

Bacterium solanacearum SMITH のバクテリオファ ージュ

河村, 榮吉
九州帝國大學農學部植物病理學教室

<https://doi.org/10.15017/20947>

出版情報：九州帝國大學農學部學藝雜誌. 9 (2), pp.148-156, 1940-12. 九州帝國大學農學部
バージョン：
権利関係：

Bacterium solanacearum SMITH の

バクテリオファヂュ

河 村 榮 吉

(昭和十五年八月二十日受理)

(第二圖版附)

緒 言

昭和10年秋、著者は瀧元清透氏の御厚意により、*Bacterium solanacearum* に侵された馬鈴薯塊莖を入手した。當時著者は植物病原細菌のバクテリオファヂュに興味を抱いてゐたので、この病塊莖を用ひて *Bacterium solanacearum* のバクテリオファヂュを分離する目的で次の實驗にかゝつた。即ち該病塊莖を細碎し之に煙草及び蕃茄より分離した *Bacterium solanacearum* の純粹培養を加へて放置した後、ゼイツ滅菌濾過板 (Seitz-Entkeimungs-Schichten) を用ひて之を濾過した。次にこの濾液を添加した馬鈴薯煎汁培養基に本菌を培養し、之を再び前同様濾過し、以下同じ操作を繰返した。この方法はバクテリオファヂュを分離するために普通に採られる方法である。そこで、3回濾過の濾液を用ひ試みに細菌と濾液とを混じて馬鈴薯寒天上に塗抹培養した。この際細菌は前記2系統の他、馬鈴薯から分離した系統をも用ひた。然るに、こゝに生じた菌苔を見ると、前2溶液を用ひたものでは何等變化を認めなかつたのに反し、後者を用ひた場合にはその菌苔中に微小なる孔を多數形成し、この部分は細菌の發育が極めて少いのを認めた。斯くの如く溶菌斑と認むべきものが豫想外に早く發現したのに奇異の感に打たれ、この第三の培養を検すると、これは他の2培養と異なり菌の聚落は fluidal であり、内容は不均質で溶菌せられた如き部分があるのに氣付いた。この時起つたのは、この培養には既にバクテリオファヂュが存するのではないかとの疑念であつた。よつて、第一は該培養からファヂュを分離することが出来るか如何かを明かにし、次で他の同種の培養に就ても之を試み、尙このファヂュが病害發生に如何なる影響を及ぼすかを知り度いと思つた。之等がこの研究に着手した動機であつて、その結果の一部は他の機會に豫報したことがある(1, 2)。

本研究は九大農學部植物病理學教室に於て行つたもので、その間御指導と御鞭撻とを賜つた故中田教授、供試材料に就て不斷の御厚意を辱くした瀧元清透氏に對して、深謝の意を表する次第である。

但し表中 一, 土, +, 十, 卅, 卍 等は濾液 10 滴を添加せる馬鈴薯煎汁 10 cc に本菌 1 白金耳量を植付け 33°C 1 晝夜後に觀察した液の濁濁度を示すもので、一は無, 土は痕跡, +, 十, 卅, 卍 等はその順に濁濁度大なるものである。以下之に準ずる。

この結果に就き一言すべきは、2 回乃至 7 回濾過の濾液を添加した場合には濾液添加區の方が反つて濁濁度大であり、而も液の上部に濃い白濁部を生ずる傾向があつた。而して此の部分を檢すると、之は細菌の凝集塊で、その細菌は運動してゐないのを認めた。濾過第 9 回頃より濾液添加區は濁濁度を減ずるに至り、11 回では透明化し、その後は極僅に濁濁するのを認め、濾液を添加せぬものとの間に明瞭な差が現はれた。

