

牛の胃内の細菌と原生動物との相関関係III : 好気性尿素分解及び非分解細菌と原生動物の尿素添加に於ける共棲試験

赤司, 景
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21187>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 12 (4), pp.411-415, 1952-09. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :



牛の胃内の細菌と原生動物との相関関係 III

好気性尿素分解及び非分解細菌と原生動物の
尿素添加に於ける共棲試験

赤 司 景

Interrelation between protozoa and bacteria in bovine rumen (III)

Symbiose test in addition of urea between protozoa and
aerobic urea-decomposing or urea-indecomposing
bacteria (in vitro)

Akira Akashi

1. 緒 言

牛の胃内の微生物が細菌性蛋白として、營養学的価値のあることは、尿素飼料が出づるに及び特に注目されるようになった。其の機構に関して種々憶測されているが、其の解決として、微生物を分離して *in vitro* に究明する一部面も残されているようである。著者は、第1報¹⁾に於て胃内の原生動物の純培養を、第2報²⁾に於て原生動物と好気性細菌との共棲拮抗関係を一報告したが、本報に於て好気性尿素分解及び非分解細菌と原生動物の尿素添加に於ける、特に原生動物及び細菌の数的消長を検討し、其の尿素の之等微生物に対する影響を見た。

2. 実験材料並びに方法

使用した菌株は第2報で述べた菌株である。

先づ尿素添加に於けるウレアーゼの有無を Levine³⁾による Anderson の変法を用いて検討した。次に共棲試験には、細菌と原生動物の共棲試験に尿素を添加し、更に尿素分解菌を加えた次の項目で実験を行った。即ち

(i) 細菌_(B)を Ringer-serum で3日間培養し、生理的食塩水 1cc 中に 0.1cc 注加したものを。

(ii) 細菌_(B)+原生動物_(P) 原生動物は第1報で報告した培養法により培養したもので尙原生動物の添加は広瀬⁴⁾による第1胃内の原虫数と細菌数の比率を参考にした。

(iii) 細菌_(B)+原生動物_(P)+尿素_(U) (3%, 0.5%, 0.2% の3列)

(iv) 細菌_(B)+原生動物_(P)+尿素_(U)+尿素分解菌_(DB) (3%, 0.5%, 0.2% の3列)

上述の如く共棲試験を行い培養後3日で稀釈培養(1万倍)を行い細菌は集落を数え、原生動物は血球計算板上にて 1mm³ の原虫数を計算した。

3. 実 験 結 果

(i) ウレアーゼ試験 先づウレアーゼの検査を次に示す。

ウレアーゼ試験に使用した方法は Levine の Anderson の変法で次の如く (A) (B) 両液を作り、両液から培養基を作り、之に細菌を培養してウレアーゼの産生を検査した。即ち

A 液	{	アルコール (95%)	2 cc
		再 蒸 溜 水	4 cc
		尿 素	2 gr
B 液	{	K_2HPO_4	0.1 gr
		KH_2PO_4	0.1 gr
		再 蒸 溜 水	100 cc
		生理的食塩水	0.5 gr
		フェノールレッド (0.2%)	1 cc

(但しBは加圧滅菌を行う)

之等A, B両液を作り、A液を 19 倍容量のB液で稀釈し之を尖底試験管に 1 cc 注加し、分離した菌株を白金耳培養し、48 時間 37°C 定温器に入れウレアーゼによる尿素分解のため生じたアルカリによつてフェノールレッドが黄→赤に変色するを観察した。成績は次の通りである。

Table 1. Urease test.

Isolated strains	Observation (Day)					Anti-urease test	
	1	3	5	7	10		
<i>Bacillus</i>	3B/M ₃	-	+	+	++	++	-
	5/M ₃	-	-	±	±	±	±
	3B/M ₂	++	++	++	++	++	-
	2B/M ₂	±	+	++	++	++	-
<i>Streptococcus</i>	1/M ₂	-	-	+	+	+	+
	3/M ₂	-	-	-	-	-	-
	2BC/M ₂	-	-	-	-	-	-
	1/M ₁	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus</i>	2Y/M ₂	-	±	±	+	+	±
	4/M ₂	-	-	-	-	-	±
	2/M ₁	-	-	-	-	-	+
	2P/M ₂	-	+	+	+	+	-

