- (6) L. C. Maillard : *Compt. rend.*, 154, 66 (1912).
 (7) M. L. Wolfrom, R. D. Schuetz, L. F. Cavalieri : *J. Am. Chem. Soc.*, 70, 514 (1948).
 (8) A. Gottschalk, S. M. Partridge : *Nature*, 165, 684 (1950).
 (9) M. L. Wolfrom, D. K. Kolf, A. W. Langer, Jr. : *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 3471 (1953).
 (10) H. M. Barnes, C. W. Kaufman : *Ind. Eng. Chem.*, 39, 1167 (1947).
 (11) M. L. Wolfrom, W. W. Binkley, J. N. Schumacher : *Ind. Eng. Chem.*, 47, 1416 (1955).
 (12) Hiromichi Kato : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 20, 273 (1956).
 (13) L. J. Schroeder, M. Lacobellis, A. H. Smith : *J. Biol. Chem.*, 212, 973 (1955).

動物消化管内繊維素分解菌に関する研究 (第 3 報)*

集殖培養を経ないで直接に聚落を生育させる法

赤 司 景 (九州大学農学部畜産学科)

昭和 32 年 10 月 26 日 受 理

既報^(1,2)のように、消化管内繊維素分解菌はオメリヤンスキーの塩類にガラクトースと寒天を加えた培養基、あるいはこれはフクシンを加えた培養基を使用することによって、比較的容易に分離できるが分離に先だってオメリヤンスキー培養基内の濾紙に試料を加えて集殖することを要する。しかし、反芻胃内での繊維素分解菌の機能状態を知ろうとする場合には、そこに於ける全細菌と本菌との数的関係をも検討しなければならない。その際上記のように集殖法をとれば、中温性好気性繊維素分解菌が集殖してしまつて、胃の内部でのその数そのものを知ることができず、従つて全細菌との関係を検することができない。このため集殖操作をしないで胃内容物から直接に培養して聚落を生育させることが必要になる。それには繊維素分解菌の生育に特に適した特殊の培養基を要すると考えられる。培養基中の糖類が阻害作用を呈することは朝井, 上田⁽³⁾や著者⁽¹⁾の報じたところであるが、一方 Hungate⁽⁴⁾によれば繊維素含有培養基での本菌群の生成物は繊維素に対し 20% のセロビオースを含むという。それでセロビオースについて検した結果、これの添加が本菌群の生育に著効があり、これを含む培養基によって上記の目的が達せられることを知つたのでその次第を報ずる。

実 験

I. 実験法 山羊の胃内容を生理的食塩水で 1:1000~1:10000 に稀釈し、後述の固態培養基に加えて 37° で培養する。生育した聚落から釣菌し、オメリヤンスキーの培養基に接種して 37° に培養し、濾紙の切断によって分解力を判定し、繊維素分解菌であるかどうかを検した。

II. 結 果

(1) ガラクトース・オメリヤンスキー塩類・寒天・培養基⁽¹⁾。組成 (ガラクトース 0.5 g, K_2HPO_4 1.0 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, $CaCO_3$ 2.0 g, NaCl trace, 寒天 20 g, 蒸溜水 1000 ml)。山羊の胃内容 8 例につき、各々の培養シャーレからそれぞれ相違する聚落を 4~5 株宛計 22 株をとつて分解力を判定したが、いずれも陰性に終つた。分離率 0/22。

(2) ガラクトース・フクシン・オメリヤンキー塩類・寒天培養基⁽²⁾ (濾過)**。炭酸カルシウムによって培養基が白濁して生育集落が判別し難いので濾過を行った。山羊の胃内容液 29 例につき 87 株をとつて検した結果、7 株の繊維素分解菌を得た。分離率 7/88。7 株を釣菌した各聚落の形状を第 1 表に表示する。なお、胃内容液 0.1 ml 中のオグリコール酸培養基*** (以下 T. G. C. と略記) による全菌数と本培養基による繊維素分解菌数との比率も参考に同表に示す。

* Studies on the Cellulose-decomposing Bacteria in the Alimentary Canal of Animals. Part III. Methods to form Colonies of these Bacteria without Accumulating Culture.
 By Akira AKASHI (Department of Zootechnical Science, Faculty of Agriculture, Kyushu University)

** フキシンの添加及び濾過については第 2 報に於て報告してある。

*** 組成 (ペプトン 15.0 g, L-シスチン 0.75 g, 葡萄糖 5.0 g, 酵母エキス 5.0 g, 食塩 2.5 g, チオグリコール酸ソーダ 0.5 g, レザズリン 0.001 g, 寒天 0.75 g, 蒸溜水 1000 ml)

