動物消化管内纖維素分解菌に関する研究

I 特にその分離法について

赤 司 景

(九州大学農学部)

Studies on the cellulose-decomposing bacteria in the alimentary canal of animals I. On the isolation of the bacteria

AKIRA AKASHI

(Facult. Agr., Kyushu Univ.)

緒 言

纖維分解菌は従来土壌微生物学の分野に於て、OMELIANSKY¹⁾・MAC. BEE²⁾・BOJANOVSKY³⁾・KALNINS⁴⁾・STANIER⁵⁾・板野・荒川⁶⁾・朝井・山田・上田⁷⁾等の諸氏によつて研究されているが、動物消化管のものは僅かに HUNGATE⁸⁾ 及び SIEPSTEIN⁹⁾ によつて反芻胃内のものに就いて追究されているに過ぎない。而も反芻動物以外にも馬に於ては、大腸、兔に於ては盲腸に於て纖維分解菌が重要な栄養上の役割を占め、又豚の消化器にも本菌群が棲息すると謂われているが、如何なる Strain によるものか、明かにされていない。又本菌の纖維分解生産物の動物栄養に対する影響等も判明していない。筆者は上述の理由で本菌に興味を抱きその分離を試みた。

実 験 I (従来法と異なる分離法)

1) 従来分離法についての検討

従来用いられた方法の主なものは次の通りである。先づ培養基は第1表に総括したものが用いられている。

Table 1

培養基種類	製 法
OMELIANSKY	$\left\{ \begin{array}{ll} \text{K}_2\text{HPO}_4 & 1.0 \text{ g} \\ \text{MgSO}_4 & 0.5 \text{ g} \end{array} \right\}$ $\left\{ \begin{array}{ll} \text{NaCl} & \text{trace} \\ \text{Distilled water} & 1000 \text{ cc} \end{array} \right\}$ $\left\{ \begin{array}{ll} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 & 1.0 \text{ g} \\ \text{Cellulose} & 1000 \text{ cc} \end{array} \right\}$
DUBOS	$\left\{ \begin{array}{ll} \text{NaNO}_3 & 0.5 \text{ g} \\ \text{K}_2\text{HPO}_4 & 1.0 \text{ g} \end{array} \right\}$ $\left\{ \begin{array}{ll} \text{KCl} & 0.5 \text{ g} \\ \text{FeSO}_4 & 0.01 \text{ g} \\ \text{Distilled water} & 1000 \text{ cc} \end{array} \right\}$ $\left\{ \begin{array}{ll} \text{MgSO}_4 & 0.5 \text{ g} \\ \text{Cellulose} & 1000 \text{ cc} \end{array} \right\}$
MC. BEE	$\left\{ \begin{array}{ll} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 & 2.0 \text{ g} \\ \text{K}_2\text{HPO}_4 & 1.0 \text{ g} \\ \text{MgSO}_4 & 1.0 \text{ g} \end{array} \right\}$ $\left\{ \begin{array}{ll} \text{CaCO}_3 & 2.0 \text{ g} \\ \text{Agar} & 1.0 \text{ g} \\ \text{Cellulose Liquid} & 500 \text{ cc} \end{array} \right\}$ $\left\{ \begin{array}{ll} \text{NaCl} & 1.0 \text{ g} \\ \text{Distilled water} & 500 \text{ cc} \end{array} \right\}$
VAN VITERSON	$\left\{ \begin{array}{ll} \text{NaNO}_3 & 2.5 \text{ g} \\ \text{K}_2\text{HPO}_4 & 0.5 \text{ g} \end{array} \right\}$ $\left\{ \begin{array}{ll} \text{Distilled water} & 500 \text{ cc} \\ \text{Cellulose liquid} & 500 \text{ cc} \end{array} \right\}$
VILJOEN	$\left\{ \begin{array}{ll} \text{Cellulose} & 15.0 \text{ g} \\ \text{Peptone} & 5.0 \text{ g} \\ \text{NaNH}_2\text{PO}_4 & 1.0 \text{ g} \end{array} \right\}$ $\left\{ \begin{array}{ll} \text{CaCl}_2 & 0.3 \text{ g} \\ \text{Distilled water} & 500 \text{ cc} \end{array} \right\}$
備 考	此の外に BOJANOVSKY ¹⁰⁾ による silica-gel 法もある。

