

ファージ法による *Xanthomonas citri* の 検出精度に関する 2, 3 の要因*

小畑 琢志・小林 敏郎・坪井 福俊**

横浜植物防疫所調査課

ファージの増殖を指標として寄主細菌の存在を検出する方法 (KATZNELSON, 1950; 脇本, 1954) は、比較的簡便な操作により、短時間のうちに、目的とする菌を雑菌や交雑物を含む試料から検出できることが大きな利点である。しかしながらこの方法の適用にあたっては、方法の信頼性そのものに直接あるいは間接に重要なかわり合いをもつ、いくつかの要因を十分に認識しておく必要がある。基本的な要因のひとつは使用するファージの寄主特異性およびその範囲であり、他はファージの感染・増殖の機作そのものに由来する菌の検出限界である。また副次的ではあるが、精度に影響する要因としてファージの時間的および量的な増殖効率をあげることができる。

現在アメリカ向け輸出みかんのかいよう病菌の検定には WAKIMOTO (1967) の CP₁ および CP₂ ファージが用いられている (OBATA et al., 1969)。この両ファージは寄主の種特異性にも比較的すぐれているうえ (Goto and STARR, 1972)、両者を合わせた溶菌範囲は、日本の輸出みかん産地に分布するほとんどすべての *X. citri* 菌系を包含することが確認されている (小畑, 1973)。本研究においては現行のファージ検定法を中心として、その検出精度を把握するため、かいよう病菌と CP₁、CP₂ 両ファージの相互的増殖関係、両ファージの一段増殖およびこれを定性的に利用した検出法などを比較検討した。

本研究をおこなうにあたり、ファージおよび指示菌を提供された九州大学脇本哲博士、種々御教示を賜わった静岡大学後藤正夫博士に厚く謝意を表する。

I 材料および方法

本研究では特に記さない限り次の材料と方法によった。

培地: 使用培地はペプトン・蔗糖寒天培地で、組成は

ペプトン 10 g, 蔗糖 10 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1 l, pH 6.8 である。重層法における上層用軟寒天培地は寒天が 6 g, 液体培地は寒天を除いた以外はそれぞれ上記培地と同一組成である。

供試菌: 本研究中のすべての実験およびファージ定量用の指示菌として N 6101 菌および N 6119 菌を用いたほか、一段増殖実験には Y 1, Y 2, Y 3, Y 4 の各菌株をあわせて用いた。各菌株の来歴、ファージ感受性は第 1 表のとおりである。

第 1 表 供試菌株の来歴とファージ感受性

菌株	来歴	ファージ感受性
N 6101	脇本氏より分譲 (1961年神奈川県下のレモンから分離)	CP ₁ (+)
N 6119	脇本氏より分譲 (1961年佐賀県下の温州から分離)	CP ₂ (+)
Y 1	1972年静岡県下のレモンから分離	CP ₁ (+)
Y 2	1971年静岡県下の香水橙から分離	CP ₁ (+)
Y 3	1971年静岡県下の温州から分離	CP ₂ (+)
Y 4	1971年静岡県下の温州から分離	CP ₂ (+)

菌の増殖とファージの増殖との相互関係の実験には斜面培地、そのほかの菌数測定を要する実験には液体培地で、それぞれ一晩前培養した菌を培地で適宜稀釈して用いた。

培養条件: ファージの増殖および菌の培養温度はすべて 25°C の条件下でおこない、振とう培養は振幅 2.5 cm, 頻度 160 回/分でおこなった。

抗ファージ血清: 分画遠心により部分純化したファージを、4~5 日おきに 0.5~2 ml ずつ家兎に注射して得た抗血清から抗菌抗体を吸収して用いた。吸収は約 10⁹/ml 濃度の菌を 37°C, 2 時間作用させた後、遠沈した上澄をさらに最低 2 回ミリポアフィルターでろ過して、菌体を除いた。抗血清のファージ不活化反応速度恒数 K は抗 CP₁ 血清が 650, 抗 CP₂ 血清が 1,850 で、一段増殖実験には両抗血清とも原液を 1/50, 高濃度ファージ法

