

[生物工学会誌 第73巻 第6号 497-502. 1995]

ノート

Nocardia nitrificans および *Thiobacillus denitrificans* による
ブタ腸内残存無機態窒素および硫酸根の変化小林 茂樹*・稲本 光彦・矢作 治子
中野由加里・狩集 保孝明治大学農学部
〒214 川崎市多摩区東三田1-1-1

(平成7年3月27日受付 平成7年7月14日受理)

Changes in Inorganic Nitrogen and Sulfate in Porcine Intestinal Contents
Resulting from *In Vitro* Inoculation of *Nocardia nitrificans* and
Thiobacillus denitrificans —Note—SHIGEKI KOBAYASHI,* MITSUHIKO INAMOTO, HARUKO YAHAGI, YUKARI NAKANO, and YASUTAKA
KARIATSUMARI (School of Agriculture, Meiji University, 1-1-1 Higashimita, Tama-ku, Kawasaki 214)
Seibutsu-kogaku 73: 497-502, 1995.

Digestion/degradation characteristics of porcine intestinal contents and feces inoculated with nitrifying and sulfur bacteria were investigated. Media of contents from the jejunum/ileum, caecum, colon and rectum of 2 Yucatan Microhogs were inoculated with strain cultures of *Nocardia nitrificans* JCM 4134 and *Thiobacillus denitrificans* JCM 3869. The former cultures were incubated in a stationary manner ($28 \pm 1^\circ\text{C}$, 5 d), and the latter under anaerobic conditions ($28 \pm 1^\circ\text{C}$, 28 d). *N. nitrificans* had no effect on substrate degradation. Inoculation with *T. denitrificans* caused decreases in T-N, $\text{NO}_3\text{-N}$ and $\text{NH}_4\text{-N}$, and a decrease in SO_4^{2-} in the early stage, in the jejunum/ileum medium. A small decrease in $\text{NO}_3\text{-N}$ and an increase in SO_4^{2-} were observed in the colon medium.

[Key words: *Nocardia nitrificans*, *Thiobacillus denitrificans*, porcine intestinal contents]

集約家畜生産にあつては、排出されるふん尿の悪臭および汚濁物質の速やかな発酵、分解あるいは浄化処理が緊急の課題となっている。¹⁻³⁾家畜ふん尿から発生する臭気の特徴は畜種により若干異なるが、化学成分としてはアンモニア、メチルメルカプタン、プロピオン酸、ノルマル酪酸、イソ吉草酸、ノルマル吉草酸などがあり、悪臭防止法に定められている規制基準値を越えていることも、しばしば報告されている。⁴⁻⁶⁾ヒトの嗅覚に感ずる各家畜の臭気については、各畜種にそれぞれ特徴があり、その相異に関する詳細な分析

の余地が残されている。

家畜から排出されるふん、ふん尿、あるいはこれらと敷料などの混合物をできるだけ速く発酵・分解し、悪臭発散を抑制するための方法として、昨今数多くの堆肥発酵促進剤が販売されている。これらの製剤の大半は、外気下に堆積されたふんやふん混合物に直接散布、あるいは散布後攪拌することによって、発酵を促進し、悪臭発生を押さえるものである。これらの発酵促進剤の使用効果を高めるためには、処理すべきふん・ふん混合物の性状や量に応じて、継続的に発酵促進剤を追加散布する必要があり、利用の労力と費用に問題が残されている。

* 連絡先, Corresponding author.