第1表に於て、時日の経過に従つてウレアーゼ陽性度が強くなつていくように見受けられるが、ウレアーゼが内性酵素と云われている点より考察すれば一応うなづける点もあり、又細菌が時日の経過と共に自家融解して内性酵素を出すことが推定され、楡垣⁵⁾の自家融解説も、納得される所である。抗ウレアーゼ試験は一番強力なウレアーゼを持つ3B/M₂と各菌株とを共に培養したものであり、陰性は抗ウレアーゼがないものと思われるのである。

(ii) 共棲試験 (A) 細菌の場合

共棲試験は上述の術式で施行し細菌数を算定した。

Table 2. Number of bacteria in symbiose test.

Kinds of exper.	Isolated strains											
	3B	3B	5	2P	1	2Y	2B	2	3C	4	1	2BC
	M ₂	M ₃	M ₃	M ₂	M ₃	M ₂	M ₂	M ₁	M ₂	M ₃	M ₁	M ₂
	Urea-decomposing						Urea-indecomposing					
B (control)	125	198	174	170	73	345	90	112	216	12	34	181
B+P	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↑	↓	↑	↑
	260	500	283	222	38	85	100	132	113	42	4	95
U+B+P (3%)	107	109	303	170	86	512	337	142	172	56	12	97
U+B+P (0.5%)	●	●	○	●	○	○	○	○	●	○	●	●
U+B+P (0.2%)	342	556	393	337	104	542	160	153	226	2	6	694
UB+B+P+U (3%)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
UB+B+P+U (0.5%)	221	200	321	235	85	200	186	146	177	8	3	189
UB+B+P+U (0.2%)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
UB+B+P+U (3%)	283	216	317	350	86	343	343	109	226	59	17	103
UB+B+P+U (0.5%)	○	○	○	○	○	●	○	○	○	○	○	○
UB+B+P+U (0.2%)	381	632	32	450	26	343	175	159	287	19	40	287
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	335	268	331	390	30	275	195	162	224	35	37	270
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

○→ Increase more than control ●→ Decrease more than control
 ↓ Increase with protozoa ↑ Restrained by protozoa
 ◎ Anti-urease bacteria

第2表より次のことが判明した。即ち

(i) UB+U+B+P。(イ) 尿素分菌添加によるアムモニヤ態窒素の産生の為細菌の増加を全菌株に認めた。

(ロ) 減少するもの、即ち、対照より減少した 5/M₃, 1/M₃, 2Y/M₂ (尿素分解菌) 2/M₁ (尿素非分解菌) に於て之等が抗ウレアーゼ菌なる為アムモニヤの産生なく、従つて細菌の増殖に不適なものと思われる。特に 1/M₃ 及び 2Y/M₂ は減少が尿素 (0.2-3%) の中2例認められるのは一方原生動物により抑制される影響も現われたものと思考されるようである。

(ii) B+P+U→ (イ) 数例を除き全菌株に於て増加が認められるが時に尿素分解菌は非分解菌より増加率が大きい。非分解菌は対照と略々変化ない。

(ロ) 減少するもの→尿素分解菌に於ては、3B/M₂, 3R/M₂, 2P/M₂, 2Y/M₂ である

が、2Y/M₂ は原生動物により抑制される菌で減少したものであるが 3B/M₂, 3B/M₃, 2P/M₂ は原生動物に抑制される菌でもない。即ちこゝに考えられるのは、尿素の濃度が高い3%に認められることから、尿素の添加の濃度が高くなれば其の浸透圧により発育を抑制されることが考えられる。尿素非分解菌は 3C/M₂, 4/M₃, 1/M₁, 2BC/M₂ に於て認められるが、此の中 3C/M₂, 1/M₁, 2BC/M₂ は原生動物に抑制される菌で、此の影響により減少したものと思われる。

(ii) (イ) の増加の場合非分解細菌が対照より稍々増加するが、細菌は主として増加にはアムモニヤ体窒素を利用する以外尿素を利用することも程度こそ少いが考えられる)

(B) 原生動物の場合。共棲試験の結果は次の如くである。

Table 3. Number of protozoa in symbiose test.

