



| | |
|------------------|---|
| Title | グラスサイレージの微生物学的研究 |
| Author(s) | 佐々木, 博; SASAKI, Hiroshi |
| Citation | 北海道大学農学部邦文紀要, 8(3), 188-251 |
| Issue Date | 1972-06-30 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/11835 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | 8(3)_p188-251.pdf |



グラスサイレージの微生物学的研究

佐々木 博

(北海道大学農学部応用菌学教室)

Microbiological studies on grass silage fermentation

Hiroshi SASAKI

(Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Received November 10, 1971

目 次

| | |
|--|-----|
| 第1編 緒 言 | 189 |
| 第2編 研 究 史 | 190 |
| 第3編 研 究 方 法 | 196 |
| 第1章 微生物相の解析方法 | 196 |
| 第2章 分析方法 | 198 |
| 第4編 研究結果および考察 | 199 |
| 第1章 サイレージ醗酵機構の解析 | 199 |
| 第1節 細切処理および脱気処理 | 199 |
| 第2節 サイレージの熟成温度 | 202 |
| 第3節 原料牧草の細切方法 | 205 |
| 第4節 原料牧草の刈取時期 | 207 |
| 第5節 原料牧草の水分含量 | 208 |
| 第6節 サイロの種類 | 210 |
| 第7節 添加物の影響 | 213 |
| 第8節 乳酸菌接種効果 | 217 |
| 第2章 サイレージ中の微生物の分類学上の位置と各種微生物の出現状況 | 219 |
| 第1節 分類学的検索結果 | 219 |
| 第2節 乳 酸 菌 | 219 |
| 第3節 酪 酸 菌 | 219 |
| 第4節 好気性細菌および蛋白分解菌 | 224 |
| 第5節 酵 母 | 224 |
| 第6節 か び | 225 |
| 第3章 有用乳酸菌の選択 | 225 |
| 第1節 有用乳酸菌の選択試験 | 225 |
| 第2節 <i>Lactobacillus plantarum</i> の生酸力 | 226 |
| 第3節 <i>Lactobacillus plantarum</i> の増殖曲線に対する温度と培地の影響 | 227 |
| 第4節 <i>Lactobacillus plantarum</i> の保存性 | 228 |
| 第4章 <i>Lactobacillus plantarum</i> 接種サイレージの調製試験 | 229 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 第1節 | <i>Lactobacillus plantarum</i> 接種サイレージの微生物相について | 229 |
| 第2節 | <i>Lactobacillus plantarum</i> と炭水化物含有添加物の相乗効果 | 230 |
| 第3節 | <i>Lactobacillus plantarum</i> とグルコースの相乗効果 | 233 |
| 第4節 | <i>Lactobacillus plantarum</i> 接種サイレージの実用中間試験 | 234 |
| 第5節 | <i>Lactobacillus plantarum</i> の簡易大量増菌法 | 238 |
| 第5章 | 乳酸菌接種サイレージ調製法の考案 | 240 |
| 第1節 | 北大式グラスサイレージ調製法の原理 | 240 |
| 第2節 | 乳酸菌培養増菌法 | 241 |
| 第3節 | 原料牧草に乳酸菌を接種する方法 | 241 |
| 第4節 | 北大式グラスサイレージ調製法の経済性 | 242 |
| 第6章 | <i>Lactobacillus plantarum</i> 接種サイレージの現地調製試験 | 243 |
| 第1節 | サイレージ用乳酸菌の現地増菌試験 | 243 |
| 第2節 | <i>Lactobacillus plantarum</i> 接種サイレージの現地調製例 | 244 |
| 第5編 | 総括 | 246 |
| 第6編 | 参考文献 | 247 |

第1編 緒言

わが国の農業は、第2次大戦後、水田中心の農業から徐々に多角経営の方向に移っては来たが、農家の収入を安定させる作物としての米の魅力は大きく、昭和44年までは年々水田が増加する状態にあった。しかしながら昭和43、44年と2年続きの豊作により多量の余剰米を生じ、昭和45年には米の作付制限が行なわれると共に、企業としての農業への体質改善が要求されて来ている。

北海道においては、この間に酪農振興政策がとられ、草地の造成、乳牛の導入、多頭飼育、家畜の合理的飼養管理などの普及が行なわれている。

酪農業における終極の目的は、生産物の利用にあるが、今日のごとき保護政策下の酪農業から脱皮し、国際的競争力をつけるためにも、また国民の食生活の向上の面からも、生産費の低減をはかることは重要な課題である。そのためには、家畜の飼養法の合理化と、安価でしかも栄養価の高い飼料の供給が大切である。このような点から考えると、家畜の飼料としては栽培に労働力がかからず、栄養学的には蛋白質に富む夏季の牧草を高度に利用することが最良であることは言うまでもない。しかしながら、北海道のごとく半年もの長い間雪にうずもれ年間を通じて生牧草を供給することが出来ない地帯では、夏季に収穫した牧草を養分損耗が少ない状態で、しかも経済的に保存することが重要な課題となって来る。

家畜の飼料貯蔵法には、乾草やサイレージの調製の外に穀実を乾燥保存して濃厚飼料として用いる方法などがあるが、これらの中でサイレージは積雪寒冷地帯におけ

る冬季の多汁質飼料として、栄養的にもまた経済的にも重要な位置を占めている。従って酪農の盛んな先進諸国においては、極めて古い時代から、サイレージの調製と研究が行なわれて来た。しかるに、家畜の飼料として好適な高蛋白質の牧草をサイレージとして保存するには、A.I.V.法を主体とした酸添加法を除いて見るべきものがなく、この方法は作業上種々の障害をもたらすため、わが国では殆んど採用されていないのが現状である。

今日までのサイレージに関する研究を見ると、その多くは調製法と出来上ったサイレージの品質との外観的關係にのみとられ、熟成が微生物によって行なわれているにもかかわらず、熟成に関与する微生物とサイレージの品質という核心的關係に目を向けているものは極めて少なかった。

北海道大学農学部応用菌学教室においては、昭和35年、北海道内の各機関協力のもとに行なった「ビートトップの飼料的価値増進の研究」の一環として「ビートトップサイレージの微生物学的研究」を開始して以来、10年余にわたりサイレージの微生物相の究明、良質なサイレージ調製に利用し得る菌類の発見、有害な菌類の防除対策の確立などを目的とし、サイレージの熟成と微生物相との關係を検討し、埋蔵時に乳酸菌を接種するとサイレージの品質が著しく向上することを明らかにし、酪農家ならびに農業改良普及員の方々の協力を得て實際利用の研究を重ね好評を得るに到った。

この方法は、現在「北大式グラスサイレージ調製法」の名のもとに、広く普及しつつある。

著者は、応用菌学教室におけるサイレージに関する一

連の研究の中で、主として基礎的部門を分担して研究を重ねて来た。従って、本論文では著者の分担した微生物相の調査、有用乳酸菌の選択、その効果を主体とし、実際利用の研究についても若干ふれることとする。

本論文を草するに当たり、研究遂行中終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜わると共に、種々の便宜を与えられた北海道大学農学部佐々木西二教授、御鞭撻ならびに御助言を賜わると共に種々の便宜を与えられた高尾彰一教授に深甚な謝意を捧げる。

昭和41年以降、卒先して大規模な調製試験を行ない、北大式 *L. plantarum* 接種サイレージ調製法確立の端緒を開いていただき、またその普及に御協力下さった渡島当別のトラピスト修道院今村セバスチアノ師、浦口ダミアノス師、外修道士の各位に深甚な感謝の意を表す。

また、未発表の乳酸菌接種サイレージの成績を提供いただいた北海道農業試験場畜産部西部慎三技官、グラスサイレージ調製試験の分析結果の一部および嗜好試験の結果を提供いただいた北海道農業試験場草地部高野信雄技官（現農林省草地試験場牧草調製研究室長）外、草地第5研究室の各位、牧草の採取に便宜を与えられ、激励いただいた北海道大学農学部広瀬可恒教授、論文校閲をいただいた伊沢正夫教授に深く感謝の意を表す。

本研究は昭和39年度から昭和42年度までの間、北海道大学農学部応用学教室の専攻学生であった前田博伸君、町田治彦君、小野弘子君、引地教雄君、田中忠昭君、高橋豊君、谷直人君の協力に負うところ大である。ここに以上の諸君に対し深甚な謝意を表す。

なお、本論文は、北海道大学に提出した学位論文を概説したものである。

第2編 研究史

サイレージの調製法は、紀元前4,000年頃穀物の貯蔵法としてエジプト地方に興り、地中海沿岸で発達、ローマ帝国時代には、すでにこの方法による緑草の貯蔵が行なわれていたと言われている。しかし、記録として見られる最も古いものは、1842年と言われ、1870年頃から実験が行なわれ、フランスでは19世紀末に GOFFART や VICOMTE DE CHEZLLES により普及された。また、イギリスでは1874年に酸性乾草の名で紹介され、1884年には JENKINS により基礎的研究が行なわれた¹²²⁾。アメリカでは、1881年ウィスコンシン州立大学で HENRY、コーネル大学で ROBERTS がサイロを建設して研究を始めた⁷²⁾。

わが国におけるサイレージ調製の歴史は、明治3年

(1870) 北海道の牧場でつくられたのに始まり⁵⁶⁾、明治20年(1887)には群馬県北甘楽郡神津牧場でもつくられたと記録されている¹¹²⁾。また、明治22年(1889)には札幌農学校(現北海道大学)第1農場に小規模ではあるが、本格的なサイロの建設を見たと言われ¹¹⁶⁾、明治23年(1890)には北海道亀田郡園田牧場において、地下式木造サイロの設置があった⁸¹⁾。

サイレージ研究の歴史的経過については、BENDER と BOSSHART (1937)¹⁴⁾、MUSGRAVE と KENNEDY (1950)⁷⁶⁾、須藤浩 (1967)¹¹³⁾ らにより紹介されているのでここではサイレージの研究の中から主として微生物に関連のあるものについて述べる。

サイレージの微生物学的研究は、1889年 BURRILL²²⁾ がサイレージから種々の細菌を分離し、熟成過程における牧草の化学的変化は、これらの菌の働きによって起こると報告、熟成過程における熱の発生は、2種あるいはそれ以上の桿菌による酪酸醗酵のためであると主張したのが最初と考えられる。この BURRILL の説に対し、FRY (1885)³³⁾ や BABCOCK と RUSSELL (1900⁸⁾、1901⁹⁾) は、サイレージの醗酵は植物の呼吸作用および植物由来する酵素によって行なわれると主張、また SHERMAN ら (1918)¹⁰⁷⁾ は、サイレージの醗酵は微生物だけが関与するのではなく、原料牧草自体の作用によるところが大きいとの意見を発表、その後 HEINEMAN と HEXSON (1924)¹⁶⁾ は、サイレージは次の3段階の醗酵過程を経て熟成が完了するとの仮説を発表した。(1) 大腸菌群が働き、酸とガスを発生する。この段階は短期間で終了し、次の段階に移る。(2) Streptococci による醗酵期間で、中程度の乳酸醗酵が行なわれる。(3) Lactobacilli による醗酵期間で、強力な乳酸醗酵が行なわれる。この段階では、数種の菌が働くであろう。

ただしこの3段階の区分は明確なものではなく、一連の状態で醗酵が行なわれる場合が多い。また、この仮説は、醗酵の初期に植物の呼吸作用および酵素作用が起こるとの説をさまたげるものではないと付言している。

その後、サイレージの微生物相ならびに醗酵機構に関する数多くの研究を重ねられ、今日では BEARDSLEY (1956)¹³⁾ の説がほぼ妥当なものと考えられるに到っている。彼は、サイレージの熟成過程を次の5期に分けて説明している。

第1期：植物の呼吸作用が続いていて、炭水化物が消費され、炭酸ガスが発生する。生化学的変化および加圧によって、牧草から水分が滲出する。熱の発生が起こる。

第2期：大腸菌群その他の微生物によって、少量の酢酸が生成される。この期間は短く、すぐに第3期に入る。

第3期：乳酸菌の作用により、炭水化物から乳酸が生成される。

第4期：乳酸醗酵が頂点に達し、静止期に入る。乳酸量は原料牧草に対し1~1.5%となり、pHは4.2以下に低下する。約3日で第3期、約3週間で第4期が終わる。サイレージの調製処理が適当であれば、十分な乳酸が生成され、空気が排除され、比較的安全に長期間保存される。しかしながら、乳酸生成が十分に行なわれていないと、次の第5期に移行する。

第5期：酪酸菌により、残存する可溶性炭水化物や、すでに生成された乳酸が消費される。最悪の場合には脱アミノ作用によってアミノ酸が揮発性の脂肪酸とアンモニアに分解、あるいは脱炭酸作用によりアミンや炭酸ガスを生成し、飼料価値を著しく低下する。

サイレージの微生物学的研究の経過を、次に大別して要約する。

1. サイレージの醗酵機構と微生物の関係

前記の BURRILL (1889)²²⁾の研究を嚆矢とし、数々の研究があり、その中で ESTEN と MASON (1912)³⁰⁾は、サイレージの醗酵は完全に微生物学的なもので、熟成中に乳酸醗酵、アルコール醗酵、酢酸醗酵などが行なわれしかも酢酸はアルコールから二次的に生ずるものであると提唱した。これに対し、RUSSELL (1908)⁹⁶⁾や SAMARANI (1913)⁹⁸⁾は、サイレージ醗酵の初期変化は植物の呼吸作用と植物の酵素によって行なわれ、細菌は二次的に醗酵に関与するものであるという幾分対立的見解を主張した。その後前述の BEARDSLEY (1956)¹³⁾の説が一般に認められるまでの間に、種々の結果が報告されて来た。すなわち、LAMB (1917)⁶¹⁾は、熟成過程における乳酸生成と糖分の減少は細菌の作用によることを明らかにすると共に、サイレージ中のアルコールは熟成初期には植物の酵素により生成されるが、その後は酵母により生成されること、蛋白質の分解も最初は植物の酵素、その後は微生物によって行なわれることなどを明らかにした。また熟成過程における発熱も、細菌が関与するものと推論した。微生物による発熱については、その後 HUNTER (1917)⁴⁹⁾により実験的証明がなされた。HUNTER は、更に微生物を乳酸菌、ゼラチン分解菌、大腸菌、酵母の4群に分別計数して、良質なサイレージでも品質の劣るものでも、微生物相に大差は認められな

かったと報告している。

JONES と GIBBARD (1923)⁵⁴⁾は、熟成過程における細菌、酵母、かびの菌数変化を調査し、加圧を十分に行ない、空気を排除し、乳酸醗酵を行なわせると、腐敗細菌、酵母、かびなどの発育を抑制出来ると報告、BAYER (1928)¹²⁾もこれと同様の見解を発表した。

WALTON (1928)¹²¹⁾は、熟成過程にあるサイレージの菌数を直接検鏡法で測定すると、埋蔵後数日間は高い菌数を示す、これに反し、平板培養法で測定すると3~4日で著しい菌数の減少がみられること、埋蔵1日では *Achromobacter fermentans* が多いが、間もなく *Streptococcus lactis* が繁殖し、酸生成菌の発育良好な時には3~5日で搾汁中の酸量は2%以上に達することを明らかにした。

MEDVINSKA (1935)⁷¹⁾は、サイロ中のサイレージの位置と微生物相の関係を調査し、(1)大腸菌群は、サイロ上層部および中層部に存在する。(2)下層になるに従い、有孢子細菌の菌数は急速に低下する。(3)pH 3.5でも醗酵力を有する蛋白分解力の強い有孢子細菌は、サイロの位置とは無関係に存在するなどの知見を発表した。

VAN BEYNUM と PETTE (1939)⁶⁾は、通常のサイレージでは、最初好気性細菌が繁殖、その後乳酸菌が繁殖する。乳酸菌ではまず *Diplococci* が増殖、次いで耐酸性の *Lactobacilli* の増殖が起こる。蛋白分解菌は乳酸により抑制されるが、pHが4.2以下に低下しない時には、*Clostridium tyrobutyricum* のような酪酸菌が乳酸を分解して、酪酸その他のカルボン酸を生ずる。これによりpHが上昇し、蛋白分解菌の発育が可能となりサイレージの変敗が起こる。従って、サイレージはpH 4.2以下なら安全だが、pH 4.2以上では変敗し易いと報告した。

STONE ら (1943)¹¹¹⁾は、調製処理の如何にかかわらず、サイレージ中には乳酸菌が存在するが、保存の悪い時には一旦生成した乳酸が消失することを見出し、これが微生物相の変化によるものでなく、糖分が無くなると乳酸菌自身が乳酸を消費するものと推論した。また、刈取直後のアルファルファを埋蔵した場合には、乳酸生成量が1.5%に止まるため、糖分が無くなると乳酸が消費され酢酸が増加し、pHが上昇して品質が低下する。これに反し、刈取後3~5時間天日乾燥した牧草でサイレージを調製すると、水分が減少すると共に還元糖が増加するので、良質なサイレージが得られると報告した。

BURKEY ら (1953)²⁰⁾は、埋蔵初期には *Lactobacilli* の外に *Pediococci*, *Streptococci* などの乳酸球菌が存

在するが、醗酵が進むにつれて *Corynebacterium* と考えられるヘテロ型の酸醗酵をする桿菌が優勢となると発表された。

KEMPTON と SAN CLEMENTE (1959)⁵⁷⁾ は、良質なサイレージでは大量の乳酸が生成され pH が低かったが、変敗したサイレージでは、醗酵初期に蓄積された乳酸が酪酸やプロピオン酸に変化し、揮発酸量を増加した。その結果 pH は上昇し、同時に大量の塩基性物質が生成されたと報告し、更に微生物学的検討を加え、変敗したサイレージでも、良質なサイレージでも、醗酵の全過程を通じ乳酸菌に差異はみられなかったが、変敗したサイレージでは Clostridia による酪酸生成が起こっていたなどの知見を発表した。

2. 原料牧草の微生物相

牧草の微生物相については、STIRLING (1951)¹⁰⁹⁾ や KROULIK ら (1955)^{59,60)} がつぎの知見を発表している。

- (a) 新鮮な牧草には多数の菌が付着しており、植物の種類、部位、熟度および季節により菌数が異なる。
- (b) 植物体が成熟するにつれ、菌数の増加がみられる。
- (c) 刈取後の萎凋および細切により、菌数が増加する。
- (d) 牧草に付着している菌には、色素をもった好気性無孢子の桿菌が多く、大腸菌群に属する *Aerobacter* もみられる。
- (e) 牧草では、サイレージにみられる菌と同じものは比較的少なく、典型的な *Lactobacilli* も検出されない。
- (f) 埋蔵当初の牧草には乳酸菌は殆んど存在しないが、埋蔵後 2~9 日で急激に菌数を増加する。
- (g) 高水分牧草は、萎凋させた牧草よりも埋蔵後の菌数の増加速度が速やかである。従って、高水分の場合には、酸生成速度も速く、菌数は最高値に達した後急速に減少するが、水分含量の低い時には酸生成速度が遅く、菌数の減少も遅れる。
- (h) 牧草中に存在する大部分の菌は、埋蔵後数日で消失し、その後乳酸菌が多数を占める。

NILSSON ら (1956)⁷⁹⁾ は、大部分の牧草では細菌やかびの菌数に大差がみられず、いかなる季節でも乳酸菌や嫌気性有孢子細菌は殆んど存在しないと述べ、ANDERSON (1956)⁶⁾ も、新鮮な牧草では極少数の乳酸菌が、大腸菌群や有孢子細菌と共存しているが、埋蔵すると大腸菌群が減少して乳酸菌が著しく増加すると報告している。

MUNDT ら (1961) は、サイレージ中に繁殖する乳酸菌がどこから侵入するかを調査し、Enterococci に属する乳酸菌は植物のつぼみや花に多く、昆虫、風、ほこり、

雨などによって伝播されることを明らかにし⁷³⁾、その後極めて少数しか存在しない牧草の *Lactobacilli* や *Pediococci* を分別計数して、*Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentans*, *L. casei* などの乳酸桿菌⁷⁵⁾、*Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus* などの 4 連球菌⁷⁴⁾ の存在を報告した。

STIRLING と WHITTENBURY (1963)¹¹⁰⁾ は、*Lactobacilli*, *Pediococci*, *Leuconostoc* などの乳酸菌は、健全な植物組織では殆んど存在しないにもかかわらず、刈取や埋蔵の作業中に出現し、菌数が急速に増加する現象を解明するために、刈取作業に使用する諸機械、農場に存在する家畜の糞、牧草、土などの乳酸菌を計数すると共に、牧草刈取から埋蔵終了までの過程における乳酸菌増加の傾向を観察し、刈取作業中に使用する器具および機械に付着している乳酸菌が刈取後植物体から滲出して来る汁液を養分として増殖するとの見解を発表した。

3. サイレージの微生物相

BURRILL (1889)²²⁾ により始められたサイレージの微生物学的研究は、GRIFFITHS (1894)¹¹⁾、GORINI (1906)³⁹⁾ らの研究と共に、サイレージ中の微生物への関心を引き起こし、次第にサイレージの醗酵に関与する微生物の種類を明らかにして来た。その主なものを次に記述する。

a. 乳酸菌

- i) *Streptococcus lactis*...GORINI (1906)³⁹⁾, WYANT (1920)¹²⁶⁾, FRAZIER (1921)³²⁾, WALTON (1921)¹²¹⁾, JOSHI (1935)⁵⁵⁾, CUNNINGHAM と SMITH (1940)²⁵⁾, 佐々木 (1966)¹⁰⁰⁾.
- ii) *Streptococcus faecalis*...LANGSTON と BOUMA (1960)⁶²⁾, 佐々木 (1966)¹⁰⁰⁾.
- iii) *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*...LANGSTON と BOUMA (1960)⁶²⁾.
- iv) *Streptococcus herbarum*...SCHIEBLICH (1932)¹⁰³⁾.
- v) *Leuconostoc mesenteroides*...CUNNINGHAM と SMITH (1940)²⁵⁾, LANGSTON と BOUMA (1960)⁶²⁾, 佐々木 (1966)¹⁰⁰⁾.
- vi) *Leuconostoc herbarum*...POLITI (1940)⁸⁸⁾.
- vii) *Pediococcus pentosaceus*...MUNDT ら (1969)⁷⁴⁾.
- viii) *Pediococcus acidilactici*...MUNDT ら (1969)⁷⁴⁾.
- ix) *Lactobacillus bulgaricus*...HEINEMAN と HEFFERAN (1909)⁴⁵⁾, HEIZE (1913)⁴⁷⁾, HUNTER と BUSHNELL (1916)⁵²⁾, SHERMAN (1916)¹⁰⁶⁾, WYANT (1920)¹²⁶⁾, HUNTER (1921)⁴⁸⁾, FRAZIER (1921)³²⁾.
- x) *Lactobacillus brevis*...FRAZIER (1921)³²⁾, VIR-

TANEN (1936)¹²⁰⁾, CUNNINGHAM と SMITH (1940)²⁵⁾, POLITI (1940)⁸⁸⁾, LANGSTON と BOUMA (1960)⁶³⁾, 佐々木 (1966)¹⁰⁰⁾.

xi) *Lactobacillus plantarum*…ALLEN と HARRISON (1936³⁾, 1937⁴⁾), CUNNINGHAM と SMITH (1940)²⁵⁾, POLITI (1940)⁸⁸⁾, ORLA-JENSEN ら (1947)⁸⁵⁾, HALL ら (1954)⁴²⁾, LANGSTON と BOUMA (1960)⁶³⁾, 佐々木 (1966)¹⁰⁰⁾.

xii) *Lactobacillus casei*…ORLA-JENSEN ら (1947)⁸⁵⁾, LANGSTON と BOUMA (1960)⁶³⁾, 佐々木 (1966)¹⁰⁰⁾.

xiii) *Lactobacillus caucasicus*…ORLA-JENSEN ら (1947)⁸⁵⁾.

xiv) *Lactobacillus sili*…POLITI (1940)⁸⁸⁾.

LANGSTON と BOUMA (1960)⁶⁴⁾ は、熟成過程における乳酸菌相の遷移を要約し、良好なサイレージが出来る場合には熟成初期に乳酸球菌が多く、この中で *Pediococci* 以外の球菌は、埋蔵後 2~3 日で消失し、乳酸桿菌に代わる。良好なサイレージでは、*Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* と *Pediococci* が優勢で、*L. brevis* は通常熟成後期に出現し、特にアルファルファサイレージに多い。品質の劣るものでは、前記 3 種の外に *L. casei* がみられると述べている。

b. 好気性細菌

Escherichia coli, *Aerobacter aerogenes*, *A. cloacae* などの大腸菌群をはじめ、*Pseudomonas*, *Proteus*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Brevibacterium*, *Klebsiella*, *Bacillus* などに属する好気性細菌が多数報告されている。[RUSSELL (1908)⁹⁶⁾, HUNTER (1917)^{49, 50)}, HASTING と MANSFIELD (1927)⁴⁴⁾, WALTON (1928)¹²¹⁾, SCHIEBLICH (1932)¹⁰³⁾, ALLEN と HARRISON (1937)⁴⁾, CUNNINGHAM と SMITH (1939)²⁴⁾, GIBSON ら (1958)³⁶⁾, HALL ら (1954)⁴²⁾, 越智ら (1965)⁸⁴⁾, 佐々木 (1966)¹⁰⁰⁾, 佐々木と佐々木 (1966)¹⁰¹⁾]. これらの菌の大部分は、埋蔵初期に一時増殖するが、熟成が正常に行なわれている場合には、乳酸菌の増殖によって著しい抑圧を受け次第に消失するとされている。[HEINEMAN と HEXSON (1921)⁴⁶⁾, VAN BEYNUM と PETTE (1939)¹⁶⁾, RICHARD と HEINZL (1942)⁹¹⁾, ORLA-JENSEN ら (1947)⁸⁵⁾, KROULIK ら (1955)⁶⁰⁾, ANDERSON (1956)⁶⁾, LANGSTON と BOUMA (1960)⁶⁴⁾, 佐々木 (1966)¹⁰⁰⁾].

興味深いものとして、RUSCHMANN (1932)⁹²⁾ のサイレージ中に酢酸菌が存在するとの見解や、DEMETER (1930)²⁶⁾ がグラスサイレージから、ETCHELLS と

JONES (1946)³¹⁾ が蒸煮馬鈴薯のサイレージから分離した好熱性有孢子酸生成菌 (*Bacillus* sp.) がある。これらの好熱性有孢子酸生成菌は、佐々木 (1966)¹⁰⁰⁾ が *Bacillus coagulans* と報告しているものと性質が近似しているが分類学上の位置は明確にされていない。

c. 嫌気性有孢子細菌

Clostridium に属する嫌気性有孢子細菌は、サイレージの酪酸醗酵をひきおこし、品質の低下をもたらすものである。この菌については、VAN BEYNUM と PETTE (1936)¹⁵⁾ が *Clostridium tyrobutyricum* と *C. saccharolyticum*, ALLEN と HARRISON (1936³⁾, 1937^{4, 5)}) が *C. sporogenes*, BRYANT ら (1952)¹⁹⁾, 1956¹⁸⁾) が *C. tyrobutyricum* を報告している外、GIBSON (1965)³⁵⁾ がサイレージ中の *Clostridia* の総説を発表している。

MARTOS (1941)⁶⁹⁾ は、サイレージ中には、乳酸塩を醗酵する嫌気性および通性嫌気性の有孢子細菌が存在すると報告、この中通性嫌気性細菌は *Aerobacillus* に属し、品質に関係なく、pH 4.0 前後でも $1.0 \times 10^4 \sim 10^5/g$ の菌数で存在するが、嫌気性細菌は品質の劣るもの程菌数が多いと述べている。

d. 真菌類

酵母やかびは、原料牧草中にかなり多数存在するが [ANDERSON (1956)⁶⁾], 好気性細菌と同様、熟成が正常に進むならば、埋蔵後次第に菌数は減少する傾向にある [JONES と GIBBARD (1923)⁵⁴⁾, 佐々木 (1966)¹⁰⁰⁾].

サイレージ中の酵母については、BAYER (1928)¹²⁾, VIRTANEN (1936)¹²⁰⁾, ALLEN と HARRISON (1937)⁴⁾, HALL ら (1954)⁴²⁾, 佐々木 (1966)¹⁰⁰⁾, 佐々木と佐々木 (1966)^{101, 102)} の報告、かびについては JONES と GIBBARD (1923)⁵⁴⁾, 半沢と吉村 (1935)⁴³⁾, ALLEN と HARRISON (1937)⁴⁾, HALL ら (1954)⁴²⁾, 佐々木 (1966)¹⁰⁰⁾ らの報告がある。それらの主な内容を要約すれば次の通りである。

i) 原料牧草には種々のかびが存在するが、埋蔵後は *Geotrichum candidum* 以外の菌は認められず、しかもこの菌も埋蔵 5~10 日で最高となり、その後急速に減少し、21 日後には殆んど見られなくなる [JONES と GIBBARD (1923)⁵⁴⁾].

ii) 埋蔵初期にみられる植物寄生性のかびは、熟成過程ではほぼ完全に消失し、熟成終了時には *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* などに属するかびが散見されるのみである [佐々木 (1966)¹⁰⁰⁾].

iii) 埋蔵時には、*Rhodotorula*, *Cryptococcus* などに属する無孢子の非醗酵性酵母が多いが、熟成終了後のサイレージでは、*Hansenula*, *Saccharomyces*, *Pichia*

などに属する有胞子の醗酵性酵母が多くなる【佐々木(1966)¹⁰⁰⁾】。

4. 添加物と微生物相

サイレージ調製時の添加物としては、(a) 乳酸生成のために必要な炭水化物を補強する目的で、糖蜜、穀粉、糖類などを加える場合、(b) 水分調節の目的で、ビートパルプ、藁、穀粉などを加える場合、(c) 酸度調節の目的で、酸類や塩類を加える場合、(d) 有害醗酵を止めるために、メタ亜硫酸ソーダ、クロールピクリンあるいは抗生物質を加える場合、(e) 養分強化の目的で、尿素、硫酸などを加える場合、(f) 低水分サイレージの保存、表層部のかびあるいは取出後のかび発生防止の目的でプロピオン酸ソーダその他の防黴剤を加える場合、(g) 乳酸醗酵を促進する目的で、乳酸菌を接種する場合などに大別される。この中で乳酸菌接種法と酸添加法については次項に述べることとし、その他の添加物と微生物相との関係について若干ふれてみよう。

JOSHI (1935)⁹⁵⁾ は、通常のサイレージでは醗酵初期に大腸菌群が多く、後期になって *Streptococcus lactis* が出現するが、麦藁や糖蜜を加えると熟成初期から *St. lactis* が多くなると報告している。

Extra-silo (Phenyl alcohol) は、グラム陰性菌を抑え【DE VUYST ら(1960)²⁷⁾】、サイロトランシン (Zn-bacitracin) は腐敗菌の孢子形成を抑制し、乳酸菌の繁殖を促進するが【RUSOFF (1959)⁹⁵⁾】、Clostridia を選択的に抑制するものとは考えられない【LANGSTON (1962)⁶⁶⁾】などの報告や、防黴剤としてのプロピオン酸ソーダ【高井と佐々木(1964)¹¹⁴⁾】の報告がみられる。

上記以外にも、多数の添加物が報告されているが、いずれも微生物相との関係を論ずるまでには到っていないので、それらの報告は省略した。

5. 乳酸菌接種法

GORINI (1918)⁴⁰⁾ が、サイレージの品質の良否は醗酵過程における乳酸菌と酪酸菌の活動によって左右されるとし、醗酵の不安定性を解消するため、すぐれた乳酸菌を接種することを提唱して以来、WYANT (1920)¹²⁶⁾、SEREDENKO (1935)¹⁰⁵⁾、RUSCHMANN (1943)⁹⁴⁾、安達ら(1963)^{11,2)}、MCDONALD ら(1964)⁷⁰⁾、WIERINGA ら(1964)^{124,125)}、佐々木(1966)¹⁰⁰⁾ らは乳酸菌の接種効果が認められると報告している。これに反し、POLITI と PEPOLI (1941)⁸⁹⁾、ARCHIBALD (1946)⁷⁾、ERIKSSON (1951)²⁹⁾、LANGSTON ら(1958)⁶⁵⁾、越智ら(1965)⁸⁴⁾ は、乳酸菌の接種効果を否定し、FRAZIER (1921)³²⁾ も熟成初期には接種した乳酸菌が働いて醗酵を促進するが、熟

成後期には、化学的にも微生物学的にも試験区間の差が殆んど無くなると否定的態度をとっている。

乳酸菌の接種効果は、原料牧草、使用菌種、接種量、接種方法などにより大きな差異を生ずるであろうことは佐々木(1966)¹⁰⁰⁾ の結果からも容易に推測出来、ことごとく無効であるとの説はとるべきでない。

6. 酸添加法と微生物相

酸添加によるサイレージ調製の実用化は、VIRTANEN (1933)¹¹⁹⁾ が、当時フィンランドにおいて良質なグラスサイレージをつくることが出来ず、酪農経営、特に冬季の良質な家畜飼料の供給に苦しんでいた状態を克服する最良の手段として、A.I.V. 法を発表したのが最初である。

彼は、サイレージ熟成過程における変敗の原因を追及し、pH 4.0 以下では微生物による脱アミノ反応は起こらぬこと、酪酸菌や大腸菌群は pH 4.0 以下で著しい抑制を受けること、pH 3.0 以下では植物の呼吸作用も抑制されることなどを見出し、数々の研究を重ねた結果、サイレージを埋蔵する際に pH が 3~4 になるように A.I.V. 液(硫酸と塩酸の混液を 2 規定に薄めたもの)を加える方法が最良であることを明らかにした。

その後、A.I.V. 液のみならず、種々の酸を添加してサイレージの品質を改善する試みがなされているが、ここではそれらの中、微生物学的立場から行なわれた研究について述べる。

VIRTANEN (1936)¹²⁰⁾ は、A.I.V. サイレージには *Lactobacillus* や *Betacoccus* に属する乳酸菌、*Bacillus subtilis*、*B. mesentericus*、*B. amylobacter* などの有胞子細菌および酵母が存在することを明らかにし、更に *L. plantarum* は pH 4.0 以下でも乳酸醗酵を行なうこと、酪酸菌は pH 3.3 でも孢子の形で残存することなどを発表した。

VAN BEYNUM と PETTE (1936)¹⁵⁾ は、A.I.V. サイレージから Clostridia を分離し、pH 3.5 以下では害作用を示さないことを明らかにした。

RICHARD と HEINZL (1942)⁹¹⁾ は、A.I.V. 法と Amasil 法(乳酸添加法)により調製したサイレージの微生物相を比較研究し、いずれの方法で調製しても、原料牧草中に存在する細菌は埋蔵後直ちに消失する。蛋白分解菌は埋蔵 1 週間後には乳酸菌と置換される。乳酸菌は、最初に Streptococci 次いで Lactobacilli が繁殖し、2~3 週間で菌数が最高となる。大腸菌群は最初急速に繁殖するが、熟成後は死滅して全く検出されなくなる。酪酸菌はやや増加し、菌数増加の割合は、A.I.V. 法の方が Amasil 法よりやや大きいなどの知見を発表した。

POLITI (1940)⁸⁷⁾ は、酸添加法(硫酸使用)で調製したサイレーズでは、最初1g 当たり数千しか存在しない乳酸菌が、 5.0×10^8 /g まで増加し、牧草中の糖分を完全に醗酵する。薬剤でこれらの乳酸菌を抑制すると、牧草中の糖分は殆んど変わらず、酸度も増加しないと述べている。また、佐々木(1966)¹⁰⁰⁾ は、酸添加法(塩酸使用)で調製したサイレーズでは、熟成期間を通じ多数の酵母が検出されると報告している。

RUSCHMANN (1933)⁹³⁾ は、Defu 法(30% 塩酸と10% 燐酸の混合液添加法)と Penthesta 法(五塩化燐を水に溶解して添加する方法)を比較し、Penthesta 法の方が腐敗菌に対する抑制効果が強く、好ましい乳酸醗酵が早く起こると述べている。

7. 熟成温度と微生物相

NILSSON (1956)⁹⁰⁾ は、サイレーズの熟成温度が28°C になると、10°C の時の10倍もの嫌気性有孢子細菌(Clostridia)が検出されると報告し、好気的条件下で保存したサイレーズでも、好気菌と嫌気菌の共棲作用が行なわれるため、多数の Clostridia が検出されると述べている。

GIBSON ら(1958)⁹⁶⁾ は、5種類の牧草を用い、22, 30 および40°C でサイレーズを調製し、グラム陰性菌は40°C で、Clostridia や Bacilli は22°C で、増殖が抑制されること、各種細菌類の増殖期は短く、いずれの熟成温度でも埋蔵後3日で増殖が終了すること、菌数の減少期に入ってから多量の酸が生成されることなどを明らかにし、酸の蓄積によって細菌類の増殖抑制が行なわれるとは断言出来ないとの意見を発表した。

8. サイレーズの微生物と乳および乳製品との関係

FUNDER, MORK と ØDEGAARD (1930)⁹⁴⁾ は、サイレーズを与えた牛の乳で製造したチーズには、サイレーズを与えなかった牛の乳で製造したチーズよりもはるかに多くの有孢子細菌が存在すると報告、HÜTTIG (1934)⁵³⁾ は、乾草やサイレーズを飼料とした時に飼料中の乳酸菌が侵入することを明らかにし、これらの菌のチーズに与える影響を調査した。

VAN BEYNUM と PETTE (1936)¹⁵⁾ は、サイレーズ中に存在する *Clostridium tyrobutyricum* と *C. saccharolyticum* のチーズへの影響を研究し、*C. tyrobutyricum* がチーズ製造上有害であると報告した。

9. サイレーズの微生物と食中毒

SEDDON (1926)¹⁰⁴⁾ は、高温多雨の場合には、サイレーズに発生したかびにより、家畜が食中毒を起こすことがあると報告、EDGAR (1929)⁹⁸⁾ は、かびの発生したサ

イレーズにより中毒死した馬の死因を調査し *Bacillus botulinus* (*Clostridium botulinum*) を分離、Botulio-toxin による死亡と判定した。