* 本報告の 1 部は 1972 年度 日本植物病理学会 夏季 関東部会 (昭和 47 年 7 月 8 日 和光市) において発表した

** 現在国際課

による菌の検出実験には、両抗血清とも 1/10 に培地でそれぞれ稀釈して用いた。

ファージ：N 6101 菌および N 6119 菌をそれぞれ用いて増強したファージ CP₁ および CP₂ をクロロホルムで処理し、培地で適宜稀釈した。溶菌斑計数は試料から 0.1 ml をとり重層法でプレートした。

菌の増殖とファージの増殖との相互関係の実験：培地 40 ml に一晩前培養した菌を、濃度が約 4×10^2 , 4×10^4 , 4×10^6 /ml になるように調節し、それぞれ 20 ml ずつ 2 つの平底フラスコ (50 ml 容) に分注した。各菌濃度区とも 1 方のフラスコに濃度が $3 \sim 4 \times 10^3$ /ml になるようにファージを添加し、これをファージの増殖定量用とした。もう一方のフラスコにはファージを添加しないで、菌の増殖定量用とし、それぞれ振とう培養した。ファージおよび菌の定量はファージ添加時から培養 3 時間ごとに 33 時間後までおこなった。

ファージの一段増殖実験：実験の手順は主として ADAMS (1959) の方法に準じ、第 2 表に示すとおりである。

第 2 表 一段増殖実験の手順

時間	試験管	手 順
— 5 分		菌およびファージの濃度測定
0	(I) 吸着管	0.9 ml の菌に 0.1 ml のファージ添加
5	(II) 血清管	(I) から 0.1 ml をとり 0.9 ml の抗ファージ血清に加える
10	(III) 稀釈管	(II) から 0.1 ml をとり 2.9 ml の培地に加える
11	(IV) 第 1 増殖管	(III) から 0.1 ml をとり 9.9 ml の培地に加える
12	(V) 第 2 増殖管	(IV) から 0.1 ml をとり 9.9 ml の培地に加える
20		(V) から 0.5 ml をとり、これをクロロホルム処理後、遊離活性ファージ検定

低濃度ファージ法および高濃度ファージ法の比較試験：

1) 試料の調整：純粋菌液試料は培地に菌を懸濁し、10 倍ごとの段階稀釈液を作製した。土壤懸濁液は畑土 5 g を殺菌水 100 ml に入れ強振し、約 1 時間静置後上澄を採取した。この上澄を 9.9 ml ずつとり、各々に段階稀釈した菌液 0.1 ml を加えてよく混合した。各菌濃度区とも 3 ml をとり、8,000 rpm、5 分間遠心分離して得た沈澱を等量の培地で再懸濁して供試した。

2) 実験の手順は第 1 図に示すとおりで、原則として脇本 (1954, 1955) の方法に準じた。

高濃度ファージ法においては、未吸着の遊離ファージの定量 (Check) はファージの潜伏期間内、新生ファージ放出後のファージの定量 (Test) は上昇期を過ぎた直後に実施した。

II 結 果

1. 菌の増殖とファージの増殖との関係

初期細菌濃度が異なる菌液に $3 \sim 4 \times 10^3$ /ml の濃度のファージを添加した場合の、菌の濃度とファージの増殖との関係を経時的に調べ、両者の相互関係から試料に比較的低濃度のファージを添加した場合の菌の検出限界濃度を推定した。

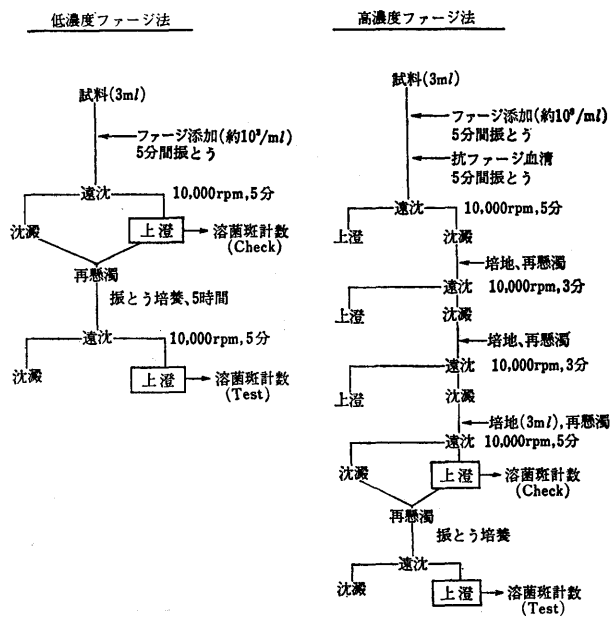
結果は CP₁-N 6101 菌の系については第 2 図、CP₂-N 6119 菌の系については第 3 図に示した。菌の増殖は N 6101 菌および N 6119 菌とも初期細菌濃度に関係なく、培養後 3 時間以内の増殖は緩慢であるが、それ以後対数増殖期に移行し、各区ともその増殖速度はほぼ一定であった。世代時間は N 6101 菌で 98 分、N 6119 菌で 95 分であった。両菌とも初期細菌濃度が 4×10^6 /ml の区では試験時間内に定常期に達し、その到達濃度は約 1.0×10^{10} /ml であった。なお培養液に濁りを生ずる時点の菌濃度は約 10^7 /ml であった。