著者らは、ブタ腸管内に残存する悪臭物質について、生体外バクテリアを経口投与し、これらを効率良く消化・分解する方法を計画した。この方法を実施可能な技術として確立するには、1) ブタ腸内残存悪臭物質を効率良く消化・分解するバクテリアの検索、2) 検索菌株悪臭物質資化遺伝子のブタ腸内常在大腸菌への組み入れ、3) 外来遺伝子挿入大腸菌を投与する野外試験の実施、の三つが必要とされる。

本報告は、上記実験計画概要の第一段階として、ブタ腸管内残存悪臭物質を効率良く消化・分解する生体外菌種・株の検索のために実施した。試験用菌種・株の選定は、既知の細菌代謝特性に基づき、好気性細菌でカルバメートを資化し、硝化能を有するバクテリア *Nocardia nitrificans* (JCM No. 4134) と通性嫌気性細菌であり、微酸性・中性域で生育し硫黄酸化および脱窒作用を有するバクテリア *Thiobacillus denitrificans* (JCM No. 3869) を用いた。⁷⁻¹⁰⁾ 分別したブタ腸内容物培地に *N. nitrificans* を接種した場合の無機態窒素の変化の検討を報告するとともに、同じ内容物培地に *T. denitrificans* を接種した場合、脱窒の傾向が見られたのでその結果を報告する。

供試動物は、ユカタンマイクロブタ成豚雄（日本チャールズリバー(株)生産）2頭を、明治大学農学部生田校舎敷地内に設置した自家製豚飼育柵（1.2×2.0 m）に収容し、マルカミ種豚用配合飼料および二種混合飼料を2:1の割合で混合したものを、1日1頭あたり1.5 kg 給与して飼育した。

供試豚は、生後8ヵ月に去勢し、その3ヵ月後に屠殺し（屠殺時体重 62.0 kg, 63.5 kg）、速やかに消化器官を分別し、空回腸、盲腸、結腸および直腸に分けて腸内容物を採取した。

使用菌株は、いずれも理化学研究所微生物系保存施設より購入した。*N. nitrificans* No. 4134 は、専用合成培地 A（水道水に酵母エキス 2.0 g, トリプトン 5.0 g, 可溶性デンプン 5.0 g, 寒天 15.0 g を加え、1 l とし、蒸気滅菌, pH 7.3）の平板培地に塗抹し、3～4日間の好気培養下で単一コロニー形成が確認された後、寒天を除いた合成培地 A に接種し、28±1°C にて5日間静置培養した。これを継代培養し、接種3日後のものを試験用接種菌液とした。本菌液は、(2.4±0.8)×10⁹ cfu/ml の菌数を含有した。*T. denitrificans* No. 3869 は、専用合成培地 B（蒸留水に KH₂PO₄ 1.8 g, NaHPO₄ 1.2 g, (NH₄)₂SO₄ 0.1 g, KNO₃ 5.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g, FeCl₃·6H₂O 30.0 mg, MnSO₄·4~5H₂O

30.0 mg, CaCl₂·2H₂O 40.0 mg, NaHCO₃ 0.5 g, 寒天 15.0 g および10% Na₂S₂O₃ 溶液 100 ml を加えて 1 l とし、蒸気滅菌, pH 7.0）の平板培地に混積接種し、28±1°C で嫌気ジャー内で2～3週間培養し、単一コロニー形成が確認された後、寒天を除いた合成培地 B に接種し、28±1°C で4週間嫌気培養した。これを継代培養し、新たに作成した培地に接種して1週間培養したものを試験用接種菌液とした。これらの嫌気培養はロールチューブ法¹¹⁾に拠った。*T. denitrificans* 接種菌液は、(9.6±1.8)×10⁹/ml の菌数を含有した。¹²⁾

消化・分解実験は、まず空回腸、盲腸、結腸、直腸の内容物および排出便の各 40 g をフラスコに採り、正確に秤量後、4倍量（湿重量）の滅菌蒸留水を加え、懸濁液とした。この希釈液 5 ml を 30 ml 容試験管30本に分注し、うち15本に *N. nitrificans* 菌液 1 ml を加え、他の15本は対照とし、28±1°C で静置培養した。同様に別個に腸内容物希釈液を調製し、これを試験管30本に分注し、うち15本に *T. denitrificans* 菌液を加え、他の15本は対照とし、28±1°C で嫌気下で培養した。