10. サイレーズ研究の問題点と意義

緒言および研究史を通じて、酪農経営におけるサイレーズの重要性とこれまでの研究の概要について述べて来たが、近年、基礎飼料としてのサイレーズの重要性は更に高まり、より良質のものをより少ない労働力で、安価に調製する技術の確立がのぞまれている。

これまでのサイレーズの研究を見ると、その多くは調製法と熟成終了後の品質と言う外部的関係のみにとらわれ、熟成に微生物が大きく関与しているにもかかわらず、微生物の遷移とサイレーズの品質と言う核心的関係にふれているものは見当たらない。

サイレーズの微生物学的研究は、BURRILL (1889)²²⁾ の研究を初めとし、特定の微生物の分類同定、熟成過程における乳酸菌の遷移状況、原料牧草中の細菌や酵母の分類同定、変敗原因菌としての酪酸菌の分類同定およびその出現状況、乳酸菌接種法などが報告され、一見相当に進んでいるかに見えるが、いずれも個々の現象の解析に止まり、熟成に関与するすべての微生物相を追跡調査して、それぞれの菌の相互作用と熟成終了後のサイレーズの品質との関係、ならびに給与開始後の保存性などにまでふれているものは、無いと言っても過言ではない。

サイレーズの熟成は、BEARDSLEY (1956)¹³⁾ の説にみられるように、埋蔵初期に植物の呼吸作用による酸素の消費、炭酸ガスの発生、牧草からの汁液の滲出、熱の発生などが起こり、最初大腸菌群が発育、次いで乳酸菌による乳酸醗酵が十分で pH が4.2以下に下がれば、そのまま長期保存に耐えられるようなサイレーズとなるが、pH が下がらない場合には、酪酸菌その他の有害菌が繁殖して変敗を起こすとの考え方がほぼ妥当なものとして認められている。

著者は、原料牧草にすでに多数の微生物が着生しているので、原料牧草の刈取、細切の時期から、これらの微生物が何等かの形で熟成に関与しているとの考え方にもとづき研究を開始した。従って、埋蔵後牧草の汁液が滲出して微生物の活動が始まると考える BEARDSLEY の説¹³⁾ とは、埋蔵初期の微生物相の考え方に若干の差異がある。また、彼の説を否定するものではないが、埋蔵初期の酸素の消費や熱の発生には、植物の呼吸作用のみならず、HUNTER (1917)⁹⁹⁾ の説にあるように微生物も関与しているとの考え方をとるのが正確であろう。

原料牧草に着生している菌の種類、菌数、埋蔵条件、

熟成温度などが埋蔵の都度異なるので、サイレージの熟成が常に同じ条件で行なわれることは期待出来ない。乳酸菌一つを例にとっても、埋蔵時の菌数、原料牧草の成分、他の微生物相との共棲あるいは拮抗作用などで、その活動状態が大きく変動することは、容易に推察される。また、乳酸菌接種法の研究を見ても、研究者によって使用菌種、接種量、接種方法などが異なり、しかも埋蔵条件と熟成終了後の品質のみから効果を論じているだけで、接種した菌の追跡調査がなされていないので、接種した乳酸菌がサイレージ熟成に最適な菌であったか否かの解析さえ出来ない有様である。

本研究は、これら未解決の問題、特に熟成に関与する微生物相相互の関係、埋蔵条件と微生物相との関係を解明すると共に、有益な乳酸菌の発見と利用法ならびに有害な菌類の防除法を追究し、熟成過程における微生物相の活動を人為的に制御する方法を考案して、常に良質なサイレージを調製しようとするもので、このような研究はサイレージの研究として未だ例を見ないものであり、この研究の完成はサイレージの品質改善のみならず、調製に要する労働力や経費の節減の上にも益する処大なるものがあると思ふ。

第3編 研究方法

サイレージの熟成は天然の乳酸醱酵を利用して行なわれているもので、埋蔵当初には植物の呼吸作用や植物起源の酵素も関与するが、原料牧草には多数の微生物が着生して、刈取、細切などの処理の段階から活動を開始し、埋蔵後の熟成過程において種々の変遷をとげ、サイレージの品質は言うにおよばず、取出開始後の保存性にまで大きな影響を与えたと考えられる。

熟成過程において、乳酸菌が活発に働いて大量の乳酸を生じ pH を 4.2 以下に低下させた場合には、長期保存に耐え得る良質なサイレージとなるが、pH の低下が不十分の場合には途中で酪酸醱酵を起こし品質の著しい低下をまねくこととなる。

一般に、デントコーンのような炭水化物の多い原料を用いた場合には、良質なサイレージが出来るが、蛋白質が多く、飼料価値の高いまめ科牧草や若刈り牧草を用いたグラスサイレージでは、pH の低下が十分でなく劣質のものとなることが多々ある。

本研究は、サイレージの品質は、熟成過程において活動する微生物相によって大きく変動するとの観点から、まず、サイレージの醱酵機構を微生物学的立場から解析し、良質なサイレージが出来る場合と、品質が悪化する

場合の微生物相の遷移状態の差異を明確にし、埋蔵条件の改良や乳酸菌の接種などによって、微生物相を人為的に良質なサイレージが出来る方向に制御し、最終的には、酪農家が常に良質なサイレージを安価に調製出来る方法を確認することを目的としたものである。

この目的を達成するための手段として、まず埋蔵条件を種々変えて、それぞれの熟成過程における微生物相の遷移状態と品質との関係を調べた。埋蔵条件としては、牧草の細切と無細切、細切長と細切方法、脱気と密封、熟成温度、刈取時期、水分、使用サイロの種類、添加物の種類、乳酸菌接種の影響などをとりあげた。また、熟成に関与する微生物相の全貌を明らかにするために、前記実験中に多数の微生物を分離し、分類学的に研究すると共に、有害な菌類の防除、有用な菌類の発見と利用を目標に、サイレージ熟成過程における乳酸菌の役割を研究した。

次いで、分離乳酸菌の中から、牧草煮汁によく繁殖する生酸性の強い菌を選択し、その培養条件、大量増菌法を考案するかたわら、乳酸菌接種サイレージの調製を行ない、炭水化物含有添加物と乳酸菌の相乗効果、その他の試験を重ね、乳酸菌接種によるサイレージ調製法の考案、その経済的価値などを調査し、最終的には、酪農家の協力を得て実用段階での実験を行ないその効果を調べた。

この研究を通じ、サイレージ原料として使用した牧草の種類、刈取時期、埋蔵方法などは多岐にわたっており、ここに一括して述べたのではかえって繁雑となる恐れがある。従って、これらの事項については、研究結果に含めて順次記述することとし、ここでは各実験に共通して用いた手法、すなわち、サイレージ中の微生物の解析、各菌群の計数、分離および分類検索の方法とサイレージの化学的分析法などについて述べる。

第1章 微生物相の解析方法

第1節 各菌群計数法

滅菌した 300 ml 容フラスコに試料 10 g を正確に秤量し、滅菌水 100 ml を注入、振盪攪拌し、試料に着生している微生物を十分に懸濁させた液を 10 倍稀釈液とし、その後滅菌水で順次 10 倍稀釈を行なって 10~10⁸ 倍稀釈の菌液を用意し、各菌群の計数に使用した。

微生物は、乳酸菌、酪酸菌、好気性細菌、蛋白分解菌、酵母およびかびの 6 群に分けて計数した。

各菌群計数のための培養温度は、予めサイレージ 10 点を用いて 27, 32, 37, 45°C の 4 段階で培養、菌数値を比

較し、最も高い菌数値が得られ、しかも短期間の培養で計数出来る温度を選んだ。各菌群の計数方法は、次の通りである。

a. 乳酸菌群計数法

1 ml 当たり 30~300 個の乳酸菌が存在すると推定される濃度を中心に、その前後各 1 段階の稀釈液をそれぞれ滅菌したペトリ皿 5 枚に 1 ml ずつ採取し、予め加熱溶解した乳酸菌計数用培地約 10 ml を 45°C 前後に冷却して無菌的に注入、十分混和して冷却固化させた後、反転して 32°C で 5~7 日間培養し、平板 1 枚当たり 30~300 個の集落を形成したペトリ皿の集落数を測定し、その平均値から試料 1 g 当たりの乳酸菌数を算出した。

乳酸菌計数用培地の組成は、酵母エキス 0.5%、ペプトン 0.5%、 KH_2PO_4 0.2%、グルコース 2.0%、寒天 2.0% で、pH は調整しないまま滅菌し、平板流込の際に、適当量の別に滅菌した炭酸カルシウムを添加、その溶解の認められた集落を計数した。

なお、集落の外観を観察し、疑わしいものについてはカタラーゼの有無を試験し、カタラーゼを持たないものを乳酸菌とした。

乳酸菌は、菌数測定後無作意に 100 個の集落を選び、グラム染色を行なって顕微鏡的に観察し、Streptococci, Pediococci, Lactobacilli の 3 群に分け、それぞれの比率を求めた。Streptococci としたものについては、その後更にグルコースからのガス生成を試験し、ガスを生成しないものを Streptococci、ガスを生成するものを Leuconostocs とした。

b. 酪酸菌群計数法

原料牧草および品質良好なサイレージでは 10^3 ~ 10^5 倍、酪酸臭の甚だしいサイレージでは 10^3 ~ 10^7 倍の 5 段階の稀釈液を、それぞれ試験管に分注滅菌した酪酸菌計数用培地 5 本に、1 ml ずつ注入攪拌し、100°C 1 分間の heat shocking を加え、32°C で 5~7 日間培養し、ガス発生認められたものを、酪酸菌が存在したものとみなし、最確数表⁵⁸⁾を用いて試料 1 g 当たりの菌数を求めた。

酪酸菌計数用培地の組成は、グルコース 1.0%、ペプトン 0.5%、 K_2HPO_4 0.05%、 KH_2PO_4 0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%、チオグリコール酸ソーダ 0.05%、寒天 0.075% で、pH を 7.0~7.2 に調整し、試験管に約 9 ml ずつ分注滅菌したものをを用いた。

c. 好気性細菌計数法

前記稀釈液中、1 ml 当たり 30~300 個の好気性細菌が存在すると推定されるものを中心に、3 段階の稀釈液

をそれぞれ滅菌したペトリ皿 5 枚に 1 ml ずつ採取し、予め加熱溶解した好気性細菌計数用培地約 10 ml を 45°C 前後に冷却し、無菌的に注入、十分混和して冷却固化させた後、反転して 32°C で 2~3 日間培養し、平板 1 枚当たり 30~300 個の集落を形成したペトリ皿の集落数を測定し、その平均値から試料 1 g 当たりの好気性細菌数を算出した。

好気性細菌計数用培地の組成は、肉エキス 0.3%、ペプトン 0.5%、寒天 2.0% で、pH は 7.0~7.2 に調整して滅菌した。

好気性細菌は、菌数測定後、無作意に 100 個の集落を選び、グラム染色を行なって顕微鏡的に観察し、グラム陰性桿菌、グラム陽性球菌、グラム陽性桿菌、*Bacillus* 属菌の 4 群に大別してそれぞれの比率を求めた。

グラム陰性菌は、必要に応じ乳糖添加肉汁に接種、ガス生成能を調べ、大腸菌群の存否を確認した。また、*Bacillus coagulans* の菌数測定の際には、培養温度を 45°C とした。

d. 蛋白分解菌群計数法

前記稀釈液中、1 ml 当たり 30~300 個の蛋白分解菌が存在すると推定されるものを中心に、3 段階の稀釈液をそれぞれ滅菌したペトリ皿 5 枚に 1 ml ずつ採取し、別に滅菌した脱脂乳 1 ml を添加、予め加熱溶解した好気性細菌計数用培地約 10 ml を 45°C 前後に冷却し、無菌的に注入、十分混和して冷却固化させた後、反転して 32°C で 2~3 日間培養、周囲に透明帯を形成した集落を計数し、その平均値から試料 1 g 当たりの蛋白分解菌数を算出した。

ここに言う蛋白分解菌とは、乳酸菌や酪酸菌のように、分類学上の特定の群をさすものではなく、好気性細菌中に、短期間に牛乳カゼインを分解する程強力な蛋白分解力を持つ菌がどの位存在するかを知るための指標としたものである。

e. 酵母群およびかび群の計数法

前記稀釈液中、1 ml 当たり 30~300 個の酵母あるいはかびが存在すると推定されるものを中心に、3 段階の稀釈液をそれぞれ滅菌したペトリ皿 5 枚に 1 ml ずつ採取し、別に滅菌した 1% 乳酸液 1 ml を添加、予め加熱溶解した真菌類計数用培地約 10 ml を 45°C 前後に冷却し、無菌的に注入、十分混和して冷却固化させた後、反転して 27°C で 5~7 日間培養した。酵母とかびは、集落の外観および顕微鏡的観察によって分別計数した。

平板 1 枚当たり 30~300 個の集落を形成したペトリ皿の酵母とかびの集落数を別々に測定し、それぞれの平均

値から、試料 1g 当たりの酵母とかびの菌数を算出した。

真菌類計数用には、馬鈴薯切片 250g、麦芽根 50g に水 1ℓ を加え、1時間煮沸、滷液を 1ℓ とし、グルコース 2.0%、寒天 2.0% を加え、加熱溶解後、pH を調整しないまま滅菌した培地を用いた。

第2節 微生物の分離法

サイレージ中に存在する微生物の種類を明らかにするために、培養によって発育して来るあらゆる微生物の分離と検索を行なうこととした。ただし、Autotrophic な菌は、本研究の目的から外れるものと考えられたので、それらの菌は考慮に入れなかった。各菌群の微生物の分離には、すでに「ビートトップサイレージの微生物相に関する研究」で述べた方法¹⁰¹⁾を採用した。

第3節 微生物の分類学的検索法

a. 細菌および放線菌

形態学的性質、培養上の性質および生理学的性質は、主にアメリカ細菌学会が編集した PELCZAR らの著書⁸⁶⁾を参照して調べ、分類学的検索には BERGEY の細菌分類書¹⁷⁾を参照した。

Bacillus 属菌は、SMITH らの用いた培地および試験方法¹⁰⁸⁾で性質を調べ、BERGEY の細菌分類書と SMITH らの記載を比較参照しつつ分類同定を行なった。

Pediococcus 属は、中川と北原⁷⁷⁾、WHITTENBURY¹²³⁾、MUNDT ら⁷⁴⁾の分類法を参照して分類同定した。

b. 酵 母

LODDER と KREGER VAN RIJ⁶⁸⁾の分類法を参照して、分類同定を行なった。

c. か び

GILMAN³⁸⁾や BARNETT¹¹⁾の記載にもとづき大略の分類を行ない、詳細については、*Aspergillus* は THOM と RAPER¹¹⁷⁾、*Penicillium* は RAPER と THOM⁹⁰⁾、*Mucor* は LENDNER⁶⁷⁾や NAUMOV⁷⁸⁾、*Rhizopus* は山本¹²⁷⁾の分類法に従って分類同定を行なった。上記研究者らの記載のみでは不十分と考えられる菌については SACCARDO の記載⁹⁷⁾を参照し、原著の得られるものについては、原著を参照して同定した。

第2章 分析方法

第1節 pH

供試試料の搾汁を取り、日立堀場製ガラス電極 pH メーター M-3 型または D-5 型で測定した。試料の水分が少なく、そのままでは搾汁を取り難い時には、極少量の蒸溜水を加え、ホモゲナイザーで組織を十分に破碎した後、搾汁を取り pH の測定に供した。

第2節 水 分

試料 5g を、赤外線水分計で恒量となるまで乾燥し、水分含量を試料中百分率で算出した。

第3節 酸組成、揮発性塩基およびアミノ酸

新鮮なサイレージ 200g を 2ℓ 容の広口瓶に取り、蒸溜水 500ml を加え、時々振盪しながら冷蔵庫中で 4 時間浸出した。浸出液をリンネルで濾別後、残渣から出来る限り汁液を搾り取り、滷液を搾汁と合して遠心分離し、上澄液 150ml に中性アルコールを加え 500ml とし、このアルコール溶液を用い、BARNETT の「Silage fermentation」記載の方法¹⁰⁾で、総酸、揮発性塩基、アミノ酸、揮発酸などを定量した。

第4節 飼料成分の一般分析法

原料牧草および熟成終了後のサイレージを 70~90°C で乾燥、粉碎し、シリカゲル・デシケーター中に保存し、一般分析用試料とした。

粗蛋白質^{10,118)}、粗脂肪¹¹⁸⁾、粗繊維^{10,118)}、粗灰分^{10,118)}、可溶性無窒素物 (NFE)^{10,118)}、可消化蛋白質¹⁰⁾ は常法により定量し、乾物中百分率として算出した。

乾物回収率は、熟成を終えたサイレージの腐敗部分を除去、給与可能な乾物総量を一般分析の結果から求め、これを埋蔵した原料牧草の乾物総量で除し、その値に 100 を乗じて乾物回収率 (%) とした。

第5節 消化率測定法および養分回収率^{10,115)}

a. 消化率測定法¹⁰⁾

原料牧草および熟成終了後のサイレージそれぞれにつき、緬羊 4 頭を用いて消化試験を行ない、給与した飼料の量と排泄物の量ならびに両者の一般分析値から、次式を用いて消化率を求めた。

$$\frac{\text{採食量} - \text{排泄量}}{\text{採食量}} \times 100 = \text{消化率} (\%)$$

上記の採食量および排泄量は、乾物消化率を求める時には、採食乾物量と排泄乾物量に、蛋白質の消化率を求める時には採食粗蛋白質量と排泄粗蛋白質量とし、粗繊維、粗脂肪、可溶性無窒素物などの消化率も同様にして求めた。

b. 可消化乾物量回収率^{83,115)}

原料牧草の乾物総量と熟成終了後腐敗部分を除いたサイレージの乾物総量、および前記の方法で求めた乾物消化率から、常法により算出した。

c. 可消化養分回収率^{83,115)}

原料牧草とサイレージの飼料成分分析値および各成分の消化率をもとに、常法により粗蛋白質、粗繊維、粗脂肪、可溶性無窒素物などの可消化養分回収率を算出した。

なお、熟成過程における各成分の可消化養分損失は、次式で求めた。

$$100 - \text{可消化養分回収率} = \text{可消化養分損失}$$

d. 可消化養分総量 (TDN)^{10,99)}

可消化養分総量は、常法により次式で算出した。

$$\text{TDN} = \text{可消化粗蛋白質} + \text{可消化粗繊維} + \text{可消化可溶性無窒素物} + \text{可消化粗脂肪} \times 2.25$$

第6節 嗜好性試験^{83,115)}

育成中の若牛(体重500~580 kg)を用い、Latin 方格法あるいは Cafeteria 法により調査した。

第4編 研究結果および考察

第1章 サイレージ醗酵機構の解析

サイレージの醗酵機構解析の1段階として、本章では、原料牧草を埋蔵する際に、牧草を長いまま用いるのと細かく切って用いるのといずれがよいのか、水分の多い牧草と少ない牧草のいずれがよいのか、サイロに埋蔵してからよく圧搾して密封するのと空気を強制的に吸引していわゆる脱気するのとどちらがよいのか、早刈牧草と遅刈牧草のいずれがよいのか、熟成温度、サイロの種類、添加物の違いなどにより微生物相や品質がどのように変化するのか、乳酸菌の接種は有効かどうかなどの諸問題を解明するための研究を行なった。

第1節 細切処理および脱気処理

サイレージ埋蔵時における牧草の細切処理やサイロの脱気処理が、熟成過程における微生物相の遷移と pH の低下にどのような影響を与えるかを明らかにするためにこの実験を行なった。

a. 方法

いね科、まめ科混播の1番牧草を刈取、長いままのもの(草丈80 cm 前後)と、細切長を1 cm に調節したサイレージカッターで細切したものを原料牧草とした。

実験用サイロは、図-1 に示した形の脱気口をつけた厚

表-1 埋蔵処理の試験区分

| 細切長 | 添加物 | | |
|----------|-----|------|--------|
| | 無添加 | 水添加* | 草汁添加** |
| 無細切 | 密封 | 密封 | 密封 |
| | 脱気 | 脱気 | 脱気 |
| 細切(1 cm) | 密封 | 密封 | 密封 |
| | 脱気 | 脱気 | 脱気 |

*, **: 添加量はいずれも 200 ml/5 kg

さ0.2 mm のビニール製の袋で、埋蔵量は5 kg とした。

試験区分は、細切の有無、密封、脱気処理別、添加物の種類により、表-1 に示した12試験区とした。表中、密封とは、原料牧草を実験用サイロにぎっちり埋蔵した後、脱気口およびサイロ上部をクリップで止め、空気が侵入しないようにしたものである。また、脱気とは、原料牧草を埋蔵し、サイロ上部をクリップで止めた後、脱気口から搾乳用真空ポンプで体積が約半分になるまで脱気した後、脱気口をクリップで止めたもので、脱気終了時にはサイロは砂袋ほどの堅さとなり、多数のしわがよっていた。

草汁添加区は、牧草300 g に水1 l を加え30分煮沸、熱時戸過、冷却した汁液を、牧草5 kg 当たり200 ml の割合で添加埋蔵した。これは、サイレージ埋蔵後牧草汁液の滲出が良好な場合を想定したものである。

水添加区は、煮沸冷却した水を草汁添加区と同量添加したもので、草汁添加区の対照としての意味の外に、雨水などで濡れた牧草を埋蔵した場合の微生物相の遷移を予測出来るのではないかと考えたものである。

埋蔵後のサイロは、いずれも室温に放置し、熟成温度の調節は行なわなかった。

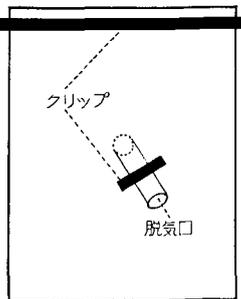
刈取時期は6月2日で、埋蔵後10日間に、最高室温が20°C を越えた日は1日しかなく、埋蔵初期には熟成温度は低いままで経過したこととなる。

埋蔵後は、経日的に10回にわたり試料を採取し、微生物相と pH の変化を追跡した。試料はその都度新しいサイロを開封して採取し、一度開封したサイロの内容物は、埋蔵状態が甚だしく変化してしまうので、その後の実験には使用しなかった。

b. 結果および考察

サイレージ熟成に最も重要な位置を占める乳酸菌と、害作用の著しい酪酸菌の遷移と pH の変化は、図-2 (密封) と図-3 (脱気) に示した。

図-2 から明らかなごとく、密封した細切牧草では、水



材料: ビニール袋
 大きさ: 52×41 cm
 厚さ: 0.2 mm
 クリップ: 硬質プラスチック
 埋蔵可能量: 生牧草 5 kg

図-1 実験用プラスチックサイロ略図

や草汁の添加にかかわりなく、埋蔵3日後にすでに $1.0 \times 10^8/g$ を越す乳酸菌の増殖がみられた。これに反し、長いままの牧草を埋蔵したものでは、草汁添加区でやや発育が良かったが、その他の試験区では発育が劣り、中でも無添加区における乳酸菌の増殖が悪かった。

脱気した場合(図-3)には、乳酸菌の増殖は密封のものと同差なかったが、pHは密封のものより低下し、酪酸菌の増殖も抑制された。しかし、長いままの牧草を、水も草汁も加えずに埋蔵したものでは、pHの低下が不十分で、酪酸菌の増殖も顕著であった。

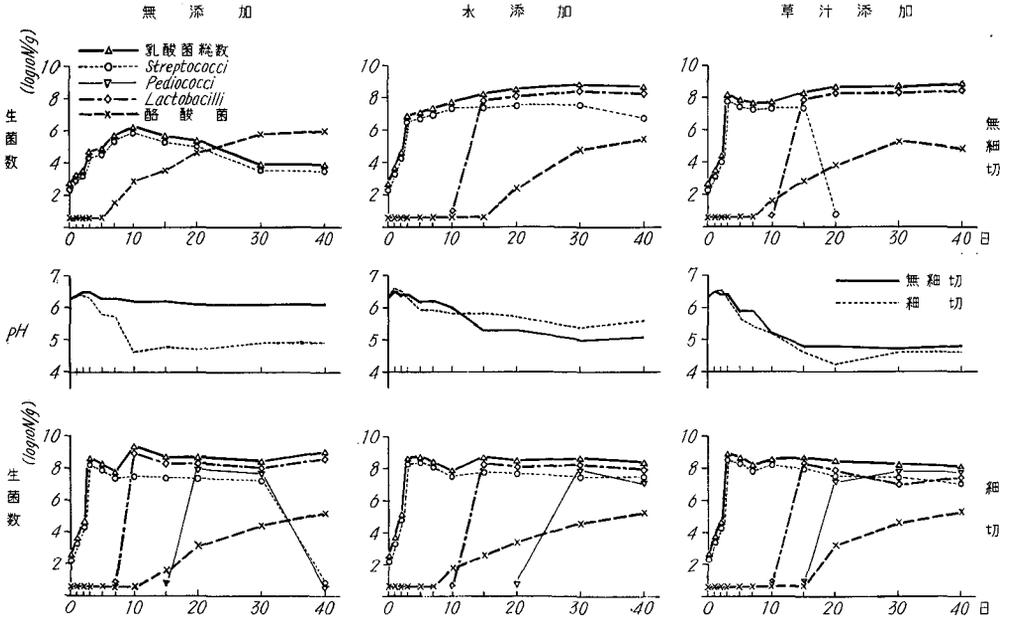


図-2 熟成過程における乳酸菌相と酪酸菌相の遷移(密封)

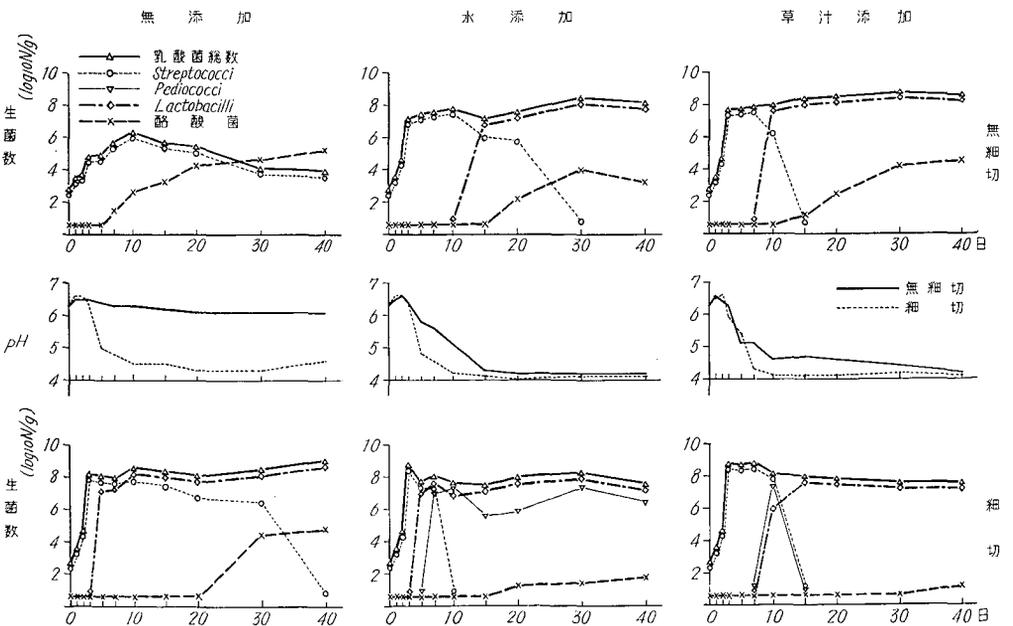


図-3 熟成過程における乳酸菌相と酪酸菌相の遷移(脱気)

乳酸菌の遷移を詳細にみると、長いままの牧草をそのまま埋蔵したものは、密封、脱気のいずれの場合にも乳酸菌の増殖が悪く、熟成期間を通じ最高 $1.8 \times 10^6/g$ の Streptococci が検出されたに過ぎなかった。しかしながら、その他の試験区では、埋蔵初期に Streptococci が多く、その後熟成が進むにつれ Lactobacilli が大勢を占めるようになった。また、Pediococci の混在する場合もあった。

草汁の添加によって、乳酸菌の増殖が促進され、pH の低下が速かになるという現象は、草汁中に乳酸菌の増殖を促進する物質が多量に含まれているものとして比較的容易に理解されるが、水のみを加えても乳酸菌の増殖が良好になったことは、やや理解に苦しむところである。しかしながら、無添加のものでは牧草汁液の滲出が遅れたが、水を加えたものでは、その水に牧草成分の一部が溶出して、乳酸菌の増殖を促進したものと考えるのが妥当であろう。

サイレージ熟成に有害な酪酸菌の増殖は、長いままの牧草をそのまま密封したもので最も顕著で、水や草汁の添加、あるいは原料牧草の細切によって増殖がかなり抑制された。酪酸菌の増殖抑制の強さは、密封した場合よりも脱気した場合の方が強力で、細切牧草に草汁を加えて脱気したもので、40 日の熟成期間を通じて、酪酸菌の増殖は殆んど認められなかった。このことは、例え脱気を行なわなくても、加圧が十分に空気の排除や牧草汁液の滲出が良好な場合には、乳酸菌の活動によって、酪酸菌の繁殖が抑制されることを暗示している。

熟成過程における pH の変化をみると、埋蔵直後未だ乳酸菌の増殖が十分でない時期には、pH が一時上昇したが、Streptococci の増殖した埋蔵 3 日頃から低下を始め、Lactobacilli の増殖の始まる頃になって、低下速度を増大する傾向がみられた。しかし、長いままの牧草をそのまま埋蔵したものでは、乳酸菌の増殖が著しく劣り、酪酸菌の増殖が顕著で、密封、脱気のいずれの場合にも pH は低下せず、熟成期間を通じ最低 pH は 6.1 に止まった。

細切牧草では、無細切のものよりも乳酸菌の増殖が良好だったため、一般に pH の低下も良好であった。細切牧草を埋蔵、脱気したものでは pH が十分に低下し、水や草汁を添加した場合には、埋蔵 10 日後に酪酸菌の発育限界である 4.2 以下となり、その後の酪酸菌の増殖が顕著に抑制され、脱気の効果が発証された。

乳酸菌および酪酸菌の遷移と pH の関係については、すでに述べたが、これらの結果のみでは、埋蔵初期にお

ける pH の一時的上昇を説明することは出来ない。そのため、この現象を解明するために必要な、他の微生物相の遷移状況を、乳酸菌総数の変化と併せて図-4 (密封) および図-5 (脱気) に示した。

両図から明らかなように、好気性細菌や蛋白分解菌は、いずれの試験区でも埋蔵後増加し、乳酸菌の増殖のみられる埋蔵 3 日後までの間にかかり繁殖していた。

蛋白分解菌は、蛋白質を分解してアミノ酸や塩基性物質を生ずることは言うまでもないが、好気性細菌の中にも、蛋白質の分解力は弱くても、低分子のペプチドやアミノ酸を分解して塩基性物質を生ずるものが少なくない。従って、これらの菌の増殖が、埋蔵初期の pH 上昇をもたらしたものであることは明らかである。

これら有害菌の減少速度は、原料牧草の細切や脱気により、速められる傾向がみられた。ただし、長いままの牧草を埋蔵したものは、脱気の効果は、細切牧草ほど顕著には現れなかった。

埋蔵初期に増殖した好気性細菌や蛋白分解菌は、すべてグラム陰性の桿菌で、分類学上は *Aerobacter*, *Escherichia* および *Proteus* に属するものであった。従って、熟成初期に乳酸菌の発育が遅れ pH の低下が不十分な時には、これらの菌が牧草中の糖分の大部分を消費し、その後乳酸菌が繁殖しても、その時には pH を低下させるに足るだけの糖分がなく、これがサイレージ変敗の原因となることもあり得る。また、例え相当量の糖分が残っていても、乳酸菌の増殖が遅れた場合には、生成する酸の大部分がすでに生成されている塩基性物質の中和に消費され、pH の低下を緩慢にする可能性も頗る大きい。

酵母は、いずれの試験区でも一旦減少した後に増殖した。しかも、原料中に多数存在していた酵母と、熟成中期になって増殖した酵母は、別種のものであることが明らかになった。すなわち、前者は *Cryptococcus* や *Rhodotorula* に属する非醗酵性の酵母であり、後者は *Hansenula* や *Saccharomyces* に属する醗酵性の酵母で、中でも *H. anomala* の増殖が顕著であった。*H. anomala* は、糖分の消費著しく、さらに乳酸菌の生成する乳酸をも同化するので、サイレージの醗酵に必ずしも好影響を与えるものではないが、エステルを生じ、家畜の嗜好性を増すので、埋蔵初期の pH 低下が十分なサイレージでは、殆んど悪影響はないものと推測される。また、埋蔵初期には酵母の増殖はみられなかったのも、これが埋蔵初期の pH 上昇の原因をなしたとは考え難い。

かびは、いずれの試験区でも埋蔵後徐々に菌数を減少しており、熟成期間に空気の侵入がなければ、サイレー

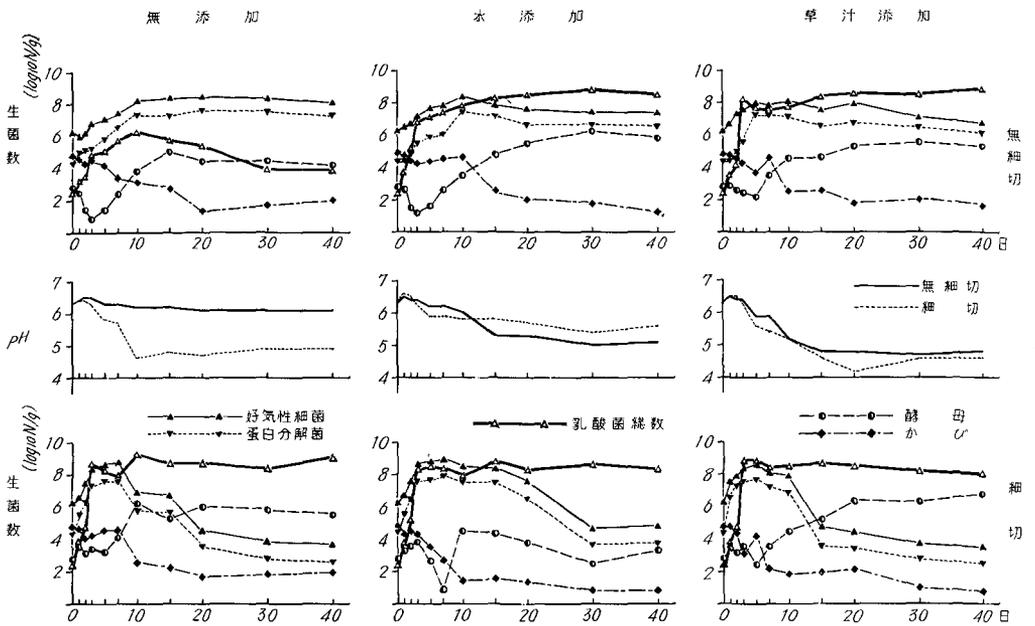


図-4 熟成過程における好気性細菌と真菌類の遷移(密封)

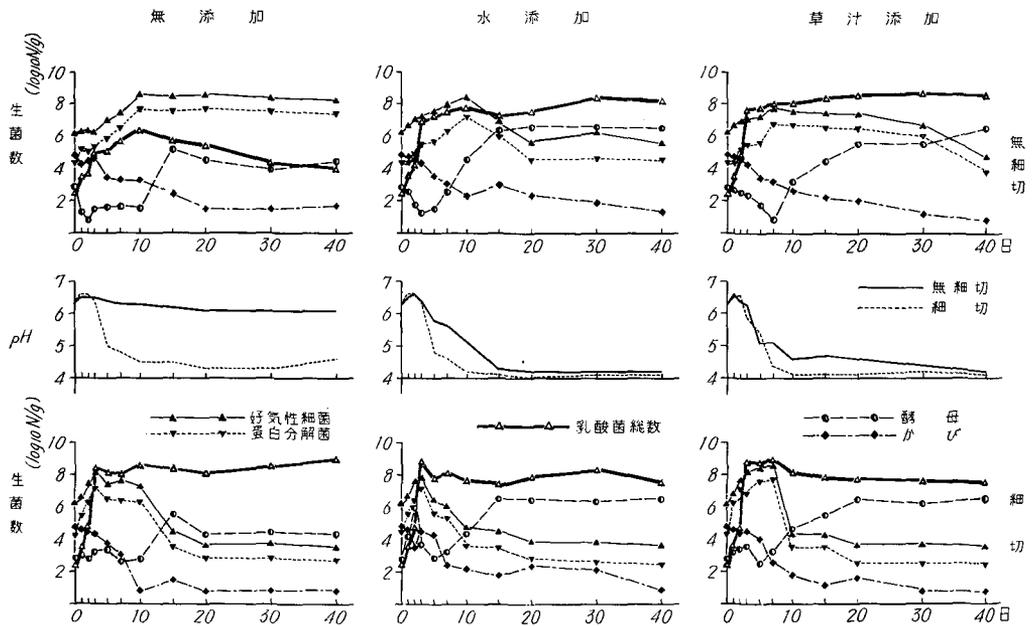


図-5 熟成過程における好気性細菌と真菌類の遷移(脱気)

シの熟成に悪影響を与えることはないものと言えよう。

サイレージの品質は、これら微生物相の動向から容易に推察出来るように、細切牧草に草汁を添加して埋蔵脱気したものが最良で、水添加脱気のもがこれに次ぎ、長いままの牧草をそのまま密封あるいは脱気したものが

最悪であった。

第2節 サイレージの熟成温度

サイレージの熟成に微生物が関与することは言うまでもなく、その微生物相が熟成温度によって大きく変動することも容易に推測される。この実験は、熟成温度と菌

生物相の関係を明確にするために行なったものである。

a. 方法

いね科、まめ科混播の1番刈牧草を採取し、2~5 cmに細切して1 kg ずつビニールの袋に埋蔵密封し、15, 30, 45 および 60°C の恒温器に入れ、40 日間保存、埋蔵当初および埋蔵後5, 10, 40 日の4回にわたり試料を採取し、微生物相の変化を追跡した。

熟成過程において熟成温度が変化する場合を想定し、15°C のものでは途中から30°C に、30°C のものでは45°C に上昇した場合の微生物相の変化、また高温側の45°C と60°C 保存のものでは、途中から30°C に低下させた場合の微生物相の変化をも調査した。

