

原 著

反芻胃内飼料片付着微生物量および in situ NDF 消失率に及ぼす
飼料片の粒度および給与乾草の影響

潘 軍・鈴木 知之・上田宏一郎・田中 桂一・大久保正彦
北海道大学農学部, 札幌市北区 060-8589

Effects of sources of fed hay and incubation particle size on
microbial attachment and in situ NDF disappearance in the rumen

Jun PAN, Tomoyuki SUZUKI, Koichiro UEDA, Keiichi TANAKA and Masahiko OKUBO

Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Kita-ku Sapporo-shi 060-8589

キーワード: in situ NDF 消失率, 飼料片サイズ, 付着細菌量, 付着プロトゾア量

Key words: in situ NDF disappearance, feed particle size, bacterial attachment, protozoa attachment

Abstract

The effect of diet on in situ NDF disappearance and particle associated bacteria (PAB) and the particle associated protozoa (PAP) mass of different size of particle was evaluated. The large particle (LP) and small particle (SP) of orchardgrass (OG) and alfalfa (ALF) hay were incubated in situ for 2, 4, 14, and 24 h in the rumen of sheep fed either OG or ALF hay once daily. The PAB mass of LP was tended to be higher than SP for OG incubation particles, but PAB mass of SP tended to be higher than LP for ALF. However, compared with PAB, opposite trends were obtained for PAP mass between different size of particles. The higher average cumulative PAB and PAP mass of incubation particles were obtained when OG fed, but the NDF disappearance: cumulative microbial nitrogen ratio was lower than ALF fed. The results suggest that incubation forage, particle size, and incubation environment affect rumen microorganisms attachment to particle and fiber digestion.

要 約

粒度の異なる飼料片に付着する細菌(PAB), プロトゾア(PAP)量およびNDF消失率に及ぼす給与乾草の影響を検討した。オーチャードグラス(OG)およびアルファルファ(ALF)乾草の大粒度飼料片(LP)と小粒度飼料片(SP)を同種類および異種類乾草のみ給与しためん羊のルーメン内で、2, 6, 14, 24 h in situ 培養した。OGのLPのPAB量はSPのPAB量と比べ、やや高い傾向にあった。一方、ALFのSPのPAB量はLPより高い値となった。PAP量はOGではLPよりSP、ALFではSPよりLPのほうが高い傾向にあった。飼料片への細菌付着量は飼料片粒度により影響されるが、その影響の程度はALF飼料片の方が大きかった。給与乾草の違いにより、飼料片への細菌の

付着量および変動のパターン、NDF消失率および消失パターンは異なる傾向が示された。

緒 言

反芻胃内の細菌はおもに飼料片に付着する状態で存在している(CHENG *et al.*, 1984)。これらの細菌に由来する繊維分解酵素活性は繊維分解と密接な関連がある(SILVA *et al.*, 1987)。さらに、in situによる実験で、DAPA(Diaminopimelic acid)をマーカーとして測定した付着微生物タンパク質量(OLUBOBOKUN *et al.*, 1990)および¹⁵Nを用いて測定した付着細菌量(BOWMAN and FIRKINS, 1993)とNDF消失率間に有意な相関関係があることが報告されている。プロトゾアも飼料片に付着し(BAUCHOP and CLARKE, 1976)、繊維質分解に大きく関与する可能性が報告されているが(COLEMAN, 1986)、飼料片に付着する細菌およびプロトゾアをそれぞれ分けて測定し、繊維分解との関連

を検討した報告はほとんどない。ルーメン微生物の飼料片への付着は飼料片の性質とルーメン微生物動態の相互作用の結果であり、飼料片の物理的および化学的な性質が付着量の影響要因と考えられる (McALLISTER *et al.*, 1994)。飼料片の粒度が異なる場合では、単位重量当たりの飼料片の表面積が異なり、小粒度の飼料片に付着する細菌量が多くなることが報告されている (GERSON *et al.*, 1988; LEGAY-CARMIER and BAUCHART, 1989)。一方、給与飼料に応じて、ルーメン環境が変わり、ルーメン内微生物の量および構成、液相および固相への微生物の分布も変動することが考えられる。このように、飼料片、微生物およびルーメン環境が相互に関連しあって飼料片に付着する微生物量を決定し、ひいては繊維質の分解を左右すると予想できる。

