

生物の種類によつて著しく相違する事、還元糖生成の最適 pH は粘度低下の夫と異つてゐる事、實驗に用いた 2 菌種の場合では粘度低下及 protopectinase の最適 pH が近接してゐる事が分る。

(4) 要 約 基質を調製する時抽出時の pH を低下せしめる事によつて或る程度ウロン酸の含量を高める事が出来たがアラバン含有量を著しく低くする事は出来なかつた。

pectinase に粘度低下の著しいものと還元糖生

成の顯著なもの二種存在するようであり前者の protopectinase 作用は平行するようである。

終に本實驗で懇切な御指導を賜つた片桐先生に深謝する。

## 文 献

- 1) F. R. Davison and J. J. Willaman, Bot. Gaz. 83(1927) 329 2) H. Colin et A. Chandun, C. R. Acad. Sci. 202(1936) 973 3) Z. I. Kertesz, J. Am. Chem. Soc. 61(1939) 2544

# 拮抗微生物利用による作物病害防除の研究

## 第 1 報 トマト青枯病菌 *Bact. solanacearum* に對し

### 拮抗作用を有する放射狀菌に就て

西門義一・大島俊市\*・石井 博・森田日出男

1. 緒 言 微生物の拮抗作用に關する研究は古くから行はれた所で、既に 1877 年パスツールは「或る一定の細菌の發育は他の種類の存在によつて阻止せられる事」を發見してゐる。拮抗微生物を應用して顯著な効果を擧げたものとしては醫學に於るペニシリンがある。植物病理學に於ても多くの研究者によつて取扱はれて居り、本邦にては日野、遠藤氏等の研究がある。

筆者等は拮抗微生物を利用して植物病害を防除する事について研究を行つて居るのであるが茲に報告するものは、トマト青枯病菌(煙草立枯病菌) *Bacterium solanacearum* E. F. Smith に對し、強い拮抗作用を示す四種の放射狀菌に就ての實驗結果である。未だ研究の日淺く、粗漏の点が多いが、不充分の所は今後の研究に俟つ事として、一應取纏めた次第である。

こゝで、微生物の拮抗作用について筆者等の考へを述べて置きたいと思ふ。

一般に或る微生物が、他の種類の微生物が存在乃至發育する事によつて致死、又は發育を阻害せられる作用を微生物拮抗作用と謂ふ。この微生物拮抗現象の原因としては多くの因子があるものと思はれるが、(1) 拮抗微生物によつて pH が變化する場合、(2) 栄養分を獨占する場

合、(3) 拮抗微生物が旺盛に發育して、他を凌駕する場合、(4) 毒素を生産する場合、等が擧げられる。筆者等はこれ等を區別して、毒素形成に由る場合を狹義の拮抗作用とし、その他の場合をも含めて一般的拮抗作用を廣義のものとして考へ、毒素形成による狹義の拮抗作用を、研究の目的とした。従つて筆者等の謂ふ微生物拮抗作用は「或る微生物が、他の種類の微生物の存在乃至發育によつて生産される毒素の爲に、致死又は發育を阻害せられる作用」と謂はねばならない。この毒素は、普通抗菌物質と呼ばれて居り、筆者等も之を襲用する。

本研究の費用は文部省自然科學試驗研究費で支辨された。記して深甚の謝意を表する。

## 2. 拮抗微生物の選出

### (1) 供試材料

(病原菌) トマト青枯病菌(煙草立枯病菌) *Bacterium solanacearum* E. F. Smith をトマト及び煙草被害株から分離し、病原性を確認したものを牛乳培養基に培養保存し、實驗に供した。

(放射狀菌) 大原農業研究所植物病理部所藏の菌株及び土壤、堆肥等より分離したものの合計 11 種類を用ひた。放射狀菌以外の微生物(細菌糸狀菌酵母等)についても實驗を行つたが、

\* 専賣局岡山煙草試驗場技官、本報告の遂行並に發表について好意を示された石戸谷場長に謝意を表する。

茲では省略する。

(2) 實驗方法 拮抗微生物を寒天上に培養するに、抗菌物質が生産され、聚落の周圍に擴散される。次で病原菌を、同寒天培養基に植付ければ、抗菌物質の擴散されてゐない部分だけに發育して聚落の周圍は發育せず、透明な部分を生ずる。この部分を、阻止帶 The Zone of Inhibition と謂ふ。この方法を筆者等は平面培養法と呼び、拮抗微生物の選出に用いてゐる。筆者等の常用する方法を述べるに次の如くである。