熟成温度の経日的変化については、図-6以降に示した通りで、実線の温度経過を行なわせたものの微生物相とpHの変化は実線で示し、温度変化を点線または破線で示したものの微生物相とpHの変化は点線または破線でそれぞれ示してある。

試料は、その都度新しい袋を開封して採取し、一度開封した袋の試料は、状態が全く変わってしまうので、その後の実験には使用しなかった。

b. 結果および考察

熟成温度の異なるサイレージの微生物相とpHの経日的変化は、図-6~9に示した。

この実験では、サイロとして小型のビニールの袋を用い、強制送風式の恒温器で温度調節を行なったので、外気温がそのまま熟成温度を示すと考えられる。

サイレージ熟成に最も重要な乳酸菌と害作用の顕著な酪酸菌の変化は、図-6に示した。図中△印は乳酸菌総数、×印は酪酸菌数、●印はpHを示し、実線は熟成温度を埋蔵時のまま保持したもの、点線は埋蔵8日後に熟成温度を30°Cに低下させたもの、破線は埋蔵14日後に、熟成温度を図示した通りの温度に上昇または下降させたものを示している。

15および30°C熟成の場合には、乳酸菌の増殖が極めて良好で、埋蔵5日でpHは4.2あるいは4.1に達した。特に15°Cよりも30°Cの方が乳酸菌の増殖が良好であった。また、酪酸菌の増殖はみられなかった。30°Cでの熟成がある程度進み、pHが低下した後に熟成温度が上昇すると、乳酸菌は完全に死滅した。これは低いpHと高温の相乗効果によるもので、春に埋蔵したビニールバキュームサイロのサイレージが、夏になって戸外で直射日光を浴び高温にさらされるならば、このような現象が起こるものと推測される。

熟成温度45°Cのものは、15, 30°Cのものに比べ乳酸

菌数が少なく、pHも前2者程低下しなかった。しかし、熟成途中において熟成温度が30°Cまで下がれば、乳酸菌の増加がみられた。ただし、この場合にはpHが更に低下することは期待し難く、むしろ、短期間45°Cに保持されたサイレージは、熟成温度が低下すると酪酸菌が増殖することを認めた。

熟成温度60°Cの場合には、原料牧草中に存在した乳酸菌は、埋蔵5日で殆んど死滅し、その後熟成温度が30°Cに下がっても、もはや乳酸菌の増殖は見られなかった。また、短期間60°Cに保持されたサイレージに熟成温度の低下が起こると、45°Cの場合と同様、酪酸菌の増殖がみられた。これらのことから、埋蔵初期の熟成温度が45, 60°Cなどと言う高温に達したサイレージは、その後熟成温度が下がっても乳酸菌の発育が悪く、pHが十分に低下しないので、酪酸菌の増殖が起こり劣質のものとなると推測される。

乳酸菌の遷移を更に詳細に示すと、図-7のごとくで、熟成温度15°Cでは埋蔵初期にStreptococciが増殖し、その後Lactobacilliが優勢となるが、熟成温度が30°Cになると、この菌相の遷移が早まるため、埋蔵5日後にはStreptococciは殆んど検出されなかった。

熟成温度45°Cでは、埋蔵5日後にはStreptococciやLactobacilliは殆んど検出されず、Pediococciが大勢を占めていた。ただし、熟成途中において熟成温度が30°Cまで低下したものでは、Lactobacilliの増殖がみられた。

60°C熟成のものでは、埋蔵5日後には乳酸菌は殆んど死滅していたが、pHは4.8まで低下し、たとえ普通の乳酸菌が働かなくても、別の酸生成菌が活動しているものと考えられた。そのため、好熱性酸生成菌を追跡して、図-8の結果を得た。図から明らかのように、好熱性酸生成菌である*Bacillus coagulans*は、熟成温度15あるいは30°Cでは殆んど検出されないのみならず、埋蔵初期の熟成温度30°Cのものが中途から45°Cに上昇しても増殖しなかった。

熟成温度45および60°Cでは、*B. coagulans*の増殖が著しく、45°Cでのサイレージの熟成には、さきの図-7に示したPediococciと共に、この菌が関与していることが明らかになった。

熟成温度60°Cでは、*B. coagulans*の増殖は45°Cよりも良好で、乳酸菌が殆んど検出されなかったことから、このような高温でのサイレージの醗酵には、*B. coagulans*が主体をなしているものとの確信を得た。

好気性細菌、蛋白分解菌、酵母、かびなどの微生物相

の変化は、図-9に示したごとくで、熟成温度15あるいは30°Cの場合には、酪酸菌とならんでサイレージの熟成に害作用を与える好気性細菌、蛋白分解菌、かびなど

は、pHの低下ともなって急速に減少した。菌数の減少速度は、30°Cの方がやや速かであった。酵母は、30°Cでは徐々に減少したが、15°Cではむしろ増加する傾向

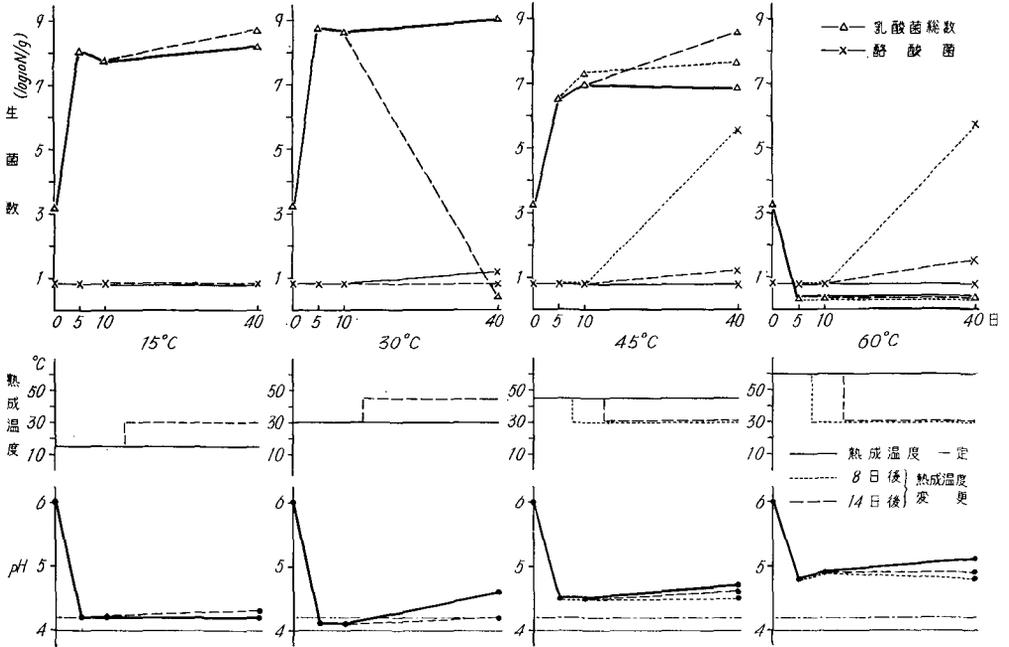


図-6 サイレージ熟成温度と乳酸菌および酪酸菌の遷移との関係

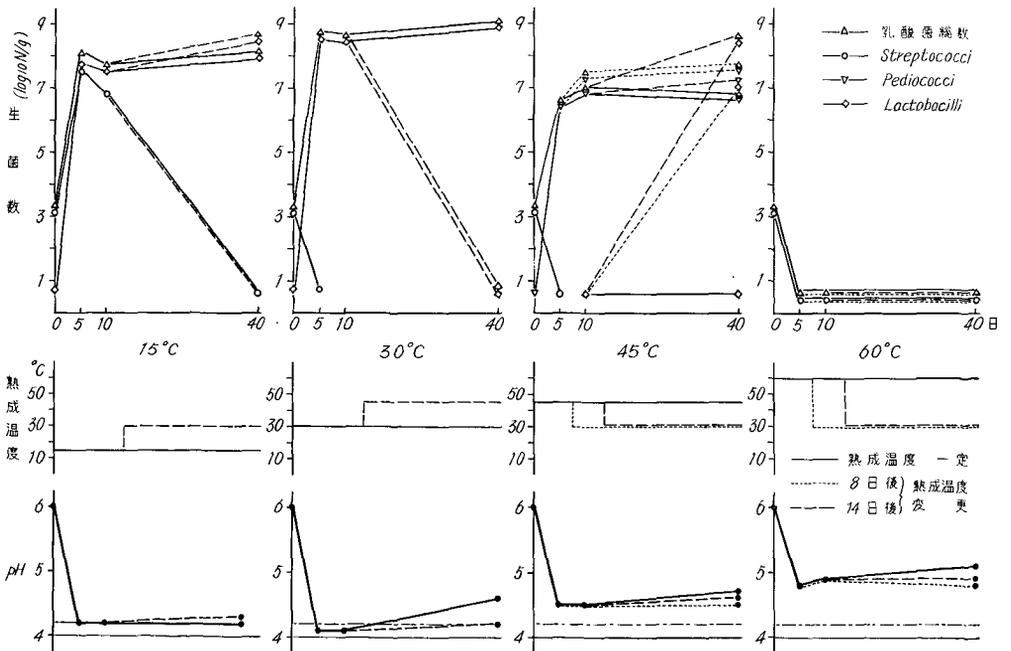
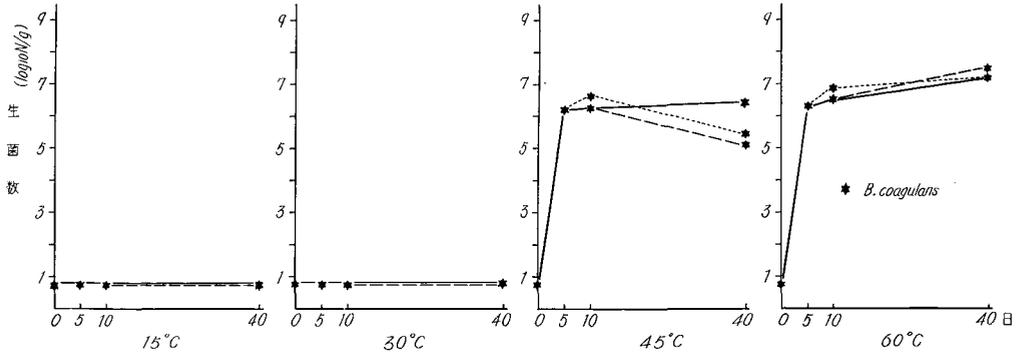
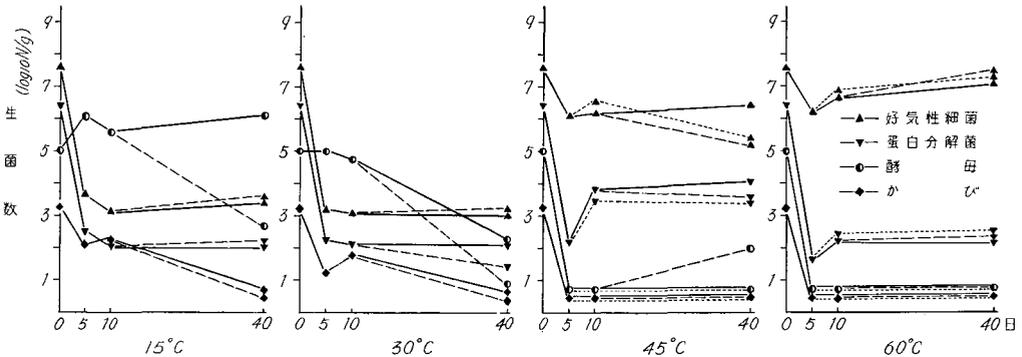


図-7 サイレージ熟成温度と乳酸菌相の遷移との関係



図—8 サイレージ熟成温度と好熱性酸性成菌 (*B. coagulans*) との関係



図—9 サイレージ熟成温度と一般微生物相の遷移との関係

にあった。

熟成温度が45あるいは60°Cの場合には、酵母やかびは急速に減少したが、好気性細菌は *B. coagulans* が増殖するので、全体としては甚だしい減少は見られなかった。また、たとえ *B. coagulans* を酸生成菌として好気性細菌から除外したとしても、蛋白分解菌に相当する数以上の好気性細菌が存在した。ただし、これらの好気性細菌や蛋白分解菌は、いずれも有孢子細菌で、菌数が多い割合に活動しているものは少ないと言う可能性も考えられる。

第3節 原料牧草の細切方法

サイレーズの調製に当たり、原料牧草を細切すれば好結果を得やすいことはすでに述べたが、細切に使用するカッターが異なれば、細切牧草の状態もそれぞれ異なり、単に細切の長さのみでは微生物相との関係を論じ難いと考えられたので、カッターを異にした牧草の細切方法および細切長が、サイレーズの醗酵にどのような影響を与えるかを、微生物学的立場から明らかにしようとした。

a. 方法

いね科、まめ科混播の1番牧草を、次の4つの方法で

刈取、細切して、2屯容の塔型サイロにそれぞれ埋藏し、埋藏当初の原料牧草および取出時のサイレーズの微生物相を調べた。

- i) 無細切： モーアで刈取、ロードワゴンで拾い集めた牧草で、平均草丈90~94 cm。
- ii) フレール型ハーベスター(10 cm)： 細切長を10 cmに調節したダブルカット式フレール型ハーベスターで収穫したもので、この機械で収穫した牧草は、細切のみならず切裂きによる牧草組織の破壊が起こるので、非常に汁液が滲出し易くなると言われている。
- iii) サイレージカッター(3 cm)： モーアで刈取、レーキで集めた牧草を、サイロの側に堆積し、細切長を3 cmに調節した吹上式のサイレージカッターで細切したもの。
- iv) シリンダー型ハーベスター(0.55 cm)： 細切長を0.55 cmに調節したシリンダー型ハーベスターで収穫したもので、試験区中で最も細かく細切したものである。

上記4種の牧草中、モーアで刈取、ロードワゴンで拾

い集めた無細切のものや、フレール型ハーベスターおよびシリンダー型ハーベスターで収穫したものは、収穫から埋蔵までの過程において土砂混入の恐れは少なかったが、刈取運搬後、地上に堆積して吹上式のサイレージカッターで細切埋蔵したものでは、その過程において若干の土砂混入はさけられなかった。

各サイロ共、4人で踏圧しながら埋蔵した後、水蓋で密封加圧し、熟成期間に滲出した汁液は排出した。

埋蔵時期は6月12日、取出時期は10月9日で、熟成期間は約4カ月であった。

b. 結果および考察

細切処理を終えた埋蔵当初の原料牧草および取出時のサイレージの微生物相は、図-10に示した。図中の菌数は、試料1g当たりの生菌数を対数で示してある。

原料牧草で極めて特徴的な現象として、フレール型ハーベスターを用いて細切した牧草で、好気性細菌、蛋白分解菌、かびなどが少なく、酵母が異常に多かったこと、サイレージカッターを用いて細切した牧草で、酪酸菌や好気性有孢子細菌が非常に多かったことが挙げられる。

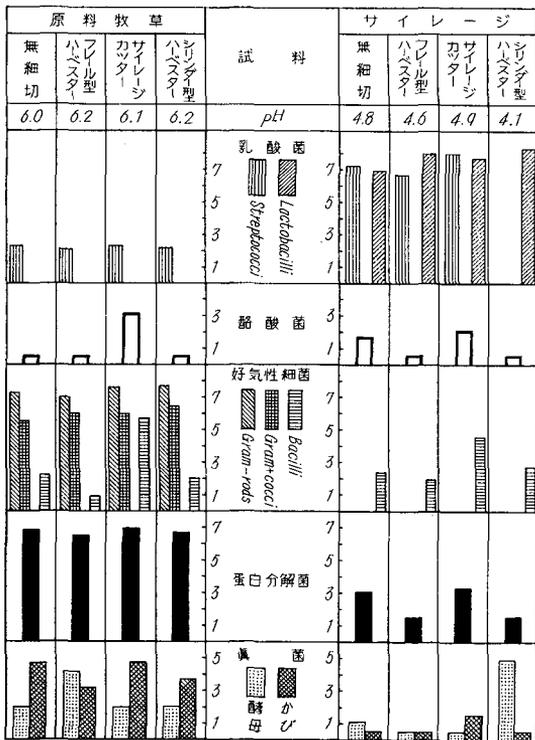


図-10 牧草の細切方法とサイレージの微生物相の関係

フレール型ハーベスターは、前述のごとく、単に刈取、細切のみでなく、牧草組織の破壊により汁液が出易くなると言う特性を有するので、刈取や細切の過程で若干の微生物を汁液と共にハーベスターやカッターにこすり落したり、機械に付着して繁殖していた微生物を混入して来たりして、前述の微生物相の変化が起こったものと推測される。また、サイレージカッターで細切した牧草の場合には、一度モアで刈取った牧草をレーキで集め、地上に堆積した後カッターにかけているので、この間に土砂と共に土壤微生物が混入し、酪酸菌や *Bacillus* 属菌の菌数を増加させたものと考えられる。

このように、同一圃場で殆んど同時に刈取った牧草でも、埋蔵までの処理方法により微生物相が大きく変動することもあり得る。

取出時のサイレージの品質は、シリンダー型ハーベスターで0.55 cmに細切埋蔵したものが最良で、フレール型ハーベスターで10 cmに細切埋蔵したものがこれに次いでいた。無細切のものとサイレージカッターで細切埋蔵したものは、かなり強い酪酸臭を生じ、品質が劣るものであった。

サイレージの微生物相をみると、シリンダー型ハーベスターで細切した牧草を埋蔵したものでは、乳酸菌は生酸性力の強い *Lactobacilli* のみで、酪酸菌、好気性細菌、蛋白分解菌、かびなどの有害菌はどの試験区よりも少なく、最良の品質であることが明らかであった。

フレール型ハーベスターで細切した牧草を埋蔵したものでは、シリンダー型ハーベスターで0.55 cmまで細切埋蔵したもののほどには乳酸菌の繁殖が促進されていなかったが、*Streptococci* よりも *Lactobacilli* の菌数が多く、酪酸菌が殆んど増殖せず、好気性細菌、蛋白分解菌、かびなどの有害菌も少なかったので、pHは4.6と比較的高かったが、品質を低下するには到らなかったものと考えられる。これに反し、無細切のものやサイレージカッターで細切したものでは、*Lactobacilli* よりも *Streptococci* の菌数が多く、酪酸菌が多数存在し、好気性細菌、蛋白分解菌などもかなり多く、十分な乳酸菌酵解が行われていなかったことが明らかである。pHも4.8および4.9といずれも高く、サイレージカッターで細切したものでは、かびも多数検出された。

サイレージカッターで細切した牧草のサイレージの品質は、無細切のものと同程度に劣っていたが、細切処理の段階において、土砂混入などによる有害菌の汚染が防止されていれば、もっと良質なサイレージが出来ていたものと推測される。

第4節 原料牧草の刈取時期

サイレージの品質が、原料牧草により大きく左右されることは言うまでもなく、刈取時期が異なれば、牧草成分のみならず、外界の温度も異なり、これらの要因がサイレージの熟成に大きな影響を与えることは自明のことである。この実験では、牧草の刈取時期とサイレージの品質との関係を微生物学的立場から明らかにしようとした。

a. 方法

いね科、まめ科混播の1番牧草を、次の各時期に刈取り、2~5 cm に細切して15 屯容の塔型サイロに埋蔵し、埋蔵時の原料牧草および取出時のサイレージの微生物相を調べた。

- i) 早刈区 穂孕期 (5月29日刈取)
- ii) 適期刈区 出穂盛期 (6月18日刈取)
- iii) 遅刈区 結実期 (7月8日刈取)

取出時期は、いずれの試験区も11月7日とした。

b. 結果および考察

刈取時期の異なる牧草それぞれの埋蔵当初の微生物相および取出時のサイレージの微生物相は、図-11 に示し

た。図中の菌数は、試料1g 当たりの生菌数を、対数で示してある。

原料牧草において特徴的なことは、刈取時期が遅くなるにつれて、好気性細菌や蛋白分解菌に増加がみられ、酵母やかびにも菌数の増減がみられたことである。このような菌数の増減は、原料牧草の成分差にもよるが、刈取時期の気温の影響も大きいと思われる。

取出時の状態を見ると、早刈牧草のサイレージは水分がかなり多く、甘酸臭を呈し、pH も低く、品質は良好であった。これに反し、遅刈牧草のサイレージは、水分が少なく、ヘイレージに近い感じでpH も6.0 と高く、醗酵は余り進んでいなかった。また、適期刈牧草のサイレージは、水分が両者の中間に位置し、pH は4.6 と早刈牧草のサイレージよりはやや高いが、醗酵はかなり進んでいた

各サイレージの取出時の微生物相を見ると、いずれの試験区でも乳酸菌は Lactobacilli のみとなっていたが、適期刈のサイレージでその数が最も多く、遅刈のもの数は少なかった。

早刈牧草のサイレージでは、乳酸菌が適期刈のものよりもやや少なかったが、酪酸菌、好気性細菌、蛋白分解菌などの有害菌も極めて少なく、pH も低く、品質は最良であった。

適期刈牧草のサイレージでは、乳酸菌が早刈のものよりもやや多かったが、酪酸菌、好気性細菌、蛋白分解菌などの有害菌や酵母も多く、pH がやや高いので、取出時の品質が早刈のものよりまざっているとは言い難かった。

遅刈牧草のサイレージは、乳酸菌数が少なく、pH は6.0 と高く、好気性細菌、蛋白分解菌などの有害菌の菌数が多く、十分な醗酵が行なわれたとは言われなかった。試験区中では水分含量が最も少ないので、これがサイレージの変質を遅延する因子として働いていたとも思われるが、有害菌が多数存在しているこのようなサイレージでは、取出開始後極めて短时日の間に二次醗酵を起し変質する可能性が大きい。

取出時のサイレージの水分含量が異なる理由として、原料牧草の水分含量の差異のほかに、早刈のものでは牧草の組織がやわらかく、加圧によって密着して保水性が良好なのに反し、刈取時期が遅くなるにつれて茎が多くなり、組織も硬化して隙間を生じ、保水性が悪くなって多量の水分を排汁として、流出したことなども考えられる。

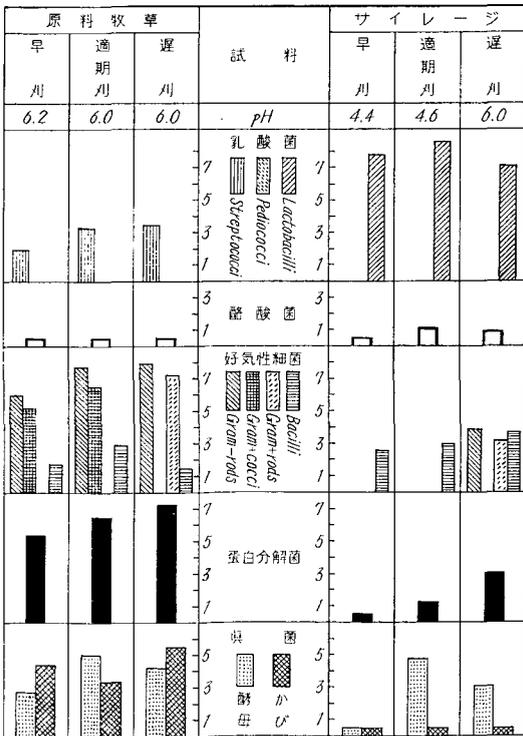


図-11 原料牧草の刈取時期とサイレージの微生物相の関係

第5節 原料牧草の水分含量

埋蔵時における原料牧草の水分含量が、サイレージの品質に大きな影響を与えることは周知の事実であり、高水分牧草を原料とすると酪酸醱酵が起り易く、また排汁中に流亡する固形も多いので、原料牧草は水分70%前後まで予乾するのが良いと言われ、更には醱酵損失を防ぐために極端に水分を減少させ、乾草とサイレージの中間型とも言うべきヘイレージさえつくりされている。しかしながら、今日までの研究を見ると、原料牧草の水分含量とサイレージの醱酵との関係を微生物学的立場から研究したものは皆無に等しく、単に原料牧草の水分含量と自然堆積醱酵にまかせた後で取出したサイレージの品質から、経験的あるいは統計的にこの現象を認識しているに過ぎなかった。

本研究は、原料牧草の水分含量とサイレージの微生物相の変化を明らかにするために、経日的に熟成過程における微生物相、pH、有機酸組成、アンモニア態窒素の変化などを追跡したものである。

a. 方法

いね科、まめ科混播の牧草を刈取、予乾しないもの、軽く予乾したものおよび強く予乾したものを、それぞれ2~5cmに細切して原料牧草とした。

実験用サイロは、5kg容のビニールバキュームサイロを使用、埋蔵量はいずれも5kgとした。

試料採取時期は、埋蔵当初と埋蔵後3, 7, 10, 20, 40日の6回とし、一度開封したサイロはもはや状態が甚だ

しく変わるので、その後の実験には使用しなかった。

試験区分の水分含量は、次の3段階とした。

- i) 無予乾：刈取直後の牧草で水分81.6%。
- ii) 軽予乾：刈取後半日予乾した牧草で、水分72.1%。
- iii) 強予乾：刈取後1昼夜予乾した牧草で、水分59.1%。

なお、埋蔵時期は6月18日、取出時期は7月29日で、この間、実験用サイロはいずれも室内(室温13~24℃)に置いたので、直射日光による加熱の影響は受けていない。また、試料はその都度新しいサイロを開封して採取し、一度開封したサイロの試料は、状態が全く変わってしまうので、その後の実験には使用しなかった。

b. 結果および考察

水分含量の異なる牧草を原料とし、サイレージ熟成過程における微生物とpHの変化を調査し、図-12の結果を得た。

図から明らかなように、原料牧草中の乳酸菌は予乾が進むにつれて減少したが、埋蔵3日後には予乾しなかったものと軽く予乾したものとの間に殆んど差がみられなかった。しかしながら、予乾の程度が増すにつれて、熟成過程における好気性細菌、蛋白分解菌、かびなどの減少速度が著しく遅くなった。

好気性細菌や蛋白分解菌では、予乾により、菌の種類に若干の変動がみられたが、菌数は殆んど減少せず、蛋白分解菌ではむしろ軽く予乾することにより若干菌数が

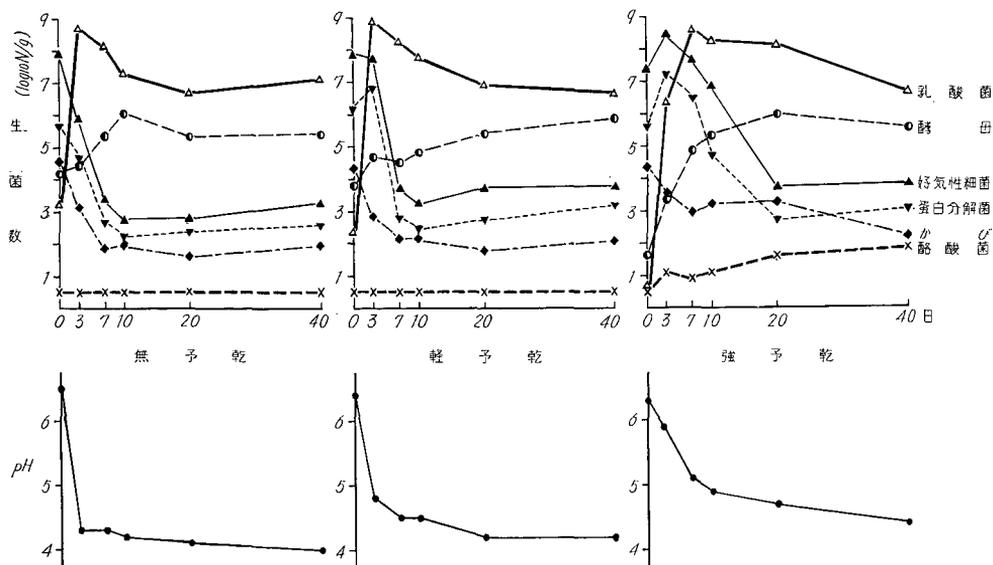


図-12 原料牧草の水分と微生物相の遷移

増加した。かびは、予乾の段階では、菌数、種類共殆んど変化がみられなかった。

強く予乾すると、牧草に附着していた乳酸菌は殆んど死滅した。そのため、これを原料としたサイレージでは乳酸菌の増殖が著しく緩慢となり、むしろそれに先んじて埋蔵3日後には好気性細菌や蛋白分解菌が一時的に増殖し、その後のこれらの菌数の減少速度も無予乾、軽予乾に比し著しく緩慢となった。

pHの低下速度は、上記の菌相の動きを頗るよく表わしており、刈取直後の牧草を原料とした無予乾区で最も早く、予乾の程度が増すにつれて遅くなった。これは予乾により原料牧草の乳酸菌数が減少し、乳酸菌の増殖が遅れたためであることは明らかである。

サイレージの醗酵に有害な酪酸菌は、無予乾および軽予乾のものよりも強予乾のもので増殖しており、高水分牧草のサイレージが熟成過程に酪酸醗酵に傾き易いとの今までの多くの研究者の説とは相反する事実を明らかにした。

一般にみられるサイレージの酪酸醗酵には、二つの場合が考えられる。その一つは埋蔵処理の不備、原料牧草の炭水化物の不足、予乾過多などから、埋蔵初期の酪酸醗酵が遅れ、熟成過程にpHが酪酸菌の発育限界である4.2まで低下しなかった場合に起こるもので、この場合には取出開始時にすでに酪酸醗酵はかなり進んでおり、埋蔵方法の改善、炭水化物の添加などによる酪酸醗酵の促進以外に防止法は見当たらない。ただし、低水分のサイレージでは、微生物相の遷移が緩慢なので、pHの低下が不十分で酪酸菌が若干増殖していても、害作用が顕著に現われる以前に家畜への給与が終わってしまい、高水分サイレージ程に害作用の認められない場合も多いとみられる。

他の一つは、取出開始時には頗る良質なサイレージであるにもかかわらず、給与中に二次的に酪酸醗酵が起こる場合である。これは、取出開始によりサイロ内に空気が侵入するので、残存していた好気性菌が一斉に増殖を始め、乳酸を消費すると同時に蛋白質やアミノ酸を分解

表一 熟成過程における有機酸組成とアンモニア態窒素の変化

| 処理区分 | 熟成日数 | pH | 有機酸組成 (%) | | | 揮発酸内訳 (mg %) | | | NH ₃ -N / Total N (%) |
|------|------|------|-----------|------|------|--------------|--------|-------|----------------------------------|
| | | | 総酸 | 不揮発酸 | 揮発酸 | 酢酸 | プロピオン酸 | 酪酸 | |
| 無予乾 | 0 | 6.5 | | | | | | | |
| | 3 | 4.3 | 1.29 | 1.06 | 0.23 | 221 | 7 | 2 | 3.69 |
| | 7 | 4.3 | 1.91 | 1.62 | 0.30 | 280 | 13 | 2 | 5.61 |
| | 10 | 4.2 | 1.92 | 1.62 | 0.30 | 288 | 8 | 2 | 5.85 |
| | 20 | 4.1 | 2.12 | 1.83 | 0.29 | 281 | 5 | — | 6.00 |
| 40 | 4.0 | 1.79 | 1.51 | 0.28 | 269 | 9 | — | 6.85 | |
| 軽予乾 | 0 | 6.4 | | | | | | | |
| | 3 | 4.8 | 1.76 | 1.46 | 0.31 | 301 | 4 | — | 5.34 |
| | 7 | 4.5 | 2.55 | 2.17 | 0.38 | 358 | 21 | — | 7.79 |
| | 10 | 4.5 | 2.81 | 2.37 | 0.43 | 422 | 11 | — | 9.25 |
| | 20 | 4.2 | 2.96 | 2.56 | 0.40 | 387 | 12 | — | 9.06 |
| 40 | 4.2 | 2.08 | 1.70 | 0.37 | 347 | 13 | 19 | 10.80 | |
| 強予乾 | 0 | 6.3 | | | | | | | |
| | 3 | 5.9 | 1.98 | 1.64 | 0.34 | 332 | 9 | — | 3.56 |
| | 7 | 5.1 | 2.67 | 2.24 | 0.42 | 406 | 17 | — | 6.38 |
| | 10 | 4.9 | 2.40 | 2.00 | 0.40 | 388 | 9 | — | 7.87 |
| | 20 | 4.7 | 3.26 | 2.55 | 0.44 | 416 | 11 | 8 | 7.52 |
| 40 | 4.4 | 2.55 | 2.14 | 0.40 | 343 | 9 | 51 | 8.81 | |

し、その結果、pHが酪酸菌の発育限界である4.2以上に上昇し、更にこれらの好気菌の増殖が部分的に強度の嫌気の状態をつくり出し、酪酸菌の増殖を促進するものと考えて間違いないだろう。

熟成過程における有機酸組成、アンモニア態窒素などの追跡結果は、表-2に示した通りで、サイレージ中の有機酸量は、埋蔵初期から乳酸菌のよく繁殖した無予乾区よりも、乳酸菌の発育の遅れた軽予乾区や強予乾区の方が多かった。しかしながら、予乾したものではアンモニア態窒素の生成量も多く、生酸量の多少が直接pHの低下に結びつかなかった。

強予乾区では、埋蔵3日後の乳酸菌が未だ十分に増殖していない時期に、すでに多量の有機酸を生じ、不揮発酸量も無予乾区や軽予乾区よりも多かった。この現象は乳酸菌が乳酸を生成してサイレージのpHを低下させるとの考えとは一見矛盾するかの感を与えるが、軽予乾区では埋蔵3日後、強予乾区では埋蔵10日後まで大腸菌群の発育が旺盛で、これらの菌が有機酸生成の役割をはたしていたことは明らかである。

大腸菌群は、ヘテロ型の酸酵を行ない有機酸を生成するが、ペプチドやアミノ酸を分解してアンモニア態窒素を生じたり、メチル・レッド・テスト陰性と言われる程pH低下力の弱いものもあって、これらの菌の生酸力のみでは、例え生成される有機酸量が多くても、同時に生ずる揮発性塩基化合物と結合してしまうため、ホモ型の乳酸菌のような強力なpHの低下は期待し得ない。

以上の結果から、生牧草を原料としたサイレージの品質は、予乾して埋蔵したサイレージにまさるとも劣らぬものであることは明らかであり、給与開始後は毎日一定量ずつ取出し、空気との接触部分に好気菌が繁殖するのを出来るだけ防止し、二次酸酵が起こらぬよう注意すれば、原料牧草の予乾を行わずに大量のサイレージを調製しても、常に良質なサイレージを家畜に給与することは可能と言えよう。

第6節 サイロの種類

サイレージを貯蔵するサイロには、塔型サイロ、バンカーサイロ、トレンチサイロ、スタックサイロなど古くから使用されているサイロの外に、近年、ステンレススチールを用いた真空サイロや合成樹脂のフィルムを用いたビニールバキュームサイロなどが使用されるようになり、更に飼料運搬の便を考えてコンテナサイロなるものの開発も行なわれている。

これらのサイロには、経済性、作業性あるいは出来るサイレージの品質などの上にそれぞれ一長一短があって

一概にどの型のサイロを用いるのが良いとは言い難い。

この実験では、従来の塔型サイロや安価でどこでも出来るスタックサイロと、近年使用され出したビニールバキュームサイロに埋蔵したサイレージの比較、塔型サイロに若干の改造を加えるのみで、真空サイロに近い能力を発揮させ得ないかどうか、また、ビニールバキュームサイロ使用時の原料牧草予乾の効果などを微生物学的立場から研究した。

a. 方法

いね科、まめ科混播の1番牧草を刈取、5~10cmに細切し、次に示す5つの方法で埋蔵し、埋蔵当初の牧草の微生物相、pH、飼料成分ならびに取出時のサイレージの外観、微生物相、pH、有機酸組成、アンモニア態窒素、飼料成分などを調べた。

実験に使用したサイロの略図は、図-13に示した。

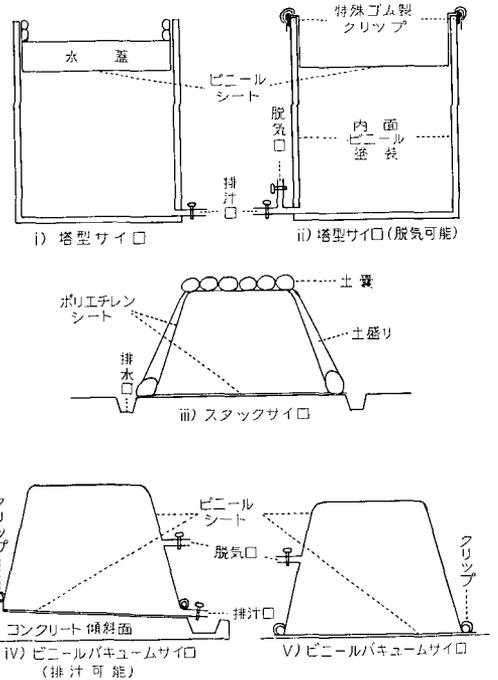


図-13 使用サイロの略図

i) 塔型サイロ、排汁 (図-13, i)

直径120cm、高さ180cmの実験用コンクリート製塔型サイロに 牧草1,248kgを3人で踏圧しながら埋蔵、水蓋をして密封加圧(水約100ℓ)、熟成過程に出て来る汁液は、下部の排水口から排出、汁液が出なくなった時期に排水口のバルブを閉じ、密封保存した。使用牧草の水分は平均84.4%であった。

ii) 塔型サイロ、バキューム、排汁

i) と同じ大きさの実験用コンクリートサイロの内面をビニールで塗装、図-13, ii) に示した通り、ビニールの被いを完全に固定出来るように上部に特殊のゴムクリップをつけると同時に、下部排汁口をT字型とし、それぞれの枝にバルブをつけ、その一つを排汁口、他の一つを脱気口として使用したもので、この装置は北海道農業試験場草地部第5研究室で試作したものである。

埋蔵方法は、最初サイロの上部まで細切牧草を投入、ビニールの被いをクリップで固定し、脱気口から搾乳用の真空ポンプで脱気、容積が半分以下になるまで牧草が沈下した後に、上部のビニールをはずし、再び牧草を投入、牧草が一杯になった後にビニールで被って更に脱気を行なった。牧草が十分に気密状態になったと思われる時点で脱気バルブを閉じ、気密状態を保った。

