

# クワ縮葉細菌病の発生生態に関する研究 V. *Pseudomonas mori*ファージの各種要因に対する抵抗力

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
著者	佐藤, 守
巻/号	43巻3号
掲載ページ	p. 224-229
発行年月	1974年6月

## クワ縮葉細菌病の発生生態に関する研究 V. *Pseudomonas mori* ファージの 各種要因に対する抵抗力

佐藤 守

東京都杉並区・蚕糸試験場  
(1973年9月13日受理)

クワ縮葉細菌病菌 *Pseudomonas mori* (BOYER et LAMBERT) STEVENS に寄生するファージは、本菌の生息場所である罹病葉 (佐藤ら, 1971) や発病桑園の土壌 (佐藤・高橋, 1972) から高頻度に分離される。このような知見から、自然界ではファージは、その寄主細菌である *P. mori* と常にあるバランスをとりながら生存していると考えられる。本病の発生生態を究明する上で、このファージと細菌との相互関係を明らかにすることは、極めて重要である。この相互関係は当然様々な要因に支配されると考えられるので、まず細菌とファージの各種要因に対する抵抗力を調べなくてはならない。またこのファージは、高い寄主特異性を示すことから、直接あるいは間接に病原細菌の検出等に利用できるものと期待される。したがってこのファージの性質に関する基礎的な研究は、クワ縮葉細菌病の生態を明らかにする上で重要である。病原細菌 *P. mori* の生育と生存に対する各種の要因の影響については前報 (佐藤・高橋, 1973) で明らかにしたが、これらの要因は、また *P. mori* ファージの増殖と生存に対しても大きな関係があるものと考えられる。本報告は *P. mori* ファージの増殖と生存に対する各種の要因 (太陽光線, 紫外線, 温度, 湿度および pH) の影響を検討したものである。

本文に入るに先だち、ご指導と本稿のご校閲いただいた蚕糸試験場、高橋幸吉技官ならびに本稿のご校閲いただいた九州大学農学部、脇本哲博士および蚕糸試験場病理部長、小林勝利博士に厚くお礼申し上げる。

### 材料および方法

#### 1. 供試ファージおよび指示菌

供試ファージは *P. mori* ファージ SP 7101 (佐藤・高橋, 1972) であり、これを  $10^{11}/\text{ml}$  濃度になるように CaVich 培地 (ビタミン除去カゼイン加水分解物10倍液 2 ml, 塩化カルシウム 0.5 g, 蒸溜水 1 l) に浮遊させ、 $5^{\circ}\text{C}$  に保存し、随時、とり出して稀釈し供試した。指示菌は *P. mori* S 6914-1 号菌で通常  $10^8/\text{ml}$  の殺菌蒸溜水浮遊液 (以後、細菌浮遊液と略称する) にして用いた。

#### 2. 増殖培地および培養温度

ファージの増殖培地は、YPDA 培地 (酵母粉末 3 g, ブドウ糖 3 g, ペプトン 6.6 g, 蒸溜水 1 l) であり、本ファージの増殖適温である  $20^{\circ}\text{C}$  (佐藤ら, 1971) で培養した。

#### 3. 太陽光線照射

径 6 cm の小型シャーレにファージの殺菌蒸溜水浮遊液 (濃度  $10^3\sim 4/\text{ml}$ ) を 5 ml 入れ、所定の時間、ふたをとり、太陽光線に当てた。その後、溶菌班計数法で、活性ファージ濃度を調べた。同時に水温の測定も行なった。

#### 4. 紫外線照射

紫外線の照射は、東芝製 15W 殺菌灯 (2537Å) を用い、被験ファージ液の準備、活性ファージの濃度検定は、太陽光線の場合と全く同様に行なった。

#### 5. 温度試験

##### (1) 溶菌班形成適温

$10^3/\text{ml}$  濃度のファージ液 0.1 ml を、 $10^8/\text{ml}$  の細菌浮遊液 1 ml に加え、さらに YPDA 培地 5 ml