ファージの増殖は CP₁, CP₂ 両ファージとも寄主細菌濃度に支配され、CP₁ では菌濃度が 10^4 /ml、CP₂ では $10^4 \sim 10^5$ /ml の場合に増殖が開始された。すなわち両ファージとも初期細菌濃度が約 4×10^6 /ml の区では、培養当初から著しい増殖が認められ、約 4×10^4 /ml の区においてもその濃度が 10^8 /ml に達する以前にファージ濃度の上昇が認められ、これらの初期細菌濃度の場合には培養 5 時間後には菌の検出が可能ながことが明らかである。初期細菌濃度が約 4×10^2 /ml の場合、CP₁ では菌濃度が 10^4 /ml、CP₂ では $10^4 \sim 10^5$ /ml に達するまでファージは増殖を開始せず、著しい増殖が認められたのは CP₁ で培養 15 時間後、CP₂ では培養 21 時間後であった。

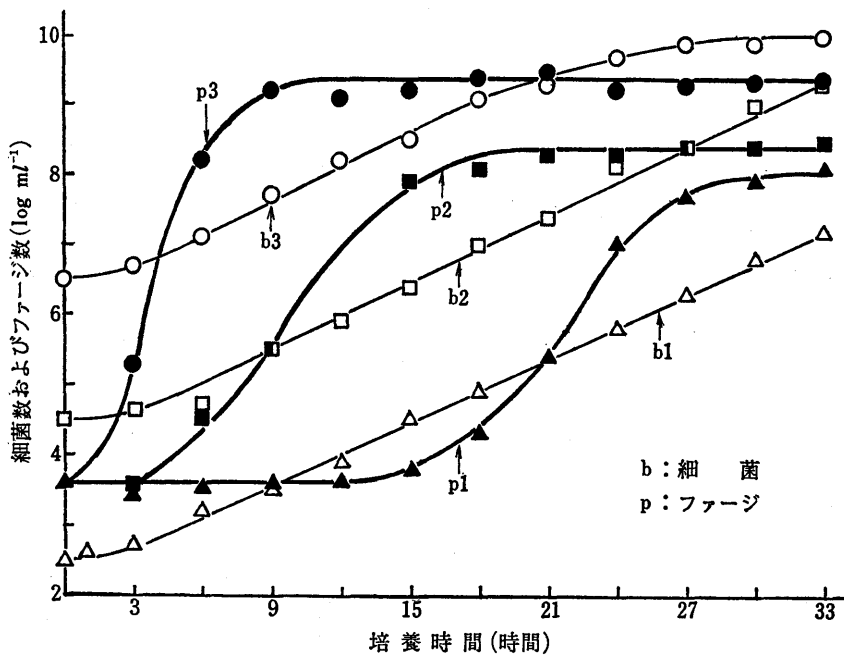
両ファージとも、その定常期における到達濃度は、実験の範囲内では初期細菌濃度が高いほど高くなる傾向があり、いずれのファージも初期細菌濃度が約 4×10^6 /ml 区では 10^9 /ml、約 4×10^4 /ml 区では 10^8 /ml のレベルに達した。

2. ファージ CP₁ および CP₂ の一段増殖実験

菌の濃度とファージの増殖との関係から、約 10^3 /ml の比較的低濃度のファージを用いて病原菌を検出しようとする場合、菌が試料中に 10^4 /ml 以上ないとファージ・菌の相互作用はほとんど起こらず、培養 5 時間後のファージ増殖は困難なことが予想される。 10^3 /ml 以下の