熟成2日後には、ガスを発生し、ビニールの被いがふくらむ状態になったので排汁を開始し、汁液と一緒に一部のガスも排出した。汁液が出なくなった時期に排汁口を閉じて密封状態を保った。埋蔵量は1,232 kgで、使用牧草の水分は、平均84.3%であった。

iii) スタックサイロ (図-13, iii)

厚さ0.1 mmのポリエチレンフィルムを地上に敷き、その上に木枠を組み、その中に細切牧草4,660 kgを5人で踏圧しながら入れ、十分踏圧後木枠をはずし、側面および上部をポリエチレンのシートで被い、約20 kgの土嚢45袋を上のにのせ、側面下部は空気が侵入しないように土嚢をならべ、側面に土をかぶせ直射日光をさえぎった。使用牧草の水分は、平均85.1%であった。

iv) ビニールバキュームサイロ、排汁

図-13, iv) に示したごとく、コンクリートのゆるい傾斜面に厚さ0.2 mmのビニールシートを敷き、その上に木枠を組み牧草2,745 kgを投入、形がくずれない程度に踏圧した後、脱気口、排汁口をつけた市販のビニールバキュームサイロ用の箱型シートをかぶせ、空気が侵入しないように下部をクリップで止めた後、排汁口を閉じ、脱気口から搾乳用真空ポンプを用いて脱気、牧草の体積が半分以下に圧縮され、十分脱気された状態になった後脱気口を閉じ密封した。熟成2日後にはガスを発生し、ビニールの被いがふくらむ状態となったので、排汁口を開き、汁液が出なくなった時期に排汁口を閉じて密封状態を保った。使用牧草の水分含量は、平均86.0%であった。

v) ビニールバキュームサイロ、予乾

図-13, v) に示したごとく、地上に厚さ0.2 mmのビニールシートを敷き、その上に木枠を組み2,350 kgの軽く

予乾した細切牧草を投入、形がくずれない程度に踏圧した後、脱気口をつけた市販の青黒色箱型のビニールバキュームサイロをかぶせ、空気が侵入しないように下部をクリップで止め、脱気口から搾乳用真空ポンプで脱気し牧草の体積が半分以下に圧縮され、十分に脱気が行なわれた状態になった後、脱気口を閉じ密封した。

熟成2日後にはガスを発生し、ビニールの被いがふくらんだが、そのまま放置したところ次第にふくらみは少なくなった。使用牧草の水分は、平均79.6%であった。

埋蔵時期は5月30日、取出時期は10月17日で、熟成期間は、約4.5カ月であった。

b. 結果および考察

サイレージ取出時の品質は、肉眼的観察その他の官能検査によれば、塔型サイロを用いて脱気したものが最良で、塔型サイロに通常の方法で埋蔵したもの、ビニールバキュームサイロに埋蔵排汁したものの順でこれに次ぎ、予乾牧草をビニールバキュームサイロに埋蔵したものは黒緑色炭化している部分が多く、酪酸臭が強く品質は最も劣っていた。

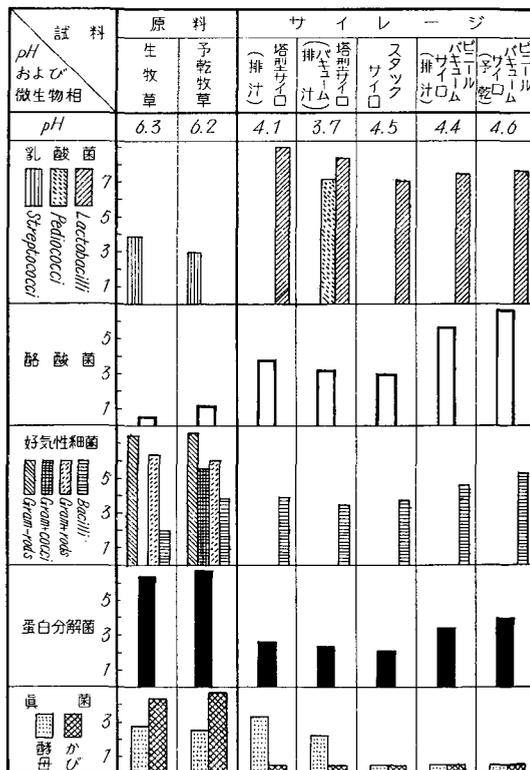


図-14 サイロの種類および埋蔵法の差異と微生物相の関係

スタックサイロに埋藏したものは、側面下部のかなりの部分が堆肥状となり、廃棄せざるを得ない状態となったが、変質部分を除くと、品質は特に劣るものとは考え難かった。

塔型サイロに通常の方法で埋藏したものは、水蓋の不備による漏水がわずかながら認められた。従って、この漏水がなかったならば、更に良質なサイレージとなっていた可能性が大である。

埋藏当初の原料生牧草および予乾牧草の微生物相、ならびに取出時のサイレージの微生物相は、図-14 に示した通りで、図中の菌数は試料 1g 当たりの生菌数を対数で示したものである。

牧草予乾過程における微生物相の変化をみると、予乾により乳酸菌は約 1/10 に減少し、酪酸菌が増加した。乳酸菌の減少は菌の死滅によるもの、酪酸菌の増加は予乾過程における土砂の混入によるところが大きいと考えられる。

好気性細菌、蛋白分解菌および酵母では、予乾過程において菌数に大きな変化はみられなかったが、グラム陽性球菌の出現、*Bacillus* 属菌の著しい増加など、菌相の上には、かなりの変化が観察された。

取出時のサイレージの乳酸菌相をみると、塔型サイロを用いて脱気したものでは *Lactobacilli* と *Pediococci* が混在していたが、その他の方法で埋藏したサイレージでは *Lactobacilli* のみが検出された。乳酸菌数は、塔型サイロ使用の 2 試験区が、スタックサイロやビニールバキュームサイロ使用のものよりも多かった。

酪酸菌は、予乾後脱気したもので最も多く、熟成過程において活発な酪酸醗酵が起こっていたことを示している。また、生牧草をビニールバキュームサイロに埋藏したもので、酪酸菌の増殖は顕著であった。

塔型サイロやスタックサイロに埋藏したものでは、酪

酸菌は前 2 者程著しい増殖は示さなかった。

好気性細菌や蛋白分解菌についてみると、ビニールバキュームサイロ使用の 2 者は、他のものに比べ菌数が多く、この点からも良好な熟成過程をたどったものとは言えなかった。

酵母は塔型サイロ使用のものに多く、ビニールバキュームサイロおよびスタックサイロ使用のものでは、殆んど検出されなかった。これは熟成期間が夏の最も暑い時期にまたがり、両サイロは共に直射日光を浴びる戸外に放置され、熟成期間を通じかなり高温に保たれたため、酵母の繁殖が抑制されたものであろう。特にビニールバキュームサイロは、青黒色の日光を吸収し易い色調で、日照時には表層部が 50°C を越えることもしばしばで、サイレージの醗酵には好ましい条件でなかった。

かびは各試験区で殆んど差がみられず、いずれもサイレージ 1g 当たりの菌数は 10 以下に止まった。ただし、塔型サイロでは上層の一部に、スタックサイロでは側面下方の一部にかびが発生し、廃棄せざるを得ない部分を若干生じた。

各サイロから取出したサイレージの有機酸組成およびアンモニア態窒素の値は、表-3 に示した。表から明らかごとく、ビニールバキュームサイロに埋藏したものは、酪酸生成量が多く、予乾牧草をビニールバキュームサイロに埋藏したものの酪酸量は特に多かった。

スタックサイロに埋藏したサイレージでは、揮発酸量は多かったが、酪酸の占める割合は、ビニールバキュームサイロのものよりも少なかった。

塔型サイロに埋藏したサイレージでは、酪酸菌数がスタックサイロのものとはほぼ同じであったにもかかわらず酪酸量は著しく少なかった。これは塔型サイロでは排汁を行なっているため、生成した酪酸の一部が排汁と一緒に流亡したためと考える。

表-3 有機酸組成並びにアンモニア態窒素

| 埋藏法 | pH, 酸組成 NH ₃ -N | pH | 有機酸組成 (%) | | | 揮発酸内訳 (mg %) | | | NH ₃ -N Total N (%) |
|-------------------|-------------------------------|-----|-----------|------|------|--------------|--------|-----|--------------------------------------|
| | | | 総酸 | 不揮発酸 | 揮発酸 | 酢酸 | プロピオン酸 | 酪酸 | |
| 塔型サイロ (排汁) | | 4.1 | 2.15 | 1.18 | 0.97 | 902 | 60 | — | 7.39 |
| 塔型サイロ, バキューム (排汁) | | 3.7 | 2.52 | 2.02 | 0.50 | 403 | 51 | 43 | 9.06 |
| スタックサイロ | | 4.5 | 2.05 | 0.60 | 1.45 | 995 | 219 | 199 | 9.39 |
| ビニールバキュームサイロ (排汁) | | 4.4 | 2.20 | 0.88 | 1.32 | 588 | 150 | 434 | 13.43 |
| ビニールバキュームサイロ (予乾) | | 4.8 | 2.35 | 0.89 | 1.46 | 373 | 128 | 860 | 12.59 |

表-4 養分回収率(%)

| 成 分 埋 蔵 法 | 乾物量 | 可消化 乾物量 | 可消化 粗蛋白質 量 | 可消化 養分総 量 |
|----------------------|------|------------|------------------|-----------------|
| 塔型サイロ(排汁) | 67.0 | 62.0 | 74.9 | 69.1 |
| 塔型サイロ、バキ ューム(排汁) | 73.1 | 69.0 | 67.7 | 75.8 |
| スタックサイロ | 57.5 | 49.0 | 60.9 | 52.5 |
| ビニールバキュー ムサイロ(排汁) | 63.9 | 57.9 | 63.8 | 63.9 |
| ビニールバキュー ムサイロ(予乾) | 76.1 | 59.0 | 60.6 | 60.8 |

熟成を終えた各サイレージの腐敗部分を除去し、養分回収率を求め、乾物回収率と比較すると表-4のごとくである。表から明らかなように、乾物回収率は、予乾牧草をビニールバキュームサイロに埋蔵した場合に最高となったが、この方法で調製したサイレージは、可消化養分の回収率が悪く、適当なサイレージ調製法とは考え難かった。

可消化養分総量の回収率は、塔型サイロを用いて脱気したものが最良で、塔型サイロで排汁したもの、ビニールバキュームサイロで排汁したもの、予乾牧草をビニールバキュームサイロに埋蔵したものの順となった。スタックサイロに埋蔵したものは、変質部を除くと、品質は予乾牧草をビニールバキュームサイロに埋蔵したものよりもすぐれていると考えられたが、廃棄部が多いため回収率の低下はまぬがれ得なかった。

ビニールバキュームサイロに埋蔵したサイレージは、肉眼的にかびの発生の認められる部分が少ないので、熱変性や細菌による変質が起こっているにもかかわらず、調製されたサイレージの殆んどすべてが家畜に給与されているのが現状である。従って、ともすればビニールバキュームサイロの使用によって廃棄部の少ない良質なサイレージが出来ると考えられがちである。今後この方法が広く普及され、覆いもかけずに直射日光下に放置される状態での使用が行なわれるものとなれば、サイレージは高温醗酵による変質や品質低下を起こし、表-4にみられるごとく、可消化養分回収率の低いサイレージとなることに留意すべきである。

予乾牧草をビニールバキュームサイロに埋蔵する場合には、予乾過程において乳酸菌が減少し、乳酸醗酵が遅れるので、有害菌の醗酵熱と直射日光による加熱が相乗的に働き、今回みられたような、養分回収率の悪い黒変炭化した劣質のサイレージを生ずる危険が大きい。

第7節 添加物の影響

サイレージの品質を改善するものとして、今日までに推奨された添加物の種類は相当の数にのぼるが、それらの添加物についての研究の多くは、埋蔵時の添加量と取出時の品質との関係を統計的に観察、あるいは熟成過程における成分変化を追跡調査して効果を論じているに過ぎず。これを微生物学的立場から研究しているものは殆んど見当たらない。

この実験では、種々の添加物の中から、代表的なものを選び実際にサイレージを調製し、添加物がサイレージの熟成にどのような効果をもたらすかを、微生物学的立場から調べた。

実験1 各種添加物と微生物相の関係

この実験は、今日使用されている添加物の中から、代表的なものとして、ふすま、糖蜜、Kofa、サイロトラスリン、塩酸、SMSの6種を選び、添加物を加えない生牧草および予乾した牧草を対照としてサイレージを調製しその効果を調べたものである。

a. 方法

レッドクローバー 90%、オーチャードグラス 10% 混播の1番牧草を刈取、2~5 cmに細切して、500 kg容の半地下式木製実験用サイロに、次に示した試験区ごとに450 kg前後埋蔵し、原料牧草、埋蔵1日後および熟成125日のものから試料を採取し、微生物相、pH、有機酸組成、熟成過程における養分損失などを調べた。

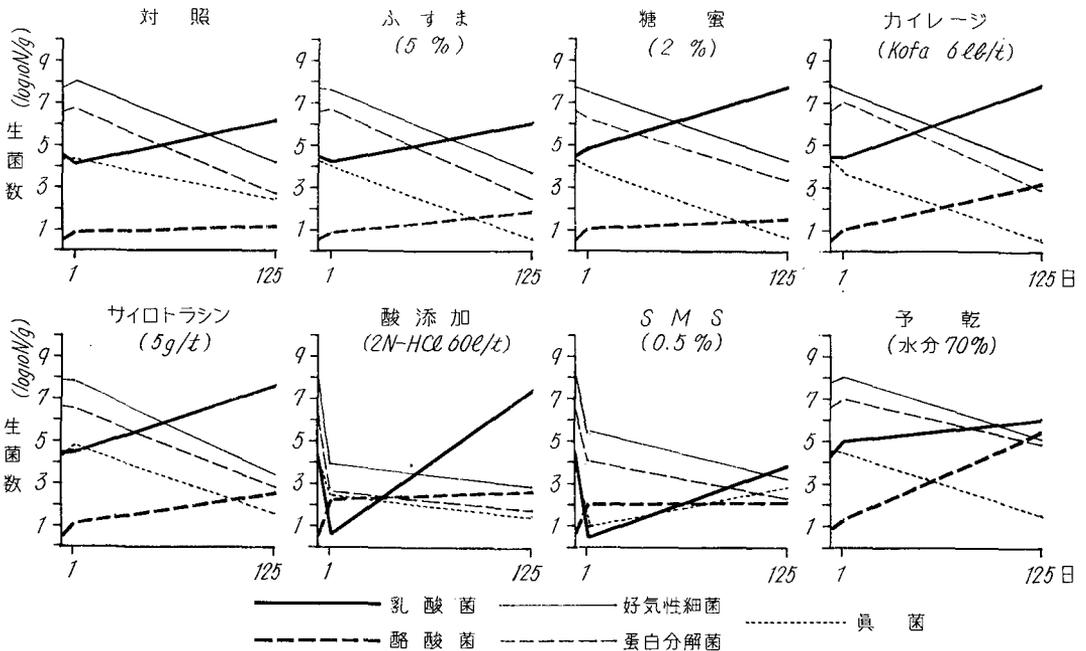
- i) 対照区：細切直後の生牧草(水分84.5%)。
- ii) ふすま添加区：原料牧草に、ふすまを5%添加。
- iii) 糖蜜添加区：原料牧草に、糖蜜を2%添加。
- iv) カイレージ(Kylage)区：Kofa(Ca-formateとNa-nitrateとの混合剤)を、原料牧草1屯当たり6ポンドの割合で添加。
- v) 抗生物質添加区：サイロトラスリン(Zn-bacitracin)を、原料牧草1屯当たり5gの割合で添加。
- vi) 酸添加区：原料牧草に塩酸(2N-HCl)を添加して、埋蔵1日後のpHが4.0になるようにした(添加量60ℓ/屯)。
- vii) SMS添加区：原料牧草に、焦性亜硫酸ソーダ(Na-meta-bisulfite)を0.5%添加。
- viii) 予乾区：軽く予乾(水分72.4%)した牧草を原料とした。

b. 結果

熟成を終えたサイレージの外観、pH、有機酸組成は

表—5 添加物とサイレージの品質との関係

| 処 理 区 分 | 外 観 | pH | 有機酸組成 (%) | | | |
|-------------------------|--------------------|-----|-----------|------|------|-------|
| | | | 総酸 | 不揮発酸 | 揮発酸 | 揮発酸総酸 |
| 対 照 | 暗緑黄色, 甘酸臭 | 4.2 | 1.38 | 0.94 | 0.44 | 32 |
| ふ す ま 5% | 淡緑黄色, 甘酸快臭 | 3.8 | 1.98 | 1.55 | 0.43 | 22 |
| 糖 蜜 2% | 淡緑褐色, 甘酸臭 | 3.8 | 1.88 | 1.49 | 0.39 | 21 |
| カ イ レ ー ジ Kofa 6lb/t | 淡緑黄色, やや刺戟性甘酸臭 | 4.2 | 1.44 | 1.01 | 0.43 | 30 |
| サイロトランシ 5g/t | 淡褐緑黄色, やや刺戟性甘酸臭 | 4.2 | 1.36 | 0.87 | 0.49 | 36 |
| 酸 添 加 pH4.0 | 黄緑色, 甘酸臭, 良好 | 4.0 | 1.12 | 0.69 | 0.43 | 38 |
| SMS 0.5% | 緑オリブ色, 軽い甘酸草臭 | 4.3 | 1.01 | 0.78 | 0.23 | 22 |
| 予 乾 水分70% | 暗緑褐色, アンモニア臭を伴なう酸臭 | 5.4 | 1.00 | 0.74 | 0.26 | 26 |



図—15 サイレージの添加物と微生物相の関係

表-5に示した通りで、ふすま添加区と糖蜜添加区は生酸量が多く、pHの低下も品質も良好であった。酸添加区は、埋蔵時に塩酸でpHを低下させたので、微生物による有機酸生成量は少なかったが、品質は頗る良好であった。

予乾したものは、酸生成量が少なく、従ってpHが高く、アンモニア臭が感じられ、最も劣質のサイレージであった。

微生物相の変化は、図-15に示した。

埋蔵時期が6月12日で品温が低かったため、酸添加、

SMS添加の2試験区以外は、埋蔵1日後では微生物相に大きな変化がみられなかった。熟成終了時には、いずれの試験区も乳酸菌が増加し、好気性細菌、蛋白分解菌、酵母およびかびが減少した。

無添加の対照区や予乾区では、埋蔵1日後には好気性細菌や蛋白分解菌の一時的増殖が認められた。熟成後の両試験区を比べると、予乾牧草のサイレージでは有害菌が多く、 3.5×10^5 /gにもおよぶ好気性細菌が残存し、酪酸菌の著しい増殖が起っていた。従って、予乾牧草でつくったサイレージの品質の劣化は、これらの有害菌が

原因をなしたものであることは明らかである。

酸添加区やSMS添加区では、埋蔵1日後の乳酸菌、好気性細菌、蛋白分解菌などの減少が著しく、酸添加区ではその後乳酸菌は増殖したが、その他の菌は更に減少した。SMS添加区では、埋蔵1日後には酸添加区ほど顕著な菌数の減少がみられなかったが、熟成終了時にも乳酸菌数が少なく、酸添加法が有害菌の増殖は抑制しても乳酸菌の増殖は抑制しないのに反し、SMS添加法はすべての菌の増殖を抑制することが明らかとなった。

カイレージやサイロトラシン添加区では、無添加の対照区との間に大きな差はみられず、酪酸菌の抑制も十分でなく、これらの微生物発育抑制剤が、特にすぐれた添加物とは言われなかった。

熟成後のサイレージを家畜に給与し、嗜好性を調べた結果、ふすま添加のものが最良で、次いで糖蜜添加、酸添加の順となった。熟成過程における養分損失、特に飼料として重要な蛋白質の損失は、カイレージ区、酸添加区およびSMS添加区がそれぞれ2%で最も少なく、牧草の色調も良好であったが、カイレージ区やSMS添加区のカイレージは家畜の嗜好性が悪く、乳酸菌の発育が抑えられているため、pHも高く、取出開始後の変質が早いと言う欠点がみられた。

予乾区は、養分損失が甚だしく、嗜好性も最下位であった。

実験2 乳酸菌接種の効果

サイレージ埋蔵時における乳酸菌の接種効果については、有効、無効の両説があって、未だ満足すべき結論は得られていない。

この実験では、細切した生牧草をそのまま埋蔵したサイレージ、および実験1で成績の良かったふすま添加サイレージを対照として、乳酸菌接種の効果をはっきりとすると共に、殺菌剤としてのクロールピクリンの効果、ならびに従来のサイレージとは若干性質の異なる半乾草(水分65および55%)を原料とした、いわゆるヘイレージの微生物相の解明などを目的とした。

a. 方法

レッドクローバー、ホワイトクローバー、オーチャードグラス混播のまめ科混入率65%の牧草を刈取、2~5cmに細切して原料とした。

サイロは、実験1で用いた木製半地下式の500kg容のもの4基、1,500kg容のコンクリート製塔型サイロ2基で、予乾しない牧草を原料とした4試験区には前者を半乾草を原料としたヘイレージ2試験区には後者を用いた。

試験区分は次の6試験区とし、原料牧草、埋蔵1日後および92日熟成を行なわせたものから試料を採取し、微生物相、pH、有機酸組成、熟成過程における養分損失などを調べた。

- i) 対照区：細切直後の生牧草(水分82%)を原料とした。
- ii) 乳酸菌接種区：グラスサイレージから分離した *Streptococcus lactis*, *St. faecalis* および *Lactobacillus plantarum* の3種を、それぞれ32°Cで4日間液体培養した後、等量ずつ混和した液を原料牧草350kgに3ℓの割合で出来るだけ均一に接種した。
- iii) ふすま添加区：原料牧草に、ふすまを5%添加した。
- iv) クロールピクリン添加区：原料牧草400kgにクロールピクリンの80%二塩化プロパン液600mlを徐々に注入添加した。
- v) ヘイレージ、水分65%区：水分が65%になるまで、予乾した牧草を原料とした。
- vi) ヘイレージ、水分55%区：水分が55%になるまで予乾した牧草を原料とした。

b. 結果

熟成を終えたサイレージの外観、pH、有機酸組成は、表-6に示した通りで、無添加の対照区や乳酸菌接種区、ふすま添加区は、pHが4.0以下に低下し品質が良好であった。

クロールピクリン添加区は、クロールピクリンの殺菌作用により、微生物の有機酸生成が著しく阻害され、その上刺激性の薬品臭のため品質は良くなかった。

強く予乾した牧草を埋蔵したヘイレージは、生酸量が多いにもかかわらずpHの低下が不十分でタバコ臭が感じられた。特に、水分55%のヘイレージでは、かびや放線菌が層状に発育し、品質が不良であった。

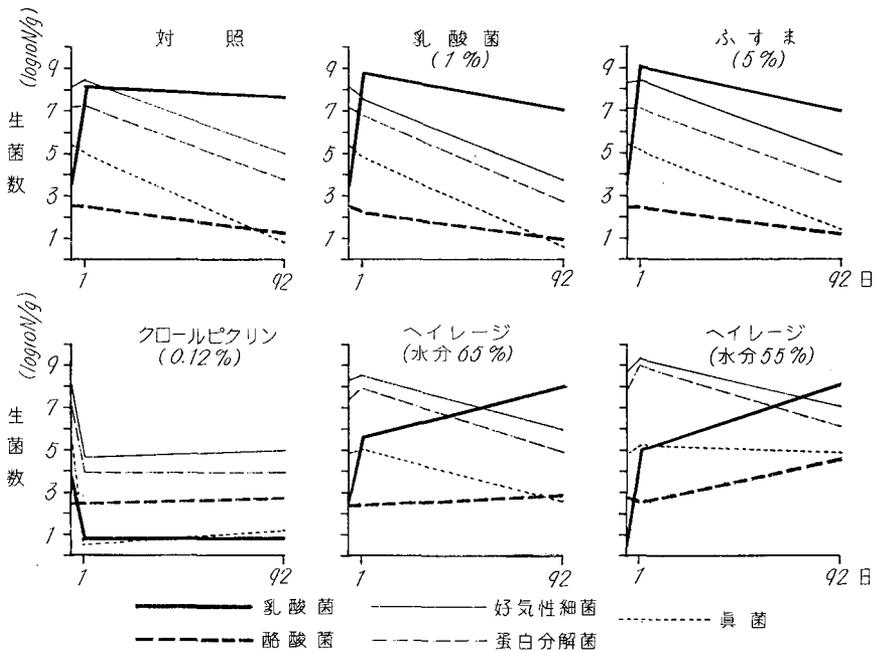
微生物相の変化は、図-16に示した。

埋蔵時期は8月13日で、気温が高く、牧草は刈取細切、運搬の過程で発熱を始める程で、実験1に比べ熟成初期の品温はかなり高い値で経過した。その結果、乳酸菌数は埋蔵後1日で著しく増加し、実験1とは乳酸菌の増殖速度が異なっていた。

対照区およびふすま添加区を、実験1の場合と比べると、実験1では酪酸菌がやや増加したのに反し、実験2では酪酸菌の減少が認められた。しかしながら、好気性細菌、蛋白分解菌などの減少傾向には殆んど差が見られなかった。

表—6 乳酸菌接種その他各種処理サイレージの酸生成状況

| 処 理 区 分 | 外 観 | pH | 有機酸組成 (%) | | | | 取出時の品温 (°C) |
|----------------|--------------------|-----|-----------|-------|-------|---------|-------------|
| | | | 総 酸 | 不 揮 酸 | 揮 発 酸 | 揮 発 酸 総 | |
| 対 照 | 淡黄緑褐色, 甘酸, わずかに刺戟臭 | 3.8 | 1.40 | 1.05 | 0.35 | 25 | 6.4 |
| 乳 酸 菌 1% | 淡黄緑褐色, 甘酸 | 3.9 | 1.37 | 1.05 | 0.32 | 23 | 7.5 |
| ふ す ま 5% | 淡緑黄褐色, 甘酸芳香 | 3.6 | 1.18 | 0.81 | 0.37 | 31 | 8.0 |
| クロールピクリン 0.12% | 淡暗緑褐色, クロールピクリン臭あり | 4.6 | 0.31 | 0.23 | 0.08 | 26 | 8.1 |
| ヘイレージ 水分 65% | 淡緑黄色, 甘酸, タバコ臭あり | 4.4 | 3.83 | 3.00 | 0.83 | 22 | 13.0 |
| ヘイレージ 水分 55% | 淡黄緑色, 甘酸, タバコ臭あり | 5.0 | 3.62 | 2.62 | 1.00 | 28 | 18.0 |



図—16 乳酸菌接種その他各種処理サイレージの微生物相

乳酸菌接種区は、対照区やふすま添加区に比べ、すべての有害菌の減少量が多く、微生物相の上からも良質なサイレージとなっていることが立証された。

クロールピクリン添加区は、埋蔵1日後に菌数が急速に減少し、その後は菌数に殆んど変化がみられなかった。

強く予乾したヘイレージでは、埋蔵1日後には好気性細菌や蛋白分解菌の増殖が認められ、これらの菌は熟成後にもかなり高い菌数で残存した。また、乳酸菌は予乾の強いもの程増殖が遅れ、水分55%ヘイレージでは、酪酸菌の増殖も認められた。

微生物相の遷移を更に詳細にみると、乳酸菌接種区では、埋蔵1日後にすでに接種した *L. plantarum* の増

殖が認められ、pHは5.1と試験区中の最低値を示し、熟成後は対照区やふすま添加区よりもやや高めpHに止まったが、養分損失が少なく、家畜の嗜好性は最良であった。

ふすま添加区は、埋蔵1日後には *St. faecalis* *St. lactis* などの乳酸球菌が多く、熟成後には *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei* などの乳酸桿菌が見られた。養分損失は乳酸菌接種区と同様極めて少なく、家畜の嗜好性も乳酸菌接種区に次いで良好であった。

対照区の乳酸菌の遷移は、ふすま添加区に近似していたが、サイレージはわずかに刺戟臭があり、家畜の嗜好性は前の2者よりも劣っていた。

クロールピクリン添加区は、埋蔵後1日で殆どどの微生物が死滅し、有孢子細菌を残すのみとなり、その後もこの微生物相に著しい変化は認められなかった。熟成後のサイレージの色調は最も良かったが、養分損失が大きく、嗜好性も刺戟性のクロールピクリン臭のため劣っていた。

ヘイレージの微生物相は、埋蔵1日後では原料牧草と大差がみられず、pHの低下も緩慢であった。特に水分55%のヘイレージでは、pHの低下が不十分で、熟成後にはかびや放線菌が内部に層状に発育し、グラム陰性の好気性細菌の繁殖も旺盛で、飼料と言うよりは未熟の堆肥に近い状態を呈し、サイロの中心部は埋蔵3カ月後にもなお発熱していた。これは原料牧草が強く乾燥されたため、普通の加圧では圧密が不完全で、空気の排除が不十分となり、好気性菌に繁殖の機会を与えたためである。

c. 考 察

実験1および2で調製したサイレージのpH、有機酸組成、醗酵過程における養分損失、取出開始後の安定性などから品質順位を求めると、表-7のごとくなる。

酸添加のものは、蛋白質の損失が少なく、取出開始後

の安定性が極めて良好で、嗜好性はやや劣るが品質は第1位と考えられた。乳酸菌接種区とふすま添加区の間には、特に大きな差がみられなかったが、嗜好性がすぐれ蛋白質の損失が少ない乳酸菌接種のものを第2位とした。

この実験では、ふすま添加区が乳酸菌接種区に次ぐ良質なサイレージとなったが、ふすまには雑菌が繁殖し易く、保存条件の悪いふすまを添加すると、乳酸菌の発育促進剤としての効果が薄く、むしろ雑菌を混入する結果となり、サイレージの品質低下につながることも多いので注意を要する。

糖蜜添加区はふすま添加区に次いで良好で、添加した糖分が乳酸菌の増殖をうながす効果を発揮した。

その他の添加物を加えて調製したサイレージは、いずれも無添加のものよりすぐれているとは言いがたかった。

強く予乾した牧草を埋蔵するヘイレージは、普通の踏圧や埋蔵後の加圧では空気の排除が十分でなく、好気性菌が繁殖して品質を著しく低下させる。従って、このような半乾草を保存するには、真空サイロの使用以外に適当な方法は見当たらない。

表-7 添加物とサイレージの品質との関係

| 処 理 区 分 | pH | 有 機 酸 組 成 (%) | | | | 養 分 損 失 率 (%) | | 嗜 好 性 順 位 | 品 質 順 位 |
|--------------------------|-----|---------------|---------|-------|-----------|---------------|-----|-----------|---------|
| | | 総 酸 | 不 揮 発 酸 | 揮 発 酸 | 揮 発 酸 総 酸 | DCP | TDN | | |
| 無 添 加 | 3.8 | 1.40 | 1.05 | 0.35 | 25 | 6 | 5 | 5 | 5 |
| ふ す ま 5% | 3.8 | 1.98 | 1.55 | 0.43 | 22 | 5 | 2 | 2 | 3 |
| 糖 蜜 2% | 3.8 | 1.88 | 1.49 | 0.39 | 21 | 4 | 7 | 3 | 4 |
| カ イ レ ー ジ Kofa 6 lb/t | 4.2 | 1.44 | 1.01 | 0.43 | 30 | 2 | 11 | 9 | 8 |
| サイロトラシン 5 g/t | 4.2 | 1.36 | 0.87 | 0.49 | 36 | 9 | 10 | 10 | 7 |
| SMS 0.5% | 4.3 | 1.01 | 0.78 | 0.23 | 22 | 2 | 1 | 7 | 9 |
| クロールピクリン 0.12% | 4.6 | 0.31 | 0.23 | 0.08 | 26 | 7 | 9 | 8 | 10 |
| 塩 酸 2N-HCl 60 l/t | 4.0 | 1.12 | 0.69 | 0.43 | 38 | 2 | 7 | 4 | 1 |
| 乳 酸 菌 1% | 3.9 | 1.37 | 1.05 | 0.32 | 23 | 3 | 4 | 1 | 2 |
| 予 乾 水分 70% | 5.4 | 1.00 | 0.74 | 0.26 | 26 | 34 | 24 | 12 | 12 |
| ヘイレージ 水分 65% | 4.4 | 3.83 | 3.00 | 0.83 | 22 | 5 | 5 | 6 | 6 |
| ヘイレージ 水分 55% | 5.0 | 3.62 | 2.62 | 1.00 | 28 | 11 | 12 | 11 | 11 |

第8節 乳酸菌接種効果

さきの実験において、乳酸菌接種あるいは酸添加によって、頗る良質なサイレージを調製出来ることが明らか

になったので、これらの結果を再確認すると共に、微生物相の遷移とサイレージの保存性との関係を把握するために、添加物を加えないサイレージを対照とし、乳酸菌

接種ならびに酸添加サイレージを調製し、長期間にわたる微生物相の遷移状況を観察した。

a. 方法

レッドクローバーとオーチャードグラス各50%混播の3番牧草を刈取、2~3cmに細切して、ガラス製の実験用サイロに試験区ごとに1.5kgずつ埋蔵した。

原料牧草は水分77%、粗蛋白質は乾物中16.7%で、可溶性無窒素物と粗蛋白質との比は2.6:1であった。

各試験区とも27°Cで熟成を行なわせ、埋蔵当初、埋蔵1, 3, 8週間および8カ月後に試料を採取し、pHと微生物相の遷移を追跡した。試料はその都度新しいサイロを開封して採取し、一度開封したサイロの内容物は、条件が全く変わってしまうので、その後の実験には使用しなかった。試験区分は、次の3試験区とした。

- i) 対照区：添加物を加えず、生牧草を細切埋蔵した。
- ii) 乳酸菌接種区： *Streptococcus lactis*, *St. faecalis*, *Lactobacillus plantarum* の3日間培養菌液を等量ずつ混和し、この混合液を、細切牧草に対し5%の割合で散布して埋蔵した。埋蔵時の乳酸菌の添加量は、牧草1g当たり 1.2×10^6 となり、その中 *L. plantarum* は約半数の 6.4×10^5 を占めていた。
- iii) 酸添加区： VIRTANEN のいわゆる A.I.V. 法にならい、塩酸 (2N-HCl) を細切生牧草に散布して埋蔵し、1日後のpHを4.0になるようにした (2N-HCl 添加量, 60 ml/kg)。

b. 結果および考察

微生物相とpHの変化は、図-17に示した。

原料牧草の刈取時期は10月16日で、気温がかなり低かったが、1, 2番草の枯葉が若干混入していたためか、埋蔵当初の細切牧草は、これまでの原料牧草に比べ細菌数がやや多かった。

熟成過程における乳酸菌の遷移状況をみると、対照区では埋蔵後1週間は Streptococci のみで、その後 Lactobacilli が出現した。

乳酸菌接種区では、埋蔵後、原料牧草中の乳酸菌と接種した乳酸菌と一緒に発育し、1週間でpHが著しく低下、乳酸菌数は試験区中最高 $2.2 \times 10^9/g$ に達し、その2割までが生酸性力の強い Lactobacilli であった。

酸添加区は、pHを4.0に低下させる程の塩酸を加えたため、乳酸菌の初期発育は対照区や乳酸菌接種区程顕著ではなかった。しかしながら、pH4.0以下でも酸を生成する Lactobacilli は、対照区よりも早い時期に出現

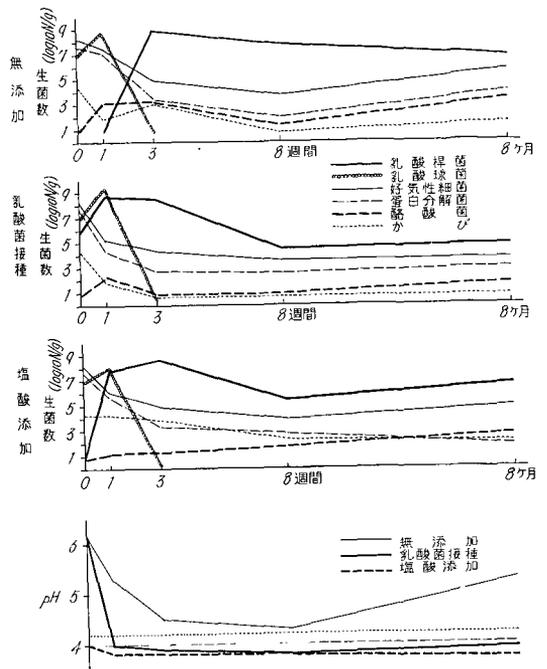


図-17 乳酸菌接種サイレージと酸添加サイレージの微生物相の遷移

した。

pH低下の著しい乳酸菌接種区や酸添加区では、埋蔵3週間で降乳酸菌が急速に減少したのに反し、pH低下が不十分な対照区では、乳酸菌の減少が緩慢であった。乳酸菌接種区や酸添加区では、埋蔵8カ月後には一旦減少した Lactobacilli が若干増加した。このような再増殖の現象出現の理由として、一つには一旦減少した乳酸菌が二次的に増殖したとの考え方もあるが、埋蔵初期に増殖した Lactobacilli には *L. plantarum* が多く、8カ月後のサイレージでは *L. brevis* が多かったことから、熟成中期になって減少した Lactobacilli と、長期間保存中に増殖した Lactobacilli は別種のものであるとの考え方が妥当である。

酪酸菌は、対照区と乳酸菌接種区では埋蔵1週間後にやや増加し、対照区では埋蔵3週間後まで高い菌数を維持していたが、乳酸菌接種区では、埋蔵3週間後には著しく減少し、8カ月後まで低い菌数を保った。酸添加区は前二者とは若干様相が異なり、埋蔵後1週間では殆んど増加せず、埋蔵後8カ月にわたって極めて徐々に増殖した。

好気性細菌や蛋白分解菌は、熟成が進むにつれて菌数を減少し、埋蔵8週間後には、*Bacillus* 属菌のみとなつ

た。菌数の減少速度は乳酸菌接種区が最も早く、対照区が最も遅かった。対照区では、一旦減少したこれらの菌が長期保存中に再増殖して、埋蔵8カ月では大腸菌群が検出された。これは熟成初期のpH低下が十分でない上に、酪酸菌の増殖により乳酸が消費され、大腸菌群の増殖をも抑制出来なくなったためと考えられる。

