

イネ白葉枯病菌の栄養性理学的研究 : II. 炭素源および新合成培地

田中, 行久
九州大学農学部植物病理学教室

<https://doi.org/10.15017/22926>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 21 (2/3), pp.149-153, 1964-12. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :

イネ白葉枯病菌の栄養生理学的研究*

II. 炭素源および新合成培地

田 中 行 久

Studies on the nutritional physiology of *Xanthomonas oryzae* (Uyeda et Ishiyama) Dowson

II. On the carbon source and a new synthetic medium

Yukihisa Tanaka

結 言

微生物の生理学的研究には、化合物としてその量の明確なる合成培地が必要である。

イネ白葉枯病菌の合成培地は、すでに向ら¹⁾によりその組成が明らかにされているが、この培地は pH の調整や、加熱などの培地作製上の処理によつて多量の沈澱物を生ずる欠点があるために、細菌の生育量や培養中における特定物質の消費の有無などを測定するさいの障がいとなる。そこで、このような欠点のない培地の出現が望まれていた。

著者は第 1 報で本菌の窒素源について明らかにしたが、¹⁾ 本実験ではさらに本菌による炭素源の利用度や、本菌の増殖に最適な C/N 率について検討し、この実験結果から従来の培地のもつ欠点のない合成培地の作製に一定程度成功の確信を得たので、ここにその概要をとりまとめて報告する。

実験材料および方法

本実験に用いた基本培地は、第 1 報で示した Starr 培地である。⁷⁾ 供試菌株、培養方法ならびに生育量の測定方法などは、すべて第 1 報に準拠して行なつた。¹⁾

1. 炭素源に関する実験

実験の目的を達成するために、基本培地の NH_4Cl を 0.2% の Na-glutamate で置き換え、glucose は除いてその代りに次記の各種炭素化合物 (糖類—1% 有機酸 0.2%) をおのおの単独に添加して、そのとき

の生育量を求めた。

供試炭素化合物の種類は次に示した。

| | |
|-----------|-----------------------------|
| a) 糖 類 | b) 有機酸 |
| Fructose | Acetic acid |
| Galactose | α -Ketoglutaric acid |
| Glucose | Citric acid |
| Mannose | Fumaric acid |
| Xylose | Malic acid |
| Lactose | Succinic acid |
| Sucrose | Pyruvic acid |
| Starch | |
| Glycerin | |
| Mannit | |

2. C/N 率に関する実験

本菌の窒素源および炭素源に関する実験結果から、最適窒素源に Na-glutamate を 1 炭素源としては sucrose を用いた。Na-glutamate の濃度は、0.1, 0.2, 0.5, 1.0% の 4 区とし、sucrose の濃度は、0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 の各濃度区を作つて本菌の最適 C/N 率を求めた。

実 験 結 果

以上の方法に基づいて行なつた実験結果を示せば次のとおりである。

1. 炭素化合物の種類とイネ白葉枯病菌の増殖

a) 糖の種類と本菌の増殖

Table 1 から明らかなように、いずれの糖類を加えた場合においてもよい増殖が認められるが、最も良好な増殖をもたらしたものは sucrose である。次いで glucose, galactose, mannit, fructose, glycerin, mannose, xylose, starch および lactose の順となる。

培地中の pH の変化をみると、sucrose, glucose,

*九州大学農学部植物病理学教室業績

本実験に当り終始懇篤な御教示を賜つた吉井甫元教授ならびに木場三朗助教授に対し深甚なる謝意を表す。

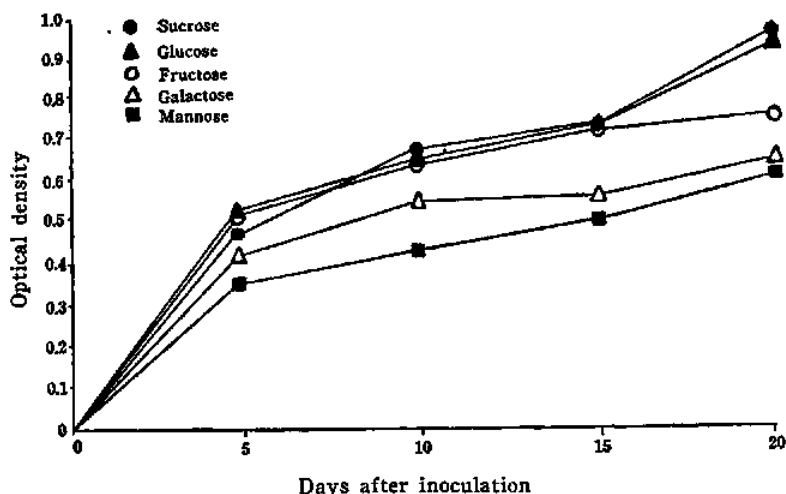
Table 1. Effect of various saccharides on the growth of *X. oryzae*.