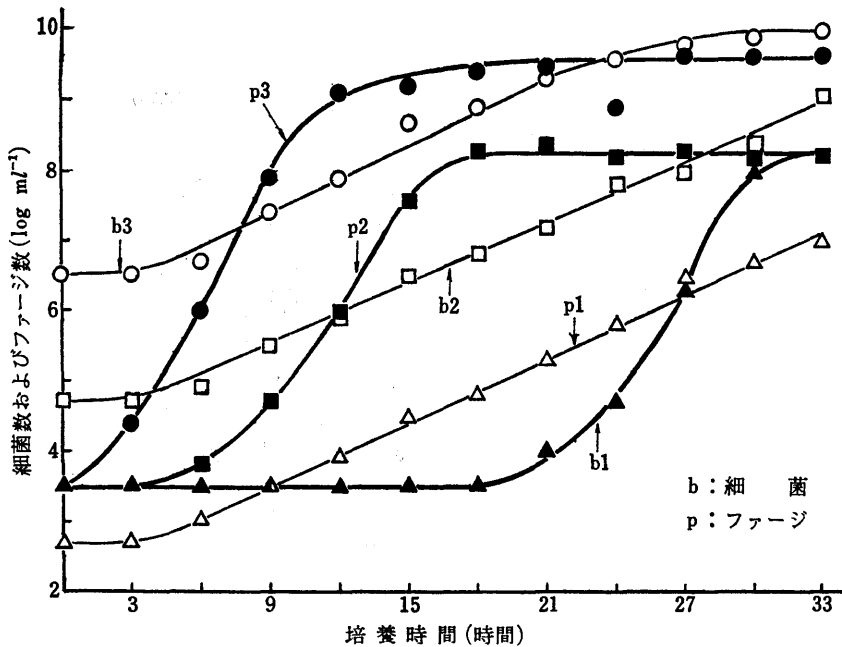


第1図 低濃度および高濃度ファージ法の検定手順



第2図 *X. citri* (N 6101) とファージ CP₁ の増殖曲線

b_1, b_2, b_3 は初期細菌濃度がそれぞれ約 $4 \times 10^2, 4 \times 10^4, 4 \times 10^6/ml$ の細菌の増殖を示し, p_1, p_2, p_3 はそれぞれ b_1, b_2, b_3 に対応するファージの増殖を示す



第3図 *X. citri* (N 6119) とファージ CP₂ の増殖曲線
 図中の記号は第2図に準ずる。

細菌を検知するためには、培養時間をより延長するか、あるいは少なくとも $10^8/\text{ml}$ 以上の多量のファージを加えて、菌への吸着・感染をはからなければならない。培養時間の延長は雑菌混入試料の場合、雑菌の増殖による目的の菌の増殖阻害が起こる恐れがある。多量のファージを使用する方法はファージの多重感染による一段増殖実験を応用するもので、新生ファージを正確に定量するため、最初に添加したファージのうち菌体に未吸着の過剰ファージを、抗ファージ血清で不活化させることが必要である。また遊離ファージの定量はファージの潜伏期間内におこなわねばならず、新生ファージの定量はすべての感染菌がファージの放出を終了した直後におこなうのが望ましい。さらに検出精度にかかわる菌のファージ放出量を把握しておくことも大切である。このような観点から、高濃度ファージ法をおこなうための前提として、一段増殖実験を試みた。

結果はファージ CP₁ については第3表および第4図 CP₂ については第4表および第5図に示すとおりである。CP₁ は潜伏期約50分、上昇期約30分、平均放出量約60で、菌株間、反復間によるふれは小さかった。CP₂ は潜伏期約110分、上昇期約70分、平均放出量約90であったが、平均放出量は少ない場合は約40、多い場合は約130になることがあり、菌株間および反復間によるふ

れが CP₁ に比し大きかった。

3. 低濃度ファージ法および高濃度ファージ法の検出精度比較試験

細菌の低濃度域において実際にどのレベルまで菌が検出できるか、低濃度のファージを添加する方法と高濃度のファージを添加する方法を、数段階の濃度の菌液を用いて比較した。また実用場面を想定して、純粋菌液のほか、土壌懸濁液中の菌と検出限界をも検討した。