次に然らば之がバクテリオファヂユによる溶菌なりや否やを確認するために、バクテリオファヂユ特有の現象たる溶菌斑の形成如何を試験した。即ち 10 回濾過の濾液を同量の細菌浮游液に混じ、之を馬鈴薯寒天上に流し 30°C に保つた。斯くしたものは 1 晝夜後發生した菌苔全面に直徑 1 mm 前後の圓形の溶菌斑多數を形成した。然るに細菌培養のみを以てしたのものには斯る現象は認められず、即ち斯くの如く大なる溶菌斑を生じなかつた。又、細菌浮游液 10 cc に對し、16 回濾過の濾液 1 滴又は 6 滴を加へ、之の 1 cc を採り馬鈴薯寒天を用ひて扁平培養したものは、1 晝夜後濾液 1 滴添加區には極多數の溶菌斑を形成して菌苔の部分が少く、6 滴添加區では全く菌の發育を認めなかつた。對照の無添加區ではペトリ皿全面が菌苔を以て蔽はれた。

なほ培養 5 を用ひた場合の経過を見ると、濾過 6 回頃より濾液添加區の濁濁度が低減し始めた。而して 15 回濾過の濾液を用ひた試験では、馬鈴薯寒天上の菌苔に明かに溶菌斑を形成した。この場合濾液不添加の對照區にも溶菌斑を形成したが、その大き及び數に於て前者のものが優つてゐた。

更に培養 6 を用ひた場合には 2 回濾過の濾液を用ひた頃より、培養 4 の場合同様、濾液添加區に細菌の凝集するを認めた。而して 19 回濾過の頃より濾液添加區に於て濁濁度の低下を來し溶菌現象を起せるを示したが、その程度は 4 の場合の如く顯著ではなかつた。本培養は之を馬鈴薯寒天上に塗抹培養すると菌苔中に多數の微小なる溶菌斑を形成した。

以上の實驗により、培養 4, 5, 6 の 3 者にはファヂユが存することを知り得た。培養 1, 2, 3 からはファヂユが得られなかつた。

II. ファヂユの各種性質

培養 4 より得たファヂユを用ひて之が二三の性質を調査した。

(1) 濾液稀釋試験

先づ 15 回濾過の濾液を用ひ、之を馬鈴薯煎汁にて 10 倍より百億倍まで稀釋し、之に細菌を植付け 33°C に保ち、16 時間・48 時間後に液の濁度を檢した。その結果は第 2 表の通りである。

第 2 表 濾液の稀釋度と *Bact. solanacearum* 培養液の濁度

稀 釋 度	濁 度		
	直 後	16 時 間 後	48 時 間 後
10 ⁻¹	+	—	±
10 ⁻²	+	—	±
10 ⁻³	+	—	±
10 ⁻⁴	+	—	±
10 ⁻⁵	+	±	+
10 ⁻⁶	+	±	+
10 ⁻⁷	+	±	+
10 ⁻⁸	+	±	+
10 ⁻⁹	+	±	+
10 ⁻¹⁰	+	+	+
濾液不添加	+	++	+++

即ちこの結果によれば原濾液を百億倍に稀釋しても溶菌作用を呈した。尙 1 萬倍までは 16 時間後液の澄明化を來したが、以後僅に濁濁するのを認めた。

次に、16 回濾過の濾液を馬鈴薯煎汁で各種の濃度に稀釋し之に細菌を植付け 33°C に保ち、

第 3 表 濾液の稀釋度と *Bact. solanacearum* の消長

稀 釋 度	細 菌 數		
	Inoculum	21 時 間 後	31 時 間 後
10 ⁻¹		223	100
10 ⁻²		420	405
10 ⁻³		720	423
10 ⁻⁴		800	450
10 ⁻⁵		1092	458
10 ⁻⁶		1170	525
10 ⁻⁷		1980	675
10 ⁻⁸		2460	700
濾液不添加	15960	52140	78300

Inoculum の細菌數と 21 時間及び 31 時間後に於ける細菌數とを調査した。その結果は第 3 表に示す通りである。但し表中の數字は培養液 1 白金耳量中の細菌數である。

