

I-4. 北海道産の各種飼料に着生する有用微生物の収集

畜産試験場 栄養部 飼料品質管理研究室

原 慎一郎

1. 目的

家畜生産には、乾物換算約2900万トンの飼料が利用されている。この中で国産で自給可能量は約20%と推定され、不安定な供給構造となっている。最近では、稲ワラですらかなりの量が近隣諸国から国内各地へ輸入されている。その反面、この国の田圃や畑にはワラ、野菜屑等、大量の農業副産物が放置されている現実もあり、時として公害問題を生じかねない場合も見受けられる。困難ではあるが、圃場残滓等の低質資源を、微生物処理等で消化性を改善し、飼料利用を図ることは、飼料自給率の改善に資するものとして緊急、かつ重要と考える。従来、この様な視点に立った研究は皆無とは云えないが、その多くが飼料と云う“物”に対する甚だしい認識不足も手伝い不成功に終わっているのが実情である。飼料微生物に関する知見、および自前の微生物ストックを基礎として、この方面の試験研究を推進する必要がある。

以上の視点でこれまでに関東、九州南西部地域において折りにふれ飼料微生物の調査、収集、特性評価を進めてきた。しかし、いま一つの主要畜産地域である北海道については気象特性、栽培草種において西南暖地と異なり、伴って分布微生物叢も既調査地域と著しく相違する可能性が考えられたが、時間と予算的制約の故に断念してきた。

今回、機会を得て北海道地域の家畜生産環境において、低質農業資源、食品製造副産物の価値改善、品質保全、醗酵改善等に供する微生物ストックを拡充することを目的として、セルロース分解糸状菌、および乳糖資化・醗酵性酵母菌の探索収集を行なうこととした。

2. 実施の概要

実施時期は、葉面微生物の多様性、作物収穫の適期、移動の難易さ等を勘案して9月に設定した。すなわち、9月24～29日の間（表1に）札幌を起点とし、道東の標津町まで北海道を横断するコース（図1）で、セルロース分解性の糸状菌分離のため生草、乾草および変敗して発熱したサイレージを、また乳糖資化・醗酵性酵母菌分離のため生草とサイレージを採取した。その結果、生草（8ヶ所、9検体）、乾草（10ヶ所、19検体）およびサイレージ（10ヶ所、18検体）の合計46検体を12ヶ所より得ることができた。採取結果の詳細は表2に総括するが、これらの中には北海道に特徴的なビートトップ生草、チモシーのビックベイル乾草、アルファルファサイレージ等が含まれる。

3. 収集成果

1) 方法

試料の採取・輸送法：できるだけ無風環境下で、雑菌汚染を排除しながら試料を採取した。採取試料は、自動車や列車で移動中を利用し、分離目的に応じて速やかに保存処置を行ない、当日、または翌日中に郵便、宅配便で研究室へ送付した。

セルロース分解菌分離用の生草と乾草は、滅菌したMSバックに詰め、シールした。この後、試料は一夜乾燥し、さらにダンボール内に乾燥シリカゲルとともに詰め、蒸れを防止した状態で梱包した。

また、乳糖資化・酸酵性酵母菌分離用の生草については、混播牧草の場合はイネ科草とマメ科草に分別し、マメ科草ではさらに茎、葉、花部に分割して、ビートは葉部を、またサイレージでは全材料を、それぞれ1~1.5cmに切断したものを材料とした。すなわち、材料新鮮物約3gをネジ口試験管中のクロラムフェニコール100ppmを含有する4%滅菌乳糖水(pH4.0)に浸漬し、密栓後、そのまま試料送付した。到着後の試験管は、ごくゆるく開栓後、斜面に静置し、25~27℃に置いて5~7日間集積培養した。予備として、サイレージは、新鮮物約1kgをEO滅菌した塩化ビニリデン製の円筒型バッグサイロ(Φ10cm×L30cm)に脱酸素剤と共に詰め、ヒートシール後、袋を排気密封し併せて送付した。

目的微生物の分離・判定法：セルロース分解性の糸状菌は、0.1%乳酸、またはクロラムフェニコール100ppmを添加したグルコースイーストエキスペプトン(GYP)寒天培地を使用し、混釈法ならびにGYP平板等に試料片を2~8切片張付け直接培養する方法を併用した。前者の方法による培養温度は35℃、後者の方法では試料1検体につき37, 41, 45および50℃を設定し、いずれの方法でも7~10日間培養した。その際、ガラスシャーレを使用し、シャーレはパラフィルムを巻いて培地の乾燥を防いだ。出現する菌は、順次顕微鏡下で柄付き針で直接分離した。分離株は、純粋性を確認後、セルロース粉末を1%添加したイーストペプトン寒天平板の中央部に接種し、以後35℃で培養を行ない、セルロース分解に伴うプラーク形成の有無をもって判別し、陽性株を目的株として保存処置した。