(平面培養法) 選出用培養基は馬鈴薯 350g. 蒸溜水100cc. 緩衝液として、0.2M NaOH 245.2cc. 0.2M.  $KH_2PO_4$  415.0cc に寒天20%を加へpH. 7.0とする。其シャーレは内徑 7cm 底面平坦な白色のものである。

殺菌シャーレに選出用培養基1ccを流して平面とし、中央に供試微生物を移植し 30°C に3日培養する。供試菌が 30°C で發育不良であれば適宜培養温度を変更する。聚落が充分發達したものは取出して病原菌を流す。即ち、Bact. solanacearum の殺菌水懸濁液を作り少量を寒天上に注加して、シャーレを徐々に傾けて、基面一様に病菌を附着させる。餘分の水はシャーレを開けて素早く捨てる。病菌を流し終つたものは 30°C の定温器に3日間保ち、阻止帶の形成を調べる。阻止帶形成の有無によつて、拮抗作用を有するか否かが判り、阻止帶の幅さ、聚落の大きさを測定する事によつて作用の強さを大體知る事が出来る。

實驗上、最も注意すべき事は、雜菌の侵入防止である。特に病菌を流して、餘分の水を除く際、雜菌が侵入する事が多い。病菌の懸濁液はその懸濁度があまり濃いと寒天上に發育して生ずる病菌聚落帶(白濁不透明の部分)が淡くなるから、少々淡い方がよい。又供試微生物が孢子を形成し、且つ發育の速いものでは、病菌を流す際に孢子が四散して、小聚落を散生する。この場合は孢子聚落發育する以前に出来るだけ早く、阻止帶を観察する様にし、若し出来なかつた場合は、次の様にする。即ち病菌懸濁液は少しく多量に用意し、これをシャーレの一侧から手早く流し込み、反對側が低くなる様シャーレを傾けて、懸濁液を集めて捨てる。斯うするに、病菌を注加した側に於ては孢子聚落の形成なく、阻止帶を測定し得る。

(3) 實驗結果 供試微生物中、四種の放射狀菌が明瞭な阻止帶を形成した。その測定結果は第1表の如くである。

第1表 Bact. solanacearum に對する拮抗放射狀菌の阻止帶形成

放射狀菌株	聚落直徑	阻止帶の幅
No. 1091	8.0mm	5.0mm
1141	11.0	8.0
1154	6.0	5.0
1166	8.0	14.5

平面培養法に於て示される阻止帶の大きさは大體に於てその菌株の拮抗作用の強さを示す。然

第2表 4種の拮抗放射狀菌の細菌類に對する作用

細菌名	放射狀菌株			
	No. 1091	1141	1154	1166
Bact. solanacearum	+	+	+	+
Bac. subtilis	-	-	+	+
Bac. coli communis	-	+	+	+
Staphylococcus pyogenes aureus	+	+	+	+
Staphyloc. pyogenes albus	+	+	+	+
Bac. typhi	-	+	-	+
Bac. tuberculosis t. gallinaceus	+	+	+	+
Bac. tuberculosis t. humanus	+	+	+	+
Bact. sp. No. 1209	+	+	+	+

(註) +印は作用有、-印は作用せずの意

し乍ら、之に依つてのみ、拮抗菌の優劣を決定する事は出来ない。何さなれば、この實驗法は全ての供試菌株を同一條件で培養するのであつて、各菌株について最適のものではないからである。更に筆者等は、4種の拮抗放射状菌の他の細菌に対する作用の有無について、實驗を行ひ、興味ある結果を得た。第2表に示す如くである。