之等の培養基に共通するところは液態培養基ならば濾紙、固形培養基ならば濾紙液を使用している点である。次に分離方法は、第1図に示す様に、A図の液態培養基で数回菌を濾紙上に集積し、之をB図の固形培養基に移植して、clear zone を形成させ、形成した場合再び液態培養基に戻し、菌を集積後、又固形培養基に移植するのである。

Fig. 1

液態培養基のみで移植する集積法では、夾雑菌との分離は殆んど不可能である。例へば山田¹¹⁾は、高温性纖維分解菌について2ケ年移植を重ねても純粋にはならなかつたと報告している。尚固形培養基に於ける clear zone も形成に時日を要し、又寒天の濃度、培養基の pH 或は夾雑菌との数的割合等に影響されて、これを形成する場合としない場合とがあり、又形成しても分解によつて clear zone 内に発育するので不明瞭になりがちである。以上の困難に拘らず之を長時間に亘つて実施され、終に数種の中温性菌株を分離された朝井・上田¹²⁾更に Hungate の変法を用いて高温性菌株を分離された朝井・山田¹³⁾氏等に敬意を表する次第である。

2) 本研究に使用した分離法

第1項の従来法を検討した結果次のことが明らかとなつた。即ち夾雑菌は纖維分解菌の分解産物である糖類を利用して発育する。而もその繊維が gel 状に寒天内に瀰漫しているので纖維分解菌が繊維を利用する際に雑菌が共棲する機会は極めて多い。つまり、この法では繊維が

糖（特に単糖類）に転化するのが早すぎるのである。依つて之を繊維のまま strip にして次の培養基に加えて使用することにした。

K_2HPO_4	1.0 g	$CaCO_3$	2.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	1.0 g	NaCl	trace
$MgSO_4$	0.3 g	Distilled water	1000cc
		Agar	10.0 g

この培養基で 37°C で培養した結果第 2 図の如く发育した。（培養法は、好氣的、嫌氣的培養法何れも試みた。）

Fig. 2

即ち、先づ OMELIANSKY 培養基内の 濾紙に 材料を接種して集殖させ約 2 週間後 濾紙が切断したものをこの固形培養基に移植したところ 2~3 日経過して、濾紙上に黄色又は淡青色の色素を出す菌の聚落の形成を認めた。

之等の 濾紙周辺の聚落は夾雑菌か、或は繊維分解菌か不明であるが、孤立聚落から釣菌して OMELIANSKY 培養液内の 濾紙上に移植し分解の有無を検したところ、濾紙の切断を認めた。従つて分解菌も夾雑菌も、繊維の炭素源を利用しなくても、上述成分の 濾紙を除いた固形培養基で发育する可能性が考えられた。特に夾雑菌は分解菌による生産物質である糖がない為にその发育は或程度抑制されたものと思われる。それで 濾紙片を入れない上記固形培養基に接種したところ发育を認めた。更に数回移植を重ね发育した個々の聚落より釣菌して分解能を検したところ約 2 週間で分解するものとしないものがあつた。即ち、濾紙を含まない固形培養基で聚落をつくらせることで短時に容易に繊維分解菌を分離する方法を設定した。尚本法により、供試数 15 頭の牛の第 1 胃より、本菌と目されるもの 10 株を得たが目下之等に就て同定中であり、後報で発表する予定である。

考 察

本法によつて分離された菌株の中には、メタン生成系の中温性繊維分解菌が多数を占めているが、数株は水素生成系の所謂高温性繊維分解菌である。後者の分離例が少ないのは供試数が少いためか、又は本法が前者に比べて後者に不適なのかその原因は今後検討する予定である。尚本法で固形培養基に发育した菌株の中 濾紙を分解するものは一応繊維分解菌と断定されるべきであろう。これらの聚落が色素を生成せず、概ね淡青色か灰白色であ

り、聚落も微細な局限的顆粒状をなす点は、従来報告されている各種固形培養基上の聚落と相違する。但し分離された菌株の中多く見られるのは *Pseudomonas* 属であるが之と目されるものは、その特徴である寒天上で凹陷をなす聚落の形成である。上述の如く、本菌及び夾雑菌の聚落が微細なことは、本菌の发育に必要な、繊維素の炭素源が無いのによるもので、この種の栄養源の状態のもとであつてもともかくも聚落を形成出来たものと思われる。この状態は夾雑菌の发育を抑制し、繊維分解菌を分離するに適したものと思われる。又稀釈平板培養法を経ているので一応純粋と見るべきであろう。尚分離した菌株は、本固形培養基で常に同一聚落を形成し、且又分解力を検定する際常に同一状態で 濾紙を分解していることは勿論である。

