Pseudomonas syringae pv. *mori* を捕食する プロトゾアの分離およびその二、三の性状

佐藤 守*

Mamoru SATO*: Isolation of protozoa feeding on *Pseudomonas syringae* pv. *mori* and its some characters

Abstract

A protozoa feeding on *Pseudomonas syringae* pv. *mori* was isolated from a subculture of the bacterial strain. The organisms formed plaques on culture of *P. s. mori* and the other bacteria including *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Some cultural conditions for plaque formation and the other properties of the organisms were also reported.

Key Words: *Pseudomonas syringae* pv. *mori*, protozoa, plaque.

植物病原細菌を捕食するプロトゾアについては、これまでいくつか報告があるが^{1,2,3,4)}、そのうちにはクワ縮葉細菌病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *mori* (以下 *P. s. mori* と略記) を捕食するものも報告されている³⁾。筆者は、これとは異なる種類とみなされ、またファージおよび *Bdellovibrio* 属細菌 (以下デロビブリオ) による溶菌斑に類似したものを形成する *P. s. mori* 捕食性プロトゾアを分離し、若干の性状を調べたのでその概要を報告する。本論文の校閲をいただいた蚕糸試験場病理部長石家達爾博士および桑病研究室長高橋幸吉博士、ご助言いただいた阿部芳彦技官、供試菌株の一部を分譲いただいた農業技術研究所病理科、長崎県果樹試験場森田昭氏の各位に厚くお礼申し上げる。

プロトゾアによる溶菌斑とその性状

P. s. mori S 6805 株を指示菌としてファージの実験中、1週間以上経過した平板培養に白濁した不透明な溶菌斑が多数観察された。この溶菌斑に白金耳を触れ、*P. s. mori* S 6805 細胞懸濁液約 1 ml 中に入れ、それを約 10 ml の YPDA 培地 (酵母粉末 3 g, ペプトン 6.6 g, グルコース 3 g, 寒天 6 g, 蒸留水 1 l) とともに 25°C で平板培養を行った。その結果、培養 2 日後にやや不整形の直径約 1~2 mm の比較的透明な溶菌

斑が多数出現し、その後拡大したが、次第に不透明となり、1週間後には発見当初と同様な白い不透明な溶菌斑へ変化した (Fig. 1)。

溶菌斑の形成に関与する因子を明らかにするため、培養数日後の溶菌斑部をかきとり、検鏡すると、直径

Fig. 1. Plaques formed by the protozoa feeding on *Pseudomonas syringae* pv. *mori* S 6805 (A) and *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Ku-12 (B) at 25°C for 3 days.

* 農林水産省蚕糸試験場 The Sericultural Experiment Station, Yatabe, Ibaraki 305, Japan

1) 日野 巖 (1926). 農学会報 289: 517-527. 2) 日野 巖 (1926). 同上 289: 528-538. 3) Singh, B. N. (1942). Ann. Appl Biol. 29: 528-538. 4) Singh, B. N. (1948). J. Gen. Microbiol. 2: 89-96.

Fig. 2. Cysts (A) and trophozoites (B, C) of the protozoa feeding on *Pseudomonas syringae* pv. *mori* stained by Wright-Giemsa method.⁵⁾
Bar represents 10 μ m.

5~6 μ m (平均5.3 μ m) の多数の球形体が観察された。つぎに、培地全面に溶菌をおこさせた平板培養 (3日間) にブイオン液を加えて懸濁液をつくり、適当な濃度に希釈して2分し、その一方は、そのまま、他方はミリポアフィルター (0.45 μ m) でろ過し、それぞれの液の0.1 mlを指示菌株 S 6805 懸濁液とともに、平板培養 (25 C) し、培養3日後に溶菌斑形成の有無を調べた。また、同時に供試液中の球形体数をトーマの血球計算盤を用いて測定した。

その結果、ミリポアフィルターろ過液を添加培養したものでは、培地上に溶菌斑はまったく観察されなかった (供試液中にも球形体は発見されない) のに対し、無処理液を用いた培地上には溶菌斑が形成され、その数は供試液中に観察された球形体数とほぼ完全に一致した。以上の結果から、溶菌斑形成に関与したものは球形体であることが推定された。

培養2~3日後の溶菌斑の一部をとり観察すると、多数の球形体に混じって10~15 μ mの大きさのアメーバ状 (リマックス型あるいはプロテウス型⁵⁾) に変形しながら運動している少数の微生物が観察された。球形体およびアメーバ状のものをライト・ギムザ二重染