を混合して、プレートした後、2.5°C から 32°C までの所定の温度に保った。そして溶菌斑形成の程度を経時的に観察した。

(2) 乾熱による不活化温度

約  $10^{10}/ml$  のファージ液を殺菌したカバーグラス上に1滴、滴下し、風乾したものを材料として、乾熱器の最上段におき、所定の温度に10分間静置した。その後、直ちに、殺菌ろ紙にはさみ、細かく碎き、殺菌試験管に入れ、1 ml の殺菌蒸溜水を加え、サーモミキサーで攪拌した後、drop 法でファージの活性の有無を判定した。

(3) 殺菌蒸溜水中の活性持続期間

所定の濃度のファージ液をつくり、それを 30°C, 20°C, 5°C に保ち、一定期間ごとに、drop 法でファージ活性の有無を判定した。

6. 乾燥に対する抵抗力

ファージ液 ( $10^9/ml$ ) を殺菌したカバーグラス上に一滴、滴下し、塩化カルシウム入りのデシケーター中に保ち、一定期間ごとに5(2)で述べた方法で、活性の有無を判定した。

7. 水素イオン濃度に対する抵抗力

ブイオンを 1N NaOH と 1N HCl を用いて、pH 2~11 に調整したものを基礎培地とした。その 10 ml に約  $10^4/ml$  のファージ液をを 0.1 ml 加え、20°C に保った。そして一定時間ごとに活性ファージ濃度を溶菌斑計数法で検定した。

結 果

1. 太陽光線による不活化

4~5月の晴天日に3回、試験を行なった。得られた結果は Table 1 に示されるように、不活化時間は、時期によって異なり、4月の実験では約3時間であったが、5月14日の場合には15分後に約80%のファージが不活化され、60分後には完全に不活化された。この不活化の原因として、太陽光線ばかりでなく、温度の影響も予想されたので、同時に水温の測定も行なった。しかし4月の場合では、水温は22~23°C とほとんど変わらず、また5月14日でも27~31°C と水温の上昇は顕著でなかった。この程度の温度による影響は、短時間ではほとんどないことがわかっているので、不活化の原因は太陽光線によるものと考えてよい。

Table 1. Inactivation of *P. mori* phage by exposing to sunlight

Date	Time of exposure (min.)					
	0	15	30	60	120	180
Apr. 14	1200*	/	400	180	60	7
May 7	(1) 330	/	110	22	1	0
	(2) 330	/	90	13	1	0
May 14	(1) 450	96	5	0	0	0
	(2) 450	71	4	0	0	0

\* Each figure is the number of plaques appeared.

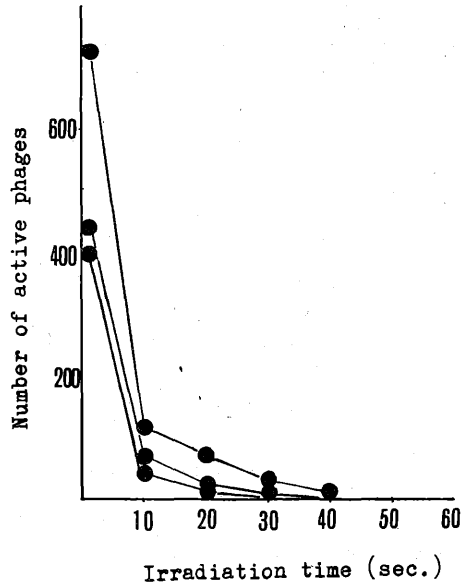


Fig. 1 Inactivation of *P. mori* phage by UV irradiation

2. 紫外線による不活化

(1)  $10^3/ml$  濃度の場合の不活化

Fig. 1 に示されるように10秒照射でかなりの程度不活化され、その後ゆるやかなカーブを描き、60秒で完全に不活化された (50秒については試験を行っていない)。