以上の結果から、乳酸菌接種法と酸添加法は、生酸性の強い *Lactobacilli* の早期増殖、急速なpH低下による有害菌の発育抑制と言う点で、極めて類似しており、両者は共にすぐれたサイレージ調製法であることを明らかに認めた。

第2章 サイレージ中の微生物の分類学上の位置と各種微生物の出現状況

サイレージの熟成に微生物が重要な役割をはたしていることは明らかであるが、これまでの研究を見ると、乳酸菌、酪酸菌その他個々の微生物についての報告はあっても、熟成過程に出現するあらゆる微生物を調査して、それぞれの菌の相互関係についてまで論及しているものは見当たらなかった。

著者は、サイレージの熟成に有益な菌類の発見、有害な菌類の防除対策確立などの基礎として、まずサイレージ熟成に関する微生物の分類学上の位置を明らかにするために、原料牧草、熟成過程および熟成終了後のサイレージから分離した微生物を、第3編記載の方法に従って分類学的に詳細に調査した。

本研究を通じて分離した微生物は5,000株を越えているが、いずれも既知の菌種ばかりであり、改めて各菌株の性質を逐一記載したのでは、余りに繁雑となり、本論文の目的からはずれる恐れが大きいため、ここでは分類同定の結果ならびに各微生物の出現状況について述べることにする。

第1節 分類学的検索結果

分離した微生物は、分類学上、分裂菌類 (*Schizomycetes*) と真菌類 (*Eumycetes*) に二分され、その中で、分裂菌類は表-8に示した通り *Pseudomonadales* と *Eubacteriales* に更に二分され、分類学的検索の結果15属35種2亜種に同定された。

真菌類 (*Eumycetes*) の中には通称酵母と言われているものと、かびと言われているものが含まれているが、属までの分類結果は表-9に示した通りであった。この中で酵母と言われているものは、*Ascomycetes* に属する *Endomycopsis*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Debaryomyces* の5属、*Basidiomycetes* に含めるのが妥

当と考えられている *Sporobolomyces*, *Deuteromycetes* に属する *Cryptococcus*, *Torulopsis*, *Candida*, *Kloekera*, *Rhodotorula* の5属、合計11属にまたがり、表-10に示した41種2亜種に同定された。

上記11属以外の真菌類は、すべてかびと言われているもので、表-11に示した21属58種3亜種に同定された。

これらの結果から、頗る多くの微生物が、サイレージの熟成に関与していることが明らかになった。

第2節 乳酸菌

サイレージ熟成に最も重要な位置を占めている乳酸菌は、いずれも *Lactobacillaceae* に属し、表-8に示した4属8種1亜種に分類同定された。

熟成過程における乳酸菌の遷移は図-2~7に示したごとくで、埋蔵初期には *Streptococci* が急速に増殖してpHを低下し、その後生酸性の強い *Lactobacilli* が出現してpHを更に低下させることが明らかになった。また、*Lactobacilli* の出現する頃から *Pediococci* の増殖の認められることもあった。

熟成初期に著しい増殖を示す *Streptococci* は、*St. faecalis* が大部分を占め、時には *St. lactis* の認められることもあった。図-2, 3の無添加の例のように、熟成後期になっても *Lactobacilli* が出現しない場合や、*Lactobacilli* が出現してもpHの高いサイレージでは *St. faecalis* var. *liquefaciens* の認められることが多かった。

Leuconostoc mesenteroides は、*St. lactis* よりも出現頻度は低かったが、熟成温度が低温で経過したサイレージでは時々検出された。

熟成過程においては、*Streptococci* の増殖期からやや遅れて *L. plantarum* と *L. brevis* の増殖がみられ、この2種の乳酸菌は共存している場合が多く、出現時期は *L. plantarum* の方がやや早い傾向がみられた。

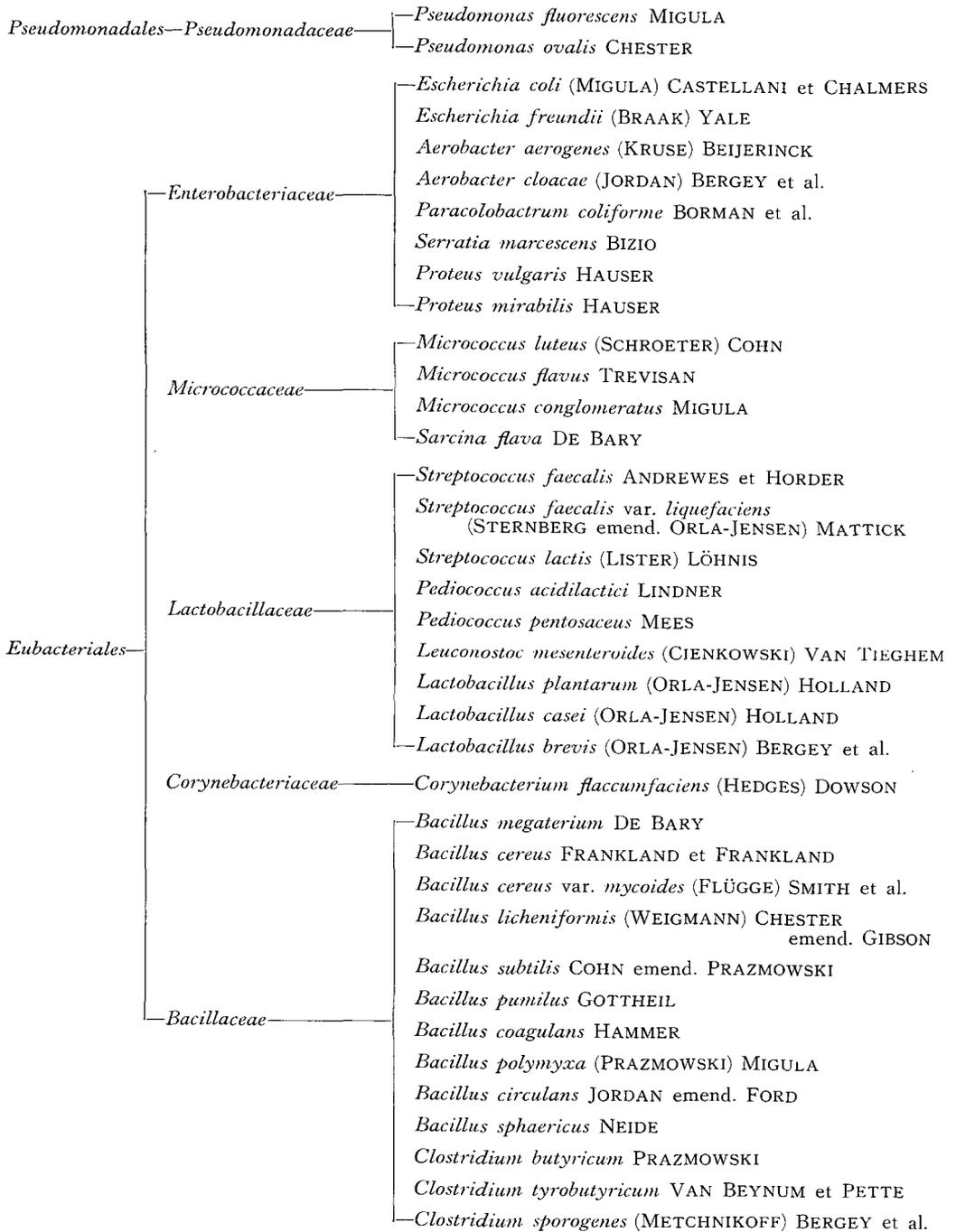
L. casei も比較的出現頻度の高い乳酸菌であったが、この菌が多数検出されるようなサイレージは、*L. plantarum* の多いサイレージに比べ品質が劣っており、この結果は LANGSTON らの品質の劣るサイレージでは、*L. casei* がみられるとの報告⁶⁴⁾ とほぼ一致した。

第3節 酪酸菌

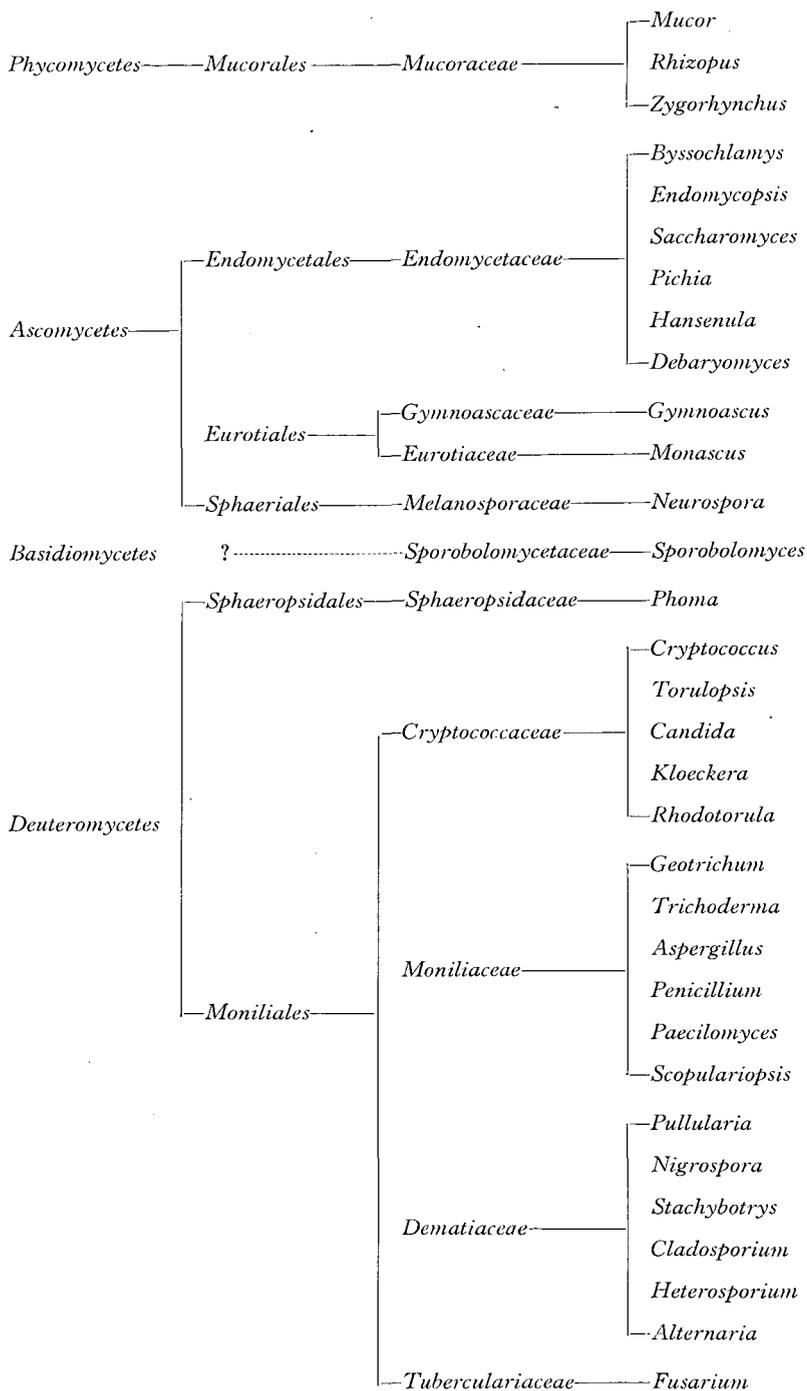
サイレージ変敗の原因菌として害作用の著しい酪酸菌は、いずれも *Clostridium* に属し、*C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes* の3種に分類同定された。

酪酸醗酵を起こしていたサイレージでは、これら3種の中、*C. butyricum* あるいは *C. tyrobutyricum* が多く、この2種がサイレージの酪酸醗酵原因菌と考えられた。

表-8 分裂菌類の分類学上の位置



表—9 真菌類の分類学上の位置



表—10 酵母の分類学上の位置

| | | |
|------------------------------|---|--|
| | — | <i>Endomycopsis fibuliger</i> (LINDNER) DEKKER |
| | | <i>Saccharomyces bayanus</i> SACCARDO |
| | | <i>Saccharomyces bisporus</i> (NAGANISHI) LODDER et VAN RIJ |
| | | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> HANSEN |
| | | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i> (HANSEN) DEKKER |
| | | <i>Saccharomyces delbrueckii</i> LINDNER |
| | | <i>Saccharomyces exiguus</i> HANSEN |
| | | <i>Saccharomyces fermentati</i> (SAITO) LODDER et VAN RIJ |
| | | <i>Saccharomyces florentinus</i> (CASTELLI) LODDER et VAN RIJ |
| <i>Endomycetaceae</i> — | | <i>Saccharomyces fructuum</i> LODDER et VAN RIJ |
| | | <i>Saccharomyces microellipsodes</i> OSTERWALDER |
| | | <i>Saccharomyces oviformis</i> OSTERWALDER |
| | | <i>Saccharomyces rosei</i> (GUILLIERMOND) LODDER et VAN RIJ |
| | | <i>Saccharomyces veronae</i> LODDER et VAN RIJ |
| | | <i>Saccharomyces willianus</i> SACCARDO |
| | | <i>Pichia fermentans</i> LODDER |
| | | <i>Pichia membranaefaciens</i> HANSEN |
| | | <i>Hansenula anomala</i> (HANSEN) H. et. P. SYDOW |
| | | <i>Hansenula californica</i> (LODDER) WICKERHAM |
| | — | <i>Debaryomyces klockeri</i> GUILLIERMOND et PÉJU |
| | | <i>Sporobolomyces roseus</i> KLUYVER et VAN NIEL |
| <i>Sporobolomycetaceae</i> — | | <i>Sporobolomyces salmonicolor</i> (FISCHER et BREBECK) KLUYVER et VAN NIEL |
| | | <i>Cryptococcus albidus</i> (SAITO) SKINNER |
| | | <i>Cryptococcus diffluens</i> (ZACH) LODDER et VAN RIJ |
| | | <i>Cryptococcus laurentii</i> (KUFFERATH) SKINNER |
| | | <i>Torulopsis bacillaris</i> (KROEMER et KRUMBHOLZ) LODDER |
| | | <i>Torulopsis candida</i> (SAITO) LODDER |
| | | <i>Torulopsis famata</i> (HARRISON) LODDER et VAN RIJ |
| | | <i>Torulopsis glabrata</i> (ANDERSON) LODDER et DE VRIES |
| | | <i>Torulopsis holmii</i> (JÖRGENSEN) LODDER |
| | | <i>Candida guilliermondii</i> var. <i>membranaefaciens</i> LODDER et VAN RIJ |
| | | <i>Candida intermedia</i> (CIFERRI et ASHFORD) LANGERON et GUERRA |
| <i>Cryptococcaceae</i> — | | <i>Candida krusei</i> (CASTELLANI) BERKHOUT |
| | | <i>Candida melinii</i> DIDDENS et LODDER |
| | | <i>Candida mycoderma</i> (REESS) LODDER et VAN RIJ |
| | | <i>Candida pulcherrima</i> (LINDNER) WINDISCH |
| | | <i>Candida rugosa</i> (ANDERSON) DIDDENS et LODDER |
| | | <i>Candida solani</i> LODDER et VAN RIJ |
| | | <i>Candida tropicalis</i> (CASTELLANI) BERKHOUT |
| | | <i>Kloeckera apiculata</i> (REESS emend. KLÖCKER) JANKE |
| | | <i>Rhodotorula glutinis</i> (FRESENIUS) HARRISON |
| | | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (JÖRGENSEN) HARRISON |
| | — | <i>Rhodotorula rubra</i> (DEMME) LODDER |

表-11 かびの分類学上の位置

| | | |
|------------------|---|---|
| | — | <i>Mucor griseo-cyanus</i> HAGEM |
| | — | <i>Mucor plumbeus</i> BONORDEN |
| Mucoraceae | — | <i>Rhizopus nigricans</i> EHRENBERG |
| | — | <i>Rhizopus nodosus</i> NAMYSLOWSKI |
| | — | <i>Zygorhynchus vuilleminii</i> NAMYSLOWSKI |
| Endomycetaceae | — | <i>Byssochlamys fulva</i> OLLIVER et SMITH |
| Gymnoascaceae | — | <i>Gymnoascus reesii</i> BARANETZKY |
| Eurotiaceae | — | <i>Monascus purpureus</i> WENT |
| Melanosporaceae | — | <i>Neurospora sitophila</i> SHEAR et DODGE |
| Sphaeropsidaceae | — | <i>Phoma</i> species |
| | — | <i>Geotrichum candidum</i> LINK |
| | — | <i>Trichoderma viride</i> PERS. ex FR. |
| | — | <i>Aspergillus repens</i> (CORDA) DE BARY |
| | — | <i>Aspergillus ruber</i> (SPIEKERMAN et BREMER) THOM et CHURCH |
| | — | <i>Aspergillus chevalieri</i> (MANGIN) THOM et CHURCH |
| | — | <i>Aspergillus chevalieri</i> var. <i>intermedius</i> THOM et RAPER |
| | — | <i>Aspergillus chevalieri</i> var. <i>ruber</i> SASAKI |
| | — | <i>Aspergillus amstelodami</i> (MANGIN) THOM et RAPER |
| | — | <i>Aspergillus umbrosus</i> BAINIER et SARTORY |
| | — | <i>Aspergillus restrictus</i> G. SMITH |
| | — | <i>Aspergillus fumigatus</i> FRESENIUS |
| | — | <i>Aspergillus nidulans</i> (EIDAM) WINTER |
| | — | <i>Aspergillus sydowi</i> (BAINIER et SARTORY) THOM et CHURCH |
| | — | <i>Aspergillus versicolor</i> (VUILLEMIN) TIRABOSHI |
| | — | <i>Aspergillus terreus</i> THOM |
| | — | <i>Aspergillus candidus</i> LINK |
| | — | <i>Aspergillus niger</i> VAN TIEGHEM |
| | — | <i>Aspergillus flavus</i> LINK |
| | — | <i>Penicillium thomii</i> MAIRE |
| | — | <i>Penicillium frequentans</i> WESTLING |
| | — | <i>Penicillium purpurescens</i> (SOPP) RAPER et THOM |
| Moniliaceae | — | <i>Penicillium aurantio-violaceum</i> BOURGE |
| | — | <i>Penicillium implicatum</i> BOURGE |
| | — | <i>Penicillium fuscum</i> (SOPP) RAPER et THOM |
| | — | <i>Penicillium baarnense</i> VAN BEYNUM |
| | — | <i>Penicillium soppi</i> ZALESKI |
| | — | <i>Penicillium lilacinum</i> THOM |
| | — | <i>Penicillium notatum</i> WESTLING |
| | — | <i>Penicillium digitatum</i> SACCARDO |
| | — | <i>Penicillium roqueforti</i> THOM |
| | — | <i>Penicillium stoloniferum</i> THOM |
| | — | <i>Penicillium resticulosum</i> BIRKINSHAW, RAISTRICK et SMITH |
| | — | <i>Penicillium cyclopium</i> WESTLING |
| | — | <i>Penicillium cyclopium</i> var. <i>echinulatum</i> RAPER et THOM |
| | — | <i>Penicillium expansum</i> LINK |
| | — | <i>Penicillium crustosum</i> THOM |
| | — | <i>Penicillium corymbiferum</i> WESTLING |
| | — | <i>Penicillium wortmanni</i> KLÖCKER |
| | — | <i>Penicillium spiculisporum</i> LEHMAN |
| | — | <i>Penicillium rubrum</i> STOLL |
| | — | <i>Penicillium variabile</i> SOPP |
| | — | <i>Penicillium rugulosum</i> THOM |
| | — | <i>Paecilomyces varioti</i> BAINIER |
| | — | <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (SACCARDO) BAINIER |
| | — | <i>Pullularia pullulans</i> (DE BARY et LÖW) BERKHOUT |
| Dematiaceae | — | <i>Nigrospora sphaerica</i> (SACCARDO) MASON |
| | — | <i>Stachybotrys lobulata</i> BERKELEY |
| | — | <i>Cladosporium herbarum</i> (PERSOON) LINK |
| | — | <i>Heterosporium terrestre</i> ATKINSON |
| | — | <i>Alternaria tenuis</i> NEES |
| Tuberculariaceae | — | <i>Fusarium graminearum</i> SCHWABE |

VAN BEYNUM と PETTE は、*C. tyrobutyricum* をサイレージの酪酸醱酵菌として報告^{15,16)}、GIBSON らは *C. butyricum*、*C. tyrobutyricum* および *C. paraputreficum* を酪酸醱酵菌として報告しており^{36,37)}、著者の結果もこれらの報告とほぼ一致した。

C. sporogenes は、原料牧草をはじめ、酪酸菌数の少ない品質良好なサイレージからも時々分離されており、頗る広範囲に存在する菌であった。酪酸醱酵の起こっていたサイレージからもこの菌は検出されたが、その場合には *C. butyricum* や *C. tyrobutyricum* が必ず混在しており、*C. sporogenes* は、酪酸醱酵の主役をなすものではないと考えられた。

GIBSON も *C. sporogenes* のサイレージ中における害作用については疑問視しており³⁵⁾、この報告は著者の推論の妥当性をうらづけるものである。

第4節 好気性細菌および蛋白分解菌

本研究を通じて分離した好気性細菌は、表-8中 *Lactobacillaceae* に含まれる乳酸菌および *Bacillaceae* 中の *Clostridia* を除く、5科10属24種1亜種であった。

熟成過程における好気性細菌と蛋白分解菌の遷移は、図-4、5および図-12に示したごとくで、ここで蛋白分解菌として計数されたものには、*Proteus vulgaris*、*Pr. mirabilis*、*Bacillus megaterium*、*B. cereus*、*B. cereus* var. *mycoides*、*B. subtilis*、*B. licheniformis* などがあり、すべて好気性菌であった。

サイレージの醱酵が良好な場合には、原料牧草に存在していた *Pseudomonas* 属その他のグラム陰性菌は埋蔵後急速に減少し、数日後には *Bacillus* 属菌を残すのみとなったが、醱酵が悪く、pH が低下しない場合には、*Escherichia*、*Aerobacter*、*Proteus* などに属する菌が熟成後期まで残存した。

埋蔵初期には、*Escherichia coli*、*E. freundii*、*Aerobacter aerogenes*、*Proteus vulgaris* など *Enterobacteriaceae* に属する菌が一時的に増殖することが多かった。また、*Micrococcus*、*Sarcina*、*Corynebacterium* などに属する菌は、熟成期間の一時期にわずかに散見されたのみで、サイレージ熟成に大きな影響を与えるものとは考えられなかった。

熟成終了時にみられた菌は *Bacillus* 属のものが最も多く、その種類も9種1亜種におよんでいた。この中で *B. coagulans* は、高温サイレージにおいて、乳酸菌に代わって酪酸醱酵の主体をなす菌で、通常の低温酪酸醱酵サイレージにも存在したが、その場合には菌数が頗る少なく、集積培養を行わなければ検出出来なかった。

熟成終了時のサイレージには、品質良好なものでも $1.0 \times 10^2 \sim 10^5/g$ の *Bacillus* 属菌が存在したが、これらの菌の大部分は胞子の形で残存しているもので、サイレージ中で活発に活動しているものは極少数と考えられた。

第5節 酵 母

熟成過程に分離した酵母は、3科11属41種2亜種に達し、それぞれの分類学上の位置については、すでに表-10に示した。

これらの酵母の出現状況を見ると、原料牧草中には *Rhodotorula glutinis*、*R. mucilaginosa*、*R. rubra*、*Cryptococcus diffluens*、*Crypt. laurentii* などの非酪酸性の無胞子酵母が多く、*Crypt. albidus*、*Sporobolomyces roseus*、*Sp. salmonicolor* なども散見された。しかし、これらの酵母は埋蔵後急速に減少し、熟成終了時には *Saccharomyces cerevisiae*、*Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus*、*Sacch. delbrueckii*、*Sacch. exiguus*、*Hansenula anomala*、*Debaryomyces kloeckeri*、*Pichia fermentans*、*P. membranaefaciens* などの有胞子酵母の検出される場合が多かった。

熟成温度が低い場合には酵母が多かったが熟成温度が30°Cを越すと、酵母は著しく減少した。

酸添加サイレージでは、無添加のものに比べ、熟成期間を通じて酵母が多数検出された。この現象は、加えた酸により細菌類の増殖が抑制されたため、低いpHでも増殖出来る酵母が菌交代現象として現われたものと理解される。

CAPRIOTTI と RAINIERI は、温室中の植物から *R. mucilaginosa*、*R. glutinis* var. *rubescens*、*Torulopsis bacillaris*、*Candida reukaufii* などを分離し²³⁾、BURMEISTER と HARTMAN は穀実サイレージから *H. anomala*、*P. membranaefaciens* のほか *Candida* 属4種を検出し、*H. anomala* や *Cand. krusei* は乳酸を同化するので、サイロ中で増殖すると述べている²¹⁾。

著者の結果も、原料牧草中に *Rhodotorula* の多いことや、熟成終了時に *H. anomala* と *P. membranaefaciens* が多い点では、これらの報告と合致したが、その他の点では必ずしも一致をみなかった。

サイレージ中には、*H. anomala* のように乳酸を消費してpHの低下をさまたげると考えられる酵母も存在するが、一般にpHの低いサイレージにおいて酵母が多いという現象から推測すれば、酵母が乳酸を消費するとの理由のみからサイレージの酪酸醱酵に有害であるとの結論も導き難く、エステルを生じ家畜の嗜好性を増大するという利点も考えられ、熟成過程における酵母の役割につい

では未だ多くの検討すべき余地を残している。

第6節 かび

熟成過程に分離したかびは、すでに表-11に示したごとく、9科21属58種3亜種にまたがり、サイレージ中には多種類のかびが存在することが明らかになった。

熟成過程におけるかびの遷移については、すでに佐々木¹⁰⁰⁾がその大要を報告しているが、原料牧草には *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* の各属を含め、植物寄生性のかびが多数検出され、その菌数は大略 $1.0 \times 10^4/g$ 前後であった。

原料牧草に由来するこれらのかびは、埋蔵後次第に菌数を減少したが、埋蔵初期には一時的に *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizopus* などに属するかびが増殖することが多く、中でも *G. candidum* は、熟成初期のみならず熟成中期になってもサイレージ中で増殖し、相当長期間にわたり高い菌数を維持することも多かった。サイレージ中で *G. candidum* が増殖することは、JONES と GIBBARD の報告にも見られ⁵⁴⁾、著者もしばしばこの現象を見て、この菌がサイレージのいわゆる「べとつき」の原因となっている場合が多いと推測している。

熟成が更に進むと、埋蔵初期に一時増殖したかびも次第に菌数を減少し、良質な高水分サイレージでは1g当たりの菌数は10以下となった。これに反し、低水分サイレージでは、空気の排除が十分でないため、埋蔵後もかびの増殖が著しく、取出時期になっても菌数の減少の認められない場合が多かった。

取出時に検出されたかびでは、*Aspergillus* 属の *glaucus* 群に含められる *A. repens*, *A. ruber*, *A. chevalieri*, *A. amstelodami* などが最も多く、次いで *Penicillium roqueforti*, *P. expansum*, *P. frequentans* などが多かった。

家畜の飼料中毒原因菌として、しばしば、報告されている *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Stachybotrys* などに属するかびは、高水分サイレージでは、熟成後には殆んど検出されなくなったが、低水分サイレージでは、これらのかびが熟成終了後まで残存していることが多かった。また、試料数は少なかったが、人畜にアスペルギルス症を起こす *A. fumigatus* が見られたことは注目すべきことである。

第3章 有用乳酸菌の選択

第1節 有用乳酸菌の選択試験

さきの実験で牧草を埋蔵する際に乳酸菌を接種すると pH が急速に低下し、サイレージの品質が向上すること

を認めたので、実際にサイレージから分離した乳酸菌の中から、生酸力が強く、サイレージの調製に役立つものを選択しようとして実験を行なった。

a. 方法

i) 供試菌種：著者が実際にサイレージから分離した乳酸菌は、前述のごとく4属8種および1亜種であったが、この亜種すなわち *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* は蛋白分解力が強く、サイレージにはむしろ好ましくないと見て、これを除外し、次の8種を用いた。

Streptococcus faecalis
Streptococcus lactis
Pediococcus acidilactici
Pediococcus pentosaceus
Leuconostoc mesenteroides
Lactobacillus plantarum
Lactobacillus casei
Lactobacillus brevis

ii) 培地の調製法：乳酸菌の培地として一般に使用されているものに、脱脂乳、グルコース・ペプトン・イーストエキス培地、トマト培地、麦芽汁、麴汁などがあるが、本実験の目的はグラスサイレージに最適な菌種を選択にあるので、既知の培地を用いることを止め、サイレージ原料の各種牧草の煮出汁を特に用いた。その調製法は次のごとくである。

新鮮な細切生牧草 250 g に水 1 ℓ を加え、1 時間煮沸後、戸過搾汁し、洗液を合わせて 1 ℓ とした。この煮汁にグルコース 2% を添加、150 ml 容エーレンマイヤーフラスコに 100 ml ずつ分注滅菌した。

この実験では、牧草はいね科としてチモシー、まめ科としてレッドクローバーを使用した。

iii) 培養法：供試菌は、予めグルコース添加ペプトン・イーストエキスの液体培地 (ペプトン 0.5%, イーストエキス 0.5%, KH_2PO_4 0.2%, グルコース 2.0%, pH 7.0) に接種し、32°C で 2 日間前培養、これを牧草煮汁培地 100 ml に 1 ml ずつ接種、32°C で 7 日間培養し、乳酸菌数、pH ならびに酸度を測定した。ただし、酸度測定にあたり、牧草煮汁は黒褐色で、フェノールフタレンを指示薬としたのでは変色域が不明確だったので、指示薬としてブローム・チモール・ブルーを用いた。

b. 結果および考察

いね科およびまめ科牧草煮汁中の乳酸菌の発育状況、pH の低下、生酸量は表-12に示した。表中の滴定酸度は試料 10 ml 当たりの N/10 NaOH の滴定値で示し、乳

表—12 牧草煮汁中における乳酸菌の酸生成状況

| 菌種名 | 牧草の種類 | | いね科牧草 | | | | まめ科牧草 | | | |
|----------------------------------|---------|--|---------------------|-----|------|--------|---------------------|-----|-------|--------|
| | 菌数, 酸生成 | | 菌数/ml | pH | 滴定酸度 | 乳酸 (%) | 菌数/ml | pH | 滴定酸度 | 乳酸 (%) |
| <i>Streptococcus faecalis</i> | | | 4.8×10 ⁵ | 5.2 | 0.60 | 0.05 | 4.4×10 ⁸ | 4.2 | 3.84 | 0.35 |
| <i>Streptococcus lactis</i> | | | 2.1×10 ⁵ | 5.6 | 0.50 | 0.05 | 4.3×10 ⁸ | 4.2 | 3.32 | 0.30 |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> | | | 4.8×10 ⁸ | 4.2 | 2.33 | 0.21 | 4.5×10 ⁸ | 3.9 | 6.72 | 0.60 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | | | 5.3×10 ⁸ | 4.1 | 2.56 | 0.23 | 5.1×10 ⁸ | 3.8 | 7.76 | 0.70 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | | | 3.5×10 ⁵ | 5.3 | 0.55 | 0.05 | 4.2×10 ⁸ | 4.2 | 3.30 | 0.30 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | | | 5.6×10 ⁸ | 3.6 | 6.64 | 0.60 | 4.8×10 ⁸ | 3.6 | 13.00 | 1.17 |
| <i>Lactobacillus casei</i> | | | 5.2×10 ⁸ | 3.8 | 3.92 | 0.35 | 4.5×10 ⁸ | 3.6 | 13.08 | 1.18 |
| <i>Lactobacillus brevis</i> | | | 4.2×10 ⁸ | 4.2 | 2.52 | 0.23 | 5.3×10 ⁸ | 3.9 | 6.60 | 0.59 |

酸の量は培地中に生成された酸をすべて乳酸として百分率で算出したものである。

種類別の供試菌株は、それぞれ2株としたが、同一種間では、著しい差異が認められなかった。

表から明らかのように、まめ科牧草の煮汁ではいずれの供試菌も良好な発育を示したが、いね科牧草の煮汁では、*Streptococcus* 属と *Leuconostoc* 属の発育が悪く、生酸量も少なかった。このことから、乳酸菌の発育には、いね科牧草よりもまめ科牧草の煮汁の方が好ましいと推察される。

Pediococcus と *Lactobacillus* に属する5種は、いね科牧草の煮汁でも良好な発育を示し、pHの低下、生酸量共に *Streptococcus* や *Leuconostoc* 属のものよりもすぐれていた。しかしながら、一般にまめ科牧草の煮汁よりはpHが高く、生酸量も劣っているものが多く、*L. plantarum* のみがいずれの牧草煮汁でもpHを著しく低下させることが明らかになった。

注目すべきことは、たとえpHが等価になっている場合でも、いね科牧草とまめ科牧草の生酸量を比較すると、まめ科牧草の方が生酸量が多かったことである。しかも、この生酸量の差はpHが低い場合ほど大となり、同じpH3.6であっても、まめ科牧草の方がいね科牧草の約2倍の酸を生じていた。このことは、まめ科牧草では煮汁中に溶出する成分の緩衝能が、いね科牧草よりもはるかに大きいことを示し、まめ科牧草のサイレージでは、いね科牧草の場合の約2倍の酸を生成しなければ、良質なサイレージとはなり得ないことを示唆している。

以上の結果から、著者はいね科、まめ科いずれの牧草を用いても多量の酸を生成し、pHの低下を良好ならしめるためのサイレージ乳酸菌として、*L. plantarum* が

最も有効であると判定した。

第2節 *Lactobacillus plantarum* の生酸力

前節の実験結果から、いね科、まめ科いずれの牧草煮汁でも *L. plantarum* が強力な生酸力を示すことが明らかになったので、この菌の増殖と生酸力との関係を明らかにすると共に、牧草煮汁の緩衝能などを知るためにこの実験を行なった。

a. 方法

選択試験の場合と同様、グルコース添加ペプトン・イーストエキス培地で32°C 2日間前培養した *L. plantarum* を、それぞれの牧草煮汁 100 ml を入れた 150 ml 容エーレンマイヤーフラスコに接種し、32°C で10日間培養し、経目的に生菌数、pH、酸度を測定した。試験に供した牧草煮汁は次の通りである。すなわち、一部は牧草煮汁そのものとし、一部はそれぞれにグルコース2%を加えたもので、これにより炭素源としてのグルコース添加の影響をも明らかにしようとした。

- i) アルファルファ煮汁
- ii) アルファルファ煮汁・グルコース
- iii) オーチャードグラス煮汁
- iv) オーチャードグラス煮汁・グルコース
- v) ビートトップ煮汁
- vi) ビートトップ煮汁・グルコース

牧草煮汁の調製法および酸度の測定法は、前節の場合と同様にした。

b. 結果および考察

牧草煮汁中における *L. plantarum* の発育、pHの变化および生酸速度は、図-18~20に示した。図から明らかのように、*L. plantarum* は3種のいずれの牧草煮汁でも良く繁殖し、アルファルファの煮汁で菌数は最高値

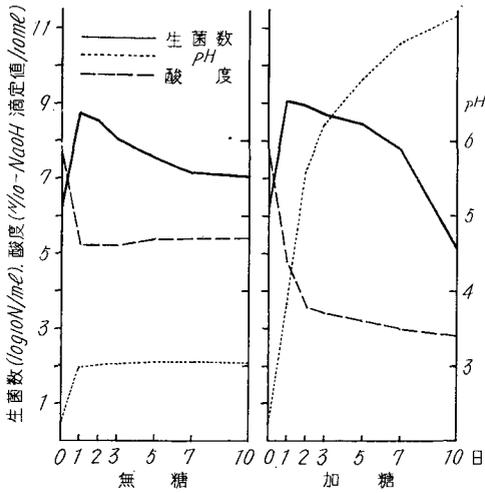


図-18 アルファルファ煮汁における *L. plantarum* の増殖と生酸力

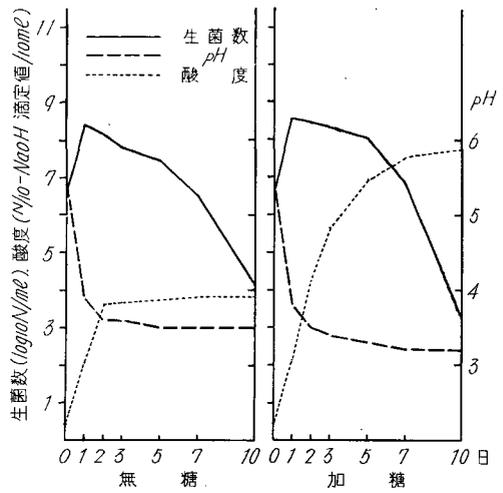


図-20 ビートトップ煮汁における *L. plantarum* の増殖と生酸力

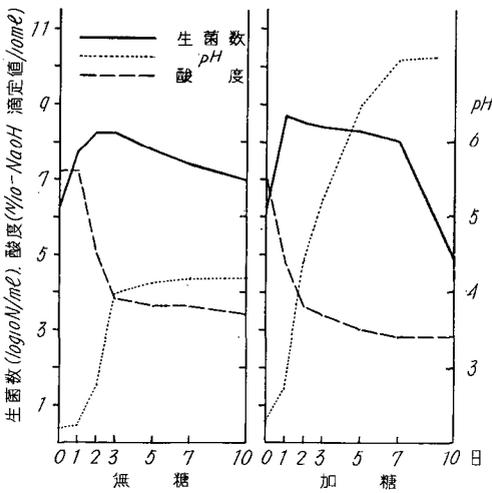


図-19 オーチャードグラス煮汁における *L. plantarum* の増殖と生酸力

を示した。また、牧草煮汁にグルコースを添加すると、無添加の場合よりも菌数は増大した。

グルコースを添加しないアルファルファの煮汁では、菌数は最高 $5.0 \times 10^8/ml$ に達していたにもかかわらず、生酸量は乳酸に換算して約 0.18% と少なく、pH も 4.6 に止まった。この現象は、アルファルファのようなまめ科牧草では、乳酸菌の利用出来る糖分が少ないため、菌が増殖しても大量の酸を生成するに到らなかったものと説明されるが、これがまめ科牧草で良質なサイレージが出来ない原因の一つとなっていると言える。