第2表の結果によれば、細菌に対する作用から、No. 1091, 1154 と 1141 及び 1166 は夫々相似たものであるが、全然同じではない様である。

この實驗によつて得た4種の放射状菌を今後の研究対象として採用した。

### 3. 拮抗放射状菌とその抗菌物質

4種の拮抗放射状菌の形態生理及びその抗菌物質について、現在迄に知り得た事を簡単に述べれば次の如くである。

No. 1091. 寒天上に白色～黄白色、粉狀、稍々隆起した聚落を形成、僅かに褐色色素を生産する。胞子豊富、基中菌糸形成良好であるアイオン寒天、グリセリン、アンモニウム寒天、馬鈴薯寒天によく發育する。炭素源は葡萄糖、麥芽糖が好適で蔗糖は不良である。發育適温24～26°C、最適 pH 7.0 液體培養基によく發育し、液面に隆起した聚落を密生し、液中に菌糸塊を形成する。本菌株の抗菌物質は培養液中にも含まれるが、菌體內に多量に含有され Endotoxin と考へられる。液に含まれるものは活性炭に吸着せしめ、菌體は粉末として、アセトンに溶出し、エーテルに轉溶して抽出し得る。熱に安定で 100°C 3 時間濕熱で破壊されない。

No. 1141. 寒天上に灰白色、粉狀の黴のある聚落を形成、暗褐色水溶性色素を生産する。馬

鈴薯寒天、アイオン寒天、チャベツク氏寒天、グリセリン、アンモニウム寒天等に發育良好、胞子豊富、馬鈴薯圓筒、米粒等を軟化する。發育適温 38°C 最適 pH 7.0 液體培養基に發育良好で、液面に菌苔を密生する。本菌株の抗菌物質は培養液に含まれ、熱に不安定で 90°C 10 分で破壊される。

No. 1154. 寒天上に白色～桃赤色粉狀の稍隆起した聚落を形成、水溶性色素は產生しない。各種の培養基に發育良好で、基中菌糸豊富、胞子形成良好である。炭素源としては蔗糖を好適とし、葡萄糖は不良である。發育適温 30—35°C 最適 pH 7.0 本菌株は水に不溶の赤色色素を形成し、色素はメタノール、エチルアルコール、クロロフォルム、キシロール、トルオールに溶解し、水、エーテル、石油ベンジン、ベンゾールに不溶性である。抗菌物質は培養液及び菌體に含まれ、酸性水によつて溶出し、アセトンを加へるに沈澱する。熱に比較的安定で 100°C 1 時間の濕熱で破壊されない。

No. 1166. 寒天上に白色粉狀、黴のある聚落を形成し、暗褐色水溶性色素を生産する。各種の培養基に發育良好で、發育適温 33～36°C 最適 pH 7.0 液體培養に於て液面に聚落を密生して、液中に菌糸塊を形成する。抗菌物質は培養液中に含まれ熱に不安定で 100°C 10 分で破壊せられる。本菌株は、No. 1141 に似るも、馬鈴薯米粒を軟化しない。

合成培養基、拮抗放射状菌の各々について培養基成分と發育の關係を實驗し、夫々について適當な合成培養基を決定した。即ち第3表に示す如くである。

放射状菌の發育に不可欠なものは N, C, 及び P であり K, Fe, Mg, 及び Na<sup>+</sup> 等は之に次ぐ、炭素源は No. 1154 菌は蔗糖を最適とするが他

第3表 拮抗放射状菌の培養基成分

菌株番號	NaNO <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	KCl	FeSO <sub>4</sub>	Glucose	Sucrase	Pepton
1091	2.0	1.0	0.5	0.5	0.1	20	—	5.0
1141	2.0	1.0	0.5	0.5	0.1	20	—	5.0
1154	2.0	1.0	0.5	0.5	0.1	—	20	5.0
1166	2.0	1.0	0.5	0.5	0.1	20	—	2.5

(註) 單位 g. 蒸溜水 1000cc pH 7.0

の3株は葡萄菌が好適である。Peptonを加へるに、發育が著しく旺盛になる。

#### 4. 抗菌物質の檢定及び測定法

抗菌物質の檢定法は種々あり、ペニシリンについては、カップ法、又は稀釋法が用ひられてゐる様である。筆者等は、殺菌濾紙に抗菌物質液を含めて細菌混合寒天平面上に置き阻止帯を形成させる方法、即ち Paper method を用ひた。

[Paper method]