(2) ファージ液の濃度別不活化率

Table 2 に示されるように、活性ファージの生残率は、初期濃度の差によって安定した数値を得ることができなかったが、各実験区ごとでは明らかに  $10^8/ml$  以上になると、それ以下の濃度に比べて高い生残率を示した。

(3) 風乾状態での紫外線による不活化

方法の5(2)で述べた同じ方法でつくったカバーグラス上の風乾状態のファージに紫外線照射を行なった。結果は Table 3 に示されるように、ほとんどが1分照射で不活化されたが、ごく少数のファージは5分照射でも活性を維持していた。

### 3. 温度に対する抵抗力

#### (1) 溶菌班形成温度

Table 4 に示されるように、溶菌班形成に要する時間は、温度によって差異を認めたが、2.5°C から

Table 2. Relation between the phage concentration and the effect of UV-irradiation

Test	No. of phage before irradiation	No. of phage after irradiation	Rate of survival (%)
1	$4.0 \times 10^7$	0	0
	$4.0 \times 10^6$	0	0
	$4.0 \times 10^5$	$5.3 \times 10^2$	0.13
	$4.0 \times 10^7$	$8.9 \times 10^4$	0.22
	$4.0 \times 10^8$	$3.1 \times 10^6$	0.78
2	$8.0 \times 10^7$	0	0
	$8.0 \times 10^6$	0	0
	$8.0 \times 10^5$	$1.5 \times 10^2$	0.02
	$8.0 \times 10^7$	$1.6 \times 10^4$	0.02
	$8.0 \times 10^8$	$2.2 \times 10^6$	0.28

Irradiation time: 60 sec.

25°C の範囲で、溶菌班の形成が可能であることが明らかになった。溶菌班の形状は、温度によって異なり、20~25°C では透明な中型であるのに対し、2.5~15°C では溶菌班にハローを伴い、2.5~5°C では溶菌班は、極めて微少であった。

#### (2) 乾熱による不活化

結果は Table 5 に示されるように、10分間の処理温度が100°C を越えると失活ファージは、急激に増加するが、一部は110°C まで活性を維持していた。120°C では完全に不活化された。湿熱についてはす

Table 3. Effect of UV-irradiation upon the survival of air-dried *P. mori* phage

Test	Irradiation time (min.)					
	0	0.5	1	2	3	5
1	+++*	++	+	⊥	⊥	⊥
2	+++	++	⊥	+	⊥	-

\* Grade of survival rate

+++ More than about  $10^5$  in number of plaques appeared

++  $10^3$  to  $10^4$

+ 10 to  $10^2$

⊥ 1 to 9

- 0

Table 4. Relation between incubation temperature and plaque-formation of *P. mori* phage

Incubation period (days)	Temperature of incubation (°C)									
	2.5	5.0	10	15	20	23	25	28	30	32
1	-*	-	±	559	631	585	531	0	0	0
2	±	441	503	//	//	//	//	0	0	0
4	341	//	//	//	//	//	//	0	0	0

\* - : Neither bacteria nor phage grew. ± unclear

0 : Bacteria grew well but phage didn't.

Each figure is the average number of plaques appeared on 3 plates.

Table 5. Thermal death point of *P. mori* phage (10 min. in hot dry air)

Test	Temperature (°C)							
	Cont.	80	90	100	110	120	130	
1	+++*	++	++	+	+	-	-	
2	+++	++	++	+	+	-	-	
3	+++	++	++	+	+	-	-	

\* Grade of survival rate

Same grade as Table 3.