| Saccharides | Optical density | Final pH of medium |
|-------------|-----------------|--------------------|
| Sucrose | 0.547 | 5.13 |
| Glucose | 0.416 | 5.20 |
| Galactose | 0.403 | 5.34 |
| Mannit | 0.396 | 7.71 |
| Fructose | 0.363 | 6.40 |
| Glycerin | 0.290 | 6.90 |
| Mannose | 0.203 | 6.62 |
| Xylose | 0.156 | 7.31 |
| Starch | 0.128 | 7.06 |
| Lactose | 0.037 | 6.73 |

galactose を添加した場合に著しく酸性側に傾いていたが、一方 mannit や xylose では逆にアルカリ側に変化していた。

Table 2. Effect of organic acids on the growth of *X. oryzae*.

| Organic acids | Optical density | Final pH of medium |
|---------------------|-----------------|--------------------|
| 2-ketoglutaric acid | 0.115 | 6.89 |
| Fumaric acid | 0.102 | 7.70 |
| Succinic acid | 0.092 | 7.60 |
| Malic acid | 0.081 | 7.12 |
| Acetic acid | 0 | 6.32 |
| Citric acid | 0 | 6.18 |
| Pyruvic acid | 0 | 5.47 |

Fig. 1. Different saccharides and the growth of *X. oryzae* with the lapse of time.

酸度を増しているが、sucrose と glucose は10—15日目頃から低下するようである。fructose や mannose の pH はともに5回目からアルカリ側に变化し、10日、15日、20日とさらにその変化を続ける。この結果は Fig. 2 のとおりである。

Table 2 から明らかなように、本菌の増殖をもたらしたものは、 α -Ketoglutaric acid, fumaric acid, succinic acid および malic acid などであり、acetic acid, citric acid, pyruvic acid では全くその増殖を認めることができなかつた。

一般に増殖が認められたときの培地中の pH は、アルカリ側に变化していた。

2. 糖の種類と本菌の増殖ならびに培地の pH の経時的変化

Table 1 で、本菌の増殖に良好な糖類、すなわち sucrose, glucose, fructose, galactose および mannose の5種類をおのおの1%ずつ単独に添加した場合における本菌の経時的な増殖状況と、培地中の pH の変化について調べた。

その結果は Fig. 1 と Fig. 2 に示すとおりである。

供試し5種類の糖類は、すべて良好な炭素源として本菌の増殖に役立つているが、中でも sucrose と glucose は特に良好な炭素源であることを認めた。

一方、pH の変化では、sucrose, glucose galactose の3種はすべて培地の pH を酸性に導く、galactose では、培養5日目から pH の低下が始まり、しだいに

3. 培地中の C/N 率と本菌の増殖

Table 3 から明らかなように、いずれの組合せにおいても窒素濃度が0.1, 0.5, 1.0%と重くなるにしたがつて増殖もよく、pH 値も窒素濃度が1.0%の場合には菌の増殖に好適な pH 6.0 以上の数値を示して

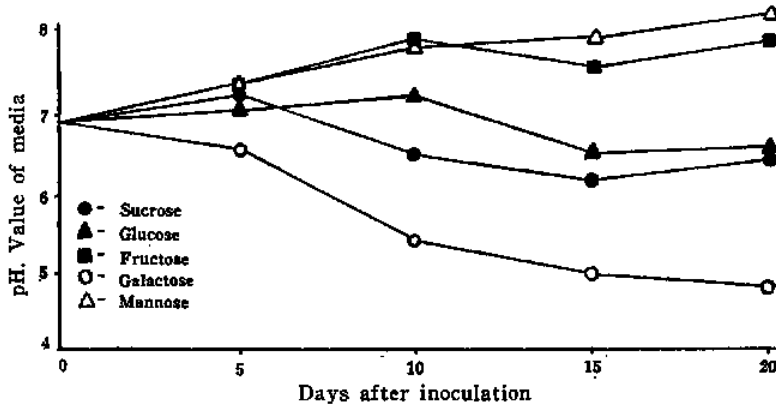


Fig. 2. Different saccharides and pH change of media with the lapse of time.