Kinds of exper.	Isolated strains											
	3B	5	1	2P	2Y	3	2B	3C	2	4	1	2BC
	M ₂	M ₃	M ₃	M ₂	M ₂	M ₃	M ₂	M ₂	M ₁	M ₃	M ₁	M ₂
	Urea-decomposing						Urea-indecomposing					
B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B + P (control)	20	36	24	36	8	8	10	20	24	12	8	36
U + B + P (3%)	32	48	44	44	37	37	48	24	32	36	32	36
U + B + P (0.5%)	70	48	64	48	48	48	28	48	48	44	32	48
U + B + P (0.2%)	40	46	8	20	20	20	16	40	20	36	12	16
UB + B + P + U (3%)	22	60	44	44	35	48	96	24	48	48	40	61
UB + B + P + U (0.5%)	28	36	28	32	38	32	28	50	32	16	24	38
UB + B + P + U (0.2%)	24	16	20	36	8	20	16	40	20	48	24	16

○ Increase ● Decrease ⊙ Anti-urease bacteria

第2表より考察すると

(イ) 尿素分解菌、非分解菌に於て原生動物の増加数は細菌の場合と異り余り差異はないようである。

(ロ) UB+U+B+P→(A) 増加するもの、対照より全菌株に於て増加が認められる。これ尿素分解菌添加により、分解したアムモニヤ体窒素が原生動物の増数に好影響あることが判る。

(B) 減少するもの→抗ウレアーゼ菌株中数株に於て認められる。但し抗ウレアーゼ菌株でも増加が認められるのは尿素分解菌添加の影響と思われる。

(ハ) B+P+U (A) 増加するもの→全菌株に於て増加が認められるが、此の際尿素分解菌と否とは数的に差はない。

(B) 減少するもの→尿素 (0.2%, 0.5%, 3%) に於て 0.2% が減少を認められる。

上述の(1)と共に原生動物は、尿素そのものを利用し、その分解、非分解は其の増数に大した影響を見ない。尿素の濃度が高ければ増加に好結果をもたらすことは注目されることであろう。

(=) 例外として細菌の場合の $4/M_3$ と原生動物の場合の $2P/M_3$ が何れも *Staphylo.* であり、減少が、抗ウレアーゼでもなく又原生動物は抑制される菌でもないのに認められるのは尿素が之等の菌株に何等か作用あるものと思われ、今後検討する予定である。

総 括

(1) 原生動物、細菌、何れも尿素添加の場合、尿素分解菌存在のもとに分解されたアミノ酸態窒素により増加する。

(2) 原生動物は、更に尿素其れ自体を増殖に利用し濃度が低ければ、高いものより増加は少いことが認められる。

(3) 細菌は増加に尿素分解産物を必要する様に見受けられ、尿素の濃度高ければ反つて発育を抑制される様である。若し増加しても尿素非分解菌は数値上余り大差ない。

(4) 尿素分解菌、非分解菌に於て尿素添加の場合減少が認められるものが数例認められるが之は抗ウレアーゼ菌か、原生動物に抑制される菌である。(但し総数にては、尿素添加により原生動物と同じく増加したことになる)

(5) 例外が *Staphylo.* 属に見られるが之は今後の研究にまつ可きものである。

摘筆するに当り本研究に御援助及び御指導を賜りし主任教授加藤嘉太郎教授、本学平井敬蔵教授、岩田久敬教授、吉井甫教授、東大越智勇一教授に深甚なる謝意を表する。

R é s u m é

Adding urea, the number of bacteria and protozoa seem to increase by using NH_4OH which is produced by urease (Tables 2 and 3).

It seems that protozoa use urea as well as NH_4OH for their growth, but bacteria use generally NH_4OH produced by urease, and that bacteria can not increase in high density of urea solution. In this study the solution of urea (0.5%–3%) seems to be moderate for the growth of bacteria (Tables 2 and 3).

In this study it has been recognized that the number of bacteria generally is increased more than the control, however about the case of the urea-indecomposable bacteria, there is no remarkable difference in the number between the control (Table 2).

And it is often observed that the decrease in the number is caused by the anti-urease or the restraint by protozoa.