色⁶⁾を行うと、前者は染色されなかった (Fig. 2, A)。このことは、この球形体が *Leptomyxa* sp. の包のう体にみられるように⁷⁾、色素分子の侵入を阻げる厚い皮膜におおわれているためと考えられる。一方、後者では、核および顆粒が染色され (Fig. 2, B)、一部には分裂期~包のう体形成期に相当するとみなされる2~4核のものがみられた (Fig. 2, C)。以上のように単一溶菌斑に両形態のものが観察されること、および両者にみられる染色性の差異などから、この微生物は、プロトゾアの根足虫類に属し、アメーバ状のものはその栄養型であり、球形体はその包のう体であると判断した。なお、Singh³⁾ が *P. s. mori* をも捕食すると記載した *Leptomyxa reticulata* は、栄養型の大きさが最長3mmに達するものもみられ、大型であること、運動形態がラジオーサ型とみなされること、溶菌斑形成の記載がないことなど、著者の観察したものと異なる点が多い。したがって、著者の分離したプロトゾアは、Singh³⁾ の発表したものと別種と考えてよからう。その分類については今後検討する。

溶菌斑形成条件

このプロトゾアは溶菌斑を形成するため、これが供

5) 太田次郎 (1970). アメーバ. 日本放送協会, 東京. pp. 16-18.
pp. 301-302. 7) 阿部芳彦 (1978). 日蚕雑 47: 421-426.

6) 佐野 豊 (1972). 組織学研究法. 南山堂, 東京.

Table 1. Relationship between age of indicator bacteria and plaque formation by a protozoa

Bacterial age (Days of culturing)	1	3	7	13	20	30	AC ^{a)}
No. of plaques	127	115	120	128	+ ^{b)}	+	0
Days for plaque formation	2	2	3	3	4	4	—

a) Autoclaved bacterial cell at concentration of 10^{10} /ml

b) Plaques appeared indistinctly

Table 2. Effect of concentration of indicator bacteria on plaque formation by a protozoa

Concentration of indicator bacteria	Days for plaque formation	No. of plaques	Diameter of plaques
10^{10} /ml	2	54	ca. 4 mm
10^9	2	42	2.5
10^8	2	15	1-2
10^7	— ^{a)}	—	—
10^6	—	—	—

a) Plaques were not observed.

試菌に混在すると、ファージあるいはデロビブリオの実験に支障をきたすので溶菌斑形成条件について検討した。調査した条件は、供試指示菌の培養日数、細菌懸濁液の濃度、および培養温度である。いずれの実験においても、とくに断わらない限り指示菌としては S 6805 株 (25°C, 1 日の培養菌体, 約 10^9 /ml 懸濁液) を、培地には YPDA を用いた。

指示菌の培養日数：それぞれ培養日数を異にした (1~30 日) 生菌ならびに死菌 (10^{10} /ml 濃度の指示菌懸濁液を高圧蒸気殺菌) を用い、この懸濁液 1ml に適宜の濃度に希釈したプロトゾア液 (後述の純粋分離法によって得たもの) 0.1ml を加え、約 10ml の培地とともに 25°C で平板培養し、10 日間以上にわたり溶菌斑の数および形成に要する日数を調べた。その結果、Table 1 に示すように、培養 1~3 日の生菌を用いた場合培養 2 日後には溶菌斑が形成されたのに対し、他の区では溶菌斑形成日数が 3~4 日を必要とし、また 20 日以上培養生菌を用いた場合には溶菌斑も不明瞭となった。一方、死菌ではまったく溶菌斑の形成はみられなかった。

指示菌の懸濁液濃度：Table 2 に示すような 10^{10} ~ 10^6 /ml の 10 倍希釈指示菌液を調製し、それぞれに前述のようにプロトゾア液を加えて培養した。その結果、Table 2 に示すように指示菌の懸濁液濃度が 10^7 /

ml 以下の場合には、溶菌斑の形成はみられなかったが、 10^8 /ml 以上ではいずれも培養 2 日後に溶菌斑が形成された。高濃度ほど大きな溶菌斑が形成され、 10^{10} /ml では溶菌斑の平均直径が約 4mm にも達した。また溶菌斑数も 10^8 /ml 区以上の濃度区で多かった。