Table 3. Relation between C/N ratio of the medium and the growth of *X. oryzae*.

| %N(%) | C(%) | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|
| | 0.5 | 1.0 | 1.5 | 2.0 | 3.0 | |
| 0.1 | 0.307 | 0.463 | 0.498 | 0.514 | 0.541 | -OD* -PH† |
| | 6.20 | 6.54 | 5.80 | 6.20 | 6.47 | |
| 0.2 | 0.482 | 0.511 | 0.559 | 0.544 | 0.552 | -OD -PH |
| | 6.35 | 6.21 | 5.66 | 5.45 | 5.55 | |
| 0.5 | 0.674 | 0.699 | 0.735 | 0.658 | 0.733 | -OD -PH |
| | 6.20 | 5.85 | 5.67 | 6.04 | 6.02 | |
| 1.0 | 0.714 | 0.766 | 0.796 | 0.750 | 0.745 | -OD -PH |
| | 6.10 | 6.04 | 6.31 | 6.40 | 6.10 | |

* OD: Optical density, † PH: final pH of medium, ‡ C: sucrose, § N: Na-glutamate.

いる。さらに最適 C/N 率をみると、sucrose 1.5%、Na-glutamate が 1.0% の組合せで最大の増殖を示した。

以上の実験結果から、Starr 培地の glucose 0.5% を sucrose 1.5% に、NH₄Cl 0.1% を Na-glutamate 1.0% におのおの置き換えて、本菌の合成培地（以下 S-T 合成培地）とした。その培地組成は次のとおりである。

| | | | |
|--------------------------------------|--------|--|--------------|
| Sucrose | 1.5 g | B(H ₂ BO ₃) | 0.5 μg |
| Na-glutamate | 1.0 g | Ca(CaCO ₃) | 10.0 μg |
| KH ₂ PO ₄ | 0.2 g | Cu(CuSO ₄ ·5H ₂ O) | 1.0 μg |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.02 g | Fe(FeSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ ·6H ₂ O) | 10.0-50.0 μg |
| | | I(K I) | 0.1 μg |
| | | Mn(MnSO ₄ ·H ₂ O) | 1.0-2.0 μg |
| | | Mo(MoO ₃) | 1.0 μg |
| | | Zn(ZnSO ₄ ·7H ₂ O) | 5.0 μg |
| 蒸留水 | 100 ml | PH | 6.8 |

4. S-T 合成培地における本菌の増殖培地中の pH 値および粘度の経時的変化

前項で示した S-T 合成培地を用いて、本菌の増殖、培地中の pH 値および粘液物質の生産に基づく粘度の変化について、3 日間隔に 21 日間経時的に測定した。

培地の粘度の測定は、培養した液体培地を久保田製遠心分離機で 6000 rpm、15 分間遠心分離して細菌体を除き、その上澄液を 10 ml とつて 30°C の恒温槽中でオスワルド粘度計により粘度を測定した。粘度値は、水の値を 1 とした場合の比数をもつて表示した。この結果は Table 4 に示すとおりである。

Table 4 から明らかなように、本菌の増殖は接種後 3 日目から顕著に行なわれ、21 日目までその増加が認められた。

これに対して、pH 値は接種後 3 日目になると急激な酸性側への低下を示し、9 日目に至ると最低の pH 値を示すようになる。その後再び上昇して、培養 21 日目には接種時の pH に近づいてくる。

一方、培地中の粘度は、接種後 3 日目から漸次その上昇が始まり、15 日目に至ると急激に上昇して重い粘

Table 4. Table showing the growth of *X. oryzae* and difference of pH and viscosity value due to the bacterial growth in S-T synthetic medium.