経時的に採取した各試料の pH 測定には、ガラス電極 pH メーター（堀場、F-11）を使用した。無機態窒素測定に関して T-N は、Kjeldahl 法により窒素化合物を分解後アルカリ性で蒸留し、留出するアンモニアを2.0% ホウ酸溶液に吸収し、これを 1/200 N 硫酸で滴定して求めた。NH₄-N は、酸化マグネシウムで検液の pH を調整後、T-N 測定時と同様に蒸留して測定した。NO₃-N は、NH₄-N 留出終了後の検液に微細粒子化したデバルダ合金を加えて検体内硝酸態窒素を還元後、NH₄-N 測定時と同様に処理して測定した。なお、亜硝酸塩が存在するとき NO₂-N も一緒に測定されるが、通常これはきわめて微量なので NO₃-N に含めて示した。硫酸根 (SO₄²⁻) の測定は、検液の pH をアンモニア水と希塩酸で6.0前後に調整後、塩化バリウム溶液を加えたとき生ずる白濁を分光光度計（日立、U-1100）を用い、485 nm で測定して求めた。

N. nitrificans JCM 4134 株による窒素化合物の消化・分解において、分別したブタ腸内容物培地および排便培地に *N. nitrificans* JCM 4134 株を接種後培養した試料の pH と無機態窒素の経時的な変化をまとめて Table 1 に示す。専用合成培地 A に *N. nitrificans* 菌液を接種した結果、対照区と比較し、72時間後に T-N の差異はなかったが、NH₄-N は接種区でやや多く、NO₃-N は残存量が少なく、測定誤差範囲に含まれた。

Table 1. Inorganic nitrogen remaining and pH in porcine intestinal contents inoculated with *Nocardia nitificans* JCM 4134 and not inoculated.

Incubation time (h)	Analysis	Jejunum/ileum		Caecum		Colon		Rectum		Feces	
		Cont.	Inoc.	Cont.	Inoc.	Cont.	Inoc.	Cont.	Inoc.	Cont.	Inoc.
0	pH	6.3	6.3	5.6	5.7	5.6	5.8	6.4	6.5	6.6	6.6
	NH ₄ -N ^a	3.9±0.2	3.8±0.2	4.4±0.3	4.4±0.2	2.5±0.3	2.6±0.2	4.0±0.2	4.0±0.3	30.1±1.8	30.0±2.1
	NO ₃ -N ^b	6.2±0.3	6.4±0.4	1.8±0.1	1.9±0.2	1.9±0.1	2.0±0.2	6.0±0.4	6.1±0.3	8.0±0.5	8.0±0.4
24	pH	4.8	4.8	4.0	4.2	4.4	4.5	6.3	6.2	6.6	6.4
	NH ₄ -N	—	—	—	—	—	—	5.0±0.3	7.6±0.4	—	—
	NO ₃ -N	—	—	—	—	—	—	8.0±0.4	8.2±0.1	—	—
48	pH	4.8	4.8	4.0	4.1	4.4	4.5	6.5	6.3	6.6	6.4
	NH ₄ -N	69.8±3.2	61.0±2.8	5.1±0.2	6.5±0.4	8.5±0.3	11.0±0.7	5.1±0.2	9.0±0.5	27.2±1.2	30.1±1.7
	NO ₃ -N	4.3±0.1	4.9±0.2	4.6±0.3	6.5±0.3	6.0±0.5	5.2±0.3	8.5±0.4	10.4±0.5	12.1±0.8	15.0±0.4
72	pH	4.8	4.8	4.2	4.3	4.7	4.7	6.7	6.5	6.7	6.5
	NH ₄ -N	—	—	—	—	—	—	5.6±0.5	9.8±0.6	—	—
	NO ₃ -N	—	—	—	—	—	—	9.0±0.4	10.2±0.7	—	—
120	pH	4.5	4.5	4.2	4.5	5.3	5.3	6.6	6.6	6.9	7.1
	NH ₄ -N	83.0±4.5	85.1±3.9	11.1±0.6	12.1±0.7	10.9±0.7	12.0±0.5	5.4±0.2	9.8±0.5	32.2±1.4	33.1±1.0
	NO ₃ -N	4.6±0.2	2.3±0.1	4.0±0.2	2.5±0.2	5.7±0.6	3.8±0.3	7.1±0.2	8.5±0.5	12.0±0.6	17.8±1.0

^a Unit, (×10² mg/l).^b Unit, (×10 mg/l).

