盤を得たワタグサレダケに對して全く生育の阻害作用が現われない。
- 6) 醋酸の Catcher としての石灰鹽の混用に依つて集積帯の形成を妨げることは出来なかつた。
- 7) ワタグサレダケ以外の木材腐朽菌中、代謝産物として醋酸を作る菌は盡く集積帯を形成する。然しこのものは單環であつた。

木材腐朽菌以外に *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. も亦立派に集積帯を作る。この時も單環であつた。

#### 参 考 文 献

- 1) 逸見武雄, 赤井重恭著: 木材腐朽菌學, 昭和20年。
- 2) Frank Bamford: Poisons their isolation and identification, 1940。
- 3) 宮路憲二著: 應用微菌學(實施編), 昭和13年。
- 4) 宮道悦男著: 植物成分研究法, 昭和16年。
- 5) Beilstein: Organischen Chemie, Band II。
- 6) 岡垣内匠: 灰像に依る日本産木炭の原料樹種鑑別法, 三重高農同窓會學術彙報, 第3號 昭和9年。
- 7) 丹波敬三著: 新編裁判化學, 大正14年。
- 8) 富金原孝: 木材腐朽菌ボリア・パボラリヤの醋酸醱酵に就て(第1報), 日本農藝化學會誌, Vol. 22, No 2, 昭和23年。
- 9) Atherton SEIDELL, PH. D.: Solubilities of inorganic and organic compounds, second edition, 1919。
- 10) 島蘭平雄: 未發表。
- 11) 坂口謹一郎: 椎茸菌 (*Cortinellus shiitake* P. Hem.) の醱酵生産物に就て, 日本農藝化學會誌, Vol 7, 1931。

(May 15, 1949)

## Résumé

Author cultured *Poria vaporaria* Pers. in agar plate containing  $\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{CuSO}_4$  and observed that it accumulated a copper salt in agar plate near by the colony as multiple rings, and named this "the accumulating phenomenon" and "the accumulating zone" of copper salt.

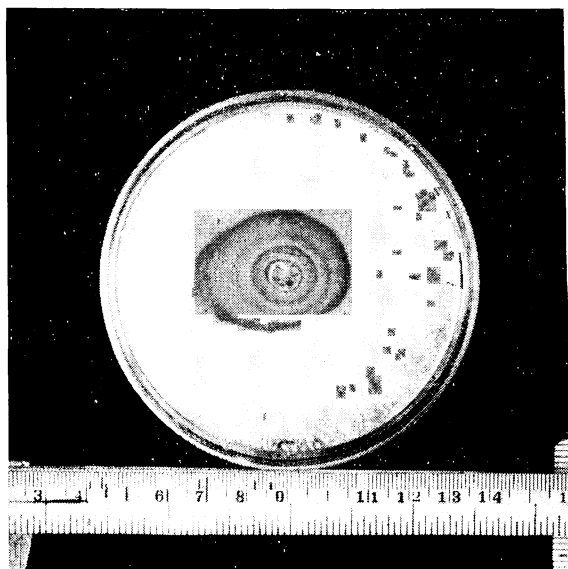
Author identified that the accumulating copper salt was copper oxalate, and the phenomenon was proved the resistance of the wood-destroying fungus, *Poria vaporaria* Pers., to copper salts by "the agar spot plate culture method" (Agar spot plate is an agar plate mixed with copper salt, whose central part 15~30mm in diameter has been replaced by agar plate without copper salt).

- 1) The accumulating zone of copper oxalate by *Poria vaporaria* Pers. appears mostly in the case of other copper salts except copper oxalate.
- 2) The accumulating phenomenon of copper oxalate by *Poria vaporaria* Pers. seems to be a biochemical Liesegang's phenomenon.
- 3) The mycelial growth always precedes to the formation of the accumulating zone, and the ring of the mycelium is formed similarly to that of the accumulating zone.
- 4) The agar spot plate culture method is very effective to the growth of the wood-destroying fungus, though on the ordinary agar plate containing high concentration of copper salt the mycelial growth does not occur. It may be said that, if only the foothold of the initial growth is given to the wood-destroying fungus, the mycelium is able to grow even in the medium containing over the limit concentration of copper salt for the growth of the fungus. Therefore, the accumulating phenomenon of copper salt is one of the resistant mechanisms of the wood-destroying fungus to copper salt.
- 5) The growth of *Poria vaporaria* Pers. occurs in the media of all the concentrations of copper oxalate used. Consequently, if other copper salts than copper oxalate are changed to copper oxalate and then produce nothing which disturbs its growth, no effect of disturbance appears for the later growth of *Poria vaporaria* Pers. which has acquired foothold of its initial growth (Author denote the initial growth as one in the period prior to the formation of the accumulating zone of copper oxalate).
- 6) The accumulating zone of copper oxalate is formed in spite of the presence of calcium salt in the medium as a catcher of oxalic acid.
- 7) All the wood-destroying fungi, as well as *Poria vaporaria* Pers., which produce oxalic acid as metabolic products form the accumulating zone of copper salt, but these are the simple ring.

*Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. also form the accumulating zone of copper salt, and these are of simple ring.

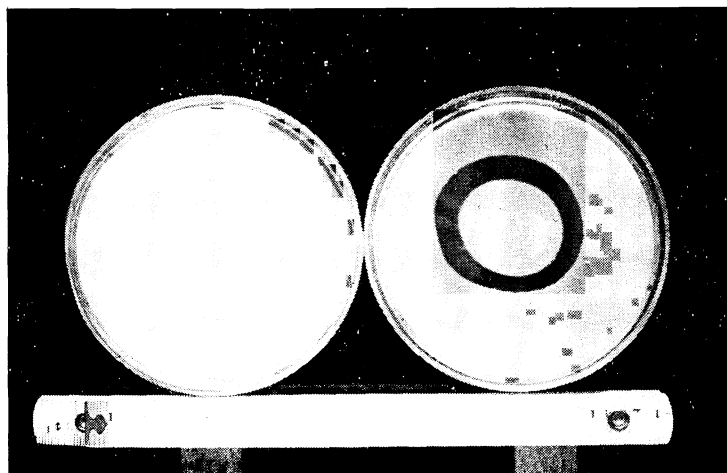


附 圖 第 I



0.4%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  のmedium に *Poria vaporaria* の  
作つた Accumulating zone. (裏面より見たもの) 15mm  
Agar spot culture に依る (原圖)

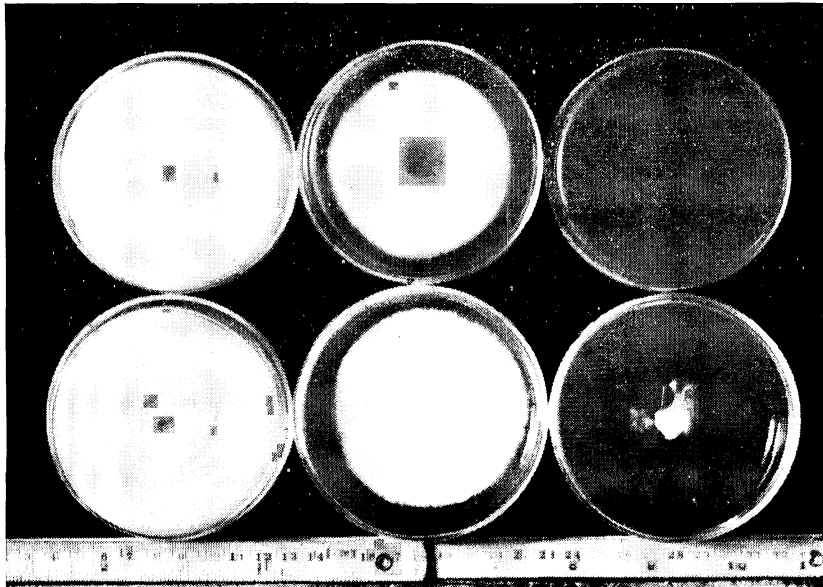
附 圖 第 II  
(A) (B)



- (A) 3%  $\text{CuO}$  の medium に *Poria vaporaria* の作つた  
Accumulating zone. (裏面より見たもの) 15mm  
Agar spot culture に依る
- (B) 1%  $\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{CuSO}_4$  の medium の中央に Oxalic  
acid の結晶を置いて生じた Liesegang 現象 (裏面  
より見たもの) (原圖)

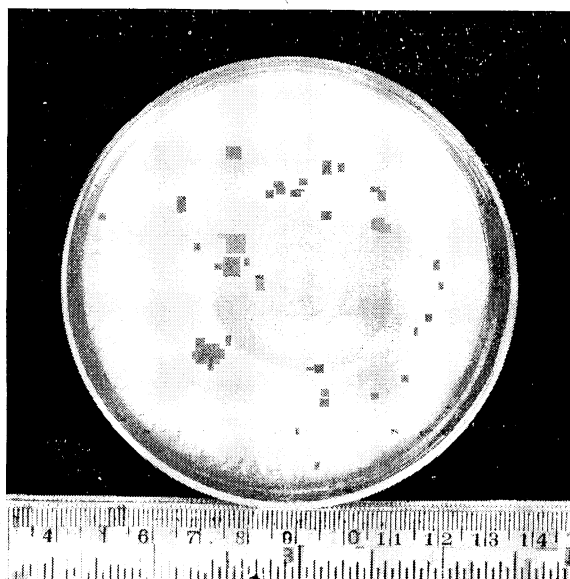
附 圖 第 Ⅲ

(A) (B) (C)