そこで、本研究は異なる乾草を給与しためん羊を用いて、給与飼料と同種類および異種類の乾草から調製した大小粒度の飼料片を *in situ* 培養し、飼料片に付着する細菌量、プロトゾア量および NDF 消失率に及ぼす飼料片の粒度および給与飼料の影響を検討することを目的とした。

材料および方法

ルーメンカニューレを装着した去勢めん羊 4 頭を供試し、オーチャードグラス (OG) およびアルファルファ (ALF) 乾草を 2 頭ずつ、それぞれ 1 日 1 回、2 時間給与した。水とミネラル塩は自由摂取させた。OG および ALF 乾草を 10 mm あるいは 1 mm メッシュの篩を付けた粉砕機で粉砕し、さらに 300 μm の篩で篩別し、篩の上に残留した飼料片をそれぞれ大粒度飼料片 (LP) および小粒度飼料片 (SP) とした。これらの飼料片を 100 μm メッシュのナイロンバックに入れ、同種類および異種類の乾草を給与しためん羊のルーメン内に飼料給与と同時に 2 バックずつ投入した。2, 6, 14, 24 h で培養した後、バックの一つは水道水で、水がきれいになるまで洗浄し、さらに家庭用洗濯機で 25 min 洗浄し、NDF 測定に供した。もう一つのバックは 45 ml の生理食塩水で 3 回に分けて洗浄し、微生物測定に供した。本実験とは別の時期に OG および ALF を同じ方法で給与しためん羊から、2, 6, 14, 24 h にルーメン内容物とルーメン液を採取した。ルーメン液の pH, $\text{NH}_3\text{-N}$, 総 VFA 濃度を測定した。

培養後飼料片に付着する細菌 (PAB) 含量は、DAPA をマーカーとし、次式によって求めた。

$(\text{飼料片中の DAPA 含量}) / (\text{分離 PAB 中の DAPA 含量})$

式中の分離 PAB は採取したルーメン内容物から、WHITEHOUSE (1994) の飼料片に付着する微生物の洗浄方法および CRAIG (1987) の細菌分離方法にしたがって分離した PAB である。

Tab. 1 Chemical composition and particle size distribution of large and small particles (LP, SP) of orchardgrass (OG) and alfalfa (ALF) hay for *in situ* incubation

	OG		ALF	
	LP	SP	LP	SP
CP (%/DM)	6.9	6.8	11.9	11.2
NDF (%/DM)	53.0	52.9	51.3	50.8
Particle size Distribution (%)				
>5600 (μm)	45.9	24.3	1.5	0
2380	23.0	32.4	4.4	1.3
1190	21.6	24.3	5.9	6.6
600	6.8	12.2	42.6	53.9
300	2.7	6.8	42.6	36.8
150	0	0	2.9	1.3
Average (μm)	3425	645	2520	545

飼料片に付着するプロトゾア (PAP) 含量を測定する方法については、AEP (Aminoethylphosphonic acid) がマーカーとして勧められているが (CZERKAWSKI, 1974)、細菌中にも AEP が検出されたので、本研究では、総 AEP 含量から細菌由来の AEP 含量を差し引いた AEP 含量を用い、次式で PAP 含量を求めた。

$(\text{飼料片中の総 AEP 含量} - \text{細菌由来の AEP 含量}) / (\text{分離 PAP 中の AEP 含量})$

式中の分離 PAP は WHITEHOUSE (1994) の飼料片に付着する微生物の洗浄方法および NEILL and IVAN (1996) のプロトゾア分離方法を参考にして分離したものである。DAPA および AEP の測定は CZERKAWSKI (1974) の方法に従った。

付着微生物による飼料片繊維質分解への時間積算的な寄与程度の指標として、BOWMAN and FIRKINS (1993) が報告した付着量の経時変化曲線下の面積を計算する方法を参考にして、PAB および PAP の積算量 (C-PAB: cumulative PAB, C-PAP: cumulative PAP) を算出した。さらに、分離 PAB および PAP 中の窒素 (N) 含量から付着する微生物の積算 N 量 (CMN: cumulative microbial nitrogen) を算出した。

