

ハンノキ属の根瘤に関する研究 (第5報)
 ハンノキ属根瘤より *Streptomyces* の分離に関する
 2, 3 の新方法について

農林技官 植 村 誠 次

Studies on the root nodules of alders (*Alnus* spp.). (V)
 Some new isolation methods of *Streptomyces* from alder nodules.

By
 Seiji UEMURA

With 3 tables, 2 plates and English résumé

目 次

I 緒 言.....	209
II 根瘤の中心柱利用による分離試験.....	210
III 滅菌剤利用による分離試験.....	216
IV 考 察.....	218
V 摘 要.....	220
VI 引用文献.....	222
VII 図版説明.....	223
VIII Résumé	224

I 緒 言

ハンノキ属根瘤形成の本体は、恐らく1種の放射状菌ならんとの説は、筆者が既に第1報(1951)で紹介したように、略々学界権威の一致している処であり、Peklo (1910) は之に対して始めて *Actinomyces alni* Peklo なる名称を与え、其の後本名称は多数の支持者を得るに至つて来た。然し最近 Waksman S. A. 及び Henrici A. T. の両氏は、Bergey's Manual of determinative Bacteriology (6th. ed. P. 967, 1948) に於て、Peklo の命名した *Actinomyces alni* を *Streptomyces* 属の中に取扱つており、更に Waksman (1950) は、之に対して *Streptomyces alni* なる名称を始めて用いるに至つた。現在迄に該根瘤から微生物(放射状菌或は細菌)の分離に成功したと称するものには、有名な Peklo (1910) の放射状菌の分離に関する報告を始め、Lieske (1921), Ziegenspeck (1929), Borm (1931), Krebber

(1931), Plotho (1941), 植村 (1951b) 等の諸報告が見受けられるが、其等のうち分離試験並びに接種試験に於て略々異論なく成功していると思われるものは、僅かに Plotho (1941) が *Alnus incana* の根瘤から一種の放射状菌 (*Actinomyces alni*) を分離し、之を水耕法で養成した *Alnus glutinosa* の幼苗に接種して、其の根瘤形成に成功せる旨の報告があるに過ぎない。

筆者は第 IV 報 (1951b) で、ハンノキ (*Alnus japonica* Sieb. et Zucc.) 及びヤシヤブシ (*Alnus firma* Sieb. et Zucc.) の主として 1~2 年生苗の根瘤から、Plotho (1941) 記載の方法を改変した分離方法、即ち石鹼と水とで充分機械的洗滌を行つた根瘤を横断し、其の外表皮に近い内部組織を酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天培地に移し、扁平培養で分離する試験を約 2 ヶ年半に亘つて実施し、前者について 87 回、計 1545 個のシャーレを用いて 63 株、後者については 72 回、計 1411 個のシャーレを用いて 13 株の放射状菌 (*actinomycetes*) の分離に成功した事を報告したが、上述の分離方法は分離頻度が極めて小で、且つ時期に依り分離の難易が存し、又必ずしも一定の放射状菌のみが分離されるとは限らず、可成り異種類の放射状菌が含まれている等のため、更に効果的分離方法の発見が望ましく考えられた。

そこで、其の後更に分離方法に関する研究を進めた結果、最近根瘤の中心柱を利用する極めて効果的且つ簡便な分離方法を見出すに至つた。本方法に依るとハンノキ属樹種の根瘤から、夫々の樹種に特有と思われる *Streptomyces* が主として分離されたので、其の分離試験について報告すると共に、従来其の方法が未解決であつたところの、消毒した此等の根瘤から一定の内生菌 (此の場合は *Streptomyces*) を分離する方法についても、略々見通しを得るに至つたので、夫についての 2, 3 の分離試験結果も付け加えることとした。

尙根瘤の中心柱を利用する分離方法をヤマモモ (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.), アキグミ (*Elaeagnus umbellata* Thunb.), モクマオウ (*Casuarina equisetifolia* Forst.) の根瘤に適用したところ、ハンノキ属の場合と同様夫々の樹種に特有と思われる *Streptomyces* が主として分離される結果を得つたことを附言する。

II 根瘤の中心柱利用による分離試験

本分離試験はヤマハンノキ (*Alnus tinctoria* Sarg. var. *glabra* Call.), ハンノキ (*A. japonica* Sieb. et Zucc.), ヤシヤブシ (*A. firma* Sieb. et Zucc.) 及びオオバヤシヤブシ (*A. Sieboldiana* Matsumura) の 4 樹種の根瘤について、自昭和 25 年 7 月至昭和 27 年 2 月間、根瘤の中心柱を利用して適宜実施したところの主として *Streptomyces* の分離試験の結果を取纏めたものである。

尙ヤマハンノキ、ハンノキは Rehder (1927) の著書より考察するに、*Alnaster* 亞属に、ヤシヤブシ、オオバヤシヤブシは *Alnus* 亞属に含まれ、お互いに極めて近い類縁関係にあ

り、且つ前2者及び後2者の根瘤からは、夫々の亞属に特有と思われる *Streptomyces* が主として分離されるので、試験遂行の便宜上前2者をハンノキ類 (*Alnaster* group), 後2者をヤシヤブシ類 (*Alnus* group) として、二つに分けて取扱う事とした。

1 材料並びに分離方法

分離に用いた根瘤は各樹種とも、農林省林業試験場 (東京都目黒区下目黒4丁目) の苗畑に養成した1~2年生の健全なる稚苗に着生している、外皮の損傷していない新鮮且つ充実したものをを用いた。

今分離方法の概要を示すと次の如くである。

- a まず根瘤着生の根を毛筆と水道の流水で充分洗滌し、適当な根瘤の着生している根の部分を1.5 cm 内外の長さに切り取り (第I図版, 写真1参照), 之を毛筆と石鹼水で充分洗い、殺菌水で数回洗滌後殺菌水を充した殺菌シャーレの中に貯える。
- b 次に無菌室内で、上述のシャーレの中から根瘤着生の根の細片を取出し、殺菌濾紙上で充分水分を拭い去り、アルコールで火焰消毒した鉗子或はアルコールで殺菌した左手の親指及び人差指で、根瘤着生直下の根の部分を充分固定し、更に別の殺菌した鉗子で根瘤の下部を挟み、之に軽く圧力を加え乍ら根瘤を外側に引きちぎる。尙根瘤が分岐している場合には、其の部分と同様の方法で引き離す。
- c 以上の操作により、新鮮な若い根瘤では、屢々根瘤の中心柱が殆んど損傷されず其のまま根に或は根瘤の基部に附着したまま残るものである (第I図版, 写真2, 3, 4参照)。尙これ迄の結果では、古い根瘤ではその中心柱の多くは根瘤と共に取り去られるか先端部が欠除する場合が多く、若い程良い結果が見受けられ、又一般にヤシヤブシ類の根瘤の中心柱は、ハンノキ類の夫に比べて容易に完全なものが得られた。
- d 次に殺菌した白金線の先端部を中心柱の先端に2~3回触れしめ、依つて得られた痕跡を、予め準備してある試験管内の斜面培地に軽く短い放電型に移植する。尙普通一つの上記中心柱の先端から2回痕跡の分離を行い、同一試験管内の斜面培地の上部と下部に移植した。
- e 分離用培地としては、筆者が前回の分離試験 (1952 b) で最も優れていると考えられた酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天培地を使用した。其の組成を示すと次の如くである。

