稻熱病の生化学的研究

(第4報) 稻熱病菌の栄養吸収に及ぼすアンモニヤ態及び硝酸態窒素の影響

田中正三・香月裕彦・香月文子

TANAKA, S., KATSUKI, H. & KATSUKI, F.: Biochemical studies on the blast disease of rice plant. IV. Effect of different nitrogen sources in the culture media upon the nutritional absorption of the blast disease fungus.

1. 緒言

稻熱病菌の人工培養に際しその窒素源として硝酸態窒素を用いるとアンモニヤ態窒素よりよく生育すると報告されてをり、我々の教室に於いても硫酸アンモニウム、鹽化アンモニウム、及び磷酸アンモニウム等の吸収に関する研究が行われていて²⁾、これらは窒素源として不適當であることが認められている。稻熱病菌は嗜鹽基性で酸性に弱く、酸性の限界として三宅、足立兩氏は³⁾ pH 3.7、西門氏は⁴⁾ pH 5.0 附近と報じている。従つて培地の窒素源として使用したアンモニウム鹽が硝酸鹽に劣るのは前者が本質的に不適當な爲ではなく、アンモニウムイオンの選擇吸収による培地の pH の低下の結果であるとの推定が行われる。又 LEAVER 等⁵⁾は稻熱病菌は必須生長素の他に有機態窒素を必要とすると報告してをり、ここに別な窒素源の問題が提出され、著者等はこの問題を解明する爲、一定の條件の下で培養液の無機態窒素として硝酸鹽及びアンモニウム鹽を使用した培地に於ける稻熱病菌の窒素吸収、並びにそれが菌の生長及び他の栄養素吸収に及ぼす影響を研究し併せて種々の點に於いて稻熱病菌とは對照的な性質をもつた *Aspergillus oryzae* との比較を行つた。

2. 實驗の部

培養液は第1表に示す様な4種類の培地を使つた。これらの4種の培地の窒素源のモル数及び窒素、磷酸、カリウムの夫々の量を培地 A を基準にした比で表わせば第2表となる。その他の實驗操作は第一報⁶⁾と同様であり菌株は1號菌を用い前培養として培地 A に8日間培養した菌の1白金耳宛を取つて接種した。培養温度は 28°C である。一定日数毎に培養フラスコの4~8本を取り出し、菌體と培養液を定量的に別ち、菌體は直ちに硫酸デシケーターで減壓乾燥して貯藏し、その1部につき水分を定量し全生長量を計出した。培養液は直ちに pH を測定した後、還元糖、非還元糖は第

第1表

培地	A	B	C	D
第一磷酸カリ	0.25 ^g	0.25 ^g	0.25 ^g	0.962 ^g
第二磷酸カリ	0.25	0.25	0.25	0.100
硫酸苦土	0.25	0.25	0.25	0.25
鹽化石灰	0.05	0.05	0.05	0.05
硝酸カリ	1.00	—	—	—
硝酸アンモン	—	0.792	0.396	—
第二磷酸アンモン	—	—	—	0.653
鹽化第二鐵	痕跡量	痕跡量	痕跡量	痕跡量
炭酸石灰	—	—	—	1.70
蔗糖	15.00	15.00	15.00	15.00
風乾稻藁(50g.)煎汁	1 L.	1 L.	1 L.	1 L.

第2表

培地	A	B	C	D
窒素源のモル数	1	1	1/2	1/2
窒素量	1	2	1	1
カリ量	1	1	1	0.562
磷酸量	1	1	1	3.84
其他	—	—	—	CaCO ₃
pH	5.5	5.5	5.5	5.7

1 報にのべた方法で、アンモニヤは水酸化カルシウムを加えて 40°C 以下で減壓蒸溜して後定量し⁷⁾、硝酸根は苛性ソーダで強アルカリ性にして DEVARDA 合金を加え煮沸還元してアンモニヤとして定量⁸⁾した。

a) 培養液の pH の變化と窒素の吸収 (第1圖)。pH 曲線は A では第一報の場合同様途中一時的な下降を示す他は上昇の途をたどつては、B では初め激しく下降し 3.8 に達しそれ以後は急激に高くなつては、C では初期の下降現象が僅かに認められた後 B の場合と同じ型の上昇を示している。D では殆ど變化がない。