Cont., control (not inoculated); Inoc., inoculated.

空回腸内容物の結果は、pH が24時間後には速やかに低下した。NH₄-N が両区で大きく増加し、これは後述の盲腸以降の内容物培地での試験結果とも関連するが、空回腸内タンパク質分解酵素の脱アミノ作用によることが、推察された。NO₃-N は減少の傾向を示したが、両区の差異は不明確であった。盲腸内容物培地では、ここでも24時間後に pH が速やかに低下し、また NH₄-N が両区で微増した。結腸内容物培地では、pH の低下は120時間後に若干戻り、NH₄-N が両区で微増し、NO₃-N は接種区で微増した。直腸内容物培地の結果は、pH の変化は小さく、NH₄-N が24時間後に接種区で微増し、NO₃-N は他の部位に比べ当初から多く、48時間後に両区で増加したが、それ以降は減少に転じた。排出便培地では、pH が中性付近にあり、両区において培養当初から NH₄-N がきわめて多く、大気中酸素および好気性細菌の影響が考えられた。培養期間後半における NO₃-N の減少は盲腸、結腸、直腸の各内容物培地にみられ、これは常在菌による脱窒素作用や、腸内容物中に残存する2級アミンなどとのニトロソ化合物の生成も推察される。しかし、NO₃-N の動態は微量であり、確証にはより詳細な試

験を要する。

T. denitrificans JCM 3869 による窒素化合物および硫黄化合物の消化・分解では、専用合成培地 B に *T. denitrificans* JCM 3869 株の菌液を接種した結果、28日間の培養中に接種区では NH₄-N が 20 mg/l から 10 mg/l に、NO₃-N が 0.9 mg/l から 0.5 mg/l に、T-N が 47 mg/l から 29 mg/l に減少した。SO₄²⁻ は同じく28日間に 2.2 mM から 2.0 mM に微減した。分別したブタ腸内容物培地および排出便培地に *T. denitrificans* JCM 3869 株を接種後培養した試料の pH の経時変化をまとめて Table 2 に示す。Fig. 1 に空回腸内容物培地に *T. denitrificans* 菌液を接種し、嫌気培養した結果を示す。まず、試験区で T-N が明らかに減少した (P<0.05)。NH₄-N は対照区で7日後に著しく増加した。接種区で NH₄-N が低くなっているのは、NO₃-N への酸化を経由した脱窒素および接種菌による同化が考えられるが、中間生成物や窒素ガスの定量による確認を要する。SO₄²⁻ は、対照区で21日以降に増加し、腸内消化酵素によるアミノ酸からの脱硫の進行が推察されたのに対し、接種区では7~14日後に大きく減少した。この減少が *T. denitrificans* による同化作用によ

Table 2. pH changes in porcine intestinal contents inoculated with *Thiobacillus denitrificans* JCM 3869 and not inoculated.

Intestine	Incubation time (d)	pH				
		0	7	14	21	28
Jejunum/ileum	Cont.	6.4	4.2	4.0	4.3	4.3
	Inoc.	6.4	6.2	4.3	4.3	4.3
Caecum	Cont.	5.3	4.2	4.0	4.2	4.2
	Inoc.	5.4	4.5	4.3	4.5	4.5
Colon	Cont.	5.5	4.7	4.3	4.4	4.4
	Inoc.	5.5	4.9	4.9	4.7	4.7
Rectum	Cont.	6.3	6.0	6.0	5.7	5.9
	Inoc.	6.4	6.3	6.3	6.2	6.3
Feces	Cont.	6.8	6.0	6.0	6.3	6.2
	Inoc.	6.8	6.1	6.4	6.4	6.4

Cont., control (not inoculated); Inoc., inoculated.