葡萄糖	20.0 g
ペプトン	10.0 g
K_2HPO_4	0.2 g
KH_2PO_4	0.3 g
$MgSO_4$	0.2 g
NaCl	0.1 g

CaSO ₄	0.005 g
酵 母 水	100.0 cc
蒸 溜 水	900.0 cc
寒 天	15~18 g

pH は NaOH で 6.8 に補整，ペプトンは武田製薬のポリペプトンを使用した。酵母水としては、エビオス粉末（薬用酵母）に 10 倍重の蒸溜水を加え、Koch 蒸気殺菌器で 1 時間浸出を行い，24 時間室温で放置後，上澄液を濾紙で濾過したものを用いた。

以上の分離操作の完了した試験管は，28°C の定温器中で約 1 ケ月間絶えず微生物の発生状態を検し，微生物聚落の発生が認められた場合は，夫等について検討の上，必要と認められたものについては数回扁平培養を繰返して純粋分離を行つた後保存し，次の実験に供した。

2 分離試験の結果

上述の根瘤の中心柱を利用する分離試験をハンノキ類（主としてヤマハンノキ），ヤシヤブシ類（ヤシヤブシ，オオバヤシヤブシ）について，昭和 25 年 7 月から昭和 27 年 2 月に亘つて，夫々 17 回，19 回，各回 10~30 本内外の試験管を用いて適宜実施したが，其の結果は第 I 表，第 II 表に示す如くである。

尙今迄の本方法による分離試験の結果では，ハンノキ，ヤシヤブシ両類から，夫々の類に特有と思われる放射状菌（actinomycetes）が主として分離されており，且つ此等放射状菌株は本分離培地上に於ける肉眼的の発生状態により，便宜上次の 3 つの発生型の何れかに類別された。

即ち

第 I 型：之に属する発生型の菌は発生が極めて迅速で，早いものは 48 時間で肉眼的に認められ，普通 1~2 週間で径 0.5 cm 内外の聚落到に發育する。黄白色或は淡黄褐色の光沢を有する軟骨状の聚落で培地に密着し，気菌絲は普通生じない。屢々其の発生の初期から褐色の色素を培地に出すものが見受けられた。本発生型に属するものは，ハンノキ類の根瘤から分離された放射状菌（actinomycetes）の大部分を占め，又ヤシヤブシ類からも時折分離された。此の発生型を示した放射状菌（actinomycetes）の中には，A-161 号菌株の如く *Micromonospora* 属に属するものも含まれたが，其等の多くは可成りの類似性を有する *Streptomyces* のように推定された。（第 II 図版，a 参照）。

第 II 型：発生が極めて遅く，普通 2~3 週間で径 1~2 mm 位の聚落として発生，聚落表面の大部分は発生の初期から白色粉状の気菌絲で覆われ，菌台は橙色で，時には紫紅色を呈し，培地に喰込み固く密着する。培地に殆んど色素を出さないが古くなると紫紅色の色素を聚落附近の培地に出す場合も見受けられた。本発生型のもはヤシヤブシ類の根瘤から分離された放射状菌（actinomycetes）の大部分を占め，まれにハンノキ類からも分離された。此等は恐ら

第 I 表 ハンノキ類分離試験結果

Table I Results of the isolation experiment on *Alnaster* group.

分 離 年 月 日	樹 種	試験管数	放射状菌 発生試験 管 数	発 生 率 百 分 率	分離放射状菌 Isolated actinomycetes		摘 要 Notes
					菌株番号 Stock number	発 生 型 Type of develop- ment	
26. VII. '50	<i>Alnus tinctoria</i> var. <i>glabra</i>	4	1	25	A-135	I	
28. VII. '50	"	7	2	29	A-136 A-137	I III	
31. VII. '50	"	8	0	0			
4. VIII. '50	"	12	1	8	A-138	I	
18. VIII. '50	"	7	0	0			
22. IX. '50	"	20	6	30	A-139	I	細菌発生1本 ¹⁾ Bact. 1 test tube
					A-140	I	
					A-141	I	
					A-142	I	
					A-143	I	
					A-144 a A-144 b	I III	
A-145	I	細菌発生1本 Bact. 1 test tube					
A-146	I						
A-147	I						
A-148	I						
7. X. '50	<i>Alnus japonica</i>	17	4	24	A-149 A-150	I I	細菌発生1本 Bact. 1 test tube
20. XI. '50	<i>A. tinctoria</i> var. <i>glabra</i>	20	5	25	A-151 a	I	
					A-151 b	III	
					A-152	II	
					A-153	II	
16. I. '51	"	11	1	9	A-155	II	
22. II. '51	"	34	3	9	A-157	I	
					A-158	I	
					A-159	I	
28. II. '51	"	10	0	0			細菌発生1本 Bact. 1 test tube
29. III. '51	"	21	1	5	A-160	I	
2. IV. '51	"	7	0	0			
13. IV. '51	"	17	0	0			
24. VII. '51	"	15	0	0			
3. IX. '51	"	13	1	8	A-161	I	<i>Micromonospora</i> に属する Belonged to <i>Micromonospora</i>
21. II. '52	"	6	2	33	A-162	I	
					A-163	II	
計 Total	17 回 times	219	27	12	29 株 stocks	I : 22 II : 4 III : 3	細菌発生計4本 Bact. 4 test tubes in total

註 (Notes) : 1) 細菌発生1本: 細菌の発生が見られた試験管が1本なることを示す。
Bact. 1 test tube: It means that the test tube in which bacteria developed was 1.
2) 同時発生: 同一場所から異なる種類の聚落が分離されたこと。
Developed on same place: It means that different kinds of colonies developed on the same place of medium and were isolated.

第 II 表 ヤシヤブシ類分離試験結果

Table II Results of the isolation experiment on *Alnus* group.