| Days after inoculation | Optical density | | | Final pH of medium | | | Viscosity of medium* | | | Relative viscosity x/H ₂ O |
|------------------------|-----------------|-------|-------|--------------------|------|------|----------------------|-------|-------|--|
| | 1 | 2 | A† | 1 | 2 | A | 1 | 2 | A | |
| 0 | — | — | — | 6.80 | 6.80 | 6.80 | 14.46 | 14.52 | 14.48 | 1.003 |
| 3 | 0.237 | 0.260 | 0.249 | 6.27 | 6.20 | 6.24 | 15.10 | 15.10 | 15.10 | 1.046 |
| 6 | 0.458 | 0.482 | 0.470 | 5.68 | 5.89 | 5.78 | 15.30 | 15.30 | 15.30 | 1.059 |
| 9 | 0.518 | 0.536 | 0.527 | 5.60 | 5.21 | 5.40 | 15.40 | 15.20 | 15.30 | 1.059 |
| 12 | 0.656 | 0.556 | 0.606 | 5.98 | 5.71 | 5.85 | 15.62 | 15.42 | 15.52 | 1.075 |
| 15 | 0.652 | 0.590 | 0.621 | 5.94 | 5.85 | 5.89 | 16.67 | 16.40 | 16.54 | 1.145 |
| 18 | 0.801 | 0.742 | 0.772 | 6.10 | 6.03 | 6.06 | 16.98 | 16.68 | 16.83 | 1.166 |
| 21 | 0.796 | 0.827 | 0.812 | 6.30 | 6.86 | 6.58 | 17.00 | 16.65 | 16.83 | 1.166 |

* H₂O: 14.44, † A: average.

度を示すようになる。

考 察

本菌の炭素源については、すでに石山,²⁾ 水田,³⁾ Fang ら⁴⁾ および渡辺¹²⁾ の各報告がある。石山,²⁾ 水田³⁾ および Fang ら⁴⁾ の実験結果は、いずれも半合成の肉汁寒天培地あるいは馬鈴薯煎汁寒天培地における結果であるために、細菌の栄養要求を確める上で不都合な点が多い。

これに対し、渡辺は¹²⁾ 合成培地を基本培地として本菌の炭素源を明らかにし、単糖類および複糖類が最も良好な炭素源であることを認めた。すなわち、本菌の増殖は sucrose が最良で、これに次いで glucose, mannose, galactose および maltose の順になることを示した。本実験では、sucrose や glucose を添加した場合に特に良好な増殖を認め、その他の糖類でも渡辺の結果とほぼ同様な傾向を認めた。

一般に良好な増殖を示す糖類の場合、著しい pH の低下を認めたが、これは恐らく上述した糖類の分解の結果生産される、中間代謝産物の有機酸によるものと考えられる。このような傾向は、生物体による糖類の酸化現象として説明され、また微生物による糖類の好氣的酸化の場合も同様な説明がなされている。⁴⁾

次に、TCA cycle 構成有機酸を唯一の炭素源として加えた場合については、渡辺は¹²⁾ succinic acid を与えた場合にのみ、良好な増殖の促進が認められ、炭素源として役立つことを明らかにした。本実験では、succinic acid の他にさらに α -ketoglutaric acid, fumaric acid および malic acid などにもその利用が認められ、炭素源として利用されることが明らかとなった。

また沖本ら⁵⁾ は、Warburg 検出計による実験で、pyruvic acid や acetic acid も本菌により酸化されることを報告して、著者や渡辺の結果との相違がみられた。

このような実験結果の相違は、基本培地が異なることに加え、基質の利用に関する測定方法の違いに帰せられると思われる。また実験者による結果の相違はあるが、本菌によつて TCA cycle 構成有機酸の acetic acid, α -ketoglutaric acid, fumaric acid, malic acid, pyruvic acid および succinic acid などの利用が認められたことは、本菌の代謝経路に TCA cycle が存在する可能性が強い。

本菌に関する合成培地は、最初向ら¹³⁾ がその組成を明らかにしたが、諏訪⁹⁾ はこの培地が 100°C, 30 分の加熱で沈澱物を生成するのに着目し、この沈澱物が本菌の増殖と密接な関係を有するのではないかとし向らの培地組成を一部改変し、単細胞菌のコロニー形成に良好な培地を作製した。

本実験で作製した S-T 合成培地は、pH の調整や加熱などの処理によつて沈澱物を生ずることがない上に、無色透明であることから、光度計による生育量の測定が可能となつた。

しかし、比濁法による細菌量の測定では、当然生菌の他に、死菌や代謝産物までが測定の対象となるので、生菌のみを知るためには別に他の方法によつて確かしておく注意が必要であろう。