(1) 實驗材料 (測定用濾紙) 東洋濾紙株式会社製 No. 2 を直径 6.0mm の小圓形に載り、殺菌する。濾紙に鉛筆で小く、番號又は符號等を記したものを作つて置くに便利である。小型シャーレに貯へる。

(培養基) 次の如き組成のブイオン寒天を用ひる。

肉	エキス	10.0g
ペ	プトン	10.0
食	塩	5.0
緩	衝液	(選出用培養基に同じ)
蒸	溜水	1000cc. pH=7.0

(測定用シャーレ) 内径 7.0cm 底面平滑白色のもの

(測定用細菌) Bacterium sp. No. 1209. 本細菌は測定に供する爲、筆者等の分離した桿菌の一種である。芽胞を形成せず、ブイオン寒天上に光澤ある薄い聚落を形成する。馬鈴薯寒天に發育せず、寒天上では10日前後で生活力を失ふ。發育の適温 30~36°C. pH は弱アルカリを好適とする。本菌は4種の拮抗放射状菌の抗菌物質に鋭敏で且發育頗る速で 30~36°C に數時間で寒天上に聚落を認める。

(2) 實驗方法 測定用細菌 No. 1209 を混じた測定用培養基 10cc を常法の如く、シャーレに流して平面とする。次に被檢液を取り出し、無菌操作によりピンセットで濾紙を抜き、被檢液に浸す。濾紙を液から上げ、餘分の水を試験管壁で去り寒天平面上に置く。濾紙に番號ある場合は番號を被檢液との關係を記録して置く。終れば、シャーレは 36°C~40°C の定温器に保つ。濾紙に含まれた抗菌物質は濾紙から寒天に擴散し、圓形に阻止帯を形成する。40°C に於ては 5~7 時間で阻止帯を測定する事が出来る。従つて、雑菌の侵入を受けても、雑菌の聚落を認め

る以前に、測定を終る事が出来る。

#### (3) 實驗上の注意

(a) 濾紙は小型シャーレに入れ、更に中型シャーレに入れて殺菌し、使用しない時は清潔な容器に保管し、吸濕や雑菌侵入の無い様にする。

(b) 測定用細菌 No. 1209 は1週間毎に新しいブイオンに植え替へて死滅せしめない事又、雑菌の侵入を受けた場合は、その好温性な發育速度を利用して、液體培養繼續法で純粹にする事が出来る。

(c) 測定用培養基の pH は正確に保たねばならない。酸性になつた場合は細菌は發育に時間を要し、且阻止帯の大きさは變化する。

(d) シャーレに寒天を流して平面とする時は寒天層が一様になる様にする事。

(e) 濾紙に過剰の被檢液を含ませるに阻止帯が過大に現れ、又不規則形となるから注意する。

(f) シャーレを定温器内に保つた場合は通常倒置しない。

(g) 阻止帯の周縁が輪狀に濃く現れる場合がある。培養時間が長かつた場合は往々認められる。之は阻止帯周縁に於て酸素の供給が良い爲、測定用細菌の發育層(通常寒天面の直下、寒天層の中央上部にある)がシャーレ底面に曲つて出来る爲である。寒天層を厚く作り、阻止帯を形成せしめて、縦断面を作つてみれば、その立體的狀態を理解する事が出来る。

(h) 被檢液は抗菌物質以外の細菌に對して阻止作用を示す物質を含まぬ事、若し含有する場合は、その物質の阻止帯を測定し、誤差を以て計算する事。

(i) 被檢液の pH は中性とし、著しく酸性又はアルカリ性に偏せしめない事。

(j) 被檢液は出来るだけ無菌とする事、但し完全無菌でなくても測定し得る。

(k) 被檢物が固體の場合は、濾紙を用ひずそのまま、寒天上に置く、この場合は抗菌物質の存否のみを知り得て、その測定は行ひ得ない

(l) 阻止帯を保存するには、少量の脱脂綿にフォルマリンを浸ませて入れ、シャーレを倒置して置く。

## 5. 摘 要

(1) 本報告はトマト青枯病菌(煙草立枯病菌) *Bacterium solanacearum* E. F. Smith に対し、拮抗作用を有する4種の放射状菌について、その選出法、性質、抗菌物質とその測定法について述べたものである。

