

## 九州で分離されたイネ白葉枯病菌の 薬剤感受性の測定

上運天 博\*, 桃坂 敬\*\*

### Measurement of Antibiotic Susceptibilities of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* Isolated in Kyushu District of Japan

Hiroshi KAMIUNTEN and Takashi MOMOSAKA

(平成2年7月2日 受理)

A total of 98 isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* were isolated from diseased rice leaves collected from various localities in Kyushu, and minimal inhibitory concentrations (MIC) of eight antibiotics against all isolates were determined by the agar dilution method. Antibiotics used were rifampicin (RF), trimethoprim (TMP), erythromycin (EM), ampicillin (AP), kanamycin (KM), streptomycin (SM), tetracycline (TC) and chloramphenicol (CP). All isolates were inhibited by  $0.39 \mu\text{g}/\text{ml}$  of RF, whereas 97 isolates were not inhibited by  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  of TMP. As for other antibiotics, normal distribution curves of MIC were shown. Peak of MIC values were ;  $0.39 \mu\text{g}/\text{ml}$  for EM,  $1.56 \mu\text{g}/\text{ml}$  for AP, KM and SM,  $6.25 \mu\text{g}/\text{ml}$  for TC,  $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  for CP.

Key words : *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*,  
Antibiotic, Minimal inhibitory concentration (MIC) .

### 緒 言

近年、植物細菌病の防除においても、ストレプトマイシン、オキシテトラサイクリン、クロラムフェニコールなどの抗生物質が使用されるようになり、とりわけ各種植物病原細菌のストレプトマイシン耐性菌の出現が報告されるようになってきた<sup>1-6)</sup>。しかし、ストレプトマイシン以外の抗生物質に対する耐性についての報告はほとんどなく、疫学的な調査研究もなされていないのが実情である。その理由として、一般圃場において細菌病の防除に抗生物質が使用されるようになっ

たとは言え、臨床細菌、畜産、水産関係の分野と比べれば、その使用頻度は低く、余り問題とならなかったことが上げられる。現在、イネ白葉枯病の防除にも抗生物質が使用されており、種々の抗生物質に対する耐性菌がどの程度の頻度で、九州内に分布しているかを調べるため、九州各地から分離したイネ白葉枯病菌に対する8種の抗生物質の最小発育阻止濃度(MIC)の測定を行った。

### 材料および方法

#### 1. 細菌の分離

九州4県各地の栽培稲(品種:クジュウ, ミナミニシキ, 日本晴, 黄金晴など)に発生していたイネ白葉枯病罹病葉から常法により病原細菌98菌株を分離し, 実験に供試した(Table 1).

Table 1. Isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*

Locality	Number of isolates
Fukuoka pref.	
Iizuka	10
Kurate	19
Saga pref.	
Saga	11
Tosu	2
Uresino	8
Shiroishi	5
Kawasoe	4
Oita pref.	
Bungotakada	4
Hita	4
Usa	4
Kusu	2
Miyazaki pref.	
Miyakonojo	15
Ebino	10
Total	98

## 2. 培地

イネ白葉枯病菌の分離およびMIC測定用培地には後藤培地<sup>9)</sup>(グルタミン酸ナトリウム1g, ペプトン10g, サッカロース10g, 寒天15g, 蒸留水1000ml, pH7.0)を用い, 継代培養にはジャガイモ煎汁半合成培地<sup>7)</sup>(ジャガイモ300gの煎汁, 硝酸カルシウム0.5g, リン酸二ナトリウム2g, ペプトン5g, サッカロース20g, 寒天15g, 蒸留水1000ml, pH7.0)を用いた。

## 3. 薬剤耐性の検定

リファンピシン(RF), トリメトプリム(TMP), エリスロマイシン(EM), アンピシリン(AP), カナマイシン(KM), ストレプトマイシン(SM), テトラサイクリン(TC), クロラムフェニコール(CM)の各抗生物質に対する耐性を調べた。リファンピシンとトリメトプリムの溶解剤としてエタノールまたはジメチルスルホキシドを用い, エリスロマイシンにはエタノールを用いた。その他の抗生物質は直接滅菌蒸留水に溶解し, 得られた1000 $\mu$ g/mlの各抗生物質溶液を原液とした。これら原液および連続2倍希釈液1mlをそれ

ぞれ溶解後約60 $^{\circ}$ Cに冷やした9mlの培地に加えてよく混ぜ, ペトリ皿に流し込み薬剤希釈平板を作った。薬剤希釈平板の濃度段階はそれぞれ, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39 $\mu$ g/mlとし, 蒸留水1mlを加えたのを対照とした。