るか否か本試験では確認できないが、21日以降での SO_4^{2-} の増加への転向は、アミノ酸からの脱硫作用が優位になったことを示すと考えられる。pH は、弱酸性であったものが4.0近くまで低下した。Fig. 2 に盲腸内容物での培養結果を示す。T-N の変化は小さく、

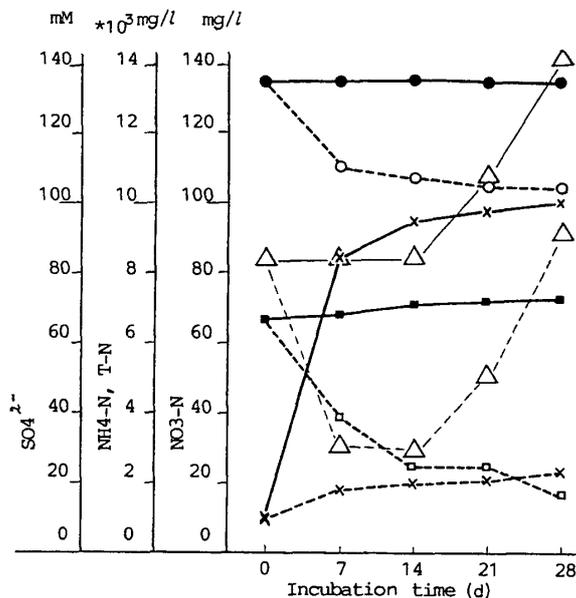


Fig. 1. Inorganic nitrogen and sulfate remaining in jejunum/ileum media inoculated with *T. denitrificans* JCM 3869 (B) and not inoculated (A). Symbols: ●—, T-N; ×—, $\text{NH}_4\text{-N}$; ■—, $\text{NO}_3\text{-N}$; △—, SO_4^{2-} in medium not inoculated (A). ○—, T-N; ×—, $\text{NH}_4\text{-N}$; □—, $\text{NO}_3\text{-N}$; △—, SO_4^{2-} in medium inoculated (B).

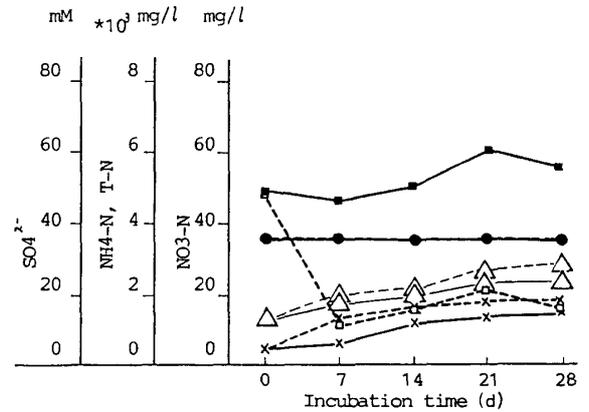


Fig. 2. Inorganic nitrogen and sulfate remaining in caecum media inoculated with *T. denitrificans* JCM 3869 (B) and not inoculated (A). Symbols are the same as in Fig. 1.

両区に差異がなかった。 $\text{NH}_4\text{-N}$ は両区で微増した。 $\text{NO}_3\text{-N}$ は接種区では減少が目立った。この減少は *T. denitrificans* の脱窒素作用によると考えられるが、その後環境の変化（常在菌との競合）からその活性が低減したのであろう。 SO_4^{2-} は培養開始時にすでに空回腸内容物培地に比べ大きく減少しており、空回腸でのその吸収が推察された。培養中に SO_4^{2-} は両区で微増した。pH は特に対照区で低下した。Fig. 3 には結腸内容物での培養結果を示す。T-N はわずかの減少を示したにすぎないが、接種区における SO_4^{2-} の増加が顕著であり、また同区の $\text{NO}_3\text{-N}$ が低位にあった。 $\text{NH}_4\text{-N}$ は漸増した。培養期間を通して常在菌による

