毛細管による細菌の氷核活性測定法とその応用

牧野孝宏*

Takahiro MAKINO*: Micropipette Method, A New Technique
for Detecting Ice-Nucleation Activity of
Bacteria and It's Application

Abstract

A new micropipette method was developed to determine the ice nucleation activity of bacterial cells. The micropipettes used for the experiments were the scaled capillary tubes (Drumond Scientific Co., USA). Deionized water could be overcooled lower than -20°C . Ordinary physical shock did not significantly influence on the freezing temperatures with slight deviations. Temperatures of the samples in micropipettes could be controlled easily and accurately. Difference was rarely detected between the temperatures of ethanol in cooling bath and water samples in micropipettes dipped in the former. Ice nucleation temperature, however, varied with the capacities of the micropipettes, showing higher value with the larger capacities. Positive correlation was observed between ice nucleation temperatures and logarithms of capacity with 0.93 or higher values of correlation coefficient. This method was compared with the procedure described by Vali. Ice nucleation temperatures by the present method showed small deviation (1 to 3% in CV). The present method was considered to be superior to other methods including Vali's method and its modifications. The ice nucleation activity of plant pathogenic bacteria was measured by the method. Isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* were very active and showed ice nucleation at -2.9°C in contrast to *P. marginalis* pv. *marginalis*, *P. s.* pv. *maculicola* and *P. s.* pv. *tabaci*. The other species of *Pseudomonas* showed no activity. No activity was also observed with follows: *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense*, *C. flaccumfaciens* pv. *oortii*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *E. herbicola*, *E. milletiae*, and *X. campestris* pv. *campestris*. Cultures of epiphytic bacteria isolated from *Actinidia chinensis*, *Cyclobalanopsis* spp., *Eriobotrya japonica*, *Ficus carica* and *Prunus avium* showed ice nucleation activity at -2.7 to -3.0°C . Deionized water in which plant buds were dipped for 3 days increased significantly ice nucleation activity due to bacteria. This method may be effective in detecting the active gemmisphere bacteria as ice nuclei.

(Received December 14, 1982)

Key Words: detection method, ice-nucleation, bacteria.

緒 言

一般に霜害は葉温の低下により葉表面の凝結水が凍結し、これが組織内部の凍結を誘発するために発生するとされている。最近、トウモロコシの葉表面に *Pseudomonas syringae* の一部の系統が多量に存在すると、霜による被害が著しく増加することが実験的に

明らかにされた¹⁾。これは葉表面で増殖した細菌が氷核として作用し、凝結水が高温で凍結するためと考えられている。このことから多くの植物の霜害の助長・決定要因のひとつとして、葉面細菌が氷核となること(氷核活性)が指摘されている^{1,3)}。

植物の霜害と細菌との関係を検討するうえで、細菌の氷核活性を迅速・正確に測定することは極めて重要

* 静岡県中遠病害虫防除所
Iwata 438, Japan

Chuen Plant Protection Office of Shizuoka Prefecture, Kawaramachi,

である。

細菌の氷核活性の測定には、Vali⁷⁾が報告した氷核の凍結温度を測定する方法が用いられているが、筆者は新たに毛細管を利用した正確簡便な方法を考案し、植物病原細菌、植物の新芽から分離された細菌および新芽の浸漬液を用いてこれらの氷核活性を測定し、若干の知見を得たので報告する。

本研究を行うにあたり、細菌の保存菌株の分譲ならびに、懇切なる御指導を賜った静岡大学農学部教授、後藤正夫先生、過分なる御指導を賜った静岡大学名誉教授、岡部徳夫先生に深く感謝申し上げる。

材料および方法

供試細菌 静岡大学農学部植物病理学教室保存菌株（植物病原細菌および非病原細菌）4属、12種36菌株、および次に述べる方法で、各種植物の新芽から分離した細菌5菌株を用いた。