実 験 II (分離期間の短縮について)

実験 (1) に於て、従来用いられた方法と異なる方法で、中温性繊維分解菌及び高温性繊維分解菌（前者は後者に比較して分離例は遙かに多い）を純粋に分離出来得ることを報告した。分離に要する日数は大略第 2 図に示す通りである。

Fig. 3

即ち A→本菌を集殖し、濾紙が切断される迄に 2~3 週間位（メタン産成系は 2 週間、水素系は 3 週間）

B→固形培養基に直ちに移植し、聚落を形成させ、後数回移植を重ね、純粋化する迄に 1~3 週間

C→分解の有無の判定に 1~2 週間

要するに材料を接種してより、繊維分解菌を分離出来る迄尚 30日~50日 を要する。従来法では少くとも 1ヶ月乃至数ヶ月（或は 1~2 ケ年）を要して居つたが、此の 30日~50日 を更に短縮し得れば分離は容易になる。然るに第 2 図の (A) (C) 期間は OMELIANSKY 培養液内の過程であり、(B) は純粋にするのに要する期間であるが、期間を短縮する為には (B) は不可能であり、又之は厳密な検計を要することでもあるので、寧ろ (A), (C) の短縮を試みるべきであると考えた。依つて従来報告された分解刺激物質を添加してその効果を再検討した。その結果は次の通りである。

Table 2

分解位	添加物	供試物番号及び 分解開始迄に要した日数	
		No. 1	No. 2
1	大麦種子滲出液	8日間	6日間
2	クローバー葉茎滲出液	7 "	7 "
3	Sodium-citrate	8 "	8 "
4	<i>Azotobacter</i>	11 "	11 "
5	<i>Micrococcus</i>	12 "	12 "
6	Sodium-sulphate	12 "	12 "
7	Control	13 "	13 "

備考

(1) 本本研究の目的は纖維分解菌の分離期の短縮にあるので濾紙の切断開始をもつて纖維分解菌の生育を検知する手段とした。

(2) *Micrococcus*=) 胃内の *clostridium* の分離の際纖維分解を示すものである。

(3) 添加物

Azotobacter
Micrococcus > 1 öse

大麦種子滲出液 (大麦種子 10g を 100 cc の水で煮沸 30' のもの) 及びクローバー葉茎滲出液 (10g を水 100 cc の水で煮沸 30' のもの) は培養液の $\frac{1}{20}$ 量其の他は 1% の割合に添加

即ち所謂分解刺激物と称せられたものは対照に比較して分解は早い。特にクローバー滲出液、大麦滲出液、sodium citrate, *Azotobacter* は分解を促進させる。次に之等の濃度の影響を検した。結果は、第 3 表に示す通である。

Table 3

分解 順位	添加物及び添 加割合	供試物番号及び分解 開始迄に要した日数		添加物の分 解に要する 最適量
		No. 3	No. 4	
1	クローバー 葉茎 滲出液	$\frac{1}{20}$ 量 $\frac{1}{10}$ 量 $\frac{1}{5}$ 量	8日間 8 " 16 "	8日間 12 " 8 " ◎
2	大麦種子 滲出液	$\frac{1}{20}$ 量 $\frac{1}{10}$ 量 $\frac{1}{5}$ 量	8 " 12 " 14 "	8 " 16 " 8 " ◎
3	Sodium -citrate	0.05% 0.1 % 0.5 %	12 " 14 " / "	8 " 8 " / " ◎
4	<i>Azotoba- cter</i> <i>Chroococ- cum</i>	1öse 5öse	16 " 13 "	15 " 11 " ◎
5	Control		16 "	17 "

即ちクローバー滲出液大麦種子滲出液はその微量成分は後日にゆずることとして概観的には可溶性無窒素物を主成分とし、外にアミドをも含有している。一方枸橼酸の効果は、これが枸橼酸 cycle に入つて働いたためと思われ、*Azotobacter* の効果はその周囲に產生する Zooglea によると思われる。つまり、これらの効果は炭水化物のエネルギー源の影響によると一応考えられる。元来培養基には意識的にエネルギー源となる糖を欠除させてあるので、これはむしろ当然とも考えられる。それ

