

牛の第一胃に於ける細菌と原生動物の相互関係 : 原生動物の培養について

赤司, 景
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21167>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 12 (3), pp.263-268, 1952-03. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :

牛の第一胃に於ける細菌と原生動物の相互関係

原生動物の培養について

赤 司 景

Interrelation between bacteria and protozoa in bovine rumen I On the culture of protozoa

Akira Akashi

I. 緒 言

反芻獣の第一胃内に多数の微生物が生棲してをり、之が栄養学上重要な意義を有してゐることは周知のことであるが、最近国内の飼料事情蛋白質資源が不足し、其の需給が困難な折、その蛋白質資源獲得に微生物を利用される傾向が見られるに至つて、この反芻獣の第一胃内の微生物の価値が注目されるようになった。その一例をあげれば尿素飼料であらう。之が反芻獣に有効とされてゐるのは、即ち、乾草のごとき粗飼料で飼養された反芻獣に、尿素を給与すると、第一胃内の Urease により、急速にアムモニヤと炭酸ガスに分解せられ、このアムモニヤ態窒素が胃内の微生物の繁殖を促がし、従つて菌蛋白態として飼料的に価値が増進することが推定されてゐる。此の微生物に関しては Margolin,¹⁾ Mangold,²⁾ Weinnecke³⁾ 及び Trier,⁴⁾ Knoth⁵⁾ 等によつて究明されてゐる。

尙 Zuntz,⁶⁾ Hagemann⁷⁾ はアマイドとこの微生物との関係を検討しアマイドが之等微生物の菌蛋白形成にあづかり、之が消化利用されるとのべてゐる。広瀬氏⁸⁾ によつても之については検討されてゐる。微生物中細菌については Henneburg⁹⁾ はセルローズ分解について重要な役割があると報告し、Hungate¹⁰⁾ は嫌気性細菌のセルローズ分解に言及し、本邦に於て梅津氏¹¹⁾ によつて A, B, C, D のセルローズ分解細菌が分離され、之を生理学上から検討されてゐる。原生動物に関しては、Sheunert,²⁾ Becker¹³⁾ 等は消化作用に無関係とし Trier, Knoth 両氏は、不成功に終つたが之等の培養を試みた。之等原生動物は、植物性蛋白を有効な細菌性蛋白の転換者である事は疑ふ余地がないけれど未だ明確に確定はされてゐない様である。筆者は之等細菌と原生動物の生理栄養学上の影響について興味を起しこれらの相互関係について研究を行つた。In vitro の実験は生体に於ける状態を観察するに経る可き過程であり、先づ細菌及び原生動物の分離を企てた。

細菌の分離は可能に近いけれども、原生動物についてはその分離は従来から困難とされてゐる。それは、原生動物は細菌を捕食し、又、両者の生活的生産物を栄養源とするから両者を完全に分つことは困難なのである。筆者は此の原生動物の純培養を種々考案し略其

の目的を達したと思はれるのでここに報告する次第である。

II. 実験方法

供試動物は屠牛であり，屠殺直後第一胃内容を採集した。培養については原生動物が細菌の死滅体及び細菌の生活生産物等の有機物を栄養源とする事に着目し，又，原生動物の包囊が薬物，特に酸に対して抵抗性がある事を利用して種々培養法を考究した。