新芽からの細菌の分離 a. 直接分離 各地の植物から、1980年5月に採取した新芽200mgを、それぞれ100mlの滅菌水中に混入し、よく振とうしたのち $10^5 \sim 10^6$ 倍に希釈し、寒天平板法により純粋培養菌株を得た。

b. 増菌分離 上記の方法で得た各植物の新芽200～500mgを約4mlの滅菌水中に投じ、植物栽培用蛍光灯(20W)または、室内間接光下において、25℃で培養増菌し、一定時間ごとに浸漬液の凍結温度を調べ、同時に希釈平板法により、純粋培養を得た。

培地 本文中にことわらないかぎり、次の培養基を使用した。細菌分離用および氷核活性測定用培地として、酵母エキス・ペプトン寒天培地（ペプトン10g、酵母エキス10g、ブドウ糖10g、寒天15g、蒸留水1l、pH6.8）を使用した。菌株保存用培地として、ジャガイモ・ペプトン寒天培地（ペプトン10g、栄研ポテト・デキストロース寒天39g、蒸留水1l、pH6.8）を使用した。

毛細管による氷核活性の測定法(毛細管法) a. 細菌浮遊液の氷核活性 供試した毛細管はドラモンド科学社製のマイクロピペットで、一定量の細菌浮遊液を吸入し、同液が封入時に高温にならないように15mm程度の空気層を先端部に残し、細い炎のガスバーナーで熔封した。必要とする精度に応じて、各被検液あたり、5～10本の試料を用意した。マイクロピペットの冷却はエタノールを使用して行い、ピペット内の液面がエタノールの面と一致するように挿入し、凍結状態を観察した。冷媒の温度は、毎分0.3～0.4℃の速

度で低下させ、温度分布が均一になるようにスターラーによって強くかくはんした。マイクロピペット内で凍結がおこった場合、体積は8.3%増加し液面の上昇がみられるので、これを肉眼で観察した。

b. 植物浸漬液の氷核活性 新芽の浸漬液はよく振とうし、30分間静置した。上清液をちりなどが入らないように吸入し、細菌浮遊液と同様に氷核活性を測定した。

水滴の凍結温度による氷核活性の測定(水滴法)

Lindow³⁾ら、Maki⁴⁾およびVali⁷⁾の報告した方法に準じて行った。1%パラフィン、キシロール溶液をアルミ箔の表面に散布し、さらに熱を加えて均一化した。この表面に被検液を、10μlずつ30箇所滴下した。アルミ箔はアルミニウム角材(100×100×200mm)上に密着させ、その間にポリエチレングリコールを拡げて熱伝導を良くした。さらに角材の冷媒上に露出した側部を、発泡スチロールでおおい、上部はアクリル板の覆いをして、温度分布の均一を図った。アルミ角材は、エタノールの冷媒中に3分の2(約14cm)程度浸漬して、毎分0.1～0.2℃程度の速度で温度を低下させた。温度は、アルミ角材上に埋めた、サーミスタ温度計により測定した。

実験結果

毛細管中の各種の水の過冷却度

蒸留水、純水、雨水、水道水を使って、毛細管(マイクロピペット10μl)中の、凍結温度を測定した結果をTable 1に示した。雨水並びに水道水は、顕微鏡観察により夾雑物の混入が認められたが、それらによる凍結温度への影響は少なく、すべて-20℃以上の過

Table 1. Freezing temperature of water samples holded in micropipette^{a)}

Sample	Freezing temperature ^{b)}			
	Experiment (I)		Experiment (II)	
	Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.
Distilled water	-21.9	0.43	-20.9	0.33
Deionized water	-23.7	0.17	—	—
Rain water	-23.3	0.15	-22.7	0.23
Tap water	-22.8	0.15	-22.0	0.45

a) Type 10LMBDA (cu. mm), capacity 10μl, made by Drumond Scientific Co., U.S.A.

b) Mean freezing temperature of the test samples and it's standard error (S.E.M.). Experiments were repeated twice using different samples except deionized water.