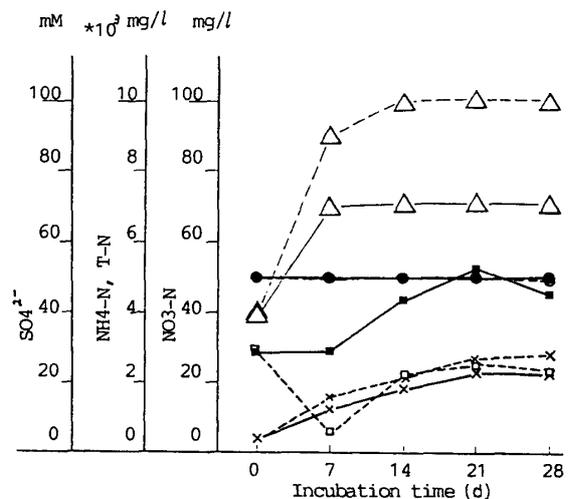


Fig. 3. Inorganic nitrogen and sulfate remaining in colon media inoculated with *T. denitrificans* JCM 3869 (B) and not inoculated (A). Symbols are the same as in Fig. 1.

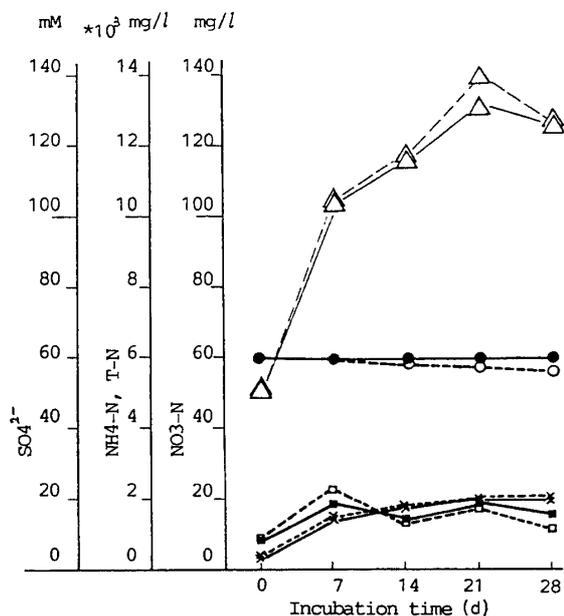


Fig. 4. Inorganic nitrogen and sulfate remaining in rectum media inoculated with *T. denitrificans* JCM 3869 (B) and not inoculated (A). Symbols are the same as in Fig. 1.

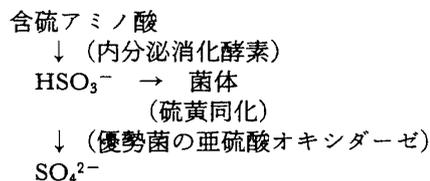
緩慢な脱アミノ作用の進行が考えられるが、ここでは特に培養初期にわずかながら *T. denitrificans* による硫酸化と脱窒素のあったことが推察される。pH は若干低下した。Fig. 4 には直腸内容物での培養結果を示す。両区において SO_4^{2-} の著しい増加と $\text{NH}_4\text{-N}$ の緩慢な増加がみられた。ここでは本来より硫酸化に関与する細菌の多いことが考えられる。pH の変化は小さかった。排出便培地での培養結果では、T-N のわずかな減少、培養初期での $\text{NO}_3\text{-N}$ の微増、および $\text{NH}_4\text{-N}$ の明らかな増加があったが、両区の間には差異は認められなかった。pH の変化は微小であった。