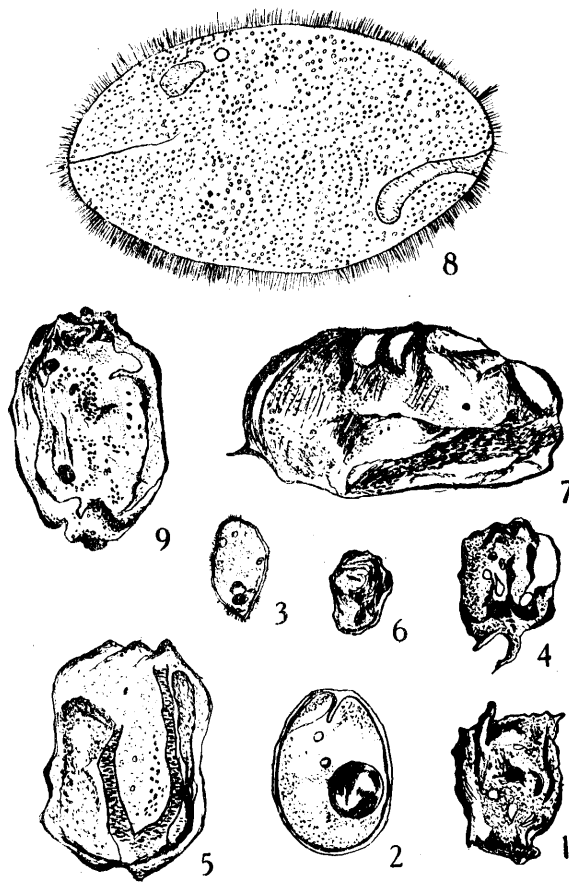


Fig. 1. *Ent. loboso-spinosum* ($40\mu \times 28\mu$) (1:1200). Fig. 2. *Dast. ruminatrium* ($41\mu \times 31\mu$) (1:1200). Fig. 3. *Dastricha* (又はDitto) ($20\mu \times 10\mu$) (1:1200). Fig. 4. *Ent. caudatum* (1:1200). Fig. 5. *Dipl. (Edpl.) caudatum* ($120\mu \times 90\mu$) (1:450). Fig. 6. *Ent. rectangulum* ($35\mu \times 23\mu$) (1:1200). Fig. 7. *Dipl. (Edpl.) caudatum* ($132\mu \times 62\mu$) (1:1200). Fig. 8. *Iso. prostoma* ($150\mu \times 72\mu$) (1:1200). Fig. 9. *Dipl. (Edpl.) maggi* ($192\mu \times 90\mu$) (1:450).

III. 実験成績及び考察

第1実験 先づ胃内容の雑菌を抑制し原生動物の発育を促す目的で低濃度の塩酸に作用させ次の培養基に培養を行つた。

培養基：藁6分，乾草4分を混合して少量の水を加へて煮沸し之を滅菌する。

培養方法：第一胃内容を1.5%，2%，3%，4%の塩酸に1分間作用させ，之を遠心器300廻転として，10分間かけ其の沈澱物を培養する。その培養成績は次の第1表に示す通りであつた。

第1表から明らかな供試濃度の塩酸で処理したものには何れも雑菌を認めた。その原因

第1表：塩酸で1分間処理した場合の微生物発育状況。

処理塩酸濃度	37°C, 24時間後の発育状況
1.5%	原生動物の活動体はない，包囊は存するが運動はない，雑菌は球菌，桿菌で陽性
2%	上記と同じ
3%	包囊は形成するか運動しない，雑菌は球菌
4%	上記と同じ

としては酸の処理時間の短いためかと思はれるので次の実験を行つた。

第2実験 塩酸各濃度に於ける処理時間を10分，20分，30分，50分及び60分として第1実験と同じ培養基で培養を行つた。その結果は第2表の通りであつた。

第2表：塩酸処理時間を10, 20, 30, 40, 50及び60分とした場合の微生物発育状況。

処理塩酸濃度	一定時間処理後 37°C で培養した場合の発育											
	10分処理		20分処理		30分処理		40分処理		50分処理		60分処理	
	細菌	原生動物	細菌	原生動物	細菌	原生動物	細菌	原生動物	細菌	原生動物	細菌	原生動物
1.5%	雑菌は球菌，桿菌何れも陽性	活動体あり運動する	雑菌は球菌，桿菌何れも陽性	包囊体となり分子運動をなす	雑菌は球菌のみ陽性	包囊体となり分子運動はなし	球菌陽性	包囊体は見られず	球菌陽性	包囊体見られず	球菌陽性	包囊体あるも運動なし
2%	球菌が陽性である	包囊体となり分子運動をなす	球菌陽性	上記と同じ	上記と同じ	上記と同じ	上記と同じ	上記と同じ	上記と同じ	包囊体あるも運動なし	上記と同じ	上記と同じ
3%	球菌が陽性	上記と同じ	上記と同じ	上記と同じ	上記と同じ	上記と同じ	上記と同じ	包囊体あるも運動なし	上記と同じ	上記と同じ	上記と同じ	上記と同じ
4%	球菌陽性	上記と同じ	上記と同じ	上記と同じ	上記と同じ	上記と同じ	上記と同じ	上記と同じ	上記と同じ	上記と同じ	上記と同じ	上記と同じ