アルファルファに比べると、オーチャードグラスやビートトップの煮汁では生酸量も多く、pH も酪酸菌の増殖限界と言われる 4.2 以下に達し、埋蔵処理が良ければ、糖分を添加しなくても良質なサイレージが出来る可能性が示された。

乳酸菌の利用し易いグルコースを加えると、いずれの牧草煮汁でも生酸速度が速かとなり、pH も急速に低下した。特に、アルファルファ煮汁が生酸量、生酸速度共に最良で、ビートトップの煮汁が最悪であった。これに反し、pH の低下はビートトップの煮汁で最も早く、アルファルファの煮汁では遅かった。このような相反するような現象は、それぞれの牧草煮汁の緩衝能の相異によるものと考えられたので、図-18~20 から pH を 4.2 に低下させるのに必要な酸量を求めたところ、アルファルファ煮汁では乳酸として約 0.40%、オーチャードグラスでは約 0.25%、ビートトップ煮汁では約 0.16% であった。このことから、アルファルファではビートトップの場合の 2 倍以上の酸生成が行なわれなければ、酪酸菌の発育限界まで pH が下がらないことが明らかとなった。しかも、アルファルファでは、牧草自体に乳酸菌が利用し得る糖分が少ないので、糖分添加以外に良質なサイレージを調製することは殆んど不可能とも言うべきで、これらのことから、まめ科牧草単一で良質なサイレージを調製することの至難なことがうかがわれる。

第 3 節 *Lactobacillus plantarum* の増殖曲線に対する温度と培地の影響

さきの実験で、*L. plantarum* が牧草煮汁中で極めて

良好な発育を示すことを明らかにしたが、これを酪農家で大量に培養する場合には、32°C という培養温度を正確に保つことはかなり難しい。また、一旦培養した乳酸菌は出来るだけ長期間高い菌数値のまま保持することが要求される。これらの要求を満たす条件を設定する手がかりを得るために、この実験では培養温度を27および32°Cの2段階として、この程度の温度差が菌数の増加にどのような影響を与えるかを明らかにすると共に、炭酸カルシウムを加えて酸を中和した場合に、菌数の減少を防げるかどうかなどを調べた。

a. 方法

使用培地は、乳酸菌の常用培地であるグルコース添加ペプトン・イーストエキス培地とグルコース2%を加えた混播牧草の煮汁の2種とし、炭酸カルシウムは予め別に滅菌しておいたものを、*L. plantarum*の接種直前に培地に0.5%の割合で添加した。*L. plantarum*の前培養、接種法、菌数測定法などは前述の通りである。

b. 結果および考察

*L. plantarum*の増殖に対する温度と培地の影響は、図-21のごとくで、乳酸菌の常用培地よりも、グルコースを加えた牧草煮汁の方が *L. plantarum*の増殖に適し、牧草のエキス分が、この菌の増殖に極めて有効なことが明らかとなった。

培養温度27°と32°Cを比較すると、*L. plantarum*の初期の発育は32°Cの方が速かだが、菌数減少の速度も早く、27°C培養の方が初期発育が若干遅れるが、長期間高い菌数値を維持していることが知られた。これらのことから、実際利用の場合の大量培養では、牧草煮汁にグルコース2%を加え、27~32°Cに2日間保持することにより、1 ml 当たり 1.0×10^9 近くの生菌数の菌液を調製出来るものとの見通しがついた。

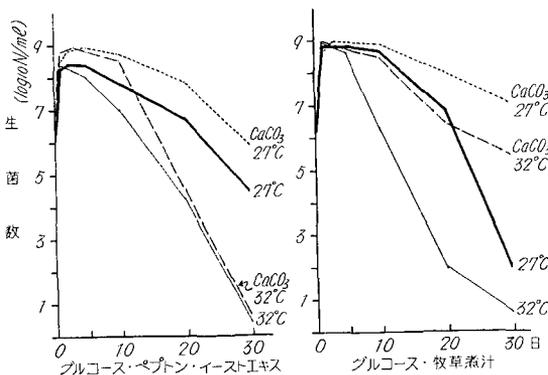


図-21 *L. plantarum*の増殖曲線に対する温度と培地の影響

培地に炭酸カルシウムを添加すると、常用培地では無添加の場合よりも菌数が大となったが、グルコース添加牧草煮汁ではこの効果がなかった。しかしながら、炭酸カルシウムの添加による菌数の減少防止効果は、32°C培養よりも、27°C培養の時に大きかった。

第4節 *Lactobacillus plantarum*の保存性

乳酸菌は、長期間保存するとそれ自身の生成する酸により死滅することが多く、保存中の菌数の減少を完全に防止することは不可能である。従って、*L. plantarum*をサイレージに利用する場合にも、一旦培養した菌液の活力をどのようにして長期間維持するかが実際上頗る重要な問題となる。

この実験は、*L. plantarum*の培養菌液の保存温度と生菌数の関係、ならびに培養菌液の希釈液の保存性を明らかにしようとしたものである。

a. 方法

*L. plantarum*をグルコース添加アルファルファ煮汁に接種、32°Cで2日間培養し、この菌液を用いて次の3系列の保存試験を行なった。

- i) 培養菌液を、そのまま5, 18~22 (室温), 27および32°Cに保存。
- ii) 培養菌液を、1%グルコース溶液で10倍に希釈し、5, 18~22, 27および32°Cに保存。
- iii) 培養菌液を、1%グルコース溶液で100倍に希釈し、5, 18~22, 27および32°Cに保存。

各温度に保存した菌液は、経日的に生菌数を測定し、その増減を観察した。

グルコース添加アルファルファ煮汁の調製法は、本章第1節に記述した通りである。

b. 結果および考察

グルコース添加アルファルファ煮汁で培養した *L. plantarum*の菌液、および1%グルコース溶液による希釈菌液の保存中における菌数変化は、図-22に示した。

培養菌液をそのまま保存した場合の菌数変化は、図-22 Aに示した通りで、保存期間が短い場合には、室温よりも発育適温あるいはこれよりやや下の27°Cで保存した方が生菌数が多かったが、10日以上の場合には5°C保存の生菌数が最も多かった。

菌液を10日間5°Cに保存すると生菌数は約1/25、室温に保存すると約1/250に減少したが、その後は保存期間を30日まで延長しても、殆んど減少はみられなかった。従って、*L. plantarum*の培養菌液は、培養終了後短時日の間に使用する場合には、発育適温よりやや低めの27°Cに保存してもよいが、長期間活性を維持するた

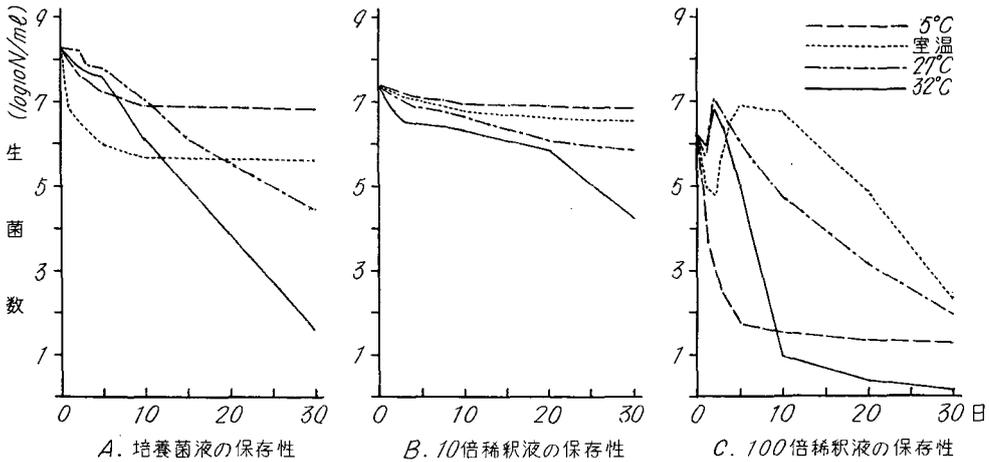


図-22 *L. plantarum* の保存性

めには、保存温度を5°C位の低温にしない限り、生菌数の著しい減少はまぬがれ得ない。

グルコース添加アルファルファ煮汁に培養した菌液を、1%グルコース溶液で10倍稀釈して保存した場合の菌数変化を図-22 Bに、100倍稀釈して保存した場合の菌数変化をCに示した。

図から明らかなように、培養菌液を1%グルコース溶液で10倍に稀釈すると、そのまま保存した場合よりも保存性が高まった。しかもこの場合には、低温保存したもの程生菌数が多く、5°Cで30日保存してもわずか1/3、室温保存でも1/7に減少したに過ぎなかった。これに反し、100倍に稀釈したものは、5°Cに保存すると急速に菌数を減少した。また、室温、27、32°Cで保存したものは、一旦菌数を減少後増殖して、その後再び減少することが明らかとなり、稀釈し過ぎると保存性が低下することを認めた。

培養菌液を1%グルコース溶液で稀釈した場合に、保存性が高まる理由として、培養菌液の乳酸菌の死滅因子である酸度が稀釈により弱まることが考えられるが、単に酸度が弱まるのみで保存性が高まるものとすれば、100倍稀釈液でも10倍稀釈液と同様な現象が見られるはずである。従って、*L. plantarum* の保存性には、死滅因子としての酸度の外に牧草に由来する窒素源その他の栄養分や菌液中のC:N比などが複雑に関与しているものと考えられる。

第4章 *Lactobacillus plantarum* 接種サイレージの調製試験

さきの実験において、サイレージから分離した乳酸菌

の中から、生酸力の最も強いすぐれたサイレージ乳酸菌として、*L. plantarum* を選択した。本章では、この菌株を用いて実際にサイレージを調製した場合の、*L. plantarum* の挙動と優秀性について調べた結果を述べる。

第1節 *Lactobacillus plantarum* 接種サイレージの微生物相について

この実験は、*L. plantarum* を用いて実験室的規模でサイレージを調製し、熟成過程における微生物相の遷移、pHの変化、有機酸の生成状況などを経日的に観察し、この乳酸菌の効果を明確にしようとしたものである。

a. 方法

オーチャードグラスとラジノクローバー混播の2番牧草を2~3 cmに細切、*L. plantarum* の培養菌液を5%の割合で散布し、ガラス製の実験用サイロに1.5 kgずつ埋蔵、27°Cで熟成を行なわせた。対照として、乳酸菌を接種しない細切牧草を同様に埋蔵して比較した。

微生物相、pH、有機酸の生成状況などについては、原料牧草および埋蔵後1、3、7、14、21、35、56日の8回にわたり、試料を採取して経日的に変化を追跡した。一度開封したサイロの内容物は、条件が甚しく変化するので、その後の実験には使用しなかった。

原料牧草は水分72.5%、粗蛋白質は乾物中14.8%、可溶性無窒素物と粗蛋白質の比は2.63:1で、蛋白質含量はかなり高かった。*L. plantarum* の接種菌数は、原料牧草1g当たり 3.0×10^7 であった。

b. 結果および考察

L. plantarum 接種サイレージの熟成過程における微生物相の遷移、pH、有機酸生成量の変化などを、無接種のものに対比して図-23に示した。図から明らかなよう

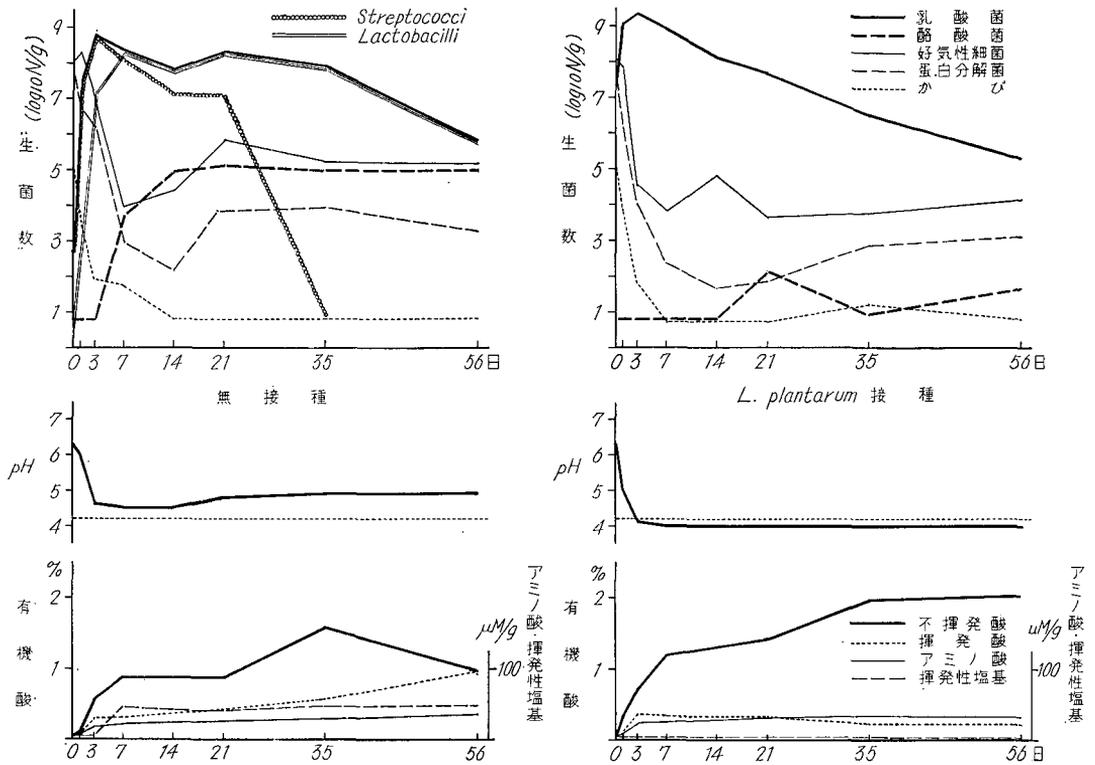


図-23 *L. plantarum* 接種サイレージの微生物相と酸生成

に、乳酸菌は埋蔵後急速に増殖し、3日後には両試験区共、菌数が最高値に達し、pHも急速に低下した。ただし、*L. plantarum* 接種のものでは、接種した菌が急速に発育し、埋蔵3日後には菌数が $2.4 \times 10^9/g$ に達し、pHも4.1まで低下したのに反し、無接種のものでは、埋蔵3日後には生酸力の弱い *Streptococcus faecalis* が多く、菌数も $6.0 \times 10^8/g$ に過ぎず、そのためpHの低下も不十分で、酪酸菌の発育限界である4.2以下には到達しなかった。

pH低下の遅い無接種のものでは、埋蔵7日後頃から酪酸菌が増殖し、これにともなって揮発酸や揮発性塩基の生成が起こり、その後は不揮発酸が増加してもpHは下がらず、埋蔵56日では、むしろ不揮発酸が減少し、pHも4.9まで上昇して、サイレージの品質は悪化した。

L. plantarum を接種したものでは、埋蔵初期から強力な乳酸醗酵が行なわれ、埋蔵3日後にはpHが酪酸菌の発育限界以下となったので、その後は、揮発酸や揮発性塩基の増加もみられず、サイレージの品質は頗る良好であった。

埋蔵初期のpH低下に悪影響を与える好気性細菌や蛋

白分解菌は、*L. plantarum* を接種したものでは埋蔵後急速に減少したが、無接種のものでは減少速度が遅く、好気性細菌は埋蔵1日後にはむしろ増加した。

酵母やかびは埋蔵後急速に減少し、その傾向は *L. plantarum* を接種したもののの方がややまさっていた。

以上の結果から、さきの実験で選択したサイレージ乳酸菌 *L. plantarum* は、埋蔵後急速な増殖をすると共に、強力な乳酸醗酵を行ない、埋蔵初期のpH低下速度を早め、好気性細菌、蛋白分解菌などの発育を抑制し、サイレージの品質を著しく改善する効果があることを認めた。

第2節 *Lactobacillus plantarum* と炭水化物含有添加物の相乗効果

これまでの実験では、乳酸菌とその他の添加物とは、並列させてその効果を調べて来た。しかし、乳酸菌はその接種により牧草中の炭水化物を効率よく乳酸醗酵させ、pHの低下を早め、有害菌の抑制を行なわせようとするためのもので、いわば主役であり、一方これに対して、糖蜜、ふすまなど炭水化物源の添加は、乳酸菌の活動を活発にするためのエネルギー源として補う脇役であって、熟成過程に果す両者の役割は自から異なる。

この実験は、前述のように相異なる役割を演ずる乳酸菌と炭水化物の多い添加物を一緒に加えてやることによって、互に不足の点を補い合い、サイレーズの品質を更に向上させることが出来るとの考えにもとづき、乳酸菌と、糖蜜、ふすま、ビートパルプ、コーンミールなどの添加物との相乗効果を調べたものである。

a. 方法

オーチャードグラスとラジノクローバー混播の2番牧草を刈取、2~3 cm に細切して、ガラス製の実験用サイロに1.5 kg ずつ埋蔵した。

試験区分は、添加物を加えないものと、糖蜜2%、ふすま、ビートパルプ、コーンミールをそれぞれ5% 加えたもの、およびこれらに更に5% の割合で *L. plantarum* の培養菌液を接種したものの10 試験区とした。

微生物相と pH の変化については、原料牧草と埋蔵後3, 7, 14, 21, 35, 56 日の試料を採取して測定を行ない、試料採取時に一度開封したサイロの内容物は、状態が全く変化するので、その後の実験には使用しなかった。

埋蔵56 日の試料については、有機酸、アミノ酸、揮発性塩基を定量すると共に、サイレーズの成分分析を行ない、醗酵過程における養分の損失を明らかにした。

b. 結果および考察

サイレーズ熟成に最も重要な乳酸菌、害作用の顕著な

酪酸菌および蛋白分解菌の経日的変化と、pH の変化を対比して示すと図-24 のごとくなる。図から明らかのように、いずれの試験区でも埋蔵後急速に乳酸菌が増殖し、3 日後には pH の著しい低下がみられた。

L. plantarum 接種のものや、これと他の添加物を併用したものでは、pH の低下が特に速かで、中でも *L. plantarum* 接種のもの、これと糖蜜を併用したものでは、pH は埋蔵3 日後に酪酸菌の発育限界である4.2 以下となった。これに反し、無接種無添加のものでは pH は4.5 以下に低下せず、糖蜜を加えたものでも pH が4.2 以下に低下するには7 日以上を要した。pH の低下が不十分な無接種無添加のものでは、埋蔵7 日後頃から酪酸菌が増殖し、これにともない一旦低下した pH は上昇した。

糖蜜、ふすま、ビートパルプ、コーンミールなどの添加物を単独で加えたものでも、pH の低下は良好となったが、これらの中では、糖蜜添加のものが最良で、他の添加物を加えたものは、糖蜜添加のものに比べ pH の低下が遅く、酪酸菌の発育限界である4.2 付近まで pH が下がるのにはかなりの日数を必要とした。そのため、糖蜜を加えたものでは好気性細菌や蛋白分解菌が急速に減少したが、ふすま、ビートパルプ、コーンミールを加えたものでは、これらの菌の減少は緩慢であった。すなわ

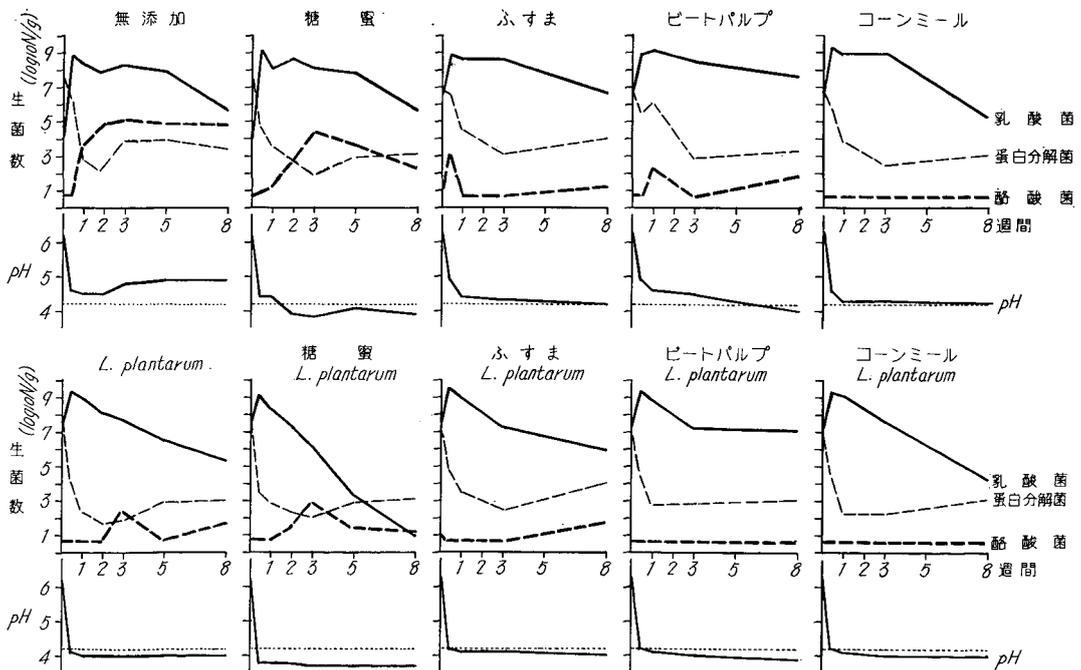


図-24 *L. plantarum* と炭水化物含有添加物の相乗効果

ち、糖蜜は速効型、その他のものは遅効型の添加物とみることが出来る。

L. plantarum 接種のものでは、この菌の作用によって、埋蔵3日後にpHは4.2以下に低下し、有害菌の減少も顕著であった。

ふすま、ビートパルプ、コーンミールなどの添加物と *L. plantarum* を併用したものでは、無接種のものよりはpHの低下や有害菌の抑制がすぐれていたが、*L. plantarum* を接種しただけのものとの間には、pHの低下状況に大差がみられず、蛋白分解菌の減少速度はむしろ逆に劣っていた。これに比べ、糖蜜と *L. plantarum* を併用したものでは、埋蔵3日後にpHは3.8まで低下し、有害菌の抑制も良好となった。これらのことから *L. plantarum* は糖蜜のように乳酸菌が直ちに利用出来る糖分を含む速効型の添加物と一緒に接種すると、その効果を更に増大することが明らかとなった。

熟成終了後の各サイレージの有機酸組成、アミノ酸、揮発性塩基の含有量は、図-25に示した。図から明らかなように、有機酸生成量は、糖蜜、ふすま、ビートパルプ、コーンミールなどの添加によって増加した。しかし、有機酸生成量の多いものが、pHも低いとは限らなかった。すなわち、ふすま、ビートパルプ、コーンミールなどを添加したものと、これらの添加物と共に *L. plantarum* を併用したものを比べると、*L. plantarum* を併

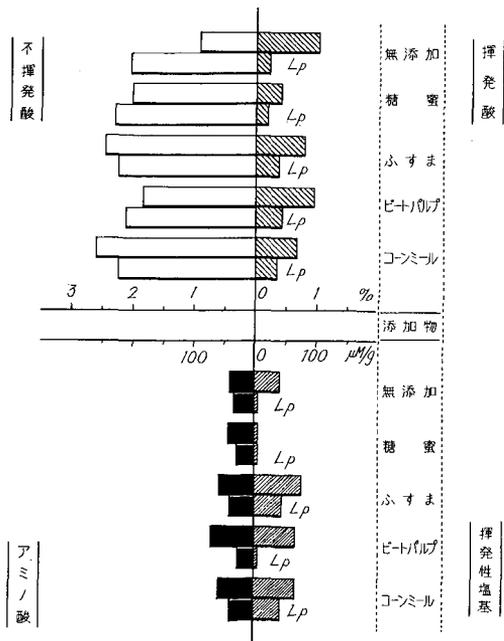


図-25 *L. plantarum* と添加物併用の効果

用したものの方が、生酸量が少ないにもかかわらず、pHの低下が速かであった。このような現象出現の理由として、*L. plantarum* の接種が埋蔵後の急速なpH低下をもたらし、他の微生物の繁殖の機会を減じ、蛋白質の分解による揮発性塩基の生成や大腸菌群によるヘテロ型の酸酵を防止したことなどが考えられる。

揮発酸、揮発性塩基、アミノ酸などの生成量は、添加物を加えただけのものよりも、添加物と *L. plantarum* を併用したものの方が少なかった。埋蔵時に *L. plantarum* を接種したものと、糖蜜を加えたもの、および両者を併用したものでは、揮発性塩基は殆んど生成されておらず、両者を併用したものでは総酸中の揮発酸の比率やアミノ酸の生成量も最低値を示し、頗る良質なサイレージであることを示していた。これらの点からも、先に述べた速効型の添加物と *L. plantarum* の相乗効果が証明されたものと言えよう。

熟成を終えたサイレージの分析結果をもとに、埋蔵当初の原料牧草ならびに添加物混合後の成分の合計を100とし、熟成過程における酸酵損失を減じて養分保持率を求めると、図-26のごとくなる。図から明らかなように、添加物を加えることにより養分保持率を高めることが出来るが、これらの添加物と一緒に *L. plantarum* を接種すると養分保持率は一層高くなることが知られた。

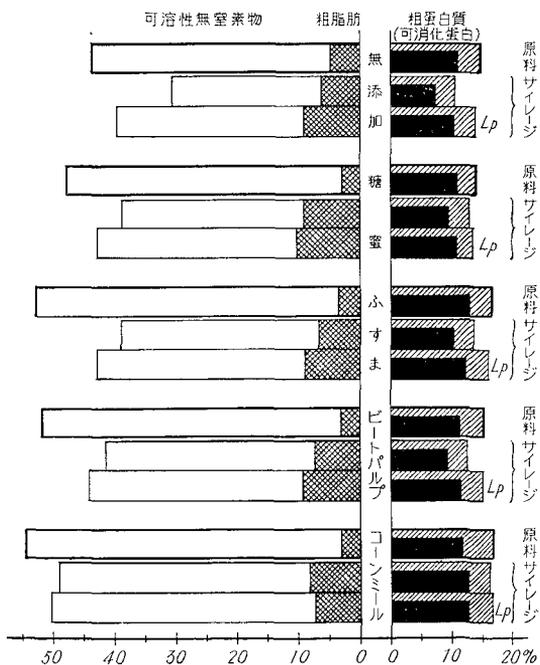


図-26 *L. plantarum* と添加物併用の飼料成分に与える影響

糖蜜ならびにコーンミールを添加し、*L. plantarum* を接種した場合に養分保持率が最良で、ふすまやビートパルプと *L. plantarum* を併用したものでは、前の2者よりも養分保持率は劣っていた。

無添加無接種のものでは、pHの低下が不十分で、熟成中期から酪酸菌や蛋白分解菌の増殖が起こったため、20%以上の養分損失が認められた。

蛋白質の損失、特に可溶性蛋白質の損失は *L. plantarum* の併用により明らかに防ぎ得ることが示された。

ビートパルプは、可溶性無窒素物の含量がふすまよりも少ないにもかかわらず、これを添加したサイレージの養分保持率は、ふすま添加のものよりもやや大きかった。その原因を種々調査したところ、ふすまは可溶性無窒素物の含量が多いが粗蛋白質の含量も多く、これを5%の割合で牧草に加えた場合の可溶性無窒素物/粗蛋白質の比は、ビートパルプを同じ割合で牧草に加えた時の可溶性無窒素物/粗蛋白質の比より小さくなっていること、ビートパルプには若干の糖分が含まれていることが解った。従って、サイレージの品質を向上させる添加物としては、先に述べたように速効型の糖分含量の多いものが最良であるが、その他の添加物を用いる場合にも、単に可溶性無窒素物の多いものを選ぶに止まらず、可溶性無窒素物/粗蛋白質の比の出来るだけ大きいものを選ぶ必要がある。

以上の結果から、サイレージ埋蔵時に *L. plantarum* あるいは可溶性無窒素物の多い添加物をそれぞれ単独で牧草に加えても、サイレージの品質を改善することが出来るが、これらの添加物と *L. plantarum* を併用することにより、養分損失の少ない更に良質なサイレージを調製出来ることが明らかになった。しかも、*L. plantarum* と併用する添加物としては、澱粉質の多い遅効型のものよりも、糖分含量の多い速効型のものの方が好ましいことも明白になった。

第3節 *Lactobacillus plantarum* と グルコースの相乗効果

これまでの実験で、サイレージ埋蔵時に *L. plantarum* の培養菌液を、原料牧草に対し1~5%の割合で接種すると、pHの急速な低下が起こり、有害菌の活動が抑制され、サイレージの品質が著しく向上することが明らかとなった。しかしながら、仮に酪農家が100屯のサイレージを調製するものとして、1~5屯の培養菌液を用意することは容易なことではない。

サイレージ接種用の培養菌液の量を減らすには、次の二つの方法が考えられる。

第1は、培養菌液の菌数値を高める方法で、例えば、生菌数 $2.4 \times 10^8 / \text{ml}$ のものを $2.4 \times 10^9 / \text{ml}$ まで高めることが出来れば、接種用の菌液量は1/10で間に合うこととなる。この点については、すでに第3章第2節で述べているように、いね科主体の牧草煮汁では培養菌液1ml当たりの菌数値が 10^8 台であるが、まめ科特にアルファルファの煮汁に培養すると1ml当り 10^9 台の菌数値の培養菌液が得られることが明らかなので、*L. plantarum* 培養用の煮汁をつくる牧草として、まめ科の多いものを用いれば、サイレージ100屯に接種する菌液量を0.1~0.5屯に減少させることが出来る。

第2は、本章第2節の実験で明らかになった、糖分含量の多い添加物と *L. plantarum* の相乗効果を利用するもので、これにより培養菌液の一部を糖液で置換出来ると推測される。

この実験は、*L. plantarum* の培養菌液を2%グルコース溶液で稀釈接種し、菌液5%接種と同等の効果が得られないかどうかを確かめるため行なったものである。さきの実験では糖蜜が最良の成績を示したが、これには酪酸菌その他の有害菌が頗る多く含まれているので、有害菌の少ない糖液をつくるために、この実験ではグルコースを使用した。

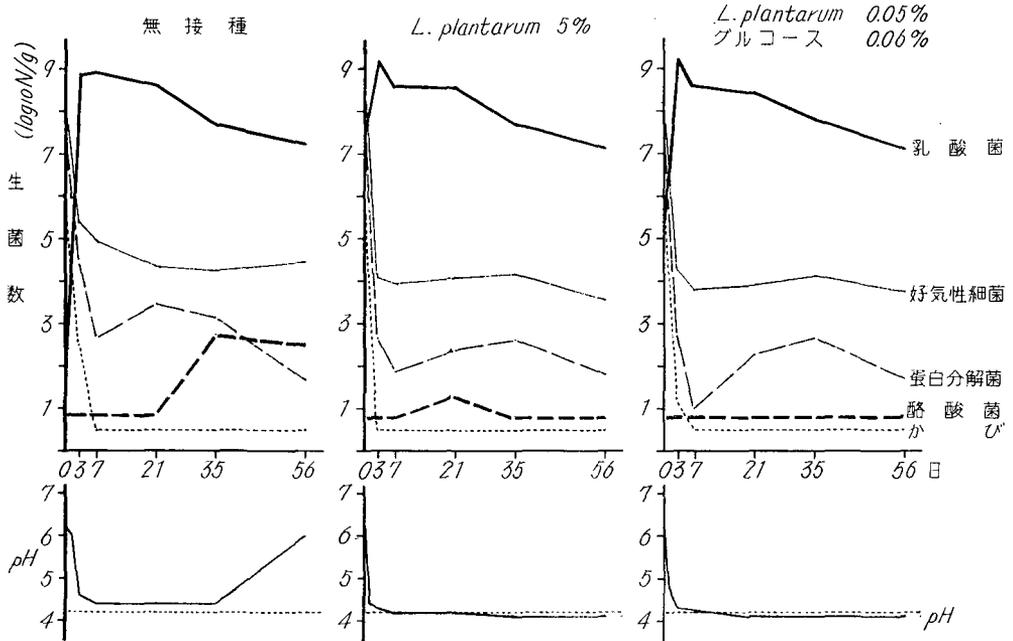
a. 方法

いね科、まめ科混播の3番牧草を刈取、2~3cmに細切し、ガラス製の実験用サイロに1.5kgずつ埋蔵し、原料牧草および埋蔵後1, 3, 7, 21, 35, 56日の7回にわたりpHの変化、埋蔵後1日を除く6回にわたり微生物相の変化を追跡した。試験区分は、次の3試験区である。

- i) 無接種： 細切牧草をそのまま埋蔵した。
- ii) *L. plantarum* 接種区： *L. plantarum* の培養菌液を、原料牧草に5%の割合で接種埋蔵したもので、菌液の菌数値は $4.2 \times 10^8 / \text{ml}$ 、埋蔵当初の牧草1g当たりの *L. plantarum* の菌数値は 2.1×10^7 であった。
- iii) *L. plantarum* 接種・グルコース添加区： *L. plantarum* の培養菌液5mlを2%グルコース溶液で300mlに稀釈し、この稀釈液を牧草1kg当り30mlの割合で接種埋蔵した。埋蔵当初の牧草1g当たりの *L. plantarum* の菌数値は 2.1×10^8 、グルコースの添加量は0.06%であった。

b. 結果および考察

埋蔵当初および埋蔵後の微生物相の遷移、pHの変化は図-27に示した。図から明らかのように、無接種のもの



図—27 *L. plantarum* とグルコース併用の効果

のは埋蔵1日後のpHが6.0で埋蔵当初と殆んど変化がなかったが、*L. plantarum* 接種のもの、およびこれとグルコースを併用したものではpHが急速に低下した。

L. plantarum 接種のものと、これとグルコースを併用したものを比べると、埋蔵1日後のpH低下は菌液5%接種の方がすぐれていたが、埋蔵3日後には両者の間に差が見られず、その後のpH低下は*L. plantarum* とグルコースを併用したものの方がややまきっていた。

これらのことから、*L. plantarum* の接種量を1/100に減じても、少量のグルコースと共に接種すると、このグルコースが乳酸菌の発育、pHの低下を促進し、培養菌液5%接種の場合とほぼ同じpH低下をもたらす効果があることが明らかとなった。これに反し、無接種のものでは埋蔵後のpH低下が遅く、埋蔵7日後でもpHは4.4に止まり、熟成期間を通じ酪酸菌の発育限界の4.2までpHが低下しなかった。そのため埋蔵35日頃から酪酸菌が増殖し、その後pHが著しく上昇、埋蔵56日後にはサイレージは初期腐敗の段階にあるのが認められた。

微生物相をみると、pH低下の速かだった*L. plantarum* を接種したものと、これとグルコースを併用したものでは、有害菌の抑制が明らかで、両者に著しい差異はみられなかった。強いてその差異を指摘するならば、*L. plantarum* とグルコースを併用したものの方が乳酸菌の増殖が良好で、埋蔵7日頃の好気性細菌や蛋白分解

菌の減少、その後の酪酸菌の抑制がすぐれていると考えられた。

官能検査によれば、*L. plantarum* 接種およびこれとグルコースを併用したサイレージは、いずれも良質で両者に優劣はつけ難かった。

この実験の結果、サイレージ埋蔵当初に接種する*L. plantarum* の菌液量は、グルコースを併用することにより約1/100に減少させ得ることが明らかになった。従ってサイレージ100屯を調製するには、酪農家で通常使用されている牛乳輸送缶2本分約50ℓの*L. plantarum* の菌液で足りることとなり、この程度の量の菌液を酪農家が培養することは容易と考えられ、実用化への見通しが明るくなった。

第4節 *Lactobacillus plantarum* 接種 サイレージの実用中間試験

これまでの研究によって、サイレージ埋蔵当初に*L. plantarum* を接種すると、サイレージの品質が向上することが明らかとなった。また、その培養菌液を2%グルコース溶液で稀釈し、この稀釈液を原料牧草に接種埋蔵しても、培養菌液そのものを接種したものに劣らないサイレージが出来ることが明らかとなり、乳酸菌接種サイレージ実用化の基礎が固められた。

この実験は、*L. plantarum* 接種サイレージ調製法を実用段階に移すための中間試験として、1,500 kg容のサ

イロを用いてサイレージを調製し、微生物相、有機酸組成、消化率、嗜好性、乾物回収率などにつき解析を行なったものである。

a. 方法

オーチャードグラスとアルファルファ混播の1番牧草を刈取、細切して、2%グルコース溶液で稀釈した *L. plantarum* の培養菌液を散布しながら埋蔵し、乳酸菌を接種しないで埋蔵したものと比較した。

使用したサイロは、直径120 cm、高さ240 cm、排汁口を有する塔型サイロで、埋蔵時には3人で踏圧しながら牧草を詰込んだ。埋蔵後は、水蓋をして約4カ月貯蔵した。実際の埋蔵量は、無接種のものが1,465 kg、*L. plantarum* 接種のものが1,348 kgであった。

L. plantarum は予めグルコース2%を加えた牧草煮汁に接種、32°Cで2日間培養し、この菌液1ℓを29ℓのグルコース溶液で稀釈、牧草に散布しながら埋蔵した。埋蔵当初の *L. plantarum* の生菌数は、サイレージ1g当たり 5.7×10^5 であった。

埋蔵時期は5月29日で、埋蔵初期は外気温が低く、熟成温度も20°C以下で経過した。

微生物相は、原料牧草、埋蔵後4日、6日の排汁ならびに熟成終了後のサイレージについて調べた。

消化試験は、原料牧草、サイレージ共に細羊4頭ずつを用いて、常法により行なった。

嗜好試験は、育成牛4頭を用いて、1期4日（内予備2日）の反転法により実施した⁸³⁾。

乾物回収率は、全重量測定法で求めた。

b. 結果および考察

原料牧草、埋蔵4日、6日後の排汁、熟成終了後のサイレージの微生物相ならびにpHは、図-28に示した。図中の菌数は、原料牧草とサイレージでは1g当たり、排汁では1ml当たりの生菌数を示している。