Table 6. Survival of *P. mori* phage in sterilized distilled water

Phage population	Temperature (°C)	Incubation period (days)						
		0	1	2	5	15	35	70
10 <sup>8</sup> /ml	30	+++*	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10 <sup>7</sup> /ml	30	+++	++	+	+	+	+	+
10 <sup>7</sup> /ml	20	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
10 <sup>7</sup> /ml	5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10 <sup>6</sup> /ml	30	+++	+	+	+	+	+	+

\* Grade of survival rate  
Same grade as Table 3

Table 7. Survival of *P. mori* phage dried in a desiccator

Incubation period (days)						
0	1	2	12	24	33	50
+++*	+++	+++	+++	++	++	+

\* Grade of survival rate  
Same grade as Table 3

Table 8. Effect of pH values on survival of *P. mori* phage

Incubation period (days)	pH									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	400*	400	400	400	400	400	400	400	400	400
2	—**	—	0	309	210	432	440	184	0	0
7	—	—	0	47	8	364	405	212	0	0

Incubation temperature : 20°C

\* Each figure is the number of plaques appeared.

\*\* — : Indicator bacteria didnot grow.

で報告してあるので(佐藤ら, 1971)省略した。

### (3)殺菌蒸溜水中での活性持続期間

Table 6 に示されるように、いずれの区も70日以上、活性を維持していたが、不活化の程度は低濃度ほど、また高温ほど、高いことが明らかになった。

### 4. 乾燥に対する抵抗力

Table 7 に示されるように、フェージはデシケーター内で50日以上活性を維持し続けた。*P. mori* のように初めの短時日で急激に減少するような点は認められず、徐々に不活化される傾向であった。

### 5. 水素イオン濃度と安定性

Table 8 に示されるように、pH 4 以下の酸性および pH 10 以上のアルカリ性培地で急速に不活化

された。

## 考 察

この研究は、病原細菌とそのフェージの相互関係を明らかにするための前段階のものである。したがって、前報(佐藤・高橋, 1974)で明らかにされた病原細菌に対する要因の影響と比較しながら考察する。

まず太陽光線の影響について、ほぼ同じ時期の5月に行なった結果と比較してみると、調査日により異なる結果が得られるため、厳密な比較はできないが、両者間に太陽光線に対する抵抗力に明らかな差異があるとはいえない。同様な方法で行なわれた紫

外線についても、失活曲線には幾分の差異はあるが両者共40秒で大部分が、そして60秒で完全に失活しており、これもほぼ同じ抵抗力といってよい。ファージも細菌と同様に  $10^8/ml$  を越えると、明らかに生残率は増加したが、細菌ほど顕著ではなかった。これは細菌の大きさが平均  $0.9 \times 2.8 \mu$  であるのに対し、ファージは約  $55 m\mu$  (佐藤ら, 1971) であり紫外線の透過性との関連で説明できよう。溶菌班形成適温については前報 (佐藤ら, 1971) で  $10 \sim 37^\circ C$  の範囲の温度の試験を行なっているが、今回、病原細菌が  $2.5^\circ C$  という低温でも増殖できることが明らかになったので、さらに低温区を設けて行なった。その結果、時間はかかるが、 $2.5^\circ C$  でも十分増殖し肉眼で観察される小さな溶菌班を形成することが明らかになった。しかし  $28^\circ C$  以上の温度では溶菌班の形成は認められなかった。これはファージそのものが、この温度では活性を失ない、吸着、侵入、増殖ができないためか、あるいはファージは増殖するが、細菌の繁殖が旺盛なために溶菌班がマスクされてしまうためと考えられる。この点については、また別に報告する予定である。またこの温度に対する反応が自然界でもあてはまるかどうかは興味あることであるが、これは次の研空課題としたい。

乾熱10分間処理で、ファージは  $110^\circ C$  でも活性を維持していた。これは *P. mori* よりも  $10 \sim 20^\circ C$  高い抵抗力を有していることで興味あることである。また保護物質のない殺菌蒸溜水中のファージの生存は、ファージ濃度が高いほど、また低温ほど安定であり、細菌の場合と同様な結果が得られた。

デシケーター中のカバーガラス上でファージは50日以上も活性を維持していたが、これは同じ条件 (殺菌蒸溜水浮遊液を乾燥させたもの) で行なった細菌の13日より明らかに長く、ファージが細菌よりも乾燥に対して強い抵抗力をもっていることを示している。