結果と考察

培養用の飼料片の粒度分布および化学成分は表-1 で示した。ALF より OG の方が平均サイズは大きかった。両乾草とも LP と SP の化学成分には違いがほとんどなかった。

培養時間に伴う NDF 消失率の変化を図-1 に示した。OG 飼料片の NDF 消失率は OG 給与下では、ほぼ直線的に増加したのに対して、ALF 給与下では、やや曲線的な消失パターンを示した。一方、ALF 飼料片はどちらの乾草の給与下でも、早い時間帯での消失量が多く、とくに ALF を給与した時の LP で顕著であっ

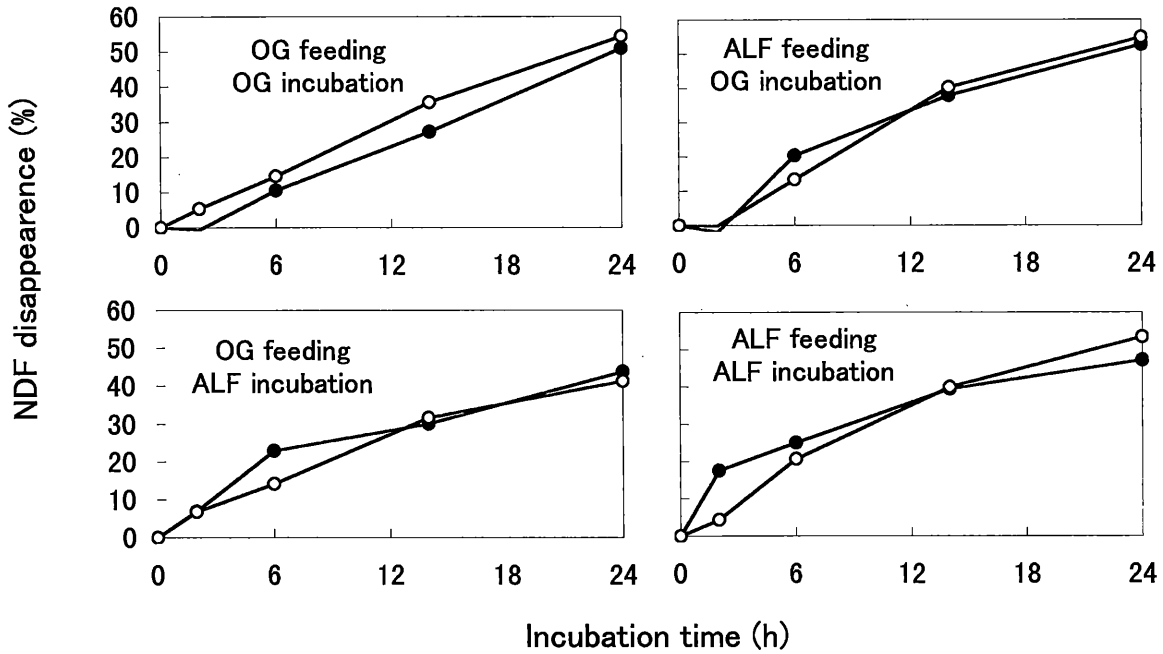


Fig. 1 Changes in the extent of NDF disappearance of large (●) and small (○) particles of OG and ALF hay during in situ incubation in the rumen of sheep fed OG or ALF hay