分 年 月 日 Date of isolation	樹 種 Species	試験管数 Number of test tubes	放射状菌 発生試験 管 数 Number of test tubes act. isolated	発 生 率 Isolating frequency %	分離放射状菌 Isolated actinomycetes		摘 要 Notes
					菌株番号 Stock number	発 生 型 Type of develop- ment	
31.VII.'50	<i>Alnus firma</i>	5	0	0			糸状菌発生 1 本 Fungi 1 test tube
4.VIII.'50	"	23	0	0			糸状菌発生 2 本 Fungi 2 test tubes 細菌発生 1 本 Bact. 1 test tube
8.VIII.'50	"	11	1	9	A-1017a A-1017b	I II	糸状菌発生 2 本 Fungi 2 test tubes 同時発生 Developed on same place
25.VIII.'50	"	12	2	17	A-1018 A-1019	II II	
8.IX.'50	"	17	1	6	A-1020	II	
14.IX.'50	"	14	5	46	A-1021 A-1022 A-1023 A-1024 A-1025 A-1026	II II II II II II	
16.I.'51	<i>Alnus Sieboldiana</i>	20	1	5	A-1027	II	
12.II.'51	<i>A. firma</i>	15	1	7	A-1028	I	
22.II.'51	<i>A. Sieboldiana</i>	17	0	0			
24.III.'51	"	39	1	3	A-1029	II	
13.IV.'51	"	15	0	0			
21.V.'51	<i>A. firma</i>	15	0	0			
21.V.'51	<i>A. Sieboldiana</i>	21	1	5	A-1030	II	
19.VII.'51	"	15	1	7	A-1031	II	
24.VII.'51	<i>A. firma</i>	26	2	8	A-1032 A-1034	I II	細菌発生 2 本 Bact. 2 test tubes
3.IX.'51	<i>A. Sieboldiana</i>	19	1	5	A-1035	I	
17.IX.'51	"	30	1	3	A-1036	II	
12.X.'51	"	17	2	12	A-1037 A-1038	II II	細菌発生 2 本 Bact. 2 test tubes
21.XII.'51	"	11	1	10	A-1039 A-1040	I II	
計 Total	19 回 times	342	21	6	24 株 Stocks	I : 5 II : 19	糸状菌発生計 5 本 Fungi 5 test tubes in total 細菌発生計 5 本 Bact. 5 test tubes in total

註 (Notes) : 第 I 表参照
cf. Table I

く同一種類に属する *Streptomyces* のように思推された（第Ⅱ図版，b参照）。

尙此等と極めて類似の *Streptomyces* が，同様の分離方法によりヤマモモ，グミ属の根瘤から屢々分離された。

第Ⅲ型：発生が可成り早く，1週間内外で径1~2mmの聚落となる。聚落の表面は其の初期より白色短綿の気菌絲で覆われ，菌台は赤橙色で，寒天培地に多少密着するが脆状を呈する。本培地上の生育は良好で，移植後10日内外で斜面培地上を被覆し，色素は出さない。本発生型を示す菌は現在のところヤマハンノキ，ハンノキ（ハンノキの根瘤からは，第Ⅳ報—1952b—記載の根瘤の外表皮に近い内部組織を用いた分離試験で4株分離された）の根瘤から時折分離され，単独で或は第Ⅰ型の *Streptomyces* と同時に発生した。

此等は何れも同一種類に属する放射状菌（actinomycetes）の如く推定されたが，何れの属に帰属するものなるかは現在調査中である（第Ⅱ図版，C参照）。

扱て，今第Ⅰ表ハンノキ類の分離試験結果を見るに，前後17回，計219個の試験管を使用して29株の放射状菌（actinomycetes）が分離された。其中22株は第Ⅰ型の発生を示し，此等はA—161号菌株が *Micromonospora* 属に属しているのを除いて，他は *Streptomyces* 属に属し且つ其の大部分は可成り類似性のある *Streptomyces* のように思われた。又第Ⅱ型の発生を示した *Streptomyces* が4株，第Ⅲ型の放射状菌（actinomycetes）が3株分離された。

次に第Ⅱ表ヤンヤブ類の分離試験結果では前後19回，計342個の試験管を使用して24株の *Streptomyces* が分離され，うち19株は第Ⅱ型，5株は第Ⅰ型の発生を示した。

両者を通じ，此等放射状菌の半数近くは，試験管内の斜面培地の同一箇所に1個の聚落として発生したが，其の他2~8個の聚落をなして発生する場合も見受けられた。又放射状菌の発生百分率，即ち放射状菌の発生が見られた試験管数の総試験管数に対する百分率は，前者では12%，後者では6%であり，又両者の根瘤から略々年間を通じて放射状菌の分離が見受けられた。

然し乍ら，ハンノキ類では第Ⅰ型の発生を示した放射状菌が大部分を占め，第Ⅱ型のものは僅かであつたが，ヤンヤブ類では第Ⅱ型のものが大部分を占め第Ⅰ型のものはまれであつたこと，及び前者では時折第Ⅲ型の放射状菌の分離が見られたが，後者では全然見られなかつたことは両者に於ける著しい違いであつた。

尙本分離試験では，両者を通じ放射状菌以外の微生物の発生が見られた場合は極めて少く，前者では細菌が4株，即ち使用試験管の約2%，後者では細菌が5株，雑菌と思われる糸状菌が5株，即ち計10株，約3%に過ぎなく，両分離試験を通じ使用試験管数の90%内外は何等微生物の発生は認められなかつた。又発生した細菌類の中には，種々なる種類のものが含まれていたが，荳科根瘤菌類似の細菌も数株見受けられた。

Ⅲ 滅菌剤利用による分離試験

従来ハンノキ属其他非蕁科根瘤植物の根瘤菌の分離試験に従事した多数の研究者は、滅菌剤で根瘤の表面消毒を行つて内生菌を分離せんとしたが、其の何れもが失敗に終つている。

筆者は第Ⅳ報 (1952 b) に於て、四季を通じて根瘤内に根瘤形成能力を有する内生菌が存在するや否やを調査するため、ハンノキの根瘤を 0.1~0.5% のメルクロン水溶液で消毒し、其の中表面消毒が完全と思われたものを磨碎して、第Ⅲ報 (1952 a) 記載の如く培養したハンノキ無菌苗に接種した結果、四季を通じて根瘤形成の可能なることが了解されたので、更に本方法を根瘤菌の分離に迄適用せんとしたが、多くは根瘤内に生棲するに非ずやと思推された蕁科根瘤菌類似の細菌及び其の他 2, 3 の細菌の発生のため失敗に帰した旨報告した。

其の後更に、根瘤から此等細菌の分離に関する研究を進めるため、上述の分離試験を継続して実施した処、屢々此等細菌以外に、ヤマハンノキの根瘤からは主として第Ⅰ型の、オオバヤシヤブシの根瘤からは主として第Ⅱ型の *Streptomyces* が分離される結果を得たので、未だ年間を通じての分離試験結果を得る迄に至つていないが、本方法によつてもハンノキ属の根瘤から夫々の樹種に応じて一定の *Streptomyces* が分離し得る一証左として、之迄の 2, 3 分離試験結果を報告する次第である。