分離株は、Cooney and Emerson (1964), Ellis (1971, 1976), Ellis and Ellis (1985) および椿ら (1977) により同定した。

乳糖酸酵性酵母菌の分離は、乳糖資化性酵母を分離後、それらの乳糖酸酵能を調べる二段階に分けて実施した。すなわち、前述の一次集積培養後の培養液より1~2白金線量を、1%乳糖加炭素源資化性試験用(LYNB)液体培地に懸濁して二次の集積培養を行なった。以上の行程で、培養液に顕著な濁りの認められなかったサイレージ試料については、別途持ち帰った試料を用いて再度集積培養を繰り返した。顕微鏡観察により、二次培養液に酵母菌の増殖の認められた場合には、この液をクロラムフェニコール加用のLYNB寒天平板への塗抹培養を約6回反復し、最終の平板から試料1点当たり2~3コロニーを分離した。

分離株は、純粋性確認後YM寒天の斜面培地で保存し、あわせてLYNB液体培地を使用する慣行の資化性試験により、乳糖酸酵試験は、ダーラム酸酵管法により行ない確認した。分離株の同定は、van Rij 編 The yeasts (1984) に準拠し、さらにBarnettら(1983)も随時参考にして実施した。

2) 結果

セルロース分解性糸状菌：生草10検体，乾草11検体および変敗したサイレージ1検体合計22検体から32株を分離した。分離株は，子囊菌2属2種 *Thermoascus curustaceus* (5株)，*Talaromyces emersonii* (3株)，不完全菌3属6種 *Trichoderma harzianum* (6株)，*Trichoderma hamatum* (3株)，*Trichoderma longibrachiatum* (1株)，*Trichoderma viride* (1株)，*Thermomyces lanuginosus* (12株)，*Aspergillus terreus* (1株) と同定された。分離株のセルロース分解力については，比較的強い能力を持つ株は，中温性の *Trichoderma* 属に限られた。好高温性を示す分離株の分解力は，弱～並であって将来的に利活用範囲が広いと考えられる好高温性で，なおかつ分解力の強力な菌株を得るため，さらに探索，収集の必要を認めた。

乳糖資化・酸酵性酵母菌：当該目的の株として，生草3検体，およびサイレージ2検体から11株を分離した。同定の結果，乳糖資化能のみを持つ株は不完全菌 *Candida intermedia* (4株) および *Candida ingeniosa* (4株) の2種を，また酸酵能を持つ種として子囊菌 *Kluyveromyces marxianus* ver. *lactis* (3株) を同定した。

5. 所感

今回に限らず，この種の収集探索を実施する際，その成否は二つの要因により決定されると思っている。すなわち，(1)限られた時間内にどれだけより多くの適切な材料を採集し，(2)それをいかに素早く前処理することが可能であったか，である。

上記の具体的対応として，センターバンクへ共用可能なモービルラボ（移動実験車）の導入を提案したい。詳細は省くが，このことにより，採集効率が飛躍的に向上し，かつ採集試料の前処理の多くの部分が不要となる。直ちに分離作業が可能となるからである。

我々の採集対象地域は，交通過疎化の進行する農山村である。持参器材の軽量・小型化に努めても合理化にも自ずと限界がある。加えて，ラボに若干の展示機能を付与すれば，試料提供者の積極的協力も可能となり得る。長期的にみて，収集事業に実り多い成果が期待可能となろう。

ちなみに，最近訪問した酸酵研究所（IFO）に於いて実物を見学した次第であるが，最近のバイオ関連企業，とりわけ製薬会社の多くは既に配備を終えているとの説明であった。

この収集探索においては，道内各地の国公立試験研究機関の旧知の方々，とくに北農試畑作部の萬田室長，滝川畜試の和泉氏，新得畜試の出岡氏，根釧農試の板東氏には材料提供，普及所や酪農家との事前調整等で，多大の御支援を賜った。とりわけ，北海道は公共交通不便であり，時間的制約の大きい官公用車利用では日程作成が困難なこと多く，これらの方々の自家用車に乗せて頂いて移動することも度々で，その距離500kmを越えた。改めて深謝申し上げる。また興味尽きない収集・調査の機会を与えられたセンターバンクはじめ関係者の方々に御礼申し上げます。