培養温度：指示菌懸濁液にプロトゾア液を加え、5, 10, 15, 20, 25, 30 および 35°C の各温度で 10 日間以上平板培養し、溶菌斑の形成を観察した。その結果、10°C 以下および 35°C では溶菌斑の形成は認められず、15~30°C で形成がみられ、とくに 25°C において 2 日で多くの溶菌斑が形成された。溶菌斑が形成されていない場合、培地をかきとり、検鏡したが球形体は観察されず、また溶菌斑形成に伴う異臭も認められなかった。

以上の結果をファージ⁸⁾あるいはデロビブリオ⁹⁾との溶菌斑形成条件と比較すると、ファージの場合とは異なる点が多い。すなわち、ファージにおいては、その溶菌斑形成日数は通常 1 日以内であり、高い指示菌濃度 (10^{10} /ml) あるいは古い培養菌では溶菌斑の形成が認められず、認められる場合でも少数であるが、低温 (5°C) でも溶菌斑は形成される。一方、デロビブリオの場合には溶菌斑が 2~4 日で形成されること、その形状が不整形になるなどプロトゾアとの類似点が多い。しかし、プロトゾアによる溶菌斑が異臭を伴な

8) 佐藤 守 (1975). 蚕糸研究 93: 47-54. 9) 植松 勉・脇本 哲 (1970). 植物防疫 24: 7-12.

う点で他二者の溶菌斑とは異なっている。

プロトゾアの純粋分離とそれによる各種細菌の捕食

プロトゾアの捕食細菌の範囲を決定するためには、それを純粋分離した上で実験する必要がある。そのため4種の抗生物質（ペニシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール）および *Nosema heliothidis* など一部のプロトゾアに殺滅効果を示すベノミル剤¹⁰⁾を用いて、これらの薬剤に対する両者の感受性の差異によって純粋分離を行うこととした。濃度100および1,000ppmの各薬剤水溶液10mlにプロトゾアおよび *P. s. mori* を含む供試液0.1mlを加え、室温に1時間保った。その後、遠心分離して沈殿物を洗い、蒸留水に再浮遊させた。細菌の生死についてはキングB培地上における生育の有無で、プロトゾアの生死については指示菌との混合平板培養法により調べた。その結果、プロトゾアは、5供試薬剤すべてに耐性を示した。*P. s. mori* は、カナマイシンおよびテトラサイクリン1,000ppmおよび100ppmでも完全に殺菌された。したがって、この2つの抗生物質のどちらかを懸濁液に加えると、容易に *P. s. mori* を除去でき、プロトゾアの純粋分離が可能ながことが明らかになった。

つぎに、カナマイシン処理により純粋分離したプロトゾアを用いて、各種植物病原細菌に対する捕食作用を平板培養法によって調べた。その結果、*P. s. mori*

の全菌株（26株）を捕食したのを始め、*P. s. eriobotryae* (3株)、*P. s. lachrimans* (2株)、*P. s. phaseolicola* (3株)、*P. marginalis* pv. *marginalis* (2株)、*P. solanacearum* (1株)、*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (クワ枝軟腐病菌8株)、*Xanthomonas campestris* pv. *citri* (3株)、*Klebsiella* sp. (クワ立枯症株からの分離菌)、*Pseudomonas* sp. (クワに根腐れ症状をおこす未同定菌)の各種細菌に対し溶菌斑を形成した。とくに *E. c. carotovora* Ku 16株では大きな溶菌斑が形成された (Fig. 1, B)。一方、溶菌斑が認められなかった菌種は、*P. cichorii* (1株)のほか、前述の細菌種の一部の菌株 *P. solanacearum* (2株) および *E. c. carotovora* (11株) であった。本実験の範囲では結論できないが、分離されたプロトゾアは、比較的広範囲の細菌種を捕食するものと考えられる。

以上のように、植物病原細菌の継代培養中に溶菌斑を形成するプロトゾアが検出されたことから、今後、ファージ、デロビブリオの実験を行うにあたり、このプロトゾアの混入に注意する必要がある。また、これまで研究蓄積の極めて少ないとされる植物細菌病の生物的防除へのプロトゾアの利用^{2,11)}についても今後、土壤等に棲息するプロトゾアも含めて検討する必要がある。

(1981年12月11日受理)

10) Brooks, W. M., Granford, J. D. and Pearce, L. W. (1978). J. Invertebr. Pathol. 31: 239-245.

11) 脇本哲 (1973). 農及園 48: 251-256.