これまでに『プロバイオテックス』としてすでに乳酸桿菌,^{14,15)} 乳酸球菌,¹⁶⁾ ビフィズス菌,^{17,18)} 桿菌類¹⁹⁾ などをブタやニワトリへ投与し、腸内菌叢の改善、下痢防止、発育促進などに効果のあることが報告されている。これらの細菌・放線菌類は必ずしも各畜種の腸内常在菌ではないが、本来ヒトや動物の生体内に生息できるものであり、動物への連続経口投与によりそれらの代謝特性を発揮できるならば、改善効果を期待できる。本研究で対象とした細菌は本来野外土壌に生息するものであり、これらの菌体の経口投与による腸内での活性保持は困難と考えられる。

腸内細菌叢に関して、ヒトでは空・回腸に少なく、回盲弁を境として菌叢の大きな変化が起こり、盲腸以

降に Bacteroidaceae, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, Peptococcaceae などの嫌気性細菌の多くなることが報告されているが、²⁰⁾ 動物の腸部位ごとの細菌叢に関する報告は少ない。²¹⁾ 動物では、ヒトと異なり一般に胃および十二指腸にも細菌類が比較的多く、空回腸にもヒトの場合よりも多くの細菌が検出される ($10^8/\text{ml}$)。²²⁾ ブタでも、空回腸において内分泌性消化液による分解と同時に、細菌による消化・分解が重要な役割を果していることが予測される。また、空回腸は好気性あるいは通性嫌気性細菌も増殖し得る環境であることが、*Lactobacillus*, *Streptococcus*, Enterobacteriaceae などの生息からも推定される。

ブタ空回腸培地に *T. denitrificans* を接種した嫌気培養において、対照区で観察された NH_4 の速やかな生成と SO_4^{2-} の緩慢な増加は、盲腸内容物培地での嫌気培養の結果には観察されず、ブタでも細菌数の多少はあろうが、回盲弁を境として内容物消化・分解に主役交替のあることが認められる。本実験でも $\text{NH}_4\text{-N}$ および SO_4^{2-} の生成・残存について空回腸と結腸では明確な差異があり、前者では接種菌と他の細菌との競合も少ない²²⁾ と考えられることから、 SO_4^{2-} の生成につき次の過程が推定される。



N. nitrificans を接種した静置培養および *T. denitrificans* を接種した嫌気培養のいずれにおいても、対照区の pH が盲腸内容物、結腸内容物、直腸内容物の順で培養後急速な下降から緩慢な下降、次いでわずかな下降と上昇(戻り)と変化し、大腸下部へ移行するに従い、消化酵素の活力低下とこれに伴う脂肪酸生成の減少が推定された。Mitsuoka *et al.* (1976) は大腸下部における高い総菌数保持を報告しており、²⁰⁾ 腸内微生物の活性も結腸遠心回で高いと考えられる。²³⁾

腸内で消化・分解された悪臭物質を含む低分子化合物は、多くが腸内壁から吸収され、一部は腸内微生物によって利用されると考えられるため、排出便に含まれる悪臭物質削減のためには、結腸終末部位でのこれらの物質の確認が重要となる。外来性細菌の利用を考えると、他の細菌との競合の少ない空回腸部位で作用させるのが有利と考えられるが、結腸部位で他の細菌と共存させることも可能であろう。本試験での *T.*

denitrificans 接種の結果では、特に結腸内容物培地での接種効果がわずかながら認められており、本菌と同類の細菌でブタ空回腸あるいは結腸内で生存・増殖能力のあるものをさらに検索することが、今後の課題となる。

要 約

ブタ排出便に残存する悪臭物質の腸内での消化・分解を促進するための基礎実験として、*Nocardia nitrificans* および *Thiobacillus denitrificans* によるブタ腸内容物および便の資化・分解特性を調べた。

供試菌株として *N. nitrificans* JCM 4134 および *T. denitrificans* JCM 3869 を用いた。ユカタンマイクロブタ成豚 (♂) の空回腸、盲腸、結腸、直腸および排出便を採取し、これらの腸内容物培地にあらかじめ調製した上記菌株液を接種し、4134株は静置、 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ で5日間、3869株は嫌気下、 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ で28日間培養し、pH の変化ならびに培地に残存する T-N, $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$ を測定し、後者については SO_4^{2-} も測定した。