6. 資料

表1. 探索・収集 日程表

(飼料に着生する耐熱性セルロース分解菌, 乳糖酸酵性酵母菌, 北海道)

年月日(曜)	行 程	行 動 内 容
1987. 9. 24(木)	筑波 →札幌市 →滝川市	北農試畜産部草開1部訪問・最終打合せ 道立滝川畜試訪問・採集
9. 25(金)	滝川市 →富良野市 →上川郡新得町 →河西郡芽室町	滝川畜試・採集 酪農家訪問・採集 道立新得畜試訪問・採集 北農試畑作部訪問・採集
9. 26(土)	芽室町 →広尾郡広尾町 →(釧路経由) →標津郡中標津町	酪農家訪問・採集 移動 道立根釧農試訪問・打合せ
9. 27(日)	中標津町 →野付郡別海町 →標津郡標津町 →中標津町	酪農家訪問・採集 酪農家訪問・採集 道立根釧農試・採集
9. 28(月)	中標津町 →(千歳経由) →札幌市	根釧農試・採集 移動 北農試・採集・挨拶
9. 29(火)	札幌市→筑波	

表2. 収集物の種類・検体数

品目	草種	採集検体数	
生草	イネ科	チモシー	1
		オーチャードグラス	3
	マメ科	アルファルファ	3
		赤クローバ	1
	その他	ビート	1
	(小計)	9)	
乾草	イネ科 (含, 混播)	チモシー	14
		オーチャードグラス	5
	(小計)	19)	
サイレージ	イネ科	チモシー	9
	マメ科	アルファルファ	2
	長大作物	トウモロコシ	7
	(小計)	18)	
	合計	46検体	