摘 要

Starr 培地の NH₄Cl の代りに 0.2% の Na-glutamate を加えた基本培地を用いて、イネ白葉枯病菌の炭素源を調べた。さらに第 1 報の窒素源に関する実験結果から、本菌の C/N 率を求めて、新合成培地を作製した。

1. 9種の糖類の中で、特に良好な増殖をもたらしたのものには、sucrose と glucose とがあり、これに続くものとして fructose, galactose, mannit および mannose がある。xylose, lactose, starch などの利用は、前述の糖ほど良好な炭素源でない。

2. 供試した7種の TCA cycle 構成有機酸の中、本菌の増殖が認められたものに α -keto glutaric acid, malic acid および succinic acid の4種類がある。

3. 本菌の最適 C/N 率は、C(sucrose) が 1.5%, N(Na-glutamate) が 1.0% のときで、このとき最大の生育量を示した。したがって、Starr 培地の NH_4Cl の代わりに Na-glutamate 1.0% を、0.5% の glucose の代わりに sucrose 1.5% をそれぞれ加えて、本菌の合成培地(S-T 合成培地)を作製した。

4. 本実験で作製した S-T 合成培地は、無色透明でかつ pH の調整や加熱などの培地作製上の処理によつても全く沈澱物を生じない利点があるので、光度計による本菌の生育量の測定にはきわめて好都合である。

引用文献

- 1) Fang, C. T., Liu, C. F. and Chu, C. L., 1957. Acta phytopath. Sinica., 3(2): 125-136. (R. A.M., 37: 475)
- 2) 石山信一, 1922. 農商務省農試報告, 45(3): 232-261.
- 3) 水田準一, 1952. 日植病報, 17(2): 73-75.
- 4) Oginsky, E. L. and Umbreit, W. W., 1954. An introduction to bacterial physiology.
- 5) 沖本陽一郎. 見里朝正, 1953. 日植病報, 28(4): 209-215.
- 6) Starr, M. P. and Weiss, J. E., 1943. Phytopath., 33: 314-318.
- 7) Starr, M. P., 1946. J. Bact., 52: 187-194.
- 8) Starr, M. P., 1959. Ann. Rev. Microbiol., 13: 211-238.
- 9) 諏訪隆之, 日植病報, 27(4): 165-171.
- 10) 田中行久, 日植病報, 27(2): 75. (講要).
- 11) ——— 1963. 九大農芸誌, 20(2): 151-155.
- 12) 渡辺 実, 1963. 日植病報, 28(4): 201-208.
- 13) 向 秀夫・渡辺 実, 1958. 日植病報, 23(1): 9 (講要).

Summary

The results of the experiment concerning the nutritional requirement of *Xanthomonas oryzae* on various carbon compounds were described.

1. Among nine carbon compounds examined, vigorous growth occurred in the basal media with glucose and sucrose as the carbon sources, and fairly good growth occurred with the following saccharides: fructose, galactose, mannit, mannose, xylose, lactose and starch.

2. Among seven organic acids, TCA cycle member organic acids examined, fairly good growth occurred with the following organic acids: α -ketoglutaric acid, fumaric acid and succinic acid.

3. As to the relation between the C/N ratio (sucrose/Na-glutamate) of the medium and growth of *X. oryzae*, much vigorous growth was obtained in the case of culture with the concentration of 1.5 per cent sucrose and 1.0 per cent Na-glutamate as the carbon and nitrogen source.

4. From the above results obtained, a new synthetic medium for *X. oryzae* is accomplished by modification of Starr's syntetic medium. The composition of a new synthetic medium is as follows: sucrose 1.5 g, Na-glutamate 1.0 g, KH_2PO_4 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, $\text{B}(\text{H}_3\text{BO}_3)$ 0.5 μg , $\text{Ca}(\text{CaCO}_3)$ 10.0 μg , $\text{Cu}(\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O})$ 1.0 μg , $\text{Fe}(\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$ 10.0-50.0 μg , $\text{I}(\text{KI})$ 0.1 μg , $\text{Mn}(\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$ 1.0-2.0 μg , $\text{Mo}(\text{MoO}_3)$ 1.0 μg , $\text{Zn}(\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ 5.0 μg and 100 ml of distilled water, PH 6.8.

This modified synthetic medium is suitable for estimation of the bacterial growth by means of photometric apparatus because it causes no precipitation in medium by heat treatment.

Laboratory of Plant Pathology,
Faculty of Agriculture,
Kyushu University