- (A) 0.4%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  の medium に *Poria vaporaria* の作つた Accumulating zone (裏面) 15mm spot culture.  
 (B) 1%  $\text{CuO}$  の medium に依る *Poria vaporaria* の 15mm spot culture. 上は裏面より下は正面より見たるもの  
 (C) 1%  $\text{CuO}$  の medium に依る *Schizophyllum commune* の 15mm spot culture. 上は裏面より下は正面より見たるもの (原圖)

附 圖 第 Ⅳ



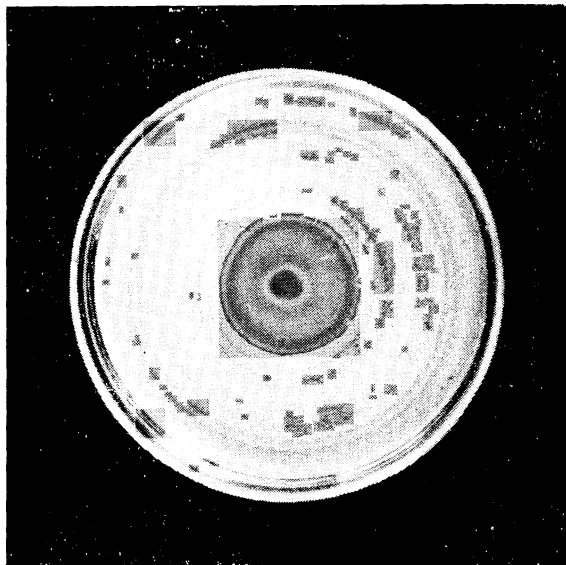
0.4%  $\text{CuSO}_4$  の medium に *Poria vaporaria* の作つた Accumulating zone (裏面) (15mm spot culture) 原圖

附 圖 第 V



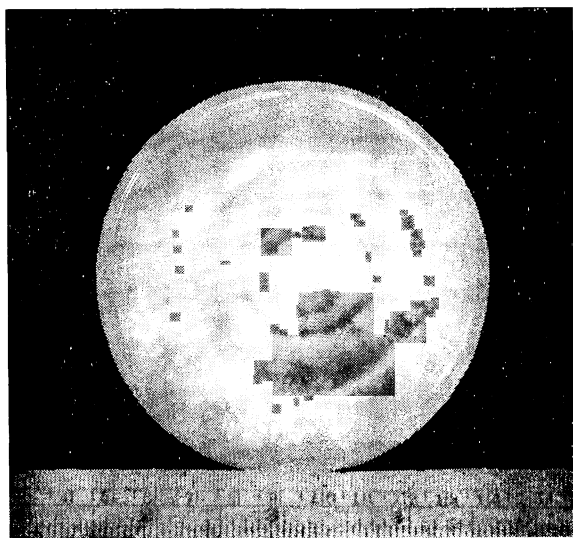
1% CuO の medium に *Poria vaporaria* の作つた Accumulating zone (裏面) (15mm spot culture) (原圖)

附 圖 第 VI



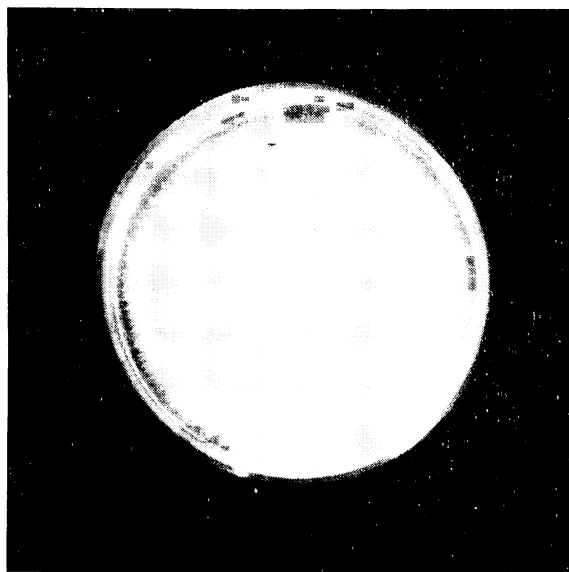
1% CuO + 1% Ca(OH)<sub>2</sub> の medium に *Poria vaporaria* の作つた Accumulating zone. (裏面) (15mm spot culture) (原圖)

附 圖 第 VII



1.0% CuO の medium 上に Accumulating zone の ring に對應して作つた *Poria vaporaria* の菌絲の ring. (第V圖の表面) (原圖)

附 圖 第 VIII



1% CuO + 1% Ca(OH)<sub>2</sub> の medium 上に Accumulating zone の ring に對應して作つた *Poria vaporaria* の菌絲の ring. (第VI圖の正面) (原圖)