第 1 表 濾過ガラクトース・フクシン・オメリヤンスキー塩類・寒天・培養基による培養から繊維素分解菌を鈎菌した集落の形状及び分離株が濾紙上で生成する色素

集落の位置	集落の形状	濾紙上の色素	S/T*
内部	楕円形またはレンズ状	黒色	—
内部	楕円形またはレンズ状	橙—褐色	10万/300万
表面	円形, 湿潤透明	黒色	2万/292万
表面または内部	円形または微小球形	黒色	—
表面	湿潤瀾漫性	黒色	0.7万/345万
表面	放射状	黒色	3万/345万
内部	楕円形・レンズ状	茶色	1万/350万

* S—0.1 ml Sample 中の繊維素分解菌数

T—Sample 0.1 ml の T.G.C. 培養基による全菌数

一系統の色素を生成する菌群だけで、これでは普遍性がない。

(3) ガラクトース・フクシン・オメリヤンスキー塩類・寒天・培養基(非濾過)。濾過を行わないと分離率は 5.26 になる。鈎菌した聚落の形状は第 2 表に表示する。

すなわち、濾過した培養基よりも分離率が高く、各系統の色素を生成する数群が分離されている。しかしまだ良好とはいえない。

(4) ガラクトース・ペプトン・塩類・寒天・培養基及びガラクトース・硝酸ソーダ・塩類寒天培養基: (1) のガラクトース・オメリヤンスキー塩類・寒天・培養基に微量の KCl と FeCl₂ を加え、CaCO₃ を加えず、(NH₄)₂SO₄ の代りにペプトンあるいは NaNO₃ を使った培養基を作成した。その組成は

(a) K₂HPO₄ 1.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, NaCl 0.05 g, KCl 0.1 g, FeCl₃·6H₂O 0.001 g, ペプトン 1g, 寒天 20 g, 蒸留水 1000 ml.

(b) 上記中ペプトンの代りに NaNO₃ 1g. 分離率は a では 0/45, b では 0/31 で、両者とも繊維素分解菌はとれなかった。なお同じ試料から T. G. C. 培養基では 18 株が分離されたが、いずれも繊維素分解能はなかった。

(5) セロビオース含有培養基

(A) セロビオース含有各種培養基の比較: (a) セロビオース・オメリヤンスキー塩類・寒天・培養基(セロビオースは 0.05~0.1% 濃度で使用), (b) セロビオース・第 1 胃内容液・オメリヤンスキー塩類・寒天・培養基(セロビオースは 0.05% 濃度, 蒸留水の代りに第 1 胃内容液を滅菌して使用), (c) a にフクシンと亜硝酸ソーダを加えた培養基, (d) b にフクシンと亜硝酸ソーダを加えた培養基。なお各種培養基とも濾過しない。分離率及び菌株を鈎菌した聚落の形状と分離株の濾紙上の色素生成は第 3 表に表示する。

すなわち(a)及び(c)の分離率がよい。つまりセロビオースもガラクトースに劣らず繊維素分解菌の生育に有効である。しかし分離率は未だ良好とは言えない。

なお各培養基とも濾過したものの分離率は 0/19.

第 3 表 セロビオース含有培養基による分離率及び繊維素分解菌株を鈎菌した集落の形状と分離株が濾紙上で生成する色素

培養基	分離率	集落の形状	濾紙上の色素
a*	5/37	円形湿潤黄色	黄色
		微小球形	淡黄色
		円形湿潤桃色	白色
		円形球形白色	白色
b*	1/41	微小球形	白色
		微小球形	白色
c*	4/33	楕円・レンズ状	白色
		円形透明湿潤	白色
		微小球形	黄・橙黄色
		楕円形・レンズ状	淡黄色
d*	2/33	微小球形	白色
		微小球形	白色

* 本文記載

第 2 表 ガラクトース・フクシン・オメリヤンスキー塩類・寒天・培養基による培養から繊維素分解菌を鈎菌した集落の形状及び分離株が濾紙上で生成する色素

集落の形状	濾紙上の色素	S/T
微小球形, 黄色	黄色	5万/352万
微小球形, 白色	白色	20万/480万
微小球形, 茶色	茶色	30万/300万
楕円・レンズ状	白色	—
微小球形, 白色	白色	—

すなわち、この培養基では分離率が悪く、また分離される株も褐色と黒色とのほぼ同

第 4 表 セロビオース (0.5%)・オメリヤンスキー塩類・寒天培養基及びセロビオース (0.5%)・フクシンオメリヤンスキー塩類・寒天培養基での分離率及び繊維素分解菌を鈎菌した聚落の形状と分離株が濾紙上で生成する色素