24時間培養の被検菌を白金耳でかきとり, 滅菌蒸留水に加え, 濃度約 $10^6$ ~ $10^8$ /mlの菌懸濁液を作り, 薬剤希釈平板上にスポット移植した後, 30 $^{\circ}$ Cで48時間培養した。移植した被検菌の生育が完全に阻止された最低の薬剤濃度を最小生育阻止濃度(MIC)とした。

## 結 果

各抗生物質のイネ白葉枯病菌に対するMICの分布曲線をFig. 1に示した。

イネ白葉枯病菌はリファンピシンに対して最も強い感受性を示し, 0.39 $\mu$ g/mlの濃度で, すべての供試菌株の生育が阻止された。次いで, エリスロマイシンに対して感受性が高く, 約86%の菌株が0.39 $\mu$ g/mlで生育が阻止され, 残り約14%の菌株は1.56 $\mu$ g/mlで生育が阻止された。アンピシリン, カナマイシンおよびストレプトマイシンのMIC値のピークはそれぞれ, 1.56 $\mu$ g/mlであり, テトラサイクリンおよびクロラムフェニコールのそれはそれぞれ, 6.25 $\mu$ g/mlおよび12.5 $\mu$ g/mlであった。トリメトプリムに対しては最も高い耐性を示し, MIC値のピークは100 $\mu$ g/ml以上であった。なお, いずれの抗生物質においても典型的な2峰性の分布曲線を示すものはなかった。

## 考 察

植物菌類病の防除剤として種々有効な薬剤が開発され, めざましい効果を上げているが, 植物細菌病においては, 効果的な防除剤が少なく, 医薬用に開発された抗生物質の中から選択し利用されるようになって来ている。それに伴い耐性菌の出現が問題となりつつある。

イネ白葉枯病菌は水田と言う特殊な環境条件下で, 他種細菌と接する可能性も高いと考えられ, 種々の抗生物質に対する耐性についての調査を行った。その結果, すべてのイネ白葉枯病菌はリファンピシンに対し, 高い感受性を示し, 他方トリメトプリムには極めて高い耐性を示していた。MIC値が100 $\mu$ g/mlのストレプトマイシン耐性菌もわずかに存在していたが, MIC