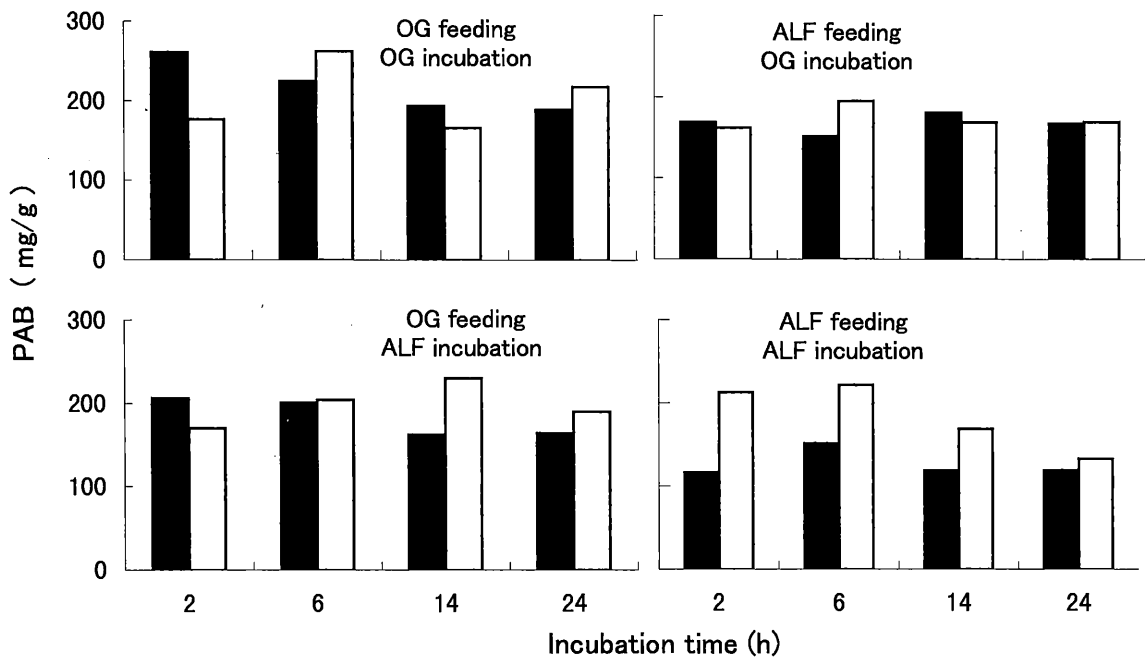


Fig. 2 Changes in the particle associated bacterial mass (PAB) of large (■) and small (□) particles of OG and ALF hay during in situ incubation in the rumen of sheep fed OG or ALF hay

た。二つ粒度間で比較すると、OG 飼料片ではほぼ同じ消失パターンであったが、ALF 飼料片では、SP より LP の方が培養 6 時間内の消失量が多くなる傾向が示された。

図-2 では各培養時間における飼料片中の PAB 含量を示した。OG 飼料片では、どちらの乾草の給与下でも、PAB 量の経時変化に一定の傾向が見られなかった。一方、ALF 飼料片は ALF 給与下では、6 時間ま

で増加し、その後、減少する傾向がうかがわれたが、OG 給与下では、このような傾向ははっきりしなかった。著者らはめん羊に ALF を給与した in vivo 試験において、給与後 2h で PAB 量が最大値になったことを観察した(潘ら, 1998)。このような in vivo と in situ 実験結果の違いはナイロンバック自体の影響により、微生物の侵入が遅くなったためかもしれない (MEYER and MACKIE, 1986)。