冷却状態を示した。

毛細管中の細菌浮遊液の容量と凍結温度

予備実験において氷核活性の異なることが明らかにされた *P. syringae* pv. *lisi* 2 菌株 (細菌濃度約 10^8 /ml) を用いて、毛細管中の細菌浮遊液の容量と凍結温度との関係を Fig. 1 に示した。容量が大きくなるに従って凍結温度は上昇する傾向がみられ、浮遊液の容量を対数にとると、凍結温度との間に高い相関関係が認められた。低温で凍結する細菌浮遊液では、高温で凍結するものに比べ、容量の増加によって、凍結温度が急激に上昇する傾向がみられた。

水滴法と毛細管法とによる細菌浮遊液の凍結温度の比較

細菌浮遊液の水滴法および毛細管法による凍結温度の測定結果を Table 2 に示した。各菌株とも測定方法による差はみられず同様な凍結温度が得られた。なお測定誤差は、毛細管を利用したほうが少なかった。

植物病原細菌および非病原細菌の凍結温度

ジャガイモ・ペプトン寒天培地に培養した *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, および *Xanthomonas* 属の細菌について、それぞれ毛細管法により氷核活性を測定し、Table 3 に示した。*P. syringae* 群のなかには氷核活性の高いものがみられた。

P. syringae pv. *lisi* は最も高く、*P. marginalis* pv. *marginalis*, *P. syringae* pv. *maculicola*, *P. syringae* pv. *tabaci*, には弱い氷核活性を示すものがみられた。しかしその他の供試菌株では、ほとんど氷核活性は認められなかった。*P. syringae* pv. *lisi* は、

Fig. 1. Relationship between ice nucleation temperature of *P. syringae* pv. *lisi* and the capacity (μ l) of test sample placed in a micropipette. Bacterial concentrations were approximately 10^5 cells/ μ l.

Table 2. Comparison between the methods employed for evaluating the ice nucleation activity of *P. syringae* pv. *lisi* and gemmisphere bacteria in droplets and micropipettes

Sample ^{a)}	Ice nucleation temperature ^{b)}							
	Experiment (I)				Experiment (II)			
	Mean	S. E. M.	Max.	Min.	Mean	S. E. M.	Max.	Min.
Micropipette (10 μ l) ^{c)} method								
Isolate 1)	-2.8	0.01	-2.7	-2.9	-2.8	0.01	-2.7	-2.9
2)	-2.3	0.01	-2.3	-2.4	-2.4	0.00	-2.4	-2.4
3)	-3.2	0.03	-3.1	-3.4	-3.2	0.03	-3.1	-3.4
Droplet (10 μ l) method								
Isolate 1)	-2.7	0.03	-2.6	-2.9	-2.8	0.04	-2.6	-3.0
2)	-2.6	0.05	-2.2	-2.8	-2.6	0.05	-2.4	-2.9
3)	-3.1	0.04	-2.9	-3.5	-3.5	0.13	-2.9	-4.4

a) Ice nucleation active bacteria, *P. syringae* pv. *lisi* (isolate 1) and gemmisphere bacteria isolated from *Prunus avium* (isolate 2) and *Ficus carica* (isolate 3), were used.

b) Mean freezing temperature of the test samples and its standard error (S.E.M.). Max. and Min. indicated the maximum and minimum freezing temperature. Experiments were repeated twice.

c) Type, 10LMBDA (cu. mm), made by Drumond Scientific Co., U.S.A.