この様な pH 曲線に現われた變化は含窒素イオンの吸収の結果によることは明らかで A では専ら硝酸根が吸収される爲に液が鹽基性に傾くのであつて硝酸の

* 京大薬理學部化学教室

第 1 圖

還元型である亜硝酸の存在を培養3日目に認めることができたがその後は亜硝酸並びにアンモニアを全く検出できなかった。Bでは

最初アンモニウムイオンの選擇吸収が専ら行われ、硝酸根は殆ど吸収されていない。この爲 pH は極度に酸性になるが、6日目にアンモニアが吸収され盡す頃になると硝酸根の吸収が始まり、pH 曲線は逆轉して上昇を始めるのである。Cでも同じ傾向が認められるが、硝酸アンモニウムの濃度が低い爲、この傾向はそれ程明瞭でない。Dではアンモニウムイオンは急激に吸収されているが、炭酸カルシウムが存在する爲に中和されて培養液の pH の變動は殆ど起らないのである。

第 2 圖

b) 菌の生長と糖の吸

收 (第 2 圖) 第 2 圖に示す如く菌の生長は2日目にはDが最も早くAはこれに次いでいるが、その後の生長速度はAが最も速くなっている。B, C 共に培地の pH が下降している間は生長は悪く、特にBでは氣中菌絲は全く生成せず液中菌絲も異常な外觀を呈した。この場合液の pH は菌の生育可能の酸性限界に近いものと推定することができる。

糖の吸収はほぼ生長と平行し、生長速度が大である場合には糖の吸収速度も大であり、又何れの場合も生長最大を示す時期には糖は完全吸収されてをり、この条件では糖量が生長の時期的な制限因子となつている。

3. 考 察

以上の結果から明かなようにに稻熱病菌には窒素源と

して與えたアンモニアは決して不適當なものでもなく、選擇吸収による培地の酸性化の影響が生育不良を招来する原因となるもの

で、アンモニア態窒素は本菌の良好な窒素源であることが明らかとなつた。又 A に於て硝酸還元成績である亜硝酸、アンモニアが培養液中に殆んど現われて來ないので B, C, に於ける硝酸及びアン

モニアの定量數値はそのまま各々の選擇吸収の状態を現わしていると考えて良いと思われるから B の場合に明らかに認められる如く先ずアンモニアが優先的に吸収され後に硝酸の吸収が行われるものと推定することができるこの現象は硝酸アンモニウムの濃度が大きい程著しい。

この結果を稻熱病菌とは種々の點で對照的な *Aspergillus oryzae* について同様な實驗を行つた結果を示すと第 3 圖及び第 4 圖のようになる。即ち培養液は硝酸カリウム：18g, 第一磷酸カリウム：5g, 硫酸マグネシウム：2.5g, 鹽化カルシウム：1g, 鹽化第二鐵：痕跡量, 蔗糖：50g, 蒸留水：1L の組成の培地に於いて 33°C で培養した場合には第 3 圖に示すように生育に伴つて少量の亜硝酸及び多量のアンモニアの蓄積が見られるようになる。

第 4 圖

この培養液の硝酸カリウムを硝酸アンモニウム：10g に置き換えると生長は遙かに早くなるが、この場合は硝酸の還元型であるアンモニアの多量が蓄積され培地の pH は極度に偏ることなく、最初から硝酸及びアンモニアの兩方を吸収している事が判る。(第 4 圖)

この 2 種の絲狀菌の比較から比較的酸性に強い *Aspergillus oryzae* ではアンモニウムイオンと硝酸イオ

ンを同時に吸収することができるが、酸性に弱い稻熱病菌ではこの現象が認められず、アンモニウムイオン

第 3 圖

を優先的に吸収することは興味深い。これは稻熱病菌がアンモニアを利用し易い菌と考えれば以上の事實も了解することができよう。

次に菌の生育中に於ける生理的活性度を比較する目的で一定期間内に於ける生長量と糖及び窒素の消費量を夫々 ΔG , ΔS , ΔN とし、それらの相互の比を求めて表示すると第 3 表のようになる。

又培養を開始してから一定時期迄の生長量及び糖、窒素の吸収量を夫々 G , S , N としそれらの相互の比を求めると第 4 表のような結果となる。

※ 但し下線を引いた數値は生長最大期のものを示す。括弧をつけた數値は自己消化期のものを示す。

第 3 表に於て $\Delta N/\Delta G$ は生長初期に於いて A では B, C, D の場合より低い値を示し、又第 4 表の N/S に

よつても糖吸収に對する窒素吸収が A では低くなつ

ていることで明らかで

ある。

糖の消費も窒素の吸収同化、培地の pH の變化の影響を受けてをり、生長の制限因子は糖に、生長速度は窒素同化及びこれに伴う培地の pH の變化に制限されているようである。

第 4 表の經濟係數 (G/S) を見ると一般に培養日數が進むにつれ値が低くなつてゐるが、これは若い菌はエネルギーの大部分を菌體構成に使うに對し、古い菌では生命維持のエネルギーを必要とするための差であらう。培養初期にこの値は A では他に比べてかなり低い値を示しているのは硝酸をアンモニアに還元するに糖を使用する爲と解される。又 B に於いてこの値が