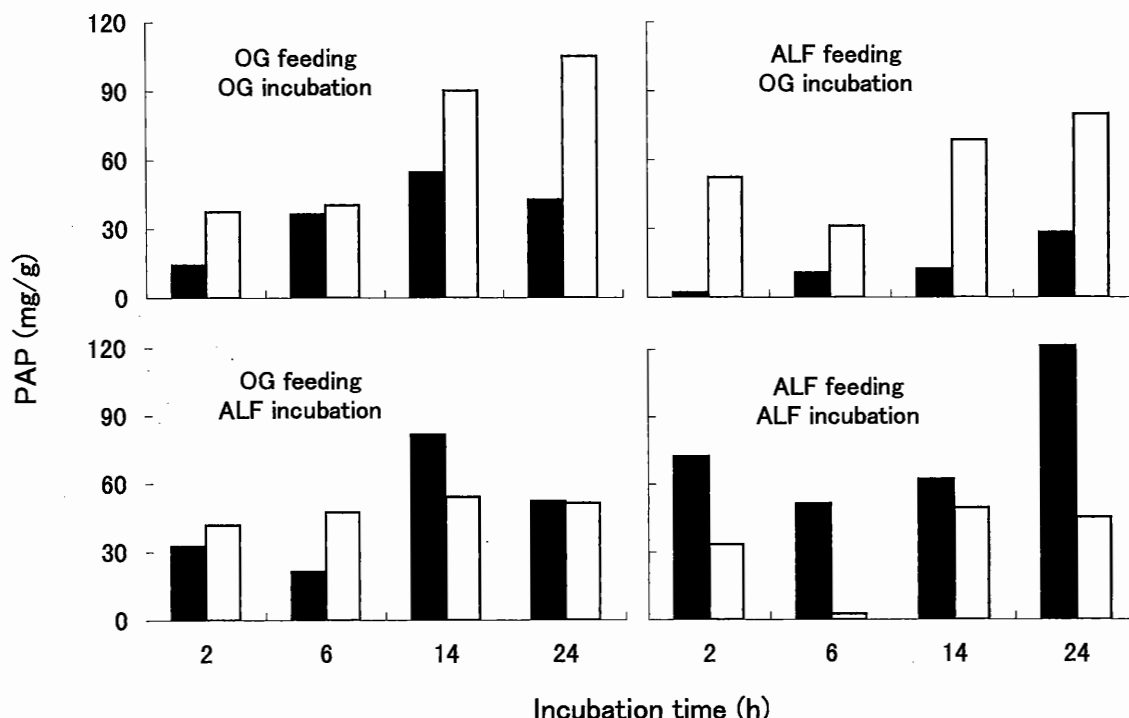


Fig. 3 Changes in the particle associated protozoal mass (PAP) of large (■) and small (□) particles of OG and ALF hay during in situ incubation in the rumen of sheep fed OG or ALF hay

Tab. 2 Effects of incubation environment and particle size of different forage sources on NDF disappearance and cumulative microbial mass during in situ incubation in the rumen of sheep

Incubation environment	Incubation feed particle	particle size	NDF disappearance (%)	Cumulative PAB	Cumulative PAP	NDF disappearance: CMN ratio
OG feeding	OG	LP	51.0	4826	965	0.16
		SP	54.4	4694	1692	0.16
	ALF	LP	43.7	4108	1221	0.15
		SP	41.3	4794	1154	0.12
ALF Feeding	OG	LP	52.8	4152	323	0.20
		SP	54.9	3819	1358	0.20
	ALF	LP	47.2	2760	1779	0.20
		SP	53.4	4155	787	0.19

各培養時間における PAP 含量を図-3 で示した。個体差が大きかったため、培養した飼料片の各時間帯および給与乾草間を比較するのは困難であったが、粒度間の違いについては、OG では LP より SP、ALF では SP より LP に多く付着する傾向が見られた。一日を通してみると、いずれの飼料片においても、培養の後半の時間帯に高い値が観察された。これはプロトゾアの増殖が遅いためであると考えられる。in vitro による検討により、プロトゾアは 12-14 時間以上培養しないと増殖が認められないと DEHORITY *et al.* (1998) は報告している。

表-2 では 24 時間の NDF 消失率、付着微生物の積

算量および NDF 消失率: CMN 比を示した。NDF 消失率については、OG 給与下で ALF 飼料片を培養した場合を除けば、LP より SP のほうが高い傾向にあり、とくに ALF 給与下で ALF 飼料片を培養した場合では、この傾向が顕著であった。C-PAB 量については、給与乾草にかかわらず OG 飼料片では SP より LP の方がやや高い傾向にあった。しかし、ALF 飼料片の C-PAB は LP より SP の方が高い値となり、とくに ALF 給与下では顕著であった。図-3 で示した傾向と同じように、C-PAP 量の粒度別飼料片間の傾向は培養した草種により異なり、OG 飼料片では LP より SP、ALF 飼料片では SP より LP のほうが高く、C-