Table 3. Ice-nucleating activity of plant pathogenic bacteria

Culture ^{a)}	Ice-nucleating temperature(C) ^{b)}	Culture ^{a)}	Ice-nucleating temperature(C) ^{b)}
<i>C. michiganense</i> pv. <i>michiganense</i>	-18.9	<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	- 7.8
<i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i>	-23.0	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	- 8.4
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	-16.5	<i>P. syringae</i> pv. <i>lisi</i>	- 2.9
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	-15.4	<i>P. syringae</i> pv. <i>theae</i>	-19.3
<i>E. herbicola</i>	-14.8	<i>P. syringae</i> pv. <i>theae</i>	-19.6
<i>E. herbicola</i>	-19.4	<i>X. campestris</i> pv. <i>begoniae</i>	-16.2
<i>E. herbicola</i>	-19.2	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	-18.6
<i>E. milletiae</i>	-15.7	<i>X. campestris</i> pv. <i>citri</i>	-14.8
<i>E. milletiae</i>	-16.3	<i>X. campestris</i> pv. <i>cucurbitae</i>	-20.0
<i>P. andropogonis</i>	-22.4	<i>X. campestris</i> pv. <i>nigromaculans</i>	-12.2
<i>P. andropogonis</i>	-19.0	<i>X. campestris</i> pv. <i>oryzae</i>	-22.3
<i>P. avenae</i>	-22.1	<i>X. campestris</i> pv. <i>pelargonii</i>	-22.2
<i>P. cissicola</i>	-18.7	<i>X. campestris</i> pv. <i>phormicola</i>	-21.0
<i>P. fluorescens</i>	-19.1	<i>X. campestris</i> pv. <i>physalidicola</i>	-16.1
<i>P. marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>	- 8.4	<i>X. campestris</i> pv. <i>pruni</i>	-19.3
<i>P. syringae</i> ^{c)}	-20.1	<i>X. campestris</i> pv. <i>tardicrescens</i>	-12.2
<i>P. syringae</i> ^{d)}	- 4.6	<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	-14.6
<i>P. syringae</i> ^{d)}	- 4.5	<i>X. campestris</i> pv. <i>vitians</i>	-19.3

a) Bacterial cultures obtained from the Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Shizuoka, Japan.

b) Mean freezing temperature of the test samples in micropipettes (10 μ l).
Bacterial concentrations were approx. 10⁵ cells/ μ l.

c) Isolate from *Photinia glabra*.

d) Isolates from Onion.

Table 4. Detection of the ice nucleation bacteria isolated from the surface of buds of various plants

Plant ^{a)}	Ice nucleation temperature ^{b)}					
	Bud-dipped water ^{c)}			Bacterial culture ^{d)}		
	Mean	S. E. M.	Max.	Mean	S. E. M.	Max.
<i>Actinidia chinensis</i>	- 5.1	0.43	- 3.7	- 3.0	0.03	- 2.9
<i>Cyclobalanopsis</i> spp.	- 3.2	0.06	- 3.0	- 3.0	0.02	- 3.0
<i>Diospyros kaki</i>	- 5.9	0.46	- 3.7	-10	—	-10
<i>Eriobotrya japonica</i>	- 2.7	0.02	- 2.6	- 3.0	0.03	- 2.9
<i>Ficus carica</i>	- 6.0	0.48	- 4.3	- 3.0	0.03	- 2.9
<i>Morus alba</i>	-10<	—	-10<	-10<	—	-10<
<i>Photinia glabra</i>	-10<	—	-10<	-10<	—	-10<
<i>Pisum sativum</i>	-10<	—	-10<	-10<	—	-10<
<i>Prunus avium</i>	- 3.1	0.15	- 2.6	- 3.0	0.04	- 2.7
<i>Prunus mume</i>	-10<	—	-10<	-10<	—	-10<
<i>Solanum tuberosum</i>	-10<	—	-10<	-10<	—	-10<

a) Buds were collected from several places in their sprouting times and kept in sterile polyethylene bags.

b) Temperature shows mean, standard error of mean (S.E.M.) and maximum (Max.) of the test samples frozen in micropipettes (10 μ l) except below -10C (-10<).

c) Two-hundred mg of the bud were dipped in 5 ml of sterile water, and incubated for 3 days at room temperature (25C).

d) Bacterial culture was isolated by dilution plate method from bud dipping water of each plant incubated by the methods mentioned above c). Bacterial concentration were approximately 10⁵ cells/ μ l.