以上の結果は、濾液を 1 億倍に稀釋しても溶菌現象が起つたことを示してゐる。濾液が濃厚な程溶菌作用は強大であつた。

(2) ファヂユの時間的消長

次に 36 回濾過の濾液を細菌培養液中に投じて 34°C に保つたものに就き、直後・5 時間後・22 時間後に之より培養液を 1 白金耳量採り扁平培養し、爰に生ずる溶菌斑の數を觀察したところ次の結果を得た。

第 4 表 ファヂユの時間的消長

時 間	溶 菌 斑 數
直 後	64
5 時 間 後	2812
22 時 間 後	12358

溶菌斑の數はファヂユの消長を表現せるものであるから、上の結果から見ると、ファヂユは時間と共にその數を増加したと認められる。

(3) 溶菌作用の特異性

上述した處で明かな如く、濾過 15 回前後のファヂユは、溶菌作用が相當強力であつたので、之が本菌の他の培養系統にも作用するやを檢した。即ち濾過 15 回の濾液を用ひ、馬鈴薯寒天扁平培養上に生ずる溶菌斑の有無を試験した結果は第 5 表の通りである。但し培養 5, 6 には前述の如く常に微小なる溶菌斑を生ずるが之は爰では看過したのである。

第 5 表 培養 4 より得たファヂユの溶菌作用

培 養 番 號	1	2	3	4	5	6
溶 菌 斑 の 有 無	-	-	-	+	-	-

即ち培養 4 より得たファヂユは 4 以外の本菌には作用しなかつた。之を以て見るに、このファヂユは特異性の強いものと認められる。

III. ファヂユ保有培養の特性

以上述べ來つたところより見るに、4, 5, 6 の 3 培養はその純粹培養に實驗開始當初より既にファヂユを有してゐたと考へられる。然らばこの培養と他のファヂユを保有せざる培養とは

培養的並に生理的性質に於て如何なる差異があるか。それに就て調査した結果の中、特に顯著な點のみを摘出して表示すれば第6表の通りである。

第6表 *Bact. solanacearum* 各培養系統の性質

培養番 號	性 質	馬鈴薯寒天上の聚落			ウシンス キー氏液 薄膜形成	コーン氏 液發育	馬鈴薯 煎汁發育	ゼラチン 液 化
		形	内 容	質				
1		圓	均 質	稍粘稠	+	+	卅	—
2		圓	均 質	稍粘稠	+	+	卅	—
3		圓	均 質	稍粘稠	+	+	卅	—
4		圓—不整	不均質 ¹	fluidal	—	++	卅	+
5		圓—不整	不均質 ¹	fluidal	—	++	卅	+
6		圓—不整	不均質 ¹	fluidal	—	++	卅	+

1. 聚落の中央部厚くして不透明、周邊部半透明部あり、或は中央部半透明、周邊部不透明。
顯微鏡的には侵蝕狀に菌苔うすき部分を各處に生じてゐる。

上表を通覽すると、1, 2, 3の3培養と、4, 5, 6の3培養とはその培養的性質を異にする他、ゼラチン液化に於ても差がある。即ち前者は馬鈴薯寒天上の聚落は内容均質であり、後者は不均質、fluidalで既に溶菌せられたと認められる部分がある。次に、液體培養基に於ける發育は後者がよく、前者はゼラチンを液化せず後者は之を液化する。但し肉汁寒天上では後者の聚落も殆ど内容均質であつた。

次に、この聚落不均質の系統からは、培養中に均質の聚落を作るものが現はれた。例へば牛乳に約3ヶ月培養後之を馬鈴薯寒天に扁平培養したところ、4, 5, 6の3培養共均質の聚落を形成する系統を生じた。肉汁寒天に於ても同様の經驗をした。又、培養4の11回濾過の濾液を加へて本菌を培養したものでは數日後之を扁平培養したところ、均質なる聚落を混生した。因に馬鈴薯煎汁では培養130日に及ぶも尙不均質の特性を保持して居た例があつた。