結果は第5表および第6表に示すとおりである。ファージ CP₁ と CP₂ との間に検出限界に大きな違いはみられなかった。低濃度ファージ法による純粋菌液からの検出では、CP₁ の場合細菌濃度が $3.4 \times 10^5/\text{ml}$ 、CP₂ の場合 $2.8 \times 10^5/\text{ml}$ で培養5時間後にファージの顕著な増殖が認められた。菌濃度が $10^4/\text{ml}$ のレベルでも溶菌斑数は明らかに Test > Check となり菌の存在が検出されたが、 $10^3/\text{ml}$ のレベルの菌濃度ではファージの増殖ははっきりせず、菌の存在を検知することはできなかった。これに対し高濃度ファージ法では $10^2/\text{ml}$ のレベルの菌濃度でファージの菌への感染が起こり、CP₁ ではファージ添加後120分、CP₂ では200分後の時点で、ファージの増殖が認められ菌の存在が検出された。それ以下の菌濃度では無菌対照区との差が有意であるかどうかははっきりしなかった。

第3表 ファージ CP₁ の一段増殖実験結果

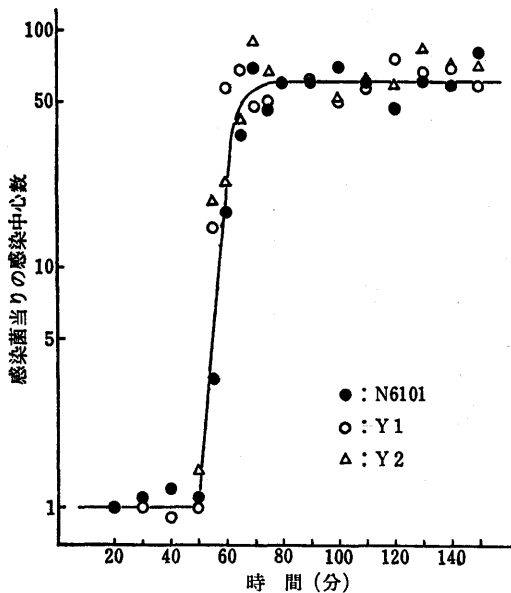
ファージ感染後の 時間	溶菌斑数*		
	N 6101 菌	Y 1 菌	Y 2 菌
20分	178	148	139
30	189	141	133
40	210	135	129
50	189	155	188
55	6	22	26
60	30	85	31
65	64	100	58
70	123	71	123
75	80	74	91
80	109	87	86
90	109	94	88
100	127	73	73
110	110	83	88
120	82	112	81
130	108	99	118
140	102	102	101
150	144	85	96
20分後の活性未吸着 ファージ数	0	0	0
使用菌濃度 (cells/ml)	2.9×10^8	2.0×10^8	1.9×10^8
添加後ファージ濃度 (pfu/ml)	1.2×10^8	1.2×10^8	1.2×10^8
感染多重度	0.16	0.22	0.29