第2表から見ると各濃度の塩酸に10~60分作用せしめても依然雑菌は全部生存して運

動する。原生動物は包囊を形成するがそれが 10 分間、2%~4%の塩酸で処理した場合にも包囊は活動態となつて雑菌も生存してゐるから目的を達し得なかつた。即ち、

- (1) 雑菌を殺すにはもつと高濃度の塩酸でなければならないこと。
- (2) 原生動物をそのまま塩酸で処理しても活動態は死滅し残つた包囊は活動体にはならないこと。

第 3 実験 先づ第一胃内容を風乾し原生動物を包囊に変ぜしめて之を塩酸の 30% に 40 分、20%、10% に 24 時間作用させ培養基としては次に挙げる 2 種類のものを使用した。

- A 法: (a) Ringer 液..... 8 分
- | | |
|-------------------|---------|
| NaCL | 7.0 g |
| CaCL ₂ | 0.2 g |
| KCL | 0.2 g |
| Aq.dest | 1000 cc |
- (b) 牛から取つた血清 1 分

(a) と (b) の混合液 10 cc に 1 滴の消毒した可溶性澱粉を加へる。之を pH 6.5~6.8 に調整する。(尙此の滅菌は間歇滅菌を良とする。)

第 3 表

培養基	供試材料 塩酸処理 濃 度	微生物發育狀況 (37°C, 24 時間後)	
		原 生 動 物	蜜 菌
A 法	30 %	包囊体は活動を開始す <i>Entodinium</i> 属 1 視野に 2~3 個	球 菌 -- 桿 菌 --
	20 %	包囊体は上記と同じ <i>Entodinium</i> 属 1 視野に 3~5 個	球 菌 -- 桿 菌 --
	10 %	包囊体は上記と同じ <i>Entodinium</i> 属 1 視野に 3~5 個	球 菌 -- 桿 菌 --
	6 %	包囊体は上記と同じ <i>Entodinium</i> 属 1 視野に 10 個	球 菌 土 桿 菌 --
	4 %	包囊体は上記と同じ <i>Entodinium</i> 属 1 視野に 7~10 個	球 菌 土 桿 菌 土
	2 %	包囊体は上記と同じ <i>Entodinium</i> 属 1 視野に 7~10 個	球 菌 土 桿 菌 土
B 法	30 %	包囊体は運動せず <i>Entodinium</i> 属 1 視野に 1~2 個	球 菌 -- 桿 菌 --
	20 %	包囊体は運動を開始 <i>Entodinium</i> 属 1 視野に 1 個	球 菌 -- 桿 菌 --
	10 %	包囊体は上記と同じ <i>Entodinium</i> 属 1 視野に 1~2	球 菌 土 桿 菌 --
	6 %	個包囊体は上記と同じ <i>Entodinium</i> 属 1 視野に 1~2 個	球 菌 土 桿 菌 --
	4 %	包囊体は上記と同じ <i>Entodinium</i> 属 1 視野に 5~6 個	球 菌 土 桿 菌 --
	2 %	包囊体は上記と同じ <i>Entodinium</i> 属 1 視野に 5~6 個	球 菌 土 桿 菌 土

B法：乾草（チモシー）100gを2 lの水にて約1時間煮沸し1 lに煮詰めた上、それを1晩放置した後再び30分間煮沸して之を濾過する。之を原液として更に10% Ringer液で稀釈を行い、その10%溶液95ccに更に新鮮な卵白10% 0.5cc加へる。（37°~39°C）で培養する。

第3表で見ると、雑菌の生存してゐないのは30%、20%、10%であるが原生動物のうち *Entodinium* 属だけが筆者が見た材料に於て見られ、他の原生動物は死滅してゐる様に見える。牛の第一胃内には、*Entodinium* 属、*Diplodinium* 属、*Dastiricha*、*Isotricha* 属等があるべき筈である。大谷・広瀬両氏は、*Diplodinium* 等は pH6.8 以下では生存し得ず、*Entodinium* 属は微酸性以下でも良く生存すると述べてゐる点から見て第3表に於て *Entodinium* 属のみが所見されるのは酸性処理で酸性に傾いたためかと思はれるので、此の酸性を中和すれば他の原生動物も培養が可能であらうと考へ次の実験を行った。