取出時のサイレージは、無接種のものではpH4.3、暗褐黄緑色、多汁質でややアンモニア臭をともなう甘酸臭、*L. plantarum* 接種サイレージはpH3.9、褐黄緑色、多汁質で甘酸芳香が感じられ、無接種のサイレージと比べて明らかに良質であった。また、これらのサイレージを、取出後1日牛舎内に放置すると、*L. plantarum* 接種のものは殆んど変質がみられないのに反し、無接種のものは魚臭を発生し、著しく変質した。すなわち、*L. plantarum* 接種サイレージは取出後の保存性も良好であるが、無接種のものは変質し易いことが明らかとなった。

サイレージの微生物相を見ると *L. plantarum* 接種のものは、無接種のものに比べ *Lactobacilli* と酵母が

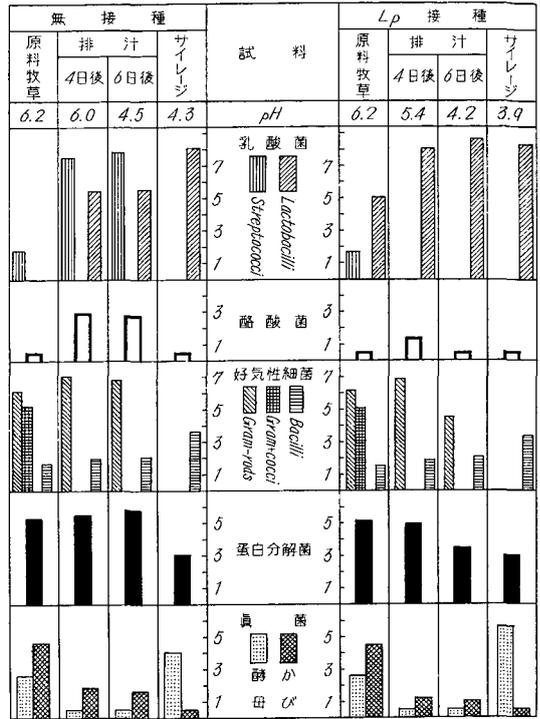


図-28 *L. plantarum* 接種サイレージの微生物相

やや多く、好気性細菌がやや少なかったが、その他の微生物相には殆んど差が認められなかった。しかしながら、埋蔵初期に出て来た排汁の微生物相とpHを見ると、*L. plantarum* 接種のものでは、埋蔵後4日で排汁中の乳酸菌は接種した *L. plantarum* のみとなり、菌数は $1.3 \times 10^8/ml$ に達し、pHも5.4に低下した。これに反し、無接種のものでは乳酸菌数は $4.4 \times 10^7/ml$ に止まり、*Lactobacilli* よりも生酸力の弱い *Streptococci* が主体をなし、pHは埋蔵当初の牧草と殆んど同じで、多数の酪酸菌、好気性細菌、蛋白分解菌、かびなどの有害菌が検出された。

埋蔵6日後の排汁では、無接種のものでも *Lactobacilli* の菌数がやや増加し、pHも4.5まで低下したが、*L. plantarum* 接種のものに比べpHが高かった。また、*L. plantarum* 接種のものでは、排汁中に流出して来る有害菌がかなり減少していたのに反し、無接種のものでは埋蔵4日後とほぼ同量の有害菌の流出が見られた。

排汁中に流出して来た微生物相から、サイレージの品質を推測すると、*L. plantarum* 接種のものでは、埋蔵後短期間のうちにpHが低下し、有害菌の菌数が著し

く減少したため、これらの菌による養分損失を少量に止めることが可能となったと思われる。これに反し、無接種のものでは、pHの低下速度が緩慢で、有害菌が減少するまでにはかなり長期間を要し、この間の有害菌の活動が品質低下の原因となったものと考ええる。

一般にサイレージの調製処理において、汁液を排出させない場合には品質が悪いと言われている反面、汁液中に養分が流亡するとの理由から、予乾を行なって原料牧草の水分含量を減らして埋蔵する方法が一部でとられて来ているが、今回の実験で明らかなように、排汁処理に

よって流出する有害菌の量はおびただしい数にのぼるもので、もしもこれらの有害菌を排出させないで、サイロ中に止めるものとするれば、サイレージの醗酵は著しく悪化することが予想される。すなわち、サイレージ調製時の排汁処理は、単に養分の流亡と言う損失面からのみでなく、サイレージ醗酵初期における有害菌の排出と言う有益面もあるとの認識に立って、利害得失を論ずる必要を強く感ずるものである。

熟成を終えたサイレージは、家畜に給与しながら、サイロの上層部、中層部、下層部の3部分から試料を採取

表-13 *L. plantarum* 接種サイレージの酸組成並びに揮発性塩基

| 区分 | サイロ部位 | pH, 組成 pH | 有機酸組成 (%) | | | 揮発酸組成 (%) | | | VBN* TN (%) |
|------|-------|--------------|-----------------|----------------|----------------|-----------|--------|-------|-------------------|
| | | | 総酸 | 不揮発酸 | 揮発酸 | 酢酸 | プロピオン酸 | 酪酸 | |
| 無接種 | 上層部 | 4.4 | 2.79 | 1.52 | 1.28 | 1.15 | 0.13 | — | 18.1 |
| | 中層部 | 4.4 | 1.93 | 0.61 | 1.32 | 1.18 | 0.13 | trace | 13.9 |
| | 下層部 | 4.2 | 2.00 | 0.91 | 1.10 | 1.03 | 0.07 | — | 10.4 |
| | 平均 | | 2.24 (100.0) | 1.01 (45.1) | 1.23 (54.9) | 1.12 | 0.11 | — | 14.1 |
| Lp接種 | 上層部 | 4.2 | 2.04 | 0.84 | 1.21 | 1.12 | 0.07 | trace | 11.6 |
| | 中層部 | 3.9 | 2.60 | 1.94 | 0.66 | 0.64 | 0.03 | trace | 7.9 |
| | 下層部 | 3.9 | 3.44 | 2.84 | 0.60 | 0.60 | trace | — | 7.3 |
| | 平均 | | 2.69 (100.0) | 1.87 (69.5) | 0.82 (30.5) | 0.79 | 0.03 | — | 8.9 |

* VBN: 揮発性塩基態窒素。 TN: 総窒素。
()内の数字は、総酸を100とした時の比率を示す。

表-14 *L. plantarum* 接種サイレージの嗜好性

| 牛 | 無接種サイレージ | | | Lp接種サイレージ | | |
|----|----------|-------|-------|-----------|-------|-------|
| | 1日目 | 2日目 | 平均 | 1日目 | 2日目 | 平均 |
| 1 | 31.14 | 25.97 | 28.56 | 29.44 | 29.86 | 29.65 |
| 2 | 37.28 | 37.82 | 37.55 | 32.38 | 37.07 | 34.73 |
| 3 | 30.68 | 29.99 | 30.34 | 34.78 | 35.33 | 35.06 |
| 4 | 30.53 | 29.08 | 29.81 | 40.90 | 39.13 | 40.02 |
| 平均 | | | 31.57 | | | 34.87 |

表-15 *L. plantarum* 接種サイレージの回収状況

| サイレージ | 埋蔵量 (kg) | | 回収量 (kg) | | 乾物回収率 (%) |
|-----------|----------|-------|----------|-------|-----------|
| | 生草 | 乾物量 | 生草 | 乾物量 | |
| 無接種サイレージ | 1,465 | 238.8 | 1,043 | 162.7 | 68.1 |
| Lp接種サイレージ | 1,348 | 214.3 | 1,042 | 162.5 | 75.8 |

して、有機酸組成ならびに揮発性塩基を分析し、その結果を表-13に示した。

サイロ上層部は、サイロ内温度測定用サーミスター差込口などをつくったため、水蓋が不完全となり、両試験区ともかびが発生し、若干の腐敗部分を生じた。そのため腐敗部分を除去し、家畜に給与出来る部分を分析しても pH がやや高く、揮発酸、揮発性塩基の量が多く、品質はやや劣っていた。

正常に酸酵が行なわれた中層部ならびに下層部は、*L. plantarum* 接種のものでは pH が 3.9 以下となり、揮発酸や揮発性塩基が少なく、頗る良質のサイレージとなった。無接種のものは、これに比べ pH が高く、揮発酸

は総酸の 50% 以上を占め、揮発性塩基の量も多く、品質はかなり劣っていた。

無接種のものの揮発酸や揮発性塩基の多い理由としては、埋蔵初期の pH 低下が不十分で、長期間にわたり大腸菌群によるヘテロ型の酸酵や蛋白分解菌による塩基性物質の生成が行なわれたことなどが考えられる。

育成牛を用いた嗜好試験の結果は、表-14に示した通りで、*L. plantarum* 接種サイレージは無接種のものより 1 割程採食量が多く、*L. plantarum* の接種がサイレージの品質を改善し、嗜好性を増大することが明らかとなった。

サイレージ熟成過程において、排汁中に流亡する養分

表-16 *L. plantarum* 接種サイレージの消化率*

| 区 分 | 成 分 | 乾 物 | 粗 蛋 白 | 粗 脂 肪 | 可 溶 性 無 窒 素 物 | 粗 織 維 |
|------------------|-----|------|-------|-------|------------------|-------|
| | | | | | | |
| 無 接 種 サ イ レ ー ジ | | 69.2 | 75.2 | 74.8 | 69.4 | 72.5 |
| Lp 接 種 サ イ レ ー ジ | | 71.0 | 77.1 | 74.8 | 73.4 | 70.6 |

* 表中の数字は、綿羊 4 頭の消化率の平均を示した。

表-17 *L. plantarum* 接種サイレージの成分分析値

| 区 分 | サイロの部位 | 成 分 | 水 分 (%) | 乾 物 中 百 分 率 (%) | | | | |
|---------------------|-----------|-----|-------------|-----------------|------------|------------------|-------------|-------------|
| | | | | 粗 蛋 白 | 粗 脂 肪 | 可 溶 性 無 窒 素 物 | 粗 織 維 | 粗 灰 分 |
| 無 接 種 サ イ レ ー ジ | 原 料 | 上 層 | 82.6 | 21.0 | 5.2 | 42.4 | 17.6 | 13.9 |
| | | 中 層 | 84.6 | 19.5 | 4.8 | 47.2 | 20.1 | 8.3 |
| | | 下 層 | 83.8 | 19.8 | 4.6 | 44.9 | 20.6 | 10.1 |
| | | 平 均 | 83.7 | 20.1 | 4.9 | 44.8 | 19.4 | 10.8 |
| | サ イ レ ー ジ | 上 層 | 84.0 | 19.8 | 7.8 | 31.0 | 26.0 | 15.4 |
| | | 中 層 | 84.1 | 19.5 | 7.1 | 40.5 | 22.9 | 10.0 |
| | | 下 層 | 83.8 | 20.7 | 8.3 | 44.0 | 24.5 | 2.5 |
| | | 平 均 | 84.0 | 20.0 | 7.7 | 38.5 | 24.5 | 9.3 |
| Lp 接 種 サ イ レ ー ジ | 原 料 | 上 層 | 84.4 | 23.1 | 4.7 | 42.8 | 20.7 | 8.7 |
| | | 中 層 | 83.7 | 18.3 | 4.8 | 47.0 | 21.1 | 8.7 |
| | | 下 層 | 84.1 | 17.9 | 5.4 | 48.9 | 20.2 | 7.7 |
| | | 平 均 | 84.1 | 19.8 | 5.0 | 46.2 | 20.7 | 8.4 |
| | サ イ レ ー ジ | 上 層 | 85.5 | 19.1 | 6.1 | 41.2 | 24.2 | 9.4 |
| | | 中 層 | 82.8 | 19.8 | 7.4 | 41.3 | 22.0 | 9.4 |
| | | 下 層 | 84.9 | 21.0 | 7.3 | 43.4 | 19.9 | 8.4 |
| | | 平 均 | 84.4 | 20.0 | 6.9 | 42.0 | 22.0 | 9.1 |

表-18 *L. plantarum* 接種サイレージの養分回収状況

| 試料 | 項目 | 乾物量 | 乾物中の各養分 | | | | |
|-----------|-------|----------|---------|------|---------|------|------|
| | | | 粗蛋白質 | 粗脂肪 | 可溶性無窒素物 | 粗繊維 | |
| 無接種サイレージ | 原料 | 乾物組成 | 100.0 | 20.1 | 4.9 | 44.8 | 19.4 |
| | | 可消化養分 | 69.5 | 14.9 | 3.0 | 31.6 | 14.2 |
| | サイレージ | 乾物回収量 | 68.1 | 13.6 | 5.2 | 26.2 | 16.7 |
| | | 可消化養分回収量 | 47.1 | 10.2 | 3.9 | 18.2 | 12.1 |
| | | 可消化養分回収率 | 67.8 | 68.7 | 130.0 | 57.6 | 85.0 |
| | | | | | | | |
| Lp接種サイレージ | 原料 | 乾物組成 | 100.0 | 19.8 | 5.0 | 46.2 | 20.7 |
| | | 可消化養分 | 69.5 | 14.9 | 3.1 | 32.6 | 15.2 |
| | サイレージ | 乾物回収量 | 75.8 | 15.2 | 5.2 | 31.8 | 16.7 |
| | | 可消化養分回収量 | 53.8 | 11.7 | 3.9 | 23.4 | 11.8 |
| | | 可消化養分回収率 | 77.4 | 78.4 | 125.7 | 71.8 | 77.7 |
| | | | | | | | |

損失、上層部の腐敗による損失、醗酵損失、給与開始後のかび発生による損失などを差引き、実際に家畜に給与した量を求めると表-15のごとくで、*L. plantarum* 接種サイレージの乾物回収率は、無接種のものに比べかなりすぐれていた。

緬羊を用いて、原料牧草および熟成終了後のサイレージの消化試験を行なった結果、表-16に示したごとく、*L. plantarum* 接種サイレージでは粗繊維の消化率がやや減少したが、乾物、粗蛋白質、粗脂肪、可溶性無窒素物などの消化率は、原料牧草よりもかなり良好となった。これに反し、無接種のサイレージでは粗蛋白質と粗脂肪の消化率は上昇したが、乾物、可溶性無窒素物、粗繊維の消化率は、原料牧草の消化率よりも低下した。

これらの事実からも、サイレージ埋蔵当初における *L. plantarum* の接種効果が立証されたものと言える。

埋蔵した原料牧草ならびに熟成終了後のサイレージの成分分析値は、表-17に示した。表中の粗脂肪の増加は、可溶性無窒素物の醗酵により生じた不揮発酸が、粗脂肪として定量されたためである。また、粗繊維の増加は、醗酵損失、水溶性物質の流亡などにより、乾物中に占める粗繊維の割合が相対的に増加したに過ぎない。

乾物回収率、消化率、成分分析結果をもとに、埋蔵した原料の乾物量を100とし、粗蛋白質、粗脂肪、可溶性無窒素物、粗繊維などの乾物中に占める割合、熟成終了後の各成分の回収率および可消化養分回収率を算出すると表-18のごとくで、*L. plantarum* 接種サイレージの原料牧草に対する可消化養分回収率は、無接種のものに比べ極めて良好なことが明らかになった。中でも可溶性

無窒素物と粗蛋白質の可消化養分回収率が無接種のものに比べ著しく高く、このことは、有害菌による両成分の消費が著しく抑制されていたことを示している。

以上の結果、*L. plantarum* 接種法を実際に応用することにより、嗜好性ならびに消化率の高い、頗る良質なサイレージを調製出来ることが立証された。

第5節 *Lactobacillus plantarum* の簡易大量増菌法

第3章の実験で、*L. plantarum* が牧草煮汁で良好な発育を示したことを示したが、実際にサイレージ接種用としてこの菌を利用する際に、大量の菌を無菌的に培養することは容易ではない。そのため、雑菌が若干混入していても、大量の乳酸菌が繁殖し、害作用の著しい雑菌が存在しない菌液であれば、サイレージ用乳酸菌液としての効果は十分期待し得るとの考えから、酪農家が簡単に培養出来る方法を考案し、その方法で培養した菌液の乳酸菌数、ならびに雑菌汚染の状況を調べた。

a. 方法

生牧草250gを3cm前後の長さに細切し、水1ℓを加え約1時間煮沸、熱時布で濾過し、濾液にグルコース20gを加え、熱湯を補足して液量を1ℓとした。この液を熱いまま2ℓ容エーレンマイヤーフラスコに注入、綿栓して32°C前後に冷却後、直ちに *L. plantarum* の菌液(32°C、2日間培養)100mlを加え32°Cで2日間培養して、pH、滴定酸度および微生物相を調べた。

生牧草としては、いね科、まめ科混播牧草の外に、オーチャードグラスやアルファルファ単一のものを用い比較した。また、荒天その他の事情で牧草の刈取不能と

か、細切などの手間ははぶく必要にせまられることもあ
ると考え、生牧草の代りに飼料用アルファルファミール
を使用して煮汁を取り、同様に培養実験をも行なった。
アルファルファミールの使用量は、生牧草の乾物量から
概算し、煮汁 1ℓ 当り 50~60g とした。

b. 結果および考察

培養菌液の性状は表-19 に示した通りで、いずれの牧
草煮汁でも *L. plantarum* の生菌数は $1.0 \times 10^8/ml$ を越
え、アルファルファ煮汁およびアルファルファミール煮
汁では $2.5 \sim 3.1 \times 10^9/ml$ にも達していた。

培養菌液の pH はいずれも 4.0 以下となり、酪酸菌数
は菌液 1 ml 当り 1 以下、好気性細菌は最高のオーチャ
ードグラス・ラジノクローバー混播牧草の場合でも $8.1 \times$
 $10^3/ml$ 、かびも最高のもので $2.1 \times 10/ml$ に過ぎなかつた。

比較的汚染度の高い好気性細菌や蛋白分解菌は、すべ
て *Bacillus* 属菌で、牧草煮汁調製中に胞子が死滅しない
まま菌液に移行したものと思われる。

著者がこの研究を通じて使用した原料牧草の菌数、簡

易培養によって得られた菌液の菌数、ならびにこの菌液
を 5% の割合で接種した時の牧草の菌数増加見込量を、
微生物相ごとに対比して表-20 に示した。表中、菌数増
加見込量は、表-19 の簡易増菌液の最低値および最高値
に 5/100 を乗じたもので、増菌液を 5% の割合で接種し
た時に、原料牧草 1g 当り各微生物相がどの程度増加す
るかを示したものである。この表から明らかのように、
簡易増菌して得た乳酸菌液を 5% の割合で接種した場合
には、乳酸菌中の *Lactobacillus* の比率は著しく増加す
るが、酪酸菌、好気性細菌、蛋白分解菌、かびなどの有
害菌は、すでに原料牧草中の菌数が余りにも多く、表示
した程度の汚染菌を含む増菌液を接種しても、埋蔵当初
の有害菌の菌数に殆んど影響を与えない。従って簡易増
菌液に由来する雑菌が、サイレージの品質に悪影響を与
えることはないものと見ることが出来る。

実際使用時には、*L. plantarum* とグルコース併用に
よるサイレージ調製を行なうので、簡易増菌液の接種量
は 0.05% となり、菌数増加見込量も表示した値の 1/100
に減少し、雑菌の影響は更に少なくなり、殆んど無視す

表-19 *L. plantarum* 簡易増菌液の微生物相

| 煮汁採 取牧草 | 混播牧草 | 混播牧草 | 混播牧草 | オーチャー | アルファ | アルファ | アルファ | |
|------------|--|--------------------------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | オーチャー ドグラス ラジノ クローバー 250 g/ℓ | チモン ラジノ クローバー 250 g/ℓ | オーチャー ドグラス アカロ クローバー 250 g/ℓ | ドグラス 250 g/ℓ | ルファ 250 g/ℓ | ファミール 50 g/ℓ | ファミール 60 g/ℓ | |
| 菌液性状 | | | | | | | | |
| pH | 3.7 | 3.5 | 3.7 | 3.6 | 3.8 | 3.7 | 3.7 | |
| 滴 定 酸 度 | 6.01 | 6.58 | 5.88 | 5.10 | 6.96 | 6.01 | 6.88 | |
| 微 | 乳酸菌 | 4.2×10^8 | 1.6×10^8 | 5.8×10^8 | 3.4×10^8 | 2.5×10^9 | 2.8×10^9 | 3.1×10^9 |
| | Streptococci | — | — | — | — | — | — | — |
| | Pediococci | — | — | — | — | — | — | — |
| | Lactobacilli | 4.2×10^8 | 1.6×10^8 | 5.8×10^8 | 3.4×10^8 | 2.5×10^9 | 2.8×10^9 | 3.1×10^9 |
| 生 | 酪酸菌 | 1> | 1> | 1> | 1> | 1> | 1> | 1> |
| | 好気性細菌 | 8.1×10^3 | 5.1×10^2 | 1.1×10^2 | 6.3×10^2 | 1.3×10^2 | 4.9×10^2 | 5.8×10^2 |
| | Gram- rods | — | — | — | — | — | — | — |
| | Gram+ cocci | — | — | — | — | — | — | — |
| | Gram+ rods | — | — | — | — | — | — | — |
| 物 | Bacilli | 8.1×10^3 | 5.1×10^2 | 1.1×10^2 | 6.3×10^2 | 1.3×10^2 | 4.9×10^2 | 5.8×10^2 |
| | 蛋白分解菌 | 2.1×10^2 | 4.8×10 | 2.1×10 | 8.3×10 | 2.5×10 | 6.7×10 | 7.1×10 |
| | 酵 母 | 1> | 7.1×10 | 1> | 2.3×10^2 | 1> | 3.4×10^2 | 1.3×10 |
| 相 | か び | 2.1×10 | 1> | 1> | >1 | >1 | 1> | 1> |

表-20 原料牧草の微生物相および簡易増菌液添加時の菌数増加見込量

| 微生物相 | 試料 | 原料牧草 (菌数/g) | 簡易増菌液 (菌数/ml) | 菌液5%接種による 菌数増加見込量 (菌数/g) |
|--------------|----|--|--|--|
| 乳酸菌 | | 10> ~2.2×10 ⁷ | 1.6×10 ⁸ ~3.1×10 ⁹ | 8.0×10 ⁶ ~1.6×10 ⁸ |
| Streptococci | | 10> ~2.2×10 ⁷ | — | — |
| Pediococci | | — ~ 10> | — | — |
| Lactobacilli | | — | 1.6×10 ⁸ ~3.1×10 ⁹ | 8.0×10 ⁶ ~1.6×10 ⁸ |
| 酪酸菌 | | 10> ~5.3×10 ² | 1> | 0.05> |
| 好気性細菌 | | 1.2×10 ⁶ ~3.5×10 ⁸ | 1.1×10 ² ~8.1×10 ³ | 5.5 ~4.1×10 ² |
| Gram- rods | | 9.5×10 ⁵ ~6.8×10 ⁷ | — | — |
| Gram+ cocci | | — ~2.8×10 ⁶ | — | — |
| Gram+ rods | | — ~4.4×10 ⁷ | — | — |
| Bacilli | | 5.1×10 ~4.7×10 ³ | 1.1×10 ² ~8.1×10 ³ | 5.5 ~4.1×10 ² |
| 蛋白質分解菌 | | 2.8×10 ⁴ ~4.8×10 ⁷ | 2.1×10 ~2.1×10 ² | 1.1 ~1.1×10 |
| 酵 | 母 | 10> ~1.0×10 ⁵ | 1> ~3.4×10 ² | 0.05> ~1.7×10 |
| か | び | 1.4×10 ² ~3.2×10 ⁵ | 1> ~2.1×10 | 0.05> ~ 1.1 |

ることが出来る。

これらの結果から、牧草煮汁とグルコースを用い、完全滅菌を行わなくても、容易にサイレージ用乳酸菌液を調製出来ることが明白になった。著者らのこの簡易増菌法を利用すれば、酪農家は今後種菌の供給さえ受ければ、手持ちの資材を利用して、大量の活性の高いサイレージ用乳酸菌を安価に培養することが可能である。

第5章 乳酸菌接種サイレージ調製法の考案

前章までの実験により、サイレージ調製時に *L. plantarum* の培養菌液を少量のグルコースと共に牧草に散布しながら埋蔵すると、良質なサイレージが出来ることが明らかとなったので、この方法を実用化するために、酪農家が手持ちの資材を高度に利用して、出来るだけ安価にグラスサイレージをつくる方法を考案し、「北大式グラスサイレージ調製法」と仮称して普及することとした。

北大式グラスサイレージ調製法の原理、乳酸菌培養増菌法、牧草への接種法、経済性などは次の通りである。

第1節 北大式グラスサイレージ調製法の原理

サイレージが良く出来るのは、乳酸菌が十分に働いて家畜の嗜好性に適した芳醇な醗酵風味を醸成すると共に、乳酸が出来るため pH が下がり、腐敗菌や酪酸菌のような有害菌を抑制するので、栄養成分の分解損失を防ぎ、悪臭、変色などが起こらないためである。

これにはサイレージ埋蔵初期の出来るだけ短期間 (3~4日以内) に強力な乳酸菌を極力増殖させてしまい、pH を早く 4.2 以下に下げることが最も大切である。これが遅れば遅れる程、腐敗菌や酪酸菌の活動を許す結果となり、サイレージの品質と栄養価が低下する。

若刈牧草やまめ科の多く混った牧草を原料としたグラスサイレージは、蛋白質の豊富な栄養価値の頗る高い飼料であるが、それだけに腐敗することが多く、悪臭を発生したり、変色、変質などを起こし使用に耐えないものとなるのがまことに多い。

乳酸菌の発育と醗酵作用を十分にさせるためには、蛋白質と醗酵性糖分との比率が重要な因子で、デントコーンはこの比率がうまく保たれているため良い醗酵が起こるが、牧草では蛋白質の方が多いため醗酵がうまく行かなくなるのである。

北海道大学農学部応用菌学教室では、10年余にわたり、グラスサイレージの醗酵についていろいろな面から研究をすすめ、特にサイレージの醗酵に最も重要な役割をはたす乳酸菌を多種類分離し、それらについて選択試験を行なった結果、*L. plantarum* が最も強力なグラスサイレージ醗酵菌であることを確認した。更に、この菌を増殖させて、若い元気のよい状態にあるものをサイレージ原料牧草に散布、同時にこの菌の醗酵誘起原料としてグルコースを少量加えてやることによって、決して失敗

することなく、品質の頗る良好なグラスサイレージが出来ることが確実となった。

第2節 乳酸菌培養増菌法

a. 培地のつくり方 (図-29 参照)

実際に用いる場合、*L. plantarum* の増菌培養に最も良い培地 (牧草煮汁・グルコース添加液) のつくり方は次の通りである。ただし、ここにはサイレージ 50 屯を調製するのに必要な培地のつくり方を記した。従って、この量は調製するサイレージの量に応じて、加減することが必要である。

- i) 牧草 (なるべくまめ科混入率の多い若草) を刈取り、直ちに 3 cm 前後の長さに切り用意する (新鮮なもの程良い)。
- ii) 牛乳輸送缶 1 本に i) の牧草 6~7 kg を入れ、水を 25 ℓ 程加え、加熱して 1 時間煮出す。
 荒天その他の事情で牧草刈取が困難な時、あるいは急を要する時には、牧草 6~7 kg の代り

に飼料用アルファルファミール 1.2~1.5 kg を使用しても良い。

- iii) 別に牛乳輸送缶 1 本にグルコース 500 g を入れておき、これに ii) の輸送缶から熱い牧草煮汁を布漙しながら加え、グルコースを溶解する。汁液が一部牧草に吸われ減少するので、熱湯を補足して全体の液量を 20~25 ℓ になるように補正する。

b. 種菌接種

- iv) 牧草煮汁・グルコース添加液の入った牛乳輸送缶 iii) を静かに放冷するか、または水に漬けて冷し、32~35°C になってから、*L. plantarum* の種菌液 (培養 10 日以内の新鮮なもの) を 2~2.5 ℓ 接種して手早く振りまぜる。

c. 培養

- v) 種菌を接種した輸送缶 iv) は、直ちに 30~32°C の恒温器に入れるか、乾草が乾いた鋸屑の中に埋めて温度が余り下がらぬようにして 2 日間静置培養する。輸送缶 iv) を電気毛布で包んで、温度調節して置くのも良い方法である。

d. 貯蔵

- vi) 上のようにして培養した乳酸菌液は直ちに使用するのが最も好ましいが、もしも何日か後に使用しなければならない時には、出来るだけ冷却して、冷たい所 (冷蔵庫, 2~5°C が理想的) に貯えることが大切である。
- vii) 冷却保存した乳酸菌液は、10 日以内のものであれば使用して十分の効果を挙げる事が出来る。

第3節 原料牧草に乳酸菌を接種する方法

- i) 前記の方法で輸送缶に培養増菌させた乳酸菌液を、グルコース 30 kg を溶かした 1~1.5 屯の水にうすめ、よく混合する。
- ii) サイレージ用原料牧草を刈取り、出来るだけ新鮮なうちに 3~5 cm 程度に切り、サイロに詰め段階でカッターから吹上機にコンペアー上を移動する間に、乳酸菌稀釈液 i) を牧草に滴下混合すると、吹上機が噴霧機の役割をして均一に菌を散布してくれるので効果的である。
- iii) 乳酸菌の稀釈液 i) は、牧草の詰めはじめから、詰め終わるまで、出来るだけ均一に添加することが必要なので、スプレーや如露で散布するのも良いが、下部にコックを取付けたドラム缶に乳酸菌稀釈液を入れておき、コックの開き方を

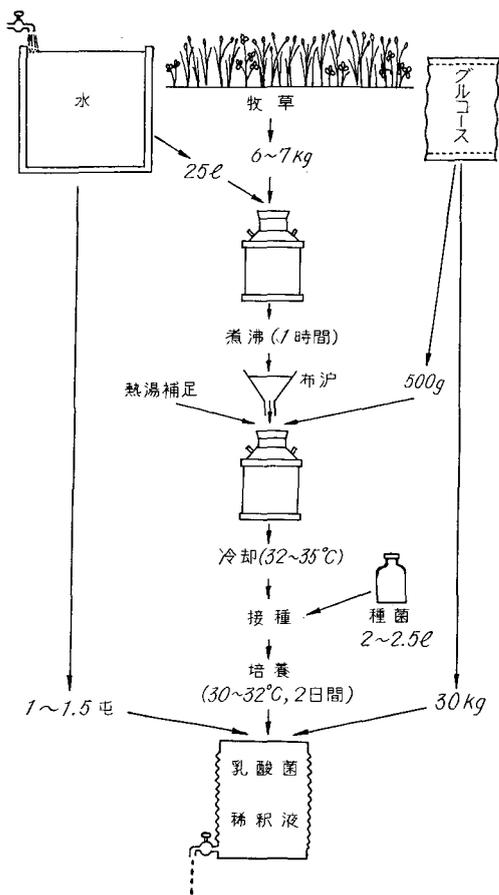


図-29 サイレージ用乳酸菌増菌法図解

加減して平均に滴下するようにした方が人手を要しなくてよい。

- iv) 牧草は、サイロ中に隙間なく、むらのないように良く踏みこんで、空気を排除するために密にしっかりと詰めることが大切である。
- v) もしも、乳酸菌稀釈液が余った場合には、埋蔵した牧草の上から散布する。
- vi) 埋蔵終了後は、かびなどの発生を防ぐために、ビニールシートをかぶせ、重石を置き十分に加圧しておくことが必要である。最近、ビニール製の水蓋が用いられることが多い。

第4節 北大式グラスサイレージ調製法の経済性

サイレージの品質を改善するために、これまで種々の添加物が用いられて来たが、今日使用されている主な添加物を選び、100 屯のサイレージを調製するのに必要な添加物の購入価格を調査し、著者らが考案した乳酸菌接種によるサイレージ調製法の必要経費と比較したところ表-21のごとくになった。

表中の必要経費は、今日一般にサイレージ埋蔵時に添加されているそれぞれの添加物の量を基礎として試算したもので、乳酸菌接種法以外では、原料牧草100 屯に添加する添加物の購入費は、比較的安いビートパルプや廃糖蜜でも5~10 万円を要し、添加効果のすぐれているコーンミールを使用するとすれば、その購入費は21 万円以上となり、酪農家としては甚大な出費となる。

今回、著者らが考案した乳酸菌接種法では、*L. plantarum* の種菌が円滑に供給されれば、酪農家が購入しなければならない資材は、サイレージ100 屯当たりグルコース60 kg、農協価格で約6,000 円に過ぎず、牧草煮汁をつくるための燃料費、培養装置に使用する電気料などの

諸経費を加算しても、これまで使用されて来た添加物に比べ著しく少ない経費ですむこととなる。

乳酸菌接種法は、現在「北大式グラスサイレージ調製法」として普及段階にあるので、北海道内でこの方法でサイレージを調製する場合には、種菌は北海道大学農学部応用菌学教室から無料で提供されている。

将来この方法によるサイレージ調製の利点が認識され、広く実施される段階に到達すれば、種菌の分譲業務は、各地の農業試験場、農業改良普及所あるいは乳業関係会社のサービス部門に移す予定で、その際には種菌の分譲を受ける酪農家は若干の経費を負担することとなる。しかしながら、種菌の分譲が営利事業として行なわれない限り、乳酸菌接種法によるサイレージ調製費の増加分は、無接種のものに比べ100 屯当たり1 万円を越えることはなく、この程度の経費の増加は、サイレージの飼料価値の増大によって十分補われるもので、しかも品質のすぐれたサイレージを確実に生産し得る点で、酪農経営に寄与するところ極めて大であると確信する。

なお、この方法によるサイレージ調製の実用化試験は、渡島当別のトラピスト修道院で昭和41年に開始、成績が良かったのでその後デントコーンによるサイレージ調製を中止し、この方法を忠実に行なって毎年500 屯ずつのグラスサイレージを調製、80 頭余の乳牛を飼育しており、今日まで優秀な成績を挙げ続けている。また、その付近の酪農家にも次第にこの方法が拡がりつつある。

昭和44年には、八雲地方、根釧地方、札幌近郊でも、この方法によるサイレージ調製が行なわれるようになり、昭和45年には北見地方にも拡がり、更に広く普及される勢にある。

表-21 サイレージ用添加物の価格調

| 添 加 物 | 包 装 (kg) | 単 価 (円) | 常用添加率 | 100 屯当添加量 | 100 屯当必要経費 (円) |
|------------------------|-------------|-------------|------------------------|--------------------|--------------------------|
| 廃 糖 蜜 ^a | 24 | 1,150 | 1~2% | 1~2 屯 | 47,920~ 95,840 |
| 糖 蜜 混 合 ^a | 20 | 550 | 2~5% | 2~5 屯 | 55,000~137,500 |
| 糖 蜜 飼 料 ^b | 20 | 620~ 650 | 2~5% | 2~5 屯 | 62,000~162,500 |
| ふ す ま ^a | 30 | 885 | 2~5% | 2~5 屯 | 59,000~147,500 |
| ビートパルプ ^a | 60 | 1,400~1,700 | 2~5% | 2~5 屯 | 46,700~141,700 |
| コーンミール ^c | 20 | 2,100~2,500 | 2~5% | 2~5 屯 | 210,000~512,500 |
| 塩 酸 (工業用) ^d | 23 | 750~900 | 2N-HClとして 60~70 l/屯 | 23 kg 詰 78~91 本 | 58,500~ 70,980 |
| グルコース +乳酸菌液 | 20 | 1,850~2,000 | 0.06% | 60 kg | 5,550~ 6,000 +乳酸菌液調製費 |

備考: a. ホクレン, b. 日甜, c. 北日本産業, d. 三井物産による調査価格。

第6章 *Lactobacillus plantarum* 接種サイレージの現地調製試験

L. plantarum の培養菌液をグルコースと一緒に接種して、グラスサイレージを調製する方法は、第4章第4節で述べた中間試験を経て、「北大式グラスサイレージ調製法」として、昭和43年から普及段階に入り、その後現在までに北海道内でこの方法でつくられたサイレージの量は、3万屯を越すものとみられる。

この方法でサイレージを調製した酪農家ならびに農業改良普及員からの報告によれば、ごく一部の例外を除き、嗜好性の高い頗る良質なサイレージが出来ていると言われているが、これらの現地調製例の報告の多くは、酪農家の経験的観察にもとづくもので、研究成果として述べるのには客観性にとぼしいとの批判を受けることもあろうと思われる。従って、本章では現地で増菌したサイレージ用乳酸菌液の性質、ならびにそれらを使用して調製したサイレージの品質について調査した結果を述べる。

第1節 サイレージ用乳酸菌の現地増菌試験

第4章第5節の実験において、牧草煮汁を熱時戸過してグルコースを加え、冷却後直ちに *L. plantarum* の種菌を接種して培養すると、培地を完全に滅菌しなくても、雑菌汚染の頗る少ない、十分に使用に耐え得る乳酸菌液が得られることを確かめた。しかしながら、酪農家において実際にこの方法で増菌した乳酸菌液が雑菌汚染の少ない状態にあるか否かを明確にしておくことが必要なので、札幌近郊の酪農家の協力を得て、サイレージに接種する直前の乳酸菌液を採取してその性質を調べた。

a. 方法

乳酸菌接種によるグラスサイレージの調製を試みよう

としていた札幌近郊の酪農家に、「北大式グラスサイレージ調製法」を説明し、第5章に記した方法でサイレージ用乳酸菌の増菌を行なわせ、使用する直前の培養菌液を採取して、乳酸菌数、雑菌汚染の状況、pH、滴定酸度などを調べた。

増菌培養の期間は2日とし、培養温度の調節には電気毛布を使用した。*L. plantarum* の種菌は、北海道大学農学部応用菌学教室から提供した。

b. 結果および考察

酪農家が培養したサイレージ用乳酸菌液の乳酸菌数、雑菌汚染の状況、pH、滴定酸度などの測定結果は、表-22に示した。表中、A, B, C, Dの4点はいね科主体、Eはまめ科主体の混播牧草の煮汁を培地としたもので、この調査でも *L. plantarum* の増菌培地としては、まめ科主体の牧草煮汁を用いるのがよいことが再確認された。