第 3 表

培 養 間	培 地	$\frac{\Delta G}{\Delta S} \times 100$	$\frac{\Delta N}{\Delta G} \times 100$	$\frac{\Delta N}{\Delta S} \times 100$
0 日	A	—	3.8	4.0
	B	—	7.36	—
	C	—	6.70	—
	D	—	5.90	12.0
2 日	A	45.0	4.05	1.82
	B	47.8	8.78	4.10
4 日	C	42.2	8.20	3.56
	D	49.0	3.69	1.78
4 日	A	36.8	0.55	0.20
	B	48.1	5.70	2.65
6 日	C	49.4	2.13	1.05
	D	38.6	0.72	0.28
6 日	A	34.2	0	0
	B	29.3	5.86	1.72
8 日	C	38.2	0.250	0.078
	D	26.1	0	0
8 日	A	29.6	0	0
	B	44.3	3.73	1.62
10 日	C	34.4	0	0
	D	39.4	0	0
10 日	A	—	—	—
	B	45.6	1.24	0.56
12 日	C	30.3	0	0
	D	41.8	0	0

稍々高いのは他に比べて窒素源が多い爲である。この事實は第3表の N/S が A, C, D では約 1 であるが, B では 1.81 を示すことによつても明らかである。

LEAVER 等⁹⁾の有機窒素を必須とするとの研究結果と著者等の結果との相異は一つは菌株の相異と云う可能も考えられるが、彼等の培地は高濃度の鹽化アンモニウム、硫酸アンモニウムを使用しているので著者等の B の實驗に認められる様な氮素吸収による培地の pH の低下を招いた爲に生じた現象と解することも可能である。又無機態窒素では全く生育不可能で、有機態窒素であれば、アミノ酸、プリン鹽基、尿素等のいかなる形で窒素源として良く利用されると云う彼の結論も理解し難い所であるが、無機態窒素は本質的に不可なのではなく、含窒有機化合物の場合には、その緩衝作用のため培地の酸性化を防止した結果となつたと考えることも出来る。

4. 摘 要

稻熱病菌はイオン選擇吸収による培地の pH 酸性化を防げば窒素栄養源としては不良と考えられていたアンモニヤを良く利用同化することが判明した。又窒素源として硝酸アンモニウムの形であたえると、アンモ

第 4 表

培 養 間	培 地	$\frac{G}{S} \times 100$	$\frac{N}{G} \times 100$	$\frac{N}{S} \times 100$
2 日	A	—	3.80	—
	B	—	7.35	—
	C	—	6.70	—
	D	—	5.90	—
4 日	A	48.9	4.01	1.96
	B	59.5	7.35	5.00
	C	59.3	7.91	4.70
	D	79.5	4.80	3.68
6 日	A	44.7	3.00	1.34
	B	55.0	7.66	4.22
	C	52.0	3.90	2.03
	D	60.6	3.60	2.18
8 日	A	42.5	2.48	1.05
	B	47.1	6.46	3.05
	C	46.6	2.73	1.28
	D	51.9	3.28	1.63
10 日	A	41.3*	2.32	0.93
	B	46.6	4.96	2.26
	C	44.3	2.32	1.03
	D	49.5	2.66	1.31
12 日	A	(39.2)*	(2.41)	—
	B	45.6	3.98	1.81
	C	43.0	2.18	0.94
	D	48.0	2.18	1.04
18 日	A	(32.2)	(2.92)	—
	B	(40.9)	(4.45)	—
	C	(36.7)	(2.52)	—
	D	42.5	1.92	0.79

ニヤを優先的に利用し、後に硝酸を吸収する。又硝酸鹽培地では糖の消費に對する窒素の吸収及び經濟係数がアンモニウム培地に比して低い、これは硝酸の還元のため糖が使用される事を意味するものであろう。

文 献

- 1) 栃内吉彦・中野富雄：北海道帝國大農學部紀要, 41:183 (1940)
- 2) 田中正三・濱田巖：未發表
- 3) 三宅康次・足立仁：Jour. Biochem., 1:223 (1923)
- 4) 西門義一：病菌害蟲彙報, 15:1 (1926)
- 5) LEAVER F. W., JEAL J. & BREWER C. R.: Jour. Bact., 54:401 (1947)
- 6) 田中正三・香月裕彦：日本植病會報, 15:109 (1951)
- 7) 赤堀四郎：アミノ酸及び蛋白質：p.188 昭 19 共立社
- 8) TREADWELL F. P.: Analytical Chemistry Vol. 2 p.454 (5th ed.)
- 9) 田中正三・香月裕彦：昭和 26 年 5 月植物病理學會講演發表