培養4, 5及び6を蕃茄の莖に接種して發病したものから接種1週間後に菌の再分離を行つたところ、4を接種せるものよりは不均質・均質兩種の聚落を生じ、5, 6の場合は均質の聚落を作る本菌を得た。

之等の結果より見るに、本菌は之を或種の培養基で人工培養するか或は寄主植物を通すとか、又はファグを加へて培養すると不均質系のものから均質系のを生ずるものと認められる。

IV. 蕃茄青枯病の發生に及ぼすフアヂユの影響

培養 4 より得た濾過 17 回目のフアヂユを用ひ次の實驗を行つた。即ち第 1 區としては本菌の殺菌水浮游液 20 cc に濾液 2 cc を加へ、之を硝子鉢の砂質壤土中に灌注し、之に蕃茄を播種し 35°C の土壤恒温槽に入れ、對照用として第 2 區(細菌のみを施せるもの)、第 3 區(細菌、濾液共に施與せぬもの)の 2 區を作り前同様に處理した。その結果、約 3 週間後には第 1、第 3 兩區の蕃茄は正常の生育をなしたが、第 2 區は發育極めて劣り、地際に褐變部を認めた。その後第 2 區は萎凋するもの續出し、之を検するに明かに青枯病なることを認めた。夫等の植物は枝根が腐敗して殆ど消失してゐた。第 7 表は之等の調査結果である。

第 7 表 蕃茄青枯病の發生に及ぼすフアヂユの影響

區別	調査事項	草 丈 cm	供試本數	發病本數	萎凋本數
第 1 (フアヂユ+細菌)		6.2	60	9	1
第 2 (細菌)		4.2	60	48	30
第 3 (無接種)		6.0	60	0	0

考 察

松本、岡部兩氏(3)は本菌のバクテリオフアヂユを青枯病被害の蕃茄から分離しその各種性質を報告してゐる。著者は之を本菌の培養から分離し得た。即ちこの場合、該培養は實驗開始の當初から既にフアヂユを保有してゐたものと考へられる。

Bact. solanacearum に變異のある事は既に古くから知られてゐたところで、夫は HONING, SMITH 等(6)の報告を見てもわかる。而して中田(4)は本菌を 2 群に分けたが、その第 1 型は聚落不規則形で fluidal な質を有し、これはゼラチンを液化するもので、第 2 型は聚落圓形で、その質一様、ゼラチンを液化しないものである。岡部(5)も亦本菌は極めて多數の變異菌を生ずる旨を報告して居り、中田の所謂第 1 型と第 2 型とが被害植物中に混在し、感染の時期進むにつれ第 2 型が多くなることを認めた。而して兩氏共第 1 型は人工培養を行ふ間に第 2 型に變化することを報告してゐる。この點著者の實驗結果も亦之に一致するものである。而して著者の取扱つた 4, 5, 6 の 3 培養は上記第 1 型に極めて類似し恐らくは之に該當するものと認められるが、之等は何れもフアヂユを保有してゐるものであつた。且この 3 菌は培養中或は其他により第 2 型に該當する菌型に變ずるのを見たが、夫等はフアヂユ抵抗菌であると考へられる。

爰に於て、著者は此の不整形、不均質系の示す變異性はファグが共存する故に生じたものであると考へるものである。岡部(5)が培養基上に於て第2型より第1型の出現せざるを報じてゐるのは、この間の消息を物語つてゐるやに思はれる。ファグを有する4,5,6のみがゼラチンを液化したのは、本菌のゼラチン分解酵素が内生酵素であつて、ファグにより細菌體が崩壊せらるゝため酵素の作用が顯著に現はれるに因るのではあるまいか。

ファグを土壤に灌注すれば實驗的には蕃茄青枯病の發生を輕減し得たが、之を防除に利用するには溶菌作用の特異性の少ないファグを分離發見する事が先決問題だと思はれる。然し抵抗性菌の發現はその實用場面を狭くする惧がある。