で本菌群の糖類転化の特異性を考慮して次の各糖類について分解力促進効果を検した。尚前者についての検討の為、アミド添加の効果をも検した。

Table 4

分解 順位	添加物 {糖類及び アミド類	供試番号及び 分解に要 した日数 No. 5	分解日数同じ場合 の濾紙切断程度
1	Xylose	6日間	+++
2	Lactose	7 "	+++
3	Dextrine	9 "	+++
4	Glucose	10 "	+++
5	Galactose	11 "	++
6	<i>Azotobacter</i> <i>chroococcus</i>	12 "	++
7	Sulcit	13 "	+++ 振盪すれば細片となる
8	Mannit	13 "	+++ 振盪すれば稍細片となる
9	Starch	13 "	++ 振盪すれば二片に切断
10	Urea	13 "	++ 振盪すれば濾紙の一部切損
11	Salicine	13 "	± 振盪すれば濾紙稍切損
12	Maltose	14 "	+
13	Succarose	14 "	+
14	Sodium-nitrite	15 "	+
15	Potacium-nitrite	15 "	±
16	Control	21 "	+

上位にある Xylose, Lactose, Dextrine, Glucose について更に 0.05%, 0.1%, 0.5% の濃度で施行したところ第 5 表に示す結果を得た。

Table 5

分解 順位	添加物及び添加割合	供試番号及び 分解開始に要 した日数		最適 量
		No. 5		
(1)	Xylose	0.05%	5 日間	◎
		0.1 %	4 "	◎
		0.5 %	8 "	
(2)	Lactose	0.05%	5 "	◎
		0.1 %	5 "	◎
		0.5 %	8 "	
(3)	Dextrine	0.05%	8 "	◎
		0.1 %	7 "	◎
		0.5 %	10 "	
(4)	Glucose	0.05%	5 "	◎
		0.1 %	5 "	◎
		0.5 %	10 "	

即ち、さきに推定した糖類とアミドの中、糖類の方が分解刺激物により有効である。更にこれ等の糖類とアミドと、大麦種子やクローバー葉茎の滲出液との分解力の強弱を比較すれば、微量成分の分解刺激効果のある程度うかがえるのでこれ等の比較を行つた。結果は第 6 表の通りである。

Table 6

分解 順位	添加物及び 添加割合	糖類の 種 類	供試番号及び分 解に要した日数 No. 6	備 考
1	Arabinose	単 糖 Pentose	5 日間	接種 分解開 月日 始月日 20/3 →24/3
2	Xylose	単 糖 Pentose	6 "	同 →24/3
3	Succarose	複 糖 単 糖	6 "	同 →25/3
4	Galactose	Hexose 単 糖	6 "	同 →25/3
5	Mannose	Hexose 単 糖	6 "	同 →同
6	Glucose	Hexose 単 糖	6 "	同 →同
7	Lactose	複 糖	7 "	同 →26/3
8	大麦滲出液	／	7 "	同 →同
9	Dextrine	多糖類	8 "	同 →27/3
10	クローバー滲 出液	／	8 "	同 →同
11	Raffinose	三糖類 単糖類	9 "	同 →28/3
12	Fructose	Hexose 単糖類	9 "	同 →同
13	Mannit	Hexose	11 "	同 →30/3
14	<i>Azotobacter</i> <i>chroococcum</i>	／	11 "	同 →同
15	Sulcit	単糖類 Hexose	11 "	同 →同
16	Urea	／	12 "	同 →31/8
17	Starch	多糖類	13 "	同 →1/4
18	Inuline	多糖類	14 "	同 →2/4
19	Maltose	複糖類	15 "	同 →2/4
20	Control	／	15 "	同 →2/4

即ち、大麦滲出液、クローバー滲出液、*Azotobacter* は Pentose, Hexose の一部より、繊維分解効果は劣り、糖類の中では、特に Pentose 類の効果が大きいことは注目に値する。

総 括

実験 (I) に於て、従来と異なる方法で繊維分解菌を分離して、その分離に長期間を要したものを30日～50日間に容易に分離し得ることが判つた。

更に実験 (II) に於て、本法による分離の過程に於て OMELIANSKY 液中に糖類特に単糖類 (Xylose, Arabinose, Glucose, Galactose等) を0.05～0.1% に添加した場合、分離期間短縮に有効であることも判明した。尚分離菌株の中で比較的中温性繊維分解菌が多く分離され高温性繊維分解菌の分離例が少ないのは、本法が不適なのか否か今後検討する予定である。分離された菌株は目下同定中であり後日発表する予定である。(1954.8.2受付)