1 材料並びに分離方法

材料としては、ヤマハンノキ、オオバヤシヤブシ 1~2 年生苗の根瘤を用い、其の採集及び試料準備の方法は第Ⅱ節の分離試験に準じた。

石鹼と殺菌水で充分洗滌した根瘤は、小粒のものは其のまゝ、分岐状のものは安全剃刀の刃で夫々の細片に分ち、0.5% メルクロン水溶液中に 3~10 分間浸漬滅菌を行つた後、其のまゝ直ちにシャーレの中の酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天培地の上に移し、28°C の定温器中に入れる。次に 24 時間毎に 3 回根瘤を別のシャーレの寒天培地に移して夫等の根瘤表面の滅菌状態を検し (勿論表面滅菌が完全と思われる根瘤の收得率は、根瘤の状態、滅菌操作の如何に依つて一定でないが、普通 20~30% 内外の滅菌根瘤が得られた)、滅菌の完全と思われた根瘤を、予め 40°C 近くに溶かした酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天培地の入つた試験管の内口に移し、消毒した三角刀で磨碎した後、寒天培地と充分混じて殺菌シャーレに移し、28°C の定温器中で平面培養を行い、約 1 ヶ月間適宜放射状菌の発生状態を観察し、発生菌のうち代表的と思われるものについては、夫々数回扁平培養を繰返して純粹分離を行つた。

2 分離試験の結果

以上の分離様式に則り昭和 26 年 12 月 21 日、昭和 27 年 2 月 20 日、同じく 4 月 16 日の 3 回に亘り、ヤマハンノキ、オオバヤシヤブシの根瘤につき夫々分離試験を実施したが、其等の結果を簡単に表示すると第Ⅲ表の如くである。

第 III 表 0.5% メルクロン水溶液利用によるハンノキ属根瘤の分離試験結果

Table III Results of the isolation test for alder root nodules (*Alnus* spp.) using 0.5 per cent Mercuron solution.

分離年月日 Date of isolation	樹種 Species	浸漬時間 Time of immersion (minutes)	分離シャーレの数 Number of Petri dishes	放射状菌発生シャーレ数 Number of Petri dishes act. isolated	摘 要 Notes
21. XII. '51	<i>Alnus Sieboldiana</i>	3分	3	2	註1: Note 1 発生放射状菌はII型の <i>Streptomyces</i> に属した。5~20 個の聚落が同一シャーレに発生した。
		5	3	3	
		10	3	1	
		計 Total	9	6	
	<i>Alnus tinctoria</i> var. <i>glabra</i>	3	3	0	註2: Note 2 発生放射状菌はI型の <i>Streptomyces</i> に属した。1 菌株が分離された。
		5	3	0	
10		3	1		
計 Total		9	1		
20. II. '52	<i>A. Sieboldiana</i>	5	4	1	註1と同じ Same as Note 1
		10	4	2	
		15	4	0	
		計 Total	12	3	
	<i>A. tinctoria</i> var. <i>glabra</i>	5	4	0	註2と同じ Same as Note 2
		10	4	0	
		15	4	1	
		計 Total	12	1	
16. IV. '52	<i>A. Sieboldiana</i>	5	5	2	註1と同じ Some as Note 1
		10	5	2	
		計 Total	10	4	
	<i>A. tinctoria</i> var. <i>glabra</i>	5	5	0	註3: Note 3 I型の <i>Streptomyces</i> の発生見られず。
		10	5	0	
		計 Total	10	0	

Note 1: Actinomycetes isolated belonged to the II nd. type *Streptomyces*. 5~20 colonies developed in a same Petri dish usually.

Note 2: Actinomycete isolated belonged to the I st. type *Streptomyces*. Only one colony was isolated.

Note 3: No *Streptomyces* belonging to the I st. type was isolated.

即ちオオバヤシヤブシの根瘤からは本分離方法に依つても、可成り容易に第II型の発生を示す *Streptomyces* が分離されており、本菌は普通同一シャーレ内に 5~20 個の聚落をなして発生し、其の多くの場合他の微生物の発生は殆んど見受けられなかつた。尚シャーレの或るものには細菌類 (主として 豇科根瘤菌類似菌其他 2, 3 の細菌) の著しい発生が見られたものもあり、又僅少ではあるが全然微生物の発生が見られないものもあつた。其の他根瘤の内生菌とは無関係と思われた放射状菌, 絲状菌, 細菌の僅少の発生も屢々見受けられたが、之等については研究の対象から除外した。

ヤマハンノキの分離試験結果では、本樹種に特有と推定される第 I 型の発生状態を示す *Streptomyces* は 3 回の分離試験を通じ僅かに 2 株分離されたに過ぎなく、第 II 型、第 III 型のものの発生は見受けられなかつた。結局今迄の所では、本分離方法によつてヤマハンノキの根瘤から第 I 型の *Streptomyces* を分離することは可能ではあるが余り効果的でない結果を示した。尙本菌は 2 株とも、何れも組織より発生し、且つ同一シャーレに発生した聚落の数は 1 株に過ぎなかつた。その他の微生物の発生状態は略々オオバヤシヤブシの場合と同様であつた。

此のほか 0.5% メルクロン水溶液の代りに 0.1% 昇汞水で 3~5 分間程度の表面滅菌を行つた根瘤を用い、酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天培地或は Plotho (1941) の提唱している酵母水—マンニツト寒天培地、肉エキス—ペプトン寒天培地を用いて同様試験的に分離を実施してみたが、条件さえよければ、前の場合と同様に充分目的とする *Streptomyces* を分離し得ることが了解された。

尙上述の分離方法をヤマモモ、グミ、モクマオウの根瘤についても実施中であるが、条件さえ良ければ夫々の樹種に特有と思われる *Streptomyces* が主として分離される結果が得られている。

IV 考 察

緒言に於て述べた如く、ハンノキ属の根瘤から根瘤菌たる一定の放射状菌 (*Actinomyces alni*) の分離に成功せる報告は最近 Plotho (1941) に依てなされており、筆者も氏の分離方法を参照改変して、即ち石鹼と水による機械的表面洗滌を行つた根瘤の外表皮に近い内部組織を用いて放射状菌 (actinomycetes) を分離する試験を 2 ヶ年半に亘つて実施し、未だ夫等分離菌の接種による普遍的且つ異論のない根瘤形成の域迄は到達していないが、一応分離試験の結果を第 IV 報 (1952 b) に詳細報告した。

されば、まず上述の分離試験の結果と、根瘤の中心柱を利用した本分離試験の結果とを比較考察してみるに、

a 前者の分離方法では、根瘤からの放射状菌の分離は、時期に依つて難易が認められ、且つ其の発生率が極めて小で、ハンノキでは 3%、ヤシヤブシでは 0.7% に過ぎず、両者の間に可成り著しい差が見られた。