継代培養によって氷核活性が低下する傾向がみられ、同一菌株でも氷核活性は一定ではなかった。

氷核活性細菌の分離

a. 希釈平板培養による方法

桜の新芽の洗浄液から、希釈平板培養によって、集落の形態および色調の異なる58菌株の純粋培養が得られた。これらを用いて蒸留水に懸濁して、毛細管法によって氷核活性を検定したところ、3菌株に活性がみられた。ビワ、イチヂク、アカガンからも同様にして、氷核活性の高い菌株が得られた。しかし、その分離頻度は高くなかった。中国サルナシ、カキ、ジャガイモ、アカメモチ、クワ、ウメ、エンドウからは、氷核活性の高い細菌は分離できなかった。

b. 新芽浸漬液の培養による方法

各植物の新芽浸漬液には、室温(25℃)で、室内光線下に静置すると、氷核活性の上昇がみられる場合があり、その結果を Table 4 に示した。氷核活性が上昇した植物は、ビワ、サクラ、イチヂク、中国サルナシ、アカガン、カキであるが、浸漬後3日で、最高温度-2.6~-4.3℃を示した。この浸漬液から、希釈平板培養によって、-3℃前後の氷核活性をもつ細菌が、純粋培養に近い状態で分離された。しかしカキからは分離されなかった。その他のジャガイモ、アカメモチ、クワ、ウメ、およびエンドウの浸漬液は、氷核活性が弱く、また氷核活性の高い細菌は分離できなかった。

考 察

一般に水は0℃で凍結するとされるが、純水をゆっくり冷却してゆくと、過冷却の状態が生じ、-40℃近くまで凍結しないことがある。これは純水中では、この温度まで安定な氷核が生成されないことによる²⁾。

Maki⁴⁾は、細菌の氷核活性の検定に、Vali⁷⁾が開発した水滴による方法を応用した。この方法は、容易に過冷却の状態がえられ、細菌の氷核活性の測定が可能である。水分活性⁵⁾の低下が無視でき、かつ容易に過冷却状態が得られる方法として、容量、管径、ガラスの質の一定した細管を用いる毛細管法を新たに開発した。毛細管の一種で、ドラモンド科学社製のマイクロピペット(商品名)と呼ばれる、5~10μl以上の容量の毛細管は、管径が0.2~0.5mm以上あり、平衡蒸気圧に対する曲率の影響は無視できるものと考えられる。蒸留水、精製水、雨水および水道水の凍結温度はすべて-20℃以下となり、氷核活性測定には充分で、均一な過冷却度が得られた。

種々の容量をもつ毛細管(マイクロピペット)に、氷核活性のある細菌を所定量吸入して、細菌浮遊液の容量と、凍結温度との関係を調べた結果、容量が大きくなるに従って凍結温度が上昇した。上昇の程度は氷核活性の低い細菌を吸入したものは大きく、氷核活性の高い細菌を吸入したものは小さかった。いずれも容量を対数にとると、直線的回帰が得られ、前者は $r=0.9612$ 、後者は $r=0.9379$ と高い相関関係が認められた。

Lindow⁸⁾が簡易的に使用している、アルミ箔を冷媒上に浮かばせて行う水滴法は、室温約20℃で実験すると、冷媒温度とアルミ箔上の水滴温度間に、1℃以上の温度差が生ずる(牧野、未発表)。また操作時の物理的衝撃の影響も大きいので、正確な氷核活性の測定には適当ではない。ただし、比較的大きな体積(100×100×200mm)をもつアルミニウム角材を用いて、測定部分を保冷すると、アルミニウム角材の表面と、小水滴の存在する空間との温度差はほとんどみられなくなる(牧野、未発表)。この方法を用いて、小水滴と毛細管中における氷核活性の高い細菌浮遊液の凍結温度を比較すると、両者間にほとんど差みられなかった。しかし測定誤差は、毛細管を利用したほうが小さく、優れていた。これは毛細管中の試料が、実験操作上の物理的衝撃に対して極めて安定であるためと考えられる。アルミニウム角材は、冷媒を用いて温度制御する場合、アルミ箔に比べて著しく熱容量が大きいいため、冷媒と測定面の温度間に、大きな緩和時間が生じ、迅速な温度制御は困難なことが多い。また測定面の温度を一定に保つのも、同じ理由でむずかしい。

しかし、毛細管を使用することにより、冷媒と毛細管内の試料との温度差は検出限界以下となり、しかも試料が速やかに所定温度に達するので、水滴法に比べて、温度制御は容易である。このように毛細管を利用する方法は、Valiの方法⁷⁾と同様に細菌の氷核活性の測定に利用できる。