その結果、*N. nitrificans* JCM 4134 株接種においては、いずれの培地においても無接種区との差異は認められなかった。これに対して *T. denitrificans* JCM 3869 接種においては、空回腸内容物培地で T-N の減少、 $\text{NH}_4\text{-N}$ の非増加、 $\text{NO}_3\text{-N}$ の減少、 SO_4^{2-} の初期の減少があり、本菌の増殖と脱窒素の進行が推定された。盲腸培地でも $\text{NO}_3\text{-N}$ が減少した。結腸培地でも $\text{NO}_3\text{-N}$ の微減と SO_4^{2-} の増加があった。直腸培地および排出便培地では、無接種区との差異が認められなかった。静置、嫌気両培養において、空回腸、盲腸、結腸で pH の低下があったが、菌接種による差異は認められなかった。

文 献

- 1) 環境庁企画調整局計画調査室：環境白書各論（平成5年版），p. 109-144，大蔵省印刷局，東京（1993）。
- 2) 農林水産省畜産局畜産経営課：平成6年畜産経営

- の動向，p. 213-248，中央畜産会，東京（1994）。
- 3) 田中 博：畜産の近未来（水間 豊編），p. 134-140，川島書店，東京（1991）。
- 4) 本多勝男，米持勝利：畜産の研究，46，1101-1104（1992）。
- 5) 本多勝男：日豚会誌，30，73-79（1993）。
- 6) 田中 博：日畜会報，50，759-767（1979）。
- 7) Nakase, T. (ed.): *JCM Catalogue of Strains*, 5 ed., 101, 223, Institute of Physical and Chemical Research, Wako, Saitama (1992).
- 8) Starley, J. T., Bryant, M. P., Pfennig, N., and Holt, J. G.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (vol. 3), p. 1855, Williams & Wilkins, Baltimore (1989).
- 9) Hirsch, P.: *Archiv. für Mikrobiologie*, 35, 407-409 (1960).
- 10) Schatz, A., Isenberg, H. D., Angrist, A. A., and Schatz, V.: *J. Bacteriol.*, 68, 1-5 (1954).
- 11) 微生物研究法懇談会編：微生物学実験法，p. 71-72，講談社サイエンティフィック，東京（1989）。
- 12) 飯塚三喜：牛の臨床検査法，p. 11-4-7，農文協，東京（1986）。
- 13) 土壌養分測定法委員会編：土壌養分測定法，p. 197-200，養賢堂，東京（1978）。
- 14) Pollmann, D. S., Danielson, D. M., and Peo, E. R. Jr.: *J. Anim. Sci.*, 51, 638-644 (1980).
- 15) Hill, I. R., Kenworthy, R., and Porter, P.: *J. Med. Microbiol.*, 3, 593-605 (1970).
- 16) Gualtieri, M. and Betty, S.: *Nutr. Abst. Rev.* (Series B), 55, 344 (1985).
- 17) Kimura, N., Yoshikane, M., Kobayashi, A., and Mitsuoka, T.: *Bifidobacteria Microflora*, 2, 41-55 (1983).
- 18) 田中 一，矢尾正博，藤原若彦，鼻岡保博，木村修武：畜産の研究，33，1123-1125（1979）。
- 19) 藤田昭二，茶園 明，小沢共輔，藪内寛次，坂井町節：畜産の研究，41，862-864（1987）。
- 20) Mitsuoka, T., Ohno, K., Benno, Y., Suzuki, K., and Nanba, K.: *Zbl. Bakteriolog. Hyg. I. Orig.*, A234, 219-233 (1976).
- 21) Salanitro, J. P., Blake, I. G., and Muirhead, P. A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 79-84 (1977).
- 22) 光岡知足：腸内細菌学（光岡知足編），p. 103-107，p. 139-140，朝倉書店，東京（1990）。
- 23) Schulze, F.: *Archiv. für Experimentelle Veterinärmedizin*, 31, 299-316 (1977).