サイレージ調製に有害な酪酸菌は、菌液1ml当たり1以下で、好気性細菌や蛋白分解菌が若干認められたが、いずれも有孢子細菌で、サイレージ熟成過程では、*L. plantarum* による急速なpH低下が起こるので、これらの菌が害作用を現わすことはないものと考えられた。酵母は菌液CとDにやや多かったが、表-20の簡易増菌液を接種した時の有害菌の増加見込量で説明したように、この程度の雑菌を含む菌液を0.05%の割合で散布埋蔵しても、原料牧草中の有害菌の方がはるかに多く、サイレージ熟成過程においてこれらの雑菌が害作用を与えることはないものと推測された。従って、前述の「北大式グラスサイレージ調製法」の諸注意を守って増菌培養を行なえば、酪農家が培養した菌液は、サイレージ用乳酸菌液として十分その効果を発揮し得るものとみなされる。

表-22 酪農家が増菌培養したサイレージ用乳酸菌液

| 農家略号 | A | B | C | D | E | |
|---------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 菌液の性状 | | | | | | |
| pH | 3.5 | 3.5 | 3.4 | 3.4 | 3.6 | |
| 滴 定 酸 度 | 6.78 | 6.58 | 6.80 | 7.72 | 5.78 | |
| 微生物相 | 乳 酸 菌 | 1.2×10^8 | 4.2×10^8 | 1.1×10^8 | 1.4×10^8 | 2.5×10^9 |
| | 酪 酸 菌 | 1> | 1> | 1> | 1> | 1> |
| | 好気性細菌 | 8.2×10^3 | 2.6×10^2 | 2.1×10^2 | 1.8×10^2 | 5.7×10^2 |
| | 蛋白分解菌 | 2.8×10^2 | 3.0×10 | 1.3×10 | 1.0×10 | 3.3×10 |
| | 酵 母 | 1> | 7.3×10 | 2.5×10^4 | 1.4×10^4 | 2.5×10^2 |
| か び | 3.6×10 | 1> | 1> | 1> | 1> | |

菌数は、菌液1ml中の生菌数を示す。

第2節 *Lactobacillus plantarum* 接種サイレージの現地調製例

著者らの考案した、*L. plantarum* とグルコースを併用してサイレージの品質を改善する方法の実際応用例として、札幌近郊の酪農家で、さきに述べた「北大式グラスサイレージ調製法」にもとづいて調製したサイレージの品質を調査した。

a. 方法

前節で述べた酪農家において増菌したサイレージ用乳酸菌液を、埋蔵量に応じて2% グルコース溶液で稀釈し、細切牧草に散布しながら埋蔵し、約3カ月の熟成を行なわせたサイレージを採取して、pH、醗酵成分、乾物中飼料成分および微生物相を調べた。

菌液の接種量は、原料牧草に対し0.05%、グルコースの添加量は0.06% となるように調整した。

サイロは、いずれも塔型サイロを使用した。

b. 結果および考察

札幌近郊の酪農家が、「北大式グラスサイレージ調製法」にもとづいて調製したサイレージの埋蔵量、pH、醗

酵成分、乾物中飼料成分ならびに微生物相は、表-23に示した。

表から明らかなように、5点のサイレージはいずれもpHが4.0あるいはそれ以下に低下し、黄緑色で甘酸臭を発生し、極めて良質であった。

サイレージAでは、揮発酸ならびに揮発性塩基がやや多かったが、他の4点では揮発酸も揮発性塩基も少なく、接種した乳酸菌が十分にその効果を発揮したものと考えられた。この中で特に興味あることとして、まめ科牧草を主体としたサイレージEの品質が、頗る良好だったことが挙げられる。

サイレージEが、まめ科主体の牧草を原料としたにもかかわらず、良質なサイレージとなった理由の一つとして、添加した乳酸菌数が著しく多かったことが考えられる。

サイレージAは、水蓋の不完全のためか、表層部に若干かびが発生、部分的に腐敗が認められ、これが揮発酸や揮発性塩基の含量を高めたものと思われる。

著者は、最初、表-19に示した簡易増菌液の菌数値か

表-23 *L. plantarum* 接種サイレージ現地調製例

| 農家略号 | | A | B | C | D | E |
|------------|---------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 成分と微生物相 | 埋蔵量(屯) | 40 | 40 | 18 | 32 | 32 |
| | 水分(%) | 80.1 | 78.5 | 78.4 | 75.6 | 81.0 |
| | pH | 4.0 | 3.8 | 3.8 | 4.0 | 3.9 |
| 醗酵成分(%) | 総酸 | 3.08 | 3.99 | 3.74 | 2.97 | 3.99 |
| | 揮発酸 | 0.63 | 0.54 | 0.28 | 0.34 | 0.51 |
| | 揮発酸/総酸 | 20.5 | 13.6 | 7.5 | 11.4 | 12.9 |
| | VBN/TN* | 10.4 | 4.8 | 4.1 | 2.6 | 6.2 |
| 乾物中飼料成分(%) | 粗蛋白質 | 12.1 | 13.6 | 15.3 | 14.4 | 23.1 |
| | 粗脂肪 | 5.7 | 5.1 | 6.8 | 9.1 | 9.1 |
| | 粗繊維 | 32.5 | 32.6 | 29.4 | 28.2 | 22.1 |
| | 可溶性無窒素物 | 42.5 | 39.3 | 42.4 | 39.2 | 36.5 |
| | 粗灰分 | 7.2 | 9.4 | 6.1 | 9.1 | 9.2 |
| 微生物相 | 乳酸菌 | 4.0×10^8 | 3.4×10^5 | 2.8×10^4 | 9.7×10^6 | 4.6×10^5 |
| | 酪酸菌 | 3.4×10 | 10> | 10> | 3.8×10 | 10> |
| | 好気性細菌 | 3.2×10^3 | 1.4×10^3 | 4.1×10^3 | 2.3×10^4 | 1.6×10^4 |
| | 蛋白質分解菌 | 2.8×10^2 | 1.3×10^2 | 7.4×10^2 | 1.0×10^4 | 1.2×10^3 |
| | 酵母 | 10> | 10> | 10> | 10> | 3.1×10 |
| | かび | 3.8×10 | 10> | 10> | 10> | 10> |

* VBN: 揮発性塩基態窒素, TN: 総窒素。

ら、まめ科混入率の多い牧草煮汁で *L. plantarum* を培養すれば、生菌数 $4.0\sim 5.0\times 10^8/ml$ の菌液が得られ、埋蔵時の菌液の接種量を 0.05% としても、牧草 1g 当りの接種菌数は $2.0\sim 2.5\times 10^6$ 前後となるものと期待していた。しかし、今回の実施例では、A, B, C, D のサイレージに接種した乳酸菌液は、いね科主体の牧草煮汁で培養されたため、B を除く 3 者では予定菌数をかなり下まわっていた。それにもかかわらず、各サイレージの品質は良好だったが、埋蔵時の接種菌数が多い場合には、サイレージ E のように、従来良質なサイレージの調製が困難とされていたまめ科主体の牧草でも、極めて良質のサイレージとなり得ることが明らかになった。この点に

注目し、サイレージ用乳酸菌の増菌には、出来るだけまめ科混入率の多い牧草あるいはまめ科牧草単一の煮汁を用い、埋蔵時に使用する増菌液の生菌数が $1.0\times 10^9/ml$ を越えるようにするのが望ましい。

サイレージ A から E までの微生物相をみると、乳酸菌はいずれも Lactobacilli で、接種した *L. plantarum* が効率よく働いていたものと推測される。また、熟成終了時の乳酸菌数は、pH の低下したものと程減少する傾向が見られた。

A および D では酪酸菌が若干存在したが、この程度の菌数値では、サイレージに顕著な害作用を与えるとは思われなかった。また、好気性細菌と蛋白分解菌は、い

表—24 *L. plantarum* 接種サイレージ現地調製例 (北農試・西部ら)

| 農家略号 | | F | G | H | I | J | |
|-------------------|--------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------|---------------|-------------------------------------|------|
| 埋蔵条件 とサイレージの成分 | 埋蔵量 (屯) | 80 | 60 | 100 | 20 | 40 | |
| | 埋蔵時水分 (%) | 80 | 80 | 80 | 予乾 70 | 予乾 70 | |
| | 使用サイロ | 角型サイロ | トレンチサイロ ビニール土盛 20 cm | バンカーサイロ ビニールのみ | 塔型サイロ | スタックサイロ ビニール土盛 | |
| | 原料牧草 | オーチャード グラス ラジノ クローパー | チモシー アカロ ーパー | オーチャード グラス ラジノ クローパー | オーチャード グラス | オーチャード グラス チモシー アカロ ーパー | |
| | 細切状況 | 長いまま | チョッパー 細切 | チョッパー 細切 | 適期細切 | 長いまま | |
| サイレ | 取出時水分 (%) | 78.8 | 77.1 | 80.3 | 77.0 | 67.2 | |
| | 取出時上層部腐敗 | なし | なし | 殆んどなし | なし | 中間部かび発生 | |
| | pH | 3.8 | 3.9 | 3.9 | 3.4 | 5.2 | |
| | 醗酵成分 (%) | 3.89 | 3.33 | 3.07 | 3.83 | 3.65 | |
| | 揮発酸 / 総酸 | 1.03 | 1.01 | 0.99 | 0.25 | 0.89 | |
| レ | 揮発酸 / 総酸 (%) | 26.5 | 30.3 | 32.2 | 6.5 | 24.4 | |
| | VBN/TN* | 11.8 | 6.9 | 13.9 | 5.5 | 15.9 | |
| | 乾物中飼料成分 (%) | 粗蛋白質 | 17.3 | 12.0 | 10.6 | 13.7 | 12.7 |
| | | 粗脂肪 | 6.5 | 5.7 | 3.4 | 4.9 | 3.4 |
| | | 粗繊維 | 29.9 | 31.5 | 39.5 | 32.3 | 34.2 |
| 可溶性無窒素物 | | 40.4 | 43.8 | 35.6 | 39.4 | 41.5 | |
| 粗灰分 | 5.9 | 7.0 | 10.9 | 9.7 | 8.2 | | |
| 備考 | 踏圧 4~5 人 | | | | 刈遅れ糖蜜飼料 10 俵 | | |

* VBN: 揮発性塩基態窒素, TN: 総窒素。
埋蔵時水分は、予定水分量で実際値とは若干差があった。

ずれも *Bacillus* 属菌で、サイレージ中で活発に活動しているものとは考えられなかった。

「北大式グラスサイレージ調製法」は、さきに述べたように、昭和41年、渡島当別のトラピスト修道院で実地試験を開始し、昭和44年以降かなり広範囲に普及され、その効果も次第に認められて来ているが、現地調製例として客観的に評価されるだけの分析結果を示しているものは甚だ少ない。

著者の調査した5例のみでは、客観性を欠くと見られる恐れもあるので、著者が入手した北海道農業試験場の西部らの結果⁸²⁾を参考までに表-24に掲げ、彼等の説明をそのまま引用すれば「サイレージ F, G, H, I は pH 4.0 以下の良質のものであり、しかも F, G, H は無細切あるいはチョッパーなどによる比較的長く切断されている原料牧草を埋蔵したものであることを考慮すると、一般的無細切サイレージに見られるような悪質なものが見られないのみか、かなり良質のものと考えられる。中でも適期刈、細切した I は最良のサイレージと考えられた。この中で最も悪かった J は刈遅れの予干を行ない、無細切で、更にグルコースが無かったので糖蜜飼料 10 俵を加えて埋蔵したものであった。従って、水分も 70% 以下となり、乳酸菌接種の効果が十分に発揮されなかったものと推測される。しかも、このサイレージも 5 例中最悪だったとは言えども、普通に酪農家で調製されているスタックサイロのサイレージと比べると品質が劣るものではなかった。」などの所見が述べられている。

以上の結果から明らかなように、著者らが考案した *L. plantarum* とグルコースを併用する「北大式グラスサイレージ調製法」は、第5章に述べた諸注意に十分留意して実施されれば、サイレージの品質は現状より顕著に改善され、酪農経営上益するところ大なるものがあると信ずる。

第5編 総 括

サイレージは、冬季の多汁質飼料としてのみならず、酪農経営の合理化の上にも頗る重要な位置を占め、酪農の盛んな先進諸国では、極めて古い時代からその調製と研究が行なわれて来た。しかしながら、家畜の飼料として好適な蛋白質の多い牧草をサイレージとして確実に貯蔵するには、A.I.V. 法を主体とした酸添加法以外に見るべきものがなく、この方法は作業上数多くの障害をとまらうので、わが国では殆んど採用されていないのが現状である。

今日までのサイレージの研究を見ると、その多くは原

料牧草の性質ならびに調製法と出来上がったサイレージの品質と言う間接的な外部的関係にのみとられ、サイレージの熟成が微生物によって行なわれていると言う本質的認識に立って研究を行なっているものは頗る少なく、まして、人為的にその微生物相を制御して、常に良質なサイレージを調製しようとする試みは、皆無と言っても過言ではなかった。

北海道大学農学部応用菌学教室においては、昭和35年以来10余年にわたり、サイレージの微生物相の究明、良質なサイレージの調製に利用し得る菌類の発見、有害な菌類の防除対策の確立などを目的として、数多くの研究を重ね、グラスサイレージの埋蔵時に乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum*) とグルコースを併用すると、サイレージの品質が著しく向上することをはじめて明らかにし、実際利用の研究を重ねて「北大式グラスサイレージ調製法(仮称)」を考案普及し、次第にその真価が認識され、好評を得るに到った。本論文は、この一連の研究の中で、著者の分担した研究の成果をまとめたものであるが、その結果を要約すると次のごとくである。

1. 牧草の細切処理は、サイレージ埋蔵時における牧草の圧密を良くし、汁液を滲出し易くするので、乳酸菌の発育を促進し、pHの低下を早める。
2. 牧草の加圧ならびにサイロの脱気処理は、好気性細菌や蛋白分解菌の増殖を抑制し、乳酸菌による pH の低下を助長する有効なものであることを、微生物相の遷移解明により確認した。
3. サイレージの熟成温度と乳酸菌相の関係を追究し、温度の低い場合は、埋蔵初期には *Streptococci* その後 *Lactobacilli* が乳酸醗酵の主体をなすが、熟成温度が頗る高い場合には、有胞子の好熱性酸生成菌 *Bacillus coagulans* が働くことを明らかにした。
4. 埋蔵初期に熟成温度の高かったサイレージでは、温度の低下にともない酪酸菌が増殖し、品質を劣化させることを認めた。
5. 牧草刈取後、埋蔵までの処理の間に、土砂などが混入すると、大量の雑菌汚染を起こし、牧草の微生物相に変動を与え、サイレージの品質に悪影響をおよぼすことを認めた。
6. 刈取時期の早い牧草では、外気温の低いことも原因して、埋蔵当初における乳酸菌および有害菌の菌数が共に少ないが、刈取時期が高温期になるにつれて、乳酸菌が増加し、同時に有害菌の数も増加することを見た。
7. 刈取時期が夏に近い遅刈牧草では、牧草の組織が硬化して圧密が悪くなるのみならず、外気温の高いこと

や有害菌が醗酵熱を生ずることなどが重なって、サイレージの醗酵温度が上昇し、品質が劣化することが多いことを認めた。

8. 原料牧草を予乾すると、乳酸菌数が減少し、pHの初期低下を不十分とするので、好気性細菌や蛋白分解菌が初期に一時増殖する。その結果、揮発酸や揮発性塩基の生成が活発になり、生酸量が多い割に品質の劣るサイレージを生ずることを明らかにした。

9. サイロの種類と微生物相ならびにサイレージの品質との関係を調べた中で、ビニールバキュームサイロは、牧草を埋藏したまま野外に放置すると、好気性細菌その他の有害菌の醗酵熱と直射日光による加熱の相乗作用を受け、サイレージの可消化養分回収率を著しく低下することを明らかにした。

10. 酸添加法、糖蜜添加法、ふすま添加法などで埋藏したサイレージの微生物相と品質との関係を調査し、これらの添加物が熟成過程における微生物相の遷移状態を改善し、サイレージの品質向上に大きな役割をはたすことを認めた。

11. 無接種のものを対照とし、乳酸菌接種法と酸添加法によってサイレージを調製し、微生物相の遷移を経日的に調査し、乳酸菌接種法と酸添加法の微生物相は近似した遷移をたどり、サイレージの品質も良好となることを提示した。

12. サイレージから分離した微生物 5,000 余株を分類学的に研究し、細菌を 15 属 35 種 2 亜種に、酵母を 11 属 41 種 2 亜種に、かびを 21 属 58 種 3 亜種に分類同定すると共に、これらの微生物の出現状況を明らかにし、多数の微生物が、サイレージの熟成に複雑に関係し、その品質に大きな影響を与えることを示した。

13. サイレージから分離した乳酸菌を用いて、サイレージ熟成菌としての適性につき実験を行ない、有用菌株として *L. plantarum* の 1 株を選択した。

14. 種々の牧草煮汁を用いて *L. plantarum* の増殖、pH の変化、生酸力などを比較し、牧草煮汁はいずれも *L. plantarum* の増菌用培地として頗る有効で、中でもまめ科牧草が最もすぐれていることを明らかにした。

15. *L. plantarum* の簡易増菌法を考案し、牧草煮汁を完全滅菌しなくても、サイレージ用菌液として十分効果を発揮し得るものを調製する方法を確立した。

16. *L. plantarum* 接種によるサイレージ調製試験を行ない、*L. plantarum* がサイレージ乳酸菌として極めてすぐれていることを確認した。

17. *L. plantarum* と炭水化物の多い添加物との相乗

効果を研究し、グルコースや糖蜜のように、埋藏後直ちに乳酸菌が利用出来る速効型の添加物を、必要最少量併用すると、*L. plantarum* の接種効果が増大することを認めた。ただし、糖蜜は雑菌の汚染が著しいので、実際利用上はグルコースを用いるのが最良であった。

18. 乳酸菌接種サイレージ実用化の予備試験として、中規模のサイロを用い *L. plantarum* の培養菌液とグルコースを併用したグラスサイレージを調製し、醗酵成分、飼料成分、嗜好性、消化率などを調べ、乳酸菌とグルコースの相乗効果により、サイレージの品質を顕著に向上させ得ることを示した。

19. *L. plantarum* 接種によるグラスサイレージ調製法を実用化するために、酪農家が手持の資材を高度に利用して、出来るだけ安価に良質なグラスサイレージを調製する方法を確立し、「北大式グラスサイレージ調製法」として普及した。

20. 酪農家の協力を得て、実際の規模で *L. plantarum* とグルコースを併用してグラスサイレージを調製し、その品質を調査検討した結果、著者らの提示した「北大式グラスサイレージ調製法」が忠実に実施されるならばグラスサイレージの品質は現状より顕著に改善され、酪農経営上益するところ大なるものがあるとの確信を持つに至った。

第6編 参考文献

- 1) 安達 充・安田弘太郎・鈴木 要・木村博一・荻野正作 磯貝誠吾・嶋田四郎・柳井羊平・嶋田洋一 (1963): 群馬県畜産試験場報告 (昭和 37 年度)。
- 2) 安達充・嶋田洋一・荻野正作・細野一英 (1963): *ibid.* (昭和 37 年度)。
- 3) ALLEN, L. A. and HARRISON, J. (1936): *Ann. Appl. Biol.*, **23**: 546-557.
- 4) ALLEN, L. A. and HARRISON, J. (1937): *ibid.*, **24**: 148-153.
- 5) ALLEN, L. A., HARRISON, J., WATSON, S. J. and FERGUSON, W. S. (1937): *Jour. Agr. Sci.*, **27**: 271-293.
- 6) ANDERSON, K. J. (1956): *Nature*, **177**: 96-97.
- 7) ARCHIBALD, J. G. (1946): *Jour. Agr. Res.*, **72**: 277-287.
- 8) BABCOCK, S. M. and RUSSELL, H. L. (1900): *Wis. Agr. Expt. Sta., 17th Ann. Rept.* (1899)/1900. p. 123-141 [cf. 50, 61].
- 9) BABCOCK, S. M. and RUSSELL H. L. (1901): *ibid.*, 18th Ann. Rept. (1900)/1901, p. 177-184 [cf. 50, 61].

- 10) BARNETT, A. J. G. (1954): Silage fermentation. Butterworths Scientific Pub., London.
- 11) BARNETT, H. L. (1960): Illustrated genera of imperfect fungi. 2nd ed., Burgess Pub. Co., Minneapolis.
- 12) BAYER, M. (1928): Bull. Ecole Sup. Agron. Brno, RČS, **C12**: 1-64 [cf. Biol. Abstr., **4**: 1812-1813 (1930)].
- 13) BEARDSLEY, D. W. (1956): Everglades Sta. Mimeo Rep., 56-15, Belle glade, Fla. May 21 [cf. SALLE, A. J. (1961): Fundamental principles of bacteriology. McGraw-Hill Book Comp.].
- 14) BENDER, C. B. and BOSSHART, D. K. (1939): Jour. Dairy Sci., **32**: 637-652.
- 15) BEYNUM, J. VAN and PETTE, J. W. (1936): Cent. f. Bakt., II Abt., **94**: 413-433.
- 16) BEYNUM, J. VAN and PETTE, J. W. (1939): Cent. f. Bakt., II Abt., **99**: 353-374.
- 17) BREED, R. S. et al. (1957): Bergey's manual of determinative bacteriology. 7th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 18) BRYANT, M. P. and BURKEY, L. A. (1956): Jour. Bact., **71**: 43-46.
- 19) BRYANT, M. P., KROULIK, J. T., BURKEY, L. A. and WISEMAN, H. G. (1952): Soc. Amer. Bact., Bact. Proc., **52**: 21-22.
- 20) BURKEY, L. A., KROULIK, J. T., BRYANT, M. P. and WISEMAN, H. G. (1953): U. S. Dept. Agr. Bur. Dairy Indus. BDI-Inf. **154**: 8 pp. [cf. 65].
- 21) BURMEISTER, H. R. and HARTMANN, P. A. (1966): Appl. Microbiol., **14**: 35-38.
- 22) BURRILL, T. J. (1889): Ill. Agr. Expt. Sta. Bull., **7**: 177-194 [cf. 65].
- 23) CAPIOTTI, A. and RAINIERI, L. (1964): Arch. f. Mikrobiol., **48**: 325-331.
- 24) CUNNINGHAM, A. and SMITH, A. M. (1939): Cent. f. Bakt., II Abt., **100**: 394-408.
- 25) CUNNINGHAM, A. and SMITH, A. M. (1940): Jour. Dairy Res., **11**: 243-265.
- 26) DEMETER, K. (1930): Cent. f. Bakt., II Abt., **82**: 71-99.
- 27) DEVUYST, A., VANBELLE, M., ARNOULD, R., MOREELS, A. and VERVACK, W. (1960): Agricultura, **8**: 703-706.
- 28) EDGAR, G. (1929): N. So. Wales Dept. Agr. Sci. Bull., **33**: 72-75 [cf. Biol. Abstr., **7**: 1132 1933]].
- 29) ERIKSSON, S. (1951): Kungl. Lanbrucks högs-kolans Annaler, **18**: 163-169 [cf. Biol. Abstr., **26** 3120 (1952)].
- 30) ESTEN, W. M. and MASON, C. J. (1912): Conn Storrs Agr. Expt. Sta. Bull., **70**: 37-40 [cf. 106].
- 31) ETCHELLS, J. L. and JONES, I. D. (1949): Jour Agr. Res., **78**: 19-31.
- 32) FRAZIER, W. C. (1921): Abstr. Bact., **5**: 8.
- 33) FRY, G. (1885): The theory and practice of sweet ensilage. London [cf. 49].
- 34) FUNDER, L., MORK, I. and ØDEGAARD, R. (1930) Statens meiereiforsøk Beret., **21**: 1-56 [cf. Biol Abstr., **5**: 526 (1931)].
- 35) GIBSON, T. (1965): Jour. Appl. Bact., **28**: 56-62
- 36) GIBSON, T., STIRLING, A. C., KEDDIE, R. M. and ROSENBERGER, R. F. (1958): Jour. gen Microbiol., **19**: 112-129.
- 37) GIBSON, T., STIRLING, A. C., KEDDIE, R. M. and ROSENBERGER, R. F. (1961): Jour. Appl Bact., **24**: 60-70.
- 38) GILMAN, J. C. (1957): A manual of soil fungi 2nd ed., Iowa State Coll. Press, Ames.
- 39) GORINI, C. (1906): Ann. Ist. Agr. (Milano) **6**: 105-122 [cf. 106].
- 40) GORINI, C. (1918): La Clin. Vet., **15**: 1-16 [cf. Abstr. Bact., **3**: 211-212 (1919)].
- 41) GRIFFITHS, A. B. (1894): Chem. News, **70**: 273-275.
- 42) HALL, H. H., ETCHELLS, J. L., JONES, I. D. and LEWIS, W. M. (1954): Jour. Dairy Sci., **37** 1325-1336.
- 43) 半沢 洵・吉村貞彦 (1935): 札幌農林学会報, No **125**: 1-18.
- 44) HASTING, E. G. and MANSFIELD, H. L. (1927) Jour. Bact., **13**: 65-66.
- 45) HEINEMAN, P. G. and HEFFERAN, M. (1909) Jour. Infectious Diseases, **6**: 304-318.
- 46) HEINEMAN, P. G. and HEXSON, C. R. (1921) Jour. Bact., **6**: 45-51.
- 47) HEIZE, B. (1913): Jahresber. Vet. Angew. Bot., **11**: 142-169.
- 48) HUNTER, C. A. (1921): Jour. Agr. Res., **21**: 767-789.
- 49) HUNTER, O. W. (1917): *ibid.*, **10**: 75-83.
- 50) HUNTER, O. W. (1917): Jour. Bact., **2**: 635-639.
- 51) HUNTER, O. W. (1918): Jour. Agr. Res., **15**: 571-592.
- 52) HUNTER, O. W. and BUSHNELL, L. D. (1916): Science, N. S., **43**: 318-320.
- 53) HÜTTIG, C. (1934): Milchw. Forsch., **16**: 229-

- 235.
- 54) JONES, DAN, H. and GIBBARD, J. (1923): *Abstr. Bact.*, **7**: 20-21.
- 55) JOSHI, N. V. (1935): *Indian Sci. Cong. Proc.*, **22**: 355 [cf. 65].
- 56) 神立 誠 (1964): *世界大百科事典*, **3**: 249, 平凡社, 東京.
- 57) KEMPTON, A. G. and SAN CLEMENTE, C. L. (1959): *Appl. Microbiol.*, **7**: 362-367.
- 58) 厚生省編 (1959): *衛生検査指針, III, 食品衛生検査指針 (I), 細菌学的検査法*. p. 46-48.
- 59) KROULIK, J. T., BURKEY, L. A., GORDON, C. H., WISEMAN, H. G. and MELIN, C. G. (1955): *Jour. Dairy Sci.*, **38**: 263-272.
- 60) KROULIK, J. T., BURKEY, L. A. and WISEMAN, H. G. (1955): *ibid.*, **38**: 256-262.
- 61) LAMB, A. R. (1917): *Jour. Agr. Res.*, **8**: 361-380.
- 62) LANGSTON, C. W. and BOUMA, C. (1960): *Appl. Microbiol.*, **8**: 212-222.
- 63) LANGSTON, C. W. and BOUMA, C. (1960): *ibid.*, **8**: 222-234.
- 64) LANGSTON, C. W. and BOUMA, C. (1960): *Jour. Dairy Sci.*, **43**: 1575-1584.
- 65) LANGSTON, C. W., IRVIN, H., GORDON, C. H., BOUMA, C., WISEMAN, H. G., MELIN, C. G., MOORE, L. A. and MCCALMONT, J. R. (1958): *U. S. Dept. Agr. Bull.*, No. 1187.
- 66) LANGSTON, C. W., WISEMAN, H. G., GORDON, C. H., JACOBSON, W. C., MELIN, C. G., MOORE, L. A. and MCCALMONT, J. R. (1962): *Jour. Dairy Sci.*, **45**: 396-402.
- 67) LENDNER, A. (1908): *Les Mucorinées de la Suisse*. K. J. WYSS libraire-editeur, Berne.
- 68) LODDER, J. and KREGER VAN RIJ, N. J. W. (1952): *The yeasts*. North-Holland Pub. Co., Amsterdam.
- 69) MARTOS, V. F. (1941): *Jour. Bact.*, **42**: 140-141.
- 70) McDONALD, P., STIRLING, A. C., HENDERSON, A. R. and WHITTENBURY, R. (1964): *Jour. Sci. Fd. Agric.*, **15**: 429-436.
- 71) MEDVINSKA, L. (1935): *Jour. Microbiol. Acad. Sci. RSS, Ukraine*, **2**: 89-102 [cf. *Biol. Abstr.*, **14**: 1030 (1940)].
- 72) MORRISON, F. B. (1945): *Feeds and feeding*. Morrison Pub. Co., New York.
- 73) MUNDT, J. O. (1961): *Appl. Microbiol.*, **9**: 541-544.
- 74) MUNDT, J. O., BEATTIE, W. G. and WIELAND, F. R. (1969): *Jour. Bact.*, **98**: 938-942.
- 75) MUNDT, J. O. and HAMMER, J. L. (1968): *Appl. Microbiol.*, **16**: 1326-1330.
- 76) MUSGRAVE, R. B. and KENNEDY, W. K. (1950): *Advances in agronomy*, **2**: 289-311.
- 77) NAKAGAWA, A. and KITAHARA, K. (1959): *Jour. Gen. Appl. Microbiol.*, **5**: 95-126.
- 78) NAUMOV, N. A. (1939): *Clés des Mucorinées*. Paul Lechevalier Editeur, Paris.
- 79) NILSSON, G. and NILSSON, P. E. (1956). *Arch. f. Mikrobiol.*, **24**: 412-422.
- 80) NILSSON, P. E. (1956): *ibid.*, **24**: 396-411.
- 81) 農林省畜産局 (1938): 本邦におけるサイロに関する調査.
- 82) 農林省北海道農業試験場 (1970): 草サイレージにおける乳酸菌剤の特性とその使用法, 昭和45年度設計会議資料.
- 83) 農林省北海道農業試験場畜産部 (1969): 昭和45年度試験成績概要.
- 84) 越智勇一・光岡知足・瀬加利夫・池上竹二・三浦高義 (1965): *日畜会報*, **36**: 317-323, 353-357.
- 85) ORLA-JENSEN, S., ORLA-JENSEN, A. D. and KJAER, A. (1947): *Antonie van Leeuwenhoek*, **12**: 97-114.
- 86) PELCZAR, M. J. et al. (1957): *Manual of microbiological method*. McGraw-Hill Book Co., New York.
- 87) POLITI, I. (1940): *Ann. Microbiol.*, **1**: 15-31 [cf. *Biol. Abstr.*, **23**: 184-185 (1949)].
- 88) POLITI, I. (1940): *Ann. Microbiol.*, **1**: 65-87 [cf. *Biol. Abstr.*, **23**: 185 (1949)].
- 89) POLITI, I. and PEPOLI, G. (1941): *Ann. Microbiol.*, **1**: 177-191 [cf. *Biol. Abstr.*, **23**: 185 (1949)].
- 90) RAPER, K. B. and THOM, C. (1949): *A manual of the penicillia*. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 91) RICHARD, O. and HEINZL, O. (1942): *Schweiz. Landw. Monatsch.*, **20**: 232-238 [cf. *Biol. Abstr.*, **23**: 1220 (1949)].
- 92) RUSCHMANN, G. (1932): *Futterkonservierung*, **3**: 237-290 [cf. *Biol. Abstr.*, **7**: 2198 (1933)].
- 93) RUSCHMANN, G. (1933): *Landw. Jahrb.*, **78**: 169-207.
- 94) RUSCHMANN, G. (1943): *Forschungsdienst*, **16**: 59-62.
- 95) RUSOFF, L. L. (1959): Paper presented at the Southwest Regional ACS Meeting, Baton, Rouge Louisiana [cf. 113].
- 96) RUSSELL, E. J. (1908): *Jour. Agr. Sci.*, **2**: 392-

- 410.
- 97) SACCARDO, P. A. (1882-1931): *Sylloge fungorum omnium hucusque cognitorum*, 1-25.
- 98) SAMARANI, F. (1913): *Biol. Min. Agr., Indus. e Com. (Rome)*, Ser. C., **13**: 87-103 [cf. 49].
- 99) 佐々木清綱監修 (1969): *畜産大事典*. 養賢堂, 東京.
- 100) 佐々木西二 (1966): サイレージにおける乳酸菌の生態論, 北原覚雄編, *乳酸菌の研究*. p. 116-137, 東大出版会.
- 101) 佐々木西二・佐々木博 (1966): *日畜会報*, **37**: 451-457.
- 102) 佐々木西二・佐々木博 (1966): *日畜会報*, **37**: 458-464.
- 103) SCHIEBLICH, M. (1932): *Cent. f. Bakt., I Abt., Orig.*, **124**: 269-276.
- 104) SEDDON, H. R. (1926): *Agr. Gaz. New South Wales*, **37**: 183-188.
- 105) SEREDENKO, L. (1935): *Jour. Microbiol. Acad. Sci. RSS Ukraine*, **2**: 81-88 [cf. *Biol. Abstr.*, **14**: 1031 (1940)].
- 106) SHERMAN, J. M. (1916): *Jour. Bact.*, **1**: 445-452.
- 107) SHERMAN, J. M. and BECHDEL, S. I. (1918): *Jour. Agr. Res.*, **12**: 589-600.
- 108) SMITH, N. R., GORDON, R. E. and CLARK, F. E. (1952): *U. S. Dept. Agr., Monograph No. 16*.
- 109) STIRLING, A. C. (1951): *Soc. Appl. Bact. Proc.*, **14**: 151-156.
- 110) STIRLING, A. C. and WHITTENBURY, R. (1963): *Jour. Appl. Bact.*, **26**: 86-90.
- 111) STONE, R. W., BECHDEL, S. I. and MCAULIFFE, H. D. (1943): *Pa. Agr. Expt. Sta. Bull.* 444, p. 17 ills. [cf. 65].
- 112) 須藤 浩 (1960): サイレージの調製と利用法. 養賢堂, 東京.
- 113) 須藤 浩 (1967): *日畜会報*, **38**: 233-244.
- 114) 高井慎二・佐々木泰斗 (1966): 第11回日本草地学会講演要旨, 78-79.
- 115) 高野信雄 (1967): *北農試報*, **70**: 1-74.
- 116) 高野信雄・三股正年 (1959): *北農試報*, **52**: 1-83.
- 117) THOM, C. and RAPER, K. B. (1945): *A manual of the aspergilli*. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 118) 東京大学農芸化学教室 (1960): *改訂実験農芸化学* (上, 中, 下). 朝倉書店, 東京.
- 119) VIRTANEN, A. I. (1933): *Empire Jour. Expt. Agr.*, **1**: 143-155 [cf. 65].
- 120) VIRTANEN, A. I. (1936): *Cent. f. Bakt., II Abt.*, **95**: 472-477.
- 121) WALTON, J. H. (1928): *Agr. Res. Inst. Pusa Bull.*, **182**: 1-3 [cf. *Biol. Abstr.*, **5**: 2053 (1931)].
- 122) WALTON, S. J. (1951): *Grassland and grassland products*. Edward and Co., London.
- 123) WHITTENBURY, R. (1965): *Jour. gen. Microbiol.*, **40**: 97-106.
- 124) WIERINGA, G. W. and BECK, T. (1964): *Wirtschaftseigene Futter*, **10**: 34-44.
- 125) WIERINGA, G. W. and HENGEVELD, A. G. (1963): *Landb. Voorl.*, **20**: 587-592 [cf. *Herbage Abstr.*, **34**: 712, p. 98 (1964)].
- 126) WYANT, Z. N. (1920): *Abstr. Bact.*, **4**: 6-7.
- 127) YAMAMOTO, Y. (1930): *Facult. Agr. Hokkaido Imp. Univ.*, **28**: 1-327.

Summary

Microbiological studies on silage fermentation were performed to make clear the mechanism of fermentation, to find out useful or harmful microbes occurring in silage, and to control artificially undesirable fermentation by the microbiological techniques.

As a part of studies on silage, this paper deals with the results of author's investigation which was carried out for about 10 years at the Laboratory of Applied Microbiology, Hokkaido University. The main results obtained were as follows:

1. Growth of lactic acid bacteria and lowering of the pH values were stimulated by chopping grasses at the time of ensiling. These effects of chopping were considered to be due to inducing a high degree of compressibility very easily and to facilitating the release of grass juice.

2. The successive change from streptococci to high acid-producing lactobacilli occurred in cold fermentation silages. On the other hand, lactic acid bacteria were not found and *Bacillus coagulans* which was a thermophilic spore-forming lactic acid-producing bacterium was predominant in warm fermentation silages.

3. In the silages whose temperature was very high at the early phase of fermentation, growth of butyric acid bacteria was encouraged and undesirable characteristics were developed, after lowering of fermentation temperature.

4. The wilting of the grasses before ensiling reduced viable counts of lactic acid bacteria, and depressed lowering of the pH values. As the re-

sults, growth of aerobic and proteolytic bacteria occurred at the first stage of fermentation. The quality of the silage was poor in spite of the high contents of organic acids, since the production of volatile acids and volatile basal compounds was activated by the aerobes.

5. The addition of mineral acids, wheat bran, or molasses was found to be effective in changing microflora in silage, in preventing undesirable fermentation and in improving the quality of silages.

6. More than 5,000 strains of microorganisms were isolated from various silages which differed in phase of fermentation, treatment of raw materials, and ensiling method. These organisms were studied taxonomically and identified. The results showed that many kinds of microbes existed in silage, and these microorganisms were playing very important roles in silage fermentation.

7. From the above isolates, a strain of *Lactobacillus plantarum* was selected as the most useful lactic acid bacterium for silage starter, and qual-

ity of the silage inoculated with this starter was examined.

8. Synergistic action was recognized between the lactic starter and carbohydrates. Lactic acid fermentation was promoted vigorously, and the pH values were rapidly lowered by the addition of the starter and fermentable carbohydrate.

9. As a method to make good quality silage constantly, a practical method was proposed. It was "Hokkaido University process" which employed the mixture of starter culture and glucose solution. The method was very effective in making excellent quality silage.

10. In the investigation on the effect of inoculation upon silage preparation under field conditions using farm-sized silos, the quality of silage was improved remarkably. From the result, it was confirmed that labor and expense of farmer in making silage were cut down comparing with ordinary method.