然し乍ら、後者の分離試験では略々年間を通じて放射状菌 (殆んど *Streptomyces*) が分離され、其の発生率は、ハンノキ類では 12%、ヤシヤブシ類では 6% で、両類の間には前者に於けるほど著しい差が認められなかつた。

b 前者の分離試験では、ハンノキ、ヤシヤブシの根瘤を通じ第 I 型の発生を示す放射状菌が最も多数を占め、第 II 型のものは全く分離されなかつた。又第 III 型のものはハンノキの根瘤からのみ 4 株分離され、此の他に第 I、II、III 型以外の発生状態を示す異なつた種類の放射状

菌も時折分離された。

後者の分離試験では、ハンノキ類からは圧倒的に多く第Ⅰ型の放射状菌が、次いで僅少の第Ⅱ、第Ⅲ型の放射状菌が分離されており、ヤシヤブシ類では之に反し、第Ⅲ型のものが圧倒的に多く分離され、残余のものは第Ⅰ型の発生を示すものであつた。

以上要するに、根瘤の中心柱を利用する分離方法は、ハンノキ属中のハンノキ類、ヤシヤブシ類の根瘤から、主として夫々の類に特有と推定される *Streptomyces* が年間を通じて容易且つ効果的に分離され、又其の操作の簡易なる点で、根瘤の外表皮に近い内部組織を用いる分離方法に比較して著しく優れている様に思われた。

尙根瘤の中心柱の先端部を利用する本分離方法に於て、根瘤内部組織の如何なる部分が内生菌の発生を齎すものであるかは、更に詳細なる細胞学的研究の結果論議せらるべきであるが、一応分離に使用された根瘤の中心柱の先端部の状態を簡単に吟味するため、略々完全なる形態を具えていると思われる中心柱の先端部を拡大鏡検を行つたところ、肉眼的に完全なる中心柱と思われたものでも、其の先端部が欠除しているものも見受けられ、(図版Ⅰ、写真4参照)、又鏡検の結果略々先端部の完全と思われるものには屢々根瘤の表皮柔細胞と思推される組織片の少量が、先端部附近に附着しているのが見受けられた。

以上の点と、之迄の分離試験結果では中心柱の先端部の欠除しているものからは何等放射状菌の分離が認められなかつたことより判断して、本分離方法によれば、恐らく根瘤の中心柱の先端部に附着している表皮柔細胞組織中の繁殖力ある内生菌が分離されるのではないかと思推された。此の他上記中心柱の先端部を切取つて磨碎し、之を偏平培養法によつて分離試験を実施してみたが、時折Ⅰ型或はⅡ型の放射状菌株の僅少なる発生が認められた場合もあつたが、何等微生物の発生が認められない場合が多数を占めているので、中心柱其のものゝ組織内に活力ある内生菌及び細菌類の存在の可否は極めて疑問視されるであろう。

尙本方法では殆ど細菌の発生が認められない点より、根瘤の中心柱の先端部或は其の極く附近の組織にも細菌類の存在は疑はしいところであり、且つ第Ⅳ報(1952b)で記載した如く、根瘤の中心に近い内部組織を用いた分離試験では何等細菌其の他の微生物の発生が認められなかつた点より判断して、若し根瘤内に細菌類の存在が是認されるとするならば、極めて表皮に近い部分に限られるものではないかと推定された。

次に滅菌剤(主として0.5%メルクロン水溶液)利用による試験結果を考察するに、Plotho(1941)の如きは、従来多数の研究者により実施せられて来たハンノキ属根瘤菌の分離試験が失敗に歸した大きな原因は「根瘤の内生菌を害することなく、凡ての或いは殆ど凡ての根瘤外部に附着している微生物を死滅せしめ得るが如き方法」が見出されないことによると指摘し、氏自身も根瘤の表面消毒による根瘤菌の分離試験は断念するに至つた。

然れども、第Ⅲ節の分離試験の結果によれば、0.5%メルクロン水溶液で3~10分間、0.1

% 昇汞水で 5 分間内外の表面殺菌を行つた根瘤を用いて、ハンノキ属の夫々の樹種に特有と思推される *Streptomyces* が、条件さえよければ可成り確実に分離され得ることが了解されたが、此の事は滅菌剤を用いて表面消毒を行つたハンノキ属根瘤からも、夫々の樹種に応じた *Streptomyces* の分離の可能なる事を実証した点で、意義あることと考える次第である。

されど本方法による分離試験は、実施後日も浅く且つ実施回数及び使用シャーレの数も少く、従つて更に研究を進めた上でないと比較断定し難いが、其の方法の繁雑なることと、分離の結果が一様でなく不安定なる点で、根瘤の中心柱利用による分離方法に比べると遙かに劣るように思われた。現在筆者は本分離方法を利用してハンノキ属根瘤から細菌類の分離試験を実施中なので、其の試験が終了の上更に詳細比較検討を行う積りである。

以上の 2 方法による分離試験で分離された各発生型に属する放射状菌菌株の主なるものについては、現在其の細菌学的諸性質を調査取纏め中で、之については引き続き第Ⅱ報で詳細報告する予定である。又夫等各菌株による厳密なる接種試験も目下実施中であるが、現在迄の処其の多くは寄主植物の生育促進には極めて良好な結果を示しているが、未だ普遍的に根瘤の形成が認められる迄には至つていない。

尙筆者はハンノキ属根瘤から主として分離される放射状菌 (actinomycetes) を、一応酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天培地上の肉眼的発生状態により第Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型の 3 つの発生型に分類したが、之は飽くまで便宜的なものであつて、夫等の型が果して分類学的に価値があるや否やについては、更に研究を進めた上報告したい。

V 摘 要

本報告は、ハンノキ属根瘤から主として *Streptomyces* を分離する目的で、筆者の考案した 2、3 の新分離方法に依つて実施した試験の結果を取扱つたものである。

A 根瘤の中心柱を利用する分離試験

(1) 本分離方法は次の如くである。最初殺菌水と石鹼で機械的に繰返し洗滌した新鮮且つ充実した根瘤着生の根の細片から (図版 I, 写真 1 参照), 成可く根瘤の完全なる中心柱が根の細片に残存するように、殺菌鉗子で根瘤を除去する (図版 I, 写真 2, 3, 4 参照)。

次に冷却した殺菌せる白金線の先端を中心柱の先端部に 2、3 回接触させ、依つて得られた白金線上の根瘤組織の痕跡を、試験管内の酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天培地 (葡萄糖 20g, ペプトン 10g, K_2HPO_4 0.2g, KH_2PO_4 0.3g, $MgSO_4$ 0.2g, NaCl 0.1g, $CaSO_4$ 0.005g, 酵母水 100cc, 寒天 15~18g, pH 6.8) の斜面上に移し、28°C の定温器中に約 1 ヶ月保持し、絶えず寒天斜面上に於ける微生物聚落の発生を調査する。