摘 要

不整形で内容不均質、fluidalな聚落を作る *Bacterium solanacearum* の馬鈴薯煎汁培養を濾過し、この濾液を本菌の培養に添加する操作を反復して、本菌に作用する強力なバクテリオファグを分離し得た。このファグは細菌培養中で増加し、15回濾過の濾液は百億倍に稀釋してもなほ溶菌作用を呈した。6培養系統の本菌を用ひて試験したところ、このファグは之を分離するに用ひた系統にのみ作用した。

このファグを土壤に灌注すると、實驗的には蕃茄青枯病の發生を輕減し得た。

Bact. solanacearum には馬鈴薯寒天上に圓形・均質な聚落を作りゼラチンを液化せぬ系統と不整形・不均質・fluidalな聚落を作りゼラチンを液化する系統とがあり、後者はバクテリオファグを有してゐた。又、前者は後者の古い培養やファグ添加の培養に出現し、或は後者を接種した寄主植物體内でも出現した。そこで、著者は *Bact. solanacearum* のこの變異にはバクテリオファグが關係してゐるといふ考へに到達した。

引 用 文 獻

1. 河村榮吉：日本植物病理學會報；6, 87-88, 1936.
2. —：科學；7, 258, 1937.
3. MATSUMOTO, T. and OKABE, N.: Journ. Soc. Trop. Agric. 7; 7, 130-139, 1935.
4. 中田覺五郎：農學會報；294, 185-216, 1927.
5. 岡部徳夫：日本植物病理學會報；7, 95-104, 1937.
6. SMITH, E. F.: Bacteria in relation to plant diseases; 3, 193-258, 1914.

BACTERIOPHAGE OF *BACTERIUM SOLANACEARUM*

(Résumé)