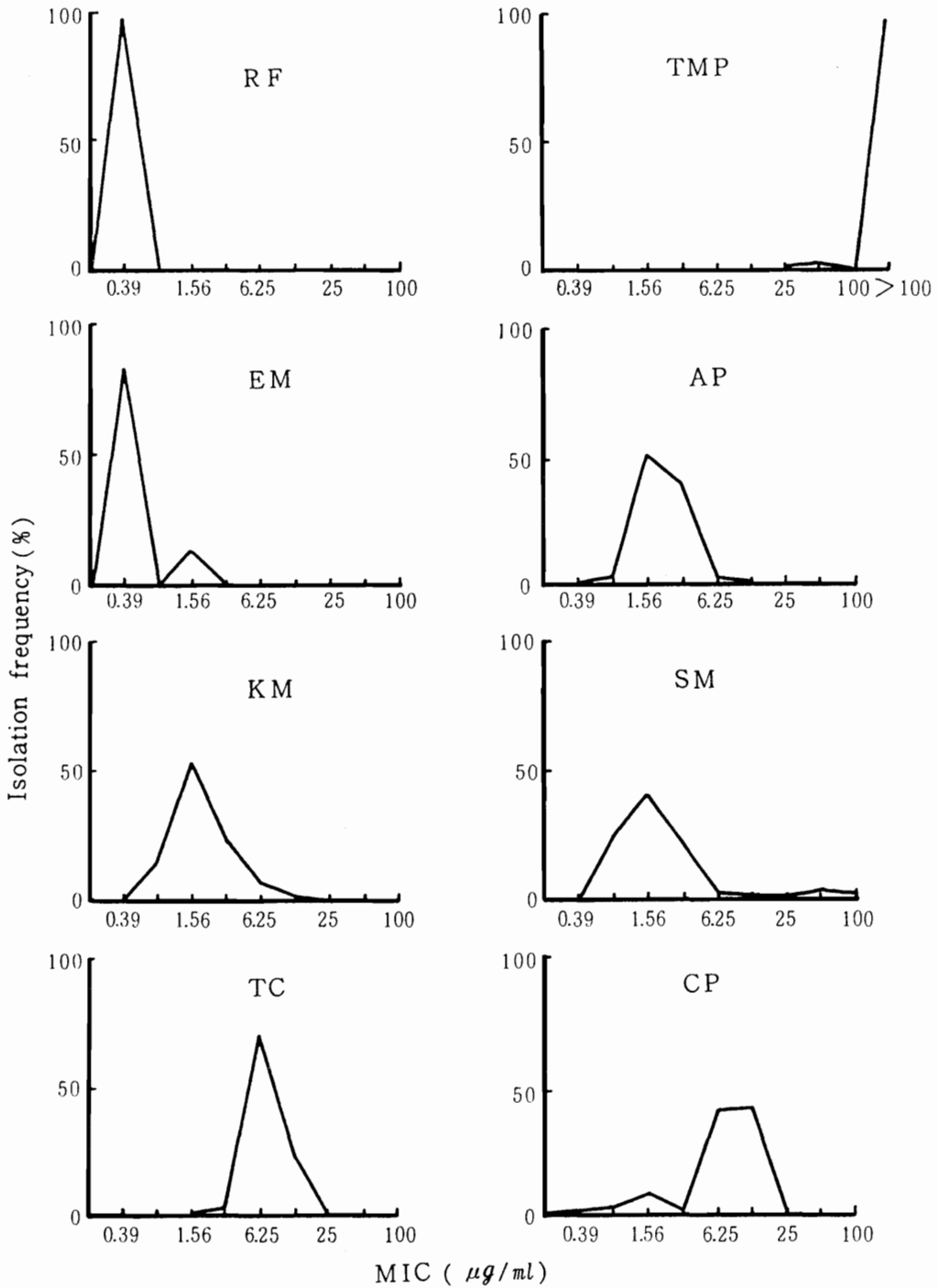


Fig. 1. Susceptibility distribution of 98 isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* against various antibiotics

のピーク値は6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。しかし、ストレプトマイシンが農薬として広く使用される以前の1956から1959年にかけて全国から分離し、数年室温で継代保存していたイネ白葉枯病55菌株のストレプトマイシンに対する耐性を調べた報告<sup>9)</sup>によると、分離菌株の約40%が10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトマイシン含有培地に生育しており、本実験の調査結果とかなりの差が認められた。この差は実験方法の違いに由来しているのかもしれない。

イネ白葉枯病菌の各抗生物質に対する感受性あるいは耐性の程度には分離菌株の地域による差は認められなかった。今後、効果的な防除を進めるためにも、全国的に分離菌の耐性をしらべ、その疫学的動向を探る必要があると思われる。

### 要 約

九州各地からイネ白葉枯病菌を計98菌株分離し、それら分離菌株に対する8種の抗生物質(リファンピシン、トリメトプリム、エリスロマイシン、アンピシリン、カナマイシン、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール)の最小発育阻止濃度(MIC)を寒天平板希釈法により求めた。その結果、分離菌株すべてがリファンピシンに感受性であり、0.39  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で生育が阻止された。それに対し、98菌株中97菌株は100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でも生育可能であり、トリメトプリム耐性であった。その他の抗生物質のMICの分布曲線は正規分布を示し、エリスロマイシン、アンピシリン、カナマイシン、ストレプトマイシン、テトラサイクリンおよびクロラムフェニコールのMIC値ピークはそれぞれ、0.39, 1.56, 1.56, 1.56, 6.25および12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

キーワード：イネ白葉枯病菌、抗生物質、最小発育阻止濃度

### 引用文献

- 1) Sakurai, H., Naito, H. and Fujita, S. : Sensitivity distribution of phytopathogenic bacteria and fungi to antibiotics. *J. Antibiotics*, **29**, 1230-1236 (1976)
- 2) 松本英紀, 大森尚典, 石井卓男: カンキツかいよう病菌のストレプトマイシン耐性菌の検定法とほ場における分布. 日植病報, **42**, 79-80 (1976)
- 3) Yano, H., Fujii, H., Mukoo, H., Fukuyasu, T., Watanabe, T. and Sekizawa, Y. : Drug-resistance of cucumber angular leaf spot bacterium, *Pseudomonas lachrymans* (Smith et Bryan) Carens. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **44**, 334-336 (1978)
- 4) 高梨和雄: モモせん孔細菌病分離株のストレプトマイシン剤耐性について. 日植病報, **45**, 552 (1979)
- 5) 林宣夫, 贅田裕行: ストレプトマイシン耐性コンニャク腐敗病菌に関する知見. 日植病報, **46**, 409 (1980)
- 6) Parry, R.W.H., and Callow, J.A. : Improved method for obtained viable counts of *Xanthomonas oryzae*. *IRRN*, **7**, 5 (1982)
- 7) Wakimoto, S. : Strains of *Xanthomonas oryzae* in Asia and virulence against rice varieties. p.19-24, *Tropical Agr. Res. Ser. No. 1.*, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council, Tokyo. (1967)
- 8) 脇本哲, 向英夫: ストレプトマイシン耐性イネ白葉枯病の自然界における分布. 日植病報, **28**, 153-158 (1963)