(2) 拮抗菌の選出には、供試菌を平面培養しその周囲に病菌を流して、阻止帯を形成せしめる、所謂平面培養法を用いた。その結果、No. 1091, 1141, 1154, 1166 の4種の拮抗放射状菌を得た。

(3) No. 1091 白色粉状の聚落を形成、24~26°C pH. 7.0 にて發育良好、抗菌物質は培養液及び菌體に含まれ、アセトンに溶出し、エーテルに轉溶して抽出することが出来る。熱に安定である。

(4) No. 1141 灰白色粉状、水溶性暗褐色色素を形成す。38°C pH. 7.0 にて發育良好、抗菌物質は培養液中に含まれ、熱に不安定。

(5) No. 1154 白色~桃赤色、粉状、赤色色素を産生し、之は水、エーテル、石油ベンジン等に不溶で、アルコール、クロロフォルム、トルオール等に溶解する。30~36°C pH 7.0 で發育良好、炭素源に葡萄糖を用ひては發育不良で蔗糖は良好である。抗菌物質は培養液及び菌體に含まれ、アルカリ性メタノールに溶出し、アセトンを加へて沈澱せしめて抽出し得る。熱に比較的安定である。

(6) No. 1166 形態は No. 1141 に似るも、馬鈴薯、米粒を軟化分解しない。33~36°C pH 7.0 にて發育良好、抗菌物質は培養液に含まれ、熱に不安定である。

(7) *Bact. solanacearum* の他、各種の細菌類(葡萄状球菌、チフス菌、結核菌、枯草菌、大腸菌) に対する拮抗作用を實驗した。

(8) 合成培養基として、 $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{FeSO}_4$ , Glucose, Sucrose, Pepton. を用ひ、各菌株最適の量を決定した。

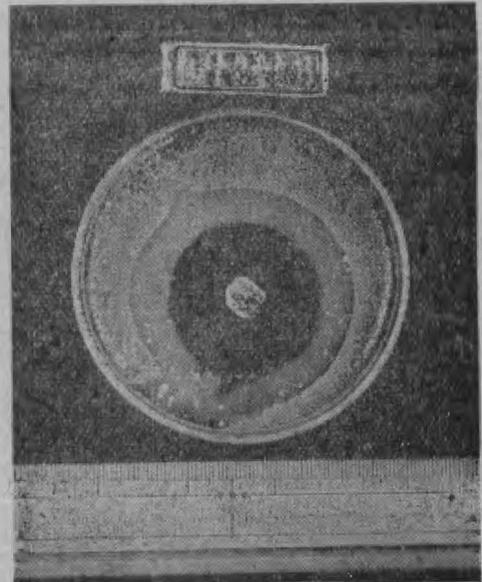
(9) 抗菌物質の檢定及び測定法として Paper method を用ひた。即ち徑6mmの小圓形濾紙に被檢液を浸ませ、測定用細菌 No. 1209 を混じたブイオン寒天平面上に置き、38~40°C に5~7時間保つて阻止帯の大きさを測る。No. 1209 は

筆者等の分離した測定用細菌で、芽胞を有しない桿状菌で、抗菌物質に対する反應は鋭敏且迅速である。

## 参 考 文 献

- (1) 遠藤茂：土壤病原菌と他の微生物との拮抗作用に就て、生理學研究、第7卷、第7卷1-7頁 1930 (2) 同上：微生物の拮抗作用に関する研究 第1報 宮崎高農學術報告、3: 95-119. 1931  
(3) 齊藤賢道：放射状菌の生産する抗菌性物質に関する研究 第1報 ペンシリン 第1卷 第4號 235頁 1947 (4) 梅澤漢夫：放射状菌の形成する抗菌物質の研究 第3報 ペンシリン 第1卷 第4號 221頁 1947 (5) 同上：ペンシリン生産培養基の研究 ペンシリン、第1卷 第7號 409頁 1948 (6) Waksman, S. A.: Associative and antagonistic effects of Microorganisms: I. Historical review of Antagonistic relationships. Soil Sci. 43.: 51-68. 1937.

## 第一圖版



No. 1154 菌と測定用細菌 No. 1209 及び鳥型結核菌の阻止帯

中央聚落 No. 1154

内側阻止帯 鳥型結核菌

外側阻止帯 No. 1209