(2) 上述の分離試験を、自昭和 25 年 7 月至 27 年 2 月間、ハンノキ類 (ヤマハンノキ及びハンノキ) の根瘤について 17 回に亘つて総計 219 本の試験管を使用して実施し 29 株の、

又ヤシヤブシ類 (オオバヤシヤブシ及びヤシヤブシ) では 19 回に亘つて計 342 本の試験管を使用して 24 株の放射状菌 (actinomycetes) を分離した。

(3) 分離頻度、即ち放射状菌の発生が見られた試験管数の総試験管数に対する百分率は、ハンノキ類では 12% (27:219)、ヤシヤブシ類では 6% (21:342) であつた。且つ此等の放射状菌は、年間を通じ両類から分離されるように思推された。

(4) 両類の根瘤から分離された放射状菌は其の発生状態により、3つの発生型即ち第Ⅰ、第Ⅱ、第Ⅲの型に分けられた。

第Ⅰ型：本型の聚落は培地に於ける発生が迅速で、早い場合は 48 時間で肉眼的に発生が認められ、普通 1~2 週間で径 0.5 cm 内外の聚落に発育した。聚落は黄白色或は淡黄褐色の軟骨状を呈し、培地に固く密着し、気菌絲は普通見られなかつた。屢々其の或るものは、発生の初期から周囲の寒天を褐色にした。

此等はハンノキ類の根瘤から分離された放射状菌の大部分を占め、又ヤシヤブシ類からも時折分離された。

第Ⅱ型：本型の聚落は培地上の発生は遅く、普通 2~3 週間で径 1~2 mm 位の聚落として発生した。聚落の表面は白色粉状の気菌絲で覆われ、菌台は橙色で、時には紫紅色を呈し、培地に固く密着した。此等の放射状菌は普通色素を培地に出さないが、古い培養のものでは時折、極く附近の培地に紫紅色の色素を出すのが見受けられた。

此等はヤシヤブシ類の根瘤から分離された放射状菌の大部分を占め、又ハンノキ類からもまれに分離された。

第Ⅲ型：本型の聚落は培地に於ける発育が可成り迅速で、1 週間で直径 1~2 mm に達した。聚落の表面は白色短綿状の気菌絲で覆われ、菌台は赤橙色で、培地に固く密着することなく脆状を呈した。

本放射状菌はハンノキ類の根瘤からのみまれに分離された。

(5) ハンノキ類から分離された 29 株の放射状菌のうち、22 株は第Ⅰ型に属し、其の大部分は略々類似性を有する *Streptomyces* のようであり、其の他のものも、A-161 菌株が *Micromonospora* 属に属しているのを除いては、同様 *Streptomyces* 属に属した。残りの 7 株のうち、4 株は第Ⅱ型に属する同一種類の *Streptomyces* の如く、3 株は第Ⅲ型に属する同一種類の放射状菌 (actinomycetes) の如く思推されたが、何れの属に帰属するかは現在検討中である。

ヤシヤブシ類から分離された 24 株の放射状菌のうち、19 株は第Ⅱ型に属する同一種類の *Streptomyces* の如く、又他の 5 株は第Ⅰ型に属する可成り類似性のある *Streptomyces* であつた。

(6) 両分離試験を通じ、上述の放射状菌以外の微生物が分離される場合は極めて少なかつ

た。

B 殺菌剤利用による分離試験

(7) 本方法はまず若いハンノキ属苗から採集した新鮮且つ充実した根瘤を、0.5% メルクロン水溶液で 3 乃至 10 分間 (或は 0.1% 昇汞水で 5 分間) 根瘤表面を殺菌し、シャーレ中の酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天培地上に移す。

次に根瘤表面の滅菌状態をシャーレの寒天培地上で 28°C で約 72 時間、途中 2～3 回、別のシャーレの寒天培地に移し換えて検査した後、根瘤表面の殺菌が完全と思われた根瘤を磨碎して、其の磨碎物を酵母水—葡萄糖—ペプトン寒天培地 (或は Plotho が 1941 年に報告している酵母水—マンニツト寒天培地、肉エキス—ペプトン寒天培地) を用いて扁平培養による分離試験に供した。

(8) 本分離試験をオオバヤシヤブシ、ヤマハンノキの根瘤について夫々 3 回、即ち昭和 26 年 12 月、昭和 27 年 2、4 月に実施したが、前者の根瘤から可成り多数の第 II 型に属する *Streptomyces* が分離され、後者からは 2 株の第 I 型に属する *Streptomyces* が分離された。

(9) A、B の分離方法、特に A の分離方法を、ヤマモモ、アキグミ及びモクマオウの根瘤に適用してみた処、各樹種に特有と思われる *Streptomyces* が主として分離されるようである。

(10) 此等分離放射状菌の主なるものについての細菌学的諸性質の調査並びに寄主植物に対する接種試験は現在実施中で、引続き発表の予定である。

本稿を終るに臨み、多大の御教示並びに御校閲を辱うした元東京大学教授、現長尾研究所長小南清、農林省林業試験場長農学博士大政正隆及び造林部長農林技官石川健康の諸先生に対し深甚の謝意を表す。

VI 引用文献

1. Borm, L. (1931) Die Wurzelknöllchen von *Hippophaë rhamnoides* und *Alnus glutinosa*. Bot. Arch., 31: 441—488, 1931.
2. Lieske, R. (1921) Morphologie und Biologie der Strahlenpilze (Actinomyceten). 1921.
3. Krebber, O. (1932) Untersuchungen über die Wurzelknöllchen der Erle. Arch. f. Miklob., 3: 588—608, 1932.
4. Peklo, J. (1910) Die Pflanzlichen Aktinomykosen (Ein Beitrag zur Physiologie der pathogenen Mikroorganismen). Centbl. Bakt. (etc.), II, 27: 451—579, 1910.
5. Plotho, O. von (1941) Die Synthese der Knöllchen an den Wurzeln der Erle. Arch. f. Miklob., 12: 1—18, 1941.
6. Rehder, A. (1927) Manual of cultivated trees and shrubs. 1927.
7. 植村誠次 (1951) ハンノキ属の根瘤に関する研究史 (ハンノキ属の根瘤に関する研究 第 1 報), 林試研報., 49: 1—10, 昭和 26 年

8. ————— (1952 a) ハンノキ属無菌苗養成に関する2, 3の実験 (ハンノキ属の根瘤に関する研究 第3報), 林試集報., 62: 53—68, 昭和27年
9. ————— (1952 b) ハンノキ属根瘤より放射状菌 (Actinomycetes) の分離に関する試験 (ハンノキ属の根瘤に関する研究 第4報) 林試研報., 52: 1—22, 昭和27年
10. Waksman, S. A. (1950) The Actinomycetes (Their Nature, Occurrence, Activities, and Importance). 1950.
11. Ziegenspek, H. (1925) Die cytologischen Vorgänge in den Knöllchen von *Hippophaë rhamnoides* (Sanddorn) und *Alnus glutinosa* (Erle). Ber. Deut. Bot. Gesell., 47: (Generalversammlheft) 50—58, 1930.