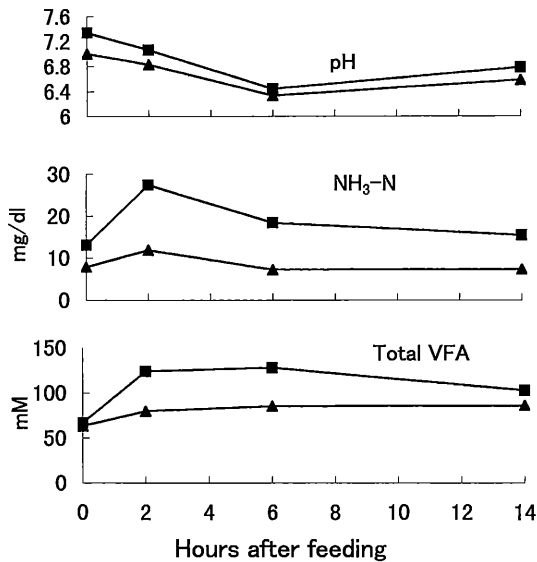


Fig. 4 Changes in pH, NH₃-N, and total VFA levels in rumen fluid of sheep fed OG (▲) and ALF (■) hay

PAB 量と対照的な結果となった。飼料片への細菌あるいはプロトゾアの付着量および繊維質分解率は粒度により影響され、その影響の程度は ALF 飼料片の方が大きかった。

給与乾草による培養環境間の違いを比較すると、ALF 給与時のルーメン液 pH, NH₃-N, および総 VFA 濃度は OG 給与時より高く推移した (図-4)。このようなルーメン環境で培養した飼料片の C-PAB および C-PAP 量は ALF 給与時より OG 給与時で高い値となったが、逆に、NDF 消失率:CMN の比は ALF の方が高い値になった。ルーメン液の pH が低くなると繊維分解菌の活性が抑制されることがよく知られているが、本実験の場合では、OG および ALF 給与時、pH の値はともに正常範囲内にあった。in vitro による実験より、VFA の濃度は高くなると、微生物の増殖が制限される可能性があるが、pH が 6.5 以下に低下しない場合、ほとんど制限されなかったとの報告もある (WOLIN, 1969)。したがって、本実験の OG あるいは ALF 乾草給与下での pH あるいは総 VFA 濃度の違いは繊維質分解微生物の活性に影響を与えないかもしれない。繊維質分解細菌にとっては、ルーメン中の NH₃-N はもっとも重要なもしくは唯一の窒素源でありながら、これらの細菌は集中的に飼料片の表面に付着する状態で分布し、NH₃-N を利用するので、飼料片周囲の NH₃-N 濃度は液相中の濃度より低いことが推測されている (MORRISON and MACKIE, 1996)。正常の繊維質分解を維持するための、ルーメン液 NH₃-N 濃度は最低 5 mg/dl と報告されているが、適切な濃度範囲は飼料片の性質により異なる (GIVENS and MOSS, 1995)。本実験では、ALF 給与時と比べると、OG を給与した場合、ルーメン NH₃-N 濃度が低

く、このため、微生物の繊維質分解活性は低くなり、NDF 消失率と CMN の比が低くなったと考えられる。

ルーメン細菌とプロトゾアはともに繊維質の分解に関与する。その関与の程度を検討するために、同種類乾草を給与したルーメンで飼料片を培養した場合の C-PAB および C-PAP 量と NDF 消失率の重回帰関係を求めた。

OG: NDF disappearance (%) = 1.01 + 0.0082 PAB + 0.0100 PAP (回帰関係と回帰係数ともに P < 0.01)

ALF: NDF disappearance (%) = 6.64 + 0.0117 PAB + 0.0080 PAP (回帰関係と PAB 回帰係数 P < 0.01, PAP 回帰係数 P < 0.05)

PAB および PAP 積算量と NDF 消失率間の回帰係数はほとんど同じであるが、飼料片への平均プロトゾア付着量は細菌付着量の 1/4 程度であるので、繊維質分解において主な役割を果たすのは細菌であると考えられた。プロトゾアについては、その付着の影響要因および繊維分解との関連に不明な部分が多く、今後さらに検討する必要があるだろう。

以上の研究により、付着する細菌量および変動パターンは飼料片の草種、粒度および給与飼料により応じて変化するルーメン環境に影響され、ひいては繊維質分解が左右されることが示唆された。