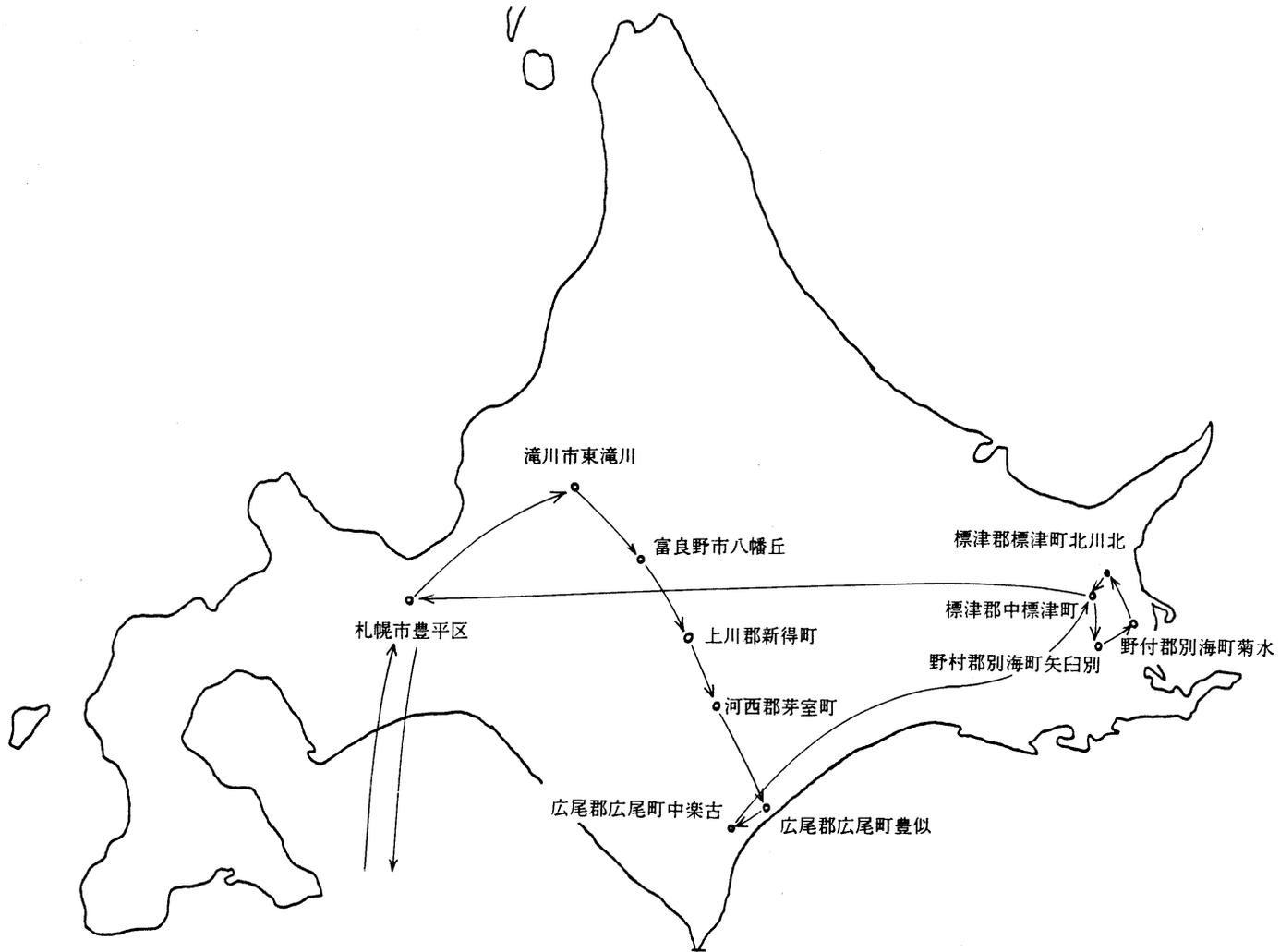


図1 探索収集の行動図

表 3. 国内微生物遺伝資源の現地収集実績 (62年度調査分)

微生物群	微生物種類	利用区分	菌株整理番号	対象微生物(属・種名または目的微生物)	分離源
100	04	50	TAG1-a	<i>Trichoderma hamatum</i>	オーチャード グラス生草
100	04	50	TAG1-b	<i>Trichoderma harzianum</i>	オーチャード グラス生草
100	04	50	FUH1-a	<i>Thermoascus curustaceus</i>	チモシー 混播乾草
100	04	50	FUH1-b	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	チモシー 混播乾草
100	04	50	FUH1-c	<i>Aspergillus terreus</i>	チモシー 混播乾草
100	04	50	FUH2-a	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	チモシー 混播乾草
100	04	50	FUH2-b	<i>Trichoderma harzianum</i>	チモシー 混播乾草
100	04	50	FUG1	<i>Trichoderma harzianum</i>	チモシー生草
100	04	50	SIH2	<i>Talaromyces emersonii</i>	チモシー乾草
100	04	50	SIL1-a	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	アルファ ルファ生草
100	04	50	SIL1-b	<i>Thermoascus curustaceus</i>	アルファ ルファ生草
100	04	50	SIL1-c	<i>Trichoderma hamatum</i>	アルファ ルファ生草
100	04	50	SIB1-a	<i>Trichoderma harzianum</i>	ビート生草
100	04	50	SIB1-b	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	ビート乾草
100	04	50	MEH1	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	チモシー生草
100	04	50	RAL1-a	<i>Talaromyces emersonii</i>	赤クロバ 生草
100	04	50	RAL1-b	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	赤クロバ 生草
100	04	50	YAH1	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	チモシー乾草
100	04	50	KIH1	<i>Thermoascus curustaceus</i>	チモシー乾草
100	04	50	KIH2	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	チモシー 混播乾草
100	04	50	KIG1	<i>Trichoderma hamatum</i>	チモシー生草
100	04	50	KIL2	<i>Trichoderma harzianum</i>	アルファ ルファ生草
100	04	50	SBH2	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	チモシー乾草
100	04	50	KOH1	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	チモシー乾草
100	04	50	KOH2	<i>Talaromyces emersonii</i>	チモシー乾草
100	04	50	KOS1	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	チモシー主体 サイレーシ
100	04	50	KOG	<i>Thermoascus curustaceus</i>	チモシー生草
100	04	50	HOH1	<i>Thermoascus curustaceus</i>	オーチャード グラス乾草
100	04	50	HOG1	<i>Trichoderma viride</i>	オーチャード グラス生草
100	04	50	HOL1-a	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	赤クロバ生草