* 感染後50分までは第1増殖管, 55分以後は第2増殖管からの溶菌斑数を示す。

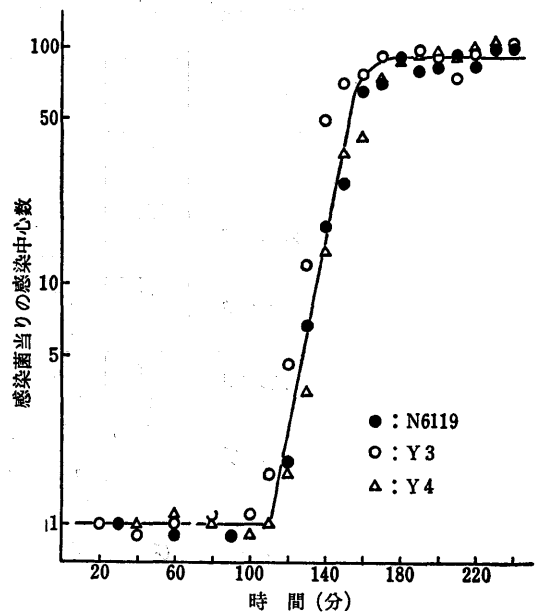
第4表 ファージ CP₂ の一段増殖実験結果

ファージ感染後の 時間	溶菌斑数*		
	N 6119 菌	Y 3 菌	Y 4 菌
20分		419	454
30	142		
40		374	463
60	129	421	484
80		446	433
90	134		
100		464	425
110		658	466
120	262	1,876	729
130	956	約 5,000	1,596
140	約 2,500	205	62
150	約 3,800	294	159
160	91	321	187
170	98	382	337
180	127	374	401
190	112	406	415
200	116	381	437
210	132	310	407
220	118	402	461
230	141	401	473
240	137	456	480
20分後の活性未吸着 ファージ数	0	0	0
使用菌濃度 (cells/ml)	1.7×10^8	8.1×10^8	7.4×10^8
添加後ファージ濃度 (pfu/ml)	1.5×10^8	6.0×10^8	6.0×10^8
感染多重度	0.27	0.17	0.20

* N 6119 菌については感染後150分まで, Y 3, Y 4 菌については130分まで第1増殖管, それ以後はそれぞれ第2増殖管による溶菌斑数を示す。



第4図 ファージ CP₁ の一段増殖曲線



第5図 ファージ CP₂ の一段増殖曲線

第5表 低濃度および高濃度ファージ法による検出精度の比較 (ファージ CP₁)

病原菌濃度 (cells/ml)	処理*	低濃度ファージ法**		高濃度ファージ法**	
		Check	Test	Check	Test
対照(無菌)	M	4.2×10 ²	4.4×10 ²	0	5.0
	S	3.4×10 ²	2.6×10 ²	0	2.5×10
3.4	M	—	—	5.0	1.5×10
	S	—	—	0	6.5×10
3.4×10	M	—	—	5.0	6.5×10
	S	—	—	0	4.5×10
3.4×10 ²	M	—	—	0	4.9×10 ²
	S	—	—	0	6.0×10 ²
3.4×10 ³	M	4.7×10 ²	5.7×10 ²	4.0×10	2.7×10 ³
	S	5.0×10 ²	3.2×10 ²	3.0×10	4.0×10 ³
3.4×10 ⁴	M	4.5×10 ²	2.1×10 ³	—	—
	S	5.2×10 ²	1.0×10 ³	—	—
3.4×10 ⁵	M	4.1×10 ²	N	—	—
	S	3.7×10 ²	N	—	—

* M: 純粋病原菌液, S: 土壤懸濁液中の病原菌液

** Check および Test 欄の数字は溶菌斑数/ml

第6表 低濃度および高濃度ファージ法による検出精度の比較 (ファージ CP₂)

病原菌濃度 (cells/ml)	処理*	低濃度ファージ法**		高濃度ファージ法**	
		Check	Test	Check	Test
対照(無菌)	M	1.7×10 ³	1.7×10 ³	5.0	3.0×10
	S	1.6×10 ³	2.0×10 ³	5.0	2.0×10
2.8	M	—	—	0	6.0×10
	S	—	—	5.0	3.0×10
2.8×10	M	—	—	10	3.0×10
	S	—	—	0	5.0×10
2.8×10 ²	M	—	—	0	2.7×10 ²
	S	—	—	5.0	2.4×10 ²
2.8×10 ³	M	1.6×10 ³	1.9×10 ³	5.0	2.7×10 ³
	S	1.6×10 ³	1.8×10 ³	5.0	7.9×10 ²
2.8×10 ⁴	M	1.8×10 ³	2.5×10 ³	—	—
	S	1.5×10 ³	2.6×10 ³	—	—
2.8×10 ⁵	M	1.7×10 ³	8.9×10 ³	—	—
	S	2.0×10 ³	7.4×10 ³	—	—

* M: 純粋病原菌液, S: 土壤懸濁液中の病原菌液

** Check および Test 欄の数字は溶菌斑数/ml

土壌懸濁液を使った実験でも両ファージ法の検出限界は、純粋菌液を使った場合とほぼ同じレベルであり、その影響はわずかに増殖ファージ数の低下がみられた程度であった。

III 考 察

寄主細菌とファージ増殖の相互関係から、添加ファージが比較的低濃度の場合、CP₁ では菌濃度が 10⁴/ml、CP₂ では 10⁴~10⁶/ml のレベルにならないとファージの増殖は開始されないことが確かめられた。これは後藤ら (1970) が CP₁ による同様の実験で報告した菌濃度 10⁶/ml のレベルに比べるとやや低い。しかし菌の検出実験では、低濃度ファージを添加し 5 時間培養する現行の検定法において、CP₁ および CP₂ とも 10⁴/ml のレベルの菌が検出されたことは、同氏らの結果とよく一致している。いずれにせよ低濃度ファージを用いた場合、10³/ml レベル以下の菌濃度ではファージの細菌への吸着・感染はほとんど認められず、両者はかかわり合いを持つことなく共存していると考えられ、この場合菌の検出は困難である。