現在までに報告された氷核活性細菌は、*E. herbiicola*^{3,6)}、*P. fluorescens* biotype G⁴⁾、*P. syringae*⁴⁾、*P. viridiflava*⁹⁾など特定の系統である。日本に存在する植物病原細菌には、*P. syringae*に属するものに氷核活性があり、特に*P. syringae* pv. *pisi*には、強い氷核活性が認められた。しかし*P. syringae*に属する細菌のすべてに強い氷核活性が認められるわけではなく、*P. syringae* pv. *tabaci*および*P. syringae* pv. *maculicola*は弱く、*P. syringae* pv. *theae*およびカナメモ4から分離された*P. syringae*には、全

く氷核活性が認められなかった。*P. marginalis* pv. *marginalis* と、*P. syringae* pv. *tabaci* は、トウモロコシの霜害を助長しなかったと報告されているが¹⁾、毛細管法による氷核活性は、 -8°C 前後と低かった。

細菌の氷核活性は、その表面構造に由来するとされている⁴⁾が、それがどのようなものと関連しているかは興味ある問題である。もし培養条件などを一定にすることによって、細菌固有の氷核活性が測定できれば、現場で必要とされる病原細菌の簡易分類への応用も考えられる。

新芽の時期になると、新芽 1g あたり、各種の細菌が、 10^7 個以上の密度で存在することが多い。一方氷核活性菌が、 $10^5/\text{g}$ 以下の低密度で存在し、しかもその特徴が十分把握できない場合には、希釈平板培養法によってこれを多数の他の細菌から区別することは、かなり困難となる。このような場合は、水中で約 3 日間培養して、氷核活性を -3°C 前後に上昇させたのち、希釈平板培養法によって容易に氷核活性細菌を分離することができる。このように浸漬増菌後分離する方法は、未知の氷核活性細菌の検出に利用できると思われる。また新芽を多量に使用すれば、浸漬液は特に培養しないでも、高い氷核活性を示すものがあるので、新芽における氷核活性細菌の菌量の調査に使用出

来るか否か、今後検討したい。

摘 要

筆者が考案したドラモンド社製毛細管を使った新しい氷核活性検定法を用いると、純水の凍結温度は、 -20°C 以下で、物理的衝撃による影響がなかった。また毛細管内試料の温度を容易に、また正確に制御でき、しかも冷媒温度と試料温度間に差がみられなかった。氷核形成温度と毛細管容積の間には 0.93 以上の相関関係がみられ、容積が大きいほど高温で凍結した。本法は偏差が小さく、氷核形成温度をより正確に測定できる点で、Vali らの方法よりすぐれていた。本法によって各種植物病原細菌保存菌株を調べたところ、*P. syringae* (ネギ斑点細菌病菌)、および *P. syringae* pv. *pisi* に強い氷核活性が認められた。しかし *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Xanthomonas* 属の各細菌には、ほとんど氷核活性が認められなかった。次に植物の芽から氷核活性の高い細菌を分離する方法を検討した。サクラ、中国サルナシ、アカガシ、ビワ、イチヂクの芽を滅菌水中に浸漬し、室内光線下で静置すると、1～3 日後に浸漬液の氷核活性が高まり、この浸漬液から平板培養法によって、容易に氷核活性の高い細菌を分離することができた。

引 用 文 献

1. Arny, D. C., Lindow, S. E. and Upper, C. D. (1976). Nature (London) 262: 282-284.
2. 小林禎作 (1980). 六花の美. サイエンス社, 東京. pp. 53.
3. Lindow, S. E., Arny, D. C. and Upper, C. D. (1978). Phytopathology 68: 523-527.
4. Maki, L. R., Galyan, E. L., Chang-Chien, M. M. and Caldwell, D. R. (1974). Appl. Microbiol. 28: 456-459.
5. 氷嶋伸也 (1980). 化学と生物 18: 593-600.
6. Paulin, J. P. and Luisetti, J. (1978). Proc. 4th. Int. Conf. Plant path. Bact., Angers. pp. 725-731.
7. Vali, G. (1971). J. Atmos. Sci. 28: 402-409.