第3実験、第4実験から雑菌が証明されないのは30%、20%、10%の塩酸であることがわかるので第一胃の内容物を風乾し之を30%塩酸に40分、20%及び10%の塩酸に一風夜浸漬し各々を苛性ソーダにて中和を行つた。（此の場合塩酸量を各1ccとして第一胃の風乾物を入れた儘苛性ソーダで各々を同濃度で中和する。）

A法にて培養した培養結果は第4表に示す。

第4表：塩酸処理後苛性ソーダで中和した場合の原生動物の發育状況。

処理塩酸濃度	發育を認めた原生動物			
	<i>Entodinium</i>	<i>Diplodinium</i>	<i>Dastiricha</i>	<i>Isotricha</i>
30%	<i>Ent. simplex longinucleatum</i>		<i>Dast. ruminatrium</i>	
	認められる確率90%	認められる確率/	認められる確率10%	認められる確率/
20%	<i>Ent. simplex longinucleatum</i> <i>Ent. loboso spinosum</i>	<i>Diplodinium maggi</i>	<i>Dast. ruminatrium</i>	<i>Isotricha prostoma</i>
	認められる確率75%	認められる確率2%	認められる確率10%	認められる確率3%
10%	<i>Ent. simplex longinucleatum</i>	<i>Diplodinium maggi</i>	<i>Dast. ruminatrium</i>	<i>Isotricha prostoma</i>
	認められる確率65%	認められる確率3%	認められる確率25%	認められる確率7%

備考。第4表に於て *Entodinium* が認められる確率が多いのは第1胃内に於ける寄生率が多いためである。尙材料によつては確率に多少の移動がある。

IV. 総括及び摘要

牛の第一胃の細菌と原生動物の相互関係を明らかにするために先づ細菌と原生動物の分離を必要としたので原生動物の純培養を試みた。而して包裹態の原生動物が生存し雑菌の死滅する濃度及び処理時間を検討した。

(1) 牛の第一胃の内容物を風乾して40分間30%並びに20%及び10%の塩酸に

一昼夜処理し 37°C に 4 時間培養すると雑菌は認められず、ただ *Entodinium* のみが活動体となつて出現する。

(2) 塩酸処理後苛性ソーダで中和して培養すると、*Dastricha*, *Diplodinium Isotricha* 等が活動体となる。

尙本研究は文部省科学研究費の補助により行はれたものである。(昭. 25)

参 考 文 献

- 1) Margolin S.: *Biolog. Bull.*, 59, p. 301~305.
- 2) Mangold E.: *Wiss. Arch. f. Landw. Abt.*, 13, 1930.
- 3) Weinnecke. E.: *Archiv Protist.*, Bd. 82, 1934.
- 4) Trier H. J.: *Z. vergl. Physiol.*, 4, 1926.
- 5) Knoth, M.: *Z. Parasitenk.*, 1, 1928.
- 6) Zuntz, N.: *Pflüger Arch.*, 49, 1891.
- 7) Hagemann, O.: *Landw. Jb.*, 20, 1891.
- 8) 広瀬可恒: 日本畜産学会報, 20卷3号.
- 9) Henneburg, W.: *Berl. Klin. Wsch.*, 56, 693, 1919.
- 10) Hungate R. E.: *J. Bact.*, 53, 1947.
- 11) 梅津元昌: 日本畜産学会口演, 1950.
- 12) Sheunert, A.: *Handbuch d. Biochem. d. Menschen u. Tieres.* 1924.
- 13) Becker. E. R.: *J. Sci.*, 1, p. 345~371, 1917.

R é s u m é

In this report the method for pure culture of protozoa found in bovine rumen is discussed, and the best method for isolating and culturing the protozoa is here stated. The airdried contents of bovine rumen are treated with 30% HCl solution for 40 minutes or 10 or 20% HCl solution for 24 hours, and put in the culture solution which is compound from Ringer's solution (8 parts) and bovine serum (1 part). When cultured at 37°C for 24 hours. Entodinia are observed in all cases and the bacteria were not found to be alive in the case of the treatment with 10, 20 and 30% HCl solution. Other protozoa e.g. *Dastricha*, *Diplodinium*, *Isotricha*, have been found when the rumen contents are neutriized by caustic soda after treated with HCl solution.