今回の試験では、土壌懸濁液中の雑菌数は測定しなかったが、供試した土壌懸濁液では低濃度および高濃度ファージ法とも、純粋菌液の場合と検出限界に大差はみられなかった。特に高濃度ファージ法では、通常培養時間がごく短時間でよいことから、相当量の雑菌が混入していても、病原菌のファージ放出に与える影響は少ないものと考えられる。

高濃度ファージ法で抗血清を使用する場合、その抗血清の性質について充分知っておく必要がある。なるべく短時間内に未吸着ファージを完全に不活化し、処理後は新生ファージに影響を与えないように抗ファージ抗体を十分に除くことが望ましい。しかし今回の試験範囲では未吸着ファージの完全な不活化は困難で、Check で数個の活性ファージが認められる場合があり、10⁰~10¹/ml のレベルの菌濃度における検出の信頼性を失なわせる結果となった。抗血清によるファージ不活化の一次反応速度式*は 90~99% のファージ不活化の範囲で成り立ち残りのファージは抗血清によって著しく中和されにくいとされている (ADAMS, 1959)。本試験において Check に数個の溶菌斑が残るのもこの傾向に従っているためと考えられる。また抗血清で不活化されないファージは通常のファージよりも溶菌斑が小さくなる傾向を示すといわれ、実際このことも本試験中しばしば観察した。抗血

清処理後、試料中に残留する抗ファージ抗体の影響をなくすることも、限られた時間内の操作では完全には困難で、新生ファージ不活化の原因となったと考えられ、Test に実際に得られた溶菌斑数は、試料中に存在する全菌がファージの感染・放出をおこなったと仮定した場合の理論値 (平均放出量 × 菌数) の 1/50~1/100 であった。また Test を 5 時間後にとってみると、ファージの不活化はさらに著しいことが観察された。

高濃度ファージ法では、'外からの溶菌' (lysis from without) の起こる可能性も考えられるが、定性的な菌の検出を目的とする場合には、精度低下の要因にはなりえても実際あまり問題にしくなくてもよいと考える。

ファージ CP₁ の一段増殖実験は、これまでに 2, 3 の報告があるが、本試験で得られた平均放出量約 60 は吉井ら (1957) の約 10、小泉ら (私信) の約 30 に比しかなり大きくなっている。この差異は培地、温度など実験条件の違いによると思われるが、潜伏期間、上昇期間においてはそれほどの違いはみられなかった。ファージ CP₂ の一段増殖実験は過去に報告は見当たらない。CP₂ でも潜伏期間、上昇期間は比較的安定しているが、平均放出量は反復、菌株間で大きなふれがみられた。このことから、とくに本ファージの場合、一段増殖を菌の定量的検出に応用するのは無理であろうと考えられる。

IV 摘 要

カンキツかいよう病菌液に約 10³/ml 濃度のファージを添加して培養し、経時的に菌の増殖とファージの増殖の相互関係を調べた結果、CP₁ では菌濃度が 10⁴/ml、CP₂ では 10⁴~10⁶/ml に達した時点でファージの著しい増殖がみられた。これ以下の菌濃度ではファージの菌への吸着はほとんど起こらず、ファージの増殖は菌濃度が一定レベルまでないと開始しないことが確認された。

ファージの一段増殖実験の結果、CP₁ は潜伏期約 50 分、上昇期約 30 分、平均放出量約 60 であり、CP₂ は潜伏期約 110 分、上昇期約 70 分、平均放出量約 90 であったが、CP₂ の平均放出量は実験および菌株によるふれが大きく、一段増殖を応用した菌の定量的検出は困難であると結論された。