培養基	分離率	聚落の性状	濾紙上の色素
a*	22/32	円形・黄色湿潤	黄白色
		楕円形・レンズ状	黄色
		楕円形・レンズ状	白色
		放射状	淡黄色
		円形湿潤	白色—黄色
		微小球形	オリブ色
b*	9/19	微小球形	淡黄色
		微小球形	淡黄色
		微小球形	淡黄色
		微小球形	白又淡黄色
		楕円形湿潤	白色
		楕円形・レンズ状	白色・淡黄色
		楕円形	白色
		円形・透明・湿潤	黄色

* 本文記載, なおいずれも濾紙が切断する迄 40 日を要した。

0/22, 0/19 及び 0/21 でまったく不良であった。

(B) セロビオースの濃度及び添加法の検討：上の結果はセロビオース 0.05~0.1% 濃度で得られたものである。更にこれを 0.5% にし、なおセロビオースを別個に滅菌し、培養基使用に際してこれを添加するようにした。(a) セロビオース・オメリヤンスキー塩類・寒天・培養基、(b) セロビオース・フクシン・オメリヤンスキー・塩類・寒天・培養基。結果は第 4 表に示す。すなわち a, b と分離率は非常に良くなった。

(C) セロビオースとガラクトースとの併用培養基：(1) 上記の諸結果からみると、セロビオース 0.5% あるいはガラクトース 0.05% をオメリヤンスキー塩類・寒天・培養基に添加したものが良好な成績を示すので、これを併用したセロビオース (0.5%)・ガラクトース (0.05%)・オメリヤンスキー塩類寒天培養 (表中 a) を検した。なお、既に記載したものの中で比較的成績の良いガラクトース・フクシン・オメリヤンスキー塩類・寒天・培養基 (表中 b) 及びガラクトース・オメリヤンスキー塩類・培養基 (表中 c) との比較を同一試料について併せ行った。結果は第 5 表に表示する。

すなわち、セロビオース (0.5%)・ガラクトース (0.05%)・オメリヤンスキー塩類・寒天・培養基では胃内繊維素分解菌の各色素系を産生する菌株が分離されている。もっとも繊維素分解菌の分離そのものを目的とする場合には、集殖法を経る前報の方が良好であることは言うまでもない。

(2) 試料を変えて牛の第 1 胃内容物についてこの併用培養基の使用を試みた。結果は第 6 表に表示する。すなわちこの場合も良好な結果を示す。

第 5 表 ガラクトース (0.05%)・セロビオース (0.5%)・オメリヤンスキー塩類・寒天培養基とガラクトース・フクシン・オメリヤンスキー塩類・培養基及びガラクトース・オメリヤンスキー塩類培養基を用いた繊維素分解菌分離の比較

培養基	分離率	聚落の形状	濾紙上の色素	菌株数
a*	5/6	円形・湿潤	白色	2
		円形又は楕円形	黄色	2
		微細球形又は円形	橙色	1
b*	3/6	円形・湿潤	白色	2
		楕円形	黄白色	1
c*	1/6	円形	黄色	1

* 本文記載

上記各表に示した聚落の形状は培養条件によって相違を来すものである。むしろ聚落の色や、濾紙上に生成される色素を参考にした方がよいと考えられる。

セロビオース・ガラクトース併用培養基で分離される繊維素分解菌が濾紙上で生成する色素には、繊維素分解菌が生成すると報告されている各色素が含まれており、中温性好気性繊維素分解菌は、各色素系にわたって分離されているものと考えられる。したがってこのセロビオース・ガラクトース・オメリヤンスキー塩類・寒天・培養基を用いれば、試料から集殖操作を経ないで直接に繊維素分解菌を分離することが可能であり、全菌数との数的関係を検討することができると考えられる。

総 括

反芻胃内の中温性好気性繊維素分解菌の胃内での機能状態を検討するため、予備的な集殖を経ないで直接に聚落を生成させる平板培養法を求めて、種々の培養基を考案検討した結果、セロビオース (0.5%)・ガラクトース (0.05%)・オメリヤンスキー塩類・寒天・培養基を用いればこの目的が達せられることを確めた。

擧筆するに当って、主任教授加藤嘉太郎教授に敬意を表し、本研究に有益な御助言を賜った東大農学部朝井勇宣教授及び朝井研究室上田清基氏に深甚なる謝意を表す次第である。

(1) 赤 司 景：日畜誌，25，193 (1954)。

(2) 赤 司 景：本誌，30，550 (1956)。

(3) 朝井勇宣，上田清基：本誌，23，554 (1950)。

(4) R. E. Hungate：J. Bact. Rev., 14, 30 (1950)。