収集年月	収集場所	特記事項
1987. 9. 25	滝川市東滝川	セルロース分解能並, 中温性
9. 25	滝川市東滝川	セルロース分解能強い, 中温性
9. 25	富良野市八幡丘	セルロース分解能並, 好高温性
9. 25	富良野市八幡丘	セルロース分解能弱い, 好高温性
9. 25	富良野市八幡丘	セルロース分解能強い, 中温性
9. 25	富良野市八幡丘	セルロース分解能弱い, 好高温性
9. 25	富良野市八幡丘	セルロース分解能強い, 中温性
9. 25	富良野市八幡丘	セルロース分解能強い, 中温性
9. 25	上川郡新得町	セルロース分解能弱い, 好高温性
9. 25	上川郡新得町	セルロース分解能強い, 好高温性
9. 25	上川郡新得町	セルロース分解能弱い, 好高温性
9. 25	上川郡新得町	セルロース分解能強い, 中温性
9. 25	上川郡新得町	セルロース分解能強い, 中温性
9. 25	上川郡新得町	セルロース分解能強い, 中温性
9. 25	河西郡芽室町	セルロース分解能並, 好高温性
1987. 9. 26	広尾郡広尾町中楽古	セルロース分解能弱い, 好高温性
9. 26	広尾郡広尾町中楽古	セルロース分解能並, 好高温性
9. 27	野付郡別海町白臼別	セルロース分解能並, 好高温性
9. 27	野付郡別海町菊水	セルロース分解能並, 好高温性
9. 27	野付郡別海町菊水	セルロース分解能弱い, 好高温性
9. 27	野付郡別海町菊水	セルロース分解能並, 好高温性
9. 27	野付郡別海町菊水	セルロース分解能強い, 中温性
9. 27	標津郡標津町北川北	セルロース分解能並, 好高温性
9. 27	標津郡中標津町	セルロース分解能並, 好高温性
9. 27	標津郡中標津町	セルロース分解能弱い, 好高温性
9. 28	標津郡中標津町	セルロース分解能並, 好高温性
9. 28	標津郡中標津町	セルロース分解能並, 好高温性
9. 28	札幌市豊平区羊ヶ丘	セルロース分解能弱い, 好高温性
9. 28	札幌市豊平区羊ヶ丘	セルロース分解能強い, 中温性
9. 28	札幌市豊平区羊ヶ丘	セルロース分解能弱い, 好高温性

微生物群	微生物種類	利用区分	菌株整理番号	対象微生物(属・種名または目的微生物)	分離源
100	04	50	HOL1-b	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	赤クローバ生草
100	04	50	HOL1-c	<i>Trichoderma harzianum</i>	赤クローバ生草
100	03	14	TAS1Y1	<i>Candida intermedia</i>	アルファルファサイレージ
100	03	14	TAS1Y2	<i>Candida intermedia</i>	アルファルファサイレージ
100	03	14	TAG1Y1	<i>Candida ingeniosa</i>	オーチャードグラス生草
100	03	14	TAG1Y2	<i>Candida ingeniosa</i>	オーチャードグラス生草
100	03	14	SIB1Y1	<i>Kluyveromyces marxianus var. lactis</i>	ビート生草
100	03	14	SIB1Y2	<i>Kluyveromyces marxianus var. lactis</i>	ビート生草
100	03	14	SIB1Y3	<i>Kluyveromyces marxianus var. lactis</i>	ビート生草
100	03	14	RAL1Y1	<i>Candida ingeniosa</i>	赤クローバ生草
100	03	14	RAL1Y2	<i>Candida ingeniosa</i>	赤クローバ生草
100	03	14	YAS1Y1	<i>Candida intermedia</i>	チモシーサイレージ
100	03	14	YAS1Y2	<i>Candida intermedia</i>	チモシーサイレージ

収集年月	収集場所	特 記 事 項
9. 28	札幌市豊平区羊ヶ丘	セルロース分解能弱い, 好高温性
9. 28	札幌市豊平区羊ヶ丘	セルロース分解能強い, 中温性
1987. 9. 25	滝川市東滝川	乳糖資化能弱い
9. 25	滝川市東滝川	乳糖資化能強い
9. 25	滝川市東滝川	乳糖資化能弱い
9. 25	滝川市東滝川	乳糖資化能強い
9. 25	上川郡新得町	乳糖醗酵能並
9. 25	上川郡新得町	乳糖醗酵能強い
9. 25	上川郡新得町	乳糖醗酵能並
9. 26	広尾郡広尾町中楽古	乳糖資化能強い
9. 26	広尾郡広尾町中楽古	乳糖資化能弱い
9. 27	野付郡別海町矢白別	乳糖資化能強い
9. 27	野付郡別海町矢白別	乳糖資化能並