引用文献

- OMELIANSKY, W. (1910) : Centrhlbl. Bact., 2, (8) ; 225-231
- MC. BEE, R. F. (1950) : Bact. Rev., 1, (14) ; 51
- BOJANOVSKY, R. (1925) : Centrhlbl. Bact., 2, (64) ; 223-303
- KALNINS, A. (1930) : Act. Univers., Latv. Seri., 1, (2) ; 221-303

5 STANIER, R. Y. (1943) : Bact. Rev., 2, (6) ; 1143-1196

6 板野新夫・荒川太千代 (1929) : 農化, 5, (61) 816

7 朝井勇宣・山田浩一・上田清基
(1952) : 農化, 26 (9) ; 442-443

(1949) : 農化, 23, (12) ; 543

(1951) : 農化, 25, (5) ; 201

(1951) : 農化, 25, (6) ; 303

(1952) : 農化, 26, (1) ; 35

8 HUNGATE, R. E. (1950) : Bact. Rev. 1 ; 14

9 SNEPSTEIJN, A. K. (1952) : J. Gen. Mic. Biol., 5, (5) ; 869-879

11 朝井勇宣・山田浩一 (1952) : 農化, 26, (6) ; 323

12 朝井勇宣・上田清基 (1952) : 農化, 26, (1) ; 37

13 朝井勇宣・山田浩一 (1950) : 応用菌学, 3, (2) ; 33

摘筆するに当り、主任加藤嘉太郎教授に敬意を表し、本研究に御指導、又御助言を賜りし東大越智勇一教授、東北大梅津元昌教授、本学農芸化学平井教授、本江助教授、東大農学部農芸化学朝井研究室山田浩一助教授、上田清基氏に深甚なる謝意を表する次第である。

Résumé

To get a pure culture of the cellulose-decomposing bacteria, there has been devised 1% agar plate composed of K_2HPO_4 (1.0g), $CaCO_3$ (2.0g), $MgSO_4$ (0.5g), $(NH_4)_2SO_4$ (1.0g), NaCl (trace), distilled water (1000cc), and agar (1.0g). In this method, cellulose is not used, but the cellulose-decomposing bacteria and the other bacteria form colonies. In dilute method pure culture is obtained. When inoculated on cellulose, these cellulose-decomposing bacteria, which are obtained by this method, do not diminish their activity. In this agar plate, the mesophilic cellulose-decomposing bacteria and also the thermophilic cellulose-decomposing bacteria are cultured, but the latter is rarely seen. On this point further investigation will be continued. It has been found in the first experiment that by using the specific agar after culturing in OMELIANSKY medium, a pure culture of the cellulose-decomposing bacteria were obtained in a comparatively short time. Shortening of the isolation stadium, is due to the apply of the specific agar, but not the apply of OMELIANSKY medium. It takes about 30-50 days to get a pure culture, but if OMELIANSKY stadium will be shortened, the isolation will become more easy. For this purpose, it has been explained in the second experiment that carbohydrate is a good stimulus to cellulose-decomposition. Especially pentose group and some of hexose group are found excellent.

赤 司 論 文 附 図

Fig 4

Fig 5

Fig 6

Fig 7

Fig 8

Fig 9

Fig 10

Fig 11

Fig 12

Fig 13

写 真 説 明

Fig. 4 clear zone

- (1) clear zone
- (2) 繊維分解菌聚落
- (3) 随伴菌聚落

Fig. 5

- (1) 紙
- (2) 紙周囲の寒天に发育した聚落

Fig. 6

- (1) 紙 之は使用しない場合多し
- (2) 寒天内に发育した聚落→之を数回稀釈平板培養を繰返して菌を分離する。

Fig. 7 OMELIANSKY 液内の繊維分解菌の分解状況

- (1) *Pseudomonas cellvibrio vulgaris* に依るもの
- (2) *Clostridium cellulosolvens* に依るもの
- (3) 対 照

(4) *Vibrio synthetica* に依るもの

Fig. 8 繊維分解菌群 (clear zone より採取, 染色せるもの)

- (1) Gと同じ
- (2) Dと同じ
- (3) Eと同じ

Fig. 9 *Vibrio synthetica* と思考する
菌体彎曲せるものあり

Fig. 10 *Clostridium cellulosolvens* と思考する

Fig. 11 *Cytophaga deprinata* の microcyst

Fig. 12 *Sporocytophaga* の糸状体

Fig. 13 *Vibrio prima* と思考する
菌体彎曲せるものあり

備考 (1)半 (15例) の第1胃より分離した繊維分解菌で、分類した基準及び其の他分離したものに就いては同定中であり後報にて発表の予定である。