Eikichi KAWAMURA

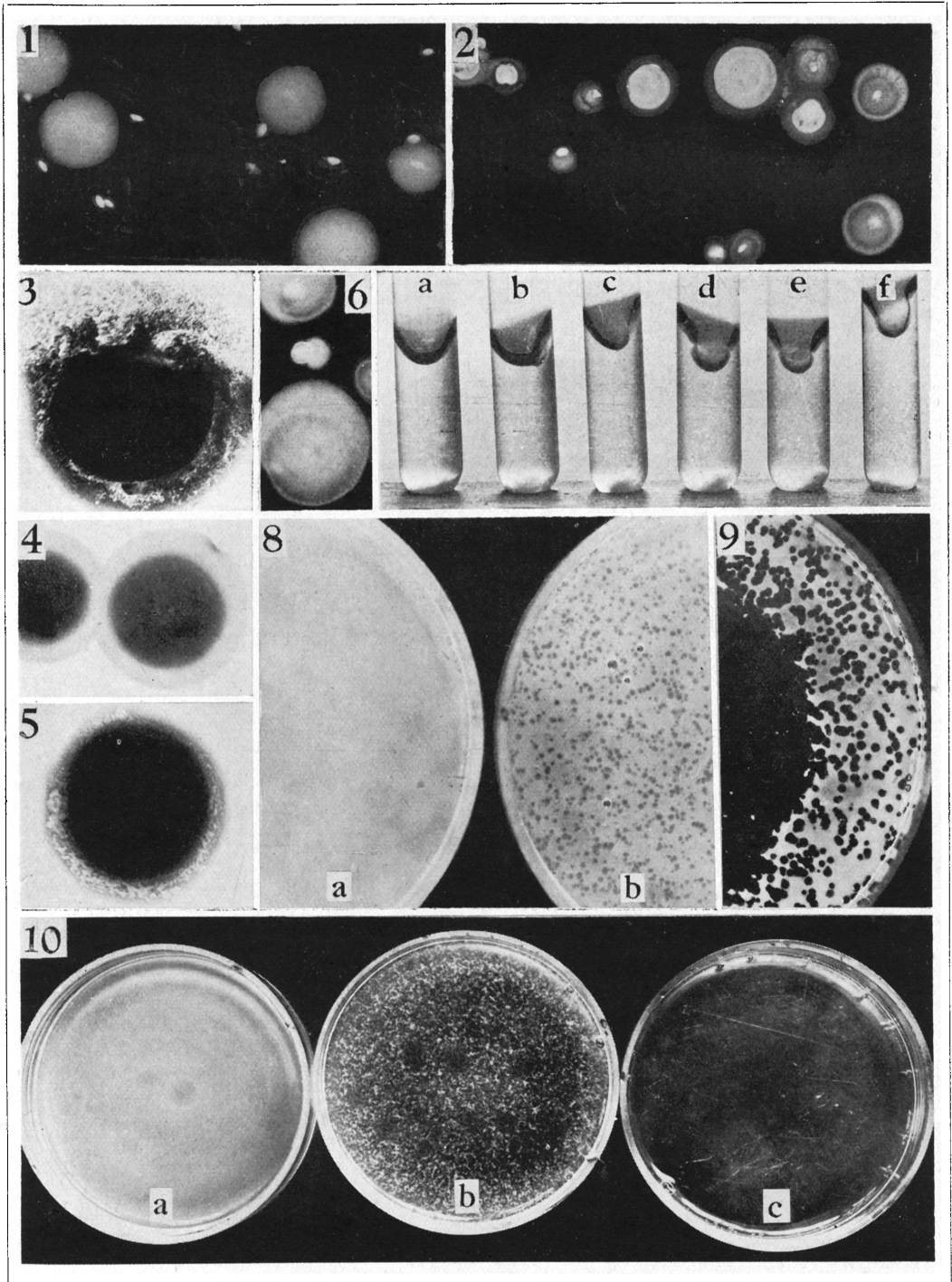
By successive filtration, a bacteriophage of high potency was isolated from a culture of *Bacterium solanacearum* in potato dextrose solution. The phage, judged from the number of plaques formed on agar plates, increased when added to the fresh bacterial culture, and after 15 filtrations inhibited the growth of the bacteria at dilution of 10^{-10} . In trials using six cultures of *Bact. solanacearum*, the phage affected only the culture of the organism from which it was isolated. Experimentally, tomato plants were protected from the bacterial wilt by adding the phage to the soil.

In the present studies the author recognized two distinct strains of *Bact. solanacearum*: one of them formed round and homogeneous colonies on potato agar and did not liquefy gelatine; whereas the other strain formed irregular, fluidal and non-homogeneous colonies and liquefied gelatine. The author demonstrated the presence of bacteriophages in the cultures of the latter. The occurrence of the homogeneous strain was observed in the old or phage-added cultures of the fluidal strain and also in the diseased lesion of tomato plants inoculated with the fluidal strain. From these experimental results the author pointed out that such fluidal strain as mentioned above may be a variation caused by the action of bacteriophage.

圖 版 說 明

Bact. solanacearum.

- 1—6: 馬鈴薯寒天扁平培養の聚落, 擴大, 3—5 は透過光線にて撮影。
 1: 培養 3, 2: 培養 4, 3: 培養 6, 4: 培養 3, 5—6: 培養 4。
 7: セラチン穿刺培養, a—c 液化なし, d—f 液化, a: 培養 1, b: 培養 2, c: 培養 3,
 d: 培養 4, e: 培養 5, f: 培養 6。
 8: 培養 4 の馬鈴薯寒天扁平培養, a: 細菌のみ, b: 16 回濾過の濾液を添加せるもの。
 9: 8 の b に同じ, 但し, 寒天表面にのみ菌苔を生ぜるもの。
 10: 培養 4 の馬鈴薯寒天扁平培養, a: 細菌のみ, b: 16 回濾過の濾液 1 滴を培養 1 cc に添加, c: 同上, 但し濾液 6 滴添加。



河 村 : バクテリオファグ
KAWAMURA : Bacteriophage