

飼料添加物中における枯草菌の培地作成と培養

黒澤俊人（三重大学生命科学研究支援センター）

1、はじめに

近年の消費者の牛乳離れやとうもろこし等の穀物の価格上昇により、畜産農家にとってより高い品質の家畜の生産とコスト削減は至上命題となっている。そこで畜産農家では牛、豚、鶏などの家畜に与える粗飼料(生草、サイレージ、乾草、わら類等)に飼料添加物を加えることにより、家畜の品質向上に努めている。飼料添加物を与えることによって乳量の増加や粗飼料の消化促進・摂取量の増加、悪臭の少ないフンの排泄、肉質の良化などが見込まれる。

飼料添加物にはさまざまな種類があるが「飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律」によると平成16年10月12日現在農林水産大臣が指定する飼料添加物は表1の通りである。

本報告では表1において生菌剤に分類され細菌の一種である枯草菌を培養し、飼料添加物中における枯草菌数を計測し評価する方法を紹介する。

表1. 農林水産大臣が指定する飼料添加物一覧

農林水産省令で定められている用途	類別
飼料の品質の低下の防止（17種）	抗酸化剤（3種） 防かび剤（3種） 粘結剤（5種） 乳化剤（5種） 調整剤（1種）
飼料の栄養成分その他の有効成分の補給（84種）	アミノ酸（12種） ビタミン（32種） ミネラル（37種） 色素（3種）
飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進（52種）	合成抗菌剤（6種） 抗生物質（19種） 着香料（1種） 呈味料（1種） 酵素（12種） 生菌剤（11種） その他（2種）
(合計 153種)	

本報告では清和酵源株式会社より提供していただいた飼料添加物『HIビタコーゲン』をサンプルとして用いた。

2、計測方法の流れ

(1) SCD 寒天培地の作成

SCD 寒天培地用試薬と精製水を三角フラスコに入れてよく攪拌し、121℃・2気圧で15分間オートクレーブ滅菌処理をする。その後三角フラスコを取出し、60℃～50℃位になったところで滅菌済みシャーレに流し込み乾燥するまで待つ。

表2. SCD (Soybean-Casein Digest) 寒天培地の組成

カゼイン製ペプトン 15g
大豆製ペプトン 5g
塩化ナトリウム 5g
カンテン 15g
精製水 10
pH 7.1～7.5

(2) 希釈系列の作成

0.9%生理食塩水を試験管に9.0mlずつ入れてモルトン栓をしたあとオートクレーブ滅菌処理をする。十分に冷めたあと試験管にサンプル1.0gを入れて、60℃の温水に20分間放置する。20分間に何度か試験管を攪拌し温度が均一になるようにする。その結果耐熱性芽胞細菌だけ残り枯草菌が測定できるようになる。

次に試験管を氷に挿してサンプルを冷やす。冷えたところで多段階に十分希釈する。

(3) サンプルの培養

1サンプルにつき3枚ずつSCD寒天培地を用意し、それぞれの培地に希釈したサンプル100μlを培地にまき、コンラージ棒で均一に広げる。その後37℃インキュベータで約1～2日間培養する。

(4) コロニーの選別と計測

培養後、SCD寒天培地上に形成されているコロニー数を計測する。

(5) 評価

カウントした希釈系列から元の飼料添加物中における枯草菌数を算出し評価する。

3、結果 I

コロニー数は30～300個程度が数えやすく信頼性が高いと言われているがコロニー同士がくっついてしまい、明確で計測可能なコロニーを形成しなかった。

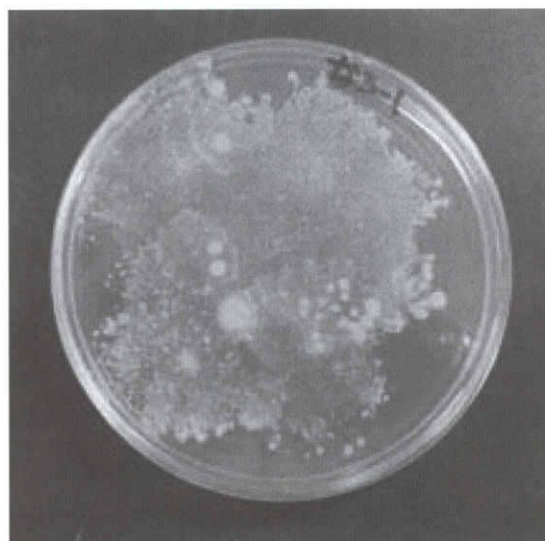


写真1. これでは数えられない

4、原因と改善点

計測可能なコロニーを形成しなかった理由として以下のような点が原因として挙げられる。それを元にさらに改善を行った。

(原因)

- ① SCD 寒天平板培地を作成したときシャーレの蓋に水蒸気が発生していた。
- ② SCD 寒天平板培地自体が乾燥してなかった。
- ③ サンプルの塗抹量が SCD 寒天培地に対して多かった。
- ④ 手技が未熟であった。

(改善点)

- ① SCD 寒天培地をシャーレに流し込む温度を寒天の固まらない 60℃ に保つため、ウォーターバスを用いて常に流し込む前の温度を一定に保つようにした。
- ② クリーンベンチ内で SCD 寒天培地をシャーレに流し込む操作を行い、無菌空气中で乾燥させ最低でも 24 時間以上放置し十分に乾燥させた。
- ③ サンプルの塗抹量を 100 μ l \Rightarrow 50 μ l \Rightarrow 25 μ l と段階的に減らして培養した。

5、結果 II

写真 2 のようにかなり改善されて計測しやすくなったが、希釈系列の系によりバラツキがあるなど満足できる結果を得ることができなかった。

6、おわりに

SCD 寒天培地を乾燥させる期間、サンプルを入れる量や入れた後の処

理方法などを変更し、コロニーが計測できるよう工夫したが今のところ安定した結果を得るまでには至っていない。また、コロニーの形態から菌種を推定し、希釈度から元の菌数を推定することがある程度出来るが、好気性耐熱性芽胞菌イコール枯草菌ではないので、今後はグラム染色性や芽胞観察(顕微鏡)を行い、菌種を特定すること必要であると考えられる。

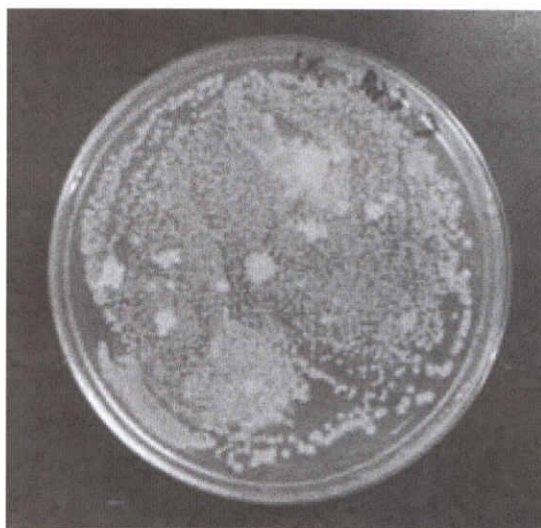


写真 2 . ある程度の改善は見られるが . .

謝辞

本報告に際して木本清一郎氏(清和酵源株式会社)、荻田修一准教授(三重大学生物資源学研究所)および荻田研究室の諸氏に御協力頂いた。付記して謝意を表す。

参考文献

独立行政法人 農林水産消費安全技術センター

<http://www.famic.go.jp/index.htm>
1 (参照日 2007.12.17)