低濃度ファージを添加する方法および高濃度ファージを添加する方法において、CP₁、CP₂ 両ファージの間に菌の検出限界に大きな差違はなかった。両ファージとも純粋菌液を使った実験で、低濃度ファージによった場合、培養 5 時間で 10⁴/ml までの菌濃度の菌を検出でき、既往の CP₁ についての報告と一致した。これに対し高濃度ファージ法によると、CP₁ はファージ添加後培養 120 分、CP₂ は 200 分後にいずれも 10²/ml の菌濃度ま

* $-dP/dt = KP/D$ P: t 分後の活性ファージ粒子数, D: 抗血清の稀釈倍率, K: 不活化反応速度恒数

で寄主細菌の存在を検出することができた。

土壌懸濁液中の菌の検出は両フェージとも、検出限界は純粋菌液を使った場合とほぼ同じレベルで、雑菌の影響はそれほどみられなかった。

引用文献

- ADAMS, M.H. (1959) Bacteriophages. Interscience Publishers, 592 pp. New York.
- 後藤正夫・芹沢拙夫・森田正人 (1970) カンキツかいよう病に関する研究 II 葉肉注射法による *Xanthomonas citri* (HASSE) DOWSON の検出特にフェージ法との比較について, 静大農研究報告, **20**: 1~19.
- KATZNELSON, H. (1950) The detection of internally-borne bacterial pathogens of beans by a rapid phage-plaque count technique. Science, **112**, 2918, 645~647. [R.A.M. **30**: 363~364].
- OBATA, T., F. TSUBOI, and S. WAKIMOTO (1969) Studies on the detection of *Xanthomonas citri*

- by phage technique and the surface sterilization of Unshu orange for export to the United States. Res. Bull. Pl. Prot. Japan **7**: 26~37.
- 小畑琢志 (1973) 日本の輸出みかん産地における *Xanthomonas citri* の CP₁ および CP₂ フェージ感受性。1973年度日本植物病理学会大会講演 (昭和48年3月27日京都市)
- 脇本 哲 (1954) フェージによる稲白葉枯病菌の生存の検定. 九大農学芸雑誌, **14**: 495~498.
- 脇本 哲・吉井 甫 (1955) Bacteriophage による Bacteria の定量. 九大農学芸雑誌, **15**: 161-169.
- WAKIMOTO, S. (1967) Some characteristics of citrus canker bacteria, *Xanthomonas citri* (HASSE) DOWSON, and the related phages isolated from Japan. Ann. Phytopath. Soc. Japan, **33**: 301~310.
- 吉井 甫・脇本 哲・中島 尚 (1957) 柑橘潰瘍病菌とそのバクテリオフェージに関する研究 (I). 日植病報, **22**: 25~26.

Summary

Evaluation of Some Factors Affecting Detection Level of *Xanthomonas citri* by Phage Technique

Takushi OBATA, Toshiro KOBAYASHI and Fukutoshi TSUBOI
Research Division, Yokohama Plant Protection Station

Detection of *X. citri* by phage technique was evaluated in the light of quantitative relationships between the growth of phages and bacteria, multiplication sequency of phages and titres of phages to be employed.

When phages Cp1 and Cp2 were cultured at an initial concentration of 10³ pfu/ml, both phages started to increase only after the bacterial growth reached up to the range of 10⁴-10⁵ cells/ml. Adsorption of phages to host bacteria did not seem to occur below this level, thus indicating that the initiation of phage-bacteria interaction depends upon the relative concentration of phages against bacteria or vice versa.

One step growth experiments revealed that the latent period of Cp1 was ca. 50 min., the rise period ca. 30 min. and the average burst size ca. 60. Corresponding figures for Cp2 were ca. 110 min., ca. 70 min. and ca. 90, respectively. Both the latent and rise periods remained constant throughout a series of tests. For a wider range of fluctuation noted in average burst size of both phages, quantitative assay of *X. citri* cells by phage technique seems impracticable.

In the method using low titre phages (10^3 pfu/ml), initial bacterial concentration in the range of 10^4 cells/ml was detected within 5 hours by both phages. By using high titre phages (10^8 pfu/ml) and eliminating surplus free phages after adsorption time, the presence of a minimum of 10^2 cells/ml was demonstrated after one step growth of both phages. In preparing bacterial samples to be tested, substitution of sterile medium with unsterilized soil extracts did not appreciably affect detection level of contained bacteria.