Ⅶ 図版説明

第Ⅰ図版

- 写真 1. 根瘤着生の分離用根の細片
 上列の3片はオオバヤシヤブシ4ヶ月苗より採集
 下列の3片はヤマハンノキ4ヶ月苗より採集
- 写真 2. 写真1の根の細片より一部根瘤を除去して、根瘤の中心柱を露出させたもの
- 写真 3. 略々完全なるオオバヤシヤブシ4ヶ月苗の根瘤の中心柱
- 写真 4. 先端を欠除したヤマハンノキ4ヶ月苗の根瘤の中心柱

第Ⅱ図版

- 移植後 28°C で 10 日間酵母水—葡萄糖—寒天斜面培地上で培養した第Ⅰ, 第Ⅱ, 第Ⅲ型の放射状菌
- a. 第Ⅰ型 (A—136), b. 第Ⅱ型 (A—1020), c. 第Ⅲ型 (A—144b). ×1.7

Explanation of plates

Plate I

- Phot. 1. Root pieces with nodules for isolation test.
 Upper three were collected from 4 months old seedlings of *Alnus Sieboldiana* Matsumura.
 Lower three were collected from 4 months old seedlings of *Alnus tinctoria* var. *glabra* Call..
- Phot. 2. Root pieces of Phot. 1 on which some of the nodules were removed and the steles of them were remained.
- Phot. 3. The complete nodule stele of *A. Sieboldiana* Matsumura (4 months old seedling).
- Phot. 4. The top-lacking nodule stele of *A. tinctoria* var. *glabra* Call.. (4 months old seedling).

Plate II

- Type I, II and III actinomycetes in 10 days at 28°C after inoculation on Yest-glucose-peptone agar slope.
- a. Type I (A—136), b. Type II (A—1020), c. Type III (A—144b). ×1.7

Résumé

Studies on the Root Nodules of Alders (*Alnus* spp.). (V)
Some new isolation methods of *Streptomyces* from alder nodules.

By Seiji UEMURA

This report deals with the isolation experiments which were carried out to isolate the *Streptomyces* from alder nodules by some new isolation methods originated by the author.

A. Isolation experiment using the top of nodule stele.

(1) This isolation method is as follows: The small root piece with fresh and complete nodules (cf. Pl. 1, Phot. 1) was mechanically washed with distilled water and soap repeatedly and the nodules so removed with a sterilized pincette from the root piece as the complete nodule steles remained on the root piece (cf. Pl. 1, Photos. 2~4).

Then, a cooled sterilized platina needle was contacted with the top of nodule stele twice or thrice and the trace of nodule tissue on it was transferred on the slope of Yeast-glucose-peptone agar medium (Glucose 20 g, Peptone 10 g, K_2HPO_4 0.2 g, KH_2PO_4 0.3 g, $MgSO_4$ 0.2 g, NaCl 0.1 g, $CaSO_4$ 0.005 g, Yeast extract 100 cc, Distilled water 900 cc, Agar 15 to 18 g, pH 6.8) in a test tube and the test tube was incubated at 28°C for about a month and the development of microorganisms on the agar slope of it was investigated continuously.

(2) From July 1950 to February 1952, the isolation test above mentioned had been done 17 times over with 219 test tubes in total on the root nodules of *Alnaster* group (*Alnus tinctoria* Sarg. var. *glabra* Call. and *A. japonica* Sieb. et Zucc.) and 19 times over with 342 test tubes in total on *Alnus* group (*A. Sieboldiana* Matsumura and *A. firma* Sieb. et Zucc.). As the results, 29 stocks of actinomycetes were isolated from the former group and 24 stocks of actinomycetes from the latter (cf. Tables I and II).

(3) The isolating frequency, that is, the ratio of the number of test tubes from which actinomycetes were isolated to the total number of test tubes was 12 per cent (27: 219) for *Alnaster* group, and 6 per cent (21: 342) for *Alnus* group, and these actinomycetes seemed to be isolated throughout the year for the both groups.

(4) Those actinomycetes isolated from the both groups seemed to be classified on the basis of their developing state into three types; I, II, and III.

Type I: Colonies of this type developed rapidly on the medium and were noticed with the naked eye in 48 hours in the earliest case and grew into 0.5 cm in diameter in one to two weeks usually. They were of cartilage in appearance with pale yellow or pale yellowish brown in color and tenaciously adhered to

the medium and aerial hypha did not appear on them usually. Frequently, some of them made the surrounding medium dark brown in color even at the beginning of their development.

This type occupied the greater part of actinomycetes isolated from *Alnaster* group, and occasionally, those isolated from *Alnus* group (cf. Table 1, 2 and Plate 2, a).

Type II : Colonies of this type developed slowly on the isolation medium and attained a diameter of 2 to 3 mm in 2 to 3 weeks usually. The surfaces of these colonies were covered with white powdery aerial hypha and the vegetative mycelia were orange or sometimes reddish purple in color and tenaciously adhered on the medium. These actinomycetes did not produce pigment on the medium usually, but sometimes they did on old culture; the reddish purple pigment was noticed on the closely surrounding medium.

These occupied the majority of actinomycetes isolated from *Alnus* group but they rarely appeared in those isolated from *Alnaster* group (cf. Table 1, 2 and Plate 2, b).

Type III : Colonies of this type developed pretty rapidly on the medium and reached a diameter of 1 to 2 mm in a week. The surfaces of these colonies were covered with white flaky powdery aerial hypha. The vegetative mycelia were reddish orange in color and they were brittle without being adhesive on the medium tenaciously.

These actinomycetes were rarely isolated and it was only from *Alnaster* group (cf. Table 1 and Plate 2, c).

(5) Among the 29 stocks of actinomycetes isolated from *Alnaster* group, 22 stocks belonged to the first type and the majority of them seemed to be a similar kind of *Streptomyces* and the others were also *Streptomyces* except A-161 stock belonging to *Mycromonospora*. And among other 7 stocks of actinomycetes, 4 stocks seemed to be the same kind of *Streptomyces* belonging to the second type and 3 stocks to be the same kind of actinomycete belonging to the third type, but to which genus these three actinomycetes belong is now under investigation.

Among the 24 stocks of actinomycetes isolated from *Alnus* group, 19 stocks seemed to be the same kind of *Streptomyces* belonging to the second type and other 5 stocks were *Streptomyces* belonging to the first type.

(6) Throughout the both isolation experiments, there were few cases in which other kinds of microorganisms except the above mentioned were isolated.