文 献

- BAUCHOP, T. and R. T. J. CLARKE (1976) Attachment of the ciliate *Epidinium* Crawley to plant fragments in the sheep rumen. *Appl. Environ. Microbio.*, **32**: 417-422.
- BOWMAN, J. G. P. and J. L. FIRKINS (1993) Effects of forage species and particle size on bacterial cellulolytic activity and colonization in situ. *J. Anim. Sci.*, **71**: 1623-1633.
- CHENG, K. J., C. S. STEWART, D. DINSDALE and J. W. COSTERTON (1984) Electron microscopy of bacteria involved in the digestion of plant cell walls. *Anim. Feed Sci. and Tech.*, **10**: 93-102.
- COLEMAN, G. S. (1986) The distribution of carboxymethylcellulase between fractions taken from rumens of sheep containing no protozoa or one of five different protozoal populations. *J. Agric. Sci. Camb.*, **106**: 121-127.
- CRAIG, W. M., GLEN A. Broderick and D. B. RICKER (1987) Quantitation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. *J. Nutr.*, **117**: 56-62.
- CZERKAWSKI, J. W. (1974) Methods for determining 2,6-diaminopimelic acid and 2-aminoethylphos-

- phonic acid in gut contents. *J. Sci. Fd. Agric.*, **25**: 45-55.
- DEHORITY, B. A. (1998) Generation time of *Epidinium caudatum* and *Entodinium caudatum*, determined in vitro by transferring at various time intervals. *J. Anim. Sci.*, **74**: 1189-1196.
- GERSON, T., A. S. D. KING, K. E. KELLY, and W. J. KELL. (1988) Influence of particle size and surface area on in vitro roles of gas production, lipolysis of triacylglycerol and hydrogenation of linoleic acid by sheep rumen digesta or *Ruminococcus flavofaciens*. *J. Agric. Sci. (Cambridge)* **110**: 31-37.
- GIVENS D. I. and ANGELA R. MOSS (1995) The nutritional value of cereal straw for ruminants-a review. *Nutrition abstracts and reviews (series B)*, **65**: 793-811.
- LEGAY-CARMIER, F. and D. BAUCHART (1989) Distribution of bacteria in the rumen contents of dairy cows given a diet supplemented with soya-oil. *Br. J. Nutr.* **61**: 725-740.
- MCALLISTER, T. A, H. D. BAE, G. A. JONES and K. J. CHENG (1994) Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J. Anim. Sci.*, **72**: 3004-3018.
- MEYER and R. I. MACKIE (1986) Microbiological evaluation of the intraruminal in sacculus digestion technique. *Appl. Environ. Microbio.* **51**: 622-629.
- MORRISON, M. and R. I. MACKIE (1996) Nitrogen metabolism by ruminal microorganisms: current understanding and future perspectives. *Aust. J. Agric. Res.*, **47**: 227-246.
- NEILL, L. and M. IVAN (1996) Comparison of methods for isolation of protozoa from ruminal fluid. *Can. J. Anim. Sci.*, **76**: 481-483.
- OLUBOBOKUN, J. A., W. M. CRAIG and K. R. POND (1990) Effects of mastication and microbial contamination on ruminal in situ forage disappearance. *J. Anim. Sci.*, **68**: 3360-3370.
- SILVA, A. T., R. J. WALLACE, and E. R. QRSKOV (1987) Use of particle-bound microbial activity to predict the rate and extent of fiber degradation in the rumen. *Br. J. Nutri.*, **57**: 407-415.
- WHITEHOUSE, N. L., V. M. OLSON, C. G. SCHWAB, W. R. CHESBOR, K. D. CUNNINGHAM, and T. LYKOS (1994) Improved techniques for dissociating particle-associated mixed ruminal microorganisms from ruminal digesta solids. *J. Anim. Sci.*, **72**: 1335-1343.
- WOLIN, M. J. (1969) Volatile fatty acid and the inhibition of *Escherichia coli* growth by rumen fluid. *Appl. Environ. Microbio.*, **17**: 83-87.
- 潘 軍, 鈴木知之, 上田宏一郎, 大久保正彦 (1998) 乾草を給与しためん羊におけるルーメン内細菌とプロトゾア量の経時的変化. 第54回北海道畜産学会大会講演要旨A-03.