細菌の生育可能な pH 範囲は  $4 \sim 11$  であるのに対し、ファージは pH  $5 \sim 9$  であり、細菌よりやや狭い適応性を示した。活性を維持できることと、増殖が可能であることとは必ずしも一致するとはいえないので、この点については次の検討課題としたい。前報 (佐藤・高橋, 1973) で述べたように、自然界では病原細菌とファージの生息場所であるクワの葉、土壌とも普通はこの範囲の pH に入っており、

まず pH による制約はないものとする。

以上、ファージとその寄主の病原細菌の各種要因に対する抵抗力の差異を述べてきたが、まとめてみると、ファージは細菌に比べて、pH でやや狭い適応性を示し、乾熱および乾燥に対する抵抗力で優位を示した。しかしこれらの抵抗力の差異もそれほど著しいものではなく、自然界で各種の要因に抗して両者が共存してきたため、似かよった性質をもつようになったと考えられる。

## 摘 要

クワ縮葉細菌病菌 *P. mori* ファージの太陽光線、紫外線、温度、乾燥および pH に対する抵抗力を調べ、次の結果を得た。

(1) ファージの不活化は、太陽光線の強さによって影響され、4月の実験では180分照射によってもなお完全には不活化されなかったが、5月中旬の調査では60分で完全に不活化された。

(2) 一定の強さの紫外線 (15W殺菌灯・40cm下) 照射によるファージの不活化は、ファージ液の濃度によって影響され、ファージ濃度が高まるにつれて生残率は高くなった。

(3) ファージの溶菌班形成温度は、 $2.5 \sim 25^\circ C$  であって、適温は  $20^\circ C$  前後であった。乾熱10分間処理による死滅温度は  $120^\circ C$  であった。殺菌蒸溜水中のファージの生存は、高濃度ほど、また低温ほど安定であった。

(4) 乾燥状態で50日以上活性を維持した。

(5) pH  $5 \sim 9$  の範囲で活性を維持した。

以上の結果を、*P. mori* と比較すると、pH に対しやや狭い適応性を示し、乾熱および乾燥に対しやや強い抵抗力を示した。

## 文 献

- 佐藤守・高橋幸吉・脇本哲 (1971) : 日植病報, **37**, 128~135.  
 佐藤守・高橋幸吉 (1972) : 日蚕雑, **41**, 285-293.  
 佐藤守・高橋幸吉 (1974) : 日蚕雑, **43**, 217-223.

## Summary •

## Ecological studies on the bacterial blight of mulberry

V. Resistance of *Pseudomonas mori* phage to some factors

By

Mamoru SATO

The author studied on the resistance of *P. mori* phage to some factors such as sunlight, ultraviolet light, temperature, dehydration, and pH. The following results were obtained.

(1) The grade of phage inactivation under sunshine depended on the strength of sunlight. The phages were completely inactivated by exposing to sunlight for 60 min. in May, but not even for 180 min in April.

(2) When the phage suspension was irradiated under a certain dosage of UV-light, the survival rate was higher corresponding to an increase of the initial phage concentration. The phages were inactivated almost completely by exposing to UV light at a distance of 40 cm under 15W lamp (2537Å), for 40 sec., if the initial phage concentration was less than  $10^3$  per ml.

(3) The phages were able to form plaques at the range of temperatures from 2.5 to 25°C. The highest plaque forming efficiency with clear plaque was obtained at about 20°C, and the plaque formation was retarded at low temperatures. The activity of the phages in sterilized water was relatively stable when they were in high concentration and kept at low temperature.

(4) The phages dried on a cover glass maintained their activity for more than 50 days in a desiccator.

(5) The phage activity was stable at the range of pH 5 to 9 in bouillon.

From the foregoing results, it is evident that *P. mori* phage is more resistant to dehydration and dry heat compared with that of *P. mori*.

(Sericultural Experiment Station, Suginami-ku, Tokyo)