B. Isolation experiment using some disinfectants.

(7) This isolation method is as follows: The fresh and complete nodules gathered from young alder seedlings (1 to 2 years old) were sterilized with 0.5 per cent Mercuron solution for 3 to 10 minutes (or with 0.1 per cent Mercuric

chloride solution for 5 minutes) for sterilizing the nodule surfaces and were transferred on Yeast-glucose-peptone agar medium in Petri dishes.

For the purpose of confirming the sterilization of the nodules placed on the agar medium in Petri dishes, they were kept in a thermostat for about 72 hours at 28°C, and during that time, at intervals of about 24 hours, portions of them were transferred on the medium of other Petri dishes to be sure that they were not contaminated.

The nodules whose surfaces turned out to be completely disinfected were polished and the nodule crushes of them were used for isolation by the method of plate culture with Yeast-glucose-peptone agar medium (or Yeast-mannit agar medium or Beef extract-peptone agar medium by Plotho stated in 1941).

(8) By doing this isolation test three times, that is, in December 1951, February and April 1952, on the root nodules of species of *Alnus Sieboldiana* Matsumura and *A. tinctoria* Sarg. var. *glabra* Call., respectively, the considerable number of *Streptomyces* colonies belonging to the second type were isolated from the former and two colonies of *Streptomyces* belonging to the first type were isolated from the latter (cf. Table III).

(9) Applying the isolation methods of A and B, especially A, on the root nodules of *Myrica rubra* Sieb. et Zucc., *Elaeagnus umbellata* Thumb., and *Casuarina equisetifolia* Forst., the *Streptomyces* apparently peculiar to each of the above species were usually isolated.

(10) The results of the detailed bacteriological investigations of these isolated actinomycetes and their inoculation tests on their host plants will be reported in the next report.

Laboratory of Forest Soil Microbiology,
Government Forest Experiment Station
Meguro, Tokyo, Japan.

第 I 図版 (Plate I)

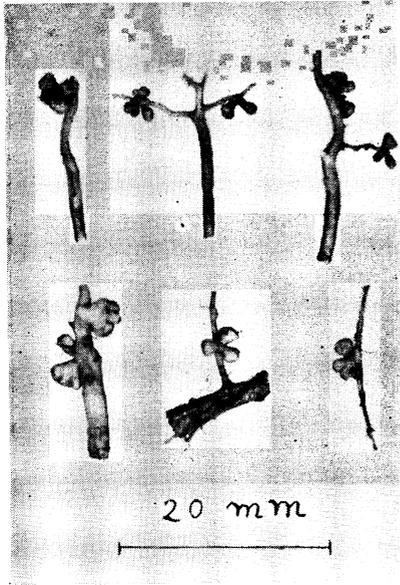


写真1 (Phot. 1)

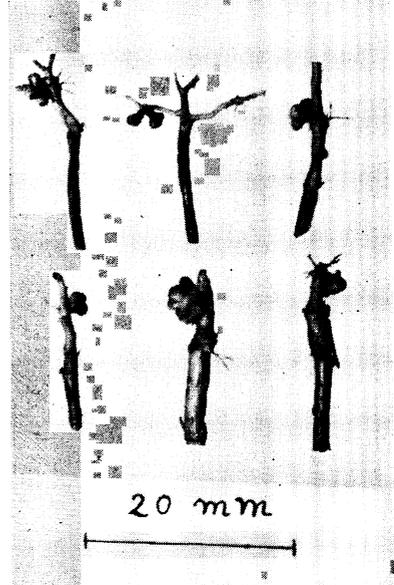


写真2 (Phot. 2)

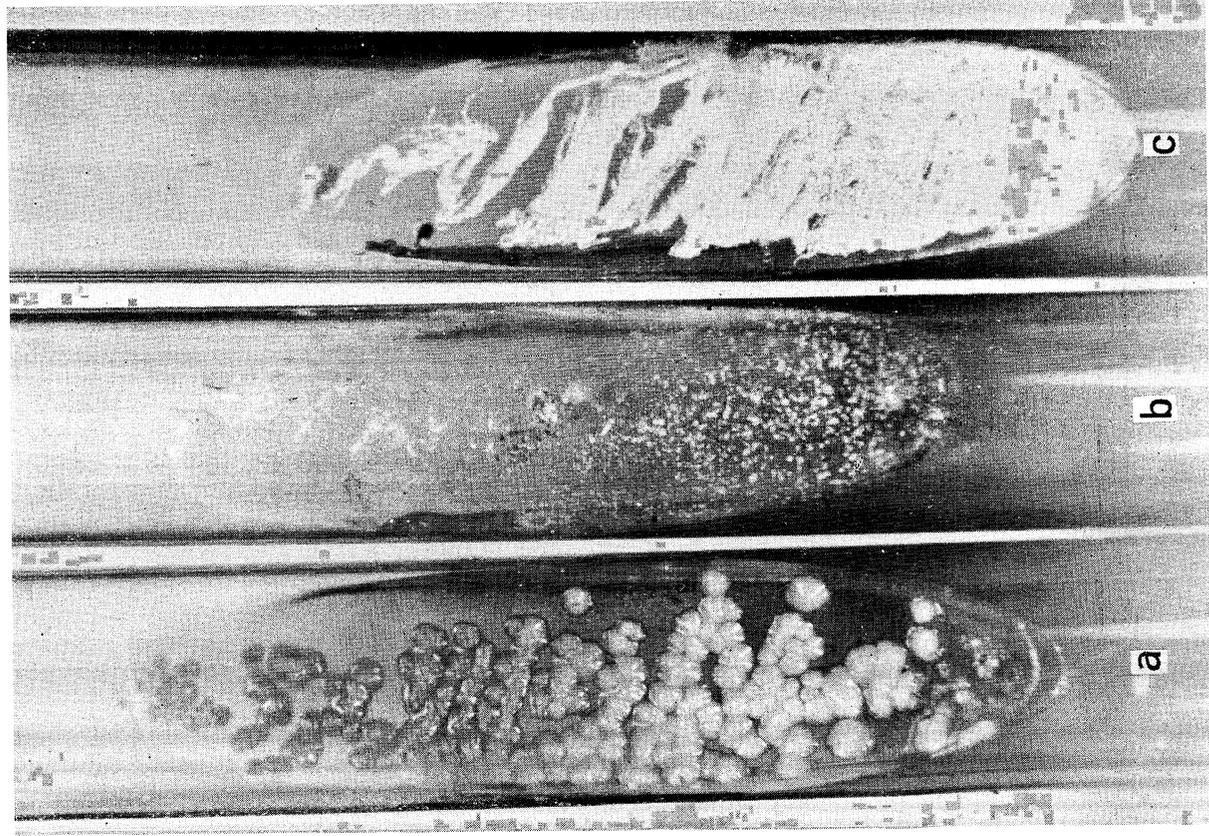


写真3 (Phot. 3)



写真4 (Phot. 4)

第 II 図 版 (Plate II)



S. UEMURA: Alder root nodule-V.